

国立精神・神経センター
神経研究所年報

第5号(通巻13号)

平成2年度

National Institute of Neuroscience
National Center of Neurology
and Psychiatry

— 1990 —

国立精神・神経センター
神経研究所年報

第5号(通巻13号)

平成2年度



国立精神・神経センター 神経研究所 平成3年3月20日

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)	10
5. 研究発表会(表4)	13

II 研究業績

1. 疾病研究第1部	19
2. 疾病研究第2部	36
3. 疾病研究第3部	53
4. 疾病研究第4部	71
5. 疾病研究第5部	84
6. 疾病研究第6部	98
7. 疾病研究第7部	114
8. 診断研究部	122
9. 微細構造研究部	130
10. 機能研究部	147
11. 代謝研究部	156
12. 免疫研究部	169
13. 遺伝子工学研究部	181
14. モデル動物開発部	191
15. 実験動物管理室	201
16. ラジオアイソトープ管理室	203

III 委 員 会	209
-----------	-----

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	225
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	227
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	228
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	229
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	230
3. 国立精神・神経センター神経研究所勤務心得	232
4. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会運営要領	233
5. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会委員	235
6. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会評価部会委員	236
7. 平成2年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表	237
8. 平成3年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表	238

I 神経研究所の概要

神経研究所の概要

1. 概 要

神経研究所は昭和61年10月、国立精神・神経センターの研究所として発足以来5年目をむかえた。

第2研究棟（研究所本館）の建築工事も着工以来4年目となり、すでに外わくははずされ武蔵野の地に地下1階、地上6階、7800㎡の威容を整えつつある。この研究所が世界に誇る精神・神経・筋・発達障害研究のメッカになる事を目ざし、今後も研究者一同地道な努力を続けていきたいと考えている。

平成2年11月13日有志による動物慰霊祭が初めて举行され、研究の為に犠牲になった多くの実験動物の霊に対し、感謝の念を捧げた。近く慰霊塔を建立する予定である。

2. 組 織

平成2年度の人事面の異動に関しては、4月1日免疫研究部へ高知医科大学免疫学教室より山元弘部長を迎えた。新進気鋭の山元部長を迎え、昨今進歩の著しい神経免疫学の飛躍的發展を期待したい。

平成2年6月16日には疾病研究第四部の柴崎部長が京都大学教授に転出されたため、所長が事務取扱いとなっている。当研究所にとって柴崎部長の転出は惜しまれるが、我国の神経学の発展の為に今後のご健闘を祈っている。

また10月1日付で待望のR1管理室が新設され、疾病研究第七部の今澤室長が管理室長に就任した。現在放射性物質を用いた研究は急速に広がりつつあり、建設中の研究所本館地下1階は全てR1実験室として使用され、規模の面でも研究者の数から言っても管理室の設置を切望していたので大変喜ばしい事と考えている。

疾病研究第七部には疾病研究第三部の西川室長が11月1日配置換えとなり、研究を引き継いでいる。

さらに、新たに平成2年10月1日より制定された科学技術庁の特別研究員として1名を加えることが出来た。研究活動の強化に心強い制度であり、今後もひきつづき受け入れを期待している。

組織および定員は表1に示されるとおり、所長1名、部長12名、室長34名と管理室長2名で合計49名となり、流動研究員は28名である。3月1日現在、賃金研究員及び賃金研究助手は40名、事務職員は3名が従事している。研究活動にはさらに併任研究員45名（センター内併任研究員を含む）、研究生93名、客員研究員22名、海外からの研究者、科学技術庁省際基礎研究や財団、民間研究所から共同研究のため参加の外来研究員20名が主籍している。合計では272名ものメンバーに支えられていることになろう。

3. 研究活動

各研究部の「一年のあゆみ」に述べられているが、幾つかの注目すべき研究成果があげられている。

例えば当研究所筋疾患研究グループ〔杉田秀夫（代表）、小沢英二郎、埜中征哉、荒畑喜一、石浦章一、塚原俊文、江口新比古、石黒恒男〕によるデュシャンヌ型筋ジストロフィーにおける欠損蛋白質（ジストロフィン）の研究に対し平成2年12月6日厚生大臣表彰が授与された。

微細構造研究部埜中征哉部長、後藤雄一流動研究員は、国立遺伝学研究所宝来聡助手との共同研究によりミトコンドリア脳筋症のうち我国に比較的多いMELASはミトコンドリア遺伝子の点突然変異によって起こる事を発見し、この研究は平成2年12月13日のNatureに掲載された。

厚生省精神・神経疾患研究委託費では埜中征哉微細構造研究部長、小澤鎮二郎機能研究部長が主任研究者をつとめ、その他多くが分担研究者として種々の研究に参加している。

厚生科学研究費、文部省科学研究費、科学技術庁科学技術振興調整費、ヒューマンサイエンス振興財団官民共同研究プロジェクト等、またその他民間の助成金などに積極的にこたえ、国内外の他の研究機関とも連携を深めながら研究の進展に資するよう努力している。

継続中の厚生省の痴呆疾患対策推進事業で、平成3年3月15日国立精神・神経センター主催第3回国際痴呆共同シンポジウムが米、豪より計3名の演者を迎え開催された。

研究所セミナーもより活発に開催され（表3）、外国人講師16名、日本人15名の講師により、合計26回のセミナーが開催された。特に外国人講師によるセミナーは海外の研究者と当研究所研究員との研究を通じての交流の良い機会でもあり更に発展させたいと考えている。

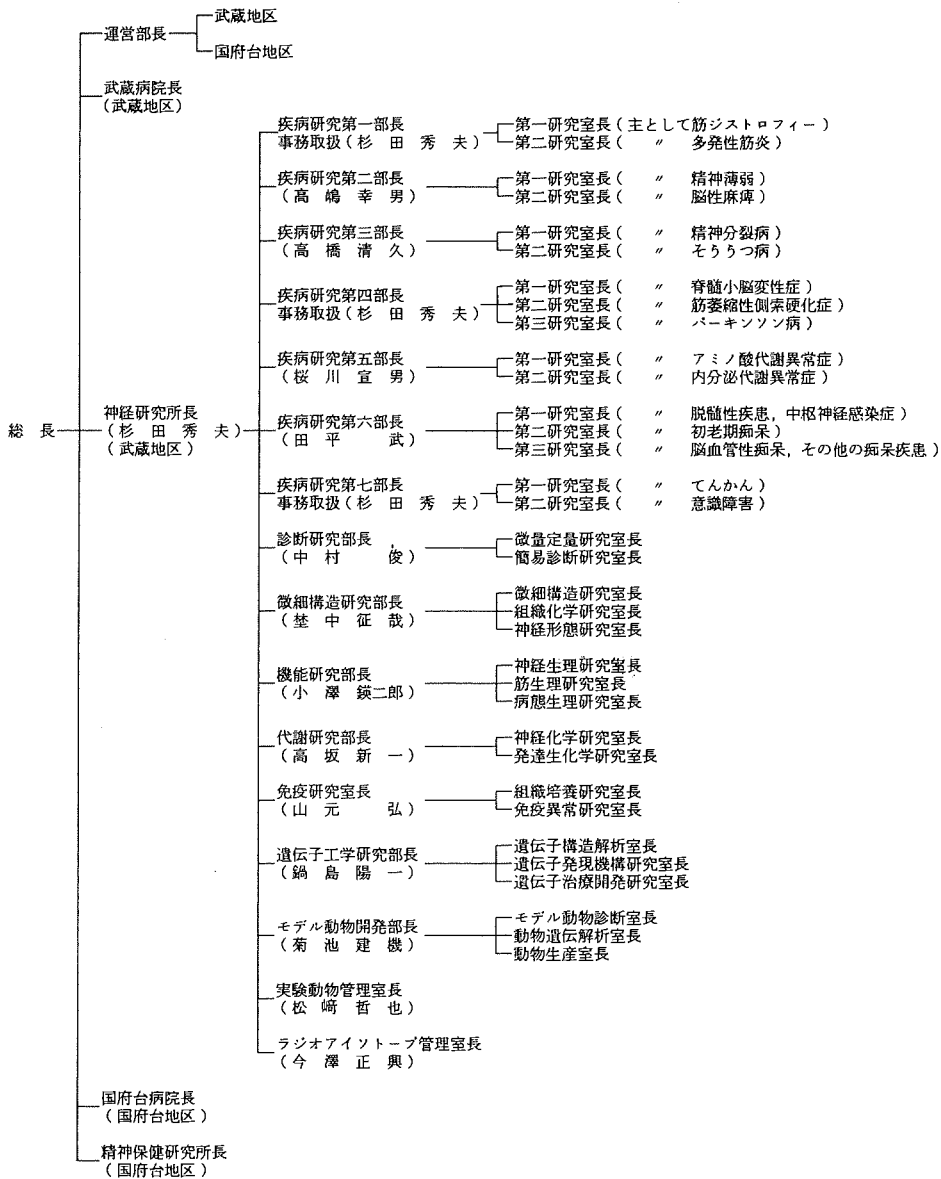
本年度に神経研究所に流動研究員、研究生、外来研究員等として籍をおき、共同研究を行った海外からの研究者は、カナダ、ブラジル、オーストラリア、フィンランド、ベルギー、ハンガリー、ユーゴスラビア、インド、バングラディシュ、中国、台湾など11カ国から総計17名であった。

平成3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 (一)		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	36	—	—	—	—	49	2	28	28	2	109	

(平成2年度の計)

神経研究所 構成員 (平成2年度)

(表2)

(平成2年4月1日～平成3年3月31日)

所 部 名	部 長	室 長	研 究 員	流動研究員	○賞金研究助手 *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
疾病研究第一部	杉田秀夫 (事務取扱)	石浦章一 荒畑喜一	塚原俊文 (2.9/1～休職)	有川恵理 三砂子 (～3.3/31)	○安楽治美 ○後藤加奈子 ○古賀律子	奥山輝之 織茂いづみ 野島美知夫 淵脇泰介 松田一彦 田川泰敬 野村木敬 入 Russel D. Johnsen (3.2/4～2/25) Slobodanka M.Todorovic (3.3/2～3/18)	石原清春 水原山鎌 原口倉瀬 幸夫彦明子史 傅輝経 恵浩	佐藤猛夫 高木昭三 本恭米	Hannu Sartiola (2.11/3～11/20)
疾病研究第二部	高嶋幸男	田中斐博史 許 (~3.3/31)	丸山悦子 (～3.3/31) 宝道定孝 (～3.3/31) 長谷川元宏 (～2.6/30)	*須貝千恵子 (～3.3/31) ○田村頼子 (～3.1/31) *久保田直美 (～2.5/31) ○森本雅子 (～3.3/31) ○山之内正弘 (～3.3/31) *堤悦子 (2.5/21～) *伊崎紀代子 (2.6/6～) ○内田泉 (2.6/16～3.3/31)	来田裕美 竹花美和 橋本冬季子 福田冬季子 小林立子 (2.7/1～) 長谷川元宏 (2.7/1～) 鈴木進 (2.7/30～8/10) 尾崎健夫 (2.7/30～8/10) 亀井淳 (2.10/1～) 平野悟 (2.10/1～)	小野寺一清 克文利彦 野田木利彦 杉林西村 (2.7/1～)	猪俣賢一郎 鈴木角朗 田西 (2.6/15～)	Martin Lammens (2.9/10～9/21) L.E.Becker (2.8/9～9/10)	

疾病研究第三部	高橋清久	三西川雅彦 (~2.10/31)	黒田安計 (~2.9/30) 武内ゆかり	○高嶋瑞千 (2.5/21~3.3/31) ○柏原淳 (2.6/1~6/30) ○芥藤和子 (2.11/26~)	福水道郎 (2.10/1~) 山内秀雄 (3.1/17~) 田村頼子 (3.2/1~)	加賀屋有士 加沢鉄文 加藤一彦 (2.6/1~) 白山幸彦 杉下真理 谷井靖之 (~2.7/20) 永木恭正 瀧田正起 加藤由起 小川哲郎 (2.6/1~) 村岡新一部 (2.6/1~) 海野麻永 伊藤夫嗣 (2.8/1~)	石川俊男 小宮山徳太郎 茨谷治男 三ツ橋伸洋 本橋浩一 綱島高	市成宮 川瀬本 宏侃 伸浩治	橋本篤司	A.P. Chandran (~2.8/11)	
疾病研究第四部	柴崎浩 (~2.6/15) (2.6/15~併任) 杉田秀夫 (2.6/16~ 事務取扱)	小田健一 郭吉瑞子	相澤仁志 真敏弘 (2.4/1~)	○松井京子 *志鎌昌子 *三浦久美子	遠藤智代子	石川純一 村昭輝 木岡繁 岡井博 井寺史 山博 (~2.7/31) 石本進士					

I 神経研究所の編制

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	研究員 研究見習生	併任研究員	客員研究員	外来研究員
疾病研究第五部	桜川 宣男	桃井 隆		佐々木 征行 (2.4/1~)	○甲 有理 (~2.7/31) *乗越 登志子 (2.4/16~3.3/31) *和 気 佳 代 (2.4/16~) *田 中 久 美 (2.4/16~) *土 橋 久 子 (2.7/1~3.3/31) ○高 橋 佳 代 (2.10/1~12/1)	男 幸 深 朗 新 井 幸 芳 有 本 尾 井 毅 治 長 庭 幸 子 富 田 幸 子 中 島 貴 之 (2.5/1~9/30) 川 井 ゆ か (2.6/1~) 小 林 治 (2.12/17~)	清 人 夫 大 村 秀 詔 吉 川 新 飯 島 浩 一 (2.10/1~) 佐 藤 充 (2.10/1~) 鈴 木 秀 典 (2.10/1~)	均 裕 庭 木 繼 稔 青 (2.10/1~)	叶 文 虎 横 山 安 伸 (2.10/1~)
疾病研究第六部	田 平 武	西 澤 正 豊 (~2.8/31) 国 下 龍 英 (2.9/1~復職) 高 橋 慶 吉 隆 山 村 (2.10/1~)		宇 宿 功 市 郎 (~2.8/18) 北 口 哲 雄 遠 藤 真 澄	○二 瓶 淳 子 ○大 八 木 保 政 (~2.6/30) *掛 場 康 予 *久 野 か ほ る (2.4/1~) *下 佐 洋 子 (2.4/16~) *吉 田 里 美 (2.4/1~10/17)	臣 洋 進 浩 溝 口 和 雅 龜 坂 中 田 山 田 (2.4/23~8/31) 大 塚 美 惠 子 (2.7/10~8/31) (2.9/7~12/28) 近 内 弘 人 (2.7/10~8/31) 井 野 邊 純 一 (2.12/1~)	明 史 節 英 頌 節 基 富 田 野 寺 宏 永 小 野 田 (2.8/1~)	正 司 河 健 並 新 島	平 敬 樹 華 並 淳 久 秀 得 路 瀨 得 榎 小 弘 雀 Osvaldo. M. Takayanagui (~2.5/23) Alice M. Takeuchi 小 西 吉 裕 一 佐 藤 準 一 (2.9/1~) 西 澤 正 豊 (2.10/1~) Ferenc Gallyas Jr. (2.10/1~)
疾病研究第七部	杉 田 秀 夫 (事務取扱)	今 澤 正 興 (~2.9/30) 西 川 徹 (2.11/1~)				斉 藤 智 子 (2.8/1~9/30)	宇 野 正 威 (2.7/1~)		

診断研究部	中村	俊	林 荻 服 (2.4/16~)	時 孝 史 介 (2.4/16~)	司 史 介				
中村	中 征 哉	加 茂 功	菊 池 愛 雄 一 (2.4/1~)	松 岡 太 正 和 (2.4/1~)	Ahmed M D Kabir (2.4/1~) 遠 藤 正 美 (2.4/16~)	*佐藤みず穂 (2.7/2~11/15) *奥 薫 (2.7/4~) ○前川みどり (2.9/1~) *高山 明 美 (2.11/15~)	室永 賢幸 屋木 子	康子	等々力英美
微細構造研究部	壘 中 征 哉	功	菊 池 愛 雄 一 (2.4/1~)	松 岡 太 正 和 (2.4/1~)	郎 和 美 (2.4/16~)	○桶田 利加子 *神岡 里子 *伊藤 すすま (2.8/20~10/31) ○高瀬 まさ美 (2.8/20~10/31)	秋山千枝子 今井尚志 内海裕一 簡 藤 裕 陽 清 亮 作 陽 高 敏 永 清 中 敬 萩 長 田 谷 林 川 鐘 辺 荒 木 曾 根 呉 建 具 明 蔡 (2.7/1~) 小 錦 運 (2.11/1~) 林 一 成 (3.1/4~)	伊勢川直久 池 憲	
機能研究部	小沢 藝 二郎	吉 田 幹 晴	萩 原 康 謙 林	田 中 光 池 (3.3/31) 池 谷 紀 代 子 (2.8/31)	*山 圭 和 藤 子 斉 (2.9/1~)	石 水 恒 一 野 恒 一 池 谷 紀 代 子 榎 本 純 子 (2.10/23~)	木村 新一郎 江口新比古 斎藤加代子	熱海佐保子 斎藤 公 司	

I 神経研究所の概要

部名	部長	室長	研究員	流動研究員	○賞金研究助手 *賞金研究助手	研究見習生	併任研究員	客員研究員	外来研究員
代謝研究部	高坂新一	中嶋一行 (2.4/1~)	武井延之	内田耕一 池田正明 斎藤茂治 (2.4/1~)	○津崎尚子 (~2.10/31) *亀井郁子 *石田郁子 ○大澤圭子 (2.9/1~) *杉山昶子 (2.8/20~9/7) *平井ふさ子 (2.10/2~)	人誠敏昭一 神之上正至 藤城宮田晃 高永(2.5/1~) 松山真千 (2.5/1~) 広瀬雄一 (3.3/1~)	中野浩武		舩人彦 島雅昭 桑本昭 北(2.10/1~)
免疫研究部	山元弘 (2.4/1~)	古川昭栄 (~2.9/30) 渡辺里仁 (~3.3/31)		松浦靖 (2.6/1~) 葛原博幸 (2.6/1~)	○北嶋しげみ (~3.3/31) ○葛原博幸 (2.5/7~5/31)	介資男 恭健浩男 西村村浩 (2.5/1~) 玉田耕一 (2.7/1~)		茂野卓栄 古川昭 (2.10/1~)	カ雄秀明子敏 リ三吉裕正敏 川二吉裕正敏 前本瀬本口 尾橋高橋田 (2.10/1~)
遺伝子工学部 研究	鍋島陽一	藤沢淳文 松崎敬 水(休職)		植月太一 千尋 浜上桂樹 (2.4/1~)	○鍋島曜子 ○宮原慶子 *細田葉子 *大滝雅子 *荊部仁美 (3.3/11~)	太透淳雄子 小泉恵 小宮倉野根 小朝星関	今村保忠 (2.6/15~) 茂田茂 (3.1/7~)		
モデル動物部 開発	菊池建機	花岡和文 田口則広		池田敏男 三木清史 (2.5/1~12/31)	○花岡美智子 *志鎌昌子 ○小林明子 *中根和子 (2.4/1~12/31) (2.9/17~3.1/31)	水谷誠斗子 山崎一斗 白杵扶佐子 (2.10/20~11/20) 下野明彦 (2.10/1~) 松垣仁 (2.12/15~3.3/8) 市原伸恒 (2.7/11~)	内雅也 内一佳 内木清史 三(3.1/16~)	利将 谷谷 浅	

実験動物管理室		松崎 哲也				海東 賢治 (2.8/1~)			
ラジオアイソトープ 管理室		今澤 正興 (2.10/1~)				*内田 史江 (~2.11/15)	斉藤 智子 (2.10/1 ~11/30)		

所長室	庶務第一課							高木 富子
事務室								桜井 真理子 斉藤 洋子
R I 室								*大崎 文香 (2.10/16~)
電顕室								○赤堀 宏 ○石井 弘子

(表3) 平成2年度神経研究所セミナー及び講演会

年月日	講師・所属	演題	担当
平成2年 4. 3	Seung U. Kim Department of Neurology, The University of British Columbia, Canada	Neural cell culture: its experimental potential	代謝研究部 微細構造研究部
4. 16	鍵山直子 財団法人実験動物中央研究所動物医学研究室	実験動物モニタリングの現状	実験動物研究 施設管理委員会
5. 18	西田栄介 東京大学理学部生物化学科	細胞情報伝達における細胞骨格筋とタンパク質リン酸化酵素の機能	診断研究部
7. 20	David Yaffe Weizmann Institute of Science, Izrael	Promotors and isoforms of transcripts of the DMD gene	機能研究部
8. 20	L.E.Becker Prof. and Head, Division of Neuropathology, Tronto University, The Hospital for Sick Children, Canada	Synaptic dysgenesis in mental retardation and epilepsy	疾病研究第二部
8. 22	Ye Wenhui Chief, Laboratory of Medical Genetics Auhui Medical University, People's Republic of China	The distribution of genetic diseases in Yang zi Huaihe region and Dabei Mountainous areas in south of Anhui, China	疾病研究第五部 疾病研究第二部 武蔵病院 小児神経科
8. 28	村上宏 Blobel laboratory, Rockfeller University, U.S.A.	Protein import into mitochondria	遺伝子工学 研究部
8. 29	Raymond A. Sobel Associate Professor of Pathology, Massachusetts General Hospital, U.S.A.	MHC expression in proteolipid protein peptide-induced experimental allergic encephalomyelitis (EAE)	疾病研究第六部 微細構造研究部
	S. Mark Sumi Professor, Department of Pathology, University of Washington, U.S.A.	Neuropathology in familial Alzheimer's disease	
8. 30	Salvatore DiMauro Professor, Department of Neurology, Columbia University, U.S.A.	Mitochondrial encephalomyopathies: personal account of an old-timer	微細構造研究部
9. 7	NATIONAL INSTITUTE OF NEUROSCIENCE MINI SYMPOSIUM "Neural Basis for the Entrainment and Generation of Circadian Rhythms" Fed W. Turek Northwestern University, U.S.A.	Feedback effects of activity on the circadian clock: Characteristics and physiological mechanisms	疾病研究第三部
	井上慎一 三菱化成生命科学研究所	視交叉上核におけるソマトスタチン mRNA の概日変動	

	本間 さと, 本間 研一 北海道大学医学部第一生理学助教授	ラットのサーカディアンリズムに及ぼすメタ ンフェミンの効果は行動測定法によって変化 する	
	塩入 俊夫, 武内ゆかり, 高橋 清久 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第三部	ラットのサーカディアンリズムの調節機構に おける興奮性アミノ酸とセロトニンの役割	
	柴田 重信 九州大学薬学部薬理学教室講師	ラットにおける視交叉上核の神経活動と行動 量におけるセロトニン1AおよびGABA受 容体の役割	
	高橋 康郎 東京都神経科学総合研究所心理学部門部長	明暗変化のパターンの差による同調様式の特 徴	
9.10	F.H. Gilles Professor, Department of Neuropatho- logy, Childrens Hospital of Los Angeles, U.S.A.	Brain tumor in children	疾病研究第二部 武蔵病院 小児神経科 脳神経外科
9.11	Volker ter Meulen 西ドイツヴェルツブルグ大学ウイルス免疫 生物学研究所	ウイルスの中枢神経系への感染と自己免疫	免疫研究部
9.12	Steven Younkin Associate Professor of Pathology and Pharmacology Case Western Reserve University, School of Medicine, U.S.A.	The amyloid protein precursor or Alzheimer's disease: mRNAs, membrane associated proteins and soluble deriva- tives.	疾病研究第六部
9.18	リチャード・マイヤーマン チュービンゲン大学神経病理学教授, 西ド イツ	多発性硬化症は自己免疫疾患か?	疾病研究第六部
9.20	Urban Ungerstedt Professor, Department of Neuropharma- cology, Karolinska Institute, Finland	Latest development of microdialysis for pharmacological and functional studies of the brain	代謝研究部 疾病研究第三部
10.19	福井 泰久 東京大学医科学研究所	p60 ^{src} によるPI-3Kinaseの活性化	診断研究部
10.31	Anthony T. Campagnoni Professor, Department of Psychiatry, University of California, Los Angeles, U.S.A.	Post transcriptional regulation of myelin protein gene expression	代謝研究部
11.6	国下 龍英 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部室長	Alzheimer病の生化学的診断とアミロイドの 生化学	疾病研究第六部
	山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部室長	中枢神経グリアの免疫学的機能—0-2A progenitor lineと T cell lineによる解析	

I 神経研究所の概要

11.14	伊藤 彬 癌研究所	研究所におけるコンピューターネットワークの導入と利用	神経研究所コンピューター委員会
11.27	小野寺 一清 東京大学農学部生物化学	染色体 21 番の遺伝子の発現と脳発達	疾病研究第二部
平成3年 2.15	松田 義宏 大阪大学蛋白質研究所代謝部門	脳におけるグルコース輸送の調節機構	免疫研究部
2.19	渡辺 里仁 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部室長	レトロウイルスによる実験動物疾患モデルの作成	免疫研究部
	古川 昭栄 岐阜薬科大学分子生物学助教授	神経成長因子 (NGF) の生合成調節とその医学的応用へのアプローチ	
2.22	上代 淑人 米国DNAX研究所	細胞内シグナル伝達に関するGTP結合タンパク質	診断研究部
3.26	許 斐博史 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第二部室長	コラーゲンの構造と疾患	疾病研究第二部
3.28	Peter Friedrich Institute of Enzymology, Biological Research Center, Hungurian Academy of Science, Hungary	Protein structural aspects of learning in Drosophila and in the hippocampus	疾病研究第六部 神経研究所長

(表4) 平成2年度 神経研究所研究発表会

平成2年3月20日(水)

コスモホール(本館3階大会議場)

9:10 [疾病研究第1部]

- | | |
|---------------------------------|--------|
| 1. アミロイド前駆体タンパク質(APP)のプロセッシング酵素 | ○田川 一彦 |
| 2. 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 | ○有川 恵理 |
| 3. パーフォリン活性阻害蛋白質の精製 | ○松田 潔 |

9:40 [機能研究部]

- | | |
|--|---------------|
| 1. ジストロフィン及びジストロフィン結合タンパク質A1の
モノクローナル抗体 | ○萩原 康子, 吉田 幹晴 |
| 2. ニワトリ胚肢芽への筋芽細胞の遊走 | ○林 謙介 |

10:10 [微細構造研究部]

- | | |
|--|--------|
| 1. ミトコンドリア脳筋症における遺伝子異常
—MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy,
lactic acidosis and stroke-like episodes) を中心として— | ○後藤 雄一 |
|--|--------|

10:40 [RI管理室]

- | | |
|--|---------------|
| 1. キャピラリー電気泳動法を用いた抗てんかん薬およびヌク
レオチドの分析 | ○今澤 正與, 斉藤 智子 |
|--|---------------|

10:50 [疾病研究第5部]

- | | |
|--|--------------|
| 1. 神経及び筋形成とレチノイン酸 | ○富田 幸子, 桃井 隆 |
| 2. Microdissection法によるG-band specific ヒト genome
DNA の cloning | ○横山 安伸 |
| 3. ニーマン・ピック病の新亜型とその酵素学的検討 | ○佐々木 征行 |
| 4. 種々の薬剤によるコレステロールエステル化とスフィンゴ
ミエリナーゼ活性阻害作用について | ○吉川 秀人 |
| 5. Dibutyryl cyclic AMPによるライソゾーム酸性リパーゼ
活性の上昇: I-cell病による検討 | ○桜川 宣男 |

11:20 [実験動物管理室]

- | | |
|--------------------|--------|
| 1. これからの実験動物(冬眠動物) | ○松崎 哲也 |
|--------------------|--------|

I 神経研究所の概要

11:30 [疾病研究第6部]

1. 中枢神経系コリン作動性ニューロンに対する Hematopoietic growth factor の作用 ○小西 吉裕
2. アミロイド前駆体代謝物についての検討 ○国下 龍英
3. SV-40 large TTS mutant 導入による神経細胞の不死化 ○Alice Mayumi Takeuchi

— 休 憩 —

13:15 [代謝研究部]

1. ミクログリア由来分泌性プロテアーゼについて ○中島 一行, 下条 雅人
浜之上 誠
2. ニューロン特異のエノラーゼの神経栄養作用 ○武井 延之, 大澤 圭子

13:45 [診断研究部]

1. NMR シグナル局在化技術開発のためのパーソナル・コンピュータによる計算機シュミレーション ○矢野登志雄, 荻野 孝史
2. テトラヒドロカルボリン類の生体内代謝に関する基礎的検討 ○林 時司
3. ras 遺伝子産物 p21 の活性調節因子 (GAP および Nfl) ○服部 成介, 前川みどり
中村 俊

14:15 [疾病研究第2部]

1. Neurofibromatosis 培養線維芽細胞における情報伝達異常の機構解明をめざして
— PHDase の nicotinamide 添加による活性増大と 酵素の生化学 — ○丸山 悦子 他
2. 近赤外線分光測定装置による脳循環動態モニターと脳障害 ○長谷川元宏 他
3. Pontosubicular necrosis の発生機序 ○高嶋 幸男 他

14:45 [モデル動物開発部]

1. 新たに見いだされた神経・筋疾患の動物モデル ○菊池 建機
2. 遺伝性劣性疾患モデルマウス作成のための新しい実験的技術の確立 ○花岡 和則

15:15 [免疫研究部]

1. フレンド白血病ウイルス由来FrC6ウイルスのラット神経膠細胞における染色体ウイルスDNAの蓄積について ○高瀬 明, 渡辺 里仁
2. ノードマウス由来T細胞クローンの胸腺ストローマ細胞上での増殖 ○田村 浩男, 葛原 博幸
山元 弘
3. イディオタイプ特異的増強性B細胞クローンの抗原受容体遺伝子クローニング ○山元 弘, 松浦 靖

15:45 [遺伝子工学部]

1. 筋分化制御遺伝子の謎 ○藤沢 淳子

16:15 [疾病研究第4部]

1. GADマウス:運動神経終末の形態学的観察
— Dying-back軸索変性の初期病変— ○遠藤智代子, 小田健一郎
2. アクロメリン酸による選択的ニューロンダメージに関して ○相沢 仁志, 郭 伸
3. 筋ジストロフィー症モデルマウスmdxの骨格筋内Ca²⁺濃度 ○吉田 瑞子

16:45 [疾病研究第3部]

1. 動物モデルを用いた精神分裂病治療薬の開発 ○橋本 篤司, 谷井 靖之
海野 麻未, 岡 高恵
西川 徹
2. 視交叉上核における光刺激の伝達機構 ○武内ゆかり, 加藤由起子
高嶋 瑞夫
3. うつ病者血小板ならびにデキサメサゾン処置グリオーマ細胞におけるセロトニン2受容体刺激性カルシウム動員の亢進 ○加賀谷有行, 村岡新一郎
斉藤 和子, 三国 雅彦

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、および多発筋炎などの後天性筋疾患の成因の解明、そしてその治療法の開発を主目的として生化学、免疫組織化学的研究を行っているが、研究はこれにとどまっていない。平成2年度、当部における研究活動に参加した人員は以下の通りである。

（事務取り扱い）杉田秀夫（室長）荒畑喜一、石浦章一（研究員）塚原俊文（併任研究員）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、淵脇泰介、織茂智之、田川一彦、野島美知夫、奥山輝明（研究見習生）野村泰広、八木敬子（賃金研究員）安楽治美、後藤加奈子、古賀律子（部長室）野中由美子

本年度当部の研究概要を次に示す。

1) 筋ジストロフィーに関する研究

Duchenne型筋ジストロフィーDMD遺伝子産物ジストロフィンのC末端ドメインの生理的意義、Becker型筋ジストロフィーBMDのジストロフィンの発現様式、先天性筋ジストロフィー筋のジストロフィンについて検討した。またmultiplex PCRを用いて遺伝子診断する方法を確立し、早期診断のみならず治療への道は着実に前進している。

2) アルツハイマー病アミロイド蓄積機構の解明

脳に蓄積するアミロイド β /A4蛋白質の生成がアルツハイマー病の直接の原因ではないかと考えられている。当部では、世界に先駆けて β /A4蛋白質を分解する酵素APPセクレターゼの同定に成功した。現在、 β /A4生成酵素の阻害剤の開発も同時に行っている。

3) リンパ球中の細胞障害因子の研究

多発筋炎を初めとする自己免疫疾患に、細胞障害性Tリンパ球CTLが重要な役割を果たしているが、中でも膜障害蛋白質パーフォリンはその特異な作用機作が注目を集めている。本年度当部では、パーフォリンの阻害物質をヒト血清中に発見し精製したところ、アポリポ蛋白Bであることが判明した。

4) マルチカタリティックプロテイナーゼMCPに関する研究

ATP-ユビキチン依存性蛋白分解系の本体であるMCPのいくつかのサブユニットを都臨床研鈴木絃一博士との共同研究でクローニングした。酵母のY13サブユニット遺伝子を破壊したMCPで細胞周期、蛋白分解との関連を追求している。

（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) Tsukahara T, Ishiura S, Kominami E, Sugita H :
Changes in proteinase activities during the differentiation of murine erythroleukemia cells.
Exp. Cell Res. 188 : 111-116, 1990
- 2) Ishiura S, Arahata K, Tsukahara T, Koga R, Anraku H, Yamaguchi M, Kikuchi T,
Nonaka I, Sugita H :
Antibody against C-terminal portion of dystrophin crossreacts with the 400 kD protein in
the pia mater of dystrophin-deficient mdx mouse brain.
J. Biochem. 107:510-513, 1990
- 3) Kamo I, Kikuchi A, Ishii H, Matsuoka T, Furukawa S, Ishiura S :
Establishment of myoid cells from bone marrow.
Cell Biol. Int. Rep. 14:595-600, 1990
- 4) Ishiura S, Matsuda K, Koizumi H, Tsukahara T, Arahata K, Sugita H :
Calcium is essential for both the membrane binding and lytic activity of pore-forming
protein (perforin) from cytotoxic T-lymphocytes.
Mol. Immunol. 27 : 803-807, 1990
- 5) Ishiura S, Nishikawa T, Tsukahara T, Momoi T, Ito H, Suzuki K, Sugita H :
Distribution of Alzheimer's disease amyloid A4-generating enzymes in rat brain tissue.
Neurosci. Lett. 115 : 329-334, 1990
- 6) Ishiura S, Tsukahara T, Sugita H :
Molecular and biochemical properties of the ATP-stimulated multicatalytic proteinase
ingensin from rat liver.
Int. J. Biochem. 22 : 1195-1201, 1990
- 7) Yamaguchi M, Ishiura S, Takano-Ohmuro H, Tsukahara T, Arahata K, Obinata T,
Tamiya, T., Tsuchiya, T., Sugita, H. :
Detection of a fast isoform of C-protein with antiserum directed against the N-terminal
portion of dystrophin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 169 : 57-63, 1990

- 8) Funabiki R , Yagasaki K , Shirakawa C , Sugita H , Ishiura S :
 Activity measurement of lysosomal cysteine proteinases, cathepsins B, H and L, in crude tissue extracts, and their relation to the fractional rate of protein degradation.
 Int. J. Biochem. 22 : 1303-1306, 1990
- 9) Tsukahara T , Ishiura S , Sugita H :
 Identification of an elastase-like activity, that decreased during the differentiation of MEL cells, as a prolyl endopeptidase.
 Int. J. Biochem. 23 : 79-83, 1990
- 10) Sorimachi H , Tsukahara T , Kawasaki H , Ishiura S , Emori Y , Sugita H , Suzuki K :
 Molecular cloning of cDNA for two subunits of rat multicatalytic proteinase.
 Eur. J. Biochem. 193 : 775-781, 1990
- 11) Tsukahara T , Ishiura S , Sugita H :
 Regulation of prolyl endopeptidase activity by the intracellular redox state.
 J. Biol. Chem. 265, 21448-21453, 1990
- 12) Emori Y , Tsukahara T , Kawasaki H , Ishiura S , Sugita H , Suzuki K :
 Molecular cloning and functional analysis of three subunits of yeast proteasome.
 Mol. Cell. Biol. 11 : 344-353, 1991
- 13) Okuyama T , Ishiura S , Nojima M , Yanagida M , Sugita H :
 Aminopeptidase A in human placenta and pregnant serum.
 Clin. Chim. Acta 196 : 207-216, 1991
- 14) Arahata K , Beggs A H , Honda H , Ito S , Ishiura S , Tsukahara T , Ishiguro T , Eguchi C , Orimo S , Arikawa E , Kaido M , Nonaka I , Ozawa E , Sugita H , Kunkel, L. M. :
 Preservation of the carboxy-terminus of dystrophin in Becker but not Duchenne muscular dystrophy.
 J. Neurol. Sci. 101 : 148-156, 1991
- 15) Wada Y , Itoh Y , Fukuhara T , Tsukagoshi H , Arahata K :
 "Quadriceps myopathy" : a clinical variant form of Becker muscular dystrophy.
 J. Neurol. 237 : 310-312, 1990
- 16) Sunohara N , Arahata K , Hoffman, EP , Yamada H , Nishimiya J , Arikawa E , Kaido M ,

II 研究業績

Nonaka I, Sugita H :

Quadriceps myopathy : Forme Fruste of Becker muscular dystrophy.

Ann Neurol 28 : 634-639, 1990

17) Kamakura K, Kawai M, Arahata K, Koizumi H, Watanabe K, Sugita H :

A manifestng carrier of Duchenne muscular dystrophy with severe myocardial symptoms.

J. Neurol 237 : 483-485, 1990

18) 阿部道郎, 荒井稔, 前原勝矢, 有川理恵, 荒畑喜一 :

精神分裂病様症状を呈した Becker 型筋ジストロフィーの一例

脳神経 42 : 1061-1066, 1990

19) 阪田千種, 山田人志, 春原経彦, 荒畑喜一, 埜中征哉 :

Becker 型筋ジストロフィーにおける心筋障害

臨床神経 30 : 952-955, 1990

20) 竹光正和, 荒畑喜一, 埜中征哉 :

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

臨床神経 30 : 1066-1072, 1990

b. 著 書

1) 荒畑喜一 :

ジストロフィン

医学大辞典。補遺巻 8。講談社, 東京, p35, 1991

2) 石浦章一, 川島誠一 :

カルパインとカルバスタチン

新生化学実験講座 11。東京化学同人。東京, p376, 1991

3) 杉田秀夫, 荒畑喜一, 小泉宏隆, 塚原俊文, 石浦章一 :

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 遺伝子産物の局在と病態。

脳の神経栄養因子と先天性代謝異常。平凡社。東京, p43, 1990

4) 塚原俊文, 石浦章一, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

筋ジストロフィー

脳と遺伝子。平凡社。東京, p227, 1991

c. 総 説

1) Ishiura S :

Proteolytic cleavage of the Alzheimer's disease amyloid A4 precursor protein.

J. Neurochem., 56 : 363-369, 1991

2) 石浦章一, 杉田秀夫 :

デュシャンヌ型筋ジストロフィー研究の現状

代謝 27, 臨時増刊号 325-329, 1990

3) 石浦章一, 荒畑喜一, 塚原俊文, 杉田秀夫 :

筋ジストロフィーの分子遺伝

日本臨床 48, 1458-1463, 1990

4) 石浦章一 :

アルツハイマー病アミロイドA4 (β)タンパク質の生成ならびに蓄積機序

蛋白質・核酸・酵素 35, 1517-1524, 1990

5) 石浦章一 :

ジストロフィン

生体の科学 41, 338, 1990

6) 石浦章一 :

アルツハイマー病アミロイド蓄積機序

医学のあゆみ 155, 648, 1990

7) 石浦章一, 杉田秀夫 :

Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) / Becker型筋ジストロフィー (BMD)

内科 66, 703-707, 1990

8) 石浦章一, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

筋ジストロフィーとその周辺

科学 60, 703-707, 1990

9) 石浦章一 :

筋ジストロフィー遺伝子の発見

日経サイエンス 20, №12, 94-102, 1990

10) 荒畑喜一 :

Duchenne型PMDとBecker型PMD

現代医療 22 : 1456-1462, 1990

11) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

II 研究業績

ジストロフィン

神経科学レビュー 4:72-99, 1990

12) 荒畑喜一 :

筋ジストロフィー

診断と治療 10:2345-2348, 1990

13) 荒畑喜一 :

ジストロフィンの免疫組織化学的診断

内科 66:711-713, 1990

14) 荒畑喜一 :

Becker型dystrophy

内科 65:1335, 1990

15) 荒畑喜一 :

ジストロフィンと筋ジストロフィー

医学のあゆみ 156:117, 1991

16) 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

日本疾患モデル動物研究会記録 6:46-49, 1990

17) 荒畑喜一 :

ジストロフィンテストの臨床応用

細胞 23:25-31, 1991

18) 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

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 杉田秀夫 :

筋ジストロフィーとジストロフィン

第4回岐阜神経疾患治療研究会 学術講演, 岐阜, 4.1, 1990

2) 杉田秀夫 :

デュシャンヌ型筋ジストロフィーとジストロフィン

第31回日本神経学会総会特別講演，横浜，5.23，1990

3) 杉田秀夫：

進行性筋ジストロフィーの分子病理

新潟薬大セミナー，6.22，1990

4) 杉田秀夫：

デュシャンヌ型／ベッカー型筋ジストロフィー発症の分子機構

第14回阿蘇シンポジウム，阿蘇，8.3，1990

5) 杉田秀夫：

筋ジストロフィーはここまでわかった

神経内科講演会，岩手，10.11，1990

6) 杉田秀夫：

デュシャンヌ型筋ジストロフィーの分子病理と治療

第21回新潟臨床神経懇話会，新潟，10.19，1990

7) 杉田秀夫：

筋ジストロフィーの分子遺伝学的研究

第3回脳神経外科医のための神経科学Update，東京，11.17，1990

8) 杉田秀夫：

筋ジストロフィーとジストロフィン研究の進歩

厚生省特定疾患・突発性心筋症調査研究班公開シンポジウム，札幌，2.5，1991

9) 石浦章一：

筋ジストロフィーとジストロフィン

第7回小児神経筋疾患懇話会，東京，8.25，1990

10) 荒畑喜一：

最近の知見について

筋ジストロフィーワークショップ，千葉，10.30，1990

11) 荒畑喜一：

ジストロフィン

リハビリテーション医学会 医師卒後教育研修会，東京，2.9，1990

12) 荒畑喜一：

II 研究業績

筋ジストロフィーの分子遺伝的診断に関する最近の知見

第7回岡山脳神経疾患フォーラム, 岡山, 2.14, 1991

13) Sugita H :

Advances of Drug Therapy

The Satellite Symposium to VII International Congress on Neuromuscular Diseases

“ Muscular Dystrophy Resesarch 90:from Molecular Diagnosis toward Therapy ” ,

Venice, 9.15, 1990

14) Arahata K , Ishihara T , Nonaka I , Sugita H :

Molecular biology and diagnosis of muscular dystrophy : immunocytochemical and immunoblot analysis.

Molecular Diagnosis toward Therapy., Venice Italy, 9.14, 1990

15) Arahata K :

Immunocytological studies in FSHD.

7th Int. Congress on Neuromuscular Diseases, Munich Germany, 9.16, 1990

16) Arahata K :

Plasmalemma.

7th Int. Congress on Neuromuscular Diseases, Munich Germany, 9.16, 1990

17) Arahata K :

Dystrophin abnormality in progressive muscular dystrophy.

Yokohama Satellite meeting of the joint convention of the 5th ICNC and the 3rdAOCN,

Yokohama Japan, 11.10, 1990

18) Arahata K , Sugita H :

Dystrophin in Duchenne MD and related diseases.

XIth Int. Congress of Neuropathology, Kyoto Japan, 11.11, 1990

19) Ishiura S :

Biochemical properties of the multicatalytic proteinase.

Symposium on proteasome/multicatalytic proteinase, Titisee Germany, 10.12, 1990

20) Ishiura S :

Production of the Alzheimer's disease amyloid A4 protein from the membrane-bound precursor protein.

8th International Congress of proteolysis, Munchen Germany, 10.16, 1990

b. 国際学会

1) Arahata K, Ishiura S, Tsukahara T, Nonaka I, Sugita H :

Conservation of the C-terminal region of dystrophin in Becker but not Duchenne muscular dystrophy

42nd Annual Meeting AAN, Miami USA, May 1, 1990

2) Kaido M, Arahata K, Nonaka I, Sugita H :

Muscle histology in Becker muscular dystrophy proven by dystrophin test.

42nd Annual Meeting AAN, Miami USA, May 1, 1990

3) Arikawa E, Arahata K, Nonaka I, Sugita H :

Dystrophin analysis in congenital muscular dystrophy.

42nd Annual Meeting AAN, Miami USA, May 1, 1990

4) Tsukahara T, Sugita H, Ishiura S :

Regulation of prolyl endopeptidase activity by the intracellular redox state.

8th International Congress of proteolysis, Munchen Germany, 10.18, 1990

c. 一般学会

1) 中嶋一行, 下条雅人, 濱之上誠, 石浦章一, 杉田秀夫, 高坂新一 :

ミクログリアの分泌性プロテアーゼについて

第63回日本生化学会, 大阪, 9.12, 1990

2) 反町洋之, 西道隆臣, 石浦章一, 大海忍, 杉田秀夫, 鈴木紘一 :

哺乳類の新しいカルシウム依存性プロテアーゼ(p94)の抗体を使った解析

同上, 大阪, 9.13, 1990

3) 石浦章一, 田川一彦, 野村泰広, 塚原俊文, 杉田秀夫 :

アルツハイマー病アミロイドA4タンパク質生成酵素の同定

同上, 大阪, 9.13, 1990

4) 松田潔, 石浦章一, 塚原俊文, 杉田秀夫 :

パーフォリンインヒビターの精製

同上, 大阪, 9.14, 1990

5) 塚原俊文, 田川一彦, 石浦章一, 杉田秀夫 :

MEL細胞の熱処理に伴うプロリルエンドペプチダーゼの失活と細胞内の酸化型グルタチオンの濃度

II 研究業績

第63回日本生化学会，大阪，9.15，1990

- 6) 田川一彦，塚原俊文，石浦章一，杉田秀夫，土屋隆英：
マルチキャタリティックプロテイナーゼのサブユニット組成と活性
同上，大阪，9.15，1990
- 7) 杉田秀夫，八木敬子，野村泰広，田川一彦，塚原俊文，石浦章一，船引龍平：
ATP添加によるマルチキャタリティックプロテイナーゼの分子量増加
同上，大阪，9.15，1990
- 8) 織茂智之，濱田恭子，市川忠，中山貴裕，新井雅信，冷牟田英三，荒畑喜一，杉田秀夫：
塩酸プビカインによる筋線維の壊死・再生モデルにおける dystrophin および他の筋蛋白質の動態
第31回日本神経学会総会，横浜，5.23，1990
- 9) 荒畑喜一，石浦章一，塚原俊文，有川恵理，階堂三砂子，埜中征哉，杉田秀夫：
ジストロフィン分子におけるC末端ドメインの臨床的意義
同上
- 10) 松田潔，荒畑喜一，杉田秀夫：
多発筋炎の発症機構
— ヒト血清中に存在するパーホリン阻害タンパク質の検討 —
同上
- 11) 野村芳子，江原真理子，瀬川昌也，山中龍宏，埜中征哉，荒畑喜一：
先天性筋ジストロフィー症の多様性について
— 免疫組織化学的検査による病型分類 —
同上
- 12) 有川恵理，階堂三砂子，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
同上
- 13) 石原博幸，寺山靖夫，横田名慈，浦野哲哉，野崎博之，儀武三郎，青柳昭雄，荒畑喜一，
石浦章一，塚原俊文，杉田秀夫：
「呼吸筋セントラルコア」の免疫組織化学的研究
同上
- 14) 階堂三砂子，有川恵理，荒畑喜一，石原博幸，埜中征哉，杉田秀夫：
ベッカー型筋ジストロフィーにおける筋組織化学所見の再検討

第31回日本神経学会総会，横浜，5.23, 1990

- 15) 春原経彦，荒畑喜一，山田人志，埜中征哉，杉田秀夫，西宮仁：

Quadriceps myopathy

forme fruste of Becker muscular dystrophy

同上

- 16) 阪田千種，荒畑喜一，春原経彦，埜中征哉，杉田秀夫，里吉栄二郎：

Becker型筋ジストロフィーと心筋症

同上

C. 班会議発表

- 1) 石浦章一：

酵母マルチキタリティックプロテイナーゼのクローニングと遺伝子破壊産物の作用：

文部省総合A『多機能プロテアーゼ』（市原班）

平成2年度班会議，東京，1.31，1991

- 2) 石浦章一，古賀律子，安楽治美，山口順士，荒畑喜一；杉田秀夫：

抗ジストロフィンペプチド抗体と反応するタンパク質：

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

平成2年度班会議，東京，12.12，1990

- 3) 杉田秀夫，塚原俊文，石浦章一：

プロリルエンドペプチダーゼの細胞内活性調節：

文部省総合A『細胞内プロテアーゼ系の遺伝子発現と病態』（鈴木班）

平成2年度班会議，東京，1.25，1991

- 4) 荒畑喜一，松田潔，石浦章一，杉田秀夫：

多発筋炎の発症機構—ヒト血清中に存在するパーフォリン阻害タンパク質の検討—：

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班（西谷班）

平成2年度班会議，東京，1.25，1991

- 5) 荒畑喜一，有川恵理，階堂三砂子，石浦章一，埜中征哉：

ジストロフィン・テストによる肢帯型筋ジストロフィーの再検討：

厚生省精神・神経疾患・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

平成2年度班会議，東京，12.7，1990

II 研究業績

- 6) 杉田秀夫, 石浦章一, 鈴木紘一:
マルチキャタリティックプロテイナーゼの構造と機能:
厚生省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)
平成2年度班会議, 東京, 3.1, 1990
- 7) 石浦章一:
アルツハイマー病アミロイド β タンパク質分解酵素の同定:
厚生省長寿科学総合研究老年病分野(痴呆関係班)
平成2年度研究発表会, 東京, 3.1, 1990
- 8) 石浦章一, 田川一彦, 野村泰宏, 安楽治美, 八木敬子, 国下龍英, 田平武:
アミロイド形成関連酵素の遺伝解析:
厚生省長寿科学研究事業「痴呆疾患の遺伝学的研究」(田平班)
平成2年度研究発表会, 東京, 3.8, 1991
- 9) 荒畑喜一:
PMDにおけるジストロフィンテストの応用と問題点
厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー総合班会議
平成2年度, 東京, 1.19, 1991
- 10) 荒畑喜一, 有川恵理, 階堂三砂子, 石浦章一, 埜中征哉:
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発現様式
厚生省精神・神経疾患・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
, 東京, 12.7, 1990
- 11) 荒畑喜一, 織茂智之, 埜中征哉:
重症筋無力症患者の生検筋に見られるlymphorrhageの免疫組織化学的検討
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班
平成2年度班会議, 東京, 1.26, 1991

3. 主な研究報告

遺伝子破壊酵母におけるマルチキャタリティックプロテイナーゼの作用

石浦章一, 塚原俊文, 榎森康文*, 鈴木紘一, 杉田秀夫

(* 東大理・都臨床研)

マルチキャタリティックプロテイナーゼ (MCP) は分子量60万の巨大蛋白分解酵素で、20数個のサブユニットからなる複合体である。植物、酵母、ハエ、ヒトを初めとする真核生物のみならず、古細菌にまで存在が確認されている普遍的な酵素である。その作用として重要なものは細胞内の異常蛋白質を分解するATPユビキチン依存性蛋白分解機構の本体としての働きで、これによって半減期の短いmycなどのガン遺伝子産物やサイクリンなどが分解されることが証明されている。

このMCPの構造と機能を明らかにする目的で私たちはラット肝臓MCPの2つのサブユニットのcDNAクローニング、及び酵母MCPの3種のサブユニットの遺伝子クローニングに成功した。酵母の3種のサブユニットのうち、Y7、Y8遺伝子を破壊すると酵母は生育できず、MCPは生育に必須らしいことがわかった。ところが、Y13遺伝子を破壊しても酵母は生き続けたため、このMCPの作用を明らかにすることはMCPの生理機能を解明する手掛かりになると考えた。

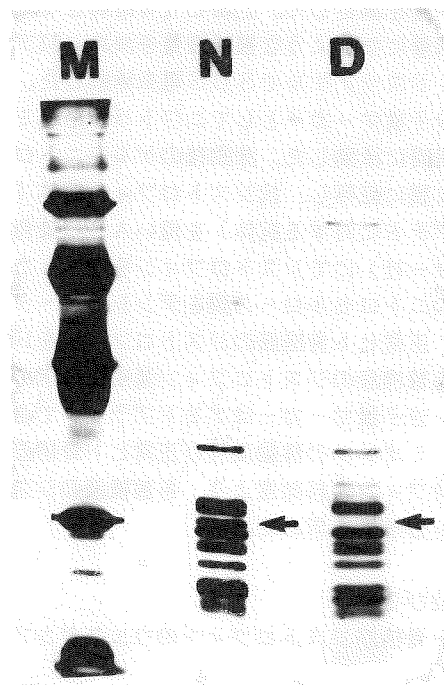
(結果と考察)

図1に遺伝子破壊酵母から精製したMCPとその対照(N)を示す。Y13遺伝子を破壊した酵母(D)のMCPは、分子量2.9万の1個のサブユニットが欠損していることがわかる。この値はY13の理論分子量28,700に一致していた。

活性を比較したところ、D-MCPは対照のN-MCPとほぼ同じ基質特異性を示すことが判明したが、キモトリプシン様

活性であるSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA分解活性は予想に反して数倍に上昇していた。この理由は、通常はlatentであるMCPが構造変化を起こしていて一部活性型に変換しているためであることが判明した。このこととDの分裂時間が遅いことの間には興味ある問題である。

現在まで数種のサブユニットがクローニングされたMCPは現在最も注目されている蛋白分解酵素である。しかしながら、未だにプロテアーゼ類似の構造はみつからない。Y13は他のY7、Y8とのアミノ酸ホモロジーが30%前後あり、ラットのサブユニットLとも60%と高値を示すので、これらは新種の蛋白分解酵素と考えられる。



ウェスタンブロット法によるジストロフィン定量法の確立

古賀律子, 荒畑喜一, 石浦章一, 杉田秀夫

筋ジストロフィーの鑑別診断は、骨格筋におけるジストロフィンの発現様式を、抗ジストロフィン抗体を用いて免疫組織化学的に測定する方法によりなされている。しかし、ジストロフィンの量的変化及び分子量変化などのより詳細な情報を得るためにはウェスタンブロット法によるジストロフィン解析が必要である。

今回我々は、ウェスタンブロット法によるジストロフィンの定量化を試み、正常ヒト骨格筋ジストロフィンとの比較による分子量変化及び量的変化を求め、ルーチン化に成功した。

方法

正常ヒト骨格筋及び正検骨格筋小片 数mgを2% SDSを含む20倍容の抽出液と共に超音波破碎し、遠心分離後の上清を被検液とした。各被検液を6% アクリルアミドミニスラブゲルでSDS電気泳動し、CBB染色後、デンストメトリー法によりミオシン量を測定した。正常ヒト骨格筋とミオシン量が同量になるような被検液量を定め、6%アクリルアミドスラブゲルでSDS電気泳動した。この場合分子量マーカーとしてニワトリ骨格筋ミオシンを同時に泳動した。泳動後のゲルをニトロセルロース膜に転写し、抗ジストロフィン抗体（C末端ペプチドに対する抗体）を用いABC染色法（ベクター社）にてジストロフィンを検出した。染色後のニトロセルロース膜をデンストメーターにかけ、正常ヒト骨格筋のジストロフィンを100%として各被検液のジストロフィン量変化を求めた。また、分子量マーカーはアミドブラックで蛋白染色し、ミオシンの移動度及び正常ヒト骨格筋のジストロフィンの移動度より、各被検液のジストロフィン分子量を求めた。

結果及び考察

ヒト骨格筋ジストロフィンのウェスタンブロッ

トにおいては、その含有量の少なさ及び42万という分子量の大きさのため、ニトロセルロース膜への転写効率が問題となり、また染色後のニトロセルロース膜をデンストメトリーで測定するためには、バックグラウンドの発色をいかに抑えるかも問題となる。検討の結果、被検液のSDS電気泳動を16cmx16cmのスラブゲルで行い、転写条件を0.1% SDSを含む緩衝液中4°Cで50mA, 16時間とし、また非特異吸着を防ぐためのブロッキングを5%スキムミルクで3時間、さらに20%正常ヤギ血清で3時間のダブルブロッキングとすることにより好結果が得られた。正常ヒト骨格筋を用いての定量性の結果は、図1に示したように良好であった。図2にDMD, BMD骨格筋の実際の分析結果を示した。

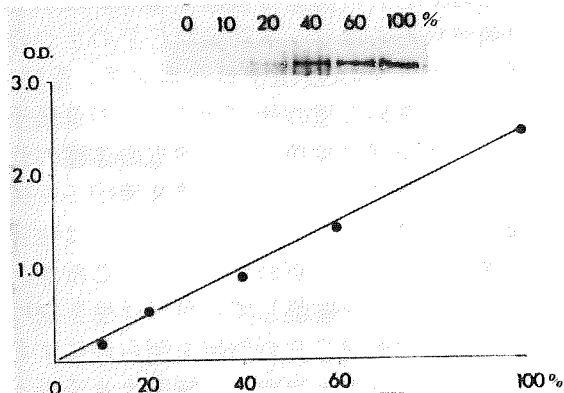


図1. ジストロフィンの定量性

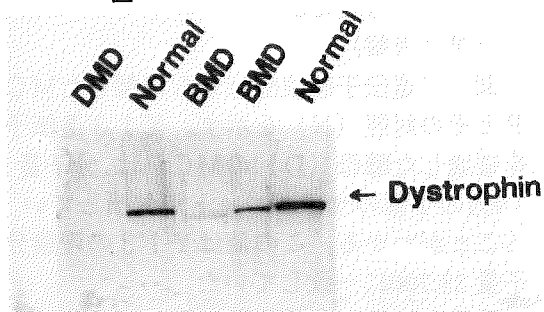


図2. DMD, BMD骨格筋のジストロフィン

アルツハイマー病アミロイド β /A4タンパク質分解酵素についての研究

田川一彦, 石浦章一

アルツハイマー病(AD)の特徴の一つである老人斑のコアには不溶性のアミロイド β /A4タンパク質(β /A4)が沈着しており、これがADの病因の1つと考えられている¹⁾。この β /A4は前駆体タンパク質(APP)からタンパク質分解を受けて生成されていることがわかっており、APPの分解のされ方によって異常タンパク質である β /A4が沈着したり、 β /A4の中間部が分解されたりすると考えられている。我々は、この異常な分解と正常な分解に関わっている酵素について研究を行なっている。今回は β /A4を正常に分解する酵素について報告する。

<方法>

正常にAPPが切断される部位は、 β /A4のGln¹⁵-Lys¹⁶かLys¹⁶-Leu¹⁷である²⁾。そこでこの部位を特異的に水解する活性を検索するためにSHHQ-MCAとSHQK-MCAという2つの人工基質を合成し、ラットの肝臓より酵素を精製した。精製は hidroキシアパタイト、CM-セルロース、G3000ゲルろ過の順に行った。次に、切断部分を含むさらに大きなペプチドである、Amy-26とAC-100³⁾を得られた酵素と反応させ、その分解を見た。

Amy-26は β /A4のAsp¹-Ser²⁶のアミノ酸配列で構成されている26merの合成ペプチドであり、AC-100はAPPのC末端側の β /A4の配列をすべて含むMet⁶⁶-Asn⁶⁶の100個のアミノ酸から成るタンパク質をE.coliで過剰発現させたものである。

<結果・考察>

精製した酵素は、その人工基質と阻害剤に対

する特異性より、cathepsin BかLであると予想された。そこでcathepsin BとLのそれぞれに対する抗体でimmunoblotを行なったところ、anti-cathepsin Bとのみ交叉した。以上よりSHHQ-MCAとSHQK-MCAを指標として精製した酵素はcathepsin Bであると同定した。

次に本酵素が実際にAPPの特異的な分解に関与しているかを検討した。本酵素とAC-100を反応させた後、APPのC末端に対する抗体を用いてimmunoblotで分析すると、AC-100は特異的に分解されることが明かとなった。これより、APPが分泌された後に、膜に残るAPPのC末端断片に対して強力に作用する能力を本酵素が持っていることが考えられた。また、Amy-26と反応させ、その反応産物ペプチドのアミノ酸シーケンスを行なったところ β /A4のLys¹⁶,Leu¹⁷,Val¹⁸のC末端で切断されていた。このように、本酵素は26個のアミノ酸からなるペプチドに対してheterogenicに切断を行なっていた。

これらの結果より、cathepsin Bが正常時にAPPを β /A4の途中の切断部位で分解する酵素(APP secretase)である可能性が示唆された。今後は、完全なAPPに対してcathepsin Bがどのように作用するかを明らかにし、さらに実際リソゾーム酵素であるcathepsin BがAPPと接触できるかどうかを検討してみたい⁴⁾。

- 1) Selkoe, D.J., Neuron, 6, 487-498 (1991).
- 2) Esch, F.S. et al., Science, 248, 1122-1124 (1990).
- 3) Maruyama, K et al., Nature, 347, 566-569 (1990).
- 4) Tagawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1991) in press.

