

国立精神・神経センター  
神 經 研 究 所 年 報

第 8 号 (通卷16号)

平成 5 年度

National Institute of Neuroscience  
National Center of Neurology  
and Psychiatry

— 1993 —

国立精神・神経センター  
神 經 研 究 所 年 報

第 8 号 (通卷16号)

平成 5 年度



神経研究所 記念撮影 平成6年3月15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)	16

## II 研究業績

1. 疾病研究第一部	21
2. 疾病研究第二部	35
3. 疾病研究第三部	54
4. 疾病研究第四部	69
5. 疾病研究第五部	77
6. 疾病研究第六部	88
7. 疾病研究第七部	107
8. 診 断 研 究 部	113
9. 微細構造研究部	124
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	170
14. モデル動物開発部	180
15. 実験動物管理室	188
16. ラジオアイソトープ管理室	192

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	211
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	213
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	214
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	215
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	216
3. 国立精神・神経センター神経研究所勤務心得	218
4. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会運営要領	219
5. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会委員	221
6. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会評価部会委員	222
7. 平成5年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表	223
8. 平成6年度 精神・神経疾患研究委託費研究課題一覧表	224

---

# I 神経研究所の概要

---

# 1. 概 要

## 1. はじめに

国立精神・神経センター神経研究所は、精神・神経・筋の疾病と、それらの発達障害の病因や病態及びその治療法の開発のために設立され、平成5年度末を以て16年の長い年月を経た。この間、昭和61年10月1日のセンター化という大変革はあったが、着々と整備が進み、所員一同の努力によって本研究所の基盤は確かなものとなった。開所以来16年の間に生物学的研究手法は革命的な変貌をとげた。すなわち遺伝子を直接手にし、それを用いて直接疾病の原因を明らかにし、病態のありようを分子レベルで理解し、さらにそれらの疾患の遺伝子治療の可能性が出てきたことである。研究の手法の変革は一方では研究者の、他方では患者およびその家族の意識の変化をもたらした。かつて遺伝性という言葉が社会的に禁句であった疾患も広く普通のこととして受け入れられるようになって来た。このような変化は、我々の対象とする疾患の研究を容易にして来ただけでなく、さらに高度の研究を可能として来ている。また現在迄アプローチの方法が不明であった疾病をも研究可能とした。こうした動きの中で、我々の研究所の研究も進み、世界中の多くの研究所から高い評価を得ている論文も少なくない。

## 2. 組 織

神経研究所は所長1、部長13、管理室長2、および研究室長31、計47名の定員から成っている。ただし部長2は選考中であり、研究室長の定員のうち4名は研究員として運用している。平成5年度には定員削減が1名あり、微細構造研究部より室長1名が欠員となった。このほかに研究所にとって最も重要なポストの一つである流動研究員30名がある。流動研究員は各部に原則として2名ずつ所属する研究者で、多くのは学位取得者であって、諸外国のpostdoctoral fellowに相当する。以上からすると研究者は77名にすぎないことになるが、我々の研究所には外来の研究者が多く平成6年3月1日現在、併任研究員55名、客員研究員29名、外来研究員21名、研究生117名、研究見習生7名で、計229名、賃金雇のセンター研究員25名、センター研究助手25名、その他2名で52名、さらに研究費雇用者28名となる。従って総計は386名の多きを数える。この中でほぼ常勤的な人数は約200名程度と考えられる。

特筆すべきは研究生のうち委託大学院学生で、修士課程9名、博士課程22名であり、定員の実に5分の3を越える。また外来研究員のうち新技術事業団科学技術特別研究員が6名、「さきがけ研究21」3名、(財)ヒューマンサイエンス振興財団流動研究員2名、(財)長寿科学振興財団リサーチレジデント2名な

## I 神経研究所の概要

ども挙げなければならない。また外国からの留学生として、新技術事業団 STA フェローは 2 名がある。人事の動きとしては平成 6 年 3 月 1 日を以て前所長杉田秀夫が国立精神・神経センター総長へ、代わって前機能研究部長小沢鋈二郎が神経研究所長へと昇格した。それ以外の人事は各研究部一年の歩みに詳しい。なお運営部所属であるが、平成 6 年 3 月 1 日付けで前所長室秘書高木富子が総長室秘書へ、前総長室秘書大関桂子が所長室秘書へと配置換えになった。

## 3. 研究活動

研究活動の詳細は各研究部の研究業績の欄にのべられている。多岐に渡った内容であり、内容も豊富であるのでそちらを参照されたい。

国立精神・神経センターによる国際痴呆共同研究による第 6 回国際痴呆シンポジウム “Alzheimer Disease : Senile Plaques and Amyloid” が平成 6 年 3 月 10、11 日に行われた。

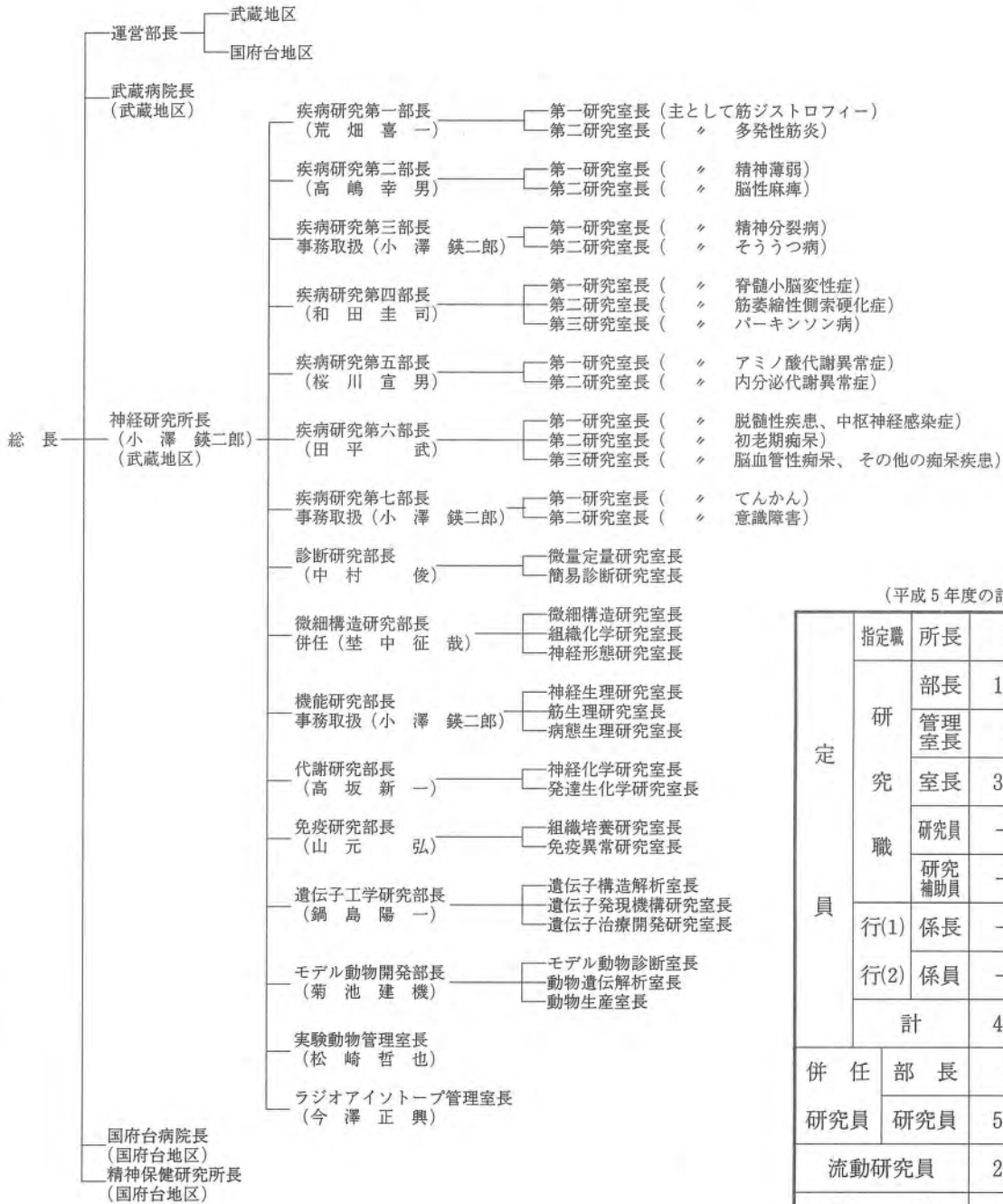
昨年の「概要」でふれた脳の十年構想も着々と議論が重ねられ、神経研究所ばかりでなく、当センター全体の問題、さらに厚生省全体の方針として採否の議論がなされつつある。この計画が実行され 21 世紀に向けて神経研究所がさらに大きな飛躍をとげることが期待される。

本研究所は国内的にも、国際的にも益々その価値を認められつつあり、本年の進展もそれに向かった着実な一歩であった。

平成 6 年 3 月末日

国立精神・神経センター 神経研究所  
所長 小沢鋈二郎

## 2. 国立精神・神経センター神経研究所組織（表1）



(平成5年度の計)

定員	指定職	所長	1	
	研究	部長	12	
		管理室長	2	
		室長	33	
	職	研究員	—	
		研究補助員	—	
	行	行(1) 係長	—	
		行(2) 係員	—	
			計	48
	併任	部長	4	
研究員		51		
		流動研究員	28	
		賃金	2	
		合計	133	



### 3. 平成5年度 神経研究所構成員 (表2)

(平成5年4月1日～平成6年3月31日)

所長: 杉田秀夫 (~6.2.28)		小沢 鏡二郎 (6.3.1~)	
部名	部長	研究室	研究員
疾病研究第一部	荒知喜一	武田伸一	塚原俊文
			中村浩一郎 (~5.4/30) 林由起子 李 濟賢 (5.5/1~) 宮越友子 (5.6/1~)
			○センター研究員 *センター研究助手 ○後藤加奈子 ○古賀律子 *小林 慶 (5.4/1~)
			研究員 △研究見習生 石井重紀子 奥山 輝智 織茂 洋宏 川口 泉 小古 城川 野田 美知 平島 惠 潤 泰 李 濟賢 (~5.4/30) 中村 昭則 (5.6/1~) 石井 弘子 (6.1/11~) 松田 知栄 (6.3/1~) 阿部 雅美 (6.3/16~)
			併任研究員 一 幸子 猛彦 明広 仁 章 博 惠 経 邦 浦原 倉藤 原口 田宮 /1~ 石 鎌 佐 春 山 吉 西 (5.9/1~)
			客員研究員 夫 昭 恭 俊 雄 木 本 島 俊 高米 寺 (5.7/1~)
			外来研究員
疾病研究第二部	高嶋幸男	田中 晴敬 水戸 (~5.9./30) 水口 雅 水口 (5.11/1~)	
			飯田 浩一 (~5.5/31) 加藤 光広 (5.4/1~) 相馬 収 (5.10/1~)
			*堤 悦子 *伊崎紀代子 *進 町子 *森本 啓子 *大橋 啓子 *岡本 公子
			研究員 一 浩文 德彦 新 郎子 二郎子 晶 功 博 俊 雅 中 総 一 美 栄 道 三 仲 沢 本 藤 藤 木 中 川 水 道 千 大 小 鬼 加 佐 鈴 田 出口 中 福 松 暹 藤 (5.4/19~)
			併任研究員 清生 繁 悟 雅 寺一 克 小野 田 岡 野 口 内 秀 真 澄 山 稲 垣 (5.8/1~)
			客員研究員 猪俣 賢博 文 義 斐木 木 角 山 田 戸 許 鈴 鈴 田 中 西 水 (5.11/1~)
			外来研究員

疾病研究第三部	杉田秀夫 (~6.2/28 事務取扱) 小沢鉄二郎 (6.3/1~ 事務取扱)	三西川 雅 彦 徹					富田 麗	○海野麻子 ○齊藤和子 ○山崎千尋	近藤昌敏 (5.4/19~) 太田垣綾美 (5.5/1~) 查星 (5.5/1~) △島田由紀 (5.7/26~7/31) 柏木愉理 (5.10/16~)	大池明彦 小池哲正 加藤由起 加藤有行 柏木淳樹 熊新子 杉下眞理 野村邦美 野村奈美 福智寿克 宗岡昌彦 村田昌彦 吉村祐志 (5.11/1~)	有車邦正 馬地皓太 小宮山秀治 小谷山幸清 小茂山ゆかり 白高橋浩博 武内島田ッ 綱松三堀 (5.10/15~)	市川宏久 岩間續 岩林	橋本篤 司
疾病研究第四部	和田圭 司	吉田瑞子 田中光一 (5.6/1~) 関口正幸 (5.6/1~)					渡瀬啓子 濱崎浩 (5.4/1~)	○松井京子 *志鎌昌子 *木内美子 ○和田惠津子 (~5.9/30) *陣野多磨	郭人見清隆 (6.1/17~)	伸清隆 (6.1/17~)	小田健一郎	和田惠津子 (5.10/1~)	
疾病研究第五部	桜川宣男	桃井隆					大島登志男 (~5.7/23) 新井幸男	*和气佳代 *西桂子 *川延康	北村純一 徐俊隆 松井隆 竹尾仁良 (5.10/1~) 萩原達也 (5.12/1~) 前野浩巳 (6.3/1~)	井藤秀典 石佐木鈴 井藤秀典 石佐木鈴	青木稔 木庭均 桜	横山安 伸	

I 神経研究所の概要

部名	部長	研究室	部長	研究員	流動研究員	○センター研究員 *センター研究助手	研究員 △研究見習生	兼任研究員	客員研究員	外来研究員
疾病研究第六部	武平	国高山 下橋村 龍慶 英吉隆	8/16～休職)	遠山潤 (5.4/1～)	○東眞木子 (5.4/5～)	△研究見習生 (～5.9/30) 小林治 (～5.6/30) 鈴木浩悦 武市知弘 角田弘之 △中川温子 大内秀高 (5.5/17～) 吉川秀人 (5.7/1～) 宮永裕子 (5.11/1～) 横田千夏 (5.11/1～)	雄澄 哲真 口藤 北遠	Grazyna Michalowska -Wender (6.3/18～)	亘弥 荒木幸 池田Milena E. Kozowska 耿同超 (～5.7/7) 光永吉宏	
疾病研究第七部	杉田秀夫 (～6.2/28) 事務取扱) 小沢鉄二郎 (6.3/1～) 事務取扱)	三辺義雄		江守賢次 (5.4/1～6.3/31) 橋井美奈子 (5.4/1～)	*川上藤江 (～5.6/30) ○村崎欣子 (5.4/2～6.3/31) *宮村操子 (5.8/23～)	橋本謙二 (5.10/12～) 足立直人 (5.11/1～) 勝盛安 (6.2/1～) 成田奈津子 (6.2/1～)	男部臣威一正博 俊孜雅正佛和陽 川田豫野沼村田 石伊宇大木東			

診断研究部	中村 俊	萩野 孝成	史 介		室屋賢康 (~6.3/31) 中福雅人 (5.4/1~6.3/31) 橋本裕子 (5.4/1~6.3/31)	*奥田 薫 ○前川みどり *高山明美 ○横田京子	後藤孝典 (5.6/25~) 矢野登志夫 (5.9/13~) △山崎貞子 (5.9/13~) △角野文緒 (6.2/11~) 李洪珍 (5.12/1~6.1/31) 中川康史 (6.3/1~)	高前山 昌道 (5.9/13~) 松森下 一 (5.9/13~) 森矢 沢部 渡部 (5.9/13~)	張李 (5.9/1~) 森下 (5.10/1~) 李洪珍 (6.2/1~) Tryambak Deo Singh (6.3/17~)	堅 紹 巍 (5.9/1~) 卓 卓 (5.10/1~) 洪 珍 (6.2/1~) Tryambak Deo Singh (6.3/17~)
微細構造研究部	中 堃 (併任)	加 茂	功	菊池愛雄 (~5.5/31)	齊藤陽子 (5.11/1~6.3/31) 山内洋子 (5.11/1~6.3/31)	○桶田利子 *神平純子	秋山千枝子 岩上元佳 井沖津藤 加門川弘龍 Beatriz Hitomi Kiyomoto 小林陽一 (~5.10/31) 小齊亮ゆ (5.10/31) 作田木根光林井野上 山内信惠 (5.6/1~) 中山佳子 (5.6/1~) 小林勝久 (5.7/1~) 松本勝久 (5.7/28~)	後藤雄一 (5.6/1~)	高橋征三 (5.9/13~)	

部名	部長	室長	研究員	流動研究員	○センター研究員 *センター研究助手	研究 △研究見習生	兼任研究員	客員研究員	外来研究員
機能研究部	小沢鏡二郎 (~6.2/28) 小沢鏡二郎 (6.3/1~ 事務取扱)	吉田幹康 萩原晴子		水野裕司 (~5.7/31) 山本秀悟 (5.4/1~)	*前垣圭津 *斉藤和江	彭明照 (~5.6/24)	鈴木厚 (~5.9/30)	斉藤加代子 清水輝夫 David Yaffe (5.9/28~10/15)	鈴木厚 (5.10/1~)
代謝研究部	高坂新一	中嶋一行 (6.1/8~ 海外出張) 久永欣哉 (5.4/1~)		広瀬雄一 浜之上誠 (5.4/1~)	○大沢圭子 *平井ふさこ ○竹本ななさ	飯高昇 石川理恵 井服達哉 樋口雅一 (5.4/12~) 池田康夫 (5.4/19~) Rebecca S. Hartlay (5.7/2~8/13)	今井嘉紀 (~5.9/30) 片岡泰文 島岡章則 武井延之		及川善博 下人雅人 今井嘉紀 (5.10/1~) Helena M. Haapaniemi (6.3/9~)
免疫研究部	山元弘	松田義宏	保竹内	葛原博幸 (~5.5/31) 田村浩男 尾花智 (5.4/1~)	*松本まり子 (~5.9/30) ○小糸寿美 (5.4/1~) ○葛原博幸 (5.6/1~)	△藤浦康良 (5.4/20~) 中田光紀 (5.11/1~)	橋川桂三 (5.5/6~) 川村則行 (5.7/1~)	石川博通 原栄一 古川昭栄 矢倉英隆	Tofazzal Hossain (~5.5/25)
遺伝子工学研究部	鍋島陽一	藤沢淳文 松崎千尋 松本		後藤倉聡 朝倉淳 (5.4/1~8/31)	○鍋島曜子 *柳瀬雅子 *刑部仁美 ○八神貴子	江隅英作 (~5.12/31) 佐藤智美 曾根雅紀 平田丞珍 李洪珍 (~5.11/30) 吉田松生 (5.4/16~) 高橋秀治 (6.1/15~)	星美奈子 (~5.9/30) 中越英樹 (~5.9/30)		Aisha Bibi Kasenally (~6.2/1) 星野幹雄 李紹魏 (~5.8/31) 星美奈子 (5.10/1~12/31) 中越英樹 (5.10/1~) 江隅英作 (6.1/1~) 千葉智樹 (6.2/1~) 千葉真紀 (6.2/1~)

モデル動物開発部	菊池建機	花岡和則 (~6.3/31) 田口文広		久保英幸 (~6.1/9) 廣井透雄 (~6.3/31) 呉江 (5.9/1~) 鈴木秀佳 (6.1/10~)	○花岡美智子 *志鎌昌枝 ○菊地寿和子 *赤間和秀佳 (5.10/18~6.1/9)	○松崎香苗 ○二瓶淳子 ○武市正美	敦恒功磨江樹 伸一吏栄榎子 村原田塚村老小松優子 (5.5/1~) 奥市石富中養△小松優佳 (5.8/1~10/17)	藤内雅規 佐田	浅利将利 白桦扶佐 水谷里 渡辺仁	山崎一斗
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								

所長室	庶務第一課								
事務室	高木富子 (~6.2/28) 大関桂子 (6.3/1~) 櫻井眞理子 齊藤洋子								
R I 室	三井恵里子 (~5.4/23) 小林悦子 (5.4/6~)								
電頭室	赤堀 宏								

## 4. 平成5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5年 4. 1	後藤 由季子 東京大学理学部生物化学科	MAPキナーゼカスケードの活性化機構 およびその機能	診断研究部
4. 21	後藤 雄一 神経研究所微細構造研究部 研究員	ミトコンドリア病の病態と遺伝子異常	セミナー委員会
4. 22	塚原 俊文 神経研究所疾病研究第一部 研究員	Tropomyosin 遺伝子の組織特異的 splicingの機構	セミナー委員会
5. 19	Konrad Beyreuther Professor, Center for Molecular Biology Heidelberg, University of Heidelberg, Germany	Ligand binding and normal function of the amyloid $\beta$ A4 protein precursor (APP) of Alzheimer's disease	代謝研究部
5. 19	水戸 敬 神経研究所疾病研究第二部室長	ダウン症候群の形態学的発達遅延	セミナー委員会
5. 26	服部 成介 神経研究所診断研究部室長	Rasシグナル伝達系の解析	セミナー委員会
6. 15	後藤 隆洋 大阪大学医学部第一解剖学講師	ニューロフィラメントのリン酸化に関する分 子形態学的解析	代謝研究部
6. 24	岡野 栄之 東京大学医科学研究所 化学研究部助手	ショウジョウバエ視覚神経系の分子遺伝学的 解析とその哺乳類神経系への応用	疾病研究第四部
6. 25	西川 徹 神経研究所疾病研究第三部室長	NMDA受容体を介する伝達障害と分裂病	セミナー委員会
6. 30	加茂 功 神経研究所微細構造研究部室長	胸腺筋様細胞の産生するコロニー刺激因子	セミナー委員会
7. 2	工藤 明 ヘキスト・ジャパン医薬総合研究所	プレB細胞レセプターを構成する surrogate L-chain のB細胞分化における 役割	疾病研究第一部
7. 7	木村 英雄 サンディエゴ市ソーク生物学研究所(米国)	シュワン細胞由来成長因子(SDGF)の増 殖作用と核内移行	疾病研究第四部
7. 7	田中 光一 神経研究所疾病研究第四部室長	神経ペプチド受容体及びグルタミン酸トラン スポーターの構造・機能解析	セミナー委員会
7. 8	貝淵 弘三 神戸大学医学部	低分子量GTP結合タンパク質と神経機能	診断研究部
7. 8	関口 正幸 神経研究所疾病研究第四部室長	AMPA型グルタミン酸受容体のキラーサブ ユニット	セミナー委員会

年月日	講師・所属	演 題	担 当
平成5年 8. 5	原 嘉 信 National Institutes of Health, U.S.A.	Brain-1, Brain-2, Brain-4 and SCIP ; mouse class III POU domain tran- scription regulators - Structure and evolution, and potential roles in the formation of the cerebral cortex	疾病研究第四部
9. 7	千 葉 晶 国立岡崎共同研究機構 基礎生物学研究所	ショウジョウバエを使った特異的シナプス形 成機構の解析	遺 伝 子 工 学 研 究 部
9. 8	山 田 源 Department of molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biophysical Chemistry, Germany	1) マウスグースコイド遺伝子の機能解析の 試み 2) in vitro 細胞分化系としてのES細胞	遺 伝 子 工 学 研 究 部
9. 16	中 谷 喜 洋 National Institutes of Health, U.S.A.	真核細胞における転写調節機構 -転写因子 TFIID クローニング、 発現、および構造活性相関-	疾病研究第四部
10. 6	David Yaffe Professor of Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Israel	The Duchenne Muscular Dystrophy Gene: Products and Regulation of Expression (ドシェンヌ型筋ジストロフィー 遺伝子: 産物と発現の調節)	機 能 研 究 部
10. 8	Christoph Redies Max-Planck-Institute, Tübingen, Germany	Cadherins and the Development of Functional Systems in the CNS (カドヘリンと中枢神経系の機能発達)	代 謝 研 究 部
10. 8	David Yaffe Professor of Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Israel	Control Sequences and Regulatory Genes involved in Myogenesis (筋形成に関与する制御配列と調節遺伝子)	機 能 研 究 部
10. 13	梅 園 和 彦 The Salk Institute for Biological Studies, U.S.A.	レチノイン酸シングル伝達における核内レセ プターの役割	疾病研究第四部 疾病研究第一部
10. 19	Rex Y. Wang Professor, Director of Neuro- psychopharmacology Unit, Dept. of Psychiatry & Behavi- oral Science, State Univ. of New York at Stony Brook, U.S.A.	5-HT <sub>2</sub> -like receptors in the medial prefrontal cortex and their functional roles	疾病研究第七部
10. 27	桃 井 隆 神経研究所疾病研究第五部室長	神経系におけるレチノイン酸の機能	セミナー委員会
10. 29	中 嶋 一 行 神経研究所代謝研究部室長	ミクログリアの生理的役割について -ニューロンの成長、成熟への関与-	セミナー委員会



I 神経研究所の概要

年月日	講 師 ・ 所 属	演 題	担 当
平成5年 11. 10	Egbert Bakker ライデン大学人類遺伝学部門教授 (オランダ)	Modern methods in prenatal diagnosis and carrier detection of X-linked diseases	疾病研究第一部
11. 10	Gert-Jan B. van Ommen ライデン大学人類遺伝学部門教授 (オランダ)	Advances in the fundamental study of muscle diseases	疾病研究第一部
11. 12	国 下 龍 英 神経研究所疾病研究第六部室長	$\beta$ アミロイド形成と神経細胞の代謝変化	セミナー委員会
11. 15	大 熊 芳 明 ロックフェラー大学(米国)	転写基本因子 TFIIIE が果たす制御的役割	遺伝子工学 研 究 部
11. 22	今 井 賢 治 Max Planck Institute of Immunobiology, Germany	脊柱形成における胚組織間相互作用の分子遺伝学的解析	疾病研究第四部
11. 24	Malcolm Levene リード大学小児科教授(英国)	Perinatal causes of cerebral palsy (脳性麻痺の周産期原因)	疾病研究第二部 武蔵病院小児神経科
12. 8	中 村 真 ジョーンズ・ホプキンス大学 (米国)	ショウジョウバエ神経発生におけるRNA結合タンパク質 musashi の役割	遺伝子工学 研 究 部
12. 9	竹 内 保 神経研究所免疫研究部研究員	胸腺内T細胞分化に関与する分子の解析	セミナー委員会
12. 20	松 本 陽 (財)東京都神経科学総合研究所	実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症機構の解析 -脳細胞との相互作用-	免疫研究部
平成6年 1. 7	芹 澤 宏 明 Oklahoma Medical Research Foundation, U.S.A.	in vitro 転写系を用いた高等動物における遺伝子発現機構の解析	診 断 研 究 部
1. 10	松 井 宏 晃 聖マリアンナ医科大学 神経精神科講師	抗うつ薬の作用機序とアドレナリン受容体	疾病研究第四部
1. 25	Erick N. Olson Professor and Chairman Robert A. Welch Professor in Chemistry Dept. of Biochemistry and Molecular Biology MD Anderson Cancer Center The University of Texas, U.S.A.	Genetic Control of Myogenesis	遺伝子工学 研 究 部
1. 27	浜 千 尋 神経研究所遺伝子工学研究部室長	中枢神経系で機能する因子を遺伝学から探索する -hikaru genki 遺伝子の解析-	セミナー委員会

年月日	講 師 ・ 所 属	演 題	担 当
平成6年 2. 10	三 品 昌 美 東京大学医学部薬理学教授	グルタミン酸受容体とシナプス可塑性	遺伝子工学 研 究 部
2. 14	西 川 徹 神経研究所疾病研究第三部室長	精神分裂病における神経伝達異常 —精神異常発現薬フェンサイクリジンおよび メトアンフェタミンを用いたアプローチ—	セミナー委員会
2. 15	梶 井 正 SRL学術顧問, 前山口大学医学部教授	雄核発生のその後	疾病研究第五部
2. 24	浅 島 誠 東京大学教授	動物の初期胚での形づくりと細胞分化の分子的 制御	遺伝子工学 研 究 部
2. 25	Efrain C. Azmitia Professor, Dept. of Biology, New York University, U.S.A.	An integrated neuronal-glia mechanism for molecular neuroplasticity (神経系の可塑性を担うニューロン・グリア 相関)	代謝研究部
3.10-11	国立精神・神経センター シンポジウム	Alzheimer Disease : Senile Plaques and Amyloid	疾病研究第六部
	Martin. N. Rossor St. Mary's Hospital, London	The clinicopathological correlates of APP mutation and familial Alzheimer's disease - the UK experi- ence.	
	池 田 修 一 信州大学医学部	Variability of $\beta$ -AP deposited lesions in the brain of Down syndrome	
	高 嶋 幸 男 神経研究所	High expression of KPI-containing substances in the cerebral vessels of patients with Down syndrome	
	浦 上 克 哉 鳥 取 大 学	Amyloid $\beta$ protein precursor (APP) in cerebrospinal fluid and APP mRNAs in cultured skin fibroblasts in patients with Alzheimer's disease	
	北 本 哲 之 九 州 大 学	Molecular pathology of amyloid deposition in the brain	
	国 下 龍 英 神 經 研 究 所	Effect of $\beta$ APP overexpression on the metabolism of neuronal cell line	
	木 村 宏 滋 賀 医 科 大 学	aFGF expression in the surroundings of senile plaques	
	鍋 島 俊 隆 名 古 屋 大 学	$\beta$ -amyloid protein-induced memory impairment and neuronal dysfunction animal model	

I 神経研究所の概要

年月日	講 師 ・ 所 属	演 題	担 当
	Gerard D. Schellenberg University of Washington, Seattle	Genetic heterogeneity and Alzheimer's disease : Chromosome 21, 14, 19 and beyond	
	石 浦 章 一 東 京 大 学	Processing and secretion of Alzheimer's disease amyloid precursor protein	
	Steven G. Younkin Case Western Reserve University, Cleveland	Processing of the Alzheimer amyloid protein precursor	
	森 啓 東京都精神医学総合研究所	Racemization : Its biological significance in Alzheimer's disease	
	黒 田 洋一郎 東京都神経科学総合研究所	Aggregation of -amyloid protein by aluminium and its neurotoxicity in cultured CNCNS neurons	
	秋 山 治 彦 東京都精神医学総合研究所	Inflammatory response in Alzheimer's disease	
	Patrick L. McGeer University of British Columbia, Vancouver	Immune mechanism in senile plaque formation	
3. 17	松 尾 雅 文 神戸大学医学部医学研究国際交流センター	ジストロフィン遺伝子 : スプライシング部位決定因子の解明と新しいジストロフィンアイソフォーム	機 能 研 究 部 疾病研究第一部
3. 18	勝 部 憲 一 フランス国立発生学研究所 (フランス)	Post-mitotic neuroblast に発現する cys repeats を持つ新しい遺伝子の解析	疾病研究第一部
3. 22	国立精神・神経センター シンポジウム	Analysis of T Cell Receptors and Regulatory T Cell Networks in Multiple Sclerosis and HAM/TSP	疾病研究第六部
	大 橋 高 志 神 経 研 究 所	Analysis of PLP-specific T cells	
	近 藤 誉 之 神 経 研 究 所	Analysis of T cell receptor rearrangements in multiple sclerosis	
	宇 宿 功 市 郎 鹿 児 島 大 学	T cell receptor analysis of MBP-responsive T cells in familial MS patients	
	原 英 夫 九 州 大 学	Autoimmune mechanism in HAM/TSP	
	山 本 一 彦 聖マリアンナ医科大学	High frequencies of identical T cell clonotypes in different areas of the synovial lesions of rheumatoid arthritis	

年月日	講師・所属	演題	担当
	Steven Jacobson NINDS, NIH, Bethesda	Immunopathogenesis of HAM/TSP : Analysis of HTLV-I specific cytotoxic T cell responses and T cell receptor usage	
	太田宏平 東京女子医科大学	Antigen presentation by MBP reactive T cells	
	滝口雅文 東京大学	Presentation of peptides by HLA class I molecules	
	Robert W. Karr Monsanto Co., St. Louis	Structure-function relationship of HLA -DR molecules in the context of T cell recognition and antibody binding	
	山村隆 神経研究所	Regulatory T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis	
	Milena Kozovska 神経研究所	T cell receptor peptide vaccination in experimental autoimmune encephalo- myelitis	
	山元弘 神経研究所	Detection of cell surface molecules involved in the early T cell development	
	湊長博	MHC-unrestricted T cell recognition	
3. 24	花岡和則 神経研究所モデル動物開発部室長	培養細胞から「ねずみ」を作る —発生工学技術と神経研究—	セミナー委員会
3. 31	Lefkos T. Middleton The Cyprus Institute of Neurology & Genetics, Cyprus	Autosomal Recessive Spinocerebellar Syndromes : Recent Advance in Molecular Genetics	疾病研究第一部 疾病研究第四部

- 国際セミナー 17名
- 神経研究所セミナー  
(講師：研究所外) 15名
- 所内スタッフセミナー 15名

## 5. 平成5年度 神経研究所研究発表会 (第15回) (表4)

平成6年3月14日(月)~15日(火)

神経研究所本館セミナー室

平成6年3月14日(月)

13:00~13:10 開会の辞

小沢鎧二郎所長

13:10~13:55 疾病研究第1部

「筋ジストロフィー (dy) マウスにおける筋細胞基底膜  
ラミニンMの欠損」

林 由起子, 古賀 律子, 宮越 友子  
李 濟賢, 石井 弘子, 塚原 俊文  
武田 伸一, 松崎 哲也, 埜中 征哉  
荒畑 喜一

「顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の遺伝子  
クローニングと遺伝子診断」

李 濟賢, 後藤加奈子, 小林 慶  
塚原 俊文, 荒畑 喜一

「筋ジストロフィーの遺伝子治療に関する基礎的研究」

武田 伸一, 石井亜紀子, 萩原 康子  
荒畑 喜一

13:55~14:40 疾病研究第2部

「神経堤由来細胞の発達-後根神経節細胞とNF1アス  
トロサイトヘテロトピアについて-」

加藤 光広, 高嶋 幸男

「protective protein のヒト中枢神経系における分布と  
発達」

相馬 収, 水口 雅, 高嶋 幸男

14:40~15:25 疾病研究第3部

「グルココルチコイド受容体に対する向精神薬の直接作  
用」

富田 麗, 三国 雅彦

「分裂病様症状惹起薬によって発現する脳内 c-fos 遺伝  
子の発達に伴う分布パターンの変化」

柏 淳, 海野 麻未, 野村奈美子

大嶋 明彦, 村田 昌彦, 西川 徹

15:25~16:10 疾病研究第4部

「軸索変性モデルマウス (gad) の責任遺伝子単離の試み」

徐 俊教, 松井 京子, 田中 光一  
山元 弘, 和田 圭司(4部, 免疫)

「AMPA型グルタミン酸レセプター機能低下トランスジェニックマウスの開発」

渡瀬 啓, 関口 正幸, 和田 圭司

16:10~16:55 疾病研究第5部

「Lesch-Nyhan症候群患者における遺伝子変異の検討」

遠山 潤, 角田 弘之, 武市 知己  
桜川 宣男

「羊膜細胞移植術と遺伝子治療」

桜川 宣男, 遠山 潤

16:55~17:15 疾病研究第7部

「キンドリング焦点におけるGABA機能の発作発現に至る力動的変化」

江守 賢次, 三辺 義雄, 村崎 欣子

平成6年3月15日(火)

9:00~9:45 疾病研究第6部

「脳炎誘起性T細胞による抗原提示を要求する

T細胞レセプター・ペプチド特異的T細胞」 Milena Kozovska, 山村 隆, 田平 武

「本邦の家族性アルツハイマー病における家系連鎖解析」

光永 吉宏, 高橋 慶吉, 田平 武(疾病研究第6部),  
田崎 博一(弘前大学精神神経科), 渡辺 俊三(愛成会病院),  
目時 弘文(黎明郷リハビリテーション病院)

9:45~10:30 微細構造研究部

「胸腺筋様細胞が産生する細胞増殖分化因子に関する研究」

I 神経研究所の概要

「MELAS 3243 変異は、なぜ CPEO の表現型をとること  
があるのか」

菊池 愛子, 岩上 登, 桒中 征哉  
加茂 功

後藤 雄一, 桒中 征哉 (微細構造研  
究部)、宝来 聡, David A. Clayton  
(スタンフォード大学)

10:30~11:15 機能研究部

「ジストロフィンとラミニンをつなぐ糖タンパク質複合  
体の分子構築」

吉田 幹晴, 鈴木 厚, 山本 秀子  
野口 悟, 水野 裕司, 小沢鉄二郎

「ジストロフィン結合糖タンパク質複合体構成成分の免  
疫化学的検索」

水野 裕司, 山本 秀子, 野口 悟  
吉田 幹晴, 山内洋子\*, 桒中征哉\*,  
小沢鉄二郎 (\*微細構造研究部)

11:15~12:00 代謝研究部

「中枢GABAニューロン様細胞株の細胞死」

久永 欣哉, 池田 康夫, 今井 嘉紀  
井幡 巖, 高坂 新一

「ニューロン膜上のAnnexin V結合蛋白の解析」

今井 嘉紀, 大澤 圭子, 高坂 新一

「低分子プラスミノゲンの神経栄養活性について」

浜之上 誠, 中嶋 一行, 竹本なぎさ  
高坂 新一

12:00~12:20 写真撮影

12:20~13:00 昼休み

13:00~13:45 診断研究部

「神経幹細胞の増殖と分化の分子機構の解析」

中福 雅人, 中村 俊

- 「Rasシグナル伝達系調節因子の多様性」  
服部 成介
- 「Brain Functional NMR Spectroscopyのための要素  
技術の開発に関する研究」  
萩野 孝史, 矢野登志雄
- 13:45~14:30 免疫研究部  
「 $\gamma\delta$ 型T細胞の免疫応答制御機構における役割の解析」  
尾花 智
- 「T細胞の初期分化に関与する分子の解析」  
田村 浩男
- 14:30~15:15 遺伝子工学研究部  
「Gene disruption法によるMyogeninの機能の解析」  
鍋島 曜子, 花岡 和則, 早坂美智子  
江隅 英作, 荒畑 喜一, 埜中 征哉  
鍋島 陽一 (遺伝子工学, 微細, 一部)
- 「神経発生の分子機構—prospero遺伝子の分子遺伝学的  
解析—」  
後藤 聡, 平田 丞, 中越 英樹  
鍋島 陽一, 松崎 文雄
- 15:15~15:30 休み
- 15:30~16:15 モデル動物開発部  
「マウスの延髄薄束核における組織構築」  
市原 伸恒
- 「マウス肝炎ウイルスS蛋白のリセプター結合部位につ  
いて」  
田口 文広, 久保 英幸, 鈴木 秀佳
- 16:15~16:35 ラジオアイソトープ管理室  
「TLC-イメージングプレート法を用いた培養細胞の  
脂質分解酵素代謝産物の簡便な定量法について」  
今澤 正興, 武市 正美
- 16:35~16:55 実験動物管理室  
「各種ミュータント系マウスの凍結受精卵の繁殖性につ  
いて」  
二瓶 淳子, 松崎 哲也
- 18:00~ 懇親会



---

## II 研 究 業 績

---

## 1. 疾病研究第一部

### 1. 研究部一年の歩み

疾病研究第一部は筋ジストロフィー，多発筋炎およびその他の神経・筋疾患の遺伝子診断，病因・病態機序の解明と治療法の開発を目指している。具体的には，①ポジショナルクローニングにより同定された最初のヒト遺伝性疾患の一つである，デュシャンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子診断及び遺伝子治療の基礎的研究，②臨床遺伝学上の画期的な発見とされ“3塩基繰り返し配列病”である筋緊張性ジストロフィーの遺伝的異質性の研究とミオトニンキナーゼの分子病理学的研究，③ホメオボックス様遺伝子との関連が示唆されている顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの遺伝子クローニングと遺伝子診断，④筋ジストロフィーモデル動物の研究，⑤細胞障害性T-リンパ球の持つパーフォリンおよびセリンエステラーゼの骨格筋障害に果たす役割とアポトーシスの研究，⑥家族性高カリウム性周期性四肢マヒにおけるチャンネル異常の検索（本邦の家系において初めてNaチャンネルの $\alpha$ -サブユニットに点突然変異が存在することを発見）などである。とくに筋ジストロフィー（dy）マウスで細胞外マトリックスの主要構成成分であるラミニンMが欠損している事を発見した意義は大きいと考えている。この筋ジストロフィーマウスは，昭和43年（1968）に厚生省の特別研究費としてスタートした筋ジストロフィー研究班（沖中重雄班長）で，実験動物中央研究所（実中研）の野村達次所長がいち早く我が国に導入を図り，その繁殖に成功し，以来厚生省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー研究班に於いて研究が続けられてきたものである。我々の研究によって，筋細胞基底膜が筋ジストロフィーの病態機序を考える上できわめて重要である事が示された。

今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
- （室長） 武田伸一
- （研究員） 塚原俊文
- （客員研究員） 高木昭夫，米本恭三，寺島俊雄
- （併任研究員） 石浦章一，石原傳幸，鎌倉恵子，佐藤 猛，春原経彦，西宮 仁，山口 明，吉田邦広
- （流動研究員） 中村浩一郎，林由起子，李 濟賢，宮越友子
- （センター研究員） 後藤加奈子，古賀律子，小林 慶
- （研究生） 石井亜紀子，石井弘子，奥山輝明，織茂智之，小泉宏隆，古城 徹，田川一彦，  
中尾洋子，中村昭則，野島美知夫，平澤恵理，淵脇泰介，松田知栄

（部長 荒畑喜一）

## II 研究業績

### 2. 研究業績

#### A 論文

##### a. 原著

- 1) Feero W.G, Wang J, Barany F, Zhou J, Todorovic S.M, Conwit R, Galloway G, Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A, Arahata K, Wessel H.B, Wadelius C, Marks H.G, Hartlage P, Hayakawa H, Hoffman E.P:  
Hyperkalemic periodic paralysis : Rapid molecular diagnosis and relationship of genotype to phenotype in 12 families.  
Neurology 43: 668–673, 1993
- 2) Wang J, Zhou J, Todorovic S.M, Feero W.G, Barany F, Conwit R, Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A, Arahata K, Wessel H.B, Sillen A, Marks H.G, Hartlage P, Galloway G, Ricker K, Lehmann-Horn F, Hayakawa H, Hoffman E.P:  
Molecular genetic and genetic correlations in sodium channelopathies: Lack of founder effect and evidence for a second gene.  
Am J Hum Genet 52: 1074–1084, 1993
- 3) Sorimachi H, Toyama-Sorimachi N, Saido T.C, Kawasaki H, Sugita H, Miyasaka M, Arahata K, Ishiura S, Suzuki K:  
Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle.  
J Biol Chem 268: 10593-10605, 1993
- 4) Matsumura K, Nonaka I, Tome F.M.S, Arahata K, Collin H, Leturcq F, Recan D, Kaplan J.C, Fardeau M, Campbell K.P:  
Mild deficiency of dystrophin-associated proteins in Becker muscular dystrophy patients having in-frame deletions in the rod domain of dystrophin.  
Am J Hum Genet 53: 409–416, 1993
- 5) Arahata K, Hayashi YK, Mizuno Y, Yoshida M, Ozawa E:  
Dystrophin-associated glycoprotein and dystrophin co-localisation at sarcolemma in Fukuyama congenital muscular dystrophy.  
Lancet 342: 623–624, 1993
- 6) Miyashita H, Ikeda U, Shimada K, Natsume T, Arahata K:

Becker muscular dystrophy with early manifestation of left heart failure.

Internal Medicine 32: 408-411, 1993

- 7) Arahata K, Hayashi YK, Koga R, Goto K, Lee J.H, Miyagoe Y, Ishii H, Tsukahara T, Takeda S, Woo M, Nonaka I, Matsuzaki T, Sugita H:

Laminin in animal models for muscular dystrophy: Defect of laminin M in skeletal and cardiac muscles and peripheral nerve of the homozygous dystrophic dy/dy mice.

Proc Japan Acad 69, Ser B: 259-264, 1993

- 8) Matusmura K, Nonaka I, Arahata K, Campbell K.P :

Partial deficiency of dystrophin-associated proteins in a young girl with sporadic myopathy and normal karyotype.

Neurology 43: 1267-1268, 1993

- 9) Arahata K, Wang J, W.Gregory F, Hayakawa H, Honda K, Sugita H, Hoffman E.P :

Identification of a Thr-to-Met mutation in the skeletal muscle sodium channel gene in hyperkalemic periodic paralysis of a Japanese family.

Ann N.Y. Acad Sci 707: 342-345, 1993

- 10) D'Amore P.A, Brown R.H, Ku, P-T, Hoffman E.P, Watanabe H, Arahata K, Ishihara T, Folkman J :

Elevated basic fibroblast growth factor in the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy.

Ann Neurol 35: 362-365, 1994.

- 11) Nakamura K, Arahata K, Ishiura S, Osame M, Sugita H :

Degradative activity of granzyme A on Skeletal muscle proteins in vitro : A possible molecular mechanism for muscle fiber damage in polymyositis.

Neuromusc Disord 3: 303-310, 1993

- 12) Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E, Goto K, Koga R, Nonaka I, Sugita H, Arahata K:

Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies.

J Neurol Sci 119: 53-64, 1993

- 13) Yoshida K, Ikeda S, Nakamura A, Kagoshima M, Takeda S, Shoji S, Yanagisawa N:

Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene in patients with Becker

## II 研究業績

muscular dystrophy presenting with dilated cardimyopathy.

Mucle & Nerve 16: 1161-1166, 1993

- 14) 坂井克之, 小島 進, 松村多可, 高木昭夫, 荒畑喜一 :

ベッカー型筋ジストロフィーを合併したダウン症候群の1例

臨床神経学 33 : 1201-1203, 1993

- 15) 竹光正和, 古賀律子, 石浦章一, 埜中征哉, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

mdxマウスの横隔膜、四肢筋および筋芽細胞移植筋におけるジストロフィン関連タンパク

臨床神経学 34 : 141-156, 1994

### b. 著 書

- 1) Arahata K, Sugita H:

Molecular genetic dianosis of muscular dystrophies.

Proc of the Third International Bioethics Seminar in Fukui, 1993. ed by Fujiki N. &

Macer D.R.J, Eubios Ethics Inst. pp53-56, 1994.

- 2) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

Becker型筋ジストロフィーとジストロフィン

Annual Review神経 1994 中外医学社, 東京, pp283-300.

- 3) 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

筋ジストロフィーの分子遺伝学的診断

「神経難病, ヒトゲノム研究と社会」: 藤木典生, メイサーダリル編, ユウバイオス倫理研究会,  
pp53-55, 1994

- 4) 荒畑喜一 :

Duchenne型筋ジストロフィー (DMD)

遺伝子病入門 高久史麿ほか編, 南江堂, 東京, pp129-142, 1993

- 5) 武田伸一 :

筋発生の遺伝子制御

Annual Review神経 1994 中外医学社, 東京 pp28-36, 1994

- 6) 林 由起子, 荒畑喜一 :

ジストロフィンの意義と診断への応用は?

神経疾患の臨床-今日の論点 柳澤信夫編, 中外医学社, 東京 pp242-250, 1993

- 7) 中尾洋子, 武田伸一, 荒畑喜一 :

進行性筋ジストロフィー —研究の現況と遺伝子診断・遺伝子治療—

臨床医のための実験医学シリーズ13 遺伝子診断 平井久丸編, 羊土社, 東京 pp36-53, 1993

c. 総説

1) 荒畑喜一 :

顔面肩甲上腕型, 肢帯型, Emery-Dreifuss型筋ジストロフィー

最新医学 48 : 516-521, 1993

2) 荒畑喜一 :

進行性筋ジストロフィー

医学のあゆみ 166 : 779-784, 1993

3) 荒畑喜一 :

デュシャンヌ型筋ジストロフィー

臨床分子医学 1 : 488-494, 1993

4) 武田伸一, 荒畑喜一 :

筋ジストロフィー (DMD, BMD)

Brain Nursing 9 : 731-736, 1993

5) 武田伸一, 塚原俊文

筋の発生に關与する遺伝子

最新医学 48 : 11-17, 1993

6) 川口洋子, 荒畑喜一, 杉田秀夫 :

筋ジストロフィー

診断と治療 81 : 1453-1457, 1993

7) 竹光正和, 荒畑喜一 :

ジストロフィンとdystrophin-related proteinおよびdystrophin-associated proteins.

神経内科 40 : 123-129, 1994

d. 班会議報告書

1) 佐藤 功, 衣斐 達, 中尾直樹, 周妨 拓, 荒畑喜一 :

病的筋の細胞膜における免疫組織化学的検討

厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー及び類縁疾患の病態と治療法に関する研究

平成5年度研究報告書 p29-31, 1994

2) 荒畑喜一, 林 由起子, 宮越友子, 李 濟賢, 後藤加奈子, 古賀律子, 塚原俊文, 武田伸一,

## II 研究業績

Engvall E, 石井弘子 :

筋ジストロフィーマウスにおける細胞外マトリックスの検討

厚生省精神・神経疾患・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

平成5年度研究報告書 p38-40, 1994

3) 荒畑喜一, 古賀律子, 平澤恵理, 後藤加奈子, 埜中征哉, 塚原俊文, 武田伸一 :

ジストロフィン分子の高システイン及びC末端領域が保持された重症DMD症例

厚生省精神・神経疾患・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

平成5年度研究報告書 p49-50, 1994

4) 荒畑喜一, 李 濟賢, 後藤加奈子, 小林 慶, 中村昭則, 塚原俊文, 武田伸一, 古川哲雄,

佐橋 功, 野村芳子, 瀬川昌也, 松原四郎, C.Wijmenga, R.R.Frants :

顔肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の遺伝子解析

厚生省精神・神経疾患・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

平成5年度研究報告書 p74-76, 1994

5) 武田伸一, 石井亜紀子, 萩原康子, 斎藤 泉 :

アデノウイルスベクターを用いた筋ジストロフィーの遺伝子治療に関する基礎的研究

厚生省精神・神経疾患・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

平成5年度研究報告書 p47-50, 1994

6) 吉田邦広, 柳澤信夫, 小林 慶, 古賀律子, 武田伸一, 荒畑喜一 :

拡張型心筋症を主徴とするベッカー型筋ジストロフィーとジストロフィン遺伝子異常について

厚生省精神・神経疾患・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

平成5年度研究報告書 p46-48, 1994

7) 水野美邦, 平澤恵理, 古賀律子, 後藤加奈子, 荒畑喜一 :

Duchenne型筋ジストロフィーにおけるジストロフィン陽性線維の解析

厚生省精神・神経疾患・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

平成5年度研究報告書 p51-53, 1994

8) 大野茂男, 丸山 敬, 石浦章一, 鈴木絃一, 荒畑喜一 :

筋緊張性ジストロフィーの原因遺伝子, MTPKの生理機能の酵素, 細胞レベルでの解析

厚生省精神・神経疾患・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

平成5年度研究報告書 p68-69, 1994

9) 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  
 厚生省厚生科学研究費補助金長寿科学総合研究  
 平成4年度研究報告書(1) p439-441, 1993

## B 学会発表

### a. 特別講演, シンポジウム

- 1) Arahata K:  
 Identification of exon skipping and alternative splicing of dystrophin mRNA.  
 HGM93(Human Genome Mapping) Satellite Symposium. Kobe, 11.15, 1993
- 2) Arahata K, Sugita H:  
 Molecular genetic diagnosis of muscular dystrophies.  
 3rd International Bioethics Seminar in Fukui, Fukui, 11.19, 1993
- 3) Hayashi YK, Nonaka I, Arahata K:  
 Changes in extracellular matrix, laminin and collagne IV, in FCMD.  
 Symposium on Fukuyama type congenital muscular dystrophy. Tokyo, 6.12, 1993
- 4) Arikawa-Hirasawa E, Nonaka I, Arahata K:  
 Immunocytochemical analysis of dystrophin and spectrin in FCMD.  
 Symposium on Fukuyama type congenital muscular dystrophy. Tokyo, 6.12, 1993
- 5) 荒畑喜一:  
 進行性筋ジストロフィー: 研究の現況と遺伝子診断・遺伝子治療  
 第48回京滋神経セミナー, 京都, 9.24, 1993
- 6) 荒畑喜一:  
 筋疾患の分子生物学と遺伝子診断  
 第66回日本生化学大会シンポジウム, 東京, 10.4, 1993
- 7) 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  
 日本人類遺伝学会第38回大会, 東京, 10.21, 1993
- 8) 荒畑喜一:  
 神経・筋疾患の遺伝子診断の現況  
 第49回広島神経疾患同好会, 広島, 2.25, 1994



## II 研究業績

### 9) 荒畑喜一 :

進行性筋ジストロフィー研究の進歩 - 遺伝的異質性 -

筑波大学ニューロサイエンスセミナー, つくば, 3.2, 1994

### 10) 武田伸一 :

The effect of microgravity on skeletal muscles.

ニューロラブ・プレ提案ミーティング, 東京, 7.21, 1993

### 11) 武田伸一 :

筋の発生に關与する遺伝子

第10回小児神経・筋疾患懇話会, 東京, 8.21, 1993

### 12) 塚原俊文, 武田伸一, 荒畑喜一 :

筋ジストロフィーの遺伝子治療・現況と展望

日本人類遺伝学会第38回大会, 東京, 10.21, 1993

## b. 国際学会

### 1) Arahata K, Lee J.H:

Application of a chromosome 4q35-gter marker, p13E-11(D4S810) for the detection of DNA rearrangement in Japanese population and for the diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy.

International Consortium Meeting for FSHD. San Francisco, 6.9, 1993

### 2) Arahata K, Hayashi YK:

Merosin abnormality in Fukuyama congenital muscular dystrophy.

Society for Experimental Neurophathology. Boston, 11.16, 1993

### 3) Takeka S:

Mutations of the dystropin gene and dilated cardiomyopathy.

Molecular diagnosis in neuromuscular disorders problems and perspectiues, Venice, Italy, 10.22, 1993

### 4) Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E, Nonaka I, Sugita H, Arahata K :

Altered basal lamina composition and dystrophin in muscular dystrophies.

45th American Academy of Neurology, New York, 4.25, 1993

### 5) Kawaguchi Y, Goto K, Nonaka I, Sugita H, Arahata K :

Detection of the dystrophin gene deletion using mumified umbilical cord.

45th American Academy of Neurology, New York, 4.25, 1993

c. 一般学会

- 1) 荒畑喜一, 川口洋子, 後藤加奈子, 平林久吾, 埜中征哉, 杉田秀夫, 古川哲雄, 佐橋 功, 周妨 拡, 野村芳子, 瀬川昌也:  
染色体4p35-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 (FSHD) の遺伝子診断  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.9, 1993
- 2) 吉村俊朗, 伊藤 聖, 長瀧重信, 辻畑光宏, 荒畑喜一:  
塩酸プピバカインによる再生筋・運動終板の免疫組織的検討  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.9, 1993
- 3) 伊藤 聖, 吉村俊朗, 長瀧重信, 辻畑光宏, 荒畑喜一:  
重症筋無力症患者の運動終板におけるジストロフィン関連蛋白の検討  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.9, 1993
- 4) 竹光正和, 荒畑喜一, 埜中征哉:  
X線照射されたmdxマウスに対する筋芽細胞移植の試み  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993
- 5) 衣斐 達, 周妨 拡, 佐橋 功, 満間照典, 荒畑喜一:  
生検筋におけるジストロフィンおよび関連蛋白の免疫組織化学的検討  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.11, 1993
- 6) 中村浩一郎, 織茂智之, 武田伸一, 塚原俊文, 杉田秀夫, 荒畑喜一:  
多発性筋炎におけるパーフォリン, グランザイムの役割  
—In situ hybridization法による解析—  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993
- 7) 平澤恵理, 水野美邦, 石原傳幸, 埜中征哉, 荒畑喜一:  
Duchenne型筋ジストロフィーにおけるrevertant fiberのDNA解析  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993
- 8) 織茂智之, 新井雅信, 玉城允之, 中村浩一郎, 荒畑喜一, 杉田秀夫:  
Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) におけるパーフォリン (Pf) の関与  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993
- 9) 林 由起子, 埜中征哉, 武田伸一, 塚原俊文, 杉田秀夫, 荒畑喜一:  
筋ジストロフィーにおける細胞外マトリックスの変化

## II 研究業績

第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.11, 1993

- 10) 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 :  
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  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.9, 1993

## C 班会議発表

- 1) 佐橋 功, 衣斐 達, 中尾直樹, 周妨 弘, 荒畑喜一 :  
病的筋の細胞膜における免疫組織化学的検討  
厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィー及び類縁疾患の病態と治療法に関する研究  
平成5年度班会議 東京, 12.3, 1993
- 2) 荒畑喜一, 林 由起子, 宮越友子, 李 濟賢, 後藤加奈子, 古賀律子, 塚原俊文, 武田伸一,  
Engvall E, 石井弘子 :  
筋ジストロフィーマウスにおける細胞外マトリックスの検討  
厚生省精神・神経疾患・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  
平成5年度班会議 東京, 12.3, 1993
- 3) 荒畑喜一, 古賀律子, 平澤恵理, 後藤加奈子, 埜中征哉, 塚原俊文, 武田伸一 :  
ジストロフィン分子の高システイン及びC末端領域が保持された重症DMD症例  
厚生省精神・神経疾患・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  
平成5年度班会議 東京, 12.3, 1993
- 4) 荒畑喜一, 李 濟賢, 後藤加奈子, 小林 慶, 中村昭則, 塚原俊文, 武田伸一, 古川哲雄,  
佐橋 功, 野村芳子, 瀬川昌也, 松原四郎, Wijmenga C, Frants R.R :  
顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の遺伝子解析  
厚生省精神・神経疾患・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  
平成5年度班会議 東京, 12.3, 1993
- 5) 大野茂男, 丸山 徹, 石浦章一, 鈴木絃一, 荒畑喜一 :  
筋緊張性ジストロフィーの原因遺伝子, MRPKの生理機能の酵素, 細胞レベルでの解析  
厚生省精神・神経疾患・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  
平成5年度班会議 東京, 12.2, 1993
- 6) 荒畑喜一, 林 由起子, 古賀律子, 杉田秀夫 :  
筋ジストロフィー (dy) マウスにおけるラミニンの欠損

1994年生体運動合同班会議，東京，1.5，1994

7) 荒畑喜一：

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの分子遺伝学

厚生省精神・神経疾患「筋ジストロフィー」総合班会議

東京，1.25，1994

8) 荒畑喜一，李 濟賢：

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの遺伝子解析

厚生省長寿科学総合研究・遺伝性神経疾患の遺伝子解析研究班

平成5年度班会議 東京，2.10，1994

9) 武田伸一，石井亜紀子，萩原康子：

培養骨格筋細胞に対する効率の高い遺伝子導入について

厚生省精神・神経疾患・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

平成5年度班会議 東京，12.2，1993

10) 武田伸一，鍋島陽一：

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療に関する基礎的研究

厚生省高度先進医療研究事業，遺伝子治療班

平成5年度臨床研究報告会，東京，3.26，1994

11) 吉田邦広，柳澤信夫，小林 慶，古賀律子，武田伸一，荒畑喜一：

拡張型心筋症を主徴とするベッカー型筋ジストロフィーとジストロフィン遺伝子異常について

厚生省精神・神経疾患・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

平成5年度班会議 東京，12.3，1993

12) 水野美邦，平澤恵理，古賀律子，後藤加奈子，荒畑喜一：

Duchenne型筋ジストロフィーにおけるジストロフィン陽性線維の解析

厚生省精神・神経疾患・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

平成5年度班会議 東京，12.3，1993

筋ジストロフィー (dy) マウスにおける筋細胞基底膜ラミニンM (メロシン) の欠損

林由起子, 古賀律子, 宮越友子, 李 濟賢  
塚原俊文, 埜中征哉, 松崎哲也, 荒畑喜一

目的: これまで我々は、ヒト筋ジストロフィー筋における細胞外マトリックスの変化を検討し、福山型筋ジストロフィー (FCMD) におけるラミニンM鎖 (メロシン) の異常を指摘してきた (Hayashi, et al. J. Neuro. Sci., 1993)。今回はさらに、筋のジストロフィー変化に及ぼすラミニンM鎖、およびその他の細胞外マトリックスの意義を詳細に説明するために、筋ジストロフィーモデル動物を用いてこれらの変化を検討した。

対象及び方法: 筋ジストロフィーモデル動物 (mdx マウス、dy マウス、BIO 14.6ハムスター、line 413チキン) について、免疫組織化学的・生化学的にラミニン (M鎖、EHS)、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ジストロフィン、DRP等の発現様式を検討した。

結果: Homozygousのdyマウス (dy/dy) ではラミニンM鎖が検出されず、M鎖の欠損が考えられた。しかし非発症のheterozygous (Dy/dy) およびコントロール C57BL/2J (Dy/Dy) では通常M鎖の染色が得られた。一方、その他の基底膜構成要素の染色性には明らかな異常は認められなかった。またDRPの染色性はコントロールと同様、NMJに明瞭に認められ、一部再生筋にも存在した。一方、mdxマウス、筋ジストロフィーハムスター、筋ジストロフィーチキンでは骨格筋基底膜には免疫化学的に明らかな異常は認められなかった。

考察: Homozygous dy/dyマウスのラミニンM鎖欠損は、本モデルマウスの病因ないしは病態機序を考える上で筋細胞基底膜が重要な関わりを持つことを示唆している。dyマウスの遺伝子座は染色体10番のDRPの遺伝子座と近い位置に報告されているが、今回の検索ではDRPに異常は認められず、dy遺伝子の変異はDRP

遺伝子とは異なることが示唆された。一方FCMDの遺伝子座は第9染色体の長腕にあることが示されており、ラミニンM鎖のそれ (第6染色体) とは異なるが、ラミニンM鎖はFCMDの病態機序を説明する上でも重要なカギを握っているものと思われる。

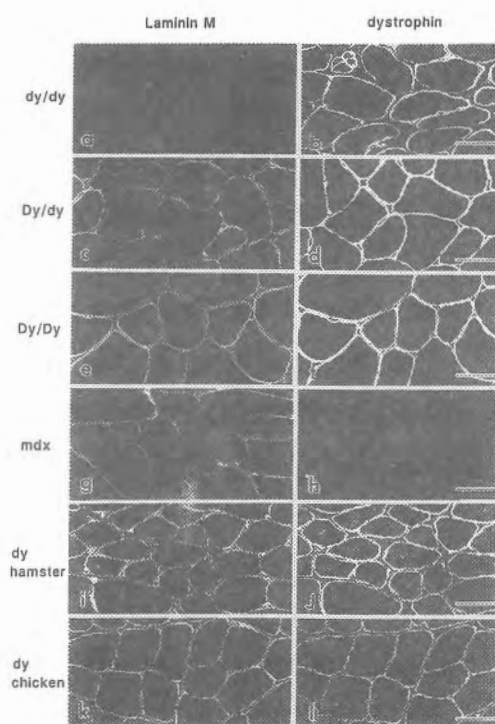


図. 説明本文中 (Bar=50microns)

[文献]  
Arahata K, Hayashi Y, Koga R, et al: Laminin in animal models for muscular Dystrophy. Proc. Japan Acad., 69, Ser B, 259-264, 1993.

