In vivoおよびin vitroにおける β -エンドルフィン様免疫活性に対するbradykininの影響

徳島大学第二内科学教室

(指導: 森 博愛)

清水 一郎, 松村 光博

In Vivo and In Vitro Effects of Bradykinin on the Release of β -Endorphin-Like Immunoreactivity

Ichiro SHIMIZU and Mitsuhiro MATSUMURA

Second Department of Internal Medicine, School of Medicine

University of Tokushima

Tokushima 770, Japan

(Director: Professor Hiroyoshi Mori)

The effect of bradykinin (BK) on the release of β -endorphin-like immunoreactivity (β -END-LI) in rats was studied in *in vivo* and *in vitro*. Intraperitoneal injection of BK at $5\mu\text{g}/100\text{g}$ body weight resulted in a significant increase in the plasma β -END-LI level after 15 min. BK at concentrations of $10^{-12} \sim 10^{-7}\text{M}$ also caused dose-dependent stimulation of β -END-LI release from the dispersed cells of the anterior pituitary of rats. On gel chromatography, the β -END-LI released by incubation of the cells with 10^{-7}M BK separated into two components; one eluted in the same positions as human β -lipotropin and the other as human β -endorphin. BK did not stimulate β -END-LI release in Ca^{++} - free medium. Addition of 10^{-3}M verapamil, 10^{-6}M dexamethason or 10^{-7}M somatostatin to the incubation medium inhibited BK-induced β -END-LI release from the cells. Ouabain (10^{-5}M) also stimulated β -END-LI release, but its effect was not additive with that of BK. These results indicate that BK stimulates β -END-LI release and that calcium ion is involved in the mechanism of this effect.

緒 言

β -Endorphin (β -END) は, pre-opiomelanocortin の一つで, β -lipotropin (β -LPH) のC 端側の 61-91位と同一のアミノ酸配列を示すペプチドとして知られている¹⁾。本ペプチドは下垂体に最も多く含まれているが, そのほか脳, 消化管, 脾, 胎盤などにもあることが報告されている^{2) 5) 9) 10) 11) 16)}。

一方, キニン は血液凝固・線溶に関する作用, 血圧・血流・血管透過性に関する作用, 発痛作用, カテコールアミン, ヒスタミン放出刺激作用などの多彩な作用があることが知られている⁴⁾。

本ペプチドは, 脳では主として視床下部に高濃度に存在するため, 下垂体前葉ホルモンの分泌調節に関与している可能性が推測されている。そこで, 著者らはブラディキニン (BK) による β -エン

ドルフィン様免疫活性 (β -END-LI) の分泌動態および分泌機序を明らかにするために本研究を行った。

研 究 方 法

1. 試薬

合成ヒト β -リポトロピン (β_h -LPH) は NIAMDD (U. S. A.) より, 合成ヒト β -エンドルフィン (β_h -END), γ -エンドルフィン (γ -END) および δ -エンドルフィン (δ -END) は武田製薬の藤野政彦博士より分与されたものを用いた。ブラディキニンおよびソマトスタチンは蛋白質研究奨励会より, deoxyribonuclease (DNase), トリプシンインヒビター, verapamil, ウアバインは Sigma 社より, 牛血清アルブミン (BSA) は生化学工業より, トリプシンは Worthington Biochemical (U. S. A.) より購入した。

2. 実験動物

In vivo の実験には, 体重200-250g の Wistar 系雄性ラット 5 匹 1 群とし, 室温22℃の動物室で, 水と飼料 (オリエンタル固形飼料 MFI) を自由に与えて飼育した。ペントバルビタール麻酔下に体重100g あたり 5 μ g の BK を腹腔内に投与し, 15分および30分後に断頭屠殺し, 血液 1 ml 当たり tr-asylol 500KIU および ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 1.2mg を入れた試験管に血液を採取し, 混和後, 4℃で血漿を分離したのち, -20℃で凍結保存した。

