ISSN:0037-3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第27回　日本神経化学会大会論文集

Vol. 23, 1984

日本神経化学会

神経化学

第27回日本神経化学会大会論文集

PROCEEDINGS OF THE 27th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於 東 京
11月15日(木), 11月16日(金), 11月17日(土)

Vol. 23, 1984

日 本 神 経 化 学 会

編集委員（五十音順）

植村慶一（代表）	（埼玉医大・Ⅰ生理）
奥山典生	（都立大・理・化学）
加藤尚彦	（東大・医・脳研）
北村邦男	（埼玉医大・Ⅰ生理）
黒川正則	（東大・医・脳研）
高垣玄吉郎	（都神経研・神経生化学）
高橋良	（東医歯大・神経精神科）
塚田裕三	（慶大・医・生理）
野口鉄也	（東邦大・医・Ⅱ生理）
濱口勝彦	（埼玉医大・神経内科）
平野修助	（東邦大・医・Ⅱ生理）
御子柴克彦	（慶大・医・生理）
宮本英七	（熊本大・医・Ⅰ薬理）

目　次

1. 脳シナプス膜のアセチルコリン受容によるコンホメーション変化の性質
— 特に vasopressin , D−tubocurarine および Ca^{2+} の作用 — …… 21
関谷　真・迫　昭子　（上智大・生命研）

2. てんかんマウス（*El*）の発育期におけるムスカリン性アセチルコリン・レセプター subtype の変化 …… 24
藤田精一郎・森　浩一・植松直道・川口賢治・千頭孝史・山上　栄・川北幸男
（大阪市大・医・神経精神科）

3. ラット胃における ^3H−QNB 特異的結合の多様性とその機能的局在 …… 27
山本　純　（名市大・医・Ⅱ外科）
津島宏美　（同・薬理）
正岡　昭　（同・Ⅱ外科）
松田友宏　（同・薬理）

4. 強制水泳によるマウス脳ベンゾジアゼピンレセプター機能変化の *in vivo* 測定：ポジトロントレーサースタディーへの応用 …… 30
井上　修・秋本義雄・橋本謙二・山崎統四郎
（放医研・臨床研）

5. ラット辺縁系脳で認められた TRHの 5−HT_1 receptor 増加作用 …… 33
船津邦比古・手嶋茂紀・稲永和豊
（久留米大・医・精神科）

6. ラット部位別脳と下垂体における TRH レセプターの多様性 …… 36
船津邦比古・手嶋茂紀・稲永和豊
（久留米大・医・精神科）

7. 視床下部視索上核，室旁核における β−アドレナリン受容体の立体特異性と生理機能 …… 39
津島宏美・森　眞由美・松田友宏
（名市大・医・薬理）

8. ラット脳における α_2−adrenergic receptor binding に関する問題点 …… 42
辻村良太郎・太田深雪・中村豊紀・野村純一
（三重大・医・精神科）

9. ラット脳内α_2受容体の可溶化とその性質 …… 45
松井宏晃・朝倉幹雄・塚本　徹・今福　淳・
伊野美幸・斉藤典子・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神科）

10. ラット大脳皮質α_2レセプター調節機構について — dopamine 処置による影響 — …… 48
河野康子　（久留米大・医・薬理）
野村靖幸　（富山医薬大・和漢薬研）
瀬川富朗　（広島大・医・薬効解析）

11. 新生期，老化期ラット線条体シナプス膜 dopamine receptor－Ns（Ni）－adenylate cyclase 共役系機能 …… 51
有馬　隆　（広島大・医・薬効解析）
野村靖幸　（富山医薬大・和漢薬研）
瀬川富朗　（広島大・医・薬効解析）

12. 電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー（HPLC/ECD）を用いた脳内 acetylcholine, choline および acetylcholine turnover の測定 …… 54
垣花　満・成実重彦・永岡明伸
（武田薬品・中研・生物研）

13. 高速液体クロマトグラフィーによる人尿および動物組織中β－フェニルエチルアミンの定量 …… 57
辻　元宏・大井　健・多賀千明・明神徹郎・
高橋三郎　（滋賀医大・精神科）

14. 肝再生におけるセロトニンの役割 — 分化増殖に関して — …… 60
山田尚登・辻　元宏・高橋三郎
（滋賀医大・精神科）

15. 細胞レベルにおけるカテコールアミン，モノフェノールアミン受容の薬理学的分類 — 軟体動物巨大神経細胞による — …… 63
庫　宝善・竹内　宏　（岐阜大・医・I生理）

16. アミン合成阻害剤によるラット脳内部位別チアミンリン酸エステルの変化について …… 66
米川　賢　（広島大・医・精神科）
金谷俊則　（吉田総合病院・精神科）
真島宏海・更井啓介　（広島大・医・精神科）

17. 無麻酔ラット脳内モノアミン類のモニタリング：透析チューブを用いる新しい方法 …… 69
加藤　武（東工大・生命化学）
浅野昌雄（東海医理科）

18. ドパミンによるAchを介するラット耳下腺からのアミラーゼ分泌 …… 72
畑　文明・近藤悦夫・幸田直彦・石川康子・
石田　甫（徳島大・歯・薬理）

19. *El*— mouse 脳切片からのserotonin releaseについて …… 75
平松　緑・加太英明・森　昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化）

20. ノルエピネフリンの視床下部内持続注入による肥満の発生 …… 78
嶋津　孝・野間めぐみ・斉藤昌之
（愛媛大・医・I医化学）

21. 低体温動物モデルにおける血漿ホルモンおよび脳内モノアミンの変動 …… 81
奥田千恵子・斉藤朗子・宮崎正夫
（京府医大・麻酔科）
栗山欣弥（同・薬理）

22. ラット脳ミクロソームestradiol 2－hydroxylaseのcatecholamineによる阻害の様式 …… 84
塚本卓治・佐藤正雄・稲葉　喬
（佐賀大・農芸化学）

23. ストレスによるラット脳内noradrenaline代謝回転亢進に対するdiazepamの抑制作用
— Ro15－1788とpicrotoxinによる検討 — …… 87
井田能成・田中正敏・津田　彰・辻丸秀策・
長崎信行（久留米大・医・薬理）

24. 反屈束を介するラット脳内ドーパミンニューロンの抑制性制御 …… 90
西川　徹（東医歯大・医・神経精神科）
B. Scatton（Synthélabo —L.E.R.S.）

25. 〔^{3}H〕SULPIRIDE及び〔^{3}H〕SPIPERONEのラット線条体D_2ドーパミン
受容体に対する結合特性（Naイオン，GTP，N－ethylmaleimideの効果） …… 93
今福　淳・朝倉幹雄・塚本　徹・松井宏晃・
伊野美幸・斉藤典子・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神科）

26. 心理的ストレスによるラット脳内ノルアドレナリン代謝回亢進に及ぼす電撃の先行経験の効果 …… 96
津田　彰・田中正敏・井田能成・辻丸秀策・長崎信行（久留米大・医・薬理）

27. L－threo－3，4－dihydroxyphenylserineのラット脳norepinephrine代謝に及ぼす影響 …… 99
仙波純一・高橋　良（東医歯大・医・神経精神科）

28. 長期ドーパ投与におけるラットの行動薬理的変化 …… 102
溝渕睦彦・堀口　淳・川本立夫（愛媛大・医・神経精神科）
吉村裕之（同・薬理）
三宅正治（同・機器センター）
柿本泰男（同・神経精神科）

29. ストレプトゾトシン誘発性糖尿病動物モデルにおける網膜内ドーパミン・ニューロンの代謝と機能の変化について …… 105
栗山欣弥・西村千尋（京府医大・薬理）

30. 実験的糖尿病ラットの黒質－線条体系における神経伝達物質の変化について …… 108
左　萍・栗山欣弥（京府医大・薬理）

31. ラット脳内ドパミン活動の日内動態 …… 111
盛政忠臣・池田正明・庄盛敏廉（岡山大・医・脳研・病態生化）
池田正人・永津俊治（東工大・生命化学）

32. Thyrotropin–releasing hormone（TRH）および類縁体DN－1417のラット側坐核および線条体からのドパミン遊離の作用機序 …… 114
成実重彦・永井康雄・佐治美昭・名川雄児（武田薬品・中研・生物研）

33. ラット線条体のドパミン代謝に対するopiopetidesの影響 …… 117
米原典史（阪大・歯）
D.H. Clouet（NYS division of Substance Abuse Services Res. Lab.）

34. TRHアナログ・DN−1417 の単回及び反復投与による中枢ドパミンニューロン系の変化 …… 120
中原辰雄（九大・理）
内村英幸・松本孝・平野誠・中村薫・
石橋賢治・平野均（国立肥前療養所）
横尾秀康（久留米大・医・精神科）

35. ドーパミンβ−ヒドロキシラーゼと中枢神経系作用薬との相互作用の研究：特にフェノチアジン系薬物の阻害作用について …… 123
嶋崎健一・小幡淳雄・山田紘一・川面博司
（城西大・薬）

36. メタンフェタミン逆耐性形成に及ぼすハロペリドールデカノエートの効果 …… 126
柏原健一・藤原豊・小川俊彦・福田賢司・
原田俊樹・佐藤光源・大月三郎
（岡山大・医・神経精神科）

37. 胎内X線照射のラット胎仔及び新生仔大脳DNAの量及び組成に及ぼす影響 …… 129
岩崎説雄・田中晴美・有馬正高
（国立神経センター・疾病Ⅱ）

38. Twitcher マウスの生化学的研究 …… 132
梅沢房代・河西悦子・井田博幸・所敏治・
衛藤義勝（慈恵医大・小児科）

39. 先天性甲状腺機能低下症マウス（*hyt*）のミエリン低形成に及ぼす甲状腺ホルモンの効果 …… 135
杉崎哲朗・野口鉄也（東邦大・医・Ⅱ生理）
佐藤勇（同・総研）
工藤玄恵（同・病理）

40. 成長ホルモン単独欠損マウス（*lit*）の大脳ミエリン低形成について …… 138
野口鉄也・杉崎哲朗（東邦大・医・Ⅱ生理）
塚田裕三（慶大・医・生理）

41. キンドリングてんかんモデルにおけるTRH機構の関与 …… 141
梶田三郎・森分隆・佐藤光源・大月三郎
（岡山大・医・神経精神科）
小川紀雄・広瀬由起子・森昭胤
（同・脳研・機能生化）

42. *El* マウス大脳皮質のシナプトソーム蛋白合成と発作の影響 …… 144
古塚大介・山上　栄・千頭孝史・平山栄一・
森　浩一・川北幸男　（大阪市大・医・神経精神科）

43. 高血圧自然発症及び脳卒中易症ラットのカテコールアミンと学習行動変化 …… 147
野村正彦・岡村邦博　（保健衛生大・医・生理）

44. 実験的脳発育障害ラットの脳内物質変化と学習機能 — MAMの胎生11～13日投与群について — …… 150
松谷天星丸・永吉道子・田丸政男・平田ゆかり・
平林邦夫　（保健衛生大・医・総医研・発達生理）

