

日本

生理学

雑誌

JOURNAL OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

30巻 5号 1968

原 著

- 齋藤英郎：ネコの視床下部ニューロン発射におよぼす黄体形成ホルモンおよび oxytocin の影響について……………299
- 松本政雄・中里邦夫・田中順：敏捷性活動に対する個人差および学習性に関する研究（1）一般成人について……………311
- 前田信治：Fingerprint 法による哺乳類ヘモグロビンの比較生理学的ならびに比較生化学的研究 1. Fingerprint 法による正常人ヘモグロビン（主成分ならびに微量成分）ならびに胎児ヘモグロビンの比較……………318
- 三田道雄：ヘモグロビン A₂ に関する研究 1. ヘモグロビン A₂ の物理化学的諸特性……………337

速 報

- 尾崎俊行・根田芳昌：体表面微小振動 (microvibration, MV) 分析への interval histogram の応用について……………353
- Tokuro Fukuda and Nobuko Akagawa: Induction of hemorrhagic lesion of intestinal mucosa by hypercalcemia in adrenalectomized rats……………355

地方小学会報

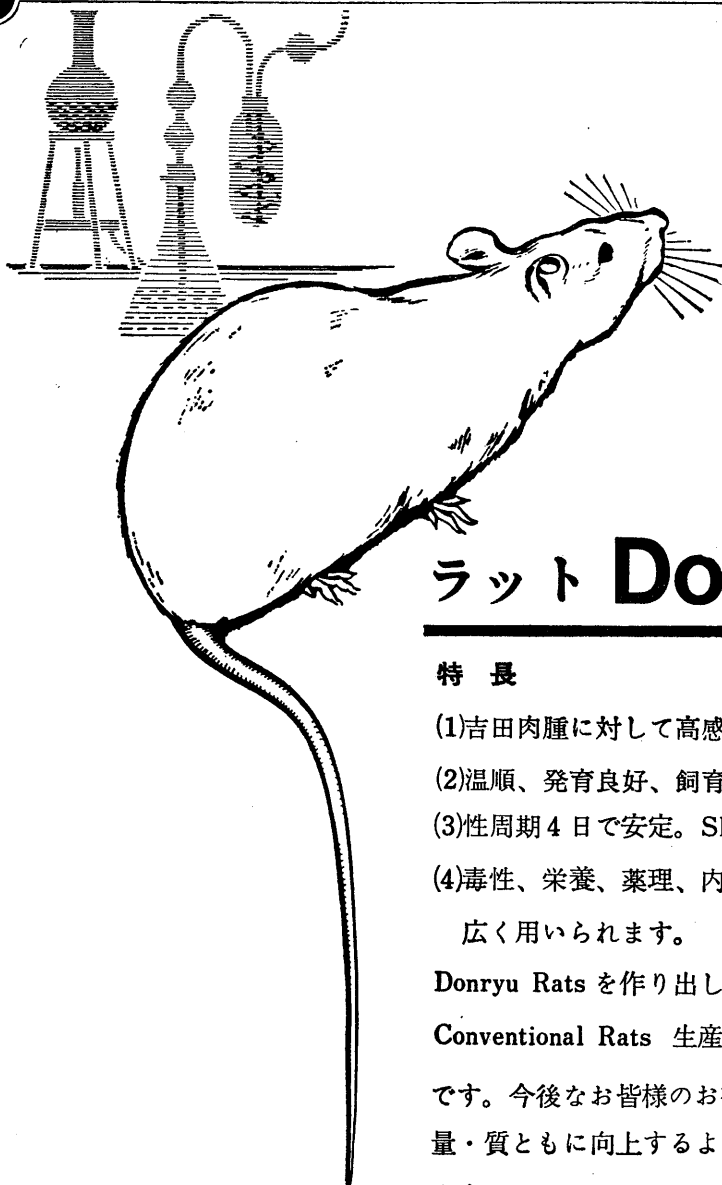
- 第36回近畿生理学談話会……………357

短 報

- 〔会報〕久保盛徳名誉教授略歴 久保盛徳先生を偲ぶ
第1回生理学教育委員会議事録……………367
日本生理学雑誌編集発行人名義変更のお知らせ……………367
- 〔学会予報〕第18回（昭和46年）日本医学会総会……………368
- 〔編集後記〕……………368

日本生理誌
J. Physiol. Soc. Japan

日本生理学会



ラット Donryu

特長

- (1)吉田肉腫に対して高感受性を有す。
- (2)温順、発育良好、飼育容易。
- (3)性周期4日で安定。Skin Grafto 高率。
- (4)毒性、栄養、薬理、内分泌その他、
広く用いられます。

Donryu Rats を作り出した日本最大の
Conventional Rats 生産専門メーカー
です。今後なお皆様のお役にたつため
量・質ともに向上するよう努力いたし
ます。

飼育系統——〈Donryu〉〈Wistar〉〈Buffalow〉



日本ラット(株)

埼玉県浦和市根岸608-3
TEL (0488) 61-6850



久保盛徳名誉教授略歴

本籍 大阪市南区北桃谷町30番地

明治26年3月28日 本籍地に生る

明治43年7月 第八高等学校入学

大正2年7月 同校卒業

大正2年7月 京都帝国大学医科大学医学部入学

大正6年11月 同大学卒業

大正6年11月 同大学生理学副手

大正8年1月 慶応義塾大学医学部助手

大正8年11月 同大学医学部助教授

大正13年10月 医学博士の学位を受く

大正13年9月より大正15年3月の間医学研究の為米英両
国に滞在

昭和12年 東京医学専門学校教授兼任

昭和17年 慶応義塾大学医学部教授

昭和20年12月 慶応義塾大学医学部教授辞任

昭和20年12月 東京医学専門学校教授

昭和24年4月 東京医科大学教授

昭和38年3月 東京医科大学教授定年に依り退職

昭和38年5月 東京医科大学名誉教授

昭和43年1月19日 逝去

久保盛徳先生を偲ぶ

久保盛徳先生は久保盛明氏の御長男として明治26年3月28日大阪市南区北桃谷町で誕生された。第八高等学校、京都帝国大学医科大学医学部を御卒業の後、大正8年1月、慶応義塾大学医学部生理学教室助手になられたが、大正8年11月生理学助教授に就任され、加藤元一教授の良き共同研究者として多彩な先生の研究生活が開始された。当時、生理学会の焦点の1つは加藤元一先生の「不減衰伝導学説」であったが、久保先生は神経の麻酔部の動作電流を測定し、「不減衰の成績」をえられた。

この実験は Harvard 大学の Forbes 教授が猫の坐骨神経を用いて行なった実験の先駆をなすもので「不減衰伝導学説」の重要な骨格をなすものである。

(G. Kato, Theory of decrementless conduction in narcotised region of nerve, chapter V, 1924)

少しくこの間の事情を詳細に記せば、1924年(大正13年)、慶応義塾大学の留学生(助教授)としてセントルイスの Erlanger 教授および Gasser 教授のいた Washington 大学に滞在されていた久保盛徳先生は、Harvard 大学の Forbes 教授が National Academy of Science において Conduction without decrement という演題の講演を行なうのを知り、直ちに Boston に急行して Forbes 教授および Davis 助教授と面会し、Harvard 学派が猫の坐骨神経を用いて久保先生がえられたと同様、「不減衰の成績」をえたのを知り、大いに意を強くされた。

「不減衰伝導学説」が一段落した後、久保盛徳先生は山田 守助手(現鳥取大学医学部生理学教授)と共に冷陰極線オッシログラフの製作を開始された。昭和13年～昭和14年の頃である。この当時、久保先生は無人島主義という先生独自の哲学を唱えられ、自ら生理学の田畑を耕し、自ら収穫する喜びを教えられた。この冷陰極線の陰極線オッシログラフに依って剔出された単一神経線維の動作電圧が始めて測定され、これは山田 守教授の

学位論文になったものと記憶している。この頃より、単一神経線維の電気生理学は次第に熱気を帯び、久保先生は小川朝吉、小野康平、小野定男、弓削 中、中村四郎(現日大医耳鼻科教授)等の人々を積極的に指導され、単一神経の電気生理学の基礎を作られた。この頃、久保先生は他の分野にも巾広い活躍をされた。すなわち、昭和13年より昭和17年の間、厚生省体力局企画課に出頭され、体力法(体力 Test)の基準について先生独自のアイディアを示された。

不幸な第二次大戦終了後、久保盛徳先生は東京医学専門学校教授(昭和20年12月)、次いで東京医科大学教授(昭和24年4月)に就任され、戦後の荒廃した研究室の再建に全努力を傾注された。この頃、御研究の重点は単一神経線維の組織化学的研究に向けられていた。

古びた教授室には「ミレーの落穂拾い」の複製が掲げられていたが、研究者は須らく落穂を拾う農夫の如く謙虚であれという教えなのであるのか、あるいは、当時の物質缺乏の時代にあっては、如何に力を尽くしても落穂しか拾えないという先生の鋭い寓意を示されたものであるのか、それは今日においても著者には解けない謎であるが、久保先生の面目躍如たるものを感じさせる。猶、昭和18年より戸塚先生等と生理学用語委員として参画され昭和35年生理学用語集は完結した。また、昭和21年より27年の間、日本生理学会誌編集幹事として活躍され、昭和40年には日本生理学会特別会員に列せられた。東京医科大学御定年退職後は、星薬科大学教授として、薬学部における独自の生理学の確立を目標として、晩年の情熱を傾注されたが、本年1月19日潜在性前立腺癌の為不帰の客となられた。先生の74年の御生涯は必ずしも短いとはいえないが、あのウイットに富んだ飄々たる御風格にもはや接する機会がないのは何よりも悲しい事である。(大畑 進)

〔原著〕 ネコの視床下部ニューロン発射におよぼす黄体形成ホルモン
および oxytocin の影響について 612.826.4 : 612.813 : 612.49

齋藤 英 郎 *

Effects of luteinizing hormone and oxytocin upon hypothalamic unit activity in female cat

Hideo Saito (*Second Department of Physiology, Yokohama City University School of Medicine*)

The influence of the increase of concentration of blood LH or oxytocin on firing activity of the hypothalamic neurones in estrous cat was studied in comparison to anestrus cat.

1. The spectrum of firing shifted to higher frequency in estrus than in anestrus in the neurones of lateral hypothalamic area and to lower frequency in the ventromedial hypothalamic nucleus and anterior hypothalamic area.

2. In most neurones the regression coefficient between the mean and the standard deviation of firing interval, varied between 1.0 and 1.4. In the neurones responsive to the change in blood LH or oxytocin, there were showing stationary variation along the slope of the regression line, while there were some showing a tendency toward nonstationary variation after administration of LH or oxytocin.

3. In some anterior hypothalamic neurones, the firing became more frequent and more nonstationary after oxytocin administration in anestrus, but in estrus the rate did not show the change.

4. After the LH injection, the firing activity of the ventromedial nucleus became less frequent. But in some neurones in this nucleus, the change in standard deviation and in the mean was more marked.

Thus the existence of hypothalamic neurones was confirmed which is driven into discharge activity only when the blood oxytocin or LH is above a certain level. A short feedback loop may be hypothesized in which these neurones acts on the neurones of final common pathway for oxytocin or LH release differentially at estrus and at anestrus.

〔J. Physiol. Soc. Japan (1968) 30, 299-310〕

1. は じ め に

視床下部ニューロンの発射頻度は、種々の要素によって時々刻々と激しく変動する。

先に報告したとおり、体液性要素、例えば oxytocin, 黄体形成ホルモン (LH) の血中濃度の増減により発射頻度の増減するニューロンがあり (Barraclough & Closs¹⁾, Ramirez, et al.²⁾, Kawakami & Saito³⁾), また後述するように腹内側視床下核や外側視床下部の多くのニューロンのように覚醒レベル、いい換れば前頭皮質脳波における紡錘波の出現消失、または海馬脳波の θ 波の出現等 (今回の実験においては前頭皮質

および海馬の脳波の同期している場合のみとした) によってその頻度が変化する²⁾³⁾。また視床下部前野やそれに近在するニューロンのように、体温の降下によってほとんど発射活動を停止するものもある。すなわち視床下部ニューロンの発射頻度は、性ホルモン投与前後の変動を観察するには有効であるが、そのみによって個々のニューロン発射の意義づけは困難であろう。

しかしながら中脳部、網様体、大脳皮質、視床等のニューロンの発射頻度と比べると、視床下部では遙かに少く、多くのニューロンには10秒間に1~100インプルスであり、200インプスを越えるものは少い。そこで視床下部ニューロンの発射様式を発射間隔ヒストグラムおよびパルス自己相関により解析し、性ホルモン投与前後におけるこれらの様式の変化を観察し、LH な

* 横浜市立大学医学部第2生理学教室

〔昭和42年12月16日受付〕

らびに oxytocin の血中増加に反応するニューロン発射の上記性ホルモン放出に関する feed back 機構での意義を考察してみた。

II. 実験方法と材料

実験は体重 2.0~3.5 kg の卵巣摘出した成熟雌ネコ40匹を用いて行なった。去勢は実験前 3~4 週間前に行なった。麻酔は手術中のみエーテルを用い、視床下部ニューロンの発射活動の誘導は、麻酔覚醒後 6 時間以上経過した後、gallamine triethiodide (Flaxedil) 投与による動物不動化の下に行なった。

施した手術は、実験動物の頭部を脳研式脳定位固定装置に固定するにさきだち、人工呼吸のための気管切開、および補液のための静脈カニューレ (上腕静脈または大伏在静脈) の留置手術を行なった。次いで頭蓋骨頭頂部に約 1 cm 平方の小穴をあけ、硬膜除去後温血動物用生理的食塩水で溶解した寒天でその部分を覆った。また、呼吸等による脳の動きをおさえるため頭蓋骨第 1 頸椎間に背側より小穴をあけ、脳脊髄液の排出路を作った。

実験経過中直腸温が 37°C 以上を保たしめるため腹部を電気ヒーターで温めた。

脳波誘導のためには前頭皮質に双極銀球電極、海馬に同心双極電極を小孔をとおして脳内に刺入し、歯科用即時重合樹脂 (Bio ribase, 松風陶歯製) にて電極を固定し、心電図は両腕より誘導した。

視床下部ニューロンの発射活動をとらえる微小電極は、ステンレス製虫ピン (No. 0 志賀昆虫普及社製) を先端が径 1 μ 程度になる迄電解研磨し、塩化ビニール系絶縁塗料 (insul-X) で被服したものを使用した。

誘導された発射活動は pushpull cathode follower preamplifier (MZ-3B, 日本光電製) で増幅し、さらに多用途ペン書記録計 (RM-150, 日本光電製) に接続し、皮質脳波、海馬脳波および心電図と同時にそのスパイクを直記して必要に応じて磁気テープに記録 (SOR-803, 日本光電製または TC-250A, Sony 製) した。また、ス

パイク波型は dualbeam oscilloscope (VC-6, 日本光電製) で観測した。

資料の解析には on-line computer (ATAC 501-20, 日本光電製) ならびに記録用紙より計測して解析した。

実験終了後、電極の位置確認は、微小電極に 6 μ A で 10 秒~1 分通電した後、potassium ferrocyanide と potassium ferricyanide 混合溶液を総頸動脈より灌流し、次いで 10%ホルマリン溶液で灌流した後、脳を所定の操作により 50 μ 連続切片にしてその局在部位を調べた。

本実験に使用したホルモンは、LH 3 U (Armour 製)、および oxytocin 0.3 U (Synotocinon, sandoz, アトニン S 帝國臓器) を用いた。また、estradiol benzoate をゴマ油に溶解したものを皮下に 0.08 mg 連続 2 日投与し、発情状態を発現せしめた。

III. 実験結果

A. 発情、非発情時における視床下部諸部位のニューロンの発射頻度について

視床下部ニューロンが、発情および非発情時にその発射頻度に変化をきたすことは、脳波等から予想されている。しかし、急性実験下において、estrogen 投与後非発情から発情状態に至る数十時間に亘って単一ニューロンの発射を追求することは、生体へのストレス、いい換れば ACTH をはじめ種々のホルモンや体液中の諸成分の組成のバランスが崩れ、特に種々ホルモン放出における最終共通路としての視床下部ニューロンは、生理的状态から遠ざかっているであろう。

そこで本実験では、去勢雌ネコに 24 時間隔てて estrogen 0.08 mg を 2 回、筋肉内に注射し、最終注射後 24 ないし 33 時間に最も強い発情行動、すなわち仙骨部軽打による臀部挙上、求愛行動がみられたのでこの期間の視床下部ニューロンの発射活動を発情時のものとし、去勢無処置のものを非発情として、各ニューロン発射のスパイクが 300 ないし 1000 個に要する時間から、平均発射頻度を調べた。

そして274個の視床下部ニューロンについて前視床下部、腹内側視床下核、外側視床下核に分けて、その頻度を0~2, 2~4, 4~6, 6~8, 8~10, 10 p/s 以上にわけ、それらの活動状態を追究した。その結果、一般に視床下部ニューロンの発射頻度は、2 p/s, 以下の状態にある場合が最も多く、約35% (274例中121例)を示した。

また、30 p/s 以上の高頻度のものは、比較的発射頻度の高い外側視床下核でも3%以下 (95例中2例)であった。

一方、発情および非発情時における発射頻度についてみると、非発情時、前視床下部では発情時に比べ、2 p/s 以下の低頻度のものがわずかに減少し、4~6 p/s の状態に移行するのが観察された。しかし10 p/s 以上の高頻度のものについては、ほとんど変化がみられなかった。

腹内側視床下核においては、2 p/s 以下の状態にある場合がほぼ50%以上をしめ、10 p/s 以上のものは少ない。そして、発情時わずかに非発情時に比べて、発射頻度スペクトラムの低頻度化がみられた。反射性排卵動物であるネコにおいて、この部位が発情、排卵に特に関係深いとされているが、この部位は後述の如く、覚醒レベルの変化により発射頻度の変動するニューロンが多く存在するゆえ、発情および非発情時における発射頻度の変化がおおわれて、発射頻度スペクトラム上に現われ難いことが考えられる (Fig. 1)。

外側視床下核においては、前記の腹内側視床下核と逆に、4 p/s 以上の比較的高頻度のニューロンが60%以上 (90例中55例)みられた。そしてまた、発情時においても腹内側視床下核とは逆に、非発情時に比べて発射頻度スペクトラムの高頻度への移行がみられた。

視床下部ニューロンの発射頻度は、上記の如く発情、非発情という長期に亘り内分泌に影響されるが、一方比較的短時間における相性な変化、例えば覚醒レベルの変化に対応して発射頻度の変動するニューロンも存在する。

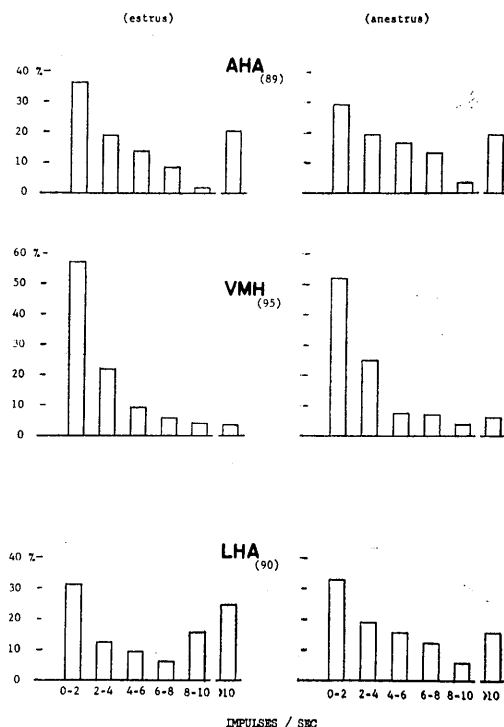


Fig. 1. Histogram showing resting firing frequencies of sample population of neurones in various portions of the hypothalamus recorded from castrated female cats immobilized with guallamine. The number in the parentheses indicates the size of the sample. Note that during estrus the spectrum of firing shifted to the lower frequency in the neurones of ventromedial hypothalamic nucleus (VMH), while in the lateral hypothalamic area (LHA) and anterior hypothalamic area (AHA) neurones the peak shifted to the higher frequency.

Table 1

| | AHA | LHA | VMH | DMH |
|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| Sleep | 7.4%(5) | 18.2% (8) | 25.4%(15) | |
| Arousal | 13.5%(9) | 22.8%(10) | 11.9% (7) | |
| No-change | 79.1%(54) | 59.0%(26) | 62.8%(37) | (33) |
| Total | 100%(68) | 100%(44) | 100%(59) | (33) |

すなわち、前視床下部、外側視床下核、腹内側視床下核、背内側視床下核等のニューロン204個について、皮質前頭脳波に出現する紡錘波および覚醒波と、これらニューロンの発射頻度との対応をみた。

その結果、視床下部ニューロンの約27%は覚醒レベルに対応して発射頻度が増加することが観察された。

部位別にこれをみると、前視床下部および外側視床下核においては、紡錘波または除波から覚醒波に移行するとき発射頻度が増加するケースが多くみられ、特に腹内側視床下核に隣接した外側視床下核ではこの傾向が強かった。一方、腹内側視床下核においては上記と逆の現象、すなわち紡錘波の出現時に発射頻度の増加が多くみられた (Table 1)。

また、これら前頭皮質脳波の変化と発射頻度の変動と対応関係をもつものについてさらに観察すると、発射頻度レベルが極めて低頻度 (0.5 p/s 以下) になっている状態では脳波パタンの変化に1~4秒先行して、スパイクの出現および消失するのが観察された。

B. 発射間隔ヒストグラムからみた視床下部ニューロン発射について
 一般に視床下部ニューロン発射において、その

一連のニューロン発射を時系列とみたとき、発射間隔ヒストグラムは、視床における感覚中継核ニューロンのそれに比べて (G. Wermer & V. B. Mountcastle⁴), Rodieck et al.⁵) ほとんどの場合定型 (指数分布型, Γ 分布型) を示した。

腹内側視床下核および外側視床下核が、指数分布型および Γ 分布型を示すということは報告されている (大村⁶) が、本実験では記録された視床下部諸部位のニューロンについて種々の分布型に分類してみると、次の如く4型とその亜型にわけることができた (Fig. 2)。

- 1) 指数型 $n = \frac{1}{\sigma} \exp\left(-\frac{x}{\sigma}\right)$
- 2) Γ 分布型 $n = \frac{\beta^\alpha}{\Gamma(\alpha)} \exp(-\beta x) x^{\alpha-1}$
 $\alpha = \left(\frac{\bar{x}}{\sigma}\right)^2, \quad \beta = \frac{\bar{x}}{\sigma^2}$
- 3) Poisson 分布型 $n = N \frac{k^x}{x!} \exp(-k)$
- 4) 正規分布型 $n = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{(x-\bar{x})^2}{2\sigma^2}\right)$
- 5) 2山分布型 およびその他

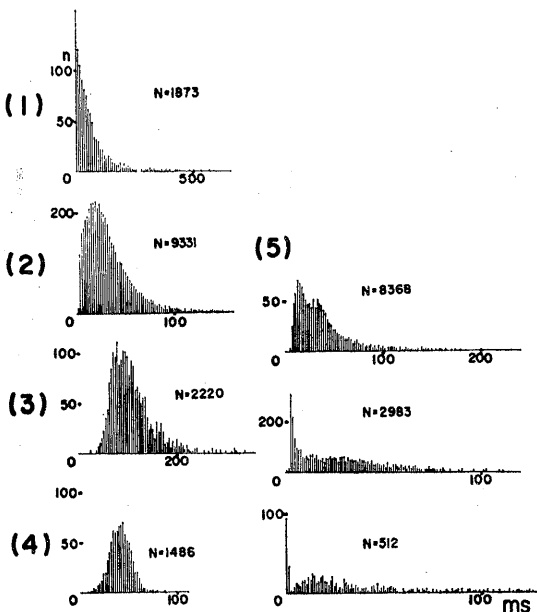


Fig. 2. Five different types of firing interval histogram in hypothalamic neurones. 1) exponential distribution. 2) Gamma distribution. 3) Poisson distribution. 4) Gaussian distribution. 5) Bimodal and unclassified.

[N; 発射間隔総数, n; 発射間隔 x のものの出現回数, \bar{x} ; 平均発射間隔, σ ; 標準偏差, それぞれの分布型の適合は5%の有意水準で χ^2 -検定した.]

そして、この内指数型および Γ 分布型は同一ニューロンの発射系列の中で、互に発射頻度の変動と共に移行するケースが多かった。しかし、指数型および Γ 分布型が他の分布型 (正規分布および多山分布型) に移行することはなかった。

また、上記2分布型 [1), 2)] の状態にあるニューロンは90%以上 (95例中85例) であり、他の2型 (正規分布型, 2山分布型) は極めて少なかった。そして多山分布型は grouping 発射をするものおよび他の分布, いい換れば2つ以上の系が加わったもの等があった。

これ迄に LH および oxytocin の血中濃度の

変化による視床下部ニューロンの発射頻度の変動が発情または非発情により異なることを報告してきた³⁾。

さらにこれら LH および oxytocin に感受性を有したニューロンの発射系列の上から分離を試みた。すなわち oxytocin (0.3 U) 投与後、視床下部ニューロン発射は、もしそのニューロン発射に変化があるときには20~80秒に始まり、5~15分続くことがわかっている。また LH 投与の場合10~30分に始まり数時間継続する。そこでこれらニューロン発射系列において、上記ホルモン投与時を0点として、前後、oxytocin の場合、1分または2分、LH 投与の場合、5分または10分に区切り、その区間内での平均発射間隔とその標準偏差をとり、間隔-偏差ダイヤグラムを作った。ここで、時系列にこうした統計処理をする際、定常性が問題となってくるが、今回の実験の場合、発射頻度の変化、いい換れば平均発射間隔の変動がホルモン投与により定常性を保って変化するか否かをも問題としたので、前記の如く統計処理区間の抽出について一連の発射間隔について定常性を検定することなく、1分、2分および5分と等間隔時間で区切った。また、自発発射において平均発射間隔標準偏差ダイヤグラムの各抽出区間の点がほぼ一直線上にあればその記録された自発発射は生理的に定常状態が保たれていたということになる。

その結果、自発単位発射時において指数型およびガンマ分布型を示したものは、ほぼ勾配1.0以上の急峻な直線上を変動し、その他の分布型はよりゆるやかな勾配で平均発射間隔の変化も少なかった (Fig. 3)。

C. LH 投与による視床下部ニューロン発射の変動について

一般に視床下部ニューロンにおいて、LH 投与による発射頻度の増減は、発情および非発情に拘らず、10分ないし30分潜時をもって始まることを先に述べたが、また頻度の増減がわずかでもその標準偏差に変化を来たす場合がしばしば

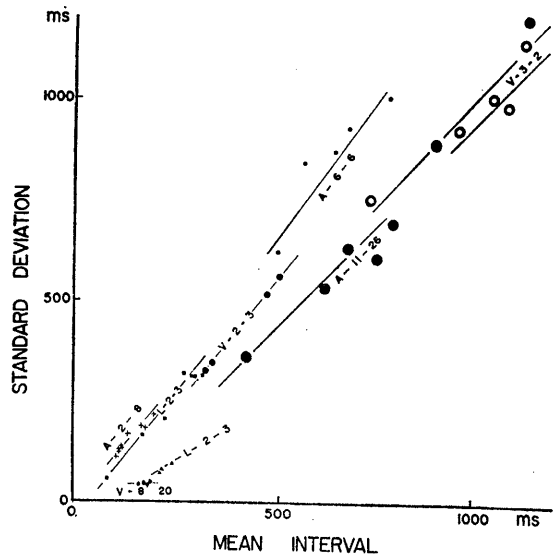


Fig. 3. Plot of mean interval and standard deviation of samples ($n: 300\sim 3000$) of resting activity of hypothalamic neurones, each sampling period being 1, 2 or 5 minutes. Abbreviations: V: VMH, L: LHA, A: AHA. Note that in most of the neurones examined the estimate of regression coefficient fell between 0.9~1.4. In a few neurones as L-2-3 and A-2, however the coefficient took lower value.

みられた。

そして既報の如く発情、非発情に拘らず、LH 投与により前視床下部および弓状核では、平均発射頻度の増加、腹内側視床下核では減少、外側視床下核では2例のみ減少という結果をみた。以下これら LH 投与により感受性を示した諸ニューロンの発射パターンについての統計処理結果についてのべる。

前視床下部: この部位において、LH 投与により発射頻度に増加を来したニューロンはいずれも前頭皮質脳波パターンの変化と対応を有しなかった。

そして発情、非発情時共に平均発射間隔は600~1000 msec のもので、自発発射時、発射間隔パターンは、変動係数がほぼ1.0前後を示していたが、いずれも指数型は示さなかった。

非発情時に平均発射間隔約 1000 msec、標準偏差 1000 msec (変動係数: 標準偏差/平均発射間隔 = 1.0) の比較的低頻度のニューロンの内、

LH 投与により10~15分より漸次発射間隔および標準変動は短縮し始め、30分後には1/2以下となった。そして各5分毎の発射間隔-標準偏差ダイアグラムは勾配1.2の回帰直線上に添って変動していった。一方、発情時自発発射時が600~700 msec の発射間隔をもち標準偏差 800~900 msec (変動係数 1.3以上) のニューロンにあって、LH 投与後10分ないし15分にその発射間隔はわずかに短縮したが、標準偏差は 600 msec に減少し、その後25~30分には発射間隔も 500 msec、標準偏差 600 msec となり、以後回帰直線上に添って変動した。

すなわち10~15分の間に発射頻度の変化は少なかったが、変動係数の減少があり、発射系列の定常状態が崩れた事といえる。

また、これら LH に反応を示したニューロンの長い周期についての自己相関をみると、2~10秒の周期をもって発射が僅かに増減しているのがみられた。

腹内側視床下核：発情、非発情に拘らずこの部位のニューロンの内に LH の血中濃度の上昇により発射間隔の延長および分散の増大をみた。

前述の如く、この部位のニューロン発射は、前頭皮質脳波の変化と対応関係を有するものが多いが、LH の血中濃度の上昇により、反応を示したニューロンは、覚醒レベルに対応を有するものおよび有しないものの両者にみられた。そして前頭皮質脳波の変化とニューロン発射との間に対応関係を有しないニューロンは網様体または、海馬の連続刺激 (6 Hz, 60Hz, 300Hz, 0.5 msec, duration, 5 秒間) を与えても刺激中およびその後約1分以内には発射間隔、標準偏差に認むべき変化はみられなかった。また、発射間隔ヒストグラムをみるといずれも指数型または Γ 分布型に近似したものが多かった。

すなわち、非発情および発情時、発射間隔 150 msec、標準偏差 100 msec の比較的高頻度でかつ覚醒レベルとニューロン発射と対応を有しないニューロンにあって、LH 投与により、その発射間隔の延長が10~30分に始まり、40分以後にはいずれもその状態を維持し、同時に標準偏

差もそれに応じて増大し、定常状態を保った。

一方、覚醒レベルの変動と対応を有したニューロンの内、LH の血中濃度上昇によりその発射態度に反応を示したものは、自発発射時、平均発射間隔 900~1000 msec、標準偏差 900~1000 msec で、間隔ヒストグラムは指数型を示したところの腹内側視床下核の内では最も一般的、発射パターンをもったものの中にみられた。

そして、LH 投与後漸次発射間隔の延長および標準偏差の増大をみた。他方自発発射時、発射間隔ヒストグラムをみると、指数型に近いが、発射間隔 100 msec 以下の分布型は多山分布をなし、且つ平均発射間隔約 200 msec、標準偏差 100~180 msec で発射を営むニューロンにあって、LH 投与により発射間隔は20分後に延長するのがみられた。しかし発射間隔ヒストグラムは、100 msec 以下の峰が変動し、各5分間毎の間隔-標準偏差ダイアグラムは広く散在するのがみられた。すなわち、LH 投与後、ニューロン発射の定常状態が崩れていったことになる。

他方、平均発射間隔 200~500 msec で偏差が 100~300 msec (変動係数が約 0.5 を示す Poisson 分布型 $K=4\sim 10$) や、正規分布型に近似したニューロンにあっては、LH 投与により平均発射間隔および分布型にほとんど変化を認めえなかった。

外側視床下核：いずれの部位にあってほとんど LH 投与により平均発射間隔および標準偏差に変化はなかった。ただ僅かに背外側視床下核のあるニューロンで自発発射時、100~200 msec の発射間隔をもち、 Γ 分布型のニューロンが LH 投与後、回帰係数 0.7~1.0 に添って平均発射間隔、標準偏差共に増大する例があった。そしてまたこのニューロン発射は前頭皮質脳波パタンの変化と対応を有しなかった。また、同じ電極より誘導された他のニューロンは、平均発射間隔 100~150 msec で、変動係数約 0.5 で Poisson 分布 ($K=5.0$) に近似したものがあったが、LH 投与による変動はなかった。そしてこの2ニューロン間で相互相関をとったところ、変動係数の小さいニューロンより近接した変動係数の大きなネ

ウロンに対し、2 msec の遅れをもって発射を抑制しているのがみられ、このようなニューロン間の関係は後述する腹内側視床下核にみられた場合と同様であった。

しかし、平均発射間隔が漸次延長し、800 msec以上となった時に、これら両ニューロン間の相互相関は逆に 2~3 msec の遅れで促進的に作用するという結果がえられた。また変動の大きい発射を営むニューロンより小さいものに対しては相関は示さなかった (Fig. 4)。

D. Oxytocin 投与による視床下部ニューロン発射の変動について

前視床下部：この部位のニューロンには、非発情時、oxytocin 投与によりその発射頻度の増加をみるものがあつたが、それらはいずれのニューロンも前頭皮質脳波とニューロン発射頻度との対応関係がみられなかった。そして発射間隔ヒストグラムのパターンは自発発射時、指数分布型および二山散布 (grouping) を示し、平均発射間隔の増減と共に、その標準偏差も増減し、勾配 1.1~1.4 の回帰直線上で変動した。

そして指数型を示したニューロンの場合、発射間隔が 80~100 msec であつたが、oxytocin 投与後発射間隔は 20秒より 5分に亘つて 1/2 以下に短縮し (すなわち発射頻度の増加)、偏差も同時にほぼ勾配 1.2 の回帰直線上にそつて減少した。すなわち oxytocin 投与後における発射間隔は、生理的定常状態をほぼ保つて変動したといえる。多くの視床下部ニューロンにおいて、平均発射間隔が 100 msec 以下の高頻度発射の状態では、 Γ 分布型を示し、変動係数は 0.7 以下となるが、これら oxytocin の血中濃度の変化に反応を示したニューロンは、高頻度発射時においても変動係数 1.2前後を示した。

また、二山分布型においても自発発射時、平均発射間隔 400~600 msec、標準偏差 600~800 msec で変動していたが、oxytocin 投与後 20秒から 6分に亘つて平均発射間隔は最高 80 msec にまで短縮したが、標準偏差もそれに応じて減少し定常状態は保たれた。

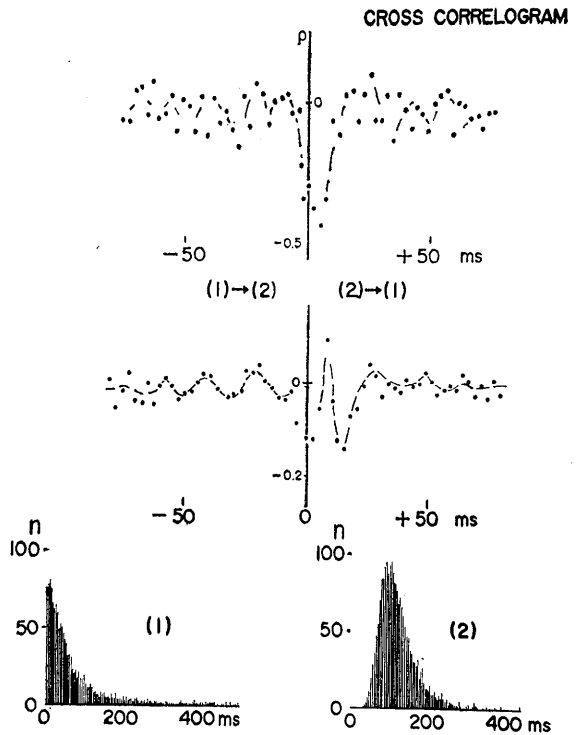


Fig. 4. The spectra of firing of two neighboring neurones in LHA and the crosscorrelogram between them. Note that one showed exponential distribution (1) while another showed Poisson distribution (2). When the former type of neurone was firing in higher frequency negative cross correlation was obtained and when the firing in lower frequency, positive cross correlation was obtained.