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

有川恵理, 階堂三砂子, 荒畑喜一, 桵中征哉, 杉田秀夫

一般筋病理像がきわめてDMDに類似する福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) におけるジストロフィンの発現様式を免疫組織化学的に検討した。

対象及び方法

先天性筋ジストロフィー51例、うちFCMD36例、非福山型先天性筋ジストロフィー (non-FCMD) 15例、及びDMD5例、Spinal muscular atrophy (SMA) 17例、の計73例について凍結切片のジストロフィン免疫染色を行った。また各ジストロフィン染色異常線維の特徴を知るため連続切片においてC^{5b-9} complement membrane attack complex (MAC)の免疫染色、アクリジンオレンジ染色、ATPase染色を含む一般組織化学染色を行った。ジストロフィン免疫染色につき定量的検討を加えるためジストロフィンの免疫染色パターンを5型に分類し、(ジストロフィンが完全に欠損しているnegative、筋形質が淡染するfluffy、一部が断裂している partially defective、正常の染色性を示すnormal、筋表面膜がnormalより一段強く染まるintense)のその出現頻度をage-matchedのFCMD、nonFCMD、SMA各5例で各生検筋あたり約500本について比較検討した(図1-1)。またジストロフィンの欠損しているDMDについては筋形質膜のマーカースペクトリンを用い膜障害の程度をFCMDと比較してみた(図1-2)。以上の免疫組織化学染色はペルオキシダーゼ間接法を用いた。

結果及び考察

FCMDでは基本的にジストロフィンが存在したが、normalの他に4型の異常染色パターンを高率(平均28%)に認め、特有のパターンを呈した(図2)。SMA(平均0%)やnon FCMD(平均4%)のパターンとは明らかに異なっていた。それらの異常線維はアクリジンオレンジ染色陽性、type 2Cの再生初期の線維や壊死変性線維に大部分が一致し本質的には二次的、非特異的所見であった。しかし、これらに加えてFCMDでは一般組織化学的染色で一見正常と思われる筋線維の中に明かにジストロフィンの異常染色を示す線維が散見され、筋形質膜の

脆弱性が存在する可能性も示唆された。連続切片においてスペクトリンはFCMD、nonFCMD、SMAともジストロフィンとほぼ同様の染色態度を呈していた。DMD筋についてスペクトリンを筋形質膜のマーカースとして用いて膜障害の程度をFCMDと比較すると、FCMDにおいてスペクトリン染色異常線維数は平均25%とage-matchedのDMDでのそれ(平均9%)よりも有意に高率であった。

結語

FCMDではジストロフィンの免疫染色パターンの異なる幼若な筋線維と変性線維とが正常筋線維の間に多数散在し、それによって特有なジストロフィンの免疫染色像を呈していることが注目された。これは臨床診断上、FCMDとnon FCMDを鑑別する一つの補助検査法としても有用であるものと思われる。また、FCMDの病態にも筋形質膜の障害が関与している可能性が示唆された。

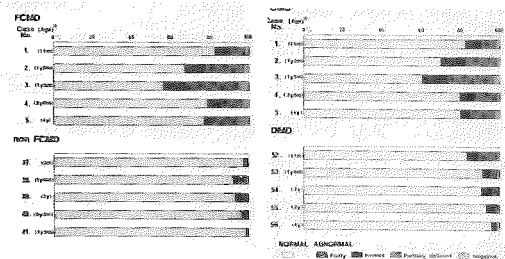


図1-1

図1-2

図1 ジストロフィン(1-1)、スペクトリン(1-2)免疫染色パターンの出現頻度の比較

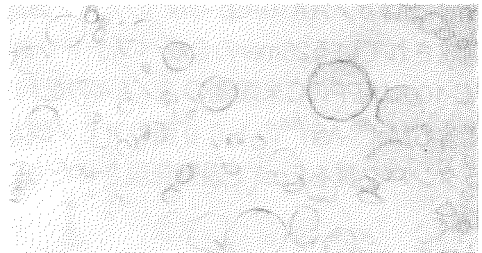


図2 FCMDのジストロフィン免疫染色像

文献 Arikawa, E, et al. J Neurol Sci(in press).

血清中のパーフォリンインヒビターはアポリポ蛋白Bである

松田潔, 石浦章一

細胞障害性Tリンパ球(CTL)中の小胞体に存在する細胞障害分子パーフォリンは、分泌された後に標的細胞膜上で重合し、孔を形成して標的細胞を破壊することが知られている¹⁾。しかし、パーフォリンは作用した後すみやかに不活性化されるがその機構については不明な点も多かった。本実験ではパーフォリンを強く阻害する物質がヒト血清中に存在することを明らかにし、それが血清LDL中のアポリポ蛋白Bであることを証明した。

＜方法＞

パーフォリンはマウスCTLL2株より調製した²⁻⁴⁾。活性は、羊赤血球の溶血を指標として測定した。阻害物質はヒト血清より種々のクロマトグラフィーを用いて均一に調製した。

＜結果・考察＞

正常ヒト血清中のパーフォリン阻害活性物質は、DEAE-セルロース、G3000によるゲルろ過、ハイドロキシアパタイトの各クロマトグラフィーにより均一に精製された。特に最後のハイドロキシアパタイト、では吸着されたタンパク質は0.3~0.4Mのリン酸カリウム緩衝液で溶出され、良好な精製度を示した。SDS電気泳動にて分子量50万の単一のバンドが得られた。ゲルろ過でも分子量は50万であることから、精製標品は分子量50万のモノマータンパク質であることが明らかとなった。

パーフォリンインヒビターをリジルエン

ドペプチダーゼで消化後、ペプチド断片をC18逆相クロマトグラフィーで分離した。そのうち2つのペプチドをシーケンスしたところ、血清アポリポ蛋白Bの(3847-3860)および(4042-4045)に100%一致した。そこでヒト血清からアポリポ蛋白Bを精製し、比較したところ、SDS電気泳動における分子量、アミノ酸組成、パーフォリン阻害活性すべてが一致した。また、精製インヒビターに対するポリクローン抗体は、血清アポリポ蛋白Bと交叉することもウエスタンブロットで明らかとなった。

以上の結果より、血清LDL中のアポリポ蛋白Bは、CTL中から放出される細胞障害因子パーフォリンを阻害する活性をもつことが証明された⁵⁾。また、弱いながらも、他のリポ蛋白であるアポリポ蛋白A、C-I、C-IIも阻害活性をもつことが判明した。

これらの結果は、リポ蛋白がCTLの細胞障害作用を抑制する働きがあることを示している。今後は、臓器移植・自己免疫疾患におけるリポ蛋白質の働きが注目される。

＜文献＞

- 1) Young et al. Science, 233, 184-190 (1986)
- 2) Ishiura et al. J. Biochem., 102, 9-12 (1987)
- 3) Ishiura et al. J. Biochem., 103, 10-13 (1988)
- 4) Ishiura et al. Mol. Immunol., 27, 803-807 (1990)
- 5) Matsuda et al. Mol. Immunol., (1991) in press

II 研究業績

2. 疾病研究第2部

1. 研究部一年のあゆみ

当部は精神遅滞や脳性麻痺などの発達障害の原因・病態を解明し、予防・治療を開発することをめざして研究している。人事面では、田中・許斐両室長は従来どおりに研究を続け、水戸室長はトロント大学小児病院へ留学中である。常勤研究員として、宝道定孝、丸山悦子、田村頼子、長谷川元宏、来田裕美、山内正弘研究員が継続、亀井淳、平野悟（小児神経レジデント）研究員が新規に加わった。非常勤研究員として、山内秀雄、福水道朗、西村淳、福田冬季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していただいた。研究助手として、堤悦子、須貝千恵子、森本雅子、伊崎紀代子、内田泉の方々に研究を助けてもらった。

本年度の主な研究は次の通りである。

1. 脳の発生・発達とその障害に関する研究を免疫組織化学的に行い、ダウン症候群、脳形成異常や代謝疾患における特徴を観察し、発生機転を検討した。
2. 幼弱脳における循環動態とその異常による障害機転について主に近赤外線分光測定装置を用いて動物実験的に検討し、予防法を追求した。
3. 胎児性症候群（アルコール、カフェイン、タバコ）の日本における実態調査および動物モデルを用いた脳障害のメカニズム防止の手段の検討を行った。
4. メンケス病、ウイルソン病における脳障害発生時期の検討および新治療薬の胎児毒性の検討、ならびにダウン症候群および結節性硬化症の本態に関する生化学的検討を行った。
5. VIII型コラーゲンを精製し、抗体を作製し、眼・神経系における生物学的意義を検討した。また、骨形成不全の細胞診断や遺伝子解析を行った。
6. 神経皮膚症候群（主にレックリングハウゼン病）についても生物学的、生化学的に検討した。

（部長 高嶋幸男）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Takashima S, Kuruta H, Mito T, Konomi H, Obata R, Onodera K :
Developmental immunohistochemistry of membrane in the brain coded by a gene on human chromosome 21
Developmental Brain Research 53 : 295-298, 1990
- 2) Takashima S, Kuruta H, Mito T, Houdou S, Konomi H, Yao R, Onodera K :
Immunohistochemistry of superoxide dismutase-1 in developing human brain.
Brain Dev 12 : 211-213, 1990
- 3) Takashima S, Kuruta H, Mito T, Nishizawa M, Kunishita T, Tabira T :
Developmental and aging changes in the expression patterns of beta-amyloid in the brains of normal and Down syndrome cases.
Brain Dev 12 : 367-371, 1990
- 4) Takashima S, Becker L.E. :
Abnormal respiratory control and perinatal brainstem and cerebellar infarctions.
Pediatric Neurology 6 : 141, 1990
- 5) Tanaka K, Kanbe N, Fujita M, Andou Y, Takashima S, Yuasa I :
Incontinentia pigmenti in identical twins with separate skin and neurological disorders.
Acta Derm Venereol (Stockh) 70 : 267-268, 1990
- 6) Koyama K, Mito T, Takashima S, Suzuki S :
Effect of phenylephrine and dopamine on cerebral blood flow, blood volume, and oxygenation in young rabbits.
Pediatric Neurology 6 : 87-90, 1990
- 7) Iwasaki Y, Yoshikawa H, Sasaki M, Sugita K, Suzuki H, Hirayama Y, Sakuragawa N, Arima M, Takashima S, Aoki N :
Clinical and immunohistochemical studies of subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis.
Brain Dev 12 : 478-481, 1990
- 8) Nishida A, Misaki Y, Kuruta H, Takashima S :

II 研究業績

Studies on the expression of Cu, Zn-superoxide dismutase in human cerebrum during Development.

Photomedicine and Photobiology 12 : 185-187, 1990

- 9) 喜田善和, 橋本和広, 竹内豊, 浅沼勝美, 高嶋幸男 :

小脳くも膜下出血に伴う脳幹障害

日本新生児学会雑誌 26 : 975-978,

- 10) 千葉貴子, 西田朗, 水戸敬, 許斐博史, 高嶋幸男 :

Thanatophoric dysplasia 剖検例のコラーゲン解析

日本新生児学会雑誌 26 : 975-978, 1990

- 11) Tanaka H, Kasama T, Inomata K, Nasu F :

Abnormal movements in brindled mutant mouse heterozygotes: as related to the development of their offspring-Biochemical and morphological studies.

Brain Dev 12 : 284-292, 1990

- 12) Tanaka H, Arima M :

Chemical pathogenesis of tuberous sclerosis.

Tuberous Sclerosis and Neurofibromatosis: Epidemiology, Pathophysiology, Biology and Management, edited by Ishibashi Y, Hori Y, Elsevier, p 115-121, 1990

- 13) Mito T, Koyama K, Houdou S, Takashima S, Suzuki S :

Response on near-infrared spectroscopy and of cerebral blood flow to hypoxemia induced by N₂ and CO₂ in young rabbits.

Brain Dev 12 : 408-411, 1990

- 14) Mito T, Ando Y, Takehita K, Takada K, Takashima S :

Ultrasonographic and morphological examination of subependymal cystic lesions in maturely brain infants.

Neuropediatrics 20 : 221-224, 1990

- 15) Mito T, Konomi H, Houdou S, Takashima S :

An immunohistochemical study of the vasculature in the developing brain.

Pediatric Neurology 7 : 8-12, 1991

- 16) 沢石由記夫, 富田豊, 水戸敬 :

聴性脳幹反応無反応例の神経学的特徴と病態に関する検討

脳と発達 22 : 223-229, 1990

17) Houdou S, Kuruta H, Konomi H, Takashima S :

Structure in lissencephaly determined by immunohistochemical staining.

Pediatric Neurology 6 : 402-406, 1990

18) Ichiyama T, Houdou S, Kisa T, Ohno K, Takeshita K :

Varicella with derayed hemiplegia in childhood.

Pediatric Neurology 6 : 279-281, 1990

b. 著 書

1) 高嶋幸男 :

姿勢の異常 (フロッピーを含む)

今日の小児診断指針 : 医学書院, 東京, p337-339

2) Takashima S, Andou Y, Kondou I :

Periventricular and intraventricular hemorrhages ; Factors influencing their prognosis.

Congress of Asian and Oceanian Association of Child Neurology Proceedings. Jakarta, p94-104, 1987

c. 総 説

1) 高嶋幸男 :

ダウン症候群とアルツハイマー型痴呆

発達障害研究 12 : 50-53, 1990

2) 高嶋幸男 :

脳室周囲白質軟化 (PVL) の発生機序

N I C U 3 : 78-81, 1990

3) 高嶋幸男 :

中枢神経発達障害の神経学—周産期低酸素性虚血性脳障害を中心に—

Neurological Medicine 33 : 455-463, 1990

4) 田中晴美 :

FASとFAE—母親の飲酒の胎児への影響

医学のあゆみ 154 : 957-961, 1990

5) 田中晴美 :

結節性硬化症—過去から未来へ—

II 研究業績

小児科 32:163-169, 1991

6) 沢田元, 許斐博史:

細胞外基質タンパク質, コラーゲン

生体の科学 41:254-260, 1990

7) 宝道定孝, 家島厚, 高嶋幸男:

先天異常(脳・神経奇形との関係)小児科的立場から

産婦人科の世界 40:49-58, 1990

d. 班会議報告書

1) 高嶋幸男:

新生児仮死の発達調査における問題

厚生省心身障害研究・周産期医療システムの改善・評価に関する研究班

平成元年度研究報告書 p15-16, 1990

2) 高嶋幸男, 長谷川元宏, 水戸敬, 宝道定孝:

低酸素症中の脳血流量, 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

平成元年度研究報告書 p45-50, 1990

3) 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研究班

平成元年度研究報告書 p67-71, 1990

4) 高嶋幸男, 富田豊:

中脳水道狭窄による水頭症患児の脳幹病理

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班

平成元年度研究報告書 p69-72, 1990

5) 高嶋幸男, 宝道定孝, 長谷川元宏, 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

厚生省心身障害研究・地域・家庭環境の小児に対する影響等に関する研究班

平成元年度研究報告書 p32-35, 1990

6) 高嶋幸男, 宝道定孝, 来田裕美, 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
平成元年度研究報告書

7) 高嶋幸男, 宝道定孝, 来田裕美, 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
平成元年度研究報告書 p57-60, 1990

8) 有馬正高, 丸山悦子, 伊藤慎一, 小野寺一清, 高嶋幸男:

NF-I腫瘍組織 cDNA ライブラリーの免疫スクリーニングと染色体マッピング

厚生省特定疾患・神経皮膚症候群調査研究班

平成元年度研究報告書 p51-53, 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

平成元年度研究報告書 p186-191, 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型コラーゲン分析

厚生省精神・神経疾患・代謝異常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

平成元年度研究報告書 p26-31, 1990

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 高嶋幸男, 宝道定孝, 長谷川元宏:

低酸素性虚血性脳障害

第32回日本小児神経学会総会, 浦安, 6.16, 1990

2) Takashima S, Houdou S, Hasegawa M, Hashimoto K:

Pathogenesis of pontosubicular necrosis in perinatal brains.

X1th International Congress of Neuropathology, Kyoto 9.6, 1990

3) 高嶋幸男:

発達障害の神経病理

II 研究業績

第5回九州病理懇話会, 佐賀, 4.21, 1990

4) 高嶋幸男 :

新生児頭蓋内出血と血栓

産婦人科・新生児血液研究会, 横浜, 6.22, 1990

5) 高嶋幸男 :

呼吸中枢の発達と乳児突然死症候群の成因

第29回九州小児神経懇話会, 佐賀, 8.5, 1990

6) Takashima S :

Golgi study of neurons in brain disease of children.

第6回神経研国際シンポジウム

Development and Involution of Neurons, Tokyo, 9.11, 1990

7) Hasegawa M, Takashima S :

Experimental study on NIRS

NIRS WORKSHOP, Hamamatsu, 11.2, 1990

8) Becker LE, Mito T, Takashima S, Onodera K :

Growth and development of the brain Down syndrome.

Seventh Annual National Down syndrome Society Symposium, New York, 1.10, 1991

9) 沢田元, 許斐博史

VIII型コラーゲンの局在について

第22回結合組織学会総会シンポジウム, 東京, 7.23, 1990

b. 国際学会

1) Takashima S, Becker LE :

Dendritic development of catecholaminergic neurons in the ventrolateral medulla of sudden infant death syndrome victims.

XIth International Congress of Neuropathology, Kyoto, 9.5, 1990

2) Tanaka H :

Caffeine and pregnancy: caffeine and dimethylxanthines in plasma and saliva.

2nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology.

Barcelona, 10.12, 1990

3) Tanaka H, Arima M :

Fetal caffeine syndrome: evidence for recognition

The Joint Convention of the 5th International Child Neurology Congress and the 3rd Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Tokyo, 11. 5, 1990

4) Konomi H, Tamura Y, Sawada H, Takashima S :

Structure and tissue distribution of type VIII collagen in central nervous system.

The Joint Convention of 5th International Child Neurology Congress and the 3rd Asian Oceanian Congress of Child Neurology, Tokyo, 11.6, 1990

5) Mito T, Becker LE :

Minor cerebral and cerebrovascular anomalies in trisomy 21 (Down's syndrome)

X1th International Congress of Neuropathology, Kyoto, 9.5, 1990

6) Mito T, Becker LE :

Expression of S-100 protein in trisomy 21

X1th International Congress of Neuropathology, Kyoto, 9.5, 1990

7) Mito T, Becker LE :

Neuropathology of central respiratory dysfunction in seven infants.

Annual Meeting of Society for Pediatric Pathology, Chicago, 3.16, 1991

8) Houdou S, Kuruta H, Hasegawa M, Suzuki Y, Takashima S :

The developmental immunohistochemistry of peroxisomes in human brain by catalase and acyl-CoA oxidase antibody.

X1th International Congress of Neuropathology, Kyoto 9.5, 1990

c. 一般学会

1) 長谷川元宏, 宝道定孝, 高嶋幸男, 鈴木進 :

Partial asphyxia中の脳内酸化型チトクローム a. a₃の変動の検討

第35回未熟児新生児学会, 神戸, 12.1, 1990

2) 藤村正哲, 竹内徹, 志村浩二, 高嶋幸男, 根岸宏邦, 橋本武夫, 船戸正久, 堀内勤 :

頭蓋内出血の実態 1989年全国調査結果—脳室内出血を除く—

第35回未熟児新生児学会, 神戸, 12.1, 1990

3) 来田裕美, 長谷川元宏, 宝道定孝, 高嶋幸男 :

胎児・新生児脳幹のカテコラミン含有神経細胞の発達

第35回未熟児新生児学会, 神戸, 11.30, 1990

II 研究業績

- 4) 高橋立子, 長谷川元宏, 宝道定孝, 高嶋幸男, 竹内豊, 大野勉, 黒川徹:
PVLにおける合併病変, 特にPSNとの関連性
第35回未熟児新生児学会, 神戸, 12.1, 1990
- 5) 工藤英昭, 長博雪, 舟橋満寿子, 安藤寛, 鈴木康之, 宝道定孝, 長谷川元宏, 高嶋幸男, 鈴木進:
重症心身障害児への近赤外線分光測定装置の応用: 呼吸の異常と脳血液量, 酸素化の変動
第93回日本小児科学会, 東京, 5.11, 1990
- 6) 西田朗, 中村利彦, 千葉貴子, 三崎泰志, 繁友憲郎, 宝道定孝, 高嶋幸男:
酸素毒性に関する研究 第3報 新生児脳組織におけるCu, Zn-superoxide dismutase (SOD)
活性
第93回日本小児科学会, 東京, 5.11, 1990
- 7) 長谷川元宏, 平野悟, 亀井淳, 宝道定孝, 高嶋幸男, 鈴木進:
近赤外線測定装置による新生・幼若仔の脳血流・代謝動態の検討
第2回臨床モニター研究会, 仙台, 3.9, 1990
- 8) 佐々木征行, 花岡繁, 清水教一, 桜川宣男, 高嶋幸男, 有馬正高:
Krabbe病のMRI所見
第32回日本小児神経学会, 浦安, 6.14, 1990
- 9) 長谷川元宏, 田角勝, 宝道定孝, 高嶋幸男, 奥山和男:
低酸素負荷に伴う脳血流速度と血流量変動の相関
第32回日本小児神経学会, 浦安, 6.15, 1990
- 10) 橋本和広, 喜田善和, 竹内豊, 高嶋幸男:
胎内発症の脳室周囲白質軟化の検討—生後発症例との比較—
第32回日本小児神経学会, 浦安, 6.15, 1990
- 11) 長谷川元宏, 来田裕美, 宝道定孝, 高嶋幸男, 浅沼勝美, 宮川智幸:
大脳大切片によるミエリンおよび塩基性蛋白発達の組織学的検討
第26回日本新生児学会, 福岡, 7.16, 1990
- 12) 藤村正哲, 竹内徹, 志村浩二, 高嶋幸男, 根岸宏邦, 橋本武夫, 船戸正久, 堀内勁:
脳室内出血の実態1989全国調査結果
第26回日本新生児学会, 福岡, 7.16, 1990
- 13) 宝道定孝, 長谷川元宏, 高嶋幸男, 竹内豊, 浅沼勝美, 大野勉, 宮川智幸:
新生児解剖例における中枢神経系形成異常

- 第26回日本新生児学会，福岡，7.16, 1990
- 14) 田中晴美，有馬正高，那須史男，猪俣賢一郎：
Fetal alcohol effects：ラットモデルからヒト症例へ
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6.15, 1990
- 15) 田中晴美，有馬正高：
胎児性カフェイン症候群の確立に関する検討
第30回日本先天異常学会学術集会，宮崎，7.13, 1990
- 16) 許斐博史，竹花美博，野田素子，高嶋幸男，有馬正高，福嶋義光，黒木良和：
骨形成不全症患者由来線維芽細胞のコラーゲン分析およびその代謝動態
第93回日本小児科学会，東京，5.11, 1990
- 17) 許斐博史，竹花美博，野田素子，高嶋幸男，有馬正高，福嶋義光，黒木良和：
骨形成不全症患者由来線維芽細胞のコラーゲン分析およびその代謝動態
第93回日本小児学会総会，東京，5.11, 1990
- 18) 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：
ペルオキシソーム関連酵素のヒト脳における発達の免疫組織化学
第35回未熟児新生児学会，神戸，11.30, 1990
- 19) 沢石由記夫，後藤敦子，小松和男，高田五郎，小野崎道彦，東音高，宝道定孝，埜中征哉：
Congenital hypomyelination neuropathy と考えられる姉弟例
第32回日本小児神経学会，浦安，6.14, 1990
- 20) 宝道定孝，来田裕美，長谷川元宏，許斐博史，高嶋幸男，鈴木康之：
抗ヒトカタラーゼ抗体による Zellweger 症候群および正常脳の免疫組織化学的検討
第32回日本小児神経学会，浦安，6.15, 1990
- 21) 丸山悦子，来田裕美，高嶋幸男：
Recklinghausen 病腫瘍由来線維芽細胞 phosphodiesterase I の nicotinamide による活性増大
第63回日本生化学大会，大阪，9.13, 1990

C. 班会議発表

- 1) 富田豊，高嶋幸男：
水頭症とくに Chiari 奇形 2 型の眼輪筋反射
厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班

II 研究業績

平成2年度 ワークショップ，東京，8.23, 1990

2) 高嶋幸男：

低酸素症のシナプス発達に及ぼす影響に関する研究

厚生省小児医療・低（無）酸素症の児の発達に及ぼす影響に関する研究班

平成2年度 ワークショップ，大津，9.8, 1990

3) 高嶋幸男，長谷川元宏，平野悟：

低酸素症のシナプス発達に及ぼす影響に関する研究：遷延性低酸素症における脳循環

厚生省小児医療・低（無）酸素症の児の発達に及ぼす影響に関する研究班

平成2年度 ワークショップ，東京，1.25, 1991

4) 高嶋幸男，富田豊：

中脳水道閉塞・狭窄の免疫組織化学的検討

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班

平成2年度班会議，京都，1.10, 1991

5) 高嶋幸男，宝道定孝，亀井淳，許斐博史：

胎児，小児脳血管における各種コラーゲンの発達

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

平成2年度班会議，東京，1.14, 1991

6) 高嶋幸男，許斐博史，田村頼子：

中枢神経系の発達とその障害へのコラーゲンの関与：神経系組織内のコラーゲンの分布・発達

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2年度班会議，東京，1.19, 1991

7) 森松義雄，佐藤順一，高嶋幸男，高田邦安：

重症心身障害の病理学的検索の問題点—剖検例アンケート集計結果より—

厚生省精神・神経疾患・重度重複障害児の疫学と長期予後に関する研究

平成2年度班会議，東京，1.25, 1991

8) 高嶋幸男，平野悟，宝道定孝，長谷川元宏，亀井淳：

先天異常における leptomenigeal glioneuronal heterotopia についての検討

厚生省心身障害・地域・家庭環境の小児に対する影響等に関する研究

平成2年度班会議，東京，2.9, 1991

9) 有馬正高，丸山悦子，許斐博史，田中晴美，高嶋幸男，小野寺一清：

神経皮膚症候群の正常部，異常部由来細胞の生化学的，分子生物学的研究

厚生省特定疾患・神経皮膚症候群調査研究

平成2年度班会議，東京，2.7, 1991

10) 田中晴美，有馬正高：

生活化学物質による胎児症候群における脳形成障害の頻度とその防止

—日本における胎児症候群の診断—

厚生省精神・神経疾患・脳形成障害の成因と疫学に関する研究班，

平成2年度班会議，東京，1.25, 1991

11) 田中晴美，山之内正弘：

妊娠マウスに投与した塩酸トリエンチンの胎仔への影響

厚生省科学研究新薬開発・先天性銅代謝異常症に対する低分子金属キレート剤の開発研究班

平成2年度班会議，市川，3.23, 1991

12) 許斐博史，田村頼子，沢田元

結合織代謝異常症のコラーゲン解析の基礎研究：VIII型コラーゲンのサブユニット鎖（ $\alpha 1$ 鎖， $\alpha 2$ 鎖）の構造と分布

厚生省精神・神経疾患・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班

平成2年度班会議，東京，1.25, 1991

13) 宝道定孝，高嶋幸男，鈴木康之：

ペルオキシソーム関連酵素のヒト脳における発達の免疫組織化学

厚生省精神・神経疾患・重度重複障害児の疫学と長期予後に関する研究

平成2年度班会議，東京，1.25, 1991

II 研究業績

3. 主な研究報告

妊娠マウスに投与した塩酸トリエンチンの胎仔への影響

田中晴美, 山之内正弘

ウイルソン病において、銅のキレート剤としての治療薬であるD-ペニシラミンによる副作用が存在する時、これに代わりうるキレート剤として使用されはじめた塩酸トリエンチン(Trientine dihydrochloride)の発生・胎性毒性に関する情報は少ない。本研究では妊娠マウスを用いて、ヒトと同様に経口投与を行い、母体および胎仔への影響を検討した。

<方法>

C3H/HeNjcl系マウスを交配させ、妊娠0日より妊娠中を通して、水道水、3,000 ppm、6,000 ppm、12,000 ppmのTrien-2HClを飲料水として投与、4群を作製した。妊娠19日に帝切を行い、母体および胎仔の状態を観察し、各種臓器を摘出、生化学的検討を行った。

<結果>

1. 塩酸トリエンチンの胎内毒性

妊娠確認マウスに対して帝切時仔のいた母獣の割合の低下、即ち胎内吸収は、3,000 ppmではみられなかったが、12,000 ppmでは50%に存在した。平均の着床数や胎仔数に差はみられなかったが、帝切時生存していた仔の帝切1時間後の生存率は12,000 ppmでは低下していた。これらの結果は、胎内の仔への影響は3,000 ppmをこえなければ存在しないことを示す。

2. 母体への影響

妊娠19日の母体重および肝臓重量には4群間に有意差は存在しなかった。

帝切時仔を保有していた母獣の血清中の銅濃度にも4群間に有意差は存在しなかった。母獣肝臓中の銅濃度は塩酸トリエンチン投与群で低下の傾向はみたが、用量依存性の低下はみられなかった。これらの結果は、塩酸トリエンチンの影響を母体の重量や、母血清中の銅濃度で判定することは困難であることを示す。

3. 胎仔への影響

妊娠19日の胎仔の体重および大脳重量は、6,000 ppm、12,000 ppm、では用量依存性の低下を示した。

妊娠19日の生存胎仔における大脳中および肝臓中の銅濃度は、3,000 ppm、6,000 ppm、12,000 ppmの塩酸トリエンチンの濃度にはほぼ依存して、銅濃度の低下がみとめられた。

帝切時生存していた仔において、脳の異常、すなわち脳内の広範な出血、脳露出、水頭症、小頭症などの割合も、塩酸トリエンチンの用量に依存して増加した。その割合は、3,000 ppmで6%、6,000 ppmで11%、12,000 ppmで33%であった。

以上の結果は塩酸トリエンチンの悪影響は妊娠母体より胎仔に対してより明らかであり、胎仔の大脳や肝臓中の銅濃度や脳異常では用量依存性に存在がみとめられることを示す。

<考察>

今回のC3H系マウスにおける塩酸トリエンチンの胎内毒性については、母親に異常のみられないレベルにおいても、胎仔には異常がみられており、母親のモニターによって胎内毒性の推定は困難である可能性を示唆している。一方、胎仔における毒性のマーカーとしては、用量依存性に低下している大脳や肝臓中の銅濃度とともに、脳異常についても注意すべきと考える。なおウイルソン病における銅の蓄積を考慮すると、ウイルソン病への投与では銅低下にもとづく毒性の発現はさらに少ないことが推定される。

先天性の銅のトランスポートの異常として知られているメンケス病のモデルマウス(C3H/HeJ-Mo^{br})においても、大脳や肝臓中の銅濃度は低下している。今回の塩酸トリエンチン12,000 ppm投与における銅レベルをメンケス病モデルマウスを用いた私達の検討¹⁾²⁾と比較すると、1)妊娠母体の肝臓中の銅濃度はメンケスヘテロ母体レベルあるいはそれより高濃度であり、2)胎仔大脳中レベルはメンケス病ヘミ雄あるいはヘテロ雌レベルであったが、胎仔肝臓中レベルはメンケス病仔に比し、はるかに高濃度であった。以上のような点を考慮しつつ、塩酸トリエンチンの発生・胎性毒性については、仔の大脳への影響を重要視すべきと考える。

<文献>

- 1) 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
- 2) Tanaka H, Kasama T, Inomata K, Nasu F. Abnormal movements in brindled mutant mouse heterozygotes: as related to the development of their offspring-Biochemical and morphological studies. *Brain Dev(Tokyo)* 12:284-292, 1990

神経系組織内の抗VIII型コラーゲン抗体と反応する物質の部分精製

田村頼子, 許斐博史, 高嶋幸男, 沢田元(横浜市大解剖)

VIII型コラーゲンは中枢神経系の組織構築に関与する可能性のある新しいタイプのコラーゲンである。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、抗体作成などを行っている。昨年度は抗VIII型モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的検索にて抗体がグリア細胞やグリア線維に反応があることを示しVIII型コラーゲンがグリア線維の構成成分である可能性を示唆した。本年度はさらに抗VIII型モノクローナル抗体と反応する物質を中枢神経系組織より抽出、精製し、その部分的なアミノ酸配列を検索したので報告する。

<方法>

- 1) 抗VIII型コラーゲン抗体と反応する物質の網膜よりの抽出および精製。ウシ眼より網膜全層を剥離し、4M塩酸グアニジン/50mMトリス中で4℃、16時間インキュベートし、その後10mM尿素に透析した。透析中に析出した沈さは除去し、上清のみを更に10,000xg 30分間遠心した。得られた沈さについてひき続き精製を行った。精製は高速液体クロマトグラフィー法(HPLC)を用いた。始めにC18逆相カラム(Micro Bondasphere, 5μ 100A, Waters)を用い、溶出は0.1% trifluoroacetic acid 存在以下で20-60%のacetonitrileのlinear gradientで行った。

次にC18逆相カラムで得られた各分画に関してWestern blotting法を行い、反応を認めた分画をゲル過カラム(Protein Pak 300, 10μ 300A, Waters)を用い、0.2% phosphate bufferにて溶出した。得られたタンパクは、再度C18逆相カラムにて溶出を行った。

- 2) ペプチドのアミノ酸配列決定。HPLCにて精製したタンパクは、0.2M重炭酸アンモニウム存在下でトリプシンを加え(30:1)37℃、2時間消化した。その後、C18逆相カラムを用いてacetonitrileで溶出を行い、各分画は477A/120Aプロテインシーケンサー(Applied Biosystems)にてアミノ酸分析を行った。

<結果と考察>

- 1) 抗VIII型コラーゲン抗体と反応する物質の網膜よりの抽出、精製。剥離した網膜全層を4M塩酸グアニジン/50mMトリス中でインキュベートしその後10mM尿素に透析、遠心した。遠心後の沈さを電気泳動したものが、図のlane3である。このサンプルと2種類の抗VIII型コラーゲン抗体(8C、6A2)

とのWestern blottingを行うと2種類の抗体にとともに反応する数本のバンドが認められた(図、lane4、5)。抗VIII型コラーゲン抗体と特異的に反応するこれらのバンドを精製する目的で、サンプルをC18 reverse phase HPLCにかけacetonitrileで溶出させた。その結果抗VIII型コラーゲン抗体に反応する分子量約2万のタンパクが分離できた。次にこのタンパクはProtein Pak 300 HPLCを用い、0.2% phosphate bufferにて溶出を行い、その後再度C18 reverse phase HPLCにかけ精製を行った。

- 2) 網膜より精製したペプチドのアミノ酸配列決定。HPLCにて精製したタンパクはトリプシンで消化後C18 reverse phase HPLCにかけ、得られた各分画は477A/120Aプロテインシーケンサーにてアミノ酸分析を行った。現在までに得られたアミノ酸配列はVIII型コラーゲンのα1鎖のアミノ酸配列とは明かに異なるものであった。従って、網膜より抽出した抗VIII型コラーゲン抗体と反応するタンパク質は角膜デスメ膜由来のVIII型コラーゲンと同じものでない可能性が高く、今後さらに検索を続けていきたい。

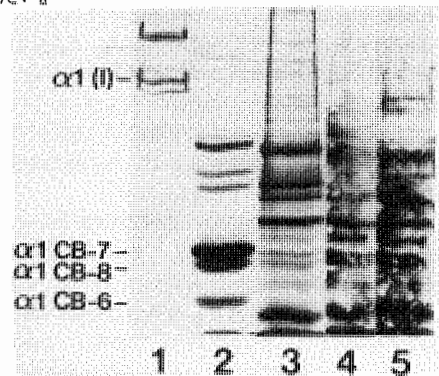


図 網膜より4Mグアニジン塩酸を用いて抽出したタンパク質の電気泳動像(8% SDS-PAGE)

- lane 1: I型コラーゲン。
lane 2: I型コラーゲンのCNBrペプチド。
lanes 3~5: 網膜から4M塩酸グアニジンを用いて抽出したタンパク質。
lanes 1~3: Coomassie brilliant blue 染色。
lane 4: 抗VIII型コラーゲン抗体(8C)による染色。
lane 5: 抗VIII型コラーゲン抗体(6A2)による染色。
何本かのバンドが抗VIII型コラーゲン抗体と反応が認められる(lanes 4, 5)。

II 研究業績

Recklinghausen 病腫瘍由来培養線維芽細胞 phosphodiesterase I の nicotinamide による活性増大と細胞の NAD レベル

丸山 蓮 丸山悦子, 柴田克己¹, 公持朗², 高嶋幸男 (¹ 帝国女子大家政学部, ² 埼玉医大皮膚科)

Recklinghausen 病の患者皮膚培養線維芽細胞を用いて代謝系の異常を見出し解析することを旨としてきた。昨年度報告した腫瘍由来培養線維芽細胞で見出した細胞表層膜の Phosphodiesterase I の Vmap の増大という知見は腫瘍細胞における本酵素蛋白発現の増大を示唆する。本酵素の本症との関連性を生化学、分子生物学的に進めるために細胞を集める一方、薬物添加実験を行ったところ nicotinamide による新知見を得た。またその代謝関連物質である NAD を測定し比較を行った。

<方法>

患者皮膚培養線維芽細胞は常法に従い継代培養し、2～3週間後 policeman で集め PBS で洗浄し、遠心後細胞 pellet を得た。酵素標品および活性測定は昨年度報告書に従った。nicotinamide は 3 日ごとに培地に 2-9 mM 添加した。NAD の定量は柴田の方法¹に従った。

<結果と考察>

表 1 のように腫瘍由来培養線維芽細胞の膜画分の phosphodiesterase I は 2-9 mM の nicotinamide を培地に添加することによって活性が 5 倍増大した。この増加は細胞ホモジネートでも認められた。しかし正常対照や患者正常部由来細胞では増大が見られなかった。腫瘍由来細胞のみが nicotinamide にレスポンスを示すことは腫瘍由来細胞のある種の受容体や、細胞内情報伝達系に異常があって細胞のネットワークに乱れがあることを想定させる。

nicotinamide は NAD の代謝関連物質である。そこで細胞 NAD の量を測定してみた (表 2)。患者腫瘍由来細胞は正常部由来に比べ NAD レベルが低く有意な差が ($t < 0.01$) が得られた。NAD は細胞の酸化、還元反応の essential な coenzyme である。しかし、今のところ NAD の細胞内レベルと nicotinamide による phosphodiesterase I の腫瘍細胞でのみ見られたレスポンスとの関わりはわからない。同一患者腫瘍部、正常部より得た線維芽細胞で見られたこれらの生化学的な違いは本態解明のために重要な鍵となるかも知れない。

細胞の生体反応は伝達物質やホルモンによりレセプターが活性化されると細胞内情報伝達系を介して再び細胞外伝達物質によって他の細胞にさまざまな情報を伝える。Recklinghausen 病においてどういう遺伝子産物がどういう遺伝子をいかなるメカニズムで活性化するのか、それがいかに細胞の分化、増殖、腫瘍化につながるのか、これらの問題を 1 つ 1 つ明らかにすることによって本態

解明がなされることであろう。

	NAD nmol/mg protein	
	Normal appearing cells	Tumor derived cells
Patient 1 (28y,m)	1.70	0.95
Patient 2 (35y,m)	2.07	0.87
Patient 3 (56y,f)	1.23	0.72
Patient 4 (60y,m)	1.67	0.97

mean ± S.D.	1.67 ± 0.34	0.88 ± 0.11

	Nicotinamide (mM)	Enzyme activity (nmol/min/mg protein)
	Patient 1 (membrane)	
Normal appearing cells	0	49.8
	9	51.9
Tumor derived cells	0	559
	9	2860
Patient 2 (whole cells)		
Normal appearing cells	0	73.0
	2	64.3
	9	72.0
Tumor derived cells	0	502
	2	630
	9	848

表 1. Recklinghausen 病腫瘍由来培養線維芽細胞 phosphodiesterase I 活性の nicotinamide による増大

表 2. Recklinghausen 病患者正常部由来と腫瘍由来線維芽細胞の NAD レベル

<文献>

- 1) Shibata et al, Nutritim international 2. 3: 177-181 1986

ペルオキシソーム関連酵素のヒト脳における発達の免疫組織化学

水道定孝, 高嶋幸男, 鈴木康之(岐阜大小児科)

<はじめに>

ペルオキシソームの先天代謝異常では、神経細胞移動や髄鞘化に障害を生じることが知られている。そこで、ヒト脳におけるペルオキシソームの役割を知るために、3種類のペルオキシソーム関連酵素を用いて、免疫組織化学的にその発達の变化を検討した。

<対象・方法>

詳細な神経病理学的検索による有意な病変の認められない、在胎17週以降の胎児8例、新生児・乳児10例、成人2例の計20例の永久保存脳(パラフィン包埋)を用いた。ホルマリン固定後の、大脳前頭葉、視床・基底核、小脳のパラフィン切片に、抗ヒト catalase 抗体(CAT)、抗 acyl-CoA oxidase 抗体(AOX)、抗 3-ketoacyl-CoA thiolase 抗体(PT)を用いて通常のPAP法により免疫組織化学的に検討した。陽性対照として、ヒト肝・腎臓を用いた。

<結果>

1. 正常肝・腎臓での各抗体による免疫染色

正常肝・腎臓でのCAT、PT、AOXの染色態度はほぼ同様であり、肝細胞の胞体内あるいは、尿管管上皮細胞内に免疫染色陽性顆粒が認められた。

2. 正常脳での各抗体による免疫染色

CAT、PT、AOXとも神経細胞およびグリア細胞において、染色態度はほぼ同様であり、陽性細胞は胞体が一様に、あるいは細顆粒状に染色された。

各部位における各抗体陽性神経細胞の発達の变化をみると、在胎27-28週より、視床・基底核の大型の神経細胞および小脳歯状核神経細胞とプルキンエ細胞の胞体が各種抗体陽性となり、在胎31-32週より、視床・基底核の小型の神経細胞が陽性を示した。また、前頭葉皮質では、在胎35-36週より錐体細胞が陽性を示した。

大脳および小脳の白質における各抗体の陽性細胞の発達の变化を示す。大脳では、在胎31-32週頃より深部白質で陽性グリアが認められ、以後、年齢的発達に伴い、表層の白質でも陽性グリアを認めるようになった。小脳でも、在胎31-32週頃より陽性グリアがみられるようになった。

<考察>

従来のペルオキシソームの形態に関する研究は、カタラーゼを指標とする酵素組織化学(DAB-H₂O₂法)によるものが主であった。

我々は、今回の報告においてペルオキシソーム関連酵素に対する抗体を用い、通常のPAP法でも免

疫組織化学的にペルオキシソームを観察できることを示した。

正常肝・腎臓において各抗体の染色態度はほぼ同様であり、肝細胞内および腎尿管細胞内に陽性顆粒が認められた。従って、各抗体ともペルオキシソームの免疫組織化学的指標になりえることが明らかになった。

脳での各抗体による免疫組織化学では、肝・腎臓と異なり、陽性を示す神経細胞およびグリア細胞の胞体は、一様に染色された。この染色態度の違いは、肝・腎臓のペルオキシソームの大きさが0.3から1.0μmであるのに対して、脳では0.15から0.25μmと小さく(microperoxisome)、大きさに差があることや脳microperoxisomeの自家融解の可能性などによると考えられる。各抗体で示したペルオキシソームの免疫組織化学的発達をみると、神経細胞では、在胎27-28週頃より視床で大型の神経細胞が陽性となり、在胎35-36週頃に大脳前頭葉の錐体細胞が陽性を示した。このように、神経細胞におけるペルオキシソームは、深部灰白質より神経細胞の胞体の成熟に伴って発達してくると考えられる。

また、グリア細胞では、在胎31-32週頃より、深部白質で陽性グリアがみられるようになり、以後年齢的発達にともなって、表層の白質でも各抗体陽性グリアがみられた。このグリアの発達の变化は、ミエリン形成グリアの発達の变化と一致すること、ラットにおいて髄鞘形成期に乏突起細胞に存在するカタラーゼの数およびその活性が増加するという報告もあり、今回の結果とあわせ、ヒト脳においてもペルオキシソームは、白質の髄鞘化と非常に関係深いことがわかった。

このことより、ペルオキシソーム異常症でみられる髄鞘化障害の一要因が示唆された。

Partial asphyxia 時の脳組織酸素化および循環動態

長谷川元宏, 平野悟, 高嶋幸男

低酸素性虚血性脳障害を予防するためには、脳循環動態の解明が重要である。

今回は partial asphyxia 時の脳循環動態を知るために、窒素ガスおよび炭酸ガスを用いた低酸素負荷による脳組織酸素化、血液量、血流量および血流速度を経時的に観察した。

<対象および方法>

生後2週齢のJW系家兔をエーテル麻酔後、臭化バンクロニウム静注で筋弛緩させ、気管切開の後人工換気を行なった。その後、窒素ガスあるいは炭酸ガスを用いて、18%、15%および10% O₂濃度の低酸素負荷を2分間行い、負荷中および負荷後の脳内総、酸化および還元ヘモグロビン(Hb)を近赤外線分光測定装置を用いて観察した。また脳血流量(CBF)をレーザー・ドプラー組織血流計、脳底動脈の血流速度(CBFV)を経頭蓋骨的超音波ドプラ血流速度計を用いて測定し、同時に大腿動脈の血圧を測定した。さらに低酸素負荷2分後の血液ガスを測定した。

<結果>

(1) 窒素ガス負荷

18%の低酸素負荷では脳内総、酸化、還元Hb、BBF、CBFVは変化しなかった。15%の低酸素負荷では脳内還元Hbは軽度増加し、酸化Hbは軽度減少したが、脳内総Hb、CBFおよびCBFVは変化しなかった。10%の低酸素負荷では低酸素血症に伴い、負荷中脳内総、還元Hbは増加し、酸化Hbは減少した。またCBF、CBFV(最大収縮期速度のみ)および血圧は増加した。負荷終了後それらは直ちに負荷前の状態に戻った。

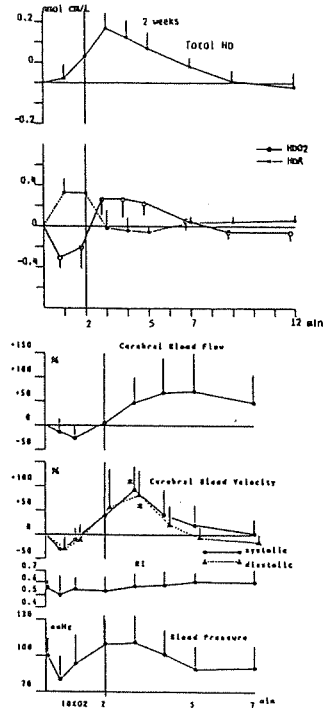
(2) 炭酸ガス負荷

18%の低酸素負荷ではアシドーシス、高CO₂血症に伴い、脳内総、酸化、還元Hb、CBF、CBFVおよび血圧は増加した。15%および10%の低酸素負荷では、アシドーシス、高CO₂血症、低酸素血症に伴い脳内総、還元Hbは増加し、酸化Hbは減少した。またCBF、CBFVおよび血圧は減少の後増加した。さらに負荷終了後、脳内酸化Hbと還元Hbは一過性の逆転の後徐々に負荷前の状態に戻り、CBF、CBFVおよび血圧は増加の後徐々に負荷前の状態に戻った。なお負荷終了後の脳内総HbとCBFの減少はほぼ平行し、脳底動脈のCBFVの減少より緩序であった。(図1, 2)<考察>

窒素ガス負荷(10%)では、低酸素血症に伴う脳組織酸素化の減少および脳血管の拡張と血圧の増加によるCBF、CBFVの増加を認めた。

一方、炭酸ガス負荷(15%、10%)では、窒素ガス負荷と異なる反応を示し、アシドーシス、高CO₂血症、低酸素血症に伴い脳組織酸素化は減少し、脳血液量は増加した。またCBF、CBFVおよび血圧は減少の後増加し、心機能の抑制と脳血管の拡張によるものと考えた。さらに、炭酸ガス負荷では、負荷終了後脳血管の拡張の持続と血液の酸素化の改善により脳内酸化Hbと還元Hbは、一過性に逆転し、CBFは脳底動脈のCBFVより長く増加した。

すなわち、新生児仮死に伴う低酸素血症、アシドーシス、高CO₂血症は心臓および脳血管に作用し、さまざまな脳組織酸素化および脳循環の変動を示すので、経時的多角的脳循環モニターが重要であると考えた。



図の説明

図1: 炭酸ガスを用いた10%酸素濃度の低酸素負荷による脳内総、酸化および還元ヘモグロビンの変動。

図2: 炭酸ガスを用いた10%酸素濃度の低酸素負荷による脳血流量、脳血流速度および血圧の変動。

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）の原因解明と新しい治療法の開発のための生物学的研究を行う部である。昨年度に引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研究班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の事務局として，内因性精神病の全国的研究活動を補佐した。また，1990年9月には第17回国際神経精神薬理学会のサテライトシンポジウムを組織したが，国の内外から200名を超す参加者があり活発な国際交流を行うことが出来た。

本年度は小川哲郎が外来研究員として，柏淳，村岡新一郎が研究生として，新たに研究活動に参加した。その他武内ゆかり（流動研究員），高嶋瑞夫（センター研究員），黒田安計，加藤由起子，白山幸彦，橋本篤司，滝田正壽，加賀谷有行，谷井靖之（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。

1. 精神分裂病の薬理生化学的研究

- i) NMDA 受容体 agonist である D-アラニンおよび D-セリンの誘導体を用い，フェンサイクリジン投与によって惹起される異常行動を抑制することに成功し，新しい精神分裂病治療薬の開発の可能性を示唆した。
- ii) シグマ受容体の結合特性を検討し，セロトナージックニューロンが影響する可能性を示唆した。

2. 躁うつ病の薬理生化学的研究

- i) 血小板を用いて大うつ病患者ではセロトニン 2 受容体機能の亢進が存在することを明らかにした。
- ii) 抗うつ剤が細胞膜 GPT 結合蛋白に直接作用する可能性を示唆した。

3. サーカディアンリズムの生理生化学的研究

- i) 視交叉上核における光刺激伝達に興奮性アミノ酸が関与する可能性を示唆した。
- ii) 母親隔離ストレスによって幼若ラットの内因性リズムが同調されることを示した。

（部長 高橋清久）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Takahashi K, Asano Y, Kohsaka M, Okawa M, Sasaki M, Honda Y, Higuchi T, Yamazaki J, Ishizuka Y, Kawaguchi K, Ohta T, Hanada K, Sugita Y, Maeda K, Nagayama H, Kotorii T, Egashira K, Takahashi S :
Multi center study of seasonal affective disorders in Japan
— A preliminary report —
J Affect Dis 21 : 57-65, 1991
- 2) Ohi K, Takashima M, Nishikawa T, Takahashi K :
N-Methyl-D-Aspartate receptor participates in neuronal transmission of photic information through the retinohypothalamic tract
Neuroendocrinol 53 : 344-348, 1991
- 3) Kazawa T, Mikuni M, Higuchi T, Arai I, Takahashi K, Yamauchi T :
Characterization of sulpiride-displaceable ³H-YM-09151-2 binding sites in rat frontal cortex and the effects of subchronic treatment with haloperidol on cortical D-2 dopamine receptors
Life Sci 47 : 531-537, 1990
- 4) Kagaya A, Mikuni M, Kusumi I, Yamamoto H, Takahashi K :
Serotonin-induced acute desensitization of serotonin₂ receptors in human platelets via a mechanism involving protein Kinase C
J Pharmacol. Exp. Ther. 255 : 305-311, 1990
- 5) Mikuni M, Kusumi I, Kagaya A, Kuroda A, Mori H, Takahashi K :
Increased 5-HT-2 receptor function as measured by serotonin-stimulated phosphoinositide hydrolysis in platelets of depressed patients
Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat 15 : 49-61, 1991
- 6) Kusumi I, Mikuni M, Takahashi K :
Effect of subchronic antidepressants administration on serotonin-stimulated phosphoinositide hydrolysis in para-chlorophenylalanine treated rat hippocampal slices
Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat 15 : 393-403, 1991
- 7) Hata N, Nishikawa T, Umino A, Takahashi K :

Evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptor in tonic inhibitory control of dopaminergic transmission in rat medial frontal cortex

Neurosci Let 120 : 101-104, 1990

- 8) Ishikawa T, Nagata S, Ago Y, Takahashi K, Karibe M :

The central inhibitory effect of interleukin-1 on gastric acid secretion

Neurosci Let, 119 : 114-117, 1990

- 9) Yamada N, Shimoda K, Takahashi K, Takahashi S :

Relationship between free-running period and motor activity in blinded rats

Brain Res Bull 25 : 115-119, 1990

- 10) 久住一郎, 三国雅彦, 黒田安計, 高橋清久 :

ラット海馬におけるセロトニン刺激性イノシトールリン脂質代謝回転の検討
—セロトニン合成酵素阻害剤および抗うつ薬の影響について—

脳と精神の医学 : 1 : 37-44, 1990

b. 著 書

(分担)

- 1) 西川徹 :

薬理作用の基礎

今日の分裂病治療, 金剛出版, 東京, p254-282, 1990

- 2) 西川徹 :

興奮性アミノ酸

精神分裂病—基礎と臨床— B. 生物学 10) 受容体

朝倉書店, 東京, p267-278, 1990

c. 総 説

- 1) 高橋清久, 大川匡子, 村上昇 :

哺乳動物のリズム同調機構—とくに臨床応用面から—

第25回脳のシンポジウム, 神経研究の進歩 34 : 892-900, 1990

- 2) 三国雅彦, 久住一郎, 加賀谷有行, 黒田安計, 高橋清久 :

うつ病血小板におけるセロトニン-2 受容体機能亢進とイノシトールリン脂質代謝

Pharma Medica 8 : 59-63, 1990

II 研究業績

3) 三国雅彦, 大月三郎 :

精神科領域におけるレセプター機能の研究の進歩

—特集にあたって—

精神医学, 医学書院, 33(2): 116, 1991

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

ヒト血小板におけるモノアミン受容体機能

—うつ病血小板におけるモノアミン受容体刺激性細胞内カルシウム濃度の検討—

精神医学, 33(2): 116, 1991

d. 班会議報告書

1) 高橋清久, 西川徹, 谷井靖之, 海野麻未, 橋本篤司 :

Phencyclidine 投与動物を用いた精神分裂病症状の発現機構と新しい治療薬開発に関する研究

厚生省精神・神経疾患・分裂病の生物学的病因および発症に関する研究班

平成元年度研究報告書, p21-29, 1990

2) 三国雅彦, 加賀谷有行, 黒田安計, 山本秀子, 加藤文代, 滝田正壽, 高橋清久 :

うつ病におけるセロトニン-2受容体ファミリーの機能に関する研究

—うつ病血小板Caイオン濃度の検討並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

平成元年度研究成果報告書, p61-67, 1990

e. その他

1) 高橋清久 :

冬季うつ病と高照度光療法

東京都神経科学総合研究所研究紀要 19: 49-65, 1991

2) 高橋清久 :

冬季うつ病

「医科学大事典」補遺巻8, 講談社, 東京, p94-97, 1991

3) 三国雅彦, 山本秀子, 加賀谷有行, 村岡新一郎, 高橋清久, 富田麗, 堅田利明 :

GTP結合タンパクに対する各種抗うつ薬の直接作用の検討

精神薬療基金研究年報 22: 156-162, 1990

4) Kagaya A, Mikuni M, Takahashi K :

Modulation of 5-HT₂ receptor-mediated intracellular calcium movement in platelets and its function in affective disorders

Jpn J Psychiat Neurol, 45(1) : 117-118, 1991

5) Kuroda A, Katoh F, Mikuni M, Takahashi K :

Rat hippocampal 5-HT_{1c} receptor binding and 5-HT_{1c} receptor mediated rat blood corticosterone responses

Jan J Psychiat Neurol, 45(1) : 119-120, 1991

6) Takashima M, Katoh Y, Takeuchi Y, Takahashi K :

Effect of subchronic administration of methylcobalamin on the acetylcholine and choline content in the brain and locomotor activity in rats

Jan J Psychiat Neurol, 45(1) : 173-177, 1991

7) Mikuni M, Kagaya A, Kuroda A, Katoh F, Takahashi K :

Responsiveness of the 5-HT₂ receptor family in affective disorders

Clinical Neuropharmacol 13 (Suppl, 2) : 15-16. 1990

8) Moriya Y, Yamazaki J, Yamauchi T, Takahashi K :

A case of Non-24Hour Sleep-Wake syndrome

Jpn J Psychiat Neurol, 44(4) : 809, 1990

9) Yamazaki J, Sugishita M, Moriya Y, Isojima G, Ohshima H, Yamazaki O, Takeda Y,

Kojima T, Yamauchi T, Takashima M, Takahashi K :

The effects of Vitamine B₁₂ on the suppression of melatonin secretion under illumination

Jan J Psychiat Neurol, 45(1) : 169-170, 1991

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 高橋清久 :

冬季うつ病と高照度光療法

第13回神経研シンポジウム(生体のリズム異常), 東京, 9.25, 1990

2) 三国雅彦, 加賀谷有行, 高橋清久 :

Alpha-2 アドレナリン受容体機能とうつ病 —セロトニン-2 受容体機能と比較して—
シンポジウム「脳血管におけるα受容体」

II 研究業績

第8回 α 受容体カンファランス, 東京, 9.8, 1990

- 3) Mikuni M, Kagaya A, Kuroda A, Katoh F, Takahashi K :

Responsiveness of the 5-HT₂ receptor family in affective disorders

Symposium : Professor Ryo Takahashi Memorial Symposium of Monoaminergic Function in Affective Disorders

17th Congress of Collegium International Neuro-Psychopharmacologicum, Kyoto, Sep 11, 1990

- 4) Mikuni M, Yamamoto H, Kagaya A, Muraoka S, Takahashi K :

Evidence that tricyclic antidepressant agents directly interact with Go/Gi GTP binding proteins

The Satellite Symposium of the 17th C. I. N. P.

New Trends in Schizophrenia and Mood Disorders Research, Kyoto, Sep 15, 1990

- 5) Nishikawa T, Umino A, Tanii Y, Hashimoto A, Takahashi K :

Possible involvement of glutamatergic dysfunction in vulnerability to schizophrenic symptoms

The Satellite Symposium of the 17th C. I. N. P.

(Sendai Symposium : Vulnerability to Schizophrenic Symptoms)

Sendai, Sep 15, 1990

- 6) Nishikawa T, Umino A, Tanii Y, Hashimoto A, Hata N, Takahashi K :

Excitatory amino acidergic dysfunction in schizophrenia and possible treatment

The Satellite Symposium of the 17th C. I. N. P.

New Trends in Schizophrenia and Mood Disorders Research, Kyoto, Sep 15, 1990

- 7) Nishikawa T, Tanii Y, Umino A, Hata N, Takahashi K :

Dysfunction of excitatory amino acidergic systems and schizophrenic disorders

The 14th international Symposium (Biological Basis of Schizophrenic Disorders)

Katata, Sep 6, 1990

- 8) Nishikawa T :

NMDA receptor, phencyclidine and schizophrenia

Schizophrenia : Dialogues in Neuroscience, Tokyo, Sep 18, 1990

- 9) Shirayama Y, Nishikawa T, Nakamura M, Takahashi K :

Effects of repeated treatment with psychoactive drugs on sigma binding sites in rat brain

The Satellite Symposium of the 17th C. I. N. P.

New Trends in Schizophrenia and Mood Disorders Research, Kyoto, Sep 15, 1990

- 10) Kagaya A, Mikuni A, Muraoka S, Takahashi K, Meltzer H Y :

Calcium mobilizing monoamine receptor function in platelets from affective disorders and normal controls

The Satellite Symposium of the 17th C. I. N. P.

New Trends in Schizophrenia and Mood Disorders Research, Kyoto, Sep 15, 1990

- 11) Tanii Y, Nishikawa T, Hashimoto A, Takahashi K :

Stereospecific effect of allosteric agonists for N-methyl-D-aspartate receptor complex on PCP-induced hyperactivity in the rat

The Satellite Symposium of the 17th C. I. N. P.

New Trends in Schizophrenia and Mood Disorders Research, Kyoto, Sep 15, 1990

- 12) Shinohara K, Nishikawa T, Yamazaki K, Takahashi K :

Ontogeny of phencyclidine and strychnine-insensitive glycine binding sites associated with NMDA receptor/ion channel complex in rat brain

Satellite Symposium of 17th C.I.N.P.

NMDA related Agents : Biochemistry, Pharmacology and Behavior

Nagoya, Sep 17, 1990

- 13) Mitsushio H, Takashima M, Takahashi K :

Effects of 40-day treatment with sodium valproate alone or in combination with haloperidol on rat brain substance P content

The Satellite Symposium of the 17th C. I. N. P.

