

国立精神・神経センター
神経研究所年報

第3号(通巻11号)

昭和63年度

National Institute of Neuroscience
National Center of Neurology
and Psychiatry

— 1988 —

国立精神・神経センター
神経研究所年報

第3号(通巻11号)

昭和63年度



神経研究所開設10周年記念講演会にて里吉所長挨拶

目 次

I	神経研究所の概要	
1.	はじめに	1
2.	組 織	1
3.	研究活動	2
4.	海外との研究協力	3
5.	精神・神経疾患研究委託費	3
6.	そ の 他	3
II	研 究 業 績	
1.	所 長	23
2.	疾病研究第1部	27
3.	疾病研究第2部	42
4.	疾病研究第3部	60
5.	疾病研究第4部	73
6.	疾病研究第5部	89
7.	疾病研究第6部	102
8.	診断研究部	118
9.	微細構造研究部	126
10.	機能研究部	140
11.	代謝研究部	147
12.	免疫研究部	156
13.	遺伝子工学研究部	165
14.	モデル動物開発部	175
III	中 央 施 設	183
IV	別 項	
1.	国立神経センター（仮称）設立準備委員会中間報告	201
2.	国立精神・神経センター神経研究所流動研究員運営要領	212
3.	A 国立精神・神経センター神経研究所併任研究員運営要領	214
	B 国立精神・神経センター神経研究所客員研究員に関する内規	215
	C 国立精神・神経センター神経研究所研究生研究見習生内規	216
4.	国立精神・神経センター神経研究所勤務心得	218
5.	精神・神経疾患研究委託費運営委員会運営要領	219
6.	研究部門将来計画	221

I 神経研究所の概要

神経研究所の概要

1. はじめに

神経研究所は国立精神・神経センターの研究所として発足後3年目を迎えたが、実質的には国立武蔵療養所神経センターとして発足してから丁度10年目を迎えるわけである。設立は昭和53年1月1日となっているが、研究所の開所式は4月24日、当時の小澤辰男厚生大臣臨席のもとで行われた。

この10年の間に研究所は8部16室から14部34室に成長し、実験動物研究施設も完成、更に第2研究棟7,800㎡の建設が第2年度を終了、7階建の鉄骨が組上って新しい研究棟の整備も近い。

組織や建物の拡大、増設のみならず研究業績の内容も一段と向上し、多数の論文が海外の雑誌に発表されており、本研究所の評価も年々高くなっている。

そこで開設10周年を記念して昭和63年11月4日、東京ガーデンパレスに於いて開設10周年記念式及び記念講演会を開催した。当日は10年間の本研究所の業績を紹介するとともに神経研究の将来をみつめて、東大の伊藤正男教授、村松正實教授、新潟大の生田房弘教授の3先生の記念講演が行われ、聴衆に感銘を与えた。所員一同にとっても記念すべき事業を無事終了し、10年の歴史に一つの足跡を残せたものと思っている。

一方、10年の歳月の中では教授として転出した方々もあるが、発足時より10年、共に活躍して来た診断研究部成瀬部長、代謝研究部宮本部長が63年3月定年退職し、新たに疾病研究第四部に佐賀医大から柴崎部長を、代謝研究部に慶応大から高坂部長を迎え、一段と若返った。11月には疾病研究第五部の鈴木部長が東京都臨床医学総合研究所の副所長として転出、目下後任を選考中である。

更に昭和64年1月1日付で島蘭総長が退官され、その後任に里吉研究所長が昇格就任、神経研究所長には杉田部長が1月2日付で昇格就任した。ここに神経研究所も新しい時代を迎えたわけである。

一方、1月7日、昭和天皇が崩御され、昭和の時代は終了し、平成の新しい時代に移りつつある。研究所のスタッフの若返りと共に今後の研究所の定員、新しい機器の整備、研究の方向性の問題など多くの問題が残されているが、新しい研究所長のもとで諸問題を解決して行くこととなった。

2. 組 織

昭和63年度の定員は表にあるように従来の所長1名、部長12名、室長33名に更に疾病研究第六部に老人痴呆研究の第3研究室が増設され、定員は計47名となった。実質的には3月1日現在所長1名、部長9名、室長25名、研究員5名、併任研究員27名(他に所内発令9名)、客員研究員21名、流動研究員21名、賃金研究員及び賃金研究助手35名、研究生78名、事務職員1名、賃金事務職員2名で、研究生78名を除いても計

1 神経研究所の概要

147名の数にのぼっている。その他ヒューマン・サイエンス財団、エイズ予防財団から研究員1名ずつが派遣され、それぞれ各部で活躍している。

3. 研究活動

詳細は本誌にまとめてあるが、業績は年々増加し、欧米の雑誌への発表が相ついでいる。

疾病研究第一部は筋ジストロフィー症の研究で目覚ましい発展があり、遺伝子産物ジストロフィンが筋ジストロフィーの細胞膜に欠損していることを証明し、Becker型の筋でも同様なジストロフィンの部分欠損のあることを証明し、多大の成果をあげ、目下ハーバード大学と協同実験を行って研究を進めている。疾病研究第二部は胎生期における形態学的研究が中心となりつつあるが、従来からの生化学的研究、コラーゲン代謝異常の研究も成果をあげつつある。疾病研究第三部は内因性精神病の生化学的研究とサーカディアンリズムなどの異常が内因性精神病の発症に関係の深いことを研究中で内外の注目を集めている。高橋部長が年末より病気のため入院したが、研究は続行中である。疾病研究第四部は柴崎部長が8月に着任、室長も交代し、変性疾患の生化学的研究に新たに取り組んでいるが、従来から定評のある電気生理学的研究の面でも病院の若いスタッフを指導している。疾病研究第五部は先天代謝異常および遺伝子異常の研究を行っており、部長の東京都臨床研転出に伴いやや研究活動は低下しているが、新しい部長の選考が終了すれば研究も再開されるものと考えている。疾病研究第六部は脱髄機構の発症に新しい因子の存在を発見すると共に老人痴呆の生化学的研究について日米共同研究の形で研究が進められ、米国NIAとの研究交流、研究者の派遣なども行いつつある。疾病研究第七部は研究室の整備がようやく進み今澤室長のもとでてんかんの生化学的研究が開始された。

基礎部門では診断研究部は成瀬部長退官後、部の研究の方向性について議論し、新しい部長の選考が行われたが、その間従来の研究が室長により継続された。微細構造研究部は筋ジストロフィー症の研究とミトコンドリア・ミオパチーの研究を進めて、多くの業績をあげているが、室長の相川久志君が3月末に急逝したのは誠に残念であった。機能研究部はトランスフェリンの分子構造と遺伝学的研究を進めており、ジストロフィンの発見から更に研究が飛躍するものと期待されている。代謝研究部は新たに高坂部長が着任し、神経系の修復機構と発育因子について研究を進めつつある。免疫研究部ではレトロウイルス感染による脳炎とエイズ発症に関する研究が進められているが、一方神経生長因子の研究もめざましい成果をあげつつある。モデル動物開発部は実験動物研究施設の拡大に追われる一方感染動物の発症のために一時その活動がかなり制限を受けたが、体制を検討し活動を再開しつつある。遺伝子工学研究部はやっと整備が終了し、大々的に活動が開始されたところである。遺伝子に関連した分野は臨床研究部をはじめ各部で非常に関心のあるところで、他の各部との連携を保ちつつ研究を進めつつあり、今後の発展が期待される。

4. 海外との研究協力

今年度も昨年に引き続き海外の研究者が多数来所され、多くのセミナーが行われた。(別表参照)流動研究員としては前年に引き続きフィリピン, Santo Thomas 大学の Dr. R. S. Javier が疾病研究第六部で研究に参加し、狂犬病の予防注射抗原についての研究を行った。疾病研究第一部には、北京協和医院, Peking Union Medical College Hospital の Dr. Chen Lin (陳琳) が約5ヶ月間、筋肉の組織化学、免疫組織化学の研究を行った。また、visiting fellow としては米国コロラド大学神経学教室の James H. Austin 教授が12月より約6ヶ月滞在の予定で疾病第四部に所属している。

5. 精神・神経疾患研究委託費

精神保健研究所が参加して以来研究プロジェクトもかなり拡大したが、委託費の総額は5億5千万円と昨年と同額におさえられた。但し老年痴呆に関する研究は別の研究費によって行われることになったため実質的には5千万の増額となり、26課題について研究委託が行われた。

6. その他

一昨年来、ヒューマン・サイエンス財団、エイズ予防財団等より研究費、流動研究員の派遣などを受け、研究が大変しやすい状況になりつつある。また、従来より受けていた文部省科研費の受入もかなり増加してきた。

平成元年3月末日

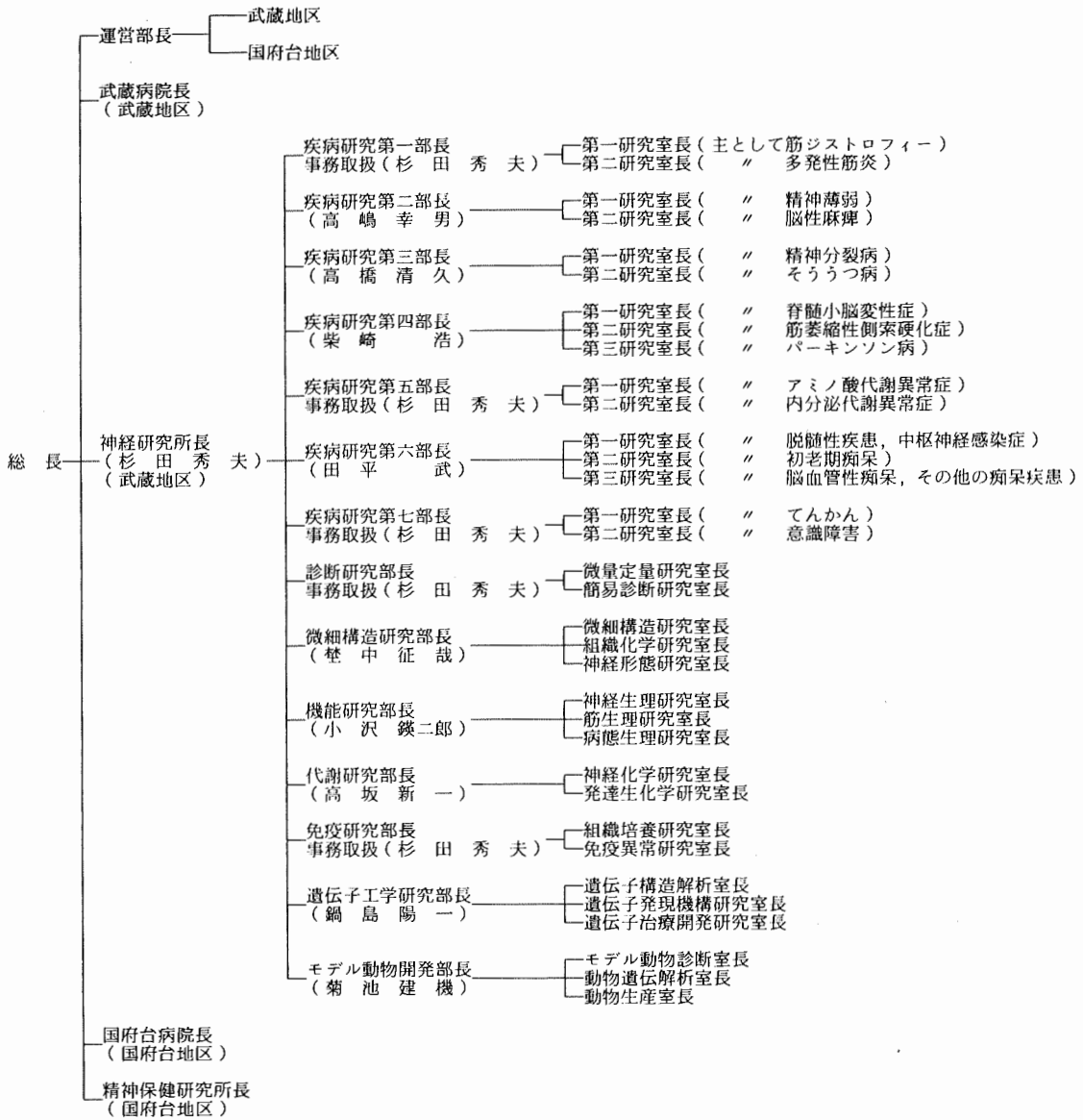
国立精神・神経センター

神経研究所長 杉田秀夫

総長(旧研究所長) 里吉栄二郎

1 神経研究所の概要

(表1) 国立精神・神経センター神経研究所組織



定 員								併任研究員		流 動 研究員	賃 金	合 計
研 究 職				行 (-)		計	部 長	研究員				
所 長	部 長	室 長	研究員	研究補助員	係 長				係 員			
1	12	34	—	—	—	—	47	2	26	28	2	105

(昭和63年度の計)

(表2)

神経研究所 組織 (昭和63年度)

(昭和63年4月1日～平成元年3月31日)

所	部長	吉栄二郎 (64.1/1まで)	杉田秀夫 (64.1/2より)	研究員	兼任研究員	客員研究員	流動研究員	研究生	○=賞金研究員 *=賞金研究助手
疾病研究第一部	石荒	浦畑 章喜 一一	杉田秀夫 (64.1/2より 事務取扱)	須原芳宏 (63.6/30退) 塚原俊文 (63.7/1採)	石清水原口倉恵 (63.5/1より)	佐高米 藤木本 藤昭恭 猛夫三	塚原俊文 (63.6/30退) Chen Lin (陳琳) (63.4/5採~ 8/31退) 織茂智之 (63.10/1採~ 1.3/31退) 有川恵理 (1.3/1採)	荒木茂智 (63.9/30まで) 鎌倉恵子 (63.4/30まで) 小武山隆 野山美夫 山島知士 山本理介 山本剛子 刺本眞子 大脇泰陽 田邊博輝 奥山いづみ 佐藤明	○小川敬子 ○安楽治美 ○後藤加奈子 ○古賀律子 (63.10/11採)
疾病研究第二部	田許	中葵 晴博 美史	高嶋幸男		小野寺川木 桜鈴林	猪俣木 (63.11/1より)	笠間子 (1.3/31退) 丸山悦 (63.4/1採)	畑山上田葉田尾 小村杉干来八 小畑弘晶生子美司 蘭和克貧裕良	*須貝千恵子 ○林昭子 ○田村頼子 *久保田直美 (63.4/1採) *三原信子 (63.4/1採~ 11/16退) ○森本雅子 (63.12/12採)

I 神祕研究所の概要

疾病研究第三部	高橋清久 里吉栄二郎 (63.7/30まで 事務取扱) 柴崎浩 (63.8/1より)	三西国川雅彦 三西国川雅彦 三西国川雅彦	吉田瑞子	成宮市林樋渡 頼本川口部 侃宏續輝修 浩治伸治彦三	大井畑久住一 (63.9/30退) 黒田安秀 (63.9/30退) 山本本秀 (63.11/1探~ 1.2/28退)	健人郎計子 (63.12/1探~ 1.2/28退)	篠杉野山水榎加塩加武永谷畑 (63.8/1より) 加賀谷内竹	原下田崎木本藤入沢内木井幸靖直より 一行一 之真理子平潤茂郎代樹士 り子之人 (63.8/1より)	○高嶋野瑞麻 (63.4/1探~ 9/30退) ○山本秀子 (63.6/15探~ 11/30退) (1.3/1探)
疾病研究第四部	里吉栄二郎 (63.7/30まで 事務取扱) 柴崎浩 (63.8/1より)	向山昌邦 (1.3/31まで) 足立皓 (63.10/15退) 小田健一郎 (63.10/1より)	吉田瑞子	安井昌之	James H. Austin (63.12/12探) 相澤仁志 (1.3/1探)	James H. Austin (63.12/12探) 相澤仁志 (1.3/1探)	三浦裕之	之 裕之 三浦裕之	*佐藤高志 (63.9/30退) ○大杉圭 (63.12/31退) *中村昌子 (63.9/20退) ○松井京子 (63.9/30退) *佐久間真喜子
疾病研究第五部	鈴木義之 (63.10/30まで) 里吉栄二郎 (63.10/31~64. 1/1事務取扱) 杉田秀夫 (64.1/2より 事務取扱)	桃井隆	飯榑	泉達郎	大島章弘 (63.6/30退) 北本年弘 (1.3/31退)	大島章弘 (63.6/30退) 北本年弘 (1.3/31退)	長岩搦糞王大 (63.7/1より) 大山	朗治成文弘 芳裕端正章 尾崎瑞正章 長岩搦糞王大 (63.7/1より) 大山	○佐藤淳子 ○新本美智枝 (63.11/30退) ○中島春子 (63.8/31退) ○榎順子 (63.4/1探~ 11/30退)

疾病研究第六部	田平武	西国高 (63.10/1より)	豊英吉 (63.10/1より)	富小山永	新島健司	小池文彦 (63.5/31退) 亀谷雅洋 Ramon S. Javier (63.6/1探) (本山和徳) (ヒューマンサイエンス財団より派遣 1.3/31終了)	佐米得	準美保子 藤沢地史	*沓掛友理子 (1.3/31退) ○二瓶淳 (63.4/1探) ○大八木保政 (63.6/1探)
疾病研究第七部	里吉栄二郎 (64.1/1まで事務取扱) 杉田秀夫 (64.1/2より事務取扱)	水戸 (63.4/1~1.2/28) 高橋慶吉 (63.4/1~9/30) 今澤正興 (1.3/1より)	敬	菊池愛子					
診断研究部	里吉栄二郎 (63.4/1~64.1/1事務取扱) 杉田秀夫 (64.1/2より事務取扱)	林 野 時 孝 司 史	矢野登志雄 (1.3/31退)	針伊勢玉			池浦千秋		
微細構造研究部	壱中征哉	加茂川久志 (1.3/30死去)	功志	二久子		古賀靖敏 (1.3/31退) 大滝悦生 (63.6/30退) 後藤雄雄 (63.7/1探)	伊今川小宮山 斎作田永中 萩野谷本藤山後 (63.6/30まで) 秋	樹志一郎 純子一三郎 夫裕彦一 和雅雄 千枝子	*神岡岡田 ○松桶

I 神経研究所の概要

微細構造研究部										男子憲之生 幸圭 清悦(り) 二沂美子 潔 井倉田宮滝 7/1よ雄裕佐 新志池高大 (63.7/1原海村田 萩簡内西松	
機能研究部	小沢 鏡二郎	荻原 康子	熱海 佐保子 斉藤 公(り)	木 村 一 藤 加代子 齋 藤 新比古 江 口	田 中 光 林 謙介 (63.4/1探 63.4/1探 1.3/31退)	山 石	山 内 敏代	山 内 敏代	○後 藤 八 重 (63.7/20退) *保土原 勝 子 (63.11/30退) *山 田 圭 津		
代謝研究部	里 吉 栄二郎 (63.4/1~64. 1/1事務取扱) 杉 田 秀 夫 (64.1/2~1. 2/28事務取扱) 高 坂 新 一 (1.3/1より)	中 嶋 一 行	美 馬 達 夫	茂 野 林					○甲 有 理 (1.3/31退) *亀 井 幸 (1.3/23探)		
免疫研究部	里 吉 栄二郎 (64.1/1まで 事務取扱) 杉 田 秀 夫 (64.1/2より 事務取扱)		美 馬 達 夫	茂 野 林	松 原 豊 田 三 (1.3/31退) 篠 田 一 (63.4/1探)	新 池 西 野 古 (63.7/20まで) 尾 玉 替 吉 (63.7/21探~ 1.3/31退)	井 上 亮 尾 健 資 沢 美 亜 利 川 美 子 (63.7/20まで) 前 田 二 雄 地 耕 一 野 恭 介 野 文 浩 吉 明 (エイズ予防財団 より派遣 63. 6/1より)	○新 井 左 衛 子 (1.3/31退) ○橋 田 滋 陽 子 *北 田 陽 子 (1.3/31退) ○古 川 美 子 (63.7/21探~ 1.3/31退)			

逋研	工学部	鍋島陽一	藤松水戸(63.12/1探) 敬(1.3/1より)	子雄 敬				伊藤肇文(63.11/30まで) 松崎文雄	植月太一(63.4/1探) 千尋(63.12/1探)	小中	尾啓	透子	鍋島曜子(63.4/25探) 大滝雅子(1.3/22探)	子美子 美子 美子 京子 探~ (1.3/31退)	
モデル発開	動物部	菊池建機	花岡口文 田和文 則広	規也典之 雅一正裕	内内岡木 山松佐	斎藤宗雄	松余(63.5/31退) 崎田哲也明	渋谷地崎 水門菊山 徹誠佳弘 智和一					早坂美智子(63.5/31退) 守田弘致(63.6/1探) 平野弘美(64.1/1探~ 1.3/31退)	桜井眞理子 齊藤洋子	
事務	室				企画室(63.6/30まで) 庶務第一課(63.7/1より)										
R	I	室													
図	書	室													
電	頭	室													
所	長	室													

(表3) 昭和63年度神経研究所セミナー及び講演会

年月日	講師・所属	演 題	担 当
昭和63年 6.28	勝 木 元 也 東海大学医学部細胞生物学	トランスジェニックマウスを用いた研究 の現状と未来	遺 伝 子 工 学 研 究 部
6.29	Marjorie B. Lees Associate Director, Biochemistry Department, Eunice Kennedy Shriver Center, U.S.A. Professor of Biochemistry in Neurology Harvard Medical School, U.S.A.	Proteolipid protein: Chemical and Immunologic aspects	所 長 疾病研究第六部
7.6	小野寺 一 清 東京大学農学部農芸化学科生物化学	染色体21番の構造と機能	疾病研究第二部 小 児 神 経 科
7.15	池 田 秀 利 愛知がんセンター 加 藤 真 吾 慶応義塾大学医学部微生物学	レトロウイルスに対する宿主抵抗性遺伝子 ヒト血液細胞に対するヒト内在性レトロ ウイルスの細胞変性効果	免 疫 研 究 部
9.20	R. E. Hausman Associate Professor, Boston University Biological Science Center, U.S.A.	Critical cell membrane events during embryonic myogenesis	機 能 研 究 部
10.24	Amanda McRae Charge de Recherche IV, INSERM U-259, Université de Bordeaux II, Bordeaux, France	Immunocytochemical investigation of Parkinson's and Alzheimer's diseases	疾病研究第三部
11.29	D. Gauvreau Institut National de la Recherche Scientifique, Québec, Canada	The IMAGE Project: An alternative approach to the study of Alzheimer disease	痴呆疾患研究 推 進 委 員 会 疾病研究第六部
12.6	高 橋 慶 吉 神経研究所疾病研究第六部室長 永 田 頌 史 精神保健研究所心身医学研究部室長	動物細胞遺伝子の転写調節 ストレスとアレルギー	疾病研究第六部
平成元年 1.24	田 村 隆 明 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所	ほ乳類の神経系特異的遺伝子発現 (in vitroでの解析)	遺 伝 子 工 学 研 究 部
"	Hans-Joachim Freund Professor and Chairman, Department of Neurology, University of Dusseldorf, Federal Republic of Germany	Disturbances of motor behaviour after cortical lesion in man	疾病研究第四部
3.28	有 賀 寛 芳 北海道大学薬学部教授	真核生物における DNA 複製開始機構	疾病研究第五部

部 長 就 任 講 演 会

年月日	講師・所属	演 題
昭和63年 11.15	柴 崎 浩 部長 疾病研究第四部	随意運動と不随意運動 —— 電気生理学的側面 ——

(表4) 神経研究所10周年記念講演会

昭和63年11月4日(金)神経研究所創立10周年を記念して、講演会が湯島の東京ガーデンパレスで開催された。

国立精神・神経センター 神経研究所は昭和53年1月、国立武蔵療養所・神経センターというかたちで、8部16室の研究所として誕生した。開所式は4月24日、当時の厚生大臣小澤辰男氏臨席のもとで行われた。この研究所は筋ジストロフィー症などの神経・筋の変性疾患、代謝異常などによる精神および神経疾患、染色体異常および周産期異常による発達障害の3つの疾患群の病因解明と治療法の開発を目的として設置されたものである。発足当時は研究職23名、併任研究員20名、流動研究員20名の計63名のスタッフであった。

その後年々組織の拡大が行われ、昭和61年には研究部門は13部門30室となり、61年10月、我が国の3番目の国立センターとして、武蔵病院、神経研究所(神経センターを改名)、精神保健研究所を統合し、後には国立国府台病院も包括して2病院2研究所を含む大きな国立センターとなった。組織も14部門34室に拡大、研究生を含めて約250名の研究者が活発な研究を行っており、その成果は広く内外に知られている。

そこで10周年の記念講演会を開き過去10年の業績のまとめを広く公開し、今後の研究所の発展を願って将来の展望についての講演を東京大学生化学 村松正實教授、新潟大学脳研 生田房弘教授、東京大学生理学 伊藤正男教授に御願した。

当日は厚生省関係者、大学の研究班長、研究施設長、関連の大学教授をはじめ難病団体の役員代表を含め約130名の方々の出席を頂いた。

午前は厚生省保健医療局、北川定謙局長の挨拶に始まり、島蘭総長、里吉研究所長の挨拶に引続いて研究所の5名の部長が代表して筋障害(杉田秀夫部長)、発達障害(高嶋幸男部長)、精神障害(高橋清久部長)、神経障害(田平武部長)、基礎研究(小沢鏝二郎部長)についてそれぞれ40分ずつの研究報告があった。

午後は村松正實教授の「神経研究における分子生物学の役割」、生田房弘教授の「神経科学と病理形態学」、伊藤正男教授の「神経科学の将来」というすばらしい講演が行われ、聴衆一同大変感銘を受けた。

午後5時に講演会は終了し、5時から簡単な祝賀会が開かれ、出席者一同昔をなつかしがったり、将来の発展の話をしたり、なごやかなひと時を過ごして7時に散会した。

以上 文責 里 吉 栄二郎

国立精神・神経センター 神経研究所開設10周年記念講演会プログラム

場 所：東京ガーデンパレス
日 時：昭和63年11月4日（金）午前10時

神経研究所10年の歩み

10：00～10：45

— 式 典 —

挨拶 厚生省保健医療局長
挨拶 国立精神・神経センター総長
挨拶 国立精神・神経センター神経研究所長

司会 高野運営部長
北川 定 謙
島 蘭 安 雄
里 吉 栄二郎

10：45～12：30

— 研究報告 —

筋障害研究 疾病研究第一部長
発達障害研究 疾病研究第二部長
精神障害研究 疾病研究第三部長
神経障害研究 疾病研究第六部長
基礎研究 機能研究部長

司会 里吉 所 長
杉 田 秀 夫
高 嶋 幸 男
高 橋 清 久
田 平 武
小 沢 鏝二郎

12：30～13：30

— 休 憩 —

神経研究の将来の展望

13：30～15：30

— 講演会 —

神経研究における分子生物学の役割
東京大学教授（医学部生化学教室）

司会 遺伝子工学研究部長
村 松 正 實
鍋 島 陽 一

神経科学と病理形態学
新潟大学教授（脳研究所所長）

司会 微細構造研究部長
生 田 房 弘
埜 中 征 哉

神経科学の将来
東京大学教授（医学部生理学教室）

司会 機能研究部長
伊 藤 正 男
小 沢 鏝二郎

15：45～17：00

— 祝 賀 会 —

(表5) 昭和63年度 神経研究所・研究発表会

平成元年3月22日(水)
第3会議室

9:30	微細構造研究部			
	1) 胸腺リンパ球の <i>in vitro</i> における増殖		加茂 功	
	2) ミトコンドリアミオパチー研究の現況		後藤 雄一	
10:00	機能研究部			
	1) ラット骨格筋におけるトランスフェリンレセプターの分布	田中 光	後藤 八重	
	2) ラット骨格筋の発生にともなう dystrophin の細胞膜への発現		萩原 康子	
10:30	代謝研究部			
	1) ニューロン培養上清に含まれるオリゴデンドロサイト成熟促進因子の分離について	中嶋 一行	今澤 正興	
	2) イノシトールトリスリン酸 (IP ₃) の脳内レセプターについて	今澤 正興	甲 有理	
11:00	免疫研究部			
	1) ラットに AIDS 様免疫不全を惹起するマウス白血病ウィルス変異株について	高瀬 明	渡辺 里仁	
	2) アストログリア細胞の NGF 合成におよぼす PC12 細胞の接触効果		篠田 一三	
	3) ラット脳の NGF マッピング		西尾 健資	
	4) カテコール化合物による末梢神経系での <i>in vivo</i> NGF 合成促進		替地 恭介	
11:30	モデル動物開発部			
	1) マウス脳中枢神経系にみられる Spheroid body		菊池 建機	
	2) アンチセンス RNA によるウィルス増殖抑制の試み		田口 文広	
— 休 憩 —				
13:00	疾病研究第1部			
	1) mdx マウスにおけるジストロフィンの欠損		石浦 章一	
	2) DMD 保因者のジストロフィン発現様式		荒畑 喜一	
	3) 実験的虚血脳におけるプロテアーゼの変動		塚原 俊文	
	4) CTL に存在する膜障害タンパク質パーフォリン		小泉 宏隆	
13:30	疾病研究第2部			
	1) 骨形成不全症2型のコラーゲン解析		許斐 博史	
	2) ヒト大脳における血管の新生・発達		水戸 敬	
14:00	疾病研究第3部			
	1) サーカディアンリズムの同調機構	大井 健	杉下真理子	
		加藤 文代	高嶋 瑞夫	
	2) うつ病とセロトニン受容体—イノシトールリン脂質代謝系—	三国 雅彦	黒田 安計	
		加賀谷有行		
	3) PCP を用いた精神分裂病モデル	西川 徹	畑 直人	
		海野 麻未		
14:30	疾病研究第4部			
	1) GAD マウスの運動ニューロン軸索の病変について		小田健一郎	
	2) 各種運動失調マウスに対する cysteamine (ソマトスタチン拮抗薬) 投与後の行動薬理的検討		松井 京子	

I 神経研究所の概要

15:00	疾病研究第5部		
	1) ヒト前骨髄性白血病細胞(HL-60)分化誘導と糖脂質ガングリオシドGM3の生合成		佐藤(粕谷)淳子 桃井 隆
	2) 発生過程におけるレチノイン酸結合タンパクの発現と局在	桃井 隆	北本 年弘
	3) 中枢神経系におけるレチノイン酸情報伝達機構	北本 年弘	桃井 隆
15:30	疾病研究第6部		
	1) 狂犬病ワクチンによる自己免疫性脳炎		ラモン・S・ハビル
	2) EAE感受性マウス(SJL)と抵抗性マウス(CBA)を用いたEAE発症機序の検討		本山 和徳
	3) コリン作動性ニューロンに対するインターロイキン3の作用		亀谷 雅洋
16:00	診断研究部		
	1) 安定同位元素トレーサー法による生体内トリプトファン代謝に関する研究—1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline類のGC/NICIMS—		林 時司
	2) MRSによる脳代謝研究—現状と展望—	矢野登志雄	荻野 孝史
16:30	遺伝子工学研究部		
	筋細胞の分化と遺伝子発現の制御	植月 太一	小宮 透
		鍋島 曜子	藤沢 淳子
		鍋島 陽一	
17:10	懇親会		

(表6) 昭和63年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表

研究課題	所属及び役職名	主任研究者	金額	人員	備考	
61指-1	難治てんかんの予防及び対策に関する研究	国立療養所静岡東病院長	清野 昌一	20,000	28	継続
61指-2	ニューロパチーの成因及び治療に関する研究	名古屋大学医学部 神経内科教授	高橋 昭	17,000	18	〃
62指-1	筋ジストロフィー症の発症に関する遺伝子工学的基礎研究	東京大学医学部 薬理学教授	野々村 禎昭	48,000	23	〃
62指-2	筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究	国立精神・神経センター 神経研究所長	杉田 秀夫	54,000	38	〃
62指-3	筋ジストロフィー症の遺伝、疫学、臨床及び治療開発に関する研究	国立療養所宇多野病院長	西谷 裕	46,000	53	〃
62指-4	筋ジストロフィー症の療養と看護に関する臨床的、心理学的研究	国立療養所東埼玉病院長	青柳 昭雄	48,000	32	〃
62指-5	発育期脳障害の発生予防と成因に関する研究	東京大学医学部 小児科教授	鴨下 重彦	38,000	42	〃
62指-6	代謝障害に基づく中枢神経疾患の発症機構と治療に関する研究	岐阜大学医学部 小児科教授	折居 忠夫	12,000	13	〃
62指-7	精神分裂病の生物学的病因及び発症に関する研究	岡山大学医学部 神経精神科教授	大月 三郎	19,000	18	〃
62指-8	そううつ病の発症機序に関する生物学的研究	滋賀医科大学 精神医学教授	高橋 三郎	16,000	17	〃
62指-9	脊椎・脊髄の発生異常に基づく神経機能障害の治療及び予防に関する研究	大阪医科大学 整形外科教授	小野村 敏信	17,000	13	〃
62指-10	中枢神経障害の発症及び診断に関するサイクロトロン核医学の応用に関する研究	秋田県立 脳血管センター部長	上村 和夫	10,000	13	〃
62指-11	遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究	大阪大学 蛋白質研究所教授	御子柴 克彦	20,000	16	〃
62指-12	心身症の診断及び治療予後に関する研究	慶応義塾大学医学部 精神神経科教授	保崎 秀夫	20,000	17	〃
62指-13	薬物依存の成因及び病態に関する研究	都立松沢病院長	加藤 伸勝	25,000	23	〃
62公-1	重度重複障害児の疾病構造と長期予後に関する研究	国立療養所西別府病院長	三吉野 産治	35,000	34	〃
62公-2	レトロウイルスによる神経障害発現の機序に関する研究	東北大学医学部 病態神経学教授	岩崎 祐三	10,000	9	〃
62公-3	児童・思春期精神障害の成因及び治療に関する研究	国立仙台病院長	白橋 宏一郎	17,000	14	〃
63指-1	筋ジストロフィー症及び関連疾患モデル動物の開発に関する研究	国立精神・神経センター 神経研究所部長	埜中 征哉	20,000	11	新規
63指-2	脳発達障害の発現機序と対策に関する開発的研究	東邦大学医学部 生理学教授	平野 修助	19,000	15	〃
63指-3	発達期における脳循環障害の発症機構と治療に関する研究	神戸大学医学部 脳神経外科教授	松本 悟	19,000	20	〃
63指-4	ミエロパチーの発現機構と病因に関する研究	東京大学医学部 脳研神経内科教授	萬年 徹	10,000	13	〃
63指-5	中枢神経系の機能修復促進に関する開発的研究	新潟大学脳研究所 神経内科教授	宮武 正	10,000	10	〃
			合計	550,000	490	

(表7) 精神・神経疾患研究委託費運営委員会委員

委 員 名	所 属 及 び 役 職 名	任 期
江 橋 節 郎	岡崎国立共同研究機構生理学研究所長	S.62.4.1~H.1.3.31
祖 父 江 逸 郎	国立療養所中部病院名誉院長	〃
福 山 幸 夫	東京女子医科大学小児科教授	〃
稲 永 和 豊	久留米大学医学部精神神経科名誉教授	〃
生 田 房 弘	新潟大学脳研究所長	〃
中 西 孝 雄	筑波大学臨床医学系内科教授	〃
内 村 英 幸	国立肥前療養所長	〃
山 下 格	北海道大学医学部精神医学教授	S.63.4.1~H.2.3.31
岩 下 宏	国立療養所筑後病院長	〃
亀 山 正 邦	財団法人住友病院長	〃
後 藤 文 男	慶応義塾大学医学部内科教授	〃
大 田 原 俊 輔	岡山大学医学部小児神経科教授	〃
高 倉 公 朋	東京大学医学部脳神経外科教授	〃
島 尾 忠 男	財団法人結核予防会結核研究所名誉所長	〃
北 川 定 謙	厚生省保健医療局長	関係行政機関等
長 尾 立 子	厚生省児童家庭局長	〃
寺 松 尚	厚生省大臣官房科学技術審議官	〃
里 吉 栄 二 郎	国立精神・神経センター総長	〃
大 熊 輝 雄	国立精神・神経センター武蔵病院長	〃
廣 川 浩 一	国立精神・神経センター国府台病院長	〃
杉 田 秀 夫	国立精神・神経センター神経研究所長	〃
藤 縄 昭	国立精神・神経センター精神保健研究所長	〃

(表8) 精神・神経疾患研究委託費運営委員会評価部会委員

委員名	所属及び役職名	任期
勝 沼 信 彦	徳島大学医学部附属酵素研究施設長	S.62.4.1～H.1.3.31
亀 山 正 邦	財団法人住友病院長	〃
北 川 照 男	日本大学医学部小児科教授	〃
稲 永 和 豊	久留米大学医学部精神神経科名誉教授	〃
中 西 孝 雄	筑波大学臨床医学系内科教授	〃
山 下 格	北海道大学医学部精神医学教授	S.63.4.1～H.2.3.31
荒 木 淑 郎	熊本大学医学部附属病院長	〃
竹 下 研 三	鳥取大学医学部脳神経小児科教授	〃
生 田 房 弘	新潟大学脳研究所長	〃
寺 松 尚	厚生省大臣官房科学技術審議官	関係行政機関等
里 吉 栄 二 郎	国立精神・神経センター総長	〃
大 熊 輝 雄	国立精神・神経センター武蔵病院長	〃
廣 川 浩 一	国立精神・神経センター国府台病院長	〃
杉 田 秀 夫	国立精神・神経センター神経研究所長	〃
藤 縄 昭	国立精神・神経センター精神保健研究所長	〃

(表9) 平成元年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表

研究課題	所属及び役職名	主任研究者	金額	備考
62指-1 筋ジストロフィー症の発症に関する遺伝子工学的基礎研究	東京大学医学部薬理学教授	野々村 禎 昭	48,000 ^{千円}	継 続
62指-2 筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究	国立精神・神経センター神経研究所長	杉 田 秀 夫	54,000	〃
62指-3 筋ジストロフィー症の遺伝、疫学、臨床及び治療開発に関する研究	国立療養所宇野病院長	西 谷 裕	46,000	〃
62指-4 筋ジストロフィー症の療養と看護に関する臨床的、心理学的研究	国立療養所東埼玉病院長	青 柳 昭 雄	48,000	〃
62指-5 発育期脳障害の発生予防と成因に関する研究	東京大学医学部小児科教授	鴨 下 重 彦	38,000	〃
62指-6 代謝障害に基づく中枢神経疾患の発症機構と治療に関する研究	岐阜大学医学部小児科教授	折 居 忠 夫	12,000	〃
62指-7 精神分裂病の生物学的病因及び発症に関する研究	岡山大学医学部神経精神科教授	大 月 三 郎	19,000	〃
62指-8 そううつ病の発症機序に関する生物学的研究	滋賀医科大学精神医学教授	高 橋 三 郎	19,000	〃
62指-9 脊椎・脊髄の発生異常に基づく神経機能障害の治療及び予防に関する研究	大阪医科大学整形外科学教授	小野村 敏 信	17,000	〃
62指-10 中枢神経障害の発症及び診断に関するサイクロトロン核医学の応用に関する研究	秋田県立脳血管センター副所長	上 村 和 夫	10,000	〃
62指-11 遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究	大阪大学蛋白質研究所教授	御子柴 克 彦	20,000	〃
62指-12 心身症の診断及び治療後に関する研究	慶応義塾大学医学部精神神経科教授	保 崎 秀 夫	17,000	〃
62指-13 薬物依存の成因及び病態に関する研究	都立松沢病院長	加 藤 伸 勝	23,000	〃
62公-1 重度重複障害児の疾病構造と長期予後に関する研究	国立療養所西別府病院長	三吉野 産 治	38,000	〃
62公-3 児童・思春期精神障害の成因及び治療に関する研究	国立仙台病院長	白 橋 宏 一 郎	17,000	〃
63指-1 筋ジストロフィー症及び関連疾患モデル動物の開発に関する研究	国立精神・神経センター神経研究所部長	埜 中 征 哉	23,000	〃
63指-2 脳発達障害の発現機序と対策に関する開発的研究	東邦大学医学部生理学教授	平 野 修 助	19,000	〃
63指-3 発達期における脳循環障害の発症機構と治療に関する研究	神戸大学医学部脳神経外科教授	松 本 悟	19,000	〃
63指-4 ミエロパチーの発現機構と病因に関する研究	東京大学医学部脳研神経内科教授	萬 年 徹	13,000	〃
63指-5 中枢神経系の機能修復促進に関する開発的研究	新潟大学脳研究所神経内科教授	宮 武 正	13,000	〃
元指-1 難治てんかんの病態と治療に関する研究	国立療養所静岡東病院長	清 野 昌 一	20,000	新 規
元指-2 ニューロパチーの臨床と病態に関する研究	名古屋大学医学部神経内科教授	高 橋 昭	17,000	〃
元指-3 精神分裂病の臨床像、長期経過及び治療に関する研究	国立下総療養所長	鈴 木 淳	20,000	〃
元指-4 アルコール依存の成因と病態に関する研究	国立療養所久里浜病院長	河 野 裕 明	10,000	〃
元指-5 中枢神経病変による運動障害の回復促進に関する臨床的研究	国立療養所宮城病院長	笹 生 俊 一	10,000	〃
元指-6 NMRを用いた精神、神経、筋疾患の病態に関する研究	国立精神・神経センター神経研究所部長	柴 崎 浩	10,000	〃
		合 計	600,000	

(表10)

国立神経センター(仮称)設立準備委員会中間報告(昭52.1)による整備計画

	研 究 所	病 院
第 一 次 計 画 (52~53年度)	一期工事(約4,400㎡) 8 研究部門発足 流動研究員, レジデント宿舎新設	神経・筋病棟新設(120床) 病理部門新設 外来部門増設 中央検査部増設
第 二 次 計 画 (できるだけ早い 時期)	3 研究部門を増設(計11部)	神経・筋病床を300床に増床する ために必要な病棟の改築, 整備を 行なう
第 三 次 計 画 (なるべく早い時 期)	7 研究部門を増設(計18部) 大型動物室, 図書館, 研修部門の新設 当初予定の規模にするため約13,000㎡の増築を 必要とする	必要部門の拡充, 整備, 改築を行 なう

II 研 究 業 績

1. 所 長

A. 論 文

a. 原 著

- 1)
- Sunohara N
- ,
- Nonaka I
- ,
- Kamei N
- ,
- Satoyoshi E
- :

Distal myopathy with rimmed vacuole formation

—a follow-up study

Brain 112:65-83, 1989

- 2)
- 富英明
- ,
- 向山昌邦
- ,
- 亀井敦行
- ,
- 春原経彦
- ,
- 里吉宮二郎
- :

中枢神経系に多数のアミロイド小体を認めた Crow-Fukase 症候群の 1 剖検例

臨床神経 28:887-890, 1988

b. 著 書

- 1)
- Kamo I
- ,
- Satoyoshi E
- :

Effects of thymic myoid cells on thymocyte proliferation

Neuroimmunological Diseases-Recent advances in pathogenesis and treatment (ed by

Igata A), Univ. of Tokyo Press, Tokyo, p287-292, 1988

c. 総 説

- 1)
- 里吉宮二郎
- :

筋収縮は頭痛を起こすか？

Clinician 371:4-7, 1988

d. 班会議報告書

- 1)
- 里吉栄二郎
- ,
- 春原経彦
- ,
- 西尾健資
- :

Parkinson 病の言語障害

東京都特殊疾病（難病）に関する研究班，昭和62年度研究報告書，p13-22, 1988

- 2)
- 里吉栄二郎
- ,
- 古川昭栄
- ,
- 赤沢左衛子
- ,
- 加茂功
- :

実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究

—自己免疫筋疾患抗原物質のモノクローナル抗体による解析—

厚生省新薬開発・低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班，昭和62年度研究報告書，

p133-136, 1988

II 研究業績

e. その他

1) 里吉栄二郎 :

一例報告の重み

順天堂医学 34:130-131, 1988

B. 学会発表

b. 国際学会

1) Satoyoshi E :

A syndrome of progressive muscle spasms, alopecia and diarrhea

Electromyographic school-Rovinj, Rovinj, Yugoslavia, Sept. 9, 1988

2) Satoyoshi E, Toyoda M, Sakuragawa N :

Positron emission tomography study in mitochondrial encephalomyopathy

9th International Meeting on Neuromuscular Diseases, Marseilles, France, Sept. 16, 1988

c. 一般学会

1) 松原豊, 渡辺里仁, 里吉栄二郎 :

ラットにおけるマウスコロナウイルス JHM 株による中枢神経の初期病変

日本神経病理学会総会学術研究会, 仙台, 5.20, 1988

2) 横井風児, 荻野裕, 西尾健資, 春原経彦, 里吉栄二郎, 飯尾正明 :

Amnesia のポジトロン CT による責任病巣及び病因に関する研究

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988 (臨床神経 28:1480)

3) 松田行生, 阪田千種, 亀井敦行, 春原経彦, 里吉栄二郎 :

Wilson 病における D-penicillamine, Triethylene tetramine, 硫酸亜鉛療法の臨床的比較検討

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.27, 1988 (臨床神経 28:1558)

4) 西尾健資, 荻野裕, 春原経彦, 里吉栄二郎 :

Parkinson 病の言語障害

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.27, 1988 (臨床神経 28:1560)

5) 富英明, 春原経彦, 里吉栄二郎 :

脊髄小脳変性症における眼球・眼瞼運動の検索

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.27, 1988 (臨床神経 28:1585)

6) 阪田千種, 富英明, 亀井敦行, 横井風児, 春原経彦, 里吉栄二郎 :

脊髄空洞症 4 例の放射線学的 (MRI) 病巣と臨床症状

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.27, 1988 (臨床神経 28:1594)

- 7) 横井風児, 向山昌邦, 春原経彦, 里吉栄二郎 :

性格変化で発症し進行性の知能低下を示した 1 剖検例

第105回日本神経学会関東地方会, 6.3, 1988 (臨床神経 29:243)

- 8) 古川昭栄, 古川美子, 篠田一三, 里吉栄二郎, 林恭三 :

PC12 細胞の共培養下におけるマウスアストログリア細胞の NGF 合成・分泌

第61回日本生化学会大会, 東京, 10.4, 1988

- 9) 古川美子, 富岡登, 佐藤若生, 里吉栄二郎, 林恭三, 古川昭栄 :

カテコール化合物によるアストログリア細胞内 NGF mRNA の誘導および構造—活性相関

第61回日本生化学会大会, 東京, 10.4, 1988

- 10) 新井洋, 古川昭栄, 古川美子, 里吉栄二郎, 林恭三 :

マウスアストログリア細胞の NGF 合成・分泌におよぼすステロイドの効果

第61回日本生化学会大会, 東京, 10.4, 1988

- 11) 富英明, 春原経彦, 里吉栄二郎 :

正常人, 各種神経疾患における electrocutaneous reflex の検討

第18回日本脳波筋電図学会, 青森, 11.11, 1988 (脳波と筋電図 17:208)

- 12) 余田明, 渡辺里仁, 里吉栄二郎 :

ラットに AIDS 様免疫不全を惹起する FLV 産生細胞株の解析

エイズ研究会第 2 回学術集会, 東京, 12.8. 1988

C. 班会議発表

- 1) 里吉栄二郎, 西尾健資 :

Parkinson 病の言語障害

東京都特殊疾病 (難病) に関する研究班, 昭和62年度研究検討会, 東京, 7.9, 1988

- 2) 渡辺里仁, 高瀬明, 里吉栄二郎 :

ラットに AIDS 様免疫不全を惹起する FLV 産生細胞株の解析

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班班会議, 東京, 1.21, 1989

- 3) 渡辺里仁, 高瀬明, 里吉栄二郎 :

中枢神経親和性レトロウイルスをベクターとした組替え病原体の解析

II 研究業績

厚生省精神・神経疾患・レトロウイルスによる神経障害発現の機序に関する研究班班会議，東京，
2.16, 1989

4) 里吉栄二郎，古川昭栄，新井左衛子：

実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究

—自己免疫筋抗原の筋組織内分布と精製の試み—

厚生省新薬開発・低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班班会議，東京，2.25,
1989

2. 疾病研究第1部

1. 研究部一年の歩み

疾病研究第一部は進行性筋ジストロフィーを中心とする遺伝性筋疾患、及び多発性筋炎などの後天性筋疾患の病因の解明と治療法の開発を主目的とし、形態・生理・生化学的側面から研究を行っている。昭和63年度当部における研究活動に参加したメンバーは以下の通りである。

〔部長〕杉田秀夫(—63.12.31), 〔室長〕石浦章一, 荒畑喜一, 〔研究員〕塚原俊文(63.7.1—), 須原芳宏(—63.6.30), 〔併任研究員〕石原傳幸, 山口明, 清水輝夫, 春原経彦, 鎌倉恵子(63.5.1—), 〔客員研究員〕高木昭夫, 米本恭三, 佐藤猛, 〔流動研究員〕塚原俊文(—63.6.30), 陳琳(63.4.5—8.31:中国, 北京・中国医学科学院より), 織茂智之(63.10.1—1.3.31), 有川恵理(1.3.1—), 〔研究生〕鎌倉恵子(—63.4.30), 野島美知夫, 小泉宏隆, 荒木誠, 山本剛司, 淵脇泰介, 織茂智之(—63.9.30), 山本真理, 武山理美, 山口順士, 大古田陽子(63.6.13—1.3.31), 田辺博子(63.7.1—63.12.31), 奥山輝明(63.10.1—), 佐藤いづみ(1.1.9—), 〔研究見習生〕田中賢一, 喜田美由紀, 〔賃金研究員〕小川敬子, 安楽治美, 後藤加奈子, 古賀律子, 〔部長室〕下川智子。

本年度当部の研究概要を次に示す。

1) ジストロフィンに関する研究

Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の遺伝子にコードされるタンパク質“ジストロフィン”が正常の骨格筋・心筋表面膜には存在するが、DMDでは発現していない事を発見し報告して来たが、今年度は更にDMD保因者のジストロフィン発現様式(免疫組織化学的モザイクパターン)及びジストロフィンの生化学的背景(骨格筋抽出実験から細胞骨格タンパクとしての特質が判明)を明らかにした。これらの研究によってDMDの病因解明・予防と治療への道は大きく前進したと言えよう。

2) パーフォリンに関する研究

多発性筋炎における骨格筋障害過程に細胞障害性Tリンパ球(CTL)が重要な役割を果たしている事を明らかにしてきたが、今年度は更にCTLに含まれる膜障害タンパク質パーフォリン純化に成功し、その機能発現に際してCaイオンの必要性、ヘパリンによる増強効果、又血清中高分子阻害物質の存在を明らかにした。これらの研究は、多発性筋炎の病態機序解明と治療法の開発へ寄与するものである。

3) プロテアーゼに関する研究

インゲンシンは当部で発見されたセリン性高分子タンパク分解酵素であるが、実はATP依存性プロテアーゼと同一の酵素である事が示された。又実験的脳虚血に於けるプロテアーゼの変動とその意義を知るために、カテプシンB・L, マルチキャタリティックプロテイナーゼ, プロリルエンドペプチダーゼ等に

II 研究業績

ついて検索した。これらの研究は今後神経細胞壊死のメカニズムを解明していく上で注目されよう。

(事務取扱 杉田秀夫)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Sugita H, Arahata K, Ishiguro T, Suhara Y, Tsukahara T, Ishiura S, Eguchi C, Nonaka I, Ozawa E :
Negative immunostaining of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and mdx muscle surface membrane with antibody against synthetic peptide fragment predicted from DMD cDNA
Proc Japan Acad 64:37-39, 1988
- 2) Ishiura S, Nojima M, Funabashi H, Okuyama T, Sugita H :
Comparative studies of aminopeptidases in human placenta and pregnant serum
Placental and Endometrial Proteins pp.291-294, 1988
- 3) Usuki F, Ishiura S, Nonaka I, Sugita H :
 α -glucosidase isoenzymes in normal and acid maltase-deficient human skeletal muscles
Muscle Nerve 11:365-371, 1988
- 4) Usuki F, Ishiura S, Higuchi I, Sugita H :
Reappearance of embryonic neutral α -glucosidase isoenzyme in acid maltase-deficient muscle of Japanese quail
Experimental Neurology 100:394-402, 1988
- 5) Dahlmann B, Kuehn L, Ishiura S, Tsukahara T, Sugita H, Tanaka K, Rivett J, Hough R.F, Rechsteiner M, Mykles D.L, Fagan J.M, Waxman L, Ishii S, Sasaki M, Kloetzel P.M, Harris H, Ray K, Behal F.J, DeMartino G.N, McGuire M.J :
The multicatalytic proteinase: a high-Mr endopeptidase
Biochem J 255:750-751, 1988
- 6) Engel AG, Arahata K :
The membrane attack complex of complement at the endplate in myasthenia gravis
Ann New York Acad Sci 505:326-332, 1988

- 7) Arahata K, Engel AG :
 Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. V: Identification and quantitation of T8+ cytotoxic and T8+ suppressor cells
 Ann Neurol 23:493-499, 1988
- 8) Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, Ishihara T, Nonaka I, Ozawa E, Sugita H :
 Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide
 Nature 333:861-863, 1988
- 9) Arahata K, Sugita H, Suenaga T, Kawamura J :
 Immunohistochemical study of dermatomyositis associated with neo plasia
 in Neuroimmunological diseases. ed by Akihiro Igata, Univ Tokyo press:313-319, 1988
- 10) Arahata K, Ishihara T, Kamakura K, Tsukahara T, Ishiura S, Baba C, Matsumoto T, Nonaka I, Sugita H :
 Mosaic expression of dystrophin in symptomatic carriers of Duchenne's muscular dystrophy
 N Engl J Med 320:138-142, 1989
- 11) Arahata K, Ishiura S, Tsukahara T, Sugita H :
 Dystrophin digest.
 Nature 337:606, 1989
- 12) Emslie-Smith AM, Arahata K, Engel AG :
 Major histocompatibility complex class I antigen expression, Immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies
 Hum Pathol 20:224-231, 1989
- 13) Tsukahara T, Ishiura S, Sugita H :
 An ATP-dependent protease and ingensin, the multicatalytic proteinase, in K562 cells
 Eur J Biochem 177:261-266, 1988
- 14) Kamakura K, Ishiura S, Nonaka I, Sugita H :
 Localization of ingensin in rat central nervous system and skeletal muscle
 Journal of Neuroscience Research 20:473-478, 1988

II 研究業績

- 15) Koizumi H, Tsukahara T, Ishiura S, Sugita H :
Localization of BLT serine esterase is distinct from that of perforin in cytotoxic T lymphocyte
Proc. Japan Acad., 64:155-158, 1988
- 16) Okuyama T, Nojima M, Fuchiwaki T, Hirayama H, Ishiura S, Sugita H, Kigawa T :
C-kinase from human placenta. In Placental and Endometrial proteins
VSP. Utrecht, Netherlands pp.333-336, 1988
- 17) Araki M, Takagi A, Higuchi I, Sugita H :
Neuroleptic malignant syndrome: Caffeine contracture of single muscle fibers and muscle pathology
Neurology 38:297-301, 1988
- 18) 岩坪威, 荒畑喜一, 本吉慶史, 村山繁雄, 萬年徹 :
重症筋無力症, 多発性筋炎の特徴を兼ね備えたミオパチー —臨床的, 免疫組織化学的検討—
臨床神経学 28:913-918, 1988
- 19) 石原傳幸, 清水輝夫, 杉田秀夫, 儀武三郎, 青柳昭雄 :
呼吸不全における呼吸筋の病理
日本胸部臨床 47:379-385, 1988
- 20) 山本真理, 佐藤猛, 杉田秀夫 :
Duchenne 型筋ジストロフィー患者血清中の Aminopeptidase 活性 —骨格筋に由来する酵素の同定および活性について—
臨床神経学 28:735-741, 1988

b. 著書

- 1) 石浦章一, 塚原俊文, 杉田秀夫 :
遺伝
「神経科学レビュー2」, 医学書院, p412-416, 1988
- 2) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :
筋萎縮症
医科学大事典・補遺巻5「最新の治療情報1988」, 講談社, 東京, p186-190, 1988
- 3) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :
多発性筋炎

神経疾患薬物療法ハンドブック，南江堂，東京，p142-143，1988

c. 総 説

- 1) 杉田秀夫，石原傳幸：
筋ジストロフィー症の治療
神経内科治療 5:209-216，1988
- 2) 杉田秀夫，石原傳幸：
筋ジストロフィー発病の仕組
看護学生 36:78-79，1988
- 3) 杉田秀夫，石原傳幸：
筋萎縮
からだの科学増刊 5:201-206，1988
- 4) 石浦章一，杉田秀夫：
筋疾患におけるプロテアーゼ作用の多様性
最新医学 43:800-805，1988
- 5) 石浦章一，小泉宏隆，杉田秀夫：
話題の疾患—Duchenne 型筋ジストロフィー—
代謝 25:609-613，1988
- 6) 石浦章一，杉田秀夫：
Creatine Kinase (CK)
神経内科 28:459-463，1988
- 7) 石浦章一，杉田秀夫：
筋細胞の収縮蛋白と調節蛋白
臨床科学 24:391-397，1988
- 8) 石浦章一，小泉宏隆，杉田秀夫：
Duchenne 型筋ジストロフィー
代謝 25:609-613，1988
- 9) 石浦章一，杉田秀夫：
膜の透過性と筋疾患
BIOMedica 3:1223-1227，1988
- 10) 石浦章一，鈴木紘一：

Ⅱ 研究業績

カルシウム依存性プロテアーゼ異常による筋疾患

代謝 25:183-186, 1988

11) 石浦章一 :

遺伝病治療の試み。慢性肉芽腫症はなおるか。

実験医学 7:172-174, 1988

12) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

筋ジストロフィーのメカニズム発見について

I Y D P 情報 8:51, 1988

13) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 遺伝子産物の局在について

—免疫組織化学的診断—

Medical Immunology 16:864-870, 1988

14) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

分子生物学から見た筋疾患；筋ジストロフィー

Clinical Neuroscience 7:77-81, 1989

15) 荒畑喜一 :

多発性筋炎・皮膚筋炎の治療法

臨床科学 24:793-795, 1988

16) 塚原俊文, 杉田秀夫 :

筋ジストロフィーの新展開—DMD蛋白質の局材と機能をめぐって

実験医学 6:1097-1102, 1988

17) 塚原俊文, 杉田秀夫 :

神経・筋疾患とプロテイナーゼ, プロテイナーゼ・インヒビター

治療学 21:614-619, 1988

18) 小泉宏隆, 石浦章一, 杉田秀夫 :

進行性筋ジストロフィー

蛋白質核酸酵素 33:1017-1022, 1988

d. 班会議報告書

1) 杉田秀夫, 石浦章一, 塚原俊文, 須原芳宏, 菊池建機 :

E-64誘導体による糖原病Ⅱ型ウズラの治療

厚生省新薬開発・低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班，

昭和62年度研究報告書 p129-131, 1988

2) 杉田秀夫，荒畑喜一，石浦章一，塚原俊文：

Duchenne 型筋ジストロフィーの欠損タンパク質 — 免疫組織化学的検討

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその原因に関する研究班，

昭和63年度研究報告書 p185-188, 1989

B. 学会発表

a. 特別講演，シンポジウム

1) 杉田秀夫：

DMD 遺伝子産物の局材と病態

運動系の分子機構 昭和63年度ワークショップ 那須，7.11, 1988

2) 杉田秀夫：

遺伝性筋疾患の病態—デュシャンヌ型筋ジストロフィーを中心に—

第16回薬物活性シンポジウム 富山，10.27, 1988

3) 杉田秀夫：

神経難病のモデルとその病態，進行性筋ジストロフィー症

難病医学研究財団シンポジウム「神経難病の基礎研究と臨床応用」東京，1.21, 1989

4) 杉田秀夫：

筋・神経疾患に関する最近の進歩，筋ジストロフィー症に関する最近の知見— Dystrophin を中心として

日本学術会議脳研究連絡委員会 第24回脳のシンポジウム 金沢，3.18, 1989

5) 杉田秀夫：

神経・筋疾患の成因解明への分子生物学的アプローチ—デュシャンヌ型筋ジストロフィーをモデルにして—

第11回日本生物学的精神医学会（教育講演） 東京，3.24, 1989

6) Ishiura S，Arahata K，Sugita H：

Role of proteases in muscle wasting diseases

The 7th Meeting of International Committee on Proteolysis Shimoda, May 19, 1988

7) Arahata K：

II 研究業績

Localization of the Duchenne muscular dystrophy gene product at the surface membrane of skeletal and cardiac muscles

The Taniguchi Symposium: International Workshop on "Molecular Biology of Human Genes." Osaka, Nov.30, 1988

8) 荒畑喜一 :

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) に於ける欠損タンパク質の局在をめぐって
第8回発達神経科学シンポジウム 東京, 11.19, 1988

9) 荒畑喜一 :

DMD の欠失遺伝子産物 (ジストロフィン) をめぐって
第6回 Neuromuscular Conference 東京, 12.24, 1988

b. 国際学会

1) Katunuma N, Sugita H :

Role of Intracellular Proteinases in Clinical Medicine
7th International Congress on Clinical Enzymology Osaka, Sep.13, 1988

2) Sugita H :

Immunohistochemistry of Dystrophin in Various Neuromuscular Disease
Workshop on the "Pathogenesis of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) in the Light of Recent Discoveries" Nedlands, Feb.20, 1989

3) Ishiura S, Arahata K, Tsukahara T, Koizumi H, Yamaguchi M, Sugita H :

Duchenne muscular dystrophy gene product, dystrophin
Int. Symp. of Protein Recognition Kyoto, Mar.15, 1989

4) Ishiura S, Koizumi H, Tsukahara T, Sugita H :

Calcium is essential for both membrane binding and lytic activity of perforin from cytotoxic T-lymphocytes
Ca and Cell Regulation Nagoya, 1988.

5) Ishiura S, Nojima M, Funabashi H, Okuyama T, Sugita H :

Comparative studies of aminopeptidases in human placenta and pregnant serum
Int. Congr. Placental and Endometrial proteins Nagoya, 1988.