しかし非発情時にあつてこの前視床下部の内にも oxytocin 投与により発射頻度の減少、すなわち投与後 1分より 10分に亘る間、平均発射間隔の延長が起るものが 2例みられた。これらのニューロンは多山分布型をし、平均発射間隔 30~40 msec の比較的高頻度の発射を営んでおり、平均発射間隔-標準偏差ダイアグラムの回帰直線は 1.4で、ほとんど定常状態にあつて変動していた。しかし oxytocin 投与前後平均発射頻度が 50~80 msec に延長したが、標準偏差は、それに相対して増大しなかつた。特に 2分から 6分に亘る区間内の発射系列では大きく定常状態から遠ざかつた。またこれを発射間隔ヒストグラムからみると、2山分布型の最初の峰

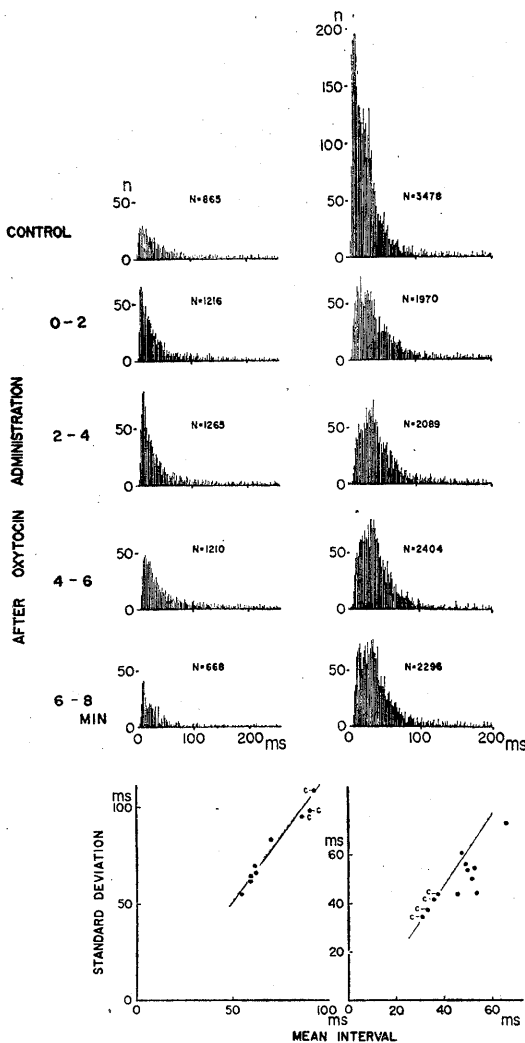


Fig. 5. Interval histogram of successive 2 minutes' samples and the plot of its mean interval and standard deviation in two AHA neurones before and after oxytocin administration at anestrus. In the neurone shown in the left of the figure, the mean firing interval and standard deviation decreased after oxytocin administration keeping a linear relationship. In the neurone, however, as exemplified in the right half, the linearity of the relations between the mean interval and the standard deviation could not be observed after oxytocin injection. The interval histogram before oxytocin injection consisted of two peaks. After oxytocin administration, the peak of shorter interval became less remarkable while the peak of longer interval became more dominant. The character "C" indicates before the administration.

が、oxytocin 投与により漸次つぶれていくのがみられ、第2の峰が優位になっていくのがみられた (Fig. 5).

一方、発情時においては、ほとんど発射頻度の変化はみられなかった。

腹内側視床下核：この部位のニューロン発射は、前頭皮質脳波の変化と対応して頻度が増減する事実が多くあることを述べたが、自発発射時その平均発射間隔は 300 msec 以上のものが多く、その発射間隔-標準偏差は回帰係数 1.0~1.1 のまわりに分散して変動し、発射間隔ヒストグラムはほぼ指数型を示した。また前頭皮質脳波に数10秒の継続した紡錘群発が出現したとき、平均発射間隔はそれ以上に短縮し、発射間隔ヒストグラムは高次 Γ 分布型を示した。

また前頭脳波の変化と対応関係も有しないニューロンについては、上記の場合と同様に回帰係数 1.0~1.1 の廻りを変動するものが大部分をしめたが、その他に発射間隔変動の少なくほぼ律動的に発射を営むニューロン、いい換れば回帰係数が 0.5 以下で、かつ変動係数が 0.4~0.6 で、発射間隔ヒストグラムをみると正規型または Poisson 分布型を示すニューロンが少数散在 (31 例中 4 例) しているのがみられた。そしてこれらニューロンは oxytocin に感受性を示さなかった。

そしてこれらニューロンと前記の発射間隔の変動が大きいニューロンとの関係をみるに、近接した2つのニューロン発射の相互関係をとったところ、発射間隔変動の小さいニューロンより大きなものに対して前頭皮質脳波の変化による発射頻度の変動とは無関係に数 10 msec の時差で発射を抑制しており、その逆向に対しては相関がないのが観察された。

次に oxytocin 投与の影響をみると、発情、非発情に拘らず、発射間隔変動の小さいニューロン (正規型または Poisson 分布型) は、その平均的発射間隔およびその標準偏差に変化はなかった。

非発情時、自発発射が平均発射間隔 300 msec 以下で発射間隔ヒストグラムが高次 Γ 分布型の

比較的高頻度発射をしているニューロンの内に oxytocin の血中濃度上昇に応じて平均発射間隔の減少するものがみられた。すなわち oxytocin 投与後20~40秒に発射間隔の延長が始まり、数分ないし15分に亘ってそれが持続し、同様に標準偏差もそれに対応して増大した。その内には oxytocin 投与後、2分で発射を停止し、数分の間において発射を繰り返すニューロンもあった。一旦発射が停止し、その後再びニューロン発射が現われた場合、ニューロンの乗り換えが考えられるが、この場合最初のニューロンと、後に現われたそれと、スパイクの波型および振巾に変化はみられなかったので同一ニューロンが一時発射を停止した後、再び発射し始めたものと思われる。

しかし僅かながら oxytocin 投与によって、発射頻度の短縮をみるものがあつた。このニューロンは、前頭皮質脳波の変化とは無関係にその発射頻度の変動し、自発発射時の平均発射間隔は70~80 msec, 標準偏差50~60 msec の Γ 分布型を示した比較的高頻度のニューロンであつたが、oxytocin 投与後30秒後に発射間隔は短縮し始め、1分および5分には10 msec 以下に達し、同様に標準偏差も回帰係数0.6付近にそつて定常状態を保つて減少して約15分には投与前時の値に回復した。

一方、発情時にあつてはいずれの種類の新ニューロンも oxytocin 投与により発射間隔が僅かに減少(頻度の増加)するか、または変化がみられなかった。

外側視床下核: この部位は前後左右に亘つて広くニューロンが散在しており、個々のニューロンの種々の要素に対する反応態度も異なる。しかし前頭皮質脳波との対応関係からみると、前記腹内側視床下核と逆の反応態度を示し、特に腹内側視床下核に接した部位での外側視床下核(仮に腹外側視床下核と名づけた)は、この傾向が強かつた。また、腹外側視床下核より浅く、視床との間に挟まれた部位、これを仮に背外側視床下核と名づけたところでは、前頭皮質脳波との対応関係が少なかつた。一方発情時、前外側視床下核は臆刺激に対して強い脳波上の変化をも

たらずとされておられ、またニューロン発射の上からみると腹内側視床下核および腹外側視床下核に発情時にもみ臆刺激後に発射頻度の増減がみられる事を報告してきた。この実験で oxytocin の作用をこれらの部位について調べた。

発情時および非発情時共に発射間隔パターンは前述の腹内側視床下核と同様の指数型および高次 Γ 分布型を主に示した。しかし平均発射間隔は腹内側視床下核に比べて小さいものが多く、200 msec 以下を示したものが50%以上あつた。特に発情時には腹外側視床下核および背外側視床下核のニューロンの内、前頭皮質脳波の変化と発射頻度との間に対応関係を有しないものの平均発射間隔が延長した。

非発情時、背外側視床下核に平均発射間隔500ないし1,000 msec で発射間隔ヒストグラムが指数分布型を示し、且つ前頭皮質脳波の変化と対応をもたないものに oxytocin 投与によりニューロン発射に変化をもたらずものがあつた。これらニューロンは oxytocin 投与後20~40 sec に平均発射間隔が短縮し始め、2分にその極期を示し、同時に標準偏差もそれに依つて減少し、いずれも6分ないし8分には元の間隔に回復した。しかし前記腹内側視床下核ニューロンの如く、10分以上に亘つて変化が持続したり、発射頻度の増減に波打つ事はなかつた。一方、発情時にあつては前記と発射様式が同様のニューロンにあつて、oxytocin 投与後、逆に1分程で平均発射間隔の増大(頻度の減少)が始まり、約2分より8分に亘つて持続して平均発射間隔、標準偏差に相関関係を保つて増大したのがみられた。

このように自発発射変動の状態が類似したものの内に発情および非発情により oxytocin 投与後の反応態度が相反するものもある。

一方、腹外側視床下核のニューロンで前頭皮質脳波変化とその頻度変化の間に有したニューロンの内、oxytocin 投与により発射間隔-標準偏差に変動をもたらずものが僅かにあつた。これ等の場合、いずれも腹内側視床下核ニューロンとは逆の反応を示し、非発情時短縮、発情時延長

の傾向を示して定常状態を保った。一方、正規性、Poisson 分布型にあっては、ほとんど認むべき変化が発射間隔においてみられなかった。

IV. 考 察

LH および oxytocin の血中濃度上昇が、視床下部ニューロン発射に変化をもたらすという事実は、直接または間接にしろこれら両ホルモンが視床下部ニューロンに対して影響をおよぼしたといえよう。この事はすでに脳波および誘発電位の立場からいわれてきている (Kawakami & Terasawa⁷⁾). しかし今回の実験結果から、視床下部ニューロンの内、LH または oxytocin に反応を示したニューロンの発射変動をみると自発発射時の平均発射間隔-標準偏差ダイヤグラムがほぼ直線上にあり定常状態を保っていても、ホルモン投与後、平均発射間隔の延長または短縮に応じて定常的に標準偏差が増大または減少する場合と、他の定常状態に移行して変動する場合がある事がわかった。

この意義を考察してみると、定常的に発射が変動するという事は、ニューロン発射が膜電位を表していると考えれば、ひとつにはこれらホルモンがニューロン自身に作用し、膜電位に変化をもたらしたとも考えられよう。もうひとつにはこれらニューロン発射を賦活している種々の系、例えば網様体-視床下部系や海馬視床下部系など脳内に存在している数多くの関連活動部位のいずれかの活動レベルにこれらホルモンが影響をおよぼし、その結果視床下部ニューロンの発射に変動を来たしたとも思われる。また、発射間隔ヒストグラムが指数型と高次 I 分布型 ($\alpha = 2 \sim 3$) に移行するのみで、発射系列の自己相関においてもホルモン投与後、正の大きい峰が現われることはなく、いい換ればニューロン発射の不規則性が高いということはこれを裏付ける傍証となろう。一方、自発発射時、発射間隔-標準偏差ダイヤグラムをみると、ほぼ直線上を変動し定常的に変動していたニューロンが、ホルモン投与後非定常的な変動を示したということ考察してみる。

前視床下部ニューロンのあるものに発射間隔ヒストグラムが二山分布型を示し、いい換れば少くとも大きく分けて2つの系が、このニューロンを賦活していると考えられるが、oxytocin 投与により2~6分に亘り非定常状態となり、一方の峰がつぶれる経過を示したということは、このニューロンに対する一方の賦活系に変動が生じた。ことが想定しうる。また LH 投与に際し、発射頻度、いい換れば平均発射間隔はさほど変化せずに分散のみ大きく変動するという事、さらにいい換れば非定常状態になったということは、LH 投与により初めてそのニューロンに volley を送るような機構の存在が想定されるであろう。逆にいえば、平時活動を停止または極めてゆっくりと発射を営んでいるあるニューロンが、LH または oxytocin の血中濃度の上昇により特異的に発射活動を営み始め、oxytocin または LH 放出に関与するニューロンに抑制または促進的に活動するのではなからうか。これらホルモンに対するニューロンの特異性については既報の如く、oxytocin および LH に反応を示すニューロンは異なるという事実から証明しうる。

一方、相隣るニューロン間にあって、変動の小さいニューロンがその大きいニューロンに対し発射頻度の高い相では抑制的に、また低い時には促進的に作用したということは、oxytocin の視床下部ニューロン発射に対する作用が発情、非発情により相反するという事と考え合わせて興味のある事実である。

すなわち、視床下部諸部位における発射頻度スペクトルが発情、非発情により移行し、また解剖的に視床下部ニューロンの dendrite は数ミリの長さであるとされていることを考え合わせると、血中 progesterone および estrogen 濃度の時間的变化が個々の oxytocin sensitive ニューロンの発射を oxytocin の血中濃度の変化に対し視床下部のニューロン間で抑制または促進的に働くことを示唆している。

また、非発情時、既報の如く視床下部ニューロンの発射の腔刺激に対する特異的、後反応がみられず、発情時にのみそれがみられ、且つ腔刺

激中については発情時のみ僅かに前視床下部ニューロンに反応がみられたという事実と、非発情時に前視床下部ニューロンの内に、oxytocin の血中濃度上昇に応じ、発射頻度が増加することと考え合わせると、この発射頻度の増加は oxytocin 放出に抑制的に働いたと考えられよう。

結局、oxytocin および LH の血中濃度の増加に対してのみ、発射活動を営むニューロンが視床下部に存在し、且つ oxytocin および LH 放出における final pathway のニューロンに対するそれらニューロンの反応態度が発情、非発情に換れば estrogen と progesterone の血中濃度差により変化するという short feed back 機構が存在するのではなからうか。

V. しめくくり

去勢雌ネコに estradiol benzoate を投与し発情状態を誘起せしめ、視床下部ニューロン発射の立場から LH および oxytocin の血中濃度の変化に対する影響を無処置非発情状態のそれと比較検討した。

1. 視床下部諸部位における発射頻度スペクトルを発情時、非発情時について比較すると、前視床下部、腹内側視床下核では低頻度化し、外側視床下部では高頻度化に移行する。

2. 一連のニューロン発射時系列とみなし、毎1分、2分ないし5分間づつについての平均発射間隔-標準偏差ダイヤグラムをとると、自発発射時ほぼ勾配 1.2前後の直線上を変動するニューロンが最も多い。そして LH および oxytocin の血中濃度上昇に応じて発射頻度（平均発射間隔）が増加または減少するニューロンは、この直線にそって生理的に定常的に変動するものと、同ホルモン投与後、ある潜時をもって他の定常状態に移行して変動するものがみられた。

3. 特に前視床下部ニューロンの内に非発情時、oxytocin の血中濃度上昇により、発射頻度が増加し（平均発射間隔の短縮）、且つ発射系列が非定常化したものがみられた。しかし発情時には発射間隔ヒストグラムが前記ニューロンと近

似したもので、oxytocin に反応を示したものは見られなかった。

4. LH 投与により発情、非発情に拘らず、前視床下部、視床下部弓状核のニューロン発射は10ないし20分の潜時をもって盛になり、腹内側視床下核では抑えられるが、発情時投与後10～15分間の発射が生理的に他の定常状態に移行するニューロンがみられた。

5. 腹内側視床下核および外側視床下核にある隣近する2つのニューロンで、一方のニューロンの発射間隔ヒストグラムが指数型または Γ 分布型で、他方が正規分布または Poisson 分布型で変動が小さいとき、後者のニューロンに対して数 msec または約 10 msec の時差で抑制的に働いているのがみられた。

6. 発射間隔ヒストグラムが正規型または Poisson 分布型で、発射変動の少ないニューロンは LH、oxytocin いずれにも反応を示さなかった。

以上の事から、視床下部ニューロンの内には LH または oxytocin の血中濃度が上昇した時にのみ発射を営むニューロンが存在し、且つ oxytocin または LH 放出に関与するニューロンに対する、これらニューロンの反応態度が発情、非発情により異なる事が予測される。

おわりに本研究に御懇篤なる御指導、御校閲下さいました川上正澄教授ならびに瀬戸勝男助教授に深く感謝致します。また、統計処理に際し、東京大学工学部池田研二先生に数々の助言を戴いたことをここに附記し、感謝致します。そして終始研究を励まして下さいました当教室の諸先生に感謝致します。

本研究は、文部省機関研究（1967. 68）の補助により行なわれた。

文 献

- 1) Barraclough, C. A. & Cross, B. A. (1963) Unit activity in the hypothalamus of the cyclic female rat: effect of genital stimuli and progesterone. *J. Endocrinol.* **26**, 339-359
- 2) Ramirez, V. D., Komisaruk, B. R., Whitmoyer, D. L. & Sawyer, C. H. (1967) Effects of hormones and vaginal stimulation on the EEG and hypothalamic units in rats. *Am. J. Physiol.* **212**, 1376-

1384

- 3) Kawakami, M. & Saito, H. (1967) Unit activity in the hypothalamus of the cat : Effect of genital stimuli, luteinizing hormone and oxytocin. *Jap. J. Physiol.* **17**, 466-486
- 4) Werner, G. & Mountcastle, V. B. (1963) The variability of central neural activity in a sensory system, and its implications for the central reflection of sensory events. *J. Neurophysiol.* **26**, 958-977
- 5) Rodieck, R. W., Kiang, N. T. S. & Gerstein, G. L. (1962) Some quantitative methods for the study of spontaneous activity of single neurons. *Biophysic. J.* **2**, 351-368
- 6) 大村 裕 (1966) 視床下部と摂食行動 神経研究の進歩 **10**, 84-97
- 7) Kawakami, M. & Terasawa, E. (1967) Differential control of sex hormone and oxytocin upon evoked potentials in the hypothalamus and midbrain reticular formation. *Jap. J. Physiol.* **17**, 65-93



〔原著〕 敏捷性活動に対する個人差および学習性に関する研究 612.766

(I) 一般成人について

松本政雄・中里邦夫・田中順*

Studies on the fitness for the action requiring quickness and learning effect (I) On the test results of adult men and women

Masao Matumoto, Kunio Nakazato and Jun Tanaka (*Department of Physiology, School of Medicine, Gunma University, Maebashi*)

The authors carried out the test of mental fitness for the action requiring quickness on 57 men and 29 women (18~66 y). The test method was the same which was reported by Matumoto et al.. The tests were done one time every day as a rule but in special cases one time a week. The score of the test and the learning effect for the action were as follows:

1. The average score of the first was 31, and that from the first to the third test was 37, the one including 38 for men and 36 for women.

2. On the relation between the average score and the test time, the average curve of the learning effect ascended with the tests repeated and attained maximum level after about 50 times of tests, and the level was maintained thereafter.

3. By ceasing the training for some months after the tests of quite many times, the score was reduced to small at the reopening of the test but soon attained the before level. However, when the interruption was took place at the beginning of the tests, the effect of the previous tests (training) remained little.

4. It was found that the score of tests and the curve of learning and the quickness of the action in daily life and sports were closely related.

In discussion of the above results the authors concluded that the method reported by Matumoto et al. was used effectively to the test of mental fitness for action requiring quickness.

[J. Physiol. Soc. Japan (1968) 30, 311-317]

速さを要する sports あるいは技術等に対する個人の適性を検査する方法として松本等は視覚刺激に対する複雑反応時を測定しその検査成績に基づいて敏捷性を判定する方法について報告⁷⁾したが著者等はその方法を用いて一般成人男女に対して検査を実施したのでその成績について報告する。

検査方法および被検者

敏捷性およびその学習性を検査するために用いた方法はさきに松本・岡田等が報告した「速さを要する技術, sports 等に対する適性検査の一方法⁷⁾」に記載されたものと同一のものを用いた。すなわち本方法は一言にしていえば視覚刺激に対する複雑反応時の測定であってその大要を述べれば次の如くである。

1. 視覚刺激を与える方法として矩形板 (40 × 50 cm) に 5 個の豆電球を設けこれに A, B, C および右, 左の足等の符号をつけこれらの電球のどれかが約 10 sec 間隔で *rondom* に点灯されるようになっていてこれを被検者の前方約 1 m の位置におく。これらの電灯が点灯されたときはこれに対応する電鍵を手または足で速やかに操作しその間の反応時間を記録する。

この際同時に、正しい反応または誤反応等も記録される。

2. 記録装置としてはペン書きオッシログラフを用い反応時間ならびに反応の正誤を区別するために 2 コのペンが用いられる。

かくしてえられた記録から連続した 30 回の刺激に対する反応時間を測定し平均時間, 誤反応の回数および反応時間の分散等の状況を求める。

3. 検査成績は 30 回の反応のうち正反応に対

* 群馬大学医学部第 1 生理学教室
〔昭和 42 年 12 月 11 日 受付〕

する平均値から求めた値をA——この値が300 msecの場合に100, 600 msecの場合50の如く定める, 反応時間のバラツキについては個々の反応時間を100 msec毎に区分し最多値を中心にして500 msecの範囲を出た値の回数からある値を定めこれをBとする, さらに反応の誤の回数からCの値を定め1回の検査に対する得点Kを,

$$K = A - B - C \quad \text{の如く定めた.}$$

以上の如き得点の算出方法は充分検討を経たわけではなく仮に採用したものであって, このような方法でえられた検査成績から逆にその方法の妥当性の検討も考慮されているわけである. 以下に述べる検査成績は上述の方法を用いてえられたものである. 尚被検者としては主として本学の職員(事務員, 作業員等を含む)および学生等で男57名, 女29名, 計86名(18才~66才)であった. かような被検者は社会全体から考えれば多少特殊な者であるかも知れないが手近な被検者として便利であったのでこれらの人達が用いられた.

検査成績

1. 被検者全体について

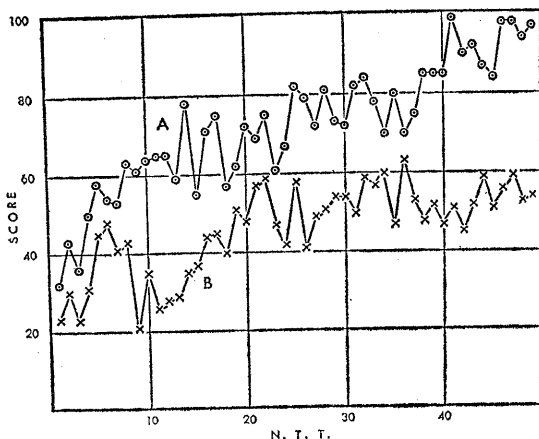


Fig. 1. Plot of scores of two subjects, showing different ability for mastering of quick action. The test (training) was carried out one time every day. A : Shows the high ability (20 years old, ♀). B : Shows the low ability (28 years old, ♀).

全被検者について初回検査の得点はその後のものより大体において小であるが場合によって2回目の検査得点の方が小であることもあった.

全被検者に対する初回得点の平均値は31となったが, 初回検査は検査方法等に対して被検者が慣れない等のことによつて得点が左右されることもあると考えられるので, 第1回目から第3回目までの得点の平均値を算出した. その結果は37点で男子の平均38点, 女子のそれは36点であった.

被検者のすべてではないが大多数の被検者については検査を毎日1回, 場合によって1日の間隔をおいて行ない各検査毎の得点と検査回数との関係を観察した. この検査は各検査を始める前にも多少予備的に練習を行ないまた検査そのものも次回検査に対する練習となりうる性質を持つため一般に検査毎に得点は上昇する. 得点を縦軸に, 検査回数を横軸に取つてこの関係を示せば Fig. 1 の如くである. かような関係を仮に学習曲線と呼ぶことにすれば, 学習曲線は検査を重ねること数十回で大体その上限に到達する. 上限に達する経過は決して単純に上昇するわけではなく相当上下しつつ上昇するのが一

般である. かような動揺は被検者によって大きいものとやや小さいものとあるがいずれの被検者にも現れる. 検査の際の心身の状態によるものか否か等は明らかでない. 得点が上限状態になるに要する検査回数, 上限の値等は各被検者によって異なる. 速かに且より高い得点において極限状態がえられる被検者の敏捷性は勝れているものと思われる. 検査を50回以上行なった被検者10名について各回の検査得点の平均値と検査回数との関係を示したものは Fig. 2 の如くになった(平均学習曲線). 平均学習曲線は勿論各個の被検者のそれより動揺は少いが尚多少これが現れている. さらに多数の被検者に関するものがえられればこのことは認められなくなるのではないかと考えられる.

2. 若年者と高齢者の成績

年齢によって検査成績に差が現れるか否かを観察したのであるが個々の被検者については個人差が大きいので明瞭には認め難いが40才以下の被検者(10名)と40才以上(10名)の被検者の平均学習曲線を比較すれば Fig. 3 に示す如くであり、検査の初めから約20回目の検査に至るまでの経過については若年者と高齢者について殆んど差が認められないがその後において若年者の得点はさらに上昇するが高齢者においては上昇が止り、この差が現われるものと看做される。

3. 学習(検査)の interval について

検査は多くの被検者について毎日または時として1, 2日を隔てて(日曜日等のため)行なわれたのであるが場合により数回ないし数十回の検査の後長時間(10日~30日)中断してその後再び続けた場合または被検者の都合で毎週1回の検査を続けた者等あった。

これらの被検者についてその得点の状況, 学習効果等を観察した結果は下の如くである。先ず毎週1回の検査の場合と毎日1回の検査の場合においては前者に対する学習曲線の上昇は小さく且その到達の上限の値も小さいことが知られた。

Fig. 4 は毎週1回検査を行なった被検者5名の平均学習曲線であるが毎日検査を行なった一般被検者の平均曲線に比較して始めは上位であるにもかかわらず数回の検査の後にはこれと同位になりさらに下になる傾向を示している。始め上位であるのはこの群の被検者が学生であって一般人より初期の得点が大であったためと思われるがかような被検者においても尚且数回の検査の後の得点は下位になる如くである。

さらに数名の被検者について約30日の間隔を経て数回の検査を行なったが学習曲線の上昇は殆んど認められなかった。

検査(学習)を一定期間休止し再び開始したと

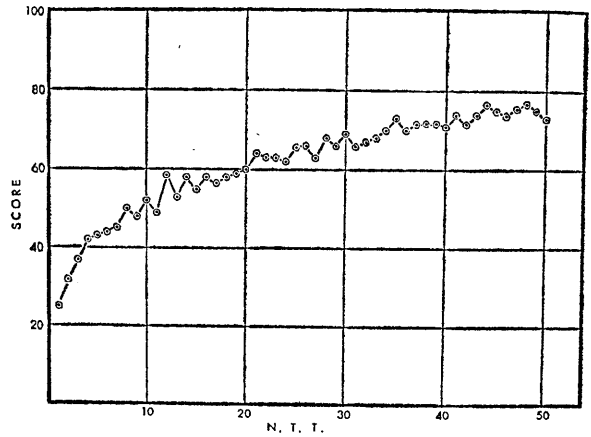


Fig. 2. Average curve showing the learning effect of ordinary adults (18-66 y, 5 men and 5 women). The test (training) was carried out one time every day.

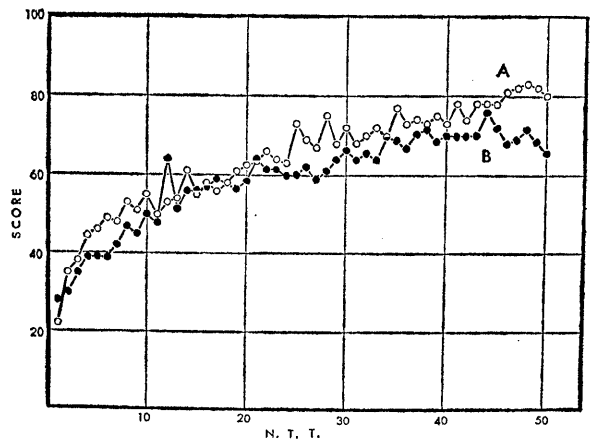


Fig. 3. Average curve showing the learning effect of young and old age subjects. The test was carried out one time every day as a rule. A: Curve on young (age) subjects (18-40 years). B: Curve on old (age) subjects (41-66 years).

きの得点は一般に休止直前に比較して相当小さい。その後検査を毎日または隔日続けた場合においては2つの場合を区別することができる。検査を数多く繰り返すその上限に達しているような被検者がある期間休止した場合には再開時の得点は小さいが数回ないし10回前後の検査の後には元の状態またはそれ以上の状態になった。換言すれば非常に速かに元に戻ったが検

査回数が未だ少く学習曲線の上昇初期に休止した場合には再開後、休止直前の値になるためには容易でなかった。すなわち以前の学習効果は殆んど失われている如くであった (Fig. 6).

4. 刺激-反応の型を変えた場合

刺激板上の電球に附した記号A, B, C等の位置を変えまたはA, B, C……等の点灯対

し右手あるいは左足等で何れの key を押すかの約束を変えることによって刺激に対する反応の型を変えることができるわけであるが、かようにしてえられた検査の得点および学習曲線と型を変えない前の学習曲線の例を示せば Fig. 7 の如くである。型を変えた直後における得点は以前の型について検査の第1回目の初期の得点

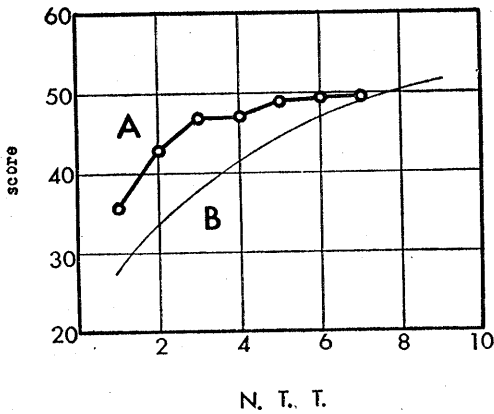


Fig. 4. Curve showing learning effect when the test was carried out one time every day and one time every week. A: Curve on the subjects who carried out tests one time every day. B: Curve on the subjects who carried out tests one time every week.

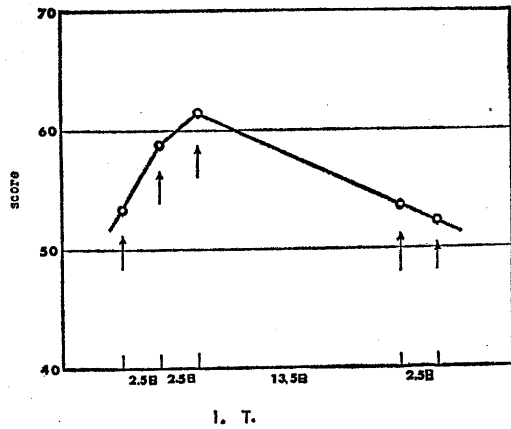


Fig. 6. Average score of 8 subjects (19-22 years) before and after an interruption of test for 13.5 days (in average), which took place after the several times of the tests. The test was carried out one time every day.

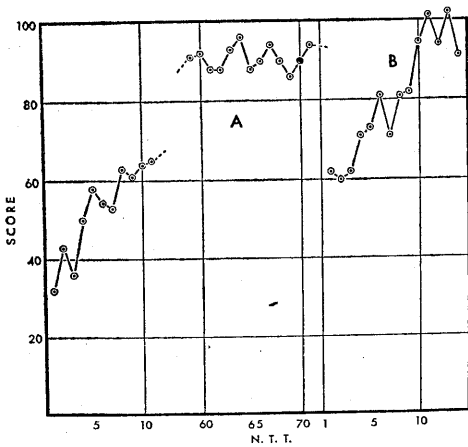


Fig. 5. Plot of the scores before and after a cease of the test (270 days). These tests were carried out one time every day. The subject was a woman of 20 years old.

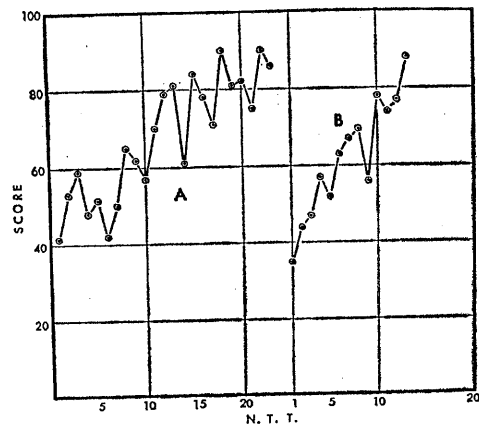


Fig. 7. Plot of the scores before and after the change of the pattern of stimulating board (see text). The test was carried out one time every day. A: Before the change of the stimulating pattern. B: After the change. Subject: 21 years, ♀.

