

国立精神・神経センター
神経研究所年報

第6号(通巻14号)

平成3年度

National Institute of Neuroscience
National Center of Neurology
and Psychiatry

— 1991 —

国立精神・神経センター
神 経 研 究 所 年 報

第 6 号(通巻14号)

平成 3 年度



国立精神・神経センター 神経研究所本館落成 平成3年9月



神経研究所 記念撮影 平成 4 年 3 月 30 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
6. 研究所本館竣工にあたって	16

II 研究業績

1. 疾病研究第一部	25
2. 疾病研究第二部	39
3. 疾病研究第三部	56
4. 疾病研究第四部	74
5. 疾病研究第五部	86
6. 疾病研究第六部	99
7. 疾病研究第七部	120
8. 診断研究部	126
9. 微細構造研究部	134
10. 機能研究部	148
11. 代謝研究部	157
12. 免疫研究部	170
13. 遺伝子工学研究部	176
14. モデル動物開発部	186
15. 実験動物管理室	194
16. ラジオアイソトープ管理室	196

III 委 員 会	201
-----------------	-----

IV 別 項

1. 国立精神・神経センター神経研究所流動研究員運営要領	219
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	221
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	222
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	223
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	224
3. 国立精神・神経センター神経研究所勤務心得	226
4. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会運営要領	227
5. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会委員	229
6. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会評価部会委員	230
7. 平成3年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表	231
8. 平成4年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表	232

I 神經研究所の概要

1. 概 要

1. 概 要

平成3年は昭和53年4月国立武蔵療養所神経センターが8部16室で発足して14年目、昭和61年10月、国立精神・神経センター神経研究所に組織替えとなってから6年目に当たる。その間に14部34室と2管理室までに中身は大きく伸展した。

この平成3年9月に、設計段階から足掛け5年の工事期間を経て、待望の新しい研究棟（地上六階、地下一階、7,800平方メートル）の竣工を迎えることができ、研究所にとって歴史的な記念すべき年となった。

我々は規模と設備においてより今日の神経研究所の要請に応えたこの新棟を研究所本館とし、旧研究棟を研究所2号館と呼ぶことにした。

本館建築に関する経緯は小沢本館建築委員長の経過報告の頁に譲るが、本館は多くの人々の努力と援助によって完成を見た。設計を担当された厚生省整備課、療養所課の方々、精神・神経センター運営部の皆様、外から多大の援助を頂いた患者家族団体の方々、そして当研究所の小沢部長を委員長とする建築委員の方々、研究所全職員に深い感謝の念を表したいと思う。

当研究所は本館、2号館、実験動物研究棟と合わせて15,000㎡の広さとなり、ナショナルセンターにふさわしい規模となった事は誠にうれしい限りである。同時に今後これらの施設を如何に活用し研究を推進させるか、我々に課せられた責務の重さを痛感する。

平成2年11月、研究の為に犠牲になった多くの実験動物の霊に対し、感謝の念を込めて有志による動物慰霊祭が初めて挙行された。本年は慰霊碑の建立が実現した。碑は武蔵病院入院患者の作業療法のひとつとして陶芸に携わる方々の手になる陶板をはめこんだものである。

2. 組 織

平成3年度の人事面では部長の異動は無かったが、疾病研究第四部、疾病研究第一部の部長を選考中である。

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名で定員合計49名であり、非常勤流動研究員は28名である。事務職員は3名が従事している。3月1日現在、フルタイム、パートタイムのセンター研究員（賃金研究員）及び賃金研究助手が各部合わせて38名である。

さらに併任研究員56名（センター内併任研究員を含む）、研究生89名、客員研究員28名、財団や外国から派遣されて研究を共に行う外来研究員19名が在籍し、実質的研究パワーを担っている。

3. 研究活動

詳細は各研究部の「一年のあゆみ」を参照して頂きたいが、日独科学技術協定に基づく「神経生物学」に関する両国間のシンポジウムが3月ハンブルグで行われ、日本側から所長、鍋島、高坂部長、中嶋、松崎室長が出席し研究発表を行い、今後の両国間の研究交流の進め方について討論した。今後はドイツのみでなく米国、イタリアなどとの共同研究を積極的に推進させて行くつもりである。

大学生に対する指導協力も活発に行われ、学部学生6名、大学院生21名が研究生として在籍し、全研究生の30パーセントになっている。

厚生省精神・神経疾患研究委託費は平成2年度に比し2千万円増額され、6億2千万円となり、精神・神経・筋・発達障害に関連する27課題の研究班にそれぞれ分配されている。神経研究所からは埜中征哉微細構造研究部長、小澤鏖二郎機能研究部長、高嶋幸男疾病研究第二部長、高橋清久疾病研究第三部長がそれぞれ主任研究者として参加している。

厚生省の痴呆疾患対策推進事業では、4年3月12日米国より3名の演者を迎え、竹橋会館で第4回国際痴呆共同シンポジウムを開催した。

神経研究所セミナーは23回開催され15名の海外からの演者が参加したが、日本での国際学会を機として当所を訪れ、海外の知見を講じ、お互い意見を交換することは研究の遂行上極めて喜ばしい事である。

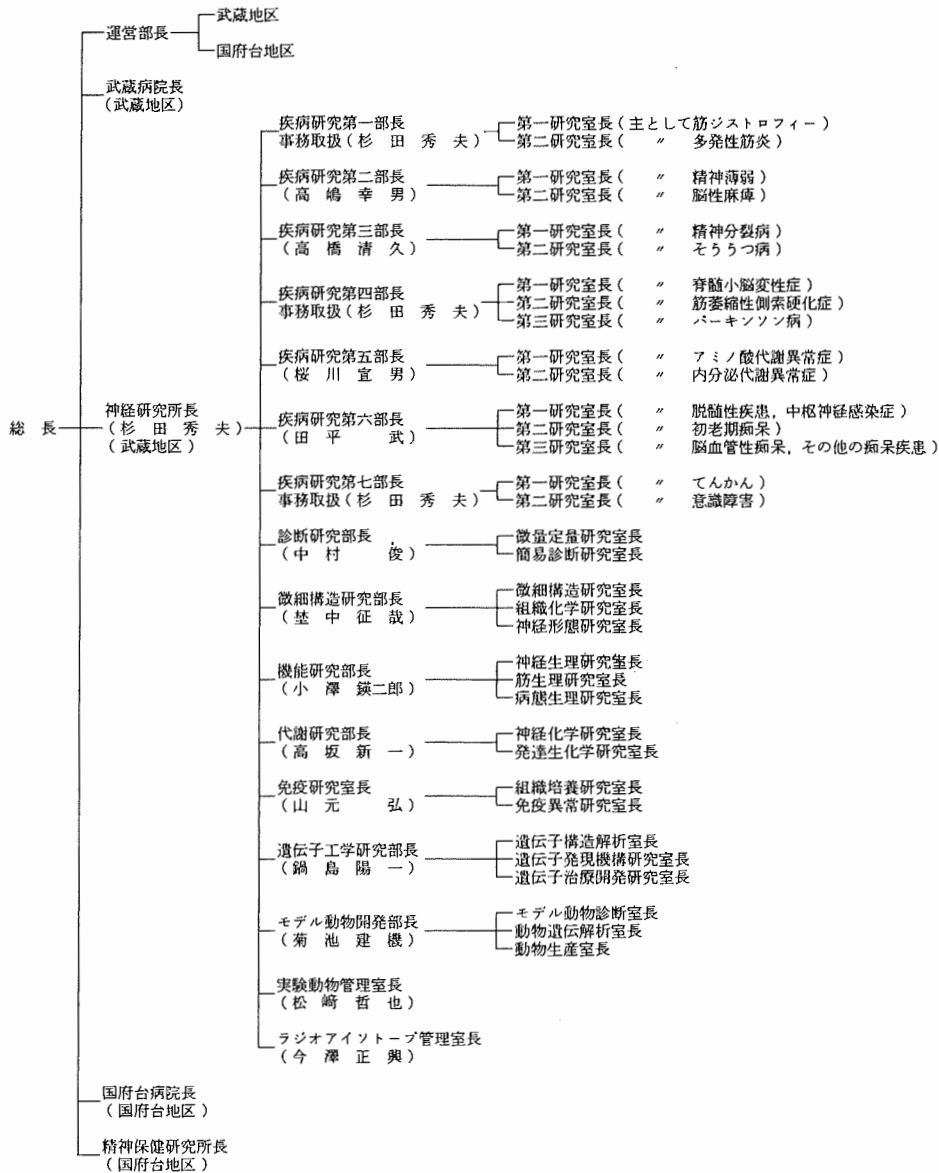
外国人で滞在した延人数は15名で、半年以上の長期滞在者は4名、来年度滞在に向け2名が年度末3月に来所している。

平成4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

2. 国立精神・神経センター神経研究所組織 (表1)



定 員						併任研究員		流 動 研究員	賃 金	合 計			
研 究 職						行(一)	行(二)						
所 長	部 長	管 理 室 長	室 長	研 究 員	研 究 員 補 助 員	係 長	係 員	計	部 長	研究員			
1	12	2	34	—	—	—	—	49	2	36	28	2	117

(平成3年度の計)

3. 平成3年度 神経研究所構成員 (表2)

(平成3年4月1日～平成4年3月31日迄)

所 部 名	部 長	室 長	研 究 員	流 動 研 究 員	○センター研究員 * 賞金研究助手	研 究 生 △研究見習生	併 任 研 究 員	客 員 研 究 員	外 来 研 究 員
疾病研究第一部	杉 田 秀 夫 (事務取扱)	石 浦 章 一 (～3.2/29) 荒 畑 喜 一	塚 原 俊 文 (休職)	有 川 恵 理 (～3.5/31) Stefan Beyenburg (3.4/1～5/31) 中 村 浩 一 郎 (3.6/1～) 林 由 起 子 (3.6/1～) 下 川 雅 文 (3.7/1～)	○青木 治美 ○後藤加奈子 ○古賀 律子	奥山 輝明 織茂 智之 階堂三砂子 田川 一彦 野島美知夫 △野村 泰広 湖脇 泰介 松田 潔 △佐伯 知勇 有川 恵理 (3.6/1～8/31) 古城 敏 (4.2/6～) 平林 久吾 (4.2/7～) 横山 和正 (4.3/1～)	石 原 幸 子 鎌 倉 彦 明 春 原 経 明 山 口 真 道 有 川 恵 理 (3.8/1～) (3.9/1～) 石 浦 章 一 (4.3/1～)	佐 藤 猛 夫 高 木 昭 三 水 本 恭 三 Ding-Guo Shen (3.9/5～9/9)	Lee Moon Keen (3.9/19～11/11)
疾病研究第二部	高 嶋 幸 男	田 中 晴 美 水 戸 敬 (3.5/1(復職))		長 谷 川 元 宏 (3.4/1～6/30) 飯 田 浩 一 (3.4/1～) 亀 井 淳 (3.8/1～)	*堤 悦子 *伊崎紀代子 ○矢野 真理 (3.4/1～4.3/31) ○丸山 悦子 (3.4/1～4.3/31) ※進 町子 (3.4/1～)	亀井 淳 (～3.7/31) 平野 悟 福田冬季 福水 道郎 山内 秀雄 松井 深 林 由起子 (～5/30) 河村 成子 (3.4/22～7/31) 田村 頼子 (3.5/13～) 小沢 浩 (3.5/22～)	小 野 寺 一 郎 杉 田 克 文 鈴 木 西 武 森 本 武 彦 水 口 雅 (3.8/1～) (3.12/1～) 瀬 川 文 徳 (4.2/1～) 難 波 吉 雄 (4.2/15～)	猪 股 賢 一 鈴木 角田 西 田 道 斐 宝 許	猪 股 賢 一 義 之 勝 朗 孝 史 明 定 博 史

疾病研究第三部	高橋清久	池田正明 (3.4/1~)	武内ゆかり (~3.9/30) 斉藤和子 (3.10/1~4.3/31)	○高嶋瑞夫 (~3.11/30) ○斉藤和子 (~3.9/30) ○海野麻未 (3.4/1~7/8) (4.3/2~)	加藤俊徳 (3.7/1~) 下山丈紀 (3.12/1~) △村上享 (4.3/5~)	石川俊 大川匡 小宮山徳 渋谷大 三本伸 綱橋浩 樋口輝 武内ゆかり (4.2/1~)	市成宮林 川瀬侃 宏本 伸浩治 治	橋本篤 海野麻未 (3.7/9~4.3/1)
疾病研究第四部	杉田秀夫 (事務取扱)	小田健一郎 郭伸	相澤仁志 (~3.8/31)	○松井京子 *志鎌昌子	小川哲郎 加藤文代 加藤由紀子 加賀屋有行 淳 柏地 曉生 黒田安計 篠原一之 白山幸彦 村岡新一郎 岩間久行 (3.5/1~) 森野百合子 (3.6/1~) 杉下真理子 (3.8/1~) 幸田和久 (3.9/2~9/14) 武井陽介 (3.9/2~9/14) 熊代新 (3.10/1~) 新野秀人 (3.12/1~) 吉村祐志 (3.12/2~) 田中邦明 (4.2/1~)	北村純一 柴崎浩		

Ⅰ 神経研究所の概観

部 名	部 長	室 長	研 究 員	流動研究員	○センター研究員 * 資金研究助手	研 究 生 △ 研究見習生	併任研究員	客員研究員	外来研究員
疾病研究第五部	桜川 宣 男	桃 井 隆	佐々木 征行 (3.5/16~)	真 先 敏 弘 佐々木 征行 (~3.5/15) 大 高 登 志 男 (3.4/1~) 天 野 寿 一 (3.4/1~9/30) 新 井 幸 男 (3.12/3~)	* 和 氣 佳 代 * 田 中 久 美 (~3.6/7) * 川 西 桂 子 (3.4/1~)	新井 幸男 (~3.12/2) 有本 深 彦 川井 ゆか 小林 幸子 富田 政孝 △ 塩塚 崇倫 (3.4/22~) 山形 崇倫 (3.10/1~)	高木 昭 輝 花岡 繁 兒 横井 風 児 (~3.9/30) 佐藤 充 夫 新川 昭 典 鈴木 秀 紀 蜂谷 秀 紀 吉村 秀 人 岡 村 秀 人 渡部 徳 子 (3.5/15~) 岩崎 裕 治 (4.1/27~)	青木 桜 庭 穂 均	横山 安 伸 Matloob Azam (4.2/4~3/31)
疾病研究第六部	田 平 武	国 高 山 隆 下 橋 慶 隆		北 口 哲 雄 遠 藤 真 得 華 崔 得 華 (4.1/1~3/31)	○ 二 瓶 淳 子 (~3.9/30) * 掛 湯 康 子 * 久 野 か ほ る * 下 佐 洋 子	井野邊 純一 井藤 悦朗 亀谷 雅洋 坂中 進 透 川初 透 (3.6/1~) 近藤 誉之 (4.2/1~)	岡田 宏 基 小野 寺 節 明 富 永 英 頌 永 田 史	並 河 正	Ferenc Gallyas Jr. 小路 久 敬 裕 華 小 西 吉 得 華 崔 一 得 華 (~3.12/31) 佐藤 準 一 Alice M. Takeuchi 西澤 正 豊 弘 瀬 秀 樹 光 永 吉 宏 Milena E Kozovska (3.10/1~)
疾病研究第七部	杉田 秀 夫 (事務取扱)	西 川 徹					宇 野 正 威		
診 断 研 究 部	中 村 俊	林 時 司 (~3.8/31) 荻 野 孝 央		Ahmed MD Kabir	* 森 田 薫 ○ 前 川 み ど り * 高 山 明 美	室屋 賢康 橋本 裕子 (3.11/12~)	等々力 英 美 高 山 豊 (3.5/1~)	上 代 淑 人	

微細構造研究部	壁中征哉		服部成介	菊池愛子 後藤雄 (3.7/22~ 海外出張)	遠藤正美 (~3.4/30)	○桶田利加 *神岡里子 *伊藤すま子 (~4.3/31)	秋山千枝子 簡 裕 芥藤 陽子 永井 敏郎 中林 治夫 萩原 雄三 田辺 雄志 鏡 育翠 眞根 翠 呉 建明 小林 一成 尾高 光昭 (3.5/13~9/30) 徳永 誠 (3.7/24~) 佐藤 温 (3.8/1~) 石原 幸宏 (3.8/1~) 川口 善治 (3.9/10~) 玉山 公基 (3.9/12~)	前川昌平 (3.7/29~)	Samuel M. Chou José C. Navarto (3.7/11~7/14)			
機能研究部	小沢鏗二郎		吉田幹晴	萩原謙 林 子介	鈴木厚 (3.4/1~8/31) 水野裕司 (3.6/1~) 山本秀子 (3.9/1~)	*山田圭津 *芥藤和江	水野一乘 池谷紀代子 △藤原敬宏 (3.12/1~)	熱海佐保子 芥藤公厚 鈴木直 伊藤忠直 (3.9/1~) (3.12/1~)	木村一郎 江口新比古 芥藤加代子 田中光			
代謝研究部	高坂新一		中嶋一行	武井延之	内田耕一 (~3.7/31) 芥藤茂治 (~4.3/31)	○大沢圭幸 *亀井 (~3.6/30) *平井ふさ子	榭原真人 浜之上 誠 永田 晃一 広瀬 雄一			昇彦人豊 昭雅 島本 奈本 北下 宮		

I 神経研究所の概要

部 名	部 長	室 長	研 究 員	流 動 研 究 員	○ センター研究員 * 賞金研究助手	研 究 生 △ 研究員習生	併 任 研 究 員	客 員 研 究 員	外 来 研 究 員
				今 井 嘉 紀 (3.4/16~)	○ 竹本なきさ (3.4/8~)	服部 達哉 中尾 裕史 岡崎 任晴 (3.4/8~) 石川理恵子 (3.12/10~) 井幡 敏 (4.1/6~)			保 坂 義 隆 (3.5/28~)
免 疫 研 究 部	山 元 弘	松 田 義 宏	保 竹 内	松 浦 靖 葛原 博 浩 幸 男 田 村 浩 男 (3.9/30)		田 村 浩 男 (~3.9/30)		古 川 昭 英 栄 一 矢 倉 栄 一 原 (3.5/1~)	
遺 伝 工 学 研 究 部	鍋 島 陽 一	藤 沢 淳 文 子 雄 尋 松 崎 千 尋 疾 (3.9/1~)		浜 千 尋 (~3.8/31) 上 条 桂 樹 修 青 藤 修 (3.4/8~9/30)	○ 鍋島 曜子 * 大滝 雅子 * 刑部 仁美 ○ 八神 貴子 (3.5/7~)	朝倉 淳 星野 幹雄 星野 美奈子 (~3.8/31) 黒尾 誠 (3.5/7~) 富岡ちあき (4.1/1~)	今 山 田 保 忠 跡 見 順 子 (3.5/1~4.2/29) 星 美 奈 子 (3.9/1~)		李 紹 巍 (4.3/1~)
モ デ ル 動 物 開 発 部	菊 池 建 機	花 岡 和 文 広 則 田 口 文 広		藤 原 純 (3.6/1~4.1/31) 久 保 英 幸 (3.7/1~)	○ 花岡美智子 * 志鎌 昌子 ○ 菊地 寿枝	水谷 誠 臼杵扶佐子 △ 市原 伸恒 佐伯 圭一 (3.7/1~)	規 雅 也 之 史 内 雅 一 佳 清 田 内 佳 清 山 内 佳 清 榊 三 木	残 利 將 男 淡 谷 徹 仁 渡 辺 里 仁	田 山 敏 斗
実 験 動 物 管 理 室		松 崎 哲 也			* 松崎 香苗 (3.9/2~) ○ 二瓶 淳子 (3.10/1~)				
ラ ン オ ア イ ン ホ ー ム 管 理 室		今 澤 正 興			○ 武市 正美				

所長室	庶務第一課	高木 寛子
事務室		桜井真理子 齋藤 洋子
R I 室		大崎 文香 (~4.2/27) 三井恵理子 (4.1/27~)
電頭室		赤堀 宏 石井 弘子 (~4.3/30)

4. 平成3年度 神経研究所セミナー及び講演会 (表3)

年月日	講師・所属	演題	担当
平成3年 4.17	河村 悟 慶応義塾大学医学部生理学教室講師	視細胞の順応を制御するカルシウム依存性蛋白質	代謝研究部
4.26	Bela Kiss Associate Director, CNS pharmacology, Gedeon Richter LTD. Hungary	Dementias: new challenge for the drug industry. On the mechanism of action of vinpocetine, a cerebroprotective and anti-dementia agent.	疾病研究第六部
5.18	John H. Johnson University of Texas, Southern Medical Center, USA	Glucose transport and islet function	診断研究部
5.25	長田 重一 大阪バイオサイエンス研究所分子生物学	G-CSFとそのレセプター	遺伝子工学研究部 診断研究部
5.28	Eric Schon Associate Professor, Department of Neurology, College of Physicians & Surgeons of Columbia University, USA	神経疾患にみられるミトコンドリアDNA欠失について	微細構造研究部
6.14	田中 一馬 東京大学理学部植物学	Neurofibromatosis Type 1 (NF1, I型神経 繊維腫症)及び酵母IRA2遺伝子産物のras GTPase 促進活性	診断研究部
6.17	堀越 正美 Assistant Professor, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, The Rockefeller University, USA	TATABOX結合因子:TFIIDを中心と した転写調節機構の解析について	遺伝子工学研究部
6.25	Peter Whitehouse Director, Alzheimer Center, Case Western Reserve University, USA	Biological foundation for treatment in Alzheimer's disease	疾病研究第六部
7.17	「海外留学帰国報告会」 水戸 敬 神経研究所疾病研究第二部室長	Down症候群におけるS-100蛋白発現の 発達特異性	疾病研究第二部
9.3	Louis M. Kunkel Professor of Pediatrics and Genetics, Harvard Medical School, USA	デュシャンヌ型筋ジストロフィーの分子遺伝 学について	所 長
9.6	Samuel M. Chou Professor, Department of Neuropathology, Cleveland Clinic, USA	Axonal constipation as the pathogenesis of ALS (amyotrophic lateral sclerosis)	微細構造研究部
9.24	Vito Turk Professor, Department of Biochemistry, Josef Stefan Institute, Slovenia	Structure and biological role of cathepsins and their endogeneous inhibitors.	疾病研究第一部 所 長

11. 1	Alvaro Rendon-Fuentes Directeur, Centre de Neurochimie du CNRS, INSERM, Universite Louis Pasteur de Strasbourg, France	How do mitochondria interact in vitro with microtubule?	疾病研究第一部
12. 16	奥山 治美 名古屋市立大学薬学部生物薬品化学教授	必須脂肪酸バランスと脳神経機能	疾病研究第三部
12. 24	佐藤 孝哉 Department of Molecular Biology, DNA X Research Institute of Molecular & Cellular Biology, USA	ras 蛋白質を介する細胞内情報伝達	遺伝子工学研究部 診断研究部
平成4年 2. 14	倉知 正佳 富山医科薬科大学精神医学教授	精神分裂病の神経回路網障害—画像診断とオ ートラジオグラフを用いて—	疾病研究第三部
2. 26	José A. Campos Ortega Institut für Entwicklungsphysiologie Universität zu Köln, FRG	ショウジョウバエにおける神経発生の分子機 構	遺伝子工学研究部
3. 3	佐古田 三郎 大阪大学医学部神経内科	ホスホグリセレートムターゼの分子遺伝学的 研究：筋型サブユニットの組織特異的発現と 欠損症の解析	機能研究部
3. 6	和田 圭司 Laboratory of Neurochemistry, NIDCD, National Institute of Health, USA	興奮性ニューロトランスミッターレセプター： 分子生物学的、免疫学的アプローチによる解 析とその臨床応用について	機能研究部
3. 10	Bruce D. Trapp Professor, Department of Neurology, The Johns Hopkins University, USA	ミエリン形成の細胞分子機構	疾病研究第三部
3. 10	～ブルース S. マッケウエン教授を囲むミ ニ・シンポジウム～ Bruce S. McEwen Labo. Neuroendocrinology, The Rockefeller University. USA 神庭 重雄 慶応大学医学部精神科 石川 俊雄 国立精神・神経センター精神保健研究所 市川 真澄 東京都神経科学総合研究所 小川 哲郎・三国 雅彦 国立精神・神経センター神経研究所 黒田 安計・三国 雅彦 国立精神・神経センター神経研究所	「発達・ストレス・神経内分泌をめぐって」	疾病研究第三部

I 神経研究所の概要

3.25	岡村 裕明・林 信二 東京都神経科学総合研究所 坂 野 仁 Division of Immunology, Department of Molecular and Cell Biology, University of California, USA	免疫および神経系における体細胞DNA変換	遺伝子工学研究部
------	--	----------------------	----------

5. 平成3年度 神経研究所研究発表会 (表4)

平成4年3月30日(月)

神経研究所本館セミナールーム

- 9:10- 9:40 疾病研究第一部
- 「アルツハイマー病におけるアミロイド前駆体タンパクの分解機構」 石浦 章一
「筋細胞に対するCTL中の細胞障害因子の検討」 中村浩一郎
- 9:40-10:10 疾病研究第二部
- 「過換気ならびに高酸素負荷による脳組織低酸素・代謝動態」 亀井 淳
「21番染色体遺伝子コード蛋白のダウン症候群脳における発現の特異性」 水戸 敬
- 10:10-10:40 疾病研究第三部
- 「ストレスによる仔ラットリズムの同調機構」 加藤由紀子、高嶋 瑞夫
「5HT₂受容体のRT-PCR法によるクローニングとそのmRNA定量化の試み」 池田 正明、斉藤 和子
三国 雅彦
「覚醒剤投与ラットの脳におけるc-Fos様免疫反応の分布」 海野 麻未、柏 淳
西川 徹
- 10:40-11:10 疾病研究第四部
- 「各種運動失調マウスの脳内NGF濃度」 松井 京子、古川 昭栄
菊池 建機
「レヴィー小体におけるmuticatalytic proteinaseの免疫組織学的局在」 真先 敏弘、石浦 章一
郭 伸
「mdx胎児骨格筋のL-タイプカルシウムチャンネルについて」 吉田 瑞子
- 11:10-11:40 疾病研究第五部
- 「Gaucher病および異染性白質変性症の遺伝子変異の検討」 大島登志男
「薬剤によるNiemann-Pick病タイプC細胞のスフィンゴミエリナーゼmRNAに対する作用」 佐々木征行

I 神経研究所の概要

11:40-12:10 疾病研究第六部

「SJL/Jマウス由来MBP特異的脳炎誘起性T細胞におけるT細胞レセプターの同定」

坂中 進、山村 隆
高橋 慶吉、田平 武
佐藤準一、Ferenc Gallyas Jr.
遠藤 真澄、国下 龍英
山村 隆、田平 武
水戸 敬(二部)
高橋 慶吉、田平 武

「細胞融合性によるマウス小脳脳幹部分化神経細胞株の樹立」

「21番染色体の未知遺伝子分離法の開発」

12:10-12:25 疾病研究第七部

「ラット脳における遊離D-セリンの分布および生後発達」

橋本 篤司、岡 高恵
西川 徹

— 休 憩 —

13:30-14:00 微細構造研究部

「実験的ミトコンドリア・ミオパチー — ゲルマニウム投与による検討 —」

松岡 太郎
埜中 征哉

「ミトコンドリア脳筋症の組織特異性」

14:00-14:30 機能研究部

「ジストロフィンのカルパイン消化」

吉田 幹晴

「ジストロフィン分子上の糖蛋白質複合体結合部位」

鈴木 厚

14:30-15:00 代謝研究部

「ミクログリア由来プラスミノーゲン-プラスミンカスケードの役割について」

中嶋 一行、永田 晃一
竹本なぎさ、浜之上 誠
武井 延之、大澤 圭子
今井 嘉紀

「アネキシンVの脳内における細胞局在とニューロンへの作用」

15:00-15:30 診断研究部

「ras 遺伝子情報伝達系の解析」

服部 成介

I 神経研究所の概要

「Brain Functional NMR Spectroscopy の開発 —— ヒト高次脳機能の無侵襲的計測」

矢野登志雄、荻野 孝史

15:30-16:00 免疫研究部

「マウス未分化胸腺リンパ球に発現される新しい抗原の同定とその生物学的意義」

葛原 博幸

16:00-16:30 遺伝子工学研究部

「ショウジョウバエの活動性に関与した遺伝子の分子生物学的研究」

星野 幹雄

16:30-17:00 モデル動物開発部

「Myotonia quailの浅胸筋にみられる形態変化」

菊池 建機、菊池 寿枝

「神経病原性マウスコロチウイルスJHM株S蛋白の組換えワクシニアウイルスによる発現」

水谷 誠

田口 文広

17:00-17:15 ラジオアイソトープ管理室

「バルプロ酸を含む抗てんかん薬のキャピラリー電気泳動による分析法について」

今澤 正興

17:15-17:30 実験動物管理室

「各種マウスの系統維持と計画生産へのエンブリオバンク（凍結保存胚）の応用」

二瓶 淳子、松崎 哲也

6. 神経研究所本館竣工にあたって

平成3年11月22日、国立精神・神経センター神経研究所本館（地下1階、地上6階7373 m^2 ）の竣工式が行われた。本館の建設は計画から7年余を経て竣工に至ったものであり、研究所職員はもとよりセンター全体の長い間の念願であった。

当日は下記式次第に従いまず午前10時より神経研究所職員を対象とした式典が行われ、杉田所長の挨拶に続いて小沢部長から本館建設計画段階から完成に至るまでの詳しい経過説明が行われた。さらに11時から1時間の間、各研究部を自由に見学出来る時間が設けられた。

午後1時前後より、厚生省保健医療局をはじめ東京近県の大学、研究所、病院に所属する方々、研究所の元部長、小平市や患者家族団体に関係する方々など約70名の来賓が三々五々来所され、担当の研究員に案内されその説明に熱心に耳を傾けられていた。

記念式典は午後2時半より本館セミナー室において開かれ、里吉総長の式辞、杉田所長の挨拶、本條運営部長の工事経過説明に引き続いて厚生省保健医療局長（田中審議官代読）と小平市長（前田助役代読）の祝辞が披露された。最後に本館工事を請け負った佐藤工業に感謝状が送られ祝電が披露され式典の幕を閉じた。式辞の中で総長は世界に誇れる立派な研究施設が出来たことを喜び、この研究所が今後飛躍的に発展するであろうことを信じるとの期待を述べられた。一方、研究所長は、研究スペースの不足という悩みが解決され、所員一同また新たな気持ちで神経系の難病に取り組む所存であるとの決意を表明され、またこの建設に関係された多くの方々に感謝の気持ちを述べられた。3時半からは会場を5階に移し、記念祝賀会が催された。吉田四部室長の司会のもとで小平市議会議長（園部副議長代読）、江橋岡崎国立共同研究機構長、塚田慶応大学名誉教授、秋元精神衛生会会長などの祝辞があり、研究所職員も多数参加し、約1時間半の和やかな歓談の時を過ごした。

式典も祝賀会もつつがなく終了した後、研究所の職員と式典の準備にたづさわった運営部の職員とが一緒になって慰労会を開き、新しいセンターの顔ともいべき本館の竣工を喜びあい式典の一日が終わった。

（文責：高橋 清久）

竣工式次第 (平成3年11月22日)

- 10:00-10:30 所内式典(セミナー室)
式 辞 杉田所長
建築経過報告 小沢部長
- 11:00-12:00 施設見学(所員)
- 13:00-14:30 施設見学(来賓)
- 14:30-15:30 式典(セミナー室) 司会:小林庶務課長
式 辞 里吉総長
挨拶 杉田所長
工事概要説明 本條運営部長
来賓祝辞 寺松厚生省保健医療局長
(田中審議官代読)
瀬沼小平市長
(前田助役代読)
感謝状贈呈 佐藤工業
祝電披露
- 15:30-17:00 祝賀会(5階南、大実験室) 司会:吉田室長
挨拶 里吉総長
来賓祝辞 藤森小平市議会議長
(園部副議長代読)
江橋岡崎国立共同研究機構長
塚田慶応大学名誉教授
乾杯 秋元精神衛生会長
祝宴
謝辞 杉田所長
- 17:30-19:00 センター慰労パーティー

I 神経研究所の概要

所内式典（セミナー室）

式 辞 杉田秀夫 所長

一言ご挨拶を申し上げます。

本来ならば本日午後2時30分から行われる本館竣工式に神経研究所の皆様全員にご出席いただくのが筋であると考えますが、場所が狭く研究所の皆様の竣工式を別に行ったことをご了承下さい。

何はともあれ我々の永年の願いであった、しかもすべてとは言えませんが我々の希望を入れて出来上がった我々のための研究所本館の落成を皆様と共に心から喜びたいと思います。

本館は多くの人々の努力と援助によって完成を見ました。設計を担当された厚生省整備課、療養所課の方々、精神・神経センター運営部のみなさま、そして何よりも神経研究所の小沢先生を委員長とする建築委員の方々、また研究所すべての皆様、外から援助して頂いた患者家族団体の方々、建築を請け負われた佐藤工業に深い感謝の念を表したく存じます。

設計段階から本館落成までの5年間はしかし決して平坦な道ではありませんでした。詳細は後程、小沢先生からご報告があると思いますが、当時疾病研究第一部の部長でありました私も、時には失望し、時には激怒し実りの少ない議論を繰り返したのであります。

例えば本館の設置場所につきましても何回か場所が変わり、本日の竣工式を迎えるこの場所に最終的に決まりましたのは整備課、運営部のご好意、研究所の努力としてこれを側面から支えた10年間研究所に蓄積されたエネルギー、ポテンシャルティの強さと、本省の当センター特に神経研究所に対する期待の大ききによるものと考えます。

この意味で我々は以前にもまして精神・神経疾患の病因の解明と治療法の開発をめざし、その基礎となる神経科学の発展のために責任と義務を有していることを皆さん一人一人が自覚していただきたく存じます。移転された部は、本年7月から殆ど研究できなかつたのではないかと考えます。しかしサイエンスは容赦なく進んでおり、色々不備な点はあるかもしれませんが、できるだけ早く本来の研究生活に戻って頂きたいと思えます。

研究所の成果は又広く社会に還元されるべきものと考えます。その為に例えば研究所主催の公開シンポジウム等も行いたいと考えております。何かよいアイデアがあればご連絡下さい。また地域の方々との連携は重要であります。岡崎共同研究機構が行っているような、年一回小平市の皆様に研究所を公開することも考えております。地域の方々が一番懸念するのは廃水、特にR Iの廃液の問題、そして将来使用するであろう実験用中動物、犬、猫の問題であり、この点は両管理室長、よろしくお願い致します。

さて従来は旧研究所が狭いながらも皆が部の壁を破り活発な共同研究を行ってまいりました。このことは当研究所の特徴でもありました。本館の竣工により、本館に9つの部が、2号館に5つの部が別々に別

れて研究することになります。2号館の方々は図書室の利用その他で本館に来る機会も多いと思いますが、本館の方々が2号館に行く機会が少なくなり、両研究所が孤立する事を些か懸念しております。この対策として例えば2号館に談話室を設ける、あるいは各部が行っているジャーナルクラブの公開など色々考えていただきたく存じますが、要は今まで以上にお互いに collaboration を期待したいと思います。

最後に所長室について一言申しあげます。

すでに多くの方々がご存じのとおり私には身にあまる立派な所長室を作ってくださいました。美観を損ねるのではないかと、机を傷つけないかなど神経を使っておりにささか肩がこる毎日です。

旧研究所の所長室は本来所長室として設計されたものではなく、お世辞にもきれいとは言えませんでした。しかし私にとっては大変仕事のしやすい場所でもありました。

それに比べて本館の所長室は広くかつ立派に出来上がっております。研究所の顔としての役目を充分に果たしてくれるでしょう。私は3年前所長に就任した際、所長室のドアは研究所の全ての方に常に開けておくべきと考えました。そして何か問題があったら遠慮せずに来てほしいと申しあげました。しかし残念ながら私は超能力者ではないので私の出来る事は限られておりますが、聞く耳は持っているつもりであると申しあげました。この公約は勿論生きておりますのでどうかいつでも新しい所長室においで下さい。

大変ざっぱく話になりましたがもう一度本館の竣工を研究所全ての方々と共に喜びかつ祝い、そしてこれまで尽くされた皆様のご努力に厚くお礼申しあげます。

建築経過報告 小沢鏝二郎研究所本館建築委員会委員長

研究所竣工式に当たりまして、研究所建築委員会を代表致しまして経過報告を致しますことは私の名誉であり、心からの喜びを感じるものであります。こゝに立ちまして「はるけくも来つるもの哉」というのが長い間その責任ある立場におかれた人間としての私の偽らざる感慨であります。

顧みますと本神経研究所は昭和53年、1978年国立武蔵療養所神経センターとして8部門発足致しました。現在の神経研究所2号館は、その当時の研究のスケールから考えて一応12部門を収容することになっておりました。これは神経センターの計画を練った国立神経センター(仮称)準備委員会の中問答申によったものですが、原案でも当研究所は最終的に15部門設置されることになっており、従ってもう一つの研究棟が必要であるとされておりました。

中問答申の計画では、2号館の北側、即ち7病棟寄りに2号館とほぼ同じ建物を建てるというものであります。その後時が経つにつれ研究部門が増え、研究所のスペースも足りなくなり、また生物学も急速に高度の発展をとげ、初めの研究所だけでは対応しきれなくなって参りました。これに伴いましてかなり早い時期から新研究棟の申請を繰り返して行いましたが、目的を達成するに至りませんでした。

I 神経研究所の概要

一方では病院の発展に伴い、特殊診療棟やリハビリ棟が建ち、当初予定された位置に新研究棟を建てることは困難になって参りました。それで昭和50年代後半当時療養所の建築計画を立案していた将来計画委員会の案としましては、新研究棟は、研究所2号館の前、即ち現在の2号館の車廻しのスペースを予定しておりました。

そのうちに動物研究棟が建ち一時的にはやゝ緩和されたものの研究棟のスペースの問題は益々深刻になって参りました。従ってこれに対処すべく昭和60年、私を委員長として建築委員会が設置されました。出発当時の委員は埜中部長、田平部長、今沢室長、高木室長および古川室長でありました。後に高木、古川両室長の転出に伴い高橋部長に参加して頂きました。

昭和61年(1986年)10月センター化が行われ、当研究所は国立精神・神経センター神経研究所と改称され、翌63年度予算ではじめて新研究棟建設が本決まりとなりました。

建築委員会では、本館設立のために多くの検討を行いました。将来計画委員会案では研究所は非常に設計にくく、更に他に敷地が求めることができるのに研究所がこのような敷地の一遇に新しく建てて不便をしなければならない理由はなかろうという意見が研究所の中で高まり敷地の検討からやり直しました。

広いように見えても具体的な場所の選定は難しく、センター内からいろいろの意見が出され、委員長としての私のみならず、研究所の関係者が最も心を痛めたところであります。色々な場所が提示され、多くの条件が求められたのであります。しかし多くの議論を重ね、各方面とも長時間に渡る接衝を行い、一方ではコンピューターシュミレーションでどの様なものを建てたならばどの建物に影響を与えるかに行った検討がなされました。その上で多くの方々に妥協をお願いし、現在の位置に決まりました。この間当時の尾崎運営部長には大いに御骨折を頂いたのであります。

10部門が入る建物を建てるという前提で、次いで本省整備課と会議を重ね、またいくつかの研究所を見学しました。即ちがんセンター研究所、循環器病センター研究所、岡崎国立共同研究機構、阪大細胞工学センター等であります。そしていろいろ検討の結果次の結論に到達致しました。すなわち建物は7階建てとし、2部門で一つの階を、管理部門、図書室、セミナー室に一つの階を、またR I実験室で一つの階を占めることと致しました。R Iは将来管理条件が厳しくなることはあっても緩和されることはないだろうという認識によったのであります。建築委員会では地上7階を考えR I室を2階に、と考えましたが、整備課の意向でR I室を地階におくことと致しました。この時点で各研究部門とそれぞれの空調を南北に分け、廊下も鍵の字型にすることによって実験室の面積を大きくするという現在のレイアウトを決めました。

私が委員長として心配した一つの大きな問題はどこの部門が移り、どこが残るかというものでした。しかしこれには殆ど異論がなく、大きなスペースを占めることのできる2号館には疾病研究第一部、第二部、第七部と微細構造研究部とが入ることに決まりました。後にこれに加えてモデル動物開発部も入ることに

なりました。従って新しい本館には疾病研究第三部、第四部、第五部、第六部、機能研究部、代謝研究部、免疫研究部、診断研究部、遺伝子工学研究部が入ることとなりました。なお「第十五部」はまだ認められておりませんので本館五階南は空室のまゝであります。

このレイアウトに従って内側の構造を決めることは、各部に委ねられました。しかし設計の一応の完成の後、疾病研究第五部、代謝、免疫、診断の各研究部は部長を含め構成員が大幅に変わったために、設計の変更の申し出がありました。これに対して整備課は出来得る限りの対応をして下さり、現在の建物ができることになったのであります。

この様にして5年という長期に渡った建築も平成3年10月完成を見たものであります。しかし乍ら、この間建築委員会の予想をはるかに越える予算の大幅の不足を招き、当初の予定を十分に満たすことが出来ず色々な点で簡略化されたことは誠に残念であります。しかし、本省整備課の御努力により研究所は堂々たる建物となり、玄関のステインドグラスや一階のカーペット敷の廊下など日本の研究所としてはあまり例をみない立派なものとなりました。

建築の初めに当たって、地下一階を作るために掘削が行われました。この時も多雨であり、プールの様になり地下の排水に大きな問題を提起いたしました。竣工式を前にして再び大雨に見舞われ、今後において排水には抜本的な対策が必要であることが判明いたしました。

本年10月竣工を迎えました。そしてこのように長期に渡った事業も最後の1ページを引越という全員参加の大事業でもって大団円を迎えたのであります。実質一月半に渡った引越大作戦でも私が指揮を取らせて頂きました。この間毎週金曜日に「引越委員会」を開き毎回約1時間の討論を行いました。そして多くの部長、室長の方々にも特別な業務を分担して頂き引越を進めました。さらに所員の皆さん方の多大な御協力により、大過なく終了することが出来ました。運営部の方々にも多くのお骨折りを頂きました。またこの間多くの業者の方々も協力してくださいました。この場をお借りして関係された方々の御協力に深く感謝致します。

本日竣工式を挙げるに当たりまして所員の方々、センター職員の方々、本省の方々、患者団体の方々等の上に述べました色々な過程においての御努力と、御協力とに多大なる感謝の意を表します。それともう一つ忘れてはならないものとして、この建物の建築を可能にした日本の tax-payer のの方々にも深く感謝したいと思います。

御静聴有難うございました。

II 研 究 業 績

1. 疾病研究第一部

1. 研究部一年の歩み

疾病研究第一部は進行性筋ジストロフィーを中心とする遺伝性筋疾患、及び多発性筋炎などの後天性筋疾患の病因の解明と治療法の開発を主目的とし、分子病理学的側面から研究を行っている。平成3年度当部における研究活動に参加したメンバーは以下の通りである。

(部長事務取扱い) 杉田秀夫, (室長) 荒畑喜一, 石浦章一(～4.2.29), (研究員) 塚原俊文, (兼任研究員) 石原博幸, 山口明, 清水輝夫, 春原経彦, 鎌倉恵子, 有川恵理, (客員研究員) 高木昭夫, 米本恭三, 佐藤猛, (流動研究員) 中村浩一郎, 林由起子, 下川雅丈, Lee Moon Keen (9.15.91-10.10.91) (研究生) 田川一彦, 野島美智夫, 淵脇泰介, 織茂智之, 奥山輝明, 古城徹, 平林久吾, 松田潔, (研究見習性) 横山和正, (賃金研究員) 青木治美, 後藤加奈子, 古賀律子。

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

ジストロフィン遺伝子を中心とした、筋ジストロフィーの分子病理学的・分子遺伝学的研究が進んだ。特に凍結保存の組織バンクからのDNAとmRNAの抽出とそれらの増幅技術に関する研究を通して、ジストロフィン遺伝子異常に伴う様々の臨床的表現型が存在することを明らかにした。さらに、ジストロフィン関連遺伝子のクローニングに関する研究も開始された。なお、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの遺伝子解析、筋緊張性ジストロフィーの遺伝子解析も同時に行っている。

2) 多発性筋炎に関する研究

これまで、多発性筋炎における骨格筋障害過程に細胞障害性Tリンパ球(CTL)が重要な役割を果たしている事を明らかにしてきた。そして、CTLに含まれる膜障害タンパク質パーフォリンと、血清中高分子阻害物質の存在をも明らかにした。現在、我々はCTLがいかに筋細胞を壊死させるのかを調べる目的で、CTLの細胞障害性因子であるパーフォリンとグランザイムの筋蛋白に対する作用を検討し、併せて実際の多発性筋炎患者生検筋でのこれらの局在も検索している。

3) プロテアーゼに関する研究

アルツハイマー病に見られる老人斑の主成分であるアミロイド β /A4蛋白はその前駆体蛋白(APP)より生成される。我々はリソゾームがAPPの代謝に関与している可能性を見いだした。

(部長事務取扱い 杉田秀夫)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Arahata K, Beggs A 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
- 2) Arikawa E, Hoffman E P, Kaido M, Nonaka I, Sugita H, Arahata K :
The frequency of patients having dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population
Neurology 41 : 1491-1496, 1991
- 3) Arikawa E, Ishihara T, Nonaka I, Sugita H, Arahata K :
Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy
J Neurol Sci 105 : 79-87, 1991
- 4) Beggs A H, Neumann PE, Arahata K, Arikawa E, Nonaka I, Anderson MS, Kunkel LM :
Possible influence on the expression of X chromosome-linked dystrophin abnormalities by heterozygosity for autosomal recessive Fukuyama congenital muscular dystrophy
Proc Natl Acad Sci USA 89 : 623 - 627, 1991
- 5) Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Sugita H, Kunkel LM :
Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy : Dystrophin gene and protein studies
Am J Hum Genet 49 : 54-67, 1991
- 6) Kaido M, Arahata K, Hoffman E P, Nonaka I, Sugita H :
Muscle histology in Becker muscular dystrophy
Muscle Nerve 14 : 1067-1073, 1991
- 7) Kamakura K, Ishiura S, Imajoh S, Sugita H :
Distribution of CANP inhibitor in the rat central nervous system
J Neurosci Res 31 : 543 - 548, 1992

- 8) Kwak S, Masaki T, Ishiura S, Sugita H :
 Multicatalytic proteinase is present in Lewy bodies and neurofibrillary tangles in diffuse
 Lewy body disease brain
 Neurosci Lett 128 : 21–24, 1991
- 9) Maruyama K, Usami M, Yamao-Harigaya W, Tagawa K, Ishiura S :
 Mutation of Glu 618 to Gln or Val642 to Ile had no effect on the processing of Alzheimer
 amyloid protein precursor expressed in COS–1 cells by cDNA transfection
 Neurosci Lett 132 : 97–100, 1991
- 10) Matsuda K, Ishiura S, Koizumi H, Kawasaki H, Arahata K, Sugita H :
 Apolipoprotein B is a major perforin inhibitor protein in human serum
 Mol Immunol 28 : 1211–1216, 1991
- 11) Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K, Sugita H :
 Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine induced myonecrosis
 Muscle Nerve 14 : 515 – 520, 1991
- 12) Tagawa K, Kunishita T, Maruyama K, Yoshikawa K, Kominami E, Tsuchiya T,
Suzuki K, Tabira T, Sugita H Ishiura S :
 Alzheimer's disease amyloid beta-clipping enzyme (APP secretase). Identification,
 purification and characterization of the enzyme
 Biochem Biophys Res Commun 177 : 377 – 387, 1991
- 13) Takemitsu M, Ishiura S, Koga R, Arahata K, Nonaka I, Sugita H :
 A dystrophin homologue on the surface membrane of embryonic and denervated mdx
 mouse muscle fibers
 Proc Japan Acad 67 : 125–128, 1991
- 14) Takemitsu M, Ishiura S, Koga R, Kamakura K, Arahata K, Nonaka I, Sugita H :
 The localization of dystrophin-related protein in the mouse skeletal muscle.
 Biochem Biophys Res Commun 180 : 1179–1186, 1991
- 15) Tanabe H, Kumagai N, Tsukahara T, Ishiura S, Kominami E, Nishina H, Sugita H :
 Changes of lysosomal proteinase activities and their expression in rat cultured keratinocytes
 during the differentiation

II 研究業績

Biochem Biophys Acta 1094 : 281 - 287, 1991

16) Tsukahara T, Sugita H, Ishiura S :

26S multicatalytic proteinase complexes decrease during the differentiation of erythroleukemia cells.

Biochem Biophys Acta 1079 : 273 - 278, 1991

b. 著 書

1) Sugita H :

Advance in drug therapy, with special emphasis on protease inhibitors
Muscular Dystrophy Research, ed by Angelini C et al, Elsevier Science Publishers,
Amsterdam, p181-190, 1991

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

Molecular biology and diagnosis of muscular dystrophy : Immunocytochemical and immunoblot assays of dystrophin

Muscular Dystrophy Research, ed by Angelini C et al,
Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p51-59, 1991

3) Arahata K, Ishiura S, Tsukahara T, Arikawa E, Kaido M, Saito K, Sunohara N,
Ishihara T, Nonaka I, Sugita H :

Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular Dystrophy.

Frontiers in Muscle Research, ed by E Ozawa E et al,
Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p411-425, 1991

4) Arahata K, Sugita H :

Dystrophin in Duchenne muscular dystrophy and related diseases

Proceedings of the XIth International Congress of Neuropathology, ed by XIth
ICN Organizing Committee, p533-542, 1991

5) 荒畑喜一 :

ジストロフィン

医科学大辞典・補遺巻8 : 35-38, 1991

6) 石浦章一 :

遺伝子でわかる脳と神経

羊土社, 実験医学バイオサイエンスシリーズ 2, 1991

7) 石浦章一 :

スロベニア脱出記

蟻塔 37 : 1 - 5, 1991

8) 石浦章一 (訳) :

D. J. セルコー著「アルツハイマー病とアミロイド蛋白質」

日経サイエンス, 1992, 1月号

c. 総 説

1) Arahata K :

Dystrophin abnormality in progressive muscular dystrophy—A review article—

Acta Paediatr Jpn 33 : 216 - 221, 1991

2) 杉田秀夫 :

疾患モデル動物の変遷——序論

神経研究の進歩 35 : 5 ~ 9, 1991

3) 後藤雄一, 杉田秀夫 :

ミトコンドリア異常と疾患

日本内科学会誌 80 : 775 ~ 780, 1991

4) 荒畑喜一 :

遺伝性疾患のDNA診断 : PCRの臨床応用

進行性筋ジストロフィー

臨床科学 28 : 416-424, 1992

5) 荒畑喜一 :

ジストロフィン・テストの臨床応用

細胞 23 : 60-66, 1991

6) 荒畑喜一, 有川恵理, 杉田秀夫 :

ジストロフィンの組織化学と病型

小児内科 23 : 23-31, 1991

7) 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

8) 有川恵理, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

II 研究業績

筋ジストロフィー

実験医学 9 : 1160-1164, 1991

- 9) 有川恵理, 荒畑喜一 :

筋ジストロフィーの分子遺伝学

小児医学 25 : 15-26, 1991

- 10) 石浦章一, 杉田秀夫 :

Duchenne 型筋ジストロフィー症, 病態研究の現状

脳と神経 43 : 405 - 409, 1991

- 11) 石浦章一, 古賀律子, 杉田秀夫 :

ジストロフィン

小児内科 23 : 1185-1190, 1991

- 12) 石浦章一, 鈴木絃一 :

アルツハイマー病脳に蓄積するアミロイド β 蛋白質の合成と分解のしくみ

神経精神薬理 13 : 763 - 770, 1991

- 13) 石浦章一 :

タンパク分解と細胞機能

Cell Science 7 : 868 - 873, 1991

- 14) 階堂三砂子, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

筋ジストロフィー

Clinical Neuroscience 9 : 383-388, 1991

- 15) 田川一彦, 丸山敬, 石浦章一 :

アミロイド前駆体タンパク質とプロテアーゼ

Dementia 5 : 220 - 227, 1991

- 16) 丸山敬, 石浦章一 :

アルツハイマー病アミロイド β タンパク質とプロテアーゼ

Cell Science 7 : 1030-1037, 1991

- 17) 織茂智之, 古川哲雄 :

ミオチューブラーミオパチー

Clinical Neuroscience 9 : 416 - 418, 1991

d. 班会議報告書

- 1) 荒畑喜一, 石浦章一, 林由起子, 後藤加奈子, Alan H. Beggs, Louis M. Kunkel :
ジストロフィン関連遺伝子のクローニングに関する研究
厚生省精神・神経疾患(2指-2), 平成3年度研究報告書 P 637 - 638, 1992
- 2) 荒畑喜一, 有川恵理, 松井潔, 林由起子, 石浦章一, 埜中征哉 :
ジストロフィン分子におけるN末端ドメインの臨床的意義
厚生省精神・神経疾患(2指-2), 平成3年度研究報告書 P 87-89, 1992
- 3) 荒畑喜一 :
顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの遺伝子解析
長寿科学総合研究事業・鍋島班, 平成3年度研究報告書 P66, 1992
- 4) 荒畑喜一, 中村浩一郎, 石浦章一 :
筋細胞に対するCTL中の細胞障害因子の作用の検討
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 平成3年度報告書(印刷中), 1992
- 5) 荒畑喜一, 織茂智之, 中村浩一郎, 埜中征哉 :
炎症性筋疾患におけるパーフォリン, セリンエステラーゼの役割
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 平成3年度研究報告書(印刷中), 1992

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

- 1) Arahata K, Arikawa E, Sugita H :
Duchenne/Becker muscular dystrophy
8th Asian and Oceanian Congress of Neurology, Tokyo, 9. 1, 1991
- 2) Arahata K :
Dystrophinopathy
Molecular Genetics Seminar, Harvard University, Boston, 8. 8, 1991
- 3) Ishiura S :
Proteolytic processing of amyloid precursor protein
Int Cong of Protease and Protease Inhibitors, Ljubijana, 6. 25, 1991
- 4) 杉田秀夫 :
筋・神経疾患と分子遺伝学

II 研究業績

第28回リハビリテーション医学会学術集会記念講演，東京，6. 2, 1991

5) 荒畑喜一，杉田秀夫：

デュシャンヌ型／ベッカー型筋ジストフィーの分子病理学的研究

第23回日本医学会総会，京都，4. 5, 1991

6) 荒畑喜一：

神経学セミナー「筋疾患の免疫染色」

第32回日本神経学会総会，東京，5. 22, 1991

7) 荒畑喜一：

ジストロフィンをめぐる最近の知見

浜松医大神経内科特別講演，浜松，4. 20, 1991

b. 国際学会

1) Sugita H：

Expression of C-Terminal domain of dystrophin in Duchenne/Becker dystrophy and mdx mouse

Workshop on Models for DMD and Genetic Manipulation, Perth, August 7, 1991

2) Sugita H：

Therapeutic trial of DMD by cysteine proteinase inhibitor

1st International Meeting on Therapy of Muscle Dystrophies and related disorders, Sorrento, October 4, 1991

3) Sugita H：

Genetic Myopathies (Dystrophies) : Molecular biology studies of defects of cytoskeletal proteins and mechanisms of consequent cellular damage

New Frontiers in Neuromuscular Diseases, The First Los Angeles International Symposium on Neuromuscular Diseases, Los Angeles, December 4, 1991

c. 一般学会

1) 荒畑喜一，有川恵理，階堂三砂子，ほか：

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

第32回日本神経学会総会，東京，5. 23, 1991

2) 有川恵理，荒畑喜一，埜中征哉，ほか：

Duchenne 型筋ジストロフィー患者筋におけるジストロフィン免疫染色陽性線維の検討

第32回日本神経学会総会，東京，5. 23, 1991

3) 階堂三砂子，荒畑喜一，埜中征哉，ほか：

肢帯型及びベッカー型筋ジストロフィーにおける一般筋病理像と筋細胞骨格の検討

第32回日本神経学会総会，東京，5. 23, 1991

4) 松田潔，石浦章一，荒畑喜一，ほか：

多発性筋炎の発症機構—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（続報）

第32回日本神経学会総会，東京，5. 23, 1991

5) 織茂智之，新井雅信，冷牟田英三，荒畑喜一，杉田秀夫：

重症筋無力症の生検筋にみられる“lymphorhage”の免疫組織化学的検討

第32回日本神経学会総会，東京，5. 23, 1991

6) 竹光正和，荒畑喜一，埜中征哉：

mdxマウスに見られるジストロフィン陽性線維の免疫組織化学的検討

第32回日本神経学会総会，東京，5. 23, 1991

c. 班会議発表

1) 中村浩一郎，石浦章一，荒畑喜一，杉田秀夫：

筋細胞に対する細胞障害性T細胞（CTL）の中の細胞障害因子の作用の検討

厚生省特定疾患，免疫神経疾患調査研究班

平成4年度班会議，東京，1. 16, 1992.

2) 石浦章一，竹光正和，桃井隆，杉田秀夫：

正常（B10）とmdxにおけるジストロフィン関連タンパク質の局在

平成3年度「筋ジストロフィー」総合班会議，東京，1. 23, 1992

3) 荒畑喜一，Beggs, A H，Kunkel, L M：

ジストロフィン関連遺伝子のクローニング

厚生省精神・神経疾患（2指-2），平成3年度班会議，東京，12. 6, 1991

4) 荒畑喜一：

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの遺伝子解析

長寿科学総合研究事業（鍋島班），平成3年度班会議，東京，2. 14, 1992

5) 有川恵理，松井潔，林由起子，石浦章一，埜中征哉：

ジストロフィン分子におけるN末端ドメインの臨床的意義

厚生省精神・神経疾患（2指-2），平成3年度班会議，東京，12. 6, 1991

II 研究業績

6) 織茂智之，中村浩一郎，埜中征哉，荒畑喜一：

炎症性筋疾患におけるパーフォリン，セリンエステラーゼの役割

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班，免疫性神経疾患に関する研究

平成3年度班会議，東京，1.16, 1992

7) 石浦章一：

エンドソーム・リソゾーム系でのアミロイド前駆体の分解

長寿科学総合研究，痴呆疾患の遺伝学的研究，東京，2.14, 1992

3. 主な研究報告

細胞障害性T細胞 (CTL) 中の細胞障害因子の検討

中村浩一郎, 石浦章一, 荒畑喜一, 杉田秀夫

多発性筋炎では細胞障害性T細胞、即ちCTLが筋線維内に浸潤し、その病因に大きく関与していると考えられている¹⁾²⁾。我々はCTLがいかに筋細胞を壊死させるのかを調べる目的でCTLの細胞障害性因子であるパーフォリンとグランザイムA³⁾の筋蛋白に体する作用を検討した。我々は、筋炎においては、パーフォリンによってsarcomereに開けられた孔よりグランザイムAが筋細胞内に侵入し、筋蛋白分解を加速しているのではないかという仮説をたて、精製したグランザイムAと筋膜蛋白および筋細胞骨格蛋白との反応を検討した。

【方法】

1) 抗体の作成及びパーフォリンとグランザイムAの抽出

パーフォリンはhumanのN末端18個のアミノ酸、グランザイムAはmouseのN末端11個のアミノ酸からなるペプチドを合成し、ウサギ (NZW) に免疫し、抗血清を得た。培養CTL細胞株CTL2を超音波破碎後、遠心にて核を取り除いた上清をゲル濾過した。次にこのグランザイムA活性分画をイオン交換カラムに吸着させ、塩濃度勾配にて溶出した。

2) グランザイムAの筋膜蛋白に対する作用の検討

B10マウス筋より抽出した膜分画と上記のグランザイムA活性分画とを37度でincubateし、その反応産物を α -アクチニン、ビンキュリン、ジストロフィンに対する抗体を用いてウエスタンブロットティング(WB)法にて解析した。

3) グランザイムAの筋構造蛋白に対する作用の検討

ウサギ背筋より抽出した筋原線維と上記のグランザイムA活性分画を37度でincubateし、その反応産物を電気泳動後、CBB蛋白染色を行った。

【結果】

1) パーフォリン、グランザイムAのimmunoblotting

CTL2粗抽出液に対し抗パーフォリン血清を用いてWBをおこなうと、67kDaの単一のバンドを認めた。イオン交換カラムから溶出されたfraction 40から60を抗グランザイムA血清を用いてWBを行うと、Fr40、Fr50、Fr57を中心として3種類の分子種が認められた。Fr50前後の35kDaのbandがBLT活性のピークでもあり、グランザイムAと考えられた。以下の実験ではこのFr50を用いた。

2) グランザイムAの筋膜蛋白に対する作用の検討

各種筋膜蛋白に対するグランザイムAの作用をWBにて解析した。ビンキュリン、 α -アクチニンは分解されなかったが、ジストロフィンが部分的に分解されていた。一方、比較として用いたトリプシンでは、いずれの筋膜蛋白も分解されていた。

3) グランザイムAの筋構造蛋白に対する作用の検討

筋構造蛋白であるミオシン、アクチン、コネクチン、

ネビュリンについて検討した。ミオシン重鎖、軽鎖ともに分解されることが分かった。コネクチン、ネビュリンの検討では、コネクチンはコントロールと比較して有意な分解がみられないのに対し、明らかにネビュリンはグランザイムAにより分解されていた(図1)。

【考察】

In vitroの系ではグランザイムAは、筋構造蛋白であるミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、ネビュリン、および筋膜蛋白であるジストロフィンを分解した。ネビュリンはZ線とミオシンをつないでthin filamentの構造を保つ800kDaの巨大な構造蛋白と考えられている⁴⁾。デュシャンヌ型筋ジストロフィーでは、CANPの活性化によりネビュリンやコネクチンが分解されることが筋障害の初期の重要な過程と考えられている。多発性筋炎においてもCTL中のグランザイムAによりネビュリンが分解され、筋障害をひきおこす可能性がある。また、筋形質膜の裏打ち蛋白と考えられているジストロフィンが分解されていたことにより、多発性筋炎における筋障害過程においてジストロフィンも関与している可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Engel, A.G., Arahata, K., and Smith, A.E. (1990) Waksman's, B.H. eds. Immunologic mechanisms in neurologic and psychiatric disease. New York : Raven press, Ltd. 141-157.
- 2) Engel, A.G., Arahata, K. (1986) Hum. Path. 17, 704-721.
- 3) Tschopp, J. and Jongeneel, C.V. (1988) Biochemistry 27, 2641-2646.
- 4) Wang, K., and Wright, J. (1988) J. Cell Biol. 107, 2199-2212.