45. Menkes' Kinky Hair Diseaseの大脳にみられた脂質及びタンパク質の異常 …… 153
原　厚・武富　保
（信州大・医・心脈管病研・脂質生化）

46. 高圧酸素の中枢神経毒性 …… 156
石田裕一・野田行文・松下浩司
（中外製薬・新薬研）

47. Gunnラット小脳低形成に伴うライソゾームの変化 …… 159
佐藤　浩・慶野宏臣・柏俣重夫
（愛知県コロニー・周生期）
山田博明・名取靖郎　（徳島大・医・栄養）

48. メチル水銀中毒動物の神経系の研究 …… 162
S.S. Haider・沢口昭一・桑野良三・荒木一明・
崎村建司・前田利長・薄井　宏・高橋康夫
（新潟大・脳研・神経薬理）

49. プロテオリピドアポ蛋白によるモルモット実験的アレルギー性脳脊髄炎 …… 165
由村健夫・国下龍英・田平　武
（国立神経センター・疾病VI）

50. 実験的アレルギー性神経炎とヒト脱髄性末梢神経疾患における細胞性免疫 — ウシP2蛋白とその合成ペプチド …… 168
野村恭一・根岸輝彦・大野良三・濱口勝彦
（埼玉医大・神経内科）
鈴木　勝・植村慶一　（同・I生理）

51. 実験的脳梗塞 gerbil 脳の神経ペプチドと受容体 …… 171
岸本　武・小川紀雄・広瀬由起子・森　昭胤
（岡山大・医・脳研）
高山晴彦　（同・Ⅲ内科）

52. 内因性うつ病患者における clonidine 投与時の血漿 noradrenaline および HGH の変化 …… 174
渡辺　厚・馬目太永・金子元久・沼田吉彦・
星野仁彦・菅野智行・熊代　永
（福島県医大・神経精神科）

53. Neuronal Ceroid Lipofuscinosis の生化学的検討 …… 177
大橋十也・呉羽由利恵・衛藤義勝・前川喜平
（慈恵医大・小児科）
後藤和利・熊谷公明（神奈川リハビリセンター・小児科）
山口修一　（埼玉県小児医療センター）

54. 実験的神経原線維変化を生じた家兎脳およびアルツハイマー病脳におけるカテプシン D 活性の変化と線維性蛋白質 …… 180
武田雅俊・多田國利・播口之朗・西村　健
（阪大・医・精神科）

55. 老年痴呆治療薬 pantoyl－GABA（ホモパントテン酸）によるコリン・アセチルトランスフェラーゼ活性の上昇および中枢アセチルコリン作働性神経へのコリン取込の増加 …… 183
中広全延・福地　勲・吉田　博
（阪大・医・Ⅰ薬理）

56. 感情病，精神分裂病における血漿遊離 MHPG，デキサメサゾン抑制試験，血清 CPK …… 186
曽良一郎・西紋孝一・藤原　豊・原田俊樹・
佐藤光源・大月三郎　（岡山大・医・神経精神科）

57. ヒト及び白鼠急性脳炎感染脳におけるコレステロールエステルについて …… 189
小川希代子・阿部敏明・浦山久美子・平岩幹男
（帝京大・医・小児科）

58. 脳ミクロソームにおける Arachidoyl－CoA 及び Behenoyl－CoA 鎖長伸長反応の性質 …… 192
吉田　敏・竹下正純　（大分医大・生化）

59. ラット脳ミクロソームにおける脂肪酸伸長酵素—NADPH 依存性酵素の性状— …… 195
竹下正純・吉田　敏　（大分医大・生化）

60. ラット脳中性スフィンゴミエリネースの精製と免疫学的性質 …… 198
野口悦子 （国立神経センター・疾病Ⅱ）

61. ラット脳におけるH_2－レセプターを介するhistamineの膜リン脂質のメチル化促進作用 …… 201
小澤孝一郎 （広島大・医・薬効解析）
野村靖幸 （富山医薬大・和漢薬研）
瀬川富朗 （広島大・医・薬効解析）

62. アメフラシにおける糖脂質：神経組織に特異的に見られたphosphonoglycosphingolipids …… 204
阿部幸子・荒木恵子・熊西敏郎・佐武明
（新潟大・脳研）

63. 胎児GM_1－ガングリオシドーシス1型及び2型の脳糖脂質 …… 207
石川幸辰・館延忠・南良二
（札幌医大・小児科）

64. マウスにおける脳とNatural Killer細胞の共通抗原としてのGA_1（Ganglio－N－tetraosylceramide）のミエリン局在性 …… 210
楠進・辻崇一 （東大・医・Ⅱ生化）
永井克孝 （同・Ⅱ生化：新潟大・脳研）

65. ラットの中枢ノルアドレナリン神経終末の神経毒物による変性に対するGM_1ガングリオシドの効果 …… 213
小島秀樹 （久留米大・医・脳研）
G. Jonsson （カロリンスカ研究所）
A. Gorio （Fidia）
山田茂人・提哲之・安楽茂己
（久留米大・医・脳研）
稲永和豊 （同・精神科）

66. ラット脳プロスタグランディンD合成酵素の精製及び免疫組織化学 …… 216
裏出良博・藤本昇・渡辺恭良・早石修
（新技術開発事業団・早石プロジェクト）
金子武嗣・水野昇 （京大・医・Ⅰ解剖）

67. 嗅覚系中枢とプロスタグランジン …… 219
渡辺恭良（新技術開発事業団・早石プロジェクト）
森　憲作・今村一之・高木貞敬
（群馬大・医・Ⅱ生理）
早石　修（新技術開発事業団・早石プロジェクト）

68. 脂肪細胞のS－100蛋白放出機構について — 免疫電顕的研究を中心に — …… 222
灰本　元（名大・医・病理）
加藤兼房・鈴木富士子（愛知県コロニー・生化）
名倉　宏（名大・医・病態研）

69. 2′, 3′－環状ヌクレオチド3′－フォスフォジエステラーゼ（CNP；EC 3.1.4.37）
のイムノブロッティング …… 225
栗原　正・高橋康夫（新潟大・脳研・神経薬理）

70. 末梢神経ミエリン糖蛋白（P0蛋白）の脂肪酸結合ペプチドについて …… 228
坂本　安・北村邦男・王　堯・植村慶一
（埼玉医大・Ⅰ生理）

71. ラット脳上清蛋白の脂肪酸結合能 …… 231
千丈雅徳・石橋輝雄・今井　陽
（北大・医・Ⅱ生化）

72. ウシ脳GABA－modulinの精製とその性質 …… 234
黒須泰行・門屋利彦・石岡憲昭・礒辺俊明・
奥山典生（都立大・理・化学）
栗岡　晋・松田　誠（慈恵医大・生化）

73. Myelin－associated glycoprotein（MAG）とヒトのT細胞性白血病由来のcell line
（HSB－2）との共通抗原 …… 237
佐藤修三・田中正美・宮谷信行・馬場広子・
宮武　正（新潟大・脳研・神経内科）

74. ヒト脳内のpeanut agglutininリセプターについて …… 240
桃井真里子（自治医大・小児科）
桃井　隆（国立神経センター・V部）
鴨下重彦（自治医大・小児科）

75. ミエリン形成障害マウス（Trembler）におけるMyelin assoiated glycoprotein（MAG）およびその他の蛋白について …… 243
犬塚　貴（新潟大・脳研・神経内科）
J. Heath, B.D. Trapp, R.H. Quarles（N.I.H.）

76. 顆粒細胞欠損マウス（*weaver*）の小脳の形態学的並びに生化学的研究：GFAP, MBP, S−100, セロトニンの免疫組織化学並びに二次元電気泳動法による解析 …… 246
御子柴克彦・岡野栄之・藤城正敏・高松　研（慶大・医・生理）
木村　宏（滋賀医大・解剖）
塚田裕三（慶大・医・生理）

77. ニューロフィラメントと微小管の結合 …… 249
徳武　哲（都精神研・神化）

78. Marquardt法による軸索流速度の数量的解析 — 亜慢性鉛中毒ラットを例として — …… 252
横山和仁・荒記俊一（大分医大・公衛）

79. 軸索内チューブリン輸送の二型 …… 255
田代朋子・小宮義璋・黒川正則（東大・医・脳研・生化）

80. 小脳発育障害で著増するラット小脳50Kタンパク（GR−50）とGFAPとの関連について …… 258
青野幸子・佐藤　浩・仙波禮治・柏俣重夫（愛知県コロニー・周生期）
L.F. Eng（スタンフォード大・医・病理）

81. 糖蛋白合成阻害剤投与によるラット小脳ミエリン異常について …… 261
高坂新一・三田浩一・須田治彦・塚田裕三（慶大・医・生理）

82. 神経終末ドーパミン結合性蛋白質の研究［続報］ …… 264
都築紀宏（名市大・医・生化）

83. 培養毛様体神経節ニューロンに働く神経突起伸展因子 — 部分精製と活性蛋白質の同定 — …… 267
林　要喜知・三木直正（金沢大・がん研・薬理）

84. 網膜VISININの局在とmRNAによる生合成 …… 270
畠 中 幸 子 （金沢大・がん研・薬理）
木 山 博 資・遠 山 正 弥 （阪大・医・高次研・解剖）
三 木 直 正 （金沢大・がん研・薬理）

85. 神経細胞及びグリア細胞に特異的なモノクロナル抗体 …… 273
天 野 武 彦・小 嶋 端 代 （三菱化成生命研・脳神経化学）

86. ニワトリ胚におけるニューロフィラメント大，中サブユニットおよび関連物質の分布 …… 276
藤 田 忍・小 幡 邦 彦 （群馬大・医・薬理）

87. グリア細胞成長因子（Glia Maturation Factor, GMF）により誘導されるglioblast
の細胞骨格の変化 …… 279
鈴 木 龍 雄・加 藤 泰 治・田 中 亮
（名市大・医・I生化）
藤 井 敏 弘 （信州大・繊維・機能高分子）

88. ウシ脳micro glutamic acid−rich proteinの一次構造，免疫化学的性質とneurofilament
68K−タンパク質との関係 …… 282
礒 辺 俊 明・真 鍋 敬・門 屋 利 彦・奥 山 典 生
（都立大・理・化学）
中 島 孝 （国立がんセンター・病理）
加 藤 兼 房 （愛知県コロニー・生化）

89. シビレエイ電気器官の界面活性剤可溶型アセチルコリンエステラーゼ：精製と性質 …… 285
酒 井 三千三・西 須 英 雄・腰 越 直 也・阿 部 輝 雄
（新潟大・脳研）

90. *mld* ミュータントマウスにおけるミエリン塩基性蛋白のモザイク発現について …… 288
御子柴 克 彦・岡 野 栄 之・藤 城 正 敏・高 松 研
（慶大・医・生理）
井 上 芳 郎 （北大・医・解剖）
塚 田 裕 三 （慶大・医・生理）

