

国立精神・神経センター  
神 經 研 究 所 年 報

第 4 号(通卷12号)

平成元年度

National Institute of Neuroscience  
National Center of Neurology  
and Psychiatry

— 1989 —

国立精神・神経センター  
神 經 研 究 所 年 報

第 4 号(通卷12号)

平成元年度



杉田秀夫新研究所長

# 目 次

I 神経研究所の概要	
1. 概 要	1
2. 組織 (表 1)	3
3. 構成員 (表 2)	4
4. セミナーおよび講演会 (表 3)	9
5. 研究発表会 (表 4)	12
II 研究業績	
1. 疾病研究第 1 部	17
2. 疾病研究第 2 部	33
3. 疾病研究第 3 部	51
4. 疾病研究第 4 部	66
5. 疾病研究第 5 部	89
6. 疾病研究第 6 部	101
7. 疾病研究第 7 部	118
8. 診断研究部	123
9. 微細構造研究部	130
10. 機能研究部	145
11. 代謝研究部	154
12. 免疫研究部	168
13. 遺伝子工学研究部	177
14. モデル動物開発部	186
15. 実験動物管理室	197
III 中央施設および委員会	201
IV 別 項	
1. 国立精神・神経センター神経研究所流動研究員運営要領	217
2-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	219
2-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	220
2-C 国立精神・神経センター神経研究所外来研究員に関する内規	221
2-D 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	222
3. 国立精神・神経センター神経研究所勤務心得	224
4. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会運営要領	225
5. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会委員	227
6. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会評価部会委員	228
7. 平成元年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表	229
8. 平成 2 年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表	230

---

# I 神経研究所の概要

---

## 神経研究所の概要

### 1. 概 要

神経研究所は発足以来、精神・神経・筋・発達障害という4本柱を研究対象とし、主として生物学的立場からその成因の解明、予防法の確立、治療法の開発を最終目的としている。

すでに国立精神・神経センターとして発足してから4年目をむかえ、基礎研究、臨床研究の二つを車の両輪として、両者の密接な連携のもとに組織的なプロジェクト研究を推進し、着実な進歩をとげつつある。1990年より21世紀に向かったの10年は“decade of the brain”と言われており、当研究所に対する期待と責任の重さを痛感している。

第2研究棟（研究所本館）の建築も3年目をむかえ、1日も早い完成が待ち望まれる。新しい研究棟の完成をもって神経研究所は15,000㎡の広さを占めることになり、広さの点では国立研究所としての面目を保つ事ができようが、研究所の定員不足という人員の面で大きな課題を残している。

限られた要員での能率向上、情報交換のスピード化のために、各部にファックスを導入し、国内、国外共に連絡を密にしている。また平均月2回諸外国からの第一級研究員を招きセミナーを行い所長以下全員で研究所の活性化に努力している。

### 2. 組 織

平成元年度の人事面の異動に関しては、6月1日診断研究部に東京大学医科学研究所より中村俊部長を迎えた。診断研究部はその名称にとらわれる事なく、精神・神経疾患の診断、本態解明のための生化学、分子生物学的手法を用いた生物学的基礎研究を行う予定である。

平成2年1月1日には疾病研究第五部に武蔵病院第2病棟部長から桜川宣男部長が就任した。所長は疾病研究第一部、疾病研究第七部、免疫研究部長事務取扱となっているが、免疫研究部長は選考が終わり、平成2年4月から着任の予定である。

また、10月1日新しく実験動物管理室が独立して設置され、平成2年1月1日モデル動物開発部から松崎哲也室長が就任した。研究所全体のための実験動物管理面で活躍が期待される。

そのほか、国内外の共同研究の多角化にともない、研究者を受け入れる制度として新たに7月から外来研究員の制度を加えた。

組織および定員は表1に示されているとおり、所長1名、部長12名、室長34名と実験動物管理室長1名で合計48名となった。流動研究員は開所当時のまま28名が認められている。3月1日現在賃金研究員及び賃金研究助手は37名であり、事務職員は3名が従事している。さらに研究生91名、併任研究員44名（うち

所内発令として主に武蔵病院から14名が研究に加わっている), 客員研究員21名, 外来研究員11名が在籍し, これら167名の研究者が加わって共に活動し, 研究推進の重要な力となっている。

### 3. 研究活動

各部の研究概要については「研究業績」の各部の項の筆頭に述べられている。

厚生省精神・神経疾患研究委託費では, 杉田秀夫所長, 柴崎浩疾病研究第四部長, 埜中征哉微細構造研究部長が主任研究者をつとめ, さらに多くの分担研究者が研究に参加している。

厚生省が昭和63年度からスタートさせた痴呆疾患対策推進事業(国際共同研究)において, 当センターはアルツハイマー病を主要テーマに海外研究者も招へいしてシンポジウムを開催した。またセンターの若手研究者が昭和63年度2名, 平成元年度3名がアメリカに長期派遣された。当研究所では疾病研究第六部が主に事業推進に携わっている。

科学技術庁科学技術振興調整費では国際流動基礎研究(省際基礎研究)で田平武疾病研究第六部長が主任研究者となっているほか, 総合研究にも4つの部から研究に参加している。

### 4. 国内・国外との研究協力

昭和63年度からスタートした科学技術庁のフェローシップ制度(STAフェロー)で国立試験研究機関に派遣されて来る外国の研究者や, ヒューマンサイエンス振興財団を通じた官民共同研究プロジェクトによる民間企業研究者などと, 共同研究を行うことがますます盛んになって来ると予測される。このため新設された外来研究員として研究に従事している11名の研究者の内訳は, ヒューマンサイエンス振興財団流動研究員1名, ヒューマンサイエンス官民共同プロジェクト関係4名, エイズ予防財団リサーチレジデント1名, STAフェロー2名, 日本学術振興会海外招へい研究者1名, ブラジル政府国費留学1名, その他1名である。

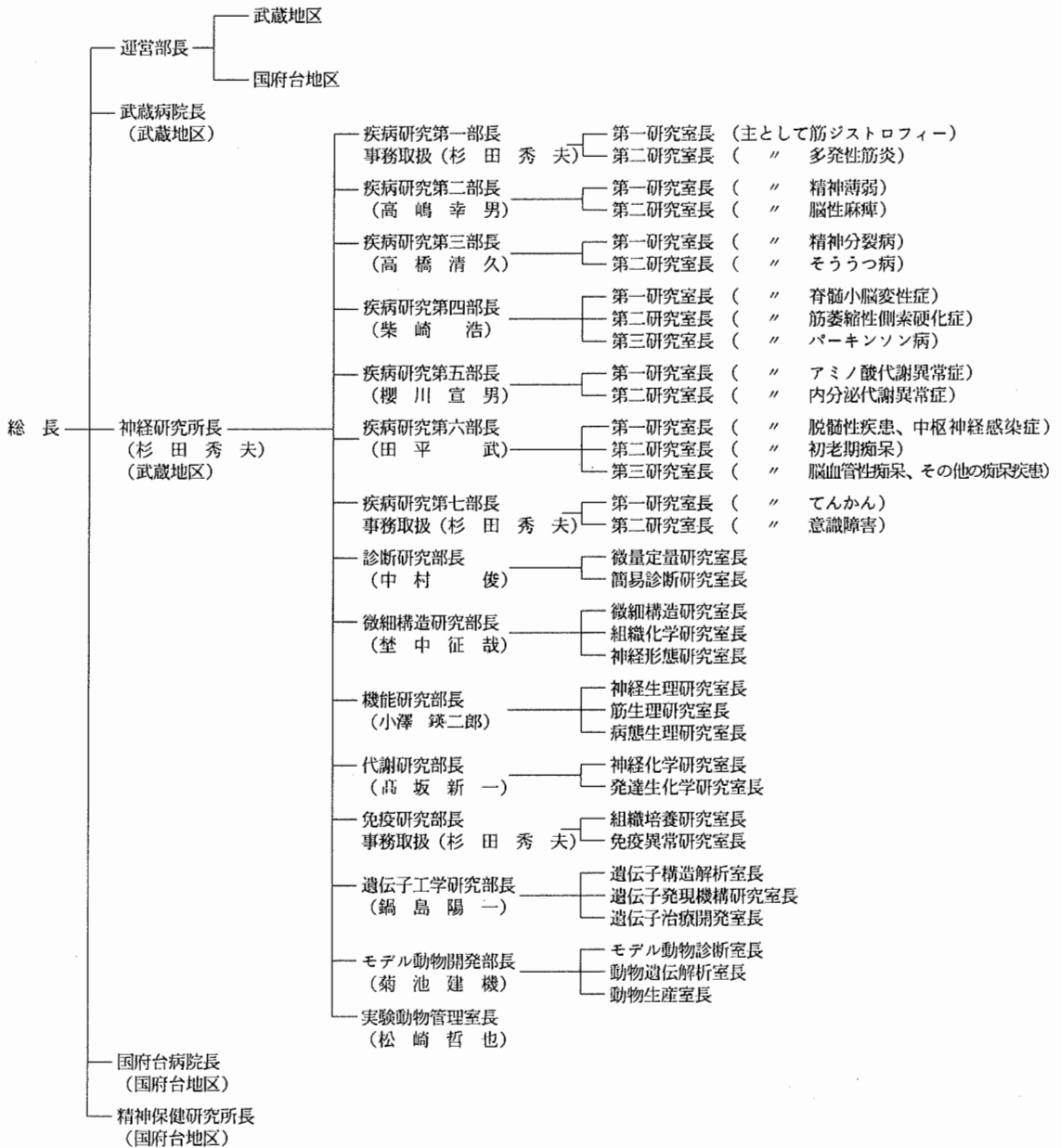
そのほか研究生として, 疾病研究第一部がイスラエルの人類遺伝学研究所より1名, 微細構造研究部で, コスタリカから電顕技術者の研修を1名, 各々1ヶ月前後受入れた。また同部で台湾の医師2名を研究生として受入れている。

平成2年3月末日

国立精神・神経センター神経研究所

所長 杉田秀夫

(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	35	-	-	-	-	48	2	28	28	2	108

(平成元年度の計)



(表2)

## 神経研究所 構成員 (平成元年度)

(平成元年4月1日～平成2年3月31日)

所長：杉田秀夫									
部名	部長	室長	研究員	流動研究員	○貸金研究員 *貸金研究助手	研究生	併任研究員	客員研究員	外来研究員 (平成元年制定)
疾病研究第一部	杉田秀夫 (事務取扱)	石光 浦畑 章一	塚原 俊文	有川 重理 齋堂 三紗子	○小川 敬子 (2. 3/31退) ○安菜 藤治 美 ○後藤 加奈子 ○古 賢律子	奥山 輝之 藤 智いづみ 佐藤 理美 田邊 博子 野島 美和 湖島 天介 山口 順士 Ruth Shomrat (2. 2/2～ 2/28) 西田 聡 野村 泰広 (1. 5/8より)	石原 幸子 伴 意夫 倉原 輝明 水原 澄史 山中 浩史 (2. 2/1より)	猛 夫三 藤 昭恭 高木 本米	
疾病研究第二部	高嶋 幸男	田中 斐 許 美史		丸山 悦孝 宝 定 (1. 5/1探) 長谷川 元宏 (1. 7/1探)	*須 貝千恵子 ○田村 頼子 *久保田 直美 ○森本 雅子 ○笠間 透 (1. 4/1探～ 2. 2/28退) ○山之内 正弘 (2. 3/23探)	美 裕弘 田 和教 山 貴子 水 良司 千 花 八 尾良美 竹 博 (1. 6/1より) 橋本 和広 (1. 7/1より) 野田 泰子 (1. 11/13より)	清 男 一 富昌 寺川 克生 小野 文晴 坂 (1. 10/31まで) 杉 林利 鈴 林	賢一郎 侯 義元 猪 木勝 田 角 (1. 7/1より)	
疾病研究第三部	高橋 清久	三 国 雅 西 川 彦		黒田 安計 武 ゆかり	○高嶋 瑞夫 ○山本 秀子 (2. 3/31退) ○海野 麻未 (2. 3/31退)	岡村 裕昭 加賀屋 有七 加賀屋 鉄文 加藤 文代 (1. 4/1～4/30) (1. 9/1より) 篠原 一幸 白山下 貴理子 杉 之彦 谷 非子 水 木幸 永 木茂	男 敬昌 俊 正進 正 進太郎 野 徳治 川 浩男 野 洋高 藤 昌一 藤 山 加 谷 小 鶴 渡 本 三 綱 本 島 橋 浩	市 成 橋 口 樋 宮 本 波	橋 本 篤 司



I 神経研究所の概要

部名	部長	室長	研究員	流動研究員	○資金研究員 *資金研究助手	研究生 研究員、見習生	兼任研究員	客員研究員	外来研究員 (平成元年制定)
疫学研究第七部	杉田秀夫 (事務取扱)	今禎正興			○青柳奈穂美 (1. 5/11採～ 7/31退) *内田史江 (1. 6/1～ 10/31)	岡哲也 岡雅子 (1. 8/1～ 11/30)			
診断研究部	杉田秀夫 (1. 5/31まで 事務取扱) 中村俊 (1. 6/1採)	林蓓 時季央				室屋賢康 (1. 12/1より)			
微細構造研究部	埜中征哉	加茂功	菊池愛子	後藤雄太郎 松岡太一 (1. 7/1採)	○松岡加穂美 (1. 7/11退) ○桶田利加子 *柳岡里子 *伊藤すま子 (1. 5/15採)	千枝子 憲志美 尚裕治 山田海 内筒小 窪山藤 田倉亮 圭子一 子(1. 6/30まで) 高宮清之 竹永正 中森敏 秋長川 西谷川 松佐智 林三子 深益 (1. 7/1より) Vargas H. Guillermo (2. 2/13～3/27)	伊勢川 藤久 仲二 邦正 針有		
機能研究部	小沢鉄二郎	吉田幹昭	萩原康子 林謙介 (1. 4/1より)	田中光 池谷紀子 (1. 6/1採)	*山田圭津 *斎藤和江 (1. 4/1採)	石黒恒一 野乗 水一 居光太郎	熱海佐保子 斎藤公司 今村保忠 (1. 10/1より)	木江齋 林新一 古藤加代子	
代謝研究部	高坂新一		中嶋一行 武井延之 (1. 10/1より)	武井延之 (1. 4/1採～ 9/30まで)	○津崎尚子 (1. 5/8採)	榎原真人 竹居光太郎			飯島昇 (1. 6/1～)

免疫研究部	杉田秀夫 (事務取扱)	古川昭里仁 栄 渡辺		内田耕一 (1. 5/1採) 池田正明 (1. 7/1採)	*亀井幸子 *石田郁子 (1. 6/19採)	畑之上誠 藤城正敏 高宮至昭 (1. 11/1~) 伊東大介 (1. 9/1~12/31) 谷口善仁 (1. 9/1~12/31) 松原篤 (1. 9/1~12/31)	美馬達夫 茂野林 卓三 萩	石川リカ (1. 7/1より)	下条雅人 (1. 6/10~)
遺伝子研究部	梶島陽一	藤沢淳子 松崎文雄 水戸敬 (1. 6/1~休職)		榎月太一 権浜	○崎島曜子 ○宮原慶子 (1. 4/1採) *細田葉子 *大滝雅子	新井亮介 池上三雄 尾前恭介 高瀬明一 田耕一 玉尾賢一 野尾賀利子 古川美清 紙谷清 (1. 6/1より) 橋本吉秀 (1. 6/1より)			
モデル動物研究部	菊地建機	花岡和文 田口広也 松崎哲也 (1. 7/1~ 1. 12/31)		松崎哲也 (1. 6/30迄) 池田敏男 (1. 4/1採)	○花岡美智子 ○守屋弘美 (1. 12/31迄) *平野弘美 (1. 12/26迄) *志鎌昌子 (1. 5/1採)	波谷徹誠 水谷誠 (1. 6/1より) 山崎一斗 (1. 7/31まで) 矢野剛美 (1. 6/12より) 瀧井淳子 (1. 8/1より) 小林明子 (1. 11/1より)	田内雅一 山内正裕 松岡裕之 佐々木	山崎一斗 (1. 8/1より)	藤宗雄 藤利将男 (1. 8/1より)

I 神経研究所の概要

部 名	部 長	室 長	研 究 員	流 動 研 究 員	○賞金研究員 *賞金研究助手	研 究 生 研 究 見 習 生	併 任 研 究 員	客 員 研 究 員	外 来 研 究 員 (平成27年制定)
実験動物管理室		杉 田 秀 夫 (1.10/1~12/31 事務取扱) 松 崎 哲 也 (2.1/1より)							
所 長 室	庶 務 第 一 課								
事 務 室									
R I 室									高 木 富 子 桜 井 真 理 子 斎 藤 洋 子 内 田 史 江 (1.4/1~5/30) (1.11/1より) 森 口 正 信 (1.5/1採~ 10/30退)
電 頭 室									石 井 弘 子 赤 須 宏

(表3) 平成元年度 神経研究所セミナーおよび講演会

月 日	講 師 ・ 所 属	演 題	担 当
平成1年 4. 4	James H. Austin Professor and Chairman, Department of Neurology, University of Colorado, U. S. A.	Studies in metachromatic leuko- dystrophy and other sulfatase disorders	疾病研究第四部
4. 8	洪 祖培 国立台湾大学医学部神経内科教授	Angiostrongyliasis: epidemiology, pathogenesis and clinical manifes- tations	疾病研究第四部
4.17	松崎文雄 神経研究所遺伝子工学研究部室長	細胞接着と細胞認識	遺伝子工学研究部
4.18	酒井徹雄 国立療養所筑後病院神経内科	Joseph病の診断	疾病研究第四部 武蔵病院神経内科
4.18	吉岡 博 京都府立医科大学小児科	新生仔の実験的脳障害のMRS研究	診 断 研 究 部 疾病研究第二部 武蔵病院小児神 経科
4.27	田内雅規 国立身体障害者リハビリテーショ ンセンター感覚 機能障害研究部室長	末梢神経移植による網膜神経節細胞の再 生	モデル動物開発部
5. 8	William R. Kennedy. Professor of Neurology, University of Minnesota Hospitals, U. S. A.	Laboratory evaluations of autonomic nervous functions and effect of pancreatic transplant on diabetic neuropathy	疾病研究第四部
5.16	小田健一郎 神経研究所疾病研究第四部室長	ヒト骨格筋の神経支配—正常と異常—	セミナー委員会
	郭 伸 神経研究所疾病研究第四部室長	変性性神経疾患脳の神経伝達物質異常	
5.25	上村 匡 京大大学理学部竹市研究室	ショウジョウバエ胚の末梢神経系形成の 分子遺伝学	遺伝子工学研究部
6. 1	Marc V. Fiszman Institut Pasteur, France	Control of alternative splicing for expression of the beta tropomyo- sin gene	遺伝子工学研究部
6. 1	田邊 等 都立神経病院院長	筋病変と motor unit 内病態局在	疾病研究第四部
6. 7	桜川宣男 国立精神・神経センター武蔵病院第二病棟部長	酵素阻害剤・誘導剤の開発研究とリピード- シスの新しい治療法	疾病研究第二部 武蔵病院小児神 経科
6.16	応 国華 中国河北医学院電顕室主任	フリーズレプリカ法及び応用	微細構造研究部

I 神経研究所の概要

6.21	石浦 章一 神経研究所疾病研究第一部室長	プロテアーゼと疾患、特にアルツハイマー病との関連について	セミナー委員会
6.27	崎山 武志 日本大学医学部小児科講師	先天性代謝異常症の病因解析と治療の試み：PNP欠損症とNiemann-Pick病を中心に	疾病研究第二部 武蔵病院小児神経科
7.12	桃井 隆 神経研究所疾病研究第五部室長	形態形成因子としてのレチノイン酸胚芽形成と神経系形成	疾病研究第五部
8.29	Hans H. Goebel Johannes Gutenberg大学, 神経病理学教室教授, 西ドイツ	Neuropathology of neuronal ceroid lipofuscinoses	微細構造研究部
9.19	妹尾 春樹 東京医科歯科大学解剖学助手	ビタミンAの細胞内取り込み機構について	疾病研究第一部 疾病研究第五部
10.20	Hans Link Professor of Neurology, Karolinska Institute, Department of Neurology, Huddinge Hospital, Sweden	B. and T cell responses evaluated at single cell level	セミナー委員会
10.30	林 謙介 神経研究所機能研究部研究員	ニワトリ前胃の形態形成と胚期ペプシノゲン遺伝子の発現	セミナー委員会
11.6	高橋 清久 神経研究所疾病研究第三部部長	サーカディアンリズムの同調機構…うつ病研究の一ストラテジ…	セミナー委員会
11.10	中瀬 浩史 東京大学医学部神経内科助手	ミトコンドリアミオパチーにおけるmtDNA異常について	微細構造研究部 疾病研究第一部
11.16	Mark Hallett Clinical Director, National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), NIH, U. S. A.	The use of magnetic stimulation to explore human cortical physiology	疾病研究第四部
11.20	西川 徹 神経研究所疾病研究第三部室長	精神分裂病と興奮性アミノ酸伝達異常	セミナー委員会
	三国 雅彦 神経研究所疾病研究第三部室長	うつ病態におけるセロトニン-2ファミリー受容体機能の検討	
12.7	R. Behringer University of Pennsylvania, U. S. A.	Neuronal and glial development in transgenic mice	モデル動物開発部
12.19	多田隈 卓史 慶応義塾大学医学部微生物学教室助教授	T細胞による自己・非自己の識別とT細胞レパトリーの形成	代謝研究部
平成2年			
1.8	山元 弘 高知医科大学免疫学助教授	免疫系におけるレパトリー形成の機序	疾病研究第六部
1.10	Donna M. Fekete Department of Genetics, Harvard Medical School, U. S. A.	Lineage analysis and immortalization of neural cells via retrovirus vectors.	疾病研究第六部

1.12	糸山 泰人 九州大学医学部神経内科助教授	HAMの免疫病理学	疾病研究第六部
1.23	笠原 忠 自治医科大学医動物学助教授	サイトカインの作用とその機能の多様性： とくにIL1とIL5を中心として	疾病研究第六部
2.9	太田 茂男 自治医科大学学生化学助教授	ミトコンドリアタンパク質の遺伝子構造 と発現制御、およびミトコンドリアの病 態	微細構造研究部 遺伝子工学研究部
2.16	Zhou Dong-feng Chief, Laboratory of Biochemistry and Psychopharmacology, Institute of Mental Health, Peijin Medical University, People's Republic of China	Effect of antidepressants, electro- convulsion and insulin-induced hypoglycemia on beta-adrenergic and serotonergic receptors in the rat brain	疾病研究第三部
2.17	山森 哲雄 Division of Biology, California Institute of Technology, U. S. A.	神経伝達物質転換因子の分子生物学	遺伝子工学研究部
2.22	Jacques Lintermans Nippon Zoki Europe Office	脳浮腫、小脳変性症に対するノイトロロ ピンの作用	疾病研究第六部
	内木 充 日本臓器生物活性研究所	EAEに対するノイトロロピンの作用	
	末広 誠之 日本臓器生物活性研究所	Fabry病に対するノイトロロピンの作 用	
3.26	Hans C. Fibiger Professor, Department of Psychiatry, (Neurological Science), The University of British Columbia, Canada	The role of dopaminergic neurones in the manifestation of various characteristic behaviors in rats	疾病研究第三部
3.27	S. B. Dunnett Associate Professor, Department of Experimental Psychology, University of Cambridge. United Kingdom	Neural transplantation in animal models of Alzheimer's disease	代謝研究部
3.28	Henry I. Yamamura Professor, Department of Pharmacology, College of Medicine, The University of Arizona, U. S. A.	The cloning and expression of the muscarinic acetylcholine receptors	代謝研究部



(表4) 平成元年度 神経研究所・研究発表会

平成2年3月14日(水)  
第3会議室

9:15	疾病研究第2部 1) 抗Ⅷ型コラーゲン抗体の作成とⅧ型コラーゲンの神経組織内分布 2) ヒト脳におけるペロキシゾーム関連酵素の免疫組織化学的発達	田村 頼子 他 宝道 定孝 他
9:45	疾病研究第4部 1) Gracile axonal dystrophy(GAD)マウスの末梢神経系病変の光顕的および電顕的研究 2) 進行性淡蒼球変性症脳における神経伝達物質の変化	三浦 裕之 小田健一郎 相澤 仁志 郭 伸
10:15	疾病研究第6部 1) HTLV-I-associated myelopathy(HAM)の免疫学的解析 2) 神経系細胞におけるアミロイド前駆体タンパク遺伝子発現パターンの比較	宇宿功市郎 大八木保政
10:45	免疫研究部 1) 細胞成長因子による神経成長因子(NGF)の合成調節 2) 脳内 NGFの合成誘導とその活性発現 3) ラットにおける中枢神経親和性レトロウィルス感染モデル	篠田 一三 橋本 吉秀 渡辺 里仁
11:15	遺伝子工学研究部 1) エンハンサーラップ法を用いたショウジョウバエの中枢神経系の解析	浜 千尋 小泉 恵太 星野 幹雄 宮原 慶子 松崎 文雄
——— 休 憩 ———		
13:00	疾病研究第1部 1) ジストロフィンN-末端抗体はC蛋白を認識する 2) ベッカー型筋ジストロフィーの筋病理 ジストロフィンテストで確定診断された20例の検討から 3) ジストロフィンC末端ドメインの臨床的意義	山口 順士 階堂三砂子 荒畑 喜一
13:30	機能研究部 1) ジストロフィンと一緒に精製されてくるタンパク質について 2) mdx carrierマウス筋細胞膜におけるdystrophinの発現様式: 骨格筋と心筋での差異	吉田 幹晴 田中 光
14:00	微細構造研究部 1) mdxマウスの筋再生過程における正常筋芽細胞移植の試み 2) ミトコンドリアミオパチーの分子生物学的進歩について	竹光 正和 後藤 雄一
14:30	疾病研究第3部 1) ラット脳におけるNMDA受容体コンプレックス関連結合部位の固体発生 2) 抗うつ薬のGTP結合調節蛋白質に対する直接作用	篠原 一之 西川 徹 高橋 清久 山本 秀子 三国 雅彦 加賀谷有行 高橋 清久
15:00	疾病研究第7部 1) けいれん関連薬物の細胞内情報伝達系に及ぼす影響の検討	今澤 正興
15:15	疾病研究第5部 1) Niemann-Pick病type C(NPC)の病因に関する研究 ①AY9944によるcontrol fibroblastのcholesterol esterification障害と	吉川 秀人

	NPC fibroblastsに対するDMSO効果について	
	②リソソーム酵素に対するMonensinの作用機序について	桜川 宣男
15:45	実験動物管理室	
	1) 新しい実験動物の開発	松崎 哲也
16:00	モデル動物開発部	
	1) 外来遺伝子導入によるマウス胚細胞の標識化	花岡 和則
	2) murine coronavirus JHMのラットに対するneurovirulenceについて	田口 文広
16:30	代謝研究部	
	1) 脳ミクログリアの分離培養法と細胞特性	中嶋 一行
	2) アストログリア由来突起伸展因子の精製	飯島 昇
	3) ヒトチロジン水酸化酵素cDNA導入培養細胞の脳内移植	内田 耕一
17:00	診断研究部	
	1) 2Teslaヒト全身用MR装置の開発	矢野登志雄 荻野 孝史
	2) テトラヒドロカルボリン類のGC-NICIMS分析法の開発と 生体内代謝に関する基礎的検討	林 時司
	3) 神経細胞分化におけるras遺伝子産物 P21の役割	中村 俊 室屋 賢康
18:00	懇談会	

---

## II 研 究 業 績

---

## 1. 疾病研究第1部

### 1. 研究部一年のあゆみ

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成因の解明、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。平成元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。

〔事務取扱・部長〕杉田秀夫、〔室長〕石浦章一、荒畑喜一、〔研究員〕塚原俊文、〔兼任研究員〕石原傳幸、山口明、清水輝夫、春原経彦、鎌倉恵子、〔客員研究員〕高木昭夫、米本恭三、佐藤猛、〔流動研究員〕有川恵理、階堂三砂子、〔研究生〕松田潔、野島美知夫、荒木誠、淵脇泰介、織茂智之、山口順士、奥山輝明、佐藤いづみ、〔研究見習生〕西田聡、野村泰広、〔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) ジストロフィーに関する研究

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、更に DMD 保因者のジストロフィン発現様式異常 (免疫組織化学的にモザイク) を明らかにしてきたが、今年度はジストロフィーの C 末端ドメインの臨床的・病理学的意義、Becker 型筋ジストロフィーの筋病理組織学的特質などについて検討した。また先天性ジストロフィーのジストロフィン発現様式についても検討を行った。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さらに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、CTL に含まれる膜障害タンパク質パーフォリンの純化に成功して来たが、今年度はヒト血清 (または血漿) 中に存在する 500Kd のパーフォリン阻害タンパク質を明らかにした。これらの研究は、多発性筋炎の病態機序解明に寄与するものである。

#### 3) プロテアーゼに関する研究

アルツハイマー病アミロイド A4 タンパク質のプロセッシングに、インゲンシンとプロリルエンドペプチダーゼが関与していることを明らかにした。後者は、MEL 細胞の分化や、熱ショックにも寄与していることも判明した。

(部長事務取扱 杉田秀夫)

## II 研究業績

### 2. 研究業績

#### A. 論文

##### a. 原著

- 1) Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, Ishiura S, Tsukahara T, Ishihara T, Sunohara N, Nonaka I, Ozawa E, Sugita H:  
Dystrophin diagnosis: Comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescent and immunoblot analyses.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7154-7158, 1989
- 2) Arahata K, Ishiura S, Tsukahara T, Sugita H:  
Dystrophin digest.  
Nature 337: 606, 1989
- 3) Arahata K, Ishihara T, Kamakura K, Tsukahara T, Ishiura S, Baba C, Matsumoto T, Nonaka I, Sugita H:  
Dystrophin and Duchenne muscular dystrophy (Reply).  
N. Engl. J. Med. 321: 398-399, 1989
- 4) Aikawa H, Momoi T, Kitamoto T, Arahata K, Momoi M:  
Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in adult rat brain.  
Biomedical Research 10: 247-250, 1989
- 5) 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
- 6) Suhara Y, Ishiura S, Tsukahara T, Sugita H. :  
Mature 98,000-dalton acid  $\alpha$ -glucosidase is deficient in Japanese quails with acid maltase deficiency.  
Muscle Nerve 12: 670-678, 1989
- 7) Ishiura S, Nomura Y, Tsukahara T, Sugita H:  
Addition of ATP increases the apparent molecular mass of the multicatalytic proteinase, ingensin.  
FEBS Lett. 257: 123-126, 1989

- 8) Ishiura S, Tsukahara T, Tabira T, Sugita H:  
Putative N-terminal splitting enzyme of amyloid A4 peptide is the multicatalytic proteinase, ingensin, which is widely distributed in mammalian cells.  
FEBS Lett. 257: 388-392, 1989
- 9) Ishiura S, Tsukahara T, Tabira T, Shimizu T, Arahata K, Sugita H:  
Identification of a putative amyloid A4- generating enzyme as a prolyl endopeptidase.  
FEBS Lett. 260: 131-134, 1990
- 10) Tsukahara T, Tanaka K, Ogawa T, Ishiura S, Funabuki R, Sugita H:  
RNA degrading activity is tightly associated with the multicatalytic proteinase, ingensin.  
FEBS Lett. 255: 179-183, 1989
- 11) Yamaguchi M, Ishiura S, Obinata T, Tsukahara T, Arahata K, Takano-Ohmuro H, Tamiya T, Tsuchiya T, Sugita H. :  
Antiserum against the synthetic polypeptide fragment of dystrophin cross-reacts with myofibrillar C-protein .  
Proc. Japan Acad. 66 (B): 19-22, 1990
- 12) 有川恵理, 荒畑喜一, 埜中征哉, 杉田秀夫:  
福山型先天性筋ジストロフィーにおけるジストロフィンの研究  
医学のあゆみ 150: 747-748, 1989
- 13) 菊本修, 好永順二, 佐々木高伸, 井手下久登, 引地明義, 荒畑喜一 :  
免疫組織化学的所見において dystrophin のモザイク様発現をみた Duchenne 型筋ジストロフィー症 manifesting carrier の1 孤発例  
臨床神経学 30: 107-109, 1990
- 14) 阪田千種, 春原経彦, 埜中征哉, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :  
心不全を初発症状とした Becker 型筋ジストロフィー症の1 例  
臨床神経学 30: 210-213, 1990
- b. 著 書
- 1) Sugita H, Arahata K, Tsukahara T, Ishiura S:  
Immunohistochemistry of Dystrophin in Various Neuromuscular Diseases.  
Pathogenesis and Therapy of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy, ed by Kakulas BA and Mastaglia FL, Raven Press Ltd., New York, p33-44, 1990

## II 研究業績

- 2) Engel AG, Arahata K, Emslie-Smith A:  
Immune effector mechanisms in inflammatory myopathies.  
Immunologic Mechanisms in Neurologic and Psychiatric Disease, ed. by B. H. Waksman,  
Raven, Ltd., New York, p141-157, 1990
- 3) 杉田秀夫 :  
筋ジストロフィー症の病態研究  
筋ジストロフィーはここまでわかった——厚生省研究班20年の歩み, 筋ジストロフィー症連絡協  
議会, 医学書院, 東京, P 73-88, 1990
- 4) 荒畑喜一 :  
炎症性筋疾患  
筋病理学, 文光堂, 東京, P327-346, 1989
- 5) 荒畑喜一 :  
筋ジストロフィーの原因と治療  
毎日ライフ 2:82-87, 1990
- 6) 荒畑喜一 :  
今日の処方, 筋ジストロフィー 1990, 3: 472-473
- 7) Ishiura S Tsukahara T, Koizumi H, Arahata K, Sugita H :  
Cytotoxic molecules, perforin and serine esterases, in cytotoxic molecules, perforin and  
serine esterases, in cytotoxic T-lymphocytes.  
Intracellular Proteolysis, ed by N. Katunuma and E. Kominami. Japan Sci. Soc. Press,  
Tokyo, p137-143, 1989
- 8) 小泉宏隆, 杉田秀夫 :  
Duchenne 型筋ジストロフィーの分子遺伝学——遺伝子から蛋白質へ——  
新小児医学体系・小児医学の進歩' 89c, p69-82 1989

### c. 総説

- 1) Arahata K, Sugita H :  
Dystrophin and the membrane hypothesis of muscular dystrophy.  
Trends in Pharmacological Sciences 10: 437-439, 1989
- 2) 荒畑喜一, 石浦章一, 塚原俊文, 杉田秀夫 :  
DMD/BMD と *mdx* マウス

- 神経研究の進歩 33: 637-651, 1989
- 3) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :  
Duchenne 型筋ジストロフィー症の病因論  
——細胞膜局在特定タンパク質「ジストロフィン」の先天性欠損——  
日本臨床 47: 1857-1864, 1989
- 4) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :  
ジストロフィン研究の進展  
BRAIN MEDICAL 1: 33-44, 1989
- 5) 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
- 6) 荒畑喜一 :  
Duchenne 型筋ジストロフィー症の膜ペプチド “ジストロフィン”  
医学のあゆみ 151: 45, 1989
- 7) 荒畑喜一 :  
多発性筋炎のリンパ球解析  
Annual Review 神経 1990 : 349-355, 1990
- 8) 石浦章一, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :  
筋疾患における細胞骨格異常  
生体の科学 40: 208-211, 1989
- 9) 石浦章一, 塚原俊文, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :  
筋ジストロフィーの分子遺伝  
実験医学 7: 1913-1918, 1989
- 10) 石浦章一, 荒畑喜一, 塚原俊文, 杉田秀夫 :  
Duchenne 型筋ジストロフィーとジストロフィン欠損  
生化学 61: 1371-1375, 1989
- 11) 石浦章一, 塚原俊文, 杉田秀夫 :  
分化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)  
代謝 26, 833-840, 1989
- 12) 奥山輝明, 野島美知夫, 石浦章一 :



## II 研究業績

ペプチドホルモンの代謝とアミノペプチダーゼ。特に、血中酸素活性と妊娠との関連について。

産婦の世界 41, 901-907, 1989

- 13) 塚原俊文, 石浦章一, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

Dystrophin

Annual Review 神経 1990 : 326-338, 1990

- 14) 塚原俊文, 石浦章一, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

筋ジストロフィー

蛋白質・核酸・酵素 35, 1246-1253, 1990

- 15) 塚原俊文, 杉田秀夫 :

筋ジストロフィーの遺伝子研究・DMD および BMD とジストロフィンの異常

作業療法ジャーナル 23:370-371, 1989

- 16) 塚原俊文, 杉田秀夫 :

ジストロフィンと筋ジストロフィー

Medical Technology 17(10):1013-1014, 1989

### d. 班会議報告

杉田秀夫, 荒畑喜一, 石浦章一, 塚原俊文, 有川恵理, 階堂三砂子, 桒中征哉 :

ジストロフィン分子におけるC末端ドメインの臨床的意義

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,

平成元年度研究報告書 P121-123, 1990

杉田秀夫, 階堂三砂子, 有川恵理, 荒畑喜一, 桒中征哉 :

ベッカー型筋ジストロフィーの筋病理……ジストロフィン・テストで確定診断された20例の検討

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,

平成元年度研究報告書 P116-120, 1990

## B. 学会発表

### a. 特別講演, シンポジウム

- 1) 杉田秀夫 :

Duchenne 型筋ジストロフィー症の成因

第26回日本臨床代謝学会総会, 大阪, 6. 9, 1989

- 2) 杉田秀夫 :

筋ジストロフィー症・ジストロフィン

第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 7, 1989

- 3) 杉田秀夫 :  
デュシャンヌ型筋ジストロフィーと dystrophin  
第19回新潟夏季セミナー, 新潟, 7. 22, 1989
- 4) 杉田秀夫 :  
デュシャンヌ型筋ジストロフィーの成因に関する最近の進歩  
第25回中部日本小児科学会, 金沢, 8. 27, 1989
- 5) 杉田秀夫 :  
Reverse Genetics デュシャンヌ型筋ジストロフィーを中心に  
岡崎国立共同研究機構生理学研究所セミナー, 岡崎, 10. 26, 1989
- 6) 杉田秀夫 :  
デュシャンヌ型筋ジストロフィー研究の最近の進歩  
徳島大学医学部記念青藍会, 徳島, 11. 3, 1989
- 7) Sugita H :  
Duchenne muscular dystrophy and related disorders  
The Fourth Rinshoken International Conference, Tokyo, June 6, 1989
- 8) Arahata K :  
Immunohistochemical study of dystrophin in DMD and BMD.  
The Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Dystrophin.  
Banbury Center, N. Y., April 2-5, 1989
- 9) 荒畑喜一 :  
Duchenne 型筋ジストロフィーの病因解明への新しい展開と mdx マウスの重要性  
第6回日本モデル動物研究会総会シンポジウム, 東京, 11. 29, 1989
- 10) 荒畑喜一 :  
進行性筋ジストロフィー症の成因について “ジストロフィンをめぐって”  
第44回国立病院療養所総合医学会, 総合指定シンポジウム 仙台, 10. 26, 1989
- 11) 荒畑喜一 :  
多発性筋炎の免疫異常……リンパ球解析  
第2回神経免疫研究会, 東京, 9. 2, 1989

## II 研究業績

12) 荒畑喜一 :

筋ジストロフィーの新しい知見について

第7回名古屋市立大学臨床神経内科研究会, 名古屋, 12. 9, 1989

13) 荒畑喜一 :

ジストロフィン

第32回日本リハビリテーション医学会医師卒後教育研修会 東京, 2. 11, 1990

14) 荒畑喜一 :

筋ジストロフィーの分子病理学的診断

第15回福島県神経内科懇話会, 磐城, 11. 24, 1989

15) 荒畑喜一 :

ジストロフィンの局在と臨床的意義

筋ジス, 杉田班, 平成元年度ワークショップ, 東京, 8. 4, 1989

16) Ishiura S:

Effect of ATP on the multicatalytic proteinase.

4th International Rinshoken Conference, Tokyo, Japan, June 5-7, 1989

17) Ishiura S:

Proteolytic processing of the amyloid precursor protein.

国際痴呆共同研究討論会。国立精神・神経センター。3. 13, 1990

18) 石浦章一 :

アルツハイマー病アミロイドβペプチド生成機構について。

Bioscience in Tokorozawa。早稲田大学人間科学部。3. 23, 1990

### c. 一般学会

1) 荒畑喜一, 石浦章一, 塚原俊文, 埜中征哉, 杉田秀夫 :

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の遺伝子産物に関する研究  
——臨床的意義——

第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 24, 1989

2) 織茂智之, 冷牟田英三, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

塩酸ブピバカインによる筋線維の壊死・再生モデルにおける筋形質膜の障害過程と補体系の関与について

第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 26, 1989

- 3) 樫村真弓, 吉岡三恵子, 古山順一, 荒畑喜一 :  
Becker 型筋ジストロフィー症 4 男児例の分子生物学的考察  
第 6 回近畿小児神経研究会, 大阪, 10. 14, 1989
- 4) 石浦章一, 塚原俊文, 杉田秀夫 :  
A 4 アミロイドタンパク質プロセッシングプロテアーゼの検索。  
第62回日本生化学会 平成 1. 11, 3-5, 京都
- 5) 西田聡, 塚原俊文, 田中賢一, 小川俊夫, 石浦章一, 船引龍平, 杉田秀夫 :  
ニワトリ肝臓マルチキタリティックプロテイナーゼの性質とその RNA 分解活性。  
同上
- 6) 山口順士, 石浦章一, 塚原俊文, 荒畑喜一, 土屋隆英, 杉田秀夫 :  
ジストロフィンの部分ペプチドに対する抗体の認識するタンパク質の検索。  
同上
- 7) 塚原俊文, 石浦章一, 杉田秀夫 :  
MEL細胞の分化に伴うマルチキタリティックプロテイナーゼ (インゲンシン) 活性の変化。  
同上
- 8) 塚原俊文, 石浦章一, 杉田秀夫 :  
MEL 細胞の分化に伴う細胞プロテアーゼ活性の変化  
第42会日本細胞生物学会大会, 京都, 10. 25-27, 1989
- 9) 鎌倉恵子, 石浦章一, 塚原俊文, 杉田秀夫, 今城忍 :  
内因性 CANP インヒビターのラット中枢における分布  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 25, 1989

### C. 班会議発表

- 1) 荒畑喜一 :  
ジストロフィン抗体の臨床応用と限界  
「筋ジストロフィー症」総合班会議, 東京, 1. 20, 1990
- 2) 荒畑喜一, 有川恵理, 階堂三砂子, 石浦章一, 塚原俊文, 埜中征哉, 杉田秀夫 :  
ジストロフィン分子における C 末端ドメインの意義  
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. 1, 1989

## II 研究業績

- 3) 階堂三砂子, 有川恵理, 荒畑喜一, 桒中征哉, 杉田秀夫 :  
ベッカー型筋ジストロフィーの筋病理……ジストロフィン・テストで確定診断された20例の検討……  
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. 1, 1989
- 4) 松田潔, 石浦章一, 塚原俊文, 桒中征哉, 荒畑喜一 :  
多発性筋炎における筋崩壊機構: Tリンパ球に存在する膜障害タンパク質, パーフォリンとその内因性阻害タンパク質 (続報)  
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 東京, 1. 19, 1990
- 5) 石浦章一 :  
マルチキャタリティックプロテイナーゼ (インゲンシン) の性質と生理的役割。  
文部省総合A『多機能プロテアーゼ』(市原班) 京都, 1. 20, 1990
- 6) 山口順士, 石浦章一, 大室弘美, 階堂三砂子, 塚原俊文, 荒畑喜一, 土屋隆英, 杉田秀夫 :  
ジストロフィン部分ペプチドの認識する130KD タンパク質。  
生体運動合同班会議 大阪, 1. 8-10 1990
- 7) 石浦章一, 荒畑喜一, 塚原俊文, 杉田秀夫 :  
mdx マウス神経系に存在する400kd ジストロフィン類似タンパク質。  
同上
- 8) 石浦章一, 古賀律子, 安楽治美, 塚原俊文, 山口順士, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :  
mdx マウス脳に検出されるジストロフィン類似400kd タンパク質。  
厚生省精神・神経疾患・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 東京,  
12. 12, 1989
- 9) 杉田秀夫, 石浦章一, 塚原俊文, 山口順士, 古賀律子, 荒畑喜一 :  
3種類の抗ジストロフィンペプチド抗体によるジストロフィン分子の解析。  
文部省重点領域・運動系の分子生物機構 東京, 12, 13-14 1989
- 10) 石浦章一, 塚原俊文, 杉田秀夫 :  
アルツハイマー病アミロイド A4タンパク質の生体機序について。  
文部省総合A『プロテアーゼ』(鈴木班) 東京, 1, 26 1989
- 11) 杉田秀夫, 塚原俊文, 石浦章一 :  
MEL 細胞の機能と Prolyl endopeptidase。  
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 (江橋班) 東京, 2. 23-24

- 12) 田平武, 石浦章一, 塚原俊文, 杉田秀夫 :

アルツハイマー病アミロイドA4 ( $\beta$ ) ペプチド生成機構について。

厚生省痴呆疾患対策調査研究事業平成元年度研究発表会。東京, 3. 2-3, 1990

- 13) 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 (I I)

医薬品基金・医薬品の副作用に起因する神経障害の治療等に関する研究班 東京, 2. 3, 1990

### 3. 主な研究報告

#### ジストロフィン分子におけるC末端ドメインの臨床的意義

荒畑喜一, 石浦章一, 塚原俊文, 有川恵理, 階堂三砂子, 杉田秀夫

##### 目的

我々はこれまでデュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) で、特異的に欠損しているタンパク質—ジストロフィン—の骨格筋における発現様式を明らかにし、その臨床診断的意義を検討してきた。特に免疫組織科学的に見て DMD と BMD (ベッカー型筋ジストロフィー) とが異なる事を初めて見だし報告した。そもそも BMD は1955年 Becker により記載された筋ジストロフィーで、臨床的に良性 DMD とも言われているとおりに発症年齢は DMD によりやや遅く、臨床経過・予後ともに軽症であるが、今日ではその分子遺伝学的背景が解明されつつある。すなわち BMD と DMD とは同じジストロフィン遺伝子のヘテロな欠陥による疾患 (allelic disease) である事が判明している。

今回我々は、Kunkel らの提唱する DMD と BMD の差異に関するジストロフィンの reading frame 仮説の妥当性について検討し、これをタンパク質レベルから明らかにする目的で、ジストロフィンのC末端ドメインに特異的なモノクローナル抗体を用いその発現様式を検討したので報告する。

##### 対象と方法

対象は DMD 18, BMD 20, その他の各種神経筋疾患 (OND) 32の計70例である。抗ジストロフィンC末端ドメイン・モノクローナル抗体はペプチド IV (ヒトC末端アミノ酸番号3495-3544) をマウスに免疫して型どおり調製された。ジストロフィンの局在は蛍光抗体間接法にて、また分子量とタンパク量は隣接の凍結切片を用いたウェスタンブロット法にて測定した。なお蛍光の定量化も試みた。

##### 結果

ウェスタンブロット法と免疫組織化学法の両者の結果から、DMD ではジストロフィンの完全欠損が、ONDでは正常の発現が確認された。しかし BMD ではジストロフィン分子量の変化 (減少17, 増加 3例), タンパク量の減少 (5~60%) および免疫染色の異常 (全体的な淡染性と部分的欠損) が認められた (表)。また MPM 200 microscope photometry system による筋形質膜の蛍光強度は DMD ;1.0 ±1.4, BMD ;27.4 ±12.2, OND ; 102.9 ±7.7であった。

##### 考察および結論

DMD で欠損している“膜”関連細胞骨格タンパク質であるジストロフィンは4つのドメインから構成されN末端から順に、アクチン結合ドメイン、スペクトリン類似の3重螺旋構造を24回繰り返す中間ドメイン、EF ハンド構造をもつ高システインドメイン、およびC末端ドメインの順に並んでいる。このうちC末端については、他のいかなる既知タンパク質ともアミノ酸配列に相同性が認められないという事実や、ヒトとニワトリの間で95%のホモロジーを認めることから、ジストロフィンの生理機能発現にとって重要な役割を担っているドメインである可能性が示唆されてきた。また Campbell らは (1989) ジストロフィンの部分精製に成功し、ジストロフィンがC末端で筋細胞膜を構成する糖タンパク質と結び付いていることを示した。

今回我々は DMD/BMD を含む70例の各種神経筋疾患について、ジストロフィンのC末端ドメインの発現様式を検討したわけであるが、これらの結果から、BMD と OND においてはジストロフィンのC末端ドメインが保たれているが、DMD では欠損していることが判明した。これはジストロフィン・タンパクの安定化または生理機能の発現にとって、そのC末端部分を含む構造が必須であることを示唆しているものと考えられ、極めて重要である。また、同時に、PCR 法とサザンブロット法による DMD 遺伝子の欠失解析に基づいて Kunkel らによって提唱されてきたジストロフィンの reading frame 仮説がタンパク質レベルから具体的に裏づけられたと言える。

## ベッカー型筋ジストロフィーの筋病理 —ジストロフィン・テストで確定診断された20例の検討—

階堂三砂子, 有川恵理, 荒畑喜一, 埜中征哉, 杉田秀夫

ジストロフィンの発見以後鑑別困難な臨床像を呈する症例においてもベッカー型 (以下 BMD) とデュシャンヌ型及び肢帯型筋ジストロフィーの診断が可能となった。我々はジストロフィン・テスト診断の確定された BMD 患者の筋病理所見を再検討した。対象と方法

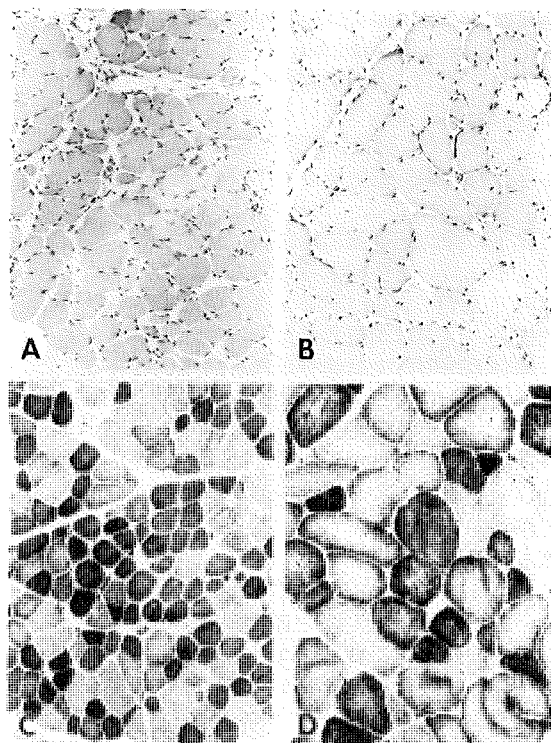
1979年-1989年に当センターで検索された BMD 20例 (2-32歳) の生検筋 (上腕二頭筋) の一般組織化学所見を検討した。ジストロフィン・テストは免疫組織化学法及びウェスタンブロット法を行った。結果及び考察

抗ジストロフィン抗体による免疫組織化学染色では全例筋表面膜のジストロフィンの免疫染色は淡く "Patchy staining 像" を示し, ウェスタンブロット法によるジストロフィンの分析結果では分子量異常や蛋白量減少を全例に認め, BMD と確認された。

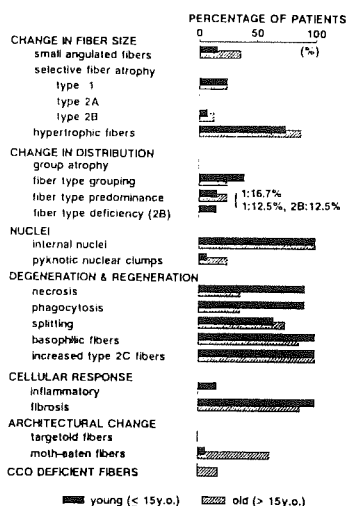
一般組織化学染色では従来の報告と同様に, 筋線維の大小不同, 中心核増加, 壊死・再生, splitting, 反応性の細胞浸潤, 間質結合織の増生, 内部構築の乱れ等の筋原性変化に加え, 小角化線維, fiber type grouping, pyknotic nuclear clumps といった神経原性変化の混在が一部に見られた。

興味深いことに, 筋病理所見に筋生検時の年齢によって一定の傾向が認められた。すなわち, 15歳以下では活発な壊死・再生像が中心であり, 16歳以降では内部構築の乱れ・splitting・中心核増加などの慢性変化が主であった。図1は左に15歳以下の若年群, 右に16歳以上の年長群における特徴的な筋病理像を示した。H&E 像において若年例では活発な壊死・再生像がしばしば群をなしてみられ (A), 反応性炎症像を伴う事が多いのに比し, 16歳以降の年長例では壊死・再生線維は少なく, 著明な大小不同, 中心核増加や splitting が認められた (B)。NADH-TR像では, 若年群の筋線維内部構築が保たれている (C) ことに比べ, 年長例では moth-eaten fiber や whorled fiber など筋線維内部構築異常が目立った (D)。図2に BMD 患者を15歳以下の若年群及び16歳以上の年長群にわけて, 筋病理所見の出現頻度をそれぞれ棒グラフで示した。

以上のような年齢に伴う筋病理像の変化は, 今回検索した限りでは臨床像 (発症年齢・罹病期間・進行の度合) やジストロフィンの免疫染色性・分子量, 蛋白量とは無関係であった。



### HISTOLOGICAL FEATURES IN BMD





### パーフォリンインヒビターの精製

松田潔, 石浦章一, 塚原俊文, 荒畑喜一, 杉田秀夫,

#### 目的

多発筋炎の病巣部には高度の細胞傷害性Tリンパ球 (Cytotoxic T Lymphocyte; CTL) 浸潤が認められており CTL の細胞傷害作用が重要な役割をはたしていると考えられている。CTL は標的細胞と結合した後、その細胞質顆粒に含まれるパーフォリンと呼ばれる細胞傷害タンパク質を細胞間隙に放出する。放出されたパーフォリン分子は Ca イオンの存在下に標的細胞膜に結合し、重合したあと膜を貫通して pore を形成すると考えられている。一方、生体内で CTL からパーフォリンが分泌された時、標的細胞の傷害に消費された後の余分なパーフォリンは細胞間隙の外では速やかに不活性化される必要がある。今までまだこの調節機構およびそれに関するタンパク質は明らかにされていない。我々はこのパーフォリン活性を阻害する物質を正常ヒト血漿および血清中にインヒビターが存在する事を認めこれを精製した。

#### 方法および結果

パーフォリンはマウス CTL 株 CTLL 2 から精製し、またパーフォリンの細胞傷害活性はヒツジ赤血球を標的細胞とした溶血反応から判定した。

健康成人から調製したヒト血清20ml から硫酸アンモニウム, DEAE -セルロース, HPLC ゲルろ過, ハイドロキシルアパタイトを用いてパーフォリンインヒビターを精製した。分子量は約500Kd であった。

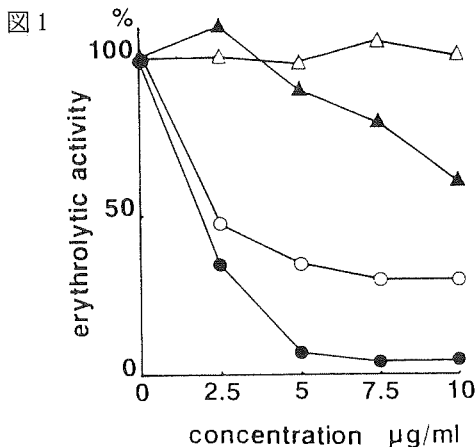
今回得られたパーフォリン活性阻害タンパク質はパーフォリンの膜結合作用及び pore 形成作用に対して濃度依存的に阻害効果を示した (図1)。またこのインヒビタータンパク質は凍結 (-20°C) 1週間保存によりそのインヒビター活性が著明に減少した (図2)。

#### 考察

対照として用いた同濃度のアルブミンでは変化がなく、この阻害タンパクは Ca をキレートしているのではないと考えられる (図1)。

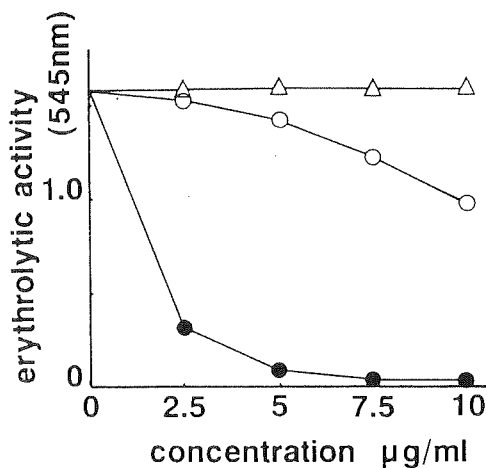
パーフォリン活性阻害タンパク質としては、今回我々が報告した分子量約500Kd のタンパク質の他に、アポリボタンパク質, AI, AII が報告されているがこれらアポリボタンパク質は分子量が25kd であり、今回我々が精製した新しいタンパク質とは異なると考えられる。今後このタンパク質の作用機序について、正常並びに筋炎患者の血清を材料にして検討し

ていく予定である。



インヒビター ● ; 膜結合阻害作用  
○ ; 孔形成阻害作用  
アルブミン ▲ ; 膜結合阻害作用  
△ ; 孔形成阻害作用

図2



● ; 4°C. ○ ; -20°C. △ ; BSA

## アルツハイマー病アミロイドA4 (β) タンパク質のプロセッシング

石浦章一, 塚原俊文, 安楽治美, 野村泰広, 西田聡,  
田川一彦, 八木敬子, 佐藤いづみ, 杉田秀夫

アルツハイマー病の脳に特徴的なアミロイドの沈着は本症の病態に重要な関連を持つものと考えられる。その主成分はA4 (β) タンパク質と呼ばれる分子量4,200のペプチドで、前駆体から切り出されて血管壁や神経細胞内に蓄積する。このA4 (β) タンパク質のプロセッシングの機構を明らかにするため、切断点を含む部分ペプチドを合成し、切断に関与するタンパク分解酵素をスクリーニングした。

図1に示すように、アミロイドA4 (β) タンパク質は前駆体は膜タンパク質で、蓄積する部分は一部膜に埋もれており、A4 (β) のN末端は細胞外に存在するといわれている。私たちは、A4 (β) のN末端とC末端を切り出す酵素をスクリーニングする目的で、人工基質 Z-Val-Lys-Met-MCA, Z-Val-Ile-Ala-MCA (及び Suc-Ile-Ala-MCA) を合成し、ラット脳を用いてその精製を行った。

その結果、A4 (β) のN末端を切り出す酵素は、ATP-依存性プロテアーゼとして知られていたマルチキャタリティックプロテイナーゼ<sup>(1)</sup> (MCP) C末端を切り出す酵素はプロリルエンドペプチダーゼ (PEP)<sup>(2)</sup> であることが明らかとなった。これら2酵素はCa依存性プロテアーゼと並ぶ代表的な細胞質酵素であり、この働きは興味深い。

図1にはアミロイド前駆体 (APP) 3種をあげてあるが、これら3種共にA4 (β) を含み、アルツハイマー病ではMCPとPEPの活性が高いためにA4 (β) が切り出され蓄積すると考えられる。一方、APP 751 APP 770はKunitz型トリプシンインヒビター (KPI) の構造を含むことが知られており、これらが正常細胞でA4 (β) を分解する酵素 (ADE) を阻害するためアルツハイマー病でA4 (β) が沈着する、という考え方もある。私たちの研究ではMCPが大脳皮質に、PEPが海馬に多い<sup>(3)</sup>という結果も得られていることから、前者の可能性が高いと考えられるが、これらは今後の課題となろう。<sup>(4)</sup>

一方、KPIと同じ構造を持つウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI) は表1のごとく、MCP (ここでは別称インゲンシン: Ing) とPEPを高濃度ながら阻害することがわかっており、APPに存在するKPIの標的がはたしてこれら細胞質酵素かどうか注目されている。

### 文献

- (1) Ishiura, S et al, (1989) FEBS Lett, 257, 388-392
- (2) Ishiura, S et al, (1990) FEBS Lett, 260, 131-134
- (3) Ishiura, S et al, (1990) Neurosci, Lett, 115, 329-334
- (4) 石浦章一 (1990) 蛋白質・核酸・酵素 35, 1517-1524

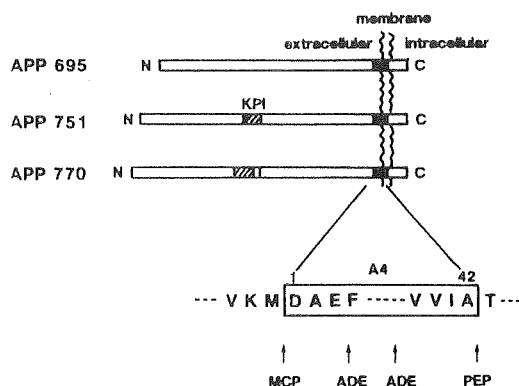


図1 アミロイド前駆体 (APP) の構造

Inhibition of amyloid A4-generating enzymes by proteinase inhibitors					
Inhibitors	concn.	Relative activity (%)			
		T	C	Ing	PEP
no addition		(100)	(100)	(100)	(100)
BPTI	0.1 μg/ml	80	100	100	100
	1	27	95	99	90
	10	3	56	71	81
	100	1	39	37	24
<sup>1</sup> I-antitrypsin	0.1	97	73	100	100
	1	57	26	100	100
	10	19	20	92	100
	100	4	12	90	100
<sup>1</sup> I-antichymotrypsin	0.1	100	92	100	100
	1	100	73	100	100
	10	100	7	100	100
	100	100	1	100	98

BPTI, bovine pancreas trypsin inhibitor; T, trypsin activity assayed with ZPR-MCA; C and Ing, chymotrypsin and MCP activities assayed with SLLVY-MCA; PEP, prolyl endopeptidase activity assayed with SGLQP-MCA at pH 7.6.