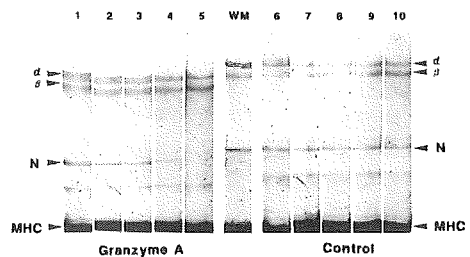


図1

α ; α -コネクチン、 β ; β -コネクチン
N; ネビュリン、MHC; ミオシン重鎖
WM; whole muscle

Incubation time: lane 1. 0min, lane 2. 30min
lane 3. 60min, lane 4. 90min, lane 5. 120min

炎症性筋疾患におけるパーフォリン、セリンエステラーゼの役割

織茂智之, 中村浩一郎, 榎中征哉, 荒畑喜一, 杉田秀夫

炎症性筋疾患における筋障害の病因については、多発筋炎や封入体筋炎では我々の生検筋での検出¹や、Hohlfeldらの培養系での検討²により細胞障害性T細胞（以下CTLと略）の重要性が指摘されている。一方CTLやナチュラルキラー（NKと略）細胞に含まれるパーフォリン（以下PFと略）とセリンエステラーゼ（以下SEと略）は、*in vitro*で強い細胞障害活性を有していることより、*in vivo*においてもCTLやNK細胞の細胞障害作用と深い関連があると考えられている³。今回我々はこれらの蛋白が炎症性筋疾患の筋障害過程にいかに関与しているかを知る目的で、合成ペプチドで作成した抗PF、抗SE抗体を用い免疫組織化学的に以下の検討を行なったので報告する。

【対象と方法】

対象は多発筋炎5例（平均51.5歳）、封入体筋炎2例（平均67.5歳）、皮膚筋炎5例（平均12.2歳）でそれぞれの生検筋を用いた。方法は4μmの連続凍結切片を作成し、一般組織化学染色としてH&E、Gomori trichrome変法、酸性フオスファターゼ染色を、同時に合成ペプチドを家兎に免疫して作成した抗PF、抗SE抗体、リンパ球表面抗原に対する単クローン抗体を蛍光抗体法で免疫染色した。また一部の例では抗PF抗体と抗CD8との二重染色を行なった。観察にはZeiss社のAxiophotを用い、浸潤細胞の見られる場所をendomysium(E)とperivascular site(P)に分けEでは1000本の筋線維あたりの、Pでは同部位にみられた各種抗体陽性細胞数を全て算定した。

【結果】

表1は多発筋炎、封入体筋炎、皮膚筋炎のEにおける各種抗体陽性細胞数の平均と百分率を表示したものである。PF、SE陽性細胞は多発筋炎、封入体筋炎に多くほぼ同数認められたが、皮膚筋炎では殆ど認められなかった。一方いずれの疾患でもPではPF、SE陽性細胞は殆ど見られなかった。リンパ球サブセットでは、多発筋炎、封入体筋炎のEではCD8陽性細胞がCD4陽性細胞より優位で、CD22陽性細胞はほとんど見られず、PではCD4陽性細胞がCD8陽性細胞より優位であった。またいずれの疾患でもCD57、CD16陽性細胞は少なかった。図1は多発筋炎のEにみられた浸潤細胞であるが(1a)、CD8陽性細胞が筋線維のまわりあるいは内部に浸潤している(1b)。矢印の細胞にPF(1c)、SE(1d)がともに陽性である。

【考察と結語】

1)多発筋炎、皮膚筋炎、封入体筋炎における浸潤細胞のリンパ球サブセットはこれまでの報告と同様であった⁴。2)多発筋炎、封入体筋炎ではPF、SE陽性細胞がEを中心に、ほぼ同じ場所にほぼ同数認められた。3)皮膚筋炎ではPF、SE陽性細胞はほとんど認められなかった。4)以上よりPF、SEは多発筋炎、封入体筋炎においては、皮膚筋炎と異なり筋障害過程に重要な役割を演じているものと思われた。

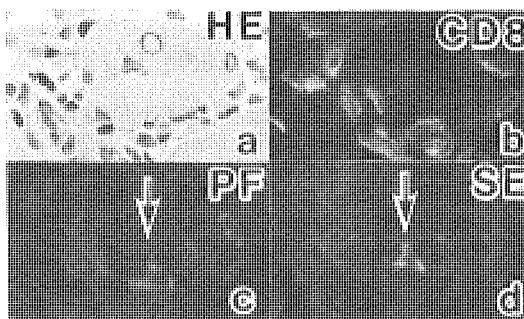
【文献】

- 1, Arahata K, Engel AG. Ann Neurol 1988, 23 : 493
- 2, Hohlfeld R, Engel AG. Ann Neurol 1991, 29 : 498
- 3, Tschopp J, Jongeneel CV. Biochemistry 1988, 27 : 2641
- 4, Arahata K, Engel AG. Ann Neurol 1984, 16 : 193

表1. The average immunoreactive cell counts per 1000 muscle fibers in endomysium (Mean±SD)

	PF	SE	CD3	CD8	CD4	CD22	CD57	CD16	%φ
PM	66±39 (8.4)	67±39 (8.5)	612±343 (77.8)	365±207 (46.4)	244±137 (31.0)	25±39 (3.2)	41±61 (5.2)	17±15 (2.2)	109±67 (13.9)
I BM	153±11 (8.0)	155±12 (8.1)	1633±327 (85.4)	1023±233 (53.5)	686±95 (35.9)	3±3 (0.2)	35±9 (1.8)	8±3 (0.4)	242±8 (12.7)
DM	0.6±1.2 (0.7)	0.4±0.8 (0.5)	34±24 (42.0)	22±8 (27.2)	21±16 (25.9)	0.8±0.7 (1.0)	4±3 (4.9)	0.5±0.5 (0.6)	42±20 (51.9)

() : % φ : macrophage



ジストロフィン分子におけるN末端ドメインの臨床的意義

有川恵理, 林由起子, 石浦章一, 埜中征哉, 荒畑喜一, 杉田秀夫

以前我々は、BMD(20例)ではジストロフィンのC末端ドメインが保たれているがDMD(18例)では欠損していることを示し、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を提示した文献¹⁾。今回我々はC末端ドメインが保たれているが、N末端側に巨大な欠損を持ち、非常に早期に重篤な臨床症状と経過を示した筋ジストロフィー患者を経験したので報告した。

【対象】 症例は2歳10ヶ月男性。主訴は高CK血症と歩行障害。生後8ヶ月時高CK血症を指摘され(20,000-30,000U/L)た。その後独歩が1歳5ヶ月と遅れ、またGowers'徴候を認めたことからDMDを疑われ筋生検が施行された。

筋生検時所見：低身長(-2SD)の他一般身体所見に問題無し。知能は遠城寺式で正常範囲。近位筋優位の筋力低下あり。歩行は不安定。走行不可。関節拘縮、仮性肥大あり。

検査結果：骨格筋CTで大内転筋、大臀筋等に低吸収域あり。心電図異常なし。血清CK値64285、GOT 511、GPT 798、LDH 2,641、ALD 154U/Lと上昇。

【方法】 抗ジストロフィン抗体；ジストロフィンのN末端からC末端までの10ヶ所の異なる領域に対して調製された抗体(N末端から順にD1-2a、2-5E2、3-4C4、3-4G4、D8、6-10、D9、D10、D11、4-4C5)を用いた(図1)。これらの抗体は同時に染色したDMD筋の筋形質膜は染色しないことから、いわゆるジストロフィン関連タンパク質(DRP)との交差反応性はないと考えられた。

免疫組織化学染色；6μmの凍結切片を用いて蛍光抗体法にて行った。

イムノブロット；生検筋の20μ凍結切片15枚からのサンプルは予めミオシン重鎖の量を揃え、筋タンパク質の量が一定になるよう調製し、抗体D1-2a、D8、6-10、4-4C5を用いて行った。

遺伝子解析；生検筋のブロックよりDNAを抽出し、Chanberlain、Beggsらにより調製されたmultiplexプライマーを用いてmultiplex PCR解析を行った。

【結果及び考察】

免疫組織化学染色；抗ジストロフィン抗体D1-2a、2-5E2、3-4C4、3-4G4、D8ではジストロフィンが全く染色されず、抗体6-10、D9、D11、4-4C5で

はコントロールに比べ淡く不均一な染色ではあったがジストロフィンが筋形質膜に沿って確認された(結果を図1に+で示した)。

イムノブロット；抗体D1-2a、D8ではジストロフィン検出されず、抗体6-10、4-4C5では分子量約100kdのジストロフィンバンドが検出され、その蛋白量はそれぞれ順にコントロールレーンの27%、45%と減少していた。

遺伝子解析；ジストロフィン遺伝子のエクソン2-44にわたる巨大な欠損を認めた。理論上フレームシフトを伴っていた(図1)。

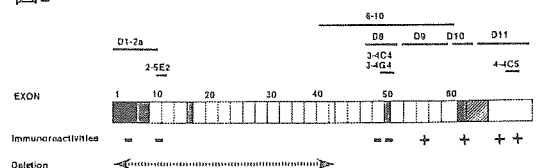
ジストロフィン遺伝子のエクソン2-44の巨大な遺伝子欠損が存在し、免疫組織化学的にN末端側を欠如する短いジストロフィンタンパク分子の存在が示された、しかも臨床的には極めて重篤な経過をとっている筋ジストロフィーの一例を報告した。この症例は今後ジストロフィンと臨床症状との関わりを考えていく上で重要な問題を提起しているものと考えられた。特に、エクソン2に始まるN末端のアクチン結合ドメインを含む欠損をみる場合にはジストロフィンは正常に機能しない可能性が示唆された。また、遺伝子解析で確認されたジストロフィンの欠損領域を越えてさらに大きな欠損がタンパク質レベルで存在したが(図1参照)、エクソン45よりさらに下流でフレームが修復された可能性が考えられた。

もう一つの可能性として我々がC末端領域に認めた免疫反応はYaffeらのいう第3のジストロフィンのようなものを認識している可能性がある。

文献

- 1) Arahata K, Beggs AH, et al.
J Neurol Sci, 101;148-156, 1991.

図1



アミロイド前駆体蛋白の細胞内局在に関する生化学的研究

下川雅丈, 田川一彦, 石浦章一, 杉田秀夫

アルツハイマー病の老人斑の主成分であるアミロイドβ/A4蛋白はアミロイド前駆体蛋白 (APP) というより大きな蛋白の異常な分解により生成されることが知られている。アミロイドβ/A4蛋白の沈着は老化したヒト脳に限られるが、APPは全身の臓器で発現している。APPはさらに種を越えて他の哺乳類やげっ歯類でも同様に発現している。このように広く存在する蛋白でありながらAPPの生成部位、存在部位、代謝機構はいまだ明らかにされていない。唯一解明されているのは膜蛋白であろうということだけである。今回我々は牛副腎髄質を用いAPPの細胞内局在を生化学的に解明しようと試みた。

(方法)

牛副腎髄質を細胞分画法で5つの分画に分画した。すなわち、核分画、ミトコンドリア分画、リソゾーム分画、ミクロソーム分画、細胞質ゾル分画である。この際各分画に局在する酵素活性を測定し指標とした。これらの分画にトライトンX-100を加えその可溶性部分のみをAPPのC末端およびアミロイド/A4

蛋白のN末端にたいする抗体(それぞれ抗AC抗体、抗β抗体)を用いてウエスタンブロット法で検討した。マーカーとしてCOS-1細胞で発現させたAPP695, APP770を用いた。

(結果と考察)

ウエスタンブロット法によりAPP770に対応する分子量のバンドをリソゾーム分画に検出した。さらに抗AC抗体と抗β抗体の両方で認識される14kdのバンドおよび抗AC抗体でのみ認識される8kdのバンドがリソゾーム分画に認められた。14kdと8kdのバンドはいずれもAPP770のC末端断片であり、14kdのバンドはアミロイドβ/A4蛋白全長を含むと考えられた。14kdと8kdのバンドはトライトン未処理のサンプルでは検出されなかったことからこれらAPP770のC末端断片は膜に存在する可能性が示唆された。

以上の結果と田川らがAPP分解酵素として報告したカテプシンBがリソゾーム酵素であることからリソゾームがAPPの代謝に関与している可能性がある。

2. 疾病研究第二部

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、田中室長は従来どおりに研究を続け、許斐室長は東京小児療育病院へ移り、水戸室長がトロント大学小児病院留学から帰国した。常勤研究員として、丸山悦子、長谷川元宏、亀井淳研究員が継続、飯田浩一、加藤俊徳、松井潔（小児神経レジデント）、福永道郎（同レジデント）研究員が新規に加わった。非常勤研究員として、田村頼子、平野悟、山之内秀雄、西村淳、小沢浩、下山丈紀研究生が研究に参加した。併人研究員、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、伊崎紀代子、進町子、矢野真理の方々に研究を助けていただいた。

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継続し、脳形成異常や周産期脳血管障害の病態と成因を検討し、発達期の特異な素因と外因の関係を追求した。
2. 発達期の脳循環動態の特異性とその障害機序について、非侵襲的な近赤外線分光測定による意義を検討し、また、NMRスペクトロスコピーによる脳組織の生化学的特性を分析した。
3. 胎児性症候群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発生機序と防止法開発の研究を行った。
4. 微量元素にもとづく脳障害発生機序の解明と胎内治療に関して、ウィルソン病への新薬としてのトリエチンの胎生毒性の検討を行った。
5. 精製したVIII型コラーゲンの構造および遺伝子解析を行うとともに、生物学的意義を眼および神経系について検討した。
6. ダウン症候群の精神遅滞と早発痴呆の発生機序を画像的ならびに免疫組織化学的に追求した。

（部長 高嶋幸男）

Ⅱ 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Takashima S, Mito T, Houdou S, Hasegawa M, Hashimoto K, Takeuchi Y :
Pathogenesis of pontosubicular necrosis in perinatal brain
Proceedings of XIth International Congress of Neuropathology, Kyoto, pp 439 – 442,
1990
- 2) Takashima S, Becker LE :
Delayed dendritic development of catecholaminergic neurons in the ventrolateral medulla
of children who died of sudden infant death syndrome
Neuropediatrics 22 : 97–99, 1991
- 3) Takashima S, Chan F, Becker L, Kuruta H :
Aberrant neuronal development in hemimegalencephaly : immunohistochemical and Golgi
studies
Pediatr Neurol 11 : 771–779, 1991
- 4) Takashima S, Chan F, Becker L, Houdou S, Suzuki Y :
Cortical cytoarchitectural and immunohistochemical studies on Zellweger syndrome
Brain Dev 13 : 158 – 162, 1991
- 5) Takashima S, Chan F, Becker L :
Cortical dysgenesis in a variant of phenylketonuria (Dihydropteridine reductase deficiency)
Pediatr Pathol 11 : 771–779, 1991
- 6) Hashimoto K, Takeuchi Y, Takashima S :
Hypocarbia as a pathogenic factor in pontosubicular necrosis
Brain Dev 13 : 155 – 157, 1991
- 7) Houdou S, Kuruta H, Hasegawa M, Konomi H, Takashima S, Suzuki Y, Hashimoto T :
Developmental immunohistochemistry of catalase in the human brain
Brain Res 556 : 267 – 270, 1991
- 8) Koyama K, Mito T, Takashima S, Suzuki S :
The effect of prostaglandin E1 and nicardipine on cerebral blood flow, blood volume and
oxygenation in young rabbits

- Brain Dev 13 : 32 - 35, 1991
- 9) Hasegawa M, Tatsuno M, Houdou S, Takashima S, Okuyama K :
Continuous comparison of cerebral blood flow velocity and volume on hypoxia
Brain Dev 13 : 433 - 437, 1991
- 10) Sakuta R, Aikawa H, Takashima S, Ryo S :
Epidermal nevus syndrome with hemimegalencephaly : neuropathological study
Brain Dev 13 : 260 - 5, 1991
- 11) Tamura Y, Konomi H, Sawada H, Takashima S, Nakajima A :
Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes
Investigative Ophthalmology & Visual Science 32 : 2636 - 2644, 1991
- 12) Kinoue K, Nemoto S, Takamiya H, Kawashima Y, Miyajima T, Ogihara M, Matsuno T,
Hoshika A, Dote T, Takashima S, Honda T :
A case of age dependent epileptic encephalopathy with CT appearance and neuropathological findings
Jap J Psychiatr Neurol 45 : 446 - 450, 1991
- 13) Sasaki M, Sakuragawa N, Takashima S, Hanaoka S, Arima M :
MRI and CT findings in Krabbe disease
Pediatr Neurol 7 : 283 - 288, 1991
- 14) Tomita Y, Tsukamoto H, Takeshita H, Takashima S :
Blink reflex in young children with medullary kink in Chiari malformation
Brain Dev 13 : 425 - 7, 1991
- 15) 高嶋幸男, 宝道定孝, 長谷川元宏, 橋本和広, 竹内豊 :
低酸素性虚血性脳障害 - 病変形成過程の早期診断
脳と発達 23 : 147 - 152, 1991
- 16) 亀井淳, 宝道定孝, 平野悟, 長谷川元宏, 高嶋幸男, 大野勉, 竹内豊 :
Potter 症候群の中枢神経系合併奇形
日本新生児学会雑誌 27 : 709 - 713, 1991
- 17) 古賀まゆみ, 林隆, 篠原照男, 高嶋幸男 :
急性ウイルス性脳炎における脳梗塞 : MRI と病理組織像
脳と発達 23 : 497 - 501, 1991

II 研究業績

- 18) 山内秀雄, 野田素子, 須貝研司, 高嶋幸男, 黒川徹 :
前頭葉起源の発作性自動症を示した2例
脳と発達 23 : 492 - 496, 1991
- 19) 佐々木征行, 花岡繁, 鈴木文晴, 高嶋幸男, 有馬正高 :
Bloch-Sulzberger症候群の1例で認められたMRI大脳白質病変
脳と発達 23 : 278 - 283, 1991
- 20) 来田裕美, 長谷川元宏, 宝道定孝, 高嶋幸男, 竹内豊, 浅沼勝美, 大野勉 :
胎児・新生児脳幹のカテコラミン含有神経細胞の発達
日本新生児学会雑誌 27 : 575 - 579, 1991
- 21) 亀井淳, 長谷川元宏, 飯田浩一, 宝道定孝, 水戸敬, 許斐博史, 高嶋幸男 :
ヒト胎児・新生児大脳血管におけるVI型コラーゲン局在の発達の特異性(未熟児脳室内出血と関連して)
医学のあゆみ 159 : 941 - 942, 1991
- 22) 松井潔, 福水道郎, 吉川秀人, 加我牧子, 黒川徹, 高嶋幸男 :
Leukodystrophy における電気生理学的検討-Blink reflex と聴性脳幹反応
日本小児科学会雑誌 95 : 2628 - 2633, 1991
- 23) Tanaka H, Nasu F, Inomata K :
Fetal alcohol effects : decreased synaptic formations in the field CA3 of fetal hippocampus
Int J Dev Neurosci 9 : 509 - 517, 1991
- 24) 水戸敬 :
胎児・新生児の脳障害予防のための病態解析 : 病理学的動態
脳と発達, 28 : 126 - 131, 1992
- 25) Mito T, Pereyra M, Becker L :
Neuropathology in patients with congenital heart disease and Down syndrome
Pediatr Pathol 11 : 867 - 877, 1991
- 26) Sawada H, Konomi H :
The $\alpha 1$ chain of type VIII collagen is associated with many but not all microfibrils of elastic fiber system
Cell Struct Funct 16 : 455 - 466, 1991

b. 著 書

1) 高嶋幸男 :

乳児突然死症候群の延髄呼吸中枢異常

Symposium on developmental neurobiology, 三報社, 東京, pp 93-96, 1991

2) Becker L, Mito T, Takashima S, Onodera K :

Growth and development of the brain in Down syndrome

The Morphogenesis of Down Syndrome, Wiley-Liss, New York, pp 133 - 152, 1991

c. 総 説

1) 高嶋幸男, 亀井淳, 飯田浩一 :

神経系の成長・発達と適応障害—とくに大脳白質を中心に

周産期医学 21 : 1305 - 1308, 1991

2) 高嶋幸男 :

乳幼児突然死症候群とその予防対策

小児科 32 : 611 - 618, 1991

3) 水戸敬, 高嶋幸男 :

頭蓋内出血

小児科診療, 54 : 2224 - 2228, 1991

4) 福水道郎, 花岡繁, 高嶋幸男 :

中枢神経奇形

周産期医学 21 : 519 - 522, 1991

5) 長谷川元宏, 高嶋幸男 :

未熟児の仮死

周産期医学 21 : 560 - 564, 1991

6) 亀井淳, 高嶋幸男 :

頭蓋内出血

小児科診療 55 : 749 - 751, 1992

d. 班会議報告書

1) 高嶋幸男, 来田裕美, 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

II 研究業績

平成2年度研究報告書 p72-75, 1991

2) 高嶋幸男, 宝道定孝, 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及び長期予後に関する研究班

平成2年度研究報告書 p45-50, 1991

3) 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leptomeningeal 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班

平成2年度研究報告書 p72-75, 1991

4) 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

—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—

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年度研究報告書 p69-73, 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の発生機構と治療に関する研究班

平成2年度研究報告書 p35-38, 1991

6) 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年度研究報告書 p51-56, 1991

7) 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年度研究報告書 p79-84, 1991

8) 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年度研究報告書 p57-61, 1991

- 9) 有馬正高, 丸山悦子, 高嶋幸男, 小野寺一清 :

Recklinghausen 病の生化学的・分子生物学的検討

厚生省特定疾患・神経皮膚症候群, 平成2年度研究報告書 1991

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

- 1) Takashima S, Mito T :

Neurological maladaptation in the neonate

Ist International Congress of Perinatal Medicine, Tokyo, Sep 5, 1991

- 2) 高嶋幸男, 宝道定孝 :

ペロキシゾーム病の神経病理

第33回日本小児神経学会, 大分, 5.31, 1991

- 3) 高嶋幸男 :

新生児の脳病理について-臨床症状, 画像診断との関係

第5回山口県小児神経研究会, 山口, 4.4, 1992

- 4) 高嶋幸男 :

いわゆる high risk child について-中枢神経系異常とシナプス発達

第32回日本児童青年精神医学会, 岐阜, 10.25, 1991

- 5) 高嶋幸男 :

重症心身障害のゴルジ法による研究

第6回神経国内研究会(東京都神経研), 東京, 10.4, 1991

- 6) 高嶋幸男 :

周産期障害・先天異常・代謝異常性疾患の中枢神経画像と病理

第9回神奈川小児神経懇話会, 1.25, 1991

- 7) 高嶋幸男 :

発達障害と脳病変-ダウン症候群

1991年度発達障害医学セミナー, 東京, 12.15, 1991

- 8) 高嶋幸男 :

II 研究業績

虚血性脳障害の発生機序

第3回長崎小児神経懇話会, 長崎, 9. 14, 1991

9) Tanaka H, Nasu F, Inomata K :

Fetal alcohol effects : decreased synaptic formations in the field CA3 of fetal hippocampus

Constituent Congress, International Society for Pathophysiology , Symposium 1.2

Receptors and central nervous system disorders, Moscow, May 29, 1991

10) 水戸敬 :

胎児・新生児の脳障害予防のための病理学的動態

第33回日本小児神経学会, 大分, 5. 31, 1991

b. 国際学会

1) Takashima S, Becker LE :

Development of catecholaminergic and substance P-positive nerve fibers in the brainstem of victims of sudden infant death syndrome

Third World Congress on Sleep Apnea and Rhonchopathy (IIIWCSAR) , Tokyo , Nov 5, 1991.

2) Hasegawa M, Tatsuno M, Okuyama K, Kamei A, Mito T, Takashima S, Ozaki T :

Continuous monitoring of intracranial hemodynamics and oxygenation on partial asphyxia

Ist International Congress of Perinatal Medicine, Tokyo, Sep 5, 1991

3) Kamei A, Hasegawa M, Iida K, Mito T, Suzuki S, Takashima S :

Monitoring of intracranial hemodynamics, oxygenation and metabolism during and after hyperventilation in rabbits by near infrared spectroscopy

Ist International Congress of Perinatal Medicine, Tokyo, Sep 5, 1991

4) Tamura Y, Konomi H, Sawada H, Takashima S, Kamei A, Nakajima A :

Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes

The Association for Research in Vision and Ophthalmology

Sarasota, Florida, April 28, 1991

c. 一般学会

1) 高嶋幸男, 水戸敬, 宝道定孝, 長谷川元宏, 亀井淳, 平野悟 :

片側巨脳症の免疫組織化学的, ゴルジ法的検討

第32回日本神経病理学会, 山形, 5. 9, 1991

- 2) 長谷川元宏, 亀井淳, 平野悟, 宝道定孝, 高嶋幸男, 浅沼勝美 :
 新生児・乳児にみられる小脳癱瘓性病変の検討
 第32回日本神経病理学会, 山形, 5. 9, 1991
- 3) 平野悟, 宝道定孝, 長谷川元宏, 亀井淳, 高嶋幸男, 浅沼勝美 :
 胎児・新生児におけるleptomeningial glioneuronal heterotopia の検討
 第32回日本神経病理学会, 山形, 5. 9, 1991
- 4) 許斐博史, 田村頼子, 宝道定孝, 高嶋幸男 :
 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
 第33回日本小児神経学会, 大分, 5. 31, 1991
- 5) 亀井淳, 宝道定孝, 平野悟, 長谷川元宏, 高嶋幸男, 大野勉, 竹内豊 :
 Potter 症候群の中樞神経系小形成異常
 第33回日本小児神経学会, 大分, 5. 31, 1991
- 6) 福田冬季子, 来田裕美, 西田朗, 高嶋幸男 :
 橋核鉤状壊死例におけるスーパーオキシドデスムターゼの免疫組織化学
 第33回日本小児神経学会, 大分, 5. 31, 1991
- 7) 宝道定孝, 亀井淳, 許斐博史, 高嶋幸男, 林利彦 :
 抗コラーゲン抗体によるヒト脳内血管の免疫組織化学
 第33回日本小児神経学会, 大分, 5. 31, 1991
- 8) 長谷川元宏, 平野悟, 亀井淳, 宝道定孝, 高嶋幸男, 鈴木進 :
 頭部および腹部における低酸素負荷時の血液量, 酸素化の変動
 第33回日本小児神経学会, 大分, 6. 1, 1991
- 9) 平野悟, 長谷川元宏, 宝道定孝, 亀井淳, 高嶋幸男, 鈴木進 :
 頸動脈閉塞時の低酸素負荷に対する脳循環の反応
 第33回日本小児神経学会, 大分, 6. 1, 1991
- 10) 西村淳, 大久保修, 来田裕美, 高嶋幸男 :
 周産期脳幹・小脳梗塞例におけるサブスタンス P およびチロシン水酸化酵素の脳幹内分布
 第33回日本小児神経学会, 大分, 6. 1, 1991
- 11) 長谷川元宏, 平野悟, 亀井淳, 宝道定孝, 高嶋幸男, 鈴木進 :
 新生・幼若仔におけるpartial asphyxia 時の脳酸素化・血流動態の検討
 第27回日本新生児学会, 東京, 7. 9, 1991

II 研究業績

- 12) 亀井淳，長谷川元宏，宝道定孝，許斐博史，高嶋幸男：
抗VI型コラーゲン抗体による胎児・小児脳血管における発達の免疫組織化学
第27回日本新生児学会，東京，7. 9, 1991
- 13) 喜田善和，竹内豊，宮坂薫，赤羽和博，飛田理子，長谷川久弥，武井治郎，浅沼勝美，飯田浩一，高嶋幸男：
超音波所見による大脳白質軟化の画像・病理学的比較
第36回日本未熟児新生児学会，東京，10.25, 1991
- 14) 高嶋幸男，水戸敬：
ダウン症候群の発達神経病理
第4回日本ダウン症候群と21番染色体研究学術集談会，東京，11. 9, 1991
- 15) 久野武，吉野相英，石田郎，足立直人，大沼悌一，村岡勳，高嶋幸男：
Heterotopic gray matter と pachygyria を合併するてんかんの1例
第2回多摩てんかん懇話会，東京，6. 29, 1991
- 16) 加藤俊徳，能勢孝一郎，三上一郎：
脳の発達に関与する無機リンの成分と発達に伴う脳細胞内PHの変化：
 ^{31}P -MRSによる評価
第36回日本未熟児新生児学会，東京，10. 25, 1991
- 17) 亀井淳，長谷川元宏，松井潔，加藤俊徳，飯田浩一，水戸敬，高嶋幸男，鈴木進：
新生家兔の過換気負荷時における脳循環環境の変化－近赤外線分光測定装置による測定
第36回日本未熟児新生児学会，東京，10. 26, 1991
- 18) 松井潔，亀井淳，加藤俊徳，飯田浩一，水戸敬，高嶋幸男：
抗ヒト内皮細胞抗体による胎児・新生児脳血管の免疫組織化学的研究
第36回日本未熟児新生児学会，東京，10. 26, 1991
- 19) 飯田浩一，亀井淳，松井潔，加藤俊徳，水戸敬，高嶋幸男，竹内豊，喜田善和，飛田理子：
大脳白質軟化の成因に関する検討－病理学的立場から
第36回日本未熟児新生児学会，東京，10. 26, 1991
- 20) 田中晴美，有馬正高：
日本における胎児性・アルコールおよびタバコ症候群－1990－
第33回日本小児神経学会，大分，5. 31, 1991
- 21) 田中晴美，山之内正弘，有馬正高：

母体投与塩酸トリエンチンのマウス胎仔への影響

第31回日本先天異常学会学術集会，出雲，7. 11, 1991

22) 田中晴美：

日本における胎児症候群－胎児性アルコール，タバコ，カフェイン症候群の実態

第50回日本公衆衛生学会，盛岡，10. 18, 1991

23) 加藤俊徳，松尾毅，能勢孝一郎，三上一郎：

^{123}I -IMP を用いた脳の髄鞘化に伴う脳血流分布の変化

新生児期の脳障害の程度とその予後の評価

第31回日本核医学会，松山，10. 23, 1991

24) 加藤俊徳，能勢孝一郎，三上一郎：

脳の発達に關与する無機リンの成分と発達に伴う脳細胞内PHの変化：

^{31}P -MR spectroscopyによる評価

第36回日本未熟児新生児学会，東京，10. 25, 1991

25) 加藤俊徳，能勢孝一郎，三上一郎：

プロトン（H）-MRSの小児の臨床応用：Lac，NAA，Choを指標とした脳障害予後の評価

第36回日本未熟児新生児学会，東京，10. 26, 1991

C. 班会議発表

1) 宮原普一，高嶋幸男，中村康寛：

ヒト流産胎児における脳形成障害の病理－13番染色体異常胎児脳について

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

平成3年度班会議，東京，12. 13, 1991

2) 亀井淳，加藤俊徳，高嶋幸男：

Hypocarbia による脳障害に関する実験的研究

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3年度班会議，東京，12. 14, 1991

3) 高嶋幸男，水戸敬：

神経細胞樹状突起発達と低酸素性脳障害に関する研究

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3年度班会議，東京，12. 14, 1991

II 研究業績

4) 飯田浩一，高嶋幸男，水戸敬：

周産期の脳室周囲白質軟化の発生要因

厚生省精神・神経疾患・発達期脳環境障害の病態形成機序とその予防法に関する研究班

平成3年度班会議，東京，12. 6, 1991

5) 小野寺一清，飯田浩一，高嶋幸男，有馬正高：

Recklinghausen 病腫瘍由来細胞から得られたcDNA にコードされるペプチドに対する抗体による組織染色

厚生省特定疾患・神経皮膚症候群調査研究班

平成3年度班会議，東京，2. 20, 1992

6) 高嶋幸男，福水道郎：

難治性水頭症脳幹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3年度班会議，京都，12. 19, 1991

7) 高嶋幸男，水戸敬，宝道定孝，竹内豊，浅沼勝美，大野勉，宮川智幸：

新生児剖検例における合併奇形

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班

平成3年度班会議，東京，12. 20, 1991

8) 田中晴美：

塩酸トリエンチンの胎生毒性について

厚生省新薬開発・先天性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

第4回班会議，市川，9. 21, 1991

9) 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－脳障害の形成に関与する要因－

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3年度班会議，東京，12. 13, 1991

10) 田中晴美：

塩酸トリエンチンの胎性毒性－続報－

厚生省新薬開発・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

第5回班会議，東京，2. 29, 1992

11) 水戸敬，高嶋幸男：

妊婦・胎児・新生児に関する後方視的調査の集計結果

厚生省精神・神経疾患・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班

平成3年度班会議，東京，12. 6, 1991

12) 水戸敬：

新生児期より中枢性呼吸障害を呈した症例の神経病理学的検討

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班

平成3年度班会議，東京，12. 11, 1991

13) 加藤俊徳，高嶋幸男，能勢孝一郎，三上一郎：

新生児仮死後の脳 MR S，MR I

厚生省心身障害・脳性麻痺児（者）の治療およびリハビリに関する研究班

平成3年度班会議，東京，2. 1, 1992

14) 許斐博史，沢田元，飯田浩一，高嶋幸男：

結合織代謝異常症のコラーゲン解析の基礎研究：中枢神経組織におけるコラーゲン

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3年度班会議，東京，1.31, 1991

II 研究業績

3. 主な研究報告

塩酸トリエンチンの胎生毒性

田中晴美, 猪俣賢一郎* (* 東邦大・医・第2解剖)

Triethylene tetramine dihydrochloride (塩酸トリエンチン) の胎生毒性につき、昨年の母と子の量依存性の変化に続き、本年は高濃度における、特に胎仔大脳への影響を検討した。 <方法>

昨年と同様C3H系マウスに、妊娠0日より妊娠中継続して飲料水として塩酸トリエンチンを投与、妊娠19日に帝切を施行した。Cu, Zn, Mgは原子吸光法、蛋白はLowry法によった。形態学的には帝切時生存していた仔を用い、大脳を固定、前額断により5μmの切片を作成し数種の染色を行った。

<結果>

1. 生化学的所見。

表に交配時から対で実験した0(コントロール)と12,000 ppm投与とにおける各母獣4匹からの胎仔8匹(8サンプル)についてのCu, Zn濃度の平均値を示す。Cuは4組織ともに低い傾向を示したが、母組織から胎仔組織に移るにつれその低下は著明となった。Zn濃度は組織によって異なり、母体肝および胎仔大脳ではコントロールと同じ、胎盤では低下、胎仔肝では高度の増加を示した。Mgおよび蛋白濃度にはコントロールと差がなかった。

2. 形態学的所見。

頭蓋や脳の異常として、広範囲の出血や血腫、頭蓋の骨化遅延、外脳症、小頭症、水頭症を認

めた。生存胎仔において、これらの1つでも存在する頻度はコントロールの1%に比し、6,000 ppmで7%、12,000 ppmで40%であった。特徴的なものとして、6,000 ppmで水頭症がみられるようになり、脳露出は12,000 ppmのみでみられた。大脳皮質の層構造には塩酸トリエンチンの量に依存して乱れが観察された。変性所見として、6,000 ppmでは脳室周囲に海綿状の変化がみられ(図)、12,000 ppmではさらに複雑な変化を示した。また変性部位を中心にミエリンの染色性も低下した。

<考察・結論>

塩酸トリエンチンの胎生毒性に関して、脳の知見はほとんどなく、またマウスにおける報告も少ない。母、仔の各種組織におけるCu, Zn濃度の変化の異なりは、おそらく、存在するメタロチオネインの組織特異性によるものと考えられる。大脳におけるCuのみの濃度低下は、同じC3H系のメンケス病モデルマウスヘミ雄の周生期のCu欠乏レベルに匹敵する。形態上認められる、ニューロンの発達もミエリンの初期発達も阻害された所見については、1つには銅欠乏による銅酵素低下としての解釈が可能である。

以上、塩酸トリエンチンの胎生毒性として、低銅状態にもとづくと考えられる脳の形態的異常の所見を示した。この異常とメンケス病の異常との比較により、メンケス病の脳障害のメカニズムの解明にも寄与するであろう。

表. 0と12,000 ppmとにおける銅と亜鉛濃度の変化 (μg/g dry wt.)

	Trien-2HCl (ppm)	Maternal liver	Placenta	Fetal liver	Fetal cerebrum
Cu	0	14.0	11.89	88.1	5.08
	12,000	13.1	7.19*	31.5**	3.29**
Zn	0	123	122	140	104
	12,000	125	107**	265**	104

* p<0.01, ** p<0.001



図 6,000 ppm投与胎仔大脳における層構造の乱れと海綿状変性

ダウン症候群脳におけるS-100蛋白質陽性細胞発現の年齢的变化

水戸 敬

これまでの転座型の症例を用いた研究により、染色体21番q22.2-22.3の部位がダウン症候群の発症に関係するといわれているが、過剰にあるどの遺伝子がダウン症候群の主要症状である精神遅滞に關与しているかはまだ不明である。一方、脳におけるS-100蛋白質の大部分を占めるβ型S-100蛋白質の遺伝子が21番q22.2にコードされていることが明かになり、S-100蛋白質がダウン症候群の原因物質ではないかという仮説が提唱されている。現在まで、我々の検索した範囲で、ダウン症候群脳におけるS-100蛋白質の発現を形態学的に検討した報告はGriffinらとMichettiらの2編であるが、それぞれの結論は相反するものである。そこで、種々の年齢のダウン症候群脳のいろいろな部位でのS-100蛋白質陽性細胞の密度について検討を行った。

[方法・対象]

在胎34, 39週、生後1, 7カ月、2, 5, 13, 20, 29, 49および57才の11例のダウン症候群と対照群の前頭葉、後頭葉、アンモン角、小脳において、S-100蛋白質とglial fibrillary acidic protein (GFAP)を一次抗体とした peroxidase-antiperoxidase 法を用いて免疫組織化学染色を行った。前頭葉、後頭葉では皮質を第1層と第2層以下に分け、さらに白質を加えた3カ所、アンモン角では錐体細胞層をCA4, CA3-2, CA1, subiculumに分けた4カ所、小脳では内顆粒細胞層、白質の2カ所で単位面積当りの陽性細胞数を5カ所以上で数えて平均値を求め、年齢にともなう変化を調べた。

[結果]

アンモン角における陽性細胞の年齢的变化を表に示した。上段がS-100蛋白質陽性細胞密度の変化であるが、ダウン症候群では対照に比べて、各部位とも胎児・新生児期と壮・老年期に約2倍密度が高かった。下段のGFAP陽性細胞の密度も同様の傾向を示したが、胎児・新生児期の症例、部位によってはS-100蛋白質での結果と異なり、対照と差のない密度を呈した。前頭葉、後頭葉の皮質ではアンモン角ほど顕著ではないが、同様の傾向を示した。しかし、白質では逆に、対照の方に陽性細胞密度が高い傾向であった。小脳では内顆粒細胞層、白質ともにダウン症候群においてS-100蛋白質陽性細胞密度が低い結果であった。

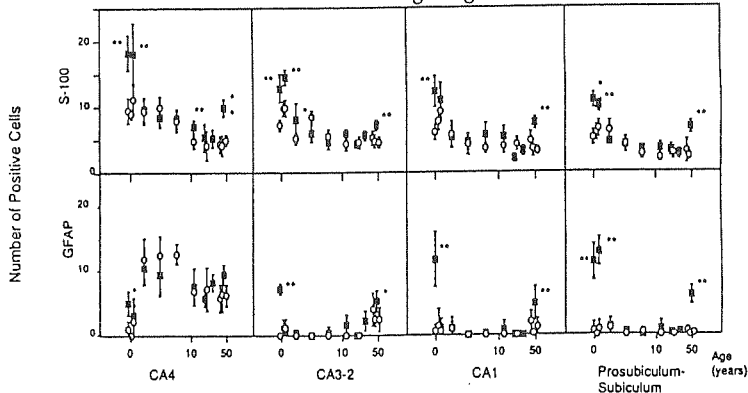
[考案]

Griffinらは在胎18週、生後2日、3カ月および41才のダウン症候群脳側頭葉を我々と同じ方法で検索し、陽性細胞密度は約2倍であったと述べている。一方、Michettiらは新生児から生後2才までのダウン症候群小脳において対照と差がなかったと報告した。今回の結果から、S-100蛋白質陽性細胞の出現、すなわち遺伝子の形態学的発現には年齢、部位による差異があることが示唆され、2つの論文はそれぞれその変化の一部を示していたと考えられた。

Griffin et al. Proc Natl Acad Sci 1989; 86: 7611-7615.

Michetti et al. Acta Neuropathol 1990; 80: 475-478.

Changes in the number of immunoreactive cells in the hippocampus according to age



Hypocarbicaによる脳障害に関する実験的研究

亀井 淳, 加藤俊徳, 高嶋幸男

【緒言】近年、高度の低炭酸ガス血症と脳障害の関係を示唆する報告が散見される¹⁻³⁾。新生児脳障害予防のため、PaCO₂低下時の脳の酸化還元状態、脳循環動態、細胞内組織代謝動態をモニターして把握することが重要である。近赤外線分光測定装置(Near-infrared spectroscopy; NIR-1000, 浜松ホトニクス; 以下NIRSと略す)を用いて、新生家兎に対し、過換気負荷、100%酸素負荷、両者の組合せの負荷を行い脳循環動態をモニターした。

【対象と方法】生後11-12日のJW系家兎の雌をエーテル吸入麻酔、臭化パンクロニウムで筋弛緩させ、気管切開にて気管内挿管し人工換気した。呼吸数30回/分から80回/分に増加させ、負荷30分後呼吸数を30回/分に戻した群を過換気負荷群(HV群、n=6)、呼吸数を30回/分のまま100%酸素投与の負荷をした群を酸素負荷群(HO群、n=5)、過換気負荷、100%酸素負荷の両者を組み合わせた群(HH群、n=5)とした。これらを対照(C群、n=5)と比較検討した。

【結果】HV群ではHbO₂は負荷中5分から既に有意差を持って低下し、次第に減少し、その低下は負荷後も持続した。HbRは負荷中次第に増加し、特に負荷中25,30分に有意差を認めた。負荷後は次第に正常域に回復した。HbTは負荷後5分の時点で減少の傾向を認め、その低下は負荷後も持続したがいずれの時点でも有意差は認めなかった。負荷中のHbTの低下はHbO₂とは異なり、漸減の傾向なく一定していた。Cyt aa₃は負荷中5分に既に有意差をもって低下しその低下は負荷中持続した。負荷後は次第に正常域に回復した。

HO群では、HbO₂は負荷中に軽度の増加の傾向を示したが、C群との有意差は認めなかった。HbRは負荷中有意差をもって低下し、負荷後はC群と同様の推移をとった。HbTはC群と比較し、負荷中に軽度低下する傾向を認め、負荷後はC群と同程度のレベルで変化した。Cyt aa₃は特に変化を認めなかった。

一方、HH群では、HbO₂は負荷中はHV群と同様に5分から有意差を持って低下したが、負荷後は有意差を認めなかった。HbRはC群と有意差なく推移した。HbTは負荷直後から、有意差を持って低下し、負荷後は有意差を認めなくなった。Cyt aa₃はHV群とは異なり負荷中の低下を認めず、むしろ負荷中止後20分で上昇を認めた。

【考察】

1. 過換気負荷は脳内HbTには有意な変化を認めず、過換気負荷前後には脳血液量に大きな変化はないといえる。一方、過換気負荷と酸素負荷を同時に

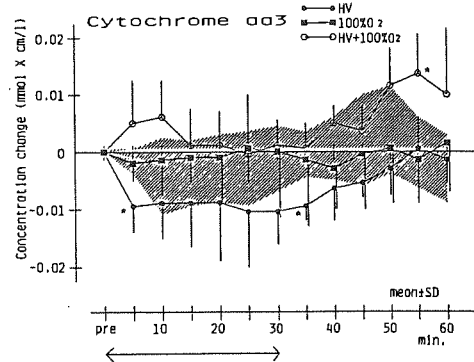
行った場合、HbTの有意な低下を認めた。この違いが何に起因しているのかは明かでないが、この時、特にHbO₂が低下する傾向があり、HbRは変化を認めず、動脈血の脳内への流入の減少に起因すると考えられる。これは酸素投与により脳内の乳酸の生産が抑えられ、脳血管(動脈)拡張の働きがなかったためと説明できる。

2. HbO₂は、過換気負荷中、単独でも、同時に酸素負荷を行った場合でも、有意差をもって低下した。しかし、過換気負荷単独の場合は、その低下が負荷後も持続する傾向があった。NIRSでみた脳内ヘモグロビンの酸化還元状態は、体循環の酸化還元状態の影響を反映するほか、脳血管の収縮や拡張、脳のうっ血の所見を捕らえる。従って、体循環の酸素飽和度は高い状態で保たれているにも関わらず動脈血が相対的に減少(血管の収縮)、あるいは静脈血が相対的に増加するような状況(うっ血)では、その所見の判断には注意が必要である。逆に、動静脈血を全体的に把握できることがNIRSの特徴ともいえる。

3. Cyt aa₃の変化は、過換気負荷時には脱酸素化を示したが、同時に酸素投与により、脱酸素化が認めなくなり、過換気負荷単独では、体循環の酸素化は保たれていても、脳組織低酸素となることを直接に証明したことになる。

【文献】

1. Greisen G et al: Acta Paediatr Scand76: 401-404, 1987
2. Calvert SA et al: Acta Paediatr Scand76: 254-259, 1987
3. Hashimoto K et al: Brain Dev 13: 155-157, 1991



Changes in the concentration of cytochrome aa₃. * P < 0.05 (Mann-Whitney test)

周産期の大脳白質軟化の発生要因

飯田浩一, 高嶋幸男, 水戸 敬

新生児剖検例における大脳白質軟化例を病理学的に、軟化の発生時期、広がりから分類し、その発生要因を検討した。検索項目として、1) 出生前発生と出生後発生の白質軟化例(出生前群、出生後群)におけるGFAP陽性細胞の分布の違いを比較。2) 出生前群、出生後群及び非白質軟化例(非軟化群)における出生前、周産期因子の比較。3) 出生後群を病変の広がりから4型に分類し、血圧、血液ガスとの関係について検討した。

対象及び方法

1. 組織反応から、出生前群は7例、出生後群は16例を対象とした。GFAP染色は、抗GFAP抗体(Dako, L1912)を用い、SAB法で行った。大脳白質を深部、中間部、皮質下に分け、600mm²の面積におけるGFAP陽性細胞の数をかぞえ、7群に分類した。

2. 出生前、周産期因子は、先天異常、SFD児などの胎児側因子、妊娠中毒症、母体疾患など母体側因子、新生児仮死、羊水混濁など周産期因子など計16項目について検討した。

3. 出生後群を白質軟化の広がりから、脳室周囲白質の前角、後角に局限しているF群、脳室周囲に広く広がっているW群、白質全体が傷害されているD群、皮質まで傷害されているMCE群に分け、血圧(最低拡張期血圧と最低収縮期血圧、それぞれLdBP、LsBP)、血液ガス所見(PaCO₂、PaO₂、pHの最低値と最高値、それぞれLpCO₂、HPaCO₂、LpO₂、HPaO₂、LpH、HpH)を比較した。

結果

1. GFAP陽性細胞は、正常対照では、深部白質では在胎28週以降に、中間部では在胎36週以降に増加し、皮質下では40週まで少数しか存在しなかった。出生前群、出生後群では、ともに軟化巣以外の深部、中間部白質で、著明な増加を認めたが、両群間に差を認めなかった。しかし、皮質下白質で出生前群では出生後群ほど増加しておらず、出生前群では脳室周囲白質に局限して増加していた。

2. 出生前群の軟化巣の組織反応からは、直前から2週間以上の経過を経た発生時期が推測されたが、出生前群、出生後群、及び非軟化群で、出生前、周産期因子を比較すると、新生児仮死の頻度が、出生後群で非軟化群より低いこと以外に、いずれの因子も有意差がなかった。

3. 出生後群では、血圧は、W群で、最低収縮

期、最低拡張期血圧ともに非白質軟化群より低値であった。また、PaCO₂最低値は、MCE群において最も低く、病変が拡大するほど低下する傾向にあった。pHとPaO₂に関しては、各群間で差がなかった(図)。

考案

白質軟化の出生前、周産期因子に関しては、仮死のみでなく出生後にも様々な成因があるものと思われた。

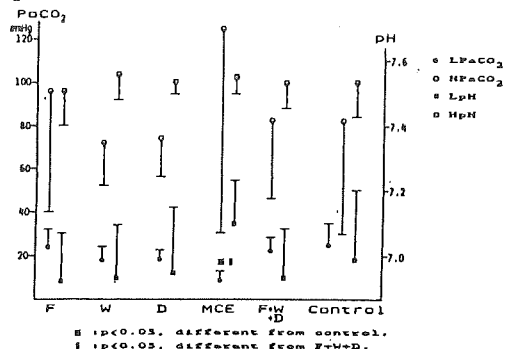
組織反応からみた出生前群の発生時期も直前から2週間以上前と様々で、出生前の広汎な時期に発生することが考えられるが、GFAP陽性細胞の分布が出生後群より脳室周囲に局限しており、動脈境界領域での虚血性変化が主体ではないかと推測された。

出生後群に関しては、近年超音波学的研究によると呼吸性アルカローシスが脳室周囲白質軟化の原因の一つであるというが[1]、私達の検討では、低炭酸ガス血症は、脳室周囲白質軟化よりも多嚢胞性脳軟化と有意に関係していた。動物実験で、低炭酸ガス血症で脳軟膜動脈径が減少し[2]、皮質を含め大脳全体で脳血流が低下するといわれており[3]、低炭酸ガス血症は、多嚢胞性脳軟化の一発生要因であると思われた。

参考文献

- [1] Calvert SA, et al. Acta Paediatr Scand 76: 254-259, 1987.
- [2] Busija DW, et al. Am J Physiol 241: H228-234, 1981.
- [3] Reuter JH, et al. Pediatr Res 20: 1102-1106, 1986.

Comparison of the lowest and the highest of both PaCO₂ and pH in each group.



3. 疾病研究第三部

1. 研究部一年のあゆみ

当部は内因性精神病，精神分裂病と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・神経疾患研究委託費の精神分裂病研究班，感情障害研究班，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，内因性精神病的全国的研究活動を補佐した。

本年度は昨年度から引き続いて三国雅彦（室長），武内ゆかり（流動研究員9/30まで），高嶋瑞夫（センター研究員11/30まで），橋本篤司（外来研究員），黒田安計，加藤由起子，白山幸彦，加賀谷有行（12/31まで），柏淳，海野麻未（研究生），宮本純子，浅川路子，岡高恵（研究補助員）らが常勤として研究活動に従事したほか，新たに池田正明（研究員），齊藤和子（流動研究員），新野秀人（研究生），大科京子，栗田雅子（研究補助員）らが参加した。

本年度の主要研究テーマとその成果は以下の通りである。

I 精神分裂病の薬理化学的研究

1. メタンフェタミン投与によりc-fos遺伝子の発現が見られるが，その発現部位が幼弱動物と成熟動物では明らかに異なることを見いだした。その臨界時期はメタンフェタミン逆耐性の現れる時期とほぼ一致していた。
2. NMDA受容体アンタゴニストMK-801の投与によって惹起される異常行動がN-Myristoyl-D-serinによって阻止されることを見いだした。

II 躁うつ病の薬理生化学的研究

1. ACTHおよびcorticosterone等の投与によりラット前頭葉皮質のセロトニン2受容体の数が増加することを見いだした。これはうつ病にHPAaxisの脱抑制と死後脳に見られるセロトニン2受容体数の増加の所見と合わせ考えると興味深い。
2. 幼弱期に一日数時間親から離すというストレスを加えると，成熟後のストレス反応性が減弱することをcorticosterone分泌を指標として認めた。

III サーカディアンリズムの生理生化学的研究

1. 網膜視床下部路の神経伝達機序を明らかにする目的で，アセチルコリンのアゴニストおよびアンタゴニストを視交叉上核内に注入した。カルバコールとブンガロトキシンのみ作用がみられ，他の多くの薬物は無効であり，光情報の伝達にコリン系がかかわっていることの実証は得られなかった。
2. 母親の隔離を20時間以上にわたって行うと仔ラットの松果体のメラトニン合成酵素の活性が著しく増大し，そのような酵素活性の上昇は仔ラットを保温することによって阻止された。（部長：高橋清久）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Mikuni M, Kagaya A, Takahashi K, Meltzer HY :
Serotonin but not norepinephrine-induced calcium mobilization of platelets is enhanced in affective disorders
Psychopharmacol 106 : 311–314, 1992
- 2) Takeuchi Y, Takashima M, Katoh Y, Nishikawa T, Takahashi K :
N-methyl-D-aspartate, quisqualate and kainate receptors are all involved in transmission of photic stimulation in the suprachiasmatic nucleus in rats
Brain Res 563 : 127–131, 1991
- 3) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K :
D-Alanine inhibits methamphetamine-induced hyperactivity in rats
Eur J Pharmacol 202 : 105 – 107, 1991
- 4) Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K :
The presence of free D-serine in rat brain
F E B S Lett 296 : 33–36, 1992
- 5) Tanii Y, Nishikawa T, Hashimoto A, Takahashi K :
Stereoselective inhibition by D- and L-alanine of phencyclidine-induced locomotor stimulation in the rat
Brain Res 563 : 281 – 284, 1991
- 6) Shioiri T, Takahashi K, Yamada N, Takahashi S :
Motor activity correlates negatively with free-running period contents in SCN in free-running rats
Physiol Behav 49 : 779 – 786, 1991
- 7) 谷井靖之, 西川徹, 橋本篤司, 日比野英彦, 高橋清久 :
Phencyclidine によって出現する異常行動とN-methyl-D-aspartate 受容体アロステリック調節部位との関連性について
脳と精神の医学 2 : 497–502, 1991

II 研究業績

- 8) Okawa M, Mishima K, Hishikawa Y, Hozumi S, Hori H, Takahashi K :
Circadian rhythm disorders in sleep-waking and body temperature in elderly patients with dementia and their treatment
Sleep 14 (6) : 478 - 485, 1991
- 9) Tsukiyama S, Hashimoto A, Katayama S, Nishikawa T, Tobe A, Maeda M :
Fluoromethylated and hydroxymethylated derivatives of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist 1 - [1 - (2 -Thienyl) cyclohexyl] piperidine
Chem Pharm Bull 39 : 1581-1584, 1991
- 10) Murakami N, Takamura M, Takahashi K, Utunomiya K, Kuroda H, Etoh T :
Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release
Brain Res 545 : 347 - 350, 1991
- 11) Takamura M, Murakami N, Takahashi K, Kuroda H, Etoh T :
Rapid reentrainment of the circadian clock itself, but not the measurable activity rhythms, to a new light-dark cycle in the rat
Physiol Behav 50 : 443 - 449, 1991
- 12) Nagayama H, Sasaki M, Ichii S, Hanada K, Okawa M, Ohta T, Asano Y, Sugita Y, Yamazaki J, Kotorii T, Maeda K, Okamoto N, Ishizuka Y, Tahashi K, Honda Y, Takahashi S :
Atypical depressive symptoms possibly predict responsiveness to phototherapy in seasonal affective disorder
J Affect Disord 23 : 185-189, 1991
- 13) Saitoh S, Iijima N, Ikeda M, Nakajima K, Kimura M, Katuki M, Mori T, Kohsaka S :
De novo production of $\alpha 2$ -macroglobulin in cultured astroglia from rat brain
Mol Brain Res 12 : 155 - 161, 1992
- b. 著 書 (編書)
- 1) 千葉喜彦, 高橋清久 :
時間生物学ハンドブック, 朝倉書店, 東京, 9, 1991

2) 高橋清久 :

うつ病

時間生物学ハンドブック，朝倉書店（千葉喜彦，高橋清久編），東京，p 357 - 372，1991.