New Trends in Schizophrenia and Mood Disorders Research, Kyoto, Sep 15, 1990

b. 国際学会

- 1) Mikuni M, Yamamoto H, Tomita U, Kagaya A, Kobayashi I, Katada T, Takahashi K :

Tricyclic antidepressants, but not MAO-I can directly interact with Go-GTP binding protein in vitro

17th Congress of Collegium International

Neuro-Psychopharmacologicum, Kyoto, Sep 12, 1990

- 2) Nishikawa T, Umino A, Tanii Y, Takahashi K :

II 研究業績

Evidence for involvement of NMDA receptor blocking in phencyclidine-induced facilitation of dopaminergic transmission in rat prefrontal cortex

17th Congress of Collegium International Neuro-Psychopharmacologicum,
Kyoto, Sep 13, 1990

3) Kagaya A, Mikuni M, Yamamoto H, Takahashi K :

Serotonin₂ and alpha₂-adrenegic receptors-induced intracellular calcium mobilization in human platelets

17th Congress of Collegium International Neuro-Psychopharmacologicum,
Sep 12, 1990

4) Kazawa T, Mikuni M, Higuchi T, Arai I, Takahashi K, Yamauchi T :

Investigation of pharmacological properties of ³H-YM-09151-2 binding sites in rat frontal cortex and the effects of subchronic treatment of haloperidol on the cortical D-2 dopamine receptors

17th Congress of Colegium International Neuro-Psychopharmacologicum,
Kyoto, Sep 12, 1990

5) Takita M, Mikuni M, Takahashi K :

Neuropharmacological studies on short-term adaptive change to stressful stimulus in frontal cortical glucose utilization obtained by on-line brain dialysis in rat

17th Congress of Collegium International Neuro-Psychopharmacologicum,
Kyoto, Sep 12, 1990

6) Yamamoto H, Tomita U, Mikuni M, Kagaya A, Kobayashi I, Katada T, Takahashi K :

Antidepressants action sites is on the α subunit of G protein

20th Annual Meeting of Society for Neuroscience, St. Louis, Oct 29, 1990

7) Shirayama Y, Nishikawa T, Takahashi K :

Effect of subchronic treatment with psychotogenic drugs on sigma binding sites in rat brain

17th Congress of Collegium International Neuro-Psychopharmacologicum,
Kyoto, Sep 12, 1990

8) Tanii Y, Nishikawa T, Takahashi K :

Allosteric agonists for NMDA receptor complex attenuate PCP-induced abnormal behaviors

17th Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum,
Kyoto, Sep 14, 1990

9) Umino A, Nishikawa T, Takahashi K :

Effects of non-competitive antagonists for NMDA type excitatory amino acid receptor on monoamine metabolism in rat brain

17th Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum,
Kyoto, Sep 13, 1990

10) Ichikawa H, Yamada S, Sato T, Takahashi K :

Sleep-waking rhythm disturbance in school refusers

12th International Congress of International Association for Child & Adolescent Psychiatry and Allied Professions, Kyoto, July 17, 1990

11) Ichikawa H, Watanabe S, Takashima M, Takahashi K :

The change of central dopaminergic and serotonergic systems in neonatal Dopamine-depletion rats : An experimental model of "Hyperkinetic Syndrome"

12th International Congress of International Association for Child & Adolescent Psychiatry and Allied Professions, Kyoto, July 19, 1990

c. 一般学会

1) 高嶋瑞夫, 武内ゆかり, 加藤由起子, 高橋清久 :

メチルコバラミンのサーカディアンリズムに及ぼす影響

第5回臨床時間生物学研究会, 東京, 9.27, 1990

2) 加藤由起子, 高嶋瑞夫, 武内ゆかり, 杉下真理子, 高橋清久 :

メラトニン(MEL)連続投与による子ラットリズムの位相変化

第7回生物リズム研究会, 奈良, 9.29, 1990

3) 武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 加藤由起子, 西川徹, 高橋清久 :

光刺激伝達における視交叉上核内興奮性アミノ酸受容体の関与

第7回生物リズム研究会, 奈良, 9.29, 1990

4) 武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 加藤由起子, 西川徹, 高橋清久 :

光刺激伝達における視交叉上核内興奮性アミノ酸受容体の関与

第110回日本獣医学会, 宮崎, 10.17, 1990

5) 武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 加藤由起子, 西川徹, 高橋清久 :

II 研究業績

光刺激伝達に興奮性アミノ酸及びコリン性ニューロンが関与する

第14回神経科学学術集会, 京都, 12.11, 1990

6) 加賀谷有行, 三国雅彦, 山本秀子, 高橋清久 :

ヒト血小板におけるモノアミン受容体機能

第20回日本神経精神薬理学会, 甲府, 10.18, 1990

7) 加賀谷有行, 三国雅彦, 高橋清久 :

ヒト血小板におけるモノアミン受容体機能—セロトニン₂受容体とアルファ₂アドレナリン受容体との相互作用—

第33回神経化学会, 広島, 10.25, 1990

8) 加賀谷有行, 三国雅彦, 高橋清久 :

血小板における5HT₂受容体, 情報伝達系の調節機構とうつ病

第7回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 東京, 5.18, 1990

9) 滝田正壽, 三国雅彦, 高橋清久 :

ストレスとその神経伝達過程に関わる脳内解糖系の変動

第33回日本神経化学会, 広島, 10.25, 1990

10) 黒田安計, 加藤文代, 谷井靖之, 三国雅彦, 高橋清久 :

mCPPによるラット血中コルチコステロン上昇反応について

第14回神経科学学術集会, 京都, 12.11, 1990

11) 黒田安計, 三国雅彦, 高橋清久 :

セロトニン・アゴニスト刺激によるコルチコステロン分泌の薬理学的検討

第7回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 東京, 5.18, 1990

12) 黒田安計, 小川哲郎, 高橋清久 :

ラット大脳皮質5-HT₂受容体結合密度に及ぼすACTHの影響について

第13回日本生物学的精神医学会, 前橋, 3.29, 1991

13) 村岡新一郎, 三国雅彦, 加賀谷有行, 松本啓, 高橋清久 :

C6BU-1細胞における5-HT₂受容体-Ca²⁺動員系に対する抗うつ薬の影響

第13回日本生物学的精神医学会, 前橋, 3.29, 1991

14) 加藤由起子, 武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 山崎晃資, 高橋清久 :

仔ラットリズムに及ぼす母ラットの影響

第13回日本生物学的精神医学会, 前橋, 3.30, 1991

- 15) 谷井靖之, 西川徹, 海野麻未, 高橋清久 :
D-Alanine は phencyclidine の生化学的並びに行動学的作用に拮抗する
第20回日本神経精神薬理学会, 甲府, 10.18, 1990
- 16) 橋本篤司, 西川徹, 高橋清久 :
Methamphetamine による異常行動の発現に対する N-Methy-D-Apartate 受容体アロステリック作動薬および誘導体の効果
第20回日本神経精神薬理学会, 甲府, 10.18, 1990
- 17) 白山幸彦, 西川徹, 高橋清久 :
線条体 sigma 結合部位に対する向精神薬反復投与の影響
第14回神経科学学術集会, 京都, 12.11, 1990
- 18) 白山幸彦, 西川徹, 高橋清久 :
ラット脳内 sigma 結合部位に対する imipramine および desipramine 投与の影響
第13回日本生物学的精神医学会, 前橋, 3.29, 1991
- 19) 柏 淳, 西川徹, 海野麻未, 高橋清久 :
MK-801 の前頭葉ドーパミン代謝に与える影響
第13回日本生物学的精神医学会, 前橋, 3.30, 1991
- 20) 山崎潤, 杉下真理子, 守屋雪夫, 磯島玄, 大島浩伸, 山崎浩, 小島通, 山内俊雄, 高嶋瑞夫, 高橋清久 :
光感受性に及ぼすビタミン B₁₂ の影響—高照度光による夜間メラトニン分泌の抑制を指標として—
第13回日本生物学的精神医学会, 前橋, 3.29, 1991
- 21) 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の 1 症例
日本睡眠学会, 米子, 6.7, 1990
- 22) 山崎潤, 杉下真理子, 守屋雪夫, 磯島玄, 大島浩伸, 山崎浩, 小島通, 山内俊雄, 高橋清久 :
光感受性に及ぼすビタミン B₁₂ の影響—高照度光によるメラトニン分泌抑制を指標として—効果の比較
第 5 回臨床時間生物学研究会, 東京, 9.27, 1990

C. 班会議発表

- 1) 高橋清久, 三国雅彦, 滝田正壽, 黒田安計, 小川哲郎 :

II 研究業績

ストレスに対する適応機構の解明のための基礎的研究

厚生省精神・神経疾患・心身症の発症機序と病態に関する研究班

東京, 1.19, 1991

- 2) 高橋清久, 西川徹, 橋本篤司, 谷井靖之, 海野麻未, 白山幸彦, 岡高恵, 柏 淳 :

NMDA 受容体アロステリック作動薬およびその脂肪酸結合化合物は phencyclidine または methamphetamine 投与後に出現する異常行動を抑制する

厚生省精神・神経疾患・精神分裂病の発症機序に関する神経科学的研究班

東京, 2.8, 1991

- 3) 高橋清久, 西川徹, 柏 淳, 海野麻未, 橋本篤司, 白山幸彦 :

メタンフェタミンによる逆耐性現象の形成と維持に関する神経回路網の研究

科学技術新興調整費総合研究第 II 期課題

ポジトロンCT等を用いる薬物依存メカニズム解明に関する研究班

東京, 3.10, 1991

- 4) 三国雅彦, 加賀谷有行, 黒田安計, 村岡新一郎, 小川哲郎, 高橋清久 :

神経由来培養細胞ならびにラット大脳皮質における 5-HT-2 受容体-G 蛋白-Ca⁺⁺ 動員系に対する抗うつ薬の作用機序とステロイドホルモンによる調節

厚生省精神・神経疾患・感情障害の成因と治療に関する研究班

東京, 2.9, 1991

- 5) 西川徹, 海野麻未, 柏 淳, 橋本篤司, 白山幸彦, 高橋清久 :

依存性薬物による逆耐性現象の発現機序に関する生化学的研究

— methamphetamine または cocaine 投与の脳内 c-Fos 蛋白様免疫活性 —

厚生省精神・神経疾患・薬物依存の発症機序と臨床及び治療に関する研究班

東京, 2.7, 1991

D. その他の研究会

- 1) 三国雅彦 :

抗うつ薬のアミン受容体, 細胞内情報伝達系への直接作用

ヒューマンサイエンス第3分野第4テーマ研究発表会

東京, 2.7, 1991

- 2) 西川徹 :

Phencyclidine の作用からみた精神分裂病症状の発現機序

第3回北海道ニューロトランスミッターと疾患研究会

丸駒温泉, 8.25, 1990

3) 橋本篤司, 西川徹, 高橋清久 :

動物モデルを用いた精神分裂病治療薬の開発

ヒューマンサイエンス第3分野第4テーマ研究発表会

東京, 2.7, 1991

II 研究業績

3. 主な研究報告

仔ラットリズムに及ぼす母ラットの影響

加藤由起子, 高嶋瑞夫, 武内ゆかり, 高橋清久

これまで我々は同調機構を調べる目的で仔ラットリズムの母親による同調様式の検討を行ってきた。その結果、幼若ラットの母親への接触を一定時間以上制限する操作 (PMD: Periodic Maternal Deprivation) を行い松果体のメラトニン合成酵素 (N-Acetyltransferase) 活性のリズムを測定すると、明期のみの接触では接触を制限しなかった場合と同様のリズムが認められるのに対し暗期のみの接触ではリズムが逆転することを示した。そこで今回我々は接触時間をさらに短縮し、母親の不在というストレスを強めた場合の仔ラットリズムの変化を観察した。<方法> Wistar系成熟ラットをL/D 12:12の条件下で飼育出産させ、光の影響を除くために生後2日目に氷冷麻酔下で仔ラットの眼球を摘出した。母親との接触時間を1日4時間に制限するPMD操作を生後7日目より7日間継続して行った後NAT活性リズムを測定した。NAT活性リズムは4時間おき24時間にわたり1点5-6匹の仔ラットを断頭屠殺、松果体を採取し出口らの方法により測定した。接触時間は明期暗期をそれぞれ3分割し明期の前・中・後期、暗期中・後期とした。さらに明期および暗期中期においてはPMD操作の期間をそれぞれ7日、3日、1日と変化させ、母親の接触前後におけるNAT活性を測定した。

<結果> 母親の接触を4時間に制限するPMD操作を7日間行くと仔ラットのNAT活性リズムが明らかに変化し、どの時間に接触させても接触前に高値を示したNAT活性が接触後顕著に低下しその後徐々に上昇するパターンを示した (Fig.1,2)。明期中期においては1日のみのPMD操作で接触前のNAT活性の上昇が認められたが、暗期中期では3日以上以上の継続が必要であった。

<考察> 母親との接触を4時間に制限することが仔ラットのリズムに大きな影響を与えることが明らかとなった。母親の不在が仔ラットにとって大きなストレスとなりそのリズムを変化させるものと思われる。一方母親との接触の後でNAT活性の低下が見られることより母親との接触授乳などの母性行動がNAT活性を低下させる要因となっている可能性が示唆される。このPMD操作によるNAT活性リズムの変化が内因性リズムの変化を反映しているか否かが問題となるところであり現在その点について検討中である。

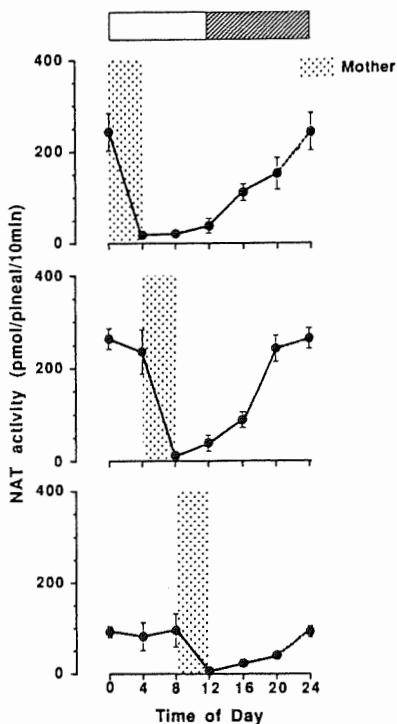


Fig.1 Effect of restriction of maternal presence to 4 hours during the light period

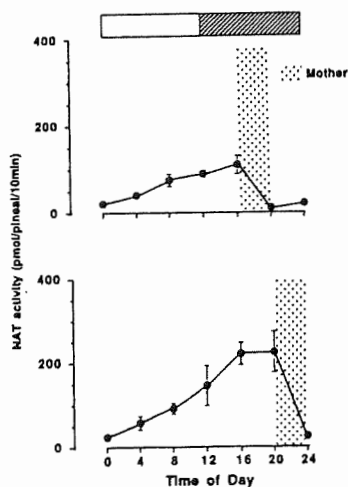


Fig.2 Effect of restriction of maternal presence to 4 hours during the dark period

脳内 sigma結合部位とセロトニン伝達系の相互作用の可能性

白山幸彦, 西川徹, 高橋清久

Sigma結合部位は(+)[³H]N-allylnormetazocine、[³H]1,3-di-o-tolylguanidine([³H]DTG)、(+)[³H]3PPP、[³H]haloperidol(HPD)などによって標識され、多くの抗精神病薬、精神異常発現薬、抗うつ薬などに高い親和性を持つことが知られている。この事からsigma結合部位が行動や情動の調節に関与していることが示唆される。本研究ではsigma結合部位と抗うつ薬の作用との関連を探る目的で、imipramine(IMI)を1回あるいは反復投与し、脳内の各部位で[³H]DTG結合能を調べた。

【方法】

実験にはWistar系雄性ラット(体重180-220g)を用いた。IMI 10mg/kg(精製水に溶解)または精製水(対照群)を腹腔内に1回投与ないし14日間反復投与(1日1回)した。また、5HT合成酵素阻害剤para-chlorophenylalanine(PCPA) 100mg/kgを腹腔内に反復投与したラットに対して、IMIの影響を調べた。動物は薬物の最終投与から26時間後に断頭し、氷上にて大脳皮質、海馬、線条体を切り出した。各脳組織に20volsの氷冷50mM Tris-HCl buffer (pH7.7, 25℃)を加えてhomogenize後、4℃40,000gで20分間遠沈した。この操作を更に2回繰り返して、最終の沈査を30volsの50mM Tris-HCl buffer (pH8.0, 25℃)に再懸濁して粗膜分画を得た。[³H]DTG結合実験は、[³H]DTG (39.1 Ci/mmol), 0.15-0.20mgの脳ホモジネート及び種々の薬物を含む0.5mlの50mM Tris-HCl buffer (pH8.0, 25℃)中で行った。反応液を25℃で90分間インキュベートした後、Whatman GF/B filterを通して吸引濾過し、氷冷50mM Tris-HCl buffer (pH8.0, 25℃) 4mlで3回洗浄した。[³H]DTGの特異的結合は、10⁻⁶M HPDまたはDTGの存在下、非存在下の差として求めた。

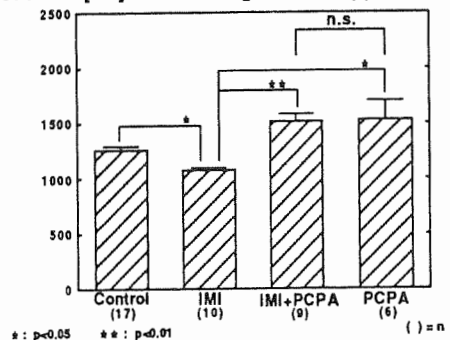
【結果】

IMI反復投与において、[³H]DTGの最大結合部位数(Bmax)が、海馬(図)、線条体で有意に低下したが、解離定数(Kd)には有意な変化が見られなかった。IMI 1回投与では線条体、海馬のKd、Bmaxは共に有意な変化を示さなかった。また、大脳皮質の組織を用い、assay medium中にIMIを添加してIMIの[³H]DTG結合に対する直接作用を調べたところ、Kdは有意に増加し

たが、Bmaxには変化が見られなかった。IMIにPCPAを同時投与することで、海馬、線条体のIMIによるBmaxの低下は拮抗された。PCPA自身の反復投与では、Bmaxの増加傾向はあったが、統計上有意な変化ではなかった。Kdはいずれも有意差はなかった。

【考察】

以上の結果から、IMIの反復投与により[³H]DTGで標識される脳内sigma結合部位が減少することがわかった。これはkdの変化を伴わないBmaxの低下によって生じており、IMIのアッセイ系への直接添加や、1回投与では同様の変化は見られないことから、薬物の残存や単回投与による影響が持続していた可能性は除外できる。一方、脳内の5HTを枯渇させるPCPAはIMIによる[³H]DTG結合の低下を抑制した。従って、IMIの5HT再取り込み阻害作用によって、5HT伝達が増強した状態が続くために、sigma結合部位が減少する機序が考えられる。これは5HT再取り込みの選択的阻害薬(fluoxetine)でも脳内の[³H]DTG結合の低下が生ずること(未発表データ)からも支持される。つまり、5HT伝達とsigma結合部位の相互作用があると考えられる。しかし、この他の機序も考えられ、今後の検討を要する。例えば、IMIはsigma結合部位に中等度の親和性を示すことより、IMIが反復してsigma結合部位に直接作用した結果、[³H]DTG結合が減少する可能性も否定できない。

Effects of IMI alone, or in combination with PCPA on [³H]DTG binding to the hippocampus

C6BU-1細胞における5-HT刺激性細胞内Ca²⁺動員系に対する 抗うつ薬ならびに dexamethasone 処置の影響

村岡新一郎, 三国雅彦, 加賀谷有行, 斉藤和子, 高橋清久

ラットグリア腫瘍よりクローン化されたC6グリオーマ細胞は5-HT受容体を持ち、抗うつ薬を取り込んでβ受容体や細胞内情報伝達系に影響を及ぼすことが知られている。これまで報告してきた5HT₂受容体とうつ病の関係をさらに探求するため、C6グリオーマ細胞の5-HT刺激性Ca²⁺動態変化を指標にして各種抗うつ薬の作用機序について検討するとともに、うつ病で過剰に分泌されると言われるグルココルチコイドがこの5-HT刺激性細胞内情報伝達系に与える影響を検索した。

材料・方法

C6BU-1細胞は、10%牛胎児血清を加えたDMEM培地で、10%CO₂を含むインキュベーター内で培養した。培養液をKrebs-Ringer HEPES緩衝液に交換した後、2μM fura-2/AMを添加したC6BU-1細胞を5-HT刺激し細胞内Ca²⁺濃度増加反応を蛍光光度計(励起340/380nm, 蛍光510nm)で測定した。薬理学的特性を明かにするため各種モノアミン受容体拮抗薬を5-HT刺激の3分前に添加し、Ca²⁺動員に対する抑制能を検索した。次に、このCa²⁺動員系に対する抗うつ薬の直接作用を検討するため、各種向精神薬(1μM)を5-HT刺激2時間前に投与し細胞を洗浄後、このCa²⁺動員に対する抑制能を測定した。次に、100nM dexamethasoneとグルココルチコイド-2受容体拮抗薬、RU38486(1μM)をそれぞれ単独または併用投与し、48時間インキュベーション後、同様にして5-HT刺激性Ca²⁺濃度増加反応を測定した。

結果と考察

C6BU-1細胞における5-HT刺激性細胞内Ca²⁺濃度増加反応は5HT₂受容体を介することを証明した。三環系抗うつ薬のイミプラミン、クロミプラミンを2時間処置したC6BU-1細胞は、対照群と比較すると10μMの5-HT刺激性Ca²⁺濃度増加反応は有意に抑制された。非定型抗うつ薬のイプリンドールにもその傾向が見られたが、MAO阻害剤パージリン、抗精神薬ハロペリドール、ならびに抗不安薬ジアゼパムは抑制されなかった(Fig 1)。これらの向精神薬は5-HT受容体に親和性が低く、また培養液を交換して培養液中の薬剤を除去しているので、

この結果は抗うつ薬が細胞内に取り込まれ、細胞内情報伝達系に直接作用しているものと考えられた。dexamethasoneを添加した培養液で48時間培養した後の10μMの5-HT刺激性Ca²⁺濃度増加反応は対照群に比し約50%の有意な亢進が観察されたが、RU38486の単独ならびにdexamethasoneとの併用処置は対照群と差がなかった(Fig 2)。これまでうつ病患者血小板における5-HT刺激性Ca²⁺上昇が正常群に比し有意に亢進している事を報告したが、C6BU-1細胞の5HT₂受容体刺激性Ca²⁺濃度増加反応は48時間のdexamethasone処置により有意に亢進し、しかもこれがグルココルチコイド-2受容体を介する事がRU38486による抑制効果から明らかとなった。したがって、dexamethasone処置による5HT₂受容体機能亢進が核内遺伝子発現調節系を介して生じている可能性が示唆されるとともに、5HT₂受容体機能亢進の機序として副腎皮質系の関与が示唆された。

Fig 1: Effect of 2hr treatment with antidepressants on 5-HT-induced Ca²⁺ mobilization in C6 cells
imipramine(IMP), clomipramine(CMI), iprindole(IPR), pargyline(PAR), haloperidole(HPD), diazepam(DZP): 1μM
*p<0.05 **p<0.01 vs control

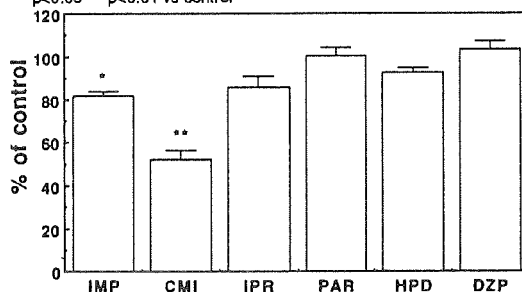
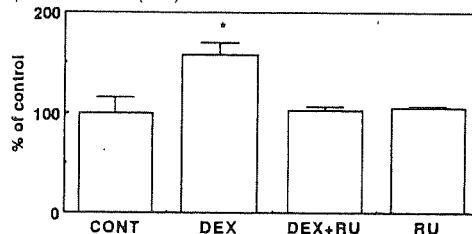


Fig 2: Effect of 48hr treatment with dexamethasone on 5-HT-induced Ca²⁺ mobilization in C6 cells
dexamethasone(DEX):100nM, RU38486(RU):1μM
*p<0.01 vs control(cont)



ラット大脳皮質 5-HT₂受容体結合密度に及ぼす ACTH並びに adrenalectomy の影響について

黒田安計, 三国雅彦, 小川哲郎, 高橋清久

死後脳を用いた最近の研究ではうつ病自殺者の大脳皮質における 5-HT₂受容体の結合数は増加しているという報告が多い。また、うつ病患者の血小板でも 5-HT₂受容体の結合密度の増加や、5-HT₂受容体の機能亢進¹⁾が報告されている。更には、多くの抗うつ薬の反復投与によりラット大脳皮質の 5-HT₂受容体の結合数が低下することから 5-HT₂受容体のうつ病における関与が注目されている。一方、従来よりうつ病患者では視床下部-下垂体-副腎皮質系の亢進に関する種々の報告があり Cushing 病患者では高率に抑うつ状態の発生が見られるなど、うつ病に対する視床下部-下垂体-副腎皮質系の影響が推測される。

そこで今回我々は 5-HT₂受容体と視床下部-下垂体-副腎皮質系の関係を調べる目的で、ラット大脳皮質 5-HT₂受容体に対する ACTH 並びに adrenalectomy(ADX)の効果について検討した。

<方法>

SD系雄性ラット (250-350 g) を ADX-ACTH群、Sham-ACTH群、ADX-saline群、Sham-saline群の四群とし、手術翌日から ACTH (コートロシン Z : 50 μ g) ないしは saline (Sal) の投与を 10 日間行った。最終投与後約 24 時間で断頭し前脳部皮質を取り出し、Leysen²⁾の方法を一部改変して [³H] ketanserin 結合実験を行った。更に同部位での 5-HT、5-HIAA 濃度を HPLC-ECD にて分離定量した。

<結果と考察>

ACTH の 10 日間投与によってラット前脳部皮質での 5-HT₂受容体結合密度 (Bmax) は対照 (Sham-Sal 群) に比して有意な増加を示した。ACTH による増加は、ADX によって拮抗された (Sham-ACTH 群 vs. ADX-ACTH 群)。ADX 単独ではラット前脳部皮質 5-HT₂受容体結合密度 (Bmax)

には変化がなかった (Sham-Sal 群 v s. ADX-Sal 群) (表 1)。なお同部位での 5-HT、5-HIAA 濃度はいずれの群間にも有意な差はなかった。

うつ病自殺者脳で見られる 5-HT₂受容体結合密度の増加は従来 5-HT 代謝の低下と関連づけられてきたが、一方、神経毒などで 5-HT 神経機能を低下させた動物の 5-HT₂受容体結合密度は増加せず、5-HT₂受容体密度増加の機序は未だ説明されていない。今回の結果は 5-HT₂受容体密度増加の機序に ACTH 刺激によって分泌される副腎性の因子が関与している可能性があることを示唆している。

<文献>

- 1) Mikuni et al., Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat., 15, 49-61 (1991)
- 2) Leysen et al. Mol. Pharmacol., 21, 301-314 (1982)

(表 1) ラット前脳部皮質 5-HT₂受容体結合に対する ACTH、adrenalectomy の効果

群	N	Kd(nM)	Bmax(fmol/mg prot.)
Sham-Sal	8	0.33 \pm 0.01	212.4 \pm 5.6
ADX-Sal	8	0.34 \pm 0.01	212.0 \pm 4.6
Sham-ACTH	7	0.37 \pm 0.01	249.9 \pm 3.9*
ADX-ACTH	8	0.33 \pm 0.02	193.6 \pm 8.6

*P<0.01 vs. Sham-Sal, ADX-Sal, ADX-ACTH 群

II 研究業績

視床下部視交叉上核における光刺激伝達機構の解析

武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 加藤由起子, 西川徹, 高橋清久

メラトニンの合成酵素である N-アセチルトランスフェラーゼ(NAT)活性リズムは光によって制御されており, 光刺激は暗期に上昇する NAT 活性を抑制する。網膜で受容された光刺激は視交叉上核(SCN)を経由して松果体に伝達されるが, 中継部位での神経伝達物質, 介在神経の存在の有無等の詳細は明らかにされていない。そこで今回我々は, 光刺激伝達の第一中継部位であり, 概日リズムのオシレーターと考えられている SCN 内における興奮性アミノ酸およびアセチルコリン受容体の果たす役割をサブタイプレベルで検討した。

<方法>ラット松果体中の NAT 活性が高い暗期に, 興奮性アミノ酸受容体もしくはアセチルコリン受容体アゴニストの SCN 内微量投与を行い, 20 分後に松果体を摘出, NAT 活性を測定した。さらにアンタゴニストを前処置して, 20 分後に 3 lux, 2 分間の光パルスを与える実験を行った。本実験で使用した薬物および現在想定されている結合部位を以下の表に示した。

	Agonist	Antagonist
Acetylcholine Receptors		
Nicotinic receptor	Carbachol	α -BTX
Muscarinic receptor	Bethanechol	PZ
Excitatory Amino Acid Receptors		
NMDA receptor	NMDA	APV
	CPP	
QA receptor	AMPA	JSTX-3
KA receptor	KA	1-NA-Spm
NMDA	:N-methyl-D-aspartate	
QA	:quisqualate	
KA	:kainate	
AMPA	: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate	
APV	:2-amino-5-phosphonovalerate	
CPP	:3-((\pm)-2-carboxypiperazine-4-yl)propyl-1-phosphonate	
JSTX-3	:Joro spider toxin-3	
1-NA-Spm	:1-naphthylacetyl spermine	
α -BTX	: α -Bungarotoxin	
PZ	:pirenzepine	

<結果>興奮性アミノ酸受容体アゴニストに関しては, いずれの薬物投与も NAT 活性を低下させ, 光

刺激と類似の効果が得られた。更に NMDA 及び AMPA については用量依存の傾向がみられた(図1)。またアンタゴニスト実験では, 全ての薬物は光刺激を部分的に遮断し, NAT 活性は比較的高値を維持していた(図2)。一方アセチルコリン受容体アゴニストの中ではカルバコールのみ NAT 活性を低下させ, アンタゴニストについては α -BTX のみ光刺激を遮断した。

<考察>以上の結果より, 興奮性アミノ酸については NMDA, QA 及び KA 全てのサブタイプが, アセチルコリンについてはニコチン性サブタイプが SCN 内の光刺激伝達に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかしながら, アセチルコリンの実験に関しては, 使用薬物の種類が少なく選択性にも問題があるため, さらに詳細な検討が必要であり, 現在実験中である。

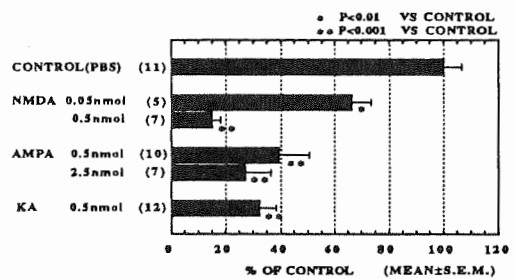


図1 各種興奮性アミノ酸アゴニストによる光刺激類似効果 (NAT活性を指標とする)

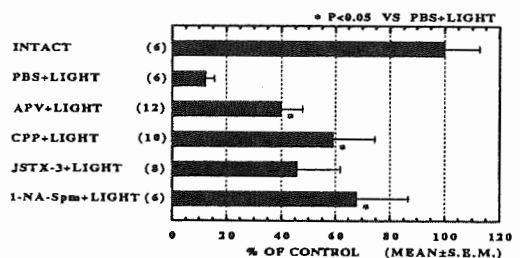


図2 各種興奮性アミノ酸アンタゴニストによる光刺激遮断効果 (NAT活性を指標とする)

4. 疾病研究第4部

1. 研究部一年のあゆみ

当研究部は変性性神経疾患の病態解明と治療法の開発を目標として研究を行ってきた。本年度の大きな出来事は柴崎浩部長の転出（2年6月京都大学）にともない、杉田秀夫研究所所長が部の指揮をとることになったことである。本年度の研究メンバーは以下の通りである。室長：小田健一郎，郭伸，吉田瑞子；流動研究員：相澤仁志，真先敏弘；センター研究員：松井京子；雇用研究助手：三浦久美子，木内美子，真野登美子，志鎌昌子；研究生：遠藤智代子；併任研究員：柴崎浩，北村純一，高木昭輝，花岡繁，横井風児；外来研究員：A. P. Chandran.

本年度の主な研究

- 1) 神経変性モデルマウス（GAD）における軸索病変を電気生理・形態学的に研究し，変性ニューロンのもつ軸索再生能の特徴を明らかにした（A. P. Chandran，遠藤，小田）。
- 2) アクロメリン酸による神経細胞死の選択性とその作用する受容体の違いにより生ずる可能性を，グルタミン酸受容体結合実験により示した（相澤，郭）。
- 3) 変性疾患における神経封入体の構成成分を検索し，multicatalytic proteinaseがレヴィー小体・神経原線維変化に局在することを免疫組織化学的に明らかにした（真先，郭）。
- 4) mdxマウスと対照のマウスの強収縮状態における長指伸筋内のCa²⁺濃度を測定した。現在までのところ両者に差を認めていない（吉田）。
- 5) 運動失調マウス脳のNGF濃度を測定し，種々の系統における脳内分布濃度の違いを明らかにした（松井）。

（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) Shibasaki H, Tomi H :
Carotid gustatory syndrome in a patient with Holmes-Adie syndrome
J Neurol Neurosurg Psychiat 53 : 359, 1990
- 2) Shibasaki H, Nakamura M, Neshige S, Kakigi R, Ikeda A :
Wave form decomposition of 'giant SEP' and its computer model for scalp topography
Electroenceph Clin Neurophysiol 77 : 286-294, 1990
- 3) Shibasaki H, Kakigi R, Ikeda A :
Scalp topography of giant SEP and pre-myoclonus spike in cortical reflex myoclonus
Electroenceph Clin Neurophysiol 81 : 31-37, 1991
- 4) Kakigi R, Shibasaki H, Neshige R, Ikeda A, Mamiya K, Kuroda Y :
Pain-related somatosensory evoked potentials in cortical reflex myoclonus
J Neurol Neurosurg Psychiat 53 : 44-48, 1990
- 5) Nakamura M, Shibasaki H, Nishida S, Neshige R :
A Method for Real-time processing to study recovery function of evoked potentials
IEEE Trans Biomed Eng 37 : 738-740, 1990
- 6) 中村政俊, 伊藤勝彦, 西田茂人, 音成龍司, 柿木隆介, 柴崎浩 :
視標追跡による手の随意運動機能の記録処置装置改良と解析法
佐賀大学理工学部集報 19 : 21-23, 1990
- 7) Oda K, Miura H, Shibasaki H, Endo C, Kakigi R, Kuroda Y, Tanaka K :
Hereditary pressure-sensitive neuropathy : demonstration of "tomacula" in motor nerve
fibers
J Neurol Sci 98 : 139-148, 1990
- 8) Aizawa H, Kwak S, Shimizu T, Goto J, Nakano I, Mannen T, Shibasaki H :
A case of adult onset pure pallidal degeneration
I. Clinical manifestations and neuropathological observations
J Neurol Sci 102 : 76-82, 1991
- 9) Aizawa H, Kwak S, Shimizu T, Mannen T, Shibasaki H :

A case of adult onset pure pallidal degeneration

II. Analysis of neurotransmitter markers, with special reference to the termination of pallidothalamic tract in human brain

J Neurol Sci 102 : 83-91, 1991

10) Matsui K, Furukawa S, Shibasaki H, Kikuchi T :

Reduction of nerve growth factor level in the brain of genetically ataxia mice (weaver, reeler)

FEBS Letters 276 : 78-80, 1990

11) Yokoi F, Hara T, Iio M, Nonaka I, Satoyoshi E :

1- [¹¹C] Pyruvate turnover in brain and muscle of patients with mitochondrial encephalomyopathy

A study with positron emission tomography (PET)

J Neurol Sci 99 : 339-348, 1990

b. 著 書

1) 小田健一郎 :

ギラン・バレー症候群

今日の治療指針 (日野原重明, 阿部正和監修), 医学書院, 東京, p209, 1991

c. 総 説

1) 山崎一斗, 小田健一郎, 菊池建機 :

Gracile axonal dystrophy (GAD) マウスの病理と遺伝

生体の科学 41 : 545-548, 1990

2) 小田健一郎, 山崎一斗, 三浦裕之, 遠藤智代子, 柴崎浩, 菊池建機 :

Gracile axonal dystrophy (GAD) マウス—“ Dying Back ” 軸索変性モデル

神経進歩 35 : 95-106, 1991

3) 郭 伸 :

興奮性アミノ酸による神経障害—プリンスエドワード島産貽貝に含まれていたドーモイ酸の場合—

内科 67 : 127-129, 1991

d. 班会議報告書

1) 吉田瑞子, 宮川厚夫, 菊池建機 :

mdx マウス骨格筋の強収縮状態における細胞内 Ca²⁺ 濃度

II 研究業績

厚生省精神・神経疾患・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
平成2年度研究報告書 p170-171, 1991

2) 萬年徹, 相澤仁志, 郭 伸, 柴崎浩, 清水輝夫:

進行性淡蒼球変性症における神経伝達物質変化—特に淡蒼球視床路の視床内終止について—
厚生省 精神・神経疾患・神経変性疾患調査研究班
平成元年度研究報告書 p104-107, 1990

3) 横井風児, 原敏彦, 飯尾正明, 伊藤高司, 小宮山佐, 明石俊雄, 塚原靖雄, 田平武, 宇野正威, 里吉栄二郎, 柴崎浩:

Blood-Brain Barrier Integrity of Alzheimer's Disease Using ^{14}C -Inulin and positron
Emission Tomography

厚生省精神・神経疾患・中枢神経障害の成因と病態に関するサイクロトン核医学による研究班
平成元年度研究報告書 p167-174, 1990

e. その他

1) 郭 伸:

レヴィー小体の構成成分に関する生化学的研究

笹川医学医療研究財団・高齢者の医学医療に関する研究年報 5:18-20, 1989

2) 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

日疾動録 6:57, 1990

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 郭 伸:

レヴィー小体の構成成分に関する生化学的研究

笹川医学医療研究財団・高齢者の医学医療に関する研究発表, 東京, 5.29, 1990

2) 郭 伸:

運動ニューロンと興奮性アミノ酸

厚生省特定疾患, 神経変性疾患調査研究班(ワークショップ), 東京, 7.27, 1990

b. 国際学会

1) Shibasaki H:

Video Session : Myoclonus

Ist International Congress of Movement Disorders, Washington, D. C. , April 26, 1990

- 2) Kakigi R, Sibasaki H, Kuroda Y, Neshige R, Tabuchi K :

Pain-related somatosensory evoked potentials in syringomyelia

115th Annual Meeting of the American Neurological Association Atlanta, Oct 16, 1990

- 3) Oda K, Shibasaki H, Endo C :

Hereditary pressure-sensitive neuropathy : Demonstration of "tomacula" in motor nerve fibers

115th Annual Meeting of the American Neurological Association Atlanta, Oct 16, 1990

- 4) Oda K, Miura H, Yamazaki K, Kikuchi T, Shibasaki H :

GAD (Gracile axonal dystrophy) mouse : dying-back process in muscle spindle

XIth International Congress of Neuropathology, Kyoto, Sept. 2, 1990

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

Gracile axonal dystrophy (GAD) mouse : neuropathology and distribution of the lesions

XIth International Congress of Neuropathology, Kyoto, Sept. 2, 1990

- 6) Kwak S, Aizawa H, Ishida M, Shinozaki H :

Selective neuron damage in the rat spinal cord induced by acromelic acid

20th Annual Meeting, Society for Neuroscience, St. Louis, Oct. 29, 1990

- 7) Yoshida M, Shibasaki H :

Importance of buffer ingredients for intracellular Ca^{2+} concentrations by ratio-method of fluorescence intensity (fura-2)

10th International Biophysics Congress, Vancouver, July. 29, 1990

- 8) Yokoi F, Shibasaki H, Kamei A, Ikeda K, Iio M, Hara T :

Study of patients with apraxia of gait by magnetic resonance imaging and positron emission tomography

115th Annual Meeting of the American Neurological Association Atlanta, Oct 16, 1990

c. 一般学会

- 1) 小田健一郎, 三浦裕之, 柴崎浩, 山崎一斗, 菊池建機, 向山昌邦 :

GAD (Gracile axonal dystrophy) マウス : 一次感覚ニューロン軸索変性の機序

II 研究業績

- 第31回日本神経学会総会，横浜，5.25，1990
- 2) 三浦裕之，小田健一郎，柴崎浩，山崎一斗，菊池建機，向山昌邦：
GAD (Gracile axonal dystrophy) マウス：下位運動ニューロン軸索変性の機序
第31回日本神経学会総会，横浜，5.25，1990
- 3) 郭 伸，相澤仁志，石田美知子，篠崎温彦，後藤泰徳：
アクロメリン酸によるラット対麻痺モデル—stiffman 症候群との関連において—
第31回日本神経学会総会，横浜，5.25，1990
- 4) 吉田瑞子，柴崎浩：
筋ジストロフィー症モデルマウス (mdx) の静止状態における骨格筋内 Ca^{2+} 濃度
第31回日本神経学会総会，横浜，5.23，1990
- 5) 吉田瑞子，柴崎浩：
fura-2 による Ca^{2+} 量測定に対する蛋白質及び fura-2 濃度の影響
日本生化学会，大阪，9.13，1990
- 6) 上田哲男，稲垣初美，吉田瑞子：
細胞の行動と代謝系の自己組織化：リン脂質組成の時間，空間分布
日本細胞生物学会，東京，10.10，1990
- 7) 相澤仁志，郭 伸，柴崎浩，清水輝夫，萬年徹：
進行性淡蒼球変性症における神経伝達物質変化の解析—特に淡蒼球視床路の考察を含めて—
第31回日本神経学会総会，横浜，5.25，1990
- 8) 相澤仁志，郭 伸：
ラット脊髄シナプトゾーム分画のカイニン酸受容体結合能に対するアクロメリン酸の効果
神経科学学術集会，京都，12.11，1990
- 9) 石田美知子，相澤仁志，郭 伸，篠崎温彦：
ラット脊髄においてアクロメリン酸とカイニン酸の薬理的性質は異なるか
第64回日本薬理学会総会，神戸，3.26，1991
- 10) 松井京子，古川昭栄，柴崎浩：
脳発達過程における weaver 小脳 NGF 濃度変化
第31回日本神経学会総会，横浜，5.25，1990
- 11) 松井京子，古川昭栄，柴崎浩，菊池建機：
Reeler マウスの脳内 NGF 分布について

第7回日本疾患モデル動物研究会総会，名古屋，11.20，1990

12) 横井風児，阪田千種，正木かつら，春原経彦，渡辺里仁：

Pick 病様痴呆，核上性眼球運動障害及びパーキンソン症状を呈した兄弟例

第116回日本神経学会関東地方会，東京，3.9，1990

13) 横井風児，里吉栄二郎 原敏彦，飯尾正明：

¹¹C-innulin による Alzheimer 病の脳血液関門の検討

第31回日本神経学会総会，横浜，5.23，1990

C. 班会議発表

1) 柴崎浩，相澤仁志，郭 伸：

グルタミン酸受容体結合能に及ぼすアクロメリン酸の影響

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，東京，1.19，1991

2) 柴崎浩，遠藤智代子，小田健一郎：

Dying back 変性運動ニューロンの軸索再生機序—遺伝性軸索変性マウス(GAD)における形態学的検討

厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班，東京，2.16，1991

3) 小田健一郎，Chandran AP，遠藤智代子：

筋内神経の変性・再生機序についての基礎的研究(II)運動神経再生現象の筋電図・組織学的研究

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，東京，1.18，1991

4) 酒井徹雄，小田健一郎：

Joseph 病：運動ニューロン軸索変性の機序—筋内神経 ときほぐしによる検討

厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班，東京，2.16，1991

5) 豊倉康夫，郭 伸，真先敏弘，清水輝夫，萬年徹，石浦章一：

レヴィー小体の免疫組織化学的検討

厚生省特定疾患・神経ペプチドによる精神神経障害治療薬の開発研究班，名古屋，2.28，1991

6) 萬年徹，真先敏弘，郭 伸，石浦章一，杉田秀夫：

レヴィー小体病脳における multicatalytic protenase (MCP) のレヴィー小体への局在に関する免疫組織化学的研究

厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班，東京，2.15，1991

7) 吉田瑞子，宮川厚夫，菊池建機：

II 研究業績

刺激時における mdx マウス骨格筋内の Ca^{2+} 濃度測定を試み

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療開発に関する研究班，
東京，12.8, 1990

8) 古川昭栄，松井京子，柴崎浩，菊池建機：

脳発達過程におけるリーラおよび AraC 惹起小脳変性マウスの脳内 NGF レベルの変動

厚生省精神・神経疾患・脳発達障害の発現機序と対策に関する開発的研究，東京，1.19, 1991

9) 横井風児，原敏彦，飯尾正明，伊藤高司，小宮山佐：

^{11}C -イヌリンによる正常人の脳皮質及び白質の脳血液関門の透過性 (permeability-surface area product) に関する研究

厚生省精神・神経疾患・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関する研究
班，秋田，9.14, 1990

10) 横井風児，原敏彦，飯尾正明，伊藤高司，小宮山佐：

^{11}C -イヌリンによる中枢性神経疾患の脳血液関門の定量的研究

厚生省精神・神経疾患・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関する研究
班，東京，2.23, 1991

3. 主な研究報告

汎発性レビー小体病脳における multicatalytic proteinase のレビー小体，
神経原線維変化への局在に関する免疫組織化学的検討

真先敏弘，郭 伸，石浦章一，杉田秀夫

Multicatalytic proteinase(MCP)は非ライソソーム系の細胞内プロテアーゼである。生体機能は蛋白の分解で近年ユビキチン依存性の蛋白分解に関与することが示唆されている。本研究では汎発性レビー小体病(DLBD)脳を対象としてMCPの神経細胞封入体への局在を免疫組織化学的に検討した。

(対象および方法) 対象はDLBDホルマリン固定脳5例。62才男性1例を正常対照とした。方法は免疫組織染色であり、用いた抗体は精製ラット肝MCPに対する polyclonal IgG¹⁾ (抗MCP p. と呼称)、精製ヒトMCPに対する monoclonal 抗体 (MA2 と呼称) および抗ユビキチン monoclonal 抗体 (DF2)²⁾ である。これらの抗体の特異性を immunoblotting あるいは immunoprecipitation により検討した。

(結果)

1. 抗体の特異性：immunoblotting上、抗MCP p. およびMA2はいずれもヒトMCPの約30kDaのサブユニットを認識していた。また immunoprecipitation より、抗MCP p. がヒト脳に存在するMCPを特異的に認識していることを確認した。

2. 免疫染色の結果

1) 正常対照：側頭葉皮質に対しMCP染色を施行。一部の錐体細胞の細胞質に弱い反応性を認めたが、MCP反応性を強く示す構造は存在しなかった。

2) DLBD

(i)皮質型レビー小体(LB)：抗MCP p. に対し側頭葉皮質のLBはMCP免疫反応性を示した。そのパターンは一様でなく diffuse に染色されるパターン(A)、中心部が強く染色されるパターン(B)、リング状に染色されるパターン(C)と3つのパターンが存在した。MA2においても同様のパターンを認めた。

(ii)脳幹型LB：抗MCP p. は脳幹のLBの一部のもののみを染色し、LBの中心部に限局した染色性を認めた(D)。一方MA2はすべてring状の染色を示した。

(iii)神経原線維変化(NFT)：DLBDには封入体としてLB以外にNFTが多発する。Flame-shaped type NFTは抗MCP p., MA2いずれの抗体に対してもMCP反応性を欠如していた(E：抗MCP p. を用いた染色)。しかしNFTの中には抗MCP抗体に反応するものが存在し、それらは globose type あるいは loosely arranged NFT と呼ばれるものに属していた(F)。

(考察) 本研究の結果は、すべての皮質型LB、一部の脳幹型LBおよび一部のNFTにMCPが存在することを示唆している。そしてMCPが構成蛋白の分解に働いているためにこれらの封入体に局在して

いるということを予想させる。LB、NFTともにユビキチンが局在することが知られており、^{2),3)} MCPはユビキチン依存性に働いている可能性がある。この場合、MCPは封入体の形成に関与しているかもしれない。しかしながら詳細に観察するとユビキチンとMCPの細胞内分布は必ずしも一致せず上記のことを結論づけることはできない。またMCPが封入体形成時に非特異的に封入体内に巻き込まれた可能性も考えておく必要がある。

(まとめ)

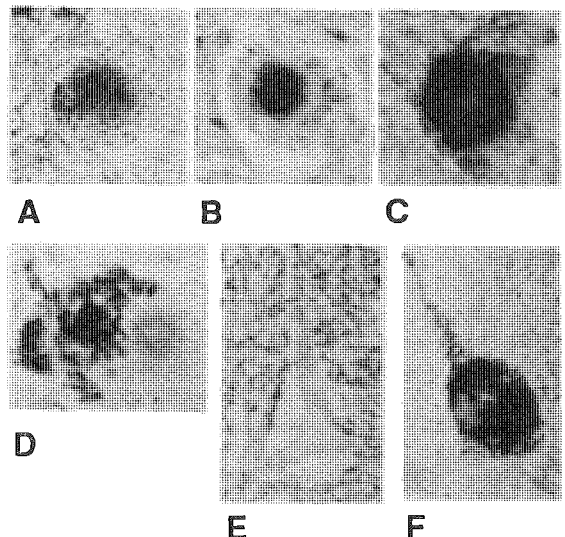
1：Multicatalytic proteinaseは汎発性レビー小体病脳のすべての皮質型レビー小体、一部の脳幹型レビー小体および一部の神経原線維変化に免疫組織化学的に存在する。

2：Multicatalytic proteinaseがそれらの封入体の構成蛋白の分解に関与している可能性がある。

(謝辞) 抗ユビキチン抗体(DF2)を提供頂いた東大医学部脳研病理井原康夫先生に深謝致します。

(文献)

- 1) Tsukahara T, Ishiura S, Sugita H. Proc. Japan. Acad. 64:72-75, 1988
- 2) Kuzuhara S, Mori H, Izumiyama N, Yoshimura M, Ihara Y. Acta Neuropathol. 75:343-353, 1988
- 3) Mori H, Kondo J, Ihara Y. Science 235:1641-1644, 1987
- 4) Kwak S, Masaki T, Ishiura S, Sugita H. Neurosci. Lett. in press. 128: 21-24, 1991



アクロメリン酸による神経毒性の部位選択性の発現機序について — グルタミン酸受容体結合能に及ぼすアクロメリン酸の影響 —

相澤仁志, 郭 伸

我々はアクロメリン酸(ACRO)をラットに投与すると痙攣対麻痺を引き起こし、選択的な脊髄介在ニューロンの変性脱落をもたらすことを神経病理学的に明かにし、この対麻痺ラットが所謂stiffman症候群の一つの動物モデルであることを指摘した^{4),6),7)}。ACROの分子構造、薬理学的特性はカイニン酸(KAIN)に類似しており^{2),3)}、またACROによる変性ニューロンの病理像がKAINによる海馬錐体細胞の変性像と類似していることから、このラットに引き起こされた病態はACROの脊髄介在ニューロンに対するexcitotoxicityのメカニズムによる可能性が強く示唆された⁴⁾。しかしKAINでは大脳辺縁系を中心とする部位に神経細胞の脱落、組織壊死が見られるのに対し、ACROでは脊髄に神経変性が見られるという部位特異性を生ずるメカニズムは明かではなかった。ACROはnon-NMDA受容体に作用すること薬理的に示され⁹⁾、non-NMDA受容体はさらにKAIN及びキスカル酸(QUIS)受容体に分類されていることから、KAINおよびQUIS受容体のより選択的なアゴニストである α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionate(AMPA)の結合部位に対するACROの親和性を調べ、ACROの作用部位とこれら受容体との関連につき知見を得ることを目的とした。

[方法]: ラット脊髄から遠心分離したシナプトソーム分画に対する³H]KAINと³H]AMPAの結合をfilter法で測定した。KAIN受容体結合の飽和実験には³H]KAIN (0.39-50nM)とtissue homogenate (0.2-0.4mg prot.)を含む1mlのassay mixtureを4℃で60分間インキュベートした。非特異的結合は100 μ M KAIN存在下で測定した。AMPA受容体結合の飽和実験では0.1% Triton X-100存在下で38℃、30分間プレインキュベートした後、³H]AMPA(0.39-100nM) tissue homogenate (0.2-0.5mg prot.)を含む1mlのassay mixtureを4℃、30分間インキュベートした。非特異的結合は100 μ M AMPA存在下で測定した。阻害実験では³H]KAIN(2.2nM)、³H]AMPA(3.0nM)の特異的結合に対するACROの阻害作用の強さからの受容体親和性を求めた。

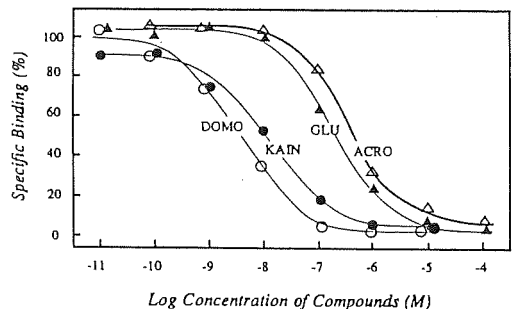
[結果]: ラット脊髄シナプトソーム分画のKAIN受容体結合のKd, Bmaxはそれぞれ 6.2 ± 0.4 nM、 51.8 ± 1.6 fmol/mg prot.(mean \pm SEM)であった。IC50値から求めたKAIN受容体親和性は domoate(DOMO) > KAIN > L-glutamate(GLU) > ACROの順であった(図)。AMPA受容体結合のKd, Bmaxはそれぞれ 7.6 ± 1.5 nM、 70.4 ± 5.6 fmol/mg prot.であった。IC50値から求めたAMPA受容体親和性は QUIS > AMPA > ACRO > L-glutamateの順であった。ACROのIC50値はQUISのその約30分の1、AMPAのその7分の1と低かった。

[考察]: 脊髄のKAIN受容体結合およびAMPA受容

体結合: KAIN受容体の研究は主に大脳を材料として行なわれ脊髄では報告されていない。Scatchard plotから脊髄のKAIN受容体は大脳の高親和性KAIN受容体に近い性質(Kd)をもつと考えられたが、結合部位数は大脳の数分の1と少なかった。ACROは強い脱分極作用を有するにも拘わらずKAIN受容体親和性が低いことは、その脱分極作用がKAIN受容体以外の受容体を介して行なわれていることを強く示唆するものと考えられる。またACROのAMPA受容体親和性はQUIS、AMPAに比べ低いので、ACROの持つ強力な脱分極作用はAMPA受容体を介したものではないと考えられる。ACROの作用点の特異性: ACROはその薬理学的作用からnon-NMDA受容体に作用することが明らかにされているが^{2),9)}、non-NMDA受容体として知られているKAIN及びAMPA結合部位のいずれに対しても親和性が低い。したがってこれら既知の受容体とは異なったACROに親和性の高いnon-NMDA受容体を介して神経毒性を引き起こしている可能性が示唆される。この受容体の中枢神経内分布がKAIN及びAMPA受容体と異なっていると考えれば、KAINと異なったACROの全身投与による神経毒性の部位特異性を説明できる。KAIN、AMPA以外のnon-NMDA受容体が存在する可能性は最近のKAIN/AMPA感受性受容体をコードするcDNAに関する研究が、複数の受容体サブタイプがあり、それぞれの発現に部位特異性があることを示していることから十分考えるものである^{1),3)}。

文献: 1) Boulter J, et al. (1990) Science 249: 1033-1037. 2) Ishida M and Shinozaki H (1988) Brain Res 474: 386-389. 3) Keinänen K, et al. (1990) Science 249: 556-560. 4) Kwak S, et al. (1990) "Amino acids: Chemistry, Biology and Medicine" (ed by G Lubec & GA Rosenthal) ESCOM Sci Pub, Leiden, 318-326. 5) Shinozaki H, et al. (1986) Brain Res 339: 359-398. 6) Shinozaki H, et al. (1990) "Amino acids: Chemistry, Biology and Medicine" (ed by G Lubec & GA Rosenthal) ESCOM Sci Pub, Leiden, 281-293. 7) Shinozaki H, et al. (1989) Brain Res 503: 330-333.

Displacement Curves of ³H]Kainate Binding



運動ニューロン再生軸索に起源を有する誘発筋電位の研究

A. P. Chandran, 小田健一郎, 遠藤智代子, 柴崎浩

運動ニューロンの軸索はその細胞体から神経終末にかけてどの部位においても再生現象を起こしうる。しかし、臨床的にその部位を特定することは一般に困難である。今回、私共は遺伝性に感覚神経系と運動神経系にdying-back typeの軸索変性をきたすGADマウス¹⁾において運動神経終末の再生現象に関連した誘発筋電位を見出したので、その発生機序を筋電図および組織学的に検討した。

〔対象と方法〕

40-80日齢のGADと正常対照マウスを対象とした。電気生理学的検査はDantec社の筋電計をもち、後脛骨神経を電気刺激し、誘発電位を足底筋より針電極を用いて導出した。組織学的検査には神経はepon包埋semi-thin切片をトルイジンブルー染色、筋はAChE-銀二重染色による筋内神経の神経-筋線維ときほぐし法を行った。

〔結果〕

電気生理学的検査

1) 神経の電気刺激を行うと、GADマウスでは、異常な低振幅の電位がM波の後に反復性に出現した(図A)。この電位は電気刺激によってのみ出現し、機械的刺激や、curareによる限局性の神経筋伝達遮断後の筋直接刺激によっても誘発されなかった。2) 不応期は10秒以上であり、3) 頻回刺激(30Hz)を負荷すると負荷直後より異常電位は消失し、約4分後より回復した。

組織学的検査

神経幹には異常を認めなかったが、運動終板部では軸索の変性が早期より出現した。また再生機序として神経終末からのterminal sproutingが旺盛に認められ、それらは錯綜した走行をとった。電顕で観察するとこれらは無髄軸索であった。

〔考察〕

本研究で認められた異常筋放電(stimulus-induced repetitive discharges (SIRDs)と名付けた)の特徴は、1) インパルスによってのみ誘発される。2) 相似した波形が反復性に出現する。3) H波よりは潜時が短い。4) 不応期は異常に長く、また、極端な易疲労性を認める。

現在までのところ、運動神経の再生に関連する電位として報告されているものとして、axon reflexがあるが、これは、近位部軸索の側芽現象によるとされている。それに対して、SIRDsの出現

する時期は軸索末端に再生現象が現れる時期と一致していた。そこで次のような仮説を立てた(図A)。運動終板は二つの群に分けられ、一つはまだ変性より免れており機能的にも健常である群と、他方は再生軸索により再支配を受けている病的終板の群が存在する。M波は前者の正常終板群に属する筋線維の活動電位の総和によりなり、SIRDsは後者の病的群に属する筋活動電位の総和であることが考えられる。このことより、1) SIRDsの潜時がM波より長いのは、再生軸索の髄鞘形成が不十分なことによる伝導速度の遅延により、2) SIRDsの反復性は近接する再生無髄軸索間におけるephaptic transmissionによる異常短絡回路の形成され、刺激が繰り返されること、3) 異常に長い不応期とtetanic刺激後の高度の易疲労性は変性/再生神経終末内でのアセチルコリンの補填、動員、放出機構の異常によることで説明されるかもしれない。

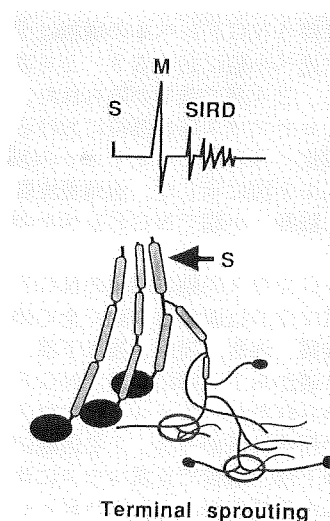
〔結論〕

SIRDsはヒト、実験動物における末梢神経再生現象をモニターするのに有用と考える。

〔文献〕

- 1) 小田ら、神経研究の進歩、35, 95-105 (1991)

図A 誘発異常筋放電の発生機序 (S:刺激部位)



II 研究業績

Reelerおよび cytosine-arabioside 投与マウスの脳内 NGF レベル

松井京子, 古川昭栄*, 柴崎浩**

* 岐阜薬大分子生物, ** 京大脳病態生理

昨年度、運動失調マウスの reeler, weaver, staggerer で大脳、小脳で NGF レベルの低下を見いだした。これらの mutant は共通して小脳顆粒細胞が減少している。一方、プルキンエの変性を特徴とする PCD では脳内 NGF レベルは異常をみいだせなかった。このことから、小脳顆粒細胞は直接または間接的にマウス脳内 NGF レベルに影響をあたえることが示唆される。今年度はこの点を確認すべく、reeler と薬物性運動失調マウスについて成長発達別に測定した。

方法

動物: reeler および ICR 系マウス生後 2, 3, 4 日目に cytosine-arabioside (Ara-C) 50 mg/kg を皮下投与したマウス。

NGF の測定: すでに報告した酵素免疫測定法 (1) を改良して (2) 行った。

結果と考察

Reeler 脳内 NGF レベルの加齢に伴う変化: 正常マウスの大脳、小脳 NGF レベルは伴に 3~12 週にかけて急速に増加し、小脳では 12~24 週にかけても増加した。Reeler では週齢に伴う NGF レベルの増加は少なく、正常マウスに比べ小脳において 3, 24 週、大脳において 12, 24 週で低下がみられた。

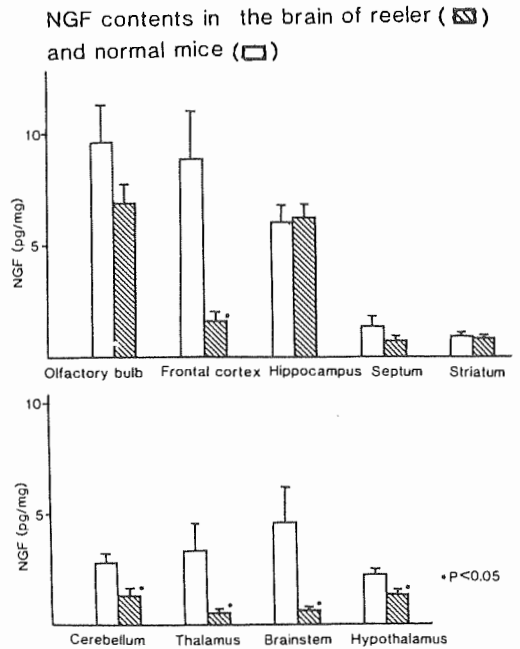
Reeler マウス脳各部位における NGF レベルの変化: 8 週齢 reeler の各脳部位の NGF レベルを図に示した。前頭葉皮質、視床、視床下部、脳幹、小脳で NGF レベルの低下がみられた。

Ara-C マウスの脳各部位の NGF レベルの変化: 正常マウスは線条体を除く全ての部位 (嗅球、大脳皮質、海馬、視床、視床下部、脳幹、小脳) で、3 週から 12 週にかけて NGF レベルの増加が認められたが、Ara-C マウスではその増加の程度は低かった。12 週齢において、視床、視床下部、脳幹で正常マウスに比べ、NGF レベルの減少がみられた。Reeler マウスにおいて神経細胞の層構造の異常がみられる部位 (嗅球、大脳皮質、海馬、小脳) と NGF レベルの低下を示した部位とは必ずしも一致しない

ことから、形態学的異常とは無関係な NGF レベルを低下させる要因があるように思われる。Reeler と Ara-C マウスにおいて共通して NGF レベルの低下が認められるのは、視床、視床下部、脳幹であり、両 mutant に共通してみられる小脳顆粒細胞減少が脳特定部位における NGF レベルの低下と何らかの関連性があることも推定される。

文献

- 1) Furukawa, S et al. (1983) J. Neurochem. 40, 737-744
- 2) Matsui, K. et al. (1990) FEBS Lett. 78-80



MDX マウス骨格筋の強収縮状態に於ける細胞内Ca²⁺濃度

吉田瑞子

目的: Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) は、ジストロフィン欠損の膜異常であることが明らかになった。しかしジストロフィンが欠損しているだけでは、筋細胞は崩壊しないようである。従って未だに筋細胞崩壊への引き金は明らかになっていない。今回この引き金を見いだす為に、モデルマウスMDXの骨格筋の強収縮状態における細胞内カルシウムイオン (Ca²⁺) 濃度を蛍光プローブ (fura-2) で測定した。

方法: DMDのモデルマウスMDX (3-6週齢、16匹)とその対照マウスB10 (3-6週齢、11匹)の長指伸筋を腿から腿まで採取し、1匹につき1本から3本の単一筋細胞(セルに固定した時、長指伸筋の両端にある単一細胞)を用いた。細胞内への蛍光プローブ fura-2の負荷は、fura-2-AM (10 μM) と pluronic F-127 (0.08%) を含むHank's-HEPES緩衝液に長指伸筋を入れ、酸素と炭酸ガス (=95:5) の混合ガスを充満させながら、10°Cで、2-2.5時間浮置し、その後、Hank's-HEPES緩衝液に移し、25°Cで約10分間浮置した。fura-2を負荷した長指伸筋を培養用カバーガラス(厚さ0.1mm)とシリコン製フレキシムパームで作成したセルに固定した。固定方法は腿の一方をアロンアルファで固定し、他方の腿を持ち長指伸筋が *in situ* の長さになるまで伸ばし、その腿をアロンアルファで固定した。セルをHank's-HEPES緩衝液で満たし、落射型蛍光顕微鏡(オリンパスIMT-2)下に置いた。細胞内Ca²⁺濃度の測定は、顕微鏡に細胞内カルシウム測定装置(オリンパスOSP-3)を接続し、340nmと380nmの励起光による蛍光強度比で検量線より算出した。検量線は80mg/ml γ-globulinと筋細胞内に負荷した濃度のfura-2を加えたCa²⁺緩衝液(pH7.00, I=0.20, 25°C)を、キャピラリー(筋細胞の太さ)に封入し、筋細胞と同様に測定して作成した。

長指伸筋の強収縮状態は筋に平行に白金電極を置き、interval 50msec, duration 1msecの電気刺激を与えた。

測定は25°Cで行った。

結果: 筋細胞の静止状態と強収縮状態の細胞内Ca²⁺濃度を図に示す。矢印(a)で長指伸筋に電気刺激を与え強収縮状態を起こし、矢印(b)で電気刺激を切り静止状態に戻した。MDXマウスの場合、強収縮状態では約700nMを示した。他のMDXマウスの筋細胞内Ca²⁺濃度は、この濃度以上にはならず、

550nM前後を示す細胞が多かった(範囲330-700nM)。対照のB10マウスの細胞内Ca²⁺濃度は約1100nMで、他のB10マウスの細胞内Ca²⁺濃度はこの濃度以上にはならず、800nM前後を示す細胞が多かった(範囲550-1100nM)。MDXマウス骨格筋の強収縮状態に於ける細胞内Ca²⁺濃度は、対照マウスB10のそれよりも僅かに低いが大差ない結果である。この結果はTurner, P. R.¹⁾等の結果とほぼ一致するが、測定した筋細胞の数が少ないので現報告では結論は避ける。

まとめ: MDXマウス骨格筋内Ca²⁺濃度は、対照のB10マウスのそれに比べ大差ないが、細胞内Ca²⁺濃度を測定した筋細胞の数が少ないので結論を避ける。

文献: 1) Turner PR, et al: Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from *mdx* mice. Nature 335: 735-738, 1988

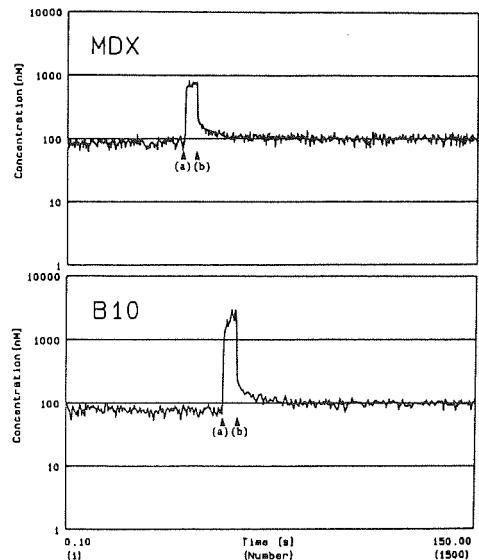


図 MDXマウスとその対照マウスB10の骨格筋の静止状態と強収縮状態の細胞内Ca²⁺濃度
矢印(a)で筋細胞に電気刺激を与え、強収縮状態を起こし、(b)で刺激を切り静止状態に戻した。縦軸はCa²⁺濃度、横軸は測定時間、括弧内は測定回数。

5. 疾病研究第5部

1. 研究部一年のあゆみ

本研究部は先天性代謝異常症の中樞障害の発症機序を解明し、治療法の開発研究を行っている。

人事面では室長は桃井 隆。流動研究員として佐々木征行が4月に赴任した。併任研究員として吉川秀人（武蔵病院小児神経科）、佐藤 充（秋田大学医学部）、鈴木秀典（東京医科歯科大学医学部）が研究に参加し、新川詔夫（長崎大学医学部、原研）および飯島浩一（秋田大学医学部）は研究の指導を担当した。研究生として、有本 潔（東邦大学医学部）、小林 治（武蔵病院小児神経科）、新井幸男（埼玉県立コロニー嵐山郷）、長尾芳朗（東京都臨床医学総合研究所）、富田幸子（東京女子医大）が研究に参加した。客員研究員として、青木継稔（東邦大学医学部）、桜庭 均（東京都臨床総合研究所）が研究の指導を行った。また外来研究員として8月には（1カ月間）中国より叶 文虎（Anhui Medical University）、10月からは横山安伸（SRL）が研究に従事した。賃金研究員の甲 有理が7月に、高橋佳代が12月に辞任した。賃金研究助手は田中久美、乗越登志子、和気佳代、土橋久子であった。

本年度の主な研究テーマは次のごとくである。

- ① ニーマン・ピック病の病態解明。とくにタイプCの病態解明と新亜型の酵素学的検討。
- ② 薬剤（アンフォフィリック・カチオニック剤、イオノフォア）による実験的リピドージスの作成。
- ③ リソソーム酵素の誘導剤の開発研究と治療薬剤としての検討。
- ④ Microdissection 法によるG-band特異的ヒトゲノムDNAのクローニング。
- ⑤ 神経発生分化調節の分子機構
- ⑥ 先天性代謝異常症のPET研究

（部長 桜川 宣 男）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

1. Yoshikawa H, Fueki N, Sakuragawa N, Ito M, Iio M:
Crossed cerebellar diaschisis in the Sturge-Weber syndrome.
Brain Dev 12:535-537,1990
2. Yoshikawa H, Fueki N, Yoneyama H, Ogawa M, Sakuragawa N:
Positron emission tomography demonstrated localized luxury
perfusion in subacute sclerosing panencephalitis.
J Child Nerrol 5:311-315,1990
3. Iwasaki Y, Yoshikawa H, Sasaki M, Sugai K, Suzuki H,
Hirayama Y, Sakuragawa N, Arima M, Takashima S, Aoki N:
Clinical and immunohistochemical studies of subependymal giant cell astrocytomas
associated with tuberous sclerosis.
Brain Dev 12:478-481,1990.
4. Yoshikawa H, Kaga M, Suzuki H, Sakuragawa N, Masataka Arima:
Giant somatosensory evoked potentials in Rett syndrome.
Brain Dev 13:36-39,1991.
5. Yoshikawa H, Araki K, Sakuragawa N, Arima M:
A rare case with fluctuating symptoms of head instability, hypotonia and choreo-
athetotic movement improved by L-dopa treatment.
Brain Dev 13:55-58,1991.
6. Sasaki M, Yoneyama H, Nonaka I:
Respiratory muscle involvement in nemaline myopathy
Pediat Neurol 6:425-427,1990.
7. Momoi T, Kumagai H, Momoi M:
Retinoic acid receptor in the chick limb buds in the early developmental stages.
Bioch Biophys Res Comm 168:544-550,1990.
8. Momoi M, Yamagata T, Ichihashi K, Yanagisawa M, Yamakado M, Momoi T.:
Expression of cellular retinoic acid binding protein in the developing nervous

Ⅱ 研究業績

system of mouse embryo.

