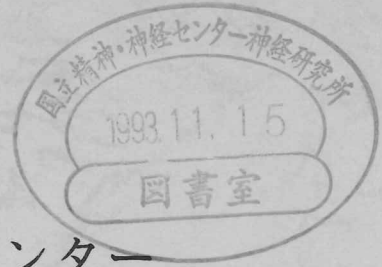


禁出持



国立精神・神経センター

神 經 研 究 所 年 報

第 7 号 (通卷15号)

平成 4 年度

National Institute of Neuroscience
National Center of Neurology
and Psychiatry

— 1992 —

国立精神・神経センター
神 經 研 究 所 年 報

第 7 号 (通卷15号)

平成 4 年度



神経研究所 記念撮影 平成5年3月22日

目 次

I 神経研究所の概要	
1. 概 要	1
2. 組織(表1)	3
3. 構成員(表2)	4
4. セミナーおよび講演会(表3)	10
5. 研究発表会(表4)	13
II 研究業績	
1. 疾病研究第一部	19
2. 疾病研究第二部	32
3. 疾病研究第三部	53
4. 疾病研究第四部	69
5. 疾病研究第五部	79
6. 疾病研究第六部	91
7. 疾病研究第七部	107
8. 診断研究部	114
9. 微細構造研究部	123
10. 機能研究部	140
11. 代謝研究部	150
12. 免疫研究部	162
13. 遺伝子工学研究部	168
14. モデル動物開発部	178
15. 実験動物管理室	187
16. ラジオアイソトープ管理室	189
III 委 員 会	195
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	213
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	215
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	216
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	217
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	218
3. 国立精神・神経センター神経研究所勤務心得	220
4. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会運営要領	221
5. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会委員	223
6. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会評価部会委員	224
7. 平成4年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表	225
8. 平成5年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表	226

I 神 経 研 究 所 の 概 要

1. 概 要

1. はじめに

平成4年、当研究所設立15周年の節目をむかえた。当所は昭和53年4月国立武蔵療養所神経センターとして8部16室で発足し、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た。国立がん、循環器病センターに次ぐ第3番目の高度専門医療センターのひとつとなることは、設立以来の我々の構想、目標であり、これを機にその責務を全うすべく、種々のご理解とご協力のもとに人材、設備の拡充を目指してきた。

組織は14部34室と2管理室となり、設備としてはまず昭和61年7月に実験動物研究施設3,000平方メートルが竣工し、平成3年9月には5年を費やして7,600平方メートルの新しい研究棟が完成した。地下1階をR I実験室として充実し、地上6階までに9つの部が移転して新しく本館となった。あわせて2号館(旧本館)の改修も行われ、研究所全体、各部が合理性と快適さを工夫した新しい研究環境を創造することができた。

中央管理のR I実験室の種々の設備のほか、動物実験施設に細胞株、受精卵の凍結保存装置を順次整備し、またコンピューターネットワークによる遺伝子解析システム利用にむけて準備を進めている。

科学技術庁など外部からの研究費の導入も順調にのび、センター化の昭和61年当時の約3倍になっている。

しかし、厳しい公務員の定員削減の波が及び、平成4年度は1室長が削減された。ただ、科技庁の特別研究員や外国からのS T Aフェローの増加は心強い。

本年10月の米国紙 Science が日本の基礎研究機関の活動の目安として提供した1981年から10年間のサイテーション頻度のリストの中で6位にランクされていることが分かった。外部からの評価の視点も我々の15年間の精進の一つの結果として認識し、今後も一層の努力を続けて行きたい。

永年当神経研究所の発展のために尽力いただいた、高橋疾病研究第三部長と埜中微細構造研究部長が武蔵病院へ移られた。ご活躍をこころからお祈りすると共に、センター病院との望ましい連携の強化を期待したいものである。

2. 組 織

人事異動としては、6月1日付で埜中部長(昭和57年より微細構造研究部長)が武蔵病院臨床検査部長に、高橋部長(昭和61年より疾病研究第三部長)が武蔵病院副院長に配置換となった。埜中部長は引き続き微細構造研究部の併任部長である。この人事異動により、直ちに後任の各部長選考委員会を組織している。

着任は、9月1日付けで疾病研究第四部にN I Hから和田圭司部長が就任した。また、5年1月1日付けで疾病研究第七部に富山医科薬科大学の神経精神医学講座講師であった三辺義雄室長が就任した。7部を預かっていた西川室長は疾病研究第三部長に戻った。疾病研究第七部は部長定員が無いがてんかんの専門研究室として初めて新しい陣容と整備を整えていくところであり、活躍を期待している。

組織および定員は(表1参照)、指定職(所長)1名、部長12名、管理室長2名と本年度定員削減で1

I 神経研究所の概要

名室長が減じ室長33名となり定員合計は48名である。非常勤流動研究員は定数28名、事務職員は3名が従事している。

平成5年3月1日現在、各部のフルタイム、パートタイムのセンター研究員24名、センター研究助手24名、合計48名在籍し、テーマによる研究費雇用は21名である。

外部からの参加制度としては、各々の内規により1年を任期として年度毎に申請していただくが、漸次毎月2回の部長会で審査の上、受け入れている。フルタイム参加としては、官民共同の各種財団から派遣されている研究者がS T A等のフェローを含め13名で、外来研究員として在籍している。科技厅特別研究員は5名である。研究生は105名が在籍している。うち約4分の1がフルタイムで参加しており多くは大学院学生の研究課題を受け入れ指導しているものである。併任研究員は57名（内、科技厅特別研究員5名、センター内併任20名を含む）、客員研究員が26名となっている。外部からの参集者は合計206名で、定員と賃金職員、研究費雇用の方々を合計すれば、349名もの人々に支えられていることになる。

3. 研究活動

詳細は各研究部の「一年のあゆみ」に的確に記録されているので参照して頂きたい。

本年新しくロシアのパプロフ医学研究所のカザコフ教授グループと当神経研究所疾病研究第一部荒畑部長のグループが共同研究を行うことで合意し、両研究所長の間で科学協力の契約書を交わした。

国立精神・神経センターによる国際痴呆共同研究として第5回シンポジウム「アルツハイマー型痴呆の画像解析と病態機序」が3月10日、11日に東京で開催された。カナダ、米国から3人の演者が招聘された。

日独科学技術協定に基づく「神経生物学」に関する両国間の第2回目ワークショップは5年5月開催にむけ計画進行中である。

厚生省精神・神経疾患研究委託費は6億2千万円であるが、27課題の研究班のうち神経研究所からは併任を含め4名の部長が主任研究者として、また27名が研究者として参加している。

所内セミナーは年間合計29回開催され、海外からの演者は14名であった。ゲストスピーカーのみでなく所内スタッフによるセミナーも更に活発に行うことを目指したい。

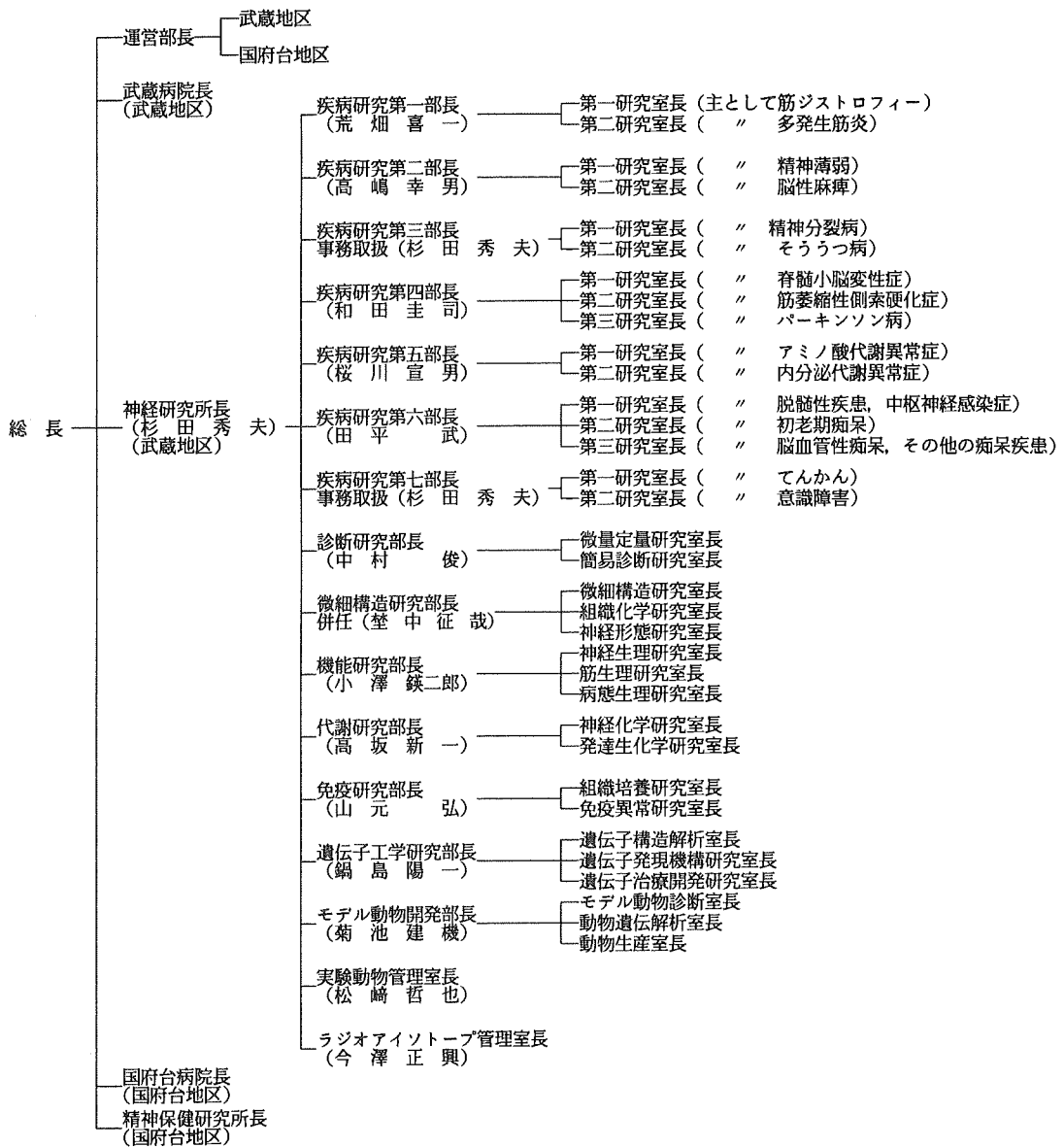
本年の総まとめの研究発表会は本年度より抄録も残せるようプログラムを編集した。また所内での研究評価を志向し、当日終了後に各部の代表者による投票を行い、優れた発表を選ぶことを試みた。

まだ緒論の状態であるが、我国におけるDecade of the Brain（脳の10年）構想も21世紀にむけて極めて重要な課題と考えるので、当センター総長を中心に体制を整えつつある。新しい研究への要請に応えられる力を蓄えるためにも、人員の増員、センター構想計画による体制の更なる充実を願うものである。

平成5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
指定職	研 究 職					行(-)	行(=)	計	部 長	研究員			
所 長	部 長	管 理 室 長	室 長	研究員	研 究 員 補 助 員	係 長	係 員						
1	12	2	33	-	-	-	-	48	2	36	28	2	116

(平成4年度の計)

3. 平成4年度 神経研究所構成員 (表2)

(平成4年4月1日～平成5年3月31日)

所長: 杉田秀夫									
部名	部長	室長	研究員	流動研究員	○センター研究員 *センター研究員	研究見習生 △研究員	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 ～4.6/30) 荒畑喜一 (4.7/1～)	荒畑喜一 (～4.6/30) 武田伸一 (4.9/1～)	塚原俊文 (4.9/1復職)	中村浩一郎 林由起子 下川雅文 (～4.6/30)	○青木治美 (～4.6/30) ○後藤加奈子 ○古賀律子	奥山茂一 織野島美知 田嶋久洋 松城林川 古平有 川有 (4.6/1～)	石傳幸子 鎌倉原明 山原彦 岡口野明 有川道 有(～4.5/31) 石中章 佐(4.7/1～) 吉田邦 広(5.2/1～)	佐藤猛 (～4.6/30) 高木昭夫 本恭三	
疾病研究第二部	高嶋幸男	田中水 晴敬		飯田浩一 龜井起子 平野悟 (4.10/1～5.3/31)	*堤悦子 *伊崎代子 *進町子 ○森本雅子 (4.4/1～) ○大橋啓子 (4.4/1～) ○岡本公子 (4.4/16～)	福水道郎 (4.4/1～9/30) 小沢文紀 山下山功 松井中一 大田中 給木総 加藤俊 岩田俊 今村淳 (4.6/1～) 松田三子 (4.6/16～) 佐藤雅彦 (4.6/16～) 鬼本博文 (4.10/1～) 亀井淳 (4.10/16～)	猪股賢一 鈴木角田 田西斐木 許博文 鈴L.E.Becker (5.2/28～3/14)	猪股賢一 鈴木角田 田西斐木 許博文 鈴L.E.Becker (5.2/28～3/14)	

疾病研究第三部	高橋清久 (~4.6/30) 杉田秀夫 (事務取扱)	三國雅徹 西川 (5.1/1~)	池田正明 (~5.3/31)	富田安 黒田 (~5.2/23)	○海野麻子 ○斉藤和子 ○山崎千尋 (4.4/16~)	瀨川文徳 (5.3/1~)	石川大 小宮山 洪三ツ 綱島ゆ 武内浩 伊豫雅 木村和 (4.4/15~) (4.7/1~) (4.10/1~) (4.10/1~) (4.10/1~) (5.2/1~)	橋本篤 司
疾病研究第四部	杉田秀夫 (事務取扱 ~4.8/30) 和田圭司 (4.9/1~)	小田健一郎 (~5.3/31) 郭伸 (~4.9/30) 吉田瑞子	眞先敏 (~4.9/30) 渡瀬啓 (5.1/1~)	○松井京子 *志鎌昌子 *木内美子 ○和田恵津子 (4.9/28~) *高橋真理 (4.10/3~5.1/18) *陣野多磨 (5.2/1~)	中村良司 (4.7/1~9/30) 徐俊教 (4.11/16~)	純輝繁伸 村木岡 花岡郭 (4.10/1~)		
疾病研究第五部	桜川宣男	桃井隆	佐々木征行 (4.7/27~ 海外出張)	大島登志男 新井幸男	*和氣佳代 *川西桂信 *佐藤滋信 (4.4/16~5.1/18) ○松延康 (4.10/1~)	充夫典之 藤詔秀 川木谷岡 新鈴崎村 岩石裕澄 井	橋本篤 司	

I 神経研究所の概要

部名	部長	室長	研究員	流動研究員	○センター研究員 *センター研究員	研究生 △研究員 △研究生	併任研究員	客員研究員	外来研究員
疾病研究第六部	田平 武	国高山 下橋村 龍慶 英吉隆		北口哲雄 (~4.9/30) 遠藤真澄 (~5.3/31) 佐藤準一 (4.4/1~9/30) 光永吉宏 (4.12/1~5.3/31)	*掛場康予 *久野かほる *田平洋子 ○小西吉裕 (4.4/1~11/30) ○光永吉宏 (4.4/1~11/30) Alice Mayumi Takeuchi (4.12/1~) 泉龍太郎 (5.2/1~)	平澤基之 (4.8/1~) 鈴木浩悦 (4.10/1~)	北口哲雄 (4.10/1~)	佐藤準一 (4.10/1)	Ferenc Gallyas Jr. (~4.10/30) Milena E Kozovska 荒木巨弥 池田幸弥 (4.4/11~) Tong-Chao Geng (4.8/3~) 須川 誠 (4.12/1~)
疾病研究第七部	杉田秀夫 (事務取扱)	西川 徹 (~4.12/31) 三辺義男 (5.1/1~)			*川上藤江 (5.3/15~)		宇野正威		
診断研究部	中村 俊	荻服部 孝成 史介		Ahmed MD Kabir (~5.3/31) 森下 卓 (4.4/1~9/30) 室屋賢蔵 (4.10/1~)	*奥田 薫 ○前川みどり *高山明美 ○室屋賢蔵 (4.4/1~9/30) ○横田京子 (4.6/1~)	橋本裕哉 田中伸哉 (4.4/16~) △塩野谷基子 (4.7/27~10/31) △佐藤小百合 (4.10/12~) 山崎典子 (8.3/1~)	前川昌平 高山 豊 (4.6/1~) 矢沢洋一 (4.8/3~) 松田道行 (4.8/24~) 森下 卓 (4.10/1~)		Zhang Jian (5.2/22~)

<p>微細構造研究部</p>	<p>埜中征哉 (~4.5/30) 埜中征哉 (4.6/1~ 併任事務取扱)</p>	<p>加茂功</p>	<p>菊池愛雄 後藤雄一 (5.1/22 海外 出張より帰任)</p>	<p>松岡太郎 (~4.6/30) 竹光正和 (~5.3/31) 作田亮一 (~5.3/31)</p>	<p>○桶田利加子 * 神岡里まこ ○竹光まこと (4.4/13~5.3/30) * 山村琴代 (4.5/1~9/30) * 平田純子 (4.10/1~)</p>	<p>秋山千枝子 簡永中田曾小石川齊岩 刃根林原口藤上 岩(4.6/1~) 田沼直之 (4.7/1~) 松岡太郎 (4.9/1~) 山内洋子 (4.10/1~) 井元千佳子 (4.9/21~) 鈴木ゆめ (4.10/1~) Beatriz Hitomi Kiyomoto (4.10/21~) 原元彦 (4.11/1~) 川元龍夫 (4.11/12~) 村上信行 (4.12/1~) 西野一三 (5.1/14~) 村山薫子 (5.1/14~) 冲津明 (5.2/1~) 門脇弘子 (5.3/1~)</p>			
----------------	--	------------	---	---	---	--	--	--	--

実験動物管理室		松崎哲也							
ラジオアイソトープ管理室		今澤正興				○武市正美			
						○二瓶淳子			
						* 松崎香苗			

所長室	庶務第一課							高木富子
事務室								桜井真理子 斎藤洋子
R I 室								三井恵理子
電顕室								赤堀 宏

4. 平成4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4年 4. 3	池田正行 神経研究所疾病研究第三部研究員	アルツハイマー病脳でのイオンチャンネルの変化	疾病研究第三部
5. 7	Muthu Periasamy Associate Professor, Dept. of Physiology and Biophysics, University of Vermont, U. S. A.	Sarcoplasmic reticulum gene expression in skeletal and cardiac muscles	遺伝子工学研究部
5. 13	小林高義 東京医科歯科大学医学部神経内科講師	ヒト筋細胞培養法によるヒト筋細胞の発達及 び神経筋疾患の病態解明への応用	微細構造研究部
	荒畑喜一 神経研究所疾病研究第一部室長	筋疾患の分子病理学的研究—現況と将来への 展望	微細構造研究部
5. 18	A. G. Engel Professor, Dept, of Neurology, Neuromuscular Research Lab., Mayo Clinic, Mayo Medical School, U. S. A.	Myasthenic syndromes	疾病研究第一部
5. 22	半田 宏 東京工業大学生命理工学部教授	E T S 関連蛋白質とNotch関連蛋白質による 複合転写因子	代謝研究部
5. 26	Richrd T. Johnson Professor, Johns Hopkins University, U. S. A.	感染後脳脊髄炎について	疾病研究第六部
5. 29	太田安隆 熊本大学医学部第一薬理学教室	細胞内情報伝達におけるアクチン結合蛋白質 の役割	診断研究部
6. 8	Eric P. Hoffman Professor, Dept. of Molecular Genetics and Biochemistry, Dept. of Human Genetics, University of Pittsburg, School of Medicine, U. S. A.	Mutation in the skeletal muscle Na ⁺ channel in hyperkalaemic periodic paralysis	疾病研究第一部
6. 8	Stephan Tapscott Fred Hutchinson Cancer Research Center U. S. A.	Molecular mechanism of muscle lineage determination	遺伝子工学研究部
6. 8	Eric Olson Professor, M. D. Anderson Cancer Center, U. S. A.	Molecular function of myogenic factors	遺伝子工学研究部
9. 28	David D. Felton Professor, Rochester Medical Center U. S. A.	免疫細胞におけるノルアドレナリンと神経ペ プチドのシグナル	疾病研究第六部
10. 22	近藤 滋 Biocenter, Basel University, Switz- land	形態形成のコンピューターシュミレーション	遺伝子工学研究部

I 神経研究所の概要

年月日	講 師 ・ 所 属	演 題	担 当
10. 29	鈴木 邦彦 Director, Biological Science Research Center, University of North Carolina, U. S. A.	Sphigolipid activator protein and its genetic abnormality	代謝研究部
11. 2	Laurence Austin Monash University, Australia	The effect of leukemia inhibitory factor and other cytokines in myoblast growth and muscle regeneration.	疾病研究第一部
11. 30	Roscoe O. Brady Chief, Developmental and Metabolic Neurology Branch, NINDS, U. S. A.	Development of effective enzyme replace- ment therapy for hereditary diseases	疾病研究第五部
11. 27	高 桑 雄 一 東京女子医科大学大学生化学教授	赤血球膜の裏打ち構造とその機能	機能研究部
12. 3	成 松 久 創価大学生命科学研究所教授	複合糖質の分子生物学	免疫研究部
平成5年			
1. 26	Irur R. Cohen Professor, Dept. of Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel	Regulation of autoimmunity	疾病研究第六部
2. 4	島 忠 雄 九州大学医学部付属脳研究施設 臨床生理 学助教授	パーキンソン病の寡動症に対する定位脳手術	疾病研究第六部
2. 10	三 辺 義 雄 神経研究所疾病研究第七部室長	1) Kindringを用いた実験てんかん研究 2) Dopamine機能の電気生理研究	セミナー委員会
2. 16	白 尾 智 明 慶応大学医学部生理学助教授	アクチン結合蛋白ドレブリンの神経発生にお ける役割	機能研究部
2. 16	Gideon Berke Professor, Head, Dept. of Cell Biology The Weizmann Institute of Science, Israel	キラーT細胞による組織障害の機構	疾病研究第六部
2. 19	寺 島 俊 雄 東京都神経科学総合研究所解剖発生	大脳皮質第五層ニューロンから起こる投射の 発生的研究	疾病研究第一部
2. 24	武 田 伸 一 神経研究所疾病研究第一部室長	Myosin heavy chain遺伝子の転写調節	セミナー委員会
2. 26	Thomas Kornberg Professor, University of California, San Francisco, U. S. A.	Gene controlling developmental compartments in drosophia	遺伝子工学研究部
3. 2	Laurence E. Becker Professor, Head of Neuropathology, University of Tronto, Canada	代謝性神経疾患：神経病理と画像の関係	疾病研究第二部

I 神経研究所の概要

年月日	講 師 ・ 所 属	演 題	担 当
3. 10	林 謙 介 神経研究所機能研究部研究員	体節から肢芽への筋芽細胞の遊走	セミナー委員会
3. 27	小 田 健一郎 神経研究所疾病研究第四部室長	先天性と自己免疫性病態モデル	セミナー委員会
3. 29	国立精神・神経センター 免疫シンポジウム	「神経系免疫性疾患におけるT細胞受容体解析」	疾病研究第六部
	井野邊 純 一 神経研究所研究第六部	プロテオリピッド・タンパク特異的Tクローンのエピトープ解析	
	太 田 宏 平 東京女子医科大学	多発性硬化症患者におけるミエリン塩基性タンパク反応性T細胞の日米比較	
	近 藤 誉 之 神経研究所	Inverse and double step PCR法によるプロテオリピッド・タンパク特異的T細胞受容体の解析	
	Ursula Utz Co-chief, NINDS, NIH, U. S. A.	一卵性双生児におけるミエリン塩基性タンパク反応性T細胞のT細胞受容体解析	
	原 英 夫 九州大学	HAM/TSP患者髄液T細胞のT細胞受容体V遺伝子解析	
	園 田 俊 郎 鹿児島大学医学部ウイルス学教授	HAM/TSP患者由来HTLV-I特異的キラー細胞の受容体解析	
	山 本 一 彦 東京大学医学部物療内科講師	SSCP法を用いたT細胞受容体選択的使用の解析	
	住 田 孝 之 千葉大学医学部第二内科	Sjögren症候群唾液線浸潤T細胞のT細胞受容体解析	
	山 村 隆 神経研究所疾病研究第六部室長	自己免疫性脳炎誘起性T細胞のT細胞受容体解析	
	William E. Biddison Chief, NINDS, NIH, U. S. A.	MSの感受性に関与するgerm-line T細胞受容体遺伝子	

5. 平成4年度 神経研究所発表会（第14回）（表4）

平成5年3月22日（月）

神経研究所本館セミナールーム

9:00-9:10 開会の辞

杉田 秀夫所長

9:10-9:40 疾病研究第一部

「長期室温保存された乾燥臍帯および筋病理組織標本によるジストロフィン遺伝子診断」

川口 洋子, 後藤加奈子
塚原 俊文, 武田 伸一
埜中 征哉*, 杉田 秀夫
荒畑 喜一（*微細）

「筋ジストロフィーにおける基底膜の変化」

林 由紀子, 平澤 恵理
塚原 俊文, 武田 伸一
杉田 秀夫, 荒畑 喜一
埜中 征哉*（*微細）

9:40-10:10 疾病研究第二部

「ヒト大脳白質のグリア細胞の発達と脳室周囲白室軟化形成に関する免疫組織学的検討」

飯田 浩一, 高嶋 幸男

「近赤外線分光測定による脳循環動態の観察：特に脳血管反応の把握を中心に」

平野 悟, 鬼本 博文
高嶋 幸男

10:10-10:40 疾病研究第三部

「哺乳類脳における内在性遊離型D-アスパラギン酸とD-セリンに関する研究」

橋本 篤司, 熊代 新
岡高 恵, 西川 徹

「セロトニンレセプターの機能：5HT_{1A}レセプター強制発現細胞樹立と5HT₂レセプター刺激性AP1, CRE結合活性の誘導について」

池田 正明, 斎藤 和子
山崎 千尋, 三国 雅彦

I 神経研究所の概要

10 : 40-11 : 10 疾病研究第四部

- 「我々の目差すもの」 和田 圭司
「GADミュータントマウスからヒト神経変性疾患へ」 小田健一郎
「強縮刺激時におけるmdx骨格筋細胞内Ca²⁺濃度および筋原線維崩壊」 吉田 瑞子

11 : 10-11 : 40 疾病研究第五部

- 「Microdissection 法によるヒト染色 region specific probe 作製に関する基礎研究」 横山 安伸, 大島登志男
桜川 宣男
「Gaucher 病及び metachromatic leukodystrophy 患者における遺伝子変異の検討」 大島登志男, 桜川 宣男

11 : 40-12 : 10 疾病研究第六部

- 「脳におけるIL-3の発現とその受容体の解析」 小西 吉裕, 崔 得華
国下 龍英, 田平 武
「活性化T細胞反応性CD4⁻CD8⁻αβT細胞による自己免疫性脳脊髄炎の抑制」 山村 隆, 二瓶 淳子
田平 武

12 : 10-12 : 40 微細構造研究部

- 「Dystrohin-related protein (DRP) の骨格筋における局在 : 免疫組織化学的検討」 竹光 正和, 埜中 征哉
石浦 章一*, 古賀 律子*
荒畑 喜一*, 杉田 秀夫*
(*疾病第一部)
「胸腺筋様細胞が産生する新しいタイプの造血刺激因子」 加茂 功

12 : 40-13 : 00 写真撮影

13 : 00-13 : 40 昼休み

13 : 40-14 : 10 機能研究部

「ジストロフィン膜結合部位における分子構築」

鈴木 厚, 林 謙介
吉田 幹晴, 小沢鎧二郎
萩原 康子, 水野 裕司
竹光 正和*, 埜中 征哉*
小沢鎧二郎 (*微細)

「mdx ノードマウス筋へ注入移植されたC2筋芽細胞の動向」

14 : 10-14 : 40 代謝研究部

「アネキシンVの中樞神経における機能解析」

今井 嘉紀, 武井 延之
大澤 圭子, 高坂 新一
中嶋 一行, 永田 晃一
浜之上 誠, 島田 章則
竹本なぎさ, 高坂 新一

「ミクログリア分泌性プラスミノーゲンは神経栄養活性を表わす」

14 : 40-15 : 10 診断研究部

「チロシンリン酸化を介する ras 活性化シグナル伝達機構の解析」

橋本 裕子, 室屋 賢康
服部 成介, 中村 俊
前川みどり, 中村 俊
服部 成介

「新しい rasGTPase 活性促進因子 (rasGAP) の精製」

「¹HMRI/³¹P MRS によるヒト下腿筋の運動適応性の個体的差異の研究—

ヒト筋繊維組成の無侵襲・非破壊計測は可能か？」

矢野登志雄, 荻野 孝史

15 : 10-15 : 40 免疫研究部

「イディオタイプ発現B細胞株の樹立とイディオタイプ特異的CD4 T細胞
の応答」

松浦 靖

「胸線内T細胞初期分化に関与する分子群の解析」

竹内 保

I 神経研究所の概要

15:40-16:10 遺伝子工学研究部

「MyoD および Myogenin による筋特異的転写誘導機構—筋分化の分子機構の解明を目指して」

藤沢 淳子, 朝倉 淳
江隅 英作, 上条 桂樹
佐藤 智美, 鍋島 曜子
八神 貴子, Shaowei Li
鍋島 陽一

16:10-16:40 モデル動物開発部

「LacZ 遺伝子を用いたマウス細胞の標識とその応用」

花岡 和則

「マウスコロナウイルス JHM 株 cl-2 変異株スパイク (S) 蛋白特異的モノクローナル抗体の認識部位について」

久保 英幸, 田口 文広

16:40-16:55 ラジオアイソトープ管理室

「ラジオHPLCによる培養小脳グラニュール細胞のイノシトールリン酸類動態の検討」

今沢 正興, 竹市 正美

16:55-17:10 実験動物管理室

「スunks (Suncus murinus) における排卵誘起及び初期発生について」

松崎 哲也

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、各種の神経・筋疾患を臨床と基礎医学の立場から研究している。私どもはこれまで、国立精神・神経センター神経研究所内部の交流に止まらず諸外国（米国・ハーバード大学、ピッツバーグ大学、La Jolla ガン研究所；オランダ王国・ライデン大学；ドイツ国・ボン大学；ロシア国・パプロフ研究所；マレーシア国・マラヤ大学）等との国際共同研究を推進して来た。これらの研究内容は大きく3つに分けられる。①筋ジストロフィーの研究 ②多発性筋炎の研究 ③その他の神経・筋疾患の研究である。研究の方法論としては、主として臨床的、分子病理学的、生化学的、遺伝子工学的側面から研究しており、これらの疾患の遺伝子診断と病因・病態機序の解明および治療法の開発に寄与することを主目的としている。①については、主としてデュシャンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、三好型筋ジストロフィー等が取り上げられた。②番目の多発性筋炎では主として細胞障害性Tーリンパ球（Tc）の骨格筋障害作用について研究を進めた。Tcのエフェクター蛋白である、パーフォリンおよびセリンエステラーゼの果たす役割を解明した。さらに、mRNAの発現状況を直接捕らえて行く予定である。③はかなり広範にわたるテーマであり、各種の先天性ミオパチーや代謝性ミオパチー、あるいは家族性高カリウム性周期性四肢マヒ（FHKPP）のようなチャンネル病がある。我々はとくに本邦のFHKPP家系において初めてNaチャンネルの α -サブユニットに点突然変異の存在することを発見した。

平成4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） 荒畑喜一（4.7.1～、4.4.1～6.30の間は杉田秀夫が事務取り扱い）

（室長） 武田伸一（4.9.1～、パスツール研究所より着任）

（研究員） 塚原俊文（4.10.1～、コールドスプリングハーバー研究所より帰国）

（客員研究員） 高木昭夫、米本恭三

（併任研究員） 石浦章一、石原傳幸、佐藤 猛、春原経彦、山口 明、鎌倉恵子

（流動研究員） 中村浩一郎、林由起子、下川雅丈

（センター研究員） 後藤加奈子、古賀律子、青木治美

（研究生） 中尾洋子、平澤恵理、織茂智之、古城 徹、平林久吾、小泉宏隆、田川一彦、吉田邦彦、奥山輝之、野島美知夫、淵脇泰介

（部長 荒畑 喜一）

II 研究業績

2. 研究業績

A 論文

a. 原著

- 1) Koga R, Ishiura S, Takemitsu M, Kamakura K, Matsuzaki T, Arahata K, Nonaka I, Sugita H :
Immunoblot analysis of dystrophin-related protein (DRP)
Biochem Biophys Acta 1180 : 257–261, 1993
- 2) Hoffman EP, Arahata K, Minetti C, Bonilla E, Rowland LP and Co-Authors :
Dystrophin abnormality in isolated cases of myopathy in females
Neurology 42 : 967–975, 1992
- 3) Koga R, Ishiura S, Arahata K, Takakuwa T, Nonaka I, Sugita H :
Quantitative analysis of dystrophin in human and rodent muscles
Biomed Res 13 : 215–219, 1992
- 4) Nakamura K, Arahata K, Orimo S, Ishiura S, Sugita H :
The role of granzyme A on cytotoxic T cell-mediated muscle fiber damage
Brain Pathology 2 : 257, 1992
- 5) Orimo S, Nakamura K, Tamaki S, Ishiura S, Nonaka I, Sugita H, Arahata K :
Immunohistochemical analysis of perforin and granzyme A in inflammatory myopathies
Brain Pathology 2 : 257, 1992
- 6) Hayashi Y, Arikawa E, Nonaka I, Sugita H, Arahata K :
Changes in extracellular matrix, laminin and collagen IV, in Fukuyama congenital muscular dystrophy
Brain Pathology 2 : 257, 1992
- 7) Shimokawa M, Nakamura K, Maruyama K, Arahata K, Miyatake T, Sugita H :
Kunitz inhibitor domain of soluble β -amyloid protein precursor shows protease inhibitory activity
Brain Pathology 2 : 259, 1992
- 8) Takeda S, North DL, Lakidh MM, Russell SD, Whalen RG :
A possible regulatory role for conserved promoter motifs in an adult-specific muscle myosin gene from mouse
J Biol Chem 267 : 16957-16967, 1992

- 9) 荒畑喜一, 古川哲雄, 佐橋 功, 衣斐 達, 野村芳子, 瀬川昌也, 中尾洋子, 後藤加奈子,
埜中征哉, 杉田秀夫 :
染色体 4 q35~qter マーカー P13E-11 による顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの遺伝子診断
医学のあゆみ 164 : 865-866, 1993
- 10) 織茂智之, 荒畑喜一 :
多発性筋炎/皮膚筋炎 : 診断のためのガイドライン
臨床医 18 : 49-51, 1992
- 11) 中村浩一郎, 織茂智之, 古賀律子, 後藤加奈子, 石浦章一, 荒畑喜一 :
多発性筋炎におけるパーフォリン, セリンエステラーゼ (グランザイム) の関与
臨床免疫 24 : 1381-1388, 1992
- 12) 中村浩一郎, 荒畑喜一, 里吉宮二郎 :
筋ジストロフィー症 : 本邦臨床統計集
日本臨床 50 : 179-185, 1992

b. 著 書

- 1) Arahata K, Sugita H :
Dystrophin defect in Duchenne and Becker muscular dystrophy
Cellular Membrane, ed by Ohnishi ST and Ohnishi T,
CRC Press, Boca Raton, p367-385, 1993
- 2) Arikawa E, Arahata K, Sunohara N, Ishiura S, Nonaka I, Sugita H :
Immunocytochemical analysis of dystrophin in muscular dystrophy
Duchenne muscular dystrophy, ed by Kakulas B, Howell JM, Roses A,
Raven Press, New York, p81-88, 1992
- 3) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :
変性性筋疾患の成因
現代病理学大系21A, 東京, p132-142, 1992
- 4) 荒畑喜一 :
筋ジストロフィー (Duchenne/Becker)
臨床遺伝医学 III 分子病, 古庄敏行ほか編, 診断と治療社, 東京, p314-321, 1993
- 5) 荒畑喜一 :
筋ジストロフィー (Duchenne, Myotonic dystrophy を含めて)

II 研究業績

神経疾患の分子医学, 辻 省次編, 羊土社, 東京, p94-110, 1993

6) 林 由起子 :

BMD/DMD の臨床と遺伝子診断

モダンクリニカルポイント神経内科, 平山恵造編, 金原出版, 東京, p112-113, 1993

c. 総 説

1) 荒畑喜一 :

遺伝性疾患のDNA : 進行性筋ジストロフィー

臨床科学 28 : 416-424, 1992

2) 林 由起子, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

DMD/BMD とジストロフィン

内科 69 : 1296-1298, 1992

3) 荒畑喜一 :

筋ジストロフィーの遺伝子診断 : Duchenne 型筋ジストロフィーと筋緊張性ジストロフィーの現況

医学のあゆみ 162 : 630-636, 1992

4) 有川恵理, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

Duchenne 型筋ジストロフィー

臨床検査 36 : 82-87, 1992

5) 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, 1992

d. 班会議報告書

1) 荒畑喜一, 武田伸一, 塚原俊文, 林由起子, 中村浩一郎, 川口洋子, 平澤恵理, 古城 徹,

織茂智之, 古賀律子, 後藤加奈子 :

ジストロフィン遺伝子異常と表現型

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

(2指-2)

平成4年度研究報告書 p17-18, 1993

2) 荒畑喜一, 埜中征哉, 古賀律子, Hoffman EP, Bonilla E :

ミオパチー女性例に見るジストロフィン異常の出現頻度

厚生省精神・神経疾患(2指-2), 平成4年度研究報告書 p169-171, 1993

- 3) 荒畑喜一, 林由起子, 平澤恵理, 武田伸一, 塚原俊文, 埜中征哉, Engvall E :
筋ジストロフィーにおける細胞外マトリックスの変化
厚生省精神・神経疾患（2指-2）, 平成4年度研究報告書 p172-175, 1993
- 4) 荒畑喜一, 川口洋子, 後藤加奈子, 塚原俊文, 武田伸一, 埜中征哉 :
長期室温保存された臍帯及び筋病理標本によるジストロフィンの遺伝子診断
厚生省精神・神経疾患（2指-2）, 平成4年度研究報告書 p166-168, 1993
- 5) 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・遺伝性神経疾患の遺伝子解析研究班平成4年度研究報告書（印刷中）
- 6) 佐橋 功, 衣斐 達, 周防 拓, 田代伯為, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :
生検筋におけるジストロフィン関連蛋白の免疫組織化学的検討
厚生省精神・神経疾患（2指-2）, 平成4年度研究報告書 p111-115, 1993
- 7) 水澤英洋, 大越教夫, 吉澤利弘, 外山昌弘, 杉下靖郎, 高木昭夫, 後藤加奈子, 荒畑喜一 :
悪性高熱を呈した Becker 型筋ジストロフィー症例
厚生省精神・神経疾患（2指-2）, 平成4年度研究報告書 p42-45, 1993
- 8) 中村浩一郎, 織茂智之, 荒畑喜一 :
筋細胞に対するCTL中の細胞障害因子の作用の検討（続報）
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班
平成4年度研究報告書（印刷中）
- 9) 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（続報）
厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班
平成4年度研究報告書（印刷中）

B 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

- 1) Arahata K, Nonaka I, Sugita H :
Molecular pathology of Duchenne/Becker muscular dystrophy
Symposia : First IUBMB International Conference on Biochemistry of Diseases, Nagoya,
6.1, 1992

II 研究業績

2) Arahata K :

FSHD and DMD research at the National Institute of Neuroscience in Tokyo
Leiden University, The Netherlands, 9. 14, 1992

3) Arahata K :

Clinical and genetic analyses of Japanese FSHD patients using the p13E-11 probe
6th International Workshop on FSH dystrophy, San Francisco, 11. 11, 1992

4) 荒畑喜一 :

解明された筋疾患遺伝子

日本神経学会関東地区生涯教育講演会, 東京, 1. 16, 1993

5) 荒畑喜一 :

筋疾患 : 臨床研究のトピックス

第41回県北神経懇話会学術講演会, 長崎, 2. 23, 1993

b. 国際学会

1) Arahata K, Nonaka I, Sugita H :

Dystrophin abnormality in patients with severe muscular dystrophy
11th International Meeting on Neuromuscular Diseases,
Marseille, 9. 12, 1992

2) Arahata K :

FSH dystrophy and lymphocytes infiltration
11th International Meeting on Neuromuscular Diseases,
Marseille, 9. 11, 1992

3) Nakamura K, Orimo S, Arahata K, Ishiura S, Sugita H :

The molecular mechanism of muscle necrosis in polymyositis
11th International Meeting on Neuromuscular Diseases,
Marseille, 9. 11, 1992

4) Nakamura K, Arahata K, Orimo S, Ishiura S, Sugita H :

The role of granzyme A on cytotoxic T cell-mediated muscle fiber damage
5th Annual Meeting of the Society for Experimental Neuropathology,
Toronto, Canada, 10. 17, 1992

5) Orimo S, Nakamura K, Tamaki M, Ishiura S, Nonaka I, Sugita H, Arahata K :

Immunohistochemical analysis of perforin and granzyme A in inflammatory myopathies
 5th Annual Meeting of the Society for Experimental Neuropathology,
 Toronto, Canada, 10.17, 1992

- 6) Hayashi Y, Arikawa E, Nonaka I, Sugita H, Arahata K :
 Changes in extracellular matrix, laminin and collagen IV, in Fukuyama congenital muscular dystrophy
 5th Annual Meeting of the Society for Experimental Neuropathology,
 Toronto, Canada, 10.17, 1992
- 7) Shimokawa M, Nakamura K, Maruyama K, Arahata K, Miyatake T, Sugita H :
 Kunitz inhibitor domain of soluble β -amyloid precursor shows protease inhibitory activity
 5th Annual Meeting of the Society for Experimental Neuropathology,
 Toronto, Canada, 10.17, 1992
- 8) Arahata K, Wang J, Feero WG, Hayakawa H, Honda K, Sugita H, Hoffman EP :
 Identification of Thr-to-Met mutation in the skeletal muscle sodium channel gene in hyperkalemic periodic paralysis of a Japanese family
 New York Academy of Sciences : Molecular Basis of Ion Channels and Receptors Involved in Nerve Excitation, Synaptic Transmission and Muscle Contraction, Tokyo, 1.13, 1993
- 9) Tsukahara T :
 Regulation of alternative 5' - and 3' - splice site selection in β -tropomyosin pre-mRNA
 Gordon Conference : RNA Processing Meeting
 Keystone, Colorado, 5.27, 1992

c. 一般学会

- 1) 荒畑喜一, 石浦章一, 林由起子, 杉田秀夫, Beggs AH, Kunkel LM :
 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
 第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.21, 1992
- 2) 有川恵理, 松井 潔, 林由起子, 埜中征哉, 杉田秀夫, 荒畑喜一 :
 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
 第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.21, 1992
- 3) 織茂智之, 沖山亮一, 荒井雅信, 玉城充之, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :
 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

II 研究業績

第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 21, 1992

C 班会議発表

- 1) 荒畑喜一, 武田伸一, 塚原俊文, 林由起子, 中村浩一郎, 川口洋子, 平澤恵理, 古城 徹,
織茂智之, 古賀律子, 後藤加奈子 :

ジストロフィン遺伝子異常と表現型

平成4年度厚生省精神・神経疾患委託費「筋ジストロフィー総合班会議」 東京, 1. 21, 1993

- 2) 荒畑喜一, 埜中征哉, 古賀律子, Hoffman EP, Bonilla E :

ミオパチー女性例に見るジストロフィン異常の出現頻度

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

(2指-2)

平成4年度班会議, 東京, 12. 4, 1992

- 3) 荒畑喜一, 林由起子, 平澤恵理, 武田伸一, 塚原俊文, 埜中征哉, Engvall E :

筋ジストロフィーにおける細胞外マトリックスの変化

厚生省精神・神経疾患(2指-2)

平成4年度班会議, 東京, 12. 4, 1992

- 4) 荒畑喜一, 川口洋子, 後藤加奈子, 塚原俊文, 武田伸一, 埜中征哉 :

長期室温保存された臍帯及び筋病理標本によるジストロフィンの遺伝子診断

厚生省精神・神経疾患(2指-2)

平成4年度班会議, 東京, 12. 4, 1992

- 5) 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・遺伝性神経疾患の遺伝子解析研究班,

平成4年度班会議, 東京, 2. 4, 1993

- 6) 佐橋 功, 衣斐 達, 周防 拓, 田代伯為, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

生検筋におけるジストロフィン関連蛋白の免疫組織化学的検討

厚生省精神・神経疾患(2指-2)

平成4年度班会議, 東京, 12. 4, 1992

- 7) 水澤英洋, 大越教夫, 吉澤利弘, 外山昌弘, 杉下靖郎, 高木昭夫, 後藤加奈子, 荒畑喜一 :

悪性高熱を呈した Becker 型筋ジストロフィー症例

厚生省精神・神経疾患（2指-2）

平成4年度班会議，東京，12.4, 1992

8) 中村浩一郎，織茂智之，荒畑喜一：

筋細胞に対するCTL中の細胞障害因子の作用の検討（続報）

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，

平成4年度班会議，東京，1.18, 1993

9) 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（続報）

厚生省特定疾患・免疫性神経疾患調査研究班，

平成4年度班会議，東京，1.18, 1993

3. 主な研究報告

筋ジストロフィーにおける細胞外マトリックスの変化

林由起子, 平澤恵理, 埜中征哉, 武田伸一, 塚原俊文, 杉田秀夫, 荒畑喜一

目的: ジストロフィンの欠損しているDMD (Duchenne型筋ジストロフィー) 筋ではジストロフィン関連膜タンパク (dystrophin-associated proteins; DAPs) も著明に減少していることが知られている。さらにこのDAPsの細胞外サブユニット (156KDAG) が筋基底膜の主成分であるラミニンと結合していることも報告されている。そこで我々は筋ジストロフィーにおける細胞外マトリックスの変化を、免疫組織化学的手法を用いて定性的、定量的に検討した。

方法: 対照は臨床的、筋病理学的に診断の確定している64症例、福山型筋ジストロフィー (FCMD;17例)、non FCMD (13例)、DMD (16例)、対照筋 (OND;18例) の生換筋を用いた。6 μ mの筋凍結切片を作成し、基底膜の主成分であるラミニン (A、B1、B2、M (メロシン) の各サブユニット)、IV型コラーゲン、および筋細胞骨格タンパクであるジストロフィン、スペクトリンに対する抗体を用いて免疫染色し、その染色パターンを比較検討した。

加えて、各疾患群よりage-matchedの5症例を選び、IBAS自動解析装置を用いて免疫染色強度を定量的に計測した。方法は同じ条件で免疫染色した標本からそれぞれ56,000 μ m²に相当する部位をランダムに選択し、それを3264個のピクセルに分割した。バックグラウンドによる誤差をなくすため、平均細胞質濃度を差し引いた後、ピクセル毎の濃度を自動的に計測し、単位面積当たりの平均免疫染色強度を計測、さらに測定部位に含まれている筋細胞の膜の全周長を測定し、単位膜当たりの平均免疫染色強度を計算した。

結果:

1. 福山型筋ジストロフィー (FCMD)
 - 1) ジストロフィン、スペクトリンは、対照筋と比較して異常な染色パターンをとる線維が多く認められた。(J Neuro Sci; 1991)
 - 2) ラミニンM (メロシン) の免疫染色強度は他の疾患群と比較して著しく減少しており、また、染色パターンの異常も認められた。ラ

ミニンB1、B2にも変化が認められたが、その程度はM鎖ほどではなかった。

- 3) FCMD胎児筋 (23w) においても、DMD胎児筋 (18w) と比較してラミニンMの免疫染色強度は著しく減弱していた。
- 4) ラミニンAは対照群の筋線維周囲には認められなかったが、FCMDではほとんどの筋線維 (~90%) で認められた。
- 5) IV型コラーゲンは染色パターンに異常は認められたが、染色強度に有意差は認められなかった。
2. DMD筋では、ラミニンM、B1、B2に変化は認められなかったが、ラミニンAがほとんどの筋線維で認められた。
3. 血管基底膜の免疫反応は疾患群による差異を認めなかった。

考察:

1. FCMDでは骨格筋線維の基底膜に異常が存在し、これが形質膜の脆弱性に関与している可能性が示唆された。
2. 特にFCMDにおけるラミニンMの著しい減少は、ラミニンの3本鎖構造が変化していることを示唆し、また、FCMD胎児においてもラミニンMが減少していることより、ラミニンMの変化はFCMDの病因と強いかかわりを持っているものと考えられた。
3. ジストロフィンの欠損は必ずしも骨格筋線維基底膜の基本構造には異常はきたさないものと考えられた。

文献

- 1) Hayashi Y, Arikawa E, Nonaka I, Sugita H, and Arahata K: Changes in Extracellular Matrix, Laminin and Collagen IV, in Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy. Brain Pathology 2:257, 1992.
- 2) Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E et al: Abnormal Localization of Laminin Subunits in Muscular Dystrophies. J Neuro Sci (In Press).

長期室温保存された臍帯及び筋病理標本によるジストロフィンの遺伝子診断

中尾洋子, 後藤加奈子, 塚原俊文, 武田伸一, 桢中征哉, 杉田秀夫, 荒畑喜一

目的:

DMD/BMD家系における保因者診断の際に、その有力な手がかりとなる発端者からの情報が得られないことがしばしばある。このような場合でも我が国では患児の臍帯が保存されていることは多い。そこで我々は、患児の臍帯及び残された筋病理組織標本よりゲノムDNAの抽出を試み、ジストロフィン遺伝子診断の可否について検討した。

方法:

DMD/BMD患者の臍帯(5例:保存期間5年~62年)及び組織化学染色(H&E, mGT, NADH, SDH, PAS, Oil red O, ATPase, Acid-phosphatase, NSE, CCO)の施された筋病理標本(4例:保存期間1年~14年)よりゲノムDNAを抽出し、マルチプレックスPCR法を用いてジストロフィン遺伝子の解析を行った。さらに入手可能であった同一患者の臍帯、末梢血リンパ球及び筋凍結切片より抽出したDNAについても同様に遺伝子解析を行った。

結果:

最長62年間室温保存された乾燥臍帯より抽出したゲノムDNAからも、新鮮材料からのDNAと同様にジストロフィン遺伝子のPCR法による増幅は可能であった。また、同一患者から得られた臍帯、末梢血リンパ球および生検筋より抽出したゲノムDNAを用いたPCR法による遺伝子解析の結果、これら3種のサンプルについてはいずれも同一部位にジストロフィン遺伝子の部分欠失が認められた(Fig.1)。組織化学染色標本については、NADH, SDH, ATPase, Acid-phosphatase 染色標本からジストロフィン遺伝子解析が可能なDNAが得られた。一方、核染色にヘマトキシリンを使用しているH&E, mGT, PAS, Oil-red O 染色標本からは、適当なDNAは得られなかった(Fig.2)。ヘマトキシリンのゲノムDNAに及ぼす効果を確認するために、ゲノムDNA自体にヘマトキシリン染色液を添加すると、紫色の沈殿物が形成された。これよりゲノムDNAを再抽出しジストロフィン遺伝子のPCR法による増幅を試みたが、アガロースゲル電気泳動上バンドは確認できなかった。

結論:

長期間室温にて保存された臍帯および筋病理組織標本の一部は、発端者がすでに死亡し、遺伝子診断に必要な血液や生検材料等が入手できない場合にも有効なジストロフィンDNAの情報源となりうると考えられる。また、ヘマトキシリンは、その酸化剤であるヘマチンがゲノムDNAのリン酸基と結合することにより、ゲノムDNA自体を阻害している可能性が示唆された。

Fig.1

臍帯, 末梢血リンパ球, 及び生検筋より抽出したDNAの対比(PCR)

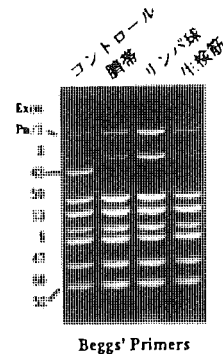
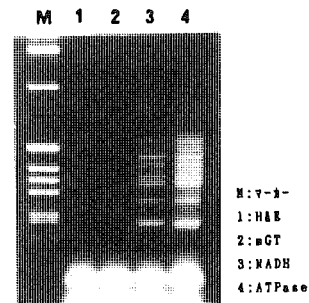


Fig.2

組織化学染色標本より抽出したDNAの対比(PCR)



イムノプロット法によるジストロフィン関連タンパク (DRP) の解析

古賀律子, 石浦章一, 竹光正和, 松崎哲也, 埜中征哉, 杉田秀夫, 荒畑喜一

ジストロフィン関連タンパク (DRP) のC末端部分に対するポリクローナル抗体を用いて、マウス筋及びヒト培養筋細胞におけるDRPの発現量、局在をイムノプロット法にて検討した。

方法

B3マウスcDNAより推定されるDRPのC末端部分のうち、ジストロフィンと相同性をもたない17個のアミノ酸からなるペプチドを抗原とし、抗DRPポリクローナル抗体を作製した。SDS-PAGEはLaemmliの方法により6%ポリアクリルアミドゲルで行い、Towbinらの方法に従ってタンパクを転写後、抗体と反応させ、ABCキット(ベクター社)により発色した。定量はデンストメトリーにより行った。

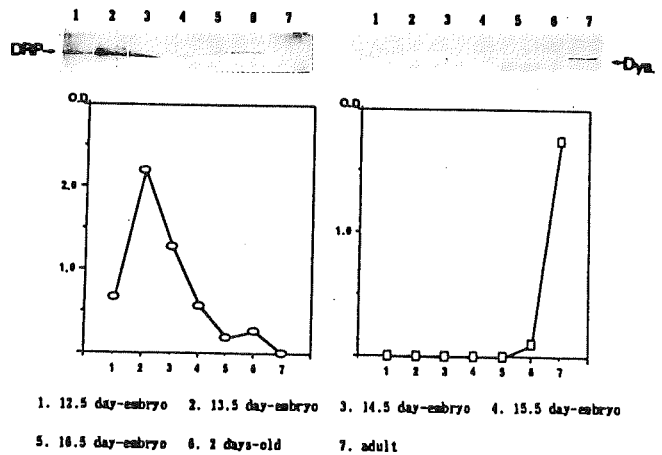
結果及び考察

本実験に用いた抗DRP抗体は、成熟マウスおよびヒト筋において抗ジストロフィンモノクローナル抗体により認識される420kDaのジストロフィンとは反応せず、マウス胎児筋、ヒト培養筋細胞で420kDaのバンドを認識した。即ち本抗体はジストロフィンとは交差しないDRPに特異的な抗体であった。

B10マウス筋におけるDRPとジストロフィンの発現を経時的に調べた結果(図)DRPは13.5日胎生筋に最も多く発現し、その後徐々に減少していく事が明らかになった。それに反しジストロフィンは胎生筋には発現しておらず、生後2日で現れ、その後速やかに増加した。

このDRPとジストロフィンの相反する発現は、DRPがマウス胎生筋におけるジストロフィンのアイソフォームである可能性を示唆していると思われた。

マウス筋の膜分画からのDRP、ジストロフィンの可溶化をトライトン、ジギトニン、SDSの3種の界面活性剤にて調べた結果、ジストロフィンはSDS添加時のみ可溶化されたのに対し、DRPはトライトン、ジギトニンでもSDSで可溶化される量の約30%が可溶化された。以上のことより、DRPはジストロフィンと同じ分子量をもち、共に膜に存在するものではあるが、膜との結合はジストロフィンよりも弱いと思われた。このジストロフィンとDRPの膜からの可溶性の差は、これら類似タンパクの生体内での機能の違いを反映している可能性も考えられた。



文献 Koga, R. et al. Biochem. Biophys. Acta. (1993) 1180, 257-261.