91. myelin deficient（*mld*）マウスにおけるMBP遺伝子とその転写の解析 …… 291
岡 野 栄 之・御子柴 克 彦・宮 脇 敦 史・塚 田 裕 三
（慶大・医・生理）

92. 網膜に特異的なcDNAのクローニング — PCR 18の解析 — …… 294
中川勇三・郭　哲輝・三木直正
（金沢大・がん研・薬理）

93. 電位依存性カルシウムチャンネルに対するキナクリンの阻害機構 …… 297
太田　章・尾上浩隆・馬場明道・岩田平太郎
（阪大・薬・薬理）

94. ジャコウネズミの加令に伴うシナプトソームのカルシウムのとりこみの消長 …… 300
山口知子（東女医大・生化）
山口　仁（昭和大・医・神経科）

95. 電位依存性カルシウムチャンネルによるカルシウム流入のアデノシンによる調節 …… 303
黒田洋一郎（都神経研・生化）
吉井光信・角尾彰信・楢橋敏夫
（ノースウェスタン大・医・薬理）

96. 受容体刺激に共役したCa^{2+}の動態とサイクリックGMP生成の関連性 …… 306
大迫俊二・出口武夫（都神経研・医化）

97. C－キナーゼによる平滑筋ミオシン軽鎖リン酸化反応の調節機構について …… 309
伊藤正明・田中利男・日高弘義
（三重大・医・薬理）

98. Ca^{2+}，カルモデュリン依存性蛋白質リン酸化反応による微小管重合調節とcAMP依存性反応との比較 …… 312
山本秀幸・福永浩司（熊本大・医・Ⅰ薬理）
後藤　恵（同・脳外科）
田中越郎・宮本英七（同・Ⅰ薬理）

99. マウス脳の発達におけるカルモデュリンの免疫組織化学的局在 …… 315
大島章子・北島哲子・佐野　護
（愛知県コロニー・形態）
加藤兼房（同・生化）
水谷　昭（同・形態）

100. ラット網膜に存在するカルモデュリン依存性アデニル酸シクラーゼ …… 318
佐野　護（愛知県コロニー・形態）

101. 培養グリオーマ細胞の分化とカルモデュリンおよびS－100 …… 321
北島哲子・大島章子・佐野　護（愛知県コロニー・形態）
加藤兼房（同・生化）
東田陽博（金沢大・がん研・薬理）

102. 牛副腎髄質細胞の凍結保存・二次培養法 …… 324
高橋正身・畠中　寛（三菱化成生命研）
熊倉鴻之助・（上智大・生命研）
溝部文夫（老人研）

103. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞における神経分泌の動態Ⅱ：細胞外液中の2価陽イオンによる調節作用 …… 327
小原美佳・中川　豊・熊倉鴻之助（上智大・生命研）

104. クロマフィン細胞アセチルコリンエステラーゼのベラトリジン刺激による細胞膜からの遊離 …… 330
溝部文夫（老人研）

105. PC12 Pheochromocytoma細胞の突起形成の Na^+ 依存性 …… 333
小池達郎（佐賀医大・化学）

106. ヒトおよびラット培養グリオーマ細胞に及ぼすプロスタグランディン D_2 の影響 …… 336
本田千穂・田渕和雄・藤原　敬・入江恵子・
吉岡純二・植田清隆・大本堯史（香川医大・脳外科）

107. 胎生期及び生後ラット脳を用いた初代培養系の継時的変化とCNPase活性について …… 339
岩崎紀子・阿相皓晃・金本和男・平野修助（東邦大・医・Ⅱ生理）

108. 培養神経細胞における各種ホルモンのミエリン脂質合成に及ぼす影響 …… 342
呉羽由利恵（慈恵医大・小児科）
辛島　仁（同・Ⅱ内科）
衛藤義勝（同・小児科）

109. ニワトリ脳の単離オリゴデンドロサイトの培養とそのミエリン塩基性蛋白（MBP）と
2′, 3′－cyclic nucleotide 3′－phosphodiesterase（CNPase）の発達に伴う変動 …… 345
熊谷博道・佐藤七枝・今澤正興・宮本侃治
（国立神経センター・代謝）

110. 培養アストログリア細胞におけるガングリオシドGM_1の変化について …… 348
阿相皓晃・岩崎紀子・原田　寧・平野修助
（東邦大・医・Ⅱ生理）

111. ラット中隔中心核培養組織に対する海馬可溶性因子のNeurotrophic effects …… 351
小鹿幸生・山本正彦　（名市大・医・Ⅱ内科）
田中　亮　（同・Ⅰ生化）
S.H. Appel　（Baylor大・内科）

112. 新生仔および成熟ラット大脳皮質切片におけるβ－水酸化酪酸の利用 …… 354
安藤雅史・伊藤忠雄　（鳥取大・医・臨床薬理）

113. 白鼠上頸部交感神経節へのα－aminoisobutyric acid（AIB）の取込みとNa^+,
K^+－ATPase活性におよぼす神経成長促進因子（NGF）の促進効果 …… 357
安藤正人・永田　豊　（保健衛生大・医・生理）
堀　真一郎　（都神経研・神経生化）

114. ラット脳内の種々の部位で^{3}H－プトレスチンより生合成された^{3}H－GABAの遊出に関する
研究 — Push－Pull Perfusion Systemを用いて — …… 360
能登　直・橋本泰道・上村　宏
（京府医大・精神科）
加藤伸勝　（都立松沢病院）
中嶋照夫　（京府医大・精神科）

115. ラットCaudate－Putamenにおいて^{3}H－プトレスチンより生合成された^{3}H－GABAの
releaseに及ぼすK^+, Ca^{++}の影響について — Push－Pull Perfusionを用いて — …… 363
能登　直・橋本泰道・中尾純治
（京府医大・精神科）
加藤伸勝　（都立松沢病院）
中嶋照夫　（京府医大・精神科）

116. ウシ大脳皮質GABA／ベンゾジアゼピン受容体の精製とその抗体生成 …… 366
田口淳一・栗山欣弥　（京府医大・薬理）
木村　宏　（滋賀医大・Ⅱ解剖）

117. モルモット大脳皮質組織における伝達物質グルタミン酸の動態 …… 369
高 垣 玄吉郎・小長谷 初 枝 （都神経研・神経生化）

118. ラット卵管内のグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD, EC 4．1．1．15）活性とγ－アミノ酪酸（GABA）濃度の分布とその性周期による変動 …… 372
村 島 善 也・加 藤 尚 彦 （東大・医・脳研）

119. 抗GABA抗血清を用いたGunn ラット小脳の免疫組織化学とglutamate decarboxylase 活性の加齢変化について …… 375
青 木 英 子・仙 波 禮 治・慶 野 宏 臣・柏 俣 重 夫
（愛知県コロニー・周生期）

120. GABA抗体の精製と免疫組織化学 …… 378
斎 藤 尚 亮・雲 井 一 夫 （神戸大・医・薬理）
木 村 宏 （滋賀医大・Ⅱ解剖）
田 中 千賀子 （神戸大・医・薬理）

121. キンドリングけいれんに対するGABA－containing Liposome の抑制効果 …… 381
森 則 夫・熊 代 永 （福島県医大・神経精神科）

122. セファロスポリン系抗生剤により誘発される痙攣とγ－アミノ酪酸 …… 385
堀 誠 治・栗 岡 晋・松 田 誠
（慈恵医大・医化学）
鳴 田 甚五郎 （同・Ⅱ内科）

123. 質量分析法による神経組織のペプチドの分析 …… 388
植 村 慶 一・坂 本 安・高 野 宏 美・西 島 樹 重
（埼玉医大・Ⅰ生理）

124. エンケファリンそのものを固相用抗原とするメチオニン－エンケファリンのenzyme－linked immunosorbent assay：直接法と拮抗法 …… 391
武 居 能 樹・小 崎 康 子 （名大・環境医研）

125. Cholecystokinin－8－sulfate の酵素免疫測定法 …… 394
山 本 秀 子・恵 美 安 裕・加 藤 武
（東工大・総理工・生命化学）

126. ストレスによるラット脳内ノルアドレナリン放出亢進の抑制作用からみたオピオイド・ペプチド類の差違 …… 397
田 中 正 敏・井 田 能 成・津 田 彰・辻 丸 秀 策・
長 崎 信 行 （久留米大・医・薬理）

127. 血圧調節に関する脊髄Substance Pニューロンとその受容体 …… 400
高野行夫・神谷大雄 （福岡大・薬・薬理）
A.D. Loewy （ワシントン大・医・Anatomy & Neurobiology）

128. Effects of alpha−fluoromethylhistidine on ACTH, Vasopressin, and Oxytocin in the Hypothalamo−Hypophyseal System and Plasma. …… 403
R. Cacabelos （阪大・医・精神科）
大和谷厚・渡辺建彦 （同・Ⅱ薬理）
高木哲・谷沢修 （同・産婦人科）
播口之朗・西村健 （同・精神科）
和田博 （同・Ⅱ薬理）

129. 向精神薬投与後のラット脳内サブスタンスPの変化 …… 406
三ツ汐洋・高嶋端夫・融道男
（国立神経センター・疾病Ⅲ）

130. 精神分裂病死後脳，前頭前野，側頭葉，辺縁系のコレシストキニン免疫活性 …… 409
渋谷治男・深間内文彦・高橋良
（東医歯大・医・神経科）
三ツ汐洋・野田恭平・高嶋端夫
（国立神経センター・疾病Ⅲ）
市川宏伸 （都梅ケ丘病院）
融道男 （国立神経センター・疾病Ⅲ）

131. 精神分裂病死後脳，側頭葉，大脳辺縁系のdynorphin関連ペプチドおよび神経伝達物質の分析 …… 412
市川宏伸 （都梅ケ丘病院）
三ツ汐洋・野田恭平・高嶋端夫・俣賀宣子・小川篤子・渡辺修三・融道男
（国立神経センター・疾病Ⅲ）
松尾寿之 （宮崎医大・Ⅱ生化）

132. Pentylenetetrazolけいれんにおける脳内TRH機構の関与 …… 415
広瀬由起子・小川紀雄・小原節子・森昭胤
（岡山大・医・脳研）
梶田三郎・佐藤光源 （同・精神科）

133. 培養クロマフィン細胞におけるメチオニンエンケファリンの取り込み …… 418
竹田二美代・竹田稔・西田均・島田明範（昭和大・医 生化）
相内敏弘・中村泰治（同・薬・生化）
紺野邦夫（同・医・生化）

134. Serotonin ニューロン破壊時の神経ペプチドの変化について …… 421
小川紀雄・広瀬由起子・小原節子・加太英明・森昭胤（岡山大・医・脳研）
貫名至（同・Ⅲ内科）

135. ヒト脳における Leumorphin の存在，及びその生物活性について …… 424
須田光明・中尾一和・坂本誠・森井成人・吉政孝明・菅原照（京大・医・Ⅱ内科，RI総合センター）
矢内原昇（静岡薬大）
井村裕夫（京大・医・Ⅱ内科）