Developmental Brain Res 54:161-167,1990.

9. Momoi T, Hanaoka K, Momoi M.:

Spatial and temporal expression of cellular retinoic acid binding protein(CRABP) along the anteroposterior axis in the central nervous system of mouse embryo.

Biochem Biophys Res Comm 169:991-996,1990.

10. Ishiura S, Nishikawa T, Tsukahara T, Momoi T, Ito H, Suzuki K, Sugita H:
Distribution of Alzheimer's disease amyloid A4-generation enzymes in rat brain tissue.

Neurosci Lett 115:329-334,1990.

11. Kobayashi Y, Momoi YM, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S.:

A point mutation in the mitochondrial tRNA^{Lys}(UUR) gene in MELAS (Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes).

Biochem Biophys Res Comm 173:816-822,1990.

12. 吉川秀人、笛木 昇、福島直喜、山内秀雄、桜川宣男：

ポジトロンエミッショントモグラフィによる亜急性硬化性全脳炎の病態の検討。

日本小児科学会雑誌 94：142

13. 吉川秀人、山田和孝、佐々木征行、桜川宣男、有馬正高：

肝脾腫を伴わない若年型 Gaucher 病の1例。

日本小児科学会雑誌 94：1656-1660,1990

14. 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

15. 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ンミオパチーの最年長生存例：9歳女児

脳と発達 22：82-85,1990

16. 吉川秀人、笛木 昇、桜川宣男：

亜急性硬化性全脳炎初期の脳波に認められる前頭部徐波の由来について

臨床脳波, 32：346-348,1990

17. 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
18. 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: 290-291, 1990
19. 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
20. 須貝研司、桜川宣男、埜中征哉：
Congenital hypomyelination neuropathy の概念および病態と治療の試み—自験例および
文献的検討—
日本小児科学会雑誌 94: 2614-2622, 1990
21. 吉川秀人、笛木 昇、高梨愛子、福島直喜、桜川宣男：
亜急性硬化性全脳炎の経過中に一過性に認められた睡眠中のa律動を有する異常波について。
脳と発達 22: 445-450, 1990
22. 吉川秀人、笛木 昇、荒木 敦、須貝研司、桜川宣男：
Menkes 病のPET所見
日本小児放射線学会雑誌 6: 126-127, 1990
23. 秋山千枝子、管野徹夫、正林陽高、鈴木文晴、吉川秀人、加我牧子、桜川宣男：
急性脳症と両側線状体の低吸収域について
小児科診療 54: 265-268, 1991

b. 著 書

1. 桜川宣男：
視覚誘発電位（フラッシュ誘発電位）の臨床応用
誘発電位の基礎と臨床、佐藤謙助、平井富雄、山岡 淳編、創造出版、
P 270-281, 1990

c. 総 説

1. 桜川宣男：
遺伝性変性疾患、特集発達障害と発達の退行。

Ⅱ 研究業績

発達障害研究 12：42-49,1990

2. 桜川宣男：

小児の代謝性神経疾患

神経内科 33：431-445,1990

3. 桜川宣男：

Positron emission tomography(PET)

小児医学 24：105-119,1991

4. 吉川秀人、桜川宣男：

画像診断－疾患による種類と適応について－

小児科診療 53：970-978,1990

d. 班会議報告

1. 桜川宣男、笹木 昇、吉川秀人、山内秀雄、飯尾正明：

水頭症患者の脳局所血流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，平成元年度研究報告書，P 80-84,1990

2. 多田博史、諸岡啓一、有本 潔、桜川宣男：

小児交互性片麻痺における尿中 5 - HIAA の変動の意義

厚生省精神・神経疾患・発達期における脳循環障害の発達機構と治療に関する研究，

平成元年度研究報告書，P 100-104,1990

3. 桜川宣男、山内秀雄、吉川秀人、小林 治：

Infantile spasm のPET 所見

厚生省精神・神経疾患・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，平成2年度研究報告書，P 125-129,1991

4. 桜川宣男、小林 治：

小児代謝変性疾患のPET

厚生省精神・神経疾患・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，平成2年度研究報告書，P 130-138,1991

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1. Sakuragawa N:

Positron emission tomography in cases with metabolic and degenerative disorders.

The Joint Convention of the 5th International Child Neurology Congress and the 3rd Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 11.6,1990.

Tokyo, Japan.

2. Yoshikawa H:

Cerebral blood flow and oxygen metabolism in Rett syndrome.

Symposium on Rett syndrome. Satellite symposium to the Joint Convention of the 5th International Child Neurology Congress and 3rd Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 11.3,1990. Tokyo, Japan.

b. 国際学会

1. Sakuragawa N, Yoshikawa H, Sasaki M:

Therapeutic effects of dimethylsulfoxide(DMSO) on various types of lipodosis.

Vth International Congress, Inborn Errors of Metabolism.

Asiloma, 6.3,1990.

2. Yoshikawa H, Sakuragawa N:

Reduction of cholesterol esterification in human fibroblasts induced by AY-9944.

Vth International Congress, Inborn Errors of Metabolism.

Asiloma, 6.4,1990.

3. Yoshikawa H, Fueki N, Sugai k, Araki A, Sakuragawa N:

Cerebral blood flow and oxygen metabolism in Menkes Kinky Hair Disease.

The Joint Convention of the 5th International Child Neurology Congress and the 3rd Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 11.5,1990. Tokyo,

Japan.

4. Sasaki M, Sakuragawa N, Takashima S, Hanaoka S, Arima M:

MR imaging in krabbe Disease.

The Joint Convention of the 5th International Child Neurology Congress and the 3rd Asian and Oceanian Congress of Child Nerology, 11.8,1990. Tokyo, Japan.

II 研究業績

5. Fueki N, Yoshikawa H, Sakuragawa N:
Positron emission tomography(PET) with 150 and evoked potentials in six child cases of well-controlled hydrocephalus.
The Joint Convention of the 5th International Child Neurology Congress and the 3rd Asian and Oceanian Congress of Child Neurology.11.6,1990.
Tokyo,Japan.
 6. Sugai K, Sakuragawa N, Arima M:
Rapid estimation of the efficacy of orally administered antiepileptic drugs by intravenous administration of the drugs under EEG monitoring.
The Joint Convention of the 5th International Child Neurology Congress and the 3rd Asian and Oceanian Congress of Child Neurology.11.6,1990. Tokyo,Japan.
 7. Suzuki H, Hirayama Y, Araki A, Fukushima N, Yoneyama H, Sasaki M, Iwasaki Y, Arima M:
Severely retarded children in Tokyo.
The Joint Convention of the 5th International Child Neurology Congress and the 3rd Asian and Oceanian Congress of Child Neurology.11.6,1990. Tokyo Japan.
- c. 一般学会
1. 荒木 敦、吉川秀人、花岡 繁、黒川 徹、桜川宣男、有馬正高：
Wilson 病における頭部超伝導 MRI 所見（T2強調像でのレンズ核低信号域）
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6.14，1990
 2. 須貝研司、桜川宣男、有馬正高：
クロナゼパムの急速な中止または減量による痙攣と安全な減量速度
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6.15，1990
 3. 米山 均、桜川宣男、末広牧子、石塚利江：
Carnitine palmitoyl-transferase(CPT) 欠損症における¹³C 標識パルミチン酸呼吸テスト
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6.15，1990
 4. 花岡 繁、平野 悟、山内秀雄、小林立子、荒木 敦、佐々木征行、笛木 昇、桜川宣男：
重度高次脳機能障害の意識障害の評価
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6.14，1990

5. 吉川秀人、笛木 昇、山内秀雄、福島直樹、桜川宣男、飯尾正明：
脳循環代謝からみた亜急性硬化性全脳炎の病態の検討
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6.14，1990
6. 笛木 昇、吉川秀人、米山 均、桜川宣男：
CT上、局所的低吸収域が多発した亜急性硬化性全脳炎一例の神経放射線学的検討
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6.14，1990
7. 小林立子、高梨愛子、笛木 昇、岩崎裕治、加我牧子、桜川宣男、有馬正高：
聴性脳幹反応無反応から回復した低酸素性脳症例の脳波と誘発電位の経時的観察
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6.14，1990
8. 平野 悟、昆かおり、佐々木征行、福島直喜、桜川宣男、有馬正高：
副腎白質ジストロフィー患児の睡眠時に認められた α 律動を有する異常波についての検討
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6.14，1990
9. 佐々木征行、花岡 繁、清水教一、桜川宣男、高嶋幸男、有馬正高：
Krabbe 病の MRI 所見
第33回日本小児神経学会総会，東京，6.14，1990
10. 吉川秀人、桜川宣男：
正常および Niemann-Pick II S線維芽細胞におけるAY-9944をはじめとする cationic amphiphilic drugs および DMSO の cholesterol esterification に対する作用について
第33回日本先天代謝異常学会，高松，11.14,1990
11. 佐々木征行、桜川宣男、米山 均、荒木 敦、吉川秀人、黒川 徹：
コレステロールエステル化障害を伴わない酸性スフィンゴミエリナーゼ部分欠損症：姉弟例報告と酵素学的検討
第33回日本先天代謝異常学会，高松，11.14,1990
12. 熊谷博道、山形 倫、桃井真理子、桃井 隆：
マウス発生初期神経系における細胞内レチノイン酸結合蛋白と核内レチノイン酸受容体の分布
第63回日本生化学会，大阪，9.12,1990
13. 桃井 隆、甲 由理、熊谷博道、首藤紘一：
レチノイン酸および誘導体によるP19テラトカルシノーマ細胞の分化方向性とレチノイン酸受容体の分布
第63回日本生化学会，大阪，9.12.1990

II 研究業績

14. 桃井 隆、熊谷博道、藤井雅寛、清水元治、山本 雅：

P 1 9細胞分化におけるレチノイン酸受容体 β の発現誘導と複合体形成

第13回日本分子生物学会，京都，11.26,1990.

d. 研究会など

1. 桜川宣男：

障害の種類と概念。

第16回障害児保育研修会，練馬．10.16,1990

2. 桜川宣男：

障害の種類と特性について

わかくさ学園講習会，東久留米，2.21,1991

3. Sakuragawa N：

Clinical features of inborn errors of metabolism.

Clinical conference of Medical Genetic Center of Anhui, Anhui, China, 3.28,1991

4. Sakuragawa N：

New therapeutic approaches to the lysosomal storage disorders.

Clinical conference of Medical Genetic Center of Anhui, Anhui, China, 3.29,1991

C. 班会議発表

1. 鈴木秀典、桜川宣男：

水頭症患者髄液中のドパミン β 水酸化酵素活性（I）一測定法と小児期における発達変化について

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班。平成2年度ワークショップ，東京，8.24,1990

2. 鈴木秀典、桜川宣男：

水頭症患者髄液中のドパミン β 水酸化酵素活性（II）

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班。平成2年度総会，東京，1.10.1991

3. 佐々木征行、有本 潔、新井幸男、吉川秀人、桜川宣男：

細胞培養系における低酸素症のコレステロール代謝に及ぼす影響

厚生省精神・神経疾患・発達期における脳循環障害の発症機構と治療に関する研究班，東京，1.14,1991

4. 吉川秀人、桜川宣男：

種々の drugs のコレステロールエステル化に対する作用について

厚生省精神・神経疾患・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班，東京，
1.25,1991

5. 小林 治、吉川秀人、桜川宣男、山内秀雄：

小児代謝変性疾患のPET

厚生省精神・神経疾患・中枢神経障害の成因と病態に関するサイクロترون核医学による研究
東京，2.23,1991

6. 桃井 隆：

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
東京，12.18,1990

7. 桃井 隆：

厚生省精神・神経疾患・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班，東京，
12.18,1990

8. 桃井 隆：

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研究班，東京，2.18,1991

II 研究業績

3. 主な研究報告

Niemann-Pick 病の新亜型：酵素学的検討と病因論的考察

佐々木征行、桜川宣男、吉川秀人

Niemann-Pick 病 (以下 NPD) は、スフィンゴミエリン (SN) やコレステロール (CH) の中枢神経系や内臓器などへの蓄積を特徴とする遺伝性脂質代謝異常症で、Spence らは酸性スフィンゴエミリナーゼ (SMase) 活性の欠損を特徴とする I 型と、本態は不明であるが SM と CH の代謝異常が疑われる II 型に分けている。II 型では、外来性のコレステロールエステル (CHE) 化障害が注目されている。我々は SMase 活性の部分欠損を示し、CHE 化の障害を認めない新しい NPD の亜型について酵素学的に検討した。

<対象と方法>

症例は 11 歳女児と 7 歳男児の姉弟例で、いずれも 2、3 歳頃から痙攣発作とミオクロヌスで発症した。精神運動退行が進行して 6 歳頃には高次機能喪失し臥床生活となった。肝脾腫はないが、電顕で骨髄に同心円状ミエリン様構造封入体を含む組織球を多数認め、直腸神経叢にも同様の所見を認めた。

症例および健常人 (対照) から皮膚線維芽細胞を得た。SMase 活性は ^{14}C -SM を基質に用いて測定した。他のリソゾーム酵素活性は 4 MU 基質を用いた。SMase 活性の pH プロファイルを作成した。「混合実験」症例、対照およびそれらを等量混合した酵素測定液をそれぞれ、0℃で 3 時間、20℃、37℃で 1 および 3 時間ブレインキューベションしてから SMase 活性を測定した。〔リポ蛋白質不含培養液による SMase 活性の変化〕lipoprotein 欠損血清 (LPDS) を 10% 加えた DMEM で皮膚線維芽細胞を培養し、2、4、7 日後に SMase 活性をみた。〔外来性 CHE 化〕皮膚線維芽細胞を LPDS 加培養液で 4 日間培養後、 ^3H -オレイン酸を負荷して 6 時間後に細胞を収穫し、脂質を抽出し TLC に展開後 CH、CHE 分画を検討した。〔フィリピン染色〕細胞内の free CH の蓄積を検討した。〔SMase 部分精製〕姉の皮膚線維芽細胞を Triton X-100 の存在下でホモジネイトし、遠心して上清を ConA-Sepharose カラムにかけた。洗浄後 0.5 M methyl α -D-mannopyranoside を含む緩衝液で溶出した。SMase の高活性分画を濃縮し、DEAE Sephacel カラムに通し、さらに高活性分画を濃縮し、透析した。この濃縮液で SMase の至適 pH、Km 値そして熱安定性を検討した。SDS-PAGE も行った。正常対照で同様に検討した。

<結果>

SMase 活性は、姉：38.8 nmol/mg prot/hr、弟：31.0 と正常対照の 105 \pm 30 のそれぞれ 37、30% の低下を示し、pH プロファイルも全体に平低であった。他のリソゾーム酵素活性は正常範囲であった。外来性 CHE 化はそれぞれ 3.3%、4.1% と正常範囲で、フィリピン染色でも free CH の蓄積増加は認めなかった。混合実験では、混合液の活性値はほぼ理論値通りで、細胞抽出液内活性抑制因子の存在は否定的であった。また SMase 活性は 10% FCS を使用しても LPDS を使用しても、症例対照いずれにも有意の変動はなかった。SMase の部分精製によって、症例と対照の SMase の回収率と精製度はそれぞれ、14.6%、23.7 倍および 10.3%、73.1 倍であった。至適 pH は症例、対照ともに 5.0、Km 値は症例では 43.4 μM 、対照では 30.3 μM で有意差はなかった。熱安定性は 55℃、60℃で検討したが両者に有意差はなかった。SDS-PAGE ではまだ複数のバンドを認めたが、70 kDa 付近に明瞭なバンドがみられた。

<考察>

本症例は進行性精神運動退行と痙攣、ミオクロヌスが幼児期に発症した同胞例である。既知の代謝・変性疾患は否定されたが、姉弟例であり遺伝性疾患が強く疑われた。肝脾腫はなかったが、骨髄で脂質蓄積所見を認め、皮膚線維芽細胞の SMase 活性が 30% 程度に低下していたことから NPD タイプ C が疑われたが、外来性 CHE 化障害がなくタイプ C も否定的であった。皮膚線維芽細胞を LPDS を用いて培養しても SMase 活性の上昇はみられず (タイプ C では上昇)、この SMase 活性低下はタイプ C とは機序が異なると考えられた。検索範囲では SMase の性質に異常は認めなかった。結局 SMase 活性の量的低下をみただけであった。この原因については、① Spence らの分類での I 型と同様の一義的な低下 (部分欠損) か、あるいは② II 型のように他に原因があって二次的に SMase 活性が低下しているかいずれかであろう。

①では、残存活性と症状発現の関連が問題となる。SMase 活性の臓器特異性が関係しているのかもしれない。

②では、SMase 活性抑制物質の存在は *in vitro* では否定的であったが、*in vivo* においてはさらに検討を要すと考えられた。

本稿の要旨は第 33 回日本先天代謝異常学会で発表した。

ニーマン・ピック病：種々のイオノフォア- による細胞培養系を用いた各亜型の実験モデル

吉川秀人、桜川宣男、佐々木征行

Niemann-Pick disease(NPD)は、acid sphingomyelinase(SMPD1)の欠損を本態とするI型と本態は不明だが二次的に sphingomyelin(SM)と cholesterol(CH)が蓄積するII型に分類されている。従来のタイプC(II型)は、培養線維芽細胞におけるコレステロールの細胞内プロセシングの異常が認められ、リソソーム-ゴルジ体領域の障害が唱えられている。我々は、ゴルジ体領域などに作用点を持つ種々の ionophore を培養皮膚線維芽細胞に投与して SMPD1 および cholesterol esterification(CHE)について検討した。SMPD1の阻害作用のみ惹起する薬剤(I型に類似)SMPD1の阻害作用とCHE障害の両者が共存する薬剤(II型に類似)が存在する事が判明した。NPDの培養細胞系の実験モデルの作成は、病態研究にも有利な薬剤実験モデルと考えられる。

〔方法〕正常ヒト由来皮膚線維芽細胞を用いて実験を行った。使用した各種 ionophore について、培養液中の適度な濃度(細胞増殖に影響を来さない)の検討を行った。使用薬剤は monensin, nigericin, A23187, alamethicin, nonactin, valinomycin, lasalocid, ionomycin である。2日間培養してから SMPD1 活性と他のライソソーム酵素を測定した。外因性 CHE 化は、4日間リポ蛋白欠乏血清(LPDS)で培養した後、更に上記濃度の各種 ionophore を加えて2日間培養する。つぎに(3H)コレステロールを加えて24時間培養として細胞を収獲し、脂質を抽出して CHE/CH 比を算出した。

〔結果〕 Ionophore の皮膚線維芽細胞の形態に及ぼす影響：胞体内の空胞形成が見られる薬剤は、monensin, nigericin, valinomycin である。いずれ

もゴルジ体領域の腫大を惹起すると言われており、それ以外の形態変化や細胞分裂に影響のない範囲の濃度で実験を行った。

Ionophore の皮膚線維芽細胞の SMPD1 活性に及ぼす影響：Monensin と nigericin は 0.05 μ M から 1.0 μ M の濃度にて対象の 30-45% の活性値に低下する。他の酵素では、 α -mannosidase が軽度低下している以外は殆ど変化を示さない。A23187 は 0.5 μ M から 5.0 μ M の濃度で、SMPD1 活性が指数関数的に阻害される。他の酵素は、同様に α -mannosidase が軽度阻害される以外は、変化が認められない。

Ionophore の CHE に及ぼす影響：正常皮膚線維芽細胞の CHE/CE 比は 4.0-8.6 に対して、monensin は 0.45, alamethicin は 0.4, Nonactin は 0.5 といずれも低下していた。他の ionophore は異常を示さなかった。

〔考察と結論〕 SMPD1 活性阻害のみを呈する I 型に類似の薬剤は、nigericin と A23187 である。SMPD1 阻害作用と CHE 化障害を呈する II 型に類似の薬剤は monensin である。また CHE 化障害のみを呈する薬剤は alamethicin と nonactin である。最近 II 型における CHE 化障害の原因論として、phosphomannosyl-directed glycoprotein の異常が提唱されている。上記薬剤によるこのようなレセプターの変化に注目している。

第 33 回日本小児神経学会(5.31.91)に発表。

Dibutyryl-cAMPによるI-cell病細胞
のlysosomal acid lipaseの上昇作用

桜川 宣男

コレステロールエステル (CHE) の加水分解酵素である lysosomal acid lipase (LAL) は、細胞内のコレステロール (CH) ホメオスタシスに関与する酵素であり、その先天的欠損症は Wolman 病および CHE 蓄積症である。近年、本酵素活性の低下と動脈硬化と関係が示唆されている。また種々のホルモンによる活性上昇作用や、細胞内の cyclic-AMP 濃度に応答した活性上昇作用が平滑筋細胞で認められている。そこで培養ヒト由来皮膚線維芽細胞に対する種々のホルモンおよび dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP) の効果を正常および I-cell 病にて検討したところ、I-cell 病の培養細胞において LAL 活性の上昇作用が認められたので詳しく検討をおこなった。

〔方法〕 正常皮膚線維芽細胞は成人男子より入手し、I-cell 病の細胞は大野先生 (鳥大) の提供による。1.0 mM DBcAMP と 0.1 mM theophylline の培養メジウムを作成して 2 日間培養した。Esteron, estradiol, estriol, progesterone, testosterone, testosterone propionate, dehydroisandrosterone, 5 α -androsterone はおのおの 1.0 μ g/ml medium の濃度で 2 日間培養した。細胞とメジウム中の LAL および他のリソソーム酵素 (11 種類) を測定した。メジウムは蒸留水で 48 時間透析してから、凍結乾燥し、少量の蒸留水で溶解して酵素測定した。LAL 活性は Cortner et al. の方法により測定した。また活性上昇因子については細胞フリー系で検討し、さらに薬剤の直接の効果も調べた。

〔結果〕 正常および I-cell 病の皮膚線維芽細胞では、種々の性ホルモンに対するリソソーム酵素

の変動はほとんど認められなかった。しかし、I-cell 病の細胞を 0.1 mM DBcAMP で 2 日間培養し、その細胞とメジウム中の LAL 活性を測定したところ、細胞では対象の 291%、メジウムでは対象の 201% の上昇を示した。そこで DBcAMP 処理後の I-cell 細胞内に LAL 活性上昇因子の出現の有無について細胞フリー系による混合実験を行った。しかし LAL 活性上昇因子の出現は認められなかった。さらに DBcAMP による LAL 活性の上昇作用が薬剤による直接作用であるかどうかの実験系では、その事実は否定された。

〔考察と結論〕 ラット動脈の培養平滑筋細胞を DBcAMP で処理すると LAL 活性値が上昇する事より、DBcAMP による細胞内応答の存在が示唆されていた。皮膚線維芽細胞を用いた今回の成績では、正常細胞では変化を認めず、I-cell 病細胞において DBcAMP が LAL 活性を上昇させる事が判明した。I-cell 病は phosphotransferase 欠損によりリソソーム酵素の標的異常をきたし、細胞内の酵素が 25% に減少するのが特徴である。従って DBcAMP による I-cell 病細胞の LAL 活性の上昇は LAL が他のリソソーム酵素とは異なった細胞内リソソーム移送経路の存在が示唆される。

第34回日本先天性代謝異常学会に発表。

神経発生分化調節の分子機構

桃井 隆

序

最近レチノイン酸受容体遺伝子が分離されたことにより、レチノイン酸の生理活性は、核内レチノイン酸受容体 (RAR) を介しておこなわれることが明らかになってきた。現在まで、*α*、*β*、*γ* の三種類の RAR が知られており、甲状腺ホルモンやステロイドホルモン受容体遺伝子と高い相同性を示す *erbA* スーパーファミリーに属する DNA 結合蛋白であることが明らかにされている。しかしながら、レチノイン酸がどのような分子機構を介して、細胞を分化させるかは、現在のところ依然として不明である。P19 マウステラトカルシノーマ細胞は、レチノイン酸の濃度に依存して、心筋細胞、骨格筋細胞、神経細胞へと多分化することが知られている。われわれは、レチノイン酸が P19 細胞を神経細胞へと分化誘導する機構を解析する目的でレチノイン酸により発現が誘導される遺伝子を調べると共に、これら遺伝子の導入による分化誘導を解析した。

方法

P19 細胞培養と遺伝子導入

P19 細胞は 10% FCS を含む MEM 培地中下、CO₂ インキュベーター中で培養された。P19 細胞の分化誘導は、1 μM *trans*-レチノイン酸存在下でおこなわれた。P19 細胞への、*c-jun* 遺伝子の導入は、20 μg の pSG5 *c-jun* DNA を 2 μg の pSV2neo ととも Ca²⁺ リン酸法をもちいて P19 細胞に導入した。G-418 (100 μg/ml) 存在下で耐性細胞を選択し、コロニー形成ののち、各クローンを得た。

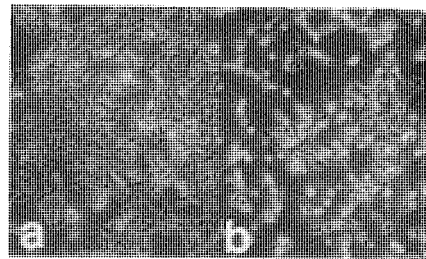
結果

P19 細胞は培地に添加するレチノイン酸の濃度、時間に依存して、RAR- および *c-jun* 遺伝子の mRNA が発現した。SV40 の発現ベクターを用いて、*c-jun* の遺伝子を P19 細胞に導入し、恒常的にそれぞれの遺伝子を発現するクローン C-2

を得た。C-2 細胞は P19 細胞の約 20 倍ほどの *c-jun* の mRNA を発現していた。この *c-jun* を恒常的に発現する C-2 細胞は形態的に線維芽細胞のように紡錘形の形をし、P19 細胞のように強い細胞間接着を示さなかった。さらに、バクテリアプレートで培養すると、やく 2 日間で、神経突起状の突起を伸長させた。

考察

c-jun 遺伝子産物は、*c-fos* 遺伝子産物と複合体を形成し、AP-1 として、TPA 応答配列 (TRE) に結合し、様々な遺伝子の転写活性を調節していることが知られている。この *c-jun* 遺伝子が P19 細胞において、レチノイン酸により発現が促進することは、レチノイン酸による P19 細胞分化の機構が、TPA が活性化する C-キナーゼ系の情報伝達系と相互作用することを示唆するものである。この分化における *c-jun* 遺伝子の発現の重要性は、*c-jun* 遺伝子を恒常的に発現する C-2 クローンが分化の形質をもつとともに、細胞凝集の条件下で、神経突起様の突起を伸長させることからの示唆される。*c-jun* 遺伝子の発現は P19 細胞の神経細胞への分化決定、調節に関与している可能性が考えられる。



a: P19 細胞 b: C2 細胞

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。

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」（主任）は2年目に入り、多数の神経細胞株が樹立された。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」ではサイトカインの中枢神経栄養作用を研究した。またヒューマンサイエンス振興財団の受託研究「神経・免疫相関と老年脳障害の発症機序の解明および治療法の開発」（主任）で、エーザイ、藤沢薬品、中外製薬、東レとの協同研究が行われた。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長寿科学研究「痴呆疾患の遺伝学的研究」（主任）が始まり、家族性アルツハイマー病遺伝子の解析、 β アミロイド沈着機序に関する分子生物学的研究等が行われた。この他、文部省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、エイズ対策岩崎班、予防接種リサーチセンター、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、山村 隆 [流動研究員] 宇宿功市郎、北口哲雄、遠藤真澄 [外来研究員] 小西吉裕、小路久敬、西澤正豊、佐藤準一、弘瀬秀樹、崔 得華、Alice Mayumi Takeuchi、Ferrenc Gallyas [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、岡田宏基 [センター研究員] 大八木保政、二瓶淳子 [研究生] 溝口和臣、亀谷雅洋、坂中進、井野辺純一 [賃金研究助手およびアルバイト] 掛場康予、吉田里美、久野かほる、下佐洋子、松本摩理子、吉村れい子、酒井めぐみ、洲鎌ヒロ子、杵掛友理子、山田陽子、津守陽子。

(部長 田平 武)

A. 論文

a. 原著

- 1) Begovich AB, Helmuth RC, Oksenberg JR, Sakai K, Tabira T, Sasazuki T, Steinman L, Erlich HA:
HLA-DP β and susceptibility to multiple sclerosis: an analysis of Caucasoid and Japanese patient populations
Human Immunol 28 : 365-372 , 1990
- 2) Endoh M, Rapoport SI, Tabira T :
Studies of experimental allergic encephalomyelitis in old mice
J Neuroimmunol 29 : 21-31 , 1990
- 3) Endoh M, Tabira T :
Effect of thymic hormones on induction of experimental allergic encephalomyelitis in old mice.
Tohoku J Exp Med 161 : 303-309 , 1990
- 4) Endoh M, Kunishita T, Nihei J, Nishizawa M, Tabira T :
Susceptibility to proteolipid apoprotein and its encephalitogenic determinants in mice.
Int Arch Allergy Appl Immunol 92 : 433-438 , 1990
- 5) Kamegai M, Konishi Y, Tabira T :
Trophic effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on central cholinergic neurons in vitro.
Brain Res 532 : 323-325 , 1990
- 6) Takashima S, Kurata H, Mito T, Nishizawa M, Kunishita T, Tabira T :
Developmental and aging changes in the expression patterns of beta-amyloid in the brains of normal and Down syndrome cases.
Brain Development 12 : 367-371 , 1990
- 7) Tokuchi F, Nishizawa M, Nihei J, Motoyama K, Nagashima K, Tabira T :
Lymphokine production by encephalitogenic and non-encephalitogenic T-cell clones reactive to the same antigenic determinant.
J Neuroimmunol 30 : 71-79 , 1990
- 8) Usuku K, Nishizawa M, Matsuki K, Tokunaga K, Takahashi K, Eiraku N, Juji T,

Ⅱ 研究業績

Osame M, Tabira T :

Association of a particular amino acid sequence of the HLA-DR β 1 chain with HTLV-I-associated myelopathy.

Eur J Immunol 20 : 1603-1606 , 1990

9) Usuku K, Nishizawa M, Eiraku N, Osame M, Tabira T :

Autoproliferative and self-reactive T-cell lines from patient with HTLV-I-associated myelopathy.

Tohoku J Exp Med 162 : 243-253 , 1990

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

Functional analysis of multiple promoters of the rat insulin-like growth factor II gene.

Biochim Biophys Acta 1048 : 165-170 , 1990

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

The primary structure of the rat insulin-like growth factor II gene region.

Biochim Biophys Acta 1049 : 350-353 , 1990

b. 著 書

1) 田平 武他 マニュアル検討委員会編 :

老人性痴呆疾患診断治療マニュアル

日本精神病院協会, 1991

c. 総 説

1) 田平 武, 西澤正豊 :

自己免疫性脳炎発症の分子機構

神経生化学〈蛋白質核酸酵素臨時増刊号〉下 35 : 1283-1290, 1990

2) 田平 武 :

バロー病(同心円硬化症)

日本医事新報 3462 : 127 , 1990

3) 田平 武 :

家族性アルツハイマー病

臨床科学 27 : 78-85 , 1991

- 4) 田平 武：
実験的アレルギー性脳脊髄炎
病理と臨床 9：177，1991
- 5) 田平 武：
免疫学的研究から
老年精神医学雑誌 2：482-489，1991
- 6) 田平 武：
アルツハイマー病と免疫
Dementia 4：101-109，1990
- 7) 田平 武：
実験的自己免疫脳炎の分子機構とその制御
実験医学 8：981-984，1990
- 8) 田平 武：
脳・免疫相関
先端の医生物とバイオサイエンス〈代謝臨時増刊号〉27：263-266，1990
- 9) 田平 武：
Baló 病
現代医学 22：1492-1497，1990
- 10) 田平 武：
多発性硬化症の治療：総論
神経内科 33：1-7，1990
- 11) 田平 武：
NTFとアルツハイマー病
Biomedica 5：63-66，1990
- 12) 田平 武：
神経栄養因子としてのサイトカイン
生体の科学 42：44-47，1991
- 13) 田平 武：
自己免疫性脱髄性脳炎の新しい展開
感染炎症免疫 21：11-20，1991

II 研究業績

14) 田平 武 :

実験的自己免疫性脳脊髄炎

Pure Chemicals "Daiichi" 22 : 1-7, 1991

15) 西澤正豊, 田平 武 :

トリソミー16マウス

神経進歩 35 : 117-131, 1991

16) 小西吉裕, 田平 武 :

四肢のしびれ

Modern Physician 10 : 642-644, 1990

17) 高橋慶吉 :

IGF II と中枢神経系

神経研究の進歩 34 : 591-597, 1990

d. 班会議報告書

1) 田平 武, 宇宿功市郎, 西澤正豊, 高橋慶吉, 徳永勝士, 松木一雄, 十字猛夫, 栄楽信隆, 末原雅人, 納 光弘 :

HAMにおけるHLA-DRB1遺伝子の解析

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

平成元年度研究報告書 p22-25, 1990

2) 田平 武, 二瓶淳子, 田平順子, 国下龍英, 西澤正豊 :

プロテオピッドアポ蛋白(PLP)による自己免疫性脳脊髄炎の研究

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班, 平成元年度研究報告書

p45-47, 1990

3) 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(β)タンパク質の生成機序について

厚生省痴呆疾患対策調査研究班, 平成元年度研究報告書 p88-90, 1990

4) 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 β 蛋白mRNAの神経特異的発現の解析

厚生省痴呆疾患対策調査研究班, 平成元年度研究報告書 p83-87, 1990

5) 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，平成元年度研究報告書，p71-74,1990

- 6) 田平 武，宇宿功市郎，西澤正豊，徳永勝士，松木一雄，十字猛夫，栄楽信隆，末原雅人，
納 光弘：

H A MにおけるH L A - D R B 1 遺伝子の解析

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，平成元年度報告書 p232-235,1990

- 7) 西澤正豊，田平 武，宇宿功市郎，高橋慶吉，徳永勝士，松木一雄，栄楽信隆，末原雅人，
納 光弘：

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に関する研究班，平成元年度研究報告書 p59-63,1990

- 8) 高橋慶吉，小西吉裕，弘瀬秀樹，田平 武：

中隔野神経細胞に及ぼすインシュリン様成長因子Ⅱ(IGFⅡ)の作用およびIGFⅡ mRNA微量定量法の開発

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2年度研究報告書 p49-57,1991

- 9) 宇宿功市郎，西澤正豊，栄楽信隆，納 光弘，田平 武：

H A M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

文部省総合研究・HTLV-II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，
平成元年度研究報告書 p41-49,1990

e. その他

- 1) 田平 武：

下半身まひ

朝日新聞 6.10,1990

- 2) 田平 武：

神経免疫相関

老年期痴呆研究会誌 3:186-189,1990

- 3) 田平 武：

痴呆と免疫

老年期痴呆研究会誌 3:195-198,1990

- 4) 田平 武：

中年以降に多い手足のしびれ

II 研究業績

生活の設計（日銀貯蓄広報中央委員会発行） 150：38-41，1990

5) 田平 武：

中年以降に多い頭痛

生活の設計（日銀貯蓄広報中央委員会発行） 151：38-41，1990

6) 田平 武：

めまい

生活の設計（日銀貯蓄広報中央委員会発行） 152：38-41，1991

7) 田平 武：

アルツハイマー型痴呆の原因：遺伝子異常

日医ニュース 710：，1991

8) 遠藤真澄，田平 武：

老齢マウスにおける脳損傷に伴うIa陽性細胞の出現

第33回日本神経科学会論文集 29：470-471，1990

B. 学会発表

a. 特別講演，シンポジウム

1) 田平 武：

神経免疫相関

第3回中・四国老年期痴呆研究会，高松，5.19，1990

2) 田平 武：

IL-3と中枢ニューロン

大阪大学蛋白質研究所セミナー「脳神経系に作用する成長因子」，大阪，7.9，1990

3) Tabira T：

Myelin destruction due to allergic processes

XIth International Congress of Neuropathology, Kyoto, Sep 6, 1990

4) Tabira T, Ordinario AT：

Concetric sclerosis seen in the Philippines.

Satellite Symposium-Demyelination Mechanism and Background, Kyoto, Sep 9,1990

5) Tabira T, Chui DH, Endoh M：

The role of MHC class II antigen-positive cells in AD brain

The 5th PRIT International Symposium, Frontiers of Alzheimer Research,
Tokyo, Sep 12, 1990

6) 田平 武 :

痴呆研究の最近の動向

第1回新潟臨床痴呆懇話会, 新潟, 9.28, 1990

7) 田平 武 :

サイトカインの中樞神経作用

第43回日本自律神経学会総会シンポジウム「免疫系と自律神経系」, 旭川, 10.6, 1990

8) 田平 武 :

神経栄養因子としてのサイトカイン

第2回ヒューマンサイエンス基礎研究セミナー:ニューロトロフィックファクター
(神経栄養因子)研究の展望, 東京, 10.16, 1990

9) 田平 武 :

自己免疫性脳炎発症機序の分子機構と新しい治療法の開発

第2回神経内科疾患治療カンファレンス, 宮崎, 10.24, 1990

10) 田平 武 :

実験的自己免疫脳炎(EAE)の発症機序と新しい制御方法

第5回バイオセラピー・カンファレンス, 兵庫, 2.2, 1991

11) 田平 武 :

"テーマ4 脳・神経系機能と生体防御機構の解明"の研究概要について

ヒューマンサイエンス基礎研究事業・官民協同プロジェクト平成2年度研究成果シンポジウム,
東京, 2.8., 1991

12) Tabira T, Nishizawa M :

MHC genes controlling susceptibility to MS in Japanese

Workshop on Thymus, Clonal Deletion and Suppressor Systems in Demyelinating
Disease, New Mexico, Mar 23, 1991

b. 国際学会

1) Fukatsu R, Fisher P, Monning U, Milbich C, Malthaup G, Weidemann A, Dyrk T,
Beyreuther K, Aizawa Y, Takamaru Y, Tabira T, Kunishita T, Takahata N:

Monoclonal antibody against native amyloid recognizes soluble form of amyloid

Ⅱ 研究業績

precursor from certain cell culture.

XIth International Congress of Neuropathology, Kyoto, Sep 4, 1990

- 2) Aizawa Y, Fukatsu R, Takamaru Y, Obara T, Fujii M, Kobayashi M, Kunishita T,
Tabira T :

Monoclonal antibodies against native amyloid protein-The application of double staining technique--

XIth International Congress of Neuropathology, Kyoto, Sep 5, 1990

- 3) Palmert M, Golde T, Cheung T, Cohen M, Estus S, Frazzini V, Hopfer C,
Kunishita T, Pasternack J, Usiak M, Younkin L, Younkin S :

The β amyloid precursor : mRNAs, membrane-associated forms, and soluble derivatives.

The 5th PRIT International Symposium, Frontiers of Alzheimer Research, Tokyo,
Sep 10, 1990

c. 一般学会

- 1) 北口哲雄, 田平 武, 後藤幾生, 立石 潤 :

Neuronal ceroid lipofuscinosis の蓄積物質における β 蛋白 immunoreactivity の生化学的および免疫組織化学的研究

第30回日本神経学会総会, 横浜, 5.24, 1990

- 2) 北口哲雄, 高橋慶吉, 田平 武 :

神経細胞の不死化・株化

第14回神経科学学術集会, 京都, 12.12, 1990

- 3) 宇宿功市郎, 西澤正豊, 田平 武, 徳永勝士, 松木一雄, 十字猛夫, 栄楽信隆, 末原雅人,
納 光弘 :

H A MにおけるHLA-DRB1遺伝子の解析

第30回日本神経学会総会, 横浜, 5.24, 1990

- 4) 遠藤真澄, 田平 武 :

老齢マウスにおける脳損傷に伴うIa陽性細胞の出現

第33回日本神経化学会, 広島, 10.26, 1990

- 5) 大八木保政, 高橋慶吉, 亀谷雅洋, 田平 武 :

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

第30回日本神経学会総会，横浜，5.25，1990

- 6) 亀谷雅洋，小西吉裕，国下龍英，西澤正豊，田平 武：

マウスコリン作動性ニューロンに対する granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) の効果について

第30回日本神経学会総会，横浜，5.24，1990

- 7) Kamo I, Kunishita T, Kikuchi A：

Dendritic cell colony stimulating factor from thymic myoid cells

第49回日本癌学会，札幌，7.4，1991

C. 班会議発表

- 1) 田平 武，宇宿功市郎，西澤正豊，納 光弘：

HAMにおけるサプレッサーサイトトキシックT細胞活性

厚生省エイズ対策岩崎班，平成2年度班会議，仙台，12.10，1990

- 2) 田平 武，西澤正豊，崔 得華，内田耕一，高坂新一：

トリソミー16マウスを用いたアルツハイマー病変化発現の解析

文部省重点領域研究・脳の老化機構に関する分子細胞生物学的研究班，平成2年度班会議，東京，12.20，1990

- 3) 田平 武，山村 隆：

プロテオリピッド・アポ蛋白(PLP)特異的T細胞，B細胞クローンの認識するエピトープ

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、東京，1.19，1991

- 4) 田平 武，山村 隆：

オリゴデンドロサイト前駆細胞株の発現するT細胞増殖活性

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，東京，1.24，1991

- 5) 田平 武，西澤正豊：

多発性硬化症における感受性遺伝子の解析

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，東京，1.24，1991

- 6) 内藤成孝，内田晴久，小林正明，井藤悦郎，原崎博美，宮内達郎，野田行文，高頭勉明，

田平 武：

プロテアーゼインヒビターの脳内注入の影響

ヒューマンサイエンス第3分野第4テーマ研究発表会，東京，2.7，1991

II 研究業績

7) 小路久敬, 弘瀬秀樹, 田平 武 :

神経細胞培養基材の探索

ヒューマンサイエンス第3分野第4テーマ研究発表会, 東京, 2.7, 1991

8) 田平 武 :

痴呆疾患の遺伝学的研究

平成2年度長寿科学総合研究発表会, 東京, 3.9, 1991

9) 西澤正豊, 宇宿功市郎, 田平 武, 徳永勝士 :

免疫性神経疾患における疾患感受性遺伝子

厚生省精神・神経疾患・遺伝子解析による神経疾患発現機構に関する研究班, 東京,
1.22, 1991

10) 高橋慶吉, 小西吉裕, 田平 武 :

神経細胞に及ぼすインシュリン様成長因子 II (IGF II) の作用

厚生省精神・神経疾患・中枢神経系の機能修復に関する研究班, 東京, 1.9, 1991

11) 小西吉裕, 新島健司, 弘瀬秀樹, 国下龍英, 高橋慶吉, 田平 武 :

中枢神経系コリン作動性ニューロンに対する hematopoietic growth factor の作用

ヒューマンサイエンス第3分野第4テーマ研究発表会, 東京, 2.7, 1991

12) 小西吉裕, 田平 武 :

インターロイキン3 (IL-3) の神経細胞に対する作用とその意義

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, 東京,
3.14, 1991

13) 崔 得華, 北口哲雄, 田平 武 :

コリン作動性ニューロンの不死化 immortalization に関する研究

科学技術振興調整費省際基礎研究・分化神経細胞の不死化技術の開発研究班, 東京,
3.1, 1991

14) 佐藤準一, Ferenc Gallyas, 遠藤真澄, 田平 武 :

細胞融合によるマウス小脳神経細胞の不死化

科学技術振興調整費省際基礎研究・分化神経細胞の不死化技術の開発研究班, 東京,
3.1, 1991

D. その他

1) Tabira T :

Neurotrophic effect of cytokines

University of British Columbia, Department of Neurology, Special Seminar,
Vancouver, Aug 15, 1990

2) Tabira T :

Cytokines as neurotrophic factors

Institute of Pathology Seminar, Case Western Reserve University, Cleveland,
Aug 17, 1990

3. 主な研究報告

アルツハイマー病患者髄液に含まれる β APP誘導体の定量

国下龍英, YOUNKIN S.G.

アルツハイマー病患者(AD)脳に見られるアミロイド蛋白(β AP)は、その前駆体(β APP)の異常代謝産物である。髄液には分泌型 β APP誘導体として125K Da(含Kunitz protein inhibitor domain)、105K Da及びそれらの二次代謝物N末由来 25K Daが存在する¹⁾。前二者は β APの一部又はすべてを含んでいることが確認されている²⁾。我々はADでの β APP代謝異常が髄液にも反映されるのではないかと考え、 β APP代謝物の定量を試みた。

<方法>

髄液はLiving AD 18例(probable AD、うち3例は死後確定)、パーキンソン病患者4例、正常対照者14例の腰椎より得た。ADの判定³⁾、AD痴呆度の判定⁴⁾は文献に従った。240 μ lの髄液を脱塩後ウエスタンブロットし、抗 β APP 45-62反応性蛋白(上記三種)を¹²⁵I protein Aで検出した。含量の計測は γ カウンターによる。

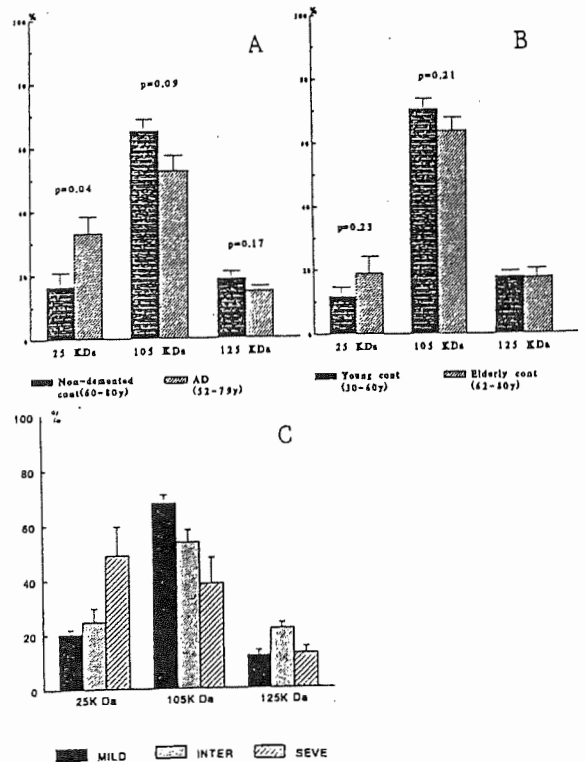
<結果・考察>

β APP誘導体の総量にはグループ間で変動は見られなかった。しかし、相対比でみると、ADにおいてのみ25K Daの増加と105K Daの減少が有意に見出された。図に正常者とADの比較を示す。同様の傾向は正常者における加齢及びADにおける痴呆の程度にも相関して見られたが、有意なものではなかった。以上の知見は、抗 β APP45-62反応性蛋白の検討がADの生化学的診断手段として有効なことを示している。Living髄液において、25K Daが主に105K Daから由来していることは、ADで25K Da形成消化活性が昂進していることを示している。死後変化によって生ずる25K Daは105K Da、125K Daの両方の減少を伴うものであり⁵⁾、少なくとも25K Da形成には二種以上の酵素が関与しているものと想像される。 β APが異常代謝の産物であることを考えると、Living ADで見られた25K Da形成活性の昂進は、 β AP形成に深く係わっている事柄かもしれない。

<文献>

- 1) Palmert M.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6338-6342 (1989)
- 2) Palmert M.R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 165, 182-188 (1989)
- 3) Mckhann G. et al., Neurology, 34, 934-944 (1984)

- 4) Folstein M.F. et al., J. Psychiat. Res., 12, 189-198 (1975)
- 5) Kunishita T. et al., in press



⊠: Relative amounts of β APP derivatives in CSF from living patients. A: age-matched cases, B: young vs elderly controls, C: AD cases by mental status.

granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)の中樞神経系コリン作動性ニューロンに対する作用

小西吉裕, 亀谷雅洋, 新島健司, 国下龍英, 田平 武

顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は, interleukin-3 (IL-3) と同様, 未分化造血幹細胞の増殖, 分化を支持する造血因子の一つである。

すでに, 我々はIL-3が, vitroでは中隔野コリン作動性ニューロンに対し, choline acetyltransferase (ChAT) を促進し, vivoでは中隔野コリン作動性ニューロンの生存維持効果を有することを報告した。¹⁾ 今回は, GM-CSF について, 同様の検討を加えた。²⁾

<方法>

① in vitro : 胎生15日のBALB/cマウス脳より中隔野を単離し, 既報¹⁾の方法に従って無血清培地にて神経細胞の培養を行った。培養開始とともに, murine GM-CSF (mGM-CSF) を種々の濃度で加え, 5日目にChAT活性と蛋白量を測定した。無添加の場合を対照とした。また, cholinergic hybridoma line cellsであるSN6.10.2.2³⁾についても, あわせて検討した。

② in vivo : 成熟雄Wisterラットの左fimbria-fornixを切断し, 切断直後から4日間, 右側脳室にmGM-CSFを50U/one shot, one shot/dayで注入した。切断して14日後, 厚さ20 μm連結脳冠状断を作成し, acetylcholinesterase (AChE) 染色を行った。効果判定は, 内側中隔核と対角帯核由来のAChE陽性細胞数について, 非切断側との比較より行った。⁴⁾ 対照として, 0.1% BSA/PBSを注入した。

<結果, 考案>

① mGM-CSFは, 初代培養中隔野ニューロンに対し, 濃度依存性にChAT活性を亢進させ, その最大効果は10U/ml添加によりえられた (Table 1)。SN6.10.2.2に対しても, mGM-CSFはChAT活性を亢進させ (Fig.1), mGM-CSFは直接ニューロンに作用してChAT活性を促進するものと考えられた。

② 非切断側に対する切断側での中隔野AChE陽性細胞数の比 (survival ratio) は, 対照に比べmGM-

Table 1 Effect of GM-CSF on ChAT activities of mouse septal neurons.

Sample	(n)	Specific activity (pmole/mg/min)	Total protein (μg/well)	Total ChAT activity (pmole/h/well)	Relative activity (%)
Control	(2)	8.5	145	74	100
GM-CSF	1U/ml (2)	13.1	188	148	200
	5U/ml (2)	20.7	115	143	268
	10U/ml (2)	31.2	143	268	362
	50U/ml (2)	23.9	119	171	231
	100U/ml (2)	25.8	108	167	225

6 × 10⁵ cells/ml of mouse septal neurons were treated with the indicated dose of GM-CSF and ChAT activities were measured on days 5.

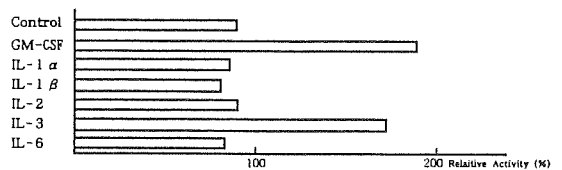


Fig.1 Effect of cytokines on ChAT activities in cholinergic hybridoma cell line SN6.10.2.2. 2 × 10⁵ cells/ml were cultured with serum-free defined medium containing each cytokine, and ChAT activities were measured 48 h later in duplicated dishes each. Values are expressed as relative activities (%) to the total ChAT activities of the control.

-CSFに注入群で有意に高かった。その生存維持効果は, β NGFほどではないが, humanIL-3と同等の効果をも有していた (Table 2)。

Table 2 Effects of hIL-3 or mGM-CSF on the survival of AChE⁺ neurons in the septal area after fimbria-fornix axotomy

(A) Control	n	Lesioned Site		Normal Site		Left/Right (%)
		(Left)	(Right)	(Left)	(Right)	
hIL-3 (1250U)	2	339	1290	26		
hIL-3 (6250U)	2	554	1141	49		
β NCF (25μg)	2	606	1422	43		
hIL-3 (50U × 4)	2	1104	1074	103		
mGM-CSF (50U × 4)	2	992	1610	62		
(B) Control	5	467 ± 109	1328 ± 176	35.4 ± 8.4 *		
mGM-CSF (50U × 4)	4	846 ± 94	1460 ± 230	59.4 ± 10.3 *		

(A) Continuously infused for 2 weeks

Control : 0.1% BSA/PBS

(B) Daily infused from day 0 to 3 (total 4 shots)

(* : p < 0.02)

IL-3と同様, GM-CSFにも, 中枢神経系コリン作動性ニューロンに対するChAT活性促進作用, 生存維持効果を有することが明らかとなった。今後, IL-3やGM-CSFにより単一の血球系への分化の方向性が決定づけられた各血球の前駆細胞に働くG-CSF, M-CSFやerythropoietinについても, 同様の検討が必要である。

<文献>

- 1) Kamegai et al., Neuron, 4, 429-436 (1990)
- 2) Kamegai et al., Brain Res., 532, 323-325 (1990)
- 3) Hammond et al., Science, 234, 1237-1240 (1986)
- 4) Niiijima et al., Brain Res., 451, 163-171 (1988)

神経細胞の不死化・株化

北口哲雄, Alice Mayumi Takeuchi, 高橋慶吉, 田平 武

ある特定のニューロンに由来し、なおかつそのphenotypeの一部を保持しつつ継代培養可能な神経細胞株を樹立し、その細胞株の機能や分化を研究できれば非常に有用である¹⁾。今回はオンコジーンを遺伝子導入する方法²⁾によって神経細胞株の樹立を試みた。

<方法>

欠損株のマウス・モロニー白血病ウィルスに由来するレトロウィルスベクター(オンコジーンとしてav-myc, SV-40 virus large T-antigenおよびその温度感受性変異遺伝子 tsA58-3を組み込み、Ψ2パッケージ細胞株に導入した(図1)。この細胞から産生される組換え型レトロウィルスベクターを培養上清中に回収した³⁾。胎生13ないし14日のBalb/cマウスの前脳中隔野、脊髄および海馬由来の初代培養神経細胞にトランスフェクションを行った。ネオマイシンを含む選択培地(Dulbecco's modified Eagle Medium+10%牛胎児血清)で継代培養した。得られた形質転換細胞のクローニングを行った。これらの細胞株を星膠細胞ではGFAP、神経細胞ではニューロフィラメント、MAP2、またprogenitor cellではA2B5, HNK-1などを細胞マーカーとしてcharacterizationを行った。またオンコジーンに対するprobeをもちいてgenomic DNAのSouthern blottingを行い、オンコジーンの組み込みおよびclonalityを検討した。

<結果>

avian v-mycを導入した前脳中隔野由来の初代培養細胞から95細胞株が得られた。免疫細胞化学によるスクリーニングでは大部分の細胞株はGFAP陽性、ニューロフィラメント陰性でありグリア細胞由来と考えられ

た。GFAP陰性かつニューロフィラメント陰性で、A2B5, HNK-1陽性の細胞株がみられ前駆細胞由来と考えられた。

またT-antigenを導入した細胞株のうちF2-1, H22-3, H22-4, HV-2, HV-3, HV-4は無血清培養条件下でニューロフィラメント陽性、GFAP陰性で神経細胞のphenotypeを示した。

<考察>

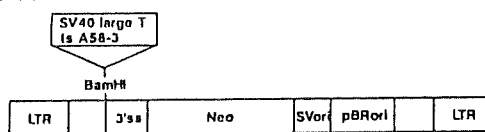
遺伝子導入法によって得られる細胞株は大部分がグリア細胞由来であるが、前駆細胞由来と考えられる細胞株が得られた。これらは神経系、特にニューロンの発生、機能分化に関わる因子を研究するのに有用である^{4), 5)}。

<文献>

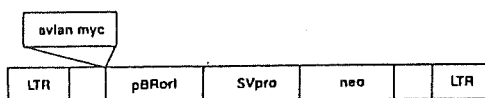
- 1) Lendahl U. et al. Trends Neurosci. 13, 132-137 (1990)
- 2) Cepko C.L. Annu. Rev. Neurosci. 12, 47-65 (1989)
- 3) Ryder E.F. et al. J. Neurobiol. 21: 356-375 (1990)
- 4) Evrard C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3062-3066 (1990)
- 5) Birren S. J. et al. Neuron 4, 189-201 (1990)

図1. レトロウィルスベクター

(A) pZIP-Neo SV(X)1



(B) pneoMLV



自己免疫性脳脊髄炎の再発抑制機構：脳炎誘起性T細胞クローン接種により誘導される自己反応性T細胞の性状

二瓶淳子, 山村 隆, 田平 武

多発性硬化症の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)の再発抑制機構はなお明らかでないが、近年suppressor T細胞が関与していることが示唆されている¹⁾²⁾³⁾。我々は、MBP特異的脳炎誘起性T細胞クローン4b.14aを同系SJL/Jマウスに接種することにより、4b.14a反応性(autoreactive)のsuppressor活性を持つT細胞を誘導した。

方法：活性化した4b.14aを同系SJL/Jマウスのfootpadsに皮下接種後10日目に所属リンパ節を採り、3種類のMBP特異的T細胞クローン4b.14a, 4E, 4b.14a/nを3000rad X線照射後stimulatorとして用い、各々に対する増殖応答を $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ の取り込みにより測定した。また、4b.14a刺激によりblast化した細胞を分離してFACS解析した。更にin vitro, in vivo 各々におけるこれらの細胞の4b.14aに対するsuppressive effectを検討した。結果：4b.14a接種後10日以内に同系SJL/Jマウスの所属リンパ節は著明に腫大し、そのリンパ節細胞は活性化状態の4b.14aと4Eに対し強い増殖応答を示した(図1)。FACS解析の結果、活性化状態の4b.14aに反応したautoreactiveな細胞はThyl.2⁺, CD5⁺, CD3⁺, B220⁻, T細胞レセプター(TCR) $\alpha\beta^+$ のT細胞であったが、そのうち約65%がCD4⁻CD8⁻であった。これらの4b.14a反応性の細胞はin vitroで4b.14aの抗原特異的な増殖を抑制し更にin vivoでも4b.14aによるEAEの発症を抑制した(図2)。

考察：近年、自己免疫疾患とTCR $\alpha\beta^+$ CD4⁻CD8⁻ T細胞との関連が報告されているが、今回の結果はEAEのeffector T細胞に反応してsuppressor活性を持つTCR $\alpha\beta^+$ CD4⁻CD8⁻ T細胞が誘導されることを示し、このようなautoreactive T細胞がEAEの回復、再発抑制に関与している可能性を強く示唆する。現在4b.14a反応性のT cell line, clone を樹立し、更に深い検討を続けている。

文献：

- 1) Sun D. et al., Nature, 332, 843 (1988)
- 2) Lider O. et al., Science, 239, 181 (1988)
- 3) Lohse A.W. et al., Science, 244, 820 (1989)

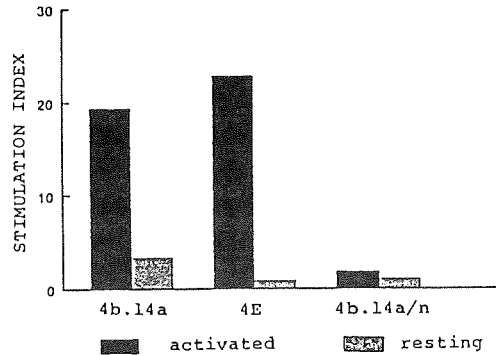


図1. Response pattern of anti-4b.14a lymphocytes. The lymphocytes proliferative responses were assayed in 96-well round bottom microtiter plates. 2×10^5 draining lymph node cells of SJL/J mice, which had been inoculated with 4b.14a 10 days previously, were confronted with 1×10^4 of 3000rad irradiated MBP-specific T cell clones. After 72hrs the cultures were pulsed with $1.0 \mu\text{Ci}$ $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ for 20hrs and harvested for evaluation of thymidine incorporation. The results are shown by stimulation index (cpm with stimulator clone/cpm without stimulator clone).