6) Arahata K, Sugita H, Nonaka I, Maruyama K :

Localization of nebulin, connectin (titin) and α -actinin in the skeletal muscle of

Duchenne muscular dystrophy (DMD)

40th Annual Meeting of the American Academy of Neurology Cincinnati, OH, U.S.A.,
April 19, 1988

7) Arahata K, Orimo S, Ishiura S, Tsukahara T, Suhara Y, Sugita H :

Developmentally regulated expression of Duchenne's muscular dystrophy gene product in the surface membrane of rat skeletal muscle

First Annual Meeting of the Society for Experimental Neuropathology. Philadelphia, PA, U.S.A., Oct. 1, 1988

8) Arahata K, Ishiura S, Tsukahara T, Nonaka I, Ozawa E, Sugita H :

Negative immunostaining of Duchenne muscular dystrophy and mdx mice muscle surface membrane with antibody against synthetic peptide from Duchenne's muscular dystrophy cDNA

113th Annual Meeting of the American Neurological Association Philadelphia, PA, U.S.A., Oct. 2, 1988

9) Tsukahara T, Ishiura S, Sugita H :

K562 ATP-dependent protease is identical to the high-molecularmass protease, ingensin

7th Meeting of International Committee on Proteolysis Shimoda, May.17, 1988

10) Orimo S, Arahata K, Ishiura S, Sugita H :

Monoclonal antibody analysis of inflammatory cells in acute muscle fiber necrosis induced by bupivacaine (BPV)

40th Annual Meeting of the American Academy of Neurology Cincinnati, OH, U.S.A., April 21, 1988

c. 一般学会

1) 荒畑喜一, 杉田秀夫, 石浦章一, 丸山工作 :

細胞骨格蛋白(ネビュリン, コネクチン及び α -アクチニン)から見たDMDの病態

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988

2) 山本真理, 石浦章一, 佐藤猛, 杉田秀夫 :

Duchenne型筋ジストロフィー患者血清中のAminopeptidase—物理化学的性質及び臨床的意義

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988

3) 織茂智之, 高橋浩士, 黒沢崇四, 新井雅信, 冷牟田英三, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

II 研究業績

塩酸ブピバカインによる骨格筋の急性壊死・再生に伴なう浸潤細胞の解析

第29回日本神経学会総会，東京，5.25, 1988

4) 山本剛司，佐藤猛，杉田秀夫：

抗フィラミン抗体による重症筋無力症のマウスへの passive transfer

第29回日本神経学会総会，東京，5.26, 1988

5) 鎌倉恵子，石浦章一，杉田秀夫，埜中征哉，今城忍：

CANP inhibitor の筋肉内分布—免疫組織化学的検討—

第29回日本神経学会総会，東京，5.27, 1988

6) 須原芳宏，石浦章一，杉田秀夫：

糖原病Ⅱ型日本ウズラの成因

第29回日本神経学会総会，東京，5.27, 1988

7) 塚原俊文，石浦章一，杉田秀夫：

K562に存在する ATP 依存性プロテアーゼとマルチキャタリティックプロテイナーゼ（インゲンシン）の同一性

第61回日本生化学会総会，東京，10.5, 1988

8) 塚原俊文，石浦章一，杉田秀夫：

MEL 細胞の分化に伴うプロテアーゼ活性の変化

第41回日本細胞生物学会大会，名古屋，11.19, 1988

C. 班会議発表

1) 荒畑喜一，石浦章一，塚原俊文，杉田秀夫：

Duchenne 型筋ジストロフィーの欠損タンパク質 —免疫組織化学的検討

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究班，
東京，12.3, 1988

2) 杉田秀夫：

筋ジストロフィー症の病態研究

厚生省精神・神経疾患「筋ジストロフィー症」総合班会議，東京，1.14, 1989

3) 塚原俊文，石浦章一，荒畑喜一，近藤智善，佐藤猛，杉田秀夫：

実験的虚血脳におけるプロテアーゼの変化

医薬品の副作用に起因する神経障害の治療などに関する研究班班会議，東京，2.4, 1989

4) 石浦章一，塚原俊文，杉田秀夫：

K562細胞骨格タンパク質の分解に対する CANP インヒビターの影響

低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班総会，東京，2.25, 1989

II 研究業績

3. 主な研究報告

デュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)保因女性におけるジストロフィンの発現様式

荒畑喜一, 石浦章一, 塚原俊文, 杉田秀夫

DMDが伴性劣性遺伝形式をとることから、その保因者診断には力が注がれて来た。血清CK活性の測定は、保因女性の約70%で上昇していることが知られており今日なお臨床の補助診断検査として役立っている。一方、DarrasらはジストロフィンのcDNAプローブによるDMDの胎児診断、保因者診断の有用性を指摘したが、遺伝子の欠失発見は65%程度であった(1)。点突然変異や小さな欠失は必ずしもつかまらないといえる。従ってDNA多形による連鎖解析がやはり必要となる訳であるが、これは必ずしも容易ではない場合が多い。そこで我々はDMDで特異的に欠損しているジストロフィンの局在を検索してみた(2)。

対象と方法

臨床的に軽い筋力低下と筋萎縮の認められた definiteな symptomatic carrier 3症例に対して免疫組織化学的検索を実施した(2)。

結果

保因女性ではいずれも筋横断切片にてジストロフィン陽性線維と陰性線維とが大別されて(それぞれ26~59%, 32~71%)いわゆるモザイク状の染色パターンを呈した(図)。また一部の筋には同一線維内に陽性部分と陰性部分を認めた(2~8%)。これらの所見は縦方向の切片でも確認された。このモザイクパターンはfiber typeとは必ずしも一致しなかったが、type 2Bと2Cに陰性線維率の多い傾向を見た(2)。

考察と結論

何故このようなモザイクパターンを取るのか議論の多い所であろうが、一つの可能性は LyonizationによりX染色体がrandomに不活化されて生じたジストロフィン陽性の筋芽細胞と陰性の筋芽細胞が(理論的に1:1)何等かの理由でnon randomに融合して筋管細胞を形成してしまう事であろう。さらに発生学的研究が必要である。臨床症状の無い asymptomatic carrierはどうかであろうか。我々はその後4例のかかる生検筋を得て(いずれも血清CK値は最高4倍まで上昇していた)検索したところ、やはり同様の結果を得ている。一方Bonillaらは5例の symptomatic 6例の asymptomaticなDMD保因者について報告し、前者には全例にジストロフィン欠損線維が認められたが後者の群には2例で欠損

を見なかったとしている。しかし彼らの報告は一例毎の検索範囲も少なくまたCK値との関連もはっきりと記載されていない。今後検査法の感度、手技も含めて更に幅広い研究を重ねて行くことが大切であろう。これはDMDの遺伝相談に重要な資料を提供するものである。

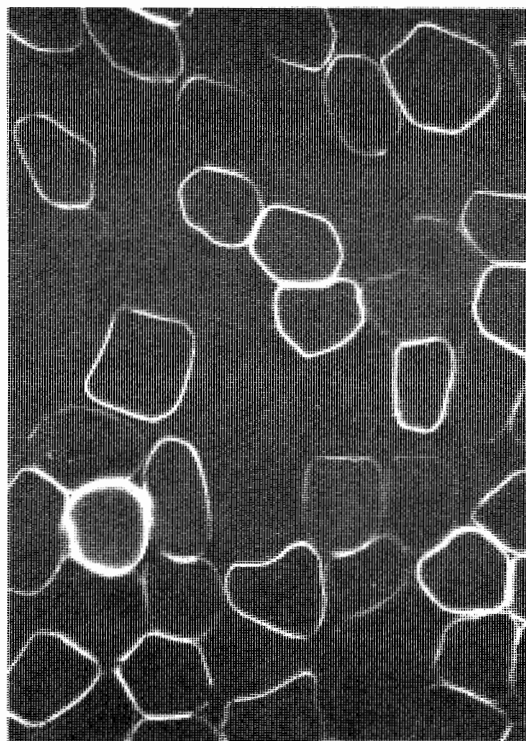


図. DMD保因者の免疫組織化学

保因者ではジストロフィン陽性の筋線維と陰性のそれとが互いに小グループないしは単独で入り交っている。いわゆるモザイクパターンを示す。しかしジストロフィンの分子量は正常(400kDa)である。

文献

- (1) Darras, B. J. et al. Am. J. Med. Genet. 29, 713-726, 1988
- (2) Arahata, K. et al. N. Engl. J. Med. 320, 138-142, 1989

ジストロフィンの抽出条件の検討

石浦章一, 塚原俊文, 山口順士, 古賀律子, 安楽治美, 荒畑喜一, 杉田秀夫

DMD/BMD 遺伝子産物のジストロフィンが膜タンパク質であることが明らかとなり, その生理作用に注目が集まっている。我々は, まず既報のごとく DMD ペプチドに対する抗体を作製し, その臓器分布, 種差を検討した。

方法

骨格筋を, 10% SDS を含む Tris buffer (0.1 M Tris Hcl pH8, 10mm EDTA, 10 μ g/ml E64・ロイペプチン, 10% SDS, 100mm ジチオスレートール) 20倍量とホモジナイズ, 100℃ 5分の処理後, 遠心上清をとって筋ホモジネートとした。

SDS 電気泳動は 6% スラブゲルを用い, ブロットは 180mA, 3時間で行った。

結果と考察

図 1 に, 動物差があるかどうかの結果を示す。400 kd のジストロフィンは, ヒト, マウス, ラット, 及びニワトリ砂のうで検出されたがジストロフィン欠損が明らかである mdx マウスにおいては検出されなかった。興味深い点は, 平滑筋であるニワトリ砂のうでも検出されたことで, しかも骨格筋に比べてかなり多量存在することが明らかとなった。

もう 1 つジストロフィンの抽出で問題となるのは, その分解が早いことである。図 2 に SDS 濃度を変化させるとジストロフィンの抽出効率がかわることを示す。抽出時に SDS 濃度が低いと 400 kd のジストロフィンは 210 kd 及び 180 kd に分解されてしまうことが明らかである。

このようにジストロフィンはタンパク分解を受け易く, 今後抽出条件の検討も必要であることがわかった。

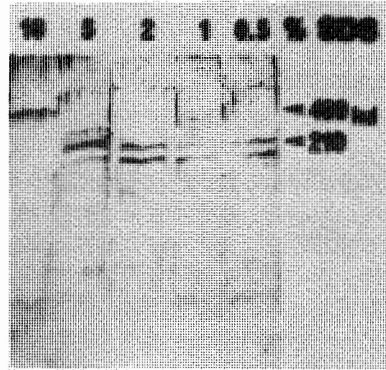


図 2 抽出条件の変化に伴うジストロフィンの分解 (抗体による検出)

ヒト骨格筋を SDS 濃度を変化させて抽出した。10%のときに 400kd のジストロフィンが見られるが, SDS 濃度が低下すると次第に 210k へと変化していくのがわかる。

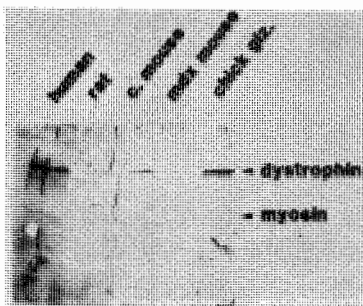


図 1 抗ジストロフィン抗体 IV によるジストロフィンの検出

実験的虚血脳におけるプロテアーゼの変動

塚原俊文, 石浦章一, 近藤智善*, 佐藤猛*, 杉田秀夫

* 順天堂大学・脳神経内科

脳虚血による遅発性神経細胞壊死においては、虚血によって神経細胞内にCa²⁺が流入しCANP(Ca²⁺依存性プロテアーゼ)が活性化されて細胞内タンパク分解が亢進し、さらにはリソゾームを介しての自己食の異常亢進を伴って最終的な細胞死に至ると考えられている。しかし、虚血にさらされた中枢神経細胞における種々のプロテアーゼの動態に関する知見はまだない。そこで我々は、今回スナネズミ前脳を実験的虚血下におき、血流再開後の脳内各部位におけるプロテアーゼ活性の変化を調べ、病態と酸素活性の関連について研究を行った。

材料および方法

桐野らの方法¹⁾に従ってスナネズミの総頸動脈を10分間結紮後、血流を再開させ、再開後、24, 48, 72時間後に屠殺し直ちに脳を摘出してイソペンタノードライアイスで凍結した。凍結脳から皮質(Cx), 線条体(St), 海馬(腹側:Hipp, 背側:CA1)の四つの部分を分離した。測定個体数は0, 24時間では5, 48, 72時間は4であった。カテプシンB活性は、カテプシンLの特異的な阻害剤であるCBZ-F A -CH₂N₂の存在下で、Z-FR-MCAを基質として測定した。カテプシンL活性は、全Z-FR-MCA分解活性からカテプシンB活性を差し引いて求めた。マルチキャタリティックプロテイナーゼは、Suc-LLVY-MCAを基質としてATP存在或いは非存在下で、またプロリルエンドペプチダーゼ活性はSuc-GPLGP-MCAの分解を10mM 2-メルカプトエタノール存在下で測定した。

結果

図に示したように、皮質や線条体では虚血負荷後の時間経過に伴ってカテプシンL活性が減少していたが、虚血によって最も障害が大きいと考えられる海馬CA1領域では、カテプシンL活性は一過性に上昇していた。この活性の上昇は24時間後に最大となり48時間後まで高い活性を保っていたが72時間後には虚血以前のレベルまで低下していた。カテプシンLの活性上昇はHippでもみられたが皮質や線条体ではみられず、またカテプシンB活性はいずれの領域においても大きな変動はみられなかった。

脳で比活性が高いプロリルエンドペプチダーゼ活性も、海馬CA1およびHipp, 線条体で活性の上昇が認められた。しかし虚血負荷後48時間で最大となっており、カテプシンL活性の上昇とは位相がずれ

ていた。これに対してマルチキャタリティックプロテイナーゼ活性はATPの存在に関係なくいずれの領域においても変動していなかった。

考察

実験的脳虚血によって、海馬特にCA1領域におけるカテプシンL活性とプロリルエンドペプチダーゼ活性の上昇が認められた。組織像では虚血負荷後24時間頃まではマクロファージ等の浸潤が見られないことからカテプシンLの活性の上昇は脳組織由来であると考えられる。カテプシンBが主に外来性タンパク質を分解するのに対してカテプシンLは自己食食に関与していると考えられており、脳虚血負荷後の早い時期にカテプシンL活性が上昇することは神経細胞壊死に先立つ細胞の異常な状態を反映していると考えられる。プロリルエンドペプチダーゼはTRHやニューロテンシンを不活性化することが知られているがその生理的役割は不明であり、虚血負荷後の活性上昇と神経細胞の壊死がいかなる関連性を持つかは不明である。しかし虚血後の活性上昇と神経細胞の機能的死との時間的一致や、比活性が海馬で高いことからこの酵素が細胞死に何らかの関与をしていると考えられ、カテプシンLとの局在の違いから、その役割の解明が今後の課題となっている。

文献

- 1) Kirino, T. Brain Res. 239 57, 1982

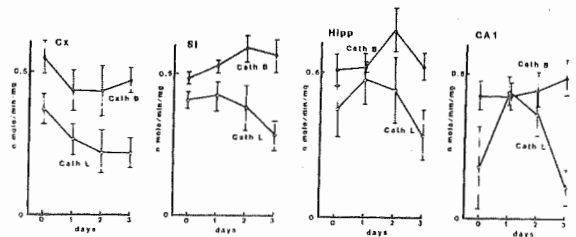


図 脳虚血負荷後の脳各部位におけるカテプシンB及びLの活性変動

DMDペプチド抗体の認識タンパク質

山口順士, 石浦章一, 塚原俊文, 杉田秀夫

最近, Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) で欠損しているタンパク質 Dystrophin の全構造が cDNA クローニングの方法により Kunkel らによって決定され, 3685 のアミノ酸からなる巨大筋構造タンパク質であることが明らかにされた。しかしこの Dystrophin の生体内での役割 (局在) はまだ明らかにされていない。

杉田らは, Dystrophin の cDNA 塩基配列をもとに 50 のアミノ酸からなる peptide I を合成し, これに対する抗体を作製した。

そこで, この抗体が認識するタンパク質を単離・精製することを目標として, まずこの抗体と反応するタンパク質を検索した。

① 分子量40万のタンパク質 (Dystrophin)

Western blot 法により, この抗体は筋肉中の分子量40万のタンパク質を認識し, ヒト, ブタ, ニワトリ, マウス等の筋肉で強く反応することがわかった。40万という分子量は, Kunkel らが先に発表した Dystrophin の分子量と一致した。この分子量40万のタンパク質は筋細胞骨格タンパク質の一種であると考えられ, また, 正常なヒト, マウスの筋肉 homogenate 中には存在したが, DMD 患者や DMD のモデル動物である mdx マウスの筋肉 homogenate 中には見られなかった。このタンパク質は多くの界面活性剤に不溶性で抽出されにくく, SDS によってのみ抽出された。

② 分子量13万のタンパク質

①と同じ peptide I を抗原としてつくったにもかかわらず, 異なる性質をもつ抗体がもう一種類できた。この抗体は分子量13万のタンパク質を認識したが, 分子量40万のタンパク質とは反応しなかった。抗体と分子量13万のタンパク質との反応は種特異性が高く, ブタ, ラット, マウスの筋肉で強く反応した。分子量13万のタンパク質も筋構成タンパク質であると考えられ, Hasselbach-Schneider 溶液や Guba-Straub 溶液で抽出された。筋肉内には分子量13.5万の C-protein が存在するので, C-protein を抽出して, peptide I を抗原として作製したこの抗体との反応性を調べたところ, 強く反応した。したがって, この抗体と反応する分子量13万のタンパク質は, C-protein である可能性が高い。Dystrophin のアミノ酸配列の一部をもつ peptide に対する抗体が, Dystrophin とは異なる分子量13万のタンパク質を特異的に認識することは大変興味深いことである。

今後, この分子量13万のタンパク質が Dystrophin と機能上どのような関わりをもつのか調べて行きたい。

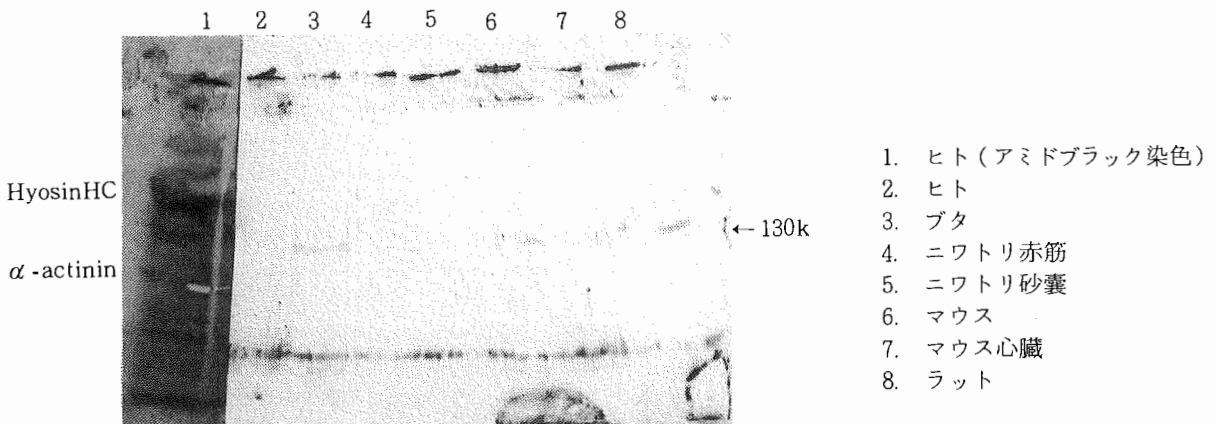


Fig 抗 130k 抗体による筋肉ホモジネートに対する染色

II 研究業績

3. 疾病研究第2部

1. 研究部一年の歩み

当部は精神遅滞や脳性麻痺などの発達障害の原因・病態を解明し 予防・治療を開発することをめざして研究する部門である。人事面では、田中・許斐両室長の他に、本年度初めに、水戸敬が鳥取大学より室長として着任した。流動研究員では笠間透は継続し、丸山悦子が賃金研究員より移った。賃金研究員では、田村頼子が順天堂大学より加わり、林昭子は転居のために退職（現在放射線医学総合研究所勤務）。研究生として、千葉貴子、小畑蘭子、来田裕美、八尾良司、小山和宏らが非常勤あるいは常勤で研究し、外部から客員または併任研究員として6名の方に指導、研究に参加してもらっている。

本年度の主な研究テーマは次の通りである。

1. 脳の発生・発達とその障害に関する研究を免疫組織化学的に行い、ダウン症候群における特異蛋白、周産期脳血管の特徴を観察した。
2. 胎児脳の発達と母体環境に関する研究では、エタノールの胎児脳障害の予防、カフェインと子供の脳障害の関連性につき検討し、報告した。
3. コラーゲン代謝異常の研究では、VIII型コラーゲンの精製と抗体作製、眼・神経系における生物学的意義を検討した。また、骨形成不全の細胞診断や遺伝子解析を行った。
4. メンケス病のモデルマウスで、活性酸素代謝異常の関与を証明し、治療として抗酸化剤と銅剤の投与を提示した。神経皮膚症候群についても細胞生化学的に検討した。

（部長 高嶋幸男）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Takashima S, Ando Y:
Reflectance spectrophotometry, cerebral blood flow and congestion in young rabbit brain
Brain Dev 10:20-23, 1988
- 2) Tomita Y, Tanaka T, Kamimura N, Shimosawa N, Takashima S, Takeshita K:
Origin and clinical significance of subcortical components in short latency somatosensory evoked potentials in children
Electroenceph clin Neurophysiol 69:199-208, 1988
- 3) Takada K, Nakamura H, Takashima S:
Cortical dysplasia in Fukuyama congenital muscular dystrophy(FCMD): a Golgi and angioarchitectonic analysis
Acta neuropath 76:170-178, 1988
- 4) Takada K, Becker LE, Takashima S:
Walker-Warburg syndrome with skeletal muscle involvement
Pediatr Neurosci 13:202-209, 1987
- 5) Inagaki M, Nakajima M, Ando Y, Takashima S, Takeshita K, Tanaka S, Tamura H, Ohayashi T:
Measurement of endotoxin in cerebrospinal fluid from neonates and infants using a new endotoxin-specific chromogenic test
Clinica Chimica Acta 175:315-319, 1988
- 6) Houdou S, Takashima S, Takeshita K, Ohta S:
Infantile subcortical leukohypodensity demonstrated by computed tomography
Pediatr Neurol 4:165-167, 1988
- 7) Nakajima M, Ishii S, Mito T, Takeshita K, Takashima S, Takakura H, Inoue I, Saheki T, Akiyoshi H, Ichihara K:
Clinical, biochemical and ultrastructural study on the pathogenesis of hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome
Brain Dev 10:181-185, 1988

II 研究業績

- 8) Kawahara H, Tomita Y, Takashima S, Nishimura S, Takeshita K:
Neurophysiological and neuropathological studies in two children with unusual form of multiple system degeneration: Evidence for cerebellar and brainstem involvement
Brain Dev 10:312-315, 1988
- 9) Shichida K, Tomita Y, Takashima S, Takeshita K:
Blink reflex in children with neurological disorders: Analysis of ipsilateral early component R₁ and late component R₂
Brain Dev 10:289-294, 1988
- 10) Kamimura N, Shichida K, Tomita Y, Takashima S, Takeshita K:
Spinal somatosensory evoked potentials in infants and children with spinal cord lesions
Brain Dev 10:355-359, 1988
- 11) Ando M, Takashima S, Mito T:
Endotoxin, cerebral blood flow, amino acids and brain damage in young rabbits
Brain Dev 10:365-370, 1988
- 12) Nakajima M, Inagaki M, Ando Y, Takashima S, Takeshita K, Tominaga H, Tanaka S, Shimizu S:
Endotoxin-specific chromogenic assay for plasma in pregnant women, umbilical cords, neonates and children
Brain Dev 10:382-384, 1988
- 13) Hokazono Y, Yokochi K, Ohtani Y, Inukai K, Takashima S:
A premature infant with a bilateral thalamostriatal hemorrhage: Brain imaging and pathology
Acta Pediatr Jpn 29:867-871, 1987
- 14) Koeda T, Ando Y, Takashima S, Takeshita K:
Changes in the lateral ventricle with the head position: Ultrasonographic observation
Neuroradiology 30:315-318, 1988
- 15) Mito T, Takada K, Akaboshi S, Takashima S, Takeshita K, Origuchi Y:
A pathological study of a peripheral nerve in a case of neonatal adrenoleukodystrophy
Acta neuropathol 77:437-440, 1988

- 16) 大谷恭一, 水戸敬, 高嶋幸男, 安東吾郎:
風疹後急性出血性白質脳炎の1剖検例
小児科臨床 41:80-84, 1988
- 17) 安藤幸典, 橋本和広, 吉田一成, 宝道定孝, 高嶋幸男, 竹下研三:
新生児期の脳機能モニターと予後
脳と発達 20:151-157, 1988
- 18) 稲垣真澄, 吉野邦夫, 高嶋幸男:
ねたきり重症心身障害児・者における睡眠時無呼吸例の血液ガス分析と経皮酸素分圧変化
脳と発達 20:288-293, 1988
- 19) 赤星進二郎, 七田謙一, 富田豊, 水戸敬, 高田邦安, 高嶋幸男, 下沢伸行, 鈴木康之:
副腎皮質機能不全, 骨端軟骨点状石灰化を呈した neonatal adrenoleukodystrophy と考えられた
1例
脳と発達 20:339-341, 1988
- 20) 大谷恭一, 稲垣真澄, 安藤幸典, 高嶋幸男:
新生児仮死例の追跡調査, 3才児健診における発達評価
鳥取医学雑誌 15:244-248, 1988
- 21) 小枝達也, 天満慎二, 鶴田悟, 若園吉裕, 太田茂, 高嶋幸男:
ACTH療法中に, 発症した肥大型心筋症
脳と発達 20:54-58, 1988
- 22) 小枝達也, 天満慎二, 樋口嘉久, 松原康策, 太田茂, 福田富美子, 高嶋幸男:
低出生体重児と成熟児の乳幼児期母親養育態度の比較
日本新生児学会雑誌 24:485-491, 1988
- 23) Tanaka H, Iwasaki S, Nakazawa K, Inomata K:
Fetal alcohol syndrome in rats: conditions for improvement of ethanol effects on fetal
cerebral development with supplementary agents
Biol Neonate 54:320-329, 1988
- 24) Matsuoka R, Uno H, Tanaka H, Kerr C S, Nakazawa K, Nadal-Ginard B:
Caffeine induces cardiac and other malformations in the rat
Am J Med Genet, Supplement 3:433-443, 1987

II 研究業績

- 25) Kasama T, Tanaka H:
Effects of copper administration on fetal and neonatal mice
J Nutr Sci Vitaminol 34:595-605, 1988
- 26) 中澤一治, 田中晴美:
血漿中, 唾液中のカフェインとジメチルキサンチン類の生体内動態
薬学雑誌 108:653-658, 1988
- 27) 那須史男, 猪俣賢一郎, 田中晴美:
E-PTA 染色法を用いた発達シナプスの臨床病理学的検索への応用
脳と発達 20:249-251, 1988
- 28) Okada Y, Konomi H, Yada T, Kimata K, Nagase H:
Degradation of type IX collagen by matrix metalloproteinase 3(stromelysin) from human
rheumatoid synovial cells
FEBS Lett 244:473-476, 1989
- 29) Maruyama E, Hayashi A, Arima M:
Deficiency of a 42-kilodalton protein in tumor-derived fibroblastic cells in
neurofibromatosis
Expl Cell Biol 56:153-158, 1988
- 30) Maruyama E N, Arima M:
Purification and characterization of neutral and acid sphingomyelinase from rat brain
J Neurochemi 52, 2:611-618, 1988
- b. 著 書
- 1) 高嶋幸男:
神経の診かた(新生児・乳児), 新生児の診かた
ベッドサイドの小児の診かた(山下文雄, 小田禎一, 植田浩司編), 南山堂, 東京, p118-129,
133-148, 1988
- 2) 河原仁志, 高嶋幸男:
神経皮膚症候群
小児神経疾患診療ハンドブック(渡辺一功編), 南江堂, 東京, p325-329, 1988
- 3) 高嶋幸男:
新生児の症候: けいれん

今日の小児診断指針（前川喜平，白木和夫，土屋裕編），医学書院，東京，p192-193，1988

4) Tanaka H, Inomata K:

Beneficial effects of supplementary agents on fetuses from ethanol-treated rats

Biomedical and Social Aspects of Alcohol and Alcoholism, *Excerpta Medica*, Amsterdam, p847-850, 1988

5) Olsen B R, Gerecke D, Gordon M, Green G, Kimura T, Konomi H, Muragaki Y, Ninomiya Y, Nishimura I, Sugrue S:

A new dimension in the extracellular matrix

Collagen: Biochemistry, Biotechnology and Molecular Biology

Vol. 4 (ed by Olsen B R, Nimni M), CRC, Boca Raton FL, 1988

c. 総説

1) 宝道定孝, 家島厚, 高嶋幸男:

先天異常（脳・神経奇形との関係）

産婦人科の世界 40（夏季増刊）:49-58, 1988

2) 水戸敬, 高嶋幸男, 大谷恭一:

神経疾患と易感染性

小児内科 20:79-83, 1988

3) 高嶋幸男, 水戸敬:

滑沢脳

Clinical Neuroscience 7:12-13, 1988

4) 田中順一, 高嶋幸男, 竹下研三:

脳梁欠損と合併脳奇形 Aicardi 症候群にみられる病理学的背景

脳と発達 20:184-190, 1988

5) 田中晴美:

胎児性アルコール症候群, 神経学的立場

産婦人科の世界 '88 夏季増刊号 こどもをとりまく危険因子 精神・神経・心理・行動の異常, p38-43, 1988

6) 田中晴美:

奇形の病因論

小児科 29:695-700, 1988

II 研究業績

7) 田中晴美:

胎児性アルコール症候群

日本臨床 特集：アルコールリズムとアルコール依存症 46:1850-1853, 1988

8) 田中晴美:

胎児性アルコール症候群

小児内科 外表奇形の臨床診断学・治療学 20:1459-1462, 1988

9) 許斐博史

分子生物学からみた神経疾患: 神経線維腫

Clinical Neuroscience 7:68-69, 1989

d. 班会議報告

1) 高嶋幸男, 富田豊, 安藤幸典:

小児の水頭症と脳障害の関連性 小児の頭蓋内圧亢進と眼輪筋反射

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班, 昭和62年度研究報告書 p25-26, 1988

2) 高嶋幸男, 安藤雅史

エンドトキシン血症の幼弱脳に及ぼす影響

厚生省精神・神経疾患・発達期における脳循環障害の発生と治療に関する研究班, 昭和62年度研究報告書 p81-85, 1988

3) 高嶋幸男, 安藤幸典:

未熟児の脳室内・周囲出血の脳合併症

厚生省心身障害・新生児管理における諸問題の総合的研究班, 昭和62年度研究報告書 p263-266, 1988

4) 高嶋幸男:

正常および乳児突然死症候群の頸髄ニューロンの樹状突起発達

厚生省心身障害・小児期の主な健康障害要因に関する研究班, 昭和62年度研究報告書 p15-21, 1988

5) 田中晴美, 笠間透, 中澤一治:

脳発育障害への活性酸素代謝の関与に関する研究

1. Menkes' kinky hair 病

厚生省精神・神経疾患・発育期脳障害の発生予防と成因に関する研究班, 昭和62年度研究報告書 p194-198, 1988

- 6) 有馬正高, 田中晴美, 中澤一治, 笠間透, 林昭子:

ウイルソン病およびメンケス病の治療薬剤の開発

厚生省新薬開発・臓器特異性貴金属化合物等の開発研究班 昭和62年度研究業績 p121-136,
1988

- 7) 有馬正高, 田中晴美, 林昭子, 丸山悦子:

結節性硬化症培養細胞へのプロリンの影響

厚生省特定疾患・神経皮膚症候群調査研究班 昭和62年研究報告書 p78-81, 1988

- 8) 有馬正高, 許斐博史:

I型コラーゲン構造異常を伴った骨形成不全症-II型におけるコラーゲン分析

厚生省精神・神経疾患・代謝障害に基づく中枢神経疾患の発症機構と治療に関する研究班
昭和63年度研究報告書 p20-24, 1989

- 9) 高嶋幸男, 許斐博史, 田村頼子, 沢田元:

中枢神経系の発達とその障害へのコラーゲンの関与-VIII型コラーゲンの精製と抗体作成

厚生省精神・神経疾患・脳発達障害の発現機序と対策に関する開発的研究 昭和63年度研究報告
書 p69-74, 1989

e. その他

- 1) 高嶋幸男:

ダウン症候群の早発老化

精神薄弱問題白書, p37-38, 1988

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

- 1) 高嶋幸男:

樹状突起発達とその異常

福岡小児神経100回記念講演会, 福岡, 4. 9, 1988

- 2) 高嶋幸男:

新生児大脳白質軟化症の発生病理

第84回九大小児科開講記念講演会, 福岡, 6. 25, 1988

- 3) 高嶋幸男:

新生児の脳血管障害

II 研究業績

第30回東京新生児研究会，東京，9. 20, 1988

4) 高嶋幸男:

Precocious aging in the brain of Down's syndrome

日米痴呆共同研究討論会 (第4回痴呆疾患研究討論会) ，東京，3. 10, 1989

5) Tanaka H:

Beneficial effect of supplementary agents on fetus from ethanol-treated rats

4th Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism
(Symposium) "Fetal Alcohol Syndrome", Kyoto June 28, 1988

6) 田中晴美:

胎児性アルコール症候群 —ヒトと動物モデルとの対比—

第28回日本先天異常学会学術集会 第7回 Behavioral Teratology 懇話会 (教育講演)
京都 7. 14, 1988

7) 田中晴美:

生活化学物質と脳発達障害

第9回環境医学シンポジウム「環境因子と脳発達障害」 名古屋 7. 21, 1988

8) Tanaka H:

Recent biochemical investigations into tuberous sclerosis

Tuberous Sclerosis Symposium 88

Nottingham, Sept. 16, 1988

b. 国際学会

1) Takashima S:

Pathology of cerebral palsy

The fourth western pacific cerebral palsy association meeting, Sendai, Sept 12, 1988

2) Tanaka H, Nakazawa K, Arima M:

Maternal caffeine and mental retardation

8th World Congress of the International Association for the Scientific Study of Mental
Deficiency

Dublin, Aug. 25, 1988

c. 一般学会

1) 高嶋幸男, 水戸敬, 宝道定孝:

Pontosubicular necrosis- アクリジンオレンジ蛍光色素法による神経細胞成熟と核崩壊の検討

第29回日本神経病理学会, 仙台, 5. 20, 1988

- 2) 水戸敬, 赤星進二郎, 宝道定孝, 竹下研三, 高田邦安, 高嶋幸男:

Neonatal adrenoleukodystrophy の末梢神経所見

第29回日本神経病理学会, 仙台, 5. 20, 1988

- 3) 宝道定孝, 水戸敬, 小枝達也, 木村正彦, 高田邦安, 湯本東吉, 高嶋幸男:

幼児型 neuronal ceroid lipofuscinosis の1剖検例

第29回日本神経病理学会, 仙台, 5. 20, 1989

- 4) 河原仁志, 宝道定孝, 竹下研三, 水戸敬, 高嶋幸男:

実験的ミトコンドリア阻害筋の病理学的検討—走査型電顕像と透過型電顕像の比較

第29回日本神経学会, 東京, 5. 26, 1988

- 5) 水戸敬, 安藤幸典, 宝道定孝, 竹下研三, 高嶋幸男:

Subependymal germinolysis が疑われた症例の臨床的検討

第30回日本小児神経学会, 徳島, 6. 9, 1988

- 6) 高嶋幸男, 水戸敬, 宝道定孝:

正常および乳児突然死症候群の頸髄ニューロンの樹状突起発達

第30回日本小児神経学会, 徳島, 6. 11, 1988

- 7) 高嶋幸男, 水戸敬:

蛍光色素法による神経細胞発達と壊死の顕微定量測光: 脳幹・小脳

第24回日本新生児学会, 東京, 7. 12, 1988

- 8) 水戸敬, 許斐博史, 高嶋幸男:

脳血管の発生・発達に関する免疫組織化学的研究: 大脳皮質・白質

第33回未熟児新生児学会, 東京, 11. 11, 1988

- 9) 小林道生, 竹内豊, 武井治郎, 長谷川久弥, 浅沼勝美, 高嶋幸男:

未熟児大脳白質の出血性梗塞の超音波所見

第33回未熟児新生児学会, 東京, 11. 11, 1988

- 10) 田中晴美, 林昭子, 有馬正高:

結節性硬化症培養細胞に対するプロリンの影響

第30回日本小児神経学会総会

徳島, 6. 9, 1988

II 研究業績

- 11) 田中晴美, 猪俣賢一郎, 那須史男, 笠間透, 有馬正高:
メンケス病モデルマウスのヘテロ母体における異常運動
第28回日本先天異常学会学術集会, 京都, 7. 16, 1988
- 12) 笠間透, 田中晴美:
新生マウスに対する銅投与の効果
第31回日本神経化学会, 仙台, 10. 28, 1988
- 13) 許斐博史, 村上晶, 糸数直哉, 有馬正高:
マルファン症候群患者の皮膚線維芽細胞が合成するコラーゲン分子の分析(第2報)
第91回日本小児科学会総会, 神戸, 5. 13, 1988
- 14) 許斐博史, 有馬正高:
レックリングハウゼン病の neurofibroma におけるコラーゲン検索 - I V型コラーゲンを中心にして
第30回日本小児神経学会総会, 徳島, 6. 9, 1988
- 15) 糸数直哉, 許斐博史, 高嶋幸男, 村上晶, 桜川宜男, 有馬正高:
マルファン症候群由来線維芽細胞のグリコサミノグリカン代謝動態
第28回日本先天異常学会総会, 京都, 7. 14, 1988
- 16) 沢田元, 許斐博史, 廣澤一成:
Type VIII コラーゲンは角膜の六角格子の成分か? -モノクローナル抗体を用いて
第41回日本細胞生物学会総会, 名古屋, 11. 17, 1988
- 17) 丸山悦子, 林昭子, 有馬正高, 高嶋幸男:
Recklinghausen 病腫瘍由来培養線維芽細胞に見出された phosphodiesterase I の活性増大
第61回日本生化学会, 東京, 10. 5, 1988

C. 班会議発表

- 1) 安藤幸典, 富田豊, 高嶋幸男:
種々の水頭症の病態評価: 脳血流と脳幹反射に基づいて
未熟児脳室内出血後水頭症の合併脳病変の発生機転
厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班, 東京, 1. 14, 1989
- 2) 水戸敬, 許斐博史, 高嶋幸男:
脳室上衣下胚層の免疫組織化学的研究
厚生省心身障害・新生児管理における諸問題の総合的研究班, 東京, 2. 18, 1989

- 3) 高嶋幸男:
乳幼児の脳幹・小脳梗塞と呼吸調節障害
厚生省心身障害・小児期の主な健康障害要因に関する研究班，東京，2. 20，1989
- 4) 水戸敬，許斐博史，高嶋幸男:
周産期脳血管の発達に関する免疫組織化学的検討
厚生省精神・神経疾患・発達期における脳循環障害の発症機構と治療に関する研究班，東京，
1. 25，1989
- 5) 許斐博史，田村頼子，高嶋幸男:
中枢神経系の発達とその障害へのコラーゲンの関与－VIII型コラーゲンの精製と抗体作製
厚生省精神・神経疾患・脳発達障害の発現機序と対策に関する開発的研究，東京，2. 18，1989
- 6) 高嶋幸男，来田裕美，水戸敬:
ダウン症候群脳の加齢による免疫組織化学的形態変容
厚生省精神・神経疾患・重症心身障害児の疾病構造と長期予後に関する研究班，東京，1. 28，
1989
- 7) 高嶋幸男，水戸敬:
HFOが脳組織に及ぼす影響
厚生省小児医療・高頻度振動人工呼吸器（HFO）の至適臨床応用法に関する基礎的研究，東京，
3.18，1989
- 8) 田中晴美，笠間透，猪俣賢一郎，有馬正高:
脳発育障害への活性酸素代謝の関与に関する研究
2. メンケス病マウスヘテロ母体における異常運動
厚生省精神・神経疾患・発育期脳障害の発生予防と成因に関する研究班，東京，1. 27，1989
- 9) 田中晴美，有馬正高，笠間透:
メンケス病の治療薬剤の開発に関する実験的検討
厚生省新薬開発・臓器特異性貴金属化合物等の開発研究班，東京，3. 17，1989
- 10) 有馬正高，丸山悦子，許斐博史，田中晴美，高嶋幸男:
P病，R病の正常部，異常部由来細胞の生化学的，分子生物学的検討
厚生省特定疾患・神経皮膚症候群調査研究班 昭和63年度第2回総会，東京，2. 16，1989
- 11) 有馬正高，許斐博史:
I型コラーゲン構造異常を伴った骨形成不全症－II型におけるコラーゲン分析

II 研究業績

厚生省精神・神経疾患・代謝障害に基づく中枢神経疾患の発症機構と治療に関する研究班
東京, 2. 2, 1989

3. 主な研究報告

メンケス病マウスヘテロ母体における異常運動

田中晴美, 笠間透, 猪俣賢一郎

脳発達障害への活性酸素代謝の関与につき, 遺伝性疾患のモデルとしてメンケス病プリンドルマウスを検討中である。その折偶然にメンケス病仔の発育関連因子としてヘテロ母体の異常運動を認めた。したがって, メンケス病の予防, 治療, 延命に関与する要因として, ヘテロ母体の異常運動の病態を検討した。

方法

C3H/HeJ-Mo^{br}-J マウス 120 匹を用い, 正常雄 (Mo^{+/y}) とヘテロ雌 (Mo^{br/+}) を交配させ病仔ヘミ雄 (Mo^{br/y}) を得た。コントロールとして正常雌 (Mo^{+/+}) を使用。妊娠中から出産後は水道水 (W), 20ppm 亜鉛水 (Zn), 0.004% 酢酸 α -トコフェロール水 (Vit E) を飲料水として投与。銅水 (Cu) 投与は 6ppm を妊娠 13 日以後とした。仔の検討は生後 5 日に行い, 異常運動出現母体については生化学的 (大脳過酸化脂質; LP, 大脳, 肝, 腎中の Cu, Zn, Cu, Zn-SOD, cytochrome oxidase, 蛋白), 形態的 (大脳皮質, 前庭神経核, 小脳の光顕, 電顕) 検討を行った。

結果

- 1) 妊娠母体の飲料水と仔の育つ割合: W;38%, Zn, 86%, Vit E;100%, Cu;92% で, さらにWにおいて育った仔における遺伝子型の割合は病仔 Mo^{br/y} で低下。
- 2) ヘテロ母体の異常運動: 仔の育たない母体において出産時すでに, あるいはその後間もなく一定の異常運動の出現, すなわち軽い tremor を伴い, 速いスピードで同一方向に回転運動を持続し, 時に ataxia が認められた。生後 3 カ月以後に出現, 頻度は Vit E;25%, Zn;45%, W;60%, Cu;67% で, 水や銅投与で出現しやすく, ビタミンEや亜鉛投与を受けた母体ではある程度出現を抑制しえた。
- 3) ヘテロ母体の異常運動と関連する生化学的所見: 正常雌, 正常運動のヘテロ雌と比べてヘテロ母体の異常運動で有意差をみたのは大脳中LP量および腎中銅濃度の増加であった。
- 4) ヘテロ母体の異常運動と関連する形態的所見: 異常運動を示すヘテロ母体に明らかな所見は小脳に認められ, 主なものとしては, ①プルキンエ細胞におけるリポフスチン顆粒の増加, ②変性小体を有した顆粒細胞, ③分子層あるいは顆粒細胞層におけるミトコンドリアの種々な変性像 (図) であった。

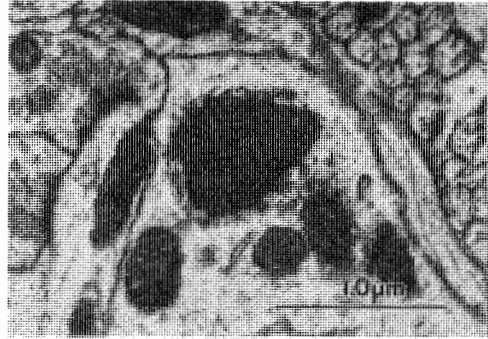


図 異常運動を示すヘテロ小脳の分子層のアストロサイトの突起における変性したミトコンドリアで網の目状になっている。

表 ヘテロ母体の異常運動とその関連因子

	Abnormal movement			
	-		+	
Feeding	+		-	
Drinking	Zn	Vit E	W	Cu
(live offspring)			↓	
LP in cerebrum	↑			↑
Cu in kidney	↑			↑
Cerebellar degeneration (mitochondria, lipofuscin)	↑			↑

考察と結論

正常雌と比較したヘテロの結果を表にまとめた。今までに報告をみないこの異常運動は抗酸化作用を有するビタミンEや亜鉛で抑制され, 活性酸素発生因子である銅で増強された。活性酸素代謝の関与は今回の私達の過酸化脂質の増加やリポフスチン蓄積の所見からも支持される。一方メンケス病仔にみられる銅の homeostasis の異常の反映として腎中銅やミトコンドリアの変化があげられる。これは銅投与を行った新生仔の発育が悪くない点からも支持される。したがってこの異常運動はメンケス病におけるX染色体異常の上に活性酸素代謝の攪乱が加わって生じたものと考えられる。メンケス病仔の発育に銅剤の投与は必須であるので, 出生前の銅剤と抗酸化剤との併用がメンケス病の予防や治療における今後の検討課題であろう。

Brindled マウス妊娠母体経口投与銅が胎仔の生存と組織中銅含量に及ぼす影響

笠間透, 田中晴美

Menkes' kinky hair 病は銅代謝異常を原因とする伴性劣性遺伝性疾患で、銅の組織分布の異常などが報告され、モデル動物としてマウスの mutant が存在する。いずれも銅含量は脳、肝で低下し、腎では増加する。ヒトでは有効な治療法はなく、マウスでは生後銅投与が有効とされる。我々は母体を介した出生前銅投与の可能性に着目し、既に C3H 系正常マウス妊娠母体に対する経口銅投与は胎仔の発育を障害せず大脳銅含量を増加させることを報告した¹⁾。今回、C3H 系 mutant の妊娠ヘテロ接合体母体に経口銅投与を行ない、胎仔組織中銅含量の変化を検討した。正常胎仔における母体遺伝形による違いも含め検討した。

[材料及び方法]

正常雄と同居させたヘテロ雌の妊娠を Plug または腔スミア中精子により確認した日を妊娠 0 日とし、妊娠 13 日より銅として 6ppm の硫酸銅溶液を飲料水として投与した¹⁾。妊娠 18 日に帝王切開し胎仔を得、性別確認の後、大脳、肝、腎の銅、亜鉛含量を測定した。対照実験として同系正常雌を用い、同様の測定を行なった。母体組織の銅、亜鉛含量も測定した。

[結果]

生存胎仔数は、非投与ヘテロ母体を除く他の三群の間では差がなく、非投与ヘテロ母体のみが有意に低かった。投与による母体組織銅含量の上昇は正常母体の肝のみで認められた。ヘテロ雌の特徴である腎銅含量の高値は、投与、非投与いずれのヘテロ母体にも認められたが、投与により上昇することはなかった。亜鉛含量に大きな変化は認められなかった。胎仔組織の銅含量は表に示した。亜鉛含量に大き

な変化はなかった。ヘテロ母体からの正常胎仔、正常母体からの正常胎仔に雌雄差はなく、それぞれ一群 (Normal) とした。大脳銅含量は全ての胎仔で投与により上昇した。ヘテロ母体からのヘミ接合体 (br/y)、ヘテロ接合体 (br/+) 胎仔の大脳銅含量は投与、非投与のいずれでも正常胎仔 (Normal) より低値を示した。正常胎仔の大脳銅含量に母体遺伝形による差はなかった。ヘテロ母体からの胎仔の肝銅含量は br/y、br/+ で正常胎仔より低く、投与しても不変であった。非投与ヘテロ母体からの正常胎仔の肝銅含量は低値を示したが、投与により上昇し、投与により変化しない正常母体からの正常胎仔の肝銅含量に等しくなった。胎仔腎銅含量の投与による上昇は正常母体からの正常胎仔においてのみ見られた。ヘテロ母体からの胎仔の腎銅含量は、br/y が br/+, 正常胎仔より高値を示した。

[考察]

非投与ヘテロ母体で低い生存胎仔数が、投与ヘテロ母体では正常母体に等しくなることから、ヘテロ母体は正常母体に比し妊娠維持が困難であり、銅投与はこれを改善すると考えられる。

母体の遺伝形による正常胎仔の銅投与に対する反応の違いは、ヘテロ母体の腸管での銅吸収の低下と胎盤を介した胎仔への銅移行量の低下によると考えられる。

Menkes' 病でも問題となる、br/y 胎仔の低い大脳銅含量は、妊娠母体銅投与で正常には達しないまでも改善され、高い腎銅含量を上昇させることはなかった。大脳銅含量の改善は br/+ 胎仔でも認められた。

母体経口投与を介した胎仔に対する銅投与は、br/+, 正常胎仔に障害を与えずに、br/y での銅の組織分布の異常を改善すると共にヘテロ母体の妊娠維持にも貢献すると考えられる。

[文献]

- 1) Kasama T, Tanaka H: J Nutr Sci Vitaminol 34: 595-605, 1988

表. 妊娠母体銅投与による 18 日胎仔の組織中銅含量の変化

母体遺伝形	br/+			+/+	
	br/y	br/+	Normal		
胎仔遺伝形	br/y	br/+	Normal	Normal	
大脳	投与	0.46*	0.48*	0.89*	0.77*
	非投与	0.32	0.38	0.65	0.66
肝	投与	3.03	3.36	20.0*	19.5
	非投与	2.71	2.01	15.5	17.8
腎	投与	1.84	0.95	0.88	1.12*
	非投与	1.53	1.02	0.84	0.95

数字は組織銅含量の平均値 ($\mu\text{g/g wet weight}$)

を示す。*は投与による有意な上昇を示す。

VIII 型コラーゲンの精製と抗体作成

許斐博史, 田村頼子, 高嶋幸男, 沢田元

VIII型コラーゲンは、大動脈内皮細胞、角膜内皮細胞、株化したヒト星状膠腫由来細胞などが合成する新しい型のコラーゲンであるが、その構造と機能の詳細は不明である。我々は種々の病態時の神経組織におけるVIII型コラーゲンの役割を明らかにする目的で、VIII型コラーゲンの精製および抗体作成を行い、さらにヒト組織における分布を免疫組織学的に検索した。

材料と方法

ウシ眼、角膜よりデスメ氏膜を剥離し、ペプシン消化、塩析、HPLCにてVIII型コラーゲンを精製した。また剥離したデスメ氏膜をPBS中でホモジナイズした後、マウスに免疫し、抗VIII型コラーゲンモノクローナル抗体を得た。autopsy時に得られたヒト組織は、無固定のまま厚さ5~10 μ mの凍結切片とし、得られた抗VIII型コラーゲン抗体を一次抗体としてPAP法にて染色、光顕的に観察した。

結果および考察

1) 図は、HPLCによるVIII型コラーゲンの精製を示す。lane 1は、デスメ氏膜をペプシン消化し、塩析にて得られたVIII型コラーゲン画分であり、50KDaの2本のバンドが主として認められる。この2本のバンドは細菌コラーゲナーゼで消化されることより、コラーゲンであることが明らかとなった。この2本のバンドをC18 reverse phase HPLCにかけ、acetonitrileで溶出させると50KDaのバンドよりなるpeak A(50KDa-A)と2本の50KDaのバンドよりなるpeak B(50KDa-B)に分離された。

2) 抗VIII型コラーゲン抗体と用いた染色ではヒト脊髄硬膜、骨膜、軟骨膜、デスメ氏膜、強膜、網膜中心動脈に明らかに反応が見られた。脳、脊髄実質に関しては、ウシ脊髄白質に線維様に存在するという報告はあるが、ヒトに関しては現在のところ確認されていない。また、腎、脾、肝臓など実質臓器では、artifactにより反応が不明瞭である為、今後、適切なblocking、又は蛍光抗体法を用いるなどして更に検索を進めていく必要がある。

我々がウシ、デスメ氏膜より精製したコラーゲンは、アミノ酸分析、CNBrペプチドマップなどよりVIII型コラーゲンであろうと考えられるが、VIII型コラーゲン分子の構造に関してはまだ十分に解明されておらず、今後さらにモノクローナル抗体を用い

て、DNAレベル、蛋白質分子レベルで検索を続けて行きたい。

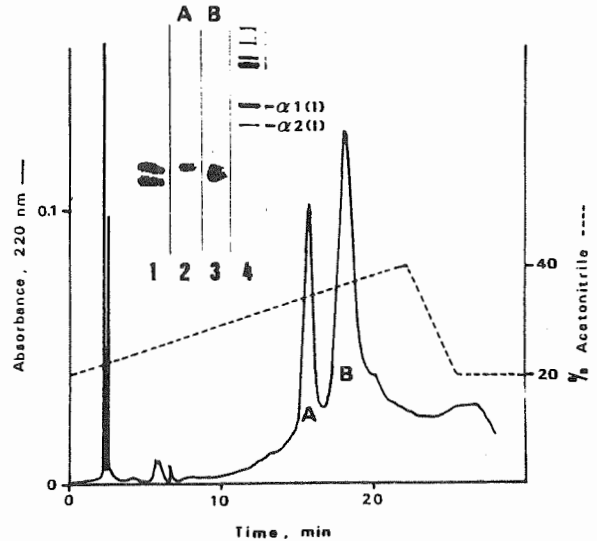


図 HPLCによるVIII型コラーゲンの精製

- lane 1: HPLCにかける前のVIII型コラーゲン画分
- lane 2: peak A
- lane 3: peak B
- lane 4: I型コラーゲン

Recklinghausen 病腫瘍由来線維芽細胞における特異蛋白

丸山悦子, 小野寺一清, 高嶋幸男, 有馬正高

Recklinghausen 病は17番染色体に原因遺伝座があるとされている優性遺伝病である。本症は胎生初期の分化異常による疾病と推察されているがその詳細は明らかではない。今回我々は患者細胞や腫瘍細胞における発症にいたる細胞形質因子を見つけるためにその検索法として吸収抗体を作成し、特異蛋白の検出を試みた。

材料と方法

Recklinghausen 病患者1例の正常部および腫瘍由来培養線維芽細胞を用いた。まず患者正常部由来線維芽細胞を confluent の状態に培養し、PBSで洗浄後、Miskimins ら¹⁾の方法により粗核蛋白を分画した。その蛋白をウサギの皮下に約2.5mg ずつ10日おきに打ち続け、血清を採取した。オクタロニー法で沈降線の形成を確認し、56℃、30分の熱処理後50%硫酸処理を行った。前もって正常人線維芽細胞より得た粗核蛋白を CNBr 活性化セファローズに結合させ、カラムに詰め、上述の患者正常部由来細胞の核蛋白に対する抗血清を流した。この素通り画分を吸収抗体とした。蛋白標品は懸濁した線維芽細胞を TCA 処理後 SDS 化して得た。10%ゲルでミニスラブ電気泳動を行い、その後セルロースメンゲレンに転写した。ブロットング後蛋白染色および alkaline phosphatase 結合抗ウサギ抗体を用い活性染色した。蛋白は金コロイド染色を行った。

結果

蛋白像(図の右3レーン)は正常人, 患者正常部では極めて類似したパターンを示した。腫瘍部由来細胞では150KDaと40KDa付近に違いがあった。中央の3レーンは抗血清(×100)を用い、左の3レーンは吸収抗体(同希釈率)で染色した。正常人核蛋白で吸収することにより極めて抗体の種類が減少したことがわかった。吸収抗体との反応の結果, 正常人, 患者正常部, 腫瘍部由来ではいくつかの共通なバンドが認められ, 腫瘍部由来では約9万Da蛋白の著しい増大と約4万Da蛋白の欠失があることがわかった。

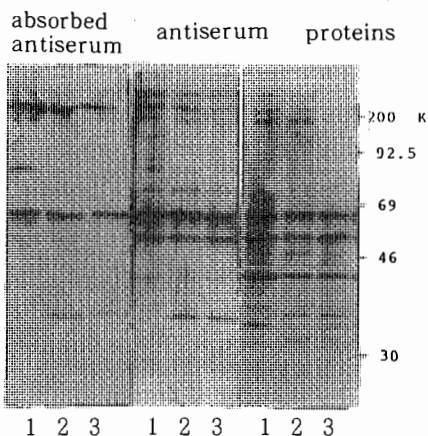
考察

我々は Recklinghausen 病で, ある特定の遺伝子の発現に関与し, 細胞増殖の異常や分化の方向性に影響を与え, 更には本症の優位遺伝のメカニズムをも説明し得るような因子の発見を目ざしてきた。今回はイムノアフィニティークロマトグラフィーの素通り画分に目的因子の特異的抗体があると考え, ウ

エステンブロットングを行って調べた。その結果腫瘍由来細胞で9万Daと4万Da蛋白が著しい違いとして見出された(図)。これらの蛋白がある種の遺伝子あるいは遺伝子産物に働いて発症にいたるのかも知れない。患者正常部細胞における特異蛋白の発見のためにはより適切な実験が必要である。これまでに電気泳動による蛋白の分析から細胞の増殖時期や培養条件によらない特異蛋白, 42KDa蛋白の欠失を腫瘍由来細胞に見出した²⁾。また phosphodiesterase I 活性が非常に高いことを腫瘍由来細胞で見つけ本酵素の分析をした³⁾。これらについては患者3例について確認したが, 今回見出した蛋白との同一性については定かではない。

文献

- 1) Miskimins WK, Roberts HP, McClalland A, Ruddle FH: Proc Natl Acad Sci USA 82: 6741-6744, 1985
- 2) Maruyama E, Hayashi A, Arima M: Exp Cell Biol 56: 153-158, 1988
- 3) 丸山悦子, 林昭子, 有馬正高, 高嶋幸男: 生化学, 60, 8, 756 (1988)



1 2 3 1 2 3 1 2 3
SDS-PAGE of cell proteins and immuno-precipitates formed by absorbed antiserum

1; tumor cells, 2; normal appearing cells from a patient, 3; control cells

周産期脳血管の発達に関する免疫組織化学的検討

水戸敬, 許斐博史, 高嶋幸男

周産期の脳障害は脳血管障害に基づくことが多く、その発生機転を考える上で脳内血管の発達を知ることが重要である。今まで、形態学的、放射線学的に種々の研究がなされてきているが、血管新生、発達のヒトにおける検討はまだ少ない。そこで、ヒトの脳血管を免疫組織化学的に観察し、血管の発達について検討した。

対象と方法

著名な病変を認めない、胎令14, 17, 20, 26, 30, 35, 38週, 生後3, 6カ月, および48才の大脳前頭葉30 m凍結切片をABC(avidin-viotin peroxydase complex)法, を用いて免疫組織化学的に染色した。一次抗体として, IV型コラーゲン, ラミニン, ファイブロンネクチンを使用し, 染色された血管の年齢に伴う変化について検討した。

結果

3抗体とも同様に血管を描出したが, 動脈と静脈の区別はつかなかった。

胎令早期では皮質から白質にかけて脳表に垂直に走る血管が主体であった。胎令後期以降も白質では脳表に垂直な血管の走行が主体であり, 血管の密度は大人まで大きな変化はなかったが, 皮質では26週以降35週の間血管は盛んに増殖して網目状を呈するようになり, 胎令35週以降大人までの血管密度にあまり差はなかった。血管の太さにおいては, 胎令14週以降, 幅10 μ m以下の細い血管を主体に10 μ mから20 μ mの間の血管も少しみられた。胎令35週以降, 皮質, 白質とも20 μ m以上の太い血管も散見されるようになり, 10 μ 以下, 10から20 μ mの間, 20 μ m以上にわたった時の血管の太さの割合は35週以降大人まで大きな差はなかった。

一方, 血管の新生と考えられた, 血管から少し離れた所に散見された点状の陽性所見の年齢に伴う変化については, 大脳皮質では胎令17週頃から増加し, 30週から35週をピークとした後減少した。白質では胎令17週以降, はっきりとした増減を示さず, 乳児期にも小数認められた(図)。

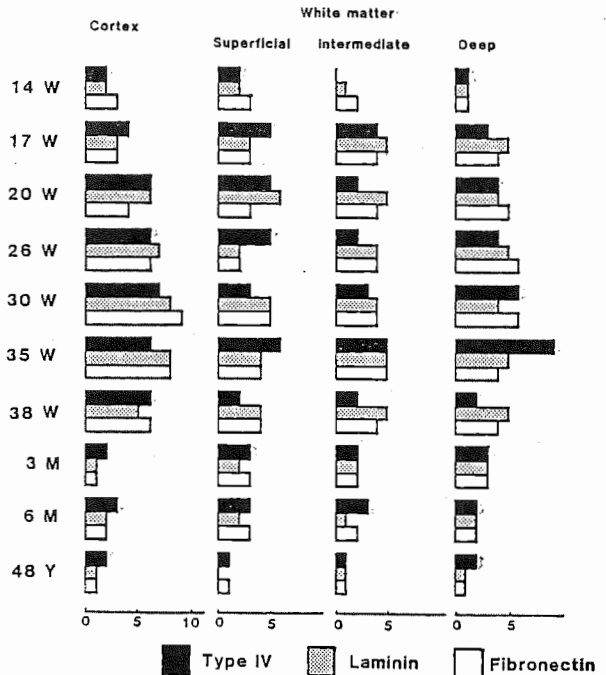
考察

今回の結果から, ヒトの大脳血管の発達について, 皮質と白質とでは大きく異なっていることが示された。皮質では, 胎令17週以降徐々に増加し, 30週から35週にかけてピークを示した血管新生の結果, 胎令26週から35週にかけて血管密度が急速に増え, ほぼ大人での密度と同じとなっていた。このことと血

管の太さの年齢に伴う変化から, 大脳皮質の血管は胎令35週にほぼ成熟すると考えられた。一方, 白質では, 皮質ほど血管の新生に増減の変化はなく, 密度に関しても年齢に伴う大きな変化はなかった。このことは, 白質では胎令期を通してほぼ一定した割合で血管新生がなされていると考えられた。また, 生後も胎令期に比べると少ないが血管新生が続いていたことは髄鞘形成との関係を示唆していると考えられた。

文献

- 1) Akima M, Nonaka H, Kagesawa M, et al: Lab Invest. 55:482-489, 1986
- 2) Marin-Padilla M: J Comp Neurol. 241:237-249, 1985
- 3) Rowan R and Maxwell D: Am J Anat. 160:247-255, 1981



Developmental changes of the number of positive cells

4. 疾病研究第3部

1. 研究部一年のあゆみ

当部は内因性精神病（精神分裂病，そううつ病）の原因解明と治療法の開発のために，生物学的研究を行う部門である。昨年度に引き続き経常的研究を行うかたわら，本年度から厚生省精神神経疾患研究委託の精神分裂病およびそううつ病両研究班の事務局として，内因性精神病的全国的研究活動を補佐した。

本年は流動研究員の交代があり，畑直人が埼玉医大，大井健が滋賀医大，久住一郎が北大へと，それぞれ出身校へ戻り，かわって山本秀子，黒田安計が赴任した。この他，高嶋瑞夫，海野麻未（賃金研究員）杉下真理子，篠原一之，谷井靖之，加藤文代，加賀谷有行（研究生）らが常勤研究員として研究に参加した。

本年度の主要研究テーマは以下のとおりである。

1. サーカディアンリズムの生理生化学的研究（高嶋，大井，杉下，加藤）
 - (i) 網膜視床下部路の神経伝達機構に興奮性アミノ酸が関与している可能性を明らかにした。
 - (ii) サーカディアンリズムの生後発達における母親の影響を調べるための研究方法を確立した。
2. そううつ病の薬理生化学的研究（三国，久住，山本，黒田，加賀谷）
 - (i) 細胞内カルシウム濃度やイノシトールリン酸の増加反応を用い，そううつ病患者の血小板のモノアミン受容体機能の解析を行った。
 - (ii) 抗うつ薬がGTP結合蛋白質に直接影響することを明らかにした。
 - (iii) うつ病の病態モデル動物の開発を試み，セロトニン受容体機能昂進ラットの作製に成功した。
3. 精神分裂病の薬理生化学的研究（西川，畑，篠原，谷井，海野）
 - (i) フェンサイクリジン投与による精神分裂病の病態モデルを用いて，興奮性アミノ酸受容体機構とドーパミン神経系との相互関連を明らかにした。
 - (ii) TCPの脳内特異的結合部位の生後発達パターンを明らかにした。