図2 アミロイドA4生成酵素に対するインヒビターの影響

## MEL 細胞の機能とプロリルエンドペプチダーゼ

塚原俊文, 石浦章一, 杉田秀夫

細胞内タンパク質量は生合成と分解によってバランスを保たれ、それぞれ特有の半減期を持っている。このバランスは、細胞の状態や環境によって変化することが知られており、特に筋ジストロフィー等の進行性の筋萎縮を伴う疾患においてはタンパク分解の異常が病態と深く関わっている。このようなタンパク分解系の異常が生理機能の喪失や疾患といかなる関連性があるのかは十分に明らかにされていない。そこでこれを明らかにする研究の一環として細胞を熱処理やストレス負荷によって病的な状態にし、それに伴うプロテイナーゼの変化を検討した。

## 実験方法

プロテイナーゼ活性は MCA 基質の分解を指標として測定し、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活性の他、種々の分解活性を検討した。プロリルエンドペプチダーゼ活性は Suc-GPLGP-MCA を基質として、2-メルカプトエタノール存在下、PH7.0で測定した。

細胞の熱処理は、FCS を含まない培地に懸濁した細胞を45°Cでインキュベートした。その後、氷冷した PBS を加えて直ちに遠心することによって細胞を集めた。

## 結果および考察

MEL 細胞を45°Cで熱処理すると多くのプロテイナーゼのうちでプロリルエンドペプチダーゼ活性が特異的に減少した。しかし細胞を42°Cで処理しても活性は変化せず、超音波破壊した細胞では45°C処理でも活性低下はみられなかった(表)。ライゼートでは活性の減少がみられないことから、熱処理による失活が細胞機能と関わっているとかがえられたのでどのような機能が活性調節に必要なかを調べたが、この失活はタンパク質や核酸の合成阻害剤を添加しても影響を受けず、これらの合成は失活に必要でないと考えられた。またプロテアーゼ阻害剤等の添加によっても失活が抑えられないことからリソソーム等で分解されて活性を失っているのではないと推定された。また熱処理によって細胞内インヒビターが活性化する可能性も考えられたが、熱処理した細胞内にはインヒビター活性は認められなかった。

熱以外のストレスを細胞に負荷したところ細胞内の酸化型グルタチオン濃度を上昇させるメナジオンの添加によってプロリルエンドペプチダーゼ活性が減少した。そこで細胞ライゼートに酸化型グルタチオンを加えプロリルエンドペプチダーゼが失活する

か否かを確認した。すると45°Cでインキュベートしたライゼートでは酸化型グルタチオンの濃度に依存して活性の減少がみられた。しかし37°Cでは酸化型グルタチオンを加えても活性は減少しなかった。この実験結果は細胞内においてはプロリルエンドペプチダーゼが、熱処理やメナジオン添加によって生じた酸化型グルタチオンによって活性を調節されている可能性を示唆した。細胞を熱処理してグルタチオンの変化を測定したところ実際に45°C処理によって酸化型グルタチオン濃度が上昇していた(図)。

## 結論

MEL 細胞の熱処理に伴ってプロリルエンドペプチダーゼ活性が特異的に減少した。熱負荷による同酵素の活性減少には細胞内酸化型グルタチオン濃度の上昇が関与していることが示唆された。

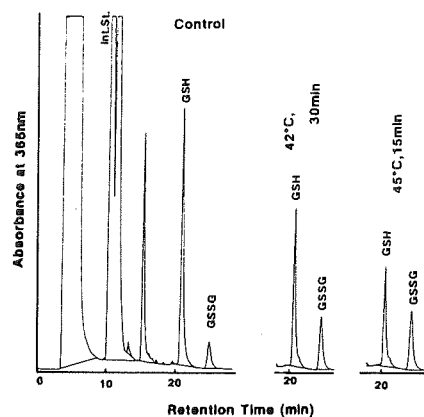
## 文献

Tsukahara T, et al. (1990) Exp. Cell Res 188, 111-116

Residual Activity of Prolyl Endopeptidase in Heat-Treated MEL Cells

	Temp. (°C)	Time	Activity (%)
Intact	—	0	100
Intact	42	10	96.1
Intact	42	20	96.7
Intact	42	30	80.9
Sonicated	45	10	84.5
Intact	45	10	20.1

Separation of GSH and GSSG by HPLC



## 2. 疾病研究第2部

### 1. 研究部一年のあゆみ

疾病研究第2部は精神遅滞，脳性麻痺，奇形性疾患などの発達障害の原因・病態を解明し，予防・治療法を開発することを目的として研究している。

本年度の主な研究は

- 1) 脳発達機構と周産期脳障害機転を明かにし，予防法を開発するために，ヒト剖検脳について形態学のおよび生化学的に検討するとともに，脳低酸素，虚血の実験的研究を行った。
- 2) 環境異常による胎児脳発達障害の発生機構の解明と治療法の開発のために，エタノール，カフェインを中心に疫学的，臨床生化学的，動物実験的研究を行った。
- 3) VIII型コラーゲンの生化学的および形態学的研究を行い，組織局在と機能を検討した。また，コラーゲン代謝異常の病因の生化学的および分子遺伝学的検索を行った。
- 4) Down症候群，神経皮膚症候群，Menkes病，Lesch-Nyhan症候群などの遺伝病の生化学的および分子遺伝学的研究を行った。

人事構成の面では，田中晴美，許斐博史室長が研究の中心となり，水戸敬室長は6月より小児の神経病理学的研究のためにカナダのトロント大学小児病院に留学した。研究員では笠間透が就職し栄転した。常勤研究員として，丸山悦子，田村頼子，宝道定孝，長谷川元宏，来田裕美，山之内正弘研究員が研究に従事した。また，武蔵病院より清水教一，野田泰子医師が研究に参加した。非常勤研究員として，竹花美博，橋本和広，千葉貴子研究生が研究に参加した。併任研究員，客員研究員の方々には，外部より研究の指導と支援をいただいた。研究助手として，久保田直美，須貝千恵子，森本雅子の方々が研究を助けてくれた。その他，大学，病院や施設とも共同研究を行い，研究を支援していただいた。

(部長 高嶋幸男)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Takashima S, Ieshima A, Nakamura H, Becker LE:  
Dendrites, dementia and the Down Syndrome  
Brain Dev 11:131-133, 1989
- 2) Takashima S, Mito T, Houdou S, Ando Y:  
Relationship between periventricular hemorrhage, leukomalacia and brainstem lesions in  
prematurely born infants  
Brain Dev 11:121-124, 1989
- 3) Takashima S, Becker LE:  
Relationship between abnormal respiratory control and perinatal brainstem and cerebral  
infarctions  
Pediatr Neurol 5:211-215, 1989
- 4) Takashima S, Mito T, Becker LE:  
Dendritic development of motor neurons in the cervical anterior horn and hypoglossal  
nucleus of normal infants and victims of sudden infant death syndrome  
Neuropediatrics 21:24-26, 1990
- 5) Nakano C, Takashima S, Takeshita K:  
Carnitine concentration during the development of human tissues  
Early Human Development 19:21-27, 1989
- 6) Sakuta R, Aikawa H, Takashima S, Yoza A, Ryo S:  
Epidermal nevus syndrome with hemimegalencephaly: A clinical report of a case with  
acanthosis nigricans-like nevi on the face and neck, hemimegalencephaly, and hemihy-  
pertrophy of the body  
Brain Dev 11:191-194, 1989
- 7) Takeshita K, Ando Y, Ohtani K, Takashima S:  
Cerebral palsy in Tottori, Japan: Benefits and risks of progress in perinatal medicine  
Neuroepidemiology 4:184-192, 1989
- 8) Mito T, Ando Y, Takeshita K, Takashima S:

Ultrasonographical and morphological examination of subependymal cystic lesions in maturely born infants

Neuropediatrics 20:211-214, 1989

- 9) Mito T, Ohno K, Takashima S:  
Effects of endotoxin on cultured venous and arterial endothelial cells from human umbilical cord  
Yonago Acta Medica 32:163-174, 1989
- 10) Houdou S, Takashima S, Takeshita K, Ohta S:  
Infantile subcortical leukohypodensity demonstrated by computed tomography  
Pediat Digest 2:2-3, 1989
- 11) Tomita Y, Shichida K, Takeshita K, Takashima S:  
Maturation of blink reflex in children  
Brain Dev 11:389-393, 1989
- 12) 来田裕美, 高嶋幸男, 水戸敬, 田平武, 西沢正豊, 国下龍英, 中村晴臣 :  
健常およびダウン症候群脳におけるアミロイド蛋白局在の年齢的变化  
医学のあゆみ 149:845-846, 1989
- 13) 来田裕美, 高嶋幸男, 水戸敬, 許斐博史, 小畑蘭子, 小野寺一清 :  
ダウン症候群および正常脳における21番染色体由来膜蛋白の年齢的变化  
医学のあゆみ 151:71-72, 1989
- 14) 小枝達也, 吉田一成, 稲垣真澄, 安藤幸典, 常井幹夫, 高嶋幸男 :  
全身性真菌感染症の未熟例—超音波断層法とエンドトキシン測定法の有用性について  
日本新生児学会雑誌 25:376-380, 1989
- 15) 安藤雅史, 汐田まどか, 水戸敬, 高嶋幸男, 竹下研三 :  
エンドトキシン血症の幼若脳に及ぼす影響  
日本新生児学会雑誌 25:376-380, 1989
- 16) Tanaka H, Nakazawa K:  
Maternal caffeine ingestion increases the tyrosine level in neonatal rat cerebrum  
Biol Neonate 57:133-139, 1990
- 17) Tanaka H, Kasama T, Arima M:  
Prevention possibility for brain dysfunction in Menkes' disease by maternal administration

## II 研究業績

of trace elements

Trace Elements in Clinical Medicine, edited by Tomita H, Springer-Verlag, Tokyo, p277-281, 1990

18) Tanaka H, Arima M:

Cerebral amino acids in neonate from caffeine-drinking dam

AMINO ACIDS, Chemistry, Biology and Medicine, edited by Lubec G, Rosenthal G A, ESCOM Science Publishers B V, The Netherlands, p 303-306, 1990

19) Kasama T, Tanaka H:

Effects of oral copper administration to pregnant heterozygous brindled mice on fetal viability and copper levels

J Nutr Sci Vitaminol 35:627-638, 1989

20) Hayashi A, Tanaka H, Arima M:

Tuberous sclerosis: aberrant proline sensitivity of skin fibroblasts

Brain Dev 11:161-163, 1989

21) Kasama T, Suzuki H, Tanaka H, Hirayama Y:

Hair copper and zinc concentration in the Rett syndrome

Brain Dev 11:433-435, 1989

22) Konomi H, Arima M, Tanaka H, Hayashi T, Ikeda S:

Increased deposition of types III and V collagen in neurofibroma tissue from patients with von Recklinghausen disease

Brain Dev 11:378-383, 1989

23) Murakami A, Konomi H, Itokazu N, Arima M, Sakuragawa N, Nakajima A, Tanaka M, Tajima S, Hayashi T, Kino J:

Partial characterization of an unusual 185 kDa protein synthesized by dermal fibroblasts from patients with Marfan syndrome: Identification of the protein as type IV collagen

J Biochem 106:490-494, 1989

24) Sawada H, Konomi H, Hirosawa K:

Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: Its relation to type VIII collagen

J Cell Biol 110:219-227, 1990

- 25) 橋本和広, 宝道定孝, 安藤幸典, 岡空輝男 :

化膿性髄膜炎 1 乳児例の超音波的手法による経過観察—超音波断層法および経頭蓋骨の血液測定—  
脳と発達 21:475-480;1989

- 26) Ichiyama T, Houdou S, Tomita Y, Yoshioka K, Ohno K:

Cerebral venous thrombosis associated with recurrent epilepsy-like attacks  
Brain Dev 11:326-328;1989

b. 著書

- 1) 高嶋幸男 :

未熟児の脳室内出血—成因, 診断, 予防および治療

新小児医学大系 小児医学の進歩 '89A, 中山書店, 東京, p125-137, 1989

- 2) 高嶋幸男 :

脳性麻痺小児の最近の神経病理学的問題

脳性麻痺—日本における療育をめぐる, モリタ印刷, 仙台, p12-16, 1989

- 3) Takashima S:

Recent neuropathological problems in children with cerebral palsy

What can we do for the cerebral palsy, Morita, Miyagi, p26-40, 1989

- 4) 久木田穰次, 高嶋幸男 :

頭部CT検査

新生児の診療と検査, 東京医学社, 東京, p381-392, 1989

- 5) 田中晴美 :

妊婦と酒・タバコ

Drug Therapy コンパクトシリーズ ⑧「妊婦への投薬」, 清水直容, 松田一郎監修,

Medical Information Express, 東京, p69-76, 1989

c. 総説

- 1) 高嶋幸男, 水戸敬, 宝道定孝 :

周産期異常と脳発達障害—脳室内出血を中心に

神経研究の進歩 33:445—453, 1989

- 2) 大野 勉, 高嶋幸男 :

頭蓋内出血

小児科診療 増刊号 (小児の治療指針) 52:688-690, 1989



## II 研究業績

### 3) 田中晴美 :

飲酒・喫煙による先天異常

小児看護 12:1524-1529, 1989

### 4) 田中晴美 :

Fetal alcohol 症候群

小児内科 臨時増刊号・小児疾患診療のための病態生理 I 21:84-85, 1989

### 5) 鈴木文晴, 田中晴美 :

皮膚所見からほぼ診断できる神経疾患

小児科 臨時増刊号・診断の決め手となる1つの所見 30:1327-1336, 1989

### 6) 許斐博史 :

コラーゲン代謝異常の最近の知見。

小児科 30:379-386, 1989

### 7) 許斐博史, 小野寺一清 :

細胞外マトリックスと細胞の相互作用。

現代化学 227:48-54, 1990

### 8) 許斐博史 :

Ehlers-Danlos 症候群・Marfan 症候群および類縁疾患

小児内科 21:661-663, 1989

## d. 班会議報告書

### 1) 高嶋幸男, 安藤幸典, 富田豊 :

種々の水頭症の病態評価：脳血流と脳幹反射に基づいて

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班, 昭和63年度研究報告書 p71-74, 1989

### 2) 高嶋幸男, 安藤幸典, 富田豊 :

未熟児脳室内出血後水頭症の合併病変の発生機転

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班, 昭和63年度研究報告書 p75-78, 1989

### 3) 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・小児重症治療用機器の開発—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研究班, 昭和63年度研究報告書 p86-87, 1989

### 4) 高嶋幸男, 水戸敬, 許斐博史 :

## 脳室上衣下胚層の免疫組織学的研究

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, 昭和63年度研究報告書 p304-308, 1989

- 5) 高嶋幸男 :  
周産期脳幹および小脳梗塞と呼吸調節異常  
厚生省心身障害・乳幼児突然死 (SIDS) に関する研究班, 昭和63年度研究報告書 p41-46, 1989
- 6) 高嶋幸男, 水戸敬, 許斐博史 :  
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, 昭和63年度研究報告書 p19-24, 1989
- 7) 高嶋幸男, 来田裕美, 水戸敬, 田平武, 西沢正豊, 国下龍英 :  
正常およびダウン症候群脳におけるアミロイド蛋白局在の年齢的变化  
厚生省精神・神経疾患・重度重複障害児の疾病構造と長期予後に関する研究班, 昭和63年度研究報告書 p62-66, 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, 昭和63年度研究報告書 p178-184, 1989
- 9) 有馬正高, 田中晴美, 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, 昭和63年度研究報告書 p103-108, 1989
- 10) 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
- 11) 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班, 昭和63年度研究報

## II 研究業績

告書 p69-74, 1989

12) 有馬正高, 丸山悦子, 高嶋幸男, 小野寺一清 :

Recklinghausen 病におけるトランスアクティングファクターの研究

厚生省特定疾患・神経皮膚症候群調査研究班, 昭和63年度報告書 p62-65, 1989

## B. 学会発表

### a. 特別講演, シンポジウム

1) 高嶋幸男 :

新生児未熟児医療と障害児

第15回九州新生児研究会(特別講演), 宮崎, 6. 3, 1989

2) 高嶋幸男 :

小児神経疾患のGolgi study

第9回日本小児病理研究会(特別講演), 名古屋, 8. 5, 1989

3) 高嶋幸男 :

新生児脳血管障害と脳循環の特異性

第4回大阪脳循環代謝研究会(特別講演), 大阪, 9. 13, 1989

4) 高嶋幸男 :

乳児突然死症候群の病因

第171回日本小児科学会東海地方会(特別講演), 名古屋, 10. 15, 1989

5) 高嶋幸男 :

小児神経疾患とその病態—発達の側面から

第85回日本小児科学会岩手地方会(特別講演), 盛岡, 12. 9, 1989

6) 高嶋幸男 :

脳の発育と発達障害

第8回秋田県小児神経・発達研究会(特別講演), 秋田, 3. 10, 1990

7) Tanaka H, Kasama T, Arima M:

Prevention possibility for brain dysfunction in Menkes' disease by maternal administration of trace elements

2nd Meeting of the International Society for Trace Element Research in Humans (Plenary Session) Tokyo, Sept. 1, 1989

8) 田中晴美 :

胎児性アルコール症候群 —10年間の変遷—

第24回日本アルコール医学会総会 (シンポジウム) 「女性飲酒の特殊性」 東京, 9. 23, 1989

9) Tanaka H, Arima M:

Chemical pathogenesis of tuberous sclerosis

International Symposium on Neurocutaneous Syndrome Tokyo, Oct. 18, 1989

10) 許斐博史 :

コラーゲン代謝異常症

第34回日本人類遺伝学会大会 (シンポジウム) 「優生遺伝性疾患の最近の知見」

松江, 10. 27, 1989

b. 国際学会

1) Tanaka H, Arima M:

Cerebral amino acids in neonate from caffeine-drinking dam

Therapy with Amino Acids and Analogues - 1st International Congress, Vienna, Aug. 7, 1989

c. 一般学会

1) 高嶋幸男, 来田裕美, 水戸敬, 許斐博史, 小畑蘭子, 小野寺一清 :

ダウン症候群の精神遅滞と早発老化に関する発達ゴルジ法・免疫組織化学的検討

第92回日本小児科学会, 新潟, 5. 19, 1989

2) 河原仁志, 竹下研三, 高嶋幸男 :

正常マウスの筋細胞内にみられる tubular aggregates の走査電子顕微鏡による観察

第30回日本神経学会, 水戸, 5. 26, 1989

3) 水戸敬, 小山和弘, 高嶋幸男, 鈴木進 :

近赤外線分光測定装置および水素クリアランス組織血流計による脳血流・血液量動態の観察

第31回日本小児神経学会, 札幌, 7. 6, 1989

4) 工藤英昭, 鈴木康之, 舟橋満寿子, 下村千枝子, 長博雪, 安藤寛, 志倉圭子, 吉野良寿, 高嶋幸男 :

経過中脳内石灰化の縮小を認めた abrenoleukodystrophy(ALD) の1例

第31回日本小児神経学会, 札幌, 7. 6, 1989

5) 河原仁志, 宝道定孝, 竹下研三, 高嶋幸男 :

走査型電子顕微鏡による筋細胞の観察—正常像と異常像

## II 研究業績

- 第31回日本小児神経学会, 札幌, 7. 8, 1989
- 6) 作田亮一, 相川久志, 高嶋幸男, 与座明雄 :  
Heimimegalencephaly を伴った epidermal nevus syndrome(ENS) の1例  
1. 臨床経過および皮膚病理所見  
2. 神経病理学的検索  
第31回日本小児神経学会, 札幌, 7. 8, 1989
- 7) 高梨愛子, 桜川宣雄, 加我牧子, 水戸敬, 高嶋幸男 :  
副腎白質ジストロフィーの長期生存例—神経生理と神経病理を中心に  
第31回日本小児神経学会, 札幌, 7. 8, 1989
- 8) 高嶋幸男, 来田裕美, 水戸敬, 田平武, 西沢正典, 国下龍英, 中村晴臣 :  
正常およびダウン症候群におけるアミロイド蛋白局在の年齢的变化  
第30回日本神経病理学会, 東京, 6. 20, 1989
- 9) 竹内徹, 藤村正哲, 志村浩二, 高嶋幸男, 根岸宏邦, 橋本武夫, 堀内到, 船戸正久 :  
新生児頭蓋内出血全国実態調査の概要  
第25回日本新生児学会, 東京, 7. 3, 1989
- 10) 堀内到, 竹内徹, 藤村正哲, 志村浩二, 高嶋幸男, 根岸宏邦, 橋本武夫, 船戸正久 :  
新生児頭蓋内出血の臨床症状とその予後との関連 (新生児頭蓋内出血全国実態調査から)  
第25回日本新生児学会, 東京, 7. 3, 1989
- 11) 住田裕, 竹内徹, 藤村正哲, 堀内到, 志村浩二, 根岸宏邦, 船戸正久, 高嶋幸男, 橋本武夫 :  
極小未熟児の脳室内出血に関する前方視的多施設共同研究  
第25回日本新生児学会, 東京, 7. 3, 1989
- 12) 那須田馨, 志村浩二, 堀内到, 竹内徹, 藤村正哲, 橋本武夫, 船戸正久, 根岸宏邦, 高嶋幸男 :  
極小未熟児の脳室内出血に関する前方視的多施設共同研究  
第25回日本新生児学会, 東京, 7. 3, 1989
- 13) 来田裕美, 宝道定孝, 水戸敬, 高嶋幸男, 竹内豊, 大野勉, 西田明 :  
Superoxide dismutase の発達の免疫組織化学  
第25回日本新生児学会, 東京, 7. 3, 1989
- 14) 小山和弘, 水戸敬, 高嶋幸男, 鈴木進 :  
薬物負荷による幼若仔脳血管, 血液量および血流量変化の観察  
第25回日本新生児学会, 東京, 7. 3, 1989

- 15) 大野勉, 長田郁夫, 鬼本博文, 勝又大助, 名越兼, 大出集, 新津直樹, 宮川智幸, 高嶋幸男 :  
出血性脳梗塞を認めた長期 ECMO 症例の病理学的検討  
第25回日本新生児学会, 東京, 7. 3, 1989
- 16) 千葉貴子, 西田明, 水戸敬, 許斐博史, 高嶋幸男 :  
Thanatophoric dysplasia 剖検例のコラーゲン分析  
第25回日本新生児学会, 東京, 7. 3, 1989
- 17) 宝道定孝, 長谷川元宏, 来田裕美, 許斐博史, 高嶋幸男, 鈴木康之 :  
ヒト大脳におけるカタラーゼの発達免疫組織化学  
第32回未熟児新生児学会, 大宮, 10. 27, 1989
- 18) 木の上啓子, 根本しおり, 高宮光, 河島充私子, 宮島祐, 荻原正明, 星加明徳, 本多輝男, 土手剛,  
高嶋幸男 :  
特異な画像と病理所見を示した年令依存性てんかん性脳症の1女例  
第17回関東小児神経学研究会, 3. 12, 1990
- 19) 山内秀雄, 花岡繁, 高嶋幸男, 黒川徹, 有馬正高 :  
前頭葉起源の発作性自動症を示した2例  
第17回関東小児神経学研究会, 3. 12, 1990
- 20) 田中晴美, 笠間透, 有馬正高 :  
メンケス病培養細胞への数種薬剤の作用に関する検討  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 7, 1989
- 21) 田中晴美, 笠間透, 有馬正高 :  
メンケス病マウスモデル: 母体投与銅の仔大脳への影響  
第29回日本先天異常学会学術集会, 山形, 7. 13, 1989
- 22) 沢田元, 許斐博史, 廣澤一成 :  
デスメ膜の格子形成コラーゲンの性質と分布  
第94回日本解剖学会総会, 宮崎, 4. 3, 1989
- 23) 許斐博史, 高嶋幸男, 有馬正高, 福嶋義光, 甲田直也, 山口修一 :  
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の生化学的分析  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 6, 1989
- 24) 田村頼子, 許斐博史, 沢田元, 高嶋幸男, 中島章 :  
ヒト眼における VIII 型コラーゲンの組織分布

## II 研究業績

- 第7回国際眼研究会議, 日本部会, 大阪, 12. 10, 1989
- 25) 清水教一, 許斐博史, 高嶋幸男, 有馬正高, 青木継稔, 菊池孝信, 嶋武博之 :  
HPRT cDNA を用いた, 日本人 Lesch-Nyhan 症候群の遺伝子解析  
第32回日本先天代謝異常学会, 福井, 11. 17, 1989
- 26) 宝道定孝, 吉田一成, 安藤幸典 :  
慢性疾患における経頭蓋骨的脳動脈血流測定  
第92回日本小児科学会学術集会, 新潟, 5. 19, 1989
- 27) 丸山悦子, 小野寺一清, 丸山芳治, 高嶋幸男, 有馬正高 :  
吸収抗体による neurofibromatosis 培養線維芽細胞の遺伝子異常発現の検索  
1990年度日本農芸化学会大会, 福岡, 3. 31, 1990
- 28) 長谷川元宏, 北沢重孝, 三上一郎, 梅田雅宏 :  
Vegitative state のMRS 所見  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 7, 1989
- 29) 長谷川元宏, 小山和弘, 宝道定孝, 高嶋幸男 :  
Partial asphyxia 時の脳組織pH, 血液量, 酸素化の変動  
第34回未熟児新生児学会総会, 大宮, 10. 27, 1989

## C. 班会議発表

- 1) 富田豊, 高嶋幸男 :  
難治性水頭症児の視覚認知について  
厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班, 東京, 8. 18, 1989
- 2) 高嶋幸男, 富田豊 :  
中脳水道狭窄による水頭症の脳幹検索  
厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班, 東京, 12. 22, 1989
- 3) 高嶋幸男, 長谷川元宏, 宝道定孝, 片山正夫, 河野寿夫, 宮坂勝之, 長谷川久弥, 竹内豊 :  
HFOが脳組織に及ぼす影響  
厚生省小児医療・小児重症治療用機器の開発—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研究班, 東京, 2. 6, 1990
- 4) 高嶋幸男, 宝道定孝, 長谷川元宏, 有馬正高, 竹内豊, 浅沼勝美, 大野勉, 宮川智幸 :  
新生児剖検例よりみた合併奇形

厚生省心身障害・先天異常のモニタリングおよび対策に関する研究班, 東京, 3. 2, 1990

6) 高嶋幸男, 長谷川元宏, 宝道定孝 :

低酸素症中の脳血流, 酸素化および代謝動態モニター

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. 17, 1990

7) 宝道定孝, 来田裕美, 高嶋幸男, 鈴木康之 :

脳形成異常の免疫組織化学的検討

厚生省精神・神経疾患・重度重複障害児の疾病構造と長期予後に関する研究班, 12. 14, 1989

8) 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 型コラーゲンの構造と神経系組織内分布

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. 17, 1990

9) 田中晴美, 笠間透, 有馬正高 :

脳发育障害への活性酸素代謝の関与に関する研究 3. 出生前治療による脳障害防止の可能性

厚生省精神・神経疾患・发育期脳障害の発生予防と成因に関する研究班, 東京, 1. 26, 1990

10) 有馬正高, 許斐博史 :

先天性結合織代謝異常症の本体解明 : 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,  
東京, 11. 25, 1989

11) 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, 東京, 2. 15, 1990



3. 主な研究報告

Fetal Alcohol Effects : 海馬におけるシナプス形成密度の低下

田中晴美, 猪俣賢一郎, 那須史男\*

妊娠母体の飲酒にもとづく子供の異常のうち, 身体発育, 脳発育, 顔面における3異常のそろわない不全型は Fetal Alcohol Effects (FAE) と称され, 日本では, 身体発育低下を示さないこの概念のものが多。したがってラットを用いて FAE のモデルを作製, 中心となる異常病態を検討した。

方法

ウイスター系ラットを用い, 妊娠前に10%エタノール (E) あるいは水 (W), 妊娠中に5%, 10%, 20% E あるいは W を投与<sup>1)</sup>, 妊娠21日の胎仔を検討した。またエタノールと同時に0.01%亜鉛 (Zn) 投与も試みた。投与方法は妊娠前-妊娠中中表示する。シナプス形成の指標としては, エタノールで問題となっている海馬の CA3 領域におけるシナプス数を E-PTA (ethanolic phosphotungstic acid) 染色法により電顕で観察<sup>2)</sup>した。値は神経細胞体を除いて neuropil の25 μm<sup>2</sup> に存在する synaptic junction の数で表示した。

結果

1) 胎仔体重, 大脳重量

体重は W-W に比し, 10% E-10% E, 10% E-20% E はエタノール濃度に依存して有意に低下が増強した。W-5% E では低下しなかった。一方大脳重量は10% E-20% E, 10% E-10% E, W-5% E, W-W の順に増加を示し, W-5% E でも W-W に比し有意に低下した。すなわちエタノール投与量の低下につれ, 身体発育に異常なく大脳重量の低下する状態が存在するといえる。

2) CA3 におけるシナプス密度

各投与群の synaptic junction の数 [平均 ± S D (胎仔数)] は, W-W ; 1.18 ± 0.27 (11), 10% E-10% E ; 0.84 ± 0.22 (9), 10% E-20% E ; 0.34 ± 0.25 (8), W-5% E ; 0.60 ± 0.20 (5) であった。W-W に比し各群とも有意にシナプス形成密度の低下をみた。注目すべき点は体重低下の存在しない W-5% E 群において10% E-10% E 群より著しいシナプス形成低下をみる点であろう。図に CA3 における2群の電顕像のモデルを示す。

3) 亜鉛投与の影響

FAE のモデルとしての母体への W-5% E に比し, これに亜鉛の同時投与 W-5% E + Zn では, a) 体重より大脳重量が増加し, b) 亜鉛量は胎盤中では増加したが海馬においては有意な増加なく, c) CA3 におけるシナプス形成の促進はみられなかった。FAE の本質的な修復は亜鉛では不可能といえる。

結論

ラットモデルにおいて, 母体に投与するエタノール濃度の低下につれ, 脳発育障害のみが残存するようになり, 海馬におけるシナプスの低形成が存在する。したがって母体投与エタノールによる子供の障害の中核となる病態として海馬のシナプスの関与があげられる。さらに海馬に高濃度に存在する亜鉛の co-teratogen としての作用が再確認された。

文献

- 1) Tanaka H, Iwasaki S, Nakazawa K, Inomata K: Biol Neonate 54:320-329, 1988
- 2) Inomata K, Nasu F, Tanaka H: Int J Dev Neurosci 5:455-460, 1987

\* (東邦大学第2解剖)

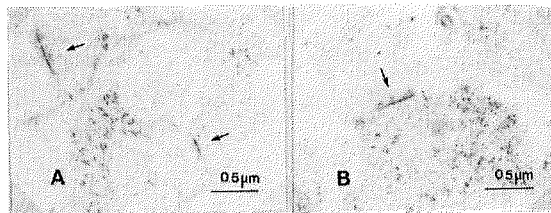


図 E-PTAによって染色されたシナプス (↑)

A : W-W B : 10% E-20% E

## VIII 型コラーゲンの構造と神経系組織内分布

許斐博史, 田村頼子, 高嶋幸男

VIII 型コラーゲンは1980年に Sage 等によって大動脈の内皮細胞の培養液中に認められた新しい型のコラーゲンである。このコラーゲンはその後、脳の毛細血管の内皮細胞, human astrocytoma により得られたU-251MG, などの cell lines により合成されることが認められた。一方, Benya は1986年, 角膜の内皮細胞の培養液中より VIII 型コラーゲンを精製し VIII 型コラーゲンの  $\alpha$ 鎖は60kDaであるとの報告をしている。1989年, Yamaguchi らはウサギの角膜内皮細胞の mRNA より cDNA ライブラリーを作成し, 60kDaのコラーゲン鎖の cDNA を単離し, この遺伝子が encoding しているコラーゲン鎖を  $\alpha 1$  (VIII) 鎖と同定した。VIII 型コラーゲンは astrocytoma よりクローン化された細胞や脳の毛細血管の内皮細胞が合成するという報告があり, 中枢神経系の組織構築にも関与する可能性があると考えられるので, われわれは中枢神経系の発達とその障害へのコラーゲンの関与を検索するために VIII 型コラーゲンの精製, 抗体作成, 及び遺伝子単離を行っている。われわれは抗 VIII 型モノクローナル抗体を作成し, その性質を詳しく調べ, この抗体を用いて VIII 型コラーゲン分子の構造, 神経組織内分布を検索したので報告する。

## 方法

## 1) VIII 型コラーゲンの精製

VIII 型コラーゲンの精製はウシ眼よりデスメ膜を剥離し0.5M酢酸存在下でペプシンを加え(0.5mg/ml) 4°C, 16時間消化してコラーゲンを可溶化した。その後塩析, 超遠心法にて VIII 型コラーゲンを部分精製し, 最終的な精製はC18逆相カラム(Micro Bondaspher, 5 $\mu$  100Å, Waters)を用いた, 高速液体クロマトグラフィー法(HPLC)で行った。

## 2) 免疫組織学的検索

剖検時に得られたヒト大脳および脊髄をドライアイス-アセトンにて急速冷凍し, クリオスタットにて切片を作成した。アセトンで5分間固定した後, 1次抗体として抗 VIII 型コラーゲン抗体を用いPAP法(DAKO PAP キット)にて染色した。

## 結果と考察

1) 抗 VIII 型コラーゲンモノクローナル抗体の性質解明。

最終的に3種類の抗 VIII 型コラーゲンモノクローナル抗体を得た。これらの3種類の抗体は HPLC で精製した VIII 型コラーゲンの 50KD-B に反応す

ることが明らかになった。反応するコラーゲンの性質をさらに検索する目的で, 50KD-B を電気泳動し polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane にブロッティングしたのち, 抗体と反応するバンドを切り取ってプロテインシーケンサーにてN末端のアミノ酸配列を分析したところ, 1989年に Yamaguchi らが報告した  $\alpha 1$  (VIII) 鎖の cDNA より類推されるアミノ酸配列の COL1 のN末端と一致した。この結果より, われわれのモノクローナル抗体は VIII 型コラーゲンの  $\alpha 1$  鎖に対する抗体であることが明らかになった。

## 2) VIII 型コラーゲン分子の構造

VIII 型コラーゲン分子の構造を明らかにする目的でデスメ膜, 培養角膜内皮細胞の細胞層及び培養液より得られた種々のサンプルを, 抗  $\alpha 1$  (VIII) コラーゲン抗体を用いた Westernblotting 法にて検索したところ, 64kDaから50kDaの間に3-4本のバンドが認められ, 同じサンプルをペプシン消化して電気泳動すると50kDaのバンドのみが認められた。従ってこれらの結果よりペプシン抵抗性の三重らせん構造をしている部分は約50kDaであり, 三重らせん構造をしていない非コラーゲン性部分も含めた intact の VIII 型コラーゲンの  $\alpha 1$  鎖は64kDaのバンドであると考えられる。

3) 免疫組織化学を用いた VIII 型コラーゲンの神経組織内分布。

抗 VIII 型コラーゲン抗体を用いてヒトの中枢神経組織をPAP法にて染色した。脊髄においては図1において示すように, 髄膜, グリア細胞, グリア線維および動脈壁に反応が認められた。また大脳においてもグリア細胞が染色され, VIII 型コラーゲンは グリア線維の構成成分の一つではないかと考えられる。今後この抗体を用いて中枢神経系の発達と障害へのコラーゲンの関与を明らかにしたい。

図1 抗 VIII 型コラーゲン抗体によるヒト脊髄灰白質の PAP 法による染色像 (×200)。グリア細胞, グリア線維および血管に反応が認められる。



Recklinghausen 病腫瘍由来培養線維芽細胞に見いだされた phosphodiesterase I の活性増大

丸山悦子, 来田裕美, 高嶋幸男

Recklinghausen 病は腫瘍の形成を特徴とする優性遺伝病であり, 患者は癌になりやすい。

我々はこれまで, まず患者の細胞に異常な蛋白や酵素が発現していないかどうかを検索し, 本症の遺伝子レベルへの研究の手がかりを得ることをめざしてきた。その結果, 患者腫瘍由来培養線維芽細胞は極めて phosphodiesterase I 活性が高いことを見いだした。

方法

正常人皮膚, 患者皮膚正常部, 皮膚腫瘍部由来線維芽細胞を培養。ほぼ confluent になった時点で細胞を集め, Lelievre ら<sup>1)</sup>の低張処理法によって膜分画を得た。酵素活性は Remacle ら<sup>2)</sup>の方法に従い thymidine 5'-monosphate nitrophenylester を基質とし, 2 mM ZnCl<sub>2</sub> を添加, pH10.2 で incubation した。膜の marker 酵素 5'-nucleotidase は Skidmore ら<sup>3)</sup>の方法により測定した。

結果

Phosphodiesterase I の活性は正常人で 302 ± 182 nmol/min/mg protein (n=6), 患者No.1 の正常部由来細胞で 154 ± 75.4, 腫瘍部由来細胞で 1492 ± 38.6, 患者No.2 の正常部由来細胞で 164 ± 63.6, 腫瘍部由来では 1479 ± 375, 患者No.3 の正常部由来細胞で 379 ± 48.2, 腫瘍由来で 711 ± 158 とすべて腫瘍部由来細胞で高かった (図1)。患者正常部由来は対照と変わらなかった。

Kinetics により解析した結果, 腫瘍由来細胞は正常部由来に比べ, V max が 22.5 倍, 13.4 倍と高いことがわかった (図2)。なお膜の marker 酵素 5'-nucleotidase はこれらの細胞で変化はなかった。

考察

この増大について 2 例の腫瘍細胞を用いて本酵素の Recklinghausen 病腫瘍由来培養線維芽細胞はこれまでに形態学的には細胞が大きいことや増殖能が劣っていることが知られている。また, 丸山らは低調処理可溶性画分に 42kD 蛋白の欠失があることを明らかにした<sup>4)</sup>。更に本研究によって, 腫瘍由来線維芽細胞の細胞膜に存在する phosphodiesterase I 活性が非常に高いことを見いだされ, それは V max の上昇によることが判明した。本酵素活性を制御する因子はどのようなものか, 本症は phosphodiesterase I の機能とどのように関連しているのか今後, 抗体作成, 酵素精製等の研究を進め本態解明のための展開をする必要がある。

文献

- 1) L. Lelievre et al. Biochim. Biophys. Acta. 291 : 662-670, 1973
- 2) J. Skidmore et al. Biochim. Biophys. Acta. 219 : 93-103, 1973
- 3) J. A. Remacle et al. Biochim. Biophys. Acta. 630 : 57-70, 1980
- 4) E. Maruyama et al. Exp. Cell Biol. 56 : 153-158, 1988

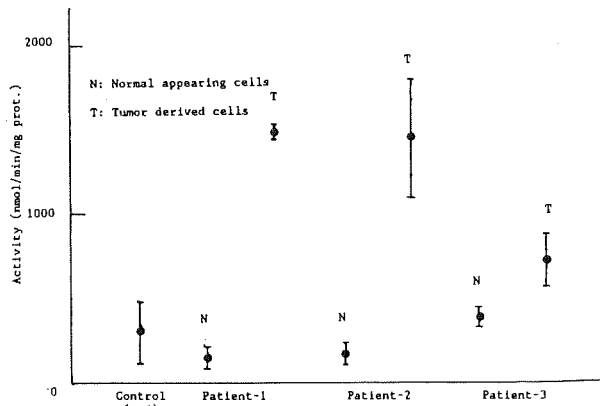


図1 Recklinghausen 病腫瘍由来細胞の phosphodiesterase I 活性の増大

	Km (nM)	Vmax (nmol/min/mg prot.)	r	
Control-1	0.32	152	0.999	
Control-2	2.01	252	0.987	
Patient-1	Normal appearing cells	0.51	127	0.994
	Tumor derived cells	1.24	2857	0.992
Patient-2	Normal appearing cells	0.80	342	0.952
	Tumor derived cells	1.20	4587	0.983

図2 正常人, 患者正常部, 腫瘍部由来細胞 phosphodiesterase I の kinetics

## ペルオキシソーム関連酵素のヒト脳における免疫組織化学的検討—正常発達と脳形成異常

宝道定孝, 来田裕美, 高嶋幸男, 鈴木康之

ペルオキシソーム (Po) の先天代謝異常は細胞内小器官の機能に異常を来し、脳の形成や髄鞘化に障害を生じることが知られている。しかし、ペルオキシソームについての研究は、主に肝臓および腎臓で研究されており、ヒト脳での研究は数少ない。そこで、今回ペルオキシソーム  $\beta$ 酸化系の初発酵素である acyl-CoA oxidase と、そこで生成された過酸化水素を分解する catalase について、ヒト正常脳における発達と Zellweger 症候群の脳を用いて免疫組織化学的に検討した。

## 対象と方法

在胎17週の胎児から32才の成人までの15例を正常発達の対象とし、さらに Zellweger 症候群でも検討した。陽性対照として、ヒト肝臓、腎臓を用いた。方法は、パラフィン包埋切片を用い、PAP法により、大脳前頭葉、視床・基底核、小脳の神経細胞およびグリア細胞について、免疫組織化学的に検討した。Poの指標として、acyl-CoA oxidase 抗体 (AOX) と anti-human catalase 抗体 (CT) を使用した。

## 結果

AOX および CT により、神経細胞およびグリア細胞の胞体は一様に染色された。

## 1. CTによる免疫組織化学染色

表1は、各部位におけるカタラーゼ陽性神経細胞の発達の変化を示す。大脳前頭葉の神経細胞は、在胎35-36週より陽性となり、視床および基底核では、在胎27-28週で大型の神経細胞のみ陽性となった。在胎31-32週以降には小型の神経細胞も陽性となった。また、小脳歯状核神経細胞およびプルキンエ細胞は、在胎27-28週以降に陽性を示した。同様にして、グリア細胞の発達をみると、大脳では、在胎31-32週頃より深部白質でも、CT陽性グリアを認めるようになった。小脳でも、在胎31-32週頃よりCT陽性グリアを認めるようになった。小脳でも、在胎31-32週頃よりCT陽性グリアがみられた。

## 2. AOX抗体による免疫組織化学染色

各部位における AOX 陽性神経細胞の発達の変化は、CTと比較し、視床において、やや出現が遅れる傾向がみられたが、ほぼ同様の結果であった。大脳および小脳の白質における AOX 陽性グリアの発達の変化は、CTと同様の傾向を示した。

3. Zellweger 症候群における CT および AOX 抗体による免疫組織化学。

Zellweger 症候群の肝臓では、肝細胞の胞体は、

正常の肝細胞のように顆粒状に染まらず、細胞質が一様に染まった。生後3カ月の症例では、CT染色により内包のグリア細胞のみ陽性を示した。表層のグリアおよび神経細胞は、陰性であった。

## 考察

今回の結果より、CT および AOX 抗体で示した Po は、正常脳において、神経細胞では、深部灰白質より神経細胞の成熟に伴って、発達してくることが判った。また、Po は、神経細胞胞体の成熟と成熟後は神経突起の発達やシナプス形成に関連していることも示唆された。グリア細胞での Po の発達の変化は、ミエリン形成グリアの発達の変化と一致しており、Po は、白質の髄鞘化と密接な関係をもつことが判った。

Po の先天代謝異常症である Zellweger 症候群では、髄鞘形成不全と大脳皮質の細胞移動障害などが知られている。カタラーゼは、Po のに取りこまれてはじめて機能するため、今回の Zellweger 症候群でみられたカタラーゼ陽性グリアも、カタラーゼ自体は胞体内に存在するが、Po のとしての機能を十分に発揮できないために髄鞘形成が遅れると考えられる。

Developmental changes of catalase immunoreactivity in neurons of the human brain

	Cerebrum				Cerebellum	
	F. S	Thal. L	Put. S	G.P. L	D.N.	Pur.
17-20GW	-	-	-	-	-	-
23-24GW	-	-	-	-	-	-
27-28GW	-	-	+	-	+	+
31-32GW	-	+	+	+	+	+
35-36GW	+	+	+	+	+	+
39-40GW	+	+	+	+	+	+
3M	+	+	+	+	+	+
2Y	+	+	+	+	+	+
19-32Y	+	+	+	+	+	+

GW, gestational weeks; M, months; Y, years; +, positive; F, frontal; Thal, thalamus; Put, putamen; GP, globus pallidus; DN, dentate nucleus; Pur, purkinje cells -, negative; S, small neurons; L, large neurons

Partial asphyxia 中の脳循環および代謝の経時的な変動

長谷川元宏, 宝道定孝, 高嶋幸男

周産期脳障害の病態を解明するために脳循環動態および脳代謝の変動を探ることは重要である。今回は窒素ガスあるいは炭酸ガスの長期負荷による partial asphyxia 中の脳組織 pH, 酸素化, 酸化チトクローム, CBV および CBF の変化を経時的に観察した。

対象および方法

31羽の生後2週間の JW 系家兎をエーテル麻酔後, 臭化パンクロニウム静注で筋弛緩させ, 人工換気下に, 炭酸ガスあるいは窒素ガスを用いた10%O<sub>2</sub>の低酸素を家兎が死亡するまで, あるいは5時間負荷した。組織 pH メーターおよび交叉熱電対式組織血流系を装着して, 脳組織 pH および血流量を測定した。また, 近赤外線分光測定装置 (NIRS) を用い脳内総酸化, 還元 Hb および酸化チトクローム a, a<sub>3</sub> (CytO<sub>2</sub>) を測定した。同時に血圧, 心拍数, 血液ガスをモニターした。

結果

(1) 窒素ガス負荷 (図上)

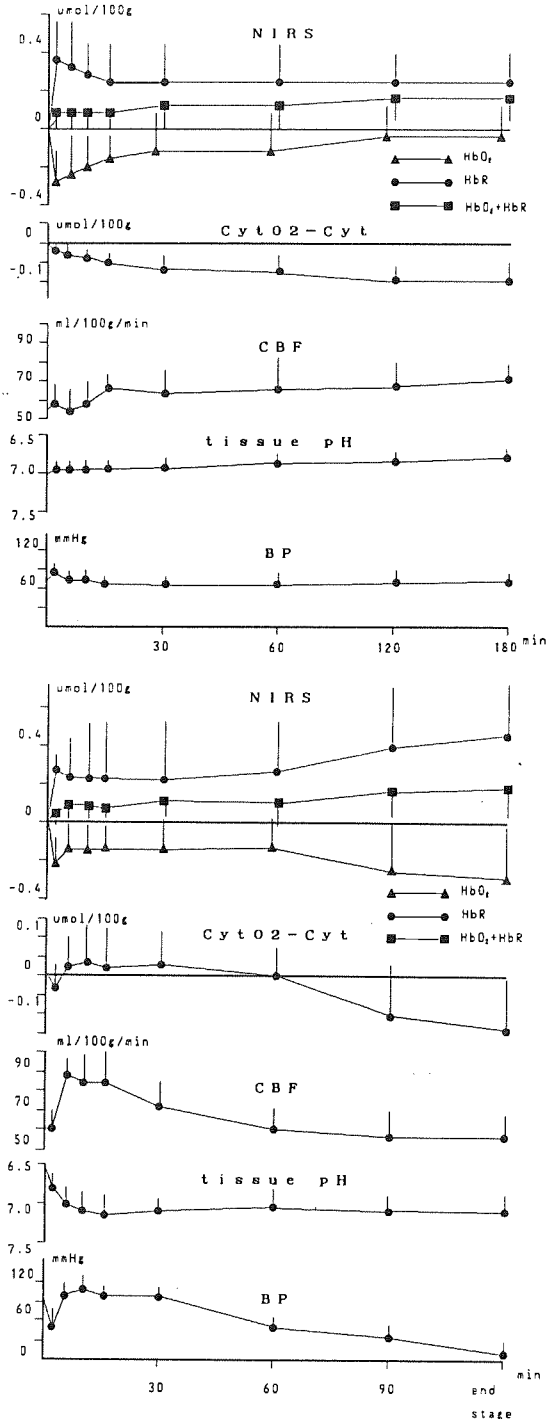
NIRS によって負荷初期に脳内還元 Hb の増加および酸化 Hb の減少と総 Hb の増加が認められ, その後それらはほぼ一定に保たれた。CytO<sub>2</sub> は, 負荷中徐々に減少した。CBF は, 負荷中軽度であるが徐々に増加した。血圧は初期に一過性の上昇を認めしたが, その後負荷前の値に戻り安定した。脳組織 pH は負荷中極く軽度の上昇を認めた。

(2) 炭酸ガス負荷 (図下)

負荷初期に NIRS では脳内還元 Hb の増加および酸化 Hb の減少と総 Hb の増加を示し, その後変化は軽度になって一定した。CBF は急速に上昇の後, 徐々に減少した。CytO<sub>2</sub> は, 一過性の減少の後, CBF とほぼ平行した。血圧の変化も CBF とほぼ平行していた。脳組織 pH は初期に著明に低下した後, わずかに上昇をした。負荷終末期 (死亡前) において, NIRS で脳内酸化 Hb と CytO<sub>2</sub> の減少および還元, 総 Hb の増加は著明であった。しかし CBF および脳組織 pH の変動はほとんどみられなかった。

考察

窒素ガスと炭酸ガス負荷では脳循環および代謝の経時的な反応に差を認めることにより, 低酸素性脳障害の病態を解明するには原因とその作用時間を考慮にいなければならない。また NIRS は種々の低酸素負荷にたいし鋭敏に反応し, かつ non invasive な検査法であり, 臨床的に低酸素性脳障害をモニターするのに有用な方法である。



### 3. 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，躁うつ病）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，厚生省精神神経疾患委託研究の精神分裂病および躁うつ病研究班，臨床時間生物学研究会，躁うつ病の薬理生化学的研究懇話会などの事務局として，内因性精神病的全国的な研究活動を補佐した。また，サーカディアンリズム異常が病因として考えられている季節性感情障害の全国実態調査を行い，高照度光による特殊療法の臨床的有用性を明らかにし，その基礎的背景に関する研究を行うための全国多施設共同研究を統括した。

本年度から武内ゆかりが流動研究員として，加藤由紀子，白山幸彦，橋本篤司，滝田正寿が研究生として新たに参加した。この他黒田安計（流動研究員），高嶋瑞夫，海野麻未，山本秀子（賃金研究員），篠原一之，谷井靖之，加賀谷有行，加藤文代（研究生）らが常勤研究員として研究に従事した。

本年度の主要研究テーマとその成果は以下の通りである。

#### I. 精神分裂病の薬理生化学的研究

- 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，NMDA 受容体アゴニストがフェンサイクリジンによる異常行動と生化学的変化の発現を阻止する事実を明らかにし，新たな精神分裂病治療薬開発の可能性を示唆した。
- ii) TCP, NMDA, Glycine の脳内特異的結合部位の生後発達のパターンを明らかにした。

#### II. 躁うつ病の薬理生化学的研究

- i) 細胞内遊離カルシウム濃度の変化を指標として，セロトナージック受容体とアドレナージック受容体との相互作用を解析すると同時に，躁うつ病の血小板を用いてセロトニン受容体の機能昂進がみられることを観察した。
- ii) mCPP (5-HT 1c agonist/2 antagonist) を用いてコルチコイド分泌反応を観察し，コルチコイド分泌機構にセロトニン 1c 受容体が発与していることを明らかにした。

#### III. サーカディアンリズムの生理生化学的研究

- i) 幼若ラットのリズムがメラトニン投与により同調されること，投与時刻により位相変化に差があることを明らかにした。
- ii) 臨床的にリズムの同調効果の認められるビタミンB12にアセチルコリン合成促進効果があることを示唆した。

(部長 高橋清久)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Ikeda M, Mikuni M, Nishikawa T, Takahashi K:  
A neurochemical study of a new mutant mouse presenting myoclonus-like involuntary movement: a possible model of spontaneous serotonergic hyperactivity  
Brain Res 495:337-348, 1989
- 2) Ohi K, Mikuni M, Takahashi K:  
Stress adaptation and hypersensitivity in 5-HT neuronal systems after repeated foot shock  
Pharmacol Biochem & Behav 34 : 603-608, 1989
- 3) Kusumi I, Mikuni M, Kuroda Y, Takahashi K:  
Subchronic administration of para-chlorophenylalanine enhances serotonin-stimulated phosphoinositide hydrolysis in rat hippocampal slices  
J Neural Transm 80:181-188, 1990
- 4) Yoshida Y, Nishikawa T, Tanii Y, Takahashi K:  
Frontal decortication decreases the affinity of N-(1-[2-thienyl]cyclohexyl) [<sup>3</sup>H]piperidine binding to rat striatum  
Brain Res 499:79-83, 1989
- 5) Shinohara K, Nishikawa T, Ishii S, Yamazaki K, Takahashi K:  
Embryonic and postnatal development of N-(1-[2-thienyl]cyclohexyl) [<sup>3</sup>H]piperidine binding sites in rat forebrain homogenates and slices  
Neurosci Let, 107:307-312, 1989
- 6) Shinohara K, Nishikawa T, Yamazaki K, Takahashi K:  
Ontogeny of strychnine-insensitive [<sup>3</sup>H]glycine binding sites in rat forebrain  
Neurosci Let, 105:307-311, 1989
- 7) Tanii Y, Nishikawa T, Umino A, Takahashi K:  
Phencyclidine increases extracellular dopamine metabolites in rat medial frontal cortex as measured by in vivo dialysis  
Neurosci Let, 112:318-323, 1990
- 8) Ookawa M, Mishima K, Nanami T, Shimizu T, Iijima S, Hishikawa Y, Takahashi K:

Vitamin B12 Treatment for Sleep-Wake Rhythm Disorders

Sleep 13(1):15-23, 1990

9) 杉下真理子, 樋口輝彦, 高橋清久 :

わが国における季節性感情障害の実態調査と光療法

精神科治療学, 5(3):333-343, 1990

b. 著 書

(編書)

1) 高橋三郎, 高橋清久, 本間研一 :

臨床時間生物学, 朝倉書店, 東京, 1990

(分担)

1) 高橋清久 :

うつ病と生体リズム

精神医学体系, 中山書店, 東京, p23-40, 1989

2) 高橋清久 :

時間生物学—特にうつ病との関連について

躁うつ病の薬理生化学 [ I ]

躁うつ病の薬理生化学的研究懇話会編 : 高橋清久, 樋口輝彦, 加藤進昌, 三国雅彦編

金剛出版, 東京, p141-156, 1989

3) 高橋清久, 高嶋瑞夫, 杉下真理子 :

時計の周期や位相を変えるもの

高橋三郎, 高橋清久, 本間研一編, 時間臨床生物学,

朝倉書店, 東京, P 42-48, 1990

4) 三国雅彦 :

うつ病のアミン仮説に関する研究の動向 —問題の所在—

躁うつ病の薬理生化学 [ I ]

躁うつ病の薬理生化学的研究懇話会編 : 高橋清久, 樋口輝彦, 加藤進昌, 三国雅彦編

金剛出版, 東京, p157-166, 1989

c. 総 説

1) Takahashi K, Ohi K, Yamada N, Shioiri T :

Environmental factors can affect the circadian system in rats



## II 研究業績

Circadian Clocks and Ecology, Eds:Hiroshige T, Honma K:Hokkaido Univ Press, p85-92, 1989

- 2) Takahashi K, Ohi K, Shimoda K, Tamada N, Hayashi S:

Postnatal maternal entrainment of circadian rhythms

Research in Perinatal Medicine, Ed:Reppert S. M: Perinatology Press, 4:p67-82, 1989

- 3) 高橋清久 :

うつ病の時間生物学—特に季節性感情障害（冬季うつ病）をめぐる—

精神科診断学, 1(2):255-267, 1990

- 4) 西川徹 :

幻覚薬—脳内結合部位をめぐる—

神経精神薬理, 11(6):445-462, 1989

- 5) 西川徹 :

精神分裂病の新しい治療薬の可能性

精神科治療学 5(2):182-202, 1990

### d. 班会議報告書

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

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, 昭和63年度研究報告書, p103-112, 1990

- 2) 三国雅彦, 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の影響

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, 昭和63年度研究報告書, p59-66, 1989

- 3) Takahashi K, Higuchi T, Sugishita M:

National survey of seasonal affective disorders and phototherapy in Japan

文部省科学研究費（総合研究）時計機構の障害と関連した精神疾患の発現機構とその治療班

Jpn J Psychiat Neurol, 44:172-173, 1990

- 4) Yamazaki J, Higuchi T, Moriya Y, Sugishita M, Ohshima H, Yamazaki O, Yamauchi T,

Takashima M, Takahashi K:

The comparison between the suppressive effects on nocturnal melatonin secretion with

$\beta$ -blocker, atenolol, and by bright artificial light in healthy subjects

文部省科学研究費（総合研究）時計機構の障害と関連した精神疾患の発現機構とその治療班

Jpn J Psychiat Neurol, 44:163-164, 1990

- 5) Yamamoto H, Kagaya A, Kuroda Y, Mikuni M, Takahashi K:

Effect of antidepressants on the GTP binding sites in rat brain homogenate

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の研究班,

Jpn J Psychiat Neurol, 44:133-134, 1990

- 6) Kagaya A, Mikuni M, Yamamoto H, Kuroda Y, Takahashi K:

Ca<sup>++</sup> mobilization mediated by monoamine receptors in human platelets

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の研究班

Jpn J Psychiat Neurol, 44:139-140, 1990

- 7) Mitsushio H, Takashima M :

Effect of acute and chronic antidepressant treatment on substance P content in rat Brain

文部省科学研究費（総合研究A）神経伝達・細胞情報伝達系からみた感情障害の研究班,

Jpn J Psychiat Neurol, 44:146-147, 1990

- 8) 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, 熱性けいれん患者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, バゾプレッシン,  $\gamma$ -アミノ酪酸の変化

厚生省精神・神経疾患, 難治性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, p35-40, 1989

e. その他

- 1) 西川徹, 海野麻未, 谷井靖之, 高橋清久 :

Phencyclidine 投与後にみられるラット前頭葉皮質の dopamine 伝達促進及び異常行動における N-methyl-D-aspartate 受容体の関与

精神薬療基金研究年報 21:290-294, 1989

- 2) 竹内潤一, 西川徹, 融道男 :

治療困難な抗精神病薬の副作用の発現機序に関する研究

精神薬療基金研究年報 21:290-294, 1989

- 3) Ichikawa H, Satou T, Takahashi K:

Sleep-waking rhythm disorders observed in five school refusers

## II 研究業績

Jpn J Psychiat Neurol, 44:188, 1990

- 4) Moriya Y, Yamazaki J, Higuchi T, Yamauchi T, Takahashi K:

A case of non-24-hour sleep-wake syndrome

Jpn J Psychiat Neurol, 44:197-198, 1990

- 5) Ookawa M, Mishima K, Hishikawa Y, Hozumi S, Hori H, Takahashi K:

The effect of phototherapy on sleep-waking and melatonin-secretion rhythm in aged patients with dementia

Jpn J Psychiat Neurol, 44:197-198, 1990

## B. 学会発表

### a. 特別講演, シンポジウム

- 1) 高橋清久 :

脊椎動物のサーカディアンリズム—臨床的応用面を含めて—

脳のシンポジウム, 長崎, 3.15, 1989

- 2) Nishikawa T, Tanii Y, Umino A, Hata N, Suga I, Kobayashi T, Takahashi K, Touru M:

Excitatory amino acidergic dysfunction and schizophrenia

American Society for Neurochemistry 21st Anniversary Meeting, Phoenix, March 8, 1990

- 3) 加賀谷有行, 三国雅彦, 山本秀子, 黒田安計, 西川徹, 高橋清久 :

シンポジウム [レセプター]

うつ病におけるモノアミン受容体機能とその基礎的検討: ヒト血小板内  $Ca^{++}$  動員と pH について

第12回日本生物学的精神医学会, 大津, 3.29, 1990

- 4) 山崎潤, 樋口輝彦, 守屋雪夫, 杉下真理子, 磯島玄, 大島浩伸, 山崎浩, 山内俊雄, 高嶋瑞夫,

高橋清久 :

健常者を対象とした  $\beta$  ブロッカー (アテノール) と高照度光のメラトニン分泌抑制効果の比較

第12回日本生物学的精神医学会 (シンポジウム 季節性感覚障害と臨床時間生物学), 大津,

3.30, 1990

- 5) 大川匡子, 三島和夫, 清水徹夫, 菱川泰夫, 穂積慧, 堀浩, 高橋清久 :

睡眠・覚醒リズム障害に対するビタミンB<sub>12</sub> の応用

第12回日本生物学的精神医学会 (シンポジウム 季節性感覚障害と臨床時間生物学), 大津,

3.30, 1990

## b. 国際学会

- 1) Mikuni M, Kusumi I, Kagaya A, Yamamoto H, Kuroda Y, Nishikawa T, Takahashi K:  
Responsiveness of serotonin-stimulated phosphoinositide hydrolysis is increased in platelets from unmedicated depressed patients  
19th Annual Meeting of Society for Neuroscience Phoenix, Nov 1, 1989
- 2) Kagaya A, Mikuni M, Yamamoto H, Kuroda Y, Takahashi K:  
Ca<sup>++</sup> mobilization mediated by 5-HT receptors in fura-2-loaded human platelets  
19th Annual Meeting of Society for Neuroscience Phoenix, Oct 30, 1989
- 3) Yamamoto H, Mikuni M, Kagaya A, Kuroda Y, Takahashi K:  
Antidepressants may directly affect GTP binding sites in vitro  
19th Annual Meeting of Society for Neuroscience Phoenix, Oct 30, 1989
- 4) Takita M, Mikuni M, Takahashi K:  
Pharmacological profile of brain glucose utilization obtained by monitoring of lactate release in vivo under the free moving condition  
2nd International Congress of Alzheimer's and Parkinson's Disease, Kyoto, Nov 7, 1989

## c. 一般学会

- 1) 飯田英晴, 定松美幸, 加藤進昌, 橋田誠一, 石川栄治, 高橋清久:  
健全成人における24時間血中成長ホルモンとプロラクチンの分泌リズムと睡眠覚醒リズムの相関について  
第14回日本睡眠学会, 東京, 6. 16, 1989
- 2) 篠原一之, 西川徹, 石井澄和, 高橋清久:  
N-(1-[2-thienyl]cyclohexyl)[<sup>3</sup>H]piperidine 結合部位のラット脳における発達  
第32回日本神経化学会, 札幌, 9. 27, 1989
- 3) 黒田安計, 三国雅彦, 久住一郎, 山本秀子, 加賀谷有行, 高橋清久:  
ラット海馬におけるセロトニン1c受容体の薬理生化学的検討  
第32回日本神経化学会, 札幌, 9. 28, 1989
- 4) 山本秀子, 加賀谷有行, 黒田安計, 三国雅彦, 高橋清久:  
抗うつ薬のラット脳内 GTP 結合部位に及ぼす影響  
第32回日本神経化学会, 札幌, 9. 28, 1989
- 5) 加賀谷有行, 三国雅彦, 久住一郎, 山本秀子, 黒田安計, 高橋清久:

## II 研究業績

- ヒト血小板におけるセロトニン2受容体機能—セロトニンによる脱感作の機序と関連して—  
第32回日本神経化学会, 札幌, 9. 28, 1989
- 6) 山崎潤, 樋口輝彦, 守屋雪夫, 杉下真理子, 磯島玄, 大島浩伸, 山崎浩, 山内俊雄, 高嶋瑞夫, 高橋清久 :  
健康者を対象とした $\beta$ ブロッカー (アテノール) と高照度光のメラトニン分泌抑制効果の比較  
第4回臨床時間生物学研究会, 東京, 9. 28, 1990
- 7) 守屋雪夫, 山崎潤, 樋口輝彦, 山内俊雄, 高橋清久 :  
非24時間睡眠覚醒症候群が疑われ光療法, Vit. B<sub>12</sub>投与を試みた1症例  
第4回臨床時間生物学研究会, 東京, 9. 29, 1990
- 8) 市川宏伸, 高橋清久 :  
不登校患者の生活リズム  
第4回臨床時間生物学研究会, 東京, 9. 29, 1990
- 9) 三ツ汐洋, 高嶋瑞夫, 高橋清久 :  
感情調節作用を持つ薬物の慢性投与後のラット脳内サブスタンスP含量に及ぼす影響  
第32回日本神経化学会, 札幌, 9. 28, 1989
- 10) 篠原一之, 西川徹, 高橋清久 :  
Strychnine 非感受性 glycine 受容体の発達  
第13回神経科学学術集会, 新潟, 10. 3, 1989
- 11) 綱島浩一, 増井晃, 加藤進昌, 高橋清久 :  
モノアミンによる体温変化に及ぼすデルタ睡眠誘発ペプチド (DSIP) の影響  
第19回日本神経精神薬理学会, 福岡, 10. 24, 1989
- 12) 谷井靖之, 西川徹, 海野麻未, 高橋清久 :  
ラット前頭葉皮質ドーパミンに対する phencyclidine の作用—microdialysis 法による検討—  
第19回日本神経精神薬理学会, 福岡, 10. 25, 1989
- 13) 加賀谷有行, 三国雅彦, 山本秀子, 黒田安計, 高橋清久 :  
モノアミン受容体を介するヒト血小板内Ca<sup>++</sup>動員について  
第19回日本神経精神薬理学会, 福岡, 10. 25, 1989
- 14) 綱島浩一, 加藤進昌, 高橋清久, 増井晃 :  
セロトニン受容体刺激による体温変化とDSIP  
睡眠促進物質研究会, 岡崎, 2. 2, 1990

- 15) 滝田正寿, 三国雅彦, 高橋清久 :  
On-line brain microdialysis 法を用いた脳内糖代謝系の薬理的検討  
第62回日本薬理学会, 東京, 3. 28, 1990
- 16) 加藤文代, 三国雅彦, 黒田安計, 高橋清久 :  
ラット血中コルチコステロンの分泌調節に及ぼすセロトニン<sub>1c</sub>受容体の役割と抗うつ薬亜急性投与の影響  
第12回日本生物学的精神医学会, 大津, 3. 29, 1990
- 17) 加沢鉄士, 三国雅彦, 樋口輝彦, 山内俊雄, 高橋清久 :  
ラットの大脳皮質の D-2 ドパミン受容体に対するハロペリドール慢性投与の影響について  
第12回日本生物学的精神医学会, 大津, 3. 30, 1990
- 18) 谷井靖之, 西川徹, 橋本篤司, 日比野英彦, 高橋清久 :  
Phencyclidine によって出現する異常行動と N-methyl-D-aspartate 受容体アロステリック調節部位との関連性について  
第12回日本生物学精神的医学会, 大津, 3. 30, 1990
- 19) 滝田正寿, 三国雅彦, 黒田安計, 高橋清久 :  
拘束ストレスによるラット脳内糖代謝系の変動—On-line brain microdialysis 法を用いて—  
第12回日本生物学的精神医学会, 大津, 3. 30, 1990
- 20) 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12回日本生物学的精神医学会, 大津, 3. 30, 1990
- 21) 塩入俊樹, 大門一司, 山田直登, 高嶋瑞夫, 辻本哲士, 北村隆行, 花田耕一, 高橋清久, 高橋三郎 :  
盲目ラットにおける飼育環境による活動リズム周期の差異と脳内アミンの関係  
第12回日本生物学的精神医学会, 大津, 3. 30, 1990

### C. 班会議発表

- 1) 三国雅彦, 加賀谷有行, 黒田安計, 山本秀子, 加藤文代, 滝田正寿, 高橋清久 :  
うつ病におけるセロトニン<sub>2</sub>受容体ファミリーの機能に関する研究  
—うつ病血血小板 Ca イオン濃度の検討ならびにラット血中コルチコステロン濃度に対する反復拘束ストレスや抗うつ薬慢性投与の影響—  
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. 3, 1990

## II 研究業績

2) 西川徹, 谷井靖之, 海野麻未, 橋本篤司, 高橋清久 :

フェンシクリンジ投与動物を用いた精神分裂病症状の発現機序と新しい治療薬開発に関する研究  
厚生省精神・神経疾患・精神分裂病の生物学病因および発症に関する研究班, 東京, 2, 2, 1990

3) 山崎潤, 樋口輝彦, 守屋幸夫, 杉下真理子, 磯島玄, 大島浩伸, 山崎浩, 山内俊雄, 高嶋瑞夫, 高橋清久 :

