平滑筋に見られるグリセロール効果について

札幌医科大学 第一生理学教室

藤 野 和 宏

ON 'GLYCEROL EFFECT' IN SMOOTH MUSCLE

Masahiro FUJINO

Department of Physiology, Sapporo Medical College, Sapporo

1. In order to discuss 'glycerol effect' in smooth muscle, an outline of the effect in frog skeletal muscle was described. Since the effect relates functionally and structurally to the excitation-contraction coupling (E-C coupling) process, an introductory description on the structure and E-C coupling in smooth muscle was also made.

2. In a Ringer containing glycerol or urea, contractility of frog stomach muscle decreases and then recovers; upon removing the substances, the contractility is again inhibited and then recovers after the lapse of relatively long time. In response to urea-Ringer, a similar phenomenon occurs also in frog ventricular cardiac muscle. It could, thus, be said that the appearance of 'glycerol effect' has no relation to the presence or absence of the transverse tubular system in muscle cell.

3. Our preliminary electrophysiological results show that these inhibition of the contractility is due to a disturbance of E-C coupling and Ca-event.

4. Ringer containing glycerol or urea exerts an ordinary hyperosmotic effect on frog skeletal, stomach, and ventricular cardiac muscles; nevertheless, the substances exist within cells.

5. Based on these findings, the site in the vicinity of plasma membrane was pointed out as the structure responsible for the inward transmission of excitation for triggering contraction.

すべての生理的収縮は、筋細胞種を問わず、先行する膜興奮（或は脱分極）によってひきおこされる。すなわち、収縮（contraction）は興奮（excitation）に連関（couple）しており、筋細胞（すなわち、筋線維）表面の形質膜の興奮は細胞内部の収縮機構の活動をひきおこす引き金なのである。この興奮収縮連関（excitation-contraction coupling, E-C coupling）がはっきりした形で問題として取りあげられて来たのは1950年前後の

事である（たとえば Hill¹⁾, Sandow²⁾）。当時は actomyosin-ATP 学説（収縮機構）と Na 学説（膜の興奮機構）とが互に独立に収縮と興奮の夫々の機序に骨組乃至実体を明瞭に与えていた時期であった（例えば Szent-Györgyi³⁾, Hodgkin⁴⁾）。

しかし、電気現象（興奮）と機械的現象（収縮）を平滑筋に於て同時に記録しようとする試みは可成り以前に始まっていた（例えば Hasama^{5,6)}）。

これはある意味では平滑筋に於ける E-C coupling に関する研究の始まりとも云える。一般的には、しかし、E-C coupling についての知見は主として骨格筋について系統的に集積し、主題の私共のグリセロール効果 ('glycerol effect') は骨格筋の E-C coupling に関連して見出された (Fujino, Yamaguchi & Suzuki; 1961⁷⁾). 特にこれは骨格筋細胞に特有な transverse tubular system すなわち T-system に関する効果であると現時点では一般にそのように信じられている様

である (Eisenberg & Eisenberg⁸⁾, Howell⁹⁾) (但し、後述と Fujino, Yamaguchi & Fujino^{10, 73)}). 平滑筋細胞の E-C coupling についてはその興奮機構の担手と見なされる Ca が直ちに収縮系の活動をひきおこす役をも担うとしばしば考えられ (後述), その意味では実質的な E-C coupling process は存在せず, excitation すなわち contraction と云うことになる. この考え方は次の様な平滑筋細胞の形態乃至構造的特徴に矛盾しない.

平滑筋細胞の形態と構造

平滑筋細胞は骨格筋細胞に比べてずっと小型である. 長さで 1000μ を越えるものはまずなく, 多くは 500μ 以下で, 例えばマウス小腸では 400μ (Taxi¹¹⁾), モルモットの taenia coli では 200μ (Bennet & Rogers¹²⁾), 同じく vas deferens では 450μ (Merrillees¹³⁾) 血管平滑筋では一般により短かく, 例えば, 豚の renal vein では 110μ (Prosser, Burnstock & Kahn¹⁴⁾), 家兎の arteriole では $30-40\mu$ (Rhodin¹⁵⁾) と報告されている. 太さ乃至直径は核の存在する部位で測って 5μ 前後で, 10μ を越すものは先ずない. 小さいものでは 2μ 位のものもある (マウス jejunum の縦走筋—Lane¹⁶⁾; 同じく small arteries—Rhodin¹⁷⁾). 勿論, 平滑筋細胞にも大型のものがあ

り, 妊娠子宮では大きいと云われるが, それでも $600\times 10\mu$ 位である (Csapo¹⁸⁾). また, 平滑筋細胞に於ても endoplasmic reticulum (Mark¹⁹⁾, Gansler²⁰⁾) や longitudinal smooth sarcotubular system (Yamauchi²¹⁾, Lane²²⁾, Rogers²³⁾), transversely-oriented tubules (Rogers²³⁾) などの細胞内の膜系があるけれども, 骨格筋細胞での常識からすると, それらは量的に乏しく, 又それらの分布にも格別の規則性がない. つまり, しばしば "余り発達していない" と表現されている. しかし, 興味あることに, Burnstock & Merrillee²⁴⁾ はラットの vas deferens の様な速やかに収縮する筋では endoplasmic reticulum が著明である (図 1) と述べ, さらに Lane²²⁾ はマウスの膀胱筋細胞の longitudinal tubular system に骨格筋細胞の longitudinal tubules におけると同様に, ATP-ase 活性が局在すると報告した.

ほとんど大部分の平滑筋細胞には plasma membrane で開口している約 $700\times 2500\text{\AA}$ の略卵形状の構造物が多数見られ, plasmalemmal vesicle (或は micropinocytotic vesicle) と呼ばれる (Caeser, Edwards & Ruska²⁵⁾; Prosser, Burnstock & Kahn¹⁴⁾; Yamauchi²¹⁾; Nagasawa & Suzuki²⁶⁾) (図 1). この vesicle は平滑筋細胞にむしろ特徴的と思われる構造物であって, Goodford *et al.*²⁷⁾ の計算によると, 細胞の表面積を約 70% 増す結果を生む. また, endoplasmic reticulum と連絡することがある (Burnstock & Merrillees²⁴⁾) (図 1), Rostgaard & Barnett²⁸⁾ や Lane²²⁾ はラット小腸筋細胞の plasmalemmal vesicle に高い ATP-ase 活性があることを証明した. plasmalemmal vesicle の機能につき Nagasawa & Suzuki²⁶⁾ は relaxing factor と関係づけ, また Yamauchi²¹⁾ は電気抵抗を減らすことによって, 興奮の速度を促進すると述べている. これらの vesicle 以外に, plasma membrane のすぐ下に位置して細胞外に開口していない構造物 ($1000-3000\text{\AA}$ の直径) が多くあり (図 1), surface cisterna (或は vacuole) と呼ばれる (Prosser, Burnstock & Kahn¹⁴⁾; Yamauchi²¹⁾).