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーにおける遺伝子異常

荒畑喜一, 塚原俊文, 武田伸一, 中尾洋子, 後藤加奈子, 埜中征哉, 杉田秀夫

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) は、常染色体優性遺伝形式をとる浸透力の高い進行性筋ジストロフィーである。その罹病率は人口100万人に2~20人とされ、筋ジストロフィー全体の約1~8%を占める。本症は高率に網膜症や難聴を合併する事でも知られている。さらに、臨床的表現型の著しい差異が家族内・家族間ともに認められ、しかも筋原性以外に神経原性変化を呈する症例も知られており、一日も早い遺伝子診断法の確立が待たれている。今回われわれは、ヒト染色体4q35-ter マーカーである p13E-11プローブを用いて、FSHD症例の遺伝子解析を試みた。その結果、家族性のFSHDおよび孤発性(newmutation)のFSHDともに、疾患とco-segregateする(健常家族には存在しない新たな)14~27kbのEcoRIフラグメントを検出し得たので、臨床遺伝学的に重要と考え報告する。

対象と方法 対象は、FSHD 2家系 (unrelated)と孤発例FSHD 2例である。FSHD患者(6例;18~54才)は、全例歩行が可能であり、障害の程度は中等度であった。また網膜症や難聴等の合併は認められなかった。血清CK値は72~120 IU/lと正常範囲にあった。ゲノムDNAは患者および家族の末梢血リンパ球より調製し、サザンブロット(SB)解析に供した。なお p13E-11 プローブの調製は Frantsらから供与された pBS/p13E-11を JM109 にトランスフォーメーションの後、アンピシリンプレート, Xgal/IPTG 選別, コロニーのLB培地震盪培養, ミニプレップ, SacI/EcoRIによる切断を行い、電気泳動で確認した。SBはゲノムDNA 7ug を制限酵素 EcoRI で消化の後0.5%アガロースゲルで電気泳動、Hybond N+ に転写しp13E-11 プローブでハイブリダイズした。

結果 対照の日本人では10人中8人が28kbよりサイズの大きいEcoRIフラグメントを p13E-11 プローブで認めた。一方、家族性のFSHDでは、健常家族には認めなかった28kb以下(16~27kb)の短いEcoRIフラグメントが全てのFSHD患者に検出された。FSHD孤発例について検索した結果では、家族発症例と同様、健常両親には存在しない新たな短い(14, 16kb)EcoRIフラグメントが検出された。

考察 今回の結果は、Wijimenga, Frantsらによってクローニングされたp13E-11 (現在のところヒト第4染色体長腕の最も遠位に位置するマーカーである)が、FSHD患者の遺伝子変異(de novo DNA rearrangements)を日本人の場合でもやはり検出し得ることを示したものである。p13E-11 が28kbよりサイズの大きい(>28kb) polymorphicなEcoRIフラグメントを認識したのは、対照例10人中8人であったことは、Wijimengaらの報告と同様、FSHDと正常ポピュレーションとのオーバーラップを見ることを示唆する。この点は実際の臨床診断にあたって recombinationの問題とともに注意を払う必要がある。重要なことは、家族発症例、孤発例とも遺伝子のrearrangementが見い出されたことで、FSHDではp13E-11 プローブの近傍に遺伝子の異常(おそらく欠失)が存在するものと推定された。またFSHDの遺伝子異常に仮にホメオボックス遺伝子の異常が伴うものとなれば、胎生期における筋分化の異常も示唆されて興味深い。

文献

1. Padberg, G. W. : Thesis-FSHD, Leiden University, 1982
2. Wijimenga, C. et al. : Nature Genetics 2: 26-30, 1992.
3. 荒畑喜一ほか : 医学の歩み 164: 865-866, 1993

2. 疾病研究第二部

1. 研究部一年の歩み

当研究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・治療法を開発することを目的として研究している。人事面では、田中室長と水戸室長は従来どおりに研究を継続し、着実に成果をあげている。常勤研究員として、亀井 淳，飯田浩一，加藤俊徳君が継続し、田中総一郎君が加わった。亀井，加藤君が年度途中に出身大学に帰る一方，平野悟君がリュウベン大学留学から帰国し，今村 淳君（小児神経レジデント）が年度後半から研究に加わった。非常勤研究員として，福水道郎，小沢 浩，鈴木 新，松田二三子，鬼本博文，佐藤雅彦，下山丈紀，大仲功一君が研究に参加した。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，熊谷昭六，堤 悦子，伊崎紀代子，進 町子，大橋啓子，森本雅子，岡本公子，神山直美の方々に研究を助けていただいた。

本年の主な研究は次の通りである。

1. ヒト脳の発生・発達とその障害に関する研究を継続し，胎児脳形成異常や周産期脳血管障害の病態と成因を検討し，発達過程における易障害性と出生前後の発生要因を追求した。
2. 幼若脳の循環の特異性と障害機序を知るため，近赤外線分光測定や画像解析を用いて実験的に検討した。
3. 塩酸トリエンチンの胎児毒性および細胞毒性に関する検討を動物実験や培養細胞を使って行った。
4. 胎児症候群（胎児性アルコール，胎児性タバコ，胎児性カフェイン）に関する日本全国調査および臨床解析を行うとともに，胎児症候群のモデルマウスを作製し，発生機序を検討した。
5. ダウン症候群の精神遅滞と早発痴呆の発生機序を21番染色体遺伝子蛋白の免疫組織化学的検討とMRI画像解析を用いて追求した。
6. 乳幼児および重症心身障害児の突然死の発生機序について，呼吸調節中枢の形態学的面から検討した。
7. 中枢神経系におけるコラーゲンの構造的発達と意義を生化学的，免疫組織化学的に研究した。

（部長 高嶋 幸男）

2. 研究業績

A 論文

a. 原著

- 1) Takashima S, Mito T :
Neurological maladaptation in the neonate
Early Human Development 29 : 171–175, 1992
- 2) Hasegawa M, Houdou S, Mito T, Takashima S, Asanuma K, Ohno T :
Development of myelination in the human fetal and infant cerebrum :
a myelin basic protein immunohistochemical study
Brain Development 14 : 1 – 6, 1992
- 3) Hirano S, Houdou S, Hasegawa M, Kamei A, Takashima S :
Clinicopathologic studies on leptomeningeal glioneuronal heterotopia in congenital anomalies
Pediatric Neurology 8 : 441–444, 1992
- 4) Fukumizu M, Yoshikawa H, Takashima S, Sakuragawa N, Kurokawa T :
Tay-Sachs disease : progression of changes on neuroimaging in four cases
Neuroradiology 34 : 483–486, 1992
- 5) Maruyama E, Takashima S, Arima M :
Increase in alkaline phosphodiesterase I activity of tumor-derived cultured fibroblasts
from neurofibromatosis patients
Clinica Chimica Acta, 211 : 181–187, 1992
- 6) Maruyama E, Takashima S, Arima M :
Nicotinamide-induced activity of alkaline phosphodiesterase I toward tumor-derived
cultured cells from neurofibromatosis patients
Biochemical Medicine and Metabolic Biology 48 : 69–73, 1992
- 7) Iida K, Takashima S, Takeuchi Y :
Etiologies and distribution of neonatal leukomalacia
Pediatric Neurology 8 : 205–209, 1992
- 8) Kamei A, Takashima S, Chan F, Becker L. E :
Abnormal dendritic development in syrup urine disease
Pediatric Neurology 8 : 145-147, 1992

II 研究業績

- 9) Kamei A, Houdou S, Mito T, Konomi H, Takashima S :
Developmental change in type VI collagen in human cerebral vessels
Pediatric Neurology 8 : 183–186, 1992
- 10) Inomata K, Igarashi H, Nasu F, Sugahara M, Takashima S :
Ultracytochemical analysis of E-PTA-positive synaptic junction
—three cases of Down's syndrome together with Alzheimer-type dementia—
Acta Histochem Cytochem 25 : 131–135, 1992
- 11) Hasegawa M, Houdou S, Takashima S, Tatsuno M, Okuyama K, Suzuki S :
Monitoring of immature rabbit brain during hypoxia with near-infrared spectroscopy
Pediatric Neurology 8 : 47–50, 1992
- 12) Kato T, Kamada K, Segawa F, Sunohara N, Takashima S, Shimizu K, Hashimoto Y :
Effects of photostimulation on the anisotropic diffusion of the visual fibers
Proceeding of Eleventh Annual Scientific Meeting of Magnetic
Resonance in Medicine 1029, 1992
- 13) Kato T, Mikami I, Takashima S, Tatsuno M, Okuyama K :
Proton MR spectroscopy of the pediatric brain with focal epilepsy
Proceeding of Eleventh Annual Scientific Meeting of Magnetic
Resonance in Medicine 2006, 1992
- 14) Kato T, Mikami I, Nose K, Takashima S, Okuyama K :
Intracellular pH alkalosis and human brain development
Proceeding of Eleventh Annual Scientific Meeting of Magnetic
Resonance in Medicine 2007, 1992
- 15) Kato T, Mikami I, Nose K, Takashima S, Okuyama K :
Variations of H-1 MR spectra in the postnatal brain impairment
Proceeding of Eleventh Scientific Meeting of Magnetic
Resonance in Medicine 2008, 1992
- 16) Tanaka H, Yamanouchi M, Imai S, Hayashi Y :
Low copper and brain abnormalities in fetus from triethylene tetramine
dihydrochloride-treated pregnant mouse
J Nutr Sci Vitaminol 38 : 545–554, 1992

- 17) Mito T, Becker L. E., Takashima S :
Neuropathology of central respiratory dysfunction in infancy
Pediatr Neurosurg 17 : 80-87, 1991-92
- 18) 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—
Jap J Child Adolesc Psychiatr 33 : 20-21, 1992
- 19) 高嶋幸男, 宝道定孝, 亀井 淳, 長谷川元宏, 水戸 敬, 鈴木康之, 前田郷子 :
ペルオキシソーム病の神経病理—Zellweger 症候群と neonatal adrenoleukodystrophy
脳と発達 24 : 186-193, 1992
- 20) 高嶋幸男, 荻原隆二, 卷淵隆夫 :
国立病院・療養所の病理解剖の現状 : 全国アンケート調査
医療 46 : 149-151, 1992
- 21) 亀井 淳, 加藤俊徳, 高嶋幸男, 尾崎健夫 :
新生家兔の過換気負荷時における脳循環動態の変化—近赤外線分光測定装置による測定
日本未熟児新生児学会雑誌 4 : 261-268, 1992
- 22) 西村 淳, 高嶋幸男 :
Walker-Warburg 型無脳回症における substance P およびチロシン水酸化酵素の脳幹内分布
日本小児科学会雑誌 96 : 2541-2544, 1992
- 23) 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 :
大脳白質軟化の超音波所見の比較検討
日本新生児学会雑誌 28 : 898-902, 1992
- 24) 田村正徳, 菱 俊雄, 石井照之, 脇田 傑, 於保信一, 渋谷和彦, 鴨下重彦, 宮坂勝之, 高嶋幸男 :
ビーグル新生犬モデルにおける, HFOとCMVによる頭蓋内出血発生頻度の比較検討
日本新生児学会雑誌 27 : 1071-1078, 1992
- 25) 加藤俊徳, 仁科正実, 松下和弘, 堀栄太郎, 水戸 敬, 高嶋幸男 :
高分解能 H-NMR を用いた N-アセチルアスパラギン酸の定量 : ヒト胎児脳からの発達評価
医学のあゆみ 163 : 625-626, 1992
- 26) 松井 潔, 舟橋満寿子, 長 博雪, 鈴木康之, 高嶋幸男 :
重度痙直型アテトーゼ脳性麻痺にみられた cardiac arrest encephalopathy

II 研究業績

—障害児の突然死と病理所見—

脳と発達 24 : 480-484, 1992

27) 松井 潔, 黒川 徹, 加我牧子, 桜川宣男, 高嶋幸男 :

Cystic dilatation of the occipital horn を呈するてんかん患者の臨床的検討

てんかん研究 10 : 138-143, 1992

28) 久野 武, 高嶋幸男, 大沼梯一, 村岡 勳, 足立直人, 吉野相英, 石田孜郎 :

てんかん発作を合併する巨大な異所性灰白質の1例

脳神経 44 : 463-467, 1992

29) 長谷川元宏, 宝道定孝, 水戸 敬, 高嶋幸男, 田角 勝, 奥山和男, 尾崎健夫 :

Partial asphyxia 時の脳組織 PH, 脳血流量, 酸素化および血液量の経時的な変動

日本新生児学会雑誌 28 : 126-131, 1992

30) 橋本和広, 橋本基也, 長谷川久弥, 武井治郎, 喜田善和, 竹内 豊, 浅沼勝美, 高嶋幸男 :

脳室周囲白質軟化の胎内発症例と生後発症例との比較

日本新生児学会雑誌 27 : 1023-1026, 1992

31) 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 24 : 169-173, 1992

b. 著 書

1) Takashima S, Mito T :

Neurological maladaptation in the neonate

Advances in Perinatal Medicine, Elsevier Science Publishers,

Amsterdam, pp171-175, 1992

2) Takashima S, Kuruta H, Mito T, Houdou S, Becker L. E. :

Neuronal development in Down syndrome and Zellweger syndrome :

A Golgi and immunohistochemical study

Development and Involution of Neurones, Japan Scientific Societies

Press, Tokyo, pp17-30, 1992

3) 高嶋幸男 :

発達障害と脳病変

発達障害医学の進歩 No.4, 診断と治療社, 東京, pp 60-67, 1992

4) 高嶋幸男 :

Leigh 脳症

神経病理学カラーアトラス

朝倉書店, 東京, p 173, 1992

5) 水戸 敬 :

Lesch Nyhan 症候群

神経病理学カラーアトラス

朝倉書店, 東京, p 173, 1992

c. 総説

1) 高嶋幸男 :

ハイリスク児の発達と予防

教育と医学 8 : 36-41, 1992

2) 花岡 繁, 高嶋幸男 :

画像診断による乳児期神経疾患の予後の判定-MR I 所見を中心として

小児科 33 : 153-161, 1992

3) 飯田浩一, 高嶋幸男 :

脳室周囲白質軟化 (PVL) の成因と診断

周産期医学 22 : 1431-1434, 1992

4) 奥山和男, 高嶋幸男 :

胎児・新生児障害予防のための病態解析

脳と発達 24 : 134-135, 1992

5) 田中晴美 :

薬物常習妊婦と胎児 (アルコール, タバコ, コカイン)

周産期医学 22 : 1101-1104, 1992

6) 水戸 敬, 高嶋幸男 :

ダウン症候群とアルツハイマー病

小児内科 24 : 1667-1670, 1992

7) 福水道郎, 花岡 繁, 高嶋幸男 :

中枢神経系奇形

周産期医学 21 : 519-522, 1992

II 研究業績

8) 亀井 淳 :

頭蓋内出血

小児の治療指針 55 : 749-750, 1992

d. 班会議報告書

1) 高嶋幸男, 飯田浩一, 水戸 敬, 亀井 淳 :

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 P29-32, 1992

2) 高嶋幸男 :

低酸素症シナプス発達に及ぼす影響に関する研究

厚生省小児医療・低(無)酸素症の児の発達に及ぼす影響に関する研究班

平成3年度研究報告書 P37, 1992

3) 高嶋幸男 :

先天性水頭症の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年度研究報告書 P20, 1992

4) 高嶋幸男, 福水道郎, 矢野真理 :

先天性水頭症の脳幹の免疫組織化学的研究

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 P74-78, 1992

5) 高嶋幸男, 工藤英昭, 長 博雪, 宝道定孝, 長谷川元宏 :

脳性麻痺児の呼吸異常と脳血液量・酸素化モニター

厚生省心身障害・脳性麻痺児(者)の治療とリハビリに関する研究班

平成3年度研究報告書 P25-27, 1992

6) 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 :

新生児剖検例よりみた合併奇形

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年度研究報告書 P82-86, 1992

7) 高嶋幸男, 長谷川元宏, 亀井 淳, 尾崎健夫, 高崎住男, 袴田直俊 :

脳機能の非侵襲的光測定技術の基盤研究

新医療技術開発研究事業研究－民間共同プロジェクト研究事業－

平成3年度研究報告書 P501-508, 1992

8) 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年度研究報告書 P105-110, 1992

9) 田中晴美, 猪俣賢一郎 :

塩酸トリエンチンの胎生毒性

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3年度研究業績 P81-87, 1992

10) 水戸 敬, 高嶋幸男 :

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及び長期予後に関する研究班

平成3年度研究報告書 P52-56, 1992

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 高嶋幸男 :

心身障害児の医学的診断－最近の画像診断を中心に－

心身障害児の医学セミナー, 東京, 7. 11, 1992

2) 高嶋幸男 :

神経病理と画像診断

第3回中国・四国小児神経学研究会, 岡山, 7. 25, 1992

3) 平野 悟, 常石秀市, Siebenthal K, Casaer P, 高嶋幸男 :

比較的全身状態の安定した未熟児における近赤外線分光測定装置(NIRS)の応用

第3回NIROワークショップ, 浜松, 10-14, 1992

4) 高嶋幸男 :

脳発達障害の成因と治療研究

第11回研究開発動向セミナー・高次脳機能研究のストラテジー

II 研究業績

『基礎と臨床』, 東京, 9. 18, 1992

5) 高嶋幸男 :

周生期脳障害の病理

第22回小児神経学セミナー, 東京, 11. 1, 1992

6) 高嶋幸男 :

画像と神経病理

第22回小児神経学セミナー, 東京, 11. 2, 1992

7) 高嶋幸男 :

脳の形態と障害

第37回日本未熟児新生児学会 プレコンgress・ミーティング

大阪, 11. 12, 1992

8) 高嶋幸男 :

重症児呼吸障害の病理

第47回国立療養所総合医学分科会 (シ), 大阪, 11, 13, 1992

9) 高嶋幸男 :

乳幼児突然死症候群の病理学的所見

第1回乳幼児突然死症候群 (SIDS) に関するオープンフォーラム

東京, 2. 27, 1993

10) 平野 悟, 加藤俊徳, 高嶋幸男 :

MRI study on adults with Down syndrome

第5回国際痴呆共同研究シンポジウム アルツハイマー型痴呆の画像解析と病態機序

東京, 3. 10, 1993

11) Becker LE, Mito T, Takashima S :

Brain morphometry in Down syndrome : Neuropathology and neuroimaging

第5回国際痴呆共同研究シンポジウム アルツハイマー型痴呆の画像解析と病態機序

東京, 3. 11, 1993

12) 高嶋幸男 :

脳・神経病理

重症心身障害児専門研修会, 東京, 3. 25, 1993

b. 国際学会

1) Takashima S, Iida K, Mito T, Arima M :

Dendritic and histochemical development and aging in Down syndrome
9 th World Congress International Association for the Scientific
Study of Mental Dificiency
Australia, August 7, 1992

2) Fukumizu M, Becker L. E. Takashima S :

Immunohistochemical studies on brainstem of children with congenital complicated
hydrocephalus
9 th World Congress International Association for the Scientific
Study of Mental Dificiency
Australia, August 9, 1992

3) Kato T, Matsuo T, Mikami I, Nose K :

Assessment of sagittal brain maturation and impairment in children with -123
iodoamphetamine SPECT : comparison with MR imaging
78th Scientific Assembly and Annual Meeting of Radiological
Society of North America, Chicago, Nov 29, 1992

4) Kato T, Sato H, Nose K, Mikami I, Takashima S :

Localized proton MR spectroscopy of the pediatric brain with focal epilepsy
78th Scientific Assembly and Annual Meeting of Radiological
Society of North America, Chicago, Dec 1, 1992

5) Segawa F, Kamada K, Miaoi T, Sunohara N, Kotou T, Takashima S, Shimizu K,
Hashimoto Y :

Molecular diffusion anisotropy in peripheral nerve
11th Annual Scientific Meeting of Society of Magnetic Resonance in Medicine,
Berlin, Germany, Aug 8-14, 1992

6) Tanaka H, Arima M :

Epidemiological study on fetal syndromes induced by maternal alcohol and cigarette use
9 th World Congress International Association for the Scientific
Study of Mental Deficiency, Broadbeach • Australia, Aug 6, 1992

c. 一般学会

II 研究業績

- 1) 亀井 淳, 飯田浩一, 水戸 敬, 高嶋幸男, 鈴木康之 :
ペルオキシソーム異常症の関連酵素抗体免疫組織化学的検討
第33回日本神経病理学会, 新潟, 5. 13, 1992
- 2) 福水道郎, 水戸 敬, 亀井 淳, 飯田浩一, 加藤俊徳, 高嶋幸男 :
満期産児先天性上衣下嚢胞の臨床病理学的検討
第33回日本神経病理学会, 新潟, 5. 13, 1992
- 3) 松井 潔, 水戸 敬, 高嶋幸男, 堀江 弘, 浅井勝美 :
在胎24週未満にて出生した超未熟児の短期生存例と長期生存例の脳病理所見
第33回日本神経病理学会, 新潟, 5. 13, 1992
- 4) 水戸 敬, 高嶋幸男, Becker LE :
ダウン症候群および transgenic mouse 脳における S-100 蛋白の発現と樹状突起異常
第95回日本小児科学会, 松山, 5. 17, 1992
- 5) 西田 朗, 小沢 浩, 水戸 敬, 高嶋幸男 :
大脳における抗酸化酵素 -Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px)- の発達
第34回日本小児神経学会, 大宮, 6. 11, 1992
- 6) 小沢 浩, 水戸 敬, 西田 朗, 高嶋幸男 :
大脳におけるフェリチン陽性細胞の発達
第34回日本小児神経学会, 大宮, 6. 11, 1992
- 7) 飯田浩一, 水戸 敬, 亀井 淳, 高嶋幸男, 竹内 豊, 大野勉 :
出生前発生の新生児大脳白質軟化の病理学的検討
第34回日本小児神経学会, 大宮, 6. 12, 1992
- 8) 松井 潔, 福水道郎, 黒川 徹, 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
—脳室周囲白質軟化との関連—
第34回日本小児神経学会, 大宮, 6. 12, 1992
- 9) 田中晴美, 有馬正高 :
胎児性アルコール症候群への母体喫煙の影響に関する検討
第34回日本小児神経学会, 大宮, 6. 12, 1992
- 10) 田中晴美, 有馬正高, 猪俣賢一郎 :

母体投与酵素ラジカル消去剤による胎仔脳障害の防護効果に関する検討

第32回日本先天異常学会学術集会, 東京, 7. 9, 1992

- 11) 水戸 敬, 亀井 淳, 高嶋幸男, Becker LE :
 新生児期の pontosubicular necrosis の成因に関する検討 ; 死産児における pontosubicular necrosis
 第34回日本小児神経学会, 大宮, 6. 12, 1992
- 12) 福島清美, 野崎秀次, 浜野晋一郎, 奈良隆寛, 前川喜平, 高嶋幸男, 埜中征哉 :
 発作性呼吸不全を繰り返した CCO 欠損の 1 例
 第34回日本小児神経学会, 大宮, 6. 12, 1992
- 13) 亀井 淳, 宝道定孝, 許斐博史, 水戸 敬, 高嶋幸男 :
 抗コラーゲン抗体によるヒト脳・肝・腎の発達の免疫組織化学
 第34回日本小児神経学会, 大宮, 6. 13, 1992
- 14) 加藤俊徳, 松尾 毅, 三上一郎, 高嶋幸男 :
 脳発達過程の SPECT-ボリウム評価画像による 8 ステージと発達期脳障害の評価
 第34回日本小児神経学会, 大宮, 6. 13, 1992
- 15) 橋本和広, 竹下研三, 竹内 豊, 高嶋幸男 :
 胎児・新生児の脳幹の形態学的発育の超音波学的検討
 第28回日本新生児学会, 盛岡, 7. 13, 1992
- 16) 小沢 浩, 水戸 敬, 西田 朗, 高嶋幸男 :
 小脳・橋におけるフェリチン陽性細胞の発達
 第28回日本新生児学会, 盛岡, 7. 13, 1992
- 17) 加藤俊徳, 仁科正実, 松下和弘, 堀栄太郎, 高嶋幸男, 水戸 敬 :
 高分解能 H-NMR を用いた N-アセチルアスパラギン酸の定量 : ヒト胎児脳からの発達評価
 第28回日本新生児学会, 盛岡, 7. 13, 1992
- 18) 亀井 淳, 加藤俊徳, 飯田浩一, 水戸 敬, 高嶋幸男, 尾崎健夫 :
 新生家兔の過換気負荷時における脳循環病態の変化および病理学的検討
 第28回日本新生児学会, 盛岡, 7. 13, 1992
- 19) 山内秀雄, 高嶋幸男, 福水道郎, Becker LE :
 乳児突然死症候群の病理学的検討
 第28回日本新生児学会, 盛岡, 7. 14, 1992

II 研究業績

- 20) 飯田浩一, 高嶋幸男, 宮原晋一 :
Leptomeningeal glioneuronal heterotopia の形成 : 13トリソミー児における発達の検討
第32回日本先天異常学会, 東京, 7. 8, 1992
- 21) 石川 充, 須貝研司, 水戸 敬, 桜川宣男 :
進行性ミオクロオヌステんかん症候群と sphingomyelinase 活性部分欠損を示した同胞例と
その一剖検例
第21回多摩小児神経集談会, 東京, 10. 24, 1992
- 22) 飯田浩一, 亀井 淳, 水戸 敬, 高嶋幸男, 喜田善和, 竹内 豊, 大野 勉 :
脳室周囲白質軟化の病理学的検討—ミクログリアとオリゴデンドログリアに関して
第37回日本未熟児新生児学会, 大阪, 11. 13, 1992
- 23) 喜田善和, 竹内 豊, 野口 靖, 宮坂 薫, 赤羽和博, 長谷川久弥, 浅沼勝美, 飯田浩一,
高嶋幸男 :
組織反応より推定された障害発生時点での大脳白質軟化の頭部超音波所見の比較検討
第37回日本未熟児新生児学会, 大阪, 11. 13, 1992
- 24) 佐藤雅彦, 小口弘毅, 石館武夫, 水戸 敬, 高嶋幸男, 大野 勉, 浅沼勝美, 竹内 豊 :
Migration disorder の臨床病理学的検討
第37回日本未熟児新生児学会, 大阪, 11. 13, 1992
- 25) 亀井 淳, 飯田浩一, 田中総一郎, 水戸 敬, 高嶋幸男, 竹内 豊, 浅沼勝美 :
新生児, 乳児における olivocerebellar lesion —免疫組織化学的検討—
第37回日本未熟児新生児学会, 大阪, 11. 13, 1992
- 26) 小沢 浩, 西田 朗, 水戸 敬, 高嶋幸男 :
胎児・新生児の小脳病変におけるフェリチン含有細胞増加
第37回日本未熟児新生児学会, 大阪, 11. 13, 1992
- 27) 田中総一郎, 亀井 淳, 加藤俊徳, 飯田浩一, 水戸 敬, 高嶋幸男 :
胎児・新生児の末梢神経系髄鞘化パターン
第37回日本未熟児新生児学会, 大阪, 11. 13, 1992
- 28) 田中総一郎, 亀井 淳, 高嶋幸男 :
新生仔脳梗塞の実験的モデル作製
第37回日本未熟児新生児学会, 大阪, 11. 13, 1992
- 29) 加藤俊徳, 仁科正実, 松下和弘, 堀栄太郎, 岩崎章宣, 水戸 敬, 高嶋幸男 :

高分解能H-NMRを用いたN-アセチルアスパラギン酸の定量：ヒト胎児脳からの発達評価と疾患脳の検討

第22回日本神経放射線研究会，東京，2. 18, 1993

30) 平野 悟，高嶋幸男：

NIRSの幼若家兔低酸素症実験と新生児への臨床応用

光断層イメージングシステム討論会，東京，11. 27, 1992

31) 瀬川文徳，鎌田和彦，岸林 潤，春原経彦，加藤俊徳，高嶋幸男，清水公治，橋本泰司：

神経原性変化に伴う筋MRI異常

第20回日本磁気共鳴医学会，札幌，10. 27-29, 1992

32) 加藤俊徳，佐藤弘之，能勢孝一郎，三上一郎，高嶋幸男：

新生児低酸素性虚血性脳症のMRI/MRS

第28回日本神経放射線学会，東京，6. 27, 1992

C. 班会議発表

1) 高嶋幸男，加藤俊徳，平野 悟，水戸 敬：

脳性麻痺児（者）の脳機能に関するdiffusion MRI・脳血流研究

厚生省心身障害・心身障害児（者）の医療療育に関する総合的研究

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4年度班会議，東京，2. 20, 1993

2) 飯田浩一，水戸 敬，高嶋幸男：

脳室周囲白質軟化におけるグリア細胞の免疫組織化学的検討

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4年度班会議，東京，12. 11, 1992

3) 高嶋幸男，水戸 敬，鈴木 新，飯田浩一：

ダウン症候群の早老に関する縦断的研究

厚生省長寿科学総合研究・早老症の発性機序に関する研究班

平成4年度班会議，東京，2. 25, 1993

4) 田中総一郎，高嶋幸男：

早老症の神経病理学的検討

厚生省長寿科学総合研究・早老症の発性機序に関する研究班

II 研究業績

平成4年度班会議，東京，2. 25, 1993

5) 高嶋幸男，小枝達也：

脳性麻痺痙直両麻痺型で認められる視覚認知障害とその責任病巣

厚生省小児医療・低体重出生者の長期予後に関する臨床的・疫学的研究班

平成4年度班会議，東京，12. 19, 1992

6) 高嶋幸男：

難治性水頭症に伴う脳機能障害の発生機序と予防に関する研究

厚生省特定疾患 難治性水頭症調査研究班

平成4年度班会議，東京，8. 21, 1992

7) 福水道郎，高嶋幸男：

胎児・新生児出血後水頭症に伴う脳障害の発生機序と予防に関する研究

厚生省特定疾患・難治性水頭症研究班

平成4年度ワークショップ，東京，1. 8, 1993

8) 高嶋幸男，水戸 敬，佐藤雅彦：

先天奇形の発生に関与する要因に関する研究

厚生省心身障害・先天異常モニタリングシステムの確立に関する研究班

平成4年度班会議，東京，11. 14, 1992

9) 田中晴美：

マウスにおける胎生毒性発現の最低限界量に関する検討

厚生科学研究オーファンドラッグ開発・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6回班会議，東京，11. 14, 1992

10) 田中晴美，有馬正高：

生活化学物質による胎児症候群における脳形成障害の頻度とその防止

—胎児症候群の日本における現状と今後の課題—

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4年度班会議，東京，12. 9, 1992

11) 田中晴美：

塩酸トリエンチンの胎生毒性—最低限界量—

厚生科学研究オーファンドラッグ開発・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7回班会議，東京，3. 27, 1993

12) 水戸 敬, 高嶋幸男, 宝道定孝, 大浜栄作, 橋本公夫 :

神経疾患をもち突然死をきたした患者における呼吸中枢の神経病理的検討

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4年度班会議, 東京, 12. 9, 1992

II 研究業績

3. 主な研究報告

塩酸トリエンチンによる胎生毒性の出現量

田中晴美

塩酸トリエンチン(Trien-2HCl)は、ウイルソン病治療において、D-ペニシラミンによる副作用の存在時使用されはじめた銅のキレート剤である。この薬物の中枢神経系への胎生毒性に関する情報はほとんどない。この点に関し、本検討ではマウスからヒトへの外挿を試みた。

<方法>

C3H系マウスを用い、妊娠以前および妊娠中の投与は表1の如く、すべて経口投与とした。妊娠19日、帝王切開により胎仔を得、生物学的、生化学的、形態的に各種検討を行った。

<結果>

1. 生存胎仔脳における4要因:

妊娠中の0~12,000ppm投与における妊娠19日の生存胎仔の大脳重量(A)、大脳中銅濃度(B)、脳異常のある仔の割合(C)、および仔当りの脳異常の数(D)を図1に示す。これらの要因はTrien-2HCl量に依存した変化を示し、胎生毒性の出現量は3,000ppmレベルと結論された。

2. 脳異常出現の限界量

問題レベルである3,000ppm前後の0-2,000, 2,000-2,000, 0-4,000(この母体への総投与量は2,000-2,000と等量)を加えて、図1のC値に該当

する脳異常(出血、頭蓋骨化遅延、水頭、外脳、小頭など)を有した仔の割合を表1に示す。妊娠中の2,000ppm投与でも問題がないとは言えず、また、妊娠前投与の胎仔への影響も示唆される。

3. 2,000~4,000ppmにおける異常

胎仔体重低下は0-2,000ではなく、2,000-2,000から存在、胎仔大脳重量低下は0-2,000、2,000-2,000からともに存在した。胎仔大脳あるいは肝臓中の銅濃度低下は0-3,000から認められた。

<考察>

胎生毒性に関与する要因として投与量とともに投与期間あるいは時期が問題となる。図1の下に妊娠中のTrien-2HCl投与量(g/kg体重/日)を示す。この値は2,000ppmでは0.27であり、このマウスの値は単純計算ではヒトの投与量の約5倍となる。ウイルソン病では体内の銅蓄積や正常人とは異なるTrien-2HClの代謝動態存在の可能性があり、正常マウスの結果のヒトへの外挿は容易ではない。しかし、今回の結果はヒトにおける妊娠中のモニターの必要性を呈示すると考える。

<文献>

- 1) Tanaka H, et al.: Low copper and brain abnormalities in fetus from triethylene tetramine dihydrochloride-treated pregnant mouse. J Nutr Sci Vitaminol 38:545-554, 1992
- 2) Tanaka H, et al.: Teratogenic effects of triethylene tetramine dihydrochloride on the mouse brain. J Nutr Sci Vitaminol 39:177-188, 1993

表1. 妊娠19日の脳異常を有した生存胎仔の割合

Trien-2HCl dose(ppm)	Live fetus with abnormal brain(%)
0-0	2.5
0-2,000	8.6
2,000-2,000	10.8
0-3,000	12.5
0-4,000	11.8
0-6,000	27.1
0-12,000	48.8

投与: 妊娠前(19日)-妊娠中(19日)

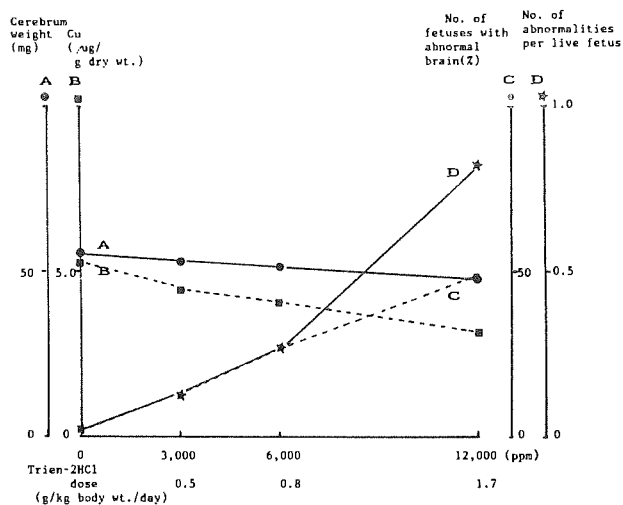


図1. 妊娠母体投与塩酸トリエンチンの生存胎仔脳への影響

Pontosubicular necrosis の発症要因と機序

水戸 敬, 亀井 淳, 高嶋幸男

Pontosubicular necrosis (PSN) は周産期に神経細胞核崩壊像が橋核と海馬の鈎状回に同時に認められる、低酸素性虚血性脳症における病理変化の1つである。これまでいくつかの研究がなされてきたが、原因は何なのか、何故、橋核と鈎状回に同時に病変が起こってくるのか、神経細胞壊死として核崩壊の形をとるのは何故なのか、この病変自体は致死的なものではないので生存した場合にどのような臨床症状を呈してくるのかなど解決されるべきことを多く残している。例えば、原因をとってみても低酸素症、高酸素血症、低血糖症、低炭酸ガス血症、呼吸・循環不全などが提唱されている状態である。そこで、神経病理学的検索にて PSN を認めた73例について臨床病理学的に検索し、病因を中心に検討を行った。

[対象・方法]

対象は PSN を認めた胎令22週から1カ月までの65例の新生児 (PSN 群) で、在胎週数、死亡時修正週数、臨床所見、神経病理学的所見について PSN を呈さなかった57例 (Non-PSN 群) と比較検討した。さらに、PSN を呈した死産児8例について在胎週数、胎内死亡から娩出までの時間、神経病理学的所見について対照の胎児19例と比較検討した。

[結果]

症例の在胎週数、死亡時修正週数、臨床症状としてアプガールスコアや呼吸窮迫症候群、肺出血、気管支肺異形成、胎便吸引症候群、無呼吸、先天性心疾患、胎児循環遺残、動脈管開存症、高ビリルビン血症、低血糖、低カリウム血症、壊死性腸炎、敗血症の頻度には PSN 群と Non-PSN 群との間に差を認めなかった。しかし、けいれん、低体温が PSN 群に、気胸が Non-PSN 群に有意に多かった。神経病理所見では、PSN 群65例中48例、Non-PSN 群57例中44例に頭蓋内出血を認め、脳室周囲白質軟化は各々27例、15例であった。

橋核と鈎状回以外の部位に神経細胞壊死を認めた症例は PSN 群40例、Non-PSN 群16例であった。これらの症例を壊死細胞の分布によって大脳皮質型、間脳型、脳幹型の3つのタイプに分けてみると、PSN 群40例中25例が間脳型、脳幹型であったのに対し、Non-PSN 群では2例のみがこの型であり、その頻度に有意差を認めた (表)。

	PSN infants	Control infants
BS	6	0
BG	6	1
BS + BG	13	1
CC + BS	5	2
CC + BG	3	3
CC + BS + BG	7	7
CC	0	2
Total	40	16

BS: brainstem BG: basal ganglia
CC: cerebral cortex

胎児の胎内死亡時週数は PSN 群が29週から41週、Non-PSN 群が23週から42週であった。死亡から娩出までの時間は各々数時間から7日 (平均49.5 時間) 数分から13時間 (平均3.1 時間) で、明かに PSN 群の方が長かった。神経細胞壊死の分布では、PSN 群が PSN のみを呈した1例を除いた7例が間脳型、脳幹型であったのに対し、Non-PSN 群では神経細胞壊死を呈したのは1例のみで、それも大脳皮質型であった。

[考案]

最近の動物実験の結果をふまえて、高酸素血症が PSN の原因として有力である。しかし、今回の結果の中に先天性心疾患、胎児循環遺残、胎児などの高酸素血症が考えにくい状態が含まれていたことから、それだけで PSN の原因を説明するのは難しいと考えられる。一方、今回の結果において、神経細胞壊死の分布が PSN 群では間脳、脳幹に有意に多く出現することを示した。このような病変分布は Myers の実験における total asphyxia すなわち、急激な虚血により生じる病変とその分布が同じである。この急激な虚血という考え方は提唱されている高酸素血症、低炭酸ガス血症とも矛盾することもない新しい考え方と思われる。

光化学反応を用いた新生仔脳梗塞の形成とその修復過程の観察

田中総一郎, 水戸 敬, 高嶋幸男

【目的】

新生児脳梗塞の原因は、動脈の血栓や塞栓、静脈血栓症、DICを伴う敗血症などが挙げられ、その組織像は、porencephaly, hydranencephaly, multicystic encephalopathyとは明らかに異なる。光増感物質である rose bengal と、これを活性化する xenon light を用いて非侵襲的に血栓を作成し、新生仔家兔の脳梗塞病変の形成とその修復過程を観察した。

【対象と方法】

生後5日のJW系新生仔家兔をエーテル麻酔後、外頸静脈より rose bengal (10mg/Kg) を30秒かけてゆっくり注入し、頭頂部または側頭部の体表から xenon light を60分間照射した。照射中止後、15分、1時間、12時間、1日、2日、3日、5日に、4% paraformaldehyde 心注による灌流固定を行い、脳を摘出した。HE染色の他に、astrocyte を抗glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体で、microglia を recinus communis agglutinin-1 (RCA-1) で、血管を抗内皮細胞抗体で、免疫組織化学的に染色し、脳病理学的検討を行った。対照には rose bengal の代わりに normal saline を同量静注した。

【結果】

照射後15分では、神経細胞の萎縮を認めるのみであったが、1時間では照射部位に一致して境界明瞭な円形の壊死巣を認め、顕微鏡的には病変部の脳軟膜血管や実質内の微小血管に血栓の形成を認めた。病変部の皮質は、神経細胞の萎縮と脱落を認め、基質は海綿状に変化していた。また、病変部と正常部の境界付近には、神経細胞の好酸性変化や核崩壊像が認められた。GFAP染色では、病変部周囲の白質や脳軟膜に接した皮質に、反応性に突起を延ばした astrocyte が見られた。

さらに、12時間後では、外表から見ると病変部は白く膨隆し、白質には凝固壊死を認めた。その病変部の白質にはGFAP染色陽性のやや丸い hypertrophic astrocyte が出現し、また、非照射域にある脳梁や対側半球の白質、内包に多くの突起を有する astrocyte が、多数認められた。以後、astrocyte はその突起を長く伸ばす像が見られるようになり、2日目には病変部周囲の皮質にも astrocyte が出現した。

5日目の病変部は黒く変色し、小さく窪み、痙攣状を呈した。GFAP染色では、壊死巣を取り囲むように astrocyte の増加が認められた。

RCA-1染色では、照射後1時間において、深部白質の microglia が反応性的変化を示し、1日目には reactive microglia が病変部外縁に出現し始めた。2日目以降、長い突起を有する microglia が病変部周囲を取り巻き、病変外側部には macrophage と考えられる大きな胞体を有する細胞が、また、病変部中央には丸い小さな胞体を持つ microglia が見られるようになった。

血管内皮染色では、血管新生が照射後5日目に病変部周囲から病変外側部にかけて認められた。

【考察】

本研究による脳梗塞作製実験では、ヒト新生児の虚血性病変と同様の変化が見られた。Astrocyte と microglia は、障害を受けて1時間後と、早期より活性化され修復に関与していると考えられた。また、やや遅れて、対側大脳半球白質の astrocyte にも反応性的変化が見られた。2日目には、macrophage が病変部に出現し、microglia が周囲を取り巻くような組織像を呈した。5日目には、血管新生が見られた。

この実験系に用いた血栓形成の原理は以下の通りである。静脈内に投与した rose bengal は光増感物質のひとつで、540nmの波長を持つ xenon light の照射を受けると、安定な状態にある基底状態酸素を活性酸素である一重項酸素へ変化させる。高いエネルギーを持つこの一重項酸素は、血管内皮細胞を傷害し、血栓が形成される。この方法の最大の特長は、頸動脈結紮などの直接的な侵襲なしに、脳梗塞病変が作製できることにある。

今後、新生児脳梗塞の病態を知るうえで、また、その治療面での研究に有用であると考えられる。

近赤外線分光測定による脳循環動態の観察：特に脳血管反応の把握を中心に

平野 悟, 鬼本博文, 高嶋幸男

<はじめに>

周産期低酸素性虚血性脳症は脳性麻痺や精神遅滞の大きな原因であり、予防が最も重要である。そのためにはベッドサイドで脳循環をモニターし、脳循環障害を治療することが必要となる。近赤外線分光測定装置(near-infrared spectroscopy; NIRS)は非侵襲的な脳循環モニターとして近年注目されている[1]。当研究部ではこれまで、幼若家兔を対象に低酸素や過換気負荷に対する脳循環動態、特に脳内の酸素化(oxygenation)をNIRSを用いて検討してきた。今回は脳血管の反応を検討するために頸動脈・頸静脈結紮および脳血管拡張剤に対する脳血液量(cerebral blood volume; CBV)の変化を中心に観察した。

<対象と方法>

幼若家兔(JW系、2週齢メス)を対象にして、1)一側および両側の総頸動脈結紮、2)一側および両側の外頸静脈結紮、3)Xenon光線照射とrose bengal静注を組み合わせた上矢状静脈洞の血栓形成、4)acetazolamide投与、5)nicardipine投与、を行った。それぞれの系においてNIRS(NIR 1000、浜松ホトニクス)を用いて、脳内酸化ヘモグロビン(HbO₂)、還元ヘモグロビン(HbR)、総ヘモグロビン(tHb)の濃度変化を半定量的に測定した。他のモニターとして全例で心拍数と血圧、対象の一部でpH・pCO₂センサー(クラレ)を用いて皮下組織pCO₂を、レーザー・ドップラー流速計(アドバンス)を用いて脳血流量(cerebral blood flow; CBF)を測定した。

<結果>

1)片側の頸動脈結紮では結紮直後からHbR増加、HbO₂減少の反応パターンを呈し、徐々に結紮前のレベルに回復した。両側を結紮すると片側結紮時よりもHbR増加、HbO₂減少の程度が大きくなりtHbも減少した。2)片側外頸静脈結紮によってHbR増加とそれに伴うtHb増加が見ら

れたが、HbO₂は変化しなかった。両側結紮ではHbRとtHbの増加の程度が大きくなった。3)上矢状静脈洞の血栓形成ではHbRとHbO₂両方の増加がみられ、tHbも増加した。4)acetazolamide投与によって皮下組織pCO₂は上昇し、それに伴いCBFも増加した。NIRSではHbO₂の増加とそれに伴うtHbの増加が認められたが、HbRは変化しなかった。5)nicardipine投与によって体血圧の軽度低下とCBVの増加が見られた。NIRSではHbO₂およびtHbは増加パターンを呈したが、HbRは変化しなかった。

<考察>

NIRSではHbO₂は動脈血流量の変化、HbRは動脈血流量と静脈血流量の両方を含んだ変化、tHbはCBVの変化に相関すると考えられている。頸動脈の結紮では脳内の動脈血流量が減少したが、静脈血流量の増加によってCBVは軽度の減少にとどまったと解釈された。頸静脈結紮による静脈うっ滞では静脈系の拡張と動脈血の停滞による動脈血流量の減少によって、HbRのみの増加となって現れると考えられた。静脈系の閉塞部位が中枢側にある場合、他の静脈系を通じてドレナージが行われるため動脈系への影響が少なく、頸静脈結紮と異なりHbO₂とHbR両方の増加パターンを呈した。Acetazolamideは組織pCO₂を増加させて脳細動脈を拡張させ、Ca拮抗剤であるnicardipineは降圧と同時に脳血流を増加させる作用があることが知られている[2]。細動脈の拡張に伴う動脈血液量の増加はHbO₂増加という反応パターンで現れた。以上のように、NIRSはCBVと脳内動静脈血の分布の変化を鋭敏にとらえることが出来た。これらの基礎的データをもとに病的な脳血管系の反応パターンを検出することは、患者の脳循環動態の把握に役立つと考えられる。

<文献>

1. von Siebenthal K, et al. Brain Dev 14;135-43(1992)
2. Friberg L, et al. Am J Physiol. B954-59(1990)

脳室周囲白質軟化におけるグリア細胞の反応と意義

飯田浩一, 高嶋幸男

新生児脳室周囲白質軟化 (Periventricular Leukomalacia, PVL) は未熟児の脳性麻痺の主たる原因とされる。既に、出生前発生の白質軟化と出生後発生のそれとでは病理像が異なり、また、出生後発生では低炭酸ガス血症が多嚢胞性脳軟化の一因であることを指摘した。今回は、病巣形成に関与するグリア細胞について免疫組織学的に検討した。

<対象, 方法>

対象は死亡時修正週数36週から42週のPVL脳10例で、生後3日以内に死亡し脳病理所見で異常を認めない23週から41週の22例を正常対照とした。抗GFAP抗体、レクチンRCA-1、抗フェリチン抗体を用い免疫組織学的に染色し、壊死の経時的変化における各グリア細胞の反応と大脳白質の各陽性グリア細胞密度を検討した。

<結果, 考察>

初期壊死巣では非壊死部で既にGFAP陽性グリアが増加していた。その後、RCA-1陽性グリアが壊死周囲に出現し、さらにその周りをGFAP陽性グリアが取り巻いている像が観察された。RCA-1陽性グリアは、深部、中間部白質で増加していた。フェリチン陽性グリアは増加していたが、フェリチン陽性オリゴデンドログリアは逆に減少していた。

GFAPはアストロサイトの中間径フィラメントであり、反応性アストロサイトのマーカーとされているレクチンRCA-1はβ-D-galactoseを認識し、ミクログリアを標識する。フェリチンは鉄担体蛋白であり、オリゴデンドログリアやミクログリアを標識すると言われている。ミクログリアやアストロサイトが産生するinterleukon-1βは、アストロサイトの誘導、分化を促しグリオシスを導くことが報告されており[1]、PVL壊死巣周囲の長い突起をもったアストロサイトの出現はこのようなサイトカインが関与している可能性が考えられる。また、PVL初期脳非壊死部でのGFAP陽性グリアの増加は壊死のみに対するものではなく、それ以前に存在したと思われる低酸素状態などの白質全体への影響によるものと推測される。

フェリチンは鉄担体蛋白であり、鉄は正常状態では髄鞘形成に関与するといわれているが[2]、虚血、アシ

ドーシスなどの病的状態ではヒドロキシラジカル産生への関与が指摘されており[3]、フェリチン陽性グリアの増加は細胞障害と関わっている可能性がある。また、フェリチン陽性オリゴデンドログリアの減少は、PVL長期生存児でみられる髄鞘化遅延の一原因であると考えられる。

<結語>

GFAP陽性グリアはPVL早期より増加しており、先行する低酸素状態の存在を示唆する。また、フェリチン陽性オリゴデンドログリアの減少はPVL長期生存児での髄鞘化障害と関係すると考えられる。

<参考文献>

1. Giulian D. et al. J. Exp. Med. 164:594-604 (1986)
2. Francois C. et al. Brain Res. 215:317-22 (1981)
3. Aruoma OI. et al. Biochem. J. 241:273-8 (1987)

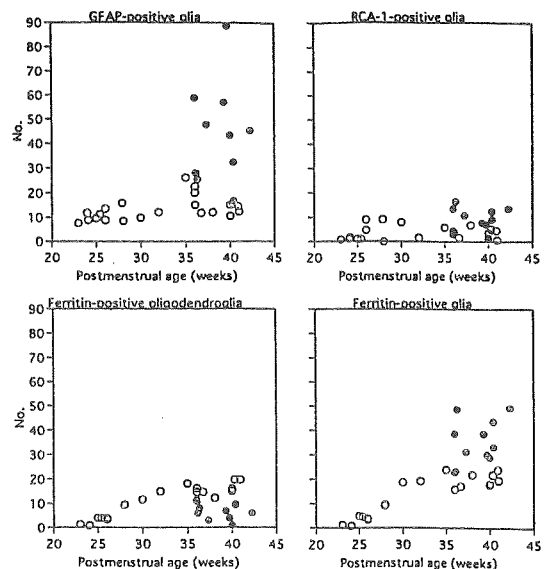


図. 大脳深部白質における単位面積辺り各陽性グリア細胞数を示す。— GFAP陽性グリア, フェリチン陽性グリアの増加, フェリチン陽性オリゴデンドログリアの減少がある。

3. 疾病研究第三部

1. 研究部一年の歩み

当部は内因性精神病，とりわけ精神分裂病と躁うつ病の病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。本年度最大の出来事は高橋清久部長が武蔵病院副院長に昇進して配置換えとなったことである。このため所長が事務取扱として指揮をとることとなった。昨年度に引き続き下記のような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，厚生省厚生科学費長寿科学総合研究事業の老化と生体リズム研究班，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全国的研究活動を補佐した。

本年度は，（部長事務取扱）杉田秀夫，（室長）三国雅彦，西川 徹（1月1日から），（研究員）池田正明，（流動研究員）黒田安計，富田 麗，（センター研究員）海野麻未，斎藤和子，山崎千尋，（外来研究員）橋本篤司，（研究生）白山幸彦，柏 淳，新野秀人，宗岡克政，熊代 新，西嶋康一，木寺克樹（1月1日より），福智寿彦（5月1日より），（研究見習生）野村奈美子，（研究補助員）宮本純子，浅川路子，岡 高恵，栗田雅子，大科京子，黒田佳代子（10月13日から），金田小幸（12月1日から）が常勤として研究活動に従事した。本年度の主要研究テーマとその成果は以下のとおりである。

I. 精神分裂病の薬理生化学的研究

精神分裂病の再発機構のモデルと考えられているメトアンフェタミンによる逆耐性現象が，発育中のラットに形成可能となる時期は，メトアンフェタミン負荷で脳内に誘導される c-fos 遺伝子やタンパク質の発現部位差が生じる時期と一致することをみいだした。また，精神分裂病様症状を惹起するフェンシクリジンによる NMDA 受容体複合体機能異常を，NMDA 受容体複合体のグリシン結合部位の刺激が改善するが，このグリシン結合部位の内在性作動物質の可能性のある D-セリンがラットやヒト脳に存在することを証明した。

II. 躁うつ病の薬理生化学的研究

躁うつ病の病態としてよく認められているグルココルチコイド受容体機能異常に基づく視床下部-下垂体-副腎皮質系の脱抑制とセロトニン-2 受容体機能亢進とが密接に関連していることを明らかにするとともに，ラット胎生期のストレス負荷が成熟後にこれらの両機能異常を生じることを明らかにした。一方，グルココルチコイド受容体刺激に基づく GTP 結合タンパク質機能の亢進がグリオーマ細胞のセロトニン-2 受容体機能亢進を起こすことを明らかにするとともに，この細胞膜に存在する NMDA 受容体刺激がグルココルチコイド受容体刺激に基づくセロトニン-2 受容体機能亢進を抑制することを明らかにした。

（部長事務取扱：杉田 秀夫）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Kato Y, Takashima M, Takeuchi Y, Sugishita M, Yamazaki K, Takahashi K :
Melatonin shifts the phase of pineal NAT activity rhythm in blinded rat pups
Neurol, Psychiat & Brain Res 1 : 107–111, 1992
- 2) Kagaya K, Mikuni M, Yamamoto H, Muraoka S, Yamawaki S, Takahashi K :
Heterologous supersensitization between serotonin-2 and alpha-2-adrenergic receptor-mediated intracellular calcium mobilization in human platelets
J Neural Transm 88 : 25–36, 1992
- 3) Kuroda Y, Mikuni M, Ogawa T, Takahashi K :
Effect of ACTH, adrenalectomy and the combination treatment on the density of 5-HT-2 receptor binding sites in neocortex of rat forebrain and 5-HT-2 receptor-mediated wet-dog shake behaviors
Psychopharmacol 108 : 27–32, 1992
- 4) Yamamoto H, Tomita U, Mikuni M, Kobayashi I, Kagaya A, Katada T, Ui M, Takahashi K :
Direct activation of purified Go-type GTP binding protein by tricyclic antidepressants
Neurosci Lett 139 : 194–196, 1992
- 5) Nanko S, Yokoyama H, Hoshino Y, Kumashiro H, Mikuni M :
Organic mood syndrome in two siblings with Wolfram syndrome.
Brit J Psychiat 161 : 282, 1992
- 6) Takita M, Mikuni M, Takahashi K :
Habituation of lactate-release responding to stimuli in rat prefrontal cortex in vivo
Am J Physiol 263 : R722–R727, 1992
- 7) Motohashi N, Takashima M, Mataga N, Nishikawa T, Ogawa A, Watanabe S, and Toru M :
Effects of sulpiride and Oxypertine on the dopaminergic system in the rat striatum
Neuropsychobiol 25 : 29–33, 1992
- 8) Takashima M, Takita M, Umino A, Nishikawa T, Mitsushio H, Takahashi K :

Modulation of cerebral acetylcholine metabolism by the dorsal diencephalic conduction system in the rat.

Neurochem Int 20 : 583-589, 1992

- 9) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Hayashi T :

Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and ophthaldialdehyde

J Chromatog 582 : 41-48, 1992

- 10) Toru M, Kurumaji A, Kumashiro S, Suga I, Takashima M, Nishikawa T :

Excitatory aminoacidergic neurones in chronic schizophrenic brain

Mol Neuropharmacol 2 : 241-243, 1992

- 11) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K :

Endogenous D-serine in brain : N-Methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging.

J Neurochem 60 : 783-786, 1993

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

Effects of 40-day treatment with carbamazepine, sodium valproate and clonazepam on GABA content in rat substantia nigra

Mol Neuropharmacol 2 : 185-188, 1992

- 13) 日比野英彦, 海野麻未, 高嶋瑞夫, 西川 徹, 野田恭平, 高橋清久 :

ホスファチジルコリン投与による脳内コリン及びアセチルコリン含量への影響

(第1報) ; ラット腹腔内投与試験

油化学 41 : 341-346, 1992

b. 著 書

- 1) 高橋清久 :

自律神経系とサーカディアンリズム

自律神経疾患—基礎と臨床—, 金剛出版(宇尾野, 入来編), 東京, P64-76, 1992

- 2) 高橋清久 :

感情障害と生体リズムの異常 : 登校拒否および自閉症と生体リズムの異常

生気象学の事典, 朝倉出版(生気象学会編), 東京, P48-50, 1992

- 3) 三国雅彦, 加賀谷有行, 村岡新一郎 :

II 研究業績

C 6

神経膠腫細胞研究テーマ別動物培養細胞マニュアル, 共立出版, 東京, P311-312, 1993

4) 三国雅彦:

躁うつ病の成因に関する生物学

精神医学と生物学の語らい—その源流と現代の視点, 学会出版センター (中沢恒幸, 小島卓也, 三国雅彦編), 東京, P121-141, 1992

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

セロトニン受容体機能とうつ病の成因

躁うつ病の薬理生化学〔II〕, 金剛出版 (三国雅彦, 樋口輝彦, 加藤進昌, 高橋清久編)
東京, P15-32, 1992

6) 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, 星和書店 (町山幸輝, 樋口輝彦編)
東京, P123-157, 1992

7) 西川 徹:

GABA による脳内セロトニン伝達の調節

躁うつ病の薬理生化学〔II〕, 金剛出版 (三国雅彦, 樋口輝彦, 加藤進昌, 高橋清久編)
東京, P111-128, 1992

c. 総 説

1) 高橋清久:

うつ病の睡眠特性と時間生物学: 睡眠・覚醒とその障害 (太田龍朗編)
精神医学レビュー 4: 48-58, 1992

2) 武内ゆかり, 高橋清久:

ケミカルメディエーターと生体機能: 生体リズム
Clinic Neurosci 10: 1151-1153, 1992

3) 山崎 潤, 高橋清久:

睡眠障害とビタミンB12
臨床成人病 22: 1217-1219, 1992

4) 高橋清久:

感情障害とその臨床: 気象病・季節病とその臨床

日本医師会雑誌 107 : 1978-1983, 1992

5) 三国雅彦 :

うつ病におけるセロトニン受容体・細胞内情報伝達系機能とコルチコステロイド受容体の機能障害
nano GIGA 2 : 22-26, 1993

6) 西川 徹, 橋本篤司, 谷井靖之, 海野麻未, 岡 高恵, 柏 淳, 岩間久行, 高橋清久 :

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-
精神医学 34 : 891-900, 1992

d. 班会議報告書

1) 高橋清久 :

季節性感情障害の臨床像

厚生省精神・神経疾患研究委託費：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年度研究報告書 P75-79, 1992

2) 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・神経疾患研究委託費：感情障害の成因と治療に関する研究班
平成3年度研究報告書 P83-89, 1992

3) 三国雅彦, 黒田安計, 小川哲郎, 加賀谷有行, 村岡新一郎, 池田正明, 新野秀人, 斎藤和子
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
的および神経化学的研究

厚生省精神・神経疾患研究委託費：心身症の発症機序と病態に関する研究班
平成3年度研究報告書 P17-22, 1992

4) 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 :

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
-ラット脳における遊離型D-セリンの分布および生後変化-

厚生省精神・神経疾患研究委託費：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年度研究報告書 P109-1144, 1992

5) 西川 徹, 海野麻未, 柏 淳, 池田正明, 白山幸彦, 高橋清久 :

II 研究業績

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・神経疾患研究委託費：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3年度研究報告書 P81-88, 1992

e. その他

1) 黒田安計, 三国雅彦, 野村奈美子, 高橋清久 :

中枢セロトニン2, β -アドレナリン受容体調節に及ぼす抗うつ薬, 電気痙攣の影響に関する検討

精神薬療基金研究年報 24 : 153-157, 1993

2) 高橋清久, 山田尚登, 大井 健, 辻本哲士, 高橋三郎 :

生体リズム異常と感情障害

日本臨床生理学雑誌 22 (Suppl) : 95-96, 1992

3) Takahashi K :

Sleep-wake rhythm disorders and vitamin B12

Proceedings of the 1st International Congress on Vitamins and Biofactors in Life Science,

P126-129, 1992

4) Takahashi K :

Melatonin and maternal factors shift the phase of NAT activity rhythm in the pineal gland in rat pups.