（部長 高橋清久）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

1) Ohi K, Hayashi S, Takahashi K:

Development of circadian rhythms in rats with lesions of serotonergic system
Physiol Behav 44:393-403, 1988

2) Ichikawa H, Nishikawa T, Mitsushio H, Takashima M:

Habenular modulation of dynorphinergic systems in rat ventral mesencephalon
Peptides 9:1107-1114, 1988

3) Shimoda K, Yamada N, Ohi K, Tsujimoto T, Takahashi K, Takahashi S:

Chronic administration of tricyclic antidepressants suppresses hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in male rats
Psychoneuroendocrinology 13:431-440, 1988

4) Mori H, Mikuni M, Koyama T, Yamashita I:

Epinephrine stimulates inositol phospholipid metabolism by activating alpha-2 adrenergic receptors in human platelets
Life Sciences 44:741-747, 1989

5) Cudennec A, Duverger D, Nishikawa T, McRae-Deguerce A, Mackenzie ET, Scatton B:

Influence of ascending serotonergic pathways on integrated functional activity in the rat brain. I. Effects of electrolytic or neurotoxic lesion of dorsal and/or median raphe nucleus
Brain Res 444:214-226, 1988

6) Toru M, Watanabe S, Shibuya H, Nishikawa T, Noda K, Mitsushio H, Ichikawa H, Kurumaji A, Takashima M, Mataga N, Ogawa A:

Neurotransmitters, receptors and neuropeptides in post-mortem brains of chronic schizophrenic patients
Acta Psychiatr Scand 78:121-137, 1988

7) Mitsushio H, Takashima M, Mataga N, Toru M:

Effects of chronic treatment with trihexphenidyl and carbamazepine alone or in combination with haloperidol on substance P content in rat brain: a possible implication of substance P in affective disorders

II 研究業績

J Pharmacol Exp Ther 245(3):982-989, 1988

8) 野田恭平, 高橋清久, 日比野英彦:

スナネズミの自発痙攣に対する phosphatidylcholine 前投与の影響

薬物・精神・行動 8:417-420, 1988

9) Nagaki S, Fukuyama Y, Kato N, Ikeda M, Higuchi T, Takahashi K, Naruse H:

Immunoreactive somatostatin contents in the cerebrospinal fluid of children with various types of epilepsy

Jap J Psychiat Neurol 42:651-652, 1988

b. 著書

1) Ohji K, Takashima M, Takahashi K, Hayashi S:

Effect of dorsal and median midbrain lesion in infant rat on the development of the circadian rhythm

Brainstem, Midbrain, Telencephalon and Behavior ed. by Segawa M, Sanposha Printing, Tokyo:99-111, 1988

2) Nishikawa T, Scatton B, Fage D, Ogawa A, Takashima M, Mataga N, Toru M:

Modulation of cerebral dopaminergic transmission exerted by habenulopeduncular pathways

Brainstem, Midbrain, Telencephalon and Behavior ed. by Segawa M, Sanposha Printing, Tokyo:201-212, 1988

3) 高橋清久:

精神疾患の成因 —うつ病と生体リズム—

現代精神医学体系, 中山書店, 東京, p20-35, 1988

4) 高橋清久:

精神内分泌学

新生理学体系, 第14巻, 神経内分泌学(八木欽治, 吉田尚編), 医学書院, 東京, p308-323, 1988

c. 総説

1) 高橋清久, 大井健, 高嶋瑞夫, 杉下真理子:

サーカディアンリズムの同調機構 —ラットにおける同調と周期に影響を及ぼす因子—

精神医学 31:25-32, 1989

2) 三國雅彦:

神経伝達と受容体・ホスホイノシチド代謝 —抗うつ・抗そう薬の作用機序をめぐって—
 神経精神薬理 10:521-528, 1988

d. 班会議報告書

1) 高橋清久, 西川徹, 畑直人:

中脳皮質系ドーパミンニューロンの調節機序 —興奮性アミノ酸性伝達による制御—
 厚生省精神・神経疾患・精神分裂病の生物学的病因および発症に関する研究班, 昭和62年度研究
 報告書, 65-72, 1988

2) 三國雅彦, 久住一郎, 西川徹, 高橋清久:

うつ病者血小板ならびにPCPA反復投与ラット海馬におけるセロトニン-2受容体機能に関する研究
 —セロトニン刺激性イノシトールリン脂質代謝回転測定による検討—
 厚生省精神・神経疾患・そううつ病の発症機序に関する生物学的研究班, 昭和62年度研究報告書,
 25-31, 1988

e. その他

1) 西川徹, 畑直人, 海野麻未, 高橋清久:

Phencyclidineの前頭葉皮質におけるドーパミン性伝達促進作用
 精神薬療基金研究年報 20:231-237, 1988

B. 国際学会

a. 特別講演, シンポジウム

1) Takahashi K:

Effect of environmental factors can affect the period of circadian rhythm
 The 3rd Sapporo Symposium on Biological Clock, Sapporo, July 27-29, 1988

b. 国際学会

1) Mikuni M, Kusumi I, Takahashi K:

Effect of subchronic administration of PCPA and/or imipramine on 5HT-stimulated inositol-
 1-phosphate accumulation in rat hippocampus
 16th C.I.N.P. Congress, Munich, August, 1988

2) Nishikawa T, Hata N, Takahashi K:

NMDA receptors may mediate tonic inhibitory control of dopaminergic transmission in rat

II 研究業績

medial frontal cortex

16th C.I.N.P. Congress, Munich, August 19, 1988

3) Sugishita M, Ohi K, Takashima M, Takahashi K:

Postnatal entraining mechanism of the circadian rhythm in the rat pup

The 3rd Sapporo Symposium on Biological Clock July 27-29, 1988

c. 一般学会

1) 池田正行, 西川徹, 三國雅彦, 高橋清久:

Wriggle Mouse Sagami の行動薬理学的検討並びに脳内モノアミン受容体結合の測定

第29回日本神経学会, 東京, 5. 25-27, 1988

2) 久住一郎, 三國雅彦, 高橋清久:

PCPA 反復投与ラットにおけるセロトニン-2受容体機能の検討

第18回日本神経精神薬理学会, 広島, 9. 21, 1988

3) 大井健, 三國雅彦, 高橋清久:

慢性ストレスによる適応現象とセロトニン神経系の感受性亢進

第18回日本神経精神薬理学会, 広島, 9, 22, 1988

4) 杉下真理子, 大井健, 高嶋瑞夫, 武内ゆかり, 高橋清久:

新生児ラットのサーカディアンリズムにおよぼす同調因子の影響

—Periodic Mother Deprivation(PMD)と Restricted Feeding(RF)の比較—

第5回生物リズム研究会, 福岡, 10. 1, 1988

5) 永木幸子, 永木茂, 福山幸夫, 高橋清久, 加藤進昌, 斉藤寿一:

ラット熱性けいれんにおける脳内神経ペプチド・ γ -アミノ酪酸の変化

第22回日本てんかん学会, 金沢, 10/7-8, 1988

6) 池田正行, 西川徹, 三國雅彦, 高橋清久:

Wriggle Mouse Sagami に関する神経化学的検討

第31回日本神経化学会, 仙台, 10. 28, 1988

7) 森秀樹, 三國雅彦, 小山司, 山下格:

ヒト血小板 α -2アドレナリン性受容体を介したイノシトールリン脂質代謝

—Bt2 cAMPおよび8Br cGMP の効果—

第31回日本神経化学会, 仙台, 10. 28, 1988

8) 山本秀子, Spatz M, Merkel N, Bembry J, Wroblewska B, 三國雅彦, 高橋清久:

脳微小血管培養細胞の炭水化物代謝に及ぼす神経伝達物質の影響

第31回日本神経化学会, 仙台, 10. 28, 1988

9) 吉田幸宏, 西川徹, 高橋清久:

皮質線条体路またはカテコールアミンニューロン破壊後におけるラット脳内PCP受容体結合の変化

第31回日本神経化学会, 仙台, 10. 27, 1988

10) 杉下真理子, 大井健, 加藤文代, 高嶋瑞夫, 武内ゆかり, 高橋清久:

母親による盲目仔ラットの同調機構

第12回神経科学学術集会, 名古屋, 12. 9, 1988

11) 海野麻未, 高嶋瑞夫, 野田恭平, 高橋清久, 日比野英彦, 川島紘一郎:

フォスファチジルコリン(PC)の脳内アセチルコリン(Ach)含量に及ぼす影響

第12回神経科学学術集会, 名古屋, 12. 9, 1988

12) 永木幸子, 永木茂, 福山幸夫, 高橋清久, 加藤進昌, 湊川文字:

熱性けいれんモデルラットの脳内ペプチド, GABAの変化

第11回熱性痙攣懇話会, 東京, 12. 17, 1988

13) 渡部修三, 市川宏伸, 高嶋瑞夫, 高橋清久:

"多動児モデル"ラットにおけるセロトニンシステム

第11回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 25, 1989

14) 三國雅彦, 久住一郎, 山本秀子, 加賀谷有行, 西川徹, 高橋清久:

うつ病のセロトニン-2受容体機能: 血小板におけるイノシトールリン脂質代謝の検討

第11回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 25, 1989

15) 山崎潤, 樋口輝彦, 大島浩伸, 林文明, 守屋雪夫, 山内俊雄, 高嶋瑞夫, 高橋清久:

夜間の血清メラトニン濃度に及ぼす光の影響(2)

第11回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 25, 1989

16) 畑直人, 西川徹, 海野麻未, 篠原一之, 高橋清久:

前頭葉ドーパミン性伝達に対する phencyclidine の作用

第11回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 24, 1989

17) 加沢鉄士, 三國雅彦, 樋口輝彦, 高橋清久, 山内俊雄:

ラット大脳皮質の³H-YM-09151-2 結合部位に対する各種向精神薬の阻害能の検討

第11回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 24, 1989

18) 阪上享子, 南海昌博, 仙波純一, 吉本静志, 加藤進昌, 高橋清久, 高橋良:

II 研究業績

感情障害における甲状腺機能（第1報）—高感度測定法による血清 TSH 値の基礎的検討—

第11回日本生物学的精神医学会，東京，3. 24，1989

- 19) 定松美幸，飯田英晴，加藤進昌，高橋清久，橋田誠一，石川栄治：

ヒト成長ホルモン（hGH）の高感度酵素免疫測定法による健常成人24時間血清中 hGH 分泌リズムの睡眠依存性の検討

第11回日本生物学的精神医学会，東京，3. 24，1989

C. 班会議発表

- 1) 西川徹，畑直人，海野麻未，吉田幸宏，篠原一之，谷井靖之，高橋清久：

Phencyclidine によって生じる中脳皮質系ドーパミンニューロンの活動異常の発現機序

厚生省精神・神経疾患・精神分裂病の生物学的病因および発症に関する研究班，東京，2. 3，1989

- 2) 三國雅彦，黒田安計，加賀谷有行，山本秀子，久住一郎，西川徹，高橋清久：

セロトニン受容体を介するイノシトールリン脂質代謝亢進に及ぼす抗うつ薬や反復ストレス影響

厚生省精神・神経疾患・そううつ病の発症機序に関する生物学的研究班，東京，2. 4，1989

- 3) 杉下真理子，大井健，高嶋瑞夫，武内ゆかり，高橋清久：

母親による盲目仔ラットの同調機構

厚生省心身障害・家庭保健と小児の成長・発達に関する総合的研究班，東京，2. 18，1989

- 4) 塚越廣，榎本武郎，三ツ汐洋，高橋清久，和田義明，早川道夫，大友英一：

進行性核上性麻痺の黒質および基底核における substance P の免疫組織化学的検討

厚生省新薬開発・神経ペプチドによる精神神経障害治療薬の開発研究班，東京，3. 10，1989

- 5) 永木幸子，永木茂，加藤進昌，高橋清久，福山幸夫：

點頭てんかん，熱性けいれん患児の髄液中ソマトスタチンと熱性けいれんモデルラット脳内ソマトスタチン，バゾプレシン， γ -アミノ酪酸の変化

厚生省・難治てんかんの予防と対策に関する研究班，東京，12. 8-9，1988

- 6) 大井健，高嶋瑞夫，西川徹，高橋清久：

光による同調機構の研究 —網膜視床下部神経路の伝達機構—

文部省科学研究費（総合研究A）時計機構の障害と関連した精神疾患の発現機序研究班，東京，9. 25，1988

- 7) 高橋清久：

覚醒困難型睡眠障害に対する高照度光療法の試み

文部省科学研究費（総合研究A）時計機構の障害と関連した精神疾患の発現機序研究班，東京，
9. 25, 1988

8) 山崎潤，樋口輝彦，林文明，山内俊雄，高嶋瑞夫，高橋清久：

夜間血清メラトニンレベルに及ぼす光の影響(2)

文部省科学研究費（総合研究A）時計機構の障害と関連した精神疾患の発現機序研究班，東京，
9. 25, 1988

9) 三國雅彦，久住一郎：

5HT-2受容体-P1系機能亢進と抗うつ薬

文部省科学研究費（総合研究A）神経伝達機構・細胞内情報伝達系からみた感情障害研究班，東京，
5. 27, 1988

10) 高橋清久：

感情障害に対する時間生物学的アプローチ

文部省科学研究費（総合研究A）神経伝達機構・細胞内情報伝達系からみた感情障害研究班，東京，
5. 27, 1988

11) 西川徹：

GABA-Bと5HT系の相互作用

文部省科学研究費（総合研究A）神経伝達機構・細胞内情報伝達系からみた感情障害研究班，東京，
5. 28, 1988

12) 三ツ汐洋：

サブスタンスPとそううつ病

文部省科学研究費（総合研究A）神経伝達機構・細胞内情報伝達系からみた感情障害研究班，東京，
5. 28, 1988

3. 主な研究報告

母親による仔ラットリズムの同調機構

—メラトニンの関与について—

杉下真理子, 大井健, 高嶋瑞夫, 高橋清久

これまで我々は、盲目仔ラットの内因性リズムにとって養母が強力な同調因子であることを示してきた。特に生後 10 日目には松果体 N-acetyltransferase (NAT) 活性リズムが明瞭化し、同時に養母の仔ラットへの接触時間を明期もしくは暗期に限らせる操作 (periodic mother deprivation: PMD) により位相に逆転関係が生じたことから、両者の併用がより早期に結果が得られる点で、同調機構の解明にあたって非常に有用な方法であることを明確にした。そこで今回我々は、母乳中のメラトニンの同調因子としての可能性を検討する目的で、内因性のメラトニン分泌を消失せしめた母親を用い、外因性メラトニン及び PMD 操作の影響について、NAT 活性リズムを指標として観察を行った。

対象・方法

Wistar 系成熟ラットを LD 条件 (明期 0800h-2000h, 暗期 2000h-0800h) 下で交配させた。仔ラットは出生日 (生後第 1 日) に両側眼球摘出術を施した。母親は出産直後ネンブタール麻酔下で松果体と眼球を摘出し、内因性のメラトニン分泌を消失せしめた。(1) 一匹につきメラトニン 100 μ g (0.01% エタノールで溶解し、生食で 100 μ l とした) を一日一回生後 3-15 日間、8 時もしくは 20 時に皮下注射を行い、生後 15 日目に仔ラットの NAT 活性リズムを測定した。(2) 出生直後から PMD 操作を行い、生後 11 日目に仔ラットの NAT 活生リズムを測定した。NAT 活性リズムは 4 時間おき 24 時間にわたり各群を断頭屠殺、松果体を採取し、Deguchi の原法に従って測定した。

結果

(1) メラトニンの 8 時投与群では仔ラットの NAT 活性リズムの投与時刻への位相の変位が認められたが、20 時投与群では変化は認められなかった (Fig. 1)。(2) メラトニン分泌を消失させた母親に育てられた仔ラットに PMD 操作を施行すると、L・D 群間で NAT 活性リズムの位相の逆転関係が認められた (Fig. 2)。

考察

連続投与実験により、メラトニンは盲目仔ラットにとって時刻依存性の同調作用があることが示された。しかし用いたメラトニン量が生理的量を遥かに越えたものであり、しかも松果体及び眼球を摘出によって内因性メラトニンを消失させた母親を用いて PMD を行っても位相の逆転関係が認められたことから、メラト

ニンは仔ラットリズムの同調に関して何らかの作用を及ぼすものの、主要な因子ではない可能性が示唆された。

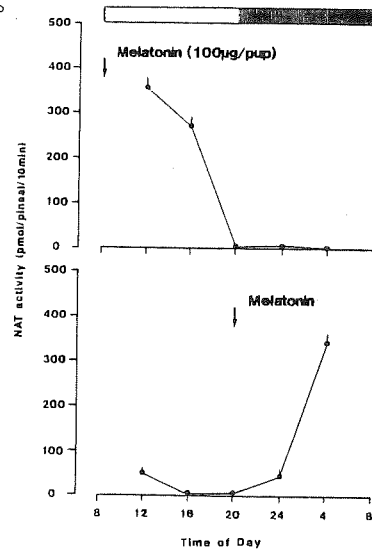


Fig. 1 Effect of chronic melatonin injection (3-15 day) on NAT rhythm in blinded rat pups raised by pinealectomy and blinded mother

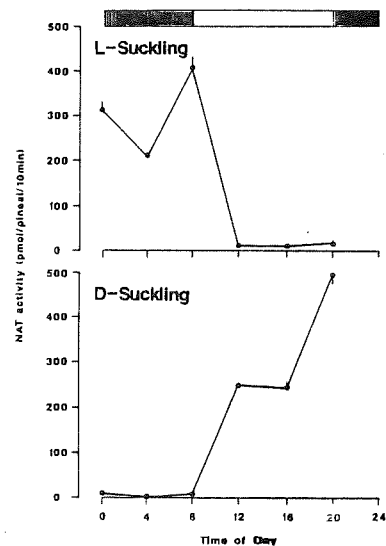


Fig. 2 Effect of PMD on NAT rhythm in 11-day old pups raised by a Px and blinded mother

三環系抗うつ薬のGTP結合部位に及ぼす影響

山本秀子, 加賀谷有行, 黒田安計, 三国雅彦, 高橋清久

中枢神経系において三環系抗うつ薬はノルエピネフリン, セロトニンの取り込み阻害を惹起することが作用機序と関わりとされていた。しかし, イミプラミン等はアミン取り込みを速やかに阻害するのに対し, 治療における抗うつ薬の作用発現は1-2週間の遅延があり, 非定型抗うつ薬であるイプリンドール, ミアンセリンは取り込み阻害能を有しない。

近年三環系抗うつ薬の長期投与は β 受容体の down regulation を惹起することが知られ, 受容体以降の情報伝達系にたいする作用が注目されている。そこで抗うつ薬の作用メカニズムを明らかにするために細胞内G蛋白質に直接作用する可能性について検討した。

材料と方法

抗うつ薬存在下でラット大脳皮質粗膜画分に対する $[^3\text{H}]$ GTP結合実験をAvissar¹⁾等の方法を修飾して行なった。高親和性GTPase活性はCassel²⁾等の方法により測定した。

結果

$[^3\text{H}]$ GTP結合をScatchard解析すると1 site型, Bmax 25pmol/mg protein, Kd値は139nMであった。百日咳毒素またはコレラ毒素処理は親和性は低下させたが, 結合数には影響しなかった。一方, 非定型をも含む抗うつ薬(300 μM)は親和性を低下させると共に結合数を増加させたが, 他の抗精神病薬や抗不安薬は影響しなかった(表1)。このとき, 高親和性GTPase活性は用量依存的に阻害された(表2)。抗うつ薬のGTP結合部位に及ぼす変化は百日咳毒素またはコレラ毒素処理により部分的に回復された。

考察と結論

$[^3\text{H}]$ GTP結合部位が毒素によるADP-リボシル化で影響されたことは, G蛋白質の機能を反映していると考えられる。G蛋白質は神経伝達物質が受容体に伝えた情報を修飾して細胞内2次メッセンジャーに伝達する。In vitroにおいて抗うつ薬が高親和性GTPase活性を粗害し, GTP結合の親和性を低下させたことはG蛋白質の turn off機構を遅らせて活性化したG蛋白質 α サブユニットを増加させている可能性を示唆している。抗うつ作用を有する薬剤がG蛋白質を低親和性, 高結合状態に移行させたことはうつ病におけるG蛋白質の関与を示唆し, 作用機構の解明に新たな方向を加えるものである。

文献

- 1) Avissar S, Schreiber G, Danon A, Belmaker R H: Nature 331:440-442, 1988
- 2) Cassel D, Sellinger Z: Biochim. Biophys. Acta 452:538-551, 1976

Table 1. Effects of drugs on GTP binding in rats

	Kd (% of Control)	
Desipramine	183.7 \pm 16.6	(5) **
Imipramine	172.1 \pm 9.1	(5) **
Clomipramine	242.4 \pm 25.6	(6) ***
Iprindole	174.1 \pm 10.8	(6) **
Amitriptyline	168.9 \pm 10.9	(4) **
Pargyline	102.9 \pm 3.1	(4)
Yohimbine	87.5 \pm 5.1	(3)
Phencyclidine	100.7 \pm 2.4	(3)
Chlorpheniramine	88.6 \pm 3.4	(4)
Clorgyline	124.6 \pm 4.9	(3)
Deprenyl	93.7 \pm 9.6	(3)
Metoclopramide	100.0 \pm 6.6	(3)
Sulpiride	104.7 \pm 8.0	(5)
Chlorpromazine	94.3 \pm 7.1	(4)
Haloperidol	81.4 \pm 2.9	(3)

Data are expressed as mean \pm SE

*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

Table 2. Effects of antidepressants on GTPase activity in rat crude membrane in vitro.

	GTPase activity (% of Control)	
	(uM)	
Desipramine	10	96.9
	30	93.6
	100	85.2
	300	51.0
Imipramine	10	96.7
	30	91.9
	100	89.0
	300	46.7
Clomipramine	10	90.4
	30	92.2
	100	67.5
	300	22.1
Iprindole	10	101.4
	30	100.6
	100	89.7
	300	48.8

ヒト血小板におけるセロトニン受容体機能

加賀谷有行, 久住一郎, 黒田安計, 山本秀子, 三国雅彦, 高橋清久

そううつ病の生物学的成因として, 中枢神経系のアミン伝達異常, 特に, 近年セロトニン(5HT)受容体過敏仮説が提唱されている。しかし, うつ病における5HT受容体機能を直接測定した報告はほとんどない。最近我々は脳内アミン受容体と薬理学的に類似した受容体を持つヒト血小板における5HT刺激性イノシトールリン脂質(PI)加水分解亢進が5HT₂受容体を介することを証明した。そこで, うつ病者の血小板における5HT刺激性PI代謝回転を調べ, さらにPIの生成物の一つであるイノシトール-三リン酸(IP₃)により増加する細胞内遊離カルシウムイオン濃度([Ca⁺⁺]_i)と5HT₂受容体の関連をヒト血小板で検討した。

方法

(1) うつ病者血小板における5HT₂受容体を介するPI代謝回転

研究趣旨をよく理解し, 採血に協力することを書面で同意したうつ病9例(未投薬)と健康成人9例で³H-イノシトールを使い血小板PIを標識し, 100 μMの5HTとともにインキュベートした後, 蓄積したイノシトール-三リン酸(IP₃)をイオン交換樹脂カラムで分離した。

(2) ヒト血小板における[Ca⁺⁺]_i測定。

健康成人の血小板浮遊血漿に3 μM fura-2/AMを添加し, 37°C, 15分間インキュベート後, 血小板をHepes bufferに浮遊させ [Ca⁺⁺]_iを蛍光分光光度計で測定した。

結果

(1) うつ病者群の血小板における5HT刺激性IP₃蓄積は非刺激時に比し150 ± 7%増加し, 対照群の132 ± 3%増加より, 有意(p < 0.02)に増加していた。(図1)

(2) 10 μM 5HT刺激の数秒~30秒後には[Ca⁺⁺]_iは116 ± 21nM上昇した。[Ca⁺⁺]_i増加は5HTに濃度依存性を示し, 10 μM 5HTで最大反応, EC₅₀は200 nMだった。5HT₂阻害剤であるketanserinは濃度依存性に5HT刺激性[Ca⁺⁺]_i増加を阻害し, IC₅₀は2nMだった。5HT₂agonistと言われるDOIは, やはり[Ca⁺⁺]_iを40nMまで上昇させたが, 5HTと同時に刺激すると5HT刺激性[Ca⁺⁺]_i上昇を阻害した。(図2)

考察

うつ病者血小板では対照群に比し, 5HT刺激性IP₃蓄積が増加しており, 対照群より高値を示す群が存在

していた。このことは少なくともうつ病の一部に5HT受容体機能亢進状態があることを示唆している。PIの生成物の一つであるIP₃は小胞体からCaを遊離することが知られており, [Ca⁺⁺]_i測定はIP₃蓄積よりも高感度にPI代謝回転を反映する可能性があり, より多くの情報が得られると考えられる。本報告で判るように, ヒト血小板では5HT₂受容体を介して[Ca⁺⁺]_iが変化することが明らかになり, さらにDOIがpartial agonistであることも観察された。しかもPI代謝回転での5HT刺激によるIP₃蓄積のEC₅₀は4 μMだが, [Ca⁺⁺]_iでは200nM, ketanserinのIC₅₀はそれぞれ30nM, 2nMと, [Ca⁺⁺]_i測定の方が高感度である。このように, ヒト血小板での[Ca⁺⁺]_i測定は簡便かつ高感度なことから, 5HT₂受容体機能を検討するのによりよい指標であると言える。今後さらに基礎解析を加えてヒト血小板5HT₂受容体の特性を明らかにし, また, うつ病者血小板での5HT₂受容体機能をCaを通じて検討してゆきたいと考えている。

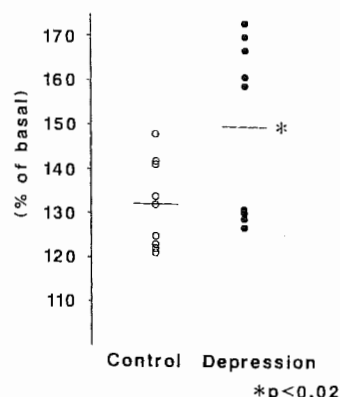


図1 血小板における5HT刺激性IP₃蓄積増加率

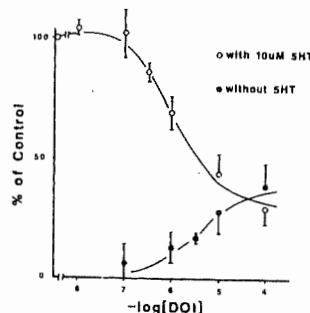


図2 血小板におけるDOI刺激性[Ca⁺⁺]_i上昇

N-(1-[2-thienyl] cyclohexyl)[³H] piperidine 結合のラット脳における発達

篠原一之, 西川徹, 高橋清久

興奮性アミノ酸受容体のサブタイプである, N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体は, 学習・記憶などの神経の可塑性や変性・低酸素による神経の損傷に関与している。また, NMDA を介する反応を非競合的に阻害する phencyclidine(PCP)は, 精神分裂病様症状を惹起することが知られている。NMDA受容体は, そのアゴニスト(L-glutamateなど)が結合する部位以外に, その神経伝達を調節するPCP受容体とstrychnine非感受性glycine受容体を有する。この受容体複合体の発達を研究することは, 精神・神経疾患の病因及び発症のメカニズムを知る上で重要と考え, 今回はPCP受容体の発達を調べた。

材料及び方法

胎生18日より生後50日までのウィスター系雄性ラットの前脳ホモジュネート及び脳スライスを用い, PCP受容体を選択的にラベルする, N-(1-[2-thienyl] cyclohexyl)[³H] piperidine 結合実験を行った。

結果

特異的 [³H]-TCP 結合は, 最低年齢である胎生18日に既に存在し, 成熟ラットの19%を示した。その後出生までは, 発達曲線の変化はみられないが, 出生後, S字曲線を描いて増加して, 生後14日に大人のレベルに達する。 [³H]-TCP 結合の性質は, 生後7日と50日で調べた。飽和実験のScatchard解析から, $k_d = 14.5 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 183 \text{ fmol/prot}$ (生後7日) $k_d = 13.6 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 556 \text{ fmol/prot}$ (生後50日)の結果を得, 発達期間中, 親和性は変化せず最大結合数が増加することが解った。競合実験からは, PCP受容体アゴニスト及びNMDA受容体アンタゴニストに対する反応性が同じであることが解った。脳のスライスのオートラジオグラフィーを用いた実験からは, 成熟期における脳内分布は従来の報告に一致すること, 及び, その発達は, 我々のホモジュネートの結果に一致することが解った。

考察

PCP受容体はすでに胎児期から存在するが, 主な増加は生後の2週目に観察された。この間親和性は変化せず受容体数が増加した。また, 幼若期と成熟期におけるNMDAアンタゴニストの [³H]-TCP受容体とPCP受容体の機能的連関は同じであると考えられる。これらのことから, NMDA受容体とPCP受容体の発達曲線は同じことが予想されるが, NMDA受容体の発達は, 幼若期に一過性に上昇するという報告⁽²⁾がある。この発達曲線の相異は, 発達段階の一時期に

においてイオンチャンネルと共役しないNMDA受容体が存在することが予想された。このことは幼若期にNMDA受容体を介する反応は, 成熟期でみられるような電位依存性を示さない報告⁽¹⁾から支持された。

Reference

- (1) Ben-Ari, Y., Cherbini, E. and Krnjevic, K., Change in voltage dependence of NMDA currents during development, *Neurosci. Lett.* 94(1988) 88-92
- (2) Trendy, E., Roisin, M.P., Represa, A., Charriat-Marlangue, C and Ben-Ari, Y., Transient increased density of NMDA binding sites in developing rat hippocampus, *Brain Res.*, 461(1988) 393-396

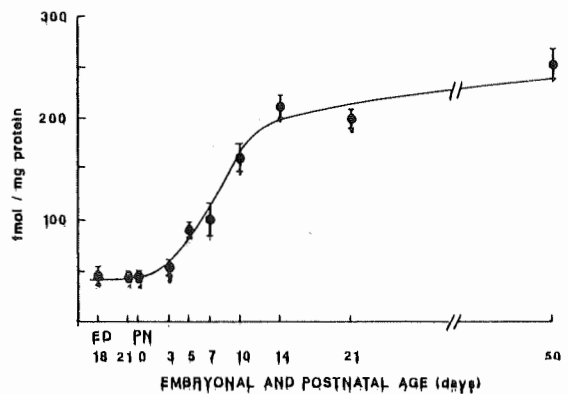


Figure 1. Ontogenic changes in specific [³H] TCP binding to rat forebrain. Results are means with S.E.M. of the data obtained from 3 determinations per each stage of maturation. At ED18, the brain tissues from 2 animals were pooled for a determination in the binding assay.

サーカディアンリズムの光による同調機構の解析

大井健, 西川徹, 高嶋瑞夫, 高橋清久

体内時計は自律性の振動体であり、その時計独自の周期を持ってフリーランをする。しかし外界に同調因子が存在すると、それに同調する性質がある。同調因子として最も強力なものは、明暗の変化である。光は網膜視床下部路を介して時計機構の中核である視交叉上核(SCN)に伝達される。しかしこの神経路の伝達物質はまだ明らかにされていない。最近 *in vitro* のスライス実験²⁾ から、興奮性アミノ酸が候補の一つになっている。

そこで、ラットを用い網膜視床下部路の伝達物質を、*in vivo* で検索した。光による網膜視床下部路の刺激は、松果体のN-アセチル転移酵素(NAT)活性を抑制することを利用し、NAT活性の測定により、網膜視床下部路の刺激効果を判定した。

方法

4週間明暗サイクル(12:12)にて飼育したウイスター系雄性ラットを用いた。1週間前に、ネブタール麻酔下でSCNの上方1.5mmに、ガイドカニューラを脳定位固定装置を用いて植込んだ。SCNへの薬物投与は、注入ポンプを用いて、0.5 μ l、2分間で行った。3luxの光照射を薬物投与20分後に、2分間行った。実験は、暗期2時から5時に、0.1lux以下の赤色光下にて行い、薬物投与40分後に断頭し、氷冷下にて松果体を取り出し直ちにNAT活性¹⁾を測定した。

結果と考察

興奮性アミノ酸の作動薬であるN-methyl-D-aspartate(NMDA) 0.5nmolをSCNに注入した場合、対照群に比較し、80%の有意な減少が認められた(図1)。この結果は、3lux、2分間の光照射を行った群と同程度であった。vehicle群、blind群には変化なかった。この事から光刺激の伝達には興奮性アミノ酸の関与が示唆された。もしそうならば、興奮性アミノ酸の拮抗薬は、光刺激の効果を抑制することが予想されたので、NMDA受容体に特異的な競合的拮抗薬であるD-aminophosphonovalerate(D-APV)をSCNに前投与し、光照射をした。対照群は完全にNAT活性の低下が認められたが、D-APVではその低下が用量依存的に阻止された。しかし、拮抗薬としての活性を欠くL-APVには光刺激の抑制効果は認められなかった。また、NMDA受容体の非競合的拮抗薬のN-(1-[2-thienyl]-cyclohexyl)piperidine(TCP)はD-APVと同様に光刺激を阻害した。しかし、キスカル酸およびカイニン酸タイプの受容

体拮抗薬である α -D-glutamyl-amino methylsulphonate(GAMS)には、阻害効果は認められなかった(図2)。

以上のことから、網膜視床下部路の伝達に関して、SCNにおいては興奮性アミノ酸が関与しており、NMDAタイプの受容体を介している可能性が示唆された。

これが、網膜視床下部路の伝達にかかわるのか、あるいはSCN内の内在性ニューロンの神経伝達、さらにはSCNからの遠心路にかかわるのか、今後検討したい。それに加えて、オートラジオグラフィ法を用いた、SCN内の興奮性アミノ酸受容体の詳細な検索の必要もある。また、carbacholのSCN内注入が光刺激と同様な効果があるという報告³⁾もあり、今後さらに、興奮性アミノ酸ニューロンとコリン性ニューロンとの関係も明らかにしたい。

文献

- 1) Deguchi T, Axelrod J: *Analyt Biochem* 174-179, 1972
- 2) Shibata S, Liou S.Y, Ueki S: *Neuropharmacol* 25:403-409, 1986
- 3) Zatz M, M.J. Brownstein: *Science* 203:358-361, 1979

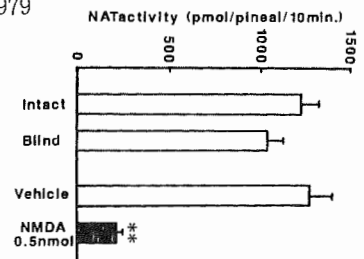


図1 ラット松果体のNAT活性に及ぼすADMAの作用。N=5~9, (mean \pm S.E.) ** $p < 0.01$ (Wiliam-Wilcoxon non-parametric multicomparison test)

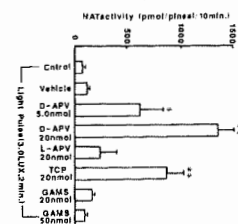


図2 ラット松果体の活性に及ぼす光の作用に対する興奮性アミノ酸拮抗薬の効果。N=5~9, (mean \pm S.E.) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

5. 疾病研究第4部

1. 研究部一年のあゆみ

本年度は人事の変動が多かった。まず15カ月間空席になっていた部長には、8月1日柴崎浩が佐賀医科大学内科から赴任した。足立皓岑室長は10月15日愛知医科大学第4内科講師として転出し、10月1日佐賀医科大学内科より小田健一郎が室長に就任した。また向山昌邦室長は平成元年3月31日辞任し、国立療養所中部病院の臨床研究部長に転出した。10月1日より、東京大学神経内科の郭伸助手、武蔵病院リハビリテーション科の北村純一医師、国立東京病院リハビリテーション科の野手とし子医師、および同リハビリ学院の高木昭輝技官が、さらに12月1日より武蔵病院小児神経科の花岡繁医員が、それぞれ併任研究員として参加した。3月1日より、東京大学神経内科から相澤仁志が流動研究員として、さらに横浜市立大学小児科の根津敦夫医師が研究生として参加した。また客員研究員であった和歌山医科大学神経精神科の安井昌之講師は5月31日辞任した。賃金研究員の松井京子は9月30日、大杉圭子は1月15日辞任したが、松井京子はその後免疫研究部との共同、さらに1月1日よりモデル動物開発部の研究費雇用助手として残った。賃金研究助手の中村昌子は9月15日、佐藤高志は9月30日それぞれ辞任した。なおそのほかに、コロラド大学神経内科のJames H. Austin教授が、12月15日より流動研究員として臨床神経学の指導に当った。

この1年間の研究業績は次のとおりである。

- (1) 骨格筋の神経支配の多様性と病態に関する研究：小田室長と三浦裕之研究生は、向山室長およびモデル動物開発部と共同で、GADマウスを組織学的に検索し、薄束遠位部のみでなく、筋紡錘からの感覚線維および α 運動線維にもそれぞれ遠位部に軸索変性を見だし、distal axonopathyのモデルとしての意義を確立した。
- (2) 骨格筋細胞内カルシウムの研究：吉田瑞子研究員は、マウス骨格筋細胞内 Ca^{2+} の画像解析法を確立した。
- (3) 脊髄小脳変性症の治療に関する研究：松井賃金研究員は遺伝性失調症マウスに種々の薬剤を投与し、その治療効果を行動薬理的に解析した。特に、ソマトスタチンの拮抗物質であるシステアミンが、Reeler および Weaver マウスの転倒回数を減少させることを明らかにした。
- (4) PET を用いた脳代謝の研究：横井風児併任研究員は、 ^{14}C -1-ピルビン酸を用いたPETにより、一過性全健忘およびアルツハイマー病の局所脳代謝機能低下を明らかにした。
- (5) 歩行障害の解析：北村純一、野手とし子、高木昭輝併任研究員は、ピドスコープを用いて、パーキンソン病および小脳失調症患者の歩行障害の特性を明らかにした。 (部長 柴崎 浩)

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Shibasaki H, Endo C, Kuroda Y, Kakigi R, Oda K, Komine S:
Clinical picture of HTLV-I associated myelopathy
J Neurol Sci 87:15-24, 1988
- 2) 富英明, 向山昌邦, 亀井敦行, 春原経彦, 里吉宮二郎:
中枢神経系に多数のアミロイド小体を認めたCrow-Fukase症候群の1剖検例
臨床神経 28:887-890, 1988
- 3) 安井昌之, 向山昌邦, 横井風児, 足立皓岑, 若山育朗, 三谷和男, 八瀬善朗, 吉田博信, 吉益文夫,
大田善一朗:
中枢神経組織内に著明な高アルミニウム値を呈した筋萎縮性側索硬化症症例の金属代謝
日内会誌 78:85-86, 1989
- 4) 武正健一, 古賀良彦, 堀宏治, 濱田庸子, 千葉忠吉, 岩尾芳郎, 神定守, 菊地健, 松岡邦彦, 岡田
瑛子, 鈴木恵晴, 嶋田誠, 大江康雄, 徳野基晴, 橋本元秀, 拓野優之, 向山昌邦, 鈴木透, 堤祐一
郎, 椎名健一, 関川淳子, 守谷直樹, 鎮目光雄:
精神科領域におけるFlunitrazepam, Triazolam, Estazolamの3剤臨床比較試験
診療と新薬 25:1343-1365, 1988
- 5) Kumazawa T, Adachi K, Suzuki O:
Monoaminergic systems in neurological mutant mice
Med Sci Res 16:603-606, 1988
- 6) Yasui M, Adachi K, Mukoyama M, Ando K, Mitsuma T, Ota K:
Low calcium-magnesium diet and thyrotropin releasing hormone
Med Sci Res 16:885-886, 1988
- 7) Mitsuma T, Adachi K, Mukoyama M, Ohsugi K, Ando K:
Concentrations of substance P-like immunoreactivity and thyrotropin-releasing hormone
in the spinal cord of patients with multiple systemic atrophy
Med Sci Res 17:303-304, 1989
- 8) Suzuki Y, Adachi K, Ando K, Mitsuma T:
Changes of monoamine and TRH contents in naloxone induced inhibited development of

rat cerebrum and cerebellum

Life Sci 43:831-835, 1988

- 9) Mitsuma T, Adachi K, Mukoyama M, Ohsugi K, Ando K:

Concentrations of thyrotropin-releasing hormone and substance P are increased in several areas of the central nervous system of shabbling mutant mice

Neurochem Int 13:261-264, 1988

- 10) Ohsugi K, Adachi K, Mukoyama M:

Biochemical studies on monoamine contents in spinal cord of patients with multiple system atrophy

Neurochem Int 13:543-547, 1988

- 11) 安井昌之, 駒井則彦, 林靖二, 大田喜一郎, 木戸拓平, 足立皓岑:

脊髄小脳変性症における thyrotropin releasing hormone 投与による thyroid stimulating hormone の分泌動態

ホルモンと臨床 37:57-62, 1989

- 12) Oda K, Fukushima N, Shibasaki H, Ohnishi A:

Hypoxia-sensitive hyperexcitability of the intramuscular nerve axons in Isaacs' syndrome

Ann Neurol 25:140-145, 1989

- 13) 松井京子, 加藤進昌, 渡辺倫子, 安藤一也:

各種運動失調マウスの脳内ソマトスタチンについて

実験動物 37:263-268, 1988

- 14) 松井京子, 真野行生, 安藤一也:

Wriggle Mouse Sagami の異常運動に対する ceruletide 投与の影響

—Rolling Mouse Nagoya との比較—

実験動物 38:61-64, 1989

b. 著書

- 1) Shibasaki H:

Notes on the pathophysiology of HTLV-I-associated myelopathy based on clinical and electrophysiological observations

In Neurology and Neurobiology, Vol. 51, HTLV-I and the Nervous System (eds by Roman GC, Vernant J-C, Osame M), Alan R. Liss, New York, p227-232, 1989

II 研究業績

2) 柴崎浩:

視覚誘発電位, C. 神経内科の面から

臨床誘発電位診断学(中西孝雄, 吉江信夫編), 南江堂, 東京, p164-179, 1989

3) 柴崎浩:

誘発電位

医科学大事典, 補遺巻6, 診断・検査法の進歩 1989(岡博, 和田攻編), 講談社, 東京,
p106-109, 1988

4) 柴崎浩:

ミオクローヌス

今日の治療指針(日野原重明, 阿部正和監修), 医学書院, 東京, p221, 1989

5) Mano Y, Funakawa I, Nakamuro T, Ikoma K, Takayanagi T, Matsui K:

The safety of magnetic stimulation

Electrophysiological Kinesiology(ed by W. Wallinga, H.B.K. Boom and J. de Vries)
Elsevier, Amsterdam, p191-194, 1988

c. 総説

1) Shibasaki H:

AAEE Minimonograph #30: Electrophysiologic studies of myoclonus

Muscle Nerve 11:899-907, 1988

2) 柴崎浩:

書評「神経科学レビュー2 '88」

臨床検査 33:220, 1989

3) 臼井康臣, 向山昌邦, 高橋昭:

Pupillary sparing

神経内科 29:369-377, 1988

4) 松井京子, 加藤進昌:

遺伝性小脳変性症と神経ペプチド

医学のあゆみ 147:827-829, 1988

5) 野手とし子:

神経疾患のリハビリテーション

臨床医 14:776-780, 1988

d. 班会議報告

1) 向山昌邦, 野手とし子, 春原経彦:

CT スキャンで小脳, 脳幹の萎縮を認めた HMSN-1 の 1 例

厚生省精神・神経疾患・ニューロパチの成因及び治療に関する研究班, 昭和62年度研究報告書, 107-109, 1988

2) 向山昌邦, 横井風児:

ポジトロンCTによる脳血流量及び酸素消費率の研究

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の遺伝, 疫学, 臨床及び治療開発に関する研究班, 昭和62年度研究報告書, 153-155, 1988

3) 向山昌邦, 野手とし子, 亀井敦行, 春原経彦, 増田国男, 山勝裕久:

脊髄小脳変性症の障害度とその進行過程

—アンケート調査から—

厚生省特定疾患・難病の治療・看護調査研究班, 昭和62年度研究報告書, 116-121, 1988

4) 近藤喜代太郎, 松岡幸彦, 南良二, 福山幸夫, 村上慶郎, 向山昌彦, 大城盛夫:

筋ジストロフィーの施設ケアの便益性

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の遺伝, 疫学, 臨床及び治療開発に関する研究班, 昭和62年度研究報告書, 5-8, 1988

5) 松岡幸彦, 斉田恭子, 高橋昭, 松永宗雄, 向山昌邦:

筋緊張性ジストロフィー全国調査アンケートの解析

第4報 重症度と臨床徴候, 血清CK値との関連

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の遺伝, 疫学, 臨床及び治療開発に関する研究班, 昭和62年度研究報告書, 9-12, 1988

6) 近藤喜代太郎, 金森雅夫, Morton NE, 藤木慶子, 椿忠雄, 乗松克政, 中里興文, 三吉野産治, 南良二, 向山昌邦, 安田徳一, 桑原英明, 笠木重人, 高橋桂一, 亀尾等, 森健一郎, 安武敏明, 大城盛夫:

Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝対策

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の遺伝, 疫学, 臨床及び治療開発に関する研究班, 昭和62年度研究報告書, 13-15, 1988

7) 安藤一也, 鈴木良弘, 足立皓岑, 向山昌邦:

筋萎縮性側索硬化症でのプロテインキナーゼ活性

II 研究業績

厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班，昭和62年度研究報告書，48-50，1988

- 8) 平田伊勢雄，山口裕敬，永田進，板倉利達，中山創生，向山昌邦，福谷喜代子，伊藤裕：

在宅難病患者（特に神経難病）へのケア・援助について

東京都特殊疾病（難病）に関する研究班，昭和62年度研究報告書

- 9) 富田武，山崎一斗，榊原朱実，向山昌邦，菊池建機：

筋ジストロフィーのためのGAD・MDX複合マウス系統の育成

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究班，昭和62年度研究報告書，63-78，1988

- 10) 吉田瑞子，菊池建機：

mdxマウス骨格筋のCa²⁺濃度

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究班，昭和63年度研究報告書，252-253，1988

- 11) 安藤一也，松井京子，向山昌邦，加藤進昌：

各種運動失調マウスの脳内ソマトスタチン濃度およびソマトスタチン拮抗薬投与効果

厚生省新薬開発・神経ペプチドによる精神神経障害治療薬の開発研究班，昭和62年度研究報告書，p106-111，1988

e. その他

- 1) 向山昌邦：

神経内科症例の検討

北多摩医師会報別冊，学術講演集第12号，46-59，1988

- 2) 喜多村孝一，杉浦啓太郎，向山昌邦：

セルフコントロールで頭痛を軽くする

暮らしと健康，60-67，1988

- 3) 松井京子，増井晃，加藤進昌，渡辺倫子，向山昌邦，安藤一也：

各種運動失調マウスの脳内 somatostatin および CCK-8 について

日疾動録 4:26，1988

B. 学会発表

a. 特別講演・シンポジウム

- 1) Shibasaki H：

Dinner Workshop: Myoclonus

American Electroencephalographic Society 1988 Annual Meeting.

San Diego, October 4, 1988

2) 向山昌邦:

運動失調モデル動物

中日友好医院神経系疾病学シンポジウム, 北京, 10. 26, 1988

3) 向山昌邦:

進行性核上性麻痺

中日友好医院神経系疾病学シンポジウム, 北京, 10. 28, 1988

4) Sasaki H, Naka K, Yamada M, Satogami E, Kondo M, Miyamura K, Mukoyama M:

Morphometric changes in peripheral nerve in streptozotocin-induced diabetic rats

Satellite Symposium of the 13th IDF Congress "Diabetic Neuropathy". Singapore,

November 17, 1988

b. 国際学会

1) Shibasaki H, Kuroda Y:

Multiple sclerorisis (MS) and HTLV-I associated myelopathy (HAM).

International Multiple Sclerosis Conference, Scientific Meeting: An Update on Multiple Sclerosis

Rome, September 15, 1988

2) Shibasaki H, Nakamura M, Nishida S, Neshige R, Kakigi R:

A novel method for real time processing to study recovery functions of evoked potentials

American Electroencephalographic Society 1988 Annual Meeting.

San Diego, October 5, 1988

3) Kakigi R, Shibasaki H, Ikeda A:

Pain-related somatosensory evoked potentials following CO₂ laser stimulation in man

American Electroencephalographic Society 1988 Annual Meeting.

San Diego, October 5, 1988

4) Kuroda Y, Shibasaki H, Endo C:

Clinical and laboratory characteristics of human T-lymphotropic virus

type I-associated myelopathy

II 研究業績

113th Annual Meeting of the American Neurological Association.

Philadelphia, October 3, 1988

- 5) Mukoyama M, Yamazaki K, Kikuchi T, Tomita T:

GAD(gracile axonal dystrophy) mouse. A new animal model of central distal axonopathy

4th International Meeting of Peripheral Neuropathy Association of America, Halifax,
July 22, 1988

- 6) Kikuchi T, Yamazaki K, Moriya H, Mukoyama M:

A neurological mutant mouse with neuroaxonal dystrophy in ascending spinal tracts

Neurological Mutation in the Mouse(The Jackson Laboratory's Seminar),
Bar Harbor, September 28, 1988

c. 一般学会

- 1) 柴崎浩, 柿木隆介, 音成龍司, 池田昭夫, 中村政俊, 西田茂人:

誘発電位回復機能の実時間検査処理法

第18回日本脳波・筋電図学会学術大会, 青森, 11. 10, 1988

- 2) 柿木隆介, 柴崎浩, 池田昭夫:

CO₂レーザー光線による痛覚刺激体性感覚誘発電位(SEP)

第18回日本脳波・筋電図学会学術大会, 青森, 11. 10, 1988

- 3) 音成龍司, 柴崎浩, Hans Lüders:

事象関連電位各成分(P3a, P3b, "N300")の関係と硬膜下電極記録による発生源の検討

第18回日本脳波・筋電図学会学術大会, 青森, 11. 11, 1988

- 4) 西田茂人, 中村政俊, 柴崎浩:

脳波・誘発電位モデルによる特徴の頭皮上分布表現

第18回日本脳波・筋電図学会学術大会, 青森, 11. 10, 1988

- 5) 向山昌邦, 山崎一斗, 菊池建機, 富田武:

GAD(gracile axonal dystrophy)マウスの計測学的研究

— Central distal axonopathyの存在について —

第29回日本神経病理学会総会, 仙台, 5. 20, 1988

- 6) 向山昌邦, 山崎一斗, 菊池建機, 富田武:

GAD(gracile axonal dystrophy)マウスの臨床病理学的及び遺伝学的研究

第29回日本神経学会総会, 東京, 5. 26, 1988

- 7) 安井昌之, 向山昌邦, 足立皓岑, 大杉圭子, 安藤一也, 吉田博信, 吉益文夫, 八瀬善郎:
各種中枢神経疾患におけるホルマリン固定試料の金属分析
— ホルマリンへの漏出検討 —
第29回日本神経病理学会総会, 東京, 5. 26, 1988
- 8) 鈴木仁, 吉田雅治, 小池秀海, 吉野佳一, 向山昌邦:
末梢神経障害及び腎障害をきたしたゲルマニウム中毒の1例
第106回日本神経学会関東地方会, 東京, 9. 3, 1988
- 9) 森田勇二, 小長谷正明, 高柳哲也, 足立皓岑, 安井昌之, 安藤一也, 満間照典:
低Ca・Mg・高Al ラットの生化学的検討 — ALS 発症の環境要因との関連について —
第29回日本神経学会総会, 東京, 5. 25, 1988
- 10) 足立皓岑, 大杉圭子, 向山昌邦, 安藤一也, 満間照典:
多系統変性症の脊髄におけるモノアミン, 神経ペプチドの検討
第29回日本神経学会総会, 東京, 5. 27, 1988

C. 班会議発表

- 1) 柴崎浩, 黒田康夫, 高島洋, 堀哲郎:
ストレスのEAEに及ぼす影響
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 東京, 1. 20, 1989
- 2) 柴崎浩, 小田健一郎:
重症筋無力症: アセチルコリン受容体抗体 IgMクラスの意義
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 東京, 1. 21, 1989
- 3) 柴崎浩, 柿木隆介:
CO₂ レーザー刺激体性感覚誘発電位による脊髄感覚路の検索
厚生省精神・神経疾患研究委託費・ミエロパチーの発現機構と病因に関する研究班, 東京,
1. 14, 1989
- 4) 柴崎浩, 向山昌邦:
遺伝性 gracile axonal dystrophy (GAD) マウスの脊髄病変
厚生省精神・神経疾患・ミエロパチーの発現機構と病因に関する研究班, 東京, 1. 14, 1989
- 5) 向山昌邦, 無江昭子:
福山型先天性筋ジストロフィー症の脳白質病変に関する研究

II 研究業績

- 厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の遺伝、疫学、臨床及び治療に関する研究班，東京，
12. 2, 1988
- 6) 向山昌邦:
GAD マウスの下肢末梢神経に関する形態学的研究
厚生省精神・神経疾患・ニューロパチーの成因及び治療に関する研究班，東京，1. 19, 1989
- 7) 向山昌邦，松本栄子:
地域ケアシステムにおける障害者福祉センターの役割 — 神経難病患者へのリハビリを中心に —
厚生省特定疾患・難病のケアシステム調査研究班，東京，2. 20, 1989
- 8) 近藤喜代太郎，岩下宏，松岡幸彦，南良二，福山幸夫，村上慶郎，向山昌邦，大城盛夫:
筋ジストロフィーの施設ケアの便益性
厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の遺伝・疫学・臨床及び治療開発に関する研究班，
東京，12. 1, 1988
- 9) 高橋昭，松岡幸彦，馬場正之，中西孝雄，平山恵造，万年徹，向山昌邦，古和久幸，塚田直敬，祖父江元，西谷裕，高橋和郎，大西晃生，後藤幾生，納光弘:
遺伝性ニューロパチーの調査報告（第1報）
厚生省精神・神経疾患・ニューロパチーの成因及び治療に関する研究班，東京，1. 19, 1989
- 10) 足立皓峯，鈴木良弘，大杉圭子，向山昌邦，安藤一也，満間照典:
オピオイドペプチド拮抗剤ナロキソンの中枢神経発育阻害での神経伝達物質の関与の検討
厚生省特定疾患・神経ペプチドによる精神神経障害治療薬の開発研究班，東京，3. 11, 1989
- 11) 松井京子，加藤進昌，向山昌邦，安藤一也:
Weaver マウスに対する cysteamine 投与後の行動薬理学的および生化学的検索
第29回日本神経学会総会，東京，5. 27, 1988
- 12) 横井風児，向山昌邦，春原経彦，里吉栄二郎:
性格変化で発症し進行性の知能低下を示した1剖検例
第105回日本神経学会関東地方会，東京，6. 4, 1988
- 13) 横井風児，富英明，向山昌邦，春原経彦，田平武:
特異な剖検所見を示した家族性痴呆の2症例
第107回日本神経学会関東地方会，東京，12. 3, 1988
- 14) 吉田瑞子，菊池建機:
mdx マウス骨格筋内の Ca^{2+} 濃度

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究班会議，
東京，12. 3, 1988

- 15) 真野行生，白川格，中室卓也，高柳哲也，松井京子：

経皮的頭部パルス磁気刺激の安全性の検討 — 動作学的，生化学的，神経病理学的検討 —

厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班，東京，2. 17, 1988

- 16) 加藤進昌，増井晃，松井京子，樋口輝彦，御子柴克彦，川瀬義久，関根一郎，芹川忠夫，笹征史：

遺伝性小脳変性マウスに共通する脳内ソマトスタチンの異常と自然発症性てんかんラットの関連につ
いて — 各種疾患モデル動物におけるけいれん感受性と脳内ソマトスタチン異常 —

厚生省特定疾患・難治てんかんの予防と対策に関する研究班，東京，12. 8, 1988

- 17) 真野行生，白川格，中室卓也，高柳哲也，松井京子，安藤一也：

中枢神経系へのパルス磁気刺激の検討

第29回日本神経学会総会，東京，5.26, 1988

- 18) 松井京子：

Weaver マウスに対する生化学的および行動薬理学的検討

第5回日本疾患モデル動物研究会総会，浜松，12. 1, 1988

- 19) 北村純一，山口明：

触覚失認，構成失行を認めた schizencephaly の成人例

第57回関東リハ医学会，東京，3. 4, 1989

- 20) 竹内博，大島純三，北村純一，山口明：

右失調性片麻痺の中年男性例

第57回関東リハ医学会，東京，3. 4, 1989

- 21) 北村純一，山口明，竹内博，大島純三，北野正二郎，大野和雄：

病変部位による脳卒中片麻痺の臨床症状の相違とリハビリテーション・アプローチ

第1回西東京リハビリテーション研究会，東京，2. 9, 1989

- 22) 野手とし子，平山義人，上田敏：

脊髄小脳変性症患者における立ち上がり動作の分析

(第5報)

第25回日本リハビリテーション医学会総会，横浜，6. 2, 1988

- 23) 野手とし子，山口明，大川弥生，上田敏：

スモン患者における立ち上がり動作の分析

II 研究業績

- 厚生省特定疾患スモン調査研究班，東京，2. 23, 1989
- 24) 柳沢健，藤原孝之，高木昭輝，中村隆一：
PNF 肢位による発声反応時間への影響
第25回日本リハビリテーション医学会総会，
横浜，6. 2, 1988
- 25) 高木昭輝，田極薫：
第3回理学療法教育研究会シンポジウム
理学療法学 15:559-561
松山，5, 1988
- 26) 高木昭輝，増田国男，山口明，北村純一，野手とし子，平山義人，篠塚直子：
小脳性運動失調症に対する理学療法の試行
第43回国立病院国立療養所医学会総会
松山，11, 1989
- 27) 増田国男，高木昭輝
重心計ピドスコープを用いた脊髄小脳変性症及びパーキンソン病患者の歩行分析
(第1報)
第1回理学療法研究会
東京，3, 1989

3. 主な研究報告

GADマウス：運動・感覚神経末梢側末端の病変について

小田健一郎，三浦裕之，向山昌邦，菊池建機，柴崎浩

GAD (gracile axonal dystrophy) マウスは80日齢前後から後肢をひきずり、ふるえを呈する遺伝性疾患モデルマウス¹⁾である。病理学的に延髄ゴル核と脊髄ゴル索に球状構造物(spheroid)を伴った変性病変(axonal dystrophy)を認めることから名付けられた。

今回GADマウスの病変が第一次感覚ニューロンの中枢側末端以外に存在するのかどうかを明らかにする目的で、運動ニューロン軸索末端、すなわち運動終板部、及び感覚性一次ニューロンの末梢側末端である筋紡錘の病変について検討した。

対象と方法

120-150日齢のGAD発症マウス6匹およびそれぞれの正常対照より胸鎖乳突筋、長趾伸筋、ヒラメ筋を採取しアセチルコリンエステラーゼー銀二重染色を行い、神経終末の形態を観察した。

結果

- 1) 運動ニューロン系：GAD全例の下肢筋で、正常対照(図1)に比較して、筋肉内神経束を構成している軸索の数が減少し、かつその径が細くなっていることが認められた。さらに軸索とつながりをもたない運動終板が多数観察された(図2)。また乏しいながら神経線維の再生機転を示す側芽現象が存在した。胸鎖乳突筋にも、軽度ではあったが下肢と同様の変化を認めた。
- 2) 感覚ニューロン系：全例のGADマウスにおいて筋紡錘の一次および2次終末に終わる有髄神経線維は消失しており、高度の変性におちいていた。これは、下肢筋、胸鎖乳突筋の両者に認めた。

考察と結論

GADマウスは、一次感覚ニューロンの中枢側遠位端の変性以外には、前角細胞、後根神経節細胞、前根、後根、坐骨神経に異常を認めないことより中枢側の軸索末端が特異的に変性に陥るcentral distal axonopathyがその病態として当初考えられた¹⁾。しかし本研究でこのGADマウスでは、運動ニューロン、感覚ニューロンの末梢側軸索末端にも異常があることが判明した。よってこのマウスは、central-peripheral distal axonopathyのモデルと考えられる。この軸索末端より変性が逆行する現象は'dying back'現象として知られており、変性疾患、代謝障害、中毒などの病態との関連が考えられている。本

マウスは、遺伝学的マーカーをもちいて発症前診断が可能なことより²⁾、今後は、若年のマウスより経時的に筋肉内神経線維の検索を行い、その発症メカニズムを明らかにしたい。

文献

- 1) Yamazaki K, Wakasugi N, Tomita T, Kikuchi T, Mukoyama M, Ando K: Proc Soc Exp Biol Med 187:209-215, 1988
- 2) Yamazaki K, Sakakibara A, Tomita T, Mukoyama M, Kikuchi T: Jpn J Genet: 62:479-484, 1987



図1



図2

II 研究業績

mdx マウス骨格筋内 Ca^{2+} 濃度測定を試み

吉田瑞子

Duchenne 型筋ジストロフィー症(DMD)は、膜異常のために細胞外から細胞内に Ca^{2+} が流入し、細胞内の Ca^{2+} 濃度が高くなり、 Ca^{2+} 依存性蛋白質分解酵素が活性化され、細胞が壊死に陥るといわれてきた。実際、表面膜に存在するジストロフィンの欠損による膜異常であることが最近明らかになった。この膜異常のために、骨格筋内の Ca^{2+} が実際に高濃度になっているのかどうか我々は筋ジストロフィー症モデルマウス(mdx)の骨格筋を用いて、細胞内の Ca^{2+} 濃度を測定することを試みた。

試料および方法

3週令と16週令のmdxマウスとその対照のB10マウスの雄を用いた。各ケースで4匹ずつ検索した。骨格筋は長指伸筋を腱まで取り出し、緩衝液中でできる限り結合組織を除去した。緩衝溶液の組織は、118.4mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.52mM CaCl_2 , 25.0mM NaCO_3 , 1.18mM KH_2PO_4 , 1.18mM MgSO_4 , 11.0mM glucose(pH7.4)を用いた。

細胞内の Ca^{2+} 濃度の測定は、蛍光プローブ、fura-2を用いた。fura-2負荷溶液は、DMSOに溶解した1mM fura-2-AMと25% pluronic F-127を、上記緩衝溶液に加え最終濃度10 μM と0.08%としたものを用いた。

fura-2負荷溶液に、1肢の長指伸筋を入れ、0:CO₂=95:5の混合ガスを吹き込みながら、10 $^{\circ}\text{C}$ で1時間45分浮置した。次に細胞外に付着しているfura-2-AMとpluronic-F-127を除去し、細胞内に入ったfura-2-AMをfura-2に分解するために、緩衝溶液に入れ酸素-炭酸混合ガスを吹き込みながら、37 $^{\circ}\text{C}$ で25分間浮置した。他技は自己発光測定に用いた。自己発光測定用長指伸筋もfura-2-AMを除いた溶液中で、fura-2-AM負荷と同様に浮置した。

fura-2を負荷した筋束あるいは自己発光測定用筋束は、0.1mmの厚さの培養用カバーガラスの上にシリコン製の枠(フレキシムパーム)を接着し、その中に置いた。筋束はカバーガラスに密着させ、両端の腱を両面テープで押えた。緩衝液を満し蛍光顕微鏡下に置いた。蛍光測定中は、酸素-炭酸混合ガスを飽和させた緩衝液を環流した。測定時の試料の温度は、25 $^{\circ}\text{C}$ とした。