3) Nishikawa T, Umino A, Tanii Y, Hashimoto A, Hata N, Takashima M, Takahashi K,
Toru M :

Dysfunction of excitatory amino acidergic systems and schizophrenic disorders

Biological Basis of Schizophrenic Disorders, ed Nakazawa T, Jpn Scientific Societies Press, Tokyo, p65-76, 1991

4) Toru M, Shibuya H, Mitsushio H, Nishikawa T, Suga I, Kiuchi Y :

Neurochemical abnormalities in chronic schizophrenia

Biological Basis of Schizophrenic Disorders, ed Nakazawa T, Jpn Scientific Societies Press Tokyo, p91-100, 1991

5) 西川徹 :

慢性精神分裂病の治療を探る

精神医学レビューNo.1，慢性精神分裂病（融道男編）

ライフサイエンス，東京，p46-57, 1991

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

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

NMDA Receptor Related Agents : Biochemistry, Pharmacology and Behavior (eds

Kameyama T, Nabeshima T and Domino, EF), p 275 - 285 NPP Books, Ann Arbor, 1991

7) 西川徹，岩間久行 :

興奮性アミノ酸受容体と新しい抗精神病薬

精神分裂病はどこまでわかったか（町山幸輝，樋口輝彦編）

星和書店，東京，p 123 - 157, 1992

8) 三国雅彦，加賀谷有行，高橋清久 :

α -2 アドレナリン受容体機能とうつ病-5-HT-2セロトニン受容体機能との比較-

脳・血管における α 受容体：藤原元始，杉本恒明，小暮久也編，

エクセプタ・メディカ，東京，p59-74, 1991

II 研究業績

c. 総 説

- 1) 三国雅彦, 滝田正寿, 高橋清久 :
ストレスと脳内糖代謝
Brain Medical 14 (1) : 87-92, 1992
- 2) 三国雅彦 :
抗うつ薬の細胞内情報伝達系に対する作用機序-GTP結合タンパクに対する直接作用の検討
臨床精神医学 20 : 415 - 420, 1991
- 3) 三国雅彦, 加賀谷有行, 村岡新一郎 :
C6神経膠種細胞
蛋白質・核酸・酵素 36 : 950 - 951, 1991
- 4) 三国雅彦 :
うつ病のセロトニン受容体応答系機能異常とグルココルチコイド
フェルマシア (日本薬学会誌) 28 : 276 - 277, 1992
- 5) 三国雅彦 :
うつ病のアミン受容体・細胞内情報伝達系機能異常とグルココルチコイドの効果
医学のあゆみ 160 : 738 - 741, 1992
- 6) 加賀谷有行, 吉田端子 :
血小板における細胞内カルシウム濃度測定法
脳と精神の医学 2 : 527 - 529, 1991
- 7) 西川徹 :
精神疾患とグルタミン酸レセプター
実験医学 9 : 61-69, 1991
- 8) 西川徹 :
NMDAレセプターと分裂病
神経精神薬理 13 : 865 - 876, 1991
- 9) 本橋伸高, 高橋清久 :
神経系に作用する薬物マニュアル, 抗うつ薬
生体の科学 42 : 529 - 531, 1991
- 10) 谷井靖之, 西川徹 :
精神分裂病の病態モデル-その2, フェンサイクリジンモデル-
臨床精神医学 20 : 1499-1510, 1991

d. 班会議報告書

1) 高橋清久, 三国雅彦, 滝田正寿, 黒田安計, 小川哲郎 :

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,

平成2年度研究報告書 p25-32, 1991

2) 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 :

神経系由来培養細胞ならびにラット大脳皮質における5-HT₂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,

平成2年度研究報告書 p67-72, 1991

3) 西川徹, 橋本篤司, 谷井靖之, 海野麻未, 岡高恵, 白山幸彦, 柏淳, 高橋清久 :

興奮性アミノ酸伝達に作用する薬物を用いた精神分裂病の発症機序と新しい治療法に関する研究

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2年度研究報告書 p69-74, 1991

4) 西川徹 :

覚醒剤及びフェンサイクリジン類投与動物を用いた精神分裂病症状の発現機構に関する研究

平成3年度科学研究費補助金(一般C)研究成果報告書 p1-36, 1992

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 投与後の脳内c-Fos 蛋白様免疫反応性-

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,

平成2年度研究報告書 p135-142, 1991

e. その他

1) 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結合蛋白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, 1991

2) Nishikawa T, Tanii Y, Umino A, Hashimoto A, Hata N, Takashima M, Shirayama Y, Takahashi K :

Phencyclidine, NMDA receptor and schizophrenia

Jpn J Psychopharmacol 11:65-69, 1991

II 研究業績

- 3) Toru M, Kurumaji A, Kumashiro S, Ishimaru M, Suga I, Nishikawa T :
Dopaminergic and glutamatergic abnormalities in postmortem schizophrenic brain
Biological Psychiatry 1 (ed by Racagni G et al) : 501 – 503, 1991
Elsevier Amsterdam

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

- 1) Takahashi K :
Rhythm disorder and their novel treatment
5 th World Congress of Biological Psychiatry
Florence , June 10, 1991
- 2) Takahashi K :
Sleep-wake rhythm disorder and Vitamin B12
ICVB Symposium on Vitamin B12
The First International Congress on “Vitamins and Biofactors in Life Science”
Kobe , 9. 16, 1991
- 3) Mikuni M, Shinno H, Muraoka S, Kagaya A, Saitoh K, Takahashi K :
Glucocorticoid , neurotransmitter-coupled signaling and neurotoxicity
4 th International Symposium on Genetic Study of Alzheimer Type Dementia Tokyo ,
March , 1992 (Symposium : Animal Model for Dementia)
- 4) 三国雅彦, 小川哲郎, 黒田安計, 高橋清久 :
視床下部－下垂体－副腎皮質系機能の脱抑制モデル：新生児期の薬物ならびにストレス負荷処置による検討
第14回日本生物学的精神医学会，若手プレゼンポジウム：精神疾患モデル
鹿児島，3. 26, 1992
- 5) 西川徹 :
フェンサイクリジンの脳に対する作用－興奮性アミノ酸伝達遮断作用を中心として－
第20回精神研シンポジウム，東京，12. 7, 1991
- 6) 西川徹 :
慢性分裂病と興奮性アミノ酸ニューロン
第15回日本神経科学学会，シンポジウム：精神疾患の神経生物学，東京，12. 19, 1991

7) 西川徹 :

フェンサイクリジン投与動物を用いた精神分裂病の研究

第14回日本生物学的精神医学会, 若手プレゼンポジウム: 精神疾患モデル,
鹿兒島, 3. 26, 1992

b. 国際学会

1) Mikuni M, Kagaya A, Muraoka S, Takahashi K :

Responsiveness of 5-HT₂ receptor-mediated calcium mobilization is increased in platelets of depressed patients and in C6 glioma cells pretreated with dexamethasone
21st Annual Meeting of Society for Neuroscience
New Orleans, Nov 12, 1991

2) Katoh Y, Takeuchi Y, Takashima M, Yamā aki K, Takahashi K :

Effect of restriction of maternal presence on NAT activity rhythm in blinded rat pups
Sapporo Symposium on Biological Rhythm, 札幌, 8. 22, 1991

3) Kuroda Y, Mikuni M, Ogawa T, Takahashi K :

Alterations in methysergide displaceable ³H-ketanserin binding in the rat cerebral cortex following subchronic administration of ACTH
5th World Congress of Biological Psychiatry, Florence, June 12, 1991

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

5-HT-induced desensitization of 5-HT₂ receptors coupled with intracellular calcium mobilization in C6 cells
5th World Congress of Biological Psychiatry Florence, June 12, 1991

5) Muraoka S, Mikuni M, Kagaya A, Saitoh K, Ikeda M, Takahashi K :

Effect of antidepressant treatment on serotonin-2 receptor-mediated calcium mobilization in rat glioma C6 BU-1 cells
21st Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Nov 12, 1991

6) Kagaya A, Mikuni M, Yamawaki S, Takahashi K :

Enhancement of serotonin-2 receptor-mediated calcium mobilization in human platelets
21st Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Nov 12, 1991

7) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Higuchi T, Takahashi K :

The effects of allosteric agonists for NMDA receptor complex on methamphetamine-

II 研究業績

induced locomotor stimulation in rats

21st Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Nov 12, 1991

- 8) Shirayama Y, Nishikawa T, Watanabe M, Takahashi K :

Imipramine reduced binding number of sigma sites in rat striatum and hippocampus

21st Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Nov 15, 1991

- 9) Kashiwa A, Nishikawa T, Umino A, Yamamoto K, Takahashi K :

The effect of MK-801 on dopamine metabolism of rat medial frontal cortex

21st Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Nov 13, 1991

- 10) Mitsushio H, Shibuya H, Noda K, Nishikawa T, Takashima M, Takahashi K, Toru M :

Increase in substance P and VIP content in the post-mortem schizophrenic brains

13th Meeting of the International Society for Neurochemistry,

Sydney, July 18, 1991

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

Effects of 40-days treatment with carbamazepine, sodium valproate and clonazepam on GABA content in rat brain

Amino Acid 91, An official Satellite to the 13th Meeting of the International Society for Neurochemistry, Sydney, July 23, 1991

- 12) Tsunashima K, Kato N, Masui A, Takashima M, Takahashi K :

Delta sleep-inducing peptide has a potent specific effect on thermoregulation via dopaminergic and serotonergic mechanisms

The Founding Congress of WFSRS, Canne, Sept 21-25, 1991

- 13) Toru M, Kurumaji A, Kumashiro S, Ishimaru M, Suga I, Nishikawa T :

Dopaminergic and glutamatergic abnormalities in postmortem schizophrenic brain

5th World Congress of Biological Psychiatry, Florence, June 12, 1991

- 14) Nanko S, Yokoyama H, Hoshino S, Kumashiro H, Mikuni M :

Psychiatric illness and Wolfram syndrome observed in 17 members of one pedigree

8th International Congress of Human Genetics, Washington, D.C., Oct 6, 1991

c. 一般学会

1) 高橋清久 :

睡眠覚醒リズム障害共同研究報告

第6回臨床時間生物学研究会, 名古屋, 10. 16, 1991

2) 加賀谷有行, 村岡新一郎, 三国雅彦, 高橋清久 :

神経系由来培養細胞の5-HT-2受容体-Ca動員系に対する抗うつ薬の直接作用とデキサメサゾンの影響

第8回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 東京, 5. 30, 1991

3) 市川宏伸, 山田佐登留, 佐藤泰三, 高橋清久 :

第87回日本精神神経学会, 東京, 5. 17, 1991

4) 黒田安計, 小川哲郎, 三国雅彦, 高橋清久 :

H P A系と5-HT受容体系機能変動動物のうつ病態モデルとしての可能性

第8回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 東京, 5. 30, 1991

5) 網島浩一, 増井晃, 加藤進昌, 高橋清久 :

ドパミンおよびセロトニンアゴニストによる体温低下作用に及ぼすデルタ睡眠誘発ペプチド(D S I P)の影響

第21回日本神経精神薬理学会, 前橋, 6. 7 - 8, 1991

6) 橋本篤司, 西川徹, 林時司, 藤井紀子, 原田馨, 岡高恵, 高橋清久 :

ラット脳内には遊離D-セリンが存在する

第64回日本生化学大会, 東京, 10. 3, 1991

7) 村岡新一郎, 三国雅彦, 加賀谷有行, 斎藤和子, 松本啓, 高橋清久 :

C6BU-1細胞における5-HT-2受容体刺激性Ca²⁺動員に及ぼすdexamethasoneの影響

第34回日本神経化学会, 東京, 10. 14, 1991

8) 橋本篤司, 西川徹, 林時司, 藤井紀子, 原田馨, 岡高恵, 高橋清久 :

ラット脳内における遊離D-セリンの同定

第34回日本神経化学会, 東京, 10. 14, 1991

9) 市川宏伸, 佐藤泰三, 内山真, 高橋清久 :

第32回日本児童青年精神医学会, 岐阜, 10. 18, 1991

10) 加藤由起子, 武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 山崎晃資, 高橋清久 :

幼若ラットリズムに与える母ラットへの接触制限の影響

II 研究業績

第1回乳児医学心理学研究会, 名古屋, 10. 27, 1991

- 11) 加賀谷有行, 三国雅彦, 村岡新一郎, 斎藤和子, 山脇成人, 高橋清久 :
C6BU-1細胞におけるセロトニン-2受容体刺激性細胞内カルシウム動員とその脱感作
第21回日本神経精神薬理学会, 前橋, 11. 1, 1991
- 12) 武内ゆかり, 西川徹, 高嶋瑞夫, 加藤由起子, 高橋清久 :
光刺激伝達におけるコリン作動性神経機構
第15回日本神経科学学会, 東京, 12. 18, 1991
- 13) 海野麻未, 西川徹, 柏淳, 高橋清久 :
メトアンフェタミン投与ラットにおける脳内c-Fos様蛋白の発現
第15回日本神経科学学会, 東京, 12. 18, 1991
- 14) 綱島浩一, 増井晃, 加藤進昌, 高橋清久 :
モノアミンによる体温変化に及ぼすデルタ睡眠誘発ペプチド(DSIP)の影響について
第11回睡眠促進物質研究会, 岡崎, 2. 6-7, 1992
- 15) 加藤由起子, 武内ゆかり, 高嶋瑞夫, 山崎晃資, 高橋清久 :
仔ラットのNAT活性リズムに及ぼす母ラットの影響
第14回日本生物学的精神医学会, 鹿児島, 3. 27, 1992
- 16) 加賀谷有行, 三国雅彦, 村岡新一郎, 山脇成人, 高橋清久 :
ラット・グリオーマ培養細胞におけるセロトニン-2受容体刺激性細胞内カルシウム動員の脱感作
の機序について
第14回日本生物学的精神医学会, 鹿児島, 3. 28, 1992
- 17) 白山幸彦, 三ツ汐洋, 谷井靖之, 西川徹, 高橋清久 :
Phencyclidine 投与後のラット脳内 substance P の変化
第14回日本生物学的精神医学会, 鹿児島, 3. 28, 1992
- 18) 黒田安計, 小川哲郎, 三国雅彦, 高橋清久 :
ラット脳5-HT-2受容体調節に対するACTH, コルチコステロンの影響について
第14回日本生物学的精神医学会, 鹿児島, 3. 28, 1992
- 19) 柏淳, 海野麻未, 西川徹, 高橋清久 :
Methamphetamine 投与後の脳内 c-fos 遺伝子発現-発達段階における検討-
第14回日本生物学的精神医学会, 鹿児島, 3. 28, 1992
- 20) 森野百合子, 三ツ汐洋, 高嶋瑞夫, 小宮山徳太郎, 高橋清久 :

アルコール離脱せん妄時におけるコルチゾールの日内リズムの検討

第14回日本生物学的精神医学会，鹿児島，3. 27, 1992

21) 三国雅彦：

視床下部－下垂体－副腎皮質系機能とうつ病

第67回長崎精神神経科集談会，長崎，7. 6, 1991

22) 池田正明，三国雅彦，高橋清久：

5－HT受容体垂型のクローニングと発現

第9回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会，伊香保，11. 1, 1991

23) 加賀谷有行，三国雅彦，池田正明，斎藤和子，高橋清久：

強制発現させた5－HT－1A受容体機能と5－HT－2受容体機能との相互作用

第9回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会，伊香保，11. 1, 1991

24) 杉下真理子，高橋清久，山崎潤，竹田吉宏，山内俊雄：

2施設における睡眠覚醒リズム障害の臨床研究

第6回臨床時間生物学研究会，名古屋，10. 16, 1991

25) 内山真，大川匡子，白川修一郎，杉下真理子，高橋清久：

リズム障害患者のポリグラフィによる検討

第6回臨床時間生物学研究会，名古屋，10. 16, 1991

26) 内山真，大川匡子，白川修一郎，杉下真理子，高橋清久：

睡眠相遅延症候群の睡眠ポリグラフと体温リズム

第14回日本生物学的精神医学会，鹿児島，3. 28, 1992

27) 内山真，大川匡子，白川修一郎，杉下真理子，高橋清久：

2施設における睡眠覚醒リズム障害の臨床研究

第14回日本生物学的精神医学会，鹿児島，3. 28, 1992

28) 熊代新，渡辺明子，車地暁生，融道男：

慢性分裂病死後脳におけるL－アスパラギン酸の定量

第15回日本神経科学学会，東京，12. 17, 1991

II 研究業績

C. 班会議発表

1) 高橋清久：

わが国の季節性感情障害の臨床像と長期経過

厚生省精神・神経疾患・感情障害の臨床像，長期経過及び予後に関する研究班

平成3年度班会議，東京，1.16, 1992

2) 西川徹，海野麻未，柏淳，白山幸彦，橋本篤司，岡高恵，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 投与ラットにおける脳内 c-fos 遺伝子の発現パターン

厚生省精神・神経疾患・薬物依存の発生機序及び治療に関する研究班

平成3年度班会議，東京，1.16, 1992

3) 西川徹，橋本篤司，岡高恵，林時司，藤井紀子，原田馨，海野麻未，高橋清久：

ラット脳には選択的NMDA受容体アロステリックアゴニストであるD-セリンが存在する

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

平成3年度班会議，東京，1.17, 1992

4) 三国雅彦，加賀谷有行，村岡新一郎，黒田安計，小川哲郎，池田正明，新野秀人，斎藤和子，高橋清久：

うつ病におけるセロトニン-2受容体機能亢進と視床下部-下垂体-副腎皮質系機能亢進との関連に関する分子薬理学的検討

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

平成3年度班会議，東京，1.18, 1992

5) 三国雅彦，小川哲郎，黒田安計，高橋清久：

モノアミン系機能を新生児期に変動させたラットに及ぼすストレス性刺激の影響に関する神経内分泌学的及び神経化学的研究

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

平成3年度班会議，東京，1.25, 1992

6) 武内ゆかり，高橋清久：

Pharmacological investigation for neuronal transmission of photic information in the SCN in rats

生物時計及び原始視覚系に關与する機能分子の検索班

平成3年度文部省科学研究費，東京，8.29, 1991

D. その他の研究会

1) 高橋清久 :

内分泌系機能と高次神経機能

信州精神神経懇話会, 松本, 9. 10, 1991

2) 高橋清久 :

サーカディアンリズムとその障害

多摩精神神経研究会, 立川, 11. 18, 1991

3) 三国雅彦 :

うつ病における視床下部-下垂体-副腎皮質系機能脱抑制とセロトニン受容体機能亢進

ヒューマンサイエンス振興財団, 第3分野第4テーマ研究発表会, 東京, 1. 23, 1992

4) 橋本篤司, 岡高恵, 西川徹 :

ラット脳における内在性遊離型D-セリンに関する研究

ヒューマンサイエンス振興財団, 第3分野第4テーマ研究発表会, 東京, 1. 23, 1992

3. 主な研究報告

仔ラットリズムの母親への同調に關与する因子

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、体内時計の同調機構を解析する目的で、周期的授乳制限 (PMD; Periodic Maternal Deprivation) を用い、仔ラットリズムの母親への同調様式について検討してきた。その結果、母親との接触を制限することにより、仔ラットの NAT (N-acetyltransferase) 活性リズムの位相が変位し、しかも母親との接触前に高値を示した NAT 活性が接触後顕著に低下するパターンを示すことを報告した。今回我々は、母親からの急性分離と分離後の再接触が仔ラットの NAT 活性に及ぼす効果を観察し、さらにそのメカニズムについて検討を加えた。

[方法]

実験1. 生後13日目の消灯時に仔ラットを母親から分離し、4時間ごとに NAT 活性を測定した。同様に母親から分離した仔ラットに、点灯時再び母親と接触させ、その NAT 活性に及ぼす効果を検討した。

実験2. 生後13日目の消灯時に仔ラットを母親から分離し、翌日の点灯時から4時間にわたり、人工授乳、保温等の処置を行い、その前後での NAT 活性を測定した。

実験3. 暗期のみに母親との接触を許し、母親と分離された時間は保温する PMD を生後7-14日に行い、4時間毎に24時間にわたり NAT 活性を測定した。

それぞれの実験において、仔ラットは、生後24時間以内に氷冷麻酔下で眼球摘出が施行された。また、NAT 活性は1点6-8匹の仔ラットを断頭屠殺して松果体を採取し、出口らの方法により測定した。

[結果]

実験1. 消灯時に母親から分離した場合も、仔ラットの NAT 活性の上昇が認められ、さらに分離を続けると、通常では活性が低下する点灯後4時間の点で、高い NAT 活性が維持された。この母親との分離により維持された高い NAT 活性は、再び母親と接触させることで、顕著に抑制された。(図1)

実験2. 人工授乳を行っても、母親と接触させたときと同様の NAT 活性の低下は、認められなかったが、母親から分離した仔ラットを暖めることにより、NAT 活性の顕著な低下が見られた。(図2)

実験3. 母親から分離した時間帯に保温し体温の低下を防いだ場合には、PMD 施行時に見られた NAT 活性リズムの位相の逆転が認められなかった。(図3)

[考察]

以上の結果より、母親との接触が仔ラットの NAT 活性を低下させる急性効果を持つこと、また、その効果は母親との分離により低下した体温が上昇することと深く関係していることが明らかになった。すなわち、PMD による仔ラットリズムの同調には、母親との分離、接触により引き起こされる体温の変化が関与しているものと考えられる。同様に母親のリズムへの同調に、この体温の変化が関与している可能性が示唆される。

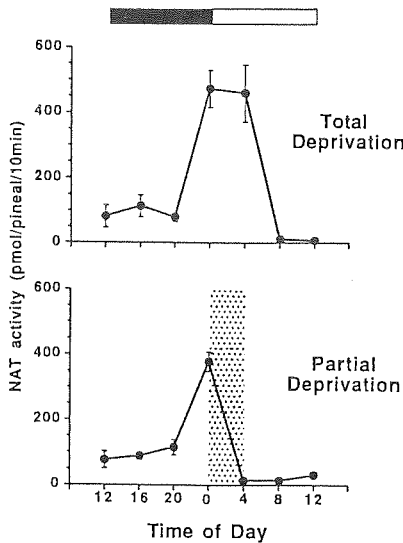


図1 母親からの分離と接触が仔ラットの NAT 活性に及ぼす影響

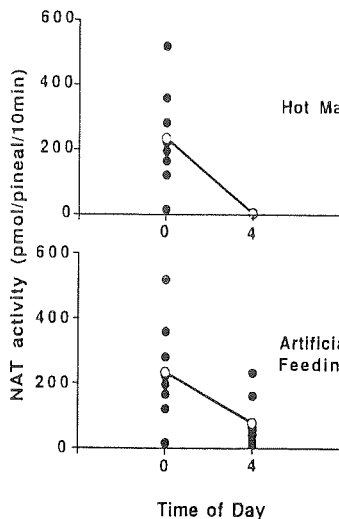


図2 NAT 活性を低下させる因子

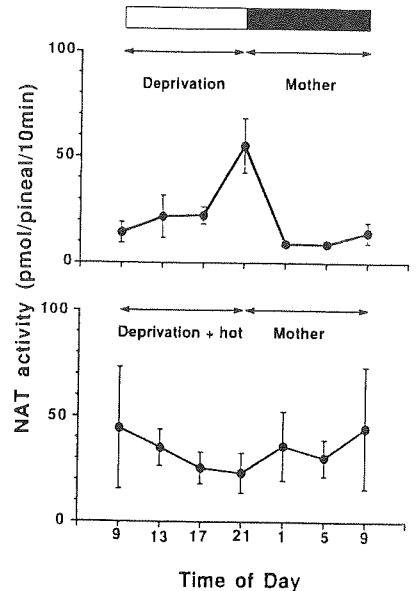


図3 母親からの分離時に保温した場合の PMD の効果の消失

Methamphetamine投与ラットにおける脳内c-fos遺伝子の発現パターン

海野麻未, 柏 淳, 西川 徹

Methamphetamine(MAP)が精神分裂病(分裂病)に酷似した精神異常状態(ヒト)や異常行動(動物)を引き起こす作用は、その反復投与後にかえって増強する。これは逆耐性現象と呼ばれ、分裂病の再燃の研究モデルとして重視されてきた。さらに最近、幼若期の動物では逆耐性が形成されないことが明らかになり、分裂病が一定の年齢以降に発症する機序を検討するうえで有用な所見と思われる。こうした個体の発達段階による差異は、MAPに反応する神経回路の違いに基づいて生ずる可能性がある。そこで我々は、離乳前の幼若期と成熟期のラットにMAPを投与し、神経活動の変化を反映すると考えられている脳内c-fos遺伝子の発現パターンを比較した。

【方法】実験には、Wistar系雄性ラットを用いた。MAP塩酸塩は生理食塩水に溶解し、皮下(s.c.)注射(6mg/kg)を行い、4時間後に脳を取り出した。c-fos遺伝子の発現は、その産生蛋白質に対する抗体を用いた免疫組織化学法(ABC法)により検出した。抗c-Fos血清はOncogene Science社より購入した。

【結果】MAP塩酸塩6mg/kg投与後の免疫組織化学では、生後56~80日の成熟ラットにおいて、大脳新皮質第II~V層、梨状葉皮質、嗅結節、中隔、側坐核、線条体内側部、海馬の一部、扁桃体、上丘、中心灰白質、黒質、腹側被蓋野、内嗅皮質、手網核、視床・視床下部の一部、背側縫線核などの部位でc-Fos様免疫反応性を認めた。これに対し、生後8日の仔ラットでは、新皮質第II~V層においてc-Fos様免疫反応性がほとんど見られず、第VI層(特に外包の直上部)に強いc-Fos様免疫反応性を認めた。その他、梨状葉皮質、嗅結節、側坐核、線条体、内嗅皮質などでは、成熟ラット同様のc-Fos様免疫反応性を示した。生理食塩水を注射した対照群では、幼若期および成熟期のいずれにおいても、脳内のc-Fos様免疫反応性はほとんど検出できなかった。

【考察】出生後8日の幼若ラットと56-80日の成熟ラットでは、少なくとも大脳新皮質においてMAP投与後のc-fos遺伝子の応答パターンの明らかな差異を示した。この結果から、発達にともないMAPに反応して異なる神経回路群が活性化されることが示唆された。すなわち、同じ外界からの刺激でも、発達段階によって脳における情報処理過程が異なることを、脳組織レベルで示した所見と思われる。さらには、生後8日は逆耐性を形成しない条件であることから、この活性化される神経回路群の変化が逆耐性の成立機序と関連している可能性がある。

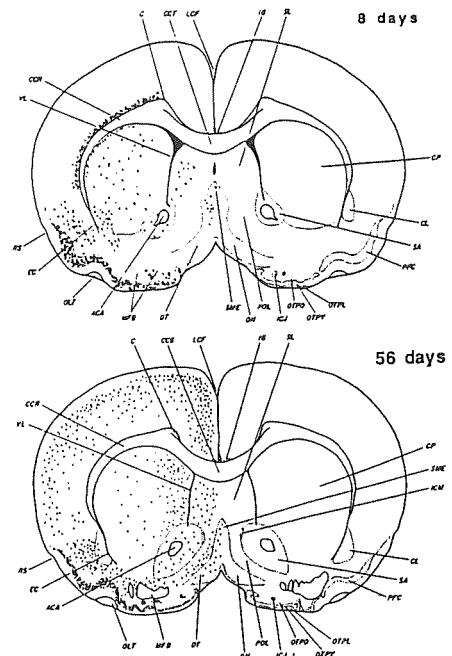


Fig.:Schematic representation of induction of nuclear c-Fos protein-like immunoreactivity in brain cells of adult (A:56 postnatal days) and neonatal (B:8 postnatal days) rats 4 hrs after systemic injection of MAP (4.8 mg/kg,s.c.). Black dots represent labelled cells.

新生児期親仔隔離処置が及ぼす視床下部一下垂体一副腎皮質系への効果

小川哲郎, 黒田安計, 三国雅彦, 高橋清久

ラット新生児に対し毎日15分間のハンドリング処置を生後3週間行くと、成熟期において海馬のグルココルチコイド受容体の密度が増加し、視床下部一下垂体一副腎皮質系のフィードバック機能の強まることが報告されている。今回我々は、より長時間の親からの隔離ストレスをラット新生児に負荷し、成熟期における視床下部一下垂体一副腎皮質系機能について検索を行った。

<方法> SD系ラットの新生児に対し出生日より生後21日目までの毎日、4.5時間の親からの隔離処置を行い、生後22日目に離乳した。これらのラットの7週齢時に2時間の拘束ストレス負荷を、また8週齢時にデキサメサゾン抑制試験を行い、血中コルチコステロン濃度を測定した。10週齢時に、副腎摘出後に得た海馬組織についてデキサメサゾン結合能を測定した。さらに同様に隔離処置を行った別の一群につき、20, 21週齢時に2時間拘束ストレス負荷およびデキサメサゾン抑制能について検討を行った。

<結果と考察> 7週齢時の2時間拘束ストレス負荷時のコルチコステロン濃度は、親子隔離されたラットで有意に低かった (Fig.1)。また、20分間の拘束ストレス負荷前に10 μ g/kgデキサメサゾンを投与し抑制能を検討したところ、親子隔離されたラットでより強く抑制を受ける傾向が認められた (Fig.2)。しかし抑制機能に関与すると考えられている海馬におけるデキサメサゾン結合能には変化を認めな

かった。20, 21週齢時では、拘束ストレス負荷時のコルチコステロン濃度に変化を認めなかったが、デキサメサゾンによる抑制能は親からの隔離処置を受けたラットで有意に強かった。以上のことより新生児期の親子隔離は、仔ラットの成熟期における視床下部一下垂体一副腎皮質系機能に影響を及ぼし、ストレス時の血中コルチコステロン濃度の上昇を低めること、フィードバック機能を強めること、その調節機構は、海馬の受容体の変化のみでは説明できないことが明らかとなった。

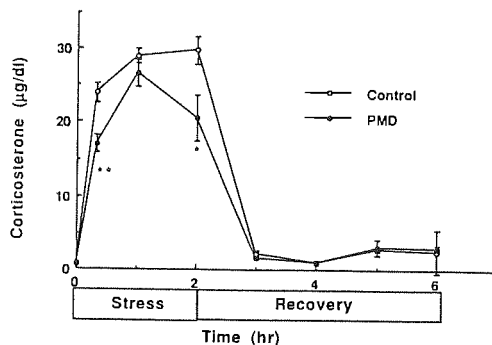


Fig.1 2 hr restraint stress at 7 weeks

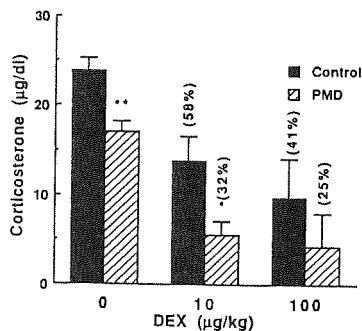


Fig.2 20 min stress 3 hr after DEX treatment at 8 weeks

C6細胞に発現する5HT₂受容体 mRNAのRT-PCR法を用いた定量化の試み

池田正明, 斉藤和子, 三国雅彦

当研究部では、C6細胞培養系において、セロトニン刺激性細胞内カルシウム動員が促進され、その反応が5HT₂受容体を介したものであること、またこの反応が4時間のセロトニン前処理で減弱し、24時間のデキサメサゾン前処理によって増強されることを示してきた。これらの反応が5HT₂レセプターの転写レベルの調節によるものである可能性を検討するためRT-PCR法によるmRNAの定量化を試みた。

方法

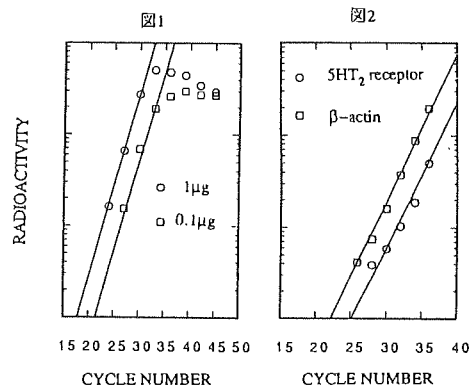
C6細胞は10%FBSを含むDMEM培地を用いて、10%CO₂インキュベーター中で培養した。細胞はFBSフリーにした後セロトニン(100μM)を添加し4時間インキュベートし、PBSで洗浄後Goughの方法によってRNAを抽出した。cDNAはランダムヘキサマーでプライミングしAMV逆転写酵素を用いて合成しその一部をPCRの鋳型として用いた。PCRに用いたプライマー(20mer)は、5HT₂レセプターはPritchettらの、β-アクチンはNudelらの報告した配列によった。PCR反応はannealing:55°C1分、extension:72°C2分、denature:94°C1分とし、各々の5'側プライマーは5'を³²Pでラベルし、反応当たり100000cpm加え、β-アクチン増幅用プライマーは16サイクル目に添加した。PCR産物は2-3サイクルごとに3μl採取しポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ゲルは乾燥した後、バイオイメージアナライザーを用いてラジオアクティビティを測定した。

結果及び考察

5HT₂レセプターおよびβ-アクチンcDNA増幅用プライマーによってC6細胞よ

り抽出したトータルRNAからRT-PCRを行なうと、各々122bp、184bpのバンドが増幅され、逆転写酵素を含まない反応や、ジェノミックDNAを鋳型にした反応からはバンドは検出されないことから、これらのバンドはジェノミックDNA由来の増幅産物ではなく、cDNA由来の特異的バンドであることが確認された。

0.1μg、1μgのRNAから、5HT₂レセプター増幅用プライマーのみを用いてRT-PCRを行ないラジオアクティビティーとサイクル数を片対数グラフに表すと、増幅産物は24サイクルから直線的に増加し30サイクルを過ぎると頭打ちになった。(図1)。次に5HT₂レセプターとβ-アクチンcDNAの同時増幅を行なうと、図2に示したように両者の傾きはほぼ等しく直線的に増加した。以上の結果からRT-PCRを用いて少量のC6細胞から5HT₂レセプターmRNAの定量化ができる可能性が示された。



4. 疾病研究第四部

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なっているが、昨年引き続き研究部長の不在を所長が代行した。本年度の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(3年8月で退職し Harvard Medical School へ留学)，真先敏弘；センター研究員：松井京子；併任研究員：柴崎浩，北村純一，高木昭輝，花岡繁，横井風児(～3年9月)。また研究助手として三浦久美子，木内美子，志鎌昌子，真野登美子の方々に研究を助けていただいた。

本年度の主な研究

- 1) 神経軸索変性モデルマウス(GAD)における軸索病変を形態学的に研究し，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(小田)。
- 2) 興奮性アミノ酸による神経細胞死の選択性と受容体サブタイプに関連につき，様々な興奮性アミノ酸を用いてラット脊髄ニューロンについて神経薬理・形態的に検討した(相澤，郭)。
- 3) レヴィー小体内の multicatalytic proteinase の免疫組織化学的局在を光顕・電顕的に明らかにし，神経細胞内封入体が動的に形成される可能性を示した。(真先，郭)
- 4) mdxマウス胎児骨格筋におけるL型カルシウムチャンネルのゲート異常を見いだした(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)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Chandran AP, Oda K, Shibasaki H :
Changes in motoneuron excitability during postnatal life in the mouse
Brain Dev 13 : 180 - 183, 1991
- 2) Kakigi R, Shibasaki H, Tanaka K, Ikeda T, Oda K, Neshige R, Araki S :
CO₂ laser-induced pain-related somatosensory evoked potentials in peripheral neuropathies :
correlation between electrophysiological and histopathological findings
Muscle Nerve 14 : 441 - 450, 1991
- 3) Endo C, Oda K, Shibasaki H :
Improved visualization of motor and sensory nerve terminals by a combination of zinc
iodide-osmium and silver stains
Biomed Res 12 : 279 - 283, 1991
- 4) 小田健一郎 :
ゴムバンドを用いた職業性振戦（書痙）の軽減法
神経内科, 35 : 236 - 237, 1991
- 5) Kwak S, Aizawa H, Ishida M, Shinozaki H :
Systemic administration of acromelic acid induces selective neuron damage in the rat
spinal cord
Life Sci 49 : PL-91-96, 1991
- 6) Kwak S, Masaki T, Ishiura S, Sugita H :
Multicatalytic proteinase is present in Lewy bodies and neurofibrillary tangles in
diffuse Lewy body disease brains
Neurosci Lett 128 : 21-24, 1991
- 7) 郭伸 :
脊髄ニューロンの選択的細胞死と興奮性アミノ酸
臨床神経31 : 1313-1315, 1991
- 8) Aizawa H, Kwak S, Shimizu T, Mannen T :
Determination of GABAergic pallidothalamic termination in human brain

II 研究業績

J Neurol Sci 105 : 124-125, 1991

9) Matsui K, Adachi K :

Lack of change in indolamine metabolism in the brain of the rolling mouse Nagoya ;
an ataxic mutant mouse

Med Sci Res 20 : 39-40, 1992

b. 著 書

1) Shinozaki H, Ishida M, Kwak S, Nakajima T :

Use of acromelic acid for production of rat spinal lesions

Methods in Neuroscience, Vol. 7 : Lesions and Transplantation ed by Conn PM,

Academic Press, New York, p38-57, 1991

c. 総 説

1) 郭 伸 :

興奮性アミノ酸と神経障害－神経疾患の実験的動物モデル

Annual Review 神経1992 p15-30, 1992

2) 郭 伸 :

アクロメリン酸による脊髄ニューロンの選択的神経細胞死－脊髄神経疾患の動物モデル

医学の歩み 159 : 219, 1991

d. 班会議報告書

1) 小田健一郎, Chandran AP, 遠藤智代子, 柴崎浩 :

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・ニューロバチーの臨床と病態に関する研究班，平成2年度研究報告書

p38-41, 1991

2) 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法による検討－

厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班，1990年度研究報告書 p221-223, 1991

3) 柴崎浩, 遠藤智代子, 小田健一郎 :

Dying-back type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，1990年度研究報告書 p224-227, 1991

4) 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，1990年度研究報告書 p 244 - 247, 1991

5) 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 proteinase (Ingensin) のレヴィー小体への局在に関する免疫組織学的研究

厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班，1990年度研究報告書 p46-49, 1991

6) 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，平成2年度研究報告書 p31-34, 1991

7) 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

厚生省新薬開発研究・神経ペプチドによる精神神経障害治療薬の開発研究班，平成2年研究成果，神経ペプチドの基礎と臨床，p6-9, 1991

8) 吉田瑞子，井上勲，松崎哲也：

mdx胎仔骨格筋の電位依存性カルシウムチャンネルについて

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3年度研究報告書 p111-113, 1992

e. その他

1) 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

日疾動録 7：59, 1991

B. 学会発表

a. 特別講演，シンポジウム

1) 郭 伸：

脊髄ニューロンの選択的細胞死と興奮性アミノ酸

第32回日本神経学会総会シンポジウム，II. 筋萎縮性側索硬化症の病因をめぐって，
東京，5.24, 1991

b. 国際学会

II 研究業績

- 1) Oda K, Endo C, Yamazaki K, Kikuchi T, Shibasaki H :

Gracile axonal dystrophy (GAD) mouse : Degeneration and regeneration of motor nerve terminals

8 th Asian and Oceanian Congress of Neurology, Tokyo, Sept 3, 1991

- 2) Aizawa H, Kwak S, Shimizu T, Mannen T :

Visualization of the terminal field of GABAergic pallidothalamic pathway in human brain

3 rd IBRO World Congress of Neuroscience, Montreal, Canada, Aug 5, 1991

- 3) Masaki T, Kwak S, Ishiura S, Sugita H :

Multicatalytic proteinase is present in Lewy bodies and neurofibrillary tangles in diffuse Lewy body disease brains

3 rd IBRO World Congress of Neuroscience, Montreal, Canada, Aug 5, 1991

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

Novel, potent kainate derivatives with low affinity for both kainate and AMPA receptors : agonists for a new type of kainate receptor subtypes ?

The 7 th International Symposium, Neuroreceptors, Ion Channels and Brain-Function, Molecular Biology and Toxicology-, Tokyo, Oct 23, 1991

- 5) Masaki T, Kwak S, Ishiura S, Sugita H :

Multicatalytic proteinase is immunohistochemically localized in Lewy bodies and neurofibrillary tangles in diffuse Lewy body disease brains

10th International Symposium on Parkinson's Disease, Tokyo, Oct 28, 1991

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

Pharmacological evidence suggesting multiplicity of kainate receptors in the rat central nervous system

21st Annual Meeting, Society for Neuroscience, New Orleans, Nov 15, 1991

c. 一般学会

- 1) 小田健一郎, Chandran AP, 遠藤智代子, 菊池建機, 柴崎浩, 山崎一斗 :

運動ニューロン再生軸索起源の異常筋放電：軸索変性マウス (GAD) の筋電図・組織学的研究
第32回日本神経学会総会, 東京, 5. 25, 1991

- 2) 遠藤智代子, 小田健一郎, 菊池建機, 山崎一斗, 柴崎浩 :

運動ニューロン dying-back 変性の機序：軸索変性マウス (GAD) の電顕・組織化学的観察

第32回日本神経学会総会，東京，5.24, 1991

3) 相澤仁志，郭 伸：

アクロメリン酸による選択的神経細胞死の発現機序：グルタミン酸受容体結合能に及ぼす影響

第32回日本神経学会総会，東京，5.23, 1991

4) 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 proteinase (Ingensin) のレヴィー小体への局在に関する免疫組織化学的検討

第32回日本神経学会総会，東京，5.25, 1991

5) 井上勲，松崎哲也，吉田瑞子：

mdx胎仔骨格筋におけるL型カルシウムチャンネルの電圧ゲート異常

第29回日本生物物理学会，仙台，9.28, 1991

6) 松井京子，橋本吉秀，古川昭栄，柴崎浩：

Reeler マウスの脳内NGFおよびNGFmRNA レベルについて

第32回日本神経学会総会，東京，5.25, 1991

7) 松井京子，古川昭栄，菊池建機：

GADマウスの運動異常と末梢NGFレベルの変化

第8回日本疾患モデル動物研究会総会，京都，11.28, 1991

d. 班会議発表

1) 小田健一郎，遠藤智代子，菊池建機，山崎一斗，若林康夫：

筋内神経の変性・再生機序の基礎的研究(3) 運動神経終末の変性・再生現象の定量化—GADマウスB₁₂投与実験

厚生省精神・神経疾患・ニューロパチーの臨床と病態に関する研究班，

平成3年度班会議，東京，1.23, 1992

2) 菊池建機，水谷誠，小田健一郎，菊池寿枝：

Myotonic quailの胸筋に見られる形態変化

厚生省精神・神経疾患・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班，

平成3年度班会議，東京，12.4, 1992

3) 郭 伸，真先敏弘：

Multicatalytic proteinase の免疫組織化学的レヴィー小体内局在：超微構造上の特徴的分布について

厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班1991年度班会議，東京，2.22, 1992

Ⅱ 研究業績

- 4) 萬年徹, 岩坪威, 川井充, 郭 伸, 井原康夫, 金澤一郎:

単離 Lewy 小体の免疫組織化学

厚生省特定疾患・神経変性疾患調査研究班1991年度班会議, 東京, 2. 22, 1992

- 5) 吉田瑞子, 井上勲, 松崎哲也:

mdx胎仔骨格筋の電位依存性カルシウムチャンネルについて

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィーおよび関連疾患の成因と治療法開発に関する研究班,

平成3年度班会議, 東京, 12. 6, 1991

3. 主な研究報告

運動神経終末の変性・再生現象の定量化
-GADマウスへのB12投与実験

小田健一郎, 遠藤智代子, 菊池建機, 山崎一斗

近年、種々の神経栄養因子、再生促進因子が見いだされ、ニューロパチー治療への応用も試みられてきている。一方、末梢神経の再生は細胞本体からその軸索末端である神経終末にかけてどの部位にても起こりうる。よって、薬物の効果を判定するには、その病変分布を考慮した評価法を適用する必要がある。今回、運動神経終末の形態変化を定量化する目的で zinc iodide-osmium (ZIO) 染色法を検討した。さらに、本法を用いて、vitamin B12 の効果を distal axonopathy のモデル動物であるGADマウスにて検討した。

[方法]

ZIO 染色法: Akert らの方法を基に染色条件を設定した。また、より感度を上げる目的で銀染色を加えた。1) 亜鉛末 (3g) とヨウ素 (1g) の混合 (40ml) 上澄を濾過 (ZIO 液)。冷所保存可。2) 染色時、ZIO 液 3 ml に 4% オスミウム酸 0.5 ml を加える (ZIO 液) 3) 未固定筋組織と反応 (室温 1時間) 4) 脱イオン水で洗浄。5) 銀染色増強法 **神経終末形態計測法 (図):** ZIO法により描出した神経終末部をスキャナーにて取り込み、画像解析装置により染色された部分の面積と周囲長を計測した。一試料につき100個以上の神経終末を計測した。

Vitamin B12 投与実験: 40日齢のGADマウス6匹、正常対照マウス6匹を対象とし、それぞれを2群に分け、一群にはmecobalamin (1 mg/kg/day) を経口投与、他の群には等量の生理食塩水を与えた。25日後、各動物より前薄筋を採取した。

[結果]

ZIO 染色法: [方法] で記載した染色条件を確立した。**GADマウス B12 投与実験:** 下肢の脱力の程度は、B12投与、非投与群で差はなかった。前薄筋近位部に分布する神経終末を形態計測法を用いて検討した。変性終末 (面積が増加し、周囲長が減少) が非投与群に、また再生終末 (分岐の増加、周囲長の増加) が B12群に多く認められた。各群における計測結果 (表) を比較すると GADの B12 投与群と非投与群 (生理食塩水投与) の間で、面積、周囲長の平均値に有意差があり、また周囲長と面積の比をとるとその差はより顕著となった。

[考察・結論]

運動神経終末は複雑な形状を示すことより、その形態を評価するに当たって、多数の神経終末をサンプリングし、解析することが必要である。そこZIO法を用いて画像解析装置による形態計測法を考案した。

GADマウスは感覚・運動神経障害をきたす自然発症のミュータントであり、病変の主座が運動神経末端にある。上記の計測法を用いてvitamin B12の軸索再生効果を定量化した。その結果、進行する軸索変性そのものを抑制する効果は明らかではなかったが、再生機転を促進する効果がみられた。vitamin B12は挫滅神経線維のSchwann cellにおける蛋白代謝を亢進する作用も報告されており、軸索と髄鞘の両者への効果があいまって再生を促進する可能性がある。

	Proximal Endplate Zone		P/A
	Terminal perimeter (P) μm	Terminal area (A) μm ²	
Control + saline	140 322+35	293+30	1.1+0.1
Control + B12	140 331+39	301+41	1.2+0.1
GAD + saline	133 277+32]**	335+30]*	0.8+0.1]**
GAD + B12	133 370+28	303+21]*	1.3+0.1]**

* P < 0.05, ** P < 0.01



図: 運動神経終末のサンプル。変性終末では面積の増加と周囲長の減少。再生では周囲長の増加をみる。

[文献]

- 1) Endo C, Oda K, Sibasaki H: Improved visualization of motor and sensory nerve terminals by a combination of zinc iodide-osmium and silver stains. Biomed. Res. 12:279-283, 1991
- 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-軸索変性モデル 神経進歩 35:95-105, 1991

興奮性アミノ酸による選択的神経細胞障害の発現機序に関する研究 ：アクロメリン酸の作用部位

郭 伸, 相澤仁志

変性性神経疾患の病因の候補の一つに興奮性アミノ酸があげられ、その可能性が探られている。その理由の一つに興奮性アミノ酸がある主のニューロンを選択的に変性させ、それが変性性神経疾患に見られる系統変性に相同であることがあげられる。従って変性性神経疾患に見られる選択的神経細胞死に類似したパターンを取る神経細胞死を生ずるかどうかの検討が必須である。我々は新しい興奮性アミノ酸であるアクロメリン酸をラットに全身投与することにより、半永続的な痙攣性対麻痺を引き起こすこと、それが脊髄介在ニューロンの選択的脱落によることを明らかにした。この病態は、脊髄神経細胞に選択性をもつ点でカイニン酸を含む既知の神経毒とは異なった作用を持つのみならず、ヒト痙攣性対麻痺、中でもstiffman症候群の臨床病理像に類似している。我々は脊髄ニューロンに対する様々な興奮性アミノ酸による神経細胞死の部位特異性のメカニズムおよび特徴を明らかにし、筋萎縮性側索硬化症などの変性性神経疾患による系統変性と興奮性アミノ酸の関連を検証することを目的とした。

方法および結果：1) 昨年に引き続き、ラット脊髄シナプトゾーム分画に対するグルタミン酸受容体結合能を、新しく合成されたカイニン酸類似物質HFPA (4-(2-hydroxyphenyl)-2-carboxy-3-pyrrolidineacetic acid)、MFPA (4-(2-methoxyphenyl)-2-carboxy-3-pyrrolidineacetic acid) を含め測定し、アクロメリン酸の占める位置を明らかにした。 [³H] カイニン酸に対する親和性はドウモイ酸 ≧ HFPA > カイニン酸 ≧ MFPA > キスカル酸 ≧ L-グルタミン酸 ≧ アクロメリン酸の順であった。アクロメリン酸のIC₅₀ 値はカイニン酸のその 1/27 であり、HFPA、MFPA はそれぞれドウモイ酸、カイニン酸に匹敵する親和性を持っていた。 [³H] AMPA 受容体親和性は脳、脊髄ともにキスカル酸 > AMPA > MFPA ≧ アクロメリン酸 > L-グルタミン酸 ≧ HFPA > ドウモイ酸 > カイニン酸の順であった。アクロメリン酸、MFPA のIC₅₀ 値はキスカル酸のその 1/30 であり、HFPA のそれは 1/70 であった。

2) また、脊髄クモ膜下腔に直接これらの物質を投与することによる行動変化、神経病理学的変化を検

討した。アクロメリン酸をクモ膜下腔に投与すると濃度依存性に、後肢の伸展、振戦、弛緩性麻痺が惹き起こされた (最小有効濃度 5 μM)。病的には神経細胞体の空泡変性が濃度依存性に認められた (最小有効濃度 8 μM)。弛緩性麻痺を生じたラットのなかには持続性の痙攣性対麻痺を呈するものが見られ、病的には脊髄小径細胞の変性が腰仙髄に認められた。持続性の痙攣性対麻痺を惹き起こすのに要する最小有効濃度は 8 μM であり、25 μM では全例に認められた。カイニン酸の投与によっても同様の行動上、病理学的変化が認められたが、アクロメリン酸の30倍以上の濃度を必要とした。AMPA は脊髄運動ニューロンに対する興奮作用はカイニン酸よりも弱かったが、後角に選択性をもつ神経細胞障害作用を認めた。

考察：アクロメリン酸の強力な脊髄ニューロンの障害作用はカイニン酸受容体、AMPA 受容体ともに親和性が低いことから、これら以外の非 NMDA 受容体を介すると考えられる。新しいカイニン酸類似物質である HFPA はカイニン酸型の薬理特性をもつが、MFPA にはカイニン酸型以外にアクロメリン酸に共通する薬理特性が認められたこともこの仮説を支持する。アゴニストの化学構造からはカイニン酸受容体サブタイプであると考えられ、これを受容体の分子構造から確認することが必要である。また、興奮性アミノ酸により全く異なった神経細胞死の分布を取ることは、脊髄ニューロンの系統変性に興奮性アミノ酸が関与している可能性が高いことを示唆し、様々な物質による神経細胞死の特徴を検索する必要がある。

文献：1) Kwak S, Aizawa H, Ishida M, Shinozaki H: *Neurosci Lett*, in press, 1992. 2) Kwak S, Aizawa H, Ishida M, Shinozaki H: *Exp Neurol*, 116: 145-155, 1992. 3) Kwak S, Aizawa H, Ishida M, Shinozaki H: *Life Sci*, 49: PL-91-96, 1991. 5) 郭 伸: *Annual Review 神経* 1992, 中外医学社, p15-30, 1992. 6) Shinozaki H, Ishida M, Kwak S, Nakajima T: *Methods in Neuroscience*, Vol. 7: Lesions and Transplantation (Ed. P.M. Conn) Academic Press, New York, pp38-57, 1991.

Multicatalytic proteinaseのレヴィー小体内局在

— 光顕・電顕によ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り、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注目されている。昨年、汎発性レヴィー小体病脳を用いて、レヴィー小体にMCPが免疫組織化学的に局在することを報告し、ユビキチンの局在する神経封入体の形成にMCPが関与している可能性を示した¹⁾。本年はMCPのレヴィー小体内局在の機能的意義につきさらに詳細な形態学的検討を行なった。

(対象)対象は汎発性レヴィー小体病剖検脳5例。脳組織の処理は以下の2つの方法を取った。

- a)ホルマリン固定・パラフィン包埋後3 μ に薄切
- b)凍結後、ショ糖密度勾配によりレヴィー小体に富む分画を分離

(方法)

i)抗体：昨年用いた精製ラット肝MCPに対するポリクローン抗体²⁾に加え、精製ヒトMCPに対し単クローン抗体を作成し、MA2・MH3・MD1の3種を得た。抗ユビキチン抗体(DF2)は東大脳研病理井原康夫先生より供与された。

ii)免疫組織化学：これらの抗体により、上記2つの方法で処理した脳組織に対し皮質レヴィー小体を対象として免疫組織化学的検討を行なった。

染色法はベルオキシダーゼABC法またはベルオキシダーゼ標識二次抗体を用いた。免疫電顕においては金コロイド法を用い、pre-embedding法によった。

(結果)

1. 抗体の特異性：immunoblotting上、4種の抗MCP抗体はヒトMCPのサブユニットをそれぞれ異なるパターンで認識した。抗MCPポリクローン抗体のヒト脳MCPに対する特異性については昨年述べた。¹⁾

2. 光顕による検討

a)の試料のみを用いた。皮質レヴィー小体は4種の抗MCP抗体すべてに対しMCP免疫反応性を示した。いずれの抗体においても3つの染色パターンすなわちdiffuseに染色されるパターン、中心部が強く染色されるパターン、リング状に染色されるパターンを認めた。これは昨年のポリクローン抗体を用いて得た結果を裏付けるものであった。¹⁾

3. 電顕による検討

a)ホルマリン固定・パラフィン包埋切片
皮質レヴィー小体内でユビキチンは特定の構造に限局することなく分布していた。しかし、MCPは径100-150nm程度の粒状の構造に集簇するという特徴的な分布を示した。

b)凍結脳より分離したレヴィー小体
汎発性レヴィー小体病大脳皮質をホモゲナイズし、不連続ショ糖密度勾配にかけると1.5M/2.2M界面にレヴィー小体が分離されてくる。³⁾

これに対し、免疫電顕による検討を行なった。その結果MCPはやはり粒状の構造に集簇する傾向を示した。このレヴィー小体内におけるMCPの特徴的な分布はMCPがレヴィー小体の特定の構成成分に対してプロテアーゼとして機能している可能性を示唆している。

(結論)

1：Multicatalytic proteinaseの異なる抗原決定基を認識する3種の単クローン抗体を作成した。

2：上記の単クローン抗体すべてに対し、レヴィー小体は免疫反応性を示した。

3：超微構造上、multicatalytic proteinaseはレヴィー小体内の特定の構造に局在していることを示唆する所見を得た。

(文献)

1) Kwak S, Masaki T, Ishiura S, Sugita H. Neurosci. Lett. 128:21-24,1991

2) Tsukahara T, Ishiura S, Sugita H. Proc. Japan. Acad. 64:72-75,1988

3) 郭 伸、萬年徹。昭和63年度変性疾患班会議研究報告書 p222-224,1989

mdx胎仔骨格筋のL型カルシウムチャンネルについて

井上 勲*, 松崎哲也, 吉田瑞子 (* 徳大 医 情報生物)

Duchenne型ジストロフィー症(DMD)とそのモデルマウスmdxはジストロフィン欠損の膜異常である。しかし今だに骨格筋壊死の原因は不明である。これまでの報告から、この原因が骨格筋の刺激-応答機構、特にカルシウムイオンの細胞内への流入機構にあるのではないかと考えた。即ち1) 筋組織内にカルシウムの蓄積がある¹⁾。しかし2) 細胞内カルシウムイオン濃度は正常値を示す²⁾。3) 脱神経した筋細胞は壊死しない³⁾。4) Z-lineの乱れがある⁴⁾。

5) 筋小胞体の機能は正常⁵⁾。6) 筋壊死が起こるまで、筋細胞として機能している。これらのことから、刺激-応答機構に異常があり、刺激を受ける度に、細胞外から細胞内にカルシウムイオンが流入し、その一部のカルシウムイオンが、細胞内に徐々に蓄積していく。そのため細胞内の局部に乱れが生じ、筋壊死へ陥ると考えた。

T-管の膜電位依存性L型カルシウムチャンネルは、筋細胞が刺激を受けた時、その刺激を細胞内に伝達する為に重要な役割を果たし、それと同時にチャンネルを通しカルシウムイオンが細胞内に流入するので、このチャンネルについて調べた。

<試料と方法>

mdxとその対照マウスB10の胎仔 16-18日齢の肋間筋のmyotubeを用いた。カルシウムチャンネル電流は、whole-cell voltage clamp法で、膜電位を-80 mVに固定して、そこから脱分極を与え、内向きのBa²⁺電流として記録した。L型カルシウムチャンネル電流は、prepulse(-30mV、100 ms)を与え、T型カルシウムチャンネルを不活性化させた後(40 ms)記録した。測定用細胞外溶液は10 mM Ba(MeSO₃)₂, 120 mM TEA-MeSO₃, 10 mM MOPS-TEA, 3 μM TTX (pH 7.4)、ピペット内溶液は、140 mM Cs-aspartate, 10 mM MOPS-Na, 5 mM EGTA, 5mM MgCl₂ (pH 7.2)を用いた。電極抵抗は約1MΩで、総ての実験は室温で測定した。

<結果>

16-18日齢のmdxとB10胎仔骨格筋の膜電位を-80 mVに固定し、その電位から脱分極した各電位(step voltage)における、電流を測定した。その結果、mdxのL型カルシウムチャンネルは約-40 mVの膜電位で活性化し電流が流れ始めた。その膜電位は対照(B10)に比べ約10 mV低い電位だった。L型カルシウムチャンネルが、最大に活性化される膜電位は約0 mVで、この電位もB10のそれに比べ約10 mV低い膜電

位だった。最大コンダクタンスは、mdxとB10間に差がなかった。

最大コンダクタンスに対する、各膜電位のコンダクタンスの比を調べたところ、17日齢のmdxは約-30 mVでコンダクタンスが大きくなり始め、B10のそれに比べ約10 mV低い電位だった。コンダクタンス比が1/2に達するところは、対照より約6.5 mV低い電位だった。16日齢のmdxとB10では、この差が小さくなり、約4 mVだった。18日齢は17日齢の結果とほぼ同じだった。

このように異常を示すカルシウムチャンネルが、T-管にあるL型カルシウムチャンネルであることは、その特異的阻害剤で確認した。

<考察>

mdx骨格筋の膜電位依存性L型カルシウムチャンネルは、対照のB10のそれよりも低い膜電位(約-40~-30 mV)で活性化され、カルシウムイオンが細胞内に流入することがわかった。またこの異常はmdx骨格筋の発達に従って亢進するようである。

これらの結果より私達が予想したように、mdx骨格筋は、刺激-応答機構の異常により細胞内に徐々にカルシウムの蓄積が起こり、乱れが生じ、筋細胞は壊死に陥るのであろう。今後この確認を行う。

<まとめ>

1) mdx胎仔骨格筋の電位依存性L型カルシウムチャンネルは、対照のそれよりも低い電位で活性化された。

2) 1)の為にmdx骨格筋内に、B10よりも低い膜電位で、カルシウムイオンが流入する。3) 1)の現象は、骨格筋の発達によって亢進することが示唆された。

<文献>

- 1) J. F. Dunn and G. K. Radda: J. Neurol. Sci. 103:226-231(1991)
- 2) 吉田瑞子、柴崎浩: 厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究(杉田班)平成元年度研究報告書、1990、145-146。
- 3) G. Karpati, et al: Muscle & Nerve 11:795-803 (1988)。
- 4) L. F. B. Torres and L. W. Duchon LW: Brain. 110:269-299, (1987)
- 5) 高木昭夫 他: 厚生省「精神・神経疾患委託費」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(荒木班)平成2年度研究報告書1991, pp167-169

Weaver マウスの運動失調と脳内 NGF

松井京子, 古川昭栄* *岐阜薬大分子生物

運動失調マウスの *reeler*, *weaver*, *staggerer* で、大脳、小脳において神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) レベルが低下していることを見いだした (1)。今回、NGF の生理的役割をさらに追求するために、*weaver* マウスの運動状態の変化 (運動量、運動失調の程度) や脳の低形成と脳内 NGF レベルとの相関性について検討した。

方法

動物: 雄性 *weaver* マウス 12 週齢 (n = 10)

運動状態の観察: Open-field (70 X 70 cm) 上において 15 分間における移動量と転倒回数を計測し、運動失調の程度の把握のために転倒指数 (転倒回数/移動量: *fall index*) を算出した。

NGF の測定: *Weaver* マウスをクロロホルムで屠殺後、大脳、小脳の 2 部位を分割して、採取した。組織からの NGF の抽出とその定量は既報に従った (1)。

結果と考察

各 *weaver* マウスの小脳重量と小脳 NGF レベル間には、正の相関性 ($r = 0.693$, $P < 0.05$) がみられたが、大脳重量と大脳 NGF レベル間には、相関性がみられなかった。各マウスの運動量と脳内 (大脳、小脳) NGF レベル間においてはなんらの相関性もみられなかった。しかし、各マウスの転倒指数と小脳 NGF レベル間においては負の相関性 ($r = 0.646$, $P < 0.05$) がみられたが、大脳 NGF レベル間においては相関性がみられなかった (図 1)。

各マウスの運動失調が増悪している程、小脳 NGF レベルは低下し、大脳 NGF レベルとは相関性がない事が見いだされた。また、小脳の発育の程度と小脳 NGF レベルの間にも正の相関性が見いだされた。最近、NGF の中枢神経における作用は大脳基底核の *cholinergic neurons* に限定されない事が示唆されている (2)。本実験結果より、小脳における NGF は運動失調の発現および小脳の成長発育において重要な役割を演じているとおもわれる。今後、他

の *neuro-trophic factor* についても測定を行い、小脳の生理的機能と *trophic factor* との関連性について検索する必要があるとおもわれる。

文献

- 1) Matsui, K. et al. (1990) FEBS Lett. 276, 78-80.
- 2) Wilma J. F. et al (1991) Dev. Brain. Res. 63, 43-51.