Clinical Neuropharmacology, 15 (Supple 1):38A, 1992

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) Takahashi K :

Melatonin and maternal factor shift the phase of NAT activity rhythm in the pineal gland in rat pups

18th C.I.N.P. Symposium "Recent advance in chronobiology"

Nice, June 27, 1992

2) 三国雅彦 :

抗うつ薬の作用機序からみたうつ病の難治化

厚生省精神・神経疾患委託費 精神疾患関連班第二回合同シンポジウム :

精神疾患の難治化—その実態, メカニズム, 治療

東京, 11. 5, 1992

3) Nishikawa T :

Regulation of cortical dopaminergic transmission by NMDA receptors.

7 th International Catecholamine Symposium, Amsterdam, June 25, 1992

4) Nishikawa T, Hashimoto A, Tanii Y, Umino A, Kashiwa A, Kumashiro S, Oka T,
Takahashi K:

Dysregulation of excitatory amino acid neurotransmission and schizophrenia.

The Seventh Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium ; The Biology of
Schizophrenia, Tokyo, October 20, 1992

5) Nishikawa T, Hashimoto A, Tanii Y, Umino A, Kashiwa A, T. Oka,
Nishijima., Takahashi K :

Excitatory amino acidergic dysfunction and schizophrenia.

Inaugural Symposium (2); Neurochemistry and Neuropsychiatric disorders,

The First Asian Pacific Society for Neurochemistry Meeting, Nagoya, October 23, 1992

6) 西川 徹 :

グルタミン酸と精神疾患

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4回「学習・記憶の分子機構」
大阪, 10. 2, 1992

b. 国際学会

1) Ikeda M, Mikuni M, Saitoh K, Yamazaki C, Takahashi K :

Quantitative estimation of 5-HT-2 receptor mRNA in rat glioma C6BU-1 cells by the RT-PCR methods.

22th Annual Meeting of the Society for Neuroscience

Anaheim, U.S.A., Oct 27, 1992

2) Kagaya A, Mikuni M, Muraoka S, Shinno H, Saitoh K, Ogawa T, Yamawaki S, Takahashi K :

Homologous desensitization of serotonin-2 receptors in rat glioma C6BU-1 cells.

22th Annual Meeting of the Society for Neuroscience

Anaheim, U.S.A., Oct 30, 1992

3) Shinno H, Mikuni M, Kagaya A, Saitoh K, Yamawaki S, Takahashi K :

II 研究業績

Effects of glutamate and /or dexamethasone on serotonin-induced intracellular calcium mobilization in C6 glioma cells.

22th Annual Meeting of the Society for Neuroscience

Anaheim, U.S.A., Oct 30, 1992

4) Nishikawa T, Umino A, Takahashi K :

Mapping patterns of c-fos protein-like immunoreactivity in rat brain after methamphetamine treatment.

XVIIIth C.I.N.P. Congress

Nice, July 1, 1992

5) Shirayama Y, Mitsushio H, Nishikawa T, Takahashi K :

Effects of phencyclidine and (+) MK801 on cerebral substance P content in the rat.

22th Annual Meeting of the Society for Neuroscience

Anaheim, U.S.A., October 26, 1992

6) Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii., Harada K, Oka T, Takahashi K :

The presence of free D-Serine in rat brain.

22th Annual Meeting of the Society for Neuroscience

Anaheim, U.S.A., October 26, 1992

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

Effects of stereoisomers of alanine and serine on phencyclidine-induced hyperactivity in the rat.

22th Annual Meeting of the Society for Neuroscience

Anaheim, U.S.A., October 28, 1992

8) Mitsushio H, Shirayama T, Nishikawa T, Takahashi K :

Effects of subacute repeated injections of phencyclidine and MK-801 on substance P content in the rat brain

International Symposium on Substance P and Related Peptides

Shizuoka, Japan Nov 3-6, 1992

c. 一般学会

1) 池田正明, 山崎千尋, 三国雅彦, 高橋清久 :

C6 グリオーマ細胞におけるセロトニン刺激によるAP-1, CRE 結合活性の誘導

- 第15回日本生物学的精神医学会，東京，3. 18, 1993
- 2) 新野秀人，三国雅彦，富田 麗，斎藤和子，山脇成人，高橋清久：
C6BU-1 細胞での 5-HT 刺激性 Ca 動員に及ぼす NMDA 受容体拮抗薬の影響
第16回日本神経科学学会，大阪，12. 8, 1992
- 3) 小川哲郎，黒田安計，宗岡克政，三国雅彦，高橋清久：
新生児期親仔隔離処置が及ぼす視床下部一下垂体-副腎皮質系への効果
第22回日本神経精神薬理学会，札幌，10. 8, 1992
- 4) 黒田安計，野村奈美子，小川哲郎，三国雅彦，高橋清久：
ACTH と抗うつ薬の併用投与がラット大脳皮質 5-HT-2， β -アドレナリン受容体に及ぼす
影響について
第22回日本神経精神薬理学会，札幌，10. 8, 1992
- 5) 加賀谷有行，三国雅彦，斎藤和子，小川哲郎，新野秀人，岡本泰昌，本橋伸高，山脇成人，
高橋清久：
C6BU-1 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同種脱感作に
ついて
第22回日本神経精神薬理学会，札幌，10. 8, 1992
- 6) 新野秀人，三国雅彦，富田 麗，斎藤和子，山脇成人，高橋清久：
C6BU-1 細胞における細胞内カルシウム動員に及ぼすデキサメサゾンおよびグルタミン酸の影響
第22回日本神経精神薬理学会，札幌，10. 8, 1992
- 7) 橋本篤司，岡 高恵，西川 徹：
ラットにおける内在性D-セリンの分布および生後変化
第26回日本てんかん学会，名古屋，10. 2, 1992
- 8) 橋本篤司，西川 徹，土井永史，金子嗣郎，金野柳一，丹羽 章，安村美博，
熊代 新，岡 高恵，高橋清久：
ヒト，マウス及びラット脳には遊離型D-セリンが存在する
第35回日本神経化学学会大会，名古屋，10. 20-22, 1992
- 9) 橋本篤司，西川 徹，岡 高恵，高橋清久：
ラット脳における内在性遊離型D-セリンの分布と発達
第65回日本生化学会大会，福岡，10. 9, 1992
- 10) 海野麻未，西川 徹，柏 淳，高橋清久：

II 研究業績

フェンサイクリジンおよび MK801 投与後におけるラット脳内 c-Fos 様免疫活性性の分布

第16回日本神経科学学会, 大阪, 12. 8, 1992

11) 柏 淳, 西川 徹, 海野麻未, 池田正明, 高橋清久 :

メトアンフェタミン投与後の c-fos 遺伝子発現の発達段階における変化について

第16回日本神経科学学会, 大阪, 12. 9, 1992

12) 熊代 新, 橋本篤司, 西川 徹, 高橋清久 :

MK-801 によって引き起こされるラットの異常行動に対する N-myristoyl-D-serine の阻害効果

第15回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 18, 1992

13) 西嶋康一, 西川 徹, 橋本篤司, 海野麻未, 岡 高恵, 柏 淳, 高橋清久 :

Phencyclidine と methamphetamine のラット前頭葉 dopamine 代謝に与える影響の比較

第15回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 19, 1992

14) 白山幸彦, 三ツ汐 洋, 西川 徹, 高橋清久 :

Phencyclidine, (+) MK-801 およびドーパミンアゴニスト急性投与によるラット脳内 substance P 含量低下の差異について

第15回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 19, 1992

C. 班会議発表

1) 高橋清久 :

季節性感情障害の多施設共同研究のまとめ—第2報—

厚生省精神・神経疾患研究委託費・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4年度班会議, 東京, 1. 20, 1993

2) 三国雅彦, 黒田安計, 宗岡克政, 池田正明, 富田 麗, 新野秀人, 斎藤和子, 高橋清久 :

セロトニン-2 受容体機能亢進とグルココルチコイド受容体機能異常との連関に関する発達薬理学的ならびに分子生物学的研究

厚生省精神・神経疾患研究委託費・感情障害の成因と治療に関する研究班

平成4年度班会議, 東京, 1. 21, 1993

3) 三国雅彦, 宗岡克政, 小川哲郎, 黒田安計, 池田正明, 新野秀人, 斎藤和子, 高橋清久 :

ストレス性刺激に対する視床下部-下垂体-副腎皮質系の反応の調節機構に及ぼす胎生期のストレス負荷ならびにアミン系機能変動の影響に関する神経科学的研究

厚生省精神・神経疾患研究委託費・心身症の発症機序と病態に関する研究班

平成4年度班会議，東京，1. 29, 1993

- 4) 西川 徹，橋本篤司，谷井靖之，海野麻未，岡 高恵，柏 淳，熊代 新，西嶋康一，白山幸彦
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・神経疾患研究委託費・精神分裂病の発症機序に関する神経科学的研究班

平成4年度班会議，東京，1. 22, 1993

- 5) 西川 徹，海野麻未，柏 淳，池田正明，高橋清久：

薬物依存による逆耐性現象の発現機序に関する生化学的研究

厚生省精神・神経疾患研究委託費・薬物依存の発症機序と臨床及び治療に関する研究班

平成4年度班会議，東京，1. 20, 1993

- 6) 西川 徹，橋本篤司，岡 高恵：

哺乳類における内在性D-セリンに関する研究

厚生省精神・神経疾患研究委託費・難治てんかんの治療法開発に関する研究班

平成4年度班会議，東京，12. 21, 1992

- 7) 橋本篤司，熊代 新，岡 高恵，西川 徹：

興奮性アミノ酸伝達系に作用する内在性D-セリンに関する研究

文部省科学研究費補助金（総合研究A）・興奮性アミノ酸ニューロンを指標とした分裂病と

てんかんの病因に関する研究

平成4年度班会議，東京，1. 30, 1993

D. その他の研究会

- 1) 西川 徹，橋本篤司，海野麻未，岡 高恵，柏 淳，熊代 新，高橋清久：

精神分裂病と興奮性アミノ酸伝達障害

第5回慶應ニューロサイエンス研究会－精神疾患の病態生理・生化学－，東京，6. 13, 1992

- 2) 橋本篤司，西川 徹：

脳内遊離型D-セリンの分布と生後変化に関する研究

OBI（大阪バイオサイエンス研究所）Neuroscience Seminar，大阪，10. 1, 1992

- 3) 西川 徹，海野麻未，柏 淳，西嶋康一，橋本篤司：

NMDA受容体による前頭葉内ドーパミン伝達の調節

OBI（大阪バイオサイエンス研究所）Neuroscience Seminar，10. 1, 1992

II 研究業績

4) 西川 徹 :

興奮性アミノ酸伝達障害からみた精神分裂病症状の発現機序と新しい治療法

第124回東京医科歯科大学難治疾患研究所セミナー, 東京, 12. 15, 1992

3. 主な研究報告

C6 グリオーマ細胞におけるNMDA受容体様複合体の薬理学的特性

○新野秀人, 三国雅彦, 斎藤和子, 富田 麗, 高橋清久

これまでグリアは、ニューロンにみられるシグナル伝達に何ら役割を果たさないと考えられてきたが、最近、glutamateによってミリ秒単位で開くイオンチャンネルがastrocyteにあることが示され、また、シグナル伝達のextraneuronal pathwayをastrocyteのネットワークが形成することを示唆する報告もみられる。今回我々は、グリオーマC6細胞でglutamate受容体の薬理学的特性を検討した。

【方 法】

(1)培養条件：C6細胞を10%牛胎児血清(FCS)を加えたDMEM培地を用いて37℃、CO₂ 10%/ air 90%の環境下で培養した。十分育成させた後にFCSを含まないDMEMに置換して24時間経過した後に測定に用いた。(2)細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)測定：3μM fura-2/ AM を含むKrebs-Ringer HEPES緩衝液(37℃)中でインキュベーションした後に、分光蛍光光度計(励起波長：340/380nm、蛍光波長：510nm)で測定した。(3)イノシトール三リン酸(IP₃)測定：アゴニスト刺激を行い、所定の時間後10%過塩素酸で反応を止めた。KOH/ HEPESによって中和させ、その上清中のIP₃量をradioimmunoassayにより測定した。

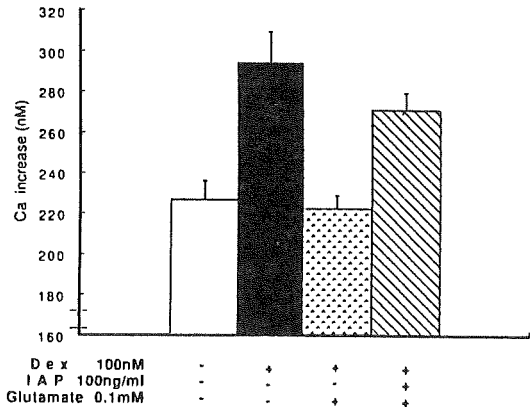
【結果と考察】

細胞外Mg²⁺,Ca²⁺非存在下で、glutamateやNMDAは[Ca²⁺]_iとIP₃を増加させた。そして、glutamateによる[Ca²⁺]_i増加は同濃度のD-APV, MK-801, HA-966およびMg²⁺ (1.2 mM)で消失した(Table)。また、百日咳毒素(PT)を前処置(24時間)したとき、[Ca²⁺]_i増加は生じなかった。次に、Mg²⁺存在下でserotonin-2(5-HT₂)受容体を介する細胞内Ca²⁺動員およびIP₃産生をglutamate, NMDA, aspartateは濃度依存的に抑制した。この興奮性アミノ酸刺激による抑制効果はデキサメサゾン(DEX)前処置により亢進した5-HT₂受容体機能に対し、より顕著となった。glutamateによる抑制効果は、細胞外Ca²⁺非存在下でもみられ、かつD-APV, MK-801, PCP, HA-966によって消失した。また、PT前処置によって抑制効果は消失した(Fig)。

これらの結果から、C6細胞では、薬理的にNMDA受容体複合体の特徴をもつ受容体がPT感受性のGTP結合蛋白-フォスホリパーゼC系と連

関していることが示唆された。しかもこの興奮性アミノ酸刺激性の情報伝達系はMg²⁺存在下でも5-HT₂受容体-細胞内情報伝達系とのクロストークによりその機能を発揮することが示唆された。

Effects of IAP and/or Glutamate on 5-HT-induced Ca Mobilization in C6BU-1 Cells Pretreated with Dexamethasone



Glutamate-induced [Ca²⁺]_i increase in C6BU-1 cells

Pretreatment	[Ca ²⁺] _i increase (nM)
saline	89.6±23.0
1.2mM MgCl ₂	15.9± 1.9 *
10 μM D-APV	20.5± 1.2 *
0.1mM D-APV	10.1± 1.6 *
0.1mM MK-801	19.6± 1.9 *
0.1mM HA-966	17.5± 3.2 *

新生児期親仔隔離処置が及ぼす視床下部-下垂体-副腎皮質系への効果：
加齢の効果についての検討

宗岡克政, 三国雅彦, 小川哲郎, 高橋清久

我々はこれまでに、ラット新生児に対し親仔隔離処置 (PMD) を行うことが成熟後のストレス負荷に対する視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA系) のフィードバック機能を強化することを明らかにしてきた。今回我々は、その効果に対する加齢の影響についての検索を行った。

<方法>

SD系ラットの新生児に対し誕生日より生後21日目までの毎日、4.5時間の親からの隔離処置を行い、授乳制限と体温低下ストレスを負荷した。これらの雄性仔ラットを21カ月齢まで飼育し、20分間の拘束ストレス負荷及び10 μ g/kgのデキサメサゾン前処置後に同様の拘束ストレス負荷 (抑制試験) を行い、血中コルチコステロン濃度を測定した。

<結果>

20分間の拘束ストレス負荷によるコルチコステロン濃度増加は、コントロール群と親仔隔離処置群のラットとで差は認められなかった。しかし、デキサメサゾン抑制試験により親仔隔離処置群が強く抑制を受けることが明らかとなった (Fig. 1)。

<考察>

加齢により辺縁系やHPA系を介するフィードバック機能が低下し、それに伴い血中コルチコステロン濃度が上昇するという報告が多い。臨床的にもアルツハイマー型痴呆でデキサメサゾンによる抑制が健康老人より明らかに減弱し、うつ病者のデキサメサゾン非抑制率は加齢とともに増加することが知られている。前回の検索では、20週齢での拘束ストレス負荷によるコルチコステロン濃度増加は両群で同等で、デキサメサゾンによる抑制が親仔隔離処置群で強いという結果であったが、21カ月齢の老齢ラットにお

いても同様の効果が認められた。また、20分間の拘束ストレス負荷によるコルチコステロン分泌に対するデキサメサゾンの抑制効果を年齢と比較した場合、コントロール群及び親仔隔離処置群の両方で年齢に伴う抑制率の低下が認めらるが、いずれの年齢においても親仔隔離処置群では、強く抑制のかかる傾向があることが明らかとなった (Table 1)。以上の結果より新生児期親仔隔離処置により強化された HPA系のフィードバック機能は、老齢期においても持続していることが示された。

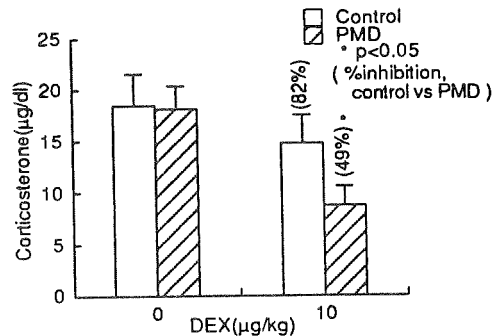


Fig.1 20min stress 3 hr after DEX treatment at 21 months

Age	Control	PMD
8~9 weeks	58%	32%
20~21 weeks	58%	26%**
21 months	82%	49%*

* p<0.05 ** p<0.01 vs control

Table 1. % inhibitions of dexamethasone (10 μ g/kg) on corticosterone secretions induced by 20 min immobilization stress.

Methamphetamine 投与後の c-fos 遺伝子発現の発達段階による変化

柏 淳, 海野麻未, 池田正明, 西川 徹

覚醒剤の反復投与により動物の異常行動の出現閾値が低下することが知られているが、これは逆耐性現象(reverse tolerance)と呼ばれ、神経系の可塑性のモデルと考えられる。さらに幼若な動物では覚醒剤を反復投与しても逆耐性現象が見られないことから、逆耐性の形成には、ある種の神経回路網の成熟が必要条件と考えられる。我々は、この逆耐性の形成に重要な役割を果たすと考えられる脳部位の検索を試みており、転写制御因子であるc-fosをマーカーとして用いている。今回はc-fos mRNA発現を発達段階を追ってNorthern blot解析により検討した。

【方法と結果】

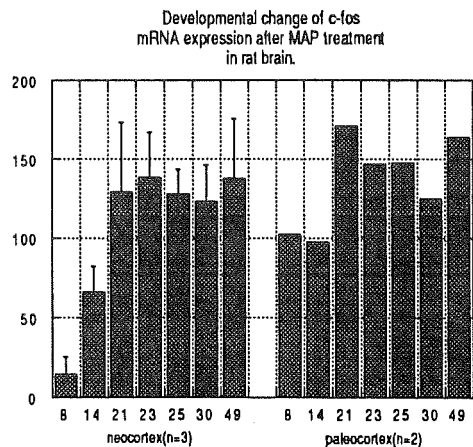
実験には、Wistar系雄性ラットを用いた。MAP塩酸塩は生理食塩水に溶解し、腹腔内(i.p.)注射を行った。注射後60分後に動物を断頭屠殺し、氷上にてneocortex, paleocortex, hippocampus, striatumを切り出し、直ちに凍結保存した。RNAはAGPC法にて抽出し、Oligotex-dT30 super (Roche)を用いてmRNAを抽出した。電気泳動(各レーン1 μ g)のちナイロンメンブレン(Hybond N+)にトランスファーし、³²Pプローブとのハイブリダイゼーションを行なった。オートラジオグラフィは、FUJI BAS-2000にて画像解析を行なった。c-fosプローブは第1、第2エクソンより各1ヶ所のantisense oligonucleotide probe (45bp and 51bp)を作製し、カクテルとして使用した。また同部位のsense probeを作製してnegative controlとして同様の実験を行った。

生後(誕生日を生後第1日とする)8, 14, 21, 23, 25, 30, 49日令のラットにMAP塩酸塩(6mg/kg)投与後60分での各脳部位におけるc-fos mRNAの発現量を比較検討した。その結果、図に示すようにneocortexでは8, 14日令では発現が弱く(特に8日令ではほとんど発現していない)、21日令以降で安定した発現量が確認された。paleocortexでも8, 14日令では発現がやや弱い

すると十分量の発現が認められた。hippocampusでは、どの日令でも発現は確認されなかった。一方sense probeでは全く発現は認められず、上述の発現はc-fos 特異的なものと考えられた。

【考察】

c-fos遺伝子は、転写制御因子をコードし、また神経成長因子、神経伝達物質、細胞内情報伝達系の変化などに応答することが知られている。また、神経機能の変化の初期過程に重要であり、ある刺激に対して作働する神経回路のマーカーとして有用と考えられている。今回の結果は、昨年度免疫組織化学的方法により同定したneocortexにおけるc-fos蛋白発現パターンの発達に伴う変化を遺伝子発現のレベルで裏付けるものであり、このneocortexにおけるc-fos遺伝子の応答パターンの差異からは、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可能性が示唆される。逆耐性との関係で見ると、ラットでは生後20日頃を境に逆耐性が形成されるようになることから、neocortexでは逆耐性が形成される時期にc-fos mRNA発現量の増大が見られ、ここで活性化される神経回路群が逆耐性の形成に関与している可能性がある。



サーカディアン機構に及ぼす加齢の影響

野村奈美子, 黒田安計, 高橋清久

高齢者でよくみられる睡眠覚醒リズムの異常は、加齢によりこの同調の機能やサーカディアンリズムが変化するために発現すると考えられる。そこで、今回我々はラットを用いて行動およびコルチコステロン分泌リズムへの加齢の影響について検討した。

〔研究方法〕

<1. 新しい明暗周期への再同調> 9時~21時の明暗サイクル条件下で2週間飼育し、その後、位相を8時間前進させ明暗サイクルを1時~13時とした。位相前進後、2~3週間の行動量を測定し、再同調に必要な日数を測定した。

<2. 恒常暗でのフリーラン周期> 12:12の明暗サイクルから恒常暗にし、3週間にわたり個々のラットの行動量を測定し、フリーラン周期を求めた。

<3. 血中コルチコステロン分泌リズム> 9時~21時の明暗サイクルにおいて、血中のコルチコステロン値を測定した。

このような3つの実験を1シリーズとし、週齢の異なる2群で繰り返し、比較検討を行なった

〔結果〕

<1. 新しい明暗周期への再同調> 7週齢では位相前進後7日目で再同調が完了したが、43週齢では13日間を要した。同様のラットを用いた2回目のシリーズの結果においては、17週齢で7日間、53週齢で10日間を要した。3回目のシリーズは、前回の実験で用いたラットの26週齢と新たに7週齢のラットを使用し同様にを行なったところ、7週齢ではこの場合も再同調に要した期間は7日、26週齢では9日となった〔Table 1〕。

<2. 恒常暗でのフリーラン周期> フリーラン周期の変化について3シリーズ(9週齢vs45週齢、21週齢vs57週齢、11週齢vs30週齢)にわたって検討した結果、全てのシリーズにおいて、週齢の大きい群が週齢の小さい群より有意に短くなった〔Table 2〕。

<3. 血中コルチコステロン分泌リズム> 血中コルチコステロン分泌リズムについて明暗時の比較(43週齢 vs 7週齢、62週齢 vs 26週齢 vs 7週齢)、あるいは24時間変動(52週齢 vs 16週齢)を指標として群間比較を行なった。その結果、通常最も低い値を示す点灯時(9時)においては、週齢の大きい群の方が週齢の小さい群より有意に高い値を示した。一方、通常

高い値を示す消灯時(21時)では、週齢の小さい方が週齢の大きい群より高い傾向にあった。また、52週齢と16週齢を用いて行なった、1日4時間間隔で測定した日内変動の結果は、週齢の大きい群では週齢の小さい群に比べコルチコステロンリズムの振幅が小さかった。〔Fig. 3〕

〔考察〕

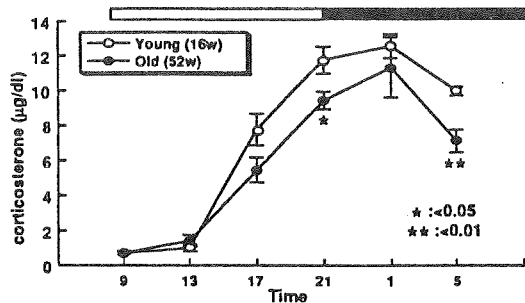
週齢の異なる2群又は3群間で比較した結果から、週齢が大きくなるにつれて再同調への機能が落ちることが示唆された。また、加齢によりフリーラン周期が短くなってくること、及び血中コルチコステロン分泌リズムの振幅が小さくなること示唆された。これらの変化は、従来、高齢の動物で報告されていたが、今回の実験より、比較的早い時期での加齢で認められることが観察された。高齢者にみられる睡眠覚醒リズム障害などもこの様な生体リズムの変化と関わっている可能性が考えられるが、今後、更にこれらの変化の始まる時期、あるいは長期経過について検討していきたい。

〔Table 1〕 再同調 〔Table 2〕 フリーラン周期

1	7週齢 -- 7日	9週齢	24.46 hr	**
	43週齢 -- 13日	45週齢	24.30 hr	
2	17週齢 -- 7日	21週齢	24.30 hr	*
	53週齢 -- 10日	57週齢	24.23 hr	
3	7週齢 -- 7日	11週齢	24.45 hr	**
	26週齢 -- 9日	30週齢	24.35 hr	

* <0.05
** <0.01

〔Fig. 3〕 血中コルチコステロン分泌リズム



4. 疾病研究第四部

1. 研究部一年のあゆみ

今年度の疾病研究第四部における一番大きな出来事は、長らく空席であった部長職に和田圭司が米国国立衛生研究所より着任（9月1日付）したことである。分子生物学，分子遺伝子学，発生工学を用いた研究方法論が新たに和田により導入され，当研究部の目標である「神経変性疾患の発症機構の解明と新治療法の開発」がよりシステム化された形で行なわれることとなった。年度前半は部長不在のなか，1) 不活化運動神経細胞感作による運動神経軸索変性モデルの開発（小田），2) 選択的脊髄神経細胞死におけるグルタミン酸の関与についての組織・薬理学的検討（郭 他），3) mdx マウス骨格筋におけるカルシウムイオン動態の生理学的検討（吉田），4) 実験的運動失調マウスにおける NGF 濃度の定量（松井 他）などの研究がおこなわれそれぞれ立派な業績を上げた（「主な研究業績」の項参照）。9月以降は和田の指導のもとに前記研究が継続発展し，さらに5) ポジショナルクローニングおよび免疫抗体法による gad 遺伝子の単離，6) グルタミン酸受容体機能を抑制するキラーサブユニットの調製（NIH との共同研究），7) トランスジェニックマウス法を用いたグルタミン酸受容体機能低下マウスの開発などのプロジェクトが新たにスタートすることとなった。新プロジェクトについてはまだ著しい成果は上がっていないが，将来の発展に向けた基礎データが蓄積しつつあり，来年度以降が大いに楽しみな状況となってきている。なお，本年度当研究部に参加したメンバーは次のとおりである。

〔 部 長 〕和田圭司（9月1日～）

〔 室 長 〕吉田瑞子，郭 伸（10月1日付で東大神経内科に転出），小田健一郎（～3月31日）

〔 流動研究員 〕真先敏弘（～9月30日），渡瀬 啓（1月1日～）

〔 センター研究員 〕松井京子，和田恵津子（9月28日～）

〔 併任研究員 〕北村純一，高木昭輝，花岡 繁

〔 研 究 生 〕中村良司（～9月30日），徐 俊教（11月1日～）

〔 研 究 助 手 〕木内美子，志鎌昌子，真野登美子（～9月30日），陣野多磨（2月1日～），

高橋真理（10月13日～1月18日）

（部長 和田 圭司）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Kwak S, Aizawa H, Ishida M, Shinozaki H :
New, potent kainate derivatives: comparison of their affinity for [³H] kainate and [³H] AMPA binding sites.
Neurosci Let 139 : 114–117, 1992
- 2) Kwak S, Aizawa H, Ishida M, Shinozaki H :
Acromelic acid, a novel kainate analogue, induces long-lasting paraparesis with selective degeneration of interneurons in the rat spinal cord.
Exp Neurol 116 : 145–155, 1992
- 3) Oda K, Yamazaki K, Miura H, Shibasaki H, Kikuchi T :
Dying back type axonal degeneration of sensory nerve terminals in muscle spindles of the gracile axonal dystrophy (GAD) mouse.
Neuropathol Appl Neurobiol 18 : 265–281, 1992
- 4) Miura H, Oda K, Endo C, Yamazaki K, Shibasaki H, Kikuchi T :
Degeneration and regeneration of motor nerve terminals in anterior gracilis muscle of GAD mouse.
Neuropathol Appl Neurobiol 19 : 41–51, 1993
- 5) Cashman NR, Durham HD, Blusztain JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP :
Neuroblastoma X spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons.
Develop Dynamics 194 : 209–221, 1992

b. 著書

- 1) Shinozaki H., Ishida M., Gotoh Y. and Kwak S :
Pharmacological contradictions in neurotoxicity of excitatory amino acids as a cause of ischemic injuries.
Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia, eds by Ito U, Kuroiwa T and Klatzo I,
Springer-Verlag, Berlin, p 87–94, 1992

c. 総 説

1) 真先敏弘, 郭 伸 :

Diffuse Lewy body disease,
内科 70 : 309-311, 1992

2) 郭 伸 :

興奮性アミノ酸による神経変性疾患モデル
最新医学 47 : 868-872, 1992

3) 小田健一郎 :

眼型重症筋無力症
神経眼科 9 : 523-526, 1992

d. 班会議報告書

1) 吉田瑞子, 松崎哲也 :

mdx 骨格筋の電気刺激時における細胞内 Ca^{2+} 濃度及びその膜電位
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4年度研究報告書 P179-180, 1992

2) 小田健一郎 :

不活化運動ニューロン細胞感作による運動神経軸索変性モデルの作成
厚生省精神・神経疾患・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班会議
平成4年度研究報告書 P18-21, 1992

e. その他

1) 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
日疾動録 8 : 55, 1992

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 郭 伸 :

興奮性アミノ酸：神経疾患と実験動物モデル
日本薬学会シンポジウム, 中枢高次脳障害と薬物療法—伝統薬から新薬まで—
富山, 10. 16, 1992

II 研究業績

b. 国際学会

1) Kwak S, Aizawa H, Nakamura R:

Intrathecally administered acromelic acid induces long-lasting spastic paraparesis with damage of spinal neurons in the rat.

22nd Annual Meeting Society of Neuroscience, Anaheim. October 29, 1992

2) Oda K:

Differences in acetylcholine receptor-antibody interactions between extracellular and extremity muscle fibers

International Congress of New York Academy of Sciences on Myasthenia gravis and related disorders, Washington, D.C., April 13, 1992

c. 一般学会

1) 真先敏弘, 郭 伸, 石浦章一:

細胞内ユビキチン依存性プロテアーゼ (multicatalytic proteinase) のレヴィー小体内局在一光顕・電顕による免疫組織化学的検討

第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 20. 1992

2) 郭 伸:

興奮性アミノ酸による脊髄ニューロンの選択的障害

第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 21. 1992

3) 中村良司, 鎌倉恵子, 郭 伸:

興奮性アミノ酸である AMPA による中枢神経障害に関する病理学的研究

第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 22. 1992

4) 小田健一郎, 北口哲雄, 田平 武, Cashman NR:

運動ニューロン細胞ハオブリドーマ株の樹立とその組織化学・生物学的特徴

第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 21. 1992

5) 小田健一郎, 山崎一斗, 高木昭輝, 菊池寿枝, 菊池建機:

GAD軸索変性マウス: 運動・感覚神経終末の病理学的変化

実験動物学会 東京, 5. 27. 1992

6) 松井京子, 古川昭栄, 菊池建機:

Cytosine arabinoside 投与による運動失調マウスの小脳 NGF 濃度

第66回日本薬理学会年会, 横浜, 3. 27, 1993

C. 班会議発表

1) 吉田瑞子, 松崎哲也 :

mdx 骨格筋の電気刺激時における細胞内 Ca^{2+} 濃度及びその膜電位

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4年度班会議, 東京, 12. 5. 1992

2) 小田健一郎 :

不活化運動ニューロン細胞感作による運動神経軸索変性モデルの作成

厚生省精神・神経疾患・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班会議

平成4年度班会議, 東京, 1. 25, 1993

3) 郭 伸 :

興奮性アミノ酸の髄注による脊髄神経細胞障害の選択性

文部省重点領域研究「神経細胞死」

平成4年度班会議, 東京, 12. 17, 1992

4) 郭 伸, 真先敏弘 :

Multicatalytic proteinase のレヴィー小体内局在 : 分離レヴィー小体を用いた免疫電顕的検討

厚生省特定疾患神経変性疾患調査研究班1992年度班会議, 東京, 2. 6, 1993

5) 郭 伸, 中村良司 :

興奮性アミノ酸による脊髄ニューロン障害の選択性に関する研究

厚生省特定疾患神経変性疾患調査研究班1992年度班会議, 東京, 2. 5, 1993

3. 主な研究報告

AMPA型グルタミン酸受容体機能を特異的に抑制するキラーサブユニットの開発

和田圭司, 関口正幸*, 渡瀬 啓, 土井勝美*, Robert J. Wenthold*

(*米国国立衛生研究所)

グルタミン酸受容体はNMDA型, Non-NMDA型 (AMPA型とkainate型), G-protein coupling型に分けることができるが、いずれも脳高次機能に密接にかかわっており、その機能異常はさまざまな神経障害を引き起こす元となる。近年、グルタミン酸受容体の基本構造が明らかにされたが、我々は、この一次構造に関する情報を元に、個々のグルタミン酸受容体の生体内における役割を明らかにするためのツールとして、グルタミン酸受容体機能を抑制するキラーサブユニットの開発に取り組んできた。今回は、ラット内耳組織より見いだされたAMPA型受容体GluR3サブユニットの変異体 (sGluR3) 1) がキラー効果を発揮するかどうかを検討した。

〈方法〉

正常シークエンス部分の変異シークエンスに置き変わったcDNA (sGluR3) をpBluescript SK(-)に組み込み、in vitroでmRNAを合成した。機能的AMPA型 (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4)、kainate型 (GluR6)、NMDA型 (NMDAR1) 各ラット受容体サブユニットmRNAを同様に合成し、sGluR3 mRNAと同様に組み合わせ、アフリカツメガエル卵に注入した。3日間の培養後、グルタミン酸アゴニストに対する反応性を2電極膜電位固定法により測定した。

〈結果〉

sGluR3自身は、カニン酸 (表1)、グルタミン酸に反応せず、受容体として機能を有しないことが示された。各受容体のwild type subunit mRNAと混注した場合、表2に見られるように、sGluR3はAMPA型受容体機能をdose-dependentに抑制するが、kainate型やNMDA型受容体機能には変化をもたらさない、という結果が得られた。

〈考察〉

生体内におけるsGluR3の生理機能については現在不明であるが、sGluR3がAMPA型グルタミン酸受容体機能を特異的に抑制したことから、生体内における同受容体の役割を検討するためのツールにsGluR3がなりうる可能性が示唆された。sGluR3は他のサブユニットの発現を抑制せず、また、他のサ

ブユニットとオリゴマーを形成することが確認されているので²⁾、その抑制効果の作用点は蛋白質翻訳後にあると考えられる。

〈文献〉

- 1) Doi, K. and R.J. Wenthold Jpn.Otology, in press (1993).
- 2) Sekiguchi, M. et al. 投稿準備中

表1 sGluR3のカニン酸に対する反応性

mRNA	ng	n	Current (nA)
GluR3	5	9/9	137±27
sGluR3	10	0/17	-

表示量のmRNAを注入3日後に、膜電位を-70 mVに固定し、100 μM (GluR3), 500 μM (sGluR3)のkainateを投与した際に流れる電流を測定した。nの分母はテストした卵の数、分子は反応の認められた卵の数を表す。平均値±S.E.

表2 sGluR3によるAMPA型特異的なグルタミン酸受容体機能抑制効果

GluR1-4 (2 ng each), -70 mV, 100 μM kainate

sGluR3	n	Current (nA)
0	18/18	82±8
0.4	10/10	86±10
4	28/34	32±3
8	2/12	11±5

GluR6 (5 ng), -70 mV, 100 μM kainate

sGluR3	n	Current (nA)
0	7/7	14±2
5	7/7	19±4

NMDAR1 (5 ng), -70 mV, 100 μM glutamate+10 μM glycine

sGluR3	n	Current (nA)
0	17/17	14±1
5	15/15	15±1

表示量のmRNA (ng)を注入し、3日後に測定した。nの分母はテストした卵の数、分子は反応の認められた卵の数を表す。数値は反応を認めた卵での平均値±S.E.である。

強縮刺激時における mdx 骨格筋内 Ca^{2+} 濃度及び細胞内破壊

吉田瑞子, 松崎哲也, 和田圭司

Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)とそのモデルマウス(mdx)の骨格筋細胞では、膜の内側にあるジストロフィンの欠損がすでに知られている。しかし筋細胞の壊死は、ジストロフィンが欠損しているだけでは起こらず、DMDの病態で最も重要な、筋細胞壊死の直接原因は未だに明かにされていない。

私達は、今までの研究成果より、筋細胞壊死は刺激一応答時に、正常よりも僅かに多いカルシウムイオンが、細胞内に流入し、徐々に蓄積してゆき、細胞内構造の崩壊が徐々に生じ、あるとき筋崩壊の引き金が引かれ、筋壊死へ陥ると考えた。最終的にこの引き金を見いだすため、昨年度は mdx 骨格筋の電位依存性L型-カルシウムチャンネルを調べた。その結果、対照(B10)に比べ、低い電位で活性化されることが分かり、mdx 骨格筋ではカルシウムイオンが、対照より多く流入することが分かった。

そこで本年度は、電気刺激時に、mdx 骨格筋細胞内のカルシウムイオン濃度が、B10のそれよりも高くなるかどうか、加えて電気刺激による細胞内破壊を調べた。

〈試料と方法〉：3-4週齢のmdx(8匹)とその対照B10(9匹)の長指伸筋を腱から腱まで採取し、筋束を $10\mu\text{M}$ テトロドトキシンを含むKrebs-HEPES溶液で満たされているセルに固定した。筋細胞内カルシウムイオン濃度の測定は、蛍光プローブfura-2を筋細胞内に負荷し、 $340\text{nm}/360\text{nm}$ の強度比による画像解析法で行った。電気刺激は、ガラス電極(細胞外溶液を充填)を用いて強縮刺激を与えた(Duration 1msec, Interval 20msec)。測定は温度 25°C で、溶液表面に酸素-炭酸ガス(95:5)を吹きながら行った。

〈結果と考察〉：細胞内カルシウムイオン濃度；強縮電気刺激を骨格筋に与えた時、mdx細胞内カルシウムイオン濃度は、対照B10に比べ低かった。B10の筋細胞内カルシウムイオン濃度は、静止状態の $80\text{-}100\text{nM}$ から、強縮刺激を受けると $500\text{-}800\text{nM}$ に上昇した。それに対し、mdxのそれは約 200nM に上昇したのみだった。この結果は一昨年報告した結果と一致する。それは長指伸筋にfura-2を負荷して、ポイント測光法で測定したもので、測定数が少なく結論を避けたが、mdx筋細胞内カルシウムイオン濃度は、B10のそれよりも低かった。何故mdxの細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が低いのか、現在のところ不明であるが、私達は一昨年、昨年、本

年度の結果から mdx 骨格筋は、正常に比べカルシウムイオンが結合型になりやすいと考えた。

電気刺激による筋細胞内破壊；私達は、電気刺激で骨格筋細胞内が破壊されることを見いだした。破壊された骨格筋は、DMDの崩壊した筋細胞に酷似している。写真で見ると電極に近い部位に強い収縮が起き(▼)、その両端で筋原繊維の断裂が生じ、左右に引っ張られて行った。そこには空洞が生じた(▼▼)。引っ張られた筋原繊維は切断されたところが強く収縮を起こしているが、それに続く部分は正常(▼▼▼)であった。この現象は筋細胞から電極を離しても生じる。空洞になった部分のカルシウムイオン濃度は 500nM 以下であった。細胞外のカルシウムイオン濃度は約 2mM 含まれているので細胞内空洞部分が 500nM ということは、筋鞘が破壊されていないことを示す。この破壊現象は写真で見ると、2本、3本と筋細胞がグループをなして起こる。この電気刺激による筋細胞内破壊現象を、詳細に調べてゆけば、DMDの病態で一番重要な骨格筋壊死への引き金を、見いだすことが出来ると考えている。

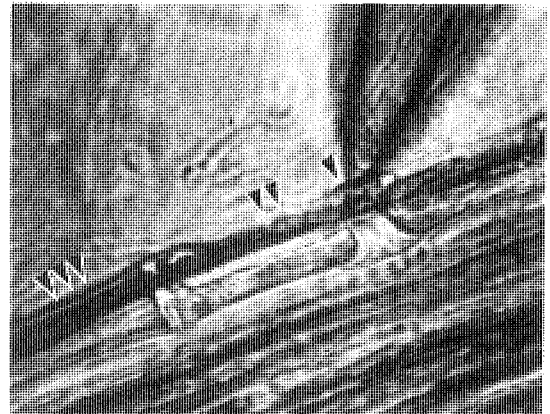
(まとめ)

1) 電気刺激により強縮刺激を与えた時、mdx筋細胞内カルシウムイオン濃度上昇は、B10のそれよりも低かった。

2) 電気刺激に依り、筋細胞内破壊が生じる事を見いだした。

3) 電気刺激による筋細胞内破壊現象は、DMDあるいはmdxの破壊された筋細胞と酷似している。

(写真)



興奮性アミノ酸による脊髄ニューロンの選択的神経細胞障害

郭 伸, 真先敏弘, 中村良司

はじめに:

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。興奮性アミノ酸がある種のニューロンを選択的に変性させことから、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がみられ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:

脊髄クモ膜下腔にアクロメリン酸、カイニン酸、AMPAを直接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 $2\mu\text{M}$)。病理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 $4\mu\text{M}$)。弛緩性麻

痺を生じたラットのなかには持続性の痙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。持続性の痙性対麻痺を惹き起こすのに要する最小有効濃度は $8\mu\text{M}$ であり、 $25\mu\text{M}$ では9割に認められた。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:

アクロメリン酸は、*in vivo*においても脊髄ニューロンに直接に作用して前角運動ニューロンの興奮を惹き起こすことが明らかになった。神経興奮作用は行動・形態変化からみればかぎりカイニン酸のものに類似しているが、活性の強さには30倍以上の開きがある。また、アクロメリン酸のカイニン酸受容体、AMPA受容体に対する親和性が低いことから、髄注による神経興奮作用・神経障害作用は、カイニン酸・AMPA受容体以外の非NMDA受容体を介する作用であると考えざるを得ない。非NMDA受容体サブタイプが数種類クローニングされているがその生物学的な意味合いは明らかではない。アクロメリン酸などの、特異な生物作用を持つリガンドは、これらの受容体の機能を探るうえに格好の道具となると思われる。

不死化運動ニューロン細胞感作による運動神経軸索変性モデルの作成

小田健一郎, 北口哲雄, 田平 武

私どもは細胞融合法を用いて運動ニューロン細胞株を樹立したり。これにより均一で大量の運動神経細胞を得ることが可能となった。この培養細胞をウサギに接種することにより免疫機序を介した実験的運動ニューロン障害の作成を試みたので報告する。

方法

運動ニューロン細胞株：aminopterin に感受性をもつ神経芽細胞とマウス胎児脊髄細胞とをPEGにより融合させ、HAT培地により selection をかけ、融合細胞を得る。その中より choline acetyltransferase を産生する株を選びさらに subcloning を行い、筋細胞との co-culture で神経・筋接合部 (acetylcholine receptor を凝集) を形成するクローンを得た (図)。培養細胞の免疫：細胞のホモジネート (2 mg/ml 蛋白濃度、0.5 ml) を免疫原としてアジュバントとともに3羽のウサギ (日本白色種) を免疫した (1 回/月、4 回)。

臨床像の評価：症状、体重の記録を行い、最終日に筋電図を行った。

病理学的検索：神経・筋組織を採取した。抗体の検索：1) 培養運動ニューロン細胞、2) マウス脊髄前角細胞、3) 運動神経終末を基質とした。抗体の神経細胞毒性：種々の濃度のウサギ血清を培地に添加し、障害された細胞から遊離するLDH値を測定し、細胞障害性を定量化した。

結果

臨床経過：2/3羽において、3カ月後より体重の減少及び、後肢の脱力を認めた。痛覚障害はなかった。筋電図検査で後肢筋に fibrilla-

tion 電位を認めた。

病理所見：脊髄では前角細胞の脱落を認めない。神経根、後根神経節、坐骨神経にも異常なし。後肢筋の運動神経軸索末端に限局した変性を認めた。

免疫学的所見：血清中に神経細胞体 (脊髄前角細胞、橋核など)、筋内神経の Ranvier nodes、運動神経終末に結合する抗体を認めた。神経細胞への毒性を検討したところ、抗血清は用量依存性に神経細胞の障害を引き起こした。

考察、結論

この研究は実験的自己免疫性運動ニューロン病モデル作成の追試を目的とした。しかし、感作したウサギの前角細胞の脱落はなく運動神経軸索の変性のみ認めたことより experimental autoimmune motor axonopathy (EAMA) の病態モデルと考えられる。

1) Cashman, N.R., H.D. Durham, J. K. Blusztajn, K. Oda, T. Tabira, et al. Dev. Dynamics 194: 209 - 221, 1992.

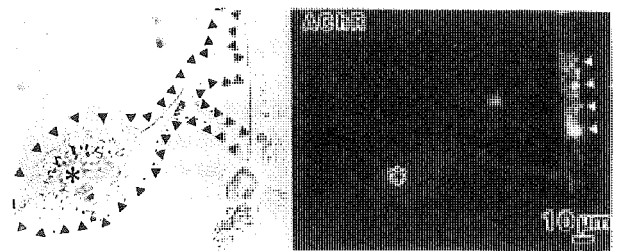


図 培養筋細胞と融合神経細胞の co-culture。左：神経細胞 (※) と神経突起 (▲)、右：myotube と神経突起との接触部 (△) に receptor の cluster をみる。

Cytosine arabinoside 投与マウスの小脳NGFレベル

松井京子, 古川昭栄*, 菊池建機

(*岐阜薬大分子生物)

NGFの小脳における生理的機能を検索するために、抗腫瘍剤であるcytosine arabinoside (Ara-C)をマウスに皮下投与し、成長発達に伴う小脳の形態的变化を検索すると共に、小脳のNGF濃度について測定した。

[方法]

動物: 雄性ICRマウス

投与薬物: Ara-C 50mg/kgを3回、以下の期間にグループ別して投与した。

Group 1: 生後2-4日目

Group 2: 生後7-9日目

Group 3: 生後35日目

NGFの測定: マウスをクロロホルムで処置後、小脳を取り出し、NGFの抽出とその定量は既報に従った(1)。

形態学的検索: Group 1マウスの生後1週、2週、3週目毎に小脳を取り出し、10%ホルマリン固定、パラフィン包埋後、HE染色にて検索した。

[結果と考察]

Group 1マウスにおいては生後2週齢頃より運動失調がみられるが、Group 2, およびGroup 3マウスにおいては運動失調の発現はみられなかった。

Group 1マウスは1-3週齢の時期において正常コントロールマウスに比べ、小脳NGF濃度の増加がみられ、以後8週齢、12週齢目では変化がみられなかった(Fig. 1)。

Group 2, およびGroup 3マウスにおいては、投与1週齢目のNGF濃度において変化がみられなかった(Fig. 2)。

Group 1マウスの小脳の形態異常は1週齢後に、顕著となった。皮質表層下で形成していた外顆粒層細胞は大部分が消失し、皮質全体の幅が薄く、プルキンエ細胞は不規則に分布し、樹状突起方向にも乱れがみられた。このような形態変化は、3週齢目の小脳においてもみられた。小葉の発達も悪く正常小脳が10葉に分岐するのに対し、7葉のまま、発達は停止した。

小脳の未成熟の時期(生後2-3日目)にAra-Cを投与(Group 1)することによ

り、小脳の形態的变化、運動失調の発現、一過性のNGF濃度の増加がみられた。これらのことからNGFは小脳の未成熟の時期において、正常な形態発育、および小脳の修復機構において何らかの生理的役割を演じていると考えられる。今後小脳のどのような細胞がこのような時期にNGFを産生するのか、詳細な検討が必要とおもわれる。

[文献]

(1) Matsui, K. et al.

(1990) FEBS Lett. 276, 78-80.

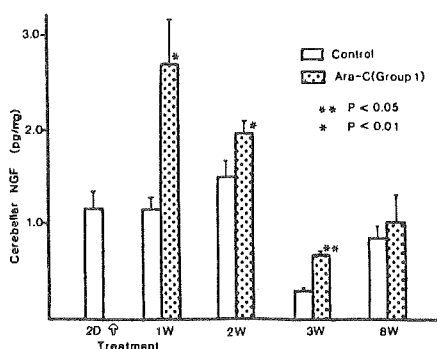


Fig. 1 NGF濃度変化-Group 1

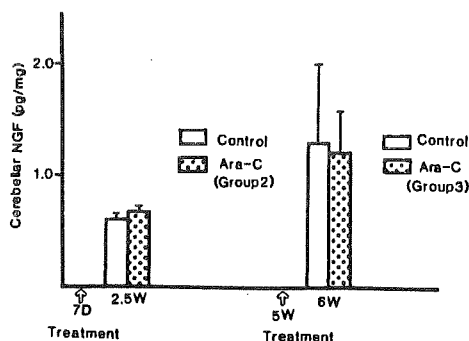


Fig. 2 NGF濃度変化-Group 2, 3

5. 疾病研究第五部

1. 研究部一年のあゆみ

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

人事面では、室長が桃井 隆、研究員は佐々木征行であった。佐々木は7月よりNIH(LMCN, NINDS)に留学している。流動研究員は大島登志男、新井幸男であった。また外来研究員は横山安伸(SRL)であった。併任研究員は岩崎祐治(武蔵病院小児神経科)、村岡 薫(武蔵病院脳外科)、石井澄和(武蔵病院中検)、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)であり、新川詔夫(長崎大学医学部原研)が研究の指導にあたった。研究生は平澤基之(順天堂大学医学部神経内科, 10月より)、有本 潔(東邦大学医学部小児科)、小林 治(武蔵病院小児神経科)、川井ゆか(早稲田大学、大学院)、富田幸子(東京女子医大心研, 11月まで)であった。客員研究員として青木継稔(東邦大学医学部第二小児科)、桜庭 均(東京都臨床総合研究所)が研究指導を行った。センター研究員は松延 康、大杉圭子、センター研究助手は和気佳代、川西桂子であった。研究補助員は松延まき子、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った。

- ① 先天代謝異常症の遺伝子診断(異染性白質変性症, ゴーシェ病, ポンペ病など)
- ② Microdissection 法による G-band 特異的ヒトゲノムDNAのクローニング
- ③ Placental carnosidaseの精製とその酵素学的特性について
- ④ グリア細胞培養系におけるLDLレセプター発現機構について
- ⑤ 血管内皮細胞および平滑筋細胞の低酸素症におけるコレステロール代謝について
- ⑥ P19細胞におけるアクチビンとレチノイン酸によるc-jun mRNAの発現増加

(部長 桜川 宣男)

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Worley KC, Towbin JA, Zhu XM, Barker DF, Ballabio A, Chamberlain J, Biesecker LG, BLethen SL, Beosnan P, Fox JE, Rizzo WB, Romeo G, Sakuragawa N, Seltzer WK, Yamaguchi S, Mocabe ERB :
Identification of new markers in Xp21 between DXS28 (C7) and DMD
Genomics 13 : 957-961, 1992
- 2) Yoshikawa H, Yamada K, Sakuragawa N :
MRI in the wariy stage of Tay-Sachs disease :
Neuroradiology 34 : 394-395, 1992
- 3) Fukumizu M, Matsui K, Hanaoka S, Sakuragawa N, Kurokawa T :
Partial seizures in two cases of metachromatic leukodystrophy :
Electrophysiologic and neuroradiologic findings
J Child Neurol 7 : 381-386, 1992
- 4) Fukumizu M, Yoshikawa H, Takashima S, Sakuragawa N, Kurokawa T :
Tay-Sachs disease:progression of changes on neuroimaging in four cases
Neuroradiology 34 : 483-486, 1992
- 5) Yoshikawa H, Fueki N, Suzuki H, Sakuragawa N, Iio M :
Cerebral blood flow and oxygen metabolism in the Rett syndrome :
Brain Dev 14 (Supp) S69-74, 1992
- 6) Yoshikawa H, Sakuragawa N :
Removal of lipoprotein fraction from culture media corrects the reduction of acid sphingomyelinase activity induced by AY9944,
J Inher Metab Dis 15 : 155-156, 1992
- 7) Momoi T, Kawai Y, Momoi M, Eto Y :
Activin synerfisitically increased c-Jun mRNA in p19 embryonal carcinoma cells in the presence of retinoic acid.
Biochem Biophy Res Commun 184 : 1350-1356, 1992
- 8) Tomita SM, Kitamoto T, Momma K, Takao A, Momoi T :

Cellular retinoic acid binding protein type II was preferentially localized in medium and posterior part of the progress zone of the chick limb bud.

Biochem Biophys Res Commun 185 : 217-223, 1992

- 9) Momoi T, Tomita SM, Nakamura S, Kimura I, Momoi M:

Retinoic acid ambivalently regulates the expression of MyoD in the myogenic cells in the limb buds of early developmental stages.

Biochem Biophys Res Commun 187 : 245-253, 1992

- 10) 吉川秀人, 笛木 昇, 桜川宣男 :

一ヶ月児の脳血流分布

小児科臨床 45 : 1383-1385, 1992

- 11) 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

- 12) 佐々木征行, 有本 潔, 新井幸男, 吉川秀人, 桜川宣男 :

細胞培養系における低酸素症モデルとそのコレステロール代謝に及び影響

日本小児科学会雑誌 96 : 1822-1826, 1992

- 13) 岩崎 章, 新井幸男, 松井 紀, 八坂 篤 :

Phenytoin-induced dystonia を呈した精神運動発達遅滞の一例

神経内科 38 : 57-63, 1993

b. 著 書

c. 総 説

- 1) Sakuragawa N :

Alternating hemiplegia in childhood : 23 cases in Japan

Brain Dev 14 : 283-288, 1992

- 2) 桜川宣男 :

Kugelberg-Welander 症候群

小児科診療 56 (sup) : 121, 1993

- 3) 桜川宣男 :

変性代謝疾患

小児神経学の進歩第21集, P 159-161, 1992

II 研究業績

4) 桃井 隆, 川井ゆか :

アクチビンとレチノイン酸による c-jun 遺伝子発現調節

実験医学 10 : 128-132, 1992

5) 山形宗倫, 富田幸子, 桃井 隆 :

神経系形成の分子機構とレチノイン酸

BIO medica 7 : 33-39, 1992

d. 班会議報告書

1) 桜川宣男 :

ニーマン・ピック病C型-総説-

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4年度研究報告書 P16-17, 1993

2) 桜川宣男 :

ニーマン・ピック病C型-薬剤誘導について-

厚生省精神・神経疾患・代謝障害に基づく中枢神経疾患の病態と治療に関する研究班

平成4年度研究報告書 P18-22, 1993

3) 桜川宣男, 大島登志男 :

培養アストロサイトのコレステロール代謝および酸性スフィンゴミエリナーゼ

活性に与える薬剤の影響について

厚生省精神・神経疾患・高次脳機能とその障害に関する基礎的並びに臨床的研究班

平成4年度研究報告書 P103-110, 1993

4) 桜川宣男, 新井幸男, 大島登志男 :

低酸素障害による脳血管内皮細胞への脂質代謝および細胞遺伝学的な検討

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4年度研究報告書 P9-15, 1993

5) 桃井 隆 :

ニワトリ筋細胞分化におけるレチノイン酸による MyoD1 発現調節

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4年度研究報告書 P99-103, 1992

6) 桃井 隆, 古賀律子, 石浦章一 :

筋細胞分化におけるジストロフィン関連蛋白(DRP)の発現と局在

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー症および関連疾患モデル動物の開発に関する研究班
平成4年度研究報告書 P27-35, 1992

e. その他

1) Sakuragawa N, Ohshima T :

Effects of dibutyryl-cAMP on fibroblasts of I-cell disease : Increase of lysosomal acid lipase in the cells and medium

Ann Neurol 32 : 470, 1992

B. 学会発表

a. シンポジウム

b. 国際会議

1) Sakuragawa N, Ohshima T :

Effects of dibutyryl-cAMP on fibroblasts of I-cell disease : Increase of lysosomal acid lipase in the cells and medium

Twenty-first national meeting of the Child Neurology Society. New Orleans, U.S.A.