3. 遊離下垂体前葉細胞の作成法

In vitro の実験には, 体重200-250g の Wistar 系雄性ラット 15 匹を断頭屠殺し, 開頭して下垂体を摘出し, 中・後葉部を除去し, 下垂体前葉組織を細片し, 0.25%トリプシンおよび0.04%DNase を含む pH7.4 の Earle's balanced salts solution (EBSS) を加え, spinner bottle 内で95%O₂ および 5%CO₂ を送気しながら, 37℃, 20分間インキュベートし, 下垂体前葉細胞浮遊液を採取した。これにあらたに0.25%トリプシンおよび0.04%DNase を含む EBSS を加えて37℃, 20分間インキュベートした。

この操作を 4 回繰り返した後, 4,000回転45秒間遠心し, 上清を除去したのち, 沈渣に0.05%トリプシンインヒビターおよび0.25%BSA を含む EBSS を加え, 再び4,000回転で45秒間遠心した。

この操作を 2 回繰り返したのち, 1 ml 当たり 10 万個の細胞を0.25%BSA を含む EBSS (pH7.4) 中で2時間ブレインキュベートした後, 対照液として0.25%BSA を含む EBSS または被検物質を含むメジウムと交換して60分間作用させ, メジウム中に放出された β -END-LI をラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。

4. 抗 β -END 抗体の作成法

抗 β -END 抗体は, bisdiazotized benzidine (BDB) 法を用いて合成ヒト β_h -END とウシ血清アルブミンを結合させ, この結合物を complete Freund adjuvant と混合したものを 2 週間隔で家兔に注射して作成した。この抗 β -END 抗体は, β_h -LPH と約4.5% (モル比) 交差するのみで, ACTH, α -, γ - および δ -END, enkephalins および各種の視床下部ホルモンとは交差性を示さなかった。

5. ¹²⁵I による β_h -END のヨード化

¹²⁵I による β_h -END の標識はクロラミン T 法により行い, Sephadex G-25 (medium) を充填したカラム (1×18cm) により, ¹²⁵I- β_h -END を分離した。 β_h -END の RIA による測定は, Matsu-mura ら⁹⁾が報告した方法により行った。本法の感度は 4 pg/tube と, 256pg/tube の間で良好な用

量反応性を示した。

6. 血漿 β -END-LI の抽出法

血漿 β -END-LI は、血漿2.5ml に 2 倍量の酸アセトン (酢酸 4 : アセトン 100) を加えて除蛋白後、その上清を 2 倍量の石油エーテルで 2 回洗浄し、石油エーテル層を除去した残液を真空遠心乾燥した後、測定用緩衝液に溶解して RIA を行なった。その際、各サンプルについてブランク (第一抗体のみを加えないもの) を用意し、非特異的干渉の影響を除外して測定値の計算を行った。添加回収率は約 73% であった。

7. ゲル濾過法による分析法

ラット遊離下垂体前葉細胞から放出された β -END-LI のゲル濾過法による分析には、Sephadex G-50 (fine) を充填したカラム (0.9×45cm) を使い、0.1% BSA 添加 0.1N 酢酸により 15ml/h の速度で溶出した溶出液を 1 ml ずつ採取し、各分画を凍結乾燥したのち、測定用緩衝液に溶解し、 β -END-LI を RIA により測定した。

8. 有意差検定

測定値の有意差検定は Students' t test により行なった。

研 究 成 績

1. In vivo での BK 投与による血漿 β -END-LI 濃度の変化

Fig. 1 に示すように、対象群では 15 分および 30 分後に血漿 β -END-LI 濃度の増加を示さなかった。一方、BK (5 μ g/100g 体重) 投与群では、前値 65.4 ± 2.6 pg/ml から投与 15 分後には 130.8 ± 18.2 pg/ml (平均値 $\pm$ 標準偏差, * $p < 0.001$) と有意の血漿 β -END-LI 濃度の上昇を示した。

Fig. 1. Plasma β -END-LI levels 0 (□), 15 (▨) and 30 (▩) min after peritoneal injection of physiological saline (0.1ml/100g BW) or BK (5 μ g/100g BW). Values are means $\pm$ SEM. Figures in parenthesis indicate numbers of rats.
* $p < 0.001$ vs. control.

2. BKによるラット遊離下垂体前葉細胞からの β -END-LI放出の経時的変動

Fig. 2に示すように、BK投与群では対象群に比べて60分後に有意の β -END-LIの放出増加を認め、120–180分後にはより著明な放出増加を認めた。

Fig. 2. Time course of release of β -END-LI from the dispersed cells of the anterior pituitary of rats in the absence (○) or presence (●) of 10^{-7} M BK.