以上の様に, 平滑筋細胞には構造上骨格筋細胞とは異なる幾つかの点があり, 機能の分析も進められているが, それらの各々が骨格筋細胞での理解とどの様に対応するかは今の所まだはっきりしないと云えそうである. なお, あとで述べる私共の平滑筋についての成績はカエルの胃筋によって得られた. Gansler²⁹⁾ によれば, この筋細胞の形態構造は上に述べてきた平滑筋細胞の平均的イメージを出していない.

図 1. 平滑筋細胞の微細構造

- a : ラットの vas deferens²⁴⁾,
R, endoplasmic reticulum
b : 豚の小腸⁷²⁾
sm, 筋細胞の尖端部; c, plasmalemmal vesicle.

確かに、平滑筋細胞は可成り小型である。しかし、骨格筋細胞と同じく細長い細胞で、かつまた、収縮系も長軸に沿って走っている（例えば Gansler³⁰⁾）から、平滑筋細胞表面の形質膜における電気的な excitation の影響は表面に直角に内部に向って線維（すなわち細胞）の中心軸に及

ぶことになる。この点は骨格筋細胞の場合と同じである。しかし、骨格筋細胞の場合は excitation は T-system を電気的に伝わって線維の内方に進み（Huxley & Taylor³¹⁾, Costantin³²⁾）、その T-system の各点でこの電気的な過程が始めて myoplasm に影響を及ぼすことになる。つまり、T-system はこの意味で実の所表面膜であるから、T-system の網の目でかこまれる myoplasm の直径を約 1μ とすると、骨格筋細胞の場合には、表面膜が収縮をおこすために影響を持つ部分、つまり、受け持ち部分は 0.5μ の深さまでとなる。一方、平滑筋細胞の場合は T-system の如き構造物はないから、細胞の直径を 5μ として同様な受け持ち部分は 2.5μ となる。そこで仮に、両筋細胞での excitation による影響が同一量とすると、平滑筋細胞の場合は 1 回の excitation で収縮要素の完全な活性化が出来ないかも知れないと云う推論が導かれる。

この様に、T-system が平滑筋細胞に欠けていることは、この小型の細胞を機能的には逆に大型な細胞にしてしまったことになる。すなわち、E-C coupling の面からは平滑筋細胞は大型なのである。この T-system の欠除の点は更に主題のグリセロール効果の問題にも関係する。先述の様にこの効果は T-system に関係していると一般的には考えられている^{8,9)} ので、この考えを進めると、平滑筋などの T-system のない筋細胞ではグリセロール効果は生じないことになる（但し、後述）。

E-C coupling の面からの平滑筋細胞の特徴はこの様な大型性の他に、その微細構造の不規則性つまりその意味での複雑性であると思われる。骨格筋細胞に於ける収縮要素とのモザイク様に対応した微細構造の規則性から類推して、この平滑筋細胞構造における複雑性は横紋の欠除すなわち収縮要素の配列の不規則性のあらわれと思われるが、収縮要素との対応性の意味では、E-C coupling 乃至収縮に必要な構造は、やはり、一つの法則性に支配されて存在していると思われる。

平滑筋細胞における E-C coupling

Hill¹⁾ は、カエルの骨格筋細胞について表面から物質が diffuse して行って収縮をひきおこす場

合の time-distance 関係を求め、それが実際の excitation-full activity の時間を大巾に超過する

ことから、この線維軸に向う process は diffusion であり得ず、何らかの signal process であるべきであると述べた。この process は T-system を伝わり、中心に向う電気的な過程であることが現在ではすでに証明されている^{31,32)} (既述)。つまり、線維の直径が $50-100\mu$ で、かつ、excitation 後速かに収縮し始める筋細胞では、収縮をひき起すために表面から線維軸に向う過程は物質の diffusion であり得ない。一方、同様の手続きで、平滑筋細胞の E-C coupling process の骨組を想定出来る。平滑筋細胞の直径を 5μ として、興奮に際し表面から物質が diffuse して内部に向い収縮をひきおこすすると、10数 msec で full activity に達することになる。この速度は充分速かであるので、このような仕組みは平滑筋細胞では実際に存在してもかまわない。これを支持する様に、確に、平滑筋細胞には T-system はなく、多くの場合、細胞内 tubular system の発達が悪い (既述)。

すでに 1930 年代に、平滑筋組織に於て電気的記録と機械的記録を同時に行う試みがなされた^{5,6)} (既述)。Bozler³³⁾ は 1948 年に平滑筋の tone は continuous spike discharge で維持されると述べた。Bülbring³⁴⁾ は 1955 年に細胞内電極法を用いてモルモットの taenia coli に於ける収縮時の発生 tension は spike discharge に比例することを観察した。つまり、contraction は excitation に couple しておこるのである。

同じ頃、平滑筋細胞の収縮乃至興奮と外液 Ca との密接な関係が指摘され始めていた。Singh & Acharya (1957)³⁵⁾、Bozler (1961)³⁶⁾ はカエルの胃筋で mM 単位の Ca の存在する sucrose 液中で収縮が生じ、かつ conduct することを報告した。Axelsson³⁷⁾ はモルモットの taenia coli で同様 mM 単位の Ca の存在する sucrose 液中で spike の発生と conduction を見ている。このような観察は更に著しく発展し、Brading & Tomita (1968)³⁸⁾、Brading, Bülbring & Tomita (1969)³⁹⁾ は平滑筋に於ける action potential は主として Ca-spike であることを証明した。

この様に、平滑筋細胞の膜興奮について明らかな骨組が与えられている一方に於て、その収縮機構についても同様の発展がなされた。すなわち、この筋の収縮系は本質的に骨格筋のそれと同様

で、その調節が Ca で行なわれることも同様なのである (岩倉⁴⁰⁾; Filo, Bohr & Rüegg⁴¹⁾; Schälder⁴²⁾ Yabu, Uchida & Miyazaki⁴³⁾)。

以上の幾つかの点は平滑筋の E-C coupling について一つの可能な機序を具体化する。つまり、Hill¹⁾ の考えを基にして膜から物質が興奮に際し内部に拡散すると考える場合、その物質は細胞膜にあるのではなく、細胞外にあり、かつそれは Ca であって、興奮に際し細胞内に膜を横切って入り込み Ca-spike を形づくる一方に於て、収縮要素を収縮に導く、と云うものである。すなわち、E-C coupling についての Ca-spike mechanism である。