細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は、Xe光源付倒立型蛍光顕微鏡を用い、340nmと360nmの励起波長で照射した。筋束からの蛍光像(510nm)を超高感度カメラ(SIT:

浜松ホトニクス)で撮影、その像をモニターテレビで観察しながらビデオテープ(U・マチック用KSP, ソニー)にとり、画像解析装置(アルガス100, 浜松ホトニクス)で解析した。励起光量は最少限にし、SITカメラの感度を最高感度にして測定した。

画像解析で Ca^{2+} 濃度を算出するための標準曲線は、EGTAを用いた Ca^{2+} 緩衝液で得た。細胞内 Ca^{2+} 濃度は、筋細胞内の蛍光プローブ蛍光輝度から自己発光輝度を差引いて算出した。

結果と考察

3週令のmdxマウスの長指伸筋内の Ca^{2+} 濃度は、80~100nMを示す線維と200nMを示す線維が存在した。16週令の筋線維は80~100nMを示し、スポット的に200nMを示す部位があった。

B10マウスの長指伸筋内の Ca^{2+} 濃度は、3週令、16週令ともに80~100nMを示した。

mdx, B10マウスの各週令で、わずか4匹ずつの検索のため、静止状態の骨格筋内 Ca^{2+} 濃度の結論はまだ出せない。

最近、fura-2を注入して、筋細胞内の Ca^{2+} 濃度を測定した結果が報告された。その結果はmdxマウスの Ca^{2+} 濃度は92nMで、正常マウスの約2.3倍であった。mdxマウスの筋細胞内 Ca^{2+} 濃度が、正常マウスに比較して高いとはいえ、我々の結果と同様に現在いわれている生理的 Ca^{2+} 濃度である。今後我々は測定数を増やし、報告された結果も合わせ、膜異常と細胞内 Ca^{2+} 濃度の関係を明らかにする。

画像解析装置による解析に、協力下さった三菱化成生命科学研究所、工藤佳久博士に感謝する。

Weaver マウスの脳内モノアミン濃度の測定 — TRH および cysteamine 投与による変動

松井京子

各種の運動失調マウスにおいては小脳での神経伝達物質の異常がいろいろ示唆されている。そこで、小脳顆粒細胞の変性を特長とする weaver マウスの小脳を含めた脳各部位について脳内モノアミン濃度を測定し、さらに運動失調改善作用を認めた薬物(TRH および cysteamine)投与による脳内モノアミンの変動についても測定し、運動失調の発現と脳内モノアミンとの関連性について検討した。

方 法

weaver マウス(n=6)と正常マウス(n=6)(各8週齢)を断頭後、各組織(小脳、大脳皮質、線条体、視床、視床下部、海馬、脳幹)の湿重量を秤量し、0.1 NPCA でホモジナイズした後、遠沈し、その上澄液を HPLC にかけて、電気化学的検出法で測定した。TRH(25mg/kg)投与(n=6)(i.p.)15分後、cysteamine(200mg/kg)投与(n=6)(i.p.)4時間後の脳内モノアミン濃度を生理食塩水投与10ml/kgの場合と比較した。

結 果

脳内モノアミン濃度:小脳でNA, 5-HT, 5-HIAA濃度の増加がみられ、線条体でNA, DA, DOPAC濃度の低下と5-HIAA濃度の増加がみられたが、他のモノアミン濃度においては明らかな差はみられなかった(表1)。大脳皮質においてはDA濃度の低下と5-HIAA濃度の増加がみられたが、NA, DOPAC, HVA, 5-HT濃度には差がみられなかった。海馬、視床、脳幹で5-HIAA, 5-HIAA濃度の増加がみられたが、NA, 5-HT濃度には差がみられなかった(DA, DOPAC, HVA: N.D.)。

TRH および cysteamine 投与後の脳内モノアミン濃度の変化: TRH 投与により大脳皮質、視床下部にてDOPAC濃度の増加、cysteamine 投与により線条体にてDOPAC, HVA濃度の増加、海馬でNA濃度の低下などが認められた以外は他のモノアミン濃度の変化はどの部位においても認められなかった。

考 察

Weaver マウスでは小脳においてNA, 5-HT, 5-HIAA濃度が増加し、線条体においてDA, DOPAC濃度が低下し、5-HIAA濃度が増加していることから、特に小脳と線条体においてモノアミン濃度の変化が著しい部位と考えられる。

Weaver マウスでは線条体、大脳皮質でDAの合成・代謝の低下、脳全体にわたり5-HT代謝の亢進が

考えられる。DA代謝の亢進がTRH投与で大脳皮質で、cysteamine投与で線条体で認められたことからWeaverの失調性歩行にDA系の関与も推定される。

TRH投与により運動失調改善を示すRolling mouse Nagoya(RMN)の小脳においてはNA濃度の増加が認められ、TRH投与により小脳NA濃度の低下を認めたことから、小脳NA濃度と運動失調との関連性が示唆されている¹⁾。しかし、今回のWeaverマウスの結果ではTRHおよびcysteamine投与による小脳NA濃度の変化は認められなかったことから、RMNとWeaverでは運動失調の発現機序が異なっている可能性が示唆された。

文 献

- 1) 小長谷正明他: 臨床神経 20: 181-187, 1980

表1. 線条体、小脳におけるモノアミン濃度 (ng/mg). Weaver n=6, control n=6
* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

	Striatum		Cerebellum	
	Weaver	Control	Weaver	Control
NA	0.066 ± 0.008*	0.138 ± 0.024	0.928 ± 0.045*	0.502 ± 0.047
DA	4.686 ± 0.376**	12.469 ± 1.427	N.O.	N.O.
DOPAC	0.743 ± 0.092**	1.288 ± 0.075	N.O.	N.O.
HVA	0.609 ± 0.048	0.751 ± 0.053	N.O.	N.O.
5-HT	0.843 ± 0.089	0.665 ± 0.033	0.583 ± 0.034**	0.284 ± 0.019
5HIAA	0.362 ± 0.039*	0.227 ± 0.030	0.230 ± 0.017***	0.108 ± 0.010

PETによる一過性全健忘(transient global amnesia)の検討

横井風児*,原敏彦*,飯尾正明

(* 国立中野病院)

2名のtransient global amnesia(以下TGA)の患者に対してポジトロンCT(以下PET)を用いて、脳血流量(CBF)、酸素摂取分画(OEF)及び脳酸素消費率(CMRO₂)を測定し、TGAの病因について検討した。

対 象

症例1。51才の男性で逆行性健忘を伴う約9時間半の記憶力障害が出現。発生後2日経過した後受診。神経学的には異常なく頭部X-CT, MRI, 脳波及び脳血管造影所見は全て正常であった。

症例2。53才の女性、偏頭痛及び軽度の高血圧の既往あり。数時間の逆行性健忘を伴う約5時間の記憶力障害が出現。症例1と同様神経学的所見, X-CT, MRI, 脳波及び脳血管造影所見に異常を認めなかった。

方 法

サイクロトロンにより産出されたC¹⁵O₂及び¹⁵O₂の持続吸入法¹⁾により、PETを用いて上記患者のCBF, OEF及びCMRO₂を測定した。使用したPETスキャナーは島津製作所製 Headtome IIである。症例1に対しては発作消失後8日目及び44日目に、症例2に対しては14日目と37日目に測定した。

結 果

症例1及び症例2共に、第1回目のPET所見では後大脳動脈(以下PCA)領域において軽度にCBF及びCMRO₂が低下し、逆にOEFは軽度上昇していた。第2回目のPET検査では両者とも、CBF, OEF及びCMRO₂は全て正常であった。

考 察

CBF及びCMRO₂が共に低下しOEFが上昇している状態は、CMRO₂の低下がCBFのそれに比して相対的に少ないことを意味し、この特殊な病的状態は、misery perfusion²⁾と呼ばれる。TGA患者では両側PCA領域のmisery perfusionがTGA症状消失後も一時的に出現していたことが今回のPET所見から証明された。

一過性脳虚血発作(以下TIA)では神経症状消失後一時的に脳内の責任病巣部位に上記のmisery perfusion現象が出現することがPETによる研究から明らかになっている³⁾。Misery perfusionは、さらにTIA症状消失後数日後から数ヶ月にわたって継続することが知られている⁴⁾。

上記の知見より、TGA症状消失後に得られた今回のPET所見、すなわち両側PCA領域の misery

perfusion現象からTGAの病因は両側PCA領域における一過性脳虚血発作と結論づけることができる。

問題は両側のPCAの血流が一過性に障害されたとするならば、何故amnesia以外のPCA閉塞症状、すなわち皮質盲、Balint症候群、metamorphosia、asimultagnosia等の神経症状が出現しないかということである。脳内には低酸素状態(anoxia)に対して他の神経組織より障害され易い(selective vulnerability⁵⁾)部位が存在する。それは、大脳新皮質の3, 5, 6層の神経細胞、一部の線条体細胞、小脳プルキンエ細胞、そして海馬のpyramidal cellである。この内海馬のpyramidal cellが最もanoxiaに対して障害され易い。海馬は近時記憶に密接な関連を有するhippocampo-mammilo-thalamic system⁶⁾の一部を構成し、さらにこのsystemはPCAより灌流される。今回検討された2例のTGAではPCA領域のCBF, CMRO₂の低下は軽度でしかもCMRO₂の低下がより軽度であることより、神経細胞の好氣的エネルギー代謝の障害に起因する神経症状は一層出現しにくく、わずかにanoxiaに対して最も障害され易い海馬のみが機能障害に陥り、神経症状(記憶力低下)を発現したと推測される。すなわちTGAは一過性の両側PCAの領域の虚血(TIA)であると考えられる。

文 献

- 1) Frackowiak RSJ, Lenzi GL, Jones T, Heather JD: J Comput Assist Tomogr 4:727-736, 1980
- 2) Baron WJ, Rougemont DD, Collard P, Bustany P, Bousser MG: In Positron emission tomography, Aran R. Liss, Inc. pp203-218, 1985
- 3) Powers WJ, Grubb RL, Raichle ME: Ann Neurol 16:546-552, 1984
- 4) Ito M, Hatazawa J, Ido T, Matsuzawa T: Neuradiology 29:416-421, 1987
- 5) Brierley JB, Meldrum BS, Brown AW: Arch. Neurol 29:367-374, 1973
- 6) Benson DF: South Med J 71:1221-1227, 1978

6. 疾病研究第5部

1. 研究部一年の歩み

代謝性遺伝病における中枢神経障害の成因を解明することを目的とした研究部であり、細胞レベルでの遺伝情報の解析を中心に研究を行った。4月には、前年度と同じスタッフでスタートしたが、大島章弘流動研究員が6月末に、更に鈴木義之部長が9月末に退職し、今年度の後半は桃井隆室長の研究グループにより研究が継続された。

研究内容は、前年度に引き続き、疾患の病態解析とその生物学的基礎の解析とが行われた。具体的には遺伝性疾患における変異タンパク質の分析、そのもとになる遺伝子異常の本態解明、個体発生におけるレチノイン酸の果たす役割の解明などが主なものである。

(1) 進行性筋ジストロフィーの遺伝子診断

X染色体短腕に存在するDNAプローブによる連鎖解析、ジストロフィン遺伝子による変異遺伝子の構造解析（主に欠失の検索）を60以上の家系について検討した。十分な数のプローブを用いることにより、少なくとも80%以上の家系における保因者診断が可能であることが明らかとなり、更に30-50%の症例においてこの巨大遺伝子のどこかに欠失を確認することができた。これらの成果は、今後 Duchenne 及び Becker 型筋ジストロフィーの遺伝解析を行う上に貴重なデータとなるであろう。

(2) 形態形成とレチノイン酸

レチノイン酸は、ニワトリ肢芽形成における形態形成因子のひとつとして近年同定されているが、当研究室ではレチノイン酸に特異的に結合する細胞内レチノイン酸結合蛋白の発生過程での発現を検討した結果、中枢神経系に発現するCRABPIと肢芽などの筋組織に発現する新たなCRABPIIを見いだした。このことはレチノイン酸が発生過程での様々な形態形成に関与している可能性を示唆するものである。

（事務取扱 杉田秀夫）

Ⅱ 研究業績

2. 研究業績(1988.4-1989.3)

A. 論文

a. 原著

- 1) Nanba E, Tsuji A, Omura Suzuki Y :
GM1 - gangliosidosis: Abnormalities in biosynthesis and early processing of β - galactosidase in fibroblast
Biochem Biophys Res Commun 152 : 794-800, 1988
- 2) Suzuki Y, Tsuji A, Omura K, Nakamura G, Awa S, Kroos M, Reuser RJJ :
Km mutant of acid -glucosidase in a case of cardiomyopathy without signs of skeletal muscle involvement
Clin Chem Acta 176 : 115-122, 1988
- 3) Tsuji A, Omura K, Suzuki Y :
I -cell disease : evidence for a mannose 6-phosphate independent pathway for translocation of lysosomal enzymes in lymphoblastoid cells.
Clin Chim Acta 176 : 115-122, 1988
- 4) Tsuji A, Omura K, Suzuki Y :
Intracellular transport of acid α -glucosidase in human fibroblasts :
Evidence for involvement of phosphomannosyl receptor-independent system
J Biochem 104 : 276-286, 1988
- 5) Iyoda K, Tanaka J, Suzuki Y, Nagao Y, Ohtawara S :
Histopathologic and biochemical analysis of classic Pelizaeus-Merzbacher disease
Pediat Neurol 4 : 252-254, 1988
- 6) Shimmoto M, Tsuji A, Suzuki Y :
Restriction fragment length polymorphisms on the short arm of Xchromosome among the Japanese population
Jpn J Hum Genet 33 : 333-338, 1988
- 7) Kobayashi T, Goto I, Yamanaka T, Suzuki Y, Nakano T, Suzuki K :
Infantile and fetal globoid cell leukodystrophy : Analysis of galactosylceramide and galactosylsphingosine
Ann Neurol 24 : 517-522, 1988

- 8) Shimmoto M, Tsuji A, Yang R-C, Nomura Y, Segawa M, Suzuki Y :
DNA deletion and recombination in the gene locus X-linked muscular dystrophies
J Inher Metab Dis 11 : 324-328, 1988
 - 9) Nanba E, Tsuji A, Omura K, Suzuki Y :
Galactosialidosis : molecular heterogeneity in biosynthesis and processing of protective for
 β -galactosidase
Hum Genet 80 : 329-332, 1988
 - 10) Ohsugi K, Ide H, and Momoi T :
Temporal and spatial expression of a position specific antigen, AV-1, in chick limb buds
Dev Biology 130 : 454-463, 1988
 - 11) Momoi T, Kitamoto T, Senoo H, and Momoi M :
The distribution of cellular retinoic acid binding protein(CRABP) in the Central Nervous
System of the chick embryo during the development
Proc Japan Acad 64 : 294-297, 1988
 - 12) Kitamoto T, Momoi T, and Momoi M :
The presence of a novel cellular retinoic acid binding protein in chick embryos : purifica-
tion and partial characterization
Biochem Biophys Res Commun 157 : 1302-1308, 1988
 - 13) Momoi T, Kitamoto T, Sato-Kasuya J, Senoo H, and Momoi M :
Developmental changes in the expression and distribution of cellular retinoic acid binding
protein(CRABP) in the central nervous system of the chick embryo
Biomedical Res 10 : 42-48, 1989
- b. 著 書
- 1) 鈴木義之 :
脳性小児麻痺
診断・治療マニュアル, 金原出版 p1140, 1988
 - 2) 鈴木義之 :
出生前診断
今日の小児診断指針 第1報(前川喜平, 白木和夫, 土屋 裕編)
医学書院, 東京, p456-459, 1988

II 研究業績

3) 鈴木義之 :

先天性代謝異常

Bed-side memo (小児科) (鴨下重彦, 小佐野満監修), 世界保健通信社, 大阪, p146-175, 1988

4) 鈴木義之 :

リピドーシス

今日の診断治療指針, 第2版, 医学書院, 東京, p1028-1030, 1988

5) 鈴木義之 :

中枢神経変性疾患

小児神経疾患診療ハンドブック (渡辺一功編), 南江堂, 東京, p363-368, 1988

6) Suzuki Y :

Therapeutische Versuche mit Proteaseinhibitoren bei Muskel-dystrophie Duchenne und anderen erblichen metabolischen Erkrankungen mit abnormaler Verminderung von zellularen Protein

Aktuelle Aspekte neuromuskularer Erkrankungen. Therapie, Genetik, Mitochondriopathien (Mortier W, Pothmann R, Kunze K, eds), Georg-Thieme Verlag, Stuttgart, p105-115, 1988

7) Suzuki Y, Omura K, Nanba E, Tsuji A, Yang R-C, Kato G, Sakuraba H, Igarashi T :

Lysosomopathies : Analysis of intracellular abnormalities of functional proteins and a survey of new therapeutic approaches

Child Neurology and Developmental Disabilities (French JH, Harel S, Casaer P, eds), Paul H Brookes Publ Co, Baltimore, p21-27, 1988

8) Izumi T, Fukuyama Y, Tsuji A, Yamanaka T, Hirabayashi Y, Suzuki Y :

GM2-gangliosidosis : B1 variant with thermostable β -hexosaminidase A and molecular analysis of the mutant enzyme. Lipid Storage Disorders

Biological and Medical Aspects (Salvayre R, Douste-Blazy L, Gatt S, eds), Plenum Press, New York, p237-245, 1988

c. 総説

1) 鈴木義之 :

先天性代謝異常

Annual Review 内分泌, 代謝 p28-35, 1988

- 2) 鈴木義之, 新本美智枝, 辻 明彦, 楊 瑞成 :
Duchenne型筋ジストロフィーの診断と治療
小児科 29 : 27-40, 1988
- 3) 鈴木義之 :
リピドーシス
ブレインナーシング 4 : 297-401, 1988
- 4) 鈴木義之 :
リソソーム酵素異常症概説
蛋白質・核酸・酵素 33 : 682-685, 1988
- 5) 鈴木義之 :
シアリドーシス
蛋白質・核酸・酵素 33 : 712-714, 1988
- 6) 鈴木義之 :
糖蛋白質異常 (いわゆるムコリピドーシス)
代謝 25 (臨増) : 205-209, 1988
- 7) 鈴木義之 :
シアリドーシス
生化学 60 : 294, 1988
- 8) 鈴木義之 :
リピドーシス
Biomedica 3 : 908-912, 1988
- 9) 鈴木義之 :
遺伝子病
保健の科学, 31 : 10-13, 1988
- 10) 鈴木義之 :
進行性筋ジストロフィーの遺伝子診断
医学のあゆみ, 148 : 186, 1989
- 11) 鈴木義之 :
先天性代謝異常
Annual Review 内分泌代謝 35-40, 1989

II 研究業績

12) 桃井 隆 :

発生過程での神経系を決定するもの

現代化学 3月号, p62-66, 1988

d. 班会議報告書

1) 鈴木義之, 大島章弘 :

β -グルクロニダーゼのクローン化と発現

厚生省厚生科学研究・遺伝子治療の基礎的研究班

昭和60-62年度研究報告書 p104-111

2) 鈴木義之, 難波栄二, 辻 明彦, 大村 清 :

ガラクトシアリドシスの病態とその多様性

厚生省精神・神経疾患研究委託・発育期脳障害の発生予防と成因に関する研究班

昭和62年度研究報告書 p223-228

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) Suzuki Y, Nanba E, Tsuji A, Omura K :

Molecular heterogeneity of protective protein in galactosialidosis

Japanese-German Symposium on Sialic Acids, Berlin, May 20, 1988

2) 鈴木義之 :

先天性代謝異常

第6回日本臨床化学会分析部会関東支部学術集会

東京, 5.28, 1988

3) Suzuki Y :

Regulation of lysosomal enzyme activities in physiological and pathological states

Philippine Biochemical Society Symposium "Updates on Biochemical Regulation"

Manila, July 2, 1988

4) Sakuraba H, Suzuki Y :

Molecular genetics of Fabry disease

The Third Rinsho-ken International Conference : Biological Significance of Glycolipids,

Tokyo, September 27, 1988

- 5) Suzuki Y, Nanba E, Tsuji A, Omura K :

Molecular abnormalities in human β -galactosidase deficiency

The Third Rinsho-ken International Conference : Biological Significance of Glycolipids,
Tokyo, September 27, 1988

- 6) Suzuki Y :

Molecular heterogeneity in lysosomal storage diseases

International Seminar on the Molecular Basis of Inherited Metabolic Diseases, Tokyo,
September 30, 1988

b. 一般学会

- 1) 楊 瑞成, 辻 明彦, 大村 清, 鈴木義之 :

二次元電気泳動による優性遺伝病の病因解析の試み

第91回日本小児科学会総会, 神戸, 5.13, 1988

- 2) 中村 元, 百々秀心, 宮下俊之, 赤木美智男, 菱 俊雄, 兼次邦男, 阿波彰一, 鴨下重彦, 山口和克, 鈴木義之 :

多源性心室性期外収縮とCPK高値を示した α グルコシダーゼKm異常症の1例

第91回日本小児科学会総会, 神戸, 5.14, 1988

- 3) 野村芳子, 瀬川昌也, 新本美智枝, 鈴木義之 :

筋ジストロフィー症の臨床像の特徴とDNA解析

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988

- 4) 山田和孝, 平山義人, 桜川宣男, 有馬正高, 辻 明彦, 大村 清, 鈴木義之, 埜中征哉 :

高脂血症を合併し, 脳梗塞を起し, 両親が特異的な酵素異常を示した幼児型Pompe病の1例

第30回日本小児神経学会総会, 徳島, 6.9, 1988

- 5) 大村 清, 鈴木義之 :

培養皮膚線維芽細胞によるニーマン・ピック病C型の生化学的診断

第30回日本小児神経学会総会, 徳島, 6.9, 1988

- 6) 楊 瑞成, 大島章弘, 長尾芳朗, 鈴木義之 :

二次元電気泳動によるヒト線維芽細胞の解析

日本人類遺伝学会第33回大会, 札幌, 9.8, 1988

- 7) 新本美智枝, 楊 瑞成, 大島章弘, 鈴木義之, 野村芳子, 瀬川昌也 :

プローブ754に欠失を示す進行性筋ジストロフィー非定型例のPGF電気泳動による遺伝子解析

II 研究業績

日本人類遺伝学会第33回大会, 札幌, 9. 8, 1988

8) 桃井 隆, 佐藤淳子, 北本年弘, 桃井真里子 :

DNA 結合活性をもつ核内レチノイン酸結合蛋白について

第47回日本癌学会総会, 東京, 9. 20, 1988

9) 川畑正博, 岩本愛吉, 堀尾恵三, 桃井 隆, 福本誠二, 松本俊夫, 吉倉 広 :

XC 細胞における細胞形態のフリップ・フロップとそれに伴う細胞内情報伝達経路の差異

第47回日本癌学会総会, 東京, 9. 20, 1988

10) 北本年弘, 熊谷博道, 桃井 隆 :

脳におけるレチノールおよびレチノイン酸結合蛋白について

第31回日本神経化学会, 仙台, 10. 26, 1988

11) 桃井 隆, 佐藤淳子, 北本年弘 :

DNA 結合活性をもつ核内レチノイン酸受容体蛋白

第61回日本生化学大会, 東京, 10. 3, 1988

12) 佐藤淳子, 桃井 隆 :

HL-60 細胞におけるキナーゼ阻害剤の作用について

第61回日本生化学会, 東京, 10. 3, 1988

13) Kitamoto T, Kasuya J, Senoo H, Momoi M, and Momoi T :

Cellular Retinoic Acid Binding Protein And Retinoic Acid Receptor in The Brain of Early Chick Embryos

4th. International Congress of Cell Biology. Montréal August 14-19, 1988

C. 班会議発表

1) 鈴木義之, 大島章弘 :

ライソゾーム酸素レセプターの解析

厚生省精神神経疾患委託研究・遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究班, 大阪, 9. 19, 1988

D. 研究会など

1) Suzuki Y :

Galactosialidosis : A new hereditary metabolic disorder of glycoprotein metabolism

Special lecture at the Department of Neurology, University of Santo Tomas, Manila,
July 1, 1988

2) Suzuki Y :

Molecular abnormality and genetic heterogeneity in lysosomal storage diseases

Special lecture at the Medical School, University of Santo Tomas, Manila, July 1, 1988

3) 鈴木義之 :

ライソゾーム酵素活性発現の遺伝情報とその制御

第2回筑波内分泌代謝懇話会, 筑波, 9.6, 1988

4) 鈴木義之, 桜庭 均, 大島章弘, 長尾芳朗 :

ガラクトシアリドシスにおける保護蛋白の分子異常

第19回病態代謝研究会中間報告会, 東京, 9.10, 1988

3. 主な研究報告

マウス・ラット中枢神経系における
細胞内レチノイン酸結合蛋白の分布と発現
桃井 隆, 北本年弘, 西川 徹, 桃井真里子

序 論

レチノイン酸は、細胞内レチノイン酸結合タンパク (CRABP) を介して、核へと運搬され核内レチノイン酸レセプターにより直接遺伝子発現を調節すると考えられている。しかしながら、このレチノイン酸の生体内での生理作用は、残念ながら不明である。近年、ニワトリ発生初期の肢芽形成に深く関与していることが明らかとなり、モルフォージェン (形態形成因子) の一つとして同定されるに至った。我々は、レチノイン酸の情報伝達に関与するCRABPがニワトリ発生初期のみならず、発生初期の中枢神経に一過性に発現することを明らかにしてきた。

本研究は、マウス胎児中枢神経系、及び成獣ラットにおいてCRABPの発現、及び、分布について検索した。

方 法

1. イムノブロット ブタこう丸より、CRABPをOngらの方法に従い精製し、ウサギに免疫し、特異抗体を作成した。同抗体は、CRABPと高い相同性を示すブタ肝臓 CRBP 及び、ウシP2タンパクとは反応せずCRABPに対し、強い特異性を示した。マウス発生過程の神経管、マウス11.5日胚中枢神経系の各部位、及びラット脳の各神経核におけるCRABPの発現は、各細胞質画分を15% SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った後、Towbinらの方法に従い、抗CRABP抗体を用いてウエスタンブロットした。

2. 組織染色 マウス11.5日胚は、ブアン固定し一方、ラット脳は、4%パラホルムアルデヒド固定した後、パラフィン包埋した切片に対し、抗CRABP抗体、コントロールとして免疫前血清をそれぞれ反応させ、CRABP陽性の発色は、パーオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体、及び、ジアミノベンチジンを用いて行った。

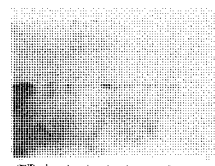
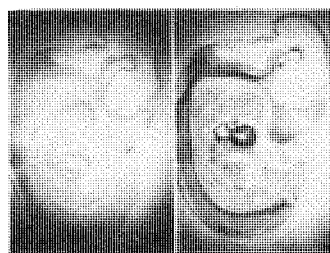
結 果

マウス11.5日胚でCRABPは、心臓及び、中枢神経系にその強い発現が認められた (図1A)。特に、神経系では、中脳から後脳、及び、神経管上部に強い発現が認められ、神経管では、腹側部に局在していた。前脳には、CRABPの発現は観察されず、神経管は、前後軸にかけてその発現が異なっており、下部にいくほどその発現が弱くなっていた。コントロールとして用いた免疫前血清では、陽性が全く観

察されなかった (図1B)。発生の過程では、11.5-13.5日胚の神経管でCRABPは、一過性に発現しており、中枢神経を4分割すると、神経管上部にCRABPの発現が最も多く、次に中一後脳、中一前脳、神経管下部の順番であった。また成獣ラット脳では、CRABPは、神経細胞に弱陽性に存在したが、グリア細胞は陰性であった。また、各種神経核におけるCRABPを調べると、線条体で他の神経核に比べ4-5倍多くのCRABPの発現がみられた (図2)。

考 察

CRABPは、成獣ラット脳では、弱陽性ながら神経細胞に見られ、グリア細胞に見られないことから、CRABPは、神経細胞に特異的に発現することが示唆された。さらに、CRABPは、マウス発生過程の神経管で一過性 (11.5-13.5日) に発現し、その発現も前後軸に沿って異なることは、CRABP陽性神経前駆体細胞の発生過程での分化程度が異なっていることが推定された。成獣ラット脳では、線条体にCRABPが多くみられることから、運動系ニューロンの分化とCRABPとの関連に興味もたれる。しかしながら、レチノイン酸が神経成長因子や、成長因子受容体の発現を調節していることを考え合わせるとレチノイン酸がCRABP陽性細胞の分化、及び増殖の調節を介して、神経系の形成に関与している可能性が考えられる。



CRBP

1 cerebral cortex frontal	6 hippocampus
2 cerebral cortex lateral	7 amygdala
3 lateral forebrain	8 nucleus accumbens
4 striatum	9 cerebellum
5 hippocampus	

HL-60 細胞の分化誘導過程におけるガングリオシドの作用機作について

佐藤淳子, 桃井 隆

序 論

酸性糖脂質であるガングリオシドは、神経芽細胞において、Neuriteの伸長促進及び、増殖抑制等、Nerve Growth factor 同様の作用をする。また、ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 細胞においてもガングリオシド GM3 は、マクロファージへと分化誘導し細胞増殖を抑制することはよく知られており、ガングリオシドと細胞増殖、分化は、密接に関連しているものと思われる。我々は、以前より TPA などの発ガンプロモーターなどによる分化の作用機作がよく調べられており、また、ガングリオシドの合成系も明らかになっている HL-60 細胞を用い、分化誘導過程におけるガングリオシドの役割りについて調べてきた。その結果、HL-60細胞は、TPA、テレオシジン、メゼレインなどの C- キナーゼ活性化物質によりマクロファージへと分化誘導される際、ガングリオシド GM3 が著名に増大すること、また、その GM3 の合成促進は、GM3合成酵素である LacCer シアル酸転移酵素の活性化によることが判明している。今回我々は、同酵素の活性化にキナーゼが関与しているかどうか、また、キナーゼが関与しているならば、どのように関与しているかをキナーゼ阻害剤である K252a、また、たんぱく合成阻害剤であるサイクロヘキシミドを用いて調べた。

材料と方法

1) ガングリオシド GM3 の抽出および同定

HL-60 細胞は、10%FCS を含む RPMI 1640 培地で継代培養した。10ng/ml TPA 及び、各試薬を添加し、2 日間培養した細胞をクロロホルム：メタノールで抽出し、DEAE-Cellulose カラムで酸性糖脂質を分離した後、薄層クロマトグラフィーにて、ガングリオシドを解析した。

2) シアル酸転移酵素の測定

10ng/ml TPA および、各試薬を添加し、15時間培養した細胞の 700g ホモジネートを酵素液とし、CMP-[³H]シアル酸と、シアル酸の受容体である CDH を加え、37°C で 1 時間反応させ、Sep-Pak を用いて脂質画分を分離し、反応生成物である [³H] GM3 を液体シンチレーションカウンターで測定した。

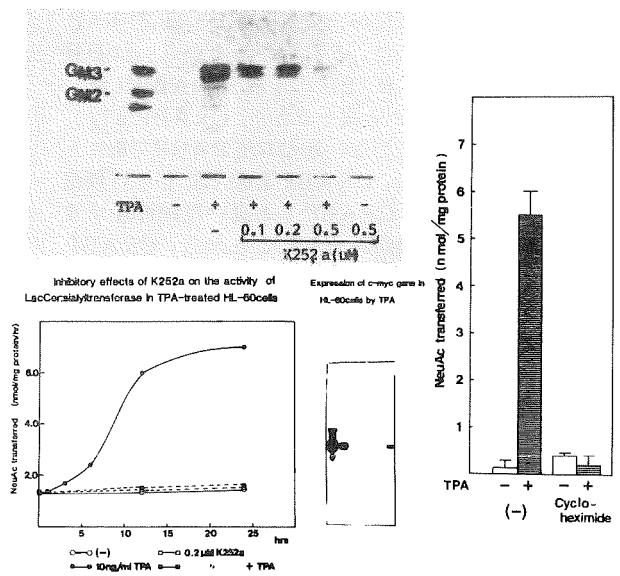
結 果

HL-60 細胞に TPA と同時に K252a を加えると、TPA によるマクロファージへの分化誘導は、濃度依存的に抑制されており、また、TPA による細胞増殖

の抑制も阻害されていた。また、TPA による GM3 の合成促進も K252a を 100nM-200nM 添加することにより抑制されていた (Fig.1)。その GM3 の合成抑制は GM3 合成酵素である LacCer シアル酸転移酵素の不活性化によるものであることが判明し、その時間的経過は、TPA による myc 遺伝子の発現抑制の時間的経過とほぼ一致していた (Fig.2)。また、更に、同酵素の活性化に必要なキナーゼが、直接同酵素をリン酸化しているのかどうかを調べるため、たんぱく合成阻害剤であるサイクロヘキシミド (5μM) で前処理した細胞を用いて同様の実験を行ったところ TPA による同酵素の活性化は、抑制されていた (Fig.3)。

考 察

K252a は、C-キナーゼだけでなく、各種 cyclic nucleotide dependent kinase にたいしても同程度に阻害作用を持つことから、HL-60 細胞における TPA による GM3 合成酵素の活性化には、C-キナーゼのほかにも K252a で阻害されるキナーゼが関与している可能性が示唆された。さらに、サイクロヘキシミドを用いた実験により、同酵素の活性化は、直接のリン酸化によるものではなく、他のタンパク、例えば、AP-1 のような転写レベルを調節するタンパクを活性化することにより、同酵素の転写を調節するためである可能性が示唆された。



II 研究業績

ニワトリ胚に存在する 新たなレチノイン酸結合タンパク質 (CRABP II)

北本 年弘, 桃井 隆

レチノイン酸は, *in vitro* でテラトカルシノーマ幹細胞などの分化を誘導することが知られていたが, 最近ニワトリ胚芽の形態形成因子であることが明らかになり, *in vitro* の発生過程での役割についても注目され始めている。細胞内レチノイン酸結合タンパク質 (CRABP) は, 細胞質から核へレチノイン酸を輸送するキャリア蛋白として, レチノイン酸の作用発現に関与するとき考えられている。今回我々は, ニワトリ胚中に, 新たな CRABP を見だし, その諸性質と胚における分布を明らかにした。

材料と方法

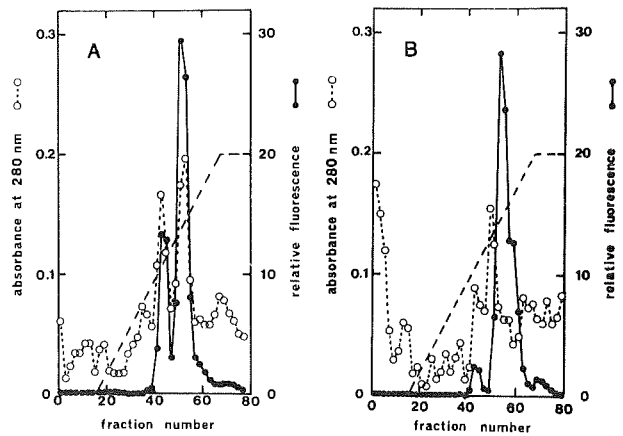
材料として, 38°C でふ卵した白色レグホンの胚を用いた。イムノブロッティングの発色は, パーオキシターゼ結合プロテイン A およびクロロナフトールを用いておこなった。

結果と考察

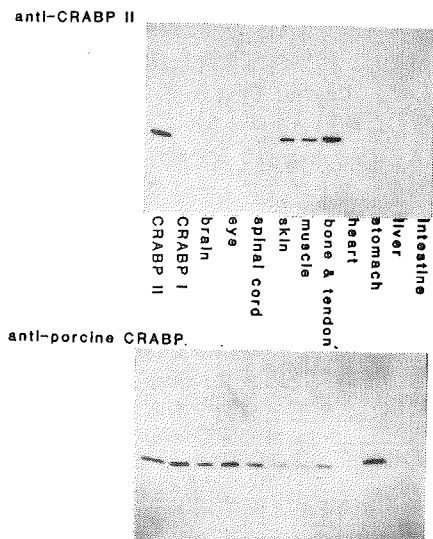
ニワトリ14日胚より調整した CRABP をふくむ画分を, DEAE-セルロースカラムにかけるとレチノイン酸結合活性が2つに分離した(図1)。それぞれ CRABP I, CRABP II と名づけ精製を行った。SDS-PAGE 下で両者は異なる分子量を示し, CRABP I は15.8 kDa, CRABP II は16.2 kDa であった。前者の分子量および精製過程での挙動は, 成鳥こう丸 CRABP と区別できなかった。また, 抗ブタこう丸 CRABP は, CRABP I, CRABP II, 成鳥こう丸 CRABP のどれとも反応したが, 抗 CRABP II は, CRABP II に特異的であった。これらのことから, 14日胚に存在する2つの CRABP のうち, CRABP I は, 成鳥こう丸 CRABP と同一であり, CRABP II は, 成鳥こう丸には存在しない新たな CRABP であると考えられた。さらに, CRABP II のN端より36残基のアミノ酸配列は, CRABP I と高い相同性を示すものの6ヶ所で置換がみられたことから, CRABP II は, CRABP I の修飾産物ではなく, 両者は異なる遺伝子に由来すると結論された。

CRABP II に対する特異抗体を用いたイムノブロッティングにより, CRABP II は, 14日胚のみならず, より初期の胚にも存在することが明らかになった。特に初期胚の胚芽に豊富に存在することから, 胚芽の形態形成に重要な役割を果たしていると思われる。一方, 成鳥の各組織には, 調べた範囲では CRABP II は検出されなかった。CRABP II は, 胚特異的なタンパク質である可能性が示唆された。また,

14日胚の組織を検索すると CRABP II は, 神経系や内臓では検出されず, 皮膚, 筋肉, 骨でのみ見いだされた(図2)。一方, 14日胚の脳, 眼, 脊髄, 砂のうなどでは CRABP II 以外の CRABP も発現しており, 複数の CRABP は, 相補的にあるいは, 協同的に働いて組織形成に関与していると考えられた。



Presence of CRABP II in tissues of 14-day embryo



Duncheon 型および Becker 型筋ジストロフィーの遺伝子診断

新本美智枝, 楊 瑞成, 大島章弘, 鈴木義之

これまでに我々は Duchenne 型と Becker 型筋ジストロフィー (DMD, BMD) の病態を, X 染色体由来の多型プローブを用いて解析してきたが, 今年度は更にジストロフィン cDNA をプローブとして用いた検索を行なった。

材料と方法

ジストロフィン cDNA は American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。この 14kb の DNA は 6 種の断片としてプラスミドに挿入されており, このプローブをそのまま用いた。患者ならびにその家族より得られた DNA は, 制限酵素 EcoRI または HindIII で切断後, サザンブロット法により検出した(1)。又一部の症例では, 制限酵素 SfiI で切断後, パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) により解析を行なった(2)。

結果

DMD の 27 家系について, 6 種の cDNA に対する欠失の有無を検討した。9 家系において確実な欠失が見出された (図)。ATCC の命名法による染色体中心側断片 57666, 57668 に対して欠失が集中していたが, 他の部位にも欠失は認められた。BMD9 家系の調査では, より末端側のプローブ 57674 に対する HindIII 断片のうち, 10kb のバンドの欠失が 5 家系に共通に認められた。今回調べた限りでは, 他のプローブに対する欠失を認めた症例はなかった。

さらにジストロフィン遺伝子座の外にある DNA プローブ 754 に対して欠失を示していた非定型的な筋ジストロフィー症例の欠失の範囲を明らかにする目的で, PFGE 分析を行なった。やはりプローブ 754 に対するバンドは検出されず, また cDNA 中心側プローブ 57666 により得られたバンドの大きさは, 正常人で 850kb であるのに対し, この患者では 700kb となっていた。

考察と結論

ジストロフィン cDNA をプローブとして用いた場合, DMD 患者の約半数に欠失を認めたとの報告がある(3)。我々の今回の分析では, DMD の 1/3 に欠失が発見されたことになる。小さい欠失は検出されなかった可能性もあるが, 日本人における大きな欠失の頻度は, 今後十分に検討されねばならない。DMD

においては欠失頻度の高い場所があることは, 他の報告(3)とも一致する。BMD における欠失が一定の場所に集中していたことの意義は不明であるが, DMD にもおなじ部位の欠失例があり, 臨床像との相関についての結論を下すには, 更に詳細な分析が必要であると考えられた。

しかしどの症例についても、大きな欠失の存在はそのままジストロフィン遺伝子の変異の直接の確認となるわけであり, 臨床診断上, 大きな意味を持つ所見である。今後発端者の診断への応用が可能となるものと期待される。

ジストロフィン遺伝子の 5' 側上流に大きな欠失を持つ特殊な症例のデータは, この遺伝子の細胞内における機能発現との関係を知る上に貴重である。単に遺伝子機能が発現していないというだけでは, この症例の特殊な臨床像は説明が困難である。更に検討を加えていきたい。

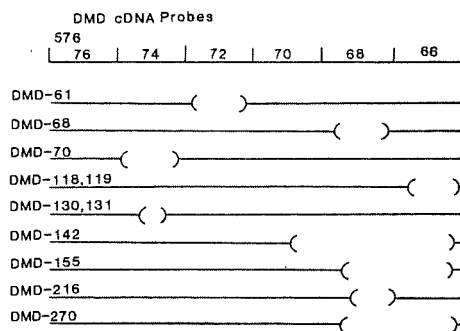
文献

- (1) Shimmoto M, Tsuji A, Suzuki Y: Jpn J Hum Genet 33: 333-338, 1988
- (2) Kenwick S, Patterson M, Speer A, Fischbeck K, Davies K: Cell 48: 351-357, 1987
- (3) Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM: Cell 50: 509-517, 1987

図の説明

欠失の認められた症例の欠失部位

欠失範囲をカッコで示した。プローブは染色体上中心側 (図の右側) より遠位側 (図の左側) に向かって 57666, 57668, 57670, 57672, 57674 と命名されている。



7. 疾病研究第6部

1. 研究部一年の歩み

疾病研究第6部は脱髄疾患，老年期痴呆を中心に神経免疫学的，生化学的，分子生物学的手法を用いて研究している。脱髄疾患の研究は実験的アレルギー性脳脊髄炎，多発性硬化症，HAM について発症機序の解明，治療法開発の研究を行なっている。また老年期痴呆の研究室は昭和63年10月より2室となり，老人斑アミロイドの形成機序，アルツハイマー病遺伝子，神経栄養賦活因子，ダウン症のモデルである16トリソミーマウス，脳の老化と免疫の研究を行なっている。63年度の研究に以下の人員が参加した。

[部長] 田平 武，[室長] 西澤正豊，国下龍英，高橋慶吉，[流動研究員] 亀谷雅洋，宇宿功市郎，Ramon S. Javier，本山和徳（ヒューマンサイエンス財団），[併任研究員] 小山内たか，永田頌史，富英明，[客員研究員] 新島健司，[賃金研究員] 二瓶淳子，大八木保政，[研究生] 佐藤準一，米沢美保子，得地史郎，[賃金研究助手] 沓掛友理子，田平順子。この他，津田塾大生が数名アルバイトとして英文タイプなどの研究補助を行なった。

今年度もヒューマンサイエンス振興財団の受託研究がひき続き行なわれ，エーザイ，藤沢薬品工業と共同研究をした。また本年度より厚生科学研究補助金による痴呆疾患対策事業「痴呆疾患の神経病理学的・生化学的研究」（班長：田平）が始まった。また，同事業による日米共同研究「アルツハイマー病の遺伝学的研究」がスタートし，田平が米国 NIH，NIMH に短期派遣され，遠藤真澄が米国 NIA，Laboratory of Neuroscience（Chief：Stanley I. Rapoport）に長期派遣された。更に NIH grant による“自己免疫と人種差”に関する国際共同研究（主任：スタンフォード大学 Lawrence Steinman 助教授）が始まった。以下に今年度の研究成果を要約する。

- 1) C3Hマウスのプロテオリピッドアポ蛋白の脳炎決定基を決定した。
- 2) ミエリン塩基性蛋白特異的T細胞クローンのアロ反応性を検討した。
- 3) フィリピンで現在も用いられている旧型狂犬病ワクチン中に自己免疫性脳炎活性物質を証明した。
- 4) 自己免疫疾患に有効な新薬のスクリーニングを行ない，アクチノボリン，バクトボラミン，FK-506などのいくつかの有効な薬剤を見い出した。
- 5) HAM患者由来T細胞株の樹立と解析を行なった。
- 6) インターロイキン3がコリン作動性ニューロンの栄養賦活因子となることを見い出した。
- 7) 16トリソミーキメラマウスの作製に成功し，16トリソミーマウスの中隔野ニューロンが β -NGFに低反応性を示すことを見い出した。
- 8) 家族性アルツハイマー病の一家系多数よりB細胞株を樹立した。

（部長 田平 武）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

1) Tabira T :

Autoimmune demyelination in the central nervous system

Ann N Y Acad Sci 540 : 187-201, 1988

2) Tabira T, Endoh M, Satoh J, Yamamura T, Kunishita T :

Experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid apoprotein

Neuroimmunological Diseases, ed by A. Igata, University of Tokyo Press 175-180, 1988

3) Tabira T, Yamamura T, Yao D L, Satoh J :

Recent progress in treatment of autoimmune encephalomyelitis using animal models

idem 393-398, 1988

4) Ohara S, Ohama E, Takahashi H, Ikuta F, Nishizawa M, Tanaka K, Miyatake T :

Alterations of oligodendrocytes and demyelination in the spinal cord of patients with mitochondrial encephalomyopathy

J Neurol Sci 86 : 19-29, 1988

5) 大原博司, 大浜栄作, 生田 弘, 西澤正豊, 桑原武夫 :

MELAS(Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke like episode)

の剖検例

臨床神経 28 : 303-310, 1988

6) 米田 誠, 西澤正豊, 原山尋美, 渥美哲至, 宮武 正 :

Machado-Joseph 病の前頭筋 dystonia

臨床神経 28 : 507-511, 1988

7) Ueno T, Takahashi K, Matsuguchi T, Endo H, Yamamoto M :

Transcriptional deviation of the rat insulin-like growth factor II gene initiated at three alternative leader-exons between neonatal tissues and ascites hepatomas

Biochim Biophys Acta 950 : 411-419, 1988

8) Ueno T, Takahashi K, Matsuguchi T, Ikejiri K, Endo H, Yamamoto M :

Reactivation of rat insulin-like growth factor II gene during hepatocarcinogenesis

Carcinogenesis 9 : 1779-1783, 1988

II 研究業績

- 9) Matsuguchi T, Takahashi K, Ueno T, Endo H, Yamamoto M :

A novel transcription unit within the exon sequence of the rat insulin like growth factor II gene

Biochem Internat 18 : 71-79, 1989

- 10) Ordinario AT, Tabira T :

15 autopsied cases of concentric sclerosis (Baló) seen in the Philippines

ICMR Ann 7 : 139-148, 1987

- 11) Kamegai M, Kunishita T, Tokuchi F, Nishizawa M, Tabira T :

Interleukin-3 promotes neurite outgrowth and elevates choline acetyltransferase activity in vitro

Proc Japan Acad 65 : 17-20, 1989

- 12) Koike F, Pálffy G, Kunishita T, Yoshida M, Tabira T :

Absence of antibodies to HTLV-I in sera from patients with multiple sclerosis

Acta Neurol Scand 78 : 177-180, 1988

- 13) Satoh J, Koike F, Tabira T :

Experimental allergic encephalomyelitis mediated by murine encephalitogenic T-cell lines specific for myelin proteolipid apoprotein

Ann N Y Acad Sci 540 : 343-344, 1988

b. 著 書

- 1) 田平 武 :

老人性痴呆の発症機構：老人斑アミロイド

老人性痴呆症と脳機能改善薬（朝長正徳，斎藤 洋編），シーエムシー，東京，p69-75, 1988

- 2) 田平 武，後藤幾生 :

感染性疾患

診療内科学（阿部 裕，塩川優一編），金原出版，東京，p846-854, 1989

c. 総 説

- 1) 田平 武 :

重症筋無力症の病態発症機構

Med Immunol 15 : 528-530, 1988

- 2) 田平 武 :

多発性硬化症：髄液オリゴクローナル IgG バンドの診断的有用性

Clin Immunol Letter 7 : 163-167, 1988

3) 田平 武 :

実験的アレルギー性脳脊髄炎の発症機構—自己免疫疾患の特異的免疫療法開発に向けて

医学のあゆみ 145 : 318-322, 1988

4) 田平 武 :

病態疾患別の management と薬物療法：脱髄疾患

臨床医 14, 702-703, 1988

5) 田平 武 :

診断基準とその使い方：多発性硬化症

Medicina 25, 2220-2222, 1988

6) 田平 武 :

アニュアルレビュー：神経免疫

神経科学レビュー 2, 322-330, 1988

7) 田平 武 :

HIV 感染症の精神・神経学的側面

エイズジャーナル 1 : 455-463, 1988

8) 田平 武 :

デビック病の治療

日本医事新報 3379 : 132-133, 1989

9) 田平 武 :

HAM の鑑別診断

臨床神経 28 : 1379-1381, 1989

10) 田平 武, 西澤正豊 :

老年痴呆の免疫学的研究

神経進歩 32 : 1005-1010, 1988

11) 得地史郎, 田平 武 :

実験的アレルギー性脳脊髄炎の発症機構

Med Immunol 17 : 185-189, 1989

12) 吉良潤一, 田平 武 :

II 研究業績

Fabry 病一典型例と部分酵素欠損例からの自律神経機能異常の考察

神経進歩 33 : 303-311, 1989

13) 西澤正豊 :

診断基準とその使い方 : Sialidosis

Medicina 25 : 1968-1969, 1988

d. 班会議報告書

1) 田平 武, 橘 真郎, 森 襄, 加藤元博 :

生体防御機構と脳内特異蛋白および神経特異物質の機能に関する研究

ヒューマンサイエンス振興財団・長寿関連基礎科学研究事業, 健康保持の基礎としての生体防御機構の解明, 官民共同プロジェクト研究報告書, 235-243, 1988

2) 田平 武, 小池文彦, 西澤正豊, 国下龍英 :

ギラン・バレー症候群における HTLV-I 抗体の検索

厚生省精神・神経疾患・ニューロパチーの成因及び治療に関する研究班, 昭和62年度研究報告書, 44-47, 1988

3) 田平 武, 遠藤真澄, 国下龍英 :

プロテオリピッドアポ蛋白の抗原決定基の検討

厚生省神経疾患・ミエロパチーの病態と発症機構に関する研究班, 昭和62年度研究報告書, 58-63, 1988

4) 田平 武, Yao D-L, 山村 隆, 青柳高明 :

バクトボリンの EAE 予防治療効果

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 昭和62年度研究報告書, 107-109, 1988

5) 田平 武, 佐藤準一, 国下龍英 :

L3T4 モノクローナル抗体による EAE の抑制

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 昭和62年度研究報告書, 110-113, 1988

6) 田平 武, 小池文彦, 国下龍英 :

多発性硬化症における抗 HTLV-I 抗体の検索

多発性硬化症の成因に関する研究 : ヒト・レトロウイルスの探索, 昭和62年度研究成果報告書, 18-24, 1988

7) 田平 武, 小池文彦, 国下龍英, 西澤正豊 :

脱髄性疾患における抗 HTLV-I 抗体の検索

厚生省神経疾患・レトロウイルスによる神経障害発現の機序に関する研究班，昭和62年度研究報告書，20-23，1988

8) 田平 武，国下龍英，小池文彦：

老人斑アミロイド前駆物質の検索(3)

厚生省神経疾患・老年期の痴呆の病因，病態，治療に関する総合研究班，昭和62年度研究報告書，190-194，1988

9) 田平 武，本山和徳，西澤正豊，姚 大林：

自己免疫性脳脊髄炎・神経炎の治療薬開発

厚生省新薬開発・自己免疫疾患患者治療薬の開発研究班，昭和62年度研究報告書，57-65，1988

10) 西澤正豊，本山和徳，酒井宏一郎，田平 武：

神経疾患の発症における免疫応答遺伝子の役割の解明—自己免疫性脳炎誘起性T細胞クローンの活性化における免疫応答遺伝子の役割—

厚生省精神・神経疾患・遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究班，昭和62年度研究報告書，73-78，1988

e. その他

1) 田平 武：

「疾患からみた神経回路網」（豊倉康夫，岩田 誠編）を読んで

医学のあゆみ 147：774，1988

2) 濱口勝彦，田平 武，高守正治，佐藤 猛：

神経疾患と免疫応答の相互関係

Clin Neurosci 7：196-209，1989

B. 学会発表

a. 特別講演，シンポジウム

1) 田平 武：

HAMの鑑別診断（シンポジウム：レトロウイルスと神経疾患-HTLV-I associated myelopathyを中心に）

第21回日本神経学会総会，東京，5.26，1988

2) 田平 武：

脳免疫系相関と免疫性中枢神経疾患

II 研究業績

第12回神経科学学術集会シンポジウム, 名古屋, 12. 8. 1988

b. 国際学会

- 1) Yamauchi T, Hiraiwa M, Tsuji S, Uda Y, Nishizawa M, Miyatake T :
Characterization of sialidase and β -galactosidase in galactosialidosis liver
39th Annual Meeting Am Soc Hum Genet, New Orleans, Oct. 12, 1988

c. 一般学会

- 1) 田平 武, 遠藤真澄, 国下龍英, 西澤正豊 :
プロテオリピッドアポ蛋白による実験的アレルギー性脳脊髄炎
第29回日本神経病理学会総会, 仙台, 5.19, 1988
- 2) 小池文彦, 国下龍英, G. Palffy, 吉田光昭, 田平 武 :
多発性硬化症における抗 HTLV-I 抗体の検索
第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988
- 3) 亀谷雅洋, 国下龍英, 田平 武 :
完全無血清培地を用いたマウスコリン作動性ニューロン栄養因子スクリーニング法の確立
同上 東京, 5.26, 1988
- 4) 本山和徳, 西澤正豊, 亀谷雅洋, 田平 武 :
自己免疫性脳炎誘起性 T 細胞クローンの活性化機序に関する検討
同上 東京, 5.27, 1988
- 5) 辻 省次, 山内豊明, 平岩雅男, 磯辺俊明, 奥山典生, 西澤正豊, 崎村建司, 高橋康夫, 宇田 裕,
宮武 正 :
Unique oligonucleotide を用いたヒトシアリダーゼ46K タンパクの cDNA クローニング
第11回日本分子生物学会年會, 東京, 12.20, 1988
- 6) 池尻公二, 上野孝毅, 松口徹也, 高橋慶吉, 山本三毅夫, 遠藤英也 :
癌におけるラットインスリン様増殖因子 II の発現特異性について
第47回日本癌学会総会, 東京, 9.20, 1988
- 7) 中牟田誠, 古市正人, 高橋慶吉, 山本三毅夫, 遠藤英也 :
ラット内在性レトロウイルスの同定と癌における選択的発現
同上
- 8) 松口徹也, 高橋慶吉, 上野孝毅, 遠藤英也, 山本三毅夫 :
ラットインシュリン様増殖因子 II のエクソン配列内に存在する独立転写単位の解析

第11回日本分子生物学会年会，東京，12.20，1988

- 9) 池尻公二，山本三毅夫，上野孝毅，松口徹也，高橋慶吉，遠藤英也：

ラットインスリン様増殖因子Ⅱ遺伝子全領域の解析

同上

C. 班会議発表

- 1) 田平 武，小川利一：

自然発症自己免疫性末梢神経障害の動物モデルの検討(1)

厚生省精神・神経疾患研究委託費 ニューロパチーの成因及び治療に関する研究班，東京，

1.19，1989

- 2) 田平 武，本山和徳，田平順子，西澤正豊，宇宿功市郎：

自己免疫性脳脊髄炎，神経炎の治療薬開発

新薬開発青柳班第5回総会，東京，3.17，1989

- 3) 田平 武：

免疫系による神経障害機序と修復機序

ヒューマンサイエンス振興財団官民共同プロジェクト研究成果発表会，東京，1.27，1989

- 4) 西澤正豊：

自己免疫性脳炎誘起性T細胞クローンの活性化機序について

厚生省精神・神経疾患・遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究班，昭和63年度班会議，

大阪，9.19，1988

- 5) 西澤正豊，遠藤真澄，小山内たか，国下龍英，田平 武：

Proteolipid apoprotein(PLP)による自己免疫性脳脊髄炎起炎部位の決定

厚生省精神・神経疾患研究委託費ミエロパチーの発現機序と病因に関する研究班会議，東京，

1.14，1989

- 6) 宮武 正，辻 省次，山内豊明，平岩雅男，西澤正豊，宇田 裕：

シアリドーシスの生化学的研究

文部省重点領域・運動系の分子生物機構，運動系の分子遺伝生物学的アプローチ，東京，

12.14，1988

- 7) 西澤正豊，本山和徳，二瓶淳子，得地史郎，田平 武：

自己免疫性神経疾患感受性を制御する免疫応答遺伝子—自己免疫性脳脊髄炎誘起性T細胞クローン

II 研究業績

の活性化とクラス II 分子一

厚生省精神・神経疾患・遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究班，昭和63年度班会議，
東京，1.25, 1989

8) 西澤正豊，花岡和則，亀谷雅洋，田平 武：

ダウン症の動物モデル：16トリソミマウスの研究

厚生省痴呆疾患対策調査研究事業 1988 年度研究発表会，東京，2.17, 1989

9) 亀谷雅洋，国下龍英，西澤正豊，田平 武：

マウスコリン作動性ニューロンにおける IL-3 の効果について

厚生省痴呆疾患対策調査研究事業 1988 年度研究発表会，東京，2.17, 1989

10) 田平 武，亀谷雅洋，国下龍英：

生体防御機構と脳内特異蛋白および神経特異物質の機能に関する研究—サイトカインの神経栄養作用—

昭和63年度ヒューマンサイエンス研究成果発表会，東京，1.20, 1989

11) Ramon S, Javier，国下龍英，田平 武：

狂犬病ワクチンによる自己免疫性脳炎

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班，昭和63年度研究班会議，東京，1.20, 1989

12) 本山和徳，二瓶淳子，得地史郎，亀谷雅洋，西澤正豊，田平 武：

EAE effector clone の活性化におけるクラス II 抗原の役割

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班，昭和63年度研究班会議，東京，1.20, 1989

13) 宇宿功市郎，西澤正豊，田平 武：

HAM 患者髄液・末梢血由来 T 細胞株の樹立とその解析

厚生省精神・神経疾患研究 レトロウイルスによる神経障害発現の機序に関する研究，東京，
2.16, 1989

14) 富 英明，春原経彦，亀谷雅洋，国下龍英，田平 武：

完全無血清合成培地を用いたマウス胎児脳神経培養細胞の発育

厚生省シルバーサイエンス総合的研究発表会，名古屋，2.10, 1989

D. 研究発表会など

1) 田平 武：

神経研究所10周年記念講演会，東京，10.4, 1988

2) 田平 武 :

HAMに関するWHO鹿児島ミーティング(オブザーバー), 鹿児島, 12.10-13, 1988

3) 田平 武 :

痴呆性疾患と免疫

テレビ医学研究講座, テレビ東京, 1.14, 1989

4) 田平 武 :

痴呆の病因に関する研究の現状と課題

昭和63年度痴呆性老人保健医療指導者研修, 埼玉, 1.31, 1989

3. 主な研究報告

EAE effector clone の活性化におけるクラス II 抗原の役割

本山和徳, 西澤正豊, 二瓶淳子, 田平 武

自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は主要組織適合性複合体 (MHC, マウスでは H-2) クラス II の拘束を受け, 起炎性抗原決定基に特異的に応答する CD4⁺ T 細胞 clone により mediate される。この EAE effector clone の transfer により EAE を誘起する場合にはあらかじめ in vitro での clone の活性化が必要とされる。当部で SJL/J(H-2^S) より樹立されたミエリン塩基性蛋白 (MBP) に特異的な起炎性 clone 4b. 14a は in vitro で抗原が存在しなくてもアロの Ia^k 抗原提示細胞 (APC) のみにより活性化され, EAE を transfer することができる。そこで (SJL/J × CBA/J) F₁ (H-2^{S/k}) に 4b. 14a を transfer する受身 EAE の実験系を作成し, 起炎性 clone の in vivo における活性化の機序, 特に EAE の発症, 再燃におけるアロ MHC の役割について検討した。

方法

受身 EAE は resting, あるいは MBP と SJL APC の存在下で 3 日間培養して活性化した 4b. 14a を 350 R の X 線照射を加えたマウスの尾静脈に注入して誘発し, 臨床症状は 6 段階で評価した。F₁ APC の抗原提示能は常法により [³H]-thymidine の取り込みから求めた。また, 移入後 5 日目にマウス脾細胞を得, 4b. 14a の認識部位である MBP peptide 89-101 に対する反応性を同様の方法により調べた。

結果

4b. 14a を resting で transfer した場合には SJL でも F₁ でも EAE は発症し得なかった。一方, 活性化した clone では SJL は全例 paraplegia を呈したのに対して, F₁ ではやはり EAE は誘発されなかった (表 1)。F₁ マウスにおいては I-A^S, Ia^k は共に発現しており, in vitro では F₁ の APC は 4b. 14a に対し Ia^k も MBP も提示することができた。clone の transfer 5 日後の脾細胞には SJL では MBP 89-101 に対する反応がみられた。一方, F₁ では MBP の非存在下で SJL よりも有意に高い応答がみられたのに対し, MBP に特異的な応答は認められなかった (表 2)。

考察

起炎性 clone の持つアロ H-2 反応性を利用して, I-A^S 拘束性, Ia^k アロ反応性の clone を H-2^{S/k} の F₁ に transfer することにより, in vivo における起炎性

clone の活性化を実証しようと試みたが, resting clone の場合のみならず, 活性化した clone でもこの F₁ は EAE に抵抗性を示し, アロ H-2 の役割を確かめることはできなかった。

このような感受性と抵抗性の strain 間の F₁ では発現する H-2 の dominance や in vivo で実際の炎症の場となる中枢神経系に誘導される Ia 陽性の APC の H-2 拘束性が重要とされるが, 今回の F₁ では従来の例と異なり transfer された clone の末梢での増殖がすでに active に抑制されている可能性が考えられる。その機序として F₁ では anti-clonal な反応がすみやかに誘導されている可能性が示唆され, さらに検討を加えている。

文献

- (1) Sakai K, Namikawa T, Kunishita T, Yamanouchi K, Tabira T: J Immunol 137: 1527-1531, 1986
- (2) Sakai K, Tabira T, Kunishita T: Eur J Immunol 17: 955-960, 1987

表 1
EAE INDUCED BY PASSIVE TRANSFER OF CLONE 4b. 14a

Condition	Cell number	Recipient	No. with clinical EAE	Maximum severity*
resting	1 × 10 ⁷	SJL/J	0 / 2	—
	1.2 × 10 ⁷	(SJL × CBA)F ₁	0 / 2	—
activated	1.2 × 10 ⁷	SJL/J	4 / 4	4.3 ± 0.5
	1 × 10 ⁷	(SJL × CBA)F ₁	0 / 4	—
	1 × 10 ⁷	(SJL × CBA)F ₁ **	0 / 2	—