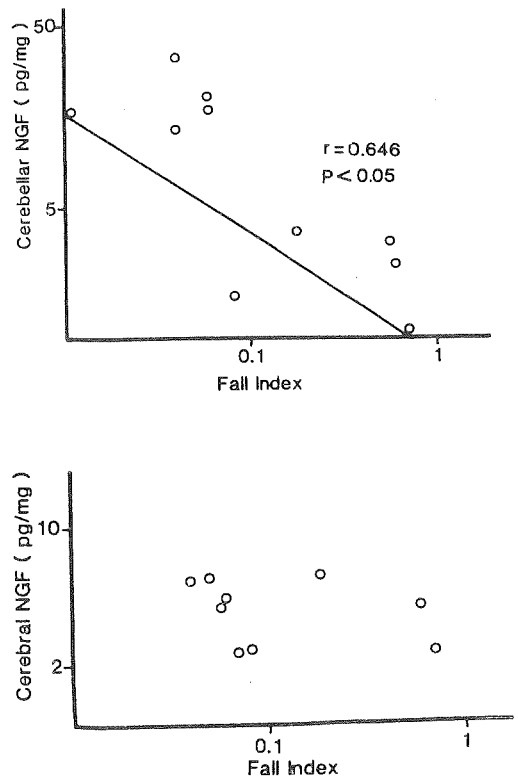


図 1

上: 小脳 NGF と転倒指数との相関性
下: 大脳 NGF と転倒指数との相関性

5. 疾病研究第五部

1. 研究部一年のあゆみ

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

人事面では、室長は桃井隆、研究員は佐々木征行（5月～）であった。流動研究員は、大島登志男（4月～）、新井幸男（12月～）天野寿一（4月～9月）であった。外来研究員は横山安伸、Matloob Azam（4.2.4 - 4.3.31）であった。併任研究員として吉川秀人および岩崎裕治（武蔵病院小児神経科）、村岡薫（武蔵病院脳外科）、佐藤充および蜂谷紀之（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）が研究の指導にあたった。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、3.4.1 - 3.11.30）、富田幸子（東京女子医大心研）および川井ゆか（早稲田大学・大学院）が研究に参加した。また研究見習生として、塩塚政孝（早稲田大学）が勤務した。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。賃金研究助手は乗越登志子、和気佳代、川西桂子、田中久美（4月～7月）。研究補助員は斎藤真姫子、金崎優子、斉藤潤子であった。

本年度の主な研究テーマは次のごとくである。

- ① 低酸素症における血管平滑筋細胞のコレステロール代謝について。
- ② 正常および Niemann-Pick 病タイプC細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼ mRNA に対するDMSO とイオノフォアの作用。
- ③ グリア細胞培養系におけるコレステロール代謝について。
- ④ HTXラットにおけるコレステロール代謝異常について。
- ⑤ 異染性白質変性症、ゴーシェ病、ポンペ病の遺伝子診断について。
- ⑥ Microdissection 法による G-band特異的ヒトゲノムDNAのクローニング。

（部長 桜川宣男）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Yoshikawa H, Kaga M, Suzuki H, Sakuragawa N, Arima M :
Giant somatosensory evoked potentials in the Rett syndrome
Brain Dev 13 : 36-39, 1991
- 2) Yoshikawa H, Araki K, Sakuragawa N, Arima M :
A rare case with diurnal fluctuation of head instability , hypotonia and choreoathetotic movements improved by L-dopa treatment
Brain Dev 13 : 55-58, 1991
- 3) Yoshikawa H :
Effects of drugs on cholesterol esterification in normal and Niemann-Pick type C fibroblasts : AY-9944 , other cationic amphiphilic drugs and DMSO
Brain Dev 13 : 115-120, 1991
- 4) Yoshikawa H, Fueki N, Sasaki M, Sakuragawa N :
Uncoupling of blood flow and oxygen metabolism in the cerebellum in type 3 Gaucher disease
Brain Dev 13 : 190-192, 1991
- 5) Yamanouchi H, Kasai H, Sakuragawa N, Kurokawa T :
Palatal myoclonus in Krabbe disease
Brain Dev 13 : 355-358, 1991
- 6) Yoshikawa H, Fueki N, Suzuki H, Sakuragawa N, Iio M :
Cerebral blood flow and oxygen metabolism in Rett syndrome
J Child Neurol 6 : 237-242, 1991
- 7) Sasaki M, Sakuragawa N, Takashima S, Hanaoka S, Arima M :
MRI and CT findings in Krabbe disease
Pediatr Neurol 7 : 283-288, 1991
- 8) Sakuragawa N, Yoshikawa H, Sasaki M :
Amniotic tissue transplantation : clinical and biochemical evaluations for some lysosomal storage diseases

II 研究業績

Brain Dev 14 : 7 - 11, 1992

9) 荒木敦, 黒川徹, 桜川宣男, 埜中征哉 :

Congenital neuromuscular disease with uniform type I fiber の 1 例

脳と発達 23 : 295 - 298, 1991

10) 吉川秀人, 山田和孝, 桜川宣男 :

Tay-Sachs病における基底核病変について

小児科臨床 44 : 1515 - 1518, 1991

11) 佐々木征行, 桜川宣男 :

Adrenoleukodystrophy の診断と臨床経過

小児科 32 : 595 - 599, 1991

12) 佐々木征行 :

Niemn-Pick 病の新亜型 - 臨床的, 酵素学的検討と病因論的検討

日本小児科学雑誌 95 : 2543 - 2550, 1991

13) 吉川秀人, 笛木昇, 山内秀雄, 桜川宣男 :

基底核領域のみに血流の残存を認めた症例の臨床的検討

脳と発達 23 : 475 - 480, 1991

14) 吉川秀人, 笛木昇, 荒木敦, 桜川宣男, 有本潔 :

Menkes 病の経時的 Positron emission tomography (PET) 所見

小児科臨床 44 : 2459 - 2462, 1991

15) 吉川秀人, 桜川宣男, 川田明宏 :

Monensinの酸性スフィンゴミエリナーゼ活性およびコレステロール
エステル化阻害作用について

日本小児科学雑誌 95 : 2261 - 2262, 1991

16) 吉川秀人, 笛木昇, 黒川徹, 桜川宣男, 埜中征哉, 矢野秀実 :

MELAS の脳梗塞発作後の PET

脳と発達 23 : 509 - 511, 1991

17) 山内秀雄, 鈴木文晴, 桜川宣男, 黒川徹 :

二次性両側同期を示す欠神発作

脳と発達 24 : 215 - 221, 1992

18) 米山均, 吉川秀人, 鈴木秀典, 岡庭真理子, 桜川宣男 :

周産期仮死児における parasagittal cerebral injury - 診断において頭部CTが有用であった症例
を中心に -

脳と発達 24: 222 - 227, 1992

19) 鈴木秀典, 桜川宣男 :

水頭症患者髄液中のドーパミンβ水酸化酵素活性

脳と発達 24: 234 - 237, 1992

b. 著 書

1) 桜川宣男 :

神経皮膚症候群

今日の小児治療指針, 第9版, 埴嘉之, 三河春樹, 重田政信編

医学書院 p 538 - 539, 1992

2) Arai Y, Araki K, Sakuragawa N, Arima M, Nonaka I, Morimatsu Y :

Histopathological study of a case of Alexander disease (infantile form)

Development and involution of Neurons, ed by Fujisawa K and Morimatsu Y,

Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p69-72, 1992

c. 総 説

1) 小林治, 桜川宣男 :

小児代謝変性疾患のPET

神経精神薬理 13: 307 - 314, 1991

2) 末広牧子, 桜川宣男, 仁志田博司 :

呼気中のCO₂測定による診断法II, ¹³C呼気検査の基礎

Radioisotopes 40: 535 - 544, 1991

3) 桜川宣男 :

Niemann-Pick 病

Clinical Neuroscience 9: 56-57, 1991

4) 桜川宣男 :

Werdnig-Hoffmann病, 脊髄小脳変性症, Charcot-Marie-Tooth病, Dejerine-Sottas病

小児科診療 55: 551 - 553, 1992

d. 班会議報告書

1) 桜川宣男, 新井幸男, 佐々木征行 :

II 研究業績

低酸素症における血管平滑筋細胞のコレステロール代謝について

厚生省精神・神経疾患・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班

平成3年度研究報告書 p99-104, 1992

2) 桜川宣男, 佐々木征行, 大島登志男 :

正常および Niemann-Pick病タイプC細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼmRNAに対するDMSOとイオノフォア-の作用

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3年度研究報告書 p15-18, 1992

3) 桜川宣男, 大島登志男, 有本潔 :

グリア細胞培養系におけるコレステロール代謝について

厚生省精神・神経疾患・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

平成3年度研究報告書 p73-78, 1992

4) 桜川宣男, 鈴木秀典 :

水頭症患者髄液中のドパミン β -水酸化酵素活性

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班, 平成3年度研究報告書, p76-80, 1991.

e. その他

1) Sakuragawa N., Yoshikawa H., Sasaki M., Ohshima T. :

Niemann-Pick disease : coupling and uncoupling of sphingomyelinase inhibition and a decrease of cholesterol esterification in fibroblasts by ionophore treatments

Ann Neurol 30 : 467, 1991

2) 山内秀雄, 平野悟, 桜川宣男, 黒川徹 :

皮膚血管腫と頭皮動静脈瘻を合併した小脳動静脈奇形の1例

脳と発達 24 : 291-293, 1992

3) 吉川秀人, 山内秀雄, 小林治, 笛木昇, 豊田桃三, 新井幸男, 桜川宣男 :

小児におけるPET ($C^{15}O_2$, $^{15}O_2$ 持続吸入法)の有用性と問題点

脳と発達 23 : 424-426, 1991

B. 学会発表

b. 国際学会

- 1) Sakuragawa N, Yoshikawa H, Sasaki M, Ohshima T :

Niemann-Pick disease : Coupling and uncoupling of sphingomyelinase inhibition and a decrease of cholesterol esterification in fibroblasts by ionophore treatments

20th Annual Meeting Child Neurology Society, Portland, 10. 3, 1991

c. 一般学会

- 1) 須貝研司, 桜川宣男, 有馬正高 :

難治てんかんに対する Clorazepate (メンドン) の効果

第33回日本小児神経学会総会, 大分, 5. 341, 1991

- 2) 桜川宣男, 川田明宏, 吉川秀人, 佐々木征行 :

タイプCニーマン・ピック病: 種々の ionophoreによる細胞培養系を用いた実験モデル

第33回日本小児神経学会総会, 大分, 5. 31, 1991

- 3) 福水道郎, 荒木敦, 米山均, 吉川秀人, 花岡繁, 桜川宣男, 黒川徹 :

γ -globulin が有効であった変性型ミオクロマてんかんの一例

第33回日本小児神経学会総会, 大分, 5. 31, 1991

- 4) 笠井肇, 吉川秀人, 花岡肇, 黒川徹, 桜川宣男, 須永康夫, 重田誠 :

進行性の筋緊張亢進を呈した Larsen 症候群の1例

第33回日本小児神経学会総会, 大分, 5. 31, 1991

- 5) 山内秀雄, 黒川徹, 桜川宣男 :

小児複雑部分発作の予後影響因子について

第33回日本小児神経学会総会, 大分, 6. 1, 1991

- 6) 大島登志男, 桜川宣男 :

ゴーシェ病, タイプCの酵素学的検討と遺伝子解析

第34回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 11.29, 1991

- 7) 桜川宣男 :

Dibutryl-cAMP によるI-cell病細胞の lysosomal acid lipase の上昇作用

第34回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 11.29, 1991

- 8) 佐々木征行, 大島登志男, 桜川宣男 :

Niemann-Pick 病の遺伝子異常の検討

第34回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 11.29, 1991

- 9) 川井ゆか, 木村一郎, 富田幸子, 林健介, 小沢二郎, 桃井隆 :

II 研究業績

ニワトリ肢芽・骨形成における CRABPⅡと受容体

発生生物学会，東京，5.24, 1991

10) 富田幸子，小松敬子，門間和夫，桃井隆：

ニワトリ菱脳の CRABP-I およびレチノイン酸受容体 β

発生生物学会，東京，5.24, 1991

11) 富田幸子，川井ゆか，桃井隆，門間和夫：

ニワトリ胚肢芽領域におけるレチノイン酸の応答性

分子生物学会，福岡，12.20, 1991

12) 塩塚政孝，桃井隆，木村一郎，高瀬明，東田英，熊谷博道，岡山博人：

レチノイン酸受容体による分化方向の決定の仕組み

分子生物学会，福岡，12.20, 1991

13) 川井ゆか，桃井隆，木村一郎，藤井雅寛，清水元治，江藤譲：

アクチビンによる c-Jun 活性化

第64回日本生化学学会，東京，10. 3, 1991

d. 研究会など

1) 桜川富男：

先天代謝異常の診断と治療－最近の知見をふまえて

第18回新潟小児神経懇話会，新潟，2. 28, 1992

2) 桜川宣男：

障害の種類と概念

第17回障害児保育研修会，練馬，10. 15, 1991

3) 桜川宣男：

小児の高次脳機能障害について

わかくさ学園講習会，東久留米，1.20, 1991

C. 班会議発表

1) 新井幸男，桜川宣男，佐々木征行：

低酸素症における血管平滑筋細胞のコレステロール代謝について

厚生省精神・神経疾患・発達期脳循環障害の病態形成機序とその予防に関する研究班，

平成3年度班会議，東京，12. 6, 1991

2) 大島登志男, 桜川宣男, 佐々木征行 :

低酸素症におけるコレステロール代謝動態について

厚生省精神・神経疾患・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班,

平成3年度班会議, 東京, 1. 18, 1992

3) 佐々木征行, 大島登志男, 桜川宣男 :

正常および Niemann-Pick 病タイプC細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼmRNA 対するDMSO
とイオノフォア-の作用

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3年度班会議, 東京, 1.31. 1992

4) 桜川宣男 :

HTX ラットにおけるコレステロール代謝異常について

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班, 平成3年度班会議, 京都, 12.19, 1991.

5) 桃井隆 :

神経発生分化調節の分子機構

文部省重点研究・ガングリオンド糖鎖情報の解読と細胞機能の制御研究班

平成3年度班会議, 東京, 11.21, 1991

6) 桃井隆 :

外来遺伝子導入による脳構成細胞の不死化

文部省重点研究・神経難病における神経細胞死の機序と修復・防御研究班,

平成3年度班会議, 東京, 10. 7, 1991

7) 桃井隆 :

レチノイン酸によるニワトリ肢芽筋細胞分化

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー発症に関する細胞生物学的基礎研究班,

平成3年度班会議, 東京, 12. 5, 1991

8) 桃井隆 :

P19EC細胞におけるジストロフィンおよび関連蛋白の発現

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

平成3年度班会議, 東京, 12. 5, 1991

9) 桃井隆 :

癌抑制遺伝子としてのレチノイン酸受容体遺伝子

II 研究業績

厚生省癌研究・ヒトがんに密接に関連する染色体レベルでの異常の分子
生物学的解析研究班，平成3年度班会議，東京，12.5, 1991

3. 主な研究報告

細胞と培養液中のコレステロールとそのエステルのHPLC定量法の開発とその意義

桜川 宣男

細胞培養系におけるコレステロールの代謝動態は、その由来、細胞内輸送、細胞外への流出の3要素が関与する。最近ニーマン・ピック病タイプCにおけるLDL由来コレステロールの細胞内移動異常が指摘されて以来、コレステロールの細胞内輸送が注目を浴びている。コレステロールとそのエステルについての従来のHPLCによる分析法を改良し、細胞と培養メジウムを用いた分析法を考察した。細胞内外におけるコレステロールの代謝動態を知る上で有用な方法であるので報告する。

〈方法〉

正常皮膚線維芽細胞を用いた。LDLレセプターの発現を最大にするために、リポタンパク質欠損血清 (LPDS) を作成し、その10%培養液にて4日間培養 (induction phase) した。その後、37%FCSまたはLDL (75-100 μ g/ml) 含有培養液で24時間培養した (esterification phase)。細胞はプロパノールでホモゲナイズし、遠心上清にNaOH (0.76mol/L) を加え (33:17, v/v)、よく攪拌する。ついでn-octaneを加えて、1分間攪拌する。遠心後、octane層をとり、窒素ガス下にてoctaneを蒸発させる。さらにプロパノールに溶解して、HPLCにかけた。最初のホモゲナイズの沈渣は、0.1N NaOHを加えて蛋白量を定量した。培養メジウムは凍結乾燥後、プロパノールとNaOH (0.76mol/L) の混合液でホモゲナイズし、遠心上清にn-octaneを加えた。さらに遠心してoctane層を分取し、同様の操作を行った。

HPLC分析は、Bio-Rad液クロシステム700を使用し、BIO-SIL ODS-5S (250 \times 4 mm) を用いた。検出器は、210nmにセットし、コレステロールおよび種々のコレステロールエステルの標品を用いて、10-500 μ gの範囲で標準曲線を求めた。さらに、20種類以上のコレステロールエステルにつき、retention timeおよびapparent extinction coefficientsを求めた。

細胞内および培養メジウムのコレステロールおよびそのエステルは、そのretention timeの比較による同定を行った。

〈結果と考察〉

コレステロールおよびそのエステルの分離は良好であり、17種類の同定は可能であった (図)。しかしコレステロールアラキドネートとコレステロールリノリナートの分離は不良であった。その他、分離不良の物質が認められたが、主要成分ではないために、定量に際しては問題なかった。標準曲線は、0-400 μ gの範囲では直線性が認められた。細胞内のコレステロールは、10%LPDS、4日間では24.7-28.9

μ g/mg prot. LDL (75-100 μ g/ml) 24時間処理により、42.8 μ g/mg protに上昇した。コレステロールエステルは、LDL負荷によっては検出されなかった。しかし、37%FCSによる24時間培養により、エステルのピークが観察され、その総量は21.9 μ g/mgであった。培養液中のコレステロールとそのエステルはesterificationに用いた培養液 (37.0%FCS、75-100 μ g/ml) により異なった組成を示した。細胞外へのeffluxのよい指標となるので、検討中である。

従来の方法では、細胞内外のコレステロールエステルの画分については定量は出来ていなかった。とくに培養液中の動態は不明であったが、本方法により細胞培養系によるコレステロールの代謝動態を解明できる可能性が示唆された。

〈文献〉

- 1) Sakuragawa et al. Sending for publication.
- 2) Sakuragawa N. 9th World congress of IASSMD

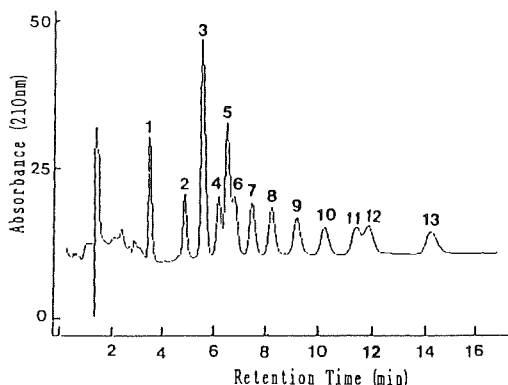


Fig. HPLC separation of cholesterol and cholesteryl ester standards. A 20 μ l sample containing 5 μ g of cholesterol and unesterified cholesterol standards was applied to the column and eluted as described in Methods. Peak identification: (1) unesterified cholesterol, (2) cholesteryl nonanate, (3) cholesteryl arachidonate, (4) cholesteryl laurate, (5) cholesteryl linoleate, (6) cholesteryl palmitoleate, (7) cholesteryl myristate, (8) cholesteryl oleate, (9) cholesteryl palmitate, (10) cholesteryl heptadecanoate, (11) cholesteryl stearate, (12) cholesteryl erucate, (13) cholesteryl arachidate.

グリア細胞培養系におけるコレステロール代謝について

大島登志男, 有本潔 (東邦大学小児科), 桜川宣男

中枢神経系におけるコレステロール代謝の細胞レベルでの検討はあまり行われていない。我々はグリア細胞初代培養系を用いてlysosomal acid lipase (LAL) とLDLレセプターに着目し検討した。

LALはLDLレセプターを介して細胞内に取込まれたコレステロールエステルをコレステロールとエステルに水解する酵素であるが、中枢神経系においてはオリゴデンドログリアに高い活性が示されているが¹⁾、これを初代培養系で検討した。また、Pitasらは免疫組織学的方法によりLDLレセプターがアストログリアに強く発現している事を示した²⁾、これをmRNAの発現としてRT-PCRで検討した。

〈方法〉

McCarthy と de Vellisの方法に準じてグリア細胞の初代培養によりアストログリア分画とオリゴデンドログリア分画を得た。それぞれGFAP, GCの免疫染色で純度は確認した。LAL活性の測定は、分離後4日間培養した後Imanakaらの方法³⁾で行った。

ラットLDLレセプターcDNA⁴⁾に相補的なプライマーを作成し、初代培養により得たアストログリアとSDラットより得た脳、肝臓からAGPC法で抽出したtotal RNAを鋳型として、通常の方法でRT-PCRを行った。ベクターにサブクローニングしたのちにdideoxy法でシークエンシングを行ない、目的とする増幅であることの確認を行なった。

〈結果・考察〉

LAL活性はオリゴデンドログリアにおいて有意に高い事が確認された ($p < 0.001$) (Fig.1)。至適pHは4.2であり、酵素活性は5mM sodium taurocholate, 0.1% Triton X-100の測定系への添加により約2倍上昇した。

LDLレセプターmRNAの発現をRT-PCR法で検討したが、ラット肝臓、脳、アストログリア分画のいずれからも増幅が認められた。(Fig.2)。またシークエンスの結果PCR産物としてラットLDLレセプターcDNAの一部が増幅されている事が確認された。

今回の検討によりグリア細胞培養系においてLDLレセプターmRNAの発現とLAL酵素活性の種々の要因による変動を検討する事が可能となった。今後中枢神経系の脂質代謝に影響を与える薬剤や低酸素の影響などを検討していく予定である。

本要旨は平成3年度「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」研究班班会議で報告した。

〈文献〉

- 1) Hirsch et al. J. Neurochem., 29, 979-985 (1977)
- 2) Pitas et al. J. Biol. Chem., 29, 14352-14360 (1981)
- 3) Imanaka et al. Biochem. Biophys. Acta, 665, 322-330 (1981)
- 4) Lee et al. Nucl. Acid Res., 17, 1259-1260 (1989)

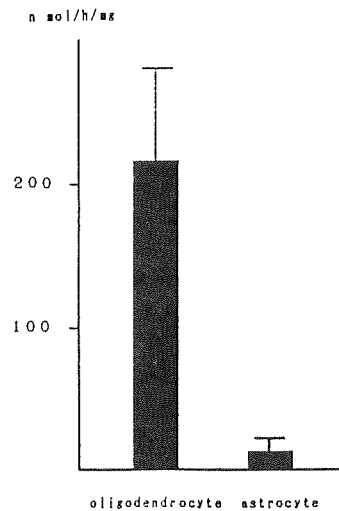


Fig.1 LAL activity of oligodendroglia and astroglia

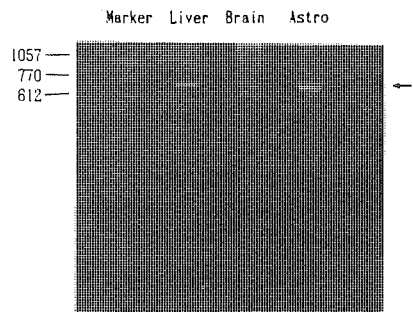


Fig.2 Electrophoresis of PCR product

Metachromatic leukodystrophy患者の遺伝子変異の検討

大島登志男, 佐々木征行, 桜川宣男

異染性脳白質変性症metachromatic leukodystrophy (MLD)はライソゾーム酵素であるarylsulfatase A (ASA)の活性低下により脳白質,末梢神経系に脂質蓄積が起き脱髄を来す疾患である。ヒトASAcDNAがクローニングされて以来¹⁾、MLD患者におけるASA遺伝子の変異の報告がなされてきている²⁾。我々はこれらの報告をもとに、成人発症例及び両親の遺伝子解析を行なった。

〈方法〉患者末梢血から通常の方法でDNAを抽出した。PCR法によりASA遺伝子のexon 8を増幅し、PUCベクターにサブクローニングし、複数のコロニーをdideoxy法にてシーケンスした。また変異が明かとなった事から、新たに考案したミスマッチプライマー法を用いて (Fig.1)、Pst I RELPにより患者及び両親についても変異の有無を検討した。

〈結果・考察〉

患者のDNAを鋳型としたPCR断片のシーケンスから⁴²⁶Pro → Leu (CCG → CTG)の変異をホモに有することが明かとなった。この変異はPoltenら²⁾が白人を対照とした検討で、成人型に高頻度で認められると報告したものである。彼らはASO法により変異のスクリーニングを行なったが、より簡便なミスマッチプライマー法による判定法を考察した (Fig.1)。この方法においてはPCR後に制限酵素処理を行ない、アガロースゲル電気泳動を行なうだけで変異の有無の判定が可能である (Fig.2)。両親が本変異をヘテロに有する事はシーケンスでも確認した。また、成人型MLD剖検例の検討をGoelzらの方法に従い³⁾パラフィン切片を用いて行なったが、本変異はなかった。

以上の結果から⁴²⁶Pro → Leu変異が本邦のMLD患者においても見出される事が明かとなった。また新たにミスマッチプライマー法による本変異の判定法を考察し、患者家族を検討した。患者は本変異をホモに両親がヘテロに有する事が確認された。この方法は簡略であるばかりでなく、剖検例でも検討可能であることが明かとなった。

〈文献〉

- 1) Stein et al. J. Biol. Chem., 264:1252 (1989)
- 2) Polten et al. N. Engl. J. Med., 324:18 (1991)
- 3) Golez et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 130:118 (1985)

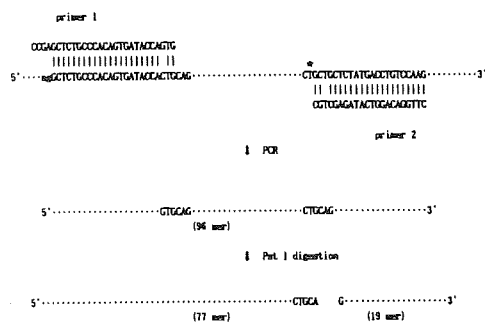


Fig.1 A schematic diagram of Pst I RELP using a mismatched primer. An asterisk indicates mutation point. The Pst I-digested PCR products derived from ⁴²⁶Pro → Leu mutation sequence run 19 bp faster than those from normal sequence in agarose gel electrophoresis.

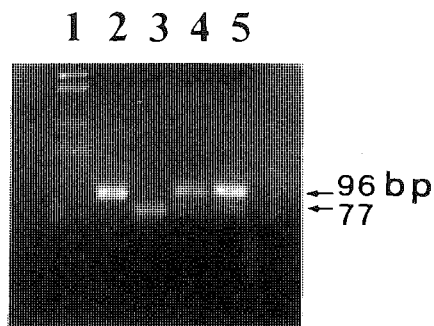


Fig.2 Detection of ⁴²⁶Pro → Leu mutation. Amplified fragment was digested with Pst I, and the resulting fragments were resolved by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. Lane 1 = DNA size marker; Lane 2 = normal control; Lane 3 =MLD patient (homozygote of ⁴²⁶Pro → Leu mutation); Lane 4 and 5 = her father and mother, respectively (heterozygote of this mutation)

正常およびNiemann-Pick病タイプC細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼ mRNAに対するDMSOとイオノフォアの作用

佐々木征行, 桜川宣男, 大島登志男

I. 緒言

Niemann Pick病は酸性sphingomyelinase (ASM) 活性欠損の有無でタイプI、IIに分けられる。タイプC (NPC) を含むタイプIIでは、ASM活性が残存するが、低下する例も多い。その本態はコレステロール代謝経路の異常が想定されている。我々は、これまで種々薬剤による培養皮膚線維芽細胞のASM活性の変動およびコレステロールエステル化の変化を検討し、Dimethylsulfoxide (DMSO) のASM活性上昇作用、特にNPC細胞のASM活性正常化作用を報告した。さらにイオノフォアによる細胞内ASM活性低下作用とコレステロールエステル化障害も見出した。これらの薬剤の遺伝子レベルでの作用を見るため、ノーザンブロット法でASMmRNA量の変動を検討した。

II. 対象と方法

正常培養皮膚線維芽細胞より全RNAを抽出し、RT-PCR法によりASMcDNAの後半部分を増幅した。DNA配列を決定してASMcDNAであることを確認し、プローブとして使用した。対象は、正常対照1例とNPC2例の培養皮膚線維芽細胞である。NPC2例はいずれもASM活性が正常の20~30%であった。正常対照細胞に対して0.5 μM, Monensin, 0.5 μM, Nigericinそして2%DMSOをDMEMに添加して48時間培養した。NPC細胞に対しては2%DMSOを加えて48時間培養した。これらから全RNAを抽出し、ノーザンブロットを常法に従い行った。

III. 結果 (表)

正常対照細胞にMonensinとNigericinを作用させるとASMmRNA量は増加した。正常対照細胞にDMSOを作用させてもASMmRNA量の変動はなかった。

NPCの2例では、通常では対照に比較してASMmRNA量が多かったが、DMSOを作用させると、ASMmRNA量の著しい減少が見られた。対照に用いたβ-actin mRNA量には変動はなかった。

IV. 考察

イオノフォア (Monensin, Nigericin) の正常細胞に対する効果として、ASM活性の低下、外因性コレステロールエステル化の障害およびコレステロールの細胞内蓄積が認められ、ASMmRNA量は微増ないし増加を示した。これはNPC細胞の病態と一致している。この薬剤投与によりNPCの細胞実験モデルの作成が可能である事を唆している。イオノフォアは、Golgi装置に働き蛋白質の成熟を阻害したり、あるいは脂質の細胞内移動を阻害したりする物質として知られている。この薬剤によりASMmRNAが増加したのは、ASM活性が減少し、ASMの基質であるスフィンゴミエリンなどが増加したことによるフィードバックのためと考えられた。NPCでASMmRNAが増加しているのも、同様の機序かも知れない。

DMSOの効果は、正常細胞に対してはASM活性を上昇させたが、ASMmRNA量には殆ど影響しなかった。NPC細胞に対しては、ASM活性を顕著に上昇させて正常化するとともに外因性コレステロールエステル化障害を軽度改善させた。大変興味深い事は、ASMmRNA量が著明に減少した事である。これは通常培地のNPC細胞ではASMmRNA量が増加している所見と比較して顕著な変化であった。

以上のDMSOおよびイオノフォアの薬理作用を解明することにより、NPCの本態により近づき、治療薬剤の開発にも大いに貢献すると考えられる。

表

	Acid sphingo- myelinase (ASM) activity	exogenous cholesterol esterification	ASM mRNA
Control	normal	normal	normal
Control+DMSO	↑	⇒	⇒
Control+Monensin	↓	↓	↑
Control+Nigericin	↓	↓	↑
NPC	↓	↓	↑
NPC+DMSO	↑↑	improve	↓↓
NPC+Monensin	↓		⇒
NPC+Nigericin	↓		⇒

6. 疾病研究第六部

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3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・免疫相関と老年期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、東レとの共同研究が行われた。山之内製薬から「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、和光純薬から「アルツハイマー病の診断法開発」に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、ヒト21染色体遺伝子のクローニング、 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、文部省科学研究費一般B、同一般C、同重点領域「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、厚生省新薬開発研究費「多発性硬化症」、厚生省精神・神経疾患委託費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〕国下龍英，高橋慶吉，山村隆〔流動研究員〕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, Ferenc Gallyas, 光永吉宏，Milena Kozovska〔客員研究員〕並河正〔併任研究員〕小野寺節，永田頌史，富英明，岡田宏基〔賃金研究員〕二瓶淳子〔研究生〕坂中進，井野辺純一，近藤誉之〔賃金研究助手およびアルバイト〕掛場康予，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，久松潤子。

（部長 田平 武）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Tagawa K, Kunishita T, Maruyama K, Yoshikawa K, Kominami E, Tsuchiya T, Suzuki K, Tabira T, Sugita H and Ishiura S :
Alzheimer's disease amyloid β -clipping enzyme (APP secretase) : Identification, purification, and characterization of the enzyme
Biochem Biophys Res Commun 177 : 377 - 387, 1991
- 2) Usuku K, Nishizawa M, Osame M, Tabira T :
Cytotoxic and suppressor activities in patients with HTLV-I-associated myelopathy
J Neuroimmunol 33 : 199 - 205, 1991
- 3) Spurkland A, Tabira T, Renningen KS, Vandvik B, Thorsby E, Vartdal F :
HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, DPA1 and -DPB1 genes in Japanese multiple sclerosis patients
Tissue Antigens 37 : 171 - 173, 1991
- 4) Estus S, Golde TE, Kunishita T, Blades D, Lowery D, Eisen M, Usiak M, Qu X, Tabira T, Greenberg BD, Younkin SG :
Potentially amyloidogenic, carboxyl-terminal derivatives of the amyloid protein precursor
Science 255 : 725 - 728, 1992
- 5) Satoh J, Tabira T, Sano M, Nakayama H, Tateishi J :
Parvalbumin-immunoreactive neurons in the human central nervous system are decreased in Alzheimer's disease
Acta Neuropathol 81 : 388 - 395, 1991
- 6) Satoh J, Yamamura T, Kunishita T, Tabira T :
Heterogeneous induction of 72-kDa heat shock protein (HSP72) in cultured mouse oligodendrocytes and astrocytes
Brain Res 573 : 37-43, 1992
- 7) Konola JT, Tyler BM, Yamamura T, Lees MB :
Distribution of proteolipid protein and myelin basic protein in cultured mouse oligodendrocytes : primary vs secondary cultures

- J Neurosci Res 28 : 49-64 , 1991.
- 8) Kuchroo VK, Sobel RA, Yamamura T, Greenfield E, Dorf ME, Lees MB :
 Induction of experimental allergic encephalomyelitis by myelin proteolipid-specific T cell clones and synthetic peptides
 Pathobiol 59 : 305 - 312, 1991
- 9) Yamamura T, Konola JT, Wekerle H, Lees MB :
 Monoclonal antibodies against myelin proteolipid protein : Identification and characterization of two major determinants
 J Neurochem , 57 : 1671-80, 1991
- 10) Konola JT, Yamamura T, Tyler B, Lees MB :
 Orientation of the myelin proteolipid protein C-terminus in oligodendroglial membranes
 Glia 5 : 112 - 121, 1992
- 11) Ikejiri K, Furuichi M, Ueno T, Matsuguchi T, Takahashi K, Endo H, Yamamoto M :
 The presence and active transcription of three independent leader exons in the mouse insulin-like growth factor II gene
 Biochim Biophys Acta 1089 : 77-82, 1991
- 12) Satoh J, Kim SU, Kastrukoff LF :
 Cytolysis of oligodendrocytes is mediated by killer (k) cells but not by natural killer (nk) cells
 J Neuroimmunol 31 : 199 - 201, 1991
- 13) Satoh J, Kim SU, Kastrukoff LF :
 Lymphokine-activated killer (LAK) and adherent LAK (A-LAK) activity in multiple sclerosis
 J Neuroimmunol 32 : 111 - 122, 1991
- 14) Satoh J, Kastrukoff LF, Kim SU :
 Cytokine-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cultured human oligodendrocytes and astrocytes
 J Neuropathol Exp Neurol 50 : 215 - 226, 1991
- 15) Satoh J, Kim SU, Kastrukoff LF, Takei F :
 Expression and induction of intercellular adhesion molecules (ICAMs) and major

II 研究業績

histocompatibility complex (MHC) antigens on cultured murine oligodendrocytes and astrocytes

J Neurosci Res 29: 1-12, 1991

b. 著書

1) Tabira T Kira J:

Strain and species differences of encephalitogenic determinants of myelin basic protein and proteolipid apoprotein

Myelin: Biology and Chemistry, ed by Martenson RE, CRC Press, p 783 - 799, 1992

2) Tabira T:

Myelin destruction due to allergic processes

Proceedings of the XIth International Congress of Neuropathology, p 402 - 405, 1990

3) 田平武:

うっ血乳頭

今日の検査指針・第2版(河合忠, 橋本信也, 只野壽太郎総編), 医学書院, 東京,

p 228 - 229, 1991

4) 田平武:

脳抗原-自己免疫性脳脊髄炎との関連

医科学大事典, 岡博, 和田攻編), 講談社, 東京, p 45-47, 1991

5) 田平武:

神経系に作用するサイトカイン

老化と脳(大村裕, 大浦彦吉編), 共立出版, 東京, p 222 - 234, 1992

6) 田平武:

多発性硬化症

今日の治療指針(稲垣義明, 多賀須幸男, 尾形悦郎総編), 医学書院, 東京, p 213 - 214, 1992

7) 田平武:

トリソミー-16マウス

新生化学実験講座・14・発生・分化・老化, 東京化学同人, 東京, p 506 - 510, 1992

8) Tabira T Chui D-H Endoh M:

The role of MHC class II-positive cells in Alzheimer's disease brain

Frontiers of Alzheimer Research, ed by Ishii T et al, Elsevier, p 251 - 258, 1991

9) 飯塚禮二, 石原幸夫, 宇野正威, 大内繁, 大塚俊男, 岡キクヨ, 亀井康一郎, 北徹, 笹森貞子, 佐藤純, 田平武, 西村健, 長谷川恒雄, 道下忠蔵, 村田明, 室伏君士, 若狭勝太郎:
老人性痴呆疾患診断・治療マニュアル, 日本精神病院協会, 東京, 1991

10) Kamegai M Kunishita T Nishizawa M Tabira T:
Interleukin-3 promotes neurite outgrowth and elevates choline acetyltransferase activity
Basic, Clinical, and Therapeutic Aspects of Alzheimer's and Parkinson's Diseases,
ed by Nagatsu T et al, Plenum Press, p 655 - 657, 1990

c. 総 説

1) 田平武 :

神経系の自己免疫疾患

臨床科学 27 : 1135-42, 1991

2) 田平武, 井野辺純一 :

HAMの発症機序

神経研究の進歩 35 : 774 - 784, 1991

3) 田平武 :

老年者の自己免疫疾患-免疫学的立場から- 4) 神経系の自己免疫疾患

老化と疾患 4 : 1976-1981, 1991

4) 田平武 :

アルツハイマー型痴呆の診断 (3) 免疫学的診断の可能性

Dementia 5 : 336 - 338, 1991

5) 田平武 :

アルツハイマー型痴呆の予防の可能性-分子遺伝学的立場から-

老年期痴呆 5 : 65-70, 1991

6) 田平武 :

神経細胞を活性化させるインターロイキン3

Academia 161 : 81-84, 1992

7) 田平武 :

アルツハイマー病と免疫

BIOMedica 7 : 77-79, 1992

8) 田平武 :

II 研究業績

脱髄とT細胞

Annual Review, 神経 249 - 256, 1992

9) 田平武

多発性硬化症:

Brain Nursing 8 : 312 - 318, 1992

10) 田平武:

プロテオリピドタンパク質 (PLP)

Dementia 6 : 125 - 129, 1992

11) 田平武:

脳で働くサイトカイン

基礎老化研究 16 : 25 - 29, 1992

12) 山村隆:

高血圧を伴わない Binswanger 型脳血管性痴呆

Dementia 6 : 178 - 184, 1992

13) 佐藤準一:

実験的アレルギー性脳脊髄炎-発症機構に関する最近の知見-

臨床免疫 23 : 968 - 980, 1991

d. 班会議報告書

1) 田平武, 宇宿功市郎, 西澤正豊, 納光弘:

HAMにおけるサブレッサー/キラーT細胞の解析

厚生科学研究費補助金エイズ対策研究・レトロウイルスによる神経障害に関する基礎的, 臨床的研究班, 平成2年度研究報告書 p26-29, 1991

2) 田平武:

家族性アルツハイマー病の家系調査と連鎖解析

厚生省・長寿科学総合研究痴呆疾患の遺伝学的研究班, 平成2年度研究報告書 1 : 98 - 100, 1991

3) 田平武:

神経・免疫相関と老年期脳障害の発症機序の解明および治療法の開発

ヒューマンサイエンス基礎研究事業・健康保持の基礎としての生体防御機構の解明研究班, 平成2年度研究報告書 p 287 - 308, 1991

- 4) 田平武 :
痴呆疾患の遺伝学的研究
厚生省・厚生科学研究・長寿科学総合研究班, 平成2年度研究報告書 1:95-97, 1991
 - 5) 田平武 :
予防接種の神経副反応に関する基礎的研究
予防接種制度に関する文献集(21) - 予防接種副反応を中心として - (財団法人予防接種リサーチセンター発行) p 313 - 328, 1991
 - 6) 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・免疫性神経疾患に関する研究班, 平成2年度研究報告書 p24-28, 1991
 - 7) 田平武, 西澤正豊, 宇宿功市郎, 徳永勝士 :
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・免疫性神経疾患に関する研究班, 平成2年度研究報告書 p39-142, 1991
 - 8) 高橋慶吉, 小西吉裕, 国下龍英, 田平武 :
中隔野コリン作動性ニューロンに及ぼすIGF IIの作用およびそのメカニズム
厚生省精神・神経疾患・神経系機能修復に関する開発的研究班, 平成3年度研究報告書 p21-27, 1992
- e. その他
- 1) 田平武 :
多発性硬化症(MS)の手引き
ssk きずな 多発性硬化症の手引き(全国多発性硬化症友の会編/身体障害者団体定期刊行物協会発行) p 4 -26, 1991
 - 2) 田平武 :
アルツハイマー型痴呆: 発症機序の解明にむけて
(財)ヒューマンサイエンス振興財団5周年記念事業, 21世紀へのヒューマンサイエンスセミナー
報告書 68-87, 1991
 - 3) 田平武 :
サイエンスニュース
(MSNR91), Bristol, U.K., Sep 1 - 6, 1991

II 研究業績

Quark 6 : 24 , 1992 .

4) 鈴木元, 田平武 :

サンタフェワークショップ

免疫 Immunology Frontier 1 : 60-66, 1991

5) Takeuchi AM, Gallyas FJr, Takahashi K, Tabira T :

Establishment of GABAergic- and Glutamatergic-like neuronal cell lines from hippocampus

第34回日本神経化学会大会論文集, 神経化学 30 : 222-223, 1991

6) 遠藤真澄, 田平武 :

コリナージックニューロン細胞株SN-6のChAT活性に及ぼすIa陽性マクロファージ培養上清の効果

第34回日本神経化学会大会論文集, 神経化学 30 : 224-225, 1991

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 田平武 :

レクチャーシリーズ, 多発性硬化症

第23回日本医学会総会, 京都, 4.6, 1991

2) 田平武 :

アルツハイマー病の対応をめぐって: 発症機序の解明にむけて

21世紀のヒューマンサイエンスセミナー, 東京, 7.4, 1991

3) Tabira T, Tokuchi F, Sakanaka S, Nihei J, Yamamura T :

Difference between encephalitogenic and non-encephalitogenic T cell clones

Satellite Symposium of 13th International Society Neurochemistry, Fiji, Jul 13, 1991

4) Tabira T :

Baló's concentric sclerosis and multiple sclerosis with concentric lesions

8th Asian and Oceanian congress of Neurology, Symposium, Neuroimmunology,

Tokyo, Sep 5, 1991

5) 田平武 :

アルツハイマー病と免疫

第40回京滋神経セミナー, 京都, 9.17, 1991

6) 田平武 :

痴呆について

第21回全国労災病院リハビリテーション技術員会全国研修会, 和歌山, 9.22, 1992

7) 田平武 :

グループディナーカンファレンス

免疫性神経疾患における抗原分子の解析: プロテオリピッドタンパク質と自己免疫性脳脊髄炎

第34回日本神経化学会, 東京, 10.15, 1992

8) 田平武 :

ダウン症とアルツハイマー病について

第17回愛媛県小児神経研究会, 松山, 10.19, 1991

9) Tabira T :

Target antigens in the central nervous system

Plenary lecture, International Society of Neuroimmunology (ISNI), Third International Congress, Jerusalem, Oct 28, 1991

10) 田平武 :

神経疾患と再発

厚生省精神・神経疾患・精神疾患関連研究班第一回合同シンポジウム, 東京, 11.8, 1991

11) 田平武 :

神経系と免疫

第15回北陸神経内科懇談会, 金沢, 11.16, 1991

12) 田平武 :

「Psychoneuroimmunology」-神経免疫学の立場より-

第15回日本心身医学会中国・四国地方会, 広島, 11.30, 1991

13) 田平武 :

アルツハイマー病と高分子, 特にアミロイド線維について

第35回医用高分子研究会, 東京, 12.5, 1991

14) 田平武 :

Stress-induced neuronal death in the hippocampus

第4回国際痴呆共同シンポジウム, 東京, 3.12, 1992

15) Tabira T :

II 研究業績

Deposition of amyloid in Alzheimer disease

Cascavel Medical Association, Seminar, Sao Paulo, Mar 23, 1992

b. 国際学会

1) Tabira T, Kamegai M, Konishi Y :

Interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as trophic factors from central cholinergic neurons

Workshop : Neurotrophic Factors, International Society for Neurochemistry, Sidney ,
Jul 15, 1991

2) Tabira T :

Recent advances in neuroimmunology

VI Course Continuous Education in Neurology and Neurosurgery, Sao Paulo ,
Mar 28, 1992

3) Tabira T :

Experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis

VI Course Continuous Education in Neurology and Neurosurgery, Sao Paulo ,
Mar 28, 1992

4) Tabira T :

Recent advances in research of Alzheimer's diseases

VI Course Continuous Education in Neurology and Neurosurgery, Sao Paulo ,
Mar 28, 1992

5) Yamamura T, Satoh J, Tabira T :

Established oligodendrocyte precursor line (L 3.2) as a tool for study of neuronal-glia and immune-glia interactions : flow cytometric analysis

Stanford Centennial Symposium, Neuronal-Astrocytic Interactions : Pathological Implication ,
Hong Kong , Jul 11, 1991

6) Yamamura T, Satoh J, Nihei J, Kitaguchi T, Tabira T :

Expression of glial fibrillary acidic protein by an oligodendrocyte precursor cell line :
Flow cytometric analysis

8 th Asian and Oceanian Congress of Neurology, Tokyo, Sep 3, 1991

7) Yamamura T, Satoh J, Nihei J, Kitaguchi T, Tabira T :

Expression of glial fibrillary acidic protein by an oligodendrocyte precursor cell line :
flow cytometric analysis

8 th Asian and Oceanian Congress of Neurology, Tokyo, Sep 3, 1991

8) Yamamura T, Satoh J, Kitaguchi T, Tabira T :

Flow cytometric analysis of an immature oligodendrocyte cell line with a mixed
oligodendrocyte-astrocyte phenotype

Plenary Session 1, International Society of Neuroimmunology (ISNI), Third
International Congress, Jerusalem, Oct 31, 1991

9) Satoh J, Yamamura T, Kunishita T, Tabira T :

Induction of 72-kilodalton heat shock protein (HSP72) in cultured adult murine glial cell
Stanford Centennial Symposium, Neuronal-Astrocytic Interactions : Pathological
Implications, Hong Kong, Jul 12, 1991

10) Satoh J, Yamamura T, Kunishita T, Tabira T :

Heat-inducible expression of 72-kilodalton heat shock protein(HSP72) on cultured mouse
oligodendrocytes and astrocytes

Workshop : Myelin antigens gene expression,, Plenary Session 1, International Society
of Neuroimmunology (ISNI), Third International Congress, Jerusalem, Oct 31, 1991

11) Satoh J, Gallyas Jr, Kunishita T, Endoh M, Yamamura T, Tabira T :

Mouse septal cholinergic hybrid clones express morphology of differentiated neurons and a
coexisting serotonin activity

8 th Asian and Oceanian Congress of Neurology, Tokyo, Sep 3, 1991

12) Nihei J, Yamamura T, Tabira T :

Suppression of EAE by double-negative ($CD4^{-} CD8^{-}$) T cell responding to syngeneic
encephalitogenic T cell clones

Third International Congress of Neuroimmunology, Jerusalem, Oct 29, 1991

13) Naito S, Uchida H, Kobayashi M, Ito E, Harazaki H, Miyauchi J, Noda Y, Takato M,
Tabira T :

Hippocampal neuronal degeneration induced by intracerebral infusion of Benzamidine

The fifth Internat. Symposia-Biochem. and Biophys. of Stroke, Neurotrauma and
Other Neurological Disorders : Molecular Sciences in Neurodegeneration and Regeneration
(MSNR91), Bristol, U. K., Sep 1-6, 1991

II 研究業績

c. 一般学会

1) 山村隆, 田平武 :

中枢神経グリアの免疫学的機能：オリゴデンドロサイト前駆細胞株の発現するT細胞増殖因子
第32回日本神経学会総会，東京，5. 23, 1991

2) 山村隆, 二瓶淳子, 田平武 :

自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における T-Tcell interactions : 2) EAE 誘起性 T細胞
クローンに反応する counter-regulatory T細胞の TCR V β 発現
第21回日本免疫学会総会，熊本，11. 27, 1991

3) 山村隆, 二瓶淳子, 田平武 :

EAE 誘起性 T細胞クローンにより誘導される CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ T細胞の性状
第4回日本神経免疫研究会学術集会，東京，1. 18, 1992

4) 国下龍英, 小池文彦, 田平武 :

抗 Alzheimer 病 β アミロイド抗体に交差する血清タンパクの同定
第64回日本生化学会大会，東京，10. 2, 1991

5) 遠藤真澄, 田平武 :

コリナージックニューロン細胞株 SN-6 の ChAT 活性に及ぼす Ia 陽性マクロファージ培養上清の
効果
第34回日本神経化学会，東京，10. 15, 1992

6) 佐藤準一, 山村隆, 田平武 :

培養成熟マウスオリゴデンドロサイト・アストロサイトにおける熱ショックタンパク質72 (HSP72)
の発現誘導の検討
第21回日本免疫学会総会，熊本，11. 27, 1991

7) 佐藤準一, 山村隆, 田平武 :

培養成熟マウスオリゴデンドロサイト・アストロサイトにおける熱ショックタンパク質72 (HSP72)
の発現誘導-免疫細胞化学的検討
第4回日本神経免疫研究会学術集会，東京，1. 18, 1992

8) 崔得華, 田平武, 巻淵隆夫, 佐藤雄二, 深津亮

AD脳に発現される MHC Class II 抗原陽性 microglia の意義について
第32回日本神経病理学会総会学術研究会，山形，5. 11, 1991

- 9) Takeuchi AM, Gallyas F Jr, Takahashi K and Tabira T :
 Establishment of GABAergic and glutamatergic-like neuronal cell lines from hippocampus
 第34回日本神経化学会，東京，10.15，1992
- 10) Gallyas Jr F, Satoh J, Takeuchi AM, Konishi Y, Kunishita T, Tabira T :
 Free amino acid- and "Monoamine" -content of immortalized neuronal cell lines
 第15回日本神経科学学会，東京，12.17，1991
- 11) 大八木保政, 高橋慶吉, 田平武 :
 マウス脳細胞の β 蛋白前駆体mRNA 発現における各種成長因子とサイトカインの効果
 第32回日本神経学会総会，東京，5.23，1991
- 12) 二瓶淳子, 山村隆, 田平武 :
 自己免疫性脳脊髄炎の再発抑制機構：1) 脳炎誘起性T細胞クローン接種により誘導されるT細胞の性状
 第32回日本神経学会総会，東京，5.23，1991
- 13) 二瓶淳子, 山村隆, 田平武 :
 自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) おけるT-T cell interactions：1) EAE誘起性T細胞クローンにより誘導される $CD4^-CD8^-TCR\alpha\beta^+$ T細胞
 第21回日本免疫学会総会，熊本，11.27，1991
- 14) 坂中進, 山村隆, 田平武 :
 Proteolipid apoprotein (PLP) 合成ペプチド特異的T細胞株・クローンの樹立；S J L/Jマウス脳炎決定基の検討
 第32回日本神経学会総会，東京，5.23，1991
- 15) 坂中進, 山村隆, 二瓶淳子, 得地史郎, 田平武 :
 S J L/JマウスMBP89-101 特異的脳脊髄炎誘起性T細胞クローンのTCR解析
 第21回日本免疫学会総会，熊本，11.27，1991
- 16) 佐藤晶, 田中正美, 田平武 :
 S J Lマウス脳微小血管由来血管内皮細胞によるMBP特異的T細胞クローンへの抗原提示能とマウスエイズウイルスによる影響
 第4回日本神経免疫研究会学術集会，東京，1.17,18，1992
- 17) 田中正美, 佐藤晶, 田平武 :
 MBP特異的マウスT細胞クローンの同種脳微小血管由来血管内皮細胞への結合

II 研究業績

第4回日本神経免疫研究会学術集会, 東京, 1.17, 18, 1992

C. 班会議発表

1) 田平武 :

神経系に作用するインターロイキン3およびその作用機構の研究

科技厅総合研究「生体情報伝達機構の解析・制御技術の開発に関する研究」班(大村),
兵庫, 9.26, 1991

2) 田平武 :

レトロウイルス感染にともなう免疫異常と神経障害

厚生科学研究, エイズ研究合同発表会, 浜松, 9.27, 1991

3) 田平武, 崔得華, 高坂新一, 内田耕一, 西澤正豊 :

トリソミー16マウスを用いたアルツハイマー病発症機序の解明

文部省・重点・脳の老化機構に関する分子細胞生物学的研究班班会議, 東京, 12.21, 1991

4) 田平武, 坂中進, 高橋慶吉, 国下龍英, 山村隆 :

脳炎誘起性T細胞T cell receptor V β 合成ペプチドによるEAE治療の試み

厚生省・特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班班会議, 東京, 1.16, 1992

5) 田平武, 井野辺純一, 国下龍英, 山村隆 :

多発性硬化症(MS)におけるPLPペプチドに対する細胞性免疫応答

厚生省・特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班班会議, 東京, 1.16, 1992

6) 田平武, 井野辺純一, 山村隆, 納光弘 :

HAMの免疫機序の解析

厚生科学研究, エイズ対策レトロウイルスによる神経障害に関する基礎的臨床的研究班班
会議, 東京, 3.16, 1992

7) 田平武, Milena Kozovska, 山村隆 :

脳炎誘起性T細胞活性化に対するミゾリピンの効果

厚生省新薬開発・多発性硬化症治療薬の開発研究班班会議, 東京, 3.18, 1992

8) 高橋慶吉, 小西吉裕, 国下龍英, 田平武 :

中隔野コリン作動性ニューロンに及ぼすIGFIIの作用およびそのメカニズム

厚生省・精神神経疾患委託・神経系機能修復に関する開発的研究班班会議, 東京, 1.11, 1992

9) 高橋慶吉, 田平武 :

21番染色体の未知遺伝子分離法の開発

長寿科学総合研究・痴呆疾患の遺伝学的研究班班会議，東京，2.14，1992

10) 国下龍英：

既存 Cholinergic clonal cell lines SN series を用いた安定性と機能性の検討

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，東京，3.1，1992

11) 佐藤準一，Ferenc Gallyas Jr，遠藤真澄，山村隆，国下龍英，田中武，水戸敬：

細胞融合法によるマウス小脳脳幹部分化神経細胞株の樹立

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，東京，3.1，1992

12) 弘瀬秀樹，田平武：

神経細胞培養法の開発

ヒューマンサイエンス第3分野第4テーマ研究発表会，東京，1.23，1992

13) 弘瀬秀樹：

神経細胞培養技術に関する研究

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，東京，3.1，1992

14) 小路久敬，弘瀬秀樹，田平武：

人工材料表面での神経細胞（ニューロン，グリア）培養試み

ヒューマンサイエンス第3分野第4テーマ研究発表会，東京，1.23，1992.

15) 小路久敬，弘瀬秀樹，田平武：

神経細胞の培養基材の探索

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，東京，3.1，1992

16) 光永吉宏，高橋慶吉，田平武，田崎博一，渡辺俊三：

家族性及び孤発型アルツハイマー病における β -アミロイド前駆体タンパク遺伝子エクソン16，17の解析

長寿科学総合研究・痴呆疾患の遺伝学的研究班班会議，東京，2.14，1992

17) 光永吉宏，北口哲雄，高橋慶吉：

成熟ニューロン特異的マーカー遺伝子の分離

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，東京，3.1，1992

18) 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，東京，3.1，1992

II 研究業績

19) Alice Mayumi Takeuchi :

Establishment of immortalized hippocampal neuronal cell lines from trisomy 16 mouse embryos

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, 1992

20) Ferenc Gallyas Jr :

Neurochemical characterization of immortalized neuronal cell lines

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, 1992

21) 西澤正豊，新島健司，小川松夫，山崎昌子，荒木正介，弘瀬秀樹 :

細胞融合による分化神経細胞株の樹立

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, 1992

22) 石浦章一，田川一彦，下川雅文，国下龍英，田平武，丸山敬，吉川和明，鈴木絃一 :

エンドソーム・リソゾーム系でのアミロイド前駆体の分解

長寿科学総合研究・痴呆疾患の遺伝学的研究班班会議，東京，2.14, 1992.