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の遺伝子クローニングと遺伝子診断

李 濟賢, 後藤加奈子, 松田知栄, 小林 慶, 塚原俊文, 荒畑喜一

目的: FSHDは顔面と上肢帯～上腕の筋肉が主として障害される常染色体優性の筋ジストロフィーである。

最近の研究から、ヒトの染色体 4q35-pterにマップされているp13E-11のプロンプを用いた遺伝子解析の結果、FSHDでは制限酵素 EcoRI切断断片サイズに差があり、おそらくFSHDの発病に関与する遺伝子には遺伝子欠失または突然変異が生じている可能性があるものと推測されている (Wijmengaら、1992)。また荒畑ら (1993)は日本人FSHDにおいてもこれを確認した。さらに p13E-11に反応するFSHD関連 EcoRI断片には 3.2kbの KpnI断片の repeatがあり、その中に homeo-domainの配列と CpGs islandなどの特殊配列が存在することが解明されつつあり、その機能とFSHDの関連が注目されている。

我々はFSHDの原因遺伝子をクローン化し、その構造と機能を明らかにするために研究を進めている。しかし、p13E-11プロンプは非特異的に反応する部分が多く、クローニングベクターにも弱いながらも反応するのでライブラリースクリーニングに適当ではなかった。本研究ではFSHDに特異性の高い新しいプロンプの作製及びFSHDゲノムライブラリーの作製を報告する。

方法及び結果: コスミドクローン C51 (Wijmengaら、1992)、プラスミド pSM1 (Weiffenbachら、1993)について制限酵素マッピング及びサブクローン化を行い、FSHD関連 EcoRI断片に特異性が高い新しいプロンプpFR1を作製した (図1)。またFSHD関連ゲノム断片はEcoRI, HindIIIの二重消化によりさらに短くなる事が分かった (図2)。現在、FSHD症例ST13につ

てEcoRI, HindIIIの二重消化による断片のゲノムライブラリーを作製して、新しいプロンプpFR1を用い、PCR法、コロニハイブリダイゼーション法、サザン法でスクリーニングを行っている。さらにFSHD関連遺伝子の部分塩基配列を決定した。

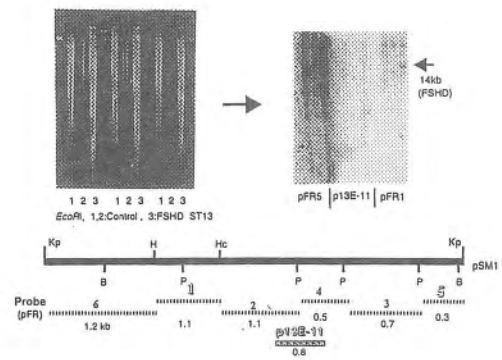


図1 説明本文中

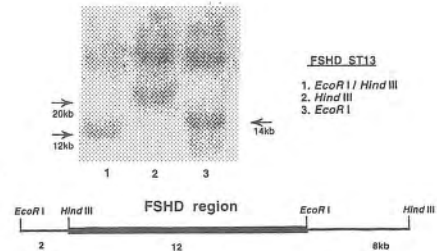


図2 説明本文中

## 筋ジストロフィーの遺伝子治療に関する基礎的研究

武田伸一, 石井亜紀子, 萩原康子\*

(\*機能研究部)

重篤な X 染色体連鎖性の遺伝性筋疾患である Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、ポジショナル・クローニングの結果、病因遺伝子である DMD 遺伝子が単離されたが、膜関連細胞骨格蛋白であるジストロフィンにコードしており、治療法に恵まれず、遺伝子治療が要請されている。遺伝子治療の方法としては、DMD で障害される骨格筋と心筋は、分裂後の細胞から構成されているため、レトロウイルスの使用には困難があり、アデノウイルスベクターの利用あるいは遺伝子導入後の筋細胞の注入移植が考えられる。我々は、骨格筋特異的なプロモーターの研究を背景として、筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の基礎的研究を行った。

## A. 研究方法

1. アデノウイルスベクター・筋特異的なプロモーターユニットの開発：  
筋特異的な発現調節を明らかにしているミオシン H 鎖 IIB プロモーターと非増殖型アデノウイルスベクターからなる筋特異的な発現ユニットを作製する。
2. 培養細胞に対する遺伝子導入法の確立：  
カチオン性脂質を用いて筋細胞培養系 (C2) および線維芽細胞培養系 (10T1/2) に対して遺伝子導入を行い、導入効率の検討を行う。
3. 筋分化制御因子による線維芽細胞の変換：  
線維芽細胞に対して MyoD ファミリー遺伝子の導入を行い、筋芽細胞への変換実験を行う。

## B. 研究結果

1. アデノウイルスベクターの利用：  
成熟したマウス骨格筋において特異的な活性を示すミオシン H 鎖プロモーター (IIB) とマーカーである lac Z 遺伝子からなるコンストラクトと非増殖型のアデノウイルスベクターの相同組み換えを行ない、(東京大学医科学研究所斎藤研究室との共同研究) 組み換えアデノウイルスを得た。現在、組み換えアデノウイルスを線維芽細胞および筋芽・筋管細胞系に導入し、その導入の効率と発現の特異性を検討している。
2. 培養細胞に対する遺伝子導入法の確立：  
カチオン性脂質を用いて遺伝子導入を行った結果、次の三点を明らかにした。下記の表に、 $\beta$ -galactosidase 染色による陽性細胞の検出率を導入効率の指標として示す。

- a) カチオン性脂質のなかでは、多カチオン性脂質 (DOSPA/DOPE, DOGS) が単カチオン性脂質に比べ高い導入効率を示した。
- b) 細胞抽出液の蛋白濃度および形態学的観察から類推される細胞毒性に関しては、単カチオン性脂質で低い傾向が認められた。
- c) 骨格筋細胞は、線維芽細胞に比べ、低い遺伝子導入効率しか得られなかった。

3. 筋分化制御因子による線維芽細胞の変換：  
線維芽細胞に対して高い導入効率を示す多カチオン性脂質を用いて MyoD ファミリー遺伝子を導入し、数パーセントの細胞で筋芽細胞の表現型を認めた。

## C. 考察

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入に関しては、MHC-IIB プロモーターと lac Z 遺伝子を用いた組み換えアデノウイルスの培養細胞系における発現を確認した後、マウス個体に対する導入を行う予定である。ジストロフィン遺伝子の組み換えについては、アデノウイルスベクターに導入可能な遺伝子の長さ制限がある点を解決する必要がある。

一方、正常遺伝子を持った筋芽細胞の注入移植は既に DMD に対する治療として行われているが、免疫学的拒絶反応と筋芽細胞の拡散障害のために良い成績を上げていない。我々は多カチオン性脂質が線維芽細胞に対して極めて高い導入効率を示したことを利用して、線維芽細胞を筋芽細胞に転換して戻し移植することを考えた。この方法では、より増殖性に富む線維芽細胞を使用でき、自家移植である点が特徴である。現在、効率の良い転換と、転換後の筋芽細胞の増殖の維持について検討を重ねている。

Transfection Agent	percent stained cells	
	C2 cells(%)	10T1/2 cells(%)
Calcium phosphate	0.2±0.1	1.4±0.3
monocationic liposomes		
DDAB/DOPE	7.2±2.2	9.2±3.2
DOTMA/DOPE	4.7±1.1	6.4±2.0
DOTAP	3.6±0.6	9.4±2.8
polycationic liposomes		
DOSPA/DOPE	16.4±0.7	71.9±4.4
DOGS	9.7±3.6	83.0±9.0

## 2. 疾患研究第二部

### 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、田中室長は従来通りに活躍中であるが、水戸室長が三木市民病院へ転勤し、臨床の場で、活発に活躍されている。後任として、水口 雅室長が東京大学小児科より着任され、新たな発展が期待される。常勤研究員として、飯田浩一君が継続し、加藤光広、出口貴美子、遠藤千晶君が新たに加わった。年度途中で、飯田君が出身大学へ、遠藤君が小児科神経レジデントへ帰り、相馬 収、中川栄二君が新たに参加した。非常員研究員として、福水道郎、田中総一郎、加藤俊徳、鈴木 新、松田二三子、鬼本博文、佐藤雅彦、小沢 浩、大仲功一、太田垣綾美、柏木愉理君が研究に参加した。併任研究員、客員研究員の方々には、外部より研究の指導と支援をしていただいた。研究助手として、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、神山直美さんには、研究を大きく援助していただいた。

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、出生前ならびに出生直後の白質軟化や神経細胞壊死の成因、および脳形成異常の病態と病因を追求した。
2. 脳循環障害による脳障害の実験的研究を行い、脳血流、血液量、酸素化および代謝の変動を近赤外線分光測定やMRSを用いて無侵襲的かつ連続的に測定し、その意義を検討した。
3. 塩酸トリエンチンの胎生毒性の防止に関する動物実験を行い、および低銅状態における細胞特性に関する検討を培養細胞を用いて行った。
4. 日本における胎児性アルコールおよびタバコ症候群に関して疫学的調査検討を継続して行った。
5. ダウン症候群における早発痴呆の発生機序、ペルオキシソーム病における脳形成異常の機序、および神経皮膚症候群における神経堤細胞発達異常の問題について、発達免疫組織科学的に検討した。
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、神経病理学的に検討した。

(部長 高嶋幸男)



## II 研究業績

### 2. 研究業績

#### A. 論文

##### a. 原著

- 1) Takashima S, Kato M, Matsuda F:  
Neural crest and central nervous system malformation  
Cong Anom, 33:327-335, 1993
- 2) Tanaka H, Inomata K, Arima M:  
Teratogenic effects of triethylene tetramine dihydrochloride on the mouse brain  
J Nutr Sci Vitaminol, 39:177-188, 1993
- 3) Tanaka H:  
Present status and future problems of fetal syndromes induced by maternal environmental agents  
Proc 11th Asian Conference on Mental Retardation, Seoul, Korea, Aug. 22-27,  
404-413, 1993
- 4) Mito T, Kamei A, Takashima S, Becker L.E.:  
Clinicopathologicval study of pontosubicular necrosis  
Neuropediatrics, 24:204-207, 1993
- 5) Iida K, Takashima S, Mito T, Yao R, Onodera K:  
Immunohistochemical and Golgi studies on brain development and aging in patients with  
Down syndrome  
Ital J Intellect Impair 6:3-11, 1993
- 6) Iida K, Takashima S, Takeuchi Y, Ohno T, Ueda K:  
Neuropathologic study of newborns with prenatal-onset leukomalacia  
Pediatric Neurology 9:45-48, 1993
- 7) Kamei A, Houdou S, Takashima S, Suzuki Y, Becker L.E., Armstrong D.L.:  
Peroxisomal disorders in children:immunohistochemistry and neuropathology  
J Pediatrics 122:573-579, 1993
- 8) Hirano S, Kato T, Takashima S, Tabira T:  
MRI study in adults with Down syndrome  
Studies in Alzheimer's disease:Brain imaging of dementia Tokyo, p 76-81, 1993

- 9) Hirano S, Hasegawa M, Kamei A, Ozaki T, Takashima S:  
Responses of cerebral blood volume and oxygenation to carotid ligation and hypoxia in young rabbits: Near-infrared spectroscopy study  
J Child Neurol, 8:237–241, 1993
- 10) Maruyama E, Iwamatsu A, Takashima S:  
Purification and amino acid microsequencing of alkaline phosphodiesterase I from calf kidney  
Biochemistry and Molecular Biology International 29:579–586, 1993
- 11) Maruyama E, Takashima S:  
Characterization of over-expressed alkaline phosphodiesterase I in tumour-derived fibroblasts from patients with neurofibromatosis  
Cell Biochemistry and Function 11:271–277, 1993
- 12) Maruyama E, Shibata K, Kuramochi A, Takashima S:  
Decrease in the NAD level in tumor-derived cultured fibroblasts from neurofibromatosis patients  
Biochemical Medicine and Metabolic Biology 49:114–115, 1993
- 13) Ogihara M, Kinoue K, Takamiya H, Nemoto S, Miyajima T, Hoshika A, Honda T, Takashima S, Genton P, Dravet C, Bureau M:  
A case of early infantile epileptic encephalopathy (EIEE) with anatomical cerebral asymmetry and myoclonus  
Brain Dev. 15:133–139, 1993
- 14) Kato T, Takashima S, Kamada K, Kishibayashi J, Sunohara N, Ozaki T:  
Advantage of near-infrared spectroscopy in the human functional MR imaging in brain  
Proceedings of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1409, 1993
- 15) Kato T, Nishina M, Matsushita K, Hori E, Mito T, Takashima S:  
Neuronal maturation and N-acetylaspartate in the human fetal, child and developmental disorder brains  
Proceedings of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1571, 1993
- 16) Kato T, Kamada K, Kishibayashi J, Sunohara N, Yamanouchi H, Takashima S, Arima M, Iwasaki A, Shimizu K, Hashimoto Y:

## II 研究業績

Fluid-attenuated inversion recovery MR imaging with paramagnetic contrast enhancement in child brain disorders

Proceedings of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1460, 1993

- 17) Kato T, Kamei A, Takashima S, Ozaki T:

Human visual cortical function during photic stimulation monitoring by means of near-infrared spectroscopy

J Cerebr Blood Flow Metabol 13:516-520, 1993

- 18) Houdou S, Takashima S, Suzuki Y:

Immunohistochemical expression of peroxisomal enzymes in developing human brain

Molecul Chem Neuropathol, 19:235-248, 1993

- 19) Yamanouchi H, Takashima S, Becker L.E.:

Correlation of astrogiliosis and substance P immunoreactivity in the brainstem of victims of sudden infant death syndrome

Neuropediatrics, 24:200-203, 1993

- 20) Tanabe Y, Iai M, Ishii M, Tamai K, Maemoto T, Ooe K, Takashima S:

The use of magnetic resonance imaging in diagnosing infantile neuroaxonal dystrophy

Neurology 43:110-113, 1993

- 21) Hashimoto A, Kumashiro S, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Mito T, Takashima S, Doi N, Mizutani Y, Yamazaki T, Kaneko T, Ootomo E:

Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex

J Neurochem. 61:348-351, 1993

- 22) Becker L.E., Mito T, Takashima S:

Brain morphometry in Down syndrome: Neuropathology and neuroimaging

Studies in Alzheimer's disease: Brain imaging of dementia

Tokyo, p 61-75, 1993

- 23) 高嶋幸男, 水戸 敬, 飯田浩一, 平野 悟, 田中総一郎, 井合瑞江, 田辺雄三, 堀江 弘:

超未熟児の脳の形態と障害

日本未熟児新生児学会雑誌 15 : 71-75, 1993

- 24) 福水道郎, 水戸 敬, 高嶋幸男:

満期産児先天性脳室上衣下嚢胞の臨床病学的検討とくに出血後例について

日本小児科学会雑誌 97 : 976-979, 1993

25) 井合瑞江, 田辺雄三, 堀江 弘, 鈴木 新, 高嶋幸男 :

超未熟児出生小児における脳MRIと脳病理所見の対比

脳と発達 25 : 259-262, 1993

26) 高橋立子, 長谷川元宏, 宝道定孝, 高嶋幸男, 竹内 豊, 大野 勉, 黒川 徹 :

脳室周囲白質軟化症の合併病変, 特に橋鉤状回壊死との関連性について

日本未熟児新生児学会雑誌 15 : 233-237, 1993

27) 小沢 浩, 岡田泰助, 中村利彦, 仲本雅哉, 西田 朗, 飯田浩一, 水戸 敬, 高嶋幸男 :

日本新生児学会雑誌 29 : 360-362, 1993

28) 平野 悟, 常石秀市, 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

#### b. 著 書

1) Takashima S, Yamanouchi H, Becker L.E.:

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

Sleep Apnea and Rhonchopathy, KARGER, Basel, p 13-18, 1993

2) 高嶋幸男 :

脳血管の発達 脳実質

小児の頭部画像診断, 南江堂, 東京, p 41-48, 1993

3) 高嶋幸男, 水戸 敬 :

脳の発達-小児の脳の特異性

小児の頭部画像診断, 南江堂, 東京, p 8-20, 1993

4) 高嶋幸男, 加藤俊徳 :

低酸素性脳症

小児の頭部画像診断, 南江堂, 東京, p 231-244, 1993

5) 高嶋幸男, 水戸 敬 :

周産期脳障害

現代病理学大系, 中山書店, 東京, p 81-103, 1993

## II 研究業績

### 6) 高嶋幸男 :

低酸素性虚血性脳障害

胎児・新生児の神経学, メディカ出版, 大阪, p 426-440, 1993

### 7) 高嶋幸男 :

中枢神経系の合併症, 続発症

胎児・新生児仮死, 金原出版, 東京, p 185-191, 1993

### 8) 高嶋幸男 :

周生期脳障害の病理

小児神経学の進歩 第22集 診断と治療社, 東京, p15-25, 1993

## c. 総 説

### 1) 高嶋幸男 :

胎児期・新生児期の神経発達の特徴

新生児期神経障害 NICU春増刊 9-14, 1993

### 2) 田中晴美 :

胎児性アルコール症候群

小児科診療 1993増刊号 小児の症候群, 56 : 88, 1993

### 3) 田中晴美 :

Fetal hydantoin症候群

小児科診療 1993増刊号 小児の症候群, 56 : 107, 1993

### 4) 田中晴美 :

胎児性アルコール症候群

日本臨床 別冊・領域別症候群シリーズ 2 内分泌症候群, 414-417, 1993

### 5) 水戸 敬, 高嶋幸男 :

周産期障害と精神遅滞

発達障害研究 15 : 31-38, 1993

### 6) 水口 雅 :

脳感染の臨床・病理, 細菌感染:化膿性髄膜炎

Brain Medical, 5 : 361-365, 1993

### 7) 飯田浩一, 高嶋幸男 :

周産期における神経系の発達と病理

産科と婦人科 60 : 1101-1105, 1993

- 8) Becker L.E., Mito T, Takashima S, Onodera K, Feriend W.C.:

Association of phenotypic abnormalities of Down syndrome with an imbalance of genes on chromosome 21

Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 101:suppl. 40, 1993

- 9) 岩崎康夫, 高嶋幸男 :

未熟児頭蓋内出血後水頭症

厚生省特定疾患「難治性水頭症」調査研究班公開シンポジウム

Proceeding 41-46, 1993

d. 班会議報告書

- 1) 高嶋幸男, 飯田浩一, 水戸 敬 :

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年度研究報告書 p39-42, 1993

- 2) 高嶋幸男 :

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・早死症の発生機序に関する研究班

平成4年度研究報告書 p350-352, 1993

- 3) 高嶋幸男, 山内秀雄, 福水道郎 :

乳幼児突然死症候群の脳幹におけるカテコラミン神経細胞およびサブスタンスP陽性神経線維の発達

厚生省心身障害研究・小児の心身障害予防、治療システムに関する研究班

平成4年度研究報告書 p251-253, 1993

- 4) 高嶋幸男, 福水道郎 :

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・難治性水頭症調査研究班

平成4年度研究報告書 p76-80, 1993

- 5) 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・脳性麻痺児(者)の治療とリハビリに関する研究班

## II 研究業績

平成4年度研究報告書 p179-181, 1993

- 6) 高嶋幸男, 平野 悟, 田中総一郎, 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礎研究

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4年度研究報告書 p423-430, 1993

- 7) 高嶋幸男, 加藤俊徳, 野沢千加子, 鈴木 新 :

未熟児出生小児の神経発達障害の病型と成因に関する縦断的研究

厚生省小児医療・低体重出生者の長期予防に関する臨床的・疫学的研究

平成4年度研究報告書 p97, 1993

- 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

-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年度研究報告書 p21-26, 1993

- 9) 田中晴美 :

マウスにおける塩酸トリエンチンによる胎生毒性発現の最低限界量に関する検討

厚生省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 平成4年度研究報告書 p87-92, 1993

- 10) 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4年度研究報告書 p68-71, 1993

## B 学会発表

### a. 特別講演, シンポジウム

- 1) Takashima S :

Prenatal and postnatal brain development and leukomalacia

International society The Fetus as a Patient

IX. International Congress, Fuji-yoshida, Nov.29, 1993

- 2) 高嶋幸男, 福水道郎 :

病理：先天性および出血後水頭症

第35回日本小児神経学会，京都，6.17，1993

3) 高嶋幸男：

神経堤細胞と先天性異常：中枢神経系の形成異常

第33回日本先天異常学会，名古屋，7.21，1993

4) 高嶋幸男：

周産期脳障害の病理と画像診断

第12回四国小児神経症例検討会，松山，8.28，1993

5) Tanaka H:

Brain dysfunction in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects - Experimental and epidemiological studies -

6th International Symposium on Developmental Disabilities, Tokyo, Nov. 18, 1993

6) 水戸 敬，瀬川昌也：

ダウン症候群の形態学的発達遅延

第34回日本神経病理学会，東京，5.11，1993

7) 水戸 敬：

重症心身障害児の脳幹病理－呼吸異常例を中心に－

厚生省精神・神経疾患委託発達障害関係研究班

平成5年度合同シンポジウム，東京，10.7，1993

8) 飯田浩一，吉岡 博：

周産期白質軟化の病理と形成機序

第34回日本神経病理学会，東京，5.11，1993

9) 平野 悟，鬼本博文，亀井 淳，高嶋幸男：

近赤外線分光測定による幼若家兔の脳循環動態の観察

第4回NIROワークショップ，浜松，12.4，1993

10) Suzuki A，Takashima S，Mizuguchi M，Kato M，Kunishita T，Tabira T:

High expression of KPI-containing substances in the cerebral vessels of patients with Down syndrome

6th International Symposium of The International Cooperative Research Program :

Genetic Studies in Alzheimer Type Dementia



## II 研究業績

Tokyo, Mar.10, 1994

### b. 国際学会

1) Tanaka H:

Present status and future problems of fetal syndromes induced by  
maternal environmental agents

11th Asian Conference on Mental Retardation, Seoul, Aug. 23, 1993

2) Kato T, Takashima S, Kamada K, Kishibayashi J, Sunohara N, Ozaki T:

Advantage of near-infrared spectroscopy in the human functional MR imaging in brain

Twelfth Annual Scientific Meeting Society of Magnetic Resonance in Medicine, New  
Resonance in Medicine, New York, Aug. 16, 1993

3) Kato T, Nishina M, Matushita K, Hori E, Mito T, Takashima S:

Neuronal maturation and N-Acetylaspartate in the human fetal, child and developmental dis-  
order brains

Twelfth Annual Scientific Meeting Society of Magnetic Resonance in Medicine, New  
York, Aug. 17, 1993

4) Kato T, Yamada K, Kishibayashi J, Sunohara N, Yamanouchi H, Takashima S, Arima M,  
Iwasaki A, Shimizu K, Hashimoto Y:

Fluid-Attenuated inversion recovery MR imaging with paramagnetic contrast enhancement  
in child brain disorders

Twelfth Annual Scientific Meeting Society of Magnetic Resonance in Medicine, New  
York, Aug. 19, 1993

5) Kato M, Takashima S:

Immunohistochemical and morphometrical development of dorsal root ganglion as a neural  
crest derivative: Comparison with fetal CNS

IX. International Congress of The Fetus as a Patient, Fuji-yoshida, Nov.30, 1993

### c. 一般学会

1) 田中晴美, 猪俣賢一郎, 有馬正高 :

マウス大脳におけるトリエチレンテトラミン 2 塩酸基の催奇形作用  
第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.17, 1993

2) 田中晴美, 有馬正高 :

- 日本における母親の飲酒および喫煙による子供の異常の現状  
第33回日本先天異常学会学術集会, 名古屋, 7.21, 1993
- 3) 水戸 敬, 高嶋幸男, 宝道定孝, 大浜栄作:  
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学的検討  
第34回日本神経病理学会, 東京, 5.11, 1993
- 4) 水戸 敬, 高嶋幸男, 伊藤孝司, 桜庭 均, 鈴木義之:  
脳におけるGM1およびGM2ガングリオシド局在の年齢的变化: 免疫組織化学的検討  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.17, 1993
- 5) 鴨下信彦, 北浦次郎, 米沢美保子, 三木裕子, 水口 雅, 榊原洋一, 鴨下重彦, 高戸 毅,  
高島敬忠:  
脳葉型全前脳胞症の1例  
第429回日本小児学会東京地方会, 東京, 3.12, 1994
- 6) 今村 淳, 高嶋幸男, 亀井 淳, 鈴木康之:  
抗bifunctional protein抗体によるヒト脳の発達の免疫組織化学  
第34回日本神経病理学会, 東京, 5.11, 1993
- 7) 平野 悟, 加藤俊徳, 高嶋幸男, 田平 武, 寺崎勝成:  
ダウン症候群成人例のMRI所見  
第34回日本神経学会, 千葉, 5.11, 1993
- 8) 鈴木 新, 水戸 敬, 高嶋幸男:  
ダウン症候群における $\beta$ 蛋白前駆体C末端の免疫組織化学的発現の年齢的变化  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.17, 1993
- 9) 石川 充, 松坂哲應, 須界研司, 水戸 敬, 桜川宣男:  
進行性ミオクローヌスてんかん症候群と sphingomyelinase 部分欠損を示した同胞例とその一培  
検例  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.17, 1993
- 10) 福水道郎, 高嶋幸男, 竹内 豊, 田辺雄三  
胎児, 新生児脳室内出血後水頭症に伴う脳障害の神経病理学的検討  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.17, 1993
- 11) 高山修二, 岩崎裕治, 山内秀雄, 須貝研司, 高嶋幸男, 岩崎 章, 丸木雄一:  
経過中ミオクローヌス, 周期性同期発射が認められなかった劇症型亜急性硬化性全脳炎の一例

## II 研究業績

- 第35回日本小児神経学会, 京都, 6.17, 1993
- 12) 松田二三子, 飯田浩一, 水戸 敬, 西田 朗, 高嶋幸男 :  
ヒト胎児組織における抗HNK-1抗体の免疫組織化学的発現  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.17, 1993
- 13) 北林和夫, 岩崎裕治, 山内秀雄, 須貝研司, 花岡 繁, 高嶋幸男 :  
Dandy-Walker症候群におけるchoroid tuftのMRI所見  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.17, 1993
- 14) 花岡 繁, 高嶋幸男 :  
31PMRSによる小児脳髄鞘化の評価  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.19, 1993
- 15) 加藤俊徳, 鎌田和彦, 瀬川文徳, 岸林 潤, 春原経彦, 山内秀雄, 須貝研司, 有馬正高, 高嶋幸男,  
鈴木康之, 舟橋満寿子, 岩崎章宣 :  
神経疾患に最適なMR-Sequenceの研究 : Diffusion MR imaging法とT2 weighted-fluid attenuated IR法の使用  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.19, 1993
- 16) 平野 悟, 鬼本博文, 高嶋幸男, Paul Casaer :  
新生児における頭部回転時のNIRS所見 : 幼若家兎における頸静脈結紮実験との比較  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.19, 1993
- 17) 今村 淳, 高嶋幸男, 亀井 淳, 鈴木康之 :  
ペルオキシソーム異常症の抗bifunctional protein抗体による免疫組織化学的検討  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.19, 1993
- 18) 小沢 悟, 西田 朗, 水戸 敬, 高嶋幸男 :  
胎児・新生児の橋核鉤状回壊死病変におけるフェリチン含有細胞増加  
第35回日本小児神経学会, 京都, 6.19, 1993
- 19) 宮原晋一, 高嶋幸男, 中村康寛, 山崎麻美 :  
X-linked劣性遺伝が考えられる先天性水頭症胎児の一培検例  
第13回日本小児病理研究会, 東京, 7.24, 1993
- 20) 飯田浩一, 水戸 敬, 高嶋幸男, 喜田善和, 竹内 豊 :  
脳室周囲白質軟化における髄鞘化障害の成因に関する検討  
第29回日本新生児学会, 京都, 7.20, 1993

- 21) 佐藤雅彦, 石館武夫, 水戸 敬, 高嶋幸男 :  
Thanatophoric dwarfismにおける多小脳回の発生機序に関する検討  
第29回日本新生児学会, 京都, 7.20, 1993
- 22) 田中総一郎, 水戸 敬, 高嶋幸男 :  
新生仔脳梗塞の形成と修復  
第29回日本新生児学会, 京都, 7.20, 1993
- 23) 鬼本博文, 平野 悟, 大野 勉, 高嶋幸男 :  
幼若家兎へのacetazolamide投与における脳循環動態の変化に関する検討  
第29回日本新生児学会, 京都, 7.20, 1993
- 24) 亀井 淳, 高嶋幸男 :  
新生仔過換気時のbrain hypoxiaに関する実験的研究: 近赤外線分光測定  
第8回 Brain Hypoxia研究会, 東京, 9.18, 1993
- 25) 喜田善和, 竹内 豊, 長谷川久弥, 橋本和広, 小松崎裕美子, 藤井克則, 小島博之, 山田恵子,  
浅沼勝美, 高嶋幸男 :  
脳室内出血児にみられた頭部超音波における脳室壁の高輝度の検討  
第38回日本未熟児新生児学会, 札幌, 10.28, 1993
- 26) 平野 悟, 田中総一郎, 鬼本博文, 高嶋幸男 :  
幼若家兎における矢状静脈洞血栓モデル: 近赤外線分光測定による血栓形成時の脳循環動態の観察  
第38回日本未熟児新生児学会, 札幌, 10.28, 1993
- 27) 出口貴美子, 飯田浩一, 水戸 敬, 高嶋幸男, 大野 勉, 角田 修, 宝道定孝 :  
先天性サイトメガロウイルス感染症の脳病理像—多彩な所見と感染時期—  
第38回日本未熟児新生児学会, 札幌, 10.29, 1993
- 28) 遠藤千晶, 出口貴美子, 加藤光広, 水戸 敬, 高嶋幸男 :  
発達に伴うneurofilamentの発現と周産期脳障害  
第38回日本未熟児新生児学会, 札幌, 10.29, 1993
- 29) 阿部知子, 成 若非, 片山 敬, 小林茂俊, 水口 雅, 榊原洋一, 鴨下重彦 :  
出生直後より反復増悪する持続性炎症反応に進行性の脳脊髄白質石灰化を伴う9歳女児例  
第21回関東小児神経学研究会, 東京, 3.19, 1994
- 30) 中川栄二, 平野 悟, 山内秀雄, 後藤雄一, 埜中征哉, 高嶋幸男 :  
Kearns-Sayre syndrome (KSS) で画像上認められた脳幹部病変についての検討

## II 研究業績

第21回関東小児神経学研究会，東京，3.19，1994

## C 班会議発表

### 1) 高嶋幸男：

新生児頭蓋内出血後の水頭症

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班

平成5年度班会議，高知，8.6，1993

### 2) 高嶋幸男，出口貴美子：

胎児・新生児の虚血性脳障害の病態形成機序に関する研究

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5年度班会議，東京，12.10，1993

### 3) 鈴木 新，水口 雅，高嶋幸男，国下龍英，田平 武：

ダウン症候群の脳血管におけるKPI-containing substanceの特異的発現

厚生省長寿科学総合研究・早発老化の遺伝的，生物学的研究班

平成5年度班会議，東京，1.28，1993

### 4) 高嶋幸男，平野 悟，長利伸一：

脳性麻痺患者の呼吸管理における脳循環動態—近赤外線分光測定法による観察

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5年度班会議，東京，2.26，1994

### 5) 高嶋幸男：

新生児脳室内出血後水頭症

平成5年度厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班

ワークショップ，東京，1.8，1994

### 6) 高嶋幸男：

新生児および乳児突然死症候群の神経病理学的分析

厚生省心身障害・「SIDSに関する研究」班

平成5年度班会議，東京，2.5，1994

### 7) 高嶋幸男，加藤俊徳，野沢千加子，鈴木 新：

未熟児出生小児の神経発達障害の病型と成因に関する縦断的研究

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5年度班会議，東京，12.20，1993

8) 田中晴美，猪俣賢一郎，有馬正高：

母体外因による脳形成障害の成因と予防に関する研究－妊娠母体投与塩酸トリエンチンによる脳形成障害とその防止に関する検討－

厚生省精神・神経疾患・脳形成障害の成因と予防に関する研究

平成5年度班会議，東京，12.8，1993

9) 水戸 敬，高嶋幸男，宝道定孝，大浜栄作：

重症心身障害者（者）の脳幹病変・突然死症例の中脳，橋病変について

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5年度班会議，東京，12.8－9，1993

10) 水口 雅，池田和彦，植木 彰，鴨下重彦：

神経系培養細胞におけるBcl-2タンパクの産生

文部省重点領域研究「神経細胞死」

平成5年度班会議，東京，12.16，1993

## FAS、FAEにおける脳機能障害の防止 —ラットモデルとヒトとの対比—

田 中 晴 美

母体の環境要因にもとづく子供の脳機能障害防止を目的として、動物モデルを用いて、障害発生の機序を検討、ヒトへの外挿を試みている。外因としてこれまで、エタノール、カフェイン、低線量X線、母体の治療薬剤などをとりあげてきた。今回は、これら異常の一モデルとして、妊娠中のエタノールによる子供の脳機能障害の防止につき、問題点を要約する。FAS(fetal alcohol syndrome)とは成長遅滞、中枢神経系の障害、特有な顔面の3項目の存在するものを、FAE(fetal alcohol effects)とはその不全型を称す。

### [対象・方法]

ラットモデル: 1)ウイスター系ラットを用い、妊娠前から妊娠中を通して、30~10%エタノール(FAS)、5%エタノール(FAE)を飲料水として投与、妊娠末期胎仔および新生仔を検討。2)障害防止の可能性の検討を目的として、エタノールと同時に亜鉛(0.01%)あるいは $\alpha$ -トコフェロール(0.02~0.03%、V)の添加による効果を検討。これら抗酸化作用物質添加の根拠は、胎内エタノール曝露により生じた亜鉛欠乏、および亜鉛欠乏とエタノールの両者によってひきおこされた過酸化脂質増加にもとづいて、FAS、FAEにおける脳機能障害が促進されるという仮説による。3)脳各部位において、生化学的には、RNA・蛋白合成能、亜鉛・V・過酸化脂質濃度、各種、亜鉛関連酵素活性など、形態的には、神経細胞内の微細構造、特にRERの変化、シナプス密度および樹状突起の分枝の発達などを検討。

ヒト症例: 1)1990~1992年に日本全国の3,380の行政単位を対象とした第1~3次調査から得た、FAS;29名、FAE;31名を用いた。2)母体側要因としては飲酒とタバコの量につき調査。3)児の中枢神経系の異常の質と量につき分析し、これらへの母体のエタノール、タバコの相互作用につき検討。

### [結果]

ラットモデル: 1)FAS大脳では、重量低下、RNA・蛋白合成能低下、炭酸脱水酵素やCNP-ase活性低下、海馬ニューロンのRERの変化、樹状突起の分枝の発達遅延、大脳皮質や海馬におけるシナプス密度の低下が存在。FAE大脳では、重量低下、さらに、海馬のシナプス密度低下がFASと同程度に存在。2)エタノール単独に比し、亜鉛あるいはV

を添加した場合、脳機能回復と考えられる所見としては、FASあるいはFAEにおいて、重量増加、RNA量増加、海馬ニューロンにおけるRNA・蛋白合成機能修復の指標としての電顕所見、樹状突起の分枝の発達促進(亜鉛添加)、および重量増加、V濃度増加、過酸化脂質低下(V添加)がみられた。しかし、海馬CA3領域におけるシナプス密度の変化は、いずれの添加でもみられなかった。また、上記の両物質による良好な所見のレベルは、エタノールの加わらないコントロールレベルには、いかなる条件でも到達しなかった。3)以上、胎内エタノールによるラット胎仔脳における最も障害されやすい1つの機序として海馬のシナプス形成があげられる。

ヒト症例: 1)中枢神経系の障害はFAS;100%、FAE;97%に存在、その種類、程度はFASで多く、強かった。中核の知能障害はFAS;86%、FAE;63%に存在した。2)アルコール依存あるいは長期大量飲酒妊婦の割合はFAEに比しFASに高頻度とはいえなかった。飲酒およびタバコ喫煙の量的変化と中枢神経系障害の存在との関係では、大量エタノールによる異常は明白であるが、母親のタバコ喫煙のみによっても、その増加とともに異常の増加をみた。3)以上、FAS、FAEの発生には血中エタノール濃度のみでなく、母親のアルコール代謝などの遺伝的要因が関与しており、また、母親の飲酒にタバコ喫煙が加わると、子供の中枢神経系の障害は増強される可能性がある。

### [考察・結論]

ラットモデルとヒト症例との対比から、エタノールによる子供の脳障害の中核の所見の1つとして、エタノールが蓄積しやすく、亜鉛に富んだ、海馬におけるシナプス形成の低下があげられる。海馬のシナプス伝達のLTPにおける変化を通して、おそらくFASに認められる学習や記憶の過程に障害を生ずると推定される。さらに、エタノールの共同催奇形因子としての低亜鉛状態や、また、タバコ喫煙も、FASの病態形成に関与しており、これらによる悪影響は、その修正によりある程度の回復は可能である。今後、障害発生に関与する、母子の遺伝的要因と母体外因の相互作用の生物学的証明が必要とされる。しかし、本質的な障害防止のためには、胎内にエタノールの存在しないという条件が必須であろう。

本稿は第6回国際発達障害シンポジウム(1993年11月18日)における講演要旨の一部の日本語訳である。

## 神経系培養細胞におけるBcl-2タンパクの産生

水口 雅, 池田和彦, 浅田 穰, 水谷修紀, 高嶋幸男

bcl-2は悪性リンパ腫（濾胞性リンパ腫）の転座部位の遺伝子解析により発見されたプロトオンコジンは、bcl-2はリンパ・血液系をはじめ種々の組織で発現しており、その主たる作用はアポトーシスの阻止にあると考えられている。神経系においてもbcl-2は発現しており、神経細胞などの死を防止する役割を担っている可能性があると思われる。最近の研究により、初代培養神経細胞または神経細胞の性質を持つ樹立細胞株に外因性bcl-2を導入すると細胞はアポトーシスに陥り難くなることが示されたが、このことも上の可能性に合致するものである。われわれは、神経系におけるbcl-2の機能について理解を深めるため、神経系の細胞、とくに初代培養された神経細胞、グリア細胞における内因性のbcl-2発現状況を、オンコプロテインBcl-2に対する特異的抗体を用いて、免疫組織化学的、免疫化学的に検索した。

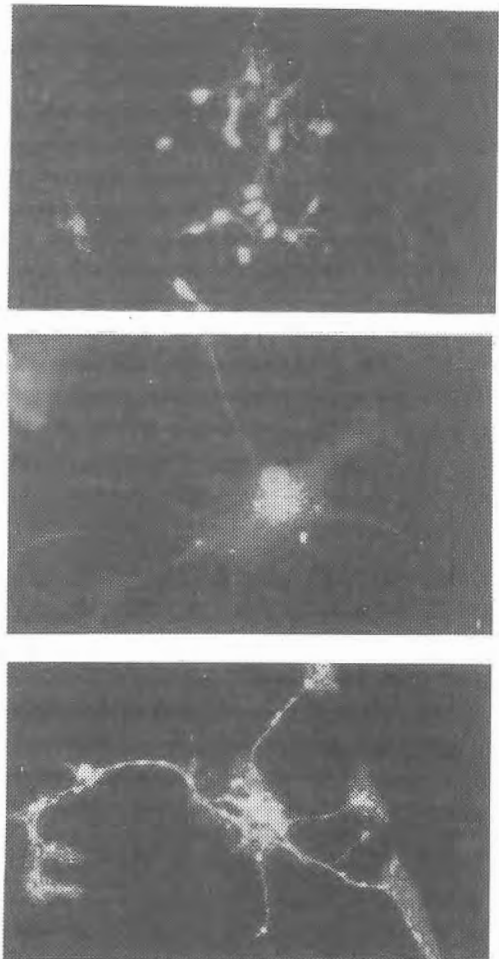
### 【結果】

1. BALB/cマウスの脳より神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアの純培養（95%以上の純度）および混合培養を作成して、ウサギ抗ヒトBcl-2抗体（マウスBcl-2とも交叉反応する）を用いて蛍光抗体染色を行ったところ、神経細胞、アストロサイトの核と細胞質に免疫反応性が認められ、オリゴデンドロサイト、ミクログリア（一部）にも弱い反応性が見られた。
2. 純培養のウエスタンブロットでは、アストロサイトにおいてBcl-2のバンド（26kDa）が最も強く、ついで神経細胞、オリゴデンドロサイトの順であり、ミクログリアではバンドを検出できなかった。
3. 細胞下分画ごとの分布状況は、神経細胞、アストロサイトとも核画分、ミトコンドリア画分に最も豊富で、マイクロソーム画分にもバンドが検出された。この分布パターンは、脳やリンパ球におけるものとはほぼ同じであった。

### 【考察】

神経系を構成する各種の細胞種のうち、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトには単独でBcl-2タンパクを産生する能力のあること

が示された。とくにアストロサイトにおける高レベルの産生が判明したので、グリアの細胞死にもbcl-2が関与する可能性が高い。また、各種細胞における細胞下のBcl-2分布状況がほぼ同じであることは、bcl-2の機能が普遍的なものであることを示唆している。



神経細胞（上）、アストロサイト（中）、オリゴデンドロサイト（下）のBcl-2免疫反応性



## Protective proteinのヒト中枢神経系における分布と発達

相馬 収, 水口 雅, 高嶋幸男

protective protein(PP)は、分子量32kDaと20kDaのポリペプチドよりなるヘテロダイマーで、酸性カルボキシペプチダーゼや中性エステラーゼなどの酵素活性、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの安定化、 $\alpha$ -ノイラミダーゼの活性化などの保護機能を有する多機能性蛋白である。ヒトにおいては、その欠陥がリソソーム病の1種であるガラクトシアリドーシスを引き起こす。今回、抗PP抗体を用い、ヒト正常脳における分布と発達にともなう変化およびガラクトシアリドーシスの中枢神経系病変を免疫組織化学的に比較検討した。

【対象と方法】通常の組織学的検索にて異常を認めない剖検脳23例(在胎19週~16歳)と神経病理学的に腫大神経細胞を有するガラクトシアリドーシス若年型1例(13歳男児)、Hurler症候群1例(16歳男児)である。ホルマリンないしはパラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン切片にしmicrowave ovenで90℃、9分前で処置を行なった。PPのN-末端の合成ペプチドを抗原としたウサギ抗PP抗体(都立臨床研 桜庭均先生より供与)を一次抗体(1:300)とし、酵素抗体法を用いて染色し、比較検討した。

【結果】正常例ではPPは特に大型神経細胞で陽性を示し、細胞内分布では神経細胞胞体、樹状突起近位部が顆粒状に染色されたが、軸索は染色されなかった。特に強い染色性を示したのは、脊髄前角細胞、脳幹の運動神経核、歯状核、マイネルト核、大脳皮質錐体細胞であった(Table 1)。海馬ではCA2~4の錐体細胞が強く染色され、CA1では弱かった。プルキンエ細胞は弱陽性であり、小脳顆粒細胞及び歯状回顆粒細胞は染色されなかった。また、発達のには、延髄では網様体、舌下神経核が在胎21~24週より、小脳では歯状核が25~28週より弱陽性を示した。大脳では錐体細胞が37~40週より陽性となり、年齢とともに陽性細胞は増加した。

一方、ガラクトシアリドーシスでは、小脳ゴルジ細胞、オリブ核、舌下神経核では、極弱い陽性所見を呈したものの、ほとんどの神経細胞は陰性であった。Hurler症候群では腫大神経細胞の蓄積部は染色

されず、胞体辺縁部が染色された。また、形態学的にはほぼ正常な神経細胞は陽性を示した。

【考察】免疫組織化学的にPPは大型神経細胞で強く染色され、その分布はガラクトシアリドーシスにおける腫大神経細胞の分布とほぼ一致していた(Table 1)。胞体が顆粒状に染色されたことは、リソソームへの局在を反映していると思われた。また、発達にともなう変化では、脳幹の運動神経核、小脳歯状核、大脳皮質錐体細胞の順に発現し、神経細胞の成熟の一面を反映していた。一方、ガラクトシアリドーシスでは、Hurler症候群に比しても明らかにPPの免疫活性は低下しており、疾患特異性があると考えられた。

Table 1. Topographical distribution of protective protein and neuronal storage in galactosialidosis type2a

Site or cells	Degree of PP-immunoreactivity	Degree of neuronal storage
<b>Cerebrum</b>		
Neocortical small cell	+	+
Neocortical large cell	++	+++
Hippocampus: CA2,3,4	++	++
CA1	+	-
Dentate gyrus	-	-
<b>Midbrain</b>		
Oculomotor nucleus	++	+++
Substantia nigra	++	++
Red nucleus	+	+
<b>Pons</b>		
Locus ceruleus	++	++
Facial nucleus	++	+++
Pontine nuclei	+	+
<b>Medulla</b>		
Hypoglossal nucleus	++	+++
Olivary nucleus	++	++
Cuneate nucleus	+	+
<b>Cerebellum</b>		
Purkinje cell	+/-	+
Granule cell	-	-
Golgi cell	+	+++
Dentate nucleus	++	++
<b>Spinal cord</b>		
Anterior horn cell	++	+++

Degree of PP-immunoreactivity: (++) ,strong and granular; (+), moderate and granular; (+/-), weak; and (-), negative.

Degree of neuronal storage: (+++) ,severe; (++) , moderate; (+), slight; and (-), none.

## 神経堤由来細胞の発達 —後根神経節細胞とNF1アストロサイトヘテロトピア—

加藤光広, 高嶋幸男

Neurofibromatosis type 1 (以下NF1)は、メラニン色素の異常であるカフェオレ斑やシュワン細胞の増殖を主体とする神経線維腫を特徴とし、神経堤由来の細胞の異常が多い。しかしながらヒト胎生期における神経堤細胞の発達はよくわかっていない。

我々は、神経堤由来の細胞として、脊髄後根神経節細胞(DRG)をとりあげ、形態計測と免疫組織化学の2方面から、神経管由来である脊髄前角細胞(SC)、大脳皮質神経細胞(CC)と比較検討した。またNF1の中樞神経系のMRIにおいて、主に小児期の小脳、脳幹にT2強調で高信号となる非腫瘍性の病変を認めることが知られてきており、NF1における中樞神経病変を免疫組織化学染色を用いて検討した。

### 【対象と方法】

対象は自然流産した在胎6から40週のヒト胎児22例。ホルマリン固定、パラフィン包埋後、4 $\mu$ mの切片とし、H.E.染色のほか、抗NSE抗体、抗HNK-1抗体で免疫組織化学染色を行い、神経細胞の胞体面積(核を含む)を画像解析装置を用い計測した。

またNF1の2症例(15, 59y)の剖検脳に対して、免疫組織化学染色(GFAP)を行った。

### 【結果】

抗NSE抗体に対する免疫反応性は、DRGとSCでは時間的によく似た経過で発達し、ともに胎生7週から陽性を示した。それに比してCCでは、胎生22週から27週と遅れていた。神経細胞の大きさは、DRGとSCにおいては10週前後から大きくなりはじめ、CCでは20週頃から徐々に大きくなっていった(Fig.1)。

HNK-1の出現は、DRGでは、NSEが陽性を示した27週でも認められた。SCにおいては8週までしか認められず、CCでも23週までと、各々NSEが陰性だった時期にほぼ一致していた。また、末梢神経の髄鞘(シュワン細胞)では40週においてもHNK-1の免疫反応性がみられたが、DRGでは27週を過ぎると陰性となっていた(Table 1)。

NF1における免疫組織化学染色では、脳表にそって脳軟膜にGFAP陽性線維を広範に認め、アストロサイトの小脳脳軟膜における異所性発現と思われた。

### 【考察】

NSE及び神経細胞の増大を成熟の指標として捉え、DRGはSCと同様の経過で時間的に推移し、かなり早期より成熟していると考えられた。

HNK-1はnatural killer細胞の表面抗原として発見された蛋白で、神経系においては、細胞接着因子として神経堤細胞に比較的特異的に発現すると言われている。しかしながら今回の結果では、神経管由来の細胞にも未熟と思われる時期には免疫反応性を有していた。DRGとPNでの出現時期の差は、両者とも神経堤由来の細胞であるが、生後においても髄鞘化は活発に行われることから、細胞突起の活動性の差を現していると思われた。

NF1では頭蓋内にグリア系の腫瘍を伴ってくることが多いが、GFAP陽性線維の小脳脳軟膜における異所性発現は、生後におこる腫瘍化ということのみならず、胎生期よりグリア細胞の異所性増加の機序が存在していると思われた。

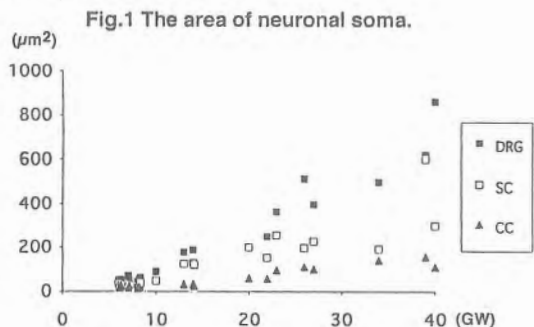


Table 1. Developmental changes of HNK-1 immunoreactivity.

GW	(N)	DRG	SC	CC	PN
6~8	(10)	+	+~±	+	+
10~14	(4)	+	-	+	+
20~23	(3)	+	-	±	+
26~27	(2)	+	-	-	+
34~40	(2)	-	-	-	+

+, strongly positive; ±, weakly positive; -, negative

### 3. 疾病研究第三部

#### 1. 研究部一年の歩み

疾病研究第3部は、精神分裂病、躁うつ病などの機能性精神病の原因および病態を分子レベルで解明し、新しい治療・予防法を開発することを目標に研究を進めている。本年度は昨年度に引き続き、研究所長が部長事務取り扱いとして指揮をとった（2月28日まで杉田秀夫、3月1日より小沢鉄二郎）。人事面では、4月より池田正明研究員が埼玉医科大学第一生理学教室助手として転出し、研究生であった白山幸彦君が武蔵病院精神科に異動した。また、10月には研究生の宗岡克政君が鹿児島大学に帰学した。一方、4月から大嶋明彦君（群馬大学）、10月からは村田昌彦君（富山医科薬科大学）が研究生として新たに加わった。その他は昨年度と同様、（室長）三国雅彦、西川 徹、（流動研究員）富田 麗、（センター研究員）海野麻未、斉藤和子、山崎千尋、（外来研究員）橋本篤司、（研究生）柏 淳、熊代 新、木寺克樹、野村奈美子、（研究補助員）浅川路子、岡 高恵、宮本純子、栗田雅子、黒田佳代子、金田小幸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

精神分裂病様症状発現薬であるメトアンフェタミンやコカインによって生ずる逆耐性現象をモデルとして、精神分裂病の発症と再発の分子機構の検討を進めた。ラットにおいて、逆耐性現象が成立し始める発達時期の前後では、これらの薬物投与後の脳内c-fos遺伝子の発現パターンが、大脳新皮質と線条体で選択的に変化することがわかり、逆耐性現象と2つの脳部位との関連が示唆された。また、精神機能の調節に関係が深いと考えられる内在性D-セリンの研究を行い、1)D-セリンがNMDA型興奮性アミノ酸受容体の刺激を介して、精神分裂病様症状を惹起するフェンサイクリジンの作用を抑制すること、2)内在性D-セリンの細胞外液中への放出とその性質、3)精神分裂病と他の精神神経疾患の患者死後脳における内在性D-セリンの含量などを明らかにした。

#### II. 躁うつ病の薬理生化学的研究

胎生期の種々の処置が発達に伴う脳の可塑的变化を生じ、成熟後のストレスに対する内分泌系の反応性を変化させ、ストレス脆弱性モデルとなり得るか、否かを明らかにすることを目的として一連の検討を行い、胎生期の生理的食塩水注射が14週齢に成熟した仔ラットの視床下部におけるセロトニン代謝の有意な低下と、恐怖条件付けストレス負荷に対するコルチコステロンの有意な過大反応を生じることを明らかにした。また、胎生期のデキサメサゾン投与も、胎生期の注射ストレス負荷の場合と類似の変化を生じることを明らかにした。

（部長事務取り扱い：杉田秀夫、小沢鉄二郎）

## 2. 研究業績

## A 論文

## a. 原著

- 1) Sugishita M, Takashima M, Takeuchi Y, Katoh Y, and Takahashi K:  
Periodic mother deprivation during the light period reversed the phase of serotonin N-acetyltransferase activity rhythm in rat pups.  
Pharmacol. Biochem. & Behav. 46:609–615, 1993
- 2) Takeuchi Y, Katoh Y and Takahashi K:  
Classical acetylcholine receptors do not play a direct role in neuronal transmission of photic information in the suprachiasmatic nucleus in rats.  
Neurosci. Lett. 158:71–74, 1993
- 3) Muraoka S, Mikuni M, Kagaya A, Saitoh K and Takahashi K:  
Dexamethasone potentiates serotonin-2 receptor-mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in C6 glioma cells.  
Neuroendocrinol. 57:322–329 (1993)
- 4) Kuroda Y, Mikuni M, Nomura N and Takahashi K:  
Differential effect of subchronic dexamethasone treatment on serotonin-2 and  $\beta$ -adrenergic receptors in the rat cerebral cortex and hippocampus.  
Neurosci. Lett. 155:195–198 (1993)
- 5) Kagaya A, Mikuni M, Muraoka S, Saitoh K, Ogawa T, Shinno H, Yamawaki S, and Takahashi K:  
Homologous desensitization of serotonin-2 receptor-stimulated intracellular calcium mobilization in C6BU-1 glioma cells via a mechanism involving calmodulin pathway.  
J. Neurochem. 61:1050–1056 (1993)
- 6) Muneoka K, Mikuni M, Ogawa T, Kitera K and Takahashi K :  
Periodic maternal deprivation induced potentiation of negative feedback sensitivity to glucocorticoids to inhibit stress-induced adrenocortical response persists throughout the animal's life-span.  
Neurosci. Lett. 168:89–92 (1994)
- 7) 樋口輝彦, 関口 定, 朝倉幹雄, 神庭重信, 渋谷治男, 野村総一郎, 三国雅彦, 山田和夫,

## II 研究業績

高橋清久, 高橋三郎

難治性うつ病の実態に関する多施設共同調査研究

脳と精神の医学 4:135-146 (1993)

- 8) Hashimoto A, Nishikawa T, Konno R, Niwa A, Yasumura Y, Oka T and Takahashi K:  
Free D-serine, D-aspartate and D-alanine in central nervous system and serum in mutant mice lacking D-amino acid oxidase.  
Neurosci. Lett., 152, 33-36, 1993.
- 9) Shirayama Y, Nishikawa T, Umino A and Takahashi K:  
p-Chlorophenylalanine-reversible reduction of  $\sigma$  binding sites by chronic imipramine treatment in rat brain  
Eur. J. Pharmacol., 237, 117-126, 1993.
- 10) Mitsushio H, Shirayama Y, Nishikawa T and Takahashi K:  
Effects of subacute repeated injections of phencyclidine and MK-801 on substance P content in the rat brain.  
Regulatory Peptides, 46, 352-353, 1993.
- 11) Hashimoto A, Kumashiro S, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Mito T, Takashima S, Doi N, Mizutani Y, Yamazaki T, Kaneko T and Ootomo E :  
Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex.  
J. Neurochem., 61, 348-351, 1993.
- 12) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Hayashi T and Takahashi K  
Widespread distribution of the free D-aspartate in rat periphery.  
FEBS Lett., 331, 4-8, 1993.
- 13) Yamagata T, Momoi T, Kumagai H, Nishikawa T, Yanagisawa M and Momoi M :  
Distribution of retinoic acid receptor proteins in rat brain: Up-regulation by retinoic acid.  
Biomedical Res., 14, 183-190, 1993.
- 14) Orita K, Sasaki S, Maeda M, Hashimoto A, Nishikawa T, Yugai T and Umezumi K:  
Synthesis and evaluation of 1-[1-[5-(2'-[<sup>18</sup>F] fluoroethyl)-2-thienyl] cyclohexyl]-piperidine as a potential in vivo radioligand for the NMDA receptor-channel complex.  
Nucl. Med. Biol., 20, 865-873, 1993

15) Shirayama Y, Nishikawa T and Takahashi K:

Differential effects of repeated dl-pentazocine treatment on sigma binding sites in discrete brain areas of the rat.

Neurosci. Lett., 165, 219-222, 1994

## b. 著 書

## 1) 高橋清久：睡眠・覚醒リズム障害の治療

睡眠学ハンドブック，日本睡眠学会編，pp422-441，1993

2) Nishikawa T, Umino A, Kashiwa A, Ooshima A, Nomura N, Takahashi K:

Stimulant-induced behavioral sensitization and cerebral neurotransmission.

In : Neurotransmitters in neuronal plasticity and psychiatric disorders, p53-62,

Excerpta Medica, Ltd. Tokyo, 1993

## c. 総 説

1) 池田正明, 高橋清久：

レセプター研究の現状

神経研究の進歩 37 : 335-350, 1993

2) 三国雅彦：

セロトニン受容体亜型及びその機能と精神神経疾患の病態

神経研究の進歩 37 : 459-467, 1993

3) 三国雅彦, 黒田安計, 宗岡克政, 高橋清久：

抗うつ薬の作用機序からみたうつ病の難治化と新しい薬物療法の可能性

脳と精神の医学 4 : 155-160, 1993

4) 三国雅彦, 小川哲郎, 宗岡克政, 木寺克樹, 黒田安計, 高橋清久：

視床下部-下垂体-副腎皮質系機能の脱抑制うつ病態モデル-新生児期のストレス負荷やセロトニン神経伝達を変動させる薬物処置による検討-

脳と精神の医学 5(Suppl) : 37-45, 1994

5) 西川 徹：

グルタミン酸と精神疾患

ブレインサイエンス 4 : 187-198, 1993

6) 西川 徹：

興奮性アミノ酸と精神分裂病

## II 研究業績

神経精神薬理 15 : 651-663, 1993

### 7) 橋本篤司, 西川 徹 :

フェンサイクリジン投与動物を用いた精神分裂病の研究

脳と精神の医学 5(Suppl.) : 47-57, 1994

### d. 班会議報告書

#### 1) 野村奈美子, 黒田安計, 高橋清久 :

行動およびコルチコステロン分泌リズムに対する加齢の影響

「老化と生体リズム異常」長寿科学総合研究費平成4年度報告書, pp.326-328, 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, 山崎千尋, 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関連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年度研究報告書, pp.99-104, 1993

#### 3) 西川 徹, 橋本篤司, 岡 高恵, 林 時司, 藤井紀子, 原田 馨, 海野麻未, 高橋清久 :

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年度研究報告書, pp.123-128, 1993

#### 4) 西川 徹, 海野麻未, 柏 淳, 白川幸彦, 橋本篤司, 岡 高恵, 高橋清久 :

依存性薬物による逆耐性現象の発現機序に関する生化学的研究 -Methamphetamine投与ラットにおける脳内c-fos遺伝子mRNA発現の発達に伴う変化-

厚生省精神・神経疾患研究委託費：薬物依存の発生機序に関する精神分裂病の発症機序と臨床および治療に関する研究班, 平成4年度研究成果報告書, pp.87-92, 1993

#### 5) 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年度研究報告書, pp.27-34, 1993

#### 6) 西川 徹, 海野麻未, 柏 淳 :

依存性薬物による持続性脳障害の発現機序に関する分子生物学的研究

厚生科学研究費補助金（麻薬等対策総合研究事業）研究「薬物依存における脳性障害発現機序に関する研究」平成4年度報告書, pp.33-48, 1993

## e. その他

- 1) 高橋清久, 三国雅彦, 西川 徹, 山脇成人, 神庭重信, 朝倉幹雄, 米田幸雄, 竹原修造 :  
 ストレス侵襲および精神神経機能障害の発症機序と治療法開発  
 平成4年度ヒューマンサイエンス基礎研究事業, 官民共同プロジェクト研究報告「第4分野:健康保持の基礎としての生体防御機構の解明」, pp.185-193, 1993
- 2) 西川 徹, 橋本篤司, 熊代 新, 岡 高恵 :  
 脳内興奮性アミノ酸性神経伝達の調節機構ならびに病態とその治療法に関する研究  
 平成4年度ヒューマンサイエンス基礎研究事業, 官民共同プロジェクト研究報告「第4分野:健康保持の基礎としての生体防御機構の解明」, pp.211-218, 1993
- 3) 柏 淳, 海野麻未, 野村奈美子, 西川 徹, 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よる変化  
 精神薬療基金研究年報, 25 : 202-207, 1994

## B. 学会発表

## a. 特別講演・シンポジウム

- 1) 三国雅彦 :  
 成育環境と視床下部-下垂体-副腎系  
 1993 Symposium on Anxiety and Depression, 御殿場, 7.31, 1993
- 2) 三国雅彦 :  
 うつ病態モデルに関する基礎的研究  
 厚生省精神・神経疾患委託費 精神疾患関連班第三回合同シンポジウム, 東京, 11.12, 1993
- 3) 三国雅彦 :  
 神経発達学の視点から見た精神疾患の病態モデル  
 第386回広島精神神経学会 広島, 12.11, 1993
- 4) 西川 徹 :  
 逆耐性現象とニューロトランスミッター  
 第10回ニューロトランスミッターと疾患研究会, 東京, 6.5, 1993
- 5) 西川 徹, 海野麻未, 柏 淳, 大嶋明彦, 野村奈美子 :  
 依存性薬物による逆耐性現象の分子薬理学的研究  
 「薬物依存形成の分子機構」



## II 研究業績

第67回日本薬理学会年会, 京都, 3.22, 1994

- 6) Nishikawa T, Hashimoto A, Umino A, Kashiwa A, Nishijima K, Kumashiro S, Oka T, Nomura N, Tanii Y and Takahashi K:

Possible implication of disturbed neurotransmission via the N-methyl-D-aspartate type excitatory amino acid receptor in schizophrenic disorders.