Clone 4b.14a either in resting state or activated with MBP + I-A^S APC was transferred i. v. to 350 R-irradiated recipient mice.
*Clinical grading of EAE by arbitrary score 0-5 (mean ± S.D.)
**800 or 1000 R irradiation

表 2
PROLIFERATIVE RESPONSES TO MBP OR MBP PEPTIDE 89-101 OF SPLEEN CELLS FROM MICE RECEIVING TRANSFER OF THE CLONE 4b. 14a

Source spleen cells	Days after transfer	[³ H]-thymidine uptake (cpm × 10 ⁻³) stimulation with		
		none	MBP	MBP peptide
SJL/J	5	22.0 ± 5.8	51.8 ± 4.1	61.6 ± 5.6
(SJL × CBA)F ₁	5	66.7 ± 2.0	60.6 ± 4.4	64.9 ± 2.4
(SJL × CBA)F ₁ *	-	21.0 ± 5.6	21.5 ± 5.0	26.4 ± 2.2

Spleen cells were obtained 5 days after iv transfer of activated clone 4b.14a (5 × 10⁶ cells). Spleen cells (8 × 10⁵ / well) were cultured with MBP (50 μg/ml) or MBP peptide 89-101 (25 μg/ml) in 96-well microtiter plates. Data were shown as mean ± S. D. of triplicate assays.
F₁ *: F₁ to which clone 4b.14a was not transferred

HAM患者髄液・末梢血リンパ球由来T細胞株の樹立とその解析

宇宿功市郎, 西澤正豊, 田平 武, 栄楽信隆*, 納 光弘*

HTLV-I-associated myelopathy(HAM)¹⁾では, *in vitro*で抗原なしで末梢血リンパ球が自己増殖する反応(APR)²⁾が報告されている。本研究は患者髄液及び末梢血よりT細胞株を樹立し, APRの本態を解析することを目的とした。またHTLV-I感染T細胞株ではいくつかのリンホカイン産生が報告されており, 樹立されたT細胞株でのLymphotoxin (LT)産生, interferon- γ (IFN- γ)産生を併せて検索した。

患者は54歳, 59歳の女性。T細胞株の樹立はMorretaの方法によった。得られたT細胞株は, FACStarによるマーカー検索, 間接蛍光法によるHTLV-I抗原・陽性率の検索を行い, T細胞株の増殖反応の系(5日間培養, ³H-TdR取り込み)では, IL-2のみに対する反応, 自己単核球に対する応答, 自己マクロファージ存在下にモルモットBP(20 μ g/ml), ウシPLP(10 μ g/ml)に対する応答を検討した。LT, IFN- γ はL929細胞を用いたbioassayで測定した。

$3 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 以上となったT細胞株は55株得られた(表1)。調べた26株中23株はIL-2のみで株として維持ができ, このうち20株は自己増殖を, 3株は自己単核球添加でより強い増殖を示した。IL-2のみでは維持できないが自己単核球に反応する株は26株中3株みられた。以上計6株が自己単核球に対し増殖応答を示したが, その応答は加えたCD4⁺T細胞; CD8⁺T細胞, B細胞, マクロファージによって応答の程度に差がみられた(表2)。モルモットBP, ウシPLPに反応を示したT細胞株は見られなかった。LTは5-125U/ml/10⁶ cellsの範囲, IFN- γ は2.3-112.5U/ml/10⁶ cellsの範囲で認められた。LT産生はgag⁺株に多く(p<0.01), IFN- γ 産生はgagに多かった(p<0.05)。

IL-2なしで短期に自己増殖する株は20株見られ, 自己単核球に対して増殖応答を示した株は6株見られた。CD4⁺T細胞に反応した株はこの細胞上のHTLV-I抗原に反応した可能性が強い。程度の差はあっても全てに反応した株が見られたが, CD8⁺T細胞はHTLV-I抗原が陰性と考えられるので, これ

らの株はHTLV-I以外の自己抗原に反応しているものと考えた。以上のようにHAM患者髄液・末梢血リンパ球中には抗原刺激なしで短期に自己増殖する集団, HTLV-I抗原に対し応答する集団, 自己単核球に反応し増殖する集団の少なくとも3つが存在し, これらがAPRの一部を構成しているものと考えた。今回の検索ではBP, PLPに反応する株はなかった。これはHAMの本態がこれらの抗原に対する自己免疫反応でない可能性を示唆しているが, 用いたBPがモルモット由来であったこと, BP・PLPに反応するT細胞が株化されなかった可能性, BP・PLP以外の自己抗原が存在する可能性を考えると, 自己免疫を否定できない。またLT・IFN- γ を産生する株がみられたが, これらがHAMの病像を修飾している可能性も考えられた。

- (1) Osame M, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Tara M, Igata A : Ann Neurol 21 : 117-122, 1987
- (2) Usuku K, Sonoda S, Osame M, Yashiki S, Takahashi K, Matsumoto M, Sawada T, Tsuji K, Tara M, Igata A : Ann Neurol 23 : S 143-S 150, 1988

表1
Phenotypes and HTLV-I Ag expression of T cell lines

phenotype	No of lines	No of HTLV-1 Ag (+) lines
CD4 ⁺ 4B4 ⁺	35	33
CD4 ⁺ 2H4 ⁺	1	0
CD4 ⁺ 2H4 ⁺ 4B4 ⁺	7	7
CD8 ⁺	8	0
CD4 ⁻ CD8 ⁻	4	2
	55	42

表2
Proliferative response against auto-PBMC

* marker	HTLV-I Ag (%)	stimulation index			
		CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	B	macrophage
1C6 - CD4 ⁺ 4B4 ⁺	19.5	4.85	7.55	4.15	8.15
2G3 - CD4 ⁺ 4B4 ⁺	27.7	2.17	1.03	1.16	1.13
3G9 - CD4 ⁺ 4B4 ⁺	22.0	2.15	1.07	1.61	1.19
5G6 + CD4 ⁺ 4B4 ⁺	44.3	3.27	4.86	0.98	3.22
3H11 + CD4 ⁺ 4B4 ⁺	34.0	4.80	7.18	5.50	23.10
4D4 + CD4 ⁺ 4B4 ⁺	5.0	2.53	1.02	2.63	1.26

* : autoproliiferation

狂犬病ワクチンによる自己免疫性脳炎

Ramon S. Javier, 国下龍英, 田平 武

Semple 狂犬病ワクチン (SRV) 接種後の脳炎やマヒの原因は、それに含まれる動物脳組織によるものと考えられている。そこで脳組織に含まれるミエリン塩基性蛋白 (MBP) に着目し、ワクチンに含まれる MBP 量の定量と、ワクチンの持つ実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) 惹起活性について検討を加えた¹⁾。

材料と方法

SRV はフィリピン製を用いた。この不活化ワクチンは 5% ヤギ脳 / 0.25% フェノール / 0.01% マーチオレートで構成されている。対照としてニワトリ胚組織培養不活化ワクチン (CEV: 化血研) を用いた。CEV は直接また SRV は PBS に対し透析してフェノールを除いた後、PBS に懸濁するか SDS に可溶化後、実験に供した。標準 MBP はウシ脊髄より調整し、抗体はウサギで作成した。MBP 定量はウエスタンブロット後免疫染色で行なった。ワクチンの感作にはハートレー系モルモットを用い、1 mg 結核死菌を含む 200 μ ICFA を後肢 foot pads に一回投与した。

結果

SRV は 1.715 mg/ml の蛋白を含んでいた。図 1 に示すように、電気泳動上 MBP に相当する場所にバンドが見られた。一方、CEV ではこの域にバンドは見い出せなかった。このことは MBP 抗体による免疫染色でも確認された (図 2)。SRV に含まれる MBP 量は 28 μ g/ml と算出され、これは総蛋白の 1.63% に相当した。20 μ g の MBP に相当する SRV 総蛋白 1.19 mg をモルモットに感作した結果、2/3 が EAE を発症した。1 mg の CEV で感作した群では EAE は見られなかった。組織学的には、脳脊髄幹の血管周囲及び髄膜下に強い細胞浸潤像を示した。

考察

MBP が種々の動物における EAE 惹起能を持つことは既に知られている。神経病理学的に類似性を持つワクチン接種脳炎 (PVE) において²⁾、MBP がその発症と関連を持つだろうことは容易に想像される。しかし、1987 年 PVE 患者の血清、髄液中で抗 BP 抗体、抗糖脂質抗体が上昇しているという報告がなされるまで、物質的なレベルでの検討はなされていなかった³⁾。今回 SRV に MBP が存在すること、SRV で EAE が発症することが初めて証明された。このことは、

PVE において細胞性免疫反応が主要な役割を果たしていることを示唆している。ただ、PVE で脱髄や慢性型も見られることから、他の脳由来の物質又はその抗体も発症に何らかの関連があるものと想像される。フィリピンでは SRV2-5ml を 14-16 回注射するので、MBP の総量は 150 mg 近くに達するものと考えられる。この研究のもう一つの意義はヤギ MBP がモルモットに起炎性を示すことを明らかにしたことである。

文献

- (1) Javier RS et al: J Neurol Sci 1989 (in press)
- (2) Shiraki H, Otani S: Allergic encephalomyelitis (Kies MW, Alvord EC eds) Springfield IL. Charles C. Thomas: pp58-129, 1959
- (3) Hemachudha T, Griffin DE, Griffels JJ, Johnson RT, Moser AB, Phanuphak P: N Engl J Med 316: 369-374, 1987

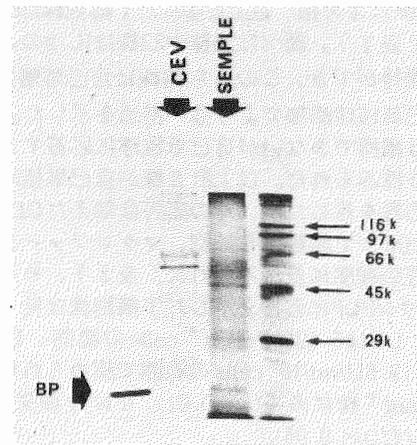


図 1 ワクチン蛋白の SDS-PAGE

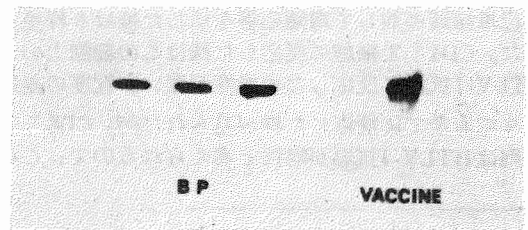


図 2 抗 MBP 抗体による免疫染色像

コリン作動性ニューロンに対するIL-3の効果

亀谷雅洋, 国下龍英, 得地史郎, 西澤正豊, 田平 武

近年アルツハイマー病でのコリン作動性ニューロンの変性, 脱落が明らかになり, Nerve Trophic Factorが注目されている。またアストロサイトよりNerve Growth Factorを始めとしてIL-1, IL-3など従来免疫系で作用したサイトカインが放出されることも明らかになり(1)(2)これらの中枢神経系での存在意義に興味もたれている。我々はマウスコリン作動性ニューロンの培養系を用い各種サイトカインの効果調べ, IL-3突起伸展効果とCholine Acetyltransferase (ChAT) 活性上昇効果があることを発見した。

方法 Primary culture

BALB/c胎生15日マウスの中隔野を単離しpoly-L-lysine処理したディッシュに神経突起観察用に 1×10^5 /ml, ChAT活性測定用に 6×10^5 /mlの濃度でまいた。基礎培地はダルベッコ改変イーグル培地とハムF-12を1:1としこれにトランスフェリン, インスリン, プロゲステロンなど約20種の物質を加え完全無血清合成培地とした。Suzumuraら(3)の方法により得たアストロサイト, ミクログリアを対照群とした。

Culture of cholinergic cell line

IL-3の効果がコリン作動性ニューロンへの直接作用であることを証明するため, Hammond, Wainerら(4)により作製され供与されたcholinergic hybridoma cell line SN 6. 10. 2. 2を用いPrimary cultureと同様の完全無血清合成培地にて培養し2日目にChAT活性を測定した。

Factors and antibody

10, 50, 100 U/ml recombinant human IL-3 (hIL-3), 10, 50, 100 U/ml highly purified mouse IL-3 (mIL-3), 26.4 U/ml recombinant human IL-1 α , 18.8 U/ml recombinant human IL-1 β , 20 U/ml recombinant tumor necrosis factor α , 10 U/ml recombinant mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor, 90 ng/ml recombinant human IL-6, 100 ng/ml β -NGF, 13.3 μ g/ml monoclonal anti-human IL-3 antibodyを培養開始時及び培地交換時に投与した。

突起伸展効果

突起保有細胞の割合は培養開始直後, 20時間, 40時間, 50時間後に測定した。

ChAT活性及びタンパク定量

ChAT活性はFonnum(5)の方法を一部変更し, 培養5日目に測定し, タンパク定量はLowry's methodを用いた。

結果

投与Factorの中でhIL-3, mIL-3がそれぞれ50, 100 U投与で50時間後に対照群の22%に対しhIL-3で46%, mIL-3で50%と約2倍の上昇を認めその結果はdose dependentであった。ChAT活性は β -NGF以上の活性を示しhIL-3で比活性357%, mIL-3で237%とhIL-3で特に高い傾向であった(Table 1)。これらIL-3の効果は抗IL-3抗体で抑制された(Table 1)。cholinergic hybridoma cell line SN6. 10. 2. 2に対するmIL-3の効果は比活性で184%と有意な上昇をみた(Table 2)。

考察

既にChAT活性の変動が神経組織の生育活性と相関することがわかっており, 今回の結果よりIL-3が直接コリン作動性ニューロンに作用したことが示唆されその効果は100 ng/ml β -NGF以上であった。Frei(2)らはアストロサイト由来のIL-3 like factorが脳内に存在している可能性を示唆している。本研究によりIL-3又はIL-3 like factorがin vivoにおけるコリン作動性ニューロンの生育, 変性修復に関与する可能性も示唆された。

Reference

- (1) Furukawa S, Furukawa Y, Satoyoshi E, Hayashi K: Biochem. Biophys. Res. Commun. 136, 57-63, 1986
- (2) Frei K, Stefan B, Schwerde C, Fontana A: J. Immunol. 137, 3521-3527, 1986
- (3) Suzumura A, Mezitas SGE, Gonatas NK, Silberbag DH: J. Neuroimmunol. 15, 263-278, 1987
- (4) Hammond DN, Wainer BH, Tonsgard JH, Heller A: Science 234, 1237-1239, 1986
- (5) Fonnum FJ: J. Neurochem. 24, 407-409, 1975
- (6) Kamegai M, Kunishita T, Tokuchi F, Nishizawa M, Tabira T: Proc. Japan Acad. 65B, 17-20, 1989

II 研究業績

Table I. Effect of IL-3 on ChAT activity in cultured septal neurons.

	n	Specific Activity (pmoles/mg/min)	Total Protein (μ g/well)	Total ChAT Activity (pmoles/hr/well)	Relative Activity (%)
control	3	12.3 \pm 2.0	120.8 \pm 29.5	89.2 \pm 27.7	100
β -NGF	3	18.1 \pm 3.4	158.6 \pm 39.1	172.2 \pm 37.2	193 \pm 35
Control	3	11.4 \pm 2.4	70.6 \pm 33.1	48.3 \pm 12.2	100
mIL-3	4	20.9 \pm 5.3	91.4 \pm 35.5	114.6 \pm 35.8	237 \pm 62
Control	3	14.6 \pm 4.6	68.9 \pm 18.7	60.4 \pm 35.9	100
hIL-3	4	32.2 \pm 8.7	111.7 \pm 21.0	215.8 \pm 49.8	357 \pm 25
Control	2	11.5	193.2	133.3	100
hIL-3	2	44.9	140.3	378.0	284
hIL-3+					
α -IL-3	2	15.4	184.3	170.3	128
α -IL-3	2	13.2	169.4	134.2	101

Table II. Effect of IL-3 on ChAT activity in cholinergic line cells.

	n	Specific Activity (pmoles/mg/min)	Total Protein (μ g/well)	Total ChAT Activity (pmoles/hr/well)	Relative Activity (%)
control	2	14.7	369.8	326.2	100
mIL-3	2	19.7	506.4	598.6	184

Down症の動物モデル：トリソミー16マウスの研究

西澤正豊, 花岡和則¹, 亀谷雅洋, 田平 武

ヒトトリソミー21(Down症:DS)の脳では40歳までに全例でAlzheimer病(AD)において認められるものと同じ病理組織学的変化が出現してくる。また, アミロイド前駆体蛋白(APP)および一部の家族性ADの遺伝子座がいずれもヒト21染色体長腕上にマップされたことから, 21染色体上の遺伝子, 特にAPP遺伝子の何らかの発現異常がADの病変形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。マウスでは16染色体上にAPPを含めてヒト21染色体のDS領域に存在する遺伝子群が保存されており, 実際マウスのトリソミー(Ts)16は病理組織学的にも生化学的にもDSと共通した特徴を保持していることが明らかになってきている。このDSのモデルマウスは残念ながら出生直前に子宮内で死亡してしまうため生後長期に渡る観察が不可能であるが, 胎児の神経細胞を何らかの方法でrescueすることにより, DS, ADにおける病変形成機序を解析できる有力なモデル系を作成できる可能性があり, 我々の現在行なっているいくつかのアプローチを紹介する。

方法と結果

1) Ts16 ↔ 正常キメラマウスの作成と解析

Ts16胚と正常胚をキメラ化することにより, DSのモザイクに相当する長期観察可能なモデルマウスを作成することができる。まず, Ts16卵を得るため, Robertson転座染色体Rb(16, 17)32LubとRb(11, 16)2Hを各々ホモに持つ親マウス間で交配を行ない, 2種類のRbを1つずつヘテロに持つF₁♂マウスを作る。これをBALB/c♀と交配すると, ♂の染色体の分離様式により一定の割合で(我々のシリーズでは12%)Ts16卵が得られる。これをさらにC57BL/6の正常卵と集合法によりキメラ化し, 仮親子宮内に移植することによりキメラマウスを得ることができた。培養線維芽細胞についてkaryotype分析を行ない, Ts16 ↔ 正常キメラマウスと同定された個体について行動の観察と病理組織学的検索を予定している。ついで, キメラ化の程度, APPのmRNA, 蛋白の発現レベルと病理組織学的変化との対応付けからDS, ADの発症機序を解明する手がかりを得たいと考えている。

2) Ts16胎児脳神経細胞の初代培養

Ts16胎児は全例fetal hydropsを呈してくるのでphenotypeからも同定可能であり, 培養細胞のkaryotypeからも確認できる。胎生15日に胎児脳を取り

出し, 亀谷が確立した無血清培地による初代培養系に移した。今回はwhole forebrainの培養系にnerve growth factor(NGF)を添加し, これによるcholine acetyltransferase(ChAT)活性の誘導をTs16とlittermateの正常胎児について比較検討した。ChAT活性はFonnumの方法を一部改変し, 培養5日目の細胞について測定した。

結果は表に示す如くで, 正常胎児脳ではChATはNGFに应答して誘導され, 60%の活性上昇が認められるのに対して, Ts16では, NGFに应答したChAT活性の上昇は認められなかった。

考案

Ts16胎児脳ではAPP遺伝子はトリソミーの結果, 正常より50%多く存在するが, そのmRNAは約3-4倍に増加していると報告されている。このようなaneuploidyによるAPP発現の異常がDS, ADに認められるアミロイドの蓄積に直結するか否か, さらに今回認められたコリン作動性ニューロンの障害とどのように関連付けられるのかが今後最も重要な課題である。Ts16をrescueする他の方法も併用し, Ts16マウスのAD研究のモデル系としての可能性についてさらに検討を加えたい。

文献

- (1) Kamegai M, Kunishita T, Tokuchi F, Nishizawa M, Tabira T : Proc Jap Acad 65 B : 9-26, 1989
- (2) Bendotti C, Forloni GL, Morgan RA, O'Hara BF, Oster-Granite ML, Reeves RH, Gearhart JD, Coyle JT : Proc Natl Acad Sci USA 85 : 3628-3632, 1988

EFFECT OF β -NGF ON CHOLINE ACETYLTRANSFERASE ACTIVITY OF TRISOMY 16 FETAL NEURONS CULTURED IN VITRO

	β -NGF 100 ng/ml	specific activity pmol/min/mg	total protein μ g/well	total activity pmol/h/well	relative activity %
control	-	8.1	166	79.6	100
	+	11.9	186	128	161
Ts 16	-	7.2	173	73.9	100
	+	6.8	198	78.1	106

in vitro culture of whole forebrain
Control : normal littermates of trisomy 16

8. 診断研究部

1. 研究部一年の歩み

診断研究部は、精神神経疾患の早期診断あるいは病態解明のための生化学的あるいは物理化学的分析法の開発とその臨床応用を目的としており、Gas Chromatography Mass Spectroscopy(GC/MS)を利用する神経伝達物質ならびに関連物質の生体内代謝に関する研究と Magnetic Resonance Spectroscopy(MRS)による脳内代謝に関する研究を行っている。本年度は、部長が不在で、室長 林 時司、荻野孝史、流動研究員 矢野登志雄、研究生 池浦千秋の四名によって研究が実施された。以下に本年度の研究の概要について述べる。

1) GC/MS を利用する神経伝達物質ならびに関連物質の生体内代謝に関する研究

これまで GC/NICIMS を利用したカテコールアミン、インドールアミンならびに関連物質の高感度安定同位元素トレーサー法の開発と精神神経疾患、特に、そううつ病、小児自閉症におけるそれらの代謝異常との関連性に関する研究が進められてきたが、本年度も引き続きこれらの研究を発展させるため、① L-DOPA の高感度測定法を開発と L-DOPA の重水素標識化合物を合成し、その代謝回転の測定を可能とした。②血中トリプトファンのアルブミンとの結合に対する 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propionic Acid の影響について検討を行った。③インドールアミンの代謝産物であると考えられているテトラヒドロカルボリン類の安定同位元素トレーサー法の開発とそれを利用した生体内代謝に関する基礎的検討を実施した。

2) MRS による脳内代謝に関する研究

動物実験では、血中に投与した安定同位体¹³C 標識グルコースがラット大脳皮質領域に血液-脳関門を介して移行し代謝される過程を、¹³CNMR により 5 分間の時間分解能で観測する実験系を確立した。データのより詳細な速度論的解析を可能とするため、更なる高感度化・高分解能化と取り組んでいる。また、国立精神・神経センターへの 2 Tesla ヒト臨床・研究用 MR 装置の導入に伴い、MRS による以外は不可能であるヒト脳の in vivo 代謝の無侵襲・非破壊計測のための高感度・高分解能・高選択的・局在化測定法の開発・実用化に向けて研究を開始した。まず、³¹P NMR によりヒト脳局所における細胞内 pH や高エネルギー磷酸化合物を定量的に測定し、エネルギー代謝・脂質代謝のヒト脳内空間分布・変化を得ることを目的に基礎的実験を行なった。更に、¹H NMR と安定同位体を利用したヒト脳内代謝動態測定法の開発を行い、アミノ酸系神経伝達物質の代謝調節・コンパートメンテーションの機構を研究していく予定である。

(事務取扱 杉田秀夫)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Hayashi T, Naruse H, Matsuda F, Iida Y :
Sensitive Determination of Deuterated and Non-deuterated Indole-3-acetic acid and 5-Hydroxyindole-3-acetic Acid by Combined Capillary Gas Chromatography-Negative-ion Chemical Ionization Mass Spectrometry
J Chromatogr 428 : 209-219, 1988
- 2) Mataga N, Hayashi T, Naruse H, Iida Y :
Determination of Kynurenine in Human Plasma by Gas Chromatography/Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry
Mass Spectroscopy 36 : 99-105, 1988
- 3) Tsuchiya H, Hayashi T, Tatsumi M, Hoshino Y, Ohtani S, Takagi N :
High-Performance Liquid Chromatographic Analysis for Serotonin and Tryptamine Excreted in Urine after Oral Loading with L-Tryptophan
- 4) 成瀬 浩, 林 時司, 武貞昌志, 中根允文, 山崎晃資 :
小児自閉症の芳香族アミノ酸モノアミンの代謝と, 新しい薬物療法の開発
脳と発達 21 : 181-189, 1989
- 5) Tsuchiya H, Koike T, Hayashi T :
On-line Purification for the Determination of Catecholamines by Liquid Chromatography
Analytica Chimica Acta 218 : 119-127, 1989
- 6) Hayashi T, Tsuchiya H :
Sensitive Method for the Determination of Deuterated and Non-deuterated L-DOPA in Human Plasma by Combined Capillary Gas Chromatography/Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry
Proc Jap Soc Biomed Mass Spectrom 13 : 229-232, 1988
- 7) Petroff OAC, Prichard JW, Ogino T, Shulman RG T, Alger JR :
Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Studies of Agonal Carbohydrate Metabolism in Rabbit Brain
Neurology 38 : 1569-1574, 1988

II 研究業績

8) Petroff OAC, Ogino T, Alger JR :

High Resolution Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Rabbit Brain
J Neurochemistry 51 : 163-171, 1988

b. 著 書

1) 林 時司 :

アミノ酸の液体クロマトグラフィー

新生児マススクリーニングハンドブック (成瀬, 松田編), 南江堂, 東京, p211-215, 1989

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 林 時司, 池浦千秋 :

3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid の GC/MS 分析

第8回生体成分の分析化学シンポジウム, 名古屋, 9.22, 1988

2) 小池 享, 久米章司, 土屋博紀, 林 時司 :

マイクロアルミナカラムによる on-line 前処理法を利用したカテコールアミンの分析法

第8回生体成分の分析化学シンポジウム, 名古屋, 9.22, 1988

3) 飯田芳男, 林 時司, 大槻なつ子, 柴田明宏 :

負イオン化学イオン化質量分析法を利用する生体成分の分析

日本分析化学会第37年会, 札幌, 9.30, 1988

b. 国際学会

1) Ogino T, Novotny EJ, Petroff OAC, Prichard JW, Shulman RG :

Approaching Perfection in an Imperfect System : Determination of Relaxation Times
in vivo

Seventh Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine,
San Francisco, USA, August 20, 1988

2) Novotny EJ, Ogino T, Petroff OAC, Prichard JW, Shulman RG :

In vivo Metabolism of 2-¹³C-Ethanol in the rabbit Brain by Combined Heteronuclear and
Homonuclear Editing

Seventh Annual Meeting of the Society of Magnetic resonance in Medicine,
San Francisco, USA, August 21, 1988

- 3) Rothman DL, Hanstock CC, Ogino T, Prichard JW, Shulman RG :

Editing ^1H Human Brain Spectra of Amino Acids at 2. 1 Tesla
Seventh Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine,
San Francisco, USA, August 22, 1988

- 4) Petroff OAC, Novotny EJ, Young RSK, Ogino T, Prichard JW :

In vivo Measurements of Alcohol Concentration in Brain by Proton Magnetic Resonance
Spectroscopy
Seventh Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine,
San Francisco, USA, August 23, 1988

c. 一般学会

- 1) 林 時司, 成瀬 浩, 土屋博紀, 巽 幹雄, 星野良行, 高木順彦 :

HPLC によるトリプトファンの生体内代謝の検討
日本薬学会第 108 年会, 広島, 4. 4, 1988

- 2) 土屋博紀, 巽 幹雄, 高木順彦, 小池 享, 山口秀樹, 林 時司 :

カテコールアミンの HPLC 分離に関する検討
日本薬学会第 108 年会, 広島, 4. 6, 1988

- 3) 林 時司, 土屋博紀 :

安定同位元素トレーサー法による L-DOPA の生体内動態の分析
日本医用マスペクトル学会, 東京, 10. 1, 1988

- 4) 土屋博紀, 巽 幹雄, 高木順彦, 林 時司 :

HPLC による L-DOPA の分析
日本分析化学会第 37 年会, 札幌, 9. 30, 1988

- 5) 矢野登志雄, 渡辺典子, 荻野孝史, 小川秀次郎, 江口恵二 :

in vivo ^{13}C NMR によるラット脳グルコース代謝の研究
第 12 回日本磁気共鳴医学会大会, 東京, 9. 27, 1988

- 6) 矢野登志雄, 荻野孝史 :

in vivo ^{13}C NMR によるラット脳グルコース輸送過程の研究
第 13 回日本磁気共鳴医学会大会, 福岡, 2. 20, 1989

Ⅱ 研究業績

C. 班会議発表

1) 矢野登志雄, 荻野孝史 :

生体内代謝動態解析のための高感度・高分解能・局在化技術の開発

科学技術庁・生体の分子レベルにおける高感度・高分解能・非破壊計測技術の開発に関する研究

班, 東京, 12. 17, 1988

3. 主な研究報告

安定同位元素トレーサー法による
テトラヒドロカルボリン類の生体内代謝の分析
林 時司

テトラヒドロカルボリン類は Pictet-Spengler 反応によって、インドールアミン類と各種アルデヒドから生成する化合物である。これらの化合物は MAO の阻害作用、セロトニンの uptake の阻害作用等の神経薬理学的作用を示すことが知られている。また、生理的条件に近い条件においても容易に生成すること、ならびに、微量ではあるが生体内にも存在することが報告され、精神神経疾患との関わりが注目されるようになってきている。しかし、それらの生体内代謝によっては不明な点が多い。

我々は、安定同位元素トレーサー法を用いたトリプトファンの生体内代謝に関する研究を進めてきているが、その一環として、テトラヒドロカルボリン類の GC/NICIMS を利用する感度の高い測定と安定同位元素トレーサー実験を可能とし、それらの生体内における動態、さらには精神神経疾患との関連性について検討することを目的とし、本研究に着手した。今年度は、トリプタミンとアセトアルデヒドから生成すると考えられる 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline(MTHC) について基礎的検討を加えた。

結果と考察

GC/NICIMS 法では、従来から安定同位元素トレーサー法に利用されてきている GC/PICIMS 法に比較して、特殊な条件を備えた化合物は、10-1000 倍程度の高感度測定が可能であることが知られている。トリプトファンをはじめとする多数のインドール化合物については、これを可能とする誘導体化反応についての基礎的検討を実施し報告してきている。これらの結果から、GC/NICIMS 法によって MTHC を高感度分析するには TFA 誘導体に導くことが最も適当であると考えた。図 1 には、その NICI マススペクトルを示したが、そのベースピークは予測どおり M^+ に対応するもので、そのイオン化効率も極めて高いものであることが確認され、極めて感度の高い測定が可能となった。

MTHC の分析に関しては、測定感度の他に試料の前処理に関する難問があった。MTHC は、冒頭でも述べたように、トリプタミンとアセトアルデヒドから脱水閉環することによって生成するが、この反応が極めて緩和な条件でも進行する。また、生体試料中には MTHC と比較すると多量のトリプタミン、

アセトアルデヒドが存在する（アセトアルデヒドは溶媒類にも含まれる）ため、試料処理中にも容易に MTHC が生成する。この問題を解決するには、試料、溶媒類からアセトアルデヒドを除去あるいは試料中からトリプタミンを何等かの方法で除去する必要がある。従来の方法ではカルボニル試薬であるセミカルバジドを利用し、アルデヒドを除去する方法が採用されてきたが、除去後に再び混入する可能性もある。また、この方法を採用した際、試料処理中に MTHC の生成が認められたとの報告もある。そこで、本研究では後者の方針で、種々検討を重ねた結果、第一級アミンの蛍光試薬である fluorescamine を利用する方法を考案し、高感度で信頼性の高い MTHC の分析法を確立することが出来た。

ヒト尿中には、MTHC が微量ながら排せつされることが報告されている。今回確立した方法で分析を行っても、それが確認されたため、L-Tryptophan-3, 3-d₂ をトレーサーとして用い、安定同位元素トレーサー実験により、その由来に関する検討を実施した。すなわち、L-Tryptophan-3, 3-d₂ 10mg/kg を健康成人男子に経口投与し、投与後経時的に採取した尿中の MTHC の分析を試みた。その結果、トレーサー由来のトリプタミンは多量排せつされることが認められたが、トレーサー由来の MTHC は確認できなかった。これらの結果は MTHC が生体内で生成することを支持するものではない。また、ラットを用いた検討から、MTHC は容易に BBB を透過すること等についても確認されたが、さらに詳細な生体内代謝に関する検討については次年度以降の研究課題としたい。

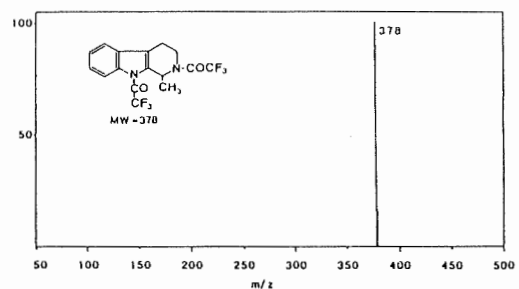


図 1 MTHC の TFA 誘導体の
NICI マススペクトル

安定同位体 ^{13}C を用いた MRS による脳グルコース代謝過程の解析

矢野登志雄, 荻野孝史

我々が既に開発した *in vivo* ^{13}C NMR測定のための動物実験系を用いたMRS実験から, 代謝動態と共に血液-脳関門を介したグルコース輸送過程に関する情報が得られる事が明らかとなった。

方法

実験には24時間絶食後の体重 200g 前後のラットを用いた。標識グルコースの血中濃度及び全血糖値を急速に一定値に安定化させるインフュージョン・プロトコールを作成するため, $1\text{-}^{14}\text{C}$ 標識グルコースを静脈に bolus 投与し, 動脈血の血清中放射能の測定により得られた washout kinetics の過渡現象を, ラプラス変換法にて解析した。作成したプロトコールの性能評価を同様の測定で行った。

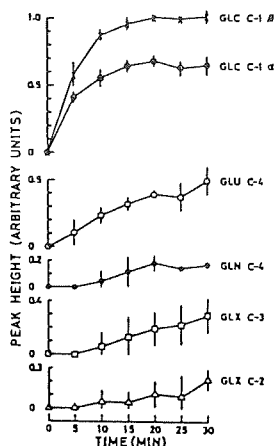
安定同位体 ^{13}C 標識グルコースを, 作成したプロトコールに従ってラットに投与し, 大脳皮質領域を対象とする ^{13}C NMR スペクトルを 67.7 MHz で測定した。自作した *in vivo* ^{13}C NMR 検出用高感度・高分解能サーフィスコイル/プローブに, 筋弛緩剤により無動化し調節呼吸としたラットを固定した。

^{13}C NMR 信号の積算を 5 分毎に繰り返した。

結果と考察

RI 実験からは, 作成したプロトコールに従うインフュージョンの結果として得られる標識グルコースの血中濃度及び全血糖値が, 1 分以内に急速に一定値に達し, 約 1 時間安定化されていることを確認した。

図は 3 例の NMR 実験のスペクトルから測定したピーク高を, 時間軸にそってプロットしたものを示す。グルコース (GLC) の α , β 各異性体の ^{13}C 標識された 1 位の炭素は TCA 回路の 1 回転目でグルタ



ミン酸 (GLU) の C-4 位に移行し, 2 回転めから C-2 位, C-3 位に移行することが知られており, 本実験の結果もこれを支持する。C-2 位, C-3 位のピークはグルタミン酸, グルタミン (GLN) が分離されない (GLX)。グルタミンへの標識の移行はグルタミン酸を前駆体とするため遅れる。血中の標識量の急速な安定化に比べ, 脳内より検出される標識グルコースのピークは, 定常値に達するまでに 20 分を要する緩慢な時間変化を示す。これは, 血液-脳関門のグルコース担体輸送過程が介在することに由来するものと考えられる。k1, k2, k3 を速度定数, ^{13}Co , ^{13}Ci を各々血漿中, 脳組織中の標識グルコース濃度, T を時間とすると,

$$\begin{array}{c}
 \text{血漿} \quad \text{血液-脳関門} \quad \text{脳組織} \\
 k1 \\
 \rightarrow \quad \quad \quad k3 \\
 ^{13}\text{Co} \text{ GLC} \quad \text{O} \quad ^{13}\text{Ci} \text{ GLC} \quad \rightarrow \text{METABOLISM} \\
 \leftarrow \\
 k2
 \end{array}$$

と表現できる。定常状態では,

$$^{13}\text{Ci} (\text{定常}) = \frac{k1}{k2 + k3} ^{13}\text{Co}$$

過渡状態では,

$$^{13}\text{Ci}(T) = \frac{k1}{k2 + k3} ^{13}\text{Co} [1 - \exp\{-(k2 + k3) T\}]$$

の式を得る。即ち, $k2 + k3$ の値が図最上段の一次反応型曲線の時定数から求まり, ^{13}Co の値は本実験条件下では一定値に固定してあるため ^{13}Ci が求まれば $k1$ を決定できることがわかる。若干の仮定を置いた試算により, 放射性同位体を用いた実験の文献値とよく一致した値が得られた。動物の生理状態を実験的に変化させることにより, 血液-脳関門の調節能力を反映するこれらのパラメータの変化を測定することができると期待される。NMR 検出感度の向上絶対量定量のための方法論的改良によって本法の応用をさらに進めて行きたい。

ヒト全身用 NMR 装置を用いたヒト脳の ^{31}P MRS による研究

矢野登志雄, 荻野孝史

本年度、国立精神・神経センターに、現在のところ臨床応用可能な最高磁場強度である 2 T (テスラ) での MRS/MRI の研究・臨床運用を目指し、フィリップス社製ヒト全身用 NMR 装置が導入された。我々は、まず 1.5 T での試験運用を行った後、in vivo NMR Spectroscopy (MRS) による以外は不可能であるヒト脳の in vivo 代謝の無侵襲・非破壊計測のための高感度・高分解能・局在化測定法の開発・実用化に向けて研究を開始した。脳代謝は、高度に分化したニューロンやグリアの構造・形態に大きく依存して調節・維持されている。従って、構造破壊が不可避である単離・精製・分析・再構成という研究方法はヒトへの適用が困難であるだけでなく、方法論的にも問題を抱えている。更に、NMR の利用により形態情報と代謝情報を密接に関連させて得ることができる。本年度は、 ^{31}P PNMR によりヒト脳局所における細胞内 pH や高エネルギーリン酸化合物を定量的に測定し、エネルギー代謝・脂質代謝のヒト脳内空間分布・変化を測定することを目的に基礎的実験を行なった。更に、 ^1H NMR と安定同位体を利用したヒト脳内代謝動態測定法の開発を行い、アミノ酸系神経伝達物質の代謝調節・コンパートメンテーションの機構を研究していく予定である。

方法

フィリップス社製 1.5 T GYROSCAN MRS/MRI システムを用い、以下の手順で NMR 測定した。

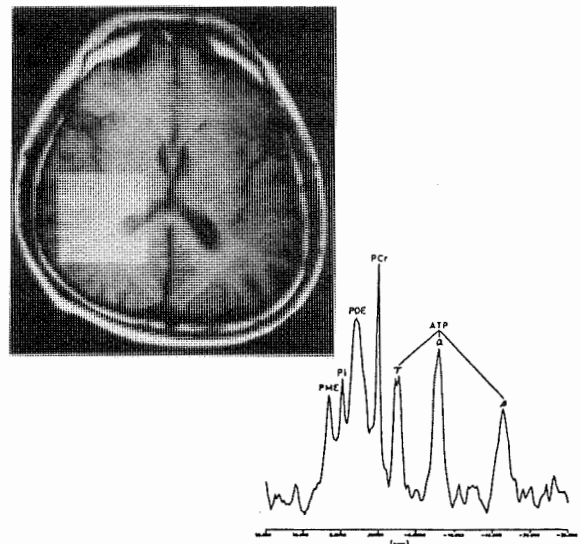
① ^1H NMR により健常人ボランティア頭部正中矢状断面 (スライス厚 10 mm) の ^1H 画像をとり、横断面の位置決め後、スライス厚 10 mm、間隔 1 mm で 7 枚の画像を得る。画像上でスペクトル選択領域 (VOI) を設定する。VOI の設定は必要な S/N と測定時間の範囲内で任意の直方体で行えるが、今回は一辺 5 cm の立方体を標準設定とした (図 1)。

② 送受信系を ^{31}P PNMR 測定条件に変更し、NMR 検出コイルの同調・整合をとった後、パルス繰り返し時間、信号積算回数を設定し ISIS (Image-Selected In vivo Spectroscopy) 法による領域選択スペクトロスコピーにより ^{31}P PNMR スペクトルを測定した。

結果と考察

図 2 に 8 歳男児より測定した脳の ^{31}P PNMR スペクトルを示す。adiabatic パルスを用い、繰り返し時間 3 秒、積算回数 256 回、サンプリング周波数 3 kHz の測定を 2 回行い、信号を加算した。横緩和時間の

短い信号成分は重畳積分差法で除き、10 Hz の Lorentz 関数フィルター処理を施した。化学シフト (横軸) より ATP、クレアチンリン酸 (PCr)、無機リン (Pi)、ホスホモノエステル (PME)、ジエステル (PDE) のピークが特定できる。PME と PDE のピークは各々膜脂質の合成・分解の指標となる。PCr に対する Pi のシフトより細胞内 pH を算出することができる。図の例では 7.0 であり、他の 5 例の健常成人の平均値 7.0 ± 0.2 と差はなかった。又、全例にわたりピークの相対面積に有意差はなかった。ヒトを対象とする ^{31}P MRS では、運動負荷をかけ易く測定領域の選択も比較的容易な骨格筋を対象とする研究が進んでいるが、脳では有効な“負荷”の創出が課題となる。又、可能な限り VOI を小さくしかも任意の場所に定位する必要もある。例えば、一辺 1 cm 立方の VOI を希望すれば、得られる信号は本実験の 1/125 となり検出感度を飛躍的に向上させる必要が生じる。このため、 ^1H NMR 法等の高感度検出法の導入が不可避である。 ^{31}P MRS では更に、磁氣的ラベル法により、クレアチン・キナーゼ、ATPase、アデニレート・キナーゼ、解糖系酵素等の酵素活性に関する重要な情報を得る事が可能であるが、このためには高いスペクトル分解能を必要とする。測定磁場の上昇は NMR 信号検出感度の向上・スペクトル分解能の向上をもたらし、MRS 研究に不可欠であり、今後 2 T 高磁場化のための装置の改良、開発を行っていく予定である。



9. 微細構造研究部

1. 研究部一年の歩み

本研究部ではこれまで通り、神経筋疾患の病因解明のため、一般病理学的手法を始め、組織培養法、疾患モデル動物等を利用した研究が進められている。

本年度は大滝悦生が6月末に流動研究員を辞し、後任に後藤雄一（北大医学部小児科）が加わった。週2～4日間勤務する研究生も5名以上、さらに不定期に検体を持参しては研究室に現われる研究者も多く、常に活気に溢れている。このような活発な研究活動中、とりわけ研究の意義、姿勢、情熱を若い研究者に説いていた相川室長が3月末に志半ばにして他界されたことは研究室一同を哀惜の念でおおった。彼の研究は多くの研究生に遺産として受け継がれている。また、3月末には流動研究員の古賀靖敏が米国コロンビア大学へミトコンドリア脳筋症の分子遺伝学的研究のため留学した。

1) 神経筋疾患の診断と組織及び培養細胞バンクの確立

神経筋疾患の診断のための筋生検依頼は年間400を越える。依頼は病院だけでなく全国研究機関、大学に及んでいる。一部は組織培養に供され、筋の発生・分化の研究にも利用されている。生検筋組織片や組織培養細胞は、超低温下に保存され、各研究者の要望に応じてこれらの材料を提供している。

近年ミトコンドリア病への関心が高まり、ミトコンドリア病の診断のための筋生検依頼が年間100例を越えている。診断には、ミトコンドリアDNAの異常の有無、呼吸系酵素活性低下の有無、病理組織化学的手法等を用いている。

2) 胸腺筋様細胞の生物学的研究

胸腺から骨格筋様細胞を新たに数株クローン化したところ、このうち2株からは、M. や GM-CSF とは異なる細胞の刺激因子が産生されており、また、神経系細胞に対する因子も産生されていることが判明したのでそれぞれの活性因子の精製を試みている。

3) 神経筋疾患モデル動物の病因解析

Shaking Rat Kawasaki (SRK) は特に小脳の神経細胞の migration に異常をきたすことを故相川室長が明らかにし、異常物質の生化学的検索が多くの研究者とともに行われている。また中毒物質(6-AN)を用いて慢性硬膜下血腫のモデルが出来ることも明らかにされ、本病解明に役立つものと期待されている。

(部長 埜中征哉)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Nonaka I, Koga Y, Okino E, Kikuchi A, Fujisawa K, Miyabayashi S :
Defects in muscle fiber growth in fatal infantile cytochrome c oxidase deficiency
Brain Dev 10 : 223-230, 1988
- 2) Nonaka I, Koga Y, Shikura K, Kobayashi M, Sugiyama N, Okino E, Nihei K, Tojo M,
Segawa M :
Muscle pathology in cytochrome c oxidase deficiency.
Acta Neuropathol 77 : 152-160, 1988
- 3) Usuki F, Ishiura S, Nonaka I, Sugita H :
 α -glucosidase isoenzymes in normal and acid maltase deficient human skeletal muscles
Muscle Nerve 11 : 365-371, 1988
- 4) Koga Y, Nonaka I, Sunohara N, Yamanaka R, Kumagai K :
Variability in the activity of respiratory chain enzymes in mitochondrial myopathies
Acta Neuropathol 76 : 135-141, 1988
- 5) Ozawa T, Yoneda M, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Suzuki H, Nishikimi M, Yamamoto M,
Nonaka I, Horai S :
Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family with mitochondrial myopathy
Biochem Biophys Res Comm 154 : 1240-1247, 1988
- 6) Yamamoto M, Nonaka I :
Skeletal muscle pathology in chronic progressive external ophthalmoplegia with ragged-red fibers
Acta Neuropathol 76 : 558-563, 1988
- 7) Koga Y, Nonaka I, Kobayashi M, Tojo M, Nihei K :
Findings in muscle in complex I (NADH Coenzyme Q reductase) deficiency
Ann Neurol 24 : 749-756, 1988
- 8) Woo M, Chung SJ, Nonaka I :
Perifascicular atrophic fibers in childhood dermatomyositis with particular reference to

II 研究業績

mitochondrial changes

J Neurol Sci 88 : 133-143, 1988

- 9) 萩原雄二, 埜中征哉, 桶田利加, 石井弘子 :
凍結骨格筋の形態に与える冷却保存温度と浸透圧脱水シートの使用の影響
凍結乾燥研究会誌 34 : 45-50, 1988
- 10) 西尾健資, 春原経彦, 埜中征哉, 大野良三, 浜口勝彦 :
多毛, 両側線条体壊死を伴う家族性慢性進行性外眼筋麻痺症候群
臨床神経 28 : 1266-1273, 1988
- 11) 松永貞一, 鈴木和男, 古賀靖敏, 埜中征哉, 山口正視, 落合幸勝, 山崎ユキ, 甘楽重信, 水野左敏,
前川奈生子, 前川喜平 :
ミトコンドリア筋症 (cytochrome c oxidase 欠損症) における白血球機能検査の試み
炎症 8 : 455-459, 1988
- 12) Arahata K, Ishihara T, Kamakura K, Tsukahara T, Ishiura S, Baba C, Matsumoto T,
Nonaka I, Sugita H :
Mosaic expression of dystrophin in symptomatic carriers of Duchenne's muscular dystrophy
N Engl J Med 320 : 138-142, 1989
- 13) Sasaki T, Shikura K, Sugai K, Nonaka I, Kumagai K :
Muscle histochemistry in myotubular (centronuclear) myopathy
Brain Dev 11 : 26-32, 1989
- 14) Ichiki T, Tanaka M, Kobayashi M, Sugiyama N, Suzuki H, Nishikimi M, Ohnishi T,
Nonaka I, Wada Y, Ozawa T :
Disproportionate deficiency of iron-sulfur clusters and subunits of complex I in mitochon-
drial encephalomyopathy
Pediatr Res 25 : 194-201, 1989
- 15) Sunohara N, Nonaka I, Kamei N, Satoyoshi E :
Distal myopathy with rimmed vacuole formatin. A follow up study
Brain 112 : 65-83, 1989
- 16) Shimomura C, Nonaka I :
Nemaline myopathy: Comparative muscle histochemistry in the severe neonatal, moderate
congenital, and adult-onset forms

Pediatr Neurol 5:25-31, 1989

- 17) Aikawa H, Nonaka I, Woo M, Tsugane T, Esaki K :
Shaking rat Kawasaki (SRK): new neurological mutant rat in the Wistar strain
Acta Neuropathol 76 : 366-372, 1988
- 18) Kamo I, Satoyoshi E: Effects of thymic myoid cells on thymocyte proliferation, in Neuro-immunological Diseases, Recent Advances in Pathogenesis and Treatment. ed. A. Igata. pp. 287-292
University of Tokyo Press, 1988
- 19) Hayashi Y, Kikuchi-Tada A, Jitsukawa K, Anzai T, and Kawashima M :
Myofibroblasts in malignant fibrous histiocytomahistochemical, immunological, ultrastructural and tissue culture studies
Clin Exp Dermatol 13 : 402-405, 1989
- 20) Hernandez F, Akahori H :
Ultrastructure of outer layer of calf rotavirus
J Electron Microsc 37 : 45-46, 1988
- 21) Akahori H, Saitoh T, Yonehara K, Suzuki K, Ishii H, Nonaka I :
Carbon coating technique by a carbon lead of a mechanical pencil
J Electron Microsc 37 : 86-88, 1988
- 22) Akahori H, Ishii H, Nonaka I, Yoshida H :
A simple freeze-drying device using t-butyl alcohol for SEM specimens
J Electron Microsc 37 : 351-352, 1988
- 23) 赤堀 宏, 石井弘子, 埜中征哉, 吉田寿治 :
コールドメタルブロックを利用した t - ブチルアルコール凍結乾燥装置
医生物走査電顕 17 : 50-51, 1988
- 24) Komiyama A, Kamo I, Furukawa S, Akazawa S, Hirayama K, Satoyoshi E :
Antibodies against saline-soluble components of skeletal muscle in myasthenia gravis
J Neurol 235 : 207-213, 1988
- 25) Komiyama A, Nonaka I, Hirayama K :
Muscle pathology in Marinesco-Sjögren syndrome
J Neurol Sci 89 : 103-113, 1989

II 研究業績

26) Ishii H, Suzuki K, Nonaka I :

Internodal Schwann cell fingers in the ventral spinal roots in mice : Incidence and relationship to the diameter of myelinated fibers

Exp Neurol 100 : 65-70, 1988

b. 総説

1) 埜中征哉 :

リハビリテーション医のための病理学

総合リハ 16 : 309-316, 1988

2) 埜中征哉 :

ミトコンドリア脳筋症

東京都神経紀要 16 : 51-62, 1988

3) 埜中征哉, 山本雅彦, 古賀靖敏 :

ミトコンドリアミオパチー

メディチーナ 25 : 1078-1089, 1988

4) 埜中征哉 :

先天性ミオパチー

メディチーナ 25 : 2277-2279, 1988

5) 埜中征哉 :

ミトコンドリア病の形態学

小児医学 21 : 856-878, 1988

6) 埜中征哉 :

筋検査

周産期医学 18 : 338-339, 1988

7) 埜中征哉, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

進行性筋ジストロフィーのモデル

Medical Immunology 16 : 247-254, 1988

8) 埜中征哉 :

進行性筋ジストロフィー

ブレインナーシング 4 : 1209-1214, 1988

9) 小宮山純, 平山恵造 :

重症筋無力症における抗骨格筋抗体の基礎と臨床

神経内科 30 : 103-109, 1989

c. 班会議報告書

1) 埜中征哉, 大滝悦生, 古賀靖敏 :

神経原性病変とミトコンドリア電子伝達系の異常

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究班, 昭和62年度研究報告書, p13-26, 1988

2) 埜中征哉, 作田亮一, 古賀靖敏, 後藤雄一, 石井弘子 :

ミトコンドリアミオパチー生検筋内の血管変化

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究班, 昭和63年度研究報告書, p172-176, 1989

3) 加茂功, 藤沢加津美, 埜中征哉, 菊池愛子 :

胸腺リンパ球の増殖

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班, 昭和62年度研究報告書, p202-204, 1988

4) 加茂 功 :

胸腺 myoid cell の生物学的研究

厚生省がん研究助成金による「胸腺腫の生物学的特性に関する研究班」, 1987年度報告書, p19-21, 1987

5) 平山恵造, 小宮山純, 古川昭栄, 池上亮輔 :

培養シュワン細胞・線維芽細胞によるラミニンの産生・分泌

厚生省精神・神経疾患研究委託費ニューロパチーの成因及び治療に関する研究班, 昭和62年度報告書, p19-22, 1988

6) 小宮山純, 平山恵造, 新井洋, 古川昭栄, 加茂功 :

重症筋無力症 (MG) におけるステロイド・胸腺摘除併用療法: 長期観察での検討

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班, 昭和62年度報告書, p429-431, 1988

7) 小宮山純, 平山恵造, 新井洋 :

重症筋無力症のステロイド療法に伴う初期増悪と日内変動の逆転現象

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班, 昭和62年度報告書, p432-435, 1988

II 研究業績

B. 学会発表

a. シンポジウム

赤堀宏, 石井弘子, 埜中征哉, 吉田寿治

コールドメタルブロックを利用した t-ブチルアルコール凍結乾燥装置

第17回 医学生物学SEMシンポジウム, 山口, 11.7, 1988

b. 一般学会

1) 埜中征哉, 古賀靖敏, 大滝悦生, 山本雅彦 :

Cytochrome c oxidase (CCO) 電顕染色の生検筋への応用

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988

2) 相川久志 :

慢性硬膜下血腫モデル動物の作製と病理学的研究

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988

3) 山本雅彦, 古賀靖敏, 大滝悦生, 埜中征哉 :

神経筋疾患における Cytochrome c oxidase 部分欠損

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988

4) 作田亮一, 古賀靖敏, 埜中征哉 :

MELAS を呈した Complex I 欠損症の筋内血管病変

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988

5) 田辺雄三, 中島博徳, 武内恒成, 大日成昂, 清水輝夫, 埜中征哉 :

筋ジストロフィーにおけるトロポニンTの変化—福山型先天性筋ジストロフィー及び Duchenne型筋ジストロフィーにおける解析

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988

6) 古賀靖敏, 埜中征哉, 大滝悦生 :

複合体IV欠損症培養細胞における組織化学および生化学的酵素活性

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988

7) 鎌倉恵子, 石浦章一, 杉田秀夫, 埜中征哉, 今城忍 :

CANP inhibitor の筋肉内分布 —免疫組織化学的検討—

第29回日本神経学会総会, 東京, 5.25, 1988

8) 埜中征哉, 禹満, 杉田秀夫 :

ネマリンミオパチーの進行性

- 第30回日本小児神経学会総会，徳島，6.9，1988
- 9) 大滝悦生，古賀靖敏，桝中征哉：
Cytochrome c oxidase 活性低下を示す疾患の多様性について
第30回日本小児神経学会総会，徳島，6.9，1988
- 10) 藤田武久，橋本清，藤野修，古谷正伸，榎戸久，洪井典子，桝中征哉：
Congenital hypomyelination syndrome の一例
第30回日本小児神経学会総会，徳島，6.9，1988
- 11) 太田正康，桝中征哉：
成長ホルモン部分欠損を伴ったDuchenne 型筋ジストロフィー症の一例
第30回日本小児神経学会総会，徳島，6.9，1988
- 12) 斉藤陽子，桝中征哉：
再生筋における筋衛星細胞の分裂・増殖について
第30回日本小児神経学会総会，徳島，6.9，1988
- 13) 東條恵，小川直子，竹内衛，郡司哲己，山口清次，古賀靖敏，桝中征哉：
グルタール酸尿症Ⅱ型とおもわれる乳児例
第30回日本小児神経学会総会，徳島，6.9，1988
- 14) 須貝研司，桝中征哉：
筋病理で確認された脊髄性筋萎縮症85例における臨床および筋電図所見の検討
第30回日本小児神経学会総会，徳島，6.9，1988
- 15) 下村千枝子，山田和孝，桝中征哉：
先天性ネマリンミオパチーの成人例と成人発症例との病理的比較
第30回日本小児神経学会総会，徳島，6.9，1988
- 16) 志倉圭子，桝中征哉，二瓶健次：
Multicore 病の筋病理学的・電顕的検討
第30回日本小児神経学会総会，徳島，6.9，1988
- 17) 加茂 功：
胸腺筋様細胞の産生する二種のコロニー刺激因子
第47回日本癌学会，東京，9.20，1988
- 18) 赤堀 宏，吉田寿治，石井弘子，桝中征哉：
携帯型浸漬圧着両用試料急速凍結装置

II 研究業績

第44回 日本電子顕微鏡学会総会，仙台，6.3，1988

19) 小宮山純，平山恵造：

重症筋無力症のクラーゼの臨床免疫学的検討

第29回日本神経学会総会，東京，5.27，1988

20) 新井洋，小宮山純，平山恵造，古川昭栄，加茂功：

重症筋無力症（MG）のステロイド・胸腺摘除併用療法：長期観察例での検討

第29回日本神経学会総会，東京，5.27，1988

C. 班会議発表

1) 埜中征哉，作田亮一，古賀靖敏，後藤雄一，石井弘子：

ミトコンドリアミオパチー生検筋内の血管変化

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー及び関連疾患の病態とその病因に関する研究班，昭和

63年度班会議，東京，12.2，1988

2) 埜中征哉，秋山千枝子，斉藤陽子：

筋再生を阻害する要因 —組織化学的研究—

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー及び関連疾患モデル動物の開発に関する研究班，昭和

63年度班会議，東京，12.7，1988

3) 相川久志，津金隆，今井尚志，斉藤陽子，古川昭栄：

Shaking rat Kawasaki (SRK) の神経病理学的研究・補遺

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー及び関連疾患モデル動物の開発に関する研究班，昭和

63年度班会議，東京，12.7，1988

4) 加茂 功：

胸腺リンパ球培養上清中に見出される増殖活性

厚生省胸腺腫の生物学的特性に関する研究班，東京，10.7，1988

5) 加茂功，古川昭栄，宮下綾，菊池愛子，渡辺里仁，浜野智代，埜中征哉：

胸腺筋様細胞の産生するコロニー刺激因子

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，東京，1.20，1989

6) 平山恵造，小宮山純，埜中征哉，田辺雄三：

Marineco-Sjogren 症候群における筋病変の臨床病理学的検討

厚生省特定疾患運動失調症研究班，東京，1.14，1989

- 7) 平山恵造，小宮山純，古川昭栄，池上亮介：

培養シュワン細胞・線維芽細胞によりラミニンの合成・分泌（第2報）

厚生省精神・神経疾患研究委託費・ニューロパチーの成因及び治療に関する研究班，東京，
1.19，1989

- 8) 小島重幸，小宮山純，高橋三津雄，今井尚志，平山恵造：

IgA 骨髄腫に伴い AL アミロイドと light chain の同時沈着を認めた骨格筋仮性肥大

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班，東京，1.20，1989

- 9) 小島重幸，小宮山純，鬼島正典，平山恵造：

眼筋型重症筋無力症におけるステロイド療法の長期的検討

厚生省特定疾患免疫性神経疾患研究班，東京，1.21，1989

3. 主な研究報告

Cytochrome c oxidase (CCO) 欠損症における

組織特異性：培養細胞に於ける検討

埜中征哉, 古賀靖敏, 菊池愛子, 後藤雄一

ミトコンドリアミオパチーは組織毎により酵素活性が異なる, すなわち組織特異性を示すことで知られている。この組織特異性を意味するものが何かを知ることは本症の発症機序を知る上に極めて重要である。我々は組織化学的に証明が可能な cytochrome c oxidase (CCO) 欠損患者に的を絞ってこの組織特異性を研究してきた^{1,2)}。今回は CCO 欠損患者の生検筋の培養細胞について検討したのでその結果を報告する。

対象・方法

対象としたのは CCO 欠損乳児致死型 1 例, 脳筋型 3 例 (急性型 2, 慢性型 1), 計 4 例であった。乳児致死型では生検筋内の筋線維には CCO 活性はなかったが, 血管壁内や筋紡錘内線維には正常活性があった。脳筋型の急性増悪例 2 例では全ての組織に活性を認めなかった。慢性型ではいわゆる部分欠損の像を示した。

これらの症例の生検筋を培養し, それが筋管細胞を形成した時点で CCO 活性を生化学的に測定し, また Seligman らの方法で電顕細胞化学用に固定し CCO 染色を行った。超薄切片にはウラニール染色のみを施した。

結果

正常対象 3 例でも 1 個の筋管細胞内に CCO (+) と (-) のミトコンドリアがモザイクをなして存在した。しかし細胞間モザイクは存在しなかった。脳筋型の急性増悪例では, 2 例とも培養筋管細胞内のミトコンドリアはすべて CCO 活性を示さなかった。乳児致死型と脳筋型の慢性例では CCO (+) と CCO (-) の 2 種類の筋管細胞 (クローン) が得られた (図 1)。電顕組織化学の結果と生化学分析の結果はよく相関した (表 1)。CCO (+) と CCO (-) ミトコンドリアとの間には形態学的な差は認められなかった。

考察

CCO 欠損に見られる組織特異性は培養筋管細胞でもよく再現された。急性脳筋型の 2 例では皮膚線維芽細胞の CCO 活性もみられなかったが, 他の型ではそれは正常であった。慢性脳筋型で CCO (+) と CCO (-) のクローンが得られたことは CCO 部分欠損の組織化学所見をよく反映している。

発生初期には CCO (+) (多分 wild mtDNA を持つ) と CCO (-) (mutant mtDNA) が 1 個の細胞内に共存するが, 分裂をくり返すごとに CCO (+) と (-) の 2 つの筋芽細胞に分かれるのだろう (mitotic segregation)。そして何らかの理由で CCO (+) の細胞同士と (-) の細胞同士は互いに融合して, CCO (+) と (-) の 2 つの筋管細胞になると考えられる。このような mitotic segregation は組織毎によっても行われ組織特異性を見ると考えられる。

文献

- 1) Nonaka I, et al. Acta Neuropathol 77 : 152-160, 1988
- 2) Nonaka I, et al. J Neurol Sci (in press).