23) 水戸敬，佐藤準一，Alice Mayumi Takeuchi，田平武 :

樹立細胞株の形態学的検討

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, 1992

3. 主な研究報告

ストレスによる海馬神経細胞死に関する若年と加齢ラットの比較研究

崔 得華, 溝口和臣, 田平 武

老人性痴呆症において海馬神経細胞の著しい脱落が見られている。最近の研究によれば、海馬神経細胞死はストレス負荷あるいはストレスレベルのコルチステロンの投与によっても引き起こされ¹⁾、副腎の摘出により、加齢ラットにおける海馬神経細胞の脱落が防がれた²⁾と報告されている。従ってストレスによる海馬神経細胞死の原因として「コルチコイド」(GC)の可能性が充分考えられる。また、その海馬神経細胞の脱落は性ホルモン(テスト)を投与することによって防がれるようになる¹⁾。しかし、まだ「コルチコイド」とテストがストレス負荷による海馬神経細胞死にどのような機序で作用しているかについては不明である。

そこで、われわれはストレス負荷の場合に体内のGCレベルやテストの機能が明らかに異なると思われる若年ならびに加齢ラットを用いて、以下の如く比較研究を行った。

実験対象ならびに方法

実験対象は加齢ラットとしては12カ月、若年ラットとしては8週齢のWistar雄性ラットを用いた。金属ケージに精巢摘出(ORX)ラットを拘束して水槽箱に入れ、毎回30分間、5週間、水中拘束ストレス負荷(室温)を行った。また、加齢ならびに若年ORXラットに水中拘束ストレス+テストステロン(テスト)投与(6mg/kg)を行った。ストレス負荷後5週間に10%ホルマリンで灌流固定をし、それぞれの処置脳より切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、脳内各部位における組織変化を調べた。また単位面積当たりの海馬神経細胞数はオリンパス製の画像解析機を用いて測定した。また、ORX後、ストレス負荷していないものを実験対照とした。

結 果

1) ストレス負荷後、脳内各部位における組織変化

ストレス負荷後、脳内各部位の変化を組織学的に調べた結果、若年群と加齢群ともに小脳のPurkinje細胞には異常な変化が認められなかったが、Septum, Dentate gyrus, Copus mamillarisなどの辺縁系の神経細胞は濃染萎縮変化が見られた。中でも、海馬CA3, CA4領域の神経細胞には著明な脱落変化が認められた(Fig 1)。

2) ストレス負荷による海馬神経細胞の脱落率とテスト投与に対する比較

ストレス負荷後、加齢群と若年群の海馬CA3神経細胞脱落の数を比較した結果、その脱落率は加齢ラット群は50.1%、若年群が34.6%で、加齢群の方が著明に脱落していた。

また、ストレス負荷と同時にテストを投与した結果、テストを投与していなかった群と比較すると若年ならびに加齢ラット両群共に神経細胞脱落を防ぐ効果が得られた。

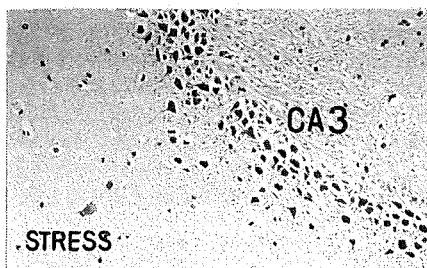
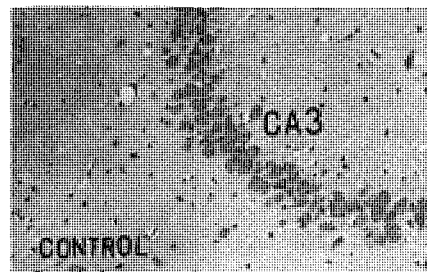
しかし若年ラットの方(93.2%)が加齢ラット(75.8%)よりその効果は著明であった。

考 察

以上の如く水中拘束ストレス負荷によって、加齢群ORXラットばかりではなく若年ORXラットも中枢神経系の中で辺縁系、特に海馬CA3, CA4領域に特異的な病理変化が認められた。しかし、若年と加齢ORXラットの間には神経細胞の脱落程度やテストに対する反応の差異が見られた。その差異はストレス負荷により増加された体内のACTH, GCの高濃度が加齢の方が若年より長く維持されること³⁾ならびに、加齢とともに性ホルモンに対する依存性が高くなっていることが原因になる可能性と、強いストレス負荷によりCA3, CA4に異常代謝ならびに異常蛋白が加齢とともに生じやすい可能性も示唆された。

参考文献

- 1) Mizoguchi K., Kunishita T., Chui D.H., Tabira T: Neuroscience Letters, 138:157-160, 1991
- 2) Landifield P.W., Baskin R.K., and Pitler T.A: Science, 214, 581-584, 1981
- 3) Ferrari E., Solerte S.B., et al: Stress and the Aging Brain, Raven, New York, pp. 39-51, 1990



細胞融合法によるマウス小脳脳幹部分化神経細胞の樹立

佐藤準一, Ferenc Gallyas, 田平 武

<目的>

形態形成をとげ成熟分化した神経細胞(differentiated neuron)は分裂増殖能を失い長期培養が困難である。神経細胞は非常に多様(heterogeneous)で、中枢神経系で同一の形態・機能を保持する細胞群は少なく、特定の神経細胞についてprimary cultureを用いたin vitroの解析には制約があった。また現在まで分化した神経細胞の形質を発現している細胞株は殆ど樹立されていない。我々は小脳脳幹部の神経細胞特異的形質発現解析のため、成熟分化しかつ増殖能を備えた細胞株の樹立を目標とした。

<方法>

生後0日BALB/cマウス小脳脳幹部を0.1% papain, 20 $\mu\text{g/ml}$ DNase Iで分散し、nylon mesh(63 $\mu\text{m}\phi$)を通しsingle cellを得た。それをhypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase(HPRT)欠損マウス神経芽細胞腫N18TG2と42% polyethylene glycol (PEG)(MW 4,000)により細胞融合し、HAT培地でhybridを選別し限界希釈法でclone(CL8c4.7, CL8a5.2)を樹立した。染色体解析には、0.1 $\mu\text{g/ml}$ colcemidで24時間処理した細胞を用いた。免疫細胞化学的検討のため、細胞(1×10^4)をpoly-L-lysineでコートした9 mm ϕ coverslip上にまき、間接蛍光抗体法で染色した(1)。Choline acetyltransferase (ChAT)活性はFonnumの方法で、その他の神経伝達物質はNeurochemとアミノ酸分析機で測定した。

<結果>

両クローンとも10% FBS/MEMで特別な分化誘導因子を加えずに継代し、発達した突起の伸展が見られた(図)。この培養条件下ではN18TG2は殆ど突起を伸展しなかった。染色体数はN18TG2(70 ± 1), CL8c4.7(106 ± 28), CL8a5.2(81 ± 1)でhybridで増加し、class I MHC抗原はBALB/c brain cells(H-2K^d), N18TG2(H-2K^k), CL8c4.7とCL8a5.2(H-2K^d & H-2K^k)であった。両クローンはglutamateを含有し、CL8a5.2はcholine acetyltransferase (ChAT)とserotoninを産生した。免疫細胞化学的に両者ともNFP(200 kDa), NSE, MAP2, tau, NCAM, HNK-1, Thy-1, saxitoxin-binding sodium channel protein, glutamateが染色された。SynaptophysinがCL8c4.7突起終末部に見られた。Western blotで両者におけるNFP、CL8a5.2におけるChATの発現を確認した。さらに生化学的にもCL8a5.2のChAT活性とserotonin, 両者のglutamateの含有を検出した。両クローンとも膜電位を脱分極するとaction potentialを発生した。

<考察>

神経細胞の不死化の方法として、retrovirus vectorを用いてoncogeneを導入する方法と細胞融合による方法がある。前者では外来遺伝子が組み込まれるのに細胞が分裂する必要があるため分裂能を持った未分化な神経細胞しか不死化できない(2)。細胞融合法では成熟した神経細胞でも不死化可能である(3)。CL8c4.7, CL8a5.2はcAMP, retinoic acid, phorbol ester等の分化誘導因子を加えない培養条件下で、分化した神経細胞の形質を発現しかつ無限に増殖する。それぞれ小脳顆粒細胞、縫線核神経細胞の起源と推察される。我々のクローンは神経細胞の分化における遺伝子発現調節機構の解析に役立つと思われる(4)。

<文献>

- (1) Satoh J et al. J Neurosci Res 29:1-12 (1991).
- (2) Cepko C. Neuron 1:345-353 (1988).
- (3) Hammond DN et al. Science 234:1237-1240 (1986).
- (4) Satoh J et al. Ann Neurol 30:265 (1991).

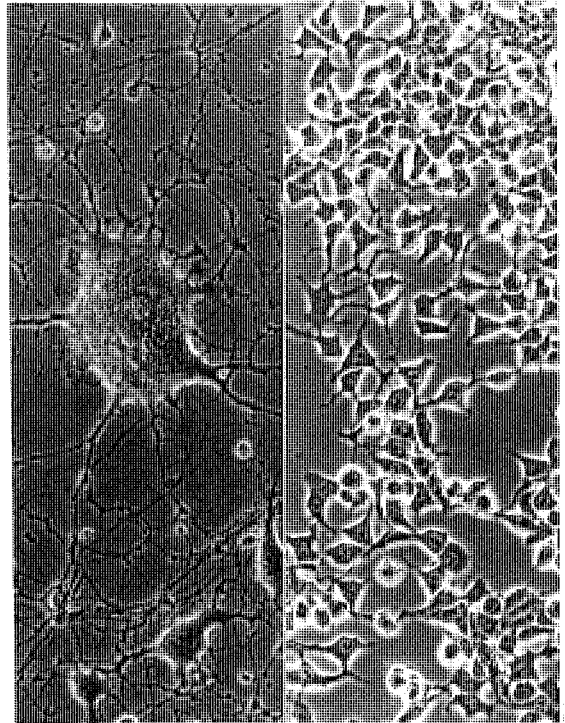


図. CL8c4.7(left), CL8a5.2(right) cultured in the 10% FBS-containing medium.

家族性及び孤発型アルツハイマー病におけるβ-アミロイド前駆体タンパク遺伝子エクソン16、17の解析

光永吉宏, 高橋慶吉, 田平 武

近年, 若年発症家族性アルツハイマー病 (FAD) 家系の一部においてβ-アミロイド前駆体蛋白(β-APP)遺伝子のcodon 717にpoint mutationが見い出され¹⁾, 若年発症FADとβ-APP遺伝子との関連が注目されている。我々は若年発症FAD二家系とアルツハイマー病孤発例5例についてβ-APP 遺伝子codon 717を含むexon 16-17の塩基配列の検索を行い, FAD一家系についてはβ-APP遺伝子intron 13の多型性²⁾を利用した連鎖解析を行った。

<方法>

FAD 二家系のゲノムDNAはEB virusで形質転換させて得た樹立細胞株より常法に従い分離し, その3 μg標品にprimerとして5'-CCTCATCCAAATGTCCCGTCATT-3', 5'-GCCTAATTCTCTCATAGTCTTAATCCAC-3'を各50pmol加え, 94°C1分, 55°C1分, 72°C3分の30サイクルでPCRを行った。尚, exon 17にC to G mutationを有するFAD Niigataの一患者DNAをpositive controlとした。増幅DNA断片の一部はBcl Iで消化後, DNAサイズを測定し, 残りはDNA塩基配列の解析に用いた。孤発例5例については前頭葉凍結標本よりグアニジン塩酸-CsCl法で抽出したtotal RNA各2 μgに3'-primerを加えてcDNAにした後, 5'-primer(5'-AAATATCAAGACGGAGGAGA-3') 30pmol, 3'-primer(5'-TCTGGGGTGACAGCGGCGTC-3') 20pmolを用いてPCRを施行し, その塩基配列を調べた。更に FAD一家系16名について, β-APP intron 13を含む領域のprimer(A strand:5'-GGAGTCTCTGCATTACAAC-3', T strand:5'-TGTGTTTAAAACCTCATTAAC-3')各20pmolと, γ-³²P dATPでラベルした A strand primer 3×10⁵cpmを加え, 94°C1分, 56°C1分, 72°C1分の27サイクルでPCR増幅後, 6%シーケンスゲルでDNA サイズを測定し, LIPED³⁾によりlod-scoreを計算した。

<結果・考察>

我々のFAD二家系において, Bcl I restriction siteはexon 17に認められず(Fig. 1), その塩基配列にも異常を認めなかった (Fig. 2)。また孤発例5例においてもexon16-17の塩基配列に異常を認めなかった。従って本FAD家系と孤発例ではβ-APP codon 717の異常は少なくとも一次的病因ではないと考えられる。一方, FAD一家系について, β-APP多型のlod-scoreは+0.903と有意な相関とは言い難かったが, 低いながらも陽性に出た事は(Fig. 3)β-APP遺伝子の他の変異の可能性も考えられる。最近, Transgenic mouseを用いた幾つかの研究⁴⁾

5)からはβ-APP過剰産生も病因の一つと考えられている。本FAD家系とβ-APPとの間に弱い相関があるとすればβ-APP遺伝子プロモーター領域の異常等, β-APP産生制御機構の変化も考えられうる。

<文献>

- 1) Goate et al. Nature, 349, 704-706 (1991)
- 2) Mant et al. Nuc. Acid Res., 19, 4572 (1991)
- 3) Ott. Am. J. Hum. Genet., 26, 588-597 (1974)
- 4) Quon et al. Nature, 352, 239-241 (1991)
- 5) Wirak et al. Science, 253, 323-325 (1991)

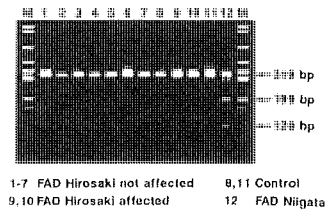


Fig. 1. Bcl I digests of the exon 17 PCR products.

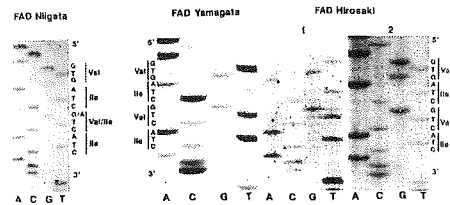


Fig. 2. Nucleotide sequence of the exon 17, β-APP gene in FAD pedigrees.

Recombination fraction	0	0.001	0.05	0.1	0.2	0.3
Lod score	+0.903	0.901	0.793	0.680	0.452	0.234

Fig. 3. Linkage analysis between FAD locus and β-APP gene in FAD Hirosaki family.

21番染色体の未知遺伝子分離法の開発

高橋慶吉, 田平 武

家族性アルツハイマー病 (FAD) は常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性疾患であり、その原因遺伝子の同定は老年期アルツハイマー型痴呆症の病因解明や診断・治療法の開発に重要な手がかりを与えるものと期待されている。この為に FAD 家系の DNA マーカーを用いる遺伝学的調査が行われ¹⁾、その一部は 21 番染色体長腕上に存在することが明らかにされたが、その正確な位置は不明である。本研究はこの様な FAD 遺伝子を同定する目的で、21 番染色体特定領域に存在する遺伝子の分離法を開発し、有効な染色体遺伝子地図を作成することを試みた。またその方法の開発に当たっては特殊な機器や技術が必要としない簡便・迅速なものであることに留意した。

<研究方法>

21 番染色体 DNA はラムダファージにクローン化された DNA を用い²⁾、存在する遺伝子の解析は前記 DNA をプローブとしマウス臓器 mRNA を用いるノーザンブロット法³⁾で行なった。この一次スクリーニングで単一 mRNA 種と hybridization するポジティブクローンを選別し、更に DNA はプラスミドベクターにサブクローンした。2 次スクリーニングではサブクローン DNA を適当な制限酵素で消化後、各 DNA 断片をプローブとしてノーザンブロット解析を行い遺伝子を含む領域を検索し、また cDNA ライブラリーより cDNA を分離した。これらの DNA は塩基配列決定後データベースの既知遺伝子との相同性を検索した。

<結果>

本ノーザンブロット解析法を用いて、ヒト 21 番染色体ライブラリーの約 400 個のクローンについて一次スクリーニングを行ったところ、単一 mRNA 種で hybridization する 10 個のポジティブクローンを得た。これらの 8 個について 2 次スクリーニングを行ない遺伝子の性質について検索した。表 1 に示すように 4 クローンは 21 番染色体由来であり、DNA 配列の相同性検索からアミロイド前駆体遺伝子、非筋肉型ミオシン軽鎖偽遺伝子、(GAAA)_n リピート、と未知遺伝子であった。また他の 4 クローンはサイトケラチン偽遺伝子、アルデヒド還元酵素に相同性を持つ新しい遺伝子、及び 2 個の未知遺伝子であった。これら未知遺伝子はそれ

ぞれ、脳及び肝で特異的に発現していることが判明した。

<考察>

今回我々が検討した方法は検出感度や特異性を従来の方法に比較して高く、簡便なものであった。しかし実際に分離できた遺伝子の半数以上は 21 番染色体以外のものであり、用いたゲノムライブラリーの純度の問題があることが明らかとなった。最近、21 番染色体特定部位が酵母由来の YAC ベクターにクローニングされ始め、更にコスミドライブラリーを用いた 21 番染色体のウォーキングが行われている。今後この様なクローン化されたゲノム DNA をプローブとすれば、遺伝子発見の効率は著しく高まるものと考えられる。

<文献>

- 1) P.H. St George-Hyslop et al: The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21, Science, Vol. 235, 885-890, 1987
- 2) B.D. Young et al: High-resolution analysis of human peripheral lymphocyte chromosomes by flow cytometry, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 78, 7727-7731, 1981
- 3) J. Sambrook et al: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989

表 1. Characterization of positive clones

Clones	Localization on ch. 21	Tissue specificity	Results of homology search
B87	Yes	Brain, Kidney	β -APP gene (exon6)
B160	Yes	All	non-muscle myosin light chain pseudogene
B141	Yes	Brain	(GAAA) homo repeat
B85	Yes	Liver	unknown
B37	No	Liver, Kidney	aldehyde dehydrogenase related gene
B55	No	Brain	unknown
A148	No	Liver	cytokeratin pseudogene
A91	No	Liver	unknown

自己免疫性脳脊髄炎誘起性T細胞におけるT細胞レセプターCDR3のホモロジー

山村 隆, 坂中 進, 高橋慶吉, 田平 武

多発性硬化症(MS)の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)において、脳炎誘起性T細胞に限られたT細胞レセプター(TCR) V β 、V α セグメントを使用していることが報告されている¹⁾²⁾³⁾。しかし、これまで解析されたのはH-2^d haplotypeを有するPL/J、B10.PLマウス、およびLewis ラットに限られており、TCRのrestricted usageがどの程度一般的な現象なのか明らかでなかった。我々は、遺伝的にV β 8.2を欠損するSJL/JマウスにおいてMBP特異的脳炎誘起性T細胞クローンのTCR α 、 β sequenceを決定した。

<方法>

脳炎誘起性クローンとして、MBP89-101をI-A^b拘束性に認識し、それぞれ独立して樹立されたSJL/Jマウス由来のクローン4b.14a、TNT-1、5Gを用いた。TCR DNA塩基配列は、各クローンより分離したRNAを用い、PCRで増幅し、決定した。 β 鎖のprimerは、抗V β 抗体を用いたFACS解析により各クローンのV β usageを決定した上で作製し、 α 鎖の増幅にはBroerenら⁴⁾のpan V α primerを使用した。

<結果・考案>

クローン4b.14a、5GはV β 17a⁺、TNT-1はV β 2⁺と判明した。既にV β 4⁺のクローンが報告されているので、SJL/Jマウスにおける脳炎誘起性T細胞のTCR V β usageはheterogeneousであると結論できた。しかし、4b.14a、5Gの β 鎖塩基配列および3クローンの α 鎖塩基配列は完全に一致し、SJL/Jマウスでは脳炎誘起性TCR repertoire (特に α 鎖)に偏りのあることがわかったが、これらのクローンの使用するV α 、V β 、J α 、J β セグメントのいずれも他の脳炎誘起性T細胞クローンで使用されたものと異なった。したがって、特定の

V β と病気の関わりを仮想する“V β region disease 仮説³⁾”は否定された。

次に、TCR アミノ酸配列をそれぞれのクローンで比較したところ、CDR3 (VDJ結合部位)に著しいホモロジーのあることがわかった。特にSJL/Jクローン β 鎖のGlyGly配列は、マウス系統、MBPエピトープの違いを越えて保存されていた。LeuGly配列もPL/Jマウスのクローンや、V β 4⁺のSJL/JクローンMM.4で保存されていた。これらの配列は、自己免疫に関係のないT細胞では0-22.5%の範囲で使用されているに過ぎない。 α 鎖のCDR3ホモロジーはさらに明らかで、SJL/JクローンのCysAla*Arg*AsnTyr配列がPL/Jクローンで保存されていた(Fig. 1)。

epitope/MHCとは無関係に脳炎誘起性T細胞が似通ったCDR3を表現していることは、他の自己免疫性T細胞においてもCDR3が共通している可能性を示唆する。事実、文献をあたってところ藤ラ氏島特異的T細胞クローン、RA患者滑膜液由来活性化T細胞のCDR3にGlyGly、LeuGly配列を高頻度に認めた。これらの事実は、自己破壊性T細胞の取り得るCDR3構造に、ある種の制限が加えられている可能性を強く示唆する。種を超えて保存されたCDR3構造を標的にして自己免疫疾患を治療できる可能性がある。

<文献>

- 1) Acha-Orbea et al. Cell 54, 263 (1988).
- 2) Urban et al. Cell 54, 577 (1988).
- 3) Heber-Katz & Acha-Orbea Immunol. Today 10, 164 (1989).
- 4) Broeren et al. Eur. J. Immunol. 21, 569, (1991).

Fig. 1. CDR3 Homology among encephalitogenic T cells

Arg*AsnTyr in the α -chain junctional region

4b.14a, 5G, TNT-1	<u>C</u>	<u>A</u>	A	R	S	N	Y	Q	L	I
PLJ Group 1 [#]	<u>C</u>	<u>A</u>	L	R	P	N	Y	G	N	E
PLJ Group 2 ^{##}	<u>C</u>	<u>A</u>	L	R	A	N	Y	G	N	E

7. 疾病研究第七部

1. 研究部一年のあゆみ

疾病研究第7部では、てんかんにおけるけいれん発作および随伴する精神症状の発症機序とその治療法に関して、生化学・薬理学的方法を用いた基礎研究を行っている。本年度は、西川徹（室長），橋本篤司（外来研究員），岡高恵（研究補助員）が研究に参加した。

本年度の主要研究テーマは、次の通りである。

1) 脳の内在性D-セリンに関する研究

哺乳類の組織中アミノ酸はL体から構成され、D体は検出されても発達の一時期か痕跡程度にすぎないと信じられてきた。こうした定説に反して、ラットではD体のセリンが脳選択的に存在し、出生時から恒常的に高濃度で維持されることを証明した。その脳内分布は、NMDA型興奮性アミノ酸受容体の分布と酷似していた。D-セリンは、NMDA受容体のアロステリックアゴニストとして作用し、NMDAで誘発されるけいれん閾値の低下や、NMDAアンタゴニストによる異常行動の抑制を起こすことが知られている。これらのことから、D-セリンが内在性のNMDA受容体調節因子であり、てんかんをはじめとする神経精神疾患の病態に関与する可能性が示唆される。

2) けいれんの発現に関与する神経回路に関する研究

けいれんのおこりやすさに年齢による差異があることに注目して、てんかんの発症に関与する神経回路の研究を進めている。すなわち、ラットを用い、c-fos 遺伝子の発現を指標として（脳スライスにおける免疫組織化学法でc-Fos 様免疫反応を検出）、けいれん誘発薬であるペンチレンテトラゾール投与に応答する脳内細胞の、発達による分布パターンの変化を検討中である。

（部長事務取扱 杉田秀夫）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Takeuchi Y, Takashima M, Katoh Y, Nishikawa T, Takahashi K:
N-Methyl-D-aspartate, quisqualate and kainate receptors are all involved in transmission of photic stimulation in the suprachiasmatic nucleus in rats
Brain Res 563 : 127 - 131, 1991
- 2) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K:
D-Alanine inhibits methamphetamine-induced hyperactivity in rats
Eur J Pharmacol, 202 : 105 - 107, 1991
- 3) Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K:
The presence of free D-serine in rat brain
FEBS Lett 296 : 33-36, 1992
- 4) Tanii Y, Nishikawa T, Hashimoto A, Takahashi K:
Stereoselective inhibition by D- and L-alanine of phencyclidine-induced locomotor stimulation in the rat
Brain Res 563 : 281 - 284, 1991
- 5) 谷井靖之, 西川徹, 橋本篤司, 日比野英彦, 高橋清久:
Phencyclidine によって出現する異常行動と N-methyl-D-aspartate 受容体アロステリック調節部位との関連性について
脳と精神の医学, 2 : 497 - 502, 1991
- 6) Tsukiyama S, Hashimoto A, Katayama S, Nishikawa T, Tobe A, Maeda M:
Fluoromethylated and hydroxymethylated derivatives of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist 1 - [1 - (2-Thienyl) cyclohexyl] piperidine
Chem Pharm Bull 39: 1581-1584, 1991

b. 著書

(編書)

- 1) Nishikawa T, Umino A, Tanii Y, Hashimoto A, Hata N, Takashima M, Takahashi K,
Toru M:
Dysfunction of excitatory amino acidergic systems and schizophrenic disorders

II 研究業績

Biological Basis of Schizophrenic Disorders, ed by Nakazawa T,
Jpn Scientific Societies Press, Tokyo, 65-76, 1991

- 2) Toru M, Shibuya H, Mitsushio H, Nishikawa T, Suga I, Kiuchi Y:

Neurochemical abnormalities in chronic schizophrenia

Biological Basis of Schizophrenic Disorders, ed by Nakazawa T,
Jpn Scientific Societies Press, Tokyo, 91-100, 1991

- 3) 西川徹:

慢性精神分裂病の治療を探る

精神医学レビューNo.1 慢性精神分裂病 (融道男編)

ライフサイエンス, 東京, p46-57, 1991

- 4) Shinohara K, Nishikawa T, Yamazaki K, Ishii S, Takahashi K:

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

NMDA Receptor Related Agenesis: Biochemistry, Pharmacology and Behavior (eds

Kameyama T, Nabeshima T and Domino, EF), p 275 - 285, NPP Books, Ann Arbor,
1991

- 5) 西川徹, 岩間久行:

興奮性アミノ酸受容体と新しい抗精神病薬

精神分裂病はどこまでわかったか (町山幸輝, 樋口輝彦編)

星和書店, 東京, p 123 - 157, 1992

c. 総 説

- 1) 西川徹:

精神疾患とグルタミン酸レセプター

実験医学 9: 61-69, 1991

- 2) 西川徹:

NMDAレセプターと分裂病

神経精神薬理 13: 865-876, 1991

- 3) 谷井靖之, 西川徹:

精神分裂病の病態モデル-その2, フェンサイクリジンモデル-

臨床精神医学 20: 1499-1510, 1991

d. 班会議報告書

- 1) 西川徹, 橋本篤司, 谷井靖之, 海野麻未, 岡高恵, 白山幸彦, 柏淳, 高橋清久 :
興奮性アミノ酸伝達に作用する薬物を用いた精神分裂病の発症機序と新しい治療法に関する研究
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2年度研究報告書, p69-74, 1991
- 2) 西川徹 :
覚醒剤及びフェンサイクリジン類投与動物を用いた精神分裂病症状の発現機構に関する研究
平成3年度科学研究費補助金(一般C)研究成果報告書 p1-36, 1992
- 3) 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 蛋白様免疫反応性 -
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,
平成2年度研究報告書 p135-142, 1991

e. その他

- 1) Nishikawa T, Tanii Y, Umino A, Hashimoto A, Hata N, Takashima M, Sirayama Y,
Takahashi K :
Phencyclidine, NMDA receptor and schizophrenia
Jpn J Psychopharmacol 11: 65-69, 1991
- 2) Toru M, Kurumaji A, Kumashiro S, Ishimaru M, Suga I, Nishikawa T :
Dopaminergic and glutamatergic abnormalities in postmortem schizophrenic brain
Biological Psychiatry 1, ed by Racagni G et al Elsevier, Amsterdam,
p501-503, 1991

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

- 1) 西川徹 :
フェンサイクリジンの脳に対する作用-興奮性アミノ酸伝達遮断作用を中心として-
第20回精神研シンポジウム, 東京, 12.7, 1991
- 2) 西川徹 :
慢性分裂病と興奮性アミノ酸ニューロン

II 研究業績

シンポジウム：精神疾患の神経生物学

第15回日本神経科学会，東京，12.19, 1991

3) 西川徹：

フェンサイクリジン投与動物を用いた精神分裂病の研究

第14回日本生物学的精神医学会，若手プレゼンポジウム：精神疾患モデル，

鹿児島，3. 26, 1992

b. 国際学会

1) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Higuchi T, Takahashi K：

The effects of allosteric agonists for NMDA receptor complex on methamphetamine-induced locomotor stimulation in rats

21th Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Nov 12, 1991

2) Shirayama Y, Nishikawa T, Watanabe M, Takahashi K：

Imipramine reduced binding number of sigma sites in rat striatum and hippocampus

21st annual meeting of Society for Neuroscience, Neworleans, Nov 15, 1991

3) Kashiwa A, Nishikawa T, Umino A, Yamamoto K, Takahashi K：

The effect of MK-801 on dopamine metabolism of rat medial frontal cortex

21st annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Nov 13, 1991

4) Mitsushio H, Shibuya H, Noda K, Nishikawa T, Takashima M, Takahashi K, Toru M：

Increase in substance P and VIP content in the post-mortem schizophrenic brains

13th Meeting of the International Society for Neurochemistry, Sydney, July 18, 1991

5) Toru M, Kurumaji A, Kumashiro S, Ishimaru M, Suga I, Nishikawa T：

Dopaminergic and glutamatergic abnormalities in postmortem schizophrenic brain

5th World Congress of Biological Psychiatry, Florence, June 12, 1991

c. 一般学会

1) 橋本篤司, 西川徹, 林時司, 藤井紀子, 原田馨, 岡高恵, 高橋清久：

ラット脳内には遊離D-セリンが存在する

第64回日本生化学大会，東京，10. 3, 1991

2) 橋本篤司, 西川徹, 林時司, 藤井紀子, 原田馨, 岡高恵, 高橋清久：

ラット脳内における遊離D-セリンの同定

第34回日本神経化学会，東京，10. 14, 1991

3) 海野麻未, 西川徹, 柏淳, 高橋清久 :

メトアンフェタミン投与ラットにおける脳内 c-Fos 様蛋白の発現

第15回日本神経科学学会, 東京, 12.18, 1991

4) 白山幸彦, 三ツ汐洋, 谷井靖之, 西川徹, 高橋清久 :

Phencyclidine 投与後のラット脳内 substance P の変化

第14回日本生物学的精神医学会, 鹿児島, 3.28, 1992

5) 柏淳, 海野麻未, 西川徹, 高橋清久 :

Methamphetamine 投与後の脳内 c-fos 遺伝子発現-発達段階における検討-

第14回日本生物学的精神医学会, 鹿児島, 3.28, 1992

C. 班会議発表

1) 西川徹, 海野麻未, 柏淳, 白山幸彦, 橋本篤司, 岡高恵, 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 投与ラットにおける脳内 c-fos 遺伝子の発現パターン

厚生省精神・神経疾患・薬物の発生機序と臨床及び治療に関する研究班

平成3年度班会議, 東京, 1.16, 1992

2) 西川徹, 橋本篤司, 岡高恵, 林時司, 藤井紀子, 原田馨, 海野麻未, 高橋清久 :

ラット脳には選択的NMDA受容体アロステリックアゴニストであるD-セリンが存在する

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

平成3年度班会議, 東京, 1.17, 1992

D. その他の研究会

1) 橋本篤司, 岡高恵, 西川徹 :

ラット脳における内在性遊離型D-セリンに関する研究

ヒューマンサイエンス振興財団, 第3分野第4テーマ研究発表会, 東京, 1.23, 1992

II 研究業績

3. 主な研究報告

ラット脳における内在性遊離型D-セリンに関する研究

橋本篤司, 岡 高恵, 西川 徹

我々哺乳類のアミノ酸はL-体から構成されていると考えられてきた。しかし、蛋白質中のアミノ酸が加齢と共にラセミ化されることや遊離型D-アスパラギン酸が数%存在すること、さらに最近我々の研究室においてラット脳内に多量の遊離型D-セリンが存在することを初めて明かにし、D-体のアミノ酸が哺乳類においても機能している可能性が示唆された¹⁾。また、この遊離型D-セリンは興奮性アミノ酸受容体の内のN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体のアロステリックアゴニストであることがすでに知られていることから、今回我々は、NMDA受容体とD-セリンとの関連性を調べるため、D-セリンの末梢分布、脳内分布および発達段階における変化について検討した。

<方法>

アミノ酸の分析は、ラット脳および他の組織の5% TCA抽出液をo-phthalaldehydeおよびBoc-L-cysteineで誘導化した後、HPLCで行なった。

<結果・考察>

遊離型D-セリンは、脳選択的に存在し、肝臓、腎臓および血清には少量しか存在しなかった(data not shown)。さらにD-セリンの脳内分布を検討したところ、大脳皮質、海馬、線条体に多く存在し、橋、延髄、小脳および脊髄にはほとんど存在しなかった(Fig.1)。また、D-セリンの量には発達段階における変化が見られ、0から3週にかけて約3倍に増加しその後加齢と共に減少する傾向が見られた(Fig.2)。これら遊離型D-セリンの脳内分布は、NMDA受容体のグルタミン酸、PCPおよびストリキニン非感受性グリシン結合部位の各Bmaxと強い正の相関を示した。さらにNMDA受容体の各結合部位も0から3週にかけて増加することが知られており、D-セリンの発達段階における変化と良く一致した。以上の結果から、これまで哺乳類において存在しないと考えられていたD-体のセリンが脳選択的、恒常的に存在し、NMDA受容体ス

トリキニン非感受性グリシン結合部位の内在性アゴニストとして機能している可能性が示唆された。

<文献>

- 1) Hashimoto A. et al. FEBS Lett., 296, 33-36 (1992)

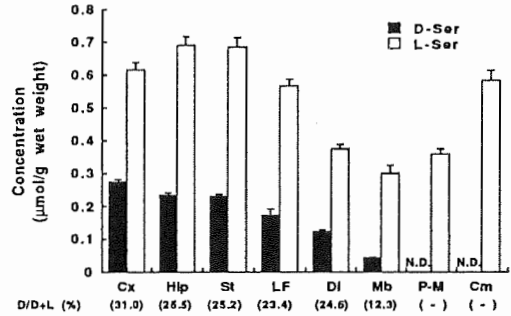


Fig.1 Regional distribution of D- and L-serine in rat brain. Filled and open columns represent D- and L-serine, respectively. The ratios of D- to total serine (D+L) are expressed as percentages in the parentheses. Cx, cerebral cortex; Hip, hippocampus; St, striatum; LF, limbic forebrain; Di, diencephalon; Mb, midbrain; P-M, pons-medulla; Cm, cerebellum.

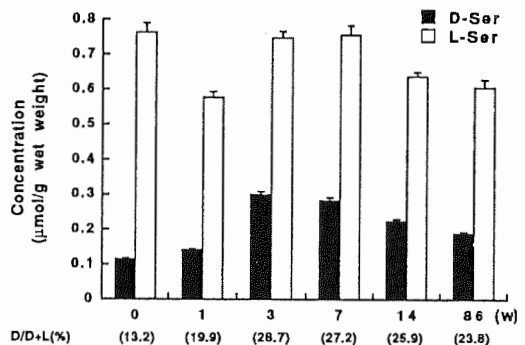


Fig.2 Postnatal changes in contents of free D-serine in rat brain. Filled and open columns represent D- and L-serine, respectively.

8. 診断研究部

1. 研究部一年の歩み

診断研究部は新部長が着任（1989年6月1日）してから3年目になろうとしている。この一年間での大きな人の動きとしては、成瀬前部長の頃から室長を勤めてこられた林時司氏がグレラン製薬株式会社の開発研究本部に就任するため、退職されたことである（1991年8月）。同氏は研究所の危険物管理のためにも尽力してこられた。あわせてこれまでの労苦をねぎらいたい。1992年3月末現在で研究部のメンバーは以下の通りである。部長，中村俊；室長，荻野孝史，服部成介；流動研究員，アーメド・カビール（バングラディシュ）；センター研究員，前川みどり；研究助手，奥田薫，高山明美；研究生，室屋賢康（東大理学系大学院博士課程終了，博士号取得），橋本裕子（学術振興会特別研究員，指導教官，岐阜薬科大学教授，林恭三）；併任研究員，前川昌平（東大理学部生物化学科助手）；高山豊（国立精神・神経センター精神科医師）；客員研究員，上代淑人（アメリカDNA X研究所）。

研究内容では，服部室長を中心に細胞の増殖・分化制御における細胞内情報伝達過程の分子機構に関する研究が，また荻野室長を中心に非侵襲生体NMR計測法の高感度化の研究が行なわれた。研究活動の詳細は，研究報告と業績リストに見ることができる。要約するとまず細胞情報伝達グループの研究としては細胞性オンコジンのひとつである *rasp21* の負の制御因子として神経繊維腫症 Type I (NF-I) の遺伝子産物 p 220 が同定された。このものは脳での発現が高く，細胞内局在では膜画分に回収されることが明らかとなった。また神経成長因子 (NGF) 受容体 *trk* のチロシンキナーゼの活性化により *rasp21* が活性化されることを示すことができた。*rasp21* の活性制御機構および活性化 *ras* の標的分子の同定を中心に来年度も研究を発展させたい。さらにより神経分化特異的な細胞応答の決定機構について一歩踏み込んだ研究を開始することを計画している。NMRグループの研究は，6.3 Tの実験用MR装置の高感度化による¹³C-ブドウ糖をトレーサーとしたグルタミン酸，乳酸などの測定，1.5 T臨床用MR装置の2 Tへの強化改良によるヒト脳¹H-MRSの測定の実用化という成果をみた。今後はさらに動物レベルでの基礎研究を進め非侵襲計測法の利点を生かした研究を展開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) Behar KL, Ogino T :

Assignment of resonances in the ^1H spectrum of rat brain by two-dimensional shift correlated and J-resolved NMR spectroscopy

Magn Reson Med 17 : 285 – 303, 1991

2) Hattori S, Ohmi N, Maekawa M, Hoshino M, Kawakita M, Nakamura S :

Antibody against neurofibromatosis type I gene product reacts with a triton-insoluble GTPase activating protein toward *rasp21*

Biochem Biophys Res Commun 177 : 83–89, 1991

3) Hattori S, Maekawa M, Nakamura S :

Identification of neurofibromatosis type I gene product as an insoluble GTPase activating protein toward *rasp21*

Oncogene 7 : 481 – 485, 1992

4) Muroya K, Hattori S, Nakamura S :

Nerve growth factor induces rapid accumulation of the GTP-bound form of $p21^{ras}$ in rat pheochromocytoma PC12 cells

Oncogene 7 : 277 – 281, 1992

5) Ishihara T, Nakamura S, Kaziro Y, Takahashi T, Takahashi K, Nagata S :

Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor

EMBOJ 10 : 1635–1641, 1991

b. 著書

1) 中村俊 :

新しい神経栄養因子は老化したニューロンをよみがえらせるか？

現代化学 254 : 11, 1992

c. 総説

1) 中村俊, 服部成介 :

GAP活性を有する NF – 1 遺伝子産物

メビオ 8 : 89–95, 1991

I 研究業績

2) 矢野登志雄, 荻野孝史 :

^{13}C -MRS (^{13}C 標識グルコース)

日本臨床 49 : 1674-1679, 1991

3) 服部成介 :

ras, GAP の新しい展開

実験医学 9 : 931 - 936, 1991

d. 班会議報告書

1) 荻野孝史, 矢野登志雄 :

Brain functional NMR spectroscopyのための要素技術の開発に関する研究

厚生省精神・神経疾患・画像解析による高次脳機能障害の総合的研究班,

平成3年度研究報告書 p19-22, 1992

2) 服部成介 :

ras 遺伝子産物 p21 による MAP キナーゼの活性化機構

文部省科学研究費がん特I 細胞増殖シグナルの伝達とその制御に関する研究班,

平成3年度研究報告書 1992

3) 服部成介 :

神経分化シグナル伝達に関する遺伝子群の同定

平成2年度科学研究費補助金研究報告書 1992

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 柴崎浩, 荻野孝史 :

先端技術と医療-MRスペクトロスコピー

第23回日本医学会総会, 京都, 4.5, 1991

b. 国際学会

1) Hattori S, Maekawa M, Nakamura S :

Identification of NF1 gene product as an insoluble GTPase activating protein toward *ras* p21

第2回日米ハワイ癌会議, ハワイ, 2.9-13, 1992

2) Shibasaki H, Yonekura Y, Fukuyama H, Nagamine T, Ogino T, Kitamura J

Non-invasive studies of human brain functions related to voluntary movement

The American Neurological Society, Seattle, USA, Sep, 1991

- 3) Petroff OAC, Novotny EJ, Avison MJ, Rothman DL, Alger JR, Ogino T, Prichard JW
Different metabolic turnover rates of brain and blood lactate pools demonstrated by labeling from 1-¹³C-glucose

10th Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, San Francisco, USA, Aug, 13, 1991

c. 一般学会

- 1) 村岡勲, 中野浩武, 小柏元英, 荻野孝史, 渡辺徳子:

慢性期脳梗塞のMR Sによる代謝動態の研究

第3回日本脳循環代謝学会総会, 盛岡, 11.7, 1991

- 2) 村岡勲, 中野浩武, 小柏元英, 荻野孝史, 渡辺徳子:

慢性期脳梗塞の ³¹P-MR S及び¹H-MR S

第50回日本脳神経外科学会総会, 京都, 10.24, 1991

- 3) 村岡勲, 中野浩武, 小柏元英, 荻野孝史, 渡辺徳子:

慢性期脳梗塞における代謝動態の研究, Part-1 慢性期脳梗塞の³¹P-MR S及び¹H-MR S

第18回日本磁気共鳴医学会大会, 熊本, 9.27, 1991

- 4) 服部成介, 川喜多正夫, 中村俊:

NF 1 活性の膜局在性GAP活性としての同定

第50回日本癌学会総会, 東京, 9.1991

- 5) 本間(加藤)美和子, 安藤昌之, 服部成介, 湯浅保仁:

家族性大腸腫瘍および大腸癌におけるGAP機能の解析

第50回日本癌学会総会, 東京, 9.1991

- 6) 服部成介, 前川みどり, Douglas Wood, 玉野井冬彦, 中村俊:

不溶性GAPとしてのNeurofibromatosis type I (NF 1) 遺伝子産物の同定

第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12.17-20, 1991

- 7) 山下俊, 後藤由季子, 服部成介, 伊藤文昭, 福田真, 酒井彦一, 中村俊, 西田栄介:

ras 発現誘導細胞におけるMAPキナーゼの活性化

第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12.17-20, 1991

- 8) アーメド・カビール, 中村俊:

II 研究業績

A substitution of glycine by valine at position 49 of G α subunit confers a differentiation potential to it in a cAMP-independent manner in PC12 cells

第34回日本神経化学会大会，東京，10.14-16,1991

9) 室屋賢康，服部成介，中村俊：

PC12細胞におけるNGF刺激にともなう活性型*ras*p21・GTP量の増加と神経分化について

第34回日本神経化学会大会，東京，10.14-16, 1991

10) 室屋賢康，服部成介，中村俊：

神経成長因子（NGF）による*ras*p21の活性化

第14回日本分子生物学会年会，福岡，12.17-20, 1991

C. 班会議発表

1) 荻野孝史：

脳内代謝動態解析のための局在化NMR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-NMR班，東京，3.10, 1992.

2) 荻野孝史：

脳内代謝動態解析のための局在化NMR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，東京，10.31-11.1, 1992

3) 服部成介：

ras 遺伝子産物p21によるMAPキナーゼの活性化機構

文部省科研費がん特I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, 1992

3. 主な研究報告

神経成長因子 (NGF) による *rasp21* の活性化

室屋賢康, 橋本裕子, 服部成介, 中村 俊

PC12細胞は神経成長因子 (NGF) の作用に応答して知覚・交感神経様の細胞に分化することが知られており、NGFによる神経分化を研究する上での格好のモデル系として広く用いられている。さらに、PC12細胞は、12番目の残基がバリンに置換された変異型*ras*遺伝子を過剰発現することにより、NGFによるのとはほぼ同様に分化することが明かにされている。また抗*ras*モノクローナル抗体のマイクロインジェクションはNGFによる細胞分化を抑制する。これらの結果は*ras*がNGFの情報伝達系路上に位置し、分化に関して必須の役割を担っていることを示している。我々は、NGFによるp21の活性化を検討するために、PC12細胞を用い、p21に結合したグアニンヌクレオチドを解析した(1)。NGFを添加したPC12細胞より*rasp21*に結合したグアニンヌクレオチドを分析した。その結果、p21に結合したGTPの割合はNGF濃度に依存して増加することが観察された。次に、p21の活性化がNGFに特異的であるか否かを明らかにする目的でPC12細胞に作用する様々な因子の効果を比較したところ、唯一EGFのみがNGFとほぼ同程度のp21・GTPの形成を誘起した(図1)。一方、分化を誘導することが知られているbFGF、IL-6、 Bt_2c AMPはいずれも効果がなかった。従って、これらの因子はp21に依存しない経路で情報を伝達しているものと考えられる。

ホルボルエステル (PMA) はT細胞においてp21を活性化することが報告されてい

るが(2)、PC12細胞に対しては効果がなかった。佐藤等も肥満細胞系のIC2-E細胞でやはり効果がないことを見ている(3)。Cキナーゼのp21に対する効果は細胞により異なるものと考えられる。

EGFは、2分間の処理でNGFと同程度にp21を活性化するが、NGFとは異なりPC12細胞の分化を誘導しない。そこで、両者のp21・GTP形成に対する時間依存性を比較した(図2)。両者とも2分以内に速やかなp21・GTPの形成を誘起したが、その後の経過は著しく異なり、NGFでは2時間後の時点でも8%のp21・GTPが観察され、さらに18時間後にも7%のp21・GTPが見られたのに対し、EGFでは1時間以内に刺激前の状態(2%以下)に戻るという対比を示した。後藤等(4)は、PC12細胞において、NGFとEGFによるMAPキナーゼの活性化の時間依存性を調べているが、その結果は、今回我々の得たp21の活性化の時間依存性と極めてよく一致している。p21とMAPキナーゼに共通の活性調節機構が存在するか、あるいは*ras*とMAPキナーゼが同一のシグナル伝達系に位置することを示している。

小泉等(5)はK-252aがPC12細胞においてNGFからの分化シグナルを特異的に阻害し、EGF、bFGF、 Bt_2c AMPからのシグナルは阻害しないことを報告している。そこで、我々は、NGFとEGFによるp21の活性化に対するK-252aの効果を調べた(図3)。K-252aは50nMでNGFによるp21・GTPの形成をほぼ完全に阻害したが、EGFに対しては

II 研究業績

効果がなかった。この結果は、NGFによるp21の活性化にK-252a感受性の特異的なプロテインキナーゼが関与していることを示している。最近の報告によれば、NGFからの分化シグナルはチロシンキナーゼ活性をもつ遺伝子産物の活性化を引き金にして細胞内に伝達される。K-252aが遺伝子産物からp21までの経路上、どのプロテインキナーゼを阻害しているのかを明らかにすることは今後の課題である (6)。

[文献]

- 1) Muroya, K., Hattori, S. & Nakamura, S. *Oncogene*, 7, 277-281 (1992).
- 2) Downward, J., Graves, J. D., Wame, P. H., Rayter, S. & Cantrell, D. A. *Nature* (London), 346, 719-723 (1990).
- 3) Satoh, T., Nakafuku, M., Miyajima, A. & Kaziro, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3314-3318 (1990).
- 4) Gotoh, Y., Nishida, E., Yamashita, T., Hoshi, M., Kawakami, M. & Sakai, H. *Eur. J. Biochem.*, 193, 661-669 (1990).
- 5) Koizumi, S., Contreras, M. L., Matsuda, Y., Hama, T., Lazarovici, P. & Gordon, G. *J. Neurosci.*, 8, 715-721 (1988).
- 6) Muroya, K., Hashimoto, Y., Hattori, S. & Nakamura, S. *Biochim. Biophys. Acta*, in press (1992).

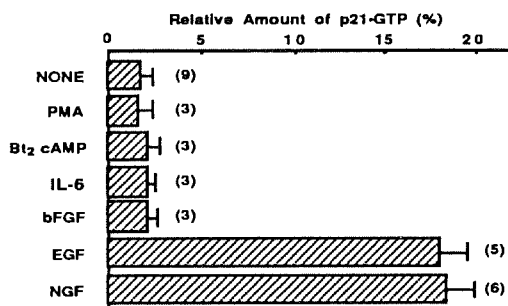


図1. 各因子のp21-GTP形成に及ぼす効果
各因子で2分間刺激後、p21に結合したGDP/GTPを測定。

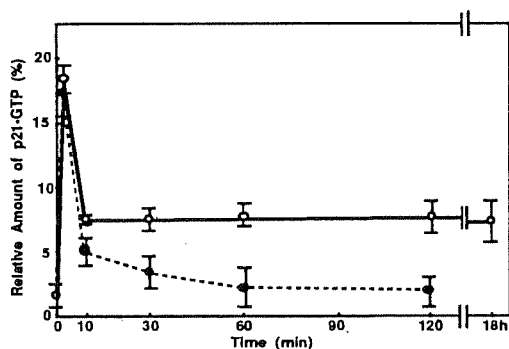


図2. NGF、EGF刺激によるp21-GTP形成の時間依存性
各時間50ng/ml NGF(—○—)、25ng/ml EGF(---●---)で刺激した後、p21に結合したGDP/GTPを測定。

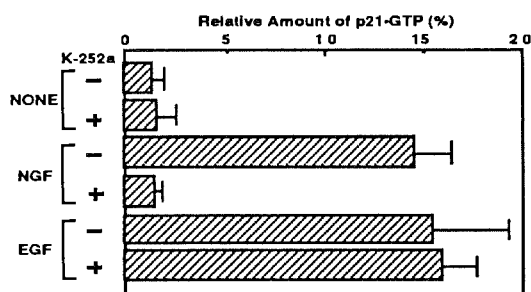


図3. NGF、EGF刺激によるp21-GTP形成に対するK-252aの阻害効果の比較。50nM K-252aで15分間前処理後(十印)50ng/ml NGF、25ng/ml EGFで2分間刺激した。

Brain Functional NMR Spectroscopyの開発---ヒト高次脳機能の無侵襲的計測

矢野登志雄, 荻野孝史

<目的>

我々は、ヒト脳の神経活動にともなう脳内の物質変化や生化学的变化を脳内の部位別に無侵襲・非破壊的に、しかも高い時間分解能で計測するNMR技術をBrain Functional NMR Spectroscopyと呼ぶことを提唱する。現在、ヒト高次脳機能を無侵襲的に計測する手段としてはSPECTやPET、SQUIDやEEGトポグラフィーなどが用いられている。NMR法の特徴は①無侵襲・非破壊的な生体系の唯一の定性・定量分析法である。②標識化合物を導入しないで内在性の生体内代謝物質についても測定することができる。③同時にあるいは相互に関連しながら変化する多数の代謝物質の検出を一回の測定で実現し、その画像化や空間分布の視覚化が行える。④機能情報と形態情報を同一の装置で得ることができる唯一の手法である---等である。本研究では、Brain Functional NMR Spectroscopyに必要な技術的諸問題を明らかにし、その解決を図るとともにBrain Functional NMR Spectroscopyの実現可能性を追求することを目的とする。

<方法>

ヒト(健康成人)脳のNMR測定には、NCNPにおいて開発したわが国で臨床応用可能な最高静磁場強度である2テスラヒト全身用NMR装置を用いた。本装置は、1.5テスラPhilips社製GYROSCANヒト全身用NMR装置の超伝導磁石を2テスラ高磁場化し、静磁場、傾斜磁場、RF送受信系、ソフトウェアの各々につき高感度化、高分解能化のための最適化を施したもので、我が国で最高感度を有するヒト全身用NMR装置である。NMR信号の検出にはMRIにも使用することができる頭部用¹Hコイルを用いた。領域選択¹H NMRスペクトロスコピーはSpin Echo法に基づいて開発したパルス系列を用いた。

<結果>

ヒト脳の¹H NMR測定において極めて高い感度と分解能で脳内代謝物のスペクトルを得ることができた。N-アセチル・アスパラギン酸やコリン、クレアチン、クレアチン燐酸由来のシグナルに加えて、脳機能との関連が高いと期待できる、乳酸やグルタミン酸、グルタミン、GABA、アスパラギン酸、イノシトール、タウリンに帰属できる多くのシグナルが検出された(図-1参照)。Spin Echo法の採用により、理論的には、従来多用されてきたSTEAM法に比べて2倍のNMR検出感度の増大が期待できる。今回の測定に

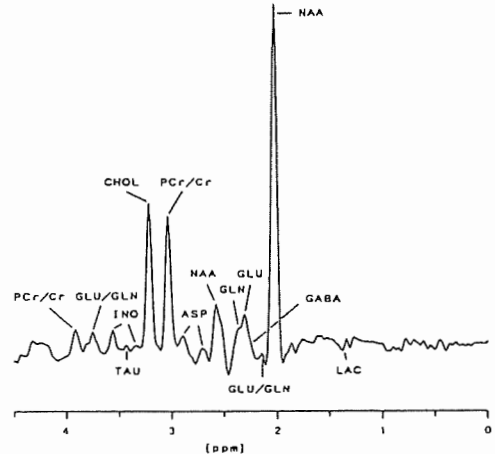


図-1 ヒト脳の2テスラ¹H NMRスペクトル。ASP: アスパラギン酸、CHOL: コリン、GABA: γ-アミノ酪酸、GLN: グルタミン、GLU: グルタミン酸、INO: イノシトール、LAC: 乳酸、NAA: N-アセチルアスパラギン酸、PCr/Cr: ホスホクレアチン/クレアチン。

おいてもほぼ2倍の感度上昇を確認することができた。基礎代謝レベルの乳酸を検出できる感度が達成されたことは注目すべきである。生理的な刺激による脳局所の興奮に伴う解糖系活性の増大の結果、乳酸生成が期待されることから、本システムの乳酸生成の検出能力を明らかにするためHyperventilation負荷実験を行った。この実験では、3分間のHyperventilation負荷によって新たに脳内に生じた0.2-0.5mMの乳酸を、数分間の測定で明瞭に検出することができた。このように脳の解糖系活性の増大を標識化合物を用いることなく直接的に測定可能であることが明らかとなり我々が提唱するBrain Functional NMR Spectroscopyの実行可能性の一つを確認することができた。

<考察>

Brain Functional NMR Spectroscopyが実行可能であるためには今後更に①高感度化技術、②高スペクトル分解能化技術、③シグナル局在化技術、④長時間分解能化技術、⑤画像化技術、を要素技術として改良・開発する必要がある。感覚刺激や課題負荷への脳局所の代謝応答を測定するような実験では同一個体での繰り返し測定が可能であることもNMRの特徴である。

9. 微細構造研究部

1. 研究部一年のあゆみ

微細構造研究部では、神経筋疾患の病因の究明と治療法の開発を目的とした研究を行っている。生検筋、皮膚、血球細胞等を利用し、確立した遺伝学的、生化学的、組織化学的検査法を用い、年500件を越える神経筋疾患の診断の依頼に応じている。

1) ミトコンドリア病の病因解明の研究

神経筋疾患の中には組織化学的検査で、明らかにミトコンドリアの異常集積や、ミトコンドリア呼吸酵素系の著しい低下を示す例が見られる。これらにはミトコンドリア遺伝子の特定部位の欠失や塩基置換が認められることが明らかになった。しかし、これらのミトコンドリア遺伝子の異常と組織特異性の問題や、核遺伝子との関係についてはまだ不明な点が多く、埼玉がんセンターや自治医大等の他研究機関との共同研究で解明に努力している。また、これまでミトコンドリア病の適切なモデル動物はなかったが、酸化ゲルマニウム含有飼料をラットに投与することで筋のミトコンドリア酵素が特異的に低下することがわかった。この系は今後のミトコンドリア病の解明や治療に利用できるものと期待される。

2) ジストロフィー関連蛋白に関する研究

デシェンヌ型筋ジストロフィーはジストロフィン遺伝子の欠損による。この発見により、類似するジストロフィン関連蛋白の存在も明かにされた。特異抗体によりアセチルコリンレセプター部位にこの蛋白が局在することがわかった。

3) 胸腺筋様細胞の産出するコロニー刺激因子の研究

胸腺筋様細胞は全ての脊椎動物に存在するが生理機能は不明であった。クローン化して調べると、80kと160kのマクローフェージ系細胞コロニー刺激因子が見いだされた。これら両因子は共に既存のM-CSFより強いIa抗原誘導性を有するが、その他の分化抗原の誘導やミクログリアの増殖に関しては異なる作用を示した。胸腺内での自己認識Tの選択的排除に関与している可能性がある。

人事面では7月に後藤雄一研究員が米国に留学し、6月には呉建明研究生が一年の研究期間を終了し台湾に帰国した。

(部長 埜中征哉)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Nonaka I, Koga Y, Kikuchi A, Goto Y :
Mitochondrial encephalomyopathies and cytochrome c oxidase deficiency :
Muscle culture study
Acta Neuropathol 82 : 286 – 294, 1991
- 2) Nonaka I :
Progressive muscular dystrophy with particular reference to muscle regeneration
Acta Paediatr Jpn 33 : 222 – 227, 1991
- 3) Goto Y, Nonaka I, Horai S :
A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy ,
lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS)
Biochim Biophys Acta 1097 : 238 – 240 , 1991
- 4) Arikawa E, Ishihara T, Nonaka I, Sugita H, Arahata K :
Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy
J Neurol Sci 105 : 79–87, 1991
- 5) Kaido M, Arahata K, Hoffman EP, Nonaka I, Sugita H :
Muscle histology in Becker muscular dystrophy
Muscle Nerve 14 : 1067–1073, 1991
- 6) Fujita T, Nonaka I, Sugita H :
Japanese quail and human acid maltase deficiency : A comparative study
Brain Dev 13 : 247 – 255, 1991
- 7) Beggs AH, Neumann PE, Arahata K, Arikawa E, Nonaka I, Anderson MDS, Kunkel LM :
Possible influences on the expression of X chromosome-linked dystrophin abnormalities by
heterozygosity for autosomal recessive Fukuyama congenital muscular dystrophy
Proc Natl Acad Sci USA 89 : 623 – 627, 1992
- 8) 鈴木文晴, 平山義人, 平野悟, 高橋立子, 桒中征哉, 杉江秀夫, 杉山成司 :
重症心身障害児にみられた carnitine palmitoyltransferase 欠損症の1例
脳と発達 23 : 93–97, 1991

II 研究業績

9) 荒木敦, 黒川徹, 桜川宣男, 桢中征哉 :

Congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber の 1 例

脳と発達 23 : 295 - 298, 1991

10) 秋山千枝子, 鈴木文晴, 桢中征哉 :

點頭てんかん, 眼底血管異常, 感音性難聴を伴った顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー

脳と発達 23 : 395 - 399, 1991

11) 御牧信義, 長谷川ひとみ, 桢中征哉 :

Ragged-red fiberの認められなかったMELASの1例

脳と発達 23 : 606 - 611, 1991

12) 東條恵, 小川直子, 竹内衛, 遠山潤, 烏越克己, 佐藤誠一, 高橋亮一, 古賀靖敏, 桢中征哉 :

筋型複合体 I 欠損症の家系分析

脳と発達 24 : 20-26, 1992

13) 池田正行, 藤ヶ崎浩人, 桢中征哉, 塚越廣 :

肥大筋線維に rimmed vacuole がみられた筋萎縮性側索硬化症

神経内科 34 : 218 - 219, 1991

14) 高橋都, 法橋建, 川瀬治通, 竿代丈夫, 桢中征哉 :

10年間の進行性筋力低下を主症状としたサルコイドーシス

神経内科 35 : 607 - 612, 1991

15) 山崎峰雄, 五十嵐博中, 濱本真, 宮崎徳蔵, 桢中征哉 :

精神異常を伴う痴呆で発症し, 経過中に悪性症候群を呈したミトコンドリア脳筋症の1例

臨床神経 31 : 1219-1223, 1991

16) Hosaka Y, Akahori H, Hernandez F, Akaike K, Ikegami N :

Pentamer arrangements in fragments of human rotavirus inner capsids observed by low dose electron microscopy

J Electron Microsc 40 : 407 - 410, 1991

17) Kobayashi T, Sano M, Tsukagoshi H, Kamo I :

Muscle inactivity reduces the content of paralbumin in rat thymic myoid cells in vitro

Neurosci Lett 131 : 221 - 224, 1991

18) Hasegawa H, Matsuoka T, Goto Y, Nonaka I :

Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with

mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes

Ann Neurol 29 : 601 – 605, 1991

- 19) Matsuoka T, Goto Y, Yoneda M, Nonaka I :

Muscle histopathology in myoclonus epilepsy with ragged-red fibers (MERRF)

J Neurol Sci 106 : 193 – 198, 1991

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

Segmental cytochrome c oxidase deficiency in CPEO : teased muscle fiber analysis

Muscle Nerve 15 : 209 – 213, 1992

- 21) Goto Y, Horai S, Matsuoka T, Koga Y, Nihei K, Kobayashi M, Nonaka I :

Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) : a correlative study of the clinical features and mitochondrial DNA mutation

Neurology 42 : 545 – 550, 1992

- 22) Takemitsu M, Arahata K, Nonaka I :

A trial of normal myoblast transfer into mdx mouse

Neuropathology, Supplement 4 : 548 – 551, 1991

- 23) Takemitsu M, Ishiura S, Koga R, Arahata K, Nonaka I, Sugita H :

A dystrophin homologue on the surface membrane of embryonic and denervated mdx mouse muscle fibers

Proc Jpn Acad 67B : 125 – 128, 1991

- 24) Takemitsu M, Ishiura S, Koga R, Kamakura K, Arahata K, Nonaka I, Sugita H :

Dystrophin-related protein in the fetal and denervated skeletal muscles of normal and mdx mice

Biochem Biophys Res Commun 180 : 1179–1186, 1991

- 25) Hayashi JI, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto YI, Nonaka I :

Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction

Proc Natl Acad Sci USA 88 : 10614–10618, 1991

b. 著 書

- 1) Nonaka I :

Progressive muscular dystrophy with particular reference to muscle regeneration

II 研究業績

Neuropathology Supp. 4, The Jpn Society of Neuropathology : p 544 - 547, 1991

2) 埜中征哉 :

Cytochrome c oxidase 欠損

Annual Review 神経 1991, 中外医学社 : p 309 - 319, 1991

3) Arahata K, Ishiura S, Tsukahara T, Arikawa E, Kaido M, Saito K, Sunohara N, Ishihara T, Nonaka I, Sugita H :

Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy

Frontiers in Muscle Research, Elsevier Science Publishers : p411-425, 1991

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

Molecular biology and diagnosis of muscular dystrophy : Immunocytochemical and immunoblot assays of dystrophin

Muscular Dystrophy Research , Elsevier Science Publishers : p51-59, 1991

c. 総 説

1) 埜中征哉 :

ミオパチーの診断：病理学的検査

CLINICAL NEUROSCIENCE 9 : 378 - 382, 1991

2) 埜中征哉 :

ミトコンドリア病

CLINICAL NEUROSCIENCE 9 : 1230-1233, 1991

3) 埜中征哉 :

皮膚筋炎

CLINICAL NEUROSCIENCE 10 : 12-13, 1992

4) 埜中征哉 :

小児筋疾患総論

小児内科 23 : 1031-1036, 1991

5) 埜中征哉 :

minimal change myopathy

小児内科 23 : 1055-1061, 1991

6) 埜中征哉 :