より低い。このことは以前の型についての反応が無意識に現われ反応を誤りまたはまごつき等のためであると思われる。

併しその後の曲線の上昇経過は速かであり検査回数で以前の型についてと同様の状態に達した (Fig. 7)。

この事柄と関連したものと思われるがタイプストおよびピアノ等を弾く被検者について、本検査を行なった場合にはこれらの被検者においては学習曲線の初期の上昇は一般被検者についてより速かであった。併しその到達の上限は必ずしも一般の被検者のそれより上位であるわけではなく上限の値は被検者の個性によって定まるものと思われる。

5. 検査成績と被検者の日常の活動状況の比較

本検査の被検者はすでに述べた如くわれわれの研究室の近くに居るか、または屢々接触する機会のある職員および学生、その他であってそれらの被検者について日常の活動状況、sports に対する巧拙等を観察しえたものが大多数を占めていたので本検査成績とそれらの状況、すなわち敏捷性如何等を比較することができたのでこの点について検討を行なった。併し各被検者に対する日常の活動状況の判定はある程度筆者等の主観に基くわけであるがこのことを考慮した上で被検者の職務、sports、その他の場合における活動状況を観察すれば本検査からえられる得点、学習曲線の経過と被検者の活動状況とは相当一致していることが認められた。併し注意を要する点は本検査成績が思わしくない被検者においてその日常活動においてまたは sports 等を行なうに際しての動作そのものは概して敏捷を欠く点では一致するが頭脳的に劣るであろうとの推定は必ずしも一致しない場合があったことである。尚、庭球、バレーボール等について勝れた技能を示す被検者に関する学習曲線は大體勝れていた。

考 案

以上検査成績として述べた所は本検査方法を

広く敏捷性検査に対する方法として用いるか否かまた本検査方法を一般に適用した場合における普通一般の成人男女の得点等についての基礎的資料をうる目的であった。併しすでに述べた如く本検査方法に於ては被検者の体格ないし体力に関する要素は殆んど関係しないものであって各種の sports 等に対する適性の判定はこれらのことなしには全く意味がないことはいうまでもない。したがって実際問題としてはこのことを充分考慮に加えなければならない。本検査方法によって行ないうるのはいわゆる mental の面に関してのみであることを充分理解しておかなければならない。

さて、本検査成績と被検者の日常生活ないし sports 等における活動状況とを比較するにそれらの動作等において種々一致した点がありいわゆる敏捷性が高いと思われる被検者においては検査成績および学習性において良好な成績を示すものが多く、これに反して物事の処理に敏捷性を欠きあるいはまたただらしている者の検査成績は良くない等検査成績と日常活動の状況はよく一致する点が多い。

尚数名の sports 選手についての検査成績においては特に良い成績というわけでもないが相当良い成績に属するものがすべてであった。

これらのことを要約すればこの検査によって(1回だけでなく少なくとも10回位の検査を行う)被検者の敏捷性を判定することが可能であることを知った。

敏捷を要する技術ないし sports の習得について常識的には若年者は高年者より秀れていると一般にいわれているが本検査の結果よりすればある程度の所までは両者において殆んど差が認められない。併し非常に優秀な成績を示す者は若年者においてのみ観察された。この点についてはさらに検討しなければならない問題である。

検査回数を重ねることによって得点が上昇することすなわち学習効果について考えるに該当刺激に対応する key を押す場合に先ずそれらの位置を記憶することから始まり、始めは意識的

な随意運動として動作するわけであるが次第に無意識的に動作が行ないうるようになりこの状況に至って動作そのものも速かにできるようになる。このような状態が習熟の過程であり条件反射化された状態である。各種の sports 技術等においてはこのことは極めて重要な問題であるがかような問題に対してはこれを行なう練習と練習との期間が重要な関係を持つものである。1日のうちに何十回かの検査を行なっても得点の上昇は殆んど見られなかったが検査を毎日1回づつ行なう場合にすでに示した如き学習曲線がえられた。併し毎週1回の検査では得点の上昇が少なかった。学校、その他においてこれに類似した技術等を毎週1回づつ行なうような場合に屢々あると考えられるが技術等の上達を目的とする練習の場合にはこのことは考慮しなければならない問題である。

尚検査を中断した場合に学習の初期にある場合においては再開後に非常に得点が低くなっているが相当習熟した者においては再開後急速に以前の程度に戻る。この点に関して考察するに技術の習得初期において中断すればそれまでえたものは殆んど失われると見做して差支えないようである。Sports 等において season off から season に入ってから練習が開始される場合等において現れる現象と比較して理解される点がある。

刺激に対する反応の型を変えた場合において以前の型における学習が如何に関係するかを観察した結果については最初のうちは以前の型の刺激に対する反応にとらわれ屢々誤反応が現われたが得点は低いがその後は新たに検査を始めた被検者に比較して得点の上昇が速やかであった。このことは類似の作業に対して行なった練習がある程度効果を持つ結果と解せられ日常タイプライター、ピアノ等を操作している被検者においてえられる本検査成績が初めのうち比較的高い得点が示されることに関係あるものと思われる。

以上は本方法を用いてえられた敏捷性に対する検査成績を種々の方面から考察したものであ

るが敏捷を要する sports、技術に対する適性ならびにその学習性等の上下の判定に対しては相等有効な判定をなしうるものと考えられる。併しすでに述べた如く本方法によってえられる被検者の敏捷性ないし学習性に関する判定は精神的関係が主であって実際の活動において筋力その他一般に体力の問題が関係する活動については問題は異なってくることは勿論であろう。したがって本法によってえられた結果を実際の技術ないし sports 等に対する適不適の判定に役立たせようとすれば、これらのことを充分考えなければならないであろう。

結 論

松本・岡田等によって考案された複雑反応時測定による敏捷性ならびに敏捷性活動に対する学習性検査方法を成人男女(男57名、女29名、18才~66才)に対して実施しえられた成績に基づいて次の如き結果をえた。

1. 初回の得点(満点100)の平均値は31, 第1回から第3回目の検査までの平均値は37, 男子のみについての値は38, 女子のみについての値は36であった。
2. 検査回数50回以上におよぶ被検者全員の平均学習曲線は大体50回の検査で最高値(約75点, 時間にして400 msec)に達しその後は殆んど不変であった。
3. 年齢による差は殆んど認められなかった。
4. 一定期間検査(練習)を中断した後検査を再開したときの状況は充分学習効果の上った者では再開後速やかに元の状態に戻ったが検査回数(練習)が少ない場合は以前の練習の効果は殆んど認められなかった。
5. 刺激に対する反応の型を変えた場合において前の型について学習効果が充分えられた被検者では新型に対する得点の上昇は速やかであった。
6. 本検査方法による得点の上昇すなわち学習曲線から考えられる結果と被検者の日常生活, sports 等における敏捷さを観察した結果

を比較するに両者において密接な関係があることを知った。

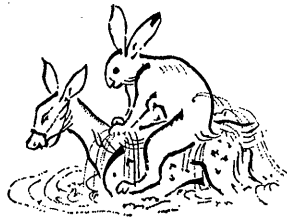
以上の事柄から著者等は本方法は被検者について敏捷性およびその学習性等を判定するための補助として用いることは相当有効であろうと結論した。

終りに検査に当って検査成績の処理について、本教室大平清氏、土谷、春原両嬢に助力をえたことを感謝する。

本論文の要旨は第43回日本生理学会総会において報告した⁷⁾。

文 献

- 1) 藤森聞一 (1966) 運動系の生理学 生理学大系 7, 717 医学書院 東京
- 2) Galanbos, R. and Morgan, C. T. (1960) The neural basis of learning. Hand book of neurology, 111, 1471
- 3) 東 正雄・安田 保 (1966) 運動と反応時間に関する研究 体育学研究 11, 87
- 4) 久松栄一郎・猪飼道夫 (1964) スポーツ医学 体育の科学社 東京
- 5) 猪飼道夫・浅見高明・芝山秀太郎 (1961) 全身反応時間の研究とその応用 Olympia, 7, 21
- 6) 小保内虎夫 (1953) 学習理論 心理学講座 5 I, VI 3 中山書店 東京
- 7) 松本政雄・岡田三郎・中里邦夫・白田小夜子 (1966) 速さを要する技術, Sports 等に対する適性検査の一方法 体育学研究 11, 112
- 8) 松本政雄・白田小夜子・中里邦夫 (1966) 要敏捷運動に対する適性と学習性について 日本生理誌 28, 398
- 9) 名取礼二 (1955) 反応時間分析法による大脳機能の研究 慈恵医学誌 70, 1209
- 10) 中里邦夫・白田小夜子 (予定) 敏捷性および学習に関する研究(Ⅱ) 男子高校生について 体育学研究 12
- 11) 相良守次 (1953) 学習実験法-人間 心理学講座 5 II, III, IV, 中山書店 東京
- 12) 辰野千寿 (1964) 学習心理学 金子書店 東京
- 13) 田中 順・白田小夜子 (1966) 敏捷性検査における左右の手および足の反応時間の相違について 体育学研究 (群馬支部) 3号 43
- 14) 吉井直三郎 (1963) 学習の機序 科学 33, 554



[原著]

“Fingerprint”法による哺乳類ヘモグロビンの比較

生理学的並びに比較生化学的研究 612. 111. 1

I. “Fingerprint”法による正常成人ヘモグロビン (主成分並びに微量成分) 並びに胎児ヘモグロビンの比較

前 田 信 治 *

Studies on mammalian hemoglobins by “fingerprinting” procedure

I. Comparison of normal human hemoglobins A₁, A₂ and F

Nobuji Maeda (Second Department of Physiology, Nara Prefectural University of Medicine,

Various human hemoglobins and their subunits are isolated and the differences and the similarities in structure are compared by fingerprinting.

1. A method was developed to isolate δ^{A_2} chain from hemoglobin A₂.

2. The similarities and the differences in fingerprints agree with those of the amino acid sequences.

3. All of peptides of α chain isolated from hemoglobin A₁ are present in fingerprints of hemoglobin A₂ and F.

4. Considerable similarities of the subunits studied are present in so-called “basic center” and in so-called “core”. It is assumed that these parts of hemoglobin have an important role to maintain the physiological function.

5. It seems that the order of the complexity in the fingerprint of the subunits agrees with the possible order of evolution of genes controlling the synthesis of these subunits.

[J. Physiol. Soc. Japan (1968) 30, 318-336]

I. ま え お き

現在ヘモグロビン(Hb)の構造, 特にヒトHbの構造についての知見は他の蛋白の場合に比していちじるしく進歩している。

こうした構造研究の端緒となったのはIngram¹⁾によって開発されたいわゆる“fingerprint”法である。当該法は未知のHbの完全構造を決定するにあたっての第一段階として有用なだけでなく、今後さらに複雑な蛋白の構造を研究するのにきわめて有用な方法であると考えられる。

今迄に報告されている多数の異常Hbは別にしても、正常人には3種のHbが存在している。すなわちHb A₁, Hb A₂ およびHb Fであり、これらHbの構造はそれぞれ $\alpha^{A_2} \beta^{A_2}$,

$\alpha^{A_2} \delta^{A_2}$ および $\alpha^{A_2} \gamma^F$ とあらわされる。これら正常Hbを構成する個々のサブユニットはそれぞれ別個の遺伝子によりその合成が調節されており、勿論その1次構造は完全に解明されている (Braunitzer et al.²⁾; Schroeder et al.³⁾; Ingram & Stretton⁴⁾。

今回、こうした1次構造のはっきりしたHbを用いて fingerprint 法実施の至適条件を検討し、また特に最近ようやく用いられるようになったアミノエチル化法 (Jones⁵⁾) を導入して、従来の fingerprint 法ではみることのできなかったいわゆる“core”部分の fingerprint についても検索を加えてみた。

II. 実験材料および実験方法

A. Hb 溶液の作製

実験材料としては成人血ならびに臍帯血を使用、前者は成人の肘静脈より採血し、後者は分娩時に臍帯より採血した。二重蔘酸塩処理した

* 奈良県立医科大学第2生理学教室
[昭和42年12月4日受付]

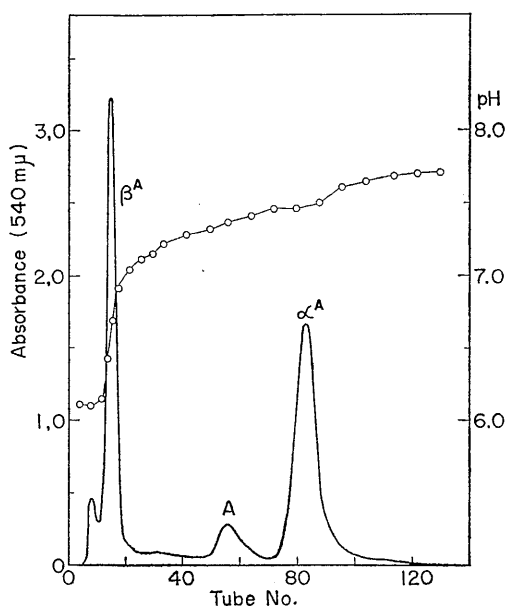


Fig. 1. Separation of α and β subunits from Hb A by Bucci & Fronticelli's procedure. Flow rate; about 8 ml/15 min fraction volume; 8 ml, \circ — \circ ; effluent pH.

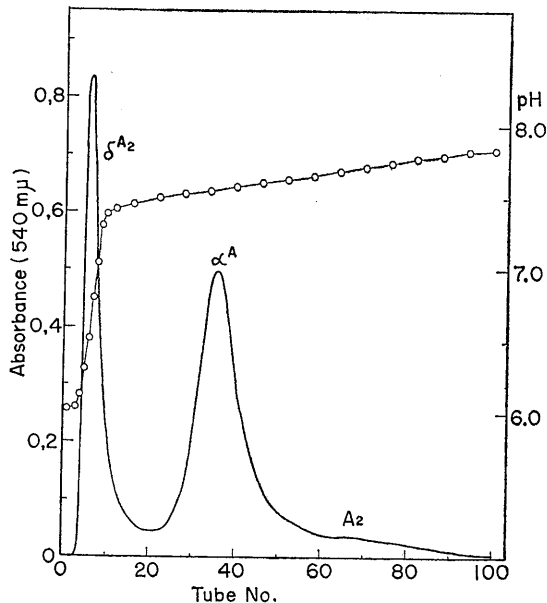


Fig. 2. pH Gradient elution from carboxymethyl cellulose column of hemoglobin A_2 treated with PCMB in 8 molar excess. Hb A_2 treated with PCMB; about 90 mg, column size; 3×4 cm, flow rate; about 30 ml/hr, fraction volume; 5 ml, \circ — \circ ; effluent pH.

血液を冷却生理的食塩水にて5回遠沈洗滌し、等量の脱イオン水およびトルエンを加え激しく振盪溶血させ、約30分間冷蔵庫内に放置する。その後遠沈により分離した溶血液をトルエンと再度振盪しさらに30分間放置した後、遠沈 (3000 r. p. m., 10分間) して stroma を除去した。このようにしてえた Hb 溶液を以下のべる緩衝液または種々塩溶液に対して氷室内 (約 2°C) で約15時間透析した。

1. Hb A_1 溶液; 成人の肘静脈血より作製した Hb 溶液をそのまま使用した。この場合、微量成分として Hb A_2 が約 2.5% 含まれるが fingerprint を作製するにあたっては無視できる程度のものである。

B. Hb F 溶液の作製

Hb F は臍帯溶血液から CM-Sephadex (C50) を用いる Zade-Oppen 法⁶⁾ の改良法 (Enoki & Maeda⁷⁾) により単離した。

臍帯溶血液は前もって一酸化炭素型 Hb (CO-Hb) とし、CO で飽和した 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 6.0, NaCl 40 mM) に対して一夜透析した。Column には 5~8% 臍帯溶血液として 1000~1500 mg 使用した。

C. Hb A_2 溶液の作製

成人の肘静脈血より作製した溶血液を CO 型とし、CO で飽和した 0.005 M K_2HPO_4 に対して一夜透析した後、DEAE-Cellulose column を用いて Hb A_2 を分離した (三田⁸⁾)。

Column (4.5×40 cm) は前もって 0.005 M K_2HPO_4 (pH 8.4) で平衡させ、6~8% の Hb 溶液約 50 ml を使用した。同一緩衝液で Hb A_2 を溶出させた後、多量に混入してくる nonheme protein を除去すべく 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡させた Amberlite XE-64 column (2×4 cm) を通し、同一緩衝液でもって nonheme protein を溶出した。その後、0.5 M K_2HPO_4 をもって Hb A_2 を溶出せしめた (三田⁸⁾)。

D. α^A および β^A サブユニットの単離

Bucci & Fronticelli の方法⁹⁾ に準じて行な

った。Fig. 1 にその実例を示す。

E. γ^F サブユニットの単離

Enoki & Maeda の方法⁷⁾により分離した。

F. δ^{A_2} サブユニットの単離

Bucci & Fronticelli の方法⁹⁾を少しかえて行なった。PCMB による Hb の修飾は全く同様の方法⁹⁾で行なったが、PCMB 添加後少なくとも 2 日間冷蔵庫内に放置することにより、高収量で δ^{A_2} 鎖を得ることに成功した。放置後、試料を 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、これを CMC column (3×5 cm) に使用した。溶出は 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0, 500 ml) と 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 8.0, 1000 ml) により形成される pH 勾配によりおこなった (Fig. 2)。

G. 各種単離鎖の脱 Hg 化

Tyuma et al. の方法¹⁰⁾に準じて行なった。

H. 澱粉ゲル電気泳動

Poulik の不連続緩衝系¹¹⁾を用い Smithies の方法¹²⁾で行なった。

なお、Hb の解裂電気泳動は蟻酸-NaOH 緩衝液 (pH 1.9, I=0.05) を用いる Müller の方法¹³⁾により行なった。

I. グロビンの作製

Anson & Mirsky の方法¹⁴⁾を少し改変して行なった。1~5%の各種 CO-Hb 溶液ならびに CO 単離鎖溶液を、約 2°C の冷室内において 0.5% 冷塩酸-アセトン溶液 10 倍液中によくかきまぜながら注ぎ込む。沈澱したグロビンを数回冷塩酸-アセトン溶液で遠沈洗滌し、最終的にアセトンで洗滌したものをデシケーター内に入れ、水流ポンプで吸引し、冷所にて乾燥させる。このようにしてえた白色生成物は冷所 (約 2°C) に保存する。

J. アミノエチル化

Jones の方法⁵⁾に準じて行なった。前に述べたようにして作製したグロビン 150 mg に脱イオン結晶化尿素 3.61 g, 5% EDTA 溶液 0.3 ml, Tris 緩衝液 (pH 8.6) 3.0 ml, および 2-mercaptoethanol 0.1 ml を加え、これに窒素を

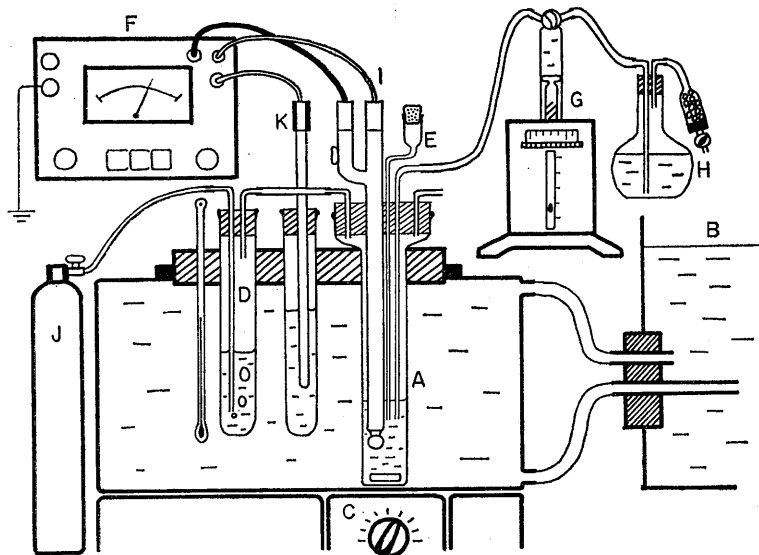


Fig. 3. Apparatus for tryptic digestion. A; Digestion cell, B; thermostat, C; magnetic stirrer, E; trypsin-supply tube, F; pH meter, G; piston buret, H; bottle containing 0.5 N NaOH, I; combined electrode, J; nitrogen gas cylinder, K; automatic temperature compensation. During the digestion, the digestion cell was flushed with a constant flow of N_2 , water-vapor saturated in D.

通気しながら室温にて約4時間反応させS-S結合の還元を行なう。ついで ethyleneimine 0.2 ml を加え30分間反応させる。反応混合物を冷所にて脱イオン水に対して約2日間透析、この間外液を頻りに交換した。なお、少量のグロビンに対しては上記反応混合物組成に比例してアミノエチル化を行なった。

K. Trypsin による加水分解

従来消化法には2種類ありその一は pH-stat を使用する方法と他は適当な緩衝液中で行なう方法である。今回両者を比較使用してみた。

1. Ingram の方法¹⁾ に準じた方法

当研究においては Hb A₁ についてのみ使用したものでその装置を Fig. 3 に示す。

約2%のグロビン溶液(8 ml)を digestion cell (1.8×10 cm) (A) に入れ、0.5 N NaOH で pH 8.0 に調節する。この digestion cell を図に示すように thermostat (B) で 38°C に保たれた装置にとりつける。Magnetic stirrer (C) でよく攪拌しながら、38°C で水蒸気により飽和された窒素ガス (D) を通気しながら約1時間放置す

る。Trypsin (twice-crystallized, salt free; Worthington) を 0.001 N HCl に溶解し 0.5% 溶液を作製し、蛋白に対する trypsin の重量比が 1/200 になるような trypsin 溶液を細ガラス管 (E) より送り込み消化を開始する。

Trypsin の加水分解作用により peptide 結合が1個切断されると H⁺ が1個放出され pH の低下がおこる。この pH を常に 7.9 と 8.0 の間に保つように pH meter (HM-5 A 型, 東亜電波) (F) をみながら piston buret (G) より 0.5 N NaOH (H) を digestion cell 内に送り込む。pH meter には digestion cell 内より複合電極 (GC-10型, 東亜電波) (I) を誘導してある。アルカリ消費がみられなくなった時、さらに細ガラス管を介して適当量の trypsin 溶液を追加する。その後のアルカリ消費が停止した点をもって最終点とし、1N HCl で pH を 6.5 におとすことにより反応を停止させる。ついで加水分解物を加熱 (90°C, 2分) することにより trypsin を失活させ、不溶分を遠沈除去し透明な上清をうる。もとのグロビン 4 mg に相当する上清量を小試験管に分注し、冷室 (約 2°C) にてデシケーター内で真空乾燥して保存した。

2. 緩衝液内での消化方法 (Katz et al.¹⁵⁾)

当研究では Hb A₁ 以外の全試料をこの方法で消化した。グロビン試料は約2%とし 0.2 M NH₄HCO₃ 溶液に対して冷所にて一夜透析したものを用いた。アミノエチル化操作をほどこしたのについては上記透析に先立ち、試料を脱イオン水に対し徹底的に透析した。透析したグロビン溶液は密封可能な小容器にうつし、0.001 N HCl に溶解した trypsin 溶液を蛋白に対して 1/100 の重量比で添加し、窒素ガスで容器内を完全に置換してから容器を密封する。そして 38°C の恒温槽内に約4時間放置し、この間内容物を頻りに振盪攪拌した。その後再び trypsin 溶液を適当量添加し、さらに1時間消化した。このようにしたものを1の場合と同様に処理し乾燥保存する。

L. Fingerprint 法

Trypsin による加水分解の結果生じた多数の

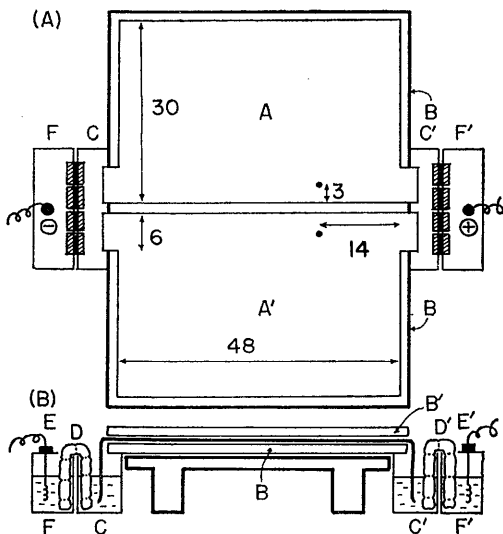


Fig. 4. Layout for paper electrophoresis. A and A'; T-shaped filter papers, B and B'; glass plates, C and C'; buffer containers, D and D'; bridges, E and E'; platinum electrodes, F and F'; electrode chambers.

peptide の混合物をロ紙電気泳動およびクロマトグラフィーを結びつけたいいわゆる fingerprint 法により分離した。

1. ロ紙電気泳動

Fig. 4 (A) に示すように 6×6 cm のたれの部分のついた 30×48 cm の大きさの T 字形ロ紙 (Toyo filter paper, No. 51) 2 枚 (A, A') をガラス板 (B) 上におき, Michl の揮発性緩衝液 (pyridine : 氷酢酸 : 水 = 10 : 0.4 : 90 (v/v/v), pH 6.5)¹⁶⁾ でひたす. 過剰の液は注意深くロ紙で吸い取って除く. Trypsin 加水分解物を 0.02 ml の同上緩衝液に溶解後, 点 P および P' におき他のガラス板 (B') でもって Fig. 4 (B) に示すようにロ紙をはさみ込み, たれの部分を緩衝槽 (C, C') にひたす. その後, 緩衝槽に揮発性緩衝液を入れる.

電気泳動は 50 mA にて 80~120 分間室温にて行なう. この間の電圧変化は 2400~1000 volt であった. 電気泳動後, ロ紙を空気の流通の良い所につるして完全に乾燥させ, たれの部分を切りはなす.

2. ロ紙クロマトグラフィー

電気泳動後の乾燥したロ紙につき電気泳動方向とは垂直に上行性クロマトグラフィーを行なう. なお, 当該クロマトグラフィーは展開中なるべく温度変化のないように留意して教室で設計したステンレス製キャビネット ($40 \times 60 \times 60$ cm) を用いて行なった. 展開は溶媒上の空間に約 2 時間ロ紙をつるして飽和した後, 15~17 時間行なった. なお, 溶媒としては次の三種類を試みた.

- (a) n-butanol : 氷酢酸 : 水 = 3 : 1 : 1 (v/v/v) (Ingram¹⁾)
- (b) pyridine : isoamyl alcohol : 水 = 35 : 35 : 30 (v/v/v) (Baglioni¹⁷⁾)
- (c) n-butanol : 氷酢酸 : 水 : pyridine = 15 : 3 : 12 : 10 (v/v/v/v) (Walley & Watson¹⁸⁾ ; Balani & Barnabas¹⁹⁾)

クロマトグラフィー終了後, ロ紙を再び室温にて空気の流通の良い所で乾燥させる.

M. Peptide ならびに特殊アミノ酸染色反応

各 trypsin 消化 peptide についての特殊染色反応は peptide の同定, 比較の意味において非常に有益な手段である. 以下列挙してみると,

1. Peptide ならびにアミノ酸染色反応—Ninhydrin 反応 (Müller²⁰⁾)

暗所にて ninhydrin 試薬を噴霧し, 4~6 時間後発現した紫色の斑点を写真にとり, トレースしておく.

2. Arginine 染色反応—Sakaguchi 反応 (Acher & Crocker²¹⁾)

Arginine 含有 peptide では薄桃色の背景に赤色斑点を形成するがこの色は数時間でうすれてゆく.

3. Histidine 染色反応

(a) スルファニール酸試薬 (Pauly 試薬) (Baldrige & Lewis²²⁾)

Histidine 含有 peptide は黄色背景下に赤色斑点を形成しその色は半永久的である.

(b) アニシジン試薬 (Sanger & Tuppy²³⁾)

薄茶色の背景に赤色の斑点を形成する.

4. Tyrosine 染色反応 (Acher & Crocker²¹⁾)

緑色の背景に赤色斑点を形成するが数 10 秒内に褪色するのですぐにトレースする. なお, tryptophan も灰褐色の斑点を形成する.

5. Tryptophan 染色反応 (Ehrlich 試薬) (Smith²⁴⁾)

試薬噴霧後空気中で乾燥させると数分後に紫色斑点が出現する.

6. 含硫アミノ酸染色反応 (Toennies & Kolb²⁵⁾)

Cysteine, aminoethylated cysteine および methionine の特殊染色反応であって桃色の背景のもとに白くぬけた斑点を形成する.

7. 重複特殊染色反応 (Jepson & Smith²⁶⁾ ; Easley²⁷⁾)

ある種の特殊アミノ酸または peptide の染色後, 他種の特殊アミノ酸染色反応が可能な場合がある. Ninhydrin 反応後, IN HCl とアセトンの 1 : 4 (v/v) 混合溶液を噴霧することにより ninhydrin 陽性斑は脱色され, その後 histidine,

tyrosine または tryptophan 染色が可能である。含硫アミノ酸発色後には tyrosine または arginine 染色が直接可能である。これらは各斑点の同定には非常に有益な手段であるが、ある場合には幾分発色の程度が弱いことに留意する必要がある。

Ⅲ. 実験結果

A. 各種 Hb およびサブユニットの単離

Hb F, Hb A₂, α^A , β^A および γ^F の単離についてはすでに記載されているので (Enoki & Maeda⁷⁾; 三田⁸⁾; Bucci & Fronticelli⁹⁾), ここでは δ^{A_2} 鎖の単離について述べる。

δ^{A_2} 鎖の単離は Bucci & Fronticelli の方法⁹⁾を少し改変して行なった。Fig. 2 に示すように 2 個の主な peak が出現した。 δ^{A_2} 鎖は pH 6.6 附近で溶出され β^A 鎖に比べるとより高い pH で溶出されてくる。ついで α^A 鎖が pH 7.5 附近で溶出され、この pH 値は Bucci & Fronticelli 法⁹⁾による α^A 鎖溶出の pH 値と非常によく一致している。なお未解裂の Hb A₂ は Hb A₁ の場合とは異なり、 α^A 鎖が溶出された後尾をひくように pH 7.7 附近で溶出された。

B. 澱粉ゲル電気泳動による各種 Hb ならびにサブユニットの比較

Poulik の不連続緩衝液系¹¹⁾を用い Smithies の方法¹²⁾で各種 Hb ならびにサブユニットの澱粉ゲル電気泳動を行なった結果を Fig. 5 (A)

に示す。

各 Hb についてみると、Hb A₁ が最も早く陽極側に移動し、わずかな差でもって Hb F がこれにつぐ。Tris-EDTA-borate 緩衝液 (pH 8.6) (Gammack et al.²⁸⁾) を使用すると両者間の差はさらに明瞭となる。Hb A₂ は最も緩徐に陽極側に移動する。

各サブユニットを比較すると、 γ^F 鎖が最も早く陽極側に移動し、 β^A 鎖がこれにつぐが両者間の差はわずかである。この場合にも Tris-EDTA-borate 緩衝液 (pH 8.6) (Gammack et al.²⁸⁾) を使用すれば、移動度の差はさらに明瞭となる。最も緩徐に移動するのは α^A 鎖であり、 δ^{A_2} 鎖は β^A 鎖と α^A 鎖との中間的な移動度を示す。

また、蟻酸緩衝液 (pH 1.9, I=0.05) (Müller²⁰⁾) を使用して電気泳動を行なった結果は Fig. 5 (B) に示すごとく、 γ^F 鎖が最も早く陰極側に移動し δ^{A_2} 鎖はわずかな差ではあるが幾分遅れて移動する。今回の電気泳動ではゲル作製用の緩衝液と緩衝槽に入れる緩衝液とは同一組成のものを使用した。Müller²⁰⁾は緩衝槽に入れる緩衝液の濃度をゲル用のものの 2 倍とし比較的良好的な分離を示している。Müller²⁰⁾と同様の緩衝液組成で泳動を試み確かに α 鎖と非 α 鎖の良好な分離をみたが、やはり γ^F 鎖は δ^{A_2} 鎖よりもわずかに早く陰極側に移動し、この点については Müller²⁰⁾の結果とは一致しなかった。なお β^A 鎖は 3 種の非 α 鎖の中で最も緩徐な移動度を示す。 α^A 鎖はこれよりもさらに緩徐な移動度を示し、かつ従来の報告 (Ingram & Stretton²⁹⁾; Hunt³⁰⁾) にみられるように 3 種の Hb (Hb A₁, Hb F および Hb A₂) に共通したものであった。

C. Trypsin による消化経過

Fig. 6 は Hb A₁ の消化経過を示すもので、消化開始後 2 時間ではほぼ完全に消化され終ることがわかる。図から、Hb 1 モル (M. W.=33,000) 当り消費された NaOH のモル数は

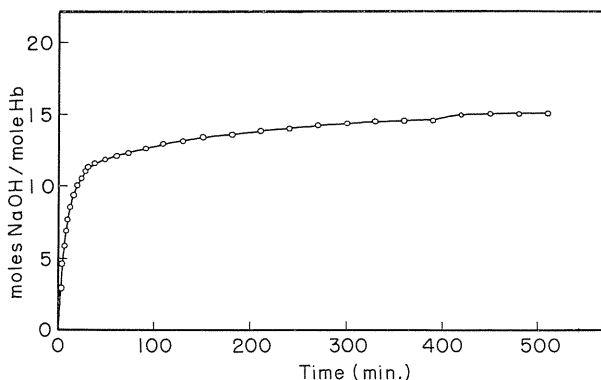


Fig. 6. Time course of the tryptic digestion of human adult hemoglobin.

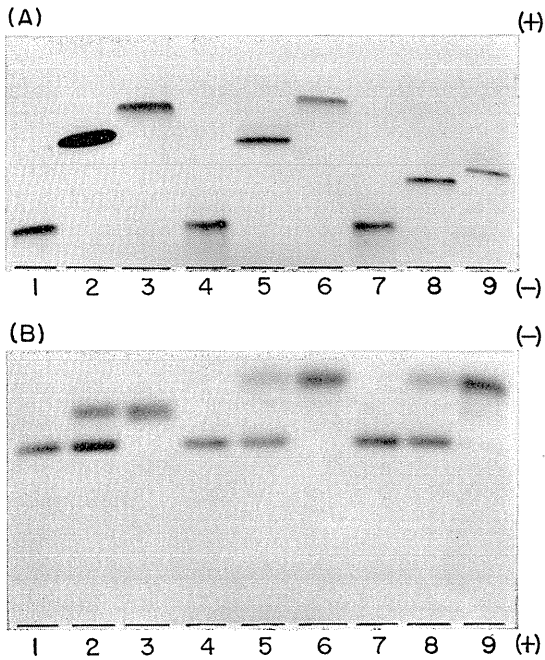


Fig. 5. Starch gel electrophoresis of hemoglobins and their subunits. Run in the Tris-citrate-borate discontinuous buffer system (A), and in the formate buffer system (B). Stained with Amido Black 10 B. 1; α chain, 2; Hb A₁, 3; β^A chain, 4; α chain, 5; Hb F, 6; γ^F chain, 7; α chain, 8; Hb A₂, 9; δ^{A_2} chain.

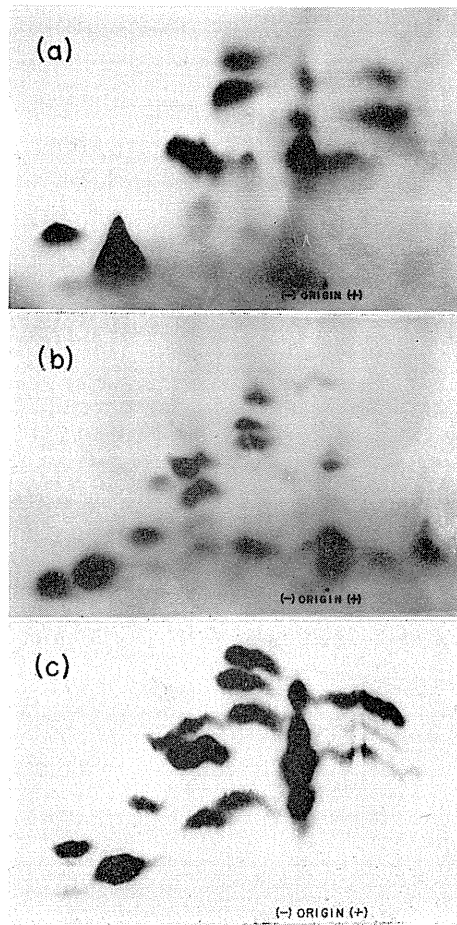


Fig. 7. Comparison of various chromatographic solvents in "fingerprinting" of Hb A. Electrophoresis was in pyridine-acetic acid-water (10 : 0.4 : 90, by vol.), pH 6.5, at 50 mA for 120 min. Ascending chromatography was carried out overnight in (a) n-butanol-acetic acid-water (3 : 1 : 1, by vol.), (b) pyridine-isoamyl alcohol-water (35 : 35 : 30, by vol.), (c) n-butanol-acetic acid-water-pyridine (15 : 3 : 12 : 10, by vol.).