136. 拘束ストレスによるモルモット脳内 methionine－enkephalin, leucine－enkephalin, methionine－enkephalin－Arg^6－Gly^7－Leu^8 および methionine－enkephalin－Arg^6－Phe^7 含量の変化について …… 427
池田淑夫・伊島正次・鈴木孝尚（保健衛生大・医・精神神経科）
木村英司（同・共利研）
中尾一和・井村裕夫（京大・医・Ⅱ内科）
中沢恒幸（保健衛生大・医・精神神経科）

137. Cholecystokinin とその mRNA 及び受容体の脳内分布 …… 430
長谷川まこと（新潟大・医・精神科）
桑野良三（同・脳研・神経薬理）
浜岡利之（阪大・医・癌研）
高橋康夫（新潟大・脳研・神経薬理）

138. ラット線条体－黒質路の切断による各種ペプチダーゼ活性の変化 …… 433
岡田正路・加藤武（東工大・総理工・生命化学）

139. 牛脊髄細胞骨格に存在するカルシウム依存性プロテアーゼの精製と性質 …… 436
石崎泰樹・黒川正則（東大・医・脳研・生化）
高橋健治（京大・霊長類研・生化）

140. コート小胞のカゼイン・キナーゼ …… 439
宮崎則幸・豊田直二・門田朋子・門田　健
（都精神研・神経化学）

141. 筋組織の発育分化ならびに脱神経退化と筋型エノラーゼアイソザイム …… 442
加藤兼房・清水温子　（愛知県コロニー・生化）
仙波禮治　（同・周生期）
佐藤豊彦　（愛院大・歯・生理）

142. Estrogen の脳内グルコース代謝率におよぼす影響 — Quantitative autoradiographic 〔^{14}C〕deoxyglucose法を用いて — …… 445
難波宏樹　（千葉大・医・脳外科）
L. Sokoloff　（LCM, NIMH）

143. ヒト脳及び赤血球の Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase の精製と免疫学的相同性 …… 448
丹野　修　（早大・応用化学）
池田和正　（早大・応用化学，日大・医・生化）
鈴木晴男　（早大・応用化学）
中川滋木　（日大・医・生化）

144. キサンチン－キサンチン酸化酵素系によるセロトニンの代謝産物の分離とその若干の性質 …… 451
植村富彦　（都精神研・神経化学）

145. Aging によるラット脳内MAO活性の変動 …… 454
荒井裕一朗　（昭和大・医・薬理）
A. Stenström　（Umeå 大・薬理）
L. Oreland　（Uppsala大・Biomedical Center ・薬理）
杵鞭宏育　（昭和大・医・薬理）

146. 基質アナログによるラット脳内MAO活性の阻害作用 …… 457
杵鞭宏育・荒井裕一朗・豊島良枝
（昭和大・医・薬理）

147. マウス脳内Monoamine Oxidase 活性に対する Methamphetamine の影響 …… 460
江頭　亨・清永由子・山中康光
（大分医大・薬理）

148. 6時間明暗条件下のラット脳神経核レベルにおけるモノアミン酸化酵素活性の日内リズム …… 463
国元憲文・挾間秀文・原田　豊・水川六郎
（鳥取大・神経精神科）

149. N－methyl－4－phenyl－1，2，3，6－tetrahydropyridine によるラット線条体スライス
チロシン水酸化酵素系の阻害 …… 466
平田洋子・永津俊治
（東工大・生命化学，名大・医・Ⅰ生化）

150. チロシン水酸化酵素の活性調節機構 ― カテコールアミンとサイクリック AMP 依存性
蛋白質燐酸化酵素による新しい調節機構 ― …… 469
奥野幸子・藤沢　仁　（旭川医大・Ⅰ生化）

1　脳シナプス膜のアセチルコリン受容によるコンホメーション変化の性質 — 特に vasopressin, D－tubocurarine および Ca^{2+} の作用 —

関谷　真・迫　昭子
（上智大・生命研）

〔要　約〕

1) 蛍光プローブ 1-anilino-8-naphthalen sulfonate (ANS) を用いて、ラット大脳皮質シナプス膜(SM)のコリン作動性の膜コンホメーション変化を観察した。

2) Ach を SM に繰返し作用させると蛍光減少を伴う段階的なコンホメーション変化を示し、Ca^{2+} による影響を受けるものであった。

3) その膜コンホメーション変化は、Ca^{2+} を関り、Vasopressin, D-tubocurarine により、各々異なる作用を受けることが解った。

4) Vasopressin が濃度依存的に、シナプス膜の ANS 蛍光を減少させ、これは、Ca^{2+} を必要とし、Mg^{2+} ではその作用が発現しなかった。

5) D-tubocurarine は、シナプス膜の ANS 蛍光を増大させ、Vasopressin とは対照的な作用を示し、同様に、Ca^{2+} 依存性であった。

6) この結果、Ach により中枢シナプス膜変動には、2 様の様態が示唆され、Ca^{2+} が関る膜機構がこれらの働きを調節していることが示された。

Key words :　Synaptic membranes,　Vasopressin,　Ca^{2+}

大脳シナプスで Acetylcholine 受容体(AchR)の存在が知られている。われわれは、従来から、ラット大脳皮質シナプス膜の性質、特に、AchR を介して起こる膜コンホメーション変化を蛍光プローブ 1-anilino-8-naphthalene sulfanate (ANS) による蛍光分光法によって観察し、そのコンホメーション変化とシナプス膜の伝達物質受容機能との関連について追求してきた。その結果、現在まで Ach 受容に際して起る膜コンホメーション変化は、段階的変化による加重効果を示し、かつ、この変化が Ca^{2+} および Ca^{2+} と共働する膜成分因子によって調節されていることをわれわれは報告した。[4] 今回は、末梢性のホルモン作用をもつ Vasopressin が脳シナプス膜にも作用し、その作用が Ca^{2+} と関連すること、また、D-tubocurarine のシナプス膜への作用の仕方と Vasopressin の作用とを比較し、AchR を介する脳シナプス膜コンホメーション変化の性質について得られた知見を報告、検討する。

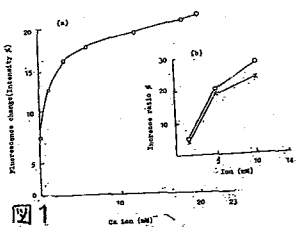


図1

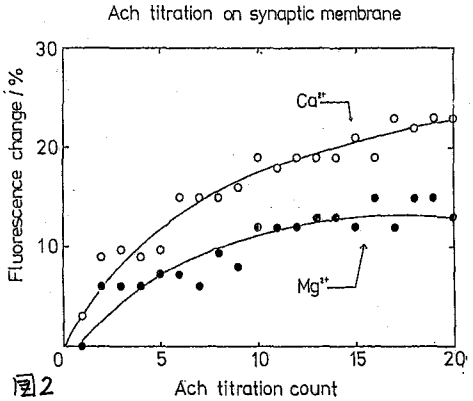


図2

「方法」　Wistar 系ラット(150～200g.♂)の大脳皮質から、Azucurra[1] らの方法を改良して得られるシナプス膜を用いた。ショ糖濃度

勾配遠心法で、ショ糖濃度 0.9-1.0 M に得られる画分を用いた。蛍光プローブ ANS は、市販のアミノ酸分析用のナトリウム塩を用いた。蛍光分析は、Spinco Bowman 型日立 204 fluorospectrometer によった。Vasopressin は、合成 oxytocine-vasopressin (Sigma) を水溶液にしたものを用いた。SM と反応した ANS は、励起 360nm で 480nm 付近に顕著な蛍光ピークを示す。Ach による蛍光変化の測定は、SM を 100μg/3ml になるように、1cm-lightpath quartz cell に 0.1M tris·Hcl buffer PH 7.4 で懸濁し、その溶液に ANS 5.3×10^{-5}M を加え、所定濃度の Ach (3.3×10^{-4}M) を 1 μl ミクロシリンジで滴下を繰返えして行った。タンパク定量は Lowry らの方法によった。

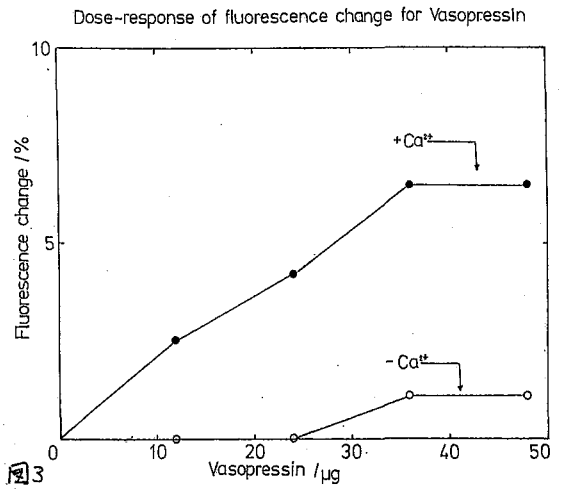


図3

「結果および考察」 (I) シナプス膜の ANS 蛍光は、Ca^{2+} および Mg^{2+} により、図1のごとく、蛍光増大を示し、その効果は同程度であった。しかしながら、Ach と SM の反応の場合には、図2に示されるごとく、2価イオンの効果は異なり、Ca^{2+} がコンホメーション変化に関してはより顕著な効果をもつことが解かる。このことは、前回当学会でわれわれが AchR を介して起こるシナプス膜コンホメーション変化が Mg^{2+} より Ca^{2+} に依存していることを示した結果と同じである[5]。また、SM に Ach を反応させ、蛍光変化を観察するには、Ach の連続繰返え し滴下が必要で、コンホメーション変化が、その機構は未詳だが、段階的変化であることが既に解っている。したがって、以後の実験においても Ach の反応は一定濃度の Ach 繰返えし滴下に依っている。その際の ANS 蛍光変化率は次のように表わした。fluorescence change $=\frac{f_0-f}{f}$ (%)。但し、f_0: 滴下前の蛍光強度、f: 滴下後の各々の蛍光強度。

(II) Vasopressin の作用　Vasopressin の所定量 (12～72 μg) を SM suspension (100μg/3ml) と 15 分間反応させると、Ca^{2+} (5mM) 存在下で蛍光減少が起こる。その作用は図3に示すごとく濃度依存性である。しかしながら、Ca^{2+} が存在しない場合は Vasopressin の作用が小さい。また、Mg^{2+} (5mM) は、Ca^{2+} のような効果はなかった。Vasopressin の場合は、一定の蛍光減少を得るのに Ach のごとく繰返えしの滴下は必要ではなかった。そのことは、Ach による AchR を介する膜変化と Vasopressin による膜変化の作用の仕方が異なることを