そううつ病における夜間メラトニン分泌に及ぼす光の影響について

—健常者を対象とした予備的検討—

厚生省精神・神経疾患・そううつ病の発生機序に関する生物学的研究班, 東京, 2, 3, 1990

### 3. 主な研究報告

#### Phencyclidine によって出現する異常行動に対する N-methyl-D-aspartate 受容体アロステリック作動薬の効果

谷井靖之, 西川徹, 橋本篤司, 高橋清久

Phencyclidine (PCP) はヒトに精神分裂病様症状を発現させる。PCP は興奮性アミノ酸受容体のサブタイプである, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を非競動的に遮断する所見が得られているため, 抗 PCP 作用を示す薬物が分裂病様症状を改善する可能性が考えられる。一方 NMDA 受容体は strychnine 非感受性 glycine 結合部位を持ち, その作動薬は PCP 類の薬物とは反対に NMDA 受容体の機能を促進することが明らかになっている。そこで PCP による行動の変化に対する NMDA 受容体アロステリック作動薬の効果を調べた。

#### 方法

実験には Wistar 系雄性ラット (体重200-250g) を用いた。PCP は生理食塩水に溶解し, N-myristoyl-D-serine (NMD-Ser) は0.1% Tween 80に懸濁し, 共に腹腔内に投与した。D-Serine (D-Ser) および 7-Cl-kynurenic acid (7-Cl-KYNA) は燐酸緩衝液/生理食塩水 (PBS pH7.4) に溶解し, 脳室内に投与した。脳室内への薬物の注入は無麻酔の動物を手で拘束し, 実験の5-7日前に装着しておいたガイドカニューラ (24G) からハミルトンシリンジに連結した注入針 (30G) を挿入して行った (側脳室: AP-0.8mm, V+2.0mm, L+1.5mm (Paxinos-Watson の図譜))。薬物は, 注入針を挿入1分後より 5  $\mu$ l を4分かけて注入した。薬物投与開始10分後に PCP を腹腔内投与し, その10分後より20分毎に Sturgeon らの尺度を改変した6段階スコアに従って評価した。

#### 結果

##### PCP 投与後に発現する異常行動に対する D-Ser および NMD-Ser の影響

D-Ser (脳室内注入) 又は NMD-Ser (腹腔内注射) を PCP 投与10分前に投与したラットでは, PCP (10.0mg/kg, i. p.) によって引き起こされる常同行動が用量依存的に有意に減少した。D-Ser 又は NMD-Ser 単独投与では, これらの異常行動は出現しなかった。また D-Ser と myristic acid を腹腔内に投与しても PCP による異常行動の改善は得られなかった。

##### PCP による異常行動に対する NMD-Ser と 7-Cl-KYNA の併用投与に影響

NMD-Ser (200mg/kg, i. p.) と同時に 7-Cl-KYNA (10.0  $\mu$ g/side) を脳室内に注入した動物では, NMD-Ser 前処置群とは異なって, PCP による

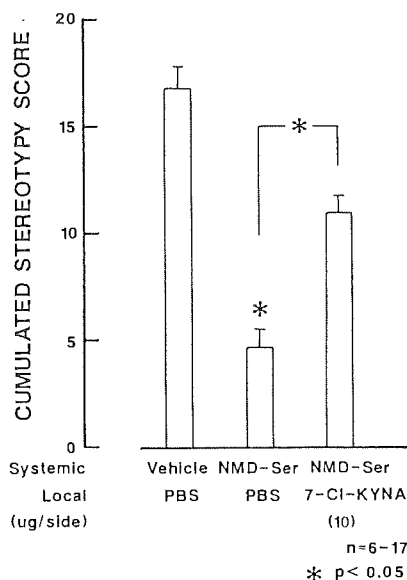
常同行動の抑制効果は認められなかった。7-Cl-KYNA 単独投与群では, 異常行動の発現は認められなかった (図1)。

#### 考察

PCP による常同行動の発現は D-Ser 又は NMD-Ser を前投与することによって有意に減少した。①NMD-Ser は血液脳関門の透過性が高いを考慮されること, ② NMDA 受容体のアロステリック作動薬である D-Ser を脳室内に投与すると抗 PCP 作用を示すが D-Ser と myristic acid を腹腔内に投与しても無効であること, ③ NMDA 受容体のアロステリック拮抗薬 7-Cl-KYNA を脳室内に注入することによりこの異常行動抑制作用が発揮されなくなるなどから, NMD-Ser は脳内で D-Ser と myristic acid に代謝され前者が NMDA 受容体のアロステリック調節部位に作用することによって, 抗 PCP 作用を示すと推測された。

##### (図1) NMD-Ser 及び7-Cl-KYNA 投与後の PCP による常同行動の変化

PCP (10mg/kg, i. p.) 投与10分前に0.1% Tween 80 (Vehicle) または NMD-Ser を腹腔内 (Systemic) 投与し, 同時に溶媒 (PBS) あるいは 7-Cl-KYNA を脳室内 (Local) に注入した。行動評価は PCP 投与10分後より90分後まで20分毎に行い, それぞれの常同行動スコアを合計したものを比較した。





ラット海馬 5HT<sub>1c</sub> 受容体結合と 5HT<sub>1c</sub> 受容体を介したラット血中コルチコステロン反応

黒田安計, 加藤文代, 滝田正寿, 三国雅彦, 高橋清久

脳室内脈絡叢に局限して存在すると考えられていたセロトニン<sub>1c</sub>受容体は、近年の mRNA レベルにおける研究により脳内で広汎に分布する可能性が明らかにされ、またセロトニン<sub>1c</sub>受容体を介した行動並びに神経内分泌機能が次第に明らかにされてきている。しかし、脈絡叢以外の脳部位における 5HT<sub>1c</sub>受容体部位は報告されていない。

今回我々はラットの海馬膜標本を用いて 5HT<sub>1c</sub>受容体の結合実験を行い、さらに 5HT<sub>1c</sub>受容体を介した内分泌機能として mCPP (m-chlorophenylpiperazine) を用いたラット血中コルチコステロン反応について実験を行い、この反応に対する抗うつ薬処置の効果を検討した。

材料・方法

受容体結合実験においては、SD 系雄性ラットを用い、<sup>3</sup>H]-mesulergine 結合を 300nM の spiperone 依存下、非存在下で行った。コルチコステロン反応実験においては SD 系雄性ラットを用い、spiperone (3.0mg/kg), mianserin (3.0mg/kg), (-)propranolol (20mg/kg) の受容体拮抗薬を mCPP それぞれ刺激60分前、ketanserin (1.0mg/kg), ritanserin (1.0mg/kg) をそれぞれ mCPP 刺激30分前にラット腹腔内注射を行い、13:00 に mCPP (3.0mg) を投与しその後60分後に断尾により採血し RIA により血中コルチコステロンを測定した。抗うつ薬はイミプラミン、デシプラミン、クロミプラミンをそれぞれ食餌に混ぜ14日間投与した後に mCPP 負荷テストを行った。

結果と考察

<sup>3</sup>H] mesulergine について Scatchard 解析を行ったところ、5HT<sub>2</sub>および5HT<sub>1c</sub>の両方を標識すると考えられる。spiperone 非存在下では Kd 1.26 ± 0.12nM, Bmax 111.2 ± 8.5fmol/mg protein を示し、300nM の spiperone 添加によって 5HT<sub>2</sub>をマスクした状態では Kd 1.17 ± 0.11nM, Bmax 50.4 ± 1.9fmol/mg protein を示した。このことから、海馬においては 5HT<sub>2</sub>と同様に 5HT<sub>1c</sub>受容体の存在が確認された。

セロトニン<sub>1c</sub>受容体作動薬である mCPP によって、ラット血中コルチコステロンは対照に比し約17倍の上昇を示し、この上昇は 5HT<sub>1c</sub>/2受容体阻害薬である mianserin, ritanserin ではほぼ完全に抑制がみられたが、5HT<sub>2</sub>受容体阻害薬である ketanserin, 5HT<sub>1A</sub>/2受容体阻害薬 spiperone,

5HT<sub>1A</sub>/1B受容体阻害薬である (-) propranolol では抑制がみられなかった。これらのことより、ラット血中コルチコステロンの上昇には mCPP 刺激によって活性化されるセロトニン<sub>1c</sub>受容体の関与が示唆された。さらに各種抗うつ薬のセロトニン<sub>1c</sub>受容体に及ぼす影響についての予備的な知見として、デシプラミンの亜慢性投与により mCPP 刺激性ラット血中コルチコステロンの上昇が有意に減少し、イミプラミン、クロミプラミンにおいても同様の傾向が見られ、抗うつ薬による 5HT<sub>1c</sub>受容体機能低下の可能性が示唆された。

図1 <sup>3</sup>H-mesulergine 結合の Scatchard 解析 (300nM spiperone の存在下●, 非存在下○)

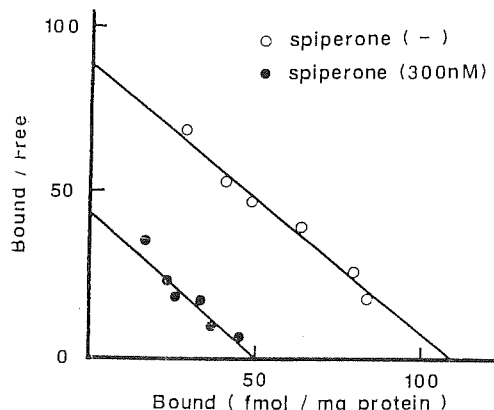
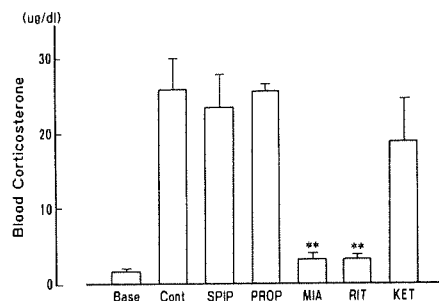


図2 mCPP 刺激性ラット血中コルチコステロン反応に対する各種セロトニン拮抗薬による抑制 Cont; mCPP+vehicle, SPI; mCPP+spiperone, PROP; mCPP+propranolol, MIA; mCPP+mianserin, RIT; mCPP+ritanserin, KET; mCPP+ketanserin. ※※ p<0.01 vs control (N=6)



## ヒト血小板におけるセロトニン受容体機能

加賀谷有行, 山本秀子, 三国雅彦, 高橋清久

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 5HT<sub>2</sub>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於ける 5HT 刺激性イノシトールリン脂質 (P1) 加水分解亢進が 5HT<sub>2</sub>受容体を介することを証明し, I P<sub>1</sub>蓄積がうつ病者で正常者より亢進していることを報告した。そこで今回は, うつ病者の血小板における 5HT 刺激性細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{++}]_i$ ) と 5HT<sub>2</sub>受容体の関連をヒト血小板で検討した。

### 方法

健康成人および, 研究趣旨を理解し, 採血に協力することを書面で同意したうつ病12例 (未投薬) から静脈血を採取した。静脈血は直ちに ACD 入りのプラスチックチューブに移され, 静かに攪拌された。これを室温で400g, 5分間遠心し, platelet rich plasma (PRP) を得た。

PRP に 3  $\mu$ M fura-2/AMを加え37°C, 15分間インキュベートした後, 700g, 10分間遠心し, 得られた沈渣をKrebs-Ringer HEPES 緩衝液 (145mM NaCl, 5mM KCl, 0.5mM Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, 10mM dextrose) に浮遊させた。

この血小板浮遊液をキュベットに入れ, 37°Cに保ちながらスターラーで緩やかに攪拌し, 励起波長340nmと380nm, 蛍光波長510nmで得られる蛍光を分光蛍光光度計で測定し, fura-2の解離定数 Kdは224nMとして  $[Ca^{++}]_i$  を算出した。

### 結果

1. うつ病者群の血小板における10  $\mu$ M 5HT刺激性  $[Ca^{++}]_i$  は非刺激時に比し128.6  $\pm$  4.9nM増加し, 対照群の109.0  $\pm$  5.1nM増加より, 有意 (P < 0.05) に高かった。

(Fig 1)

2. 正常群における10  $\mu$ M 5HT刺激性  $[Ca^{++}]_i$  上昇は108nMだったが, これは10  $\mu$ M 5HT 前処置により完全に消失した。それに対して  $\alpha_2$  アドレナリン受容体刺激剤であるノルエピネフリン (NE) 100  $\mu$ M前処置により10  $\mu$ M 5HT 刺激性  $[Ca^{++}]_i$  上昇は128nMに亢進した。また, この感受性亢進は GTP 結合タンパク質を直接活性化する NaF の前処置により抑制された。(Table 1)

### 考察

うつ病者血小板では正常群に比し 5HT 刺激性  $[Ca^{++}]_i$  上昇が有意に亢進していた。この結果は, 前回の報告にあるうつ病者血小板における I P<sub>1</sub>蓄積亢進と一致して, うつ病における 5HT 受容体機能亢進状態を表していると考えられる。

このような 5HT 受容体機能亢進状態は, 正常者血小板においても  $\alpha_2$  アドレナリン受容体を刺激することにより誘発され, しかも GTP 結合タンパク質を介した反応であることが示唆された。以上のように, うつ病における 5HT<sub>2</sub>受容体機能亢進状態が細胞内情報伝達系の異常に起因する可能性が示唆されたことは, 非常に興味深いことである。

Fig 1 : 10  $\mu$ M 5HT-induced  $[Ca^{++}]_i$  increase in human platelets

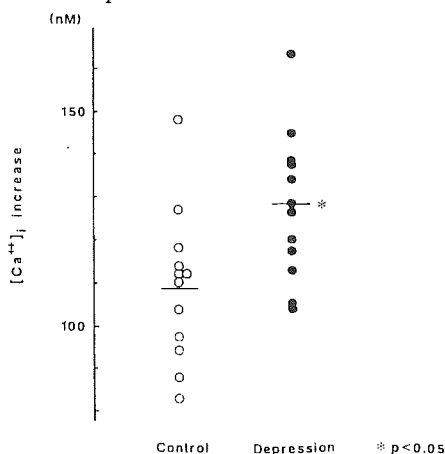


Table 1 : Effects of various pretreatments on 10  $\mu$ M 5HT induced  $[Ca^{++}]_i$  increase in human platelets

pretreatment	10 $\mu$ M 5HT-induced $[Ca^{++}]_i$ increase
(control)	108 $\pm$ 8.0
10 $\mu$ M 5HT	0 **
100 $\mu$ M NE	128 $\pm$ 9.2 **
1mM NaF / 100 $\mu$ M NE	119 $\pm$ 14 *
3mM NaF / 100 $\mu$ M NE	100 $\pm$ 6.3

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs control

ビタミンB<sub>12</sub> 慢性投与の生体リズム及び脳内アセチルコリンへの影響

高嶋瑞夫, 海野麻未, 高橋清久

生体リズムの異常に様々のものが知られているが、睡眠相遅延症候群や非24時間睡眠・覚醒症候群がその代表的なものである。それらの原因として考えられるのは、元来24時間よりも長い生体リズムを外界の24時間周期へ同調できなくなることに起因する。睡眠・覚醒リズムの障害に対する治療には確立されたものがなく、現在、時間療法や高照度光照射などが予備的に試みられているにすぎない。

1983年に Kamger-Paris らにより、他の目的に用いたビタミンB<sub>12</sub>が偶然に睡眠・覚醒リズムの障害の治療効果をあげた事を報告した。わが国でも、1988年に大川らが、ビタミンB<sub>12</sub>を用いて治療に成功して以来、その治療有効例が徐々に数を増やしている。

最近ビタミンB<sub>12</sub>が脳内コリン系に作用する可能性が示唆されている。ラット胎児脳スライスを用いた取り込み実験によりメコバラミン(メチルービタミンB<sub>12</sub>)のメチル基が、メチル基転移反応に用いられ、メチル基供与体として、一部レシチンの合成に関与し脂質代謝を促進する。また、ネコに経口投与すると、脳内各部位においてアセチルコリン(ACh)の合成酵素であるコリンアセチル基転移酵素(CAT)の増加がみられ、AChの増加が示唆された(A. Nadeau, A. G. Roberge:1988)。一方AChが生体リズムに影響を与える事も示唆されており、Murakami ら(1986)は、ラット脳室内にACh類に作用物質のカルバコールを投与すると、free-running rhythmの周期が短縮する事を報告している。

そこで我々はビタミンB<sub>12</sub>が、脳内でAChの代謝に影響を与え、かつ生体の時計機構を変化させている可能性を考え、以下の実験を行った。

## 方法

Wistar 雄性ラットを用い、恒常暗下で飼育しメコバラミン一日一回(500 μg/kg s. c.) 21日間慢性投与した。その間行動量を自動測定し、free-running rhythmの周期を求めた。また同様に薬剤を14日、21日および28日間投与し、最終投与後1時間で断頭し、脳をいくつかの部位に分け、脳内ACh・Ch濃度をHPLC法(一部RIA法)を用いて測定した。

## 結果

4匹のラットにおけるフリーラン周期は、投与前後で変化なく(投与前平均周期24.26±0.06時間、投与後平均周期24.28±0.07時間)、影響を与えないものと考えられた。脳内ACh濃度は、各群8匹について測定した(表1)。ACh濃度は、腹側被蓋野(VTA)において、28日間投与で対照群と比較して、

122%の有意(p<0.05)な増加を示した。一方Ch濃度は、扁桃核(Amy)において、28日間投与で対照群と比較して、133%の有意(p<0.01)な増加が認められた。

## 考察

本実験では free-running rhythm の周期に変化はみられなかったが、ビタミンB<sub>12</sub>は末梢からの吸収が悪いために作用が十分ではなかった可能性もあり、直接脳内へ投与した場合の検討をする必要であろう。脳内ACh・Ch濃度の増加が一部でみられたことは、ビタミンB<sub>12</sub>がCh系に何らかの影響を与えることが示唆される。ネコにおけるCAT測定報告の増加する部位と今回の実験でCh濃度の増加がみられた部位がほぼ一致することは、興味ある事実と思われる。動物種によりビタミンB<sub>12</sub>の吸収や代謝が異なることも考えられ、臨床でみられたようなビタミンB<sub>12</sub>のリズムの同調作用について今回その機序を明らかに出来なかったが、今後さらに睡眠・覚醒リズムも含めて検討を加えていきたい。(メコバラミン注射アンプルは、エーザイより供与を受けた。)

表1: ビタミンB<sub>12</sub>慢性投与による脳内アセチルコリン・コリン濃度の変化, 各群N=8, 平均±標準誤差, 検定は対照群に対する student's t-検定。

\* P&lt;0.05, \* P&lt;0.01。

	Acetylcholine(pmol/mg protein)			
	28-day	21-day	14-day	control
F C (RIA)	153.5 ± 12.19	158.5 ± 12.49	170.7 ± 38.43	155.1 ± 8.58
S T R (RIA)	749.1 ± 100.3	720.1 ± 137.5	823.1 ± 89.21	743.0 ± 132.5
M L	690.8 ± 118.3	687.1 ± 115.4	691.3 ± 68.28	690.6 ± 84.37
S E P	337.7 ± 42.78	322.1 ± 78.07	378.7 ± 29.88	315.6 ± 87.77
H y T h	193.7 ± 18.93	308.7 ± 17.57	198.8 ± 11.77	205.6 ± 20.93
T h	440.8 ± 79.35	429.7 ± 73.81	472.7 ± 71.75	426.5 ± 98.51
H i p	297.3 ± 42.93	318.1 ± 29.24	386.2 ± 110.2	364.3 ± 78.34
A m y	451.5 ± 21.99	464.7 ± 60.85	448.0 ± 83.20	424.0 ± 34.20
S N	190.3 ± 33.53	220.3 ± 44.24	214.8 ± 40.57	220.9 ± 54.98
V T A	622.8 ± 68.21*	523.6 ± 105.4	547.7 ± 87.23	511.4 ± 41.30
I P	1686 ± 376.9	1870 ± 334.5	1400 ± 286.9	1410 ± 275.9
R a p h e	355.0 ± 45.83	338.3 ± 28.35	344.8 ± 24.36	361.9 ± 109.5
S C N	192.0 ± 33.56	193.3 ± 56.53	215.3 ± 36.32	181.4 ± 29.28
	Choline(pmol/mg protein)			
M L	339.3 ± 73.76	297.0 ± 52.38	339.7 ± 69.81	306.7 ± 27.55
S E P	223.7 ± 17.56	228.3 ± 38.97	236.7 ± 34.84	229.3 ± 58.86
H y T h	148.7 ± 27.91	165.3 ± 13.08	179.5 ± 28.28	189.6 ± 21.09
T h	209.5 ± 120.4	233.4 ± 93.98	298.2 ± 228.3	188.9 ± 35.48
H i p	221.3 ± 60.04	205.2 ± 36.68	222.4 ± 55.26	227.0 ± 63.86
A m y	338.4 ± 57.98**	341.3 ± 80.35	316.0 ± 89.49	252.5 ± 55.20
S N	92.2 ± 37.11	118.9 ± 49.97	92.3 ± 20.71	88.9 ± 29.15
V T A	258.8 ± 18.22	240.3 ± 54.32	240.0 ± 43.99	230.1 ± 36.91
I P	320.2 ± 314.0	340.0 ± 59.30	301.3 ± 57.09	292.3 ± 40.33
R a p h e	110.2 ± 46.79	117.2 ± 21.67	131.3 ± 38.11	97.3 ± 18.10
S C N	525.5 ± 193.2	595.0 ± 212.0	559.8 ± 134.5	559.1 ± 118.7

母親による仔ラットリズムの同調機構  
 —メラトニン連続投与による仔ラットリズムの位相変化—

武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 加藤由起子, 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。さらに, 母乳中のメラトニン (MEL) の同調因子としての可能性を検討する実験より, 外因性の MEL が仔ラットの内因性リズムの位相に影響を及ぼすことを明らかにした。そこで今回我々は, MEL の作用時刻及び作用時間を検討した。

方法

Wistar 系成熟ラットを LD 条件 (明期0800-2000h, 暗期2000-0800h) 下で交配, 飼育した。母ラットは分娩後直ちに両眼球及び松果体を摘出した。仔ラットは出生日に両眼球を摘出し, MEL 投与群には MEL 300 μg/pup を対照群には saline を 1 日 1 回特定の時刻に下記条件で投与した。

1. MEL 投与時刻展開

Control 群: 生後 3-17日 (14日間) 0800h投与  
 MEL 投与群: 生後 3-17日 (14日間) 0800h, 1000hまたは1400hに各々投与

2. MEL 投与期間展開

Control 群: 生後 3-17日 (14日間) 0800h投与  
 MEL 投与群: 生後 3-10日 (7日間) 0800h投与  
 生後 3-13日 (10日間) 0800h投与  
 生後 3-17日 (14日間) 0800h投与  
 生後 3-17日 (14日間) 0800h投与後 3日間 MEL 投与中止

いずれの仔ラットも MEL 投与期間終了当日より, 4 時間おきに各点 6 匹以上を 24 時間にわたって断頭屠殺, 松果体を採取し, N-acetyltransferase (NAT) 活性を Deguchi らの方法に準じて測定した。

結果

1. MEL 投与時刻に関して (図 1)

Control 群 (○) は成熟ラットの活性リズムとほぼ同一のパターンを示したが, 0800h投与群 (■), 1400h投与群 (▲) では位相が変化した。1000h投与群 (●) は固体差がかなり生じたために平均値では明瞭なサーカディアンリズムが検出されなかった。

2. MEL 投与期間に関して (図 2)

7日間投与群 (●) は未だ活性リズムが明瞭ではなく10日間投与群 (■) では本来低値を示すべき時点でやや高値を示すものの, 位相自体は Control 群に近いものであった。14日間投与群 (◆) では明らかにリズムの位相が変化しており, その後3日間

投与を中止した群 (□) にも変化した位相はそのまま維持されていた。

考察

本実験により MEL の反復投与は仔ラットの NAT 活性リズムの位相を変化させることが確認され, さらにその作用には, 時刻依存性があることが示唆された。母親の MEL リズムを消失させた後にも仔ラットの NAT 活性リズムは正常であったことや, 生理学的見地からすると大量な MEL を投与しないと効果が明瞭に現れないことを考慮にいと, 母乳中の MEL が直接的な同調因子とは思われないが, 仔ラットに対する同調機構に間接的な役割を果たしている可能性は十分考えられる。今回の実験で成熟ラットと仔ラットでは MEL 作用時刻が異なることが示唆されたので, 今後は MEL レセプターレベルで感受性の解析を行っていく予定である。

図 1 メラトニン反復投与 (0800h, 1000h, 1400h) が仔ラット NAT リズムに及ぼす影響

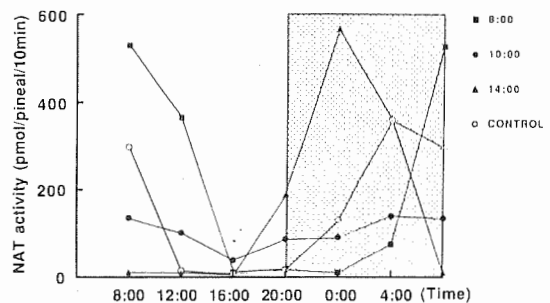
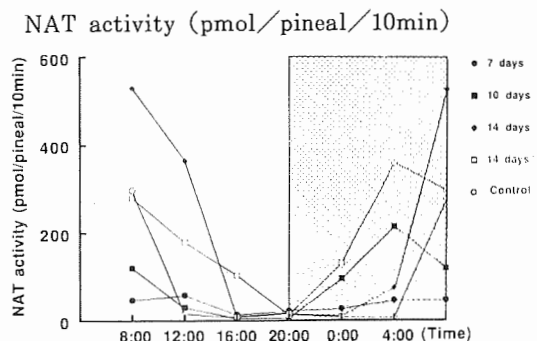


図 2 メラトニン投与期間 (0800h) と仔ラット NAT 活性リズムとの関係。



## 4. 疾病研究第4部

### 1. 研究部一年のあゆみ

本年度は四部にとっては充実の年であった。まず4月1日に東大神経内科から郭伸室長が赴任し、相澤仁志流動研究員、および11月27日から参加した真先敏弘併任研究員と共に神経化学研究チームを作った。小田健一郎室長は、4月1日に昇格した三浦裕之併任研究員、および2月12日よりインドの A. P. Chandran 外来研究員（学振）と GAD マウスの形態学および生理学的研究を進展させた。吉田瑞子研究員は5月1日に室長に昇格し、松井京子賃金研究員が4月1日に復帰した。武蔵病院精神科の山寺博史医長が5月15日、国立別府病院神経内科石本進士医長が1月26日に併任研究員となった。その他、根津敦夫研究生、および向山昌邦、野手とし子、横井風児、花岡繁、北村純一、高木昭輝の各併任研究員が研究を継続し、最初の三者は3月31日に辞任した。佐久間真喜子賃金研究助手が6月3日に辞任し、中村昌子賃金研究助手が5月1日モデル動物開発部と共同で復帰した。6月15日より三浦久美子賃金研究員が経理事務と病理実験に、また6月20日より木内美子研究費雇用実験助手が実験室・器具の清掃に、それぞれ多大の貢献をした。

本年度当部の主要な研究業績は次のとおりである。

1. GAD マウスが、一次感覚ニューロンの中枢側だけでなく末梢側軸索にも遠位部軸索変性を示し、dying-back 変性疾患のモデルとなることを明らかにした（小田，三浦）。
2. 興奮性アミノ酸アクロメリン酸によるラットの対麻痺が、腰仙髄灰白質中心部の小神経細胞の選択的脱落によるものであり、いわゆる stiffman 症候群のモデルとなり得ることを明らかにした（郭，相澤）。
3. 進行性淡蒼球変性症の一部検脳を病理学および化学的に検討し、パーキンソン病とは異なった動作緩慢が淡蒼球の 選択的障害でも起こること、ヒトの淡蒼球視床路の神経伝達物質に GABA が含まれること、そしてそれぞれが VL 核に patchy に終止していることを明かにした（相澤，郭）。
4. mdx マウスの静止状態における長指伸筋内の  $Ca^{2+}$  濃度を画像解析装置で測定したところ、対照マウスと相違がなかった（吉田）。
5. 種々の遺伝性運動失調マウスの大脳および小脳の NGF 濃度を two-site EIA 法で測定し、reeler, weaver および staggerer の小脳で低下していることを明かにした（松井，免疫研究部古川）。
6. 精神・神経疾患研究委託費「NMR を用いた精神，神経，筋疾患の病態に関する研究」の初年度研究班長を勤めた（柴崎）。

（部長 柴崎浩）

## 2. 研究業績

## A. 論文

## a. 原著

- 1) Shibasaki H, Tokudome S, Kuroda Y, Yanagawa T, Yoshihara M:  
Prevalence of HTLV-I-associated myelopathy among HTLV-I carriers in Saga, Japan  
Neuroepidemiology 8:124-127, 1989
- 2) Oda K, Araki K, Totoki T, Shibasaki H:  
Nerve conduction study of human tetrodotoxification  
Neurology 39:743-745, 1989
- 3) 西田茂人, 中村政俊, 柴崎浩 :  
むだ時間を含む2次要素並列結合による誘発電位の頭皮上分布モデル  
電子情報通信学会論文誌 J 72 (D-II):1567-1574, 1989
- 4) 柿本隆介, 音成龍司, 柴崎浩, 野口清 :  
老年痴呆の薬剤効果判定における事象関連電位 " P300 " の意義  
脳波と筋電図17:359-364, 1989
- 5) 西田茂人、中村政俊、柴崎浩 :  
脳波・誘発電位の頭皮上分布モデル構成と特徴表現  
医用電子と生体工学27:141-148, 1989
- 6) 小田健一郎, 福島範子, 柿本隆介, 柴崎浩 :  
起立性振戦, パーキンソニズムによる1例  
臨床神経学29:924-926, 1989
- 7) Nakamura M, Nishida S, Shibasaki H:  
Evaluation of the signal-to-noise ratio for average evoked potentials : determination of  
interstimulus interval and averaging number  
Frontiers Medical Biological Engineering 1 : 341-349, 1989
- 8) Nakamura M, Shibasaki H, Nishida S:  
Method for recording short latency evoked potentials using an EKG artifact elimination  
procedure  
Journal of Biomedical Engineering 12:51-56, 1990
- 9) 中村政俊, 西田茂人, 武藤裕二, 池田昭夫, 音成龍司, 柿本隆介, 柴崎浩 :

## II 研究業績

- 2次元画面視標追跡による手の随意運動機能の記録処理法  
医用電子と生体工学28:9-17, 1990
- 10) Nishida Y, Kobayashi T, Machi M, Yamada T,  
Kitaguchi T, Oda K, Goto I:  
Congenital myopathy with myasthenic features and congenital cataract in two siblings  
J Neurol 236:161-163, 1989
- 11) H. Shinozaki, M. Ishida, Y. Gotoh & S. Kwak  
Specific lesions of rat spinal interneurons induced by systemic administration of acromelic  
acid, a new potent kainate analogue.  
Brain Res., 503:330-333, 1989.
- 12) 真野行生, 舟川格, 中室卓也, 高柳哲也, 松井京子 :  
脳へのパルス磁気刺激に関する行動, 生化学及び病理的検討  
臨床神経29:982-987, 1989
- 13) H. Okeda, T. Matuno, Y. Kawahara, Y. Eishi, Y. Tamai, M. Tanaka, M. Kamaki, N. Tsubota  
and H. Yamadera:  
Adult pigmet type(Peiffer)of sudanophilic leukodystrophy  
Acta Neuropathology 78:533-542, 1989
- 14) 山寺博史, 加藤昌明, 塚原靖二, 斉藤治, 大熊輝男 :  
定量的脳波分析とトポグラムによる向精神薬の作用の研究—非ベンゾジアゼピン系睡眠薬ゾピクロ  
ンの薬物脳波的研究  
精神薬療基金研究年報21:108-114, 1989
- 15) 塚原靖二, 山寺博史, 上埜高志, 加藤昌明, 大熊輝男 :  
各種基準電極導出法による脳波トポグラフィの特徴  
脳波と筋電図18:233-243, 1990
- 16) Mukoyama M, Yamazaki K, Kikuchi T, Tomita T:  
Neuropathology of gracile axonal dystrophy(GAD)mouse.  
An animal model of central distal axonopathy in primary sensory neurons  
Acta Neuropathol 79(3):294-299, 1989
- 17) Yamazaki K, Mukoyama M, Kikuchi T, Sakakibara A, Tomita T :  
Effects of dietary vitamin E supplement on gracile axonal dystrophy(gad)mouse

- Exp Anim 38(3):195-200, 1989
- 18) 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 system atrophy  
Med Sci Res 17:303-304, 1989
- 19) Sunohara N, Furukawa S, Nishio T, Mukoyama M, Satoyoshi E :  
Neurotoxicity of human eosinophils towards peripheral nerves  
J Neurol Sci 92:1-7, 1989
- 20) Sunohara N, Mukoyama M, Funamoto H, Kamei N, Tomi H, and Satoyoshi E :  
Supranuclear paralysis preventing lid closure in amyotrophic lateral sclerosis  
Japanese J Med 28(4):515-519, 1989(July)
- 21) 安井昌之, 向山昌邦, 横井風児, 足立皓岑, 若山育郎, 三谷和男, 八瀬善郎, 吉田博信, 吉益文夫,  
大田喜一郎 :  
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
- 22) 野崎稔, 小池秀海, 入江宏, 吉野佳一, 向山昌邦 :  
Plasma cell dyscrasia, 血中 IgA 高値を示し末梢神経組織に IgA 沈着を認めた多発ニューロパチーの一例  
杏林医会誌20(1):77~82, 1989
- 23) 臼井康臣, 向山昌邦, 橋爪真言, 高橋昭 :  
糖尿病性眼筋麻痺の臨床病理学的研究——本邦剖検報告第一例——  
臨床神経29(4):442~449, 1989
- 24) 臼井康臣, 玉木伸一郎, 橋爪真言, 向山昌邦, 松尾敏和 :  
脳圧亢進を示した慢性腎透析の一症例——脳脊髄液循環動態 (CSF dynamics) に関する考察——  
脳神経41(4):397-404, 1989
- 25) 向山昌邦 :  
diaphenylsulfone によるニューロパチー  
神経内科治療 7 ( 1 ) : 7 ~ 9 , 1990
- 26) Yasui M, Yase Y, Ando K, Adachi K, Mukoyama M, Ohsugi K :  
Magnesium concentration in brains from multiple sclerosis patients



## II 研究業績

Acta Neurol Scand 81:197-200, 1990

### b. 著 書

- 1) Shibasaki H, Kuroda Y :  
Multiple sclerosis and HTLV-I-associated myelopathy.  
Multiple Sclerosis Research(ed by Battaglia MA), Elsevier, Amsterdam, p89-94, 1989
- 2) 黒田康夫, 柴崎浩 :  
非感染性炎症性疾患  
神経内科 Quick Reference (水野美邦編), 分光堂, 東京, P416-424, 1989
- 3) 黒田康夫, 柴崎浩 :  
多発性硬化症  
神経内科 Quick Reference (水野美邦編), 文光堂, 東京, p425-432, 1989
- 4) 柴崎浩 :  
頭痛  
神経内科 Quick Reference (水野美邦編) 文光堂, 東京, p106-112, 1989
- 5) 春原経彦, 柴崎浩 :  
筋固縮 (rigidity)  
図説内科診断治療講座15, パーキンソン症候群と類縁疾患 (萬年徹編), メジカルビュー社,  
東京, p132-141, 1989
- 6) 柴崎浩 :  
急性散在性脳脊髄炎  
今日の治療指針 (日野原重明, 阿部正和監修), 医学書院, 東京, p211-212, 1990
- 7) 柿木隆介, 柴崎浩 :  
脳・脊髄誘発電位  
臨床検査 MOOK No. 35「神経・筋疾患の臨床検査」(浜口勝彦編), 金原, 東京, p86-94, 1990
- 8) S. Kwak, H. Aizawa, M. Ishida, Y. Gotoh & H. Shinozaki :  
Small neurons in the lower spinal cord are selectively damaged in the spastic rat induced  
by acromelic acid.  
Amino Acids:Chemistry, Biology and Medicine, ESCOM Science, Leiden, p318-326, 1990
- 9) H. Shinozaki, M. Ishida, Y. Gotoh & S. Kwak :  
Acromelic acid as a tool for the study of specific lesions of spinal neurones.

Amino Acids : Chemistry, Biology and Medicine, ESCOM Science, Leiden, p281-293, 1990

10) 砂田芳秀・郭伸 :

移植療法の現況と展望

図説内科診断治療講座15巻, パーキンソン症候群と類縁疾患, メジカルビュー社, 東京, p244-253, 1989

11) 向山昌邦 :

神経原性筋疾患

筋病理学 ( 桧澤一夫, 埜中征哉, 小沢二郎編 ), 文光堂, 東京, P296-304

12) 向山昌邦 :

筋萎縮性側索硬化症

筋病理学 ( 桧澤一夫, 埜中征哉, 小沢二郎編 ), 文光堂, 東京, P296-304

13) 向山昌邦 :

末梢神経障害

筋病理学 ( 桧澤一夫, 埜中征哉, 小沢二郎編 ), 文光堂, 東京, P311-315

14) 向山昌邦, 桧澤一夫, 香川典子 :

本邦における筋ジストロフィーの剖検例の検討

内科 MOOK 41・ミオパチー ( 阿部正和, 尾前照雄, 河合忠一編 ) 金原出版, 東京, P289-295, 1989

c. 総 説

1) 柴崎浩 :

書評「新生理科学大系, 第12巻, 高次脳機能の生理学 ( 鈴木寿夫, 坂田英夫編集 )」

脳と神経41:500-501, 1989

2) 高島洋, 柴崎浩 :

多発性硬化症

総合臨床 38 ( 増刊 ) : 1025-1028, 1989

3) 柴崎浩 :

「内科治療ガイド」, 多発性硬化症

Medical Practice 6 ( 臨時増刊 ) : 54-55, 1989

4) 柴崎浩 :

「内科治療ガイド」, 急性散在性脳脊髄炎

## II 研究業績

- Medical Practice 6 (臨時増刊) : 56, 1989
- 5) 柴崎浩 :  
「話題の疾患, その診断と治療」, 多発性硬化症  
現代医療21:1780-1783, 1989
  - 6) 富英明, 柴崎浩 :  
多発性硬化症, 最新の診断法 (CT, MRI, 髄液, 電気生理)  
Brain Nursing 5:722-726, 1989
  - 7) 柴崎浩 :  
多発性硬化症患者の DNA から HTLV-I 塩基配列の増幅と分離  
Medical Briefs in Brain & Nerve 4:11-12, 1989
  - 8) 柴崎浩 :  
多発性硬化症の疫学  
神経進歩33:778-789, 1989
  - 9) 正木かつら, 柴崎浩 :  
不随意運動  
Brain Nursing 5:1373-1381, 1989
  - 10) 池田憲, 柴崎浩 :  
病期・病態からみた薬剤の選択と投与方法 : 多発性硬化症 (Devic 病を含む)  
医学と薬学22:1119-1124, 1989
  - 11) 音成龍司, 柴崎浩 :  
診療の秘訣, 痙攣  
Modern Physician 9:1696, 1989
  - 12) 里吉宮二郎, 向野和雄, 田代邦雄, 柴崎浩 :  
座談会, 視力障害, 眼筋麻痺をめぐって  
Clinical Neuroscience 8:208-222, 1990
  - 13) 富英明, 柴崎浩 :  
誘発電位  
総合臨床39:308-313, 1990
  - 14) 小田健一郎 :  
重症筋無力症における血漿交換と抗体特異性

神経内科32:21-26, 1990

15) 相沢仁志, 郭伸 :

脳神経伝達物質

臨床成人病, 19:1313-1319, 1989

16) 豊田純三, 高山豊, 山寺博史 :

精神疾患の画像診断 分裂病のPETを中心に

作業療法ジャーナル23:302-304, 1989

17) 山寺博史, 大熊輝男 :

最近の睡眠薬の動向ベンゾジアゼピン系, 非ベンゾジアゼピン系睡眠薬を中心に

作業療法ジャーナル24:301, 1990

d. 班会議報告書

1) 柴崎浩, 黒田康夫, 堀哲朗 :

ストレスのEAEにおよぼす影響

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患に関する研究班, 昭和63年度研究報告書, p82-83, 1989

2) 柴崎浩, 小田健一郎 :

重症筋無力症(MG):アセチルコリン受容体(AChR)抗体IgMクラスの意義

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患に関する研究班, 昭和63年度研究報告書, P 369-372, 1989

3) 柴崎浩, 柿木隆介 :

CO<sub>2</sub>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・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,  
P 21-23, 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, 昭和63年度研究報告書,  
p58-60, 1989

5) 小田健一郎 :

筋内神経の変性・再生機序についての基礎的研究

(I) 筋内神経の神経-筋線維ときほぐし法

厚生省精神・神経疾患・ニューロパチーの臨床と病態に関する研究班, 平成元年度研究報告書,  
p90-92, 1990

## II 研究業績

- 6) 柴崎浩, 小田健一郎, 菊池建機, 三浦裕之 :  
GAD (Gracile Axonal Dystrophy) マウス :  
central and peripheral distal axonopathy モデル  
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, 平成元年度研究報告書,  
p22-24, 1990
- 7) 柴崎浩, 郭伸, 相澤仁志, 篠崎温彦 :  
興奮性アミノ酸によるstiffman 症候群類似のラット対麻痺モデルについて  
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, 平成元年度報告書,  
p38-41, 1990
- 8) 豊倉康夫, 郭伸, 萬年徹, A. Matus:  
海馬顆粒細胞樹状突起の可塑性に関する免疫組織化学的研究  
厚生省痴呆疾患・昭和63年度研究報告書, p15-19, 1989
- 9) 萬年徹, 郭伸 :  
汎発性 Lewy 小体の分離について  
厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班, 昭和63年度研究報告書, p222-224, 1989
- 10) 吉田瑞子, 柴崎浩 :  
mdx マウス骨格筋内の Ca イオン濃度  
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,  
平成元年度研究報告書p145-146, 1990
- 11) 山口明, 北村純一 :  
中枢神経疾患に伴う拘縮に関する研究  
厚生省精神・神経疾患・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班,  
平成元年度報告書, p33-36, 1990
- 12) 向山昌邦 :  
GAD (gracile axonal dystrophy) 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, 昭和63年度研究報告書,  
p50-51, 1989
- 13) 向山昌邦, 無江昭子 :  
福山型先天性筋ジストロフィー症の大脳白質病変に関する研究  
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63年度研究報告書, p320-322, 1989
- 14) 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, 疫学, 臨床及び治療開発に関する研究班,  
昭和63年度研究報告書, p5-6, 1989
- 15) 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  
厚生省特定疾患・難病のケアシステム調査研究班, 昭和63年度研究報告書, p129-133, 1989
- 16) 原敏彦, 飯尾正明, 横井風児 :  
ニコチンの脳内代謝に関する研究  
厚生省精神・神経疾患・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班, 平成元年度研究報告書, p58-63, 1990
- 17) 春原経彦, 池田憲, 阪田千種, 正木かつら, 糖沢達志, 横井風児 :  
多発性硬化症における Gd-MRI の検討  
厚生省精神・神経疾患・NMR を用いた精神, 神経, 筋疾患の病態に関する研究班,  
平成元年度研究報告書, p15-20, 1990
- 18) 柴崎浩, 横井風児, 池田憲, 亀井敦行, 飯尾正明 :  
MRI 及びポジトロン CT (PET) による歩行失行の基礎疾患及び脳内責任病巣の検討  
厚生省精神・神経疾患・NMR を用いた精神, 神経, 筋疾患の病態に関する研究班,  
平成元年度研究報告書, p43-49, 1990
- 19) 横井風児, 田平武, 宇野正蔵, 原敏彦, 飯尾正明, 伊藤高司 :  
<sup>11</sup>C-イヌリンによる中枢神経疾患の脳血液関門透過性の定量的検討  
厚生省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班,  
平成元年度研究報告書, p96-101, 1990

## B. 学会発表

### a. 特別講演, シンポジウム

#### 1) Shibasaki H :

Populations of special interest, Oriental populations

Workshop : Genes and Susceptibility to Multiple Sclerosis, Cambridge, U. K. ,

## II 研究業績

July, 26, 1989

2) Shibasaki H, Kakigi R :

Clinical uses of upper and lower limb SEPs in neuropathies and spinal disorders

Symposium "Clinical Use of Evoked Potentials",

XIVth World Congress of Neurology, New Delhi Oct. 23, 1989

3) Shibasaki H, Tabira T :

Multiple sclerosis in Asia : An epidemiological and genetic study

Symposium "Multiple Sclerosis"

XIVth World Congress of Neurology, New Delhi, Oct. 25, 1989

4) Shibasaki H :

Electrical activity associated with human cerebrocortical functions

Symposium "Cerebrocortical Functions"

XIVth World Congress of Neurology, New Delhi, Oct. 26, 1989

5) Shibasaki H :

Epidemiology of MS in Japan

The Third Asian Multiple Sclerosis Workshop, New Delhi, Oct. 27, 1989

6) 柴崎浩, 音成龍司 :

痴呆ならびにその他の神経疾患における P300 の臨床応用

トピック「事象関連電位の臨床応用」

第19回日本脳波・筋電図学会学術大会, 岡山, 11. 11, 1989

7) 向山昌邦 :

GAD (gracile axonal dystrophy) マウス-脊髄薄束に変性病巣を持つ遺伝性モデル動物-

第30回日本神経病理学会総会シンポジウム「神経疾患の動物モデル」, 東京, 6. 21, 1989

### b. 国際学会

1) Kwak S. , Aizawa H, Ishida M, Gotoh Y & Shinozaki H :

Small neurons in the lower spinal cord are selectively damaged in the spastic rat induced by acromelic acid.

Therapy with amino acids and analogues: International Congress, Vienna, Aug. 7, 1989

2) Shinozaki H. , Ishida M, Gotoh Y & Kwak S :

Acromelic acid as a tool for specific neurone damage.

Therapy with amino acids and analogues:1st International Congress, Vienna,  
Aug. 7, 1989

3) Matsui K, Kato N, Masui A, Ando K :

Elevated immunoreactive-somatostatin levels in the brain of ataxic mutant mice :  
possible relevance of somatostatin to cerebellar ataxia

International Symposium on Somatostatin, Montreal, Aug. 7, 1989

4) Kitamura J, Yamaguchi A, Sunohara N, Takagi A, Masuda K :

Gati analysis of spinocerebellar degeneration disease(SCD)and Parkinson's disease(PD)by  
pedoscope

V Time International Symposium, Neurological basis of human locomotion, Tokyo,  
November 15, 1989

5) Mukoyama M, Yamazaki k, Kikuchi T, Tomita T :

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

14th World Congress of Neurology, New Delhi, India 10. 27, 1989

6) Hara T, Mituhata T, Aida M, Morimoto M, Sakamoto S, Masuoka T, Iio M, Izuchi R,  
Yokoi F :

Quantitative measurement of regional myocardial blood flow in patients with coronary  
artery disease by intravenous injection of  $^{13}\text{NH}_3$  in positron emission tomography

5th symposium on the medical application of cyclotrons, Turku, Jun 2, 1989

c. 一般学会

1) 音成龍司, 池田昭夫, 柿木隆介, 黒田康夫, 柴崎浩 :

HTLV-I-associated myelopathy (HAM) と多発性硬化症 (MS) における "P300" と MRI

第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 26, 1989

2) 中村良司, 鎌倉恵子, 高谷治, 栗崎博司, 野手とし子, 細田義人, 柴崎浩 :

Hyperkinesies volitionnelles に関する検討。主に MRI, 表面筋電図, SSEP, 薬物に対する反応に  
関して

第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 25, 1989

3) 中村政俊, 西田茂人, 武藤裕二, 柴崎浩, 池田昭夫 :

2次元画面視標追跡による手の随意運動記録処理法の開発

第19回日本脳波・筋電図学会学術大会, 岡山, 11. 10, 1989



## II 研究業績

- 4) 西田茂人, 中村政俊, 柴崎浩 :  
脳波除去による誘発電位の高精度記録処理法  
第19回日本脳波・筋電図学会学術大会, 岡山, 11.10, 1989
- 5) 小田健一郎, 柴崎浩 :  
重症筋無力症 (MG) の発症要因に関する研究 : アセチルコリン受容体抗体 IgM クラスの経時的変動  
第30回日本神経学会総会, 茨城, 5.26, 1989
- 6) 小田健一郎, 柴崎浩, 遠藤智代子, 柿木隆介, 田中薫 :  
遺伝性圧過敏性ニューロパチー : 運動神経線維における tomacula の証明  
第30回日本神経病理学会総会, 東京, 6.20, 1989
- 7) 郭伸, 萬年徹, A. Matus :  
除神経による海馬顆粒細胞樹状突起の可塑性  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5.25, 1989
- 8) 郭伸, 相澤仁志, 篠崎温彦, 石田美知子, 後藤泰徳 :  
アクロメリン酸によるラット痙性対麻痺は脊髄小細胞の選択的脱落による  
第13回神経科学学術集会, 新潟, 10.3, 1989
- 9) 篠崎温彦, 石田美知子, 後藤泰徳, 郭伸 :  
アクロメリン酸によるラット脊髄神経細胞の特異的破壊  
第13回神経科学学術集会, 新潟, 10.3, 1989
- 10) 松井京子, 古川昭栄, 柴崎浩, 菊池健機 :  
遺伝性運動失調マウスの脳内 NGF レベルについて  
第6回日本疾患モデル動物研究会総会, 東京, 11.28, 1989
- 11) 北野正二郎, 大島純三, 竹内博, 大野和男, 北村純一, 山口明 :  
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 (第一報)  
第26回日本リハビリテーション医学界総会, 仙台, 6.1, 1989
- 12) 北村純一, 山口明, 春原経彦, 大野和男, 北野正二郎 :  
重心計ペドスコープによる脊髄小脳変性症及びパーキンソン病の歩行分析 (第一報)  
第26回日本リハビリテーション医学会総会, 仙台, 6.1, 1989
- 13) 竹内博, 大島純三, 北野正二郎, 大野和男, 北村純一, 山口明 :

重心計ベドスコープによる脳卒中片麻痺の歩行分析（第一報）

第26回日本リハビリテーション医学会総会，仙台，6.1，1989

- 14) 北村純一，山口明，春原経彦，高嶋幸男，柴崎浩，有馬正高：  
Schizencephaly の成人例における触覚認知障害，構成失行  
第26回日本リハビリテーション医学会総会，仙台，6.1，1989
- 15) 青木正，西村康，大熊輝夫，北村純一，山口明：  
長期経過した Lobotomy 例の障害学的検討－精神・神経症状を中心として－  
第26回日本リハビリテーション医学会総会，6.2，1989
- 16) 北村純一，山口明，大島純三，北野正二郎，竹内博：  
線条体病変を有する脳卒中片麻痺における抗パーキンソン剤の有用性  
－中枢性筋弛緩剤としての有効性－  
第110回日本神経学会関東地方会，東京，10.7，1989
- 17) 有馬邦正，北村純一，大沼悌一，広瀬久昭，山寺博史，山口明：  
抗てんかん薬（AED）服用患者における重心動揺検査  
日本てんかん学会，東京，10.6，1989
- 18) 北村純一，山口明，北野正二郎，大島純三，大野和男，竹内博：  
脳卒中片麻痺における trihexyphenidyl の中枢性“筋弛緩剤”としての有用性。  
第44回国立病院療養所総合医学会，仙台，10.27，1989
- 19) 北村純一，山口明，高木昭輝：  
内包後脚における錐体路の身体部位局在にかんする考察－レンズ核障害型と視床障害型の運動麻痺  
の回復過程の相違より－  
第111回日本神経学会関東地方会，東京，12.2，1989
- 20) 三浦裕之，向山昌邦，亀井敦行：  
両側脳室周囲，Wetterwinkel に連続性の嚢胞性病巣を認めた  
多発性硬化症の一例  
第30回日本神経病理学会総会，東京，6.20，1989
- 21) 中啓吾，山田真智，佐々木秀行，平山純二，里神永一，三家登喜夫，近藤溪，南條輝志男，宮村敬，  
向山昌邦：  
STZ 糖尿病ラットの末梢神経の形態計測学的変化と ARI の効果  
第32回日本糖尿病学会総会，金沢，4.22，1989

## II 研究業績

22) 向山昌邦 :

遺伝性脊髄後索変性 (GAD) マウスの一次感覚ニューロンに関する計測学的研究  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 26, 1989

23) 足立皓岑, 満間照典, 鈴木良弘, 大杉圭子, 向山昌邦, 安藤一也 :

オピオイ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  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 24, 1989

24) 及能克宏, 根本博, 富英明, 向山昌邦, 春原経彦, 里吉栄二郎 :

多発性硬化症における帯状異常感覚について  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 24, 1989

25) 春原経彦, 西尾健資, 向山昌邦, 里吉栄二郎, 古川昭栄 :

Hypereosinophilic syndorome に伴う peripheral neuropathy の pathogenesis について  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 24, 1989

26) 向山昌邦, 山崎一斗, 菊池健機, 富田武 :

遺伝性脊髄 Goll 索変性 (GAD) マウスの病巣進展に関する研究  
第30回日本神経病理学会総会, 東京, 6. 21, 1989

27) 有馬邦正, 猪瀬正, 明石俊雄, 向山昌邦, 春原経彦 :

多系統変性症 (Oppenheimer) において見いだされた嗜銀性細胞内構造物の検討  
第30回日本神経病理学会総会, 東京, 6. 20, 1989

28) 佐々木秀行, 中啓吾, 山田眞智, 貴志豊, 里神永一, 南條輝志男, 宮村敬, 向山昌邦 :

STZ 糖尿病ラットの末梢神経の形態計測学的変化と ARI の効果  
第30回日本神経病理学会総会, 東京, 6. 20, 1989

29) 花岡繁, 小林立子, 苗木昇, 桜川宜男, 有馬正高 :

無酸素性脳症が原因と思われる, CT で大脳基底核並びに視床に低吸収を呈した症例の NMR 像  
第15回日本磁気共鳴医学会大会, 岐阜, 2. 16, 1990

30) 池田憲, 阪田千種, 山田人志, 横井風児, 春原経彦 :

Willson 病における頭部超電導MRI (2.0T) の検討-CT, PET, 1.5T 超電導 MRI との比較-  
第14回日本磁気共鳴医学会大会, 東京, 9. 18, 1989

31) 横井風児, 根本博, 山口明, 里吉栄二郎 :

Adrenoleukodystrophy の PET による脳血流量および脳酸素消費率の検討  
第30回日本神経学会, 水戸, 5. 24, 1989

32) 横井風児, 伊藤高司, 原敏彦, 飯尾正明 :<sup>14</sup>C-1-ピルビン酸の脳内代謝のコンパートメントモデル解析

第29回日本核医学会総会, 大津, 10, 21, 1989

## C. 班会議発表

1) 柴崎浩, 西谷裕, 井形昭弘, 大野良之, 久保奈佳子 :

アジアにおける多発性硬化症の疫学特性

厚生省特定疾患・難病の疫学調査研究班, 東京, 12, 13, 1989

2) 柴崎浩, 大野良之, 久保奈佳子, 西谷裕, 斎田孝彦, 福山幸夫 :

多発性硬化症全国症例調査中間報告

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 東京, 1, 18, 1990

3) 柴崎浩, 池田憲, 阪田千種, 正木かつら, 富英明, 春原経彦, 田平武 :

MRIによる多発性硬化症の経時的観察

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 東京, 1, 18, 1990

4) 納光弘, 久保田裕章, 井形昭弘, 西谷裕, 柴崎浩 :

HTLV-I-associated myelopathy (HAM) と multiple sclerosis (MS) の臨床疫学的検討

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 東京, 1, 18, 1990

5) 黒田康夫, 遠藤智代子, 高島洋, 柴崎浩 :

ーグロブリン大量療法による HAM の治療

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班, 東京, 1, 18, 1990

6) 柴崎浩, 小田健一郎, 三浦裕之, 菊池健機 :

GAD(Gracile Axonal Dystrophy)マウス : central and peripheral distal axonopathy モデル

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, 20, 1990

7) 柴崎浩, 郭伸, 相澤仁志, 篠崎温彦 :

興奮性アミノ酸による stiffman 症候群類似のラット対麻痺モデルについて

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, 東京, 1, 20, 1990

8) 柴崎浩, 横井風児, 池田憲, 亀井敦行, 飯尾正明 :

MRI およびポジトロン CT (PET) による歩行失行の基礎疾患および脳内責任病巣の検討

厚生省精神・神経疾患・NMR を用いた精神, 神経, 筋疾患の病態に関する研究班,

東京, 2, 10, 1990

## II 研究業績

- 9) 柴崎浩, 山田人志, 池田憲, 及能克弘, 阪田千種, 春原経彦 :  
パーキンソン病患者の日内変動に対する低蛋白質の効果  
厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班, 東京, 2. 23, 1990
- 10) 萬年徹, 清水輝夫, 相澤仁志, 郭伸, 柴崎浩 :  
進行性淡蒼球変性症における神経伝達物質変化  
厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班, 東京, 2. 23, 1990
- 11) 小田健一郎 :  
筋内神経の変性・再生機序についての基礎的研究  
(1) 筋内神経の神経-筋線維ときほぐし法  
厚生省ニューロパチーの臨床と病態に関する研究班, 東京, 1. 13, 1990
- 12) 吉田瑞子, 柴崎浩 :  
mdx マウス骨格筋内の Ca イオン濃度  
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,  
東京, 12. 2, 1989
- 13) 古川昭栄, 松井京子, 柴崎浩, 菊池健機 :  
遺伝性運動失調マウスの脳内 NGF レベル  
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. 17, 1990
- 14) 大熊輝夫, 有馬邦正, 北村純一, 大沼悌一, 山寺博史, 広瀬久昭, 山口明, 足立直人 :  
重心動揺計を用いた失調症状の臨床評価の試み,  
厚生省精神・神経疾患・難治性てんかんの予防と対策に関する研究班報告,  
東京, 10, 1989
- 15) 山口明, 増田国男, 平山義人, 北村純一 :  
筋ジス・デイケアの試み (第一報)  
厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の遺伝疫学・臨床および治療開発に関する研究班,  
東京, 11. 30, 1989
- 16) 向山昌邦, 臼井康臣, 富英明, 春原経彦, 祖父江逸郎 :  
筋緊張性ジストロフィーの中樞神経病変  
厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の遺伝疫学, 臨床および治療開発に関する研究班,  
東京, 12. 1, 1989
- 17) 桧澤一夫, 向山昌邦, 石原伝幸, 藤井義孝, 森内幹, 香川典子 :

## 筋ジストロフィー症剖検例の検討

## FSH 型筋ジストロフィー症と考えられる兄妹 2 剖検例

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の遺伝疫学、臨床および治療開発に関する研究班、  
東京、12. 1, 1989

- 18) 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・国療筋ジス施設以外の患者の実態

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、11. 30, 1989

- 19) 向山昌邦, 山崎一斗, 菊池建機, 富田武:

Gracile axonal dystrophy(GAD)マウスの病変発現機序—各種ビタミンの血中及び臓器内濃度について—

厚生省精神・神経疾患・ニューロパチーの臨床と病態に関する研究班、東京、1. 13, 1989

- 20) 向山昌邦, 杉原盛子, 中野朋子, 加知輝彦:

神経難病患者の継続看護, 病棟と外来, 保健所との連携について—

厚生省特定疾患・難病のケアシステム調査研究班, 静岡, 2. 19, 1990

- 21) 正木かつら, 山田人志, 有馬邦正, 春原経彦, 向山昌邦:

脊髄小脳変性症と加齢—剖検例の検索

厚生省シルバーサイエンス・第一分野老化に伴う特異病態の解明・I—1 高齢者の神経・筋機能とその障害に関する研究班, 名古屋, 2. 2, 1990

- 22) 山田人志, 正木かつら, 春原経彦, 有馬邦正, 向山昌邦:

筋萎縮性側索硬化症と加齢—剖検例の検索—

厚生省シルバーサイエンス・第一分野老化に伴う特異病態の解明・I—1 高齢者の神経・筋機能とその障害に関する研究班, 名古屋, 2. 2, 1989

- 23) 横井風児, 原敏彦, 飯尾正明, 伊藤高司, 田平武, 宇野正威:

<sup>14</sup>C-イヌリンによる中枢神経疾患の脳血流関門の透過性の定量的検討

厚生省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班  
東京, 2. 1, 1989

3. 主な研究報告

GAD マウス：一次感覚ニューロン軸索変性の機序

小田健一郎, 三浦裕之, 柴崎浩, 菊池建機

GAD マウスは第5常染色体上にその遺伝子座を有する神経変性疾患モデル動物である。臨床的には30日頃より感覚性失調, 80日より後肢のひきずり, 筋萎縮をみる。病理学的には一次感覚ニューロンの中枢側末端であるゴル束と, またその末梢側遠位端の軸索に変性を認める。本研究では, 感覚ニューロンの軸索変性の機序を明らかにする目的で筋紡錘内における軸索病変を経時的に検討した。筋紡錘を選んだ理由は同部が感覚神経の終末を有し, かつその神経支配が明瞭であるためである。

対象と方法

GAD (gad/gad) および正常コントロール (gad/+ , +/+) の10-60日齢の下肢筋を用いた。摘出した筋組織を10%ホルマリンで固定し, ついで筋内神経および感覚神経終末をAChE-銀染色により描出した。染色した筋束をグリセリン中に入れ, 実体顕微鏡下で神経・筋線維のときほぐしを行った。筋紡錘内における軸索変性と再生線維の出現の頻度を定量した。各筋組織より10-20個の筋紡錘を取り出し, “変性” は錘内線維の中央部のラセン構造の消失。 “再生” は同部位への複数の細い線維の伸長と定義した。

結果

正常例では, 生後15日齢まで一次終末は長軸方向に伸びた単純な形態をとっており, 20日齢よりラセン構造をみるようになり, 30日までに成熟する。それに対して GAD マウスでは生後15日齢までは正常例と同じく軸索の発達をみるが, 20日頃より軸索終末のラセン構造の消失を認める様になる。30日ではその頻度がまし, さらに軸索の変性が筋内神経束にまで上行することが認められる。更に, 50日齢ごろより複数の細い再生神経線維が筋紡錘の赤道部に向かって伸びてくることが観察される。変性・再生を定量すると, 生後20-30日齢において変性が顕著になり, ついで40日齢より再生が始まることが示された(図)。

考察

本研究により GAD マウスにおける感覚ニューロン変性の時間的および空間的变化が明かとなった。

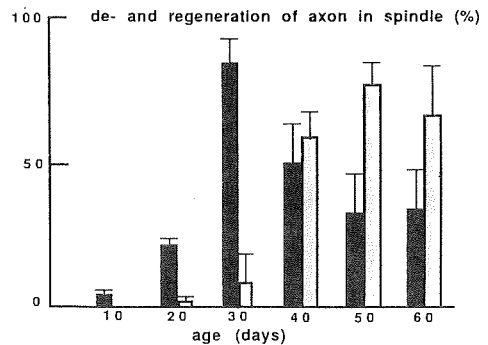
1) 軸索終末は一定の期間までは正常に発育する。すなわち, いわゆる先天性の hypoplasia ではない。

2) 病変は時間とともに細胞本体に向かって進む。

このニューロンの変性パターンは ‘dying-back’ 現象として知られており, 種々の変性神経疾患の病因に関連していることが推測されている。

本マウスでは変性の進展が20-40日の間においてみられたが, この期間は急激な身体発達の時期に一致する。このことより, この変性の機序としてニューロン細胞体が身体発育に見合うだけの軸索伸長を行い得ない(たとえば細胞骨格タンパク質の合成, 輸送の障害)ために軸索末端より異常が始まるということが考えられる。この仮説が妥当なものとする, ヒト遺伝性神経変性疾患の中で, 若年発症するもの, 例えば Friedreich's ataxia, hereditary sensory and motor neuropathy の発症において身体発育の程度が重要な因子になりうるということが推測される。

3) 本マウスでは末梢側において軸索の再生が認められたが, 中枢側での再生線維の有無を検討することにより, 中枢神経系と末梢神経系内での軸索再生能の違いを明らかにしうるのはと考えられる。



図の説明

筋紡錘内での軸索変性 (■) と再生 (▨) の頻度。

## 新しい興奮性アミノ酸アクロメリン酸によるラット対麻痺モデルについて

郭 伸, 相澤仁志, 篠崎温彦\*, 石田美和子\* (\*都臨床研・薬理)

近年, 興奮性アミノ酸により選択的な神経細胞の変性が生ずることが明らかになり, 変性性神経疾患に見られる選択的神経細胞死の病因に通ずる点で脚光を浴びている。本研究で用いたアクロメリン酸は, ごく最近毒キノコより抽出された物質で, 薬理学的にはカイニン酸, ドーモイ酸と共にカイニン酸受容体のアゴニストでありその脱分極作用はあらゆる興奮性アミノ酸の中でも最も強力である。カイニン酸が海馬に選択的な神経細胞障害性を持つことからアクロメリン酸も中枢神経に対する強力な細胞毒性を持つことが予測され, ラットに全身投与した。

## 方法および結果

Wistar 系ラットにアクロメリン酸3-5mg/kgを全身的に投与し, これによる行動上の変化を観察した。アクロメリン酸投与後後肢の痙性麻痺を生じた2匹のラットにつき, それぞれ7日目, 86日目に灌流固定により組織学的な変化を検索した。第一仙髄の神経細胞の cytometry を行った。

行動上の変化は後肢・尾に限局し, 30分後より尾がヘビのような動きを始め, 後肢が伸展し, 腰を高く上げる不自然な姿勢を取るようになった。後肢の伸展は徐々に増強し, 痙攣に移行すると共に持続的になった。投与後90分には全身痙攣が起こり30分間持続, その後後肢の弛緩性麻痺を生じた。投与翌日には二匹が痙性対麻痺を呈した。この痙性はアクロメリン酸の追加投与なしに最長86日間の観察期間の間ほぼ不変のまま経過した。組織学的には, 投与7日目のラットでは, 腰仙髄灰白質中心部に限局した神経細胞の変性像と著明なグリオーシスが認められた(図A, B)。86日目では, 神経細胞数の減少が明らかであったが, 前角運動ニューロン・白質・前根はよく保たれていた。細胞計測の結果は, 7日, 86日も小経細胞の減少を示していた。胸髄レベルより吻側には, 海馬を含め異常所見を認めなかった。

## 考 察

アクロメリン酸の全身投与がラットに及ぼした影響は, ほとんどが腰仙髄の病変によると考えられる。即ち, 投与まもなく出現した尾・下肢の異常運動, 下肢の伸展, 投与翌日より長期間持続する痙性対麻痺である。病理学的には, 脊髄白質および脊髄前根・後根が保たれていたことから, 脱落した小径神経細胞は脊髄介在ニューロンであると思われる。末梢神経, 筋には著見を認めず, アクロメリン酸の全身投与によってラットに作り出された半永久的な痙

性対麻痺は脊髄介在ニューロンの選択的な変性によると考えられる。

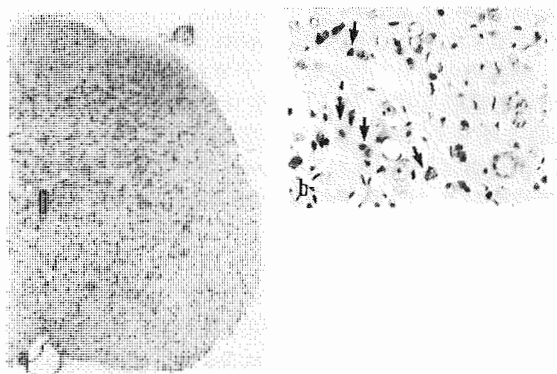
アクロメリン酸による神経変性のメカニズムは, 広くグルタミン酸等の興奮性アミノ酸の持つ excitotoxic mechanism によるものと考えられる。しかしながら, 薬理学的特性が似ているにもかかわらず, カイニン酸の神経細胞毒性とは変性部位が全く異なっている。両物質が同じ受容体に働くと考えては両者の神経変性作用の違いを説明できないので, カイニン酸受容体のサブタイプの可能性を含め今後検討を要する課題である。

脊髄介在ニューロンの選択的変性という病理像は所謂 stiffman 症候群およびその関連疾患として報告されたものおよび動物での脊髄の虚血実験の中に見いだすことができる。したがって stiffman 症候群の病因, 脊髄の虚血による神経脱落のメカニズムにある種の興奮性アミノ酸が関与していることが予想される。

## References

- 1) Kwak S., Aizawa H., et al. In AminoAcids: Chemistry, Biology and Medicine (Eds Lubec G & Rosenthal GA) ESCOM Science, 318 1990.
- 2) Shinozaki H., Ishida M., et al.:Brain Res. 503, 330 1989
- 3) Shinozaki H., Ishida M. et al.:Brain Res. 399, 395 1986.