Asia-Oceanian Symposium on Recent Advances in Biological Psychiatry. Kobe, March 23, 1994

### b. 国際学会

- 1) Muneoka K, Mikuni M, Higuchi T, Takahashi K and Matsumoto K .:

Effects of prenatal dexamethasone administration on brain biogenic amine and 3H-paroxetine binding capacities in rat offsprings.

23th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C., U.S.A., Nov 10, 1993

- 2) Ikeda M, Yamazaki C, Mikuni M, and Takahashi K:

Serotonin induction of AP-1 and CRE DNA binding activities in rat C6BU-1 glioma cells.

23th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C., U.S.A., Nov 11, 1993

- 3) Shinno H, Mikuni M, Yamawaki S and Takahashi K:

N-Methyl-D-aspartate receptor-like complex is coupled to pertussis toxin-sensitivie G-protein and phospholipase C in C6 cells.

23th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C., U.S.A., Nov 12, 1993

- 4) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T and Takahashi K:

The anatomical distribution and age-related changes in free D-serine in rat brain.

Fourteenth Meeting of the International Society for Neurochemistry, Montpellier, France, Aug. 25, 1993.

- 5) Hashimoto A, Nishikawa T, Kumashiro S, Oka T, Takahashi K, Mito T and Takahashi S:

Embryonic and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex.

Satellite Meeting of the Fourteenth Meeting of the International Society for

## Neurochemistry:

Excitatory amino acid neurotransmission, Marseille, France, Aug 30-, 1993.

- 6) Hashimoto A, Nishikawa T, Kumashiro S, Oka T and Takahashi K:  
Embryonic development and postnatal changes in free D-forms of aspartate and serine in the human prefrontal cortex.  
23rd. Annual Meeting Washington, D.C., Nov 11, 1993.
- 7) Kashiwa A, Nishikawa T, Umino A, Ikeda M and Takahashi K:  
Developmental changes in methamphetamine-induced c-fos gene expression in rat brain.  
23rd. Annual Meeting Washington, D.C., Nov 9, 1993
- 8) Nishijima K, Nishikawa T, Hashimoto A, Umino A, Kashiwa A, Oka T and Takahashi K:  
Differential effect of phencyclidine on dopamine and its metabolites in the rat medial frontal cortex and striatum : An in vivo dialysis study.  
23rd. Annual Meeting Washington, D.C., Nov 9, 1993

## c. 国内学会

- 1) 新野秀人, 三国雅彦, 斎藤和子, 山脇成人, 高橋清久 :  
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  
第23回日本神経精神薬理学会, 東京, 9.28, 1993
- 2) 斎藤和子, 三国雅彦, 池田正明, 富田 麗, 山崎千尋, 高橋清久 :  
神経系由来培養細胞に強制発現させたセロトニン-1A受容体機能について  
第17回日本神経科学学会, 名古屋, 12.7, 1993
- 3) 富田 麗, 三国雅彦, 高橋清久 :  
グルココルチコイド受容体に対する向精神薬の直接効果  
第17回日本神経科学学会, 名古屋, 12.8, 1993
- 4) 池田正明, 山崎千尋, 三国雅彦, 高橋清久 :  
C6BU-1グリオーマ細胞におけるセロトニン刺激性AP-1, CRE結合活性誘導  
第16回日本分子生物学会, 浦安, 12.18, 1993
- 5) 宗岡克政, 三国雅彦, 高橋清久, 松本 啓 :  
胎生期のストレス処置およびグルココルチコイド投与が生後のセロトニン神経系の発達に与える影響  
第16回日本生物学的精神医学会, 神戸, 3.24, 1994

## II 研究業績

- 6) 新野秀人, 三国雅彦, 斎藤和子, 山脇成人, 高橋清久 :  
C6グリオーマ細胞におけるグルタミン酸受容体とセロトニン-2受容体の連関  
第16回日本生物学的精神医学会, 神戸, 3.25, 1994
- 7) 加沢鉄士, 三国雅彦, Herbert Y Meltzer, 山内俊雄 :  
ラット大脳皮質におけるドパミンD-4受容体について  
第16回日本生物学的精神医学会, 神戸, 3.25, 1994
- 8) 西嶋康一, 西川 徹 :  
NMDA 受容体の競合的拮抗薬である CGS19755 がラット前頭葉 dopamine 代謝に与える影響  
-Microdialysis 法による検討-  
日本神経精神薬理学会年会, 東京, 9.28, 1993
- 9) 橋本篤司, 西川 徹, 岡 高恵, 高橋清久 :  
ラット末梢組織には多量の遊離型D-アスパラギン酸が存在する  
第66回日本生化学会大会, 東京, 10.2, 1993
- 10) 橋本篤司, 西川 徹, 熊代 新, 岡 高恵, 水戸 敬, 高嶋幸男, 高橋清久 :  
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  
第36回日本神経化学大会, 大阪, 10.25, 1993
- 11) 熊代 新, 橋本篤司, 西川 徹 :  
ヒト死後脳における遊離型D-セリン含量の検討  
第17回日本神経科学大会, 名古屋, 12.8, 1993
- 12) 海野麻未, 野村奈美子, 柏 淳, 西川 徹 :  
幼若ラット脳におけるmethamphetamine誘起性c-fos様蛋白質の分布パターン  
第17回日本神経科学大会, 名古屋, 12.8, 1993
- 13) 白川幸彦, 西川 徹, 三ツ汐洋, 高橋清久 :  
精神異常発現薬 phencyclidine の急性投与による substance P 含量低下に対する抗精神病薬  
haloperidol の効果  
第16回日本生物学的精神医学会, 神戸, 3.25, 1994

## C. 班会議発表

- 1) 三国雅彦, 宗岡克政, 木寺克樹, 斎藤和子, 山崎千尋, 小川哲郎, 高橋清久 :  
胎生期や新生児期のストレス負荷ならびにグルココルチコイド受容体刺激が及ぼす成熟後のストレ

スに対する視床下部—下垂体—副腎皮質系の反応への影響

厚生省精神・神経疾患研究委託費：感情障害の神経科学的成因及び治療に関する研究班

平成5年度班会議，東京，1.20，1993

2) 西川 徹，橋本篤司，熊代 新，岩間久行，岡 高恵，海野麻未，高橋清久：

抗フェンサイクリジンおよび抗メトアンフェタミン作用をもつD-アミノ酸に関する研究

厚生省精神・神経疾患研究委託費：精神分裂病の発症および病態生理に関する基礎的，臨床的研究班 平成5年度班会議，東京，1.21，1994

3) 西川 徹，海野麻未，柏 淳，野村奈美子，大嶋明彦，村田昌彦：

c-fos遺伝子の発現を指標とした依存性薬物に応答する脳内神経回路の研究

厚生省精神・神経疾患研究委託費：精神作用物質性精神障害の診断と治療に関する研究班 平成5年度班会議，東京，1.28，1994

4) 橋本篤司，熊代 新，岡 高恵，西川 徹：

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5年度班会議，東京，1.22，1994

5) 岩間久行，海野麻未，西川 徹：

NMDA受容体グリシン結合部位アンタゴニストの行動およびドーパミン代謝に対する影響

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5年度班会議，東京，1.22，1994

## D. その他の研究会

1) 野村奈美子，高橋清久：

生体リズムへの加齢の影響

厚生省研究費補助金長寿科学総合研究事業「老化と生体リズム異常」

第2回（平成5年度）班会議，12.17，1993

2) 三国雅彦：

抗うつ薬の作用機序からみたうつ病の成因

福島医大シンポジウム：躁うつ病の薬理・生化学的病態をめぐって，福島，5.1，1993

3) 三国雅彦：

## II 研究業績

各種精神疾患におけるセロトニン受容体亜型の機能障害に関する基礎的研究

鹿児島ニューロトランスミッター懇話会－基礎と臨床，鹿児島，10.1，1993

4) 三国雅彦，木寺克樹，宗岡克政，斉藤和子，高橋清久：

副腎皮質系のストレス反応性を規定する妊娠期の諸要因の解析

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5年度研究発表会，3.7，1994

5) 橋本篤司，熊代 新，岡 高恵，西川 徹：

ラット脳および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-セリンに関する研究

ヒューマンサイエンス振興財団第4分野第4テーマ

平成5年度研究発表会，東京，3.7，1994

6) 西川 徹：

興奮性アミノ酸伝達系を標的とする新しい抗精神病薬の可能性

精神・神経疾患診断・治療薬開発調査研究会

第3回研究会，東京，10.1，1993

7) 柏 淳，海野麻未，野村奈美子，西川 徹，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よる変化

精神薬療基金研究発表会，大阪，12.6，1993

グルココルチコイド受容体に対する向精神薬の直接効果

富田 麗, 三国雅彦

グルココルチコイド受容体 (GCR) が種々の精神疾患に関与することが示唆されており、うつ病患者では、リンパ球のGCR量が減少していること、また抗うつ薬を動物に投与すると脳内GCRのmRNA量に変化することが報告されている。このように、GCRに対する抗うつ薬の影響を実験動物や患者サンプルで検討している例は多いが、受容体蛋白質への直接作用を *in vitro* で検討した報告はない。そこで我々はラット大脳皮質、肝臓の細胞質画分を用い、抗うつ薬およびその他の向精神薬のGCR複合体への直接作用を<sup>3</sup>H]デキサメサゾン (<sup>3</sup>H]Dex) 結合を指標に検討した。

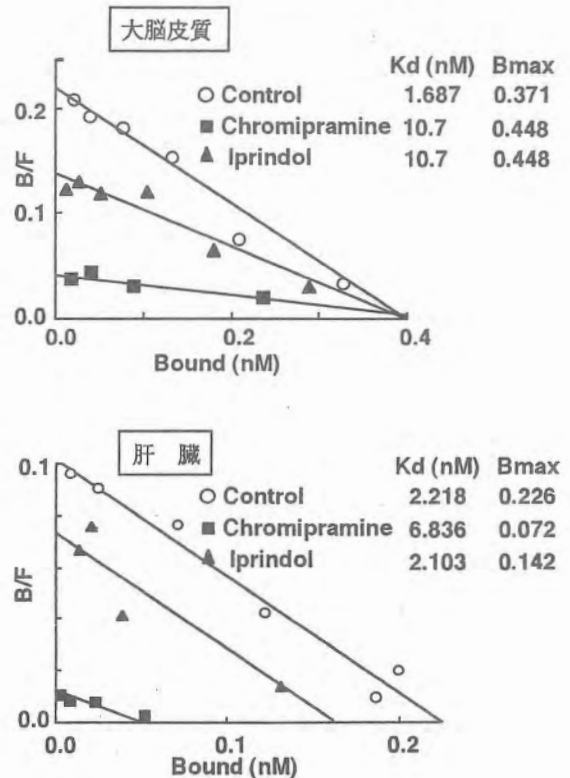
**【方法】細胞質画分:** 臓器をホモゲナイズ後 10万gで1時間遠心した上清からチャコール処理によって内因性のコルチゾールを除去し、細胞質画分として実験に用いた。**結合実験:** 細胞質画分に<sup>3</sup>H]Dex、薬物を同時に添加し、4℃でインキュベートした後、<sup>3</sup>H]Dexの特異結合量をチャコール法、ゲル濾過法、フィルター法で測定した。10μMのDex存在下での結合量を非特異結合とした。

**【結果】** 一般的に<sup>3</sup>H]Dex結合実験は、受容体複合体安定化作用を持つモリブデン酸 (10 mM 程度) 存在下で検討されるが、このモリブデン酸濃度は非生理的である (生体内は3μM程度)。そこでモリブデン酸非存在下で<sup>3</sup>H]Dex結合実験を行ったところ、クロミプラミン、イプリンドール (100μM) の添加によって肝臓と大脳皮質で<sup>3</sup>H]Dex結合が抑制された。Scatchard 解析を行ったところ、両者は肝臓の受容体に対しては競合的に、大脳皮質受容体に対しては、非競合的に拮抗した。拮抗の様式の差が生じる機序を検討するため、抗GCR抗体による免疫沈降を行い、受容体と共沈してくる蛋白質を、抗GCR抗体、受容体複合体の構成成分の1つHSP90に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングによって解析した。肝臓では、薬物添加、非添加サンプルでほぼ同程度のGCRとHSP90が検出された。一方、大脳皮質では、GCRに差はなかったが、HSP90はクロミプラミンを添加したサンプルでほとんど検出されなかった。以上の結果から、クロミプラミンによって、大脳皮質ではGCR複合体が受容体自身と付随蛋白質に解離

し、アゴニストに対して低親和性結合活性を示すGCR単体となった結果、Bmaxが減少し非競合的拮抗を示すことが示唆された。GCRに対する<sup>3</sup>H]Dex結合におよぼす各種向精神薬の効果を大脳皮質細胞質画分で検討したところ、クロミプラミン、イプリンドール、クロルプロマジンが抑制すること、ジアゼパム、ハロペリドールは影響しないことが示された。

**【考察】** 向精神薬によってGCRに対する<sup>3</sup>H]Dex結合が抑制され、しかもその作用機構が臓器によって異なった。向精神薬が受容体、付随蛋白質どちらに作用するのか、臓器差を生じる原因は不明である。この点を検討するために各臓器由来の精製受容体に対する作用の検討を計画している。

Fig. 1 グルココルチコイド受容体に対する<sup>3</sup>H]Dex結合のスキッチャード解析



## 胎生期ストレス負荷によるうつ病態モデル動物の作製

木寺克樹, 三国雅彦, 齋藤和子, 宗岡克政, 山崎千尋, 高橋清久

うつ病では高コルチゾール血症やデキサメサゾン非抑制が高頻度に観察されることから、視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 系の異常が示唆されている。HPA系の異常の機構を解明するためには、類似の病態を示すモデル動物を作製する必要がある。そこで我々は、妊娠ラットにストレスを負荷することで胎生期ラットの脳を可塑的に変化させる方法 (Prenatal stress) を用いてモデル動物の作製を試みた。

## &lt;方法&gt;

SD系ラットを用いた。妊娠14日目から20日目の間、妊娠ラットに対し一日一回の生理食塩水皮下注射ストレスを加え、生まれたラットが成熟してから恐怖条件づけストレスに対するコルチコステロン分泌を指標にHPA系を評価し、さらに一週間の慢性ストレス負荷後に強制水泳テストを用い行動を評価した。

## 1. 恐怖条件づけストレス

ストレスボックスにて20分間のフットショックストレスを三日間負荷し条件づけを行う。四日目には、フットショックを加えずにボックスに20分間おく。

## 2. 強制水泳テスト

シリンダに温水をいれ、逃避できない条件のもとで15分間泳がせ、無動時間 (immobility) と逃避行動時間 (escape directed behavior) を測定する。

## &lt;結果&gt;

胎生期生食注射ストレス群において、恐怖条件づけストレス負荷によるコルチコステロン濃度はストレス直後に有意な増加を認め、ストレス後のコルチコステロン濃度のrecoveryは遅れる傾向を認めた。(Fig.1) 強制水泳テストでは、胎生期生食注射群で無動時間、逃避行動時間の有意な増加を認めた。(Fig.2)

## &lt;考察&gt;

胎生期に生食注射ストレスを負荷されたラットは、ストレスに対するコルチコステ

ロンの過剰分泌、つまりHPA系の昂進を認め、さらにストレス後の recoveryの遅れすなわちネガティブフィードバック機構の減弱を示す傾向を認めた。これらうつ病類似のHPA系の異常を示すものであり、prenatal stressを用いて、うつ病態の一つを表現する動物モデルが作製される可能性が示唆された。また、これらのラットは、強制水泳テストで無動時間と逃避行動時間の増加を認めた。抗うつ薬は無動時間を短縮する作用を持つことが知られており、逃避行動時間の増加は抗不安薬で正常化されるとの報告もある。Prenatal stressを負荷されたラットは、病態生理だけでなく行動上もうつ病と類似性をもっている可能性が示唆された。

Fig.1 : Effect of prenatal stress on corticosterone secretion induced by conditioned fear stress in male rats at 28 weeks of age

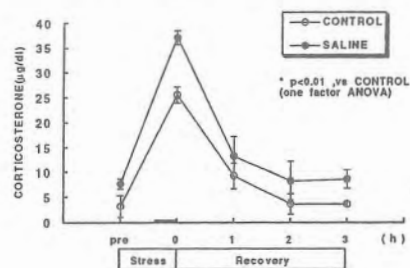
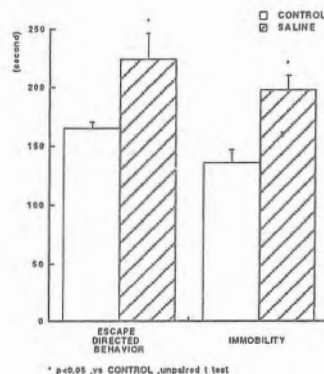


Fig.2 : Effect of prenatal stress on forced swim test after chronic stress in male rats at 8 weeks of age



## ラット脳における内在性D-セリンの細胞外液中への放出

橋本篤司, 岡 高恵, 西川 徹

哺乳類の遊離型アミノ酸はすべてL-体から構成されていると考えられてきた。しかし、最近我々はヒトやラット脳内に多量の遊離型D-セリンが存在すること及びD-セリンの脳内分布がN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型興奮性アミノ酸受容体の分布と正の相関を示すことを明らかにし、哺乳類においてもD体のアミノ酸が機能していることを示唆した。またD-セリンは、NMDA受容体のアロステリックアゴニストであり、精神分裂病様症状惹起薬の作用に拮抗することを考えあわせると、脳内で細胞間の情報伝達に関係することにより、精神機能の調節を行っている可能性がある。そこで今回我々は、脳内透析法(in vivo dialysis)を用いて細胞外液中へのD-セリンの放出とその性質について検討した。

## [方法]

実験には、Wistar系雄性ラット(8週令)を用いた。脳内透析は、実験の2日前に各脳部位にプローブを挿入・固定し、自由運動下で行った。透析液中のアミノ酸は、サンプルをo-phthalaldehyde及びBoc-L-cysteineで誘導化した後、蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィーによって分離、定量した。

## [結果]

脳内透析液中のD-セリンの基礎遊離量は、前頭葉皮質と線条体で高く、小脳では痕跡程度であった。D-セリンと同じくNMDA受容体のアロステリックアゴニストとして作用するグリシンの遊離量は、前頭葉皮質でD-セリンよりやや高く、線条体においてはほぼ半分程度であったが、小脳では50倍以上の高値を示した。また前頭葉皮質において、灌流液中のCa<sup>2+</sup>除去やNa<sup>+</sup>チャンネル遮断薬であるテトロドキシンの添加を行っても、細胞外D-セリン濃度の減少は見られなかった。さらに、灌流液中にNa<sup>+</sup>チャンネルを活性化するベラトリンを添加すると、グリシンは著明に上昇したのに対してD-セリン濃度の増加は見られなかった。

## [考察]

今回の研究で前頭葉皮質や線条体の細胞外液中に高濃度のD-セリンの遊離が見られ、小脳では痕跡程度であることが明らかとなった。この部位差は、ラット脳組織中のD-セリン濃度の部位差と類似している。また、前頭葉皮質や線条体では、細胞外D-セリ

ン濃度がNMDA受容体グリシン部位の内在性アゴニストと推定されているグリシンと同程度かより高値であり、グリシン部位の最大反応を引き起こすレベルであることより、D-セリンがグリシンとともにNMDA受容体の内在性調節因子である可能性が支持された。これに対して、小脳におけるD-セリンの細胞外液中濃度はグリシンよりはるかに低く、グリシン部位に対するK<sub>d</sub>値あるいはED<sub>50</sub>値より小さいことから、NMDA受容体を介する神経伝達への関与も少ないことが推察される。

細胞外液中のD-セリンがどのような種類の脳細胞から放出されるのかについては、未だ明らかではない。前頭葉皮質のD-セリンの基礎遊離量が、灌流液中のCa<sup>2+</sup>除去や神経インパルスを遮断するテトロドキシンの添加によって減少せず、脱分極を誘起するベラトリンを灌流しても増加しなかった点からみると、D-セリンはニューロン由来ではない可能性が考えられる。今後は、D-セリンの脳組織への取り込みの検討や、抗D-セリン抗体の作製を試みることに、D-セリンの局在および神経情報伝達への関与をさらに検討する予定である。

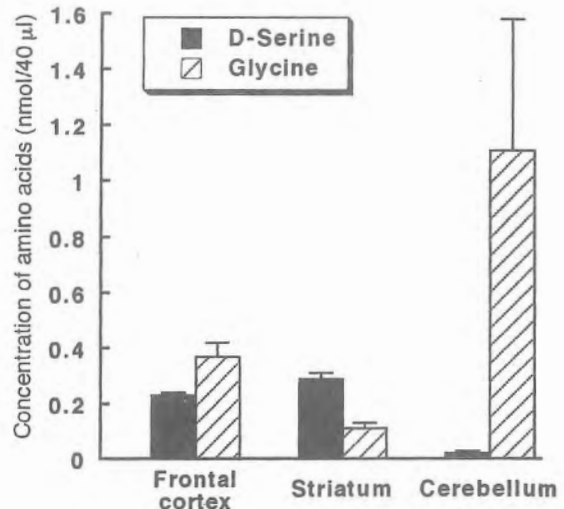


図1 ラット脳内各部位における細胞外液中D-セリンおよびグリシンの濃度



## 分裂病様症状惹起薬によって発現する脳内c-fos遺伝子の発達に伴う分布パターンの変化

柏 淳, 海野麻未, 野村奈美子, 大嶋明彦, 村田昌彦, 西川 徹

精神分裂病(分裂病)に酷似した症状を引き起こす薬物のうち、amphetamine、methamphetamine (MAP)、cocaine(COC)などを反復摂取したヒトおよび実験動物では、これらの薬物に対する感受性が亢進して、幻覚・妄想状態あるいは異常行動が生じ易くなる現象—逆耐性現象—が認められる。従って、逆耐性現象は分裂病の再発のモデルとして重視されている。また、逆耐性が一定の発達段階から形成され始める点は、分裂病が思春期以降に発症することと関係する可能性がある。そこで、我々は分裂病の発症や再発の分子機構にアプローチするため、逆耐性現象の研究を進めている。本年度は、逆耐性の成立に関係の深い脳部位を見出す目的で、神経活動の変化を反映するc-fos遺伝子の発現を指標として、各発達段階のラットにおけるMAPやCOCに対する脳内各部位の応答性の変化を観察し、逆耐性現象の発達と比較した。

## [方法]

実験には、生後8-100日令のWistar系ラットを用いた。逆耐性の形成実験では、MAP 4.8mg/kg(皮下注射)を1日1回5日間投与し、最終投与21日後にMAP 1.6mg/kg(腹腔内注射)をチャレンジして異常行動の評価を行った。c-fos遺伝子の発現を検討する実験では、MAP 4.8 mg/kgまたはCOC 30 mg/kgを皮下注射し、1または3時間後に脳を取り出した。続いて、ノーザンブロットを用いてc-fos mRNAの半定量的測定を行い(薬物投与1時間後)、免疫組織化学法によってc-Fos様免疫反応を検出した(3時間後)。

## [結果・考察]

MAPに対する感受性は、生後8,14あるいは18日にMAPの反復投与を開始した動物では変化しなかったが、生後21,23,25,31または56日に開始した場合には有意に昂進し、ラットの逆耐性形成における臨界期が生後21から25日頃に存在することが確認された。MAP急性投与後のc-Fos様免疫反応の脳内分布を、生後8日から56日の動物で調べたところ、1)分布パターンは発達に伴って変化し、全体のパターンが成熟期と同様になるのは生後21日頃であること、2)変化は大脳新皮質で最も著しく、8日令においては深層の一部でわずかに出現するにすぎないが、次第に広範囲にわたって著明な反応が出現すること、3)梨状葉皮質(旧皮質)、嗅結節、線条体などでは8から56日令まで多数のc-Fos陽性細胞が認められること、4)海馬(古皮質)では各発達期を通じてきわめて低レベルの免疫

反応しかみられないことなどがわかった。COC急性投与を行った生後8日および56日のラットの脳においては、MAP投与後と類似したc-Fos陽性細胞の分布が見られた。一方、MAP投与後の大脳皮質におけるc-fos mRNA量は、1)発達とともに増加し生後21日頃に成熟期のレベルに近づく、2)新皮質の増加率(10倍以上)は旧皮質(約2倍)よりはるかに大きい、3)海馬ではいずれの生後発達段階においても少量であるなどの特徴を示し、免疫組織化学の結果と矛盾しなかった。生理食塩水を投与した対照動物の脳では、c-fosの発現はわずかに認められるのみであった。以上の結果から、MAPやCOC投与後の脳内情報処理機構は生後発達とともに変化し、逆耐性形成の臨界期付近で成熟期に近づくことが示唆された。従って、逆耐性の成立には特定の神経回路の発達が必要と考えられる。c-fos発現の変化から見ると、このような神経回路は大脳新皮質を含む脳部位に存在する可能性がある。

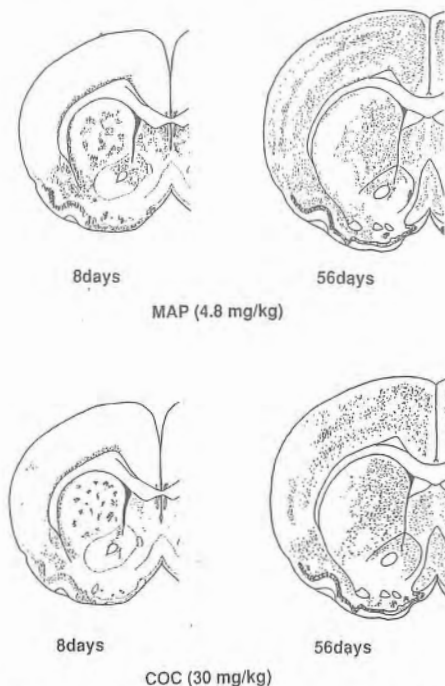


図1 MAPおよびCOC投与後の脳におけるc-Fos様免疫反応の生後発達に伴う変化(線条体および中隔を含む冠状断:c-Fos陽性の核を黒点で示す)

## 4. 疾病研究第四部

### 1. 研究部一年の歩み

疾病研究第4部では神経変性疾患の発症にまつわる基本原理を分子レベルで解明し、革新的治療法を開発することを目標に研究を行なっている。昨年9月の和田の着任に続いて今年度6月から田中、関口両室長が参画し、当研究部がめざす「欧米の追随ではない、独創性の高い」研究の指導体制がようやく整うことになった。大学院生などの受託研究生を中心にした若手研究者も予想を上回る数を確保することができ、両室長の好指導もあり全員公私ともに神経研究所での生活を楽しんでいる。目に見える形での今年度の研究業績は高くはないが来年度以降の成果の飛躍的な向上をめざして、和田の統括のもと以下の研究が精力的に進行した。

- 1) 遺伝性神経変性疾患の病因遺伝子の単離：神経軸索変性モデル動物を主な材料として研究生の徐君（名古屋大学大学院生）を中心に松井(京)センター研究員、田中室長が補佐をする形でポジショナルクロニング、免疫学的検索を行なった。
- 2) 神経伝達物質受容体・トランスポーター機能の発生日学的解析：田中室長を中心に浜崎、渡瀬両流動研究員、和田(憲)新技術事業団特別研究員、静岡県立大学大学院生の萩原君、大阪大学大学院生の前野君がチームを構成し、グルタミン酸受容体・トランスポーター、ボンベシン受容体、ニューロテンシン受容体に焦点を当てた研究が進行した。
- 3) アフリカツメガエル卵を用いた遺伝子発現系による受容体機能の解析：関口室長を中心に、流動研究員の渡瀬君、研究生の松井(隆)君（近畿大学大学院生）および竹尾君がチームを構成し、新規受容体遺伝子の検索、グルタミン酸受容体の機能-構造関連の解析、新規グルタミン酸作用調節薬の開発等をめざした研究を行なった。
- 4) その他、吉田室長は筋ジストロフィーの生理学的研究を行ない、筋崩壊にL型カルシウムチャンネルが関与することを見いだした。松井(京)研究員は神経成長因子の遺伝子発現に関する研究および神経疾患モデル動物の行動薬理学的研究を引き続き行なった。

最後に、実験補助として木内、陣野、志鎌各研究助手に大変お世話になった。この場を借りてお礼申し上げます。

(部長 和田圭司)

## II 研究業績

### 2. 研究業績

#### A 論文

##### a. 原著

- 1) Matsui K, Wada K, Kwak, S:  
Ataxia-ameliorating effects of YM-14673, a potent analog of thyrotropin releasing hormone, in ataxic mutant mice.  
Eur J Pharmacol 254:295-297, 1994
- 2) Kawakami K, Tanaka K, Nakayama T, Inoue K, Nakamura S:  
Cloning and expression of a human glutamate transporter  
Biochem Biophys Res Commun. 199:171-176, 1993
- 3) Matsui K, Masui A, Kato N, Adachi K:  
Levels of somatostatin and cholecystokinin in the brain of ataxic mutant mice  
Life Sci, 53:333-340, 1993
- 4) Ikeda M, Matsui K, Ishihara Y, Morita I, Murota S, Yuasa T, Miyatake T:  
Cerebellar nitric oxide synthase, cGMP and motor function in the two lines of cerebellar mutant mice, Staggerer and Wriggle Mouse Sagami  
Neurosci Lett 168:65-68, 1994

##### b. 著書

- 1) 和田圭司:  
遺伝子の発現—レセプター・イオンチャンネル複合体の場合—  
レセプター, 基礎と臨床, 井村, 岡, 芳賀, 岸本編集, 朝倉書店, 東京, p305-315, 1993

##### c. 総説

- 1) 和田圭司, 関口正幸:  
分子生物学的に見たグルタミン酸レセプターの機能発現  
実験医学 11:1382-1387, 1993
- 2) 田中光一:  
伝達物質の小胞への輸送機構—トランスポーターの分子機構  
Mebio, 10:59-65, 1993
- 3) 田中光一:  
伝達物質のトランスポーター

精神神経薬理, 16 : 85-93, 1994

4) 田中光一 :

伝達物質のトランスポーター

生体の科学, 45 : 159-163, 1994

d. 班会議報告書

1) 和田圭司, 関口正幸, 渡瀬 啓 :

グルタミン酸受容体機能を修飾する dominant-negative 型 mutant subunit の開発と可塑性研究への応用

厚生省精神・神経疾患委託「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年度研究報告書 p57-60, 1994

2) 和田圭司, 徐 俊教, 松井京子, 田中光一, 山元 弘 :

モデル動物を用いた感覚性運動失調症病因遺伝子の探索

厚生省特定疾患「運動失調症調査研究班」平成5年度報告書, p71-74, 1994

3) 吉田瑞子, 松崎哲也, 和田圭司 :

強縮刺激時に於ける外液Ca<sup>2+</sup>による骨格筋崩壊現象

厚生省精神・神経疾患委託「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」班

平成5年度報告書 p121-124, 1994

## B. 学会発表

b. 国際学会

1) Suh J-G, Yamazaki A, Tomita A :

Breeding of the Gad-mdx mouse: influence of genetically-induced denervation on dystrophic muscle fibers

Fall Conference of Korean Association for Laboratory Animal Science Taejon, Korea,

October 16, 1993

c. 一般学会, その他

1) 和田圭司, 関口正幸, 渡瀬 啓 :

AMPA受容体のキラーミュータント: GluR3第2細胞内ループの部分欠損について

第16回日本分子生物学会年会, 幕張, 12.18, 1993

2) 関口正幸, 和田圭司 :

## II 研究業績

AMPA受容体のキラーミュータント：GluR3第2細胞内ループの部分欠損について

第17回日本神経科学大会，名古屋，12.9，1993

### 3) 小田健一郎，北口哲雄，田平武：

クローン化神経細胞感作による運動ニューロン病作成の試み

第34回日本神経学会総会，幕張，6.11，1993

### 4) 山本直之，内山博之，浜崎浩子，田中英明，伊藤博信：

GnRH細胞の鼻プラコードからの移動：ニワトリウズラのキメラを用いた解析

第17回日本神経科学大会，名古屋，12.7，1993

## C. 班会議発表

### 1) 和田圭司，関口正幸，渡瀬 啓：

グルタミン酸受容体機能を修飾する dominant-negative型 mutant subunitの開発と可塑性研究への応用

厚生省精神・神経疾患委託「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，11.24，1993

### 2) 和田圭司，徐 俊教，松井京子，田中光一，山元 弘：

モデル動物を用いた感覚性運動失調症病因遺伝子の探索

厚生省特定疾患「運動失調症調査研究班」平成5年度班会議，2.12，1994

### 3) 和田圭司，関口正幸，渡瀬 啓，宮崎純一：

蛋白質レベルでのターゲッティングによるグルタミン酸レセプター機能低下マウスの開発

文部省重点領域研究「中枢シナプスの分子生物学」平成5年度班会議 9.2，1993

### 4) 田中光一：

グルタミン酸放出過程に関与する新機能分子の体系的検索

文部省重点領域研究「中枢シナプスの分子生物学」平成5年度班会議 9.3，1993

### 5) 吉田瑞子，松崎哲也，和田圭司：

外液Ca<sup>2+</sup>による骨格筋崩壊現象

厚生省精神・神経疾患委託「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」班

平成5年度班会議，12.4，1993

## 軸索変性モデルマウス (gad) の責任遺伝子単離の試み

徐 俊 教, 松井京子, 田中光一, 山元 弘, 和田圭司

Gracile axonal dystrophy(gad)マウスは日本で発見されたミュータントマウスで常染色体劣性遺伝形式をとり、その責任遺伝子は染色体5番にマッピングされている。病理学的には末梢性感覚および運動ニューロンの軸索が変性に陥る。その病態がヒトの末梢神経変性疾患と類似しているため責任遺伝子の単離はヒト疾患の病態解明および治療法開発に役立つと考えられる。

[方法] 1) 発症gadマウスのもどし交配による連鎖解析、2) 既知の遺伝子・蛋白質からの候補遺伝子の検索および3) 同種抗体を用いた免疫抗体学的検索の3法を試みた。

## [結果及び考察]

1) 発症gadマウスのもどし交配による連鎖解析のため一般的に使われるM.Spretusとの間で自然交配及び人工受精を試みたがF1が得られなかった。次いで、ラブラトリーマウスの中でマイクロサテライトマーカーに高いpolymorphismを示したC57B/6Jマウスとの間でもどし交配を行った。現在のところN2が128匹得られており、図1に示すようなマイクロサテライトマーカーを用い解析を進めている。

2) 既知の遺伝子・蛋白質からの候補遺伝子の検索

軸索機能関連遺伝子産物で遺伝子座が分かっていないか、マウス染色体5番あるいはヒト4、7番に遺伝子座が存在するものとしてキネシン、ダイニン他がリストアップされた。キネシン、ダイニンについては座骨神経の結紮実験を行ったがgadマウスにおいても正常マウス同様キネシンは結紮部位の近位端に、ダイニンは近位及び遠位端に蓄積することが特異的抗体を用いた免疫染色により確認された。

3) 同種抗体を用いた免疫抗体学的検索  
非発症対照マウスの脊髄で発症ホモマウスを8回免疫した後脊髄白質の神経突起様構造物と反応する抗血清が得られた。正常血清では同様の反応は認められなかったので免疫マウスの脾細胞とミエローマ細胞を融合させ抗体産性細胞をクローン化した。抗体はIgMに属し神経系に特異的に存在する分子量約7.5万の蛋白質を認識したが当該蛋白質は発症ホモマウスにも同様に存在した。組織化学的には脊髄だけではなく嗅球、海馬などの神経突起に主に反応した。

## [まとめ]

いまだ遺伝子単離には到っていないが今後は1)の連鎖解析をおし進めポジショナルクローニングを行う予定である。

## [文献]

- 1) Yamazaki K. et al.(1987) Jpn.J.Genet. 62, 479-484
- 2) Miura H. et al.(1993) Neuropathol. Appl.Neurobiol. 18,265-281

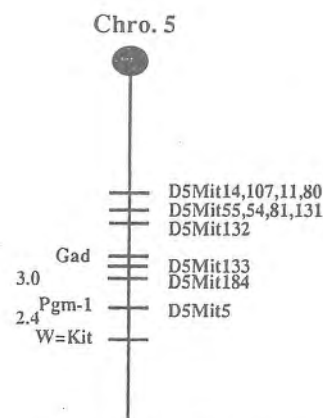


図1 gad遺伝子の高密度連鎖解析に用いているマイクロサテライトマーカー

## グルタミン酸トランスポーターの分子の実体と 脳における生理的・病態生理的役割の解明

田中光一, 萩原達也, 渡瀬 啓, 和田圭司

グルタミン酸は哺乳類の中樞神経系において最も重要な興奮性神経伝達物質であり、学習・記憶などの脳高次機能に重要な役割を果たしている。しかし、その機能的な重要性の反面、過剰なグルタミン酸は神経毒性を示し、神経変性疾患や脳虚血後の遅延性神経細胞死などの原因と考えられてきた。現在までのところ、グルタミン酸を受容する側（グルタミン酸受容体）の分子の実体は詳細に研究されつつある。それに比べ、放出されたグルタミン酸を取り込み、グルタミン酸の作用を不活化すると共に、細胞外グルタミン酸濃度を低く保つ機構（グルタミン酸トランスポーター）の分子の実体は不明な点が多かった。しかし、1992年の暮れ、我々を含め4つのグループが3種のグルタミン酸トランスポーターの単離に成功し、ようやくその分子の実体が明らかになった。本年度は、すでにその分子の実体を明らかにしたグリア型グルタミン酸トランスポーター（GluT-1）の生理的・病態生理的役割を個体レベルで明らかにするため、ジーンターゲット法によりGluT-1欠損マウス作成を試みた。更に、GluT-1と神経変性疾患の関係を明らかにするため、ヒトの脳からGluT-1を単離し、構造決定・特性解析を行った。

### 【結果】

1. マウスグルタミン酸トランスポーター（mGluT-1）の遺伝子を単離し、その構造を解析した。mGluT-1の遺伝子は10個のエクソンと9個のイントロンからなり、全長は53Kbp以上である。コーディング領域はエクソン2から始まり、エクソン2,3,4,6はそれぞれ膜貫通領域1,2,3,4を含んでおり、膜貫通領域5,6はエクソン7に含まれている。エクソン6にネオマイシン遺伝子を挿入し、3'末端にジフテリアトキシン遺伝子を付加したジーンターゲットベクターを作成し、ES細胞に導入し、現在、相同組み換えの起こったES細胞を得たところである。

2. ヒトのグルタミン酸トランスポーター（hGluT-1）は542個のアミノ酸からなる蛋白質で、6個の膜貫通領域を持ち、ラット、マウスのGluT-1とは96.9%、96.7%の相同性があった。hGluT-1の活性はNa<sup>+</sup>依存性で、グルタミン酸に対する親和性は78.4 μMであった。hGluT-1の活性はグリアタイプの阻害剤により抑制された。hGluT-1のmRNAは脳に最も多く存在し、少量ではあるが、心・肺・筋肉などの末梢組織にも存在した。

### 【考察】

グルタミン酸トランスポーターの個体レベルにおける生理的・病態生理的役割を明らかにするためには、GluT-1欠損マウスの作成だけでは不十分であり、GluT-1を過剰発現させたマウスのphenotypeの解析も必要である。今後GluT-1を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成する。また、他の2種類のグルタミン酸トランスポーター（ニューロンタイプとグリアタイプ）に関してもそれらの遺伝子を既に単離し構造解析を行っており、それらの欠損マウス及び過剰発現マウスを作成し、GluT-1欠損マウスとのダブルミュータントを作成するなどして各々のサブタイプの個体レベルでの機能を明らかにする予定である。更に、各々の遺伝子のプロモーター領域の解析を行い、グリアタイプ・ニューロンタイプを決めている部位及び因子を同定する。また、hGluT-1の遺伝子座を決定中であり、遺伝性神経変性疾患との関連が期待される。

## D-SerineによるNMDA受容体の活性に関する薬理的検討 —アフリカツメガエル卵による遺伝子発現系での解析—

松井隆明, 関口正幸, 渡瀬 啓  
橋本篤司, 西川 徹, 利田圭司

### N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA)

受容体は中枢神経系の興奮性神経伝達物質受容体であり、記憶、学習などの高次大脳機能の形成維持に密接に関与することが知られている。伝達物質グルタミン酸によるNMDA受容体活性化は、グリシンやD-セリン等の共存下で著しく増強されることが報告されている。しかし、ごく最近までD-セリンは生体内には存在しないとされていたため、グリシンが唯一の内因性増強物質として認識されていた。しかし、近年、西川らの研究により、遊離D-セリンが、ラット脳内にかなりの高濃度で存在することが明らかとなり、D-セリンもNMDA受容体の内因性増強物質として機能している可能性が示唆された。今回、我々はNMDA受容体活性に対するD-セリンとグリシンの増強作用を薬理的に比較検討することにより、D-セリンの内因性増強物質としての位置づけを試みたので報告する。

### 【方法】

マウスNMDA受容体サブユニットをコードするcDNA ( $\zeta 1, \epsilon 1, \epsilon 2, \epsilon 3, \epsilon 4$ ) からcRNAを合成し、 $\epsilon 1/\zeta 1, \epsilon 2/\zeta 1, \epsilon 3/\zeta 1, \epsilon 4/\zeta 1$ の組み合わせでそれぞれ50ngをアフリカツメガエル卵母細胞に注入した。2-3日の培養後発現した受容体のD-セリン、グリシン添加に対するグルタミン酸 ( $10\mu\text{M}$ ) 反応の膜電流変化を2電極膜電位固定法により記録した (固定膜電位  $-100\text{mV}$ )。薬液は、卵母細胞に灌流投与した。

図 1

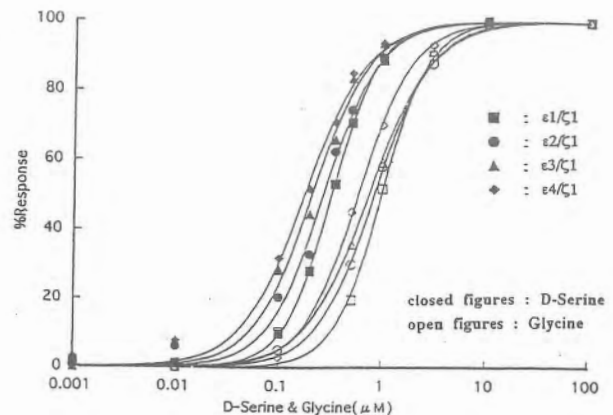
D-セリン、グリシンに対するNMDA受容体チャンネル各サブユニット濃度-応答曲線

### 【結果】

1) D-アミノ酸は単独ではグリシン同様、各NMDAチャンネルを軽度活性化するとどまったが、D-アミノ酸にL-グルタミン酸を加えることにより活性は増強した。L-アミノ酸の作用は相当するD体に比べて著しく弱かった。

2) NMDAチャンネルのD-セリン、グリシンに対する親和性はともに、 $\epsilon 4/\zeta 1 > \epsilon 3/\zeta 1 > \epsilon 2/\zeta 1 > \epsilon 1/\zeta 1$ の順であった。D-セリンのED50はそれぞれ $0.32\mu\text{M}, 0.26\mu\text{M}, 0.21\mu\text{M}, 0.17\mu\text{M}$ でありまた、グリシンのED50は $0.97\mu\text{M}, 0.84\mu\text{M}, 0.76\mu\text{M}, 0.56\mu\text{M}$ の順であった (図1)。

以上のことからNMDAチャンネルに対するD-セリンの親和性はグリシンと比較して有意に高く、内因性D-アミノ酸の一つであるD-セリンは中枢神経系においてグリシン同様、NMDA受容体を介した神経機能に関与している可能性が示唆された。





## 遺伝子相同組み換え法によるボンベシンレセプターの機能解析

和田恵津子, 浜崎浩子, 和田圭司

ボンベシンは14個のアミノ酸からなるペプチドで最初カエルの皮膚から単離された。哺乳類ではボンベシン類似のペプチドとしてこれまでにニューロメジンB (neuromedin B、以下略してNMB) とガストリンリリージングペプチド (gastrin-releasing peptide、以下略してGRP) の2つが報告されている。NMB、GRPのいずれも、哺乳類の中樞神経系、消化管などに広く分布し、ニューロモジュレーターとして、内外分泌、代謝および行動などを調節し、さらに成長因子としても働くことが知られている。このようにNMB、GRPは多様な生理機能を持ち、生化学的に、薬理的に解析が進められているが、受容体に焦点を当てそれぞれの作用機序の特異性を分子レベルで解析した研究はなされていない。

1991年に Battey らによって GRP に特異的な GRPレセプター (GRPR) <sup>1)</sup> の、1992年には Wada らによって NMB に高い親和性を示す NMBレセプター (NMBR) <sup>2)</sup> のそれぞれの cDNA 構造が報告された。GRPR と NMBR が異なった薬理学的特徴を持つこと、さらにラット脳における GRPR と NMBR mRNA の分布が全く異なることから、両レセプターが脳において異なった機能を持つことが示唆された。さらに1993年 Fathi らによって GRPR や NMBR と高い相同性を示す新しいボンベシンレセプター (BRS3) が報告された<sup>3)</sup>。BRS3はGRP、NMBいずれに対しても低い親和性を示し、高い親和性を示すリガンドは今のところ報告されていない。私達は、これらの3種類のボンベシンレセプターの機能をより直接的に個体レベルで解析するために、遺伝子相同組み換え法を用いた GRPR、NMBR および BRS3欠損マウスの作成を試みている。

## (結果と考察)

GRPR: マウス GRPR cDNA <sup>1)</sup> をプローブとして、マウスゲノミックライブラリー (約10<sup>6</sup> プラ

ク) をスクリーニングした。その結果、エクソン1を含む10 kb、エクソン2を含む13kbの2個のクローンを得た。現在後者の、エクソン2を含む13kbのクローンを用いてターゲティングベクターを作成中である。

NMBR: ラット NMBR cDNA <sup>2)</sup> をプローブとしてライブラリーのスクリーニングを行なった結果、約15kbと13kbの2個の陽性クローンを得た。両方のクローン共にエクソン1から3を含んでいた。マウス NMBR 遺伝子は、ヒト NMBR 遺伝子と同様に3個のエクソンからなり、そのコーディング領域は、ラットやヒトの NMBR 遺伝子の塩基配列と高い相同性を示した。また、エクソン1と2は約5kbのイントロンによって隔てられており、さらにエクソン2の下流約3kbにエクソン3が存在することが明らかになった。エクソン2を含む約5kbの部分を用いてターゲティングベクターを作成中である。

BRS3: ヒト BRS3 cDNA <sup>3)</sup> をプローブとしてスクリーニングを行なった結果、5個の陽性クローンが得られたので、ゲノムの構造を解析中である。

今後、ES細胞に各々のターゲティングベクターを導入し、相同的遺伝子組み換えを起こした細胞を用いてキメラマウスを作成する予定である。ボンベシンレセプターの異なるサブタイプを欠損したマウスを作成することにより、各レセプターの機能分担に関する新しい知見が得られるものと期待される。

## 参考文献;

- 1) Battey et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 395-399.
- 2) Wada et al., (1992) Neuron 6, 421-430.
- 3) Fathi et al., (1993) J. Biol. Chem. 268, 5979-5984.

## 5. 疾病研究部第五部

### 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、治療法の開発を目的にしている。人事面では、室長は桃井 隆、研究員は佐々木征行であり、佐々木はNIH (LMCN, NINDS) に留学中である。流動研究員は大島登志男 (6月まで)、新井幸男、遠山 潤であった。また外来研究員は横山安伸 (SRL) であった。併任研究員は鈴木秀典 (東京医科歯科大学)、佐藤 充および蜂谷紀之 (秋田大学医学部)、村岡 薫 (武蔵病院脳外科)、石井澄和 (武蔵病院中検) であった。研究生は有本 潔 (東邦大学医学部小児科)、平澤基行 (順天堂大学神経内科)、小林 治 (武蔵病院小児神経科)、角田弘之 (日大、農獣医)、武市知己 (高知医科大学医学部小児科)、伊藤茂子 (自治医科大学小児科)、鈴木浩悦 (日本獣医畜産大学) であった。研究見習生は石井 俊 (日大、農獣医学部4年) と中川温子 (東邦大学理学部4年) であった。客員研究員は青木継稔 (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、東 真木子、研究助手は和気佳代、川西佳子、研究補助員は松延まき子、斎藤潤子、松本真理であった。

本年度の主な研究テーマは次の如くであった。

- ① Placental carnosinaseの精製とそのアミノ酸配列の決定
- ② Microdissectionを用いた染色体painting probeの作製。
- ③ 羊膜細胞の不死化と遺伝子導入
- ④ 先天性水頭症の原因遺伝子の探査研究。
- ⑤ P19EC神経細胞分化に必要な細胞間接着からのシグナル伝達

(部長 桜川宣男)

## II 研究業績

### 2. 研究業績

#### A. 論文

##### a. 原著

- 1) Ohshima T, Sasaki M, Matsuzaki T, Sakuragawa N:  
A novel splicing abnormality in a Japanese patient with Gaucher's disease  
*Human Molecular Genetics*, 2:1497-1498, 1993
- 2) Sasaki M, Sakuragawa N, Ohshima T, Arai Y:  
Effect of DMSO on acid sphingomyelinase at the mRNA level in fibroblasts from  
Niemann-Pick-type C patients  
*Mol Biol (Life Sci Adv)*, 12:49-52, 1993
- 3) Yamanouchi H, Kaga M, Iwasaki Y, Sakuragawa N, Arima M:  
Auditory evoked responses in Krabbe disease  
*Pediatr Neurol*, 9:387-390, 1993
- 4) Tohyama J, Kato M, Koeda T, Ohno K:  
Type C Niemann-Pick disease: Detection and quantification of cholesterol-accumulating cells  
in bone marrow  
*Brain and Dev*, 15:316-317, 1993
- 5) Tohyama J, Inagaki M, Koeda T, Ohno K, Takeshita K:  
Intracranial calcification in sibiligs with nephrogenic diabetes insipidus: CT and MRI  
*Neuroradiology*, 35:553-555, 1993
- 6) Yamagata T, Momoi T, Kumagai H, Nishikawa T, Yanagisawa M, Momoi M:  
Distribution of retinoic acid receptor  $\beta$  protein in rat brain  
*Biomedical Res* 14:183-190, 1993
- 7) Sasaki M, Lovell K, Moller JR :  
Myelin-associated glycoprotein (MAG) in myelin deficiency of caprine  $\beta$ -mannosidosis  
*Brain Res* 620 : 127-132, 1993
- 8) Tohyama J, Nanba E, Ohno K:  
Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Identification of point  
mutations in Japanese Patients with Lesch-Nyhan syndrome and hereditary gout and their  
permanent expression in an HPRT-deficient mouse cell line

Human Genetics, 93:175-181, 1994

- 9) Ohshima T, Sasaki M, Takahashi J, Sakuragawa N:  
Rapid detection of common mutation of arylsulfatase A in metachromatic leukodystrophy by polymerase chain reaction with a mismatched primer  
J Child Neurol, 9:38-40, 1994
- 10) Yamagata T, Momoi M, Yanagisawa M, Kumagai H, Yamakado M, Momoi T:  
Changes of the expression and distribution of retinoic acid receptors during neurogenesis in mouse embryos  
Dev Brain Res 77:163-176, 1994
- 11) 高橋純子, 高橋 智, 檜沢公明, 東儀英夫, 大島登志男:  
発症年齢および臨床経過に相違のあった異染色性白質ジストロフィーの1同胞例  
臨床神経学 33 : 312-316, 1993
- 12) 大島登志男, 高橋純子, 東儀英夫, 桜川宣男:  
成人型異染色性白質ジストロフィーの遺伝子変異の検討  
臨床神経学34 : 1-4, 1994
- 13) 昆 かおり, 桜川宣男, 黒川 徹:  
球筋協調障害で発祥した若年性Parkinson病の1例  
脳と発達 26 : 269-274, 1994
- 14) 新井幸男, 山内秀男, 岩田 俊:  
クモ膜嚢胞による欠伸発作の一例  
小児科臨床 47 : 291-295, 1994

b. 著 書

c. 総 説

- 1) 新井幸男, 桜川宣男:  
視床下部性肥満症候群  
日本臨床, 領域別症候群シリーズ1. 内分泌症候群-関連内分泌病を含めて- (上巻),  
p114-115, 1993
- 2) 桜川宣男:  
肥満を伴う遺伝性(先天性)症候群-概論-  
日本臨床, 領域別症候群シリーズ2. 内分泌症候群-関連内分泌病を含めて- (下巻),

## II 研究業績

p421-423, 1993

### 3) 桜川宣男 :

Alstorm症候群

日本臨床, 領域別症候群シリーズ2. 内分泌症候群-関連内分泌病を含めて- (下巻),  
p424-425, 1993

### 4) 桜川宣男 :

Bardet-Biedle症候群

日本臨床, 領域別症候群シリーズ2. 内分泌症候群-関連内分泌病を含めて- (下巻),  
p426-428, 1993

### 5) 小林 治, 桜川宣男 :

Biamond症候群

日本臨床, 領域別症候群シリーズ2. 内分泌症候群-関連内分泌病を含めて- (下巻),  
p378-379, 1993

### 6) 小林 治, 桜川宣男 :

画像診断 (CT, MRI, PET)

日本臨床, 51: 95-100, 1993

## d. 班会議報告書

### 1) 横山安伸, 大島登志子, 桜川宣男 :

先天性水頭症の原因遺伝子の探査に関する基礎的研究-Micordissection法によるregion specific probeの作製-

厚生省特定疾患 那智性水頭症調査研究班. 平成4年度研究報告書.

平成5年3月, pp58-62

### 2) 新井幸男, 桜川宣男 :

胎盤カルノシナーゼの精製と性質の検討

厚生省精神・神経疾患・中枢神経症状を呈する遺伝性代謝病の病態解明と予防・治療に関する研究班. 平成5年度研究報告書. 平成6年3月, p53-55

### 3) 遠山 潤, 桜川宣男 :

標的細胞としての羊膜細胞に対する遺伝子導入法の検討

厚生省精神・神経疾患・中枢神経症状を呈する遺伝性代謝病の病態解明と予防・治療に関する研究班. 平成5年度研究報告書. 平成6年3月, p57-60

4) 桜川宣男, 横山安伸 :

ヒト染色体microdissection法によるG-binding specificヒトゲノムDNAのクローニングの機能解析

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年度報告書, p45-50

e. その他

1) 桜川宣男 :

「21世紀に向けての治療」-米國小児神経学会に参加して-

脳と発達 26 : 2, 1994

## B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム

1) 桜川宣男 :

先天性水頭症の遺伝子解析

特別シンポジウム “神経遺伝学の新しい流れ” 日本人類遺伝学会

第38回大会, 東京, 10.23, 1993

2) 桜川宣男 :

発達障害児の遺伝的側面について

第15回秋田県小児神経・発達研究会, 秋田, 8.28, 1993

3) 桜川宣男 :

羊膜組織移植術について

第5回長崎小児神経懇話会, 長崎, 9.24, 1993

b. 国際学会

c. 一般学会

1) 新井幸男, 佐々木征行, 大島登志男, 桜川宣男 :

低酸素による血管内皮細胞への脂質代謝の影響について.