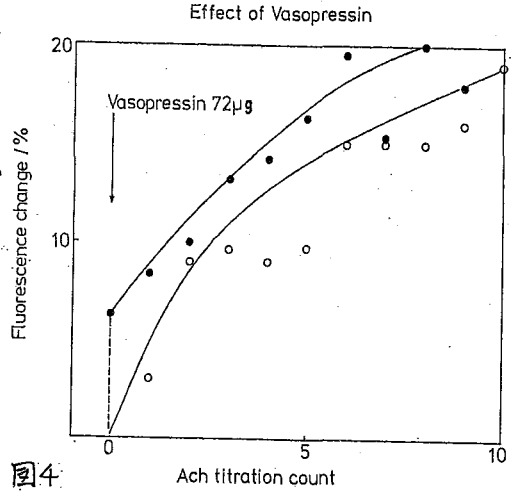


図4

示すが、図4に示されるように、Vasopressinの作用したシナプス膜はAchの作用を加重的に受容していることが解かる。Ach滴下の途中でVasopressinを作用させた場合もここには示していないが同様に加重性が観察された。Ca^{2+}がAchとVasopressinの作用に関連することを考慮すると、それらは作用機序が異なるか作用を及ぼす膜領域は同一でCa^{2+}の調節を受けていることが示唆された。

(3) D-tubocurarineの作用　D-tubocurarineを10^{-4}M以上の濃度でSMに作用させるとVasopressinと異なって蛍光増大が見られた。増大率はほぼ30%であった。その時に、Ca^{2+}(5mM)存在下で、Achを滴下すると、Achの作用が抑制された(図5)。この抑制作用は、ここに示されていないが濃度依存の抑制である。この抑制はcholinergic antagonistの作用であるが、Vasopressinと同様にCa^{2+}に依存していることから、antagonistの作用がAchRへの吸着のみに関るのではなく、シナプス膜コンホメーションにも影響を与えていることが示唆される。

Effect of D-tubocurarine on synaptic membrane on Ach-induced conformational change

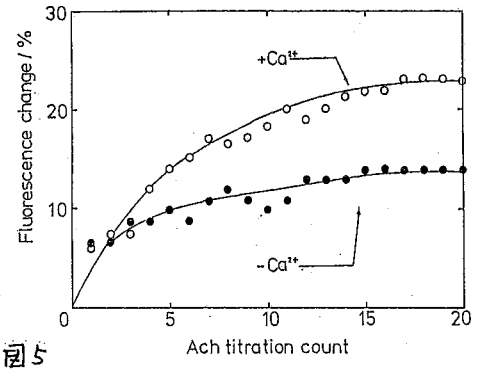


図5

以上のことから、図6にまとめているように、AchRを介してAchがSMに作用して起こす膜コンホメーション変化に影響を与える生理的な作用には2様態があって、即ち、一つは、蛍光減少の方向に作用するものと他は、蛍光増大の方向に作用するものである。その際に膜コンホメーション変化が脳シナプス膜のいかなる機能に関るかは未詳だが、Grinvald[3]らが他の蛍光プローブを開発し、電気的刺激によって生じる脱分極に対応して蛍光減少を観察している。しかしながら、われわれの実験は、time resolutionが明確に設定できないので、Grinvaldらの結果とは比較できない。

Effect of Agents on Synaptic Membranes in terms of Fluorescence Change

Agent	Fluorescence Change
Acetylchline	decrease
D-tubocurarine	Increase
Vasopressine	decrease

図6

また、Dewied[2]らによってvasopressinの中枢作用が報告されているが、vasopressinの作用が神経繊維由来か、あるいは、末梢血管由来かは検討を要する。

D-tubocurarineはcholinergic antagonistであるが、endogenousな因子ではないため、endogenousな因子であって蛍光増大の方向に作用する内在因子が存在するかは興味があるが、シナプス膜コンホメーション変化のメカニズムを知ることによって、脳シナプス膜の可塑性についてさらに検討が可能であろうと考える。

文献

1) Azcurra, J.M.,DeRobertis, E and Fiszer, S(1967) Brain Res.,5, 45
2) DeWied, D., (1984) TINS 7(3),62-64
3) Grinvald, A, Hildesheim,R, Farber, I.C and Anglister, L. Biophys. Journal 39, 301-308
4) 関谷真・門多和広・三村千春・菊野正隆 (1982)神経化学 21,93-95
5) 関谷真・三村千春・熊倉鴻之助(1983)神経化学 22, 159-161

2　てんかんマウス（*El*）の発育期におけるムスカリン性アセチルコリン・レセプターsubtypeの変化

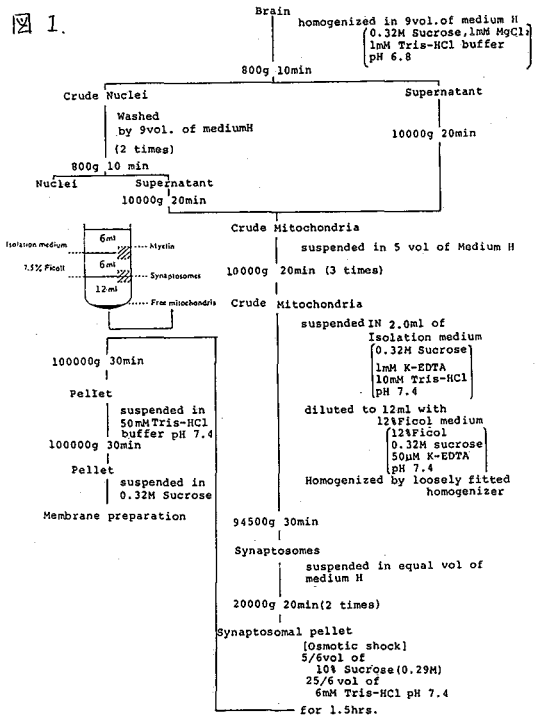
藤田精一郎・森　浩一・植松直道・川口賢治
千頭孝史・山上　栄・川北幸男
（大阪市大・医・神経精神科）

〔要　約〕

痙攣素因をもつElマウス脳のmuscarinic acetylcholine receptor（以下*m*Ach-Rと略）について，[³H]-*l*-quinuclidinyl benzylate（[³H]-*l*-QNB）の特異結合に対する，carbachol の displacement binding を用いた方法で*m*Ach-R のaffinity を解析した。結合実験から得られた結果をSimplex法でコンピュータ解析し，2 siteおよび3 site modelの各パラメータとHill係数を算出した。その結果carbachol によるdisplacement binding curve の収束安定性の比較から2 site modelの適合性が優れていた。マウス脳の海馬，中隔野，線條体および大脳皮質から得たシナプス膜分画につき発育期，痙攣中および痙攣後のhighおよびlow affinity binding site（以下HおよびL siteと略）の占める占有率ならびに結合定数K_HおよびK_Lの変化を調べた。その結果，H siteの占める占有率は海馬で生後14日より75日まで，中隔野では25日より75日までの間でEl(+)がdd-Yより有意に増加していた。海馬では強直痙攣期，痙攣後30分のL siteは発作間歇期と比べて有意に増加し，中隔野のL siteの占有率は強直痙攣期での減少，発作後30分での増加が有意に認められた。また，K_HおよびK_Lの値は部位毎の差異ならびに発育に伴う変化をしめしたが痙攣発作との密接な関連性をしめすEl(+)とdd-Yとの有意差はなかった。

Key words：　El，Muscarinic receptor binding，Seizure-related affinity change

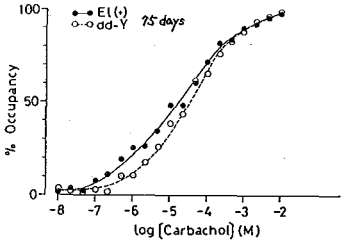
図 1.



(I)　はじめに

痙攣素因をもつElマウス脳の*m*Ach-Rの発育期における変化は[³H]-*l*-QNBを用いたantagonist結合実験の結果のScatchard 解析から，receptor density（Bmax）とaffinity（Kd）ともに脳の部位毎に特異な成熟過程をしめすこと，また同時に行なった対照（dd-Y）との比較からElの*m*Ach-R densityは海馬，中隔野，大脳皮質および線條体においてそれぞれ部位特異性のあるupおよびdown regulationをしめすこと，この対照からの偏位はElが痙攣発作をしめす以前の時期からみられること，したがってこれらのreceptor densityの変化が痙攣の結果でないことを前報にて報告した。[5] さらにElマウスの発作誘発のための拠り上げ刺激はEl，dd-Yのreceptor densityには影響をおよぼさないがreceptor affinityに対しては生後25日のElの海馬，大脳皮質お

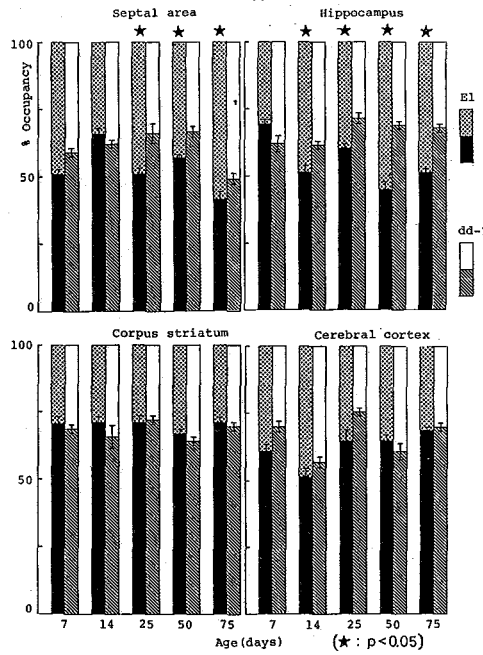
および線條体ではKd値の増加が，同じくdd-Yの海馬，線條体ではKd値の低下が有意にみられaffinityの変化が痙攣発作とより密接な関係を持つことが示唆された。[6),7)] そこで今回は，結合実験にagonistをligandとして用いることにより mAch-R のsubtype,[1),2),4),8),9)] とくに発育期および痙攣発作時についてhighおよびlow affinity binding sitesに分けて調べた。



Carbachol Displacement Curves to [^{3}H]-l-QNB Specific Binding of Synaptic Membrane from Hippocampus

(II) 実験方法　　実験動物の飼育，発作誘発およびマウス脳の部位の切り出しは前報[5)]にしたがった。今回は海馬，中隔野，線條体および大脳皮質の4部位について調べた。各部位のシナプス膜分画を図1にしめすように調製した。[3)] シナプトソーム分画およびシナプス膜分画の電顕写真は学会場にて提示する。結合実験はAronstam and Aboodの方法にしたがった。[1)] リーガンドとして[^{3}H]-l-QNB (NEN. specific activity 33.1 mCi/m mol) を 3×10^{-11}M で用いた。反応溶液として100mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を用い，0.07－0.1mg 蛋白量のシナプス膜分画を加え，carbacol 濃度を 10^{-2}～10^{-8}M に変化させて加え総容量を2mlとし25℃で90分間インキュベートした。反応停止後，減圧下でワットマン・ガラス・フィルター(GF/F)で急速濾過し乾燥した後液シンで放射活性を測定した。得られた結果をSimplex 法にて電算機で解析し2 site 及び3 site model の各Parameter, Hill係数を算出した。その結果carbacholによるdisplacement binding curveの収束安定性を比較したところで2 site modelの方がよく適合した。