平滑筋細胞についての種々な観察値 (活動電位, 60mV ⁴⁴⁾; 膜容量, $3\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ⁴⁵⁾; 筋細胞の表面積, $5000\text{cm}^2/\text{g}$ 組織¹⁷⁾) に基づく計算はその様な機序の実在性を裏附けるように見える。つまり、1回の興奮 (これを Ca-spike と考える) で細胞内に入る Ca^{++} は $4-5\text{m}\mu\text{-moles/g}$ 筋組織となり、これは他の筋種に比べて可成り多い。平滑筋では収縮性蛋白質の含有量はずっと少ない (Needham & Williams⁴⁶⁾) から、この Ca^{++} 量は、Weber⁴⁷⁾ に基づいて求められる収縮に必要な Ca^{++} 量の範囲に入っている。

これを支持するように、種々の条件下での、また、色々の条件による平滑筋の収縮は、多くの場合外液における Ca の存在を必要とする (たとえば、宮崎、藪、砂野⁴⁸⁾)、しかし、平滑筋についての多くの観察によると、たった1回の spike によって最大収縮が生ずることはなく、発生した一連の spike の各々の時間間隔が充分短かく、先行収縮に次の収縮が加重することによって出力が始めて増加し最大に達する (例えばモルモットの taenia coli-Bülbring⁴⁹⁾) (図2)。若し1回の spike で入る Ca 量を充分量とするならば、これは説明出来ない。また、spike が生じてから収縮が生ずるまでの所要時間 (0.2-1 秒) は単純な拡散から考えられる時間より一般に長そうであり、中間過程の活動をうかがわせる (しかし、これは幾様にも解釈出来る)。また、骨格筋に於ける^{7,50)} (前述) と同じく平滑筋 (モルモットの taenia coli) も2倍程度の高浸透圧液によって収縮が抑制されるが、spike は殆ど変ならい (Tomita⁵¹⁾)。若し spike (すなわち Ca 侵入) と収縮が直結するの

図 2. モルモット taenia coli の電氣的及び機械的活性⁴⁹⁾.

上のカーブ： 等尺性収縮

下のカーブ： 膜電位

6つの自発活動が連続して発生しており、収縮に加重が見られる。

ならば、これは直ぐには説明出来ない。この様な

骨格筋のグリセロール効果

浸している Ringer 液に数 100mM の glycerol を加えると、カエル縫工筋の収縮性は始め抑制されて行くが、後恢復に向う。この恢復が可成りの程度に達した時点で (通常 50-60 分), glycerol を除き去ると、この筋の収縮性はなくなってしまふ (或は低下してしまう)。この一連の収縮性の変化は単一筋線維を用いると全筋の場合に比べて可成り速におこる。この様な条件下で、活動電位の高さは殆ど一定に保たれており、観察される収縮性の変化は膜の興奮以外の要因によって決定されていることになる (図 3)。

以上が、グリセロール効果 (glycerol effect) についての最初の論文⁷⁾で、私共 (Fujino, Yamaguchi & Suzuki; 1961) が述べたことのあらすじである。この研究の発端の 1 つは Szent-Györgyi³⁾ の glycerol 処理筋に電氣的被刺激性が具っているかどうかを知るにあった。当時、この glycerol 処理筋を電気刺激した人々は可成りあった (たとえば梅沢⁵⁷⁾) が、結論はすべて negative であった。これらは勿論正しい。私共は全く別の目的でこの問題をとりあげた。すなわち、細胞内の環境液の定常成分として adenosine triphosphate (ATP) を考えてこれを実験溶液に

考え、つまり細胞内の貯蔵 Ca を重視する見解にむしろ立つ事実を Edman & Schild⁵²⁾, Daniel⁵³⁾ は子宮筋について報告しており、血管平滑筋では、この様式を示す成績が多い (たとえば, (Axelsson *et al.*⁵⁴⁾, Bozler⁵⁵⁾)。しかし、他方に於ては、Imai & Takeda⁵⁶⁾ は上記 2 つの E-C coupling 様式がモルモットの taenia coli で存在していると述べている。

この様に、平滑筋の E-C coupling は極めて単純なようにも見えるし、また、骨格筋の場合よりずっと複雑である可能性もある。さらに、これは平滑筋の種類にも依存するようである。この現状に於ては、他の面からのアプローチが平滑筋の E-C coupling 機構の解決に必要と思われる。以下から述べ始める平滑筋のグリセロール効果はこの機構に関係ありと考えられるが、まだ現象論に止まっていて、問題の焦点には達していない。

加え、かつ、glycerol 処理の影響が進行してしまわない時期を選ぶならば、筋細胞内の膜系は尚生きていて電気刺激に応答し、結局は収縮が生じはしないかと考えたわけである。結果は positive であり、この様な条件で glycerol 処理筋は電流に応答して収縮し、かつその収縮速度を速めた (Fujino *et al.*⁵⁸⁾)。何よりも興味をひいたのは leak 電流と云う小さい電流でもこの応答があらわれたことであつた。しかし、余りに小さな応答であり、このままではより以上の実験は判断を誤らせる危険があつた (この現象の機構についての実験は私自身再検討が必要と思っている) ので、この系を用いつつ、大きな応答のあらわれる条件を探そうと考えた。この意図のもとに、また別の目的 (文献 (7) に記載、この比重も大きかった) もあって、始め 2.3% (約 300 mM, これは細胞内小器官抽出液の sucrose 濃度にヒントを得た)、後約 400 mM (実験の進行と共に至適濃度を探してずらして行つた) の glycerol を一定短時間生筋に作用させた後の、また、その最中での筋の収縮性或は態度を調べようと一連の観察を行なった。

glycerol を含む Ringer 液と云うこの様な環

図 3. 蛙骨格筋単一線維におけるグリセロール効果^{7,10)}

a : 活動電位 (細胞内電極法による).