Figure:a:First segment of paraplegic rat 7 days after the injection of acromelic acid.  
b:Magnified view illustrates degenerated neurons occasionally with reactive glias(arrow)





mdx マウス骨格筋の静止状態における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度

吉田瑞子

Duchenne 型筋ジスロフィー症の骨格筋内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、膜異常のため高濃度になっていると予測されてきた。その確認のために昨年に引き続き筋ジスロフィー症モデルマウス (mdx) の骨格筋細胞内の静止状態における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定した。

## 試料および方法

3週齢と16週齢の mdx とその対照マウス B10の雄を、各々10匹ずつ検索した。骨格筋は長指伸筋を筋束で使用した。腱から腱までを採取した筋束は、緩衝液中で長指伸筋以外のものをできる限り除去した。

緩衝液は Hank's-HEPES (pH7.35, 25°C) を用いた。

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の検出は、蛍光プローブ fura-2を用い、画像解析法で行った。fura-2の筋細胞内負荷は、膜透過性の fura-2-AM (10  $\mu\text{M}$ ) とその膜透過性を高める pluronic F-127 (0.08%) を緩衝液に加え、超音波で分散し、その中に筋束を入れ、微量の  $\text{O}_2 : \text{CO}_2 = 95 : 5$  を吹き込みながら、10°Cで1.5~2.0時間浮置した。その筋束を25°Cの緩衝液で洗滌後セルに固定した。

筋束の固定は、腱をアロンアルファーで培養用カバーガラスに直接接着した。この筋束を落射型蛍光顕微鏡下に設置し、緩衝液を灌流した (25°C)。

画像解析を行うために、筋細胞を Xe 光源から340と360nmの励起光で照射して、それぞれの蛍光像を、超高感度カメラで撮影し、モニターで観察しながらビデオテープに記録した。

筋細胞は自己発光があるが、細胞の重なりが少ないところは自己発光強度が小さいので、その部位の細胞を1枝につき、約20本検索した。fura-2を負荷した筋細胞が、機能を維持していることを caffeine 処理で調べ、蛍光が  $\text{Ca}^{2+}$  と結合した fura-2のものであることを 1  $\mu\text{M}$  ionomycin 処理で確認した。

細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、ビデオに記録した蛍光像を画像解析装置で処理し、蛍光強度化 (I 340/I 360) を求め、検量線より算出した。

検量線は Ca 緩衝液に fura-2とタンパク質を加えて作成した。Ca 緩衝液は Harafuji-Ogawa<sup>1)</sup>に則った Horiuchi<sup>2)</sup>の方法を模倣した。溶液は25°C, pH7.00, I=0.20の条件で、10mM EGTA, 4.3mM ATP, 5.0mM  $\text{MgCl}_2$ に、作成する  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に必要な  $\text{CaCl}_2$ 量とそれに対応する KCl量を加え調整した。この Ca 緩衝液に40  $\mu\text{M}$  fura-2と  $\gamma$ -globulins (S

igma, 5009) を50mg/ml, 80mg/mlあるいは100mg/mlを加えて、検量線用標準溶液とした。この標準溶液を筋細胞とほぼ同じ太さのガラス毛细管に封入し、25°Cの水の中に入れ、蛍光顕微鏡下で筋細胞と同じように蛍光像を得て、蛍光強度比より作成した。

## 結果と考察

最近 fura-2は細胞内蛋白質と結合するので、無機塩類のみで作成した検量線は、細胞内の正確な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を反映しないことが明らかになった。そこで細胞内に近づけるため、 $\text{Ca}^{2+}$  緩衝液に50mg/ml, 80mg/mlあるいは100mg/mlの割合で、 $\gamma$ -globulinsを加えて検量線を作成してみると、生理的  $\text{Ca}^{2+}$  より高濃度では、 $\gamma$ -globulins の濃度が高くなるにつれ、蛍光強度比が小さくなった。しかし生理的  $\text{Ca}^{2+}$  濃度より低濃度では、大きな差はなかった。そこで筋細胞内可溶性蛋白質は約80mg/mlなので、一応80mg/ml- $\gamma$ -globulins で作成した検量線を用いて検索した。

fura-2を負荷した筋細胞は滑らかで、5mM caffeine を作用すると収縮振動を示し、筋細胞の機能を維持していることを示した。また1  $\mu\text{M}$ の ionomycin を作用させると、蛍光強度比が高くなり、細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入して fura-2に結合したことを示した。すなわち fura-2-AM が細胞内で fura-2に分解して  $\text{Ca}^{2+}$  と結合していることを示した。

3週齢と16週齢の mdx とB10マウス (雄) の各々10匹の長指伸筋の蛍光強度比は、いずれの場合も0.65~0.80であった。mdx とB10間、週齢間において差異は認められなかった。この蛍光強度比を検量線より、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度に換算すると50~100nMであった。これは現在迄予測されている細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に一致する。これ等の結果より、mdx マウスの静止状態における長指伸筋肉の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、正常値であることを結論する。

## まとめ

mdx マウスの静止状態における長指伸筋内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、正常値であった。

## 文献

- 1) Harafuji H, Ogawa, Y : J Biochem. 87 : 130-1312, 1980
- 2) Horiuchi K : J Physiol. 373 : 1-23, 1986

## 進行性淡蒼球変性症脳の神経伝達物質変化 ——特に淡蒼球視床路の視床内終止について——

相澤仁志, 郭 伸, 清水輝夫\*, 柴崎 浩, 萬年 徹\* (\*東大脳研神経内科)

淡蒼球 (GP) は視床に大きな投射線維を送り、大脳基底核の主要な出力路であると考えられている。しかし、その病変に特異的な症状や神経伝達物質変化、淡蒼球視床路の視床内終止についてヒト脳では十分明らかにされていない。そこで、GPに限局した中枢神経病変を持つ進行性淡蒼球変性症状 (PPD) を対象としてこれらを明らかにした。

### 対象と方法

**症例:** 62歳男性。48歳頃より、動作緩慢・歩行障害で発症。56歳頃より徐々に、眼球運動・構音及び四肢・軀幹の動作緩慢が著明により、62歳に死亡。緩徐進行性の経過を示し、眼球運動を含む全身の著明な動作緩慢が特徴であった。**神経病理所見:** GPに限局した神経細胞の脱落と gliosis, およびKB染色ではGPの投射線維のミエリンの淡明化が見られた。視床下核 (ST) は軽度萎縮していたが、神経細胞は保たれていた。そのほかの中枢神経系には黒質を含め異常所見を認めなかった。**方法:** PPD 1例と正常対照例16例 (年齢43-79歳) の凍結保存脳より淡蒼球外節 (GPe)・淡蒼球内節 (GPi), 尾状核, 被殻, 側坐核, 視床下核 (ST), 黒質, 大脳皮質, 視床垂核をそれぞれ切り出し、ガンマアミノ酪酸 (GABA), グルタミン酸, コリンアセチル転換酵素 (ChAT) 活性, モノアミンを測定した。病理変化の強いGPの神経細胞数を計測した。視床VL核のレベルの前額切片において microdissection 法<sup>1), 2)</sup>を用いGABA微細分布を測定した。

### 結果

神経伝達物質: PPD脳のGABAはGPe, GPi, STで低下, グルタミン酸はGPiで増加, ChAT活性はGPe, GPi, 視床VA核・VL核で増加。GPの神経細胞数は、淡蒼球の萎縮による体積の減少を考慮にいれると、それぞれコントロール脳GPの神経細胞数の約30% (GPe), 26% (GPi)と著明に減少していた。GABA濃度は視床垂核レベルではコントロール群と差はないが、microdissection法ではコントロール群で特徴的にみられる patchy なGABAの分布様式がVL核の外側で消失しており、GABA濃度が一様に低下していた (図)。

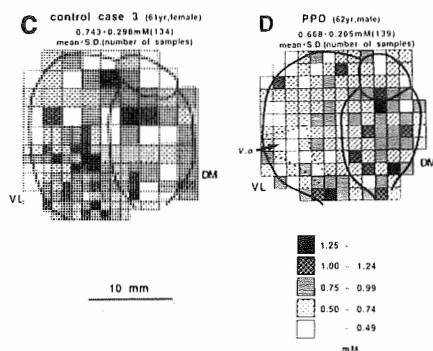
### 考察

(1) PPD脳の神経伝達物質変化はすべてGPとその投射系に限局していたので、神経病理学的に見られた選別的なGP病変を反映していると考えら

れた。GPのGABAの低下は、主に線条体からのGP内入力線維終末の変性のため、STのGABAの低下はGPe由来のGABA作動性神経線維及び神経終末の変性のためと考えられる。GPiのグルタミン酸はSTからの入力線維に由来しているので、GPiの萎縮による濃縮効果のためであろう。ChAT活性の亢進した部位学的GPとその投射系のみに限局しているのは、GP病変に対する何らかの代償作用の現れであろう。(2) PPD脳の病変は神経病理学的にも神経伝達物質の変化からも淡蒼球に限局していたので、本症例の主要な症状である動作緩慢は淡蒼球病変に拠るものであり、Parkinson病のakinesiaと近似しているが両者の病態生理は異なっていると考えられる。(3) コントロール脳の視床で見られた patchy なGABA分布様式がPPDでは外側腹側 (VL) 核の外側部を中心に消失し、一様にGABA濃度が低下していた。これはヒトの淡蒼球視床路の神経伝達物質にGABAが含まれていること、さらにそれが、VL核に patchy に終止していることが示唆される。動物脳では autoradiography<sup>3)</sup>で淡蒼球視床路の終止がVL核内に濃淡をもって分布していることが明らかにされており、我々の得たヒト脳におけるGABAの patchy な分布と類似している点で興味深い。

### 文献

- 1) Kanazawa I: Brain Microdissection Techniques, IBRO chap 3: 127-153, 1983
- 2) Kwak S, Kanazawa I, Sugita H and Toyokura Y: Neurosci, 13: 717-731, 1984
- 3) DeVito JL and Anderson ME: Exp Brain Res, 46: 107-117, 1982



## 遺伝性運動失調マウスの脳内NGFレベル

松井京子, 古川昭栄, 柴崎 浩, 菊池建機

神経成長因子 (NGF) は後根神経節細胞, 交感神経節細胞の分化や生存維持に重要な栄養因子として知られている。中枢神経系においても大脳基底核のコリン作動性神経細胞に作用すると考えられているが, 脳内における NGF の生理的役割については十分明らかにされていない。そこで各種の遺伝性運動失調マウスを対象とし, 脳内 NGF 濃度の測定を行い, 雄雌差, 系統差を検討するとともに, 運動失調と NGF との関連性について検討した。

### 材料と方法

マウス: reeler (B6C3Fe-a), weaver (B4CBA), staggerer (C57BL/4J), PCD (C57BL/4J) および対照としてそれぞれ同腹の非発症正常歩行マウス (control マウス)。NGF の測定: マウスはクロロホルムで屠殺後, 脳を摘出し, 氷上で小脳とそれ以外の脳 (以後大脳という) にわけ, 使用まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。脳試料は5% (W/V) でホモジナイズ用溶液 (組成: 0.1 M Tris-HCl buffer, PH 7.6; 1.0M NaCl; 2% (W/V) 牛血清アルブミン; 0.02%  $\text{NaN}_3$ ; 0.08u/ml aprotinin 中にひたし, 超音波破壊後, 遠心分離 (3万回転, 10分) して得た上清中の NGF を古川らの Two-site EIA 法に準じ定量した。

### 結果

系統差および性差に基づく NGF レベル: 運動失調マウスの由来系統は staggerer と PCD が同じ C57BL/4J で weaver は B4CBA, reeler は B6C3Fe-a である。雄雌正常マウスで NGF レベルを比較してみると, 雄雌間, 系統間で NGF レベルには大きな差があることが認められた。最もレベルの高い系統は B4CBA であり, 最も低い B6C3Fe-a より5倍も高かった。各系統とも, 雄は雌の2~5倍高い値を示した。

運動失調マウスの脳内 NGF 濃度: reeler, weaver, staggerer の小脳 NGF 濃度はそれぞれの control マウスより顕著に低下していた。staggerer の雌の小脳だけが例外的に差を認めなかった。control マウスと同様に雌雄差が認められた。大脳においても小脳と同様に reeler, weaver, staggerer で NGF レベルの低下が認められた。しかし, PCD は雌雄とも, 小脳, 大脳いずれも正常との間に有意差を認めなかった (図)。

### 考察

これまで脳内 NGF の研究はラットが用いられ,

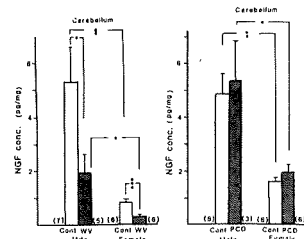
マウスに関する報告は非常に少ない。今回我々の成績でマウス脳内 NGF レベルに雌雄差, 系統差を認めた。雌雄差に関しては Semba-Kato らの最近の報告と一致していた。ラットには雌雄差はないことからマウスはラットと異なり, なんらかの性ホルモンや系統特異的な因子によって脳内 NGF レベルが調節されていることが考えられる。

運動失調マウスの小脳の主な形態学的特徴として, reeler はプルキンエ細胞と顆粒細胞の層構造の逆転, weaver は顆粒細胞の変性, staggerer はプルキンエ細胞—顆粒細胞のシナプスの欠損, PCD はプルキンエ細胞の変性脱落などが報告されている。reeler, weaver および staggerer はともに顆粒細胞の減少が認められていることから, 小脳 NGF レベルの減少と顆粒細胞の減少との間に何らかの関連性があると推定される。

NGF は NGF 応答神経細胞の標的となる細胞側で合成・分泌され, 神経終末から取り込まれ, 軸索内を逆行輸送によって神経細胞体へ運ばれ作用すると考えられている。これらのことから, reeler, weaver, staggerer においては NGF の合成・分泌あるいは輸送過程においても障害があることも十分推定される。

### 文献

- 1) Furukawa, S., Kamo, I., et al: J. Neurochem. 40, 734-744 (1983)
- 2) Kato-Semba, R., Semba, R., et al: J. Neurochem. 52, 1559-1565 (1989)



Mean NGF concentrations in the brains of weaver (WV) and Purkinje cell degeneration (PCD) comparing control mice (Cont).

( ) : number of subjects

A vertical line on the top of each bar is S. E. M.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

## 5. 疾病研究第5部

### 1. 研究部一年のあゆみ

先天性代謝異常症の中樞神経障害の成因を解明し、治療法を開発することを目的とした研究部である。前年度に鈴木義之部長が退職し、今年度の前半は桃井隆室長の研究グループによって研究が継続されていた。平成2年1月1日に桜川宣男が国立精神・神経センター武蔵病院より配置換えとなり、部長に赴任した。流動研究員の佐藤淳子が平成1年12月31日に退職した。平成2年2月1日より、国立療養所西多賀病院の大村清、武蔵病院小児神経科の吉川秀人が併任研究員として参加した。また、同日より嵐山郷コロニーの新井幸男、東邦大学大森病院小児科の有本潔、東京都臨床医学総合研究所の長尾芳朗が研究生として参加した。養田正文は昨年引き続き研究生として、また甲有理は研究助手として研究を行った。2月1日より、東京都臨床医学総合研究所の桜庭均が客員研究員として研究の指導にあたった。

本年度の主な研究テーマは次の通りである。

#### 1) 形態形成因子（モルフォージェン）としてのレチノイン酸について。

(i) ニワトリ胎児中には2種類 CRABP（細胞内レチノン酸結合タンパク）、タイプ I と II が存在することを見いだした。タイプ I は発生初期の中樞神経系に、タイプ II は筋肉、骨形成期に強く発現した。タイプ I の発生初期中樞神経系での分布により、神経系前後軸形成にレチノン酸が関与することが示唆された。

(ii) RAR（核内レチノン酸受容体）に対する特異抗体を合成ペプチドより作製し、ニワトリ肢芽（3-4日胚）における RAR の分布を調べたところ、RAR は肢芽の anteriorproximal 領域の細胞群に特異的に発現することから、この領域の細胞が、肢芽形成に重要な役割を果たすことが考えられた。

#### 2) Drug-induced lipidosisの作製。

Amphiphilic cationic drugs および種々の ionophore が皮膚繊維芽細胞の sphingomyelinase 活性低下を惹起する（既報）と同時に、cholesterol esterification をも障害することを見いだした。

#### 3) リピドージスの薬剤療法の開発研究。

DMSO による sphingomyelinase 活性上昇作用の発見に基づいて、Niemann-Pick 病タイプ II S の患者に治療効果を認めている。種々のリピドージスについても検討を行っている。

#### 4) 先天性代謝異常症の PET 研究。

小児神経科との共同で、主としてリピドージスの脳循環と酸素代謝について研究した。

（部長 桜川宣男）

## 2. 研究業績

### A. 論文

#### a. 原著

- 1) 吉川秀人, 加我牧子, 桜川宣男, 加我君孝 :  
Tay-Sachs 病における驚愕反応の神経耳科学的検討——聴覚過敏という表現の不適當性について  
脳と発達 21 : 583-585, 1989
- 2) 吉川秀人, 笛木昇, 米山均, 小川誠, 桜川宣男 :  
興味深い CT, PET 所見を示した SSPE の1例  
日本小児放射線研究会雑誌 5 : 46-47, 1989
- 3) 清水教一, 野田泰子, 吉川秀人, 桜川宣男, 有馬正高 :  
頭部 CTscan, MRI が正常であり, PET にて右側頭葉病変が認められたヘルペス脳炎の一乳児例  
日本小児放射線研究会雑誌 5 : 64-65, 1989
- 4) 新井幸男, 野田泰子, 桜川宣男, 荒木克仁, 岩田俊 :  
複雑部分発作に対するフルニトラゼパムの使用経験  
小児科臨床 42 : 97-101, 1989
- 5) 東條恵, 桜川宣男, 須貝研司, 前田香織, 桒中征哉 :  
最重症型ネマリソ・ミオパチーの5歳女児例——発達と経過と臨床的位置づけ——  
神経内科 30 : 53-60, 1989
- 6) 鈴木文晴, 高梨愛子, 平山義人, 桜川宣男, 有馬正高, 館野昭彦, 小出博義 :  
Rett 症候群の CT スキャンの検討——16例の CT スキャン像について  
小児科臨床 42 : 1002-1007, 1989
- 7) 鈴木文晴, 平山義人, 桜川宣男, 有馬正高 :  
Rett 症候群の CT スキャンの検討——5例の経時的変化について——  
脳と発達21 : 321-326, 1989
- 8) 野田泰子, 岩崎裕治, 坂井香織, 萩野谷和裕, 桜川宣男, 有馬正高 :  
重症型ネマリソ・ミオパチーにおける呼吸制御, 睡眠時ポリグラフの検討  
臨床脳波 31 : 253-256, 1989
- 9) 多田博史, 三宅太, 山田美智子, 岩本弘子, 諸岡啓一, 桜川宣男 :  
小に交互性片麻痺の年長児の1例  
脳と発達 21 : 283-288, 1989

- 10) 吉川秀人, 桜川宣男, 新田初美 :  
Congenital cerebellar ataxia 9例の臨床的, および CT, MRI による検討  
脳と発達 22 : 9-15, 1990
- 11) 吉川秀人, 鈴木文晴, 加我牧子, 桜川宣男 :  
Rett 症候群の体性感覚誘発電位 (SEP), 特に Giant SEP について  
脳と発達 22 : 186-188, 1990
- 12) 岩崎裕治, 須貝研司, 桜川宣男, 埜中征哉 :  
Neuronal ceroid lipofuscinosis の1例——筋生検および TRH 療法を中心とした検討——  
脳と発達 22 : 189-190, 1990
- 13) 吉川秀人, 佐々木征行, 昆かおり, 桜川宣男 :  
若年型 Gaucher 病の脳波所見  
臨床脳波 32 : 278-284, 1990
- 14) 吉川秀人, 笛木 昇, 鈴木文晴, 桜川宣男 :  
RETT 症候群の脳循環代謝  
脳と発達 22 : 216-222, 1990
- 15) 吉川秀人, 山田和孝, 桜川宣男, 有馬正高 :  
高脂血症を伴い脳梗塞を繰り返した糖尿病Ⅱb, 小児型の1例  
日本小児科学会雑誌 94 : 363-367, 1990
- 16) 野田泰子, 坂井香織, 東條 恵, 桜川宣男, 有馬正高 :  
乳児期発症重症型ネマリソミアチーの最年長生存例  
脳と発達 22 : 82-85, 1990
- 17) 吉川秀人, 松尾多希子, 桜川宣男 :  
L-dopa が著効を呈した, 運動によって悪化し休息により回復するジストニアの1女児例  
脳と発達 22 : 290-292, 1990
- 18) Toyoda M, Sakuragawa N, Arai Y, Yoshikawa H, Sugai K, Arima M, Hara T, Iio M,  
Satoyoshi E :  
Positron emission tomography using pyruvate-1-<sup>14</sup>C in two cases of mitochondrial  
encephalomyopathy  
Ann Nucl Med 3 : 103-109, 1989
- 19) Yoshikawa H, Fueki N, Sugai K, Araki A, Sakuragawa N, Iio M :

## II 研究業績

Decreased blood flow and oxygen metabolism in the cerebellum, brain stem and thalamus in a case with Menkes kinky hair disease

Brain & Devel 11 : 426-429, 1989

- 20) Murakami A, Konomi H, Itokazu N, Arima M, Sakuragawa N, Nakajima A, Tanaka M, Tajima S, Hayashi T, Kino J :

Partial characterization of an unusual 185kDa protein synthesized by identification of the protein as Type IV collagen

J Biochem 106 : 490-494, 1989

- 21) Aikawa H, Momoi T, Kitamoto T, Arahata K, Momoi M :

Expression of cellular retinoic acid binding protein(CRABP) in adult rat brain.

Biomed Res 10 : 247-250, 1989

- 22) Kitamoto T, Momoi M, Momoi T :

Expression of cellular retinoic acid binding protein II (Chick-CRABP II) in the chick embryo.

Biochem Biophys Res Commun 164 : 531-536, 1989

- 23) Momoi T, Momoi M, Kumagai H, Utsumi H, Tomita M-S, Takao A :

The expression of retinoic acid receptor in the chick limb bud during early developmental stages.

Proc Jap Acad 65 : 191-194, 1989

### b. 著 書

- 1) 桃井 隆 :

神経系におけるオンコジーンとモルフォージェン。

脳の神経栄養因子と先天性代謝異常, 永津俊治, 吉田充男, 金沢一郎, 小川紀雄編, 平凡社

### c. 総 説

- 1) 桜川宣男 :

小児交互性片麻痺

小児科 21 : 570-572, 1989

- 2) 桜川宣男 :

Niemann-Pick 病の新しい治療法——リソソーム病に対する薬剤療法の可能性について——

小児科 31 : 1891-198, 1990

3) 桜川宣男, 有馬正高 :

小児脳虚血性疾患の特異性について。

小児脳血管障害, The 7th Meeting of The Mt. Fuji Workshop on CVD.

Vol 7, 137-143, 1989

4) 吉川秀人, 桜川宣男 :

VII. 疾患による画像診断の種類と適応。神経疾患

小児科診療 53 : 970-978, 1990

5) 桃井真里子, 桃井隆 :

形態形成因子としてのレチノイン酸と神経形成。

神経研究の進歩 33 : 495-506, 1989

## d. 班会議報告書

1) 桜川宣男, 吉川秀人, 笛木 昇, 飯尾正明 :

ポジトロンエミッショントモグラフィーによる亜急性硬化性全脳炎の病態の検討

厚生省精神・神経疾患・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班, 平成元年度報告書 p118-128, 1990

2) 米山 均, 吉川秀人, 笛木 昇, 桜川宣男 :

虚血性脳病変を呈した, SSRE 患児に対する idebenone (Avan) による治療の試み

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, 昭和63年度報告書 p85-89, 1989

3) 米山 均, 吉川秀人, 笛木 昇, 桜川宣男, 岡庭真理子, 鈴木秀典 :

発達期における成因の異なった脳循環障害3例のCT上の経時的变化と予後について

厚生省精神・神経疾患・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班, 昭和63年度報告書 p91-94, 1989

4) 桜川宣男, 笛木 昇, 吉川秀人, 飯尾正明 :

予後良好な術後水頭症3例の脳循環代謝及び誘導電位について

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班, 昭和63年度研究報告書, p97-100, 1989

5) 桃井 隆, 北本年弘, 相川久志, 西川 徹, 花岡和則, 桃井真里子 :

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タンパクの分布と発現。

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, p-99-103, 1989



B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

b. 国際学会

c. 一般学会

- 1) 桜川宣男, 吉川秀人, 佐々木征行, 須貝研司, 福島直喜, 原 孝 :  
先天性代謝異常症に対する羊膜組織移植術について : 術式, 応用および問題点  
第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 7, 1989
- 2) 吉川秀人, 鈴木文晴, 笛木 昇, 平山義人, 桜川宣男 :  
Rett 症候群の脳循環代謝  
第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 7, 1989
- 3) 笛木 昇, 吉川秀人, 荒木 敦, 福島直喜, 桜川宣男 :  
術後水頭症3例の脳循環代謝について  
第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 8, 1989
- 4) 米山 均, 吉川秀人, 笛木 昇, 桜川宣男, 岡庭真理子, 鈴木秀典 :  
小児期の Watershed 型虚血性脳病変についての検討  
第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 7, 1989
- 5) 清水教一, 野田泰子, 岩崎裕治, 桜川宣男 :  
心臓伝導障害を合併した Krabbe 病の長期生存例  
第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 6, 1989
- 6) 須貝研司, 岩崎裕治, 高梨愛子, 清水教一, 米山 均, 笛木 昇, 荒木 徹, 桜川宣男, 有馬正高 :  
脳波モニター下抗痙攣剤静注による難治性てんかんに対する抗痙攣剤の効果予測  
第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 7, 1989
- 7) 須貝研司, 高梨愛子, 岩崎裕治, 吉川秀人, 野田泰子, 清水教一, 糸数直哉, 花岡 繁, 桜川宣男,  
有馬正高 :  
Giant SEP を示した25例の臨症的検討  
第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 7, 1989
- 8) 鈴木文晴, 高梨愛子, 清水教一, 平山義人, 桜川宣男, 有馬正高 :  
Rett 症候群19例の CT スキャンの検討  
第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 8, 1989
- 9) 鈴木文晴, 平山義人, 桜川宣男, 有馬正高 :

Rett 症候群の CT スキャンの経時的変化の検討

第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 8, 1989

- 10) 高梨愛子, 桜川宣男, 加我牧子, 水戸 敬, 高嶋幸男 :

副腎白質ジストロフィーの長期生存例——神経生理と病理所見を中心に——

第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 8, 1989

- 11) 花岡 繁, 須貝研司, 荒木 敦, 米山 均, 清水教一, 桜川宣男, 有馬正高 :

長期呼吸管理児に対する気管切開適用と呼吸管理の際の合併症

第31回日本小児神経学会 札幌, 7. 6, 1989

- 12) 桜川宣男, 吉川秀人, 佐々木征行, 福島直喜, 笛木 昇 :

種々のリポドージスに対する DMSO の治療効果 : 臨床的, 生化学的検討

第32回日本先天代謝異常学会 福井, 11. 16, 1989

- 13) 稲田成安, 阿部東子, 地頭所 保, 田代克弥, 川下智子, 桜川宣男 :

Tay-Sachs 病の1例

日本小児科学会鹿児島地方会 第83回例会 鹿児島, 10. 15, 1989

- 14) 吉川秀人, 笛木 昇, 桜川宣男 :

興味深い CT, PET 所見を呈した SSPE の1例。

第21回日本小児放射線研究会 久留米, 10. 13, 1989

- 15) 吉川秀人, 笛木 昇, 荒木 敦, 須貝研司, 桜川宣男 :

Menkes 病の PET 所見。

第22回日本小児放射線研究会 埼玉, 5. 11, 1989

#### d. 研究会など

- 1) 桜川宣男 :

小児の神経発達のみかた——1歳6カ月検診におけるボーダーラインの児のフォロー

東京都市保健衛生事務連絡協議会保健婦部会講習会 東京, 5. 22, 1989

- 2) 桜川宣男 :

代謝性神経疾患の最近のトピックス

第1回長崎県小児神経懇談会 長崎, 9. 15, 1989

#### C. 班会議発表

- 1) 吉川秀人, 笛木 昇, 桜川宣男 :

## II 研究業績

### 亜急性硬化性全脳炎の PET 所見

厚生省精神・神経疾患・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班第1回班会議, 京都, 8. 25, 1989

2) 吉川秀人, 笛木 昇, 山内秀雄, 桜川宣男 :

基底核領域にのみ血流, 酸素代謝の残存を認めた症例の臨床的検討

厚生省精神・神経疾患・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班第2回班会議, 2. 1, 1990

3) 桜川宣男, 笛木 昇, 吉川秀人 :

水頭症状患者の脳局所血流量のフラッシュ刺激前後の変化について

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班会議, 東京, 12. 22-23, 1980

4) 桜川宣男, 多田博史, 諸岡啓一, 有本 潔 :

小児交互性片麻痺における尿中 5-HIAA の変動の病的意義

厚生省精神・神経疾患・発達期における脳循環障害調査研究班会議, 東京, 1. 17, 1990

5) 米山 均, 末広牧子, 桜川宣男 :

CPT 欠損症における糖・パルミチン酸呼吸テストについて

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の療養と看護に関する臨床的・心理学会的研究班会議, 東京, 11. 28-29, 1989

6) 柳原美奈子, 桜川宣男 :

PMD 患児(小児)の母親の意識調査

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の療養と看護に関する臨床的・心理学的研究班会議, 東京, 11. 28-29, 1989

7) 山口 明, 増田国男, 萩原理美, 佐藤福志, 駒沢愛子, 江上祐子, 山勝裕久, 酒井和江, 宮本冬陽子, 下田文幸, 柳原美奈子, 北村純一, 平山義人, 桜川宣男 :

筋ジスデイケアの試みについて

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症の療養と看護に関する臨床的・心理学的研究班会議, 東京, 11. 28-29, 1989

## 3. 主な研究報告

## 種々のリビドージスに対する DMSO の治療効果：臨床的、生化学的検討

桜川宣男, 佐々木征行, 吉川秀人

Dimethylsulfoxide (DMSO) の Niemann-Pick 病タイプC (NPC) に対する臨床的有効性および皮膚線維芽細胞の欠損酵素活性の正常化については既報のごとくである。今回われわれは、その他の種々のリビドージスについて検討した結果、若年型 Gaucher 病にも DMSO 治療の有効性を認めたので報告する。

## 対象

皮膚線維芽細胞の DMSO 効果判定を行った対象は下表に示した。臨床的に DMSO 治療を試みた症例は、NPC (#1, #2), 若年型 Gaucher 病 (#3), Tay Sachs 病 (#5), 若年型異染性白質変性症 (#10) である。

## 研究方法

## 1) 培養細胞に対する DMSO 効果について。

細胞の実験条件については、既報のごとくである。

## 2) 酵素活性の測定

HN-Galactosidase は Gal et al. の方法にしたがって測定し、arylsulfatase A の測定は Baum et al. の原法に準じた。その他の酵素活性の測定法は既報の通りである。

## 3) DMSO 治療法

精製された DMSO (菱山製薬) を最大100-150 mg/kg の経口投与を行った。

## 結果

1) 培養細胞の酵素に対する DMSO の効果 NPC に対する DMSO の効果は既報のごとくである。その他のリビドージスの欠損酵素の残余活性に対する DMSO の効果として、その活性上昇率は残余酵素の91.0-170%であった。

## 2) DMSO 臨床的治療効果

NPC 2例の臨床的効果は文献3で報告したが、第1例の姉(①)は最近肺炎にて12歳で死亡した。DMSO 150mg/kg/d を約4年間服用し、肝脾腫の縮小、発作の軽減、脳波上の改善などを認めた。第2例の妹(②)は約1年前より強直間代発作出現し、失調性歩行障害、知的退行が進行し始めたために DMSO 経口投与を開始。現在120mg/kg/d 服用し、肝脾腫の縮小、発作の軽減を認めているが、歩行障害と知的退行は緩慢に進行している。

第3例は Gaucher 病の15歳女児。5歳頃自発症様の症状にて発症。13歳に酵素学的に確定診断された。

14歳10カ月および15歳4カ月に羊膜組織移植術を受けた。その後も全身性痙攣発作が頻発。精神運動退行が急速に進行して周囲に対する反応性が低下し、経管栄養となった。DMSO 40mg/kg/d より開始し暫増。約1カ月後より意識レベルの改善がみられ、会話が可能となる。3-4カ月後より小脳性失調症状は残存するも書写可能となり、監視下で歩行器歩行も可能となった。輻輳性眼球運動障害は改善、ミオクロームと全身発作の軽減を認めている。しかし脳波改善はまだみられず、CT 上の変化はなし。白血球の  $\beta$ -glucosidase 活性が0.18から0.76nmol/kg prot/h (正常対象, 0.81-5.0) に上昇。症例 (Tay Sachs 病) と症例10 (MLD) の治療効果は認められなかった。

## 考察

NPC に対する DMSO の治療効果は sphingomyelinase の活性誘導作用の結果と考えられているが、今回の Gaucher 病の臨床上の著明な改善効果も白血球中の欠損酵素活性の上昇と関連が示唆される。最近 Mackie et al は NPC 細胞における LDL コレステロールプロセッシングの異常を DMSO が修復し、その効果は膜透過性の亢進またはコレステロールの溶解性の増加の現れと推測している。臨床的治療効果に対する支持データとして評価される。(第32回日本先天代謝異常学会 福井, 11. 16-18, 1989)

Table Clinical and d biochemical effects of DMSO to patients with different lysosomal dx enzymes in fibroblasts not

clinical

Disease	(nmol/kg prot/hr)	not treated	DMSO	%increase	improvement
①. Niemann-Pick dx. type C	Sphingomyelinase	34.9	149.5	428	++(+)
②.		45.4	163.6	363	-
③. Gaucher's dx. juvenile.	$\beta$ -glucosidase	6.8	8.9	131	++
4.	infantile.	1.7	2.8	170	
⑤. Tay Sachs disease	#1 Hexosaminidase A	23.2	27.7	119	=
6.	#2	9.3	13.5	144	
7.	#3	20.0	19.7	98.6	
8. GM <sub>1</sub> gangliosidosis	#1 $\beta$ -galactosidase	5.6	7.4	130	
9.	#2	18.8	17.7	94.0	
⑩. MLD.	juvenile. Arylsulfatase A	32.3	33.7	104	-
11.	infantile.	7.8	12.9	165	
12. Krabbe's disease	HNGal-ase	5.7	5.2	91.0	

## AY-9944による皮膚線維芽細胞におけるコレステロール・エステル化の阻害

吉川秀人, 桜川宣男

Niemann-Pick type C (NPC) は近年, cholesterol esterification (CE) の障害が証明され, type A および B とは異なり cholesterol lipidosis として定義づけられているが, その病因については未だ解明されていない。一方, AY-9944 は cationic amphiphilic drug (CAD) の 1 つで 7-dehydrocholesterol reductase の阻害剤であり通常は hypocholesteremic drug として作用する。また, AY-9944 をはじめとする CAD は sphingomyelinase 活性を特異的に低下させ, rat に投与して Niemann-Pick 病と類似の病態を生じることが報告されている。また sphingomyelinase の活性を高める DMSO が, NPC の CE を部分的に改善させることが最近報告された。

しかし, AY-9944 の CE に対する AY-9944 の作用について検討し, NPC の病態との関係につき考察した。

## 対象および方法

正常および NPC fibroblasts を Dulbecco MEM 培地で non-confluent な状態まで培養し,  $^3\text{H}$ -cholesterol を培地に加え 24 時間培養した。そのあと, 細胞を pellete にして homogenate し chloroform : methanol (2 : 1) で抽出し薄層クロマトグラフィーで脂質分析を行った。ester 化は ester / free cholesterol 比で評価した。また組織化学で, 細胞内の free cholesterol を染める filipin 染色を行い free cholesterol の蓄積という面からも評価を行った。

## 結果

正常コントロールと, それに  $2\mu\text{M}$  AY-9944 を加えたものと, NPC 細胞について経時的に ester / free cholesterol 比 (図 1) をみた。コントロールでは 24 時間を peak に 4-5% の反応が認められるが, AY-9944 を加えたものでは 1% 以下の反応しか認められず NPC 細胞と同程度まで制御された。Filipin 染色で AY-9944 を加えた正常皮膚線維芽細胞は NPC 細胞と同程度の free cholesterol の蓄積が認められた。AY-9944 の濃度との関係では  $1.0\mu\text{M}$  異常で CE の制御が濃度依存的に認められた。

## 考察

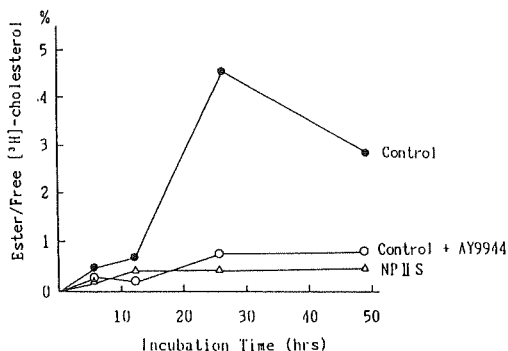
AY-9944 は皮膚線維芽細胞において sphingomyelinase 活性を特異的に阻害するが, 今回の検討では, 理由は不明だが CE を阻害することが明らかになった。Cholesterol と sphingomyelinase はともに膜

の成分でありもっとも密接な関係が存在する。AY-9944 による 7-dehydrocholesterol reductase 制御によって生じる cholesterol と 7-dehydrocholesterol の過剰蓄積が sphingomyelinase 活性を抑制することが推察されている。しかし, これらの異常蓄積が CE にたいして作用するのか, AY-9944 が直接 CE に作用するのか, その機序は不明である。

このような皮膚線維芽細胞における AY-9944 の作用は, drug-induced NPC model を考える上で有用であり, 更に動物実験で NPC model を作る上で有用と思われる。さらに検討を進め, NPC における CE と sphingomyelinase との関係を明らかにする糸口を得たい。

Fig. 1. Time course of the reduction of cholesterol esterification in normal fibroblasts (●), fibroblasts treated with  $2\mu\text{M}$  AY-9944 (○) and NP II S cells (△). Normal and NP II S cells were established as described in Methods. Cells were incubated for the indicated time and harvested.

Cellular levels of unesterified and esterified cholesterol were measured as described in Methods. The results represents the average of duplicate flasks. Cholesterol esterification of fibroblasts treated with AY-9944 decreased to about 10% of control cells at 24 hours of the incubation, and the reduced activity remained almost unchanged during subsequent incubation. There were no apparent morphological changes in the fibroblasts exposed continuously for 3 days to  $2\mu\text{M}$  AY-9944.



ラット脳発達過程における細胞内レチノイン酸結合蛋白 (CRABP) の局在

桃井 隆

ビタミンAの誘導体であるレチノイン酸は、培養系で神経芽細胞をふくむ各種癌細胞の再分化の誘導を促進することが知られている。レチノイン酸の生体内での生理作用は不用であったが、近年、内因性モルフォジェン(形態形成因子)として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になった。

一方、われわれは、レチノイン酸の情報伝達に關与するCRABPがニワトリ発生初期の肢芽のみならず、発生初期の中枢神経系に特異的かつ一過性に発現することを見出ししてきた。本研究において中枢神経系におけるレチノイン酸の生理的意義を明らかにするために、CRABPに対する特異抗体を用いてラット脳発達過程におけるCRABPの局在について検討した。

対象と方法

(1) CRABPの精製とN末端アミノ酸配列の分析

ブタ脳より、CRABPをOngらの方法に従い精製した。精製したCRABPのN末端アミノ酸配列は470A Protein Sequencerにより決定した。

(2) 免疫組織化学染色

各発達段階のウィスターラットの脳を4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、パラヒン包埋した。これらのブロックから6μm厚の切片を作製し、抗CRABP抗体を用いて酵素抗体法による免疫組織化学染色を施行した。酵素抗体法にはストレプトアビジン・ビオチン法を用いた。後染色には、0.1%メチルグリーン溶液をもちいた。対照切片には、一次抗体として免疫前正常ウサギ血清を使用した。

結果

1. CRABPの精製とそのN端解析

ブタ脳より精製した蛋白は、分子量15.5kDaであり、ブタこう丸にみられるCRABPと同じ分子量であった。そのN末端アミノ酸配列を決定するとブタこう丸にみられるCRABPのN端28残基の配列が完全に一致していた(図1)。

2. CRABPの局在

各発生段階におけるCRABP陽性細胞の出現を部位別にまとめた(表1)。CRABP強陽性細胞は、胎児期17日の扁桃体に群を形成しており、また生後10日の線条体に少数ながら強陽性細胞が散在しているのが見られた。脈絡叢においては、E17よりD5までの大部分の上皮組織がCRABP強陽性を示した。

考 察

現在までにCRABPは、ニワトリとラットの胎児において二種類(type IとII)の存在が知られており、主とし、type Iは外胚葉-神経系に、type IIは中胚葉-筋、骨に存在している。我々がブタ脳より精製したCRABPのN-端アミノ酸配列や、抗体によるこう丸CRABPとの反応性も脳に存在するCRABPがtype Iであることを支持した。

免疫組織染色による脳発達過程におけるCRABPの脳内局在部位での時間的推移の結果は、CRABPは胎児期に多く出現し、脈絡叢の上皮細胞や大脳基底核の発達と密接な関係をもっていることを示した。すなわち、CRABPは、大脳基底核に属する線条体と扁桃体の発達過程に伴いCRABP陽性細胞の出現が変化した。扁桃体におけるCRABP陽性細胞の出現(-E17)と消失(E19以後)は扁桃体の神経形成の時期と一致していた。このことは、終脳からの線条体と扁桃体への神経形成の過程にレチノイン酸がCRABPを介して重要な役割を果していることを強く示唆していると思われる。

	Striatum	Amygdala	Hippocampus	Cortex	Cerebellum	Choroid plexus
E 17	±	++	-	-	-	++
E 19	±	++	-	-	-	++
D 0	+		-	±	±	++
D 5	++	+	±	±	±	++
D 10	++		±	±	+	+
D 15	-	-	-	-	±	+
D 20	-	-	-	-	-	-
Adult	-	-	-	-	-	-

		10	20	30
Porcine				
CRABP ( brain )	PNFAGTWKMR	SSENFDELLK	ALGVNAML	
CRABP ( testis )	PNFAGTWKMR	SSENFDELLK	ALGVNAMLK	
-----				
CRABP I ( chick )	PNFAGTWKMR	SSENFDELLK	ALGVNMLR	VAVAAA
CRABP II ( chick )	PNFSGNWKMK	SSENFDELLK	ALGVNMLR	IAVAAA
-----				
CRBP I ( rat )	PVDFNGYKML	SNENFEEYLR	ALDVNVALRK	IANLLK
P2 ( bovine )	SNKFLGTWKL	SSENFDEYMK	ALGVGLATRK	LGNLAK
		10	20	30

脳循環代謝からみた亜急性硬化性全脳炎の病態の検討

吉川秀人, 笛木 昇, 桜川宣男

亜急性硬化性全脳炎（以下SSPE）は麻疹変異株の持続感染によって生じる遅発性進行性脳炎である。しかしその病態に関しては不明な点が多い。神経放射線学的にはCT, MRTでは多くの報告があるが、PETに関しては糖代謝に関して僅かに報告されている程度で脳血流, 酸素代謝に関しては皆無である。臨床病期の異なる3例のSSPE患児にPET施行し病態との関係につき検討した。

対象および方法

対象は臨床病期の異なる3例のSSPE患児である（表1）。尚、臨床病期分類は neurological disability index (NDI) score を用いた Jabbour 分類で行った。PETはHEADTOME-IVを用い脳血流量(CBF), 脳酸素消費率(CMRO2), 脳酸素摂取率(OEF)を定量的に測定した。

結果(表1)

症例1は, Jabbour 分類Ⅱ期でのミオクロームスを認めた脳波上 periodic synchronous discharge (PSD) を認めた。CTは軽度脳萎縮が認められた。PETでは大脳前半部でCBFの増加およびOEF, CMRO2の, 低下すなわちluxury perfusionの所見が認められ炎症の反映と考えられた。症例2はJabbour 分類Ⅲ期で, ミオクロームスは消失し脳波上でもPSDの消失が認められた。CTでは高度脳萎縮がみられ, PETでは後頭部にCBF, CMRO2の残存を認めるのみで広汎な組織破壊の所見が認められた。症例3例はJabbour 分類Ⅲで症例2より更に進行した症例である。ミオクロームス, PSDは消失しCT高度脳萎縮が認められた。PETでは後頭部に僅かにCBF, CMRO2の残存がみられる程度で症例2より更に進んだ破壊の所見が認められた。

考察




以上の検討により, Jabbour 分類Ⅱ期まではミオクロームス, PSDなどを認める活動性の症状を呈しPETでも炎症の所見が得られたことにより, 炎症期という概念でとらえられると思われた。Ⅲ期以降は上記に活動性の所見は消失しPETでも破壊性の所見が認められたことにより破壊期という概念でとらえられると考えられた。従来, Jabbour 分類は臨床的には必ずしも使いやすいものではなく, 明確な分類が困難な症例も多かった。しかし今回の検討によりミオクロームスおよびPSDを指標にして炎症期, 破壊期というような病期に分類できれ

ば明確な分類の進行方向に関しては, CT, EEGによる検討では前から後ろへ進行するという報告が多いが, 病理学的には初期の炎症所見が後頭部を中心に認められるという報告もある。今回のPETの検討では前から後ろへ進行することが示唆されたが, 副腎白質ジストロフィーのように症例により進行方向が異なる可能性もあり更に検討が必要と思われた。

治療に関しても炎症期であれば, 効果を期待できると思われるので, 適応を考慮する場合にも炎症期というような概念は有用と思われた。

	CASE 1	CASE 2	CASE 3
Jabbour Staging	II	III	III
NDI score(%)	49	78	80
Myoclonus	+	-	-
Decorticate posture	-	+	+
PSD	+	-	-
Brain atrophy	mild	severe	severe

PET	inflammation	destruction	destruction
			
	inflammation ■	destruction ▨	

## 6. 疾病研究第6部

### 1. 研究部一年のあゆみ

疾病研究第6部は脱髄疾患，老年期痴呆を中心に主として神経免疫学的，生化学的，分子生物学的手法を用いて研究している。脱髄疾患の研究室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，治療法の開発研究を行っている。老年期痴呆の研究室は，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トリソミーマウスについて主として研究を行っている。

今年度より科学技術庁省際基礎研究「分化神経細胞の不死化技術の開発研究」が始まった。更に科学技術庁総合研究「生体情報伝達機構の解析・制御技術の開発に関する研究」に参加することになった。またヒューマンサイエンス振興財団の受託研究が第2期に入り，「神経・免疫相関と老年期脳障害の発症機序の解明および治療法の開発」で，エーザイ，藤沢薬品，中外製薬，東レとの共同研究が始まった。山之内製薬からは「脳内Ia発現細胞に関する基礎的研究及びその応用」に関する研究に個別の受託研究費を受けた。厚生科学研究補助金による痴呆疾患対策事業では「アルツハイマー型痴呆及び脳血管性痴呆の生化学的・病理学的研究」としてひき続き行われることとなった。更に同事業による国際共同研究「アルツハイマー病の遺伝学的研究」では中心的役割を果たした。この他，文部科学研究費重点領域「脳の老化機構に関する分子細胞生物学的研究」，厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，厚生省新薬開発青柳班，厚生省精神・神経疾患萬年班，御子柴班，宮武班から研究費を受けた。

本年度の研究には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，北口哲雄，[外来研究員] 小西吉裕，小路久敬，榎並淳平，弘瀬秀樹，崔 得華，Alice Mayumi Takeuchi，Osvaldo Massaiti Takayanagui，[客員研究員] 並河 正，新島健司，[併任研究員] 小野寺節，永田頌史，富 英明，[賃金研究員] 大八木保政，二瓶淳子，田平順子，[研究生] 溝口和臣，得地史郎，[賃金研究助手] 掛場康予，吉田里美，久野かほる，下佐洋子。この他津田塾大生がアルバイトとして研究補助を行った。

(部長 田平 武)



## 2. 研究業績

### A. 論文

#### a. 原著

1) Tabira T:

Cellular and molecular aspects of the pathomechanism and therapy of murine experimental allergic encephalomyelitis

Crit Rev Neurobiol 5:113-142, 1989

2) Yamamura T, Tabira T:

Abrogation of spleen macrophage suppressive activity by 15-deoxyspergualin

Int Arch Allergy Appl Immunol 89:211-216, 1989

3) Javier RS, Kunishita T, Koike F, Tabira T:

Semple rabies vaccine: presence of myelin basic protein and proteolipid protein and its activity in experimental allergic encephalomyelitis

J Neurol Sci 93:221-230, 1989

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

Putative N-terminal splitting enzyme of amyloid ingensin, which is widely distributed in mammalian cells

FEBS Lett 257:338-392, 1989

5) Satoh J, Tabira T:

A study of bystander demyelination using T line cells specific for a non-neural antigen

Biomed Res 1:25-31, 1989

6) Ishiura S, Tsukahara T, Tabira T, Shimizu T, Arahata K, Sugita H:

Identification of a putative amyloid A4-generating enzyme as a prolyl endopeptidase

FEBS Lett 260:131-134, 1990

7) Ohyagi Y, Takahashi K, Kamegai M, Tabira T:

Developmental and differential expression of beta amyloid protein precursor mRNAs in mouse

Biochem Biophys Res Commun 167:54-60, 1990

8) Kamegai M, Niijima K, Kunishita T, Nishizawa M, Ogawa M, Araki M, Ueki A,

Konishi T, Tabira T:

- Interleukin 3 as a trophic factor for central cholinergic neurons in vitro and in vivo  
Neuron 4:429-436, 1990
- 9) Hozumi I, Nishizawa M, Ariga T, Inoue Y, Ohnishi Y, Yokoyama A, Shibata A, Miyatake T:  
Accumulation of glycosphingolipids in spinal and sympathetic ganglia of a symptomatic heterozygote of Fabry's disease  
J Neurol Sci 90:273-280, 1989
- 10) Yoneda M, Tanaka M, Nishikimi M, Suzuki H, Tanaka K, Nishizawa M, Atsumi T, Ohama E, Horai S, Ikata F, Miyatake T, Ozawa T:  
Pleiotropic molecular defects in energy-transducing complexes in mitochondrial encephalomyopathy(MELAS)  
J Neurol Sci 92:143-158, 1989
- 11) Tsuji S, Yamauchi T, Hiraiwa M, Isobe T, Okuyama T, Sakimura K, Takahashi Y, Nishizawa M, Uda Y, Miyatake T:  
Molecular cloning of a full-length cDNA for human  $\alpha$ -N-acetylgalacto-saminidase ( $\alpha$ -galactosidase B)  
Biochem Biophys Res Commun 163:1498-1504, 1989
- 12) Hozumi I, Nishizawa M, Ariga T, Miyatake T:  
Biochemical and clinical analysis of accumulated glycolipids in symptomatic heterozygotes of Fabry's disease in comparison with hemizygotes  
J Lipid Res 31:335-340, 1990
- 13) Matsuguchi T, Takahashi K, Ueno T, Endo H, Yamamoto M:  
A novel transcription unit within the exon sequence of the rat insulin growth factor II gene  
Biochem Internat 18:71-79, 1989
- 14) Ueno T, Takahashi K, Matsuguchi T, Ikejiri K, Endo H, Yamamoto M:  
Multiple polyadenylation sites in a large 3'-most exon of the rat insulin-like growth factor II gene  
Biochem Biophys Acta 1009:27-34, 1989
- 15) 来田裕美, 高嶋幸男, 水戸 敬, 田平 武, 西澤正豊, 国下龍英, 中村晴臣 :

## II 研究業績

健常およびダウン症候群脳におけるアミロイド蛋白局在の年齢的变化

医学のあゆみ 149:845-846, 1989

16) 大八木保政, 石本進士 :

長期の潜伏期および非定型的熱型を呈した三日熱マラリアの1例

医療 44:400-403, 1990

17) 田平 武, 小池文彦 :

最近注目されている疾患とウイルス-神経疾患

第22回日本医学会総会々誌 II:594-595, 1988

### b. 著書

1) 田平 武 :

痴呆と免疫

痴ほうの百科 長谷川和夫他監修, 平凡社, p113-119, 1989

2) 西澤正豊 :

Sialidosis 臨床

進行性ミオクローヌステんかん, 内藤明彦, 小柳新策編, 医学書院, 東京, p120-127, 1989

3) 西澤正豊 :

代謝性疾患

神経内科 Quick Reference, 水野美邦編, 文光堂, 東京, p433-448, 1989

### c. 総説

1) 田平 武 :

神経免疫 (アニュアルレビュー)

神経科学レビュー 3:262-270, 1989

2) 田平 武 :

内科キーワード : EAE

内科 63:1106, 1989

3) 田平 武 :

多発性硬化症の発症機構

臨床免疫 21:1284-1293, 1989

4) 田平 武, 小池文彦 :

病気のはなし : 重症筋無力症

検査と技術 17:1366-1370, 1989

5) 田平 武 :

神経と免疫

MEDICO 20:8756-8759, 1989

6) 田平 武 :

多発性硬化症

臨床医 15:1682-1684, 1989

7) 田平 武 :

神経成長因子によるアルツハイマー病の治療

Biomedica 5:53-56, 1990

8) 田平 武 :

T細胞自己免疫—最近のトピックス

神経精神薬理 12:77-84, 1990

9) 宇宿功市郎, 田平 武 :

Postinfectious polyradiculoneuropathy

Annual Review 神経 291-300, 1990

10) 大八木保政, 田平 武 :

多発性硬化症

Clinical Neuroscience 8:175-177, 1990

11) 西澤正豊, 桜庭 均 :

Fabry病の分子遺伝学

神経進歩 33:604-612, 1989

d. 班会議報告書

1) 田平 武, 宇宿功市郎, 西澤正豊, 栄楽信隆, 納 光弘 :

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

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

昭和63年度研究報告書 p47, 1989

2) 田平 武, 小川利一 :

自然発症性自己免疫性脳神経炎の研究 (1)

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

## II 研究業績

- 昭和63年度研究報告書 p58-60, 1989
- 3) 田平 武, 吉良潤一, 後藤幾生 :  
Fabry病の自律神経障害の研究  
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  
昭和63年度研究報告書 p140-144, 1989
- 4) 田平 武, 西澤正豊, 遠藤真澄, 小山内たか, 得地史郎, 国下龍英 :  
Proteolipid apoprotein (PLP) による自己免疫性脳脊髄炎—マウスにおける起炎性決定基の同一—  
厚生省・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 p69-72, 1989
- 5) 高橋慶吉, 亀谷雅洋, 国下龍英, 田平 武 :  
神経細胞の発達維持および生存におけるインシュリン様成長因子Ⅱの役割  
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年度研究報告書 p55-59, 1989
- 6) 田平 武, Ramon S. Javier, 国下龍英 :  
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年度研究報告書 p48-52, 1989
- 7) 田平 武, 本山和徳, 二瓶淳子, 得地史郎, 西澤正豊 :  
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年度研究報告書 p72-76, 1989
- 8) 宮武 正, 米田 誠, 田中恵子, 西澤正豊, 渥美哲至, 田中雅嗣, 小沢高将, 大浜栄作, 宝来 聡 :  
多臓器障害を呈した MELAS 剖検例の臨床および生化学的研究  
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1989, p153-157, 1989
- 9) 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細胞クローンの活性化とクラスⅡ分子—  
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年度研究報告書 p47-53, 1989

- 10) 辻 省次, 山内豊明, 西澤正豊, 宮武 正, 平岩雅男, 宇田 裕, 崎村健司, 高橋康夫, 磯部俊明, 奥山典生 :

ヒトシアリダーゼの分子生物学的研究

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年度研究報告書 p73-77, 1989

e. その他

- 1) 田平 武 :

神経内科

医学生のための卒後進路ガイダンス (卒業進路ガイダンス編集委員会/編)

90-91, 1989

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

- 1) 田平 武 :

自己免疫性視神経炎の発症機序

第27回日本神経眼科学会, 東京, 10. 21, 1989

- 2) 田平 武 :

第2期研究テーマの概要について

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成果シンポジウム,

東京, 1. 26, 1990

- 3) Tabira T:

Cellular and molecular mechanisms of allergic encephalomyelitis

American Society for Neurochemistry 21st Annual meeting, Symposium

XI: Myelin-immunological and molecular investigations

Phoenix, Mar. 9, 1990

- 4) Tabira T:

Familial Alzheimer's disease – an overview

Symposium on familial Alzheimer's disease

Tokyo, Mar. 15, 1990

II 研究業績

5) 田平 武 :

神経系に作用するインターロイキン

第10回和漢薬研究特別セミナー：老化と脳，富山，3. 23, 1990

6) Tabira T:

HLA-DP  $\beta$ , -DQ  $\beta$  and susceptibility to MS in Japanese population

The Third Asian Multiple Sclerosis Workshop

New Delhi, Oct. 27, 1989

7) Tabira T:

PLP-induced EAE

International Workshop:T cell autoimmunity

München, West Germany, Dec. 4, 1989

8) Nishizawa M, Tabira T:

Susceptibility genes in EAE

Workshop on genes and susceptibility to multiple sclerosis

Cambridge, Jul. 2, 1989

9) Usuku K, Nishizawa M, Matsuki K, Tokunage K, Takahashi K, Eiraku N, Suehara M,  
Juji T, Osame M, Tabira T:

HLADRB1 gene analysis in patients with HTLV-I-associated myelopathy

idem

Cambridge, Jul. 27, 1989

b. 国際学会

1) Shibasaki H, Tabira T:

Multiple sclerosis in Asia:an epidemiological and genetic study

XIVth World Congress of Neurology, New Delhi, Oct. 25, 1989

2) Tabira T, Endoh M, Kunishita T, Nihei J, Nishizawa M:

Encephalitogenic epitopes of proteolipid apoprotein in mice

XIVth World Congress of Neurology, New Delhi, Oct. 26, 1989

3) Aizawa Y, Fukatsu R, Takamaru Y, Tsuzuki K, Obara T, Fujii M, Kobayashi M,  
Takahata N, Gotoda T, Oguma K, Kunishita T, Tabira T:

Monoclonal antibodies against senile plaque amyloid in Alzheimer's disease

Alzheimer's and Parkinson's Diseases. The Second International Conference,  
Kyoto, Nov. 7, 1989

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

Identification of putative amyloid A4-splitting enzymes with two endopeptidases widely distributed in mammalian cells

Alzheimer's and Parkinson's Disease. The Second International Conference  
Kyoto, Nov. 7, 1989

5) Kamegai M, Kunishita T, Nishizawa M, Tabira T:

Interleukin-3 promotes neurite outgrowth and elevates choline acetyltransferase activity

Alzheimer's and Parkinson's Diseases. The Second International Conference  
Kyoto, Nov. 9, 1989

6) Nishizawa M, Motoyama K, Tabira T:

Immunopathology of experimental autoimmune encephalomyelitis in (SJL J x CBA J)  
F<sub>1</sub> mice

Workshop on Immunopathology of the Nervous System, 7th International Congress of  
Immunology, Berlin, Aug. 1, 1989

c. 一般学会

1) 本山和徳, 西澤正豊, 二瓶淳子, 得地史郎, 田平 武 :

自己免疫性脳炎 (EAE) 発症機序の解析—(SJL x CBA) F<sub>1</sub> マウスにおける検討—  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 14, 1989

2) 宇宿功市郎, 西澤正豊, 田平 武, 栄楽信隆, 納 光弘 :

HAM 患者髄液・末梢血由来 T 細胞株の樹立とその解析  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 25, 1989

3) 亀谷雅洋, 本山和徳, 得地史郎, 国下龍英, 田平 武 :

マウスコリン作動性ニューロン培養系に対する IL-3 の効果について  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 25, 1989

4) 相沢裕二, 深津 亮, 続 佳代, 藤井 充, 小原敏之, 後藤田敏彦, 高丸勇二, 小熊恵二, 高畑直彦,  
国下龍英, 田平 武 :

モノクローナル抗体による老人斑の研究—抗体の作成と免疫組織学的検討—  
第30回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 6. 22, 1989



## II 研究業績

- 5) 高嶋幸男, 来田裕美, 水戸 敬, 田平 武, 西澤正豊, 国下龍英, 中村晴臣 :  
正常およびダウン症候群脳におけるアミロイド蛋白局在の年齢的变化  
第30回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京6, 22, 1989
- 6) 宇宿功市郎, 西澤正豊, 田平 武, 栄楽信隆, 納 光弘 :  
HAM 患者髄液・末梢血由来T細胞株の樹立とその解析  
第19回日本免疫学会総会, 札幌, 11. 14, 1989
- 7) 山内豊明, 辻 省次, 平岩雅男, 磯部俊明, 奥山典生, 西澤正豊, 崎村健司, 高橋康夫, 宇田 裕,  
宮武 正 :  
ヒトシアリダーゼ 46kDa 蛋白 cDNA の塩基配列の解析  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 24, 1989
- 8) 辻 省次, 山内豊明, 平岩雅男, 磯部俊明, 奥山典生, 西澤正豊, 崎村健司, 高橋康夫, 宇田 裕,  
宮武 正 :  
ヒトシアリダーゼ 46kDa 蛋白の cDNA クローニング  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 24, 1989

## C. 班会議発表

- 1) 田平 武, 西澤正豊, 亀谷雅洋, 古川昭栄, 花岡和則, 高橋慶吉 :  
Trisomy16マウスを用いたAlzheimer病発症機序の解析  
文部省重点領域・脳の老化機構に関する分子細胞生物学的研究班, 東京, 12. 21, 1989
- 2) 田平 武, 宇宿功市郎, 西澤正豊, 栄楽信隆, 納 光弘 :  
HAM 患者髄液・末梢血中自己反応性T細胞株の解析  
文部省科学研究費・HTLV-Iに関連した神経疾患の病態・遺伝疫学・治療に関する研究班  
平成元年度班会議, 東京, 1. 17, 1990
- 3) 田平 武, 得地史郎, 二瓶淳子, 本山和徳, 長嶋和郎, 西澤正豊 :  
起炎性, および非起炎性T細胞クローンにおけるサイトカイン産生能  
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班会議, 東京, 1. 18, 1990
- 4) 柴崎 浩, 池田 憲, 阪田千種, 正木かつら, 富 英明, 春原経彦, 田平 武 :  
MRIによる多発性硬化症の経時的観察  
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班会議, 東京, 1. 18, 1990
- 5) 田平 武, 宇宿功市郎, 西澤正豊, 栄楽信隆, 納 光弘 :

HAM 患者髄液・末梢血由来 T 細胞株の樹立とその解析

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究会議，東京，1. 18, 1990

- 6) 田平 武，二瓶淳子，田平順子，国下龍英，西澤正豊：  
 プロテオリピッドアポ蛋白 (PLP) による自己免疫脳脊髄炎の研究  
 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会議，  
 東京，1. 20, 1990
- 7) 田平 武，大八木保政，高橋慶吉，亀谷雅洋：  
 マウス脳における各種アミロイド  $\beta$  蛋白 mRNA の神経特異的発現の解析  
 厚生省厚生科学研究費・痴呆疾患対策調査研究事業平成元年度研究発表会，東京，3. 3, 1990
- 8) 田平 武，石浦章一，塚原俊文，杉田秀夫：  
 アルツハイマー病アミロイド A4 ( $\beta$ ) ペプチド生成機構について  
 厚生省厚生科学研究費・痴呆疾患対策調査研究事業平成元年度研究発表会，東京，3. 3, 1990
- 9) 田平 武，田平順子，姚 大林，西澤正豊：  
 自己免疫性脳脊髄炎，神経炎の治療薬開発 1. Bactobolin 誘導体の検討，2. Bactobolin 誘導能の  
 検討  
 厚生省新薬開発・自己免疫疾患治療薬の開発研究（青柳班）第 6 回総会，3. 16, 1990
- 10) 小路久敬，田平 武：  
 アルツハイマー病関連脳内特異蛋白の検索—研究のストラテジー—  
 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「脳神経系機能と生体防御の解  
 明」第 1 回研究発表会，東京，1. 13, 1990
- 11) 内藤成孝，小林正明，宮内達雄，野田行文，田平 武：  
 老人斑アミロイド形成機序の解明に関する研究—Protease inhibitor のラット脳室内投与の影響—  
 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「脳神経系機能と生体防御の解  
 明」第 1 回研究発表会，東京，1. 13, 1990
- 12) 亀谷雅洋，小西吉裕，国下龍英，西澤正豊，田平 武：  
 IL-3 のコリン作動性ニューロンに対する in vitro および in vivo における効果  
 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「脳神経系機能と生体防御の解  
 明」第 1 回研究発表会，東京，1. 13, 1990
- 13) 田平 武：  
 中枢性コリン作動性ニューロンに対する IL-3

## II 研究業績

科学技術庁総合研究・生体情報伝達機構の解析・制御技術の開発に関する研究班会議,  
東京, 3.17, 1990

14) 西澤正豊, 宇宿功市郎, 田平 武, 徳永勝士 :

自己免疫性神経疾患に対する感受性を制御する免疫応答遺伝子の解析

厚生省精神・神経疾患・遺伝性神経病発現の機構調節解明研究班, 東京, 1.25, 1990

15) 高橋慶吉 :

中枢神経系におけるインシュリン様成長因子IIの発現の特徴

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, 東京, 1.6, 1990

## D. 研究会など

1) Tabira T:

Investigations of PLP induced EAE

Special Seminar(Harvard Medical School)

Boston, Nov. 28, 1989

2) Tabira T:

Interleukin 3 as a novel trophic factor for central cholinergic neurons

Special Neuroimmunology Seminar (Montreal Neurological Institute)

Montreal, Dec. 8, 1989

3) 田平 武 :

アルツハイマー病・最近のトピックス

第31回広島神経疾患同好会, 広島, 5.12, 1989

4) 田平 武 :

痴呆と免疫

第31回九州老年期痴呆研究会, 大阪, 7.15, 1989

5) 田平 武 :

自己免疫性脳脊髄炎の抗原

神経免疫研究会, 第2回研究集会, 東京, 9.1, 1989

6) 田平 武 :

痴呆と免疫

高槻市医師会学術講演会, 高槻, 10.6, 1989

## 3. 主な研究報告

## コリン作動性ニューロンに対する栄養因子としてのIL-3

亀谷雅洋, 新島健司, 国下龍英, 西澤正豊, 小西吉裕, 田平 武

インターロイキン3 (IL-3) は骨髄の幹細胞に対するコロニー刺激因子 (CSF) として作用するサイトカインであるが, これが *in vitro* においてマウスコリン作動性ニューロンに対し突起伸長を促進し, コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 活性を高めることを見出し昨年報告した<sup>1)</sup>。その後の検討により IL-3は *in vitro*, *in vivo* においてラットコリン作動性ニューロンに対しても栄養因子として作用することを見出したので<sup>2)</sup>, ここにその要旨を示す。

## 方法

Wister ラット胎生18日の中隔野ニューロンを突起伸長効果の評価には  $1 \times 10^6$  個/ml, ChAT 活性の評価には  $5 \times 10^6$  個/ml で無血清合成培地で培養した。これにヒトリコンビナント IL-3 5U/ml を加え, 突起保有細胞を 20, 40, 50 時間後に数えた。ChAT 活性は 1, 5, 10, 50, 100U/ml IL-3 を加え培養し 5 日目に評価した。In vivo 実験では一側の fimbria-fornix を切断し, 脳室内に 5, 25U/ml IL-3 を持続注入し, 14 日目に中隔野のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 陽性細胞をすべて数え, 対側に対する残存比率で示した。一部は, IL-3 50U/ml per shot/day をはじめの 4 日間行い, 14 日目に同様に評価した。

## 結果

IL-3 はラット中隔野ニューロンの突起伸長を促進した。ChAT 比活性亢進効果は 5U/ml で 219% を示した (表 1)。更に *in vivo* においては持続注入では約 45% の, one shot 法では 62% の AChE 陽性細胞の残存を認め, 対照の 26% に比し有意に高値を示した (表 2)。

## 考察

本研究により IL-3 は *in vivo* においてもコリン作動性ニューロンの栄養因子となることが示された。脳での IL-3 産生細胞が何かは未だ確定的ではないが, *in situ* hybridization 法の結果からニューロンと一部のグリアであると言われる<sup>3)</sup>。ニューロンでは特に海馬などに多く, NGF と同様に逆行性輸送されて中隔野ニューロンに作用している可能性が高い。今後加齢による変化, アルツハイマー病での変化, 受容体の解析, 治療効果等について検討しなければならない。

## 謝辞

自治医科大学解剖学教室の小川松夫先生, 荒木正介先生, 植木彰先生に研究のご協力を頂き感謝致します。

## 文献

- 1) Kamegai, M. et al.: Proc. Japan Acad. 65, 17-20, 1989.
- 2) Kamegai, M. et al.: Neuron 4:429-436, 1990.
- 3) Farrar, W. L. et al.: Blood 73:137-140, 1987.