図2　Changes of H and L Sites Occupancy During Development in Septal Area, Hippocampus, Corpus Striatum and Cerebral Cortex of El and dd-Y Mice



(III) 結果および考察　　生後75日のマウス脳海馬からえたシナプス膜における[^{3}H]-l-QNB特異結合に対するcarbacholのdisplacement binding curve を例として図2にしめす。El(+)が左方に偏位しているのが認められる。生後7日より75日までの間で他の部位についても同様の実験を行い得られたデータを非線形最小2乗法で解析した。[4)] その結果，Hill係数は全ての実験で1以下(0.45～0.55)で mAch-R のsubtype の存在が示唆された。High および low affinity binding sites (H および L sites) の占める百分率を図2に，またそれぞれの K_H および K_L 値を表1にしめす。これらの結果のうち図2にみられるようにEl(+)とdd-Yとの間でHおよびL sites の占有率が海馬で14日から75日，中隔野で25日から75日で，いずれもEl(+)のH siteの増加(L siteの減少)が有意に認められた。一方，線條体および大脳皮質では両者の間に有意な差はみられなかった。また，K_H および K_L

の値では部位差ならびに発育に伴う変化はみられるもののEl(+)とdd-Yとの間で痙攣発作と直接に関連するような変化はみられない。これらHおよびL sitesの占有率の変化はElの痙攣発作の始まる前から認められmAch-R densityの変化と同様に素因としての遺伝的な調節の一端を示唆するものであろうと考えられる。以上の結果はいずれも発作間歇期のEl(+)に関するものである。次に、El(+)の痙攣発作中および発作後30分での海馬と中隔野でのmAch-Rの

表1. Changes of K_H and K_L Values During Development in Septal Area, Hippocampus, Corpus Striatum and Cerebral Cortex of El and dd-Y Mice

Age (days)	El(+) K_H (10^{-7} M)	El(+) K_L (10^{-4} M)	dd-Y K_H (10^{-7} M)	dd-Y K_L (10^{-4} M)
Septal Area				
7	0.85 ± 0.07	5.73 ± 3.19	0.17 ± 0.07	1.71 ± 0.17
14	9.37 ± 0.26	8.34 ± 0.72	8.96 ± 1.46	1.95 ± 0.39
25	55.21 ±21.69	1.02 ± 1.15	5.45 ± 3.38	0.61 ± 0.37
50	17.71 ± 7.29	2.47 ± 2.00	6.07 ± 2.15	1.53 ± 0.45
75	34.61 ±23.11	4.17 ± 2.98	26.47 ±11.19	1.49 ± 0.05
Hippocampus				
7	8.78 ± 1.47★	1.22 ± 0.07	0.42 ± 0.24	0.46 ± 0.32
14	49.79 ±27.29	3.82 ± 3.08	25.84 ± 0.66	3.77 ± 0.35
25	3.85 ± 2.83	5.51 ± 0.94	3.17 ± 2.48	1.62 ± 0.67
50	17.71 ± 7.29	2.47 ± 2.00	6.09 ± 2.15	1.53 ± 0.45
75	13.87 ± 1.92	2.95 ± 0.35	5.55 ± 2.86	1.05 ± 0.37
Corpus striatum				
7	2.09 ± 0.99	0.69 ± 0.02	0.64 ± 0.38	0.92 ± 0.36
14	5.21 ± 1.81	0.50 ± 0.33	3.91 ± 2.74	0.17 ± 0.05
25	4.91 ± 4.30	0.67 ± 0.05	7.56 ± 2.09	0.10 ± 0.03
50	1.95 ± 1.31	0.13 ± 0.03	5.71 ± 1.10	0.12 ± 0.04
75	1.15 ± 0.55	1.03 ± 0.10	16.26 ± 1.30	0.98 ± 0.04
Cerebral cortex				
7	0.22 ± 0.13	0.74 ± 0.42	0.40 ± 0.09	1.43 ± 0.49
14	1.96 ± 0.48	0.72 ± 0.26	2.03 ± 1.26	0.83 ± 0.04
25	0.63 ± 0.10★	2.51 ± 1.82	1.87 ± 0.37	3.93 ± 1.30
50	18.94 ± 6.37	2.82 ± 1.90	16.89 ±11.15	5.62 ± 1.82
75	3.06 ± 0.94	1.92 ± 0.03	6.05 ± 2.89	0.93 ± 0.01

(★ : $p<0.05$)

4) $\text{Occupancy} = \frac{Fr(H)[C]}{[C]+K_H} + \frac{Fr(L)[C]}{[C]+K_L} + [1-Fr(H)-Fr(L)]$, $[C] = [\text{carbachol}]$

(* : $P<0.05$)

表2. Changes of Muscarinic Receptor Subtypes in Hippocampus and Septal Area During and After Convulsive Seizures of El Mice

	H site K_H (10^{-7})	H site %	L site K_L (10^{-4})	L site %
Hippocampus				
Interictal phase	5.29 ± 4.98	49.1 ± 0.6	2.29 ± 1.36	50.9
Tonic convulsive phase	3.31 ± 2.95	34.3 ± 7.9*	0.98 ± 0.17	65.7*
Post convulsion (30 min)	3.25 ± 2.64	26.9 ± 7.1*	0.86 ± 0.26	73.1*
Septal area				
Interictal phase	2.68 ± 0.65	50.0 ± 1.1	1.09 ± 0.48	50.0
Tonic convulsive phase	1.49 ± 0.66	62.0 ± 2.3*	0.88 ± 0.15	39.8*
Post convulsion (30 min)	0.98 ± 0.70	30.8 ± 7.7*	0.47 ± 0.14	69.2*

subtypeの変化を表2にしめす。海馬および中隔野ともにK_HとK_Lの値は低下傾向また海馬ではL siteの著しい増加が痙攣後30分でなお続いている。一方，中隔野ではL siteは強直痙攣期には一時減少し痙攣後30分では逆に増加している。現在，抓り上げ刺激を開始してから痙攣開始までの間にこのHおよびL siteの占有率の変化が生じるかどうか検討している。

〈文　献〉

1) Aronstam,R.S., Kellogg, C. and Abood, L.G., Brain Res. 162,231, 1979.
2) Birdsall,N.J.M., Hulme,E.C. and Sir Burgen,A., F.R.S., Proc. R. Soc. Lond., B 207, 1, 1980.
3) Booth,R.F.G. and Clark,J.B., Biochem.J., 176, 365, 1978.
4) Hedlund,B. and Bartfai,T., Mol.Pharmacol. 15, 531, 1979.
5) 藤田精一郎，森浩一，川口曜治，古塚大介，山上栄，川北幸男．神経化学 22，162，1983.
6) Mori,K., Fujita,S., Kawaguchi,K., Chikami,T., Ohno,K., Tsuji,M., Onishi,H., Yamagami,S. and Kawakita,Y., Folia Psychiat. Neurol. Jpn. 37, 299, 1983.
7) Mori,K., Fujita,S., Kawaguchi,K., Furutsuka,D., Yamagami,S. and Kawakita,Y., Folia Psychiat. Neurol. Jpn. in press, 1984.
8) Savage,D.D. and McNamara,J.O., J.Pharmacol.Exp.Therap. 222, 670,1982.
9) Sokolovsky,M., Gurwitz,D. and Kloog,J., Advance in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 55, 137,1983.

〈謝辞〉

非線形解析にあたり，大阪大学医学部第一薬理，吉田博教授，内田修治助教授ならびに教室員の方々の御援助を得たので深く感謝いたします。

3　ラット胃における ^{3}H－QNB特異的結合の多様性とその機能的局在

山本　純　（名市大・医・Ⅱ外科）　津島宏美　（同・薬理）
正岡　昭　（同・Ⅱ外科）　松田友宏　（同・薬理）

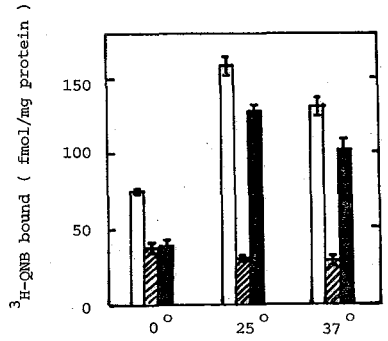
〔要　約〕

胃の生理機能におけるムスカリン様アセチルコリン受容体の役割を研究する目的で、ラット胃ホモジェネートの ^{3}H－QNB の結合を検討した。非特異的結合（10^{-5}M アトロピン存在下の結合）は 0°～37°とで一定の低値を示したが、特異的結合（上記アトロピンによって阻害される結合）は温度依存性があり、25°とで至適となり、20分でほぼプラトーとなった。非特異的結合は ^{3}H－QNB 濃度に比例して増大したが、特異的結合は 2 nM ^{3}H－QNB でほぼ飽和され、その最大結合量は蛋白量約 0.8 mg までほぼ比例していた。胃の平滑筋層には唯一つの（K_{D1} ≒ 0.037 nM, $Bmax_1$ ≒ 300）、粘膜層には2つの（K_{D2} ≒ 0.12 nM, $Bmax_2$ ≒ 30 ; K_{D3} ≒ 1.1 nM, $Bmax_3$ ≒ 15）（$Bmax$ の単位：f mol / mg protein）特異的結合部位（状態）が認められた。平滑筋層、粘膜層ともに蛋白 mg 当りの特異的結合量は胃の幽門部（縦走筋、輪状筋がよく発達し、幽門腺がある）において最も高かった。

Key words : Acetylcholine receptor, QNB(quinuclidinyl benzilate), Stomach

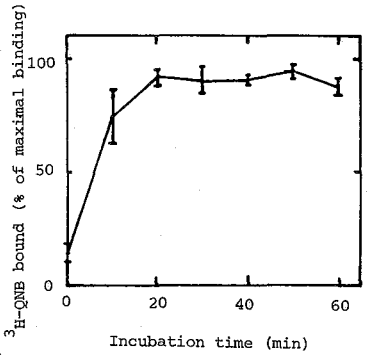
我々は中枢神経系ならびに内臓のムスカリン様アセチルコリン受容体の多様性と生理機能について研究して来た(1,2,4-7,9,10)。栄養物質の消化吸収の主な場としての小腸においては、薬理学的な平滑筋収縮実験ならびに生化学的な ^{3}H－QNB結合実験からムスカリン様受容体の多様性が示唆された(1,2)。今回は胃の栄養物の貯蔵、部分消化、小腸への輸送運動等の機能におけるム

Fig.1. Effect of temperature of incubation medium upon ^{3}H-QNB binding to the homogenate of whole stomach.