420 mM glycerol-Ringer 中の浸析時間は 66 分間

b : 等尺性攣縮, 420 mM glycerol-Ringer 中の浸析時間は 63 分間

glycerol-Ringer 浸析前 (C), 中 (G), 後 (R). G と R に添えた数字は夫々の液への浸析開始後の時間 (分)

境は当時 Hodgkin & Horowicz⁵⁰⁾ により示された収縮と膜興奮の分離をおこす条件, すなわち高浸透圧 Ringer 液環境と偶然一致した。しかし, 吾々の条件下におこる現象は Hodgkin らのそれにはない特徴があった。すなわち, 前述のように高浸透圧環境にあり, またその効果に認むべき回復がない (図 4) のに収縮性は回復するのである。高浸透圧条件による収縮性の抑制は後 Ho-warth⁵⁹⁾ により収縮系そのものの変化に基づくと言われたが, 吾々のこの発表以来 E-C coupling process の抑制によると考えられるようになった様である (Brading⁵⁰⁾)。

図 4. 420 mM glycerol-Ringer の蛙縫工筋に及ぼす浸透圧効果⁷⁾.
↓から↑まで glycerol-Ringer に浸析

加えてある glycerol を除いた後にも特異的な現象があらわれる。活動電位の大きさが殆ど正常でありながら, 前述の様に収縮性が再び抑制されるのである。当時, これは E-C coupling の抑制によると思われた (図 5)¹⁰⁾。この事実は後に, 骨格筋細胞の色々な機能や現象に於ける transverse tubular system (T-system) の意義に関する数多くの研究^{8,9,61-66)} の発端となった。すなわち, Howell⁹⁾, Eisenberg & Eisenberg⁸⁾ は glycerol をとり除いた後の収縮性抑制の条件下には T-system が消失していることを見出した (図 6)。この条件下に, 骨格筋細胞における表面形性膜の興奮を内部に伝える系が消失しているのだから, 膜興奮による収縮が生じないのは当然なのである。

図 5. 420 mM glycerol-Ringer 60 分間前処理後の蛙縫工筋の収縮能力¹⁰⁾
a: カリウム攣縮 (110 mM K)
b: カフェイン攣縮 (5 mM カフェイン)
c: " (30 mM カフェイン)
○は対照, 縦軸は前処理前における攣縮張力の%

1 μ

図 6. 蛙骨格筋線維の transverse tubules に対する 400 mM glycerol-Ringer 60 分間前処理の影響⁹⁾.
1 の A: 正常の tubules,
2 の A: 前処理後の tubules.

図 7-1. 蛙骨格筋単一線維の活動電位 (A) と等尺性攣縮 (B) に対する urea-Ringer の影響^{10,67,68)}. urea-Ringer 浸析前 (C), 中 (U), 後 (R). U と R に添えた数字は夫々の液への浸析開始後の時間 (分). urea-Ringer 浸析 (urea は 400mM) A では 37 分間, B では 53 分間. 尚, 図 3 を参照.

図 7-2. 蛙骨格筋単一線維の等尺性攣縮に対する 400mM urea-Ringer の影響^{67,68}.
urea-Ringer 浸析前 (C), 中 (•, 0 より ↓ まで), 後 (↓ 以後);
A, B, C, D は夫々 1 本の線維を示し, 各点は攣縮高.

一方、吾々は^{7,10,67}) glycerol をめぐるこれらの現象が glycerol に特異的なものかどうかを調べた。mannitol, monoaceticin, glucose, sucrose ではあられわれず, urea ではあられわれる (図 7-1, 7-2)。つまり, glycerol 特異的ではなく, 分子の大きさ, 形やその他の性質 (lipoid solubility など) に関係する。それ故, 以上の現象は, ひとまず, 'non-electrolyte effect' と云うのが正しいことになる。しかし, urea は水素結合を切るなどの side effect をひきおこすかも知れないし, 目的にもよるが, glycerol を用いる方が気軽である (後で述べる様に, 経験した限りでは urea を用いても質的には異ならない)。この意味で glycerol の内容を広くとって, この現象をなお 'glycerol effect' (グリセロール効果) と呼ぶことはそう甚だしく間違っていないと思われる。

尚, glycerol 等を含む液に浸した後正常環境液に戻すことによって action potential を介する収縮の生起を抑制する様にする (この状態で

T-system が消失していることを期待しながら) osmotic shock を与える⁶⁶), detubulate する⁶⁶), T-tubules なしの筋をつくる⁶⁵), T-tubules を disrupt する⁸), また, もっと実際に即して, glycerol で前処理する⁸) などと表現されている。

その後, glycerol 等による前処理が軽度 (濃度や時間) の時には収縮性は恢復することが判った^{67,68}). これには T-system の恢復が伴う (図 8, 9)。また, 前処理によるこの抑制は T-system のない筋細胞ではあられわれないことが予想され, 実際にその様に一般に考えられて来た^{8,9}). しかし, 私共¹⁰) は最近, 平滑筋やカエル心筋 (他動物の心筋と同様, これにも横紋はある。しかし, T-system はなく, 太さは一般平滑筋細胞並みで約 5μ である—Staley & Benson⁶⁹) などの T-system のない筋細胞に於ても, かかる前処理によって収縮性の抑制があらわれることを確かめた (第 49 回日本生理学会総会⁷³) (昭和 47 年 5 月, 盛岡) でも発表)。これらについては以下で再び触れる。

平滑筋のグリセロール効果

平滑筋に於てグリセロール効果 ('glycerol effect') が生ずるや否やは, 骨格筋に於てそれが

見出されて間もなく, この機構解明の目的と比較生理学的見地とから吾々にとって一つの課題とな

図 8. glycerol-(或は urea-) Ringer 前処理による蛙縫工筋の収縮の抑制と回復.^{67,68)}
 A : 400 mM urea-Ringer に浸析 (← →).
 B : 左記載の濃度の glycerol-Ringer に浸析 (← →).
 収縮は等尺性.

った。図 10 は第 46 回日本生理学会総会（昭和 44 年 4 月，鳥取）に於て発表したカエルの胃筋についてのものである（更に，文献 10 参照）。確かに glycerol を含んだ Ringer 液中で収縮性は一旦低下した後恢復し，glycerol を除くと再び収縮性が低下する。ここまでは骨格筋における当時の常識と異ならない。しかし，この常識と異なり，正常 Ringer 液中に戻した後の収縮性の低下は一時的であった。これに加うるに，T-system のない筋に属するカエルの心筋では glycerol 含む Ringer 液中及び戻した正常 Ringer に於ての

収縮性の変化は単純な浸透圧の影響のみであり（つまり，Hodgkin & Horowitz⁵⁰⁾ 的（前述）），グリセロール効果の片鱗もない（図 10）。更に，骨格筋に於ける前処理後の収縮性の低下の機構については T-system との関連が強調され始めた^{8, 9)}。事実，カエル心筋での成績は前処理後の収縮性の低下が T-system の変化に依るとする考えの証拠とすら見なされた（Chapman⁷⁰⁾）。かくして，この図 10 の判断は最近まで保留されていた。

現在，しかし，平滑筋に於てもカエル心筋に於ても，つまり T-system のない筋細胞でもグリセ

図 9. 400 mM urea-Ringer 40 分前処理後の収縮性と transverse tubule の内腔の大きさ^{67,68)}.
前処理後の収縮張力を処理前のそれを 100 としてあらわした。