表 1

	Specific Activity (pmol/min per mg)	Total Protein ( $\mu$ g per well)	Total ChAT Activity (pmol/hr per well)	Relative Activity (%)
Control	19.3 $\pm$ 4.3	123.4 $\pm$ 21.8	151.6 $\pm$ 44.0	100
IL-3 (100 ng/ml)	35.9 $\pm$ 4.8	165.2 $\pm$ 37.5	249.5 $\pm$ 35.5	231
Control	20.2 $\pm$ 5.0	214.7 $\pm$ 72.8	245.8 $\pm$ 36.4	100
IL-3 (5 U/ml)	30.3 $\pm$ 7.1	200.1 $\pm$ 30.8	355.0 $\pm$ 28.9	144
(10 U/ml)	43.5 $\pm$ 8.0	220.9 $\pm$ 57.0	536.9 $\pm$ 122.1	219
(50 U/ml)	26.5 $\pm$ 2.1	267.1 $\pm$ 72.9	419.5 $\pm$ 86.4	171
(100 U/ml)	21.4 $\pm$ 2.4	224.0 $\pm$ 59.7	291.6 $\pm$ 63.0	119
(150 U/ml)	22.9 $\pm$ 4.1	208.0 $\pm$ 32.7	275.6 $\pm$ 79.3	112

Cells ( $6 \times 10^6$  per ml) dissociated from the septal region of Wistar albino rats were cultured in the serum-free defined medium. IL-3 or IL-3 was added when the culture was started, and the medium was changed on day 3. ChAT activity was measured on day 5 ( $n = 3$  in all).

表 2

	Lesioned Side (Left)	Normal Side (Right)	Left/Right (%)
(A) Control	319	1290	26
IL-3 (5 U/ $\mu$ l)	554	1141	49
(25 U/ $\mu$ l)	606	1422	43
IL-3 (75 ng/ $\mu$ l)	1104	1074	103
(B) IL-3 (50 U/10 $\mu$ l per shot)	992	1610	62

(A) The left fimbria-fornix was cut and aspirated, and IL-3 or IL-3 was infused into the lateral ventricle continuously for 2 weeks. Rats were sacrificed and AChE-positive neurons in the medial septum were counted. The control group received 0.1% bovine serum albumin in PBS ( $n = 2$  in each).

(B) IL-3 was infused daily from day 0 to day 3 (total 4 shots) into 2 rats. The animal was sacrificed on day 14, and the surviving neurons were counted as in (A).

マウス脳における各種アミロイドβ蛋白 mRNA の神経特異的発現の解析

大八木保政, 高橋慶吉, 亀谷雅洋, 田平 武

近年, アルツハイマー病患者の脳に沈着するβ蛋白の前駆体(BPP)には, 少なくとも3種類の isoform が存在することが知られている(BPP695, 751, 770)<sup>1)</sup>。このうち, 後2者は Kunitz protease inhibitor (KPI) ドメインをコードしている。

最近, アルツハイマー病患者の脳では, このBPP 770および751が健常人に比べ増加していることが報告されている<sup>2)</sup>。我々は, この3種類のBPPの mRNA の脳内における発現を, S1 ヌクレアーゼ解析を用い, 検討した<sup>3)</sup>。

材料と方法

- (1) S1 ヌクレアーゼ解析: プローブは, 図1Aに示すように作成した。マウスBPP cDNAのKPIドメインおよび19アミノ酸(19AA)ドメインを含む部分を, M13mp19ファージに組み込み, これを鋳型としてプローブを合成した。RNA とのハイブリッド後, S1 ヌクレアーゼで消化し, 電気泳動を行った。
- (2) 細胞培養: neuron は胎生15日, glia は生後2日のマウス脳より分離培養した。glia は培養10日後および14日後に, shaking により oligodendrocyte および microglia を分離し, astrocyte が残存した。
- (3) RNA の抽出: 培養細胞は0.5% Noidet P-40を用いて, またマウス組織よりは, 8M 塩酸グアニジン CsCl 濃度勾配法を用いて RNA を抽出した。

結果

- (1) 全身臓器: BPP 770および751は, 全身の臓器に発現していたが, BPP 695は脳にのみ過剰に発現していた。
- (2) 培養細胞: さらに脳細胞では, BPP 695は neuron に, BPP 770および751は glia に特異的に発現されていた(図1B)。
- (3) 脳発達過程: neuron や glia の分化・増殖が著しい胎生期から生後期にかけての脳では, BPP の発現に差が見られ, BPP 695の増加が顕著であった(図2)。

考案

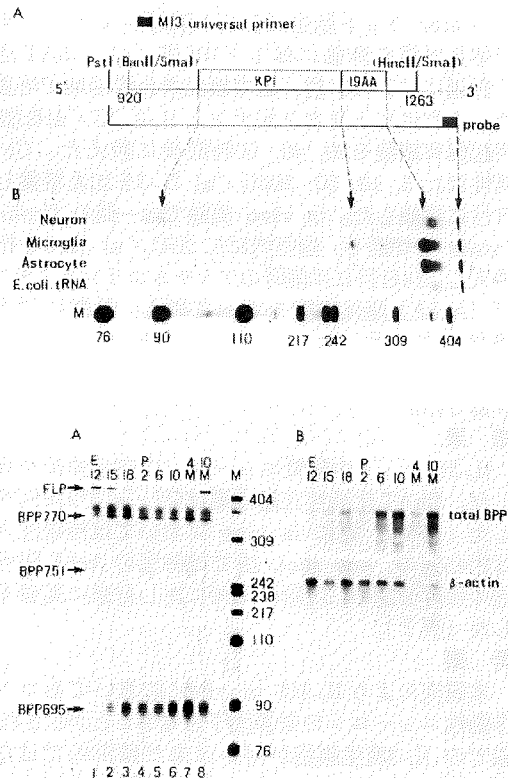
これまでの報告では, 脳内でのBPPの発現は neuron 主体であり, glia はほとんど発現しないということであったが, 我々の結果では, 少なくとも in vitro では glia もBPPを発現していた。さらに glia のBPPは neuron と全く異なり, KPIドメインを持つBPP 770および751が主体であった。またそれぞれのBPPの発現は, 脳発達過程におい

ても差が見られた。これらのことは, BPP 770および751とBPP 695は, 脳内において全く異なった機能を有していることを示唆しているのかも知れない。

またアルツハイマー病脳におけるBPP発現パターンの変化には, glia 系細胞のBPP発現が関与していることも推察された。

文献

- (1) Kitaguchi N et al: Nature 331:530-532, 1988
- (2) Tanaka S et al: Biochem Biophys Res Commun 157:472-479, 1988
- (3) Ohyagi Y et al: Biochem Biophys Res Commun 167:54-60, 1990



## トリソミー16マウスを用いた Alzheimer 病発症機序の解析

西澤正豊, 亀谷雅洋, 古川昭栄, 田平 武

マウスの第16染色体にはアミロイド前駆体蛋白 (APP) 遺伝子を含めてヒト第21染色体上に存在する一群の遺伝子が保存されているので, トリソミー16 (Ts16) マウスはダウン症 (DS) と同様に Alzheimer 病 (AD) の発症機序を解析するための有用なモデル系と期待される。Ts16マウスは胎生末期に子宮内で死亡してしまうので, これをAD研究に应用するためにはTs16の細胞を rescue する必要があり, 我々は① Ts16胚と正常胚のキメラ化による個体の作成, ② Ts16胎児脳組織の正常マウス脳への移植, ③ Ts16神経細胞の不死化, ④ Ts16神経系細胞の in vitro での培養, などの手段により長期的な観察が可能なシステムを樹立してきた。ここでは培養条件下での Ts16神経細胞についての知見を紹介する。

## 方法

胎児前脳基底野の神経細胞の初代培養には亀谷が確立した無血清培養系<sup>1)</sup>を用いた。胎生15日の培養系で Nerve growth factor (NGF) の添加5日目に choline acetyltransferase (ChAT) 活性の誘導の程度を正常対照 (littermate) と比較した。NGFは古川の方法<sup>2)</sup>により定量した。

## 結果

表1に示すように正常対照ではChAT活性は70%上昇し, NGFに应答したChATの誘導が確認された。これに対し, Ts16胎児の前脳基底野の神経細胞ではNGFによるChAT活性の誘導は全く認められなかった。

胎生15日における全脳のNGF含量を定量すると(表2), Ts16では脳重量が少ないことを反映して全脳当りのNGF量は正常対照よりも少なかったが, 単位重量当りのNGF含量は対照に比して有意に増加していた。

## 考察

以上の結果からTs16脳のコリン作動性ニューロンにはNGF receptor, あるいはその後の情報伝達のどこかに欠陥があるためChATの誘導がみられない可能性が示唆される。NGF含量の増加は消費が少ないこと, あるいはなんらかの代償機序によるものと考えられる。この結果はADにおけるコリン作動性ニューロンの異常の病態について示唆を与えるものであり, 現在さらにAPP発現量との関係を検討している。

## 文献

- 1) Kamegai M, et al: Neuron 4:429-436, 1990
- 2) Furukawa S, et al: J Neurochem 40:734-744, 1983

	NGF 100 ng/ml	比活性 pmol/min/mg	総蛋白 μg/well	総活性 pmol/h/well	相対活性 %
正常対照	-	9.2	70	38.5	100
	+	17.0	65	66.4	172
Ts16	-	10.6	90	56.6	100
	+	9.0	91	48.8	86

表1. 胎生15日の全脳基底野ニューロン培養系におけるNGF添加によるChAT活性の誘導

	NGF含量 ng/g brain	全脳湿重量 mg	NGF量 ng/brain
正常対照	0.95 ± 0.02	43.5 ± 6.8	0.043 ± 0.007
Ts16	1.44 ± 0.33	17.2 ± 4.6	0.024 ± 0.008

表2. 胎生16日の全脳におけるNGF量  
(平均 ± 標準偏差で表示)

HAM における HLA-DRB 1遺伝子の解析

宇宿功市郎, 西澤正豊, 松木一雅\*, 徳永勝士\*, 栄楽信隆\*\*, 末原雅人\*\*, 十字猛夫\*, 納光弘\*\*, 田平武 (\*東大輸血部, \*\*鹿大三内)

対象及び方法

対象は HAM 32例, ATL 8例, HTLV-I carrier 46名, 鹿児島健常人40名, 東京健常人36名である。DNA 1  $\mu$ g を PCR で増幅後, SSOP で hybridize した。使用した primer, 各々の SSOP の核酸配列, probe で検出されるアミノ酸配列, HLA allele は表 1. にまとめた。

結果及び考察

Probe 3が HAM で有意であった(表 2) が, HTLV-I キャリアーと鹿児島の健常人の間で頻度差がなかったことより, <sup>69</sup>EQRRAAV<sup>76</sup> は HTLV-I に対する易感染性より HAM 発症に関連しているもの, また鹿児島と東京の健常人の間でみられた頻度差は HAM 発症の地域偏在性に寄与しているものと考えた。

Brownら<sup>1)</sup>の HLA-DR 鎖のモデル(図)では DR  $\beta$ 鎖の70, 71番は抗原の結合部位かつ T細胞の認識部位であるとされている<sup>2)</sup>。Probe 4のみが HAM で有意であり Q<sup>70</sup>R<sup>71</sup> の 2 個の残基が上記配列の中で HAM 発症に重要と考えられた。<sup>3)</sup>

文献

- 1) Brown JH, et al. Nature 332:845-850, 1988
- 2) Lombardi G, et al. Proc Natl Acad Sci USA 86:4190-4194, 1989
- 3) Usuku K, et al. Europ J Immunol, 20:1603-1606, 1990

Table 2. Dot blot analysis of HAM patients, ATL patients, HTLV-I carriers and controls

	n	Probe 3	Probe 4
HAM	32	22(68.8)	23(71.9)
ATL	8	2(25.0)	2(25.0)
HTLV-I carrier	46	20(43.5)	17(40.5) (n=42)
Kagoshima control	40	16(40.0)	14(35.0)
Tokyo control	36	6(16.7)	not done

	R.R.	$\chi^2$	p
a:	6.6	3.444	<0.04
b:	2.86	4.856	<0.05
c:	3.3	5.896	<0.02
d:	10.0	18.973	<0.00005
e:	3.3	5.015	<0.05
f:	7.67	4.167	<0.05
g:	3.67	7.210	<0.01
h:	3.83	7.276	<0.01

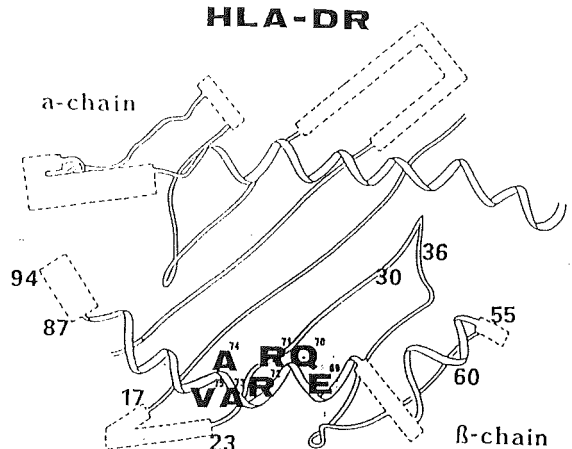


Table 1. Synthesized Oligonucleotides

Oligo-nucleotide Sequence	Amino Acid Sequence <sup>b)</sup>	TH <sup>c)</sup>	Reported HLA Allele
<b>Primers</b>			
1 TTCTCAATGGGACGGAGCG	17FFNGTER	23	
2 GCCCGTGCACTGTGAAGCTCTC	87ESFTVQRR	94	
<b>Probes</b>			
1 TACTTCTATCACCAAGAGGA	30YFYHOEP	36	DR4
2 CGGCATGGCCGAGTAC	55RPSAEV	60	DR4Dw15, DRw8
3 CGCAGGCCGGCCCGGT	69EQRRAAV	75	DR1, DR4Dw14/15, DRw14Dw16
4 CTGGAGCAGAGCGGGCC	68LEQRRRA	73	DR1, DR4Dw13/14/15/KT2, DRw14Dw16
5d) .....AG.C.....C....	68LEDERRA	73	DRw15Dw2/12
6 .....AG.CGA.....	68LEDERA	73	DR4Dw10, DRw13
7 .....AG.C.....	68LEDERRA	73	DR5Dw5, DRw8
8 .....G.....	68LEERRA	73	DRw14Dw9, DRw9, DRw10

a) Each nucleotide sequence is written in order of 5'- to 3'-end.  
 b) Each amino acid sequence is given in the one-letter amino acid code.  
 c) TH, temperature ( $^{\circ}$ C) for hybridization.  
 d) Periods indicate identity of the nucleotide to that of Probe 4.

## 起炎性、および非起炎性T細胞クローンにおけるサイトカイン産生能

得地史郎, 二瓶淳子, 本山和徳, 西澤正豊, 田平 武

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) はT細胞により媒介される自己免疫性脳脊髄炎であるが、中枢神経系における免疫現象の本態には未だ不明な点が多い。我々はSJLマウスより樹立されたミエリン塩基性蛋白(MBP)に特異的な脳炎誘起性T細胞クローン(Tcl)の中に、長期間の培養の間に起炎性決定基であるMBP 89-101に対する反応性は保ちながら、起炎性を喪失したクローンを見出した。起炎性、非起炎性Tclの差異を明らかにすることは起炎性の本態を解明する上で重要な意義を持つので、ここでは両者のサイトカイン産生能に着目し、培養上清における主要なサイトカイン活性を比較検討した<sup>1)</sup>。

## 方法

起炎性Tcl:4b.14a<sup>2)</sup>, TNT-1, 非起炎性Tcl:4b.14a/nを各々SJL脾細胞を抗原提示細胞としてMBP 89-101により刺激し、48時間後の培養上清を試料とした。活性化された各Tclの一部はSJLに受身移入して起炎性の有無を再確認し、同時にMBP 89-101に対する増殖応答が保たれていることも確かめた。サイトカイン活性の測定はbioassayによった。TNF活性はL929細胞を用いたcytotoxicity assayにより求め、ついで抗マウスTNF $\alpha$ 抗体で吸収した試料について同様にLT(TNF $\beta$ )活性を得、両者の差をTNF $\alpha$ 活性とした。IFN- $\gamma$ 活性はL929とvesicular stomatitis virusを用いたcytopathic effect reduction assay, IL-2活性はCTLL-2, HT-2細胞による<sup>3</sup>H]-thymidineの取り込みから求めた。

## 結果

表1に示すように、LT活性は4b.14a/nの方が4b.14aよりも低値であったが、もう一つの起炎性Tcl TNT-1ではさらに低値であった。TNF $\alpha$ 活性では4b.14a/n上清の活性が高値を示した。IFN- $\gamma$ 活性は4b.14a/nの方が4b.14aよりも高値であったが、TNT-1とは同レベルであった。IL-2活性はいずれのTcl上清においても非常に低値を示した。また、4b.14a/nの培養上清を4b.14aのMBP 89-101に対する増殖反応系に加え、起炎性Tclの増殖を制御する因子が存在する可能性を検討した結果(図1)、容量依存的な抑制因子が認められたが、4b.14aの培養上清にも同様の活性があり、非起炎性Tclに特異的なものではなかった。

## 考察

今回検索したサイトカインの中で起炎性、非起炎性Tclの間で差異がみられたのはTNF $\alpha$ 活性のみであり、他は起炎性の喪失には直接の関与はないものと考えられた。TNF $\alpha$ は共存する抗原提示細胞から産生されるものと思われ、移入の際には除かれるが、TNF $\alpha$ にはミエリン障害性があるとの報告もあり、この意義はさらに検討を要する。今後さらにmRNAレベルでの検討が必要である。

## 文献

- 1) Tokuchi F et al: J Neuroimmunol, 1990 (in press)
- 2) Sakai K et al: J Immunol 137:1527, 1986

表1

	total TNF	LT (TNF $\beta$ )	TNF $\alpha$	IFN- $\gamma$
4b.14a	422 368	279 251	143 117	39000 $\pm$ 9300
4b.14a/n	640 538	211 130	429 408	68700 $\pm$ 13200
TNT-1	211 160	86 77	125 83	58800 $\pm$ 19100

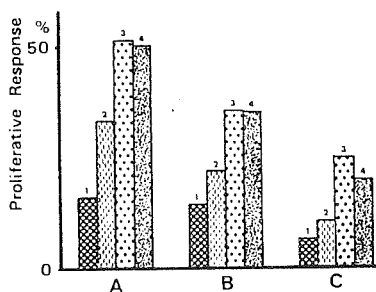


図1. T細胞クローン培養上清中に存在する4b.14aの増殖反応に対する抑制因子

培養上清(A: 10 $\mu$ l, B: 20 $\mu$ l, C: 30 $\mu$ l)を添加した場合の<sup>3</sup>H]-thymidineの取り込みを対照の取り込みに対する%で表示。1, 3: 4b.14a上清, 2, 4: 4b.14a/n上清, 1, 2: Indacin 無添加, 3, 4: Indacin添加(終濃度1 $\mu$ M)



## 7. 疾病研究第7部

### 1. 研究部一年のあゆみ

平成元年3月1日、本研究部第一研究室長として今澤正興が本研究所代謝研究部より配置換えとなり、てんかんの発症機序とその治療に関する研究を開始した。この他、賃金研究員の青柳奈緒美（5月-7月）、森口正信（5月-10月）と研究見習生の岩本雅子（8月-10月）が在籍し、研究活動に参加した。

本年度の主な研究テーマは、てんかんの発症の機序と治療法の基礎を、生化学的に解明しようとする次の二つである。

1. グアノシントリリン酸（GTP）再生酵素であるヌクレオシド二リン酸キナーゼに対するけいれん関連薬物の作用を検討し、フェニトイン等の抗てんかん薬の作用点の一つがこの酵素であることを明らかにした。本酵素は、細胞表面のレセプター刺激から細胞内への情報伝達の過程で重要な役割を果たしていると考えられている。
2. てんかんの発症の原因の中での、細胞内情報伝達機構の占める役割を明らかにするため、リン脂質由来のセカンドメッセンジャーである  $IP_3$  の新しい、精度に優れた分析法を開発した。現在、感度を更に鋭敏にするため研究を続けている。

（部長事務取扱 杉田 秀夫）

## 2. 研究業績

## A. 論文

## a. 原著

- 1) Imazawa M, Kabuto Y, Miyamoto K, Nishimura S, Yagi K:  
Inositol trisphosphate ( $IP_3$ ) receptors and epileptic seizure  
Jpn J Psychiat Neurol 43:465-468, 1989

## b. 著書

- 1) Imazawa M, Taguchi F, Miyamoto K:  
Levels of polyphosphoinositides in the rat brain obtained using sacrifice by microwave fixation.  
Microwave irradiation for histological and neurochemical investigations (ed by Blank, C. L., Howard, Y., Maruyama, Y.), Soft Science Publ, Tokyo, p11-17, 1989

## d. 班会議報告書

- 1) 今澤正興, 古川昭栄:  
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  
ヒューマンサイエンス官民共同プロジェクト・第3分野（健康保持の基礎としての生体防御機構の解明） 昭和63年度研究報告書, p258-265, 1989
- 2) 今澤正興, 岩本雅子:  
けいれん発現と脳生体膜情報伝達機構—けいれん関連薬物のGTP代謝回転系に及ぼす影響—  
厚生省精神・神経疾患・難治てんかんの病態と治療に関する研究班, 平成元年度研究報告書, p21-25, 1990

## B. 学会発表

## a. 一般学会

- 1) 今澤正興:  
けいれん関連薬物のGTP代謝回転系に及ぼす影響の検討  
第23回日本てんかん学会, 東京, 10. 7, 1989

## C. 班会議発表

- 1) 今澤正興, 岩本雅子:

## II 研究業績

けいれん発現と脳生体膜情報伝達機構－けいれん関連薬物のGTP代謝回転系に及ぼす影響－  
厚生省精神・神経疾患・難治てんかんの病態と治療に関する研究班，平成元年度班会議，  
東京，12.22, 1989

### 2) 今澤正興, 岩本雅子：

神経系細胞における細胞内情報伝達機構と生体防御反応に関する研究－IP<sub>3</sub>の新定量法について－  
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テーマ研究発表会，東京，1.13, 1990

## 3. 主な研究報告

IP<sub>3</sub>の新定量法の検討

今澤正興, 岩本雅子

イノシトール1,4,5トリリン酸(IP<sub>3</sub>)は、細胞内情報伝達機構の中で、重要な位置を占めるイノシトールリン脂質由来の第二メッセンジャーである。本研究では、IP<sub>3</sub>の HPLC による精度の良い分析法の開発を目的とした。

## 方法

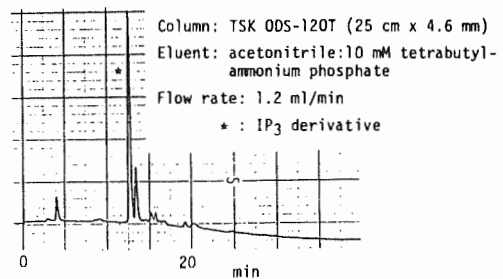
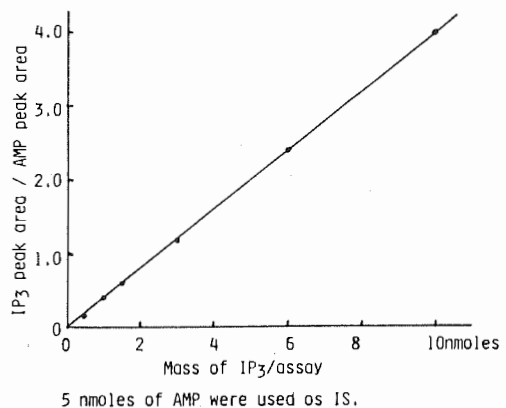
ラット前脳を0.4M HClO<sub>4</sub>中ホモジナイズし、15,000g、10分遠心し、上清をK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で中和し、沈澱を除いた。上清を陰イオン交換カラム (Bond elut SAX, 1ml) に吸着させ、0.2M HCl 0.8mlで洗浄後、0.5M HCl 0.8mlを用いた溶出液を凍結乾燥し、IP<sub>3</sub>分析試料とした。100mM MESNa(pH6.0)10 $\mu$ l, アデノシンモノリン酸 (内部標準) 10 $\mu$ l, 試料水溶液80 $\mu$ lの混液に0.02%の9-anthryldiazomethane (ADAM) メタノール溶液100 $\mu$ lを冷却下に加え、4 $^{\circ}$ C、30分間反応を行った。200 $\mu$ lの CHCl<sub>3</sub>を加え攪拌後、水相を HPLC 分析用試料とした。HPLC 分離には逆相系カラム (TSK ODS-120T, 4.6mm x 25cm) を用い、溶出液として CH<sub>3</sub>CN-10mM リン酸テトラブチルアンモニウム (pH6.5) を使用し、CH<sub>3</sub>CN 濃度 36%→74%、30分の直線濃度勾配溶離を行った。検出には蛍光分光検出器を用い、励起波長365nm, 蛍光波長412nmを使用した。分離は室温で、流速1.2ml/minで行った。定量は目的物質のピークの内部標準のピークに対する面積比より行った。

## 結果と考察

IP<sub>3</sub>の HPLC による感度の良い定量法の開発のため、IP<sub>3</sub>の標識試薬として蛍光ラベル試薬を用いることとした。ADAM との反応は種々の温度条件でその進行が認められたが、4 $^{\circ}$ C、30分で副産物の生成が少なく、至適と認められた。また主生成物の収率は、ADAM の濃度が0.01~0.05%で変化なく、0.05%以上では副産物の増加のため、減少する傾向を示したので、ADAM の至適濃度としては0.02%を採用した。複数の(-) 荷電と疎水性基をもつIP<sub>3</sub>-ADAM 誘導体を良好に分離するため、逆相系カラムを用いたイオンペアクロマトグラフィーを採用した。主生成物の後ろに、副産物のピークが認められたが、両ピークは完全に分離されているため、定量の障害にはならない(図1)。本法によるIP<sub>3</sub>の検量線を図2に示した。検出限界は試料当たり約200

pmole であり、10nmole まで良好な直線性を示した。HPLC 打ち込み当たりの検出限界は約10pmole である。全域にわたって、変動係数 (CV) は5%以下であった。

IP<sub>3</sub>の絶対量の定量法についていくつかの報告があるが、最も一般的なものは結合蛋白を用いたラジオレセプター分析である。この方法は competitive assay であるため精度 CV=約20%と十分でなく、IP<sub>3</sub>の正確な定量には不適當である。我々は蛍光試薬 ADAM を用いた HPLC 分析法を検討し、精度の良い方法を開発できた。しかし検出感度は既存のラジオレセプター分析法に及ばない。この点を改善するため、今後さらに別の蛍光試薬の選択等の検討を行って行きたい。

図1. IP<sub>3</sub>の ADAM 誘導体の分離図2. IP<sub>3</sub>の検量線

## けいれん関連薬物のGTP代謝回転系に及ぼす影響

今澤正興, 岩本雅子, 青柳奈緒美

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する。本年度は, レセプター刺激から細胞内への情報伝達の過程で重要な GTP 結合蛋白質の活性調節の役割を有すると考えられる GTP 産生・再生酵素, ヌクレオシド二リン酸キナーゼ (NDPK) に対するけいれん関連薬物の影響を検討した。

## 方法

ラット脳ホモジェネートの35,000g, 20分の遠心操作によって得られた上清を NDPK 画分として用いた。0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 120mM KCl 存在下, 20mM MOPS (pH7.0) 中25°Cで反応を行った。基質としては0.5mM のグアノシン二リン酸 (GDP) を用い, リン酸供与体として1mM ATPを用いた。反応が直線的に進行している一定時間後に, 試料の一定量を取り, 2N HCl を加えて反応を停止し, HPLC にて分析を行った。Asahipak GS-320(7.6×500mm)カラムを用い, 0.15Mリン酸ナトリウム (pH6.0) により, 溶出を行った。定量には, UVモニターを, 測定波長として285nmを採用した。GTP の生成率を反応の進行率とした。

## 結果と考察

図には反応液に加えた GDP, ATP, 反応によって生じた GTP, ADP を分離したクロマトグラムの1例を示した。グアノシン誘導体に相対的に感度の高い 285nm を測定波長として採用した結果, 本法により反応初期の少量の GTP を正確に定量することができた。

種々の抗てんかん薬の NDPK 活性に及ぼす影響を検討した結果を表に示した。PHT, CBZ は治療有効濃度の上限において NDPK を有意に ( $p < 0.01$ ) 阻害することが認められた。また有意ではないが, Zonisamide, PB も本酵素を阻害する傾向を示した。一方, Diazepam, VPA, Ethosuximide は NDPK 活性に影響を与えなかった。PHT, CBZ, Zonisamide, PB などの生体膜に作用すると考えられている抗てんかん薬が, NDPK 活性を阻害すると認められたことは興味深い。一方, 抗てんかん薬以外の種々の薬物の NDPK 活性に対する薬物の効果を, それら薬物の治療有効濃度の上限を用いて検討した。けいれん誘発剤 PTZ, および抗精神病薬 Chlorpromazine, 抗うつ剤 Imipramine 等は NDPK 活性に影響を与えなかった。また解熱鎮痛薬 Phenacetin が阻害作用を示さなかったことは, PHT などの NDPK 阻害

作用が疎水性相互作用に基づく非特異的なものでないことを示しているといえよう。以上検討した薬物の中で, 抗てんかん薬の一部のみが NDPK 活性を阻害したことは注目に値する。

図 NDP Kinase 活性の HPLC による分析

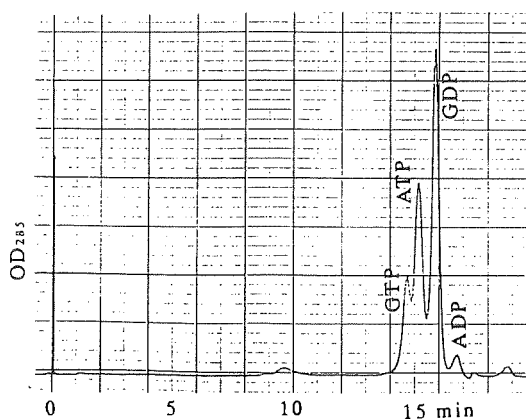


表 種々の抗てんかん薬のNDP Kinase 活性に及ぼす影響

Drugs	conc.	NDP kinase activity	
	mM	%	
Control	---	100	± 4.5
PHT	0.2	83.6	± 6.9
CBZ	0.1	89.1	± 7.9
Zonisamide	0.2	93.9	± 6.8
PB	0.2	94.1	± 6.9
Diazepam	0.005	97.4	± 7.7
VPA	1	101.2	± 8.3
Ethosuximide	1	96.1	± 8.9

GDP を基質として用いた。

## 8. 診断研究部

### 1. 研究部一年のあゆみ

診断研究部はこれまで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、物理化学的分析法の開発とその臨床応用を目的とし、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きた。室長林時司、同荻野孝司、研究員矢野登志雄らがこの研究を進めてきた。本年度6月1日に新任部長として中村俊が就任したことにより当研究部は神経細胞の分化、発生機構を分子生物学的あるいは細胞生物学的に解明することを目指す基礎研究部としてあらたなスタートを切ることとなった。12月には東大医科研大学院生の室屋賢康が研究生として加わった。今後の研究課題としては、1) 神経細胞分化因子による分化シグナルの伝達機構 2) マウスをモデル系として、中枢神経の発生制御遺伝子群の同定とその作用ネットワークの解明、特に脳の形態形成の発生上のユニットを知ること、出生後の個体の経験によるシナプス形成の修飾の分子機構を知ることにより力を尽くしたいと考えている。ヒトの精神神経疾患との接点はそれらの生物学上の知見の蓄積の上に見いだされるものと思われる。研究設備と人員の整備を進め本格的な研究を展開するための準備を行なっている。

(部長 中村 俊)

## II 研究業績

### 2. 研究業績

#### A. 論文

##### a. 原著

- 1) Tsuchiya H, Ohtani S, Takagi N, Hayashi T:  
High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Time-dependent Changes in Urinary Excretion of Indoleamines Following Tryptophan Administration  
Biomed. Chromatogr., 3: 157-160, 1989
- 2) Nagata K, Hayashi T, Naruse H, Iida Y:  
A Study on Effective Derivatization for Ultra-micro Detection of Dopamine by Gas Chromatography/Electron Capture Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry  
Anal. Lett., 22: 2281-2290, 1989
- 3) Tsuchiya H, Hayashi T:  
Determination of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine in Blood by High-performance Liquid Chromatography after Solvent Extraction  
J. Chromatogr., 491: 291-298, 1989
- 4) Tsuchiya H, Hayashi T:  
High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Catecholamines in Biological Samples by Liquid/Liquid Extraction Prepurification  
J. Pharmacol. Methods, 23: 21-30, 1990
- 5) Petroff OAC, Novotny EJ, Ogino T, Avison M, Prichard JW:  
In Vivo Measurements of Ethanol Concentration in Rabbit Brain by <sup>1</sup>H Magnetic Resonance Spectroscopy  
J. Neurochem., 54:1188-1195, 1990

##### b. 著書

- 1) 中村俊, 遠藤正美:  
細胞増殖  
日本生化学会編, 新生化学実験講座 8, 細胞内情報と細胞応答, 東京化学同人, p309-321, 1990

##### c. 総説

- 1) 荻野孝史:  
MRS の技術的進歩

医学のあゆみ 150:807-811, 1989

d. 班会議報告書

1) 荻野孝史, 矢野登志雄, 舩田晋 :

In vivo NMR スペクトロスコープによる脳代謝の研究 (その1) 2.0テスラ・ヒト全身用 MR 装置の開発

厚生省精神・神経疾患・NMRを用いた精神, 神経, 筋疾患の病態に関する研究班, 平成元年度  
研究報告書 p59-63, 1990

e. その他

1) 林時司:

安定同位元素トレーサー法によるトリプトファンおよび関連物質の生体内動態の研究

昭和63-平成1年度文部省科学研究補助金 (一般研究B) 研究報告書, 1990

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 赤坂一之, 荻野孝史, 甲斐荘正恒, 三森文行, 池平博夫, 伊藤正光, 間島寧興, 亀井裕孟, 成瀬昭二 :

MRS-基礎と臨床の対話

第14回日本磁気共鳴医学会大会シンポジウム, 東京, 9.19, 1989

c. 一般学会

1) 石原健, 中村俊, 上代淑人, 高橋健治 :

ウシすい臓セクレチン受容体の可溶化

第62回日本生化学会大会, 京都, 11.4, 1989

2) 林時司, 池浦千秋 :

HPLCによるCMPFPAの定量

日本薬学会第109年会, 名古屋, 4.4, 1989

3) 土屋博紀, 巽幹雄, 高木順彦, 林時司 :

溶媒抽出前処理によるカテコールアミンのHPLC

日本薬学会第109年会, 名古屋, 4.5, 1989

4) 永木幸子, 永木茂, 林時司 :

GC/NICIMSを利用する血液中  $\gamma$ -アミノ酪酸の高感度定量

第29回日本臨床化学会年会, 東京, 9.16, 1989



## II 研究業績

- 5) 林時司, 飯田芳男 :  
GC/NICIMS を利用するテトラヒドロカルボリン類の分析  
第29回日本臨床化学会年会, 東京, 9. 16, 1989
- 6) 林時司, 飯田芳男 :  
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  
第14回日本医用マススペクトル学会年会, 名古屋, 9. 29, 1989
- 7) 林時司, 等々力英美 :  
高速液体クロマトグラフィーによるテトラヒドロカルボリン類の高感度分析  
日本分析化学会第38年会, 仙台, 10. 3, 1989
- 8) 柴田明宏, 飯田芳男, 林時司, 大槻なつ子 :  
高分解-GC/NICIMS 法による生体試料中フェニルピルビン酸の定量  
日本分析化学会第38年会, 仙台, 10. 5, 1989
- 9) 矢野登志雄, 永山素男, 舩田晋, 大屋徹, Luyten PR, den Hollander JA, 荻野孝史 :  
2TMRS によるヒト脳の研究  
第14回日本磁気共鳴医学会大会, 東京, 9. 18, 1989
- 10) 矢野登志雄, 舩田晋, 永山素男, 田中良一, 大屋徹, Wardenier P, 荻野孝史 :  
NCNP における2テスラ・ヒトボディコイル・イメージング  
第15回日本磁気共鳴医学会大会, 岐阜, 2. 16, 1989
- 11) 永山素男, 穴見公隆, 村上弘司, 舩田晋, 矢野登志雄, 荻野孝史 :  
2TNMR 装置を用いた  $^{31}\text{P}$ -NMR によるヒト脳の研究 磷酸化合物の部位別分布を中心として  
第15回日本磁気共鳴医学会大会, 岐阜, 2. 17, 1989

## C. 班会議発表

- 1) 中村俊 :  
神経細胞分化のシグナル伝達過程における *ras* 遺伝子産物 p21 の役割  
厚生省痴呆疾患対策調査研究事業, 東京, 3. 3, 1990
- 2) 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. 26, 1989

## 3. 主な研究報告

神経細胞分化のシグナル伝達過程における *ras* 遺伝子産物 p21の役割

中村 俊

ラットの褐色細胞腫由来の PC12細胞は NGF によって神経細胞へ分化することが知られている。NGF によって開始される分化シグナル伝達過程はあらかじめ PC12細胞に抗 *ras* 抗体を微量注入しておくことによって阻害されること、逆に変異型 *ras* 遺伝子産物 p21の微量注入によって神経突起の伸長が引き起こされることから、p21がこのシグナル伝達過程で重要な役割を果たしていることが推定される。我々は p21の役割を明らかにする目的で PC12細胞をひとつのモデル系と考えて実験を行ってきた。

## 結果

細胞性 *ras* 遺伝子産物 p21はタンパク質一分子あたり一分子のグアニンヌクレオチドを結合し、結合した GTP を GDP と Pi に水解する活性 (GTPase) を有している。発癌性 *ras* 遺伝子産物 p21はグアニンヌクレオチドを結合するが、GTPase 活性が著しく傷害されている。我々は大腸菌で大量発現した正常型の p21と変異型の p21 (12番目のグリシンがバリンに置換したもの) を精製し、GTP の非加水分解アナログである GTP  $\gamma$ S を安定に結合した p21を調整した。正常型 p21  $\cdot$  GTP  $\gamma$ S を PC12細胞に微量注入すると、注入後24時間で約半数の細胞に突起伸長がみとめられた。この突起伸長は抗 *ras* 抗体をあらかじめ細胞に注入しておくことによって抑制されるため、p21によって特異的に引き起こされたものであると考えられる。以上の実験結果から、正常型 p21であっても GTP 結合型ではシグナル伝達を ON にすることができることが示された。

一方、変異型 p21は、p21  $\cdot$  GDP として PC12細胞に微量注入しても突起伸長を高頻度 (80%) で引き起こすが、GTP へと再生されない GDP のアナログである GDP  $\beta$ S とともに微量注入すると突起伸長はみとめられない。この結果は変異型 p21  $\cdot$  GDP は細胞内で p21  $\cdot$  GTP へと交換されてシグナルを伝達するが、GDP  $\beta$ S はその交換を抑制したと解釈される。変異型 p21が細胞内で GTP 結合型として存在しうるか否かという点について、以下の実験によってさらに詳しく検討した。変異型 p21の cDNA を発現誘導可能なマウスのメタルチオネインプロモーターに連結した発現ベクターを構築し、このベクター DNA を選択マーカー遺伝子 (neo 耐性) とともに P

C12細胞にリン酸カルシウム法によってトランスフェクトした。G418耐性のクローンを選択し、カドミウムの添加によって突起を伸長する細胞株を樹立した。この細胞株はカドミウムの添加によって p21を過剰に発現することがウェスタンブロット法により確認された。この細胞株を用いて *ras* に結合したヌクレオチドを分析した結果、変異型 p21には GTP が結合していることが示された。一方、親株の PC12細胞では正常型 p21に結合したヌクレオチドは GDP であり、GTP は認められなかった。以上の実験から、変異型 p21は GTPase が損傷されているために GTP を結合した状態が維持される結果、シグナル伝達過程が ON になっているのに対し、正常型 p21では GTP がすみやかに水解されるために、シグナル伝達過程が通常は OFF になっていると推定される。

## 考察

最近、p21に結合した GTP の水解を促進するタンパク質因子 (GTPase Activating Protein, GAP) が脳をはじめとする種々の組織に見い出された。GAP は正常型 p21には作用するが、変異型 p21には作用しない。したがってこの因子は通常、*ras* のシグナル伝達過程を OFF にするものであると考えられる。*ras* 遺伝子は繊維芽細胞においては細胞の増殖に必須であることが知られているが、とくに最近の報告では、血小板由来増殖因子 (PDGF) のシグナル伝達過程で作用している可能性が示されつつある。神経分化における GAP および *ras* の活性制御機構は今後の重要な研究課題である。(以上の研究は佐藤孝哉、上代淑人ら (東大医科研) とともに行われたものである。)

## 文献

- 1) Satoh, T., Nakamura, S., and Kaziro, Y.: Mol. Cell. Biol. 7:4553-4556, 1987
- 2) Satoh, T., Endo, M., Nakamura, S., and Kaziro, Y.: FEBS Lett. 236:185-189, 1988

## GC/NICIMS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、MAO の阻害作用、セロトニンの uptake の阻害作用等の興味ある神経薬理学的活性を有する。また、生理的条件に近い緩和な条件下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様になってきている。分析法としては TLC, GC, GC/MS 等を利用する方法が報告されているが、生体試料中に存在する量が微量である上に、前駆物質であるアミンが、試料中あるいは使用する試薬、溶媒類中に存在するアルデヒドと反応し、容易にテトラヒドロカルボリンが生成するといった問題があり、これらに対して充分な対応がとられているとは考えられない。昨年は、トリプタミン (TA) とアセトアルデヒド (AA) から生成すると考えられる 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline (MTBC) を取り上げ、fluorescamine を利用する効果的な前処理法を考案し、極めて高感度で信頼性の高い GC/NICIMS 法を開発した。そこで、この方法を TA とホルムアルデヒド (FA) から生成する 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline (TBC) をも同時分析できる方法に発展させるとともに、MTBC ならびに TBC の生体内代謝に関する次のような基礎的検討を加えた。TBC, MTBC がヒト尿中に排せつされていることは既に報告されているが、その由来等詳細な点については不明な点が多い。そこで、TA の前駆アミノ酸であるトリプトファンの重水素標識体 (L-tryptophan-3,3- $d_2$ ) を健康成人男子に経口的に投与後、経時的に採取した尿試料中の TA, TBC および MTBC の追跡を実施した。その結果、投与したトリプトファンの重水素標識体 (Trp- $d_2$ ) 由来の TA- $d_2$  は投与1時間後に採取した尿中には非標識体に匹敵するような量が排せつされ、その後徐々にその排せつ量は減少していくのが観察された。それに対して尿中 TBC および MTBC の測定では対応する重水素標識体は確認できなかった。また、飲酒時には生体内におけるアセトアルデヒドの濃度が上昇することが知られているので、飲酒時における同様の Trp- $d_2$  投与実験を実施したが、結果は同様であった。そこで、もし尿中に排せつされる TBC, MTBC が食事由来のものであるならば絶食時にはテトラヒドロカルボリン類の排せつ量の減少が観察されるはずであると考え、

3日間水分以外のものの摂取を絶ち、尿中への TBC, MTBC および TA の排せつ量の経時的变化の追跡を実施した。その結果、TBC および MTBC の排せつ量は絶食時間とともに徐々に減少していくのが観察された。以上の実験結果から、尿中に排せつされる TBC および MTBC の少なくとも大部分は食事由来の外因性物質であろうと考えられた。次に、午前10時前後に採取した健常人の尿中 TBC, MTBC の測定を実施した。その結果、TBC の排せつ量は MTBC のそれより少なく、その分布も MTBC のそれよりも狭かった (TBC :  $\bar{x}$  = 1.49 pmol/mg creatinine,  $s$  = 1.23 pmol/mg creatinine, MTBC :  $\bar{x}$  = 14.80 pmol/mg creatinine,  $s$  = 30.3 pmol/mg creatinine)。これは、生体内に取り込まれた TBC や MTBC の大部分が速やかに代謝され尿中に排せつされ、しかも MTBC の光学異性体に対して選択的であれば、MTBC の排せつ量の方が TBC のそれより多く、個人差が大きいことがよく理解できる。これまでに生体内における存在が確認されているテトラヒドロカルボリン類の中で最初に TBC, MTBC を取り上げたのはその化学構造から血液脳関門 (BBB) の透過性が高いことが予測されたからである。そこで、TBC および MTBC の BBB の透過性についての検討を実施したところ、予測どおり、両者とも BBB の透過性は高く、しかも、脳組織に対する親和性が極めて高いものであることが確かめられた。

以上、TBC ならびに MTBC の GC/NICIMS 分析法を開発し、TBC および MTBC の生体内代謝について基礎的な検討を加えた。その結果、尿中に排せつされる TBC および MTBC の大部分は外因性の物質であること、ならびにこれらの物質は BBB に対して高い透過性と脳組織に対して高親和性を有することが確認された。また、健常人の尿分析の結果から、これらの物質に対する代謝過程の存在が推定された。これらの問題についての詳細については次年度の研究課題としたい。

## 2.0テスラ・ヒト全身用 MR 装置の開発

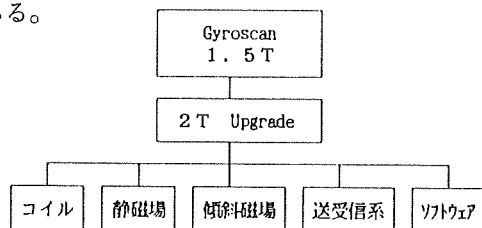
荻野孝史, 矢野登志雄

NMR を用いた無侵襲・非破壊測定法である *in vivo* NMR スペクトロスコピー (MRS) と NMR 画像法 (MRI) とは、前者は生化学情報を、後者は形態情報を与える点で異なるだけでなく、測定技術や装置的要求にも相違がある。しかし、高感度化は両者に共通の重要課題であり、この課題を解く最も有効な方法は高磁場化である。高磁場化すれば、感度のみならずスペクトル分解能も向上する。故に、高磁場化は MRS に必須であるが、MRI においても 1) 画質の向上、2) 測定時間の短縮、3) 空間分解能の向上、4)  $^1\text{H}$  核以外の核種を対象とするイメージング、5) 化学シフトに選択的なイメージング等を可能にする利点がある。ところが、高磁場化に伴い生体系の NMR 測定には (特に  $^1\text{H}$  MRI では)、RF 効果等により種々の問題が生じる。従って、 $^1\text{H}$  MRI による詳細な形態情報と MRS による局所的な生化学情報を一貫して得るには、両測定法の要求を満たす最適最高静磁場強度を見いだす必要がある。以上の点を踏まえ我々は、現在臨床応用可能な最高静磁場強度である 2.0T (テスラ)・ヒト全身用超伝導磁石を用いて、我国で初めて MRI と MRS の統合的運用を可能とする 2.0T MR 装置を開発した。

## 方法

2.0T ヒト全身用 MR 装置の基本システム構成は、

超伝導磁石 : Oxford HiHo  
 磁場勾配用アンプ : Hamburg Master/Slave  
 磁場勾配用コイル : SMIT  
 RFアンプ : Ehrhorn  
 コンピュータ : VAX 11/750 である。  
 装置の仕様は、Yale 大学と Bruker-ORS 社とで共同開発された 2.1T ヒト全身用 MR 装置の仕様を参考にした。2.0T MR 装置開発の概略は下図の通りである。



## 結果と考察

I. 2.0T コイル: 測定目的に応じて9種類の NMR 検出コイルを製作した。MRI 用の Helmholtz 型ヘッドコイルと bird cage 型ボディコイル及び MRS 用の  $^3\text{P}$  ヘッドコイルの性能を対応する 1.5T 用

コイルと比較した。2.0T では 1.5T に比べ、ファントム測定時には3種共約100% SNR (信号/雑音比) が向上した。Hoult と Lauterbur の理論によれば、2.0T では 1.5T に対して 33%–65% の SNR 向上が期待される。今回、理論的期待値を越えて SNR が向上したのは、システム全体の 2.0T 高磁場への最適化に成功した為である。

## II. MRI 応用

① 空間分解能の向上: 測定時間を延長せずに空間分解能を上げるには、非常に高感度な MR 装置が必要である。今回開発した装置では空間分解能 0.3 mm x 0.3mm のヒト脳の良質な画像が得られ、2.0T 高磁場化による感度向上を実証した。

② 水・脂肪分離画像: 化学シフトは静磁場強度に比例し、水と脂肪の化学シフトは 2.0T 高磁場では約 300 Hz になる。この大きな化学シフト差を利用し、周波数選択励起を用いて、容易に高感度で水画像と脂肪画像を分離し独立に求めることができた。

③ ボディコイルとサーフィスコイル: 高磁場では呼吸や血流に起因する artifacts が画像に生じ易いが、ECG 同期、pre-saturation、flow compensation、信号積算順序の変更等の方法を併用して 2.0T でも良好なボディ画像が得られた。更に、送信に RF 磁場均一性の高いボディコイルを、受信に信号検出感度の高いサーフィスコイルを用いて、良好な脊髄画像を得ることができた。

## III. MRS 応用

①  $^3\text{P}$  MRS: ISIS 法 (Image Selected *in vivo* Spectroscopy) による領域選択スペクトロスコピーで得られたヒト脳内高エネルギーリン酸化合物や膜脂質代謝物の  $^3\text{P}$  スペクトルでは、2.0T 高磁場化による感度・分解能の向上を確認した。この結果はスペクトルの定量的解析に極めて有用である。

②  $^1\text{H}$  MRS:  $^1\text{H}$ MRS では生体内の水の巨大なシグナルの選択的抑制が必要であると共に、狭い化学シフト範囲内に多くのシグナルが観測されるために高いスペクトル分解能が要求される。ヒト脳から N-アセチルアスパラギン酸、グルタミン酸/グルタミン、クレアチンリン酸/クレアチン、コリン等を含む良好な高分解能スペクトルを得た。このように、2.0T 高磁場化は  $^1\text{H}$ MRS 測定においては極めて有利となることを実証した。

## 謝辞

「2.0テスラヒト全身用 MR 装置の開発」は Philips Medical Systems と共同で行なわれた。

## 9. 微細構造研究部

### 1. 研究部一年のあゆみ

本研究部では神経筋疾患の病因解明のため、生検筋材料を使っての形態学的、生化学的解析、培養細胞生物学的研究を行っている。

人事では流動研究員の古賀靖敏が米国コロンビア大学 DiMauro 教授の所へ留学、新しく7月より流動研究員として松岡太郎（阪大小児）、研究生として4月から長谷川ひとみ（北里大神内）、竹光正和（旭川医大整外）、7月から林明益（台湾大小児）が加わった。この研究生3名は月～土曜日までフルタイムで活躍している。昨年春逝去した相川室長の後任には、流動研究員である後藤雄一が平成2年4月1日付で決定した。

#### 1) 神経筋疾患の診断と組織バンクの確立

神経筋疾患の診断のために検索を依頼される検数は年々増加し、昨年は435にも達した。依頼された施設には病理学的（組織化学、電顕）、生化学的、DNA解析の検索を行い回答した。全ての検体はバンクに入れた。今年度のバンクからの貸し出しは米国、国内（都立神経研など）数施設に及び、筋組織バンクシステム作りが軌道に乗り出したといえる。

#### 2) ミトコンドリア病の病因に関する研究

ミトコンドリア病は診断法の確立とともに、多くの患者が存在することが分かり、神経筋疾患研究の中心をなすようになった。本研究部でもミトコンドリアDNAの解析（国立遺伝研、宝来聡博士との共同研究）が進んだ。ミトコンドリアDNA異常が意味するところを形態学的に解析し、ミトコンドリア病の本態に関する研究発表を多く行った。

#### 3) 筋移植に関する研究

モデル動物MDXマウスにもデュシャンヌ型筋ジストロフィーと同じくジストロフィンの欠損があることが明らかにされている。そこで、治療の一方法として、正常筋芽細胞をMDXマウスに移植する移植実験を開始した。移植細胞によるジストロフィンの発現を確認している。

#### 4) 胸腺筋様細胞の産生する生物活性因子の研究

これまで異所性の筋様細胞の生理機能については全く不明であったが、無血清培地に適応できるクローンが樹立され、活性因子の精製が可能となった。その結果FGFとは異なると思われるアストロサイト増殖因子と、 dendritick細胞増殖因子が判明し、いずれも新しい因子と考えられるので精製を急いでいる。

（部長 埜中征哉）

## 2. 研究業績

## A. 論文

## a. 原著

- 1) Nonaka I, Koga Y, Ohtaki E, Yamamoto M:  
Tissue specificity in cytochrome c oxidase deficient myopathy  
J Neurol Sci 92:193-203, 1989
- 2) Nonaka I, Ishiura S, Arahata K, Ishibashi-Ueda H, Maruyama T, Ii K:  
Progression in nemaline myopathy  
Acta Neuropathol 78:484-491, 1989
- 3) Akahori H, Ishii H, Nonaka I, Yoshida H:  
A portable type of rapid freezing device for metal contact and immersion freezing  
J Electron Microsc 38:158-162, 1989
- 4) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase F, Bonialla E, Werneck LC, Servidei S, Nonaka I, Koga Y, Spiro AJ, Bownell KW, Schmidt B, Schotland DL, Zupanac M:  
Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns Sayre syndrome  
N Engl J Med 320:1293-1299, 1989
- 5) 宗 東林, 佐藤 猛, 氏家 寛, 桮中征哉, 小澤高将:  
金コロイド標識免疫電子顕微鏡によるミトコンドリアミオパチーの研究  
臨床神経 29:405-410, 1989
- 6) Yamamoto M, Koga Y, Ohtaki E, Nonaka I:  
Focal cytochrome c oxidase deficiency in various neuromuscular diseases  
J Neurol Sci 91:207-213, 1989
- 7) Sakuta R, Nonaka I:  
Vascular involvement in mitochondrial myopathy  
Ann Neurol 25:594-601, 1989
- 8) Sakuta R, Aikawa H, Takashima S, Yoza A, Ryo S:  
Epiderma nevus syndrome with hemimegalencephaly: a clinical report of a case with acanthosis nigricans-like nevi on the face and neck, hemimegalencephaly, and

II 研究業績

- hemihypertrophy of the body  
Brain Dev 11:191-194, 1989
- 9) 於保祐子, 太神和広, 渡辺三郎, 五十嵐隆, 赤城邦彦, 古賀靖敏, 埜中征哉:  
Fanconi 症候群を伴ったミトコンドリアミオパチー (cytochrome c oxidase 部分欠損) の幼児例  
日児誌 93:1337-1342, 1989
- 10) 有川恵理, 荒畑喜一, 埜中征哉, 杉田秀夫:  
福山型先天性筋ジストロフィーにおけるジストロフィンの研究  
医学のあゆみ 150:747-748, 1989
- 11) Tanaka M, Yoneda M, Ohno K, Sato W, Yamamoto M, Nonaka I, Horai S, Ozawa T:  
Differently deleted mitochondrial genomes in maternally inherited chronic progressive external ophthalmoplegia  
J Inherited Metab Dis 12:359-362, 1989
- 12) Matsumura K, Shimizu T, Nonaka I, Mannen T:  
Immunochemical study of connectin (titin) in neuromuscular disease using a monoclonal antibody: connectin is degraded extensively in Duchenne muscular dystrophy  
J Neurol Sci 93:147-156, 1989
- 13) Hagiwara Y, Yoshida M, Nonaka I, Ozawa E:  
Development expression of dystrophin on the plasma membrane of rat muscle cells  
Protoplasma 151:11-18, 1989
- 14) 松田行正, 阪田千種, 春原経彦, 埜中征哉, 里吉宮二郎:  
眼筋型重症筋無力症として経過観察されていた mitochondrial myopathy (cytochrome c oxidase 部分欠損) の2例  
臨床神経 29:1180-1182, 1989
- 15) Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, Ishiura S, Tsukahara T, Ishihara T, Sunohara N, Nonaka I, Ozawa E, Sugita H:  
Dystrophin diagnosis: Comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analyses  
Proc Natl Acad Sci USA 86:7174-7158, 1989
- 16) Kikuchi A, Kamo I, Fujisawa K, Nonaka I:  
Changes of subcellular localization of Thy-1 antigen during thymic myoid cell

differentiation

Biosci Rep 5:605-613, 1989

- 17) 志倉圭子 :  
セントラルコア病の筋病理学的研究—疾患の位置づけとコア構造の特異性について—  
日本小児科学会誌 93:2634-2643, 1989
- 18) Chien-Y-Y, Nonaka I:  
Peripheral nerve involvement in Werdnig-Hoffmann disease  
Brain Dev 11:221-229, 1989
- 19) Kohyama J, Niimura F, Kawashima K, Iwakawa Y, Nonaka I:  
Congenital fiber type disproportion myopathy in Lowe syndrome  
Pediatr Neurol 5:373-376, 1989
- 20) Hashimoto K, Shimizu T, Nonaka I, Mannen T:  
Immunochemical analysis of  $\alpha$ -actinin of nemaline myopathy after two dimensional electrophoresis  
J Neurol Sci 93:199-209, 1989
- 21) Hayashi Y, Kikuchi-Tada A, Jitsukawa K, Sato S, Anzai T, Kawashima M:  
Muscle regeneration and cell-mediated cytotoxicity in the autologous muscle culture  
Acta Derm Venereol (Stockh) 70:53-55, 1990
- 22) 香坂 忍, 香坂雅子, 福田紀子, 後藤雄一, 植竹公明, 寺内 昇, 梶井直文 :  
携帯型脳波記録システムを用いた発作時脳波の解析  
脳と発達 22:30-37, 1990
- 23) 長谷川ひとみ, 長谷川一子, 斎藤豊和, 古和久幸, 埜中征哉 :  
潰瘍性大腸炎の経過中に発症したミオパチーの一例  
臨床神経学 30:184-188, 1990
- 24) 赤堀 宏, 吉田寿治, 埜中征哉, 石井弘子 :  
イオンスパッタコーティングにおけるターゲット冷却の効果  
医生物走査電顕 Vol. 18, 33-35, 1989
- 25) Aikawa H, Momoi T, Kitamoto T, Arahata K, Momoi M:  
Expression of cellular retinonic acid binding protein (CRABP) in adult rat brain  
Biomed Res 10:247-250, 1989