10. 22-24, 1992

c. 一般学会

1) 花岡 繁, 福水道郎, 笠井 肇, 黒川 徹, 桜川宣男 :

Krabbe's leudocystrophy の 31p MRS

第34回日本小児神経学会総会, 大宮, 6. 11, 1992

2) 小林 治, 山内秀雄, 吉川秀人, 黒川 徹, 桜川宣男, 福島直喜 :

P E Tによる若年型異染性ロイコジストロフィー (MLD) の脳血流, 酸素代謝の検討

第34回日本小児神経学会総会, 大宮, 6. 11, 1992

3) 佐々木征行, 大島登志男, 桜川宣男, 黒川 徹 :

糖原病II型の遺伝子変異

第34回日本小児神経学会総会, 大宮, 6. 12, 1992

4) 新田初美, 東条 恵, 桜川宣男, 柳本利夫 :

Angelmann 症候群 4 例に療育経過

第34回日本小児神経学会総会, 大宮, 6. 12, 1992

5) 桃 敏彦, 多田博史, 岡庭真理子, 桜川宣男 :

II 研究業績

緩徐進行性の白質ジストロフィーをもつ一家系

第34回日本小児神経学会総会, 大宮, 6. 13, 1992

- 6) 昆かおり, 桜川宣男, 黒川 徹 :

摂食障害で発症した若年性パーキンソン病の一例

第34回小児神経学会総会, 大宮, 6. 13, 1992

- 7) 大島登志男, 佐々木征行, 桜川宣男, 松坂哲應 :

ゴーシェ病の遺伝子異常の解析

第34回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 11. 5 - 6, 1992

- 8) 桜川宣男, 新井幸男, 野呂瀬 昇 :

DMSO治療を行った Niemann-Pick disease type C 患者の脳脂質分析

第35回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 11. 5 - 6, 1992

- 9) 桜川宣男, 大島登志男, 新井幸男 :

HPLCによるコレステロールエステル化障害の解析

第35回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 11. 5 - 6, 1992

- 10) 横山安伸, 佐々木征行, 大島登志男, 桜川宣男 :

Microdissection 及び microcloning 法の基礎的研究

日本人類遺伝学会第37回大会, 筑波, 10. 29-30, 1992

- 11) 平澤基之, 服部信孝, 水野美邦, 有川恵理, 森本啓介 :

Galactosialidosis 家系における保護蛋白の遺伝子解析

第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 21, 1992

- 12) 桃井 隆, 木村一郎 :

レチノイン酸による MyoD1 発現制御

第65回日本生化学学会, 福岡, 10. 9, 1992

- 13) 川井ゆか, 桃井 隆 :

P19EC 細胞分化と糖脂質ガングリオシドの発現調節

第65回日本生化学学会, 福岡, 10. 9, 1992

- 14) 桃井 隆 :

神経, 筋発生分化とレチノイン酸による遺伝子発現調節

第15回日本分子生物学会, 京都, 12. 10, 1992

- 15) 富田幸子, 佐藤信滋, 桃井 隆 :

ニワトリ胚心臓と肢芽に発現する2種類のアクチビン遺伝子

第15回日本分子生物学会, 京都, 12. 19, 1992

d. 研究会など

- 1) 山内秀雄, 加我牧子, 岩崎祐治, 桜川宣男 :

Krabbe 病の聴覚誘発反応

小児誘発脳波談話会, 平成4年10月7日, 東京

- 2) 石川 充, 須貝研司, 水戸 敬, 桜川宣男 :

進行性ミオクローヌステんかん症候群と sphingomyelinase 活性部分
欠損を示した同胞例とその一部検例

多摩小児神経集談会, 平成4年10月24日, 東京

- 3) 桜川宣男 :

障害の種類と概念

第18回障害児保育研究会, 練馬, 10. 13, 1992

- 4) 桜川宣男 :

遺伝病の基礎と臨床について

わかさ学園講演会, 東久留米, 12. 7, 1992

C. 班会議発表

- 1) 横山安伸, 大島登志男, 桜川宣男 :

水頭症の分子遺伝学的研究: 遺伝性, 難治性水頭症の原因遺伝子の探査に関する基礎的研究班
厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班

平成4年度班会議, 東京, 8. 21, 1992

- 2) 横山安伸, 桜川宣男 :

Microdissection and microcloning の応用: STS欠損患者における“cryptic” translocation の
スクリーニングの検討

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

平成4年度班会議, 東京, 11. 27, 1992

- 3) 新井幸男, 大島登志男, 桜川宣男 :

低酸素障害による脳血管内皮細胞への脂質代謝および細胞遺伝学的な検討

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

II 研究業績

平成4年度班会議，東京，12. 11, 1992

4) 大島登志男，桜川宣男：

培養神経グリア細胞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5年度班会議，東京，1. 16, 1993

5) 横山安伸，大島登志男，桜川宣男：

水頭症マウスからの candidate gene の cloning : Microdissection and microcloning 法の応用検討

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班

平成4年度班会議，東京，1. 8, 1993

6) 桃井 隆：

ニワトリ筋細胞分化におけるレチノイン酸による MyoD1 発現調節

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

平成4年度班会議，東京，12. 12, 1992

7) 桃井 隆，古賀律子，石浦章一：

筋細胞分化におけるジストロフィン関連タンパク (DRP) の発現と局在

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

平成4年度班会議，東京，12. 12, 1992

3. 主な研究報告

Microdissection and Microcloning 法に関する基礎研究

横山安伸*, 大島登志男, 佐々木征行, 桜川宣男 (*SRL 染色体部)

Microdissection 法は、1981年 Scalenge et al.¹⁾により、初めてDrosophila 多糸染色体で実施されて以来、既に数々の報告がなされ、ヒト染色体についてもその応用が報告されてきている。特に、1989年Ludecke et al.²⁾が、G-band染色体からマニピュレーターを装着した倒立顕微鏡下で特定染色体領域をかきとり、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で増幅してクローニングする方法を報告したことは、この手法がlinkage の明らかな疾患全てに対して、positional cloningを可能とする点で特筆に値する。しかしながら、彼らの方法は、全ての反応と操作を顕微鏡下で行わなくてはならず、複雑で熟練を要し、決して容易な手法とは言いがたい。

そこで、より迅速で簡単な手法の開発を目的として研究を行った。

〈方法〉

カバーガラス上に作製したヒト染色体標本から、倒立顕微鏡下(x1500)でマニピュレーターを用いて、数個の22番染色体長腕部位をかきとり、PCR チューブ内のProteinase K を含むコレクション溶液中にガラス針ごと回収した。Proteinase K処理後、Meltzer らのDegenerate Oligonucleotide Polymerase Chain Reaction (DOP-PCR) 法³⁾をmodifyしたTwo steps DOP-PCR 法によりDNA 増幅を行った。

増幅されたDNA の由来同定には、PCR 産物をニックトランスレーション法によりビオチン標識し、染色体In situ hybridization を行った。

次に、このPCR 産物を用いた、cDNA libraryからのcDNA cloning の可能性を調べる目的から、22番染色体に既にmap されている Arylsulfatase Aの第8 exon領域の5', 3'側にprimerを設定してPCR を実施した。

〈結果・考察〉

Positional cloningにより遺伝性疾患の候補遺伝子を、探査・捕捉する目的から、Microdissection and Microcloning 法の技術開発を行った。

ヒト染色体22番の長腕部分(22q11-ter)をマニピュレーターを用いて物理的にかきとり、直接、我々がmodifyしたTwo steps DOP-PCR 法による増幅を行った(Fig. 1)。その結果、200bp-数KbのDNA 増幅を認めた。ヒト染色体 In situ hybridization法による由来同定の結果、dissect した22番染色体長腕部分にハイブリが認められ、目的の染色体領域からの増幅であることが確認された(Fig. 2)。PCR 増幅DNA は、pBR322から作製したT-vectorにクローニングした。

さらに、このPCR 産物をtemplateとしたArylsulfatase A の第8 exon 領域のPCR を実施し、268bp 目的の増幅を

認めた。

以上の結果から、我々が改良開発したMicrodissection and Microcloning法は、短時間(約一週間)の内に染色体領域特異的 genomic DNAのクローニングが可能であり positional cloningの有効な手段と考える。又、PCR 産物を用いたcDNAのクローニングの可能性についても有望となった。

〈文献〉

1. Scalenge et al. Chromosoma 82:205-216, (1981)
2. Ludecke et al. Nature 338:348-350, (1989)
3. Meltzer et al. Nature Genetics 1:24-28, (1992)

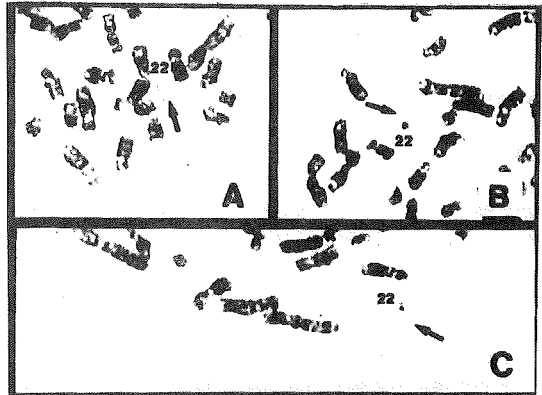


Fig.1. Chromosome microdissection. A-C illustrating the microdissection of chromosome band region 22q11-ter.

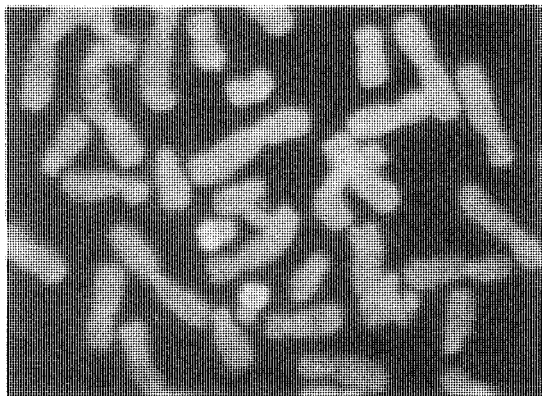


Fig.2. Chromosome in situ hybridization with PCR products demonstrating the region-specific fluorescence.

ゴーシェ病患者における新たな遺伝子変異の同定

大島登志男, 佐々木征行, 桜川宣男

ゴーシェ病は患児の細網内皮系のライソソーム内にグルコセレブロシドが蓄積する先天代謝異常症であるが、ライソソーム酵素であるglucocerebrosidase(GC)の欠損を特徴とする。GCのcDNAがクローニングされて以来¹⁾これまでに種々の遺伝子変異が報告されている。我々はこれまで日本人症例の遺伝子変異の検討を行ってきたが、さらに症例を追加して検討した結果、これまでに報告のない新たな遺伝子変異を見出したので報告する。

< 症例と方法 >

症例は4歳の女兒で、hepatosplenomegalyと眼球異常運動を認め、皮膚線維芽細胞のGC活性の低下などから、Gaucher病Ⅱ型と診断された。培養皮膚線維芽細胞より通常の方法にてRNAを精製し、逆転写酵素にて1本鎖cDNAを合成し、これを鋳型としてPCRを行った。プライマーはcDNAのアミノ酸コード領域を3つの部分に分け、active geneを選択的に増幅するため、pseudogene²⁾で欠失した塩基部分を含むようにデザインした。PCR産物は制限酵素処理後にpUCベクターにサブクローニングし、dideoxy法にてシークエンスを行い、遺伝子変異の検討を行った。変異部位に関してはプライマーを追加して、精製したDNAを鋳型としてPCRを行い同様に検討した。

< 結果及び考察 >

シークエンスを行ったすべてのクローンがactive gene由来であったことから、我々の設定したプライマーからは、pseudogeneからの増幅はないと考えた。

2つの遺伝子変異がheteroallelicに認められた。ひとつは既に報告されている⁴⁰⁹Asp(GAC)→His(CAC)³⁾であった。他方の変異はこれまでに報告されていないもので、エクソン10の最後の塩基のGからAへの置換に引き続いて、イントロン10由来の12塩基対が挿入されていた。この部分のGC遺伝子のシークエンスでは、予想された通りエクソン10の最後の塩基がGからAへ変異していた。この変異(IVS 10⁻¹G→A)によりエクソン10の最後のコドンがArgからGlnに置換し、次のコドンがTGAのストップコドンとなっていた。その結果エクソン11以降が欠落したGCができ、酵素活性が失われるものと考えられた。スプライシングの際にイントロン10の-1の位置に相当する塩基がGからAに置換したために、本来のgtが認識されず、次のgtの出現までイントロンが翻訳されたために、12塩基対の挿入が起きたものと考えられた (Fig 1)。

両親及び兄に関して変異の有無を検討したところ、父親がIVS10⁻¹G→Aの、母親が⁴⁰⁹Asp→Hisの変異をヘテロに

有しており、患児が両変異のcompound heterozygoteであることが裏付けられた。患児は兄をドナーとした骨髄移植を受け現在経過観察中であるが、ドナーである兄はいずれの遺伝子変異も有していなかった。

ゴーシェ病においてはスプライシング異常としてIVS 2⁺¹G→Aが報告されており⁴⁾、またβ-サラセミアやテイ・サックス病などではイントロンの-1の塩基の置換によりスプライシングの異常が報告されている。しかしこれらの変異では結果としてエクソンのスキッピングが起これら、同時にmRNAの発現が低下すると報告されている。しかしこの患児の変異であるIVS10⁻¹G→Aにおいては12塩基対の挿入が起きていた。本変異はゴーシェ病の新たな遺伝子変異であると同時に、正常なスプライシングにおけるイントロンの-1位の塩基の重要性を示唆していると考えられた。

< 文献 >

- 1) Sorge J et al. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:7289-7293
- 2) Horowitz M et al. Genomics 1989; 4:87-96
- 3) Theophilus BDM et al. Nucleic Acid Res 17:7707-7722
- 4) He GS et al. Am J Hum Genet 51:810-820

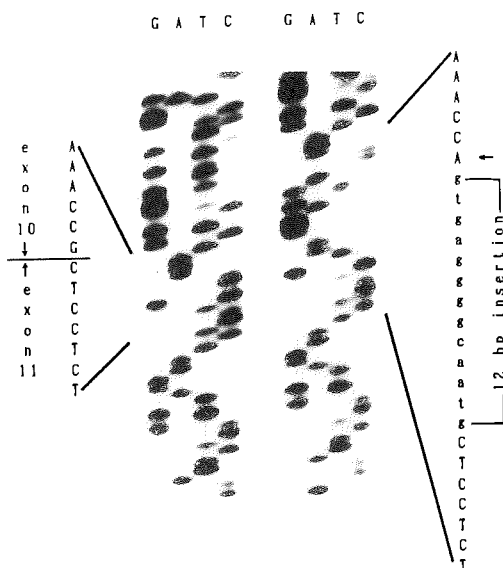


Fig. 1 Nucleotide sequences of patient's normal and mutant transcripts. The arrow indicates the position of the nucleotide substitution.

低酸素障害による脳血管内皮細胞への脂質代謝の影響

新井幸男, 大島登志男, 桜川宣男

低酸素による脂質代謝への影響は病態解明、薬物効果などのために *in vitro* 低酸素障害モデルが作製が必須である。各種培養細胞を用いた低酸素による脂質代謝への影響を検討した報告がみられ、多くは ACAT の亢進とコレステロールエステル (CE) の蓄積を報告しており低酸素による硬化性病変への強い役割を示唆している。我々は各種細胞における低酸素障害モデルを作製し低酸素負荷における脂質代謝の影響を検討してきた。ラット脳微小血管内皮細胞を用いて低酸素障害モデルにおける脂質代謝の影響を検討したので報告する。

【対象と方法】

Minakawa¹⁾の方法を改変して、成熟雄SDラットより、脳微小血管内皮細胞を単離、培養した (BEC)。さらに同じ個体の大動脈より、大動脈血管内皮細胞 (AEC) と平滑筋細胞 (VSMC) を Hoshi²⁾の方法を改変して、培養した。同定は免疫組織化学染色によって行った。デシケターを用いて、減圧→窒素ガスを1気圧になるまで封入する操作で、低酸素を作製した。低酸素による脂質代謝への影響は、酸性フォスファターゼ、 β ガラクトシダーゼ、酸性スフィンゴミエリナーゼ、酸性リパーゼ³⁾について検討した。細胞内遊離コレステロール (C) のエステル化酵素である ACAT は、Vanier の方法⁴⁾を改変して行った。細胞内外の C と CE の定量は HPLC 法で行った。

【結果】

通常の培養では、培養液中の酸素分圧が約 160 mmHg であるが、低酸素実験ではこの 50 から 60 % に定常的に低下し、24 時間の負荷を与えた。通常培養を対照とした。pH の低下は対照と有意差なかった。低酸素負荷による細胞生存率は、トリパンブルー染色で 98 % 以上であり、対照と同様であった。対照細胞の酸性リパーゼ活性は VSMC では AEC と BEC の 10 % の活性と低値を示し、低酸素負荷により各細胞とも 70 % の低下がみられた。対照細胞の ACAT は VSMC では、BEC と AEC の 10 倍の高値を示している。ACAT は低酸素負荷で VSMC は低下し、血管内皮細胞では変化なしに軽度上昇であった (Table 1)。HPLC 分析では、各種細胞内では脂質は

大部分 C として存在していた。VSMC では細胞内 CE は極めて低濃度であり、低酸素負荷による影響は不明である。BEC では低酸素により CE は低下し、AEC ではむしろ増加していた。

【考察】

AEC では低酸素により ACAT が上昇し、CE 濃度が上昇したことは従来の報告どおり低酸素による動脈硬化発現機序を示唆する。これに反して BEC では ACAT の変化は少なく、また、CE はむしろ低下している。BEC じたいの低酸素による動脈硬化への寄与は少ないと考えられる。動脈硬化の病変の主座である VSMC は酸性リパーゼ活性が低値であり、ACAT は高値を示し、細胞内 CE 含量は微量であった。CE 代謝が早いことによると考えられる。低酸素障害によりこの代謝が阻害されることが ACAT 活性の低下で示されたが、細胞内 CE の挙動については、その濃度が測定限界を越えて微量であったため評価できなかった。細胞の種類により、低酸素への抵抗性が異なることを示唆している。CE 代謝に関連する各種酵素蛋白 mRNA の動態について検討中である。

【文献】

- 1) Minakawa et al. Stroke 20, 947-951 (1989)
- 2) Hoshi et al. In Vitro Cell Dev 22, 51-56 (1986)
- 3) Patrick et al. J Med Genet 13, 49-51 (1976)
- 4) Vanier et al. Clin Genet 33, 331-348 (1988)

Table 1) ACAT Acid lipase

CELL	ACAT		Acid lipase	
	CONTROL	HYPOXIA	CONTROL	HYPOXIA
BEC	1.6±0.3	1.5±0.8	1	70%
AEC	2.1±0.6	3.2±0.61	1	91%
VSMC	20.2±5.0	14.0±3.91	10%	70%

ACAT activity is cholesterol (%)-cholesterol formation expressed as units of nmol/hr per cell/10⁶ cells. Each value is the mean ± SD of triplicates. "1" or "10" denote significantly increased or decreased activity induced by hypoxic treatment (*p* < 0.05). Acid lipase was expressed as per cent of control enzyme activity (BEC and AEC).

II 研究業績

P19細胞におけるアクチビンとレチノイン酸による c-jun mRNA の発現増加

桃井 隆

ビタミンAの代謝誘導体であるレチノイン酸は、神経芽細胞を含む様々な細胞の増殖と分化を調整するだけでなく、近年ニワトリ胚芽の前後軸形成を調節する因子として注目をあつめている。われわれは、細胞内レチノイン酸結合タンパク (CRABP) がマウス発生過程の神経系で神経系形成に伴い一過性にかつ空間特異的に発現する事を示した。一方、レチノイン酸の生理作用は核内レチノイン酸レセプター (RAR) を介して行われる事が、ChambonとEvansの研究から明らかにされ、RARはステロイド・サイロイド受容体スーパーファミリーに属する遺伝子であり、現在までに α 、 β 、 γ の3種類の異なる遺伝子が発見されている。レチノイン酸は転写活性をもつこれら受容体をかいして、細胞分化、形態形成の過程で必要とされる遺伝子の発現を調節するものと考えられている。一方、アクチビンはフレンド細胞分化、中胚葉誘導などさまざまな生理活性をもっていることが知られているが、最近、神経細胞の6番目の生存因子としての生理作用がみいだされている。また、P19EC細胞には、アクチビン受容体が多く発現している事から、レチノイン酸による神経細胞分化誘導におけるアクチビンの生理機能が注目されてきた。われわれは、レチノイン酸誘導体によるP19EC細胞の神経細胞分化誘導の過程で、c-jun遺伝子の発現が誘導されるとともに、c-junの発現が神経細胞分化と関連することを明らかにした。本年度はレチノイン酸誘導体と神経細胞生存因子 (アクチビン) が、相乗的にP19EC細胞のc-jun遺伝子の発現を促すことを明らかにした。

[方法]

P19細胞は10%FCSを含む α -MEM培地下、CO2インキュベーター中で培養された。レチノイン酸誘導体として、シス、トランスレチノイン酸、レチナール、レチノール (ビタミンA) をそれぞれ0.5 μ M添加し、アクチビン存在下、非存在下で1-30時間培養した。各培養条件下での細胞をグアニジンチオシアネート法でRNAを分離し、c-jun mRNAをノーザンハイブリダイゼーションにより検出した。

[結果・考察]

P19細胞は0.5 μ Mレチナール、13-シスレチノイン酸、トランスレチノイン酸により、24時間以内にc-jun遺伝子の発現が誘導される。100 ng/mlアクチビン単独ではc-junの発現を促進しないが、レチノイドとの共存下でc-jun mRNAの発現が著しく促進した。さらに時間経過を追って調べてみると、アクチビンによる相乗効果は3時間以内に見られ、48時間後では、c-jun mRNAの発現量は5-6倍に増加していた。また、c-jun発現に必要なトランスレチノイン酸の量は100 nMであるが、100 ng/mlのアクチビン共存下では、10 nMであり、0.5 μ Mトランスレチノイン酸に対し相乗効果をしめすアクチビンの濃度は1 ng/mlで十分であった。

最近アクチビン受容体遺伝子が分離され、そのDNA配列より、アクチビン受容体はC-キナーゼとおなじセリン・スレオニンキナーゼ活性を持っている可能性が示唆されている。C-キナーゼの活性化であるTPAはアクチビンと同様レチノイン酸存在下のみで、c-jun遺伝子の発現を促進することから、アクチビンは受容体を介してのリン酸化による情報伝達の結果、c-jun遺伝子の発現が促進するものと推測される。c-jun遺伝子の発現はc-jun遺伝子の上流に存在するTPA応答配列 (TRE) を介してc-jun蛋白により自己調節されるが、c-jun蛋白のDNAに対する結合能はリン酸化により発現誘導されたc-jun蛋白が、アクチビン受容体によりリン酸化の調節を受け、c-jun遺伝子の発現が活性化されたものと推測される。

[文献]

Momoi, T., Kawai, Y., Momoi, M. and Etoh, Y.: Activin synergistically increased c-Jun mRNA in P19 embryonal carcinoma cells in the presence of retinoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1350-1356 (1992).

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髄脊髄炎，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。

科学技術振興調整費総合研究「生体情報伝達機構の解析・制御技術の開発に関する研究」（大村班）が第2期に入り，サイトカインの中枢神経栄養因子作用を研究した。同総合研究「脳機能の外来因子による異常発現機構解明のための技術開発に関する研究」がスタートし，自己免疫性脳炎の分子機構を研究した。ヒューマンサイエンス振興財団の受託研究は第3期に入り「神経・免疫・内分泌相互因子による神経系の障害・修復機序の解明と応用」（主任）で，エーザイ，藤沢薬品，中外製薬，ツムラ，新田ゼラチン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）は2年目に入り，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的研究等が行われた。この他，文部省科学研究費一般B，同重点領域「老年痴呆」，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。科学技術振興調整費個別重要国際共同研究「多発性硬化症およびHAM/TSPの日米比較研究」を米国NIH, Dale E. McFarlinと行ない，T細胞受容体に関する日米シンポジウムを開いた。

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〕佐藤準一，北口哲雄，遠藤真澄，光永吉宏，〔外来研究員〕小西吉裕，弘瀬秀樹，崔得華，Ferrenc Gallyas, Milena Kozovska, 荒木 亘，池田幸弥，須川 誠，耿 同超，Tofazzal Hossain，〔併任研究員〕北口哲雄，〔研究生〕井野辺純一，近藤誉之，大橋高志，〔センター研究助手およびアルバイト〕久野かほる，掛場康予，下佐洋子，松本摩理子，久松潤子，下地公子，真野登美子，津久井由美。

（部長 田平 武）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Cashman NR, Durham HD, Blusztajn, JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP :
Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons
Dev Dynamics 194 : 209–221, 1992
- 2) Satoh J, Gallyas F Jr, Endoh M, Yamamura T, Kunishita T, Tabira T :
Coexistence of cholinergic, catecholaminergic, serotonergic, and glutamatergic
neurotransmitter markers in mouse clonal hybrid neurons derived from the septal region
J Neurosci Res 32 : 127–137, 1992
- 3) Satoh J, Gallyas F, Endoh M, Yamamura T, Kunishita T, Kobayashi T, Tabira T :
Establishment of mouse immortalized hybrid clones expressing characteristics of
differentiated neurons derived from the cerebellar and brain stem regions
J Neurobiol 23 : 905–919, 1992
- 4) Satoh J, Nomaguchi H, Tabira T :
Constitutive expression of 65-kDa heat shock protein (HSP65)-like immunoreactivity in
cultured mouse oligodendrocytes
Brain Res 595 : 281–290, 1992
- 5) Ohyagi Y, Takahashi K, Satoh Y, Makifuchi T, Tabira T :
Cerebral cortical amyloid protein precursor mRNA expression is similar in Alzheimer's
disease and other neurodegenerative diseases
J Neurol Sci 111 : 33–38, 1992
- 6) Ohyagi Y, Tabira T :
Effect of growth factors and cytokines on expression of amyloid beta protein precursor
mRNAs in cultured cells
Mol Brain Res 18 : 127–132, 1993
- 7) Konishi Y, Chui D-H, Hirose H, Kunishita T, Tabira T :
Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic
neurons in vitro and in vivo

Brain Res 609 : 29-35, 1993

- 8) Mizoguchi K, Kunishita T, Chui D-H, Tabira T :

Stress induces neuronal death in the hippocampus of castrated rats

Neurosci Lett 138 : 157-160, 1992

- 9) Onodera T, Momotani E, Shimizu S, Yoshihara K, Tabira T :

Histopathology and image analysis of brain lesions in ovine scrapie in Japan

Jpn J Vet Sci 52 : 439-442, 1992

- 10) 井野邊純一, 山村 隆, 田平 武 :

HAM 研究の最近の進歩. 発症機序の考察.

免疫性疾患としての考察(2)基礎免疫の視点から

臨床神経 32(2) : 1341-1343, 1992

b. 著 書

- 1) 田平 武 :

同心円硬化症

モダンクリニカルポイント 神経内科(平山恵造編), 金原出版, 東京, P134-159, 1993

- 2) 池中一裕, 鹿川哲史, 山村 隆, 山田正信, 清水恵司, 御子柴克彦 :

脳髄疾患に対する脳内移植

脳腫瘍の免疫と分子生物学(高倉公朋, 最上平太郎, 早川 徹監修), 金芳堂, P333-342, 1992

c. 総 説

- 1) 田平 武 :

アルツハイマー病の多因子

からだの科学〔増刊〕(長谷川和夫編), 日本評論社, P26-32, 1992

- 2) 田平 武 :

アルツハイマー型痴呆症にみる分子遺伝子学的研究

臨床精神医学 21 : 871-876, 1992

- 3) 田平 武 :

サイトカインによる神経細胞とグリア細胞の機能調節

Clinical Neuroscience 10 : 643-645, 1992

- 4) 田平 武 :

神経疾患と再発

II 研究業績

Brain Science and Mental Disorders 3 : 201-205, 1992

5) 田平 武 :

サイトカインの神経栄養因子作用

Dementia 6 : 235-241, 1992

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 :

家族性アルツハイマー病の分子遺伝学

老年精神医学雑誌 3 : 970-977, 1992

8) 田平 武 :

グリアとサイトカイン

Dementia 6 : 371-378, 1992

9) 田平 武 :

遺伝素因からみたアルツハイマー型痴呆

老年期痴呆 6 : 61-66, 1992

10) 田平 武 :

脳内サイトカインの神経系への作用

BIOmedica 7 : 1406-1410, 1992

11) 田平 武 :

多発性硬化症 : 最新療法の紹介

神経治療学 9 : 549-553, 1992

12) 山村 隆 :

T細胞レセプターペプチドによる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の治療

臨床免疫 24 : 1353-1358, 1992

13) 山村 隆 :

自己免疫性脳脊髄炎 (EAE), 発症とサイトカイン

臨床免疫 25 : 70-76, 1993

d. 班会議報告書

e. その他

- 1) 大友英一（司会），平井俊策，田平 武，武田雅俊：
座談会：老年期痴呆における最近の知見
老年期痴呆 7：19-33, 1993
- 2) 田平 武：
研究施設から：国立精神・神経センター
老年期痴呆 156-159, 1993
- 3) 高橋（取材・文），田平 武，中村重信（取材協力）：
けんこう新世紀第11回ここまでわかってきたアルツハイマー型痴呆
NHKきょうの健康 2月号 P92-99, 1993
- 4) 田平 武（取材協力）：
アルツハイマー病を追いつめる
フォト，時事画報社，3月1日号 P47-49, 1992
- 5) 田平 武（取材協力）：
サイエンスニュース ストレスとホルモン不足が老人性のボケを作る
Quark，講談社，6：24, 1992
- 6) 平野正巴（取材・文），田平 武，長谷川和夫（取材協力）：
アルツハイマー最前線
Be-Common，NHK出版，7：38-39, 1992
- 7) 田平 武（取材協力）：
脳と健康を科学する，これがボケる脳の兆しだ
週刊ポスト，小学館，10. 2：211-213, 1992

B. 学会発表

a. 特別講演，シンポジウム

- 1) 田平 武：
脳で働くサイトカイン
第14回日本基礎老化学会シンポジウムー生体統御システムと老化，東京，4. 11, 1992
- 2) 田平 武：
シンポジウム：“HAM研究の最近の進歩”：発症機序の考察，基礎免疫の視点から
第33回日本神経学会総会，鹿児島，5. 21, 1992

II 研究業績

- 3) 田平 武 :
アルツハイマー型痴呆の解明—予防と治療の可能性をめぐって
シンポジウム：超高齢化社会，ぼけ予防の可能性を探る（毎日新聞社・財団法人ぼけ予防協会／主催），東京，6. 10, 1992
- 4) 田平 武 :
多発性硬化症：最新療法の紹介
第10回日本神経治療学会総会，シンポジウム“慢性期多発性硬化症の治療”
東京，6. 11, 1992
- 5) Tcira T :
Studies of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. T-cell receptor analysis and double negative suppressors
Seminar, TNO Medical Biological Laboratory, Rijswijk, Aug 14, 1992
- 6) 田平 武 :
ストレスと神経細胞死
第11回研究開発動向セミナー“高次脳機能研究のストラテジー「基礎と臨床」”
（医薬品副作用被害救済研究振興基金），東京，9. 18, 1992
- 7) Gallyas FJr, Tabira T :
The effect of corticosterone and RU 28362 on immortalized neuronal and precursor cell lines
7th Rinshoken Internat. Symp., Tokyo, Oct 5 - 7, 1992
- 8) Tabira T :
Stress induces neuronal death in the hippocampus
International Forum in Shiga, Immunological Aspects of Alzheimer's Disease :
Strategy and Tactics towards Treatment (Molecular Neurobiology Research Center),
Shiga, Nov 15, 1992
- 9) 田平 武 :
長野県痴呆性老人シンポジウム，伊那，11. 20, 1992
- 10) 田平 武 : フィリピンにおける脱髄性脳疾患について
Niigata International Symposium (Joint Research Work) : Pathoanatomical study on the demyelinating disease in China, Niigata, Nov 27, 1992
- 11) 田平 武 :

特別講演：自己免疫性脳炎の発生機序から治療法の開発へ

第40回近畿内科神経懇話会，大阪，12. 5，1992

12) 田平 武：

特別講演：脳内サイトカインとミクログリア

第5回マクロファージ研究会「マクロファージの認識機構をさぐる」，東京，12. 21，1992

13) 田平 武：

シンポジウム：成人病と遺伝子，アルツハイマー病の遺伝子

第27回日本成人病学会，東京，1. 15，1993

14) 田平 武：

テーマ4 神経系の機能・病態の解析と医療への応用：第3期研究テーマの概要について

ヒューマンサイエンス・官民共同プロジェクト研究成果シンポジウム，東京，1. 28，1993

15) 田平 武：

脳の栄養因子として働く免疫サイトカイン

シンポジウム '93「明日をめざす科学技術」，東京，3. 24，1993

16) Yamamura T：

Transplantation of a permanent glial cell line characteristic of O-2A lineage

Special Seminar of National Institute of Neurological Disease and Stroke,

Bothesda, Sep 23, 1992

17) Yamamura T：

Immunoregulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4⁺CD8⁻ T cells

Special Seminar of Eunice Kennedy Shriver Center, Waltham, Sep 24, 1992

b. 国際学会

1) Inobe J, Yamamura T, Kunishita T, Tabira T：

Multiple T-cell epitopes of myelin proteolipid protein (PLP) in Japanese multiple sclerosis (MS)

44th Ann Meeting Amer Acad Neurol, San Diego, May 7, 1992

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

Coexistence of cholinergic, catecholaminergic, serotonergic and glutamatergic neurotransmitter markers in mouse septal hybrid neurons

44th Amer Acad Neurol Congress, San Diego, May 5, 1992

II 研究業績

- 3) Yamamura T, Chui DH, Satoh J, Kitaguchi T, Tabira T :
Transplantation of immortalized glial cells characteristic of oligodendrocyte type 2 astrocyte (O-2A)
44th Ann Meeting Amer Acad Neurol, San Diego, May 5, 1992
- 4) Kunishita T, Gallyas F Jr, Konishi Y, Kuno K, Tabira T :
Neurochemical characterization of septal neuronal cell lines SN6, 29, 52
1st IUBMB Conference, Biochemistry of Disease, Nagoya, Jun 3, 1992
- 5) Hirose H, Kitaguchi T, Tabira T :
An improved method of neuronal cell culture by use of extracellular matrix
1st IUBMB Conference, Biochemistry of Disease, Nagoya, Jun 3, 1992
- 6) Tabira T, Nihei J, Kozovska M, Yamamura T :
Double negative suppressor T cells against encephalitogenic T cell clones
Satellite Conference of the 8th International Congress of Immunology,
Neuroimmune Interactions and Their Regulation, Budapest, Aug 21, 1992
- 7) Yamamura T, Sakanaka S, Kozovska M, Tabira T :
Immunomodulation by T cell receptor (TCR) vaccination : The appearance of TCR
dull-positive cells in the spleen
Workshop, 8th International Congress of Immunology, Budapest, Aug 26, 1992
- 8) Kitaguchi T, Chui DH, Tabira T :
In vivo differentiation of V-myc-immortalized progenitor cell line on transplantation into the
adult brain
The American Neurological Association Meeting, Tronto, Oct 23, 1992
- 9) Yamamura Y, Nihei J, Tabira T :
Extrathymic maturation of CD4⁻ CD8⁻ T cells down-regulating autoimmune encephalomyelitis
Winter Advanced Course for Immunology and Infectious Disease, Chiba, Jan 24, 1993
- 10) Inobe J, Yamamura T, Kunishita T, Tabira T :
Myelin proteolipid (PLP) specific autoimmune T cells in multiple sclerosis and healthy
subjects
Winter Advanced Course for Immunology and Infectious Disease, Chiba, Jan 24, 1993
- 11) Kozovska M, Yamamura T, Tabira T :

T cell receptor (TCR) vaccination in EAE : Induction of down-regulator T cells specific for V β 17a CDR2 peptide

Winter Advanced Course for Immunology and Infectious Disease, Chiba, Jan 24, 1993

c. 一般学会

- 1) 崔 得華, 溝口和臣, 田平 武 :
 ストレスによるラット海馬における神経細胞死と astrocyte との関連について
 第34回日本神経病理学会, 東京, 5. 13, 1993
- 2) 山村 隆, 佐藤準一, 北口哲雄, 田平 武 :
 O-2A グリア細胞の成熟オリゴへの分化を抑制する液性因子と接触性因子について
 第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 20, 1992
- 3) 井野辺純一, 山村 隆, 国下龍英, 田平 武 :
 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
 第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 21, 1992
- 4) 小田健一郎, 北口哲雄, 田平 武, Cashman NR :
 運動ニューロン細胞ハイブリドーマ株の確立とその組織化学, 生物学的特徴
 第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 21, 1992
- 5) 佐藤準一, 山村 隆, 田平 武 :
 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
 第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 22, 1992
- 6) 山村 隆, 坂中 進, 田平 武 :
 自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 誘起性 T 細胞の T 細胞レセプター CDR 3 間のホモロジー
 第22回日本免疫学会総会, 名古屋, 11. 27, 1992
- 7) 佐藤準一, 山村 隆, 田平 武, 野間口博子 :
 熱ショック蛋白質 HSP65 を構成的に発現するマウスタイプ 2 アストロサイト前駆細胞株の樹立
 第22回日本免疫学会総会, 名古屋, 11. 27, 1992
- 8) 井野辺純一, 山村 隆, 田平 武 :
 日本人多発性硬化症患者由来ミエリン塩基性蛋白 (MBP) ペプチド特異的 T 細胞の解析
 第22回日本免疫学会総会, 名古屋, 11. 27, 1993
- 9) 遠藤真澄, 国下龍英, 田平 武 :
 MHC クラス II 抗原陽性マクロファージ由来神経栄養因子について
 第16回日本神経科学学会, 大阪, 12. 8, 1992
- 10) 佐藤準一, 山村 隆, 田平 武, 野間口博子 :

II 研究業績

オリゴデンドログリア, 熱ショック蛋白, $\gamma\delta$ T細胞

第5回日本神経免疫研究会学術集会, 東京, 1. 20, 1993

11) Milena Kozovska, 山村 隆, 国下龍英, 田平 武 :

T細胞レセプターペプチドによるEAEの治療. V β 17a CDR2反応性T細胞の性状

第5回日本神経免疫研究会学術集会, 東京, 1. 20, 1993

12) 山村 隆 :

ミエリン塩基性タンパク, プロテオリピッドタンパク, T細胞受容体

第5回日本神経免疫研究会学術集会, 東京, 1. 20, 1993

C. 班会議発表

1) 高橋慶吉, 田平 武, 中島 衝, 今村 孝 :

ヒト21番染色体の未知遺伝子分離法の開発

ワークショップ: 日本におけるヒトゲノム研究, 東京, 7. 23, 1992

2) 田平 武, 井野辺純一, 山村 隆 :

HAMの免疫学的研究

厚生省・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

仙台, 12. 3, 1992

3) 田平 武, 高橋慶吉 :

ノーザンブロット法を用いた21番染色体遺伝子のスクリーニング

文部省・重点・老年痴呆の分子機構(辻班)班会議, 東京, 12. 21, 1992

4) 田平 武, 近藤誉之, 高橋慶吉, 山村 隆 :

多発性硬化症におけるミエリン自己抗原特異的T細胞受容体の double step inverse PCR 法による解析

厚生省・特定疾患・免疫性神経疾患研究班班会議, 東京, 1. 18, 1993

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 第二報

厚生省・特定疾患・免疫性神経疾患研究班班会議, 東京, 1. 18, 1993

6) 田平 武, 光永吉宏, 高橋慶吉, 渡辺俊三, 田崎博一, 井野美幸 :

本邦の家族性アルツハイマー病における家系連鎖解析

長寿化学「痴呆疾患の遺伝学的研究」研究発表会, 東京, 2. 19, 1993

7) 石浦章一, 木野内忠稔, 友町洋之, 鈴木紘一, 矢崎まどか, 田川一彦, 中嶋一行, 高坂新一,

田平 武, 杉田秀夫 :

アミロイド生成に関与する新規酵素の同定

長寿科学「痴呆疾患の遺伝学的研究」研究発表会，東京，2. 19, 1993

8) 遠藤真澄，国下龍英，田平 武：

活性化マクロファージ由来神経栄養因子について

ヒューマンサイエンス第4分野第4テーマ「神経系の機能・病態の解析と医療への応用」

平成4年度研究発表会，東京，3. 5, 1993

9) 崔 得華，田平 武，溝口和臣：

ストレス負荷による海馬神経細胞死に関する研究

ヒューマンサイエンス第4分野第4テーマ「神経系の機能・病態の解析と医療への応用」

平成4年度研究発表会，東京，3. 5, 1993

10) 弘瀬秀樹，田平 武：

神経細胞特異物質を認識するモノクローナル抗体の作製

ヒューマンサイエンス第4分野第4テーマ「神経系の機能・病態の解析と医療への応用」

平成4年度研究発表会，東京，3. 5, 1993

11) 内藤成孝，池田幸弥，田平 武，高橋慶吉，国下龍英，荒木 亘：

アミロイドβ蛋白質の生成及び沈着機構の解明

ヒューマンサイエンス第4分野第4テーマ「神経系の機能・病態の解析と医療への応用」

平成4年度研究発表会，東京，3. 5, 1993

12) 国下龍英：

神経系に作用する免疫サイトカイン類の脳における発現とその作用機構の研究

科技振興調整費総合研究「生体情報伝達機構の解析・制御技術の開発に関する研究」

(大村班) 班会議，兵庫，9. 29, 1992

13) 国下龍英：

ヒト血小板膜に存在する amyloidogenic fragments の検討

厚生省長寿科学総合研究「早老症の発症機序に関する研究」(高嶋班) 班会議

東京，2. 26, 1993

14) 国下龍英：

神経系に作用する免疫サイトカイン類の脳における発現とその作用機構の研究

科技振興調整費総合研究「生体情報伝達機構の解析・制御技術の開発に関する研究」

(大村班) 班会議，東京，3. 15, 1992

3. 主な研究報告

脳における IL-3 の発現とその受容体の解析

小西吉祐, 崔 得華, 高橋慶吉, 山村 隆, 国下龍英, 田平 武

我々はインターロイキン 3 (IL-3), 顆粒球・マクロファージコロニー形成刺激因子 (GM-CSF), エリスロポエチン (EPO) の様な幾つかのサイトカインが in vivo, in vitro の両方において中隔野コリン作動性神経細胞に対し栄養因子作用を示すことを報告した^{1,2)}。その意義を明らかにするための第一段階として、今回脳内、培養神経細胞 (株) およびグリア細胞における IL-3 産生と IL-3 受容体の発現を検討した。

[方法]

- 1) IL-3 の発現: マウス IL-3 遺伝子より得た合成プライマーを用い、マウス培養細胞由来 Poly A-RNA を PCR 増幅した後解析した。
- 2) IL-3 受容体の発現: 組織化学的検討は二種類の抗体 (低親和性抗体 Aic-2、高親和性抗体 F9) を用いラット脳で行った。マウス培養細胞での発現は Northern blot または FACS 解析により検討した。

[結果]

- 1) IL-3 の発現: 一次培養細胞で検討した結果、海馬神経細胞で陽性であり、グリア細胞で陰性であった。
- 2) IL-3 受容体の発現: Aic 2 抗原の発現は中隔野、対角帯核、灰白質に存在する大型のコリン作動性神経細胞 (ChAT⁺ 神経細胞) のみに見られ、他の神経細胞およびグリア細胞 (GFAP⁺ 細胞) には見いだされなかった。RNA レベルでも同様に神経細胞のみにその発現が見られた。一方、脳内における F9 抗原の分布は Aic-2 抗原の場合よりも特異性がややゆるやかで、コリン作動性神経細胞の他大脳皮質に存在するその他の神経細胞でも F9 抗原陽性を示すものがあった。また髄膜周囲のみではあるがグリア細胞にも陽性であった。FACS では F9 抗原の発現は新生マウス中隔野由来の神経細胞株や海馬由来の神経細胞株で強く、胎生マウス中隔野由来の神経細胞株では IL-3 受容体を IL-1β で誘導した時に見いだされた。

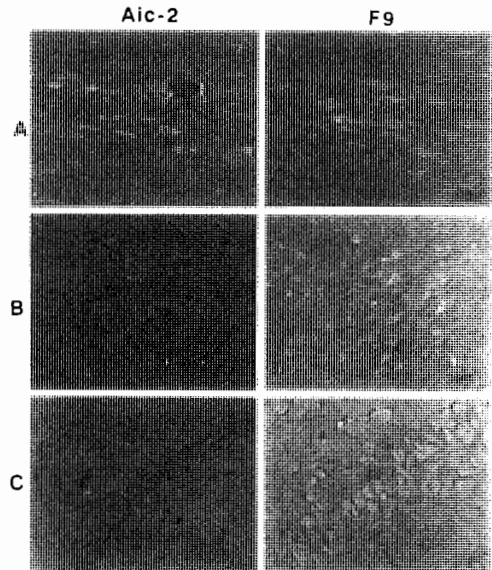
[考察]

IL-3 が海馬の神経細胞で産生され、その受容体が中隔野コリン作動性神経細胞に存在するこ

とが明らかになった。このことは脳内に IL-3 を恒常的に利用する系が造血系とは別に存在していることを示唆すると共に、神経系と造血系の共通性あらためて示している。IL-3 は造血系で種特異性が高いとされ、ヒト IL-3 はマウスには作用しないといわれている。また、Aic-2 抗原の一つである Aic-2A は造血系でのマウス IL-3 受容体サブユニットと考えられている。一方、F9 は IL-3 様活性を持ち、リユーマチ患者の単核球と反応する抗体である。今回、F9 抗原がラットおよびマウス脳に見いだされた。我々は、既報でヒト IL-3 がマウスのもの同様にマウス中隔野コリン作動性神経細胞に活性を持つことを示しているが、今回の知見は神経系における IL-3 のヒト/マウス交叉性が F9 抗原を介して現れることを示すものかも知れない。F9 は神経系に存在する未知の IL-3 受容体の可能性が高く、現在その解析を行っている。

[文献]

- 1) Kamegai M. et al., Neuron 4, 429, 1990.
- 2) Konishi Y. et al., Brain Res. 609, 29, 1993.



A:Septum, B:Cortex, C:Hippocampus.

MS患者由来PLPペプチド特異的T細胞株の解析

井野辺純一, 山村 隆, 国下龍英, 田平 武

<目的>

多発性硬化症(MS)の発症機序として中枢神経自己抗原を認識するT細胞が関与するという自己免疫説が有力である。実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の研究からミエリン塩基性蛋白(MBP)及びプロテオリビッド蛋白(PLP)が自己抗原の候補として挙げられている。我々はEAEの脳炎惹起性エピトープが集積しているPLPアミノ酸位85-159をカバーする7種類のペプチドを合成し、PLPペプチド特異的T細胞株をMS患者及び健康者(HS)の末梢血から樹立しその性質を検討した。

<方法>

被検者(MS HLA-DR2* 3例, DR4* 4例; HS DR4* 2例, DR2*DR4* 4例)の末梢血単核球(PBMC)を、 2×10^6 cells/mlに調整し、各PLPペプチド(PLP85-104, 95-116, 105-124, 118-139, 130-148, 139-155, 145-159)(40 μ g/ml)を加え96穴丸底プレートにて培養。3-4日毎にIL-2, IL-4を含む培養液にて増殖を促し、13日目にT細胞株の抗原特異性を $[^3H]$ サイミジンの取り込みにて決定。以後2週間毎にペプチドとX線照射したPBMCを加えT細胞株を維持した。そしてこれらのT細胞株のMSとHSの各ペプチド毎の樹立頻度、MHC-拘束性、細胞表面マーカー、エピトープ特異性を検討した¹⁾。

<結果>

1. 計3435個のT細胞株中281個がPLPペプチド特異的T細胞株であった。T細胞株はMSからより高頻度に樹立された($P < 0.01$)。さらにMSの中ではDR2*MSからDR4*MSより高頻度に樹立された($P < 0.01$) (図)。
2. PLP 85-104, 95-116, 105-124, 130-148, 139-155に対するT細胞株樹立頻度は高く、PLP 118-139, 145-159に対する頻度は低い傾向を認めた(図)。
3. 各ペプチド特異的T細胞株は、主にHLA-DRにより拘束されていたが、-DP, -DQ拘束性T細胞株も含まれていた。
4. 樹立されたT細胞株は、TCR $\alpha\beta$, CD3, CD4, HLA-DR, VLA-4を発現していた。
5. PLP 85-159間に、少なくとも7種類の独立し

たT細胞エピトープの存在を確認した。

<考察>

MSにおけるPLPに対する細胞性免疫の解析はその重要性にもかかわらずPLP分子の疎水性のため明らかではなかった。そこで我々は合成ペプチドを用いて解析をおこなった。その結果、MSのPBMCはHSのそれと比べてPLPに対する応答性が高く、末梢血中のPLP特異的T細胞のfrequencyも高いことが明らかになった。PLPペプチド特異的T細胞株の性質はMBP特異的T細胞株と同一のものであった²⁾³⁾。以上の結果はPLPはMBPと同様にMSにおける標的抗原である可能性を示唆していると思われた。

<結論>

MSのPLPに対する細胞性免疫応答はHSと比べて亢進している事を証明した。

<文献>

1. Inobe J. et al., (submitted).
2. Inobe J. et al., J. Neuroimmunol. (in press) (1993)
3. Pette M. et al., Neurology 40, 1770 (1990)

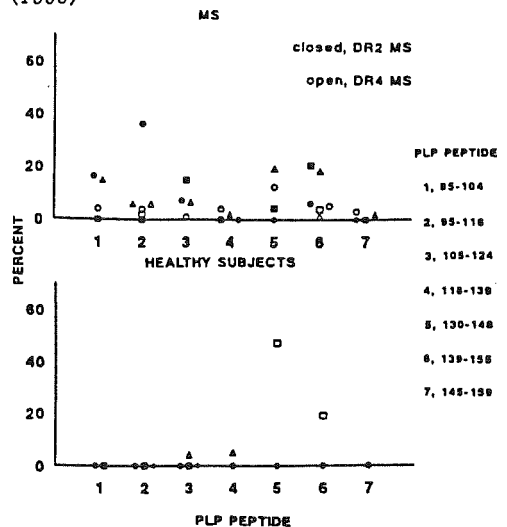


図 MSおよびHSのPLPペプチド特異的T細胞株の樹立頻度縦軸、PLPペプチド特異的T細胞株/全体のT細胞株 x 100横軸、各PLPペプチド。

MS 患者の T 細胞受容体の解析

近藤譽之, 山村 隆, 高橋慶吉, 田平 武

多発性硬化症 (MS) のモデル動物である実験的アレルギー性脳脊髄炎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 α 、V β セグメントを使用していることが報告されて以来、MS においては MBP、PLP 特異的 T 細胞の TCR 可変領域の役割が注目されてきた。TCR の解析には Polymerase chain reaction (PCR) が使用されてきたが、V 領域を決定出来ない TCR を解析することは困難であった。そこで Uematsu らの方法¹⁾を発展させ、独自の Inverse PCR 法を確立した。この方法を用いて MS 患者の PLP 特異的 T 細胞の TCR に restricted usage が存在するかを明らかにすることを目的として TCR V β 遺伝子塩基配列の解析を行った。

<方法>

DRw15⁺ の MS 患者末梢血より樹立した PLP peptide 特異的 T 細胞株 (TCL) より RNA を調整し、oligo-dT をプライマーとして cDNA を作成した。cDNA の両端に EcoR I アダプターを付加した後、self-ligation させて環状化した。次に C 領域の 5' 側、3' 側に特異的な逆向きの複数のプライマーを用いて、PCR により増幅し、サンガー法で DNA 塩基配列を決定した (図 1)。

<結果、考察>

Inverse PCR 法では C 領域に対するプライマーのみで TCR 遺伝子を増幅できる。合成された cDNA の両末端を cohesive end として環状化の効率の向上を図った。試みた 6 細胞株全ての TCR V β 遺伝子塩基配列の決定に成功した。そのうちの一つは今まで同定されたことのないものであった。

V β の usage は多様 (表 1) で CDR3 領域塩基配列にも一定の傾向を見いだせなかった。

次に CDR3 領域のアミノ酸配列を Oksenberg らによって報告された MS plaque に浸潤していた T 細胞 TCR CDR3 の領域のアミノ酸モチーフ²⁾と比較したところ、GXX J β 1.2 というモチーフが両者に共通して認められた。

また、既報の MBP 特異的 T 細胞株 TCR CDR3 領域で認められた GRS というモチーフ³⁾を見いだすことが出来た。

浸潤 T 細胞と PLP 特異的 T 細胞が共通したモチーフを CDR3 領域にもつことは病変部位に存在する T 細胞の中に PLP を標的としたものがある可能性を示唆していると思われる。また、PLP と MBP に特異的な T 細胞 TCR に共通したモチーフを認めたことは CDR3 領域が抗原特異性とは別の機序で MS の病態に関わっているのではないかという問題を提起しよう。

- 1) Uematsu et al. Proc. Natl. Acad. Sci 88, 8534 (1991)
- 2) Oksenberg et al. Nature 362, 68 (1993)
- 3) Giegerich et al. Eur. J. Immunol. 22, 753 (1992)

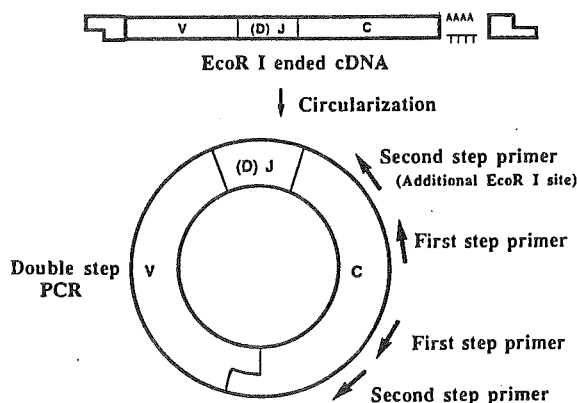


図 1. Procedure of inverse PCR

TCL	EPITOPE	V β
T120	PLP 105-124	New V β family
T121	PLP 105-124	V β 15
T149	PLP 139-155	V β 13.2, V β 2.1
T165	PLP 139-155	V β 23, V β 6, V β 2.1
OK41	PLP 139-155	V β 8.2

表 1. PLP peptide 特異的 T 細胞 TCR の V β

βアミロイド前駆体蛋白遺伝子の神経細胞株への導入

荒木 亘, 国下龍英, 池田幸弥, 高橋慶吉, 田平 武

アルツハイマー病はβアミロイド蛋白を主成分とする老人斑の脳内への出現を特徴とする痴呆疾患であり、その病因にはβ蛋白の蓄積が深く関与することが示唆されている。最近の研究によりβ蛋白は、膜蛋白構造を持つβアミロイド前駆体蛋白(APP)に由来すること、APPは通常の代謝経路ではβ蛋白配列の中で切断されN末側が分泌されることが明らかとなった。しかし、β蛋白が生成する機序は全く不明である。今回我々は、このβ蛋白の生成機序を解明するために、遺伝子導入によりAPPを過剰発現する神経細胞株の分離を試みた。

〔方法〕

宿主細胞はmouse cholinergic hybridoma cell line (SN49)を用いた。マウスAPP695 cDNAを発現ベクター(stratagene社、pXT1)に挿入し、リン酸カルシウム法で細胞に導入した。G418 (500 μg/ml)による選別後、トランスフェクタント(SN49-A)3クローンを得た。対照としてベクターのみを導入した(SN49-P)。APP mRNA量は細胞より抽出したtotal RNAを用い、マウスAPP cDNAをプローブとしてノーザンブロット法で解析した。培養上清中のβ蛋白の分析は³⁵Sメチオニン標識細胞の上清より得た抗β蛋白抗体免疫沈降物をTris/Tricineゲルで分離した後、フルオログラフィーで行なった。

〔結果〕

SN49とそのトランスフェクタント(SN49-P 2クローン、SN49-A 3クローン)のAPP発現をmRNAレベルで検討した。各細胞株で約3.5 kbの位置にAPP mRNAのバンドが認められ、SN49-Aでは対照に比較して発現の増加が観察された(Fig. 1)。βアクチン量で補正すると、SN49-AではAPP発現が約4倍に増加していることが判明した。更に蛋白レベルでも、APP C末抗体を用いるウエスタンブロットにより全長型APPの増加を確認した。また興味深いことに、SN49-A#2、#3では細胞内に空胞が多数出現していた。

次に、培養上清中のβ蛋白の存在を検討した。SN49-P、SN49-Aともに抗β蛋白抗体で認識される4 kDの蛋白が認められ、その量はSN49-Aで著明に増加していた(Fig. 2)。この4 kD蛋白の移動度は合成ペプチドβ1-42と一致した。

〔まとめ〕

遺伝子導入により、全長型のAPPを過剰発現する神経細胞株を作成することが出来た。更に、この細胞ではβ蛋白(4 kD)の生成が増加していることが示唆され、最近の報告とも一致した。今後は、この実験系を用いてβ蛋白の生成、分泌に関与する因子を検索し、その蓄積機序を明らかにしていく予定である。

〔文献〕

1. Lee H.J. et al. Dev. Brain Res. 52:219, 1990
2. Haass C. et al. Nature 359:322, 1992
3. Shoji, M. et al. Science 258:126, 1992

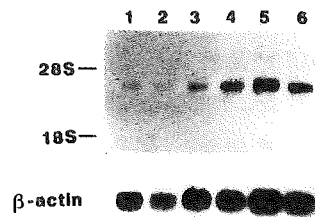


Fig. 1 Northern blot analysis of APP cDNA transfected SN49 cells. 1:SN49, 2:SN49-P#1, 3:SN49-P#2, 4:SN49-A#1, 5:SN49-A#2, 6:SN49-A#3

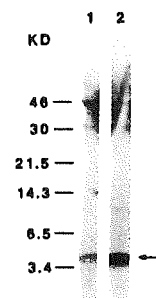


Fig. 2 Immunoprecipitation of cell-conditioned medium of APP cDNA transfected SN49 cells. 1:SN49-P#1, 2:SN49-A#2

活性化マクロファージ由来神経栄養因子について

遠藤真澄, 国下龍英, 田平 武

アルツハイマー病等の変性疾患患者
大脳に出現する MHC クラスII 抗原陽
性 microglia/macrophage の意義につ
いて明らかにするため γ -interferon
(IFN) 刺激により Ia 抗原を発現させ
た macrophage 培養上清の神経細胞に
対する作用について検討した。

活性化 macrophage 細胞株 (RAW264.
7) 培養上清中に cholinergic neuron
細胞株 SN6 並びにマウス中隔野由来初
代培養 neuron のコリンアセチル基移
転酵素 (ChAT) 活性を増加させる液性
因子を確認した。培養上清を限外濾過
(PM-10) にて濾過後、ゲル濾過 (TSK-
G3000SW) 並びにヒドロキシアパタイト
クロマトグラフィーにて、活性画分を
回収した。次いで二次元電気泳動で展
開、PVDF 膜に転写後 IFN 刺激により
upregulate される蛋白を切り出し、ア
ミノ酸シーケンサーにてアミノ酸配
列を調べた。その結果これまでのとこ

ろ三つのアミノ酸配列が明らかとなり
配列をデータベースで検索した結果、
translationally controlled tumor
protein, thioredoxin, α -1-anti-
trypsin であった。このうち thiore-
doxin (TRX) を SN6 並びに初代培養
neuron に添加しその ChAT 活性を検
討した結果、ChAT 活性は有意に増加
する事が明らかとなった (Table)。

TRX は生体内に広く存在し、酸化還
元制御能、活性酸素消去能等を有し免
疫系賦活因子として、又種々の細胞障
害に対する防御因子としての役割を担
っている。脳内においても加齢や外傷
等によりグリア細胞に TRX が発現す
ることが明らかとなっており、これは神
経細胞障害に対する防御反応である可
能性が示唆されている。したがって今
後アルツハイマー脳において TRX が発
現しているか否かの検討が急務である。

(Engdoh M et al: BBRC, 1993 In pre-

Effect of thioredoxin and NGF on ChAT activity
of cultured mouse septal neurons

	n	Specific Activity (pmoles/min/mg)	Total Activity (pmoles/hr/well)	Relative Activity(%)
control	3	19.8 \pm 4.4	142.3 \pm 11.3	100
NGF(100 ng/ml)	3	30.8 \pm 5.2	277.8 \pm 18.5	196
TRX(5 μ g/ml)	3	20.6 \pm 3.6	173.3 \pm 30.0	122
TRX(10 μ g/ml)	3	36.4 \pm 5.6	293.4 \pm 32.5	206
TRX(20 μ g/ml)	3	28.2 \pm 1.5	271.0 \pm 14.1	191

TRX ; thioredoxin, NGF ; nerve growth factor.