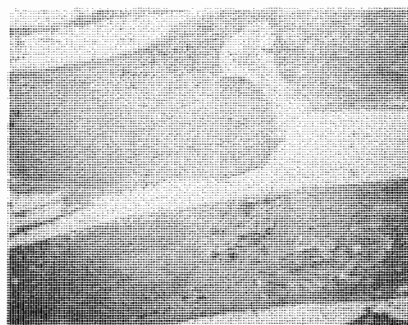


図 1

表 1

Cytochrome c Oxidase (CCO) Activity in Cultured Muscle Cells

Patient	Number of Cells Examined ()	Number of Mitochondria			Biochemistry*	
		CCO (+)	CCO (-)	% of CCO (+)		
Fatal Infantile 1	31 (16)	302	311	49.3	1.5	
Encephalomyopathic						
	Acute 2	46 (10)	137***	544	20.1	1.9
	3	25 (25)	0	145	0	1.4
Chronic 4	23 (11)	249	192	56.5	2.2	
Controls (N=3) (Range)	74 (0)	1136	394	74.2 (71.9-75.9)	10.8 ± 4.1 (5.6-16.8)	

*: nmol/min/mg of tissue ()**: cells containing CCO (-) mitochondria only
 : faintly positive ** (N=8)

胸腺リンパ球の増殖

加茂 功

若いマウスの胸腺からおしつぶし法によって細胞を調整すると、大部分はリンパ球であり、ごく一部がマクロファージやデンドリティック細胞からなっている。このような細胞集団をピーナッツレクチンに対する反応性を利用して分別すると(+)と(-)の細胞集団が得られる。これまでピーナッツレクチン反応(-)の細胞集団は牛胎児血清と2MEの存在下で培養するとレクチンやサイトカイン等の存在なしに自己増殖するのが認められた。今回はこの増殖がいかなる機構の下に行われているのか、またどんな因子が増殖に関与しているのかを検討する。

材料と方法

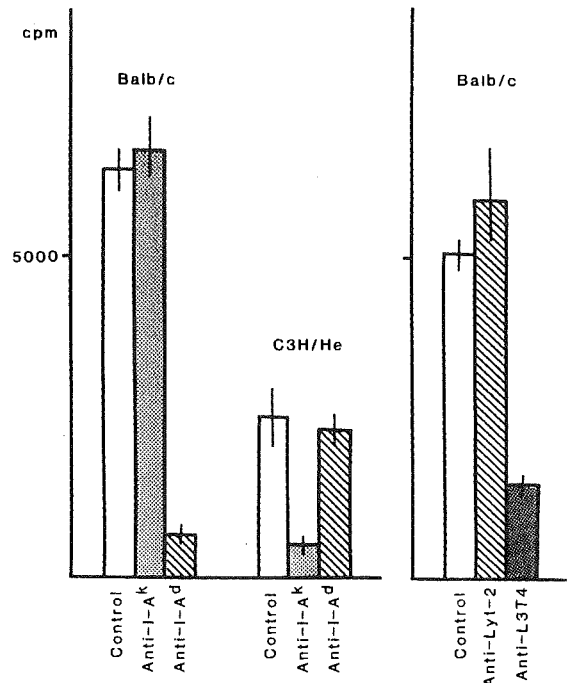
3~4週令 BALB/C メスマウス胸腺ピーナッツレクチン反応(-)細胞を定法に従って調整し、 $5 \sim 6 \times 10^6/ml$ の条件で RPMI 1640+5% 牛胎児血清+ $1 \times 10^{-8}M$, 2メルカプトエタノール存在下で培養した。

コンディションドメディウムの調整は牛胎児血清存在下で4日間培養したリンパ球を無血清培地で洗滌後、無血清培地でさらに1~2日培養して行った。リンパ球増殖の判定は、 $0.1 \sim 0.2 \mu Ci$ の 3H -サイミジン8~24時間の取り込みによった。細胞表面抗原の同定や、増殖抑制実験には、Thy 1, L3T4, Lyt 2, Ia^d, Ia^kに対するモノクローナル抗体を用いた。必要に応じてリコンビナント IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, グラニューロサイトマクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を、特に記載する時以外は、最適濃度で用いた。

結果と考察

ピーナッツレクチン(-)胸腺リンパ球は6~7日間にわたり、レクチン、サイカイン等の存在しない条件下でも良く増殖した。しかしながらこの細胞集団も2メルカプトエタノールが牛胎児血清を除去すると全く、増殖反応を示さなかった。増殖5日目の細胞表面抗原はThy 1 99%, L3T4 75-80%, Lyt 2+L3T4 11%, Lyt 2 < 1%であった。リンパ球の増殖系に、抗Ia^k, Ia^d, L3T4, Lyt 2 抗体を加えると、BALB/CのIaである抗Ia^dとヘルパーの抗原である抗L3T4抗体によって抑制された。このことは上記の細胞表面抗原の結果と考え合わせるとIaとL3T4の反応の下にL3T4のマーカーを有するヘルパーリンパ球の増殖機構が存在すると考えられる。このような増殖反応を示すリンパ球はやがて、IL-1, IL-2, IL-4には良く反応したが、

IL-3やGM-CSFには全く反応しなかった。これらのサイトカイン要求性から判断すると、この自然増殖には少なくともタイプ2のヘルパーTが関与していたことが示唆される。このような自然増殖がオートクライン的にリンフォカインを産生しながら増殖しているのが否かを調べるために培養開始後5~7日目の培養上清のリンパ系細胞に対する作用をみると、ピーナッツレクチン(-)細胞、IL-3依存性細胞FDK-P2、骨髄細胞等に対しては増殖作用を示したがIL-2依存性細胞、エオジノ好性細胞、後根神経筋細胞等に対しては殆んど作用しなかった。従ってIL-2, 4, 5, 6等が産生されている可能性は少ないものと考えられる。このようにピーナッツレクチン(-)リンパ球はIL-1, IL-3様因子を産生しつつ自己増殖をするものと思われるがリコンビナントIL-1やIL-3とはピーナッツレクチン(-)細胞に対する作用が異なるので既存の因子ではない因子によって増殖している可能性を考えている。



Suppressive effects of anti Ia and anti L3T4 antibodies on PNA(-) cell proliferation

胸腺由来筋様細胞が生産する glial cell 増殖因子分離精製の試み

菊池愛子, 加茂功, 松岡加津美

緒言

胸腺は免疫機能に重要な役割を果たしていると共に、発生過程において神経分泌細胞の分化に作用するといわれる。しかしその細胞レベルでの機序は解明されていない。私たちは、さきに、胸腺の筋様細胞培養上清中に、細胞増殖分化活性があり、脳内の細胞とリンパ系の細胞に対する作用が、他の臓器、例えば筋、血管、末梢神経、肺細胞などに比べ高いことを見いだした。その標的細胞としては、未分化な星状細胞で、増殖ばかりでなく分化促進作用も受けていた。残念ながらその後産生細胞の産生機能が失われてしまったが、少なくとも、glial cell 増殖分化因子の一つとして知られる FGF とは異なり、fibroblast を豊富に含む肺や皮膚線維芽細胞の増殖促進作用がないことから、別な因子の存在を考え、産生細胞の再クローニングを行った。今回新たに、しかも同様の作用を持つ筋様細胞のクローンがとれたので、その作用物質の単離を企てた。まだ、部分精製の段階であるがここに報告する。

材料と方法

産生細胞は、新生ラットの胸腺の培養細胞から分離された筋様細胞クローン(87127C)で、通常の増殖培地としては、10%牛胎仔血清を含む RPMI1640 で培養した。産生物質の分離は、細胞がフルシートになった時点で、培地を insulin, transferrin を含む RPMI1640 に代えさらに sodium butyrate 2 mM と E.coli LPS 1 µg/ml を加えて60時間 super induction を行い、その上清をとりわけ、細胞の破碎物などを遠心操作で除いた後、アミコン YM-10 で濃縮を行い、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過による分離精製の材料とした。

標的細胞は、同じく新生ラットの脳より髄膜を剝離し、組織を細切分散させ、シャーレに約18時間培養後、接着細胞を PBS(-) で洗い、トリプシンで細胞をはがし、1X110⁴ cell/200 µ/well (96 well microplate) の条件で、conditioned medium あるいは各 fraction を含む培地で26時間培養した。そして、0.1 µCi の ³H-TdR を加えて16時間後、培養上清を捨て PBS(-) で2回洗浄後 EDTA を加えて24時間放置した後、auto-cell harvester で細胞を採取しラベルの取り込みを計測した。

結果

myoid cell clone 87127C の培養上清の濃縮液を、DEAE-Sephacryl CL-6B を用いてイオン交換ク

ロマトグラフィーを行った結果を図に示す。0.05M - pH8.0 phosphate buffer で平衡化して吸着させ、0-1 M NaCl の linear gradient で溶出させた。その結果、三つの主活性画分が得られた。図の太い実線が標的細胞の取り込み(単位:cpm)を、細い実線は、塩濃度(単位:mmho)、点線はタンパク量(単位:OD_{280nm}での吸収)を示す。

このうち、最も高活性画分を Shephacryl S-200 を用いてゲル濾過を行った。その結果、分子量は約25k であることがわかった。

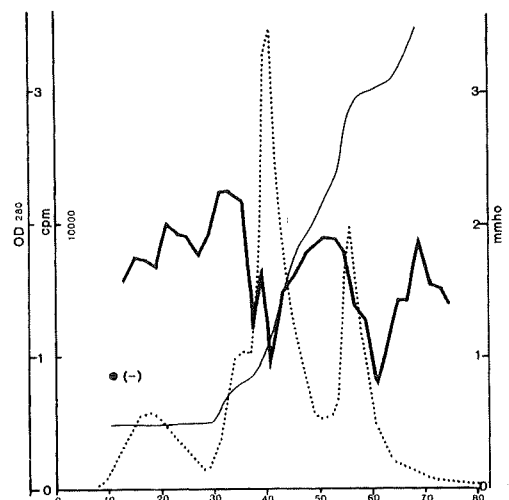
考察

従来星状細胞とリンパ系細胞の増殖分化因子としてはほかに CSF (colony stimulating factor), IL 1, IL 2 などが知られているが、本物質は、少なくとも CSF とは異なる位置に溶出された。また胸腺リンパ球にたいする作用もないことから、IL 1, IL 2 とは異なると考えられる。

本物質は、生体内で、異所ではあるが、発生や生理機能、病態と関連性があると想定されている臓器の特定の細胞種が産生することに興味もたれるので、本物質を単離し同定をすすめ、その作用機序を明らかにしたい。他の、二つの高活性画分についても同様の検討を行う所存である。

文献

Tada - Kikuchi A : et al :
Astrocyte growth enhanced by culture supernatant of a cloned rat thymic myoid cell Brain Res 348,404-408,1985.



Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF)
と複合体IVとの関連性

後藤雄一, 古賀靖敏, 埜中征哉

目 的

Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) は、1980年に福原らにより提唱された疾患概念であり、ミオクロヌスてんかん・小脳失調症・ミオパチーを症状の中核とする、ミトコンドリアミオパチーの一臨床疾患単位と考えられている。MERRFの病態並びに病因を理解するために、生検筋について酵素組織化学的及び生化学的検討を行った。

対象と方法

臨床的にミオクロヌスてんかん・小脳失調を有し、生検筋で ragged-red fiber (RRF) を認めた4例（症例1：37歳，女；症例3：7歳，男；症例4：16歳，女；症例5：15歳，女）と、症例1の母で臨床症状はないが、生検筋にて RRF を認めた症例（症例2：61歳，女）を対象とした。方法は生検筋について、cytochrome c oxidase (CCO, 複合体IV) 染色を含めた各種組織化学的染色を行い、一部の検体は電子顕微鏡的に CCO 活性を検討した。また生化学的には、新鮮ミトコンドリアを分離し、呼吸基質投与時の酸素消費量及び電子伝達系酵素活性を測定した。

結 果

生化学的には、症例1でのみ、CCO活性と酸素消費量の有意な低下が認められた（表1，2）。組織化学的には5例全例が、CCO活性のない筋線維が散在する部分欠損の像を示した（図1）。電顕活性染色では、正常な筋線維はすべてのミトコンドリアが染まり、活性のない筋線維ではすべて染まらず、筋線維間モザイクは存在しても、ミトコンドリア間モザイクは存在しなかった。

考 按

MERRFに認められた生化学的異常については、複合体I，IV，I+IV欠損などの報告がある。今回の症例は、組織化学的には5例とも、生化学的には1例が複合体IV欠損を示した。複合体IVの異常が、MERRFの病態と深く関わっていることが示唆された。

表 1

Respiratory Chain Enzyme Activities

Patient No.	I + III	II + III	IV
1	186.0	165.4	43.3
2	371.8	217.1	249.2
3	1217.1	580.9	255.1
4	652.2	548.9	131.8
5	365.8	669.6	114.4

Control			
Mean	226.9	232.9	270.7
± SD	119.6	96.6	133.0

表 2

State 3 and State 4 Rates of Oxygen Consumption and Respiratory Control and ADP/O Ratios

Patient No.	Respiratory Substrates 5mM Pyruvate and 5mM Malate Added				Respiratory Substrate 5mM Succinate Added			
	State 3	State 4	RCR	ADP/O	State 3	State 4	RCR	ADP/O
1	ND	30.9	ND	ND	ND	55.6	ND	ND
2	206.8	159.1	1.30	2.52	494.4	247.2	2.0	1.8
3	—	—	—	—	—	—	—	—
4	65.9	52.4	1.26	3.86	155.7	131.8	1.18	2.52
5	115.0	106.1	1.20	4.04	255.8	168.3	1.52	2.76

Control								
Mean	190.3	63.1	3.02	3.36	355.6	128.1	3.19	2.28
± SD	92.3	24.2	0.76	0.75	172.4	68.7	1.41	0.34

RCR: respiratory control ratio, ADP/O: adenosine diphosphate/oxygen, ND: not detectable, SD: standard deviation.

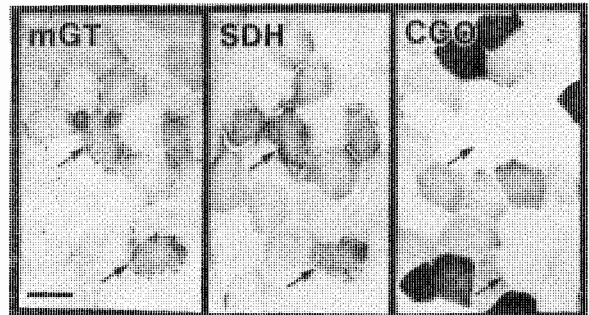


図 1

矢印は RRF を示す (patient 5)
mGT : modified Gomori trichrome stain,
SDH : succinate dehydrogenase stain,
CCO : cytochrome c oxidase stain,
bar = 5 μm.

II 研究業績

10. 機能研究部

1. 研究部一年の歩み

昭和63年度において本研究部で研究に携わったのは、小沢鏝二郎、斎藤公司、吉田幹晴、萩原康子、林謙介、田中光と後藤八重であり、山田圭津と保土原勝子がこれを補助した。その他併任研究員として、熱海佐保子（山梨医科大学解剖学教室 教授）が、客員研究員として木村一郎（早稲田大学人間科学部 教授）、江口新比古（味の素株式会社中央研究所 副部長）および斎藤加代子（東京女子医科大学小児科学教室 講師）が、また研究生として石黒恒男（味の素株式会社中央研究所 主任）および山崎芳仁（埼玉医科大学解剖学教室 助手）が参加した。

林謙介は、昭和63年東京大学理学部動物学教室第二講座（主任水野丈夫教授）にて大学院博士過程を終了した。ニワトリ消化管の発生について研究し理学博士を授与された。

田中光は、昭和63年東京大学薬学部薬品作用学教室（主任斎藤洋教授）にて大学院博士過程を終了した。ラット発生発達期における心臓の薬理学について研究し、薬学博士を授与された。

斎藤公司は、昭和56年1月より室長として採用となったが、昭和63年5月1日を以って東京医科歯科大学医学部薬理学教室助教授として転出した。この間、培養筋細胞の収縮や張力の定量的測定法を開発した。この分野では余人の追従を許さない研究を行った。なお昭和60年11月より9ヶ月間、南カリフォルニア大学神経内科の客員教授を勤めている。また昭和63年5月1日より当研究部併任研究員となり、上記の仕事を継続している。

後藤八重は昭和63年7月20日退職し、兵庫県赤穂市アース製薬株式会社研究所に勤務した。

本年も当部年来の研究対象であるトランスフェリンの研究と、ジストロフィンの研究とを併せて行った。

対外的には、小沢は厚生省 精神・神経委託費による筋ジストロフィー症研究連絡協議会及び野々村班の運営幹事をつとめた。

（部長 小沢鏝二郎）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Shimizu T, Matsumura K, Hashimoto K, Mannen T, Ishiguro T, Eguchi C, Nonaka I, Yoshida M, Ozawa E :

A monoclonal antibody against a synthetic polypeptide fragment of dystrophin (amino acid sequence from position 215 to 264)

Proc Japan Acad B. 64 : 205-208, 1988

- 2) Hagiwara Y, Shimo-Oka T, Okamura K, Ozawa E :

Basis for the assay of myogenic cell growth in vitro using creatine kinase activity as an index, with special reference to measurement of power ratio of transferrins in growth promotion

Japan J Pharmacol 49 : 53-58, 1989

- 3) Kimura I, Gotoh Y, Ozawa E :

Further purification of a fibroblast growth factor-like factor from chick embryo extract by heparin-affinity chromatography

In Vitro Cell Develop Biol 25 : 236-242, 1989

b. 著書

c. 総説

d. 班会議報告書

- 1) 小沢鏝二郎, 野呂知加子 :

衛星細胞の増殖にかかわる因子

厚生省精神・神経疾患：筋ジストロフィー症の発症に関する遺伝子工学的基礎研究班

昭和62年度研究報告書 23-27, 1988

e. その他

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

- 1) 萩原康子, 吉田幹晴, 小沢鏝二郎 :

ラット骨格筋の発生に伴う Duchenne 型筋ジストロフィー症遺伝子産物 (dystrophin) の発現

II 研究業績

第16回薬物活性シンポジウム, 富山, 10.26, 1988

b. 国際学会

1) Ozawa E, Saito K:

Contraction of intact and skinned chick myotube in culture

17th Annual Meetings of UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Steam Boat Spring, USA, March 6, 1988

c. 一般学会

1) 萩原康子, 吉田幹晴, 小沢鉄二郎:

ラット骨格筋の発生に伴う dystrophin の細胞膜への発現

第62回日本薬理学会総会, 京都, 3.26, 1989 (Japan J. Pharmacol 49 (suppl): 225p, 1989)

C. 班会議発表

1) 後藤八重, 斎藤公司, 小沢鉄二郎:

トランスフェリン受容体のラット骨格筋における分布

第12回鉄代謝研究会, 岡山, 11.7, 1988

2) 小沢鉄二郎, 萩原康子, 吉田幹晴:

ラット骨格筋の発生に伴う dystrophin の細胞膜への発現

厚生省精神・神経疾患: 筋ジストロフィー症の発症に関する遺伝子工学的基礎研究班, 昭和63年度班会議, 東京, 12.8, 1988

3. 主な研究報告

ジストロフィン精製の試み

吉田幹晴, 小沢鉄二郎

ジストロフィンは正常なヒトの筋肉表面膜に存在する巨大なタンパク質で、DMD患者の筋肉では欠如しており、この事が病気の原因と考えられている(1)。ジストロフィンについてはcDNAの塩基配列から推定されたアミノ酸の一次配列に基づくある程度の構造予測が為されているだけで、その性質については全く不明である(2)。従ってDMD発症のメカニズムを明らかにするために、ジストロフィンの精製を行い、その性質を突き止めることが緊急課題である。

材料と方法

ジストロフィン抗血清(P-34a)を兎で作製した。ヒトジストロフィンのアミノ酸配列3495番目より50残基を含む合成ペプチドを抗原とし、FIAとMDP(3)の混合物をアジュバントとして免疫した。

抗血清の一部は、プロテインAカラムを利用したアフィニティ精製によってIgGとし、アガロースに不溶化した。ジストロフィン精製のための出発物質として、新鮮な蟹食い猿の骨格筋を使った。ジストロフィンの検出はVECTASTAIN社のABCキットをもちいたウェスタンブロットで行った。

結果と考察

これまで使われていた抗血清(P-04bまたはc)はウェスタンブロットの際、背景が強く出て使いにくかったが、P-34aは高希釈(>1000倍)に耐える良い抗血清であった。この抗血清はP-04bまたはcと同様、ヒトまたは猿のジストロフィンと反応し、また各々の筋肉表面膜を染めた。

筋肉をGuba-Straub溶液中でホモゲナイズし、遠心分離するとジストロフィンは主として沈澱側にあった。これを低イオン強度下で抽出した後、ウェスタンブロットでジストロフィンを検出しながら、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー(DEAE)、分子ふるいクロマトグラフィー、そして抗体アフィニティクロマトグラフィーを順次行い、精製を進めた。このようにして得られた標品をSDSゲル電気泳動にかけ、銀染色すると、図1に示すように分子量約400kdの3本のバンドと約53kd及び約43kdのバンドからなっていた。約53kdのバンドはウェスタンブロットでも強く染まっているが、これは抗体カラム精製後に現れたタンパク質で0.2Mgly-HCl(pH2.5)で溶出の際ゲルからリークしてきたIgGの重鎖と考えられる。約400kdのバンドはいずれもp-34aと反応し、ジストロフィンおよびその分解物

と考えられる。一番分子量の大きいバンドが新鮮な筋肉中に見られるジストロフィンのバンドと一致し、また精製が進むに連れて、より低分子のバンドが増加して行くのを我々は観察している。従って得られた標品は約43kdのタンパク質(アクチン)を一部混入した、ジストロフィンとしてはかなり精製度の高いものである。この精製法の問題点は、プロテアーゼが作用していることも問題であるが、それよりもジストロフィンの抽出液にアクチンが混入して来ることである。このアクチンは超遠心分離では完全に除けない。しかもこの処理でかなりのジストロフィンが失われてしまう(アクチンと結合しているからであろう)。除けなかったアクチンは後のクロマトグラフィーの分解能を低下させる。ジストロフィンとアクチンを如何に分離するかが今後の問題である。

- (1) Sugita, H. et al., Proc. Japan Acad., 64, 210-212 (1988)
- (2) Koenig, M. et al., Cell, 53, 219-228 (1988)
- (3) Ellouz, F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 1317- (1974)

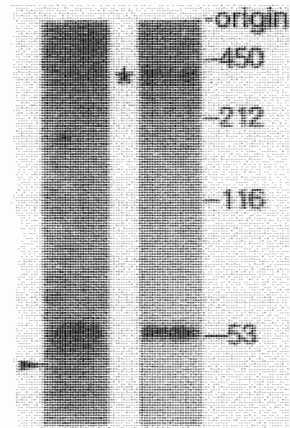


図1

部分精製されたジストロフィンのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン(A)とウェスタンブロット(B)。タンパク質は銀染色法で染めた。分子量マーカー: ラミニンA(450kd), ミオシン重鎖(212kd), beta-ガラクトシダーゼ(116kd), グルタミン酸脱水素酵素(53kd)。ジストロフィン(★), アクチン(▶)

ラット骨格筋の発生に伴う dystrophin の細胞膜への発現

萩原康子, 吉田幹晴, 小沢鏝二郎

Dystrophin は, Duchenne muscular dystrophy (DMD) 遺伝子産物であり, 正常な筋の細胞膜に存在し, DMD 患者の骨格筋及び心筋の細胞膜には欠除している(1)。今回は, 正常ラット骨格筋の発生過程のどの時期から dystrophin が細胞膜に発現するのかを, 主に免疫組織化学的手法を用いて調べた。

材料と方法

材料は, Wistar 系ラットの EDL 筋を用いた。胎児の場合は, ちつ栓発現を 0 日令とした妊娠ラットを麻酔し, 適当な日令の胎児を取り出して用いた。Dystrophin 抗体として, cDNA sequence のアミノ酸残基 440-489 に対応する合成ポリペプチドを抗原としてウサギで作製した抗血清を用いた。免疫組織化学的手法および Immunoblot analysis は, 常法に従って行った(2)。発生期の筋細胞同定の為に, 連続切片を抗 troponin T 血清 (anti-TNT) を用いて調べた。

結果

1. 抗血清の性質

抗血清 (anti-D) は, Immunoblot analysis によって正常ヒト筋抽出物中の分子量約 400 KD のタンパク質を認識した。このタンパク質は DMD 患者筋抽出物には存在しなかった。さらに, cross section を anti-D により免疫染色した結果, 正常筋ではすべての筋細胞膜が均一に染まったが, DMD の患者筋の細胞膜は染まらなかった。即ち anti-D が dystrophin を認識する。この anti-D は, 8 週令ラット骨格筋細胞の細胞膜を染めた。

2. 発生過程における dystrophin の発現

a) 免疫組織化学的手法

胎児 15 日令では, anti-TNT で染まる細胞が出現しており, primary myotube が形成されていることが示された。胎児 18 日令では, anti-TNT で染まる中心核を持つ myotube が多数見られた。しかし, 胎児 15 日令, 18 日令の myotube は anti-D で細胞膜が染まらなかった (図 A)。胎児 19 日令では, primary myotube と secondary myotube がみられたが, primary myotube のいくつかは細胞膜が anti-D で染まった。胎児 20 日令では, secondary myotube の数が増加した。ほとんどすべての primary myotube およびいくつかの secondary myotube の細胞膜が部分的に anti-D で染まった (図 B)。生後 3 日令になると中心核を持つ細胞の数が減少した。ほとんどの myotube の細胞膜が anti-D で染まったが, いくつかの

myotube では細胞膜全周が染まるまでには至らなかった。生後 5 日令では, ほとんどすべての myotube の細胞膜が全周染まり (図 C), 生後 8 週令の adult (図 D) の筋組織での染まりに近ずいた。生後 9 日令, 21 日令と進むにつれて筋細胞はサイズが大きくなったが, 細胞膜の anti-D での染まりは adult とほぼ同様に全周が均一にそまった。

b) Immunoblot analysis

ラットおよび, ヒト筋の dystrophin は電気泳動上同じ分子量を示した。胎児 15 日令の筋抽出物中には, 僅かな量の dystrophin が認められ, 発生が進むにつれてその量は増加した。細胞膜上に発現し始めた胎児 19 日令では急激に増加し, 生後 0 日令では 8 週令の adult とほぼ同様のレベルになった。

考察

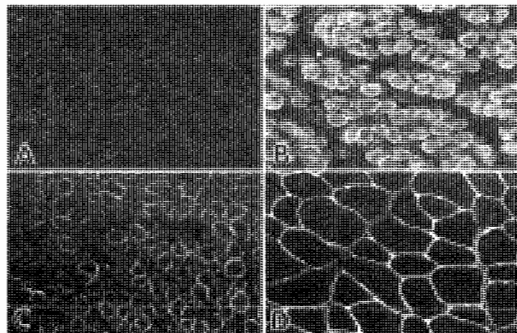
ラット筋発生の初期において, myotube は胎児 15 日令で形成されているが dystrophin の細胞膜への発現はない。その後の発達につれ発現し始め, 出生直前から急速に増加する。従って dystrophin は運動量の増加に対応すべく細胞膜に発現するようにみえる。ヒト胎児でのデータ(3)は材料の問題から限られたものではあるが, 発現パターンが類似している。

文献

1. Sugita, H. et al. Proc. Japan Acad. 64, 37-39 (1988)
2. Hagiwara, Y. et al. Protplasma in press.
3. Shimizu, T. et al. Proc. Japan Acad. 64, 205-208 (1988)

(図の説明)

ラット EDL 筋凍結切片を dystrophin 抗体と反応させた後, FITC 標識二次抗体で蛍光染色した。A: 胎児 18 日, B: 胎児 20 日, C: 生後 5 日, D: 生後 8 週。



偏平多層上皮におけるトランスフェリンレセプター

林 謙介, 小沢鏡二郎

トランスフェリンレセプター (TfR) は、組織液中のトランスフェリンを細胞の膜上で捕獲し、細胞はトランスフェリンから鉄イオンを取り込む。TfR の発現は細胞による鉄イオンの需要に応じて調節されていると考えられている。DNA 合成経路に、鉄を要求する酵素が関与しているために、一般に増殖の盛んな細胞は TfR を多く発現している。TfR を多くもつにも関わらず、増殖しない細胞としては、鉄タンパク質を多量に合成する赤芽球細胞 (ヘモグロビン)、筋細胞 (ミオグロビン) が知られている。我々は、偏平多層上皮中で、増殖を終え、終末分化を迎えた細胞が TfR を多く持っていることを発見した。この細胞によって多量に合成される鉄タンパク質は知られていない。

材料と方法

動物は Wistar 系ラット約 8 週令のものを用いた。

TfR は、凍結切片上で抗ラット TfR モノクローナル抗体 OX26 を用いた ABC 法-DAB 発色により検出した。チミジンの取り込みは小さく切り出した組織を $10 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^3H] TdR 中で 30 分間保温し、固定・薄切後オートラジオグラフィで観察した。HE 染色, SDH (succinic dehydrogenase) 組織化学は常法どおり行った。

結果

偏平多層上皮は形態的に、基底細胞層 (B)、偏平細胞層 (S)、ケラチン化死細胞層 (K) の 3 つの細胞層に分けることができる (Fig. 1)。TfR は、舌、口腔内上皮、食道、ちつ、無毛皮膚の基底細胞層に少量、偏平細胞層に大量に検出された (Fig. 2)。移行上皮である膀胱上皮にはほとんどなかった。

偏平多層上皮における TfR と、細胞増殖との相関を調べるために、食道上皮細胞へのチミジンの取り込みを見ると、DNA 合成中の細胞は基底細胞層に限って観察され、基底細胞層よりも TfR の発現の高い偏平細胞層にはなかった (Fig. 3)。

細胞内の鉄イオンは酸化還元酵素の補助因子として使われることが多く、その多くはミトコンドリア内で呼吸活性を担っていると思われる。そこで、偏平細胞層での TfR の発現がそこでの呼吸活性を反映している可能性が考えられたため、食道上皮におけるミトコンドリアの局在を SDH 組織化学によって調べた。ミトコンドリアは、偏平細胞層よりも、基底細胞層に多くあった (Fig. 3)。

考察

動物の体の大部分は偏平多層上皮で覆われている。偏平多層上皮を構成する細胞は、基底細胞層に存在する幹細胞の盛んな分裂によって供給され、偏平細胞層に移動すると分裂を停止し、終末分化を遂げ、やがて死に、死細胞層を形成する。偏平細胞層ではケラチンなどの構造タンパク質が盛んに合成され、それらが細胞死と同時に重合することによって、機械的損傷を防ぐという偏平多層上皮の機能が発揮される。

我々は、偏平細胞層に大量の TfR が存在することを見だし、その存在が DNA 合成活性によっても、呼吸活性によっても説明がつかないことを明らかにした。このことは偏平多層上皮の機能発現に、鉄イオンが未知の役割を果たしていることを示している。

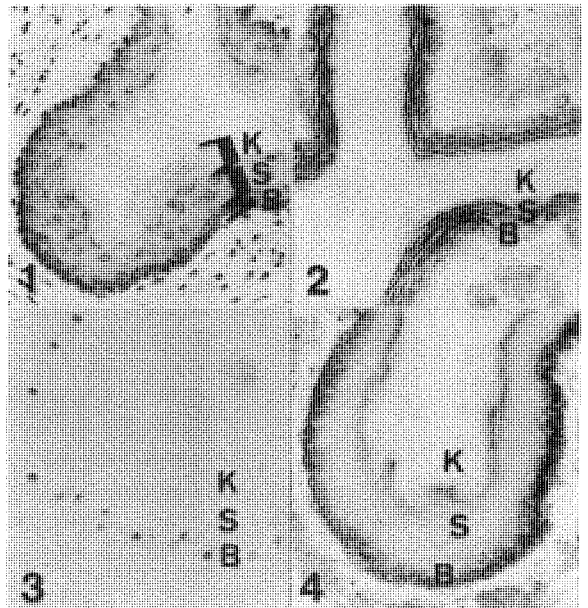


Fig 1. ラット食道上皮 HE染色
2. 同, 抗TfR免疫組織化学
3. [^3H] TdRを取り込ませた食道のオートラジオグラフィ
4. SDH染色
(B) 基底細胞層, (S) 偏平細胞層, (K) ケラチン化死細胞層

ヒト筋紡錘内線維における dystrophin の発現

田中光, 吉田幹晴, 小沢鏝二郎

Duchenne 型筋 dystrophy (DMD) は X 染色体上の単一遺伝子の異常に起因することが知られている。近年の免疫組織化学的研究により, その遺伝子産物 dystrophin が正常な筋線維の細胞膜上に存在していることが明らかになった。Dystrophin は DMD 筋では発現しておらず, dystrophin の欠損が筋変性の原因であると考えられている。

筋紡錘は筋緊張度の制御をつかさどる組織で, そこに含まれる筋線維(錘内線維)は中央部が張力センサーの役割を果している。DMD においては, 普通の筋線維(錘外線維)の変性がかなり進んだ段階においても錘内線維はほぼ正常に保たれていることが知られている。そこで今回われわれは, 正常筋及び DMD 筋の筋紡錘における dystrophin の発現を調べる目的で dystrophin のアミノ酸配列に対応した合成ペプチドに対する抗血清を作製し, 抗体染色を行った。

方法

抗血清は, dystrophin の cDNA sequence のアミノ酸残基 11-60 に対応するペプチドを抗原とする p-00 a と, 3495-3544 に対応するペプチドを抗原とする p-34 c の 2 つを作製した。白色日本種のウサギに 0.2 mg の抗原および 0.1-0.2 mg の muramyl dipeptide を Freund's incomplete adjuvant とともに 2 週間おきに 3 回注射した。ペプチドの合成は Sugita et al., Proc. Japan Acad. 64 b : 37-39., Immunoblotting 及び組織の抗体染色は Hagiwara et al., Protoplasma, in press. の方法にしたがって行った。ヒト筋肉サンプルは, 微細構造研究部の埜中征哉部長に御提供いただいた。

結果

抗血清の characterization

Immunoblotting の結果, 抗血清 P-00 a および P-34 c はともに正常筋において dystrophin に相当する分子量約 400 kd の蛋白を認識した。この蛋白は DMD 筋には存在しなかった。組織染色においては P-00 a および P-34 c はともに正常筋の錘外線維の細胞膜のみを染め, DMD 筋は染めなかった(図)。これらの結果から, P-00 a および P-34 c はともに dystrophin をほぼ特異的に認識していることが確認された。

筋紡錘における dystrophin の発現

正常筋においては, P-00 a, P-34 c とともに錘外線維同様に錘内線維の細胞表面膜を一様に染めた。細

胞質, 筋紡錘の鞘や組織液などには強い染まりは見られなかった。また, DMD 筋はいずれの抗体によっても染まらなかった。

考察

今回我々は抗 dystrophin 抗血清として P-00, P-34 を作製しその特異性を確認した。これまでに用いてきた P-02, P-04 とあわせると dystrophin の 4 つの異なる部位に対する抗体を得たことになる。いずれの抗体によっても正常筋線維の細胞表面膜が染まり, DMD 筋においては染まりが見られなかった。このことから, Becker 型 dystrophy において様々な分子量の dystrophin が発現されている (Arakata et al. 1989 in press) のに対して, DMD においてはいかなる形の dystrophin も発現されていないことが考えられる。

筋紡錘の組織染色により, dystrophin は正常筋の錘内線維の細胞表面膜上にも発現されており, DMD 筋錘内線維では発現されていないことがあきらかになった。DMD において, 錘内線維でも dystrophin が欠損しているにもかかわらず, 他の線維の変性がかなり進行した後まではほぼ正常に保たれていることは興味深く, dystrophin の生理的機能を考える上で有益な情報が得られるものとする。

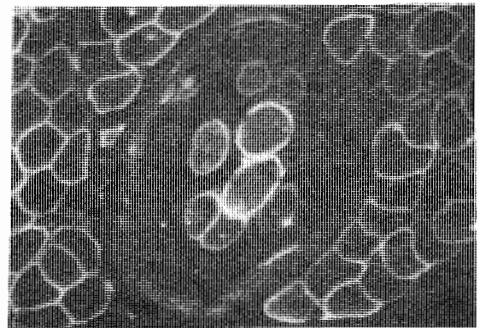


図 正常ヒト骨格筋横断切片を抗 dystrophin 抗血清 P34 c で染色したもの。錘内線維, 錘外線維ともに細胞表面膜が染まっている。

400倍

11. 代謝研究部

1. 研究部一年の歩み

前部長退官（昭63.3）後，新部長着任までの間，中枢神経系細胞の発達とその障害についての生化学的研究として，以下の課題が取り組まれた。

1) ミエリン形成と関連蛋白

ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトを単離後培養した場合，ニューロン（Neu）の添加がミエリン特異蛋白であるミエリン塩基性蛋白（MBP）の増量に著明な効果を示した。本作用を示す可溶性の蛋白性因子をNeu細胞体より精製した。

2) 脳生体膜情報伝達とてんかん

イノシトールリン脂質代謝によって生成する第二メッセンジャーの一つであるIP₃に対するレセプターとけいれん発現との関連，およびIP₃依存性の生体膜からの細胞内Ca²⁺遊離能に対する抗てんかん薬の影響を検討した。

又，平成元年3月1日新部長高坂新一が着任してからは，従来の研究に加え遺伝子導入，神経移植等の技術を用いての解析が行われることとなり，その準備が進められている。

本年度の研究は主に今澤正興室長，中嶋一行研究員，甲有理賃金研究員によって行われた。又，研究生として山内敏代（城西大学薬学部，昭63.4～9）が在籍し，研究に参加した。平成元年3月からは前述の新部長高坂新一が着任し，又，亀井幸（平1.3）が賃金研究助手となった。

（部長 高坂新一）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Tsukada Y :
Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats
Dev Brain Res 38 : 201-210, 1988
- 2) Kohsaka S, Takayama H, Ueda T, Toya S, Tsukada Y :
Reorganization of cerebellar cell suspension transplanted into the weaver mutant cerebellum and immunohistochemical detection of synaptic formation
Neurosci Res 6 : 162-166, 1988
- 3) 吉田一成, 高坂新一, 倉持 茂, 篠崎智文, 大谷光弘, 塚田裕三, 戸谷重雄 :
Oligodendroglioma におけるミエリン特異蛋白の発現—免疫組織化学的検討
脳腫瘍病理 5 : 145-150, 1988
- 4) Uchida K, Takamatsu K, Kaneda N, Toya S, Tsukada Y, Kurosawa Y, Fujita K, Nagatsu T, Kohsaka S :
Transfection of tyrosine hydroxylase cDNA into C6 cells. The synthesis and release of L-DOPA
Proc Jpn Acad 64 : 290-293, 1988
- 5) Kohsaka S, Shinozaki T, Nakano Y, Takei K, Toya S, Tsukada Y :
Expression of Ia antigen on vascular endothelial cells in mouse cerebral tissue grafted into the third ventricle of rat brain
Brain Res 484 : 340-347, 1989

b. 著書

- 1) 高坂新一, 井上 洋, 戸谷重雄, 塚田裕三 :
神経組織の移植
最新脳の科学 I (伊藤正男, 桑原武夫編), 同文書院, 東京, p343-359, 1988

c. 総説

- 1) 高坂新一, 中野幸照, 篠崎智文, 戸谷重雄, 塚田裕三 :
神経組織の移植における血管支配と血液脳関門

Bio Medica 3 : 719-722, 1988

- 2) 高坂新一, 高山秀一, 井上 洋, 戸谷重雄, 塚田裕三 :

神経組織の移植研究

神経科学レビュー 2, (伊藤正男, 榎林博太郎編), 医学書院, 東京, p 151-172, 1988

- 3) 高坂新一, 高山秀一, 篠崎智文, 戸谷重雄, 塚田裕三 :

小脳への細胞移植

代謝(代謝病ハイライト) 25 : 569-573, 1988

- 4) 井上 洋, 高山秀一, 高坂新一, 中野幸照, 大谷光弘, 塚田裕三, 戸谷重雄 :

脳発育障害ミュータント動物への脳内移植

神経進歩 32 : 794-807, 1988

- 5) 高坂新一, 吉田一成, 井端由紀郎, 戸谷重雄, 塚田裕三 :

神経栄養因子

神経進歩 32 : 839-850, 1988

- 6) 高坂新一, 塚田裕三 :

オリゴデンドログリアの脳内移植

医学のあゆみ 145 : 341-345, 1988

- 7) 高坂新一, 井上 洋, 戸谷重雄, 塚田裕三 :

大脳基底核疾患と脳細胞移植

代謝 25 : 45-53, 1988

d. 班会議報告書

- 1) 高坂新一, 篠崎智文, 中野幸照, 竹居光太郎, 戸谷重雄, 塚田裕三 :

異種間脳組織移植における免疫拒絶反応機序に関する基礎的研究—MHC抗原の発現—

厚生省精神・神経疾患・脳発達障害の発現機序と対策に関する開発的研究班, 昭和63年度研究報告書, 75-81, 1989

- 2) 高坂新一, 高宮至昭, 戸谷重雄, 塚田裕三 :

脳損傷後反応性アストロサイトの出現様式

厚生省精神・神経疾患・中枢神経系の機能修復に関する開発的研究班, 昭和63年度研究報告書, 11-19, 1989

- 3) 高坂新一, 長池一博, 阿相皓晃 :

神経回路網の形成に関与するラット海馬由来神経発育因子

II 研究業績

文部省特定研究・神経回路網の可塑性, 昭和63年度研究報告書, 116-117, 1989

4) 今澤正興, 甲 有理, 宮本侃治 :

けいれん発現と脳生体膜機能—イノシトールトリスリン酸 (IP_3) のけいれん発現への関与の検討
厚生省精神・神経疾患・難治てんかんの予防と対策に関する研究班, 昭和63年度研究報告書, 11-15, 1989

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 高坂新一 :

移植免疫と血管支配

文部省重点領域研究・運動系の分子生物機構班, 昭和63年度ワークショップ—神経組織の移植と再生促進—, 那須, 7.12, 1988

2) 高坂新一 :

神経組織の移植における免疫応答

第3回 Biomedicine Symposium —脳の老化と再生, 細胞生物学的アプローチ—, 富士吉田, 9.16, 1988

3) 高坂新一 :

神経系における成長因子

第61回日本生化学会大会シンポジウム—これからのニューロサイエンス—, 東京, 10.4, 1988

4) 高坂新一 :

神経組織の移植

第10回新潟神経内科シンポジウム—老年期痴呆: 神経組織障害の修復—, 新潟, 11.5, 1988

5) 高坂新一 :

神経組織移植の脳研究への応用

厚生省発達障害関係研究班合同シンポジウム, 東京, 11.18, 1988

6) 高坂新一 :

脳組織の移植における免疫応答

日本学術会議第24回脳のシンポジウム, 金沢, 3.18, 1989

7) 今澤正興, 甲 有理, 宮本侃治, 西村成子, 八木和一 :

けいれん発作と IP_3 レセプターの関連性の検討

第22回日本てんかん学会スペシャルセッション, 金沢, 10. 7, 1988

b. 国際学会

- 1) Takei K, Nakano Y, Toya S, Tsukada Y, Kohsaka S :
Mosaic reconstruction of blood vessels within the grafted tissue in xenogeneic neural transplantation
International Symposium on Information Transduction and Processing in Biological Systems, Kagawa, Mar. 13, 1989
- 2) Uchida K, Takamatsu K, Toya S, Tsukada Y, Kaneda N, Nagatsu T, Kohsaka S :
Transfection of tyrosine hydroxylase c-DNA into cultured nonneuronal cells
International Symposium on Information Transduction and Processing in Biological Systems, Kagawa, Mar. 14, 1989

c. 一般学会

- 1) 高坂新一, 井端由紀郎, 吉田一成, 井上芳郎, 戸谷重雄, 塚田裕三 :
ニューロンの発育におけるアストログリアの機能的役割
第65回日本生理学会大会, 和歌山, 4. 4, 1988
- 2) 中野幸照, 高坂新一, 篠崎智文, 井上 洋, 戸谷重雄, 塚田裕三 :
神経組織の移植における血管新生について
第65回日本生理学会大会, 和歌山, 4. 4, 1988
- 3) 藤城正敏, 高坂新一, 高松 研, 塚田裕三 :
ミエリン特異酵素CNPの分子多様性について
第65回日本生理学会大会, 和歌山, 4. 6, 1988
- 4) 井端由紀郎, 高坂新一, 山村初雄, 阿相皓晃, 戸谷重雄, 塚田裕三 :
アストログリア膜表面におけるニューロン突起伸展促進物質の検討
第31回日本神経化学学会大会, 仙台, 10.27, 1988
- 5) 高坂新一, 阿相皓晃, 榊原真人, 塚田裕三, 長池一博, 本多利幸, 近藤 淳 :
牛海馬由来神経栄養因子の解析
第12回神経科学学術集会, 名古屋, 12. 8, 1988
- 6) 阿相皓晃, M. Schachner, 高坂新一 :
神経成長円錐の形態形成と細胞間接着因子L1
第12回神経科学学術集会, 名古屋, 12. 8, 1988

II 研究業績

- 7) 中野幸照, 高坂新一, 竹居光太郎, 戸谷重雄, 塚田裕三:
異種間脳組織の移植における血管構築について
第12回神経科学学術集会, 名古屋, 12.9, 1988
- 8) 中野幸照, 高坂新一, 竹居光太郎, 大谷光弘, 戸谷重雄, 塚田裕三:
異種間神経組織移植における血管新生
神経組織の成長・再生・移植研究会第3回学術集会, 大阪, 12.17, 1988
- 9) 内田耕一, 高坂新一, 塚田裕三, 戸谷重雄, 金田典雄, 永津俊治:
ヒト tyrosine hydroxylase (TH) cDNA 導入培養細胞の脳内移植
神経組織の成長・再生・移植研究会第3回学術集会, 大阪, 12.17, 1988
- 10) 中嶋一行, 今澤正興, 宮本侃治:
培養オリゴデンドサイトの成熟促進物質について
第61回日本生化学会大会, 東京, 10.5, 1988
- 11) 今澤正興, 山内敏代, 甲 有理, 宮本侃治:
脳膜分画 IP₃ レセプターの結合能に及ぼすポリアミンの影響について
第61回日本生化学会大会, 東京, 10.6, 1988
- 12) 中嶋一行, 今澤正興, 宮本侃治:
ニューロン培養上清に含まれるオリゴデンドロサイト成熟促進物質の部分精製について
第31回日本神経化学会大会, 仙台, 10.27, 1988

C. 班会議発表

- 1) 高坂新一:
大脳皮質神経細胞の生存維持因子に関する神経化学的研究
文部省重点領域・運動系の分子生物機構班, 昭和63年度班会議, 東京, 12.14, 1988
- 2) 高坂新一:
脳損傷後反応性アストロサイトの出現様式について
厚生省精神・神経疾患・中枢神経系の機能修復促進に関する開発的研究班, 昭和63年度班会議,
東京, 1.7, 1989
- 3) 高坂新一:
神経回路網の形成に関与するラット海馬由来神経発育因子
文部省特定研究・可塑性神経回路, 昭和63年度班会議, 東京, 2.10, 1989

4) 高坂新一 :

脳組織移植における血管新生と免疫応答

厚生省精神・神経疾患・脳発達障害の発現機序と対策に関する開発的研究班, 昭和63年度班会議,
東京, 2.18, 1989

5) 高坂新一, 井端由紀郎, 山村初雄, 阿相皓晃 :

神経細胞と各種グリア細胞の相互認識と生体防御反応に関する研究—神経細胞の突起伸展に与するアストログリア膜表面物質について—

ヒューマンサイエンス官民共同プロジェクト第3分野第4テーマ(脳神経系機能の生体防御機構の解明)研究報告会, 東京, 1.20, 1989

6) 今澤正興, 甲 有理, 宮本侃治 :

けいれん発現と脳生体膜機能—イノシトールトリリン酸(IP₃)のけいれん発現への関与の検討

厚生省精神・神経疾患・難治てんかんの予防と対策に関する研究班, 東京, 12.8, 1988

7) 今澤正興, 中嶋一行, 宮本侃治 :

神経細胞と各種グリア細胞の相互認識と生体防御反応に関する研究—ニューロン培養上清に含まれるオリゴデンドロサイトのMBP増加因子の精製

ヒューマンサイエンス官民共同プロジェクト第3分野第4テーマ(脳神経系機能の生体防御機構の解明)研究報告会, 東京1.20, 1989

II 研究業績

3. 主な研究報告

培養ニューロン由来のオリゴデンドロサイト成熟因子の精製

中嶋一行, 今澤正興

中枢神経系のミエリンを形成する細胞であるオリゴデンドロサイト (OLG) の成熟過程を神経系細胞間の相互作用の面から検討してきた。昨年は分離した OLG にアストロサイト, ニューロン (Neu) などの細胞を共培養して, ミエリン特異タンパクである MBP を分析し, Neu の添加が著明な MBP 増量をもたらすことを報告した。さらに Neu より分泌される液性因子が本効果を示すことが推測され, その因子の Neu 培養上清からの分離, 精製を進めてきたが, 今回は培養 Neu 細胞体より精製を行った結果について報告する。

方法

Neu は孵卵 7 日のニワトリ胚脳より分離し,¹⁾ 5 日間培養し, 培養上清と細胞をそれぞれ回収した。細胞はホモジナイズし, ポストミクロソーム画分を得, 出発材料とした。

OLG は孵卵 14 日のニワトリ胚脳よりパーコール遠心法により分離し,²⁾ 4~5 日間培養を行い, MBP 量および CNP 活性を測定した。

結果と考察

Neu 培養上清中に分泌される液性因子は, 当初ハイドロキシアパタイト, CM セルロースにより³⁾ 精製を行ったが, 回収量は微量で, 種々の分析には不十分であったため, 量的に多く存在すると推定された Neu の細胞体からの分離を試みた。方法の概略は図 1 に示した。まず pH 7.4-4.0 の範囲のクロマトフォーカシングを行った。MBP 増量活性は pI 5.4-5.0 に現れた。この活性画分を塩析により回収し, ヘパリンセファロースに添加した。MBP 増量活性は 2M NaCl 溶出画分には回収されず, 大部分が非吸着画分に検出された。活性画分を Tris HCl (pH 7.4) で平衡化した CM セファデックス C-50 カラムに吸着させ, 0.1M, 0.5M, 1.0M NaCl で溶出すると, 本活性は 1M NaCl 溶出画分に回収された。この画分を SDS-PAGE により検索すると, MW 1.5 万のタンパクが主に観察された (図 2)。最終的にこのタンパクはセファデックス G-75 カラムによりほぼ均一な状態に精製された。収量は培養上清からの精製に比し, 2~3 倍であった。OLG の MBP 増量因子として精製した MW 1.5 万のタンパクは等電点および分子量について, aFGF⁴⁾ と類似しているが, ヘパリンセファロースに吸着しない点で FGF と異なると思われる。

文献

- 1) Aizenman Y. et al. : Proc. Natl Acad. Sci. USA 83 : 2263-2266, 1986
- 2) Kumagai H. et al. : Dev. Brain Res. 27 : 270-274, 1986
- 3) 中嶋一行ら : 生化学, 60 : 624, 1988
- 4) Gospodarowicz D. : Methods in Enzymology, 147 : 106-119, 1987

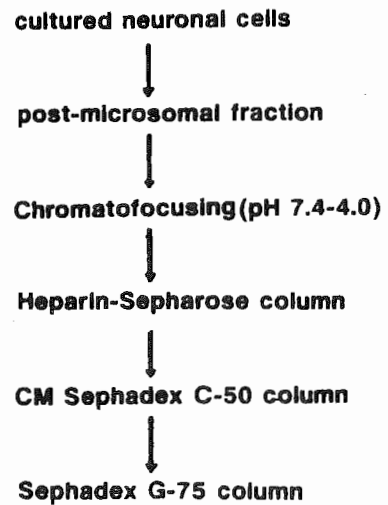


図 1. オリゴデンドロサイト成熟因子の精製

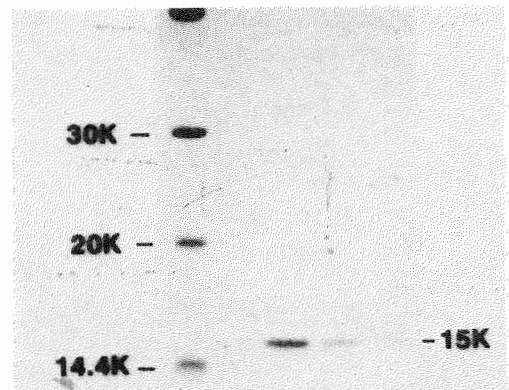


図 2. オリゴデンドロサイト成熟因子の SDS-PAGE CM セファデックス C-50 カラムクロマトグラフィにおける 1.0M NaCl 溶出画分について SDS-PAGE を行った。

イノシトールトリスリン酸 (IP₃) レセプターのけいれん発現への関与の検討

今澤正興, 甲有理, 山内敏代

けいれん発現機序について, 生体膜の生化学的機能の面から検討している。本年度はイノシトールリン脂質代謝によって生成する第二メッセンジャーの一つである IP₃ に対するレセプターとけいれん発現との関連を検討した。IP₃ レセプターについては Snyder らのグループにより¹⁾その精製と性質に関する研究が進展しつつあり, 細胞内 Ca²⁺ チャネルとして細胞の興奮現象との関係が注目されている。

方法

[³H]IP₃ 結合活性の測定は Worley らの条件¹⁾を若干変更して行った。ラット脳膜分画を 1 nM の [³H]IP₃ と共に 50 mM TAPS, pH 8.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT 中, 4 °C, 15 分間インキュベートし, 反応液をグラスフィルター (GF/C) 上に透過後, 液体シンチレーションカウンターにより結合放射能を測定した。Ca²⁺ 遊離活性の測定は小脳膜分画を 1 mM ATP, 10 mM クレアチンリン酸, 20 IU/ml クレアチンリン酸キナーゼを含む pH 7.2 の等張緩衝液中, 37 °C でインキュベートして行った。遊離 Ca²⁺ 濃度は蛍光色素 Fura-2 を用いて測定した。

結果および考察

IP₃ のレセプター結合に及ぼす種々の薬物の影響を検討した。けいれん誘発剤のペンチレンテトラゾール (10 mM), および抗てんかん薬フェニトイン (PHT), バルプロ酸は結合能に影響を与えなかった (表 1)。一方 Ca²⁺ チャネルブロッカーのうち, フルナリジン, ニカルジピン, シンナリジンでは高濃度で IP₃ 結合の増強作用が認められ, この現象はこれらの中枢性薬物の副作用と関連していることも考えられる。また, てんかんモデル動物であるキンドリングラットの種々の脳部位における IP₃ レセプターと対照との間には, その Kd 値, Bmax 値において有意の差は認められなかった。

小脳膜分画よりの Ca²⁺ 遊離能に対する薬物の影響を検討すると, IP₃ 依存性の Ca²⁺ 遊離能の減少が, 抗てんかん薬 PHT, フェノバルビタール, カルバマゼピンにより認められた。一方 IP₃ 依存性 Ca²⁺ 遊離能を阻害すると報告されている²⁾Ca²⁺ チャネルブロッカー, フルナリジン, シンナリジンでは影響が認められなかった (表 2)。以上の結果より IP₃ レセプターのけいれん発現への関与については, 今後さらに検討が必要と考察される。

文献

1) Worley P. F., Barabam J. M., Supattapone

S., Wilson V. S., Snyder S. H.: J. Biol. Chem. 262: 12132-12136, 1987

2) Seiler S. M., Arnold A. J., Stanton H. C.: Biochem. Pharmacol. 36: 3331-3337, 1987

表 1. 抗てんかん薬および Ca²⁺ チャネルブロッカーの IP₃ 結合に及ぼす影響

[³ H]IP ₃ binding	
	%
Control	100
Phenytoin, 100 μM	97 ± 10
Sodium valproate, 2 mM	108 ± 8
Diltiazem, 100 μM	100 ± 10
Verapamil, 100 μM	110 ± 9
Flunarizine, 100 μM	146 ± 11
Nicardipine, 100 μM	163 ± 12
Cinnarizine, 100 μM	135 ± 10

表 2. 抗てんかん薬および Ca²⁺ チャネルブロッカーの IP₃ 依存性 Ca²⁺ 遊離に及ぼす影響

	%
Control	100
Phenobarbital, 180 μM	80 ± 1
Phenytoin, 60 μM	89 ± 3
Phenytoin, 120 μM	81 ± 5
Phenytoin, 240 μM	70 ± 6
Carbamazepine, 80 μM	87 ± 5
Sodium valproate, 1.2 mM	98 ± 9
Diazepam, 0.5 μM	107 ± 6
Flunarizine, 50 μM	102 ± 4
Cinnarizine, 50 μM	110 ± 7

12. 免疫研究部

1. 研究部1年の歩み

里吉栄二郎部長（事務取扱）のセンター総長就任にともない、杉田秀夫神経研究所所長が、昭和64年1月より免疫研究部の指揮を取るようになった。本研究部では、昨年度から引続きウィルス学的な研究と、免疫生化学的な研究が行われた。免疫異常研究室の渡辺里仁室長と、松原豊流動研究員及び北田陽子賞金研究助手は、レトロウィルス、コロナウィルス JHM 株を扱ったが、新たにエイズ予防財団の委託研究員として高瀬（旧姓余田）明が、ラットに免疫不全を惹起するフレンド白血病ウィルス（FLV）の分子生物学的研究を開始した。また研究生として、玉田耕一（北里研究所付属病院小児科）、野沢資亜利（実験動物中央研究所）が、ヘルペス脳炎およびトランスジェニックマウスの胎児の組織学的研究を行った。一方組織培養研究室では、古川昭栄室長、古川美子及び赤沢左衛子賞金研究員、篠田一三流動研究員が、神経成長因子（NGF）の合成制御機構の研究と、重症筋無力症の抗原物質の研究に携わった。また、慈恵医科大学整形外科より派遣された池上亮介、替地恭介両研究生は、末梢神経切断時における NGF の動態の研究を行い、更に西尾健資研究生（武蔵病院）は、NGF の脳内分布を詳細に検討した。

本年度の主な研究概要は以下の通りである。

- 1) 中枢神経親和性フレンド白血病ウィルス（FLV）および FLV 産生細胞株の解析
 - a) FLV 産生性ラット T 細胞株では、ヘルパータイプの他、欠損ウィルスも増殖していることが示唆された。
 - b) ラットに免疫不全を惹起する FLV のクローニングに成功し、これはヘルパータイプのフルゲノムを持っていることが判明した。
- 2) 種々のコロナウィルス JHM 株による病原性を検討した。
- 3) 神経成長因子（NGF）の合成制御機構
 - a) 培養細胞の NGF 合成を促進する低分子化合物は生体レベルでも NGF 合成を促進することが判明した。
 - b) ラット脳内の NGF 分布マッピングがほぼ完成した。
 - c) 神経細胞はそれと接触する非神経細胞の NGF 合成を変化させることが示唆された。
- 4) 重症筋無力症の筋抗原物質の研究

筋抗原分子は骨格筋組織の細胞膜または細胞間マトリックス構造部分、横紋に相関する構造部分、に局在していた。

（事務取扱 杉田秀夫）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Shinoda I, Takeuhi R, Kurobe M, Furukawa S and Hayashi K :
Molecular nature of β -nerve growth factor (NGF) -like immunoreactive substance (s)
in mouse plasma
J Clin Biochem Nutr 5 : 135-144, 1988
- 2) Shinoda I, Tokida N, Kurobe M, Furukawa S and Hayashi K :
Identification of epidermal growth factor in mouse abdominal effusion
Biochem Int 16 : 53-58, 1988
- 3) Shinoda I, Tokida N, Kurobe M, Furukawa S and Hayashi K :
Demonstration of a considerable amount of mouse epidermal growth factor in aqueous
humor
Biochem Int 17 : 243-248, 1988
- 4) Komiyama A, Kamo I, Furukawa S, Hirayama K and Satoyoshi E :
Antibodies against saline-soluble components of skeletal muscle in myasthenia gravis
J Neurol 235 : 207-213, 1988
- 5) 茂野卓, 美馬達夫, D I Graham , 古川昭栄, 高倉公朋 :
海馬細胞遅発性細胞死の NGF による抑制
医学のあゆみ 145 : 529-530, 1988
- 6) 池上亮介, 室田影久, 富田泰次, 中村信之, 古川昭栄 :
ラット坐骨神経再生時における神経内 NGF レベルの経時的変化
日本手の外科学会誌 5 : 58-62, 1988

b. 著書

- 1) 古川美子, 古川昭栄, 林恭三 :
神経成長因子の生化学
精神疾患の生物学的研究, 医学書院, 東京, p 327-351, 1988.
- 2) 古川美子, 古川昭栄 :
神経栄養因子
アルツハイマー型老年痴呆—最新の知識—, 藤田企画, 春日井, p 81-101, 1988

II 研究業績

3) 古川美子, 古川昭栄 :

NGF および神経栄養因子

老人性痴呆と脳機能改善薬, シーエムシー, 東京, p144-161, 1988

4) 古川昭栄, 古川美子

神経成長因子とグリア細胞

ブレインサイエンス I, 朝倉書店, 東京, p230-242, 1988

5) Wege H, Doerries R, Massa P, Watanabe R :

Autoimmunity and immune pathological aspects of virus disease In: Perspectives on Autoimmunity. (Ed. Cohen I)

CRC-Press. Florida, 111-133, 1988

c. 総 説

1) 古川美子, 古川昭栄 :

神経成長因子

内科 62, 1050, 1988

B. 学会発表

c. 一般学会

1) 古川美子, 富岡登, 佐藤若生, 里吉栄二郎, 林恭三, 古川昭栄 :

カテコール化合物によるアストログリア細胞内 NGF mRNA の誘導および構造-活性相関

第61回日本生化学会大会, 東京, 10, 4, 1988

2) 新井洋, 古川昭栄, 古川美子, 里吉栄二郎, 林恭三 :

マウスアストログリア細胞の NGF 合成・分泌におよぼすステロイドの効果

第61回日本生化学会大会, 東京, 10, 4, 1988

3) 古川昭栄, 古川美子, 篠田一三, 里吉栄二郎, 林恭三 :

PC12細胞の共培養下におけるマウスアストログリア細胞の NGF 合成・分泌

第61回日本生化学会大会, 東京, 10, 4, 1988

4) 竹内理恵, 篠田一三, 古川昭栄, 林恭三 :

マウス血中の神経成長因子 (NGF) の存在様式の検討

第61回日本生化学会大会, 東京, 10, 4, 1988

5) 大井長和, 松倉茂, 古川昭栄, 池上亮介, 林恭三 :