第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.17, 1993

2) 大島登志男, 佐々木征行, 桜川宣男 :

糖原病型の遺伝子変異の解析

第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.17, 1993

3) 石川 充, 松坂哲應, 須貝研司, 水戸 毅, 桜川宣男 :

## II 研究業績

進行性ミオクローヌスてんかん症候群とsphingomyelinase部分欠損を示した同胞例と一培検例

第35回日本小児神経学会総会，京都，6.17，1993

### 4) 新井幸男，桜川宣男：

胎盤carnosinaseの精製と性質検討

第36回日本先天代謝異常学会総会，仙台，10.28，1993

### 5) 遠山 潤，角田弘之，武市知己，桜川宣男：

日本人レッシュナイハン症候群の遺伝子解析

第36回日本先天代謝異常学会総会，仙台，10.29，1993

### 6) 服部欽哉，日野原知之，矢部普生，矢部みはる，加藤俊一，祐川和子，折居忠夫，賀左伸省，桜川宣男：

先天性代謝異常疾患における骨髄移植

第36回日本先天代謝異常学会総会，仙台，10.29，1993

### 7) 大島登志男，桜川宣男，高橋純子，東儀英夫，安野みどり：

Metachromatic leukodystrophyの遺伝子変異

第34回日本神経学会総会，千葉，6.18，1993

### 8) 桃井 隆，東 真木子，伊東茂子：

P19EC細胞の神経細胞化に発現するB-HLH遺伝子

第66回日本生化学学会，東京，10.4，1993

### 9) 東 真木子，伊東茂子，桃井 隆，江藤 譲：

アクピチンによる分化制御因子(B-HLH)の発現制御

第66回日本生化学学会，東京，10.4，1993

## d. 研究会など

### 1) 桜川宣男：

障害の種類と概念

第19回障害児保育研究会，東京，10.12，1993

### 2) 桜川宣男：

障害と医療

第11回子育て集会，障害児・者の分科会，東京，2.27，1994

### C. 班会議発表

1) 新井幸男, 桜川宣男 :

胎盤カルノシナーゼの精製と性質の検討

厚生省精神・神経疾患・中枢神経症状を呈する遺伝性代謝病の病態解明と予防・治療に関する研究班, 平成5年度班会議, 東京, 11.26, 1993

2) 遠山 潤, 桜川宣男 :

標的細胞としての羊膜細胞に対する遺伝子導入法の検討

厚生省精神・神経疾患・中枢神経症状を呈する遺伝性代謝病の病態解明と予防・治療に関する研究班, 平成5年度班会議, 東京, 11.26, 1993

3) 桜川宣男, 横山安伸 :

難治性水頭症原因遺伝子クローニングに向けて—Microdissection法の応用による染色体地図の作製—

厚生省特定疾患・難治性水頭症調査研究班, 平成5年度班会議, 高知, 8.6, 1993



## 先天性水頭症原因遺伝子の探査に関する研究

横山安伸, 石井 俊, 中川温子, 桜川宣男

先天性水頭症は、病因が多岐にわたり、その発症機序及びその病態についても殆ど解明されていない。遺伝性水頭症には、常染色体優性、常染色体劣性及びX連鎖性の遺伝形式をとるものが知られている。また、近年、X-linked hydrocephalusの原因遺伝子が接着因子L1タンパクであることが報告された。しかしながら、その他の常染色体性の遺伝形式をとる水頭症については、未解決のまま残されている。そこで、われわれはその成因/病態の解明を目的として、この候補遺伝子のポジショナルクローニングに着手した。

## 〈対象〉

自然発症型の先天性水頭症のモデルマウスとして、ch, hy-1, hy-2, hy-3などの分離系統が作られ、本疾患の成因及びその病態解明に貢献してきている。これらのモデルマウスのうち、遺伝子座位が明らかと成っているものには、ch (mouse chromosome #13)、hy-3 (mouse chromosome #8D-E)等がある。さらに、hy-3は、常染色体劣性遺伝形式をとり、その遺伝子座位領域は、ヒト16番染色体長腕にシンテニー保存領域が存在する。そこで、このシンテニー保存領域をinvolveし染色体異常を伴った水頭症の報告例を文献調査した。その結果、Taysi et al., Callen et al. により、水頭症、尿道下裂及びその他の小奇形を呈し、t(4;16)(q35;q22.1)核型をもつde novo typeの症例を見出した。

以上のことから、常染色体劣性遺伝形式をとる本疾患の候補遺伝子の一つは、その相同性比較からヒト16番染色体長腕部に座位が存在し、上記のケースの場合、転座に伴って片方の遺伝子が破壊された結果、発症したと推測される。

そこで、われわれはこの推測のもとに、Taysi et al., Callen et al. により報告された線維芽細胞GM2346をHuman Genetic Mutant Cell Repository (Camden, NJ) より入手してこの転座部位(16q22.1)のクローニングを行うためゲノム解析を行った。

## 〈方法及び結果〉

ヒト16番染色体のゲノム解析については、すでに、Callen et al. により、54のmouse/human 体細胞雑種パネルが作製されて、平均 1.6Mbの高精度なフィジカルマップが作製されている。

そこで、彼らの報告から、ヒト16番染色体q22.1領域のゲノム解析を行うにあたり、そのアンカーポイントとして、転座点上流及び下流のcalbindin 2(CALB2), haptoglobin(Hp) 遺伝子を選びクローニングを行った。

1)16q22.1 領域のゲル電気泳動によるサザンプロット解析。

まず、t(4;16)(q35;q22.1)の転座部位が通常のサザンプロット解析の検出範囲内に存在するかを確認するため、Hp, CALB2 遺伝子をプローブとして解析を行ったが、転座に伴う再構成は認められなかった。

2)16q22.1 領域のパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析。

GMO2346 から作製したプラグをrare-cutter 制限酵素 NotI, SfiI で完全消化し、PFGE解析を行った。その結果、CALB2 遺伝子をプローブとした解析では、SfiIによる再構成は認められなかったが、NotIで約1.2 Mbの転座に伴う再構成バンドを検出した。

次に、転座点下流に座を有すると考えられるHp遺伝子をプローブとして、NotI, SfiI切断による解析を行ったが、転座に伴う再構成バンドは検出されなかった。

従って、GMO2346の転座点は、CALB2 遺伝子から、約 1.2Mbの領域内に存在することが示唆された。

3)16q22 領域のmicrodissection 法による領域特異的probe の作製。

さらにより転座点の近位に存在するprobe を作製するために、昨年度、我々が開発したMicrodissection/Microcloning法にさらに改良を加え、16q22 に領域特異的なprobe を作製を行った。

## 〈考案〉

以上の結果から、線維芽細胞GMO2346 が有する核型 t(4;16)(q35;q22.1)の16番染色体側の転座点は、CALB2 遺伝子から約1.2Mb 以内のdistal領域に存在すると考えられた。しかしながら、gene walkingを行うには、まだ距離を有するため、より近位に存在するprobe を得る必要がある。そこで、Microdissection/Microcloning 法により得られた領域特異的なprobe による解析を進めている。また、平行して、この領域特異的DNA probe による16q22.1 の領域特異cDNAのスクリーニングを行っていく予定である。

## 羊膜細胞による遺伝子治療の基礎的研究

遠山 潤, 桜川宣男

ヒト羊膜上皮細胞(羊膜細胞)はHLA-A,-B,-C,DR抗原がその細胞表面に発現していない細胞であり羊膜組織移植術は急性拒絶反応を呈さないことが知られている。これまで種々の先天代謝異常症に羊膜移植術が施行され、本邦では我々がTay-Sachs病、juvenile Gaucher病、異染色性白質変性症患者に本術式を施行し、juvenile Gaucher病の女兒に臨床症状と検査上の一過性の改善をみたが、羊膜移植術の有効性については議論の余地を残している。一方先天代謝異常症の遺伝子治療はリンパ球、骨髄幹細胞あるいは肝細胞を標的としたex vivo法が行われている。我々は羊膜細胞を標的細胞として遺伝子治療を行うために、培養羊膜細胞の免疫原性を検討し、また羊膜細胞への遺伝子導入による発現効率や導入遺伝子産物の産生について検討するため、形質転換した羊膜細胞を作成し、 $\beta$  galactosidase ( $\beta$  gal)およびchloramphenicol acetyltransferase (CAT)遺伝子を導入し検討した。

## 【対象および方法】

1)羊膜細胞の培養：帝王切開分娩から無菌的に胎盤を入手し、羊膜を剥離・分離して培養した。2)羊膜の免疫原性の検討：免疫組織化学的に酵素抗体法を用いてHLA class I と class II の有無を調べた。次にフローサイトメトリーによる羊膜細胞のHLA抗原の分析を行った。対象として皮膚線維芽細胞、リンパ球および単球のHLA抗原を分析した。3)羊膜細胞の不活化：初代培養羊膜細胞にSV40 largeT抗原を持つplasmid pMTIODをelectroporation法を用いて導入し長期生存細胞群をcloningし培養した。electroporationに際しては初代培養羊膜細胞を $4 \times 10^6 / 0.8 \text{ ml}$  PBSに調整し細胞生存率をだし条件を検討した。4)不活化羊膜細胞への遺伝子導入：作成した細胞にelectroporationとトランスフェクタムを用いてpSV- $\beta$  galを導入し染色により導入の有無について検討した。またpSV2-CATをelectroporation法を用いて導入しCAT assayを行った。CAT assayは $^{14}\text{C}$  Chloramphenicolを用いてbutyryl CoAを用いたphase-extraction法で測定し、cpmの値により比較した。

## 【結果】

免疫組織化学的検索では、ヒト羊膜細胞はマウス抗ヒトclass Iモノクローナル抗体とマウス抗ヒト

HLA-DR抗体による免疫染色は陰性であった。フローサイトメトリーによるHLA抗原の分析結果、ヒト培養羊膜細胞はclass IIマーカーの発現が認められず、class Iマーカーの発現が弱いことが判明した。一方皮膚線維芽細胞はclass IIマーカーの発現が強陽性であった。またリンパ球はclass I と class IIマーカーの発現がともに強陽性であった。羊膜細胞のelectroporationによる生存率は培養皮膚線維芽細胞とほぼおなじであった。pMTIOD導入羊膜細胞から正常羊膜細胞の継代数を超えて増殖する細胞を単一コロニーより10クローン以上分離し継代培養続けたところ、これらの細胞群では正常羊膜細胞に比べて増殖速度の増加と接触阻止能の消失がみられた。不活化羊膜細胞に対する $\beta$ -galの導入ではelectroporation、トランスフェクタムどちらも少数の陽性細胞がみられた。CAT assayでは羊膜細胞でのCATの活性はCOS I細胞での約0.3倍であった(Table)。

## 【考案】

羊膜細胞のHLA抗原についての検索では、免疫組織化学的には従来の報告と同じく両抗原の発現は陰性であった。しかしフローサイトメトリーによる分析ではclass I が弱く発現していることが判明した。この結果羊膜細胞移植術は急性拒絶反応は起きにくく、かつ移植細胞対宿主反応が惹起されることが推測される。従って羊膜細胞は皮膚線維芽細胞およびリンパ球と異なり他家移植法が可能な細胞であることがより明瞭に証明された。今回作成した不活化羊膜細胞を用いた遺伝子導入実験は、羊膜細胞での外来遺伝子の発現効率の検討や羊膜細胞の酵素産生や分泌に関する性質検討に有効であると思われた。 $\beta$  galの発現についてpSV- $\beta$  galは羊膜細胞内では発現が弱く、羊膜細胞においての至適プロモーターを検討する必要があった。今回のCAT assayの結果では羊膜細胞内で発現はみられたがまだ発現量が充分でなく今後ウイルスベクターの使用など遺伝子導入条件を検討していく予定である。

Table. CAT activity by electroporation

Cell	cpm	(/25 $\mu$ g prot/hr)
AEC	4111	AEC; amniotic epithelial cell
COS I	13760	

## 胎盤カルノシナーゼの精製と性質の検討

新井幸男, 桜川宣男

Carnosineを水解する酵素は組織に存在する non-specific cytosolic dipeptidaseと血清carnosinaseの2種類が存在する。両者はその性質が異なり後者の先天的欠損症は血清Carnosine欠損症として知られている。これらの酵素の、高純度精製とその性質については十分に検討されていない。また血清Carnosinase欠損症については、分子遺伝学的な検討はなされていない。我々は胎盤Carnosinaseの精製を行いその性質の検討を行ったので報告する。

## I. 研究方法

ヒト胎盤約3kgを入手して次の手順で酵素の精製を行った。Carnosinaseの測定はLenny et al(1982)の方法によった。胎盤を緩衝液A(10mMトリス塩酸緩衝液、pH7.0; 0.1mmol/LMnCl<sub>2</sub> および0.02%NaN<sub>3</sub> 含有)でホモゲナイズしてガーゼで濾してから、11000g 1時間遠心した。次に上清を50%硫酸処理を行い、この分画を緩衝液Aで2日間透析を行った。次にDEAE cellulose chromatographyにかけ、0-0.5M NaClの直線的濃度勾配で溶出した。酵素含有分画を濃縮し、緩衝液Aで透析した。次にSephadex G-200 gel filtrationを行った。酵素分画を濃縮して緩衝液B(10mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.8; 0.1mmol/L MnCl<sub>2</sub> および0.02%NaN<sub>3</sub> 含有)で透析した。この酵素液をhydroxylapatite columnにかけ、10-100mMリン酸ナトリウム緩衝液による直接的濃度勾配で溶出した。酵素分画を濃縮後、緩衝液Aで透析した。次にAGMP-1陰イオン交換樹脂カラムクロマトを行い0-1.0mM NaClの直線的濃度勾配をかけて酵素活性の高い分画を得た。次に濃縮してから緩衝液Aで透析した。最後にBlue sepharose CL-6B chromatographyを行った。これら操作は原則として室温で行った。

精製酵素を用いて、K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>, pHプロファイル、熱安定性を検討した。またSDS-ゲル電気泳動を行った。

## II. 結果

胎盤carnosinaseの精製手順とその結果を表に示した。第一段階の硫酸による塩析法似については、種々の塩濃度について予備実験を行った。50%飽和度で1.7倍の純度と収率41%を得た。DEAE cellulose chromatography

では、収率13%、純度は13.3倍に上昇した。

Hydroxylapatite columnに本酵素は吸着し、リン酸ナトリウム緩衝液(0-500mM)の直接的濃度勾配により溶出されその純度は683倍に上昇した。さらにAGMP-1陰イオン交換樹脂カラムクロマトでは直線的濃度勾配により本酵素は溶出され、純度は3775倍、収率は3%であった。Blue sepharose CL-6B chromatographyでは非吸着分画に活性ピークが得られた。最終的には純度は5583倍、収率は1%であった。

SDSゲル電気泳動上、最終的精製酵素は複数のバンドが存在しており、部分精製された酵素であることが示唆された。この酵素のK<sub>m</sub>値は45.5mmol/L, V<sub>max</sub>は27.1U/mg prot, 至適pHは8.0-8.5であった。

予備実験として行ったConA sepharose column chromatographyでは、本酵素は吸着しなかった。熱安定性については、55°C加熱で失活した。塩化マンガンと塩化カドミウムは、カルノシナーゼ酵素活性を促進し、EDTAとDithiothreitolは酵素活性を阻害した。

現在アミノ酸シーケンスを解析中であり、アミノ酸側鎖が修飾された残基を含むものである可能性が高いことが示唆されている。

## III. 考察

ヒト臓器(肝臓)のcarnosinaseの精製はLenny et al(1985)により高度精製が行われた。ポリアクリルアミドゲル電気泳動では3バンドを検出しているが非活性、収率、純度の記載はなく不十分な報告であった。また最近Lenney(1990)は、prolinaseとcarnosinaseは同一酵素であり、non-specific dipeptidaseの胡椒呼称を提唱している。

血清carnosinaseについてJackson et al(1991)らが18000倍の純度に精製し、pI4.4の糖蛋白であって、2サブユニットをもつdimerであると報告している。我々の精製胎盤carnosinaseとは種々のカラム溶出パターンが異なっている。血清carnosinase欠損症では、組織carnosinase活性は正常であるとされている。この疾患の細胞生物学的研究のために本酵素の分離精製と性質の検討を急いでいる。

## P19EC神経細胞分化に必要な細胞間接着からのシグナル伝達

桃井 隆, 東真木子(疾病研究5部), 中村 俊(診断)

我々はレチノイン酸受容体, 細胞内レチノイン酸結合タンパクがマウス9.5-10.5日胚の神経系にすでに発現しており, 神経系形成に伴い著明な発現と分布の変化を示すことから, レチノイン酸(RA)が神経系形成に深く関与していることを明らかにしてきた. RAによるP19細胞の神経細胞分化誘導の分子機構を詳細に研究した結果, P19EC細胞の神経細胞分化にはRAにより特異的に発現するbHLH遺伝子, ホメオボックス遺伝子以外に, 細胞凝集による細胞間接着を介しての情報伝達が必須であることが明かとなった. 神経細胞分化に必要な細胞間接着からの情報伝達について解析した.

## 「結果」

RA 48時間処理により, 神経細胞分化の転写調節に必要とされるMASH, NSCL, MEBなどB-HLH遺伝子が発現した. 組織非特異的B-HLH遺伝子であるMEBはRA処理, 未処理でも発現していたが, マウス初期神経系に発現するMASHは1nMRA, 6時間以内に発現が見られ, NSCLは0.1uMRA, 48時間で発現が観察され, 神経細胞分化を誘導するRAの濃度, 処理時間と対応していた. Paxなどのホメオボックス遺伝子群, また, TrkBなどのニューロトロフィックファクター受容体遺伝子がRAにより発現が誘導された. しかし, この段階では成熟神経細胞のマーカーであるニューロフィラメント, MAP-2は発現しておらず, むしろ神経前駆体細胞(神経上皮細胞)のマーカーであるネスチンが発現していた. このRA処理した細胞を凝集により細胞間接着を促進させると48時間以内に成熟神経細胞へと分化し, ニューロフィラメント, MAP2, A2B5, HNK-1などの神経細胞マーカーが発現した. このことから, RA処理48時間だけでは完全な神経細胞には分化していないものの, 神経前駆体細胞へと分化しており, 細胞間接着による情報により神経細胞へと分化することが明かとなった.

Rasを発現させたP19EC細胞をRA処理すると神経細胞に分化すること, また, ドミナントネガティブRasを導入したP19EC細胞ではRA処理と細胞間接着によっても神経細胞には分化しないことから, 細胞間接着からの神経細胞分化の情報伝達にRasの活性化が関与している可能性が考えられた.

## 「考察」

P19細胞はRA存在下で凝集状態で培養したのち, RA非存在下で培養すると神経細胞へと分化する. RA単独でも, また凝集状態だけでも神経細胞へは分化しないことから, 神経細胞への分化にはRAの情報と凝集による細胞間接着からの情報の二つが必須であることを意味している. われわれはこの二つの情報を詳細に検討した結果, RA(0.5uM)で2日間培養すると, bHLHモチーフを持つMASH, NSCLが発現し, ネスチン陽性の神経細胞前駆体である上皮細胞へと分化し, さらに細胞間接着によるRas活性化のシグナルが加わると神経細胞へと分化することが明かとなった. 筋細胞分化におけるMyoDのようにMASH, NSCLが神経細胞分化を制御しているかの証拠はないが, 細胞間接着からのシグナルがRasを介してMASH, NSCLの蛋白を活性化し, 神経細胞分化を制御している可能性が考えられる.

最近, SCFとc-kitのように膜結合型サイトカインによる細胞間認識を介しての情報伝達や, N-CAM, CD4のように細胞接着からの情報伝達が注目されており, こうした情報伝達系が神経細胞分化にとっても重要であると考えられる. 今後P19細胞神経細胞分化に関与する膜結合型サイトカイン, およびその受容体, 細胞間認識蛋白の同定をすすめていくことが重要であると考えられる.

## 6. 疾病研究部第六部

### 1. 研究部一年のあゆみ

疾病研究部第6部は多発性硬化症，アルツハイマー病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。第1研究室は実験的アレルギー性脳脊髄炎，多発性硬化症，HAM，AIDS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。第2，第3研究室は，老人斑アミロイドの形成機序，家族性アルツハイマー病遺伝子，神経栄養賦活因子について研究している。

科学技術振興調整費総合研究「生体情報」(大村班)では神経細胞におけるIL-3受容体発現を研究した。同総合研究「脳炎・脳症」(森班)では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「第4分野第4テーマ」(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を行なった。また，同健康保持，免疫低下防止事業ではネコ免疫不全ウイルスの研究を開始した。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。厚生省長寿科学研究「痴呆疾患の遺伝学的研究」(主任)で，我が国の家系としてははじめて14番染色体遺伝子と有意の連鎖を示す家族性アルツハイマー病を見出した。また， $\beta$ アミロイド沈着機序に関する分子生物的研究を行なった。この他，文部省科学研究費一般B，C，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，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・神経疾患委託費高坂班，萬年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，Henry F. McFarland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。文部省科学研究費国際学術研究「フィリピンにおけるBaló病の研究」を開始した。この他，毎日新聞社ほけ予防協会との共催によるアルツハイマー病国際シンポジウム，内藤財団特定研究「神経・免疫・内分泌ネットワーク」で中心的役割を果たした。部開設10周年を記念し武蔵野フォーラムを開いた。

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] 近藤誉之，小西吉裕，[外来研究員] 光永吉宏，崔 得華，Milena Kozovska，荒木 亘，池田幸弥，耿 同超，Tofazzal Hossain，Grazyna Michalowska-Wender，[併任研究員] 北口哲雄，遠藤真澄，[研究生] 井野辺純一，大橋高志，横山和正，中垣慶子，白井 徹，[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，下地公子，真野登美子，津久井由美，松田みどり。

## 2. 研究業績

## A. 論文

## a. 原著

- 1) Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F, Tabira T, Sasaki R:  
Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics: comparison with receptor properties of erythroid cells  
J Biol Chem, 268:11208-11216, 1993
- 2) Inobe J, Yamamura T, Kunishita T, Tabira T:  
T lymphocyte lines and clones selected against synthetic MBP 82-102 peptide from Japanese MS patients  
J Neuroimmunol, 46:83-90, 1993
- 3) Hirose H, Kitaguchi T, Konishi Y, Tabira T:  
Enriched cultures of differentiated neurons from mouse embryo whole brain by using extracellular matrix constituents  
J Tissue Culture Method, 15:131-138, 1993
- 4) Endoh M, Kunishita T, Tabira T:  
Thioredoxin from activated macrophages as a trophic factor for central cholinergic neurons in vitro  
Biochem Biophys Res Commun, 192:760-765, 1993
- 5) Tanaka M, Sato A, Makino M, Tabira T:  
Binding of an SJL T cell clone specific for myelin basic protein to SJL brain microvessel endothelial cells is inhibited by anti-VLA-4 or its ligand, anti-vascular cell adhesion molecule 1 antibody  
J Neuroimmunol, 46:253-258, 1993
- 6) Hirose H, Kitaguchi T, Tabira T:  
Neurite promoting activity of collagens on embryonic neurons: Decreased effect at the post-natal stage  
Tohoku J Exp Med, 170:207-218, 1993
- 7) Satoh J, Tabira T, Yamamura T, Kim SU:  
HSP72 induction by heat stress is not universal mammalian neural cell lines

## II 研究業績

J Neurosci Res, 37:44–53, 1994

- 8) Araki W, Kunishita T, Takahashi K, Ikeda S, Tabira T:

Demonstration of amyloid  $\beta$ -protein secretion in mouse neuronal cell line

Neurosci Lett, 167:125–127, 1994

- 9) 佐伯圭一, Alice Mayumi Takeuchi, 松本安喜, 廣田好和, 田平 武, 松本芳嗣, 小野寺節:

ラット脳およびラット由来不死化神経細胞株よりプリオン蛋白cDNAのクローニングと遺伝子発現の解析

家畜生化学研究会報 31:37–44, 1994

### b. 著 書

- 1) 田平 武:

脱髄疾患

神経病理学カラーアトラス (朝長正徳, 桶田理喜編), 朝倉書店, 東京, p78–83, 1992

- 2) 田平 武:

脱髄疾患

神経病理学—基礎と臨床— (朝長正徳, 桶田理喜編), 朝倉書店, 東京, p144–147, 1992

- 3) 田平 武:

アルツハイマー病

神経疾患の遺伝学 (近藤喜代太郎, 鈴木義之編), 金原出版, 東京, p96–100, 1993

- 4) 田平 武:

多発性硬化症

分子病理学 (杉山武敏編), 文光堂, 東京, p526–531, 1993

- 5) 田平 武:

脳内のサイトカインの役割

神経内分泌免疫学 (井村裕夫, 堀 哲郎, 村松 繁編), 朝倉書店, 東京, p215–222, 1993

- 6) 田平 武:

痴呆と免疫

痴呆の基礎研究 (松下正明編), 中央法規出版, 東京, p219–233, 1993

- 7) 田平 武:

免疫性神経障害の治療: 多発性硬化症における治療の選択

メディコピア (山中 學, 亀田治男, 河合 忠, 平山恵造編), 共立印刷, 東京, p69–75, 1994

## c. 総 説

- 1) 田平 武 :  
Myeline Basic Protein (MBP)  
内科 71 : 1492, 1993
- 2) 田平 武 :  
アルツハイマー病の遺伝子  
臨床成人病 23 : 623-628, 1993
- 3) 田平 武, 小西吉裕 :  
脳内サイトカイン受容体  
神経研究の進歩 37 : 398-409, 1993
- 4) 田平 武 :  
脊髄小脳変性症 : 病因のトピックス  
Clinical Neuroscience 11 : 21-23, 1993
- 5) 田平 武 :  
家族性アルツハイマー病の分子遺伝学的研究  
治療 75 : 1753-1758, 1993
- 6) 田平 武 :  
ダウン症における免疫異常  
老年精神医学雑誌 4 : 638-642, 1993
- 7) 田平 武 :  
アルツハイマー病と遺伝  
老化と疾患 6 : 1752-1758, 1993
- 8) 田平 武 :  
論評 : パーキンソン病における痴呆 : 異常タウの免疫学的検出法を用いた大脳皮質病変の生化学的  
証明  
老年期痴呆 7(4) : 400-401, 1993
- 9) 田平 武 :  
遺伝子と頭の外傷がほけを促進するという話  
学会会報 802 : 93-96, 1994-1
- 10) 田平 武 :



## II 研究業績

第23回日本免疫学会シンポジウム「脳と免疫」

Immunol Frontier, 4 : 45-47, 1994

### 11) 田平 武 :

アポEとアルツハイマー病

老化と疾患 7 : 439-441, 1994

### 12) 田平 武 :

サイトカインの神経栄養因子作用

最新医学 49 : 846-850, 1994

### 13) 田平 武 :

遺伝子診断の問題点

Clinical Neuroscience 12 : 378-380, 1994

## d. 班会議報告書

### 1) 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・免疫性神経疾患研究班班会議抄録集 p6, 1994

### 2) 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・免疫性神経疾患研究班班会議抄録集 p11, 1994

### 3) 田平 武, 荒木 亘, 国下龍英, 高橋慶吉, 池田幸弥 :

マウス神経細胞株におけるアミロイド $\beta$ 蛋白の分泌

厚・精神神経疾患・神経疾患の病態解明に関する分子遺伝学的研究 平成5年度研究報告書 p 17-19, 1994

### 4) 国下龍英 :

ヒト血小板顆粒画分膜に存在するアルツハイマー病アミロイドジェニック断片の検討

長寿科学総合研究平成4年度研究報告書 6 : 353-355, 1993

### 5) 国下龍英 :

アミロイド形成下における神経細胞の代謝変化

笹川医学医療研究財団高齢者の医学医療に関する研究 平成4年度研究業績年報 8 : 27-31, 1993

- 6) 山村 隆, 横山和正, 近藤誉之, 田平 武, 高橋慶吉, 国下龍英, 西尾健資 :  
脱髄性ポリニューロパチーにおける蛋白抗原特異的なT細胞免疫応答の解析  
厚・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  
平成5年度研究報告書 p56-58, 1994
- 7) 高橋慶吉, 小西吉裕, 崔 得華, 田平 武 :  
中枢神経組織におけるIGF II 受容体の分布  
厚・精神・神経疾患・神経系機能修復に関する開発的研究 平成5年度研究報告書 p19-22,  
1994
- e. その他
- 1) 田平 武 :  
痴呆疾患の遺伝学的研究  
Advances in Aging and Health Research ((財)長寿科学振興財団編), p19-32, 1994
- 2) 田平 武 :  
学会報告: 国際シンポジウム「アルツハイマー病治療の戦略と戦術」  
老年精神医学 5: 471-472, 1994
- 3) 近藤誉之, 山村 隆, 井野辺純一, 高橋慶吉, 田平 武 :  
多発性硬化症患者末梢血由来のPLP特異的T細胞受容体の解析  
神経免疫学 2: 44-45, 1994
- 4) Milena Kozovska, 山村 隆, 田平 武 :  
脳炎誘起性T細胞による抗原提示を要求する  
神経免疫学 2: 52-53, 1994
- 5) 荒木 亘, 国下龍英, 池田幸弥, 高橋慶吉, 田平 武 :  
神経細胞株におけるアミロイドβ蛋白の生成について—APP遺伝子導入による検討—  
第36回日本神経化学会大会論文集 32: 150-151, 1993

## B. 学会発表

### a. 特別講演, シンポジウム

- 1) 田平 武, 山村 隆 :  
遅延型アレルギー神経疾患とT細胞  
第43回日本アレルギー学会総会シンポジウム, 横浜, 10.25, 1993

## II 研究業績

- 2) Tabira T, Chui D-H, Koya G, Ogata J:

Immunohistochemical and histometric studies of the brain from aged leprosy patients.

Internat Symp on Alzheimer's Disease, Otsu, Nov.15, 1993

- 3) 田平 武 :

アルツハイマー病のナゾに迫る

シンポジウム “アルツハイマー病のナゾに迫る” , (財)ほけ予防協会, 国立精神・神経センター,  
(財)精神・神経科学振興財団共催, 東京, 3.11, 1994

- 4) 田平 武 :

脳におけるサイトカインの産生とその受容体及びその意義

感染症と生体防御の学際的シンポジウム, 東京, 3.28, 1994

- 5) Kunishita T, Araki W, Ikeda S, Tabira T:

Effect of APP overexpression on the metabolism of neuronal cell line.

6th Internat Symp, Alzheimer Disease: Senile Plaques and Amyloid, National Center of  
Neurology and Psychiatry, Tokyo, Mar.10, 1994

- 6) Inobe J, Yamamura T, Kunishita T, Tabira T:

Myelin proteolipid protein peptide-specific T cells in multiple sclerosis and healthy subjects.

Multiple Sclerosis Satellite Symposium, Victoria, B.C., Sep.11, 1993

- 7) 荒木 亘, 国下龍英, 池田幸弥, 高橋慶吉, 田平 武 :

神経細胞株におけるアミロイドβ蛋白の生成について—APP遺伝子導入による検討—

第36回日本神経化学会ミニシンポジウム, 大阪, 10.26, 1993

- 8) Abramsky O, Duquette P, Tabira T, Pollard J, Newsom-Davis J, Lisak R, Weiner H:

Neuroimmunology

XVth World Congr Neurol, Plenary Lecture, Vancouver, Sep. 8, 1993

- 9) Suzuki A, Takashima S, Mizuguchi M, Kato M, Kunishita T, Tabira T:

High expression of KPI-containing substances in the cerebral vessels of patients with Down  
syndrome.

6th Internat Symp, Alzheimer Disease: senile Plaques and Amloid, National Center of  
Neurology and Psychiatry, Tokyo, Mar.10, 1994

## b. 国際学会

- 1) Yamamura T, Sakanaka S, Kozovska M, Takahashi K, Tabira T:

T-cell receptor CDR3 homology among T lymphocytes capable of inducing auto-immune encephalomyelitis

45th Annual Meeting Program, American Academy of Neurol, New York, Apr.29, 1993

2) Yamamura T, Inobe J, Tabira T:

Heterogeneous expression of CD4 and CD8 molecules on MBP-specific T cell clones derived from MS

XVth World Congr Neurol, Vancouver, Sep.8, 1993

3) Yamamura T, Kondoh T, Sakanaka S, Kozovska M, Takahashi K, Tabira T:

Homologous T cell receptor complementarity determining region 3 among T cells capable of inducing experimental autoimmune encephalomyelitis

Advances in the Understanding & Treatment of Multiple Sclerosis, San Diego, Dec.9-10, 1993

4) Kunishita T, Araki W, Ikeda S, Tabira T:

Metabolic and functional changes in  $\beta$  APP overexpressed mouse neuronal cell line

The 3rd Internat Conference of Alzheimer's and parkinson's Disease, Chicago, Nov.2, 1993

5) Takahashi K, Mitsunaga Y, Tabira T:

A new approach for the identification of expressed genes in target chromosomal regions

Human Genome Mapping Workshop, Kobe, Nov.14-17, 1993

6) Mitsunaga Y, Takahashi K, Tabira T:

Linkage and mutational analysis of Japanese familial Alzheimer's disease pedigrees for the  $\beta$ -APP gene region

Human Genome Mapping Workshop, Kobe, Nov.14-17, 1993

7) Kondo T, Yamamura T, Inobe J, Takahashi K, Tabira T:

T cell receptor analysis of MS-derived T cell clones reactive with PLP peptides: Application of inverse PCR

XVth World Congr Neurol, Vancouver, Sep.8, 1993

8) Kondo T, Yamaura T, Inobe J, Takahashi K, Tabira T:

T cell receptor (TCR)  $\beta$  chains of proteolipid protein (PLP)-specific T cells derived from multiple sclerosis (MS)

IBC Conference: Advances in the Understanding & Treatment of Multiple Sclerosis, San

II 研究業績

Diego, Dec.9-10, 1993

9) Kozovska M, Yamaura T, Tabira T:

TCR vaccination in EAE: Induction of Down-regulatory T cells specific for V $\beta$  17a CDR2 peptide

XVth World Congr Neurol, Vancouver, Sep. 7, 1993

10) Kozovska M, Yamamura T, Tabira T:

Regulatory T cells requiring presentation of TCR peptide by encephalitogenic T cells

IBC Conference: Advances in the Understanding & Treatment of Multiple Sclerosis, San Diego, Dec.9-10, 1993

11) Saeki K, Takeuchi AM, Ikeda T, Matsumoto Y, Matsumoto Y, Onodera T, Hirota Y, Yamamura T, Tabira T:

Expression of PLP gene in rat tissue and immortalized neuronal cell line

9th Internat Congr Virol, Glasgow, Aug.10, 1993

12) Tanaka M, Sato A, Tsuji S, Tabira T:

The roles of adhesion molecules in the binding of SJL murine T cell clone specific for myelin basic protein to SJL endothelial cells from brain microvessels

XVth World Congr Neurol, Vancouver, Sep.7, 1993

c. 一般学会, その他

1) 田平 武:

自己免疫性脳炎惹起T細胞の抗原受容体解析

第3回視神経炎治療多施設トライアル研究グループ総会, 横浜, 10.15, 1993

2) 田平 武:

多発性硬化症とアレルギー性脳炎をめぐる最近のトピックス

第29回福島県神経内科懇話会, 福島, 10.29, 1993

3) Tabira T:

Alzheimer's disease

Seminar at University of Santo Tomas, Manila, Nov.3, 1993

4) 田平 武:

多発性硬化症

国府台病院神経内科セミナー, 千葉, 1.11, 1993

- 5) 田平 武 :  
 アルツハイマー病：遺伝因子と免疫因子の関与  
 創価大学生命科学研究所セミナー，東京，11.24，1993
- 6) 田平 武 :  
 神経免疫学－最近の進歩－  
 第13回岡山脳神経疾患フォーラム，岡山，3.17，1994
- 7) 山村 隆，坂中 進，田平 武 :  
 脳炎誘起性T細胞のT細胞受容体CDR3のホモロジー  
 第34回日本神経学会総会，千葉，6.10，1993
- 8) Yamamura T :  
 Immunological aspects of multiple sclerosis  
 A Special Seminar at University Santo Thomas, Manila, Nov.11, 1993
- 9) 山村 隆，Geng Tong-Chao，田平 武 :  
 自己免疫性脳炎の寛容誘導には胸腺外経路が関与する  
 第23回日本免疫学会，仙台，11.17，1993
- 10) 国下龍英，荒木 亘，池田幸弥，田平 武 :  
 $\beta$ アミロイドの形成機序  
 武蔵野フォーラム，東京，7.5，1993
- 11) 国下龍英，荒木 亘，池田幸弥，田平 武 :  
 アミロイド前駆体蛋白遺伝子導入による神経細胞株の代謝変化  
 文部省重点領域研究 平成5年度公募ワークショップ「老年痴呆の分子機構」，京都，8.6，1993
- 12) 高橋慶吉，小西吉裕，崔 得華，田平 武 :  
 中枢コリン作動性ニューロンに及ぼすインシュリン様成長因子の作用  
 第17回日本神経科学大会，名古屋，12.8，1993
- 13) 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
- 14) 光永吉宏，高橋慶吉，田平 武，田崎博一，渡辺俊三，伊野美幸 :  
 家族性アルツハイマー病の連鎖解析とAPP遺伝子変異の検索  
 第34回日本神経学会総会，千葉，6.10，1993

## II 研究業績

- 15) 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 及び MBP ペプチド特異的 T 細胞株の解析  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.11, 1993
- 16) 井野辺純一, 山村 隆, 大橋高志, 田平 武 :  
多発性硬化症患者末梢血由来プロテオリピッド蛋白ペプチド特異的 T 細胞株の解析  
第23回日本免疫学会, 仙台, 11.17, 1993
- 17) 荒木 亘, 国下龍英, 高橋慶吉, 池田幸弥, 田平 武 :  
 $\beta$  アミロイド前駆体蛋白遺伝子の神経細胞株への導入  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993
- 18) 弘瀬秀樹, 田平 武 :  
細胞外マトリックス物質を用いた分化神経細胞の培養法  
第66回日本組織培養学会, 筑波, 6.18, 1993
- 19) Milena Kozovska, 山村 隆, 田平 武 :  
脳炎誘起性 T 細胞による T 細胞レセプター CDR2 ペプチドの提示  
第23回日本免疫学会, 仙台, 11.18, 1993
- 20) Milena Kozovska, 山村 隆, 田平 武 :  
脳炎誘起性 T 細胞による抗原提示を要求する T 細胞レセプター・ペプチド特異的 T 細胞  
第 6 回日本神経免疫研究会学術集会, 東京, 1.21, 1994
- 21) 近藤誉之, 山村 隆, 高橋慶吉, 井野辺純一, 田平 武 :  
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  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993
- 22) 近藤誉之, 山村 隆, 井野辺純一, 田平 武 :  
多発性硬化症患者末梢血由来のプロテオリピッド蛋白特異的 T 細胞レセプターのレパトア解析  
第23回日本免疫学会, 仙台, 11.19, 1993
- 23) 近藤誉之, 山村 隆, 井野辺純一, 高橋慶吉, 田平 武 :  
多発性硬化症患者末梢血由来の PLP 特異的 T 細胞受容体の解析  
第 6 回日本神経免疫研究会学術集会, 東京, 1.21, 1994
- 24) Takeuchi AM, Gallyas F, Takanashi K, Tabira T, Onodera T :  
Establishment of hippocampal precursor neuronal cell lines immortalized by recombinant

retrovirus vector

第115回日本獣医学会, 東京, 4.3, 1993

- 25) 佐伯圭一, Alice Mayumi Takeuchi, 池田敏男, 松本安喜, 廣田好和, 松本芳嗣, 山村 隆,  
田平 武, 小野寺節:

ラットおよびラット由来不死化神経細胞株における正常プリオン蛋白mRNAの検出

第115回日本獣医学会, 東京, 4.3, 1993

- 26) 佐伯圭一, Alice Mayumi Takeuchi, 松本安喜, 廣田好和, 松本芳嗣, 田平 武, 小野寺節:  
レコンビナント・レトロウイルスベクターを用いて不死化したラット由来神経細胞株におけるプリ  
オン遺伝子発現の解析

第41回日本ウイルス学会, 札幌, 10.13-15, 1993

- 27) 佐伯圭一, Alice Mayumi Takeuchi, 池田敏男, 松本安喜, 廣田好和, 松本芳嗣, 山村 隆,  
田平 武, 小野寺節:

不死化神経細胞株におけるプリオン蛋白遺伝子の発現

第139回日仏生物学会, 京都, 11.6, 1993

- 28) 森 敏, 田平 武, 河田光博, 伊地智俊晴, 宮田清典, 中島健二:

Wriggle mouse sagami: 脳のセロトニンニューロン系-免疫組織化学的研究

第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.9, 1993

- 29) 平野 悟, 加藤俊徳, 高嶋幸男, 田平 武, 寺崎勝成:

ダウン症候群成人

第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993

- 30) 小田健一郎, 北口哲雄, 田平 武:

クローン化神経細胞感作による運動ニューロン病作成の試み

第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.11, 1993

### C. 班会講発表

- 1) 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

- 2) 田平 武:



## II 研究業績

- 21番染色体遺伝子の分離法の開発—コスミドクローンを用いるスクリーニング—  
文・重点・老年痴呆の分子機構研究班班会議，東京，12.21，1993
- 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）による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：  
多発性硬化症類縁疾患の疫学調査  
厚・免疫性神経疾患調査研究班班会議，東京，1.19，1994
- 7) 田平 武，山村 隆，近藤誉之，Milena Kozovska，高橋慶吉：  
脳炎誘起性T細胞のT細胞受容体解析  
厚・免疫性神経疾患調査研究班班会議，東京，1.19，1994
- 8) 田平 武，大橋高志，井野辺純一，国下龍英，山村 隆：  
多発性硬化症におけるPLPペプチド特異的T細胞の解析（第三報）：樹立頻度とHLA DR相関  
厚・免疫性神経疾患調査研究班班会議，東京，1.19，1994
- 9) 田平 武，荒木 亘，国下龍英，高橋慶吉，池田幸弥：  
マウス神経細胞株におけるアミロイドβ蛋白の分泌  
厚・神経疾患の病態解明に関する分子遺伝学的研究平成5年度研究班班会議，東京，2.4，1994
- 10) 田平 武，荒木 亘，国下龍英，高橋慶吉，池田幸弥：  
マウス神経細胞株におけるアミロイドβ蛋白の分泌  
厚生省精神・神経疾患・神経疾患の病態解明に関する分子遺伝学的研究班  
平成5年度班会議，東京，2.4，1994
- 11) 田平 武，光武吉宏，高橋慶吉，田崎博一，渡辺俊三，目時弘文：  
本邦の家族性アルツハイマー病における家系連鎖解析

長寿科学総合研究「痴呆疾患の遺伝学的研究」平成5年度研究発表会，東京，2.17，1994

12) 田平 武，中垣慶子，山村 隆：

エイズ脳症モデルとしてのFeline Immunodeficiency Virus (FIV)脳症の発症メカニズムに関する研究

ヒューマンサイエンス振興財団，健康管理・免疫低下防止事業「HIV等のウイルスによる痴呆や運動失調をはじめとする神経障害に関する基礎的，臨床的研究」平成5年度研究成果発表会，東京，2.18，1994

13) 山村 隆，横山和正，近藤誉之，田平 武，高橋慶吉，国下龍英，西尾健資：

脱髄性ポリニューロパチーにおける蛋白抗原特異的なT細胞免疫応答の解析

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会，東京，1.27，1994

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) 研究会，兵庫，9.29，1992

15) 国下龍英：

$\beta$ アミロイド過剰発現下における神経細胞代謝の変化

長寿科学総合研究事業早発老化の遺伝的，生物学的研究班 平成5年度研究成果報告会，東京，1.28，1994

16) 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) 研究会，東京，2.26，1993

17) 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) 研究会，東京，3.15，1992

18) 国下龍英：

IL-3受容体関連蛋白(F9抗原)とその部分アミノ酸配列

生体情報伝達機構の解析・制御技術の開発に関する研究 平成5年度第二回全体研究会，東京，3.16，1994

## II 研究業績

- 19) 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
- 20) 崔 得華, 田平 武, 高屋豪瑩, 緒方 絢 :  
高齢ライ患者脳における低 $\beta$ タンパク沈着と高PHFタウ沈着について  
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5年度研究発表会, 東京, 3.7, 1994
- 21) 小西吉裕, 崔 得華, 国下龍英, 高橋慶吉, 山村 隆, 田平 武 :  
マウスおよびラット脳内インターロイキン-3受容体の発現  
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5年度研究発表会, 東京, 3.7, 1994
- 22) 弘瀬秀樹, 山村 隆, 田平 武 :  
神経細胞表面抗原特異的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5年度研究発表会, 東京, 3.7, 1994
- 23) 池田幸弥, 内藤成孝, 国下龍英, 高橋慶吉, 荒木 亘, 田平 武 :  
老人斑アミロイド生成機序に関する研究—培養細胞を用いたin vitroモデルの作製—  
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5年度研究発表会, 東京, 3.7, 1994
- 24) 中島 修, 浜島浩史, 田平 武, 国下龍英, 荒木 亘, 澤田正史 :  
アルツハイマー病患者の喫煙者及び非喫煙者におけるアミロイド前駆体とそのプロセッシングエンザイムの比較研究  
第8回平成4年度助成研究発表会(財団法人喫煙科学研究財団主催), 東京, 7.1, 1993

## 脳炎誘起性T細胞による抗原提示を要求するT細胞 レセプター・ペプチド特異的T細胞

Milena Kozovska, 山村 隆, 田平 武

近年、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の回復、寛容誘導にT細胞レセプター (TCR) ペプチドを認識する調節性T細胞が関与していることを示す実験結果が集積されつつある。しかし、その性状、抗原認識機構については論議があり、詳細な検討が待たれている。今回我々はSJL/Jマウス脳炎誘起性T細胞において優先的に使用されているV $\beta$ 17a遺伝子産物のCDR2領域に相当するペプチドを合成し、同ペプチド特異的な調節性T細胞株の樹立に成功した。

### 〈方法〉

V $\beta$ 17aペプチド (EEIMEQTDLVKKRFSKCS) と完全フロイント・アジュバントのエマルジョンで雌SJL/Jマウスを免疫し、11日目に感作脾細胞 (p-SpC) を調精した。V $\beta$ 17aペプチド特異的T細胞株の樹立には、脳炎誘起性T細胞クローン4b.14aをX線照射 (3,000 Rad) した後抗原提示細胞 (APC) として使用し、2週間ごとにV $\beta$ 17aペプチドで抗原刺激を繰り返した。

### 〈結果〉

p-SpCは通常の方法ではV $\beta$ 17aペプチドに反応しないが、MHCクラスI陽性のT細胞クローン存在下ではペプチド特異的な強い増殖反応を示した。V $\beta$ 17aペプチドでパルスしたT細胞クローンもp-SpCを刺激することから、T細胞にユニークな抗原提示能のあることがわかった。T細胞クローンをAPCとして樹立されたV $\beta$ 17aペプチド特異的T細胞株 (V $\beta$ 17a-TCL) のペプチド特異的な活性化は、(1) クラスI陽性のT細胞クローンをAPCとして用いた時のみ得られ、未感作T細胞、正常脾細胞では代用できない。(2) 抗MHCクラスI抗体で阻害されるが、抗MHCクラスII抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体では阻害されない。(3) クラスI提示経路を阻害する薬物 gelonin による阻害を受ける、な

どの特徴を有した。

V $\beta$ 17a-TCLはCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>またはCD4<sup>dim</sup>CD8<sup>-</sup>のフェノタイプを有し、V $\beta$ 17aを優先的に使用していた。In vitroでT細胞の活性化を抑制し、in vivoではEAEの発症を抑制した (図1)。In vitroでの抑制には可溶性因子の介在することが確認された。

### 〈考察—結論〉

V $\beta$ 17a CDR2ペプチド特異的T細胞はT細胞クローンにより提示されたTCRペプチドをMHCクラスI拘束性に認識し、EAE抑制能をもつユニークなCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>調節性T細胞であることが明らかになった。近年、T細胞が抗原提示細胞 (APC) としての能力を備えているという報告が散見されるが、そのAPCとしての能力はconventional APCよりも明らかに劣るものと考えられてきた。しかし我々の実験結果は、調節性抗イデオタイプT細胞の少なくとも一部はT細胞を "specialized" APCとして要求することを示している。T細胞をAPCとして使用することによりクラスI拘束性調節性細胞の研究に新しい展開がみられる可能性が示唆された。

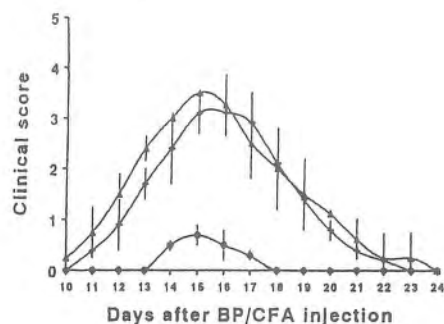


図1: V $\beta$ 17a特異的TCLのEAE予防効果  
1 x 10<sup>7</sup> のV $\beta$ 17a特異的TCL (●)、  
OVA特異的TCL (▲) の移入を受けたマウス、および未処置 (+) のマウスにEAEを誘導した。

## コリン作動性ニューロンに及ぼすインシュリン様成長因子II (IGF II) の作用

小西吉裕, 高橋慶吉, 崔 得華, Ron G. Rosenfeld\*, 姫野 勝\*\*, 田平 武

(\*Stanford大医学部, \*\*九大薬学部)

IGFIIは中枢神経系組織では胎児から成熟個体を通じて比較的高い産生が保持され、成熟個体では脳脊髄に局限している低分子増殖因子である。その為、IGFIIは神経細胞の増殖、分化や生存に重要な因子と推測され、注目されている。そこで、我々は中隔野コリン作動性神経細胞に対するIGFIIの栄養因子としての作用を検討した。

(方法) 既報(1)に従いマウス15日胚脳の中隔野からの初代神経細胞を無血清培地で培養した。培養開始と共にIGFIIを添加し、Fonnumらの方法でコリン・アセチル転移酵素(ChAT)活性を測定し、平行してChAT陽性細胞の形態変化を免疫染色法で調べた。更に、中隔野由来の初代培養神経細胞におけるIGFII受容体(IGFIIIR)の存在を、抗IGFIIIR抗体(RII-PABL BII-MH) (2)と抗ChAT抗体の二重染色にて検討した。

(結果) IGFIIは中隔野由来の初代培養コリン作動性神経細胞のChAT活性を増加させ、その最適濃度は10~50ng/mlであった。経時的には5日目が最高で、IGFII無添加時(コントロール)より約2倍のChAT活性値を示した(2)。形態的には、コントロールでは少数の細胞が淡くChAT陽性で、その突起の数は少なくかつ短い(平均突起長 $9.8 \pm 7.1 \mu\text{m}$ )のに対し、IGFII添加により細胞は強陽性となり、突起はより伸展(平均突起長 $31.9 \pm 9.2 \mu\text{m}$ )と分岐を示した。

又、IGFIIはコリン作動性神経細胞株SN6(3)のChAT活性も増加させた。更に、初代神経細胞培養中に抗IGFIIIR抗体を加えると、IGFIIによるChAT活性亢進は完全に阻害された。IGFIもChAT活性を最適濃度100ng/mlでもって増加させるが、それは50%阻害するに留まった(表1)。IGFIIに $\beta$ NGF、bFGFやIGFIを併用するとChATは相加的に増加したが、IL-3やGM-CSFでは明確な相加効果は見られなかった(図1)。免疫染色では、中隔野由来の多数の初代培養神経細胞が染色され、その一部はChAT陽性であった。

(考察) IGFIIは中隔野コリン作動性神経細胞のChAT活性を増加させた。IGFII添加にても培養細胞全体の蛋白量はコントロールと変わらず、後者ではむしろ培養3日から5日目で蛋白量がやや低下傾向だが、IGFII添加でその低下は防げること、IGFIはChAT免疫反応性を高め、突起伸展を促すことから、IGFIIは同神経細胞に対して増殖促進よりもむしろ、生存維持や分化促進作用を有すると考えられる。又、IGFIIのChAT活性促進作用はIGFIより低濃度で起こり、IGFIIIR抗体で完全に阻害され、IGFIと共に加える

ると相加的に増強されること、又、その作用はSN6細胞でも見られ、ChAT陽性細胞にIGFIIIRが認められることより、IGFIIの作用はコリン作動性神経細胞に存在するIGFIIIRを直接介したものと考えられる。

(参考文献) (1) Kamegai et al.(1990). Neuron 4, 429-436. (2) Konishi et al.(1994). Brain Res. in press. (3) Hammond et al.(1986). Science 234, 1237-1240.

Factor	n	Total ChAT Activity, <i>pmole/hr/well</i> (Relative Activity)	
		Anti-IGFII Receptor Antibody	
		No Addition	Addition
Control	3	155.9 $\pm$ 28.0 (100)	176.6 $\pm$ 48.2 (100)
IGFII	3	319.1 $\pm$ 60.2 (205)	95.1 $\pm$ 50.5 (54)
IGFI	3	585.9 $\pm$ 64.9 (376)	320.1 $\pm$ 52.4 (181)
NGF	3	304.2 $\pm$ 71.4 (195)	296.3 $\pm$ 23.1 (168)
IL-3	3	373.1 $\pm$ 38.8 (239)	422.4 $\pm$ 12.2 (239)

表1 Effect of IGFII receptor antibody on ChAT activity induced by IGF II or other trophic factors. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Relative activity represents the percentage of control activity measured in the absence of any trophic factors.

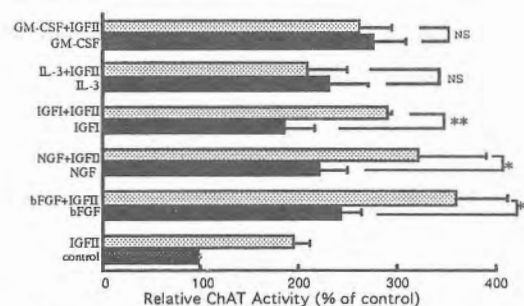


図1 Combined effects of IGFII and various trophic factors on ChAT activity in mouse primary septal cultures. Data are percentages of control activity (relative activity) and represent mean  $\pm$  SEM (bars). NS (not significant); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

## 老人斑アミロイド生成機序に関する研究

池田幸弥, 国下龍英, 荒木 亘, 高橋慶吉, 田平 武

アルツハイマー病は家族性及び孤発性いずれの場合においても病因論的にはheterogeneousな疾病である。しかしながらアルツハイマー病の病理学的特徴である老人斑の主要構成成分、アミロイドβプロテイン(Aβ)の生成及び沈着は、発症メカニズムの中心に位置するものと推定される。これを裏付けるように家族性アルツハイマー病(FAD)やアミロイドーシスを伴った遺伝性脳出血(HCHWA-D)で見い出されたβアミロイド前駆体タンパク質(βAPP)の変異がAβの分泌増大や凝集の促進を誘起することが最近の研究により示された。<sup>1) 2) 3)</sup>

そこで我々は、βAPPの代謝と変異との関連を検討するため、human βAPP遺伝子及び変異βAPP遺伝子を培養細胞に強制発現させるin vitroモデルの作製を試みた。

## [方法]

βAPP695 (wild type)及び変異βAPP695 cDNAをEF1-αプロモーターの制御下で発現させるベクターに組み込んだ。変異βAPP695としてはFAD或いはHCHWA-Dで見い出されたpoint mutation 即ちβAPP695<sup>595,596</sup>KM-NL,<sup>642</sup>V-I,<sup>618</sup>E-Qの3種を用いた。各種βAPP695を組み込んだベクターをCOS 7細胞にLipofection法にて導入し、48-72時間後の細胞を解析に供した。導入βAPP695の発現と代謝の解析はNorthern blot法、Western blot法及び<sup>35</sup>S] methionineで代謝的に標識した細胞タンパク質の免疫沈降法で行った。免疫沈降には抗Aβ<sub>1-28</sub> (Affi 28)、抗Aβ<sub>1-40</sub> (SGY2133)及び抗βAPP C末(AC24)の各抗体を用いた。

## [結果・考察]

導入したβAPP695(wild type)の発現は、ベクターのみを導入したcontrolに較べRNAレベルで約5倍の上昇が見られ、更にタンパク質レベルでもβAPP695の過剰発現が確認された。

そこで3種の変異βAPP695を加えてCOS細胞における発現と代謝を免疫沈降法で解析した結果、βAPPの発現は標識時間の長短(30分或いは16時間)にかかわらずwild typeと変異βAPP間で差異は認められなかった(Fig. 1)。しかしAβの分泌はFAD Swedishの家系で発

見されたAβ N末直前の2つのアミノ酸の変異(βAPP695<sup>595,596</sup> KM-NL)を導入した時のみ著しい増加が認められた。この増加はwild typeを発現させた時に較べ15倍以上であった(Fig. 2)。FAD Swedishの変異を持つβAPPを培養細胞に発現させた場合Aβの分泌が増加することは既に報告されているが、今回得られたAβの分泌増加は報告値の2-3倍以上であった。したがって本細胞はAβ生成に関わる代謝経路を解析するのに極めて有効と考えられた。現在、COS細胞におけるβAPP及び変異βAPPの代謝を詳細に検討している。

## [文献]

1. Citron, M. et al. Nature 360, 672-674 (1992)
2. Cai, X-D. et al. Science 259, 514-516 (1993)
3. Fraser, P. E. et al. Biochemistry 31, 10716-10723 (1992)

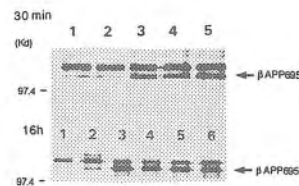


Fig. 1 Expression of βAPP695 in COS 7 cells.

1: no transfected, 2: vector alone, 3: βAPP695 wild type, 4: βAPP695<sup>595,596</sup> KM-NL, 5: βAPP695<sup>642</sup>V-I, 6: βAPP695<sup>618</sup>E-Q

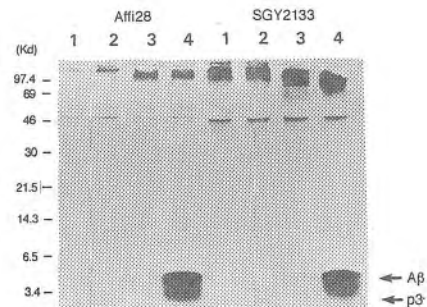


Fig. 2 Secretion of Aβ from COS 7 cell transfected with FAD Swedish mutant βAPP695 cDNA.

1: no transfected, 2: vector alone, 3: βAPP695 wild type, 4: βAPP695<sup>595,596</sup> KM-NL

## 第14番染色体に連鎖した家族性アルツハイマー病の 家系連鎖解析とハプロタイプ解析

光永吉宏, 高橋慶吉, 田平 武

家族性アルツハイマー病 (FAD) は若年発症FADと高齢発症FADに分類される。一部の若年発症FADは $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白 ( $\beta$ -APP) 遺伝子コドン670/671, 692, 717に点突然変異を持つ事が分かり、多くの高齢発症FADと孤発型ADではアポリポプロテインE (APOE) のサブタイプ $\epsilon$  4の頻度が高い事が分かった。また多くの若年発症FADでは14q24.3領域との連鎖が報告されている。我々は本邦のFAD家系を用いて第14, 19, 21番染色体上での連鎖解析と14q24.3領域内のマーカーを用いたハプロタイプ解析を行った。

### [方法]

FAD-H家系 (家系員20名, 患者5名) のEB virus形質転換リンパ球より常法に従いゲノムDNAを分離し、その100ng標品に14q24.3上 (D14S77, S71, S43, FOS, S76, S61, S53)、21番染色体上 (D21S13E, S120, S210, APP intron1, intron13)、19番染色体上 (ATP1A3) のマーカーのprimer各15pmol、0.4mM dNTPs、1XPCR buffer、0.5U Taq polymerase、 $2 \times 10^5$  cpm end-labeled primerを加え (計15 $\mu$ l)、94 $^{\circ}$ C 60秒、適当なアニーリング温度 90秒、72 $^{\circ}$ C 90秒の22サイクルでPCRを行った。得られたPCR産物は6%シーケンスゲルで電気泳動して断片長多型を調べ、LINKAGE (MLINK, LINKMAP) にて解析を行った。また各家系の患者DNAより $\beta$ -APPエクソン14~17を直接シーケンスして変異の有無も調べ、更にAPOE対立遺伝子型も検索した。

### [結果]

14番染色体q24.3領域のマーカーを用いた多点解析からはD14S71の近傍で $Z_{max} = +4.47$ を得た (Fig. 1)。またハプロタイプ解析の結果、D14S61とS53の間に組換えのある事が分かった (Fig. 2)。一方、21番染色体上のAPP intron 1, 13で最大多点ロッドスコア $Z_{max} = +0.73$  ( $\theta = 0.22$ )を得たが、 $\beta$ -APPエクソン14~17に変異を認められず、またD21S13E, S120については有意な連鎖は認められなかった。更に19番染色体上のATP1A3との連鎖、及びAPOE対立遺伝子型とFAD発症年齢の間に関連は無い事が判明した。

### [考察]

我々が調査したFAD-H家系は、i)  $\beta$ -APP周辺で低い正のロッドスコアを示したが、 $\beta$ -APPエクソンに変異を認めない事、ii) 14q24.3上のマーカーで圧倒的に高く有意なロッドスコアを得た事、以上の理由によりFAD原因遺伝子は14q24.3領域に

存在する事が明らかとなった。更に患者と同一のハプロタイプを有するFAD-H家系員は調査中に発症し、ハプロタイプによる発症予測が可能である事も分かった。本家系は本邦で最初に14q24.3領域との連鎖が証明されたFAD家系であり、組換えによりその位置はD14S53よりもセントロメア側にある事も示唆された。現在、この領域のYACライブラリーを得、FAD原因遺伝子のクローニングを行っている。

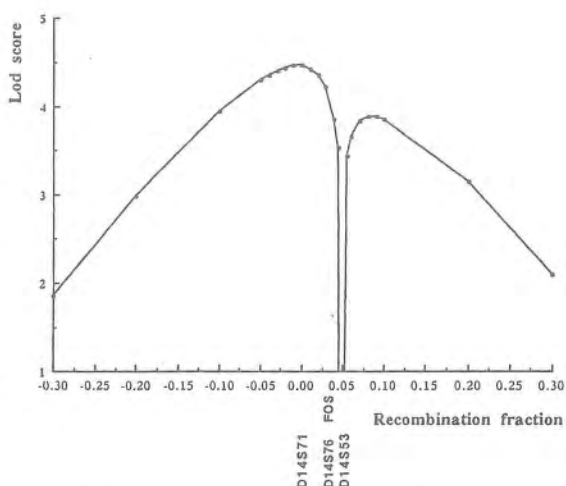


Fig.1 Multipoint linkage analysis on 14q24.3

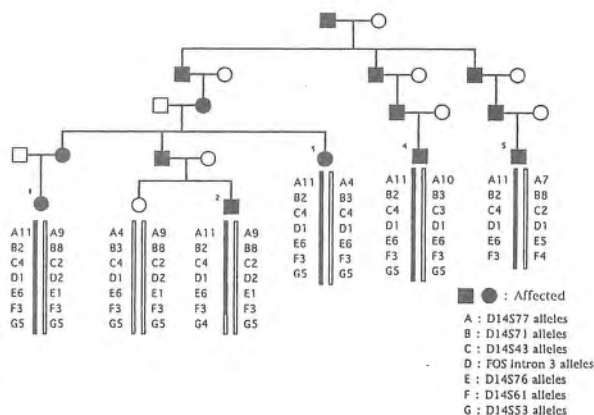


Fig.2 Abridged segregation of marker alleles on 14q24.3

## 7. 疾病研究第七部

### 1. 研究部1年の歩み

平成5年度は新室長のもとに新しくスタートした年であった。

平成5年度において当研究部において研究に携わったのは三辺義雄（室長）、橋井美奈子（流動研究員、金沢大神経情報研より転入）、江守賢次（流動研究員、富山医科薬科大学精神科より転入）、東田陽博（併任研究員、金沢大神経情報研教授）、石川俊男、木村和正、伊豫雅臣（以上併任研究員、精神保健研究所）、橋本謙二（研究生、精神保健研究所持別研究員）、勝盛宏（研究生、東京女子医大小児科）、成田奈津子（研究生、東海大精神科）である。村崎欣子、川上藤江、宮村操子、大科京子が研究の補助にあたった。

本年度行なった主な研究プロジェクトとしては次のとおりである。

#### 1) キンドリングてんかん動物を用いた研究

低頻度電気刺激キンドリング法を用いて海馬発作発現のメカニズムに迫った。すなわちGABA反回性抑制の崩壊は発作波の出現の後に出現し、キンドリングの進行とともに焦点部位のGABA抑制は強化された。さらにGABA拮抗薬が発作域値を上昇させたことなどからGABA局所抑制が発作の発現に重要な役割を担わないことを示唆した。

#### 2) てんかん発現におけるCa、Kチャンネルの研究

パッチクランプ法および分子生物学的方法をもちいててんかん発現の分子レベルの研究を展開した。すなわち細胞のCaオシレーションにおける過分極性Ca流入、セカンドメッセンジャーの役割を明らかにした。さらにKチャンネル操作による発作誘発機序についての予備的研究をおこなった。

#### 3) dopamine機能の電気生理学的研究

非定型抗精神病薬の作用機序、dopamineと他の神経伝達物質の相互作用、および依存性薬物に対する感受性の異なる近交系ラットのdopamine機能の差異を追求した。米国ブルックヘブン国立研究所との共同研究を継続した。

#### 4) PETスキャンの受容体トレーサーの開発に関する研究

当センターに本年度着工したPETスキャンを用いた臨床研究の基礎研究として動物を用いた研究の準備を進めた。

当部は発作性疾患、高次機能障害の基礎的研究を今後も国内、外の基礎および臨床（特に精神科、小児科）研究室と協力しながら進めてゆきたい。

（部長事務取扱：小沢鉄二郎）



## II 研究業績

### 2. 研究業績

#### A. 論文

##### a. 原著

- 1) Hashii M, Nozawa Y, Higashida H:

Bradykinin-induced cytosolic  $Ca^{2+}$  oscillations and inositol  
tetrakisphosphate-induced  $Ca^{2+}$  influx in voltage-clamped ras-transformed  
NIH/3T3 fibroblasts

J Biol Chem 268:19403-19410, 1993

- 2) Hashii M, Hirata M, Ozaki S, Nozawa Y, Higashida H:

$Ca^{2+}$  influx evoked by inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphate in ras-transformed  
NIH/3T3 fibroblasts

FEBS Lett 340:276-280, 1994

##### b. 著書

- 1) 三辺義雄 :

低頻度刺激キンドリング

てんかんの神経機構：キンドリングによる研究，

世界保健通信社（Wada, 佐藤, 森本編），

大阪, P300-308, 1993

- 2) 東田陽博, 橋井美奈子, 横山 茂, 川村哲郎 :

神経腫瘍細胞によるレセプター遺伝子の発現解析

レセプター—基礎と臨床—3. 分子生物学的方法, 朝倉書店（井村, 岡, 芳賀, 岸本編）, 東京,

P316-325, 1993

##### c. 総説

- 1) 三辺義雄 :

抗てんかん薬効果スペクトルと実験モデル：難治てんかん

精神医学レビュー 10 : 105-108, 1994

- 2) 三辺義雄, 橋井美奈子, 村崎欣子, 東田陽博 :

イオンチャネルの分子構造

メビオ 10 : 24-32, 1993

##### d. 班会議報告書 なし

## B. 学会発表

a. 特別講演, シンポジウム なし

b. 国際学会

1) Ashby Jr. CR, Minabe Y, Toor K, Emori K and Wang RY:

The effect of MDMA on the activity of A10 dopamine neurons in the nucleus accumbens :  
an electrophysiological study.

23rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington, D.C., U.S.A., Nov 11, 1993

c. 一般学会

1) 三辺義雄, 江守賢次, Ashby Jr.CR, Wang RY:

Neurokinin 1リセプターアンタゴニスト (CP96345) の中脳発火dopamine細胞への効果

第23回日本神経精神薬理学会, 東京, 9.29, 1993

2) 橋井美奈子, 村崎欣子, 三辺義雄, 野澤義則, 東田陽博:

rasトランスフォームした細胞で変調するブラジキニン反応: 膜過分極による活性化する Ca<sup>2+</sup> + オシレーションおよび Ca<sup>2+</sup> 流入

第36回日本神経化学会, 大阪, 10.25, 1993

## C. 班会議発表

1) 三辺義雄, 江守賢次, 村崎欣子:

てんかん焦点に誘発される電場電位の発作発現に至る変化

厚生省精神・神経疾患研究委託費・難治てんかんの治療法に関する研究班

平成5年度班会議, 東京, 12.20, 1993

2) 東田陽博, 横山茂, 星直人, Shahidulla M, 伊藤裕二, 三辺義雄:

NGKI膜電位依存性K<sup>+</sup>チャンネルを阻害する物質によるてんかんの誘発

厚生省精神・神経疾患研究委託費・難治てんかんの治療法に関する研究班

平成5年度班会議, 東京, 12.20, 1993

## D. その他の研究会

1) 三辺義雄:

てんかんの発症機序と抗てんかん治療開発へのアプローチ

技術情報協会セミナー, 東京, 8.19, 1993

## Neurokinin 1リセプターアンタゴニスト (CP96345)の中脳発火dopamine細胞への効果

三辺義雄, 江守賢次, Ashby Jr. CR\*, Wang RY\*  
(New York州立大学精神科)

Substance Pはdopamine起始細胞が存在する腹側被蓋 (VTA、A10) と黒質緻密層 (SN PC, A9) に高濃度に見られる。substance Pはdopamine細胞の機能を修飾することが知られている。最近の神経学の進歩によりneurokinin receptorは3種のsubtypeに分けられ、substance Pはneurokinin 1 receptorに高い親和性を有する。neurokinin receptor agonistがdopamine機能を亢進させることからantagonistが抗精神病作用を有する事が期待されている。今回neurokinin 1 receptor antagonistであるCP96345の発火dopamine起始細胞への効果をin vivo単一細胞外記録法を用いて検討した。

### 方法

ガラス製micropipettesをpuller (Narishge PE-2)で処理し先端を実体顕微鏡下で除去し、1% Fast Green dyeを含んだ2M食塩水を充てんし抵抗を1.0-1.6M $\Omega$  (in vivo)、2.4-3.0M $\Omega$  (in vivo)に調整した。この電極をmicromanipulatorを用いてA9, A10に挿入した。dopamine細胞は1). 2-3相の幅広いaction potentialで第1陽性相にくびれを有する、2)緩除で規則的なバーストを伴う事が多い、3)2-8 Hzの発火頻度、から他のnon-dopamine細胞から容易に区別できた。以下各々の薬理実験について述べる。

1)A9またはA10のdopamine細胞を1個保持し、3-5分間発火頻度が一定であることを確認しCP96345(0.01~1.28mg/kg)を尾静脈より投与しドーパミン細胞発火頻度への効果を調べた。CP96345はまず10 $\mu$ g/kgを投与し1分間隔で順次前回投与量の2倍量を投与した。

2)CP96345 5、10mg/kgを単回、ないしは1日1回3週間腹腔内投与し、最終投与2時間後にA9、A10発火dopamine細胞数を調べた。電極を各々の領域に10回挿入し1回挿入あたりの平均発火dopamine細胞数を算出した。コントロールとして生食水を投与し実験者は各々の動物の処置についてblindであった。さらに

細胞数を調べた後apomorphine50 $\mu$ g/kgを静脈投与しさらに5回電極を挿入して発火dopamine細胞数を調べた。この実験はCP96345による変化がdepolarization inactivationによるものかを確認するために行われた。

3)10mg/kgCP96345腹腔投与2時間後にdopamine細胞を保持し発火頻度が一定であることを確認した後、apomorphineを1 $\mu$ g/kgより始めて1分間隔で順次前回投与量の2倍量を静脈内投与した。発火頻度が完全に抑制されたらさらに1分後にhaloperidol 0.1mg/kgを静脈内投与し発火の回復を確認した。実験終了後25 $\mu$ Aの陰性直流電流を電極に流しFast Greenで記録部位にスポットを作った。このスポットを後に細胞学的に確認しdopamine細胞の位置を記録した。

### 結果

1)CP96345静脈投与は10~120 $\mu$ g/kgの範囲でA9、A10dopamine細胞発火頻度を25~30%抑制した。しかし120 $\mu$ g/kg以上の投与ではplateau効果がみられた。同量のCP96345はA9、A10のnon-dopamine細胞の発火頻度には影響をあたえなかった。

2)CP96345 5、10mg/kg単回腹腔内投与はコントロールに比べA9、A10発火dopamine細胞数を有意に減少させた。同様に21日間の慢性投与によりA9、A10発火dopamine細胞数はコントロールに比べ有意に減少した。apomorphine 50 $\mu$ g/kg静脈内投与はこの減少効果を阻止しなかった。

3)apomorphine投与によるdopamine細胞発火頻度抑制のID<sub>50</sub>はコントロール群においてA9=9.8 $\pm$ 1.8、A10=8.5 $\pm$ 1.5 $\mu$ g/kgであったが、CP96345投与群ではA9=5.5 $\pm$ 1.3、A10=5.5 $\pm$ 1.1 $\mu$ g/kgで有意な減少がみられた。

### 考察

以上の結果によりCP96345はdopamine起始細胞の活動を抑制するが、この抑制機序は従来の抗精神病薬と異なりdepolarization inactivationによらないと考えられる。

## てんかん焦点に誘発される電場電位の発作発現に至る変化

江守賢次, 三辺義雄, 勝盛 宏

てんかんの病態生理においてその発作発現機構を解明することは治療研究の鍵となるであろう。これまでスライスなどを用いたin vitroで比較的多くの研究がなされているがin vivoへ発展させた研究は数少なく、特に刺激部位での検討はほとんどなされていない。低頻度電気刺激によるキンドリングは刺激パルスの間歇期に脳内の電場電位を記録できるため刺激を開始してから後発射が誘発されるまでの間の力動的な電位の変化をとらえることが可能であり、無麻酔、無拘束下における発作発現機構の電気生理学的研究に有用と考えられる。そこで、このモデルを用い海馬歯状回キンドリング刺激パルスの間歇期に同期させ刺激部位へ単シナプス的に入力する貫通路線維にも弱い電気パルス（2連パルス）を与え、キンドリング刺激中に刺激部位近傍に単シナプスの誘発される電場電位の変化を後発射誘発に至るまで連続的に測定、解析した。

## [結果]

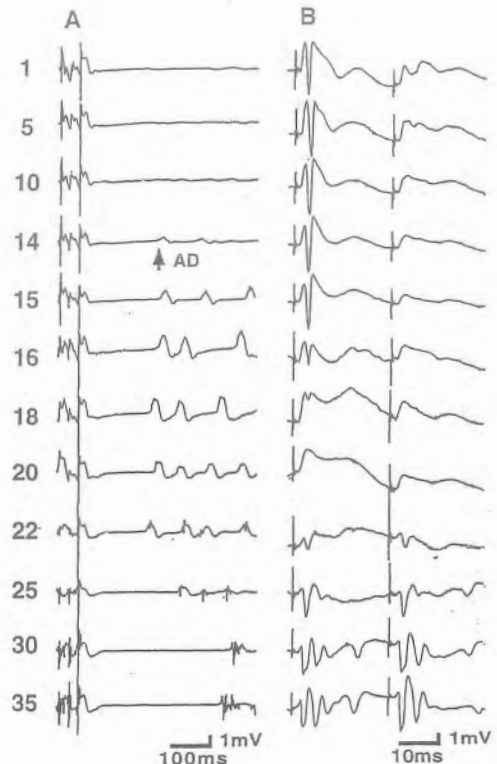
10例中6例が平均29.8回の刺激で全身けいれんに至り検討の対象とした。図に典型例の記録を示す。キンドリング刺激により集合電位はまず2連パルス抑制の増強を示し（2番目の集合電位の漸減、消失）後発射の誘発の後に減退・消失し、2連パルス抑制の脱抑制（1番目も2番目も同等の集合電位の誘発およびその漸増、multiple spike化）を伴って再度出現するというパターンをしめした。キンドリング形成によりこの基本パターンに変化はなかったが、

(1) 刺激初期での2連パルス抑制の増強、  
(2) 刺激中期での2連パルス抑制の脱抑制に至るまでの潜時（2番目の集合電位の再出現に要するキンドリング刺激のパルス数）の延長（ $14.8 \pm 0.8$ から $19.2 \pm 1.2$ に増加、Wilcoxon test、 $P < 0.05$ ）、  
(3) キンドリング初期では刺激の後期で再度減退傾向をしめしたのに対し、キンドリング完成後では2連パルス抑制

の脱抑制を伴う集合電位のさらなる増高傾向を示した。また、以前われわれが報告したようなキンドリング形成過程におけるPNTの急降下現象ははっきりしなかった。

## [考察]

TuffとRacinによれば、2連パルス抑制の脱抑制の後に後発射が誘発されるとされ、発作発現機構のGABA脱抑制説を支持する結果となっている。しかし、今回の結果は後発射の出現の後に局所のGABA反回性抑制の崩壊が生じる可能性を示唆する所見と考えられ、むしろ興奮性の増大による後発射の誘発がトリガーとなり加速度的なGABA反回性抑制の崩壊を引き起こす可能性を示唆する所見かもしれない。



## ras トランスフォーム細胞におけるレセプター作動性Ca流入の解析

橋井美奈子, 三辺義雄, 東田陽博

周期的な細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇 ( $Ca^{2+}$ オシレーション) は多くの非興奮性細胞で見られ、ホルモン分泌・細胞増殖などに重要な働きをする。この機序として細胞外からの $Ca^{2+}$ 流入が必須であるとされており、キメッセンジャーとしてイノシトール3リン酸 ( $IP_3$ )、4リン酸 ( $IP_4$ ) 等が注目されている。このレセプター作動性 $Ca^{2+}$ 流入経路の詳細はほとんど解明されていない。今回、ras 導入細胞でのブラジキニン (BK) 刺激およびイノシトールリン酸注入によっておこされる $Ca^{2+}$ 流入を解析した。コントロールとras 遺伝子でトランスフォームしたNIH/3T3線維芽細胞 (DT細胞) を使い、fura-2による細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 測定と同時に、ホールセルパッチクランプによる膜電位固定を行なった。

## [結果および考察]

1. BKを投与すると、DT細胞でのみ、細胞外に $Ca^{2+}$ が存在するときに $Ca^{2+}$ オシレーションがみとめられ、細胞外 $Ca^{2+}$ を除くと消失した。
2. 1の現象は細胞膜電位を変化させる操作で再現できた。過分極側で $Ca^{2+}$ オシレーション頻度は増強、一方、 $-10$  mV以下で消失した。
3. BKを投与したDT細胞では、膜電位過分極化と共に $[Ca^{2+}]_i$ は顕著に増加した。BKを投与しないDT細胞では、過分極化に伴う $[Ca^{2+}]_i$ 増加はわずかであった。
4. BKを投与したNIH/3T3細胞では、過分極化による $[Ca^{2+}]_i$ 増加は、わずかであった。
5. DT細胞内にIns(1, 3, 4, 5)P<sub>4</sub>、Ins(3, 4, 5, 6)P<sub>4</sub>、Ins(1, 3, 4, 6)P<sub>4</sub>をそれぞれ注入すると、外液に $Ca^{2+}$ が存在するときのみ持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 増加を示し、膜過分極で増強した。Ins(1, 4, 5)P<sub>3</sub>には $Ca^{2+}$ 流入作用はなかった。
6. NIH/3T3細胞では $IP_4$ による $Ca^{2+}$ 流入は一過性であった。

NIH/3T3細胞には微量ではあるが、もともと

過分極側で増強する $Ca^{2+}$ 流入経路があり、ras トランスフォーメーションおよびBK刺激によって、過分極性 $Ca^{2+}$ 流入は増強すると考えられる。この $Ca^{2+}$ 流入が $Ca^{2+}$ オシレーションの発現と維持に重要な働きをすると想定される(1)。さらに、この過分極性 $Ca^{2+}$ 流入機構には $IP_4$ が重要な働きをすることが示唆された(2)。

## [文献]

1. Hashii, M., Nozawa, Y. & Higashida, H. (1993) J. Biol. Chem. 268, 19403-19410.
2. Hashii, M., Hirata, M., Ozaki, S., Nozawa, Y. & Higashida, H. (1994) FEBS Lett. 340, 276-280.

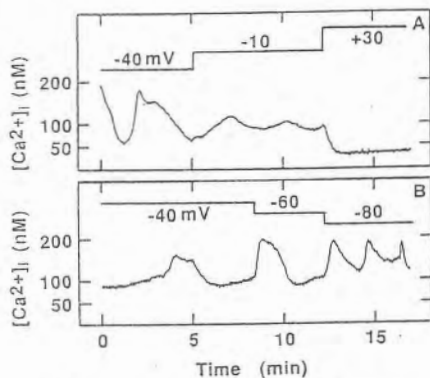


図1.  $Ca^{2+}$ オシレーション-膜電位関係 (DT)

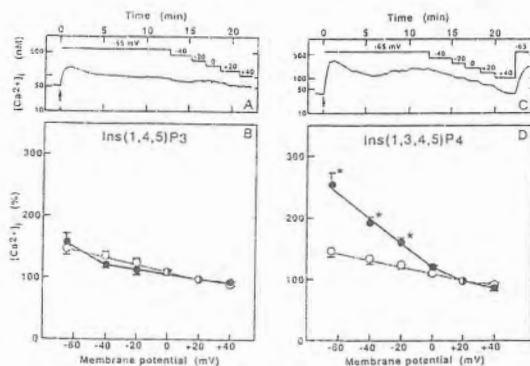


図2. DT膜過分極化による $[Ca^{2+}]_i$ 増加はIns(1, 3, 4, 5)P<sub>4</sub>を注入した場合に著明であった。

## 8. 診断研究部

### 1. 研究部一年の歩み

今年度（1993年4月～1994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。前年度に引き続き、兼任研究員、研究生の方々が多数参加され、研究上新たな展開をみる事が出来た。部長：中村俊；室長：萩野孝史，服部成介；流動研究員：中福雅人，室屋賢康，橋本裕子；STAフェロー：張聖（同仁大学医学部，中国）；科学技術庁非常勤職員：李紹巍（白球大学医学部，中国）；センター研究員：前川みどり，横田京子；センター研究助手：奥田 薫，高山明美；兼任研究員・森下卓（科技厅特別研究員），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），渡辺徳子（日本水産大学教授）；客員研究員：高橋征三（日本女子大学理学部化学科教授）；研究生：吉野温子（日本女子大学理学部助手），李 洪珍（白球大学医学部，中国），中川康史（東京大学医学部博士課程2年），田中伸哉（北海道大学医学部博士課程4年），後藤典子（東大医学部助手）；研究見習生：山崎典子（日本女子大学理学部化学科4年），角野文緒（日本女子大学理学部化学科3年）。

研究課題は、「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」，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2年度を迎えた。この研究は診断研究部が中核となり，国立精神・神経センター高次脳機能総合脳画像解析室（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以下の各研究発表及び研究報告を参照していただきたい。

（文責 部長 中村俊）

## II 研究業績

### 2. 研究業績

#### A. 論文

##### a. 原著

- 1) Kabir A, Kozasa T, Kaziro Y, Nakamura S:  
A mutation substituting valine for glycine at position 49 of Gs $\alpha$  induces neuronal differentiation of PC12 cells without an activation of adenylate cyclase.  
Cellular Signalling 5:443-452, 1993
- 2) Maekawa S, Maekawa M, Hattori S, Nakamura S:  
Purification and molecular cloning of an acidic protein enriched in growth cone from rat brain.  
J Biol Chem 268:13703-13709, 1993
- 3) Tanaka S, Hattori S, Kurata T, Nagashima K, Fukui Y, Nakamura S, Matsuda M:  
Requirement of both the SH2 and SH3 domains for neuronal differentiation of PC12 cells induced by human CRK protein.  
Mol Cell Biol 13:4409-4415, 1993
- 4) Maekawa M, Nakamura S, Hattori S:  
Purification of a novel ras GTPase-activating protein from rat brain.  
J Biol Chem 268:22948-22952, 1993
- 5) Hashimoto Y, Matuoka K, Takenawa T, Muroya K, Hattori S, Nakamura S:  
Different interactions of Grb2/Ash molecule with the NGF and EGF receptors in rat pheochromocytoma PC12 cells.  
Oncogene 9:869-875, 1994
- 6) Gotoh N, Toji A, Muroya K, Hashimoto Y, Hattori S, Nakamura S, Takenawa T, Yazaki Y, Shibuya M:  
Epidermal growth factor receptor-mutant lacking the autophosphorylation sites induces phosphorylation of Shc and association of Shc with Grb2/Ash, and retains mitogenic activity.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:167-171, 1994
- 7) Behar KL, Ogino T:  
Characterization of macromolecule resonances in the <sup>1</sup>H NMR spectrum of rat brain.

Magn Reson Med 30:38-44, 1993

- 8) Yamasaki K, Shirouzu M, Muto Y, Fujita-yoshigaki J, Koide H, Ito Y, Kawai G, Hattori S, Yokoyama S, Nishimura S, Miyazawa T:

Site-directed mutagenesis, fluorescence, and 2-dimensional NMR studies on microenvironments of effector region aromatic residues of human c-Ha-Ras protein.

Biochemistry 33:65-73, 1994

- 9) Tobe K, Matuoka K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Asai S, Noguchi T, Matsuda M, Tanaka S, Hattori S, Kadowaki T:

Insulin stimulates association of insulin receptor substrate-1 with the protein abundant Src homology/growth factor receptor-bound protein 2.

J Biol Chem 268:11167-11171, 1993.

- 10) Kobayashi M, Hashimoto N, Hoshino M, Hattori S, Iwashita S:

Differential contribution of M(r) 120 kDa ras GTPase-activating protein and neurofibromatosis type 1 gene product during the transition from growth phase to arrested state in human fibroblasts accompanied by a unique rasGTPase-activating activity.

FEBS Lett. 327:177-182, 1993.

#### b. 著 書

- 1) 荻野孝史, 矢野登志雄 :

*in vivo* NMR

新化学実験講座第20巻「機器分析概論」(東京化学同人)所収, 251-273, 1993

#### c. 総 説

- 1) 室屋賢康, 服部成介, 中村俊 :

細胞刺激に伴うRas活性化の測定法

実験医学 11: 91-94, 1993

- 2) 服部成介 :

チロシンキナーゼによるRas活性化のメカニズム

細胞工学 12: 638-643, 1993

- 3) 服部成介 :

ショウジョウバエの視覚細胞形成におけるRasシグナル伝達系の機能

実験医学 11: 75-78, 1993



## II 研究業績

### d. 班会議報告書

#### 1) 荻野孝史, 矢野登志雄 :

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

厚生省精神・神経疾患研究委託費：画像解析による高次脳機能障害の総合的研究班，平成5年度  
研究報告書，1994

#### 2) 服部成介 :

NFI遺伝子産物の同定とその細胞内局在

厚生省神経皮膚症候群調査研究班，

平成5年度研究報告書，1994

## B. 学会発表

### a. 特別講演，シンポジウム

#### 1) 荻野孝史 :

MRI, MRSの原理と脳研究への応用

「NMR法の現状と将来－医学，生物学への応用」

第3回岐阜薬科大学生物薬学研究所学術講演会

岐阜，11.28, 1993

#### 2) 松田道行, 田中伸哉, 森下卓, 橋本裕子, 服部成介, 中村 俊, 倉田 毅, 長嶋和郎 :

チロシンキナーゼからRasへ：CRK蛋白下流因子のクローニング

第16回日本分子生物学会年会

幕張，12.16, 1993

### b. 国際学会

#### 1) Hashimoto Y, Matuoka K, Takenawa T, Muroya K, Hattori S, Nakamura S :

Different interactions of Grb2/Ash molecule with the NGF and EGF receptors in rat pheochromocytoma PC12 cells.

Gordon Research Conference, Neurotrophins,

Plymouth State College, USA, July 28, 1993

#### 2) Hattori S, Maekawa M, Nakamura S :

Identification and purification of a novel Ras GTPase-activating protein (GAP) from rat brain.

Ninth Annual Meeting on Oncogenes,

Fredrick, Maryland, USA, June 23, 1993

- 3) Shirouzu M, Fujita-Yoshigaki J, Hattori S, Nishimura S, Yokoyama S:

Roles of amino acid residues in the regions adjacent to the effector region of human Ha-Ras protein.

Ninth Annual Meeting on Oncogenes,

Frederik, Maryland, USA, June 24, 1993

- 4) Kimura K, Hattori S, Kabuyama Y, Nakamura S, Fukui Y:

Wortmannin inhibits differentiation of PC12 cells.

Ninth Annual Meeting on Oncogenes,

Frederick, Maryland, USA, June 24, 1993

- 5) Tobe K, Matuoka K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Asai S, Matsuda M, Hattori S, Fukui Y, Akanuma Y, Yazaki Y, Takenawa T, Kadowaki T:

Insulin stimulates association of IRS-1 with ASH/GRB2

Ninth Annual Meeting on Oncogenes,

Fredreick, Maryland, USA, June 25, 1993

c. 一般学会

- 1) 橋本裕子, 松岡耕二, 竹縄忠臣, 服部成介, 中村 俊 :

タンパク質チロシンリン酸化を介するNGF作用伝達機構の解析

第66回生化学会年会, 東京, 10.2, 1993

- 2) 松田道行, 田中仲裁, 室屋賢康, 服部成介, 倉田 毅, 長嶋和郎, 中村 俊 :

CRKタンパクによるRasの活性制御

第66回生化学会年会, 東京, 10.3, 1993

- 3) 前川昌平, 松浦善治, 中村 俊 :

神経特異蛋白NAP-22の解析

第66回生化学会年会, 東京, 10.4, 1993

- 4) 後藤典子, 橋本裕子, 服部成介, 中村 俊, 渋谷正史 :

ヒトEGF受容体の自己リン酸化部位の検討ー自己リン酸化はシグナル伝達系の活性化と細胞増殖促進に必須ではない

第16回日本分子生物学会年会, 幕張, 12.19, 1993

## II 研究業績

- 5) 後藤典子, 室屋賢康, 服部成介, 中村 俊, 竹縄忠臣, 渋谷正史 :  
EGF受容体を介する情報伝達機構の解析  
第52回日本癌学会総会, 仙台, 10.5, 1993
- 6) 田中伸哉, 服部成介, 中村 俊, 長嶋和郎, 倉田 毅, 松田道行 :  
ヒトCRK前癌遺伝子産物による信号伝達  
第52回日本癌学会総会, 仙台, 10.5, 1993
- 7) 大仲功一, 矢野登志雄, 荻野孝史, 山口 明 :  
 $^{31}\text{P}$ -MRSによるヒト下腿筋の代謝的不均一性の観察  
第99回日本体力医学会関東地方会, 東京, 1.8, 1994
- 8) 高橋征三, 荻野孝史 :  
ラット脳内微量代謝成分のNMRによる解析  
第32回NMR討論会, 東京, 11.6, 1993
- 9) 高橋征三, 荻野孝史 :  
ラット脳のCH<sub>2</sub>次元相関NMRスペクトルの解析  
第21回日本磁気共鳴医学会大会, 筑波, 9.10, 1993
- 10) 花岡 繁, 矢野登志雄, 荻野孝史 :  
 $^{31}\text{P}$ -MRSによる小児脳成熟過程の評価  
第21回日本磁気共鳴医学会大会, 筑波, 9.10, 1993
- 11) 穴見公隆, 矢野登志雄, 高橋征三, 荻野孝史 :  
 $^{31}\text{P}$ -MRSによる小児脳成熟過程の評価  
第21回日本磁気共鳴医学会大会, 筑波, 9.9, 1993
- 12) 大仲功一, 山口 明, 矢野登志雄, 荻野孝史 :  
 $^{31}\text{P}$ -MRSによるヒト下腿筋の代謝的不均一性の研究～トレーニングによる変化～  
第21回日本磁気共鳴医学会大会, 筑波, 9.9, 1993
- 13) 大仲功一, 山口 明, 高島典弘, 出倉庸子, 矢野登志雄, 荻野孝史 :  
運動負荷時のヒト骨格筋の代謝特性の個人差について～ $^{31}\text{P}$ -MRSを用いた研究～  
第30回日本リハビリテーション医学会学術集会, 仙台, 5.10, 1993
- 14) 前川みどり, 中村 俊, 服部成介 :  
新たなRasGAP分子 (p100GAP) の精製  
第16回日本分子生物学会年会, 幕張, 12.19, 1993

- 15) 前川みどり, 中村 俊, 服部成介 :  
 新たなRasGAP分子 (p100GAP) の精製  
 第52回日本癌学会総会, 仙台, 10.5, 1993
- 16) 吉垣純子, 白水美香子, 服部成介, 古山俊介, 西村 暹, 横山茂之 :  
 Rasタンパク質のエフェクター領域C末端側領域の役割  
 第16回日本分子生物学会年会, 幕張, 12.19, 1993
- 17) 福田 真, 後藤由季子, 服部成介, 西田栄介 :  
 RasによるMAPキナーゼの活性化におけるRafの関与  
 第16回日本分子生物学会年会, 幕張, 12.19, 1993
- 18) 片桐晃子, 服部成介, 中村 俊, 山本 雅, 吉田 彪, 片桐拓也 :  
 HL-60細胞のマクローファージへの分化におけるGAP会合蛋白質分子群のチロシン磷酸化とrasの活性化  
 第52回日本癌学会総会, 仙台, 10.6, 1993
- 19) 片桐拓也, 高橋威夫, 福井泰久, 服部成介, 竹森利忠, 山本 雅, 高津聖志 :  
 $\gamma$ -Surrogate L Chains Complexを介したシグナル伝達におけるFynの機能  
 第52回日本癌学会総会, 仙台, 10.5, 1993
- 20) 木村幸太郎, 蕪山由己人, 志沢泰彦, 服部成介, 中村 俊, 松田 譲, 福井素久, 小野寺一清 :  
 PC12細胞の分化におけるPI3-kinaseの役割  
 第66回生化学会年会, 東京, 10.2, 1993

### C. 班会議発表

- 1) 荻野孝史 :  
 脳内代謝動態解析のための局在化NMR技術の開発  
 科学技術庁・生体の分子レベルにおける高感度・高分解能非破壊計測技術の開発に関する研究班,  
 東京, 11.27, 1994
- 2) 荻野孝史, 矢野登志雄 :  
 Brain functional NMR spectroscopyのための要素技術の開発に関する研究  
 厚生省精神・神経疾患研究委託費：画像解析による高次能機能障害の総合的研究班, 東京, 1.21,  
 1994
- 3) 荻野孝史 :

## II 研究業績

### 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, 10.4, 1993

#### 4) 荻野孝史, 矢野登志雄 :

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

厚生省精神・神経疾患研究委託費：画像解析による高次能機能障害の総合的研究班, 秋田, 9.24,  
1993

#### 5) 服部成介 :

NFI遺伝子産物の同定とその細胞内局在

厚生省神経皮膚症候群調査研究班,  
2.6, 東京, 1994

## 多能性神経幹細胞の増殖と分化の分子機構の解析

中福雅人, 中村 俊

哺乳動物の中樞神経系を構成する3種類の主要な細胞系列、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトはいずれも、胎児脳の神経上皮に存在する多分化能を有した「神経幹細胞」より発生すると考えられている。我々は中枢神経系の発生と分化の分子基盤を明らかにしていく手がかりとして、特にこの神経幹細胞に焦点をあてた研究を昨年よりはじめています。

まず分子レベルでの解析を進めていくための材料として、ラット胎児神経上皮より多数の不死化細胞株を樹立し、その性質の解析を行った。その結果、*in vitro*で上記3種類の細胞系列のいずれにも分化しうる細胞株が複数種得られた。これらの細胞株はいずれも、*nestin*、*vimentin*、*RC1*等の抗原マーカーを発現しており、また**bFGF**によってその増殖が促進されるなど、神経上皮細胞の性質をよく反映した表現型をもっている。これらの細胞株はエストロゲン受容体と *c-myc* との融合タンパク質 (*mycer*) の導入によって樹立されたものであるが、**bFGF** とともにこの *mycer* の活性化を引き起こすエストロゲンを培地に添加すると、幹細胞株の増殖は著しく促進され、非接着性の培養器中では多数の細胞よりなる凝集塊が形成される。この細胞凝集塊を接着性の培養器上で再培養すると、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの発生が誘導される。このことは、神経幹細胞の増殖あるいは分化の誘導に増殖因子からのシグナルとともに、細胞内での *c-myc* の活性化が重要な役割を果たしていることを示唆している。

現在、これら細胞株の増殖と分化の分子メカニズムの *in vitro*での解析をさらに進めるとともに、生体ラット脳組織への細胞株の移植・再導入の手法を用いた個体 (*in vivo*) レベルでの幹細胞の分化の解析を計画している。

## [文献]

1) Possible cooperative effect of *c-myc* and basic fibroblast growth factor on the proliferation and differentiation of a multipotential neural stem cell line. Nakafuku, M. and Nakamura, S (submitted).

Fig. 1 Growth Stimulation of the Multipotential Neural Stem Cell Line MNS-57 by bFGF and *c-myc*

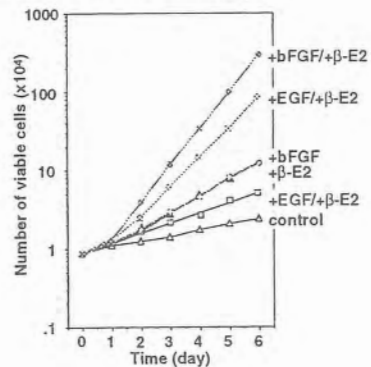
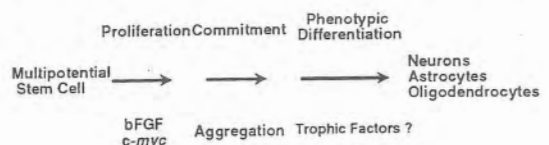


Table 1 Induction of Neural Differentiation of MNS-57 Cells by bFGF and *c-myc*

culture condition		MAP2 <sup>+</sup> cells/total number of cells counted			
β-E <sub>2</sub>	bFGF	exp. 1	exp. 2	exp. 3	ratio (%)
-	-	2/1856	1/1976	2/1358	0.10
+	-	2/1258	10/1522	10/1927	0.47
-	+	4/1631	10/2905	4/1602	0.29
+	+	132/1542	187/1379	179/1244	12.0

Fig. 2 Mutistep Processes of the Differentiation of Neural Stem Cells



## 新規Ras GTPase活性化因子の遺伝子クローニング

前川みどり, 李 紹巍, 岩松明彦\*, 森下 卓, 横田京子

今井嘉紀\*\*, 高坂新一\*\*, 中村 俊, 服部成介

(\*\*国立精セ・神経研・代謝, \*キリンビール基盤技術研究所)

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(2)。

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、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。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(2)。

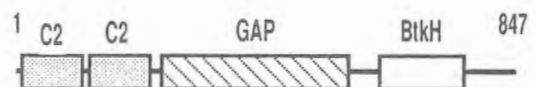
p100GAPの部分アミノ酸配列を決定しこ

の結果をもとに合成オリゴヌクレオチドをプローブとしてcDNAを単離しその全構造を決定した。予測された配列からこの遺伝子は847アミノ酸より構成される分子量97kDaの蛋白質を産生することが判明したが、この値はp100GAPの分子量に近い。GenBankに登録されている他の蛋白質との相同性を検討したところ、ショウジョウバエのGap1と全体にわたり高い相同性を示し、Gap1の哺乳動物相同遺伝子であることがわかり、Gap1<sup>m</sup>と名付けた。大腸菌内で産生したGap1<sup>m</sup>はGAP活性を示すこと、酵母内で酵母のGAP相同遺伝子であるira2の欠損を相補する活性も認めている。

Gap1<sup>m</sup>はさらにCキナーゼのリン脂質結合部位(C2領域)と相同な領域が2ヶ所認められ、細胞膜との相互作用を示唆する(図)。またヒトの遺伝性疾患であるX染色体連鎖生免疫不全症の原因遺伝子であるBtkチロシンキナーゼとも相同性を示す領域が存在し、共通の因子と相互作用する可能性が考えられる。以上の結果は単離Gap1<sup>m</sup>遺伝子が新規のRas GTPase活性化因子であることを明確に示したものである。

## [文献]

- 1) Hattori, S., Maekawa, M. & Nakamura, S. *Oncogene*, 7, 481-485 (1992).
- 2) Maekawa, M., Nakamura, S., & Hattori, S. *J. Biol. Chem.*, 268, 22948-22952 (1993)



## Brain Functional NMR Spectroscopy の開発 —ヒト脳の過呼吸負荷における代謝応答の検出—

穴見公隆, 矢野登志雄, 荻野孝史

### <目的>

NMR 法は、生体系の構造、機能、代謝に関する情報を同一個体について経時的に、かつ3次的に無侵襲、非破壊的に計測できる唯一の方法である。我々は人間の脳活動を構造、機能、代謝的側面から高感度、高分解能で検出し、高い時間、空間分解能で可視化、画像化するNMR技術を Brain Functional NMR Spectroscopy と名付け、その計測技術および周辺技術の開発を行っている。近年、ヘモグロビンを内因性の造影剤として脳局所の血流変化を水信号を介して検出することにより脳活動を画像化する機能磁気共鳴イメージング(MRI) が注目を浴びているがこれも Brain Functional NMR Spectroscopy 技術の応用の一つである。これに対して、本来のNMR 法の特徴である「化学分析」能力に注目するスペクトロスコピー (MRS) 法の立場からは、神経細胞の機能的活動を支えるエネルギー代謝、物質代謝、イオン輸送の変動を検出することにより、脳活動をより直接的に可視化・画像化することができる。しかしながら、水の1/100,000 以下の濃度でしか存在しない脳内の代謝物質のNMR 信号を測定するMRS 法では極めて高い検出感度を必要とする。さらに、多種類の代謝物質が同時に混在する生体を対象とする測定において相異なる代謝物質由来のNMR 信号を完全に分離検出できる高いスペクトル分解能も必要である。このような要請を満たす測定は、従来のMRI 測定技術の単純な延長によっては実現できない。

本研究では、脳波学的意義が確立されているにも関わらず、脳代謝への影響については完全に解明されていない過呼吸負荷に対するヒト脳の代謝応答を *in vivo* NMR スペクトロスコピー法で明らかにすると共に、脳賦活研究へのNMR 法の適用可能性について検討した。

### <方法>

ヒト(健康成人)脳のNMR 測定には、NCNPにおいて開発したわが国で臨床応用可能な最高静磁場強度を持つ2テスラヒト全身用NMR 装置を用いた。装置内で被検者を仰臥位とし、3-8分間の自発的過呼吸を行わせた。<sup>1</sup>HNMR スペクトルはMRI と共通の頭部用コイルを用いてSE法で局在化測定した。<sup>31</sup>PNMR スペクトルは自作した直径8cmのsurface コイルを被験者の右側頭-頭頂部に固定し、脳実質の信号が最大となるようにフリップ角を最適化した条件で測定した。surface コイルの信号検出領域はビオ・サヴァールの法則に基づきコイル検出感度を計算するプログラムを作成し、計算により求めた。

### <結果と考察>

ヒト脳の<sup>1</sup>HNMR測定により、過呼吸中に脳内乳酸濃度の増加が認められ、過呼吸後も高いレベル(数mM)を維持したままであった。脳内乳酸信号の同定は、乳酸メチル基のプロトンスピ結合に特異的なNMR シグナルのJ変調により確認した。以上の結果は、過呼吸によりヒト脳内で解糖系が活性化されていることを意味する。さらに、ヒト脳の<sup>31</sup>PNMR測定により、過呼吸負荷中にヒト脳内pHの上昇(動脈血pH上昇に比べて一桁低い)および、[PCr]の低下、[Pi]の上昇を認めた(図-1, 参照)。この結果は過呼吸により脳内エネルギー代謝の変動が起こっていることを意味する。過呼吸負荷による脳内pHの上昇に関してはこれまで報告があったが、エネルギー代謝の微少な変化は我々の2テスラ装置の感度、分解能により初めて明らかにすることができた。

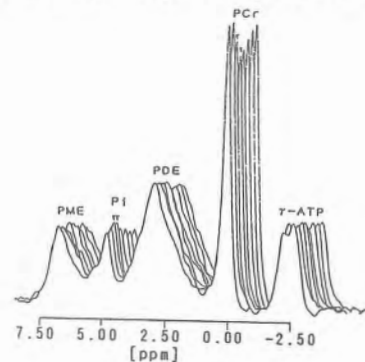


図-1. 過呼吸負荷前8分・中(矢頭)8分・後期12分におけるヒト脳の<sup>31</sup>P NMRスペクトル。4分間積算して得たスペクトルを右にずらしながら重ねて表示した。

これらの結果は、ヒト脳において低[CO<sub>2</sub>]が脳血管の収縮を引き起こし、pH上昇で生じるボーア効果と合わせて脳組織に虚血性低酸素状態を生じさせることを初めて実験的に明らかにしたものである。また、自発呼吸では過呼吸後もエネルギー代謝変動は速やかに回復せず数分間持続した。

脳神経細胞の活動にともない局所脳血流が増大するにも関わらずそれに応じて酸素消費量が増大せず血液ヘモグロビンの酸素化が変わることが機能MRIの根拠とされている。本研究で示されたように、解糖系の活性化による乳酸生成や高エネルギーリン酸化化合物動態を指標とすることにより、より直接的に脳活動の可視化・画像化が可能である。



## 9. 微細構造研究部

### 1. 微細構造研究部一年の歩み

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。

研究は埜中部長（併任）の下、加茂室長、菊池研究員、後藤研究員（武蔵病院・小児神経科医長併任）を中心として進められている。多くの研究生が所属しているが、Beatriz H Kiyomoto研究生が1年半の研究生活を終えブラジルに、山内洋子研究生がカナダに留学した。流動研究員は空席のままであったが、平成6年4月1日より2人増加の予定である。22人の研究生とともに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600以上の生検筋の組織学的、生化学的、DNA分析以来が全国よりあるが、その20%はミトコンドリア病に関するものである。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とを、さらに多くの例で明らかにした。また我々が見出したMELASの第2の変異（3271変異）をミトコンドリアDNA（-）のrho<sup>+</sup>細胞に導入し、本変異が生化学的欠損を惹起することも明らかにした。

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

本研究の小澤部長らとの共同研究で筋ジストロフィーハムスターにDAGのサブユニット50DAG、35DAGが欠損していることを明らかにした。この欠損は悪性肢帯型（三好）、severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy（SCARMD）でもみられるので、筋ジストロフィーハムスターはよいモデル動物と考えられた。

#### 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、リンパ球のpumping outに関与しているのではないかとする説もある。他に生理作用が存在するの否かは不明であった。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著しく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60-80kDaと100kDaの二因子によることが判明した。特異抗体を作製し既存のサイトカインとの相違について調べたが、交差反応を示すものはなく両者とも新しいサイトカインと考えられる因子であった。これらの因子は脳のミクログリアにも作用するので、脳内にも胸腺同様の産生機構があるのか検討中である。なお筋様細胞からはこれらの因子のほかにも数種のサイトカインが認められるので、これらの因子の解明も行っている。

## 2. 研究業績

## A. 論文

## a. 原著

- 1) Kamo I, Kikuchi A, Nonaka I, Yamada E, Kondo J:  
Haemopoietic activity associated with biglycan like proteoglycan  
Biochem Biophys Res Commun, 195:1119-1126, 1993
- 2) Kamo I, Kunishita T, Kikuchi A, Nonaka I, Komiyama A:  
Characterization of a macrophage lineage cell colony-stimulating factor produced by thymic myoid cells  
Immunology, 79:103-106, 1993
- 3) 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
- 4) Sakuta R, Goto Y, Nonaka I:  
An A-to-G transition at nucleotide pair 11084 in the ND4 gene may be an mtDNA polymorphism  
Am J Hum Genet, 53:964-965, 1993
- 5) Takemitsu M, Murayama K, Saga T, Michihiro N, Shiihara H, Kimizuka M, Nonaka I:  
Monomeric muscle atrophy  
Neuromusc Disord, 3:311-317, 1993
- 6) Takemitsu M, Nonaka I, Sugita H:  
Dystrophin-related protein in skeletal muscles in neuromuscular disorders: immuno-histochemical study  
Acta Neuropathol 85:256-259, 1993
- 7) Yamanouchi Y, Mizuno Y, Yamamoto H, Takemitsu M, Yoshida M, Nonaka I, Ozawa E:  
Selective defect in dystrophin-associated glycoproteins 50DAG (A2) and 35DAG (A4) in the dystrophic hamster: an animal model for severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMD)  
Neuromusc Disord, 4:49-54, 1994

II 研究業績

- 8) Nagai T, Tuchiya Y, Taguchi Y, Sakuta R, Ichiki T, Nonaka I:  
Fatal infantile mitochondrial encephalomyopathy with complex I and IV deficiencies  
*Pediatr Neurol* 9:151-154, 1993
- 9) Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y:  
Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect  
*Nature*, 364:532-535, 1993
- 10) Mizuno Y, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E:  
Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects  
*J Neurol Sci*, 119:43-52, 1993
- 11) Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E, Goto K, Koga R, Nonaka I, Sugita H, Arahata K:  
Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies.  
*J Neurol Sci*, 119:53-64, 1993
- 12) Yamamoto M, Mizuno Y, Nonaka I, Ozawa E:  
A dystrophin-associated glycoprotein, A3a (one of 43DAG doublets), is retained in Duchenne muscular dystrophy muscle  
*J Biochem*, 114:634-639, 1993
- 13) Arahata K, Hayashi YK, Koga R, Goto K, Lee JH, Miyagoe Y, Ishii H, Tsukahara T, Takeda S, Woo M, Nonaka I, Matsuzaki T, Sugita H:  
Laminin in animal models for muscular dystrophy. Defect of laminin M in skeletal and cardiac muscles and peripheral nerve of the homozygous dystrophic dy/dy mice  
*Proc Jpn Acad*, 69B:259-264, 1993
- 14) Yamamoto H, Mizuno Y, Hayashi K, Nonaka I, Yoshida M, Ozawa E:  
Expression of dystrophin-associated protein 35DAG (A4) and 50DAG (A2) is confined to striated muscles  
*J Biochem*, 115:162-167, 1994
- 15) Hayashi J, Ohta S, Takagi D, Miyabayashi S, Sakuta R, Goto Y, Nonaka I:  
Accumulation of mtDNA with a mutation at position 3271 in tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene introduced from a MELAS patient to HeLa cells lacking mtDNA results in progressive inhibition of

mitochondrial respiratory function.

Biochem Biophys Res Commun 197:1049–1055, 1993

- 16) Toda T, Segawa M, Nomura Y, Nonaka I, Masuda K, Ishihara T, Suzuki M, Tomita I, Origuchi Y, Ohno K, Misugi N, Sasaki Y, Takada K, Kawai M, Otani K, Murakami T, Saito K, Fukuyama Y, Shimizu T, Kanazawa I, Nakamura Y:  
Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33  
Nature Genet, 5:283–286, 1993
- 17) Matsumura K, Nonaka I, Tomé FMS, Arahata K, Collin H, Leturcq F, Recan D, Kaplan J-C, Fardeau M, Campbell KP:  
Mild deficiency of dystrophin-associated proteins in Becker muscular dystrophy patients having in-frame deletions in the rod domain of dystrophin  
Am J Hum Genet, 53:409–416, 1993
- 18) Matsumura K, Nonaka I, Campbell KP:  
Abnormal expression of dystrophin-associated proteins in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy  
Lancet, 341:521–522, 1993
- 19) Ishikawa T, Kitoh H, Awaya A, Nonaka I:  
Rapid cataract formation in Marinesco-Sjögren syndrome  
Pediatr Neurol, 9:407–408, 1993
- 20) Yoshinaga H, Ogino T, Ohtahara S, Sakuta R, Nonaka I, Horai S:  
A T-to-G mutation at nucleotide pair 8993 in mitochondrial DNA in a patient with Leigh's syndrome  
J Child Neurol, 8:129–133, 1993
- 21) Hori S, Ohtani S, Shimizu T, Ibi T, Sahashi K, Nonaka I, Miyamoto K, Tanabe H:  
Multiplicity of abnormal dystrophin in Becker muscular dystrophy. A Becker muscular dystrophy gene frequently produced two smaller sizes of dystrophin  
J Neurol Sci, 12:183–189, 1994
- 22) Tokunaga M, Mita S, Sakuta R, Nonaka I, Araki S:  
Increased mitochondrial DNA in blood vessels and ragged-red fibers in mitochondrial

II 研究業績

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

Ann Neurol, 33:275-280, 1993

- 23) Mizuno Y, Yoshida M, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E:  
Expression of utrophin (dystrophin-related protein) and dystrophin-associated glycoproteins in muscles from patients with Duchenne muscular dystrophy  
Muscle Nerve, 17:206-216, 1994
- 24) Onuma T, Adachi N, Katoh M, Ishida S, Sakuta R, Nonaka I:  
Studies of mitochondrial DNA in progressive myoclonus epilepsy (PME) and a case of atypical MELAS  
Jpn J Psychiat Neurol 47:315-317, 1993
- 25) Tsujino S, Shanske S, Nonaka I, Eto Y, Mendell JR:  
Three new mutations in patients with myophosphorylase deficiency (McArdle disease)  
Am J Hum Genet 54:44-52, 1994
- 26) Kawakami Y, Sakuta R, Hashimoto K, Fujino O, Fujita T, Hida M, Horai S, Goto Y, Nonaka I:  
Mitochondrial myopathy with progressive decrease in mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mutant genomes  
Ann Neurol 35:370-373, 1994
- 27) Iso A, Murakami N, Yoneyama H, Hanaoka S, Kurokawa T, Nonaka I:  
Idiopathic lactic acidemia with developmental delay and type I muscle fiber atrophy  
Brain Dev, 15:384-386, 1993
- 28) 齊藤 浩, 菊本 修, 山脇成人, 片山禎夫, 作田亮一, 桒中征哉:  
発症初期に神経性食欲不振症と考えられたKearns-Sayre症候群の一例  
臨床精神医学, 23:93-97, 1994
- 29) 伊藤昌弘, 浅野 優, 下平雅之, 岩川善英, 後藤雄一, 桒中征哉:  
酸性マルターゼが正常な糖原病 (lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase) の一例  
脳と発達, 25:459-464, 1993
- 30) 米山 均, 河野義恭, 桒中征哉:  
強直性脊椎症候群 (rigid spine syndrome) の一例 -筋病理について-

脳と発達, 25 : 374-378, 1993

b. 著 書

1) 埜中征哉 :

臨床のための筋病理, 日本医事新報社, 東京, 1993

c. 総 説

1) 埜中征哉 :

ミオグロビン尿症 —原因となる代謝異常—

小児科診療, 56 : 740-744, 1993

2) 埜中征哉 :

進行性筋ジストロフィー

現代医療, 26 : 109-114, 1994

3) 埜中征哉 :

神経・筋疾患と遺伝子変異 —病態解明と診断への応用

最新医学, 48 : 487-492, 1993

4) 長谷川ひとみ, 埜中征哉 :

MELAS症候群

神経眼科, 11 : 29-33, 1994

5) 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 : 557-563, 1993

6) 後藤雄一, 埜中征哉 :

ミトコンドリア病とミトコンドリアDNA異常

臨床分子医学, 1 : 446-452, 1993

7) 後藤雄一 :

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy lactic acidosis, and stroke-like episodes)  
の病態と遺伝子異常

日本臨床, 51 : 2373-2378, 1993

8) 後藤雄一 :

日本におけるMELAS

臨床科学, 30 : 383-388, 1994

## II 研究業績

### 9) 後藤雄一, 埜中征哉 :

ミトコンドリア脳筋症

Clinical Neuroscience, 12 : 451-454, 1994

### 10) 村上信行, 埜中征哉 :

Duchenne型筋ジストロフィーとBecker型筋ジストロフィーの臨床概念

神経内科, 40 : 130-136, 1994

## d. 班会議報告書

### 1) 埜中征哉, 竹光正和 :

主要組織適合抗原の異なる筋芽細胞の移植実験

平成5年度厚生省精神・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報告書 69-72, 1994

### 2) 埜中征哉, 山内洋子, 水野裕二, 山本秀子, 吉田幹晴, 竹光正和, 小沢鉄二郎, 日置恭司, 斎藤宗雄 :

筋ジストロフィーハムスター骨格筋におけるジストロフィン結合蛋白の異常

平成5年度厚生省精神・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報告書 73-78, 1994

### 3) 埜中征哉, 作田亮一, 松岡太郎, 後藤雄一 :

ゲルマニウムラットにおけるCoQ<sub>10</sub>治療効果の検討

平成5年度厚生省・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報告書, 1994

### 5) 加茂 功, 菊池愛子, 埜中征哉, 寺西 豊, 山田 英, 近藤 淳, 高橋和展, 鈴木淳子 :

胸腺間質細胞からの新しいマクロファージ系細胞分化増殖遺伝子の同定と生体防御への応用

平成4年度ヒューマンサイエンス基礎研究事業官民共同プロジェクト研究報告  
第4分野健康保持の基礎としての生体防御機構の解明 9-11, 1993

### 6) 後藤雄一, 村上信行, 埜中征哉 :

Danon disease (lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase) の膜異常について

平成5年度厚生省精神・神経疾患研究委託費 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報告書 32-34, 1994

### 7) 後藤雄一, 埜中征哉, 宝来 聡, David A Clayton :

ミトコンドリアチロシン転移RNA遺伝子近傍の挿入変異とミトコンドリア病との関係

平成5年度厚生省精神・神経疾患研究委託費 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報告書 168-169, 1994

8) 宝来 聡, 榎根一夫, 後藤雄一, 作田亮一, 桝中征哉:

MELASにおけるミトコンドリアDNAの変異

平成5年度厚生省精神・神経疾患研究委託費 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報告書 159-162, 1994

9) 内野 誠, 箕田修治, 徳永 誠, 安藤正幸, 桝中征哉:

MELASの筋病理における変異mtDNAの役割

平成5年度厚生省精神・神経疾患研究委託費 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報告書 163-164, 1994

10) 太田成男, 鷺見正人, 吉田賢右, 桝中征哉, 作田亮一, 林 純一:

ミトコンドリア脳筋症MELASにおける複合体形成異常

平成5年度厚生省精神・神経疾患研究委託費 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報告書 165-168, 1994

## B. 学会発表

### b. 国際学会

1) Goto Y, Nonaka I, Horai S, Hayashi J-I, Marie SKN:

Evidence for the 3271 mutation in the mitochondrial transfer RNA gene relating to mitochondrial encephalomyopathies.

Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, New Orleans, USA, 1993

### c. 一般学会

1) 加茂 功, 菊池愛子, 山田 英:

プロテオグリカン1 (ピグリカン) 様因子によるモノサイト系細胞の分化増殖

第52回日本癌学会総会, 仙台, 10.5, 1993

2) 作田亮一, 後藤雄一, 桝中征哉, 宝来 聡, 一木 貴:

ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリアDNA変異: ND4サブユニットの点変異(塩基番号11084)の検討

第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993



## II 研究業績

- 3) 作田亮一, 後藤雄一, 桒中征哉, 宝来 聰 :  
ミトコンドリアDNA3243点変異による症状多様性  
第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.17, 1993
- 4) 竹光正和, 荒畑喜一, 桒中征哉 :  
X線照射されたmdxマウスに対する筋芽細胞移植の試み  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993
- 5) 村上信行, 里吉宮二郎, 桒中征哉, 竹光正和 :  
封入体筋炎の位置づけ (DMRVとの比較を中心として)  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993
- 6) 村上信行, 秋山千枝子, 桒中征哉 :  
神経筋疾患におけるcytoplasmic bodyおよびspheroid bodyの形態発生に関する一考察  
第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.18, 1993
- 7) 斎藤陽子, 桒中征哉 :  
ミオチューブラーミオパチー筋の抗デスミン抗体に対する酸前処理後の染色性の変化  
—ラット再生筋の筋芽細胞との比較—  
第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.18, 1993
- 8) 秋山千枝子, 桒中征哉 :  
ネマリンミオパチーの長期予後  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993
- 9) 村山恵子, 児玉真理子, 児玉和夫, 桒中征哉, 村山繁雄 :  
Early-onset combined (軸索変性+脱髄) sensorimotor neuropathy  
—神経学的, 神経生理学的, 神経病理学的検討  
第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.18, 1993
- 10) 田辺雄三, 牧野道子, 金澤正樹, 桒中征哉 :  
ミトコンドリアDNA点変異 (塩基番号3243) を有し明らかな中枢神経障害を認めなかったミトコ  
ンドリアミオパチーの一例  
第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.17, 1993
- 11) 服部優子, 水野美邦, 後藤雄一, 作田亮一, 桒中征哉, 宝来 聰 :  
欠失のない慢性進行性外眼筋麻痺患者 (CPEO) におけるミトコンドリアtRNA遺伝子の検討  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993

- 12) 箕田修治, 徳永 誠, 熊本俊秀, 安藤正幸, 作田亮一, 埜中征哉 :  
MELASにおける変異ミトコンドリア (mt) DNAの検討  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.10, 1993
- 13) 佐橋 功, 衣斐 達, 堀真一郎, 清水輝夫, 宮本和人, 田邊 等, 埜中征哉 :  
Becker型筋ジストロフィー (BMD) における異常ジストロフィンの解析  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.9, 1993
- 14) 鈴木正彦, 中林治夫, 埜中征哉 :  
低K血症に伴うミオパチーの臨床病理学的研究  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.9, 1993
- 15) 広瀬隆一, 長谷川ひとみ, 大部 誠, 角田令子, 作田亮一 :  
びまん性甲状腺腫を伴ったMELASの1家系  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.11, 1993
- 16) 大塚美恵子, 植木 彰, 藤井幹久, 作田亮一, 埜中征哉 :  
肥大心筋症、糖尿病、難聴を主症状としたミトコンドリアDNA3243番点変異を示した一同胞例  
第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.11, 1993
- 17) 須田真津子, 山内秀雄, 岩崎裕治, 須貝研司, 村上信行, 作田亮一, 埜中征哉, 宝来 聰 :  
ミトコンドリアDNA8344点変異 (MERRFに特異的な変異) をもつ症例の臨床的検討  
第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.17, 1993
- 18) 萩原正明, 星加明德, 松野哲彦, 宮島 祐, 王 傳育, 三輪あつみ, 埜中征哉, 伊藤政孝, 鶴井聰, 杉江秀夫 :  
Phosphoglycerate kinase欠損症の1例  
第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.18, 1993
- 19) 沢石田由記夫, 早坂 清, 後藤敦子, 高田五郎, 須貝研司, 埜中征哉 :  
Congenital hypomyelination neuropathyの病態に関する検討  
第35回日本小児神経学会総会, 京都, 6.18, 1993
- 20) 後藤雄一, 埜中征哉, 宝来 聰, SKN Marie :  
ミトコンドリアDNA3271 (T→C) 変異を有するブラジルの一家系  
第38回日本人類遺伝学会, 東京, 10.22, 1993

## c. 班会議発表

- 1) 埜中征哉, 竹光正和 :

## II 研究業績

### 主要組織適合抗原の異なる筋芽細胞の移植実験

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5年度班会議，東京，12.1，1993

### 2) 桒中征哉，山内洋子，水野裕司，山本秀子，吉田幹晴，小沢鉄二郎，日置恭司，斎藤宗雄：

#### 筋ジストロフィーハムスター骨格筋におけるジストロフィン結合蛋白の異常

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5年度班会議，東京，12.1，1993

### 3) 桒中征哉，作田亮一，松岡太郎，後藤雄一：

#### ゲルマニウムラットにおける CoQ<sub>10</sub> 治療効果の検討

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5年度班会議，東京，2.26，1994

### 4) 加茂 功，菊池愛子，桒中征哉，寺西 豊：

#### 胸腺筋様細胞が産生するマクロファージ系細胞コロニー刺激因子について

ヒューマンサイエンス振興財団・官民共同プロジェクト研究第4分野

免疫系による生体防御機構の解明と新規成体調節物質の開発班班会議，東京，1.17，1994

### 5) 後藤雄一，村上信行，桒中征哉：

Danon disease (lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase) の膜異常について

厚生省精神・神経疾患研究委託費，筋ジストロフィー及び類縁疾患の病態と治療法に関する研究班，平成5年度班会議，東京，12.3，1993

### 7) 後藤雄一，桒中征哉，宝来 聡，David A Clayton：

#### ミトコンドリアアチロシン転移RNA遺伝子近傍の挿入変異とミトコンドリア病との関係

厚生省精神・神経疾患研究委託費，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班，平成5年度班会議，東京，12.3，1993

### 8) 後藤雄一：

#### ミトコンドリア脳筋症に関する最近の研究の進歩

厚生省精神・神経疾患研究委託費，「筋ジストロフィー」総合班会議，東京，1.25，1994

### 9) 後藤雄一：

#### ミトコンドリア病における血管異常と遺伝子変異

厚生省循環器病研究委託費，心臓・血管病に関する分子遺伝学的研究班，

平成5年度班会議，大阪，2.1，1994

- 10) 宝来 聰，梅根一夫，後藤雄一，作田亮一，埜中征哉：

MELASにおけるミトコンドリアDNA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類縁疾患の病態と治療法に関する研究班，平成5年度班会議，東京，12.3，1993

- 11) 内野 誠，箕田修治，徳永 誠，安藤正幸，埜中征哉：

MELASの筋病理における変異mtDNAの役割

厚生省精神・神経疾患研究委託費，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班，平成5年度班会議，東京，12.3，1993

- 12) 太田成男，鷺見正人，吉田賢右，埜中征哉，作田亮一，林 純一：

ミトコンドリア脳筋症MELASにおける複合体形成異常

厚生省精神・神経疾患研究委託費，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班，平成5年度班会議，東京，12.3，1993

- 13) 宝来 聰，後藤雄一，作田亮一，埜中征哉：

ミトコンドリア脳筋症・MELASにおけるDNAの変異の解析

文部省重点領域研究「単一遺伝子病」平成5年度会議，東京，12.6，1993

- 14) 宝来 聰，梅根一夫，後藤雄一，作田亮一，埜中征哉：

ミトコンドリア脳筋症・MELASにおけるDNAの変異の解析

文部省重点領域研究「神経難病における神経細胞死の機序と修復・防御」班，東京，12.16，1993

## 胸腺筋様細胞が産生するリンフォカイン

加茂 功, 岩上 登、菊池愛子, 埜中征哉

胸腺固有の機能発現には胸腺内に存在する種々の間質系細胞が重要な作用をすることが指摘されている。個体レベルの発達にともない胸腺内間質細胞構成にも変化が見られる。脊椎動物の胸腺内には筋様細胞(myoid cell)が胎生期に多く存在し、出生後減少する傾向にある。これまで本細胞の機能としてはその収縮性を利用し胸腺リンパ球のpumping outに作用するとする考え方があったが、胸腺がより大きくなる生誕後に減少するという点を考慮すると、他に生理的機能があるのではないかと考え、筋様細胞をクローン化し、生理活性因子に注目し分離同定を行ってきた。これまで二種の新しいタイプのマクロファージ系細胞の分化増殖因子を分離精製することが出来た。いずれも既存のサイトカインとは異なる因子であった。筋様細胞の培養上清にはこれらの因子によるモノサイト系細胞の分化増殖を促す作用ばかりでなくT細胞の分化増殖を誘導する活性もみられたのでその因子を同定することを試みた。

## 材料と方法

ウイスターラット胸腺由来871207B筋様細胞を人工合成培地(RPMI 1640 + ITS)で4日間培養し、培養上清を濃縮し、DEAE Sepharose CL6B, Heparin Sepharoseカラム等を使用し、部分分画をおこなった。分画画分は、PNA(-)胸腺細胞、サイトカイン依存性細胞、中和抗体、RT-PCR法等を用いて活性因子の同定を行った。

## 結果と考察

胸腺筋様細胞の培養上清を胸腺リンパ球に添加して培養すると、PNA(+ )には全く作用しないが、PNA(-)には増殖活性をしめた(Fig. 1)。DEAE-Sepharose CL-6Bで分画を試みると、結合画分はD10N4M細胞に対して増殖反応をしめた。この活性は抗IL-1 alpha抗体で中和された。また、RT-PCR法により、IL-1 alphaのmRNAの発現を産生細胞に見いだした。DEAEカラム通過画分をさらにHeparin-Sepharoseカラムで、通過画分、部分的結合画分、0.5M NaCl溶出画分に分画できた。通過画分にはマクロファージ系細胞増殖活性が認められた。部分的に結合する画分にはIL-6依存性細胞MH60が反応し、筋様細胞にもRT-PCR法

により、IL-6 mRNAの発現を検出できた。0.5M NaClで溶出される活性は抗IL-7抗体により活性が中和された。以上の結果から、胸腺筋様細胞はマクロファージ系の細胞に対する新しい分化増殖因子の他にも、IL-1, IL-6, IL-7などのサイトカインを産生し、T細胞の分化増殖にも直接関与していることが明確になった。新たに見いだされたマクロファージ系細胞増殖因子とIL-1, IL-6, IL-7等の組合せには未知の作用が期待できるものと思われる。

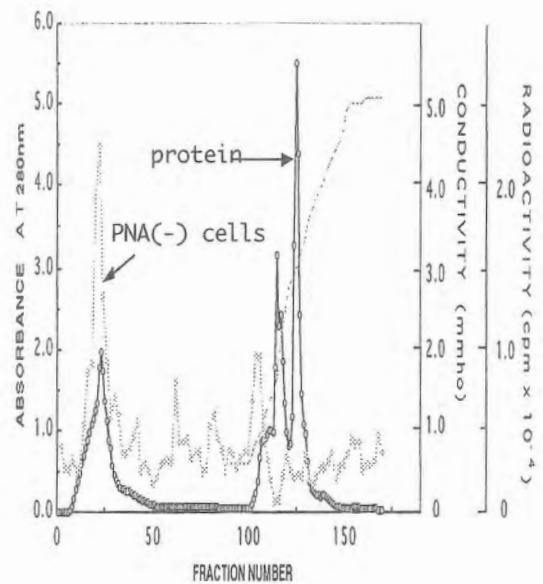


Fig. 1 Profile of DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography of myoid cell culture supernatant. PNA(-) thymocytes were used for proliferation assay.