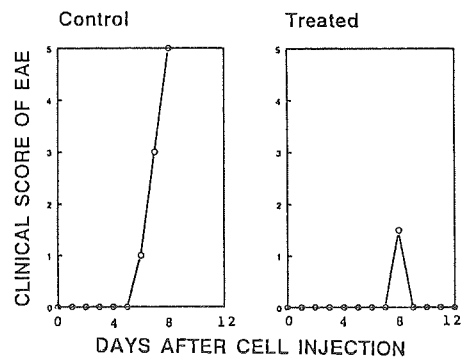


図2. In vivo protective activity of anti-4b.14a autoreactive lymphocytes. SJL/J mice, which had been irradiated with 550rad of X-ray, were injected i.v. with 1.5×10^7 activated 4b.14a. The mice of treated group were additionally injected i.p. with 1.5×10^7 activated anti-4b.14a lymphocytes, which were freshly activated by confrontation with irradiated clone 4b.14a in the activated state.

7. 疾病研究第7部

1. 研究部一年のあゆみ

疾病研究第7部では、てんかんの発症機序とその治療に関し、主として生化学・薬理学的研究を行っている。平成元年3月より本研究部第一研究室室長として任に当たってきた今澤正興が平成2年10月付けで本研究所ラジオアイソトープ管理室長に昇任し、替って11月1日付で、西川徹が本研究部疾病研究第3部より配置換えとなった。この他研究見習生の斉藤智子(8月-9月)が在籍し、抗てんかん薬分析法の研究に協力した。

本年度の主な研究テーマは次の2つである。

1. 分離能に優れた新しい方法であるキャピラリー電気泳動法を用い、多剤併用時の血中の抗てんかん薬の精度の良い分析法を開発した。本法は操作も簡便であり、今後抗てんかん薬の有用な分析法となることが期待される。
2. てんかんの痙攣発作および痙攣準備状態の形成には、脳内のNMDA型興奮性アミノ酸受容体の過剰な刺激が関与することが示唆されている。そのメカニズムを明らかにするための研究の一環として、NMDA受容体アロステリック調節部位に作用してNMDA受容体機能を増強する作用をもつ、未知の内在性因子の検索を始めた。

(部長事務取扱 杉田秀夫)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1)
- Shimamura M
- ,
- Ohara T
- ,
- Imazawa M
- ,
- Miyamoto K
- :

Purification of myelin-associated glycoprotein from calf brain using high-performance liquid chromatography.

J chromatogr 526 : 535-539 , 1990

- 2)
- Nakajima K
- ,
- Imazawa M
- ,
- Miyamoto k
- :

Presence of another species of myelin basic protein(MBP) in the developing chick brain.

Neurochem Int 18 : 357-365 , 1991

- 3)
- Ohi K
- ,
- Takashima M
- ,
- Nishikawa T
- ,
- Takahashi K
- :

N-Methyl-D- aspartate receptor participates in neuronal transmission of photic information through the retinohypothalamic tract.

Neuroendocrinol 53 : 344-348 , 1991

- 4)
- Hata N
- ,
- Nishikawa T
- ,
- Umino A
- ,
- Takahashi K
- :

Evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptor in tonic inhibitory control of dopaminergic transmission in rat medial frontal cortex.

Neurosci Let 120 : 101-104 , 1990

b. 著書

(分担)

- 1)
- 西川 徹
- :

薬理作用の基礎

今日の分裂病治療, 金剛出版, 東京, p254-282 , 1990

- 2)
- 西川 徹
- :

興奮性アミノ酸

精神分裂病-基礎と臨床-B.生物学 10) 受容体

朝倉書店, 東京, p267-278 , 1990

d. 班会議報告書

- 1)
- 今澤正興
- :

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

II 研究業績

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）

平成元年度研究報告書，p319-326，1990

2) 今澤正興，斉藤智子：

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脳内グアニンヌクレオチドレベルに及ぼす影響—

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2年度研究報告書，p9-13，1990

3) 高橋清久，西川 徹，谷井靖之，海野麻未，橋本篤司：

Phencyclidine 投与動物を用いた精神分裂病症状の発現機構と新しい治療法開発に関する研究
厚生省精神・神経疾患・精神分裂病の生物学的病因および発症に関する研究班，平成元年度研究報告書，p21-29，1990

B. 学会発表

a. 特別講演，シンポジウム

1) 今澤正興，斉藤智子：

キャピラリーゾーン電気泳動法による脳内ヌクレオチドの分析

第10回キャピラリー電気泳動シンポジウム，大阪，12.14，1990

2) Nishikawa T，Umino A，Tanii V，Hashimoto A，Takahashi K：

Possible involvement of glutamatergic dysfunction in vulnerability to schizophrenic symptoms.

The Satellite Symposium of the 17th C.I.N.P.

(Sendai Symposium: Vulnerability to Schizophrenic Symptoms)

Sendai, Sep 15, 1990

3) Nishikawa T，Umino A，Tanii V，Hashimoto A，Hata N，Takahashi K：

Excitatory amino acidergic dysfunction in schizophrenia and possible treatment.

The Satellite Symposium of the 17th C.I.N.P.

New Trends in Schizophrenia and Mood Disorders Research, Kyoto, Sep 15, 1990

4) Nishikawa T，Tanii Y，Umino A，Hata N，Takahashi K：

Dysfunction of excitatory amino acidergic systems and schizophrenic disorders.

The 14th international Symposium(Biological Basis of Schizophrenic Disorders)
Katata, Sep 6, 1990

5) Nishikawa T :

NMDA receptor, phencyclidine and schizophrenia

Schizophrenia; Dialogues in Neuroscience, Tokyo, Sep 18, 1990

6) Shinohara K, Nishikawa T, Yamazaki K, Takahashi K :

Ontogeny of phencyclidine and strychnine-insensitive glycine binding sites associated with NMDA receptor/ion channel complex in rat brain

Satellite Symposium of 17th Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (NMDA related Agents : Biochemistry, Pharmacology and Behavior),
Nagoya, Sep 17, 1990

b. 国際学会

1) Nishikawa T, Umino A, Tanii Y, Takahashi K :

Evidence for involvement of NMDA receptor blocking in phencyclidine-induced facilitation of dopaminergic transmission in rat prefrontal cortex.

17th Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum,
Kyoto, Sep 13, 1990

2) Shirayama Y, Nishikawa T, Takahashi K :

Effect of subchronic treatment with psychotogenic drugs on sigma binding sites in rat brain.

17th Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum,
Kyoto, Sep 12, 1990

3) Tanii Y, Nishikawa T, Takahashi K :

Allosteric agonists for NMDA receptor complex attenuate PCP-induced abnormal behaviors

17th Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum,
Kyoto, Sep 14, 1990

4) Umino A, Nishikawa T, Takahashi k :

Effects of Non-competitive antagonists for NMDA type excitatory amino acid receptor on monoamine metabolism in rat brain

II 研究業績

17th Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum,
Kyoto, Sep 13, 1990

5) Shirayama Y, Nishikawa T, Nakamura M, Takahashi K :

Effects of repeated treatment with psychoactive drugs on sigma binding sites in rat brain.

The Satellite Symposium of the 17th C.I.N.P.

New Trends in Schizophrenia and Mood Disorders Research, Kyoto, Sep 15, 1990

6) Tanii Y, Nishikawa T, Hashimoto A, Takahashi K :

Stereospecific effect of allosteric agonists for N-methyl-D-aspartate receptor complex on PCP-induced hyperactivity in the rat.

The Satellite Symposium of the 17th C.I.N.P.

New Trends in Schizophrenia and Mood Disorders Research, Kyoto, Sep 15, 1990

c. 一般学会

1) 今澤正興, 斉藤智子 :

キャピラリーゾーン電気泳動法によるリボヌクレオチド分離条件の検討

第63回日本生化学会大会, 大阪, 9.13, 1990

2) 今澤正興, 斉藤智子 :

キャピラリー電気泳動による抗てんかん薬分析の検討

第24回日本てんかん学会, 沖縄, 11.17, 1990

3) 武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 加藤由起子, 西川 徹, 高橋清久 :

光刺激伝達における視交叉上核内興奮性アミノ酸受容体の関与

第7回生物リズム研究会, 奈良, 9.29, 1990

4) 武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 加藤由起子, 西川 徹, 高橋清久 :

光刺激伝達における視交叉上核内興奮性アミノ酸受容体の関与

第110回日本獣医学会, 宮崎, 10.17, 1990

5) 武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 加藤由起子, 西川 徹, 高橋清久 :

光刺激伝達に興奮性アミノ酸及びコリン性ニューロンが関与する

第14回神経科学学術集会, 京都, 12.11, 1990

6) 谷井靖之, 西川 徹, 海野麻未, 高橋清久 :

D-Alanine は phencyclidine の生化学的並びに行動学的作用に拮抗する

第20回日本神経精神薬理学会, 甲府, 10.18, 1990

7) 橋本篤司, 西川 徹, 高橋清久 :

Methamphetamine による異常行動の発現に対する N-methy-D- aspartate 受容体アロステリック作動薬および誘導体の効果

第20回日本神経精神薬理学会, 甲府, 10.18, 1990

8) 白山幸彦, 西川 徹, 高橋清久 :

線条件 sigma 結合部位に対する向精神薬反復投与の影響

第14回神経科学学術集会, 京都, 12.11, 1990

9) 白山幸彦, 西川 徹, 高橋清久 :

ラット脳内 sigma 結合部位に対する imipramine および desipramine 投与の影響

第13回日本生物学的精神医学会, 前橋, 3.29, 1991

10) 柏 淳, 西川 徹, 海野麻未, 高橋清久 :

MK-801の前頭葉ドーパミン代謝に与える影響

第13回日本生物学的精神医学会, 前橋, 3.30, 1991

c. 班会議発表

1) 今澤正興 :

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脳内グアニンヌクレオチドレベルに及ぼす影響—

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2年度報告会, 東京, 12.6, 1990

2) 高橋清久, 西川 徹, 橋本篤司, 谷井靖之, 海野麻未, 白山幸彦, 岡高恵, 柏 淳 :

NMDA受容体アロステリック作動薬およびその脂肪酸結合化合物は phencyclidine または methamphetamine 投与後に出現する異常行動を抑制する

厚生省精神・神経疾患・精神分裂病の発症機序に関する神経科学的研究班, 東京, 2.8, 1991

3) 高橋清久, 西川 徹, 柏 淳, 海野麻未, 橋本篤司, 白山幸彦 :

メタンフェタミンによる逆耐性現象の形成と維持に関する神経回路網の研究

科学技術振興調整費総合研究第II期課題

ポジトロンCT等を用いる薬物依存メカニズム解明に関する研究班, 東京, 3.10, 1991

4) 西川 徹, 海野麻未, 柏 淳, 橋本篤司, 白山幸彦, 高橋清久 :

依存性薬物による逆耐性現象の発現機序に関する生化学的研究

—methamphetamine または cocaine 投与後の脳内 c-Fos 蛋白様免疫活性—

II 研究業績

厚生省精神・神経疾患・薬物依存の発生機序と臨床及び治療に関する研究班，東京，2.7，
1991

d. その他

1) 今澤正興，斉藤智子：

キャピラリー電気泳動によるグアニンヌクレオチドの測定法について

ヒューマンサイエンス第3分野第4テーマ研究発表会，東京，2.7，1991

2) 西川 徹：

Phencyclidine の作用からみた精神分裂病症状の発現機序

第3回北海道ニューロトランスミッターと疾患研究会，丸駒温泉，8.25，1990

3) 橋本篤司，西川 徹，高橋清久：

動物モデルを用いた精神分裂病治療薬の開発

ヒューマンサイエンス第3分野第4テーマ研究発表会，東京，2.7，1991

キャピラリー電気泳動による抗てんかん薬分析法の開発

今澤正興, 斉藤智子

キャピラリー電気泳動法は、高電圧下で毛細管中の物質の泳動を行なう、分離能に優れ、操作の簡便な新しい分析法で、その応用範囲はHPLCを上回ることも考えられている。近年、この方法が種々の薬物の分析法として有用であることが報告されているが^{1,3)}、我々は、これを複数の抗てんかん薬の同時分析法として適用することを検討した。

<方法>

Beckman P/ACE 2000 型キャピラリー電気泳動装置を用い、分離用キャピラリーには、内径 75 μm 、有効長 50cm のシリカ管を使用し、25 $^{\circ}\text{C}$ 、25KV の高電圧下で分析を行なった。泳動用緩衝液としては 25mM sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む borate (pH 8.6) を使用し、検出には UV 検出器 (検出波長 214nm) を用いた。内部標準 (methylphenylphenylhydantoin, MPPH) を含むサンプルは、酢酸エチルで抽出し、遠心エバポレーターで減圧乾固後、泳動緩衝液に溶解し、オートサンプラーによりキャピラリーに注入した。定量は内部標準に対する面積比により行なった。

<結果・考察>

上記の条件で抗てんかん薬、PB、PHT、CBZ、PRM、ESM、Zonisamide およびそれらの代謝産物、epoxy-CBZ、p-HPPH と内部標準が完全に分離し、分析は 7 分以内に終了した (Fig.1)。各薬物はいずれも 1 $\mu\text{g/ml}$ までの分析が可能で、分析値の変動係数 (CV) は、CBZ の低濃度の場合 (約 11%) を除き、いずれも約 5% 以下であった (Table I)。溶出の順序は ESM、PRM、Zonisamide、PB、HPPH、PHT、MPPH、epoxy-CBZ、CBZ であり、逆相カラムを用いた HPLC の分離パターンと類似の傾向を示し、薬物の親油性が移動速度に影響している。泳動用緩衝液の pH および薬物を吸着するミセル形成剤としての SDS 濃度を調節することにより、他の種々の抗てんかん薬とその代謝産物も分離することが可能であろう。またシリカキャピラリーは短時

間自動洗浄することにより、再分析が可能で、その耐久性も HPLC カラムに優れている。本法は操作が簡便であり、精度も通常の HPLC 法より優れているため、今後種々の抗てんかん薬の分析に広く使用し得るものと考察される。現在更に、HPLC 法では分析の困難なバルプロ酸の本法の変法による分析法を検討している。

<文献>

- 1) Olefirowicz et al. J. Neurosci. Meth., 34, 11-15(1990)
- 2) Fanali et al. Il Farmaco, 45, 693-702(1990)
- 3) Fujiwara et al. Anal. Chem., 59, 2773-2776(1987)

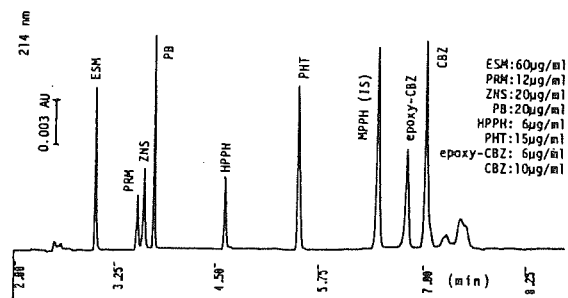


Fig.1 Electropherogram of an extract of serum containing AEDs

Table I Precision for measurement of AEDs in serum

	Cocn.		CV	
	$\mu\text{g/ml}$	%	$\mu\text{g/ml}$	%
ESM	60	4.0	5	5.3
PRM	10	4.6	1	7.8
ZNS	20	2.5	2	4.6
PB	20	3.4	2	4.6
PHT	10	3.5	1	6.3
CBZ	6	5.6	1	11.5
HPPH	6	3.7	1	6.2
epoxy-CBZ	6	2.9	1	5.7

n=10

8. 診 断 研 究 部

《 研究部一年のあゆみ 》

診断研究部は細胞増殖因子および分化因子によるシグナル伝達機構の解析を通じて、神経細胞分化の分子機構の理解に貢献することを、さしあたりの重点課題として研究に取り組んでいる。この研究課題の遂行のために1990年4月より室長として東大教養学部助手の服部成介を迎え、さらにアーメド・カビール(バングラディシュ)と遠藤正美の2名が東大医学部博士過程の終了直後同年4月より流動研究員としてこの研究に加わった。5月からは、賃金研究助手佐藤みず穂(同年11月退職、後任高山明美)、7月よりさらに、賃金研究員前川みどり、賃金研究助手奥田薫を迎えたことで、研究を遂行する体制が次第に整ってきた。この研究グループによる今期の主な研究成果は1)細胞増殖因子の一つである血小板由来増殖因子(PDGF)のシグナル伝達の下流に細胞性オンコジンは*ras*が位置づけられることを明らかにした。2)*ras*の活性制御因子である、GTP水解促進因子(GAP)と、I型神経線維腫症(NFI)の遺伝子産物の細胞内局在について研究し、NFI遺伝子産物が細胞の膜画分に存在するGAP活性として同定されることをしめした。総じて、研究を進めるうえで不可欠な実験材料である遺伝子、その産物、抗体などを調製しながら、研究を着実に軌道にのせつつあると評価される。東大理学系大学院生室屋賢康が研究生として引き続き研究に参加し、また新たに、米国DNAX研究所の上代淑人が客員研究員として加わった。林時司室長、等々力英美(琉球大、併任研究員)らによるガスマスクを用いた薬物代謝の研究、荻野孝史室長らによる2テスラNMRを用いたヒトのMRSの研究が引き続き進められている。

来期は、新研究棟への移転によりラボスペースが広がるため、複数の研究室と人的な交流を広げ、さらに充実した研究成果を生みだしたいと考えている。

(部長 中村 俊)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Satoh T, Endo M, Nakafuku M, Nakamura S, Kaziro Y:
Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21^{ras} • GTP complex in Swiss mouse 3T3 cells
Proc Natl Acad Sci USA 87:5933-5977,1990
- 2) Hayashi T, Todoriki H, Iida Y:
Highly sensitive method for the determination of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline using combined capillary gas chromatography and negative-ion chemical ionization mass spectrometry
J Chromatogr 528:1-8,1990
- 3) Todoriki H, Hayashi T, Gunshin H, Dominicus DAR, Iida Y, Todoriki T, Akamatsu T:
Determination of hippuric acid in urine by GC/MS -in vivo metabolism of toluene to hippuric acid on toluene poisoning-
Mass Spectroscopy 38:87-94,1990
- 4) Hayashi T, Todoriki H, Iida Y:
Determination of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline in human urine by capillary GC/NICIMS
Mass Spectroscopy 39:35-42,1991
- 5) 林時司, 池浦千秋, 等々力英美:
高速液体クロマトグラフィーによる血漿中3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の定量
分析化学 49:169-173,1991
- 6) Novotny EJ, Jr, Ogino T, Rothman DL, Petroff OAC, Prichard JW, Shulman RG:
Direct carbon versus proton heteronuclear editing of 2-¹³C ethanol in rabbit brain *in vivo*: A sensitivity comparison
Magn Reson Med 16:431-443,1990
- 7) Satoh T, Endo M, Nakafuku M, Akiyama T, Yamamoto T, Kaziro Y:

Ⅱ 研究業績

Accumulation of p21^{ras}·GTP in response to stimulation with epidermal growth factor and oncogene products with tyrosine kinase activity

Proc Natl Acad Sci USA 87:7926-7929,1990

b. 著書

1) 中村俊：

PC12-MTHR(Val-12)

蛋白質核酸酵素 36:945-946,1990

2) 服部成介：

*ras*タンパク質

新生化学実験講座 8:91-98,1990

d. 班会議報告書

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，痴呆疾患の病態解明に関する研究，

平成元年度研究報告書，3,1990

2) 荻野孝史，矢野登志雄：

In vivo NMR スペクトロスコピーによる脳代謝の研究（そのⅡ）

2テスラ・ヒト全身用MR装置の開発・改良

厚生省・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2年度報告書，

p69-75,1991

B. 学会発表

a. 特別講演，シンポジウム

1) 林時司：

GC/NICIMSを利用するテトラヒドロカルボリン類の定量

第17回BMS談話会，浜松，7.10,1990

2) 林時司：

GC/NICIMSを利用するテトラヒドロカルボリン類の高感度分析法の開発

第9回生体成分の分析化学シンポジウム，東京，11.22,1990

3) 荻野孝史 :

In vivo NMR スペクトロスコピー(MRS)の最近の動向
-脳代謝研究を中心にして

第13回生物学的精神医学会大会若手プレシンポジウム, 前橋, 3.28,1991

4) 荻野孝史 :

In vivo NMR スペクトロスコピー I, 基礎技術の開発
脳-NMR で何がわかるか

科学技術庁振興調整費10周年記念シンポジウム, 東京, 3.18,1991

b. 一般学会

1) 林時司 :

GC/NICIMSによる1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolineの高感度定量

日本薬学会第110年会, 札幌, 8.21,1990

2) 林時司, 飯田芳男, 等々力英美 :

1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolineの光学異性体のGC/NICIMSによる分析

日本分析化学学会第39年会, 名古屋, 10.16,1990

3) 林時司, 等々力英美 :

1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolineの一水酸化体のGC/NICIMS分析

日本薬学会第110年会, 東京, 3.29,1991

4) 舛田晋, 矢野登志雄, 荻野孝史 :

NMRシグナル局在化技術開発のためのパーソナル・コンピューターによる
計算機シミュレーション

第16回日本磁気共鳴医学会大会, 名古屋, 9.20,1990

5) 穴見公隆, 村上弘司, 永山素男, 本田秀夫, 矢野登志雄, 荻野孝史 :

Alzheimer型痴呆の各病期における³¹P-NMRスペクトロスコピーの検討

第16回日本磁気共鳴医学会大会, 名古屋, 9.21,1990

c. 班会議発表

1) 服部成介 :

GAPの大腸菌内発現とNF1遺伝子産物の同定

東京都臨床研細胞増殖シグナルの伝達とその制御に関する研究班, 東京,

2.3,1991

Ⅱ 研究業績

2) 荻野孝史：

生態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，東京，9.28,1990

3. 主な研究報告

I型神経線維腫症(NF1)の遺伝子産物を同定する試み

服部成介, 前川みどり, 中村俊

I型神経線維腫症(Neurofibromatosis type I, NF1)は神経嚙起源性の母斑病で皮膚の神経線維腫とカフェオレ色の色素斑、神経系の腫瘍を主徴とする、常染色体性優性の遺伝性疾患である。NF1の遺伝子はヒトの第17染色体上7q11.2に位置することが知られていたが、最近そのcDNAが単離された¹⁾。cDNAは少なくとも2485アミノ酸をコードしており、興味深いことに、がん原遺伝子*ras*のGTPの加水分解を促進する因子(GAP)と構造上の相同性が見出された。事実、GAP構造との相同部分を大腸菌内で発現させた産物はGAP活性を有することが示された²⁾。我々はこれまで、細胞の増殖、分化因子によるシグナル伝達機構の解析に対する興味から*ras*の活性制御に関する因子に関する研究を行ってきた。今回はこの研究の発展の一つとしてNF1遺伝子産物の同定を試みた。

NF1のcDNAの全長の構造はまだ報告されていないが、推定C末端は明らかにされていたので、C末端側12アミノ酸残基(G·S·F·K·R·I·S·I·K·K·I·V)に対する抗体を作製した。

GAP活性は*ras*の遺伝子産物p21にあらかじめ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を結合させておき、加水分解によって放射活性が減少する程度で測定している。我々はウシ脳の可溶性画分にGAPが多く含まれていることをすでに見いだしていたが³⁾、不溶性の粗膜画分中にもGAP活性が認められることに興味をもった。そこで粗膜画分をし糖密度勾配遠心などでさらに精製した。この膜画分にも確かにGAP活性の存在が確認されたが、これが従来のGAPと同一分子による

ものか否かをGAP抗体を用いたウェスタンブロットで検討した。GAP活性として同一量を用いて解析したところ、可溶性画分には従来のGAPが同定されたが、膜画分にはGAP分子が見いだされなかった。ところが、NF1抗体でウシ脳膜画分を免疫沈降すると、その沈降物の中にGAP活性が検出された。この活性は、GAP抗体によっては免疫沈降されない。一方NF1抗体は、可溶性画分中のGAP活性を免疫沈降することができなかった。この結果は、NF1分子が膜画分中に存在しGAP活性を示すことを示唆している。ラットを用いて、NF1の組織分布を検討した。脾臓と胸腺にわずかに認められた以外、ほとんど脳のみで活性が検出された。

NF1は*ras*の活性を抑制する機能を有していることから、この遺伝子の欠失あるいは機能の欠損が、*ras*の持続的な活性化をひきおこし、これが、細胞のがん化にいたると一応は理解される。しかし、*ras*が神経系細胞では増殖の停止と分化を引き起こすことを考慮すると、NF1分子が*ras*の標的分子である可能性も否定してはならないだろう。NF1が脳組織内でどのような分布を示すのか、細胞膜にあってどのような増殖、分化のシグナル伝達に関与しているか、GAPとはこれらの点でどのような差異があるのかなどについてさらに検討してゆきたいと考えている。

1) Xu, G. *et al.* Cell, 62, 599-608 (1990)2) Martin, G. A. *et al.* Cell, 63, 843-849 (1990)3) Hoshino, M. *et al.* Mol. Cell. Biol., 8, 4169-4173 (1988)

安定同位元素トレーサー法による テトラヒドロカルボリン類の生体内代謝の分析

林 時司

テトラヒドロカルボリン類はインドールアミン類と各種アルデヒドから Pictet-Spengler 反応によって生成する化合物で、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。これらの物質は尿中に常時排せつされていることが知られているが、その由来、生体内における動態の詳細については不明である点が多い。これは、分析操作時に、これらの物質が試料中に共存する前駆物質から容易に生成するという分析化学的な問題が充分解決されてなかったことに起因する可能性の高いことが推測された。そこで、尿中に排せつされていることが知られているテトラヒドロカルボリンの中から血液脳関門の透過性の高いことが予測された 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (TBC) ならびに 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (MTBC) に注目し、GC/NICIMS を利用する高感度で信頼性の高い分析法を確立するとともに生体内代謝に関する基礎的な検討を進めてきた。その結果、尿中に排せつされている TBC および MTBC は外因性の物質であること、ならびにこれらの物質は予測通り血液脳関門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を示唆する結果が得られた。そこで、今年度は、TBC ならびに MTBC の生体内代謝過程について安定同位元素トレーサー法による検討を実施した。

《結果と考察》

MTBC の 1-位の炭素は不斉炭素であるため、MTBC には光学異性体が存在する。一般にこのように光学異性体が存在するような場合には生体内代謝は光学異性体に対して選択的であることが多い。そこで MTBC のラセミ体の重水素標識体をヒトに投与し、尿中に排せつされる MTBC の重水素標識体の光学異性体の量比を確認することにより、生体内代謝過程の存在の確認を試みた。その結果、尿中に排せつされた MTBC の重水素標識体の光学異性体の量比は投与した MTBC の重水素標識体とは大きく異なっており、立体選択的な代謝過程の存在を示唆するものであった。なお MTBC の重水素標識体の光学異性体の分析は、(R)-2-phenylbutyryl chloride と反応させジアステレオマーとし、さらに TFA 化した後、GC/NICIMS により行った。以上のように、MTBC に対する生体内代謝過程の存在を示唆する結果が得ら

れたのでその本体についての検討を実施した。ところで、ヒト尿中には MTBC、TBC の他にこれらが水酸化を受けた形に相当するテトラヒドロカルボリンが存在することが知られている。これらが MTBC、TBC の代謝物である可能性が高いと考え、一水酸化物へ代謝される可能性について検討した。実際には MTBC ならびに TBC の 3,4-位を重水素 4 個で標識したものをヒトに投与し、投与前後に尿試料を採取した。このようにして得た尿試料より MTBC、TBC を抽出し、TFA-誘導体に導いた後、予測されるベースピーク [M - TFA]⁻ をモニタリングイオンとして GC/NICIMS 分析を実施した。投与前後に採取した尿試料について得られたマスフラグメントグラムを比較し、投与後のマスフラグメントグラムにのみ観察されるピークを検索した。その結果、投与後に採取した尿試料について得られたマスフラグメントグラムには MTBC の一水酸化物に対応するものと考えられる二本の強いピークが観察された。そこで予測される MTBC の一水酸化物を合成し、検討したところ、これらは MTBC の 7-位水酸化体および 6-位水酸化体であることが確かめられた。投与後数時間以内に排せつされたこれら二種類の一水酸化物は経口投与した MTBC の重水素標識体の約 45% にも達しており、MTBC の主代謝経路であると考えられた。また、TBC についても MTBC の場合と同様な結果が得られた。これらの代謝過程は生体防御機構という観点からも興味深いものである。MTBC ならびに TBC の生体内代謝について更に詳細な検討を進めるとともに上記代謝過程と精神疾患との相関性についても検討を加えていきたいと考えている。

《文献》

- 1) Hayashi, T., Todoriki, H., and Iida, Y.: J. Chromatogr., 528, 1-8 (1990)
- 2) Hayashi, T., Todoriki, H., and Iida, Y.: Mass Spectroscopy, 39, 35-42 (1991)

NMR シグナル局在化技術開発のためのパーソナル・ コンピュータによる 計算機シミュレーション

舛田晋*, 矢野登志雄, 荻野孝史* (東大・薬)

<目的>

生体内の微量代謝物質を測定するin vivo NMR スペクトロスコピー (MRS)では、信号検出感度の向上と測定領域の局在化が最重要課題となる。検出感度はハードウェアやソフトウェアの改良により向上させることができる。また局在化測定の理想は生体の特定領域に由来する信号だけを損失なく得る事である。測定には静磁場(B₀)ないしは高周波磁場(B₁)の勾配を必要とし、shaped pulseを含む特定のパルス系列が適用される。今回、感度及び局在化の最適化されたソフトウェアの開発支援や、スペクトルの定量的解釈を可能とする事を目的として、特定のコイルとパルス系列を用いた場合のNMR シグナルの空間分布をシミュレートするプログラムをパーソナル・コンピュータ上で開発した。

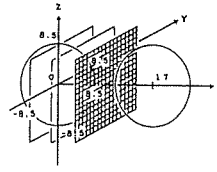
<方法>

プログラム開発には数値演算補助プロセッサ付きのIBM 社PC/ATコンパチブル機とTurbo Pascalを用いた。プログラムの評価のためには、NCNPの2 テスラヒト全身用NMR 装置でヒト脳の³¹P MRS 測定に使用している直径17cm、軸間距離17cmのヘルムホルツ型コイルと既知のパルス系列を組合せてシミュレートした。コイルが作るB₁強度を実測して計算値と比較するために、アクリル製サンプル支持台を製作し、850 μl の85%磷酸を入れたガラス球を取り付けて空間内の座標点を移動させNMR 測定した。

<結果と考察>

本プログラムには以下の3つの機能を持たせた。

- ①B₁強度の空間分布の計算： コイルの形状を指定し測定対象となる空間の座標を定義すると単位電流が流れた場合にコイルが作るB₁強度の空間分布をビオ・サバルの法則に基づいて計算し、任意の領域についてのデータの統計処理を行なう。
- ②スピン応答の計算： 1スピン系に任意のパルス系列を印加した場合のスピン応答を計算する。位相、周波数オフセット、パルス幅、パルス強度、ディレーの継続時間の内2つを変数にしてスピン応答の二次元相関を解析する。パルスは矩形波の他にSinc-Gauss、hyperbolic secant等のshaped pulseを15種類選択可能とした。パルスとディレーは全部で80個まで設定できる。
- ③ ①, ②を組み合わせ、特定のコイルとパルス系列を使用した場合のNMR シグナルの空間分布をシミュレートする。



(X=0.5)	(X=4.5)	(X=8.5)
C O G K O L R R R R R L O X G D C	A A B B B B C C C C C B B B A A	A A B B B B B B B B B B B B A A A
G H R R P M J J K L M P R R R D	A B B C C C D D D D D C C C B B A	A A B B C C C C C C C C C B B A A
L R A P L K J I I I J K L P R R L	B C D D D D E E E E E D D C C B	B B C C C C D D D D D C C C C B B
R O L J I H H H I J L O R R	C D E E E E F F F F F E E D D C	D D C C D D D D D D D C C C C B
R R N K I H H H H H I K R R R	C D E E E E F F F F F E E E E D D	D D C C D D D D D D D C C C C B
R O L J I H G G O G H I K P R	D E E E E E F F F F F E E E E D D	D C C C D D D D D D D C C C C B
R P K I H H G G O G H I K P R	D E E E E E F F F F F E E E E D D	D C C C D D D D D D D C C C C B
R O L J I H G G O G H I J L O R R	D E E E E E F F F F F E E E E D D	D C C C D D D D D D D C C C C B
R P K I H H G G O G H I K P R	D E E E E E F F F F F E E E E D D	D C C C D D D D D D D C C C C B
R R N K I H H H H H I K R R R	C D D D E E E E E E E E E D D C	D C C C D D D D D D D C C C C B
R O L J I H H H I J L O R R	C D D D E E E E E E E E E D D C	D C C C D D D D D D D C C C C B
L R R P L K J I I J K L P R R L	A B B C C C D D D D D C C C B B A	A B B C C C C C C C C C C B B A A
G H R R P M J J K L M P R R R D	A B B C C C D D D D D C C C B B A	A A B B B B B B B B B B B B A A A
O H H R R G O O D O R L O X G D C	A A B B C C C C C C C C C B B A A	A A B B B B B B B B B B B B A A A

図 直径17cm、軸間距離17cmのヘルムホルツコイルが作るB₁強度の空間分布。一方のエレメントの中心は(0,0,0)にある。B₁強度は(X,Y,Z)=(8.5,0,0)の点が90°パルスを与えるとして基準化しフリップ・アングルの分布で表現した。コイルに平行なX=0.5, 4.5, 8.5 cmで8cm×8cmの3枚の平面について示す。

シミュレーションではヘルムホルツコイルを図の様に配置してB₁強度の空間分布を計算した。X=8.5の平面上の36点で90°パルスのパルス強度を実測し、B₁強度を算出した。実測値の計算値からの逸脱は最大1.9°で平均0.625 ± 0.428° (SD)となり、両者は良く一致した。誤差はサンプルが点ではなく体積を持つ事や空間移動の精度、90°パルス条件の測定精度、コイルの工作精度等に由来すると考えられる。

次に、spin echo パルス系列についてスピン応答のシミュレーションを行い、不均一なB₁により生じるrefocusしない成分をphase cyclingにより消失させることができた。

更に、B₁不均一に非感受性のadiabatic パルスを90°励起に使用し、パルス強度を変えながら、on resonanceでのスピン応答を計算した後、これをヘルムホルツ・コイルに適用してシグナルの強度分布を計算した。パルス強度が低いと低信号域でのゆがみが大きくなり、逆に高すぎると高信号域で強度分布のゆがみが生じてくるのがわかり、パルス強度の最適化に応用できた。

NMR 測定の計算機シミュレーションによりパルス形状、及びパルス系列の開発・改良を効率的に進めることが可能となるとともに、個々の測定条件による信号強度変化の補正も可能となった。

9. 微細構造研究部

1. 研究部一年のあゆみ

本研究部では従来通り、神経筋疾患の病因を究明するため、生検筋材料や血球細胞を用いて形態学的、生化学的、細胞培養学的手法等を駆使して研究を進めている。

人事面では竹光正和（旭川医大整外）が4月より流動研究員として、6月からは呉建明が台湾亜東記念病院小児部より研究生として加わり、9月には林明益が台湾大小児科に、10月には長谷川ひとみが北里大神経内科にそれぞれ復帰した。

1) ミトコンドリア病の病因解明に関する研究

神経筋疾患のなかには組織化学的に明確にミトコンドリアの異常と診断できるものがあるが、その原因がミトコンドリア遺伝子の欠失や塩基置換によることがこの1-2年世界的に明らかにされてきた。当研究部でも数多くの症例を集積することにより、MELAS とよばれるミトコンドリア病はミトコンドリアDNAの1塩基置換によって起こることを国立遺伝研との共同研究により明らかにした。

現在、ミトコンドリア病をはじめとする神経筋疾患の診断のための生検の依頼は年間400件にも及び研究員の多大な協力のもとに行われている。得られた組織等はバンクに登録し、必要に応じて研究所内外の施設で利用されている。

2) 進行性筋ジストロフィーに関する研究

ヒトDMDと同じくジストロフィンが欠損したmdxマウスを使用し、培養筋芽細胞移植、ジストロフィン関連蛋白の研究が進んでいる。ヒト各種筋ジストロフィーの診断やジストロフィンとの関連性については疾病研究第1部との共同研究が行われ、大きな成果をあげている。ジストロフィン抗体を使ったジストロフィーの免疫組織化学的診断法をアジアの各国にも普及させた。

3) 胸腺筋様細胞が産生する生物活性因子の研究

胸腺筋様細胞からはマクロファージ、デンドリティック細胞系に作用する因子が産生されており、この因子はほぼ160Kでこれまでに知られていない因子の可能性が大きい。ミクログリアもこの因子に反応して増殖することがわかり、マクロファージ系細胞の分化増殖は複雑であるが、これは分化増殖因子の全容が解明されていないことにもよると考えられるが、不明パスウェイがより明確になると期待される。

（部長 榎中征哉）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Kamo I, Kikuchi A, Ishii H, Matsuoka T, Furukawa S, Ishiura S:
Establishment of myoid cells from bone marrow
Cell Biol Intern Rep 14:595-600, 1990
- 2) Goto Y, Komiyama A, Tanabe Y, Katafuchi K, Ohtaki E, Nonaka I:
Myopathy in Marinesco-Sjögren syndrome: An ultrastructural study
Acta Neuropathol 80:123-128, 1990
- 3) Goto Y, Koga Y, Horai S, Nonaka I:
Chronic progressive external ophthalmoplegia: a correlative study of mitochondrial DNA deletions and their phenotypic expression in muscle biopsies
J Neurol Sci 100:63-68, 1990
- 4) Goto Y, Nonaka I, Horai S:
A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies
Nature 348:651-653, 1990
- 5) Goto Y, Itami N, Kajii N, Tochimaruru H, Endo M, Horai S:
Renal tubular involvement mimicking Bartter syndrome in a patient with Kearns-Sayre syndrome
J Pediatr 116:904-910, 1990
- 6) Koga Y, Nonaka I, Nakao M, Yoshino M, Tanaka M, Ozawa T, Nakase H, DiMauro S:
Progressive cytochrome c oxidase deficiency in a case of Leigh's disease
J Neurol Sci 95:63-76, 1990
- 7) Ishibashi-Ueda H, Imakita M, Yutani C, Takahashi S, Yazawa K, Kamiya T, Nonaka I:
Congenital nemaline myopathy with dilated cardiomyopathy: An autopsy study
Hum Pathol 21:77-82, 1990
- 8) Katafuchi Y, Kosai K, Ohtaki E, Yamashita Y, Horikawa M, Terasawa K, Nonaka I:
Cerebral cortex and brainstem involvement in Marinesco-Sjögren syndrome
Ann Neurol 27:448-449, 1990

II 研究業績

- 9) Sunohara N, Arahata K, Hoffman EP, Yamada H, Nishimiya J, Arikawa E, Kaido M, Nonaka I, Sugita H:
Quadriceps myopathy: Forme fruste of Becker muscular dystrophy
Ann Neurol 28:634-639, 1990
- 10) Mori K, Narahara K, Ninomiya S, Goto Y, Nonaka I:
Renal and skin involvement in a patient with complete Kearns-Sayre syndrome
Am J Med Genet 38:583-587, 1991
- 11) Yokoi F, Hara T, Iio M, Nonaka I, Satoyoshi E:
1-¹¹C Pyruvate turnover in brain and muscle of patients with mitochondrial encephalomyopathy. A study with positron emission tomography (PET)
J Neurol Sci 99:339-348, 1990
- 12) Nozaki H, Hamano S, Ueoka Y, Horita H, Koga Y, Nonaka I:
Cytochrome c oxidase deficiency with acute onset and rapid recovery
Pediatr Neurol 6:330-332, 1990
- 13) Sasaki M, Yoneyama H, Nonaka I:
Respiratory muscle involvement in nemaline myopathy
Pediatr Neurol 6:425-427, 1990
- 14) Arahata K, Beggs AH, Honda H, Ito S, Ishiura S, Tsukahara T, Ishiguro T, Eguchi C, Orimo S, Arikawa E, Kaido M, Nonaka I, Sugita H, Kunkel LM:
Preservation of the C-terminus of dystrophin molecule in the skeletal muscle from Becker muscular dystrophy
J Neurol Sci 101:148-156, 1991
- 15) Ohtaki E:
Secondarily reduced cytochrome c oxidase activity in various neuromuscular disorders
Brain Dev 12:326-333, 1990
- 16) Ohtaki E, Yamaguchi Y, Yamashita Y, Matsuishi T, Terasawa K, Katafuchi Y, Nonaka I:
Complete external ophthalmoplegia in a patient with congenital myopathy without specific features (minimal change myopathy)
Brain Dev 12:427-430, 1990

- 17) Yamamoto M, Akiyama C, Aikawa H:
D-penicillamine-induced copper deficiency in suckling mice: neurological abnormalities and brain mitochondrial enzyme activities
Dev Brain Res 55:51-55, 1990
- 18) Hernandez F, Akahori H, Hosaka Y, Ikegami N, Akatani K:
The finest ultrastructural details of the inner layer of retrovirus revealed by nubunak ekectrin doses
J Electron Microsc 39:105-107, 1990
- 19) 竹光正和, 荒畑喜一, 埜中征哉:
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
臨床神経学 30:1066-1072, 1990
- 20) 須貝研司, 桜川宣男, 埜中征哉:
Congenital hypomyelination neuropathy の概念および病態と治療の試み
日本小児科学会誌 94:2614-2622, 1990
- 21) 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
- 22) 阪田千種, 山田人志, 春原経彦, 荒畑喜一, 埜中征哉:
Becker 型筋ジストロフィーにおける心筋障害
臨床神経学 30:952-955, 1990
- 23) 大野雅治, 小林卓郎, 田中 薫, 後藤幾生, 埜中征哉:
一過性の筋脱力及び高CK血症を繰り返したミトコンドリア脳筋症
—cytochrome c oxidase 部分欠損—
臨床神経学 30:317-319, 1990
- 24) 長浦智明, 隅 清臣, 埜中征哉:
活発な筋線維の壊死, 再生を伴ったミトコンドリアミオパチーの女兒例
臨床神経学 30:432-438, 1990
- 25) 丸山哲弘, 羽生憲直, 丸山恵子, 武田伸一, 柳沢信夫, 埜中征哉:
成人発症型ネマリンミオパチー 2 症例の臨床的, 病理学的検討
臨床神経学 30:738-744, 1990

II 研究業績

- 26) 遠山 潤, 鳥越克巳, 後藤誠一, 高橋亮一, 須田昌司, 東條 恵, 埜中征哉, 古賀靖敏, 田中雅嗣, 小沢高将:
発作性の呼吸不全を繰り返した筋型複合体 I 欠損症の 1 例
脳と発達 22:369-375, 1990
- 27) 栗原まな, 今井裕之, 熊谷公明, 長谷川ひとみ, 埜中征哉:
学習困難を主訴として来院した Duchenne 型筋ジストロフィー保因者の 8 歳女児例
脳と発達 22:394-396, 1990
- 28) 松尾光弘, 松坂哲應, 折原康子, 下村千枝子, 辻 芳郎, 埜中征哉:
筋生検にて診断できた ceroid lipofuscinosis
脳と発達 22:396-398, 1990
- 29) 内海裕美:
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の局在
東京女子医大誌 60:837-846, 1990

c. 総説

- 1) 埜中征哉:
骨格筋の構造と機能
臨床整形外科 25:951-956, 1990
- 2) 埜中征哉:
進行性筋ジストロフィー
日本臨床 48:1451-1457, 1990
- 3) 埜中征哉:
筋生検
臨床検査 Mook 35:129-138, 1990
- 4) 埜中征哉:
Cytochrome c oxidase 欠損
Annual Review 神経 309-319, 1991
- 5) 後藤雄一, 埜中征哉:
ミトコンドリアミオパチーの分子生物学
小児科 31:635-644, 1990
- 6) 竹光正和, 埜中征哉:

mdx マウス

生体の化学 41:549-552, 1990

d. 班会議報告書

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

平成元年度研究報告書 p41-49, 1990

2) 埜中征哉, 後藤雄一, 松岡太郎, 長谷川ひとみ, 宝来 聡 :

ミトコンドリアミオパチーにおけるミトコンドリアDNA異常について

厚生科学・新薬開発事業・ミトコンドリア病治療薬の開発研究

平成元年度研究報告書 p27-31, 1990

3) 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

平成元年度研究報告書 p369-370, 1990

4) 杉田秀夫, 松岡太郎, 後藤雄一, 長谷川ひとみ :

慢性進行性外眼筋麻痺症候群とMERRFは病理発生的に異なる

一筋線維ときほぐし法による検討一

厚生科学・新薬開発事業・ミトコンドリア病治療薬の開発研究

平成元年度研究報告書 p12-15, 1990

5) 桃井 隆, 内海裕美, 相川久志, 埜中征哉 :

レチノイン酸受容体のラット脳内での局在とSRKでの異常

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

平成元年度研究報告書 p73-81, 1990

6) 小林高義, 道川 誠, 亀田典佳, 塚越 廣, 加茂 功 :

胸腺内筋様細胞の形態学的, 電気生理学的検討

厚生省・特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班

平成元年度研究報告書 p356-360, 1990

II 研究業績

B. 学会発表

a. シンポジウム

- 1) Nonaka I, Goto Y, Hasegawa H, Matsuoka T, Koga Y:

Tissue specificity in cytochrome c oxidase deficiency: with particular reference to focal deficiency.

A Satellite Symposium of the XIth International Congress of Neuropathology

"MITOCHONDRIAL ENCEPHALOMYOPATHIES", Tokyo, 9.1, 1990

- 2) Nonaka I, Koga Y, Goto Y, Hasegawa H, Matsuoka T:

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)

VIIth International Congress on Neuromuscular Diseases, Munich, Sep. 16, 1990

- 3) Nonaka I, Ishiura S, Sasaki M, Arahata K:

Progression in nemaline myopathy

VIIth International Congress on Neuromuscular Diseases, Munich, Sep. 20, 1990

- 4) Nonaka I, Goto Y, Matsuoka T, Koga Y, Hasegawa H:

Chronic metabolic encephalopathies associated with ragged-red fibers

The Joint Convention of 5th ICNC and 3rd AOACN, Tokyo, Nov. 7, 1990

b. 国際学会

- 1) Goto Y, Koga Y, Horai S, Nonaka I:

Chronic progressive external ophthalmoplegia: a correlative study on mitochondrial DNA deletions and their phenotypic expression on biopsied muscles.

VIIth International Congress on Neuromuscular Diseases, Munich, Sep. 21, 1990

- 2) Goto Y, Nonaka I, Horai S:

Chronic progressive external ophthalmoplegia in childhood: a comparative study with adult-onset cases.

The Joint Convention of 5th ICNC and 3rd AOACN, Tokyo, Nov. 5, 1990

- 3) Matsuoka T, Goto Y, Hasegawa H, Nonaka I:

Morphogenesis of focal cytochrome c oxidase deficiency in CPEO.

—Muscle fiber teasing analysis—

VIIth International Congress on Neuromuscular Diseases, Munich, Sep. 21, 1990

- 4) Matsuoka T, Goto Y, Hasegawa H, Nonaka I:
 Focal cytochrome c oxidase deficiency and mitochondrial DNA deletions in chronic progressive external ophthalmoplegia —Muscle fiber teasing analysis
 The Joint Convention of 5th ICNC and 3rd AOACN, Tokyo, Nov. 8, 1990
- 5) Takemitsu M, Arahata K, Nonaka I:
 A trial of normal myoblast transfer into mdx mouse
 XIth International Congress on Neuropathology, Kyoto, Sep. 4, 1990
- 6) Takemitsu M, Arahata K, Nonaka I:
 Muscle regeneration in mdx mouse and trial of myoblast transfer into regenerating dystrophic muscle
 VIIth International Congress on Neuromuscular Diseases, Munich, Sep. 21, 1990
- 7) Hasegawa H, Matsuoka T, Goto Y, Nonaka I:
 Tissue specificity in mitochondrial myopathy-an electron cytochemical demonstration of cytochrome c oxidase (CCO) activity.
 VIIth International Congress on Neuromuscular Diseases, Munich, Sep. 21, 1990
- 8) Saito Y, Nonaka I:
 Replication of satellite cells in muscle regeneration after bupivacaine induced myonecrosis
 The Joint Convention of 5th ICNC and 3rd AOACN, Tokyo, Nov. 8, 1990
- 9) Lin Y-L, Nonaka I:
 Facioscapulohumeral muscular dystrophy: Histochemical analysis on muscle fiber types
 The Joint Convention of 5th ICHC and 3rd AOACN, Tokyo, Nov. 8, 1990
- 10) Hashimoto K, Asano G, Fujino O, Fujita T, Nonaka I, Arahata K, Sakuraba H, Suzuki Y:
 Fabry disease and Duchenne muscular dystrophy in a Japanese boy
 The Joint Convention of 5th ICNC and 3rd AOACN, Tokyo, Nov. 8, 1990
- 11) Kobayashi T, Mishima M, Michikawa M, Kameda Y, Matsumoto T, Tsukagoshi T, Kamo I:
 α -, β -, γ -, δ - & ϵ -subunit-specific mRNA of acetylcholine receptors (AChRs) express in cultured rat thymic myoid cells
 VIIth International Congress on Neuromuscular Diseases, Munich, Sep. 17, 1990

II 研究業績

c. 一般学会

- 1) 桮中征哉, 古賀靖敏, 後藤雄一, 松岡太郎, 長谷川ひとみ:
MELAS症候群の臨床的, 生化学的, 病理学的検討
第31回日本神経学会総会, 横浜, 5. 23, 1990
- 2) Kamo I, Kunishita T, Kikuchi A:
Dendritic cell colony stimulating factor from thymic myoid cells
第49回日本癌学会総会, 札幌, 7. 4, 1990
- 3) 菊池愛子, 加茂 功, 古川昭栄, 桮中征哉:
培養ラット胸腺筋様細胞が産生する中枢神経系細胞増殖因子の分離精製とその生物学的性状
第63回日本生化学会大会, 大阪, 9. 12, 1990
- 4) 後藤雄一, 遠藤満智子, 桮中征哉, 宝来 聡, 伊丹儀友, 初丸博幸, 梶井直文:
骨格筋と腎臓にミトコンドリアDNAの部分欠失を認めたKearns-Sayre症候群の一例
第93回日本小児科学会学術集会・総会, 東京, 5. 11, 1990
- 5) 後藤雄一, 桮中征哉, 宝来 聡:
ミトコンドリアDNA異常とcytochrome c oxidase部分欠損との関係
第31回日本神経学会総会, 横浜, 5. 23, 1990
- 6) 後藤雄一, 桮中征哉:
小児科に発症した慢性外眼筋麻痺症候群13例の臨床像とミトコンドリアDNA
第32回日本小児神経学会総会, 千葉, 6. 14, 1990
- 7) 後藤雄一, 宝来 聡, 桮中征哉:
ミトコンドリアDNA欠失の発生機序についての考察
日本人類遺伝学会第35回大会, 福井, 8. 2, 1990
- 8) 後藤雄一, 松岡太郎, 長谷川ひとみ, 桮中征哉, 宝来 聡:
慢性進行性外眼筋麻痺症候群(CPEO)とミトコンドリアDNA異常
第7回神経筋疾患懇話会, 東京, 8. 25, 1990
- 9) 松岡太郎, 後藤雄一, 長谷川ひとみ, 桮中征哉:
筋線維ときほぐし標本によるチトクロームc酸化酵素部分欠損の検討
第31回日本神経学会総会, 横浜, 5. 25, 1990
- 10) 松岡太郎, 岩川善英, 藤野 修, 田辺雄三, 桮中征哉:
高CK血症の検討 —筋病理と長期予後—

- 第32回日本小児神経学会総会，浦安，6. 14, 1990
- 11) 長谷川ひとみ，松岡太郎，後藤雄一，桒中征哉：
慢性進行性外眼筋麻痺におけるチトクローム c 酸化酵素の電顕細胞化学的検討
第31回日本神経学会総会，横浜，5. 23, 1990
- 13) 斎藤陽子，桒中征哉：
ラットの筋再生におけるデスミンの発現について
第31回日本神経学会総会，横浜，5. 23, 1990
- 14) 斎藤陽子，桒中征哉：
筋の中心核線維における中間フィラメントのタンパクデスミンの存在
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6. 14, 1990
- 15) 秋山千枝子，斎藤陽子，桒中征哉：
筋崩壊と筋再生 — 溶液の酸性度 (pH) の検討 —
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6. 14, 1990
- 16) 竹光正和：
正常筋芽細胞移植による筋ジストロフィー症の治療の実験的試み
第1回日本小児整形外科学会，東京，11. 18, 1990
- 17) 村上信行，武田興二，前田浩子，森田英雄，脇口 宏，倉繁隆信，木田和伸，桒中征哉：
Nifedipineが奏効した Myotonic dystrophy の1例
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6. 14, 1990
- 18) 阪田千種，荒畑喜一，春原経彦，桒中征哉，杉田秀夫，里吉宮二郎：
Becker型筋ジストロフィーと心筋症
第31回日本神経学会総会，横浜，5. 23, 1990
- 19) 沢石由記夫，後藤敦子，小松和男，高田五郎，小野崎通彦，東 音高，宝道定孝，桒中征哉：
Congenital hypomyelination neuropathy と考えられる姉弟例
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6. 14, 1990
- 20) 赤司真理子，川目房代，赤塚 章，山崎ユキ，落合幸勝，甘楽重信，前川喜平，須貝研司，桒中征哉：
乳児期発症し進行性の経過をとった congenital hypomyelination neuropathy の1例
第32回日本小児神経学会総会，浦安，6. 14, 1990
- 21) 松村喜一郎，清水輝夫，萬年 徹，桒中征哉，木村澄子，丸山工作：

Ⅱ 研究業績

福山型先天性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:

モノクローナル抗体による検討

第31回日本神経学会総会, 横浜, 5. 23, 1990

- 22) 春原経彦, 荒畑喜一, 山田人志, 埜中征哉, 杉田秀夫, 西宮 仁:

Quadriceps myopathy: forme fruste of Becker muscular dystrophy

第31回日本神経学会総会, 横浜, 5. 24, 1990

- 23) 外木秀文, 藤枝憲二, 梶井直文, 小堤閑雄, 長野省吾, 後藤雄一, 埜中征哉, 新川詔夫:

複合型グリセロールキナーゼ欠損症2例の分子生物学的研究

第93回日本小児科学会学術集会総会, 東京, 5. 11, 1990

- 24) 橋本倫太郎, 池田稲穂, 関 亨, 山崎徹夫, 後藤雄一, 古賀靖敏, 埜中征哉:

Cytochrome c oxidase 活性の低下を認めた Kearns-Sayre 症候群の一例

第32回日本小児神経学会総会, 浦安, 6. 15, 1990

- 25) 宝来 聡, 村山久美子, 近藤るみ, 石田貴文, 斎藤成也, 後藤雄一, 孫 介山, 潘以 宏:

台湾先住民族・高山族におけるミトコンドリアDNAの変異

第44回日本人類学会・日本民族学会連合大会, 川崎, 11. 12, 1990

- 26) 石田貴文, 斎藤成也, 宝来 聡, 村山久美子, 後藤雄一, 近藤るみ, 孫 介山, 潘以 宏:

台湾先住民族における腫瘍ウイルスの疫学

第44回日本人類学会・日本民族学会連合大会, 川崎, 11. 12, 1990

c. 班会議発表

- 1) 埜中征哉, 長谷川ひとみ, 松岡太郎, 後藤雄一:

MELAS生検筋にみられる strongly SDH-reactive blood vessels (SSV) の診断的意義

厚生省・精神神経疾患・筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法に関する研究班,

平成2年度班会議, 東京, 12. 8, 1990

- 2) 埜中征哉, 竹光正和, 荒畑喜一:

mdx マウスの骨格筋のジストロフィン陽性線維の出現率: 塩酸プピバカイン, FK-506,

筋芽細胞移植の影響

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

平成2年度班会議, 東京, 12. 12, 1990

- 3) 埜中征哉, 呉 建明, 松岡太郎, 竹光正和, 後藤雄一:

実験的ミトコンドリア・ミオパチー(ゲルマニウム・ミオパチー)に対するCoQ₁₀の治療効果

- 厚生科学・新薬開発研究事業・ミトコンドリア病治療薬の開発研究班，
平成2年度班会議，東京，2. 15，1991
- 4) 加茂 功，菊池愛子，国下龍英，古川昭栄，埜中征哉：
筋様細胞が産生するコロニー刺激因子
厚生省・特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，平成2年度班会議，東京，1. 25，1990
- 5) 後藤雄一，埜中征哉，宝来 聡，小林葉子，桃井真里子，太田成男，田中雅嗣，小沢高将：
MELASの分子遺伝学的解析
厚生省・精神神経疾患・筋ジストロフィー総合班会議，東京，1. 19，1991
- 6) 杉田秀夫，松岡太郎，前田浩子，後藤雄一，沖 武人，埜中征哉：
ミトコンドリア脳筋症の生検筋におけるCOQ₁₀含量の検討
厚生科学・新薬開発研究事業・ミトコンドリア病治療薬の開発研究班，
平成2年度班会議，東京，2. 15，1991
- 7) 勝木元也，高橋利一，木村 穰，石浦章一，竹光正和，埜中征哉：
新しいDMD遺伝子欠失マウスの単離
厚生省・精神神経疾患・筋ジストロフィー及び関連疾患モデル動物の開発に関する研究班，
平成2年度班会議，東京，12. 12，1990
- 8) 小林高義，佐野元規，塚越 廣，三品昌美，古川昭栄，加茂 功：
胸腺内筋様細胞におけるacetylcholine receptor (AChR) subunitsの発現，NGF産生，
parvalbumin (PA)の動態に関する検討
厚生省・特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，平成2年度班会議，東京，1. 25，1990
- 9) 梶井直文，後藤雄一：
MELAS患者のミトコンドリアDNAの家系分析
厚生省・精神神経疾患・脳形成障害の成因と疫学に関する研究班，
平成2年度班会議，東京，1. 24，1991

II 研究業績

3. 主な研究報告

胸腺筋様細胞のコロニー刺激

加茂 功

ラット胸腺よりクローン化した筋様細胞からは様々な生物活性因子が産生されている。特に、造血系に作用する因子に着目すると、マクロファージ系の細胞を増殖させる因子の存在が見いだされた。マクロファージ系細胞の存在様式は多様性をしめすが、これまでこの細胞種に作用する分化増殖因子としてはM-CSFとGM-CSFが知られているにすぎず、多様性を十分説明できない。筋様細胞が産生する因子は従来のM-CSFやGM-CSFが腹腔浸出細胞には強く作用し胸腺細胞には微弱な作用しかしないのに対し、全く逆の作用を示した。このことは筋様細胞が産生している因子は従来のM-CSF等とは異なる因子を含むものであり、マクロファージ系細胞の多様な存在様式の一部を説明出来るものと思われる。そこで、この細胞よりマクロファージ系細胞に作用する因子の分離精製を試みた。

材料と方法

胸腺筋様細胞(871207C)はウイスターラットよりクローンとして樹立した。細胞の継代はRPMI 1640+ 10% FCSの条件でおこなった。この細胞をローラーボトルで回転培養し、適切な時期にインスリン、トランスフェリンを含む培地に交換しさらに3-4日培養し、この培養上清を出発材料として精製した。精製にはDEAE-Sepharose CL-6B, Blue-Sepharose, Toyo G4000SW等を用いた。活性因子の測定は0.4% soft agaroseによるラット骨髄細胞のコロニー形成数の算定とマイクロプレートによるトリチュウムサイミジンの取り込み法を用いた。増殖細胞種の同定にはOX2, OX6, OX8, OX42, W3/25, BMAC-5, B118-6, B118-7等の細胞表面に対するモノクローナル抗体による間接蛍光抗体法やロゼット法によるFcレセプターの検出を用いた。

結果

培養上清をpH7.3の条件でDEAE-Sepharose CL 6Bに吸着させNaClの濃度勾配法により溶出すると、低塩濃度で溶出する画分と高塩濃度で溶出する画分の両者にマクロファージ様細胞の増殖活性が見いだされた。前者はToyo G4000SWを用いた場合60-80Kに活性が認められ、骨髄細胞に作用させると非特異エステラーゼ、貪食作用とも強陽性細胞が出現するところから、この

因子は既存のM-CSFと考えられた。一方、高塩濃度で溶出される因子はほぼ160Kのサイズを示した。この因子を骨髄細胞に作用させると約7-10日間増殖し続ける。増殖した細胞の表面抗原をモノクローナル抗体等で調べると90%以上の細胞がOX42(マクロファージ、グラニューロサイト、デンドリティック細胞に共存する抗原と反応)に強く反応した。また、これらの細胞の10-30%において濾胞デンドリティック細胞抗原(OX2)、Ia抗原(OX6)、リンフォイドデンドリティック細胞特異抗原(B118-7)が検出された。またこれらの細胞は弱い貪食作用を示すが、Fcレセプターはほとんど検出されず、多くのマクロファージ特異抗体(W3/25, BMAC-5, B118-6)には反応しなかったが、増殖停止数日後からはほぼ半数の細胞においてこれらの抗原が検出された。