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・電気生理学・薬理学的方法を用いた基礎的研究を行っている。本年度は、平成2年11月より第一研究室長として任にあたってきた西川徹が、平成5年1月付けで疾病研究第3部に配置換えとなり、かわって三辺義雄が富山医科薬科大学医学部精神医学教室より着任した。このほか、橋本篤司（外来研究員）、熊代新（研究生）および岡高恵（研究助手）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) 哺乳類の脳における内在性D-アミノ酸に関する研究

てんかんの病態には、中枢神経系の興奮性アミノ酸伝達異常が関与すると考えられている。D-セリンは、NMDA型興奮性アミノ酸受容体のグリシン結合部位に対する選択的かつ強力なアゴニストであるが、他のD-アミノ酸と同様に内在性物質ではないと信じられてきた。しかし当研究室では、昨年度までに、ラットの脳内には高濃度の遊離型D-セリンが存在し、NMDA受容体と類似した分布を示すことを明らかにしてきた。本年度は、マウスやヒトの脳でも高いレベルのD-セリンが検出されることや、NMDA受容体の興奮性アミノ酸結合部位に作用するD-アスパラギン酸が、ヒトの胎児死後脳において高濃度で含まれる（出生後は痕跡程度）ことなどを明らかにした。

2) けいれんの発現に関与する神経回路に関する研究

幼若期にけいれん発作がおこりやすいことに注目し、けいれん惹起薬を投与した新生仔ラット（生後8日令）における脳内各部位の神経活動の変化を調べた。すなわち、ペンチレンテトラゾール投与後に、大脳新および旧皮質、線条体、視床などを含む広範な部位で強い*c-fos* 遺伝子の発現が観察され（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）、*c-fos* 遺伝子を指標として見る限り、成熟期よりペンチレンテトラゾールに対する反応性が高い傾向が認められた。

3) 今後は、①動物実験モデル（キンドリング）およびイオンチャンネル操作によるてんかん原性の研究、②パッチクランプ法を用いた神経細胞の分子薬理学的研究、③ドーパミン神経機能の電気生理学的研究などを中心に行う予定であり、本年度はこれらの準備を進めた。

（部長事務取扱 杉田 秀夫）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Motohashi N, Takashima M, Mataga N, Nishikawa T, Ogawa A, Watanabe S, and Toru M :
Effects of sulphiride and Oxyptertine on the dopaminergic system in the striatum
Neuropsychobiol. 25 : 29–33, 1992
- 2) Takashima M, Takita M, Umino A, Nishikawa T, Mitsushio H, Takahashi K :
Modulation of cerebral acetylcholine metabolism by the dorsal diencephalic conduction system in the rat.
Neurochem. Int. 20 : 583–589, 1992
- 3) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Hayashi T :
Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high performance liquid chromatography after derivatization with N-tert. -butyloxycarbonyl-L-cysteine and ophthaldialdehyde
J. Chromatog 582 : 41–48, 1992
- 4) Toru M, Kurumaji A, Kumashiro S, Suga I, Takashima M, Nishikawa T :
Excitatory aminoacidergic neuroneds in chronic schizophrenic brain
Mol Neuropharmacol 2 : 241–243
- 5) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K :
Endogenous D-serine in rat brain : N-Methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging.
J Neurochem, 60 : 783–786, 1993
- 6) 日比野英彦, 海野麻未, 高嶋瑞夫, 西川 徹, 野田恭平, 高橋清久 :
ホスファチジルコリン投与による脳内コリン及びアセチルコリン含量への影響
(第1報) ; ラット腹腔内投与試験
油化学 41 : 341–346

b. 著書

- 1) 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, 星和書店 (町山幸輝, 樋口輝彦編), 東京, P123–157, 1992

2) 西川 徹 :

GABA による脳内セロトニン伝達の調節

躁うつ病の薬理生化学〔Ⅱ〕, 金剛出版 (三国雅彦, 樋口輝彦, 加藤進昌, 高橋清久編),
東京, P111-128, 1992

c. 総 説

1) 西川 徹, 橋本篤司, 谷井靖之, 海野麻未, 岡 高恵, 柏 淳, 岩間久行, 高橋清久 :

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—
精神医学 34 : 891-900, 1992

d. 班会議報告書

1) 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 :

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—
ラット脳における遊離型D-セリンの分布および生後変化—
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年度研究報告書 P109-114, 1992

2) 西川 徹, 海野麻未, 柏 淳, 池田正明, 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・神経疾患研究委託費：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3年度研究報告書 P81-88, 1992

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) Nishikawa T :

Regulation of cortical dopaminergic transmission by NMDA receptors.
7th International Catecholamine Symposium, Amsterdam, June 25, 1992

2) Nishikawa T, Hashimoto A, Tanii Y, Umino A, Kashiwa A, Kumashiro S, Oka T,
Takahashi K :

Dysregulation of excitatory amino acid neurotransmission and schizophrenia.
The Seventh Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium ; Biology of
schizophrenia, Tokyo, October 20, 1992

II 研究業績

- 3) Nishikawa T, Hashimoto A, Tanii Y, Umino A, Kashiwa A, T. Oka, Nishijima., Takahashi K :
Excitatory amino acidergic dysfunction and schizophrenia.

Inaugural Symposium (2) ; Neurochemistry and Neuropsychiatric disorders,

The First Asian Pacific Society for Neurochemistry Meeting, Nagoya, October 23, 1992

- 4) 西川 徹 :

グルタミン酸と精神疾患

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4回「学習記憶の分子機構」

大阪, 10月2日, 1992

b. 国際学会

- 1) Nishikawa T, Umino A, Takahashi K :

Mapping patterns of c-fos protein-like immunoreactivity in rat brain after methamphetamine treatment.

XVIIIth C.I.N.P. Congress of Clin. Neuropharm.

Nice, July 1, 1992

- 2) Shirayama Y, Mitsushio H, Nishikawa T, Takahashi K :

Effects phencyclidine and (+)MK801 on cerebral substance P content in the rat.

22th Annual Meeting of the Society for Neuroscience

Anaheim, U.S.A., October 26, 1992

- 3) Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K :

The presence of free D-serine in rat brain.

22th Annual Meeting, of the Society for Neuroscience

Anaheim, U.S.A. October 26, 1992

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

Effects of stereoisomers of alanine and serin on phencyclidine-induced hyperactivity in the ray.

22th Annual Meeting of the Society for Neuroscience

Anaheim, U.S.A. October 28, 1992

c. 一般学会

- 1) 橋本篤司, 岡 高恵, 西川 徹 :

ラットにおける内在性D-セリンの分布および生後変化

第26回日本てんかん学会, 名古屋, 10. 2, 1992

- 2) 橋本篤司, 西川 徹, 土井永史, 金子嗣郎, 金野柳一, 丹羽 章, 安村美博, 熊代 新, 岡 高恵, 高橋清久 :
ヒト, マウス及びラット脳には遊離型D-セリンが存在する
第35回日本神経化学学会大会, 名古屋, 10. 20-22, 1992
- 3) 橋本篤司, 西川 徹, 岡 高恵, 高橋清久 :
ラット脳における内在性遊離型D-セリンの分布と発達
第65回日本生化学会大会, 福岡, 10. 9, 1992
- 4) 海野麻未, 西川 徹, 柏 淳, 高橋清久 :
フェンサイクリジンおよびMK801投与後におけるラット脳内 c-Fos 様免疫活性の分布
第16回日本神経科学学会, 大阪, 12. 8, 1992
- 5) 柏 淳, 西川 徹, 海野麻未, 池田正明, 高橋清久 :
メトアンフェタミン投与後の c-fos 遺伝子発現の発達段階における変化について
第16回日本神経科学学会, 大阪, 12. 9, 1992
- 6) 熊代 新, 橋本篤司, 西川 徹, 高橋清久 :
MK-801によって引き起こされるラットの異常行動に対する N-myristoyl-D-serine の阻害効果
第15回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 18, 1992
- 7) 西嶋康一, 西川 徹, 橋本篤司, 海野麻未, 岡 高恵, 柏 淳, 高橋清久 :
Phencyclidine と methamphetamine のラット前頭葉 dopamine 代謝に与える影響の比較
第15回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 19, 1992
- 8) 白山幸彦, 三ツ汐洋, 西川 徹, 高橋清久 :
Phencyclidine, (+)MK-801 およびドーパミンアゴニスト急性投与によるラット脳内
substance P 含量低下の差異について
第15回日本生物学的精神医学会, 東京, 3. 19, 1992

C. 班会議発表

- 1) 西川 徹, 橋本篤司, 谷井靖之, 海野麻未, 岡 高恵, 柏 淳, 熊代 新, 西嶋康一, 白山幸彦, 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・精神分裂病の発症機序に関する神経科学的研究班
平成4年度班会議, 東京, 1. 22, 1993

II 研究業績

2) 西川 徹, 海野麻未, 柏 淳, 池田正明, 高橋清久 :

薬物依存による逆耐性現象の発現機序に関する生化学理学的研究

厚生省精神・神経疾患薬物依存の発症機序と臨床及び治療に関する研究班

平成4年度班会議, 東京, 1. 20, 1993

3) 西川 徹, 橋本篤司, 岡 高恵 :

哺乳類における内在性D-セリンに関する研究

厚生省精神・神経疾患・難治てんかんの治療法開発に関する研究班

平成4年度班会議, 東京, 12. 21, 1992

4) 橋本篤司, 熊代 新, 岡 高恵, 西川 徹 :

興奮性アミノ酸伝達系に作用する内在性D-セリンに関する研究

文部省科学研究費補助金(総合研究A)・興奮性アミノ酸ニューロンを指標とした分裂病と

てんかんの病因に関する研究

平成4年度班会議, 東京, 1. 30, 1993

D. その他の研究会

1) 西川 徹, 橋本篤司, 海野麻未, 岡 高恵, 柏 淳, 熊代 新, 高橋清久 :

精神分裂病と興奮性アミノ酸伝達障害

第5回慶應ニューロサイエンス研究会-精神疾患の病態生理・生化学-, 東京, 6. 13, 1992

2) 橋本篤司, 西川 徹 :

脳内遊離型D-セリンの分布と生後変化に関する研究

OBI (大阪バイオサイエンス研究所) Neuroscience Seminar, 大阪, 10. 1, 1992

3) 西川 徹, 海野麻未, 柏 淳, 西嶋康一, 橋本篤司 :

NMDA受容体による前頭葉内ドーパミン伝達の調節

OBI (大阪バイオサイエンス研究所) Neuroscience Seminar, 大阪, 10. 1, 1992

4) 西川 徹 :

興奮性アミノ酸伝達障害からみた精神分裂病症状の発現機序と新しい治療法

第124回東京医科歯科大学難治疾患研究所セミナー, 東京, 12. 15, 1992

3. 主な研究報告

ヒト死後脳における内在性遊離型D-アスパラギン酸とD-セリンの
発達及び加齢に伴う変化に関する研究

橋本篤司, 熊代 新, 岡 高恵, 西川 徹

これまで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が、最近我々はラット脳内に多量のD-セリンが存在することをはじめて明かにした。さらにD-セリンの脳内分布を調べたところ、大脳皮質、海馬、線条体に多く、橋、延髄、小脳及び脊髄にはほとんど存在しないというN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型興奮アミノ酸受容体と正の相関のある分布を示し、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を示唆した¹⁾。今回我々は各発達段階のヒト死後脳においてD-アミノ酸の測定を行なったので報告する。

<方法>

アミノ酸の分析は、ヒト死後脳の5%TCA抽出液をo-phthaldialdehydeおよびBoc-L-cysteineで誘導化した後、蛍光検出器付きHPLCを用いて行なった。

<結果・考察>

胎生14週の前頭前野には、多量のD-セリンばかりでなくD-アスパラギン酸も見いだされた。D-アスパラギン酸含量は発達に伴って急激に減少し、胎生41週には痕跡程度になり、出生以降はほとんど検出できなくなった。一方、D-セリン含量は胎生期及び出生以降もそれぞれ比較的一定していたが、胎生期のD-セリン含量は出生以降の約2倍であった。D-アスパラギン酸及びD-セリンはそれぞれNMDA受容体のグルタミン酸結合部位及びストリキニン非感受性グリシン結合部位の選択的なアゴニストであることがすでに知られていることからこれらのD-アミノ酸は大脳皮質の発達やNMDA受容体を介した種々の機能と関連している可能性が示唆された。

<謝辞>

今回の実験でヒト死後脳を提供していただいた水戸敬、高嶋幸男(疾病研究第2部)、土井永史(都立府中病院)、金子嗣郎(都立松沢病院)の各先生方に感謝致します。

1) Hashimoto A. et al., J. Neurochem., 60, 783-786 (1993)

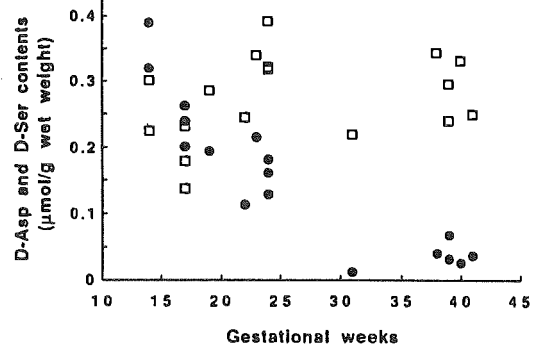


Fig. 1. Embryonic changes in the contents of free D-aspartate and D-serine in human prefrontal cortex. Each value is the content of D-aspartate (○) or D-serine (□) in the individual frontal tip.

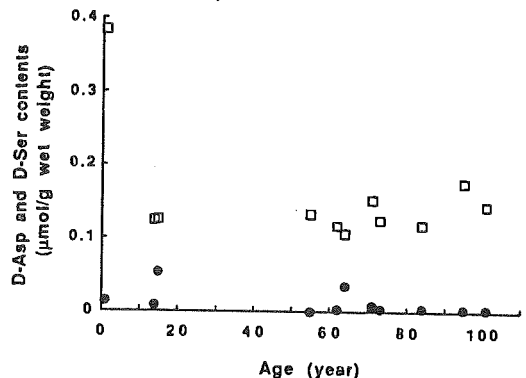


Fig. 2. Postnatal changes in the contents of free D-aspartate and D-serine in human prefrontal cortex. Each value is the content of D-aspartate (○) or D-serine (□) in the individual frontal tip.

8 . 診 断 研 究 部

1. 研究部一年の歩み

今年度（1992年4月～1993年3月）の当研究部における研究は以下の人々によって進められた。とりわけ多くの併任研究員，研究生の方々の参加により，研究室に新しい刺激と活気をもたらされた。

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，森下 卓（1992年9月まで），室屋賢康（1992年10月より）；STAフェロー：張堅（中国）；センター研究員：前川みどり，横田京子（1992年6月より）；センター研究助手：奥田 薫，高山明美；併任研究員：森下 卓（科学庁特別研究員，1992年10月より），橋本裕子（学振特別研究員），前川昌平（東京大学理学部助手），松田道行（予研感染病理部主任研究官，さきがけ研究特別研究員），矢沢洋一（北海道教育大学旭川分校教授），高山 豊（武蔵病院精神科）；研究生：田中伸哉（北海道大学医学部博士課程3年），後藤典子（東大医学部博士課程4年）；研究見習生：佐藤小百合（北海道教育大学旭川分校4年），塩野谷基子（東京大学教養学部2年），山崎典子（日本女子大学理学部化学科3年）。

研究課題は，従来の課題「細胞の増殖と分化のシグナル伝達過程における *ras* 遺伝子の役割」，「生体 NMR の高分解能化と高次脳機能解析への応用」に加え，科技厅の省際基礎研究として「哺乳動物の神経特異的遺伝子の発現パターンを非侵襲的に計測する技術の開発」が3年間の計画で開始された。この研究は診断研究部が中核となり，国立精神・神経センター脳画像解析グループ（高山 豊），モデル動物開発部（花岡和則），通産省電総研（亀井裕孟），農水省家畜衛生試験場発生工学グループ（福田勝洋），等の協力のもとに進められている。これらの研究課題の主な成果については研究報告を参照していただきたい。

（部長 中村 俊）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Muroya K, Hashimoto Y, Hattori S, Nakamura S :
Specific inhibition of NGF receptor tyrosine kinase activity by K-252a.
Biochim Biophys Acta 1135 : 353–356, 1992
- 2) Hattori S, Fukuda M, Yamashita T, Nakamura S, Gotoh Y, Nishida E :
Activation of microtubule-associated protein kinase and its activator by *ras* in intact cells
and in a cell-free system.
J Biol Chem 267 : 20346–20351, 1992
- 3) Awaya A, Kobayashi H, Horikomi K, Kabir AMD, Yokoyama K, Ohno H, Kato K,
Kitahara T, Tomino I, Isayama S, Nakamura S :
Neurotropic pyrimidine heterocyclic compounds. I. The newly synthesized pyrimidine
compounds promote neurite outgrowth of GOTO and neuro 2a neuroblastoma cell lines,
and potentiate nerve growth factor (NGF)-induced neurite sprouting of PC12 cells.
Biol Pharm Bull 16 : 2489–253, 1993
- 4) Petroff OAC, Novotny EJ, Avison M, Rothman DL, Alger JR, Ogino T, Shulman GI,
Prichard JW :
Cerebral lactate turnover after electroshock : In vivo measurements by ¹H/¹³C magnetic
resonance spectroscopy.
J Cereb Blood Flow Metab 12 : 1022–1029, 1992

b. 著書

- 1) 中村 俊, 服部成介 :
GTP結合のモジュレーター
神経研究の進歩 36 : 442–453, 1992
- 2) 中村 俊 :
がん遺伝子, *ras*系
臨床分子医学 1 : 11–17, 1993
- 3) 服部成介 :
ras シグナル伝達系の調節因子 GAP および NF1 は癌抑制遺伝子か？

II 研究業績

実験医学 10 : 83-87, 1992

4) 服部成介 :

ras 遺伝子産物 P 21 による MAP キナーゼ系の活性化

実験医学 11 : 23-29, 1993

5) 服部成介 :

ras 発癌遺伝子産物 P 21 が関与する細胞増殖制御系の解析

薬学研究の進歩, 研究成果報告集 8 : 156-166, 1992

6) 服部成介 :

NF1 遺伝子

蛋白質・核酸・酵素 37 : 3079-3080, 1992

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 - *in vivo*

¹H 検出法の開発

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 4 年度研究報告書, p 20-23, 1993

B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 荻野孝史 :

in vivo NMR スペクトロスコピー脳研究の新しい方法論

平成 4 年度日本分光学会春季講演会シンポジウム「NMR の現象と未来への展望」

東京, 5. 18, 1992

2) 荻野孝史 :

MRS による化学情報の画像化

第35回日本神経化学学会シンポジウム「脳の機能イメージング」, 名古屋, 10. 21, 1992

c. 一般学会

1) 前川昌平, 中村 俊 :

ラット及びウシ脳より調製された新しいカルモジュリン結合蛋白質

第45回細胞生物学会, 徳島, 10. 22, 1992

- 2) 橋本裕子, 室屋賢康, 服部成介, 中村 俊 :
 K-252a による NGF 受容体チロシンキナーゼの特異的阻害
 第35回神経化学学会大会, 名古屋, 10. 20, 1992
- 3) 田中伸哉, 松田道行, 倉田 毅, 長嶋和郎, 福井泰久, 服部成介, 中村 俊 :
 ヒト *CRK* 遺伝子産物による PC12 細胞の分化誘導
 第15回分子生物学会年会, 京都, 12. 7, 1992
- 4) 穴見公隆, 矢野登志雄, 荻野孝史 :
In vivo NMR スペクトロスコピーによる脳機能研究
 1) 2 T ヒト全身用 NMR 装置による過呼吸負荷時のヒト脳の ^3P -MRS と ^1H -MRS
 第20回日本磁気共鳴医学会大会, 札幌, 10. 27, 1992
- 5) 大仲功一, 山口 明, 矢野登志雄, 荻野孝史 :
 2 テスラヒト全身 NMR 装置を用いた ^3P -MRS によるヒト下腿筋の代謝的不均一性の研究
 第20回日本磁気共鳴医学会大会, 札幌, 10. 29, 1992
- 6) 岸田昭世, 貝淵弘三, 佐古田剛, 岸 清彦, 土井健太郎, 服部成介, 高井義美 :
c-fos 遺伝子発現の制御機構における *ras* P21 と *raf* キナーゼの役割
 第51回日本癌学会総会, 大阪, 9. 29, 1992
- 7) 戸部一之, 為本浩至, 植木浩二郎, 福井泰久, 服部成介, 松田道行, 田中伸哉, 赤沼安夫,
門脇 孝, 矢崎義雄 :
 インスリン依存性のチロシン磷酸化蛋白質と SH2 蛋白質の結合
 第51回日本癌学会総会, 大阪, 9. 29, 1992
- 8) 福田 真, 服部成介, 山下 俊, 中村 俊, 後藤由季子, 西田栄介 :
 無細胞系における *ras* P21 による MAP キナーゼの活性化
 第65回生化学学会年会, 福岡, 10. 10, 1992
- 9) 白水美香子, 小塩尚代, 外山洋一, 吉垣純子, 伊藤 隆, 山崎和彦, 武藤 裕, 服部成介,
西村 暹, 横山茂之 :
 Ras タンパク質の機能発現に関わる残基の役割の解析
 第65回生化学学会年会, 福岡, 10. 10, 1992
- 10) 吉垣純子, 山崎和彦, 白水美香子, 服部成介, 西村 暹, 横山茂之 :
 GAP との相互作用における Ras タンパク質のエフェクター領域の C 末端側領域 (K42-L53)
 の役割

II 研究業績

第65回生化学会年会, 福岡, 10. 10, 1992

- 11) 服部成介, 福田 真, 山下 俊, 中村 俊, 後藤由季子, 西田栄介 :

細胞内及び無細胞系における *ras* 遺伝子産物 P21による MAP キナーゼ/MAP キナーゼアクチベーター系の活性化

第15回分子生物学会年会, 京都, 12. 7, 1992

- 12) 戸部一之, 為本浩至, 植木浩二郎, 野口哲也, 松田道行, 田中伸哉, 服部成介, 福井泰久, 赤沼安夫, 門脇 孝, 矢崎義雄 :

インスリン受容体キナーゼ基質-1 (IRS-1) に結合する SH2 蛋白質

第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 7, 1992

- 13) 藤村このみ, 服部成介, 田中一馬, 東江昭夫 :

IRA2 蛋白質の機能解析

第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 8, 1992

- 14) 外山洋一, 吉垣純子, 山崎和彦, 小塩尚代, 白水美香子, 武藤 裕, 服部成介, 西村 暹, 横山茂之 :

Ras タンパク質エフェクター領域内のプロリン残基の役割

第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 10, 1992

- 15) 権 浩政, 吉田 稔, 福井泰久, 室屋賢康, 服部成介 :

新しいチロシンキナーゼ阻害剤 radicicol による *ras* シグナル伝達経路の阻害作用

第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 10, 1992

- 16) 森下 卓, 光沢 浩, 安楽泰宏 :

出芽酵母におけるアデニル酸シクラーゼを介さない RAS 遺伝子破壊の効果

第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 10, 1992

C. 班会議発表

- 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-その2

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, 秋田, 9. 11, 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, 11. 27, 1992

3) 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—その 3

厚生省精神・神経疾患・画像解析による高次機能障害の総合的研究班, 東京, 1. 9, 1992

4) 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

—NMR 班, 東京, 3. 19, 1993

3. 主な研究報告

新しい *ras* GTPase 活性促進因子 (*ras* GAP) の精製

前川みどり, 中村 俊, 服部成介

GAPは、*ras*遺伝子産物p21のGTPase活性を促進する因子であり、Rasに結合したGTPの加水分解を促進することにより活性型であるGTP結合型から不活性型であるGDP結合型への移行を早め、*ras*シグナル伝達系を負に制御する因子と考えられる。現在までに分子量120 kDaのGAP (p120 GAP) およびI型神経線維腫症の原因遺伝子であるNF1遺伝子産物の二種のGAPが知られている。

我々は、両GAP因子の細胞内分布を検討する過程で、抗p120 GAPおよび抗NF1抗体によっては、活性が中和されない新たなGAP活性を、ラット脳抽出液中の可溶性および不溶性画分に認めた(1)。そこで両画分よりこの新しいGAPをほぼ均一標品に精製した。可溶性画分からの精製倍率は200,000倍以上でありその収率は6%であった。ゲルろ過およびSDA-PAGEの結果から新たなGAP分子は分子量100 kDaのポリペプチドであり、サブユニット構造を持たないことが示唆された。

精製p100 GAPの活性は抗p120 GAPおよび抗NF1抗体により中和されないこと (Fig. 1)、ウェスタンブロットにおいても両抗体と反応しないことからp100 GAPはp120 GAP、NF1の分解産物ではなく新規のGAP分子であることが示された。p100 GAPは変異型*ras*や*ras*類似低分子量GTP結合タンパク質には作用しないことから、その基質特異性はp120 GAP、NF1と同じと考えられた (Fig. 2)。しかし、Rasに対する親和性は

p120 GAPともNF1とも異なる値を示し、この点からもp100 GAPが新規のGAP因子であることが示された。今後はp100 GAPの遺伝子クローニング、p100 GAP活性の制御機構について研究を進めて行きたい。

[文献]

- 1) Hattori, S., Maekawa, M. & Nakamura, S. *Oncogene*, 7, 481-485 (1992).

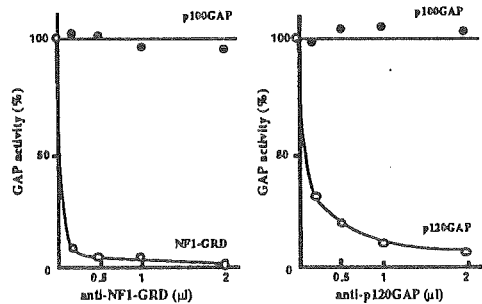


Fig. 1. The Effect of Anti-NF1-GRD or Anti-p120GAP Antisera on the Activity of p100GAP

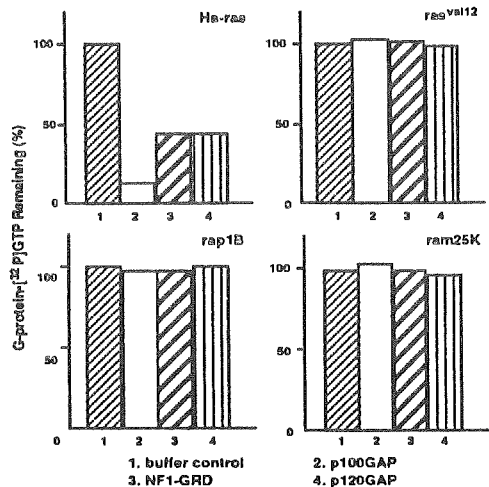


Fig. 2. Specificity of the p100GAP

チロシンリン酸化を介する *ras* 活性化シグナル伝達機構の解析

橋本裕子, 室屋賢康, 服部成介, 中村 俊

我々は、ラット褐色細胞腫由来PC12細胞を用い、神経成長因子NGF添加により Ras・GTP量が増加しRasが活性化されること、チロシンキナーゼ阻害剤がRasの活性化および細胞の分化を完全に抑制することを見だし、NGFシグナル伝達にチロシンキナーゼが必須であることを示した(1)。そこで、NGF添加後のホスホチロシン含有タンパク質の挙動を調べた。

NGFを添加後速やかにNGFレセプターである *trk* 遺伝子産物 (gp140^{trk})、および分子量110 kDa、55 kDa、44 kDa、42 kDaのタンパク質のチロシンリン酸化が観察された(図)。分子量55 kDaのチロシンリン酸化タンパク質 (pp55)は、抗gp140^{trk}抗体の免疫沈降物中に回収されることより、gp140^{trk}と複合体を形成することが示唆された。pp55は、EGF刺激後、EGF受容体とも同様に複合体を形成する。また、44 kDa、42 kDaの二本のバンドは *ras* シグナル伝達系において下流に位置するMAPキナーゼと考えられた。

そこで、レセプターからのシグナル伝達の初期過程を解析するために、4°Cで細胞をEGF刺激したところ、EGF受容体、pp55のチロシンリン酸化は徐々に増加し、それに伴いRasの活性化がみられた。37°Cの時とは異なりEGF処理後長時間経過しても、MAPキナーゼのチロシンリン酸化はみられず、低温下では、レセプターチロシンキナーゼ → (pp55) → Rasまでの経路は進行するが、Ras以降はシグナルの伝達が遮断

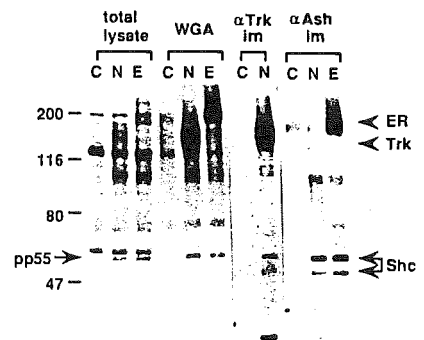
される可能性が考えられた。

レセプターからのシグナルをRasに伝達する因子として、最近その機能が注目されているAsh分子とpp55との相互作用を検討したところ、NGFおよびEGF刺激に依存してpp55とAshが複合体を形成することが示された(図)。しかし、EGF存在下にAshがEGFレセプターに結合するのに対し、NGF存在下においてもAshは *trk* に結合せず、両シグナル伝達系の機構の違いを反映すると考えられた。さらに、pp55はAshと複合体を形成するShcと呼ばれる分子であることがウエスタンブロッティングにより判明した。NGF添加後には、チロシンリン酸化したShcが *trk*、Ash各々と複合体を形成し、*trk* からAshに至るNGFのシグナルを伝達する役割を果たす可能性も考えられる。

[文献]

- 1) Muroya, K., Hashimoto, Y., Hattori, S. & Nakamura, S. *Biochim. Biophys. Acta*, 1135, 353-356 (1992).

[図]



NGF、EGF添加後のチロシンリン酸化タンパクとレセプターおよびASHとの複合体形成パターン。

¹H MRI/³¹P MRS によるヒト下腿筋の運動適応性の個体的差異の研究
 - ヒト筋繊維組成の無侵襲・非破壊計測は可能か？

矢野登志雄, 大仲功一, 荻野孝史

<目的>

健康成人の骨格筋繊維は形態、機能的、代謝的性質の差により3種のサブタイプ (I; Slow Oxidative, IIa; Fast Oxidative Glycolytic, IIb; Fast Glycolytic) に分類できる。筋繊維組成は遺伝的決定に従うとされるが、個々の筋繊維は運動負荷に対して適応的な変化を示すことも知られており、筋繊維型の可塑性については意見が分かれる。本研究では、ヒト骨格筋の筋繊維型の可塑性を検討する第一歩として、ヒト筋組織内で進行するエネルギー代謝や生化学的・生理的变化をNMR法により計測することにより、ヒト筋繊維組成についての情報を無侵襲・非破壊的に得る方法を確立することを目的とした。

<方法>

ヒト (健康成人) 下腿筋の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を持つ2テスラヒト全身用NMR装置を用いた。NMR装置内で被検者を仰臥位とし、重りにつないだペダル踏みを行わせて運動負荷を加える装置を自作した。¹H MRIはBody Coilを用いてT₂強調のFFE法で1画像/53秒で撮影した。³¹P MRSは直径8cmのsurfaceコイルを下腿三頭筋の直下におき、コイル中心を90°パルスとして8回/10秒毎にシグナルを積算した。

<結果>

¹H MRIでは、運動に関与した筋を可視化することができた。運動負荷装置の重りを6kgとし、足底の底屈頻度2Hzの運動負荷を2分間加えた後、安静時に比べ腓腹筋の信号強度がおよそ70%増加し20分後も完全には回復しなかった。ヒラメ筋の信号強度は運動前後で変化しなかった (図-1)。

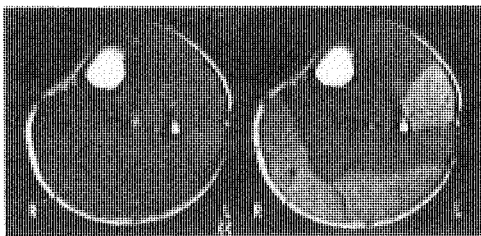


図-1 運動負荷前後のヒト下腿断面の¹H MRI像。
 左：安静時 右：運動終了直後

³¹P MRSでは負荷応答に個体差はあるが、同一負荷強度における個人の応答の再現性は良かった。6kg

・2Hzの負荷では化学シフトがpH依存性で変化する無機リンが3つのピークに分裂するのが観察された (図-2)。

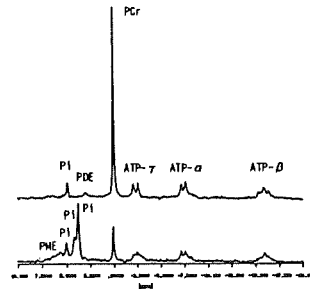


図-2 ヒト下腿筋の³¹P NMRスペクトル。運動負荷によりPiのピークが3分裂する。

上：安静時 下：運動開始後1分20秒経過時

<考察>

¹H MRI信号強度が変化する生理的・生化学的メカニズムについては不明な点もあるが、下腿三頭筋に注目すると、Fleckensteinら [1] の採用した体重をかけた立位姿勢でのかかとあげ運動では腓腹筋とひらめ筋の双方が高信号化した。これに対して、仰臥位での我々の運動負荷プロトコールではヒラメ筋の信号強度は運動前後で変化しなかった。この結果と検出コイルの感度分布を考慮すれば、本研究で運動負荷中に得られた³¹P NMRスペクトルの変化に寄与する筋肉は腓腹筋であると結論することができる。³¹P NMRスペクトルは筋肉内に細胞内pHが異なる3つの代謝コンパートメントが存在することを示しており、これらは3種の筋繊維型のそれぞれに対応すると考えられる。比較的単純な筋繊維組成をとる動物の筋を用いた³¹P NMR測定からKushmerickら [2, 3] は安静時の高エネルギーリン酸化合物濃度においても、運動終了後の代謝回復過程においても型の異なる筋繊維が区別可能であると主張している。今後この観点から実験及びデータ解析を進めたい。ヒト筋繊維組成は、その代謝的性質の差異を利用して、無侵襲・非破壊的にNMRを用いて定性・定量化できるものと思われる。

<文献>

- [1] Am J Radiol 1988; 151:231-
- [2] Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:7521-
- [3] Am J Physiol 1992; 263:C598-

9. 微細構造研究部

1. 研究部一年の歩み

微細構造研究部では、神経筋疾患の成因究明と治療法の開発を目的とした研究、胸腺筋様細胞の産生するコロニー刺激因子の研究を行っていて、大きな成果をあげつつある。

人事では埜中部長が平成4年6月1日付で武蔵病院臨床検査部長へ転任（後任部長決定までは併任）、松岡太郎、竹光正和、作田亮一流動研究員がそれぞれ大阪大、旭川医大、日本大（越谷）に帰学した。なお後藤研究員が平成5年1月にStanford大学から1年半の留学を終えて帰国、また多くの研究生が参加して、人員はやや減ったものの活気溢れる毎日を送っている。

① ミトコンドリア病の病因解明に関する研究

ミトコンドリアDNA変異の発見以来、多くの神経筋疾患がミトコンドリアDNA変異に由来することが明らかにされつつある。我々の研究部には年間500以上の生検筋の組織学的、生化学的、DNA分析依頼が全国よりあるが、その20%はミトコンドリア病に関するものである。昨年はミトコンドリアDNA変異が脳筋症だけでなく、糖尿病、難聴、低身長合併例と密接に関係することを明らかにした。また我々が見出したMELASの第2の変異（3271変異）は日本人だけでなく、ブラジル人（イタリア・ポルトガル系）にも存在することを明らかにした。

② ジストロフィン関連蛋白（DRP）、結合糖蛋白（DAG）と筋ジストロフィー筋壊死との関連

米国アイオワ大学のCampbell、松村らとの共同研究で福山型先天性筋ジストロフィーにDAGの減少することを明らかにした。ただこれが福山型の一次的病因であるかどうかは疑問が残されている。

DAGについては、最近、機能研究部と共同研究が進み、DAGの筋ジストロフィーにおける意義について次々と新しい知見が見出され、論文は国際一流誌に受理されている。

③ 胸腺筋様細胞の産生するコロニー刺激因子の研究

胸腺には筋様細胞が存在するが、重症筋無力症発症との関係が示唆されるのみでその生理作用は不明であった。筋様細胞をクローン化し、培養上清の生物活性を調べたところマクロファージ系細胞の分化増殖を誘導する因子が存在した。この活性は60-80 kDaと100-160 kDaの二因子によることが判明した。精製品のアミノ酸配列を部分的に調べたところ両者共相互に異なり、さらに既存マクロファージコロニー刺激因子にはないアミノ酸配列をしめす因子であった。有効利用を考慮し、遺伝子組換え法による大量生産に取り組んでいる。

（併任部長 埜中 征哉）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Goto Y, Tojo M, Tohyama J, Horai S, Nonaka I :
A novel point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu (UUR)} gene in a family with
mitochondrial myopathy
Ann Neurol 31 : 672–675, 1992
- 2) 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
- 3) Matsuoka T, Maeda H, Goto Y, Nonaka I :
Muscle coenzyme Q₁₀ in mitochondrial encephalomyopathies
Neuromusc Disord 1 : 443–447, 1991
- 4) Matsuoka T, Goto Y, Nonaka I :
“All-or-none” cytochrome c oxidase positivity in mitochondria in chronic progressive
external ophthalmoplegia : An ultrastructural-cytochemical study
Muscle Nerve 16 : 206–209, 1993
- 5) Matsuoka T, Nonaka I :
Germanium myopathy : an animal model of mitochondrial encephalomyopathy
J Clin Elect Microsc 25 : 406–407, 1992
- 6) Sakuta R, Goto Y, Horai S, Ogino T, Yoshinaga H, Ohtahara S, Nonaka I :
Mitochondrial DNA mutation and Leigh’s syndrome
Ann Neurol 32 : 597–598, 1992
- 7) Sakuta R, Goto Y, Horai S, Nonaka I :
Mitochondrial DNA mutations at nucleotide positions 3243 and 3271 in mitochondrial
myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes: a comparative study
J Neurol Sci 115 : 158–160, 1993
- 8) Takemitsu M, Nonaka I, Sugita H :
Dystrophin-related protein in skeletal muscles in neuromuscular disorders :

immunohistochemical study

Acta Neuropathol 85 : 256–259, 1993

- 9) Wu C-M, Matsuoka T, Takemitsu M, Goto Y, Nonaka I :
An experimental model of mitochondrial myopathy : Germanium-induced myopathy and coenzyme Q₁₀ administration
Muscle Nerve 15 : 1258–1264, 1992
- 10) Nagai T, Goto Y, Matsuoka T, Sakuta R, Naito E, Kuroda Y, Nonaka I :
Leigh encephalopathy : Histologic and biochemical analyses of muscle biopsies
Pediatr Neurol 8 : 328–332, 1992
- 11) Nagai T, Hasegawa T, Saito M, Hayashi S, Nonaka I :
Infantile polymyositis : A case report
Brain Dev 14 : 167–169, 1992
- 12) Akiyama C, Kobayashi S, Nonaka I :
Comparison of behavior in muscle fiber regeneration after bupivacaine hydrochloride- and acid anhydride-induced myonecrosis
Acta Neuropathol 83 : 584–589, 1992
- 13) Hasegawa H, Matsuoka T, Goto Y, Nonaka I :
Cytochrome c oxidase activity is deficient in blood vessels of patients with myoclonus epilepsy with ragged-red fibers
Acta Neuropathol 85 : 280–284, 1993
- 14) Tokunaga M, Mita S, Sakuta R, Nonaka I, Araki S :
Increased mitochondrial DNA in blood vessels and ragged-red fibers in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS)
Ann Neurol 33 : 275–280, 1993
- 15) Koga R, Ishiura S, Arahata K, Takakuwa T, Nonaka I, Sugita H :
Quantitative analysis of dystrophin in human and rodent muscles
Biomed Res 13 : 215–219, 1992
- 16) Koga R, Ishiura S, Takemitsu M, Kamakura K, Matsuzaki T, Arahata K, Nonaka I, Sugita H :
Immunoblot analysis of dystrophin-related protein (DRP)

II 研究業績

- Biochim Biophys Acta 1180 : 257-261, 1993
- 17) Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C, Attardi G :
MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts
Proc Natl Acad Sci USA 89 : 4221-4225, 1992
- 18) Yamanouchi H, Nonaka I, Kaga M, Hirayama Y, Kurokawa T :
Congenital focal muscle dysplasia in the lower extremities from probable abnormal innervation : A case report
Brain Dev 14 : 118-121, 1992
- 19) Matsumura K, Nonaka I, Campbell KP :
Abnormal expression of dystrophin-associated proteins in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy
Lancet 341 : 521-522, 1993
- 20) 後藤雄一 :
ミトコンドリア脳筋症における遺伝子診断の臨床応用
Clinical application of molecular diagnosis for mitochondrial encephalomyopathies
北海道医学雑誌 67 : 27-39, 1992
- 21) 松岡太郎, 長谷川ひとみ, 埜中征哉 :
各種神経筋疾患における strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels (SSV)
臨床神経学 32 : 645-647, 1992
- 22) 長谷川ひとみ, 松岡太郎, 後藤雄一, 埜中征哉 :
Ragged-red fiber を伴う慢性進行性外眼筋麻痺症候群における血管病変—生検筋での検討
臨床神経学 32 : 155-160, 1992
- 23) 池田 憲, 木下真男, 岩崎泰雄, 埜中征哉, 春原経彦 :
喉頭CTによる Shy-Drager 症候群の声帯外転筋麻痺の検討
—CT, 臨床症状, 神経病理学的所見との対比—
神経内科 36 : 477-484, 1992
- 24) 小林葉子, 二瓶健次, 桑島克子, 埜中征哉 :

還元小体ミオパチー (reducing body myopathy) の1例

臨床神経学 32 : 62-67, 1992

25) 瀬川文徳, 山田人志, 富 英明, 春原経彦, 埜中征哉 :

進行性ミオパチーを伴った自己免疫性多腺性内分泌不全症第1型の1例

臨床神経学 32 : 501-505, 1992

c. 総 説

1) Nonaka I :

Mitochondrial diseases

Curr Opin Neurol Neurosurg 5 : 622-632, 1992

2) 埜中征哉 :

ミトコンドリア脳筋症; 最近注目されてきた病態と疾患

内科 69 : 1294-1295, 1992

3) 埜中征哉 :

ミトコンドリアサイトパチーの臨床病理

神経研究の進歩 36 : 952-960, 1992

4) 埜中征哉 :

脳・神経疾患; 進行性筋ジストロフィー

治療 75 : 22-30, 1993

5) 埜中征哉 :

慢性進行性外眼筋麻痺症候群-Kearns-Sayre 症候群を含む一

小児内科 24 : 927-932, 1992

6) 埜中征哉 :

[診断のためのガイドライン] 進行性筋ジストロフィー症

臨床医 18 : 40-44, 1992

7) 埜中征哉 :

神経・筋疾患と遺伝子変異一病態解明と診断への応用

最新医学 48 : 487-492, 1993

8) 後藤雄一 :

ミトコンドリア病とミトコンドリアDNA変異

最新医学 48 : 556-563, 1993

II 研究業績

9) 松岡太郎, 埜中征哉 :

ミトコンドリア遺伝子とその疾患；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) 作田亮一 :

ミトコンドリア病における遺伝子診断
小児科学年鑑 小児科の進歩 12 : 13-17, 1992

11) 作田亮一 :

重症筋無力症
小児科診療 55 : 2465-2469, 1992

d. 班会議報告書

1) 埜中征哉, 竹光正和, Morgan JE, Partridge TA :

筋芽細胞移植における宿主免疫能の影響：ヌード mdx マウスと mdx マウスの比較
厚生省精神・神経疾患研究委託費，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年度研究報告書 P13-16, 1992

2) 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 :

ジストロフィン関連蛋白 (DRP) の骨格筋内の局在：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年度研究報告書 P57-62, 1992

3) 埜中征哉, 竹光正和, 荒畑喜一, 石浦章一, 杉田秀夫 :

mdx マウス骨格筋における免疫抑制剤の影響
厚生省精神・神経疾患研究委託費，筋ジストロフィーモデル動物の開発，生産とその評価に関する研究班
平成4年度研究報告書 P63-69, 1993

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-動物モデルの検討
厚生省・厚生科学研究費・新薬開発研究事業，ミトコンドリア病治療薬の開発研究班
平成3年度研究報告書 P11-14, 1992

5) 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3年度研究報告書 P 349-351, 1992

6) 後藤雄一, 作田亮一, 埜中征哉, 宝来 聰 :

ミトコンドリア DNA 3243 点変異による症状の多様性

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4年度研究報告書 P 244-246, 1993

7) 後藤雄一, 村上信行, 作田亮一, 埜中征哉, 宝来 聰 :

封入体筋炎の位置づけ (DMRV との比較を中心として)

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4年度研究報告書 P 53-57, 1993

8) 三池輝久, 大谷宜伸, 後藤雄一, 作田亮一, 埜中征哉 :

MELAS および MERRF 各一家系が示すミトコンドリア遺伝子異常とその問題点

厚生省・厚生科学研究費・新薬開発研究事業, ミトコンドリア病治療薬の開発研究班

平成3年度研究報告書 P 52-55, 1992

9) 宝来 聰, 服部優子, 水野美邦, 後藤雄一, 作田亮一, 埜中征哉 :

ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア tRNA 遺伝子の変異

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4年度研究報告書 P 251-254, 1993

10) 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

厚生省・厚生科学研究費・新薬開発研究事業, ミトコンドリア病治療薬の開発研究班

平成3年度研究報告書 P 29-33, 1992

11) 石浦章一, 古賀律子, 安楽治美, 鎌倉恵子, 桃井 隆, 竹光正和, 松崎哲也, 荒畑喜一, 埜中征哉
杉田秀夫 :

ジストロフィン関連蛋白質 (DRP) の細胞内局在

厚生省精神・神経疾患研究委託費, 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

II 研究業績

る研究班

平成3年度研究報告書 P47-52, 1992

e. その他

- 1) 竹光正和, 埜中征哉, 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
- 2) 竹光正和, 埜中征哉 :
脊髄・脊椎疾患と筋病理 (3) 進行性筋ジストロフィー
脊椎脊髄ジャーナル 5 : 393-396, 1992
- 3) 竹光正和, 埜中征哉 :
脊髄・脊椎疾患と筋病理 (5) 特発性側彎症
脊椎脊髄ジャーナル 5 : 553-566, 1992

B. 学会発表

c. 一般学会

- 1) 埜中征哉, 簡 浴沂, 林 明益 :
小児神経筋疾患における筋内末梢神経の異常
第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 21, 1992
- 2) 加茂 功, 菊池愛子 :
胸腺筋様細胞の産生するコロニー刺激因子の性状
第51回日本癌学会総会, 大阪, 10. 10, 1992
- 3) 菊池愛子, 国下龍英, 埜中征哉, 加茂 功 :
筋様細胞コロニー刺激因子によるミクログリアの分化増殖
第65回日本生化学会大会, 福岡, 10. 10, 1992
- 4) 松岡太郎, 埜中征哉 :
ゲルマニウム・ミオパチー : ミトコンドリア・ミオパチーの動物モデル
第95回日本小児科学会学術集会, 松山, 5. 15, 1992
- 5) 松岡太郎, 作田亮一, 埜中征哉 :
ミトコンドリア・ミオパチーにおける ragged-red fiber の組織化学的検討
第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 20, 1992

- 6) 松岡太郎, 多田博史, 飯森祐一, 四方啓裕, 近藤昌敏, 内藤悦雄, 黒田泰弘, 宮林重明, 作田亮一,
埜中征哉 :
 反復性の筋力低下, 呼吸不全, 高乳酸血症を呈し, 筋病理学的に末梢神経病変を認めた
 4 症例の検討
 第34回日本小児神経学会総会, 大宮, 6. 12, 1992
- 7) 松岡太郎, 埜中征哉 :
 ゲルマニウム・ミオパチー: ミトコンドリア・ミオパチーの動物モデル
 第24回日本臨床電子顕微鏡学会総会, 岡山, 9. 19, 1992
- 8) 作田亮一, 松岡太郎, 後藤雄一, 埜中征哉 :
 MELAS の点変異: nt 3243 と nt 3271 の比較検討
 第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 21, 1992
- 9) 作田亮一, 松岡太郎, 埜中征哉, 宝来 聡 :
 ミトコンドリア脳筋症における遺伝子診断の臨床応用
 第95回日本小児科学会学術集会, 松山, 5. 15, 1992
- 10) 作田亮一, 松岡太郎, 埜中征哉, 宝来 聡 :
 ミトコンドリア脳筋症の遺伝子診断—PCR 法によるスクリーニングの検討—
 第34回日本小児神経学会総会, 大宮, 6. 13, 1992
- 11) 作田亮一 :
 ミトコンドリア病のDNA診断
 第9回小児神経・筋疾患懇話会, 東京, 8. 22, 1992
- 12) 作田亮一, 松岡太郎, 埜中征哉, 永井敏郎, 吉永治美, 大田原俊輔, 宝来 聡 :
 Leigh 脳症におけるミトコンドリアDNA異常
 第35回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 11. 6, 1992
- 13) 竹光正和, 石浦章一, 埜中征哉, 杉田秀夫 :
 ヒト骨格筋におけるジストロフィン関連タンパク (DRP) の免疫組織化学的検討
 第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 22, 1992
- 14) 竹光正和, 松崎哲也, 埜中征哉, 杉田秀夫 :
 mdx マウスの筋芽細胞移植療法
 第39回日本実験動物学会総会, 東京, 5. 29, 1992
- 15) 竹光正和, 埜中征哉, Morgan JE, Partridge TA :

II 研究業績

筋ジストロフィーの筋細胞移植療法

第7回日本整形外科学会基礎集会, 東京, 10. 9, 1992

- 16) 竹光正和, 徳広 聡, 小野寺信男, 宮津 誠, 宮沢 学, 柏崎祐一, 竹光義治 :

末梢神経の高度の脱髄を呈した Engelmann 病の1例

第3回日本小児整形外科学会学術集会, 福岡, 12. 4, 1992

- 17) 竹光正和, 埜中征哉 :

筋再生におけるサイクロポリンAの影響

第8回北海道整形外科基礎研究会, 札幌, 1. 9, 1993

- 18) 竹光正和, 高橋 滋, 前田龍智, 寺西 正, 熱田祐司, 加茂裕樹, 原田吉雄, 竹光義治,

埜中征哉 :

腰部変性後彎の傍脊柱筋の病理学的検討

第84回北海道整形災害外科学会, 札幌, 1. 30, 1993

- 19) 斎藤陽子, 埜中征哉 :

筋細胞の抗デスミン抗体に対する染色性の変化: 酸性前処理による検討

第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 21, 1992

- 20) 秋山千枝子, 作田亮一, 松岡太郎, 埜中征哉 :

各種神経筋疾患における cytoplasmic body の意義

第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5. 21, 1992

- 21) 曾根 翠, 埜中征哉 :

Prader-Willi 症候群の筋病理学的検討

第34回日本小児神経学会総会, 大宮, 6. 12, 1992

- 22) 永井敏郎, 後藤雄一, 松岡太郎, 作田亮一, 内藤悦雄, 黒田泰弘, 埜中征哉 :

Leigh 脳症の病変について—生検での組織および生化学検討

第95回日本小児科学会学術集会, 松山, 5. 15, 1992

- 23) 飯森祐一, 松岡太郎, 埜中征哉, 宮林重明, 今野金祐 :

反復性の小脳失調, 筋力低下と高乳酸・ピルビン酸血症を呈し, 筋肉に pyruvate dyhydrogenase complex の活性低下と末梢神経病変がみられた一女児例

第34回日本小児神経学会総会, 大宮, 6. 12, 1992

- 24) 四方啓裕, 松岡太郎, 縣 裕篤, 島袋 恵, 島袋直哉, 埜中征哉, 内藤悦雄, 黒田泰弘 :

痙攣, 筋力低下, 呼吸不全, 高乳酸血症をもって急性に発症した PDHC 欠損症の1例

第34回日本小児神経学会総会，大宮，6. 12, 1992

- 25) 川上康彦，橋本 清，藤野 修，藤田武久，埜中征哉，松岡太郎，作田亮一：

ミトコンドリアDNA点変異(3243：A→G)をもち，10数年間中枢神経症状，筋力低下の増悪を認めなかったミトコンドリアミオパチーの1例

第34回日本小児神経学会総会，大宮，6. 12, 1992

- 26) 箕田修治，徳永 誠，荒木淑郎，石井弘子，埜中征哉：

In situ hybridization (ISH) 法を用いたミトコンドリア (mt) 脳筋症における変異 mtDNA の解析

第33回日本神経学会総会，鹿児島，5. 21, 1992

- 27) 清水輝夫，本吉慶史，寺尾寿夫，砂田芳秀，金澤一郎，埜中征哉：

先天性筋疾患におけるジストロフィン発現の特異性

第33回日本神経学会総会，鹿児島，5. 21, 1992

- 28) 小島 進，高木昭夫，松村多可，大矢 寧，渡辺知司，井田雅祥，黒岩義之，埜中征哉：

悪性光熱，セントラルコア病などの骨格筋ライアノジンアレセプター異常

第33回日本神経学会総会，鹿児島，5. 21, 1992

C. 班会議発表

- 1) 埜中征哉，竹光正和，荒畑喜一，石浦章一，杉田秀夫：

mdx マウス骨格筋における免疫抑制剤の影響

厚生省精神・神経疾患研究委託費，筋ジストロフィーモデル動物の開発，生産とその評価に関する研究班

平成4年度班会議，東京，12. 3, 1992

- 2) 埜中征哉，作田亮一，松岡太郎，後藤雄一：

各種ミトコンドリア脳筋症生検筋におけるCoQ濃度の検討

厚生科学研究費補助金・新薬開発研究事業・ミトコンドリア病治療薬の開発研究班

平成4年度班会議，東京，2. 19, 1993

- 3) 加茂 功，菊池愛子，埜中征哉，国下龍英，近藤 淳，山田 英：

胸腺筋様細胞が産生するマクロファージ様細胞増殖因子

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班

平成4年度班会議，東京，1. 18, 1993

II 研究業績

4) 後藤雄一, 作田亮一, 埜中征哉, 宝来 聰 :