実験的糖尿病ラットにおける NGF の坐骨神経内逆行性軸索輸送の機構の検討

第29回神経学会総会，東京，5，26，1988

- 6) 茂野卓，美馬達夫，高倉公朋，古川昭栄，D I Graham：

NGF 脳室内投与は海馬細胞の死をすくった……，一神経可塑性への治療的接近—

第29回神経学会総会，東京，5，27，1988

- 7) 池上亮介，室田影久，富田泰次，中村信之，古川昭栄：

ラット坐骨神経再生時における神経内 NGF レベルの経時的変化

第31回日本手の外科学会総会，名古屋，5，20，1988

- 8) 池上亮介，室田影久，富田泰次，中村信之，古川昭栄：

ラット坐骨神経切断後の神経内 NGF 含量の経時的変化

第3回日本整形外科学会基礎学術集会，東京，9，1，1988

- 9) 余田明，渡辺里仁，里吉栄二郎：

ラットに AIDS 様免疫不全を惹起する FLV 産生細胞株の解析

エイズ研究会第2回学術集会，東京，12，8，1988

- 10) 松原豊，渡辺里仁，里吉栄二郎：

ラットにおけるマウスコロナウイルス JHM 株による中枢神経の初期病変

日本神経病理学会総会学術研究会，仙台，5，20，1988

C. 班会議発表

- 1) 里吉栄二郎，古川昭栄，新井左衛子，加茂功：

実験的筋炎モデル動物の作成に関する研究—自己免疫筋抗原の筋組織内分布と精製の試み—

厚生省新薬開発・低分子化合物による難病治療薬の開発研究班班会議，東京，2. 25，1989

- 2) 古川昭栄，篠田一三，古川美子：

アストログリア細胞の NGF 合成・分泌に及ぼす分化型 PC 12 細胞の接触効果

ヒューマンサイエンス基礎研究事業官民共同プロジェクト研究・昭和63年度第3分野第4テーマ
報告会，東京，1. 20，1989

- 3) 古川昭栄，替地恭介，池上亮介，古川美子：

ラット末梢神経系における NGF の合成誘導の試み

厚生省精神・神経疾患・中枢神経系の機能修復に関する開発的研究班，東京，1. 6，1989

- 4) 古川昭栄，相川久志，西尾健資，古川美子：

II 研究業績

神経成長因子（NGF）の脳内機能—マウス，ラット脳内NGF分布—

厚生省精神・神経疾患・脳発達障害の発現機序と対策に関する開発的研究班，東京，2. 18，
1989

5) 古川昭栄，西尾健資：

ラット脳内NGF分布マッピング

文部省特定研究・脳の老化機構に関する分子細胞生物学的研究班，東京，2. 3，1989

6) 渡辺里仁，高瀬明，里吉栄二郎：

ラットにAIDS様免疫不全を惹起するFLV産生細胞株の解析

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，東京，1. 21,1989

7) 渡辺里仁，余田明：

フレンド白血病ウイルス（FLV）産生細胞株を用いたフレンド病発症機構の解析

文部省がん特別研究・ウイルス性白血病の発症機構の解析班，箱根，1. 26，1989

8) 渡辺里仁，高瀬明，里吉栄二郎：

中枢神経親和性レトロウイルスをベクターとした組換え病原体の解析

厚生省精神・神経疾患・レトロウイルスによる神経障害発現の機序に関する研究班，東京，2.
16，1989

9) 渡辺里仁，高瀬明，田口文広：

レトロウイルスベクターを用いた脳変性発現機構解析技術の開発

科学技術庁脳機能解明のための基盤技術の開発研究班，東京，3. 10，1989

3. 主な研究報告

NGF の脳内分布マッピング

西尾健資, 古川昭栄, 里吉栄二郎

神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) は、神経栄養因子のうち唯一その一次構造が決定された蛋白であり、末梢神経系における生理的機能については確立されている。近年酵素免疫測定法 (Enzyme Immunoassay; EIA) の開発により中枢神経系における極微量の NGF も検出可能となり、前脳基底核の大細胞性コリン作動性神経に対して栄養因子として作用していることが明かにされた。しかし、NGF や NGF mRNA, さらに NGF receptor の分布などから前脳基底核以外のニューロンに対しても NGF が栄養因子として作用している可能性が示唆されているが、詳細な脳内 NGF 分布は不明である。脳内の NGF 含量は非常に低く、組織化学的手法ではその分布を明かにできない為、我々は微小組織中の高感度測定系を確立し、ラット脳内 NGF 分布を検索した。

方法

Wistar Rat (age; 7 w, male, n=3) 脳を凍結下 (-10°C) に小片化 (1.5×1.5×0.9mm³) し、微小片中の NGF 含量を EIA で測定した。

結果及び考案

測定結果を図示した。図の左半に解剖学的位置を、右半に各切片中の NGF 含量を円で示した。NGF 含量は円の直径に比例し、切片中に円の表示のないものは 100pg/g 組織以下であり、最高 1800pg/g 組織であった。

前頭葉では従来の報告どおり全体に中等度の NGF

含量を認めたが、なかでも帯状回と梨状葉で高く、外側面で低いという傾向を認めた。前脳基底核では中隔・ブローカ対角帯は、従来の報告通り中等度認めたが、マイネルト核では低値であった。視床では、全体としては低値であったが、視床内側核群に相対的高値を認めた。海馬では全体に高値であったが、CA1-2 に比して CA3-4・歯状回でより高値であった。大脳皮質では頭頂・後頭葉において高値を認めた。また、扁桃核でも高値を認めた。脳幹・小脳では、従来の報告通り全体に低値であったが、小脳核、中脳中心灰白質、橋網様体などで相対的高値を認めた。

今回の検索により、大脳皮質内の NGF 分布は一樣でなく、部位により差があることが明かとなった。特に帯状回で高く、外側面で低いという分布は、Tyrosine Hydroxylase の分布に類似しており、カテコラミン作動性神経が NGF 合成を調整している可能性が示唆された。また、従来の報告では NGF 含量が低いとされていた部位のなかにも、今回の詳細な検索により相対的高値を認めた部位があり、これらの神経細胞が新たな NGF responsive neuron である可能性が示唆された。この例として、前頭葉・帯状回と線維連絡を有する視床内側核群の神経細胞や、小脳核に投射している Purkinje 細胞などが挙げられるが、今後、¹²⁵I-NGF による逆行性軸索輸送を検索することにより、この可能性を確認したい。

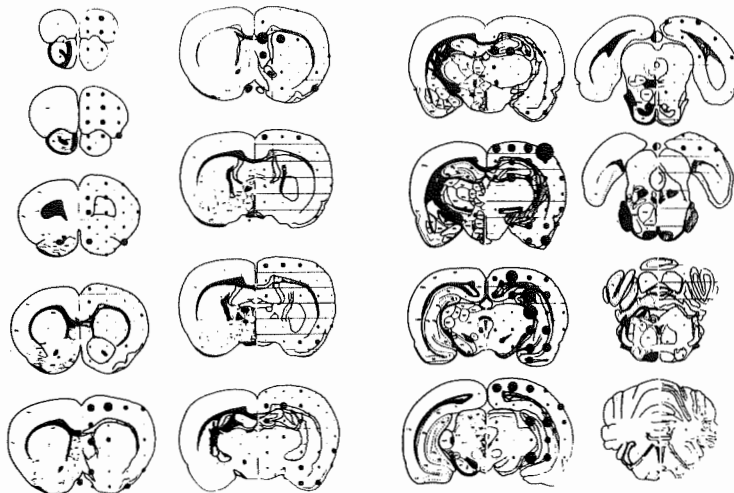


図 NGF の脳内分布マッピング

ラット脳の冠状断面 (厚さ0.9mm) を小片化 (1.5×1.5mm) し、小片中の NGF 量を測定した。

II 研究業績

マウスアストログリア細胞のNGF合成・分泌におよぼす分化型PC12細胞の接触効果

篠田一三, 古川美子, 古川昭栄

神経成長因子 (NGF) は, 神経細胞の軸索投射部位で合成され, 軸索末端から神経細胞に取り込まれるが, この合成の制御機構は明かにされていない。最近, 発達途上のラット脳において神経細胞の分化と投射部位での NGF の合成量の上昇とが時期的に一致すると報告され, 神経細胞の分化あるいは軸索投射そのものが NGF の合成の開始を伝えるシグナルとなる可能性が示唆されている。そこで, 未分化の神経細胞の諸性質を兼ね備え, しかも NGF を作用させることで容易に分化型神経細胞に誘導できるラット褐色細胞腫, PC12 細胞と NGF 合成能を有するマウスアストログリア細胞とを共存させた場合, PC12 細胞の分化状態の差異によりアストログリア細胞が合成・分泌する NGF 量に変化が現われるかどうか調べた。なお, 未分化型および分化型 PC12 細胞自身は, NGF を合成・分泌しないことは確認している。

方法

PC12細胞の分化誘導は, コブラ科ヘビ毒 NGF (*Naja naja siamensis* NGF: NNS-NGF) を100ng/ml, 10%馬血清, 5%牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で2週間行なった。NNS-NGF はマウス NGF と免疫交叉性はなく, マウス NGF の定量系に何ら影響を及ぼさないことから用いた。未分化型あるいは分化型 PC12 細胞を0.5% BSA および分化維持のための NNS-NGF を100ng/ml 含む DMEM に懸濁し静止期に導入したマウスアストログリア細胞 (24穴あるいは96穴プレートを使用) に添加し, 24時間共培養した。アストログリア細胞が合成・分泌する NGF は酵素免疫測定法で定量した。

結果

分化型 PC12 細胞とアストログリア細胞を細胞比 1:40 で共培養したとき, NGF 合成量はコントロールの4.5倍に上昇した。一方, 未分化型細胞との共培養では, NGF 合成の促進は全く認められなかった。しかしながら, PC12 細胞の細胞膜成分を0.32M ショ糖溶液を用い常法に従い抽出したところ図1に示すように, 分化型細胞のみならず未分化型細胞の抽出液および超遠心で得られるペレットに NGF 合成促進活性が認められ, しかも活性の強さに有位差はなかった。さらに, 抽出液をゲルろ過した結果 (図2), 分化型細胞と未分化型細胞の活性成分は同じ分子量 (void, 20-30万, 約10万, 約5万) を示し, 同じ分子種であろうと推定された。

考察

以上の結果は次のように解釈している。PC 12 細胞の細胞膜にはアストログリア細胞に対して NGF 合成を促進させる活性を有する物質が存在するが, 分化するとその存在様式が変り作用しやすくなったのではないかと考えている。

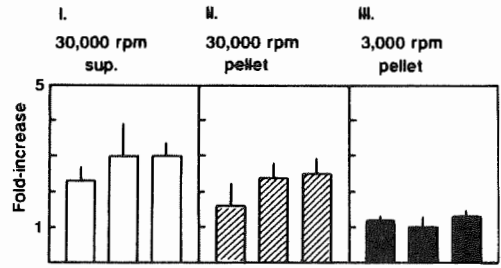
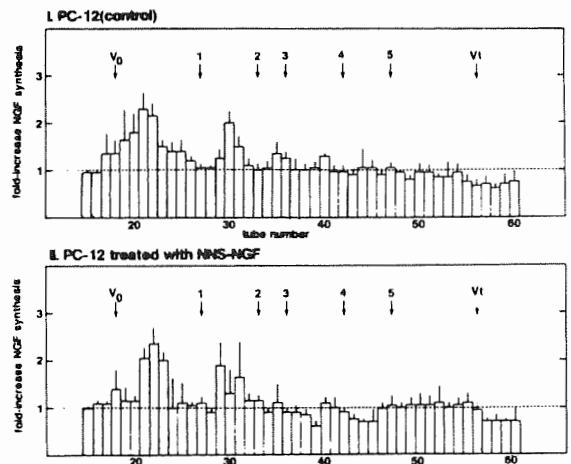


図1. PC12細胞のNGF合成促進活性物質の0.32M ショ糖溶液による抽出効果

NNS-NGF を0日 (A), 3日 (B), および2週間 (C) 作用させた PC12 細胞を110mM食塩, 10 mM塩化カルシウムを含む0.32M ショ糖溶液でホモジュナイズ (3×10^8 cells/ml) し, 細胞塊を低速遠心で除いた後, 上清を超遠心した。得られる3つの画分 (図中, I, II, III) を培養液で5倍に希釈しアストログリア細胞に添加した。縦軸はコントロールの何倍の NGF が合成・分泌されたかを示す。



Conditions: column size, 0.8x66cm; fractions, 0.5ml; flow rate, 0.5ml/hr; elution medium, DMEM (x2 conc.) containing 20mM HEPES.
Calibration markers: 1, aldolase; 2, BSA; 3, ovalbumin; 4, chymotrypsinogen A; 5, cytochrome c.

図2. 0.32M ショ糖抽出液の NGF 合成促進活性の Sephadex G-150によるゲルろ過の溶出パターン

4-メチルカテコールによるラット生体内 NGF 合成の亢進

替地恭介, 池上亮介, 古川昭栄

目的

神経成長因子 (NGF) は交感神経系また知覚神経系においてもその生存・機能の維持に重要な働きを担っている (1)。

NGF は NGF 応答性神経の軸索が投射する末梢部位で合成され, 神経終末から受容体を介して取り込まれ, 軸索内を逆行性に輸送されて細胞体に到達し機能する。すでに培養下でカテコールアミンを含むカテコール化合物が NGF 産生細胞に対し NGF 合成誘導促進効果を持つことを確認している (2)。そこで, 培養下で強い NGF 合成促進作用を認め, アドレナリン作動性神経に対し α 作用, β 作用を持たないので生体毒性が低く生体内投与に適していると考えられる 4-メチルカテコールを取り上げ, ラット生体内においても NGF 合成を促進できるか否かを検討した。

方法

7週齢ウィスター系ラット腹腔内に $2 \mu\text{g}$ の 4-メチルカテコールを投与し, 経時的に各組織 (心臓, 顎下線, 坐骨神経, 上頸交感神経節, 後根神経節) の NGF 含量を測定した。NGF の定量は高感度酵素免疫測定法を用いた。

結果

NGF 産生部位である末梢標的組織の心臓, 顎下線では, 16時間で対照の3倍に達するピークが認められた。坐骨神経においては12時間で対照の2.5倍に達し16時間で再び対照値に戻った。これは坐骨神経内における NGF 合成と思われる。その後20時間で坐骨神経末梢側に NGF レベルのピークが現れ, 24時間ではそのピークは坐骨神経中枢側へ移動した。これは合成誘導された NGF が軸索内を輸送されているも

のと思われる (図)。細胞体の存在する上頸交感神経節, 後根神経節においては32-40時間で NGF レベルのピークが出現した。

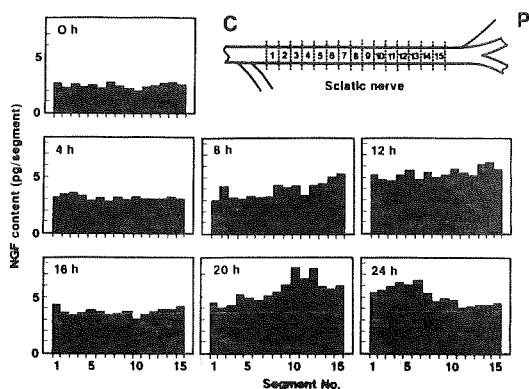
考察

培養下で強い効果を示した 4-メチルカテコールの生体内投与により 2-3 倍の NGF 合成誘導効果が得られた。しかも末梢神経投射部位で合成誘導された NGF は軸索内を逆行性に細胞体まで輸送されることから神経細胞に対し生物活性を発現すると考えられた。今後, 神経伝達物質合成に関与する酵素活性, m-RNA を調べることによって実証したい。

4-メチルカテコールはカテコール環に側鎖がメチル基一つというきわめて単純な構造を持つ。カテコール環が NGF 合成促進にきわめて重要な構造であることをすでに明らかにしており, カテコール環の側鎖をさまざまに変えることにより NGF 合成促進作用を持ちながら, そのほかにいろいろな特性を持つ化合物の合成が可能である。これらをさらに発展させ神経再生促進や神経機能修復に有効かどうか検討を加えたい。

文献

- (1) Thoenen H, Bandtlow C The Physiological Function of Nerve Growth Factor in the CNS: Comparison With the Periphery. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol 109: 145-178 (1987)
- (2) Furukawa Y, Furukawa S, Satoyosi E Catecholamines Induce an Increase in Nerve Growth Factor Content in the Medium of Mouse L-M Cells. J. Biol. Chem 261: 6039-6047 (1986)



TIME COURSE OF NGF CONTENT IN SEGMENTS OF THE RAT SCIATIC NERVE AFTER ADMINISTRATION OF HOMOCATECHOL

図 4-メチルカテコール投与後のラット坐骨神経内 NGF 量の経時的变化。経時的に坐骨神経を採取し, 分枝の少ない約 2 cm の部分を 1.3 mm, 15 セグメントに細断しそれぞれのセグメント中の NGF 含量を測定した。

ラットに AIDS 様免疫不全を惹起するマウス白血病ウイルスについて

高瀬 明, 渡辺里仁, 里吉栄二郎

ヒトの AIDS の原因とされている Human immunodeficiency virus (HIV) はマウスやラットに感染性がなく, ヒト AIDS の小動物実験モデルは未だ確立されていない。そこで我々は, 動物のレトロウイルスを用いて実験小動物で AIDS のモデルを確立することを試みた。その結果, フレンドマウス白血病ウイルス (FLV) をラットで接種継代することにより得られたレトロウイルスがラットに AIDS 様免疫不全 (RAIDS) を起こすことを見出した。

方法

BALB/c マウスで31代継代した FLV をルイスラット脳内に接種し, 継代を繰り返した際に生じた脾腫より FLV 産生 T 細胞株 FLe-ly を樹立した。さらにこのウイルスをラット神経膠細胞由来の C 6 細胞株に順化させ, FLV 産生 C 6 細胞株 FrC6 を樹立した。羊赤血球 (SRBC) 特異的ラットヘルパー T 細胞 (HTL) 株は, SRBC を免疫したラットの脾細胞を培養し, SRBC による刺激と IL-2 による増殖を繰り返すことによって得た。HTL 活性は, HTL とラット B 細胞を SRBC と共に混合培養し, SRBC を含む寒天培地中に種々の濃度でまき, モルモットの補体を加えることにより生じるブラックを算定することにより測定した。

結果

FLe-ly および FrC6 細胞の培養上清の逆転写酵素活性を測定した結果, FLV 感染細胞培養上清の10倍以上の高い活性を示した。培養上清のウイルス感染価は, FLe-ly が 1×10^2 XC-PFU/ml, FrC6 が 5×10^5 XC-PFU/ml, FLV が 1×10^3 XC-PFU/ml であった。

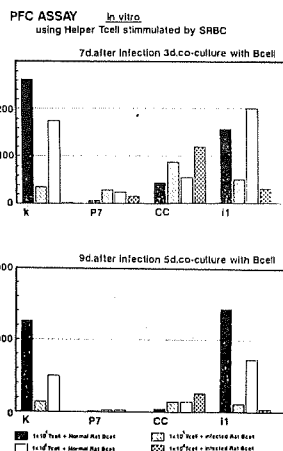
FLe-ly および FrC6 細胞産生ウイルスは in vitro でラットヘルパー T 細胞に感染性を示した。FLV が感染した細胞には細胞変性効果 (CPE) が認められなかったが, FLe-ly および FrC6 ウイルス感染細胞には巨細胞が出現し, CPE が認められた。また, HTL 株にこれらのウイルスを感染させ, HTL 活性を測定した結果, その活性 (図 1, P7) はコントロール (図 1, K) の $1/200$ 以下となった。このような免疫能の低下は in vivo でも認められ, FLe-ly および FrC6 ウイルス感染ラットの脾細胞では, SRBC 免疫後のブラック形成細胞数が正常ラットの約 $1/100$ となった。

ラットに順化させる前の FLV には, 欠損型ウイルス遺伝子を持ち replication-defective な spleen

focus-forming virus (SFFV) と SFFV のヘルパーとして働く replication-competent な murine leukemia virus (MuLV) が含まれる。FLe-ly および FrC6 細胞の染色体に組み込まれたウイルスの遺伝子とその発現を調べるために, これらの細胞から DNA および mRNA を抽出し解析した。MuLV-DNA および SFFV を検出する DNA をプローブとしてサザンブロットを行った結果, FrC6 細胞にはヘルパータイプの MuLV 遺伝子のみが組み込まれていることが明らかとなった。FLe-ly 細胞には MuLV 遺伝子に加えて欠損ウイルス DNA の存在が示唆されたが, SFFV 遺伝子は検出されなかった。また, ノーザンブロット解析の結果, FLe-ly および FrC6 細胞には共に MuLV 遺伝子の mRNA のみが認められた。一方, 細胞の染色体外 DNA をサザンブロット解析した結果, FrC6 細胞では大量の染色体外ウイルス DNA の蓄積が認められた。しかし, FLe-ly 細胞および FLV 感染細胞では, 染色体外ウイルス DNA はほとんど検出されなかった。

考察

以上の結果から, FrC6 ウイルスはラットに免疫不全 (RAIDS) を起こすことが示された。RAIDS は, (1) ウイルスがヘルパー T 細胞に感染することにより細胞に CPE が認められ, ヘルパー T 細胞活性が低くなる, (2) ウイルスは神経細胞にも親和性がある, (3) replication-competent なウイルスが感染することで免疫不全が起こる, (4) 感染細胞に染色体外ウイルス DNA の蓄積が認められる, といった点でヒトの AIDS に類似していると考えられる。



13. 遺伝子工学研究部

1. 研究部一年の歩み

62年11月に研究部が発足し、初年度設備費による基本的なセットアップにひきつづいて本格的な実験を進めるための整備と新しいプロジェクトの開始のための一年であった。

4月よりあらたに東大医科研より植月太一（流動研究員）、細田葉子（研究助手）、小宮透（東大、医、大学院生）、九大伊藤助教授（客員研究員）を迎え、筋細胞における遺伝子発現の制御機構と筋細胞の分化を制御する遺伝子の研究を開始した。7月より中尾啓子（東大、理、大学院生）を、また12月より松崎文雄（ロックフェラー大より、室長）、浜千尋（UCSFより、流動研究員）、小泉啓一（早稲田大学、学生）を迎え、神経系の発生、構築の分子機構の研究を開始した。

神経、筋肉系の発生、分化、構築の分子機構の研究を総合的に行うためには遺伝子を取り扱う技術や機器類のみならず、形態学的観察、生化学的解析などの周辺領域の研究のための設備と技術を導入することは不可欠と考えていたがこの方向に添って設備を拡充することができた。

2. 研究成果

a 筋細胞分化過程に於ける遺伝子発現の制御機構解析のモデルとしてミオシン軽鎖遺伝子群の転写制御因子の解析を行い、分化した骨格筋で発現を著しく増大させるエンハンサー、横紋筋で発現する軽鎖遺伝子のプロモーターに存在する共通配列、発現を抑制的に調節する領域を明らかにした。

b 筋細胞分化誘導因子のcDNAのクローニングを行い、その塩基配列、アミノ酸配列を決定した。このcDNAは多能性細胞として知られている10T1/2細胞を筋原細胞へと変換誘導する活性を有していることから筋細胞分化誘導因子と考えられ、その詳細な機能を解析中である。

c 神経系の発生、構築の分子機構の解明は神経系の複雑さ故に困難をきわめていたが近年、ショウジョウバエの系を中心に急速に進展しつつある。ショウジョウバエの系は様々な実験上の有利な点があることから、当研究部においてもモデル系として導入した。現在神経系の発生、構築異常を示す突然変異体の解析、P-element enhancer trapping法による中枢神経系で特異的に発現する遺伝子の単離とその機能解析の方向性のもとに研究を進めている。

64年4月から研究助手2名、大学院生2名の参加が予定されており、総勢14名となる。スペースが研究の進展を制限しかねない状況になっており、一日も早い研究所本館の完成を望みたい。

（部長 鍋島陽一）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Shirakata M, Nabeshima Y, Konishi K, Fujii-Kuriyama Y :

Upstream regulatory region for inducible expression of the chicken skeletal myosin alkali-light chain gene

Mol Cell Biol 8 : 2581-2588, 1988

- 2) Nakamura S, Nabeshima Y, Kobayashi H, Nabeshima Y, Nonomura Y, Fujii-Kuriyama Y:

Single chicken cardiac myosin alkali light-chain gene generates two different mRNAs by alternative splicing of a complex exon

J Mol Biol 203 : 895-904, 1988

- 3) Nabeshima Y, Nabeshima Y, Kawashima M, Nakamura S, Nonomura Y, Fujii-Kuriyama Y :

Isolation of the chick myosin alkali light chain gene expressed in embryonic gizzard muscle and transitional expression of the light chain gene family in vivo

J Mol Biol 204 : 497-505, 1988

- 4) Fujisawa-Sehara A, Yamane M, Fujii-Kuriyama Y :

A DNA binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm : Its possible translocation to nucleus

Proc Natl Acad Sci USA 85 : 5859-5863, 1988

- 5) Matsuzaki F, Matsumoto S, Yahara I, Yonezawa N, Nishida E, Sakai H :

Cloning and characterization of porcine brain cofilin cDNA

J Biol Chem 263 : 1564-1568, 1988

- 6) Mege R-M, Matsuzaki F, Gallin W J, Goldberg J I, Cunningham B A, Edelman G M:

Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules

Proc Natl Acad Sci USA 85 : 7274-7278, 1988

- 7) Matsuzaki F, Mastumoto S, Yahara I :

Truncation of the carboxy-terminal domain of yeast beta-tubulin causes temperature-sensitive growth and hypersensitivity to antimetabolic drugs

J Cell Biol 107 : 1427-1433, 1988

- 8) Yonezawa N, Nishida E, Sakai H, Koyasu S, Matsuzaki F, Iida K, Yahara I :

Purification and characterization of the 90-kDa heat-shock protein from mammalian tissues

Eur J Biochem 177 : 1-7, 1988

- 9) Uetsuki T, Naito A, Nagata S, Kaziro Y :

Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 α

J Biol Chem 264 : 5791-5798, 1989

c. 総 説

- 1) 鍋島陽一 :

筋構造蛋白質遺伝子の構造と発現

Therapeutic Research 8 : 987-993, 1988

- 2) 鍋島陽一 :

ミオシン

代謝病ハイライト 代謝 25 : 29-34, 1988

- 3) 植月太一, 鍋島陽一 :

筋収縮蛋白質遺伝子群のオルタナティブスプライシング

実験医学 7 : 165-171, 1989

d. 班会議報告

- 1) 鍋島陽一 :

ミオシン軽鎖遺伝子の発現に関する制御因子の解析と筋細胞の分化

厚生省精神・神経疾患研究・筋ジストロフィー症の発症に関する遺伝子工学的基礎研究

昭和62年度研究報告書 p106-110, 1988

- 2) 鍋島陽一 :

ミオシン軽鎖遺伝子群の筋細胞分化過程における発現制御

文部省科学研究費補助金重点領域研究・真核生物遺伝子の転写制御機構

昭和63年度研究成果報告集 p20, 1989

II 研究業績

3) 鍋島陽一 :

ガン細胞におけるミオシン軽鎖遺伝群の発現と機能

文部省科学研究費がん特別研究(1)・細胞がん化にともなう細胞骨格異常の分子生物学的解析

昭和61, 62, 63年度研究成果報告書 p22-26, 1989

4) 鍋島陽一 :

筋蛋白の遺伝子構造

文部省科学研究費特定研究・血管の細胞生物学的, 分子生物学的並びに代謝学的研究

昭和62年度研究成果報告書 p28-30, 1988

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) Nabeshima Y, Shirakata M :

Regulatory element (S) involved in the regulation of myosin alkali light chain gene family

UCLA Symposium on molecular and cellular biology Cellular and molecular biology of muscle development

Steamboat Springs, Colorado, 4. 8, 1988

2) Hama C, Kornberg T :

The analyses of engrailed-lacZ transgenic flies

Northern California Drosophila Conference

Berkeley, 5. 15, 1988

3) 松崎文雄 :

細胞接着と細胞認識

蛋白研セミナー・脳の可塑性とその分子的基盤

大阪大学蛋白研究所, 3. 24, 1988

c. 一般学会

1) Hama C, Kornberg T :

The engrailed gene expression and the developmental compartments

29th Annual Drosophila Research Conference, Tronto, Canada 4. 12, 1988

2) 白形正樹, 鍋島陽一, 小西和彦, 藤井義明 :

骨格筋ミオシン軽鎖遺伝子の転写促進領域

第60回日本生化学会大会，東京，10. 5, 1988

3) 小宮透，藤沢淳子，村松正実，鍋島陽一：

骨格筋ミオシン軽鎖遺伝子の発現誘導に關与する領域

第11回日本分子生物学会年会，東京，12. 23, 1988

4) 植月太一，川島真帆，藤沢淳子，鍋島陽一：

胚型ミオシン23k 軽鎖遺伝子の発現制御

第11回日本分子生物学会年会，東京，12. 20, 1988

5) 金東玩，植月太一，上代淑人，山口宣生，菅野純夫：

ヒトEF-1 α 遺伝子の promoter を利用した広宿主細胞域高発現性ベクターの作製

第11回日本分子生物学会年会，東京，12. 22, 1988

6) 浜千尋，Kornberg T：

ショウジョウバエの engrailed 遺伝子と後部コンパートメントについて

第11回日本分子生物学会年会，東京，12. 22, 1988

7) 中尾啓子，花岡和則，鍋島陽一，堀田凱樹：

キイロショウジョウバエ胚神経系形態形成の発生遺伝学的解析

第11回日本分子生物学会年会，東京，12. 22, 1988

C. 班会議発表

1) 鍋島陽一：

遺伝子発現の制御：転写後の制御機構研究の今後の方針

科学技術振興調整費・発生工学技術の開発等に関する研究班 東京，9. 16, 1988

2) 鍋島陽一：

ミオシン軽鎖遺伝子群の筋細胞分化過程における発現制御

文部省科学研究費補助金重点領域研究・真核生物遺伝子の転写制御機構研究班，河口湖

9. 28, 1988

3) 鍋島陽一：

筋細胞に導入した遺伝子の発現制御機構の解析

厚生省精神・神経疾患委託費・筋ジストロフィー症の発症に関する遺伝子工学的基礎研究班，

東京，12. 8, 1988

II 研究業績

4) 鍋島陽一：

神経・筋細胞の増殖と分化にかかわる因子の遺伝学的解析

文部省科学研究費補助金重点領域研究・運動系の分子生物機構研究班，東京，12. 14, 1988

5) 鍋島陽一：

がん細胞におけるミオシン軽鎖遺伝子群の発現と機能

文部省科学研究費がん特別研究(1)・細胞がん化にともなう細胞骨格異常の分子生物学的解析研究班，東京，3. 4, 1989

6) 鍋島陽一：

神経疾患の遺伝子解析

厚生科学研究費補助金・遺伝子治療研究班，東京，3. 4, 1989

7) 鍋島陽一：

遺伝子の転写後の段階の制御技術の研究

科学技術振興調整費・発生工学技術の開発等に関する研究班，箱根，3. 9, 1989

ミオシナルカリ軽鎖遺伝子の発現を制御するシスエレメントの検索

植月太一, 鍋島曜子, 藤沢淳子, 鍋島陽一

筋繊維を構築する主要なタンパク質の一つであるミオシナルカリ軽鎖には、多種類のアイソフォームが存在しており臓器及び発生段階特異的に異なった発現制御を受けている。

我々は、ニワトリ胚の発生、分化に伴うミオシナルカリ軽鎖のアイソフォームの切り換えの機構を研究する目的で心筋型ミオシン軽鎖、骨格筋型軽鎖(LC1)、胚型軽鎖(L₂₃)などの遺伝子の発現制御機構の検索を進めている。

材料と方法

1) 軽鎖遺伝子のプロモーター活性の測定

軽鎖遺伝子のプロモーター活性の測定は、いわゆるCATアッセイ法によって行なった。

胚型軽鎖L₂₃染色体遺伝子の5'上流域約3.7kbのDNA断片の下流にCAT(クロラムフェニコール、アセチルトランスフェラーゼ)遺伝子を結合したプラスミドを構築し、L₂₃のプロモーター活性測定の出発材料とした。また心筋型軽鎖は、5'上流域約5kbをCAT遺伝子に結合したプラスミドを構築し、検索を行なった。これらのプラスミドを、ニワトリ11日胚の胸筋、心筋より調製した初代培養に導入し2日後に細胞内のCATの酵素活性を測定した。

結果と考察

L₂₃遺伝子の5'上流域を短かくした欠失プラスミドを用いてCATアッセイを行なったところ、活性は上流域を削ると上昇し、mRNAの開始点の5'上流80bpを含むプラスミドでは著しく低下した(図1)。そこで-128bpと-80bpの間にL₂₃の発現に必須なシスエレメントが存在するものと考えて、さらにこの領域を詳細に検索し、塩基配列を同定した。また、いずれのプラスミドでも線維芽様初代培養細胞では発現がほとんど見られず、この塩基配列は筋細胞特異的な発現に機能しているものと結論した。このシスエレメントは、筋細胞で発現するミオシナルカリ軽鎖遺伝子群のプロモーター領域に共通に存在する極めて良く保存された塩基配列であることが分かった(図2)。また、L₂₃では-2.7kbと-3.7kbの間に発現を抑制する領域が見出されており、共通エレメントの他に複数の調節領域が存在するものと考えられる。心筋型軽鎖のプロモーター領域の検索の結果からも、L₂₃の場合と同様に共通エレメントが発現に必須であること、また心筋特異的に発現するための調節領域が、さらに上流に存在していることを示唆する結果を得た。骨格筋型軽鎖LC1において共通エレメント以外に骨格筋特異的な発現を促すエン

ハンサーが存在することが明らかになっており、筋で発現するミオシナルカリ軽鎖遺伝子群は、共通エレメントと、一つ以上の別のシス領域により転写調節を受けるという特徴を示している。

今後は特に共通エレメントに着目して、この領域に結合する核内タンパク質が存在するかどうか、また筋分化を引き起こす遺伝子の産物との関連などを検討する必要がある。

参考文献

Kawashima, M., Nabeshima, Y., Obinata, T., Fujii-Kuriyama, Y. (1987) J. Biol. Chem. 262, 14408-14414

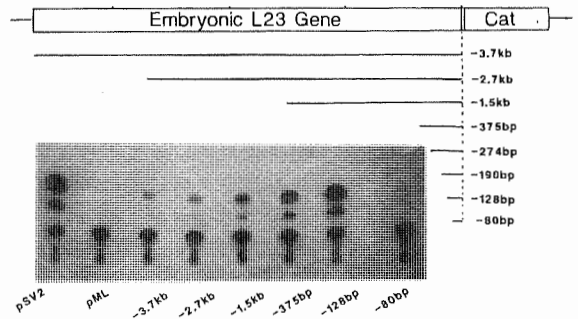


図1

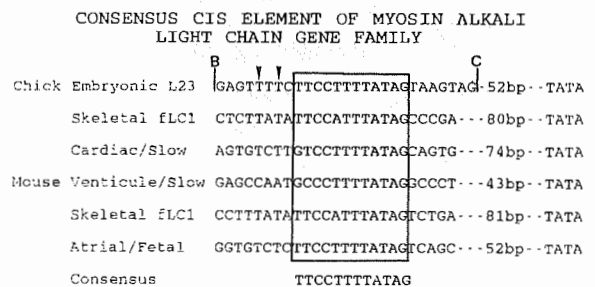


図2

筋分化をひき起こす遺伝子のクローニングとその性質

藤沢淳子, 鍋島陽一

最近, 線維芽細胞と筋細胞に分化誘導する2種類の遺伝子のcDNA (MyoDおよびmyogenin) が, WeintraubおよびWrightのグループによりあいついで単離された^{1,2)}。発生における筋分化の過程の中で, これらの遺伝子は非常に重要な役割を果たしているに違いない。我々の研究室では, これまで筋分化のメカニズムを知る手がかりとして, 各種myosin light chain 遺伝子を単離し, その発現誘導機構を検討してきたが, 分化における遺伝子発現のヒエラルキーの中で, 筋収縮蛋白質遺伝子群と上記誘導遺伝子の発現とはどのように結びついているのであろうか。

この問題にアプローチするため, まずこれらの遺伝子のマウスcDNAのクローニングをおこなった。それぞれ全長と思われるクローンを得, その塩基配列を決定した。(そこから推定されるアミノ酸配列は, myogeninの場合, 報告されているものとはかなり異なっているが, 紙面の都合上その構造は割愛する。)いずれのcDNAもc-mycとホモロジーがあり, その隣りにArg, Lysの含量の高い配列が見られた。

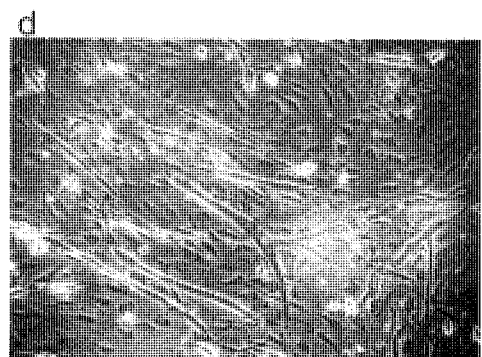
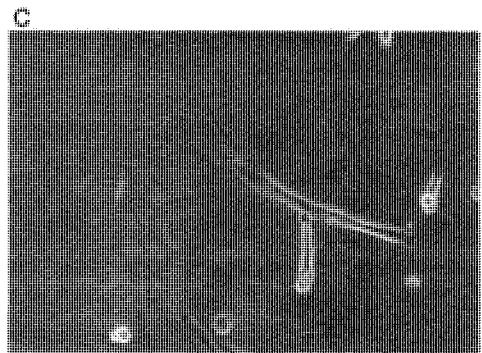
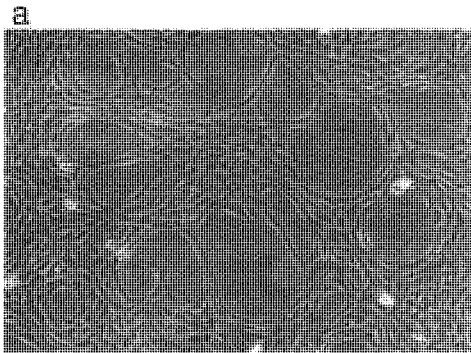
これらのcDNAをヒト β -actinのプロモーターに

連結した発現プラスミドを作成し, Neomycin耐性遺伝子とともに10T1/2マウス線維芽細胞に導入し, transformantを30~40個ずつ単離した。特徴的なクローンの写真を下に示す(図1)。a, bはmyogeninのtransformant, c, dはmyoDのtransformantである。myogeninのtransformantではその多くがconfluentになった後に細胞融合をはじめめるのに対し, myoDのtransformantの多くはsparseな状態でも融合をおこすのが大きな特色である。現在, それらのクローンの性質を詳細に検討しているところである。

これらのcDNAとtransformantを用いて, ①myoDやmyogeninが働きかける遺伝子, あるいは相互作用する蛋白質は何か, ②それによって筋収縮蛋白質遺伝子の発現はどのように誘導されるのか, を明らかにしていきたい。

文 献

- 1) Davis, R.L., Weintraub, H., and Lasser, A.B. (1987) Cell 51, 987-1000
- 2) Wright, W.E., Sassoon, D.A., and Lin, V.K. (1989) Cell 56, 607-617



骨格筋型ミオシン軽鎖遺伝子の発現誘導に關する領域

小宮 透, 藤沢淳子, 鍋島陽一

骨格筋型ミオシン軽鎖(LCI)は筋分化に伴いその発現が他の筋収縮タンパク質と同調的に誘導される。又その誘導はmRNA レベルで調節されている。この分化に伴った特異的な遺伝子発現機構を解明する目的でニワトリのLCI遺伝子とCAT 遺伝子の融合遺伝子を作成し、ニワトリ胚筋肉の一次培養細胞に導入し発現を検討した。その結果、①プロモーター領域と約2 kbp上流の領域(-2096~-1936)を連結すると分化した筋細胞で特異的に発現が誘導されること、②後者の領域は分化した筋細胞で特異的に働くエンハンサーであること、③そのエンハンサーはSV40のプロモーターでは働かないことを明らかにした。今回このエンハンサー領域について解析を進めたので報告する。

方法

CAT 遺伝子上流にLCI 遺伝子のプロモーターと考えられる領域を連結し、その上流におよそ160bpのエンハンサー(1~161と命名)を5'側、3'側およびinternalにdeleteしたものを連結した。それらをニワトリ胚胸筋の一次培養細胞に導入しCAT 活性を測定することによりエンハンサーとしての活性を検討した。

結果

5'端よりけずると39から57の間で活性が低下し、さらに122までけずると完全に活性がなくなった(図1)。3'側からけずると136から127の間で完全に活

性がおちた。さらに57から104までのinternalなdeletionでは全長に比較し同レベルの活性を示した。以上の結果よりこのエンハンサー中にはすくなくとも2つのシスのエレメントが関与していることが示唆され、3'側のエレメントのみが単独で発現誘導をかけうること、しかしそれだけでは十分ではなく5'側のエレメントと協同して十分な発現を誘導できるものと考えられた。

さらに詳細に検討したところ、①発現誘導に必須なエレメント(P)は105から136の配列中に存在すること、②協同的に働くエレメント(D)は17から53までの配列中に2つ存在し、そのうちのどちらか1つがあればPと協同し十分な発現を誘導しうるものと考えられた。

考察

P およびD のエレメントの塩基配列を比較した(図2)。①D側には12bpのdirectrepeatが存在しこのリピートがDのエレメントに対応しているのではないかと想像される。②P側とD側にも比較的高いホモロジーが存在している。現在これらのエレメントに働く因子の解明を進めている。

文献

- 1) Shirakata M, Nabeshima Y, Konishi K, & Fujii-Kuriyama Y. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 2581-2588

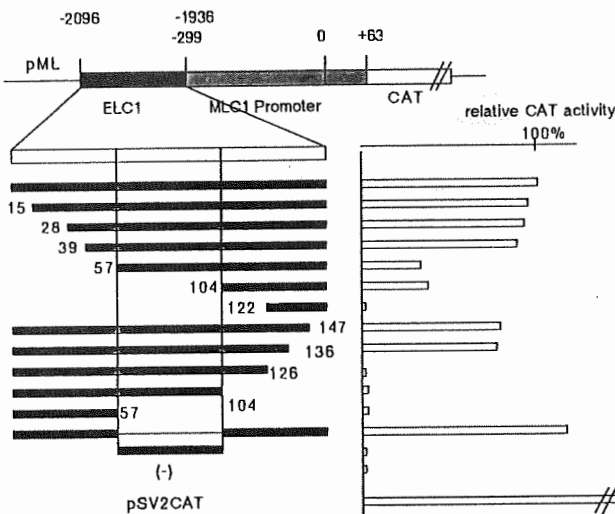


図1 Localizaton of Enhancer Elements

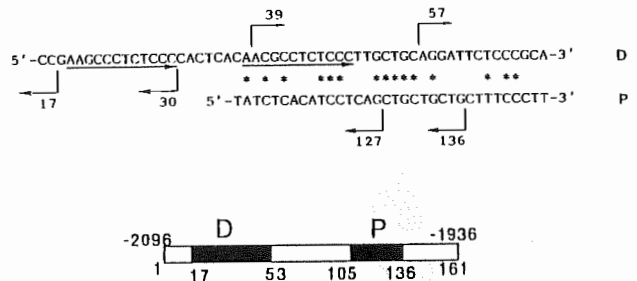


図2 Nucleotide Sequence of Regulatory Elements

中枢神経系の形態形成と機能分化の分子生物学

浜 千尋, 松崎文雄

脳・中枢神経系の発生過程は、個体発生の中心課題であるにもかかわらず、その複雑さ故に未知の部分が多く、特に個々の神経細胞の系譜と機能の分化の分子生物学はその緒についたばかりである。ショウジョウバエの系では多数の神経系の突然変異体が蓄積されており、遺伝子解析技術の発展に伴い、その解析から、多くの新しい知見が得られつつある。例えば、神経発生の最初の過程である上皮細胞と神経芽細胞の分離を制御する遺伝子群の実体が明らかにされ、その多くが高等動物に存在する転写制御因子、及び、細胞間情報伝達因子と相同性を持つことが判明した。ショウジョウバエを用いた神経系の研究が、人間に至る高等動物の神経系の理解にも大きく寄与するとの認識が持たれるに至っている。

また最近、発生過程で発現される多くの遺伝子（未知のものも含む）に挿入突然変異を導入し、その遺伝子の発現を細胞レベルで簡単に追跡できる方法（enhancer trap）が開発された。すなわち、ショウジョウバエのトランスポゾン的一种であるP-エレメントに大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子

を組み込んだものをトランスポーゼの働きで染色体上を転移させる。それがある遺伝子のエンハンサー近傍に挿入された場合のみ、その遺伝子の発現パターンに従って β -ガラクトシダーゼが発現される。この方法により、特定の神経細胞の発生・分化、又は機能に関与する未知の遺伝子の挿入突然変異を得ることができると同時に、比較的容易にその遺伝子を単離することができるようになった。さらにその遺伝子の発現する細胞を特異的に標識し、その細胞系譜及び細胞からのびる神経繊維を遺伝的に追跡することが可能となった。

この方法は現在、神経芽細胞の空間的配列パターンなど、神経発生の初期過程の解析に威力を発揮しつつあり、より複雑な脳の形態形成などの研究にも、大きく寄与すると期待される。我々のグループはこの方法を用いて、脳・中枢神経系を特異的に標識する突然変異体を多数単離し、脳を構築する細胞群のマーカーとすると同時に、その形成過程を支配する遺伝子群の解析を行うための基礎研究を開始した。



図 ショウジョウバエ胚の中枢神経系
（抗HRP抗体染色）

14. モデル動物開発部

1. 研究部の歩み

当研究部はヒトの種々の神経難病の成因の解明や、治療法の確立のためにそれらのモデルとなる自然発症ミュータントを確立したり、遺伝子および胚操作を応用して人為的にモデル動物を作成することを研究目的としている。

研究室の整備は、実験動物研究施設の内部整備と平行して進行し、昭和62年4月の施設開所式以来待望の動物実験が可能となり、現在、本格的な研究が行なわれている。

研究部3室のうち、動物生産室は現在欠員であるが、動物遺伝解析室は花岡和則室長により遺伝子導入動物の作出や、胚性幹細胞株の樹立とそれらのキメラ能の検査が行なわれている。同室長は年度末の3月13日、14日の両日、文部省科研費重点領域研究のワークショップ“Transgenic mouseとChimera mouse”を主催した。モデル動物診断室は田口文広室長によりウィルス感染症、特にマウス肝炎ウィルス(MHV-JHM株)の向神経性の本態を分子生物学的手法により解析している。遺伝性神経疾患モデル動物としてはhusマウスとGADマウスが種々の角度から評価を受けている。husマウスは脳中枢神経系全域にわたり生後早期からミエリン形成不全を示す。従来のshivererマウスやmldマウスに似た面があるが、グリア細胞の増生や腫脹が顕著である点で大きな相違がある。GADマウスはヒトの軸索ジストロフィーの動物モデルとして期待されているが、本年度は、脳中枢神経におけるSperoid体や、神経伝達物質の局在性についてさらに広範囲に検索した。本疾患マウスは脊髄後索のみならず、脊髄小脳路、運動神経の末梢部分に新たな変性所見が見出され、ヒトの脊髄小脳変性症の動物モデルとしても有用であることが明かとなった。

人事の交流は以下のようなものである。流動研究員は松崎哲也、高瀬 明(旧姓:余田)の両名であるが、高瀬は昭和63年5月エイズ予防財団へ転出した。賃金研究員として、胚操作の研究に早坂美智子、組織病理学的研究に守屋弘美が活躍している。実験助手として梶谷美代子、平野弘美、梅田道子、田岸敦子、が従来通り研究を支えた。その他、併任研究員:山内一也(東大医科研)、田内雅規(国立リハセンター)、佐々木裕之(九大遺伝情報)、松岡正典(国立多摩研)、客員研究員:斎藤宗雄(実中研)、加藤淑裕(発生生殖生物研—昭和63年4月物故)、研究生:山崎一斗(株エーザイ)、水谷 誠(日生研)、渋谷徹(食薬センター)の諸氏に外部から研究活動を応援して頂いた。(以上所属名略称)

(部長 菊池建機)

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

1) 守屋弘美, 菊池建機 :

筋ジストロフィーハツカネズミ (mdx) 骨格筋線維の再生と中心核の増殖
医学と生物学 118 : 115-118, 1989

2) Taguchi F, Fleming.J.O :

Comparison of six different murine coronavirus JHMV variants by monoclonal antibodies against E2 glycoprotein
Virology 169 : 233-235, 1989

b. 総説

1) 花岡和則 :

キメラ動物を用いた遺伝子発現の解析
代謝 25 : 1041-1047, 1988

c. 班会議報告書

1) 菊池建機, 守屋弘美, 松崎哲也 :

筋ジストロフィー (mdx) 骨格筋線維の壊死と再生
厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究班
昭和62年度研究報告書 p47-62, 1988

2) 富田 武, 山崎一斗, 榎原朱美, 向山昌邦, 菊池建機 :

筋ジストロフィー症研究のための GAD-MDX 複合マウス系統の育成
厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究班
昭和62年度研究報告書 p63-78, 1988

3) 菊池建機, 余田 明, 田口文広 :

バキュロウィルスベクターを用いたマウス肝炎ウイルス E2 蛋白の産生
厚生省精神・神経疾患・遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究班
昭和62年度研究報告書 p31-35, 1988

4) 菊池建機, 長浜嘉孝, 榎佳之, 加藤淑裕, 山内一也 :

発生工学を応用した医療研究用実験動物の開発
昭和62年度長寿関連基礎科学研究事業報告書 (第一分野), p311-331, 1988

5) 田口文広 :

マウス肝炎ウィルス JHM 株のラットに対する神経病原性について
 厚生省精神・神経疾患・ミエロパチーの発現機構と病因に関する研究班
 昭和63年度研究報告書, p61-64, 1988

B. 学会発表

a. 国際学会

1) Kikuchi T, Yamazaki K, Moriya H, and Mukoyama M :

A neurological mutant mouse with neuroaxonal dystrophy in ascending spinal tracts
 The Jackson Labo. Conference on neurological mutants in the mouse. Bar Harbor, U.S.A.
 Sept.28-Oct.2, 1988

2) Mukoyama M, Yamazaki K, Kikuchi T, and Tomita T. :

GAD (gracile axonal dystrophy) mouse-a new animal model of central distal axonopathy.
 4th International Meeting of the Peripheral Neuropathy Association of America, Halifax,
 Nova Scotia, July 19-23, 1988

b. 一般学会

1) 向山昌邦, 山崎一斗, 菊池建機, 富田 武 :

GAD (gracile axonal dystrophy) マウスの計測学的研究—Central distal axonopathy の存在について—
 第29回日本神経病理学会, 仙台, 5.3, 1988

2) 榎原朱美, 山崎一斗, 富田 武, 菊池建機, 斎藤宗雄, 野村達次 :

GAD・MDX 複合マウスの育種
 第35回日本実験動物学会, 金沢, 5.18, 1988

3) 向山昌邦, 山崎一斗, 菊池建機, 富田 武 :

GAD (gracile axonal dystrophy) マウスの臨床病理学のおよび遺伝学的研究
 第29回日本神経学総会, 東京, 5.25, 1988

4) 守屋弘美, 松崎哲也, 新田耕一, 菊池建機 :

筋ジストロフィーマウス (mdx) 骨格筋線維の再生
 第35回日本実験動物学会, 金沢, 5.18, 1988

5) 向山昌邦, 菊池建機, 安藤一也, 山崎一斗, 富田 武 :

II 研究業績

GAD (gracile axonal dystrophy) マウスの病理形態学的研究

第28回日本神経病理学会, 神戸, 6.2, 1988

6) 菊池建機, 守屋弘美, 松崎哲也, 水谷 誠 :

糖原病ウズラ骨格筋の酵素組織化学的検討

第5回日本疾患モデル動物研究会総会, 浜松, 12.2, 1988

7) 余田 明, 菊池建機, 田口文広 :

マウス肝炎ウイルス peplomer 蛋白 (E2) のバキュロウイルスベクターによる産生

第105回日本獣医学会, 東京, 4.4, 1988

8) 田口文広 :

Anti-sense (アンチセンス) RNA によるマウス肝炎ウイルスの細胞内増殖抑制の試み

第36回日本ウイルス学会総会, 11.2, 1988

9) 余田 明, 田口文広 :

バキュロウイルスベクターによるマウス肝炎ウイルス peplomer 蛋白 (E2) の産生

第36回日本ウイルス学会総会, 東京, 11.2, 1987

C. 班会議発表

1) 菊池建機, 水谷 誠 :

糖原病II型ウズラ骨格筋の組織学的研究

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィーおよび関連疾患モデル動物の開発班, 東京, 12.7, 1988

2) 水谷 誠, 菊池建機 :

糖原病II型ウズラにみられる組織学的に異なるタイプとそれらの遺伝様式

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィーおよび関連疾患モデル動物の開発班, 12.7, 1988

3) 吉田瑞子, 菊池建機 :

mdx マウス骨格筋内の Ca^{2+} 濃度

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症および関連疾患の病態とその病因に関する研究班, 東京, 12.3, 1988

4) 菊池建機 :

バキュロウイルスベクターによって産生されたマウス肝炎ウイルス peplomer 蛋白 (E2) の解析

厚生省精神・神経疾患・遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究班, 大阪, 9.19, 1988

5) 余田 明, 田口文広, 菊池建機 :

マウス肝炎ウイルス peplomer 蛋白 (E2) のバキュロウイルスベクターによる発現

厚生省精神・神経疾患・遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究班, 東京, 1.25, 1989

6) 菊池建機, 守屋弘美, 菊地和弘, 信永利馬 :

新たに発見されたミエリン形成異常ミュータント

厚生省精神・神経疾患・遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究班, 東京, 1.25, 1989

7) 花岡和則 :

胚操作を利用したモデル動物の開発

文部省科研費重点領域・DNA 導入動物研究班, 東京, 9.26, 1988

8) 花岡和則 :

マウス胚幹細胞株の樹立について

文部省がん特別研究Ⅱ班, 名古屋, 11.15, 1988

9) 花岡和則 :

胚幹細胞の維持, 操作技術の研究

科学技術庁・発生工学の開発に関する研究班, 箱根, 3.10, 1989

II 研究業績

3. 主な研究報告

ミエリン形成異常マウス (*hus*) の神経病理学的研究

菊池建機, 守屋弘美, 菊地和弘, 信永利馬¹⁾

昭和62年, 東北大学医学部実験動物施設において IVCE 系マウスから腰部や臀部を中心に体を震わせて行動する突然変異が発見された¹⁾。遺伝様式は常染色体劣性遺伝に従う。異常個体は, 症状が後軀を振りながら踊るように見えることと発見された地名から, *hula sendai* と命名し, 遺伝子記号を *hus* とした。本ミュータントは我が国が初めて発見されたミエリン形成異常突然変異である。

材料と方法

生後23日の雄1匹雌1匹, 48日の雄1匹, 70日の雌1匹, 76日の雄1匹の計5匹の *hus* 個体と同腹の正常個体2-3匹を供試した。ネンプター麻酔下でマウスは心臓より生理食塩水で脱血し, 10%緩衝ホルマリン溶液で灌流し, 固定した。脳中枢神経組織は摘出後, 脱水し, パラフィンに包埋し, 薄切した。光顕組織標本は Hematoxylin-Eosin (H-E), Klüver-Barrera (K-B) そして Bodian 染色を施した。標本観察は何れも冠状断面の〔線条体〕, 〔海馬—視床—視床下部〕, 〔中脳—橋〕, 〔小脳—錐体〕, 延髄, 頸髄, 胸髄, 腰髄の8カ所において行なわれた。免疫組織化学的解析には鶏脳より抽出したMBPに対する兎抗血清を10%ホルマリン緩衝液で灌流固定した小脳, 延髄のパラフィン切片において HRP-DAB 法で反応させた。

結果と考察

hus マウスにみられる行動異常は生後13-20日に現れ, 大部分の異常個体は生後61-77日齢で死亡する。給餌が充分に行なわれれば正常, 異常個体間の生体重差は, 発症後期まで認められない。生後23日の *hus* マウスの脳中枢神経系にみられる主な病変は, グリア細胞の腫脹と毛細血管の軽度の拡張が原因となって脳実質および髄鞘線維間に泡沫状に発生する多くの空胞である。この変化は, 組織の広い範囲にわたり, 低倍率の観察では浮腫を伴った海綿変化と捉えられる。グリア細胞は核の周辺に広い空隙を有し, それ以外の突起は分枝しながら拡張し, 周辺で局部的泡沫状空胞を形成する。これらの変化は視床, 中脳, 延髄そして脊髄へと広範囲に及ぶ。軸索の成熟は正常マウスとほぼ同程度であるが, 蛇行と迷走が目立つ。脳梁より線条体へ侵入する軸索は, 正常では群または束として走行するが, 異常個体では束

の構築が不完全で, 実質を多くの軸索線維が迷走する。以上の病変は一時的で, 生後48日以後の観察ではみられない。

グリア細胞の増生は生後23日でわずかに認められるが, 48日以後の日齢でさらに顕著となる。この病変は大脳, 小脳, 延髄そして脊髄に含まれる全ての白質でみられる。延髄および脊髄の白質はこれらの変化とともに菲薄化し, 延髄と脊髄は正常個体に比べ全体に萎縮し, 細くなる。さらに, このグリア細胞の増生は灰白質にもおよび, 視床, 延髄, 脊髄の神経細胞は多くのグリア細胞で取り囲まれる。

hus マウスの大脳, 小脳, 延髄, 脊髄で多くの髄鞘線維が密に走行する領域, 特に脳梁, 小脳および脊髄の白質のミエリンはK-B染色の Luxol fast blue に染らず, これらの部分のミエリン形成が不全であることを示している。抗 MBP 抗体による免疫組織反応も小脳白質においてミュータントでは全くこの蛋白を欠いている。一方, 腰髄でみられる脊髄神経の背根は正常, 異常個体いずれの場合も正常に染色され, 末梢神経でのミエリン形成は *hus* マウスの場合もよく保たれている。

hus マウスは以下の諸点で Shiverer や *mld* マウスに類似の突然変異と考えられる。1) 離乳前後の生後23日ですでにミエリン形成は認められない。2) 以後の日齢でも脱髄や再生の所見はない。3) 末梢神経でのミエリン形成は正常である。4) 加齢とともに脳中枢神経系, 特に白質でのグリア細胞の増生が活発である。しかし23日でみられた一時的なグリア細胞の腫脹と組織に広範囲に出現する泡沫状の空胞は他のもので記載はなく, *hus* マウス独特の病変と考えられる。またグリア細胞の増生は他の突然変異よりも懸著である²⁾。

文 献

- 1) 信永利馬, 渡辺康治 (1988) 第35回日本実験動物学会総会 (講演要旨), 105
- 2) 菊池建機, 守屋弘美 (1989) 医学と生物学, 118/6: 37-40

1) 東北大学動物実験施設

マウス胚性幹細胞株の樹立

花岡和則, 早坂美智子

発生的全能性を持つ幹細胞株を用いキメラ法により外来遺伝情報をマウス個体内に導入する手法は、直接マウス受精卵に遺伝子を導入する方法に比べいくつもの利点があることから可能性に富んだ胚操作技術の一つとして非常に注目されている。特に、培養条件下で選択することができるという特徴を利用することにより、遺伝子の相同組み換え (homologous recombination) により任意の遺伝子の機能を破壊した幹細胞株を単離することができるという報告は、この手法の応用範囲を飛躍的に広げるものであり、今後ますます重要な技術に発展することは確実と思われる。

全能性を持つ未分化幹細胞としては奇形腫に由来する EC 細胞及び正常初期胚から直接樹立される ES 細胞が知られている。特に ES 細胞は、腫瘍の段階を経っていないことからより初期胚に近い性質を保持していることが期待でき胚操作の担体として有利な点が多い。しかし、ES 細胞樹立の方法はまだ確立されたものとはいえないのが現状である。そこで、キメラ法を利用した疾患モデル動物の開発のための基礎的研究の一つとして ES 細胞株をより効率的に樹立するための培養条件についてさらに検討を加えた。

方法及び結果

1) 初代培養

マウス胚盤胞期胚を培養条件下 (15% FCSを含む DMEM) に移す。胚は通常 4 日目には発達した卵円筒様構造を形成した。これらの胚から、トリプシン/EDTA 処理により胚体葉細胞を単離した。これらの細胞を軽くピペティングした後フィーダー細胞上に移した。フィーダー細胞としては、マイトマイシン処理を施した STO, 3T3 細胞株およびマウス 12-15 日胚繊維芽細胞を用いた。

2) 培地

様々な培地を検討した結果、DMEM 培地に、 10^{-4} Mメルカプトエタノール、2.1 g/l 炭酸水素ナトリウム、0.3 g/l グルタミン、10ml/ 非必須アミノ酸、10mg/l インシュリン、5 mg/l トランスフェリン、 10^{-8} M亜セレン酸ナトリウムを加えたものを使用した。血清は40以上のロットのうち最も ES 細胞の増殖のよいものを選び使用した。

3) 胚性幹細胞株の樹立

上記の方法により培養条件下に移された胚細胞は多くの場合極めて不安定であり、数週間後には様々

な細胞に分化し、その増殖性を失った。培地の組成、継代方法、フィーダー細胞などについて様々な検討を加えた結果、1) フィーダー細胞としてはマウス初期胚の初代繊維芽細胞を用い、2) バッファローラット肝細胞の conditioned medium を培地中に添加する、3) 継代方法の改良等を加えることにより、効率的に胚細胞を未分化状態で維持することができることが判明した。この方法により増殖能のある幹細胞株を樹立することに成功した。

考 察

発生的全能性を持つ未分化細胞株を用いたキメラ作成技術は、Homologous recombination 技術と組合わさることにより、任意の遺伝子機能を破壊した動物個体を人為的に作成することを可能にする。この実験系は遺伝子機能の解析手段として、また疾患モデル動物の作成技術として重要な技術となる。特に、ヒトの遺伝性難治疾患のほとんどを占める劣性遺伝疾患のモデル動物を人為的に作成することが可能な数少ない実験系のひとつと思われる。本年度の研究をもとに今後上記の実験系の確立に向けて研究を進める予定である。

マウスコロナウイルス JHM 変異株 E 2 蛋白の モノクローナル抗体を用いた比較

田口文広

マウスコロナウイルス JHM 株は、マウス、ラットの脳脊髄で増殖し、急性及び亜急性の脱髄性脳脊髄炎を引き起こすことから、ヒトの脳疾患のモデルとして広く研究されている。我々は JHM 親株をラット脳内接種後に見られる急性脳炎では、ウイルス粒子表面に存在する E2 蛋白の大きい変異株 (CI-2) が選択的に増殖しているのを見出した¹⁾。またラット由来アストロサイトの primary culture でも同様の E2 蛋白の大きい変異株 (CNSV) が、親株と比べよく増殖することを報告した²⁾。一般にコロナウイルスの E2 蛋白は、ウイルスが保有するいくつかの興味ある生物活性、例えば細胞融合活性、感受性細胞表面にあるリセプターに結合するリガンドとしての活性、動物に対する病原性などに深く関与していることが報告されている^{3,4)}。そこで我々が分離した JHM 変異株の E2 蛋白について詳しく検討する目的で、現在広く使用されている DL, DS, JHM-X の 3 株と分離した 2 株、また JHM 親株から plaque-purify した Sp-4 を用い E2 蛋白の大きさとその抗原性について比較検討した。

材料及び方法

JHM 株 DL, DS は南カリフォルニア大学 Stohlman 博士から、JHM-X は同大学牧野博士から分与された。これらのウイルス増殖には DBT 細胞を用いた。Northern blot¹⁾、免疫沈降¹⁾モノクローナル抗体の作成⁵⁾、ELISA⁵⁾については既に報告した。

結果及び考察

上記 6 株の JHM を DBT 細胞に moi 0.2~1 で接種し、感染後 8~12 時間に感染細胞から RNA を分離し、Northern blot によりウイルス特異的 RNA について検討した。JHM 感染細胞には 8 本のウイルス特異的 mRNA が検出され、その中でサイズの小さい mRNA 4~7 については株間で大きさに差はなかった。E2 蛋白をコードする mRNA 3 及び mRNA 2, 2a については、Sp-4 と JHM-X は他の 4 株と比べ 300~400 ベース小さい mRNA を産生した。これらのウイルス感染細胞で産生される E2 蛋白を抗 E2 抗体及びコントロールとして抗 N (ヌクレオプロテイン) 抗体を用い、免疫沈降により検討した。その結果、小さい mRNA 3 を産生する Sp-4 と JHM-X 感染細胞では他の株の感染細胞で産生される E2 蛋白と比べ 15~20K ダルトン小さい E2 蛋白が検出された。これらのことは、上の JHM 6 株は小さい E2