Points and bars indicate means $\pm$ SEM for four experiments.

* $p < 0.001$ vs. the corresponding control value.

3. 種々の濃度のBKによる遊離下垂体前葉細胞からの β -END-LI放出効果

10^{-12} – 10^{-7} M濃度のBKを用いて用量反応性の検討を行った。 10^{-12} MのBK添加により、有意の β -END-LI放出増加を認め、 10^{-7} Mまでの間で用量反応性を認めた (Table 1)。

4. 遊離下垂体前葉細胞から放出された β -END-LIのゲル濾過による分析

メジウム中に放出された β -END-LIの分子サイズを検討すると、Fig. 3に示すように、 β -END-LIは合成ヒト β _h-LPHおよび合成ヒト β _h-ENDの溶出部位と同一部位に溶出され、その割合はモル比で約5.2:1であった。

5. BKによる遊離下垂体前葉細胞からの β -END-LI放出に対する Ca^{++} の効果

10^{-7} M濃度のBKを遊離下垂体前葉細胞と60分間インキュベートした際、細胞からの β -END-LI放出は Ca^{++} 無添加時には認めなかった。一方、1.25 mMの Ca^{++} 添加により細胞からの β -END-LI放出が増加し、2.5 mM以上の濃度の Ca^{++} の添加では細胞からの β -END-LI放出は頂値に達した (Fig. 4)。

6. BKによる遊離下垂体前葉細胞からの β -END-LI放出に対するverapamilの効果

10^{-3} M濃度のverapamilを遊離下垂体前葉細胞と60分間インキュベートしたが、細胞からの β -END-LI放出は認めなかった。一方、BKによる β -END-LI放出は、verapamilの同時添加により抑制された (Table 2)。

Table 1. Dose-response to bradykinin of β -END-LI release from the dispersed cells of the anterior pituitary of rats.

Bradykinin concentration (M)	β -END-LI release (pg/60 min/ 10^5 cells)
0	0.59 $\pm$ 0.04
10^{-12}	0.90 $\pm$ 0.30*
10^{-11}	1.14 $\pm$ 0.21**
10^{-10}	1.69 $\pm$ 0.21**
10^{-9}	2.18 $\pm$ 0.20**
10^{-8}	2.44 $\pm$ 0.16**
10^{-7}	2.56 $\pm$ 0.13**
10^{-6}	2.49 $\pm$ 0.07**

Values are means $\pm$ SEM for five samples.

* p < 0.01 vs. control.

** p < 0.001 vs. control.

Fig. 3. Gel-filtration chromatography on Sephadex G-50 of β -END-LI released from the dispersed cells of the anterior pituitary of rats in the presence of 10^{-7} M BK. The column (0.9×45 cm) was calibrated with synthetic β_h -LPH, synthetic β_h -END.

Fig. 4. Effect of calcium ion on β -END-LI release from the dispersed cells of the anterior pituitary of rats induced by 10^{-7} M BK. The cells were incubated at 37°C for 60 min in the medium containing no calcium ion (□) or 1.25mM, 2.5mM or 5mM Ca^{++} with 10^{-7} M BK (▨). Values are means $\pm$ SEM for four experiments. * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.001$ vs. control.

Table 2. Effect of verapamil on bradykinin-induced β -END-LI release from the dispersed cells of the anterior pituitary of rats.

Addition	β -END-LI released (ng/60 min/ 10^5 cells)
None	1.70 ± 0.25
Verapamil (10^{-3} M)	1.72 ± 0.22
Bradykinin (10^{-7} M)	$4.22 \pm 0.20^*$
Bradykinin (10^{-7} M) plus verapamil (10^{-3} M)	$2.21 \pm 0.30^{*,+}$

Values are means $\pm$ SEM for five samples.

* $p < 0.001$ vs. control.

*,+ $p < 0.001$ vs. bradykinin.

Table 3. Effect of dexamethasone on bradykinin-induced β -END-LI release from the dispersed cells of the anterior pituitary of rats.