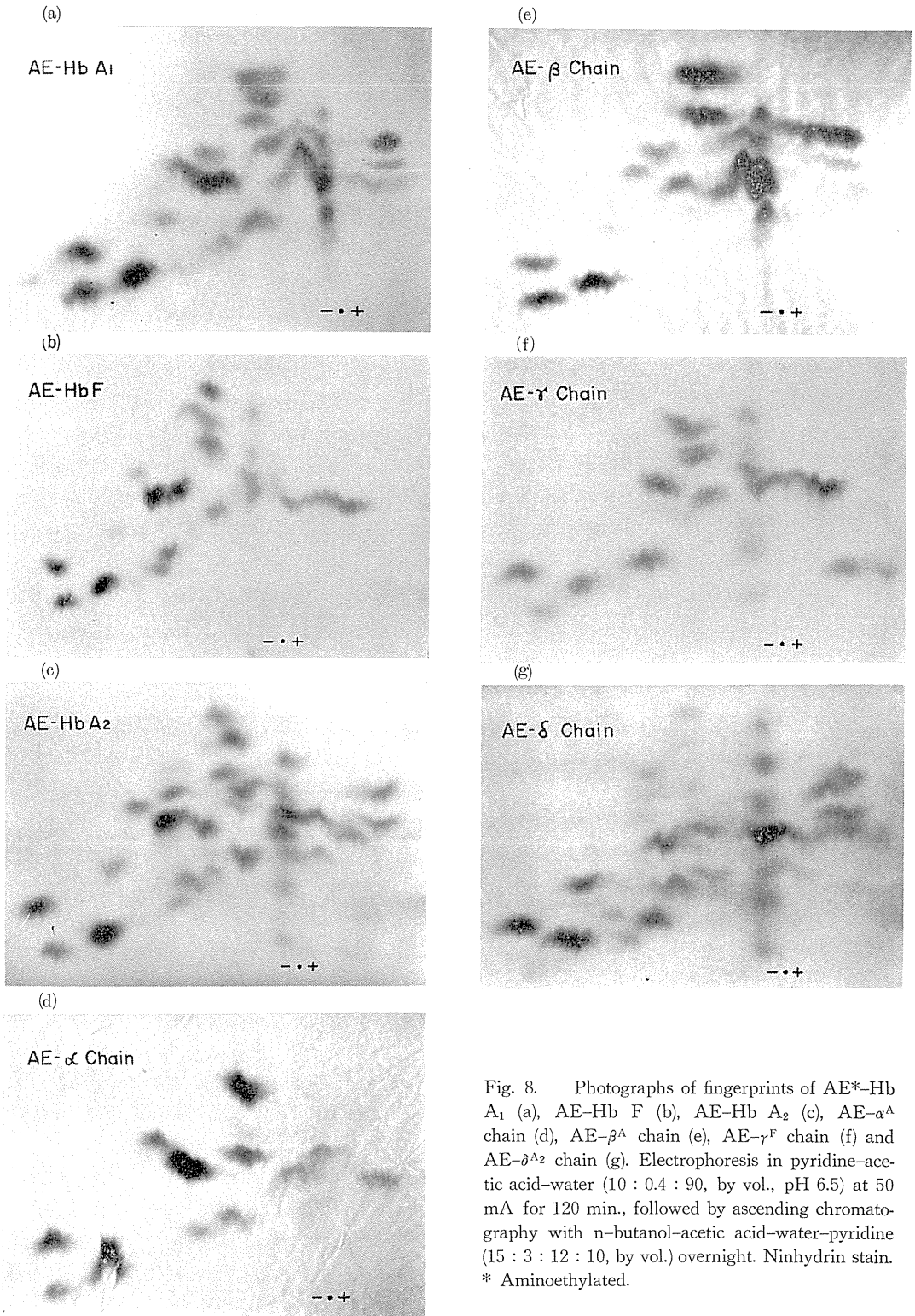


Fig. 8. Photographs of fingerprints of AE*-Hb A₁ (a), AE-Hb F (b), AE-Hb A₂ (c), AE- α^A chain (d), AE- β^A chain (e), AE- γ^F chain (f) and AE- δ^{A_2} chain (g). Electrophoresis in pyridine-acetic acid-water (10 : 0.4 : 90, by vol., pH 6.5) at 50 mA for 120 min., followed by ascending chromatography with n-butanol-acetic acid-water-pyridine (15 : 3 : 12 : 10, by vol.) overnight. Ninhydrin stain. * Aminoethylated.

約15であり, Ingram¹⁾の15~16という値と非常によく一致している。

なお, アミノエチル化 Hb (AE-Hb) の消化過程は図に示していないが, アルカリ消費がかなり増していることが確認された。これは lysine および arginine の C 末端部分の他にいわゆる core の中に存在する cysteine が AE 化された結果できる AE-cysteine の C 末端部分も, trypsin 感受性を帯びるためである (Raftery & Cole³¹⁾)。さらに AE 化により上記以外でも trypsin 感受性の昂進する部位のあること (Jones⁵⁾) もその原因と考えられる。

D. 各種クロマトグラフィー溶媒の比較

Fig. 7 (a), (b), (c) はそれぞれクロマトグラフィー溶媒として n-butanol-酢酸-水 (BAW) (Ingram¹⁾), pyridine-isoamyl alcohol-水 (PIW) (Baglioni¹⁷⁾), n-butanol-酢酸-水-pyridine (BAWP) (Walley & Watson¹⁸⁾; Balani & Barnabas¹⁹⁾) を使用し, Hb A₁ について fingerprint を作製したものである。

BAW 系においてはいずれの斑点にも tailing が著明にみられ, 特に中性 peptide 群のように重複してくるような部位においては, 個々の peptide 斑を判別し難く分離良好とはいえない。

PIW 系においては tailing は改善されている。ただ, 塩基性 peptide 群においては良好な分離がみられるが, 酸性ならびに中性 peptide 群における分離は良好といえない。また, 溶媒をその都度取り換えなければ再現性は非常に悪くなる。ところが BAWP 系においては, tailing もなく, peptide pattern 全体に良好な分離ならびに再現性を示した。以後, BAWP 系溶媒を使用することにより, 各種 Hb およびサブユニットの fingerprint を比較した。

E. 各種 Hb ならびにサブユニットの fingerprint による比較

1. Hb A₁ における α^A 鎖ならびに β^A 鎖

Hb A₁ の fingerprint における各 peptide 斑の同定はすでに完成されている (Baglioni¹⁷⁾) が, AE 化されたものについてはまだその報告

をみない。

Fig. 8 (a), (d), (e) および Fig. 9 (a), (d), (e) はそれぞれ AE-Hb A₁, AE- α^A 鎖, AE- β^A 鎖の fingerprint ならびに特殊染色反応の結果を示したものである。AE- α^A 鎖の fingerprint と AE- β^A 鎖の fingerprint を重ねあわせることにより AE-Hb A₁ の fingerprint と全く区別し難い pattern がえられることは図から明らかである。また Hb A₁ を構成する 2 種のサブユニットを単離したことによって AE-Hb A₁ の pattern で重複していた peptide 斑が明らかに分離されていることもわかった。可溶性 peptide に由来する peptide 斑については, その位置ならびに特殊染色反応の結果から従来報告されているもの (Ingram¹⁾; Baglioni¹⁷⁾) と対応させることにより容易に同定できた。その結果は図に示すように α^A 鎖ならびに β^A 鎖の N 末端より順次番号を附して示した。AE 化することにより出現するいわゆる core 部分の peptide 斑については, 任意に番号を附し特殊染色反応の結果およびその位置から同定を試みた。

α^A 鎖に関しては, AE 化したものとしないうものとの間にはほとんど差違がみられなかった。ただ, 前者では spot 1 が不明瞭ながらみられるが, 後者ではみられなかった。しかし正味荷電 (net charge) および特殊アミノ酸染色の結果から spot 1 は α T-13 に相当するものと考えられる。Spot 2 は両者共にみられ, α T-11 に相当するものと考えられ, 正味荷電から推測してもほぼ一致する。ただ, α T-11 も α T-13 も特殊アミノ酸がみられないため他の spot に重複して存在することも考慮しなければならない。もしそうであれば, spot 1, 2 は人工産物であるとも考えられる。Spot 3 に関しては β T-3 と非常によく似た位置に出現するが, arginine が存在せず人工産物と考えられる。また, core 部分の AE-cysteine の C 末端部分の解裂により出現すべき α T-12a および α T-12b (Jones⁵⁾) に相当する spot もみられなかった。 α T-12a は histidine および含硫アミノ酸を含み, α T-12b は histidine を含んでいるためこ

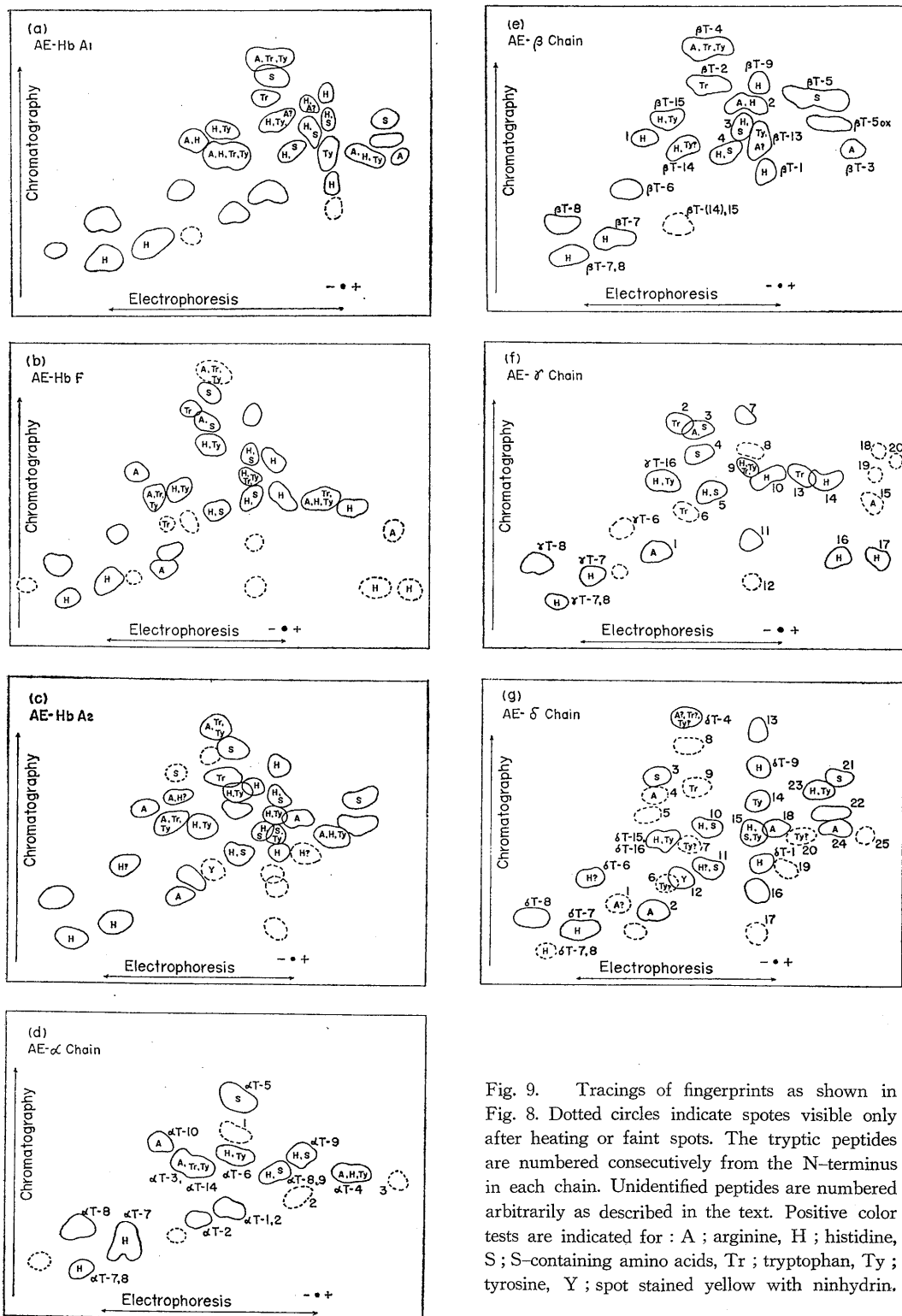
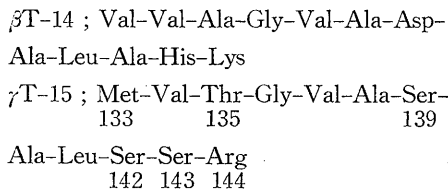


Fig. 9. Tracings of fingerprints as shown in Fig. 8. Dotted circles indicate spots visible only after heating or faint spots. The tryptic peptides are numbered consecutively from the N-terminus in each chain. Unidentified peptides are numbered arbitrarily as described in the text. Positive color tests are indicated for : A ; arginine, H ; histidine, S ; S-containing amino acids, Tr ; tryptophan, Ty ; tyrosine, Y ; spot stained yellow with ninhydrin.

が他の部分に生ずるはずである。γT-4 a の組成をみると特殊アミノ酸として tyrosine および tryptophan を含み、かつ荷電を有したアミノ酸はみられない。したがって中性 peptide と考えられるから spot 9 に重複していると同定するのが最も妥当である。γT-4 b については spot 1 が最も妥当な対応と考えられる。消失した γT-4 の位置が spot 1 と spot 9 の中間的な位置をしめているのも興味深い。

Spot 2 は再現性良好な spot の一つであり、βT-2 と非常によく似た位置に出現する。アミノ酸配列を γT-2 と比較すると4カ所のアミノ酸残基に相違がみられるが、これらのいずれもが中性および非特殊アミノ酸であることから γT-2 に対応すると考えてよい。Spot 3 は非 AE 化 γ^F 鎖にも出現する peptide であり、含硫アミノ酸は methionine であることを示す。γ^F 鎖由来の peptide で arginine と methionine を含んだ peptide は γT-15 以外にはみられない。これに相当する β^A 鎖のアミノ酸配列と対応させると、



となり histidine の欠除していること、および 139 番目の荷電アミノ酸の変化をも考慮するとよく一致している。

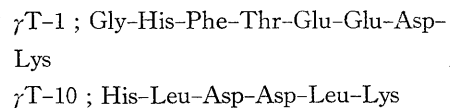
Spot 4 は AE-Hb F の fingerprint 上には全くみられないが、AE 化ならびに非 AE 化 γ^F 鎖 fingerprint に共にみられることから含硫アミノ酸は methionine と考えられる。βT-5 および βT-5_{ox} (peptide 内の methionine が酸化されたもの) に対応する spot が AE-γ^F 鎖および非 AE-γ^F 鎖の fingerprint にみられないことから γT-5 に対応するものと考えられる。荷電アミノ酸の変化をみると52番目で β^A 鎖の aspartic acid が γ^F 鎖では serine におきかわっている。したがって βT-5 に比しかなり陰極側に存

在することとも一致している。Hb F および AE-Hb F の fingerprint に出現しなかった理由としては、含硫アミノ酸の発色程度の良好でないことおよび αT-6 の spot と重複することがあげられる。γT-5_{ox} に関しては他の peptide に重複していると考えられる。

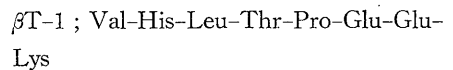
Spot 5 は非 AE-γ^F 鎖にはみられないから、core 部分に由来する peptide と思われ、特殊アミノ酸反応から γT-11 と考えられる。Jones⁵⁾ によると93番目の AE-cysteine の C 末端部分は trypsin により加水分解を受けず 95 番目の lysine の C 末端で解裂を受けるという。

Spot 6 については γ^F 鎖を単離することにより目立ってくるものでアミノ酸配列上対応させるものがない。この他にも spot 7, 8, 11 および 12 に対応できる peptide を追求することは困難であった。ただ中でも比較的明瞭な斑点を形成する spot 7 および 11 に関しては γT-9 または γT-8, 9 が対応するのかも知れない。

Spot 9 は前にも述べたように γT-4 a が重複していると考えられるものでこの他に histidine 含有 peptide を含んでいる。この histidine 含有 spot の他に spot 10, 14, 16 および 17 のいずれもが histidine を含んでおり、非 AE-γ^F 鎖にも出現することからこれらに対応する peptide として、



なる 2 個の peptide が考えられる。ここで参考のため βT-1 peptide のアミノ酸配列をあげると、



であり、その組成から判断すれば γT-1 の方がかなり陽極側に泳動される。γT-10 はその組成より中性附近またはごくわずかに陽極側に泳動されるものと考えられる。さらに spot 9, 16 および 17 の histidine 反応に比して spot 10 および 14 の histidine 反応が著明且つ再現性の良好な点から対応させるとすれば spot 10 は γT-10

に spot 14 は γ T-1 に相当するものと考えられる。他の産物は恐らく人工的なものと考えられる。Spot 18, 19 および 20 も γ^F 鎖を単離することにより軽度に発色されるもので人工産物であろう。

Spot 13 は α^A 鎖に由来する peptide と重複しているもので、 γ^F 鎖を単離することにより明らかとなった。これは γ T-14 に対応すると考えられる。その根拠としては、アミノ酸配列上これに相当する β T-13 での 130 番目の tyrosine が γ T-14 では tryptophan におきかわっていること、および荷電を有するアミノ酸の相違として 125 番目で β^A 鎖の proline が γ^F 鎖で glutamic acid になっていること、すなわちより酸性側に泳動されること、である。

β T-3 と γ T-3 ではアミノ酸配列では 4 カ所に相違がみられるが、組成をみると唯 1 個異なるだけで、且つこれが中性アミノ酸間の相違であることから spot 15 が γ T-3 に対応するものと考えてよい。

以上対応してきた spot の他に、これらの対応からもれた peptide として core 部分に由来する γ T-12 および γ T-13 がある。 γ T-12 に関しては 104 番目のアミノ酸が lysine であるのに対して、これに対応する β T-11 では arginine におきかわっているにすぎない。且つ histidine を含んでいることから恐らく spot 9 に重複しているものと推察される。また γ T-13 も histidine を含み、他に荷電アミノ酸として lysine があるのみであるから、histidine 含有塩基性 peptide 斑のいずれかに重複して存在するものと考えられる。

Hb F および AE-Hb F の fingerprint では、 α^A 鎖に属さない spot が spot 8 のやや陽極側に出現するが、 γ^F 鎖を単離すると全く検出されずその原因は不明である。

3. Hb A₂ と Hb A₁ の比較

AE-Hb A₂ および AE- δ^{A_2} 鎖についての結果を Fig. 8 (c), (g) および Fig. 9 (c), (g) に示す。Hb F の場合と同様に各サブユニットの比較を試みた。 α^A 鎖に関しては Hb A₁ から単

離された α^A 鎖に由来する peptide のすべてが AE-Hb A₂ の fingerprint 上に明らかに出現している。

アミノ酸配列を参考にし β^A 鎖と全く同一であるために同定が容易であったものは δ T-1, δ T-4, δ T-6, δ T-7, δ T-7, 8, δ T-8, δ T-9, δ T-15 および δ T-16 であった。これらの peptide の中で δ T-6 には histidine は含まれないが、spot には histidine 反応は弱陽性であった。また δ T-15 および δ T-16 が 1 個の比較的大きな spot となっているのは分離不良のためと考えられる。また、Jones⁵⁾ によれば両 peptide 間の消化が不完全で δ T-15, 16 なる peptide も形成されるという。

AE- δ^{A_2} 鎖の fingerprint は AE- β^A 鎖に比較すると非常に複雑である。この原因として、構造の相違による複雑さは勿論考えられるが、それ以外に δ^{A_2} 鎖を単離した際にその収量がわずかであったため 1 枚の fingerprint を作製するのに比較的多量の稀薄な trypsin 消化産物溶液を濃縮したこと、trypsin による消化が不完全かまたは trypsin に対する感受性の低い peptide 結合が多数存在するためか起因する重複 peptide の出現、などが考えられる。このため同定し難い peptide 斑が多数みられた。これに属するものとしては spot 1, 3, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 23, 24 および 25 である。しかしこれらの中にはアミノ酸分析さえすれば同定可能なものも多数あるかも知れないが、ただ人工産物として出現したものも考えられる。

Spot 2 は AE- γ^F 鎖の場合にも全く同じ位置に出現したもので恐らく δ T-4 の解裂産物であろう。Spot 4 も spot 2 と同様 arginine を含んでいるが、非 AE 化 δ^{A_2} 鎖の fingerprint には検出し難いことから、core 部分に由来する δ T-12b と考えられる。しかし、この斑点は非常に薄いため人工産物にすぎないという懸念もある。この場合には δ T-12b が spot 2 に重複している可能性もある。

Spot 9 は稀薄な斑点ではあるが明らかに tryptophan を含んでおり、 β T-2 とよく似てい

るがそのクロマト移動度はかなり低い。この位置は Ingram & Stretton³²⁾ が示したように、明らかに $\delta T-2$ に相当するもので彼らの結果とよく一致している。

Spot 10 および 11 は AE 化により出現した斑点であり、その組成からこのいずれかが $\delta T-10$ に相当するものと思われる。しかし AE-Hb F の fingerprint には、spot 10 に相当する位置には core 部分に由来する特殊アミノ酸陰性の斑点があるにすぎない。したがって spot 11 が本来 $\delta T-10$ の位置であり、spot 10 は $\delta T-10$ が何らかの化学的修飾を受けて出現したものか、または同定されない別の peptide に由来するものである。

Spot 12 は Hb A₂ に固有の斑点であり、他の斑点とは異なり黄色を呈するもので、Ingram & Stretton³²⁾ が peptide A₂a と命名しているものである。アミノ酸配列の点から Hb A₂ に固有で且つ特殊アミノ酸陰性の peptide としては $\delta T-13$ 以外にはみられない。しかし、Jones⁵⁾ によるとこれは core 部分に由来する peptide であり、且つ $\delta T-13$ 単独の peptide は形成されずに $\delta T-12$ b, 13 なる重複 peptide の形をとるといふ。一方、Ingram & Stretton⁴⁾ ならびに Hill & Kraus³³⁾ は可溶性 peptide より $\delta T-13$ を単離している。今回の結果では、spot 12 は非 AE 化 δA_2 鎖の fingerprint にもみられるので、後者の説をとるのが妥当と思われる。

$\delta T-11$ は $\beta T-11$ と全く同じアミノ酸配列を有するが、AE- δA_2 鎖の fingerprint には全くみられない。しかし AE-Hb A₂ の fingerprint 上には $\alpha T-6$ と $\alpha T-9$ の中間位に core 部分由来の斑点としてみられる。ただ当該 peptide には arginine が含まれているはずであるが、検出できなかった。

Spot 15 は非常に濃く染色された spot の一つで、特に tyrosine は濃く染色された。AE-Hb A₂ の fingerprint では明らかに 2 個の spot となっているが、その一方には $\alpha T-8, 9$ を含み且つこれに重複して βA 鎖の対応部分と全く同じアミノ酸配列を有する $\delta T-12$ a が存在する

ものと思われる。他の含硫アミノ酸および tyrosine を含んだ peptide に対応するものとしては $\delta T-14$ がある。 $\delta T-14$ は $\beta T-13$ に対応する peptide であり、 $\beta T-13$ に比しクロマト移動度の低いこと、可溶性 peptide に属したがって含硫アミノ酸が methionine であることの点で Ingram & Stretton³²⁾ の結果とよく一致している。

Hb A₂ の特長を示す spot の代表的なものが spot 18 である。これは Ingram & Stretton³²⁾ が示したように $\beta T-3$ の位置に出現すべき spot が δA_2 鎖では glutamic acid から alanine への置換のためにより中性側の位置に出現したものであり、 $\delta T-3$ と同定することができる。Spot 21 および 22 に相当する位置には βA 鎖では $\beta T-5$ および $\beta T-5_{ox}$ が存在し、その位置ならびに特殊アミノ酸反応の点でよく一致することから、 $\delta T-5$ および $\delta T-5_{ox}$ と考えられる。 δA_2 鎖のこれらの spot は、 βA 鎖に比してクロマト移動度が低いという Ingram & Stretton³²⁾ の説もあるが、今回の結果では AE- δA_2 鎖の fingerprint でも AE-Hb A₂ の fingerprint でも有意の差はみられなかった。

IV. 考 察

A. いわゆる core 部分の構造比較手技

Hb の trypsin 消化に際し、Hb のある部分は加水分解の結果可溶性となるが、ある部分は不溶性となり沈澱することを Hunt & Ingram³⁴⁾ が Hb A において見だし、この部分を trypsin-resistant core と呼んだ。その後、Hb F (Schroeder et al.³⁾) にも Hb A₂ (Ingram & Stretton³²⁾) にも同様の部分のあることが明らかにされた。従来このような core 部分の構造研究には

1. Trypsin-resistant core を分離し、これを chymotrypsin で消化する方法 (Hunt & Ingram³⁴⁾)

2. Core の cysteine 残基を酸化または carboxymethyl 化し、これをもう 1 度酵素で加水分解する方法 (Schroeder et al.³⁾; Guidotti

et al.³⁵⁾

の如き手段がとられてきた。しかしこのような操作はいずれも、最初 trypsin で加水分解した後さらに化学的ならびに酵素的段階をふまねばならない。これらの点を簡潔化するため最近次のような2種類の手段が使用されるようになった。これらはいずれもが core 形成の原因となる S-S 結合の還元と SH 基の被覆にある。

1. 尿素溶液中で mercaptoethanol により還元し、次いで iodoacetate を作用させ S-carboxymethyl 化蛋白を作る方法 (Crestfield et al.³⁶⁾)

2. 尿素溶液中で mercaptoethanol により還元し、次いで bromoethylamine または ethy-

leneimine を作用させて S-aminoethyl 化蛋白を作る方法 (Raftery & Cole³¹⁾)

Jones⁵⁾は両者の利点を取り入れヒトの正常ならびに異常 Hb の構造研究に応用した。現在では異常 Hb, 特に core 部分に異常のある Hb, の研究 (Clegg et al.³⁷⁾), 免疫グロブリンの構造研究 (Baglioni et al.³⁸⁾), TMV 蛋白の構造研

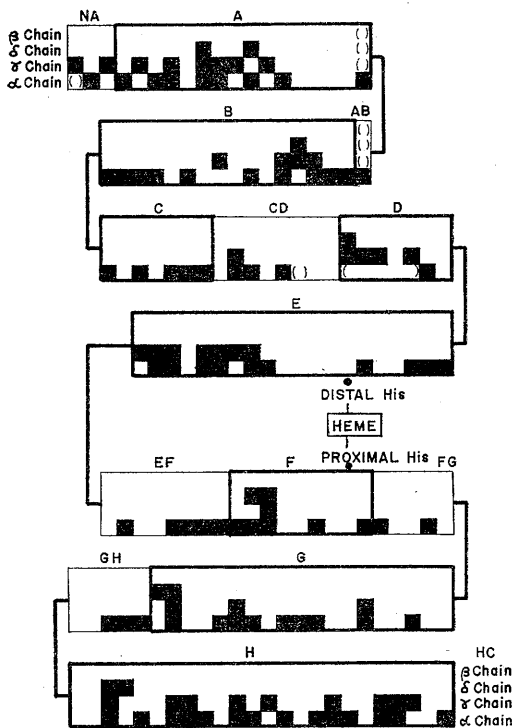


Fig. 10. Comparison of the primary structure of normal subunit chains of human hemoglobins. Amino acid sequence of α chain is matched with those of non- α chains according to Perutz⁴¹⁾. □; Non-helical region, ▣; helical region, ■; region different from that in β chain, (); region which has no residue corresponding to those in another chain.

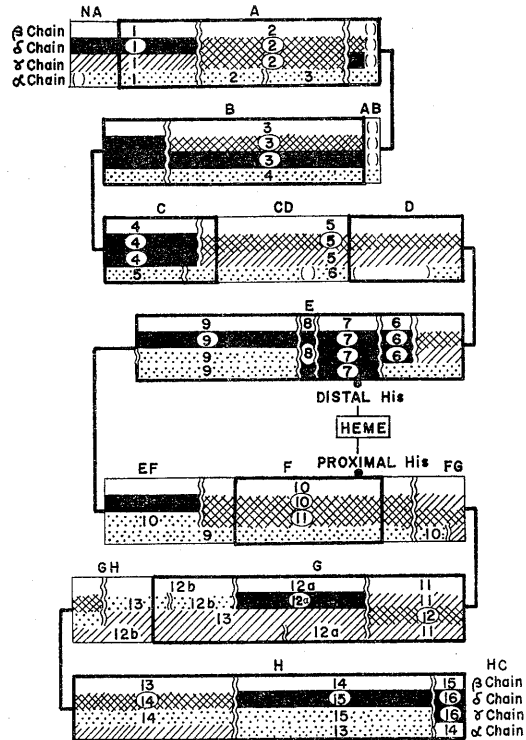


Fig. 11. Comparison of tryptic peptide maps of aminoethylated normal subunit chains of human hemoglobins. Scale is the same as in Fig. 10. Comparison based upon the three criteria: (1) electrophoretic behavior, (2) chromatographic behavior and (3) specific amino acid staining, of each tryptic peptide. □, ▣, (); of Fig. 10, ▨; peptide bond cleaved by trypsin, ■; peptide behaving identically to that of β chain by all the three criteria, ▩; peptide behaving similarly to that of β chain by two of the three criteria, ▪; peptide behaving similarly to that of β chain only by one of the three criteria, ▫; peptide entirely different from that of β chain by all the three criteria, ▬; peptide behaving similarly to that of β chain only by one of the three criteria, ▭; peptide entirely different from that of β chain by all the three criteria. Figures inserted show the serial number of tryptic peptide from N-terminus. 12 a, b represents an additional cleavage at aminoethylated cysteinyl residue.

究 (Tsung & Fraenkel-Conrat³⁹), などにも応用され有益な情報がえられている。

今回の研究においても当操作を用い core 部分の構造比較に役立てた。AE 化に際してはより効果的な ethyleneimine を使用した。AE 化操作中に cysteine の他に peptide の α -アミノ基ならびに lysine の ϵ -アミノ基が影響を受けないことは Raftery & Cole⁴⁰ によりすでに報告されている。

B. Trypsin による加水分解

理在では trypsin による加水分解法には二通りの方法がある。その一つは pH-stat を使用する方法で最も一般的なものであり、他は NH_4HCO_3 - $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 緩衝液内で消化を行なう方法である。

pH-stat を使用する消化方法では長時間にわたる消化の場合、electrode plug より消化混合物中に KCl がもれでてくるため消化物を乾燥しても除去できず、fingerprinting を行なった場合、電気泳動方向に著明な tailing をきたすおそれがある。特に稀薄な試料を消化に使用した場合に顕著となり、微量の試料には使用し難い。たとえ使用できたとしても消化後脱塩操作をほどこす必要がある。したがって脱塩操作なしでは、試料濃度は少なくとも 1% なくては pH-stat を使用できないものと考えられる。

一方、0.2 M NH_4HCO_3 溶液を使用する場合には消化混合物を真空乾燥すれば、 NH_4HCO_3 は NH_3 および CO_2 の形で完全に除去されてしまうので塩類の混入による fingerprint 上での tailing を全く避けることができる。特に極く微量の試料を消化する場合には非常に有益な手段である。

消化時間に関しては Fig. 6 からわかるように約 2 時間でほぼ完全に消化されているが、引き続き消化しアルカリ消費がなくなるまで行なった。今回使用した trypsin では痕跡程度の chymotrypsin の汚染も考慮し、4~6 時間程度でとどめた。

C. Hb A₁, Hb F および Hb A₂ の比較 Hb A₁, Hb F および Hb A₂ を構成する各

サブユニットのアミノ酸配列はすでに解明されている。Fig. 10 は β^A 鎖のアミノ酸残基と他のサブユニットのアミノ酸残基との類似性および相違性を示したもので、各アミノ酸残基の対応は Perutz⁴¹ のものにしたがった。一方今回の実験により fingerprint 上でみられた類似性および相違性を Fig. 11 に示す。したがって Fig. 10 はアミノ酸単位での比較であるのに対し、Fig. 11 は peptide 単位での比較である。

両図を比較しても明らかのようにアミノ酸配列に多数の相違のみられる peptide は fingerprint 上においても相違は著しく、アミノ酸配列の類似したものでは fingerprint でも類似した斑点を形成する。ただ、アミノ酸配列が非常によく似ていてもその中に lysine, arginine および cysteine のいずれかであるために 2 個の peptide となった場合には fingerprint 上では一見著しい相違を示すようになる。この点を注意すれば、fingerprint 法は蛋白質の 1 次構造の概略を比較する上で非常に有益な手段であることがよくわかる。

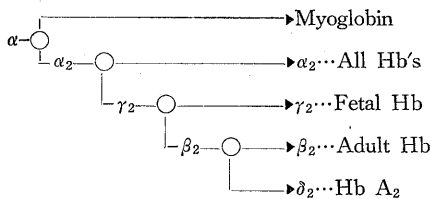
β^A 鎖をもとに他のサブユニットを比較すると (Fig. 11), 著明な類似性を示す部位はいわゆる basic center と呼ばれる distal histidine (α 鎖では No. 58, 非 α 鎖では No. 63) の周辺である。他方 proximal histidine (α 鎖では No. 87, 非 α 鎖では No. 92) の周辺も他の peptide の部分に比較すればその類似性は著しい。すなわちヘム近傍のアミノ酸配列は他の部分のアミノ酸配列よりも著しい類似性を示す。Ingram⁴² は現在の α , β , γ および δ 鎖は約 6 億年前に原始的なミオグロビン様前駆体から突然変異と自然淘汰および遺伝子の重複と転位により進化してきたものであるという。ヘム近傍のアミノ酸配列、殊に basic center と呼ばれる部分、は長期間にわたり突然変異および自然淘汰から被覆されてきたものと考えられる。したがって Hb の機能を維持する上では非常に重要な部位であると思われる。

ヘム近傍のアミノ酸配列の類似性について、比較的著明な類似性を示す部位は一部ヘム近傍

の配列を含んだいわゆる core 部分の peptide である。ただ今回行なった fingerprint 法では、AE-cysteine の C 末端で切断される部位とそうでない部位があるために、アミノ酸配列が同じであっても異った斑点を形成しているものあることに留意しなければならない。

さらに一般的に言えることは、短い peptide ほどその類似性が大であり、長い peptide ほどかなりの差異があらわれるということである。また、 β^A 鎖に対する類似性は δ^{A2} 鎖が最も大で鎖が最も小さい。この点についてはアミノ酸配列ともよく一致している。

Ingram⁴²⁾ は Hb の各サブユニットの進化を次のような模式図で示した。この模式図を示すにあたって 3 項目よりなる仮説をたてた。



1. 遺伝子の突然変異の結果、peptide 鎖に 1 個または多数のアミノ酸置換が起り新しい peptide が生み出される。

2. 遺伝子の重複およびそれと同時に起る転位により別個の遺伝子が形成される。

3. α 鎖は他のサブユニットと適合する必要があるため突然変異によって影響を受けることは少ない (“conservative”).