蛋白を産生する短い mRNA 3 を持つ Sp-4, JHM-X とその他の 4 株の少なくとも 2 つのグループに大別できることを示している。次にこれら 6 株により産生される E2 蛋白の抗原性をモノクローナル抗体を用いて比較した。モノクローナル抗体は南カリフォルニア大学 Fleming 博士により DL 株を用いて作成されたものを使用し、モノクローナル抗体に対する反応は ELISA により行なった。その結果、大きい E2 を産生する CI-2, CNSV, DL, DS は全ての抗 E2 モノクローナル抗体と同程度に強く反応したが、Sp-4, JHM-X では用いた 8 種の抗 E2 抗体の 1 種のみが強く反応し、その他のものは全く反応しなかった。抗 N モノクローナル抗体を用いた場合には全ての株が同様に強く反応した。以上のことから、Sp-4, JHM-X により産生される E2 蛋白は、大きさのみならず抗原性も他の 4 株と著しく異なることが判明した。しかしながらこれら 6 株間の相異は、全ての株が同じ様に抗 N 抗体に反応することから、非常に小さく、ただ E2 蛋白についてのみ 2 つのグループの存在することが推測される。今後この 2 種類の E2 をコードする mRNA 3 から cDNA を作成し、E2 の抗原性に大きく関与していると考えられる大きい E2 にのみ存在する 15~20K ダルトンの蛋白部位を明らかにしてゆきたい。また Sp-4, JHM-X と他の 4 株の間ではラットに対する神経病原性が著しく異なり、JHM の病原性に E2 蛋白が深く関与しているという今までの報告⁶⁾から考え合わせると、上述の 15~20K ダルトンの蛋白部位が同時に病原性について関与している可能性があり今後その点についても検討してゆきたい。

この研究は米国南カリフォルニア大学 Fleming 博士と協同で行なった。

文 献

- 1) Taguchi F., et al., J. Virol. 54, 429-435 (1985)
- 2) Taguchi F., et al., Virology. 155, 267-270 (1986)
- 3) Holmes, K.V., et al., Ad. exp. Med. Biol. 142, 133-144 (1981)
- 4) Sturman, L.S., and Holmes, K.V., Adv. Virus Res. 28, 35-112 (1983)
- 5) Fleming, J.O., et al., Virology, 131, 296-307 (1983)
- 6) Fleming, J.O., et al., J. Virol. 58, 869-875 (1986)

III 中 央 施 設

I 実験動物研究施設

施設は昭和62年4月16日に開所式を挙行し、一部未整備のままではあったが動物実験を開始し、本年度末で満2年目を迎える。新たに発足した遺伝子工学研究部は、施設の一、二階の共通実験室を第2研究棟移転まで研究室に改造して使用し、先に発足したモデル動物開発部とともに研究を進めている。

施設は動物実験に悪い影響を与える感染症防御の対策をとっていたが、不幸にも昭和63年11月初旬に飼育中のラットにセンダイウイルス(HVJ)の伝播が明らかとなった。委員会は直ちにその対策を立て、利用者の協力と飼育管理者の努力により、12月末までに一応の終息をみた。

委員会は今後の感染の再発を防ぐため、施設の利用法と動物飼育管理の在り方について見直しを行い、1)委員会を定期的に開催して施設利用者にその対策を徹底する。2)原則として三階はマウス、二階はラットの飼育にあて、一階は鳥類、ウサギ、モルモット等の実験動物の領域とする。3)開設当初に立案した管理規程や施設の利用法を見直す等の諸件について打ち合せ、作業に着手した。年度末を迎えるに当たり、従来の施設の管理運営規約や、新しく開設するSPF飼育ゾーン(遺伝子導入動物飼育領域)の利用規約等を作成中である。

本年度の施設整備は、二階において飼育室(1-5)と飼料室を加え合計6室のためのクリーンラック、三階においてSPF動物飼育ゾーンの共通胚操作実験室関連機器、一階への鳥類、ウサギ、モルモットの移動、一階の大型ケージ洗浄室でのEOGガス蒸気滅菌器の設置、三階の感染実験室の陰圧アイソラック、その他実験機器の設置等が行なわれた。

(実験動物研究施設管理委員会委員長 菊池建機)

II RI 研究施設

RI施設は高橋疾病研究第三部長がRI委員会委員長を務め、今沢代謝研究部室長(RI取り扱い主任者)の献身的な協力によりスムーズに管理、運営されていたが高橋部長の病気入院という思わぬ事態が発生したために鍋島遺伝子工学研究部長が代行を務めることとなった。しかしながら今沢室長、内田さんの努力と各RI委員の方々の協力により実験に支障を来すことなく運営された。

今年度の主な進展は次の3点である。

1) RI施設に感染実験ゾーンを開設した。

RI室のP2施設に顕微鏡、CO₂インキュベーター、等を購入し感染細胞を用いた標識実験に使用することとなった。

2) 施設の拡充のために液体シンチレーションカウンター(ベックマン)1台、超低温フリーザー(サンヨー)1台を購入した。

Ⅲ 中央施設

3) かねてより懸案であった専任職員の確保のために二度にわたり、募集広告を出したところ複数の応募者があり、面接の上ふさわしいと思われる方を採用することとなった。

今後ますます RI の使用が増大し、施設の拡充が研究所の発展にとって重要と考えられるが現施設の拡充は極めて困難なことから研究所本館地階に建設の RI 室の早期開設が待ち望まれる。幸い建設は予定どおり進められているとのことであり、RI 施設の最終設計、打ち合せもおこなわれた。今後は施設に設置する設備備品の購入のために各方面の協力をお願いしたい。

(RI 委員会委員長代理 鍋島陽一)

Ⅲ 電子顕微鏡室

1) 施設及び機器

設置されている機種は、透過型として日立 H700, H600, H7000, 走査型として日立 S700, S430 である。新機種の H7000 は、簡便で操作性に優れ、初心者の使用に利用され、利用頻度も最も高い。旧機種の H600 と H700 は、最近、部品の寿命による故障が増加し、中でも H600 は、ロータリーポンプなど、電子顕微鏡の構成部品としてもかなり主要な大型部品の交換を余儀なくされている。

同様に共同利用されているライヘルツ社のマイクロームは、その性能が高く評価され、利用者が多く、予約表の申込みにより、フルに活用されている。

2) 運営上の問題点

建物床面の振動が大きく、走査型電子顕微鏡の性能が年々低下していたが、重心位置が上部にある S700 の性能低下が著しく、倍率 10,000 倍の撮影が、日中は困難になった。床振動の最も少い一階への移転が望まれる。

開所当時は新機種であった上記の電子顕微鏡も、使用頻度の順に部品の寿命による故障が多くなっている。特に、H600 は、最近故障が目立ち、新機種への更新が望まれる。

(電顕委員会委員長 桒中征哉)

Ⅳ 組換え DNA 実験安全委員会

平成元年 3 月 17 日に今年度の安全委員会を開催した。鈴木義之疾病研究第 5 部部長が東京都臨床研に転出されたために委員の欠員が生じたが部長会の意向で本年度は補充せずに審査することとなった。30 件の申請がだされ、基本的にはすべての計画が承認されたが、1) ウイルスや感染実験の規制をうける計画に関しては感染委員会の承認を得ること、2) ヒト材料を対象とする計画は倫理委員会に申請することなどの意見がだされたものもあった。本年度の特徴は個体を宿主とした計画が 9 件にのぼったことと遺伝子導

入により形質転換した細胞の移植実験への活用計画が申請されたことである。これらの計画は何れも動物実験室の整備を必要としており、速やかな整備と実験の性質をよく理解した運営が望まれる。SPFゾーンに胚工学に必要な機器類が設置されたこと、動物実験室の管理、運営の見直しも行われ、新しい体制が整いつつあることからようやく一定程度の見通しを持って実験を行えるところまで来たと考えている。しかしながら、現在の研究のスピードからすれば施設整備の遅延によって生じた研究の遅れを取り戻すのにどれほどの困難を必要とするかを考えると心の痛む思いを禁じ得ない。

されど前進あるのみ！

(組換え DNA 実験安全委員会委員長 鍋島陽一)

V 感染実験安全委員会

第3回感染実験安全委員会が開かれ、安全規程の一部改正が審議され了承された。この改正により、感染実験安全委員会で管理する、生物学的相互作用を通じて人体に及ぼす要因は、感染性を有する病原微生物に限られることとなった。同時に組替 DNA 実験を管理する安全委員会との分担もある程度整理され、安全委員会でその扱いの安全運用が管理されている生物活性物質のうち、1) 各種オンコジーン等のように病原体などから分離された遺伝子断片であってもそれ自体に感染性のないものを扱う場合、2) 遺伝子組換え実験に用いられているクラス1の病原体(大腸菌)については、感染実験安全委員会への届出、申請の義務がなくなった。また感染実験安全委員会では、新たに10件の申請が審議され了承された。さらに、神経研究所のRI研究施設内の、それまでP2実験室として使用されていた部屋を、感染実験室としても使用することについての安全性が審議され、一般のP2実験の条件に、部屋を遺伝子組換え実験の目的に使用することを妨げない、利用者委員会を作り安全性の徹底を計る等、4条件を加えて使用することが了承された。この後、P2実験室を通常の培養室及び遺伝子組換えの目的で使用する代表を交えた利用者委員会で規程が作成され、現在、この部屋は神経研究所RI委員会、部長会での審議、了承を経た後、一部感染実験(主として患者リンパ球の短期培養)の目的に使用されている。

(感染実験安全委員会委員長 杉田秀夫)

VI 研究所本館建築委員会

これまで第二研究棟と称していた新しい建物は研究所において最も中心的なものであるから研究所本館と呼称すべきであるという杉田所長の提唱によりそのように変更することとなった。

当初の予算と建築計画のずれなどの問題はあったが、設計の打ち合わせが進められ、昭和63年度中に地階のRI室、1～2階の合わせ図の確認作業が終了した。これにもとずいて昨年に引続き佐藤工業により建

III 中央施設

築が進められ、昭和63年度末までに地階から二階までの鉄筋及び床のコンクリート打ちがなされた。

(研究所本館建築委員会委員長 小沢鉄二郎)

VII 図書委員会

本研究所の図書は以下の通りである。

(図書委員会委員長 小沢鉄二郎)

洋雑誌名

1. Acta Histochemica et Cytochemica (1983～) vol.16～
2. Acta Neurologica Scandinavica (1967～) vol.43～
3. Acta Neuropathologica (1978～) vol.41～
4. Acta Physiologica Scandinavica (1968～) vol.72～
5. Advances in Neurology (1973～) vol.1～
6. AIDS (1987～) vol.1～
7. American Journal of Anatomy (1968～) vol.122～
8. American Journal of Human Genetics (1968～) vol.20～
9. American Journal of Medical Genetics (1977～) vol.1～
10. American Journal of Pathology (1968～) vol.52～
11. American Journal of Physiology (1968～) vol.214～
12. Analytical Biochemistry (1968～) vol.22～
13. Anatomical Record (1968～) vol.160～
14. Anatomy & Embryology (1978～) vol.153～
15. Annals of Neurology (1978～) vol.3～
16. Annals of New York Academy of Science (1968～) vol.146～ (vol.177～402 欠番)
17. Annual Review of Biochemistry (1974～) vol.43～
18. Annual Review of Cell Biology (1985～) vol.1～
19. Annual Review of Genetics (1974～) vol.8～
20. Annual Review of Immunology (1983～) vol.1～
21. Annual Review of Neuroscience (1978～) vol.1～
22. Annual Review of Pharmacology & Toxicology (1984～) vol.24～

23. Annual Review of Physiology (1974~) vol.36~
24. Archives of Biochemistry & Biophysics (1968~) vol.123~
25. Archives of Neurology (1959~) vol.1~
26. Archives of Pathology & Laboratory Medicine (1983~) vol.107~
27. Archives of Virology (1986~) vol.87~
28. Biochemical and Biophysical Research Communications (1960~) vol.1~
29. Biochemical Journal (1968~) vol.106~
30. Biochemical Genetics (1987~) vol.25~
31. Biochemical Medicine & Metabolic Biology (1987~) vol.37~
32. Biochemical Pharmacology (1958~) vol.1~
33. Biochemical Society Transactions (1978~) vol.6~
34. Biochemistry (1962~) vol.1~
35. Biochemistry & Cell Biology (1987~) vol.65~
36. Biochemistry International (1980~) vol.1~
37. Biochimica Biophysica Acta (1968~) vol.150~
38. BioEssays (1984~) vol.1~
39. Biological Psychiatry (1969~) vol.1~
40. Biology of Neonate (1987~) vol.51~
41. Biomedical Mass Spectrometry (1974~) vol.1~
42. Biomedical Research (1980~) vol.1~
43. Biophysical Journal (1960~) vol.1~
44. Bioscience Reports (1983~) vol.3~
45. Biosis Cas Selects : Alzheimer's Disease & Senile Dementias (1987~) vol.1~
46. Blood : Journal of Haematology (1987~) vol.69~
47. Brain (1968~) vol.91
48. Brain Research (1985~) vol.349
49. Brain Research Bulletin (1987~) vol.18~
50. Brain Research Reviews (1979~) vol.1~
51. British Journal of Haematology (1987~) vol.65~

III 中央施設

52. British Journal of Pharmacology (1968~) vol.34~
53. Cancer Research (1968~) vol.28~
54. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology (1987~) vol.65~
55. Cell (1974~) vol.1~
56. Cell & Tissue Kinetics (1983~) vol.16~
57. Cell & Tissue Research (1978~) vol.186~
58. Cell Biochemistry & Function (1987~) vol.5~
59. Cell Biology : International Reports (1983~) vol.7~
60. Cell Calcium (1985~) vol.6~
61. Cell Differentiation and Development (1983~) vol.12~
62. Cell Motility & Cytoskeleton (1983~) vol.3~
63. Cellular & Molecular Neurobiology (1983~) vol.3~
64. Cellular Immunology (1970~) vol.1~
65. Cellular Signalling (1989~) vol.1~
66. Chemical Reviews (1968~) vol.68
67. Chemical Titles (1968~) vol.1~
68. Chromosoma (1986~) vol.93~
69. Chronobiology International (1986~) vol.3~
70. Clinica Chimica Acta (1968~) vol.19~
71. Clinical & Experimental Immunology (1987~) vol.67~
72. Clinical Chemistry (1975~) vol.21~
73. Clinical Genetics (1970~) vol.1~
74. Clinical Immunology & Immunopathology (1987~) vol.42~
75. Clinical Neuropathology (1983~) vol.2~
76. Clinical Neuropharmacology (1987~) vol.10~
77. Cold Spring Harbour Symposium (1988~) vol.L11~
78. Computers & Biomedical Research (1987~1988) vol.20~21
79. Cumulated Index Medicus (1986~) vol.9~
80. Cytobiology (1969~1979) vol.1~18
81. Cytogenetics & Cell Genetics (1983~) vol.35~

82. Development (1987～) vol.99～
改名前の名称 (Journal of Embryology and Experimental Morphology (1986) vol.91～98)
83. Developmental Biology (1968～) vol.17～
84. Developmental Brain Research (1986～) vol.24～
85. Differentiation (1973～) vol.1～
86. Electromyography & Clinical Neurophysiology (1983～) vol.23～
87. The EMBO Journal (1983～) vol.2～
88. Endocrinology (1968～) vol.82～
89. Epilepsia (1987～) vol.28～
90. Epilepsy Research (1987～) vol.1～
91. European Journal of Biochemistry (1967～) vol.1～
92. European Journal of Cell Biology (1979～) vol.19～
93. European Journal of Immunology (1983～) vol.13～
94. European Journal of Medical Chemistry (1987～) vol.22～
95. European Journal of Pharmacology (1967～) vol.1～
96. European Neurology (1987～) vol.26～
97. Experientia (1968～) vol.24～
98. Experimental Brain Research (1966～) vol.1～
99. Experimental Cell Biology (1983～) vol.51～
100. Experimental Cell Research (1968～) vol.49～
101. Experimental Gerontology (1987～) vol.22～
102. Experimental Neurology (1959～) vol.1～
103. Experimental Pathology (1983～) vol.23～
104. FASEB Journal (1987～) vol.1～
105. 改名前の名称 Federation Proceedings of the Federation of American Societies for
Experimental Biology (1968～1987) vol.27～46
FEBS Letters (1968～) vol.1～
106. Gene (1986～) vol.41～
107. Genes & Development (1987～) vol.1～
108. Genetical Research (1987～) vol.49～

III 中央施設

109. Genetics (1987~) vol.115~
110. Genome (1987~) vol.29~
111. Genomics (1987~) vol.1~
112. GLIA (1988~) vol.1~
113. Histochemistry (1983~) vol.77~
114. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie, Briological Chemistry (1983~)
115. vol.364~
Human Genetics (1964~) vol.1~
116. Immunochemistry (1964~1974) vol.1~17
117. Immunological Reviews (1987~) vol.95~
118. Immunology (1968~) vol.14~
119. Immunology Today (1983~) vol.4~
120. Infection & Immunity (1970~) vol.1~
121. International Archives of Allergy & Applied Immunology (1987~) vol.82~
112. International Journal of Biochemistry (1983~) vol.15~
123. International Journal of Cancer (1987~) vol.39~
124. International Journal of Neuroscience (1983~) vol.18~
125. In Vitro (1983~) vol.19~
126. Journal of Affective Disorders (1986~) vol.10~
127. Journal of American Chemical Society (1968~) vol.90~
128. Journal of American College of Neuropsychopharmacology (1987~) vol.1~
129. Journal of Anatomy (1967~) vol.102~
130. Journal of Biochemistry (1922~) vol.1~
131. Journal of Biological Chemistry (1968~) vol.243~
132. Journal of Cell Biology (1968~) vol.36~
133. Journal of Cell Science (1966~) vol.1~
134. Journal of Cellular Physiology (1968~) vol.71~
135. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (1981~) vol.1~
136. Journal of Chemical Neuroanatomy (1988~) vol.1~
137. Journal of Child Neurology (1987~) vol.2~

138. Journal of Chromatographic Science (1987~) vol.25~
139. Journal of Chromatography (1958~) vol.1~
140. Journal of Clinical Investigation (1984~) vol.73~
141. Journal of Comparative Neurology (1898~) vol.1~
142. Journal of Cyclic Nucleotide & Protein Phosphorylation Research (1987~) vol.12~
143. Journal of Developmental Physiology (1987~) vol.9~
144. Journal of Electron Microscopy (1978~) vol.27~
145. Journal of Experimental Medicine (1968~) vol.127~
146. Journal of Experimental Psychology (1987~) vol.13~
147. Journal of Experimental Zoology (1986~) vol.237~
148. Journal of General Physiology (1919~) vol.1~
149. Journal of General Virology (1986~) vol.67~
150. Journal of Heredity (1986~) vol.77~
151. Journal of Histochemistry & Cytochemistry (1968~) vol.16~
152. Journal of Immunological Methods (1971~) vol.1~
153. Journal of Immunology (1968~) vol.100~
154. Journal of Inherited Metabolic Disease (1978~) vol.1~
155. Journal of Lipid Research (1968~) vol.9~
156. Journal of Magnetic Resonance (1969~) vol.1~
157. Journal of Medical Genetics (1987~) vol.24~
158. Journal of Membrane Biology (1969~) vol.1~
159. Journal of Mental Deficiency Research (1957~) vol.1~
160. Journal of Molecular Biology (1969~) vol.39~
161. Journal of Morphology (1983~) vol.175~
162. Journal of Muscle Research & Cell Motility (1983~) vol.4~
163. Journal of National Cancer Institute (1987~) vol.78~
164. Journal of Neural Transmission (1968~) vol.31~
165. Journal of Neurobiology (1983~) vol.14
166. Journal of Neurochemistry (1968~) vol.15~

III 中央施設

167. Journal of Neurocytology (1983~) vol.12~
168. Journal of Neurogenetics (1983~1987) vol.1~4(休刊?)
169. Journal of Neuroimmunology (1981~) vol.1~
170. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry (1926~) vol.1~
171. Journal of Neurological Sciences (1964~) vol.1~
172. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology (1987~) vol.46~
173. Journal of Neurophysiology (1938~) vol.1~
174. Journal of Neuroscience (1986~) vol.6~
175. Journal of Neuroscience Methods (1979~) vol.1~
176. Journal of Neuroscience Research (1983~) vol.9~
177. Journal of Pathology (1983~) vol.139~
178. Journal of Pediatrics (1968~) vol.72~
179. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics (1967~) vol.156~
180. Journal of Pharmacy & Pharmacology (1987~) vol.39~
181. Journal of Physiology (1968~) vol.194~
182. Journal of Tissue Culture Methods (1983~) vol.8~
183. Journal of Toxicology : Toxin Reviews (1987~) vol.6~
184. Journal of Ultrastructure Research & Molecular Structure Research (1968~) vol.22~
185. Journal of Virology (1967~) vol.1~
186. Laboratory Animal (1986~) vol.20~
187. Laboratory Animal Science (1986~) vol.36~
188. Laboratory Investigation (1968~) vol.18~
189. Lancet (1968~)
190. Life Science (1968~) vol.7~
191. Lipids (1966~) vol.1~
192. Membrane Biochemistry (1987~) vol.7~
193. Metabolic Brain Disease (1987~) vol.2~
194. Methods in Enzymology (1955~) vol.1~
195. Molecular & Cellular Biochemistry (1973~) vol.1~
196. Molecular & Cellular Biology (1983~) vol.3~

197. Molecular Biology Reports (1987~) vol.12~
198. Molecular Brain Research (1986~) vol.1~
199. Molecular Immunology (1979~) vol.16~
200. Molecular Pharmacology (1965~) vol.1~
201. Muscle & Nerve (1978~) vol.1~
202. Mutation Research (1964~) vol.1~
203. Nature (1968~) vol.217~
204. Neunym-Schmiedberg's Archives of Pharmacology (1985~) vol.331
205. Neurobiology of Aging (1987~) vol.8~
206. Neurochemical Pathology (1987~) vol.6~
207. Neurochemical Research (1976~) vol.1~
208. Neurochemistry International (1987~) vol.10~
209. Neuroendocrinology (1987~) vol.45~
210. Neurology (1970~) vol.20~
211. Neuron (1987~) vol.1~
212. Neuropathology & Applied Neurobiology (1975~) vol.1~
213. Neuropediatrics (1978~) vol.9~
214. Neuropeptides (1983~) vol.4~
215. Neuroscience (1983~) vol.8~
216. Neuroscience Abstracts (1987~) vol.5~
217. Neuroscience Letters (1975~) vol.1~
218. Neuroscience Research (1984~) vol.1~
219. Neurotoxicology (1987~) vol.8~
220. New England Journal of Medicine (1967~) vol.276~
221. Nucleic Acids Research (1974~) vol.1~
222. Pathology (1983~) vol.4~
223. Pediatric Research (1967~) vol.1~
224. Peptides (1983~) vol.4~
225. Pediatric Neurology (1987~) vol.3~
226. Pflugers Archiv European Journal of Physiology (1947~) vol.249~

III 中央施設

227. Pharmacological Reviews (1968~) vol.20~
228. Pharmacology Biochemistry & Behavior (1983~) vol.18~
229. Physiological Reviews (1968~) vol.48~
230. Physiology and Behavior (1987~) vol.39~
231. Proceedings of Japan Academy (1944~) vol.20~
232. Proceedings of National Academy of Sciences (1968~) vol.59~
233. Proceedings of Royal Society of London Ser. B: Biological Science (1982/83) vol.217~
234. Proceedings of Society for Experimental Biology & Medicine (1987~) vol.184~
235. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1966~) vol.1~
236. Psychopharmacology (1959~) vol.1~
237. RAMBIOS (1986~1987) vol.3~4
238. Regulatory Peptides (1986~) vol.14~
239. Reviews of Magnetic Resonance in Medicine (1986~) vol.1~
240. Revue Neurologique (1978~) vol.134~
241. Roux's Archives of Developmental Biology (1969~) vol.162~
242. Sciences (1968~) vol.159~
243. Second Messengers and Phosphoproteins (1988~) vol.12~
244. Somatic Cell & Molecular Genetics (1986~) vol.2~
245. Studia Biophysica (1983~) vol.93~
246. Subcellular Biochemistry (1987~)
247. Synapse (1987~) vol.1~
248. Theriogenology (1986~) vol.25~
249. Tissue & Cell (1983~) vol.15~
250. Tohoku Journal of Experimental Medicine (1984~)
251. Toxicology Letters (1987~) vol.35~
252. Transplantation (1987~) vol.43~
253. Trends in Biochemical Sciences (1983~) vol.8~
254. Trends in Genetics (1986~) vol.2~
255. Trends in Neurosciences (1983~) vol.6~
256. Trends in Pharmacological Sciences (1983~) vol.4~

- 257. Veterinary Record (1986～) vol.118～
- 258. Virchows Archiv A: Pathological Anatomy & Histology (1947～) vol.314～
- 259. Virchows Archiv B: Cell Pathology (1968～) vol.1～
- 260. Virology (1986～) vol.4～
- 261. Virus Research (1986～) vol.4～

和雑誌名

- 1. 遺伝 (1981～) vol.35～
- 2. イアトロス (1989～)
- 3. 科学 (1981～) vol.51～
- 4. 化学 (1981～) vol.36～
- 5. 細胞工学 (1985～) vol.4～
- 6. 神経研究の進歩 (1981～) vol.25～
- 7. 神経内科 (1982～) vol.16～
- 8. 生体の科学 (1981～) vol.32～
- 9. 総合臨床 (1981～) vol.30～
- 10. 組織培養 (1981～) vol.7～
- 11. 蛋白質・核酸・酵素 (1981～) vol.24～
- 12. 治療 (1981～) vol.63～
- 13. 脳と発達 (1981～) vol.13～
- 14. ラボラトリーアニマル (1986～1988) vol.5 No.1 以後休刊
- 15. サイエンス (1987～) vol.17～
- 16. 神経精神薬理 (1987～) vol.9～
- 17. 実験医学 (1986～) vol.4～
- 18. 代謝 (1987～) vol.24～
- 19. 臨床神経学 (1982～1986) vol.23～26
- 20. Clinical Neuroscience (1987～) vol.5～
- 21. 続・生化学実験講座

IV 別

項

(別項1)

1. 国立神経センター(仮称) 設立準備委員会中間報告

(昭和52年1月)

1. はじめに

進行性筋ジストロフィー症, 精神薄弱, 脳性麻痺, 変性性神経疾患, 精神疾患などの精神・神経・筋疾患および発達障害は, その多くのもが原因不明であり, 治療方法も予防法もまだ確立していない。このために, 患者はもちろん家族の苦悩は, 測り知れないものがある。

これらの難治疾患に対する医療と研究を速かに整備, 充実すべきだとする世論に応じて, 厚生省は昭和39年以降, 筋ジストロフィーおよび重症心身障害の専門病床の整備を進めるとともに, 「進行性筋ジストロフィーの成因と治療」, 「心身障害の発生予防」の研究の強化を計り, また昭和47年度以後には, 重症筋無力症, 筋萎縮性側索硬化症, 多発性硬化症などの神経系難病の研究を推進して今日に至っている。しかし, その成果は必ずしも満足すべきものではないとして, これらの難治疾患の原因解明と治療開発をより一層推進するために, 医学のみならず, 関連諸科学を含めた大規模な総合的研究機構を, 国家的見地に立って建設する必要があることが各方面から要望された。

このような状況のもとで, 昭和43年には国立脳・神経センターの構想が国立武蔵療養所から厚生省に提出され, さらに昭和48年からは患者家族と研究者の協力により, この種の研究機構の構想が検討された。昭和49年には厚生大臣官房科学技術審議官室が, 精神・神経・筋・発達障害研究体制検討会(委員長森山豊)を設置し, 昭和50年に中間報告をまとめた。翌昭和51年, 国立精神・神経・筋・発達障害センター(仮称)発足のための施設整備費が認められ, 具体化の第一歩を踏みだした。昭和51年1月, 本センター設立準備委員会の設置が決まり, 16名の委員が厚生省事務次官より委嘱された(表1)。

本委員会は昭和51年1月から8月迄に8回(その他小委員会2回)開催され, 毎回長時間の熱心な討議が行なわれた。細部についてはまだ十分検討が加えられていない憾みがあるが, 現在迄に得られた本委員会の結論の大綱をここに報告する。

2. 目標と使命

本センターが対象とする精神疾患, 神経・筋疾患, 発達障害は各種の解明困難な疾患を含んでいるが, おおむね次の3群に大別される。

1. 進行性筋ジストロフィー症等の神経・筋・変性性疾患群
2. 代謝異常などによる精神疾患群及び神経疾患群

IV 別 項

3. 染色体異常および胎内・周産期異常による精神薄弱，脳性麻痺などの発達障害群

これらの疾患群および発達障害群は，従来精神科，神経内科，小児科，産科などの諸分野でそれぞれの専門的立場から研究されてきた。

しかしこれらは中枢神経系，末梢神経系，神経・筋接合を経て筋に至る一貫した機能系に障害のある難治疾患であるため，共通の基盤に立って研究を行なうことが可能かつ必要であり，臨床医学の関連諸分野および基礎医学のみならず，近年めざましい進歩をとげている分子生物学，発生学，遺伝学，情報処理などの関連諸科学との密接な協力のもとに，原因の解明，新しい治療法の開発，予防法の確立を期することを目標とする。

このような目標の達成には既存の治療・研究体制から脱皮し，新しい発想のもとに関連諸分野の研究者が協力しうる組織，機構，運営を考慮することが必要である。

本センターの目標と使命は具体的にはおよそ次のように要約される。

1. 本センターは目的指向型の研究施設として，合理的かつ効果的な研究と施設の運営を行なう。
2. 本センターは独自の研究施設，組織と十分な研究費をもつとともに，大型研究プロジェクトを全国的に推進できる中枢としての機能をもつ。
3. 本センターは医学のみならず，分子生物学，発生学，遺伝学，情報処理などの関連諸科学の総力を結集できる組織と機構をもち，研究プロジェクトに対応できる流動的な研究態勢を確立する。
4. 本センターは共通の目標をもつ全国の大学その他の医療，研究機関と密接な連携を保ち，門戸を広く開放して施設の共同利用，人的交流をはかる。
5. 本センターは流動研究員制度およびレジデント制度を設け，国内および，国外からの研究者を受け入れる体制を備える。
6. 本センターは研究を推進するために必要な国内および国外の情報を収集し，国内および国外に対して情報サービスを行なう。
7. 本センターに研究者，専門医，その他の医療従事者，医療保健従事者などの養成，研修のための施設を設ける。

3. 名称及び設置場所

国立神経センター（仮称）と称し，東京都小平市小川東町2620国立武蔵療養所に設置する。

4. 組織及び機構

厚生省設置法を改正して，国立がんセンターと同様の国立センターとする。国立武蔵療養所はセンター

の病院部門に包括される。

センターはセンター長の下に研究所，病院，研修所，運営部を置き，センター長はセンター運営委員会および研究委員会を統轄して，各部門の連繋と円滑な運営をはかるものとする。

(1) 研 究 所

イ. 次に掲げる疾患研究部門 8 部及び基礎部門 18 部の計 18 部を設置する。

- (1) 疾患研究第 1 部（主として筋疾患）
- (2) 疾患研究第 2 部（主として先天性代謝異常）
- (3) 疾患研究第 3 部（主として周産期・胎内発達異常）
- (4) 疾患研究第 4 部（主として精神疾患）
- (5) 疾患研究第 5 部（主として変性性神経疾患）
- (6) 疾患研究第 6 部（主として染色体異常）
- (7) 疾患研究第 7 部（主として脳器質疾患）
- (8) 疾患研究第 8 部（主として発作性疾患）
- (9) 心身障害診断研究部
- (10) 疾患モデル動物開発部
- (11) 疫学研究部
- (12) 神経・筋微細構造研究部
- (13) 神経機能研究部
- (14) 代謝研究部
- (15) 分析科学研究部
- (16) 薬物反応研究部
- (17) 感染・免疫研究部
- (18) 発生・発達研究部

ロ. 共同利用部門として (1)情報センター（図書館を含む），(2)実験動物管理室，(3)中央機器室，(4)電子顕微鏡室，(5)アイソトープ室，(6)工作室，(7)写真室 を設置する。

(2) 病 院

イ. 病棟部門：既設の病棟の他に，神経疾患および筋疾患のための病棟（120床）を新設し，将来300床程度とする。なおリハビリテーション施設を新設する。

ロ. 外来部門：既設のものほかに，神経疾患，筋疾患および精神薄弱などの発達障害のための外来部門を新設し，全国の対象疾患患者への医療サービス（他の医療機関からの紹介，対象患者の追跡

IV 別 項

など)にあてる。

また、専門外来として、精神科、神経内科、神経小児科、神経外科、麻酔科、口腔外科を置き、常勤医をあてる。その他内科(循環器、内分泌、血液などの各科)、小児内科、整形外科、神経耳科、神経眼科、皮膚科、泌尿器科、産婦人科を設け、非常勤医をあてる。

ハ、共同利用部門：センター病院としての機能を果たすため国立武蔵療養所の現有施設を拡充強化し、病院共同利用部門として次の各部を設置する。

- (1) 中央検査部(生化学、生理、血液、血清、微生物、診断用アイソトープなど)
- (2) 病理部(剖検センター、一般病理、神経病理)
- (3) 放射線部 (4) メディカル・リハビリテーション部 (5) 心理部
- (6) ソシアルワーク部

(3) 研 修 所

研究者、専門医、医療従事者、医療保険従事者の養成、研修を行なうための施設および宿舍を設置する。

(4) 運 営 部

庶務、会計、医事、調査、企画、図書、研修などの部局をおき、センター運営にあたる。

5. 職 員

本センターがその使命を達成するためには、高度の医療と研究の水準を確保するのに十分な人材をもつことが不可欠の条件である。そのためには、医学および関連諸科学の優秀な研究者は勿論、その他情報部門(図書館司書を含む)、共同利用部門、実験動物管理部門に、専門技術と経験をもった技術者を充足することが必要である。また病院については、検査、リハビリテーション、ソシアルワーク、心理などのパラメディカル部門の職員を十分に持つことが必要である。

さらに重要なことは、流動研究員、併任研究員などの制度を活用して、全国の関連する医療・研究機関との交流を推進することである。

(1) 研 究 所

各研究部には次の職員を置くものとする。

部 長	1 名
室 長(主任研究員)	2～4 名
研究員	4～8 名
技術員(研究助手)	6～10 名

事務員（秘書その他） 1～2名

計 14～25名

その他に流動研究員若干名，併任職員若干名を置く。

(2) 病 院

部長，医長，専任医員の他にレジデントを置き，病棟および外来の診療にあたるものとする。

医師，看護婦，パラメディカル要員については，センターの使命にふさわしい高度の医療水準の確保にこと欠かないだけの定員が設定されなければならない。

なお研究所と病院の人事交流を緊密にするために併任制度を活用すべきである。

6. 設立計画

患者，家族の方々の期待に応えるためにも，センターの構想が一気に実現することを望むものであるが，現在の諸般の状況からは設立計画を段階的に遂行せざるを得ない。

まず研究所については，表2に示す18研究部門，共同利用部門，図書館，動物管理室などを完成するためには少なくとも17,000㎡の規模を必要とする。昭和52年10月に予定された開設のための第一次計画としては，昭和51年度予算7億円で4,400㎡（4階建）の建物が建設されることになった。また第一次計画として本委員会は基礎4部門（神経・筋微細構造研究部，神経機能研究部，代謝研究部，感染・免疫研究部）および疾患研究7部門（筋疾患，先天性代謝異常，周産期・胎内発達障害，精神疾患，変性性神経疾患，脳器質疾患の各疾患研究部および心身障害診断研究部）の計11部門をもって発足することを決定した。しかし，厚生省の要請により，第一次計画は基礎4部門，疾患研究4部門の計8部門で発足することになった。

研究のために必要な機器類の経費として27億円が計上されたが，初年度は13億円が予定されている。

研究要員については本委員会は8研究部で108名程度の専任職員が必要であるとしたが，第一次計画では8研究部門で26名（他に事務職員3名）が予定されているにすぎない。

病院部門には当面現在の国立武蔵療養所が充当されるが，センターの病院の機能としては不十分であるため，第一次計画として神経・筋疾患病棟（120床）の新設と，外来，中央検査部，病理部の拡充，整備を行なう。さらに第二次計画以後，リハビリテーション部の新設および神経・筋疾患の病床を300床に増設させるために必要な改築，整備を順次行なう。

第一次計画につづく第二次，第三次整備計画（表3）を一日も早く完成し，構想に示されたセンターの機能が十分に発揮できるようにすべきである。

IV 別 項

7. おわりに

患者、家族の方々と関係者の多年の努力が実って、本センターが建設の第一歩を踏みだしたことはまことによろこばしい。これはひとえにこれらの方々の協力のたまものである。

この報告でも明らかにしたように、いま発足しようとするセンターの態勢はその任務の重いのに比べて、決して十分とは言えない。本委員会はセンターの将来に希望を託し、その完成に向かって力をつくしたいと思う。全国の患者、家族の方々はもとより、医療関係者、研究者、さらには広く国民各位の一層の理解と支援を願ってやまない。

昭和52年 1 月

国立神経センター（仮称）設立準備委員会

委員長 秋 元 波留夫

副委員長 里 吉 栄二郎

表 1. 国立神経センター（仮称）設立準備委員会委員名簿

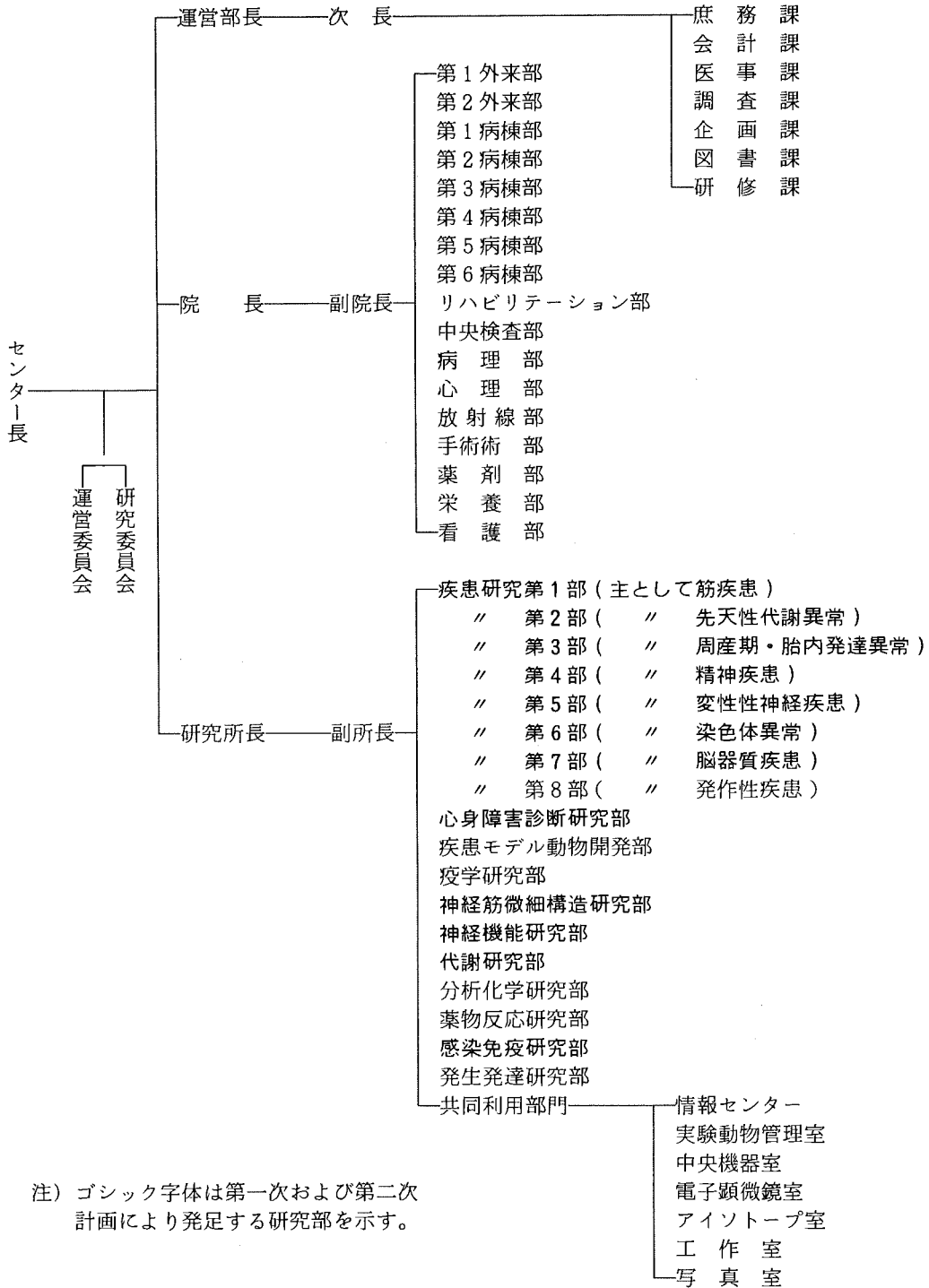
氏 名	所 属
◎ 秋 元 波留夫	国立武蔵療養所所長
○ 里 吉 栄二郎	東邦大学医学部教授（神経内科）
島 蘭 安 雄	東京医科歯科大学教授，附属病院長（精神科）
椿 忠 雄	新潟大学医学部教授，脳研究所長（神経内科）
豊 倉 康 夫	東京大学医学部教授，附属脳研究施設長（神経内科）
祖父江 逸 郎	名古屋大学医学部教授，附属病院長（神経内科）
成 瀬 浩	国立精神衛生研究所優生部長
森 山 豊	日本母性保護医協会長
福 山 幸 夫	東京女子医科大学教授（小児科）
塚 田 裕 三	慶応義塾大学医学部教授（生理学）
勝 沼 信 彦	徳島大学教授，附属酵素研究施設長（生化学）
江 橋 節 郎	東京大学医学部教授（薬理学）
生 田 房 弘	新潟大学脳研究所教授（実験病理学部）
黒 岩 義五郎	九州大学教授，脳神経病理研究施設長（神経内科）
山 中 和	厚生省大臣官房科学技術審議官
石 丸 隆 治	厚生省医務局長

備 考：事務局 厚生省医務局国立療養所課

◎ 委員長

○ 副委員長

表 2 国立神経センター（仮称）の組織



注) ゴシック字体は第一次および第二次計画により発足する研究部を示す。

表 3 整 備 計 画

	研 究 所	病 院
第 一 次 計 画 (52~53年度)	一期工事(約4,400㎡) 8 研究部門発足 流動研究員, レジデント宿舎新設	神経・筋病棟新設(120床) 病理部門新設 外来部門増設 中央検査部増設
第 二 次 計 画 (できるだけ早い時期)	3 研究部門を増設(計11部)	神経・筋病床を300床に増床 するために必要な病棟の改築, 整備を行なう
第 三 次 計 画 (なるべく早い時期)	7 研究部門を増設(計18部) 大型動物室, 図書館, 研修部門の新設 当初予定の規模にするため約13,000㎡の増 築を必要とする	必要部門の拡充, 整備, 改築 を行なう

IV 別 項

国立神経センター（仮称）設立準備委員会経過

- 第 1 回 51. 1.16 厚生省高木事務次官より本センターへの抱負開陳および委員委嘱
精神・神経・筋・発達障害研究体制検討会の中間報告説明
委員長に秋元委員を選出し、委員長より里吉委員に副委員長を委嘱
センターの基本構想の検討
- 第 2 回 51. 2. 6 センターの基本方針の検討
- 第 3 回 51. 2.24 センターの将来構想案決定
- 第 4 回 51. 3.12 国立武蔵療養所視察
研究所の第一次計画（11研究部）検討
病院拡充、整備案（神経・筋病棟120床新設）の検討
- 第 5 回 51. 3.27 研究所、病院の第一次計画検討、決定
- 第 6 回 51. 4.16 基礎研究部門、疾患研究部門別に各部門の面積配分、必要人員などの細部検討
- 第 7 回 51. 5.11 研究所の必要機器の検討
病棟新設（神経・筋病棟）に併せて、検査部、病理部、外来の増設決定
- 小委員会 51. 7.16 昭和52年度予算要求案の定員および機器予算額の検討
- 小委員会 51. 7.23 同上検討継続
- 第 8 回 51. 8.11 昭和52年度予算要求（療養所課）の説明および討議
センターの名称検討（その決定は委員長、副委員長に一任）
センターの設置について、石丸医務局長より厚生省設置法を早急に改正する旨の
方針表明

附 記

厚生省医務局療養所課の昭和52年度予算要求は、下記左欄に示したものであったが、昭和52年1月右欄に示す内示があった。

	要 求	内 示
必要機器設備費など	約 1,300,000 千円	624,000 千円 (内 宿舎整備費 100,000千円を含む)
人 員		
専 任 職 員	29人 (センター長1, 部長6, 研究員19, 事務3)	15人 (センター長1, 部長6, 研究員8, 事務0)
流 動 研 究 員	20人	20人
併 任 研 究 員	20人	20人
レ ジ デ ン ト	19人	0人
賃 金 職 員	2人	2人
その他		
専 門 外 来 職 員	7人	5人

参考資料

1. 国立脳・神経センターの構想：国立武蔵療養所 昭和43年5月
2. 国立精神神経センターの基本構想：国立武蔵療養所 昭和47年12月
3. 精神・神経・筋・発達障害研究体制について（中間報告）：厚生省 昭和50年3月
4. 神経センター（仮称）設置について：厚生省 昭和51年8月

IV 別 項

(別項2)

2. 国立精神・神経センター神経研究所 流動研究員運営要領

1. 目 的

神経研究所の研究体制の方針即ち

ア. 本研究所では、プロジェクト研究を中心に研究を行う。

イ. 共通の目的をもつ全国の大学，その他の医療機関と密接な連携を保ち，門戸を広く開放して施設の共同利用，人的交流をはかる。

ウ. 独自の研究施設，組織，研究委託費を総合的に活用し，大型研究プロジェクトを全国的に推進できる中枢としての機能をもつ。以上の方針のもとに，研究員制度として，流動研究員制度を設け，国内および国外からの研究者を受け入れるものとする。

2. 募 集 方 法

公募とし，募集要綱を関連する大学，試験研究機関等に配布し希望者を募集する。

3. 流 動 研 究 員 の 区 分

流動研究員を段階にわける。決定にあたっては，経歴及び研究業績を審査し，原則として下記の基準にしたがうものとする。

A) 文部省大学令に基づく大学教授，又はそれに準ずる研究歴を有し，大学卒業後15年以上の者又は本研究所部長に準ずるもの

B) 文部省大学令に基づく大学助教授，又は大学卒業後10年以上の研究歴を有するもの又は本研究所室長に準ずるもの

C) 文部省大学令に基づく大学講師，又は大学卒業後5年以上の研究歴を有するもの

D) 大学卒業後3年以上の研究歴を有するもの，もしくはこれに準ずるもの

上記の大学とは4年制大学及びこれに準ずるものをさし，医学部医学科及び歯学部歯学科卒の場合は卒業の時点において既に2年の研究歴を有するものと認定する。

4. 選 考

神経研究所部長会議で応募者の審査，選考を行い，総長にその結果を報告，承認を得る。

5. 定数，任命及び任用期間

毎年度その定める各研究課題毎の定数内において総長が任命する。

任用期間は6ヶ月以内の期間を定め任命する。

但し，研究成果に基づき，さらに6ヶ月以内の延長を認めることができる。

原則として 総計3年以内とする。

6. 身 分

国家公務員で，非常勤職員とする。

7. 服 務

その任期内において，国家公務員法第3章第7節（服務）各条の適用者となる。

8. 勤 務 時 間

週33時間とする。

9. 災 害 補 償

国家公務員災害補償法の適用を受ける。

10. 給 与

非常勤職員手当と，給与法第22条の定めるところにより支給する。

1) その基準は下記のとおりとする。

A（教授＝研究部長）クラス 時給 2,400円

B（助教授＝研究室長）クラス 時給 2,000円

C（講師＝主任研究官）クラス 時給 1,800円

D（助手＝研究員）クラス 時給 1,400円

2) 通勤手当，扶養手当，期末手当，勤勉手当等その他手当は一切支給しない。

3) 食事，厚生施設等は，所内施設の利用を認める。

11. 適 用 時 期

この規程は，昭和61年10月1日から適用する。

Ⅳ 別 項

(別項3)

3 - A 国立精神・神経センター神経研究所 併任研究員運営要領

1. 目 的

神経研究所の次の研究体制の方針のもとに併任研究員制度を設け、公務員の研究者を受入れるものとする。

- (1) 本研究所では、プロジェクト研究を中心に行う。
- (2) 共通の目的をもった全国の大学、その他の医療機関と密接な連携を保ち、門戸を広く開放して施設の共同利用、人的交流をはかる。
- (3) 独自の研究施設、組織、研究委託費を総合的に活用し、大型プロジェクトを全国的に推進できる中枢としての機能をもつ。

2. 選 考

- (1) 神経研究所部長会議で選考を行い、総長にその結果を報告する。
- (2) 併任研究員を受入れようとする部長(以下「当該部長」という。)は、神経研究所併任研究員申請書(様式1)を神経研究所部長会議に提出する。

3. 定数、任命および併任期間

- (1) 毎年度その定める各部の定数内において、総長が任命する。
- (2) 任命は、神経研究所部長会議の決定に基づき任命しようとする者の所属先の同意を得た後、総長が之を行う。
- (3) 併任期間は1年以内とする。ただし、再併任することは妨げない。

4. 責任と義務

- (1) 併任研究員の神経研究所内の服務規律および特許権等並びに設備、施設の利用については、神経研究所職員に準じて行うものとする。
- (2) 併任研究員が神経研究所における研究業績を発表しようとするときは、当該部長の許可を得るものとする。

附 則

この運営要領は、昭和61年10月1日から適用する。

(別項3)

3-B 国立精神・神経センター神経研究所 客員研究員に関する内規

1. 神経研究所に客員研究員をおくことが出来る。
2. 客員研究員は、各研究部に属し当該部長の責任において研究に従事するものとする。
3. 客員研究員は、大学に所属するものは教授、助教授または研究歴十年以上の講師とし、研究所に所属するものは部長、室長または研究歴十年以上の主任研究員とし、その他研究歴十年以上の研究者で神経研究所部長会議で適当と認められた者とする。
4. 任期は1年以内とし、再任を妨げない。
5. 客員研究員を受入れようとする部長は、神経研究所客員研究員申請書(様式1)を総長あてに提出する。
6. 任命は、神経研究所部長会議の決定に基づき任命しようとする者の所属先の同意を得た後、総長が之を行う。
7. 客員研究員の事故等については、補償を行わない。

〔附 則〕

この内規は昭和61年10月1日より施行する。

IV 別 項

(別項3)

3 - C 国立精神・神経センター神経研究所 研究生研究見習生内規

1. 目 的

神経研究所の研究対象疾病に関する原因の解明，治療法の開発，予防法の確立について，研究および技術修得のための研修を希望する者を，この内規の定めるところにより研究生または研究見習生として受入れられるものとする。

2. 資 格

研究生は，大学卒業者または国立精神・神経センター総長（以下「総長」という。）が，同等以上の学力を有すると認めた者で，所属する機関長等の推薦する者。

研究見習生は，高等学校以上の学校を卒業した者または総長が同等以上の学力を有すると認めた者で，所属する機関長等の推薦する者。

3. 選 考

- (1) 神経研究所部長会議で選考を行い，総長にその結果を報告する。
- (2) 研究生または研究見習生の承認を受けようとする者は，神経研究所研究生研究見習生申請書（様式1）を，指導を受けようとする部長（以下「指導部長」という。）を経て神経研究所部長会議に提出する。

4. 定数，承認および承認期間

- (1) 研究生および研究見習生の定数は各部若干名とし，総長が承認する。
- (2) 承認期間は1年以内とする。ただし，再選考することは妨げない。

5. 身 分

推薦する機関長の所属とする。

6. 給 与

研究生および研究見習生には，国から一切の給与を支給しない。

7. 責任と義務

- (1) 研究生および研究見習生の服務規律および特許権については、神経研究所に準ずるものとする。
- (2) 研究生および研究見習生は、指導部長の指示または許可を得て、研究・研修および研究業績の発表を行うものとする。

8. 辞 退

研究生および研究見習生は、研究および研修を辞退したい場合には、辞退届を指導部長を経て総長に提出するものとする。

9. 承認の取消

総長は、研究生および研究見習生がこの内規に違背し、または研究生および研究見習生としてふさわしくない言動があった場合においては、神経研究所部長会議で承認を取り消すことができる。

10. 弁 済

研究生および研究見習生は、本人の故意または重大な過失により国に損害を与えたときは、その弁済の責を負わなければならない。

附 則

この内規は、昭和61年10月1日から施行する。

IV 別 項

(別項4)

4. 国立精神・神経センター神経研究所 勤務心得

1. 神経研究所の勤務者（以下「勤務者」という。）は、研究者としての責務を自覚し、旺盛な研究心をもって対象疾病の研究に勤めなければならない。
2. 勤務者はそれぞれの所属部（室）の機能に応じて業務を分担してこれを行う。
3. 勤務者は勤務時間外あるいは出張・休憩の際、自己の研究体制に落度のないよう心掛ける。
4. 勤務者の出勤および退勤は、所定位置の名札の表裏によって明瞭にしなければならない。
5. 勤務者は勤務時間中、自己の所在位置を明瞭にしなければならない。
6. 庁外に対し、個人的意見の発表は良識にしたがって、慎重を期さなければならない。
7. 神経研究所の研究において得られた技術が、特許権・実用新案権または意匠権の対象となるときは、その権利を取得するための手続をとるとともに、神経研究所長及び総長に届出するものとする。
8. 官物と私物の区別は厳重にし、つねに公私の混同を戒めなければならない。

(別項5)

5. 精神・神経疾患研究委託費 運営委員会運営要領

1. 目 的

精神・神経疾患研究委託費運営委員会(以下「運営委員会」という。)の適正な運営を図るため、運営委員会要領を定める。

2. 運営委員会の業務

- (1) 精神・神経疾患研究委託費(以下「委託費」という。)の委託の対象となる研究課題及び研究者の選考並びにそれぞれの課題に対して、委託しようとする研究費についての審議に関すること。
- (2) 委託費の事業実績(研究成果)の審査に関すること。
- (3) その他委託費の適正な運用に関すること。

3. 組織及び委員の構成

- (1) 運営委員会は、委員22名以内をもって組織し、会長1名を置く。
- (2) 運営委員会の委員は次の者のうちから保健医療局長が委嘱する。
 - イ. 関係行政機関及び国立精神・神経センターの職員
 - ロ. 学識経験のある者
- (3) 会長は、国立精神・神経センター総長の職務にある者とし、会長に事故あるときは、委員のうちからあらかじめ会長が指名する者がその職務を代理する。
- (4) 委員の任期は2年とする。ただし関係行政機関及び国立精神・神経センターの職員は当該職務に在職の期間とする。また委員に欠員を生じたときは、それを補充することができるものとし、当該委員の任期は残任期間とする。

なお、原則として継続した再任は認めない。

- (5) 運営委員会に評価部会を置くことができる。
 - イ. 評価部会は研究成果の評価を行い運営委員会に報告しなければならない。
 - ロ. 評価部会の委員は、運営委員会の委員の中から運営委員会会長が保健医療局長と協議のうえ依頼する者若干名とし、部会長を置く。
 - ハ. 評価部会に上記委員のほか、保健医療局長の依頼する専門委員若干名を置くことができる。

IV 別 項

4. 運営委員会の開催

運営委員会（評価部会を含む）は、必要に応じ、会長が保健医療局長と協議のうえ招集する。

5. 運営委員会の庶務

運営委員会の庶務は、国立精神・神経センター運営部において処理する。

6. 雑 則

この要領に定めるもののほか、運営委員会の運営に関し必要な事項は、会長が保健医療局長と協議のうえ定める。

7.（附 則）

- (1) この要領は、昭和62年4月1日より施行し、従前の神経疾患研究推進委員会規程は、廃止する。
- (2) この規定の施行後最初に委嘱する委員のうち保健医療局長の指定する者の任期は本文の規定にかかわらず1年とする。

6. 研究部門将来計画

部	室 名	主として行う研究テーマ
疾病研究第1部 (主として筋疾患)	1. 筋ジストロフィー 2. 筋炎および筋無力症 3. 先天性筋疾患	筋ジストロフィーの病因の解明と治療法の研究 筋炎および筋無力症の病因, 病態生理, 治療法の研究 先天性筋疾患の分類, 成因, 代謝, 治療の研究
疾病研究第2部 (主として発生・発達障害疾患)	1. 精神遅滞 2. 運動感覚発達障害 3. 奇形症候群	精神遅滞の機序の生化学, 形態学, 症候学的研究と対策 運動感覚発達障害の生化学, 形態学, 症候学的研究と対策 脳奇形および随伴症状の発現機序の研究と予防対策
疾病研究第3部 (主として精神疾患)	1. 精神分裂病 2. 躁うつ病 3. 非定型精神病	精神分裂病の成因の生化学的および薬理学的研究 躁うつ病の成因の生化学的および薬理学的研究 非定型精神病の病態と成因に関する生理学および生化学的研究
疾病研究第4部 (主として変性性神経疾患)	1. 脊髄小脳変性症 2. 運動ニューロンおよび末梢神経疾患 3. 錐体外路疾患	脊髄小脳変性症の成因, 病態の解明と治療法の研究 運動ニューロン・末梢神経疾患の成因, 病態の解明と治療法の研究 パーキンソン病などの錐体外路疾患の原因, 病態の解明と治療法の研究
疾病研究第5部 (主として先天代謝異常症)	1. 遺伝生化学 2. 分子病 3. 治療開発	先天代謝異常症の遺伝生化学に関する研究 酵素蛋白異常などを伴ういわゆる分子病の本態解明に関する研究 先天代謝異常症の治療の開発に関する研究
疾病研究第6部	1. 第1研究室	多発性硬化症などの脱髄性疾患, 中毒性神経疾患,

IV 別 項

部	室 名	主として行う研究テーマ
(主として脳器質疾患)	2. 第2研究室 3. 第3研究室	脳炎などの中樞神経感染症, 脳血管障害, 脳腫瘍, 脳外傷, 初老期および老年期などの多くの脳器質疾患につき適時これらの疾患の本態および治療法につき研究する
疾病研究第7部 (主として染色体異常性疾患)	1. 常染色体異常症 2. 染色体切断症候群 3. 染色体構造	ダウン症候群などの常染色体異常症の成因, 予防, 治療に関する研究 染色体の不安定性を伴う疾患の成因, 予防, 治療に関する研究 染色体の分析技術の開発と構造の個体差などに関する研究
疾病研究第8部 (主として発作性疾患)	1. 本態性てんかん 2. 症候性てんかん 3. 発作性脳幹障害	原因不明(本態性)てんかんの成因に関する生理学的および生化学的研究 種々の脳障害に基づくてんかん, 特に難治性てんかんの本態, 治療に関する研究 ナルコレプシーなど脳幹性の意識・睡眠障害の本態, 治療に関する研究
診断研究部	1. 微量定量 2. 新生児スクリーニング 3. 発達異常診断開発	生体異常成分の微量測定法の開発に関する研究 代謝異常等の新生児早期診断に関する研究 精神発達障害, 自閉症などの早期診断に関する研究
疾患モデル動物用開発研究部	1. モデル動物診断 2. モデル動物遺伝解析 3. モデル動物生産	神経・筋疾患モデル動物の開発に関する研究 神経・筋疾患モデル動物の遺伝的因子の分析 神経・筋疾患モデル動物の生産と維持
疫学研究部	1. 疾患統計調査 2. 遺伝疫学 3. 実験疫学	神経・筋疾患の発生率, 有病率, 死亡率等に関する調査 神経・筋疾患の遺伝, 遺伝子頻度, 外因等の分析 疫学的に推定される諸因子と疾病の関連に関する実験的研究

部	室 名	主として行う研究テーマ
微細構造研究部	<ol style="list-style-type: none"> 1. 超微構造 2. 微細組織化学 3. 生体膜 	<p>神経・筋組織における正常および病的構造の電子顕微鏡による研究</p> <p>細胞・組織内の元素分布の変動の分析電顕による解析と構造・機能の関連に関する研究</p> <p>生体膜の構造および抗原・レセプター分布の免疫学的手法による解析</p>
機能研究部	<ol style="list-style-type: none"> 1. 筋生理学 2. 神経生理学 3. 病態生理学 	<p>筋収縮およびそれに関連する機能の生理学的研究</p> <p>神経の興奮・伝導およびそれに関連する機能の生理学的研究</p> <p>神経系・筋疾患における機能変化の生理学的研究</p>
代謝研究部	<ol style="list-style-type: none"> 1. 神経化学 2. 発達生化学 3. 細胞化学 	<p>神経系の化学的構成および代謝機構の研究</p> <p>神経系の発達に伴う生体物質の代謝機構の変動に関する研究</p> <p>ニューロン・グリアなどの神経系の細胞における生化学的調節機構の研究</p>
免疫研究部	<ol style="list-style-type: none"> 1. 免疫発現機構 2. 免疫化学 3. 免疫異常 	<p>免疫発現機構の細胞学および免疫化学的研究</p> <p>免疫関連因子の化学的構造と機能に関する研究</p> <p>神経・筋疾患における免疫異常の解析と制御機構に関する研究</p>
分析化学研究部	<ol style="list-style-type: none"> 1. 生体物質分析 2. 物質構造解析 3. 生物有機化学 	<p>未知の生体物質の分離および化学構造の研究</p> <p>生体高分子物質の構造のX線回析，核磁気共鳴，電子スピン共鳴などによる研究</p> <p>生体物質とその近縁物質の化学合成と，これを用いて生体物質の化学反応機構の研究</p>
薬物作用研究部	<ol style="list-style-type: none"> 1. 細胞薬理 2. 発生薬理 3. 薬物代謝 	<p>細胞内における薬物の反応機構に関する研究</p> <p>発生，分化の過程における薬物作用の変動の研究</p> <p>生体内における薬物代謝の機構に関する研究</p>

IV 別 項

部	室 名	主として行う研究テーマ
発生生物学 研究部	1. 細胞分化 2. 分子発生 3. 発生生理	発生過程における細胞分化の機構の生理学のおよ び生化学的研究 発生過程における核酸・蛋白質などの機能の分子 レベル的研究 発生・発達に伴う生体機能の制御機構に関する研 究
生体工学研究部	1. 生体情報 2. 機器開発	生体情報の受容，制御および動作発現に関する電 子工学的研究 神経・筋疾患に対する医用機器の開発と応用

国立精神センター神経研究所年報

第3号(通巻11号)(昭和63年度)

発行 平成元年 3月 31日
発行者 杉田 秀夫
編集者 菊池 建機
高嶋 幸男
印刷 御幸印刷株式会社

国立精神センター神経研究所

〒187 東京都小平市小川東町4-1-1

電話 0423 (41) 2711