考察

胸腺筋様細胞からは二種類のマクロファージ系コロニー刺激因子が産生されていた。Ia抗原を表現しているデンドリティック細胞やマクロファージは外来性抗原や自己抗原情報をT細胞に伝達し、免疫反応開始に必須なアクセサリ細胞である。最近ある種のマクロファージはデンドリティック細胞の段階を経てマクロファージに分化するという報告がある(1)。この点160K因子が増殖期の骨髄細胞にIa抗原やデンドリティック抗原を誘導し、その後にマクロファージ抗原発現を誘導したと一致しているように思われる。60-80K因子は直接マクロファージの特徴を有する細胞を誘導する点、両者はマクロファージ系細胞の多様性発現に深く関わっているように考えられる。胸腺内のマクロファージ系細胞も三種のタイプに分類されているが胸腺筋様細胞が産生しているこれらの因子はこの多様性に対応しているものと思われる(2)。またこのようにして分化したマクロファージ系細胞は胸腺内におけるT細胞のネガティブセレクションに関与すると考えられる。

文献

- 1) Peters et al. Immunobiol., 176, 154-166 (1987)
- 2) Toussaint-Demyelle et al. Cell Tissue Res. 263, 293-301 (1991)

胸腺筋様細胞の産生物質のミクログリア増殖刺激活性

菊池愛子

中枢神経系では、アストログリア、ミクログリア、オリゴデンドログリアなどがIa抗原を獲得することができるため種々の免疫反応をひき起こすことに参与していると考えられる。種々のリンフォカンや、ウイルス感染によってひき起こされるインターフェロンが、これらの細胞の増殖やIa抗原の表現をコントロールしている。

しかしながらその詳細に関しては不明な部分が多い。胸腺筋様細胞からは免疫・造血系に作用する様々な因子が産生されていた。またこのほかにはアストログリアの増殖を促進する因子も認められる。ミクログリアのオリジンに関しては議論の多いところであるが、その種々の特徴が造血系由来のマクローファージ系細胞に類似することに関しては異論が少ない。これまでミクログリアにはマクローファージコロニー刺激因子(M-CSF)が増殖作用を示し、インターフェロンがIa抗原の表現を誘導することが報告されている。従来のM-CSFの他に、胸腺筋様細胞から160Kの新しい造血系増殖因子が産生されていることが見いだされた。造血系由来のマクローファージ系細胞とミクログリアの類似性から、160K因子がミクログリアにも何らかの作用を誘導する可能性が推測されたので、増殖活性とIa抗原誘導能について検討した。

材料と方法

胎生20日のウイスターラット脳細胞を14日間培養しタッピング法でミクログリアをその培養上清と共に集めた。細胞数を 3×10^3 /mlに調製し、予め本因子をコートした96マイクロプレートに各 $200 \mu\text{l}$ ずつ加えた。以上の操作は、細胞の非特異性接着を防ぐために 4°C 以下で行なった。24時間培養後、 $0.2 \mu\text{Ci}$ ^3H -Thymidineを加えさら12時間培養後取り込みを測定した。Ia抗原の検出は、細胞を同じく本因子をコートしたカバースリップに培養し、OX6モノクローナル抗体

を用い間接蛍光抗体法で観察した。ミクログリアの同定にはOX42モノクローナル抗体を使用した。160K因子の精製は胸腺筋様細胞(871207C)の培養上清から骨髓細胞をソフトアガロース中に培養するコロニーアッセイ法等を利用しセファローズCL-6B、トーヨーソーダG4000SW等を用いて行った。

結果

用いた細胞集団はほとんど(98%以上)がOX42抗体に対して陽性であった。

造血系に作用する160K因子は、造血系に対すると同様な濃度で、24-48時間という短期間の作用でも、ミクログリアに対しても増殖促進効果を示した(Fig.1)。

OX6抗体を用いてIa抗原の検出を試みたが、160K因子で増殖しているミクログリア細胞群は、対象群よりむしろ低染色性を示した。

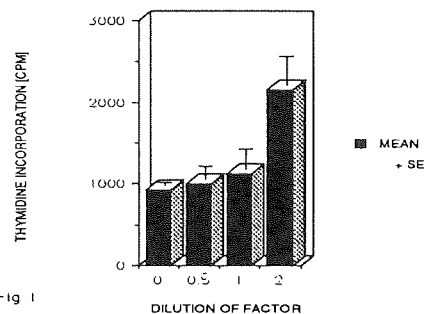


Fig 1

考察

160K因子は分子サイズ、pI、作用機序の点で従来のM-CSFとは異なる因子として分離精製されたが、マクローファージ系細胞を刺激する点ではM-CSFに類似するので、ミクログリアに対する作用を観察した。その結果Ia抗原の誘導は見られないが、増殖促進効果が認められた。M-CSFやその他のサイトカインとの組合せによる共同作用や、ミクログリアの発生学的研究に160K因子が重要な役割を演ずると思われる。

MELASにおける遺伝子異常の発見

後藤雄一, 埜中征哉, 宝来 聡>(*国立遺伝学研究所)

【はじめに】

ミトコンドリア脳筋症は、臨床的に3型に分類されている。すなわち、CPEO、MERRF、MELASである。これらに関するミトコンドリア(mt) DNA研究の進歩はめざましい。我々は本邦における約65%のCPEO患者生検筋には、大きな欠失をもつ異常mtDNAの存在することを明らかにし、また臨床症状と欠失の大きさや部位などと相関関係がないことをすでに報告した¹⁾。また異常mtDNAの発現の研究により、転移RNA(tRNA)の何らかの異常が病因と関わっていることが判明し、MERRFについてもmtDNA上のリジンtRNA内の塩基番号8,344のAがGに変異していることが明らかにされた。そこで我々は残るMELASにおいても、ミトコンドリアtRNA異常が存在する可能性が高いと考えた。その理由は、①MELASにも母系遺伝と考えられる家系があること、②三型とも、筋組織学的所見が類似していること、③臨床症候群と酵素学的異常が対一に対応しないこと、などである。

【対象】

母系遺伝と考えられるMELAS家系の一患者の生検筋からDNAを分離した。全tRNAを含む領域をPCR法を用いて増幅し、サンガー法で塩基配列を決定した²⁾。

【結果と考察】

アンダーソンの正常ヒト塩基配列と比較検討したところ、tRNAに関する限り、塩基番号3,243のみが変異していた(図1)。この部位は、ロイシンtRNAのdihydrouridineループの最初の塩基にあたり、ヒトの他のミトコンドリアtRNAや核tRNAでもアデニンのことが多い。さらに、この部位は、ヒトからウニに至るまで、厳密に保存されていることを考えると、この部位の変異は、tRNAの機能に重大な影響を与えることが予想された。この変異により、GAGCCCがGGGCCCとなり、新たに制限酵素ApaIの切断部位を生じていた。したがって、変異部位を含む領域をPCR法で増幅し、ApaIで切断することで、容易に変異の有無を検出できる。そこで、我々は他のMELAS患者39例とコントロール50例をはじめ、CPEO患者40例(単一欠失例29例、多発欠失例2例、無欠失例9例)、MERRF患者6

例についても検討した(表1)。その結果MELASでは、32例(80%)でこの変異が存在したが、コントロールでは一例も認められなかった。また、CPEOの例外的な一例以外、他のミトコンドリア脳筋症でもこの変異は存在しなかった。変異の存在したCPEO例は、サザン法で大きな欠失は見つかっておらず、また、その母と姉もCPEO患者であったが、姉にはMELASを思わせる脳卒中様症状が存在していた。以上からこの塩基番号3,243のA→G変異が、MELASの最も主要な遺伝子異常と結論した²⁾。また、mtDNA全部が変異mtDNAではなく、正常と異常とが混在している(ヘテロプラスミー)ことも明らかになった。サザンプロテイング法から計測すると、変異DNAの割合は50%~92%であった²⁾。

【おわりに】

MELASの主要な遺伝子異常が明らかになった。今後は、この遺伝子異常が、具体的にどのような生化学異常を引き起こし、ひいてはどのように臨床症状と結び付くのかを詳細に検討しなくてはならない。

【文献】

- 1) Goto Y, et al. J Neurol Sci 100:63 (1990)
- 2) Goto Y, et al. Nature 348:651 (1990)

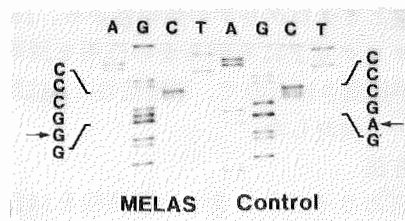


図1 Direct sequencingの結果

	Wild-type	Mutant	Total
MELAS	8	32	40
MERRF	6	0	6
CPEO with deletion	32	0	32
without deletion	7	1	8
Leigh's encephalopathy	26	0	26
Controls	50	0	50

表1 ミトコンドリア脳筋症における塩基番号3,243の変異の有無

ミトコンドリア脳筋症の筋線維ときほぐし

標本による電顕細胞化学的検討

松岡太郎, 後藤雄一, 埜中征哉

ミトコンドリア脳筋症の一疾患単位である慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (CPEO) の生検骨格筋には、組織化学的に cytochrome *c* oxidase (CCO) の部分欠損の所見と、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析で大きな欠失をもつ mtDNA が正常のものと同様に混在する所見とが認められ、病態発生との関連で注目されている。私達はこの CPEO の生検骨格筋を筋線維ときほぐし法により光顕レベルで検討し、CCO 活性陰性部が一本の筋線維上に明瞭な境界をもって節状に分布することを報告してきた。今回私達は CPEO の病態をより詳細に知るために、この筋線維ときほぐし標本の電顕細胞化学的検討を行った。

[対象]

臨床症状、筋病理組織所見より診断された CPEO 6 例を対象とした。生検骨格筋の凍結横断切片にて ragged-red fibers および CCO 部分欠損の所見を全例に認めた。Southern法による筋 mtDNA の分析では全例に欠失をもつ mtDNA を認めた。

筋生検の結果、神経筋疾患とは診断されなかった 3 例を対照とした。

[方法]

生検筋 (長さ 1 cm) を 2% グルタルアルデヒド溶液 (0.05M リン酸緩衝溶液内、pH 7.4) 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て数本ずつの筋線維よりなる筋束ときほぐした後、Seligman らの方法により CCO 染色した。染色後、再びピンセットを用いて一本一本の筋線維にまでときほぐし、実体顕微鏡にて観察した。一本の筋線維上に節状に分布する CCO 陽性部と陰性部を切り出し、それぞれ別々に 0.5% で後固定し、脱水、エポキシ包埋した。超薄切片を作成し、ウラニール染色を行い、電子顕微鏡にて観察した。

[結果]

1) 対照では、数% のものを除き大部分のミトコンドリアが陽性に染まった。形態にも有意な異常はなかった。

2) CPEO の陽性部では、数% のものを除き大部分のミトコンドリアが陽性に染まった。一例でミトコンドリアの異常な集積を認めたが、形態異常は例外的で、対照と差はなかった (図 A)。

3) CPEO の陰性部では、形態的に正常な区域 (図 B) に混じって、異常な集積などミトコンドリアの形態異常が明らかな区域 (図 C) が点在していた。

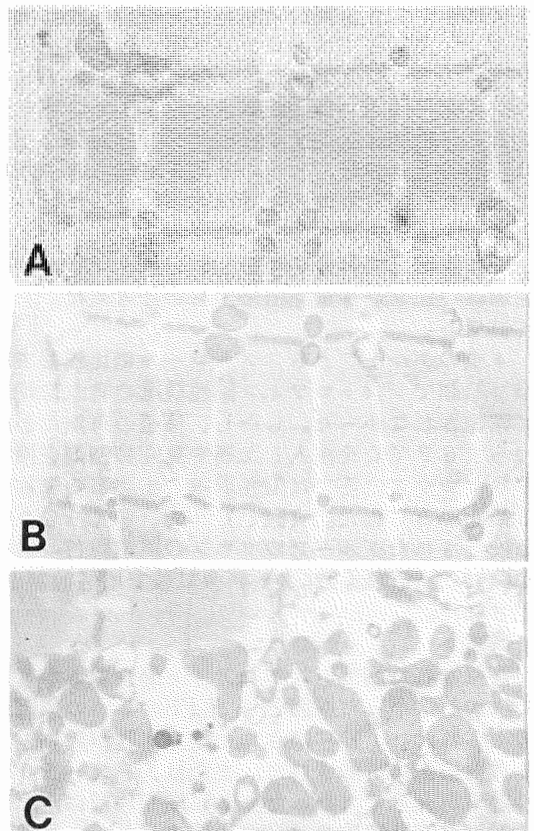
形態異常の有無にかかわらず、全てのミトコンドリアは CCO 染色されなかった。

[考察]

CCO 活性陽性部、陰性部それぞれのミトコンドリアの染色性にバラツキは少なく (CCO 活性に節内モザイクの所見は乏しく)、一本の筋線維に由来しても二つの部位ははっきり区別できた。CCO 活性陰性のミトコンドリアでもその多くは形態的に正常で、CPEO にみける (CCO 活性を指標とした) ミトコンドリアの機能異常が形態異常に先行することが示唆された。今後は CCO 活性の分布と変異 mtDNA の分布との対応を電顕レベルで検討する必要があると考えられた。

[文献]

Matsuoka, T. et al.: Muscle Nerve (in press)



mdx マウスの骨格筋のジストロフィン陽性線維の出現率：

塩酸ピピバカイン，FK-506，筋芽細胞移植の影響

竹光正和，荒畑喜一，埜中征哉

現在、進行性筋ジストロフィーに対する治療法として筋芽細胞の移植が試みられている。我々は、注入された筋芽細胞が生着するためには、宿主の筋衛星細胞の活動化と免疫能の抑制が必要と考え以下の実験を行った。

<方法>

宿主動物は移植時4週令のC57BL/10ScSn-mdx (mdx) マウスで、5匹ずつ4つのグループに分けた。グループ1には特別な処置をしなかった。グループ2は筋衛星細胞を活動化するため移植前日に0.25%塩酸ピピバカイン (BPVC) を移植筋に注入した。グループ3は免疫抑制剤FK-506¹⁾を投与した。FK-506は移植初日より2週間連日皮下に1mg/kg投与した。グループ4はBPVC注入とFK-506投与を行った。以上のマウスについて3日間連続細胞注入を行い最終移植日より3週間後ジストロフィン陽性線維の出現率を抗ジストロフィン (アミノ酸3495-3545) 抗体²⁾を用いた免疫染色の結果より計測した。正常筋芽細胞は胎生20日のC57BL/10ScSnマウスの骨格筋より分離したものを培養増殖させて移植に用いた。筋芽細胞の移植は右前脛骨筋に行い、左はコントロールとした。従って、左のコントロールに比較して有意に増加したジストロフィン陽性線維が正常筋芽細胞由来のものと考えた。

<結果>

4つのグループともコントロールに比較して細胞移植側でジストロフィン陽性線維の有意な増加は確認されなかった。しかし、移植の有無にかかわらずBPVCを注入した筋や免疫抑制剤を投与されたマウスの筋では陽性線維の出現率の増加する傾向がみられた。(図1) 尚、FK-506を投与されたグループのマウスの脾細胞(T cell)はConcanavarian Aによる刺激試験で増殖抑制が確認された。

<考察>

移植された筋でジストロフィン陽性線維が有意に増加しなかった原因として以下の3つの原因が考えられた。1) 移植された筋芽細胞が異物として貪食細胞に排除された。または、FK-506の効果が充分でなかった。2) 細胞移植に用いた注射針が筋芽細胞を機械的に傷害した。3) 宿主

にジストロフィン陽性線維が存在し、且つその出現率に個体差が大きいため、正常筋芽細胞由来のジストロフィン陽性線維の評価がされなかった。

無処置のmdxマウスにジストロフィン陽性線維が観察されたことより、mdxマウスにはジストロフィンもしくはジストロフィン関連蛋白 (GRP)³⁾の存在することが示唆された。しかし、いずれにせよ正常筋芽細胞が生着すればジストロフィン陽性線維の出現頻度は有意に増加するはずである。今後移植法の改善とともに、mdxマウスの骨格筋にみられるジストロフィン陽性線維の解析も必要と考えられた。

<文献>

- 1) Inamura N et al. Transplantation, 45, 206-209 (1988)
- 2) Ishiura S et al. J Biochem., 107, 510-513 (1990)
- 3) Love DR et al. Nature, 339, 55-58 (1989)

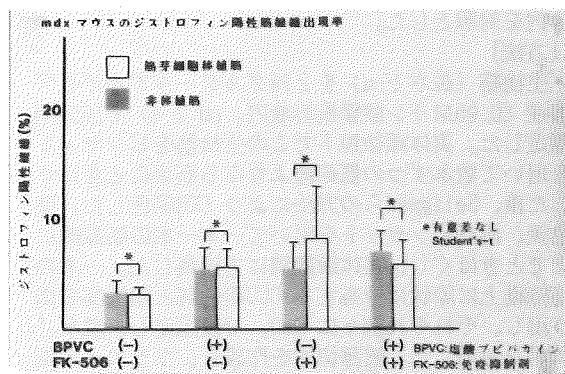


図1. mdx マウスの前脛骨筋におけるジストロフィン陽性線維出現率。□は約 1×10^7 個の培養筋芽細胞を注入された筋。■は細胞移植を受けなかった筋。いずれのグループとも正常筋芽細胞移植後、ジストロフィン陽性線維の有意な増加は見られなかった。

10. 機能研究部

1. 研究部一年のあゆみ

平成2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、田中光と池谷紀代子であり、山田圭津と斎藤和江がこれの補助を行なった。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）と熱海佐保子（山梨医科大学解剖学教室、教授）が、客員研究員として木村一郎（早稲田大学人間科学部、教授）、江口新比古（味の素株式会社中央研究所、副部長）および斎藤加代子（東京女子医科大学小児科学教室、講師）が、また非常勤の研究生として水野一乗（東京大学教育学部、大学院博士過程学生）が参加した。10月からは池谷紀代子が研究生となった。

池谷紀代子は平成元年6月1日より平成2年9月30日まで流動研究員として勤務した。終了後、東京女子医科大学小児科助手に復職した。田中光は昭和63年4月1日より平成3年3月31日まで流動研究員として勤務し、平成3年4月1日より東邦大学講師として赴任した。

当部の研究は主としてジストロフィンの研究を行なっている。吉田はウサギからジストロフィンを精製し、それに結合している6種のジストロフィンを細胞膜に固定しているタンパク質を得た。その中にはジストロフィンの作用を知るための鍵があると期待される。萩原はこのタンパク質の一つA₁のモノクロナル抗体がトリプレットA1の2本だけしか認識しないことを見つけ、それが複雑な構成であることを推定させた。田中は免疫組織化学やPCRによって心筋発生におけるジストロフィン発現の研究を行ない、さらにジストロフィン関連タンパク質の筋細胞内分布を明らかにした。池谷はベッカー型筋ジストロフィーの分析を行なった。林は骨格筋初期発生において体節から四肢への筋原細胞の遊走の問題を研究するために蛍光色素を用いた染色法を開発し、それを用いて研究を進めている。

対外的には小沢は厚生省精神・神経疾患研究依託費による筋ジストロフィー研究連絡協議会運営幹事及び平成2年度から開始された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の班長をつとめた。また平成2年8月17日より19日に行なわれた上原財団シンポジウム——1990 Frontiers of Muscle ResearchのOrganizing CommitteeのChairmanをつとめた。

（部長 小沢鏝二郎）

Ⅱ 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

1) Yoshida M., Ozawa E. :

Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma.

J. Biochem., 108 : 748-752, 1990

2) Tanaka H., Ozawa E. :

Developmental expression of dystrophin on the rat myocardial cell membrane.

Histochemistry 94 : 449-453, 1990

3) Tanaka H., Ozawa E. :

Expression of dystrophin mRNA and the protein in the developing rat heart.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 172 : 824-829, 1990

c. 総説

1) 小沢鉄二郎 :

特集に寄せて<特集ジストロフィン>

細胞 23 : 41-42, 1991

2) 吉田幹晴 :

ジストロフィンとジストロフィン結合蛋白質

細胞 23 : 51-54, 1991

3) 萩原康子, 田中光 :

筋発生におけるジストロフィンの発現

細胞 23 : 55-59, 1991

d. 班会議報告書

1) 小沢鉄二郎, 吉田幹晴 :

ジストロフィンを筋細胞膜に固定する糖蛋白質複合体

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細胞生物学的基礎研究班, 平成2年度

班会議報告書, p37-41, 1991

B. 学会発表

a. シンポジウム

- 1) Ozawa E., Yosida M., Hagiwara Y., Hayashi K., Ikeya K. :

Formation of dystrophin lining on muscle cell membrane in myogenesis.

Uehara Memorial Foundation Symposium, Tokyo, Jul 17, 1990

- 2) Saito K., Ikeya K., Yamauchi A., Harada T., Tanaka H., Ozawa E., Fukuyama Y. :

Molecular genetic analysis of DMD/BMD families.

The Joint Convention of the 5th International Child Neurology Congress and the 3rd Asian and Oseanian Congress of Child Neurology, Tokyo, Nov 4, 1990

b. 国際学会

- 1) Hayashi K., Ozawa E. :

Fluorescent tracing of myogenic cell-migration in the chick limb bud.

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Meeting on Gene Expression in Neuromuscular Development, USA, Jan 27, 1990

- 2) Ikeya K., Tanaka H., Fukuyama Y., Ozawa E. :

Dystrophin Expression in Skeletal and Cardiac Muscles of mdx Carrier mice.

VII International Congress on Neuromuscular Diseases. Munich, FRG, Sep 16, 1990

- 3) Ikeya K., Saito K., Hayashi K., Yamauchi A., Ozawa E., Fukuyama Y. :

A case of Becker muscular dystrophy (BMD) patient showing an unusual pattern in immunostaining of biopsied muscle.

The Joint Convention of the 5th International Child Neurology Congress and the 3rd Asian and Oseanian Congress of Child Neurology, Tokyo, Nov 4, 1990

- 4) Saito K., Ikeya K., Tanaka H., Yamauchi A., Ozawa E., Fukuyama Y. :

Deletion pattern studies on dystrophin gene of Japanese DMD/BMD families.

VII International Congress on Neuromuscular Diseases, Munich, FRG, Sep 16, 1990

- 5) Shimizu T., Murayama T., Sunada Y., Mannen T., Ozawa E., Marayama K. :

Immunohistochemical localization and electron microscopic visualizaion of dystrophin.

VII International Congress on Neuromuscular Diseases, Munich, FRG, Sep 16, 1990

c. 一般学会

- 1) 吉田幹晴, 小沢鉄二郎 :

II 研究業績

ジストロフィンを筋細胞膜に固定する糖蛋白質複合体

日本生化学会第63回大会, 大阪, 9, 5, 1990

2) 萩原康子, 吉田幹晴, 小沢鏝二郎 :

ジストロフィン及びジストロフィン結合タンパク質を認識する抗体の作製

日本細胞生物学会第43回大会, 東京, 10, 8, 1990

3) 萩原康子, 吉田幹晴, 小沢鏝二郎 :

Dystrophin 及び Dystrophin 結合タンパク質 A 1 を認識するモノクローン抗体

日本薬理学会第64回総会, 神戸, 3, 26, 1991

4) 林謙介, 小沢鏝二郎 :

体節の蛍光標識による筋芽細胞遊走の観察

日本発生生物学会第23回大会, 広島, 5, 24, 1990

5) 田中光, 小沢鏝二郎 :

ラット心筋の発達に伴うジストロフィンの筋細胞膜への出現

第83回日本薬理学会関東部会, 東京, 10, 6, 1990

6) 田中光, 小沢鏝二郎 :

発達期ラット心筋におけるジストロフィン及び mRNA の出現

第64回日本薬理学会総会, 神戸, 3, 26, 1991

C. 班会議発表

1) 小沢鏝二郎, 吉田幹晴 :

ジストロフィンを筋細胞膜に固定する糖タンパク質複合体

厚生省精神・神経疾患・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班, 平成二年度

班会議, 東京, 12, 13, 1990

2) 小沢鏝二郎, 吉田幹晴 :

ジストロフィンを筋細胞膜に固定する糖蛋白質複合体

厚生省精神・神経疾患・「筋ジストロフィー」総合班会議, 東京, 1, 19, 1991

3) 吉田幹晴, 萩原康子, 小沢鏝二郎 :

ジストロフィンとジストロフィン結合蛋白質

生体運動合同班会議, 東京, 1, 9, 1991

3. 主な研究報告

精製ジストロフィンのキモトリプシンによる限定分解

吉田幹晴, 小沢鐵二郎

Koenigと Kunkel(1)はジストロフィンの一次構造を詳細に検討し、分子内部にヒンジ(蝶番)として作用する短い配列(H1~H4)が4つあることを提案した(図1)。今回我々は精製したジストロフィンについてキモトリプシン限定分解を行い、分解物を6種の抗体を使って調べた結果、基本的には彼らの主張するヒンジが存在することを確認した。

<材料と方法>

ジストロフィンは既報(2)に従って精製した。限定分解は 1mg/mlジストロフィン、0.01mg/mlキモトリプシン、pH7.5、25℃で行った。反応はアプロチニンで止めた。イムノプロットの検出はABC kitで行った。使用した抗体(P00~P34)が作製された抗原のジストロフィン分子内における位置は図1に示した。

<結果と考察>

キモトリプシンによるジストロフィン分解物の電気泳動パターン(CBB染色)の時間変化を図2に示す。パターンは予想以上に複雑であった。各分解物それぞれに対し、6種の抗体を使って行ったイムノプロットのパターンは、P00とM02が区別できないことを除き、各抗体とも独特であり、それぞれは異なるエピトープを認識していることが確認された。そこで各抗体が認識するバンドの分子量、及び同一バンドを認識する抗体の確認を行い多数のバンドの分子内における局在を決めた結果、Koenigと Kunkelが提案したヒンジのうち、H1、H2、H4近辺が切断され易いことがわかった。また彼らが指摘した内在性のプロテイナーゼによる切断部位(EP)近辺も切断されることがわかった。しかしH3は切れず、その結果EPとH4間の断片(図2 bands 1)がかなり安定なものとして検出された。H3にはヒトの場合環状の側鎖を持ったアミノ酸が無いので、これはキモトリプシンに特異的な結果かもしれない。ジストロフィンのN端部(アクチン結合ドメイン)はキモトリプシンがH1で作用することにより、反応初期から33 kDa断片(図2 bands 2)として生成し、以後強度の分解を受けない。P00とM02のイムノ

ロットパターンが区別できないのは、N端部がこの様にキモトリプシン消化に抗するためと考えられる。一方H2とEPの間は100残基程度の間隔を置いて細かく切断されることが見出され、これがジストロフィン分解パターンの複雑さの原因となっていた。H4から後のC末ドメインはキモトリプシンに敏感で、P34は消化開始4分以後殆ど反応しなくなった。この様にジストロフィン分子は内部にいくつかの異なる構造を持つドメインでできていることが確認された。

<文献>

- (1) Koenig, M. & Kunkel, L.M. (1990)
J. Biol. Chem. 265, 4560-4566
- (2) Yoshida, M. & Ozawa, E. (1990)
J. Biochem. 108, 748-752

図1. ジストロフィン分子内のヒンジ及び各抗体の認識部位

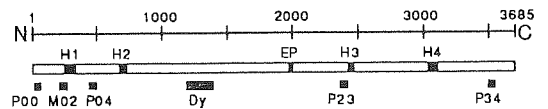
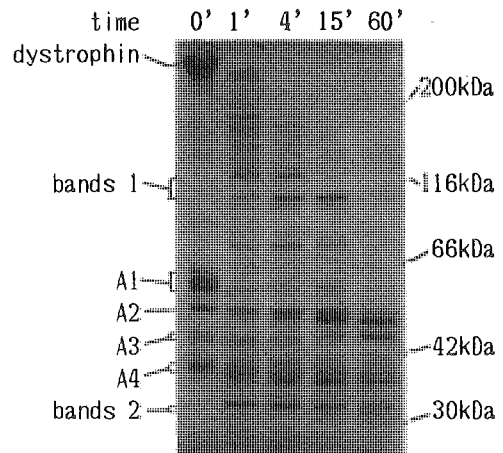


図2. キモトリプシンによるジストロフィン分解物のSDS電気泳動パターン



Dystrophin結合タンパク質 A 1 を認識するモノクローナル抗体

萩原康子, 吉田幹晴, 小沢鏝二郎

Dystrophin は、骨格筋および心筋の細胞膜に存在する分子量427kDaのタンパク質である。その異常が Duchenne型および Becker型筋ジストロフィーの原因となることは知られているがその生化学的特性、生理的機能は解明されていない。

Yoshida と Ozawa は、dystrophinと一緒に精製されてくる 6群のタンパク質(A0-A5)を見だし、これらが dystrophinと結合して dystrophin complex を作っていることを明らかにした¹⁾。

今回は、dystrophin結合タンパク質A1を認識するモノクローナル抗体を得たので報告する。

<方法>

ウサギ筋肉からCampbell と Kahl の方法²⁾により小麦胚芽レクチン(WGL)カラムで部分精製したものを抗原として BALB/cマウスに免疫し、常法に従ってハイブリドーマを作成した。抗体産生のスクリーニングには、抗原を SDS-PAGEしたイムノブロット法を用いた。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・考察>

2段階のクローニングの結果、分子量約62kDaのバンドと特異的に反応するクローンを得た。このモノクローナル抗体 B25b が dystrophin 結合タンパク質A1の抗体であることを、A1の性質¹⁾を用いて以下の実験で確認した。

(1) FPLC superose 6 chromatographyで精製したdystrophin complexのA1と特異的に反応した。
 (2) 架橋剤のbis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS³)により dystrophin complexのA2以外のものは dystrophinと架橋される。B25bで抗体染色されたタンパク質は 0.3mM BS³ 処理後はA1に相当する位置にはなく dystrophinと架橋された (Fig.1)。高分子領域が B25bと反応しないのは架橋の結果、epitopeに抗体が結合できない状態になった為と考えられる。

(3) dystrophin complex を 2M KI 処理して WGL gel 結合分画と結合しない分画とに分けると、A1は結合しない分画に入る。B25bと反応するタンパク質は結合しない分画にあり、結合する分画にはなかった (Fig.2)。

以上の結果から B25bは A1を認識するモノクローナル抗体と考えられる。B25bは A1の3本のバンドのうち泳動距離の短い2本のバンドと反応することから、この2本は同じ epitopeを持ち、isoformsあるいは1つの物質が修飾を受けたものであろうと考えられる。

<文献>

- 1) Yoshida, M. and Ozawa, E. (1990) J. Biochem. 108:748-752
- 2) Campbell, K.P. and Kahl, S.D. (1989) Nature 338:259-262

Fig.1

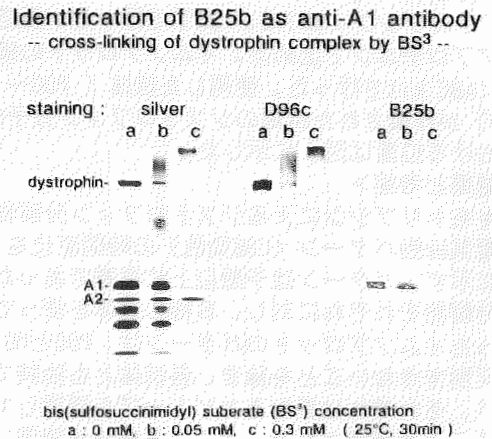
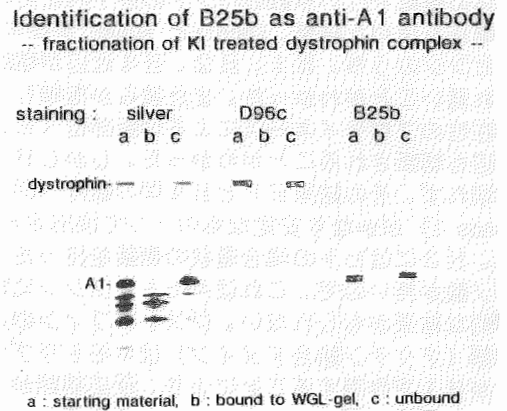


Fig.2



筋ジストロフィー患者骨格筋の細胞膜に dystrophin 類似タンパク質が存在する

田中光, 石黒恒男¹, 江口新比古¹, 斎藤加代子, 小沢鏝二郎

1 味の素中央研

【背景・目的】 Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の原因は 427kDa の細胞膜タンパク質 dystrophin が欠損することにあるが、DMD患者の間でも症状の重篤度にバラツキがみられ、dystrophin 以外にも病態を修飾する要因があると考えられる。以前我々は dystrophin のC末端に対する抗体(p34a)が dystrophin の欠損している筋肉の細胞膜上に存在する分子量約400kDaのタンパク質と交叉反応することを見だし、dystrophin のC末端と類似した別のタンパク質が細胞膜に存在することを示した(1)。今回我々は、このタンパク質が Loveらの報告したDMD類似遺伝子(2)に由来するタンパク質(dystrophin related protein, DRPと呼ぶ)であることを免疫学的手法により明らかにした(3)。

【方法】 Loveらの報告したcDNA配列にもとづき51アミノ酸残基のペプチドを合成して抗原とし、ウサギで抗DRP抗血清を作製して用いた。Dystrophin に特異的な抗体としては 4C5、p34c を用いた。ヒトおよびマウス骨格筋凍結標本を用い、SDS抽出液のimmunoblotting、および間接蛍光抗体法による組織染色を行った。

【結果考察】 Immunoblottingの結果、DRPはDMD筋、non-DMD筋ともに約400kDaのタンパク質と反応した。N末端側に欠損がある260kDaの特殊な dystrophinをもつBecker型筋ジストロフィー患者の骨格筋では、抗dystrophin抗体が約 260kDa の band とのみ反応したのに対し、抗DRPは約 400kDaのbandとのみ反応した。これらの結果から、DRP がタンパク質として確かに存在していること、抗DRP は DRP特異的であり dystrophin とは交叉しないことがわかった。

Immunohistochemistry の結果抗DRPにより細胞膜が染まり、DRPは細胞膜に存在するタンパク質であることがわかった。抗DRPの染まりには濃淡があったが、そのパターンはp34aの染まりのパターンと一致し、p34aと交叉反応するタンパク質がDRPであることが示された。また、DRPの染まりはdystrophin のない DMD筋で顕著であり、non-DMD筋ではわずかであった。DRPの機能は現在まったく不明であるが、代償性の発現と考えれば興味深い。

【文献】

- (1) Proc. Japan Acad. 65B:238-241,1989
- (2) Nature 339:55-58,1989
- (3) Histochemistry 95:in press.,1991

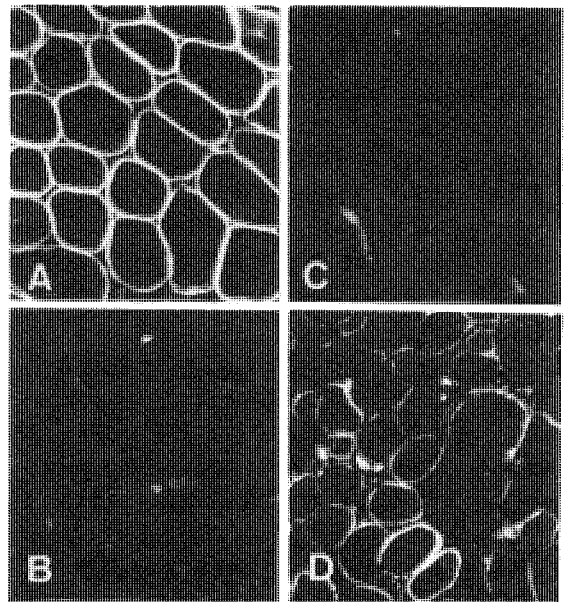


図1 骨格筋でのdystrophinおよびDRPの発現
Non-DMD筋(A,C)およびDMD筋(B,D)における
dystrophin(A,B)およびDRP(C,D)の組織染色

ラット心筋の発達に伴う dystrophin および mRNA の出現

田中 光, 小沢 鏡二郎

【目的】 Dystrophin は骨格筋および心筋の細胞膜を裏打ちする427kDaのタンパクであり、その異常が Duchenne 型および Becker 型筋 dystrophy の原因である。今回我々は、心筋の発達に伴う dystrophin およびその mRNA の出現をラットを用いて immunohistochemistry, immunoblotting および PCR により観察した。また交感神経除神経の影響も検討した。

【方法】 Wistar 系ラットの心室筋を用いた。抗体は cDNA 配列にもとづく 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 p34c およびマウスで作製した monoclonal 抗体 4C5 を用いた。Immunohistochemistry は間接蛍光抗体法により、immunoblotting は心筋の SDS 抽出液を用い ABC 法により検出した。交感神経除神経は、新生ラットに 6-hydroxydopamine を 150 mg/kg/day 14 日間腹腔内投与して行った。

【結果】 ラット心筋の dystrophin mRNA は胎齢10日目で既に発現されていた(図1)。一方、dystrophin タンパク質は胎齢 17 日目頃から細胞膜上に検出された。細胞膜の染まりははじめ薄かったが、出生前後に次第に濃くなり、生後 2 週齢の時点で adult level に達した(図3)。Immunoblotting においても、dystrophin の band に同様の発達変化が見られた(図2)。生後 2 週齢の正常心筋と除神経心筋とでは、dystrophin の蓄積に違いは見られなかった。

【考察】 ラットの心臓は胎齢10日目頃に拍動開始する。今回のPCRの結果は、dystrophin mRNA が他の筋肉特異的タンパク質と同時に発現するという考えと矛盾しない。Dystrophin タンパク質が検出されるのはこれより数日後であった。この理由としては、dystrophin mRNA が全 mRNA 量の 0.1-0.01% と少ないため検出可能な量蓄積するのに時間がかかること、transcriptional な制御が存在すること、dystrophin の細胞膜への蓄積に associated

proteins の出現など dystrophin の合成以外の要因が必要であること、などが考えられる。ラット心室筋の交感神経支配は主として出生後に発達し、心筋の発達に様々な影響を与えると考えられているが、dystrophin の蓄積にはほとんど影響しないことがわかった。

【文献】

Histochemistry (1990) 94:449-453
BBRC (1990) 172:824-829

A B C D E F

図1 Dystrophin mRNA の発現

A: 胎齢10日、B: 胎齢11日、C: 胎齢12日、
D: 胎齢19日、E: 生後14日、F: 成体

A B C D E F G

図2 Dystrophin タンパク質の発現

A: 胎齢15日、B: 胎齢17日、C: 胎齢19日、
D: 生後1日、E: 生後5日、F: 生後14日、G: 成体

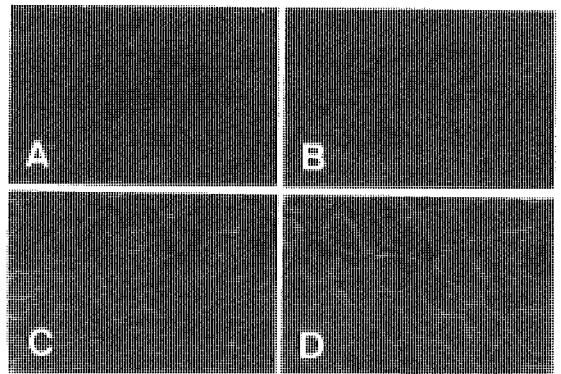


図3 Dystrophin の細胞膜への蓄積

A: 胎齢15日、B: 胎齢19日、C: 生後14日、D: 成体

四肢部と胴部の間充織を染め分ける抗体

林 謙介, 小沢鉄二郎

近年、肢芽のパターン形成については分子レベルでの研究が盛んに行われているが、体のどこに肢芽が形成されるかという問題に対する分子的アプローチはほとんど行われていない。肢芽はその先端にある頂堤と呼ばれる外胚葉上皮の肥厚と、肢芽形成領域の体壁板中胚葉との相互作用によって発生する。肢芽を形成しない胴部の体壁板中胚葉には頂堤を誘導する能力も、それを維持する能力もない。しかし、実験的には胴部の体壁板も発生をきわめて初期には肢芽を形成する能力があり、後にその能力が低下するのである(1)。また、系統発生学的には肢芽の原型は胴部を含めた体壁板全長にわたって形成されていたといわれている(2)。従って、胴部体壁板中胚葉に起こる何等かの変化が肢芽形成能を阻害し、肢芽形成が前方と後方の二箇所に限定されることとなったと考えられる。胴部中胚葉で起こる変化の実体はわかっていない。我々は、肢芽の間充織と胴部の間充織を染め分けるモノクローン抗体を得たので、ここに報告する。

<方法>

ニワトリ8日胚の四肢基部の筋及び結合組織をBa1b/cマウスに免疫し、脾細胞を調整した。ミエローマP3U1と融合したハイブリドーマを、ニワトリ4日胚肢芽の凍結切片上で蛍光抗体法によってスクリーニングした。蛍光抗体法は、未固定凍結切片、アセトン後固定、FITC標識抗マウスIgによっておこなった。

<結果と考察>

スクリーニングの結果、ニワトリ4日胚肢芽の後半の一部分のみを染める抗体が見つかった。この抗体で他の組織も染色してみると、神経管と胴部の体壁板中胚葉を強く染めた。

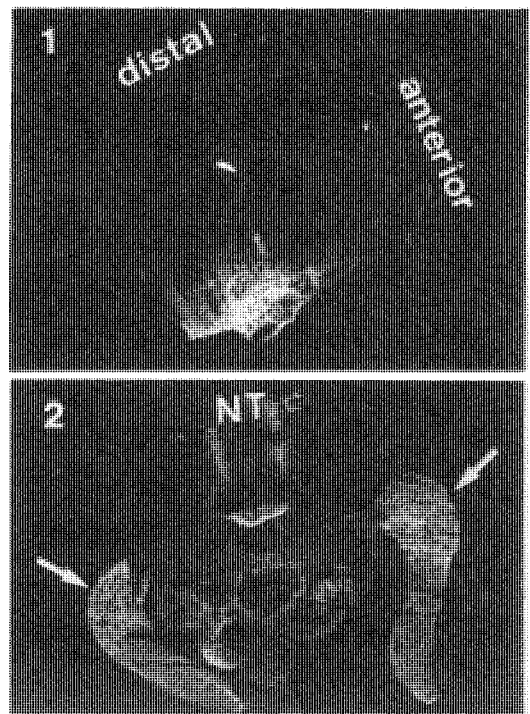
神経管は頸部より後方で調べた限りどの場所でも染まったが、体壁板中胚葉は翼肢芽基部の後半(図1)、胴部(図2)、下肢芽基部の前半のみに染色がみられた。頸部体壁板、肢芽の大部分、体節などは染まらなかった。染色は粗い線維状に観察され、抗原は細胞骨格か細胞外基質であるように思われた。翼肢における染色パターンはZPAとの関連を思わせるが、下肢のZPA領域は染まらないので、今のところ否定的に考えている。

<文献>

1) Stephens T.D. et al. Limbness in the early chick embryo lateral plate.

Dev. Biol., 133:1-7 (1989)

2) Weichert C.K. and Presch W. Elements of chordate anatomy, Fourth edition, McGraw-Hill Book Company (1986)



11. 代謝研究部

1. 研究部一年のあゆみ

代謝研究部は本年度も脳神経系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及び分子生物学的に明らかにして行くことを目的としてきた。平成2年4月以降代謝研究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

〔室長〕 中嶋一行

〔研究員〕 武井延之

〔流動研究員〕 内田耕一, 池田正明(～3.3.31), 斎藤茂治(2.4.1～)

〔外来研究員〕 飯島 昇, 下条雅人, 北本昭彦(2.10.1～)

〔研究生〕 濱之上誠, 榊原真人, 藤城正敏(～3.3.31), 松山真千(2.5.1～3.3.31), 高宮至昭(2.4.1～3.3.31), 永田晃一(2.5.1～), 広瀬雄一(3.3.1～)

〔資金研究員〕 津崎尚子(～2.10.31), 大澤圭子(2.9.1～)

〔資金研究助手〕 亀井 幸, 石田郁子(～2.8.17), 平井ふさこ(2.10.1～)

〔併任研究員〕 中野浩武(2.4.1～3.3.31)

本年度の研究成果は以下の通りである。

1) アストログリアの $\alpha 2$ M生合成

昨年度、アストログリア培養上清中に存在するニューロン突起伸展因子につき生化学的に検索した結果 $\alpha 2$ -マクログロブリン($\alpha 2$ M)であることが判明した。但しこれは培地中に存在していた牛胎児血清からの持ち込みの可能性及び用いた $\alpha 2$ M抗体が $\alpha 1$ -インヒビター3($\alpha 1$ I3)と交叉反応していた可能性を否定できない。そこで本年度はpolymerase chain reactionを応用して $\alpha 2$ Mと $\alpha 1$ I3に特異的なプローブによりアストログリアにおけるそれぞれのmRNA発現につき検討を加えた。その結果培養アストログリアは明らかに $\alpha 2$ MのmRNAを発現することが示された。また、この結果は 35 S-メチオニンにより標識された蛋白の免疫沈降を行う実験結果においても確認された。さらに $\alpha 2$ Mの発現を各種細胞において(ニューロン, ミクログリア, 髄膜フィブロラスト)ノーザンブロット法により検討した結果 $\alpha 2$ Mの主な産生細胞はアストログリアであることが明らかとなった。

2) 脳内ミクログリアとニューロンの相互作用に関する研究

昨年度は新生児ラット脳の初代培養よりミクログリアを簡便にかつ高純度で分離培養する方法を確立した。本年度はこのミクログリアを用いニューロンの発育に影響を与える生理活性物質の研究を開始した。この過程でミクログリア培養上清 (Mic-CM) 中にプロテアーゼ活性を見だしその生化学的特性につき検討を加えた。このプロテアーゼの至適pHは中性領域であること、また種々の阻害剤による検討の結果からセリンプロテアーゼに属することが判明した。さらにゲル濾過による解析及びウェスタンブロットの結果からエラスターゼであることが強く示唆された。

一方Mic-CM中にはニューロンの生存を維持する活性が存在することが昨年度明らかにされたことから、今年度はその候補となり得る既知の諸因子につき生存維持活性を検討した。その結果basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) が最も低濃度でニューロンの生存を維持することが明らかとなった。さらにミクログリアにおけるbFGFの産生をPCR法を用い検討した結果、極めて微量ではあるがミクログリアでmRNAが発現していることが示された。

3) 脳内の神経栄養因子に関する研究

昨年度は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そのうちの 하나가Neuron Specific Enolase (NSE)であることを明らかにした。今年度はこの結果をさらに詳細に検討するため高度に精製されたNSEの効果及びそれらに対するモノクローナル抗体の影響を検討した。NSEは極めて低濃度から生存維持活性を示しED₅₀は3ng/mlであった。またこの生存維持活性はモノクローナル抗体の添加により完全に中和された。さらにエノラーゼの他のアイソザイムである $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ タイプの生存維持効果につき検討した結果NSEに見られた活性を認めることは出来なかった。一方ラット中脳の初代培養系を用い大脳皮質ニューロン以外のニューロンの生存維持に対するNSEの効果についても検討を加えた。NSEは中脳のニューロンの生存維持も明らかに促進しており様々な種類のニューロンに効果を有することが示唆された。

(部長 高坂新一)

Ⅱ 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Azuma N, Hida T, Akiya S, Uemura Y, Kohsaka S and Tsukada Y :
Histochemical studies on hyaluronic acid in the developing human retina.
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 228 : 158-160, 1990
- 2) Ishii A, Hagihara M, Matsuura S, Uchida K, Kiuchi K, Kaneda N, Toya S,
Kohsaka S and Nagatsu T :
Effect of (6R)- and (6S)-tetrahydrobiopterin on L-3, 4-dihydroxyphenylalanine
(DOPA) formation in NRK fibroblasts transfected with human tyrosine hydroxylase type
2 cDNA.
Neurochem Int 17 : 625-632, 1990
- 3) Takei K, Nakano Y, Shinozaki T, Toya S, Tsukada Y and Kohsaka S :
Immunological rejection of grafted tissue in xenogeneic neural transplantation.
Prog Brain Res 82 : 103-109, 1990
- 4) Mori T, Iijima N, Kitabatake K and Kohsaka S :
 α_2 -Macroglobulin is an astroglia-derived neurite-promoting factor for cultured neurons
from rat central nervous system.
Brain Res 527 : 55-61, 1990
- 5) Takei N, Tsukui H, Kumakura K and Hatanaka H :
Monitoring of acetylcholine released from postnatal rat basal forebrain cholinergic neurons
cultured on membrane filter by cell bed perfusion system and HPLC-ECD.
Exp Neurol 108 : 229-231, 1990
- 6) Iijima N, Oohira A, Mori T, Kitabatake K and Kohsaka S :
Core protein of chondroitin sulfate proteoglycan promotes neurite outgrowth from cultured
neocortical neurons.
J Neurochem 56 : 706-708, 1991
- 7) Ibata Y, Toya S and Kohsaka S :
Effects of astroglia on the development of cultured neurons from embryonic rat cerebral
cortex.

Comp Biochem Physiol 98C : 139-146, 1991

- 8) Shimojo M, Nakajima K, Takei N, Hamanoue M and Kohsaka S :
Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia.
Neurosci Lett 123 : 229-231, 1991
- 9) Nakajima K, Imazawa M and Miyamoto K :
Presence of another species of myelin basic protein (MBP) in the developing chick brain.
Neurochem Int 18 : 357-365, 1991
- 10) Hama T, Yushima Y, Miyamoto M, Kubota N, Takei N and Hatanaka H :
Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal two-week-old rats in cultures.
Neuroscience 40 : 445-452, 1991
- 11) Malatynska E, Dilsaver S C, Knapp R J, Giroux M L, Ikeda M and Yamamura H
I :
The interaction of a benzodiazepine receptor antagonist (Ro15-1788) with GABA and GABA receptor antagonists at the GABA_A receptor chloride-ionophore complex.
Neurochem Int 18 : 405-410, 1991

b. 著 書

- 1) 内田耕一, 高坂新一 :
脳組織移植
新生化学実験講座, 第11巻 神経生化学, 東京化学同人, 東京, p.251-258, 1990
- 2) Kohsaka S :
Molecular basis of immunological rejection in xenogeneic neural transplantation.
In : Senile neurodegeneration and neurotransmitters. (T. Nagatsu ed) Excerpta Medica, Tokyo, p.24-31, 1990
- 3) Uchida K, Toya S, Tsukada Y, Nagatsu T and Kohsaka S :
Transfection of tyrosine hydroxylase cDNA into non-neuronal cells : application for intra-cerebral grafting.
In : Aging of the brain : Cellular and molecular aspects of brain aging and Alzheimer's disease. (Nagatsu T, Hayaishi O eds) Japan scientific Societies Press, Tokyo, p.79-93, 1990

Ⅱ 研究業績

4) 武井延之, 高坂新一 :

神経成長因子

小児医学の進歩 '90C, 中山書店, 東京, p.163-171, 1990

5) 武井延之 :

アセチルコリンの微量定量法

神経生化学マニュアル(御子柴克彦, 畠中 寛編), 羊土社, 東京, p.91-97, 1990

6) 竹居光太郎, 高坂新一 :

異種間脳組織移植における免疫学的拒絶機構

老年期痴呆「神経組織障害の修復」(宮武 正編), 科学評論社, 東京, p.145-160, 1991

7) 中嶋一行, 高坂新一 :

グリア細胞特異タンパクと遺伝子

「脳と遺伝子」(永津俊治, 吉田充男, 金澤一郎, 小川紀雄編), 平凡社, 東京, p.29-44,
1990

8) 武井延之, 高坂新一 :

神経の成長因子とその遺伝子

「脳と遺伝子」(永津俊治, 吉田充男, 金澤一郎, 小川紀雄編), 平凡社, 東京, p.169-183,
1991

c. 総 説

1) 高坂新一 :

脳内移植と免疫

Dementia 4 : 159-167, 1990

2) 中嶋一行, 濱之上 誠, 下条雅人, 高坂新一 :

脳とミクログリア

神経進歩 34 : 577-590, 1990

3) 池田正明 :

レセプターの構造解析 「Gタンパク質介在型レセプターを中心として」

脳と精神の医学 1 : 210-224, 1990

4) 武井延之, 高坂新一 :

中枢神経系における神経栄養因子

脳と神経 43 : 5-13, 1991

5) 内田耕一, 高坂新一 :

パーキンソン病の脳内移植療法の現状と問題点

Annual Review 神経, 1991 : 91-101 1991

6) 竹居光太郎, 高坂新一 :

新皮質の異種間移植と血管新生

生体の科学, 42 : 92-97, 1991

d. 班会議報告書

1) 高坂新一 :

中枢神経系における神経栄養因子の探索的研究

ヒューマンサイエンス振興財団官民共同プロジェクト第1分野第1テーマ, 平成元年度研究成果報告書, 55-64, 1990

2) 高坂新一 :

生体防御反応における脳神経系細胞間の相互作用に関する研究

ヒューマンサイエンス振興財団官民共同プロジェクト第3分野第4テーマ, 平成元年度研究成果報告書, 303-310, 1990

3) 高坂新一, 中嶋一行, 下条雅人, 濱之上誠 :

ミクログリア由来分泌性プロテアーゼ

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2年度研究報告書, 59-63, 1991

4) 高坂新一, 内田耕一, 戸谷重雄, 永津俊治 :

チロシン水酸化酵素遺伝子導入細胞の脳内移植

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返的研究班, 平成2年度研究報告書, 75-82, 1991

5) 高坂新一 :

チロシン水酸化酵素遺伝子の培養細胞への導入「パーキンソンモデルラットへの脳内移植」

平成元年・2年度文部省科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書, 1-59, 1991

B. 学会発表

a. 特別講演・シンポジウム

1) 高坂新一 :

Ⅱ 研究業績

脳組織移植と免疫

第7回ニューロトランスミッターと疾患研究会シンポジウム「脳老化・脳変性疾患と神経伝達物質：最近の話題」，東京，6.16，1990

2) 高坂新一，中嶋一行，飯島 昇，下条雅人，武井延之：

グリア細胞と神経栄養因子

大阪大学蛋白質研究所セミナー「脳神経系に作用する成長因子」，大阪，7.9，1990

3) 高坂新一：

チロシン水酸化酵素遺伝子導入細胞の脳内移植

神経移植と修復のサマーセミナー「遺伝子操作・キメラ」，岐阜，8.2，1990

4) 武井延之：

中枢神経系の神経栄養因子

第5回脳腸ホルモン学会基調講演，新潟，9.25，1990

5) 高坂新一，中嶋一行：

脳ミクログリアの分離培養と細胞特性

第7回脳疾患治療研究会セミナー，水上，10.1，1990

6) 高坂新一：

ニューロン・グリア相互機能調節：グリア由来因子

ヒューマンサイエンス振興財団公開シンポジウム「神経栄養因子研究の展望」，東京，10.16，1990

7) 高坂新一：

脳内移植研究の問題点

第49回日本脳神経外科学会総会シンポジウム「実験的脳移植と将来の展望」，東京，10.26，1990

8) 高坂新一：

脳内移植：神経科学研究への応用

上智大学公開講座「最先端技術」，東京，10.30，1990

9) 高坂新一：

脳由来神経栄養因子

文部省重点領域研究「神経回路形成の分子機構」公開シンポジウム，東京，11.17，1990

10) 高坂新一：

神経組織の脳内移植：遺伝子工学の立場から

第5回「大学と科学」公開シンポジウム「脳と老化」，東京，1.12，1991

11) 高坂新一：

グリア由来生理活性物質

名古屋市立大学医学部セミナー，名古屋，2.1，1991

12) 中嶋一行：

ラット脳ミクログリアの分泌性プロテアーゼ

ヒューマンサイエンス振興財団官民共同プロジェクト平成2年度研究成果シンポジウム，東京，
2.8，1991

b. 一般学会

1) 武井延之，高坂新一：

Phosphoglucose isomeraseの神経栄養作用

第67回日本生理学会大会，宮崎，4.3，1990

2) 飯島 昇，大平敦彦，森 俊夫，北畠克顕，高坂新一：

脳由来コンドロイチン硫酸プロテオグリカンのニューロン突起伸展活性

第63回日本生化学会大会，大阪，9.12，1990

3) 中嶋一行，下条雅人，濱之上誠，石浦章一，杉田秀夫，高坂新一：

ミクログリアの分泌性プロテアーゼについて

第63回日本生化学会大会，大阪，9.12，1990

4) 中嶋一行，下条雅人，濱之上誠，石浦章一，杉田秀夫，高坂新一：

ミクログリア分泌性プロテアーゼの性質

第33回日本神経化学会大会，広島，10.24，1990

5) 武井延之，近藤 淳，長池一博，高坂新一：

牛脳由来神経細胞生存維持因子の同定

第33回日本神経化学会大会，広島，10.25，1990

6) 飯島 昇，大平敦彦，森 俊夫，北畠克顕，高坂新一：

脳由来コンドロイチン硫酸プロテオグリカンのニューロン突起伸展作用

神経組織の成長・再生・移植研究会第5回学術集会，岡山，12.8，1990

7) 斎藤茂治，池田正明，飯島 昇，森 俊夫，北畠克顕，木村 穰，勝木元也，高坂新一：

培養アストロサイトにおける $\alpha 2$ -マクログロブリンの産生

II 研究業績

第14回神経科学学術集会, 京都, 12.11, 1990

- 8) 下条雅人, 中嶋一行, 武井延之, 濱之上誠, 高坂新一 :

ラット脳ミクログリアによるbFGFの産生

第14回神経科学学術集会, 京都, 12.11, 1990

- 9) 高坂新一 :

アストログリアの $\alpha 2$ -マクログロブリン産生と突起伸展作用

第3回神経再生と機能再建の研究会, 東京, 2.28, 1991

- 10) 永田晃一, 武井延之, 中嶋一行, 下条雅人, 高坂新一 :

ミクログリア培養上清のラット胎児培養中脳神経細胞に対する生存維持作用

第64回日本薬理学会総会, 神戸, 3.25, 1991

- 11) 武井延之, 大澤圭子, 永田晃一, 高坂新一 :

ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)の神経栄養作用

第68回日本生理学会大会, 京都, 3.28, 1991

C. 班会議発表

- 1) 高坂新一 :

中枢ニューロンの生存維持因子

文部省重点領域研究・神経回路形成の分子機構・平成2年度班会議, 東京, 11.17, 1990

- 2) 高坂新一 :

神経細胞の生存維持因子に関する分子生物学的研究

文部省総合研究(B)・神経難病における神経細胞死の機序と修復・防御班会議, 東京, 12.19, 1990

- 3) 高坂新一, 中嶋一行 :

中枢神経系の機能修復におけるミクログリアの役割に関する基礎的研究

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2年度班会議, 東京, 1.9, 1991

- 4) 高坂新一, 武井延之 :

牛脳由来神経細胞生存維持因子の同定

ヒューマンサイエンス振興財団官民共同プロジェクト第1分野第1テーマ・平成2年度研究成果発表会, 東京, 1.18, 1991

- 5) 高坂新一，内田耕一，戸谷重雄，永津俊治：

チロシン水酸化酵素遺伝子導入細胞の脳内移植

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2年度班会議，
東京，1.19，1991

- 6) 中嶋一行，高坂新一：

ミクログリア由来分泌性プロテアーゼ

ヒューマンサイエンス振興財団官民共同プロジェクト第3分野第4テーマ・平成2年度研究成果
発表会，東京，2.7，1991

- 7) 北本昭彦，下条雅人，高坂新一：

神経系細胞の不死化に関する基礎的研究

科学技術振興調整費省際基礎研究「分化神経細胞の不死化技術の開発研究」研究発表会，東京，
3.1，1991

3. 主な研究報告

ミクログリア分泌性プロテアーゼについて

中嶋一行, 下条雅人, 濱之上誠, 石浦章一, 杉田秀夫, 高坂新一

培養ミクログリアはIL-1, IL-6, TNFなどのサイトカイン類や、NGF等を分泌することから、in vivoにおいてニューロンの生育やグリアの増殖調節に働くことが示唆されている。我々はニューロンの生育に対するミクログリアの分泌性生理活性物質に注目し探索を進めてきたが、その過程でミクログリアの培養上清中にプロテアーゼ活性を検出した。本年度はその分泌性プロテアーゼの性質について検討した結果を報告する。

方法

ミクログリアは既報¹⁾の如く、ラット大脳の初代培養系により分離した。ミクログリアの培養上清(Mic-CM)は無血清のDMEDを用いて1-2日間培養し、アミコンの限外濾過装置により濃縮して使用した。プロテアーゼは基質としてMBPを使用し、その分解はSDS-PAGEおよびデンストメーターにより定量化した²⁾。

結果及び考察

Mic-CMは比較的強い蛋白分解活性を含んでおり、カゼイン、ヒストン、フィブロネクチンなど分解したが、特にMBPは効率よく分解された(図1)。

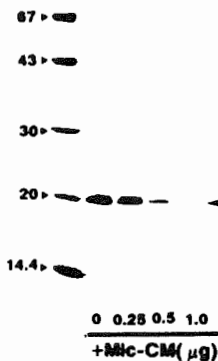


図1. Mic-CMのMBP分解活性

至適pHを検討するとMic-CMでは7.5付近であるのに対し細胞ホモジネートでは5付近を示し、細胞外へ特定のプロテアーゼが分泌されるものと推測された。そのプロテアーゼを同定するために各種インヒビターによる阻害効果を検討したが、その結果エラスターゼやOMeSuc-AAPV-CH₂Clが強い阻害効果を示したことからMic-CM中にエラスターゼの存在が示唆された。Mic-CMをsuperoseによりゲル濾過を行うと分子量2~3万の位置にエラスターゼと考えられる活性が検出された(図2)。エラスターゼ抗血清を使用したウェスタンブロットを行うと、この画分に1本のバンド(分子量2.5万)が検出された(図3)。以上の結果よりミクログリア培養上清に検出されるプロテアーゼとしてエラスターゼまたはエラスターゼ様プロテアーゼの存在が明らかになった。この酵素の生理的意義は不明であるが、傷害、炎症時におけるスカベンジャーとして機能するだけでなく、正常時の細胞外タンパク代謝に関わっている可能性も考えられ興味深い。

文献

- 1) Nakajima, K. et al.: Biomed. Res. 10 (S3): 411-423, 1989
- 2) 中嶋一行, 他: 神経化学 29: 96-97, 1990

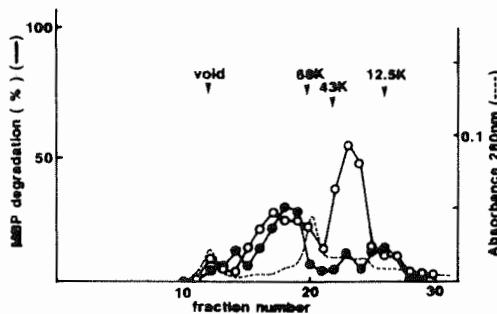


図2. Mic-CMのゲル濾過
○-○: 各画分のMBP分解活性
●-●: インヒビター存在下のMBP分解活性

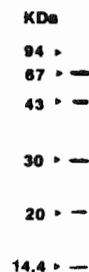


図3. エラセターゼのウェスタンブロット

ニューロン特異的エノラーゼの神経栄養作用に関する研究

武井延之, 大澤圭子, 高坂新一

脳抽出液中には数多くの神経栄養因子が含まれていると考えられているが、我々はその中の一つのものがニューロン特異的エノラーゼ (NSE) と相同であることを見いだしてきた。エノラーゼは解糖系の酵素であり、 α , β , γ の3種のサブユニットの組み合わせからなる2量体で、5種類のアイソザイムが存在する。NSE ($\gamma\gamma$ タイプ) はこのうちニューロンに特異的に存在するもので、その特異性や発生過程における発現様式 (ニューロンの分化・成熟やシナプス形成の伴って増加する) から何らかの (酵素活性以外の) 役割があるのではないかと考えられていた。本年度はNSEの神経栄養作用についてさらに詳細な検討を加えた。

方法

神経栄養活性の検定にラット胎児の中脳ニューロンの初代培養系を用いた。大脳皮質については昨年度年報の通り、また中脳ニューロンに関しては胎生16日胚ラット中脳の腹側部を切り出し、分散して培養した。精製ラットNSE及び抗NSEモノクローナル抗体は愛知県コロニーの加藤兼房先生より供与されたものを用いた。

結果及び考察

初代培養ニューロンに対する生存維持作用がNSEそのものによるもので、市販品のコンタ

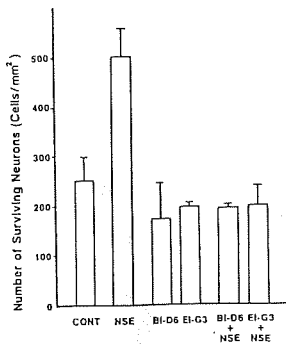


Fig.1. Inhibition of Neurotrophic activity of NSE with anti-NSE monoclonal antibody (BI-D6, EI-G3).