## 筋様細胞由来コロニー刺激因子の免疫・生化学的研究

菊池愛子, 加茂 功, 埜中征哉

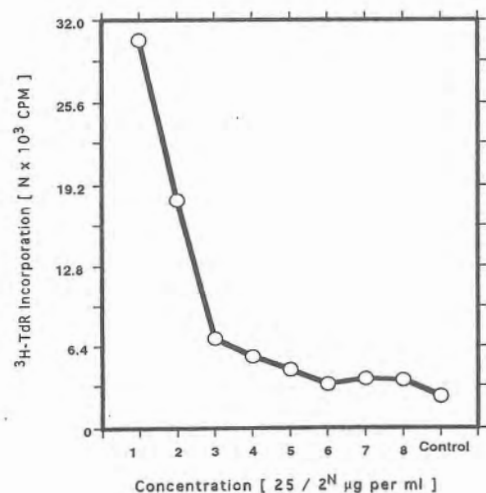
昨年本報において、私たちは、胸腺筋様細胞が産生する二種のマクロファージコロニー刺激因子を新たに見だし、それらの因子のマイクログリアに対する作用を検討し報告した。その因子の一つ、分子量100kについては、ビグリカン様の物質であることが判明したものの、当該の物質にはその活性は知られておらず、また既存の高分子M-CSFとは分子サイズや精製パターンがよく似ているため、私達の活性画分への混在が問題となった。

今回は、100k因子の抗ペプチド抗体を作成し、因子の精製標品の異なるタンパク混入や活性画分の物質確認を行った。

**[方法]増殖アッセイ：**ラット腹腔浸出細胞4,000個を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、Sephrose CL6B, Hydroxyapatite, Con A/Blue-Sephrose, Toso G-4000SW、Reversed phase HPLC等で精製した標品を用いた。**抗ペプチド抗体の作成とcDNA クローニング：**精製標品のアミノ酸分析結果から、合成ペプチドを作成し、家兔に免疫してペプチドカラムアフィニティーで抗体を精製した、また、合成DNAプライマーを作成し、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した。

**[結果と考察]** 抗100kペプチド抗体と、キリン研究所から分与頂いた抗ヒトM-CSF抗体を用いて、1。100k産生細胞7Bと、M-CSFを産生することが知られているマウスL929細胞を対象にして、夫々免疫染色を行ったところ、抗

100kペプチド抗体は7Bのみ、抗M-CSF抗体はL-929のみを染色し、互いに相異なる、物質産生を示した。2。精製標品をドットプロット法で調べたところ、私たちの100k因子は、抗100kペプチド抗体とのみ反応し、マウスL929細胞の培養上清DEAE精製標品は、抗ヒトM-CSF抗体と種を超えて反応するが、抗100kペプチド抗体との反応は検出限界以下であった。3。ウエスタンプロット法で調べると、同様に、100k、L929由来の精製標品には互いに共通なモチーフは見い出せなかった。4。抗ペプチド抗体でアフィニティカラムを作成し、100k画分を精製した。そのアフィニティカラム精製物の希釈列を作り培養系に加え、そのサイミジンの取り込みを調べたところ、量依存的な反応を示した。(下図)。従って、私達がみいだした活性が、この精製標品に由来することが、強く支持された。5。100k-cDNAクローンをプローブとして、ノーザンプロット法により産生細胞での発現を確認した。



## ミトコンドリアチロシン転移 RNA 遺伝子近傍の挿入変異

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) に特異的とされる3243変異が CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia) 患者にも存在することが知られている。同一変異が、明らかに異なる臨床病型を表現する理由を明らかにするために、3243変異を持つCPEO患者 (OS例) について、mtDNA内の他の部位に変異がないかどうかを検討した。その結果OS例は、3243変異とともにチロシン転移RNAとCOIサブユニットの間に約10塩基の挿入変異を有していた。今回は、この挿入変異のミトコンドリア病患者と正常コントロールでの頻度を調べ、そのミトコンドリア病との関係を検討した。

## 対象と方法

新たに発見できた挿入変異を検出するには、PCR法を用いた。対象は、mtDNAに欠失のあるCPEO患者58例 (うち3例は多重欠失)、欠失のないCPEO患者24例、3243変異を有するMELAS患者68例、および3243変異を有するミオパチー患者4例である。

## 結果

## 1. CPEO患者での挿入変異の頻度

サザン法で欠失のあった58例には1例も認めなかった。欠失のない24例のうち、3243変異を有する2例にこの挿入変異を認め、残りの3243変異を持たない22例には認めなかった。

## 2. 3243変異を有する患者の挿入変異の頻度

典型的な臨床症状と筋病理所見を示したMELAS患者68例の中に3例の挿入変異を有する例を認めた。また、3243変異を持ちながら、ミオパチーのみの4例には認めな

かった。

## 3. 正常コントロールでの挿入変異の頻度

Horaiらは、日本人116例を対象に種々の制限酵素を用いた切断パターンを調べている。今回の挿入変異は、HaeIIIを用いた多型の検討で1例に認めている。

## 考察

臨床病型がCPEOであるのに、3243変異を有するOS例が見つかった時、われわれは、(1)3243変異をもつ変異型ゲノムが、MELASの症状を引き起こす程十分な量がない可能性 (量の問題) と、(2) 別のCPEOを引き起こす異常の方が、MELASを引き起こす3243変異よりも大きい効果を持った可能性 (質の問題) を考えた。今回の研究では、mtDNAの中に、新たに挿入変異が見い出された。しかし、最も重要なことは、この挿入変異が質的異常たりうるかという点である。

その点を検証するために、多くの症例と正常コントロールでの頻度を検討した。その結果、3243変異を有するCPEO例2例ともにこの挿入変異を認めた。この事実は、挿入変異の病気への関わりを強く示唆した。しかし、次の2つの点で、病気への関わりを疑わせることになった。(1)典型的MELASの症状をもつ患者2例 (2/68) にこの挿入変異を有する例が見つかった。(2)正常コントロールの中の1例 (1/116) にこの挿入変異が見つかった。

したがって、現在のところこの挿入変異が質的異常たりうるかという問題の結論はでていない。さらに詳細な細胞生理学的な発現研究をおこない、この問題を追及する必要がある。

## Cardiomyopathy with MR and vacuolar myopathy の膜異常について

村上信行, 後藤雄一, 埜中征哉

## 【はじめに】

本症は1981年にDanonらにより最初に報告された遺伝性疾患である。臨床症状は肥大型心筋症, 精神発達遅滞, 近位筋の筋力低下および高CK血症である。本症の筋病理所見では, 筋線維内に多数の小空胞を有し, 空胞内に糖の蓄積が認められる。また, 電顕的には糖を含む自己貪食胞の集積が認められる。本症と同様の症例が報告されているが, その病因は未だ明らかにされていない。

## 【対象と方法】

対象は国立精神・神経センターにて臨床症状, 組織化学および生化学的に本症と診断した3例である。この3例について組織化学, 電顕および免疫組織化学的に検討した。

## 【結果】

HE染色では, 筋線維の大小不同に加えて, 好塩基性の顆粒を含む小空胞を有する筋線維が散在性に認められた。時に, 筋鞘膜の陥入が認められた。PAS染色では小空胞にわずかな糖の蓄積が認められた。非特異エステラーゼ(NSE)およびアセチルコリンエステラーゼ(AChE)染色では, 空胞および筋鞘膜の陥入部に両酵素が高活性であった。電顕所見では, 多くの空胞が単位膜と基底膜により境界されていた。この中に自己貪食胞や細胞質の変性産物が認められた。時に, 筋鞘膜の陥入が認められ, この中に単核細胞が認められた。ジストロフィン, ジストロフィン結合糖蛋白, ラミニンおよび4型コラーゲンについての免疫染色では, 空胞および陥入部に陽性所見が認められた。しかし, 4型コラーゲン陽性空胞は他の免疫染色の陽性空胞に比して頻度の少ないものであった。また, ジストロフィン関連蛋白の免疫染色では極弱い反応が認められた。これらの免疫染色において, よく空胞と筋鞘膜が陥入により連続する像が認められた。

## 【考察】

組織化学的にはHE染色で筋線維内に好塩基性の顆粒を有する小空胞が多数認められた。また, 時に筋鞘膜の陥入が認められた。糖原病II型と異なり, 小空胞を有する筋線維のPAS陽性物質の蓄積はごく少量であった。また, 酸フォスファターゼ活性の上昇もわずかであった。これに対して, NSEおよびAChE染色では本症の空胞および膜陥入部は共に高活性を示し, よくこれらを描出するものであった。すなわち, これは本症の組織化学的特徴である。電顕所見において本症の空胞の多くは単位膜と基底膜によって境界されており, この中に自己貪食胞および細胞質の変性産物が認められた。本症の空胞膜および陥入膜の特性を検討するために免疫染色を行った。ジストロフィン結合糖蛋白は筋鞘膜の細胞骨格であり, 50kDaと43kDaのジストロフィン結合糖蛋白は筋鞘膜の膜貫通蛋白とされている。本症の空胞膜にジストロフィンおよびジストロフィン結合糖蛋白免疫染色において陽性所見が認められた。すなわち, 本症の空胞膜は筋鞘膜の特徴を有するものである。また, ラミニンおよび4型コラーゲンは, 基底膜の主な構成成分である。ラミニンおよび4型コラーゲン免疫染色において本症の空胞膜に陽性所見が認められたことから, 本症の空胞膜は基底膜の特徴も有するものであった。

本症の空胞膜は, 糖原病II型とは異なり, 筋鞘膜および基底膜の特徴を有していた。また, この基底膜はAChEをも含んでいた。このことから, 本症の空胞膜は神経筋接合部または筋腱接合部に似るものであると考えられた。また, 小空胞と筋鞘膜が陥入により連続する像が認められることから, 本症の空胞形成には膜の陥入を引き起こすような膜の異常が関与するものと考えられた。



## 10. 機能研究部

### 1. 研究部1年の歩み

平成5年において当研究部で研究に携わったのは小沢鉄二郎，吉田幹晴，萩原康子，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），野口 悟（流動研究員）であり，前垣圭津と斎藤和江がこの補助に当たった。その他客員研究員として斎藤加代子（東京女子医科大学小児科学教室，講師）が参加した。

常勤の研究員として林謙介が，4月1日より群馬大学医学部行動医学研究施設行動分析学教室助手として転出した。山本秀子は7月31日付けで退職して姫路工業大学理学部物質科学科化学分析研究室へ転務した。

研究テーマとしては，昨年度に続き筋ジストロフィーの成因と治療とを取り上げた。

病因研究としては結合タンパク質の研究を行ない，(1)結合タンパク質のうち糖タンパク質はジストログリカン複合体と，サルコグリカン複合体とに分けることができること，(2)ジストログリカン複合体のうち43DAGはジストロフィンと，156DAGは基底膜成分のラミニンと結合しているので，この複合体は，細胞内に存在するジストロフィンと，細胞外のラミニンとを結ぶ架橋体の役割を果たしていること，サルコグリカン複合体は細胞膜タンパク質であるが直接にはジストログリカン複合体に結合するものの，他の成分とはついていないこと，(3)サルコグリカン複合体は骨格筋と心筋にしか存在しないこと，(4)筋ジストロフィーではジストログリカン複合体は減少するにしても著しくはないのに反して，サルコグリカン複合体は著しく減少すること，(5)SCARMDジストロフィーではこの傾向が徹底していることから，サルコグリカン複合体の減少がジストロフィンの病態形成に重要であることを明らかにした。また治療の基礎実験として，遺伝子の細胞内への取り込み実験を行なった。

小沢は厚生省精神・神経研究委託費による筋ジストロフィー研究連絡協議会運営幹事及び本年度から開始された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の班長を勤めた。

なお小沢は平成6年3月1日を以て所長に就任した。

（部長事務取扱 小沢鉄二郎）

## 2. 研究業績

## A. 論文

## a. 原著

- 1) Yoshida M, Mizuno Y, Nonaka I, Ozawa E:

A dystrophin-associated glycoprotein, A3a (one of 43DAG doublets), is retained in Duchenne muscular dystrophy muscle

J Biochem, 114:634-639, 1993

- 2) Hayashi K, Hagiwara Y, Ozawa E:

Vimentin expression pattern is different between the flank region and limb verregions of somatopleural mesoderm in the chicken embryo

Develop Growth Differ, 35:301-309, 1993

- 3) Mizuno Y, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E:

Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects.

J Neurol Sci, 119:43-52, 1993

- 4) Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Hirai S, Ozawa E:

Distribution of dystrophin isoforms and dystrophin-associated proteins 43DAG (A3a) and 50DAG (A2) in various monkey tissues

J Biochem, 114:936-941, 1993

- 5) Mizuno Y, Yoshida M, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E:

Expression of utrophin (dystrophin-related protein) and dystrophin-associated glycoproteins in muscles from patients with Duchenne muscular dystrophy

Muscle Nerve, 17:206-216, 1994

- 6) Yamamoto H, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Ozawa E:

Heterogeneity of dystrophin-associated proteins

J Biochem, 114:132-139, 1993

- 7) Yamamoto H, Mizuno Y, Hayashi K, Nonaka I, Yoshida M, Ozawa E:

Expression of dystrophin-associated protein 35DAG (A4) and 50DAG (A2) is confined to striated muscles

J Bioche, 115:162-167, 1994

II 研究業績

- 8) Iwata Y, Nakamura H, Mizuno Y, Yoshida M, Ozawa E, Shigekawa M:  
Defective association of dystrophin with sarcolemmal glycoproteins in the cardiomyopathic hamster heart  
FEBS Lett, 329:227-231, 1993
- 9) Arahata K, Hayashi KY, Mizuno Y, Yoshida M, Ozawa E:  
Dystrophin-associated glycoprotein and dystrophin co-localisation at sarcolemma in Fukuyama congenital muscular dystrophy  
Lancet, 342:623-624, 1993
- 10) Yamanouchi Y, Mizuno Y, Yamamoto H, Takemitsu M, Yoshida M, Nonaka I, Ozawa E:  
Selective defect in dystrophin-associated glycoproteins 50DAG (A2) and 35DAG (A4) in dystrophic hamster: An animal model for severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMD)  
Neuromusc Disord, 4:49-54, 1994
- b. c. な し
- d. 班会議報告書
- 1) 小沢鎧二郎:  
筋細胞の系譜とファイバータイプの決定機構  
平成3～5年度文部省総合研究, 筋形成の分子機構成果報告書 21-25, 1994
- 2) 小沢鎧二郎, 鈴木 厚, 吉田幹晴, 林 謙介, 水野裕司, 萩原康子:  
形質膜結合部位におけるジストロフィンと結合タンパク質群との相互作用  
厚生省精神・神経疾患研究委託費, 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 平成5年度研究報告書 1-7, 1994
- 3) 田之倉優, 鈴木 厚, 野口 悟, 小沢鎧二郎:  
ジストロフィンの立体構造に関する研究  
厚生省精神・神経疾患研究委託費, 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 平成5年度研究報告書 17-20, 1994
- 4) 桑山秀人, 吉田幹晴:  
ジストロフィンのC末端部分の機能に関する研究  
厚生省精神・神経疾患研究委託費, 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 平成5年度研究報告書 21-24, 1994

## B. 学会発表

## a. シンポジウム

- 1)
- 小沢鎧二郎
- ,
- 吉田幹晴
- ,
- 鈴木 厚
- ,
- 水野裕司
- ,
- 山本秀子
- ,
- 萩原康子
- :

ジストロフィンとジストロフィン結合タンパク質の分子構築と筋ジストロフィー分子病体生理の基礎

第46回日本細胞生物学会大会 前橋, 10.21, 1993

## b. な し

## c. 一般学会

- 1)
- 小沢鎧二郎
- ,
- 水野裕司
- ,
- 山本秀子
- ,
- 埜中征哉
- ,
- 吉田幹晴
- :

Duchenne型筋ジストロフィーにおけるジストロフィン結合糖タンパク質及びジストロフィン関連タンパク質の存在様式について

日本生化学会第66回大会, 東京, 10.2, 1993

- 2)
- 吉田幹晴
- ,
- 鈴木 厚
- ,
- 山本秀子
- ,
- 水野裕司
- ,
- 萩原康子
- ,
- 小沢鎧二郎
- :

ジストロフィン複合体のOctyl- $\beta$ -glucosideによる部分解裂

日本生化学会第66回大会, 東京, 10.2, 1993

- 3)
- 萩原康子
- ,
- 水野裕司
- ,
- 小沢鎧二郎
- :

*mdx*ヌードマウス筋へ注入移植されたC2筋芽細胞の動向

第46回日本細胞生物学会大会, 前橋, 10.20, 1993

- 4)
- 萩原康子
- ,
- 水野裕司
- ,
- 竹光正和
- ,
- 埜中征哉
- ,
- 小沢鎧二郎
- :

C2筋芽細胞注入移植による*mdx*マウスでのdystrophin陽性筋線維の形成

第67回日本薬理学会年会, 京都, 3.22, 1994

- 5)
- 鈴木 厚
- ,
- 吉田幹晴
- ,
- 林 謙介
- ,
- 萩原康子
- ,
- 水野裕司
- ,
- 小沢鎧二郎
- :

ジストロフィンの膜結合部位における分子構築

日本生化学会第66回大会, 東京, 10.2, 1993

- 6)
- 水野裕司
- ,
- 吉田幹晴
- ,
- 埜中征哉
- ,
- 平井俊策
- ,
- 小沢鎧二郎
- :

Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) におけるジストロフィン結合タンパク質A3a(43kDa), ジストロフィン関連タンパク質 (dystrophin-related protein, DRP) の存在様式について

第34回日本神経学会総会, 千葉, 6.11, 1993

- 7)
- 水野裕司
- ,
- 山本秀子
- ,
- 吉田幹晴
- ,
- 平井俊策
- ,
- 小沢鎧二郎
- :

サル組織におけるA2, A3aの存在様式について

## II 研究業績

日本生化学会第66回大会, 東京, 10.2, 1993

8) 水野裕司, 吉田幹晴, 桒中征哉, 平井俊策, 小沢鎧二郎 :

Duchenne型筋ジストロフィー筋における50DAG(A2), 43DAG(A3a)及びutrophinの存在について

第46回日本細胞生物学会大会, 前橋, 10.21, 1993

9) 山本秀子, 水野裕司, 林 謙介, 山内洋子, 桒中征哉, 吉田幹晴, 小沢鎧二郎 :

ジストロフィン結合タンパク質A4を認識するモノクローナル抗体—動物種での比較と組織分布—

日本生化学会第66回大会, 東京, 10.2, 1993

10) 山内洋子, 桒中征哉, 水野裕司, 山本秀子, 吉田幹晴, 小沢鎧二郎 :

筋ジストロフィーハムスター骨格筋におけるジストロフィン結合蛋白の異常

日本生化学会第66回大会, 東京, 10.2, 1993

11) 岩田裕子, 水野裕司, 吉田幹晴, 小沢鎧二郎, 中村 浩, 重川宗一 :

心筋症ハムスター (Bio14.6) 心筋におけるジストロフィン結合蛋白質の異常

日本生化学会第66回大会, 東京, 10.4, 1993

## C. 班会議発表

1) 小沢鎧二郎 :

ジストロフィンとジストロフィン結合タンパク質の分子構築及び病態生理学

平成5年度厚生省精神・神経疾患研究委託費, 「筋ジストロフィー」総合班会議, 東京, 1.25, 1994

2) 吉田幹晴, 鈴木 厚, 山本秀子, 水野裕司, 小沢鎧二郎 :

ジストロフィン結合糖タンパク質複合体の構造

平成5年度生体運動合同班会議, 東京, 1.5, 1994

3) 萩原康子, 小沢鎧二郎 :

ヌードmdxマウスに注入移植されたC2筋芽細胞による筋管細胞形成

平成5年度筋形成の分子機構班会議, 千葉, 2.5, 1994

4) 鈴木 厚, 吉田幹晴, 林 謙介, 水野裕司, 萩原康子, 小沢鎧二郎 :

形質膜結合部位におけるジストロフィンと結合タンパク質との相互作用

平成5年度厚生省精神・神経疾患研究委託費, 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班会議, 東京, 12.2, 1993

- 5) 鈴木 厚, 吉田幹晴, 林 謙介, 水野裕司, 萩原康子, 小沢鉄二郎 :

形質膜結合部位におけるジストロフィンと結合タンパク質との相互作用

平成5年度生体運動合同班会議, 東京, 1.5, 1994

- 6) 田之倉優, 鈴木 厚, 野口 悟, 小沢鉄二郎 :

ジストロフィン・ロッドのヒンジ3を含むセグメントの高次構造—CDとNMRによる研究

平成5年度厚生省精神・神経疾患研究委託費, 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班会議, 東京, 12.2, 1993

- 7) 田之倉優, 鈴木 厚, 野口 悟, 小沢鉄二郎 :

ジストロフィン・ロッドのヒンジ3を含むセグメントのNMRとCDによる測定

平成5年生体運動合同班会議, 東京, 1.5, 1994

- 8) 埜中征哉, 山内洋子, 水野裕司, 山本秀子, 吉田幹晴, 小沢鉄二郎, 日置恭司, 斎藤宗雄 :

筋ジストロフィーハムスター骨格筋におけるジストロフィン結合タンパクの異常

平成5年度厚生省精神・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会議, 東京, 12.1, 1993

## ジストロフィンとラミニンをつなぐ糖タンパク質複合体 (GPC) の分子構築

吉田幹晴, 鈴木 厚, 山本秀子, 野口 悟, 水野裕司, 小沢鉄二郎

### 【はじめに】

GPCは複数のジストロフィン結合タンパク質 (DAP) からなる細胞膜貫通性の複合体であり、筋細胞内のジストロフィンを基底膜のラミニンに結合させている。GPCの中で、ジストロフィンと結合しているのは43DAG、ラミニンと結合しているのは156DAGであることは既に知られているが、この2つを除く他のGPC構成DAPがどのように構築されているか明らかでなかった。GPCの構造、機能を明らかにすることは筋ジストロフィーの病態解明に必須と考えられ、今回は構造面での情報を得るため以下の実験をした。

### 【実験】

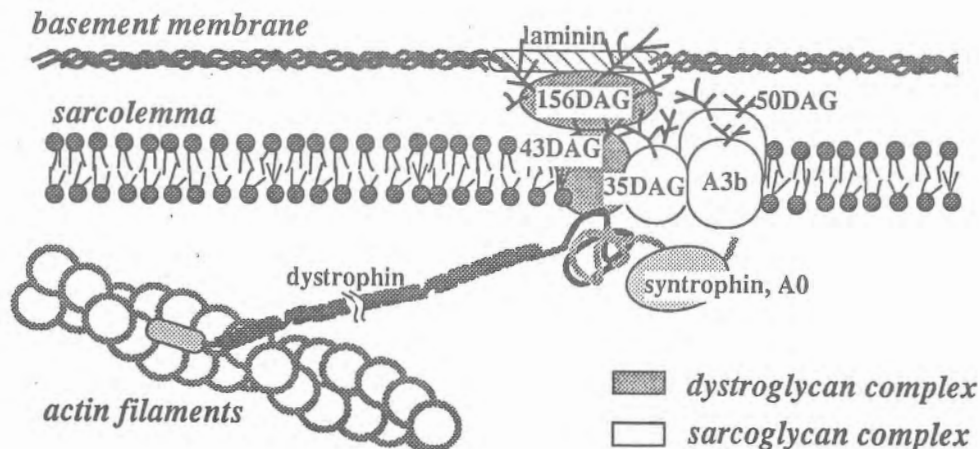
GPCを含む精製したジストロフィン複合体 (dys-DAP complex) をやや変性力の強い表面活性剤 n-octyl- $\beta$ -D-glucoside で処理して部分的に開裂させ、生成物をゲル濾過で分離した。

### 【結果と考察】

この実験でGPCの構成成分が異なるgroup (group I: 156DAG, 43DAG; group II: 50DAG, A3b, 35DAG) に分かれて溶出した。これら2つのgroupはそれぞれ複合体を維持していることが架橋実験、及びimmunoaffinity chromatographyによ

て確認され、このことからGPCがこれら2つの小複合体で構成されているものと我々は結論した。group I、group IIよりなる複合体をそれぞれ dystroglycan complex (DGC)、sarcoglycan complex (SGC) と名づけることにした。この結論を基に現在我々が考えるdys-DAP complexの分子構築モデルを下図に示す。このモデルはサルの変性筋組織及び筋ジストロフィーを患ったヒトやハムスター筋組織について、DAPを免疫化学的に検索した結果<sup>1)</sup>を大変良く説明することができる。なおSGCの構成成分A3bはDGCの構成成分でアミノ酸配列も既に知られている43DAGと、SDS/PAGEにおける移動度がよく似ているために最近まで一括して扱われ、注目されていなかったタンパク質である。しかし我々は今回等電点電気泳動、ペプチドマップ、イムノプロットによる実験を合わせて、A3bが43DAGとは異なる新種のDAPであることを明らかにした。現在このタンパク質についてクローニングを試みている。

<sup>1)</sup>水野裕司ら、神経研究所年報 第8号 (平成5年)



ジストロフィン・シントロフィン相互作用の研究

鈴木 厚, 小沢鉄二郎

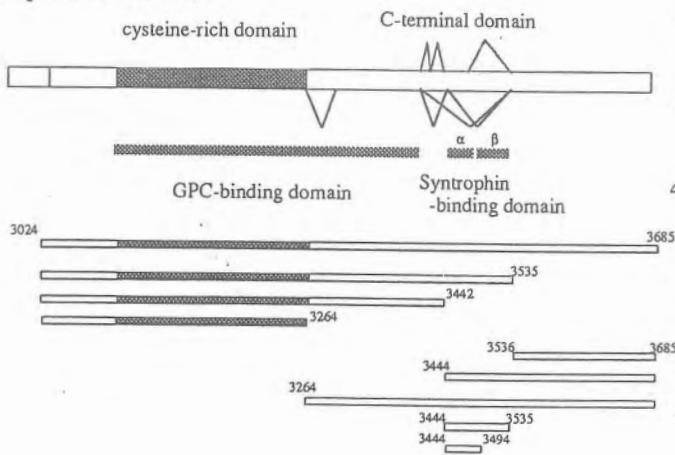
ジストロフィン結合タンパク質(DAPs)は、①筋肉形質膜内で一個の糖タンパク質複合体(GPC)を形成しジストロフィンの膜へのアンカーリングを媒介しているタンパク質群、156DAG, 50DAG, 43DAG, A3b, 35DAG、および、②細胞質内の可溶性タンパク質であるA0, A1とに分類しうる。すでに報告しているように、我々はGPC構成タンパク質の中で43DAGが直接ジストロフィンと結合しており、その結合部位は臨床的にその重要性が指摘されてきたシステイン類出領域にあることを明らかにしている<sup>21, 22</sup>。一方、我々はA0,  $\beta$ -A1が、GPCとは独立にC末端ドメイン後半に結合していることを観察している。このうち $\beta$ -A1は、神経筋接合部におけるアセチルコリンレセプターの局在に重要な役割を果たしていると考えられているタンパク質「シントロフィン」と相同であることが最近明かされた<sup>23</sup>。この事実は、ジストロフィンの機能の研究に今後新たな展開をもたらすものと予想される。今回、この $\beta$ -シントロフィン( $\beta$ -A1)の機能に関する情報を得るためにそのジストロフィン分子上における結合部位を昨年と同様に融合タンパク質を利用したoverlay実験によって詳細に検討した。

【結果と考察】

今回は、ジストロフィンC末端のアミノ酸配列に対して下図に示すような融合タンパク質を作成し、それぞれの $\beta$ -シントロフィンへの結合

をoverlay実験によって調べた。下図にまとめたように、系統的な変異融合タンパク質の作成によって、最終的に $\beta$ -シントロフィンの基本的な結合にはジストロフィンのアミノ酸配列3495-3535にわたる領域が必須であることがわかった。この部分に対応する合成ペプチドを用いた実験から、実際にこの領域に $\beta$ -シントロフィン結合部位が存在することが確認された。さらに今回の実験の中で、以前確認できなかった $\alpha$ -シントロフィン( $\alpha$ -A1)のジストロフィンへの相対的に弱い結合が見つかった。しかも、この $\alpha$ -シントロフィンの結合する部位は $\beta$ のものとは非常に近接しているが全く異なった配列を示すアミノ酸3444-3494に存在することが明かとなった。即ち、シントロフィンの2つのアイソフォームが異なった結合様式で一個のジストロフィン分子に結合している可能性が示唆された。さらに、興味深いことに、この $\alpha$ および $\beta$ -シントロフィンの結合部位は、ジストロフィン分子上の可変スプライシングを受け、組織依存的に(心筋や脳で)取り除かれるエクソン73、および74にコードされる部分にそれぞれ対応する。即ち、ジストロフィンとシントロフィンとの相互作用は、可変スプライシングによって結合部位を取り外すことによって制御されている可能性が示唆された。

Dystrophin C-terminus



- 1) Suzuki, A et al. (1993) FEBS Lett. 308:154-160
- 2) Suzuki, A et al. (1994) Eur. J. Biochem. 220: 283-292
- 3) Ahn, H. A. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press

43DAG	$\beta$ -syntrophin /A0	$\alpha$ -syntrophin
+	+	+
+	+	
+	-	
+	-	
-	-	
-	+	
-	+	
-	-	+
-	-	+



ジストロフィン結合糖タンパク質複合体構成成分の免疫化学的検索

水野裕司, 野口 悟, 吉田幹晴, 埜中征哉, 小沢鉄二郎

【はじめに】

ジストロフィン結合糖タンパク質複合体はdys-troglycan complex (DGC)とsarcoglycan complex (SGC)の二つより構築されていることが生化学的に示された<sup>1)</sup>。我々は43DAG (DGCの構成成分)及び50DAGと35DAG (SGCの構成成分)の特異的抗体を用いてサル、骨格筋、心筋、子宮を含む10種類の臓器におけるこれらタンパク質を検索した。その結果、43DAGはすべての臓器で検出されたのに対し、50DAGと35DAGは骨格筋と心筋でのみ検出されたことから、DGCは普遍的に発現しているが、SGCは横紋筋に特異的な成分であると推定した。

さらに我々はこれまで知られていなかったA3b (SGCの構成成分)が新たなジストロフィン結合糖タンパク質であることを示したが、今回その抗体を初めて作製した。この抗体を使って、DMD、DHの骨格筋を免疫組織化学的手法を使って調べた。

【結果、考察】

ジストロフィン遺伝子の異常によって発症するDuchenne muscular dystrophy(DMD)ではジストロフィンの欠失の他に、Campbellらによってすべてのジストロフィン結合糖タンパク質の減少が報告されていたが、我々は、これと少し異なり、SGCの構成成分がDGCのそれより減少していることを観察した(図1)。

最近DMDと良く似た症状を示すSCARMDと呼ばれる筋ジストロフィーが報告されたが、これは50DAGが激減しておりジストロフィンやその他のジストロフィン結合糖タンパク質は維持されていてDMD発症の根本を考える上で注目された。しかし、この病気は単に50DAG減少症として片づけられず、数種の遺伝子が関与する病気の総合であることが明らかになってきた。我々はこの病気のモデル動物と思われる筋ジストロフィーハムスター(DH)において50DAGだけでなく、A3bと35DAGも激減していることを見だし(図2)、病因を50DAGの欠失に限定するよりはむしろSGC構造の異常がSCARMDやDH発症の主

因ではないかと考えた。すなわちDGCは正常でも、SGCの3成分のうち何れかに異常が起こればSGCの構造が変化し、その機能が損なわれ発症すると考えるのである。

1) 吉田幹晴ら 神経研究所年報 第8号

図1

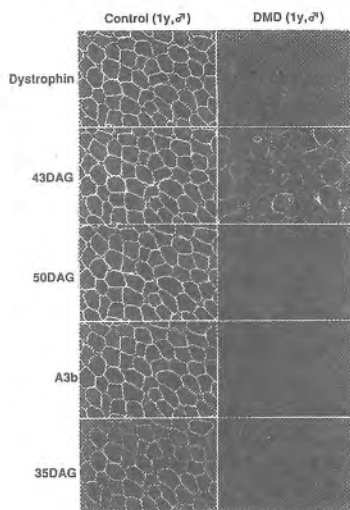
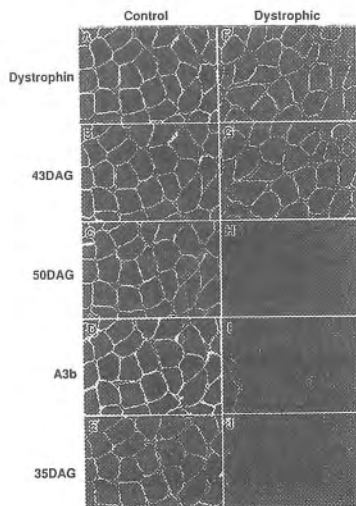


図2



## ジストロフィンの立体構造に関する研究

鈴木 厚, 野口 悟, 田之倉優\*, 小沢鉄二郎

(\*東大、理)

## 【はじめに】

ジストロフィンは、筋ジストロフィーの責任蛋白質であり、その三次元構造を明らかにすることは、機能発現部位の詳細と作用機構を解明する上に重要である。これまでに、KoenigとKunkel<sup>1)</sup>、およびCrossら<sup>2)</sup>はアミノ酸配列に基づいて三次元構造を予測し、ロッド部分の繰り返し構造が、 $\alpha$ ヘリックスの三重鎖をとるというモデルを提出している。しかし、両モデルには繰り返し単位の長さやヒンジの位置において差違がみられる。本研究では、ジストロフィンの三次元構造の解明を目指して、ロッド部分のヒンジ3を含むセグメントについて、核磁気共鳴(NMR)および円偏光二色性(CD)スペクトルの測定を行った。

## 【方法】

ヒトのジストロフィンのロッド部分の2種類のセグメント(DCR: アミノ酸残基2266-2557およびR19-H3: 2323-2468)は大腸菌において、融合蛋白質として発現した後、アフィニティクロマトグラフィーにより精製を行い、さらに酵素処理によって純粋な標品を得た。400MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、Bruker AM400 NMR分光計により、約10mg/mlの濃度の重水溶液および90%軽水/10%重水溶液を用いて25°Cで測定した。CDスペクトルは、0.1~0.2mg/mlの試料を用いて、Jasco J-600 円二色性分散計により25°Cで測定した。蛋白質の二次構造含量は、プログラムCONTINによりCDスペクトルを解析して求めた。

## 【結果と考察】

セグメントDCRの重水中の<sup>1</sup>H-NMR測定では、次のような特徴あるスペクトルが得られた: ①ランダムコイル状態にあるペプチド鎖中のメチル水素が観察される化学シフト(0.9~1.4ppm)の高磁場側に、シフトしたシグナルが観察された。これは、D

CRが何らかの高次構造を有することを示している。②水のシグナルの低磁場側( $\beta$ シート構造中の $\alpha$ 水素が観測される領域)に $\alpha$ 水素が全く観測されなかった。DCRには $\beta$ シート構造が存在せず、 $\alpha$ ヘリックスとランダム構造だけが含まれることが示された。③ペプチド主鎖のアミド水素が全く観測されなかった。このことは、いずれの部分も溶媒の水分子と容易に接し得ることを示している。以上のことから、DCRが通常の球状蛋白質とは著しく異なる立体構造を有すると考えられた。

DCRのCD測定の結果、 $\alpha$ ヘリックスが66%、 $\beta$ シートが0%と求められ、NMRの結果を支持した。また、ヒンジ領域には $\alpha$ ヘリックスが存在しないと仮定して求めたKoenigとKunkelのモデル(56%)およびCrossらのモデル(65%)の $\alpha$ ヘリックス含量のいずれとも一致していた。

ヒンジ3の位置を明らかにするために、KoenigとKunkelのモデルではヒンジ3が含まれるがCrossらのモデルでは含まれない、R19-H3セグメントのCDスペクトルを解析した。その結果、 $\alpha$ ヘリックス含量は54%と求められた。これは、KoenigとKunkelのモデル(49%)とは傾向が一致するものの、Crossらのモデル(76%)とは逆の傾向を示した。つまり、ヒンジ3の位置についてKoenigとKunkelのモデルが妥当であると結論された。

多次元NMRによる構造解析の基礎として二次元NMR測定の結果、R19-H3は十分解析可能なスペクトルを与えたので、現在三次元構造の決定のため、<sup>15</sup>NでラベルしたR19-H3の三次元スペクトルを測定している。

- 1) Koenig, M. & Kunkel, L. M. (1990) J. Biol. Chem. 265, 4560-4566
- 2) Cross, R. A. et al. (1990) FEBS Lett. 262, 87-92

## 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脳神経系の正常発達を支えている物質的な特にニューロン・グリア相関および神経栄養因子について神経化学的あるいは分子生物学的な研究を進めてきた。また、各種神経変性疾患の本体とも言えるニューロン死のメカニズムに関する研究も行っている。具体的にはニューロン・グリア相関の研究ではミクログリアから分泌される各種プロテアーゼの脳内機能に関する解析を進めた。また、神経栄養因子様活性を示すカルシウム依存性リン脂質結合蛋白の一種であるアネキシンVやニューロン特異的エノラーゼの作用メカニズムについて、主に受容体の立場から検索を進めてきた。更にニューロン死のメカニズムを検討するためにはラット海馬ニューロンに温度感受性Large-Tを導入することにより、株化した細胞を用い研究を進めている。平成5年4月以降代謝研究部におけるこれら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 (6.1.8～ドイツマックスプランク研究所に留学),  
久永欣哉 (5.4.1～)

[流動研究員] 広瀬雄一, 浜之上誠 (5.4.1～)

[センター研究員] 大沢圭子, 竹本なぎさ, 平井ふさこ

[外来研究員] 今井嘉紀 (科学技術特別研究員)  
Helena Haapaniemi (6.3.9～, STAフェロー),  
下条雅人, 及川善博

[研究生] 飯島 昇 (~6.3.31), 服部達哉, 石川理恵子, 井幡 巖,  
Rebecca Hartley (5.7.2～5.8.18, 科技厅サマーインスティテューション),  
池田康夫 (5.4.1～), 樋口雅一 (5.4.12～6.3.31)

[併任研究員] 島田章則 (5.4.1～), 武井延之 (5.4.1～6.3.31),  
片岡泰文 (~6.3.31)

班会議などの面では高坂が以下のような活動を行った。

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」主任研究者

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」班員

文部省重点領域研究

「神経難病における神経細胞死の機序と修復・防御」計画班員，研究計画委員長

文部省重点領域研究

「老年痴呆の分子機構」計画班員，研究企画委員

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分野テーマ1

「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」テーマリーダー

ヒューマンサイエンス振興財団国際共同研究

「ニューロトロフィックファクターの生理機能に関する基礎的研究とその臨床応用」代表研究者

(部長 高坂新一)

A. 論文

a. 原著

- 1) Nagata K, Nakajima K, Takemoto N, Saito H and Kohsaka S:  
Microglia-derived plasminogen enhances neurite outgrowth from explant cultures of rat brain  
Int. J. Dev. Neurosci. 11:227-237, 1993
- 2) Nakajima K and Kohsaka S:  
Characterization of brain microglia and the biological significance in the central nervous system  
Adv. Neurol. 60:734-743, 1993
- 3) Nakajima K and Kohsaka S:  
Functional roles of microglia in the brain  
Neurosci. Res. 17:187-203, 1993
- 4) Nagata K, Nakajima K and Kohsaka S:  
Plasminogen promotes the development of rat mesencephalic dopaminergic neurons in vitro  
Dev. Brain Res. 75:31-37, 1993
- 5) Nakajima K, Nagata K, Hamanoue M, Takemoto N, Shimada A and Kohsaka S:  
Plasminogen-binding protein associated with the plasma membrane of cultured embryonic rat neocortical neurons  
FEBS Lett. 333:223-228, 1993
- 6) Nakajima K, Nagata K, Hamanoue M, Takemoto N and Kohsaka S:  
Microglia-derived elastase produces a low-molecular-weight plasminogen that enhances neurite outgrowth in rat neocortical explant cultures  
J. Neurochem. 61:2155-2163, 1993
- 7) Kobayashi H, Uchida Y, Ihara Y, Nakajima K, Kohsaka S, Miyatake T and Tsuji S:  
Molecular cloning of rat growth inhibitory factor cDNA and the expression in the central nervous system  
Molecular Brain Res. 19:188-194, 1993
- 8) Shimojo M, Imai Y, Nakajima K, Mizushima S, Uemura A and Kohsaka S:  
Interleukin-2 enhances the viability of primary cultured rat neocortical neurons

Neurosci. Lett. 151:170-173, 1993

- 9) Hirose Y, Imai Y, Nakajima K, Takemoto N, Toya S and Kohsaka S:

Glial conditioned medium alters the expression of amyloid precursor protein in SH-SY5Y neuroblastoma cells

BBRC 198:504-509, 1994

b. 著 書

- 1) 中嶋一行, 高坂新一 :

ニューロンの生育・成熟とミクログリアーミクログリア由来プラスミノーゲンの神経栄養活性ー  
実験医学増刊 Vol.11 (御子柴克彦編), pp.139-143, 羊土社, 東京, 1993

- 2) 永田晃一, 中嶋一行, 森 俊夫, 高坂新一 :

神経系における神経栄養因子としてのプロテアーゼ・プロテアーゼ阻害物質

廣川タンパク化学 8 卷, 成長因子 I (林 恭三, 古川昭栄編), pp.75-96, 廣川書店, 東京, 1993

- 3) 永田晃一, 中嶋一行, 森 俊夫, 高坂新一 :

神経系における神経栄養因子としてのプロテアーゼ・プロテアーゼ阻害物質

神経内分泌免疫学 (井村裕夫, 堀 哲郎, 村松 繁編), pp.56-61, 朝倉書店, 東京, 1993

- 4) 中嶋一行, 高坂新一 :

神経栄養因子と病理

分子病理学, 疾病の分子機構 (杉山武敏編), pp.519-525, 文光堂, 東京, 1993

c. 総 説

- 1) 高坂新一 :

老化と神経栄養因子

昭和医学会雑誌 52 : 563-589, 1993

- 2) 中嶋一行, 島田章則, 高坂新一 :

ミクログリアと病態

神経研究の進歩 37 : 665-676, 1993

- 3) 中嶋一行, 高坂新一 :

ニューロンの生育・成熟とミクログリアーミクログリア由来プラスミノーゲンの神経栄養活性ー

実験医学 増刊 11 : 1337-1343, 1993

d. 班会議報告書

- 1) 高坂新一 :

## II 研究業績

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分野テーマ1，平成4年度研究報告書，2-4，1993

### 2) 高坂新一：

神経系における神経栄養因子の生理機能の解析

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分野テーマ1，平成4年度研究報告書，23-32，1993

### 3) 高坂新一，今井嘉紀，大澤圭子：

ニューロン膜上のAnnexin V結合蛋白質の解析

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5年度研究成果報告書 15-18，1994

### 4) 高坂新一，中嶋一行，浜之上誠，竹本なぎさ：

低分子量プラスミノ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5年度研究成果報告書 37-41，1994

## e. その他

### 1) 高坂新一：

神経細胞の生存・維持にかかわる神経栄養因子

とれもろ 13，3-4，1994

## A. 学会発表

### a. 特別講演・シンポジウム

#### 1) Nakajima K and Kohsaka S：

Neurotrophic effect of microglia-derived plasminogen.

The 2nd German-Japanese Joint Workshop "Neurobiology of glia in Health and Disease"  
Tokyo, 5.20, 1993

#### 2) 高坂新一：

ミクログリア由来分泌性プロテアーゼとその機能

日本薬学会シンポジウム「脳高次機能の老化と障害」予防薬，治療薬を求めて，札幌，7.1，1993

#### 3) 高坂新一：

## ミクログリアの脳内機能

国立岡崎共同研究機構生理学研究所セミナー「ニューロンとグリア相互作用」, 岡崎, 7.8, 1993

4) 高坂新一 :

神経細胞の生存維持に関わる神経栄養因子

第2回パーキンソン病治療研究会「Neuroprotective Therapyの基礎と臨床」, 東京, 10.9, 1993

5) Kohsaka S, Nakajima K, Hamanoue M and Inoue K:

Microglia-derived plasminogen has neurotrophic effects on the CNS neurons in vitro.

1st International Symposium on Microglia, Munich, 10.18, 1993

6) 高坂新一, 中嶋一行, 浜之上誠, 竹本なぎさ, 井上和秀, 小泉修一 :

ミクログリア由来プラスミノゲンの神経栄養活性

文部省重点領域研究「神経細胞死」平成5年度公開シンポジウム, 東京, 12.17, 1993

7) 樋口雅一, 伊藤隆司, 神佳之, 今井嘉紀, 高坂新一 :

神経突起伸長因子  $\alpha 2$ -マクログロブリンの遺伝子発現制御

文部省重点領域研究「老年痴呆の分子機構」平成5年度公開シンポジウム, 東京, 12.22, 1993

8) 高坂新一, 中嶋一行, 浜之上誠, 竹本なぎさ, 井上和秀, 小泉修一 :

ミクログリア由来プラスミノゲンの神経栄養活性

第4回日本病態生理学会総会シンポジウム, 大阪, 1.22, 1994

9) 高坂新一 :

グリア細胞由来神経栄養因子

文部省総合B公開シンポジウム「ニューロンネットワークの組織化とその可変性」, 大阪, 1.31, 1994

## b. 国際学会

1) Hattori T, Ohsawa K, Takei N, Kato K and Kohsaka S:

Mechanism of neuronal survival effects of neuron specific enolase.

14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, France, 8.26, 1993

2) Nakajima K, Nagata K and Kohsaka S:

Rat microglia secrete plasminogen that has neurotrophic effects on CNS neurons.

14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, France, 8.25, 1993

3) Kohsaka S, Nakajima K, Hamanoue M and Takemoto N:

Microglia secrete plasminogen that enhances the maturation of mesencephalic dopaminergic



## II 研究業績

neurons in vitro.

The 3rd International Conference on Alzheimer's and Parkinson's diseases, Chicago,  
11.5, 1993

### c. 一般学会

- 1) 下条雅人, 今井嘉紀, 中嶋一行, 水島誠一, 植村昭夫, 高坂新一 :  
インターロイキン2の神経栄養効果  
第70回日本生理学会, 4.3, 甲府, 1993
- 2) 久永欣哉, Frank R. Sharp, Dale E. Bredesen, 高坂新一 :  
温度感受性SV40 large T 抗原遺伝子導入により株化したGABAニューロン様細胞の分化と細胞死  
第8回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会, 6.12, 東京, 1993
- 3) 中嶋一行, 浜之上誠, 竹本なぎさ, 加藤兼房, 高坂新一 :  
ニューロン細胞膜上のプラスミノーゲン結合タンパクの同定  
第36回日本神経化学学会大会, 10.27, 大阪, 1993
- 4) 久永欣哉, 呉 繁夫, 池田康夫, 高坂新一 :  
中枢GABAニューロン様細胞株の細胞死  
第36回日本神経化学学会大会, 10.27, 大阪, 1993
- 5) 今井嘉紀, 高坂新一 :  
ラットアネキシンV遺伝子の構造解析  
第66回日本生化学会, 10.2, 東京, 1993
- 6) 中嶋一行, 永田晃一, 竹本なぎさ, 浜之上誠, 高坂新一 :  
ミクログリア培養上清中に検出される低分子プラスミノーゲンの神経栄養効果  
第66回日本生化学会, 10.2, 東京, 1993
- 7) 矢崎まどか, 田川一彦, 土屋隆英, 中嶋一行, 高坂新一, 石浦章一, 鈴木絃一 :  
ミクログリア由来のアミロイド前駆体タンパク質分解酵素  
第66回日本生化学会, 10.2, 東京, 1993
- 8) 下条雅人, 高杉和弘, 今井嘉紀, 中嶋一行, 植村昭夫, 高坂新一 :  
MPP+誘発ドバミン神経細胞死に対するインターロイキン2の保護効果  
第17回日本神経科学大会, 12.9, 名古屋, 1993
- 9) 浜之上誠, 永田晃一, 中嶋一行, 竹本なぎさ, 高坂新一 :  
ミクログリア由来低分子量プラスミノーゲンのニューロンへの作用

第17回日本神経科学大会, 12.7, 名古屋, 1993

10) 樋口雅一, 今井嘉紀, 高坂新一, 榊 佳之 :

$\alpha$  2-マクログリブリン遺伝子のラットアストログリアおよび脳内における発現調節

第17回日本神経科学大会, 12.9, 1993

11) 樋口雅一, 伊藤隆司, 今井嘉紀, 服部正平, 高坂新一, 榊 佳之 :

$\alpha$  2-マクログリブリン遺伝子のラット星状膠細胞および脳内における発現調節

第16回日本分子生物学会年会, 12.18, 1993

d. 班会議発表

1) 高坂新一, 今井嘉紀, 大澤圭子 :

ニューロン膜上のAnnexinV結合蛋白の解析

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並びに臨床的研究」・平成5年度班会議, 東京, 11.24, 1993

2) 高坂新一, 中嶋一行, 浜之上誠, 竹本なぎさ, 小泉修一, 井上和秀 :

ミクログリア由来プラスミノーゲンの神経栄養活性

文部省重点領域研究「神経細胞死」・平成5年度班会議, 東京, 12.17, 1993

3) 高坂新一 :

神経細胞膜上プラスミノーゲン結合蛋白の同定

文部省重点領域研究「老年痴呆の分子機構」・平成5年度班会議, 東京, 12.21, 1993

4) 高坂新一, 中嶋一行, 浜之上誠, 竹本なぎさ :

低分子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5年度班会議, 東京, 1.8, 1994

5) 今井嘉紀, 大澤圭子, 高坂新一 :

ニューロン膜上のAnnexinV結合蛋白の解析

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5年度研究成果発表会, 東京, 1.21, 1994

神経栄養因子としての神経特異性エノラーゼの作用機序の検討

服部達哉, 大澤圭子, 加藤兼房, 高坂新一

我々はこれまでに解糖系の酵素である $\gamma\gamma$ エノラーゼ(神経特異性エノラーゼ、NSE)が培養神経細胞に対し生存維持効果を有することを見いだし報告してきた<sup>1)</sup>。神経栄養因子としてのNSEの作用機序を検討するため、NSEの合成ペプチドを用いた解析を行なった。

(方法) 胎生17日のラット大脳皮質神経細胞を、poly-L-Lysine処理した24-well culture plateに $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の密度で培養した。低血清培養条件(1%FCS含有MEM培地)下で、培養24時間後にNSE、 $\alpha\alpha$ エノラーゼ(非神経エノラーゼ、NNE)、およびNSE、NNEのC末30残基にあたる合成ペプチドを添加、培養5日目の生存細胞数を観察し神経細胞の生存維持に対する効果を検討した。

(結果) 図1に示すようにNSEおよびそのC末30残基に相当する合成ペプチド(s- $\gamma$ )が、神経細胞に用量依存的に生存維持効果を持つことが明らかとなった。しかし、s- $\gamma$ の神経栄養作用はNSEと比較してより高濃度が必要であった。一方、NSEのアイソザイムであるNNEおよびそのC末30残基に相当する合成ペプチド(s- $\alpha$ )には生存維持効果は認められなかった。

(考察) エノラーゼのC末30残基はエノラーゼアイソザイム間で最もアミノ酸配列に相違のある部分の一つであり、抗原性の検討からはNSEを特異的に認識する抗体のエピトープになる領域と報告されている<sup>2)</sup>。NSEおよびNNEの神経栄養因子活性の差には、C末30残基が重要である可能性が示唆される。但し、s- $\gamma$ の神経栄養作用はNSEと比較してより高濃度が必要であったことは、高次構造が神経栄養因子活性の発現に関与している可能性も考えられる。

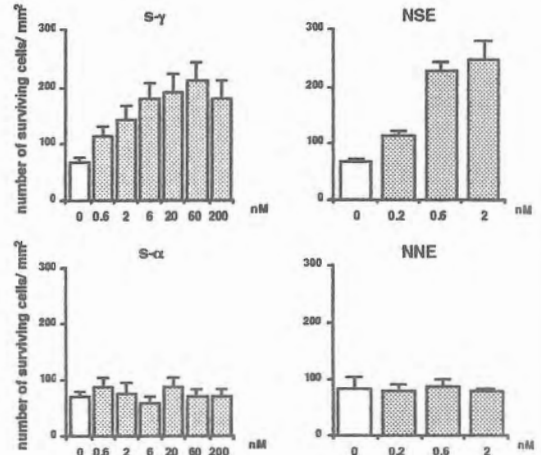


図1. NSE, NNEおよびそのC末30残基の合成ペプチドの神経細胞生存維持効果

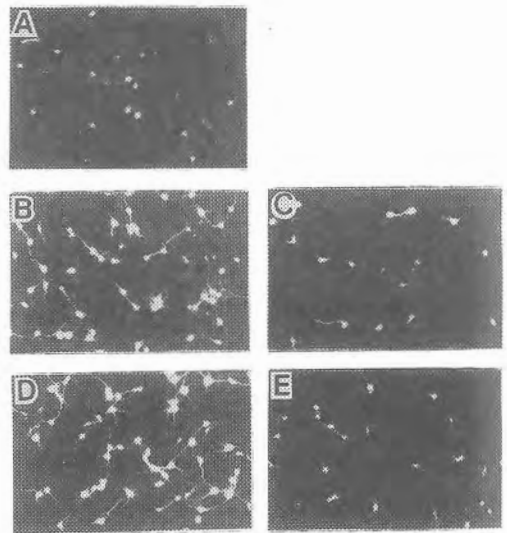


図2. 抗MAP-2モノクローナル抗体を用いた免疫染色 A, Control; B, +native NSE (2nM); C, +native NNE (2nM); D, +s- $\gamma$  (20nM); E, +s- $\alpha$  (20nM)

(参考文献) 1) Takei N. et al.: J. Neurochem 57: 1178-1184, 1991. 2) McAleese S. M. et al.: Eur. J. Biochem 178: 413-417, 1988

## 低分子量プラスミノーゲンの神経栄養活性

浜之上誠, 竹本なぎさ, 中嶋一行, 高坂新一

[序論] 元来ミクログリアは脳内のマクロファージ、つまり単なる貪食細胞としてその機能が考えられてきたが、近年様々な疾患との関係が指摘されたり、またミクログリアが非常に多くの生理活性物質を分泌することが判明するに当たり脳内におけるミクログリアの機能、役割についての認識が見直されつつある。我々は中枢におけるミクログリアの役割として神経栄養効果に着目しこれまで解析を行ってきた。その結果プラスミノーゲン (PGn) が神経細胞突起伸展促進、中脳細胞ドーパミン取り込み能促進、チロシン水酸化酵素 (TH) 陽性細胞数の増加などの神経栄養効果を持つこと、さらにこのPGnのC末部分である低分子量プラスミノーゲン (LMW-PGn) もPGnと一部同様の神経栄養効果を持つことも明らかにしてきた。またその作用にはPGnの神経細胞上のリセプター様蛋白への結合が重要であることも既に示してきた。今回はこのLMW-PGnを使用し神経細胞へのさらなる栄養効果の検定、さらに神経細胞上の特異的結合蛋白の検索を行なうことによりPGnの作用発現機序について検討を加えた。

## [結果、考察]

## 1 LMW-PGnの神経細胞に対する神経栄養効果

中脳細胞中にLMW-PGnを添加して3日後にドーパミン取り込み能を測定した。LMW-PGnは濃度依存的にドーパミン取り込み量を増大させその最大効果を示す濃度は約100nMであった。(図1)。また同3日目のTH陽性細胞数を1mm<sup>2</sup>当たりの細胞数で比較するとLMW-PGn100nM添加群はコントロール群に比べ約1.4倍の細胞数の増加が認められた(図2)。これらの結果からLMW-PGnは大脳皮質組織片の突起進展促進、培養中脳細胞のドーパミン取り込み促進に加えてドーパミン作動性神経細胞の成熟、あるいは生存維持にも働いていることが示唆された。

## 2 ライガンドプロットによるLMW-PGn結合分子の解析

胎生17日の中脳膜画分、同ホモジネートをサンプルとして<sup>125</sup>I標識したLMW-PGnにて結合蛋白を調べてみると2つのバンドが検出された。それぞれのSDS-PAGE上の分子量は54kDa, 42kDaであった(図3 レーン1,2)。またこれらのバンドは過剰量(20倍)の非標識LMW-PGnをライガンドと共存させると消失した(図3 レーン3,4)。これらの結果から中脳細胞膜上には54kDaと42kDaのLMW-PGn特異的結合蛋白が存在していることが示された。

これまでPGn結合蛋白としては、フィブリン等数種類が報告されているがこれらの蛋白の分子量は今回我々の同定した蛋白とは異なっており別な蛋

白であろうと思われる。しかし単球においてはPGn結合蛋白としてSDS-PAGE上の分子量が54kDaのαエノラーゼが報告されており、また我々も中枢神経でαエノラーゼが神経細胞上のPGn結合蛋白として機能していることを確認している<sup>2)</sup>ので今回報告したLMW-PGnに結合する54kDaの蛋白はαエノラーゼである可能性が強く示唆されている。しかし54kDaの蛋白以外のPGn結合蛋白、即ち今回示した42kDaのPGn結合蛋白など未知のPGn結合蛋白のある可能性もある。PGnの神経栄養効果の作用機序を考える上でも今回示した結合蛋白の詳細な解析がさらに必要であろうと思われる。