図 10. 蛙の胃 (A) 及び心室筋 (B) の収縮に対する glycerol-Ringer 前処理の影響¹⁰⁾.
単一刺激により収縮をひき起した。

ロール効果があらわれる、と吾々は考えている。この検討を再びとり上げたのは前処理後に低下した骨格筋の収縮性がある条件では恢復すると云う事実が確認されたからであった。この事実の端緒も初期の吾々の成績のなかにあったが、明瞭な形で確認されたのは比較的新しい。glycerol 等を含む液への浸析が強ければ（濃度、時間）勿論恢復はない。しかし、浸析条件を glycerol であれば約 300 mM（これはグリセロール効果の実験で最初選ばれた濃度に一致する）urea であれば 400 mM とし、さらに、時間については比較的短かく

すれば、浸析終了後の収縮性は一旦低下した後、長時間かかって殆ど恢復してしまう（図 8）。この恢復には一旦狭小になった transverse tubules の太さの恢復が伴っていた^{67,68}（図 9）。この様にして、正常液に戻してから態度によりグリセロール効果は現象的に収縮性の恢復する場合と恢復しない場合とに分類されることになる。すると、図 10 は平滑筋に於ては収縮性の恢復する型のグリセロール効果があらわれることをすでに示していたわけである。このことは詳細な検討の結果、現在もっと典型的な形で確認されている。図 11 はその 1

図 11. カエル胃筋の 'glycerol effect'⁷³⁾

F, 対象; G, 400mM glycerol-Ringer (A, B 何れも 90 分間); R, 戻した正常 Ringer 液。

A: 単一刺激による収縮。

B: 溶液を K で K-Ringer におきかえ、↑で正常 Ringer 液に戻した。R₅ から R₁₀ までは収縮を示す。

例であり、骨格筋における恢復型のグリセロール効果が殆んどそのまま現われている (図 8 参照). 唯、骨格筋と異なる所は戻した正常液中に於ける収縮性の恢復の開始が早期であり、また、その速さも可成り大きいことである. 勿論, urea を用いても同様の収縮性の変化はよくあらわれる. 現在の時点では、非恢復型があらわれるかどうかの点に未だ検討の余地がある.

この様に、T-system のない平滑筋細胞組織に於てグリセロール効果があらわれることが確認されたので、同様 T-system のないカエル心筋について詳細に再検討した. 確かに、glycerol を用いたのでは種々に条件をずらしても、単純に高滲透圧の影響があらわれるに過ぎない (図 10). そこで、すでに述べた様に、グリセロール効果特有な収縮性の変化の出現には必ずしも glycerol を用いる必要はなく、用いる物質分子の大きさ、形などが必要条件であることを考慮して、urea を用いた. 図 12 はその結果の 1 つであり、グリセロール効果に特有な収縮性の変化がよくあらわれている. 例えば、正常 Ringer 液に戻したことにより、urea が細胞内から脱出して行き影響が消失して行くはずであるにもかかわらず、収縮性は低下して行く (ouabain, Ca 増加で恢復する), 唯、特有な収縮性の低下と恢復が urea 浸析直後にあらわれた後、時間と共に再び収縮性が低下して行き、また、正常 Ringer 液に戻した直後短時間、一時的に収縮性を恢復する点がこれまでと異なる様に見える. しかし urea を用いた場合骨格筋で

も同様のことがしばしばあらわれ、かつ又、細胞内に侵入した urea の side effect の出現からすべて理解される. これまでの多くの成績では、浸析終了後長時間正常 Ringer に放置しても、収縮性は完全には恢復しない. つまり、不完全恢復型と云うことになる.

この様に、glycerol 等を含む液に浸析後正常 Ringer 液に戻すことにより収縮性が低下するや否や、つまり、グリセロール効果が生ずるかどうかは T-system がその筋細胞に具わっているかどうかと必ずしも関係しないことが、平滑筋、カエル心筋を用いることにより確認された^{10,73)}.

現在までの成績によれば、平滑筋に於てもカエル心筋に於ても、正常 Ringer 液に戻した後の各時点でのカリウム収縮の大きさは上記の収縮性の増減に平行する (図 11). この観察は収縮性の変化が活動電位の変化 (形や経過、数) に由来するかも知れない可能性を除外するためになされたものである. カエル心筋の活動電位は urea 前処理によりわずかわる様であるが、収縮性の減少を説明しがたい (持続時間の延びが目立つ). 平滑筋、心筋ともに、前処理による大きな変化は静止電位にもなかった. この様にして、T-system のない平滑筋やカエル心筋におけるその様な収縮性の変化が、T-system のある骨格筋のそれに単に現象的に類似しているのみならず、表面の膜機構の無関係な点に於ても類似していると云い得る. 尚、このパラグラフ記載の観察は今後更に検討を加えて行きたい.

図 12. カエル心室心筋筋の収縮に及ぼす urea を含む Ringer 液前処理の影響⁷³⁾. F は前処理前、他の説明は図 7, 10 に準ず.

グリセロール効果と E-C coupling

glycerol 或は urea などを含む環境液に筋細胞をある時間浸し (すなわち、前処理)、後正常環境液に戻すと、収縮性は筋細胞の種類と無関係に必ず低下或は消失する、その後、それが恢復に向

うかどうかは前処理の強度や筋細胞の種類による、これが現在得られている確かな結論である.

前処理による骨格筋の収縮性の低下或は消失は専ら T-system の動向に関係づけられて来て現在

に至っている^{8,9}). T-system が表面形質膜の興奮を細胞の中心部に伝える構造体であることは確かな事実である^{31,32}) ので、それは筋道のたった1つの結論であり、また、T-system の動向は前処理による骨格筋の収縮の抑制を招来している必要な実質的な因子の1つである。そこで、いま、T-system の存在しない筋細胞でも全く同じ条件により収縮性の低下が生ずると云う事実を前にして、全く別個の機序を夫々に考えることも不可能ではない。しかし、すべての場合に共通な機序が実は存在していて、たまたま T-system が存在する場合、随伴してそこにも変化が生ずるのだと考えることも出来る。むしろ、その方が考えやすそうである。現時点では私はこの立場をとりたい。

たしかに、骨格筋におけるグリセロール効果は色々の意味を E-C coupling に関して持っており^{7,60}), そこであらわれる T-system の消失と云う事実は広い意義を持つ^{8,9,61-66})。しかし、位置的に細胞内に存在するこの T-system がいかに表面膜の興奮を内部に伝える極めて重要な構造体であっても、これは細胞表面で細胞外と交通し、ま

た、興奮を伝える様式も電気的であるなど、結局は表面膜の細胞内奥へ向う延長であり、換言すれば細胞内部に存在する「表面」なのである。したがって、膜の興奮に始まり細胞内原形質に向う signal 機構、つまり E-C coupling の問題はグリセロール効果についての従来の見解からすればそのまま残り残されていることになる。

しかし、グリセロール効果を平滑筋やカエル心室筋の面から考えると、これは E-C coupling の問題に直接関係していることになる。何となれば、これらの筋細胞では表面膜の興奮に継起して収縮を惹起するための signal mechanism は直接細胞内原形質に向かうはずであるから、glycerol 等の前処理によりこの機構そのものが直接抑制されていなければならない。

そこで、グリセロール効果の機構を考えたい。すでに述べた様に、グリセロール効果は物質の化学的に特異的な働きに因らない、何故なら、この効果は glycerol, urea などの化学的に類似性のない物質を用いながら共通に発現するからである(文献7, 10, 67 及び既述)。つまり、この effect の基礎になる機点は結局、物理化学的なものと解

図 13. カエル胃と心室筋に対する夫々 400 mM glycerol-Ringer と 1 M urea-Ringer の滲透圧効果⁷³⁾. 上、胃条片; 下、心室筋条片. ↓で正常 Ringer 浸に戻す.