## II 研究業績

### c. 総説

- 1) 埜中征哉 :  
ミトコンドリア脳筋症  
現代医療 21:1704-1710, 1989
- 2) 埜中征哉 :  
先天性ミオパチー  
小児内科 21 (臨時増刊号) : 622-627, 1989
- 3) 埜中征哉 :  
糖原病Ⅱ型 (Pompe 病)  
小児内科 21 (臨時増刊号) : 208-210, 1989
- 4) 長谷川ひとみ, 埜中征哉 :  
特集/病期からみた薬剤の選択と投与方法 多発性筋炎  
医学と薬学 22:1155-1159, 1989

### d. 班会議報告書

- 1) 埜中征哉, 後藤雄一, 長谷川ひとみ, 松岡太郎 :  
チトクロームC酸化酵素部分欠損—筋線維ときほぐし標本による検討—  
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,  
平成元年度研究報告書 p247-250, 1990
- 2) 埜中征哉, 後藤雄一, 宝来 聰 :  
慢性外眼筋麻痺症候群におけるミトコンドリアDNA異常と臨床像・筋病理所見との対応  
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,  
平成元年度研究報告書 p267-270, 1990
- 3) 埜中征哉, 秋山千枝子, 斎藤陽子 :  
筋再生を阻害する因子—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モデル動物の開発に関する研究班,  
昭和63年度研究報告書 p79-95, 1989
- 4) 加茂 功, 古川昭栄, 渡辺里仁, 宮下 綾, 浜野智代, 菊地愛子, 埜中征哉 :  
胸腺筋様細胞の再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, 昭和63年度報告書 p407-409, 1988
- 5) 相川久志, 津金隆夫, 今井尚志, 斎藤陽子, 加茂 功, 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・筋ジストロフィー症及び関連疾患モデル動物の開発に関する研究班,  
昭和63年度研究報告書 p23-41, 1989

## B. 学会発表

## a. シンポジウム

- 1) 埜中征哉, 後藤雄一, 菊地愛子, 宝来 聡 :  
ミトコンドリアミオパチーにおける分子生物学的アプローチ  
第32回日本先天代謝異常学会総会シンポジウム, 福井, 11. 17, 1989
- 2) 赤堀 宏, 吉田寿治, 埜中征哉, 石井弘子 :  
イオンスパッタコーティングにおけるターゲット冷却の効果  
第18回医学生物学走査電顕シンポジウム, 鹿児島県霧島町, 10. 6, 1989

## b. 国際学会

- 1) Takemitsu M, Arahata K, Nonaka I :  
Evaluation of recovering process in dystrophic muscle after local injection of bupivacaine hydrochloride (Marcaine).  
9th WPOA AOA SOA MEETING  
Singapore, Nov. 25, 1989

## c. 一般学会

- 1) 松村喜一郎, 清水輝夫, 埜中征哉 :  
デュシャンヌ型およびベッカー型筋ジストロフィー症におけるコネクチンの分解過程について :  
モノクローン抗体による検討  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 24, 1989
- 2) 荒畑喜一, 石浦章一, 塚原俊文, 埜中征哉, 杉田秀夫 :  
デュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の遺伝子産物 (ジストロフィン) の関する研究—臨床的意義—  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 24, 1989
- 3) 清水輝夫, 松村喜一郎, 橋本和季, 萬年 徹, 埜中征哉, 小澤鏗二郎 :  
ジストロフィンの単クローン抗体の確立  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5. 24, 1989

## II 研究業績

- 4) 桮中征哉, 古賀靖敏, 菊地愛子 :  
チトクロームC酸化酵素欠損—培養筋細胞と皮膚繊維芽細胞における再現性—  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5.26, 1989
- 5) 後藤雄一, 古賀靖敏, 桮中征哉 :  
Myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) と複合体IVとの関連性  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5.26, 1989
- 6) 秋山千枝子, 斎藤陽子, 桮中征哉 :  
筋の壊死と再生に関する因子—組織学的検討—  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5.26, 1989
- 7) 斎藤陽子, 桮中征哉 :  
塩酸ブピバカイン投与後の筋衛星細胞の分裂, 増殖について  
第30回日本神経学会総会, 水戸, 5.26, 1989
- 8) 長浦智明, 隅 清臣, 西垣敏紀, 桮中征哉 :  
著明な筋線維の壊死, 再生を伴ったミトコンドリアミオパチーの女兒例  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7.6, 1989
- 9) 道上敏美, 塚本浩子, 谷池雅子, 西本潤史, 緑川光雄, 乾 幸治, 岡田伸太郎, 後藤雄一, 古賀靖敏,  
桮中征哉 :  
比較的良好な経過を示す cytochrome c oxidase 欠損症の一例  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7.6, 1989
- 10) 田中茂樹, 下村千枝子, 松坂哲應, 辻 芳郎, 高柳俊光, 富増邦夫, 桮中征哉 :  
乳児致死型 cytochrome c oxidase 欠損症の新生児死亡例  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7.6, 1989
- 11) 佐々木公男, 館 延忠, 飯塚貴介, 山田智子, 古賀靖敏, 桮中征哉 :  
Ragged-red fiber を伴うミオクロヌステんかん (MERRF) の一例  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7.6, 1989
- 12) 後藤雄一, 桮中征哉 :  
Marinesco-Sjögren syndrome の筋病変—生検筋の病理学的検討—  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7.6, 1989
- 13) 大滝悦生, 山下裕史朗, 堀川瑞穂, 寺沢健二郎, 片渕幸彦, 桮中征哉 :  
筋原性変化を伴った Marinesco-Sjögren 症候群の一例

- 第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 6, 1989
- 14) 永井利三郎, 村上良子, 羽場敏文, 天野晴美, 田中順子, 安部治郎, 杉江秀夫, 埜中征哉 :  
運動時筋痙攣と高 C P K 血症を呈する一学童例  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 6, 1989
- 15) 大谷 勉, 尾関里絵, 山田紀子, 粟屋厚子, 杉山成司, 志倉圭子, 埜中征哉, 杉江秀夫 :  
Rhabdomyolysis にて急性腎不全を呈した phosphoglycerate kinase  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 6, 1989
- 16) 埜中征哉, 後藤雄一, 竹下研三, 田中朋子, 二瓶健次, 小林葉子 :  
核異常, 筋原線維崩壊, 自己貪食を主病変とする小児筋炎—病理発生についての考察—  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 6, 1989
- 17) 神山 潤, 新村文男, 川嶋浩一郎, 岩川善英, 埜中征哉 :  
Fiber type dysproportion を呈した Lowe 症候群の兄弟例  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 6, 1989
- 18) 佐賀 岳, 道廣成実, 椎原弘章, 有泉基水, 菅野吉一, 埜中征哉, 山形恵子 :  
片側下腿のみに進行性筋ジストロフィー様変化を認めた一例  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 8, 1989
- 19) 秋山千枝子, 斎藤陽子, 埜中征哉 :  
筋再生と間質結合組織増生との関係  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 8, 1989
- 20) 斎藤陽子, 埜中征哉 :  
塩酸ブピバカイン筋注後の分裂細胞の免疫電子顕微鏡的観察  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 8, 1989
- 21) 作田亮一, 相川久志, 館野昭彦, 大泉 純 :  
ビオチン欠乏飼育ラットにおける行動学的検討  
第31回日本小児神経学会総会, 札幌, 7. 8, 1989
- 22) 加茂 功 :  
マウス胸腺細胞の増殖  
第48回日本癌学会総会, 名古屋, 10. 23, 1989
- 23) 赤堀 宏, 吉田寿治, 埜中征哉, 石井弘子 :  
簡易型 t-ブチルアルコール凍結乾燥装置とその特性

## II 研究業績

第45回日本電子顕微鏡学会総会, 大阪, 6. 1, 1989

- 24) 後藤雄一, 古賀靖敏, 菊池愛子, 埜中征哉, 宝来 聡 :

Myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) の生化学的検討

第32回日本先天代謝異常学会総会, 福井, 11. 16, 1989

### C. 班会議発表

- 1) 埜中征哉, 竹光正和, 荒畑喜一 :

mdx マウスにおける筋再生と, その過程における正常筋芽細胞の移植

厚生省精神・神経疾患・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班,

平成元年度班会議, 東京, 12. 12, 1989

- 2) 埜中征哉, 後藤雄一, 宝来 聡 :

慢性外眼筋麻痺症候群におけるミトコンドリアDNA異常と臨床像・筋病理所見との対応

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,

平成元年度班会議, 東京, 12. 2, 1989

- 3) 埜中征哉, 後藤雄一, 長谷川ひとみ, 松岡太郎 :

チトクロームC酸化酵素部分欠損一筋線維ときほぐし標本による検討一

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,

平成元年度班会議, 東京, 12. 2, 1989

- 4) 埜中征哉, 後藤雄一, 長谷川ひとみ, 松岡太郎, 宝来 聡 :

ミトコンドリア脳筋症におけるDNA異常と電子伝達系酵素異常

文部省重点領域研究「バイオエナジテックス」班会議,

平成元年度研究成果発表会, 名古屋, 12. 12, 1989

- 5) 加茂 功, 菊池愛子, 国下龍英, 古川昭栄, 篠田一三, 渡辺里仁, 埜中征哉 :

胸腺筋様細胞が産生するデンドリティックと思われる細胞の分化増殖因子

厚生省特定疾患, 免疫性神経疾患調査研究班, 東京, 1. 18, 1990

## 3. 主な研究報告

## MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)の臨床的, 生化学的, 病理学的研究

埴中征哉, 後藤雄一, 長谷川ひとみ, 松岡太郎:

MELAS は卒中様症状をくり返すことを特徴としたミトコンドリア脳筋症である。本症の位置づけをより明らかにするため, 我々が生検筋を検索し, 臨床症状から MELAS と診断した症例につき検討した。

## 対象・方法

MELAS と診断したのは35名(男16名, 女19名)であった。これらの症例の臨床症状, 生検筋より分離したミトコンドリア電子伝達系酵素活性の測定, 生検筋の組織化学的, 電子顕微鏡的検索結果を分析した。

## 結果

## ①臨床症状(図1)

発症は2~30歳までであったが大半は5~15歳の小児期に発症していた。乳幼児期には正常で突然発症のものが多かった。卒中様症状としては嘔吐を伴う激しい頭痛(100%), けいれん, 半盲, 片麻痺などが大半の例でみられた。以下に述べる酵素欠損と臨床症状の間には差はなかった。

## ②生化学所見

生化学的には複合体 I 欠損が17名, 複合体 IV (cytochrome c oxidase, CCO) 欠損が7名であった。生化学的には正常な例で, 組織化学的にのみ CCO 部分欠損を認めたのは8例であった。図1の複合体IV欠損例には CCO 部分欠損例をも含めた。

## ③組織化学所見

全例に筋線維(タイプ1, 2とも)の大小不同, タイプ2 B線維の選択的小径化を認めた。Ragged-red fiber (RRF)は0.1%~26%と全例に認めた。

特記すべきことは SDH 染色で濃染する血管 (strongly SDH-reactive vessels, SSV) を数多く認めたことであり, 生検筋の65.7%に異常血管を認めた。この血管は電子顕微鏡的には小動脈で, その平滑筋内には著しく数を増し, 異常な形態をしたミトコンドリアの充満をみた。

## 考察

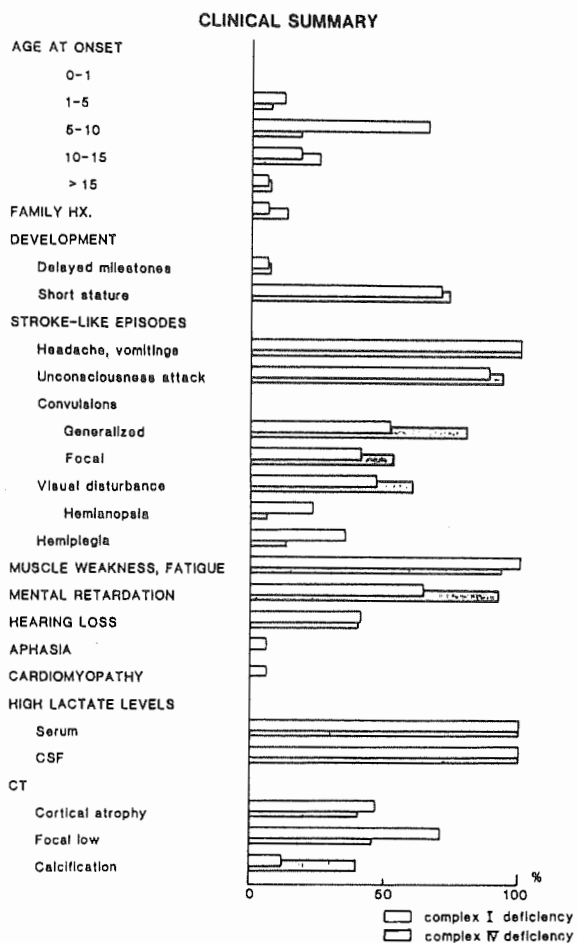
MELAS は複合体 I 欠損と密接に関連しているが, 複合体IV欠損も存在し, 多因性であった。血管異常は電子顕微鏡的にも確認されているが<sup>1)</sup>, 光学顕微鏡的にも SSV として確認でき, 65.7%もの生検筋に異常が確認できた。MELAS は多因性ではあ

るが, 全身の動脈系が好んで浸されるミトコンドリア病であることが明らかとなった。

## 文献

- 1) Sakuta R, Nonaka I: Vascular involvement in mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 1989;25:594-601

図1



## mdx マウスの筋再生能と、その過程における正常筋芽細胞の移植

竹光正和, 荒畑喜一, 埜中征哉 :

より効率よくジストロフィン陽性細胞を mdx マウス筋内に出現させることを目的として以下の実験を行った。mdx マウス骨格筋の再生についての基礎実験をまず行い、次に正常筋芽細胞を mdx マウス再生途上筋に移植 (transplantation) し、免疫組織学的に観察し、移植細胞の生着をジストロフィンの発現率で検討した。

## 対象と方法

(1) 正常筋芽細胞の移植を行う前に mdx マウス骨格筋の0.25%塩酸プピバカイン注入後の壊死、再生過程を正常対照の C57 BL/10 ScSn (B10) マウスと組織学的に比較検討した。生後12週目の mdx マウス36匹、その正常対照36匹を使用した。塩酸プピバカイン注入後第1日目から第7日目まで毎日、さらに第2週目と第4週目にそれぞれ4匹ずつ注入筋を採取し、凍結標本として H&E, mGT, NADH 染色を行った。塩酸プピバカインを注入した mdx マウスの筋、無処置の反対側の筋、さらにB10マウスの塩酸プピバカイン注入側及び無処置側とを比較検討した。また、筋線維直径も測定し比較した。

(2) 移植する正常筋芽細胞は胎生15-20日のB10マウスより採取した。約1週間培養の後、分裂増殖した細胞を用いた。10匹の mdx マウスの筋に0.25%塩酸プピバカインを注入後第1日目と2日目に連続して正常筋芽細胞を1-3×10個移植した (A group)。2週後に移植筋を採取し抗ジストロフィン抗体 (IV) で免疫染色を行った。対照として無処置の mdx マウスの10匹の筋 (B group) 及び塩酸プピバカインのみ注入後2週後のもの4匹 (C group) に対して同様の染色を行った。

## 結果

(1) mdx マウス骨格筋も、対照のB10マウスも光顕ではほぼ同じ形態を再生筋は呈した。筋線維径の成長は大小不同はあるものの、mdx マウスの方が速かった。何れの再生筋も1カ月で壊死前の筋線維直径に回復した。

(2) 移植を受けた A group は、総筋線維数のうち  $3.86 \pm 1.50\%$  (mean  $\pm$  S. D. n=10) の筋線維にジストロフィン発現がみられた。B group は、 $0.84 \pm 0.59\%$  (n=10)、C group では  $0.99 \pm 0.71\%$  (n=4) であった。(表1)

## 考察

今回の結果は無処置の mdx マウスよりは有意にジストロフィン陽性筋線維が出現したが、他の報告

を上回るものではなかった。

正常筋芽細胞の移入によるジストロフィン発現を高率にするためには、免疫学的拒絶反応の阻止、基底膜の破壊、筋芽細胞移植時期、及び方法の検討など多くの問題が残されている。

## 参考文献

- 1) Karpati G, Pouliot Y et al : Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. Am J Pathol 134:27, 1989
- 2) Partridge TA, Morgan JE et al : Conversion of mdx myofibers from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblast. Nature 337:176, 1989

## 図表説明

表1 : mdx マウスのヒラメ筋のジストロフィン陽性線維の出現率。

A group : 0.25%塩酸プピバカイン注入後24時間と48時間後に正常筋芽細胞を移入した筋。B group : 何も処理をしていない筋。C group : 0.25%塩酸プピバカイン注入のみ行われた筋。

\* : 有意差あり,  $P < 0.05$

+ : 有意差なし,  $P < 0.05$

The percentage of dystrophin positive fibers in the soleus muscles of young adult mdx mice.

	Marcaline	transplant	dystrophin positive fibers (%) mean $\pm$ S.D.
A group (n=10)	+	+	$3.86 \pm 1.50^{\circ}$
B group (n=10)	-	-	$0.84 \pm 0.59$
C group (n=4)	+	-	$0.99 \pm 0.71$

$\circ$  significant ( $P = 0.05$ )

## ミトコンドリア・ミオパチーの cytochrome c oxidase 部分欠損に関する研究 —筋線維ときほぐし法による検討—

松岡太郎, 後藤雄一, 長谷川ひとみ, 桢中征哉

ミトコンドリア・ミオパチーの代表的疾患として慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO) と myoclonus epilepsy with ragged-red fibers (MERRF) がある。両者には正常活性をもつ筋線維のなかに cytochrome c oxidase (CCO) 活性を欠く線維が散在する所見 (CCO 部分欠損) を組織化学的に認め、その部分欠損の病理発生を知ることは病因を知るうえで重要であると考えられている。一方, Southern 法にて半数前後の CPEO 症例で筋ミトコンドリア DNA (mtDNA) の欠失が証明されているにもかかわらず, MERRF における mtDNA の欠失例の報告はない。私達は, 横断切片の組織化学染色では区別をつけがたい CPEO と MERRF の CCO 部分欠損をより詳細に検討し, その違い, さらに欠失をもつ mtDNA の果たす役割を明らかにするために, 新しく考案された筋線維ときほぐし法による研究を行った。

### 対象

臨床症状, 筋病理組織所見より診断された CPEO 6 例, MERRF 3 例を対象とした。筋組織学的に CCO 部分欠損を全例に認め, Southern 法による筋 mtDNA の分析では, CPEO の全例においてその欠失を認めたが, 欠失部位, その大きさ, 及び欠失 mtDNA の比率 (5~70%) は症例により異なっていた。MERRF においては, 筋 mtDNA の異常は検出されなかった。

### 方法

生検筋 (長さ約 1 cm) を 0.05M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) 使用の 2% グルタル液で 10 分間固定した。実体顕微鏡下でこの生検筋をピンセットを用い数本ずつの筋線維よりなる筋束にときほぐした後, Seligman らの方法にて CCO 染色した。染色後, 再び筋束をピンセットを用いて単一線維にまでときほぐし, 実体顕微鏡下で観察した。CPEO の症例においては, 各症例あたり 200 本の筋線維につきその全長および CCO 陰性部の長さをそれぞれ計測し, CCO 陰性部の占める比率を算出, その欠失 mtDNA の比率との相関関係につき検討した。

### 結果

CPEO においては, CCO 陽性部と陰性部が節状に混在する筋線維を全症例で認めた。CCO 陽性部と陰性部の境界は常に明瞭で直線状であった (図 1)。

MERRF においても, 一本の筋線維上に CCO 陽性部と陰性部が混在していたが, その境界は不鮮明で, CPEO のそれとは異なっていた。CPEO における CCO 活性陰性部の占める比率は, 3.4~25.4% と症例により異なっていた。この値は欠失 mtDNA の比率とは正の相関関係を示した。(図 2)。

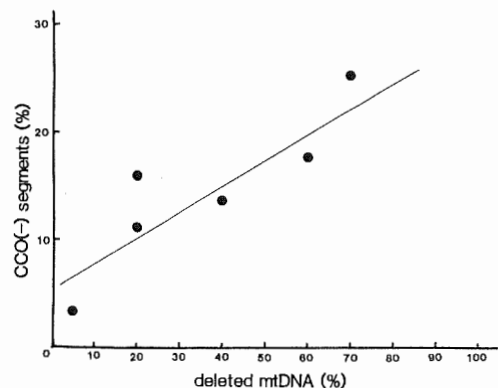
### 考察

今回の筋線維ときほぐし法による検討で, 1) 横断切片の組織化学染色では同じ CCO 部分欠損の像を呈する CPEO と MERRF も, 単一筋線維における酵素欠損の分布様式が異なること, 2) 欠失 mtDNA をもつ CPEO においては, 酵素欠損部が明瞭な境界をもち節状に分布すること, 3) CPEO における酵素欠損部の比率は欠失 mtDNA の割合が増すと大きくなること, が示された。CPEO にみられる CCO 部分欠損の病態発生における欠失 mtDNA の関与が示唆されたが, なぜ酵素欠損部が境界明瞭な節状に分布するかは今後の課題である。

図 1



図 2





ミトコンドリアミオパチーにおけるミトコンドリア DNA 異常の検討

後藤雄一, 埜中征哉, 宝来 聡\* (\*国立遺伝学研究所)

ミトコンドリアミオパチーにおいて, ミトコンドリア DNA (mtDNA) 欠失の認められることが報告されて以来, 同疾患に対する分子生物学的研究は著しく進歩した。我々は, 当研究部筋組織バンクに保存されている75例のミトコンドリアミオパチーについて, 筋 mtDNA 分析を行った。

対象・方法

一般的に用いられる臨床的分類である3病型と, それらに分類されない群とを対象とした(表1)。各症例について, 臨床症状, 検査結果, 筋病理所見, 筋ミトコンドリア酵素活性などを mtDNA 分析結果と比較検討した。

mtDNA は, 常法により全 DNA として分離し, ヒト正常 mtDNA をプローブとしてサザン分析を行い, 欠失の有無を検討した。また, PCR 法にて欠失部位の同定を行い, 一部は直接塩基配列決定法で欠失断端を決定した。

結果

サザン法にて欠失が認められたのは, 慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (CPEO) 40例中の27例 (68%) であり, 他の病型では認められなかった。そのうちの22例についてまとめたのが図1であり, 欠失は, H鎖とL鎖の複製点間に存在し, 大きさは1.8から8.8 kilobase であった。欠失と臨床症状との関係では, 外眼筋麻痺が欠失例で必発していたこと, 欠失が大きいほど発症年齢が低く, 障害が多臓器に及ぶ傾向があることが示された。欠失と生化学的酵素活性とは, 明らかな相関関係を示さなかった。欠失と筋病理所見との関係は, CPEO の症例のほぼ全例に認められる cytochrome c oxidase (CCO) の部分欠損像に注目し検討した。すなわち, CCO 部分欠損を示す症例でも, mtDNA 欠失をもつ症例群で有意に CCO 欠損線維の出現頻度が高く, また, mtDNA 欠失例の中でも, 欠失 DNA を多く持つ症例の方が出現頻度が高かった。

一方, 欠失の起こる機序については, 欠失断端の塩基配列が, ほとんどの例で3~13塩基の direct repeats もしくはきわめて相同性の高い配列になっていることから, “slipped mispairing を介する recombination” が最も考えやすい。しかし, 断端にまったく類似性のない症例も存在することから, おそらく欠失には複数の機序が存在すると思われる。

考察

mtDNA の欠失が CPEO では, 高頻度に存在する

ことが示された。また, CCO 欠損線維の出現頻度から, 欠失 mtDNA が病態になんらかの影響を与えていることが示唆された。しかし, mtDNA レベルの異常と蛋白合成・発現レベルの異常との間にはまだ大きな隔たりがあり, 臨床症状との関係はなお一層不明な点が多い。今後は, mtDNA の欠失がもつ病理学的意味を詳細に検討する必要がある。

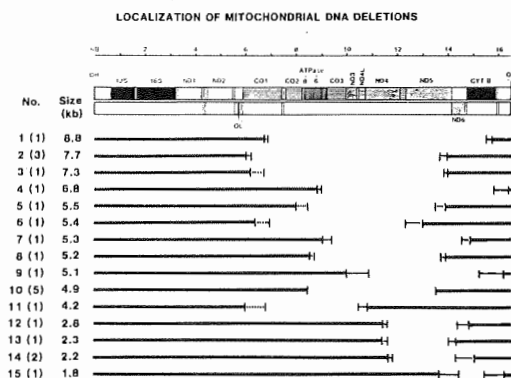
文献

- 1) Goto Y, Itami N, Kajii N, et al.: J Pediatr 114: 904-910, 1990
- 2) Goto Y, Nonaka I and Horai S: J Neurol Sci (submitted)

表1 Mitochondrial DNA Analysis

	Total Number	Sex M/F	Deletion M/F
CPEO	40	19/21	10/17
MELAS	10	7/3	0/0
MERRF	7	2/5	0/0
Others	18	8/10	0/0

図1



## 骨髄細胞からの筋様細胞の樹立

加茂 功

これまで、松果体、視神経、胸腺などからは、いわゆる異所性の筋様細胞が観察されている。特に、胸腺の筋様細胞に関しては、重症筋無力症との関係からも多くの人々により研究され、数種の動物種でいくつかのクローンも樹立されている。

一方、骨髄も多能性幹細胞を豊富に有する臓器として知られており、筋再生分化にも影響を及ぼすという報告もある。上記の臓器同様筋様細胞の存在を想像がされる。

実際、これまでに、骨髄細胞を長期にわたって培養していると、ごくまれであるが、多核な細胞が出現してくることが知られている。しかし、その多核細胞そのものの同定はなされてなかった。

今回骨髄細胞の long term culture を行い、培養基質（器）に付着細胞をクローン化し、多核形成能に着目して、分離した細胞の性格を検討し、骨髄においても筋様細胞、少なくとも *in vitro* で筋管形成をなす細胞が存在していることを証明した。

## 材料と方法

8日令のメスのウイスター系ラットを用いた。大腿骨を周辺の筋組織より注意深くとりだし、さらに、極力骨髄以外の細胞の混入阻止するために、酒精綿で表面をこすり、70%アルコールに数秒間浸し、ガスバーナーの火炎中を通過する処置を施す、そして、直ちに、4℃培地に移した。

培地のなかで、23G針付き注射筒ですできるだけ大腿骨内を繰り返し洗滌した。

骨髄細胞と大腿骨を、それぞれ RPMI 1640+10% FBS の条件下培養した。

クローン化、並びにアセチルコリンレセプターの検出等、私たちが、胸腺筋様細胞の樹立の際に用いた方法に従った。<sup>1)</sup>

筋のミオシンH鎖と  $\alpha$  アクチニンは、それらの抗体を用いてイムノブロット法で検出した。

## 結果と考察

大腿骨だけの培養を長期観察しても、細胞の伸展は全く認められなかった。

一方、骨髄細胞の培養からは、非常にまれではあるが、2-3核を有する細胞集団の形成が観察された。これらの、細胞をペニシリンカップを用い、他細胞集団より分離し、さらに96穴マイクロプレートを用いてクローニングを繰り返して、細胞の融合率の高い細胞を一株を得た。この細胞は非常に弱いながら Thy-1 抗原を単核細胞の時点で、発現してい

た。長期に培養していくとやがて、多核細胞を形成した(図1)。この多核細胞は、 $\alpha$ -ブングロトキシンと反応することから、アセチルコリンレセプターを有することが判明した。

また、電子顕微鏡的観察からは、横紋筋細胞に特有の細胞骨格を示すタンパク構造が認められた。

免疫生化学的分析の結果、ミオシン重鎖や、横紋筋に特異的な  $\alpha$ -アクチニンが認められ、これらの構造タンパクが、筋特異的であることが裏付けられた。

以上のように、周辺の筋組織の混入のない培養条件下で、骨髄細胞から、横紋筋の特徴を有する細胞が樹立された。

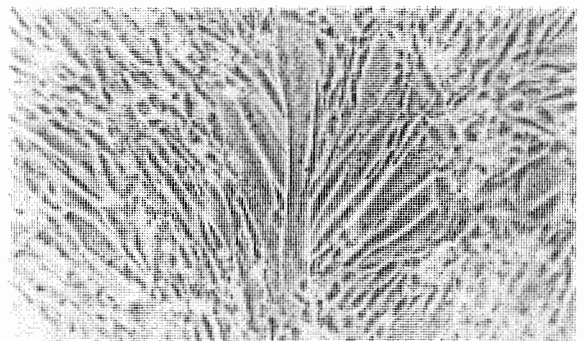
このような細胞が、どのような幹細胞から分化してくるのか、また、骨格筋との lineage について興味もたれるところである。

ところで、これまでの研究では、骨髄は筋再生に重要な役割を果たしていると思定はされてはいるが、実際にどのような細胞が、再生筋の構築に実際に関わっているという証明は未だ成されていない。

今回の実験によって、少なくとも、骨髄中の筋様細胞が横紋筋の形成に参画しうる能力を持つことを証明できた。その生体内での機能についても興味もたれる。

## 文 献

- 1) Kamo I, Nonaka I, Furukawa S, et al, : Biosci. Rep. 4:925-932, 1984
- 2) Grounds MD, : Cell Tissue Res. 234:713-722, 1983
- 3) Yarom R, Meyer S, Carmy O, et al, : Virchows Arch. 41:171-180, 1982



## 胸腺筋様細胞の培養上清中の中枢神経系細胞増殖分化因子の分離精製

菊地愛子, 加茂 功

胸腺の筋様細胞から免疫系と中枢神経系細胞に特異的に作用する増殖分化因子をその培養上清中に見出した。分離精製の結果、両者は物質として相異なることが判った。今回産生細胞を無血清培地でもその物質の生産性に変化を与えることなく培養可能であることが判った。血清含有培地では困難であった本物質の単離を目的として、本物質の分離精製とその生物学的性状を免疫組織化学的方法で検討した。

## 材料及び方法

大量培養：ラット胸腺筋様細胞クローン(871207C)を、10% FBS + RPMI 1640で増殖培養し、confluent になった状態で、(PBS (-))で3回洗滌の上培地をITS + RPMIに替えて4日間培養した。その上清を、出発物質とした。

分離精製：上記材料をアミコン YM10で濃縮または90%飽和硫酸で沈澱させ、pH7.3, 0.05MPBに透析、同バッファーで平衡化したDEAE-セファロース CL-6B カラムにかけ、0-1.2 MNaClのグラディエントで溶出、次いで活性画分をブルーセファロース、ヘパリンカラム等を通し、トーヨーのG4000SWでゲル濾過した。

増殖アッセイ：ラット胎生19日令脳を2日間培養し、これを凍結保存したものを使用。

$2-5 \times 10^3$  cells/0.2ml/well (96 wells-plate)の細胞の培養開始時にサンプルを加え、20-24時間ITS + RPMIの条件下で培養し、 $^3\text{H}$ -サイミジン  $0.1 \mu\text{Ci}$ を培養開始後4時間目に加え、アッセイした。

増殖細胞の検討：抗GFAP抗体等を用いて、免疫組織化学的に検討。

## 結果

上記のラット脳アストロサイトリッチな細胞をITS + RPMIで培養し、これに培養上清からの抽出物を加えると、添加後3-4時間で細胞の形態変換が認められる。

この活性は、DEAE-セファロース CL-60カラムで溶出した分画に幅広く認められるが、メインは1mmho近辺に見いだされるので、この画分を、ブルーセファロースカラムにかけ、再度、NaCl 0.6-1.5Mで溶出すると、0.6Mに強活性が認められたので、この画分をヘパリンセファロースカラムにかけ、NaClで溶出すると0.6M近辺に活性画分を見いだした。この画分をHPLC用トーヨーG4000SWカラムで、0.05 M pH 7.3のPBで溶出を試みたが、吸着が強く認められたので、この溶媒に0.01% Tween 20, 0.6

MNaClを加えて溶出を試みたところ、9万前後のところ活性画分が見いだされたが、SDS-PAGEではまだ数本のバンドが認められるので、更に精製が必要と思われる。

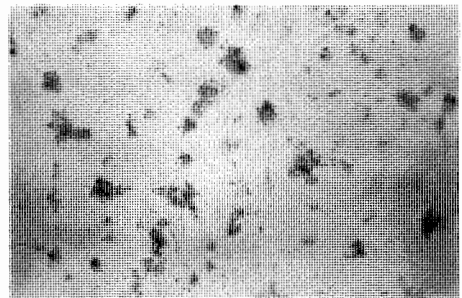
標的細胞、増殖細胞はいずれも、抗GFAP抗体(+)の細胞であった。

## 考察

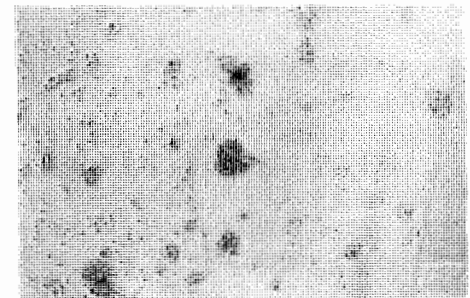
本因子はヘパリンに吸着し、アストロサイトに作用するところから、FGF、特にaFGFの可能性が考えられるので、その異同について、免疫学的交差性をELISA法で検討したところ、検出限界以下であった。また、分子量的にも、FGFのそれとは異なるようである。しかしながら、詳細は純品になってから、さらに比較する必要があると思われる。またアストロサイトのどの発達段階に作用したか如何なる分化をなさしめるかという点については、現在抗A2B5抗体などを用いて検討中である。

## 参考文献

1. A. Tada-Kikuchi, et al: Brain Res. 348:304-308, 1985
2. Y. Shing: J. Biol. Chem. :263:9059-9062, 1988



第1図(本因子添加ラット脳培養細胞)



第2図(本因子非添加ラット脳培養細胞)

## 10. 機能研究部

### 1. 研究部一年のあゆみ

平成元年度において当研究部で研究に携わったのは、小沢鏝二郎、吉田幹晴、萩原康子、林謙介、田中光、池谷紀代子と水野一乗であり、山田圭津と斉藤和江がこれを補助した。その他併任研究員として斎藤公司（東京医科歯科大学医学部薬理学教室、助教授）、熱海佐保子（山梨医科大学解剖学教室、教授）と今村保忠（東京大学教養学部、助手）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、また非常勤の研究生として石黒恒男（味の素株式会社中央研究所、主任研究員）が参加した。

林謙介は昨年来流動研究員として当部に勤務していたが、当部前室長斉藤公司在昭和63年5月1日に東京医科歯科大学医学部助教授転出の後を受け平成元年4月1日付を以て当部研究員に採用された。林は東京大学理学部大学院終了、理学博士の称号を授与されている。大学院時代は実験発生形態学及び分子生物学の本格的な教育を受け、現在筋発生における形態形成、特に筋芽細胞の走出の問題に取り組んでいる。

池谷紀代子は、昭和55年東京女子医科大学卒業後小児科医局に在籍している。昭和61年4月より63年10月まで米国 NIH に留学し、P450の分子生物学的研究に従事した。平成元年6月1日より当部流動研究員として勤務している。

当部の研究は、従来のメインテーマであったトランスフェリンの研究は縮少し、代わってジストロフィンの研究をメインテーマとして取り上げた。吉田はジストロフィンタンパク質の精製を行い50%以上の純度にまで精製し、これとそれに結合するタンパク質の研究を行っている。萩原は、ジストロフィンのモノクローナル抗体の作製に成功している。田中は主として、ジストロフィン遺伝子に障害のある *mdx* マウスの保因子動物を作製し、免疫組織学的手法を用いて Lyon 説を形態学的に可視化した。池谷は、東京女子医科大学小児科の臨床例に Becker 型ジストロフィーの特異例を発見し、その解析をしている。この症例は、我々の持っている抗体の分子内部における特異性の証明に役立った。

対外的には、小沢は厚生省精神・神経研究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。また平成2年8月17日より19日に行われる上原記念生命科学財団シンポジウム1990—Frontiers of Muscle Research「筋の発生・維持と収縮：最近の発展」の組織委員長を勤めている。

（部長 小沢鏝二郎）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Hori S, Sugiura H, Shimizu T, Hirabayashi T, Ohtani S, Yoshida M, Miyamoto K, Tanabe H :  
Detection of dystrophin on two-dimensional gel electrophoresis  
Biochem Biophysical Res Comm 161 : 726-731, 1989
- 2) Hagiwara Y, Yoshida M, Nonaka I, Ozawa E :  
Developmental expression of dystrophin on the plasma membrane of rat muscle cells  
Protoplasma 151 : 11-18, 1989
- 3) Hagiwara Y, Ozawa E :  
Suppression of transferrin internalization in myogenic L6 cells by dibucaine  
Biochimica Biophysica Acta 1051 : 237-241, 1990
- 4) Tanaka H, Shimizu T, Ozawa E :  
Expression of a dystrophin-like protein on the surface membrane of muscle cells in *mdx* mice  
Proc Japan Acad 65 (B) : 238-241, 1989
- 5) Tanaka H, Yoshida M, Ishiguro T, Eguchi C, Nonaka I, Ozawa E :  
Expression of dystrophin on the cell surface membrane of intrafusal fibers of human skeletal muscle  
Protoplasma 152 : 109-111, 1989
- 6) Tanaka H, Ikeya K, Ozawa E :  
Difference in the expression pattern of dystrophin on the surface membrane between the skeletal and cardiac muscles of *mdx* carrier mice  
Histochemistry 93 : 447-452, 1990
- 7) Kimura I, Saito K, Ozawa E :  
Occurrence of degradation products of chicken transferrin in murine circulating blood  
Japan J Pharmacol 51 : 397-401, 1989
- 8) Song Si-Y, Saito K, Noguchi K, Konishi S :  
Different GTP-binding proteins mediate regulation of calcium channels by

acetylcholine and noradrenaline in rat sympathetic neurons

Brain Res 494 : 383-386, 1989

b. 著 書

- 1) 小沢鋈二郎, 斎藤公司, 吉田幹晴 :

筋の収縮とエネルギー代謝

筋病理学 (檜澤一夫, 埜中征哉, 小沢鋈二郎編), 文光堂, 東京, p14-25, 1989

- 2) 小沢鋈二郎, 萩原康子 :

筋の発生, 分化と成長

筋病理学 (檜澤一夫, 埜中征哉, 小沢鋈二郎編), 文光堂, 東京, p42-50, 1989

- 3) 小沢鋈二郎 :

筋の成長と維持

筋ジストロフィーはここまでわかった (筋ジストロフィー症研究連絡協議会編), 医学書院, 東京, p115-126, 1990

c. 総 説

- 1) Ozawa E :

Transferrin as a muscle trophic factor

Rev Physiol Biochem Pharmacol 113 : 89-141, 1989

- 2) Saito K, Yoshida M, Ozawa E :

Contraction of intact and skinned chick myotube in culture

Cell Molec Biol of Muscle Devel : 893-903, 1989

d. 班会議報告書

- 1) 小沢鋈二郎, 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年度研究報告書73-78, 1989

B. 学会発表

a. 一般学会

- 1) 田中 光, 池谷紀代子, 小沢鋈二郎 :

*mdx*キャリアーマウス筋細胞膜におけるdystrophinの発現様式 :

## II 研究業績

### 骨格筋と心筋での差異

第63回日本薬理学会総会, 東京, 3.27, 1990

#### b. 班会議発表

1) 小沢鎧二郎, 田中 光, 池谷紀代子 :

*mdx* キャリアーマウス筋細胞膜における *dystrophin* の発現様式 : 骨格筋と心筋での差異

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, 平成元年  
度班会, 東京, 12.12, 1989

2) 小沢鎧二郎 :

筋の形成とジストロフィンの研究

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, 1.20, 1990

## 3. 主な研究報告

## ジストロフィンを筋細胞膜に固定する糖蛋白質複合体

吉田幹晴, 小沢鉄二郎

ジストロフィンは筋細胞膜を裏打ちする巨大蛋白質である。Campbell と Kahl<sup>1)</sup> は小麦胚芽レクチンゲルを用いた方法でウサギ骨格筋からジストロフィンを高純度に精製したが、その際ジストロフィンを膜に固定する糖蛋白質の存在を示唆した。今回我々は彼らの調製法を改良してジストロフィンを得、その時一緒に精製されてくる蛋白質に注目していくつか実験を行ったところ、この糖蛋白質を同定することができた。

## 材 料

ジストロフィンは Campbell と Kahl の方法を改良してウサギより調製した。改良とは、抗体アフィニティカラムによるリアノジンレセプター除去の操作を省いたこと、陰イオン交換樹脂として DEAE セルロースの代わりに monoQ ビーズ (FPLC) を用いたこと、そして Superose 6 ゲルによる分子ふるいクロマトを最終精製に加えたことである。この改良により、純度は彼らのおよそ 1.5 倍、収率は monoQ クロマトの段階で約 6 倍にアップした。

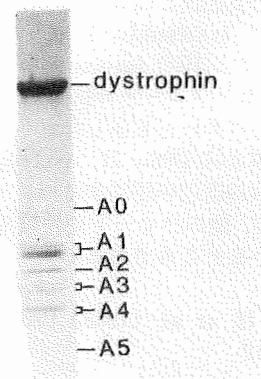
## 結果と考察

1) 我々の得た最終精製標品は図に示すようにジストロフィン分子のほか 6 群の蛋白質, A0 ~ A5 を含んでいた。それぞれの分子量は 94, 62, 52, 43, 36, 24 kDa であり、そのうちの 4 つはジストロフィン分子に対し、化学量論比で存在していた。A1, A3, A4 のそれぞれは 2 ~ 3 本のバンドからなっていた。しかしこの研究においては、A3 を除く各蛋白質群それぞれは同一蛋白質であるかのようにふるまった。2) ジストロフィン標品を 0.065 mg/ml という希薄濃度下、bis (sulfosuccinimidyl) suberate で架橋反応を試みたところ、A2 を除き総てジストロフィンと架橋された。これらはジストロフィン結合蛋白質と考えられる。3) ジストロフィン標品を Campbell と Kahl に従い、膜細胞骨格蛋白質を解離させることで知られている 2 M ヨウ化カリで処理し、小麦胚芽レクチンゲルに対する吸着を調べた。彼らが述べたように、この処理でジストロフィン分子は吸着されなかったが、ほかに A1 も吸着しないことがわかった。一方吸着したのは A2, A3, A4 の各蛋白質群であった。4) ジストロフィン標品を SDS 存在下で電気泳動し、ビオチン化小麦胚芽レクチンを用いてブロッティング解

析を行ったところ、反応したのは A2 と A3 であり、A4 を含むほかの蛋白質は反応しなかった。この結果は 3) の結果と一見矛盾するようであるが、もし A4 が A2 または A3, あるいは双方に結合しており、この結合がヨウ化カリ処理によっても壊れないと考えれば説明できる。ジストロフィンを筋細胞膜に固定する蛋白質はジストロフィンと化学量論比で存在すると期待される。A3 はジストロフィンと等モルで存在するが、3) と 4) の実験で不均一成分である可能性が示唆されたので、この点難がある。このようなことから我々は [A2・A4] 複合体をジストロフィン固定蛋白質と考える。A2, A4 はそれぞれジストロフィンに対し 1 及び 2 モル存在する。A2 は 2) の実験でジストロフィンと架橋されなかったため、これと直接結合しておらず A4 を通じて間接的に結合していると思われる。予備的実験から A4 も糖鎖を持っており、糖蛋白質と考えられ、A2 とともに細胞間隙に露出していることが予想される。今後この複合体の機能を明らかにすることが筋ジストロフィー症の原因解明につながるかもしれない。またジストロフィン結合蛋白質としての A1 や A3, そして微量ではあるが A0, A5 についても検討していく必要があろう。

1) Campbell, K. P. & Kahl, S. D. (1989) Nature 338, 259-262

(図) 精製ジストロフィン標品の SDS-PAGE パターン。Coomassie Brilliant Blue (G) 染色。A0 ~ A5 ; ジストロフィン結合蛋白質。





## Dystrophin に対するモノクローナル抗体

萩原康子, 吉田幹晴, 小沢●二郎

DMD/BMD 遺伝子産物の dystrophin は, 筋細胞膜に存在していることが明らかにされた<sup>1)</sup>が, その生化学的特性, 生理的作用は解明されていない。最近, Campbell と Kahl は, dystrophin を膜に固定する糖タンパク質の存在を示唆し<sup>2)</sup>, さらに Y oshida と Ozawa は, dystrophin を筋細胞膜に固定する糖タンパク質複合体について報告している<sup>3)</sup>。我々は dystrophin の生理的作用を明らかにする手段を得るために, dystrophin および dystrophin と一緒に精製されてくるタンパク質に対するモノクローナル抗体の作成を試みた。

### 方法

抗原には, ウサギ筋肉から Campbell と Kahl の方法<sup>2)</sup>により小麦胚芽レクチンカラムで部分精製したものを用いた。免疫した BALB/c マウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞を常法に従って融合させ, HAT 培地で選択したハイブリドーマを培養した。抗体産生のスクリーニングには, immunoblot analysis を用いた。クローニングは, フィーダー細胞および IL-6 を用いた限界希釈法により行った。

### 結果と考察

2 段階のクローニングの結果, 分子量約 400 KDa, 62 KDa, 35 KDa のバンドそれぞれと特異的に反応する 3 種類のクローンを得た。

約 400 KDa のバンドと特異的に反応するモノクローナル抗体 (D96-c) については, 以下のことが明らかになった。

- (1) Immunoblot analysis により, 精製した dystrophin と特異的に反応した (図 1)。
- (2) 凍結切片を用いた間接蛍光抗体法により, ヒトコントロール筋細胞膜と反応した (図 2 A) が, DMD 患者の筋細胞膜とは反応しなかった (図 2 B)。
- (3) 精製した dystrophin を  $\alpha$ -キモトリプシンで部分消化した試料の immunoblot analysis により, D96-c はポリクローナル抗体 P04d<sup>4)</sup> のものと非常に類似したパターンを示した。

以上の結果から D96-c は, dystrophin のアミノ酸残基 440-489 近辺を認識するモノクローナル抗体である。現在, 他のクローンの性質の詳細についても検討しているところである。

### 文献

- 1) Sugita, H. et al. (1988) Proc. Japan Acad. 64 : 210-212

- 2) Campbell, K. P. and Kahl, S. D. (1989) Nature 338 : 259-262
- 3) 吉田幹晴, 小沢●二郎 (1990) J. Biochem. inpress
- 4) Hagiwara, Y. et al. (1989) Protoplasma 151 : 11-18

図 1. D96-c の反応特異性  
a ; 金染色, b ; 抗体反応

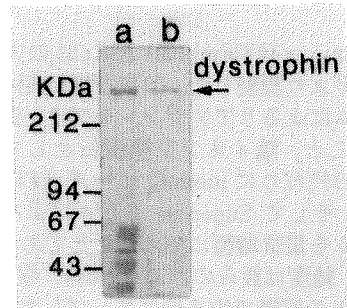
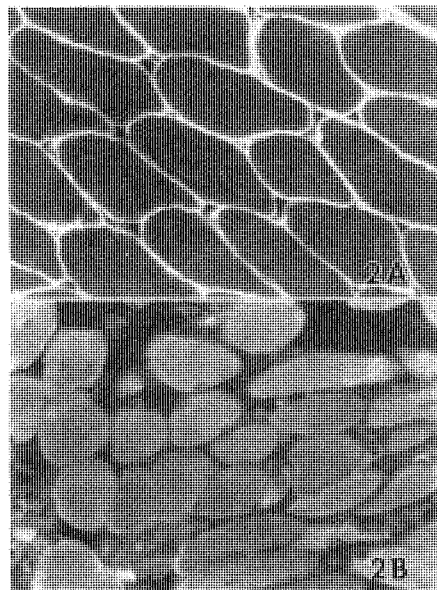


図 2. D96-c による免疫組織染色像



## 体節の蛍光標識による筋芽細胞遊走の観察

林 謙介, 小沢鉄二郎

### 導入

四肢の筋肉細胞を作る筋芽細胞は、発生の初期に体節から走出し肢芽へ移動してくる。その筋芽細胞を観察する方法として、標識された体節を交換移植することが行われてきた。しかし体節から筋芽細胞を走出させる因子を明らかにするためには、体節以外の組織にも操作を加える実験を行なう必要がある。その場合体節移植法は必ずしも有効でない。

そこでこれに代わる方法として、蛍光色素をニワトリ胚の体節内に注入することにより体節からの細胞の走出を検出する方法を開発し、その方法を用いて細胞走出を誘引する要因について調べた。

### 材料と方法

DiI と DiO は、脂溶性の蛍光色素であり、細胞がこれに触れると脂質二重膜にこれを取り込み持ちつづける。DiI はローダミンフィルターで赤く、DiO は FITC フィルターで緑色に観察される。

DiI または DiO を 1 mM ホスファチジルコリン / Tyrode 中でソニケートし、ガラス微小管で体節内に注入した。胸部体節には stage 15 以前に、胴部には stage 16 以前に、腰部には stage 17 以前に注入した。

### 結果

(1) 胸部および腰部の体節から細胞が走出し、側板中あるいは肢芽中に移動していた (図 1-3)。感度が高いために切片上ではもちろん、Whole mount でも観察することができた。各々の体節から走出した細胞が、肢芽中で各々かたまりのまま移動している姿も一目瞭然となった (図 3)。

胴部の体節は myocoel (図 4, 矢印) を形成し、側板中へ伸長するが、細胞は走出させなかった。

この方法で標識され肢芽へ移入する細胞の大半が筋芽細胞であることは、標識された細胞がいずれ、筋肉組織を作ることによって確認できた。過去のウズラの体節の移植実験からも、体節から四肢へ移入した細胞は筋肉細胞にしかならないことが示されている。

(2) 肢芽が出来るより前の時期の胸部の体壁板を、別の胚の胴部へ交換移植すると同時に胴部体節に色素を注入した。1 日後移植片は肢芽を形成し、胴部体節から細胞が走出していた (図 5)。

胴部の体壁板を胴部に移植する対照実験では、体節は myocoel を形成し、細胞の走出はほとんどなかった。

### 考察

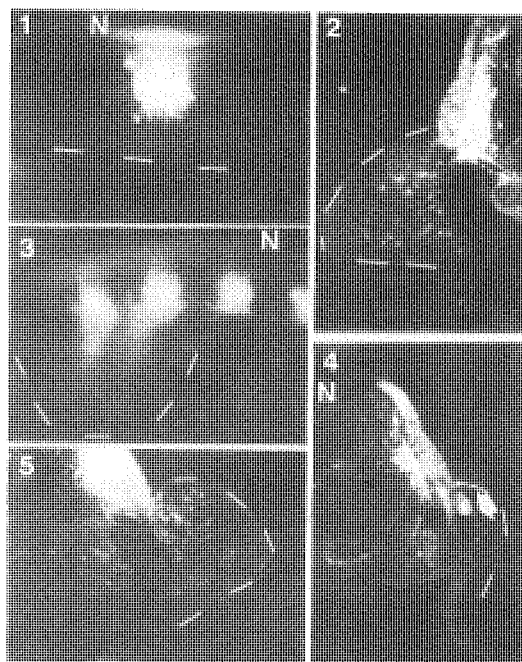
(1) この方法は

- ・他の手術実験との併用が容易である、
- ・標識された細胞の検出感度が高い、
- ・操作による損傷が移植手術より小さい、
- ・DiI と DiO の 2 種類の標識が使える、

等の利点を持っている。

(2) 過去の実験において、胴部の体節も胸部や腰部に移植されると筋芽細胞を肢芽へ走出させることから、体節自身に違いはなく筋芽細胞の走出は胸部の環境によることが既に示されている。今回の結果はその環境要因が肢芽に由来する事を示している。

- (1)胸部, stage 17 (2)胸部, stage 19 (3)腰部, stage 22 (4)胴部, stage 20 (5)胴部に移植された肢芽への走出 (N) neural tube  
(---) 側板あるいは肢芽の輪郭  
(1), (3)は whole mount 他は切片



mdx carrier マウス筋細胞膜における dystrophin の発現様式： 骨格筋と心筋での差異

田中 光, 池谷紀代子, 小沢鏐二郎

哺乳動物の雌では、2本のX-染色体のうち一方が発生の初期に不活性化されると考えられている。父親由来のX-染色体と母親由来のものとのうちどちらが不活性化されりかは細胞ごとにランダムに決まると考えられているが、組織学的な検討はほとんどなされていない。Duchenne型筋 dystrophy 遺伝子産物, dystrophin はX-染色体上にコードされており、また免疫組織学的検出が可能である。

今回私たちは mdx マウスを用いて dystrophy carrier を作製し、細胞ごとの dystrophin の発現を心筋と骨格筋とで比較した。

方法

Wild type (C57BL/ScSn) の雌と, mdx (C57BL/ScSn-mdx) の雄を交配して得られたF1の雌を mdx carrier マウスとして生後2週齢から6週齢の age で用いた。合計10 family, 18匹の mdx carrier マウスについて immunoblotting および免疫組織染色をおこなった。抗体は, cDNA sequence にもとづく dystrophin のC末端に相当する合成ペプチドを用い, ウサギで作製した抗血清を用いた。

結果

(1) Immunoblotting (図1)

Wild type (a: 母, c: F1) では、心筋 (A) ・骨格筋 (B) とともに, dystrophin に相当する分子量約400 KDa の band が染まったが, mdx (b) では染まらなかった。Carrier の心筋 (Ad) は Wild type の半分程度の染まりであった。骨格筋 (Bd) では carrier の染まりは Wild type に比べると弱かったものの、心筋の場合よりは強く染まっていた。

(2) Immunohistochemistry

心筋 Wild type では、全ての細胞膜の全周が染まったが, mdx では染まらなかった。Carrier では細胞膜の全周が染まっている細胞と染まっていない細胞とが約1:1の比率でモザイク状に混在していた (図2A)。

骨格筋 Wild type 雌ではすべての fiber の細胞膜の全周が染まり, mdx では染まらなかった。Carrier では、矢印で示したように細胞膜が染まらない fiber もわずかに見られたが、ほとんどの fiber で細胞膜の全周が染まっていた (図2B)。

考察

Carrier の心筋では約半分の細胞が dystrophin を発現していた。心筋細胞は単核なので各々の細胞での dystrophin 発現の有無が、どちらのX-

染色体が不活性化されているかと直接対応している。したがって, mdx carrier マウス心筋における dystrophin のモザイク模様は心筋の発生初期でのX-染色体の random inactivation を反映していると考えられる。X-染色体の random inactivation は従来は主として酵素活性の変動等の生化学的データから研究されてきたが、今回の結果は組織学的側面からのアプローチとして貴重なものであると考える。また、ヒト心筋のサンプルは入手困難であるが、今回の結果からヒト carrier の心筋においても同様に dystrophin がモザイク状に発現していることが推定される。

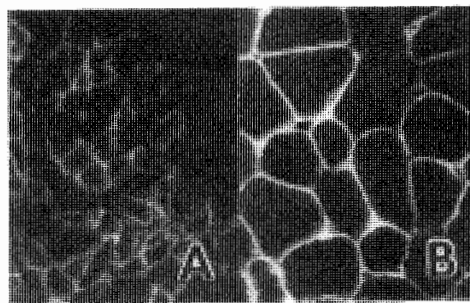
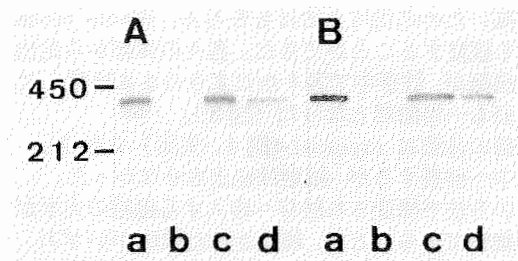
一方, carrier の骨格筋では細胞膜のほとんどの部分に dystrophin が発現されていた。これは、X-染色体の不活性化が起きる時点では dystrophin の発現がないことや, carrier マウス骨格筋において顕著な筋変性が見られないことなどから, dystrophin の筋線維内拡散によるものと考えられる。

謝辞

Mdx carrier マウスを作製して下さった当研究所動物実験施設の松崎哲也博士, 鈴木健一氏に感謝いたします。

文献

Tanaka H, Ikeya K and Ozawa E (1990) Histochemistry 93 : 447-452



## dystrophin タンパク上における抗 dystrophin 抗体の認識部位の決定

池谷紀代子, 斉藤加代子, 小沢鏝二郎

dystrophin cDNA sequence にもとづいた4種類合成ポリペプチドを用い、我々は抗 dystrophin 抗体を作製して、免疫組織染色及び immunoblot analysis に使用してきた。今回、deletion のみられた Becker Muscular Dystrophy (BMD) の生検筋を用いて抗体のタンパク上における認識部位を確認した。

## 材料と方法

cDNA をプローブとした Southern blot analysis で、exon 10-37 の deletion がみられ、臨床的に BMD と診断された6才男児の生検筋について、免疫組織染色及び immunoblot analysis を常法に従っておこなった。抗 dystrophin 抗体として P00, P04, P23, P34 の4種の polyclonal 抗体を用いたが、これらはそれぞれ cDNA sequence にもとづくアミノ酸残基 11-60, 440-489, 2360-2409, 3495-3544 に対応する 50mer の合成ポリペプチドを抗原としてウサギで作製したものである (Fig 1)。

## 結果

免疫組織染色で P00, P23, P34 は筋細胞膜を完全に染めたが、P04 はまったく染めなかった (Fig 2)。Immunoblotting では P00, P34 は約 23 kDa の band を染めた。これは deletion の大きさ (約 4500bp) から計算される変異 dystrophin の分子量とほぼ一致している。しかし、P04 はこの 23 kDa の band を検出できなかった (Fig 3)。同時におこなった正常筋の免疫組織染色では、すべての抗体は筋細胞膜を完全に染めた。また、immunoblot analysis でもすべての抗体が正常 dystrophin の分子量に相当する約 400 kDa の band を検出した。

## 考案

一般に BMD における免疫組織所見は筋細胞膜の patchy あるいは discontinuous staining であり immunoblot analysis では異常な分子量の変異 dystrophin が検出されるといわれている。我々の例はいわゆる BMD の所見とは異なった免疫組織染色パターンを示したが Southern blot analysis 上、dystrophin gene に in-frame-deletion があることがわかっており、immunoblot analysis で低分子量の dystrophin が検出されたことより、BMD の 1 type であろうと考えられる。Southern blot analysis により確認された exon 10-37 の deletion はアミノ酸残基 321-1775 に相当する。それぞれの抗体の作製に使用された合成ペプチドの位置は、抗体

P00 では deletion の前、P04 では deletion の中、P23 と P34 では deletion の後である。このうち P04 は、この BMD 例では免疫組織染色でも immunoblot analysis でも反応しなかったが、正常組織とは反応した。このことは、P04 が deletion 内の gene が code するタンパクは認識するが、deletion 以外の部位の gene が code するタンパクは認識しないことを示しており、抗体の認識部位特異性の高さを示唆している。

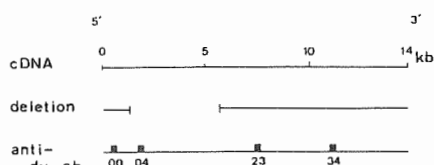
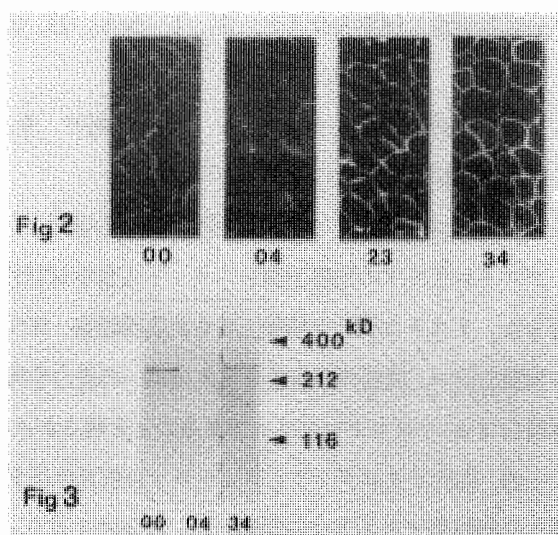


Fig 1



## 11. 代謝研究部

### 1. 研究部一年のあゆみ

代謝研究部は脳の正常な分化・発育を支えている物質的な基盤を神経化学的および分子生物学的に明らかにしてゆくことを主目的としている。平成元年4月以降当部の研究活動に参加したメンバーは以下の通りである。

〔部長〕高坂新一

〔研究員〕中嶋一行, 武井延之 (1. 10. 1～)

〔流動研究員〕武井延之 (1. 4. 1. ～1. 9. 30), 内田耕一 (1. 5. 1～),  
池田正明 (1. 7. 1～)

〔外来研究員〕飯島 昇 (1. 6. 1. ～), 下条雅人 (1. 6. 10～)

〔研究生〕濱之上誠 (1. 4. 1～), 竹居光太郎 (1. 4. 1～2. 3. 31), 藤城正敏 (1. 4. 1～),  
榊原真人 (1. 4. 1～)

〔研究見習生〕伊東大介 (1. 9. 1. ～1. 12. 31), 谷口善仁 (1. 9. 1～1. 12. 31), 松原 篤  
(1. 9. 1～1. 12. 31)

〔賃金研究員〕津崎尚子 (1. 5. 8～), 亀井 幸, 石田郁子 (1. 6. 19～)

本年度の研究成果は以下の通りである。

#### 1) ニューロンとグリアの相互作用に関する研究

アストログリアの培養上清からラット大脳半球初代培養ニューロンの突起伸展を促進する物質の精製を行った。アストログリア培養上清を硫酸濃縮後, WGA-アガロース, ゲル濾過およびイオン交換カラムにて精製を行い, 突起伸展活性を有する単一の蛋白を得た。ウェスタンブロッティングによる解析の結果, 本蛋白は $\alpha_2$ マクログロブリンであることを明らかにした。

一方, 脳内ミクログリアとニューロンの相互作用を検討する目的で, まずミクログリアの簡便で且つ大量に分離培養できる方法を開発した。基本的にはラット脳の初代培養を行い, 1週間後に単層に培養された細胞上に浮遊してくる細胞を採取することによりミクログリアを得ることができた。本細胞は各種のミクログリアのマーカーとして知られている蛋白あるいは生化学的な性質を有しており, 他のグリア細胞とは極めて性質が異なっていることを明らかにした。

#### 2) 脳内の神経栄養因子に関する研究

以前から牛海馬組織の抽出液に存在するニューロンの生存維持因子の精製を進めていたが本年度は以下のことが明らかとなった。

生存維持因子は最低2種類存在しており、それらの分子量は約3万および約4万、pIは約4.5であった。この生存維持因子に対する抗体を作製し、ウェスタンブロッティングで染色される蛋白を抽出し、その部分アミノ酸配列を決定した。分子量約4万のものに関しては Neuron Specific Enolase と同定された。

### 3) 遺伝子導入細胞の脳内移植に関する研究

カテコールアミンの合成律速酵素であるチロジン水酸化酵素 (TH) のcDNAを線維芽細胞である NPK-49F に導入し、本細胞における L-DOPA の合成につき検討を加えた。in vitro の実験では高い TH 活性が認められたにもかかわらず実際の細胞の中では L-DOPA の蓄積は全く認められなかった。しかし本細胞を Tetrahydro-biopterin (BH<sub>4</sub>) と共にインキュベートすると多量の L-DOPA が検出された。本細胞はラット脳内に移植した場合にも TH 蛋白を発現しており、また BH<sub>4</sub>を脳内灌流した場合に L-DOPA の放出が認められた。

(部長 高坂新一)

## II 研究業績

### 2. 研究業績

#### A. 論文

##### a. 原著

- 1) Asou H, Hirano S, Kohsaka S :  
Changes in ganglioside composition and morphological features during the development of cultured astrocytes from rat brain  
Neurosci Res 6 : 369-375, 1989
- 2) 川村真理, 東 範行, 高坂新一 :  
Monosodium-L-gutamateによる幼若ラットの小眼球形成に関する実験的研究  
日本眼科学会雑誌 93 : 553-561, 1989
- 3) 川村真理, 東 範行, 高坂新一 :  
Monosodium-L-gutamateによる幼若ラットの白内障および水晶体形成に関する実験的研究  
日本眼科学会雑誌 93 : 562-568, 1989
- 4) Nakano Y, Takei K, Toya S, Tsukada Y, Ghandour S, Kohsaka S :  
Mosaic reconstruction of blood vessels in mouse neocortical tissue transplanted into the third ventricle of rat brain  
Brain Res 496 : 336-340, 1989
- 5) Nakajima K, Hamanoue M, Shimojo M, Takei N, Kohsaka S :  
Characterization of microglia isolated from a primary culture of embryonic rat brain by a simplified method  
Biomed Res 10 (S3) : 411-423, 1989
- 6) Takei N, Nihonmatsu I, Kawamura H :  
Age related decline of acetylcholine release evoked by depolarizing stimulation  
Neurosci Lett 101 : 182-186, 1989
- 7) Ikegami S, Nihonmatsu I, Hatanaka H, Takei N, Kawamura H :  
Recovery of hippocampal cholinergic activity by transplantation of septal neurons in AF-64A treated rats  
Neurosci Lett 101 : 17-22, 1989
- 8) Takei N, Tsukui H, Hatanaka H :  
Intracellular storage and evoked release of acetylcholine from basal forebrain cholinergic

neurons in culture with nerve growth factor

J Neurochem 53 : 1405-1410, 1989

- 9) Ikegami S, Nihonmatsu I, Hatanaka H, Takei N, Kawamura H :  
Transplantation of septal cholinergic neurons to the hippocampus improves memory impairments of spatial learning in the rats treated with AF64A  
Brain res 496 : 321-326, 1989
- 10) Hisanaga K, Kogure K, Tsukui H, Takei N, Nishio C, Hatanaka H :  
Increase in choline acetyltransferase activity in septum of rats after transient forebrain ischemia: A possible role of factors released in the hippocampus  
neurosci Lett 105 : 321-325, 1989
- 11) Uchida K, Takamatsu K, Kaneda N, Toya S, Tsukada Y, Kurosawa Y, Fujita K, Nagatsu T, Kohsaka S :  
Synthesis of L-3, 4-dihydroxyphenylalanine by tyrosine hydroxylase cDNA-transfected C6 cells: application of intracerebral grafting  
J Neurochem 53 : 728-732, 1989
- 12) Uchida K, Ishii A, Kaneda N, Toya S, Nagatsu T, Kohsaka S :  
Tetrahydrobiopterin-dependent production of L-DOPA in NRK fibroblasts transfected with tyrosine hydroxylase cDNA: future use for intracerebral grafting  
Neurosci Lett 109 : 282-286, 1990
- 13) Ikeda M, Weber K H, Bechtel W D, Malatynska E, Yamamura H I :  
Relative efficacies of 1, 4-diazepines on GABA-stimulated chloride influx in rat brain vesicles  
Life Sci 45 : 349-358, 1989
- 14) Ikeda M, Knapp R J, Malatynska E, Yamamura H I :  
Amoxapine inhibition of GABA-stimulated chloride conductance :  
Investigation of potential sites of activity  
Life Sci 45: 1903-1910, 1989
- 15) Malatynska E, Knapp R J, Ikeda M, Yamamura H I :  
 $\beta$ -Carboline interaction at the BZ-GABA receptor chloride-ionophore complex in the rat cerebral cortex



## II 研究業績

Brain Res Bull 22: 845-848, 1989

### b. 著書

- 1) Takei K, Nakano Y, Toya S, Kohsaka S :  
Mosaic reconstruction of blood vessels within the grafted tissue in xenogeneic neural transplantation  
In : Bioinformatics. (O. Hatase, J. H. Wang eds) p. 323-326,  
New York, Elsevier, 1989
- 2) Uchida K, Takamatsu K, Toya S, Tsukada Y, Kaneda N, Nagatsu T, Kohsaka S :  
Transfection of tyrosine hydroxylase into cultured non-neuronal cells : Application for intracerebral grafting.  
In : Bioinformatics. (O. hatase, J. H. Wang eds) p. 375-378,  
New York, Elsevier, 1989.
- 3) 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免疫応答と血管新生  
脳の神経栄養因子と先天性代謝異常 (永津俊治, 吉田充男, 金澤一郎, 小川紀雄編), 平凡社,  
東京, p. 241-255, 1989
- 4) 高坂新一, 井端由紀郎 :  
神経細胞の分化発育とアストログリア  
脳-可塑性研究 (久保田 競, 水野 昇, 山本長三郎編), 朝倉書店, 東京, p. 222-234, 1990

### c. 総説

- 1) 高坂新一, 内田耕一, 戸谷重雄, 塚田裕三, 永津俊治 :  
神経組織移植研究の現状  
Clinical Neuroscience 7 : 390-393, 1989
- 2) 高坂新一, 竹居光太郎 :  
脳内移植研究の現状と展望  
Roche Review 14 : 50-52, 1989
- 3) 阿相皓晃, 高坂新一 :  
神経系の発生における細胞接着因子 L1  
実験医学, 特集 神経系の初期発生 7 : 891-896, 1989
- 4) 内田耕一, 高坂新一 :

## 脳神経移植に関する最近の進歩

Human Cell 2 : 150-155, 1989

- 5) 内田耕一, 高坂新一 :  
Parkinson病に対する神経移植療法  
外科治療 61 増刊 : 117-121, 1989
  - 6) 竹居光太郎, 高坂新一 :  
脳内移植 (パーキンソン病)  
Medical Immunology 18 : 345-350, 1989
  - 7) 高坂新一, 竹居光太郎 :  
脳組織移植における免疫応答  
神経研究の進歩 33 : 986-995, 1989
  - 8) 内田耕一, 高坂新一 :  
パーキンソン病の脳内移植治療  
総合臨床 38 : 3045-3049, 1989
  - 9) 高坂新一, 森 俊夫, 飯島 昇, 北畠克顕, 井端由紀郎 :  
アストログリアによるニューロンの発育調節機構  
Human Cell 2 : 388-396, 1989
  - 10) 竹居光太郎, 中野幸照, 篠崎智文, 戸谷重雄, 塚田裕三, 高坂新一 :  
異種間脳組織移植における移植組織内血管構築  
今日の移植 2 : 499-504, 1989
  - 11) 武井延之 :  
NGF遺伝子導入細胞の脳内移植  
実験医学 7 : 1417-1420, 1989
- d. 班会議報告書
- 1) 高坂新一, 森 俊夫, 飯島 昇, 北畠克顕 :  
アストロサイト由来ニューロン突起伸展因子の精製  
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, 平成元年度研究報告書, 53-57, 1990
  - 2) 高坂新一, 中野幸照, 戸谷重雄, 竹居光太郎, 塚田裕三 :  
異種間脳組織移植における拒絶機構

## II 研究業績

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平成元年度研究報告書, 73-80, 1990

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

文部省特定研究・神経回路網の可塑性, 昭和63年度報告書, 116-117, 1989

## B. 学会発表

### a. 特別講演, シンポジウム

1) 高坂新一, 森 俊夫, 飯島 昇, 北畠克顕 :

アストログリアによるニューロンの発育調節機構

第7回 ヒト細胞研究会大会シンポジウム, 東京, 8. 30, 1989

2) 高坂新一 :

脳組織移植における免疫応答

第2回 神経免疫研究会シンポジウム-神経移植免疫-, 東京, 9. 1, 1989

3) 高坂新一 :

神経移植研究の現状と展望

国立岡崎共同研究機構生理学研究所セミナー, 岡崎, 10. 16, 1989

4) Uchida K, Toya S, Tsukada Y, Nagatsu T, Kohsaka S :

Transfection of tyrosine hydroxylase cDNA into non-neuronal cells

第13回谷口財団国際シンポジウム, La Jolla, 1. 31, 1990

### b. 国際学会

1) Kohsaka S, Nakano Y, Takei K, Toya S, Tsukada Y :

Mosaic reconstruction of blood vessels in xenogeneic neural transplantation.