## [文献]

- 1) Nagata, K., Takei, N., Nakajima, K., Saito, H. and Kohsaka, S. (1993) J. Neurosci. Res. 34, 357-363
- 2) Nakajima, K., Nagata, K., Hamanoue, M., Takemoto, N., Shimada, A. and Kohsaka, S. (1993) FEBS Lett. 333, 223-228

図1 ドーパミン取り込み能

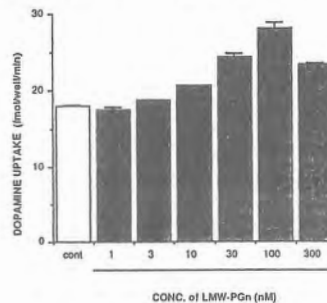


図2 TH陽性細胞数

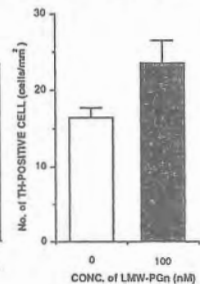
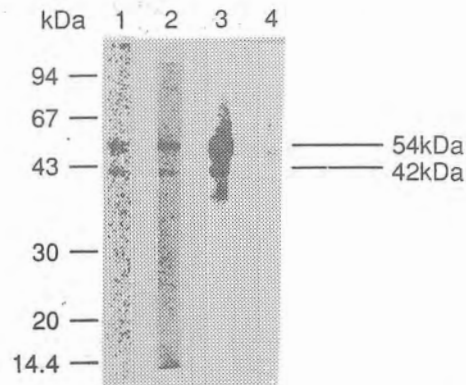


図3 ライガンドプロット解析



## ニューロン膜上の Annexin V 結合蛋白質の解析

今井嘉紀, 大澤圭子, 高坂新一

我々は牛海馬抽出液より、初代培養神経細胞への生存維持効果を指標として、神経栄養因子の単離同定を進めてきた。その結果、カルシウム依存性リン脂質結合蛋白質であるアネキシンVが同定された。アネキシンVは神経細胞には存在せず、アストログリア、ミクログリアに局在することが明らかとなった。このことは、アネキシンVがグリア細胞で産生され神経細胞に作用するパラクライン因子として機能していることを示唆する。

さらに、アネキシンVの作用機構について解析を進めた。培養神経細胞培地中に添加したアネキシンVは時間依存性に細胞膜と結合した。さらに我々は、アネキシンVの神経細胞への作用機序を調べる目的で神経細胞膜上のアネキシンV結合蛋白質の解析を行った。

初代培養神経細胞あるいは胎生17日のラット大脳皮質をホモゲナイズ後遠心分画、パーコール密度勾配遠心法により分離し膜画分を得た。この膜画分にたいしてペルオキシダーゼ標識アネキシンVをリガンドとし、ファーウェスタンプロット法によりアネキシンV結合蛋白質の解析をおこなった。カルシウムおよび磷脂質存在下で、アネキシンVは分子量約70,000および90,000のふたつの蛋白質と結合した一方、カルシウムあるいは磷脂質非存在下ではこの結合は全くみられなかった(図1)。さらに、これらの結合蛋白質の細胞内局在を調べたところ、核、ミトコンドリア、細胞質には存在せず、膜画分に局在することが解かった。

さらに解析を進める目的で、大腸菌を用い大量にアネキシンV、グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合蛋白質を発現させた。融合蛋白質の、培養神経細胞にたいする生存維持効果の比活性は、非融合蛋白質とほぼ同等であった。この融合蛋白質をペルオキシダーゼで標識し同様にリガンドブロッ

ト解析を行った。カルシウムおよび磷脂質存在下で融合蛋白質は、非融合蛋白質と同じく、分子量約70,000および90,000のふたつの蛋白質と結合したのみならず、カルシウム存在、磷脂質非存在下でも結合をせしめた。この現象はアネキシンVの結合が磷脂質を介した間接的なものではなく直接的な蛋白質蛋白質間の相互作用であることを示す。以上の結果は、分子量約70,000および90,000のふたつの蛋白質が細胞膜上のアネキシンV結合蛋白質であることを強く示唆する。

これらの蛋白質をクローニングする目的で、胎生17日ラット脳よりラムダgt11 cDNAライブラリーを作成し、アネキシンV蛋白質をリガンドとするファーウェスタンプロット法によりスクリーニングを行った。現在複数のポジティブクローンを得ているが、それらの構造、機能については解析を進めているところである。

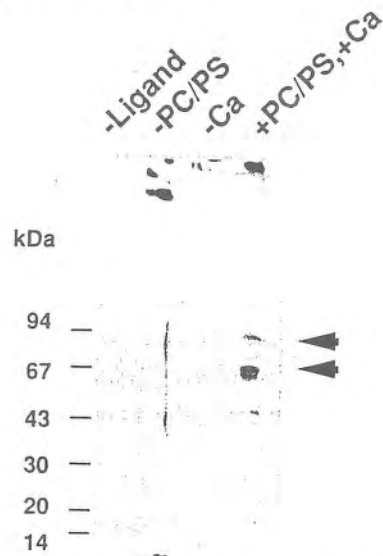


図1. アネキシンVをリガンドとしたラット大脳皮質膜画分蛋白質のファーウェスタンプロット解析

## 温度感受性中枢ニューロン様細胞株の細胞死

久永欣哉, 池田康夫, 今井嘉紀, 高坂新一

神経系の発生の過程では一部の神経細胞が死滅することが知られており、いわゆるプログラム細胞死と考えられている。その細胞死のメカニズムにはリンパ球などでみられるいわゆるアポトーシスとの共通性も指摘され、老化や神経疾患における神経細胞死との関連も含めて興味を集めている。

我々は温度感受性 SV40 large T 遺伝子導入により樹立されたラット胎仔海馬初代培養由来の細胞株において温度依存性にニューロン様細胞への形態変化及び細胞死が見られることに着目し、その細胞死の性質等につき検討した。

[方法] 温度感受性中枢ニューロン様細胞株 (HS-2) を 33.5°C 及び 38.5°C で培養し、細胞の数や形態の変化、いくつかの蛋白の免疫染色性を調べ、また RNA blotting 及び PCR を用いていくつかの messenger RNA の発現を調べた。さらにアポトーシスの指標とされる DNA の断片化の有無をゲノム DNA の電気泳動により、核の形態を acridine orange による核酸染色により調べた。

[結果及び考察] この細胞は 33.5°C では上皮細胞様の形態を示し、5% 牛胎仔血清存在下で盛んに分裂増殖するが、38.5°C の環境下に移すと導入された腫瘍遺伝子蛋白の分解が進み、細胞分裂は速やかに抑制され、しだいに突起を持つニューロン様の形態になる。dibutyryl-cyclic

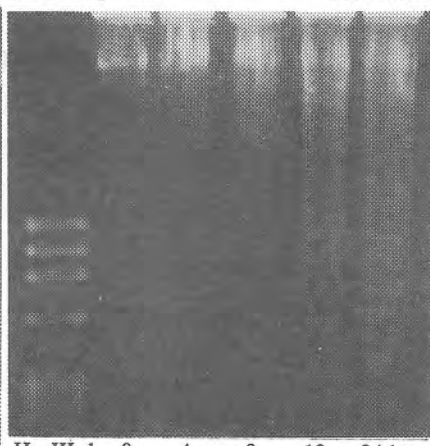
AMP を投与すると、細胞の多くはさらにニューロンに近い形態をとるようになる。この細胞は neuron specific enolase (NSE; 図1) や GABA の合成酵素である glutamic acid decarboxylase の免疫染色性を示す。また RNA blotting により低親和性 NGF 受容体及び truncated form の *trkC* と考えられるシグナルが認められ、PCR では *trkA* の発現も確認されている。

神経細胞様の形態変化と並行して、アポトーシスの指標とされる DNA の断片化や核の凝縮を伴う細胞死が認められた。すなわち 5% 血清存在下で 38.5°C の環境下に移して 12 時間後より DNA の断片化が顕著に認められ (図2)、acridine orange による核酸染色では核の凝縮が認められた。細胞数は 48 時間後までに約 5 割にまで減少した (図3; 5% 血清)。

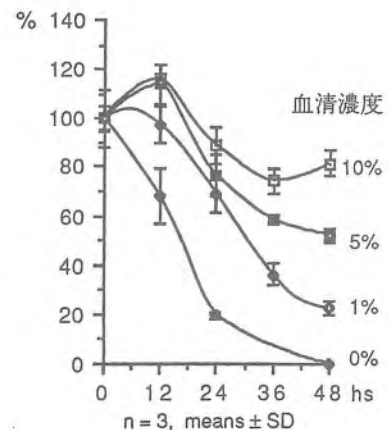
この株細胞は DNA の断片化を伴う中枢神経細胞死のメカニズムを分子レベルで解析するのに有用であると考えられる。この細胞株ではリンパ球などの細胞死に関与するとされる proto-oncogene *p53*, *fyn*, 及び *bcl-x<sub>L</sub>* の発現も確認されており、この細胞株における細胞死への関与の有無を検討している。また NGF の効果の検討を含めて、この細胞死を抑制する液性因子も現在探索している。



(図1) NSE 染色



(図2) DNA 断片化



(図3) 38.5°C での細胞数の変化

## 12. 免疫研究部

### 1. 研究部一年の歩み

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5年度に研究に参加したのは、松田義宏（室長）、竹内 保（研究員）、田村浩男（流動研究員）、尾花 智（流動研究員）、葛原博幸（流動研究員、センター研究員）、小糸寿美（センター研究員）、橘川桂三（琉球大学内科講師、国内留学）、川村則行（精神保健研究所研究員、併任研究員）、中田光紀（東京大学大学院生）、藤浦康良（東京理科大学学生）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。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（慶応義塾大学）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、藤原茂子が参加した。

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得られた。マウス未熟胸腺細胞上に見いだした新しい抗原分子が、サイトカイン様物質の受容体である可能性が示された。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が、未熟胸腺細胞の分化を完全に抑制することを明らかにした。この抗原分子の遺伝子解析も進行中である。自己免疫疾患の治療法の1つとして、近年再び注目をあびはじめた経口免疫寛容の機序に、 $\gamma\delta$ 型T細胞が重要な働きをしていることも判った。一方、神経系の細胞間相互作用に係わる分子と考えられているミエリン関連糖蛋白質の遺伝子発現機序を解析し、いくつかの興味ある知見が得られた。また、神経系による免疫反応の制御機構を明らかにする目的で神経免疫学的研究を開始し、ニューロペプチドが免疫制御の機序に係わっているということもわかり、今後の研究に期待がもたれる。

免疫研究部が新しい体制になって4年目を迎え、新しいプロジェクトも興味ある多くの成果が蓄積されはじめた。平成6年度からはこれら成果を基礎に更なる発展を目指し、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) Yamamoto H :

Idiotype-dependent repertoire generation in the network system  
 Crit Rev Immunol 13:151-161, 1993

2) Tamura H, Takeuchi T, Kuzuhara H, Yamamoto H :

The novel mAb QR6.6 detects a surface molecule on immature thymocytes and inhibits their proliferation on thymic epithelial cells  
 J Immunol 152:1134-1140, 1994

## c. 総説

1) 松浦 靖, 山元 弘 :

CD5<sup>+</sup>B細胞のレパートリー  
 臨床免疫 25 : 1245-1251, 1993

## d. 班会議報告書

1) 山元 弘, 松田義宏, 松浦 靖, 藤田信也, 佐藤修三 :

Myelin associated glycoprotein (MAG)の動物細胞での発現  
 平成4年度厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班報告書  
 273-275, 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  
 平成4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  
 192-195, 1993

3) 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  
 がん研究と診療の飛躍 厚生省対がん10カ年総合戦略プロジェクト研究第Ⅲ期-1総括集  
 201-206, 1993

## e. その他

1) 田村浩男, 山元 弘 :

免疫学辞典(項目別分担執筆) 東京化学同人 11.15, 1993



## II 研究業績

### B. 学会発表

#### b. シンポジウム

- 1) 尾花 智, 橘川桂三, 藤浦康良, 石川博通, 糸原重美, 山元 弘

$\gamma$   $\delta$ 型T細胞欠損マウスにおける体表面・消化管免疫応答の解析

第23回日本免疫学会総会シンポジウム, 仙台, 11.17, 1993

- 2) Yamamoto H :

Detection of cell surface molecules involved in the early T cell development

NCNP International Symposium of Neuroimmunology, Tokyo, 3.22, 1994

#### c. 一般学会, その他

- 1) Takeuchi T, Yamamoto H :

In vitro arrest of immature T cell development by a novel monoclonal antibody

3rd Kyoto T Cell Conference, 京都, 10.14, 1993

- 2) 松浦 靖, 尾花 智, 山元 弘 :

抗体重鎖遺伝子導入B細胞株の樹立とイディオタイプ抗原提示

第23回日本免疫学会総会, 仙台, 11.17, 1993

- 3) 竹内 保, 葛原博幸, 田村浩男, 松浦 靖, 山元 弘 :

T細胞増殖・分化に関する胸腺上皮細胞表面抗原の検索

第23回日本免疫学会総会, 仙台, 11.19, 1993

- 4) 高橋聖一, 山元 弘, 小川正晴, 谷口武利, 藤本重義 :

相同性のある2つの神経特異的遺伝子の単離とそのユニークな空間的・時間的発現パターン

第16回日本分子生物学会年会, 千葉, 12.18, 1993

### C. 班会議発表

- 1) 山元 弘 :

胸腺上皮細胞株を用いた中枢性免疫制御機構の解析

文部省重点領域研究, 免疫制御・寛容の分子機構班会議, 福岡, 9.13, 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ヵ年総合戦略プロジェクト研究第6分野合同班会議, 東京, 10.22, 1993

- 3) 山元 弘, 松田義宏, 小糸寿美, 佐藤修三 :

Myelin associated glycoprotein (MAG) 遺伝子の発現機序

厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究会議，東京，1.20，1994

4) 山元 弘：

ヘルパーT細胞サブセットの偏倚誘導

ヒューマンサイエンス振興財団健康管理・免疫低下防止研究事業班会議，東京，2.18，1994

5) 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会議，東京，2.28，1994

## 胸腺内 T 細胞初期分化に関与する分子群の解析

竹内 保, 田村浩男, 葛原博幸, 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どのような細胞群で、またどのような機能を有しているかということは、ほとんど未解明のまま残されている。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(1993)。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 (QR6.6) を得た(1994)。一方、SL10.3 を免疫して得たモノクロナル抗体 (AS19, AS32) 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 (AS19, AS32, HS9) や QR6.6 は、きわだった特徴を示すことから、これら抗体の作用・認識分子の解析をさらに進めた。

## 【結果と考察】

1. 未熟胸腺細胞に特異的に反応する抗体、QR6.6 が認識する分子。

QR6.6 は、未熟胸腺細胞表面抗原を認識する。われわれは当初、QR6.6 が認識する分子は未熟胸腺細胞と胸腺上皮細胞との間の相互作用に関与する分子であると考えてきた。しかし最近、胸腺細胞をコンカナバリン A で刺激した培養上清が未熟胸腺細胞を増殖刺激すること、またこの増殖反応が QR6.6 抗体で抑制されることを見いだした。IL2, IL7 等既知のサイトカインによる増殖応答が QR6.6 抗体では抑制されないことから、QR6.6 が認識する分子は未知のサイトカイン (もしくは既知のサイトカインの未知の作用) に対する受容体分子を認識しているものと考え、培養上清から活性因子の単離精製、および QR6.6 分子の遺伝子クローニングを目指して材料の大量調製を進めている。

2. 胸腺上皮細胞特異的抗体、AS19 (AS32) が認識する分子。

SL10.3 cDNA ライブラリーをモノクロナル抗体および特異的抗血清を用いて expression cloning を行った。AS 発現が強く誘導される発現細胞クロンを得、遺伝子構造解析を行った。この遺伝子は細胞膜通過部分を欠くため本来目的とした遺伝子ではなく、ヒト small G 蛋白質の一種に高い相同性を示した。しかし small G 蛋白質がどのような機序を介して胸腺上皮細胞表面上の AS 対応抗原の発現に働くかは興味深く、現在その機序の解析を通じて胸腺上皮細胞機能の役割を明らかにすべく研究を進めている。

3. 胸腺上皮細胞特異的抗体、HS9 が認識する分子。

胸腺上皮細胞クロン由来 cDNA ライブラリーを HS9 を用いて expression cloning を行った。現在いくつかの candidate cDNA をクローニングしており、構造解析を進めている。マウス small G 蛋白質発現細胞では弱いながらも HS9 に反応性を示すことから、HS9 対応抗原も small G 蛋白質を介した細胞内調節によって制御されている可能性がある。

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 (およ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。

## サイトカインによるT細胞サブセットの偏倚誘導

尾花 智, 橘川桂三, 山元 弘

マウスCD4陽性T細胞は、それが産生するサイトカインの種類によってTh1とTh2の2種に分類される。Th1はIL2、 $\text{INF}\gamma$ を産生し、遅延型エフェクターT細胞等の細胞性免疫に関与するT細胞、Th2はIL4、IL10を産生しIgG2抗体産生のヘルパーT細胞に分類できる。それぞれのT細胞サブセットが産生するサイトカインは、互いにもう一方のサブセットに対し抑制的に働く。ある種の抗原をマウスに免疫した時、遅延型反応を強く誘導する方法では抗体産生が抑制され、また逆に抗体産生が強く誘導されるときは遅延型反応が抑制されるという、いわゆるsplit toleranceという現象が古くから知られているが、この現象は現在ではTh1とTh2のバランスで説明が可能である。細胞性免疫による種々自己免疫疾患やIgE抗体をはじめとする種々アレルギー性液性免疫が、Th1とTh2のバランスを選択的に誘導することによって人為的に偏倚できれば、新しい免疫制御の方法が可能になる。しかしヒトT細胞では、IL4、 $\text{INF}\gamma$ 共に産生するT細胞(Th0と称される)が多く存在することから、この様な分類が困難であるとも指摘されている。われわれはマウス・ヒトリンパ球を用いて、種々抗原に対するT細胞応答を調べ、Th1/Th2分類の妥当性と偏倚誘導の可能性を検討している。

## 【結果と考察】

1. レジオネラ菌(Lp)に対するヒトT細胞応答。  
レジオネラ菌は、いわゆる「在郷軍人病」として知られる肺炎の原因菌であり、液性免疫を誘導すると共に菌の細胞内増殖性に伴う細胞性免疫が活性化される。ホルマリン固定したLpで多数の健康人末梢血リンパ球を刺激すると、強いCD4T細胞増殖を示した。増殖応答と $\text{INF}\gamma$ 産生量は直線関係を示すため、リンパ球が産生するIL4と $\text{INF}\gamma$ 量をRT-PCR法にて半定量した。その結果、菌体刺激では $\text{INF}\gamma$ 産生が著明であるのに反し、IL4産生は全く検出できなかった。菌体刺激で長

期培養したT細胞クロンを樹立してサイトカイン産生パターンを調べたところ、 $\text{INF}\gamma$ 産生のみ認められた。一方菌体培養上清で末梢血リンパ球を刺激すると、 $\text{INF}\gamma$ 産生と共にIL4も産生されることから、感染に対する液性免疫の重要性も物語っている。培養上清刺激で応答する細胞がTh1/Th2の総和かTh0によるものかは判っていない。

2. インターロイキン12(IL12)によるサイトカイン産生制御。

IL12は近年発見されたサイトカインで、Th1をはじめナチュラルキラー(NK)細胞、細胞障害性T細胞の活性化因子である。IL12は細胞性免疫を強めるため、免疫応答の制御への応用に期待が集まっている。われわれはIL12によるサイトカイン産生制御の可能性を検討する目的で、まずマウスIL12遺伝子をクローニングし、発現細胞株の樹立を試みた。IL12はA、B2本のペプチドから成るため、AおよびB鎖遺伝子を順次トランスフェクトして、IL12活性を示す細胞株をクローニングした。遺伝子導入細胞培養上清は、T細胞増殖活性とNK活性増強作用を示した。

多発性硬化症をはじめ自己免疫疾患の多くは細胞性免疫が原因となっている。マウスでみられるようなヘルパーT細胞サブセットの選択的活性化が、細胞性免疫を強めるか液性免疫を強めるかを支配するとすれば、少なくともマウスをモデルとした自己免疫現象での人為的偏倚誘導の可能性が期待できる。ヒトT細胞でも特定の抗原刺激に対する偏倚的応答が起こることが判った。IL12はTh1活性化の上位のサイトカインであり、またマウスIL12はヒトT細胞に対しても作用を発揮する。今後IL12を用いて、マウスEAE誘発性T細胞の誘導と、ヒトおよびマウスT細胞サブセットの偏倚誘導の可能性について検討する予定である。

## ミエリン特異的タンパク質の遺伝子発現機序の解析

松田義宏, 小糸寿美, 山元 弘

脱髄性疾患の発症機序あるいは回復機序を明らかにする上で、ミエリンの形成機構を理解することは必須要件である。これまでに、ミエリン形成に際して重要な役割が想定される特異的タンパク質として、ミエリン形成細胞と神経細胞の直接の接着に関与する MAG(myelin associated glycoprotein)、髄鞘膜間の緊密な接着に関わる PLP (proteolipid protein) 等が知られているが、それらの発現制御機構、細胞間接着機構、及びアイソフォームの役割分担等、数多くの問題が未だ解明されていない。本研究では、RT-PCR 法を利用して、MAG 及び PLP 遺伝子の発現の定量を試み、ミエリン形成時におけるこれら特異的タンパク質の発現制御機構並びにアイソフォームの役割分担に考察を加えた。

## 【方法】

1. 生後、ミエリン形成期のさまざまな日齢のマウス脳から総 RNA 画分を調製し、逆転写によって cDNA を得た後、選択的スプライシングにより生じる MAG 及び PLP のそれぞれ 2 種のアイソフォームを分別できる特異的プライマーを用いて 20-30 回の PCR を行った。基質中に  $^{32}\text{P}$ -dCTP を加えておき、取り込まれた放射活性から各 mRNA の相対的定量を試みた。

2. マウス脳ミエリン画分で免疫したハムスターの脾細胞とマウスミエローム細胞を融合させ、MAG タンパク質の細胞外領域と特異的に反応する単クローン抗体(2B6)を産生するハイブリドーマクローンを得た。この抗体を出生直後のマウス腹腔に投与し、ミエリン形成開始期におけるミエリン特異的タンパク質の発現に対する影響を観察した。

## 【結果】

1. RT-PCR 法による定量の RNA 量依存性を検討したところ、3-30ng/ $\mu\text{l}$ の範囲で PCR 産物量との間に比例関係が認められた。

2. マウスの生後、脳内における MAG mRNA の発現の推移を調べたところ、ミエリン形成期に相当する 10-21 日目に L-MAG の著明な増大が認められ

た。一方、S-MAG は出生時に既にかかなりの量が発現されていたが、ミエリン形成期には L-MAG と逆相関的に低下し、その後再び上昇を示して、成熟動物中では主成分となった。また、PLP は生後 10 日目頃から増大する L-MAG と同様の発現パターンを示したが、胎児型アイソフォームといわれる DM20 は出生時から高いレベルにあり、ミエリン形成期以降も PLP とほぼ同レベルの発現を示した。3. 新生仔マウスに 100  $\mu\text{g}$  (10  $\mu\text{l}$ ) の抗 MAG 単クローン抗体を腹腔内投与し、ミエリン形成開始期にあたる 5-7 日目に脳内の MAG、PLP の発現を調べたところ、抗体投与動物では PBS を投与した対照動物に比べ、L-MAG 及び PLP の発現が半減していた。この時、S-MAG 或は DM20 の発現に差は認められず、抗体の影響はミエリン形成に関与する分子に特異的であることが示唆された。

## 【考察】

MAG アイソフォームの生理的役割について、ミエリン形成期には L 型が関与し、完成後のミエリンの維持には S 型が作用するとの考えが提唱されているが、本実験成績もこれを支持するものであった。但し、出生時期に有意な S-MAG の発現が認められたことは予想外の結果で、MAG がミエリン形成以外の役割を担う可能性を示唆する。培養細胞系を用いて、MAG が細胞外に分泌されることや、神経突起の伸展に促進作用を有することが報告されているが、脳内ではこの早期に発現される MAG 分子が神経栄養因子様に作用しているのかも知れない。

抗 MAG 抗体が新生仔マウスの脳に *in vivo* に作用して L-MAG の発現を抑制したことは本抗体がタンパク質の発現を阻害するような何らかの情報をミエリン形成細胞にもたらしたことを示す。さらに、PLP の発現が同時におさえられたことは両者の発現がミエリン形成期に共通の制御下にあることを示唆する。

## T細胞機能の神経性調節

川村則行\*, 田村浩男, 山元 弘, 石川俊男\*, 吾郷晋浩\* (\*精神保健研究所)

アレルギー性疾患の発症と経過には、心理社会的要因が深く関連しており、また心身医学的治療は、一般内科学的治療単独に比べて寛解導入率が有意に高いことが示されている。これらの事実がいかなる生物学的基盤を持つかを明らかにすることを本研究の目的とする。

近年、神経系、内分泌系、及び免疫系はそれぞれ独立に機能しているのではなく、相互に密接に関係し、分子レベルで情報のやりとりをしていることが明らかにされている。例えばリンパ球は、細胞表面及び内部に、内分泌ホルモンや神経伝達物質のリセプターをもち、また、自身でホルモンや神経伝達物質を産生・分泌することができるがその生理的意味はまだ明らかにされていない。これらの事実を背景に、気管支喘息の病態生理において中心的な役割を果たしているヘルパーT細胞に対して、気道及び末梢血中に存在する種々の神経ペプチドがいかなる影響を与えるかを、マウスの抗原特異的T細胞クローンを用いて、増殖能とサイトカインの産生に焦点をあてて検討した。

【方法】 マウスT細胞クローンは、BALB/c 由来 BSA 特異的 Th1 クローン、C3H 由来 KLH 特異的 Th1 クローン、さらに C57BL/6 由来 KLH 特異的 Th2 クローンなどを用いた。

神経ペプチドは、主に気道にみられる substance P (SP)、carcitonin-gene related peptide (CGRP)、neuropeptide Y (NPY)、vasoactive intestinal peptide (VIP)と

主に末梢血中にみられる

$\beta$ -endorphin ( $\beta$ -End)、leucine-enkephalin (l-Enk)、methionine-enkephalin (m-Enk)を用いた。

上記の7種類の神経ペプチドを、 $10^{-6}$ M から  $10^{-13}$ M までの生理的濃度でT細胞クローンと共に培養し、 $^3$ H-TdR の取り込みを調べることにより、その作用を検討した。さらにこれらの神経ペプチドを、同様の条件で作用させ、24 時間後に、細胞を回収し、total RNA を用いた RNase-protec-

tion assay により、サイトカインの mRNA を測定し、神経ペプチドを作用させない群と比較した。

【結果】 T細胞クローンの増殖に与える神経ペプチドの影響には濃度依存性があり、以下に示すような傾向があることが示唆された。

- ① SP は Th1 の増殖に対して抑制的に働く。
- ② l-Enk と m-Enk は Th2 に対して抑制的に働く。
- ③ NPY と VIP は、Th1 に対してやや促進的に働くが、Th2 に対しては、抑制的に働く。
- ④ CGRP と  $\beta$ -End は両者に対して抑制的に働く。

T細胞クローンの産生するサイトカインのうち、IL-5 と IFN $\gamma$  の産生に対して、神経ペプチドの与える影響には、濃度依存性があり以下のような傾向があることが示された。

神経ペプチド	IFN $\gamma$	IL-5
SP		↑
CGRP	↓	↓
VIP		↓/→
l-Enk		↓
m-Enk		↓
$\beta$ -End	↑	↓

【考察】 気管支喘息患者の BALF 中の SP 濃度は、非喘息健康人のそれと比べて有意に高く、また発作時には、安静時に比べて5から20倍程度上昇する。以上のように喘息患者の気道中の如く、SP濃度が高くなる環境下において、ヘルパーT細胞は、Th1 の増殖が抑制され、Th2 の産生する IL-5 の産生が促進されるなど、相対的に Th2 優位の状態が引き起こされる可能性が示唆された。これは、何らかの神経性の調節機構が、喘息の病態を左右するメカニズムが存在することを意味する。また、その他の神経ペプチドにおいても、T細胞に対する調節機構があることが示され、喘息のみならず潰瘍性大腸炎などの消化器心身症でも、神経性の病態生理学的意義の存在が示唆された。

## 13. 遺伝子工学研究部

### 1. 研究部一年の歩み

研究部の開設以来5年あるいは6年の歳月をかけて積み上げてきた研究がようやく実を結びつつあることを感じた年であった。開設に伴い、ゼロから出発したショウジョウバエの神経系の研究については焦点が絞られ、神経機能の分子遺伝学的解析を進めるための将来展望が開けてきた。また、数年来の課題であった標的遺伝子のノックアウトに成功し、国際誌に掲載することができた。結果としてシンポジウムや総説執筆の依頼が増えることとなり、研究室の成果を多くの研究者に知っていただける機会が得られ、人的な交流の枠も広がった。しかし、この様なことが過度になると実験への集中を欠いてしまう恐れがあるのでオリジナルな研究成果を上げることにできるだけ専念しなければならないと考え、なるべく減らそうと思っている。数年前より遺伝子治療研究が話題とされてきたが日本でも委員会が発足し、また厚生省より研究費も出されることになり、当センターでも参加することとなり、筋ジストロフィーを対象に研究をスタートした。非常に困難な課題であるが研究所全体で協力しあって一步一步進んでいければと思っている。

メンバーの移動は次のとおりである。イギリスからのSTAフェローで参加されたアイシャさんは“おめでた”のため任期途中であったが2月に帰国した。科学技術特別研究員の星さんは三菱生命研究所へ1月より転出した。大学院時代のテーマであるリン酸化酵素の研究を行うことになったが、良い成果を期待したい。理研つくばライフサイエンスセンターより千葉君がさきがけ21のフェローとして2月より参加した。また、夫人の真紀さんも一緒に来られ、研究を始めることとなった。東大浅島研究室の高橋君が初期発生、誘導現象を分子レベルで解析することを目的に研究生となった。

3月には私どもが当センターで研究を始めて以来、共同研究を続けてきたモデル動物開発部の花岡室長が北里大学理学部の教授として栄転された。花岡さんは我々がもっていない学問的なバックグラウンドを持っておられる方で私共の研究を推進する上で大変重要な役割を果たしていただいた。今後も共同研究を続けることになっているが花岡さんのスタイルを守りつつ花岡さん独自の道を切り開いていかれることを期待したい。

(部長 鍋島陽一)

## 2. 研究業績

## A. 論文

## a. 原著

- 1) Saitoh O., Fujisawa-Sehara A., Nabeshima Y. and Periasamy M.  
Expression of myogenic factors in denervated chicken breast muscle: isolation of the chicken Myf5 gene. *Nucleic Acids Res.*, 21:2503-2509, 1993
- 2) Nabeshima Y., Hanaoka K., Hayasaka M., Esumi E., Li Shawei., Nonaka I., and Nabeshima Y.  
Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*, 364:532-535, 1993
- 3) Asakura A., Fujisawa-Sehara A., Komiya T., Nabeshima Y., and Nabeshima Y.  
Myo D and myogenin act on the chicken myosin light chain I gene as distinct transcription factors. *Mol. Cell. Biol.*, 13:7153-7162, 1993

## b. 著書

- 1) 富樫 伸, 鍋島陽一：  
新化学実験講座 第2巻 核酸 V 細胞工学的技術  
P因子によるショウジョウバエへの遺伝子導入とその応用  
日本生化学会編 東京化学同人 1993

## 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  
実験医学増刊 “転写因子研究の新展開”，11：1020-1024, 1993
- 2) 朝倉 淳, 藤沢淳子, 鍋島陽一：  
組織分化：筋誘導 特集 現代の医学，生物学の仮説・学生  
生体の科学，44：498-499 1993
- 3) 黒尾 誠, 永井良三, 矢崎義雄, 花岡和則, 鍋島陽一：  
Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆輸送担体のトランスジェニックマウスの作成とその病態解析  
日本臨床 51：1524-1529, 1993
- 4) 黒尾 雅人, 広井透雄, 相川真範, 永井良三, 花岡和則, 早坂美智子, 鍋島陽一, 野口 毅,  
宮岸 明, 加藤祐久, 矢崎義雄：



## II 研究業績

発生工学的技術を用いた新しい高血圧モデル動物の開発— $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆輸送担体を過剰発現するトランスジェニックマウスの病態解析 医薬ジャーナル, 30 : 212-215, 1994

### 5) 鍋島陽一 :

発生・分化と転写調節 特集 遺伝子発現と転写因子 Mebio, 11 : 98-105 1994

### 6) 鍋島陽一 :

相同組み換えを用いた遺伝子変異導入法

BIO Clinica, 9 : 201-205, 1994

## d. 班会議報告書

### 1) 鍋島陽一 :

筋細胞分化の遺伝子制御ネットワーク

平成5年度文部省重点領域研究「細胞の機能分化に関わる遺伝子制御ネットワーク」研究班報告書 44-45, 1994

### 2) 鍋島陽一 :

筋発生における筋分化制御因子群の機能分担

平成5年度文部省重点領域研究「形態形成の調節機構」研究班報告書 64-65, 1993

### 3) 鍋島陽一 :

Myogenin欠失マウスの解析

平成5年度文部省重点領域研究「標的遺伝子組み換えによる生体機能の研究」研究班報告書 206-209, 1993

### 4) 鍋島陽一 :

筋発生におけるMyogeninの機能の解析

平成5年度厚生省精神・神経疾患研究委託費「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」研究班報告書 54-59, 1993

### 5) 鍋島陽一 :

運動機能を調節する神経回路の形成に必要なhigタンパク質の機能の解析

平成5年度厚生省精神・神経疾患委託費「神経疾患の病態解明に関する分子遺伝学的研究」研究班報告書 9-12, 1993

### 6) 鍋島陽一 :

Myogeninの発生における機能

平成5年度文部省科学研究費 総合A「筋形成の分子機構」研究班報告書 17-20, 1993

7) 松崎文雄 :

ショウジョウバエの初期胚神経発生を制御するprospero遺伝子

平成5年度文部省科学研究費重点領域「ショウジョウバエを用いた遺伝子機能解析」研究班報告書 42-43, 1993

8) 鍋島陽一, 藤森由美 :

遺伝子機能を人為的に制御する技術の開発

平成4年度HS財団「疾患モデル開発のための基礎研究及び動物の開発」研究班報告書 246-250, 1993

## B. 学会発表

## b. シンポジウム

1) Matsuzaki F., Goto S., Hirata J., Nakagoshi H., and Nabeshima Y. :

Neural precursor gene, prospero and fundamental processes in Drosophila Neurogenesis. Japan Intractable Diseases Research Foundation Seminar, Neurobiology VI, Molecular and Developmental Biology of Neural networks Tokyo, 1.20, 1994

2) Nabeshima Y., Hanaoka K., Hayasaka M., Esumi E., Nonaka I., and Nabeshima Y. :

Genetic control of myogenesis: The role of myogenic bHLH proteins in myogenesis. The 33rd NIBB Conference on Approachs to the Cellular and Molecular Mechanisms of Regeneration. Okazaki, 3.25, 1994

3) 鍋島陽一 :

筋細胞分化の分子機構 日本農芸化学会シンポジウム 仙台, 4.1, 1993

4) 鍋島陽一 :

筋分化制御因子Myogeninの機能の解析 日本生化学会東北支部シンポジウム, 仙台, 5.29, 1993

5) 鍋島陽一 :

Gene disruptionによって明かされたMyogeninの機能  
日本細胞生物学会 ミニシンポジウム 前橋, 10.22, 1993

6) 松崎文雄, 後藤 聡, 中越英樹, 平田 丞, 鍋島陽一 :

ショウジョウバエの神経初期発生  
日本分子生物学会シンポジウム 幕張, 12.18, 1993

## II 研究業績

- 7) 鍋島曜子, 花岡和則, 早坂美智子, 江隅英作, 埜中征哉, 鍋島陽一 :

筋細胞分化の分子機構 ——筋分化制御遺伝子群の機能の解析——

日本分子生物学会シンポジウム 幕張, 12.19, 1993

- 8) Hoshino M., Hama C., Matsuzaki F. and Nabeshima Y. :

hikari genki, a CNS-specific gene identified by abnormal locomotion, encodes a novel type of protein.

34th annual Drosophila Research Conference, San Diego, 4.4, 1993

### c. 一般学会, その他

- 1) 松崎文雄, 後藤 聡, 平田 丞, 中越英樹, 鍋島陽一 :

prospero遺伝子によるショウジョウバエ神経発生の制御

第26回日本発生生物学会年会 福岡, 5.26, 1993

- 2) 浜 千尋, 星野幹雄, 鍋島陽一 :

活動性低下によって同定された神経発生に関与するショウジョウバエ遺伝子

第26回日本発生生物学会年会 福岡, 5.26, 1993

- 3) 鍋島陽一, 鍋島曜子, 早坂美智子, 江隅英作, 埜中征哉, 花岡和則 :

Gene disruptionによって明かにされたMyogeninの機能

第26回日本発生生物学会年会 福岡 5.26, 1993

- 4) 星野幹雄, 鈴木えみ子, 三宅 端, 鍋島陽一, 浜 千尋 :

ショウジョウバエの神経系特異的に発現するhikaru genki遺伝子の解析

第16回日本分子生物学会年会 幕張メッセ, 12.18, 1993

- 5) 曾根雅紀, 星野幹雄, 西郷 薫, 鍋島陽一, 浜 千尋 :

中枢神経系で発現した運動機能の形成に関わるショウジョウバエの遺伝子の98.1の解析

第16回日本分子生物学会年会 幕張メッセ, 12.18, 1993

- 6) 星 美奈子, 中越英樹, 鍋島陽一, 松崎文雄 :

エンハンサートラップ法による視覚情報処理に関する遺伝子の検索

第16回日本分子生物学会年会 幕張メッセ, 12.18, 1993

- 7) 中越英樹, 星美奈子, 鍋島陽一, 松崎文雄 :

ショウジョウバエを用いた脳高次機能解析の試み

第16回日本分子生物学会年会 幕張メッセ, 12.18, 1993

- 8) 後藤 聡, 平田 丞, 中越英樹, 鍋島陽一, 松崎文雄 :

神経発生に必要なホメオボックス遺伝子であるprosperoの標的遺伝子の検索

第16回日本分子生物学会年会 幕張メッセ, 12.18, 1993

9) 平田 丞, 中越英樹, 後藤 聡, 鍋島陽一, 松崎文雄 :

神経発生における転写後発現制御

第16回日本分子生物学会年会 幕張メッセ, 12.18, 1993

10) 朝倉 淳, 藤沢淳子, 鍋島陽一 :

Myogenin特異的エンハンサーの解析

第16回日本分子生物学会年会 幕張メッセ, 12.18, 1993

11) 鍋島曜子, 花岡和則, 早坂美智子, 江隅英作, Shaowei Li, 埜中征哉, 鍋島陽一 :

Gene disruption法によるMyogeninの機能の解析

第16回日本分子生物学会年会 幕張メッセ, 12.18, 1993

12) 江隅英作, 鍋島曜子, 荒畑喜一, 花岡和則, 鍋島陽一 :

Myogenin機能を欠失したマウスの変異表現型

第16回日本分子生物学会年会 幕張メッセ, 12.18, 1993

d. 班会議発表

1) 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

平成5年度科学技術庁「新しい動物実験系開発のための基礎技術の研究」班会議 8.25, 1993

2) 藤沢淳子 :

発生過程の遺伝子操作技術の開発 ; 骨格筋分化特異的な遺伝子制御系の研究

平成5年度科学技術庁「発生工学技術の開発等に関する研究」班会議, 東京, 9.1993

3) 鍋島陽一 :

筋細胞分化の遺伝子制御ネットワーク

文部省重点領域研究「細胞の機能分化に関わる遺伝子制御ネットワーク」班会議

宇奈月, 9.13, 1993

4) 鍋島陽一 :

筋発生における筋分化制御因子群の機能分担

文部省重点領域研究「形態形成の調節機構」班会議 名古屋 10.7, 1993

5) 鍋島陽一 :

筋発生におけるMyogeninの機能の解析

## II 研究業績

厚生省精神・神経疾患研究委託費「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」班会議 東京, 12.2, 1993

6) 鍋島陽一 :

Myogenin欠失マウスの変異表現型

文部省重点領域研究「標的遺伝子組み換えによる生体機能の研究」班会議 唐津 1.12, 1994

7) 浜 千尋, 鍋島陽一 :

運動機能を調節する神経回路の形成に必要な hlg タンパク質の機能の解析

厚生省精神・神経疾患研究委託費「神経疾患の病態解明に関する分子遺伝学的研究」班会議 東京, 2.4, 1994

8) 鍋島陽一 :

Myogeninの発生における機能

文部省科学研究費 総合A 班会議 千葉 2.5, 1994

9) 浜 千尋, 鍋島陽一 :

遺伝学的手法を用いた神経機能分子の解析

長寿科学振興財団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」班会議 東京, 2.10, 1994

10) 藤沢淳子 :

発生過程の遺伝子操作技術の開発; 骨格筋分化特異的な遺伝子制御系の研究

科学技術庁「発生工学技術の開発等に関する研究」班会議 東京, 2, 1994

11) 松崎文雄 :

ショウジョウバエの初期胚神経発生を制御するprospero遺伝子

文部省科学研究費重点領域「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, 2.15, 1994

12) 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「新しい動物実験系開発のための基盤技術の研究」班会議 東京, 3.11, 1994

13) 鍋島陽一, 藤森由美 :

遺伝子機能を人為的に制御する技術の開発

HS財団「疾患モデル開発のための基礎研究及び動物の開発」班会議, 東京, 3.24, 1994

14) 鍋島陽一, 武田伸一 :

筋ジストロフィーに対する遺伝子治療に関する基礎的研究

厚生省高度専門医療研究費「遺伝子治療臨床研究」班会議 東京, 3.26, 1994

## MyoD, myogenin 特異的エンハンサーの存在

藤沢淳子, 朝倉 淳, 小宮 透, 佐藤智美, 八神貴子, 鍋島陽一

## 1) 研究の動機とその背景

骨格筋の分化は、基本的には中胚葉由来の多能性細胞から筋芽細胞が生じ、それが互いに融合して筋管を形成する過程であり、細胞分化、形態形成機構を理解する上で優れた系のひとつといえるだろう。近年、MyoD, myogenin をはじめとして、繊維芽細胞を筋芽細胞に転換する4種類の遺伝子のcDNAが単離された。筋形成の過程においてこれらの遺伝子は、それぞれどのような役割を担っているのだろうか。

Myogenin は、他の筋分化誘導因子と異なり、調べられた全ての樹立筋芽細胞で、構成的あるいは誘導的に発現がみられ、また、マウスの胚発生の中で体節、肢芽など筋芽細胞が生ずる部位においてその転写活性化がみられる。さらに、myogenin 欠損マウスは胎児期における筋形成が阻害され致死であったことから、myogenin が筋形成に必要な遺伝子であることが証明された。一方、Myf5, MyoD は、その発現パターンや欠損マウスの表現型から、筋分化において myogenin とは異なる機能をもつことが示唆された。では、これら筋分化誘導因子の異なる機能の実体は何なのであろうか。

## 2) Myogenin 或はMyoDに特異的なエンハンサーの存在

これら筋分化誘導因子は、転写調節領域に存在するE-box (CANNTG) に結合する転写因子である。

我々は、骨格筋型ミオシン軽鎖 (MLC1f/3f) の上流に骨格筋特異的エンハンサーが存在し、これがmyogenin 或はMyoDによって活性化されること、さらにその詳細な検討から、そのエンハンサーがMyoDによって活性化される領域 (EN I) と myogenin によって活性化される領域 (EN II) に分割されることを明らかにした。このエンハンサー約300bpの上流半分がEN I であるが、その活性は2個のE-box (E 1、

E 2) の存在に依存していた。一方、EN II はこのエンハンサーの下流側にあり、その活性には、E 5が必須であった。しかし、これらのE-boxはmyogenin にもMyoDにも結合し、これらの因子の転写特異性はE-boxに対する結合性によらないことがわかった。

## 3) Myogenin特異的エンハンサーの特異性はどのように決まるか

では、このように同じDNA配列を認識しながら、それぞれ異なる転写活性化能をもつのはどうしてであろうか。Myogenin と MyoDの特異性の違いのメカニズムをあきらかにするために、MyoDとmyogeninのキメラタンパク質を作成し、これらの因子のどの領域がその特異性に関与しているかを調べてみると、それにはDNA結合性に関与するbHLHドメイン以外の領域が関与していることがわかった。さらにEN II領域の中のE-box以外の領域が、EN II領域のmyogeninによる活性化に関与していることも示された。

これらの結果から、myogenin やMyoDと協同的に働き、その特異的転写にかかわる因子があるのではないかと考えられる。今後、そのような因子を同定することによって、myogenin やMyoDによる転写活性化機構、筋分化の分子機構を明かにしていきたい。

## (参考文献)

MyoD and myogenin act on the chicken myosin light chain 1 gene as distinct transcriptional factors. (1993) Mol. Cell. Biol. 13, 7153-7162.

Differential trans-activation of muscle-specific regulatory elements including the MLC box by chicken MyoD, myogenin, and MRF4. (1992) J. Biol. Chem. 267, 10031-10038.

神経分化因子 *prospero* の発現制御

平田 丞, 中越英樹, 後藤 聡, 鍋島陽一, 松崎文雄

我々はショウジョウバエをモデル実験系として、神経発生の遺伝的なプログラムの理解をめざしている。

神経発生に異常をきたす突然変異から、我々が同定した*prospero*遺伝子はホメオボックスを持つ核蛋白をコードし、転写調節遺伝子として働くと想定される。この遺伝子が欠損すると、胚発生時に、神経ネットワークの形成が著しいダメージを受け、致死となるため、神経発生に重要な役割を果たしていると考えられる。

## 目的

*prospero* mRNAは1次前駆細胞である神経芽細胞と2次前駆細胞で発現するが、*prospero* 蛋白は2次前駆細胞の核だけに蓄積する。

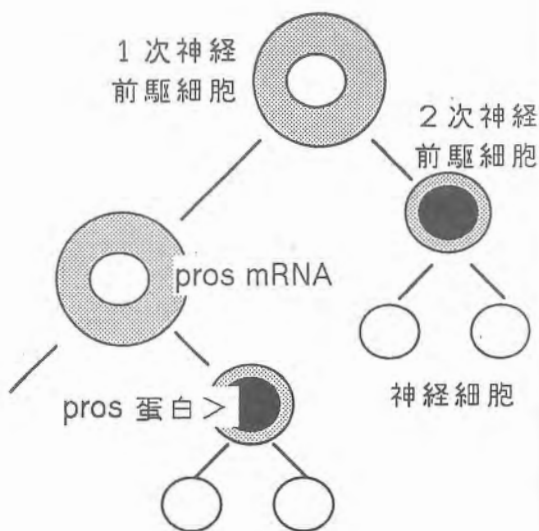
1次前駆細胞と2次前駆細胞におけるこの非対称な蛋白の発現は、*prospero*蛋白を2次前駆細胞だけで機能させるために重要な意味を持つと考えられる。そこで、*prospero*の発現調節の仕組みとその生理的な意味を解析することにした。

## 結果と考察

*prospero*遺伝子上流発現調節領域(5 kb)は1次、及び2次神経前駆細胞での遺伝子発現に十分な領域を含んでいるので、このDNA断片に*prospero* cDNAの全長をつないだmini-geneを作製し、*prospero*遺伝子の欠失した個体に戻して、その発現を観察した。このmini-geneは1次、及び2次神経前駆細胞で等しく転写されたが、その翻訳産物は後者のみで観察され、ゲノム上の本来の*prospero*遺伝子からの発現と同様の振舞いを示した。このことは、1次前駆細胞で*prospero*蛋白の発現を抑制する情報が、成熟した*prospero* mRNA上に含まれていることを

意味する。一方、この完全長*prospero* cDNAにlacZ遺伝子を挿入し、*prospero* 蛋白のN端側の一部とlacZの融合蛋白を発現させると、この蛋白はそのmRNAと同様の発現パターンを示し、1次前駆細胞での発現抑制は見られない。従って、発現の抑制は成熟した*prospero* mRNA上の情報によるものの、卵母細胞に蓄えられた母性遺伝子mRNAの場合に見られる翻訳の抑制によるのではなく、翻訳後に起ることが示唆された。

そこで、*prospero*蛋白の一部を欠く、欠失遺伝子を多数作成し、その発現の解析を行っている。この解析から、1次前駆細胞での発現抑制に必要な*prospero*蛋白上のシグナルを突き止めることができる。また、そのシグナルを欠いた変異*prospero*遺伝子を用いれば、1次前駆細胞に*prospero*蛋白を蓄積させ、神経発生に与える影響を検討することが可能になる。



## ショウジョウバエからアプローチするシナプスの生物学

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様々な神経機能を生みだしている。この複雑な情報システムが成立するためには、神経細胞間の個々のシナプスにおける神経伝達物質の放出とその調節を基礎とした多様な分子機構が存在するはずである。近年生化学的な解析からシナプス小胞に作用して放出を調節する複数の因子が同定されてきたがその研究はまだ緒についたばかりであり、さらにシナプスの可塑性の問題も未だ断片的な知見が得られたのに過ぎない。われわれは今までにシナプスの諸問題に焦点をあてながらショウジョウバエの運動機能異常変異株の解析を行ってきた。その結果、シナプスで機能する二つの新しい因子を発見することに成功し、現在その解析を進めている。

## (結果および考察)

(1) **hikaru genki (hig)** タンパク質はシナプス間隙に存在する。

*hig* 遺伝子は運動機能の低下および非協調的運動を示す突然変異株の解析により同定された。この遺伝子は中枢神経系特異的な発現パターンを示し、塩基配列の解析からN端にシグナル配列、RGDS配列、そして免疫グロブリンドメインと補体結合ドメインを持つ非常にユニークな構造を持つ約90kdの分泌性のタンパク質をコードしていることが予想された(Hoshino *et al.*, (1993) *Neuron* **10**, 395-407)。この*hig* タンパク質の機能を明かにするため抗体を作製し局在を調べると神経細胞の細胞体では小胞体/ゴルジ体が染まり、さらに軸索および神経筋節合部では小胞体の染色が観察された。さらに興味深いことに成虫脳ではシナプス間隙に顕著に局在することが明らかとなった(東大医科研、鈴木えみ子博士との共同研究による)。従って、*hig* タンパク質はシナプス前細胞で産生された後シナプス小胞に取り込まれて軸索輸送を受け、シナプス末端で放出されてシナプス間隙に蓄積すると考えられる。

*hig* タンパク質が欠損すると運動機能に異常が生じるが、細胞レベルでの *hig* タンパク質の機能は未だ不明である。われわれは、(i) シナプスの構造的安定化に直接的に働く、(ii) シナプス後膜に情報を伝達するシグナル分子として機能する、という二つの可能性を考えて *hig* タンパク質の機能解析を進めている。

(2) **98.1** タンパク質は前シナプス末端内に局在する。

*98.1* 遺伝子は *hig* 遺伝子と同様、運動機能の低下を示す変異株の解析から同定された。構造解析の結果より、この遺伝子は3種の新しい配列からなる内部繰返し構造を持ちまた細胞質に存在する性質を持つタンパク質をコードしていることが判った。抗体を用いた解析から、このタンパク質は中枢神経系で主に見られ、特に成虫の脳ではシナプスが多い領域で顕著な染色が見られる。電子顕微鏡を用いて観察すると前シナプス末端の活性領域と思われる部位近傍に集合しているシナプス小胞を含む細胞質領域が染色を示していることが判った。これらの結果からわれわれは *98.1* タンパク質がシグナル伝達により調節を受ける小胞からの放出機構に関与していることを予想しており、そのことを検証するために *98.1* 遺伝子変異株の電気生理を調べることにより直接的にシナプスでの神経伝達能の異常を検出することを試みている。



*hig* タンパク質のシナプス間隙における局在



## 14. モデル動物開発部

### 1. 研究部1年の歩み

当研究部は、種々の神経・筋疾患の病因解明や、治療法の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、ウイルス感染による実験的病態モデルの作製、遺伝子および胚操作による人為的モデル動物を作製することを目的としている。

マウス肝炎ウイルス（MHV）の表面にあるS蛋白は、病原性や生物活性と深く関わっている。本年度は、S蛋白が合成後N末側のS1とC末側のS2に開裂することが、細胞融合活性に必須な過程であるかを検討した。また、ウイルスリセプターの結合部位は、S1側にあることが予想されているが、その活性部位の同定のため、変異S1蛋白を発現させて決定しようとしている。

マウスの胚幹細胞を介したGene targeting法や構築された遺伝子のマウス個体へのTransgene systemは本年度も共同研究が行われた。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ことは、発生生物学的実験素材として有用である。これまでのヒトペプチド鎖伸展因子のプロモーターを使った細胞標識法とは別に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを標識遺伝子として同様のTransgenic mouseを作製中である。

軸索変性GADマウスは生後早期より延髄薄束核において軸索腫大やグリアの増生を示す。サブスタンスP（SP）は後根神経節や脊髄後角などの知覚神経に含まれ、薄束核には陽性細胞は少ない。しかし、GADマウスの薄束系は多くのSP陽性細胞が出現し、その大部分の細胞はアストロサイトであることを明らかにした。

人事の面では、これまで発生工学の分野で活躍してきた花岡和則室長が、北里大学理学部分子発生学教室教授として本年度末をもって転出することとなり、流動研究員の久保英幸は（株）ゲンコーポレーションの研究室へ、高橋浩美は国立予研へそれぞれ就職し、広井透雄は東京大学医学部へもどった。研究部は、平成5年9月から呉江（中国長春医科大学）、平成6年1月から鈴木秀佳の両名を新たに流動研究員として加えた。

（部長 菊池建機）

## 2. 研究業績

### A. 論文

#### a. 原著

- 1) Yamazaki K, Moriya H, Ichihara N, Mitsushio H, Inagaki S, Kikuchi T :  
Substance P-immunoreactive astrocytes in gracile sensory nervous tract of spinal cord in gracile axonal dystrophy mutant mouse  
Mol Chem Neuropathol 20:1-20, 1993
- 2) Kikuchi T, Oda K, Yamazaki K, Tagaki A, Kikuchi H :  
Early stages of axonal degeneration of Ia fibers in muscle spindles of GAD mutant mouse  
Brain Pathol 3:307-316, 1993
- 3) Miura H, Oda K, Endo C, Yamazaki K, Shibazaki H, Kikuchi T :  
Progressive degeneration of motor nerve terminals in GAD mutant mouse with hereditary sensory axonopathy  
Neuropathol Appl Neurobiol 19:41-51, 1993
- 4) Taguchi F, Ikeda T, Saeki K, Kubo H, Kikuchi T :  
Fusigenic properties of uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV  
Adv Exp Med Biol 342:171-175, 1993
- 5) Kubo H, Yoden-Takase S, Taguchi F :  
Neutralization and fusion inhibition activities of monoclonal antibodies specific for S1 subunit of spike protein of neurovirulent JHMV cl-2 variant  
J gen Virol 74:1421-1425, 1993
- 6) Yamada K.Y, Yabe M, Yamada A, Taguchi F :  
Detection of mouse hepatitis virus by the polymerase chain reaction and its applicability for the rapid diagnosis of infection  
Lab Animal Sci 43:285-290, 1993
- 7) Kubo H, Taguchi F :  
Expression of the S1 and S2 subunits of murine coronavirus JHMV spike protein by a vaccinia virus transient expression system  
J gen Virol 74:2373-2383, 1993
- 8) Taguchi F, Ikeda T, Makino S, Yoshikawa H :

## II 研究業績

A murine coronavirus MHV-S isolate from persistently infected cells has leader and two consensus sequences between the M and N genes

Virology 198:355-359, 1994

- 9) Cavanagh D, Brain D.A, Brinton M, Enjuanes L, Holmes K.V, Horzinek M.C, Lai M.M.C, Laude H, Plagemann P.G.W, Siddell S.G, Spaan W.J.M, Taguchi F, Talbot P.J :

Revision of the taxonomy of the coronavirus, Torovirus, and Arterivirus genera

Arch Virol 135:1-2, 1994

- 10) Sawai S, Shimono A, Wakamatsu Y, Palmes C, Hanaoka K, Kondo H :

Defects of embryonic organogenesis resulting from targeted disruption of the N-myc gene in the mouse

Development 117:1445-1455, 1993

- 11) Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Showei Li, Esumi Y, Nabeshima Y :

Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defects

Nature 364:332-335, 1993

### b. 著 書

- 1) 菊池建機, 高嶋幸男 :

中枢神経変性代謝疾患

[疾患別] モデル動物の作製と新薬開発のための試験・実験法, 技術情報協会,

東京, p18-28, 1993

### c. 総 説

#### d. 班会議報告書

- 1) 菊池建機, 小田健一郎, 菊池寿枝, 市原伸恒, 高木昭輝 :

GAD (gracile axonal dystrophy) マウスの筋紡錘にみられる神経軸索変性

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

平成4年度研究報告書 p19-25, 1993

- 2) 菊池建機 :

神経筋疾患モデル動物の病態解析及び開発のための基礎的研究

ライフサイエンスの基礎としてのバイオテクノロジーの応用と評価技術の開発班

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報告書 p251-256, 1993

- 3) 花岡和則 :

筋ジストロフィーモデルマウス作製のためのジーンターゲッティング技術の確立  
厚生省精神・神経疾患・筋ジストロフィーの形態学的及び生化学的基礎研究班  
平成5年度研究報告書 p51-53, 1993

## B. 学会発表

### a. 特別講演, シンポジウム

#### 1) 田口文広 :

コロナウイルスのスパイク蛋白の生物活性

東京農工大学第4回生物機能開発セミナー, 東京, 3.7, 1994

### b. 国際学会

#### 1) Kikuchi T, Oda K, Yamazaki K, Takagi H, Kikuchi H :

Early stages of axonal degeneration of Ia fibers in muscle spindles of GAD mutant mouse  
6th annual meeting of society for experimental neuropathology, Boston, 10.16, 1993

### c. 一般学会

#### 1) 市原伸恒, 山崎一斗, 浅利昌男, 鹿野 胖, 菊池建機 :

マウス延髄薄束核にみられるニューロン及びシナプスの構造

第115回日本獣医学会, 東京, 4.3, 1993

#### 2) 久保英幸, 田口文広 :

マウスコロナウイルススパイク蛋白S1サブユニットに対するモノクローナル抗体の認識領域について

第115回日本獣医学会, 東京, 4.2, 1993

#### 3) 高橋浩美, 田口文広 :

神経病原性マウスコロナウイルス由来のモノクローナル抗体抵抗性変異株について

第115回日本獣医学会, 東京, 4.2, 1993

#### 4) 久保英幸, 田口文広 :

マウスコロナウイルスのS欠損変異蛋白を用いた中和エピトープ存在領域の解析

第41回日本ウイルス学会, 札幌, 10.13, 1993

#### 5) 田口文広, 山田靖子, 久保英幸 :

マウス肝炎ウイルス特異的リセプター遺伝子の分離と培養細胞での発現

第116回日本獣医学会, 山口, 10.5, 1993

## II 研究業績

- 6) 山崎一斗, 小田健一郎, 菊池建機, 若林康夫:  
GADマウスの軸索変性は神経系の老化モデルとなりうるか  
第40回日本実験動物学会, 仙台, 6.2-4, 1993
- 7) 菊池建機, 水谷 誠, 小田健一郎, 板倉智敏, 菊地寿枝, 呉 江, 市原伸恒:  
筋緊張性ジストロフィーウズラの浅胸筋にみられる形態変化  
第10回日本疾患モデル学会, 熊本, 11.25-26, 1993
- 8) 水谷 誠, 菊池建機, 菊地寿枝, 梅沢英彦, 小松和英, 板倉智敏:  
筋緊張性ジストロフィーウズラ(LWC系)の育成  
第10回日本疾患モデル学会, 熊本, 11.25-26, 1993

## C. 班会議発表

- 1) 菊池建機:  
これまでに確立しつつある神経・筋疾患モデル動物  
厚生省精神神経疾患委託費, 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,  
東京, 12.1, 1993
- 2) 菊池建機:  
神経・筋疾患モデル動物の開発に関する研究  
ヒューマンサイエンス財団官民共同研究プロジェクト, 神経・筋疾患モデル動物の病態解析及び  
開発のための基礎的研究班, 東京, 3.24, 1994
- 3) 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・脳機能の外來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,  
東京, 8.27, 1993
- 4) 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・脳機能の外來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,  
東京, 2.22, 1994