Open column: total; striped column: non-specific; closed column: specific binding by incubation at the temperature indicated for 30 min.
^{3}H-QNB: 1 nM, protein used: approx. 0.8 mg

Fig.2. Time course for specific ^{3}H-QNB binding to the homogenate of whole stomach

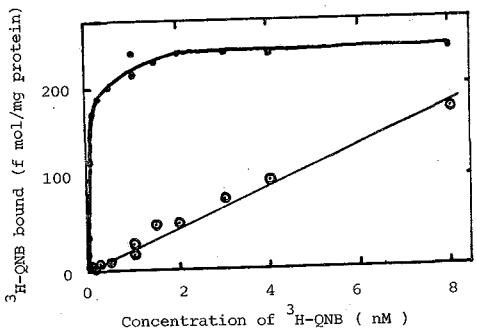


^{3}H-QNB: 1 nM, protein used: approx. 0.7 mg.
Incubation: at 25°C for the time indicated.

スカリン様受容体の役割を知るため、以下の実験を行った。

《方法》動物：ウィスター系雄性ラット（8週令、体重 250～300g）。胃のホモジェネートの調整、^{3}H－QNBの結合実験はYamamuraらの方法（10）によった。胃の平滑筋層と粘膜層は外科用メスにて剥離した（検鏡確認）。平滑筋層はハサミで小片とし、粘膜層はそのままで、湿重量の9倍容量の0.05M Na-Kリン酸バッファー（pH 7.4）を加え、グラス－グラスホモゲナイザーで20～25回上下し、次にポリトロン（No.7, 60 sec）でホモジェネートを調整した。胃の区分はTakagiらの方法（8）、蛋白定量はホモジェネートをミクロ－ウルトラソニック（コンテス）で均一にした後、BSAを対照としてLowryらの方法（3）によった。

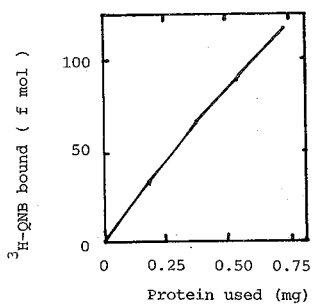
Fig.3. Specific and non-specific binding to the homogenate of the smooth muscle layer of stomach.



Closed circle: specific; open circle: non-specific binding. Concentration of ^{3}H-QNB was indicated on the abscissa. Protein used: 0.585 mg. Incubation: at 25°C, for 30 min.

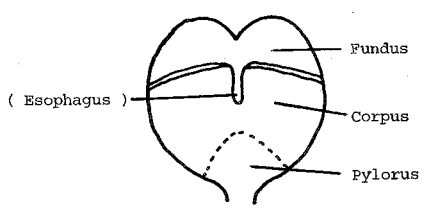
（結果・考察）図1と2から、特異的^{3}H－QNB結合のインキュベーションの温度と時間を25°C, 30分とした。図3から最大特異的結合が2～3nM ^{3}H－QNB濃度で得られるものとした。図4は蛋白量約0.8mgまで最大特異的結合が用いた蛋白量にほぼ比例していることを示している。図5の胃全体のホモジェネートでは2～3種の親和性の異なる結合部位が示唆されたので、平滑筋層b）と粘膜層c）のホモジェネートについて検討したところ、前者には唯1つの{K_{D1} = 0.037 ± 0.012 nM, B_{max1} = 304

Fig.4. Specific ^{3}H-QNB bound to the homogenate of whole stomach as a function of protein used for incubation.



^{3}H-QNB: 2 nM, protein used was indicated on the abscissa, incubation: at 25°C, for 30 min.

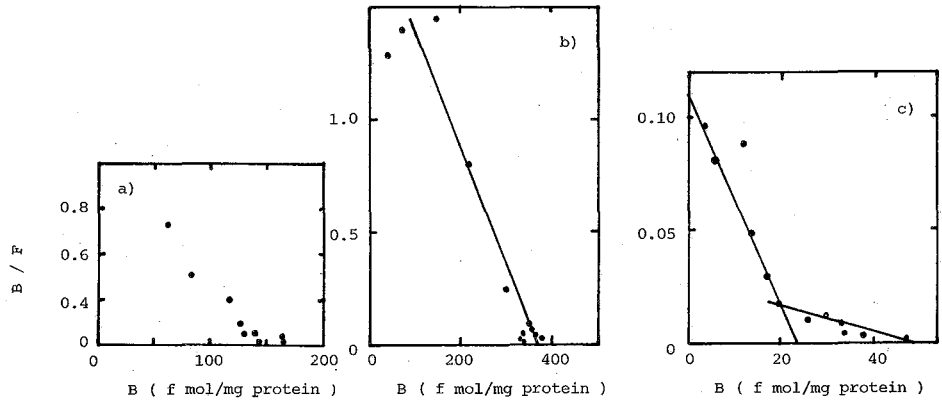
Fig.6. Various regions of the stomach.



Stomach was incised along the greater curvature.

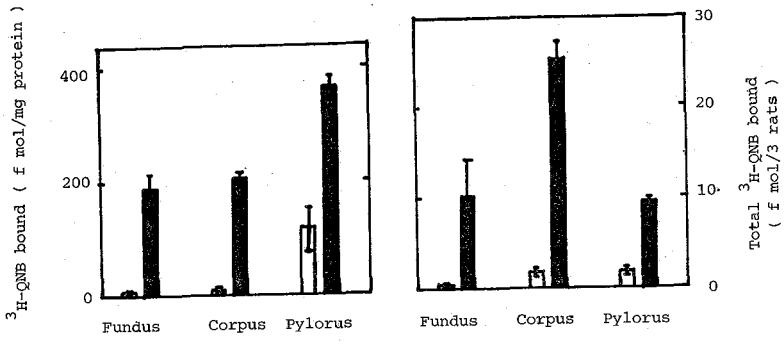
± 38 (n=6)}。後者には2つの{K_{D2} = 0.119 ± 0.039 nM, B_{max2} = 30 ± 15 (n=6); K_{D3} = 1.1 ± 0.8 nM, B_{max3} = 15 ± 10 (それぞれ n = 7, 8)} (B_{max} の単位：

Fig.5. Scatchard plots for specific ^{3}H-QNB binding to the homogenate of whole stomach and of smooth muscle and mucosal layers of stomach



Homogenates of a: whole stomach; b: smooth muscle; c: mucosal layer of stomach were used.

Fig.7. Regional distribution of specific ^{3}H-QNB binding in the stomach.



Open column: mucosal layer; closed column: smooth muscle layer. ^{3}H-QNB: 3 nM; incubation: 25°C, 30 min.

f mol/mg protein) 親和性の異なる特異的結合部位があることが明らかとなった。図6には胃の3区分が示されているが、図7に示したように、幽門部において蛋白1mg当りの^{3}H-QNBの特異的結合が平滑筋層でも粘膜層でも最も高かった。胃には縦走、斜走、輪状の3層の平滑筋があるが、^{3}H-QNB特異的結合親和性が同一であること、幽門部の上記の所見と平滑筋の発達や幽門腺機能との関係が示唆された。

(文献) (1) Li,Z.,Asano,M.,Matsuda,T.(1981)Japan.J.Pharmacol.31,Suppl.231P (2) Li,Z.,Asano,M.,Matsuda,T.(1982) Japan.J.Pharmacol.32,Suppl,41P (3) Lowry,O.H.et al(1951)J.biol.Chem.193,265 (4) Matsuda,T.et al(1979)In Neurobiology of Chemical Transmission,ed.by M.Otsuka & Z.Hall,p77,John Wiley Publishers,N.Y. (5) Matsuda,T.,Higuchi, H.,Yoshida,H.(1979)神経誌18,172 (6) Matsuda,T.(1980)現代医学28,41 (7) Mori,M,Tsushima,H.,Matsuda,T.(1984)Japan.J. Pharmacol.35,27 (8) Takagi,K.et al(1964)Chem.Pharm.Bull.14,465 (9) Uchida,S.,Takeyasu,K.,Matsuda,T.,Yoshida,H. (1979)Life Sci.24,1805 (10) Yonehara,N.,Matsuda,T.,Saito,K.,Ishida,H.,Yoshida,H.(1980)Brain Research,182,137 (11) Yamamura,H.I.,Snyder,S.H.(1974)Mol.Pharmacol.10,861.

4　強制水泳によるマウス脳ベンゾジアゼピンレセプター機能変化の *in vivo* 測定：ポジトロントレーサースタディーへの応用

井上　修・秋本義雄・橋本謙二・山崎統四郎
（放医研・臨床研）

〔要　約〕

Bz レセプターに対する強力なアンタゴニストである Ro15-1788 の ^{3}H 標識体を用いて、In Vivo での Bz レセプター機能（$\alpha=\frac{1}{Kd}\cdot Bmax$）を定量化する方法について検討した。その結果 ^{3}H-Ro15-1788 はマウス静注後速やかに、平衡状態に近い状態に到達し、かつ脳内総放射能に対する特異的結合の占める割合が大きい事が判明し、In Vivo においても十分に α の値が推定可能である事が予想された。更にマウスを強制水泳させると、^{3}H-Ro15-1788 の脳内動態は著明に変化した。10mg/kg のキャリアー Ro15-1788 を同時投与すると、脳内放射能は血中よりも低く、コントロール群と強制水泳群との間にはそれ程大きな差異を認めなかった。以上の事からストレス負荷後における ^{3}H-Ro15-1788 の動態変化は、脳の Bz レセプター機能（α）の変化に基づくものである事が推定される。強制水泳時間の影響について検討した結果、この可逆的かつ急激な α の変化は、大脳皮質に特異的に生じている事が判り、生理的にも重要な意義を有する事が示唆された。ポジトロントレーサーである ^{11}C-Ro15-1788 と、非侵襲的な負荷試験法を組み合わせる事により、各種中枢疾患におけるストレスに対する応答性について直接的な評価を行える事が示唆された。

Key words：Bz receptor　Forced-swimming　Positron

〔目的〕　近年高比放射能ポジトロン標識リガンドを用いて、ヒト脳内のレセプター分布を生きている状態において計測する事が可能となってきた(1)。ポジトロントレーサーによるレセプター研究において最も重要な課題は、レセプター機能（Kd, Bmax）を In Vivo で定量化する事にあるが現状では多くの困難な問題が残されている。最も大きな問題点の一つは、レセプターに対する特異結合と非特異結合、遊離型リガンドとをどのように区別するかという点にあり、他の問題として、In Vitro の系で用いられるようなスキャッタードプロットを行う事が事実上不可能であるという点にある。そこで我々は、平衡状態に到達するのがきわめて速いようなリガンド－レセプター系を選択する事によって、脳内総放射能のみからレセプターの Binding availability $\alpha=\frac{1}{Kd}\cdot Bmax$ を求める事が可能であると考え、3H-Ro15-1788 を用いて基礎的な検討を行った。更にストレス負荷前後における Bz レセプターの変化(2,3)が In Vivo においてもとらえる事が可能か否かについて、検証する為に強制水泳の影響を検討した。