これらの仮説をもとにした Ingram⁴²⁾ の所説によれば、ミオグロビン様前駆体 (原始 α 鎖) から遺伝子の重複と同時に起る転位により、1 個はミオグロビン遺伝子となり、他の 1 個は現在の Hb の α 鎖遺伝子となる。 α 鎖遺伝子は独立して進化するうちにふたたび遺伝子の重複、転位を起し γ 鎖遺伝子を新しく生みだす。以下同様に β 鎖および δ 鎖遺伝子が生みだされる。さらに各鎖遺伝子は進化の間に 2 量体を形成する能力を帯び、やがて非 α 鎖遺伝子は α 鎖遺伝子と共に 4 量体を形成する能力を帯びてくる。

Fingerprint 上にこれらの進化の跡をたどってみると、4 種のポリペプチド鎖を比較した場合、最も単純なパターンを呈しているのは明らかに α 鎖 (Fig. 8, 9) である。4 種のポリペプチド鎖の中で、 α 鎖が最も早く他のポリペプチド鎖から枝分れし、保守的 (“conservative”) で突然変異があまり起っていないという Ingram⁴²⁾ の所説が正しければ、この α 鎖の fingerprintこそ最も原始的な Hb のそれに近いものと考えられる。他の 3 種のポリペプチド鎖を fingerprint の単純さからみると、 γ 鎖が α 鎖に次ぎ、 β 鎖 δ 鎖の順になる。この点についても Ingram⁴²⁾ の提唱した各ポリペプチド鎖進化の順序とよく一致しているのが面白い。

V. 総 括

Fingerprint 法実施に際しての基本的な諸条件について検討を加えた。正常ヒト Hb (Hb A₁, Hb F, Hb A₂) およびそれらを構成するサブユニットを単離し、当該法により構造上の類似性および相違性を比較検討した。

1. アミノ酸配列の類似性と fingerprint の類似性はよく対応し、蛋白質の構造を比較するにあたり fingerprint 法は有益な手段であることがわかった。

2. Hb A₁ から単離された α 鎖の fingerprint 上の斑点のすべてが Hb F および Hb A₂ の fingerprint 上に観察された。

3. 各サブユニットの basic center と呼ばれる部分には構造上の著明な類似性がみられ、core 部分にもかなりの類似性がみられた。Hb の機能を維持する上で、これらの部分は重要な役割を演じているものと推測される。

4. 各サブユニットの中では α^A 鎖が最も単純な fingerprint パターンを呈し、 γ^F 鎖、 β^A 鎖がこれに次ぎ、 δ^{A2} 鎖は最も複雑なパターンを呈する。この順序は Ingram⁴²⁾ がいうように各サブユニットの合成を支配する遺伝子の進化の順序とよく一致し、Hb 分子が進化するにしたがって fingerprint 上のパターンは複雑化すると考えられる。

5. Bucci & Fronticelli 法⁹⁾を少しく改変して, Hb A₂ から δ^{A2} 鎖を分離する方法を開発した。

終りに, 御指導ならびに御校閲いただきました榎泰義教授および富田晋助教授に深く感謝の意を表します。また種々御指導, 御忠告いただきました中馬一郎教授(阪大第1生理学教室)に感謝いたします。

文 献

- 1) Ingram, V. M. (1958) Abnormal human haemoglobin. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by “fingerprinting”. *Biochim. biophys. Acta* **28**, 539-545
- 2) Braunitzer, G., Gehring-Muller, R., Hilschmann, H., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V. and Wittmann-Liebold, B. (1961) Structure of normal adult human hemoglobins. *Z. Physiol. Chem.* **325**, 283-286
- 3) Schroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Cormick, J. and Jones, R. T (1963) The amino acid sequence of the γ chain of human fetal hemoglobin. *Biochemistry* **2**, 992-1008
- 4) Ingram, V. M. and Stretton, A. O. W. (1962) Human haemoglobin A₂ II. The chemistry of some peptides peculiar to haemoglobin A₂. *Biochim. biophys. Acta* **63**, 20-33
- 5) Jones, R. T. (1964) Structural studies of amino-ethylated hemoglobins by automatic peptide chromatography. *Cold Spring Harbour Symp.* **29**, 297-308
- 6) Zade-Oppen, A. M. (1963) Separation of hemoglobin A and F by cation-exchange dextran gels. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **15**, 491-496
- 7) Enoki, Y. and Maeda, N. (1968) Method for isolation of active γ^F subunit from normal foetal haemoglobin. *J. Mol. Biol.* **31**, 613-615
- 8) 三田道雄(1968)ヘモグロビン A₂ に関する研究 I 日本生理誌 **30**, 337
- 9) Bucci, E. and Fronticelli, C. (1965) A new method for the preparation of α and β subunits of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **240**, PC 551-PC 552
- 10) Tyuma, I., Benesch, R. E. and Benesch, R. (1966) The preparation and properties of the isolated α and β subunits of hemoglobin A. *Biochemistry* **5**, 2957-2962
- 11) Poulik, M. D. (1957) Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature* **180**, 1477-1479
- 12) Smithies, O. (1955) Zone electrophoresis in starch-gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* **61**, 629-641
- 13) Müller, C. J. (1960) Separation of the α - and β - chains of globins by means of starch-gel electrophoresis. *Nature* **186**, 643
- 14) Anson, M. L. and Mirsky, A. E. (1930) Protein coagulation and its reversal. The preparation of insoluble globin, soluble globin and heme. *J. Gen. Physiol.* **13**, 469-476
- 15) Katz, A. M., Dreyer, W. J. and Anfinsen, C. B. (1959) Peptide separation by two-dimensional chromatography and electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **234**, 2897-2900
- 16) Michl, H. (1951) Über Papierionophorese bei Spannungsgefällen von 50 Volt/cm.. *Monatsh. Chem.* **82**, 489-493
- 17) Baglioni, C. (1961) An improved method for the fingerprinting of human hemoglobin. *Biochim. biophys. Acta* **48**, 392-396
- 18) Walley, S. G. and Watson, J. (1954) Trypsin-catalysed transpeptidation. *Biochem. J.* **57**, 529-538
- 19) Balani, A. S. and Barnabas, J. (1964) Evaluation of multiple hemoglobins of ruminants by tryptic peptide pattern analysis. *Indian J. Biochem.* **1**, 220-224
- 20) Muller, C. J. (1961) “Molecular evolution. A comparative study on the structure of mammalian and avian hemoglobins”. The Netherlands, Van Gorcum, Assen
- 21) Acher, R. and Crocker, C. (1952) Réactions colorées spécifiques de l'arginine et de la tyrosine réalisées après chromatographie sur papier. *Biochim. biophys. Acta* **9**, 704-705
- 22) Baldrige, R. C. and Lewis, H. B. (1953) Diet and the ergothionine content of blood. *J. Biol. Chem.* **202**, 169-176
- 23) Sanger, F. and Tuppy, H. (1951) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem. J.* **49**, 463-481
- 24) Smith, I. (1953) Color reactions on paper chromatograms by a dipping technique. *Nature* **171**, 43-44
- 25) Toennies, G. and Kolb, J. J. (1951) Techniques and reagents for paper chromatography. *Anal. Chem.* **23**, 823-826
- 26) Jepson, J. B. and Smith, I. (1953) “Multiple dipping” procedures in paperchromatography: A specific test for hydroxy-proline. *Nature* **172**, 1100-1101
- 27) Easley, C. W. (1965) Combinations of specific color reactions useful in the peptide mapping technique. *Biochim. biophys. Acta* **107**, 386-388
- 28) Gammack, D. B., Huehns, E. R., Shooter, E. M. and Gerald, P. S. (1960) Identification of the abnormal polypeptide chain of hemoglobin Grb. *J.*

- Mol. Biol. **2**, 372-378
- 29) Ingram, V. M. and Stretton, A. O. W. (1961) Human haemoglobin A₂: Chemistry, genetics and evolution. *Nature* **190**, 1079-1084
- 30) Hunt, J. A. (1959) Identity of the α -chains of adult and foetal human haemoglobins. *Nature* **183**, 1373-1375
- 31) Raftery, M. A. and Cole, R. D. (1963) Tryptic cleavage at cysteinyl peptide bonds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**, 467-472
- 32) Ingram, V. M. and Stretton, A. O. W. (1962) Human haemoglobin A₂ I. Comparison of haemoglobins A₂ and A. *Biochim. biophys. Acta* **62**, 456-474
- 33) Hill, R. J. and Kraus, A. P. (1963) Studies of the amino acid sequence of A₂. *Fed. Proc.* **22**, 597
- 34) Hunt, J. A. and Ingram, V. M. (1958) Abnormal human haemoglobin. II. The chymotryptic digestion of the trypsin-resistant “core” of haemoglobins A and S. *Biochim. biophys. Acta* **28**, 546-549
- 35) Guidotti, G., Hill, R. J. and Konigsberg, W. (1962) The structure of human hemoglobin. II. The separation and amino acid composition of the tryptic peptides from the α and β chains. *J. Biol. Chem.* **237**, 2184-2195
- 36) Crestfield, A. M., Moore, S. and Stein, W. H. (1963) The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.* **238**, 622-627
- 37) Clegg, J. B. Naughton, M. A. and Weatherall, D. J. (1965) An improved method for the characterization of human haemoglobin mutants: Identification of $\alpha_2\beta_2^{95G^{1u}}$, Haemoglobin N (Baltimore). *Nature* **207**, 945-947
- 38) Baglioni, C., La Via, M. and Venturato, V. (1965) A study of immunoglobulin structure I. The fingerprinting of aminoethylated Bence-Jones proteins. *Biochim. biophys. Acta* **111**, 479-484
- 39) Tsung, C. M. and Fraenkel-Conrat, H. (1966) The preparation and tryptic hydrolysis of S-aminoethylated tobacco mosaic virus protein. *Biochemistry* **5**, 2061-2067
- 40) Raftery, M. A. and Cole, R. D. (1966) On the aminoethylation of proteins. *J. Biol. Chem.* **241**, 3457-3461
- 41) Perutz, M. F. (1965) Structure and function of haemoglobin I. A tentative atomic model of horse oxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* **13**, 646-668
- 42) Ingram, V. M. (1961) Gene evolution and the haemoglobins. *Nature* **189**, 704-708



〔原著〕

ヘモグロビン A₂ に関する研究 612.111.1

I. ヘモグロビン A₂ の物理化学的諸特性

三 田 道 雄 *

Studies on hemoglobin A₂. I. Isolation and some physico-chemical properties

Michio Santa (*The Second Department of Physiology, Nara Medical University*)

Hemoglobin A₂ isolated by using starch block electrophoresis technique have been compared with hemoglobin A₁ in several physico-chemical aspects.

1. Absorption spectrum of A₂ is strictly the same as that of A₁ in both visible and ultraviolet regions.

2. Oxidation kinetics of A₁ and A₂ depend on pH. The oxidation-pH curves of both the hemoglobins are found to have comparable behaviour to the oxygenation-pH (Bohr effect) curve. A₂ has a consistently higher susceptibility to oxidation than A₁ throughout the pH range (pH 5.3~8.1).

3. The alkaline denaturations of A₁ and A₂ show no difference in their carboxy form, but a distinct difference in their oxy form. In oxy form, A₂ appears to have a higher resistance to alkaline denaturation than A₁.

4. Reactive SH groups of A₂ is estimated as 2.3 per mole by Boyer's *p*-Mercuribenzoate titration.

[*J. Physiol. Soc. Japan* (1968) 30, 337-352]

I. ま え お き

同一機能, 同種特性をもつ蛋白質中に, 明らかに一次構造を異にする成分の存在すること, いわゆる蛋白質の不均質性ないし多元性の問題は, 生物学的見地からみて極めて興味深い問題である. ヘモグロビン (Hb) についてもその例外でなく, 動物の種類によって明らかに同一個体で二種以上の成分の存在することが認められる (Gratzer & Allison¹). 正常成人の場合にも大半を占める主成分 Hb A₁ 以外に, 極めて微量ではあるが小成分 Hb A₂ および Hb A₃ の存在することが, ほとんど時を同じくして Kunkel & Wallenius²) によりデンプンブロック電気泳動法で, Morrison & Cook³) によりカラムクロマト法で見出されている. その後両法の改良によって各小成分の単離, 特に Hb A₂ の単離が容易となり, その化学構造が詳細に検索された結果, 主成分 A₁ ($\alpha_2^A \beta_2^A$) の場合と全く

一次構造を同じくする一対の α 鎖と, β 鎖とは 10 個所でアミノ酸残基を異にする一対の δ 鎖から構成される四量体 ($\alpha_2^A \delta_2^{A_2}$) であることが明らかにされた (Ingram & Stretton^{4,5}), Hill & Kraus⁶).

しかしこのようにして A₂ の一次構造が完全に解明されるに至ったものの, このような化学構造上の差異が如何に当該蛋白質の生物学的特性に反映しているかという問題については, まだ断片的な検索がなされているのみである. 特にわれわれ生理学の立場から最も興味ある酸素運搬機能が, 構造上の差異を何らかの形で反映しているか否かの問題については, 従来二, 三の検索がなされているものの, 互に相反する結論がえられている現状である (Eddison et al.⁷), Rossi-Fanelli et al.⁸), Meyering et al.⁹), Huisman et al.¹⁰).

以上の点にかんがみ, 今回は単離 A₂ についてその物理化学的ならびに生理学的諸特性について検討してみた. まず本篇では A₂ の物理化学的諸特性について述べ, 第 II 篇でその酸素平衡機能について述べる.

* 奈良県立医科大学第 2 生理学教室

〔昭和 42 年 12 月 4 日受付〕

II. 実験方法

A. 溶血液の作成

抗凝固剤として二重酢酸塩を加えた正常成人血を, Drabkin¹¹⁾ の方法に準じて 0.9% 生理食塩水で 5 回洗滌-遠沈 (1,500 r. p. m.) を繰り返す. その間適時に CO ガスを通気して, O₂ Hb を CO Hb に完全に交換しておく. 最後に等量の脱イオン水で完全に溶血させた後, 1/2 容量のトルエンを加えてよく振盪混和し, 一夜 4°C 下で放置したのち, 4,000 r. p. m. 15 分間遠沈し, stroma を除去して透明な溶血液をうる. または一夜放置することなく 1 時間後に遠沈, stroma 除去後再びトルエンを添加, 振盪し, 40 分後に遠沈して透明な溶血液をうる. 以上のようにしてえた溶血液を Veronal 緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.05$) に対して 1 時間透析しさらに 15 分間 0°C で高速遠沈 (10,000 r. p. m.) を行なった後, ただちにデンプンブロック電気泳動にかけ, A₂ の単離を行なった. なお溶血液の最終 Hb 濃度は 8% であった.

B. デンプンブロック電気泳動による A₂ の単離

局方のバレイショデンプンを次のような操作で精製する. 1.5 kg のデンプンに 2 l の脱イオン水を加えてよく振盪混和する. 1 時間放置して, 上清およびまだ沈澱しない細かい浮遊粒子をすてる. この操作を 5 回繰り返す, 次に 55°C の温水を 2 l 加えて振盪混和し, 30 分放置して上清をすてる. この操作をさらに 5 回繰り返した後ガラス漏斗に移し, 吸引して充分水分を取り除き, 精製したデンプンをうる. このデンプンに Veronal 緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.05$) を加えてマグネチック・スターラーで 2 時間攪拌し, 再び緩衝液を入れかえて 4°C の低温室に貯えておく.

デンプンブロック電気泳動は下記の如く, Kunkel & Slater¹²⁾ の方法に準じて行なった. 緩衝液と平衡させておいた上記デンプンを約 1/3 容の緩衝液とよく攪拌して均質懸濁液とし, アクリル樹脂製の泳動用トレー (52×42×1 cm) に流し込む. しばらく放置後余分の緩衝

液は口紙で吸い取る. できたデンプンブロックは温度平衡に達するまで 4°C の低温室に放置する.

溶血液の注入には種々な方法が記載されているが (Kunkel & Slater¹²⁾, Bloemendal¹³⁾, Petz & Economidou¹⁴⁾, Masri et al.¹⁵⁾), われわれは以下のようにして最良の結果をうることができた. すなわち, 長さ 2 cm のできるだけ狭いスリットをブロックに作り (各スリット間隔は 2 cm), Mantoux 針をつけたツベルクリン注射器により, スリット 1 個当り 0.3 ml の溶血液を注入した. デンプンブロックは長軸 (長さ 52 cm) 方向に使用し, スリットの位置は陰極端から 9 cm の所に第 1 列目, さらにそれぞれ 12~13 cm の間隔を取って第 2 列目, 第 3 列目を作る. 通常 1 回の実験にブロック 2 個を使用し, Hb 濃度 8% の溶血液 20 ml (Hb 総量 1,600 mg) を添加した.

試料の添加が終ると, ブロックの両端にリンネルの布地をつけ, ブロック全面にビニールシートをかぶせ, 更にビニール板で圧迫, 固定して緩衝液槽に接続する. 緩衝液槽と電極槽の接続は口紙片を重ねたものを使用した. 電極としてはコイル状白金線を電極槽中の 1% KCl 溶液中に挿入して用いた. 緩衝液槽には約 800 ml の Veronal 緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.05$) を入れ, 電極槽中の KCl 液面は緩衝液のそれより少し低くしておいた. 電気泳動はブロックを水平にして行なったが, electro-osmosis が著明な場合には, 陽極側の両液槽の高さを陰極側のそれより約 5 cm 低くすることにより解決することができた. 以上試料添加から泳動全操作は全て低温室 (4°C) 内で行なった.

A₂ の分離は 550~600 V, 50~60 mA で 20~22 時間の通電により完了する. A₂ に相当するゾーンを小さなヘラで取り出し, 小ガラス漏斗にうつし, 注意して吸引しながら最少量の飽和 CO 水 (4°C) で溶出する.

C. 非ヘム蛋白 (non-heme protein) の分離

後述するように, デンプンブロック電気泳動で上記のようにして分離した A₂ には, ほぼそ

れと等量の非ヘム蛋白が混入してくるので、これを除去する必要がある。この目的のために以下述べるようにして、陽イオン交換樹脂 Amberlite XE 64 を使用して A₂ と非ヘム蛋白の段階溶出分離を行なった。樹脂は Hirs et al.¹⁶⁾ の方法にしたがって精製し、1.5×4 cm のカラムに充填した後、0.05 M 燐酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を十分に流してこれと平衡させておく。これに非ヘム蛋白含有の A₂ を添加し上記緩衝液を流せば、A₂ は完全にカラム上端に吸着されるのに反して、非ヘム蛋白は樹脂を素通りして溶出する。充分非ヘム蛋白を当該緩衝液で洗い流した後、展開液に NaCl (0.3 M) を加えると、純粋な A₂ が樹脂を離れて一挙に流出してくる。

溶出した Hb の濃縮はコロジオン膜 (Membranfiltergesellschaft, porosity < 5 m μ) を使用して限外濾過によって行なった。これらの全操作は 4°C のもとで行なった。

D. K₃Fe(CN)₆ による被酸化性の測定

分離した A₁ および A₂ を種々の pH の燐酸塩緩衝液 (0.01 M) に対して一夜透析した後、Hb 濃度を 0.1% にする。さらに充分に CO を通気し CO 型にした当該 Hb 溶液 3 ml を分光測定用セル (光路長 10 mm) にとり、これに K₃Fe(CN)₆ 溶液 0.1 ml を加えて手早く転倒混和 [K₃Fe(CN)₆/Heme モル比=100] した後、540 m μ での吸光度の変化を指標として、2 価鉄ヘムの 3 価鉄ヘムへの酸化過程を経時的に測定した。実験温度は 23°C で、実験中に温度変化のないように温度平衡に留意した。なお、測定には島津自記分光光度計 (SV-50A 型) を使用した。時刻 t での Ferri-Hb のパーセントは次の式で計算される。

$$\frac{E_0 - E_t}{E_0 - E_c} \times 100 = \text{Ferri-Hb } \%$$

ただし、E₀ は K₃Fe(CN)₆ 添加前の CO-Hb の吸光度であるが、この際、Hb 溶液 3 ml に対し試薬を 0.1 ml 添加するため、試薬添加前の CO Hb 吸光度に 3/3.1 を乗じたものとした。E_t は試薬添加後、時刻 t での反応溶液の

吸光度であり、E_c は完全に Ferri-Hb となった時の吸光度である。反応終了後、さらに少量の K₃Fe(CN)₆ 粉末を添加して吸光度の変化のないことを確認した。

いま上記酸化反応が一次反応の型式にしたがうとすれば、

$$\log \frac{C_0}{C_t} = \frac{kt}{2.303}$$

の関係式が成立する。ただし C₀ は時刻 0 での Ferro-Hb 濃度で C_t は試薬添加後、時刻 t での Ferro-Hb 濃度である。k は反応速度定数である。ここで、log C₀/C_t を時刻 t に対してプロットすると、その直線の勾配から反応速度定数 (k) を求めうる。

E. アルカリ変性抵抗

試料 A₁ および A₂ を各々 0.2 M NaCl 溶液に対して一夜透析し、Hb 濃度を 0.1% として O₂ 型および CO 型について Jonxis & Visser¹⁷⁾ の分光学的方法に準じアルカリ (0.1 N NaOH) 変性抵抗を測定した。

F. 反応性 SH 基の測定

Boyer¹⁸⁾ の方法に準じて測定した。Hb 溶液は 0.2 M NaCl 溶液に対して透析した 4.41×10⁻⁵ M のものを 1 ml 使用した。Hb 濃度はシアンメトヘモグロビン法により分子量 68,000 として算出した。PMB (*p*-Mercuribenzoate) は Boyer¹⁸⁾ の記載にしたがって精製し、最少量の苛性ソーダに溶かした後、燐酸塩緩衝液 (0.05 M, pH 7.0) で希釈した 1.62×10⁻³ M 溶液として用いた。なお、正確なモル濃度は 232 m μ でのモル吸光係数 1.69×10⁴ により計算した。測定は pH 7.0 燐酸塩緩衝液 (0.05 M) 下で波長 250 m μ で行なった。

III. 結 果

A. デンプンブロック電気泳動による A₂ の分離

Plate 1 にデンプンブロック電気泳動パターンの 1 例を示す。これから明らかなように、A₂ は A₁ よりもその易動度が小さく (したがって A₁ より正味の陰性荷電が小さい)、明確な

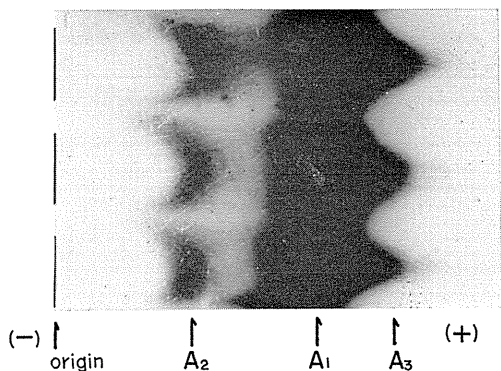


Plate 1. Electrophoretic separation of Hb A₂ on starch block. Veronal buffer (pH 8.6, $\mu=0.05$).

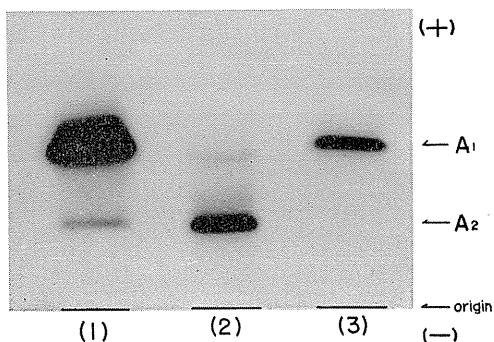


Plate 2. Starch gel electrophoresis of isolated Hb A₂. Poulik's tris-citrate-borate discontinuous buffer system, benzidine stain. (1) whole hemolysate. (2) isolated A₂. (3) isolated A₁.

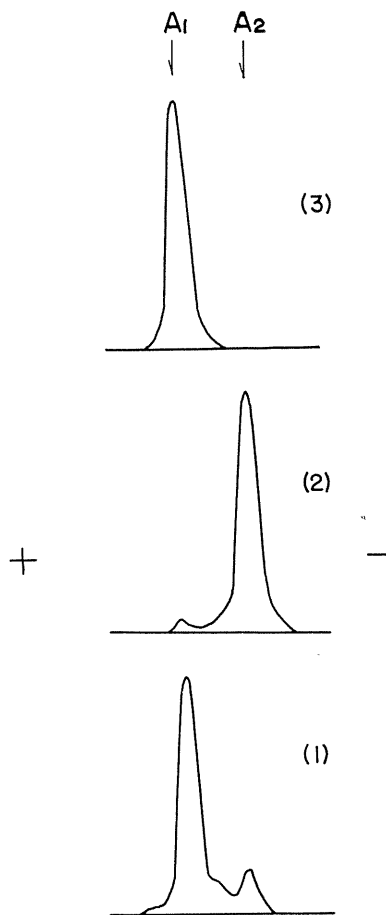


Fig. 1. Densitometric tracings of glycerine-soaked gel strips as shown in Plate 2.

Table 1. Purity of isolated Hb A₁ and A₂ as determined by densitometry of glycerine-soaked starch gels.

| Sample No. | Whole hemolysate | | A ₁ Fraction | | A ₂ Fraction | |
|------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | A ₁ % | A ₂ % | A ₁ % | A ₂ % | A ₁ % | A ₂ % |
| 1 | 97.8 | 2.2 | 100 | — | 1.3 | 98.7 |
| 2 | 97.7 | 2.3 | 100 | — | 1.4 | 98.6 |
| 3 | 97.4 | 2.6 | 100 | — | 1.0 | 99.0 |
| 4 | 97.7 | 2.3 | 100 | — | 1.5 | 98.5 |
| 5 | 97.5 | 2.5 | 100 | — | 1.2 | 98.8 |
| 6 | 97.6 | 2.4 | 100 | — | — | 100 |
| 7 | 97.7 | 2.3 | 100 | — | — | 100 |
| 8 | 97.5 | 2.5 | 100 | — | — | 100 |
| 9 | 97.7 | 2.3 | 100 | — | — | 100 |
| 10 | 97.6 | 2.4 | 100 | — | — | 100 |

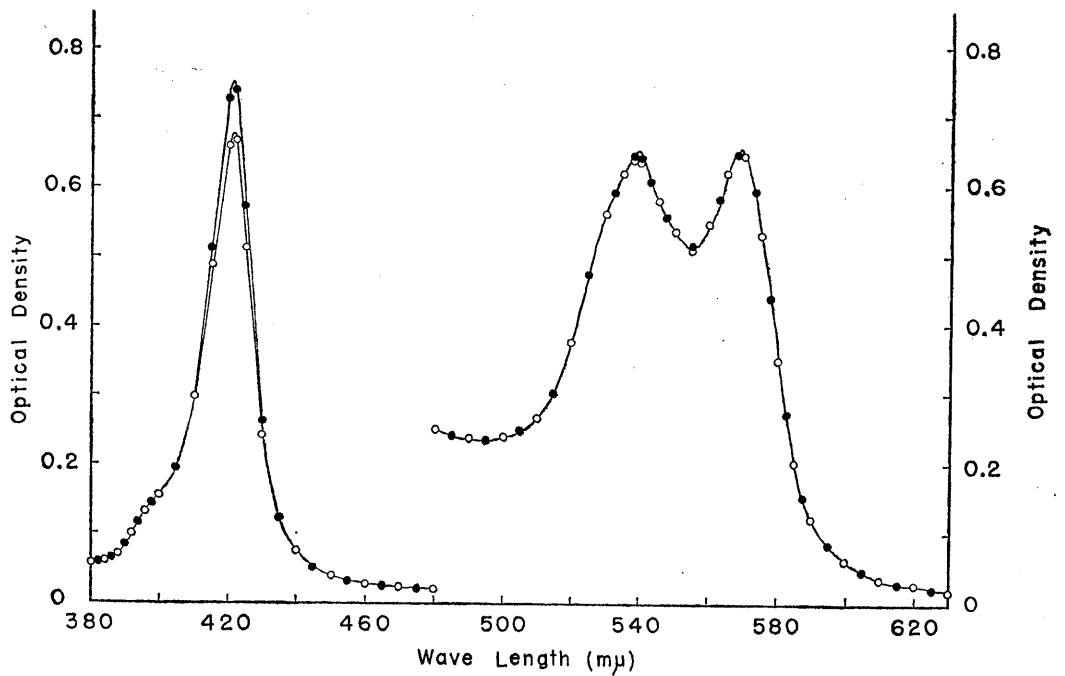


Fig. 2. Visible and Soret spectra of CO Hb A₁ and A₂ as isolated by starch block electrophoresis. ●—● : A₂, ○—○ : A₁.

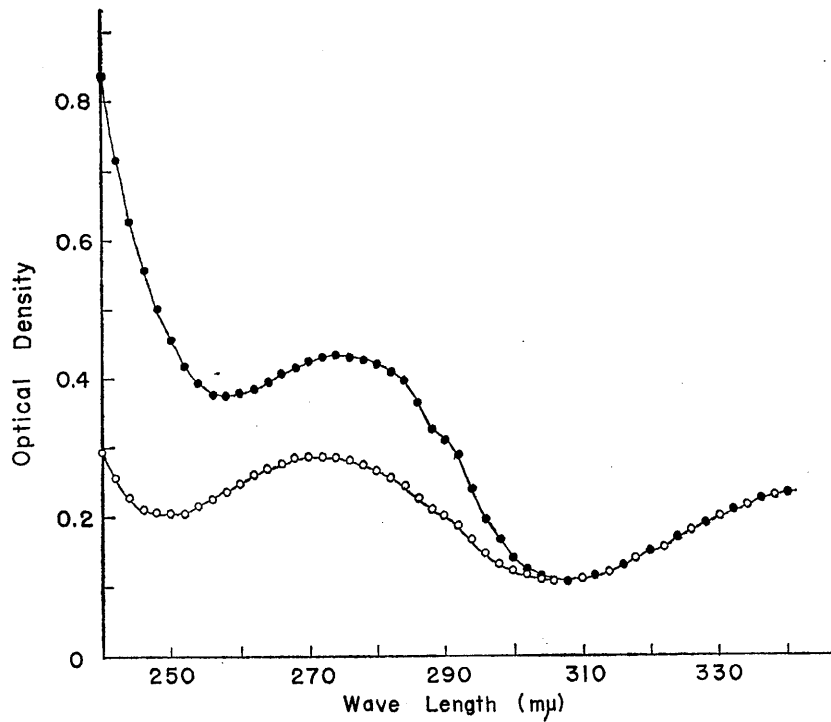


Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of CO Hb A₁ and A₂ as isolated by starch block electrophoresis. ●—● : A₂, ○—○ : A₁.

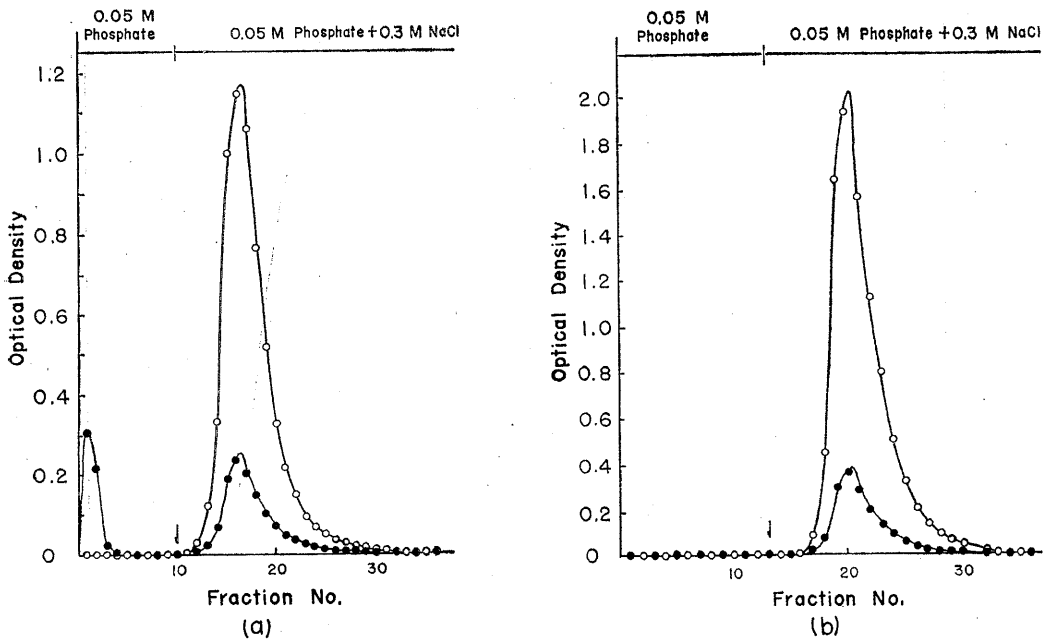


Fig. 4. Chromatographic separation of non-heme protein from Hb A₂ and A₁ as isolated by starch block electrophoresis. ●—●: O. D. at 280 m μ , ○—○: O. D. at 420 m μ . (a) CO Hb A₂ (40 mg) was applied to 2 \times 4 cm column of Amberlite XE 64 equilibrated with 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5). After complete elution of non-heme protein (first peak), Hb A₂ (second peak) was eluted by raising salt concentration. (b) CO Hb A₁ (40 mg). Same column conditions as (a). Notice no presence of non-heme protein.

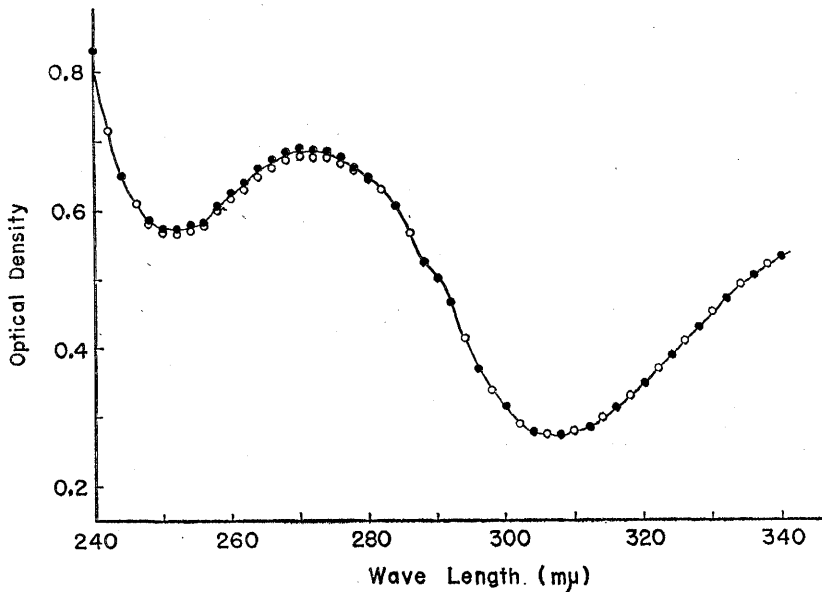


Fig. 5. Identity of ultraviolet spectra of Hb A₁ and A₂ freed of non-heme protein. ●—●: A₂, ○—○: A₁.

ゾーンとして A₁ と分離している。この分離した A₂ を単離、濃縮した後、極めて良好な分離能をもつ Poulik¹⁹⁾ の不連続緩衝系によりデンプンゲル電気泳動にかけ、ベンチジン染色をほどこした結果が Plate 2 である。単離した A₂

には A₁ を痕跡程度に認めるに過ぎず、極めて良好な単離をえたことがわかる。さらに混在 A₁ の定量化を図るため、泳動後のデンプンゲルを厚さ 1 mm に切り、ベンチジン染色後、グリセリンに浸漬し、透明固化 (Gratzer & Beaven²⁰⁾) したゲル片について Densicord model 542 (Photovolt) により densitometry を行なった (Fig. 1)。Densitogram を厚手の紙にトレースし、“切り抜き秤量法”によって測定してみると、Table 1 に示すように A₂ 分画での A₁ の混入程度は 0~1.5% で充分無視しうる程度であった。

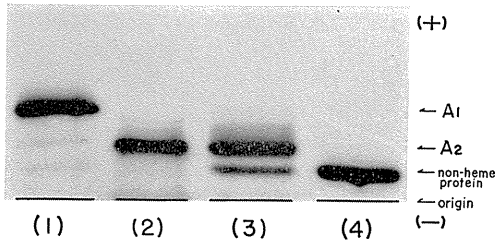


Plate 3. Starch gel electrophoresis of Hb A₂. Poulik's discontinuous buffer system, amido black 10B stain. (1) Whole hemolysate (destomatized). (2) Hb A₂ freed of non-heme protein by chromatography. (3) Hb A₂ as isolated by starch block electrophoresis. Notice evident presence of non-heme protein. (4) Non-heme protein as separated by chromatography from (3).

なお、10例の溶血液中 A₂ 含有率は平均 2.4% で (Table 1), よく先人の値 (Kunkel et al.²¹⁾) と一致している。

B. 吸収スペクトル

デンプンブロックから溶出した A₂ を CO 型にして、可視部吸収スペクトルをみると 570 m μ , 539 m μ および 420 m μ に極大吸収をもつ CO 型に特有なスペクトルをえた (Fig. 2).