ミトコンドリアDNA 3243点変異による症状の多様性

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4年度班会議, 東京, 12. 5, 199

5) 後藤雄一, 村上信行, 作田亮一, 埜中征哉, 宝来 聰 :

封入体筋炎の位置づけ (DMRV との比較を中心として)

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4年度班会議, 東京, 12. 4, 1992

6) 宝来 聰, 服部優子, 水野美邦, 後藤雄一, 作田亮一, 埜中征哉 :

ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリアtRNA 遺伝子の変異

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4年度班会議, 東京, 12. 5, 1992

7) 杉田秀夫, 松岡太郎, 作田亮一, 竹光正和, 後藤雄一, 埜中征哉 :

ゲルマニウム中毒ラット骨格筋の組織化学的, 電子顕微鏡的および生化学的検討

厚生科学研究費補助金・新薬開発研究事業・ミトコンドリア病治療薬の開発研究班

平成4年度班会議, 東京, 2. 19, 1993

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分化増殖因子

加茂 功, 菊池愛子, 国下龍英, 埜中征哉

解剖学的に調べられた限り、全ての脊椎動物の胸腺には骨格筋様細胞が存在している。この細胞は特に、胎生期から幼若期にかけて多数出現することから胸腺の免疫機能の発達に関わっていることが考えられるが、生理機能に関しては不明な点が多かった。我々はこの点を少しでも明確にするため、多数の筋様細胞をクローン化し、その培養上清の生物活性因子をこの数年来追及してきている。この培養上清は特に、マクロファージ系細胞に作用する活性因子を含有していた。この活性は既存のマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)とは作用上の点で異なっていた。今回はこの活性因子を分離精製し、アミノ酸配列を決定する。

方法

産生細胞：ウイスターラット由来871207B筋様細胞。

産生条件：上記細胞をRPMI1640 + 10% 牛胎児血清の条件でローラーボトルに培養し、コンフルエント時に、洗浄し、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸を含むRPMI1640でさらに4日培養し、この培養上清を出発材料とした。

増殖アッセイ：マイクロプレートにラット骨髄細胞200000個培養し、トリチウムサイミジンの取り込みで増殖を判定した。

分離精製：Sephrose CL-6B, Hydroxyapatite, Con A/Blue-Sephrose, Toso G4000SW, Reversed phase HPLC等を用いた。

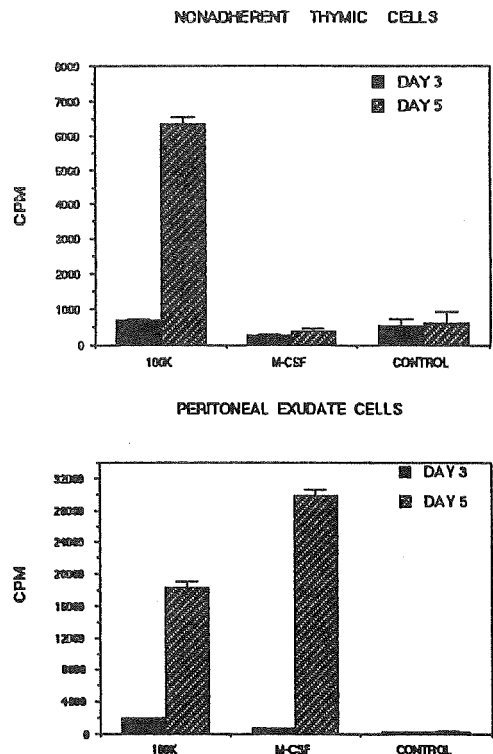
結果と考察

DEAE-Sephrose CL-6Bによりマクロファージ増殖活性は二つの異なる画分に分離された。

両画分をそれぞれ上記方法で、分離精製したところ両者ともM-CSFにはないアミノ酸配列を示す因子であった。特に、大きい方の因子はヒト

プロテオグリカンI(biglycan)のコアタンパクとホモロジーを有する因子であった。

プロテオグリカン類はGM-CSF、IL-3、TGF-β等のリザーバーとして作用することが知られているが、今回精製された因子がM-CSFのリザーバーとして働いている可能性は完全に否定できないが、下図のように、それ自体が活性因子として作用している可能性が大きい。



Reference: Kamo I., et al
Characterization of a macrophage lineage cell colony-stimulating factor produced by thymic myoid cells, Immunol. 1993;79 103-106

筋様細胞コロニー刺激因子によるミクログリアの分化増殖

菊池愛子, 加茂 功, 国下龍英, 桒中征哉

ミクログリアの発生分化に関しては論議の多いところであるが、血球系の分化増殖因子であるマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)がミクログリアも刺激することが知られている。私達が分離した胸腺筋様細胞は、既知のM-CSFとは異なる作用を示すマクロファージ増殖因子を産生していた。そこで、今回これらのミクログリアに対する作用を検討した。

方法

増殖アッセイ：ラットミクログリア細胞4,000個マイクロプレートに培養し、トリチウムサイミジンの取り込みで増殖を判定した。また、寒天をプレート上に敷き、増殖細胞を各種抗体で染色し、細胞の同定を行った。因子：ウイスターラット由来871207B筋様細胞をRPMI1640 + 10%牛胎仔血清で培養増殖させ、フルシート時に洗浄し、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸を含むRPMI1640に交換後4日培養し、この培養上清を出発材料とし、Sephacryl6B, Hydroxyapatite, Con A/Blue-Sephacryl, Toso G-4000 SW, Reversed phase HPLC等で精製した標品を用いた。cDNA クローニング：精製標品のアミノ酸分析結果と、産生細胞から得たmRNAを用いて当該遺伝子のクローニングを試みた。

結果と考察

各因子を添加した培養系と無添加対照群の培養系でのミクログリアの増殖活性を比較すると、60Kの因子を添加した培養系では3日目には、3.7倍、5日目には17倍と増殖活性が増していた。また100K因子を添加すると、それぞれの培養日数で、L929培養上清由来のM-CSFによる増殖活性値、2.9倍4倍に比肩する、2.7倍、3倍の活性上昇を示した。(図1)

これらの細胞をED1, ED2, ED3, OX6, OX42の各種モノクロナル抗体を用いて蛍光抗体法で

染色した(図2)。いずれのファクターでも確かにミクログリアの増殖が認められた。60K因子による、増殖活性の強さと、OX6 (Ia抗原)の誘導は、ウイルス感染に対するミクログリアのin vivoの機能などとも考え合わせ興味もたれる。100K因子はアミノ酸分析結果からプロテオグリカンI (biglycan)のコアタンパクとホモロジーを有する因子であったが、一部異なる部位があり、その遺伝子構成に興味をもち、産生細胞(871207B)からmRNAをとり、cDNAクローニングを行った。そのクローンをCHO細胞にtransfectし遺伝子発現を試みている。

図1：各因子のミクログリア増殖への影響

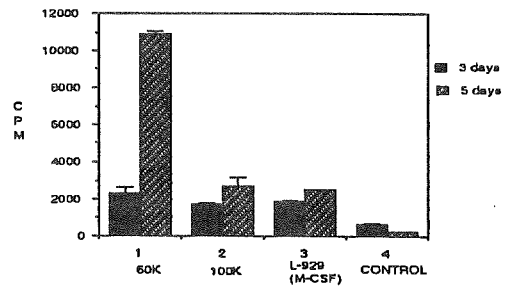
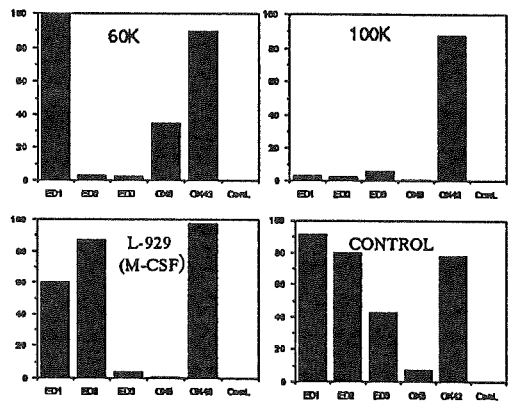


図2：各種モノクロナル抗体を用いた刺激応答細胞の染色結果(%)



ミトコンドリア DNA 3243 点変異による症状多様性

作田亮一, 後藤雄一, 埜中征哉, 宝来 聡*

(*国立遺伝学研究所)

はじめに

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes)は脳卒中症状を特徴とし、小児期に発症するミトコンドリア脳筋症の一つである。MELASの患者の約80%に、tRNA^{Leu(UUR)}の塩基番号 (nt) 3243にAからGの点変異を認める^{1,2}。MELASには低身長、難聴、糖尿病、心筋症など多くの合併症が認められる。MELASの遺伝子診断が進むにつれて明らかな脳卒中発作がなくミオパチー症状もほとんどみられない患者にもMELASの変異である3243変異を認めるものが少なからず存在することがわかってきた。そこで、我々は、このような非典型例が今後MELASに移行するかを予測できれば臨床上有用であると考え、典型的MELASと非典型例において変異ミトコンドリアDNAの割合や筋病理像、生化学所見などを検討した。

対象・方法

骨格筋に3243変異を有する症例の中でPavlakisの提唱したMELASの主症状である脳卒中症状、乳酸アシドーシスなどをみた典型的なMELAS30例とその母親3例、脳卒中様症状が全く認められない非典型例6例を対象とした。骨格筋から分離した全DNAを用いてtRNA^{Leu(UUR)}領域をPCR法にて増幅し制限酵素ApaIで消化して3243変異の有無を判定した。変異ミトコンドリアDNAの割合はサザンプロテイング法により定量した。

結果・考察

脳卒中様症状のない非典型例の患者は1) 進行性ミオクローヌスてんかん、低身長、2) 心筋症、糖尿病、難聴、3) 痩せ、軽度外眼筋麻痺、4) 呼吸障害、筋力低下、5) 慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)、6) 低身長などの症状を呈していた。症状の初発症状は、半数が20歳以降と遅い傾向があった。MELASの母親の年齢は40から50歳で、一人は無症状、あとの二

人は易疲労性、難聴、軽度の筋力低下などを呈していた。

変異mtDNAの割合は、典型的MELASが平均84%、非典型例62%、MELASの母親61%と、非典型例や母親では、典型的MELASに比べて変異mtDNAの割合が少ない傾向があった(図1)。ただし、そのばらつきは大きく、非典型例でも80%を超えるものが2例存在した。MELASの初発年齢と変異mtDNAの割合には相関関係は見られなかった。

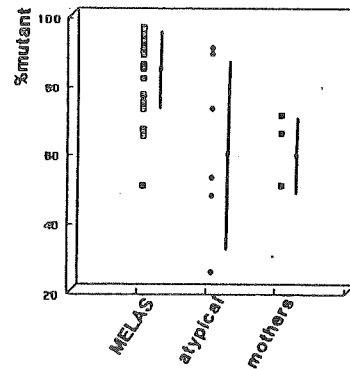


図1. 典型的MELAS, 非典型例、MELASの母の骨格筋における3243変異の割合

典型的MELAS、その母親、非典型例の筋病理、生化学所見の検討では、RRFは3者とも全例に、SSVは、典型例では93%、しかし、非典型例や母親では1/3にSSVを見ない例が存在した。生化学的には、典型例、非典型例とも複合体IとI+IV欠損が多く、母親では3例とも正常範囲であった。

以上より、非典型例が今後脳卒中様症状を呈するか予測することは難しいが、変異の割合や血管の変化(SSV)などを指標にして慎重なフォローが必要と考えられた。

文献

- 1) Goto Y et al. Nature., 348, 651-653 (1990)
- 2) Goto Y et al. Neurology., 42, 545-550 (1992)

封入体筋炎の位置づけ (DMRV との比較を中心として)

村上信行, 後藤雄一, 埜中征哉

Rimmed vacuole (以下RVと略す)は様々な疾患に認められ、疾患特異性はないとされている。一方、封入体筋炎 (以下IBMと略す)、distal myopathy with rimmed vacuole formation (以下DMRVと略す)はRVを病理学的に特徴とする。IBMは欧米では比較的多く認められるのに対して、日本ではごく希な疾患とされている。近年、IBMとして家族性を示すものや炎症細胞浸潤のないものなどが報告されており、DMRVとの異同が問題にされるようになった。

我々はRVの疾患別頻度を検討し、IBMを同定し得ると報告されたCongo red染色、ubiquitinおよび β -amyloid protein免疫染色を行い、IBMとDMRVを比較検討したので報告する。

対象・方法

対象は国立精神・神経センター 神経研究所に1978年から1992年9月までに寄せられた3403例の生検筋を用いた。RVはGomori trichrome変法染色にて観察し、1切片に3個以上RVが認められるものをRV陽性例とした。RV陽性55例についてCongo red染色、抗ubiquitinおよび β -amyloid protein抗体を用いた免疫組織染色を行った。

結果

3403例中87例、2.5%にRV陽性例が認められた。頻度は様々であるが、種々の疾患にRVは認められた。また、IBM、DMRV以外にも眼咽頭遠位型筋ジストロフィー、Marinesco-Sjogren症候群、糖原病2型に高頻度にRVが認められた。

RV陽性55例中Congo red染色にて陽性、疑陽性、陰性所見を認めたものは、それぞれ18例(32.7%)、5例(9.1%)、32例(58.2%)であった。Ubiquitin免疫染色では、陽性、疑陽性、陰性それぞれ28例(51.0%)、9例(16.3%)、18例(32.7%)であった。また、 β -amyloid protein免疫染色ではそれぞれ35例(63.6%)、14(25.5%)、6例(10.9%)であった。以上3染色ともに陽性率は異なったが、特に疾患特異性を示すものではなかった。

考察

現在、RVは変性した細胞内蛋白を分解する自己食能が異常に活性化されたためにRVは形成されると考えられており、疾患特異性のないものとされている。一方、IBM、DMRVではRVは筋病理学的特徴の一つに挙げられている。我々の行ったRVの疾患別の出現

頻度を検討した結果、頻度様々であるが、種々の疾患にRVは認められ、RVそれ自身は疾患特異性を示すものではなかった。一方、IBM、DMRV、眼咽頭遠位型筋ジストロフィー、Marinesco-Sjogren症候群などのRVの頻度の高い疾患においては、これらの疾患の筋萎縮を説明し得る程の変性機転がRV以外に認められないことから、これらの疾患においてはRVはなんらかの病因的意義を有すものと考えられた。

近年、IBMに家族性を示すものや炎症細胞浸潤を認めないものが報告されるように欧米ではIBMの診断基準が拡大解釈されることがある。これに対して、日本においてはDMRVが比較的多くみられるため家族性を示すものや炎症細胞浸潤のないものをIBMと診断されることはない。

1991年、MendellらはIBMのRVを有する筋線維にCongo red染色陽性物質が認められ、IBMに特異的に認められるものであると報告した¹⁾。また、Askanasらは1991年にIBMのRVを有する筋線維に抗ubiquitin抗体を用いた免疫染色陽性物質が認められ、これが免疫電顕にて15-20 μ mのfilamentous inclusionに一致することを報告した²⁾。さらに1992年に β -amyloid protein抗体を用いた免疫染色により同様に陽性物質がIBMに特徴的に認められ、これがより細かいfilamentous inclusionに一致することを報告した³⁾。

結果に示したようにIBMを同定し得ると報告された三染色ともに疾患特異性を有するものではなく、RVを有するような変性線維に非特異的に認められるものであった。

IBMとDMRVは臨床的にも類似する点があるが、遺伝形式、発症年齢、罹患筋等において異なっており、異なった疾患概念と考えられる。一方、筋病理学的には炎症細胞浸潤を除き非常に似かよった病理像を呈し、IBMを同定し得るとされたこれら三染色法を用いても鑑別することはできなかった。これらのことからIBMとDMRVを鑑別する際は、筋病理学的には炎症細胞浸潤が重要であり、これと臨床経過および臨床症状などを総合的に判断し、診断する必要があると考えられた。

文献

- 1) Mendell JR et al. Arch Neurol 48:1229, 1991.
- 2) Askanas V et al. Neurosci Lett 130:73, 1991.
- 3) Askanas V et al. Am J Pathol 141:31, 1992.

筋芽細胞移植療法におけ宿主に対するX線照射の影響

竹光正和, 荒畑喜一, 埜中征哉

Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の治療として、欠損しているジストロフィン(dys)を補う筋芽細胞移植が各施設で実験的に試みられている。この方法では、移植した正常筋芽細胞がdysを産生することで宿主筋組織の正常化が期待される。しかし、移植筋芽細胞の生着には宿主の免疫能が大きく関与すると考えられる。そこで、X線照射で免疫抑制した宿主マウスに対して、宿主と主要組織適合抗原(MHC)の異なる筋芽細胞を移植した場合の生着率を検討した。

<方法>

DMDと同様にdysが欠損しているmdxマウスを宿主として用いた。mdxマウスは5匹ずつ4群に分けた。1群のマウスには5Gyの全身照射と20Gyの局所照射(右下肢)を行い、3日後に右前脛骨筋に正常筋芽細胞を 1×10^5 個移植した。2群には5Gyの全身照射を行い、3日後に1群と同様の移植を行った。3群はX線照射を行わずに1群と同様の移植を行った。4群はX線照射も細胞移植も行わないコントロール群とした。正常筋芽細胞は胎生16日から20日目のBALB/Cマウスより採取し、5日間の培養の後、宿主mdxマウスの右前脛骨筋にガラスピペットを用いて移植した。移植の4週後に各マウスの前脛骨筋を採取して、HE染色と抗dys(60kDa)抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。移植細胞生着率は、前脛骨筋の総筋線維数に対するdys陽性線維の比率(%)で比較した。

<結果>

1群のマウスの右前脛骨筋では著明な線維化が見られた。1-4群のマウスの前脛骨筋にみられたdys陽性筋線維の比率の平均±標準偏差は、1群 $1.3 \pm 0.5\%$ 、2群 $0.8 \pm 0.3\%$ 、3群 $0.4 \pm 0.1\%$ 、4群 $0.5 \pm 0.1\%$ であった。いずれのマウスにおいても、拒絶反応を示唆する炎症細胞の移植部位への浸潤は確認されなかった。

<考察>

筋芽細胞移植実験で、X線の全身照射を宿主マウスの免疫抑制に初めて用いた寺尾ら¹⁾の成績では、細胞移植後のdys陽性線維出現率が $2.2 \pm 1.3\%$ で、我々が同様に行った2群の実験結果の $0.8 \pm 0.3\%$ に比較して高率であった。寺尾らは

宿主と移植細胞のMHCが一致する組合せを用いたが、今回の実験では一致しない組合せを用いた。MHCが異なる移植細胞に対する宿主の強い拒絶反応は、5Gyの全身照射では十分に抑制できなかったために細胞生着率が低かったと考えた。炎症細胞の移植部位への浸潤が観察されなかった理由は、筋を採取した時期と拒絶反応が起こった時期が一致しなかったためと考えた。

Morganら²⁾はヌード化したmdxマウスを宿主とする実験で、X線の局所照射を移植前に行うと細胞生着率が向上することを報告している。今回の実験でも、移植前に5Gyの全身照射を行った2群に比較して、20Gyの局所照射をさらに加えた1群のマウスで有意($p < 0.05$)にdys陽性線維出現率が高かった。その原因として、X線局所照射が宿主の筋線維再生を抑制することで総筋線維数が減少しdys陽性線維数が相対的に増加すること、X線の宿主筋に対する直接的な組織障害が移植細胞の易生着性(移植細胞と宿主筋線維との融合し易さ)を高めることが考えられた。

dys陽性線維の比率を増加させることのみを目的とするならば、宿主に対する移植前のX線局所照射は有効な手段である。しかし、局所照射を行っても移植した細胞が生着しなかった部位は線維化する。結果として、移植筋がdysを発現した筋線維を有していても、線維化が起これば筋の機能は低下する。従って、治療法としての筋芽細胞移植にX線局所照射はマイナスに作用すると考えた。今後、さらに効率的な細胞移植の方法の開発が必要と考えた。

<参考文献>

- 1) 寺尾寿夫、加藤洋司ら：ジストロフィー筋への正常myoblastの注射に関する研究—X線の効果。厚生省精神・神経疾患荒木班平成2年度研究報告書：200, 1991
- 2) Morgan JE, Hoffman EP et al: Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse. *J Cell Biol* 111: 2437, 1990

10. 機能研究部

1. 研究部一年の歩み

平成3年度において当研究部で研究に携わったのは、小沢鎧二郎、吉田幹晴、萩原康子、林謙介、鈴木厚（科学技術庁特別研究員，併任研究員），水野裕司（流動研究員），山本秀子（流動研究員）であり，前垣圭津と斎藤和江がこの補助を行った。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）が，客員研究員として清水輝夫（帝京大学医学部神経内科教室，助教授）及び斎藤加代子（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）とが参加した。

常勤の研究者は平成3年度と全く変化がなかった。しかし萩原康子は平成4年4月1日付けで研究員より病態生理室長へと昇格した。

研究内容としては，ジストロフィンおよびその結合タンパク質の問題と*mdx*マウスへの筋芽細胞の注入移植を主なテーマとしている。

結合タンパク質とジストロフィンの相互作用については，特に力をいれて研究を行った。その一部として以下の抄録には結合タンパク質のうちA2（52kDa），A3a（43kDa）のアミノ酸配列を決定し，それに従って抗体を作成し，免疫学的検索を行いドシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）で減少はしているが残っていることを示した。これは正常ではジストロフィンに結合している糖タンパク質が，DMDではジストロフィンの代わりに発現されているユートロフィンに結合して残っている可能性があることを示唆している。またジストロフィン上の糖タンパク質結合部位の解析も進んでおり，病態生理の解明に踏み出している。さらにそれを進めるために他の抗体の開発を行っている。そしてタンパク質の組織分布を調べたところ，A2とA4との発現スペクトラムが同じであることが分かった。このことはA2とA4が結合していることを示す我々の他のデータとも合致した。糖タンパク質はジストロフィー病態形成の鍵物質であると思われるが，まだ機能が分かっていないので，その面への切り込みが必要であると思われる。

一方DMD治療の一つの試みとして，筋芽細胞の注入移植を行っている。そしてその経過の解析を行った。

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および平成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班の班長をつとめた。

（部長 小沢鎧二郎）

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Masuda T, Fujimaki N, Ozawa E, Ishikawa H :
Confocal laser microscopy of dystrophin localization in guinea pig skeletal muscle fibers
J Cell Biol 119 : 543-548, 1992
- 2) Yoshida M, Suzuki A, Shimizu T, Ozawa E :
Proteinase-sensitive sites on isolated rabbit dystrophin
J Biochem 112 : 433-439, 1992
- 3) Suzuki A, Yoshida M, Yamamoto H, Ozawa E :
Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain
FEBS Lett 308 : 154-160, 1992
- 4) Ikeya K, Saito K, Hayashi K, Tanaka H, Hagiwara Y, Yoshida M, Yamauchi A,
Fukuyama Y, Ishiguro T, Eguchi C, Ozawa E :
Molecular genetic and immunological analysis of dystrophin of a young patient with X-linked muscular dystrophy
Am J Med Genet 43 : 580-587, 1992

b. 著書

- 1) 小沢鎧二郎 :
ジストロフィン
学会出版センター, 東京, 1992

c. 総説

- 1) 小沢鎧二郎, 水野裕司 :
ジストロフィン, ジストロフィン関連タンパク質と進行性筋ジストロフィー
最新医学, 48 : 18-25, 1993
- 2) 吉田幹晴 :
ジストロフィン—生化学的研究の現状
生化学, 64 : 1120-1124, 1992

II 研究業績

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

Molecular genetic analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy families

Fetal and Perinatal Neurology (Fukuyama Y, Suzuki Y, Kamoshita S, Casaer P edc)

S. Karger, Basel, p46-59, 1992

d. 班会議報告書

1) 小沢鏊二郎, 山本秀子, 萩原康子, 水野裕司, 吉田幹晴 :

ジストロフィン結合タンパク質のヘテロジェネティー

平成4年度研究報告書, p22-27, 1993

2) 小沢鏊二郎, 吉田幹晴, 萩原康子, 鈴木 厚, 水野裕司, 山本秀子 :

ジストロフィン結合タンパク質

平成4年度研究報告書, p133-137, 1993

B. 学会発表

a. シンポジウム

1) Ozawa E :

Submolecular basis for severe phenotype of muscular dystrophy caused by truncated dystrophin

5 th International Congress on Cell Biology, Madrid, July 28, 1992

b. 国際学会

1) Ishikwa H, Fujimaki N, Masuda T, Murakami T, Ono M, Shimada O, Ozawa E :

The localization of dystrophin on the sarcolemma of mammalian skeletal muscle fibers

5 th International Congress on Cell Biology, Madrid, July, 27, 1992

2) Suzuki A, Yoshida M, Ozawa E :

Submolecular basis for severe phenotype of muscular dystrophy caused by truncated dystrophin

5 th International Congress on Cell Biology, Madrid, July 31, 1992

3) 鈴木 厚, 吉田幹晴, 小沢鏊二郎 :

Glycoprotein-binding site of dystrophin and its pathological meaning

第1回国際生化学連合国際会議, 名古屋, 6. 4, 1992

c. 一般学会

1) 小沢鏊二郎, 鈴木 厚, 吉田幹晴, 山本秀子 :

ジストロフィン分子上の糖タンパク質複合体結合部位とその病態生理学的意義
第66回日本薬理学会年会, 横浜, 3.27, 1993

2) 萩原康子, 小沢鏊二郎 :

Hydroxyurea の線維芽細胞増殖抑制効果を利用した筋初代培養法
第45回日本細胞生物学会大会, 徳島, 10.22, 1992

2) 萩原康子, 小沢鏊二郎 :

骨格筋初代細胞培養における hydroxyurea の効果
第66回日本薬理学会年会, 横浜, 3.25, 1993

4) 林 謙介, 小沢鏊二郎 :

肢芽による体節からの筋芽細胞誘引
第25回日本発生生物学会大会, 横浜, 5.28, 1992

5) 林 謙介, 萩原康子, 小沢鏊二郎 :

鶏胚体壁板中胚葉におけるビメンチンの発現
第63回日本動物学会大会, 仙台, 10.7, 1992

6) 鈴木 厚, 吉田幹晴, 小沢鏊二郎 :

ジストロフィンの糖タンパク質複合体結合部位
第65回日本生化学会大会, 福岡, 10.11, 1992

7) 水野裕司, 埜中征哉, 小沢鏊二郎, 平井俊策 :

各種神経筋疾患とジストロフィン関連蛋白 (dystrophin related protein, DRP) の関係について
第33回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.22, 1992

8) 山本秀子, 水野裕司, 萩原康子, 吉田幹晴, 小沢鏊二郎 :

ジストロフィン結合タンパク質の2次元電気泳動法による解析
第65回日本生化学会大会, 福岡, 10.11, 1992

C. 班会議発表

1) 小沢鏊二郎 :

ジストロフィン結合タンパク質

厚生省精神・神経疾患研究委託費 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

II 研究業績

総合班会議, 東京, 1.21, 1993

2) 小沢鏊二郎, 林 謙介 :

肢芽肉筋芽細胞の遊走と細胞系譜

科学研究費補助金総合研究(A)「筋形成の分子機構」班会議, 千葉, 2.6, 1993

3) 吉田幹晴, 水野裕司, 埜中征哉, 小沢鏊二郎 :

ジストロフィン結合タンパク質 (A 2, A 3 a) はDMD筋で残っている

平成4年 生体運動合同班会議, 名古屋, 1.6, 1993

4) 山本秀子, 水野裕司, 萩原康子, 吉田幹晴, 小沢鏊二郎 :

ジストロフィン結合タンパク質の2次元電気泳動法による解析

厚生省精神・神経疾患研究委託費 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4年度班会議, 東京, 12.2, 1992

3. 主な研究報告

ジストロフィン膜結合部位における分子構築

鈴木 厚, 林 謙介, 吉田幹晴, 小沢鉄二郎

我々は昨年、Dystrophin分子の糖タンパク質複合体(GPC)結合部位がそのC末端のシステイン頻出ドメイン周辺に存在することを始めて生化学的に実証した(1)。今年度は、このGPC結合部位をさらに絞るために、Dystrophin C末の配列を有するいくつかの融合タンパク質を大腸菌内で合成し、GPCを含むDystrophin 結合タンパク質群(DAPs)との結合を検討した。

【方法】

Dystrophin cDNA(cDMD9-14、及び cDMD8)の制限酵素断片を pGEXベクター(Pharmacia)に組み込み、大腸菌lon⁻変異株(ME8624)に発現させた。融合タンパク質は、C末端に対して DCT685(アミノ酸3024-3685)、DCT440(3024-3440)、DCT263(3024-3263)の3種類、及びロッドの部分に対してDCR(2265-2556)の1種類作製した。それぞれの標品は、グルタチオン-アフィニティーカラム、およびゲルろ過によって、ほぼシングルバンドにまで精製した。

DAPsとの再構成はブロット膜上に分離・転写した Dystrophin-結合タンパク質複合体と上記融合タンパク質(〜0.3μM)を室温 2 時間インキュベーションすることにより行った。DAPs に結合した融合タンパク質は対応する抗 Dystrophin 抗体による染色によって検出した。

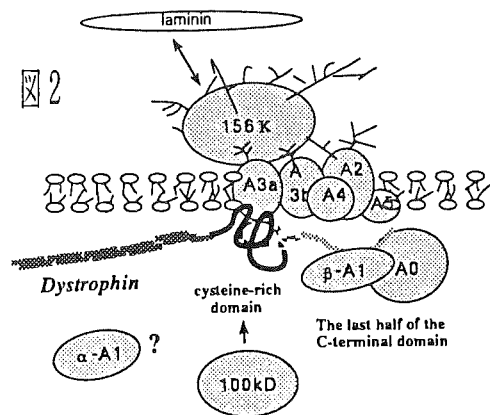
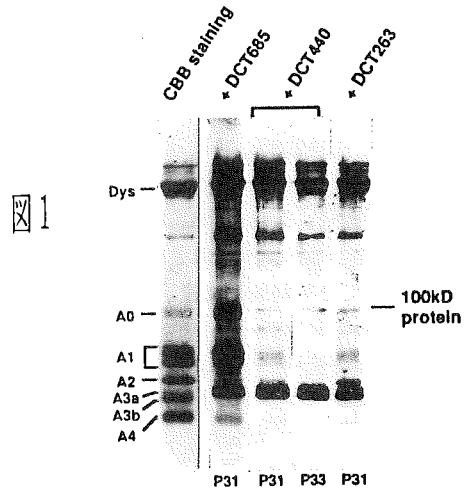
【結果と考察】

図1に見られるように、Dystrophin C末端はPVDF膜上に転写された DAPs に対して配列特異的な結合を示した。すなわち、C末端全配列を有する DCT685 は A0, βA1, A3a および100kD protein に結合したが、C末端ドメイン後半を欠失している DCT440 ではA0, βA1への結合は失われた。一方、A3a および100kDへの結合はほぼシステイン頻出ドメインのみを含む DCT263 においても観察された。また、DCT685 を前もってNENで処理しシステイン残基を修飾すると、A3a, 100kD protein への DCT685 の結合は完全に阻害されるが、A0, βA1への結合はなんら影響を受けないことがわかった。以上のことから、我々は、A3a および100kD protein がシステイン頻出ドメイン内部に、他方、A0 およびβA1 が種々の可変スプライシングを受けるC末端ドメイン後半に結合していると結論した(図2)。

本実験では、dystrophin C末端の A3a 以外のGPCタンパク質(A2, A3b, A4)への結合は観察

されなかった。従って A3a が dystrophin を形質膜に連結している膜タンパク質であると考えてよいであろう。このA3a はラミニン結合タンパクである156kD proteinと結合していることが最近明かとなった(吉田ら未発表データ)。したがって、A3a-156DAG-システイン頻出ドメインの結合が Dystrophin の形質膜、およびそれを通じた基底膜への結合を基本的に担っていると考えられる。

1)Suzuki et.al. FEBS Lett. 308: 154-160 (1992)



ジストロフィン結合タンパク質 (A2, A3a) の 内部アミノ酸配列分析とその抗体作成

吉田幹晴, 水野裕司, 埜中征哉, 小沢鏝二郎

【はじめに】

cDNAの全配列が決定されているジストロフィンに比べると、これに結合しているタンパク質 (156DAG, A0~A5) の情報は依然として乏しい。今回、このうち A2と A3aについて、それぞれ複数の部分的内部アミノ酸配列を決定することができた。このデータを基に抗体を作成し、ジストロフィンを欠いている DMD筋に適用したところ、少なくとも A2や A3aについてはそれほど失われていないことが判明したので報告する。

【内部アミノ酸配列分析と抗体作成】

精製したウサギジストロフィン複合体 (CDAP) ~300 μ gを一枚のミニスラブゲルで SDS-PAGEし、PVDF膜に転写、染色した。A2と A3aに相当するバンドを切り出し Aebersoldの方法¹⁾に従い V8 proteaseで in situ digestionを行った。消化後 PVDF膜から遊離したペプチドは逆相カラムを用いた HPLCによって分離精製した後、各ピークの N末端アミノ酸配列を気相シーケンサーによって決定した。A2と A3aの配列データよりそれぞれ 1個ずつ選択し、等価のペプチドを合成して BSAに conjugateし、抗原を調製した。これを常法に従ってウサギに免疫し、得られた抗血清は BSAカラムで精製した。

【結果と考察】

我々は最長で 23残基からなる独立した内部アミノ酸配列を A2より 5個、A3aより 4個決定した。A2の配列は今のところ報告がないが、データベースとの比較ではこれといった類似タンパク質は見いだせない。この配列データを使って cDNAをクローニングするプロジェクトが他の研究室と共同で進行している。A3aの配列については後に発表された²⁾ dystroglycan (156DAGと 43DAGがこの順で tandemにつながった前駆体タンパク質) の C末端領域の配列にすべて含まれていることがわかった。

即ち A3aは Campbellらの 43DAGに一致することが確認された。

これら配列データを基に作成した A2と A3aの抗体 (PA2, PA3a) はイムノブロットで、わずか 20ngという極微量の精製したウサギ CDAPに含まれる A2, A3aを特異的に検出した。なお、おもしろいことに PA3aは A3aより分子量のわずかに小さい A3bとは反応せずこれらが異なるタンパク質である可能性を示唆した。

PA2と PA3aはヒト骨格筋 SDS抽出物のイムノブロットでウサギの A2, A3aとそれぞれ分子量の良く似た単一のタンパク質を検出した。また組織化学染色では、いずれの抗体もジストロフィン抗体と同様、ヒト筋細胞の表面膜を染めた。従ってこれらの抗体はヒトの A2, A3aを認識すると考えられる。

ところでジストロフィンを欠く DMD筋では一群の結合タンパク質も相当量失われるとする報告がなされている。しかし今回我々が得た抗体で DMD筋を調べたところ、その報告と異なり、少なくとも A2と A3aに関しては決して大量に失われていないことが判明した。

A2, A3aがジストロフィンを欠いているにも関わらず DMD筋の表面膜上で維持されているのは何故であろうか。DMD筋では utrophinと呼ばれるタンパク質がジストロフィンの代わりに多く発現しているが、いくつか知られている結果を踏まえると、これが A2や A3aを筋表面膜上に固定している可能性がある。

【文献】

¹⁾ Aebersold, RH., et al. (1987) *Proc. NAS. USA* **84**, 6970-6974

²⁾ Ibraghimov-Beskrovnaya, O., et al. (1992) *Nature* **355**, 696-702

ジストロフィン結合タンパク質を認識するモノクローナル抗体

山本秀子, 水野裕司, 林 謙介, 小沢鏝二郎

ジストロフィンとは、複数のタンパク質と複合体を形成した状態で、筋形質膜に局在している。近年、このジストロフィン結合タンパク質のうち156DAG、A2、A3、A4よりなるglycoprotein complexとジストロフィンの結合部位が明らかにされ¹⁾、ジストロフィンのその部位の欠失がある患者は重症になることや、A2が欠如する疾患がDMD様の症状を示すことが報告される²⁾など、ジストロフィン結合タンパク質の重要性が明らかになってきた。

我々は、これまでジストロフィン結合タンパク質の解析を2次元電気泳動法により進めてきたが³⁾、さらに、ジストロフィン結合タンパク質の生理的役割を調べるためにジストロフィン結合タンパク質に対するモノクローナル抗体を作成し、組織分布等を調べた。

【方法】

抗原には、吉田らの方法⁴⁾により精製したジストロフィン複合体をアルカリ処理したものを用いた。免疫したBALB/cマウスの脾細胞とマウスミエロマ細胞(X63.653)を融合させ、HAT培地でハイブリトマを選択、培養した後、抗体産生ハイブリトマをイムノプレート法により選択した。クロニングは、IL-6を添加したRPM1培地(+10% FCS)中での限界希釈法により行った。

【結果・考察】

抗体のキャラクタリゼーション2段階のクロニングの結果、分子量88KDaと64KDaのジストロフィン結合タンパク質ハプトと反応するクローンを1種類、52KDaに対するものを2種類、35KDaに対するものを3種類得た。精製ウサギ骨格筋ジストロフィン複合体の2次元電気泳動・イムノプレートの結果からも、それぞれ β -A1、A2、A4を認識するモノクローナル抗体であることが示された。

β -A1に対するモノクローナル抗体(MA1-2)は、先に得られたMA1-1(MAb B25b)³⁾と異なり β -A1だけでなくA0も認識した。この結果から、 β -A1とA0では相同性の高い部位が存在することが推察された。

A2に対するもの(MA2-1、MA2-2)は、ウサギ、ヒト、ウシのうちウサギのみのA2を認識したことから、吉田らの得た抗A2抗体(PA2)⁵⁾とは認識部位が異なると考えられた。またこの認識部位は3動物種間で相同性の低い部位であることが推測された。

A4に対する3種類のモノクローナル抗体(MA4-1、MA4-2、MA4-3)のうちMA4-2、MA4-3はウサギ、ヒト両種のA4を認識したが、MA4-1はウサギのみを認識した。ウサギ骨格筋の凍結切片を用いた間接蛍光抗体法により、今回得られたモノクローナル抗体は全て筋細胞膜と反応した。

ウサギ、ヒト、ウシのA4の比較—各動物の骨格筋の2次元電気泳動・電気泳動転写の後、MA4-2を用いてA4を検出した。ウサギでは、近接した酸性スポット群Iつのみを染めたのに対し、ヒトではそれに加えて、より酸性の分子量65KDaのスポット群を染色した。ウシのA4は、ウサギに比べより塩基性の等電点を示した。

ヒトコントロール筋、DMD筋のA4—ヒトコントロール筋の凍結切片を用いた間接蛍光抗体法により、MA4-2、MA4-3は筋細胞膜と反応した。DMD患者の筋細胞膜との反応性は減少していたが、明かな反応が見られた。DMD筋におけるA4の減少は2次元電気泳動・イムノプレートの結果でも同様に確認された。また、MA4-2で検出された分子量65KDaのスポット群も同様にDMD筋では減少していた。

A4の組織分布—ウシの骨格筋、心筋、子宮、大動脈、脊髄、末梢神経、肺、肝臓、大脳、小脳について、MA4-2を用いて2次元電気泳動・イムノプレート法により調べた。A4は、骨格筋、心筋のみに明らかな存在が確認された。平滑筋を含む子宮、大動脈をはじめ他の組織では、検出されなかった。この組織特異性は水野らによるA2の結果⁶⁾と同様であり、吉田らの示唆したA2とA4の結合の可能性⁴⁾を支持するものであると考えられた。

- 1) Suzuki, A., et al. (1992) FEBS LETTRES **308**, 154-160
- 2) Matsumura, K., et al. (1993) Nature **359**, 320-322
- 3) Yamamoto, H., et al. (1993) J. Biochem. **114**, in press
- 4) Yoshida, M., et al. (1990) J. Biochem. **108**, 748-752
- 5) 吉田 幹晴ら、神経研究所年報 **第7号** 平成4年度
- 6) Mizuno, Y., et al. in preparation

II 研究業績

DMD, BMD, DMD-Carrier における utrophin (dystrophin-related protein, DRP) の発現様式について

水野裕司, 埜中征哉, 平井俊策*, 小沢鏝二郎

*群馬大学神経内科

はじめに

UtrophinはジストロフィンのC端側に非常に高いホモロジーを持つ, 分子量395kDaのタンパク質である。ジストロフィンが発現している正常筋ではほとんど発現していない utrophin は、DMD筋ではジストロフィンの欠損を代用するかのようによく発現している。このタンパク質は筋肉のみならず、腎や肝などの非筋組織にも存在している。

方法

DMD, BMD, DMD-Carrier、Control の計80例の生検筋組織を、抗ジストロフィン抗体4-4C5, 抗utrophin抗体で免疫組織染色した。その内訳を表1に示した。臨床的, 組織学的には非特異的な異常を認めるものの, 最終的には診断のつかなかった筋組織を対照筋とした。また抗utrophin抗体はジストロフィンと相同性のほとんどない部分の51アミノ酸残基に対して作られたものである。なおDMD筋は3つのグループに分けた。

結果

1. 対照筋は抗utrophin抗体に対しほとんど染まらないか、もしくは薄く染まる程度であった。
2. DMD、BMD、Carrierのようにジストロフィン異常のある筋は抗utrophin抗体に対して対照筋より強い反応を示した。4-4C5に対する反応性の悪い筋組織は抗utrophin抗体に強く染まり、大まかには逆相関していた。しかし個々の筋線維単位で調べると、逆相関関係が成り立たないものもあった(表2)。
3. 症例数は少ないが、高齢DMD筋や死後DMD筋における抗utrophin抗体の染色性は、低年齢DMD筋に比べ悪かった。

考察

1. DMD筋における4-4C5と抗utrophin抗体の逆相関関係から、utrophinはジストロフィンの代用をある程度しているだろう。
2. Utrophinの発現量が減少するとDMD患者の臨床症状は悪化するかもしれない。
3. ジストロフィンの発現量とutrophinの発現量とは何らかの関連を持って調節されていると思われる。

表1 :

	number of patients	age	
		range(y)	mean(y)
DMD ^a	34	0 ~ 8	3.2
DMD ^b	3	10	10.0
DMD ^c	2	16~22	19.0
BMD	11	1~45	16.0
Carrier	4	4 ~ 9	6.3
Control	26	0~14	3.1
Total	80		

We divided the DMD patients into three groups.

^a DMD patients under 9 years of age.

^b DMD patients at advanced ages.

^c DMD muscles obtained posthumously.

表2 :

	dystrophin-negative fiber	reciprocal dystrophin/utrophin		non-reciprocal dystrophin/utrophin	
		+/-	-/+	+/+	-/-
case 1	0%	11%	2%	0%	87%
case 2	20%	20%	13%	1%	66%
case 3	21%	15%	4%	1%	80%
case 4	83%	6%	87%	2%	5%

Carrier筋を100-200個観察し、ジストロフィンとutrophinの各抗体に対する染色性を調べ、反応性の強い繊維を+、弱い繊維を-で表した。Case 4が一番逆相関関係が成立している。

mdxヌードマウス筋へ注入移植されたC2筋芽細胞の動向

萩原康子, 水野裕司, 竹光正和*, 埜中征哉*, 小沢鏝二郎

(*微細構造研究部)

Duchenne型筋ジストロフィーの治療法開発の一つとして, 病態モデル動物であるmdxマウス筋に正常筋芽細胞を注入移植してdystrophinを発現させることが試みられている。既にこの方法でのdystrophin陽性細胞の出現が, いくつかの研究グループで成功しているが, 陽性細胞の出現率はそれ程高くない。また出現機序についても, 十分には解明されていない。

我々は, 宿主にPartridgeらによりヌード化されたmdxマウスを用い, 注入移植する筋芽細胞としてはマウス筋芽株細胞のC2細胞を用いて実験を行なった。注入移植されたC2細胞の宿主筋内での動向を経時的に調べ, dystrophin陽性細胞の出現機序を検討した。

方法

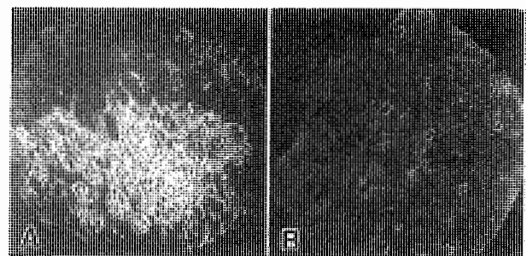
蛍光色素PKH26で標識したC2細胞を, 5週令前後のmdxヌードマウスの右前脛骨筋に注入移植した。左前脛骨筋にPBSを同様に注入して対照とした。経時的に採取した前脛骨筋は, 常法に従って凍結固定した。厚さ5 μ mの凍結切片を作成し, H&E染色およびdystrophin, laminin, troponin Tに対する抗血清を用いた間接免疫蛍光染色を行なった。Glucose-6-phosphate isomeraseのisozyme等を等電点電気泳動法と活性染色法により調べた。

結果と考察

C2細胞を注入移植した1, 2, 3, 4週間後の右前脛骨筋では, 左前脛骨筋に比べて多数のdystrophin陽性細胞がみられた(図)。さらに1週間を経時的に調べた。C2細胞は注入部位を中心に広範囲に広がった。注入部位周辺においては, 1日目では筋線維が破壊された像が観察され, 2~3日目にはマクロファ

ージに侵食されている筋線維の像もみられた。5日目では, 多くの幼若な筋線維が形成されていた。dystrophin陽性細胞は, 注入移植後2日目から小さな細胞が出現し始めた。その後, 大小様々な陽性細胞の数が増えた。7日目には宿主筋とほぼ同サイズのdystrophin陽性細胞が出現していたが, 小さな陽性細胞も多数みられた。Glucose-6-phosphate isomeraseのisozyme法による判定で, C2細胞と宿主細胞とのハイブリッドは3日目には認められなかったが, 7日目には既に形成されていた。

サイズの小さいdystrophin陽性細胞がまず出現し, その数が増加し, やがて大きな陽性細胞が認められるようになるという経過から, 陽性細胞の多くはC2細胞同志の融合により形成された筋線維と考えられた。また注入移植によって宿主の筋線維が障害を受け, それによって活性化された筋衛星細胞とC2細胞とが融合した新しい筋線維も形成されたと思われる。



前脛骨筋の抗dystrophin抗血清による間接免疫蛍光染色像。注入移植後2週間目。A: C2細胞を注入移植した右肢 B: PBSを注入した左肢

mdxヌードマウスの繁殖にご協力いただきました松崎哲也室長に感謝いたします。

11. 代謝研究部

1. 研究部一年の歩み

代謝研究部では本年度も神経系の正常な発達を支えている物質的基盤，特にニューロン・グリア相関，および神経栄養因子について神経化学的或いは分子生物学的な研究を進めてきた。平成4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（～4. 11. 30）京都工芸繊維大学へ転出

〔流動研究員〕今井嘉紀（～4. 9. 30），広瀬雄一（4.10. 1～）

〔センター研究員〕大澤圭子，竹本なぎさ，平井ふさこ

〔外来研究員〕下条雅人，及川善博（4. 4. 1～），保坂義隆（～4. 5. 31）

〔研究生〕浜之上誠（～5. 3. 31），服部達哉，石川理恵子，井幡 巖

永田晃一（～5. 3. 31），広瀬雄一（～4. 9. 30），飯島 昇（4. 4. 1～）

〔併任研究員〕島田章則（4. 5. 1～5. 2. 28），片岡泰文（4. 12. 1～）

今井嘉紀（4. 10. 1～）科学技術庁特別研究員

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

我々はニューロングリア相関の分子機構を解明する研究の一つとして，ミクログリア由来の神経栄養因子の検索を行ってきた。この過程で各種のプロテアーゼが培養ミクログリアより合成分泌されていることを見だし，これまでにエラスターゼ，プラスミノーゲンアクチベーター，およびプラスミノーゲンを同定してきた。これらプロテアーゼのニューロンに対する効果を検討してみると，プラスミノーゲンが神経突起の伸展，ニューロンの生存維持，ドーパミンの取り込み促進などの様々な神経栄養効果を有することが明らかとなった。ヨード化プラスミノーゲンをを用い，培養ニューロンへの特異的結合を調べてみると，高親和性および低親和性の特異的結合様式が観察された。更にこの特異的結合は，各種培養細胞の中でもニューロンで圧倒的に高いものであることが明らかになった。これらのことはプラスミノーゲンの神経栄養作用がニューロンの膜上にあるレセプター様蛋白を介している可能性を示唆するものである。

2) アネキシンVの神経栄養効果と発現調節機構の解析

牛脳抽出液によりニューロンの生存を維持する因子の精製を試みていたが，この一つがカルシウム結

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は培養ニューロンに対し、用量依存的に生存を維持すると共に、グルタミン酸により誘発される細胞死を防御する作用も示した。アネキシンVは培養ニューロンに特異的な様式で結合し、更に細胞内への移行も観察された。現在、この作用メカニズムにつき検討を進めている。

一方、アネキシンVは脳内でグリア細胞には存在するが、ニューロンには認められない。このニューロンでの特異的な発現抑制機構を解明するため、ラットアネキシンVのゲノムDNAの解析を進めている。現在までのところ、アネキシンV遺伝子は全長約40kbpにもおよび13のエクソンを有し、そのプロモーターは4つのGCbox様の配列を含む一方、TATAbox, CAATboxを欠き、いわゆる house keeping gene 様の構造をとることが明らかとなっている。

3) IL-2の神経栄養効果に関する研究

近年、IL-3やIL-6などのサイトカインが中枢神経系のニューロンに対し、神経栄養因子として機能することが報告されている。当研究部ではIL-2の中枢ニューロンに対する作用を検討した。IL-2は培養ニューロンに対し、用量依存的に生存を維持した。またIL-2受容体(α)の存在をノザンプロットにて解析してきた結果、培養ニューロンで強く発現していることが示され、更に発育を追ったin vivoでの検索では生後の脳で著明に増加することが明らかとなった。これらの結果はIL-2も脳内で神経栄養因子として機能していることを強く示唆するものである。

4) アミロイド前駆体蛋白(A β PP)の生理機能に関する研究

アルツハイマー病脳内に沈着する β アミロイドの前駆体蛋白は、病因との関わりで注目されている。当研究部ではA β PPの正常な生理機能に着目し、研究を進めている。A β PPは現在主要なものとしては3種類のアイソフォーム(695, 751, 770)が知られているが、ニューロンでは主に695が発現している。我々はこの特異的なアイソフォームの発現がニューロングリア相関により調節され得るかを検討するためニューロblastomaであるSY-5Y細胞を用い、アストログリアおよびミクログリアの培養上清の効果を検討した。通常のSY-5Y細胞ではニューロン同様695のアイソフォームが多く発現しているが、グリア細胞の培養上清を添加した場合、770アイソフォームが増加してくることが明らかとなった。このことはニューロンにおけるA β PPの転写様式が周囲のグリア細胞により影響を受けることを示すもので、A β PPの生理機能を考える上で極めて興味深い。

(部長 高坂新一)

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Nakajima K, Tsuzaki N, Shimojo M, Hamanoue M, Kohsaka S :
Microglia isolated from rat brain secrete a urokinase-type plasminogen activator
Brain Res 577 : 285–292, 1992
- 2) Hosaka Y, Kitamoto A, Shimojo M, Nakajima K, Handa H, Kohsaka S :
Generation of microglial cell lines by transfection with simian virus 40 Large T gene
Neurosci Lett 141 : 139–142, 1992
- 3) Nakajima K, Tsuzaki N, Nagata K, Takemoto N, Kohsaka S :
Production and secretion of plasminogen in cultured rat brain microglia
FEBS Lett 308 : 179–182, 1992
- 4) Uchida K, Tsuzaki N, Nagatsu T, Kohsaka S :
Tetrahydrobiopterin-dependent functional recovery in 6-hydroxy-dopamine-treated rats by
intracerebral grafting of fibroblasts transfected with tyrosine hydroxylase cDNA
Dev Neurosci 14 : 173–180, 1992
- 5) Nakajima K, Takemoto N, Kohsaka S :
Retinoic acid enhances the secretion of plasminogen from cultured rat microglia
FEBS Lett 314 : 167–170, 1992
- 6) Nagata K, Takei N, Nakajima K, Saito H, Kohsaka S :
Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic
neurons from embryonic rat brain
J Neurosci Res 34 : 357–363, 1993

b. 著書

- 1) 下条雅人, 高坂新一 :
神経栄養因子と治療への応用
一億人の化学10「脳の働きを科学する」(日本化学会編), 大日本図書, 東京,
pp. 167–179, 1992
- 2) 内田耕一, 高坂新一 :
遺伝子工学の治療への応用—脳内移植を中心として

生物学的精神医学Vol. 2 「神経疾患の分子遺伝学」(日本生物学的精神医学会 加藤進昌, 高橋清久編), 学会出版センター, 東京, pp. 161-171, 1992

3) Takei N, Hattori T, Nagata K, Ohsawa K, Kohsaka S :

Neuronal survival promoting activity of neuron specific enolase

In : Taniguchi Symposia on Brain Sciences No.15

Neurotrophic Factors. (Y. Tsukada and E. Shooter eds) Japan Scientific

Societies press, CRC press, Tokyo JAPAN, pp. 161-172, 1992

4) 中嶋一行, 高坂新一 :

オリゴデンドロサイトの分離と培養

動物培養細胞マニュアル(瀬野悍二, 小山秀機, 黒木登志夫編), 共立出版, 東京

pp. 321-322, 1993

5) 中嶋一行, 高坂新一 :

ミクログリアの分離と培養

動物培養細胞マニュアル(瀬野悍二, 小山秀機, 黒木登志夫編), 共立出版, 東京

pp. 322-323, 1993

6) Nakajima K, Kohsaka S :

Characterization of brain microglia and the biological significance in the central nervous system

In : Advances in Neurology No. 60 (H. Narabayashi, T. Nagatsu, N. Yanagisawa, and

Y. Mizuno eds) Raven Press, Ltd., New York pp. 734-743, 1993

c. 総説

1) 高坂新一, 中嶋一行, 永田晃一, 森俊夫, 武井延之 :

別の生理機能を持つタンパク質による新しい神経栄養因子作用

Dementia 6 : 243-249, 1992

2) 高坂新一 :

成長因子-神経細胞の発育維持に関する諸因子-

ブレインサイエンス 3 : 175-185, 1992

3) 中嶋一行, 高坂新一 :

ミクログリアの分泌性プロテアーゼ

神経研究の進歩 36 : 697-708, 1992

II 研究業績

4) 中嶋一行, 高坂新一 :

ミクログリアの分泌性生理活性物質とその作用
脳と精神の医学 3 : 393-399, 1992

5) 中嶋一行, 高坂新一 :

ミクログリアの分化と機能
Dementia 6 : 332-341, 1992

d. 班会議報告書

1) 高坂新一 :

ニューロトロフィックファクター等の分離技術及び機能の解析技術の開発
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年度研究報告書, 2-6, 1992

2) 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3年度研究報告書, 54-68, 1992

3) 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3年度研究報告書, 317-326, 1992

4) 高坂新一, 武井延之, 今井嘉紀, 大澤圭子 :

アネキシンV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ならびに臨床的研究班,
平成4年度研究成果報告書 17-22, 1993

5) 高坂新一, 中嶋一行, 永田晃一, 竹本なぎさ :

ミクログリア由来プラスミノーゲンの神経栄養活性
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4年度研究成果報告書 48-53 1993

e. その他

1) 高坂新一 :

座談会「神経移植の新しい動向」

Clinical Neuroscience 10, 1052-1066, 1992

B. 学会発表

a. 特別講演・シンポジウム

1) 高坂新一 :

老化と神経栄養因子

第1回昭和医学シンポジウム 老化研究のストラテジー

東京, 7.11, 1992

2) 高坂新一 :

神経回路形成とその発達

医薬品副作用被害救済・研究振興基金 研究支援事業第11回研究開発動向セミナー

“高次機能研究のストラテジー「基礎と臨床」” 東京, 9.18, 1992

3) 高坂新一, 中嶋一行, 武井延之, 今井嘉紀, 永田晃一, 大澤圭子, 飯島 昇, 森 俊夫 :

グリア細胞由来多機能蛋白による神経栄養効果

第65回日本生化学会大会シンポジウム 神経細胞死研究の新しい展開

福岡, 10.9, 1992

4) 高坂新一 :

ニューロトロフィックファクター等の分離技術および機能の解析技術の開発

平成4年度ヒューマンサイエンス「官民共同プロジェクト研究成果シンポジウム」,

東京, 1.29, 1993

b. 国際学会

1) Nagata K, Nakajima K, Takei N, Kohsaka S :

Binding characteristics of rat plasminogen to cultured neuron.