Addition	β -END-LI released (ng/60 min/ 10^5 cells)
None	1.50 ± 0.05
Dexamethasone (10^{-6} M)	$1.07 \pm 0.06^*$
Bradykinin (10^{-7} M)	$2.95 \pm 0.05^{**}$
Bradykinin (10^{-7} M) plus dexamethasone (10^{-6} M)	$0.94 \pm 0.02^{**,+}$

Values are means $\pm$ SEM for five samples.* $p < 0.01$ vs. control.** $p < 0.001$ vs. control.**, + $p < 0.001$ vs. bradykinin.7. BK による遊離下垂体前葉細胞からの β -END-LI 放出に対するデキサメサゾンの効果

10^{-6} M 濃度のデキサメサゾンを遊離下垂体前葉細胞と 60 分間インキュベートすると, 細胞からの β -END-LI 放出は抑制された。また, BK による β -END-LI 放出も, デキサメサゾンの同時添加により抑制された (Table 3)。

Table 4. Effect of somatostatin on bradykinin-induced β -END-LI release from the dispersed cells of the anterior pituitary of rats.

Addition	β -END-LI released (ng/60 min/ 10^5 cells)
None	1.53 ± 0.10
Somatostatin (10^{-7} M)	$1.10 \pm 0.04^*$
Bradykinin (10^{-7} M)	$5.30 \pm 0.41^{**}$
Bradykinin (10^{-7} M) plus somatostatin (10^{-7} M)	$4.78 \pm 0.38^{**,+}$

Values are means $\pm$ SEM for four samples.* $p < 0.01$ vs. control.** $p < 0.001$ vs. control.**, + $p < 0.01$ vs. bradykinin.

8. BKによる遊離下垂体前葉細胞からの β -END-LI放出に対するソマトスタチンの効果

10^{-7} M 濃度のソマトスタチンを遊離下垂体前葉細胞と60分間インキュベートすると、細胞からの β -END-LI放出は抑制された。また、BKによる β -END-LI放出も、ソマトスタチンの同時添加により抑制された (Table 4)。

9. BKによる遊離下垂体前葉細胞からの β -END-LI放出に対するウアバインの効果

10^{-5} M 濃度のウアバインを遊離下垂体前葉細胞と60分間インキュベートすると、細胞からの β -END-LI放出は有意に増加したが、BKによる β -END-LI放出に対しては影響を与えなかった。(Table 5)。

Table 5. Effect of ouabain on bradykinin-induced β -END-LI release from the dispersed cells of the anterior pituitary of rats.

Addition	β -END-LI released (ng/60 min/ 10^5 cells)
None	1.10 ± 0.05
Ouabain (10^{-5} M)	$2.20 \pm 0.04^*$
Bradykinin (10^{-7} M)	$2.31 \pm 0.09^*$
Bradykinin (10^{-7} M) plus ouabain (10^{-5} M)	2.27 ± 0.05

Values are means $\pm$ SEM for four samples.

* $p < 0.001$ vs. control.

考 察

キニン系は心・血管系、平滑筋、内分泌腺などに多彩な作用を示し、血液凝固や炎症の発現に関連が深いことが知られている⁴⁾。最近、ブラディキニン(BK)が視床下部に高濃度に存在することが明かになり³⁾、BKが下垂体前葉ホルモンの分泌に関与することが推測されている。

著者らは、BKによる β -END-LIの分泌動態および分泌機序を明らかにするために、in vivoおよびin vitroの実験により検討した。まず、in vivoの実験として、BKをラット腹腔内に投与すると、Fig. 1に示すように血漿 β -END-LI濃度が増加することをみいだした。

このことは、視床下部にあるBKが、下垂体門脈系を介して下垂体前葉に送られ、 β -END-LIの分泌を刺激する可能性があることを示している。しかし、現在、下垂体門脈血中の生理的なBK濃度は未だ明かにされていない。また、ラット腹腔内に投与したBKが、下垂体前葉における β -END-LIの分泌を刺激し得る程度の下垂体門脈一血中BK濃度をもたらすかどうかとも明かでない。