12th International Meeting of ISN, Algarve, 4. 24, 1989

2) Kohsaka S, Uchida K, Takamatsu S, Toya S, Kaneda S, Nagatsu T, Tsukada Y :

Transfection of tyrosine hydroxylase c-DNA into C-6 cells:

Application in the intracerebral grafting.

12th International Meeting of ISN, Algarve, 4. 25, 1989

3) Takei K, Shinozaki T, Nakano Y, Otani M, Toya S, Tsukada Y, Kohsaka S, :

Immunological rejection of the grafted tissue in xenogeneic neural transplantation. I.  
Role of MHC antigen

3rd International symposium on Neural Transplantation, Cambridge, 8.7, 1989

- 4) Nakano U, Takei K, Inoue H, Takayama H, Toya S, Tsukada Y, Kohsaka S :  
Immunological rejection of the grafted tissue in xenogeneic neural transplantation. II.  
Vascularization within the grafted tissue

3rd International symposium on Neural Transplantation, Cambridge, 8.8, 1989

- 5) Hama T, Miyamoto M, Noguchi K, Takei N, Tsukui H, Nishio C, Kushima Y, Hatanaka H :  
Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting survival of septal cholinergic neurons  
and mesencephalic catecholaminergic neurons from postnatal rats

2nd International Congress for Alzheimer's and Parkinson's Disease, Kyoto, 11.8, 1989

- 6) Lai J, Smith T L, Mei L, Ikeda M, Gomez J, Roeske W R, Yamamura H I :  
The M<sub>1</sub> muscarinic receptor regulates cytosolic calcium via pertussis toxin sensitive path-  
way in a eukaryotic gene expression system

9th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Phoenix, 11, 3, 1989

c. 一般学会

- 1) 池上司郎, 二本松伊都子, 武井延之, 川村 浩 :  
マイネルト基底核細胞の海馬移植と空間的学習  
第66回日本生理学会大会, 岡山, 4.6, 1989
- 2) 内田耕一, 高坂新一, 竹居光太郎, 戸谷重雄, 塚田裕三, 永津俊治, 金田典雄 :  
チロジン水酸化酵素 (TH) cDNA導入培養細胞の脳内移植  
第66回日本生理学会大会, 岡山, 4.7, 1989
- 3) 竹居光太郎, 高坂新一, 塚田裕三, 中野幸照, 戸谷重雄, 成松 久, 多田隅卓史 :  
異種間脳組織移植における末梢リンパ球の免疫応答  
第66回日本生理学会大会, 岡山, 4.7, 1989
- 4) 森 俊夫, 飯島 昇, 北島克顕, 高坂新一 :  
アストロサイトの産生するニューロン突起伸展因子について  
第32回日本神経化学学会大会, 札幌, 9, 27, 1989
- 5) 榊原真人, 河瀬恵信, 高坂新一 :

## II 研究業績

安定型アスコルビン酸（L-2-アスコルビン酸-2-リン酸エステルナトリウム塩）の初代培養神経細胞に対する作用

第32回日本神経化学学会大会，札幌，9. 27, 1989

- 6) 濱登希子，宮本真美，武井延之，野口かおり，九島洋一，畠中 寛：

生後ラット脳幹カテコールアミンニューロンの初代培養とIL-6によるその生存維持作用

第32回日本神経化学学会大会，札幌，9. 27, 1989

- 7) 内田耕一，石井 晃，金田典雄，戸谷重雄，塚田裕三，永津俊治，高坂新一：

ヒト tyrosine hydroxylase (TH) cDNA 導入線維芽細胞におけるL-DOPA合成能について

第32回日本神経化学学会大会，札幌，9. 29, 1989

- 8) 熊倉鴻之助，武井延之，今泉美佳，笠井久隆：

マストパランによる伝達物質放出はCa<sup>2+</sup>に依存しない

第32回日本神経化学学会大会，札幌，9. 29, 1989

- 9) 浜之上誠，中嶋一行，武井延之，高坂新一：

ラットの脳内ミクログリアの簡便分離培養法の試み

第13回神経科学学術集会，新潟，10. 3. 1989

- 10) 竹居光太郎，中野幸照，戸谷重雄，塚田裕三，多田隅卓司，高坂新一：

異種間脳組織移植における末梢リンパ球の応答

第13回神経科学学術集会，新潟，10. 3, 1989

- 11) 中嶋一行，濱之上誠，武井延之，高坂新一：

ラット脳ミクログリアの簡易分離法の確立とその細胞特性

第62回生化学学会大会，京都，11. 5, 1989

- 12) 池上司郎，武井延之，朱宮正剛，川村 浩：

老化促進モデルマウス（SAM）における放射状迷路学習と脳内コリン作働系

第13回日本基礎老化学会，名古屋，11. 15. 1989

- 13) 武井延之，池上司郎，二本松伊都子，田中真人：

NGFを産生する線維芽細胞株の樹立

第12回日本分子生物学会大会，仙台，11. 29, 1989

- 14) 中野幸照，高坂新一，高山秀一，大谷光弘，塚田裕三：

移植組織内血管の血液脳関門（BBB）について

第4回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会，東京，12. 9, 1989

15) 下条雅人, 中嶋一行, 濱之上誠, 武井延之, 高坂新一 :

脳ミクログリアの単離培養と神経栄養効果

第4回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会, 東京, 12. 9, 1989

## C. 班会議発表

1) 高坂新一, 中嶋一行, 濱之上誠, 下条雅人, 武井延之 :

中枢ニューロン発育制御物質の解析

文部省重点領域研究・神経回路形成の分子機構・平成元年度班会議, 東京, 11. 13, 1989

2) 高坂新一 :

チロジン水酸化酵素 cDNA 導入培養細胞の脳内移植

文部省重点領域研究・運動系の分子生物機構・平成元年度班会議, 東京, 12.13, 1989

3) 高坂新一, 森 俊男, 飯島 昇, 北畠克顕 :

アストロサイト由来ニューロン突起伸展因子について

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・平成元年度班会議, 東京,  
1. 6, 1990

4) 高坂新一, 中嶋一行, 濱之上誠, 武井延之 :

生体防御における脳神経系細胞間の相互作用に関する研究—ラット脳ミクログリアの簡易分離法とその細胞特性について—

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の解明)平成元年度研究報告会, 東京, 1. 13, 1990

5) 高坂新一 :

中枢神経系における神経栄養因子の探求的研究

ヒューマンサイエンス官民共同プロジェクト第1分野第1テーマ(ニューロ・トロフィック・ファクター等の分離技術及び機能の解析技術の開発)平成元年度研究連絡会議, 東京, 1. 20, 1990

6) 高坂新一 :

異種間脳組織における拒絶機構

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・平成元年度班会議,  
東京, 2. 17, 1990

3. 主な研究報告

ミクログリアの簡便分離法と細胞特性

中嶋一行, 濱之上誠, 下条雅人, 高坂新一

ミクログリアは中枢神経系のグリア細胞の一つであり, その存在は古くから知られているが, 生理機能に関しては不明な点が多く残されている。我々は正常および損傷脳におけるミクログリアの機能的役割を明らかにすることを目的とした研究の一環として, 本年度はミクログリアの分離法を確立し, またその細胞特性について検討した。

方法

胎生20日令のラット大脳半球を既報の方法に従って分散培養した。約1週間後, 単層に培養された細胞の上に浮遊してくる円形の細胞を軽く振とうして採取した。得られた細胞即ちミクログリアを10% FCSを含むDMEMを用いてフラスコに播種した。各種抗体による染色および酵素活性の測定は既報<sup>2)</sup>に従った。

結果及び考察

約1週間培養を続けた初代培養フラスコを軽く2~3分振とうし浮遊してくる細胞を集め, 別のフラスコに播種した後, 接着力の強い細胞のみを残しミクログリアとした。この簡便な方法で分離される細胞は極めて均一であり (Fig. 1), 純度は98%以上であった。一度に回収できる細胞数も初代培養系に使用した細胞数の5-10%に相当した。初代培養細胞より反復して回収できることも利点である。分離した細胞はアストログリアのマーカーであるGFAPやオリゴデンドログリアのマーカーであるガラクトセレブロシド (GC) に陰性であり, ミクログリアの同定に使用されるED-1抗体に陽性であった (Fig. 2)。アストログリアのマーカー酵素であるグルタミン合成酵素, オリゴデンドログリアのマーカー酵素であるグリセロール-P-脱水素酵素はミクログリアでは低値であり, 5'-ヌクレオチダーゼ, 酸性フォスファターゼ, カテプシンDは他のグリア細胞に比較して数倍高い値を示した (Table 1)。またビーズ等の取り込み活性 (貪食能) や, 非特異的エステラーゼ活性も強く, その他変性LDLの結合と取り込み能, イソレクチンB<sub>4</sub>の結合性も認められた。以上の結果より, 我々の分離した細胞は高純度のアメボイド型ミクログリアであり, 他のグリア細胞とはかなり異なる性質を持つことが示された。現在ミクログリアとニューロンとの相互作用をはじめとして, 中枢における機能的役割について検討し

ている。  
文献

- 1) Yoshida, K. et al. : Neurosci, Lett. 66 : 181-186, 1986
- 2) Nakajima, K. et al. : Biomed. Res. 10 (S3) : 411-423, 1989

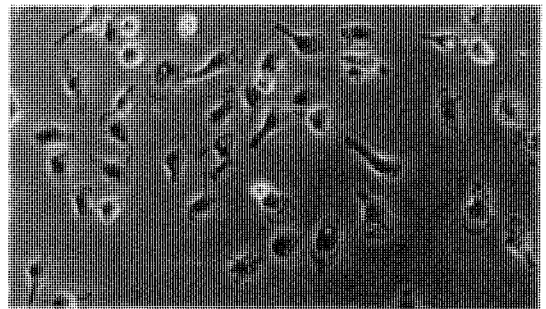


Fig. 1 Microglia isolated from primary culture.

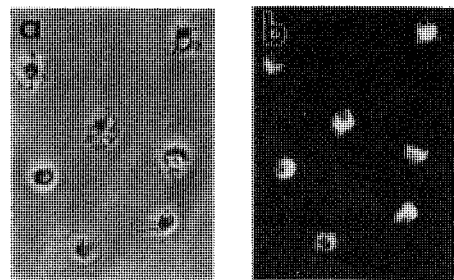


Fig. 2 Immunocytochemical staining of microglia  
a. phase contrast b. immunostaining with ED-1

	neurons	astrocytes	oligodendrocytes	microglia
glycerol phosphate dehydrogenase (nmole/min/mg protein)	7.1	3.8	34.5	6.8
glutamine synthetase (nmole/min/mg protein)	1.8	30.0	1.7	0.8
5-nucleotidase (nmole/min/mg protein)	17.9	26.5	49.7	161.2
acid phosphatase (nmole/min/mg protein)	27.7	89.9	60.1	182.7
arylsulfatase (nmole/min/mg protein)	16.3	81.8	33.7	93.2
cathepsin D (Tyr μg/min/mg protein)	1.9	4.9	9.4	29.7

Table 1 Enzyme activities of microglia and other cells

## 中枢神経系の神経栄養因子に関する研究

武井延之, 高坂新一

ニューロンの分化や成熟, 及び生存維持には神経栄養因子と呼ばれる蛋白性の生理活性因子が大きな役割担っていることが明らかにされつつある。我々も牛脳抽出液中にいくつかの神経栄養活性があることをラット胎児の大脳皮質ニューロンの初代培養系を用いて明らかにしてきた。さらにその精製を進め, その中の一つがニューロン特異的エノラーゼ (neuron specific enolase) と相同であることを見いだした。

## 方法

16日胚ラット大脳皮質ニューロンを初代培養し, 5~7日後に生細胞数を算定することにより神経栄養活性を検定した。

牛脳抽出液よりイオン交換クロマトグラフィー, ゲル濾過等によって部分精製したものを抗原としてウサギに免疫し, 抗血清を得た。

アミノ酸シーケンスは蛋白をフラグメントに切断後, 気相式シーケンサーによって決定した。

## 結果および考察

イオン交換クロマトグラフィー (DE-52) の結果から2つの神経栄養活性画分 (フラクション14 (F14) 及び23 (F23)) が得られた。それぞれをさらにゲル濾過し, 分子量約50 KDa以下の画分集め, ウ

サギに免疫し, 抗体を得た。抗体はそれぞれF14及びF23の活性を特異的に抑制し, 交差性はなかった。この抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところF23では分子量約44 KDaのバンド得られた。そこでこのバンドををSDSゲルから抽出し, フラグメントに切断後アミノ酸シーケンスを調べ, 相同性の検索をしたところNSEと一致した。そこでNSEとして精製された標品 (Polysci.) の神経栄養作用について検討した (Fig 1)。

NSEは用量依存的にラット初代培養大脳皮質ニューロンの生存を維持することが明らかになった。さらにこの作用はNSEの抗体及びF23の抗体によって消失した。以上このことから牛脳抽出液中の神経栄養因子の一つはNSEであり, ニューロンの生存維持に作用することが明らかになった。

NSEは神経特異的な酵素であり, その発現はニューロンの発達に従って増加し, シナプス形成の時期に多いことが知られていたがその酵素活性以外には特別な意味は知られていなかった。NSEが神経栄養作用を持つことがあきらかになり, NSEが正常な発達の過程や, 損傷時にニューロンの細胞外に出て他のニューロンに作用している可能性につき興味を持たれる。

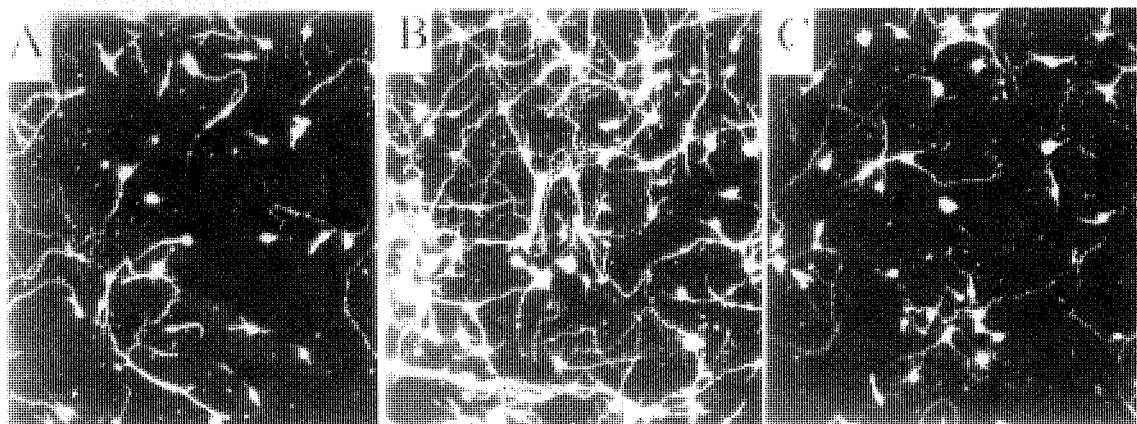


Fig. 1 Photomicrographs of immuno-staining of cultured neurons with anti-neurofilament antibody. A) control B) + NSE C) NSE + anti NSE



## ヒト tyrosine hydroxylase (TH) cDNA 導入培養細胞の脳内移植

内田耕一, 津崎尚子, 高坂新一

Catecholamine 産生細胞の脳内移植により, 実験的 Parkinson 病の機能回復が得られることが指摘され, 現在では臨床応用までなされている。本実験では, catecholamine 産生細胞の脳内移植による症状改善の機序解明を目的とし, さらに遺伝子導入培養細胞が脳内移植に応用可能であるか否かを検討した。

### 方法

ヒト type 1 又は type 2 TH cDNA をラットグリオーマ細胞 (C6) 及びラット線維芽細胞 (NRK-49F) へ導入し, L-DOPA 分泌細胞 (C6neoTH1), 及び tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) 依存的に L-DOPA を分泌し得る細胞 (NRKneoTH2) を確立し, これをドナー細胞とした。右黒質を 6-hydroxy dopamine により破壊したラット (6-OHDA ラット) をホストとした。C6neoTH1 又は NRKneoTH2 の細胞懸濁液を右線条体 2ヶ所へ注入した。コントロールとして, C6及び NRK-49F の移植も併せて施行した。移植線条体における catecholamine 代謝は, intracerebral-microdialysis 法により解析した。NRKneoTH2 移植群においては, 灌流液に 1mM BH<sub>4</sub> を添加した場合の catecholamine 代謝についても検討した。

### 結果および考察

C6neoTH1 および NRKneoTH2 細胞を 6-OHDA 処理したラットの線条体に移植し, 10日目まで脳切片を作製し, TH 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。Fig 1 に示した如く細胞は TH 抗体にて明らかに染色されており, 脳内という環境下でも TH を発現することが明らかとなった。次に脳内に移植された細胞からの L-DOPA の放出を *in vivo* microdialysis 法により検討した。C6neoTH1 移植群においては, 脳内においても L-DOPA の自発的放出を認めた (Fig 2)。一方 NRKneoTH2 移植群におい

ては, L-DOPA の放出は認められなかったが, 灌流液に BH<sub>4</sub> を添加した場合のみ L-DOPA の分泌がみられた (Fig 3)。以上の結果から TH cDNA 導入非神経細胞は, 脳内という環境下でも TH を発現し, さらにこの外来性に導入した形質は機能的にも安定に保たれることが示された。

Fig 1

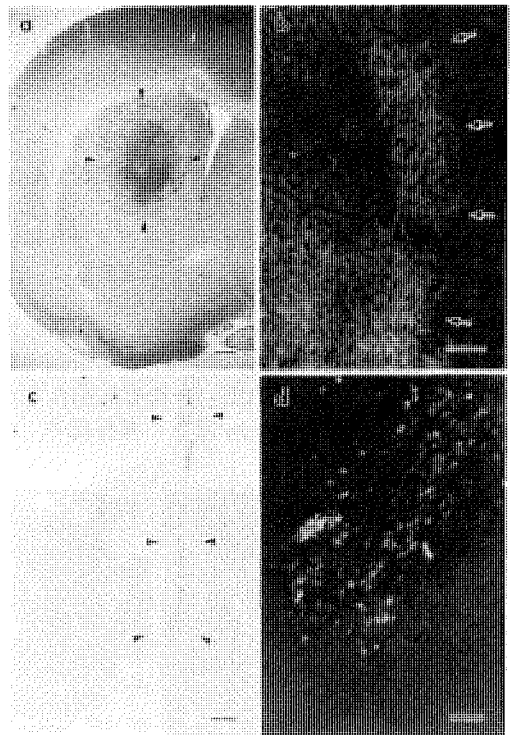
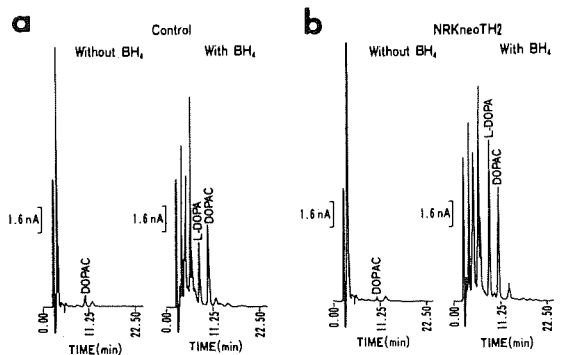
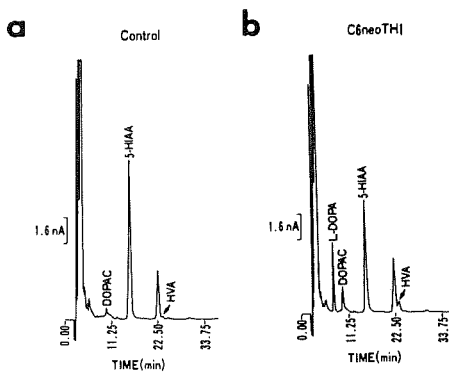


Fig 3

Fig 2



アストログリアの産生するニューロン突起伸展因子について

飯島 昇, 森 俊夫\*, 北畠克顕\*, 高坂新一

アストログリア (As) の conditioned medium (CM) 中には, 中枢神経系ニューロンの突起伸展を促進する因子が存在することが知られている<sup>1)</sup>。しかしながら, その液性因子の同定は必ずしも明らかにされていない。今回我々は, ラットの胎仔大脳半球より得た初代培養ニューロンの突起伸展を指標として, 因子の精製を行い, その同定を試みた。

方法

As は, 新生 1~3 日令の SD ラット大脳半球より調製し, McCarthy & de Vellis の方法<sup>2)</sup>に従って精製し, AsCM を得た<sup>3)</sup>。胎生 17 日令 SD ラットの大脳半球より調製したニューロンを, 検体を含む無血清培地で 2 日間培養後, 突起伸展につき測定した。突起伸展活性は, 計数した細胞中で 1 細胞長以上の突起を有する細胞の % をもって数値化した。

結果と考察

AsCM を無血清培地に添加した場合には無添加群に比し, ニューロンの突起伸展が著しく促進されることが観察された (Fig 1)。この AsCM を 80% 硫酸で濃縮後, WGA-アガロースにアプライし, 0.1 MGlcNAc で溶出した。WGA に結合した画分に活性が回収された。さらにその活性画分を FPLC-Superose 6 でゲル濾過を行ったところ, 2 つの活性ピークが得られた。void volume に溶出されるピーク I は現時点では未同定である。分子量約 70 万の位置に溶出されてくるピーク II 画分を Mono Q により, さらに精製を行った (Fig 2)。この活性ピーク画分を SDS-PAGE 後, 銀染色したところ, 還元下 180 KDa の単一バンドが認められた (Fig 3)。このタンパクは, western blotting 等の結果から,  $\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2M$ ) であることが確認された。市販のヒト  $\alpha_2M$  も同様の突起伸展活性を示した。抗体による活性阻害実験では, ラミニンやフィブロネクチンの抗体は活性に影響を与えないが,  $\alpha_2M$  の抗体は活性を完全に阻害した。以上の結果から, AsCM 中の突起伸展因子の少なくとも 1 つは  $\alpha_2M$  であることが強く示唆された。

文献

- 1) Banker, G. A. : Science 209 : 809-810, 1980
- 2) McCarthy, K. D. and de Vellis, J. : J. Cell Biol. 85 : 890-902, 1980
- 3) Mori, T. et al. : Brain Res. (in press), 1990

(注) \*アサヒビール中央研究所

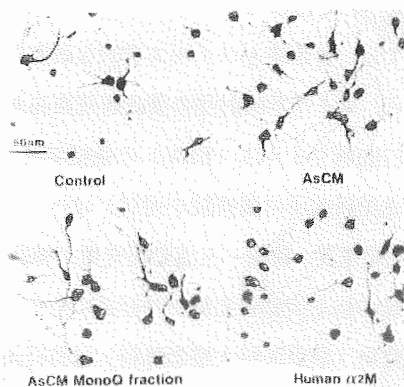


Fig 1 Effects of neurite outgrowth

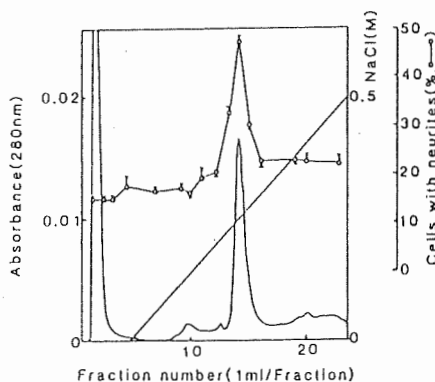


Fig 2 Mono Q column

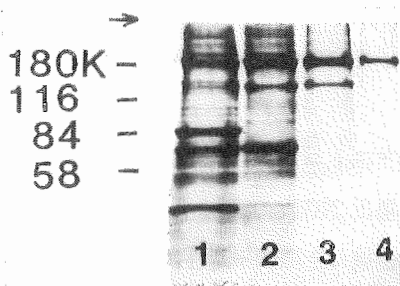


Fig 3 SDS-PAGE analysis of neurite promoting fractions (silver staining). 1: AsCM, 2: WGA-Agarose, 3: Superose 6, 4: Mono Q

## 12. 免疫研究部

### 1. 研究部一年のあゆみ

本研究部では、引き続きウイルス学的な研究と、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、エイズ予防財団の委託研究員高瀬明、北嶋しげみ賃金研究員はラットに免疫不全を惹起するフレンド白血病ウイルス（FLV）の免疫学的、ウイルス学的、分子生物学的研究を行った。また玉田耕一研究生（北里研究所付属病院小児科）はヘルペス脳炎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、篠田一三流動研究員が神経成長因子（NGF）の合成調節機構の研究を引続き行った。また新たに橋本裕子流動研究員が神経系の分化とチロシンリン酸化の関連について研究を開始した。また替地恭介研究生（慈恵医科大整形外科）は神経再生への NGF の応用研究を、西尾健資研究生（京大医神経内科）は脳内 NGF の詳細な分布を検討した。またヒューマンサイエンス官民共同研究に三井製薬生物科学研から橋本吉秀研究生、キリンビール医薬開発研から石川リカ研究生が参加し、NGF の脳内機能や合成誘導の研究を行った。

今年度の主な研究成果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イルス（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、欠損ウイ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) コロナウイルスのE2蛋白をコードする遺伝子（S1）をレトロウイルスベクターに組み込み、レトロウイルス感染により *in vitro* でリンパ球に S1 の発現が認められた。
- 3) 神経成長因子（NGF）の合成調節
  - a) 低分子化合物の投与によって末梢組織や脳で NGF が誘導され、その NGF は生理作用を発揮する。
  - b) 培養アストログリア細胞による NGF 合成調節にタンパク質リン酸化が関与している。
- 4) 神経損傷と NGF の役割
  - a) 脳損傷後の空隙に一過性に高レベルの NGF が放出される。
  - b) 末梢神経切断後 NGF 合成を誘導すると神経再生が促進される。

（部長事務取扱 杉田秀夫）

## 2. 研究業績

## A. 論文

## a. 原著

- 1) Furukawa Y, Tomioka N, Sato W, Hayashi K, Furukawa S:  
Catecholamines increase nerve growth factor mRNA content in both mouse astroglial cells and fibroblast cells  
FEBS Lett 247:463-467, 1989
- 2) Oda T, Ohta M, Inoue S, Ikeda K, Furukawa S, Hayashi K:  
Amino acid sequence of nerve growth factor purified from the venom of the Formosan cobra *Naja naja atra*  
Biochem Int 19:909-917, 1989
- 3) Sunohara N, Furukawa S, Nishio T, Mukoyama M, Satoyoshi E:  
Neurotoxicity of human eosinophils toward peripheral nerves  
J Neurol Sci 92:1-7, 1989
- 4) Ikegami R, Furukawa Y, Kaechi K, Hayashi K, Furukawa S:  
Effects of catecholamines and 4-methylcatechol on the synthesis and secretion of nerve growth factor by rat sciatic nerve segments in culture  
Biomed Res 11:61-65, 1990
- 5) Ohi T, Furukawa S, Hayashi K, Matsukura S:  
Ganglioside stimulation of nerve growth factor synthesis in cultured rat Schwann cells  
Biochem Int 20:739-746, 1990
- 6) Takeuchi R, Murase K, Furukawa Y, Furukawa S, Hayashi K:  
Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion by 1, 4-benzo-quinone and its derivatives in cultured mouse astroglial cells  
FEBS Lett 261:63-66, 1990
- 7) Shinoda I, Furukawa Y, Furukawa S:  
Stimulation of nerve growth factor synthesis by propentofylline in cultured mouse astroglial cells  
Biochem Pharmacol 39:1813-1816, 1990

## II 研究業績

- 8) 小宮山純, 古川昭栄, 池上亮介, 平山恵造, 里吉栄二郎 :  
培養シュワン細胞, 線維芽細胞によるラミニンの合成・分泌とその細胞増殖依存性  
医学のあゆみ 150:753-754, 1989
- 9) Yoden S, Kikuchi T, Siddell SG, Taguchi F :  
Expression of the peplomer glycoprotein of murine coronavirus JHM using a baculovirus  
vector  
Virology 173:615-623, 1989

### c. 総説

- 1) 古川昭栄, 篠田一三, 古川美子 :  
神経系培養細胞を用いた nerve growth factor の合成調節機構の研究  
Human cell 2:137-142, 1989
- 2) 古川昭栄 :  
アルツハイマー病治療薬開発へのアプローチ  
化学と工業 42:1362-1364, 1989
- 3) 古川昭栄, 古川美子 :  
自律神経細胞の成長, 機能維持, 修復と神経成長因子  
神経研究の進歩 33:237-248, 1989
- 4) 渡辺里仁 :  
動物におけるレトロウイルス感染症  
小児内科 21, 1659-1661, 1989
- 5) 尾前二三雄, 古川美子, 古川昭栄 :  
Nerve growth factorの遺伝子  
Dementia 3:398-408, 1989
- 6) 西尾健資, 古川昭栄 :  
神経系と免疫系をつなぐ活性因子  
神経精神薬理 12:21-31, 1990

## B. 学会発表

### a. 特別講演, シンポジウム

- 1) 古川昭栄 :

神経栄養因子

文部省重点研究・脳の老化機構に関する分子細胞生物学的研究班夏期ワークショップ,  
京都, 8. 24, 1989

2) 古川昭栄 :

神経成長因子 (NGF) の合成調節による神経機能修復へのアプローチ

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ワークショップ,  
名古屋, 9. 9, 1989

b. 国際学会

1) Furukawa S, Furukawa Y, Hayashi K:

Regulation of nerve growth factor synthesis in cultured mouse fibroblasts and astroglial cells

International Symposium of Natural Toxins

Guilin, May 24, 1989

c. 一般学会

1) 替地恭介, 池上亮介, 古川美子, 林恭三, 古川昭栄 :

4-methylcatecholによる末梢神経系NGFの合成誘導

第32回日本神経化学学会大会, 札幌, 9. 27, 1989

2) 西尾健資, 秋口一郎, 古川昭栄 :

高感度微量酵素免疫測定法によるラット脳内NGFの分布

第32回日本神経化学学会大会, 札幌, 9. 28, 1989

3) 紙谷清, 三谷山晶子, 古川昭栄, 林恭三, 千谷晃一 :

N-Acetyltransferaseのラット脳内分布

第62回日本生化学会大会, 京都, 11. 4, 1989

4) 西尾健資, 古川昭栄 :

ラット脳内NGF分布マッピング

第62回日本生化学会大会, 京都, 11. 5, 1989

5) 替地恭介, 古川美子, 池上亮介, 尾前二三雄, 林恭三, 古川昭栄 :

ラット末梢神経系NGFの合成誘導とその逆行性輸送

第62回日本生化学会大会, 京都, 11. 5, 1989

6) 古川昭栄, 橋本吉秀, 尾前二三雄, 深沢信幸, 林恭三, 古川美子 :

## II 研究業績

### ラット脳内NGFの合成誘導

第62回日本生化学会大会, 11. 5, 1989

- 7) 村瀬勝人, 竹内理恵, 古川美子, 古川昭栄, 林恭三 :  
マウスアストログリア細胞のNGF合成を促進する化合物の検索  
第62回日本生化学会大会, 京都, 11. 6, 1989
- 8) 古川美子, 新井洋, 篠田一三, 尾前二三雄, 中山和久, 林恭三, 古川昭栄 :  
NGF合成調節の細胞内作用機構  
第62回日本生化学会大会, 京都, 11. 6, 1989
- 9) 大井長和, 古川昭栄, 松倉茂, 林恭三 :  
ガングリオシドによる培養シュワン細胞のNGF合成の促進  
第31回日本神経学会総会, 水戸, 5. 25, 1989
- 10) 小宮山純, 平山恵造, 古川昭栄, 池上亮介 :  
培養シュワン細胞・線維芽細胞によるラミニンの合成・分泌  
第31回日本神経学会総会, 水戸, 5. 25, 1989
- 11) 松井京子, 古川昭栄, 柴崎浩, 菊池建機 :  
遺伝性運動失調マウスの脳内NGFレベルについて  
第6回日本疾患モデル動物研究会総会, 東京, 11. 28, 1989
- 12) 渡辺里仁, 高瀬明, 池田秀利 :  
フレンド白血病ウイルス (FLV) 感染マウス及びラットより樹立された種々の細胞株から産生されるFLVの病原性の検討  
第37回日本ウイルス学会総会, 大阪, 11. 2, 1989
- 13) 松原豊, 渡辺里仁, 田口文広 :  
マウスコロナウイルスJHM変異株のラットに対する病原性について  
第37回日本ウイルス学会総会, 大阪, 11. 2, 1989
- 14) 高瀬 (余田) 明, 渡辺里仁 :  
ラットにエイズ様免疫不全を起こすマウス白血病ウイルスの分子生物学的解析  
第37回日本ウイルス学会総会, 大阪, 11. 2, 1989
- 15) 高瀬 (余田) 明, 渡辺里仁 :  
マウス白血病ウイルスFrC6株感染細胞でみられた染色体外ウイルスDNAの蓄積について  
第12回分子生物学会年会, 仙台, 11. 30, 1989

## C. 班会議発表

- 1) 古川昭栄, 橋本吉秀, 古川美子 :  
脳内神経成長因子 (NGF) の合成誘導  
文部省重点研究・脳の老化機構に関する分子細胞生物学的研究班, 東京, 12. 21, 1989
- 2) 古川昭栄, 替地恭介, 古川美子 :  
末梢神経系NGFの合成誘導とその生物活性発現  
厚生省精神・神経疾患委託研究・中枢神経系の機能修復に関する開発的研究班,  
東京, 1. 6, 1990
- 3) 古川昭栄, 松井京子, 柴崎浩, 菊池建機 :  
遺伝性運動失調マウスの脳内NGFレベル  
厚生省精神・神経疾患委託研究・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. 17, 1990
- 4) 春原経彦, 古川昭栄, 里吉栄二郎 :  
ヒト血清中の自己免疫筋抗原(SE-antigen)の測定  
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, 東京, 2. 24, 1990
- 5) 古川昭栄, 古川美子, 尾前二三雄, 篠田一三, 林恭三 :  
NGF合成の細胞内調節機構  
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・第3分野  
第4テーマ (脳・神経系機能と生体防御の解明) 報告会, 東京, 1. 13, 1990
- 6) 古川昭栄, 篠田一三 :  
Epidermal Growth Factorの高感度Enzyme immunoassayの確立と脳内分布の検討  
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・第1分野第1テーマ (ニューロ  
トロフィックファクター等の分離技術及び機能の解析技術の開発) 報告会, 東京, 1. 20, 1990



3. 主な研究報告

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

渡辺里仁, 高瀬明, 田口文広

現在、動物個体に遺伝子を導入しそれを発現させる方法としては、トランスジェニック動物の作成が確立しているのみである。この方法は、効率がきわめて悪く膨大な動物、それを管理する設備を必要とし、しかも受精卵を取り扱うことから人道上の問題もありヒトの遺伝疾患などの治療の目的には応用できない。本実験は、レトロウイルスベクターを利用し、動物個体に遺伝子を導入する技術を開発し、この方法を用いて、病原体の遺伝子発現による脳機能障害の機序を解明しようとするものである。

〔材料と方法〕

細胞傷害性の強いコロナウイルス JHM 株の外殻蛋白 (E2蛋白) をコードする JHM-S1 とレトロウイルスベクター pZ1P Neo SV(X)の組み換え遺伝子 ER-1 を作成した。ER-1 をレトロウイルスに感受性の強いラット由来の NRK 細胞と 3Y1 細胞にトランスフェクトした。

NRK 細胞と 3Y1 細胞にトランスフェクトされた ER-1 の増殖、感染には近年我々が分離した中枢神経に親和性のあるフレンド白血病ウイルス (FLV) 産生性細胞株 FLely-i1 を用いた。FLV 感染後培養上清をコロナウイルス JHM 株に感受性の高い L細胞の培養に添加し、ネオマイシン耐性 L細胞 (L(neo) cell) を、クローニングした。L(neo) cell にコロナウイルス JHM 株を感染させて ER-1 による影響を調べた。

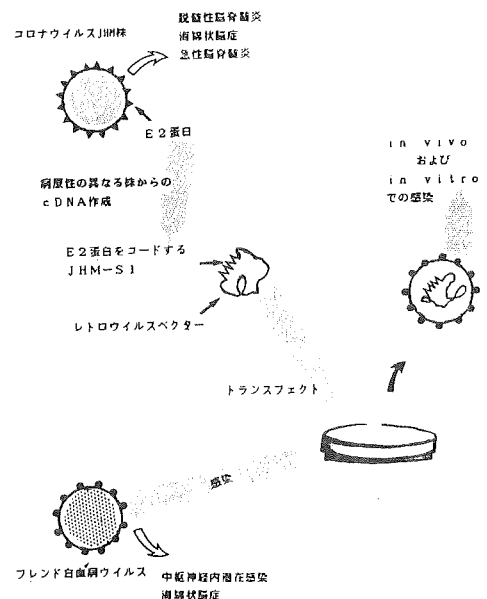
〔結果と考察〕

イ) レトロウイルスは 3Y1 細胞に対して細胞傷害性を示さないが、ER-1 遺伝子をトランスフェクトされた 3Y1 細胞 (3Y1-ER) は、FLely-i1 感染によりシンシチウムを形成した。シンシチウムは感染後 3 日で顕著となり一週間から 10 日でほとんど全ての細胞が融合して、培養皿から剥離した。また、ここに 3Y1-ER を加えることにより新たなシンシチウムが形成された。この FLV 感染を受けた 3Y1-ER の培養上清を 3Y1 に 2 次感染させてもシンシチウムの形成がみられたが、この場合にみられたシンシチウム形成は一過性で、正常な形態の 3Y1 細胞に置き換えられた。シンシチウムが消えて 1 週間で 3Y1 からの FLV の産生も見られなくなった。このことから、3Y1-ER 細胞に FLV を感染さ

せたときにシンシチウムが形成され、かつそれが広がるためには full genome をもった helper FLV が増殖し、ER-1 遺伝子を大量に放出させることが必要であり、かつ FLV 感染 3Y1-ER 細胞培養上清中のウイルス粒子のほとんどは、FLV のエンベロープを持ち、ER-1 遺伝子をもつ欠損型のウイルスであることが示唆された。

ロ) FLV 感染を受けた 3Y1-ER の培養上清、すなわち ER-1 遺伝子をもつ FLV を L細胞にかけたところ L細胞の腫大、小シンシチウムの形成が感染後 2~3 日で出現した。このような変化は、新たな L細胞と FLV を加えることで維持された。なお、L細胞に FLV を感染させただけでは、変化を生じなかった。

ハ) ER-1 遺伝子を持つ FLV の感染を受けた L細胞 (L-neo-CTR (3Y1-7)細胞) にコロナウイルス JHM 株を重複感染させると JHM 株特有の 24 時間で培養皿一面に広がるシンシチウムの形成が抑制され、JHM 感染後 5 日間経過しても巨大シンシチウムは形成されなかった。ほとんどの細胞株から低い感染価の JHM ウイルスが検出されたが、まったく感染の成立しなかったクローンもあった。



## アストログリア細胞のNGF合成に対する細胞成長因子の効果

篠田一三, 古川昭栄

神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) は、脳内では大細胞性コリン作動性ニューロンの栄養因子として機能する。

既に、我々は培養アストログリア細胞が NGF を合成・分泌することを見出し、脳内 NGF レベルの調節にアストログリア細胞が関与する可能性を指摘した。現在までの研究結果から、培養アストログリア細胞の NGF 合成は増殖依存性であり、細胞を静止期に導入すると著しく抑制されることが明らかになっている。<sup>1)</sup> このことは、細胞の増殖を促進する細胞成長因子が NGF 合成に影響を及ぼすことを示唆する。そこで、本実験では、いくつかの細胞成長因子について、それらの効果を比較検討した。

## ＜方法＞

アストログリア細胞は生後 3 日齢 ICR マウス大脳皮質より常法に従い調製し、初代培養から 4 回継代した後、実験に供した。なお、GFAP 陽性であることは確認している。10% FCS を含む DMEM で confluent になるまで培養した後、FCS を除き、さらに培養を 1 週間継続し、細胞を静止期に導入した。0.5% BSA を含む DMEM で調製した種々の細胞成長因子を加え、24 時間培養し、培養液中に分泌される NGF 量の変動を酵素免疫測定法により調べた。

## ＜結果・考察＞

EGF, IGF-I, および TGF- $\alpha$  は顕著な効果を示さなかったが、PDGF, bFGF および TGF- $\beta$  は培養液中の NGF 量を著しく増大した (Fig. 1)。いずれの場合も<sup>2)</sup>Hチミジンの取り込みはなく、効果が顕著であった PDGF と bFGF は competent factor であることから、NGF の合成を促進するには、細胞をG<sub>0</sub>期からG<sub>1</sub>期に移行させることが重要であると考えられた。また、PDGF と bFGF のシグナル伝達系は C kinase を介する<sup>3)</sup>ことから、NGF の合成促進と、C kinase との関連性が注目された。TGF- $\alpha$  に関しては、その効果が EGF と同じであったことから、従来から指摘されているように EGF レセプターを介して作用したと考えられた。

NGF 分泌量の経日変化を調べた結果、TGF- $\beta$  以外の因子の効果は 1 日目が最大で以後減少する傾向を示したが、TGF- $\beta$  ではその逆となった。また、TGF- $\beta$  の効果は EGF との共存で特に高められた。これらの現象から TGF- $\beta$  による NGF 合成

の促進は PDGF や bFGF とは異なる機構によると判断された。現在のところ、TGF- $\beta$  の伝達系には C kinase は関与しないと考えられている<sup>3)</sup>。

以上のことからアストログリア細胞の NGF 合成は種々の細胞成長因子により促進されることが明らかになった。また、その調節機構は 1 つに限定できず、様々なルートが存在すると考えられた。なお、EGF, bFGF, および TGF- $\beta$  に関しては、培養液中の NGF 量の上昇は、細胞内 NGF mRNA 量の上昇と相関することは確認している。

## ＜文献＞

- 1) Furukawa et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 142, 395-402 (1987)
- 2) 貝淵ら, 蛋白質, 核酸, 酵素, 34, 1061-1068 (1989)
- 3) Sporn et al. J. Cell. Biol., 105, 1039-1045 (1987)

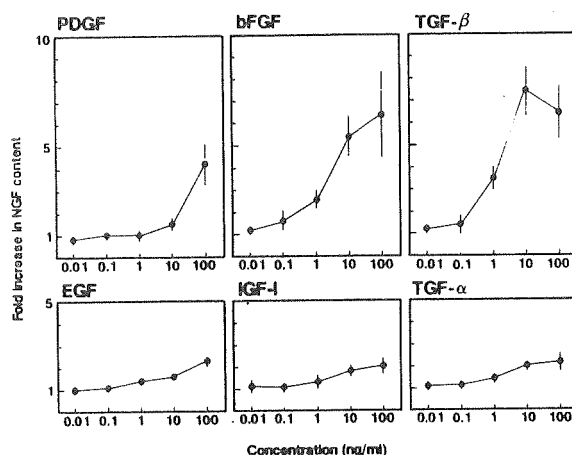


Fig. 1. Effects of various growth factors on NGF contents in the supernatant of astroglial cell cultures.

Astroglial cells were cultured with various concentrations of growth factors dissolved in DMEM containing 0.5% BSA (0.1 ml) in 96-well plates ( $4.2 \times 10^4$  cells/well). The NGF content in the supernatant collected 24 h later was determined by EIA and expressed as fold increase over that of control. Each point is the mean  $\pm$  SE of four determinations.

## カテコール化合物による脳内NGF誘導

橋本吉秀, 古川昭栄

NGF は、中枢神経系においても代表的な神経栄養因子として、その生理的役割及びある種の神経退行性疾患の病態との関与の可能性等で注目を集めている。そこで、NGF 産生分泌の調節に関わる液性因子と、これらによって惹起される一連の細胞内イベントの生理化学的プロフィールを明らかにすることを目的とし、この種の作動物質の薬理学的応用の可能性について検討した。

## 【方法】

ラット脳内 NGF レベルの酵素免疫測定法(EIA)による定量：7週齢の雄性ウイスターラット（1群10頭）の脳を摘出し、氷上にていくつかの部位に分け $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。凍結した脳組織を秤量し、20~50倍量の抽出液中にて超音波破碎、ついで超遠心した。その上清中の NGF レベルをサンドイッチ EIA で定量した。

カテコール化合物のラット脳内 NGF レベルに及ぼす効果：2種類のカテコール化合物 4-methyl catechol(MC)及び1, 2-diacetyl-4-propylcatechol(DPC)を、それぞれ6~7週齢の雄性ウイスターラット（1群3頭）に腹腔内投与した。薬物投与量は、0, 10, 50, 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、PBS に溶解し半日毎に計5回投与した。最後の投与から4時間後に脳を摘出し、氷上にていくつかの部位に分け $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。凍結したラット脳組織中の NGF レベルを、上記の方法で測定した。

## 【結果】

7週齢の雄性ウイスターラットの脳各部位における組織湿重量1g当りの NGF レベルは、海馬で最高値（約1ng）を示し、ついで皮質、基底核、中隔で高く、線条体、間脳、小脳、中脳で低く、橋・延髄で最も低い値が得られた。薬物投与後のラット脳内 NGF レベルは、コントロール群（PBS投与）に比べ MC 投与群では、中隔、海馬、間脳、小脳等で増加傾向が認められた。また、DPC 投与群でも、中隔、海馬、間脳で同じく増加傾向が認められた（Fig. 1）。両カテコール化合物による中隔、海馬に於ける組織湿重量1g当りの NGF 増加量は、最高約100pgを示した。

## 【考察】

今回 EIA により測定したラット脳内 NGF レベルは、コリナージックニューロンの被投射領域である海馬、皮質等で高く、同支配神経の存在する領域である中隔、基底核等で中程度の、また同支配神経

の投射部位ではないと考えられている中脳、小脳、橋・延髄等で低いという従来の報告を裏づける結果であった。カテコール骨格を有する化合物は、in vitro において培養アストログリア細胞の NGF 合成誘導を高め、その作用はアドレナージックレセプターを介さないで起きることが知られている。今回、カテコール化合物の代表として MC 及び、カテコール環の二つの水酸基をアセチル基で保護した DPC を用い in vivo に応用し、脳内の NGF 産生分泌に対する影響を検討した。腹腔内投与することにより両化合物共、脳内特にコリナージックニューロンの被投射領域である海馬内において、NGF レベルを増加させる傾向にあることを認めることが出来た。作用機序等の説明は今後の検討に抛らねばならないが、これらカテコール骨格を有する化合物は、加齢変化の認められる基底核コリナージックニューロンの賦活化剤として、あるいは NGF の脳内での働きを探るツールとして利用出来る可能性が示された。

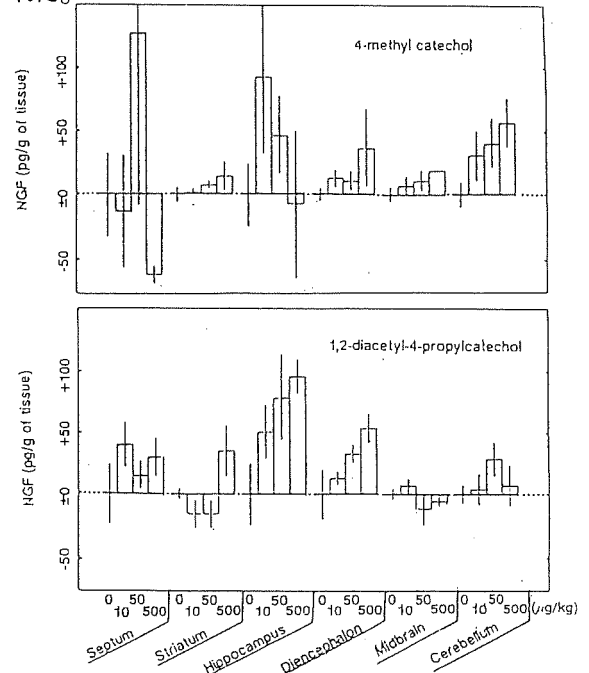


Fig. 1 Changes of NGF content in various regions of rat brain by the repetitive administration of drugs.

Columns represent means  $\pm$  S. E. M. (n=3)

## 13. 遺伝子工学研究部

### 1. 研究部一年のあゆみ

研究部が発足し、2年目を迎えた。初年度に基本的なセットアップを終え、新しいプロジェクトをスタートさせていたこともあり、全体としてみれば2年目にふさわしい研究ができたと考えている。

4月より新たに新潟大脳研より星野幹夫（大学院生）、東大医科研より朝倉淳（大学院生）、賃金研究員として宮原慶子、研究助手として大滝雅子を迎えた。星野、宮原はショウジョウバエチームの一員として、朝倉は筋発生グループのメンバーとして、熱心に研究を進めている。また、平成2年1月より関根陽子を迎え、総勢14名となった。関根は中枢神経のカルシウムチャンネルに関連する蛋白の遺伝子に関する共同研究のために新潟大学脳研より派遣された大学院生である。

### 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に結合する蛋白性因子の解析をした。また横紋筋で発現する軽鎖遺伝子群のプロモーター領域に存在する共通配列を発見し MLC box と名付けた。さらに MLC box を認識する蛋白と c-fos の SRE、アクチンの CArG box を認識する因子の関係を明らかにした。
- b 筋細胞分化誘導因子 myogenin の構造解析の結果、これらの因子には2つの保存されたドメインが存在することを見いだした。MyoD1, myogenin によって誘導される筋原細胞の性質が異なることを明らかにした。
- c 神経系の発生、構築の分子機構の解析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。

P-element enhancer trapping 法をもちいて1100を超える独立したラインを解析しており、中枢神経系の構築、特定のネットワークの形成、高次神経機能の分子機構を解析する手がかりが得られつつある。

(部長 鍋島陽一)

## II 研究業績

### 2. 研究業績

#### A. 論文

##### a. 原著

- 1) Nabeshima Y, Shirakata M. :  
Regulatory elements involved in the regulation of myosin alkali light chain gene family.  
Cellular and molecular biology of muscle development, 713-723, 1989
- 2) Sogawa K, Handa H, Fujisawa-Sehara A, Hiromasa T, Yamane M, Fujii-Kuriyama Y, :  
Repression of cytochrome P-450c gene expression by co-transfection with adenovirus Ela  
DNA.  
Eur. J. Biochem. 181 : 539-544, 1989
- 3) Fujii-Kuriyama Y, Fujisawa-Sehara A, Sogawa K,  
Gene structure and regulation of cytochrome P-450, Arch. Toxicol. , Suppl. 13 : 141-  
144, 1989

##### b. 著書

鍋島陽一, 植月太一, 小宮透, 鍋島曜子, 藤沢淳子 :  
筋肉細胞の分化過程  
分子生物学の進歩 第7巻, 丸善, 東京, p1691-186, 1989

##### c. 総説

- 1) 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
- 2) 鍋島陽一 :  
真核細胞における遺伝子の発現制御  
神経精神薬理 11 : 861-874, 1989

##### d. 班会議報告

- 1) 鍋島陽一 :  
筋細胞に導入したミオシン軽鎖遺伝子の発現制御機構の解析  
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  
昭和63年度研究報告書 p106-110, 1989

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年度研究成果報告書 p20, 1989

3) 鍋島陽一 :

ショウジョウバエ脳の遺伝的標識

文部省科学研究費補助金 重点領域研究・ショウジョウバエ分子生物学による生体高次機能解析

平成元年度研究成果報告書 p118-120, 1990

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63年度研究成果報告書 p34-36, 1989

## B 学会発表

## a 特別講演, シンポジウム

1) Nabeshima Y, Uetsuki T, Komiya T, Nabeshima Y, Fujisawa-Sehara A ;

Regulatory elements of chicken myosin alkali light chain genes expressed in skeletal muscle.

EMBO workshop on cellular and molecular biology of muscle development

King's College Cambridge England, 27th Sep. , 1989

2) Nabeshima Y, Uetsuki T, Nabeshima Y, Fujisawa-Sehara A :

Regulatory elements involved in chicken myosin alkali light chain gene expression

International symposium on Dynamic state of muscle fiber, Konstanz, 1st Oct. 1989

3) Fujisawa-Sehara A, Hosoda Y, Nabeshima Y, Nabeshima Y :

Myogenin exhibits distinct features of myogenic activity from MyoD1.

UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology

Keystone Colorado, 2nd Feb. , 1990

4) 鍋島陽一 :

筋細胞を制御する遺伝子と収縮蛋白の発現

日本学術会議 細胞生物学シンポジウム 細胞骨格——細胞の増殖と分化への関与——

## II 研究業績

東京, 5. 12, 1989

5) 鍋島陽一 :

筋細胞の分化と遺伝子発現

ギブコシンポジウム, 箱根, 7. 20, 1989

6) 藤沢敦子, 植月太一, 小宮 透, 鍋島曜子, 細田葉子, 鍋島陽一 :

筋細胞分化を制御する遺伝子の機能と収縮タンパク質遺伝子の発現誘導

第42回細胞生物学会大会合同シンポジウム 細胞応答から遺伝子発現へ 京都, 10. 26, 1989

7) 藤井義明, 十川和博, 安元研一, 今高寛晃, 藤沢淳子 :

チトクロームP-450遺伝子の発現制御機構

第42回細胞生物学会大会合同シンポジウム 細胞応答から遺伝子発現へ 京都, 10. 26, 1989

8) 浜千尋 :

前後部コンパートメントの形成とengrailed遺伝子の発現について

日本生物物理学会シンポジウム ショウジョウバエの発生, 東京, 10. 15, 1989

### c 一般学会

1) 松崎文雄, 浜千尋, 小泉恵太, 吉岡 亨, 星野幹雄, 佐武 明, 宮原慶子, 鍋島陽一 :

ショウジョウバエ中枢神経系の1acZライブラリーの作成

第12回日本分子生物学会年会 仙台, 11. 29, 1989

2) 浜千尋, 松崎文雄, 小泉恵太, 吉岡 亨, 星野幹雄, 佐武 明, 宮原慶子, 鍋島陽一 :

ショウジョウバエ脳の遺伝的標識

第12回日本分子生物学会年会 仙台, 11. 29, 1989

3) 花岡和則, 早坂美智子, 植月太一, 藤沢敦子, 鍋島陽一 :

外来遺伝子の導入による胚細胞標識化の試み

第12回日本分子生物学会年会 仙台, 11. 30, 1989

4) 植月太一, 藤沢淳子, 鍋島陽一 :

ミオシンアルカリ軽鎖遺伝子のプロモーターに存在する共通配列の解析

第12回日本分子生物学会年会 仙台, 12. 1, 1989

5) 小宮 透, 藤沢淳子, 村松正実, 鍋島陽一 :

骨格筋型ミオシン軽鎖の発現誘導に關与する領域

第12回日本分子生物学会年会 仙台, 12. 1, 1989

- 6) 藤沢淳子, 細田葉子, 鍋島曜子, 鍋島陽一 :  
筋分化におけるMyoD1およびmyogenin遺伝子の役割  
第12回日本分子生物学会年会 仙台, 12. 1, 1989

### C 班会議発表

- 1) 鍋島陽一, 藤沢淳子 :  
筋細胞の分化誘導とミオシン軽鎖遺伝子の発現制御  
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, 10. 5, 1989
- 2) 鍋島陽一, 藤沢淳子 :  
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・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, 1989
- 3) 鍋島陽一, 藤沢淳子 :  
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. 8, 1989
- 4) 鍋島陽一 :  
遺伝子導入による筋細胞の分化誘導  
厚生省科学研究費補助金・遺伝子治療研究班, 東京, 3. 13, 1990
- 5) 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. 22, 1990



3, 主な研究報告

Myogeninによって引き起こされる筋分化

藤沢淳子, 鍋島曜子, 細田葉子, 鍋島陽一,

[目的と方法]

最近, マウス線維芽細胞を筋細胞に分化誘導する遺伝子 MyoD の cDNA が Weintraub のグループにより単離された。我々はこの cDNA を単離すると同時に, それとホモロジーが高く, 同様の筋分化をひき起こす myogenin の cDNA を単離した。これらの遺伝子は, どのような過程をへて筋分化をもたらすのだろうか? また, それぞれの遺伝子の「役割分担」があるとすれば, それは何だろうか?