The 1st APSN Meeting, Nagoya, 10.23, 1992

c. 一般学会

1) 保坂義隆, 下条雅人, 中嶋一行, 高坂新一 :

S V40 large T 遺伝子によるラット脳由来ミクログリアの cell line 化

第69回日本生理学会大会, 秋田, 4.2, 1992

2) 武井延之, 大澤圭子, 中尾裕史, 高坂新一 :

アネキシンVのニューロンに対する神経栄養効果

II 研究業績

- 第65回日本生化学会大会, 福岡, 10.10, 1992
- 3) 中嶋一行, 永田晃一, 竹本なぎさ, 高坂新一 :
ミクログリア分泌性プラスミノーゲンとその作用
第65回日本生化学会大会, 福岡, 10.11, 1992
- 4) 今井嘉紀, 武井延之, 高坂新一 :
中枢神経系におけるアネキシンVの発現調節
第65回日本生化学会大会, 福岡, 10.10, 1992
- 5) 矢崎まどか, 田川一彦, 丸山 敬, 中嶋一行, 石浦章一, 土屋隆英, 高坂新一, 鈴木絃一 :
アミロイド前駆体及び分解酵素のラット神経細胞内局在
第65回日本生化学会大会, 福岡, 10.11, 1992
- 6) 飯島 昇, 吉村倫彰, 宮本 豊, 森 俊夫, 高坂新一 :
 $\alpha 2$ -マクログロブリンのニューロンへの特異的結合
第65回日本生化学会大会, 福岡, 10.11, 1992
- 7) 武井延之, 大澤圭子, 中尾裕史, 今井嘉紀, 高坂新一 :
アネキシンVの神経栄養作用と神経保護作用
第35回日本神経化学会大会, 名古屋, 10.21, 1992
- 8) 中嶋一行, 永田晃一, 浜之上誠, 竹本なぎさ, 高坂新一 :
ミクログリア産生プラスミノーゲンの作用-ニューロン上のプラスミノーゲン結合蛋白の検出-
第35回日本神経化学会大会, 名古屋, 10.21, 1992
- 9) 服部達哉, 武井延之, 大澤圭子, 加藤兼房, 高坂新一 :
神経栄養因子としてのニューロン特異的エノラーゼの作用
第16回日本神経科学学会, 大阪, 12. 8, 1992
- 10) 浜之上誠, 中嶋一行, 永田晃一, 高坂新一 :
神経細胞上のプラスミノーゲン結合蛋白について
第16回日本神経科学学会, 大阪, 12. 3, 1992
- 11) 広瀬雄一, 今井嘉紀, 中嶋一行, 戸谷重雄, 高坂新一 :
培養神経芽細胞腫におけるアミロイド前駆体蛋白 mRNA の発現様式
- グリア細胞 conditioned medium の影響 -
第7回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会, 名古屋, 12.12, 1992
- 12) 永田晃一, 武井延之, 中嶋一行, 高坂新一 :

プラスミノーゲンのラット胎児培養神経細胞に対する結合特性

第66回日本薬理学会総会，横浜，3.27, 1993

d. 班会議発表

1) 高坂新一，武井延之，今井嘉紀，大澤圭子：

アネキシンVの神経栄養効果

文部省重点領域研究「神経細胞死」・平成4年度班会議，東京，12.17, 1992

2) 高坂新一，中嶋一行，永田晃一，竹本なぎさ：

ミクログリア由来プラスミノーゲンの神経栄養効果

文部省重点領域研究「老年痴呆の分子機構」・平成4年度班会議，東京，12.21, 1992

3) 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の神経栄養活性

厚生省精神・神経疾患研究委託費「神経系機能修復に関する開発的研究」

平成4年度班会議，東京，1.9, 1993

4) 高坂新一，武井延之，大澤圭子，今井嘉紀：

アネキシンVの神経栄養効果

厚生省精神・神経疾患研究委託費「高次脳機能の発達とその障害に関する基礎的ならびに

臨床的研究」・平成4年度班会議，東京，1.16, 1993

5) 高坂新一，服部達哉，武井延之，大澤圭子：

ニューロン特異的エノラーゼの神経栄養効果の解析

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

「ニューロトロフィックファクター等の分離技術および機能の解析技術の開発」

平成4年度研究成果発表会，東京，1.22, 1993

3. 主な研究報告

ミクログリア分泌性プラスミノーゲンは神経栄養活性を表す

中嶋一行, 永田晃一, 浜之上誠, 島田章則, 竹本なぎさ, 高坂新一

ミクログリアは正常脳発達におけるニューロンの生存、生育或いは脳傷害時の修復、再生といった過程を調節している可能性が推定されてきた。実際我々はミクログリアの培養上清(Mic-CM)に神経栄養活性を認め、その本態の探索を行ってきたがその過程で培養ミクログリアがプロテアーゼを分泌することを明らかにした。昨年はウロキナーゼタイプのプラスミノーゲンアクチベーター(uPA)を分泌することを示した。本年度はミクログリアがuPAの基質であるプラスミノーゲン(PGn)も産生、分泌すること、そのPGnは神経栄養活性を示すこと、更にPGnのその作用はニューロンの特異的レセプターを介している可能性のあることを報告する。

<方法>

ミクログリアの分離およびMic-CMの調整は既報¹⁾の如く行った。PGnの検出はラットPGn抗体を使用したウェスタンブロットおよびPGn抗体とプロテイン-Aガロースを使用した免疫沈降法²⁾により行った。ニューロンの突起伸長活性⁴⁾は胎生16日のラット大脳皮質の組織片を無血清下に培養し、またドーパミンの取り込み活性³⁾は同時期中の脳ニューロンを用いて測定した。¹²⁵I-PGnはクロラミンT法により調製し、培養ニューロンに対する結合実験^{4,5)}に使用した。

<結果および考察>

ミクログリアの培養上清を回収しラットPGn抗体を使用したウェスタンブロットを行うと分子

量約90kDaにPGnが検出された。この分泌性PGnは³⁵S-メチオニンの取り込みと免疫沈降による結果(図1)からミクログリアで生合成されたものであることが確認された。分泌性PGnはLPSおよびレチノイン酸による刺激で倍増した。次にこのミクログリア由来PGnのニューロンへの作用を想定して培養ニューロンに対する効果を検討した。ラット大脳皮質の組織片培養を行い、神経突起の伸長に対するPGnの効果を調べると、PGnの添加により突起の伸長が促進されることがわかった。またラット中脳ニューロンのドーパミン取り込み活性に対するPGnの影響を調べると、濃度依存性に取り込みを促進した(図2)。以上の結果からPGnはニューロンの成熟や活動に効果を示すことが明らかとなった。これらPGnの神経栄養作用はニューロン細胞表面上のレセプターを介している可能性が示唆されたため、¹²⁵I-PGnの結合性を検討した。¹²⁵I-PGnの両ニューロンへの結合は過剰のPGn添加により抑制される特異的なものであった(図3)。現在このPGn結合タンパクをPGn特異的レセプターの候補に上げ、精製、同定を試みている。

<文献>

- 1) Nakajima et al. Brain Res. 577, 285-292, 1992;
- 2) Nakajima et al. FEBS Lett. 308, 179-182, 1992;
- 3) Nagata et al. J. Neurosci. Res. 34, 357-363, 1993;
- 4) Nagata et al. Int. J. Dev. Neurosci. in press;
- 5) Nagata et al. Dev. Brain Res. in press

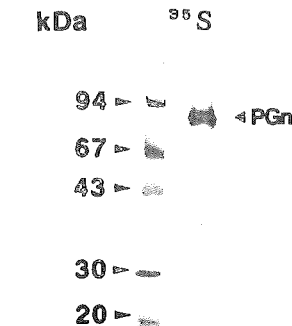


図1. PGnの免疫沈降

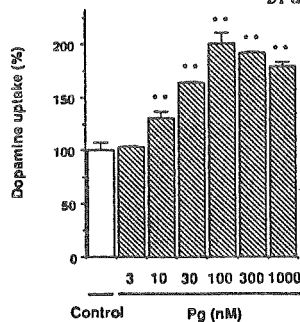


図2. PGnのドーパミン取り込み活性の促進

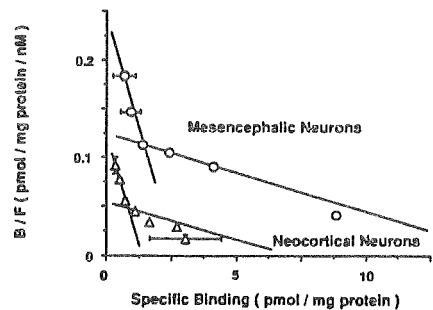


図3. PGnのニューロンへの結合性

アネキシンVの神経栄養作用と神経保護作用

武井延之, 大澤圭子, 今井嘉紀, 高坂新一

アネキシンVは一群のカルシウム・リン脂質結合蛋白質のファミリーのメンバーであるが、その生理的作用については不明であった。アネキシンVは中枢神経系を含む多くの臓器、組織に広く分布しているが、脳内ではアストロサイトおよびミクログリアでは発現している一方、神経細胞には存在しないことが明らかとなった。そこで、アネキシンVを神経細胞培養系に添加し、生存維持作用を調べた。さらに、グルタミン酸の神経毒性に対する保護作用も併せて検討した。

<方法>

神経細胞生存維持効果：E17ラット胎仔大脳皮質神経細胞を 5×10^4 個/cm²で播種し、2日間培養後アネキシンVを添加し、さらに3日後生存細胞数を計測した。

グルタミン酸の神経毒性に対する保護効果：大脳皮質神経細胞を 10^5 個/cm²で播種し、培養7日後1mMグルタミン酸およびアネキシンVを添加し、さらに24時間後細胞数を計測した。

アネキシンVの神経細胞への結合：大脳皮質神経細胞を 5×10^5 個/cm²で播種し24時間培養した後、¹²⁵I標識アネキシンVと氷上で90分インキュベートし、結合した放射活性を測定した。

<結果と考察>

初代培養大脳皮質神経細胞に対するアネキシンVの作用を調べた。培地中へ1-100ng/mlのアネキシンVを添加すると、用量依存的に生存細胞数が増加した(図1)。培地中に抗アネキシン抗体を同時に添加すると、この生存維持効果は抑制された。

次に大脳皮質神経細胞へのグルタミン酸の毒性に対するアネキシンVの保護効果を調べた。アネキシンV非存在下では、神経細胞を1mMグルタミン酸に24時間暴露することにより、生存細胞数はグルタミン酸非添加時の約50%へ減少した。一方、100ng/mlのアネキシンV存在下では、生存細胞数は約80%にまで回復した。また、培地中へアネキシンVを添加し、6時間後にアネキシンVを除き、それからグルタミン酸を加えた場合にも同様の保護効果がみられた。

次にアネキシンVの神経細胞に対する結合を調べた。スキッチャード解析の結果Kd値がおよそ10nMに相当する特異的結合が細胞あたり約 10^6 サイト認められた(図2)。さらに、アネキ

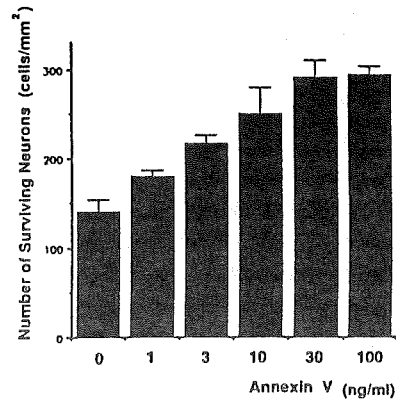


図1 アネキシンVの大脳皮質神経細胞の生存維持効果

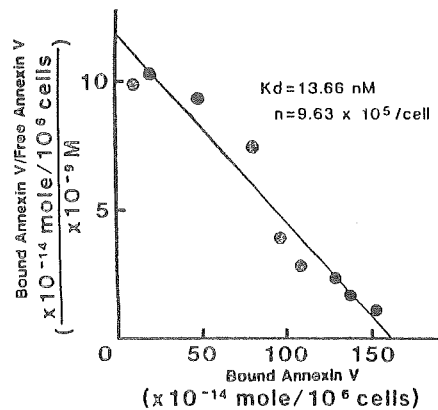


図2 アネキシンVの神経細胞への特異的結合

シンVが細胞内に取り込まれることも解かった。以上の結果より、アネキシンVが脳内でグリア細胞により産生され、神経細胞に特異的に結合する、神経栄養効果をもつ蛋白質であることが示された。さらに、アネキシンVがグルタミン酸の神経毒性に対する保護効果を持つことが解かった。これらの事実はアネキシンVが新しいタイプの神経栄養因子のひとつである、ということを示唆する。アネキシンVの中枢神経系での実際の生理機能の解明にはさらなる研究が必要である。

Interleukin-2の神経栄養効果

下条雅人, 今井嘉紀, 中嶋一行, 高坂新一

神経細胞の分化、成熟、生存維持、および再生過程において、ニューロトロフィック因子(NTF)が極めて重要な役割をはたしていることが明らかにされつつある。最近、新規のNTFとしていわゆるneurotrophin familyに属するタンパク質などが単離同定され、盛んに研究が進められているが、その一方でIL-3やIL-6など、既知のサイトカインの中にも中枢ニューロンに対するNTFとしての作用が明らかにされているものが見られる。今回我々は、胎生期ラット大脳皮質ニューロンに対するIL-2の作用を検討した。

<方法>

胎生17日齢ラットの大脳皮質を摘出し、トリプシン消化により細胞を分散し、1% FBS-DMEM/F12に懸濁し、1 cm²あたり5x10⁴子播種した。培養1日後にIL-2を含む新しい培地に公刊し、更に1日培養し、1%グルタルアルデヒドで固定後、顕微鏡観察下に生存ニューロンの計数を行った。

また、各種細胞および組織よりトータルRNAを抽出し、IL-2レセプター α サブユニットに対するプローブを用い、ノザンプロットを行った。

<結果・考察>

マウス、ラット、およびヒト由来のIL-2を用い検討したところFig.1に示すように、何れのIL-2も要領に依存し顕著な生存維持効果を示し、充分量加えるとほぼ100%のニューロンの生存を維持した。マウス、およびラットIL-2はほぼ同等の効力を示したが、ヒトIL-2は効果を示すものの、マウス等より約6倍弱い効力であった。更にこのIL-2作用は中和抗体で完全に吸収された。

ノザンプロットでIL-2レセプターの発現を検討したところ、培養ミクログリア、アストログリア、およびニューロン何れにお

いても発現が認められ、特にニューロンで強く発現していた。従って今回見いだしたIL-2の神経栄養効果は主にニューロンに直接作用していることによると考えられた。また、ラット全脳でのIL-2レセプターmRNAの発現を経時的に検討したところ、胎生期初期における発現は少ないが、発生段階が進むにつれその発現は増し、生後3日でほぼプラトーに達し、以後強く発現し続けることがわかった。

以上、脳におけるIL-2の由来等、幾つかの検討課題が残されているが、中枢ニューロンに対するNTFとしてのIL-2の生理的な役割が示唆された。

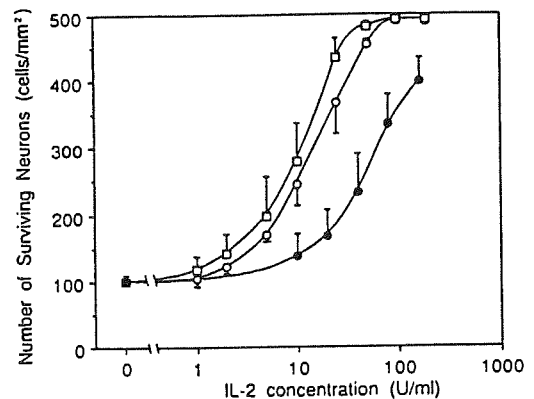


Fig. 1. Dose-response curves for neurotrophic effects of mouse (open squares), rat (open circles) and human IL-2 (closed circles). The value for the control culture is presented as a closed square. Each value is the mean \pm S.E. from three independent experiments. One biological unit of IL-2 was defined as the amount of IL-2 required to support half-maximal stimulation in mouse CTLL cells, which was established as an interim standard by the National Institutes of Health (USA).

<参考文献>

Shimojo et al., Interleukin-2 enhances the viability of primary cultured rat neocortical neurons. *Neurosci. Lett.* 151 (1993) 170-173

培養神経芽細胞腫における APP mRNA の発現様式 — グリア細胞 conditioned medium の影響 —

広瀬雄一, 今井嘉紀, 中嶋一行, 高坂新一

【目的】 Amyloid Precursor Protein (APP) は、アルツハイマー病脳にみられる β -amyloid の前駆体であり、同病の pathogenesis との関与についての研究が多い。一方、APP には、主に 3 種の isoform (APP695, 751, 770) があり、alternative splicing により、その構成比が規定されるが、細胞の種類、あるいは分化度により、その pattern は異なるとされている。我々は、培養ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y の培地中に、胎仔ラット脳由来アストログリア、あるいはミクログリアの conditioned medium を加えた際の、APP mRNA 発現、およびその splicing pattern の変化について検討した。

【方法】 胎仔ラット脳由来アストログリアおよびミクログリアを分離し、血清無添加 DMEM で 24 時間培養して得られた培養上清を、それぞれの conditioned medium とした。これと、10% FCS-DMEM とを、1:1 で混和したものを培地として、SH-SY5Y 細胞を 3 日間培養し、細胞質分画から RNA を調整した。この RNA を用いて、APP695cDNA より作製した probe により、Northern blotting を行った。また、alternative splicing の検討に関しては、前述の RNA より、reverse transcriptase により cDNA を作製し、KPI 領域の 5' 側と 3' 側にプライマーを設定して、PCR を行い、増幅された DNA の電気泳動パターンの変化を調べた。各実験の対照としては、5% FCS-DMEM で培養した SH-SY5Y を用いた。

【結果】 SH-SY5Y 細胞は、その培養条件によって、形態的、あるいは生化学的特徴が変化し得る細胞であるが、アストログリア、ミクログリアの conditioned medium を加えて培養した場合には、基本的な形態には明かな変化がみられなかった。APP695cDNA より作製した、3 種の isoform をすべて認識する probe を用いて行った Northern blotting では、各グリア細胞の conditioned medium を加えて培養した SH-SY5Y において、APP mRNA の増加がみられた。さらに、以上の各培養条件下での、

APP の各 isoform の変化を PCR により検討してみると、アストログリア、あるいはミクログリアの conditioned medium を加えて培養した SH-SY5Y では、KPI 領域をもつ APP、特に APP770 の占める割合が増加していることが明らかとなった。

【考察】 脳内では、APP はニューロン由来のものが多いとされている、各種病態下においては、その発現がグリア細胞により影響をうけることも考えられる。我々は、培養ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y の培地中に、胎仔ラット脳由来アストログリア、あるいはミクログリアの conditioned medium を加えた際の、APP mRNA 発現、およびその splicing pattern の変化について検討したが、対照群と比べて、明かな差が認められた。これまで、神経系培養細胞には、その培養条件によって、APP mRNA の splicing pattern に変化が認められることが報告されており^{1, 2)}、また虚血大脳皮質において、KPI 領域を持つ APP の mRNA が誘導されるとの報告もある³⁾。一方、病理組織学的研究により、アルツハイマー病の病態形成の上では、グリア細胞が深く関与することが示唆されている⁴⁾が、今回の我々の検討により、in vitro において、グリア細胞が、APP 転写様式に影響を及ぼすことが示された。この、ニューロン・グリア相互作用は、まだ不明な点の多い、APP の生理的作用や、アルツハイマー病でのアミロイド沈着機構を解明する上で、重要な意味を持つものと考えられる。

文献

- 1) König et al. FEBS lett., 269, 305-310, (1990)
- 2) Smith et al. Mol. Brain Res., 10, 351-354, (1991)
- 3) Abe et al. Neurosci. lett., 125, 172-174, (1991)
- 4) Shigematsu et al. J. Neurosci. Res., 31, 443-453 (1992)

12. 免疫研究部

1. 研究部一年のあゆみ

免疫研究部では、平成2年4月以来免疫生物学を基礎とした研究を展開してきた。平成4年度に研究に参加したのは、松田義宏（室長）、竹内 保（研究員）、松浦 靖（流動研究員）、田村浩男（流動研究員）、葛原博幸（流動研究員）であり、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を開始した。松浦 靖は、平成5年3月をもって流動研究員を辞し、アメリカ合衆国アラバマ州、アラバマ大学バーミンガム校医学部の John F. Kearney 教授のもとへ、自己免疫疾患発症の分子機構を研究するため留学した。WHO留学生、Tofazzal Hossain（バングラデッシュ）が免疫学の研修を行った。客員研究員として、矢倉英隆（東京都神経科学総合研究所）、古川昭栄（岐阜薬科大学）、原 栄一（埼玉県がんセンター）、石川博通（慶應義塾大学）を迎え、共同研究を含めた積極的な研究交流を行った。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進めている。本年度はいくつかの新しい知見があった。B細胞が産生する抗原が、B細胞自身によってT細胞に抗原提示されることを明らかにした。また、マウス未熟胸腺細胞が胸腺上皮細胞株と相互作用を起こして増殖することを報告してきたが、この相互作用を阻止する、胸腺上皮細胞表面抗原に向かったモノクロナル抗体の作成に成功した。このモノクロナル抗体は、未熟胸腺細胞の分化を完全に抑制することも明らかになった。胸腺上皮細胞株が抗原提示能を持っていることも分かり、神経系や免疫系の蛋白質を外来性に胸腺上皮細胞に発現させて、人為的な中枢性（胸腺性）免疫制御法の確立をめざしている。

本年度は研究部新体制発足後3年目に当たり、新しいプロジェクトも徐々に成果が蓄積されはじめた。平成5年度には新しいメンバーも増える予定であり、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) Takahashi S, Matsuura Y, Taniguchi T, Tamura H, Bitoh S, Onishi S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Fujimoto S :
Molecular analysis of immunoglobulin heavy chain genes coding for idiotypic and anti-idiotypic antibodies involved in B-B cellular interaction
Microbiol Immunol, 36 : 855-963, 1992
- 2) Takeuchi T, Kuzuhara H, Tamura H, Hiramane C, Hojo K, Yamamoto H :
A 60-kDa thymic epithelial cell surface protein as a potent molecule mediating the cellular interaction with immature T cells
Cell Immunol, 146 : 324-334, 1993
- 3) Matsuura Y, Yamamoto H :
Establishment of immunoglobulin gene transfected B cell lines
J Cell Biochem, 17B : 212, 1993

c. 総説

- 1) 山元 弘 :
イディオタオプ-抗イディオタイプ
Medicina, 29 : 2028-2029, 1992
- 2) 松浦 靖, 大西三朗 :
免疫抗体の構造と働き
Medicina, 29 : 1982-1984, 1992

d. 班会議報告書

- 1) 山元 弘 :
免疫系細胞間相互作用を支配する分子機能の修飾による抗腫瘍免疫応答の増強
平成3年度厚生省対がん10カ年総合戦略プロジェクト研究報告書 186-189, 1992
- 2) 松浦 靖, 山元 弘 :
マウス自己反応性B細胞クロンの抗体遺伝子解析
平成3年度厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班報告書 27-30, 1992

II 研究業績

B. 学会発表

b. シンポジウム

1) Yamamoto H, Matsuura Y :

Establishment of immunoglobulin gene transfected B cell lines and detection of idiotype-specific T lymphocytes.

Molecular Aspects of B Lymphocyte Differentiation.

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Taos, NM, 2. 2, 1993

c. 一般学会, その他

1) 葛原博幸, 竹内 保, 田村浩男, 松浦 靖, 松田義宏, 山元 弘 :

未熟胸腺細胞特異的抗原のT細胞分化における役割

第22回日本免疫学会総会, 名古屋, 11. 25, 1992

2) 竹内 保, 葛原博幸, 田村浩男, 平峯千春, 北条憲二, 山元 弘 :

胸腺ストローマ細胞-T細胞間相互作用に関するストローマ細胞側分子の解析

第22回日本免疫学会総会, 名古屋, 11. 26, 1992

3) 葛原博幸, 竹内 保, 山元 弘 :

胸腺上皮細胞株を用いたT細胞初期分化の解析

第2回 Kyoto T Cell Conference, 京都, 10. 2, 1992

4) Takeuchi T :

Thymic epithelial cells for T cell development

5 th International Workshop of WACIID, 1993, Chiba, 1. 24, 1993

5) Matsuura Y :

Establishment of immunoglobulin gene transfected B cell lines

5 th International Workshop of WACIID, 1993, Chiba, 1. 24, 1993

6) Kuzuhara H :

Analysis of early T cell differentiation with thymic epithelial cell clone

5 th International Workshop of WACIID, 1993, Chiba, 1. 24, 1993

C. 班会議発表

- 1) 山元 弘, 松田義宏, 松浦 靖, 藤田信也, 佐藤修三 :

Myelin associated glycoprotein (MAG) の動物培養細胞での発現

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班会議, 東京, 1.20, 1993

- 2) 山元 弘 :

免疫系細胞間相互作用を支配する分子機能の修飾による抗腫瘍免疫応答の増強

厚生省対がん10カ年総合戦略プロジェクト研究班会議, 東京, 2.19, 1993

3. 主な研究報告

胸腺内T細胞初期分化に関与する分子群の解析

竹内 保, 葛原博幸, 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、様々な胸腺内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、かつ単一の機能を有しているかどうかなどはほとんど未解明のまま残されている。胸腺内では、自己反応性T細胞が消去される(negative selection)が、この選択過程にどのような細胞群が係わっているのかを明らかにすることは、自己免疫性疾患の原因を解析する上できわめて重要である。当研究部では、胸腺間質細胞に依存して増殖するT細胞株(N-9F)を樹立し、この増殖を支持する胸腺上皮細胞株(SL10.3)を得ることに成功した。また、N-9Fや未熟胸腺細胞に特異的で、未熟胸腺細胞の増殖を阻止するモノクロナル抗体を得た(論文投稿中)。一方、SL10.3を免疫して得たモノクロナル抗体が、未熟胸腺細胞の増殖を阻止することも明らかにした(1993)。SL10.3特異的モノクロナル抗体の1つ、HS9.5は、きわだった特徴を示すことから、この抗体の作用・認識分子の解析をさらに進めた。

[結果]

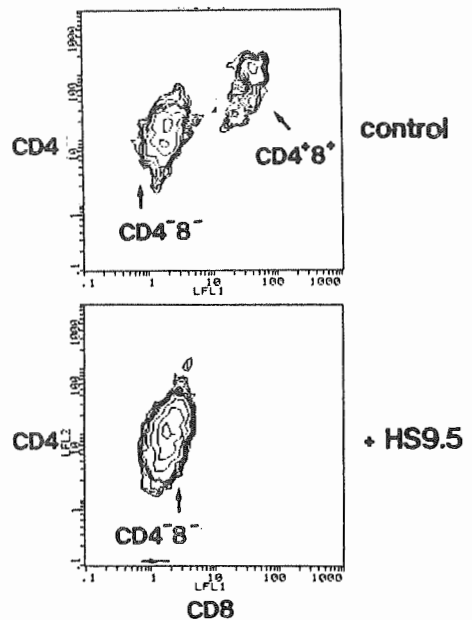
1. BALB/c マウス由来胸腺上皮細胞株 SL10.3 をアルメニアンハムスターに免疫して常法どおりに細胞融合し、SL10.3 上での N-9F T細胞クローンの増殖抑制活性を指標にモノクロナル抗体をスクリーニングした。
2. 抑制活性を示したモノクロナル抗体 HS9.5 は、胸腺皮質外側の上皮細胞に反応性を示した。
3. HS9.5 は、SL10.3 上の約 50kD の分子を認識していることが判った。
4. deoxyguanosine 処理してリンパ系細胞を除去した胎児胸腺を、胎児肝細胞(リンパ系幹細胞を含む)にて再構築する際 HS9.5 を共存させておくと、CD4⁺8⁺ のフェノタイプをもった未熟胸腺細胞の増生が完全に抑制された。

[考察]

胸腺内T細胞初期分化を解析するためには、選択を受ける以前の未熟細胞を用いる。これは CD4⁻8⁻ であるが、胎児胸腺より採取してもすでに次の分化段階に commit してしまっている細胞が多く含まれてしまう。従って初期分化を解析するには、CD4⁻8⁻ の胸腺内初期分化、即ち幹細胞(胎児肝細胞)から CD4⁺8⁺ への分化を in vitro で

再現できる系を樹立するのが望ましい。この分化過程はサイトカインだけでは維持されず、胸腺上皮細胞と未熟T細胞との直接接触が必須である。その際の細胞間相互作用に係わるリンパ球側、および胸腺上皮細胞側の分子群についてはほとんど解明されていない。この点で、deoxyguanosine 処理胸腺を用いた系で HS9.5 がT細胞分化を抑制したことは、HS9.5 が認識する分子がT細胞分化に重要な役割を果たしていることを示唆している。

本研究プロジェクトでは、胸腺内微小環境を構成する複数の細胞成分(及びそれらに由来する因子)を1つずつ単離し、かつ細胞間相互作用分子を同定してゆくことによって、T細胞分化の機序を明らかにすること、並びに、これら細胞を用いて中枢性免疫寛容・応答を人為的に操作することを目的としている。この手法は自己免疫性疾患の治療法の開発や抗原特異的免疫制御法の開発に役立つものと考えている。現在 50kD 分子の cDNA クローニングとシーケンス解析を行っている。



HS9.5 存在下で胎児胸腺の再構築を行うと、CD4⁺8⁺ 細胞が出現してこない。

イディオタイプ発現B細胞株の樹立とイディオタイプ特異的T細胞の応答

松浦 靖, 山元 弘

B細胞は細胞表面に抗原受容体としての抗体分子を有すると共に、主要組織適合性抗原クラスII分子を発現している。外来性・内因性抗原は、特異的な受容体を介してB細胞内に取り込まれ、ペプチド断片に消化される途中で、クラスII抗原にトラップされて細胞表面に抗原提示される。抗原特異的T細胞は、B細胞上のクラスII抗原プラス抗原ペプチドを認識し、特異的免疫応答を発揮する。一方、抗体分子のV領域にはイディオタイプ(I_dと略)と呼ばれる抗原決定基が存在する。I_dは抗I_d抗体によって認識され、これらI_d間の相互作用はB細胞レパートリー形成のみならず、T細胞レパートリー形成にも重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、B細胞の抗原提示能を、B細胞自身が産生する抗体のI_d決定基をモデルに解析した。

〔方法〕

1. MOPC104E I_d 発現B細胞株の樹立

BALB/c マウス MOPC104E ミエローマ細胞より抗体重鎖 rearrangend genomic 遺伝子を単離し、 μ 鎖定常部領域遺伝子と結合後、pSV2neo vector に挿入した。Electroporation 法にて B lymphoma 細胞株 A20.2J に transfect した。G418 選別により、transfectant (AME 株) を得た。抗体重鎖の発現は、northern blotting および免疫沈降法により確認した。一方対照細胞として、I_d は異なるが、MOPC104E 抗体重鎖の可変部領域と高い相同性を有する HB19 hybridoma の重鎖を発現するB細胞株 (AHB 株) を同様の方法により樹立した。

2. MOPC104E 蛋白反応性T細胞株の樹立

MOPC104E 蛋白 50 μ g を CFA と共に BALB/c マウスに免疫し、10日後に所属リンパ節細胞を得た。リンパ節細胞を *in vitro* にて MOPC104E 蛋白 50 μ g と X線照射脾細胞による刺激を2週間毎に繰り返す、3種のT細胞株 (MRT 株) を樹立した。

〔結果〕

1. Transfectant (AME, AHB 株) は、northern blotting 法にて導入遺伝子を発現していることを、また抗 μ 抗体を用いた免疫沈降法にて、蛋白分子の発現を確認した。 μ 鎖と同時に κ 鎖も抗 μ 抗体で沈降することから、parental 細胞(A20.2J)由来の κ 鎖が transfect した μ 鎖と会合していることが示唆された。

2. Flowcytometry 法にて、細胞表面にIgM分子を発現していること、また培養液中に <1 μ g/ml

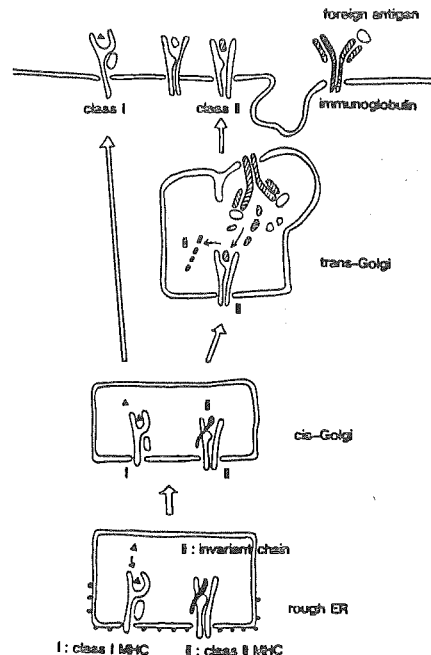
のIgMを分泌していることがわかった。

3. MOPC104E 反応性T細胞株(MRT)はいずれもCD4⁺8⁻のT細胞であった。そのうちの1つMRT-2はMOPC104E蛋白、およびJ558蛋白(MOPC104Eと交叉反応性I_dを有するミエローマ蛋白質)に対し特異的増殖を示した。

4. Transfectant を抗原提示細胞として用いると、AMEはMRT-2に対し強い増殖応答を誘起した。

5. AME株によるMRT-2T細胞の応答は、主要組織適合性抗原クラスIIに対する抗体、抗I-E抗体によって阻止された。抗I-A抗体は無効であった。

6. AME株(抗原提示細胞)を、メンブレンフィルターにてMRT-2(T細胞株)(+抗原提示細胞)と隔離して培養しても、MRT-2の増殖は認められなかった。このことは、一旦遊離された抗体分子は、抗原提示細胞によってre-uptakeされてから提示されるのではなく、AME株自身が産生する抗原を細胞内でクラスII分子にプロセスしていることを示唆する。



B細胞による自己・外来抗原提示の模式図

13. 遺伝子工学研究部

1. 研究部一年のあゆみ

研究所本館に移り、実際に実験をしながら実験室、R I室を使いやすいようにアレンジした。問題がおこるたびにルールを決めたり、試行錯誤したりしながらも、段々使いやすい研究室になってきているように思う。図書館やR I室、事務室が近く動物センターに仮住まいしていた時より便利になったが動物センターの一階で過ごしていたころを懐かしむ声もないではない。

4月より長寿科学振興財団のポストドクとして理研つくばセンターより中越君が加わりショウジョウバエの高次機能の研究を松崎室長と開始した。千葉大理学部4年の佐藤さんが藤沢室長のもとで転写制御を、東大理学部西郷研より曾根君が博士課程の仕事として行動異常変異体の原因遺伝子の解析を浜室長のもとで開始した。新潟大学脳研究所より平田君がどうしてもショウジョウバエの遺伝学がやりたいと参加を希望し、松崎室長の指導を受けることとなった。また、東大理学部堀田研のドクターを終えた後藤君が流動研究員として着任し、独自の理論と話題を提供している。当研究室でのテーマは pros 変異を中心とした神経発生の研究となった。2月からイギリスよりSTAフェローとしてカゼナリーさんが研究に加わった。文化の違う国での生活は大変とは思いますが楽しい日本滞在になることを祈っている。多くの優秀な研究者を迎え、今後の発展を期待しているところである。また、朝倉、星野の両君はめでたく博士号を取得した。流動研究員として3年間過ごした上条君が出身大学の信州大学医学部生化学教室の助手として赴任し、4月より8月まで研究生だった富岡さんは群馬大学医学部助手として転出した。

研究面では行動異常を手がかりに hikaru genki と名付けた全く新しいタイプの遺伝子を分離し、Neuron に発表し、トランスジェニックマウスの作成、Myogenin 遺伝子のジーンターゲティングに成功し、個体レベルの解析手段を確立できた年であった。

(部長 鍋島陽一)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Hoshino M, Matsuzaki F, Nabeshima Y, and Hama C :
hikaru genki, a CNS-specific gene identified by abnormal locomotion in *Drosophila*,
encodes a novel type of proteins.
Neuron 10 : 397–407, 1993
- 2) Fujisawa-Sehara A, Hanaoka K, Hayasaka M, Hiromasa-Yagami T, and Nabeshima Y :
Upstream region of the myogenin gene confers transcriptional activation in muscle cell
lineages during mouse embryogenesis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 191 : 351–356, 1993
- 3) Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y, Komoya T, Hiromasa-Yagami T, and Nabeshima Y :
Differential trans-activation of muscle-specific regulatory elements including the MLC
box by chicken MyoD, myogenin, and MRF4.
J. Biol. Chem. 267 : 10031–10038, 1992
- 4) Piette, J., Huchet M., Duclert, A., Fujisawa-Sehara A, and Changeux, J.-P.
Localization of mRNA coding for CMD 1, myogenin and the α -subunit of the acetylcholine
receptor during skeletal muscle development in chicken.
Mechanisms of Development, 37 : 95–106, 1992

b. 著書

- 1) Nabeshima Y, Uetsuki T, Komiya T, Nabeshima Y, Asakura A, Kamijo K, Yagami-
Hiromasa T, and Fujisawa-Sehara A.
Positive and Negative Gene Regulation in Muscle.
Molecular Biology of Muscle. ed. by Alicia EL Haj. 343–353, The Company of Biologists
Limited.
- 2) Nabeshima Y, Uetsuki T, Komijo T, Nabeshima T, Asakura A, Kamijo K, Yagami-
Hiromasa T, and Fujisawa-Sehara A.
Developmental Regulation of the Chicken Alkali Light-Chain Gene Expression.
NEUROMUSCULAR DEVELOPMENT AND DISEASE. ed. Alan M. Kelly & Helen M. Blau
145–155, 1992, Raben Press

II 研究業績

- 3) Nabeshima Y, Uetsuki T, Komiya T, Nabeshima Y, Asakura A, Kmijo K, Hosoda Y,
and Fujisawa-Sehara A.

Myosin alkali light chain (MLC) gene regulation during myogenesis.

Molecular Approaches to the study and treatment of human diseases. rd. Takato Yoshida
and James Wilson, 221-228, 1992. ELSEVIER

c. 総 説

- 1) 鍋島陽一, 朝倉 淳, 藤沢淳子

筋細胞における転写制御因子

実験医学 11 : 1020-1025, 1993

- 2) 朝倉 淳, 藤沢淳子, 鍋島陽一

筋分化の制御遺伝子群

実験医学 10 : 1646-1655, 1992

- 3) 鍋島陽一

筋細胞分化を制御する遺伝子

Annual Review 細胞生物学1992 192-201, 1992

- 4) 鍋島陽一

ショウジョウバエの神経発生学

BRAIN MEDICAL 4 333-340, 1992

- 5) 鍋島陽一

筋肉細胞への分化

科学 (岩波書店) 62 : 418-426, 1992

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4年度研究成果報告書 55-56, 1993

- 2) 鍋島陽一

筋分化制御因子 Myogenin の機能と発現

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4年度研究報告書 107-111, 1993

3) 鍋島陽一

協調運動の異常を示す突然変異体の分子遺伝学的解析

厚生省精神・神経疾患・遺伝子解析による神経疾患発現機構に関する研究班

平成4年度研究報告書 57-62, 1993

4) 鍋島陽一

協調運動の異常を示す突然変異体の分子遺伝学的解析

厚生省科研費 重点領域, ショウジョウバエを用いた遺伝子機能解析

平成4年度成果報告書 36-38, 1993

B. 学会, シンポジウム

a. シンポジウム

1) Nabeshima Y, Asakura A, Nabeshima Y, Yagami-Hiromasa T, Sato T, and Fujisawa-Sehara A.

Differential trans-activation of muscle-specific regulatory elements by myogenic factors.

EMBO Workshop "Molecular Biology and Pathology of Skeletal and Cardiac Myogenesis"
Italy, Sep. 28, 1992

2) Fujisawa-Sehara A, Hanaoka K, Hayasaka M, Hiromasa-Yagami T, and Nabeshima Y.

Cell lineages during mouse muscle embryogenesis.

Taniguchi Symposium on Developmental Biology IV, "Gene regulation in development",
Sapporo, Feb. 23, 1993

3) Nabeshima Y.

Gene Regulation in Muscle.

First IUBMB Conference on "Biochemistry of Disease" Nagoya, May 5, 1992

4) 松崎文雄, 鍋島陽一

ショウジョウバエ中枢神経系の形態形成を調節する prospero 遺伝子の解析

第16回細胞生物学シンポジウム, 東京, 5.16.1992

5) 鍋島陽一

筋発生の分子機構

日本生化学会関東支部シンポジウム 筋肉の発生と分化, 千葉, 5.23.1992

6) 鍋島陽一, 朝倉 淳, 上条桂樹, 鍋島曜子, 藤沢淳子

II 研究業績

筋細胞分化を制御する因子

日本発生生物学会シンポジウム, 横浜, 5.30.1992

7) 鍋島陽一

神経系突然変異から神経機能へ

第22回新潟神経学夏期セミナー, 新潟, 7.24.1992

8) 鍋島陽一

ショウジョウバエを用いた神経機能の遺伝子解析

第10回研究開発動向セミナー, 高次機能障害研究のストラテジー, 東京, 9.18.1992

9) 松崎文雄

ショウジョウバエ神経前駆細胞の分化

大阪大学蛋白研究所セミナー, 神経形成の制御 大阪, 9.28.1992

10) 松崎文雄

ショウジョウバエ中枢神経系の分化

第35回日本神経化学会グループディナーカンファレンス, 分化と遺伝子発現 名古屋,
10.20.1992

b. 国際学会

1) Asakura, A., Fujisawa-Sehara, A., Nabeshima, Y., Yagami, T., and Nabeshima, Y.

MyoD and myogenin act as a distinct transcription factors.

EMBO Workshop "Molecular Biology and Pathology of Skeletal and Cardiac Myogenesis"
Italy, Sep. 27, 1992

2) Kmijo, K., Yagami, T., Nabeshima, Y., and Fujisawa-Sehara, A.

Conditional expression system of myogenic regulatory factors.

EMBO Workshop "Molecular Biology and Pathology of Skeletal and Cardiac Myogenesis"
Italy, Sep. 27, 1992

3) Hoshino, M., Hama, C., Matsuzaki, F., and Nabeshima, Y.

hikaru genki, a CNS-specific gene identified by abnormal locomotion, encodes a novel type of proteins

34th annual Drosophila Research Conference, San Diego, March 31, 1993

4) Broadus, J. S., Matsuzaki, F., and Due, C. Q.

Characterization of prospero sequence and expression in Drosophila and Grasshopper.

34th annual Drosophila Research Conference, San Diego, March 31, 1993

c. 一般発表

- 1) 星野幹雄, 浜 千尋, 松崎文雄, 鍋島陽一
異常運動を示すショウジョウバエ突然変異体の分離と解析
第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 7. 1992
- 2) 上条桂樹, 鍋島陽一, 藤沢淳子
筋分化因子とステロイドホルモンレセプターとの融合蛋白質による骨格筋特異的遺伝子群の
発現調節
第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 10. 1992
- 3) 藤沢淳子, 花岡和則, 八神貴子, 鍋島陽一
マウス胚体節および肢芽における myogenin 遺伝子の発現誘導
第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 10. 1992
- 4) 朝倉 淳, 藤沢淳子, 佐藤智美, 横田 崇, 鍋島陽一
Myogenin 特異的エンハンサーの存在
第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 10. 1992

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班会議, 大阪, 9. 24. 1992
- 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, 9. 4. 1992
- 3) 浜 千尋, 星野幹雄, 松崎文雄, 鍋島陽一
協調運動の異常を示す突然変異体の分子遺伝学的解析
文部省重点領域, ショウジョウバエを用いた遺伝子機能解析, 研究班会議, 名古屋,
11. 12. 1992
- 4) 藤沢淳子
発生における Myogenin 遺伝子の発現制御機構の解析

II 研究業績

文部省がん特別研究 (1) がんの増殖と分化に関連する遺伝子の発現制御, 班会議, 大阪
12. 12. 1992

5) 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4年度班会議, 東京, 1. 27. 1993

6) 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. 2. 1992

7) 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
湯河原, 1. 13. 1993

8) 黒尾 誠, 鍋島陽一

個体において遺伝子機能を制御する技術の開発とその応用

H S財団プロジェクト第1回班会議, 東京, 1. 19. 1993

9) 浜 千尋, 鍋島陽一

遺伝学的手法を用いた神経系機能分子の解析

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子解析に
関する研究班

第2回班会議, 東京, 2. 4. 1993

10) 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4年度班会議, 東京, 2. 6. 1993

3. 主な研究報告

神経発生の遺伝学的制御

後藤 聡, 平田 丞, 中越英樹, 鍋島陽一, 松崎文雄

研究の目的

神経細胞は通常、分裂能を持つ前駆細胞から生まれ、発生過程を通じて驚くべき多様性を示すに至るが、同時に、神経細胞に共通な性質を獲得するプロセスも進行する。本研究はショウジョウバエをモデル実験系として、神経発生に共通な遺伝的制御を知ることをめざしている。

背景

ショウジョウバエの腹部神経節の場合、ほとんどの神経細胞は、神経芽細胞から神経母細胞が生まれ、もう一度分裂するという、共通の細胞分裂パターンから生じる。神経系の発生分化を制御する遺伝子の中で、神経系のこのような基本的な発生プロセスに関与するショウジョウバエの突然変異を検索し、我々は*prospero* 遺伝子を見出した。この遺伝子は次のような特徴を持つ。

- 1) *prospero* 遺伝子産物はホメオボックスを持つ核蛋白であり、染色体DNAに結合すると考えられる。
- 2) *prospero* 遺伝子の欠損は、胚発生時に、神経ネットワークの形成に著しいダメージを与え、致死となる。
- 3) *prospero* mRNAは神経芽細胞から強く発現するが、翻訳レベルの発現調節を受け、*prospero* 蛋白は神経系の二次前駆細胞だけで特異的に発現する。

しかも、*prospero* 蛋白の発現は中枢、末梢を問わず、ほとんど全ての神経系の細胞系譜で認められることから、神経発生のプロセスのなかでも、二次前駆細胞という特定の発生段階で共通に*prospero* 活性が必要であると考えられる。しかし、*prospero* 遺伝子産物は転写因子と予想されるだけで、二次前駆細胞で果たす役割に関しては殆ど判っていない。

結果と考察

ショウジョウバエ胚で*prospero* 蛋白の発現を詳しく調べると、核内に一様に存在するのではなく、斑点状に分布していることが観察される。このことから、*prospero* 蛋白が染色体上の限られた部位に結合して、機能することが予想された。

一方、ショウジョウバエの幼虫の唾腺染色体は、細胞分裂を伴わずにDNA複製が繰り返された巨大な多肢染色体であり、その縞模様の上に既知の遺伝子座の多くがマップされている。従って、*prospero* 蛋白を幼虫の唾腺で発現させたとき、胚での発現と同様の特異性を保ちつつ染色体に結合するならば、多肢染色体の縞模様の上で*prospero* 蛋白の結合している部位を特定することが出来る。即ち、*prospero* のターゲットを同定することが可能になる。

そこで、本来*prospero* を発現しない野性型幼虫の唾腺で、*prospero* 蛋白を強制的に発現させることを試みた。まず、ヒートショック遺伝子*hsp70*のプロモーターにつながれた*prospero* cDNAを持つ形質転換系統を作成した。この系統の3齢幼虫にヒートショックを与え、その後、唾腺を抗*prospero*抗体で染色したところ、*prospero* 蛋白の発現が誘導され、細胞核に局在していることが確認された。さらに、染色体上で*prospero* 蛋白は限られた数の縞に局在していることが観察されている。従って、このアプローチは*prospero* のターゲットを同定するのに有効であると考えられ、遺伝的な解析と組み合わせることで、*prospero* 遺伝子の下流に位置する遺伝子群を同定できると期待される。

ショウジョウバエの運動を制御する神経回路の発生に関与する遺伝子の解析

星野幹雄, 曾根雅紀 (東大, 理, 生化), 鍋島陽一, 浜 千尋

(序) 中枢神経系は生体内外の情報に対する神経応答を統合することにより種々の運動を支配している。この複雑な情報システムが成立するためには、多様に分化した神経細胞がその軸索を特異的に正しい標的細胞へ伸ばしシナプス結合することにより機能的な神経回路が形成される必要がある。現在までに細胞間の認識を媒介して軸索のガイダンスに直接関与すると思われる分子がいくつか発見されているが、それらも生体内での機能は殆どわかっておらず、神経回路の形成における遺伝的プログラムの解明はまだこれからの問題である。われわれは今までに、学習や記憶ができる程度には高度ではあるが比較的単純な神経系を持つショウジョウバエに注目し、回路形成に関与する因子を同定し得る実験系の開発を試みてきた。その結果、新しい分子遺伝学的手法によって作成した突然変異株を行動異常という独自の基準でスクリーニングすることにより回路形成に関わる新しい因子を多数同定し得ることがわかってきた。

(結果) 今までに上記のようなスクリーニングによって *hikaru genki* (*hig*) 遺伝子を同定し、実際 *hig* が中枢神経系の限られた細胞で発現し、その欠損により幼虫および成虫で運動異常が生じることを明らかにしてきた。さらに、*hig* は免疫グロブリンドメインおよび補体結合ドメインをあわせ持つ新しいタイプのタンパク質をコードしており、細胞外で機能して神経発生に役立っていることが示唆されている (Hoshino *et al.*, 参考文献参照)。この *hig* タンパク質の機能を調べるために以下の実験を行った。i) *hig* タンパク質に対する抗体を作成したところ *hig* mRNA陽性の神経細胞の細胞体膜近傍および一部の細胞の軸索にも染色が認められた。ii) 培養細胞に *hig* cDNAを導入し強制発現させる実験系を作成した。このことにより実際 *hig* タンパク質が細胞外に分泌されるかどうか検証できる。さらに細胞に接着能を

付与したり軸索の伸長に影響を与えたりするか調べることが可能となった。

(考察及び展望) 神経回路の形成を考えてみると、それは多くの因子がそれぞれ単独に働いて成立するのではなく、多細胞間あるいは細胞内での情報伝達の一連のカスケードの中で相互作用することにより調和のとれた機能的回路ができることが予想される。本研究は行動異常という変異表現型に基づいて変異株を分離しており、類似した回路調節経路上の因子が分離されてくる可能性があり (曾根, 未発表)、その中にはひとつの調節経路上の因子も存在し得る。この情報の流れにおける因子の位置づけは遺伝的相互作用を調べることによりアプローチできる。さらに、軸索経路上で発現している因子の間には機能的重複が見られる場合があり、それが単一の因子の欠損による変異表現型を隠し機能の解明に障害になることが考えられる。以上の問題の解明および克服のために、本研究で分離された変異株どうし、あるいは既存の神経接着分子をコードする遺伝子の変異株とかけあわせ、その二重変異株における行動および神経系の形態異常を調べる必要がある。このことにより、神経回路の形成における調節経路の中で同定された因子間の情報の流れが明かとなることが期待される。また従来の実験系をさらに発展させ、より多くの関連因子を同定するとともにその構造と機能を明かにし、神経細胞がまわりの細胞と情報をいかに伝達、連携して機能的な回路を組み上げていくのか分子レベルで明かにしていきたい。

<参考文献>

M. Hoshino, F. Matsuzaki, Y. Nabeshima, and C. Hama. *hikaru genki*, a CNS-Specific Gene Identified by Abnormal Locomotion in *Drosophila*, Encodes a Novel Type of Protein. *Neuron* 10, 395-407 (1993).