そこで、ラット遊離下垂体前葉細胞を用いて、BKによる β -END-LIの放出効果を検討した。Table 1に示すように、BKは 10^{-12} — 10^{-7} M 濃度の範囲で用量反応性に β -END-LIの放出を促進した。このことは、下垂体門脈血液中のBK濃度が 10^{-12} M以上に達すると、BKは β -END-LIを放出する可能性があることを示唆している。

β -LPH, endorphins などは ACTH と共通の前駆体由来することが明かにされ、これらのペプチドの作用あるいは分泌機序について強い関心が持たれている。従来、 β -END の分泌刺激因子としては、インスリン低血糖、メチラポン、バゾプレッシン、corticotropin releasing factor (CRF) などが知られている^{13) 15) 20)}。また、in vitro では、バゾプレッシン、高 K^+ および CRF が、 β -END の分泌を刺激することが知られている^{12) 17) 18)}。

Matsumura ら⁸⁾は、ウアバインがラット遊離下垂体前葉細胞からの β -END-LI の放出増加を起こすことを報告している。その機序として、ウアバインは $Na^+-K^+-ATPase$ の阻害を介して Ca^{++} の汲み出しを抑制し¹⁹⁾、高濃度の K^+ は膜を脱分極して Ca^{++} の透過性を増加し、ともに Ca^{++} の細胞内濃度を増加して β -END-LI の放出を促進するものと考えられる。

Verapamil, デキサメサゾンおよびソマトスタチンには、 Ca^{++} の細胞内流入を競合的に阻害する作用があることが知られている^{7) 21)}。本研究において、verapamil, デキサメサゾンおよびソマトスタチンは、BK による β -END-LI の放出を抑制した。また、 Ca^{++} 無添加状態では、BK による β -END-LI の放出はみられなかった。これらの所見は、BK による β -END-LI の放出に Ca^{++} が関与することを示唆している。

BK の生理的意義については、未だ不明な点が少なくない。Fields と Basbaum⁶⁾、および Ribeiro ら¹⁴⁾は、BK の灰白質内投与により鎮痛効果を増すことを報告している。免疫組織化学的検討により、この部位には β -END が高濃度に存在することが知られており¹⁶⁾、BK による鎮痛作用が内因性オピオイド物質の一つである β -END を介して作用する可能性を示唆している。

以上、in vivo の検討で BK が血漿 β -END-LI の分泌を促進することを明かにした。また、ラット遊離下垂体前葉細胞を用いた in vitro の検討から、BK が直接に下垂体前葉細胞に作用して β -END-LI の放出を促進することを明かにした。また、この BK による β -END-LI の放出には Ca^{++} が関与することを示唆する所見を得た。

結 論

β -エンドルフィン様免疫活性 (β -END-LI) 放出に対するブラディキニン (BK) の効果を in vivo および in vitro の実験により検討し、以下のような結果を得た。

- 1) 体重100g あたり $5\mu g$ の BK をラットの腹腔内に投与すると、血漿 β -END-LI 濃度は15分後に有意に増加した。
- 2) 10^{-12} - $10^{-7} M$ 濃度の BK の存在下で、ラット遊離下垂体前葉細胞をインキュベートすると、用量反応性に β -END-LI の放出が増加した。しかし、メジウムから Ca^{++} を除いた際には、この放出促進効果は認められなかった。
- 3) メジウム中に放出された β -END-LI をゲル濾過法を用いて検討すると、ヒト β_h -lipotropin とヒト β_h -endorphin の溶出部位と同じ位置に溶出された。
- 4) メジウム中に、1mM の verapamil と BK を同時添加すると、BK による β -END-LI 放出促進は抑制された。
- 5) メジウム中に、 $10^{-6} M$ のデキサメサゾンと BK を同時添加すると、BK による β -END-LI 放出促進は抑制された。
- 6) メジウム中に、 $10^{-7} M$ のソマトスタチンと BK を同時添加すると、BK による β -END-LI 放出促進は抑制された。

7) ウアバインは β -END-LIの放出を促進するが、その効果はBKの放出促進効果に影響を与えなかった。

これらの結果は、BKが直接に下垂体前葉細胞に作用し、 β -END-LIの放出を促進し、この放出促進作用には Ca^{++} が関与することを示している。

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました森 博愛教授に深謝します。また、御協力頂いた第二内科教室員各位に感謝します。