Hüfner 商 (E_{540}/E_{560}) を求めると 1.23 の値を

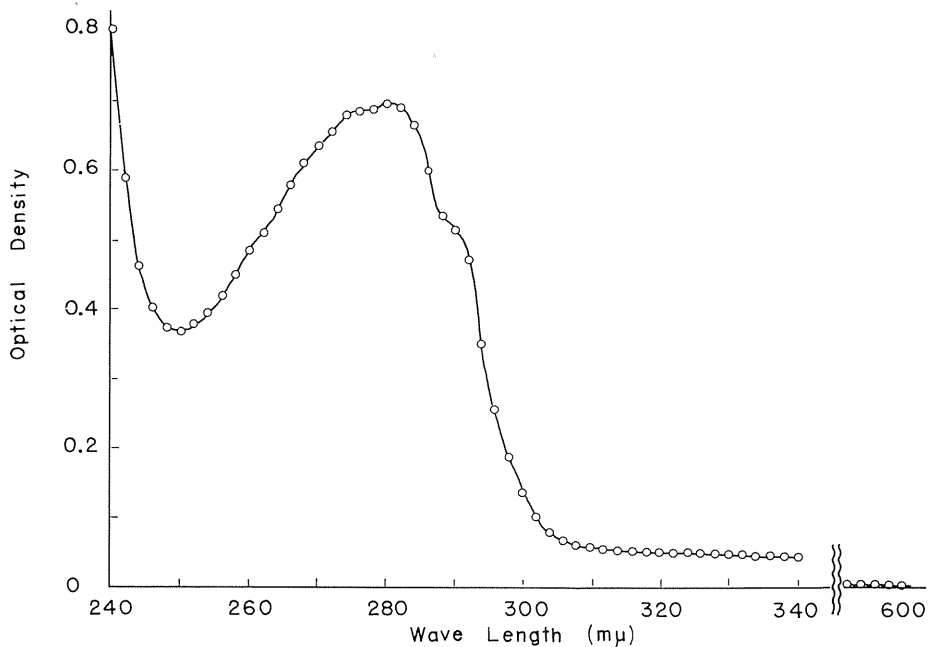


Fig. 6. Ultraviolet spectra of non-heme protein isolated from electrophoretic Hb A₂ fraction. cf. Fig. 4 a.

えて、全く A₁ と差異を認めなかった。

一方、紫外外部吸収スペクトルをみると、A₂ と A₁ の間に大きな差異を認めた (Fig. 3)。しかし、単離した A₂ についてデンプンゲル電気泳動した後、Amido black 10 B で染色してみると A₂ よりも易動度が小さく、しかも A₂ に接近して移動する非ヘム蛋白の約等量の混在が明らかに認められる (Plate 3)。したがって上記の差異はこの混在非ヘム蛋白に起因するものと考え Amberlite XE 64 により混在非ヘム蛋白の除去を試みた。

Fig. 4a に示すように、波長 280 m μ での吸光度を測定すると完全に分離した二つのピークがえられる。非ヘム蛋白は樹脂に吸着することなく溶出するので容易にこれを除去することができた (Plate 3)。なお、当然のことながら、A₁ を同様処理した場合には何ら非ヘム蛋白の混在を認めなかった (Fig. 4b)。

以上のようにして純化した A₂ について再度その紫外外部吸収スペクトルをみると両 Hb の間に全く差異を認めなかった (Fig. 5)。

また可視部スペクトルについては、非ヘム蛋白混在 A₂ についての結果と全く同じであった。なお、この純化 A₂ のメトヘモグロビン含量を Evelyn & Malloy²²⁾ の方法で測定すると全て 1% 以下であった。

また、上記のようにして分離した非ヘム蛋白のスペクトルをみると、可視部では全く吸収がなく上述の結果とよく一致している。紫外部では著明な吸収を認め、290 m μ 附近に Tryptophan に起因すると思われる微細構造バンドの存在を認めえた (Fig. 6)。

C. 被酸化性

非ヘム蛋白除去 A₂ および A₁ の CO 型につ

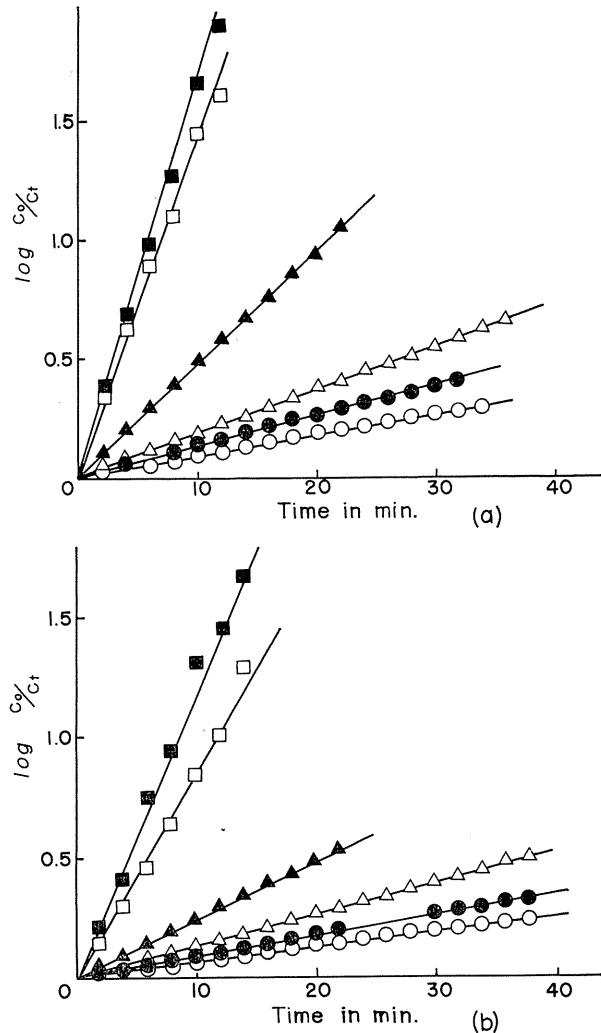


Fig. 7. Time courses of oxidation of CO Hb A₁ (b) and A₂ (a) at various pH's by ferricyanide. Hb Concentration: 0.1%, Ferricyanide/Heme ratio: 100 Temp. 23°C, Buffer: 0.01 M phosphate. □—□: pH 5.3, ■—■: pH 6.1, ▲—▲: pH 6.8, △—△: pH 7.4, ●—●: pH 7.8, ○—○: pH 8.1.

いて、実験温度 23°C, 0.01 M 磷酸塩緩衝液、種々 pH (5.3, 6.1, 6.8, 7.4, 7.8, 8.1) 下での K₃Fe(CN)₆ による酸化の kinetics を測定した (Fig. 7)。

反応経過は A₂ および A₁ とも今回の実験条件下では見かけ上一次反応の形式にしたがっていることがわかる。また、明らかに反応速度の pH 依存性が認められるので、この間の事情を

Table 2. Kinetics of oxidation of CO Hb A₁ and A₂ with ferricyanide at varied pH's. Ferricyanide/Heme molar ratio=100, 0.01 M phosphate, 23°C.

| pH | Rate constants (min ⁻¹)* | |
|-----|--------------------------------------|-------------------|
| | Hb A ₁ | Hb A ₂ |
| 5.3 | 0.198 | 0.267 |
| 6.1 | 0.272 | 0.313 |
| 6.8 | 0.058 | 0.111 |
| 7.4 | 0.030 | 0.044 |
| 7.8 | 0.021 | 0.030 |
| 8.1 | 0.014 | 0.021 |

* First order reaction kinetics are assumed.

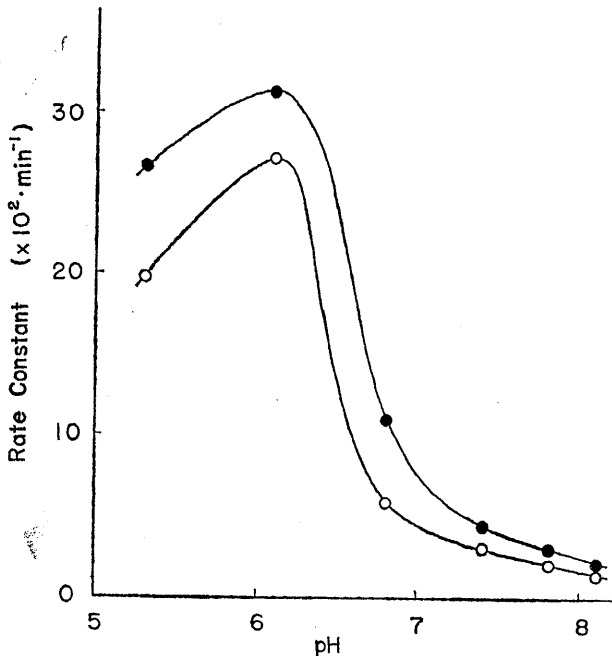


Fig. 8. Relation between pH and oxidation rate constant of CO Hb A₁ and A₂. Hb Concentration: 0.1 %, ferricyanide/heme ratio: 100. Temp. 23°C, buffer: 0.01 M phosphate. ●—●: A₂, ○—○: A₁.

さらに明示するため, $\log C_0/C_t$ vs. t の勾配より反応速度定数を求め (Table 2), pH に対してプロットしてみた (Fig. 8). A₂, A₁ ともによく類似した pH 依存性を示すことがわかる. すなわち, pH 6 近傍で反応速度が最大になり, 酸性, アルカリ両側で反応速度は低下している. 特に pH 6 から 7 の範囲においてその低下が著しく, 以後 pH の上昇に対しては緩徐となっている.

次に, A₂ と A₁ を比較してみると, 今回の実験 pH 範囲全域において前者の方が後者に比し, 明らかに大きい被酸化性を示す.

D. アルカリ変性抵抗

Fig. 9 に示す如く, CO 型 A₂ および A₁ のアルカリ変性経過は非常にゆるやかであり, 見かけ上一次反応の型式にしたがい, かつ両者でよく一致し, 50% 変性に要する時間は両 Hb とも約 6 分であった. 一方 O₂ 型では両 Hb とも CO 型に比しその変性経過は非常に早く, しかも両者間に明らかな差異を認める. すなわち, A₁ はアルカリ添加後 10 秒ですでに 90% 以上が変性しているにもかかわらず, A₂ ではなお約 21% の未変性 A₂ を認める. また, A₁ については CO 型同様見かけ上一次反応であるのに反し, A₂ はアルカリ添加後 30 秒までは一応直線的経過をとるがその後は大きく一次反応からずれることがわかる.

E. 反応性 SH 基

Boyer¹⁸⁾ の PMB 適定法による A₂ および A₁ の反応性 SH 基滴定結果を Fig. 10 に示した.

Hb 量を一定にして PMB を添加して行くと, Hb の反応性 SH 基と PMB との反応による Mercaptide 形

成によって 250 m μ での吸光度上昇が生ずる。やがて全反応性 SH 基の PMB との反応が終了すれば、以後 PMB を添加してもその吸光度の上昇は見られなくなり、滴定曲線に“折れ”が生ずる。このときの PMB モル濃度と Hb モル濃度から Hb の反応性 SH 基を算出すると、Hb 1 モル当り A₂ は 2.30, A₁ は 2.25 となり、両者共に同一であった。

IV. 考 察

正常成人 Hb 中に主成分 Hb A₁ とは電気泳動易動度を異にする 2.5% 程度の小成分の存在することを初めて見出したのは Kunkel & Wallenius²⁾ である。その後沈降分析結果から、当該 Hb A₂ は A₁ と全く同一の分子量をもつことが知られた (Kunkel et al.²¹⁾。また、A₂ と異常 Hb である Hb H (β_4^A) または Hb G ($\alpha_2^G \beta_2^A$) との Hybridization によって、それぞれの Hb 混合液から Hb A₁ と易動度を同じくするゾーンの形成されることから、Hb A₂ が Hb A₁ とは α 鎖が共通し、非 α 鎖のみが異なる全く別な分子種、すなわち $\alpha_2^A \delta_2^{A_2}$ であることが示唆された (Huehns & Shooter²³⁾。さらに A₂ と A₁

との tryptic peptide の比較から事実 α 鎖には差が無く、 δ 鎖において、 β 鎖とは少なくとも 3 個以上の peptide に差のあることが明らかに

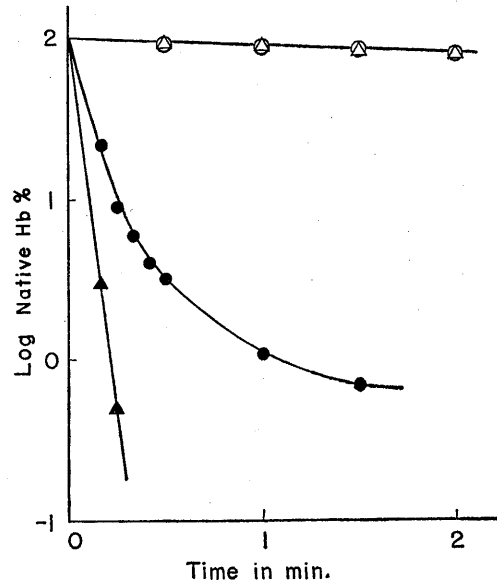


Fig. 9. Alkali denaturation curves of Hb A₁ and A₂ in 0.1N NaOH at 23°C. ○—○: CO Hb A₂, △—△: CO Hb A₁, ●—●: O₂ Hb A₂, ▲—▲: O₂ Hb A₁.

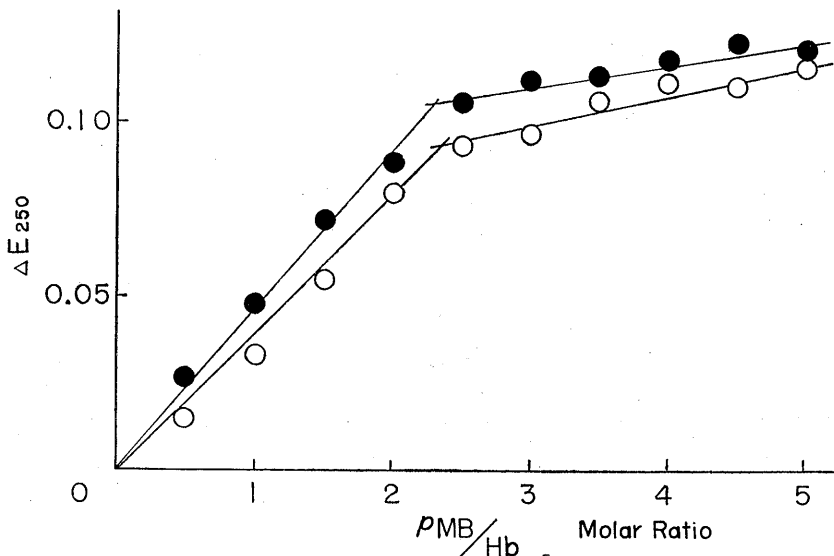


Fig. 10. *p*-Mercuribenzoate titration of Hb A₁ and A₂. 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0).

●—●: A₁, ○—○: A₂.

良く知られているように、300 m μ 以下中等度紫外部領域での吸収は蛋白中の有核アミノ酸残基、tyrosine, phenylalanine, tryptophan 等の寄与によるものであるが、Beaven et al.²⁷⁾ によればヘム部分も可なり程度に関与するという。また、結合配位子の差異によっても蛋白構造の改変ないし有核アミノ酸の電子状態の変化がおこり吸収スペクトルに変化の生ずる (Enoki & Tyuma²⁸⁾) ことが示されている。しかし、今回のスペクトル測定には両 Hb とも同じ配位子 (CO 型) であること、ヘムはプロトヘムで共通していること、および有核アミノ酸の置換の無いこと (cf. Fig. 11) から δ 鎖のアミノ酸置換は何ら当該 Hb の紫外部吸収スペクトルに影響をおよぼさないことがわかる。

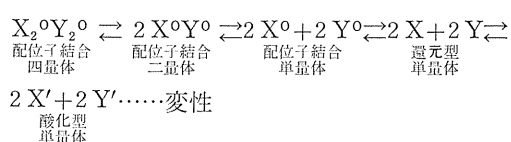
Kunkel & Wallenius²⁾ はデンプンブロック電気泳動による A₂ 単離中、その極めて被酸化性の高いことを認め単離の困難さを指摘している (Kunkel et al.²¹⁾). さらに、単離後 4°C 下に短期間放置してもその電気泳動易動度の著明な変化の生ずることを認めている。事実、彼らのえた可視部吸収スペクトルを見ると、明らかに相当量の Met Hb の混在が示唆される。ところでこのような A₂ の高い被酸化性が、A₂ そのものの存在比が極めて小さく (約 2.5%)、したがって単離操作中における極端な希釈その他の影響によるのか、それとも真実 A₂ 自体のもつ特性の反映かについては定かでない。その後この点に関連して、Martin & Huisman²⁹⁾ が亜硝酸ソーダを用いて酸化の kinetics を検索し、O₂ 型 A₂ は A₁ よりも酸化に対して可成りの抵抗性をもつことを報告している。しかし、酸化前の両者の吸光度は同一であるにもかかわらず酸化完了後の両者の吸光度に大きな差異がある。今回行なった実験条件下では、その可視部吸収スペクトルおよび Met Hb の測定結果から僅かな Met Hb の混在しか認めず Kunkel et al.²¹⁾ の所見と著しく異なっている。そこで以上の点をさらに解明するために、K₃Fe(CN)₆ による A₂ の被酸化性を検索した (Fig. 8, Table 2) ところ、明らかに全 pH にわたりその大なる

を認めた。Betke et al.³⁰⁾ は各種動物 Hb の K₃Fe(CN)₆ による被酸化性の差異をヘム鉄配位酸素分子の解離速度定数 (dissociation rate constant) の差に求めているが、この場合、一次構造の差がさらに高次の構造の差の原因となり、その結果各 Hb のヘムに対する Fe(CN)₆³⁻ の接近性に差が生じるとして説明することも可能である (Sutin³¹⁾). ところで、通常非 α 鎖のヘムは helical segment F 上の N 末端から 92 番目の his 残基と共有結合により結びつき、蛋白のクレバス内に存在している (Perutz et al.³²⁾, Watson & Kendrew³³⁾; Perutz³⁴⁾ 35)). Hb のヘム鉄 (2 価鉄) は分子状酸素と可逆的に結合する (oxygenation) ことは良く知られている事実であるが、この際同時に徐々にではあるが自動酸化 (oxidation) を受けることを Brooks³⁶⁾ は指摘している。しかし、蛋白内ではヘム単独に比しその安定性は極めて高く、したがって蛋白部分がヘムの自動酸化を何らかの要因でもって防禦していることが推測される。Wang et al.³⁷⁾ によれば、ヘムが蛋白の疎水性残基中に埋没していることがその原因であるという。最近の X 線回折法によっても明らかにヘム近傍に疎水性残基の多いことが証明されている (Perutz³⁴⁾ 35)). このようなことから、A₂ と A₁ の被酸化性の差異はヘム近傍の疎水性環境の変化に依存するとの推測も可能である。立体的にみてヘム結合部位または、ヘム埋没クレバス面において置換の認められるのは 86 Ala \rightarrow Ser, 87 Thr \rightarrow Gln のみである。これら 2 個の非極性残基が極性残基に置換することにより、イオンのヘムの接近性ないしはヘム近傍の疎水性環境が変化を受け、A₂ の被酸化性が A₁ より先進するものと推定される。しかし、この点についてはさらに、詳細な検討を加える必要があると思われる。さらにもう一つの所見、すなわち Hb の被酸化性と pH の関係 (Fig. 8) を見るに、その曲線の形が全体として、Hb の酸素化に際しみられる pH 依存性、いわゆる Bohr 効果曲線によく類似していることが注目される。近年、Hb の 2 価鉄ヘムとガス状配位子 (例えば O₂, CO 等)

の結合の諸特性と、3 価鉄ヘムと 2 価鉄ヘム間の電子授受 (酸化—還元) 反応の諸特性との間に一定の平行関係が示されている (Brunori et al.³⁸⁾) ことからみて、極めて興味深い結果である。

A₂ と A₁ のアルカリ抵抗性の結果から明らかに二つの点が指摘される。先ずその第一は両 Hb とも CO 型では O₂ 型に比し極めてアルカリに対する抵抗性が強く、しかも一次反応の型式にしたがって変性する事実、その第二は O₂ 型 A₂ は A₁ に比し、アルカリ抵抗性が大きく且つ一次反応の型式から大きく逸脱している点である。現在のところアルカリ変性に関する機序は不明と言わざるをえないが、Steinhardt & Zaiser³⁹⁾ は CO 型 Hb の酸変性を検索し、その抵抗性は met Hb より大なることを報告し、変性中間産物として met Hb の形成を指摘している。また、配位子結合 2 価鉄ヘム蛋白の 3 価鉄ヘム蛋白への酸化は配位子の離脱した還元型ヘム蛋白を通じて行なわれるという (Betke et al.³⁰⁾; Wittenberg et al.⁴⁰⁾。一方、Guidotti et al.⁴¹⁾ は Hb の四次構造の変化を考慮に入れて、アルカリ変性機序に関する一仮説を提出している。それによれば高アルカリ性溶媒中では四量体構造をもつ Hb は速やかに対称的に解裂し、生じた二量体はさらに単量体に解裂する。この第二段の解裂反応は第一段に比し

て進行が遅く、したがって全変性経過の律速段階であるという。さらに Gottlieb et al.⁴²⁾ は単量体に解裂すると同時に変性過程に入ることを推論している。そこで、いま一応アルカリ変性を次の逐次反応とすれば、



この反応過程における正の反応速度定数が最小である段階が律速段階となる。第一の点に関しては、一酸化炭素の解離速度定数が酸素のそれに比し極めて小さく (Wittenberg et al.⁴⁰⁾、且つ変性過程各段階での速度定数に比し極めて小さいとすれば定性的ではあるが説明できよう。この場合 A₂ と A₁ の酸化の速度定数の差はわずかであり今回の実験手段では有意な差を認めえないものと思われる。

Plate 4 に示す如く、A₂ とイヌ、A₁ とイヌ両 Hb 混合液 (何れも O₂ 型) についてアルカリ側 (pH 11.2) で 6 時間 hybridization を行なった (Robinson & Itano⁴³⁾) ところ、後者では約 50% の hybrid 分子の形成を認めるに反し、前者ではほとんどその形成を認めない。この際、Schroeder & Jones⁴⁴⁾ が指摘する如く鎖間の不適合性は考慮しなければならないが、しかし Huehns & Shooter²³⁾ の pH 4.7 における (A₂+G₂) 混合液についての結果とよく一致している。Hybridization の機序についてはなお多少の疑義なしとしないが、いずれにせよ単量体への解裂がその必須条件であることは間違いない。今回の実験条件下で、A₂ とイヌ Hb 間に hybrid 分子が形成されないことは、A₂ の単量体形成速度が A₁ に比し可なり小さいことを示すものと解釈され、したがって Guidotti et al.⁴¹⁾ の仮説が正しいとすれば A₂ が A₁ に比しアルカリ抵抗性の大なることがよく理解される。しかし、通常還元型 Hb ではその解裂傾向が著しく抑制されている (Ranney et al.⁴⁵⁾、Enoki & Tomita⁴⁶⁾ にも拘らず、ウシ Hb の還元型が O₂ 型に比しアルカリ抵抗性が小さい (Enoki

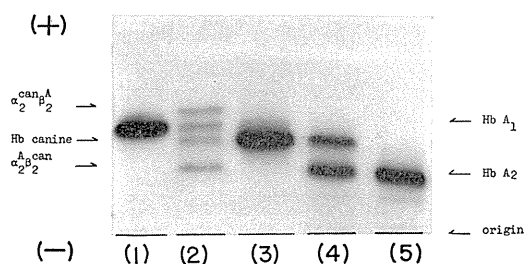


Plate 4. Starch gel electrophoresis of hemoglobin mixtures hybridized at pH 11.2 (0.2 M glycine-sodium hydroxide buffer) for 6 hr. Poulik's discontinuous buffer system, Amido black 10B stain. (1) Hb A₁, (2) Hb A₁ and canine mixture hybridized, (3) Hb canine, (4) Hb A₂ and canine mixture hybridized, (5) Hb A₂.

& Tyuma²⁸⁾ 点等, なお今後に残された問題も多い。O₂ 型 A₂ の一次反応型式からの“ズレ”は, 反応経過中の溶液の混濁によっても説明することができるが, そのような事実は今回認められなかった。したがって, A₂ は少なくとも二つ以上の律速段階の存在する複雑な変性経過を示すことになる。同様の現象は, Hb S について Beetstone & Irvine⁴⁷⁾ および Hb A について Itano⁴⁸⁾ により見出されている。ただ, 今回は 540 m μ での吸光度変化を唯一の指標として変性経過を追求したが, 直接蛋白の変化をみる方法 [例えば蛋白沈澱法 (Singer et al.⁴⁹⁾] によっても測定すべきであろう。ところで, Robinson⁵⁰⁾ は Hb のアルカリ抵抗性とその SH 基との関連を示す結果を得, Hb F が Hb A に比し変性抵抗が大であるのは, 前者が後者に比し SH 基数が少ないことを関連づけている。しかし今回の A₂ では一次構造上からも明らかな如く (Fig. 11), 活性 SH 基 (2 個) 数, 不活性 SH 基 (4 個) 数ともに A₁ と差異がなく, しかも活性 SH 基に関するかぎり何ら二次的变化を認めず, Robinson⁵⁰⁾ の説では説明できない。それよりもむしろ, アミノ酸置換にもとづく何らかの立体構造上の変化にその原因を求める方が妥当と思われる。

そのアミノ酸配列から当然予想されるように, A₂ の反応性 SH 基数は A₁ のそれと全く同じ筈であるが, 著者の知る限り A₂ についてその反応性 SH 基数を実際に測定した報告はない。今回この点に関して, 予想の全く正しいことを実証しえた。

V. 総 括

デンブンプロック電気泳動法により Veronal 緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.05$) を用いて, 正常成人溶血液から Hb A₁ および Hb A₂ を単離し両者の物理化学的検索を行なった。

A. 紫外部および可視部吸収スペクトルを CO 型で比較したところ, 両者よく一致する結果をえた。

B. 種々 pH における K₃Fe(CN)₆ による

Hb の被酸化性をみたところ, A₁, A₂ 共に反応経過は見かけ上一次反応型式にしたがう。また, 反応速度は両者とも pH 依存性を認め, 且つ pH 6 近傍で最大となるが, A₂ の方が各 pH (5.3~8.1) を通じて常に大であった。

C. CO 型および O₂ 型についてアルカリ変性抵抗をみるに, 前者では A₁, A₂ 間に著明な差を認めない。しかし, 後者では A₂ がより強いアルカリ抵抗を示した。

D. A₂ の反応性 SH 基数は 1 分子あたり 2.30 個で A₁ と全く同じであった。

文 献

- 1) Gratzler, W. B. and Allison, A. C. (1960) Multiple haemoglobins. *Biol. Rev.* **35**, 459-506
- 2) Kunkel, H. G. and Wallenius, G. (1955) New hemoglobin in normal adult blood. *Science* **122**, 288
- 3) Morrison, M. and Cook, J. L. (1955) Chromatographic fractionation of normal adult oxyhemoglobin. *Science* **122**, 920-921
- 4) Ingram, V. M. and Stretton, A. O. W. (1962) Human hemoglobin A₂: (I) Comparison of hemoglobin A₁ and A₂. *Biochim. biophys. Acta* **62**, 456-474
- 5) Ingram, V. M. and Stretton, A. O. W. (1962) Human hemoglobin A₂: (II) The chemistry of some peptides peculiar to hemoglobin A₂. *Biochim. biophys. Acta* **63**, 20-33
- 6) Hill, R. J. and Kraus, A. P. (1963) Studies on the amino acid sequence of Hb A₂. *Fed. Proc.* **22**, 597
- 7) Eddison, G. G., Briehl, R. W. and Ranney, H. M. (1964) Oxygen equilibria of hemoglobin A₂ and hemoglobin Lepore. *J. Clin. Invest.* **43**, 2323-2331
- 8) Rossi-Fanelli, A., Antonini, E., Benerecetti, A. S. and De Marco, C. (1960) Equilibrio con l'ossigeno della emoglobina umana normale A, ed A₂. *Boll. Soc. ital. Biol. sper* **36**, 2025-2027
- 9) Meyering, C. A., Israels, A. L. M., Sebens, T. and Huisman, T. H. J. (1960) Studies on the heterogeneity of hemoglobin. (II) The heterogeneity of different human hemoglobin type in CMC and in Amberlite IRC 50 chromatography: Quantitative aspects. *Clin. Chim. Acta* **5**, 208-222
- 10) Huisman, T. H. J., Dozy, A. M., Nechtman, C. and Thompson, R. B. (1962) Oxygen equilibria of hemoglobin A₂ and its variant hemoglobin A₂'

- (B₂). *Nature* **195**, 1109-1110
- 11) Drabkin, D. L. (1946) Spectrophotometric studies. XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. *J. Biol. Chem.* **164**, 703-723
 - 12) Kunkel, H. G. and Slater, R. J. (1952) Zone electrophoresis in a starch supporting medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 42-44
 - 13) Bloemendal, H. (1960) Starch block electrophoresis. *Chromatographic Rev.* **2**, 44-58
 - 14) Petz, L. D. and Economidou, J. (1965) The technique of starch block electrophoresis. *Clin. chim. Acta* **11**, 469-474
 - 15) Masri, M. S., Josephson, A. M. and Singer, K. (1958) Starch block electrophoresis studies of human hemoglobin solution. (I) Technique and results in the normal adult. *Blood* **13**, 533-542
 - 16) Hirs, C. H. W., Moore, S. and Stein, W. H. (1953) A chromatographic investigation of pancreatic ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **200**, 493-506
 - 17) Jonxis, J. H. P. and Visser, H. K. A. (1956) Determination of low percentages of fetal hemoglobin in blood of normal children. *Am. J. Dis. Child.* **92**, 588-591
 - 18) Boyer, P. D. (1954) Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4331-4337
 - 19) Poulik, M. D. (1955) Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature* **180**, 1477-1479
 - 20) Gratzer, W. B. and Beaven, G. H. (1960) Transparent starch gels: Preparation, optical properties, and application to hemoglobin characterization. *Clin. Chim. Acta* **5**, 577-582
 - 21) Kunkel, H. G., Ceppellini, R., Müller-Eberhard, H. and Wolf, J. (1957) Observation on the minor basic hemoglobin component in the blood of normal individual and patients with thalassemia. *J. Clin. Invest.* **36**, 1615-1625
 - 22) Evelyn, K. A. and Malloy, H. T. (1938) Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *J. Biol. Chem.* **126**, 655-662
 - 23) Huehns, E. R. and Shooter, E. M. (1961) Polypeptide chains of haemoglobin A₂. *Nature* **189**, 918-919
 - 24) Ingram, V. M. and Stretton, A. O. W. (1961) Human haemoglobin A₂: Chemistry, Genetics and Evolution. *Nature* **190**, 1079-1084
 - 25) Ingram, V. M. (1961) Gene evolution and the haemoglobin. *Nature* **189**, 704-708
 - 26) Schneck, A. G. and Schroeder, W. A. (1961) The relation between the minor components of whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1472-1478
 - 27) Beaven, G. H., Ellis, M. J. and White, J. C. (1960) Studies on human foetal haemoglobin. I. Detection and Estimation. *Brit. J. Haematol.* **6**, 1-22
 - 28) Enoki, Y. and Tyuma, I. (1964) Further studies on hemoglobin oxygen equilibrium. *Jap. J. Physiol.* **14**, 280-298
 - 29) Martin, H. and Huisman, T. H. J. (1963) Formation of ferrihemoglobin of isolated human hemoglobin types by sodium nitrite. *Nature* **200**, 898-899
 - 30) Betke, K., Greinacher, I. and Hucker, F. (1956) Oxidation menschlicher und tierischer oxyhämoglobine durch kaliumferricyanid. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **229**, 207-219
 - 31) Sutin, N. (1961) Rate of oxidation of ferrohaemoglobin by ferricyanide ions. *Nature* **190**, 438-439
 - 32) Perutz, M. F., Rossman, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G. and North, A. C. T. (1960) Structure of haemoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* **185**, 416-422
 - 33) Watson, H. C. and Kendrew, J. C. (1961) Comparison between the amino-acid sequences of sperm whale myoglobin and of human haemoglobin. *Nature* **190**, 670-672
 - 34) Perutz, M. F. (1965) Structure and function of haemoglobin. I. A tentative atomic model of horse oxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* **13**, 646-648
 - 35) Perutz, M. F. (1965) Structure and function of haemoglobin. II. Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **13**, 669-678
 - 36) Brooks, J. (1935) The oxidation of haemoglobin to methaemoglobin by oxygen. II. The relation between the rate of oxidation and the partial pressure of oxygen. *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B.* **118**, 560-577
 - 37) Wang, J. H., Nakahara, A. and Fleischer, E. B. (1958) Hemoglobin studies. I. The combination of carbon monoxide with hemoglobin and related model compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1109-1113
 - 38) Brunori, M., Antonini, E., Wyman, J., Zito, R., Taylor, J. F. and Rossi-Fanelli, A. (1964) Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. II. Carboxypeptidase digests of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **239**, 2340-2344
 - 39) Steinhardt, J. and Zaiser, E. M. (1955) Hydrogen ion equilibria in native and denatured proteins. *Advances in Protein Chemistry* **10**, 151-226
 - 40) Wittenberg, B. A., Brunori, M., Antonini, E., Wittenberg, J. B. and Wyman, J. (1965) Kinetics of the reaction of alypsia myoglobin with oxygen

- and carbon monoxide. Arch. Biochem. Biophys. **111**, 576-579
- 41) Guidotti, G., Konigsberg, W. and Craig, L. C. (1963) On the dissociation of normal adult human hemoglobin. Proc. Natl. Acad. Sci. **50**, 774-782
- 42) Gottlieb, A. J., Robinson, E. A. and Itano, H. A. (1967) Protein-protein interaction among hemoglobin subunits. A comparison of adult, fetal and bovine carboxyhemoglobin. Arch. Biochem. Biophys. **118**, 693-701
- 43) Robinson, E. A. and Itano, H. A. (1960) Asymmetrical recombination of alkalidissociated hemoglobin mixtures. Nature **185**, 547-549
- 44) Schroeder, W. A. and Jones, R. T. (1965) Some aspects of the chemistry and function of human and animal hemoglobins. Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe. **23**, 113-194
- 45) Ranney, H. M., Benesch, R. E., Benesch, R. and Jacobs, A. S. (1963) Hybridization of deoxygenated human hemoglobin. Biochim. biophys. Acta **74**, 544-547
- 46) Enoki, Y. and Tomita, S. (1967) Ligand binding and dissociation into subunits in hemoglobin: A study with "hybridization" techniques. Jap. J. Physiol. **17**, 149-157
- 47) Beetlestone, J. G. and Irvine, D. H. (1962) Reactivity differences between hemoglobin A and S. Nature **193**, 1044-1045
- 48) Itano, H. A. (1959) Abnormal hemoglobins, ed by Jonxis, J. H. P., Blackwell, Oxford.
- 49) Singer, K., Chernoff, A. I. and Singer, L. (1951) Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. Blood **6**, 413-428
- 50) Robinson, E. A. (1965) Alkali denaturation of human hemoglobin: Possible role of disulfide formation. Biochem Biophys. Res. Commun. **20** 573-579,



体表面微小振動 (microvibration, MV) 分析への interval histogram の応用について

On the application of the interval histogram for the analysis of the microvibration (MV)

尾崎 俊行・根田 芳昌
(Toshiyuki Ozaki and Yoshimasa Konda)*

弘前大学医学部第1生理学教室

近年、筋緊張の指標としてその生理的並びに臨床的意義が検討されている筋肉上体表面微小振動 (microvibration, MV または minor tremor, MT) の解析方法としては周波数分析⁷⁾⁹⁾、自己並びに相互相関分析¹⁾³⁾⁴⁾⁷⁾⁸⁾などの他に刺激により誘発される MV 反応をアナログ方式誘発反応加算装置、またはディジタル方式データ処理用小型電子計算機により求める方法⁵⁾²⁾も開発されている。しかしながら、interval histogram による MV の解析に関する研究はまだ報告されていない。最近、私共は interval histogram による MV の解析にデータ処理用小型電子計算機 (ATAC-402, Nihon Kohden Co. Tokyo) を応用し、2, 3の知見をえたのでその一端を報告する。

Fig. 1 の上は interval histogram を求めるのに必要な電子計算機と MV, 脳波, 心電図などをポリグラフ的に記録する装置のブロックダイアグラムを示す。先ず、MV 導出用のロッシェル塩ピックアップをヒトや家兎などの被検動物の筋肉上体表面の適当な部位に絆創膏でなるべく軽く、しかし密着するように固定して機械的振動を電氣的振動に変換し増幅器で増幅した出力を ATAC への入力とすると同時にインク書きオシログラフにも接続し、脳波、心電図、心拍動などと同時記録する。この場合に、増幅された MV 出力は CR-型 low pass filter を通してその 50 c/sec 以上の高周波成分を noise level 以下に減衰させて ATAC への入力とし、

他方 slice level は noise level 以上に設定する。ATAC を起動させると、MV の各振動の時間間隔があらかじめ設定された一定個数まで計測された後に、横軸に時間間隔 (interval) 縦軸にその頻度を表わす interval histogram としてブラウン管上に表示される。これを撮影記録する。なお、時間間隔を τ msec とすると次式によりその周波数を求めることが可能である。

$$\text{frequency (c/sec)} = 1000 \times 1/\tau \text{ (msec)}$$

Fig. 1 の下は覚醒並びに麻酔状態における家兎の脳波、MV (L) とその interval histogram (R) を示す。すなわち、L, a は家兎の固定後しばらく経って落ち着いてからの記録、L, b は 10 mg/kg の Nembutal 静脈内麻酔後 3 分経過の記録、L, c は麻酔後 5 分の記録である。MV の interval histogram (R, a, b, c) の総度数 999 個、その階級は ATAC の address 数が 400 であり、分析時間 250 msec (横軸の全長) であるから 250/400 msec きざみになっている。L, a では脳波は速波成分を多く含む覚醒状態を示している。MV には全体的に高振幅を示すがかなり速い成分も認められている。このときの MV の interval histogram (R, a) は 33 msec (33 c/sec) と 52.6 msec (19 c/sec) に 2 つの峰が認められる。Nembutal 麻酔後 3 分の記録 (L, b) では脳波は徐波化し MV はその振幅が低下し速波成分も減少している。その interval histogram (R, b) には 33 msec (33 c/sec) の峰は著明に減少し相対的に 52.6 msec (19 c/sec) の峰が増高している。麻酔後 5 分 (L, c) では脳波は L, b におけるよりも幾分徐波化が強いがそれほど著しい差は認められない。MV も L, b の

* First Department of Physiology, Faculty of Medicine, Hirosaki University

[昭和43年1月22日受付]

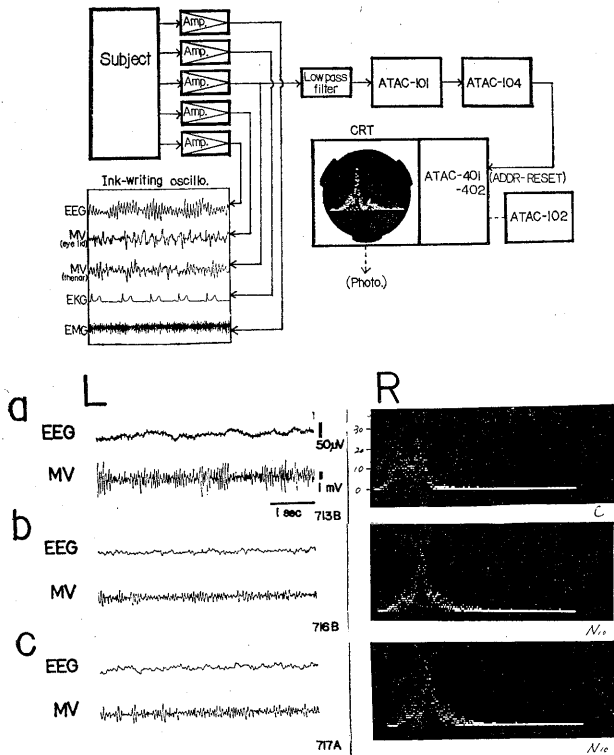


Fig. 1. Above : Over all block diagram of the polygraph and ATAC for obtaining the interval histogram of the MV. Below : Electroencephalogram (EEG, LO-N), microvibration (MV, r. thigh muscle) and interval histogram of the MV before (a), 3 minutes (b) and 5 minutes (c) after the intravenous injection of Nembutal in a dose of 10 mg/kg. In the left side (L) of this figure were shown partially the EEG and MV tracings, because it was impossible to display all of 999 vibrations necessary for obtaining the interval histogram of the MV. In the right side (R) of this figure were shown the interval histogram of the MV, whose analysis time is 250 msec. The calibration shows 50 μ V and 1 mV in the EEG and MV, respectively.