生検

小児科診療 54：2487-2490, 1991

7) 桮中征哉：

進行性筋ジストロフィー

小児医学 25：29-49, 1992

8) 松岡太郎, 杉田秀夫：

ミトコンドリア病とは：ミトコンドリアDNA異常による分類と病態の解明

Mebio 8 (4)：20-25, 1991

9) 松岡太郎, 桮中征哉：

ミトコンドリア脳筋症の骨格筋における形態異常とその意義

細胞工学 11：28-34, 1992

10) 竹光正和, 桮中征哉, 荒畑喜一：

ジストロフィンをめぐる最近の話題

臨床検査 36：341 - 343, 1992

d. 班会議報告書

1) 桮中征哉, 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：塩酸ピピバカイン, FK-506, 筋芽細胞移植の影響

厚生省精神・神経疾患研究委託費, 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年度研究報告書 p83-87, 1991

2) 勝木元也, 木村穰, 高橋利一, 横山峯介, 石浦章一, 竹光正和, 桮中征哉：

新しいジストロフィン遺伝子欠失突然変異マウスの開発

厚生省精神・神経疾患研究委託費, 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年度研究報告書 p45-54, 1991

3) 桮中征哉, 呉建明, 竹光正和, 松岡太郎, 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) とCoQ₁₀ の治療効果

厚生科学研究費補助金・新薬開発事業, ミトコンドリア病治療薬の開発研究班
平成2年度研究報告書 p16-19, 1991

4) 杉田秀夫, 松岡太郎, 前田浩子, 後藤雄一, 沖武人, 桮中征哉：

ミトコンドリア脳筋症の生検筋におけるCoQ含量の検討

厚生科学研究費補助金・新薬開発事業, ミトコドリア病治療薬の開発研究班,

II 研究業績

平成2年度研究報告書 p93-97, 1991

5) 後藤雄一, 松岡太郎, 作田亮一, 長谷川ひとみ, 埜中征哉 :

ミトコドリア脳筋症における血管病変

厚生省精神・神経疾患研究委託費・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班, 平成3年度研究報告書 p178-181, 1992

6) 後藤雄一, 作田亮一, 松岡太郎, 埜中征哉, 宝来總 :

MELAS の点変異: 塩基番号3243と3271の比較検討

厚生省精神・神経疾患研究委託費・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班, 平成3年度研究報告書 p260-262, 1992

7) 加茂功, 菊池愛子, 国下龍英, 古川昭栄, 埜中征哉 :

胸腺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年度研究報告書 p425-427, 1991

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, nerve growth factor (NGF) の産生, parvalbumin (PV) の動態に関する研究

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 平成2年度研究報告書 p428-432, 1991

B. 学会発表

a. 一般学会

1) 加茂功, 菊池愛子, 国下龍英 :

160 k コロニー刺激因子 (CSF) の性状

第50回日本癌学会総会, 東京, 9.10, 1991

2) 林純一, 太田成男, 菊池愛子, 竹光正和, 後藤雄一, 埜中征哉 :

mtDNA 欠損 HeLa 細胞株を用いたミトコンドリア病の研究

第64回日本生化学会大会, 東京, 10.2, 1991

3) 松岡太郎, 後藤雄一, 埜中征哉 :

CPEOとMERRF: ミトコンドリアDNA 異常の違いは表現型にどう反映するか

第94回日本小児科学会学術集会, 京都, 4.11, 1991

4) 松岡太郎, 後藤雄一, 埜中征哉 :

ミトコンドリア・ミオパチーの筋線維ときほぐし標本による電顕細胞化学的検討

- 第32回日本神経学会総会，東京，5.25, 1991
- 5) 後藤雄一，松岡太郎，古賀靖敏，桢中征哉：
MELAS の遺伝子異常：ミトコンドリア転移 RNA-Leu (UUR) 上の一塩基置換
第32回日本神経学会総会，東京，5.24, 1991
- 6) 長谷川ひとみ，古和久幸，松岡太郎，後藤雄一，桢中征哉：
MERRF における血管病変
第32回日本神経学会総会，東京，5.25, 1991
- 7) 呉建明，松岡太郎，竹光正和，後藤雄一，桢中征哉：
ミトコンドリア・ミオパチーの動物モデル：ゲルマニウム・ミオパチーとCoQ₁₀の投与
第32回日本神経学会総会，東京，5.25, 1991
- 8) 松岡太郎，長谷川ひとみ，後藤雄一，桢中征哉：
ミトコンドリア脳筋症における血管病変
第33回日本小児神経学会総会，大分，5.31, 1991
- 9) 後藤雄一，松岡太郎，宝来聰，桢中征哉：
MELAS 40例の検討
第33回日本小児神経学会総会，大分，6.1, 1991
- 10) 多田博史，小澤安文，武居正郎，岡庭真理子，熊田聡子，桢中征哉，松岡太郎：
末梢神経病変を認めた高乳酸血症の1例
第33回日本小児神経学会総会，大分，5.31, 1991
- 11) 竹光正和，荒畑喜一，桢中征哉：
mdxマウスにみられるジストロフィン陽性線維の免疫組織化学的検討
第32回日本神経学会総会，東京，5.24, 1991
- 12) Takemitsu M，Arahata K，Nonaka I，Morgan JE，Partridge TA：
Myoblast Transfer Therapy For Progressive Muscular Dystrophy
XIIIth Annual Scientific Convention of Philippine Neurological Association，Manila
11.16, 1991
- 13) 横田和子，久原とみ子，松本勇，中島寛明，小国美也子，大沢真木子，桢中征哉，作田亮一：
ミトコンドリアtRNA^{Leu (UUR)}遺伝子の点変異を認め，complex IおよびIV活性低下を示した
MELAS 患児の尿中有機酸プロファイルについて
第34回日本先天代謝異常学会，東京，11.30, 1991

II 研究業績

c. 班会議発表

- 1) 埜中征哉, 竹光正和, 石浦章一, 荒畑喜一, 古賀律子, 鎌倉恵子, 杉田秀夫 :
骨格筋におけるジストロフィン関連タンパクの局在：免疫組織化学的検討
厚生省精神・神経疾患研究委託費，筋ジストロフィー研究第1・第5班合同班，
平成3年度班会議，東京，12. 4, 1991
- 2) 後藤雄一，松岡太郎，作田亮一，長谷川ひとみ，埜中征哉 :
ミトコンドリア脳筋症における血管病変
厚生省精神・神経疾患研究委託費・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班，平成3年度班会議，東京，12. 7, 1991
- 3) 後藤雄一，作田亮一，松岡太郎，埜中征哉，宝来聡 :
MELAS の点変異：塩基番号3243と3271の比較検討
厚生省精神・神経疾患研究委託費・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班，平成3年度班会議，東京，12. 7, 1991
- 4) 埜中征哉，松岡太郎，呉建明，竹光正和，作田亮一 :
ゲルマニウムによるミトコンドリア障害：動物モデルの経時的検討
厚生科学研究費補助金・新薬開発事業・ミトコンドリア病治療薬の開発研究班，
平成3年度班会議，東京，2. 15, 1992
- 5) 杉田秀夫，松岡太郎，作田亮一，後藤雄一，埜中征哉 :
Ragged-red fiberはミトコンドリア脳筋症の各病型でどのように異なるか
厚生科学研究費補助金・新薬開発事業・ミトコンドリア病治療薬の開発研究班，
平成3年度班会議，東京，2. 15, 1992
- 6) 加茂功，国下龍英，菊池愛子，埜中征哉 :
胸腺筋様細胞のコロニー刺激因子について
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，平成2年度会議，東京，1. 7, 1992

3. 主な研究報告

胸腺筋様細胞が産生するマクロファージ系細胞増殖因子

加茂 功, 菊池愛子, 國下龍英, 桵中征哉

全ての脊椎動物の胸腺には筋様細胞が存在している。その生理的機能は不明な点が多いが、T細胞や造血系細胞の分化増殖に関する支持細胞の可能性が考えられる。また、この細胞は骨格筋との類似性から重症筋無力症の発症にも関係することが示唆されている。そこで、これらの諸問題を解明する目的で、ラット胸腺より筋様細胞をクローン化した。多くのクローン化筋様細胞からはマクロファージ系細胞コロニー刺激因子が産生されていた。本研究では、この因子の作用について調べる。

方法

産生細胞： ウイスターラット由来871207B筋様細胞をRPMI1640 + 10%牛胎児血清の条件でローラーボトルでコンフルエントになるまで培養し、洗滌後インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸を含む培地でさらに4日培養し、この培養上清を出発材料とした。

精製： 培養上清を濃縮後、DEAE-Sepharose CL-6B、トーンソー-G4000SW等を用いて活性因子を部分精製し実験に供した。

増殖細胞のアッセイと同定： ウイスター、WF/Nラットの骨髄細胞を0.4%アガロース中で培養し、コロニー数を算定するか、マイクロプレートを用いて増殖判定をした。増殖細胞の同定にはOX2, OX6, OX8, W3/25, OX42, B118-6, B118-7, BMAC-5等のモノクローナル抗体を用い、Fcレセプターの検出には牛赤血球とその抗体の複合体を用いた。

結果と考察

DEAE-SepharoseCL-6Bやトーンソー-G4000SWによりマクロファージ系細胞増殖活性は80kと160kに二相性に認められた。

160kの方が単一蛋白として精製されたので、本因子によって増殖してくる細胞の特徴を種々のモノクローナル抗体等を使用して調べた。精製160k因子はソフトアガロース中で培養した骨髄細胞を約一週間にわたり増殖させ続けた。7日目の細胞をパスツールピペットでほぐし、ラプティックチェンバーに移し、2-3時間培養した。その後、各種の抗体と正常山羊血清を加え、4Cで1時間反応させた後、ローダミンラベルした抗マウスIgG, IgM山羊IgGとさらに4Cで1時間反応させ、エタノール固定後陽性細胞の割合を調べた。

OX2 (thymocyte, neural endothelial and follicular dendritic cell): 7-23%

OX6 (Ia antigen): 15-20%

OX8 (NK, suppressor T): <1%

W3/25 (helper T, macrophage): <1%

OX42 (macrophage, dendritic cell, granulocyte): 90%

B118-6 (macrophage): 1%

B118-7 (dendritic cell): 13-20%

BMAC-5 (macrophage): <1%

Fc Receptor: <1%

160k因子はマウスの骨髄にも作用するので、骨髄由来多分化能M-1細胞に作用させたが、明確な分化誘導作用は認められなかった。

160k因子は分子量の点でも既存のサイトカインより大きく、granulocyteは誘導せず、貪食能を有する細胞を誘導することからM-CSFのファミリーに属する因子と考えられるが、M-CSF単独ではIa抗原の誘導能力は弱い、160kは強いなど、従来のM-CSFとは相異点も認められる因子であり、遺伝子を決めて明確にする予定である。

培養細胞を用いたミトコンドリアサイトパチーの研究

菊池愛子, 加茂 功, 埜中征哉

ミトコンドリアサイトパチーはミトコンドリアの形態や酵素活性の異常を示標として診断されてきたが、近年慢性進行性外眼筋麻痺症候群(CPEO)、MERRF、MELASなどでミトコンドリア(mt) DNAの異常が明らかになった。しかし同症の酵素活性低下とmtDNA変異の間には乖離があり、活性低下や変異mtDNAは組織特異的に量比や分布が異なるなど、両者の関係は非常に複雑で、その機序は未だ不明である。mtDNA変異や酵素活性低下などの細胞特性維持を目的とした培養細胞法の確立と、mt酵素の微量アッセイ法の開発がこれらの問題の解明に重要と考え、以下の研究を行なった。

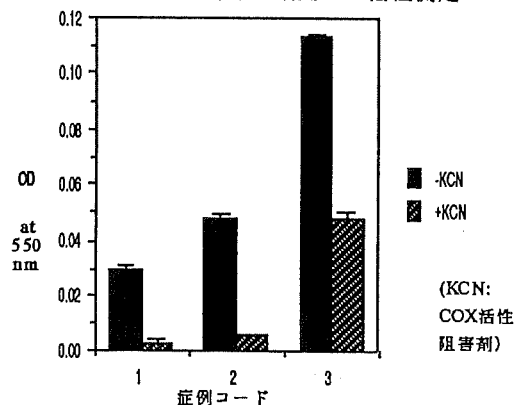
方法：予め検討した条件下で輸送された患者由来の筋、皮膚、血液組織を培養に供した。細胞特性の維持の為、家鶏筋とヒト神経細胞を用いた検討を基礎に確立した培養法と凍結保存法を適用した。mtDNAは細胞よりHirtの方法で抽出し、PCR法及びSouthern blot法を用いて分析した。mt酵素は、培養胸筋細胞を用いて確立した微量法を応用して定量した。

結果：これまで無菌的に輸送された全症例の各組織の増殖や筋管形成を実現出来た。各種deleted mtDNA(d-mtDNA)の存在を、115例中11症例に確認出来た。また従来は皮膚繊維芽細胞でのd-mtDNAの多継代培養維持は困難とされてきたが、私達の培養系では、10回の凍結融解と再培養後も全例において同じ変異を消失することなく検出することが出来た。次に、これらの細胞特性を知る上で最も重要な示標と考えられるサイトクロームオキシダーゼ(COX)の活性と抗原量の微量測定法を開発した。この方法は、筋細胞だけでなく生検筋組織凍結切片(図1)やCOX標品の活性測定にも応用可能なこともわかった。COX標品を用いて検量線を描き、各種の培養細胞や各凍結切片のCOX活性を定量化出来た。これにより、COXの欠損部位、部分的陰性部位、全陽性の部位を数値化して比較が出来た。

考察：今回培養細胞から検出されたd-mtDNAの結果は、筋組織を用いたDNA診断結果と一致した。このd-mtDNAの選択的増加を目的に、筋細胞を用いHeLa

細胞とのhybridやcybridの作成を再三試みたが成功しなかった。一方、SV40等DNA導入法での株化には成功した。また多継代の皮膚繊維芽細胞にもd-mtDNAが検出できたことによって、林博士(埼玉がんせ)との共同研究によりmtDNAを除いたHeLa細胞との間でcybridを作成できた。ところで、ミトコンドリア異常症の診断には組織化学的、免疫組織化学的手法が極めて重要な役割を果たすが、定量的な相互比較力に乏しかった。今回開発した微量酵素活性測定法と免疫組織化学的定量法で、筋管形成能の著明な低下を示すCOX欠損症児の筋細胞(1983:本書)とその後得た同一症状を示す弟の筋細胞を相互比較したところ、弟は、COX活性は極めて低値を示すにも拘わらず、筋管形成能は高く正常筋細胞に比肩する筋管形成能を示した。従って、多様な症例を用いて、m酵素活性の定量比較や増殖分化に伴う経時的な変化の追及が重要と考えられる。前述の脱mtDNA細胞へのd-mtDNAの移入実験も、mtDNA発現に貴重な資料を提供したが、別途私達が作成した脱mtDNAHeLa細胞は移入前にmt酵素活性が亜株毎に異なり、表現形質と変異DNAの間はまだ検討項目が残されている。何れにせよ各種症例の細胞蓄積が重要と考えデータベースソフトを構築した。今後は本研究を進め各細胞の特性を明らかにし、ミトコンドリアサイトパチーの発症機構の研究に資したい。

図1：生検筋凍結筋切片の微量COX活性測定



ゲルマニウムのミトコンドリア障害作用：実験的ミオパチーによる検討

松岡太郎，埜中征哉

ミトコンドリア脳筋症の骨格筋には、異常な形態をもつミトコンドリアが集積するragged-red fiber (RRF) や電子伝達系酵素の一つである cytochrome *c* oxidase (CCO) 活性を欠く筋線維をしばしば認める。一方、ゲルマニウム中毒症の病理学的検討で、ゲルマニウムがミトコンドリア障害作用をもつことが示唆されてきた。私達は、骨格筋に RRF や CCO 活性陰性線維などの所見を実験的に作り出せないかと考え、ラットにゲルマニウムを投与し、その骨格筋を組織化学的、生化学的、および電顕的手法を用いて経時的に検討した。

〔材料と方法〕

3週齢の雌のウィスターラット72匹を2群に分けた。一方には 0.15%の二酸化ゲルマニウムを含む餌を自由に摂取させ、G群とした。他方は通常の餌で飼育し、C群とした。毎週体重を測定しながら観察し、投与開始後第1日、および第1、5、10、15、20の各週に各群6匹の前脛骨筋を採取した。採取した骨格筋の一部より作製した凍結切片に各種組織化学染色を施し、特に RRF の有無と CCO の染色性につき注目し観察した。また骨格筋の一部よりミトコンドリアを分離し、CCO活性を含む電子伝達系酵素活性を測定した。第20週には、電子顕微鏡による観察とともに、X線分光法による分析電顕も行った。

〔結果〕 (図1)

- 1) 第5週までは、G群とC群の組織化学所見に差はなかった。生化学所見にも有意差はなかった。
- 2) 第10週では、G群の中に、CCOの染色性が軽度低下しているものがみられた。生化学的には、G群の CCO活性はC群の 64%であった。
- 3) 第15週では、G群全ての前脛骨筋で、CCOの染色性の中等度から高度の低下を認めた。生化学的には、G群の CCO活性はC群の 40%であった。CCO活性の低下にもかかわらず、RRFは一本も認めなかった。
- 4) 第20週では、G群の CCO活性はC群の 11%とさらに低下した。また、G群全ての前脛骨筋で、多数の RRFを認めた。RRFは CCO活性を欠いていた。電顕的には、RRFに相当すると思われる筋線維で、巨大化し、複雑なクリステをもつミトコンドリアの集積を認めた。一部のミトコンドリアは、その基質に

高電子密度の顆粒状物質を入れており、分析電顕で同部位よりゲルマニウム元素が検出された。経過中、CCO 以外の電子伝達系酵素活性の低下はなく、むしろ高値を示した。

〔考察〕

- 1) ゲルマニウム・ミオパチーの所見は、ミトコンドリア脳筋症の骨格筋所見に類似している。
- 2) ゲルマニウムは CCO活性を障害し、二次的にミトコンドリアの形態異常(RRF形成)をもたらす可能性がある。
- 3) 本動物モデルは、ミトコンドリア脳筋症の病態解明と治療法の開発に有用である。

〔文献〕

- 1) Higuchi I, Izumo S, Kuriyama M, et al.: Acta Neuropathol 79: 300-304, 1989
- 2) Higuchi I, Takahashi K, Nakahara K, et al.: Acta Neuropathol 82: 55-59, 1991
- 3) WU C-M, Matsuoka T, Takemitsu M, et al.: Muscle Nerve (in press)

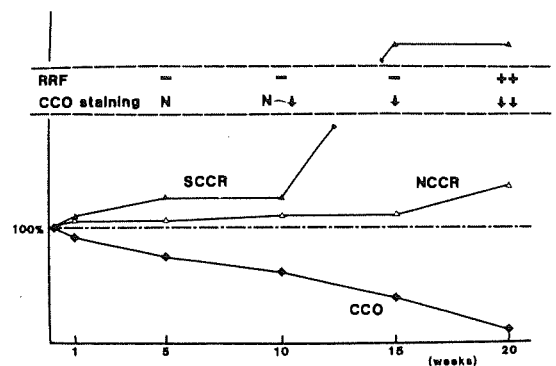


図1. 組織化学および生化学所見のまとめ。

NCCR: rotenone-sensitive NADH-cytochrome *c* reductase
 SCCR: succinate-cytochrome *c* reductase
 電子伝達系酵素活性は、対照群におけるその週での平均値を100%とし、相対値で示した。

ジストロフィン関連タンパクの骨格筋における局在

竹光正和, 荒畑喜一, 埜中征哉, 杉田秀夫, 石浦章一

ジストロフィン関連タンパク(DRP)は、6番染色体にコードされていて、ジストロフィン(dys)とアミノ酸配列において高い相同性がある¹⁾。しかし、dysと同様に、その生理的機能や各組織における極在には不明な点が多い。そこで、本実験では、DRPに対する特異的な抗体を作成し、その骨格筋における極在を検討することを目的とした。また、それとdysとの関連性を調べるために、正常筋とdys欠損筋でDRPの発現様式の差を免疫組織化学的に比較検討した。

<材料および方法>

[抗体]DRPのCOOH末端にあるB3領域でdysと相同性の無い部分(LDPDASGPQFHQAAGEC)の合成ペプチドを作成し、それを家兎に免疫してDRPに対する抗血清(Ab-LDP)を作成した²⁾。

[動物]胎生14日と20日、生後1週、1か月、18か月のC57B1/10-ScSn(B10)およびC57B1/10-ScSn-mdx(mdX)マウスをそれぞれ5匹ずつ用いた。また、生後1か月の時点で坐骨神経および大腿神経を切断して8日目のマウスもそれぞれ5匹ずつ用いた。各マウスは屠殺した後、前脛骨筋を採取して凍結標本とした。

[組織化学的検討]上記の標本の連続切片を作成し、アセチルコリンエステラーゼ(AchE)染色³⁾、Ab-LDPを用いた間接免疫蛍光染色を行った。

<結果>

胎生筋は、B10およびmdxマウスともに筋線維表面膜で全周性にDRPが陽性であった。ただし、その染色輝度はmdxの方がB10のものより強かった。生後のB10マウスは神経筋接合部(NMJ)のみがDRP陽性であった(Fig. 1A)。mdxマウスは、生後1週では筋線維表面膜全周性に均一に、その後はNMJおよびその周囲の表面膜(Fig. 1B)と再生線維の表面膜がDRP陽性であった。また、脱神経筋では、B10とmdxマウスともにそれぞれの胎生筋と同様の結果であった。

<考察>

今回の結果より、DRPはアセチルコリン受容体

と関連して発現していると考えられた。すなわち発生初期には筋線維表面膜の全周性に発現して、NMJが形成されるとそこにclusterとなって存在する⁴⁾。さらに、その筋線維が脱神経されると再度表面膜全周性に発現するのである⁵⁾。また、dysの欠損しているmdxマウスではNMJが形成された後も筋線維表面膜にDRPが存在することから、DRPのdys欠損に対する代償的発現も推測された。

<文献>

- 1) Love et al. Nature, 339, 55-58 (1989)
- 2) Takemitsu et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 180, 1179-1186 (1991)
- 3) Karnovsky et al. J. Histochem. Cytochem. 12, 219-221 (1964)
- 4) Bevan et al. J. Physiol., 267, 195-213 (1977)
- 5) Howe et al. Exp. Neurol., 52, 272-284 (1976)

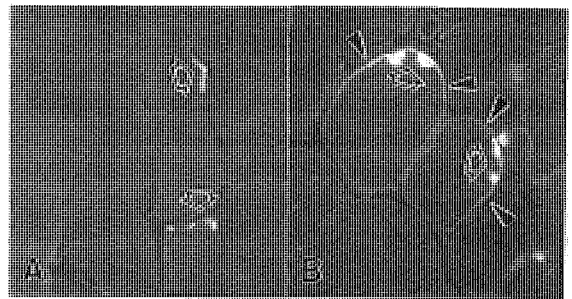


Fig. 1 マウス骨格筋のDRP. 間接免疫蛍光染色. ×180.

A: 正常のB10マウスではNMJ(矢印)に一致してDRPの陽性反応がみられる。

B: mdxマウスではNMJ(矢印)とその周囲の筋線維表面膜(▲)でDRP陽性反応がみられる。

MELASの点変異：塩基番号3243と3271の比較検討

作田亮一，後藤雄一，松岡太郎，埜中征哉，宝来 聰*（*国立遺伝学研究所）

はじめに

ミトコンドリア脳筋症における変異ミトコンドリアDNA(mtDNA)の報告が次々と行なわれている。特に、昨年、MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes)においてtRNA^{Leu(UUR)}の塩基番号(nt)3243にAからGの一塩基置換が報告されMELASの診断は飛躍的に進歩した¹。我々は、この結果に基づいてPCR-RFLP法を用いて40例のMELASの診断を行ない80%の患者にnt3243の変異を認めたが、残りの症例には異常は見られなかった²。今回、我々は、nt3243の変異のない臨床的にMELASと診断された症例についてさらにmtDNAの異常を検討し、新たな点変異を認めたので報告する³。

対象・方法

臨床的にMELASと診断されているがnt3243の変異を認めない例についてmtDNAの全tRNAを含む領域をPCR法を用いて増幅し、サンガー法にて塩基配列を決定した。

結果・考察

アンダーソンの塩基配列と比較検討しtRNA^{Leu(UUR)}領域のnt3271にTからCの一塩基置換を認めた。この部位は、tRNA^{Leu(UUR)}のアンチコドンシステムに位置していた。人や牛ではnt3271はTに保存されておりnt3261のAと相補的塩基対を形成している。しかし、nt3271のTがCに変異することによってnt3261のAとの相補性は保たれなくなる。

表1. nt3243変異とnt3271変異の患者の臨床症状の比較

	nt3243(n=38)	nt3271(n=6)
Stroke-like episodes	38(100%)	6(100%)
Episodic headache with vomiting	33(86.8)	6(100)
Convulsion	31(81.6)	3(50)
Visual disturbance	21(55.3)	1(16.7)
Transient hemiplegia	7(18.4)	1(16.7)
Additional symptoms		
Muscle weakness	29(76.3)	3(50)
Mental retardation	28(73.7)	2(33.3)
Short stature	22(57.9)	2(33.3)
Hearing loss	10(26.3)	1(16.7)
Cardiomyopathy	4(10.5)	1(16.7)
Ptosis	3(7.9)	2(33.3)
Heart block	1(2.6)	0(0)
Delayed development	1(2.6)	0(0)
Retinal pigmentation	0(0)	0(0)

以上より、nt3271の点変異はtRNA^{Leu(UUR)}の構造や機能に大きな影響を与えるものと考えられた。このnt3271変異が他のミトコンドリアミオパチーにも認められるのかどうか、nt3243に変異のあるMELAS 32例、nt8344に変異のあるMERRF 6例、欠失のあるCPEO 32例、欠失のないCPEO 8例およびコントロール 50例について検索しその結果、nt3271変異は一例も認められず、この変異がnt3243変異のないMELASにのみ存在していることが明らかになった。

さらに、nt3271変異を有するMELASとnt3243変異を有するMELASの間に臨床的な差が存在するのかどうか検討した。nt3271変異のMELAS 4家系6例とnt3243変異のMELAS 38例を対象とした。表1のごとく、脳卒中様発作はnt3271変異でも全例に認められ、その中でも頭痛・嘔吐、痙攣が多く見られた。また、筋力低下、精神遅滞、低身長が多く、これらはnt3243のMELAS患者と同様の傾向であった。

筋病理および電子伝達系酵素の検討でも両者に大きな差は認められなかった。

以上より、nt3271変異の患者は、nt3243変異を有するMELASの臨床症状、筋病理所見、電子伝達系酵素活性において同様であり、このことからnt3271変異はnt3243変異とともにMELASの病因となると考えられた。

文献

- 1) Goto Y et al. Nature., 348, 651-653(1990)
- 2) Goto Y et al. Neurology., 42, 545-550 (1992)
- 3) Goto Y et al. Biochim Biophys Acta., 1097, 238-240(1991)

10. 機能研究部

1. 研究部一年のあゆみ

平成3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、鈴木厚、水野裕司、山本秀子であり、山田圭津と斎藤和江がこれの補助を行った。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池谷紀代子（東京女子医科大学小児科学教室、助手）と水野一乗（東京大学教育学部、大学院博士課程学生）とが参加した。

鈴木厚は、昭和60年3月京都大学理学部生物系卒業。平成3年3月京都大学大学院理学研究科博士課程を卒業、理学博士の称号を受けた。大学院では生物物理学科伊藤忠直助教授のもとでアクチンフィラメントの物理化学の研究を行った。当部には平成3年4月1日より流動研究員として研究に参加した。平成3年9月1日より科学技術庁特別研究員に採用され、当センター外来研究員となった。

水野裕司は、昭和62年3月群馬大学医学部卒業後、群馬大学神経内科に在籍した。当部には平成3年6月1日より流動研究員として研究に参加した。

山本秀子は、昭和60年3月東京都立大学理学部化学科卒業後、東京都立大学院理学研究科にて奥山典生教授のもとでタンパク質の分析化学の研究を行った。平成2年3月大学院卒理学博士の学位を授与された。同4月からスイス国サンド・バーゼル本社薬剤事業部にて post doctoral fellow として勤務、平成3年9月より当部流動研究員として研究に参加した。

研究の内容としては、ジストロフィンおよびその結合糖タンパク質複合体を主な対象としている。本年度はジストロフィンの分子構造の解析（吉田）、ジストロフィンの複合体結合位置の決定（鈴木）、複合体を形成するタンパク質の解析（山本）とジストロフィンや関連タンパク質の免疫組織化学的研究（水野）を行った。

その他にも萩原はジストロフィン関係のいくつかの問題と培養筋細胞に及ぼすハイドロオキシウレアの作用の研究を行った。また林は昨年引き続きニワトリ胚を用いて筋芽細胞の遊走の問題について研究を行った。

小沢は厚生省精神・神経疾患研究委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。

（部長 小沢鏝二郎）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

1) Hayashi K, Ozawa E :

Vital labelling of somite-derived myogenic cells in the chicken limb bud
Roux's Arch Dev Biol 200: 188-192, 1991

2) Tanaka H, Hayashi K, Ozawa E :

Positive immunostaining with dystrophin antibodies in mdx skeletal muscle
Proc Jpn Acad 67B : 148-152, 1991

3) Tanaka H, Ishiguro T, Eguchi C, Saito K, Ozawa E :

Expression of a dystrophin-related protein associated with the skeletal muscle cell membrane
Histochemistry 96 : 1-5, 1991

4) Saito K, Yoshida M, Tanaka H :

Sensitivity of cultured and skinned chick myotube to calcium, strontium, and barium ions examined by recording isometric contractions
J Cell Physiol 150 : 45-51, 1992

b. 著書

1) Ozawa E, Yoshida M, Hagiwara Y, Tanaka H, Hayashi K, Ikeya K :

Formation of dystrophin lining on muscle cell membrane in myogenesis in vivo
Frontiers in Muscle Reserch ; myogenesis, muscle contraction and muscle dystrophy
(Ozawa E, Masaki T, Nabeshima Y eds) Excerpta
Medica Press, New York, p 305 - 319, 1991

c. 総説

1) 小沢鏝二郎 :

筋の分化
小児内科 23 : 5-10, 1991

d. 班会議報告書

1) 小沢鏝二郎, 鈴木厚, 吉田幹晴 :

ジストロフィン分子上の糖タンパク質複合体結合部位について

II 研究業績

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3年度班会議報告書 p21-27, 1992

B. 学会発表

a. シンポジウム

b. 国際学会

c. 一般学会

1) 吉田幹晴，鈴木厚，小沢鏝二郎：

精製ジストロフィンのキモトリプシンによる限定分解

第64回日本生物学会，東京，10. 2, 1991

2) 斎藤公司，田中光，吉田幹晴，小沢鏝二郎：

ニワトリ遅筋のCa，SrおよびBa イオンに対する感受性は速筋トロポニンCで置換した後も変わらない

第65回日本薬理学会総会，仙台，3. 24, 1992

3) 田中光，林謙介，重信弘毅，小沢鏝二郎：

シストロフィン欠損筋細胞膜におけるジストロフィン抗体およびDRP抗体による陽性組織染色

第65回日本薬理学会総会，仙台，3. 24, 1992

4) 池谷紀代子，斎藤加代子，山田あけみ，小沢鏝二郎，福山幸夫：

Becker 型筋ジストロフィー例の分子遺伝学的，免疫学的検討

第36回日本人類遺伝学会，山口.24-26, 1991

C. 班会議発表

1) 小沢鏝二郎，鈴木厚，吉田幹晴：

ジストロフィン分子上の糖タンパク質複合体結合部位について

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3年度班会議，東京，12. 4, 1991

2) 小沢鏝二郎：

ジストロフィン分子構造と糖タンパク質複合体結合部位

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，
総合班会議，東京，1. 23, 1992

3) 吉田幹晴, 鈴木厚, 小沢鏝二郎 :

ジストロフィンのカルパイン消化

生体運動合同班会議, 名古屋, 1.6, 1992

4) 鈴木厚, 吉田幹晴, 小沢鏝二郎 :

ジストロフィン分子上の糖蛋白質複合体結合部位

生体運動合同班会議, 名古屋, 1.6, 1992

5) 林謙介, 小沢鏝二郎 :

ニワトリ胚芽への筋芽細胞の移動

総合研究(A)「筋形成の分子機構」班会議, 東京, 2.22, 1992

II 研究業績

3. 主な研究報告

単離精製したジストロフィンのカルパインによる限定消化

吉田幹晴, 鈴木 厚, 小沢鐵二郎

昨年の年報では結合タンパク質を含む複合体として調製されたジストロフィン (DAPC) のキモトリプシン (CT) 消化について述べた。本報では結合タンパク質を含まない単離ジストロフィン (DYS) を新たに調製し、CTとは特異性の異なるカルパイン (CP) による限定消化をイムノプロットとN末端アミノ酸配列分析で調べた結果、ジストロフィン分子内にはプロテイナーゼに分解され易い複数の特定部位のあることを明らかにした。

(材料と方法)

DYSはDAPCのアルカリによる解離とゲルろ過により精製した。限定分解はCa²⁺とDTT存在下、重量比1/100のCPを使ってpH7.5、25℃で行った。反応はEGTAで止めた。アミノ酸配列分析はPVDF膜に転写されたバンドを切り出して直接シーケンサーにかけて行った。

(結果と考察)

DAPCのCP消化の様子をSDS-PAGEのCBB染色パターンで調べると昨年報告したCT消化のものに比べ少し違いが見られた。まずジストロフィンは分解されるが結合タンパク質の方は比較的分解を受け難いことであった。次にジストロフィンからは比較的大きなフラグメントが生成し、特に145kDaフラグメントの存在が目についた。この2点がジストロフィン結合タンパク質である糖タンパク質複合体のジストロフィン分子上における結合部位の限定へと発展した¹⁾。

DYSのCP消化パターンは、CBB染色で見ると結合タンパク質由来と考えられるバンドを除いてDAPCのものと同様であった。この結果はイムノプロットでも支持された。このことからDYSはpH11という比較的過酷な処理を経て調製されたにも関わらず、その構造を維持していると考えられた。また結合タンパク質の存在が一部の局所的な違いを除きジストロフィンの消化パターンに影響することはないと結論された。

7種の抗体 (P00, M02, P04, Dy, P23, P31, P34) を使って行ったイムノプロットの結果から、各フラ

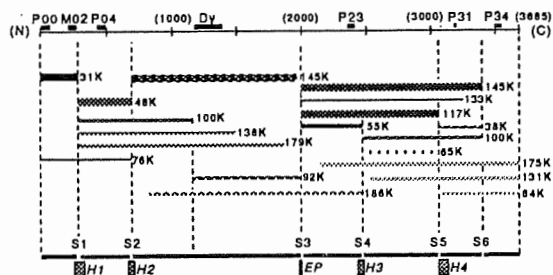
グメントをその分子量とそれを認識する抗体の違いによってジストロフィン分子上に矛盾することなく並べて地図を作った (図1)。アミノ酸配列分析の結果がこれを補強した。その結果ジストロフィン上にはS1~S6の少なくとも6ヶ所、CPによる切断部位のあることがわかった。このうちS1~S5はCTの切断部位でもあった。S6を除くこれらの切断部位はKoenigとKunkel²⁾がヒトジストロフィンのアミノ酸配列に基づいてその存在を予測した5つの配列 (H1~H4, EP) と良く一致した。即ちアミノ酸配列分析の結果から、S1, S2はそれぞれH1, H2の中に、またS3はEPから僅か1残基C端側へ外れたところであった。また鈴木らのイムノプロットの結果を考えるとS5もH4の中にあると推定される¹⁾。S4もH3に一致するようであるが、この部位は他の部位に比べCPやCTによって切断され難いようである。

KoenigとKunkelはH1~H4がヒンジ (榩番) として機能すると考え、ユニークなハチの巣状のジストロフィン細胞膜裏打ちモデルを唱えているが、これまで電顕で確認されていない。ここで示されたプロテイナーゼで切断され易いジストロフィン上の部位の存在がどのような意味を持つか今後の問題である。

(文献)

- 1) 鈴木ら 本年報を参照
- 2) Koenig, M. & Kunkel, L.M. (1990) *J.Biol.Chem.*, 265, 4560-4566

(図1) ジストロフィンのカルパインフラグメントの地図



ジストロフィンの糖タンパク質複合体結合部位

鈴木 厚, 吉田幹晴, 山本秀子, 小沢鏝二郎

ジストロフィンの筋肉形質膜への結合はラミニン結合性の糖タンパク質複合体 (GPC) を介していることが近年明かたされた(1,2)。一方、ジストロフィン分子上の GPC結合部位に関しては、いくつかの間接的な結果からC末端ドメインにあることが予想されていた。しかしこれには直接的な証拠が欠けており、むしろ最近、C末端を欠損した分子も形質膜に観察し得るという報告がなされ、再検討が求められている。我々は今回、カルバインによる限定分解法を用いて、GPC結合部位を生化学的に直接同定し、ジストロフィンのC末端領域(正確にいうとこれまで予想されていた領域より若干内部の部分)が GPCを介して形質膜に結合していることを初めて実証した。

【方法】ジストロフィン-結合タンパク質複合体(DAPC)のカルバインによる限定分解は、DAPC/カルバイン = 100:1 という重量比で25°C、30分おこなった。反応を5mM EGTAで停止した後、消化物を小麦胚芽レクチン(WGA)アフィニティーカラムで分画した。使用した抗ジストロフィン抗体はすべてヒトのアミノ酸配列に基づいて合成したペプチドを用いて作製した。そのエピトープの分子上の位置は図2に示す通りである。

【結果と考察】

ジストロフィン-結合タンパク質複合体をカルバインで消化した場合、ジストロフィンは速やかに145,117,100,55,48,33kDaなどの断片に分解された(吉田報告参照)。しかし、結合タンパク質の多く、特に糖タンパク質(GPC)はカルバインの消化に対して比較的耐性を示した(図1a、lane 2)。その結果、GPCとの結合を維持しているジストロフィン断片をWGAアフィニティーカラムで分画することが可能となった(図1a、lane 3)。既に我々の研究室で有していた六種の抗体を用いて、マッピングを試みたところ、GPC結合に必須な領域は P34の認識するC末端部分より内部にあり、P23の認識する145kD断片と117kD断片との非重複部分に存在することが示唆された。アミノ酸シーケンシングの結果これら145kD および117kD のN末端が同じであることが明かとなり、この非重複部分はシステイン頻出ド

メイン周辺に存在することが予想された。この予想はこの領域に対する三種の抗体(P30b,P31b,P33c)を新たに作製することによって確認され、最終的にGPC結合に必須な 35-38kD断片が同定された(図1b)。この断片は、ジストロフィン分子上のシステイン頻出ドメイン、およびC末端ドメインの前半に対応する(図2)。この領域は、アミノ酸配列が非常に高度(>99%)に保存されている領域であり、またその欠失が必ず重篤な症状に至ると臨床的に指摘されてきた領域に対応する。今回の我々の結果は、他の膜結合部位の存在を否定するものではないが、C末端領域におけるGPCを介した膜への結合がジストロフィンの機能にとって非常に重要であることを示している。

【文献】1)Yoshida, M. & Ozawa, E. (1990)

J. Biochem. 108, 748-752

2)Ibraghimov-Beskrovnaya, O. et al.

(1992) Nature 355, 696-702

図1 DAPCのカルバイン消化物のWGA カラムによる分画、および P31bによるイムノプロット

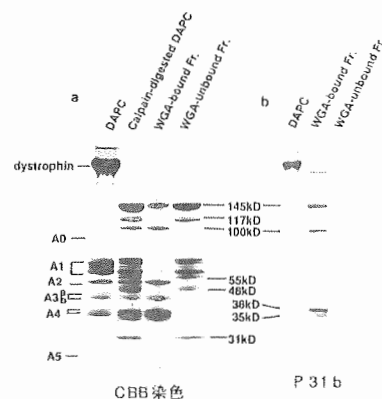
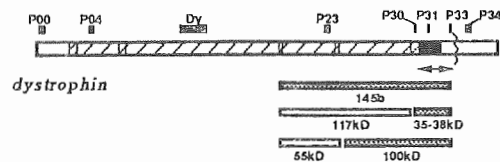


図2 各断片の分子内マッピング、および GPC 結合部位の同定



Dystrophin結合タンパク質の2次元電気泳動法による解析

山本秀子, 水野裕司, 萩原康子, 吉田幹晴, 小沢鏝二郎

Dystrophin は、筋肉の膜画分をジキトニンで処理すると、複数のタンパク質との複合体として抽出される^{1, 2)}。この dystrophin結合タンパク質が、dystrophin を細胞膜に局在させていると考えられ、個々の結合タンパク質に関する研究が進められている。

我々は、ウサギ骨格筋より精製した dystrophin複合体を2次元電気泳動法により分析し、個々の dystrophin 結合タンパク質について、新しい情報を得たので報告する。

方法

Dystrophin 複合体は、吉田ら¹⁾の方法により精製した。この標品、あるいは酵素処理した標品に、氷上で urea 粉末 (最終濃度 8M) さらに 8M urea, 1% NP-40, 5% 2-mercaptoethanolを含む "denaturing soln." を等量加え電気泳動用試料とした。urea 添加による加水分解を防ぐため、粉末 urea を室温で手早く溶かした後、ただちに分析に供した。

結果と考察

Fig.1に、urea により解離した dystrophin 複合体の泳動図を示す。個々の結合タンパク質スポットの同定は、分子量、特異抗体染色、レクチン染色、^[125I]T10 との結合性により行った。

1) SDS-スラブゲル電気泳動において非常に近接したタンパク質バンド群である A1は、1次元目の electrofocusing で大きく収束位置の異なる二つのスポット群に分離された。最も分子量の小さいA1はゲル中央に複数のスポットとして、高分子側のA1は、塩基性側にやはり複数のスポットとして検出された。Anti-A1 MAb B25b により、塩基性側のスポット群のみが認識され、A1は2種類のタンパク質群、basic A1(b-A1)、neutral A1 (n-A1)に区別できるものと考えられた。

2) b-A1、n-A1、A2、A3、A4、A5は、それぞれ単一のスポットには収束せずに、荷電の近接した複数

のスポットに分離された。b-A1はMAb、A2、A3 はそれぞれ特定シクエンスにたいするポリクローナル抗体で近接した全てのスポットが認識されたことから charge isomer であると考えられた。n-A1、A4、A5 スポット群についても同様の事が推測された。これらの charge heterogeneity の原因のひとつとして、b-A1、n-A1 ではリ酸化があげられた。シアル酸基を結合した糖鎖の影響とも推測されたが、neuraminidase 処理により1次元目の収束位置に変動が生じた A2、A3、A4 (糖鎖末端にシアル酸基をもつ) について、スポット数の変化は検出されなかった。

3) レクチン染色により、A2、A3、A4、156Kタンパク質が糖タンパク質であることが確認され、さらに糖タンパク質でないと言われていた b-A1 について糖鎖の結合を示す結果が得られた。156Kタンパク質は、分子量的に不均一な、非常に酸性のタンパク質であったことから、プロテオグリカである可能性が示された。

1)Yoshida et al., J. Biochem. 108(1990)748.

2)Ervasti et al., Nature 345(1990)315.

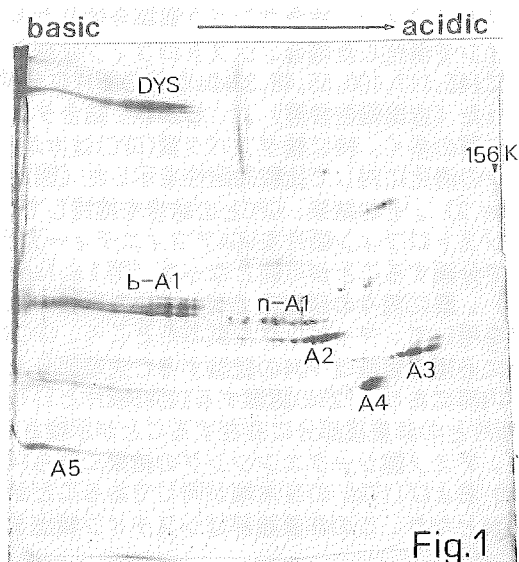


Fig.1

Muscle Cell Primary CultureにおけるHydroxyureaの効果

萩原康子, 小沢鏝二郎

Muscle cell primary culture においては、筋組織から myoblast を分離する過程で fibroblast の混在が避けられない。Myoblast を fibroblast から分離する方法としては、両者の培養皿への付着力の差を利用するいくつかの方法(DA や DT)や比重の差を利用する遠心法がある。また myoblast が融合して myotube を形成した後に fibroblast の増殖を抑える方法として、myotube が DNA 合成をしないことを利用して cytosine の derivative である D-arabinofuranosylcytosine(略称 Ara-C)を培養液に一定期間添加する方法がある。我々は、ribonucleotide reductase の阻害剤である hydroxyurea (HU) を myotube 形成後の培養液に添加することにより、fibroblast の少ない myotube の培養を可能にしたので報告する。

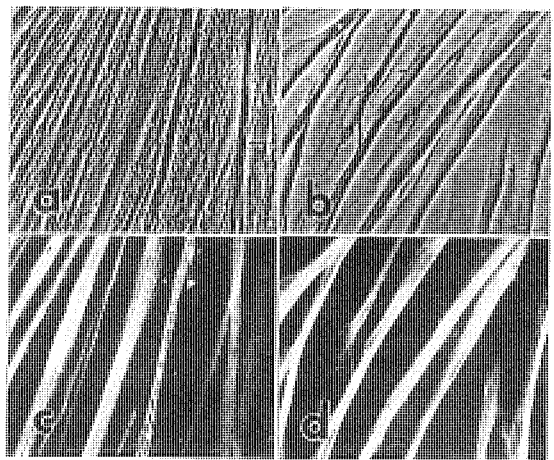
〔方法〕

ニワトリ11日胚の胸筋から酵素処理なしに機械的な解離法で得た単核細胞を、 2×10^5 個ゼラチン塗布した培養皿にまいて培養した。培養液は 85%Eagle's MEM-15% ウマ血清に ovo transferrin を 15 μ g/ml の濃度で加えたものを用いた。

〔結果と考察〕

HU は濃度依存的に単核細胞の増殖を抑えた。細胞が培養皿に付着した後に、種々の濃度の HU を添加した培養液に変えて 10 時間培養した。その後 ^3H -thymidine を添加して 12 時間培養し細胞への ^3H -thymidine 取り込み抑制を測定した結果、HU の 50% 抑

制濃度は 5×10^{-4} M であった。Myotube が形成され始めた培養 2 日後に種々の濃度の HU を添加した培養液にかえて培養を続けた。培養 7 日目の HU 0 M では、myotube の間を fibroblast が埋め尽くしていたが (図 a)、HU 1×10^{-3} M では fibroblast の増殖が抑えられて、myotube 間に fibroblast がほとんど見られなかった (図 b)。しかし、HU 0, 1×10^{-3} M 共に myotube には fast type myosin heavy chain の存在がモノクローナル抗体により示され (図 c & d)、横紋および自発的収縮が観察された。Ara-C と異なり、核酸の derivative でない HU は核酸への直接の影響は考えられず、また myotube の differentiation に影響を与えずに fibroblast の増殖を抑えることができる。Muscle cell primary culture において、HU を用いることによりかなり純粋な myotube の培養を得ることができる。



肢芽による筋芽細胞の誘引

林 謙介, 小沢鏝二郎

手足の筋肉細胞は体節に由来することが知られている。発生過程で、肢芽に隣接した体節から筋芽細胞が肢芽中へ移動して来る。この現象は四肢動物の形態形成過程において、又、骨格筋細胞の発生過程において重要なステップであるにも関わらず研究があまり進んでいない。その理由は筋芽細胞を他の細胞と区別するのが困難であるからである。これまでに我々は、ニワトリの体節を *in situ* で蛍光ラベルすることにより肢芽中で筋芽細胞を識別、観察する方法を開発し、筋芽細胞は肢芽中の限られた場所にしか入らないことを報告した (Roux's, 200, 188-192, 1991)。今回は、正常では筋芽細胞が走出しない胴部へ肢芽部体壁板を移植し、移植片に筋芽細胞を誘引する作用があるか否かを調べる実験を行った。なお、胴部の体節も肢芽領域に移植されれば筋芽細胞を走出させることは既に知られている。

【方法】

移植する体壁板はD i Oのホスファチジルコリン溶液中に浸すことにより、又、ホストの体節はD i Iの同溶液を注入することにより標識した。両色素は励起波長の違いにより区別できる。

【結果と考察】

実験1) 肢芽部体壁板を胴部に移植すると胴部に肢芽が形成され、本来細胞の走出を起こさない胴部の体節から細胞が肢芽へ走出した。胴部の体壁板を胴部へ移植する対照実験では走出は起こらなかった。このことから肢芽部体壁板が、体節の細胞へ何等かの作用を及ぼしていることが示された。

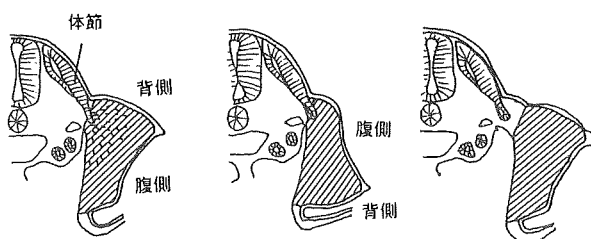
実験2) 肢芽部体壁板を180度回転して胴部に移植すると背腹軸が逆になった肢芽が成長する。この時、体節の細胞の走出は起こら

なかった。このことは、肢芽の腹側領域(正常発生でもこの領域には筋芽細胞は入らない)は体節からの細胞走出を引き起こす作用を持っていないことを示している。

実験3) 肢芽部体壁板を移植する際に、胴部の体壁板をわずかに残しておくことと移植片と体節との接触を阻止できる。その時、体節細胞の走出は起こらなかった。このことは、体節細胞が走出を起こすためには肢芽部体壁板と極めて接近する必要があることを示している。

【まとめ】

肢芽の背側部の中胚葉には、体節中の筋芽細胞を誘引する働きがあるらしい。その作用は組織間の接触を必要とし、また、肢芽の腹側部や胴部の中胚葉にはなく背側部に偏在する。これらのことから、肢芽の背側部には拡散性の小さい細胞外基質あるいは細胞外に固定された増殖因子などの活性物質が局在し、筋芽細胞に働きかけていることが想像される。



実験 1

実験 2

実験 3

11. 代謝研究部

1. 研究部一年のあゆみ

代謝研究部では本年度も引き続き神経系の正常な分化発育を支えている生理活性物質，特に神経栄養因子につき神経化学的および分子生物学的な研究を進めてきた。本研究部の新規研究テーマがスタートして早くも3年が経過したが，ようやく研究体制も整い，研究成果も徐々にではあるが充実してきていることは喜ばしいことである。平成3年4月以降代謝研究部の研究活動を支えてき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（～3.7.31），斎藤茂治（～4.3.31），今井嘉紀（3.4.16～）

〔センター研究員〕 大澤圭子，竹本なぎさ（3.4.8～），平井ふさこ，亀井 幸（～3.6.30）

〔外来研究員〕 下条雅人，飯島 昇（～4.3.31），北本昭彦（～4.3.31），保坂義隆（3.5.28～），

宮本 豊（3.4.1～4.3.31）

〔研究生〕 浜之上誠，永田晃一，広瀬雄一，服部達哉（3.4.1～），中尾裕史（3.4.1～4.3.31），

榊原真人（～4.3.31），石川理恵子（3.12.10～），井幡 巖（4.1.6～），

岡崎任晴（3.4.4～4.3.31）

本年度の研究成果は以下の通りである。

1) ミクログリア由来生理活性物質の研究

昨年度までに我々はミクログリア培養上清中の生理活性物質を探索する過程で各種のプロテアーゼ活性を見だし，その同定を進め，そのうちのひとつはエラスターゼであることを明らかにした。本年度は更にプラスミノージェンアクチベーター様活性を見だし，その生化学的特性を検討した結果ウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベーター（uPA）であることが判明した。また，このuPAの基質であるプラスミノージェンもミクログリアより分泌されることが示された。中枢ニューロンへのプラスミノージェンおよびその活性化産物であるプラスミンの効果を検討した結果，両者とも神経突起の形成を促進し，またドーパミン作動性ニューロンの成熟を促進した。

2) ミクログリア細胞株の樹立

ラット脳より調整したミクログリアに温度感受性SV40のlarge T遺伝子を導入することによりミクログリア由来の細胞株を樹立することに成功した。本細胞はミクログリアのマーカーであるED-1モノクロー

II 研究業績

ーナル抗体に陽性であり、かつ高い non-specific esterase 活性、貪食活性、イソレクチンB4 結合活性が認められた。本細胞のダブリングタイムは約16時間であり、コンタクトインヒビションが認められた。この細胞株からもuPAの分泌が認められ、これはサイトカイン等種々の刺激により変化した。この細胞はミクログリア由来生理活性物質の検索およびミクログリア自身の細胞特性を検討する上で有用と考えられる。

3) 脳由来神経栄養因子に関する研究

ラット胎児大脳皮質ニューロンの生存維持活性を指標に牛脳抽出液中より神経栄養因子の同定を行ってきたが、昨年までに我々はひとつの因子がニューロン特異的エノラーゼであることを明らかにした。本年度はいまひとつの因子の検討を進めた結果、カルシウム依存性リン脂質結合蛋白の一種であるアネキシンVであることを明らかにした。アネキシンVの生理機能を解析する目的で、まずウェスタンブロットにより細胞局在を検討した結果アネキシンはアストログリア、ミクログリアおよび髄膜フィブロブラストには存在するもののニューロンには全く同定することが出来なかった。この結果はノザンブロットによるアネキシンVmRNAの解析からも確認された。

4) $\alpha 2$ -マクログロブリンの突起伸展作用

我々はアストログリア培養上清中に認められる中枢ニューロンの突起伸展促進因子がプロテアーゼインヒビターである $\alpha 2$ -マクログロブリン($\alpha 2$ M)であることを報告した。今年度はその突起伸展作用機序について検討を加えた。プロテアーゼ $\alpha 2$ M複合体はプロテアーゼインヒビターとしての活性を失っているが突起伸展作用に関してはNativeの $\alpha 2$ Mに比し、より強い活性が認められた。また、プロテアーゼ $\alpha 2$ M複合体はニューロン膜に対して特異的に結合することが示された。このことから $\alpha 2$ Mの突起伸展作用は受容体を介したものであることが強く示唆され、現在この受容体の解析を進めている。

(部長 高坂新一)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Mori T., Miyamoto Y., Iijima N., Kitabatake K., Kohsaka S. :
Dissociation of neurite-promoting activity and protease-inhibiting function of α_2 -macroglobulin in culture
Brain Res 567 : 355 - 357, 1991
- 2) Takei N., Kondo J., Nagaike K., Ohsawa K., Kato K., Kohsaka S. :
Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase
J Neurochem 57 : 1178-1184, 1991
- 3) Saitoh S., Iijima N., Ikeda M., Nakajima K., Kimura M., Katsuki M., Mori T., Kohsaka S. :
De novo production of α_2 -macroglobulin in cultured astroglia from rat brain
Mol Brain Res 12 : 155-161, 1992
- 4) Nakajima K., Shimojo M., Hamanoue M., Ishiura S., Sugita H., Kohsaka S. :
Identification of elastase as a secretory protease from cultured rat microglia
J Neurochem 58 : 1401-1408, 1992
- 5) Imai Y., Matsushima Y., Sugimura T., Terada M. :
A simple and rapid method for generating deletions by PCR
Nucleic Acids Res 19 : 2785, 1991
- 6) Imai Y., Matsushima Y., Sugimura Y., Terada M. :
Purification and characterization of human papillomavirus type 16E7 protein with preferential binding capacity to under-phosphorylated form of retinoblastoma gene product
J Virol 65 : 4966-4972, 1991

b. 著書

- 1) 高坂新一 :
神経組織の脳内移植 - 遺伝子工学の立場から -
脳と老化-長寿社会に生きる- (第5回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会編) ,
クバプロ, 東京, pp.135-147, 1991
- 2) Kohsaka S. :
Immunological aspects of neural transplantation

II 研究業績

Parkinson's disease : from clinical aspects to molecular basis.