される。今, glycerol 或は urea を含む Ringer 液にカエルの sartorius, 胃条片, 心室筋条片を浸して見る (図 4, 13). 筋重量は減少し始めて, 浸透圧効果の発現を物語る。時間が経つと最低値 (或は恒常値) に達した後, この筋重量は恢復し始める (60 分前後, 図 4 であらわれていない)。すなわち, これらの物質は, 速度は遅いが diffusion barrier を通過し得ることになる。このような態度は筋種には全く依存しない。そこで, 細胞内に存在する glycerol, urea の量を測定した。それによると, それらを含む液に浸析した後の可成りの早い時期にこれらの物質は細胞内に浸入し切っているのである (図 14)。それにもかかわらず浸透圧効果があらわれているのであるから, diffusion barrier は細胞表面にあるのではなく, 細胞内部に存在するはずである。同様の事柄を urea に関して Bozler⁷¹⁾ もカエルの sartorius とカエルの胃筋について報告しており, いまここで, glycerol でもまた心筋でも事態は同じであることが証明されたのである。この diffusion barrier の実体は占める容積の点から細胞の所謂小器官ではなく, Bozler が指摘する様に, ある機能を営む分子集団としての構造体であって, 原形質内に多

数存在すると考えられる。

以上から次の理解が試験的に成り立つ。すなわち, この E-C coupling process を担う系にもかかる diffusion barrier の性質をもつ構造体があり, これは glycerol 分子以下のものを通過させる。いま, glycerol, urea 等を含む Ringer 液にカエルの骨格筋, 平滑筋, 心筋を浸析すると, まず, この構造体からの脱水 (及びそれによる構造変化) に依って, E-C coupling の機能の低下がおこり, 次で, これら分子の透過に基づく浸透圧効果の減弱によって, この構造体が恢復し, それによって E-C coupling process の機能が元に戻る。glycerol 等を外液からとり去っても, これらの分子は透過速度が小さいから, この構造体に暫時残存する。これらは結局は構造体から出て細胞外に移行するけれども, それまでの間は浸透圧効果をあらわし, その時この構造体に状態或は構造変化が生ずる。一旦生じたこの変化は浸透圧効果がなくなっても一般には残存していて, ある時には可逆的であり (平滑筋), ある時には不完全 (カエル心筋) である。骨格筋の場合には, 浸透圧効果がさらに transverse tubules 周囲から内腔 (これは外液と直結する) に向って及ぶ結果, 極端な時にはその破壊が生ずるものと解される。この破壊が生ずると恢復の可能性は恐らくは失われる^{67,68)}。前処理後に各種筋にあらわれる収縮性の変化 (低下) は E-C coupling を担う系のこの様な変化に基づくことになる。

グリセロール効果の面から推定された E-C coupling を担う系 (構造体) の所在は勿論現在定かではないが, 骨格筋の場合には T-system に著変が見られるから transverse tubules と lateral sac の間の部位と思われる。そこで, この部位の特徴を電気現象を生ずる膜のすぐ近傍と見做せば, 平滑筋やカエル心筋に於ては, 形質膜のすぐ近傍と云うことになる。しかし, これと膜の所の電子顕微鏡的微小構造 (微小構造の項参照) との対応性の推定は現在では不可能である。図 15 はこれらの考えをあらくまとめたものである。尚, 手持ちの成績は E-C coupling に関してグリセロール効果から注目される系の機能は Ca と関係していることを示している。

以上の議論は平滑筋特にカエルの胃筋の収縮が骨格筋と同じく細胞内の結合 Ca の遊離によって

図 14. カエル縫工筋, 胃, 心室の各筋細胞に於ける glycerol 及び urea の透過性⁷³⁾. ¹⁴C 標識-glycerol, -urea, -inulin を用う. glycerol, urea の濃度は夫々 1M 他の条件は図に準ずる。(各点は 3~5 例の平均値)

図 15. 骨格筋, 平滑筋, カエル心筋における 'glycerol effect' と E-C coupling (模式図).

O, 細胞外を示す.

L.T., longitudinal tubules.

○, 'glycerol effect' をうける部位

■, 収縮をひきおこすための形質膜部分.

□, 収縮をひき起すために, 形質膜から原形質内に向うシグナル (trigger-Ca?).

→, 結合型 Ca を遊離させるための刺激.

→, 遊離した Ca の収縮系への拡散 (即ち, 収縮の生起).

P.M., plasma membrane.

T., transverse tubules.

○, 結合 Ca の存在する部位

生ずるとの考え方 (平滑筋の E-C coupling の項参照) を支持するように見える. たしかに, 得られた成績が骨格筋と平滑筋, カエル心筋との間で同様であるので, その様に受けとられやすい. しかし, この点については, 活動電位を形成しながら細胞内に侵入したと考えられる Ca が収縮を起

し得る程大量である点を想起せねばならない. 従って, 平滑筋の E-C coupling 機構について, 両者の機構が共存するのか何れかの方のみであるのかはグリセロール効果の機構が更に明らかになった時点で改めて考えたい.

ま と め

1. 平滑筋のグリセロール効果 ('glycerol effect') を論ずるために, カエル骨格筋のグリセロール効果の概略を述べた. この効果は機能と構造の面で興奮収縮連関 (E-C coupling) と密接に関連する現象であるので, 平滑筋の構造と E-C coupling にも言及した.

2. カエルの胃筋を glycerol 或は urea を含む Ringer 液に入れると, 収縮性は初め減少し後回復する. これらの物質を除去すると, 収縮性は再び抑制され長時間を経て回復する. カエルの心室筋でも urea を用いると同様の現象が生ずる. 但し, 前処理後の回復は不完全である. これらは骨格筋で見られるグリセロール効果と同じであるので, グリセロール効果は transverse tubular sy-

stem の有無と必ずしも関係する現象ではないと思われる.

3. 現在までの電気生理学的成績は, これらの収縮性の抑制が E-C coupling の抑制によることを示している.