場合とほぼ同様のパターンを示す。その interval histogram (R, c) は R, b とほぼ同様の形を示している。以上の実験結果に示すように、覚醒時に 2 峰性を示した MV の interval histogram が麻酔により脳波が徐波化するにつれて速波成分に対応する峰がかなり低下し、相対的に徐波成分の峰が増大する事実はすでに私共が主張してきたように、MV の速波成分は筋性成分を、徐波成分はいわゆる心弾図性成分であることを示唆する。なお、MV が中枢神経系や末梢神経系の活動性の変化と密接に関係することはすでに報告⁶⁾されてきたが、これらの場合に MV のどの成分が主に影響されるかということについて検討することは方法論的に困難であったと思われる。しかし、以上述べてきたように MV の分析に interval histogram による方法を用いると、MV の筋性ならびに心弾図性成分を分離的に観察することが可能となり各種条件下においてそれぞれの生理的性質を調べるのに非常に好都合である。今後さらに MV の生理的な

らびに臨床的意義について詳細に検討するつもりである。

この稿のおわりに、日本光電工業株式会社小林洋征氏の技術的御援助に対して深く感謝します。

文 献

- 1) Awazu, T. (1965) Studies on human minor tremors. *Jap. J. Physiol.*, **15**, 579
- 2) 伊藤 久 (1967) 覚醒ならびに睡眠時における閃光刺激による誘発眼瞼微小振動反応について。 *日本生理誌* **29**, 628
- 3) Ozaki, T., Sato, K., Awazu, T., Mimura, K., Honda, N., Teramoto, S. and Kitajima, K. (1962) Some observations of minor tremors related to heart beat. *Jap. J. Physiol.*, **12**, 484
- 4) Ozaki, T., Sato, K., Awazu, T., Honda, N., Teramoto, S. and Kitajima, K. (1963) Some observations of the effect of sensory stimulation upon minor tremors in man. *Jap. J. Physiol.*, **13**, 24
- 5) 尾崎俊行・藤原克三・伊藤 久 (1966) 閃光刺激による誘発眼瞼微小振動について。 *日本生理誌* **28**, 241
- 6) 尾崎俊行 (1966) MV の基礎的研究 Microvibration 基礎とその応用。 40 医学書院 東京
- 7) 佐藤謙助 (1966) MV の生体情報処理 Microvibration 基礎とその応用。 97 医学書院 東京
- 8) Tomonaga, K. (1965) On the effect of heart beat on minor tremor. *Jap. J. Physiol.*, **15**, 560
- 9) Yoshii, N., Inaba, E., Suzuki, S. and Arai, S. (1963) Frequency analysis of "minor tremor" on the body surface. *Folia psych. Neurol. Jap.*, **17**, 287

Induction of hemorrhagic lesion of intestinal mucosa by hypercalcemia in adrenalectomized rats

Tokuro Fukuda and Nobuko Akagawa *

Department of Physiology, Chiba University School of Medicine, Chiba

It has been reported from this laboratory that rabbits and dogs became extremely susceptible to intravenous infusion of CaCl_2 solution after adrenalectomy. Specific anaphylaxis-like shock appeared even in mild hypercalcemia which did not disturb the cardiac function. That is, the vasoconstriction of the pulmonary artery in rabbits¹⁾ and the histamine release from the liver in dogs²⁾ determined the lethal course in each species. Thereafter, it was also observed that in guinea-pigs asthmatic respiration and pulmonary emphysema was induced by hypercalcemia especially after adrenalectomy (unpublished data). In extension of this series of works it was intended here to examine whether the specific anaphylactic reaction in rats, i. e. the hemorrhagic lesion of the intestinal mucosa³⁾ could be induced by hypercalcemia in adrenalectomized rats.

1.0% CaCl_2 solution was given intraperitoneally in an amount of 2.0 ml per 100 g body weight both to intact and adrenalectomized rats weighing about 150 g. Adrenalectomized rats were maintained by giving 0.7% saline solution as drinking water at least for more than 4 days after the operation. The serum Ca concentration was raised from about 9 mg % up to about 18 mg % within one hour and then gradually declined. This was the same both in intact and adrenalectomized rats. All of the adrenalectomized rats died after about 2 to 3 hours, while

80% of the intact rats survived this dose. Even intact rats could not tolerate twice the above dose of CaCl_2 , which elevated the serum Ca level so high (about 30 mg %) that bradypnea, bradycardia and cardiac arrest ensued. The autopsy findings of the adrenalectomized rats were quite characteristic. Intense hyperemia in the small intestine was accompanied by partial or total hemorrhagic mucosal lesion, blood and mucous being found in the lumen of the gut, just as the case with the anaphylaxis in this species³⁾. Such lesions were entirely absent in intact animals even in the lethal case. Thus it became clear that in the absence of adrenal glands the course of calcium shock was accelerated by the intestinal complication. It may be mentioned here that the results were the same even when non-irritable calcium gluconate solution of the same calcium content was given.

In order to elucidate the mechanism of the increased susceptibility of adrenalectomized rats to hypercalcemia the effects of pretreatment with glucocorticoid, epinephrine and others were examined. The results were summarized in Table 1. Glucocorticoid alone did neither prevent the intestinal lesion nor improve the survival rate definitely. Epinephrine was effective in preventing the intestinal lesion, but was unable to recover all the animals treated. When glucocorticoid and epinephrine were given together all survived the Ca injection and the hemorrhagic lesion was absent. Thus the increased susceptibility to hypercalcemia after adrenalectomy in rats was found to be due to

* 福田篤郎・赤川宣子：千葉大学医学部第2生理学教室

[Received for publication March 4, 1968]

Table 1. Hypercalcemic shock in rats (1.0% CaCl₂ solution, 2.0 ml/100 g body weight, intraperitoneally)

| Conditions | Total cases | Survival | Hemorrhagic lesion of intestinal mucosa |
|-------------------------------------|-------------|----------|---|
| Intact | 10 | 8 | — |
| Adrenx. | 12 | 0 | +++ |
| Adrenx. + Decadron ¹⁾ | 12 | 2 | +++ |
| Adrenx. + Epinephrine ²⁾ | 12 | 5 | — |
| Adrenx. + Atropine ³⁾ | 8 | 2 | + |
| Adrenx. + Deca. & Epi. | 8 | 8 | — |
| Adrenx. + Deca. & Atro. | 12 | 6 | + |

1) 2 mg i. v., before 1 hr. 2) 10~20 μ g i. m., before 5 min. 3) 0.2 mg i. m., before 15 min.

the absence of both the cortical and medullary secretion.

It was remarkable that epinephrine was quite effective in preventing the hemorrhagic lesion of the intestinal mucosa. Some protection was afforded also by atropine, suggesting participation of cholinergic mechanism. However, bilateral cervical vagotomy did prevent neither the intestinal lesion nor the terminal bradycardia. Direct observation of the intestine through an abdominal window revealed that after the Ca injection intestinal movement was inhibited, but later with the appearance of hyperemia and hemorrhage in the mucosa vigorous movement set off.

In summary the results of the present experiments on rats would give a further support to our working hypothesis that the specific shock organ might be susceptible to hypercal-

cemia in the absence of the adrenal glands. However, the main cause of the increased susceptibility of the shock organ in rats to hypercalcemia was, in contrast to rabbits¹⁾ and dogs²⁾, the lack of epinephrine secretion. That the target organ in anaphylaxis is different according to the animal species has been variously interpreted. Further inquiries from the above view point would be necessary, since the role of Ca ions in triggering various kinds of biological activities has recently been recognized as the most fundamental one.

References

- 1) Fukuda, T. and Ui, J. (1967) *Jap. J. Physiol.* **17**, 589
- 2) Fukuda, T. and Enjoji, S. (1968) *Jap. J. Physiol.* (in press)
- 3) Sanyal, R. K. and West, G. B. (1958) *J. Physiol.* **142**, 571

〔地方小学会報〕

第36回近畿生理学談話会

日時 昭和42年9月23日 午前9時30分より

場所と当番 大阪大学松下会館 大阪大学医学部高次神経研究施設 岩間吉也

1. 頭頂部鋭波の2, 3の性質

山口雄三 (阪大第2生理)

睡眠の一定の時期に、頭頂部を中心として鋭波(いわゆる瘤波)が出現することは、よく知られている。著者は Flaxédil で不動化した猫の脳波に、頭頂部鋭波 (biparietal hump=B. H.) が多く出現することに注目して次の実験を行なった。

局所麻酔を施した Flaxédil 不動化猫を用い、新皮質、帯回、海馬などの脳波を記録した。

B. H. に対する Flaxédil 大量投与の影響、脳幹高頻度刺激の効果を検討した。

1. B. H. は陰陽の2相性、または陽陰陽の3相性であるが、陰性波を主成分とするものが多く、持続は100~500 msec、振幅は0.5 mV に達する。B. H. は正中線上で、A5~APO の附近でもっとも大きく記録される。

2. Flaxédil 大量投与で B. H. は増加し0.5~1 c/s、またはそれ以上の頻度で、連続的・規則的に出現する。その際、B. H. は正中線附近に限局する傾向がある。

3. 通常量の Flaxédil を投与した猫で、脳幹の高頻度刺激によって B. H. を誘発することができる。これには尾状核、視床前部の刺激がもっとも有効である。ここで誘発された B. H. は、波形・極性・出現部位・背景脳波などが、自発性に出現するものと類似しており、これら両者は同一の起源のものと考えられる。中心核、中脳網様体の刺激では、B. H. は抑制されるが、刺激後かえって増強されることがある。

4. 背景脳波が脱同期を示すときに、または脳幹の強刺激によって、いわゆる“cortical activation wave” (Calvet et al., 1965) が出現する。これは一般に陽性波を主成分とするもので、正中線附近で APO またはそれより後寄りでもっとも大きく記録される。その波形、極性および背景脳波などから、B. H. との区別は一般に困難ではない。

2. 中枢電気現象と自律機能の関連性について

(続報) 中枢支配を中心として

安原基弘・内藤博江・市来京子・林マコト (関西医大第2生理)

前報に引き続き、中枢電気現象と腸管運動との関連性について検討した。

無麻酔のウサギを脳定位装置に固定し、Sawyer の坐標図にしたがい視床の nucl. ventralis anterior (VA), nucl. centrum medianum (CM) および中脳網様体 (RF) に電極を刺入した。一方上行結腸に挿入した balloon の内圧の変動を、前報と同様な方法により電氣的に変え、脳波計に導入記録した。また脳波の同時記録をおこない、中枢活動の変化を同時に観察記録した。えられた成績の概要は次のごとくである。

1. 視床に対する刺激条件と腸管運動の変化との関係について検討した結果、VA, CM の3c/s 刺激では spike and wave の発現に伴い腸管運動には促進効果のみが現われたが、8c/s 刺激では recruiting response の発現に伴って、VA では促進効果のみが、CM では促進の現われる場合と抑制の現われる場合とが略同程度認められることがわかった。

また VA, CM の100 c/s 刺激では、その刺激部位が3c/s や8c/s 刺激をおこなった部位と同一部位であっても、抑制効果のみが現われることを確かめた。

2. RF の100 c/s 刺激により、脳波に覚醒反応が発現すると同時に、腸管運動には著明な抑制効果が認められたが、この抑制効果は adrenalectomy により何ら影響を受けなかった。

3. RF 刺激による腸管運動の抑制効果には、vagotomy による影響も認められなかった。したがってこの抑制効果には、迷走神経の介入はないものと考えられる。

4. RF 刺激による腸管運動の抑制効果は、内臓神経の切断により消失することが認められた。したがってこの脳幹網様体の刺激による腸管運動の抑制効果は、内臓神経を介してあらわれるものと考えられる。

3. マイクロフォン電位に対する内リンパ液置換の影響

池田勝浩・松裏修四 (大阪市大第1生理)

内リンパ液の組成については通常の細胞外液の組成とことなり、 K^+ イオン濃度が高く Na^+ イオン濃度の低いことが報告されている。またモルモットなどにおいて K^+ イオン濃度を減少させるとマイクロフォン電位 (MP) が著明に減少することが報告されている。この内リンパ液の組成と MP の関係を調べるため、金魚を用いて、種々の組成をもった液で内耳小嚢の内リンパ液を置換することによりマイクロフォン電位がどのように変化するかを調べた。

方法としては先端 $1\sim 2\mu$ の微小電極を用いて、内耳小嚢内よりマイクロフォン電位を記録しながら、別に刺入した液置換用のガラスカニューレ (先端外径 $15\sim 35\mu$) から毎分 $0.1\sim 0.3\mu l$ 位の割合で種々の組成の液を注入することにより、MP がどのように変化するかを調べた。なお換液の程度をみる為に 0.001% 程度のメチレンブルーを混入した。

120 mM KCl 液では MP の大きさはほとんど変化しないが、等張 $NaCl$ 液では、MP のわずかな減少がみられる。等張蔗糖液では等張 $NaCl$ 液よりやや程度のつよい MP の減少がみられるが、この減少は等張 KCl 液で洗うことによって回復がみられる。

約 1.5 倍以上の高張液を用いると KCl 液であっても MP の減少がみられ 4 倍の高張液では回復があまりみられない。

Ca^{++} イオンについては数 mM 程度の増加では MP に変動がみられないが、 20 mM 以上になると MP の減少がみられ、さらに高濃度では著明な不可逆的な減少がみられた。

Kanamycin, Dihydrostreptomycin の薬剤によって MP は小さくなる。しかし Kanamycin ではごくうすい濃度 ($50\text{ }\gamma/ml$ 位) では MP は少し増大することが多い。また $400\text{ }\gamma/ml$ の濃度までは MP の減少は可逆的であるが、Dihydrostreptomycin では同程度の濃度でも変化がつかく回復しない。

4. 運動ニューロンにおける興奮性シナプス下膜のイオン透過性 (続報)

荒木辰之助・遠藤克昭 (京大第1生理)

食用蛙の脊髄を Ringer 液で灌流し Ringer 液中の Na^+ の 80% を約 40 種の陽イオンで置換して後根あるいは LC 刺激による EPSP の平衡電位を測定すると、平衡電位の変化が殆んどない場合と、平衡電位が正常 Ringer 液のときよりも $40\sim 50\text{ mV}$ 過分極側に移動する場合とがある。前者の場合は置換した陽イオンが活動時の興奮性シナプス下膜を通過すると考えられ、後者では通過しないと考えられるが、その限界は水和 K イオンの 2.08 倍のところであり、それよりも小さいイオンはすべて通過し、大きいイオンは $(C_2H_5)_3NH^+$ (イオンの大きさ 2.14) を除いて通過しない。この興奮性シナプス下膜のイオン透過性は外液の Ca^{++} 濃度によって変化し、 Ca^{++} 濃度を 1.8 mM から 12 mM に増加させると、非通過イオンの $(CH_3)_3C_6H_5N^+$ (イオンの大きさ 2.12) は通過するようになる。 Ca^{++} を 18 mM に増加させると $(C_2H_5)_4N^+$ (イオンの大きさ 2.27) は通過するようになる。 Ba^{++} および $(C_3H_7)_2NH_2^+$ は外液の Ca^{++} が 18 mM では通過しないが 30 mM のときには通過する。このように外液の Ca^{++} 濃度の増加とともに興奮性シナプス下膜の pore size は大きくなると考えられる。 Ca^{++} はその大きさが非通過イオンのグループに属するが、外液の Ca^{++} 濃度を 66 mM に増加させ presynaptic terminal を直接に電気刺激して発生する EPSP の平衡電位を検すると、正常 Ringer 液の場合と殆んど変らない (42 mM のときも同様)。この結果は興奮性シナプス下膜の pore size が Ca^{++} によって大きくなり Ca^{++} が通過するようになることを示すと考えられる。なお、運動終板においても Ach pot. の平衡電位を指標として陽イオンの透過性を調べたが、運動ニューロンの興奮性シナプス下膜のそれと殆んど同じである。ただし、運動ニューロンにおいて例外的に通過すると考えられる $(C_2H_5)_3NH^+$ は終板膜においては通過しない。

5. Nucleus supratrigeminalis の細胞集団について

高田 充・加藤一郎・河村洋二郎 (阪大歯口腔生理)

Lorente de N6 (1922), Torvik (1956) が三叉神

経運動核の上部に小さな細胞の集団があることを報告し、この細胞集団は介在神経細胞であろうと推察した。現在この介在神経細胞の機能ははっきりしていないが、解剖学的にはこの細胞集団は *nucleus supratrigeminalis* と命名されている。

本実験は *nucleus supratrigeminalis* の細胞の働きを除脳猫を用いて分析したものである。局所加圧の方法を用いて咬筋ならびに側頭筋の筋紡錘を変形せしめ、58の細胞を調べたところ、咬筋筋紡錘の変形のみ反応した細胞が1個、側頭筋筋紡錘の変形のみ反応したものが1個、両者に反応したものが56個の3種類に分類できた。これら各細胞をそれぞれ M-cell, T-cell, M・T-cell と命名した。各 M・T-cell では、咬筋加圧に対する反応と側頭筋加圧に対する反応の比は1のものが多く、この細胞集団が正規分布を示すことが明確になった。かつ、この細胞の活動は *succinylcholine* 静注により著明に促進される。既に報告したごとく¹⁾、*succinylcholine* ではまず最初細胞の活動は停止し、ついで著明な放電の増加が誘発される。

また、M・T-cell の活動は反対側の咬筋・側頭筋筋紡錘の変形により抑制された (*contralateral inhibition*)。これに反し、M-cell, T-cell の活動は反対側咬筋・側頭筋筋紡錘の変形により促進された。

Contralateral inhibition が如何なる機序によるのか現在のところ断定できないが、20例中3例において *nucleus supratrigeminalis* の試験刺激による咬筋神経の活動は反対側咬筋 Ia 神経の条件刺激により増強されること、また、*picrotoxin* 静注により脱抑制がおり、かつ、反対側からの抑制が消失することから考えると前シナプス抑制が一つの要因として挙げられる。

文 献

- 1) 高田 充・加藤一郎・河村洋二郎(1967) 三叉神経運動核における *Crossed inhibition*. 第44回日本生理学会総会(名古屋) 日本生理誌 29(8号)

6. 味覚刺激による人の大脳の加算誘発反応 船越正也・河村洋二郎(阪大歯口腔生理)

各種感覚刺激による人の大脳皮質誘発電位は、近年、電子計算機を用いて加算することにより比較的容易に記録できるようになった。しかし、味

覚刺激に対する大脳皮質の誘発反応については未だ報告されていない。本研究は CAT を用い人の頭皮上誘導による大脳皮質の味覚誘発反応を記録し、その結果に若干の検討を加えたものである。

実験は健康成人男子5名につき行ない、被験者を防電室内の歯科用治療椅子に坐らせ、安頭台にて頭部を固定した。大脳皮質の電気活動の導出には銀円盤型頭皮表面電極を用い、側頭-耳単極誘導法を用いた。味物質溶液の投与には、回転するスプーンとスイッチにより CAT の掃引と同期せしめ、漏斗を介して被験者の舌表面を静かに流れるようにした。1回の投与量は 1 ml とし、投与約10秒後に試験液を吐き出させ、水道水にて口をすすがせた。これらの操作が終り、脳波が安定してから次の試験液を投与した。誘発反応は40回加算後、ペン書きレコーダーにより記録した。

舌表面に基本的四味物質(蔗糖・食塩・キニーネ・酒石酸)溶液および脱イオン水を投与した場合、誘発された大脳皮質の反応は上記の5溶液のすべてに対して認められた第1波と、酒石酸および食塩水刺激により認められた第2波とが区別された。第1波は潜時が約 150 msec で peak までの潜時は約 300 msec であった。酒石酸および食塩水投与の場合には上記第1波の他に潜時約 0.5~1.2秒、peak までの潜時は約 1~2.2秒の第2波が続いていた。

このような第2波は試験液の濃度を増すにつれて反応の大きさも増大した。第1波は触覚誘発反応であると思われる、第2波が味覚誘発反応であろうと思われる。ただし、蔗糖およびキニーネにより第2波の反応がえられなかった理由は目下検討中である。

7. 嗅覚受容器における電気現象の分析

高木貞敬(群馬大第2生理)

1937年細谷・吉田両氏が犬の嗅粘膜に匂をふきかけ、そこで起る遅い電気変動を記録して以来今日までに合計5種の電位変化が認められた。

1. 電氣的陰性の On-電位
(Hosoya and Yoshida, 1937 Ottoson, 1956)
2. 電氣的陰性の Off-電位
(Takagi and Shibuya, 1959, 1960)
3. 電氣的陽性の On-電位
(Takagi, Shibuya, Higashino and Arai 1960)

これには一般に電氣的陰性の Off-電位が附随する。

4. 電氣的陰性の Off-電位

(Shibuya, 1960: Gesteland ら, 1965)

5. 電氣的陽性の後電位

(Takagi, Wyse and Yajima, 1966)

これらの電位発生のイオン機序, 起源および機能について考察する。

I. イオン機序

(a) On-, Off-型の陰性電位は主として Na^+ の侵入と K^+ の漏出によって起る (Takagi, Wyse, Kitamura and Ito, 1967). (b) 陽性後電位は主として Cl^- の侵入と K^+ の漏出によって起る. そして陰イオンの侵入機序は IPSP とは異なる (Takagi, Wyse and Yajima, 1966). (c) On-, Off-型の陽性電位のイオン機序についてはまだ明らかでない。

II. 起源

嗅神経を切断し嗅細胞の変性を起させた嗅粘膜では, 陰性の On-, Off-電位および陽性の On-電位は現われなくなるから (Takagi and Yajima, 1965), これらは嗅細胞から発生すると考えられる. しかし陽性後電位は消失せず現われたから, これは支持細胞から出るものと考えられる。

III. 機能

インパルス発生様式を調べると次の五型が認められた (Takagi and Omura, 1963). これらは上記の遅電位の諸型と対応するものと思われる。

a. On-discharge

電氣的陰性 On-電位に対応

b. Off-discharge

電氣的陰性 Off-電位に対応

c. Post-inhibitory excitation

電氣的陽性 On-電位に対応

d. Post-excitatory inhibition

電氣的陽性 Off-電位に対応

e. Simple inhibition

(電氣的陽性 On-電位の一特型と考える)

電氣的陽性の後電位は数百ミリ秒以上もつづく長いものであり, インパルスの発生パターンにはこれに相当するものが認められない. これが支持細胞より発する可能性が大きいことを考えると, この電位は一種の分泌電位であると推定される。

文 献

- 1) Hosoya, Y. and Yoshida, H. (1937) Ueber die bioelektrische Erscheinungen an der Riechschleimhaut. Jap. J. med. Sci. III. Biophysics 5, 22-23
- 2) Takagi, S. F., Wyse, G. A. and Yajima, T. (1966) Anion permeability of the olfactory receptive membrane. J. gen. Physiol. 50, 473-489
- 3) Takagi, S. F., Wyse, G. A., Kitamura, H. and Ito, K. (1967) The roles of Sodium and Potassium ions in the Olfactory receptive membrane. In preparation.

8. Parabiotic rat における睡眠

松本淳治・堀 夕美 (徳島大第2生理)

睡眠の体液説を検討する目的をもってこの研究を行っており, 現在までの成績について報告する。

体重 120 g 前後の雄ダイコクネズミを使用した. まずネブタール麻酔下に手術を行なって, 大脳皮質前頭・後頭部脳波・眼球運動・筋電図・心電図を慢性記録できるようにし, ついで7~10日後に体重の接近した2匹をえらんで Bunster and Meyer の方法にしたがってふたたびネブタール麻酔下に手術を行っておりパラビオーゼを作った. 一部はその方法を改良して頭部を固定連結して極力, 縫合部の解離を防ぐようにした.

パラビオーゼ手術後第1日目より防音防電室に入れて記録を行ない経過を観察した。

34例中, 術後1週間以内に死亡したものは24例であり, 最長生存日数は16日であった。

パラビオーゼの左右のネズミについて実験終了後に徐波睡眠 (SS), 逆説睡眠 (PS) の時間を加算してその値を L, R とし左右同時おこった SS・PS の占める時間の計を C とし, $C/(L+R)$ の値の変化に着目した。

$C/(L+R)$ (SS) は術後第1日目より45%を示しだいに低下して約35%となり, $C/(L+R)$ (PS) は第1, 2日目には0%, その後だいに上昇するが20%をこさない。

以上の成績では SS の同期性はほとんど行動性のものであり, PS の同期性は偶然性のもと考えられ, いずれも体液性によるものとは思われない。

9. 咬合・咀嚼時の歯の硬組織のひずみについて

和泉功一・天野仁一朗 (大阪歯大生理)

咬合・咀嚼および外力によって生ずるヒトおよびイヌの歯の硬組織のひずみを、歯面に貼ったストレーンゲージによって測定し、つぎの成績をえた。

1) 咬合時には、前歯部でも臼歯部でも、咬合圧にはほぼ比例した大きさのひずみが生じる。2) そして、前歯部では、つねに唇面は圧縮し、舌面は伸張する。しかし、臼歯部のひずみは複雑で、頬面と舌面においては前歯部におけるような関係はみとめられていない。3) また、上顎中切歯については唇面切端部では、切端中央1/3部がもっともひずみやすい。4) 唇面中央部では、咬合時、歯の長軸方向には圧縮ひずみが、近遠心方向には伸長ひずみが生ずる。5) 咀嚼時のひずみの波形および大きさは、食品の種類によって著しい影響をうける。すなわち、食品の硬度や粘性がひずみの大きさや波形に關与する。6) 唇面および舌面から、歯の長軸に対して小さな角度で外力を加えると、歯冠のどの歯面(唇面・舌面・近心面・遠心面の中央部)においても、圧縮ひずみがみられる。したがって、強度の反対咬合の場合には、歯冠全体は歯の長軸方向に縮むものと考えられる。しかし、軽度の反対咬合・切端咬合および正常咬合の場合には、前歯々冠は、前述したようにつねに側方向へ折れ曲るようひずむ。7) イヌの大歯を用いて、窩洞形成(5級窩洞)前後のひずみの変動を調べた結果では、唇側から舌側方向に押した(100~500g)場合の唇側歯頸部におけるひずみは、形成後では形成前にくらべて著しく減少する。そして窩洞に充填(リン酸亜鉛セメント)した後では、ひずみはもとの2/3まで回復した。

以上、歯に加わる力の方向と歯のひずみとの関係から、歯のひずみによって、咬合・咀嚼時に歯に加わる力の方向と大きさならびに歯軸の方向を知ることができる。

10. 細谷、関根両教授の追悼講演

覚道幸男 (大阪歯大生理)

木村英一 (大阪市大第2生理)

11. シンポジウム

学部後期における生理学再教育

話題提供者

河村洋二郎 (阪大歯口腔生理)

須田 勇 (神戸大第2生理)

高木貞敬 (群馬大第2生理)

日本生理誌 29, 741-746 を参照

12. 体運動に関するエネルギー式について

久保秀雄 (大阪体育大生理)

水泳競技の全コースをm区間にわけ、100m区間毎の所要時間 t_i を知るとその速さ v_i について

$$\sum v_i \ln v_i = m v_o \ln v_o$$

が成立する。 v_o は全コースの平均の速さ ($100m / \sum t_i$) この関係は $E = kv^n$ の n の算出に当り、 $E/t_i = 0.47$ [O₂消費] 馬力/1分に代用される条件関係となる。 $n = 1 + x$ とおくと

$$\sum x_i = \sum \frac{\ln \frac{v_i}{v_o}}{\ln \frac{v_i}{v_o}}$$

が導かれる。O₂消費測定によらずにラップタイムから算出される v_i, v_o によって $\sum x_i$ 、ひいて n が定められる。実験公式として

$$x = a + b \ln v, \quad a = 4.716, \quad b = 5.5129$$

したがって

$$E = kv^n = kv^{(a+1)} \cdot v^{b \ln v}$$

$$E/t = P = v^{(x+2)} = v^{(2+a+b \ln v)}$$

$dp/dv = 0$ において v の極限值として

$$v_{max} = -\frac{a+2}{2b} = 1.838_8 \text{ m/sec.}$$

13. スピード競技記録の法則性について

人体の運動方程式にもとづく考察

井上 章・品川嘉也・品川泰子 (京大第2生理)

陸上競技ランニングの世界記録で、競技距離 x の対数と記録(平均速度 v) の間に一定の関係があることは Hill によって指摘されたが、古沢はこれを2本の直線で近似して記録予想を行なった。この直線は古沢-Hill の運動方程式から、一定の近似で導けるので、われわれはさらに一般的な拡張として人体の運動方程式を

$$m dv/dt = f - k_1 v - k_2 v^2 - k_3 v^3 \dots \dots \dots (1)$$

のように導いた。(1)式から定常状態の近似を用

いて

$$\Phi/x = k_1v + k_2v^2 + k_3v^3 \dots\dots\dots(2)$$

となる。ただし Φ は $\Phi = \int v dt - 1/2 mv^2$ で定義される定常状態におけるエネルギー散逸関数で Φ/t はエネルギー代謝率に比例する。(2)式を最小自乗法により電子計算機を用いて、陸上競技のランニング、競歩、スピード・スケート、水泳(自由型)の世界記録および日本記録にあてはめ、よいあてはまりがえられた。常に、 $k_1, k_3 > 0$, $k_2 < 0$ となり、Hill の特性方程式から導れる筋収縮の運動方程式とよい対応を示した。

同様に電子計算機を使用して、過去のオリンピック記録に最小自乗法で

$$R = R_0 - R_1/(T - T_0) - R_2/(T - T_0)^2 \dots\dots\dots(3)$$

をあてはめ、予想記録 R 、限界記録 R_0 を求めた。これにより1968年オリンピック記録を $R \sim R_0$ で予想すると次のようになる。

| | | |
|----|-------------|-----------------|
| 陸上 | 100m | 10秒2 ~ 10秒1 |
| | 棒高とび | 5 m 18 ~ 5 m 92 |
| | 走幅とび | 8 m 03 ~ 8 m 34 |
| | 走高とび | 2 m 19 ~ 2 m 25 |
| | 女子走幅とび | 6 m 67 ~ 6 m 97 |
| | 女子走高とび | 1 m 94 ~ 2 m 19 |
| 水泳 | 100m 自由型 | 55秒4 ~ 53秒3 |
| | 女子 100m 自由型 | 60秒7 ~ 56秒9 |

14. 精神性発汗と温熱性発汗について

中山昭雄 (名大第1生理)

手掌の発汗が精神性刺激によって容易に増加すること、一般体表面の発汗は温熱性刺激に応ずるものであるが、ある条件下では精神的要因によっても影響を受けることはすでに久野によって述べられている。

抵抗湿度計によって各部の発汗を連続的に記録すると、数秒の不規則な周期で発汗が同時に増減しているのが認められる。一般体表面が中等度の発汗をしているとき、手掌の発汗も極めてよく似た変動を示す。手掌のGSRが発現するときとはほとんど常に一般体表面の発汗にもそれと同期した一時的増加が認められる。室温 35°C 前後では被験者が安静な状態にあるにも拘らず GSR が連続的に記録されることがあり、その際一般体表面の発汗はそれに平行した変動を示す。