## β-ガラクトシダーゼで標識されたトランスジェニックマウス作出の試み

花岡和則, 早坂美智子

遺伝的に異なる二種以上の動物胚を組み合わせて一個のキメラ個体を作成する方法は多細胞生物における生命現象を細胞レベルで解析するための実験系としてきわめて有用であると考えられる。我々は、個体のあらゆる細胞で普遍的に発現する外来遺伝子を胚幹細胞やマウス受精卵に導入することによりキメラマウスの一方の細胞群を人為的に標識化し、キメラマウスを詳細に解析することのできる実験系を構築することを目的として研究を行っている。今までに、1) ヒトペプチド進展因子プロモーター(EF1 $\alpha$ )がマウス個体内の普遍的な発現を保証するプロモーターとして有用であることをトランスジェニックマウスを用いて証明した<sup>1)</sup>。2) 標識遺伝子としてβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を用い、さらに核移行シグナルを付け加えたプラスミド(pEFNL)を作成し、このプラスミドが胚幹細胞の標識に有用であることもすでに報告した。本年度はpEFNLを導入したトランスジェニックマウスの作成を試みたので報告する。

〔方法〕導入に用いた遺伝子は、ヒトペプチド鎖伸長因子(EF1 $\alpha$ )のプロモーター領域に大腸菌β-ガラクトシダーゼ遺伝子および大腸菌核移行シグナルを連結したpEFNL及び核移行シグナルを持たないPEFLである。これらのプラスミドを顕微注入法によりマウス受精卵に導入しトランスジェニックマウスを作成した。

〔結果〕

1) pEFNLをマウス受精卵に注入しトランスジェニックマウスの作成を試みた。425個の移植胚から125匹のマウスが誕生したが、そのうちの5匹に遺伝子が組み込まれていた。しかし、各組織でのlacZの発現はきわめて弱く、普遍的なlacZ遺伝子の発現は認められなかった。また、5匹中4匹が不妊であった。

2) pEFNLを用いた実験では330個の胚を移植し、106匹出産。そのうちの6匹がトランスジェニックマウスであった。1系統は不妊であったが残りの系統は妊性があり、その内の2系統

では胎生15日目の胎児の各組織でlacZのきわめて強い発現が認められた。現在、成体各組織での発現を解析中である。

〔考察〕β-ガラクトシダーゼを用いて細胞を標識する研究はすでに数多くなされてきたが、個体全体が標識されたトランスジェニックマウスの作成は報告されていない。その理由として、β-ガラクトシダーゼに細胞毒性があり本遺伝子が体内で普遍的に発現すると致死になるという可能性が考えられている。本研究結果でも細胞質を標識するpEFLを用いたトランスジェニックマウスを作成することはできずこの可能性を支持する結果が得られた。

遺伝子産物(β-ガラクトシダーゼ)を核移行シグナルの作用により核に局在させるように設計したプラスミドPEFNLを用いた実験では、ほとんどの組織で強く発現する個体が得られ、この手法により上記の問題が解決される可能性を示す結果であると考えられる。

現在、以上の結果をもとに体内の全ての細胞がβ-ガラクトシダーゼで標識されたマウスの系統を確立するための研究を続けている。このようなマウスは、キメラマウスの解析に有用であるだけでなく、実験動物を用いた組織や器官の移植実験に応用することもでき、その分野で広く利用されることも期待している。

〔文献〕

- 1) Hanaoka, K., Hayasaka, M, Uetsuki, T, Fujisawa, A and Nabeshima Y: Differentiation, 48, 183-189

## マウス肝炎ウイルスS蛋白のリセプター結合部位について

田口文広, 久保英幸, 鈴木秀佳

マウス肝炎ウイルス(MHV)のS蛋白は、ウイルスエンベロープに存在し、約1400個のアミノ酸からなる糖蛋白で、合成後N末端側のS1とC末端側のS2に開裂する<sup>1, 2)</sup>。この蛋白は、感受性細胞への吸着(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傷害性T細胞の惹起、動物に対する病原性などMHVのもつ多くの生物活性に関与している<sup>2)</sup>。我々は、これらの生物活性の中で、ウイルスの細胞特異性に深く関与すると思われる、MHV特異的リセプターへの結合について解析を行っている。MHV特異的リセプターについては、immunoglobulin superfamilyに属するmmCGM(CEA gene family member)であり、現在いくつかのisoformが報告され、S蛋白と結合するmmCGMの領域は、N末端のドメインに存在することが明らかにされている<sup>3, 4)</sup>。我々は、mmCGMの一種であるbiliary glycoprotein C(Bgp C)の遺伝子mL900を分離し培養細胞で発現した結果、既に報告されているように、MHVのリセプターとして機能することが確認された。このBgp Cと欠損変異S蛋白を用いてMHVのS蛋白のリセプター結合性について検討し、以下の結果を得た。Bgp Cは、組換えワクシニアウイルス(RVV)を用いてRK13細胞で発現した。S蛋白に関しては、cl-2ScDNA<sup>5)</sup>を鋳型としPCRでいくつかのC末端の欠損した欠損変異S1蛋白を発現する遺伝子を構築し、VV transfer vector、pSFに挿入し、transientの系で発現した<sup>6)</sup>。発現されたS1蛋白とBgp Cの結合は、Bgp CをWestern blotでnitrocellulose膜上に用意し、各欠損変異S1蛋白を反応させた後、

抗S1蛋白単クローン抗体を用いて解析した<sup>7)</sup>。その結果、S1蛋白のN末端から330個のアミノ酸残基からなる欠損S1蛋白、及びそれより多くのアミノ酸を含むS1蛋白がBgp Cと結合した。このことは、S1蛋白のN末端330個のアミノ酸からなる領域に、MHVリセプターと結合する活性部位が存在することを示唆している。また、いくつかの異なるMHV株がBgp Cをリセプターとして認識することから、これらのウイルスのS1蛋白N末端330個のアミノ酸配列の中で、保存されている領域がリセプター結合部位として機能するという予測の基に、現在この領域のアミノ酸配列をを比較し、その活性部位の同定を行っている。

## 文献

- 1) Siddell, S., Wege, H., ter Meulen, V. J. gen. Virol. 64: 761-776, 1983
- 2) Spaan, W., Cavanagh, D., Horzinek, M. J. gen. Virol. 69: 2939-2952, 1988
- 3) Williams, R. K., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 5533-5536, 1991
- 4) Dveksler, G. S., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1716-1720, 1993
- 5) Taguchi, F., Ikeda, T., Shida, H. J. gen. Virol. 73: 1065-1072, 1992
- 6) Kubo, H., Taguchi, F. J. gen. Virol. 74: 2373-2383, 1993
- 7) Kubo, H., Takase, S., Taguchi, F. J. gen. Virol. 74: 1421-1425, 1993

## GAD(gracile axonal dystrophy)マウスの脊髄後索系にみられる 軸索変性とアミロイド前駆体蛋白(APP)の蓄積

市原伸恒, 呉 江, 崔 得華\*, 山崎一斗, 菊池建機

GADマウスは感覚神経の中樞および遠位端より逆行性に軸索変性を示す突然変異体である。軸索腫大、脱髄等の初期病変はまず延髄薄束核にみられ、進行に伴い脊髄薄束に及ぶ。病変部は顕著なグリア増生を伴う<sup>1), 2)</sup>。

本報告はGADマウスにみられる軸索変性はアミロイド $\beta$ /A4蛋白の前駆体蛋白(APP)の生成を伴うのか、またその分布はどのように変化するかを免疫組織化学的に検討したものである。

### [材料および方法]

生後4、9、18週齢のGAD(NIN: gad/gad)と対照正常マウス各3匹を供試した。麻酔後左心室より4%パラホルムアルデヒド緩衝液で灌流固定した。同液に1晩再固定後緩衝液で洗い、ショ糖緩衝液(4℃)に検査まで保存した。

クライオスタトにて延髄、脊髄および後根神経節(DRG)の20 $\mu$ m浮遊切片を作製し、その切片をTritonX-100および正常血清で処理した後、一次抗体と一晚反応させた。一次抗体はウサギから得られた2種の抗APP抗体(GIDおよびPN-II)または抗GFAP抗体(Zymed社)のいずれかを用いた。切片はビオチン標識抗ウサギIgGに続いてHRP標識ストレプトアビジンで反応後DABを用い発色を行った。

### [結果と考察]

軸索腫大は生後4週齢のGADマウス延髄薄束核にすでに散見されるが、その他の部位

には形態異常を認めない。行動異常の顕著となる9週齢では変性は脊髄頸髄レベルに及び始める。

Astrocyteの変化については、GFAP染色により、薄束核のみならず、脊髄薄束路および白質外縁に沿ったAstrocyteの活性化がみられた。特に軟膜直下のAstrocyteは大型となり、多数の細胞突起を白質内部へ伸ばした所見が見られた。

DRGニューロンはPN-II抗体およびGID抗体に強く発現していた。PN-II抗体の染色所見としては、脊髄では対照群の灰白質のニューロンと白質外縁を走行する軸索で強い反応をみるが、GADマウスでは脊髄レベルの白質内部にまで陽性であり、特に薄束核と薄束路に強い反応を認める。GID抗体の染色では、GADマウスの薄束路は強陽性であり、薄束路以外では軟膜の直下、白質外縁および中心管の周辺に活性化されたAstrocyteにAPPが強く発現していた。これらのAstrocyteは隣接切片のGFAP染色により確認した。

現在、mRNAレベルでAPPの発現を検討しているが、GADマウスは軸索変性の時期とその程度に伴うAPP代謝を検索できる動物モデルとして応用できると思われる。

### [文献]

- 1) Mukoyama M., Yamazaki K., et al. (1989) Acta Neuropathol. 79:294-299
- 2) Kikuchi T., Mukoyama M., et al. (1990) ibid. 80:145-151



## 15. 実験動物管理室

### 1. 管理室一年の歩み

実験動物研究施設では、年々系統動物の多様化と共に動物維持数も多くなってきた。そこで本年はラット飼育室に自動給水装置を設置した。これらの設置によって従来の給水や洗浄・滅菌等に要した作業時間や労力が大きく省力化された。また、当初は自動給水装置からの漏水で動物の死亡事故が懸念されたが幸い事故も無く順調に稼働している。本年度からは新たに動物の微生物モニタリングに加え環境モニタリングを開始した。環境モニタリングは動物施設内に浮遊している菌数や菌種を調査して施設内の汚染状態を把握すると共に、病原微生物の侵入防止並びに早期発見に有効な手段である。これまでの検査では病原微生物等の危険な菌種は発見されず当施設が極めてクリーン状態で維持されていることが確認された。なお、1993年12月現在の動物維持数は、マウス：13,600匹、ラット：640匹、ウサギ：43匹、モルモット：13匹、スunks：53匹、オニコミス：400匹及びハムスターやニワトリ・ウズラ等が若干飼育されている。これらの動物の維持管理には10名の派遣飼育技術者が従事している。

実験動物管理室では、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キタバッタネズミ Northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*) の妊娠率や産子数、性周期等の繁殖性の検討と共に、臓器重量や血清生化学値等の特性の調査を行った。また、てんかん様発作症状を示す個体が発見され、これらの系統化を進めている。
- ② 系統維持：マウス受精卵の凍結保存が可能となり、神経・筋疾患モデル動物の系統維持を左記の方法で進めると共に、凍結した受精卵を融解して仮親マウスに移植し、更に個体発生させるまでの技術的开发並びに繁殖性を検討した。また、開発中のスunksやキタバッタネズミの胚発生及び受精卵の凍結保存に関する検討を行った。

(管理室長 松崎哲也)

## 2. 研究業績

## A. 論文

## a. 原著

- 1) Arahata K, Hayashi K.Y, Koga R, Goto K, J.H.Lee, Miyagoe Y, Ishii H, Tsukahara T, Takeda S, M.Woo, Nonaka I, Matsuzaki T, Sugita H :

Laminin in animal models for muscular dystrophy, Defect of laminin M in skeletal and cardiac muscles and peripheral nerve of the homozygous dystrophic dy/dy mice

Proc. Japan Acad. 69:259-264, 1993

## b. 班会議報告書

- 1) 吉田瑞子, 松崎哲也, 和田圭司 :

強縮刺激時に於ける外液  $Ca^{2+}$  による骨格筋崩壊現象

平成5年度厚生省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班報告書 121-124, 1993

## B. 学会発表

## a. シンポジウム

- 1) 松崎哲也 :

実験動物技術からの展望・野生動物の実験動物化における飼育繁殖技術

「実験動物科学の使命と新たな展望」東京, 5.21, 1993

## b. 一般学会

- 1) 松崎哲也, 松崎香苗, 大坪リラ, 神谷正男 :

キタバッタネズミ (Onychomys leucogaster) の室内繁殖

第40回日本実験動物学会総会, 仙台, 6.4, 1993

- 2) 松崎哲也, 松崎香苗, 二瓶淳子, 神谷正男 :

キタバッタネズミ Onychomys leucogaster の発育と成長

第25回成長談話会大会, 松本, 11.13, 1993

## c. 班会議発表

- 1) 吉田瑞子, 松崎哲也, 和田圭司 :

強縮刺激時に於ける外液  $Ca^{2+}$  による骨格筋崩壊現象

平成5年度厚生省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班会議,

東京, 12.4, 1993

各種ミュータント系マウスの凍結受精卵の繁殖性について

二瓶淳子, 松崎哲也

神経・筋疾患系難病の研究には、ヒト疾患モデルとなるミュータント系マウスが必要不可欠である。これらの系統を維持するためにはエンブリオバンクシステムは極めて有効である。例えば、飼育スペースや経費・労力の削減、あるいは突然変異事象の蓄積や感染事故、系統消滅の防止など、実験動物の系統維持管理に重要な役割を担っている。近年では多くの実験動物施設でこれらの方法が取り入れられて活用されている。当動物管理室で維持されている系統には、疾患モデルとなるミュータント系マウスが多く、これらは運動失調を伴い自然繁殖が難しく計画的に動物を生産供給することが困難な動物である。そこで、繁殖障害を持つこれらの系統の維持及び生産供給体制を確立する目的で、発生工学的手法を用い、その繁殖性を検討した。

『材料と方法』

過排卵処理 (PMSG-hCG) した雌より得た未受精卵と、雄の精巣上体尾部から採取した精子をTYH培地内で24時間培養し体外受精させて2細胞期胚を得た。凍結、融解はWhittinghamらの方法を若干修正した緩慢法で行い、冷却時には凍る直前の温度上昇を防ぐため-7℃で植氷 (seeding) を施した。融解後回収した胚は形態学的観察した後、正常胚のみを偽妊娠1日目の仮親 (MCH:ICR系) に卵管移植し新生子への個体発生を確認した。なお、これらの発生工学的手法は実験動物中央研究所の方法に準じた。

『結果』

小脳変性症を示すstaggererの発症雌では排卵がまったく見られず、同症のweaverやミエリン形成不全を示すquakingの発症雄からは精子が得られなかった。これらの系統は、雌雄いずれか一方にヘテロを使用し、それぞれの配偶子の組み合わせによる体外培養で2細胞期胚を得た。この時の正常な2細胞期胚の発生率はstaggerer 67.2%、weaver 56.7%、quaking 40.5%であった。この数値は、生殖能力のない発症ホモのかわりにヘテロ配偶子を組み合わせた場合の成績で、この成績から他の一方の発症ホモの配偶子には十分な繁殖能力のあることが確認できた。一方、神経軸索変性症を示すGADの発症雄の精子は、発症雌及び正常雌の卵子との体外培養

による受精率が低く、正常2細胞期胚の発生率も、21.2%、38.5%と低値であった。小脳変性症を示すreelerでは排卵数も多くホモ同士の体外受精で64.7%の受精率を得た。また、同症のpcdや筋ジストロフィー症のdyでもホモ同士の受精率はそれぞれ42.3%、47.1%であった。雌1匹から得られる2細胞期胚の数は系統による差異が大きく、これは自然交配で得られた産子数に匹敵していた。凍結受精卵の融解後の正常胚の割合は系統に拘らず68-93%で安定していた。移植後の移植卵数に対する正常産子の発生割合は、B10やICRでは50%に達し、ミュータント系の多くは18-28%と低値であった。

『考察』

繁殖障害を伴うミュータント系マウスの維持・生産には、発生工学的手法は有効な手段と考えられた。しかし、現状ではその生産性は低く、これを更に高めるためには発症ホモで生殖能力のない系統あるいは生殖能力の著しく低い系統等について、卵巣移植技術による機能回復や未成熟卵母細胞の体外培養による受精胚の作成などの検討が重要と考えられた。また、発症ホモ同士の配偶子による受精卵を大量に作成することによって、計画的な生産供給が可能になると考えられた。

『文献』

- 1) D.G. Whittingham et al., Science 178, 411-414 (1972)
- 2) 野村達次監修、発生工学実験マニュアル、講談社 (1987)

疾患モデルマウスの体外受精による胚採取成績

系統名	使用メス数	排卵数 (平均)	体外受精 使用卵数	配偶子 ♀×♂	2細胞期胚数 (平均)	受精率 (%)
staggerer (小脳変性症)	●	(-)				
	◎	8	100 (12.5)	67 33	45 (9.0) 13 (4.3)	67.2 39.4
	○	4	50 (12.5)	47	19 (3.2)	40.4
weaver (小脳変性症)	●	7	178 (25.4)	157 21	89 (12.7) 17 (8.5)	56.7 81.0
	◎	34	690 (20.3)	681	449 (13.2)	65.9
	○					
quaking (ミエリン形成不全)	●	21	214 (10.2)	153 61	62 (4.8) 23 (2.9)	40.5 37.7
	◎	4	35 (8.8)	35	9 (3.2)	25.7
	○	55	538 (9.8)	536	243 (2.3)	45.3

●; 発症ホモ ◎; ヘテロ ○; 未確認

実験動物としてのキタバッタネズミ (*Onychomys leucogaster*) の飼育繁殖と成長

松崎哲也, 神谷正男\*

(\*北海道大学獣医・寄生虫)

キタバッタネズミ Northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*) は、げっ歯目 Rodentia、キヌグネズミ科 Cricetidae、バッタネズミ属 *Onychomys* に位置する小型の哺乳動物である。神谷らはキタバッタネズミが小型の食肉獣であることに着目し、Echinococcosis 感染症のモデル動物としての可能性を考え、1990年8月にわが国へ導入した。一方キタバッタネズミのドーパミン等の脳内生理活性アミン濃度はマウスに比較して高く、神経科学分野におけるモデル動物への可能性も期待される。本研究はキタバッタネズミの実験動物化を目的として実験室内における繁殖成績並びに出生仔の成長について検討した。

## 『材料と方法』

1990年12月北海道大学獣医学部より野生キタバッタネズミ雌4匹雄3匹を導入し、これらを基礎繁殖コロニーとした。飼育室の温度は $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度は $55 \pm 5\%$ 、照明時間は6:00-20:00迄を明とし他の時間帯を暗の条件に設定した。繁殖用ケージはプラスチック製で間口210 mm奥行315 mm高さ130 mmの大きさのものを使用した。飼料は粟・稗・カナリヤシード等の穀類やマウス用固型飼料(CA-1・CLEA) スクウス用固型飼料(CIEA-305)を与えた。飲水には水道水を用い200ml 容プラスチック製給水瓶で自由摂取させた。体重測定は新生仔から20週齢迄の期間雌65匹雄63匹を毎週1回電子天秤(1/1,00g計量)で秤量した。

## 『結果』

キタバッタネズミの室内飼育環境は、マウス・ラットのそれと同様の条件で可能であった。妊娠率は雌雄1:1の短期間同居では低く、長期間同居(30日)では75%と高率であった。1腹の産子数は平均 $3.5 \pm 1.2$ 匹で、その幅は1-6匹であった。精子確認法による妊娠期間の調査では、交配した雌45匹中28匹の腔垢から精子が確認され、これらの雌は25-31日目に産産が観察された。この場合の平均妊娠期間は $27.4 \pm 2.0$ 日であった。離乳率では、野生由来の雌3匹のそれは93.9%と高率であったが、室内生まれの雌45匹では76.5%と若干低下した。年間を通して温湿度一定の飼育室では周年繁殖が可能であった。

出生仔の成長：新生仔の皮膚は赤色を呈し被毛はなく閉眼していた。生後3日目には色

素沈着が観察された。10日頃には耳翼が立ち背部には灰褐色の毛がはえ、腹部は白色毛で覆われた。16-17日頃には開眼し、飼料を摂取しはじめると同時に行動も活発となり、21日目には離乳が可能となった。新生仔の体重は雌雄とも $3.0 \pm 0.2\text{g}$ であったが、3週齢から8週齢にかけての成長速度は最も大きく直線的成長を示した。9週齢頃からは成長速度がやや緩慢で、15週齢では雌 $38.6 \pm 7.2\text{g}$ 、雄 $39.9 \pm 5.9\text{g}$ となり、体重はほぼプラトーに達した。個体間の体重の変動を変異係数でみると生後1-3週齢では雌雄とも16.0-24.3%と大きく、それ以外の週齢では12-18%の範囲内であった。これらの体重成長をロジスティック曲線  $Y=A/(1+be^{-Kt})$  を適応し図1に示した。

## 『考察』

キタバッタネズミの室内繁殖は、比較的容易であった。しかし短期間同居による妊娠率の低下や早期に繁殖を停止した個体、喰殺する個体等も見られ、これら繁殖群の中から不良個体の選抜淘汰を強化することによって計画生産は可能になると考えられた。なお *O. leucogaster* には sodium pentobarbital 投与に対する鎮静効果がなく、chloridiazepoxide 投与ではマウスに対する攻撃時間が延長したとの報告もある。また筆者らが飼育中にてんかん様発作症状を示す個体を発見した。以上の如く、この動物は脳神経科学分野の治療薬の開発や神経作用機序解明の動物モデルになり得るものと期待される。

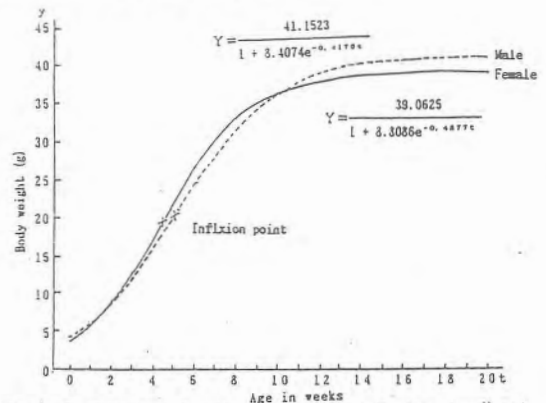


Fig. 1 The growth curve of northern grasshopper mice (*Onychomys leucogaster*) which is applied logistic curve. Each value represents of the 65 females and 63 males.

## 16. ラジオアイソトープ管理室

### 1. 管理室一年の歩み

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RI施設における放射線障害防止法に基づく放射線安全管理と、ラジオアイソトープを用いた新しい研究方法の開発を行うことを目的としている。本年度の人事としては三井恵理子（賃金研究助手）が退職し、代って平成5年4月より小林悦子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。また、これまで通り、武市正美が放射線安全管理と研究開発を担当している。

安全管理業務の中、RI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。

本年度の放射線業務従事者（159名）の放射線被曝はほとんど無く、全員の線量当量が5mSv以下であった。一方、使用核種の特徴としては、<sup>35</sup>S使用量が大きく増大した。

研究の面では、神経系の情報伝達に重要な脂質由来の複数の代謝産物を、イメージングプレートを用いたオートラジオグラフィーにより、感度良く、簡便に定量する方法を開発し、これを用い中枢神経系の培養細胞におけるこれら代謝産物の動態を検討した。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）

## 2. 研究業績

### A. 論文

#### c. 総説

##### 1) 今澤正興 :

キャピラリー電気泳動による体液中薬物の分析

臨床化学, 22 : 225-229, 1993

#### d. 班会議報告書

##### 1) 今澤正興 :

培養神経細胞膜を介した生体調節機構の解明と障害防止への応用

ヒューマンサイエンス官民共同プロジェクト・第4分野(健康保持の基礎としての生体防御機構の解明), 平成4年度研究報告書, p284-293, 1993

### B. 学会発表

#### a. シンポジウム

##### 1) 今澤正興, 赤星えりか :

ミセル動電クロマトグラフィーによる血清中ベンゾジアゼピン系抗てんかん薬の分析

第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 東京, 12.9, 1993

#### c. 一般学会

##### 1) 今澤正興, 赤星えりか :

キャピラリー電気泳動によるベンゾジアゼピン系統てんかん薬の分析について

第27回日本てんかん学会, 弘前, 10.2, 1993

## TLC-イメージングプレート法を用いた培養細胞の 脂質分解酵素代謝産物の簡便な定量法について

今澤正興, 武市正美

細胞膜における外部からの信号の情報伝達には、複数の脂質分解酵素の活性化が含まれ、その結果として、ジアシルグリセロール (DAG)、イノシトールポリリン酸、アラキドン酸 (AA) などのリン脂質由来のセカンドメッセンジャーが生成する。活性化される酵素としては、フォスフォイノシチド特異的及びフォスファチジルコリン特異的フォスホリパーゼ C (PI-PLC 及び PC-PLC)、フォスファチジルコリン特異的フォスホリパーゼ D (PC-PLD)、フォスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)、ジアシルグリセロールリパーゼ (DAG-L) などが有る。我々はこれらの活性化脂質代謝産物の分析法の一つとしてラジオ HPLC 法によるイノシトールポリリン酸類の分析の改良法について報告したが、HPLC は分解能に優れている反面手間がかかる。今回、RI 標識後の試料を薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離後イメージングプレートを用いたオートラジオグラフィーにより、複数のこれらの脂質分解酵素代謝産物を感度良く定量する簡便な方法を検討した。

### 【結果】

細胞に取り込ませる標識化合物としては、<sup>[14C]</sup> ラベルの脂肪酸またはリゾフォスファチジルコリンを用いた。一般に使用されている厚さ 0.2-0.25mm のシリカゲルプレートに厚さ 0.1mm のものに替え、また、DAG が TLC 操作中に 1,3 型異性体の一部変化することを防ぐために TLC プレートは予めほう酸処理して用いた。展開溶媒としては初めにイソオクタン-酢酸エチル-酢酸-水系を用い、同じプレートをさらにベンゼン-酢酸エチル-ギ酸-ピリジン系で展開し、DAG、脂肪酸、フォスファチジン酸、フォスファチジルエタノール (PEt、エタノール存在下の PLD 代謝産物) などを分析した。標準脂質の混合物を用いたモデル実験では、一般に行われるスポットかき取り後液体シンチレーションカウンターで測定する方法とほぼ一致する分析値を与え、精度も同様であった (図 1)。相対量 0.1% までの放射活性を測定することが可能であり、培養細胞などに加える標識化合物の放射エネルギーは従来法の 1/10 で充分であった。培養小脳グラニュール細胞を、カルシウムイオノフォアである ionomycin で刺激すると、30 分後には、PEt の上昇 (約 2 倍)、DAG の

上昇 (約 2 倍)、脂肪酸の大きな上昇 (約 8 倍) が認められ (図 2)、培養神経細胞においてこの方法によって、一つの試料から複数の活性化脂質代謝産物の追跡ができることが明らかとなった。

### 【考察】

TLC-IP 法を用いた脂質分解酵素による代謝産物の定量法は、高感度で簡便であるという利点を持つ優れた分析法である。また、これまでのこれら活性化代謝産物の定量法は、多くても二つの代謝産物の定量の目的に限られており、今回の一度に数種の定量を行うものとは異なっている。この方法は昨年我々が報告したイノシトールリン酸類のラジオ HPLC による分析法と併せて、細胞膜におけるリン脂質由来のセカンドメッセンジャーの動態を検討するための有用な手段となるであろう。

表 1 <sup>14</sup>C 標識標準脂質混合物のイメージングプレートまたは液体シンチレーション法を用いた TLC 分析

Lipid (Rf value)	imaging plate	scintillation counter
	% of total radioactivity S.D. [mean PSL value with imaging plate]	
Lysophosphatidylcholine (0.01)	25.68±0.19 [2897]	26.47±0.14
Phosphatidic acid (0.09)	37.46±0.26 [4227]	38.33±0.33
Oleic acid (0.79)	36.87±0.26 [4160]	35.19±0.20

表 2 <sup>[14C]</sup> リゾフォスファチジルコリン標識した培養小脳グラニュール細胞の脂質代謝産物

addition	fatty acid	DAG	PEt	PA
	% of control (% of total radioactivity)			
none	100 (0.98)	100 (0.71)	100 (0.51)	100 (0.64)
10uM ionomycin (30 min)	788 (7.72)	192 (1.36)	188 (0.96)	94 (0.60)

---

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7年目を迎える。委員会は月一回の定例で開催される。本年度の施設整備は建物2階のビニールアイソレーター室を三つの飼育実験室に改造する工事が主なものであった。本工事は7月下旬までに終了し、疾病研究第四部が使うこととなった。また、2階のラットゾーンに自動給水装置をセットする工事と同じく7月中に完了し、当初心配されていた水漏れのトラブルもなく経過している。ウサギの需要増にあわせ、ウサギ用ラックを1階の101号室に増設し、105号室はモルモットの専用飼育室とした。

(実験動物研究施設管理委員会委員長補佐 菊池建機)

### II. RI委員会

新研究棟に移り、2年が過ぎ、実験室の利用、維持、管理運営にも慣れ、スムーズに施設が利用された。また、各部の実験台にも必要とする機器が備えられ、実験しやすい施設になってきている。平成5年度の放射線業務従事者は159名であったが特に重大な汚染事故等も起こることなくアイソトープ実験が行われた。

2号館のRI室の実験機器の整備に重点をおいて機器の購入を行い、本館との格差が解消される方向に進んだ。購入された機器は一般実験機具、X線フィルムプロセッサ、BAS2000用シールドボックスなどである。

施設の点検を行ったところ、概ね良好であったが手直しを必要とする部分が一部に見つかったために、科学技術庁に報告すると同時に改善を進めている。

(委員長 鍋島陽一)

### III. 電顕委員会

設置されている機種は透過型日立H7000、H700、600、走査型として日立S700、S430がある。H7000が新しく、簡便なために、最も頻繁に使用されている。ライヘルト社のマイクローム2台も故障なくよく使用されている。クライオセクションシステムの使用は少ない。運営の面では、透過型電顕は使用頻度は高く、十分に活用されている。走査型電顕は使用頻度は少ないが、老朽化が進み、維持に費用がかさむようになってきた。自動現像機の故障が多く、更新の必要がある。また、専任管理者が平成4年3月よりいなく、塾中併任部長によって管理されている。機械の運転、現像液の管理、フィルムの管理などで、利用者は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)

### III 委員会

#### IV. 組み替えDNA委員会

組み替えDNA実験が特別な実験であった時代は完全に過ぎ去った。バイオに関連する研究室では何処でもだれでもがやっている研究となった。新しい方法が次々に開発され、便利なキットが続々売り出され、実に手軽に新しい技術を導入することができることも大きな要因であるが、さらに大きな要因は世界の研究の流れが分子生物学的解析に大きく傾いたことであろう。この流れは当センターでも例外ではなく、事実、組み換えDNAの申請にタッチしていない研究者はごく少数となった。もちろん、遺伝子を取り扱っているかないかなどと言うことは研究の価値とは何ら関係ないことで、問題はどれだけ新しい研究が生まれるかである。

本年度の最大の課題は遺伝子治療研究がスタートしたことである。最終的にはヒト個体に遺伝子を導入することを認める方向を打ち出したからである。今後の発展には紆余曲折もあろうが人類のなし得る最大の実験の一つに自らの手を染めることができる時代に研究者として生を受けていることに感謝しようではないか。いずれにせよ、実行に移していくには組み換えDNA委員会、倫理委員会、その他センターの知恵を絞って対応する体制をつくらなければならない。また、臨床応用に進むには病院の発展が必須となろう。

長らく組み換えDNA委員会のメンバーであり、個体の遺伝子操作の審査を担当していただいたモデル動物の花岡室長が北里大学理学部教授に栄転された。後任として第4部の和田部長が選出された。

(委員長 鍋島陽一)

#### V. 感染実験安全委員会

本年度は次のメンバーで構成した。

委員長：杉田 秀夫（所長）

委員：小松 俊彦（国立予防衛生研究所室長）

田平 武（疾病研究第六部部長）

鍋島 陽一（遺伝子工学研究部部長）

菊池 建機（モデル動物開発部部長）

松崎 哲也（実験動物管理室室長）

加茂 功（微細構造研究部室長）

田口 文広（モデル動物開発部室長）

平成5年3月23日（昨年度）の委員会で申請された下記が承認され、本年度実験が行われたが、事故は全くなかった。

申請書提出部	主実験者	共同研究者数	取扱病原体 (Class)	実験の場所 (注1)	承認月日
疾病研究第五部	桜川 宣男	5名	EB(2b)	A	平成5.3.23の委員会で承認
〃 第六部	山村 隆	4名	HTLV-1(2b)	A, B	
〃 〃	〃	4名	EB(2b)	A	
微細構造研究部	加茂 功	2名	EB(2b)	A	
〃	〃	2名	VSV(2b)	A	
〃	〃	2名	FLV(2b)	A	
〃	〃	2名	HSV-1(2b)	A	
〃	〃	2名	HSV-2(2b)	A	
〃	〃	2名	SV40(2b)	A	
〃	〃	2名	polyoma(2b)	A	
モデル動物開発部	田口 文広	5名	Corona(2a)	A, C	〃
〃	〃	5名	Vaccinia(2b)	A, B	
〃	〃	5名	VSV(2b)	A, B	
疾病研究第六部	山村 隆	2名	FIV(2b)	A	平成5.12.13承認
モデル動物開発部	田口 文広	1名	アデノウイルス(2b)	A	〃

注1) A:各研究部感染実験室 B:RI室 C:2号館動物感染実験室

なお、平成6年3月1日付で委員長は杉田より小沢に交代した。

(感染実験安全委員会委員長 小沢鉄二郎)

## 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ているかを検討している。本年も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、研究者より提出された動物実験計画を各委員で詳細に審議した。一部の計画書は実験責任者に修正を求めたが、すべて適正であり、承認された。また、平成5年11月8日に実験に供された動物の霊に対する動物慰霊祭を行い、大熊総長より動物慰霊祭挨拶、杉田神経研究所長より慰霊の言葉が述べられ、研究所、病院、運営部から集まった多数の参加者によって、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)

### III 委員会

#### Ⅶ. 図書委員会

図書委員会は各部から選出された図書委員により構成された。司書がないので担当の部が定期的に図書の整理，チェックにあたった。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。古くなりあまり利用されていない雑誌も少なからず見られるので，購買雑誌の見直し作業に入った。

(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 Biochemstry & 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～

### III 委員会

30. Biochemical and Biophysical Research Communications (1960～ ) vo 1.1～
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.1～28
39. Biochemistry and Molecular Biology International (1993～ ) vol.29～
40. Biochemica Biophysica Acta (1968～ ) vol.150～
41. BioEssays (1984～ ) vol.1～
42. Biological Psychiatry (1969～ ) vol.1～
43. Biological Mass Spectrometry (1991～ ) vol.20～
44. Biology of Neonate (1987～ ) vol.51～
45. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry (1974～1990) vol.1～ 19
46. Biomedical Research (1980～ ) vol.1～
47. Biophysical Journal (1960～ ) vol.1～
48. Bioscience Reports (1983～ ) vol.3～
49. Biosis Cas Selects : Alzheimer's Disease & Senile Dementias (1987～1989) vol.1～3
50. Bio Research Today Series' (1990～1991) vol.1～2
51. Blood : Journal of Haematology (1987～ ) vol.69～
52. Brain (1968～ ) vol.91～
53. Brain and Development (1979～ ) vol.1～
54. Brain Research (1989～ ) vol.476～
55. Brain Research Bulletin (1987～ ) vol.18～
56. Brain Research Reviews (1979～ ) vol.1～
57. British Journal of Haematology (1987～1993) vol.65～85
58. British Journal of Pharmacology (1968～ ) vol.34～
59. Cancer Research (1968～ ) vol.28～
60. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology (1987～ ) vol.65～

61. Cell (1974~ ) vol.1~
62. Cell & Tissue Kinetics (1983~1990) vol.16~23
63. Cell & Tissue Research (1978~ ) vol.186~
64. Cell Biochemistry & Function (1987~ ) vol.5~
65. Cell Biology International (1983~ ) vol.7~
66. Cell Calcium (1985~ ) vol.6~
67. Cell Differentiation and Development (1983~1990) vol.12~32
68. Cell Motility & Cytoskeleton (1983~ ) vol.3~
69. Cell Proliferation (1991~ ) vol.24~
70. Cell Structure and Function (1975~ ) vol.1~
71. Cellular & Molecular Neurobiology (1983~ ) vol.3~
72. Cellular Immunology (1970~ ) vol.1~
73. Cellular Signaling (1989~ ) vol.1~
74. Chemical Reviews (1968~ ) vol.68~
75. Chemical Titles (1968~1992) vol.1~24
76. Chromosoma (1986~ ) vol.93~
77. Chronobiologica (1985~ ) vol.12~
78. Chronobiology International (1986~ ) vol.3~
79. Clinica Chimica Acta (1968~ ) vol.19~
80. Clinical & Experimental Immunology (1987~ ) vol.67~
81. Clinical Chemistry (1975~ ) vol.21~
82. Clinical Genetics (1970~ ) vol.1~
83. Clinical Immunology & Immunopathology (1987~ ) vol.42~
84. Clinical Neuropathology (1983~ ) vol.2~
85. Clinical Neuropharmacology (1987~ ) vol.10~
86. Cold Spring Harbor symposium (1988~ ) vol.L11~
87. Computers & Biochemical Research (1987~1988) vol.20~21
88. Cumulated Index Medicus (1968~ ) vol.9~
89. Current Contents (1990~ )
90. Cytobiology (1969~1979) vol.1~18
91. Cytogenetics & Cell Genetics (1983~ ) vol.35~

III 委員会

92. Development (1987～ ) vol.99～  
改名前の名称(Journal of Embryology and Experimental Morphology(1986) vol.91～98)
93. Developmental Biology (1968～ ) vol.17～
94. Development Growth and Differentiation (1972～ ) vol.14～
95. Developmental Brain Research (1986～ ) vol.24～
96. Development Dynamics (1992～ ) vol.193～
97. Differentiation (1973～ ) vol.1～
98. Electromyography & Clinical Neurophysiology (1983～ ) vol.23～
99. The EMBO Journal (1983～ ) vol.2～
100. Endocrinology (1968～ ) vol.82～
101. Endocrinologica Japonica (1984～ ) vol.31～
102. Endocrinological Reviews (1986～ ) vol.4～
103. Epilepsia (1987～ ) vol.28～
104. Epilepsy Research (1987～ ) vol.1～
105. European Journal of Biochemistry (1967～ ) vol.1～
106. European Journal of Cell Biology (1979～ ) vol.19～
107. European Journal of Immunology (1983～ ) vol.13～
108. European Journal of Medical Chemistry (1987～ ) vol.22～
109. European Journal of Neurosciences (1989～ ) vol.1～
110. European Journal of Pharmacology (1967～ ) vol.1～
111. European Neurology (1987～ ) vol.26～
112. Experientia (1968～ ) vol.24～
113. Experimental and Toxicologic Pathology (1992～ ) vol.44～
114. Experimental Brain Research (1966～ ) vol.1～
115. Experimentatl Cell Biology (1983～1989) vol.51～57
116. Experimental Cell Research (1968～ ) vol.49～
117. Experimental Gerontology (1987～ ) vol.22～
118. Experimental Neurology (1959～ ) vol.1～
119. Experimental Pathology (1983～1991) vol.23～43
120. 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
121. FEBS Letters (1968~ ) vol.1~
  122. Gene (1986~ ) vol.41~
  123. Genes & Development (1987~ ) vol.1~
  124. Genetical Research (1987~ ) vol.49~
  125. Genetics (1987~ ) vol.115~
  126. Genome (1987~ ) vol.29~
  127. Genomics (1987~ ) vol.1~
  128. GLIA (1988~ ) vol.1~
  129. Growth Factors (1988~ ) vol.1~
  130. Handbook of Neurochemistry vol.1~
  131. Histochemistry (1983~ ) vol.77~
  132. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, Biological Chemistry(1983~ ) vol.364~
  133. Human Gene Therapy (1992~ ) vol.3~
  134. Human Genetics (1964~ ) vol.1~
  135. Human Molecular Genetics (1992~ ) vol.1~
  136. Immunochemistry (1964~1974) vol.1~17
  137. Immunogenetics (1992~ ) vol.35~
  138. Immunological Reviews (1987~ ) vol.95~
  139. Immunology (1968~ ) vol.14~
  140. Immunology Today (1983~ ) vol.4~
  141. Infection & Immunity (1970~ ) vol.1~
  142. International Archives of Allergy & Applied Immunology (1987~ ) vol.82~
  143. International Journal of Biochemistry (1983~ ) vol.15~
  144. International Journal of Cancer (1987~ ) vol.39~
  145. International Journal of Neuroscience (1983~ ) vol.18~
  146. In Vitro (1983~ ) vol.19~
  147. Japanese Journal of Pharmacology (1989~ ) vol.49~
  148. Japanese Journal of Physiology (1984~ ) vol.34~

### III 委員会

149. Journal of Affective Disorders (1986～ ) vol.10～
150. Journal of American Chemical Society (1968～ ) vol.90～
151. Journal of American College of Neuropsychopharmacology (1988～ ) vol.1～
152. Journal of Anatomy (1967～ ) vol.102～
153. Journal of Biochemistry (1922～ ) vol.1～
154. Journal of Biological Chemistry (1968～ ) vol.243～
155. Journal of Cell Biology (1968～ ) vol.36～
156. Journal of Cell Science (1966～ ) vol.1～
157. Journal of Cellular Physiology (1968～ ) vol.71～
158. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (1981～ ) vol.1～
159. Journal of Chemical Neuroanatomy (1988～ ) vol.1～
160. Journal of Child Neurology (1987～ ) vol.2～
161. Journal of Chromatographic Science (1987～ ) vol.25～
162. Journal of Chromatography (1958～ ) vol.1～
163. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (1980～ ) vol.50～
164. Journal of Clinical Investigation (1984～ ) vol.73～
165. Journal of Comparative Neurology (1898～ ) vol.1～
166. Journal of Comparative Psychology (1992～ ) vol.106～
167. Journal of Cyclic Nucleotide & Protein Phosphorylation Research(1987～ )vol.12～
168. Journal of Developmental Physiology (1987～ ) vol.9～
169. Journal of Electron Microscopy (1978～ ) vol.27～
170. Journal of Embryology and Experimental Morphology (JEEM) (1986) vol.91～98
171. Journal of Experimental Medicine (1968～ ) vol.127～
172. Journal of Experimental Psychology (1987～ ) vol.13～
173. Journal of Experimental Zoology (1986～ ) vol.237～
174. Journal of General Physiology (1919～ ) vol.1～
175. Journal of General Virology (1986～ ) vol.67～
176. Journal of Heredity (1986～ ) vol.77～
177. Journal of Histochemistry & Cytochemistry (1968～ ) vol.16～
178. Journal of Immunological Methods (1971～ ) vol.1～
179. Journal of Immunology (1968～ ) vol.100～

180. Journal of Intellectual Disability Research (1992～ ) vol.36～
181. Journal of Inherited Metabolic Disease (1978～ ) vol.1～
182. Journal of Lipid Research (1968～ ) vol.9～
183. Journal of Magnetic Resonance (1969～ ) vol.1～
184. Journal of Medical Genetics (1987～ ) vol.24～
185. Journal of Membrane Biology (1969～ ) vol.1～
186. Journal of Mental Deficiency Research (1957～1991) vol.1～35
187. Journal of Molecular Biology (1969～ ) vol.39～
188. Journal of Morphology (1993～ ) vol.175～
189. Journal of Muscle Research & Cell Motility (1983～ ) vol.4～
190. Journal of National Cancer Institute (1987～ ) vol.78～
191. Journal of Neural Transmission (1968～ ) vol.31～
192. Journal of Neural Transmission (1989～ ) vol.1～
193. Journal of Neurobiology (1983～ ) vol.14～
194. Journal of Neurochemistry (1968～ ) vol.15～
195. Journal of Neurocytology (1983～ ) vol.12～
196. Journal of Neurogenetics (1983～ ) vol.1～
197. Journal of Neuroimmunology (1981～ ) vol.1～
198. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry (1926～ ) vol.1～
199. Journal of Neurological Sciences (1964～ ) vol.1～
200. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology (1987～ ) vol.46～
201. Journal of Neurophysiology (1938～ ) vol.1～
202. Journal of Neuroscience (1986～ ) vol.6～
203. Journal of Neuroscience Methods (1979～ ) vol.1～
204. Journal of Neuroscience Research (1983～ ) vol.9～
205. Journal of Pathology (1983～ ) vol.139～
206. Journal of Pediatrics (1968～ ) vol.72～
207. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics (1967～ ) vol.156～
208. Journal of Pharmacy & Pharmacology (1987～ ) vol.39～
209. Journal of Physiology (1968～ ) vol.194～
210. Journal of Tissue Culture Methods (1983～ ) vol.8～

Ⅲ 委員会

211. Journal of Toxicology : Toxin Reviews (1987～ ) vol.6～
212. Journal of Structure Biology (1990～ ) vol.103～  
改名前の名称 Journal of Ultrastructure Research & Molecular Structure Research  
(1968～1990) vol.22～102.
213. Journal of Virology (1967～ ) vol.1～
214. Laboratory Animals (1986～ ) vol.20～
215. Laboratory Animal Science (1986～ ) vol.36～
216. Laboratory Investigation (1968～ ) vol.18～
217. Lancet (1968～ )
218. Life Science (1968～ ) vol.7～
219. Lipids (1966～ ) vol.1～
220. MATRIX (1990～ ) vol.10～
221. Magnetic Resonance Imaging (1992～ ) vol.11～
222. Mechanisms of Development (1991～ ) vol.33～
223. Membrane Biochemistry (1987～ ) vol.7～
224. Metabolic Brain Disease (1987～ ) vol.2～
225. Methods in Enzymology (1955～ ) vol.1～
226. Methods in Neurosciences (1990～ ) vol.1～
227. Molecular & Cellular Biochemistry (1973～ ) vol.1～
228. Molecular & Cellular Biology (1983～ ) vol.3～
229. Molecular and Cellular Neuroscience (1993～) vol.4～
230. Molecular & Chemical Neuropathology (1989～ ) vol.10～
231. Molecular Biology Reports (1987～ ) vol.12～
232. Molecular Brain Research (1986～ ) vol.1～
233. Molecular Immunology (1979～ ) vol.16～
234. Molecular Neurobiology (1987～ ) vol.1～
235. Molecular Pharmacology (1965～ ) vol.1～
236. Muscle & Nerve (1978～ ) vol.1～
237. Mutation Research (1964～ ) vol.1～
238. Nature (1968～ ) vol.217～
239. Nature Genetics (1992～ ) vol.1～

240. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (1985~ ) vol.331~
241. Neurobiology of Aging (1987~ ) vol.8~
242. Neurochemical Pathology (1987~1988) vol.6~9
243. Neurochemical Research (1976~ ) vol.1~
244. Neurochemistry International (1987~ ) vol.10~
245. Neurodegeneration (1993~ ) vol.2~
246. Neuroendocrinology (1987~ ) vol.45~
247. Neurology (1970~ ) vol.20~
248. Neuromuscular Disorders (1992~ ) vol.1~
249. Neuron (1988~ ) vol.1~
250. Neuropathology & Applied Neurobiology (1975~ ) vol.1~
251. Neuropediatrics (1978~ ) vol.9~
252. Neuropeptides (1983~ ) vol.4~
253. Neuropsychopharmacology (1988~ ) vol.1~
254. Neuroscience (1983~ ) vol.8~
255. Neuroscience Abstracts (1987~ ) vol.5~
256. Neuroscience Letters (1975~ ) vol.1~
257. Neuroscience Research (1984~ ) vol.1~
258. Neurotoxicology (1987~ ) vol.8~
259. New England Journal of Medicine (1967~ ) vol.276~
260. Nucleic Acids Research (1974~ ) vol.1~
261. Oncogene (1991~ ) vol.6~
262. Pathologie (1983~ ) vol.4~
263. Pathobiology (1990~ ) vol.58~
264. Pediatric Research (1967~ ) vol.1~
265. Peptides (1983~ ) vol.4~
266. Pediatric Neurology (1987~ ) vol.3~
267. Pflugers Archive European Journal of Physiology (1947~ ) vol.249~
268. Pharmacological Reviews (1966~ ) vol.18~
269. Pharmacology Biochemistry & Behavior (1983~ ) vol.18~
270. Psychoneuroendocrinology (1981~ ) vol.6~

### III 委員会

271. *Physiological Reviews* (1968~ ) vol.48~
272. *Physiology and Behavior* (1987~ ) vol.39~
273. *Proceedings of American Association for Cancer Research* (1984~ ) vol.25~
274. *Proceedings of Japan Academy* (1944~ ) vol.20~
275. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* (1968~ ) vol.59~
276. *Proceeding of Royal Society of London Ser. B : Biological Science* (1982~1992) vol. 217~250
277. *Proceedings of Society for Experimental Biology & Medicine* (1987~ ) vol.184~
278. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (1966~ ) vol.1~
279. *Progress in Medical Virology* (1965~ ) vol.7~
280. *Protoplasma* (1989~ ) vol.148~
281. *Psychopharmacology* (1959~ ) vol.1~
282. *RAMBIOS* (1986~1987) vol.3~4
283. *Regulatory Peptides* (1986~ ) vol.14~
284. *Reviews of Magnetic Resonance in Medicine* (1986~1991) vol.1~10
285. *Revue Neurologique* (1978~ ) vol.134~
286. *Roux's Archives of Developmental Biology* (1969~ ) vol.162~
287. *Science* (1968~ ) vol.159~
288. *Second Messengers and Phosphoproteins* (1988~ ) vol.12~
289. *Somatic Cell & Molecular Genetics* (1986~ ) vol.12~
290. *Studia Biophysica* (1983~ ) vol.93~
291. *Subcellular Biochemistry* (1987~ ) vol.12~
292. *Synapse* (1987~ ) vol.1~
293. *Theriogenology* (1986~ ) vol.25~
294. *Tissue Antigens* (1990~ ) vol.35~
295. *Tissue & Cell* (1983~ ) vol.15~
296. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* (1984~ ) vol.142~
297. *Toxicology Letters* (1987~ ) vol.35~
298. *Transplantation* (1987~ ) vol.43~
299. *Trends in Biochemical Science* (1976~ ) vol.1~
300. *Trends in Cell Biology* (1991~ ) vol.1~

301. Trends in Genetics (1986～ ) vol.2～
302. Trends in Neurosciences (1983～ ) vol.6～
303. Trends in Pharmacological Sciences (1979～ ) vol.1～
304. Veterinary Record (1986～ ) vol.118～
305. Virchows Archiv A : Pathological Anatomy & Histology (1947～1993) vol.314～423
306. Virchows Archiv B : Cell Pathology (1968～1993) vol.1～64
307. Virology (1986～ ) vol.148～
308. Virus Research (1986～ ) vol.4～

### III 委員会

#### 和雑誌名

1. 遺伝 (1981～ ) vol.35～
2. イアトロス (1989～1990) vol.6～7
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. 脳と精神の医学 (1991～ ) vol.2～
15. ラボラトリーアニマル (1986～1987) vol.3～4
16. サイエンス (1987～ ) vol.17～
17. 神経精神薬理 (1987～ ) vol.9～
18. 実験医学 (1986～ ) vol.4～
19. 代謝 (1987～1992) vol.24～29
20. Molecular Medicine (1993～ ) vol.30～
21. 臨床神経学 (1971～ ) vol.11～
22. Clinical Neuroscience (1987～ ) vol.5～
23. 生化学 (1978～ ) vol.50～
24. 続・生化学実験講座
25. 新・生化学実験講座 (1989～ )
26. 学術雑誌総合目録(欧文編) (1988～ )
27. 日本生理学雑誌 (1978～ ) vol.40～
28. 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、人的交流を図る。
- ウ. 独自の研究施設、組織、研究委託費を総合的に活用し、大型研究プロジェクトを全国的に推進できる中枢としての機能をもつ。以上の方針のもとに、研究員制度として、流動研究員制度を設け、国内および国外からの研究者を受け入れるものとする。

## 2. 募集方法

公募とし、募集要綱を関連する大学、試験研究機関等に配布し希望者を募集する。

## 3. 流動研究員の区分

流動研究員を段階にわける。決定にあたっては、経歴及び研究業績を審査し、原則として下記の基準に従うものとする。

- 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指し、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機関毎の定数内において総長が任命する。

任用期間は6ヶ月以内の期間を定め任命する。

但し、研究成果に基づき、さらに6ヶ月以内の延長を認めることができる。

原則として、総計3年以内とする。

### 6. 身 分

国家公務員で、非常勤職員とする。

### 7. 服 務

その任期内において、国家公務員法第3章第7節（服務）各条の適用者となる。

### 8. 勤 務 時 間

週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。

- 1) その基準は下記のとおりとする。 平成4年5月より

A（教授＝研究部長）クラス	時給 2,840円
B（助教授＝研究室長）クラス	時給 2,380円
C（講師＝主任研究員）クラス	時給 2,330円
D（助手＝研究員）クラス	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、人的交流を図る。
- (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、総長がこれを行う。
- (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。

## 2 - B. 国立精神・神経センター研究所 客員研究員に関する内規

1. 神経研究所に客員研究員を置くことが出来る。
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. 客員研究員を受け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、総長がこれを行う。
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置くことができる。
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年以内とし、再任を妨げない。
5. 外来研究員を受け入れようとする部長は、神経研究所外来研究員申請書（様式）を総長あてに提出する。
6. 任命は、神経研究所部長会議の決定に基づき任命しようとする者の所属先の同意を得た後、総長がこれを行う。
7. 外来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，研究及び技術修得のための研修を希望する者を，この内規の定めるところにより研究生または研究見習生として受入れるものとする。

### 2. 資 格

研究生は，大学卒業者または国立精神・神経センター総長（以下「総長」という。）が，同等以上の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ものと認めた者で，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、自己の所定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従って、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慎重にし、つねに公私の混同を戒めなければならない。

## 4. 精神・神経疾患研究委託費 運営委員会運営要領

### 1. 目 的

精神・神経疾患研究委託費運営委員会（以下「運営委員会」という。）の適正な運営を図るため、運営委員会要領を定める。

### 2. 運営委員会の業務

- (1) 精神・神経疾患研究委託費（以下「委託費」という。）の委託の対象となる研究課題及び研究者の選考並びにそれぞれの課題に対して、委託しようとする研究費についての審議に関すること。
- (2) 委託費の事業実績（研究成果）の審査に関すること。
- (3) その他委託費の適正な運用に関すること。

### 3. 組織及び委員の構成

- (1) 運営委員会は、委員23名以内をもって組織し、会長1名を置く。
- (2) 運営委員会の委員は次の者のうちから保健医療局長が委嘱する。
  - イ. 関係行政機関及び国立精神・神経センターの職員
  - ロ. 学識経験のある者
- (3) 会長は、国立精神・神経センター総長の職務にある者とし、会長に事故あるときは、委員のうちからあらかじめ会長が指名する者がその職務を代理する。
- (4) 委員の任期は2年とする。ただし関係行政機関及び国立精神・神経センターの職員は当該職務に在職の期間とする。また委員に欠員を生じたときは、それを補充することができるものとし、当該委員の任期は残任期間とする。
 

なお、原則として継続した再任は認めない。
- (5) 運営委員会に評価部会を置くことができる。
  - イ. 評価部会は、研究成果の評価を行い運営委員会に報告しなければならない。
  - ロ. 評価部会の委員は、運営委員会の委員の中から運営委員会会長が保健医療局長と協議のうえ依頼する者若干名とし、部会長を置く。
  - ハ. 評価部会に上記委員のほか、保健医療局長の依頼する専門委員若干名を置くことができる。

#### Ⅳ 別 項

#### 4. 運営委員会の開催

運営委員会（評価部会を含む）は、必要に応じ、会長が保健医療局長と協議のうえ招集する。

#### 5. 運営委員会の庶務

運営委員会の庶務は、国立精神・神経センター運営部において処理する。

#### 6. 雑則

この要領に定めるもののほか、運営委員会の運営に関し必要な事項は、会長が保健医療局長と協議のうえ定める。

#### 7. (附則)

- (1) この要領は、昭和62年4月1日より施行し、従前の神経疾患研究推進委員会規程は、廃止する。
- (2) この規程の施行後最初に委嘱する委員のうち保健医療局長の指定する者の任期は本文の規定にかかわらず1年とする。
- (3) 平成3年4月1日一部改正

## 5. 精神・神経疾患研究委託費運営委員会委員

委 員 名	所 属 及 び 役 職 名	任 期
井 形 昭 弘	国立療養所中部病院長	H 4 . 4 . 1 ~ H 6 . 3 . 31
遠 藤 實	東京大学医学部名誉教授	〃
大 谷 藤 郎	財団法人藤楓協会理事長	〃
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	神戸大学医学部名誉教授	〃
飯 田 光 男	国立療養所鈴鹿病院長	H 5 . 4 . 1 ~ H 7 . 3 . 31
大 塚 俊 男	国立下総療養所長	〃
大 月 三 郎	財団法人慈圭会精神医学研究所顧問	〃
柴 崎 浩	京都大学医学部教授	〃
立 石 潤	九州大学医学部脳神経病研究施設教授	〃
御子柴 克 彦	東京大学医科学研究所教授	〃
三吉野 産 治	東京都立東大和療育センター院長	〃
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	〃
平 良 専 純	厚生省保健医療局精神保健課長	〃
三 觜 文 雄	厚生省児童家庭局母子衛生課長	〃
杉 田 秀 夫	国立精神・神経センター総長	〃
荒 川 直 人	国立精神・神経センター国府台病院長	〃
小 澤 鏝二郎	国立精神・神経センター神経研究所長	〃

(平成6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
井 形 昭 弘	国立療養所中部病院長	H 4 . 4 . 1 ~ H 6 . 3 . 31
遠 藤 實	東京大学医学部名誉教授	〃
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	〃
飯 田 光 男	国立療養所鈴鹿病院長	H 5 . 4 . 1 ~ H 7 . 3 . 31
大 塚 俊 男	国立下総療養所長	〃
柴 崎 浩	京都大学医学部教授	〃
立 石 潤	九州大学医学部脳神経病研究施設教授	〃
三吉野 産 治	東京都立東大和療育センター院長	〃
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	〃
三 觜 文 雄	厚生省児童家庭局母子衛生課長	〃
杉 田 秀 夫	国立精神・神経センター総長	〃
荒 川 直 人	国立精神・神経センター国府台病院長	〃
小 澤 鏡二郎	国立精神・神経センター神経研究所長	〃

(平成6年3月31日現在)

## 7. 平成5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	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	千円 27,000	継 続
3指-2	神経系機能修復に関する開発的研究	国立精神・神経センター 神経研究所 部長	高 坂 新 一	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 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	慶應義塾大学 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シ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 院長	村 上 慶 郎	10,000	〃
4指-6	治療抵抗性精神障害の成因、病態に関する研究	国立精神・神経センター 精神保健研究所 部長	北 村 俊 則	10,000	〃
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 鉄二郎	57,000	新規再編
5指-2	筋ジストロフィー及び顔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 院長	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 院長	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 神経精神科 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	脊髓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	精神 神経科 教授 神 戸 大 学 医 学 部 脳 神 経 外 科 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 神 経 内 科 教 授	金 澤 一 郎	21,000	〃
5公-5	児童・思春期における行動・情緒障害の病態解析及び治療に関する研究	東 京 大 学 医 学 部 精 神 衛 生 ・ 看 護 学 教 授	栗 田 廣	16,000	〃
合 計				620,000	

## 8. 平成6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	備考
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	千円 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	群馬大学医学部解剖学教授	石川春律	57,000	継続
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	〃
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神経精神科教授	融道男	17,000	〃
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	山梨医科大学精神神経科教授	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	神戸大学医学部脳神経外科教授	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	東京大学医学部神経内科教授	金澤一郎	21,000	〃
5公-5	児童・思春期における行動・情緒障害の病態解析及び治療に関する研究	東京大学医学部精神衛生・看護学教授	栗田廣	16,000	〃
6指-1	筋ジストロフィー及び神経・筋疾患モデル動物の開発、供給に関する研究	国立精神・神経センター神経研究所部長	鍋島陽一	27,000	新規再編
6指-2	脳神経系機能障害の防御と修復に関する開発的研究	国立精神・神経センター神経研究所部長	高坂新一	14,000	〃
6指-3	胎児・新生児脳循環障害の発症機序と予防に関する開発的研究	国立精神・神経センター神経研究所部長	高嶋幸男	19,000	〃
6指-4	感情障害の経過型からみた成因解明と治療法の開発研究	国立精神・神経センター武蔵病院副院長	高橋清久	10,000	〃
6公-1	神経疾患及び精神疾患の発症要因に関する疫学的研究	北海道大学医学部公衆衛生学教授	近藤喜代太郎	10,000	〃
6公-2	機能的画像診断による精神・神経疾患の総合的研究	東京大学医学部放射線医学教授	佐々木康人	20,000	〃
6公-3	高次脳機能の発達異常に関する基礎的研究	慶應義塾大学医学部生理学教授	植村慶一	19,000	〃
合 計				620,000	

---

国立<sup>精神</sup>神経センター神経研究所年報  
第8号（通巻16号）平成5年度

発行 平成6年3月31日  
発行者 小澤 鉄二郎  
編集者 山元 弘  
          中村 俊  
印刷 御幸印刷株式会社

---

国立<sup>精神</sup>神経センター神経研究所  
〒187 東京都小平市小川東町4-1-1  
電話 0423 (41) 2711

---