胚発生におけるMYOGENIN遺伝子の発現制御機構の解析

藤沢淳子, 花岡和則, 早坂美智子, 八神貴子, 鍋島陽一

序論

骨格筋の分化は、中胚葉由来の一群の細胞が筋芽細胞としての決定を受け、増殖し、さらに多核の筋管細胞を形成していくプロセスであり、胚発生における器官形成、細胞分化のメカニズムを探る有用な系のひとつである。

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、またそれぞれの様な役割を果たし、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。

我々はmyogenin遺伝子の胚発生における発現誘導機構に興味を持ち、これまでに(1) myogenin遺伝子を単離し、(2) その遺伝子上流にCAT遺伝子を結合したリポーター遺伝子を作成し、種々の細胞に導入することにより、これが筋細胞特異的な発現を示すこと、(3) さらに、MyoD, MRF4等、他の筋分化誘導因子によってその転写が活性化されることを見出した。

これを基に、我々はこの融合遺伝子のリポーター遺伝子をlacZ遺伝子に置き換え (pMGlacZ(-4k)), それを導入したトランスジェニックマウスを作成し、細胞レベルのみならず個体レベルにおいてどのような転写調節を受けているかを検討したので報告する。

結果

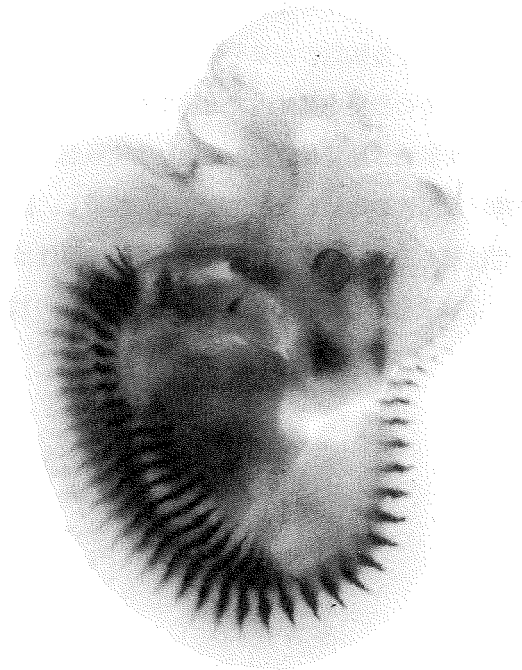
トランスジェニックマウスの胚発生におけるその発現を調べたところ、8.5日胚の体節で強い発現が見られ、9.5日胚のbranchial arches (咽頭筋や顔筋の筋芽細胞が生ずる部位)、さらに11日胚で肢芽における誘導がみられた。そして、13日胚では筋肉組織のほぼ全体

でその活性がみられた。これらは、報告されているmyogenin遺伝子の発現パターンとほぼ一致してしているものであった。

以上のことから、myogenin遺伝子の上流領域には、筋細胞特異的な発現に必要な領域と体節および肢芽における発現誘導にかかわる領域が含まれていることが示された。

そしてさらに、プロモーター領域の解析から筋細胞特異的な発現に必要な領域は主に-300bpまでの近傍にあるのに対し、体節における活性化には、更に上流領域が必要であることを明かにした。

写真 12.5日胚におけるlacZ遺伝子の発現を示したものである。筋節や肢芽、或は顔筋や咽頭筋を形成する部位でその活性化がみられる。



14. モデル動物開発部

1. 研究部一年のあゆみ

当研究部は、ヒトの種々の神経・筋疾患の成因解明や、治療法確立のために有用な疾患モデル動物を開発するため、種々の動物で見出される自然発症ミュータントの比較病態解析、遺伝子および胚操作により人為的に疾患モデル動物を作製することを目的としている。

一昨春秋に研究室は実験動物研究施設より研究棟へ移転したが、その後整備は一応終了し、現在活発な研究が行なわれている。神経軸索変性を示すGADマウスの病態解析は本年度も引き続き行われ、本ミュータントは脊髄神経節細胞の中樞端のみならず、筋紡錘の深部知覚神経終末からもDying back型の変性が進行することを明らかにした。また、運動ニューロンの変性はこれより遅れて末梢端より始まり、その過程ではげしい再生反応を伴うことを示した。GADマウスの病勢進展は比較的緩やかであり、薬物効果の判定に有用であることが予想されたが、最近、メチル型ビタミンB₁₂が運動ニューロンの再生反応を促進し、軸索変性を有意に遅らせることを報告した。

動物遺伝解析室は遺伝子工学研究部や他大学との共同研究において発生工学的技術、特に遺伝子の顕微注入法や胚幹細胞を介したGene targeting法によりTransgenic mouseを作出した。現在、導入遺伝子が個体内でどのように発現し、どのような異常を示すかについて検索している。また、キメラ個体内で発生分化してくる細胞の由来を明らかにするため、細胞を標識する技術も確立し、現在胚幹細胞に遺伝子を導入し、その発現を個体内で追跡できる系を確立しつつある。

モデル動物診断室は念願の感染動物実験飼育室を整備した。ウイルス感染症、特にマウス肝炎ウイルスの神経病原性の本体を分子生物学的に解析し、個体レベルでの中枢神経系脱髄疾患モデルを作製し、その発症機構を調べている。ウイルスの神経病原性はスパイク(S)蛋白の関与が考えられ、神経病原性の強いc1-2株と弱い他の株とを比較することにより検索を進めている。

(部長 菊池建機)

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Yamazaki K, Wakabayashi T, Kikuchi T:
Occurrence of axonal dystrophy in the dorsal nucleus of Clarke of BALB/c mice with aging
Biomed Res 13 : 163–166, 1992
- 2) Oda K, Yamazaki K, Miura H, Shibasaki H, Kikuchi T :
Dying back type axonal degeneration of sensory nerve terminals in muscle spindles of
the gracile axonal dystrophy (GAD) mutant mouse
Neuropathol Appl Neurobiol 18 : 265–281, 1992
- 3) Fujisawa-sehara A, Hayasaka M, Hanaoka K, Hiromasa-Yagami T, Nabeshima Y :
Upstream region of the myogenin gene confers transcriptional activation in muscle
cell lineages during mouse embryogenesis
Biochem Biophys Res Commun 191 : 351–356
- 4) Taguchi F, Ikeda T, Shida H :
Molecular cloning and expression of a spike protein of neurovirulent murine coronavirus
JHMV variant c1-2
J Gen Virol 73 : 1065–1072, 1992
- 5) Taguchi F :
Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant c1-2
J Virol 67 : 1195–1202, 1993

c. 総説

- 1) 田口正敏 :
フローサイトメトリーの新たな展開
細胞工学 11 : 927–931, 1992
- 2) 臼杵扶佐子 :
代謝性疾患—Acid maltase 欠損症
Annual Review 神経 1993 : 245–252, 1993
- 3) 花岡和則 :
キメラ解析のための導入遺伝子マーカー

II 研究業績

実験医学 10 : 38-42, 1992

4) 花岡和則, 石田 功, 富塚一磨 :

培養細胞から動物个体をつくる

バイオサイエンスとインダストリー 50 : 7-8, 1992

d. 班会議報告書

1) 菊池建機 :

発生工学を応用したライフサイエンス研究用実験動物の開発

ヒューマンサイエンス基礎研究事業官民共同プロジェクト

平成4年度研究報告書 P439-441, 1992

2) 菊池建機, 及川胤昭, 若林康夫, 山内一也, 榊 桂之, 長濱嘉孝, 角田幸雄, 渋谷 徹

発生工学を応用した医療研究用実験動物の開発

ヒューマンサイエンス基礎研究事業官民共同プロジェクト

平成4年度研究報告書 P442-453, 1992

3) 菊池建機, 田口文広 :

神経病原性マウス肝炎ウイルス JHM変異株 cl-2S 蛋白の細胞融合活性に関する研究

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4年度研究報告書 P37-41, 1992

4) 菊池建機, 小田健一郎, 菊地寿枝, 水谷 誠 :

Myotonia quail の浅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, 平成4年度研究報告書 P71-76, 1992

5) 菊池建機, 臼杵扶佐子, 樋口逸郎, 加塩信行, 石浦章一 :

糖尿病Ⅱ型ウズラの病態生理-培養系における発現-

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, 平成4年度研究報告書 P41-45, 1992

6) 花岡和則 :

キメラマウスを利用した mdx マウス筋形成過程の解析

厚生省精神・神経疾患研究, 筋ジストロフィー発症の細胞生物学的基礎研究班

平成4年度研究報告書 P68-71, 1992

B. 学会発表

a. シンポジウム

- 1) 小田健一郎, 遠藤智代子, 菊池建機, 山崎一斗, 若林康夫 :

軸索変性モデルマウス (GAD) へのメチルB₁₂投与実験

メチルB₁₂フォーラム, 東京, 1.15.1993

- 2) 花岡和則 :

外来遺伝子導入によるマウス細胞標識化とその応用

第16回比較内分泌学会シンポジウム, 岐阜, 10.5.1992

b. 国際学会

- 1) Kikuchi T, Yamazaki K :

Ultrastructural changes in ascending nervous system of GAD (gracile axonal dystrophy) mice

5 th Society for Experimental Neuropathology, Toronto, Oct. 17-18, 1992

- 2) Taguchi F, Ikeda T, Saeki K, Kubo H, Kikuchi T :

Fusogenic properties of uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV

5 th International Symposium on coronaviruses, Chantilly, Sept 14, 1992

c. 一般学会

- 1) 小田健一郎, 山崎一斗, 高木昭輝, 菊地寿枝, 菊池建機 :

GAD軸索変性マウス : 運動感覚神経終末の病理学的変化

第39回日本実験動物学会, 東京, 5.29.1992

- 2) 加藤秀樹, 若菜茂晴, 江袋美和, 菊池建機 :

ddy由来の近交系に見いだされた歩行異常マウス

第9回日本疾患モデル学会, 大阪, 11.19-20, 1992

- 3) 山崎一斗, 小田健一郎, 菊池建機, 若林康夫 :

Gracile axonal dystrophy (GAD) マウスの運動神経変性に対するメチル型ビタミンB₁₂の効果

第9回日本疾患モデル学会, 大阪, 11.19-20, 1992

- 4) 松井京子, 古川昭栄, 菊池建機 :

Cytosine arabinoside による運動失調マウスの小脳におけるNGFレベルの変化

第66回日本薬学会, 横浜, 3.27.1993

- 5) 藤沢淳子, 花岡和則, 八神貴子, 鍋島陽一 :

II 研究業績

マウス胚体節および肢芽における myogenin 遺伝子の発現誘導

第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 7 - 10, 1992

6) 近藤寿人, 沢井昭次, 若松義雄, Cynthia P., 下野明彦, 花岡和則 :

N-myc 欠損マウス胚が明らかにする器官形成の制御

第15回日本分子生物学会年会, 京都, 12. 7 - 10, 1992

7) 久保英幸, 田口文広 :

神経親和性マウスコロナウイルス S 蛋白の解裂産物の同定

第113回日本獣医学会総会, 相模原, 4. 2, 1992

8) 佐伯圭一, 久保英幸, 小野寺 節, 田口文広 :

マウスコロナウイルスによる巨細胞形成 (細胞融合) に関する研究 :

巨細胞形成能欠損株を用いた解析

第113回日本獣医学会総会, 相模原, 4. 2, 1992

9) 田口文広, 佐伯圭一, 久保英幸 :

マウスコロナウイルスによる巨細胞形成 (細胞融合) に関する研究 :

非解裂性変異 S 蛋白による解析

第113回日本獣医学会総会, 相模原, 4. 2, 1992

10) 田口文広 :

マウスコロナウイルススパイク (S) 蛋白による細胞融合に関する研究 :

非解裂性変異 S 蛋白による解析

第40回日本ウイルス学会総会, 神戸, 10. 28, 1992

11) 久保英幸, 田口文広 :

マウスコロナウイルススパイク (S) 蛋白及び S 蛋白サブユニットの培養細胞での発現と細胞融合活性について

第40回日本ウイルス学会総会, 神戸, 10. 28, 1992

C. 班会議発表

1) 菊池建機, 小田健一郎, 菊地寿枝, 高木昭輝, 佐藤福志, 養老栄樹 :

GAD マウス筋紡錘にみられる神経軸索変性

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, 平成4年度班会議, 東京, 12. 3, 1992

2) 山崎一斗 :

軸索変性モデル, GADマウス : 運動神経変性に対するメチル型ビタミンB₁₂の効果
H S財団研究プロジェクト, 疾患モデル開発のための基礎研究およびモデル動物の開発班
平成4年度班会議, 東京, 1.19, 1993

3) 菊池建機, 田口文広 :

神経病原性マウスコロナウイルスS蛋白の細胞融合活性
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4年度班会議, 東京, 1.27.1993

4) 花岡和則 :

キメラマウスを利用したmdxマウス筋形成過程の解析
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
平成4年度班会議, 東京, 12.4, 1992

5) 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会議, 東京, 2.20, 1993

6) 田口文広 :

感染因子を用いる神経特異的遺伝子発現制御技術の開発
科学技術庁・脳機能の外来因子による異常発現機構解明のための技術開発に関する研究班
平成4年度班会議, 東京, 3.18.1993

II 研究業績

3. 主な研究報告

GADマウスの延髄薄束核における軸索変性の初期的形態変化

市原伸恒, 山崎一斗, 菊地寿枝, 浅利昌男, 菊池建機

【目的】

GADマウスは、脊髄神経節にニューロン本体をもつ一次感覚ニューロンの中枢端並びに末梢端からの軸索変性を誕生後早期より呈するミュータントマウスである。既にその臨床症状及び病理形態学的研究は詳しく行われており、特にその中枢端である薄束核と脊髄薄束におけるdying-backタイプの軸索変性が顕著である。それは光顕において好エオジン性の類球体すなわちSpheroidとして確認できる。Spheroidの電顕観察では腫大した軸索終末部にミトコンドリアの集積やelectron dense body, フィラメント状構造物などの存在が認められている。今回は薄束核での軸索変性のその発生初期における形態学的変化について検討を加えた。

【材料と方法】

今回の実験では、10日齢、20日齢、30日齢、35日齢、40日齢のGADマウスを用いた。これらのマウスはエーテル麻酔下で、放血、延髄薄束核に相当する部位を実体顕微鏡下で採取した。採取した組織は3%グルタルアルデヒド・0.12 Mリン酸緩衝液 (pH7.2) で前固定した後に1%オスミウム酸で後固定し、エタノール脱水後、エポキシ包埋を行った。超薄切片は電子染色後、観察に供した。

【結果と考察】

今回の実験では、Spheroidは光顕、電顕観察において共に20日齢より確認できた。光顕観察ではそれらは大きさが様々であり、メチレンブルー染色では青色を呈し、その細胞質には黒い顆粒が確認された。この顆粒の数は、数個から20個余りまで様々であった。しかし一般的にSpheroidの大きが増すにつれ、顆粒の数も相関して増している傾向がうかがえた。さらに40日齢においては顆粒をもたずに青色で均一に濃染する、これまで成齢で確認されてきたようなSpheroidも確認できた。

電顕観察では、光顕では確認できなかった変性した軸索が多数確認でき、実際には大小様々な変性軸索の存在が認められた。これら変性軸索内には、これまで明らかにされているGAD

マウスのSpheroidと同様にミトコンドリアやフィラメント状構造物の集積、膜様構造物や空胞化、electron dense bodyなどの所見が認められた。樹状突起とのシナプス結合を保っているような小さな腫大を示す軸索にはミトコンドリアやelectron dense bodyの集積が認められ、腫大の程度が増すにつれてフィラメント状構造物の集積や空胞化も認められるようになり、軸索全体の電子密度が増加していた。これらの事よりGADマウスの薄束核における軸索変性初期の形態学的変化は、軸索終末部の腫大と共にミトコンドリアやelectron dense bodyの集積が生じ、さらにこれらの集積と共に腫大も進み、フィラメント状構造物や空胞形成が見られ始め、樹状突起とのシナプス結合も消失して行くことが考えられる。そして軸索はフィラメント状構造物や空胞化が顕著になりその電子密度は増加する。GADマウスにおいては、このような初期的变化を経て逆行性の軸索変性へと続いて行くものと考えられる。

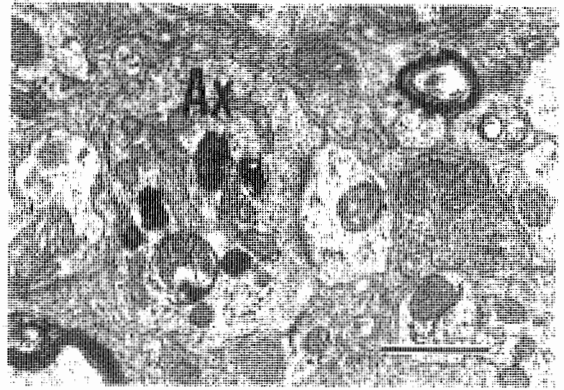


写真 20日齢 GADマウスの電顕写真
シナプス結合を保ちながら、既に変性の始まっている軸索終末部(Ax)が認められる。スケール=1 μ m

胚幹細胞を介したマウス胚へのNGF遺伝子の導入

花岡和則, 古川昭栄 (岐阜薬大)

神経成長因子(NGF)は、ニューロンの分化、生存維持に重要な役割を果たしていると考えられている、代表的な神経栄養因子の一つである。NGFによる生理作用の研究は、これまで主に末梢神経系で進められてきたが、最近中枢神経系にもNGFが存在することが確認されその機能が注目されている。NGFの生理作用に関する研究はこれまで主として体外培養系を用いてなされており、*in vivo*では、成体へのNGFの大量投与以外の研究は少ない。我々は、胚幹細胞を用いたキメラ作成の実験系を用いてマウス胎児においてNGF遺伝子を異所的に強制発現させ、神経回路形成過程におけるNGFの生理作用を解析することを目的とした研究を開始したのでその経過を報告する。

[方法]

1 lacZ標識された胚幹細胞株

遺伝子導入には、昨年度報告した大腸菌 β -ガラクトシダーゼ(lacZ)の導入により細胞核を標識したE14胚幹細胞株を用いた。

2 導入遺伝子

NGF遺伝子を異所的に発現させるため、マウスNGFcDNAにヒトEF1 α プロモーターを連結したプラスミドpEFNGFを作成し、導入遺伝子とした。

3 遺伝子導入

pEFNGFおよびpEFHg(ハイグロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド)を電気穿孔法により胚幹細胞にco-transfectし、ハイグロマイシン存在下で生存する胚幹細胞クローンを単離した。

4 キメラマウスの作成

上記胚幹細胞株のうち、NGFを強く発現している細胞株をマウス胚盤胞期胚に顕微注入した後仮親マウス子宮に移植しキメラマウスを作成した。

[結果]

ハイグロマイシン存在下で分離された胚幹細胞株のうちpEFNGFの組み込みが確認された各クローンを培養し、培養メディウム中に分泌されたNGF量を測定した。結果の一部を表1に示す。

NGF活性の高い胚幹細胞株#32を用いてキメラマウスを作成した(表2)。仮親マウス子宮に移植した胚効に比べ産仔数がかなり低いこと、誕生したマウスにおいて胚幹細胞の占める割合の高いキメラマウスが少ないことから異所的なNGFの発現が出生前後で致死的に働いている可能性があり今後さらに検討する必要がある。

生存しているキメラマウスの各組織のNGF量を測定したところ、各組織で対照マウスに比べ約10倍NGF量が上昇しているキメラ個体がいることが判明した。また、これらのキメラ胎児、新生児の中に、神経組織の形態異常を呈する個体がすでに見つかっている。

[考察]

胚幹細胞を担体としてNGF遺伝子を異所的に発現させたキメラマウスの作成に成功した。これらキメラマウスにおけるNGF遺伝子の発現部位はlacZマーカーにより同定できるので、今後NGF遺伝子発現組織と神経回路形成の関係について詳細に検討する予定である。

表1 胚幹細胞におけるNGFの強制発現
メディウム中のNGF濃度

E14細胞(対照)	0.068 (ng/ml)
クローン#3	0.15
#8	5.5
#13	10.5
#32	14.0

表2 キメラマウスの作成(ESクローン#32)

移植胚数	産仔数	出生後死亡	キメラ
770	89	15	25

神経親和性マウスコロナウイルスのS蛋白特異的 モノクローナル抗体の認識部位の解析

久保英幸, 田口文広

【序論】マウスコロナウイルス(MHV)は、マウス、ラットに脱髄性脳脊髄炎を誘発し、広くウイルス性脱髄疾患のモデルとして研究されている。MHV粒子表面のスパイクを構成するS蛋白は、分子量150~180Kの糖蛋白であり、感染細胞内で合成後、N末端側のS1およびC末端側のS2の二つのサブユニットに開裂する。S蛋白は、細胞表面のウイルスリセプターへの結合、細胞融合活性、中和抗体および細胞性免疫の惹起、ウイルス病原性などMHVの持つ重要な生物活性を担っているが、その活性部位については不明な点が多い。そこで、S蛋白上におけるこれらの生物活性の活性部位を明らかにするために、神経病原性の強いJHM株c1-2変異株のS蛋白に対するモノクローナル抗体(MAb)およびそのcDNAを作製した。我々は既に、作製したcDNAを用いて発現させたS蛋白は、細胞融合活性を示し^{1,2}、MAbを用いて解析した結果、c1-2感染細胞内に認められるS蛋白と抗原性に相違のないこと¹を明らかにした。今回は、これらのMAbのS蛋白上の認識部位について検討を行った。

【結果】15種のS蛋白特異的MAbは、MHV各株との反応性から、A)全MHV株に(MAb No.2,7,19)、B)JHM株特異的に(MAb No.3,6,13,18,71,93)、C)大きなS蛋白を持つJHM株特異的に(MAb No.8,12,47,63,78,85)反応を示す3グループに分類された。また、³⁵S標識後の細胞溶解質を、尿素および2-メルカプトエタノール処理後免疫沈降を行うことにより、SDS-PAGEでS1およびS2の分離が可能であることが明らかとなり、この方法により、No.18を除くすべてのMAbはS1を認識することが判明した³。S1特異的MAbのうち、中和または細胞融合抑制活性を示すものはグループBおよびCに属し、特にグループBのMAbのほとんどは、高

い両活性を有していた³。また、これらのMAbは、S1およびS2遺伝子をワクシニアウイルストランスファクター pSF7.5EB1-B5-12(pSF)に挿入し、ワクシニアウイルス感染DBT細胞で発現したS1、S2蛋白に強い反応を示した⁴。そこで、中和エピトープおよび細胞融合活性部位を明らかにする目的で、S1特異的MAbのS1上の認識部位を詳細に解析するため、S1のN末端から220,330,453,594および769個のアミノ酸を発現できる各遺伝子をpSFに挿入し(それぞれ、pSFS1N(660),pSFS1N(990),pSFS1N,pSFS1NM,pSFS1uttと命名)、ワクシニアウイルス感染DBT細胞に発現させ、間接蛍光抗体法を用いて各発現蛋白と14種のS1特異的MAbとの反応性を調べた。その結果、グループCのMAbはpSFS1uttの発現蛋白のみと反応を示し、グループAおよびBのMAbはpSFS1N(660)以外での発現蛋白すべてと反応を示した。このことから、高い中和および細胞融合抑制活性を示すグループBのMAbの認識部位は、N末端から330番までのアミノ酸で構成される領域であること、すなわち、中和エピトープ、細胞融合活性部位、あるいはその一部は、N末端から330個のアミノ酸で構成されていることが示唆された。

文献

1. Taguchi, F., Ikeda, T., and Shida, H. (1992) *J. gen. Virol.* 73, 1065-1072
2. Taguchi, F. (1993) *J. Virol.* 67, 1195-1202
3. Kubo, H., Takase, S. Y., and Taguchi, F. (1993) *J. gen. Virol.* in press
4. Kubo, H., and Taguchi, F. submitted for publication.

15. 実験動物管理室

1. 管理室一年のあゆみ

実験動物研究施設では、施設利用者の増加に伴い下記のごとく飼育スペースの拡充をはかった。3階旧モデル動物実験室をマウス飼育室（3室）に、2階ビニールアイソレータ室（207号室）を実験室兼マウス飼育室（4室）に改修した。1階旧モデル動物実験室にはアイソレータを移設し系統維持や不慮の感染事故が発生した際の動物救助に使用することとした。また、1階ウサギ室は使用数の増加と長期飼育が多いことから動物室を104号室から101号室へ移設すると共に流水式自動洗浄ラック（FRP）2機（27匹収容）を増設した。なお、現在常時飼育されている動物数は、マウス12,100匹、ラット500匹、ウサギ56匹、スンス66匹、ハムスター11匹であり、その他鶏類や開発中の小型動物200匹が飼育されている。これらの動物は、(株)JACより派遣された10名の飼育技術者によって管理されている。

実験動物管理室では、昨年に引き続き二瓶淳子（センター研究員）、松崎香苗（研究助手）の3名で以下の研究を進めている。

1. 実験動物の開発

実験動物化を進めているゲッ菌目キヌゲネズミ科に属するキタバッタネズミ Northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*) は、脳内生理活性アミン濃度が高く神経科学分野のモデル動物として有用性が期待される。現在室内繁殖が可能となり特性を検索中である。

2. 系統維持

本年は動物施設内に液体窒素タンクによる受精卵凍結保存室（1階旧検査室）が設けられ、神経・筋疾患モデル動物等の系統維持を受精卵で凍結保存することが可能となった。現在マウス系統で20系統約9,500個の受精卵が凍結保存された。今後、国内外の主要な系統を維持供給できるシステム化を進めると共に、マウス以外の種、例えばラットや開発中の動物等についても受精卵の凍結保存方法を検討してゆく予定である。

（管理室長 松崎哲也）

II 研究業績

2. 研究業績

A. 論文

a. 原著

- 1) Suzuki S, Mifune H, Nishida T, Matsuzaki T, Nishinakagawa H, Otsuka J :
Fine Structure of the Parotid Gland in the Crest-Tailed Marsupial-rat (Dasyuroides byrnei)
Exp. Anim. 41 : 491-498, 1992
- 2) Koga R, Ishiura S, Takemitsu M, Kamakura K, Matsuzaki T, Arahata K, Nonaka I, Sugita H :
Immunoblot analysis of dystrophin-related protein (DRP)
Biochimica et Biophysica Acta 1180:257-264, 1993

B. 学会発表

a. シンポジウム

- 1) Saito M, Matsuzaki T, Hioki K, Ebukuro S, Nomura T :
Rearing and reproduction of the suncus (Jic : SUN) as Laboratory animal
The Symposium on Experimental Animal and Pharmacology in Commemoration of the 27TH
Anniversary of the CHIA NAN Junior College of Pharmacy, Formosa, 3.14, 1993

c. 一般学会

- 1) 竹光正和, 松崎哲也, 埜中征哉, 杉田秀夫 :
mdx マウスの筋芽細胞注入療法
第38回日本実験動物学会総会, 東京, 5.29.1992
- 2) 大坪リラ, 横畑泰志, 松崎哲也, 奥 祐三郎, 神谷正男 :
キタバツタマウス (Onychomys leucogaster) の実験室内繁殖
第114回日本獣医学会, 北海道, 9.30.1992
- 3) 松崎哲也, 松崎香苗, 大坪リラ, 神谷正男 :
キタバツタネズミ (Onychomys leucogaster) の室内繁殖
第18回日本実験動物技術者協会懇話会総会, 川崎, 2.27.1993

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月に発足し、今澤正興がこれまで室長として任に当たっている。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なうことを目的としている。本年度の人事の動きは特に無く、センター研究員として武市正美が放射線安全管理と研究開発を担当している。また三井恵里子（賃金研究助手）が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業務を行っている。

安全管理業務の中、R I排水処理・有機廃液焼却・施設管理については委託業者、運営部会計課と協力して行った。また放射線安全教育を5月、8月、11月、2月に実施した。一方、放射線障害防止法の改正にともなう当研究所の放射線障害予防規定の改定を運営部庶務課と協力して行い、年度末までに科学技術庁に提出した。5月には、科学技術庁による施設への立入検査が有り、施設・取扱・健康診断・手続き等について一部指摘を受けたが、運営部と協力し、10月までに、改修工事をも含めて、全ての改善措置を終了する事ができた。

研究の面では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を確立し、これを用いて中枢神経系の培養細胞におけるイノシトールリン酸類の動態を検討した。この他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、薬物・生体物質等の簡便で分解能の良い分析法の開発を続行している。

（管理室長 今澤正興）

II 研究業績

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3年度研究報告書，P333-344，1992

B. 学会発表

a. シンポジウム

1) 今澤正興 :

キャピラリー電気泳動による血清中の複数の抗てんかん薬の同時定量について

第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム，姫路，12. 3, 1992

c. 一般学会

1) 今澤正興 :

キャピラリー電気泳動によるクロナゼパム，ニトラゼパムの分析法について

第26回日本てんかん学会，名古屋，10. 2, 1992

3. 主な研究報告

ラジオ HPLC による培養小脳グラニュール細胞の

イノシトールリン酸類動態の検討

今澤正興, 武市正美

細胞内カルシウム (Ca^{2+}) 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離に関わるセカンドメッセンジャーであるイノシトール(1,4,5)三リン酸 ($Ins(1,4,5)P_3$) を始めとするイノシトールリン酸類の動態をラット小脳グラニュール細胞の初代培養系において、ラジオ HPLC を用いて検討した。

生体中の多くのイノシトールリン酸類異性体を分離するためには、これまでシリカゲル系の強陰イオン交換カラム (SAX) が主に使われており、樹脂系のイオン交換カラム等を用いた場合、異性体相互の分離が不完全であった。しかし、SAX カラムの難点は、比較的長い分析時間を要すること ($InsP_4$ まで分析する場合で 60 分)、及び非常に高い塩濃度の溶出液が必要 ($InsP_4$ まで分析する場合で 2.2 M) なため、処理に難のある高塩濃度の RI 廃液が生ずることである。我々は、シリカゲルの表面をジエチルアミノ基を有する樹脂でコートしたカラムの適用を検討した。

〈方法〉

HPLC カラムには VYDAC 304 0L を使い、 $HCOONH_4$ 1.3 M までの濃度勾配溶出により、 $InsP \sim InsP_6$ までの主な異性体の分析を行った。放射活性の溶出パターンはフローラジオモニターにより、正確な計測は、分画を分取後、液体シンチレーションカウンターにより行った。生後 8 日齢 Sprague-Dawley ラットの小脳を摘出し、trypsin 処理後、単離細胞を調製した。7 日間培養後、 $[^3H]$ イノシトールを添加し、18 ~ 24 時間培養した。Agonist を添加後、一定時間 incubation し、過塩素酸にて反応を停止、遠心、中和を行い、その上清をラジオ HPLC の分析試料とした。

〈結果・考察〉

イノシトールリン酸類の HPLC による分析条件を検討したところ、 $InsP_6$ までの分析時間を 50 分に短縮し、用いる溶出液の $HCOONH_4$ 濃度を 1.3 M までに減少させることができた。この条件において、 $Ins(1)P$ 、 $Ins(4)P$ 、 $Ins(1,4)P_2$ 、 $Ins(1,3,4)P_3$ 、 $Ins(1,4,5)P_3$ 、 $InsP_4$ 、 $InsP_5$ 、 $InsP_6$ が良好に分離した。また、SAX カラムの場合に認められた分離条件下でのカラムの速やかな劣化が、本カラムでは認められなかった。次に培養小脳グラニュール細胞における、カルバコール刺激時のイノシトールリン酸類の動態を検討した。

生後 8 日のラット由来の小脳グラニュール細胞では、カルバコール刺激により $PtdIns(4,5)P_2$ の分解が促進され、セカンドメッセンジャー、 $Ins(1,4,5)P_3$ が約 2 ~ 3 倍に増大する事が認められた (Fig.1)。一方、これまで Costa ら (1989) は、ほぼ同一の系を用いて IP_3 の上昇は無かったと報告している。更に、 $Ins(1,4,5)P_3$ は、脱リン酸酵素により $Ins(1,4)P_2$ に変換されるか、又はリン酸化を受け、やはり細胞内 Ca^{2+} 濃度を高めるセカンドメッセンジャーと考えられている $Ins(1,3,4,5)P_4$ に転換されるかの二つの代謝ルートがあるが、この系では前者が主であることが示された。この結果は、小脳スライスを用いた結果と全く異なっており興味深い。 $InsP_5$ 及び $InsP_6$ はカルバコールにより変動せず、これらのイノシトールポリリン酸は、細胞の生存維持活動一般の指標となる可能性もある。

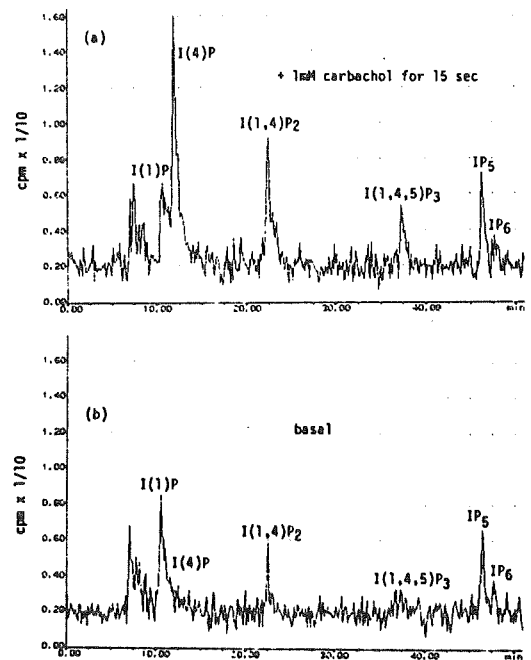


Fig.1 HPLC separation of the $[^3H]$ inositol phosphates in extracts from carbachol-stimulated cerebellar granule cells.

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、本年度末で満6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）は各研究部およびR I、動物管理室から1名が出席し、施設の利用や所内の動物実験に関し月1回の定例会議で審査している。動物間の感染防止対策は動物委員会の大きな課題であるが、本年度は施設内各飼育室の利用者名簿と責任体制のリストを作成することにより、利用者に一段と注意を喚起することになった。

2号館2階にP2動物感染実験室を設置する件について検討した。本実験はマウスおよびラットに感染し、強い伝播力を持つ感染体を用いた動物実験および感染動物の飼育を行うことができるため、動物委員会としては施設内の動物への感染を防ぐ立場から、十分に審議し、厳格な利用規則を作成した。感染動物実験は感染実験安全委員会の承認を得た上で、11月中旬より開始した。

施設整備は開所以来、利用者の長期的、短期的実験計画に合わせて実施されてきた。本年度はかねて改修中の3階動物飼育室がオープンし、2階の行動薬理実験室が整備できた。2階の207号室（アイソレーター室）は独立した飼育実験室3室に改造し、その内の2室は疾病研究第4部が使用することとなった。1階は2階よりアイソレーター室が移り、さらに、101号室がウサギ室、105号室がモルモット室となった。また、1階の犬運動場は、所内の液体窒素凍結保存システムの一環として凍結細胞および凍結受精卵保存室として、今後動物、特にマウスの系統保存に利用されることとなった。動物委員会は施設が外国人研究者によっても利用されやすいように、英語の案内プレートと英文施設利用マニュアルの作成を始めた。

平成5年1月、京大医学部の実験用ラットに、ここ7年間鳴りをひそめていた腎症候性出血熱（HFRS）が検出された。動物委員会は本件を重視し、所内のゴミ捨て場の改修とドブネズミ対策に乗り出した。本年末には特に衛生状態の劣悪であった2号館ゴミ捨て場の改修工事が終り、利用者に正しい使い方を徹底することとなった。

（実験動物研究施設管理委員会委員長補佐 菊池建機）

II R I委員会

神経研究所本館が完成し、本格的な実験を開始した。本年度は本館新築に伴う設備費がついたこともあって、開設時に購入できなかった機器の購入を進めることができた。特にR I室の管理に必要なコンピューターシステムを完成させることができ、管理面での進歩がもたらされた。また、一定期間利用した結果から改善すべきことが明かとなり、試行錯誤を繰り返しながらも全体としては改善されてきている。培養室を増やしたり、イメージアナライザーのバージョンアップをはかるなど、利用者サイドの意見により実験の実態に見合ったR I室にする努力がなされた。一方、これまで利用してきた2号館のR I室の機能的な

Ⅲ 委員会

レベルアップをおこなうために備品の購入を行った。

最近の機器の進歩により、より低レベルのR I，あるいは蛍光色素などで実験ができるようになり、今後は相対的にR Iの使用が減少することが予想される。この点を念頭において今後の研究所の運営を計ったらよいのではと考えている。

(R I委員会委員長 鍋島陽一)

Ⅲ 電顕委員会

1) 施設および機種

設置されている機種は透過型として日立H7000，H700，600，走査型として日立S700，S430がある。比較的新しいH7000は簡便で，操作が簡単なので，初心者にも熟練者にも頻回に使用されている。ライヘルツ社のマイクローム2台も故障なくよく利用されている。ただクライオクセクションシステムは，利用者がほとんどなく，活用されていない。

2) 運営

透過型電顕については使用頻度もたかく，十分に活用されている。ただ走査型電顕は使用されることはほとんどない。また老朽化がはげしく維持に費用がかさむようになってきた。

電顕室の専任管理者であった石井弘子が平成4年3月で退職し，その後任がまだなく，埜中併任部長が管理している。機械の運転，現像液の管理，フィルム管理などで利用者は不便を余儀なくされることがあり，専任管理者がぜひ必要である。

(電顕委員会委員長 高嶋幸男)

Ⅳ 組換えDNA安全委員会

本年度は組換えDNA実験指針が改定された。安全委員会にかなりの決定，裁量する機能が与えられるとともに，実験がスムーズに実施できる方向にすすんでいると判断している。平成5年度の実験計画を審査した。38件の申請がだされ，基本的に全ての申請が承認された。厚生省でヒトを対象とした遺伝子治療実験指針が取り上げられたこともあって将来の遺伝子治療にむけた基礎実験の計画書が出されたのが今回の特徴といえる。この方向の実験を進めるためには動物個体，体細胞の遺伝子操作が必須であり，動物委員会，感染委員会との連絡，動物センターとの連絡を密にして取り組んで行かなければならないとの意見が出された。

(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5年3月23日に、第9回感染実験安全委員会が神経研究所内の6委員出席のもとで開催され、平成5年度に計画されている感染実験の安全性について審議された。感染実験の申請は、4研究部から14件なされ、全て平成4年度からの継続或は過去に既に申請され許可されたものであり、問題なく承認された。

(感染実験安全委員会委員長 杉田秀夫)

VI 動物実験倫理問題検討委員会

動物実験倫理問題検討委員会は平成2年5月に発足し、動物慰霊碑が平成3年7月22日に建立された。本委員会は動物実験が医学的に重要であって他の研究方法では行いがたく、かつ動物福祉・倫理の観点から適切に施行されるかを検討している。構成委員は、高橋委員長が武蔵病院へ転任されたため、高嶋、田平、菊池、高坂、桜川部長、田口、松崎室長および企画室長である。

本委員会の主な任務は、第一に、実験動物の飼育管理および動物実験が適切に行われているかを検討し、その問題点の把握と対応について審議することである。本年度は研究者より提出された動物実験計画書を各委員で詳細に検討し、計画書は実験責任者に一部修正を求めたものもあったが、すべて適正であり、承認された。第二に、実験に供された動物の霊に対して動物慰霊祭を行うことである。本年度は平成4年10月26日に動物慰霊祭を行い、大熊総長より動物慰霊祭挨拶、杉田所長より慰霊の言葉が述べられ、研究所、病院および運営部から集まった100人以上の参加者によって献花、献杯が心をこめて行われた。

(動物実験倫理問題検討委員会委員長 高嶋幸男)

VII 図書委員会

図書委員ははじめ田平 武、中村 俊、西川 徹、松崎文雄、武井延之がつとめたが、図書の整理が悪く、紛失も相次ぐ為、各部から1名の図書委員を出し、月に1回担当の部が図書の整理、チェックにあたり、本の整理、持ち出し禁止等を徹底することになった。しばらく様子を見て、本の紛失が続くようであれば自動監視システムの導入を考慮することとした。雑誌は昨年購入雑誌をすべて更新し、新規に数種類の雑誌を購入することとした。図書の受け入れは事務の斎藤が当たった。近年カラー写真が多く、カラーコピー機を導入した。

(図書委員会委員長 田平 武)

Ⅲ 委員会

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. Advances in Second Messenger and Phoprotein Research (1988～) vol. 21～
8. AIDS (1987～) vol. 1～
9. American Journal of Anatomy (1968～1991) vol. 122～192 (タイトル変更)
10. American Journal of Human Genetics (1968～) vol. 20～
11. American Journal of Medical Genetics (1977～) vol. 1～
12. American Journal of Pathology (1968～) vol. 52～
13. American Journal of Physiology (1968～) vol. 214～
14. Analytical Biochemistry (1968～) vol. 22～
15. Anatomical Record (1968～) vol. 160～
16. Anatomy & Embryology (1978～) vol. 153～
17. Annals of Neurology (1978～) vol. 3～
18. Annals of New York Academy of Science (1968～) vol. 146～
19. Annual Review of Biochemistry (1974～) vol. 43～
20. Annual Review of Cell Biology (1985～) vol. 1～
21. Annual Review of Genetics (1974～) vol. 8～
22. Annual Review of Immunology (1983～) vol. 1～
23. Annual Review of Neuroscience (1978～) vol. 1～
24. Annual Review of Pharmacology & Toxicology (1984～) vol. 24～
25. Annual Review of Physiology (1974～) vol. 36～
26. Archives of Biochemostry & Biophysics (1968～) vol. 123～
27. Archives of Neurology (1959～) vol. 1～
28. Archives of Pathology & Laboratory Medicine (1983～) vol. 107～
29. Archives of Virology (1986～) vol. 87～

30. Biochemical and Biophysical Research Communications (1960～) vol. 1～
31. Biochemical Journal (1968～) vol. 106～
32. Biochemical Genetics (1987～) vol. 25～
33. Biochemical Medicine & Metabolic Biology (1987～) vol. 37～
34. Biochemical Pharmacology (1958～) vol. 1～
35. Biochemical Society Transactions (1978～) vol. 6～
36. Biochemistry (1962～) vol. 1～
37. Biochemistry & Cell Biology (1987～) vol. 65～
38. Biochemistry International (1980～1992) vol. 1～ vol. 28 (タイトル変更)
39. Biochimica Biophysica Acta (1968～) vol. 150～
40. BioEssays (1984～) vol. 1～
41. Biological Psychiatry (1969～) vol. 1～
42. Biological Mass Spectrometry (1991～) vol. 20～
43. Biology of Neonate (1987～) vol. 51～
44. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry (1974～1990) vol. 1～ vol. 19
45. Biomedical Research (1980～) vol. 1～
46. Biophysical Journal (1960～) vol. 1～
47. Bioscience Reports (1983～) vol. 3～
48. Biosis Cas Selects : Alzheimer's Disease & Senile Dementias (1987～1989) vol. 1～ vol. 3
49. Bio Research Today Series' (1990～1991) vol. 1～vol. 2
50. Blood : Journal of Haematology (1987～) vol. 69～
51. Brain (1968～) vol. 91～
52. Brain and Development (1979～) vol. 1～
53. Brain Research (1989～) vol. 476～
54. Brain Research Bulletin (1987～) vol. 18～
55. Brain Research Reviews (1979～) vol. 1～
56. British Journal of Haematology (1987～) vol. 65～
57. British Journal of Pharmacology (1968～) vol. 34～
58. Cancer Research (1968～) vol. 28～
59. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology (1987～) vol. 65～

Ⅲ 委員会

60. Cell (1974～) vol. 1～
61. Cell & Tissue Kinetics (1983～1990) vol. 16～ vol. 23
62. Cell & Tissue Research (1978～) vol. 186～
63. Cell Biochemistry & Function (1987～) vol. 5～
64. Cell Biology : International Reports (1983～) vol. 7～
65. Cell Calcium (1985～) vol. 6～
66. Cell Differentiation and Development (1983～1990) vol. 12～ vol. 32
67. Cell Motility & Cytoskeleton (1983～) vol. 3～
68. Cell Proliferation (1991～) vol. 24～
69. Cell Structure and Function (1975～) vol. 1～
70. Cellular & Molecular Neurobiology (1983～) vol. 3～
71. Cellular Immunology (1970～) vol. 1～
72. Cellular Signaling (1989～) vol. 1～
73. Chemical Reviews (1968～) vol. 68～
74. Chemical Titles (1968～1992) vol. 1～ vol. 24
75. Chromosoma (1986～) vol. 93～
76. Chronobiologica (1985～) vol. 12～
77. Chronobiology International (1986～) vol. 3～
78. Clinica Chimica Acta (1968～) vol. 19～
79. Clinical & Experimental Immunology (1987～) vol. 67～
80. Clinical Chemistry (1975～) vol. 21～
81. Clinical Genetics (1970～) vol. 1～
82. Clinical Immunology & Immunopathology (1987～) vol. 42～
83. Clinical Neuropathology (1983～) vol. 2～
84. Clinical Neuropharmacology (1987～) vol. 10～
85. Cold Spring Harbor Symposium (1988～) vol. L11～
86. Computers & Biomedical Research (1987～1988) vol. 20～21
87. Cumulated Index Medicus (1968～) vol. 9～
88. Current Contents (1990～)
89. Cytobiology (1969～1979) vol. 1～18

90. Cytogenetics & Cell Genetics (1983～) vol. 35～
91. Development (1987～) vol. 99～
改名前の名称 (Journal of Embryology and Experimental Morphology (1986) vol. 91～98)
92. Developmental Biology (1968～) vol. 17～
93. Development Growth and Differentiation (1972～) vol. 14～
94. Developmental Brain Research (1986～) vol. 24～
95. Development Dynamics (1992～) vol. 193～
96. Differentiation (1973～) vol. 1～
97. Electromyography & Clinical Neurophysiology (1983～) vol. 23～
98. The EMBO Journal (1983～) vol. 2～
99. Endocrinology (1968～) vol. 82～
100. Endocrinologica Japonica (1984～) vol. 31～
101. Endocrinological Reviews (1986～) vol. 4～
102. Epilepsia (1987～) vol. 28～
103. Epilepsy Research (1987～) vol. 1～
104. European Journal of Biochemistry (1967～) vol. 1～
105. European Journal of Cell Biology (1979～) vol. 19～
106. European Journal of Immunology (1983～) vol. 13～
107. European Journal of Medical Chemistry (1987～) vol. 22～
108. European Journal of Neurosciences (1989～) vol. 1～
109. European Journal of Pharmacology (1967～) vol. 1～
110. European Neurology (1987～) vol. 26～
111. Experientia (1968～) vol. 24～
112. Experimental and Toxicologic Pathology (1992～) vol. 44～
113. Experimental Brain Research (1966～) vol. 1～
114. Experimental Cell Biology (1983～1989) vol. 51～vol. 57 (タイトル変更)
115. Experimental Cell Research (1968～) vol. 49～
116. Experimental Gerontology (1987～) vol. 22～
117. Experimental Neurology (1959～) vol. 1～
118. Experimental Pathology (1983～1991) vol. 23～vol. 43 (タイトル変更)

Ⅲ 委員会

119. 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
120. FEBS Letters (1968～) vol. 1～
121. Gene (1986～) vol. 41～
122. Genes & Development (1987～) vol. 1～
123. Genetical Research (1987～) vol. 49～
124. Genetics (1987～) vol. 115～
125. Genome (1987～) vol. 29～
126. Genomics (1987～) vol. 1～
127. GLIA (1988～) vol. 1～
128. Growth Factors (1988～) vol. 1～
129. Handbook of Neurochemistry vol. 1～
130. Histochemistry (1983～) vol. 77～
131. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, Biological Chemistry
(1983～) vol. 364～
132. Human Gene Therapy (1992～) vol. 3～
133. Human Genetics (1964～) vol. 1～
134. Human Molecular Genetics (1992～) vol. 1～
135. Immunochemistry (1934～1974) vol. 1～17
136. Immunogenetics (1992～) vol. 35～
137. Immunological Reviews (1987～) vol. 95～
138. Immunology (1968～) vol. 14～
139. Immunology Today (1983～) vol. 4～
140. Infection & Immunity (1970～) vol. 1～
141. International Archives of Allergy & Applied Immunology (1987～) vol. 82～
142. International Journal of Biochemistry (1983～) vol. 15～
143. International Journal of Cancer (1987～) vol. 39～
144. International Journal of Neuroscience (1983～) vol. 18～
145. In Vitro (1983～) vol. 19～

146. Japanese Journal of Pharmacology (1989～) vol. 49～
147. Japanese Journal of Physiology (1984～) vol. 34～
148. Journal of Affective Disorders (1986～) vol. 10～
149. Journal of American Chemical Society (1968～) vol. 90～
150. Journal of American College of Neuropsychopharmacology (1988～) vol. 1～
151. Journal of Anatomy (1967～) vol. 102～
152. Journal of Biochemistry (1922～) vol. 1～
153. Journal of Biological Chemistry (1968～) vol. 243～
154. Journal of Cell Biology (1968～) vol. 1～
155. Journal of Cell Science (1966～) vol. 1～
156. Journal of Cellular Physiology (1968～) vol. 71～
157. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (1981～) vol. 1～
158. Journal of Chemical Neuroanatomy (1988～) vol. 1～
159. Journal of Child Neurology (1987～) vol. 2～
160. Journal of Chromatographic Science (1987～) vol. 25～
161. Journal of Chromatography (1958～) vol. 1～
162. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (1980～) vol. 50～
163. Journal of Clinical Investigation (1984～) vol. 73～
164. Journal of Comparative Neurology (1898～) vol. 1～
165. Journal of Comparative Psychology (1992～) vol. 106～
166. Journal of Cyclic Nucleotide & Protein Phosphorylation Research (1987～) vol. 12～
167. Journal of Developmental Physiology (1987～) vol. 9～
168. Journal of Electron Microscopy (1978～) vol. 27～
169. Journal of Embryology and Experimental Morphology (JEEM) (1986) vol. 91～98.
170. Journal of Experimental Medicine (1968～) vol. 127～
171. Journal of Experimental Psychology (1987～) vol. 13～
172. Journal of Experimental Zoology (1986～) vol. 237～
173. Journal of General Physiology (1919～) vol. 1～
174. Journal of General Virology (1986～) vol. 67～
175. Journal of Heredity (1986～) vol. 77～

Ⅲ 委員会

176. Journal of Histochemistry & Cytochemistry (1968～) vol. 16～
177. Journal of Immunological Methods (1971～) vol. 1～
178. Journal of Immunology (1968～) vol. 100～
179. Journal of Intellectual Disability Research (1992～) vol. 36～
180. Journal of Inherited Metabolic Disease (1978～) vol. 1～
181. Journal of Lipid Research (1968～) vol. 9～
182. Journal of Magnetic Resonance (1969～) vol. 1～
183. Journal of Medical Genetics (1987～) vol. 24～
184. Journal of Membrane Biology (1969～) vol. 1～
185. Journal of Mental Deficiency Research (1957～1991) vol. 1～vol. 35
186. Journal of Molecular Biology (1969～) vol. 39～
187. Journal of Morphology (1983～) vol. 175～
188. Journal of Muscle Research & Cell Motility (1983～) vol. 4～
189. Journal of National Cancer Institute (1987～) vol. 78～
190. Journal of Neural Transmission (1968～) vol. 31～
191. Journal of Neural Transmission (1989～) vol. 1～
192. Journal of Neurobiology (1983～) vol. 14～
193. Journal of Neurochemistry (1968～) vol. 15～
194. Journal of Neurocytology (1983～) vol. 12～
195. Journal of Neurogenetics (1983～) vol. 1～
196. Journal of Neuroimmunology (1981～) vol. 1～
197. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry (1926～) vol. 1～
198. Journal of Neurological Sciences (1964～) vol. 1～
199. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology (1987～) vol. 46～
200. Journal of Neurophysiology (1938～) vol. 1～
201. Journal of Neuroscience (1986～) vol. 6～
202. Journal of Neuroscience Methods (1979～) vol. 1～
203. Journal of Neuroscience Research (1983～) vol. 9～
204. Journal of Pathology (1983～) vol. 139～
205. Journal of Pediatrics (1968～) vol. 72～

206. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics (1967～) vol. 156～
207. Journal of Pharmacy & Pharmacology (1987～) vol. 39～
208. Journal of Physiology (1968～) vol. 194～
209. Journal of Tissue Culture Methods (1983～) vol. 8～
210. Journal of Toxicology : Toxin Reviews (1987～) vol. 6～
211. Journal of Structure Biology (1990～) vol. 103～
- 改名前の名称 Journal of Ultrastructure Research & Molecular Structure Research
(1968～1990) vol. 22～vol. 102
212. Journal of Virology (1967～) vol. 1～
213. Laboratory Animal (1986～) vol. 20～
214. Laboratory Animal Science (1986～) vol. 36～
215. Laboratory Investigation (1968～) vol. 18～
216. Lancet (1968～)
217. Life Science (1968～) vol. 7～
218. Lipids (1966～) vol. 1～
219. MATRIX (1990～) vol. 10～
220. Magnetic Resonance Imaging (1992～) vol. 11～
221. Mechanisms of Development (1991～) vol. 33～
222. Membrane Biochemistry (1987～) vol. 7～
223. Metabolic Brain Disease (1987～) vol. 2～
224. Methods in Enzymology (1955～) vol. 1～
225. Methods in Neurosciences (1990～) vol. 1～
226. Molecular & Cellular Biochemistry (1973～) vol. 1～
227. Molecular & Cellular Biology (1983～) vol. 3～
228. Molecular & Chemical Neuropathology (1989～) vol. 10～
229. Molecular Biology Reports (1987～) vol. 12～
230. Molecular Brain Research (1986～) vol. 1～
231. Molecular Immunology (1979～) vol. 16～
232. Molecular Neurobiology (1987～) vol. 1～
233. Molecular Pharmacology (1965～) vol. 1～

Ⅲ 委員会

234. Muscle & Nerve (1978～) vol. 1～
235. Mutation Research (1964～) vol. 1～
236. Nature (1968～) vol. 217～
237. Nature Genetics (1992～) vol. 1～
238. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (1985～) vol. 331～
239. Neurobiology of Aging (1987～) vol. 8～
240. Neurochemical Pathology (1987～1988) vol. 6～vol. 9 (タイトル変更)
241. Neurochemical Research (1976～) vol. 1～
242. Neurochemistry International (1987～) vol. 10～
243. Neuroendocrinology (1987～) vol. 45～
244. Neurology (1970～) vol. 20～
245. Neuromuscular Disorders (1992～) vol. 1～
246. Neuron (1988～) vol. 1～
247. Neuropathology & Applied Neurobiology (1975～) vol. 1～
248. Neuropediatrics (1978～) vol. 9～
249. Neuropeptides (1983～) vol. 4～
250. Neuropsychopharmacology (1988～) vol. 1～
251. Neuroscience (1983～) vol. 8～
252. Neuroscience Abstracts (1987～) vol. 5～
253. Neuroscience Letters (1975～) vol. 1～
254. Neuroscience Research (1984～) vol. 1～
255. Neurotoxicology (1987～) vol. 8～
256. New England Journal of Medicine (1967～) vol. 276～
257. Nucleic Acids Research (1974～) vol. 1～
258. Oncogene (1991～) vol. 6～
259. Pathologie (1983～) vol. 4～
260. Pathobiology (1990～) vol. 58～
261. Pediatric Research (1967～) vol. 1～
262. Peptides (1983～) vol. 4～
263. Pediatric Neurology (1987～) vol. 3～

264. Pflugers Archive European Journal of Physiology (1947～) vol. 249～
265. Pharmacological Reviews (1966～) vol. 18～
266. Pharmacology Biochemistry & Behavior (1983～) vol. 18～
267. Psychoneuroendocrinology (1981～) vol. 6～
268. Physiological Reviews (1968～) vol. 48～
269. Physiology and Behavior (1987～) vol. 39～
270. Proceedings of American Association for Cancer Research (1984～) vol. 25～
271. Proceedings of Japan Academy (1944～) vol. 20～
272. Proceedings of National Academy of Sciences USA (1968～) vol. 59～
273. Proceedings of Royal Society of London Ser. B : Biological Science (1982/83) vol. 217～
274. Proceedings of Society for Experimental Biology & Medicine (1987～) vol. 184～
275. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1966～) vol. 1～
276. Progress in Medical Virology (1965～) vol. 7～
277. Protoplasma (1989～) vol. 148～
278. Psychopharmacology (1959～) vol. 1～
279. RAMBIOS (1986～1987) vol. 3～4
280. Regulatory Peptides (1986～) vol. 14～
281. Reviews of Magnetic Resonance in Medicine (1986～) vol. 1～
282. Revue Neurologique (1978～) vol. 134～
283. Roux's Archives of Developmental Biology (1969～) vol. 162～
284. Science (1968～) vol. 159～
285. Second Messengers and Phosphoproteins (1988～) vol. 12～
286. Somatic Cell & Molecular Genetics (1986～) vol. 12～
287. Studia Biophysica (1983～) vol. 93～
288. Subcellular Biochemistry (1987～) vol. 12～
289. Synapse (1987～) vol. 1～
290. Theriogenology (1986～) vol. 25～
291. Tissue Antigens (1990～) vol. 35～
292. Tissue & Cell (1983～) vol. 15～
293. Tohoku Journal of Experimental Medicine (1984～) vol. 142～

Ⅲ 委員会

294. Toxicology Letters (1987～) vol. 35～
295. Transplantation (1987～) vol. 43～
296. Trends in Biochemical Sciences (1975～) vol. 1～
297. Trends in Cell Biology (1992～) vol. 1～
298. Trends in Genetics (1986～) vol. 2～
299. Trends in Neurosciences (1983～) vol. 6～
300. Trends in Pharmacological Sciences (1979～) vol. 1～
301. Veterinary Record (1986～) vol. 118～
302. Virchows Archiv A : Pathological Anatomy & Histology (1947～) vol. 314～
303. Virchows Archiv B : Cell Pathology (1968～) vol. 1～
304. Virology (1986～) vol. 148～
305. 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 以降休刊
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. 生化学 (1978～) vol. 50～
22. 続・生化学実験講座
23. 新・生化学実験講座 (1989～)
24. 学術雑誌総合目録 (欧文編) (1988～)
25. 日本生理学雑誌 (1978～) vol. 40～
26. 日本薬理学雑誌 (1978～) vol. 74～

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核としての機能をもつ。以上の方針のもとに、研究員制度として、流動研究員制度を設け、国内および国外からの研究者を受け入れるものとする。

2. 募集方法

公募とし、募集要綱を関連する大学、試験研究機関等に配布し希望者を募集する。

3. 流動研究員の区分

流動研究員を段階にわける。決定にあたっては、経歴及び研究業績を審査し、原則として下記の基準にしたがうものとする。

- A) 文部省大学令に基づく大学教授、又はそれに準ずる研究歴を有し、大学卒業後15年以上の者又は本研究部長に準ずるもの。
- 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

4年4月まで週31.5時間、4年5月より週30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。

	平成4年4月	平成4年5月より
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 2,700円	時給 2,840円
B（助教授＝研究室長）クラス	時給 2,270円	時給 2,380円
C（講師＝主任研究員）クラス	時給 2,220円	時給 2,330円
D（助手＝研究員）クラス	時給 1,830円	時給 1,920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。

この要領は、平成4年4月1日に一部改正する。

この要領は、平成4年5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) 併任研究員を受け入れようとする部長（以下「当該部長」という。）は、神経研究所併任研究員申請書（様式1）を神経研究所部長会議に提出する。

3. 定数、任命および併任期間

- (1) 毎年度その定める各部の定数内において、総長が任命する。
- (2) 任命は、神経研究所部長会議の決定に基づき任命しようとする者の所属先の同意を得た後、総長が之を行う。
- (3) 併任期間は1年以内とする。ただし、再併任することは妨げない。

4. 責任と義務

- (1) 併任研究員の神経研究所内の服務規律および特許権並びに設備、施設の利用については、神経研究所職員に準じて行う。
- (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、神経研究所客員研究員申請書（様式）を総長あてに提出する。
6. 任命は、神経研究所部長会議の決定に基づき任命しようとする者の所属先の同意を得た後、総長が之を行う。
7. 外来研究員の事故については、補償を行わない。

〔 附 則 〕

この内規は、平成元年7月1日より施行する。

2 - D. 国立精神・神経センター神経研究所 研究生研究見習生内規

1. 目 的

神経研究所の研究対象疾病に関する原因の解明，治療法の開発，予防法の確立について，研究および技術修得ための研修を希望する者を，この内規の定めるところにより研究生または研究見習生として受入れるものとする。

2. 資 格

研究生は，大学卒業または国立精神・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託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
生 田 房 弘	新潟大学脳研究所教授	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	東邦大学長	〃
山 口 成 良	金沢大学医学部教授	〃
井 形 昭 弘	国立療養所中部病院長	H. 4. 4. 1～ H. 6. 3. 31
大 谷 藤 郎	財団法人藤楓協会理事長	〃
遠 藤 實	東京大学医学部教授	〃
里 吉 榮二郎	国立精神・神経センター名誉総長	〃
島 田 司 巳	滋賀医科大学教授	〃
松 下 正 明	東京大学医学部教授	〃
松 本 悟	神戸大学名誉教授	〃
小 林 秀 資	厚生省大臣官房審議官 科学技術担当 国立病院担当	関係行政機関等
西 本 至	厚生省保健医療局国立病院部政策医療課長	〃
廣 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5年3月31日現在)

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
生 田 房 弘	新潟大学脳研究所教授	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	〃
山 口 成 良	金沢大学医学部教授	〃
松 下 正 明	東京大学医学部教授	〃
井 形 昭 弘	国立療養所中部病院長	H. 4. 4. 1～ H. 6. 3. 31
島 田 司 巳	滋賀医科大学教授	〃
遠 藤 實	東京大学医学部教授	〃
松 下 正 明	東京大学医学部教授	〃
小 野 昭 雄	厚生省大臣官房厚生科学課長	関係行政機関等
西 本 至	厚生省保健医療局国立病院部政策医療課長	〃
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5年3月31日現在)

7. 平成4年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題

課題番号	研 究 課 題	所 属 及 び 役 職 名	主任研究者	委 託 額 千円	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 鏡二郎	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	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	御慈主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	東北大学医学部神経科 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 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	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 武蔵病院部長	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 武蔵病院副院長	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	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	国立療養所久里浜病院 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	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	

8. 平成5年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題及び委託額

課題番号	研 究 課 題	所 属 及 び 役 職 名	主任研究者	委 託 額 千円	備 考
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 武蔵病院 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 武蔵病院 副 院 長	高 橋 清 久	10,000	〃
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	継 続
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 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	国立療養所久里浜病院 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 所 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	〃
5指-1	筋ジストロフィーの形態学的及び生化学・分子生物学的基礎研究	国立精神・神経センター 神経研究所 部長	小 澤 鏝二郎	57,000	新規再編
5指-2	筋ジストロフィー及び類縁疾患の病態と治療法に関する研究	虎の門病院神経内科 部長	高 木 昭 夫	46,000	〃
5指-3	筋ジストロフィーの臨床・疫学及び遺伝相談に関する研究	国立療養所兵庫中央病院 副 院 長	高 橋 桂 一	49,000	〃
5指-4	筋ジストロフィーの療養と看護に関する臨床的、社会学的研究	国立療養所筑後病院 所 長	岩 下 宏	45,000	〃
5指-5	脳形成障害の成因と予防に関する研究	鳥取大学医学部脳神経小児科教授	竹 下 研 三	35,000	〃
5指-6	中枢神経症状を呈する遺伝性代謝病の病態解明と予防・治療に関する研究	国立精神・神経センター 神経研究所 部長	桜 川 宣 男	15,000	〃
5指-7	精神作用物質性精神障害の診断と治療に関する研究	北里大学医学部精神科教授	村 崎 光 邦	12,000	〃
5指-8	心身症の臨床病態と疫学に関する研究	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	〃
5指-9	重症心身障害児の病態・長期予後と機能改善に関する研究	国立療養所西別府病院 所 長	黒 川 徹	38,000	〃
5指-10	睡眠障害の診断・治療及び疫学に関する研究	国立精神・神経センター 精神保健研究所 部長	大 川 匡 子	10,000	新 規
5公-1	精神分裂病の発症及び病態生理に関する基礎的、臨床的研究	東京医科歯科大学医学部 教 授	融 道 男	17,000	新規再編
5公-2	感情障害の神経科学的成因及び治療に関する研究	山梨医科大学 教 授	假 屋 哲 彦	17,000	〃
5公-3	脊髄空洞症及び二分脊椎症に伴う脊髄病態及び治療に関する研究	神戸大学医学部 教 授	玉 木 紀 彦	22,000	〃
5公-4	神経疾患の病態解明に関する分子遺伝学的研究	東京大学医学部 教 授	金 澤 一 郎	21,000	〃
5公-5	児童・思春期における行動・情緒障害の病態及び治療に関する研究	東京大学医学部 教 授	栗 田 廣	16,000	〃
合 計				620,000	

国立^{精神}神経センター神経研究所年報
第7号（通巻15号）平成4年度

発行 平成5年3月31日
発行者 杉田秀夫
編集者 山元弘
桜川宣男
印刷 有限会社新和印刷

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