一般体表面の発汗の増加は温度以外の要因によ

って容易におこされる。また GSR の発現が温度によって左右されることはよく知られている。これらは温熱性発汗が精神性要因によって中枢性に修飾されたものとも考えられるが、末梢性に次の如き可能性も否定できない。すなわち一般体表面の発汗の緩徐な増減は温度刺激に比例するが、比較的速やかな変化は GSR を発現させる要因によって左右される。前者は汗腺細胞の分泌活動に関係し、後者はむしろ汗腺平滑筋上皮の収縮に関与するのではなかろうか。手掌の汗腺においても本質的には同じことが云えよう。なお側胸部圧迫によって抑制されるのは前者である。

精神性要因が汗腺細胞の分泌そのものの増加を来すのか、あるいはすでに腺腔に分泌されている汗を平滑筋上皮の収縮によって皮面上に押し出すのみであるのか、今後の検討を要する。

15. 熱電変換体を利用せる温度感覚測定

(第2報)

桑島 勉 (大阪医大第2生理)・笹川総逸 (京大整形外科)

前回我々は、熱電変換体を利用して、従来の水、温湯等を以てする皮膚温度感覚測定法の欠陥を物理生理学的に能う限り除去しえる温冷覚の測定を行なった改修装置とその成績の一端を報告したが、此の時まだ実用上多くの改修改良点が考えられる事を指摘した。今回は更に一部を改良した改修型を制作した。すなわち、熱電変換体の正規電流方向で吸熱する側に、加熱および吸熱する面の面積を一定にするため、および将来此の部分に更に温度計等を取りつけたり、他に色々の装置を附加したものによる実験が行ないようするために測定用アダプターを取りつけた。さらに正規の電流方向で加熱する側に、水冷式の放熱板を取りつけた。このことにより熱電変換体に正規電流方向に通電した時、冷却側の能力を前回以上に高める(室内で約5分間で結氷を見る)ことができ、その測定温度範囲を広くした。このような改修装置を用いて、手の指頭を対象として、温度感覚を測定し、前回に優るかなりの成績をえたのでその内容の詳細を報告して批正を仰がんとするものであるが、このような改修方法でも尚やはり不安定、不確実の因を為すべきファクターがかなり窺われ向後は脳波計、温度計を利用し、温度と温

度感覚との関係を物理化学的により精確に探索すると共に、さらに皮膚抵抗測定等の検索も続けてゆきたい。

16. 熱感覚測定装置について

奥原昌徳 (大阪医大第2生理)・笹川総逸 (京大整形外科)

東洋における温探法系特殊刺激療法の一つ、すなわち皮膚を主体とした身体組織の温度刺激療法に対する近代医学的解析の一端として、著者の一人奥原が前回発表し実験供覧した熱感覚測定装置は、被検者の耐ええる限度内における熱感覚の諸程度を非主観的すなわち物理学的に測定し、この測定値を温度にして表現したものであった。しかし乍らこの方法には、被検時における被検者の複雑な生活条件ないし諸表現や微妙な身体的器械的条件によりその成績が未だかなり複雑に左右される。これらの要素を少しでも少くする為に脳波をも同時に併せ測定し、この脳波により温度計の制御を行なうように試みた。この結果、そのえられる測定値にかなりの安定性を得たので、まづこの改修の内容を報告する。

さらに測定脳波変化の状態を少しでもわかり易くし、またできるだけ誤動を防止するために、デジタルカウンターを応用して改修の一端とした。前回に引き続き今回われわれが改修した要点は、被検人体の耐えうる熱感覚をば、今回説明するような精密測定機の長所を利用して、比較的精確に実数で表現しうることにある程度の成績があげられたので、まづこの改修の内容について報告し、それによって実測を試みた成績をも例示して検討批正を仰ぎたい。

しかしこの改修改良にも未だ個々の部分に聊か不十分な点も存在し誤動も免れぬこともあるので、この辺を検討し、殊に回路の改修を加えてより精確な生理現象認識の機器としての進歩を期している。

17. イヌの心終弛期における肺循環系の圧勾配、とくに、実験的肺水腫に関連して

徳政義和・木下安弘・中村 仁・渡辺伸宏・角田興一 (千葉大第2内科)

Kaltman ら (1966) は、先天性、および、後天性心疾患患者に右、および、左心カテーテル法

を行ない、心弛期の終りにける肺動脈・左心圧勾配を調べた。僧帽弁閉塞のない患者では、肺動脈弛期圧・左室弛期終圧、および、平均左房圧が 15 mmHg 以下のさいに三者のあいだに、有意な相関があり、肺動脈・左室間に圧勾配はない。そして、きまった範囲内では、肺脈管床の摩擦が小さいので、弛期の終りに圧平衡の状態が成り立つと述べた。

われわれは、イヌに実験的急性肺水腫を起こさせ、そのさい、肺動脈弛期終圧・左房圧勾配の変化を調べた。(1) 尋常のイヌ12匹に、Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. (121, 902, 1966)、日本生理誌 (29, 422, 1966) に述べた方法にしたがい、肺水腫をつくり、弛期の終りの肺動脈圧、肺静脈圧、左房圧を測定した。(2) コントロールの肺動脈圧 6.0~24.8、肺静脈圧 1.5~15.0、左房圧 0~14.0 mmHg で、3者のあいだに、弛期の終りに、ほぼ、かれらのいう圧平衡の状態が成り立つ。(3) 注入 500~1000 ml になると肺動脈圧 23.0~66.7、肺静脈圧 24.0~55.5、左房圧 30.0~56.5 mmHg と上昇した。この圧範囲では、肺動脈・左房間に圧勾配を生じ、3者のあいだに圧平衡が失われる。(4) 重症肺水腫群 (肺重量/体重比 > 2) では、注入 1000~1500 ml において、弛期の終りに左房圧 > 肺静脈圧 > 肺動脈圧となり、肺動脈・左房圧勾配が、マイナスとなった。

以上の成績は、尋常のイヌでは、心弛期の終りに、肺動脈圧、肺静脈圧、および、左房圧のあいだに、ほぼ、圧平衡の状態が成り立つ。そして、(1) の方法による肺水腫のさいに、血行動態の変化にしたがい、肺動脈・左房圧勾配の発生、正方向への増大、減少および負方向への変化が生じる。それゆえ、このさいの圧勾配の変化は、コントロールのさいの圧平衡の延長ではないと考える。

18. 体循環充滿平均圧は肘静脈圧から推定できるか

平川千里・酒井 章・木々下正彦・高安正夫 (京大第3内科)

Guyton によって誘導せられた静脈帰来方程式の中で重要な役割を演ずる体循環充滿平均圧 (mean systemic filling pressure, 以下 Pms と略記) が如何なる条件の許で肘静脈圧から近似的に推定し得るかを検討した。Pms がモデル的に想定せ

られた静脈の内圧に近似的に等しい事は原式から容易に誘導し得るが、若しある条件の許に Pms が肘静脈から推定し得ることが判れば、心送血量調節機構の理解の上に好都合であると考えた。

そこで正常人6名を含む44人のヒトに右心カテーター検査を行って直接 Fick 法により毎分送血量を測定すると同時に平均右房圧を求め、次の仮定の許に Guyton の graphic analysis を行った。すなわち、(a) 正常なヒトの安静時 Pms は 7 mm Hg であり、この時右房圧ゼロに対して静脈帰来量は $3.8 \text{ lit} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$ である。(b) すべてのヒトの安静時静脈帰来曲線は上記の正常な静脈帰来曲線と同じ勾配を持つ。

この方法によって作図的に Pms を近似的に求め、これを仰臥位で測定した肘静脈圧と比較した結果、両者の間には可成りのバラツキがあるが、回帰直線として次式が得られた。

$$\text{Pms.gr.} = 3 + 0.8 \text{ Pcv}$$

ここに Pms. gr. は上の如く作図的に求められた体循環充満平均圧、Pcv は肘静脈圧を示す(単位は mmHg)。尚血圧の零基準面は胸廓前後直径の中点を通るものと定義した。

上の成績は肘静脈圧が正常上界 (11 mmHg) を越えて高くなると両者が殆んど等しくなる事を示唆する。そこで静脈系を上流(毛細管寄り)側、下流側の二つの部分に分けたモデルを用いて静脈帰来方程式を誘導したところ、理論的に Pms が下流の静脈圧に接近する為の条件が判った。これらの条件は心不全において肘静脈圧が上昇する際には略々満たされると考えるべき根拠がある。

19. Kallikrein-Kinin 抑制系の生理的意義

村上長雄・榊村純生・堀 清記 (三重大第1生理)

Kallikrein-kinin 系は血圧降下作用、毛細管の透過性亢進、白血球凝集作用疼痛の発生、平滑筋収縮作用を介しての血圧、炎症、腺分泌等重要な生理作用を有する血中或は組織中の活性物質として注目されている。さらに、村上等により身体運動時にも、kallikrein-kinin 系が賦活され疲労にも関係する事が示された。一方、これらの生理作用は kallikrein または kinin の活性化および不活性化による調節機構の存在により生体の恒常性が持たれていると思われる。すでに、Werle は1936

年血漿より2種の kallikrein-inhibitor を分離している。その後、Webster, Krut 等より膵臓、耳下腺、肺臓中に同様の物質が存在することが示されている。Kininase は Rochae Silva が1949年血漿中にその存在を認めてから、Lewis, Amundsen, Greenbaum 等により血中および組織中に kininase の存在する事が認められた。しかし、kallikrein-inhibitor, kininase に関する系統的な報告は少ない。村上等は、既に組織中、尿中の kallikrein 様物質についての報告をしたが、今回は kallikrein-inhibitor, kininase について、家兎、モルモット、マウスの種々組織中の濃度分布、細胞内存在様式、遊離条件、化学的性質を調べて、次の結果を得た。(1) Kallikrein-inhibitor, kininase は広く動物体内に分布している。(2) Kallikrein-inhibitor は膵臓、腎臓に多く、胃、脳には少ない。Kinase は、食道、腸、膵臓に多く、胃、脳には少ない。(3) Kininase は細胞内で一部顆粒に結合しているが、一部分は遊離状態で存在する。(4) 結合時の kininase は超音波、D. O. C., osmotic shock 等により遊離する。(5) Kininase 活性は中性、弱アルカリ性で活性が強い。(6) Kininase は pH 5 以下の条件で放置すれば、活性が著しく低下する。

これらの抑制系は、kallikrein-kinin 系がハーゲマン因子、pH の低下等により活性化された場合、局所に対する調節作用として、生理的に意味のあるものと思われる。

20. 組織抽出物による血小板セロトニンの遊離塩 栄夫 (京大第2生理)

血小板のセロトニンは哺乳動物組織特に腎臓のアルカリ抽出物で遊離することが知られている。これまでこの現象は種々の system で検討されて来たが、遊離活性物質、作用機序ともに明らかでない。ここではウサギ血小板のセロトニンを指標としてこの物質の精製を試みた。

豚腎よりえた粗抽出物 (Toh の方法による) を 80% エタノール処理すると活性は上清に回収される。これを減圧濃縮し、エチルエーテル、クロロホルム・メタノールなどで抽出することにより活性が有機層に移ることが判った。なお腎のクロロホルム・メタノール抽出物は活性をもたず、そのアルカリ処理物は活性を有することから、組織をアルカリ処理することにより活性部分が分離して

来るものと思われる。このことはこの両者を薄層クロマトグラフィで展開した時に前者に欠けているスポットのみに活性が存在することから裏づけられる。クロロホルム・メタノール(2:1)混液によって抽出された活性物質を薄層クロマトによって分離し、ほぼ単一スポットを示す活性部分をえた。これは ninhydrin 陰性、ヨード反応陽性であり、現在その定性を進めている。

この実験に用いた血小板浮遊液は Ca^{++} イオンを含まず、かつ glucose を欠いている。この腎抽出物によるセロトニン遊離は glucose を添加することによって著しく抑制される。一方、C 18~22 の飽和脂肪酸 (Na 塩) が血小板に damage を加え、同時にセロトニン、ヒスタミンを遊離させることが知られているが、plasma free, Ca^{++} イオンの存在のもとでこれと腎抽出物の作用を比較するに、これらは明らかに区別しうることが判った。腎抽出物によって血小板が形態的变化を起すか否かは未確定であるが、位相差顕微鏡による血小板数の減少は認めず、いったん遊離した血小板は再びセロトニンをとりこむことは明らかである。

21. 自然止血機構における紡錘形細胞の役割

竹下 正・木村修平・木下喜博・木村英一 (大阪市大第2生理)

鶏の末梢血中より紡錘形細胞を教室独自の方法でほぼ純粋に分離し、この分離紡錘形細胞を Ca^{++} free の血漿および TC-199 混合培養液中で培養し倒立位相差顕微鏡で観察すると、細胞の両端から線維状の突起を出し、振動させながら培養液中を浮遊するのが見られた。これは哺乳類の血小板の偽足様突起に相当すると考えられ、異物への粘着性細胞間の凝集現象に関係すると推定された。この Ca^{++} free の培養液中に Ca^{++} を添加すると時間経過と共に両端の突起を消失し、互いに凝集し集塊となるのが見られた。また分離紡錘形細胞を電子顕微鏡で観察すると、哺乳類の血小板の電顕像と同様に線維状の突起およびその突起内あるいは細胞質内に electron dense material が認められた。これは serotonin の存在に関係があると考えられているが、紡錘形細胞に serotonin が存在しているか否かはこれから検討すべき問題である。さらに分離紡錘形細胞が血餅退縮現象におよぼす影響を modified Tocantins' method によ

り検討してみた。5本のシリコン塗布した試験管に ACD 溶液で凝固阻止した血液からえた packed red blood cells を一定量入れ、それぞれに細胞濃度を異にする分離紡錘形細胞浮遊血漿 (Ca^{++} free) を加え (control はこの細胞を含まない血漿)、さらに Ca^{++} の最終濃度が 10 mg/dl になるように 1/40 M $CaCl_2$ 液を加え凝固を完成させ、37°C 恒温槽中で1時間放置させた後に析出する血清量を測定した。紡錘細胞を附加しない場合、血清の析出は見られず、加えられた紡錘形細胞濃度の増大と共に析出血清量が増える傾向のあることをとらえた。紡錘形細胞が凝固時生成されたフィブリン網に附着し、凝塊の収縮を促し血清を圧出したのであろう。

以上のことから紡錘形細胞は哺乳類の血小板とほぼ同一の構造および機能を有し、自然止血機構の研究の為に比較生理學上興味深い材料である。

22. 唾液塩分分泌に及ぼす第三脳室の浸透圧変化の影響について

吉村寿人・井上太郎・平位喜七郎 (京都府立医大第1生理)

教室の従来の研究によって、犬顎下腺を正常血で灌流しつつ全身血の浸透圧を上昇させると唾液中への塩分の分泌が増加することを確かめた。この場合、唾液の塩分分泌の増加は神経作用によるものであって、体液の浸透圧が上昇すると、視床下部にある血液浸透圧調節中枢が反応して、ここから発する神経インパルスが特定の神経線維を介して唾液腺に到り、唾液腺の塩分分泌を増加させることが明らかとなった。その後、このような中枢から唾液腺にインパルスを伝える神経としては、鼓索神経、迷走神経および舌下神経の3神経 (salt nerve と名付けたい) がそれに当ることも報告した。さらにこの salt nerve から遠心性インパルスを取り出して高張液を全身に注入するとこの遠心性インパルスが増加し、低張液の場合は減少することも証明した。

今回は唾液の塩分分泌におよぼす脳中枢の作用を解明するために、犬の第三脳室に高張液や低張液を注入して、唾液の塩分分泌がどのように変化するかを検討した。あらかじめ犬に顎下腺 fistel を作成し、さらに stereotaxic apparatus を使って第三脳室へ注射針を埋込み、溶液の注入できる

準備をしておく。かかる手術を施してより後3週間後に第三脳室へ溶液を注入するとともに同時にピロカルピン唾液を採集する。生理的食塩水 0.2 ml を脳室に注入して採唾する実験を control とし、高張液や低張液を同量注入して唾液の塩分 (Na, K, Cl) 分泌の変化の様相を検討した。

その結果、高張液注入後約6分たてば唾液の Na, Cl 分泌は著明に増加し、約25分間持続する。一方、低張性溶液注入の場合は高張液注入の場合のように dramatic な成績はえられないが、やはり低張液注入後 Na, Cl の分泌は低下する。以上の成績はおそらく第三脳室近傍に存在する paraventricular nucleus が脳室液の浸透圧変化を感受して、ここより発する神経インパルスによって唾液性状を変化させるものと推論せられる。

23. 二波長分光器の試作とその使用例

中瀬雄三・菅野 司・辻本 毅・長井音次 (和歌山医大第1生理)

濁った溶液、例えば mitochondria suspensions, bacterial cells, muscle homogenates における分光学的観察において入射光のほとんどが散乱され、明確な吸収 spectrum はえられない。その解決法として、オパールガラス法等があるが、Chance は double beam apparatus を使いその測定値が濁りの変化に影響を受けないで、optical density の小さな変化の追求に有用であることを実証した。しかし彼の精巧な system (安定した electric circuit, vibrating mirror 方式の光学系) は製作が困難である。そこで大西の sectors 方式を採り、たま sample cell にはオパールガラス法を採用した。その概要は、lamp から出た光を mirrors で分け、2つの monochromators (その波長を λ_1, λ_2) を通し、2つの sectors で交互に通過され、sample cell に入る。その光を photomultiplier で受け sectors の回転と同期した2つの gate で弁別し、さらに積分された各々の signal の差を pen-recorder で記録する。この2つの波長の1つ (例えば λ_2) を Isosbestic point にとれば酸化型・還元型の間の変化を反応速度論的に追求出来る。このとき変化した濃度と O. D. の変化の関係は、

$$\Delta C = \frac{\Delta D_1}{\Delta \epsilon}$$
 である。但し、 ΔC は濃度の変化、 ΔD_1 は λ_1 での O. D. の変化、 $\Delta \epsilon$ は酸化型

および還元型の吸光係数の差である。

装置の特性は

1. Noise level: full scale 0.025 O. D. のとき、time constant 1.0 で 2.0×10^{-4} O. D., time constant 0.2 で 5.8×10^{-4} O. D.

2. Drift: 1. の条件で 3.0×10^{-4} O. D.

3. Linearity: 低濃度で良

さらに本装置を使用した cytochrome b および pyridine nucleotide の酸化還元状態の例、および濁りの影響についての考察を報告する。

24. 光照射による D-アミノ酸酸化酵素のセミキノン形成

黄 健周・亘 弘・中馬一郎 (阪大第1生理)

D-アミノ酸酸化酵素に可視光線を照射すると free radical が形成され電子スピン共鳴吸収を示すことが教室の志賀らによって報告されている。私達は D-アミノ酸酸化酵素に光照射を行い、その際に生ずる可視部吸収スペクトルの変化と電子スピン共鳴吸収の変化を同時測定することによりこの free radical が D-アミノ酸酸化酵素のセミキノン形成に由来することを認めた。光照射によってえられたセミキンは本酵素のヒドロサルファイト滴定により形成されたセミキノンとスペクトル的にも、また電子スピン共鳴吸収の上からもまったく同一であった。

D-アミノ酸酸化酵素は外部より還元剤を加えることなく、単に光を照射するだけでセミキノン形成する。従って光照射によるセミキノン形成時には、何が電子供与体となって酵素のフラビンを還元するかは興味ある問題である。実験条件より、電子供与体として可能性のあるものは、水・フラビン側鎖および酵素蛋白の三種類が考えられる。以前よりフラビンの光化学反応で問題になっているように、水からの電子供給はエネルギー的に難点があり、フラビン側鎖からの電子供給も、光照射によるセミキノン形成後、フラビンの分解が認められなかった事より否定できる。

D-アミノ酸酸化酵素の光還元時には酵素蛋白から電子が供給されるらしく、それを支持するような結果が得られた。

25. 人体基礎生理学研究所案についての報告

井上 章 (京大第2生理)

〔短報〕

〔会報〕

第1回生理学教育委員会議事録

日 時：昭和43年4月4日 午後4時30分～5時40分

場 所：熊本大学教養部会議室

出席者：藤森聞一・田崎京二・横山正松・高木貞敬・市河三太・内籾耕二・高橋 憲・名取礼二・真島英信・宮川 清・井上 章・中馬一郎・西田勇・入沢 宏・岡 芳包・問田直幹・佐藤昌康 (17名)

議事

1. 委員長より、昭和42年10月福岡で開かれた第27回国立大学医学部長会議の席上、文部省大学学術局より配布された「学生実験実習設備標準」に端を発し、昨年12月の東京、また今度の熊本における生理学常任幹事会の審議を経て、この委員会が組織されるにいたった経過が報告された。

2. 委員会の任務については、常任幹事会で、また4月3日午後開かれた生理学将来計画委員会同シンポジウムでも論議されたが、まず緊急になすべきことは、文部省が、その「設備標準」に基づいて現在の国立大学に対して学生の実験実習設備費を今年も大蔵省に要求する方針であるので、医学教育の現状に鑑み、今年度の概算要求手続に間に合うように本年6月までに、(1) 関連基礎医学会と連絡し、その協力をえて、基礎医学実験実習設備費の特配がうけられるように文部省対策その他を講ずること、(2) その過程において、2,000万円を越える二、三の学科があるのに生理学の設備費が最低に近い僅か700万円程度であというる

著しいアンバランスを、一旦答申されたものは本質的には直せないといわれていても、何とか修正の方策を講じてもらうこと、の二つであろうということになった。

3. 関連基礎医学会に対しては、松田庶務幹事から連絡、依頼してもらい、速やかに「合同教育委員会」の開催にこぎつけ、上記の対策を講じてもらうことにするが、なにぶんにも緊急のため、もし関連基礎医学会全部の参加がえられないばあい、あるいは種々の点で意見の一致がえられないばあいに対しても、生理学教育委員会としては何らかの対策を考究していかなければならないという意見がだされた。

4. 臨床医学教育方針が混乱状態に陥っている現状に鑑み、以上のほか関連基礎医学会としてもなるべく連絡、協力して速やかに準備態勢を備え、事前対策をたてるのが望ましいものと思われるので、生理学教育委員会としても、極力前向きにこの方面から問題を拾い、資料を整えることは必要とみなされる。しかしそれらはすべて常任幹事会へ報告し、さらに将来計画委員会とも連絡を密にし、それらの問題の処理ないし具体的対策の樹立などは、この教育委員会の権限外として、常任幹事会の指示にしたがうことが妥当であるという話し合いとなった。

5. 第2回委員会は5月2日午前10時半～午後3時(東大赤門横学士会館)とし、引続き3時～6時に同所で合同委員会の開催を予定す。

日本生理学会「教育委員会」の構成(19名)

藤森聞一(委員長)・内籾耕二(副委員長)・田崎京二・横山正松・高木貞敬・本間三郎・市河三太・高橋 憲・名取礼二・真島英信・宮川 清・伊藤竜・井上 章・中馬一郎・西田 勇・入沢 宏・岡 芳包・問田直幹・佐藤昌康

日本生理学雑誌編集発行人名義変更のお知らせ

日本生理誌の編集発行人名義は創刊号以降第30巻4号迄戸塚武彦君であったが、本号より内籾耕二君に変更しました。

〔学会予報〕

第18回(昭和46年)日本医学会総会

会頭 沖中重雄・副会頭 上田英雄・牛場大蔵・

準備委員長 中尾喜久

事務局 東京都千代田区神田駿河台2-5

日本医師会館 電話 03(291)2121

第18回日本医学会総会第一次準備計画案

1. 目標：第18回日本医学会は高度に専門化した各分科の進歩を総合し、これを将来の日本医学の発展と医療の向上に資する。

2. 日程：昭和46年4月5日(月)開会式 学術集会, 6日(火)学術集会, 7日(水)学術集会 閉会式

会期中 展示, 映画, テレビ等を行なう。

4月3日(土), 4日(日)の2日間を分科会に充てる。

3. 学術集会：開会講演, 総会講演, シンポジウム等とし, 総会講演は1時間以内, シンポジウム等は3時間以内を原則とする。なお, 別に夜間の公開講演等を予定している。

講演内容をよりよく理解して貰うためにはスライド, 口述法はじめ, その他の運営にできるだけ工夫を加える予定である。

4. 講演会場：総会には現在のところ

①上野, 文京地区. ②神田地区. ③大手町, 日比谷地区. ④虎の門地区. ⑤赤坂地区, の5地区で約30会場(約3万座席)を予定。

なお, 前記の2日間に開催される分科会には会場を総会において準備し, 協議の上決定する。

5. 開・閉会式場ならびに展示会場

(1) 開会式場 日本武道館

(2) 閉会式場 東大安田講堂の予定

(3) 展示会場 都立産業会館 その他

〔編集後記〕

○本誌の生みの親の1人であり, また育ての親でもあり, さらにまた現在編集委員の1人として, 本誌と共に30年を越す年月を歩んでこられた戸塚教授がこの度「編集兼発行人」の職を退かれることになりました。そしてこの職があらたに内菌教授にうつることになりました。一口に30年といえどもそれまでですが, 現在生理学の第一線で活躍中の若い研究者の生まれた頃からの年月と思うと, 短いようで長いものだとしみじみ感じます。30余年に亘って戸塚教授が本誌の育成と発展につくされた並々でない御骨折りに対し衷心よりお礼を申し上げ度いと存じます。

○3月の編集会議で7号までの編集が終り, 8号は学会号となります。したがって, 4月以降御投稿の原稿は9号以後に載ることとなります。

○生理学用語委員会の委員が決まり4月26日に委員会が発足致しました。今後のスケジュールは9月上旬に中間案を各評議員にお送りし御意見を求め, これを整理して11月中に結論を出す予定となっております。

当用漢字の選定や送り仮名のつけ方が白紙にもどって再検討され始めた今日, 生理学用語を決め

ることは少し時機が悪く決めにくいかもしれませぬ。しかし, どのように用語を決めたところで, 言葉とは所詮多くの人に愛用されるものだけが生き残るのではないのでしょうか? 明治時代に森鷗外が選定した軍隊用語のいくつが今日残っているのでしょうか? 現在われわれが「トマト」としているものは, それが日本に初めて輸入された江戸時代には「サンゴジュナスビ」といわれたようですが, これではあまりに長い名称だということで明治時代に「アカナス」と呼ばれるようになったとのことです。英語辞典の出版で有名な某社では英和辞典の寿命は7年とみております。このようなわけで言葉にもきびしい自然淘汰があります。このように考えますと学術用語は5年に1度位は検討し直す必要があると考えられます。この意味で生理学用語も国語審議会の審議とは無関係に再検討の時機に達したものということができましよう。

用語の改定は会員全体が関心をもつ問題であります。御意見なり御助言なりを短報欄にでも御投稿頂き, 用語改定に全会員が積極的に御協力下さるようお願い申し上げます。

(市岡正道記)

最新刊

■最新の知見を豊富に収載した人体生理学の決定版!／

新医科生理学

全3巻

京都府立医科大学教授 吉村 寿人・神戸大学医学部教授 岡本 彰祐 共編
京都府立医科大学教授 岩瀬 善彦・横浜市立大学医学部教授 川上 正澄

<上巻> B5判・512頁 図237・表31 上製本箱入 定価4,000円
<中巻> B5判・410頁 図179・表50 上製本箱入 定価3,500円
<下巻> B5判・約950頁 上製本箱入(組版中) 9月発刊予定一

本書は臨床医学の基礎的知識を与えるための人体の生理学書であることを主眼として書かれたものであって、生物学としての生理学を主体としたわが国の多くの生理学書の中にあって大きい特長をもっている。

なお本書の上巻は序論、血液、循環、呼吸の各編を収めて、吉村・岡本両教授の共編とし、中巻は消化吸収(中間代謝)、排泄、エネルギー代謝(体温調節)の3編を収めて、吉村教授が編集を分担、下巻は神経の一般生理、情報伝達、筋の生理、感覚生理、中枢神経系の生理、内分泌、生殖の7編を収めて、吉村・岩瀬・川上の3教授の共編となっている。いずれも病態生理学領域にふれ、臨床医を志す医学生の教科書臨床医の参考書としてユニークなものである。

【内容見本送呈】

生理学 上・下巻

加藤元一著 各B5

上巻：定価2,000円

挿図に特別の注意をはらい十分理解できるように再編した好著。下巻：定価2,000円

運動生理学序説

井上・品川共著

A5判・186頁

人体の筋運動に関連した事項の詳細な生理学的解説を主に記述、

定価500円

生体膜実験技術

大西 勁編

A5判・492頁

電子顕微鏡観察から人工膜まで37項にわたり膜研究の分野を網羅。

定価2,700円

興奮性膜の一般生理

北里 宏著

A5判・216頁

生体膜の実験を志す人々に膜の物理化学的取扱いの一典型を提供。

定価980円

ムコ多糖の構造と機能

長谷川栄一他著

B5判・200頁

これまでに発見された殆どすべてのムコ多糖について詳細に記述した。

定価1,000円

医学英語の知識

持田 製葉編

新書判・220頁 定価600円

本書は、辞書にない読み覚える医学英語の決定版として、病歴のとり方を始め各部人体の名称を図解をまじえて、入門的に基礎から応用まで平易詳解した医学英語のガイドブック。従来の医学英語にくらべ、患者の主訴をそのまま英語でつづる実用書。

本店 118 東京都文京区本郷3丁目42・振替口座東京 149・電話(811)7234(代表)

支店 604 京都市中京区寺町通御池南・振替口座京都5050・電話(221)7841(代表)

南江堂

新発売

動物実験に理想的な非動性を得られる

非脱分極性筋弛緩剤

2%ガラミン注射液“テイサン”

(1 ml中20 mgのガラミントリエチオダイドを含有)

〔特長〕

1. 理想的な筋弛緩が得られ、持続性あり、完全に可逆性。
2. 循環系に対して副作用が少ない、一過性に脈博数の増加と血圧の軽度上昇をみるのみ。
3. 非常に安定で経年変化が少い。
4. 拮抗剤により拮抗される。

〔包装〕 20ml (400mg)バイアル

5ml (100mg)10管

販売

長瀬産業株式会社 化学品第二部

大阪市東区平野町3-6

製造

帝国化学産業株式会社

大阪市西区北堀江上通1-10(大阪中央ビル)

比色計の価格で 分光計の性能！

340 ~ 800 $m\mu$

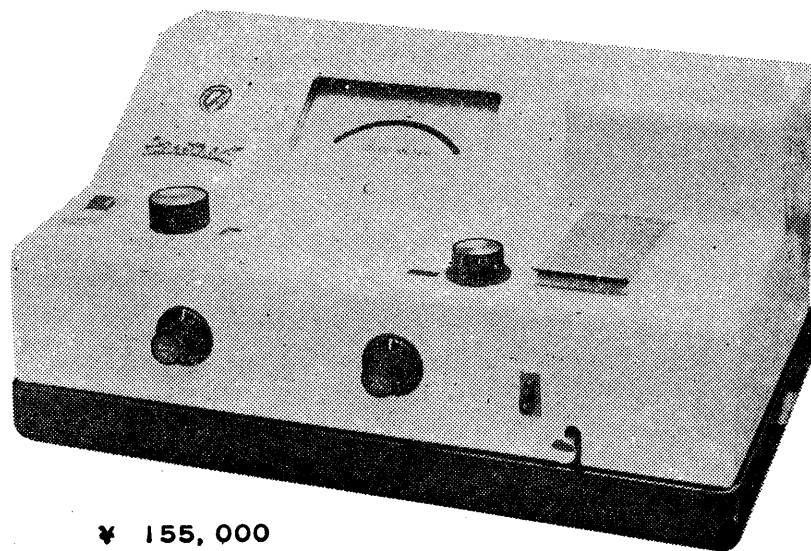
合金鑄造の匡体中に密封されたモノクロメーターはリトロー式マウンティングで重フリントプリズム使用により340~800 $m\mu$ の範囲で常に高い分解能を示します。すなわち可視域中心部で波長巾5 $m\mu$ のスペクトル純度が得られます。他器と比較してください。

電源には本器のために開発した光電式定電圧回路を採用、 $\pm 10V$ の変動に対し0.3%におさえ、周波数変動の心配もありません。

検出管には光電子増倍管を使用しています。

吸収液槽は10mm角硝子、同時に4本セット。

分光光電比色計スペクトロ-5



¥ 155,000

伊藤超短波株式会社

東京都文京区白山1丁目23番15号

電話 03 (812) 1216 (代表)

営業所 大阪市住吉区菟田町11の7 電話 06 (691) 1163

営業所 名古屋市中区大池町5の2 電話 052 (251) 3049

J. Physiol. Soc. Japan Vol. 30. No. 5 (1968)

Originals

Hideo Saito : Effects of luteinizing hormone and oxytocin hypothalamic unit activity in female cat 299

Masao Matsumoto, Kunio Nakazato and Jun Tanaka : Studies on the fitness for the action requiring quickness and learning effect (1) On the test result of adult men and women 311

Shinzi Maeda : Studies on mammalian hemoglobins by "Fingerprinting" procedure
 I. Comparison of normal human hemoglobins A₁, A₂ and F 318

Michio Santa : Studies on hemoglobin A₂. I. Isolation and some physicochemical proper ties 337

Short communications

Toshiyuki Ozaki and Yoshimasa Konda : On the application of the interval histogram for the analysis of the microvibration (MV) 353

Tokuro Fukuda and Nobuko Akagawa : Induction of hemorrhagic lesion of intestinal mucosa by hypercalcemia in adrenalectomized rats 355

昭和四十三年四月二十日印刷

編集兼
 発行人

東京都文京区本郷七丁目三の一号
 内 東京大学医学部生理学教室
 菌 耕 二

印刷者
 印刷所

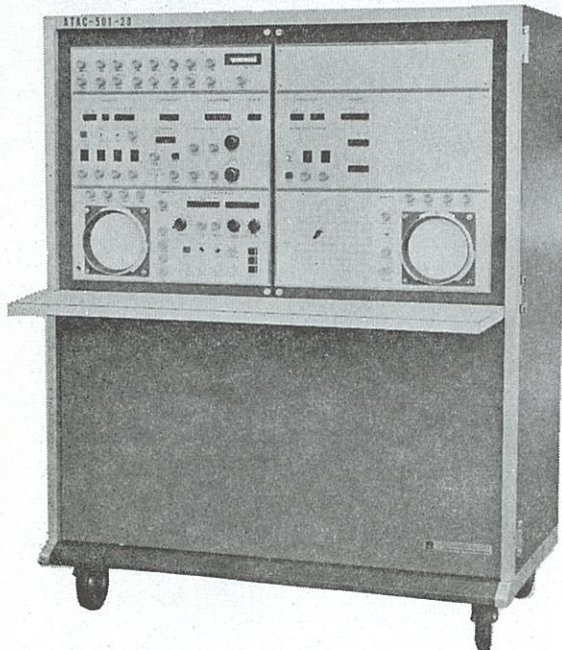
山形県鶴岡市山王町一四一四
 平 田 貞
 鶴岡印刷株式会社

発行所

東京都文京区本郷七丁目三の一号
 東京大学医学部生理学教室
 日本生理学会

振替
 東京八六四三〇
 四〇
 代

光電 医学のあらゆる分野に活躍する



データ処理用電子計算機

ATAC-501-20型

主なプログラム

- 加算平均
- 自己・相互相関
- 時間ヒストグラム
- 移送平均
- 振幅ヒストグラム
- データ移送
- メモスコープ
- 微積分
- プログラムプッシュボタン切換式
- On-line方式
- 出力アナログデジタル両方式



日本光電工業株式会社
 東京都新宿区西落合1-31-4 (953) 1181代