ミではないことを確認するため、加藤らによって精製されたNSE及び抗NSEモノクローナル抗体を用い大脳皮質ニューロンに対する生存維持作用を調べた。NSEは用量依存性に生存維持作用を示し、ED₅₀値はおよそ2 ng/mlであった。さらにNSEに対するモノクローナル抗体はNSEの神経栄養活性を完全に抑制した (Fig.1)。次にNSEの酵素産物であるホスホグリセレートとホスホエノールパイルベイトを培地に添加してニューロンの生存を調べた。どちらを添加した場合にも (1 mM~10 μ M) ニューロンの生存には全く影響がなかった。このことからNSEが培地中で酵素として働き培地の組成を変えて作用しているのではなく、直接的にニューロンに作用しているということが推測される。

次に他のニューロンに対する作用を調べる目的で中脳ニューロンの初代培養系にNSEを添加した。NSEは中脳のニューロンに対しても用量依存性に生存維持活性を示した (Fig.2)。

以上のことからNSEはラット中脳ニューロンに対し生存維持作用をもち、その作用はニューロンに対し直接的なものであるということが示唆された。またNSEはある特定のニューロンというよりは、中脳ニューロン一般に作用する可能性が高いと考えられる。このことは脳内におけるNSEの分布 (すべての部位に存在する) とよく合った結果であるといえよう。

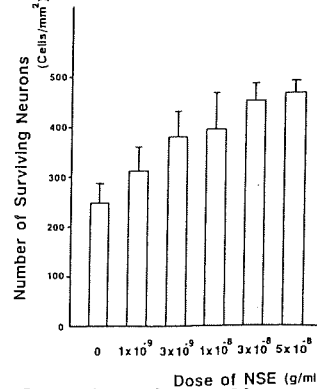


Fig. 2. Dose dependent effect of NSE on cultured mesencephalic neurons.

培養アストログリアにおける $\alpha 2$ マクログロブリンの産生

齋藤茂治, 飯島 昇, 池田正明, 高坂新一

我々は、アストログリアの培養上清中に、中枢ニューロンの神経突起の伸展を促進する活性があり、その一部をになう蛋白が $\alpha 2$ -マクログロブリン($\alpha 2 M$)であることを既に報告した¹⁾。但し、抗体の特異度に限界があり類似蛋白を認識する危険性や、培養上清の調製前に添加した牛胎児血清から $\alpha 2 M$ を持込んだ可能性があった。そこで、培養アストログリアでの $\alpha 2 M$ の産生につき、PCRを利用し、mRNAレベルで確認を試みた。

<方法>

ノザン・ブロッティングの際に、遺伝子ファミリーに属し、サイズの等しい $\alpha 1$ インヒター-3($\alpha 1 I 3$)との鑑別を要し、以下の方法をとった。常法により培養したアストログリアの全RNAと正常および炎症下の肝臓の全RNAから、cDNAを逆転写し、次に、 $\alpha 2 M$ 、 $\alpha 1 I 3$ 共に共通の塩基配列のプライマーを用いPCRで増幅した。 $\alpha 2 M$ から570bp、 $\alpha 1 I 3$ から593bpの産物が期待された。さらに、 $\alpha 2 M$ のみに制限酵素部位を持つPvuIIにより、 $\alpha 2 M$ 由来の産物は312bpに断片化し、各々に特異的な30bpのプロープでサザン・ブロッティングを行った。

さらに、アストログリアの他にニューロン、ミクログリア、髄膜のファイブロブラストを培養し、全RNAを回収し、ノザン・ブロッティングを行った。プロープは絆らのクローニングした $\alpha 2 M$ cDNAクローンHG193からEcoRIで切り出したコーディング部分2.6kbを用いた。コントロールとして、テルペン油を投与し $\alpha 2 M$ 産生を促された肝臓RNAを用いた。

<結果・考察>

図1の如くPCR産物のサザン・ブロッティングで、 $\alpha 1 I 3$ プロープに結合するのは、肝臓からの産物だけであった。 $\alpha 2 M$ プロープに結合する570bpとPvuII処理後の312bpの産物は肝臓、アストログリアともに認められた。このことからアストログリアでは $\alpha 2 M$ は産生されているが、 $\alpha 1 I 3$ はほとんど作られていないと考えられた。

次に、各細胞のノザン・プロットでは、ニュー

ロン、ミクログリア、ファイブロブラストでは明かなバンドを認めず(図2)、 $\alpha 2 M$ mRNAは主にアストロサイトで産生されると考えられた。

<文献>

- (1)Mori T. et al., Brain Res. 527, 55-61, 1990

図1. 同時増幅されたPCR産物

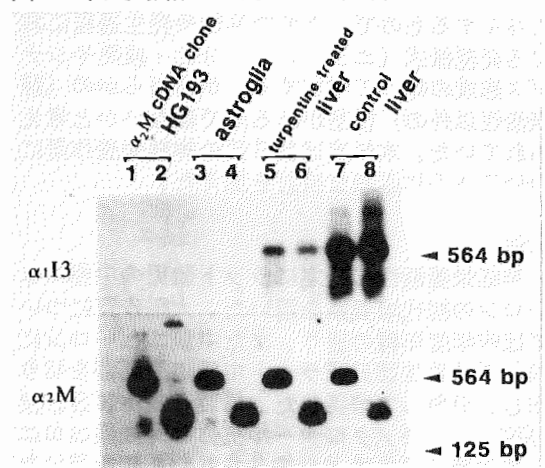
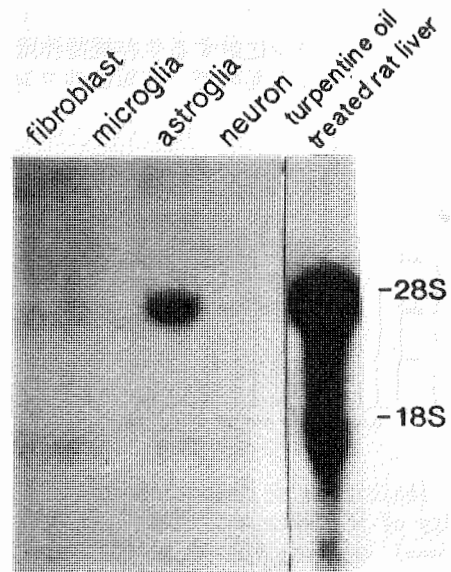


図2. 各種培養細胞での $\alpha 2 M$ mRNAの発現



1.2. 免疫研究部

1. 研究部一年のあゆみ

免疫研究部では、これまで古川昭栄室長らによる神経生化学的な研究と、渡辺里仁室長らによるウィルス学的な研究が行なわれてきた。平成2年4月1日付けで山元 弘（前高知医科大学助教授）が部長として着任し、新たに免疫生物学研究グループが発足した。(1) 免疫生物学グループには5月より葛原博幸（6月から流動研究員）、6月から松浦靖（流動研究員）と田村浩男（研究生）の3名が高知医科大学から参加し、免疫担当系細胞間相互作用を支配する分子の検索とその免疫学的意義の解析を中心テーマに研究を開始した。特に、イディオタイプ特異的リンパ球の活性化機序の研究、および、胸腺間質-Tリンパ球間相互作用分子の同定を行なっている。(2) 神経生化学グループには、古川室長以下、橋本吉秀（三井製薬）、橋本裕子（外来研究員）、石川リカ（キリンビール）が昨年度に引き続き参加し、これまでの研究を更に発展させることができた。一過性脳虚血モデルでの脳内神経成長因子レベルの測定や、繊維芽細胞成長因子の脳内マッピングの研究に新たな知見を加えることができた。本研究はヒューマンサイエンス官民共同研究にも含まれる。(3) ウィルス学グループには、渡辺室長以下、高瀬明（エイズ予防財団、科学技術庁特別研究員）、北嶋しげみ（賃金研究員）、10月から田口正敏（エイズ予防財団）が参加した。フレンド白血病ウィルスを用いたラット免疫不全症モデルの作出に続き、ウィルスの分子生物学的研究に新たな知見が得られた。

本年度は部長の着任をはじめ、人事の面で大きな異動があった。古川室長は10月1日付けで岐阜薬科大学助教授に転出し、2月末をもって神経生化学グループの諸氏も岐阜薬科大学に移った。また、渡辺室長は平成3年4月1日付けで創価大学生命科学研究所教授に転任する予定で、それに伴ってウィルス学グループの諸氏も異動した。これまで長年免疫研究部を支えてきた両氏の御栄転は非常に喜ばしいことであり、更なる発展を祈るものである。一方後任の室長も人選が終り、免疫生物学を基礎にした新しいチームによって、免疫系のみならず神経系細胞間の生理的相互作用の解析をも目指している。

（部長 山元 弘）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Bitoh S, Fujimoto S, Yamamoto H :
Evidence for idiotypic - and anti-idiotypic B-B cellular interaction with the use of cloned anti-idiotypic B cell line.
J Immunol 144 : 2046-2052, 1990
- 2) Sovenyi J F Yamamoto H, Fujimoto S, Kusuda R :
Lymphomyeoid cells, susceptibility to erythrodermatitis of carp and bacterial antigens.
Comp Develop Immunol 14 : 185-200, 1990
- 3) Taniguchi T, Takahashi S, Yamamoto H, Fujimoto S, Okayama H :
Requirement of down-regulation of NAD⁺ADP-ribosyltransferase for the IFN- γ -induced activation process of murine macrophage tumor.
Eur J Biochem 195 : 557-562 1991
- 4) Tomoda T, Kurashige T, Yamamoto H, Fujimoto S, Taniguchi T :
Fluctuation of gene expression for poly(ADP-ribose) synthetase during hemin-induced erythroid differentiation of human leukemia K562 cells and its reversion process.
Biochim Biophys Acta 1088 : 359-364, 1991
- 5) Furukawa Y, Fukazawa N, Miyama Y, Hayashi K, Furukawa S :
Stimulation of 4-alkylcatechol and their diacetylated derivatives on the synthesis of nerve growth factor.
Biochem Pharmacol 40 : 2337-2342, 1990
- 6) Shigeno T, Yamasaki Y, Kato G, Kusaka K, Mima T, Takakura K, Graham D, Furukawa S :
Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis.
Neurosci Lett 120 : 117-119, 1990
- 7) Matsui K, Furukawa S, Shibasaki H, Kikuchi T :
Reduction of nerve growth factor level in the brain of genetically ataxic mice (weaver, reeler).
FEBS Lett 276 : 78-80, 1990

- 8) Murase K, Takeuchi R, Furukawa S, Furukawa Y, Hayashi K :
Highly sensitive enzyme immunoassay for beta-nerve growth factor (NGF) : A tool for measurement of NGF level in rat serum.
Biochem Int 22 : 807-813, 1990
- 9) Kamo I, Kikuchi A, Ishii H, Matsuoka T, Furukawa S, Ishiura S :
Establishment of myoid cells from bone marrow.
Cell Biol Int Rep 14 : 595-600, 1990
- 10) Ishikawa R, Nishikori K, Furukawa S :
A sensitive enzyme immunoassay for acidic fibroblast growth factor and developmental change in rat brain.
J Neurochem 56 : 836-841, 1991
- 11) Takase-Yoden S, Kikuchi T, Siddell S.G, Taguchi F :
Localization of major neutralizing epitopes on the S1 polypeptide of the murine coronavirus peplomer glycoprotein.
Virus Research 18 : 99-108, 1990

b. 著 書

- 1) 古川美子, 古川昭栄, 林恭三 :
神経成長因子
現代化学, 増刊18 (大沢利昭編), 東京化学同人, 169-182, 1990
- 2) 古川昭栄, 古川美子 :
神経成長因子の合成制御機構とその神経機能修復への応用
老年期痴呆-神経組織障害の修復-, 宮武正編, 科学評論社, pp62-79, 1990

c. 総 説

- 1) 山元 弘 :
イエルネ (Jerne) のネットワーク説
病理学キーワード, 臨床と病理臨時増刊号, 文光堂, 9 : 72, 1991
- 2) Furukawa S, Furukawa Y :
Nerve growth factor synthesis and its regulatory mechanisms : An approach to therapeutic induction of nerve growth factor synthesis.
Cerebrovasc Brain Metabol Rev 2 : 328-344, 1990

II 研究業績

3) 古川昭栄, 古川美子, 林恭三:

神経成長因子とアストロサイト

神経研究の進歩, 34: 526-538, 1990

4) 西尾健資, 古川昭栄:

大脳コリン系とNGF

Dementia 4: 209-219, 1990

5) 茂野卓, 美馬達夫, 高倉公朋, Graham D.I., 加藤軍四郎, 橋本吉秀, 古川昭栄:

遅発性神経細胞壊死と nerve growth factor

Dementia 4: 241-245, 1990

d. 班会議報告書

B. 学会発表

a. シンポジウム

1) 山元 弘:

Evidence for novel cellular interaction among B lymphocytes: Anti-idiotypic mouse B lymphocyte clone stimulates idiotypic antibody production.

第32回日本熱帯医学会総会サテライトシンポジウム "Idiotype Network Theory and Practice",
横浜, 11.7, 1990

b. 国際学会

1) Maeda N, Hamasato S, Miyazawa H, Takata M, Yamamoto H, Fujimoto S:

Activation of human cytotoxic T lymphocytes (CTL) against autologous tumor by a factor released from human monocyte cell line for CTL therapy of cancer.

第15回国際癌学会議, Hamburg, Aug 1990

2) Fujimoto S, Kataoka S, Suzuki C, Bitoh S, Takata M, Maeda N, Yamamoto H, Araki K, Hamasato S:

T cell response to syngeneic tumor and UBENIMEX.

第15回国際癌学会議, Hamburg, Aug 1990

3) Hamasato S, Sonobe Y, Ohtsuki Y, Miyazawa H, Kuzuhara H, Araki K, Maeda N, Fujimoto S:

Development of human anti-tumor cytotoxic T lymphocytes therapy. I. Analysis of infil-

trating lymphocytes in regressing tumor tissues by the CTL therapy in the human.

第15回国際癌学会議, Hamburg, Aug 1990

- 4) Araki K, Noguchi Y, Yoshikawa E, Miyazawa H, Maeda N, Hamasato S, Kuzuhara H, Fujimoto S :

Development of human anti-tumor cytotoxic T lymphocytes therapy. II. Efficacy of CTL induced by crossreactive allogeneic tumor cells on tumor regression in the human.

第15回国際癌学会議, Hamburg, Aug 1990

c. 一般学会

- 1) 田村浩男, 葛原博幸, 平峯千春, 北条憲二, 藤本重義, 山元 弘 :

ヌードマウス由来T細胞クローンの胸腺ストローマ細胞上での増殖

第20回日本免疫学会総会, 東京, 11.28, 1990

- 2) 尾前二三雄, 伊原待恵, 古川美子, 林恭三, 古川昭栄 :

NGF合成調節の細胞内作用機構

第63回日本生化学会, 大阪, 9.12, 1990

- 3) 篠田一三, 古川美子, 林恭三, 尾前二三雄, 古川昭栄 :

アストログリア細胞のNGF合成に及ぼす細胞成長因子の効果

第63回日本生化学会, 大阪, 9.13, 1990

- 4) 根本清光, 田代文夫, 幅野渉, 平野直光, 古川昭栄, 尾前二三雄, 口野嘉幸, 白木和子, 上野芳夫 :

v-src 遺伝子により形質転換したラット繊維芽細胞からの神経分化因子の産生

第63回日本生化学会, 大阪, 9.13, 1990

- 5) 橋本吉秀, 川面博, 志賀義男, 古川昭栄, 茂野卓 :

スナネズミ一過性脳虚血モデルにおける脳内NGFレベルの変動

第63回日本生化学会, 大阪, 9.13, 1990

- 6) 石川リカ, 錦織浩治, 古川昭栄 :

ラット脳内aFGFの分布と脳の発達にともなう変化

第63回日本生化学会, 大阪, 9.12, 1990

- 7) 石川リカ, 錦織浩治, 古川昭栄 :

脳損傷に伴うaFGFおよびNGFレベルの変動

第33回日本神経化学会, 広島, 10.26, 1990

- 8) 茂野卓, 美馬達夫, 高倉公朋, 古川昭栄, 橋本吉秀, 加藤軍四郎 :

II 研究業績

海馬遅発性神経細胞死とNGF：NGFはいつ必要とされるか

第31回神経学会総会，横浜，5.24，1990

9) 高瀬 明，渡辺里仁：

マウス白血病ウィルスの増殖と染色体外ウィルスDNAの蓄積について

第38回日本ウィルス学会総会，東京，11.12，1990

10) 渡辺里仁，高瀬 明，田口文広：

異種ウィルス遺伝子断片によるレトロウィルスの病原性の修飾

第13回日本分子生物学会年会，京都，11.26，1990

11) 高瀬 明，渡辺里仁：

マウス白血病ウィルス感染ラット神経膠細胞における多核巨細胞形成について

第13回日本分子生物学会年会，京都，11.26，1990

c. 班会議発表

1) 山元 弘：

マウス自己反応性B細胞クローンの長期培養

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班会議，東京，1.24，1991

2) 山元 弘：

ヒトキラーT細胞活性化因子の単離とその応用

厚生省厚生科学研究費・対がん戦略事業平成2年度研究発表会，東京，2.27，1991

3) 古川昭栄，橋本吉秀，川面博，志賀義男，茂野卓：

スナネズミ一過性脳虚血モデルにおける脳内NGFレベルの変化

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，東京，12.20，1990

4) 古川昭栄，替地恭介，池上亮介，古川美子：

NGF合成誘導による末梢神経の再生促進

厚生省精神・神経疾患・中枢神経系の機能修復に関する開発的研究班，東京，1.9，1991

5) 古川昭栄，松井京子，柴崎 浩，菊池建機：

脳発達過程におけるリーラー，およびAra C惹起小脳変性マウスの脳内NGFレベルの変動

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，東京，1.19，

1991

6) 春原経彦，古川昭栄，里吉栄二郎：

培養神経細胞に及ぼす自己免疫筋抗原の作用の検討

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，東京，3.2，1991

- 7) 古川昭栄，古川美子，尾前二三雄，篠田一三，林恭三：

サイトカインによるNGF合成調節

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，東京，2.7，1991

- 8) 古川昭栄，古川美子，村上豊，篠田一三，林恭三：

NGF合成刺激因子-生体内分布と精製の試み-

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，東京，1.18，1991

- 9) 古川昭栄，橋本吉秀，古川美子，林恭三：

低分子化合物の末梢投与によるラット脳内神経成長因子（NGF）の合成誘導

長寿科学総合研究老年病分野痴呆関係班班会議，東京，3.2，1991

3. 主な研究報告

イディオタイプ特異的増強性B細胞の抗体重鎖遺伝子解析

松浦 靖, 山元 弘

免疫系は、様々な機能を有した、胸腺に由来するリンパ球の1群(T細胞)と、T細胞の調節を受けつつ抗体分子を産生するB細胞とによって構成されている。われわれは、抗体産生の調節機構を解析してきた過程で、抗体産生をそのイディオタイプ(Id)特異的に増強する細胞活性を見出し、その細胞学的、免疫遺伝学的機能を検索してきた。その結果、抗体産生を Id 特異的に増強する細胞は、いわゆるヘルパーT細胞ではなくて、B細胞によっていることを明らかにし、これまで知られてきた抗体産生能以外に、B細胞が新たな機能を有することを見出した。この Id 特異的増強性B細胞活性は、抗体産生(CRI産生)B細胞との間の協同作用に主要組織適合性抗原(MHC)の一致を必要とし、その拘束性はクラスII分子によるものであった。また Id 特異的増強性B細胞活性が誘導されるためには、その個体が M104E CRI 産生能を有しておらねばならないことを明らかにした。四親性キメラマウスを用いた研究により、MHCによる拘束性が、宿主環境によって適応的に分化する(後天的な選択過程を経る)のに比し、免疫グロブリン重鎖遺伝子(Igh)による拘束性は、四親性キメラマウスにおいても適応的な分化を起こさず、あくまでも供与骨髄細胞由来個体の免疫グロブリン遺伝子型に依存していることがわかった。T細胞抗原受容体のMHC拘束性が後天的な適応分化過程を経ることが知られており、B細胞のMHC拘束性も同様の機序が推定される。しかるに一方、B細胞のIgh拘束性は、免疫グロブリン自体の構造遺伝子によるものであり、適応的な分化を受けける程には選択されるだけのレパトリーを保持していないであろう。CRI産生能と増強性B細胞活性誘導能とが密に連関することより、Igh拘束性の遺伝子レベルでの機序には次の可能性が考えられる。

① Id 特異的増強性B細胞が用いる免疫グロブリン重鎖遺伝子は、対応するCRI遺伝子と密接に関連した遺伝子座に存在し、同じ調節を受けながら挙動する、②両者は同一

のVH遺伝子を用いつつ、異なったDもしくはJ断片と遺伝子再構成をしている、③同一のV-D-J遺伝子構成をもちながら、異なった軽鎖を利用したためId、抗Idの関係になっている。Igh拘束性の3つの可能性を検索するためには、増強活性を有したB細胞クロンを得なければならぬ。われわれは以前、B細胞長期培養法を確立しているため、この方法を駆使してB細胞のクロン化を行ない、増強活性を有した株を得、これから抗体重鎖遺伝子をクローニングして、その遺伝子構造を解析した。結果、両者の塩基配列を比較すると、互いに異なったD-J遺伝子断片を用いてはいるが、leader peptide領域、VH遺伝子領域は極めて類似性が高く、DNAレベルで91%、アミノ酸レベルで89%の類似性を示した。BALB/cマウスのJ558 germ line gene subfamilyと文献的に比較しても、他subfamilyとの類似性がたかだか70-80%ぐらいいとどまっておらず、下段HB19は今回得たクロン化B細胞の、MOPC104Eは抗原とした骨髄腫の抗体重鎖の、その他は文献的に調べたBALB/c germ line V遺伝子のそれぞれアミノ酸配列)、両者は極めて密に関連したgerm line遺伝子由来の抗体遺伝子であると考えられる。従って、われわれが当初仮定した3つの可能性のうち、1番目の可能性が最も高いと考えられた。現在、より多くのB細胞クロンの樹立を試み、またIdに特異的なT細胞のレパトリー形成についても、ここでクローニングした遺伝子の導入細胞を樹立し、更なる解析を目指している。

	FRM1	CDR1	FRM2	CDR2	FRM3
	10	20	30	40	50
H 30	QVQLQSGAELVYKFGASVKMSCKASGYYFFSYTHM	VYKQRP6QGLENIQY	IMPSSGTYNYNQFKDK	KATLTAOKSSS	STATYMQLSSTLSEDSAVYYCAR
H 13-3	-----A---ARP-----	-----M---E-----	-----E-D-DS-----	-----G---V-----	-----H-----T-----
VH 124	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 39d	-----P---S---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 15c-1	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 80a-1	-----A---P---RP---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
NBR eq 33	-----P---K---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
pCh 105	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 8	-----P---P---R-I-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 9	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 13-1	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 17	-----D---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 15c-2	-----D---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
NVAR 2/10	-----RP---T---V-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
VH 104B	-----P---SV---RP---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 80a-2	-----RP---T---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 16	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
pCh 108A	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 26-6	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 18	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 10	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 4a-3	-----RP---L---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
H 2b-3	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----
HB19-1	EI---T---P---L-----	S---D---I---F-----	SH---KS-----	D---M---G---S-----	G---V---F---N-----
MOPC104E	-----P---P---L-----	-----W---E-----	-----M-Y-G-S-DE-S	-----G---G---V-T-----	-----H-----T-----

胸腺間質細胞に依存して増殖応答を示す T 細胞の特性

田村浩男, 葛原博幸, 山元 弘

免疫系は抗原受容体やサイトカインおよびその受容体を介した多様な細胞集団が織りなすネットワークから形成されている。特にリンパ球の成熟・分化あるいはその機能発現の過程では、他の細胞との直接的な接触が必要であり、機能的接触を支配する分子群についても、近年種々の知見が蓄積されはじめている。T 細胞は、胎児肝や骨髄を起源とする前駆細胞が一旦胸腺に流入し、そこで機能的分化を果たすとともに、自己に対する反応性をもったクロンを除去する、いわゆる negative selection の過程を経て成熟し、末梢組織に到達する。したがって、T 細胞の胸腺内での成熟分化機構を *in vitro* で明らかにすることは、T 細胞レパトリー形成の細胞学的機序を検索するうえで極めて重要である。ヌードマウスは先天的に胸腺を欠損しているものの、末梢には極く少数の T 細胞系リンパ球が存在しており、これらは未だ胸腺の影響を受けていない細胞群であると考えられる。われわれは、ヌードマウス脾臓から得たリンパ球が胸腺間質細胞と接触することによって新たな機能的変化が認められるか否かについて検討した。

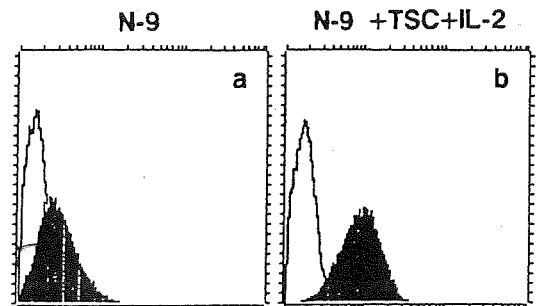
方法

ヌードマウス (BALB/c nu/nu) 脾細胞を T 細胞増殖因子 (TCGF, コンカナバリン刺激脾細胞培養上清) を用いて長期培養・クロン化し、いくつかの T 細胞株を得た。胸腺間質細胞は平峯らの方法により調製した。

結果と考察

ヌードマウス由来クロン化 T 細胞 3 種 (N-4、N-9、N-24)、および対照としたクロン (KA10-5、MOPC104E ミエローマ特異的キラー T 細胞クロン) について胸腺間質細胞と共に 24 時間培養したところ、N-9 のみが増殖応答を示した。それぞれの細胞は、flowcytometry および northern blotting 法によって、N-4 (CD3⁻4⁻8⁺、TCR $\alpha\beta$)、N-9 (CD3⁺4⁺8⁺、TCR $\gamma\delta$)、N-24 (CD3⁺4⁻8⁻、TCR $\gamma\delta$)、KA10-5 (CD3⁺4⁻8⁺、TCR $\alpha\beta$) であることを確認した。N-9 は TCGF には応答し増殖するものの、種々のサイトカイン (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7、IFN- γ) 単独ではなら増殖しなかったが、胸腺間質細胞存在下に微量の IL-2 を加えた時のみ強い増殖を示し、かつ IL-2 受容体発現量も増大した。胸腺間質細胞が産生する可溶性増殖因子の効果を検討するため、胸腺

間質細胞と N-9 クロンを 0.45 μ m のフィルターで隔離した状態で IL-2 存在下に培養したが、N-9 は増殖しなかった。従って胸腺間質細胞と N-9 との間には直接的な細胞間接触が必要であることがわかった。胸腺間質細胞の増殖促進効果は、腹腔浸出細胞、脾臓細胞、繊維芽細胞では代用できないことから、胸腺間質細胞に特徴的な機能であることがわかった。またこの効果は、① H-2 congenic マウス由来胸腺間質細胞でも再現できること、② CD3 発現能を無くしてしまった N-9 細胞でも応答すること、③ N-9 の亜株 N-9.23 は CD2 を発現していないにもかかわらず応答性を保持していること、④ 胸腺間質細胞培養上清は N-9 の増殖になんら効果を発揮しないこと等を考え合わせると、胸腺間質細胞と N-9 T 細胞の間には、MHC 分子、T 細胞抗原受容体分子、CD2/LFA3 (CD58) 分子等以外の細胞間相互作用分子が介在している可能性が強く示唆された。現在、N-9 や胸腺間質細胞をマウスやハムスターに免疫し、相互作用分子に対する抗体の作成を進めている。



N-9 T 細胞 interleukin-2 受容体発現の胸腺間質細胞による増強 (flowcytometry 法による)

N-9 : ヌードマウス脾臓由来 T 細胞株

TSC : 胸腺間質細胞

IL-2 : recombinant human interleukin-2

(open: control, closed: experimental)

縦軸: IL-2 受容体発現量 (by MoAb: 7D4)

横軸: 蛍光強度

aFGF (acidic fibroblast growth factor) の脳内分布と脳損傷に伴う変化

石川リカ, 古川昭栄

酸性繊維芽細胞成長因子(aFGF, acidic fibroblast growth factor)は本来中胚葉由来細胞に増殖刺激活性を持つ因子として分離されたもので、神経組織に多く分布し、近年培養系における中枢神経細胞の生存維持活性が報告されている。しかしその脳内での機能や役割については全く未知である。そこでaFGFの脳内での生理作用を検討するためにaFGFに特異的な高感度酵素免疫測定法(EIA)を確立し、これを用いて脳発達過程のラット脳内aFGFの分布を調べ、また損傷後の神経機能修復への関与という観点から、脳損傷後のaFGFの動態についても調べ、NGFの場合と比較した。その結果、aFGFの脳内分布、脳損傷後の分泌時間がNGFの場合とは全く異なることが明らかになり、発達過程や損傷後の修復機能においてNGFとは異なる生理作用をもつことが推定された。

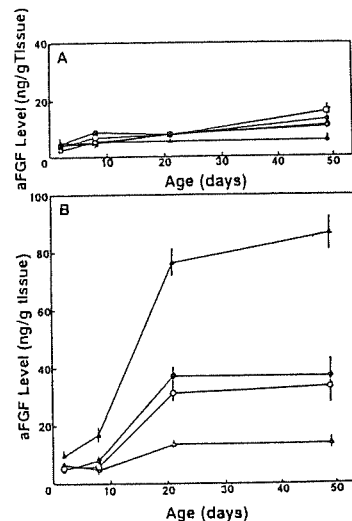
方法. aFGFはウシ脳より精製し、リビアジュバントと共にラットに免疫し、抗血清を得た。EIAは、特異性を高めるためにサンドイッチ法を組み立てた。抗ウシaFGF抗体を固相化したマイクロプレート上で標準ウシaFGFあるいは測定試料液を反応させ、ついでビオチン化抗aFGF抗体と反応させた。結合抗体量をストレプトアビジン-β-ガラクトシダーゼと蛍光基質によって、蛍光強度として測定し、標準ウシaFGFから得られた蛍光強度をもとに試料中のaFGF濃度を求めた。ラットの脳組織および、脳損傷(大脳皮質部分の吸引除去)部位への浸出液は2% BSA、1 M NaCl、2mM EDTA、80U/l aprotininを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液、pH7.6で抽出後、EIAにて定量した。

結果と考察. 組み立てたEIA系において、aFGFは0.2ng/mlより検出され、bFGFはまったく反応性を示さなかった。また、脳内に存在する可能性のある種々の成長因子類とも交差反応性をしめさず、ラット脳の抽出液中の免疫反応活性の分子量はウシaFGFと同じ約18Kであり、その希釈曲線はウシaFGFのそれと一致した。

このaFGFに特異的なEIA系を用いて発達過程のラット脳内aFGFレベルを測定した結果、2日齢では全ての部位でaFGFレベルは低いが、21日齢にかけて特に橋/延髄および間脳、中脳において著しくレベルが上昇し、49日齢でもその高いレベルは維持されていた(図B)。その他の部位では加齢にともない上昇が認められるもの

の低レベルにとどまった(図)。生後3週までのこの時期は生後の神経細胞の分化やグリア細胞の増殖が著しい時期と一致し、NGFの合成が盛んになる時期でもあることから、aFGFが発達過程および成熟後の脳内のこれらの部位で何らかの生理作用を担っていることが示唆された。

一方大脳皮質の一部除去による損傷後に、除去空隙において、NGFは極めて初期(4時間後)から検出されるのに対して、aFGFはこれに遅れてNGFレベルが漸減しつつある時期(10-30日後)に増加し、これらの動態は対照的であった。aFGFは、上記のように脳内においてNGFとは異なる部位特異的な分布を示すものの、明確なシグナルペプチドがないためにその分泌機構についてはまだ不明であり、損傷後の緩やかなレベル上昇は、アストログリア細胞の増殖よりずっと遅れており、細胞死によるのかもかもしれない。NGFとaFGFは応答神経細胞が異なりその脳内分布も異なること、生成過程も異なること(分泌、非分泌型)と損傷後の分泌のタイムコースが違うことを考えあわせると、これらの因子が異なった機構で損傷後の修復過程に寄与していることが示唆された。



Developmental changes in aFGF level in various regions of rat brain. A: Telencephalic areas including olfactory bulb (○), frontal cortex (●), piriform cortex (△), hippocampus (▲), and striatum (□). B: Diencephalon (●), mesencephalon (○), and metencephalic areas including cerebellum (△) and pons-medulla (▲).

スナネズミ一過性前脳虚血モデルにおける脳内 NGF レベル変動

橋本吉秀, 古川昭栄

スナネズミやラットにおいて、短時間の一過性前脳虚血により海馬CA1錐体細胞が、遅発的、選択的に消失してゆくことが知られており、遅延性神経細胞壊死と呼ばれている。最近、スナネズミ前脳虚血モデルにおいて、虚血前後に外来性NGFを脳室内投与すると神経細胞死が防止されること、また、ラット前脳虚血モデルにおいて、海馬の内在性NGFを増加せしめた時期に虚血負荷すると、神経細胞死が防止されること等、神経細胞死に対するNGFの防護効果に関する報告が増加している。しかしながらこれまで、虚血前後の脳内NGFレベルの動態については明らかにされていなかった。今回我々は、脳虚血損傷と内在性NGFとの関係を明らかにする目的で、スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用い、虚血後1週間にわたり脳内NGFレベルを酵素免疫測定法(EIA)により測定した。

方法。桐野らの方法に従い、雄性スナネズミの両側頸動脈を5分間閉塞した後、血流を再開通し一過性前脳虚血モデルを作成した。血流再開後、経日的に脳を摘出し各部位(嗅球、前頭葉皮質、中隔、海馬、線条体、中脳、小脳)に分離、凍結保存した。凍結した脳組織を昨年報告した抗マウスNGF抗体を用いるサンドイッチEIA法により測定した。

結果と考察。本EIA系における希釈試験の結果より、スナネズミNGFは、マウスNGFおよびラットNGFとほぼ同等の免疫交差性を示した。スナネズミ脳内のNGF分布は、嗅球において最高レベルを示し、ついで、海馬、中隔、大脳皮質等で高レベルであった。5分間虚血負荷後2日および7日目の脳各部のNGFレベルは、海馬において有意な低下が認められ、その他の部位(嗅球、前頭葉皮質、中隔、線条体、中脳、小脳)では、有意な変化は認められなかった。5分間虚血負荷後の海馬のNGFレベルを詳細に検討すると、虚血後1日目では変化が認められず、2日目から有意な低下が認められ、3日目に最低となり、7日目にはやや回復する傾向が認められた。5分間虚血負荷群において、海馬をCA1を主に含む背側部と、CA3、歯状回を主に含む腹側部に二分し、それぞれNGFレベルを測定すると、神経細胞死の認められる背側部においてはレベル低下が認められず、神経細胞死の認められない腹側部において有意な一過性のレベ

ル低下が認められた(図)。虚血早期に生ずる細胞障害因子として、現在、グルタミン酸による細胞興奮性刺激とそれに続く細胞内へのCaイオン流入が考えられているが、細胞障害から壊死にいたる過程が、CA1領域に特異的かつ遅延性であることについては明確ではない。今回、スナネズミに、5分間の虚血負荷を加えたところ、海馬において特異的な、遅延性の一過性NGFレベル低下が観察され、その経日変化は、CA1錐体細胞の消失時間によく対応していた。虚血時に、外的、内的に海馬NGFレベルを高めておくことにより、神経細胞死が保護されるのは、この虚血後のNGFレベル低下を補っているためとも考えられる。従来、海馬内のNGF合成細胞は、CA1-4領域の錐体細胞や、歯状回の顆粒細胞等の神経細胞であると報告されている。しかし、虚血後、ほとんどの錐体細胞が消失するにも係わらず、CA1領域においては、有意なNGFレベル低下が認められなかった。CA1領域では、虚血後早期にGFAP陽性反応性アストロサイトが出現することが知られており、このアストロサイトのNGF合成が、神経細胞障害に伴うNGFレベル低下を代償している可能性も考えられた。

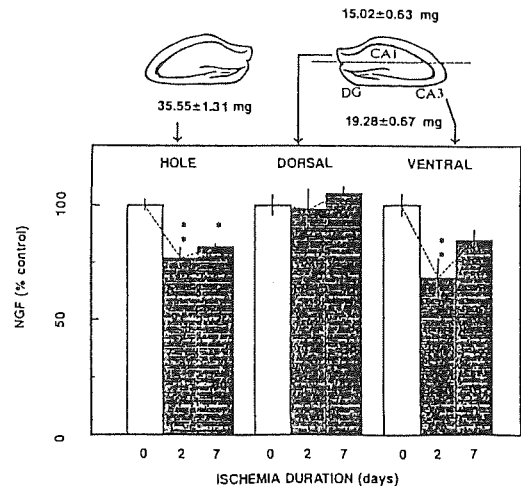


Fig. Changes of NGF content in gerbil hippocampus during 5-min ischemia and recirculation. Hippocampus was divided to dorsal and ventral portions. NGF content was measured in whole, dorsal portion and ventral portion. Columns represent means \pm S.E.M. (n=4).

マウス白血病ウイルスの増殖と染色体外ウイルス DNA の蓄積について

高瀬 明, 渡辺里仁

レトロウイルスは細胞のレセプターを介して細胞内に取り込まれ、ウイルスの逆転写酵素の働きでウイルス RNA を鋳型として2本鎖のウイルス DNA が合成される。ウイルス DNA は染色体に組み込まれ(integration)、ウイルス粒子が新たに組み立てられ、細胞外に放出される(図1)。ある種のレトロウイルスが感染した細胞では染色体外に遊離したウイルス DNA が蓄積することが知られているが、その意義は明らかではない。我々が分離したフレンドマウス白血病ウイルス由来 FrC6 ウィルスは、大量に染色体外ウイルス DNA が蓄積する。このウイルスおよび抗レトロウイルス剤を用いて、染色体外ウイルス DNA の蓄積のメカニズムを検討した。

結果と考察。ラット神経膠細胞株 C6 細胞にFrC6 ウィルスを感染させウイルス増殖の kinetics を調べた。その結果、約12時間で1回目の integration が成立し、20時間前後に2回目の感染がおこり、約30時間で2回目の integration が成立し、36時間以後は徐々に感染がおこり、ウイルス量が増加することが明らかとなった。染色体外 DNA は感染後12時間目から検出され、36時間以後大量の蓄積が認められた(図2)。ウイルスの逆転写酵素阻害剤 AZT はウイルス感染のどの段階で加えても染色体外ウイルス DNA の蓄積を阻止した(図3)。したがって、染色体外ウイルス DNA の蓄積には逆転写酵素が必須であると考えられる。抗体(Ab)およびデキストラン硫酸(DS)はウイルスの細胞への吸着を阻止するが、これらを感染初期に加え、2回目の感染を阻止すると、大量の染色体外ウイルス DNA の蓄積は認められなかった(図3)。したがって、染色体外ウイルス DNA の蓄積にはウイルスの重感染が必要であると考えられる(図1の経路1)。また、感染後30時間以後に Ab および DS を加えても染色体外ウイルス DNA の蓄積は阻害されなかった(図3)。このことから、感染後期では、ウイルスの重感染のみならず、細胞内のウイルス RNA が直接鋳型となって逆転写がおこり染色体外ウイルス DNA が蓄積するメカニズム(図1の経路2)も示唆された。

図1

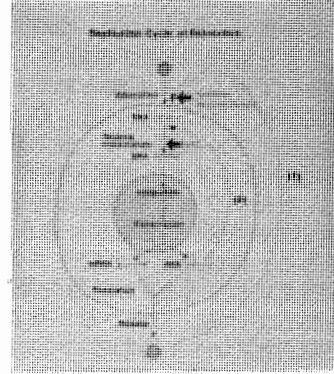


図2 染色体外 DNA は Hirt 法により調製した。プローブはウイルス DNA 全領域を用いた。

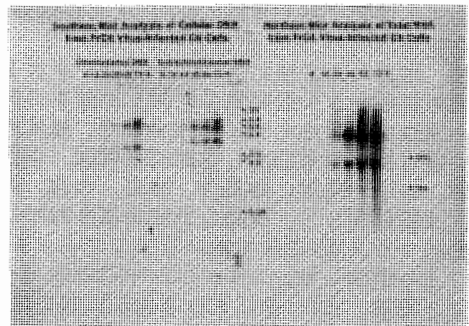
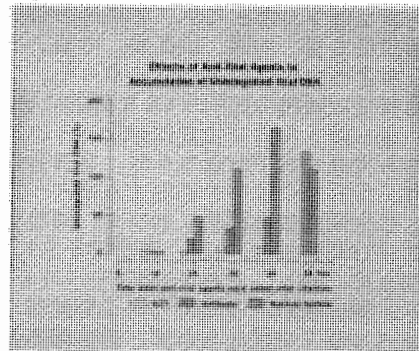


図3 ウィルス感染後 12-54 時間目に抗体および薬剤を加えて培養を続け、72 時間目に染色体外ウイルス DNA を抽出した。抗体および薬剤を加えない時のウイルス DNA 量を 100% とした。



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、3年目を迎えた。基本的なセットアップを終え、新しいプロジェクトも準備段階を終え、一定の成果が得られるようになった。また、発足後にスタートした研究も論文として発表することができ、全体としてみれば3年目にふさわしい研究ができたと考えている。

5月より新たに今村（東大、基礎科助手）を迎え、ヒトコラーゲン遺伝子に関する共同研究を開始した。8月にショウジョウバエグループの研究助手だった宮原が退職し、後任として泉（刑部）仁美を都臨床研より迎えた（平成3年3月）。平成3年3月いっばいで流動研究員の植月は退職し、テキサス大のWright博士のもとに留学した。また、大学院生の小宮、関根、小泉はそれぞれ、新技術事業団、古沢発生プロジェクト、東大、理、物理（堀田研）ドクターコース、東大、医、解剖（広川研）博士過程へと転身した。これらの諸君の今後の活躍を期待したい。また、その活動力とキャラクターで研究所の人気ものだった細田さんが3月末に退職した。大幅入れ替えとなったが、幸い、それぞれ良い後任者に引き継がれた。なお、本年度より開始された杉田杯ソフトボール大会では紆余曲折の末、優勝した。

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筋分化制御因子が結合すること、筋分化に伴う遺伝子発現の抑制機構を解析し、シス因子を同定した。筋分化制御遺伝子群の機能の解析、初期胚に於ける発現などとともに筋分化制御因子の発現調節機構の解析を行い、その一端を明らかにしつつある。また、本研究のためにパスツール研との共同研究を開始した。

b 神経系の発生、構築や行動、学習、記憶など高次機能の分子機構解明をめざして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、中枢神経系の構築異常を示すラインと行動異常ラインを分離した。それぞれ、原因遺伝子の解析と表現系の解析を行い、興味ある結果が得られた。

（部長 鍋島陽一）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Uetsuki T, Nabeshima Y, Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y :
Regulation of the chicken embryonic myosin light-chain (L23) gene : Existence of a common regulatory element shared by myosin alkali light chain genes.
Mol Cell Biol 10 : 2562-2569, 1990
- 2) Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y, Hosoda Y, Obinata T, Nabeshima Y :
Myogenin contains two domains conserved among myogenic factors.
J Biol Chem 265 : 15219-15223, 1990
- 3) Matsuzaki F, Mege RM, Jaffe SH, Friedlander DR, Gallin WJ, Goldberg JI, Cunningham BA, Edelman GM :
cDNAs of Cell Adhesion Molecules of Different Specificity Induce Changes in cell Shape and Border Formation in Cultured S180 Cells.
J Cell Biol 110 : 1239-1252, 1990
- 4) Jaffe SH, Friedlander DR, Matsuzaki F, Crossin K, Cunningham BA, Edelman GM :
Differential effects of the cytoplasmic domains of cell adhesion molecules on cell aggregation and sorting-out.
Proc Natl Acad Sci USA 87 : 3589-3593, 1990
- 5) Hama C, Takizawa T, Moriwaki H, Urasaki Y, Mizobuchi K :
Organization of the replication control region of plasmid Collb-P9.
J Bacteriol 172 : 1983-1991, 1990
- 6) Hama C, Takizawa T, Moriwaki H, Mizobuchi K :
Role of leader peptide synthesis in repZ gene expression of the Collb-P9 plasmid.
J Biol Chem 265 : 10666-10673, 1990
- 7) Asano K, Kato A, Moriwaki H, Hama C, Shiba K, Mizobuchi K :
Positive and negative regulation of plasmid Collb-P9 repZ gene expression at the translation level.
J Biol Chem 266 : 3774-3781, 1991
- 8) Hama C, Ali Z, Kornberg TB :

Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter.

Genes Dev 4 : 1079-1093, 1990

- 9) Kamijo K, Taketani S, Yokota S, Osumi T, Hashimoto T :

The 70-kDa Peroxisomal Membrane Protein is a Member of the Mdr (P-glycoprotein) - related ATP-binding Protein Superfamily.

J Biol Chem 265 : 4534-4540, 1990

- 10) Hirose A, Kamijo K, Osumi T, Hashimoto T, Mizugaki M :

cDNA cloning of rat liver 2,4-dienoyl-CoA reductase.

Biochem Biophys Acta 1049 : 346-349, 1990

b. 著 書

- 1) Nabeshima Y, Uetsuki T, Komiya T, Nabeshima Y, Fujisawa-Sehara A :

Regulatory elements involved in chicken myosin alkali light chain gene expression.

ed by Pette D. Walter de Gruyter • Berlin • New York, 33-43, 1990

- 2) Kornberg T, Hama C, Gay NJ, Poole SJ :

englailed, A Gene for All Segments.

ed by Bellve AR, Vogel HJ Academic Press, 267-278, 1991

- 3) Yamaguchi S, Fukao T, Nagasawa H, Orii T, Sakura N, Schutgens R. B. H, Sweetman L, Fujiki Y, Kamijo K, Osumi T, Hashimoto T :

3-Ketothiolase Deficiency : Molecular Heterogeneity of the Enzyme Defect and Cloning of the cDNA.

Fatty Acid Oxidation : Clinical, Biomedical, and Molecular Aspects, 673-679, Alan R.

Liss, Inc., 1990

- 4) 橋本 隆, 大隅 隆, 温 進坤, 上条桂樹 :

膜酵素, 424-435, 広川書店, 1990

c. 総 説

- 1) 上月太一, 鍋島陽一 :

筋発生・分化における遺伝子発現

蛋白質, 核酸, 酵素, 臨時増刊, 心臓の細胞生物学, 35 : 1637-1648, 1990

- 2) 鍋島陽一 :

II 研究業績

Id 遺伝子 -- HLH ファミリーの Negative Regulator.

実験医学, 8: 2133-2138, 1990

3) 浜 千尋 :

englailed 遺伝子の構造と発現調節

実験医学, 8: 587-593, 1990

d. 班会議報告書

1) 鍋島陽一 :

DNA に結合する筋分化制御因子の機能の解析

文部省科学研究費補助金, 重点領域研究・転写制御因子研究班, 平成2年度研究報告書, p37, 1991

2) 鍋島陽一 :

ショウジョウバエ脳細胞の遺伝的標識

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研究班, 平成1年度報告書, p118-120, 1990

3) 鍋島陽一 :

筋細胞分化を制御する遺伝子の機能の解析

厚生省精神・神経疾患・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班, 平成2年度研究報告書, p91-93, 1991

B. 学会発表

a. シンポジウム

1) Nabeshima Y, Uetsuki T, Komiya T, Nabeshima Y, Asakura A, Fujisawa-Sehara A :

Transcriptional regulation of chicken myosin alkali light chain genes.

UEHARA memorial foundation symposium, Frontiers of Muscle Research Tokyo, July 19th, 1990

2) 鍋島陽一, 浜 千尋, 小泉恵太, 星野幹雄, 宮原慶子, 松崎文雄 :

ショウジョウバエの分子遺伝学的解析を基礎とした神経研究

日本遺伝学会第62回大会シンポジウム, 情報伝達の遺伝子学から遺伝学へ, 東京, 10.6, 1990

3) Nabeshima Y :

Transcriptional regulation of chicken myosin alkali light chain genes during myogenesis.

The third Italy-Japan joint meeting on molecular biology, Regulation of cell differentiation and eukaryotic gene expression. Fukuoka, October 26th, 1990

- 4) Nabeshima Y, Uetsuki T, Komiya T, Nabeshima Y, Asakura A, Hosoda Y, Fujisawa-Sehara A :

Developmental regulation of the chicken alkali light chain gene expression.

Keystone symposium, Gene expression in neuromuscular development. Keystone, Colorado, January 30, 1991

- 5) 鍋島陽一 :

筋分化を制御する遺伝子による収縮蛋白遺伝子の転写誘導

シンポジウム「若手研究者, 日本の転写研究を考える」, 奥志賀高原ホテル, 2月14日, 1991

- 6) 藤沢淳子, 植月太一, 小宮透, 鍋島曜子, 朝倉淳, 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13回日本分子生物学会年会シンポジウム, 発生, 分化Ⅱ, 京都, 11月26日, 1990

- 7) 松崎文雄 :

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

若手シンポジウム「もぎたての分子生物学」, 東京, 6月30日, 1990

- 8) 松崎文雄 :

エンハンサートラップ法による中枢神経系の解析

第21回 Drosophila Meeting, 東京, 10月7日, 1990

- 9) Matsuzaki F, Hama C, Koizumi K, Hoshino M, Miyahara Y, Nabeshima Y :

Genetic dissection of Drosophila brain using the enhancer-trap method.

Japan-USA joint workshop, Development of new experimental models in the life science. Yokohama, December 4th, 1990

- 10) 浜千尋, 松崎文雄, 小泉恵太, 星野幹雄, 宮原慶子, 鍋島陽一 :

ショウジョウバエの脳細胞を遺伝的に標識する

第43回日本細胞生物学大会ワークショップ, 東京, 10月10日, 1990

b. 国際学会

- 1) Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y, Komiya T, Uetsuki T, Asakura A, Hosoda Y, Nabeshima Y :

Cloning and characterization of cDNAs for chicken myogenic factors.

II 研究業績

Keystone symposium on Gene Expression in Neuromuscular Development Keystone, Colorado, January 27th, 1991

2) Matsuzaki F, Koizumi K, Hama C, Yoshioka T, Nabeshima Y :

Identification and characterization of a gene involved in neural development.

32nd Annual Drosophila Reseach Conference, Chicago, March 22nd, 1990

3) Hama C, Komiya T, Hoshino M, Kornberg T, Nabeshima Y :

engrailed expression in the brain of the Drosophila.

32th Annual Drosophila Reseach Conference, Chicago, March 22nd, 1990

c. 一般学会

1) 藤沢淳子, 植月太一, 小宮 透, 鍋島曜子, 朝倉 淳, 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 遺伝子の発現誘導

第13回日本分子生物学会年会, 京都, 11月27日, 1990

2) 植月太一, 鍋島曜子, 藤沢淳子, 鍋島陽一 :

心筋ミオシンアルカリ軽鎖遺伝子の発現制御領域

第13回日本分子生物学会年会, 京都, 11月27日, 1990

3) 小宮 透, 朝倉 淳, 鍋島曜子, 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の解析

第13回日本分子生物学会年会, 京都, 11月27日, 1990

4) 小泉恵太, 松崎文雄, 浜 千尋, 吉岡 享, 宮原慶子, 鍋島陽一 :

中枢神経系形成に異常の見られるショウジョウバエの突然変異体の作製とその分子遺伝学的解析

第13回日本分子生物学会年会, 京都, 11月29日, 1990

C. 班会議発表

1) 鍋島陽一 :

DNA に結合する筋分化制御遺伝子の機能の解析

文部省科学研究費, 重点領域, 転写制御因子班会議, 箱根, 9月21日, 1990

2) 鍋島陽一 :

転写後の遺伝子発現の制御機構

科学技術庁, 振興調整費, 発生工学技術の開発研究班, 班会議, 東京, 10月1日, 1990

3) 藤沢淳子 :

筋芽細胞の増殖と分化における MyoD および myogenin 遺伝子の役割

文部省科学研究費，がん特別研究(1)，癌の増殖と分化に関連する遺伝子の発現制御研究班，班会議，大阪，11月30日，1990

4) 鍋島陽一：

筋細胞分化を制御する遺伝子の機能の解析

厚生省精神・神経疾患・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班，班会議，東京，12月12日，1990

5) 鍋島陽一：

中枢神経系の発生，構築の異常をもたらす突然変異体の分子遺伝学的解析

厚生省精神・神経疾患・遺伝子解析による神経疾患発現機構に関する研究班，東京，1月22日，1991

3. 主な研究報告

筋芽細胞の増殖と分化における MyoD および myogenin 遺伝子の役割

藤沢淳子, 鍋島曜子, 小宮透, 植月太一, 朝倉淳, 上条桂樹, 鍋島陽一

<序>

骨格筋の分化は、基本的には中胚葉由来の多能性細胞から筋芽細胞を生じ(分化の決定)それが互いに融合して筋管を形成する(最終分化)過程であると言えるだろう。

近年、MyoD、myogeninをはじめとして、線維芽細胞を筋芽に分化誘導する遺伝子の cDNA がいくつか単離された。これらの遺伝子は筋分化の決定と最終分化を支配する遺伝子群と考えられるが、それぞれの遺伝子がその過程の中でどのような役割を担っているのかは解明されていない。

<結果・考察>

これら筋分化をひき起こす遺伝子の役割を明らかにするため、我々はニワトリの筋分化誘導因子のクローニングを行った。その結果ニワトリ MyoD、myogenin、MRF 4 の cDNA を単離することができ、これらはいずれもニワトリの primary fibroblast から myotube を形成させる活性があった。しかし、形成された筋管の形態は、3つの cDNA の発現により異なっておりこのことから3つの筋分化誘導因子の転写活性化能に違い(活性化される遺伝子の種類やその発現量の違い)があることが予想された。そこでまず、これらの誘導因子が骨格筋型ミオシン軽鎖 LC1 の発現にどのようにかかわっているかを調べたところ、次のような結果が得られた。

① MyoD は我々がすでに見出していた LC1 遺伝子上流に存在する筋細胞特異的なエンハンサーに結合し、これを活性化する。

② Myogenin はエンハンサーには結合するが、

これを活性化するにはそれ以外の上流領域をさらに必要とする。

③ MRF 4 はエンハンサーへの結合能が非常に低く、またプロモーターも活性化しない。④このような差があるにもかかわらず、抗体を用いて LC1 の発現をみると、いずれの誘導因子も fibroblast における LC1 の発現を活性化していることが見出された。このことから、3つの誘導因子の LC1 遺伝子の転写活性化のメカニズムが異なっていることが示唆された。MRF 4 の場合は MyoD や myogenin を介して間接的に転写を活性化している可能性も考えられる。

<展望>

ミオシン軽鎖遺伝子群は発生にしたがって一律に活性化されるわけではなく、ニワトリでは LC1、LC3 はそれぞれ 11 日胚・14 日胚ごろに活性化され生後も活発に転写されるのに対し、LC23 は胎児期にのみその発現がみられる。このような発現パターンの差異もそれらの発現に関与する分化誘導因子やそれと相互作用する転写因子の差に基づくものではないかと考え、現在さらに検討中である。

<文献>

- 1) 藤沢淳子 (1991) 実験医学、9、N07、111-115
鍋島陽一、同誌、117-121
- 2) A. Fujisawa et al. (1990) J. Biol. Chem., vol. 265, 15219-15223.
- 3) Yoko Nabeshima et al., in preparation.

神経系の初期発生に関与する遺伝子の分子遺伝学

松崎文雄, 小泉恵太*, 浜 千尋, 鍋島陽一

* 早大理工

ショウジョウバエの神経発生は神経芽細胞の形成に始まる。神経芽細胞は神経母細胞に分裂し、そこから一対のニューロンが生まれる。この様な共通の分裂パターンから神経細胞の多様性が生み出される仕組みは良く解っていない。本研究では、初期発生の過程でニューロンの分化に関わる遺伝子 *prospero* を同定し、その分子構造を明かにした。

方法と結果 神経発生の基本的な過程に関与する遺伝子の突然変異体は致死になることが予想される。そこで、今までに本研究部で樹立した劣性致死の *enhancer trap* 系統 (染色体に一個の P 因子の挿入を持つ) 約 200 種の中から、胚発生時に神経形成に異常を示す変異系統を検索した。A63 系統はこの検索で見いだされた系統で、神経芽細胞の数や形態に異常はないが、その後、腹部神経節の梯子状神経束のうち、縦方向の神経束が欠落する。P 因子の挿入を受けた遺伝子座の欠失変異株では、縦方向の神経束の欠失に加え、各神経節に 2 本ある横方向の神経束が融合してしまう。既に同定されている特定の神経細胞のふるまいを見ると、神経線維が本来と異なる道筋をたどることが確認された。神経束の欠失や融合はそのためであると考えられる。

遺伝学的な解析から、P 因子の挿入により変異を起こした遺伝子は *prospero* (*pro*) と名付けられた遺伝子と同一であることが判明した。*pro* 遺伝子の genomic DNA のクローニングを行ない、転写産物を調べると、約 6 kb の長さの mRNA が検出された。

これまでに、この *pro* mRNA の全長に近い 5.6 kb の cDNA を単離し、*pro* 遺伝子産物の一次構造を推定できた。1500 以上のアミノ酸からなる *pro* 蛋白には核移行シグナルとホメオドメインという特徴的な配列が見いだされる。ホメオドメインは発生に関わる転写調節因子に存在する配列で、DNA と特異的に結合する領域であることが知られている。*pro* 蛋白に見いだされたホメオドメインは従来にないユニークな配列を持つが、この遺伝子産物が転写調節に関わることを示唆する。

in situ hybridization 法により *pro* mRNA の発現をみると、中枢神経系、及び末梢神経系の precursor 細胞の殆ど全てで発現し、神経細胞に分化した段階では発現が終っている事が明らかになった。

考察 ショウジョウバエの場合、個々の神経細胞の特性は、外胚葉の祖先細胞の位置により決定されると考えられている。*pro* 変異個体では、この情報が、分化した神経細胞にまで正しく伝えられず、神経線維の誤った伸長を招くと推定される。*pro* 遺伝子はこのように precursor 細胞の段階で神経細胞の分化に関わる新しいタイプの遺伝子である。今後、*pro* 遺伝子と相互作用する遺伝子の検索を通して、神経細胞の多様性の獲得の機構を明かにして行きたい。

文献

- 1) Doe et al. *Cell*, 65, 451-465 (1991)
- 2) Matsuzaki et al. in preparation.