本論文の要旨の一部は第54回内分泌学会総会（岡山，1981）で発表した。

文 献

- 1) Bradbury, A.F., Smyth, D.G. and Snell, C.R.: Biosynthesis of β -MSH and ACTH, 609–615. Ed. by Water, R. and Meienhofer, J., Chemistry: Structure and Biology, Ann Arbor Sci. Inc., 1975.
- 2) Bruni, J.F., Atkins, W.B. and Yen, S.S.C.: β -Endorphin in the human pancreas. J. Clin. Endocrin. Metab., 49: 649–651, 1979.
- 3) Corrêa, F.M., Innis, R.B., Uhl, G.R. and Snyder, S.H.: Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 1489–1493, 1979.
- 4) Eisen, V.: Formation and function of kinins. Rheumatology, 3: 103–168, 1970.
- 5) Feurle, G.E., Weber, V. and Holmstaedter, V.: β -Endorphin-like material in human pancreas and pyloric antral mucosa. Life Sci., 27: 467–473, 1980.
- 6) Fields, H.L. and Basbaum, A.I.: Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. Annu. Rev. Physiol., 40: 217–248, 1978.
- 7) Maruyama, T. and Ishikawa, H.: Somatostatin: its inhibitory effect on the release of hormones and IgG from clonal cell strains. Its Ca -influx dependence. Biochem. Biophys. Res. Commun., 74: 1083–1088, 1977.
- 8) Matsumura, M., Yamanoi, A., Yamamoto, S. and Saito, S.: In vivo and in vitro effects of substance P on the release of β -endorphin-like immunoreactivity. Neuroendocrinology, 35: 163–168, 1982.
- 9) Matsumura, M., Saito, S. and Fujino, M.: Effects of solution of low pH and taurocholate on release of β -endorphin-like immunoreactivity from human duodenal mucosa in vitro. Regul. Peptides., 3: 173–181, 1982.
- 10) Nakai, Y., Nakao, K., Oki, S. and Imura, H.: Presence of immunoreactive β -endorphin in human placenta. Life Sci., 23: 2013–2018, 1978.
- 11) Orwall, E.S. and Kendall, J.E.: β -Endorphin and adrenocorticotropin in extrapituitary sites: gastrointestinal tract. Endocrinology, 107: 438–442, 1980.
- 12) Przewlocki, R., Holtt, V. and Herz, A.: Release of β -endorphin from rat pituitary in vitro. Eur. J. Pharmacol., 15: 179–183, 1978.
- 13) Przewlocki, R., Holtt, V., Voigt, K.H. and Herz, A.: Modulation of in vitro release of β -endorphin from the separate lobes of the rat pituitary. Life Sci., 24: 1601–1608, 1979.
- 14) Ribeiro, S.A., Corrado, A.P. and Graeff, F.G.: Antinociceptive action of intraventricular bradykinin. Neuropharmacology 10: 725–731, 1971.
- 15) Rivier, C., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J. and Vale, W.: In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, β -

- endorphin and corticosterone. *Endocrinology*, 110: 272–278, 1982. 16) Rossier, J., Vargo, T.N., Minick, S., Ling, N., Bloom, F.E. and Guillemin, R.: Regional dissociation of β -endorphin and contents in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5162–5165, 1977. 17) Vale, W., Rivier, C., Yang, L., Minick, S. and Guillemin, R.: Effects of purified hypothalamic corticotropin-releasing factor and other substances on the secretion of adrenocorticotropin and β -endorphin-like immunoreactivities in vitro. *Endocrinology*, 103: 1910–1915, 1978. 18) Vale, W.J., Spiess, J., Rivier, C. and Rivier, J.: Characterization of a 41 residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science*, 213: 1394–1397, 1981. 19) Vizi, E.S.: $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - activated adenosine-triphosphatase as a trigger in transmitter release. *Neuroscience*, 3: 267–384, 1978. 20) Wardlaw, S.L. and Frantz, A.G.: Measurement of β -endorphin in human plasma. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 48: 176–180, 1979. 21) Weakly, J.N.: The action of cobalt ions on neuromuscular transmission in the frog. *J. Physiol.*, 234: 597, 1973. (受付日: '85. 7. 24)