4. glycerol 或は urea を含む Ringer 液はカエルの骨格筋, 胃筋, 心室筋に高浸透圧効果を及ぼす. しかし, 同じ時期にこれらの物質は細胞内に充分透過している.

5. 以上の成績に基いて, E-C coupling の機構をグリセロール効果の面から論議した. とくに, 収縮を trigger するために興奮を細胞内に伝達する形質膜の近傍の部に注目した.

文

- 1) Hill, A.V.: On the time required for diffusion and its relation to processes in muscle. *Proc. Roy. Soc., B*, **135**, 446-453, 1948.
- 2) Sandow, A.: Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J. Biol. Med.*, **25**, 176-201, 1952.
- 3) Szent-Györgyi, A.: *The chemistry of muscular contraction*, Acad. Press, New York, 1947.
- 4) Hodgkin, A.L.: The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. *Biol. Rev.*, **26**, 339-409, 1951.
- 5) Hasama, B.: Pharmakologische Studien: Ueber den bioelektrischen Strom am isolierten Harnleiter. *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, **160**, 107-116, 1931.
- 6) Hasama, B.: Die elektrischen Vorgänge am isolierten Eileiter bei Ablauf der peristaltischen Kontraktion. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **231**, 311-331, 1933.
- 7) Fujino, M., Yamaguchi, T. & Suzuki, K.: 'Glycerol effect' and the mechanism linking excitation of the plasma membrane with contraction. *Nature*, **192**, 1159-1161, 1961.
- 8) Eisenberg, B. & Eisenberg, R.: Selective disruption of the sarcotubular system in frog sartorius muscle. *J. Cell Biol.*, **39**, 451-467, 1968.
- 9) Howell, J.N.: A lesion of the transverse tubules of skeletal muscle. *J. Physiol.*, **201**, 515-533, 1969.
- 10) Fujino, M., Yamaguchi, T. & Fujino, S.: 'Glycerol effect' in various kinds of muscle cell. *Jap. J. Physiol.*, **22**, 477-489, 1972.
- 11) Taxi, J.: Contribution à l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. *Naturelles Zoologie*, 12^e série. VII, 413-674, 1965.
- 12) Bennett, M.R. & Rogers, D.C.: A study of the innervation of the taenia coli. *J. Cell Biol.*, **33**, 573-596, 1967.
- 13) Merrilees, N.C.R.: The nervous environment of individual smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens. *J. Cell Biol.*, **37**, 794-817, 1968.
- 14) Prosser, C.L., Burnstock, G. & Kahn, J.:

献

- Conduction in smooth muscle: Comparative structural properties. *Am. J. Physiol.*, **199**, 545-552, 1960.
- 15) Rhodin, J.A.G.: The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters. *J. Ultrastruct. Res.*, **18**, 181-223, 1967.
- 16) Lane, B.P.: Alterations in the cytologic detail of intestinal smooth muscle cells in various stages of contraction. *J. Cell Biol.*, **27**, 199-213, 1965.
- 17) Rhodin, J.A.G.: Fine structure of vascular walls in mammals, with special reference to smooth muscle component. *Physiol. Rev.*, **42**, suppl. 5, 48-81, 1962.
- 18) Csapo, A.: Smooth muscle as a contractile unit. *Physiol. Rev.*, **42**, suppl. 5, 7-33, 1962.
- 19) Mark, J.S.T.: An electron microscope study of uterine smooth muscle. *Anat. Rec.*, **125**, 473-493, 1956.
- 20) Gansler, H.: Struktur und Funktion der glatten Muskulatur. II. Licht- und elektronenmikroskopische Befunde an Hohlorganen von Ratte, Meerschweinchen und Mensch. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **55**, 724-762, 1961.
- 21) Yamauchi, A.: Electron microscopic studies on the autonomic neuromuscular junction in the taenia coli of the guinea-pig. *Acta anat. Nippon*, **39**, 22-38, 1964.
- 22) Lane, B.P.: Localization of products of ATP hydrolysis in mammalian smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **34**, 713-720, 1967.
- 23) Rogers, D.C.: Comparative electronmicroscopy of smooth muscle and its innervation. Ph. D. Thesis, Zoology Dept., Univ. of Melbourne, 1964.
- 24) Burnstock, G. & Merrilees, N.C.R.: Structural and experimental studies on autonomic nerve endings in smooth muscle. *Proc. 2nd Intern. Pharmacol. Meeting (Prague)*, Oxford: Pergamon Press, pp 1-17, 1964.
- 25) Caesar, R., Edwards, G.A. & Ruska, H.: Architecture and nerve supply of mammalian smooth muscle tissue. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **3**, 867-878, 1957.