活動性の低いショウジョウバエ突然変異体の分離とその解析

星野幹雄, 浜 干尋, 松崎文雄, 鍋島陽一

ショウジョウバエでは突然変異体の分離によって学習、記憶、日周期リズム等に関わる遺伝子が同定され、これら高度な生命現象を分子レベルで記述する試みがなされてきている。我々は、脳の高次機能の解明を最終目的として、エンハンサートラップ法によって得られた系統の解析を進めてきたが、その中に活動性の著しく低下した変異株を見だし、その遺伝的な解析を行なってきた。

結果および考察

トランスポゾン的一种であるP因子に*lacZ*遺伝子を組み込んだP-*lacZ*因子を用いたエンハンサートラップ法によって作製した1100株の系統の中に、2株、動きの非常に悪い系統が存在することを見いだした。それぞれの変異に関するホモ接合体は成虫まで成長するが羽化後殆ど歩かず、また、おそらく生殖行動もとれないために不妊である。少なくとも1株については、幼虫の活動性も低下していた。

P-*lacZ*因子の染色体上の挿入位置をそれぞれ調べたところ、第二染色体上の45Cと第三染色体上の64Eであることが判明した。さらにこれらの挿入が変異表現型の原因であることを調べるために、P-*lacZ*を染色体から除去したところ、表現型は野生型に復帰していた。即ち、これらの挿入が活動性低下の原因であり、挿入を受けた染色体上の異なる2つの遺伝子が”動く”ために必要であると考えられることができる。

エンハンサートラップ法の有利な点のひとつは、染色体に挿入された*lacZ*遺伝子の発現

パターンを調べることにより、近傍の遺伝子の発現の組織特異性を知ることができることにある。得られた2株について*lacZ*遺伝子の発現パターンを調べてみると、いずれも脳および腹部神経節での特異性が高かった。また、強い光を照射すると過度な動きを示すことから、筋肉系には異常がないと思われる。以上のことから、P-*lacZ*の挿入を受けた2つの遺伝子は神経系で特異的に発現し、”動く”ために必須な分子をコードしている可能性が高い。

現在、第二染色体上の45Cに位置する遺伝子の分子生物学的解析を行っており、P-*lacZ*因子が染色体上の転写領域の極く近傍かイントロン内に挿入されていることをつきとめた。得られたcDNAの構造解析と発生過程における発現パターンを今後調べていく予定である。

今後の展望

ひとつの類似した変異表現型に注目して突然変異体を多数分離することによってひとつの情報伝達経路や発現調節経路に関わる複数の因子を明らかにした例はショウジョウバエでは体節の形成や眼の形態形成において知られている。我々は、”動かない”ハエの変異株を多数分離することによって”動く”ために必要な神経系の因子を同定し、因子間の情報の流れを明らかにできるのではないかと考えている。

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それらの実験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により人為的に疾患モデル動物を作製することを目的としている。

研究部は3室で構成される。動物遺伝解析室は発生工学的技術を用いた疾患モデルマウスの作製が、モデル動物診断室では、ウイルスの神経親和性の本体を分子生物学的に解析している。動物生産室は現在欠員である。

本年度研究部で行なわれた研究は以下のものである。

1) 神経親和性ウイルスの分子生物学的研究

マウス肝炎ウイルスの神経親和性にはウイルス粒子表面にあるS蛋白の関与が考えられる。S蛋白の構造や機能を解析するため、神経親和性の強いJHM株c1-2のS蛋白cDNAをワクシニアウイルスをベクターとして培養細胞で発現させた。その蛋白は、c1-2感染マウス細胞で産生されるS蛋白と同じ性質を示した。

2) 遺伝子導入によるマウス細胞の標識化

これまで、マウス胚幹細胞(ES)株の樹立、維持技術の確立を試みてきた。本年度は動物細胞に普遍的に発現するCAT遺伝子を胚幹細胞や、受精卵へ導入し、キメラマウス個体内における細胞の標識を可能とした。また、相同組換えを利用したGene targetingにより胚幹細胞のN-myc遺伝子を欠失させ、キメラ個体を介してN-myc遺伝子欠損マウスの作製を試みた。

3) 自然発症ミュータントの特性解析

先に見出されたGADマウスについて病理学的、免疫組織学的検討が進み、本ミュータントが脊髄神経節細胞の末梢、中枢両端からはじまるdying-back typeの神経軸索変性の疾患モデルとして有用であることが明らかとなった。また、ウズラにおいて筋緊張性ジストロフィー様形態変化を示す個体が抽出され、電気生理学的検索に入っている。

平成2年度の研究部の構成は次のとおりである。

[部長] 菊池建機, [室長] 花岡和則, 田口文広, [流動研究員] 池田敏男(-12/31), 三木清史(-12/31), [賃金研究員] 花岡美智子, 小林明子, [賃金研究助手] 中根和子, 志鎌昌子, 梶谷美代子。[外来研究員] 山崎一斗, [客員研究員] 浅利将男, 澁谷 徹, [併任研究員] 山内一也, 榊 佳之, 田内雅規, 三木清史(1/1-), [研究生] 白杵扶佐子, 水谷 誠, 市原伸恒, 下野明彦, 檜垣 仁。

(部長 菊池建機)

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Kikuchi T, Mukoyama M, Yamazaki K, Moriya H :
Axonal degeneration of ascending sensory neurons in gracile axonal dystrophy mutant mouse.
Acta Neuropathol 80 : 145-151, 1990
- 2) Yamazaki K, Moriya H, Wakabayashi T, Kikuchi T :
Grial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity in the central nervous system of GAD (gracile axonal dystrophy) mice.
Biomed Res 11 : 145-149, 1990
- 3) Ishiura S, Arahata K, Tsukahara T, Koga R, Anraku H, Yamaguchi M, Kikuchi T, Nonaka I, Sugita H :
Antibody against the C-terminal protein of dystrophin crossreacts with the 400 kDa protein in the pia mater of dystrophin-deficient mdx mouse brain.
J Biochem 107 : 510-513, 1990
- 4) Matsui K, Furukawa S, Shibasaki H, Kikuchi T :
Reduction of nerve growth factor level in the brain of genetically ataxic mice (weaver, reeler).
FEBS Letters 276 : 78-80, 1990
- 5) Yamazaki K, Moriya H, Nakayama M, Wakabayashi T, Kikuchi T :
Substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of Wriggle mouse Sagami, an ataxic mutant mouse.
Biomed Res 11 : 433-436, 1990
- 6) Takase-Yoden S, Kikuchi T, Siddell S.G, Taguchi F :
Localization of major neutralizing epitopes on the S1 polypeptide of the murine coronavirus peplomer glycoprotein.
Virus Res 18 : 99-108, 1990

b. 総説

- 1) 菊池建機 :

疾患モデル動物－その医学・生物学への応用－

日本薬剤師会雑誌, 42: 17-26, 1990

2) 菊池建機 :

我が国における神経・筋疾患モデル動物の開発

日疾動録, 6: 13-19, 1990

3) 山崎一斗, 小田健一郎, 菊池建機 :

Gracile axonal dystrophy (GAD) マウスの病理と遺伝

生体の科学, 41 (6) : 545-548, 1990

4) 菊池建機 :

疾患モデル動物の開発－その医学生物学への応用－

Pharm Tech Japan 7 (1) : 87-94, 1991

5) 小田健一郎, 山崎一斗, 三浦裕之, 遠藤智代子, 柴崎浩, 菊池建機 :

Gracile axonal dystrophy (GAD) マウス－ ” Dying back ” 軸索変性モデル－

神経研究の進歩, 35: 95-105, 1991

6) 田口文広 :

コロナウイルスの分子生物学

ウイルス, 40: 81-90, 1990

7) 花岡和則 :

胚性癌腫細胞

蛋白質核酸酵素, 35: 2058-2059, 1990

8) 花岡和則 :

奇形腫幹細胞と胚幹細胞

組織培養, 16: 310-314, 1990

9) 花岡和則, 鍋島陽一 :

遺伝子導入によるマウス細胞の標識化

組織培養, 16: 525-529, 1990

10) 三木清史, 花岡和則 :

マウス胚幹細胞株

神経研究の進歩, 35: 17-26, 1991

II 研究業績

c. 班会議報告書

1) 菊池建機, 守屋弘美, 埜中征哉 :

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およぼす影響

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報告書, 35-40, 1990

2) 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の成果 (研究支援事業第1期総括集), 135-142, 1990

3) 田口文広, 松原 豊 :

コロナウイルス JHM のラットに対する神経病原性について

厚生省精神・神経疾患・ミエロパチーの発現機構と病因に関する研究班報告書, 17-21, 1990

4) 花岡和則 :

筋ジストロフィー解明のための発生工学的手法の利用

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細胞生物学的基礎研究班報告書, 117-120, 1990

d. その他

1) 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

日疾動録, 6 : 57, 1990

2) 山崎一斗, 守屋弘美, 若林庸夫, 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

日疾動録, 6 : 60, 1990

3) 菊池建機 :

我が国で開発された神経軸索変性症モデル動物-GAD マウスをめぐる一

遺伝性脳神経疾患動物ニュースレター, vol 3, No. 3, 2, 1990

B. 学会発表

a. 特別公演, シンポジウム

1) 花岡和則 :

発生工学的手法によるキメラマウスの解析

文部省重点領域「神経回路形成」公開シンポジウム，東京，11.15，1990

- 2) 沢井昭司，下野明彦，花岡和則，近藤寿人：

相同組換えを用いたマウスN-myc 遺伝子への変異導入

第13回分子生物学会年会シンポジウム，京都，11.26，1990

- 3) 花岡和則：

発生工学的手法によるマウス胚の遺伝子操作

東京農工大第一回細胞機能開発セミナー，3.15，1991

b. 国際学会

- 1) Yamazaki K，Kikuchi T：

Substance P-like immunoreactivity in the CNS of gracile axonal dystrophy (GAD) mice.

Xlth International Congress of Neuropathology, 9.3, Kyoto 1990

- 2) Oda K，Miura K，Yamazaki T，Kikuchi T，Shibasaki H：

GAD (Gracile axonal dystrophy) mouse : Dying-back process in muscle spindle.

Xlth International Congress of Neuropathology, 9.3, Kyoto, 1990

- 3) Mukoyama M，Kikuchi T，Oda K，Yamazaki T，Tomita T：

Gracile axonal dystrophy (GAD) mouse : Neuropathology and distribution of the lesions.

Xlth International Congress of Neuropathology, 9.3, Kyoto, 1990

c. 一般学会

- 1) 山崎一斗，守屋弘美，若林庸夫，菊池建機：

GAD マウスの中枢神経系におけるサブスタンス P の免疫組織化学的検討

第37回日本実験動物学会，京都，5.23，1990

- 2) 水谷哲也，林 正信，田口文広，波岡茂郎：

MHV に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの抗ウイルス剤としての基礎的研究

第37回日本実験動物学会，京都，5.23，1990

- 3) 花岡和則，早坂美智子，植月太一，藤沢淳子，鍋島陽一：

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

第23回日本発生生物学会大会，広島，5.26，1990

- 4) 近藤寿人，沢井昭司，下野明彦，花岡和則：

ES細胞の遺伝子操作によるN-mycの機能解析

第43回細胞生物学会，東京，10.8，1990

II 研究業績

- 5) 矢野剛美, 池田敏男, 田口文広 :
神経病原性コロナウイルス JHM のスパイク蛋白遺伝子の構造解析
第38回日本ウイルス学会, 東京, 11. 14, 1990
- 6) 山崎一斗 :
脊髄小脳路の変性と Substance P の分布
遺伝性脳神経疾患動物研究会, 名古屋, 11. 19, 1990
- 7) 松井京子, 古川昭栄, 柴崎 浩, 菊池建機 :
Reeler マウスの脳内 NGF 分布について
第7回日本疾患モデル動物研究会, 名古屋, 11. 20, 1990
- 8) 菊池建機, 小林明子, 石浦章一, 水谷 誠 :
糖原病Ⅱ型ウズラの遺伝様式
第7回日本疾患モデル動物研究会, 名古屋, 11. 21, 1990
- 9) 花岡和則, 早坂美智子, 植月太一, 藤沢淳子, 鍋島陽一, 田中真人 :
外来遺伝子の導入によるマウス細胞の標準化
第13回分子生物学会年会, 京都, 11. 26, 1990
- 10) 沢井昭司, 下野明彦, 花岡和則, 近藤寿人 :
相同組換えを用いた N-myc 遺伝子への変異導入
第13回分子生物学会年会, 京都, 11. 26, 1990
- 11) 下野明彦, 沢井昭司, 花岡和則, 近藤寿人 :
マウス発生過程における N-myc 遺伝子強制発現の影響
第13回分子生物学会年会, 京都, 11. 26, 1990

C. 班会議発表

- 1) 菊池建機 :
神経軸索変性の動物モデル (GAD マウス)
厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー及び関連疾患モデル動物の開発に関する研究, 東京,
12. 12, 1990
- 2) 水谷 誠, 菊池建機, 石浦章一 :
糖原病ウズラコロニーより分離育成した筋肉異常ウズラ
厚生省精神・神経疾患研究・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, 東

京, 12.12, 1990

3) 吉田端子, 宮川厚夫, 菊池建機 :

刺激時における mdx マウス骨格筋内の Ca²⁺ 濃度測定を試み (fura-2)

厚生省精神・神経疾患研究・筋ジストロフィー症及び関連疾患の成因と治療法開発に関する研究,
東京, 12.8, 1990

4) 花岡和則 :

外来遺伝子の導入を遺伝子を利用したキメラマウス解析技術の開発

文部省重点領域「神経回路形成」夏期ワークショップ, 裾野 静岡, 7.30, 1990

5) 花岡和則 :

胚幹細胞の維持操作技術の開発

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, 東京, 10.1, 1990

6) 花岡和則 :

筋ジストロフィー解明のための発生工学的手法の利用

厚生省精神・神経疾患研究・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, 東京,
12.12, 1990

7) 田口文広 :

ラットに脱髄性脳脊髄炎を引き起こすマウス肝炎ウイルスに関する研究

平成2年度班会議, 東京, 1.19, 1991

3. 主な研究報告

GAD マウス長期生存例に関する神経病理学的検討

山崎一斗^{1),2)}, 小林明子¹⁾, 菊池建機¹⁾

1) 国立精神・神経センター, 2) エーザイ筑波研究所

【目的】

GAD(gracile axonal dystrophy)マウスは常染色体性劣性の神経軸索変性モデル動物である。中枢神経系においては、上行性知覚神経路である薄束路と後脊髄小脳路が選択的に変性する[1, 2]。また末梢神経系では、筋紡錘、運動終板に軸索の変性が認められる。これらのことからGADマウスはヒトの遺伝性変性疾患群である脊髄小脳変性症のモデルとして期待される。以上の所見は20日から150日齢のマウスに関するものである。今回は230日齢を越える長期生存マウスを得ることができたので、中枢神経系に関する病理学的所見について報告する。

【材料と方法】

実験に供したマウスはコンジュニック系C57BL/6-gadのGAD(gad-gad)マウスと同腹正常マウス(+/+あるいはgad/+)である。検査日齢は、115-135日と258-272日である。固定は左心室より4%パラホルムアルデヒド緩衝液を灌流して行なった。脳脊髄を摘出し、HE、KB、Bodian及びPAS染色を行なった。

【結果と考察】

115-135日齢において、これまでの報告と同様、薄束路に多くのspheroid体(神経軸索の腫大)が観察され、特に延髄薄束核、頸髄薄束に著しい。また、これらは脊髄前・側索、胸髄核、下小脳脚、小脳白質にも観察され、後脊髄小脳路においても軸索変性は進行する。さらに三叉神経脊髄路核にもspheroid体を認めた。238-272日齢になると、

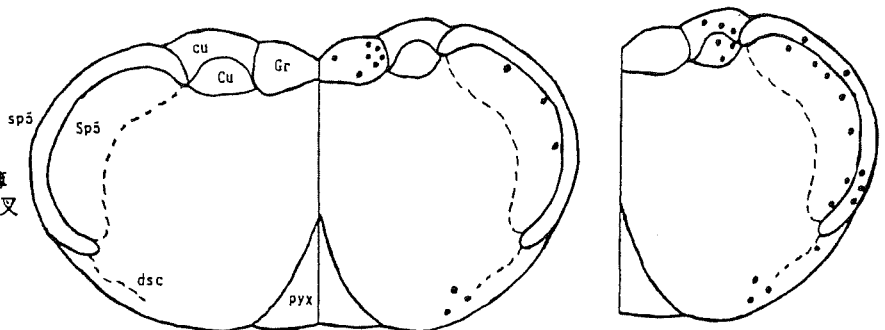
延髄レベルの薄束核は萎縮し、グリア増生をみるが、spheroid体は消失する。しかし、これまでみられなかった楔状束核と楔状束にspheroid体が出現する。さらに三叉神経脊髄路(図1)及び脊髄後索の腹部にも分布している。脊髄後索腹部のspheroid体は頸髄よりも、胸髄、腰髄で多くみられる。以上のことから、加齢に伴うGADマウスの病変部位の拡張が認められた。特に脊髄後索腹部はマウスの錘体路が走行しているのもので、この部位の軸索変性は、GADマウスの錘体路の変性を示している。脊髄神経路におけるspheroid体の分布が知覚性上行路と運動性下行路で対照的である。すなわち、薄束路では頸髄レベルに、錘体路では胸・腰髄レベルに多い。このことは、GADマウスの軸索変性は前者が上位より、後者が下位より進行することを示す。ヒトの脊髄小脳変性症の代表であるFriedreich失調症の中枢神経系における主な病変部位は、薄束路、後脊髄小脳路そして錘体路である[3]。従って、今回の結果は、GADマウスが脊髄小脳変性症、特にFriedreich失調症のモデルとなる可能性を示唆する。

【文献】

- [1] Yamazaki, k., et al. Proc.Soc.Exp.Biol. Med.,187, 209-215 (1988)
- [2] Kikuchi, T., et al. Acta Neuropathol., 80,145-151 (1990)
- [3] Walton, J. In Brain's Diseases of the Nervous System, 9th Edition., Oxford university press, pp. 362-370 (1985)

図-1.

115-135日齢(左)および238-272日齢におけるGADマウスの延髄各部位に見られるspheroid体の分布。Cu: 楔状束核、cu: 楔状束、dsc: 後脊髄小脳路、Gr: 薄束核、pyx: 錘体交叉、Sp5: 三叉神経路核、sp5: 三叉神経路



mdx マウス由来胚幹細胞株の樹立

花岡和則, 早坂美智子

発生的全能性を持つ幹細胞株を用いたキメラマウスの作成を利用して外来遺伝子をマウス個体内に導入する手法は、直接マウス受精卵に遺伝子を導入する方法に比べいくつかの利点がある。特に、相同組み換え反応 (homologous recombination) を利用することにより任意の遺伝子の機能が破壊された幹細胞株を単離することができるという報告は、この手法の応用範囲を飛躍的に広げるものであり、今後胚操作の重要な技術として発展することは確実と思われる。

全能性を持つ未分化幹細胞としては奇形腫に由来する EC細胞¹⁾及び正常初期胚から直接樹立される ES細胞²⁾が知られている。ES細胞は、腫瘍の段階を経ないことからより初期胚に近い性質を保持していることが期待でき胚操作の担体として有利な点が多い。しかし、ES細胞樹立の方法はまだ確立されたものとはいえないのが現状である。そこで、キメラ法を利用した疾患モデル動物の開発のための基礎的研究の一つとして ES細胞株をより効率的に樹立するための培養条件について検討を加えてきた。本年度は、ジストロフィン遺伝子が欠損した筋ジストロフィーのモデルマウスと考えられる mdx マウスの胚から胚幹細胞株を樹立することを試みたので報告する。

[方法及び結果]

- 1) 初代培養 マウス胚盤胞期胚を培養条件下 (15%FCS を含む DMEM) に移す。胚は通常4日目には発達した卵円筒様構造を形成した。これらの胚から、トリプシン/EDTA 処理により胚体外胚葉細胞を単離した。これらの細胞を軽くピペッティングした後フィーダー細胞上に移した。フィーダー細胞としては、マイトマイシン処理を施した STO, 3T3細胞株およびマウス12-15日胚繊維芽細胞を用いた。
- 2) 培地 様々な培地を検討した結果、DMEM培地に、メルカプトエタノール、グルタミン、非必須アミノ酸、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウムを加えたものを使用した。血清は40以上のロットのうち最も ES細胞の増殖のよいものを選び使用した。
- 3) 胚性幹細胞株の樹立 上記の方法により培養条件下に移された胚細胞は多くの場合極めて不安定であり、数週間後には様々な細胞に分化しその増殖性を失った。培地の組成、継代方法、フィーダー細胞などについて様々な検討を加え、効率的に幹細胞を未分化状態で維持することができる培養条件を確立した。この方法により、現在までに12株の mdx マウス由来の胚幹細胞株を単離することに成功した(図1)。これらの細胞株はいずれも体外で長期間安定に維持することが確認されており、現在そのキメラ形成能や生殖細胞への分化能について検討を急い

でいる。

[考察] 今回作成した mdx マウス由来胚幹細胞株は、ジストロフィン遺伝子を欠損した発生的多能性細胞株である。これらの細胞株に lacZ や CAT 等の外来標識遺伝子を導入することにより本細胞株を標識化することは容易であり³⁾、キメラ法を用いた mdx マウスの解析に有用であると期待できる。また、Homologous re-combination 技術と組み合わせることにより、任意の遺伝子機能を操作したマウスを人為的に作成することが可能になる。この実験系は遺伝子機能の解析手段として、また疾患モデル動物の作成技術として重要な技術となる。特に、ヒトの遺伝性難治疾患のほとんどを占める劣性遺伝疾患のモデル動物を人為的に作成することが可能な現在唯一の実験系と思われる。本年度の研究をもとに今後上記の実験系の確立に向けて研究を進める予定である。

[文献]

- 1) Hanaoka, K et al. Differentiation(1991) In press
- 2) Bradley A et al. Nature(1984) 309:255-256
- 3) Hanaoka, K et al. Differentiation(1991) In press.

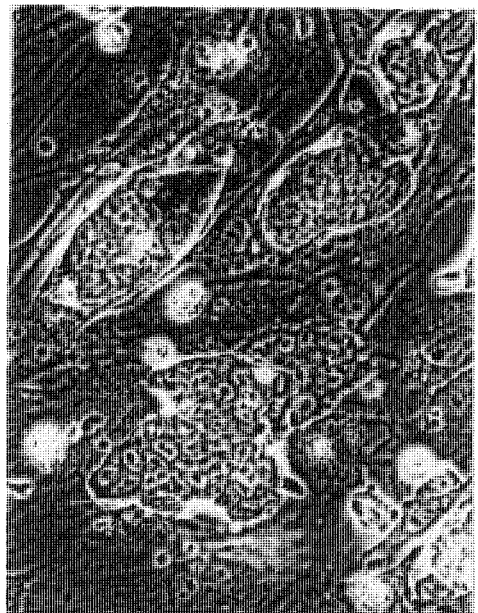


図1 mdx マウス由来胚幹細胞株

組換えワクシニアウイルスによるマウス肝炎ウイルスS蛋白の発現

田口文広

マウスコロナウイルスのスパイク(S)蛋白は分子量15-18万で、ウイルス粒子表面に存在する長さ約20nmのコロナ様突起を構成し、多くの生物活性が知られている。この生物活性の解析のため、我々は組換えバキュロウイルスを用いてS蛋白を発現しそのS蛋白は、免疫原性に関してMHV感染細胞で産生されるS蛋白と異なることを明らかにした。これは、組換えバキュロウイルスは、昆虫細胞で増殖させるため付加される糖鎖に哺乳動物細胞との違いがあるためと考えられた。今回はこの問題点を克服するため組換えワクシニアウイルス(RVV)を用いてS蛋白を発現し、その性質についてMHV感染細胞で産生されるS蛋白と比較した。

材料と方法

トランスファーベクター作成用のプラスミドは、京大ウイルス研の志田博士から分与された2種類の異なるプロモーターをもつpSFB5を用いた。トランスファーベクターの作成は、約4、3kbのc1-2S蛋白cDNAを、pUC19-c12-SからBamHIで切り出し、klenowで末端を平滑にし、pSFB5のSmaI部位に挿入しpSFB5(c12-S)を得た。RVVの作成には、1-2時間前にmoi0、1でWR株を感染させたRK細胞に、リン酸カルシウム法でpSFB5(c12-S)をトランスフェクションし、36-48時間培養後細胞内ウイルスを回収し、血球吸着反応陰性(HA(-))の組換えウイルスを選択した。その後、HA(-)ウイルスについて、サザンブロット、蛍光抗体法によりc1-2S遺伝子をもつ組換えウイルスを選択した。

結果

RK細胞にRVVおよびWR株をmoi1で感染させ、細胞内のウイルス感染価と発現されたS蛋白の量を検討するとウイルス感染価は、感染後12時間から高くなり24時間でピークに達した。また発現されたS蛋白量も同様に感染後12時間

から高くなり24時間で最高値を示した。次に³⁵Sメチオニンでラベルし、抗S蛋白単クローン抗体を用いて免疫沈降を行い、SDS-PAGEで解析した。その結果RVV感染RK細胞で発現されたS蛋白は、分子量約17万で、c1-2感染DBT細胞内のS蛋白と一致した。また、RVVで発現されたS蛋白はc1-2感染細胞内のS蛋白同様トリプシンによる解裂が認められた。

RVVで発現されたS蛋白は、c1-2感染細胞で産生されるS蛋白で免疫して得た16種類の抗S蛋白単クローン抗体に反応した。またRVVをマウス、ラットに感染させると、血清中にS蛋白に対する抗体を蛍光抗体法および中和試験により検出できた。これらのことはRVVにより発現されたS蛋白は抗原性及び免疫原性の点からもc1-2感染で産生されるS蛋白と相違がないことを示している。

MHV感染細胞では、一般的に細胞融合が観察され、この活性はS蛋白によるものと理解されている。そこでRVVにより発現されるS蛋白が、細胞融合活性を示すか否かを、培養細胞を用いて調べると、RVVをc1-2感受性のマウス由来DBT細胞のみならず非感受性のラット由来RK細胞などに接種すると、c1-2感染DBT細胞で認められるのと同様の細胞融合が認められた。さらに、この細胞融合活性は抗S蛋白単クローン抗体で抑えることができた。このことは、RVV感染細胞で認められた細胞融合は、発現されたS蛋白によることを示唆している。

考察

RVVを用いて発現させたS蛋白をc1-2感染細胞で産生されるS蛋白と比較すると、分子量、抗原性、免疫原性の何れの点でも相違は認められず、またS蛋白の重要な生物活性である細胞融合活性も認められた。このことは、RVVで発現されたS蛋白はバキュロウイルスで産生したS蛋白より本来のS蛋白に近い性質を備え、その構造および機能について詳細な解析が可能であることを示している。

15. 実験動物管理室

1. 管理室一年のあゆみ

動物管理室では、派遣社員8名と共に実験動物研究施設の環境維持および実験動物の飼育管理を行なった。SPF動物施設では感染症防止対策が最も重要であり、動物委員会で指定された病原体(HVJ, MHV, Myco.)の感染対策として、本年度は3階フロアのSPF実験ゾーンおよび一般飼育ゾーンをマウス飼育ゾーンに、2階フロアをラット飼育ゾーンに、1階をマウス・ラット以外の動物の飼育ゾーンとしてフロアごとに区分し、感染およびその拡大防止に努めた。また、各飼育室には微生物モニター用のマウス・ラットを設置し、毎月1回感染の有無を確認する定期モニタリング検査を実施した。指定ブリーダー(実験動物納入業者)以外から搬入された動物(国内・外の研究機関を含む)については、全てビニールアイソレータに収容し、感染症のないことを確認してから飼育室へ搬入した。重要な系統についてはビニールアイソレータに収容すると共に、感染病原体に汚染されている系統については帝王切開里仔法によるクリーニングを行ない、SPF化する等、マウス・ラットの感染症に対する微生物モニタリング体制を確立した。

本年度の主な研究は以下の通りである。

1. モデル動物の開発

「高地適応動物モデルとしてのナキウサギの調査研究」のため、中国科学院西北高原生物研究所(青海省西寧・平成2年8月)、中国科学院上海実験動物中心(上海・平成3年3月)に出かけ、ナキウサギを捕獲調査し、環境生理学的実験のモデル動物としてその特性を調査した。

また、平成2年9月には、北海道大学獣医学部よりニューメキシコ産のポケットマウス(Perognathus)2種およびバタネズミ(Onychomys)を導入した。これらの種は冬眠することから、サーカディアンリズムあるいは臓器移植の研究に優れたモデル動物になることが予想される。現在室内繁殖を進め、繁殖が可能な段階にきている。

2. 系統維持

現在、神経研究所で維持しているマウス系統を受精卵の状態に凍結保存し、多数の系統を維持供給できるシステムを進めている。

(管理室長 松崎哲也)

Ⅱ 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Okamoto M, Kamiya M, Oku Y, Ohbayashi M, Matsuzaki T :

Low susceptibility of the laboratory-reared Afghan Pika, *Ochotona rufescens rufescens* to *Haemonchun contortus*.

Jpn J Vet Sci 52 : 1107-1108, 1990

b. 著書

c. 総説

- 1) 松崎哲也 :

オオネズミクイの特性と利用の可能性

畜産の研究, 45 : 172-176, 1991

16. ラジオアイソトープ管理室

1. 管理室一年のあゆみ

ラジオアイソトープ管理室は、平成2年10月1日付で発足し、同日、今澤正興が当研究所疾病研究第七部より室長として昇任し、これまで任に当たっている。

当管理室は、本研究所R I施設における放射線障害防止法に基づく放射線安全管理と、ラジオアイソトープを用いた新しい研究方法の開発を行うことを目的としている。本年度の人事としては、長らくR I施設の管理事務担当として献身してきた内田史江（賃金研究助手）が平成2年11月15日付をもって退職し、代わって大崎文香（賃金研究助手）が10月16日よりラジオアイソトープの購入・使用・廃棄及び施設使用者の教育・健康診断に関する事務等の業務を担当している。また斎藤智子が10月より11月まで研究見習生として在籍し、研究に協力した。

本年度の安全管理業務の中、R I 廃水処理・有機廃液焼却・施設管理については委託業者、運営部会計課職員と協力して行った。また放射線安全教育を5月と11月に実施した。その他、平成3年度10月に開設予定の新研究棟R I施設の使用承認手続きを運営部企画室および会計課と協力して行い、科学技術庁との打ち合わせもほぼ終了することができた。更に現在、在庫管理・出入管理・廃水管理をパーソナルコンピューターを用いた管理に移行させるため、必要な作業を行っている。

研究の面では、生化学的な新しい分析法であるキャピラリー電気泳動を用いて生体物質の簡便で分解能のよい分析法を開発した。本法は、ラジオアイソトープの新しい分離分析法としても有用と考えられる。

（管理室長 今澤正興）

Ⅱ 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Shimamura M, Ohara T, Imazawa M, Miyamoto K :

Purification of myelin-associated glycoprotein from calf brain using high-performance liquid chromatography.

J Chromatogr, 526 : 535-539, 1990

- 2) Nakajima K, Imazawa M, Miyamoto K :

Presence of another species of myelin basic protein (MBP) in the developing chick brain.

Neurochem Int, 18 : 357-365, 1991

d. 班会議報告書

- 1) 今澤正興 :

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

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), 平成元年度研究報告書, p319-326, 1990

- 2) 今澤正興, 斎藤智子 :

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脳内グアニンヌクレオチドレベルに及ぼす影響—

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2年度研究報告書, p9-13, 1991

B. 学会発表

a. シンポジウム

- 1) 今澤正興, 斎藤智子 :

キャピラリーゾーン電気泳動法による脳内ヌクレオチドの分析

第10回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 大阪, 12.14, 1990

c. 一般学会

- 1) 今澤正興, 斎藤智子 :

キャピラリーゾーン電気泳動法によるリボヌクレオチド分離条件の検討

第63回日本生化学会大会, 大阪, 9.13, 1990

2) 今澤正興, 斎藤智子 :

キャピラリー電気泳動による抗てんかん薬分析法の検討

第24回日本てんかん学会, 沖縄, 11.17, 1990

C. 班会議発表

1) 今澤正興 :

キャピラリー電気泳動による脳内グアニンヌクレオチドの測定法について

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, 2.7, 1991

3. 主な研究報告

キャピラリーゾーン電気泳動による脳内ヌクレオチドの分析

今澤正興, 斎藤智子

キャピラリー電気泳動法は核酸構成成分の分析法として有用であり, 生体組織内に存在し, (-) 荷電を有するヌクレオチドの分離に関しては, 電気浸透流存在下¹⁾, および非存在下^{2, 3)} の分離例の報告がある。しかし, 後者では組織内に比較的大量にあるヌクレオシドトリリン酸が先に検出され, 微量のヌクレオシドモノリン酸が遅れて現れるため, 生体試料の分析に適さず, 前者における泳動条件の検討も充分しつこされたとは言いがたい。我々は電気浸透流存在下におけるキャピラリーゾーン電気泳動によるヌクレオチドの分離に対する pH 緩衝液の影響を検討し, 至適条件を見だし, 更にそれを脳組織中のヌクレオチド分析に応用することを目的とした。

〈方法〉

Beckman P/ACE System 2000 キャピラリー電気泳動システムを用い, 検出波長には 260nm を使用した。分離用キャピラリーには, 内径 75 μm, 有効長 50cm のヒューズドシリカ管を用いた。pH 緩衝液としては, pH5.6~pH11.0 の間では Good の緩衝液 (70~100mM) を, pH4.4~pH5.5 では酢酸リチウム (50mM) を用い, 25°C, 20~25kV で泳動を行った。内部標準として 8-BrAMP を用いて, 面積比法により各ヌクレオチドの定量を行った。マイクロ波照射したラット (7週令, 雄) の前脳を抽出後, 冷却下, 3 倍量の 0.4M HClO₄ 中ホモジナイズし, 30,000xg, 20 分間遠心分離した上清を 4M KOH で中和し, 同様の遠心分離操作を行い KClO₄ を除いた。得られた上清を水で 4 倍に希釈し, 電気泳動用の脳由来ヌクレオチド試料とした。

〈結果・考察〉

AMP, GMP, CMP, UMP, ADP, GDP, CDP, UDP, ATP, GTP, CTP, UTP の 12 種類のヌクレオチド標品の混合物の分離を pH4.4~pH11.0 の間で検討したところ, pH4.7±0.2 (LiOAc), pH6.1±0.1 (MES-Li) (Fig. 1), pH10.4 (CAPS-Na) において 11 分以内に全てのヌクレオチドが完全に分離した。pH4.7 および pH6.1 では, ヌクレオシドモノリン酸, ジリン酸, トリリン酸が各グループとして泳動され, 塩基による移動速度は各々の pH で C>A>G>U, G>A>C>U の順であった。緩衝液に加えた陽イオンの移動速度に与える影響を検討すると, Li>Na>K の順にその減少が認められ, K を用いた場合は Li を用いた場合の約 2 倍の分析時間を必要とした (pH6.1)。従って, pH4.7 および pH6.1 における分離には分析時間短縮のため, Li 塩型の緩衝液を用いるのが適当である。ただ pH10.4 では Li 塩型緩衝液

では各ヌクレオチドが完全分離されないため, CAPS-Na を使用することとした。次に, 分離に及ぼすキレート試薬の効果を検討した。キレート試薬 (EDTA) の存在はヌクレオチドの良好な分離のため不可欠であり, その非存在下では, 特にヌクレオシドトリリン酸ピークに著しいリーディングが認められた。通常, pH4.7, pH6.1, pH10.4 において, 各々 3mM, 1mM, 100 μM の EDTA を使用している。本法の検量線は, 2 μM~120 μM の間で良好な直線関係を示した。また標品サンプルを用いた場合の ATP, ADP, GTP, GDP の分析値の変動係数 (CV 値) はいずれも 3% 以下であった。また分離の理論段数は約 30 万段であり, HPLC を用いた場合よりも一桁以上高い値を示した。

pH6.1 および pH10.4 緩衝液を用いてラット脳内ヌクレオチドの分析を行うと, 各々良好な分離結果が得られた。前述のヌクレオチドの他に, NADH の分解物の比較的大きなピークが認められた。本分析法により種々の条件下の組織, 細胞内のヌクレオチドの正確で, 簡便な定量が可能であろう。

〈文献〉

- 1) Tsuda et al. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 11, 721-722 (1988)
- 2) Dolnik et al. J. Chromatogr., 480, 321-330 (1989)
- 3) Gross et al. J. Chromatogr., 480, 169-178 (1989)

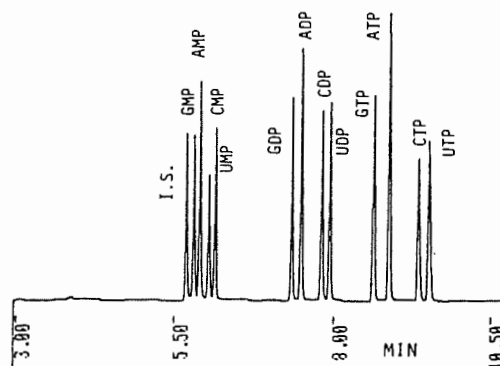


Fig. 1 Separation of nucleotides by capillary electrophoresis at pH 6.1

III 委 員 会

I 実験動物研究施設管理委員会

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4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〔実験動物研究施設管理運営規約〕や〔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、定例の動物委員会をとおして、施設を利用する研究者や、飼育管理者間の意志の疎通や、情報交換を計っている。また、動物委員会は開所以来2度目の利用者教育講習会を計画し、4月16日、〔実験動物モニタリングの現状〕（演者：鍵山直子氏）と題する講習会を主催した。

施設管理部門補佐会は昨年経験したHVJ感染事故の再発を防ぐため、種々の方策をこうじて来たが、不幸にも、4月26日に3階306号室にHVJ感染を、また、平成3年1月30日に再び2階の204号室にHVJ感染と、2度の感染を経験した。いずれの場合も感染初期に対処できたことから、約1カ月後には実験再開に踏切ることが出来たが、補佐会は今後の感染事故を防ぐため、さらに厳しい対策をこうじなければならなかった。感染事故を経験する度に取られる厳しい防止策は、逆に、施設を利用する研究者の動物実験をますますやりにくくすることにもなる。動物委員会は、この両方の立場を勘案しながら、現在中・長期的な将来計画を検討している。

動物実験が活発に行なわれるようになり、委員会は、動物実験に際し、動物を必要以上に殺したり、虐待しないよう動物福祉の立場を明らかにするため〔動物実験倫理指針〕の作成に入った。起草委員会は本指針にもとづいて動物実験が適切に行なわれるよう必要な事項を審議する委員会を設置し、〔動物実験倫理問題検討委員会規定〕を立案した（平成2年5月7日施行）。本委員会（委員長：高橋清久部長）はまず研究所の動物実験での問題点を挙げてみることから作業を開始し、11月13日には、第1回動物慰霊祭を挙行了。慰霊祭は関係者の御努力により、約100名の参加者があり、全員の献花により、質素ではあるが心のこもった式典となった。

（実験動物研究施設管理委員長補佐 菊池建機）

II RI委員会

RI研究施設の1990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ベータープレートを一台購入した。本機は多数のサンプルを同時に測定できることからスピードアップと混雑解消に威力を発揮するものと思われる。
- 2) 研究所より5人が第1種放射線取扱主任者試験に挑戦したところ、遺伝子工学研究部の鍋島曜子賃金研究員が合格した。今沢RI管理室長の代理者をおくことができるようになり、長年の懸案を解決できたことは大変喜ばしい。

III 中央施設

3) RI施設の事務を担当されていた内田さんが秋に退職されたことに伴い、後任者として大崎さんが採用された。

4) 新研究棟のRI施設の使い方を討議し、各部の使用スペース、購入機器などについて決定した。

今後もますます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 電顕委員会

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、初心者にも熟練者にも頻回に利用されている。H7000と同時に搬入されたライヘルツ社のマイクロトームも操作性に優れ、故障もないので利用者が多く夜間、休日にも利用され、予約待ちの状況である。今年度は、ライヘルツ社のクライオセクションシステムが新たに搬入された。

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10,000倍の撮影が困難である。H7000の撮影枚数が19,000枚に達し、利用回数の増加とともに部品の摩耗による故障が発生し始めた。旧機種の電子顕微鏡は、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、部品としても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 組換えDNA安全委員会

安全委員は昨年と同様で鍋島遺伝子工学研究部長(委員長)、桜川第5部長、中村診断研究部長、高橋第6室長(安全主任者)、花岡モデル動物開発部室長が研究所より、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依頼した。1991年間の研究計画として37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。

組換えDNA安全基準の緩和を文部省において検討していたが新しい安全基準が策定された。

新基準の最大の特徴は個体を宿主とする実験でも危険が推測されないような遺伝子を導入する場合は機関承認となったことである。

(組換えDNA安全委員会委員長 鍋島陽一)

V 感染実験安全委員会

平成3年3月29日に、第7回感染実験安全委員会が研究所内の6委員と外部機関、国立予防衛生研究所の小松俊彦室長のもとで開催された。委員会では、渡辺里仁室長の辞職にともない新しく田口文広室長が危険防止主任者に任命された。また、平成4年度の感染実験計画が5研究部から9件申請され、審議された結果、全て了承された。

(感染実験安全委員会委員長 杉田秀夫)

VI 建築委員会

本館の外装も整いガラス窓が入り、足場もほとんど外れて建物としての偉容を現した。設計開始の時に考えられた、外壁にタイルを張ることは予算の都合で不可能になったため、褐紫色の吹き付けになった。方々の入り口にはドアがつけられたが、玄関のドアはまだつけられていない。

内装も本年度になってから急速に進んだ。いろいろな配管や配線、それに壁や床張などもかなり出来上がった。この間、それぞれの部員が時々それらをチェックして修正を依頼し、概ね希望が叶えられた。各階の部屋のドアもつけられたがまだ塗装はされていない。廊下の天井はまだ張られていない。1階ロビーはまだ出来ていない。エレベーターもついていない。これらは秋までに完成すると思われる。

実験台やその他の設備、それにアイソトープ室のモニター類の発注の準備が進められた。基本になる実験台を主とする備品(実験器具を除く)は移転に伴って新たに購入する予定である。

厚生省による検査が平成3年10月15日に、開所式が同年11月22日にそれぞれ予定されているので、それに合わせた旧棟からの移転の計画が必要になってきた。

新研究棟には地階にアイソトープ室、1階に所長室、事務室、図書室、応接室、セミナー室、コピー室や湯沸かし室が作られる。更に大型コンピューターの設置も計画されている。移転するのは9つの部であって2階南には遺伝子工学研究部(現在動物研究棟)、北には疾病研究第5部、3階南には診断研究部、北には代謝研究部、4階南には機能研究部、北には疾病研究第3部、5階北には疾病研究第4部、6階南には疾病研究第6部、北には免疫研究部がはいる予定である。5階南には設置予定の発生物研究部が入るように設計されている。なお旧棟からの移転が済み次第、現在動物研究棟にはいつているモデル動物開発部は旧棟へ移転する予定である。

建物の外回りの工事はまだあまり進んでいないが秋までには出来上がるものと思われる。

(委員長 小沢鏝二郎)

III 中央施設

VII 図書委員会

委員長および図書委員が交代し、田平 武，中村 俊，西川 徹，松崎文雄，武井延之がその任に当たることになり，図書の整理には従来通り事務の斉藤洋子が当たることになった。基本方針は従来のもを踏襲し，雑誌を中心に購入することとした。従来購入の雑誌はすべて更新し，新しく3種類を増した。研究所1階書庫の夜間休日利用希望が多かったので，希望に応じこれを可能にした。

(委員長 田平 武)

洋雑誌名

1. Acta Histochemica et Cytochemica (1983~) vol.16~
2. Acta Neurologica Scandinavica (1967~) vol.43~
3. Acta Neuropathologica (1978~) vol.41~
4. Acta Physiologica Scandinavica (1968~) vol.72~
5. Advances in Neurology (1973~) vol.1~
6. AIDS (1987~) vol.1~
7. American Journal of Anatomy (1968~) vol.122~
8. American Journal of Human Genetics (1968~) vol.20~
9. American Journal of Medical Genetics (1977~) vol.1~
10. American Journal of Pathology (1968~) vol.52~
11. American Journal of Physiology (1968~) vol.214~
12. Analytical Biochemistry (1968~) vol.22~
13. Anatomical Record (1968~) vol.160~
14. Anatomy & Embryology (1978~) vol.153~
15. Annals of Neurology (1978~) vol.3~
16. Annals of New York Academy of Science (1968~) vol.146~
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 (1974~1990) vol.1~ vol.19
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 (1987~1989) vol.1~ vol.3
46. Bio Research Today Series' (1990~) vol.1~
47. Blood: Journal of Haematology (1987~) vol.69~
48. Brain (1968~) vol.91~
49. Brain Research (1989~) vol.476~
50. Brain Research Bulletin (1987~) vol.18~
51. Brain Reserch Reviews (1979~) vol.1~
52. British Journal of Haematology (1987~) vol.65~

III 中央施設

53. British Journal of Pharmacology (1968~) vol.34~
54. Cancer Research (1968~) vol.28~
55. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology (1987~) vol.65~
56. Cell (1974~) vol.1~
57. Cell & Tissue Kinetics (1983~1990) vol.16~ vol.23
58. Cell & Tissue Research (1978~) vol.186~
59. Cell Biochemistry & Function (1987~) vol.5~
60. Cell Biology:International Reports (1983~) vol.7~
61. Cell Calcium (1985~) vol.6~
62. Cell Differentiation and Development (1983~1990) vol.12~ vol.32
63. Cell Motility & Cytoskeleton (1983~) vol.3~
64. Cellular & Moleccular Neurobiology (1983~) vol.3~
65. Cellular Immunology (1970~) vol.1~
66. Cellular Signaling (1989~) vol.1~
67. Chemical Reviews (1968~) vol.68~
68. Chemical Titles (1968~) vol.1~
69. Chromosoma (1986~) vol.93~
70. Chronobiology International (1986~) vol.3~
71. Clinica Chimica Acta (1968~) vol.19~
72. Clinical & Experimental Immunology (1987~) vol.67~
73. Clinical Chemistry (1975~) vol.21~
74. Clinical Genetics (1970~) vol.1~
75. Clinical Immunology & Immunopathology (1987~) vol.42~
76. Clinical Neuropathology (1983~) vol.2~
77. Clinical Neuropharmacology (1987~) vol.10~
78. Cold Spring Harbour Symposium (1988~) vol.L11~
79. Computers & Biomedical Research (1987~1988) vol.20~21
80. Cumulated Index Medicus (1968~) vol.9~
81. Current Contents (1990~)
82. Cytobiology (1969~1979) vol.1~18

83. Cytogenetics & Cell Genetics (1983～) vol.35～
84. Development (1987～) vol.99～
改名前の名称 (Journal of Embryology and Experimental Morphology (1986) vol.91～98)
85. Developmental Biology (1968～) vol.17～
86. Developmental Brain Research (1986～) vol.24～
87. Differentiation (1973～) vol.1～
88. Electromyography & Clinical Neurophysiology (1983～) vol.23～
89. The EMBO Journal (1983～) vol.2～
90. Endocrinology (1968～) vol.82～
91. Epilepsia (1987～) vol.28～
92. Epilepsy Research (1987～) vol.1～
93. European Journal of Biochemistry (1967～) vol.1～
94. European Journal of Cell Biology (1979～) vol.19～
95. European Journal of Immunology (1983～) vol.13～
96. European Journal of Medical Chemistry (1987～) vol.22～
97. European Journal of Neurosciences (1989～) vol.1～
98. European Journal of Pharmacology (1967～) vol.1～
99. European Neurology (1987～) vol.26～
100. Experientia (1968～) vol.24～
101. Experimental Brain Research (1966～) vol.1～
102. Experimental Cell Biology (1983～1989) vol.51～ vol.57
103. Experimental Cell Research (1968～) vol.49～
104. Experimental Gerontology (1987～) vol.22～
105. Experimental Neurology (1959～) vol.1～
106. Experimental Pathology (1983～) vol.23～
107. 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
108. FEBS Letters (1968～) vol.1～
109. Gene (1986～) vol.41～

III 中央施設

110. Genes & Development (1987~) vol.1~
111. Genetical Research (1987~) vol.49~
112. Genetics (1987~) vol.115~
113. Genome (1987~) vol.29~
114. Genomics (1987~) vol.1~
115. GLIA (1988~) vol.1~
116. Growth Factors (1989~) vol.1~
117. Histochemistry (1983~) vol.77~
118. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie,Biological Chemistry
(1983~) vol.364
119. Human Genetics (1964~) vol.1~
120. Immunochemistry (1964~1974) vol.1~17
121. Immunological Reviews (1987~) vol.95~
122. Immunology (1968~) vol.14~
123. Immunology Today (1983~) vol.4~
124. Infection & Immunity (1970~) vol.1~
125. International Archives of Allergy & Applied Immunology (1987~) vol.82~
126. International Journal of Biochemistry (1983~) vol.15~
127. International Journal of Cancer (1987~) vol.39~
128. International Journal of Neuroscience (1983~) vol.18~
129. In Vitro (1983~) vol.19~
130. Journal of Affective Disorders (1986~) vol.10~
131. Journal of American Chemical Society (1968~) vol.90~
132. Journal of American College of Neuropsychopharmacology (1987~) vol.1~
133. Journal of Anatomy (1967~) vol.102~
134. Journal of Biochemistry (1922~) vol.1~
135. Journal of Biological Chemistry (1968~) vol.243~
136. Journal of Cell Biology (1968~) vol.36~
137. Journal of Cell Science (1966~) vol.1~
138. Journal of Cellular Physiology (1968~) vol.71~

139. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (1981~) vol.1~
140. Journal of Chemical Neuroanatomy (1988~) vol.1~
141. Journal of Child Neurology (1987~) vol.2~
142. Journal of Chromatographic Science (1987~) vol.25~
143. Journal of Chromatography (1958~) vol.1~
144. Journal of Clinical Investigation (1984~) vol.73~
145. Journal of Comparative Neurology (1898~) vol.1~
146. Journal of Cyclic Nucleotide & Protein Phosphorylation Research (1987~)
vol.12~
147. Journal of Developmental Physiology (1987~) vol.9~
148. Journal of Electron Microscopy (1978~) vol.27~
149. Journal of Experimental Medicine (1968~) vol.127~
150. Journal of Experimental Psychology (1987~) vol.13~
151. Journal of Experimental Zoology (1986~) vol.237~
152. Journal of General Physiology (1919~) vol.1~
153. Journal of General Virology (1986~) vol.67~
154. Journal of Heredity (1986~) vol.77~
155. Journal of Histochemistry & Cytochemistry (1968~) vol.16~
156. Journal of Immunological Methods (1971~) vol.1~
157. Journal of Immunology (1968~) vol.100~
158. Journal of Inherited Metabolic Disease (1978~) vol.1~
159. Journal of Lipid Research (1968~) vol.9~
160. Journal of Magnetic Resonance (1969~) vol.1~
161. Journal of Medical Genetics (1987~) vol.24~
162. Journal of Membrane Biology (1969~) vol.1~
163. Journal of Mental Deficiency Research (1957~) vol.1~
164. Journal of Molecular Biology (1969~) vol.39~
165. Journal of Morphology (1983~) vol.175~
166. Journal of Muscle Research & Cell Motility (1983~) vol.4~
167. Journal of National Cancer Institute (1987~) vol.78~

III 中央施設

168. Journal of Neural Transmission (1968~) vol.31~
169. Journal of Neurobiology (1983~) vol.14~
170. Journal of Neurochemistry (1968~) vol.15~
171. Journal of Neurocytology (1983~) vol.12~
172. Journal of Neurogenetics (1983~) vol.1~
173. Journal of Neuroimmunology (1981~) vol.1~
174. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry (1926~) vol.1~
175. Journal of Neurological Sciences (1964~) vol.1~
176. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology (1987~) vol.46~
177. Journal of Neurophysiology (1938~) vol.1~
178. Journal of Neuroscience (1986~) vol.6~
179. Journal of Neuroscience Methods (1979~) vol.1~
180. Journal of Neuroscience Research (1983~) vol.9~
181. Journal of Pathology (1983~) vol.139~
182. Journal of Pediatrics (1968~) vol.72~
183. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics (1967~) vol.156~
184. Journal of Pharmacy & Pharmacology (1987~) vol.39~
185. Journal of Physiology (1968~) vol.194~
186. Journal of Tissue Culture Methods (1983~) vol.8~
187. Journal of Toxicology : Toxin Reviews (1987~) vol.6~
188. Journal of Structure Biology (1990~) vol.103~
改名前の名称 Journal of Ultrastructure Research & Molecular Structure Research
(1968~1990) vol.22~vol.102
189. Journal of Virology (1967~) vol.1~
190. Laboratory Animal (1986~) vol.20~
191. Laboratory Animal Science (1986~) vol.36~
192. Laboratory Investigation (1968~) vol.18~
193. Lancet (1968~)
194. Life Science (1968~) vol.7~
195. Lipids (1966~) vol.1~

196. MATRIX (1989~) vol.9~
197. Membrane Biochemistry (1987~) vol.7~
198. Metabolic Brain Disease (1987~) vol.2~
199. Methods in Enzymology (1955~) vol.~
200. Methods in Newosciences (1990~) vol.1~
201. Molecular & Cellular Biochemistry (1973~) vol.1~
202. Molecular & Cellular Biology (1983~) vol.3~
203. Molecular & Chemical Neuropathology (1989~) vol.10~
204. Molecular Biology Reports (1987~) vol.12~
205. Molecular Brain Research (1986~) vol.1~
206. Molecular Immunology (1979~) vol.16~
207. Molecular Neurobiology (1987~) vol.1~
208. Molecular Pharmacology (1965~) vol.1~
209. Muscle & Nerve (1978~) vol.1~
210. Mutation Research (1964~) vol.1~
211. Nature (1968~) vol.217~
212. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (1985~) vol.331~
213. Neurobiology of Aging (1987~) vol.8~
214. Neurochemical Pathology (1987~1988) vol.6~vol.9(タイトル変更)
215. Neurochemical Research (1976~) vol.1~
216. Neurochemistry International (1987~) vol.10~
217. Neuroendocrinology (1987~) vol.45~
218. Neurology (1970~) vol.20~
219. Neuron (1988~) vol.1~
220. Neuropathology & Applied Neurobiology (1975~) vol.1~
221. Neuropediatrics (1978~) vol.9~
222. Neuropeptides (1983~) vol.4~
223. Neuroscience (1983~) vol.8~
224. Neuroscience Abstracts (1987~) vol.5~
225. Neuroscience Letters (1975~) vol.1~

III 中央施設

226. Neuroscience Research (1984~) vol.1~
227. Neurotoxicology (1987~) vol.8~
228. New England Journal of Medicine (1967~) vol.276~
229. Nucleic Acids Research (1974~) vol.1~
230. Pathologie (1983~) vol.4~
231. Pathobiology (1990~) vol.58~
232. Pediatric Research (1967~) vol.1~
233. Peptides (1983~) vol.4~
234. Pediatric Neurology (1987~) vol.3~
235. Pflugers Archive European Journal of Physiology (1947~) vol.249~
236. Pharmacological Reviews (1968~) vol.20~
237. Pharmacology Biochemistry & Behavior (1983~) vol.18~
238. Physiological Reviews (1968~) vol.48~
239. Physiology and Behavior (1987~) vol.39~
240. Proceedings of Japan Academy (1944~) vol.20~
241. Proceedings of National Academy of Sciences (1968~) vol.59~
242. Proceedings of Royal Society of London Ser.B:Biological Science (1982/83) vol.217~
243. Proceedings of Society for Experimental Biology & Medicine (1987~) vol.184~
244. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1966~) vol.1~
245. Protoplasma (1989~) vol.148~
246. Psychopharmacology (1959~) vol.1~
247. RAMBIOS (1986~1987) vol.3~4
248. Regulatory Peptides (1986~) vol.14~
249. Reviews of Magnetic Resonance in Medicine (1986~) vol.1~
250. Revue Neurologique (1978~) vol.134~
251. Roux's Archives of Developmental Biology (1969~) vol.162~
252. Science (1968~) vol.159~
253. Second Messengers and Phosphoproteins (1988~) vol.12~
254. Somatic Cell & Molecular Genetics (1986~) vol.2~
255. Studia Biophysica (1983~) vol.93~

256. Subcellular Biochemistry (1987～) vol.12～
257. Synapse (1987～) vol.1～
258. Theriogenology (1986～) vol.25～
259. Tissue & Cell (1983～) vol.15～
260. Tohoku Journal of Experimental Medicine (1984～) vol.142～
261. Toxicology Letters (1987～) vol.35～
262. Transplantation (1987～) vol.43～
263. Trends in Biochemical Sciences (1983～) vol.8～
264. Trends in Genetics (1986～) vol.2～
265. Trends in Neurosciences (1983～) vol.6～
266. Trends in Pharmacological Sciences (1983～) vol.4～
267. Veterinay Record (1986～) vol.118～
268. Virchows Archiv A:Pathological Anatomy & Histology (1947～) vol.314～
269. Virchows Archiv B:Cell Pathology (1968～) vol.1～
270. Virology (1986～) vol.148～
271. Virus Research (1986～) vol.4～

和雑誌名

1. 遺伝 (1981～) vol.35～
2. イアトロス (1989～)
3. 科学 (1981～) vol.51～
4. 化学 (1981～) vol.36～
5. 細胞工学 (1985～) vol.4～
6. 神経研究の進歩 (1981～) vol.25
7. 神経内科 (1982～) vol.16～
8. 生体の科学 (1981～) vol.32～
9. 総合臨床 (1981～) vol.30～
10. 組織培養 (1981～) vol.7～
11. 蛋白質・核酸・酵素 (1981～) vol.24～
12. 治療 (1981～) vol.63～

III 中央施設

13. 脳と発達 (1981～) vol.13～
14. ラボラトリーアニマル (1986～1988) vol.5 No.1以後休刊
15. サイエンス (1987～) vol.17～
16. 神経精神薬理 (1987～) vol.9～
17. 実験医学 (1986～) vol.4～
18. 代謝 (1987～) vol.24～
19. 臨床神経学 (1982～1986) vol.23～26
20. Clinical Neuroscience (1987～) vol.5～
21. 続・生化学実験講座
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部長に準ずるもの。

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核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。

IV 別 項

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。

IV 別 項

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るものとする。

2. 資 格

研究生は，大学卒業者または国立精神・神経センター総長（以下「総長」という。）が，同等以上の学力を有すると認めた者で，所属する機関長等の推薦する者。

研究見習生は，高等学校以上の学校を卒業した者または総長が同等以上の学力を有すると認めた者で，所属する機関長等の推薦する者。

3. 選 考

- (1) 神経研究所部長会議で選考を行い，総長にその結果を報告する。
- (2) 研究生または研究見習生の承認を受けようとする者は，神経研究所研究生研究見習生申請書（様式1）を，指導を受けようとする部長（以下「指導部長」という。）を経て神経研究所部長会議に提出する。

4. 定数，承認および承認期間

- (1) 研究生および研究見習生の定数は各部若干名とし，総長が承認する。
- (2) 承認期間は1年以内とする。ただし，再選考することは妨げない。

5. 身 分

推薦する機関長の所属とする。

6. 給 与

研究生および研究見習生には，国から一切の給与を支給しない。

7. 責任と義務

- (1) 研究生および研究見習生の服務規律および特許権については、神経研究所に準ずるものとする。
- (2) 研究生および研究見習生は、指導部長の指示または許可を得て、研究・研修および研究業績の発表を行うものとする。

8. 辞 退

研究生および研究見習生は、研究および研修を辞退したい場合には、辞退届を指導部長を経て総長に提出するものとする。

9. 承認の取消

総長は、研究生および研究見習生がこの内規に違背し、または研究生および研究見習生としてふさわしくない言動があった場合においては、神経研究所部長会議で承認を取り消すことができる。

10. 弁 済

研究生および研究見習生は、本人の故意または重大な過失により国に損害を与えたときは、その弁済の責を負わなければならない。

附 則

この内規は、昭和61年10月1日から施行する。

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、会長が保健医療局長と協議のうえ定める。

7.（附 則）

- (1) この要領は、昭和62年4月1日より施行し、従前の神経疾患研究推進委員会規程は、廃止する。
- (2) この規定の施行後最初に委嘱する委員のうち保健医療局長の指定する者の任期は本文の規定にかかわらず1年とする。

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
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	東北大学医学部神経内科教授	〃
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・神経センター名誉院長	〃
萬 年 徹	東京大学医学部神経内科教授	〃
森 温 理	東京慈恵医科大学精神医学教授	〃
森 和 夫	国立療養所下志津病院長	〃
大谷 藤 郎	財団法人藤楓協会理事長	H.2.4.1～H.4.3.31
小野村 敏 信	大阪医科大学整形外科学教授	〃
鴨 下 重 彦	東京大学医学部薬理学第1教授	〃
西 園 昌 久	福岡大学医学部精神医学教授	〃
西 谷 裕	国立療養所宇多野病院長	〃
野々村 禎 昭	東京大学医学部薬理学第1教授	〃
森 亘	科学技術会議議員	〃
寺 松 尚	厚生省保健医療局長	関係行政機関等
土 井 豊	厚生省児童家庭局長	〃
谷 秀 一	厚生省大臣官房科学技術審議官	〃
里 吉 榮二郎	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	〃
有 馬 正 高	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
江 橋 節 郎	岡崎国立共同研究機生理学研究所長	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院長	〃
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	〃
岩 崎 祐 三	東北大学医学部神経内科教授	H.2.4.1～H.4.3.31
鴨 下 重 彦	東京大学医学部薬理学第1教授	〃
西 谷 裕	国立療養所宇多野病院長	〃
西 村 健	大阪大学医学部精神医学教授	〃
谷 秀 一	厚生省大臣官房科学技術審議官	関 係 行 政 機 関 等
里 吉 榮二郎	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	〃
有 馬 正 高	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2年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覽表

研 究 課 題	所 属 及 び 役 職 名	主 任 研 究 者	金 額	備 考
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	桒 中 征 哉	23,000 ^{千円}	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	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 神 経 外 科 教 授	松 本 悟	19,000	〃
63指-4 ミエロパチーの発現機構と病因に関する研究	東 京 大 学 医 学 部 脳 研 神 経 内 科 教 授	萬 年 徹	13,000	〃
63指-5 中枢神経系の機能修復促進に関する開発的研究	新 潟 大 学 脳 研 究 所 神 経 内 科 教 授	宮 武 正	13,000	〃
元指-1 難治てんかんの病態と治療に関する研究	国立療養所静岡東病院長	清 野 昌 一	20,000	〃
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	〃
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	小 澤 鏝 二 郎	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	荒 木 淑 郎	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 副院長	高 橋 桂 一	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長	飯 田 光 男	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	竹 下 研 三	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	折 居 忠 夫	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	大 月 三 郎	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	高 橋 三 郎	20,000	〃
2指-9 脊髄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	矢 田 賢 三	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 立 脳 血 管 研 究 セ ン タ ー 所 長	上 村 和 夫	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	御 子 柴 克 彦	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	吾 郷 晋 浩	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	佐 藤 光 源	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長	三 吉 野 産 治	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	若 林 慎 一 郎	17,000	〃
		合 計	600,000	

Ⅳ 別 項

8. 平成3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
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	千円 20,000	継続
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	〃
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	小澤 鏑二郎	57,000	継続
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 第一内科教授	荒木 淑郎	46,000	〃
2指-3 筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究	国立療養所兵庫中央病院 副院長	高橋 桂一	49,000	継続改変
2指-4 筋ジストロフィーの療養と看護に関する研究	国立療養所鈴鹿病院長	飯田 光男	45,000	継続
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	竹下 研三	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	折居 忠夫	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	大月 三郎	19,000	〃
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	高橋 三郎	18,000	〃
2指-9 脊髄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	矢田 賢三	22,000	継続改編
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	御子柴 克彦	21,000	継続
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	吾郷 晋浩	17,000	〃
2指-13 薬物依存の発症機序と臨床及び治療に関する研究	東北大学医学部 神経科精神科教授	佐藤 光源	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長	三吉野 産治	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	若林 慎一郎	17,000	〃
3指-1 筋ジストロフィーモデル動物の開発、生産とその評価に関する研究	国立精神・神経センター 神経研究所部長	埜 中 征 哉	27,000	新規再編
3指-2 神経系機能修復に関する開発的研究	新潟大学脳研究所 神経内科学教授	宮 武 正	14,000	〃
3指-3 精神・神経・筋疾患の頻度、発症要因及び予防に関する研究	北海道大学医学部 公衆衛生学教授	近藤 喜代太郎	10,000	新規
3指-4 発達期脳循環障害の病態形成機序とその予防法に関する研究	国立精神・神経センター 神経研究所部長	高嶋 幸男	19,000	〃
3指-5 画像解析による高次脳機能障害の総合的研究	秋田県立 脳血管研究センター所長	上村 和夫	20,000	〃
3指-6 感情障害の臨床像、長期経過及び予後に関する研究	国立精神・神経センター 神経研究所部長	高橋 清久	12,000	〃
3公-1 高次脳機能の発達とその障害に関する基礎的並びに臨床的研究	慶応義塾大学医学部 生理学教授	植村 慶一	19,000	〃
合	計		620,000	

国立^{精神}神経センター神経研究所年報

第5号（通巻13号）平成2年度

発行 平成3年3月31日

発行者 杉田秀夫

編集者 埜中征哉

高坂新一

印刷 株式会社 タマタイプ

国立^{精神}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