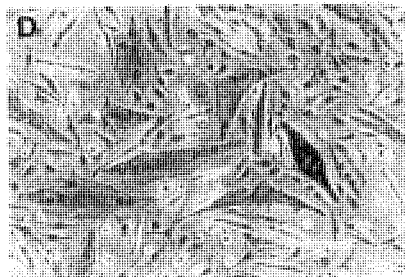
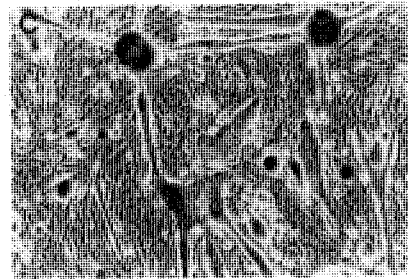
私たちは, こうした問題に対するひとつのアプローチとして, 外来性の myogenin 或は MyoD を発現させることによって得られた筋芽細胞の性質について検討してきた。今回は, myogenin を発現させることによって得られた筋芽細胞(M-筋芽細胞)について, 興味ある知見を得たので報告する。

[結果と考察]

多くのM-筋芽細胞は血清濃度の低下にともない, 融合細胞数の少ない短い筋管を形成したが, これらを passage していくと, やがて血清濃度が高い状態でも筋管を形成する細胞がその中に現れはじめた(写真D. 千葉大理学部大日方教授より 供与頂いた anti-troponin T抗体で, 酵素抗体法にて染色したもの)。そこで, これらの transformant を limited dilution の方法により cloning したところ, clone の多くは, 血清濃度の低下から約2日後に細胞融合をはじめ(写真A), 4日後にはBのように, 殆どすべての細胞が互いに融合してしまうような状態(burst of fusion)をひき起こした。それに対し一部の clone は血清濃度に依存せず sparse な状態から細胞融合がはじまり, 強く troponin Tを発現している丸い筋管を形成した(写真D)。また, M-筋芽細胞のあるものは, passage を重ねることによって筋管形成能を獲得していくことがわかり, この場合も clonal analysis を行うと一部の clone が burst of fusion をひき起こした。

以上の結果から, M-筋芽細胞には3つの stage があると仮定される。myogenin を発現しているにもかかわらず筋管形成能のない stage I, 血清濃度低下により細胞融合のひき起こされる stage II, 血清濃度非依存的に細胞融合をおこす stage III の3種類であり, clone analysis からM-筋芽細胞は stage I → II → III の過程をたどると考えられ

る。stage I, II の筋芽細胞には生化学的な差異も見いだされており, 今後, どのようなプロセスで stage I から II, III の筋芽細胞を生じるのかを明らかにしていきたい。



ミオシナルカリ軽鎖遺伝子プロモーターに存在する共通エレメントの解析

植月太一, 小宮 透, 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, ニワトリの筋分化に伴うミオシナルカリ軽鎖の発現制御を研究する目的で心筋型, 骨格筋型, 胚型の遺伝子のプロモーターの機能を解析している。これまでに, これらのミオシナル軽鎖のプロモーター領域には, TATAboxの上流100bp付近に, 16bpからなるシスエレメントが共通に存在しており, いずれの軽鎖の発現にも必須であることを見出した。我々は, このシスエレメントを「MLCbox」と名付けて, その機能の解析を行っている。

〔材料と方法〕

1) 軽鎖遺伝子プロモーターの活性測定

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った。また, 詳細なシスエレメントの解析を行うために, オリゴヌクレオチドを合成し, 本来のMLCboxの代わりに変異を導入したMLCboxを挿入し, 変異の転写活性への影響を検討した。また, MLCboxに結合する核タンパク質が存在するかどうかをバンドシフトアッセイ法により検討した。この際に, 変異をもつMLCboxと競合させることによってMLCboxの活性と結合能が一致するかどうかを検討した。

〔結果と考察〕

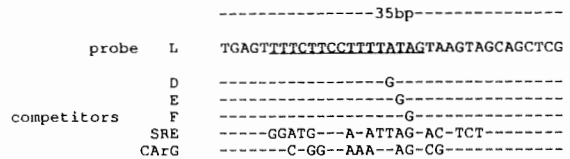
MLCboxを成す16bpの配列それぞれに変異を導入して活性を測ったところ, 16bpの配列はどれも重要であることが分かった。特に, 変異D及びE(図-1, D及びE)は, 1bpの置換にもかかわらず, MLCboxの活性をほとんど失わせた。また, 唯一, 変異Fだけが活性を上昇させた(図-1, F)。さらにMLCboxは反対方向でも活性があること, 骨格筋型LC1fのMLCboxが活性が低いことが明らかになった。

次に胸筋より核抽出液を調整し, In vitroで結合するタンパク質が存在することを確認した。さらに, このタンパク質の結合がMLCboxの活性と関連していることを, 変異MLCboxとのコンペティションアッセイにより確認した(図1, 図2)。

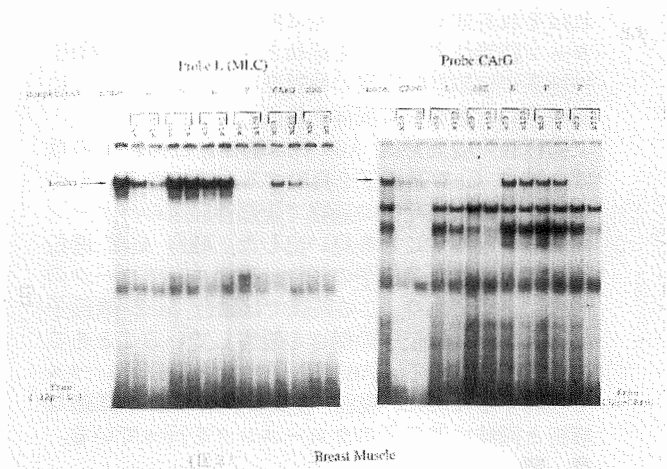
Kedesらは,  $\alpha$ -アクチンにはCArGboxというシスエレメントが存在し, 筋特異的な発現を制御していることを報告した。CArGboxとMLCboxは, 塩基配列, 機能などが類似している(図1)。

そこで我々は共通の因子が,  $\alpha$ -アクチンとミオシナル軽鎖の同調的発現を制御している可能性があると考え, MLCboxとCArGboxが互いに競合するかどうかを調べた。その結果図2中矢印で示したDNAタンパク質複合体のバンドがMLCbox, CArGboxに共通に結合するものであることを見出した。今後このタンパク質の機能や, その発現のパターンを調べることを通じて筋分化における遺伝子発現の同調的制御機能を明らかにしたい。

- 1) Miwa, T., Kedes, L., : Mol. Cell. Biol. 7, 2803-2813(1987)
- 2) Mohn, T. J., Taylor, M. V., Garrett, N., Gurdon, J. B. : EMBO J., 8 1153-1161(1989)



(図1)



(図2)

エンハンサートラップ法によるショウジョウバエ中枢神経系の解析

松崎文雄, 浜 千尋, 小泉恵太, 星野幹雄, 宮原慶子

中枢神経系はいかなる遺伝子支配の基に発生し、ニューロンネットワークを完成し、高度な機能を獲得するのだろうか。この問題に取り組むために我々が選んだ実験系はショウジョウバエである。この生物は単純であるが由に遺伝学の蓄積が豊富である一方、記憶や学習を行う程には複雑であるため、中枢神経系の分子遺伝学的な解析の対象としてすぐれた系である。本研究はショウジョウバエの中枢神経系、特に脳の発生と機能の発現を分子レベルで解明することを目的とする。

方法と結果—エンハンサートラップ

本研究の出発点としてエンハンサートラップ法によりショウジョウバエの *lacZ* ライブラリーを作成した。即ち、大腸菌 *lacZ* 遺伝子と短い中立なプロモーターの融合遺伝子をP因子を介し、1個挿入する。このような系統を独立に約1100種樹立し(図1)、第一次のスクリーニングとして、成虫脳における *lacZ* 遺伝子の発現を見ると、約半数の系統で *lacZ* 遺伝子の脳における発現が検出された。その中で、*lacZ* 遺伝子の発現が中枢神経系に限られる系統が現在までに十数種確認され、最終的にその数はさらに増えることが期待される。

これらの系統では、中枢神経系に特異的な発現を示す遺伝子に融合 *lacZ* 遺伝子が挿入されたと考えられる。この遺伝子の産物は発現する神経細胞の発生あるいは機能にどのようにかかっているのだろうか。融合 *lacZ* 遺伝子の挿入がその遺伝子の働きを阻害している場合、個体の変異表現形を検出すればそれを知ることが可能になる。このために、パターン認識能力の検定を始めとする行動異常の検出、神経系の解剖学的変異の検討を行っており、すでに興味深い行動異常変異体を見出している。

劣性致死変異系統 A63 株は脳を含む神経系のほぼ全域で *lacZ* 遺伝子を発現する系統である。そのホモ接合体は胚発生の過程で腹部神経系のパターンに異常をきたすことを見出した。融合 *lacZ* 遺伝子が挿入された遺伝子の産物は神経ネットワークの形成に必須であり、この系統では融合 *lacZ* 遺伝子の挿入がその遺伝子の働きを阻害していることをこの観察は意味する。A63遺伝子の機能を分子レベルで理解するために、現在、変異表現形のより詳細な解析と同時に遺伝子のクローニングを行っている。

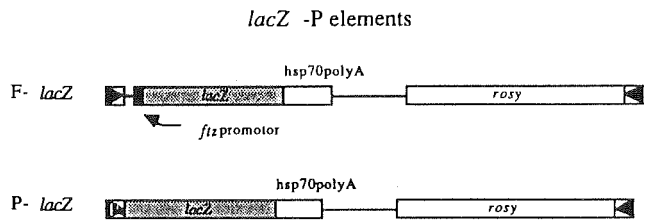
展 望

融合 *lacZ* 遺伝子の発現パターンから、その遺伝

子の重要性が示唆されるにもかかわらず、変異表現形を持たない系統に関するも、*lacZ* 遺伝子を含む欠失を持つ変異体を作成することにより、その遺伝子の機能にせまることが可能であり、現在その方向の解析も進めている。

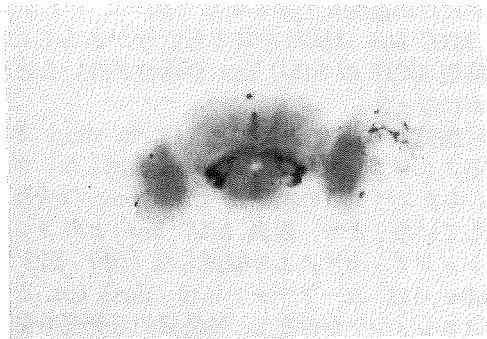
中枢神経系、特に脳の発生あるいは機能にかかわる遺伝子を系統的に同定し、分子生物学的解析、組織化学的解析を加え、遺伝子が果たす普遍的な役割を明らかにできることを期待している。

図1 *lacZ*ライブラリーの作成



strains	chromosomal linkage			total
	2nd	3rd	other	
F- <i>lacZ</i> (lethal)	500 (88)	459 (102)	16	975 (190)
P- <i>lacZ</i> (lethal)	50 (7)	63 (10)	4	117 (17)

図2 脳の特定の神経細胞が標識される系統の一例



ショウジョウバエ脳の発生における *engrailed* 遺伝子の発現

浜 千尋, 小宮 透, 星野幹雄

発生生物学におけるショウジョウバエの研究の意義は、特に発生の分子機構の解明において増大している。このことは、数多くの突然変異体の分離に基づいた遺伝的な解析が、分子生物学的な解析へと技術的に結びつけられるようになったからである。体節形成機構の研究はこの代表例であり、ほとんど全ての分節遺伝子が同定されたのにひき続き次々とクローニングされ、その分子生物学的な研究が精力的に進められている。さらにこれらの遺伝子をプローブとして数多くの類似した遺伝子が人間を含めた脊椎動物にも見いだされており、ショウジョウバエの研究によって得られた知見が広く生物一般の問題として敷衍されることが実証されてきている。

脳の研究は、生物学の重要な問題のひとつであるが、ショウジョウバエにおいても遺伝子レベルでの解析は未だ進んでいない。われわれは脳の発生機構を明らかにするために、分節遺伝子のひとつである *engrailed* 遺伝子の発現パターン及び発現調節を抗 *engrailed* 抗体を用いて染色することにより解析した。

## 結果及び考察

ショウジョウバエの脳は、産卵後約4時間の胚に最初の発生が認められるが、既にこの時期に *engrailed* 遺伝子は脳予定域での発現を始める。さらに発生が進むと、頭部神経芽細胞は分裂し移動するが、それに伴い *engrailed* 陽性細胞も数を増し、10時間胚では既に形態的に明瞭な脳半球を横切るようになる。この主な発現領域の他に前後にひとつずつ、計3つの細胞集団が脳で産卵後10時間までに *engrailed* を発現するようになる。以後、幼虫を経て蛹の時期まで同様な3つの細胞集団が *engrailed* 陽性であることから、*engrailed* 遺伝子の発現パターンは胚後期に確立していると考えられる。もともと *engrailed* 遺伝子は、胸腹部表皮及び腹部神経節で縞模様状に発現し、体節形成に必須な機能を持つことが知られている。それでは、脳における *engrailed* の発現は、果して、この縞模様状の発現と同じ制御機構によって調節されているのだろうか。このことを調べるために、*engrailed* 遺伝子の縞模様状の発現を調節する他の分節遺伝子 *hairy*, *fushi tarazu*, *odd paired*, *paired*, *odd skipped*, *patched*, *naked* の変異株胚の脳での *engrailed* の発現を調べたところ、いずれも変化は認められなかった。即ち、このことは脳での *engrailed* の発現は異なった調節機構

によって支配され、また脳の発生は繰り返し構造を持つ腹部神経節の発生とは独立な制御機構を持つことを示している。ただし、分節遺伝子のひとつ *wingless* の活性は *engrailed* の脳での初期発現に必要なことが見いだされた。

この脳での異なる発現制御機構の存在は、シス因子の解析によっても示された。すなわち、種々長さの異なる *engrailed* 遺伝子の上流配列を大腸菌の *lacZ* 遺伝子に接続した融合遺伝子を用いてショウジョウバエの形質転換体を作製して、その *lacZ* 遺伝子の胚における発現分布を調べたところ、7.5kbの上流配列を持つ形質転換体では表皮および腹部神経節で縞模様状の発現が観察されたが、脳での発現は認められなかった。従って、脳での発現に必要な独立なシス因子が存在することになる。興味深いことに、本研究で用いられた抗体は脊椎動物や環形動物の中樞神経系の一部を特異的に染めることから、*engrailed* の機能は進化的にもともと中樞神経系の形成に関与することが示唆されていた。ショウジョウバエの脳での発現に必要なシス因子の存在はこの考えと一致しており、進化の過程で、表皮及び腹部神経節での発現に必要なシス因子が後から付加したものと推定できる。

現在のところ、*engrailed* 変異株胚における脳の形態異常が明瞭に検出されていないために、*engrailed* 遺伝子の胚の脳発生における役割は明らかでない。しかし、成虫脳ではモザイク解析により *engrailed* がその形態形成に関与していることが報告されている。そこで、成虫へと発生する過程の、蛹の脳における *engrailed* の発現を調べてみると、3対の細胞集団が陽性だった。表皮における機能から類推すると、*engrailed* がそれらの細胞集団にコンパートメントとしての特性を付与し、*engrailed* 陰性の細胞との混合を妨げながら脳の構造形成に関与しているのであろう。現在、陽性細胞から伸びる神経繊維の位置を同定することにより、脳の発生と構造の特徴を調べている。

## 14. モデル動物開発部

### 1. 研究部一年のあゆみ

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技術を応用して人為的に疾患モデル動物を作成することを目的としている。

研究室の設備は、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月の施設開所以来、待望の動物実験が可能となり、現在活発な研究が行われている。

研究部は3室で構成される。動物遺伝解析室は花岡和則室長により、発生工学的技術を用いた疾患モデルマウスの作出が試みられている。モデル動物診断室は田口文広室長により、ウイルス感染症、特にマウス肝炎ウイルスの向神経性の本体が分子生物学的に解析されている。動物生産室は欠員であったが、当部の流動研究員で、(財)実中研より派遣されていた松崎哲也が7月1日付で採用となった。当人は、かねて申請中の共同利用部門の実験動物管理室の開設に伴い、平成2年1月1日付で実験動物管理室長へ転出し、施設の実験動物の維持管理に当ることとなった。また、対外的には、菊池は、11月28、29日の両日第6回日本疾患モデル動物研究会総会、東京大会の大会幹事を務めた。大会は約300名の参加の下に盛会に行われ、我が国で開発された種々の疾患モデル動物の発表が活発に行われた。

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(6月末まで)、池田敏男(東京大学農)の兩名である。賃金研究員としては、胚操作の研究に花岡美智子、組織形態学研究に守屋弘美(12月退職)が活躍している。また、松井京子が、ミュータントの脳内NGFの研究に当たった(平成元年1月より3ヶ月間)。実験助手として志鎌昌子(旧姓中村)、梶谷美代子、平野弘美、梅田道子、田岸敦子が研究を支えた。

その他、併任研究員は山内一也(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)、渋谷 徹(食薬センター)、研究生は山崎一斗(エーザイ)、矢野剛美(東京大学農)、水谷 誠(日生研)、小林明子(麻布大)の諸氏に研究を応援して頂いた(以上所属略称)。

(部長 菊池建機)

## 2. 研究業績

## A. 論文

## a. 原著

- 1) Yoden S, Kikuchi T, Siddell S, Taguchi F:  
Expression of the peplomer glycoprotein of murine coronavirus JHM using a baculovirus vector  
Virology 173:615-623, 1989
- 2) Yamazaki K, Moriya H, Wakabayashi T, Kikuchi T:  
Substance P - like immunoreactivity in the gracile nucleus and fasciculus in old mice  
Neurosci Lett 106: 258-260, 1989
- 3) Mukoyama, M, Yamazaki K, Kikuchi T, Tomita T:  
Neuropathology of gracile axonal dystrophy (GAD) mouse - An animal model of central distal axonopathy in primary sensory neurons  
Acta Neuropathol 79 : 294-299, 1989
- 4) Yamazaki K, Mukoyama M, Kikuchi T, Sakakibara A, Tomita T:  
Effects of dietary vitamin E supplement on gracile axonal dystrophy (gad) mice  
Exp Anim 38: 195-200, 1989
- 5) Cavanagh D, Brian DA, Enjuanes L, Holmes KV, Lai MMC, Laude H, Siddell SG, Taguchi F, Talbot PJ:  
Report of study group. Recommendation of the coronavirus study group for the nomenclature of the structural proteins, mRNAs, and genes of coronaviruses  
Virology 176:306-307, 1990
- 6) 菊池建機, 守屋弘美 :  
ミエリン形成異常ハツカネズミ (hus) の神経病理学的研究  
医学と生物学 118:363-367, 1989

## c. 総説

- 1) 花岡和則 :  
キメラ胚における奇形腫細胞の分化  
Human Cell 2 :375-381, 1990

## II 研究業績

### 2) 花岡和則 :

脳とキメラ

蛋白質・核酸・酵素 35 :1197-1205, 1990

### d. 班会議報告書

#### 1) 菊池建機, 守屋弘美, 松崎哲也, 石浦章一, 水谷 誠 :

糖原病Ⅱ型ウズラ骨格筋の病理組織学的検討

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モデル動物の開発に関する研究班

昭和63年度研究報告書 P7-11, 1989

#### 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・筋ジストロフィー症及び関連疾患モデル動物の開発に関する研究

昭和63年度研究報告書 p3-6, 1989

#### 3) 菊池建機, 余田 明, 田口文広 :

バキュロウイルスベクターによって産出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

昭和63年度研究報告書 p27-31, 1989

#### 4) 菊池建機, 守屋弘美, 菊池和弘, 信永利馬, 御子柴克彦 :

ミエリン形成異常マウス (hus) の神経病理学的研究

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年度研究報告書 p67-71, 1989

#### 5) 菊池建機, 長浜嘉孝, 榊 桂之, 及川胤昭, 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

長寿関連基礎科学研究班 (第一分野)

昭和63年度研究報告書 p362-372, 1989

#### 6) 田口文広 :

マウス肝炎ウイルスJHM株のラットに対する神経病原性

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, 1989

#### 7) 加藤秀樹, 江崎孝三郎, 菊池建機 :

実中研で見出された歩行異常マウスとその遺伝子のマッピング

厚生省特定疾患・難病の疾患モデル調査研究班

昭和63年度研究報告書 p80-85, 1989

e. その他

1) 菊池建機 :

我が国における疾患モデル動物の開発

HS News 5: 36-39 1989

2) 菊池建機 :

第6回日本疾患モデル動物

BIOMedica 5: 98, 1990

3) 菊池建機, 守屋弘美, 松崎哲也, 水谷 誠 :

糖尿病Ⅱ型ウズラ骨格筋の酵素組織化学的検討

日疾動録 5:95, 1989

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 菊池建機 :

発生工学を応用したライフサイエンス研究用実験動物の開発

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成果シンポジウム, 東京, 1. 24, 1989

2) 菊池建機 :

胚および遺伝子操作による実験動物の開発

愛知県発達障害研究所セミナー, 春日井, 3. 6, 1989

3) 田口文広 :

コロナウイルスの分子生物学

第109回日本獣医学会微生物分科会, 東京, 3. 31, 1990

b. 国際学会

1) Taguchi F, Yoden S, Siddell S:

Expression of the spike proteins of murine coronavirus JHM using baculovirus vector

4th International Symposium on Coronaviruses, Cambridge, July 16-21, 1989



## II 研究業績

### 2) Hanaoka K:

Use of a transgene as a cellular marker in chimeric mice

US-Japan cooperative program for recombinant DNA research

11th workshop on transgenic animals Hawaii, April 2-3, 1990

### C. 一般学会

#### 1) 向山昌邦, 山崎一斗, 菊池建機, 富田武 :

遺伝性脊髄Goll索変性 (GAD) マウスの病巣進展に関する研究

第30回日本神経病理学会総会, 東京、6. 22, 1989

#### 2) 松原 豊, 渡辺里仁, 田口文広 :

コロナウイルスJHM変異株のラットに対する神経病原性について

第37回日本ウイルス学会総会, 大阪、10. 31, 1989

#### 3) 池田敏男, 矢野剛美, 田口文広 :

マウス肝炎ウイルスMHV-S持続感染細胞より分離された変異株の性状について

第37回日本ウイルス学会総会, 大阪, 10. 31, 1989

#### 4) 花岡和則, 早坂美智子, 植月太一, 藤沢淳子, 鍋島陽一 :

外来遺伝子導入による胚細胞の標識化

第12回日本分子生物学会総会, 仙台, 11. 29, 1989

#### 5) 菊池建機, 守屋弘美, 菊地和弘, 信永利馬 :

hula sendai (hus) マウスの神経病理学的研究

第36回日本実験動物学会総会, 東京, 5. 29, 1989

#### 6) 花岡和則 :

キメラ胚における奇形腫細胞の分化

第2回ヒト細胞研究会 東京, 8. 31, 1989

#### 7) 松井京子, 古川昭栄, 柴崎 浩, 菊池建機 :

遺伝性運動失調マウスの脳内NGFレベルについて

第6回日本疾患モデル動物研究総会, 東京, 11. 28, 1989

#### 8) 山崎一斗, 守屋弘美, 若林康夫, 菊池建機 :

GAD (gracile axonal dystrophy) マウスの上行性知覚神経路における Spheroid の分布

第6回日本疾患モデル動物研究総会, 東京, 11. 28, 1989

## C. 班会議発表

- 1) 菊池建機, 守屋弘美 :  
mdxマウス骨格筋の除神経について  
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, 東京, 12. 12, 1989
- 2) 向山昌邦, 山崎一斗, 菊池建機, 富田 武 :  
gracile axonal dystrophy (GAD) マウスの病変発現機序ー各種ビタミンの血中および臓器内濃度についてー  
厚生省精神・神経疾患・ニューロパチーの臨床と病態に関する研究班, 東京, 1. 13, 1990
- 3) 田口文広, 菊池建機 :  
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  
ヒューマンサイエンス基礎研究事業・発生工学を応用したライフサイエンス研究用実験動物の開発班, 東京, 1. 18, 1990
- 4) 山崎一斗, 守屋弘美, 菊池建機, 若林康夫 :  
GAD (Gracile axonal dystrophy) マウスの遺伝学及び病理学的研究ヒューマンサイエンス基礎研究事業・発生工学を応用したライフサイエンス研究用実験動物の開発班, 東京, 1. 18, 1990
- 5) 柴崎 浩, 小田健一郎, 三浦裕之, 菊池建機 :  
GAD (Gracile Axonal Dystrophy) マウス : central and peripheral distal axonopathy モデル  
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. 20, 1990
- 6) 花岡和則 :  
キメラマウス作成による疾患モデル動物の開発  
文部省重点領域研究・遺伝子導入動物班, 東京, 9. 20, 1989
- 7) 花岡和則 :  
外来遺伝子の導入による細胞の標識化及びそれを利用したキメラマウス解析技術の確立  
文部省重点領域研究神経回路形成の分子機構班, 東京, 11. 13, 1989
- 8) 花岡和則 :  
胚幹細胞の維持操作技術の研究,  
科学技術振興調整費総合研究・発生工学的技術の開発等に関する研究班, 箱根, 3. 23, 1990
- 9) 田口文広, 松原 豊 :  
マウスコロナウイルスJHM変異株のラットに対する神経病原性について

## II 研究業績

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. 20, 1990

10) 池田敏男, 矢野剛美, 田口文広, 菊池建機 :

神経親和性マウスコロナウイルスのスパイク蛋白質遺伝子の構造解析

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，  
東京，1. 25, 1990

11) 古川昭栄, 松井京子, 柴崎 浩, 菊池建機 :

遺伝性運動失調マウスの脳内NGFレベル

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. 17,  
1990

## 3. 主な研究報告

## 筋ジストロフィーマウス (mdx) 骨格筋の除神経とその病変に及ぼす影響

菊池建機, 守屋弘美, 埜中征哉\*

神経は筋線維の収縮機能のみならず, その分化や, 成長に重要な役割を持つ。神経作用を除去することは, 筋の収縮弛緩を停止し, 細胞をより未分化なステージへと移行させる。mdx マウス骨格筋にみられる筋線維の壊死は, 生後ある日齢に達してから急に顕著となる。本研究は, 筋線維壊死の起こる前(生後14日)に座骨神経を切断し, その効果が筋線維の組織病変, とりわけ, 変性壊死, 再生筋線維の出現等にどのような影響を与えるかを検討したものである。

## 実験材料および方法

実験に供した動物は, 正常対照マウス (C57BL/10-ScSn: B10と略) とX染色体劣性筋ジストロフィーマウス (C57BL/10-ScSn-mdx と略) であり, いずれも雄獣である。生後14日に座骨神経を0.5-1.0cm切除し, 術後7日, 14日目に筋を採取した。全例とも, 麻酔下で10%中性ホルマリンの全身灌流により固定し, 2, 3日後に術側(右), 無処理対照側(左)の前脛骨筋(TA), 長趾伸筋(EDL), ヒラメ筋(SO)を採取し重量測定後, 筋腹横断面を観察できるようパラフィンに包埋した。

## 実験結果と考察

## 1) 筋線維横断面積の変化

筋比体重値はTA筋, EDL筋, SO筋いずれも座骨神経切断後無処理筋の値に比して有意に低くなり, 除神経による筋萎縮が顕著である。mdx および BIO マウスの3種の筋線維横断面積( $\mu\text{m}^2$ )の術後変化は, 筋重量, 筋比体重値に並行する。無処理側の筋線維面積を比較すると, いずれの筋も正常 BIO マウスのものが高い値を示す。値は, 術後7日(生後21日), 14日(生後28日)と成長に伴い増加するが, 手術側の筋は除神経萎縮によりその増加は抑制される。BIO マウスにみられるこのような値の推移は, mdx マウスではみられない。無処理側のTA筋, EDL筋における線維面積は日齢とともに増加するが, SOL筋では逆に減少している。除神経により筋線維の成長は抑制されるが, 正常マウスにみられるような術後日齢を追った増加は必ずしもみられない。

## 2) 筋線維の壊死, 再生

座骨神経切断により, 術後7日, 14日に筋萎縮が認められる。除神経効果は, 筋内末梢神経枝に骨髄や軸索の消失により確認でき, 術後7日で十分な効果を見る。mdx マウス筋は無処理側で生後21日, 28日と次第に群性線維壊死叢, 小型円形細胞の増殖, 筋線維の再生を認める。一方, 除神経側の筋は, 全ての筋線維に一樣な萎縮をみるが, それらの形態や, 筋束の構築は正常に保たれており, 無処理側にみられる広範な筋線維壊死, 再生像は全くみられない。mdx マウス除神経筋と正常マウス除神経筋の間に顕著な組織学的差は認めない(図-1)。

本研究は, mdx マウス骨格筋の筋線維の変性壊死は除神経により防がれること, またこのような除神経筋に中心核線維が殆どみられないことを明らかにした。このことは, 筋線維の壊死崩壊と中心核を有する再生線維の形成が密接に関連していることを示している。神経作用を除くことによりなぜ筋線維の崩壊が抑えられたかは明らかではないが, 運動を停止することにより筋線維, とりわけその膜系への物理的な衝撃や力の負荷が減じたためか, または, 未熟な状態へ移行した萎縮筋線維に欠損蛋白質を補うような別の蛋白質(要因)が合成されたためか, などいくつかの可能性が考えられる。

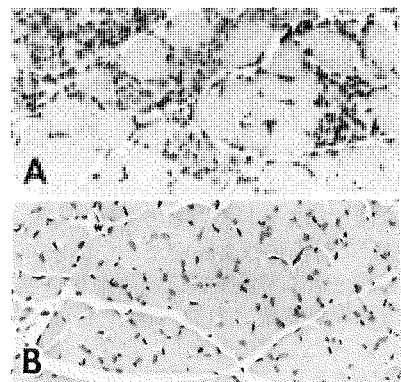


図-1 除神経後14日(生後28日)の筋ジストロフィーmdx前脛骨筋の組織所見。無処理側(A), 手術側(B), 除神経された筋には筋線維壊死, 再生がみられない。

Bar 50  $\mu\text{m}$

\* 微細構造研究部

マウスの上行性知覚神経路薄束および薄束核における  
Substance P の加齢による免疫組織化学的变化

山崎一斗\*, 守屋弘美, 若林康夫\*, 菊池建機

延髄薄束核 (Goll核) と脊髄後索の薄束 (Goll束) の神経軸索終末や軸索にみられる変性腫張 (Spheroid) がマウス, ラット, ヒトの中樞神経の老化 (aging) と関連していることが報告されている。中樞神経系におけるこれらの領域は, 脊髄神経節細胞の上行性知覚神経路として知られ, 主に後肢の末梢側の筋紡錘や腱に反対側の終末部を有している。

Spheroid 形成が神経ペプチドの一つである Cholecystokinin (CCK) の軸索内含有量の増加と関連することが知られているが, 今回知覚神経のもう一つのペプチドとして知られる Substance P (SP) に着目し, その免疫反応 (SPI) がマウスの老化に伴う軸索変性とどのように関連しているかを調べた。

材料と方法

3カ月齢の BALB/c 雄マウスを大村実験動物より購入し, エーザイ筑波研究所で飼育した。飼育条件は, 温度 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 湿度 $55 \pm 5\%$ , 12時間照明 (午前7時点灯) のコンベンショナルで, CE-2固形飼料 (日本クレア) と殺菌水を自由摂取させた。検査年齢は3カ月, 6カ月及び13カ月である。ペントバルビタール麻酔下 ( $45\text{mg}/\text{kg b. w. i. p.}$ ) のマウスの左心室より, 4%パラホルムアルデヒド緩衝液 (pH7.4) を灌流して固定した。固定後, 脳脊髄をとりだし, パラフィンに包埋した。厚さ  $6 \mu\text{m}$  の環状断面切片を作製し, PAP 法のキット (Histogen, BioGenex Lab., U. S. A.) を用いて染色した。第一抗体はウサギ抗 SP 抗体 (BioGenex Lab., U. S. A.) を使った。連続切片を別に, HE あるいは Klüver-Barrera 染色し病理を検索した。

結果と考察

今回調べたすべてのマウスの, 頸 (C3), 胸 (T8), 腰 (L2) 髄の後角にサブスタンスP様免疫反応 (Substance P-like Immunoreactivity 以下SPI) がみられた。3カ月及び6カ月齢マウスの脊髄前側, 後索には反応はなかった。しかし13カ月齢マウスの脊髄後索の薄束及び延髄薄束核に強い SPI を有する軸索が観察された (図-1)。このSPIは薄束核にもっとも密に分布し, 以下, 頸, 胸, 腰髄の薄束の順である。延髄楔状束核及び脊髄後索の楔状束に反応はなかった。

薄束の一部は, 脊髄後根神経節から伸びる軸索か

ら成る。従って, 薄束核と薄束において SPI を有する軸索の出現する原因として, (1) SP の軸索内輸送の異常, (2) 脊髄後根神経節細胞における SP 合成の亢進あるいは分解の低下, が挙げられる。

13カ月齢マウスの薄束核のみに, SPI に加えて spheroid が観察され, いくつかの spheroid は SPI を有していた。spheroid の成因として軸索内輸送の停滞が報告されている。よって, 薄束核及び薄束における SPI の出現は軸索内輸送の局所的停滞が原因である可能性がある。さらにこの SPI の蓄積は, spheroid 生成と同様, 中樞神経系の老化に伴う変化であることが示唆される。

要 約

サブスタンスP様免疫反応が, 13カ月齢マウスの延髄薄束核と脊髄薄束を構成する軸索内に観察された。一方, 3カ月及び6カ月齢のマウスにはみられなかった。薄束系を構成する軸索内におけるSPの蓄積は, 中樞神経系の老化に伴う現象の1つであることが示唆された。

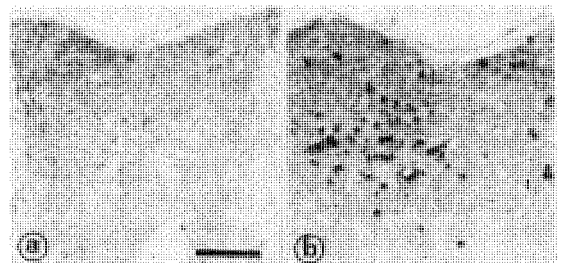


図-1 3カ月齢 (a), 13カ月齢 (b) マウスの頸髄後索, 特に薄束における Substance P の免疫組織化学的所見。Bar  $50 \mu\text{m}$

\* エーザイ (株) 筑波研究所

## キメラマウス解析のためのトランスジェニックマウスの作成

花岡和則, 早坂美智子, 植月太一, 藤沢淳子, 鍋島陽一

発生過程における細胞間相互作用や遺伝子発現を解析するために、実験的に作成したキメラ動物を利用するという方法は、生物学における伝統的な手法の一つとして古くから様々な動物を用いて研究が行われてきた。キメラ動物の詳細な解析のためには、キメラ個体を構成する2種類の遺伝的に異なった細胞群を明瞭に同定することが必要である。

マウス胚を用いたキメラの実験系は、1) 近交系が多数作成されており、その遺伝的背景についての情報量が多いこと、2) 比較的容易にキメラ胚を動物個体にまで発生させることができること、3) 奇形腫細胞や胚幹細胞など培養可能な多能性全能細胞株を利用できることなど、他の動物種にない特徴がある反面、キメラを組織レベルで解析することのできる遺伝的マーカーが知られていないことが問題点として残されていた。我々は、以上の問題点を解決するための一つの方法として、個体のあらゆる細胞で普遍的に発現する外来遺伝子を胚幹細胞株やマウス受精卵に導入することにより細胞を標識化することを目的として研究を行った。

## 方 法

導入に用いた遺伝子は、動物細胞で普遍的に発現していると予想されるヒトペプチド鎖伸展因子 (EFl $\alpha$ ) のプロモーター領域にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を連結したものである。この遺伝子を含むプラスミド (P321CAT) を、胚幹細胞に対しては磷酸カルシウム法により、マウス胚に対しては顕微注入法によりそれぞれ導入した。

組織レベルでの CAT 活性の検出は、抗 CAT 血清を用いた免疫組織学的方法を用いた。

## 結 果

1) まず最初に、奇形腫細胞や胚幹細胞における本プラスミドの発現を調べた。

transient expression assay では、調べた未分化細胞株ではすべて強い CAT 活性が検出され、本プラスミドによるマウス細胞の標識化の可能性が示唆された。

2) 個体再構成能を持つ胚幹細胞株 EKCPI に本プラスミドを導入し、transformant 細胞株を樹立した。得られた細胞株のうちの過半数の細胞株では、未分化幹細胞及びレチノイン酸処理により分化した細胞で高い CAT 活性が発現されてい

た。これらの細胞株を用いてマウス胚とのキメラを作成し、キメラ胚の発生過程での発現を免疫組織学的に検出した。多数のキメラ胚の解析により、本プラスミドがあらゆる組織で発現していることを示唆する結果が得られた。

3) 以上の結果をもとに、本プラスミドをマウス胚に注入し、トランスジェニックマウスの作成を試みた。誕生したマウスのなかに、特に強く CAT 活性が発現している個体が認められた。このマウスの子孫を用いて詳しく解析したところ、調べた全ての組織において強い CAT 活性が認められ、また発生過程においても普遍的に発現していることが判明した。これらのトランスジェニックマウスは、発生過程での異常も認められていない。これらのマウスはキメラや移植を利用した研究に、きわめて有用であると考えられる。

## 神経親和性マウスコロナウイルスのスパイク蛋白遺伝子の構造解析

池田敏男, 矢野剛美, 田口文広

マウス肝炎ウイルス JHM 株は、ラットに対して高い神経病原性を示し、急性脳脊髄炎や亜急性の脱髄性脳脊髄炎を引き起こすことが知られている。我々は、ウイルスの病原性に関与する因子として、ウイルス粒子表面に存在するS蛋白に注目して実験を行ってきた。今回は、神経病原性を分子レベルで解析する目的で、ラットに対して神経病原性の高い JHM 変異株 c1-2 のS蛋白遺伝子の cDNA を作成し、その塩基配列を決定した。

## 結 果

単離した c1-2 のS遺伝子の ORF は4128bp であり、1375アミノ酸をレコードしていることが明らかになった。これまで既に報告されている JHM 親株のS遺伝子と比較すると423bpの挿入配列が5'側の約1.5kbの位置に認められた。塩基配列から予想される蛋白の構造は、分子量約150キロダルトンの膜蛋白であり、N末端に15個の疎水性アミノ酸よりなるシグナルペプチドが存在していた。アミノ酸769番目と770番目の間にはプロテアーゼによるクリーページサイトが存在し、C末端には28個の疎水性アミノ酸からなる細胞膜貫通部位がみとめられた。また糖鎖の付加が可能な部位が21カ所存在していた。挿入領域を除いた非病原性 JHM 株とのホモロジーは、98.9%であった。クリーページサイトの前後(N末側:S1, 9OB, C末側:S2, 9OA)にくぎってアミノ酸を比較すると、各々、98.6%, 99.3%のアミノ酸が一致しており、N末端側の変異がC末端と比較して若干大きいことが示された。また2種類の配列間で異なっているアミノ酸が顕著なクラスターを形成している領域は見いだせなかったが、異なっている3, 4個のアミノ酸が数個のアミノ酸をはさんで連続している部分は存在していた。

我々は今回の実験で神経病原性を持つ JHM 変異株 c1-2 株のS遺伝子をクローニングし、現在までに報告されている非神経病原性株のS遺伝子と構造を比較することにより神経病原性を決定している領域を推定することを試みた。

その結果、非病原性 sp-4 のS遺伝子(JHM親株のS遺伝子)と比較して大きく異なる点は、c1-2 には、423塩基(アミノ酸141個)の挿入部位が存在することであった。このことは、アミノ酸141個の挿入部位がラットに対する神経病原性を規定するドメインである可能性を示唆している。しかしながら、

c1-2 にみとめられた様な141個アミノ酸とほぼ同様の挿入部位を持つ DL 変異株では、ラットに対する神経病原性が c1-2 程高くないことから、141個のアミノ酸の中でみられる c1-2 と DL の2-3個のアミノ酸の相違が神経病原性に関与する可能性も否定できない。これらの問題を解決するためには、S遺伝子の組換えウイルスを作成し、病原性を検討することが必要と思われる。

現在までに、JHM 変異株で塩基配列が決定されているものの中で、c1-2 のS遺伝子は、MHV-4, DL 株とともに最大であるがその他の多くの変異株は、c1-2 S 蛋白400-600番目の間に大小さまざまな欠損を有することが報告されている。S蛋白のこの部位以外での欠損株は、まだ見つかっておらず、この部位が、変異及び欠損のホットスポットであろうと考えられている。このことは、JHM 株の神経病原性が多様でありウイルス継代により容易に神経病原性が変化することなどと考え合わせると、この領域が神経病原性に何等かの形で関わっていることが強く示唆される。今後これらの変異株についてラットに対する神経病原性を詳しく検討していく必要がある。

## 15. 実験動物管理室

### 1. 管理室一年のあゆみ

実験動物管理室は、平成元年10月1日付で発足し、杉田秀夫神経研究所所長（事務取扱）が12月31日迄指揮をとられた。翌年平成2年1月1日付で管理室長が配属された。

当管理室では、実験動物研究施設管理運営委員会（委員長：杉田所長）で討議された事項を、所長より専任された管理部門補佐3名および飼育技術者（派遣社員）8名と共に、実験動物研究施設（一般飼育ゾーン、SPF実験飼育ゾーン、感染実験飼育ゾーン）の実務管理にあたっている。

本年度は実験動物研究施設の利用登録者（125名）の増加に伴って、飼育スペースの拡充を計った。特に、2階飼育ゾーンの孵卵室、育雛室、ニワトリ室、ウサギ・モルモット室、飼料室をマウス、ラット用飼育室に改修し、利用出来るようにした。これにより、一般飼育スペースは従来からの2倍に拡充された。なお、1階飼育ゾーンにニワトリ・ウズラ飼育室、ウサギ・モルモット飼育室を設置した。

施設整備としては、SPF実験飼育ゾーンにマイクロマニピレータ等の共通胚操作関連実験機器やクリーンラック等の飼育器具器材、2階一般飼育室の器具器材の整備等を行った。また、1階の器材室を実験室として改修し、微生物モニタリングや系統動物の受精卵凍結保存等バイオセフティーキャビネットやインキュベータ、液体窒素タンク等を整備した。

管理室では、実験動物研究施設で行われる動物実験が適切に且つ円滑に行えるよう動物の飼育管理、器具器材の整備、更に環境統御や病原微生物を統御し、動物実験が常に再現性のある結果が得られるよう、研究の質的向上を計ると共に、神経・筋疾患動物の系統維持や生産供給を行う等の研究支援を行ってゆく予定である。

（室長 松崎哲也）



II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Matsuzaki T. Yasuda Y. Nonaka S.  
The Genetics of Coat Colors in the Mongolian Gerbil (Meriones unguiculatus)  
Exp. Anim. 38 : 337-341, 1989
- 2) Suzuki S. Nishida T. Matsuzaki T. Nishinakagawa H. Otsuka J.  
Fine Structure of the Mandibular Gland in Crest-tailed Marsupial-rat (Dasyuroides byrnei)  
Exp. Anim. 39 : 55-62, 1990
- 3) Kurohmaru M. Nishida T. Hayashi Y. Yamashiro S. Matsuzaki T.  
An Ultrastructural Study of Developing Spermatids and Associated Sertoli Cells during  
Spermiogenesis in the Kowari (Crest-tailed Marsupial Rat) Dasyuroides byrnei  
Okajimas Folia Anat. Jan. 66 : 393-404, 1990

---

### III 中央施設および委員会

---



## I 実験動物研究施設

施設は昭和62年4月16日に開所し、一部未整備のままであったが動物実験を開始し、本年度末で満3年目を迎える。実験動物研究施設管理委員会（以下動物委員会と略）は昨年度経験したセンダイウイルス（HVJ）の感染事故の再発を防ぐため、従来の管理規約や、施設の利用法を見直し、施設の適切な管理運営を計るための〔実験動物研究施設管理運営規約〕、実験動物の飼育管理を円滑に、かつ倫理的、科学的に行なうための〔実験動物研究施設の運営に関する規則〕をそれぞれ作成し実行に移した。

施設三階のSPF動物飼育領域は、組換えDNA実験指針の規制を受ける動物実験や、発生工学的手法を用いた動物実験を行なうゾーンとなり、〔SPF実験ゾーン運営規約〕の下に実験が開始された。また、同階の感染実験ゾーンは、すでに神経研究所の定めた病原体等安全運営規程や感染実験安全運営規則に従い実験を開始していたが、あらためて、ゾーン内の実験を円滑に行ない、かつ安全を確保するため、〔感染実験ゾーン運営規約〕を作成した。これらのゾーンの利用者は、それぞれの小委員会で安全管理に関する事項や、利用者の要望等を討議し、その結果を動物委員会へ報告することとなった。

施設の整備は、昨年度積み残しのSPF実験ゾーンの2飼育室と一般飼育室1室へクリーンラックが設置され、その他予備ケージ、流し台、自記記録温湿度計等の補充とSPF実験ゾーンへマイクロマニピュレーター1式を購入した。動物委員会は、新しいタイプの動物実験への対応や、利用者の施設内への出入りに関する諸問題、施設外での動物実験や感染実験の在り方等きめ細かい討議を重ねてきた。また、新研究棟建設に伴う施設内研究部門の移転と、その後の施設の利用法について、中、長期的計画の立案を急いでいる。

人事の面では、かねて申請中の実験動物管理室が10月1日付で発足の運びとなり、共同利用部門の実験動物管理室長として、モデル動物開発部・動物生産室長であった松崎哲也が発令された。施設は、ここに内部整備の峠を越え、人的にも一つの核を得て、研究者と動物飼育管理者が一体となって、新たな発展期を迎えようとしている。

（実験動物研究施設管理委員会委員長補佐 菊池建機）

## II RI研究施設

RI研究施設の1989年度の主な出来事は次の4点である。

- 1) 施設の拡充のためにバイオイメージアナライザー（フジフィルム）、超遠心分離機（ベックマン）1式、クイックカウント1台を購入した。イメージアナライザーはこれまでの方法に較べて極めて感度が高く、定量性にも優れているので研究のスピードアップに威力を発揮している。
- 2) 昨年度採用したRI研究施設の専任職員が退職した。採用当初より、雇用条件に問題があったことも

### Ⅲ 中央施設

あり、今回の事態を今後のRI研究施設の運営に活かすようにしなければならない。

3) RI管理室長の新設を申請していたところ、1990年10月より、認められる予定である。新研究棟の建設に伴いRI研究施設の拡充を計画しており、活躍を期待したい。

4) DNAを対象とした研究が多くなったこともあり、<sup>32</sup>Pの使用量が急速に増大したが、幸い、年間最大使用量を超えずにすんだ。新研究棟が完成すれば大幅に使用量を増やすことができるので、それまで研究に支障をきたさないように運営できればと願っている。

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なる。各方面の協力をお願いしたい。

(RI委員会委員長 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H7000、H600、H700、走査型として日立S700、S430である。最も新しいH7000は、簡便で操作性に優れ、初心者用に頻回に利用され、電顕写真の撮影枚数も10000枚を超過した。時期によっては利用待ちの状況の為、操作に慣れた数人に、H600の利用を勧めるも、操作性の難易度に差がある為、H600の利用者は少ない。H7000と同時に搬入されたライヘルツ社のマイクロームも、その性能が高く評価され、利用者が多く、夜間、休日にも利用され、予約待ちの状況である。

#### 2) 運営

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10000倍の撮影が日中は困難である。

旧材種の電子顕微鏡は、利用頻度が低いにもかかわらず、部品の寿命による故障が増加し、部品として主要な大型部品の交換を余儀なくされている。

(電顕委員会委員長 埜中征哉)

### Ⅳ 組替えDNA実験安全委員会

安全委員の交代期にあたり、部長会において新委員を選出した。新委員は鍋島遺伝子工学研究部長(委員長)、桜川疾病研究第5部長、中村診断研究部長、高橋疾病研究第6部長、花岡モデル動物開発部長が研究所より選出され、センター運営部より萩原企画室長、外部機関より木村早稲田大学人間科学部教授に委員を依頼した。委員会で互選の結果、遺伝子研究歴の豊富な高橋室長が安全主任者を務めることと

なった。

1990年度の研究計画として42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。固体を宿主とする計画が4部門より、申請され、科学技術庁の承認を得るべく書類を整えているところである。

(委員長 鍋島陽一)

## V 感染実験安全委員会

平成2年3月20日に、第6回感染実験安全委員会が、8委員の出席のもとで開催された。4研究部から申請された18件の研究計画について審議され、一部付帯条件がつけられた上で了承された。この後全ての申請に対して、感染実験安全委員長の実験許可が出された。

(委員長 杉田秀夫)

## VI 研究所本館建築委員会

平成1年度の初め迄に、代謝研究部高坂、診断研究部中村両部長の着任があったため間仕切り等の設計変更の希望を厚生省整備課に申し入れた。またその他の部も設計の進むに従って起こった小さな変更を5～6月に希望した。これらの希望は大筋の設計変更のない範囲において整備課の好意によって殆んどすべて受け入れられ実行に移されることとなった。また昨年、予算の都合により見送りとなったが当初の設計で考えられていた(1)建物外側のタイル張り、(2)研究棟外側の駐車場の舗装、(3)他の建物との間の渡り廊下の屋根、(4)建物、特にRI室の自動制御、(5)その他についての復活は成らず、他の手段によって必要な部分を補充してゆくこととなった。

建築は引き続き佐藤工業の手によって行われ、建物の外壁は機械室などの付随したものを含め平成1年度末までに荒壁状態で完成している。内装も地階から行われ、4階迄は軽金属筋による間仕切りが出来上がった。完成は平成3年度中であると考えられるが、一日も早い完成が待たれる。

(委員長 小沢鏊二郎)

## VII 図書委員会

図書は現在5階の旧動物飼育室の書庫に～1974年迄、事務室横の1階書庫に1975～1987年迄、1988年以降のものは4階図書室に置いてある。5階と1階のものは、鍵を事務室に置き、使用者は所属と氏名、時間を書いて入室することとなっているため、午後5時に事務室の閉室と共に夜間は使用できなくなっている。この点につき夜間も何等かの方法で開室してほしいという声もある。

現在はモノグラフは買わずに雑誌を買い入れることとしている。モノグラフの選択には研究者の個性が

### Ⅲ 中央施設

強く出るため一般性が少ないことと高価なことのためである。従って定期刊行されるYear Bookなどを小数購入しているにとどまっている。

所員は著書を出版するたびに図書室へ一部ずつ寄付することとなった。

図書の整理には専任の人はいないので事務の齋藤洋子が当たっている。

(委員長 小沢鏝二郎)

#### 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 (1986～ ) 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～
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~
52. British Journal of Pharmacology (1968~ ) vol.34~
53. Cancer Research (1968~ ) vol.28~
54. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology (1987~ ) vol.65~



III 中央施設

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 (1968～ ) 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 Neurosciences (1989～ ) vol.1～
96. European Journal of Pharmacology (1967～ ) vol.1～
97. European Neurology (1987～ ) vol.26～
98. Experientia (1968～ ) vol.24～
99. Experimental Brain Research (1966～ ) vol.1～
100. Experimental Cell Biology (1983～ ) vol.51～
101. Experimental Cell Research (1968～ ) vol.49～
102. Experimental Gerontology (1987～ ) vol.22～
103. Experimental Neurology (1959～ ) vol.1～
104. Experimental Pathology (1983～ ) vol.23～
105. FASEB Journal (1987～ ) vol.1～  
改名前の名称 Federation Proceedings of the Federation of American Societies for  
Experimental Biology (1968～1987) vol.27～46
106. FEBS Letters (1968～ ) vol.1～
107. Gene (1986～ ) vol.41～
108. Genes & Development (1987～ ) vol.1～
109. Genetical Research (1987～ ) vol.49～
110. Genetics (1987～ ) vol.115～
111. Genome (1987～ ) vol.29～

112. Genomics (1987~ ) vol.1~
113. GLIA (1988~ ) vol.1~
114. Growth Factors (1989~ ) vol.1~
115. Histochemistry (1983~ ) vol.77~
116. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie, Biological Chemistry (1983~ ) vol.364~
117. Human Genetics (1964~ ) vol.1~
118. Immunochemistry (1964~1974) vol.1~17
119. Immunological Reviews (1987~ ) vol.95~
120. Immunology (1968~ ) vol.14~
121. Immunology Today (1983~ ) vol.4~
122. Infection & Immunity (1970~ ) vol.1~
123. International Archives of Allergy & Applied Immunology (1987~ ) vol.82~
124. International Journal of Biochemistry (1983~ ) vol.15~
125. International Journal of Cancer (1987~ ) vol.39~
126. International Journal of Neuroscience (1983~ ) vol.18~
127. In Vitro (1983~ ) vol.19~
128. Journal of Affective Disorders (1986~ ) vol.10~
129. Journal of American Chemical Society (1968~ ) vol.90~
130. Journal of American College of Neuropsychopharmacology (1987~ ) vol.1~
131. Journal of Anatomy (1967~ ) vol.102~
132. Journal of Biochemistry (1922~ ) vol.1~
133. Journal of Biological Chemistry (1968~ ) vol.243~
134. Journal of Cell Biology (1968~ ) vol.36~
135. Journal of Cell Science (1966~ ) vol.1~
136. Journal of Cellular Physiology (1968~ ) vol.71~
137. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (1981~ ) vol.1~
138. Journal of Chemical Neuroanatomy (1988~ ) vol.1~
139. Journal of Child Neurology (1987~ ) vol.2~
140. Journal of Chromatographic Science (1987~ ) vol.25~

141. Journal of Chromatography (1958～ ) vol.1～
142. Journal of Clinical Investigation (1984～ ) vol.73～
143. Journal of Comparative Neurology (1898～ ) vol.1～
144. Journal of Cyclic Nucleotide & Protein Phosphorylation Research (1987～ )  
vol.12～
145. Journal of Developmental Physiology (1987～ ) vol.9～
146. Journal of Electron Microscopy (1978～ ) vol.27～
147. Journal of Experimental Medicine (1968～ ) vol.127～
148. Journal of Experimental Psychology (1987～ ) vol.13～
149. Journal of Experimental Zoology (1986～ ) vol.237～
150. Journal of General Physiology (1919～ ) vol.1～
151. Journal of General Virology (1986～ ) vol.67～
152. Journal of Heredity (1986～ ) vol.77～
153. Journal of Histochemistry & Cytochemistry (1986～ ) vol.16～
154. Journal of Immunological Methods (1971～ ) vol.1～
155. Journal of Immunology (1968～ ) vol.100～
156. Journal of Inherited Metabolic Disease (1978～ ) vol.1～
155. Journal of Lipid Research (1968～ ) vol.9～
158. Journal of Magnetic Resonance (1969～ ) vol.1～
159. Journal of Medical Genetics (1987～ ) vol.24～
160. Journal of Membrane Biology (1969～ ) vol.1～
161. Journal of Mental Deficiency Research (1957～ ) vol.1～
162. Journal of Molecular Biology (1969～ ) vol.39～
163. Journal of Morphology (1983～ ) vol.175～
164. Journal of Muscle Research & Cell Motility (1983～ ) vol.4～
165. Journal of National Cancer Institute (1987～ ) vol.78～
166. Journal of Neural Transmission (1968～ ) vol.31～
167. Journal of Neurobiology (1983～ ) vol.14～
168. Journal of Neurochemistry (1968～ ) vol.15～
169. Journal of Neurocytology (1983～ ) vol.12～

Ⅲ 中央施設

170. Journal of Neurogenetics (1983～ ) vol.1～
171. Journal of Neuroimmunology (1981～ ) vol.1～
172. Journal of Neurology,Neurosurgery & Psychiatry (1926～ ) vol.1～
173. Journal of Neurological Sciences (1964～ ) vol.1～
174. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology (1987～ ) vol.46～
175. Journal of Neurophysiology (1938～ ) vol.1～
176. Journal of Neuroscience (1986～ ) vol.6～
177. Journal of Neuroscience Methods (1979～ ) vol.1～
178. Journal of Neuroscience Research (1983～ ) vol.9～
179. Journal of Pathology (1983～ ) vol.139～
180. Journal of Pediatrics (1968～ ) vol.72～
181. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics (1967～ ) vol.156～
182. Journal of Pharmacy & Phamacology (1987～ ) vol.39～
183. Journal of Physiology (1968～ ) vol.194～
184. Journal of Tissue Culture Methods (1983～ ) vol.8～
185. Journal of Toxicology : Toxin Reviews (1987～ ) vol.6～
186. Journal of Ultrastructure Research & Molecular Structure Research (1968～ )  
vol.22～
187. Journal of Virology (1967～ ) vol.1～
188. Laboratory Animal (1986～ ) vol.20～
189. Laboratory Animal Science (1986～ ) vol.36～
190. Laboratory Investigation (1968～ ) vol.18～
191. Lancet (1968～ )
192. Life Science (1968～ ) vol.7～
193. Lipids (1966～ ) vol.1～
194. MATRIX (1989～ ) vol.9～
195. Membrane Biochemistry (1987～ ) vol.7～
196. Metabolic Brain Disease (1987～ ) vol.2～
197. Methods in Enzymology (1955～ ) vol.1～
198. Molecular & Cellular Biochemistry (1973～ ) vol.1～

199. Molecular & Cellular Biology (1983～ ) vol.3～
200. Molecular & Chemical Neuropathology (1989～ ) vol.10～
201. Molecular Biology Repors (1987～ ) vol.12～
202. Molecular Brain Research (1986～ ) vol.1～
203. Molecular Immunology (1979～ ) vol.16～
204. Molecular Neurobiology (1987～ ) vol.1～
205. Molecular Pharmacology (1965～ ) vol.1～
206. Muscle & Nerve (1978～ ) vol.1～
207. Mutation Research (1964～ ) vol.1～
208. Nature (1968～ ) vol.217～
209. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (1985～ ) vol.331～
210. Neurobiology of Aging (1987～ ) vol.8～
211. Neurochemical Pathology (1987～1988) vol.6～vol.9 (タイトル変更)
212. Neurochemical Research (1976～ ) vol.1～
213. Neurochemistry International (1987～ ) vol.10～
214. Neuroendocrinology (1987～ ) vol.45～
215. Neurology (1970～ ) vol.20～
216. Neuron (1988～ ) vol.1～
217. Neuropathology & Applied Neurobiology (1975～ ) vol.1～
218. Neuropediatrics (1978～ ) vol.9～
219. Neuropeptides (1983～ ) vol.4～
220. Neuroscience (1983～ ) vol.8～
221. Neuroscience Abstracts (1987～ ) vol.5～
222. Neuroscience Letters (1975～ ) vol.1～
223. Neuroscience Research (1984～ ) vol.1～
224. Neurotoxicology (1987～ ) vol.8～
225. New England Journal of Medicine (1967～ ) vol.276～
226. Nucleic Acids Research (1974～ ) vol.1～
227. Pathologie (1983～ ) vol.4～
228. Pediatric Research (1967～ ) vol.1～

III 中央施設

229. Peptides (1983~ ) vol.4~
230. Pediatric Neurology (1987~ ) vol.3~
231. Pflugers Archiv European Journal of Physiology (1947~ ) vol.249~
232. Pharmacological Reviews (1968~ ) vol.20~
233. Pharmacology Biochemistry & Behavior (1983~ ) vol.18~
234. Physiological Reviews (1968~ ) vol.48~
235. Physiology and Behavior (1987~ ) vol.39~
236. Proceedings of Japan Academy (1944~ ) vol.20~
237. Proceedings of National Academy of Sciences (1968~ ) vol.59~
238. Proceedings of Royal Society of London Ser.B:Biological Science (1982/83) vol.217~
239. Proceedings of Society for Experimental Biology & Medicine (1987~ ) vol.184~
240. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1966~ ) vol.1~
241. Protoplasma (1989~ ) vol.148~
242. Psychopharmacology (1959~ ) vol.1~
243. RAMBIOS (1986~1987) vol.3~4
244. Regulatory Peptides (1986~ ) vol.14~
245. Reviews of Magnetic Resonance in Medicine (1986~ ) vol.1~
246. Revue Neurologique (1978~ ) vol.134~
247. Roux's Archives of Developmental Biology (1969~ ) vol.162~
248. Science (1968~ ) vol.159~
249. Second Messengers and Phosphoproteins . (1988~ ) vol.12~
250. Somatic Cell & Molecular Genetics (1986~ ) vol.2~
251. Studia Biophysica (1983~ ) vol.93~
252. Subcellular Biochemistry (1987~ )
253. Synapse (1987~ ) vol.1~
254. Theriogenology (1986~ ) vol.25~
255. Tissue & Cell (1983~ ) vol.15~
256. Tohoku Journal of Experimental Medicine (1984~ ) vol.142~
257. Toxicology Letters (1987~ ) vol.35~
258. Transplantation (1987~ ) vol.43~

259. Trends in Biochemical Sciences (1983～ ) vol.8～
260. Trends in Genetics (1986～ ) vol.2～
261. Trends in Neurosciences (1983～ ) vol.6～
262. Trends in Pharmacological Sciences (1983～ ) vol.4～
263. Veterinary Record (1986～ ) vol.118～
264. Virchows Archiv A: Pathological Anatomy & Histology (1947～ ) vol.314～
265. Virchows Archiv B: Cell Pathology (1968～ ) vol.1～
266. Virology (1986～ ) vol.148～
267. 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. 生態の科学 (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



Ⅲ 中央施設

20. Clinical Neuroscience (1987～ ) vol.5～
21. 続・生化学実験講座
22. 新・生化学実験講座 (1989～ )
23. 学術雑誌総合目録 (欧文編) (1988～ )

---

IV 別 項

---



## 1. 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、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2年以上の研究歴を有するもの。

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、農学部獣医学科及び歯学部歯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。

#### IV 別 項

##### 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31.5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 2,500円

B(助教授=研究室長)クラス 時給 2,100円

C(講師=主任研究員)クラス 時給 2,060円

D(助手=研究員)クラス 時給 1,700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

この規定は, 昭和61年10月1日から適用する。

この要領は, 平成2年4月1日に一部改正する。

## 2-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け入れるものとする。

- (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。

## 2-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。

## 2-C 国立精神・神経センター神経研究所 外来研究員に関する内規

1. 神経研究所に外来研究員をおくことができる。
2. 外来研究員は、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. 外来研究員は、官民共同研究の一環として、派遣された研究者とし、部長会議で適当と認められた者とする。
4. 任期は1年とし、再任を妨げない。
5. 外来研究員を受入れようとする部長は、神経研究所外来研究員申請書（様式）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. 外来研究員の事故については、補償を行わない。

### 【附 則】

この内規は、平成元年7月1日より施行する。



## 2-D 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。

### 3. 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きをとるとともに、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。

## 4. 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、関係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。

## 5. 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
岩下 宏	国立療養所筑後病院長	S. 63. 4. 1～H. 2. 3. 31
大田原 俊輔	岡山大学医学部小児神経科教授	〃
亀山 正邦	財団法人住友病院長	〃
後藤 文雄	慶応義塾大学医学部内科教授	〃
島尾 忠男	財団法人結核予防会結核研究所名誉会長	〃
高倉 公朋	東京大学医学部脳神経外科教授	〃
山下 格	北海道大学医学部精神医学教授	〃
荒木 淑郎	熊本大学医学部内科学第1教授	H. 1. 4. 1～H. 3. 3. 31
岩崎 祐三	東北大学医学部病態神経学教授	〃
勝沼 信彦	徳島大学酵素科学研究センター長	〃
島 蘭安雄	国立精神・神経センター名誉総長	〃
萬年 徹	東京大学医学部神経内科教授	〃
森 温理	東京慈恵会医科大学精神医学教授	〃
森 和夫	国立療養所下志津病院長	〃
長谷川 慧重	厚生省保健医療局長	関係行政機関等
古川 貞二郎	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	〃

## 6. 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
荒木 淑郎	熊本大学医学部内科学第1教授	S.63.4.1~H.2.3.31
生田 房弘	新潟大学脳研究所長	〃
竹下 研三	鳥取大学医学部脳神経小児科教授	〃
山下 格	北海道大学医学部精神医学教授	〃
江橋 節郎	岡崎国立共同研究機構生理学研究所長	H.1.4.1~H.3.3.31
風祭 元	帝京大学医学部精神神経科学教授	〃
祖父江 逸郎	国立療養所中部病院名誉会長	〃
豊倉 康夫	東京都老人医療センター院長	〃
松田 一郎	熊本大学医学部小児科学教授	〃
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	〃

## 7. 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
			千円	
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	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	国立療養所宇多野病院長 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 鳴 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一部長 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	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学教授 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	



## 8. 平成2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
			千円	
63指-1	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	国立精神・神経センター 神経研究所 部長	23,000	継続
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	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	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	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	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 院長	20,000	〃
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	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 院長	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 院長	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 院長	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	10,000	〃
2指-1	筋ジストロフィーの発症に関する細胞生物学的基礎研究	国立精神・神経センター 神経研究所 部長	57,000	新規
2指-2	筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法開発に関する研究	熊本大学 医学部 内科学第1 教授	46,000	〃
2指-3	筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究	国立療養所兵庫中央病院 院長	46,000	〃
2指-4	筋ジストロフィーの療養と看護に関する総合的研究	国立療養所鈴鹿病院 院長	45,000	〃
2指-5	脳形成障害の成因と疫学に関する研究	鳥取大学 医学部 脳神経小児科 教授	35,000	〃
2指-6	代謝障害に基づく中枢神経疾患の病態と治療に関する研究	岐阜大学 医学部 小児科 教授	15,000	〃
2指-7	精神分裂病の発症機序に関する神経科学的研究	岡山大学 医学部 神経精神科 教授	20,000	〃
2指-8	感情障害の成因と治療に関する研究	滋賀医科大学 精神医学講座 教授	20,000	〃
2指-9	脊髓空洞症とその関連疾患の病態と治療に関する研究	北里大学 医学部 脳神経外科 教授	17,000	〃
2指-10	中枢神経障害の成因と病態に関するサイクロトロン核医学による研究	秋田県 脳血管研究センター 所長	10,000	〃
2指-11	遺伝子解析による神経疾患発現機構に関する研究	大阪大学 蛋白質研究所 教授	20,000	〃
2指-12	心身症の発症機序と病態に関する研究	国立精神・神経センター 精神保健研究所 部長	17,000	〃
2指-13	薬物依存の発生機序と臨床及び治療に関する研究	東北大学 医学部 精神科神経科 教授	23,000	〃
2指-14	重度重複障害児の疫学及び長期予後に関する研究	国立療養所西別府病院 院長	38,000	〃
2指-15	児童・思春期における行動・情緒障害の成因と病態に関する研究	岐阜大学 医学部 神経精神科 教授	17,000	〃
		合 計	600,000	

---

国立<sup>精神</sup>神経センター神経研究所年報

第4号(通巻12号)〔平成元年度〕

発行 平成2年3月31日  
発行者 杉田秀夫  
編集者 高嶋幸男  
高坂新一  
印刷 有限会社新和印刷

---

国立<sup>精神</sup>神経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

---