(Nagatsu T, Narabayashi H and Yoshida M eds), Springer-Verlag, New York, pp.119-127, 1991

3) Kohsaka S, Takei N, Ohsawa K, Kato K :

Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase

Molecular Basis of Neuronal Connectivity (Satake M, Obata K., Hatanaka H, Miyamoto E and Okuyama T eds), Kohko-Do, Niigata, pp.97-100, 1992

c. 総 説

1) 飯島昇, 森俊夫, 高坂新一 :

ニューロン・グリア相互機能調節

BIOmedica 6 : 918-922, 1991

2) 武井延之, 高坂新一 :

中枢神経系由来の神経栄養因子

—脳特異的蛋白の神経栄養作用—

Pure Chemicals "DAIICHI" 22 : 50-59, 1991

3) 中嶋一行, 高坂新一 :

オリゴデンドロサイト

蛋白質・核酸・酵素, 36 : 1575-1576, 1991

4) 中嶋一行, 高坂新一 :

ミクログリア

蛋白質・核酸・酵素 36 : 1576-1577, 1991

5) 下条雅人, 高坂新一 :

ニューロン・グリア成長因子としてのインターロイキン

最新医学, 46 : 575 - 580, 1991

6) 中嶋一行, 高坂新一 :

中枢グリアの増殖・分化因子

最新医学 46 : 639 - 645, 1991

7) 中嶋一行, 高坂新一 :

ニューロン・グリア相互作用からみた神経栄養因子

代謝 28 : 目でみるページ, 332, 1991

8) 武井延之, 高坂新一 :

神経系における成長因子

Annual Review 神経 1992 : 31-41, 1992

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2年度研究成果報告書 66-77, 1991

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2年度研究成果報告書 309 - 319, 1991

3) 高坂新一, 保坂義隆, 下条雅人, 中嶋一行 :

SV40 large T 遺伝子によるラット脳由来ミクログリアのcell line 化

厚生省精神・神経疾患・神経系機能修復に関する開発的研究班
平成3年度研究成果報告書 45-49, 1992

4) 高坂新一, 武井延之, 大澤圭子, 服部達哉 :

神経栄養因子としてのニューロン特異的エノラーゼ

厚生省精神・神経疾患・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班,
平成3年度研究成果報告書 17-21, 1992

5) 高坂新一 :

中枢ニューロンの生存維持因子

文部省科学研究費補助金重点領域「神経回路形成の分子機構」,
平成2年度研究成果概要集, 17-18, 1992

e. その他

1) 高坂新一 :

脳研究における「物質と精神」

By-Line 4, 1991

2) 高坂新一 :

老年痴呆

三田評論 932 : 27, 1992

II 研究業績

B. 学会発表

a. 特別講演・シンポジウム

1) 高坂新一：

神経突起伸展因子としての α -2マクログロブリン

日本工業技術振興協会「ニューロサイエンスとドラッグ・デザイン研究部会」,
東京, 7. 5, 1991

2) 高坂新一, 中嶋一行：

脳ミクログリアとプロテアーゼ

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」
平成3年度夏期ワークショップ, 京都, 8. 22, 1991

3) 高坂新一：

神経細胞の発育維持に関する諸因子

千里ライフサイエンスセミナー, ブレインサイエンスシリーズ第2回「成長因子」,
大阪, 10. 25, 1991

4) Nagata K, Nakajima K, Kohsaka S：

Characterization of brain microglia and the biological significance in the central nervous system

10th International Symposium on Parkinson's disease, Tokyo 10. 30, 1991

5) 武井延之, 高坂新一：

神経細胞生存維持因子としてのニューロン特異的エノラーゼ

文部省重点領域研究「神経細胞死」, 平成3年公開シンポジウム, 東京, 12. 13, 1991

6) 中嶋一行, 高坂新一：

ミクログリア由来生理活性物質

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」第3回公開シンポジウム
-アルツハイマー病の原因を探る-, 東京, 12. 20, 1991

7) 武井延之, 高坂新一：

神経細胞生存維持因子としてのニューロン特異的エノラーゼ

ヒューマンサイエンス振興財団平成3年度官民共同プロジェクト研究成果シンポジウム,
東京, 1. 22, 1992

8) Takei N, Kohsaka S：

Neuronal survival promoting activity of neuron specific enolase

The 15th International Symposium of the Taniguchi Foundation

"Neurotrophic factors", Monterey, 2. 5, 1992

9) Kohsaka S, Nakajima K, Nagata K :

Physiological significance of microglia in the central nervous system

第4回国際痴呆共同シンポジウム「痴呆研究のストラテジー」, 東京, 3. 11, 1992

10) Nakajima K, Nagata K, Kohsaka S :

Physiological significance of microglia in the central nervous system

Japanese-German joint workshop on molecular approach to neurological disorders,

Hamburg, 3. 20, 1992

11) 高坂新一, 中嶋一行, 永田晃一 :

ミクログリア由来神経栄養因子

第65回日本薬理学会総会シンポジウム, 神経細胞の突起伸展と生存に関与する因子,

仙台, 3. 23, 1992

b. 国際学会

1) Nakajima K, Shimojo M, Hamanoue M, Kohsaka S :

Identification of secretory proteases from rat microglia in vitro

13th Meeting of the International Society for Neurochemistry, Sydney, 7. 16, 1991

2) Takei N, Ohsawa K, Kato K, Kohsaka S :

Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron specific enolase

13th Meeting of the International Society for Neurochemistry, Sydney, 7. 16, 1991

c. 一般学会

1) 今井嘉紀, 松島曜子, 杉村隆, 寺田雅昭 :

HPV16E7 たんぱく質のRB結合能に対するRBリン酸化の影響

第50回日本癌学会総会, 東京, 9. 10, 1991

2) 加藤勝, 服部豊, 佐々木博巳, 加藤修, 今井嘉紀, 坂本裕美, 吉田輝彦, 杉村隆, 寺田雅昭 :

K-*sam* 遺伝子およびその遺伝子産物の発現について

第50回日本癌学会総会, 東京, 9. 10, 1991

3) 中嶋一行, 下条雅人, 浜之上誠, 津崎尚子, 高坂新一 :

ミクログリア由来プラスミノーゲンアクチベーターについて

II 研究業績

4) 武井延之, 大澤圭子, 中尾裕史, 高坂新一 :

中枢神経系における Calphobindin-I/Annexin-V の細胞及び細胞内局在
第64回日本生化学会大会, 東京, 10. 3, 1991

5) 飯島昇, 宮本豊, 斎藤茂治, 森俊夫, 北畠克顕, 高坂新一 :

$\alpha 2$ -マクログロブリンの中枢ニューロン突起伸展作用
第34回日本神経化学会, 東京, 10. 14, 1991

6) 中嶋一行, 津崎尚子, 下条雅人, 浜之上誠, 高坂新一 :

ミクログリア分泌性プラスミノーゲンアクチベーターについて
第34回日本神経化学会, 東京, 10. 14, 1991

7) 浜之上誠, 梶原景正, 木村穰, 菅谷英一, 勝木元也 :

マウス脳初代培養細胞からのジストロフィン様cDNA のクローニング
第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12. 17, 1991

8) 保坂義隆, 北本昭彦, 下条雅人, 中嶋一行, 高坂新一 :

SV40 Large T 遺伝子導入によるミクログリア細胞株の樹立
第15回日本神経科学学会大会, 東京, 12. 18, 1991

9) 永田晃一, 中嶋一行, 武井延之, 高坂新一 :

プラスミノーゲンの神経突起伸展作用: ミクログリアの生理的意義
第15回日本神経科学学会大会, 東京, 12. 18, 1991

10) 永田晃一, 武井延之, 中嶋一行, 高坂新一 :

胎児ラット培養中脳神経細胞の発育に対するプラスミノーゲン及びプラスミンの効果
第65回日本薬理学会総会, 仙台, 2. 24, 1992

d. 班会議発表

1) 高坂新一, 中嶋一行, 永田晃一 :

ミクログリア由来プラスミノーゲンアクチベーターについて
文部省重点領域研究・脳の老化機構に関する分子細胞学的研究班,
平成3年度班会議, 東京, 12. 21, 1991

2) 高坂新一, 中嶋一行, 永田晃一 :

神経機能修復におけるミクログリアの生理的意義
厚生省精神・神経疾患・神経系機能修復に関する開発的研究班,
平成3年度班会議, 東京, 1. 11, 1992

- 3) 武井延之, 永田晃一 :
ニューロン特異エノラーゼの神経栄養効果
厚生省精神・神経疾患・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班,
平成3年度班会議, 東京, 1. 18, 1992
 - 4) 高坂新一, 武井延之 :
アネキシンの脳内細胞局在について
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3年度班会議, 東京, 1. 17, 1992
 - 5) 飯島昇 :
 $\alpha 2 M$ のニューロン突起伸展作用機序
ヒューマンサイエンス振興財団官民共同プロジェクト・第1分野第1テーマ,
平成3年度班会議, 東京, 1. 17, 1992
 - 6) 永田晃一, 中嶋一行, 武井延之, 高坂新一 :
末梢および中枢神経系におけるプラスミノージェンの突起伸展作用: ミクログリアの生理的意義
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3年度班会議, 東京, 1. 23, 1992
 - 7) 保坂義隆, 下条雅人, 高橋靖雄, 植村昭夫 :
SV40 large T 遺伝子によるラット脳由来ミクログリアの cell line 化
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3年度班会議, 東京, 1. 23, 1992
 - 8) 保坂義隆, 中嶋一行, 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班,
平成3年度班会議, 東京, 1. 31, 1992
- e. その他
- 1) 高坂新一 :
見事なネットワーク
テレビ東京・第461回「医食同源」, 9. 22, 1991
 - 2) 高坂新一 :
驚くべき伝達の仕組み

II 研究業績

テレビ東京・第462回「医食同源」, 9. 28, 1991

3) 高坂新一 :

神経細胞長生きの秘密

テレビ東京・第463回「医食同源」, 10. 6, 1991

3. 主な研究報告

ミクログリア分泌性プラスミノーゲンアクチベーターの性質について

中嶋一行, 浜之上誠, 竹本なぎさ, 高坂新一

培養ミクログリアは種々の生理活性物質を産生、分泌する能力を持つことから、in vivoにおいても周囲のニューロンやグリアの生育を調節している可能性がある。我々はミクログリアの培養上清に神経栄養活性を認め¹⁾、その本態の探索を行ってきたが、その過程でミクログリアの培養上清に数種のプロテアーゼを検出した。昨年度は、そのひとつとしてエラスターゼの分泌について報告した²⁾が今年度は、分泌性プラスミノーゲンアクチベーター(PA)の性質について報告する³⁾。

〈方法〉

ミクログリアの分離、およびミクログリアの培養上清(Mic-CM)の調整は既報³⁾の如く行った。カゼインサイモグラフィーはあらかじめプラスミノーゲンおよびカゼインを含む1%アガロースゲルを作製しておき、それにPAを含む試料を流したポリアクリルアミドゲル(SDSを除去したもの)を密着させ37℃で保温することにより行った。PAの存在する場所ではアガロースゲル中のプラスミノーゲンが活性化されカゼインを分解するのでアガロースゲルを染色すると透明にぬけて見える。

〈結果および考察〉

Mic-CMをアミコンの濃縮装置により30倍以上に濃縮しサイモグラフィーにかけると図1, レーン2に見られるように分子量約47および28kDaに2本のバンドが検出された。しかし新鮮なMic-CMには

47kDaのバンドのみ検出された(レーン1)。レーン2の試料を室温放置、あるいは凍結融解を繰り返すと47kDaが減少し28kDaが増加する(レーン3)ことから28kDaのPAは47kDaがMic-CM中のプロテアーゼにより切断されて生じた活性断片と推測された。またこれらのPAはウロキナーゼ抗体と反応し、tPA抗体には認識されないことからウロキナーゼタイプのPA(uPA)と判明した(図2)。更にミクログリアからのuPAの分泌は種々の刺激により変動することが認められた。IL-1やbFGFの添加により対照の2~3倍分泌が増加し、逆にLPSの刺激では数分の1に減少した(図3)。これらの結果はミクログリアは主にuPAを産生、分泌することを示している。近年、PAはニューロンの突起伸長や、小脳ニューロンの移動、アストロサイトの分裂に関与することが報告されており神経系における機能が注目されている。今後ミクログリア由来PAの生理的役割について検討する予定である。

〈文献〉

- 1) Nakajima et al. Biomed. Res. 19(S3), 411-423, 1989
- 2) Nakajima et al. J. Neurochem. 58, 1401-1408, 1992
- 3) Nakajima K et al. Brain Res. 577, 285-292, 1992

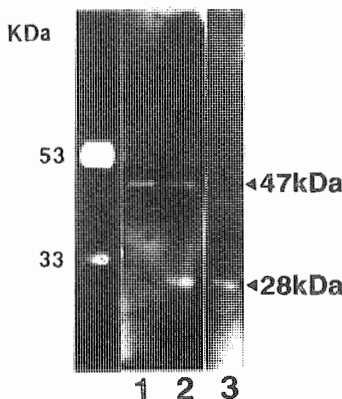


図1. Mic-CMのサイモグラフィー

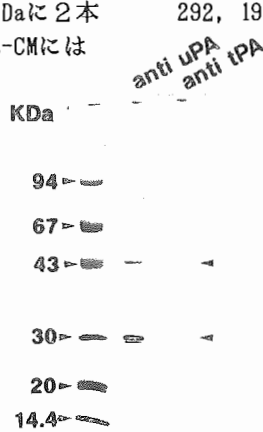


図2. ウェスタンブロット

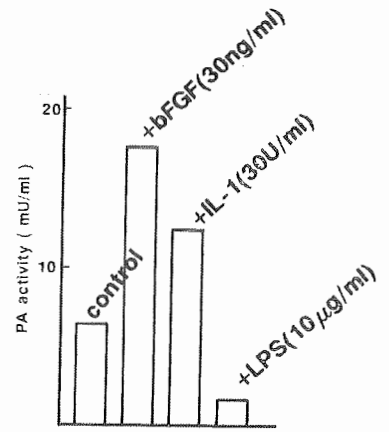


図3. PA分泌の刺激応答性

中枢神経系におけるアネキシンVの存在と役割

武井延之, 大澤圭子, 今井嘉紀, 高坂新一

アネキシンは、一群のカルシウム依存性リン脂質結合蛋白からなるファミリーで、現在までに7種類が知られている¹⁾。アネキシンは、さまざまな分野の研究から、それぞれ個別に同定されてきたものであるが、その真の生理的役割については不明な点が多く残されている。またその分布は多くの臓器にわたっており、脳にも存在が報告されているが、どの細胞に発現しているのかは明らかでなかった。

今回我々は、アネキシンVに注目し、その脳内における細胞局在をラット脳より調製した培養細胞を用いて検討した。その結果、アネキシンVはニューロン以外の全ての細胞には存在するが、ニューロンにだけは存在しないことが明らかとなった。さらに新しい作用として神経栄養活性を見いだした。

方法

中枢神経系細胞の培養：ラット中枢神経系由来の細胞、ニューロン、アストロサイト、ミクログリア、ファイブプロラストは当研究室で確立した方法により調製した²⁾。各培養細胞の純度は、特異的な細胞マーカーに対する抗体で免疫染色で確認したところ、すべて95%以上であった。アネキシンVの同定：培養細胞におけるアネキシンV蛋白の同定はウエスタンブロット法により行なった。またその生合成は免疫沈降法で、mRNAの発現はノザンブロット法でそれぞれ調べた。神経栄養活性の計測：神経栄養活性は胎生16日のラット大脳皮質ニューロンの初代培養系を用い、生存細胞数を計数することによって行なった³⁾。

結果と考察

アネキシンVはアストロサイト、ミクログリア、ファイブプロラストには存在することがウエスタンブロットにより明らかになったが、ニューロンでは検出されなかった (Fig. 1)。さらに細胞を³⁵S-メチオニンでラベルした後、免疫沈降してアネキシンVの生合成を調べたところ、同様にニューロン以外の全ての細胞で生合成が認められた。mRNAの発現も同様に、ニューロン以外の、アストロサイト、ミクログリア、ファイブプロラストでは発現していた

が、ニューロンでは全く発現が認められなかった。以上のことからアネキシンVはニューロンにのみ特異的に存在しない蛋白である可能性が強く示唆された。

次にアネキシンVがニューロンに対して何らかの作用を持つかどうかを調べる目的で、培地にアネキシンVを添加したところ、アネキシンVは用量依存的にニューロンの生存を維持することが判明した。これはニューロン・グリア間の相互作用という観点から興味深く、現在さらに検討を加えている。

文献

1. Crumpton&Dedman, (1990) Nature 345, 212
2. Saitoh et al., (1992) Mol.Brain Res. 12, 155-161
3. Takei et al., (1991) J. Neurochem. 57, 1178-1189

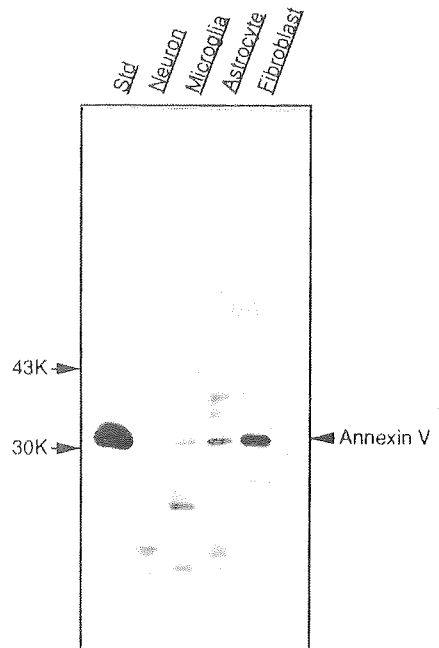


Fig.1 Western blotting of annexinV in CNS cells.

SV40 large T 遺伝子によるラット脳ミクログリアの cell line 化

保坂義隆, 下条雅人, 中嶋一行, 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。我々はミクログリアの培養上清中に神経栄養因子活性を見いだしているが、ミクログリアは通常の培養条件では活発に分裂、増殖する細胞ではないため、培養上清を大量に取得することは困難である。そこで、ミクログリアの産生する神経栄養因子を精製、同定することを目的とし、ラット脳ミクログリアの cell line 化を試みた。

〈方法〉

トランスフェクションに用いたプラスミドである pUC-SVODtsT は SV40 温度感受性変異株の large T 遺伝子を ori(-) とし、これを pUC19 に挿入することにより調整した。ミクログリアは胎生 20 日のラット大脳皮質細胞の初代培養系より調整し、この細胞に pUC-SVODtsT をリン酸カルシウム共沈法によりトランスフェクトした。4 週間培養した後、得られた細胞を限界希釈法によりクローニングした。クローニングされた細胞の増殖特性は細胞をトリプシン処理により分散させ血球計数盤を用い測定した。抗 ED-1 抗体による免疫染色は既述の方法に従って行った¹⁾。なお、pUC-SVODtsT は東工大の半田教授より供与して頂いた。

〈結果および考察〉

トランスフェクションの結果得られた 52 個のクローンを RBM101~RBM152 と命名した。この中で RBM129 が最も強い増殖能を示したので、以下の実験には RBM129 を使用した。RBM129 は 37°C 培養時、活発な増殖が認められ doubling time は約 16 時間であった。一方、40.5°C 培養時では増殖はほとんど認められなかった (図 1)。また、ウェスタンブロットの結果 large T 抗原の発現も認められたことから、この細胞は温度感受性の large T 遺伝子により不死化した細胞であることが確認された。

RBM129 はミクログリアのマーカーの一つである

ED-1 抗体により強く染色されたが (図 2)、抗ニューロフィラメント抗体および抗 GFAP 抗体では染色されなかった。以上の結果により、この細胞はラット脳ミクログリア由来の細胞株であることが強く示唆された。

今回、我々はラット大脳皮質細胞由来のミクログリアに温度感受性の large T 遺伝子を導入することにより不死化に成功し、この細胞の培養上清においても神経栄養効果を認めている。このことから RBM129 はミクログリア由来の神経栄養因子の探索あるいは因子の精製、同定を行うに際し極めて有用であると思われる。

〈文献〉

- 1) Nakajima, K. et al.: Biomed. Res. 10(S3): 411-423, 1989

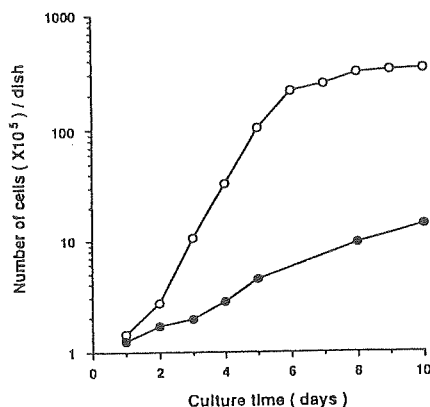


図 1. RBM129 の増殖特性

○—○37°C, ●—●40.5°C

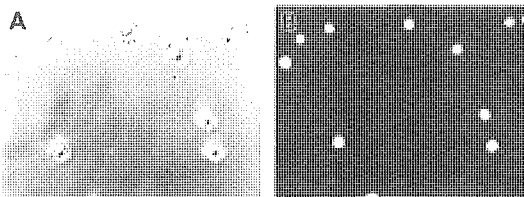


図 2. ED-1 抗体による免疫染色

A: 位相差像, B: 蛍光像

12. 免疫研究部

1. 研究部一年のあゆみ

平成2年4月、山元が部長として着任して以来、免疫生物学を基礎とした研究を続けて来た。平成3年4月には、松田義宏（大阪大学蛋白質研究所）を免疫異常研究室長に、また竹内 保（高知医科大学医学部）を組織培養研究室研究員に迎えた。平成2年度から研究に従事している松浦 靖（流動研究員）、葛原博幸（流動研究員）、田村浩男（研究生、10月から流動研究員）も引き続き参加した。新しい体制は総勢6人という少数ではあるが、免疫系細胞間相互作用のみにとどまらず、神経系の細胞間にみられる相互作用機構解明への新しいアプローチも開始した。客員研究員として、矢倉英隆（東京都神経科学総合研究所）、原 栄一（埼玉県がんセンター研究所）、古川昭栄（岐阜薬科大学）を迎え、共同研究を含め積極的な研究交流を行なった。また研究補助に松本まり子が参加した。

当研究部では、細胞間相互作用を介した免疫応答の細胞性機構の解明を基礎に、自己反応性リンパ球の出現機序を明らかにし、神経系をも巻き込む自己免疫性反応の発動機序の解析と、自己免疫疾患の予防・治療の方法を開発することを目標に研究をすすめている。本年度は免疫系の細胞間相互作用のうち、胸腺内でのTリンパ球分化に係わる分子についての研究が進んだ。あるT細胞クロンと、このクロンの増殖を支持する胸腺上皮細胞株の樹立に成功し、これら細胞間相互作用に係わる分子の同定ができた。現在これら分子の蛋白化学的解析と、遺伝子の単離を急いでいる。一方神経系では、神経系細胞に特異的なモノクロナル抗体の作成を試み、そのうちの1つはある種の神経細胞に特異的なものであることがわかった。この研究も、対応抗原の単離・精製、遺伝子解析を中心に神経生物学的意義を明らかにしてゆく計画である。

研究部新体制発足後まだわずかではあるが、あたらしいプロジェクトも徐々に成果が蓄積されはじめ、全員一丸となって研究に励んでいる。

（部長 山元 弘）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Numata S, Matsuura Y, Onishi S, Yamamoto Y, Ohno F, Tagoh H, Yoshizaki K, Fujimoto S, Yamamoto H :
Interleukin-6 positive follicular hyperplasia in the lymph node of a patient with rheumatoid arthritis
Am J Hematol, 36 : 282 - 284, 1991
- 2) Tamura H, Kuzuhara H, Hiramane C, Hojo K, Yamamoto H, Fujimoto S :
Proliferation of an athymic mouse-derived T-cell clone on thymic stromal cells with interleukin-2
Immunology, 74 : 265 - 270, 1991
- 3) Enzan H, Hiroi M, Saibara S, Onishi S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Hara H :
Immunoelectron microscopic identification of asialo GM1-positive cells in adult rat liver
Virchows Arch (B) 60 : 389 - 398, 1991
- 4) Tomoda T, Kurashige T, Moriki T, Yamamoto H, Fujimoto S, Taniguchi T :
Enhanced expression of poly (ADP-ribose) synthetase gene in malignant lymphom
Am J Hematol 37 : 223 - 227, 1991
- 5) Yang W-J, Matsuda Y, Sano S, Masutani H, Nakagawa H :
Purification and characterization of phytase from rat intestinal mucosa
Biochim Biophys Acta 1075 : 75-82, 1991
- 6) Yang W-J, Matsuda Y, Inomata M, Nakagawa H :
Developmental and dietary induction of the 90k subunit of rat intestinal phytase
Biochim Biophys Acta 1075 : 83-87, 1991
- 7) Takeuchi T, Barcos MP, Seon BK :
Monoclonal antibody SN10 which shows a highly selective reactivity with human B leukemia-lymphoma and is effectively internalized into cells
Cancer Res 51 : 2985-2993, 1991
- 8) Takeuchi T, Kubonishi I, Ohtsuki Y, Miyoshi I :
A new monoclonal antibody to human subcapsular epithelial cells

II 研究業績

Virchow Archiv [A]419 : 147 - 151, 1991

- 9) Kuzume T, Kubonishi I, Takeuchi S, Takeuchi T, Iwata J, Sonobe H, Ohtsuki Y, Miyoshi I :

Establishment and characterization of a thymic carcinoma cell line

(Ty-82) carrying t(15:19)(q15:p13) chromosome abnormality

Int J Cancer 50 : 259-264, 1991

b. 著 書

- 1) 山元 弘 :

抗イデオタイプ抗体の作製と検出法

新生化学実験講座, 第12巻, 分子免疫学Ⅲ, 東京化学同人, 東京, p 175 - 183, 1992

d. 班会議報告書

- 1) 山元 弘 :

マウス自己反応性B細胞クロンの長期培養

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班, 平成2年度研究報告書, p38-40, 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・平成2年度, 対がん10カ年総合戦略プロジェクト研究報告書, p173-175, 1991

- 3) 松田義宏, 中川八郎

ガングリオンド依存性タンパク質リン酸化の神経機能に対する役割

文部省科学研究費補助金・重点領域研究, ガングリオンド糖鎖情報の解読と細胞機能の制御研究班, 平成3年度研究成果報告書, p25-26, 1992

B. 学会発表

c. 一般学会

- 1) 田村浩男, 葛原博幸, 竹内 保, 松浦 靖, 松田義宏, 山元 弘 :

胸腺ストローマ細胞上での細胞増殖に関与するT細胞表面抗原の解析

第21回日本免疫学会総会, 1991年11月

- 2) 竹内 保, 久保西一郎, 田口博國, 園部宏, 大舩祐治, 三好勇夫 :

Hodgkin細胞に反応する単クローン抗体, 27-18の作成

第53回日本血液学会総会，1991年4月

C. 班会議発表

1) 山元 弘：

マウス自己反応性B細胞クロンの長期培養

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3年度研究発表会，東京，2. 27, 1991

3) 松田義宏：

PC12h細胞のNGF誘導性分化及びタンパク質リン酸化に対するガングリオシドの作用

文部省科学研究費補助金・重点領域研究，ガングリオシド糖鎖情報の解読と細胞機能の制御研究班，平成3年度班会議，東京，11. 21, 1991

II 研究業績

3. 主な研究報告

マウス未熟胸腺細胞上の新しい抗原—細胞間相互作用における役割—

田村浩男, 葛原博幸, 竹内 保, 松浦 靖, 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細胞レパートリー形成の細胞学的機構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樹立したTリンパ球クロン N-9F が胸腺間質細胞と直接接触することによって増殖応答を示すことを明らかにした。そこでこの細胞間相互作用に係わる分子を同定する目的で、このT細胞クロンをラットに免疫して、増殖応答を阻止するモノクロナル抗体の作製を試みた。

方法

ヌードマウス(BALB/c nu/nu)脾細胞由来T細胞クロン N-9F をSDラットに頻回免疫し、ラット脾細胞を常法に従いP3U1細胞と融合し、モノクロナル抗体(MoAb)産生株を樹立した。MoAbは次の4つの criteria に従いスクリーニングした。(1) N-9F を染めるもの、(2) 胸腺上皮細胞上での N-9F 増殖を抑制するもの、(3) 脾細胞、リンパ節細胞を染めないもの、また、(4) 胸腺細胞の大部分を染色するものは除外した。

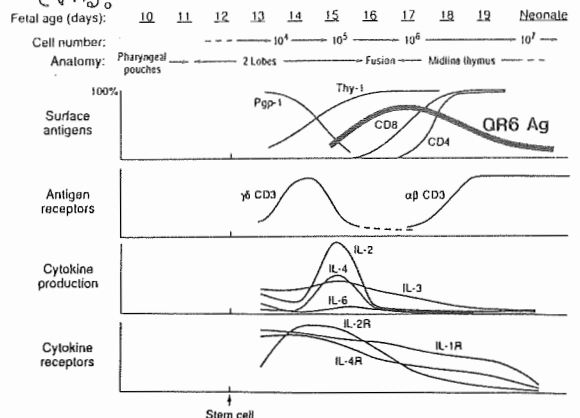
結果と考察

以上の criteria に合致する MoAb が6種類得られたが、そのうちで最も抑制活性の高いものについてクロン化し、QR6.6 MoAb を得た。QR6.6 は成マウス(約5週齢)の骨髄、脾臓、リンパ節細胞は染色せず、胸腺細胞の3-5%を染色するにとどまった。胸腺上皮との相互作用に係わる分子を検出しているものならば、もっ

と幼弱な時期の胸腺細胞を染色すると考え、新生児期から遡って、胎生期までの胸腺細胞の染色を試みた。新生児期では15-20%、胎齢16-17日では約70%を染め、胎齢14日では30-40%がQR6.6陽性であった。胸腺内で、T細胞はCD4⁻8⁻から一旦CD4⁺8⁺に分化し、次いでCD4⁺8⁻またはCD4⁺8⁺となり末梢へ流出する。従ってCD4⁻8⁻およびCD4⁺8⁺の時期を未熟胸腺細胞とよぶが、これらの時期にQR6.6抗原の発現はどのようになっているかを調べた。その結果、胎生期胸腺ではCD4⁻8⁻細胞の全てと、CD4⁺8⁺細胞の一部がQR6.6陽性であることがわかった。このことは、QR6.6抗原は胸腺細胞の最も未熟な時期に発現されていることを示唆した。

胸腺内でT細胞が分化成熟してくる過程で、様々な抗原がリンパ球上に発現される。これら既知の細胞表面抗原とQR6.6抗原との異同を調べたが、陽性細胞の分布から考え、QR6.6抗原は今まで知られていない新しい抗原(系)を検出していることがわかった。N-9F細胞膜成分を可溶化後¹²⁵I標識しQR6.6で免疫沈降したところ、分子サイズ100kdに特異的バンドが検出できた。またN-9F細胞膜成分をwestern blotしてQR6.6 MoAbで染色しても同一のバンドが認められた。

この100kd成分を生化学的に精製し、モルモットに免疫して抗血清を得た。これら精製標品のアミノ酸配列の決定、抗血清による発現ベクターのスクリーニング法を組合わせて、QR6.6対応抗原のcDNAクローニングを計画している。



マウス胸腺上皮細胞クローンの性状—未熟胸腺細胞との相互作用—

葛原博幸, 竹内 保, 田村浩男, 松田義宏, 山元 弘

胸腺内でのT細胞の分化・成熟過程には様々な微小環境が重要な役割を果たしている。胸腺上皮細胞、マクロファージ、樹状細胞等より成る非リンパ系細胞を総称して胸腺間質(thymic stroma)と呼ぶが、これら個々の細胞が単一の細胞群で、かつ単一の機能を果たしているか否かなどはほとんど未解明のまま残されている。T細胞の成熟過程の中でも、自己反応性細胞がどのような微小環境に支配されて消去されてゆくか(negative selection)、また消去されなかった細胞が成熟・分化を遂げる(positive selection)に必要な微小環境はいかなるものであるかを知ることは、自己免疫疾患の発症機序を知る上で極めて重要な課題である。このような多種の細胞が入り組んで形成する複雑な微小環境の役割を調べるためには、個々の細胞を単離した形での微分的解析が有用であると考えられる。当研究部では、ヌードマウス脾臓由来T細胞クローンの1つ(N-9F)が、胸腺間質細胞と直接的接触を介して増殖応答を示すことを明らかにした。そこで、N-9F T細胞の増殖を支持する細胞株を、胸腺間質から長期培養細胞株として単離することを試みた。

方法

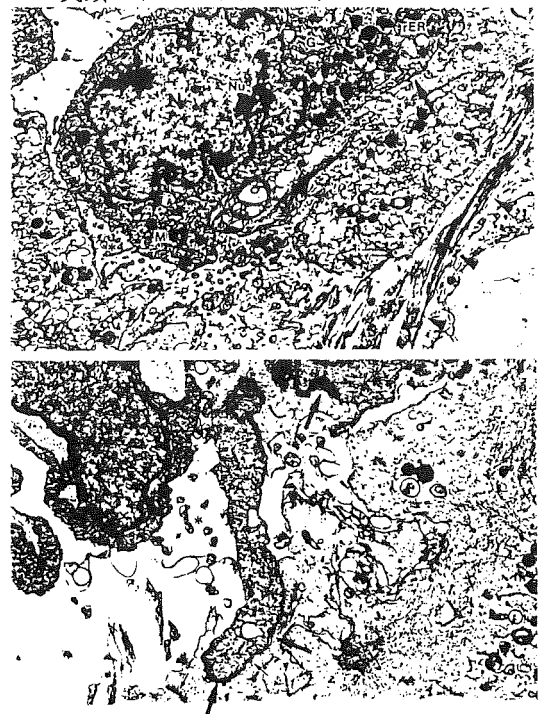
成マウス胸腺を細切後トリプシン処理して、EGF(epidermal growth factor)存在下にディッシュ付着性細胞の培養を続けた。培養数カ月後に single cell manipulation 法にてクローン化し、そのうちで N-9F の増殖を支持するクローンを選別し、最も活性の高いクローン SL10.3 を得た。SL10.3 は、組織化学的・電子顕微鏡的に形態学的観察を行なった。一方、SL10.3 をラットに頻回免疫し、常法に従ってモノクロナル抗体を作製した。

結果と考察

SL10.3 細胞は N-9F の増殖を支持したが、これが単に特殊な T細胞株のみに有効なものかどうかを調べる目的で、胎児期マウス胸腺細胞の増殖を支持するか否かを調べた。胎齢 17日の胸腺細胞は、SL10.3 上での増殖を示さなかったが、human recombinant IL-2 を共存させると有意な増殖応答を示した。この時期の胸腺細胞は IL-2 receptor を発現していること、また N-9F の胸腺間質上での増殖が IL-2 で増強される(既報)ことから、SL10.3 細胞は

未熟胸腺細胞の増殖応答に生理的にも係わっていることが示唆された。SL10.3 は、免疫組織化学的にはサイトケラチンが陽性であった。電子顕微鏡下では、デスモソーム・トノフィラメント・微絨毛が観察され、典型的な上皮系細胞であることが確認できた。N-9F の SL10.3 上での増殖を阻止する活性を指標にモノクロナル抗体をスクリーニングした。得られた抗体は、N-9F の増殖のみならず IL-2 存在下での胎児胸腺細胞の増殖も阻止したが胎児肝細胞(stem cells)の増殖には影響を与えなかった。これら抗体は 60kd の蛋白に反応することがわかった。これらの事実は、胸腺上皮上の 60kd 蛋白は未熟胸腺細胞と相互作用すること、60kd に対応する胸腺細胞上分子は胎児肝から胸腺内に移入して初めてその機能を発揮することを示唆する。現在、遺伝子クローニングも含めてこの蛋白のより詳細な解析を進めている。

図 SL10.3 の電顕写真。矢：デスモソーム、矢頭：トノフィラメント



13. 遺伝子工学研究部

1. 研究部一年のあゆみ

最大のイベントは研究棟本館への移転である。研究部発足以来、3年半程、実験動物センターに仮住いをしてきたが11月に本館へ移転した。動物センターでは1、2階に研究室が分かれていた上に動物飼育室を実験室としていたために不便であったが本館では実験室がまとまっており、又、研究の実態に即したレイアウトをしてあるために便利になったように思える。ハード面においては高水準の研究環境が得られたと喜んでいるが、移転直後にもかかわらず、研究室はぎっしりで新しい大型装置の設置や新規プロジェクトのためのスペースが全く無い状態となっており、将来を考えると憂慮すべき事態となっている。

1991年度は流動研究員としてバーモント大学より斉藤君、文部省の内地留学として東大教養の跡見助教授、科学技術庁の特別研究員として東大理学部より星美奈子さん、S T A フェローとして中国より李さん、藤沢室長の研究助手として八神貴子さん、研究生として東大第3内科より黒尾君が加わった。斉藤君は都神経研にスタッフの職を得て、10月に転出した。跡見助教授はcDNAの解析を試みたが難渋し、残念な結果となったが92年度より東大に戻り、ここでの経験を活かすこととなった。星さんは松崎室長のもとで神経高次機能の解析に取り組んでおり、黒尾君は高血圧モデルマウスの作成をめざしてトランスジェニックマウスをつくり、成果をあげつつある。李さんは中国から日本に来られてとまどっている様子で、しかも言葉や研究知識の面でもハンディがあるために大変とは思いますが早く日本に慣れることを期待したい。八神さんは癌研時代に研究助手として一緒にいた方で4月にスイスより帰国したばかりのところに電話をかけて来ていただいた。仕事にも慣れており、研究室全体を明るくしてくれる貴重な方である。

ショウジョウバエの神経形成、神経機能の解析を始めて3年目を迎え、松崎室長を中心に Prospero 遺伝子を分離し、その特徴的な発現を解析し、星野君、浜室長はほとんど動けない変異体の原因遺伝子の構造を明かにし、その機能の解明に全力をあげている。藤沢室長を中心に筋細胞分化の分子機構を特に MyoD family の機能にターゲットをあてて研究を行っている。転写制御因子としての MyoD family の機能の一部を明らかにし、個々の因子の性質を解明しつつある。いずれの領域も最も競争が激しい分野で苦しい戦いを強いられている。新しいことを1つずつ明らかにする気持ちでがんばっていきたいと考えている。

92年度は新しい研究室に移ったことでもあり、気持ちを新たにして研究に励み、良い成果が生まれることを期待したい。

(部長 鍋島陽一)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Matsuzaki F, Koizumi K, Hama C, Yoshioka T, Nabeshima Y :
Cloning of the *Drosophila prospero* Gene and Its Expression in Ganglion Mother Cells
Biochem Biophys Res Comm 182 : 1326–1332, 1992
- 2) Itasaki N, Ichijo H, Hama C, Matsuno T, Nakamura H :
Establishment of rostrocaudal polarity in tectal primordium : engrailed expression and subsequent tectal polarity
Development 113 : 1133–1144, 1991
- 3) Hanaoka K, Hayasaka M, Uetsuki T, Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y :
A stable cellular marker for the analysis of mouse chimeras : the bacterial chromophenicol acetyltransferase gene driven by the human elongation factor 1 α promoter
Differentiation 48 : 183–189, 1991
- 4) Piette J, Huchet M, Duclert A, Fujisawa-Sshara A, Changeux J, -p :
Localization of mRNA coding for CMD1, myogenin and the α - subunit of the acetylcholine receptor during skeletal muscle development in the chicken
Mechanisms of Development 37 : 95–106, 1992

b. 著書

- 1) Kornberg T, Hama C, Gay N.J, Poole S.J :
engrailed, A gene for all segments, *Molecular mechanisms in cellular growth and differentiation*
ed by Bellve A.R. and Vogel, H.J, Academic press, New York, 267–278, 1991
- 2) Nabeshima Y, Uetsuki T, Komiya T, Nabeshima Y, Asakura A, Hosoda Y, Fujisawa-Sehara A :
Transcriptional regulation of chicken myosin alkali light chain genes
Frontiers in muscle reseach, ed by Ozawa E, Masaki T, Nabeshima Y, Elsevier Science Publishers, Amsterdam 125–137, 1991

c. 総説

- 1) 浜千尋, 松崎文雄, 鍋島陽一 :

II 研究業績

ショウジョウバエ脳細胞の遺伝的標識

病態生理 10 : 270 - 279, 1991

2) 鍋島陽一, 植月太一, 鍋島曜子, 小宮透, 朝倉淳, 藤沢淳子 :

筋分化制御遺伝子の機能と遺伝子発現

代謝 28 : 367 - 374, 1991

3) 鍋島陽一 :

筋細胞分化を制御する遺伝子

BIO medica 6 : 1009 - 1014, 1991

4) 鍋島陽一 :

筋細胞の増殖と分化

Annual Review 神経 1992, 42 - 51, 1992

5) 藤沢淳子 :

細胞分化のモデルとしての筋分化

実験医学 発生分化から形態形成へ, 9 : 111 - 116, 1991

6) 鍋島陽一, 植月太一, 小宮透, 朝倉淳, 鍋島曜子, 下条桂樹, 藤沢淳子 :

筋細胞における遺伝子発現

実験医学 発生分化から形態形成へ, 9 : 117 - 122, 1991

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群の機能の解析

文部省重点領域, 細胞特異性を規定する転写制御因子, 研究班

平成3年度研究成果報告書, 54 - 55, 1992

2) 鍋島陽一 :

筋細胞分化制御因子の機能の解析

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3年度研究報告書 120 - 124, 1992

3) 鍋島陽一 :

中枢神経系の発症, 構築に関与する遺伝子

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

平成3年度研究報告書 57 - 61, 1992

B. 学会、シンポジウム

a. シンポジウム

1) 鍋島陽一 :

中枢神経系の発生異常をもたらす遺伝子

遺伝研研究集会, ショウジョウバエ遺伝学の新展開, 三島, 8. 2, 1991

2) Nabeshima Y, Uetsuki T, Nabeshima Y, Kamijo K, Asakura A, Fujisawa-Sehara A :

Positive and negative gene regulation in muscle

S.E.B.Symposium on Molecular Biology of Muscle, Birmingham, Sep.11, 1991

3) 松崎文雄, 鍋島陽一 :

中枢神経の分化

第14回日本分子生物学会年会, ショウジョウバエ分子生物学による生体高次機能解析, 福岡,
12. 20, 1991

4) 鍋島陽一 :

筋細胞分化の分子機構-筋分化制御因子の機能

大阪大学蛋白研究所セミナー, 筋肉の発生と分化の分子的解析, 大阪, 1. 30, 1992

5) Hama C, Hoshinno M, Matsuzaki F, Nabeshima Y :

Molecular analysis of the H101 gene that may be required for locomotion activity of Drosophila

Second United States-Japan Workshop on New models in the life sciences NIH,
Bethesda,, May 16, 1992

6) Matsuzaki F, Hama C, Nabeshima Y :

The role of the novel homeo-box gene on the neurogenesis of Drosophila

Japanese-German Joint Workshop on Molecular Approach to Neurological Disorders,
Hamburg, March 20, 1992

b. 国際学会

1) Matsuzaki F, Koizumi K, Hama C, Nabeshima Y :

Molecular characterization of prospero locus

Molecular Neurobiology of Drosophila, Cold Spring Harbor, Sept 25, 1991

2) Hoshino M, Hama C, Matsuzaki F, Nabeshima Y :

Molecular analysis of P-element insertion mutation which strongly reduces locomotor

II 研究業績

activity

33rd annual Drosophila Research Conference, Philadelphia March 13, 1992

c. 一般学会

1) 浜千尋, 小宮透, 星野幹雄, 鍋島陽一 :

ショウジョウバエ脳の発生過程における engrailed 遺伝子の発現と調節

第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12. 20, 1991

2) 星野幹雄, 浜千尋, 松崎文雄, 鍋島陽一 :

中枢神経系の異常による活動性の低いショウジョウバエ突然変異 hikaru genki の分離とその分子遺伝学的解析

第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12. 17, 1991

3) 鍋島曜子, 藤沢淳子, 小宮透, 植月太一, 朝倉淳, 鍋島陽一 :

筋分化制御因子群によるミオシン軽鎖遺伝子群の転写誘導

第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12. 20, 1991

4) 上条桂樹, 藤沢淳子, 鍋島陽一 :

筋分化因子とステロイドホルモンレセプターとのキメラ蛋白質による筋分化の誘導的発現系

第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12. 20, 1991

5) 斎藤修, 藤沢淳子, 鍋島陽一, Periasamy M :

発生に伴う筋分化制御因子の発現変化

第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12. 20, 1991

6) 跡見順子, 植月太一, 鍋島曜子, 藤沢淳子, 鍋島陽一 :

ミオシンアルカリ軽鎖遺伝子の転写調節領域MLC box と筋分化誘導因子とのかわり

第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12. 20, 1991

7) 藤沢淳子, 朝倉淳, 鍋島曜子, 八神貴子, 鍋島陽一 :

筋分化誘導因子 myogenin 遺伝子の発現制御機構

第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12. 20, 1991

8) 朝倉淳, 藤沢淳子, 鍋島曜子, 横田崇, 鍋島陽一 :

特異性の異なる転写因子群としての MyoD family

第14回日本分子生物学会年会, 福岡, 12. 20, 1991

c. 班会議発表

1) 鍋島陽一 :

筋分化制御因子群によるミオシン軽鎖遺伝子群の転写誘導

文部省重点領域，細胞特異性を規定する転写制御因子研究会議，東北大，9. 20, 1991

2) 鍋島陽一：

エンハンサートラップ法の応用を含む神経高次機能解析系の開発

科学技術庁科学技術振興調整費，新しい動物実験系開発のための基盤技術の開発研究班，
第1回班会議，東京，10. 1, 1991

3) 鍋島陽一：

神経系の発生，構築に関する遺伝子

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，
平成3年度班会議，東京，12. 2, 1991

4) 鍋島陽一：

筋分化制御因子の機能の解析

厚生省精神神経疾患，筋ジストロフィー研究第1，第5合同班会議，東京，12. 5, 1991

5) 松崎文雄，鍋島陽一：

遺伝学的手法を用いた神経系機能分子

厚生省長寿科学総合研究費ヒューマンゲノムプロジェクト遺伝性神経疾患の遺伝性神経疾患の遺
伝子解析に関する研究班，第一回班会議，東京，2.14, 1992

6) 鍋島陽一：

筋分化制御因子の機能の解析

文部省科学研究費総合（A）筋形成の分子機構研究班，
平成3年度班会議，東京，2. 22, 1992

II 研究業績

3. 主な研究報告

筋分化制御因子とステロイドホルモンレセプターとのキメラ蛋白質による筋分化の誘導系

上条桂樹, 藤沢淳子, 鍋島陽一

現在までに MyoD, myogenin などの数種類の遺伝子が, 未分化中胚葉系培養細胞を筋細胞へ分化させる筋分化制御因子として同定されている。これらの因子は myc蛋白質などとホモロジーを有するbasic domain とHelix-Loop-Helix domainを持つ遺伝子ファミリーに属し, 骨格筋特異的遺伝子の転写活性化因子として働くDNA結合蛋白質である。

一連の骨格筋の分化過程において, 複数存在するこれらの筋分化制御因子がそれぞれどのような役割を担っているかは重要な課題である。しかしながら, 筋分化制御因子を発現させた stable transfectant細胞では他の筋分化制御因子の転写が活性化されるため, すでに筋芽細胞としての形質を有しており分化過程, 特にその初期段階の解析には不都合である。

そこで, 2つの筋分化因子MyoDとmyogeninについて, ステロイドホルモン受容体の1つであるグルココルチコイドレセプターのホルモン結合部位とのキメラ遺伝子を作成し, 線維芽細胞株(C3H10T1/2)で発現させることにより, 未分化形質を維持し, ホルモンにより筋分化が誘導される細胞系の作成を試みた。グルココルチコイドレセプターのリガンド結合部には, ホルモンに依存した核への極在化シグナルとレセプターの結合する遺伝子の転写を活性化する領域が含まれている。したがって, 筋分化因子とグルココルチコイドレセプターのキメラ蛋白質はホルモンに依存して, 核へ移行し, 筋特異的遺伝子を活性化することが期待される

<方法>

MyoDおよびmyogeninのC-末端側にグルココルチコイドレセプターのリガンド結合部(GR)を有するようなキメラ蛋白質(MyoD/GR, myogenin/GR)をコードするようなcDNAをヒトのエロンゲーションファクター(EF-1 α)のプロモーターの下流につないだ発現ベクターを作製した。これらと骨格筋特異的発現をするレポーター遺伝子とをC3H10T1/2に導入しtransientな発現を解析した。また発現ベクターとpSV2neoとをC3H10T1/2細胞にco-transfectし, Geneticin(G418)で選択した。G418耐性のクローンを筋分化制御因子の抗体でウエスタンブロッ

ティングによりスクリーニングしキメラ蛋白質を発現している細胞クローンを得た。

<結果, 考察>

myogenin/GR, MyoD/GRキメラ蛋白質の発現ベクターを筋特異的に発現する遺伝子の1つであるmyogenin遺伝子の転写開始部位の上流約4kbまでを含むレポータープラスミド(下流に大腸菌CATの構造遺伝子を持つ)とC3H10T1/2細胞にco-transfectし, 1 μ Mのデキサメサゾンの有無のもとで, そのCAT活性を調べた。MyoD/GRおよびmyogenin/GRはグルココルチコイドホルモンに依存してmyogenin遺伝子を活性化した。

G418 耐性のキメラ蛋白質を発現している stable transfectantの細胞クローンは分化培地中で培養するとデキサメサゾン存在下では融合したが, デキサメサゾンを加えない場合は融合しなかった。また骨格筋特異的蛋白質に対する抗体を用いた蛍光抗体法で, 融合した細胞は染色された。こうしたことから, キメラ蛋白質を発現するこれらの細胞クローンは, グルココルチコイドホルモンに依存して筋細胞へ分化することがわかった。

細胞分画によりキメラ蛋白質の極在を検討すると, キメラ蛋白質はホルモンに依存して細胞質から核に移行することが示された。

マウスのクレアチンキナーゼのエンハンサーを Herpes simplex ウイルスのチミジンキナーゼプロモーターの上流につないだプラスミドやマウスのmyogenin遺伝子の転写開始部位から上流4kbまでを含むプラスミドをレポーターとしてキメラ蛋白質を発現している細胞に導入しCAT活性を調べるとデキサメサゾンによる, これら筋特異的遺伝子の転写活性の誘導が認められた。

以上より, 筋分化因子とグルココルチコイドレセプターのリガンド結合部のキメラ蛋白質をコードする発現ベクターを用いて, グルココルチコイドホルモンの添加により, はじめて筋分化の過程が活性化される誘導的発現系が確立された。本系は未分化中胚葉系細胞から筋細胞へ至る, 一連の発生過程のよいモデルとなると考えられる。特に, 今まで解析の困難であった, 骨格筋分化機構の初期の段階の解析に有用であると思われる。

神経発生に関わるショウジョウバエ H101 遺伝子の分子生物学的解析

星野幹雄(新潟大学脳研), 浜 千尋

神経発生は神経細胞の分化、軸索の伸長とその標的細胞への経路発見、そしてシナプス形成と複数の段階を経て成立している。これらのいずれの過程の欠損も神経回路の機能に異常をもたらすことが予想される。われわれは神経発生、特に軸索伸長以後の発生の機構を明らかにすることを目的として、ショウジョウバエを材料に用いて活動性の低下した変異体を分離し、その原因となる新しい遺伝子 *H101* の分子生物学的解析を行ってきた。その結果、*H101* 遺伝子は中枢神経系で特異的に発現することが明らかとなり、また塩基配列から新しいタイプの分泌性蛋白質をコードしていることが予想された。

<結果>

エンハンサートラップ法によって作製した1100株の系統をスクリーニングすることにより、動きの非常に悪い系統 *H101* 株を見いだした。こ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。この原因となる遺伝子の活性がなくなった *amorph* 変異を分離したところホモ接合体の1-2%が成虫まで育つが殆どの個体が発生途上で死ぬことがわかった。神経系における形態異常は今のところ認められていない。

H101 遺伝子の cDNA を成虫頭部のライブラリーよりスクリーニングしたところスプライシングの違いによる4種の異なったタイプのDNAクローンが得られた。これらがコードする蛋白質の共通した特徴的な構造として、まずN端に分泌に必要な疎水性のシグナル配列があり、順に、インテグリンに

よって認識されうる RGD 配列、I gドメイン、補体結合モチーフの3ないし4個の繰返しが存在する。さらにN-グリコシルーションを受け得る配列が全体で7つ存在する。また、N端の半分は電荷を持つアミノ酸に富む一方、全長にわたり膜貫通領域は認められなかった。以上の特徴は、*H101* 蛋白質が分泌性であることを示唆している。

H101 遺伝子の mRNA は胚から成虫にかけて発現しており、成虫では特に頭部に多量に存在する。*in situ hybridization* により胚での mRNA の局在を調べてみると脳および腹部神経節の限られた細胞で特異的に発現していることが判り、この遺伝子が確かに神経系で機能することが明らかとなった。

<考察および展望>

H101 遺伝子が神経の発生あるいは機能に関与しているのかは未だ結論を得ていない。しかし、cDNA を heat shock promotor の制御下で発現させて変異株の復帰実験を行ったところ、蛹の時期に heat shock したのち羽化した成虫の活動性および生存期間は野生型に近付いたのに対し、成虫時に heat shock した個体に顕著な変化は認められなかった。このことは *H101* 遺伝子が神経発生に関与していることを示唆している。今後は抗体を作成して *H101* 蛋白質の局在を調べると共に変異株における神経系の異常を詳細に解析していく。また、培養細胞に導入して細胞レベルでの解析を進める。*H101* 蛋白質と相互作用する因子を遺伝的に調べる。さらに哺乳動物などで類似の遺伝子を探索していく予定である。

ショウジョウバエ神経前駆細胞の分化調節因子 *prospero* の解析

松崎文雄, 浜 千尋, 鍋島陽一

研究の目的

中枢神経系を構成する神経細胞は、驚くべき多様性を示すが、ショウジョウバエの場合、分化した神経細胞の個性を決めるのは、主に神経芽細胞の生まれた”位置の情報”であると考えられている。しかし、個々の細胞の発生を追うと、神経芽細胞が分裂を繰り返し、神経母細胞を生み、さらに神経細胞へと分裂するという共通の過程をたどる。この様に神経細胞が共通な発生プロセスをたどりながら、多様性を獲得する機構についてはほとんど解っていない。

本研究では、前駆細胞の段階で神経細胞の分化に関わる *prospero* 遺伝子を中心に、神経系の発生と分化の遺伝子支配を明らかにすることを目的とする。

背景

エンハンサートラップ法を用いて、中枢神経系の初期発生に参与する遺伝子を検索し、劣性致死変異 *prospero* を見いだした。この遺伝子の欠失した変異個体は胚発生時に神経発生に異常をきたし、死に至る。ある特定の神経細胞の発生過程を調べると、その形質の決定に関わる遺伝子が発現せず、神経線維も誤った方向に伸びることが観察される。従って、この遺伝子は神経細胞の正常な分化に必要なものである。

前年度までに、我々は *prospero* 遺伝子をクローニングし、全長約 6 kb の cDNA の塩基配列を決定した。この塩基配列から

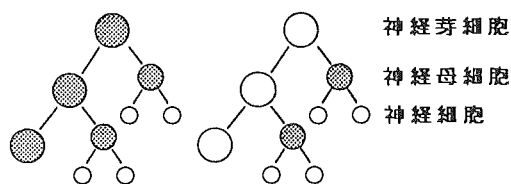
prospero 遺伝子産物は 1403 アミノ酸からなり、転写因子に特徴的なアミノ酸配列ホメオドメインを持つと予想される。

結果と考察

この遺伝子の mRNA は中枢、及び、末梢神経系のほとんど全ての前駆細胞で発現し、神経細胞に分化すると速やかに消失する。従って、*prospero* は神経前駆細胞でひろく機能する遺伝子である可能性が高い。そこで、この可能性を検討するために、予想される *prospero* 蛋白質のアミノ酸配列に対する抗体を作成し、胚発生時における *prospero* 蛋白質の発現パターンを調べた。驚くべきことに、神経母細胞のみで *prospero* 蛋白質が検出され、転写後の何らかの調節により *prospero* 蛋白の発現が 2 次前駆細胞に特定されている可能性が高い。*prospero* 変異個体で見られる遺伝子発現の異常が全て神経母細胞の段階を境に起こることからも、*prospero* 蛋白は 2 次前駆細胞の分化を支配する新しいクラスの分化調節因子であると考えられる。

POST-TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF PROSPERO EXPRESSION

pros transcript *pros* protein



Myogenin遺伝子の単離とその発現制御機構

藤沢淳子, 八神貴子, 鍋島陽一

序論

これまでにそのcDNAが単離された4つの筋分化誘導因子MyoD, myogenin, Myf-5, MRF4は、それらの発現によって繊維芽細胞などの非筋細胞を筋芽細胞に質的に変化させること、さらにその分子機構として、多くの筋特異的に発現する遺伝子を直接的に活性化することがあきらかにされてきた。これらの遺伝子が胚発生の過程でどのように活性化、調節されるのか、またそれぞれどのような役割を果たし、どの様に連関しているのかを明らかにすることは、筋分化を理解する上でのひとつの大きな課題であろう。Myogeninは、胚の体節でその強い発現がみられ、また他の三つと違って、報告されているかぎり全ての樹立筋芽細胞株で発現が誘導されることなどから、骨格筋の分化に重要な位置を占める遺伝子であろう。本研究は、筋分化機構を理解する一つのアプローチとして、myogenin遺伝子に焦点をあてて、細胞及び個体レベルでその発現機構を解析しようとするものである。

結果

1) マウス myogenin 遺伝子の単離

まず、マウス genomic library から、すでに我々の単離したマウスmyogeninのcDNAをプローブに用いて、その遺伝子を単離した。Myogenin遺伝子は3つのexonからなり、4つの誘導因子に共通に見られるいわゆるbasic-helix-loop-helix domainと、保存されているもうひとつのdomainはそれぞれexon Iとexon IIIにみられた。

2) Myogenin 遺伝子のリポーター遺伝子の作成とその筋細胞特異的な発現

個体レベルではMyogenin遺伝子は、体節で活性化される。細胞レベルにおける発現の特徴は、筋芽細胞特異的に転写されること、多くの場合、増殖の抑制にともなって転写誘導がひきおこされること、MyoDなどの筋分化誘導因子によって転写が活性化されることなどである。これら、個体レベルおよび細胞レベルにおける発現制御機構を知る目的でmyogenin遺伝子の転写と同様の制御をうけるリポーター遺伝子の作成を試みた。chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝子を用い、myogenin遺伝子の転写開始部位を含む上流4 kb とのキメラ遺伝子を作成し(pMGCAT(-4kb)), aza-myoblasts (10T1/2細胞を5'-aza-cytidine処理して得られた樹立筋芽細胞) およびもとの10T1/2繊維芽細胞にtransientに導入し、pMGCAT(-

4kb)が筋細胞特異的な発現を示すことを確かめた。

3) 10T1/2細胞の5'-aza-cytidine処理によるpMGCAT(-4kb)の転写活性化

では、このリポーター遺伝子の転写は、10T1/2細胞の5'-aza-cytidine処理によってどのように活性化されるだろうか。それを知る目的で、10T1/2細胞にpMGCAT(-4kb)を導入したtransformantsを24時間5'-aza-cytidine処理した後、CAT活性の経時変化を調べた。その結果、筋管細胞の出現する少し前の、5-6日目に活性化された。その活性化のメカニズムについては今後検討していきたい。

4) 筋芽細胞における、pMGCAT(-4kb)の血清枯渇による転写活性化

このリポーター遺伝子を、MyoD 或は myogenin の発現ベクターとともに10T1/2細胞に導入し、生じた筋芽細胞におけるCAT活性をしらべると、大部分のmyogeninのtransformantsでは、血清濃度の低下にともなうCAT活性の誘導が見られ、それに対して、MyoDのtransformantsではconstitutiveな発現が見られた。そのようリポーター遺伝子の発現は、内在性のmyogenin遺伝子の転写レベルを、ほぼ反映していた。

5) リポーター遺伝子のMyoDとMRF4による活性化
最初に述べたように、何れの筋分化誘導因子を発現させたtransformantでもmyogenin遺伝子が活性化されることから、myogenin遺伝子はauto-regulationおよびcross-regulationをうける遺伝子であることが知られている。そこで、リポーター遺伝子がこのような発現調節をうけるかどうかを知るために、リポーター遺伝子をMyoD, myogenin, あるいはcMRF4の発現ベクターとともに10T1/2細胞にtransientに導入し、そのCAT活性を測定した。その結果、リポーター遺伝子はMyoDおよびcMRF4によって強く活性化されること、それに対してmyogenin自身では殆ど活性化されないことが示された。

結論

- 1) マウスmyogenin遺伝子を単離した。
- 2) Myogenin遺伝子上流とCAT遺伝子の融合遺伝子を作成し、これが細胞レベルで、ほぼmyogenin遺伝子自身の発現と同じ調節を受けるリポーター遺伝子であることをいろいろな角度から確認した。
- 3) Myogenin遺伝子の転写は、MyoD及びMRF4によって活性化されることをあきらかにした。

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モデルとなる疾患動物を開発したり、ウイルス感染や、遺伝子および胚操作技術を応用して疾患モデル動物を作製し、病因の解明や治療法の確立を目指している。

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。本年度行われた研究は以下の通りである。

1) 遺伝子導入によるマウス細胞の標識化

マウス胚幹細胞は未分化な細胞で、その多能性や全能性を利用して培養下で遺伝子操作を加え、人為的に個体を作製できるため、世界的に使われ始めている。昨年度CAT遺伝子によりキメラマウス個体内における細胞の標識を可能にしたのに続き、本年度は細胞核を選択的に標識する方法を検討している。

2) 自然発症ミュータントの特性解析

GADマウスは脊髄神経節細胞の中枢および末梢端より逆行性の軸索変性を示す。本年度は老齢マウスの中枢神経系を病理形態学的に検索し、GADマウスの胸髄 Clarke 核にみられる軸索変性と同様の病変を観察した。Myotonia quailの浅胸筋は電気生理学的にミオトニー反応を示すことが明かとなり、形態変化との関連性を調べている。

3) ウイルスの神経親和性

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。昨年度はワクシニアウイルスをベクターにしてS蛋白cDNAを培養細胞で発現させたが、本年度はウイルス感染による細胞融合活性について組換えワクシニアウイルスの系を使って解析した。

人事の交流は以下のようなものである。流動研究員は藤原純(3,6/1-4,1/31)、久保英幸(3,7/1-), センター研究員は花岡美智子、菊地寿枝(3,4/12-)である。賃金助手は、志鎌昌子、北嶋しげみ(-4,3/30)、赤間和子(3,6/1-), 岡野美佐子である。併任研究員は山内一也(東大医科研)、榊佳之(東大医科研)、田内雅規(厚生省リハセンター)、三木清史(名大農)、客員研究員は浅利将男(麻布大)、渋谷徹(食薬センター)、渡辺里仁(創価大)に協力を頂いた。外来研究員は山崎一斗(エーザイ)、田口正敏(エイズ財団)である。その他、研究生として水谷誠(日生研)、臼杵扶佐子(鹿児島大医)、研究見習生として市原伸恒(麻布大)が参加した。(以上所属敬称略)。

(部長 菊池建機)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Yamazaki K, Kobayashi A, Kumazawa A, Wakabayashi T, Kikuchi T :
Axonal degeneration in the central nervous system of gracile axonal dystrophy (GAD) mice progresses like in human spinocerebellar ataxia
Biomed Res 12 : 143 – 148, 1991
- 2) Yamazaki K, Kikuchi T :
Distribution of spheroids in the CNS of gracile axonal dystrophy (GAD), an ataxic mutant mouse
Brain Pathol 1 : 318, 1991
- 3) Hanaoka K, Hayasaka M, Noguchi T, Kato Y :
The stem cells of a germ cell derived teratocarcinoma have the ability to form viable chimeras
Differentiation 48 : 83–87, 1991
- 4) Hananoka K, Hayasaka M, Uetsuki T, Fujisawa A, Nabeshima Y :
A stable cellular marker for the analysis of mouse chimeras : Bacterial chloramphenicol acetyl transferase gene driven by the human elongation factor1a promoter
Differentiation 48 : 183 – 189, 1991
- 5) Matsubara Y, Watanabe R, Taguchi F :
Neurovirulence of six different murine coronavirus JHMV variant for rats
Virus Res 20 : 45–58, 1991
- 6) Sawai S, Shimono A, Hanaoka K, Kondoh H :
Embryonic lethality resulting from disruption of both N-myc alleles in mouse zygotes
New Biologists 3 : 861 – 869, 1991

b. 著書

- 1) Hanaoka K :
Use of a transgene as a stable cellular marker for the analysis of mouse chimeras
Molecular basis of neural connectivity, ed by Satake S, Obata K and Hatanaka H, Kohko-Do, Niigata, p27–29, 1992