- 26) Nagasawa, J. & Suzuki, T.: Electron microscopic study on the cellular interrelationship in the smooth muscle. *Tohoku J. exp. Med.*, **91**, 299-313, 1967.
- 27) Goodford, P.J. et al: The transport of sodium in smooth muscle cells. *J. Physiol.*, **194**, 77-78 p, 1967.
- 28) Rostgaard, J. & Barnett, R.J.: Fine structure location of nucleoside phosphates in relation to smooth muscle cells and unmyelinated nerves in the small intestine of the rat. *J. Ultrastruct. Res.*, **11**, 193-207, 1964.
- 29) Gansler, H.: Phasenkontrast- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie und Funktion der glatten Muskulatur. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **52**, 60-92, 1960.
- 30) Gansler, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Uterusmuskel der Ratte unter Follikelhormonwirkung. *Virchows Arch. path. Anat. Physiol.*, **329**, 235-244, 1956.
- 31) Huxley, A.F. & Taylor, R.E.: Local activation of striated muscle fibers. *J. Physiol.*, **144**, 426-441, 1958.
- 32) Costantin, L.L.: The role of sodium current in the radial spread of contraction in frog muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, **55**, 703-715, 1970.
- 33) Bozler, E.: Conduction, automaticity and tonus of visceral muscles. *Experientia*, **4**, 213-218, 1948.
- 34) Bülbring, E.: Correlation between membrane potential, spike discharge and tension in smooth muscle. *J. Physiol.*, **128**, 200-221, 1955.
- 35) Singh, I. & Acharya, A.K.: Excitation, inhibition, action potentials and conduction in unstriated muscle in the absence of any electrolyte in the external medium. *Proc. Ind. Acad. Sci.*, **46**, 285-292, 1957.
- 36) Bozler, E.: Contractility of muscle in solutions of low electrolyte concentration. *Am. J. Physiol.*, **199**, 299-300, 1960.
- 37) Axelsson, J.: Studies of electrical and mechanical activity in intestinal smooth muscle. *Phil. D. Thesis*, Gleerups, Lund, 1962.
- 38) Brading, A.F. & Tomita, T.: The action potential of the guinea-pig taenia coli in low sodium solution. *J. Physiol.*, **197**, 30-31 p, 1968.
- 39) Brading, A.F., Bülbring, E. & Tomita, T.: The effect of sodium and calcium on the action potential of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.*, **200**, 637-654, 1969.
- 40) 岩倉博光: 平滑筋の新しい収縮性蛋白質 (I) 平滑筋の native tropomyosin. *東医誌*, **73**, 49-57, 1965.
- 41) Filo, R.S., Bohr, D.F. & Rüegg, J.C.: Glycerinated skeletal and smooth muscle: Calcium and magnesium dependence. *Science*, **147**, 1581-1583, 1965.
- 42) Schälder, M.: Proportionale Aktivierung von ATPase-Aktivität und Kontraktionsspannung durch Calciumionen in isolierten kontraktilen Strukturen verschiedener Muskelarten. *Pflügers Arch.*, **296**, 70-90, 1967.
- 43) Yabu, H., Uchida, I. & Miyazaki, E.: Participation of native tropomyosin in the ATP-contraction of an intestinal glycerinated muscle bundle. *Jap. J. Physiol.*, **21**, 465-473, 1971.
- 44) Bülbring, E. & Kuriyama, H.: Effects of changes in the external sodium and calcium concentrations on spontaneous electrical activity in smooth muscle of guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.*, **166**, 29-58, 1963.
- 45) Tomita, T.: Membrane capacity and resistance of mammalian smooth muscle. *J. theor. Biol.*, **12**, 216-227, 1966.
- 46) Needham, D.M. & Williams, J.M.: The protein of the dilution precipitate obtained from salt extracts of pregnant and non-pregnant uterus. *Biochem. J.*, **89**, 534-545, 1963.
- 47) Weber, A.: In Brillers, S.A. & Conn, H. L.Jr. (editors), *The myocardial cell*, p 131, Univ Pennsylvania Press, Philadelphia, 1966.
- 48) 宮崎英策, 藪 英世, 砂野 哲: 平滑筋の興奮と収縮. *日平滑筋誌*, **7**, 83-97, 1971.
- 49) Bülbring, E.: Physiology and pharmacology of intestinal smooth muscle. *Lect. Sci. Basis Med.*, **7**, 374-397, 1957.
- 50) Hodgkin, A.L. & Horowicz, P.: The

- differential action of hypertonic solutions on the twitch and action potential of a muscle fibre. *J. Physiol.*, 17-18 P, 1957.
- 51) Tomita, T.: Electrical responses of smooth muscle to external stimulation in hypertonic solution. *J. Physiol.*, **183**, 450-468, 1966.
 - 52) Edman, K.A.P. & Schild, H.O.: The need for calcium in the contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus. *J. Physiol.*, **161**, 424-441, 1962.
 - 53) Daniel, E.E.: On roles of calcium, strontium and barium in contraction and excitability of rat uterine muscle. *Archs int. Pharmacodyn. Thé.*, **146**, 298-349, 1963.
 - 54) Axelsson, J. *et al.*: Influence of the ionic environment on spontaneous electrical and mechanical activity of the rat portal vein. *Circulation Res.*, **21**, 609-619, 1967.
 - 55) Bozler, E.: Role of calcium in initiation of activity of smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, **216**, 671-674, 1969.
 - 56) Imai, S. & Takeda, K.: Actions of calcium and certain multivalent cations on potassium contracture of guinea-pig's taenia coli. *J. Physiol.*, **190**, 155-169, 1967.
 - 57) 梅沢俊一: 単一筋線維内外の電気刺激. *動物学雑誌*, **65**, 427-434, 1956.
 - 58) Fujino, M. *et al.*: Effect of electrical stimulation on a muscle fibre model in the presence of adenosine triphosphate. *Nature*, **186**, 318-320, 1960.
 - 59) Howarth, J.V.: The behaviour of frog muscle in hypertonic solutions. *J. Physiol.*, **144**, 167-175, 1958.
 - 60) Brading, A.F.: in Bülbiring, E. *et al.* (editors), *Smooth muscle*, p 166, Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, 1970.
 - 61) Krolenko, S.A.: Changes in the T-system of muscle fibers under the influence of influx and efflux of glycerol. *Nature*, **221**, 966-968, 1969.
 - 62) Takeda, K. & Oomura, Y.: Two component anomalous rectification in frog muscle fibers. *Proc. Japan Acad.*, **45**, 814-819, 1969.
 - 63) Gage, P.W. & Eisenberg, R.S.: Capacitance of surface and transverse tubular membrane of frog sartorius muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, **53**, 265-278, 1969.
 - 64) Eisenberg, R.S. & Gage, P.W.: Ionic conductances of the surface and transverse tubular membranes of frog sartorius fibers. *J. Gen. Physiol.*, **53**, 279-297, 1969.
 - 65) Gage, P.W. & Eisenberg, R.S.: Action potentials, afterpotentials, and excitation-contraction coupling in frog sartorius fibers without transverse tubules. *J. Gen. Physiol.*, **53**, 298-310, 1969.
 - 66) Sakai, T., Geffner, E.S. & Sandow, A.: Caffeine contracture in muscle with disrupted transverse tubules. *Am. J. Physiol.*, **220**, 712-717, 1971.
 - 67) Fujino, M.: Physiological properties of single fiber from frog skeletal muscle under the influence of hypertonic urea-Ringer with particular regard to the structural flexibility of transverse tubular system. *Proc. XXV Intern. Union Physiol. Sci. (Munich)*, **IX**, 557, 1971.
 - 68) Fujino, M. & Yamaguchi, T.: Flexible characteristics of transverse tubules and recovery of contractibility in frog skeletal muscle pretreated with non-electrolyte Ringer. *J. Physiol. Soc. Japan*, **34**, 90, 1972.
 - 69) Staley, N.A. & Benson, E.S.: The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanism of excitation-contraction coupling. *J. Cell Biol.*, **38**, 99-114, 1968.
 - 70) Chapman, R.A.: Is there a T-system in frog cardiac muscle cells? *J. Physiol.*, **215**, 48-49 P, 1971.
 - 71) Bozler, E.: Osmotic effects and diffusion of nonelectrolytes in muscle. *Am. J. Physiol.*, **197**, 505-510, 1959.
 - 72) Rogers, D.C. & Burnstock, G.: Multiaxonal anatomic functions in intestinal smooth muscle of the toad (*Bufo marinus*) *J. comp. Neurol.*, **126**, 625-652, 1966.
 - 73) 藤野和宏: 筋細胞に於ける E-C coupling と 'glycerol effect'. 第 49 回日本生理学会大会予稿集, p 114, 1972.