II 研究業績

c. 総説

1) 花岡和則 :

キメラ解析のための新しい導入遺伝子マーカー

実験医学 羊土社, 東京, p16-21, 1991

d. 班会議報告書

1) 菊池建機, 田口文広 :

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。

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

平成2年度研究報告書 p27-30, 1992

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班,

平成2年度研究報告書 p5-7, 1992

3) 菊池建機, 山崎一斗, 小田建一郎 :

神経軸索ジストロフィーの動物モデル-GADマウス

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班,

平成2年度研究報告書 p17-24, 1992

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 菊池建機 :

疾患モデル動物-神経疾患GADマウスをめぐって-

東京都神経研セミナー, 3.5, 1992

b. 国際学会

1) Oda K, Endo C, Yamazaki K, Kikuchi T, Shibasaki H :

Gracile axonal dystrophy (GAD) mouse : Degeneration and regeneration of motor nerve terminals

8th Asian Oceanian Congress of Neurology, Tokyo, Sep 1-6, 1991

2) Yamazaki K, Kikuchi T :

Distribution of spheroids in the CNS of gracile axonal dystrophy (GAD), an ataxic

mutant mouse

4th annual meeting Soc. Exp. Neuropatho, Seattle, Sept, 28-29, U.S.A, 1991

c. 一般学会

- 1) 小田健一郎, 菊池建機, 山崎一斗, 柴崎浩 :
運動ニューロン dying-back 変性の機序: 軸索変性マウス (GAD) の電顕, 組織化学的観察
第32回日本神経学会総会, 東京, 5. 24, 1991
- 2) 小田健一郎, A.P.Chandran,, 遠藤智代子, 菊池建機, 山崎一斗, 柴崎浩 :
運動ニューロン再生軸索を起源とする刺激誘発性反復筋放電: 軸索変性マウス (GAD) の筋電図,
組織学的研究
第32回日本神経学会総会, 東京, 5. 25, 1991
- 3) 秦有紀, 落合謙哉, 御領政信, 板倉智敏, 水谷誠, 菊池建機 :
ウズラ LWC 系の胸筋に認められた筋緊張性ジストロフィー様変化に関する形態学的研究
第 111 回日本獣医学会, 東京, 4. 5, 1991
- 4) 山田靖子, 矢部美機子, 田口文広 :
マウス肝炎ウイルスの PCR 法による検出
第 112 回日本獣医学会総会, 岐阜, 10. 3, 1991
- 5) 久保英幸, 高瀬明, 田口文広 :
マウス肝炎ウイルス c12 変異株の S 蛋白に対するモノクローナル抗体の中和活性及び細胞融合抑制活性について
第 112 回日本獣医学会総会, 岐阜, 10. 3, 1991
- 6) 田口文広, 池田敏夫, 久保英幸, 志田寿利 :
神経病原性マウス肝炎ウイルス S 蛋白遺伝子の単離と組換えワクシニアウイルスによる発現
第 112 回日本獣医学会総会, 岐阜, 10. 3, 1991
- 7) 田口文広, 志田寿利 :
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
第39回日本ウイルス学会総会, 福岡, 10. 23, 1991

C. 班会議発表

- 1) 白杵扶佐子, 樋口逸郎, 加塩信行, 石浦章一, 菊池建機 :
糖尿病Ⅱ型ウズラの病態生理-培養系における発現-

II 研究業績

厚生省精神・神経疾患研究・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班，東京，12. 4, 1991

2) 菊池建機，水谷誠，小田健一郎，菊地寿枝：

Myotonic quailの胸筋にみられる形態変化

厚生省精神・神経疾患研究・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班，東京，12. 4, 1991

3) 小田健一郎，遠藤智代子；菊池建機，山崎一斗，若林康夫：

筋内神経の変性・再生機序の基礎的研究（3）運動神経終末の変性・再生現象の定量化－GADマウスB12投与実験－

厚生省精神・神経疾患研究・ニューロパチーの臨床と病態に関する研究班，東京，1. 23, 1992

4) 田口文広，菊池建機：

神経親和性マウスコロナウイルスS蛋白の組換えワクシニアウイルスによる発現

厚生省精神・神経疾患研究・遺伝子解析による神経疾患発現機構に関する研究班，東京，12. 2, 1991

5) 花岡和則：

mdxマウス由来胚幹細胞株の樹立及びその利用

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー発症の細胞生物学的基礎研究班，東京，12. 4, 1991

6) 花岡和則：

全能性胚幹細胞の維持操作技術について

科学技術庁発生工学の開発に関する研究班全体班会議，東京，10. 7 - 8, 1991

3. 主な研究報告

外来遺伝子の導入による細胞核の標識化

花岡和則, 早坂美智子

マウス胚幹細胞を利用した遺伝子機能の解析や新しい疾患モデル動物の作成などの研究が近年急速に進展している。胚幹細胞はマウス胚の中に導入すると、宿主胚細胞と混じり合いながら発生しキメラマウスとして誕生する。キメラマウスを用いた解析を行ううえで宿主胚細胞と外から注入された胚幹細胞を見分けることが必要である。我々は、この問題を解決するための一つの方法として、個体のあらゆる細胞で普遍的に発現する外来遺伝子を胚幹細胞株やマウス受精卵に導入することにより一方の細胞群を人為的に標識化することを目的として研究を行っている。今までに、ヒトペプチド進展因子プロモーター(EF1 α)がマウス個体内の普遍的な発現を保証するプロモーターとして有用であり、本プロモーターにクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を導入したプラスミド(pEF321CAT)を細胞標識マーカーとして用いることができることを報告した。本年度は、核移行シグナルをさらに付け加えることにより細胞の核を選択的に標識する方法を開発したので報告する。

方法：導入に用いたプラスミドpEFNlacZは、普遍的発現のためのヒトEF1 α プロモーター、大腸菌由来核移行シグナル、レポーター遺伝子として用いた大腸菌 β -ガラクトシダーゼ(lacZ)遺伝子を連結したものである。本プラスミドの胚幹細胞への導入には磷酸カルシウム法を用いた。レポーター遺伝子(lacZ)活性の検出には、X-Galを用いた組織化学的方法を用いた。

[結果及び考察]

1) 未分化な胚幹細胞における本プラスミドの発現を調べるために、pEFNlacZとpST-neoBをco-transfectし、G418を含む選択培地で培養した。生き残った胚幹細胞をX-Galで活性染色したところ、いくつかの胚幹細胞クローンにおいて、増殖中の胚幹細胞の全ての核が選択的に染色されていることが判明した。2) これらの細胞株を用いてマウス胚とのキメラを作成し、キメラ胚の発生過程での発現を組織化学的に検出した。多数のキメラ胚およびキメラマウスの解析により、本プラスミドがあらゆる組織で発現していることを示唆する結果が得られた。

3) 昨年度報告したmdxマウス由来胚幹細胞株を本プラスミドにより標識し、mdxマウスの筋発生過程の解析を行う研究および本プラスミドを導入したトランスジェニックマウスの作成が現在進行中である。

[文献]

Hanaoka, K., Hayasaka, M., Uetsuki, T., Fujisawa, A and Nabeshima Y: Differentiation, 48, 183-189

神経病原性マウス肝炎ウイルス JHM 変異株 c1-2S 蛋白の細胞融合活性に関する研究

田口 文広

マウス肝炎ウイルス (MHV) の S 蛋白は、ウイルス粒子表面に存在する長さ約 20 nm のコロナ様突起を構成する分子量 15-18 万の糖蛋白である。S 蛋白は、MHV 感受性細胞表面に存在するリセプターへの結合、合胞性巨細胞形成能 (細胞融合活性) など MHV の持つ生物活性を担っている。また、S 蛋白は、感染動物の抗体及び細胞性免疫の主要な標的蛋白である。そのほかに、S 蛋白には動物に対する病原性を決定する部位があることも示唆されている。我々は神経病原性 MHV-JHM 変異株 c1-2¹⁾ の神経病原性²⁾ を、分子レベルで明らかにする目的で、c1-2 株の S 蛋白について研究を行ってきた。分離した c1-2 S 蛋白 cDNA の塩基配列から、c1-2 の S 蛋白は、1376 個のアミノ酸からなり、神経病原性を示さない sp-4 株と比べて、141 個のアミノ酸挿入部位があることが明らかになった³⁾。この挿入部位は単クローン抗体を用いた実験から、ウイルスの吸着に関係のある部位であることが示唆されている。

S 蛋白のいくつかの生物活性のなかで細胞融合活性は、神経病原性との関連性が示唆されているが、活性部位に関しては、詳細なことは明らかにされていない。S 蛋白による細胞融合活性は、分子中程に存在する塩基性アミノ酸配列 Arg-Arg-Ala-Arg-Arg の C 末端側が、細胞由来のトリプシン様蛋白分解酵素で開裂されることにより、始めて活性化されると考えられている。我々は、神経病原性 c1-2 株の S 蛋白 cDNA を分離し、アミノ酸配列を調べた結果、c1-2 S 蛋白にも Arg-Arg-Ala-Arg-Arg の塩基性アミノ酸のクラスターが存在し、更にこの c1-2 S 蛋白 (wt S 蛋白) を組換えワクシニアウイルスを用いて発現することにより、この S 蛋白は開裂性であり、細胞融合活性も保持していることが明かとなった。そこで、S 蛋白の開裂が細胞融合活性に必須かどうかを知る目的で c1-2 S cDNA を用いて *in vitro* mutagenesis により、アミノ酸配列 Arg-Arg-Ala-Arg-Arg から Arg-Thr-Ala-Leu-Glu になるように操作し、その変異 S 蛋白を組換えワクシニアウイルスを用いて、培養細胞で発現し、細胞融合活性を検討した。wt S 蛋白遺伝子を持つ RVV を RK13 細胞に 2-3 PFU/細胞で感染させると、

感染後約 15 時間から、wt S 蛋白を発現する RVV 感染細胞で細胞融合が観察された。その後、約 12 時間で細胞融合は殆ど統べての細胞におよんだ。細胞融合が観察された感染後 24 時間の時点で、RVV 感染 RK13 細胞内には、免疫沈降法及びウエスタンブロット法により、分子量 170 K の S 蛋白と、96 K (S1), 86 K (S2) の S 蛋白開裂産物が認められた。一方非開裂性が予想される変異 S 蛋白遺伝子を持つ RVV を同様に感染させた系では、感染後少なくとも 24 時間までには細胞融合は観察されなかった。感染後 24 時間で、発現されている変異 S 蛋白を検索すると、170 K の S 蛋白は観察されたが、S 蛋白の開裂産物の S1 及び S2 は認められなかった。これらの結果から、RK13 細胞における S 蛋白の開裂と細胞融合活性には相関があり、このことは S 蛋白の開裂産物が細胞融合に大きく関与していることを示唆している。

ウイルス感染による細胞融合に関してはセンダイウイルス、インフルエンザウイルス、HIV 等を用いた研究が進んでいる。これらのウイルスの細胞融合に関与する蛋白は、MHV と同様ウイルス粒子表面に存在する膜蛋白である。これらの膜蛋白は細胞内で合成後、細胞由来の蛋白分解酵素による開裂というプロセッシングをうけることにより、細胞融合活性を獲得することはよく知られている。MHV を含むコロナウイルスにおいても、同様のメカニズムにより、細胞融合が起こる可能性が示唆されている。我々は、S 蛋白 cDNA を用いて、非開裂性変異 S 蛋白を発現させることにより、この可能性について検討した。その結果、ウサギ由来 RK 細胞と c1-2 S 蛋白の系では、開裂が細胞融合に関与していることが示唆された。今後、c1-2 株の自然宿主であるマウス細胞を用いて、S 蛋白の開裂と細胞融合活性について検討していきたい。

- 1) Taguchi, F. et al. (1985) J. Virol. 54, 429-434
- 2) Matsubara, Y., Watanabe, R., Taguchi, F. (1991) Virus Res. 20, 45-58
- 3) Taguchi, F., Ikeda, T., Shida, H. (1992) J. gen. Virol. in press

Myotonia quailの浅胸筋にみられる形態変化

菊池建機, 小田健一郎¹⁾, 菊地寿枝, 水谷 誠²⁾

〔目的〕

糖原病Ⅱ型ウズラの生産コロニーより見いだされた筋緊張性ジストロフィー様形態変化を示す個体は、翼の挙上不能にもかかわらず、骨格筋、特に浅胸筋の筋線維内グリコーゲンの蓄積や、壊死線維、脂肪化等、糖原病特有の病変が認められない。さらに、本形質の遺伝様式は常染色体性優性遺伝であり、糖原病Ⅱ型ウズラが常染色体性劣性遺伝である点を考慮すると、本質的に異なるミュータントを分離した可能性がある。ここでは、1)異常筋を電気生理学的に検査して、実際にミオトニー反応が誘発されるかどうか、2)ミオトニー反応と骨格筋の形態異常がどのように関連するのか、の二点について検討した。

〔材料および方法〕

総頸静脈よりペントバルビタール(30mg/Kg)で麻酔したウズラを仰向けにし、1側後肢にアース電極を装着した。胸筋の皮膚を切開し、浅胸筋に針電極を刺入し、双極性に筋の電気的活動を誘導し、筋電計の磁気テープに記録した。

電顕検索として、麻酔下で左側浅胸筋を左腕頭動脈より2.5%グルタルアルデヒド・0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.2)で灌流固定した後、1%四酸化オスミウムで後固定し、エタノール脱水後、エポキシ包埋を施した。筋の採取部位は浅胸筋の腱接合部(胸骨柄)と、上腕骨稜と胸骨の中間部(筋腹部)の2ヶ所である。

〔結果および考察〕

針電極を筋中へ刺入すると、正常個体では刺入後の活動電位の持続時間はごく僅かである。しかし、異常個体では高頻度放電が刺入活動に続いて起こり、放電頻度が急に減少するような、いわゆる dive bomber sound を伴うミオトニー反応が誘発された(図-1)。

異常個体の浅胸筋の形態異常は主に筋の表層部にみられる。筋線維内の空胞形成や、グリコーゲンの蓄積、マクロファージ等による清掃反応を伴う壊死線維等は認められない。この部位での筋線維は正常なものが大部分であるが、

中に、線維周辺が明るく、この部分の横紋を失って小さな顆粒状となった大小の筋線維が散在する。筋線維核は核壁異染色質に富み、不規則な突起によりアメーバ状の形態を示す。この核の突起は時に線維周辺から中央へ及び、しばしば細い縊れで連絡している。

筋線維周辺部の明るい部分を観察すると、中心部の筋原線維の走行に対して直角または斜めに走る筋原線維が頻繁にみられる。これらの筋原線維は細胞表面で形質膜へ付着し、起始点を形成する。付着部を構成する表面膜は、形質膜を境として細胞の表裏とも肥厚し、筋原線維により細胞内へ強く引張られた部分は内側へ陥凹し、この領域の表面膜に細かな凹凸を形成する。このような肥厚した膜の凹凸は、正常な浅胸筋では筋腱接合部でのみ見られるが、それ以外の部位で観察されることはない。

本成績は、これらの形態異常が電気生理学的ミオトニー反応と深い関係があることを示している。異常筋で頻繁にみられる筋線維周辺の明るい部分は、従来 Sarcoplasmic mass として知られている。また、この部位には、筋原線維が筋線維の長軸に対して直角に渦巻くように走行するのが観察される。このような筋線維は Ring fiber として知られる筋線維の微細構造とよく一致する。

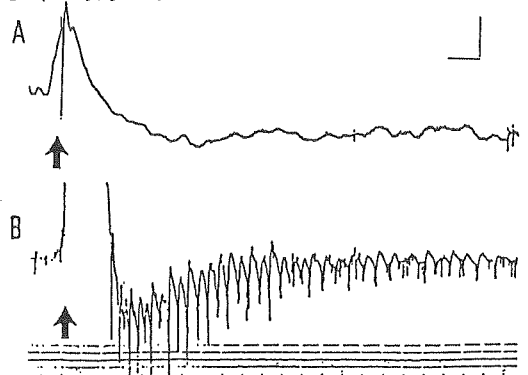


図-1 機械的刺激により筋電計で記録されたミオトニア反応。A: 正常浅胸筋、B: 異常浅胸筋、スケール: 200 msec, 500 μ V. 針電極の刺入活動(矢印)により持続性的高頻度放電が異常個体で記録される。

1)疾病研究第4部、2)(財)日生研

15. 実験動物管理室

1. 管理室一年のあゆみ

実験動物研究施設は、神経研究所本館の設立に伴い動物施設に同居中であった2研究部（遺伝子工学研究部・モデル動物開発部）が本年11月にそれぞれ本館および2号館へ移転し、施設全体が実験動物研究施設として機能することになった。なお、2研究部が使用していた旧実験室の大半を飼育室として利用することになりその整備に着手した。特に旧実験室にはパッケージエアコンを設置し夜間（17:00-翌9:00）の空調も連続運転できるようにした。また、飼育ゾーンの拡大に伴い一般ゾーンと飼育ゾーンとの境界に密閉可能なドアを設置（2階廊下及び3階廊下）し、汚染空気の流入を防止できるようにした。

なお、動物施設には現在マウス約9,000匹、ラット約500匹が常時飼育されており、その他にウサギ・モルモット・ハムスター・スunksが、また新しい実験動物としてポケットマウスやオニコミス・オオネズミクイ等の開発動物も飼育されている。これらの動物は本年4月から（株）JACより派遣された飼育技術者によって維持管理されている。

実験動物管理室では二瓶淳子（センター研究員・10月1日付）、松崎香苗（研究助手・9月2日付）の2名が加わり、以下の研究を進めている。

1. 実験動物の開発：

オオネズミクイは有袋類の仲間では仔はいわゆる未熟の状態です生まれることからヒトの発達障害等のモデル動物になることが期待され、平成4年1月にオーストラリア医学・獣医科学研究所のギルス・プレインズ動物資源センターより雌雄20匹を導入し飼育繁殖を開始した。また昨年より室内繁殖を進めているオニコミスは、コロニーが増殖し現在F₂世代までに達した。さらに増殖を継続しつつ特性を調査中である。

2. 系統維持：

マウス系統を受精卵の状態です凍結保存し、多数の系統を維持供給できるシステムを進めている。本年は神経・筋疾患モデルマウス10系統・延べ2,500個の体外培養による受精卵を凍結保存することができた。また、同時に凍結胚の融解・移植技術の開発も進めているところである。

（管理室長 松崎哲也）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1)
- 松崎哲也
- , 若菜茂晴, 江袋進, 伊藤守, 神谷正男:

野生エゾヤチネズミ (Clethrionomys rufocanus bedfordiae) の実験室内繁殖
 実験動物 41:161-166, 1992

- 2)
- 松崎哲也
- , 田中亨, 斉藤亮一, 山中聖敬, 斉藤宗雄, 野村達次:

スunksにおけるクロズドコロニー (Jic:SUN) の確立
 実験動物 41:167-172, 1992

b. 著書

c. 総説

- 1)
- 松崎哲也
- :

特集: 飼育技術者と微生物モニタリング
 アニテックス 4:16-19, 1992

B. 学会発表

a. シンポジウム

- 1)
- 松崎哲也
- :

飼育技術者と微生物モニタリング
 第25回日本実験動物技術者協会総会シンポジウム, 新潟, 6. 30, 1991

b. 国際学会

- 1)
- Nihei J
- ,
- Yamamura T
- ,
- Tabira T
- :

Suppression of EAE by double-negative ($CD4^{-}CD8^{-}$) cells responding to syngeneic encephalitogenic T cell clones

3rd International Society of Neuroimmunology Jerusalem Oct 27, 1991

c. 一般学会

- 1)
- 二瓶淳子
- ,
- 山村隆
- ,
- 田平武
- :

自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における T-T cell interactions: 1) EAE 誘起性 T細胞クローンにより誘導される $CD4^{-}CD8^{-}TCR\alpha\beta^{+}$ T細胞

第21回日本免疫学会総会, 熊本, 11. 27, 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、今澤正興が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、平成3年4月1日より武市正美（城西大学薬修士卒）がセンター研究員として放射線安全管理と研究開発の任に当たっている。また、R I 施設の管理事務を担当としてきた大崎文香（賃金研究助手）が平成4年2月27日付をもって退職し、代わって三井恵里子（賃金研究助手）が1月27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。

本年度の安全管理業務の中、R I 廃水处理・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。この他、本年度に開設予定の新研究棟（本館）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、科学技術庁の最終的な承認を平成3年11月11日付で受け、原子力安全技術センターの施設検査にも平成4年1月17日付で無事合格することができた。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等、必要な作業も行って、本館R I 施設の使用を平成4年2月初めより開始している。

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。この他、神経系の情報伝達に重要なイノシトールリン酸系の第二メッセンジャーのラジオHPLCを用いた新しい分析法も検討している。

（管理室長 今澤正興）

2. 研究業績

A. 論文

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2年度研究報告書 p 327 - 339, 1991

2) 今澤正興 :

けいれん発現と脳生体膜情報伝達機構－抗てんかん薬の IP_3 代謝に及ぼす影響－

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3年度研究報告書 p 9 - 14, 1992

B. 学会発表

c. 一般学会

1) 今澤正興 :

バルプロ酸を含む抗てんかん薬のキャピラリー電気泳動による分析法について
第25回日本てんかん学会，静岡，10.4, 1991

C. 班会議発表

1) 今澤正興 :

けいれん関連薬物の IP_3 代謝に及ぼす影響

ヒューマンサイエンス官民共同プロジェクト第3分野第4テーマ研究発表会，
東京，1.23, 1992

II 研究業績

3. 主な研究報告

バルプロ酸を含む抗てんかん薬のキャピラリー電気泳動による分析法の開発

今澤 正興

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う、分離能に優れ、操作の簡便な新しい分析法で、近年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¹⁻³⁾。我々は先に本法がPB, PHT, CBZ, PRM, ESM, Zonisamide等の複数の抗てんかん薬の同時分析法として有用であることを報告した。今回は、紫外吸収が弱く、分析に困難が予想されたため、前回検討しなかったバルプロ酸(VPA)の分析法として、本法が適用可能か否かを調べた。

〈方法〉

Beckman P/ACE System 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の熔融シリカ管を使用し、25°C、25kv電圧下で分析を行った。泳動用緩衝液としては25mM lithium dodecyl sulfate (LDS) を含む40 mMリン酸バッファー(pH 6.0)を使用し、検出波長はUV検出器を用いた。検出波長はVPAに対する感度を上げるため、これまでの214nmを200nmに変更した。内部標準物質(3-hydroxynonanoic acid)を含むサンプルは、塩酸酸性とした後、n-ペンタン:酢酸エチル(4:1)で抽出し、遠心操作により分離した有機溶媒相に10mMリン酸第二ソーダ水溶液を加え振盪した。遠心エバポレーターにより有機溶媒を留去後、試料をオートサンプラーでキャピラリーに注入した。

〈結果・考察〉

感度増大の目的で、検出波長を200 nmに変更して分析を行うと、同時に妨害ピークの増大が予期されたが、上述の条件でVPAは血清もしくは溶媒由来のピークと完全に分離して検出された。分析は10分以内に終了し、定量可能なVPA濃度の下限は7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度であり、この濃度における分析値の変動係数は約10%であった。サンプルの前処理の際、従来問題とされてきた、有機溶媒留去におけるVPAの一部の損失は、リン酸塩を含む水溶液の共存下に有機溶媒留去を行うことにより防ぐことができ、分析の精度は良好である。本法は誘導体化していないVPAの分析法として、操作が簡便であり、感度的にも満足できるものである。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カラムに優っている。次に同一の条件での他の抗てんかん薬の分離を検討したと

ころ、Zonisamide, PB, PHT, CBZが各々単一のピークとして、夾雑物のピークと分離して確認された(Fig. 1)。泳動の順序は、Zonisamide, PB, VPA, PHT, CBZであり、VPA以外は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、LDSとの相互作用に寄与する薬物の親油性が移動速度に影響している。本法はVPAを含む複数の抗てんかん薬の同時分析法としても優れたものである。

〈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)

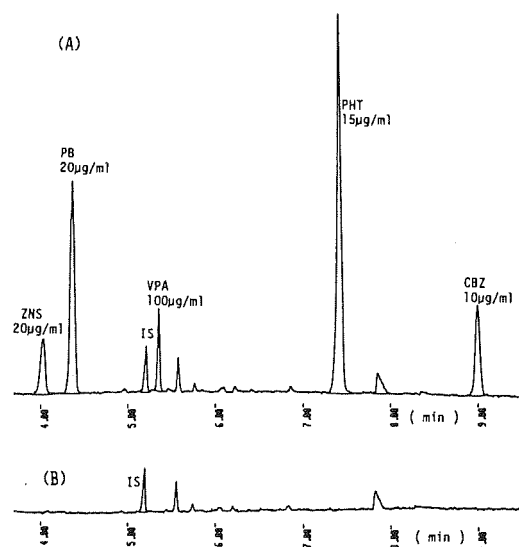


Fig. 1 Electropherogram of an extract of serum containing five AEDs.
A: five AEDs, B: control.

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月に開所し、一部未整備のままであったが動物実験と動物飼育を開始し、本年末で満5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、緊急の場合を除き、月一回の定例会議を行っている。動物委員会の主な審議内容は、施設を利用する研究者間、および研究者と動物管理室の下で作業をする飼育管理者間との意思の疎通や、情報交換を行い、利用者の研究内容や、その規模に合せ、共同利用としての“場”をできるだけ有効に使う方策を検討することである。

施設の動物実験にとって大きな障害となるのは動物感染事故であるが、本年5月のラットのHVJ感染を除いては現在まで正常に運営されている。委員会はこれまでの施設の使用実態調査や、管理部門補佐会による事故対策案により引続きその防止に全力をあげている。その結果、1)三階の感染実験室は、陰圧空調条件をそのままとして、感染事故が起りやすい性質の動物実験および飼育区域として利用する、2)三階はマウスを、二階は主にラットを飼育し実験する区域とし、動物種によって階を分ける、3)三階は主にマウスの系統維持と関連する動物実験、トランスジェニックマウスの飼育区域とする、等の案が承認された。従来の感染実験室は将来必要な場合に変更することも含め、今後さらに充実した感染実験室を要望することとした。

本年度は、本館建設に伴い各研究部の移転の年であった。これまで施設に研究室を持っていたモデル動物開発部、遺伝子工学研究部の2研究部は施設より研究棟へ移転したため、施設の動物数の増加、実験規模の拡大が可能となった。施設整備は研究部移転後の空室の流しの設置を終了し、さらに三階の間仕切りや空調の整備、ウサギのラック、アイソレーター等の購入を予定している。

本年度の教育講習会は、4月15日東北大学医学部、信永利馬先生による〔動物実験施設でみられた感染症とその対策 — 東北大学医学部動物実験施設を例として — 〕であった。委員会は年度末に当たり、研究所内部、および外部の利用者に対し感染事故へ重ねて注意を喚起するため、誓約書を提出して貰うことにした。

（実験動物研究施設管理委員会委員長補佐 菊池建機）

II RI委員会報告

神経研究所本館の建築に伴い、1991年11月に新しいRI実験室が完成した。実験台、測定機器、など必要な機器を購入し、科学技術庁の使用許可を得て、1992年2月より使用を開始した。これまでのRI実験室は手狭となっただけにようやく十分な実験設備がえられた喜びは計り知れないものがある。また、2号館のRI室は2号館の研究部で利用すべく改造するとともに動物を用いた実験や感染実験など特殊なRI実験のための設備として充実を図ることとした。新RI室はIdカードの利用、汚染のコンピューター管

II 委員会

理等、近代的な設備を整えたものとなったのをはじめ、ヨードを優先的に使用する部屋や、培養室、電気泳動室、P2実験設備、遠心機室等、いろんな実験に対応できる態勢を整えた。実験室のセットアップにあたり、ご尽力いただいた運営次長をはじめとする事務スタッフの方々に感謝したい。

利用当初は混乱もみられたがRI管理室長を中心にRI管理室のスタッフの努力で軌道にのってきた。ルールを守り、安全にRIを使用していただきたい。

今年度もRI主任者試験を受験していただいたが3人の方が合格した。奮闘に感謝すると共にRI実験室の管理のためにご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) 施設及び機種

設置されている機種は透過型として日立 H7000、H700、H600、走査型として日立S700、S430である。最も新しいH7000は簡便で走査性に優れ、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。昨年度ライヘルツ社のクライオセクションングシステムが新たに導入されたが、利用が少なく十分に活用されていない。

2) 運営

H7000、H700、H600とも十分に利用されているが、特にH7000の使用頻度が高い。H7000の撮影枚数が20,000枚以上に達し、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関わらず、部品の寿命による故障が増加し、それも主要な大型部品の交換を余儀なくされている。

2～3年以内での更新が必要と考えられる。

(電顕委員会委員長 埜中征哉)

IV 組換えDNA安全委員会

例年のごとく、1992年度の組換えDNA実験計画書の審査を行った。ほとんどの申請は昨年度までの研究計画を継承発展させるもので特に問題となるものはなかった。しかし、生物学的封じ込めレベル、物理学的封じ込めレベルが必要以上に厳しく申請しているものがかなりの件数あり、来年度の申請にあたってはガイドライン的なものを出し、より実験しやすい条件で実験を進めるように指導したらどうかとの意見がだされた。

Ⅱ 委員会

1991年度に文部省、科学技術庁の実験指針が緩和され、個体を宿主とした実験も一部をのぞいて機関承認実験となった。相同組換えによる特異遺伝子のノックアウト技術も定着しつつあり、今後、個体を宿主とした実験が増えると予想される。その点からすると動物センターの一層の充実が不可欠になると思われる。

(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4年3月26日に、第8回感染実験安全委員会が神経研究所内の6委員のもとで開催され、平成4年度に計画されている感染実験について審議された。感染実験の申請は、5研究部から15件なされ、モデル動物開発部から申請された2号館動物感染実験室で行う予定の実験計画を除き全て了承された。2号館動物感染実験室で行う予定の実験に関しては、実験室がP3として承認されてから審議することになった。

(感染実験安全委員会委員長 杉田秀夫)

VI 建築委員会

研究所本館は平成3年10月に竣工し、同月22日に竣工式を挙げた。

竣工式前の一ヶ月半程度を用いて引越を行ったが、さらにそれに遡って9月から毎週引越委員会を開き引越の細目を決めた。

神経研究所の職員だけによる竣工式を午前中に、国立精神・神経センターの記念式典を午後に行い、その後祝賀会を行った。午前中のものは杉田所長の祝辞と私の経過報告だけであったが、この二つを合わせると建築に関する事情が明らかになると思われる。(1 神経研究所の概要 6 研究所本館竣工式 参照) なお建築委員会は平成4年1月に開散した。

(建築委員会委員長 小沢鏡二郎)

VII 動物実験倫理問題検討委員会

動物実験は、科学的であると同時に倫理的でなければならない。科学的であるか否かの判定は研究者自身に負うところ大であるが、倫理的にはいずれも動物福祉の観点から苦痛を伴わない適切な処置を施さなければならない。国立精神神経センター神経研究所では、動物倫理委員会(仮称)(高橋、田平、高嶋、菊地各部長、松崎室長)を発足(平成2年2月)し、「動物実験に関する倫理指針」及び「動物実験倫理問題検討委員会規定」が作成され、杉田秀夫所長に答申し承認された。平成2年5月に動物実験倫理問題検討委員会が発足(委員長:高橋部長)、委員には旧メンバーと新たに高坂部長、田口室長及び運営部の荻原企画室長が加わった。

Ⅱ 委員会

委員会の主な任務は、第一に、実験動物の飼育管理及び動物実験が適切に行われているか、さらにそれらの問題点の把握及びその対応について審議することになった。研究者より提出された動物実験計画書は、平成2年度は72件であり本年度は68件であった。これらは本委員会で特に①代替法の有無について、②使用する動物数は適当な数であるか、③外科的処置を施す動物に苦痛を強いていないか等を重点的に審査され、すべて承認された。第二は、これら実験に供された多くの動物の霊に対し、年に1度研究者全員が集い感謝の気持ちを込めて動物慰霊祭を行うことにした。第一回動物慰霊祭は、動物慰霊祭実行委員会有志代表（高橋部長）の指揮の下で平成2年11月13日に動物棟西側に祭壇が祀られ、約100名の参加者の献花によって挙行された。本年は職員の拠金とリハビリテーション部及び関係者の努力により動物棟西側に動物慰霊碑が完成し、7月22日に動物慰霊碑除幕式を兼ねた慰霊祭が執り行われた。初めに実行委員会有志代表（高橋部長）より慰霊碑建立の報告並びに謝辞が述べられた。除幕式では里吉総長からの挨拶があり、続いて杉田所長より、「医学に従事する者にとって、その第一歩は人体の構造や機能を良く理解することでありますが、その為の教育・研究には人間と同じ生命を持つ動物達の体をかりて調べることを余儀なくされます。このように尊い使命のためとは言い動物たちの命を奪わなくてはならないことについて深い同情、慈愛の念と感謝の気持ちを忘れてはなりません」と慰霊の言葉が述べられた。質素ではあるが心のこもった慰霊祭であった。

（動物実験倫理問題検討委員会委員長 高橋清久）

Ⅷ 図書委員会

図書委員は田平 武、中村 俊、西川 徹、松崎文雄、武井延之がつとめ、図書の整理は斉藤洋子が行なった。従来購入の雑誌をすべて更新した。10月研究所本館落成にともない、1985年以降の雑誌は本館図書室に、1975～1984年の雑誌は2号館1階書庫B（旧1階図書室）に設置した。旧5階書庫にあったそれ以前の雑誌は2号館1階書庫A（旧1階事務室）に設置した。MEDLINEのCD ROMによる検索システムを購入することとした。

（図書委員長 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 Immunology (1971~) vol.13~
6. Advances in Neurology (1973~) vol.1~
7. AIDS (1987~) vol.1~
8. American Journal of Anatomy (1968~1991) vol.122~192
9. American Journal of Human Genetics (1968~) vol.20~
10. American Journal of Medical Genetics (1977~) vol.1~
11. American Journal of Pathology (1968~) vol.52~
12. American Journal of Physiology (1968~) vol.214~
13. Analytical Biochemistry (1968~) vol.22~
14. Anatomical Record (1968~) vol.160~
15. Anatomy & Embryology (1978~) vol.153~
16. Annals of Neurology (1978~) vol.3~
17. Annals of New York Academy of Science (1968~) vol.146~
18. Annual Review of Biochemistry (1974~) vol.43~
19. Annual Review of Cell Biology (1985~) vol.1~
20. Annual Review of Genetics (1974~) vol.8~
21. Annual Review of Immunology (1983~) vol.1~
22. Annual Review of Neurosciences (1978~) vol.1~
23. Annual Review of Pharmacology & Toxicology (1984~) vol.24~
24. Annual Review of Physiology (1974~) vol.36~
25. Archives of Biochemistry & Biophysics (1968~) vol.123~
26. Archives of Neurology (1959~) vol.1~
27. Archives of Pathology & Laboratory Medicine (1983~) vol.107~
28. Archives of Virology (1986~) vol.87~
29. Biochemical and Biophysical Research Communications (1960~) vol.1~

Ⅱ 委員会

30. Biochemical Journal (1968~) vol.106~
31. Biochemical Genetics (1987~) vol.25~
32. Biochemical Medicine & Metabolic Biology (1987~) vol.37~
33. Biochemical Pharmacology (1958~) vol.1~
34. Biochemical Society Transactions (1978~) vol.6~
35. Biochemistry (1962~) vol.1~
36. Biochemistry & Cell Biology (1987~) vol.65~
37. Biochemistry International (1980~) vol.1~
38. Biochimica Biophysica Acta (1968~) vol.150~
39. BioEssays (1984~) vol.1~
40. Biological Psychiatry (1969~) vol.1~
41. Biological Mass Spectrometry (1991~) vol.20~
42. Biology of Neonate (1987~) vol.51~
43. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry (1974~1990) vol.1~ vol.19
44. Biomedical Research (1980~) vol.1~
45. Biophysical Journal (1960~) vol.1~
46. Bioscience Reports (1983~) vol.3~
47. Biosis Cas Selects: Alzheimer's Disease & Senile Dementias (1987~1989) vol.1~ vol.3
48. Bio Research Today Series' (1990~) vol.1~
49. Blood: Journal of Haematology (1987~) vol.69~
50. Brain (1968~) vol.91~
51. Brain and Development (1979~) vol.1~
52. Brain Research (1989~) vol.476~
53. Brain Research Bulletin (1987~) vol.18~
54. Brain Research Reviews (1979~) vol.1~
55. British Journal of Haematology (1987~) vol.65~
56. British Journal of Pharmacology (1968~) vol.34~
57. Cancer Research (1968~) vol.28~
58. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology (1987~) vol.65~
59. Cell (1974~) vol.1~

60. Cell & Tissue Kinetics (1983~1990) vol.16~ vol.23
61. Cell & Tissue Research (1978~) vol.186~
62. Cell Biochemistry & Function (1987~) vol.5~
63. Cell Biology:International Reports (1983~) vol.7~
64. Cell Calcium (1985~) vol.6~
65. Cell Differentiation and Development (1983~1990) vol.12~ vol.32
66. Cell Motility & Cytoskeleton (1983~) vol.3~
67. Cell Proliferation (1991~) vol.24~
68. Cell Structure and Function (1975~) vol.1~
69. Cellular & Molecular Neurobiology (1983~) vol.3~
70. Cellular Immunology (1970~) vol.1~
71. Cellular Signaling (1989~) vol.1~
72. Chemical Reviews (1968~) vol.68~
73. Chemical Titles (1968~) vol.1~
74. Chromosoma (1986~) vol.93~
75. Chronobiologica (1985~) vol.12~
76. Chronobiology International (1986~) vol.3~
77. Clinica Chimica Acta (1968~) vol.19~
78. Clinical & Experimental Immunology (1987~) vol.67~
79. Clinical Chemistry (1975~) vol.21~
80. Clinical Genetics (1970~) vol.1~
81. Clinical Immunology & Immunopathology (1987~) vol.42~
82. Clinical Neuropathology (1983~) vol.2~
83. Clinical Neuropharmacology (1987~) vol.10~
84. Cold Spring Harbour Symposium (1988~) vol.L11~
85. Computers & Biomedical Research (1987~1988) vol.20~21
86. Cumulated Index Medicus (1968~) vol.9~
87. Current Contents (1990~)
88. Cytobiology (1969~1979) vol.1~18
89. Cytogenetics & Cell Genetics (1983~) vol.35~

Ⅱ 委員会

90. Development (1987～) vol.99～

改名前の名称 (Journal of Embryology and Experimental Morphology (1986) vol.91～98)

91. Developmental Biology (1968～) vol.17～

92. Development Growth and Differentiation (1972～) vol.14～

93. Developmental Brain Research (1986～) vol.24～

94. Differentiation (1973～) vol.1～

95. Electromyography & Clinical Neurophysiology (1983～) vol.23～

96. The EMBO Journal (1983～) vol.2～

97. Endocrinology (1968～) vol.82～

98. Endocrinologica Japonica (1984～) vol.31～

99. Endocrinological Reviews (1982～) vol.3～

100. Epilepsia (1987～) vol.28～

101. Epilepsy Research (1987～) vol.1～

102. European Journal of Biochemistry (1967～) vol.1～

103. European Journal of Cell Biology (1979～) vol.19～

104. European Journal of Immunology (1983～) vol.13～

105. European Journal of Medical Chemistry (1987～) vol.22～

106. European Journal of Neurosciences (1989～) vol.1～

107. European Journal of Pharmacology (1967～) vol.1～

108. European Neurology (1987～) vol.26～

109. Experientia (1968～) vol.24～

110. Experimental Brain Research (1966～) vol.1～

111. Experimental Cell Biology (1983～1989) vol.51～ vol.57 (タイトル変更)

112. Experimental Cell Research (1968～) vol.49～

113. Experimental Gerontology (1987～) vol.22～

114. Experimental Neurology (1959～) vol.1～

115. Experimental Pathology (1983～) vol.23～

116. 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

117. FEBS Letters (1968～) vol.1～
118. Gene (1986～) vol.41～
119. Genes & Development (1987～) vol.1～
120. Genetical Research (1987～) vol.49～
121. Genetics (1987～) vol.115～
122. Genome (1987～) vol.29～
123. Genomics (1987～) vol.1～
124. GLIA (1988～) vol.1～
125. Growth Factors (1988～) vol.1～
126. Handbook of Neurochemistry vol.1～
127. Histochemistry (1983～) vol.77～
128. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, Biological Chemistry
(1983～) vol.364～
129. Human Genetics (1964～) vol.1～
130. Immunochemistry (1964～1974) vol.1～17
131. Immunological Reviews (1987～) vol.95～
132. Immunology (1968～) vol.14～
133. Immunology Today (1983～) vol.4～
134. Infection & Immunity (1970～) vol.1～
135. International Archives of Allergy & Applied Immunology (1987～) vol.82～
136. International Journal of Biochemistry (1983～) vol.15～
137. International Journal of Cancer (1987～) vol.39～
138. International Journal of Neuroscience (1983～) vol.18～
139. In Vitro (1983～) vol.19～
140. Japanese Journal of Pharmacology (1989～) vol.49～
141. Japanese Journal of Physiology (1984～) vol.34～
142. Journal of Affective Disorders (1986～) vol.10～
143. Journal of American Chemical Society (1968～) vol.90～
144. Journal of American College of Neuropsychopharmacology (1988～) vol.1～
145. Journal of Anatomy (1967～) vol.102～

Ⅱ 委員会

146. Journal of Biochemistry (1922~) vol.1~
147. Journal of Biological Chemistry (1968~) vol.243~
148. Journal of Cell Biology (1968~) vol.36~
149. Journal of Cell Science (1966~) vol.1~
150. Journal of Cellular Physiology (1968~) vol.71~
151. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (1981~) vol.1~
152. Journal of Chemical Neuroanatomy (1988~) vol.1~
153. Journal of Child Neurology (1987~) vol.2~
154. Journal of Chromatographic Science (1987~) vol.25~
155. Journal of Chromatography (1958~) vol.1~
156. Journal of clinical Endocrinology and Metabolism (1980~) vol.50~
157. Journal of Clinical Investigation (1984~) vol.73~
158. Journal of Comparative Neurology (1898~) vol.1~
159. Journal of Cyclic Nucleotide & Protein Phosphorylation Research (1987~)
vol.12~
160. Journal of Developmental Physiology (1987~) vol.9~
161. Journal of Electron Microscopy (1978~) vol.27~
162. Journal of Embryology and Experimental Morphology (JEEM) (1986~) vol.91~98
163. Journal of Experimental Medicine (1968~) vol.127~
164. Journal of Experimental Psychology (1987~) vol.13~
165. Journal of Experimental Zoology (1986~) vol.237~
166. Journal of General Physiology (1919~) vol.1~
167. Journal of General Virology (1986~) vol.67~
168. Journal of Heredity (1986~) vol.77~
169. Journal of Histochemistry & Cytochemistry (1968~) vol.16~
170. Journal of Immunological Methods (1971~) vol.1~
171. Journal of Immunology (1968~) vol.100~
172. Journal of Inherited Metabolic Disease (1978~) vol.1~
173. Journal of Lipid Research (1968~) vol.9~
174. Journal of Magnetic Resonance (1969~) vol.1~

175. Journal of Medical Genetics (1987～) vol.24～
176. Journal of Membrane Biology (1969～) vol.1～
177. Journal of Mental Deficiency Research (1957～) vol.1～
178. Journal of Molecular Biology (1969～) vol.39～
179. Journal of Morphology (1983～) vol.175～
180. Journal of Muscle Research & Cell Motility (1983～) vol.4～
181. Journal of National Cancer Institute (1987～) vol.78～
182. Journal of Neural Transmission (1968～) vol.31～
183. Journal of Neural Transmission (1989～) vol.1～
184. Journal of Neurobiology (1983～) vol.14～
185. Journal of Neurochemistry (1968～) vol.15～
186. Journal of Neurocytology (1983～) vol.12～
187. Journal of Neurogenetics (1983～) vol.1～
188. Journal of Neuroimmunology (1981～) vol.1～
189. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry (1926～) vol.1～
190. Journal of Neurological Sciences (1964～) vol.1～
191. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology (1987～) vol.46～
192. Journal of Neurophysiology (1938～) vol.1～
193. Journal of Neuroscience (1986～) vol.6～
194. Journal of Neuroscience Methods (1979～) vol.1～
195. Journal of Neuroscience Research (1983～) vol.9～
196. Journal of Pathology (1983～) vol.139～
197. Journal of Pediatrics (1968～) vol.72～
198. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics (1967～) vol.156～
199. Journal of Pharmacy & Pharmacology (1987～) vol.39～
200. Journal of Physiology (1968～) vol.194～
201. Journal of Tissue Culture Methods (1983～) vol.8～
202. Journal of Toxicology : Toxin Reviews (1987～) vol.6～
203. Journal of Structure Biology (1990～) vol.103～
- 改名前の名称 Journal of Ultrastructure Research & Molecular Structure Research

Ⅱ 委員会

- (1968~1990) vol.22~vol.102
204. Journal of Virology (1967~) vol.1~
205. Laboratory Animal (1986~) vol.20~
206. Laboratory Animal Science (1986~) vol.36~
207. Laboratory Investigation (1968~) vol.18~
208. Lancet (1968~)
209. Life Science (1968~) vol.7~
210. Lipids (1966~) vol.1~
211. MATRIX (1990~) vol.10~
212. Mechanisms of Development (1991~) vol.33~
213. Membrane Biochemistry (1987~) vol.7~
214. Metabolic Brain Disease (1987~) vol.2~
215. Methods in Enzymology (1955~) vol.~
216. Methods in Neurosciences (1990~) vol.1~
217. Molecular & Cellular Biochemistry (1973~) vol.1~
218. Molecular & Cellular Biology (1983~) vol.3~
219. Molecular & Chemical Neuropathology (1989~) vol.10~
220. Molecular Biology Reports (1987~) vol.12~
221. Molecular Brain Research (1986~) vol.1~
222. Molecular Immunology (1979~) vol.16~
223. Molecular Neurobiology (1987~) vol.1~
224. Molecular Pharmacology (1965~) vol.1~
225. Muscle & Nerve (1978~) vol.1~
226. Mutation Research (1964~) vol.1~
227. Nature (1968~) vol.217~
228. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (1985~) vol.331~
229. Neurobiology of Aging (1987~) vol.8~
230. Neurochemical Pathology (1987~1988) vol.6~vol.9 (タイトル変更)
231. Neurochemical Research (1976~) vol.1~
232. Neurochemistry International (1987~) vol.10~

233. Neuroendocrinology (1987~) vol.45~
234. Neurology (1970~) vol.20~
235. Neuron (1988~) vol.1~
236. Neuropathology & Applied Neurobiology (1975~) vol.1~
237. Neuropediatrics (1978~) vol.9~
238. Neuropeptides (1983~) vol.4~
239. Neuroscience (1983~) vol.8~
240. Neuroscience Abstracts (1987~) vol.5~
241. Neuroscience Letters (1975~) vol.1~
242. Neuroscience Research (1984~) vol.1~
243. Neurotoxicology (1987~) vol.8~
244. New England Journal of Medicine (1967~) vol.276~
245. Nucleic Acids Research (1974~) vol.1~
246. Oncogene (1991~) vol.6~
247. Pathologie (1983~) vol.4~
248. Pathobiology (1990~) vol.58~
249. Pediatric Research (1967~) vol.1~
250. Peptides (1983~) vol.4~
251. Pediatric Neurology (1987~) vol.3~
252. Pflugers Archive European Journal of Physiology (1947~) vol.249~
253. Pharmacological Reviews (1966~) vol.18~
254. Pharmacology Biochemistry & Behavior (1983~) vol.18~
255. Psychoneuroendocrinology (1981~) vol.6~
256. Physiological Reviews (1968~) vol.48~
257. Physiology and Behavior (1987~) vol.39~
258. Proceedings of American Association for Cancer Research (1984~) vol.25~
259. Proceedings of Japan Academy (1944~) vol.20~
260. Proceedings of National Academy of Sciences USA (1968~) vol.59~
261. Proceedings of Royal Society of London Ser.B:Biological Science (1982/83) vol.217~
262. Proceedings of Society for Experimental Biology & Medicine (1987~) vol.184~

■ 委員会

263. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1966~) vol.1~
264. Progress in Medical Virology (1965~) vol.7~
265. Protoplasma (1989~) vol.148~
266. Psychopharmacology (1959~) vol.1~
267. RAMBIOS (1986~1987) vol.3~4
268. Regulatory Peptides (1986~) vol.14~
269. Reviews of Magnetic Resonance in Medicine (1986~) vol.1~
270. Revue Neurologique (1978~) vol.134~
271. Roux's Archives of Developmental Biology (1969~) vol.162~
272. Science (1968~) vol.159~
273. Second Messengers and Phosphoproteins (1988~) vol.12~
274. Somatic Cell & Molecular Genetics (1986~) vol.12~
275. Studia Biophysica (1983~) vol.93~
276. Subcellular Biochemistry (1987~) vol.12~
277. Synapse (1987~) vol.1~
278. Theriogenology (1986~) vol.25~
279. Tissue Antigens (1990~) vol.35~
280. Tissue & Cell (1983~) vol.15~
281. Tohoku Journal of Experimental Medicine (1984~) vol.142~
282. Toxicology Letters (1987~) vol.35~
283. Transplantation (1987~) vol.43~
284. Trends in Biochemical Sciences (1975~) vol.1~
285. Trends in Genetics (1986~) vol.2~
286. Trends in Neurosciences (1983~) vol.6~
287. Trends in Pharmacological Sciences (1979~) vol.1~
288. Veterinay Record (1986~) vol.118~
289. Virchows Archiv A: Pathological Anatomy & Histology (1947~) vol.314~
290. Virchows Archiv B: Cell Pathology (1968~) vol.1~
291. Virology (1986~) vol.148~
292. Virus Research (1986~) vol.4~

和雑誌名

1. 遺伝 (1981～) vol.35～
2. イアトロス (1989～) vol.6～(vol.8, No.4より休刊)
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 (1974～) vol.1～
8. 生体の科学 (1981～) vol.32～
9. 総合臨床 (1981～) vol.30～
10. 組織培養 (1981～) vol.7～
11. 蛋白質・核酸・酵素 (1981～) vol.24～
12. 治療 (1981～) vol.63～
13. 脳と発達 (1981～) vol.13～
14. ラボラトリーアニマル (1986～1988) vol.5 No.1以後休刊
15. サイエンス (1987～) vol.17～
16. 神経精神薬理 (1987～) vol.9～
17. 実験医学 (1986～) vol.4～
18. 代謝 (1987～) vol.24～
19. 臨床神経学 (1971～) vol.11～
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ると。決定にあたっては，経歴及び研究業績を審査し，原則として下記の基準にしたがうものとする。

A) 文部省大学令に基づく大学教授，又はそれに準ずる研究歴を有し，大学卒業後15年以上の者又は本研究部長に準ずるもの。

B) 文部省大学令に基づく大学助教授，又は大学卒業後10年以上の研究歴を有するもの又は本研究所室長に準ずるもの。

C) 文部省大学令に基づく大学講師，又は大学卒業後5年以上の研究歴を有するもの。

D) 大学卒業後2年以上の研究歴を有するもの。

上記の大学とは4年制大学及びこれに準ずるものをさし，医学部医学科，農学部獣医学科及び歯学部歯科卒の場合は卒業の時点において既に2年の研究歴を有するものと認定する。

4. 選 考

神経研究所部長会議で応募者の審査，選考を行い，総長にその結果を報告，承認を得る。

IV 別 項

5. 定数，任命及び任用期間

毎年度その定める各研究課題毎の定数内において総長が任命する。

任用期間は6ヶ月以内の期間を定め任命する。

但し，研究成果に基づき，さらに6ヶ月以内の延長を認めることができる。

原則として，総計3年以内とする。

6. 身 分

国家公務員で，非常勤職員とする。

7. 服 務

その任期内において，国家公務員法第3章第7節（服務）各条の適用者となる。

8. 勤 務 時 間

週31.5時間とする。

9. 災 害 補 償

国家公務員災害補償法の適用を受ける。

10. 給 与

非常勤職員手当と，給与法第22条の定めるところにより支給する。

1) その基準は下記のとおりとする。

A（教授＝研究部長）クラス 時給 2,500円

B（助教授＝研究室長）クラス 時給 2,100円

C（講師＝主任研究員）クラス 時給 2,060円

D（助手＝研究員）クラス 時給 1,700円

2) 通勤手当，扶養手当，期末手当，勤勉手当等その他手当は一切支給しない。

3) 食事，厚生施設等は，所内施設の利用を認める。

11. 適 用 時 期

この要領は，昭和61年10月1日から適用する。

この要領は，平成2年4月1日に一部改正する。

2 - A. 国立精神・神経センター神経研究所 併任研究員運営要領

1. 目 的

神経研究所の次の研究体制の方針のもとに併任研究員制度を設け、公務員の研究者を受け入れるものとする。

- (1) 本研究所では、プロジェクト研究を中心に行う。
- (2) 共通の目的をもった全国の大学、その他の医療機関と密接な連携を保ち、門戸を広く開放して施設の共同利用、人的交流をはかる。
- (3) 独自の研究施設、組織、研究委託費を総合的に活用し、大型プロジェクトを全国的に推進できる中枢としての機能をもつ。

2. 選 考

- (1) 神経研究所部長会議で選考を行い、総長にその結果を報告する。
- (2) 併任研究員を受入れようとする部長（以下「当該部長」という。）は、神経研究所併任研究員申請書（様式1）を神経研究所部長会議に提出する。

3. 定数，任命および併任期間

- (1) 毎年度その定める各部の定数内において、総長が任命する。
- (2) 任命は、神経研究所部長会議の決定に基づき任命しようとする者の所属先の同意を得た後、総長が之を行う。
- (3) 併任期間は1年以内とする。ただし、再併任することは妨げない。

4. 責任と義務

- (1) 併任研究員の神経研究所内の勤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られるものとする。

2. 資 格

研究生は，大学卒業者または国立精神・神経センター総長（以下「総長」という。）が，同等以上の学力を有すると認めた者で，所属する機関長等の推薦する者。

研究見習生は，高等学校以上の学校を卒業した者または総長が同等以上の学力を有すると認めた者で，所属する機関長等の推薦する者。

3. 選 考

- (1) 神経研究所部長会議で選考を行い，総長にその結果を報告する。
- (2) 研究生または研究見習生の承認を受けようとする者は，神経研究所研究生研究見習生申請書（様式 1）を，指導を受けようとする部長（以下「指導部長」という。）を経て神経研究所部長会議に提出する。

4. 定数，承認および承認期間

- (1) 研究生および研究見習生の定数は各部若干名とし，総長が承認する。
- (2) 承認期間は1年以内とする。ただし，再選考することは妨げない。

5. 身 分

推薦する機関長の所属とする。

6. 給 与

研究生および研究見習生には，国から一切の給与を支給しない。

7. 責任と義務

- (1) 研究生および研究見習生の服務規律および特許権については、神経研究所に準ずるものとする。
- (2) 研究生および研究見習生は、指導部長の指示または許可を得て、研究・研修および研究業績の発表を行うものとする。

8. 辞 退

研究生および研究見習生は、研究および研修を辞退したい場合には、辞退届を指導部長を経て総長に提出するものとする。

9. 承認の取消

総長は、研究生および研究見習生がこの内規に違背し、または研究生および研究見習生としてふさわしくない言動があった場合においては、神経研究所部長会議で承認を取り消すことができる。

10. 弁 済

研究生および研究見習生は、本人の故意または重大な過失により国に損害を与えたときは、その弁済の責を負わなければならない。

附 則

この内規は、昭和61年10月1日から施行する。

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23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) この規程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。
- (3) 平成3年4月1日一部改正

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
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	大阪医科大学教授	〃
鴨下 重彦	東京大学医学部教授	〃
西園 昌久	福岡大学医学部教授	〃
西谷 裕	国立療養所宇多野病院長	〃
野々村 禎昭	東京大学医学部教授	〃
森 亘	科学技術会議議員	〃
生田 房弘	新潟大学脳研究所長	H.3.4.1 ~ H.5.3.31
伊東 宗行	国立療養所金石病院長	〃
古和 久幸	北里大学医学部教授	〃
高橋 睦正	熊本大学医学部教授	〃
西村 健	大阪大学医学部教授	〃
平野 修助	東邦大学学長	〃
山口 成良	金沢大学医学部教授	〃
谷 修一	厚生省大臣官房審議官(科学技術担当)	関係行政機関等
篠崎 英夫	厚生省保健医療局国立療養所課長	〃
広瀬 省	厚生省保健医療局精神保健課長	〃
田中 慶司	厚生省児童家庭局母子衛生課長	〃
大熊 輝雄	国立精神・神経センター総長	〃
有馬 正高	国立精神・神経センター武蔵病院長	〃
荒川 直人	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	〃

(平成4年3月31日現在)

Ⅳ 別 項

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
鴨 下 重 彦	東京大学医学部教授	H. 2. 4. 1 ~ H. 4. 3. 31
西 谷 裕	国立療養所宇多野病院長	〃
西 村 健	大阪大学医学部教授	〃
生 田 房 弘	新潟大学脳研究所長	H. 3. 4. 1 ~ H. 5. 3. 31
伊 東 宗 行	国立療養所釜石病院長	〃
古 和 久 幸	北里大学医学部教授	〃
高 橋 睦 正	熊本大学医学部教授	〃
野々村 禎 昭	東京大学医学部教授	〃
山 口 成 良	金沢大学医学部教授	〃
松 田 朗	厚生省大臣官房厚生科学課長	関係行政機関等
篠 崎 英 夫	厚生省保健医療局国立療養所課長	〃
田 中 慶 司	厚生省児童家庭局母子衛生課長	〃
大 熊 輝 雄	国立精神・神経センター総長	〃
有 馬 正 高	国立精神・神経センター武蔵病院長	〃
荒 川 直 人	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	〃

(平成4年3月31日現在)

7. 平成3年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表

課題番号	研 究 課 題	所属及び役職名	主任研究者	委託額	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	20,000 ^{千円}	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 鉄二郎	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総合的研究	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	継続改変
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	東京医科歯科大学医学部 神経内科教授	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教授	植村 慶一	19,000	〃
合		計		620,000	

8. 平成4年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表

課題番号	研 究 課 題	所属及び役職名	主任研究者	金 額	備 考
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 鎮二郎	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	熊本大学名誉教授	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	〃
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	(財) 慈 圭 会 精神医学研究所顧問	大月 三 郎	17,000	〃
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	17,000	〃
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	〃
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	東京大学医科学研究所 化学研究部教授	御子柴 克 彦	21,000	〃
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	16,000	〃
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	東北大学医学部精神科教授	佐藤 光 源	21,000	〃
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	東京都立東大和 療育センター所長	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 神経精神医学教授	若林 慎一郎	16,000	〃
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	継 続
3指-2	神経系機能修復に関する開発的研究	東京医科歯科大学医学部 神経内科教授	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	〃
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	11,000	〃
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	〃
4指-1	難治てんかんの治療法開発に関する研究	国立療養所 静岡東病院副院長	八 木 和 一	19,000	新規再編
4指-2	慢性進行性ポリニューロパチーの成因と治療に関する研究	京都大学医学部 神経内科教授	木 村 淳	17,000	〃
4指-3	精神分裂病の病態解析に関する臨床的研究	国立肥前療養所長	内 村 英 幸	19,000	〃
4指-4	アルコール依存の発症機序と治療に関する研究	国立療養所 久里疾病院副院長	高 木 敏	10,000	〃
4指-5	中枢神経性障害のリハビリテーション機器開発に関する研究	国立療養所箱根病院長	村 上 慶 郎	10,000	〃
4指-6	治療抵抗性精神障害の成因、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	北 村 俊 則	10,000	新 規
合 計				620,000	

国立^{精神}神経センター神経研究所年報

第6号(通巻14号) 平成3年度

発行 平成4年3月31日

発行者 杉 田 秀 夫

編集者 桜 川 宣 男

埜 中 征 哉

印刷 有限会社三協印刷

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