〔実験〕　動物実験は全て、日周リズムの影響を避けるために 14:00～16:00 の間に行った。コントロール群および強制水泳（16℃±1℃, 5分間）直後の C3H 雄マウス（一群3匹）の尾静脈より、約 1μCi（0.01n mol）の ^{3}H-Ro15-1788（87Ci/m mol）をそれぞれキャリアフリー（CF）および 10mg/kg のキャリアー添加（CA）の状態で投与し、経時的に大脳皮質、小脳、延髄－橋、血液の放射能（%Dose/g）を測定した。トレーサー（CF）投与30分後における脳を取り出し、ホモジネート作成後クロロメタンで放射性物質を抽出し（抽出効率95%以上）、TLC（シリカゲル、クロロメタン：メタノール＝9：1）にてその化学形を分析した。強制水泳（16℃±1℃）時間の影響をみるために、

マウスをそれぞれ0，1，2，3，5，10分間泳がせた直後に、トレーサー（CF）を投与し、5分後における大脳皮質、小脳、延髄－橋、血液の放射能を比較検討した（一群3匹）。

〔結果〕 コントロール群およびストレス負荷群におけるCF，CAの3H-Ro15-1788静注後の血液及び脳内各部位における放射能の経時変化をFig.1-A,B，Fig.2-A,Bに示す。コントロール群においては、CFの状態でトレーサーを投与すると投与5分後で脳内各部位における放射能は最大となり以後急激に減少した。いずれの時点においても、脳内の局在分布に著しい相異が認められ、Bzレセプターの密度分布と良好な対応を示した（Fig.1-A）。一方キャリアーを同時投与した場合には、脳内の各部位間における放射能分布にばらつきがなく、しかも脳放射能は血中と比較して常に低かった（Fig.1-B）。強制水泳を負荷したマウスにおいては、Fig.2-A,Bに示すように、CFトレーサー投与ではコントロールと比較してその脳内動態に著しい変化を認めたが、CAトレーサー投与ではコントロール群との相異はそれ程著明ではなかった。CF，CA両群共に、血中半減期は、コントロール群と比較して若干長くなった。このストレス負荷時におけるCFトレーサーの動態の再現性をみた結果、Fig.2-A,Bと殆ど同じ結果を得た。トレーサー投与30分後における脳内放射能の化学形を検討した結果、コントロールおよびストレス負荷時においても、その95％以上の放射能は未変化体のRo15-1788体である事が判明した。強制水泳時間の影響をみた結果、Fig.3に示すように、大脳皮質の放射能のみが、きわめて経時的に変化する事が判明し、その変化は3分以内が最も著しかった。

Fig 1. Biodistribution of ^{3}H-Ro15-1788 in control mice

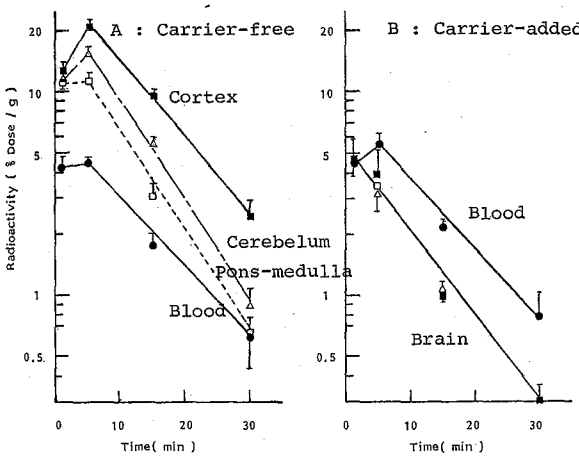
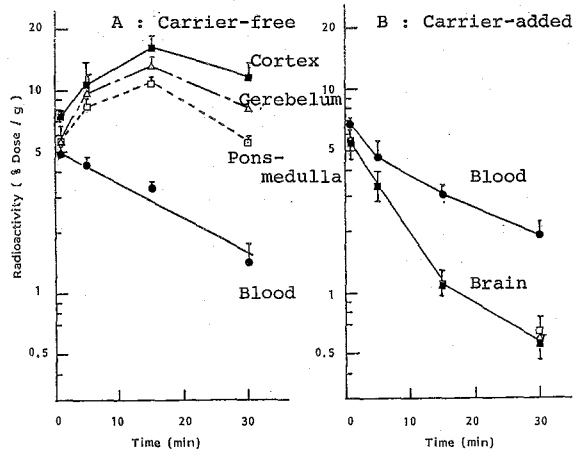


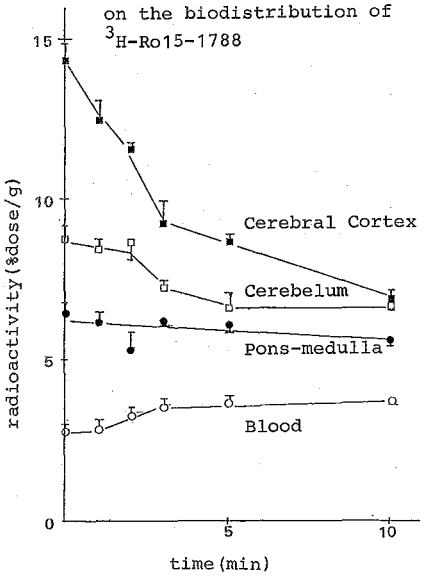
Fig 2. Biodistribution of ^{3}H-Ro15-1788 in stress-loaded mice



〔考察〕 3H-Ro15-1788は、Bzレセプターに対する親和性が高く、かつ解離速度定数が大きいので、比較的平衡状態に到達するのが速いと予想される。また既に^{11}C-Ro15-1788の標識合成および動物実験も報告されている(4)。本実験の結果でもコントロール群においてはBzレセプターの密度分布とよく一致した放射能分布が得られた。コ

コントロール群の血中半減期と脳内各部位の半減期がほぼ等しい事から、In Vivoにおいても平衡状態に近い状態に到達している事が予想される。一般にきわめて微量の標識リガンドを投与した場合、平衡条件下ではレセプターに対する特異的結合(B)と遊離型リガンド濃度(F)との関係は次式で表わされる。$B/F \fallingdotseq \frac{1}{kd} \cdot Bmax = \alpha$. 脳内の〔F〕は高脂溶性リガンドの場合血中〔F〕と等しいと考える事ができるし、脳内の非特異的結合〔NSB〕は〔F〕×β で表わされる($\beta = K \cdot [N]$, 但し、Kは非特異的結合部位との親和定数、〔N〕は非特異的結合サイトの濃度)。従って、血中放射能、脳内総放射能、血中蛋白結合率の値から特異的結合〔B〕を算出する事ができ得る。Ro15-1788の場合には、CA群の脳内総放射能は〔F〕+〔NSB〕とみなせ、この値がきわめて低い(Fig.1-B)事から、総放射能の変化のみから脳内のBzレセプターの機能の変化をとらえる事ができると考えられる。本実験で得られた重要な知見は、CFトレーサーの脳内動態が強制水泳負荷後において著明に変化している事であり、脳内のBzレセプターのBinding availability(α)が可逆的にかつ急激にストレス負荷により変化する事を示唆している。^{3}H-Ro15-1788は脳内においては、投与30分後においても安定であったが、末梢においては血液-脳関門を通過しにくい代謝物が生成している可能性や、コルチコステロイド含量変化等による血中〔F〕%の変化がある事も予想される為、Binding availability がどのように変化してるかを正確に判定するには、今後の詳細な検討が必要である。しかし、Fig.3に示すようにこの変化が大脳皮質のみに特異的に生じる事から考えて、非常に重要な生理的意義があるものと考えられる。分裂病等の精神疾患においては、ストレス負荷に対する応答性に異常を認める場合が報告されており(5)、^{11}C-Ro15-1788と非侵襲的な負荷条件との組み合せにより、ヒト脳のBzレセプターのもつ生理的意義において重要な知見がもたらされるものと期待される。

Fig 3. Effect of swimming period on the biodistribution of ^{3}H-Ro15-1788



References

(4) Maziere M., Prenant C., Sastre J., et.al. C.R.Acad.Sc.Paris, 296,871(1983)

(2) Medina J.H., Novas M.L. and Robertis E.D. Eur.J.Pharmacol. 96,181(1984)

(5) Rubin L.S. and Barry T.J. Biol.Psyhiat. 5,181 (1972)

(3) Soubrie P., Thiebot M.H., Jobert A., et.al. Brain Res. 189, 505 (1980)

(1) Wagner H.N., Burn H.D., Dannals R.F. et.al. Science. 221, 1264 (1983)

5　ラット辺縁系脳で認められたTRHの5－HT_1 receptor 増加作用

船津邦比古・手嶋茂紀・稲永和豊
（久留米大・医・精神科）

〔要　約〕

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) のラット脳内 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor に与える影響を検討した。部位別に分けた脳から得たレセプター標本をTRH存在下で37°C 10分間インキュベートし、遠心によりTRHを除去した後、再懸濁したペレットを用いて[^{3}H]5-HT結合実験を行ない、5-HT_1 receptor の変化を調べた。TRH は limbic forebrain (nucleus accumbens, septum, olfactory tubercle, cingulate cortex を含む), hippocampus, frontal cortex にて有意に 5-HT_1 receptor 数を増加させたが、親和性には影響を与えなかった。縫線核を含み、同一神経細胞内でTRHと5-HTの共存が認められている brain stem では、5-HT_1 receptor の変化は認められなかった。Limbic forebrain と hippocampus にてこのような receptor-receptor interaction が認められたことは他の行動薬理学的および電気生理学的観察の結果とも関連して、TRHの中枢作用部位として辺縁系が重要であることを示唆している。

Key words：　TRH　　5-HT_1 receptors　　limbic brain

Thyrotropin releasing hormone (TRH) が神経終末での dopamine 放出を促進し、また恐らく dopamine 受容体にも直接作用して dopaminergic neurotransmission を促進するであろうということは、すでに幾つかの報告に示されている[7,10]。TRHはラット脳中隔野の muscarinic receptor を増加させ[9]、また 5-hydroxytryptamine (5-HT) の neurotransmission に対しても促進的に作用すると考えられている[2]。ラット脳幹部の神経細胞中にTRHと5-HTが共存するというHokfelt ら[4]の組織化学的知見も、この neuropeptide と classical neurotransmitter としての 5-HT の間の相互作用の可能性を示唆している。実際、同様に同一神経細胞内に共存している substance P と 5-HTについてはすでに、相互作用が認められている。すなわち substance P は in vitro でラット脊髄の 5-HT receptor を増加させるが、substance P と 5-HT が同一細胞中に共存していると考えられている脳皮質においては、5-HT receptor の増加は認められない[1]。それゆえ我々もTRHと5-HTのreceptorに対する相互作用について脳を部位別に分けて検討してみた。

〈実験方法〉

(1) レセプター標本の作製

新鮮な Wistar 雄性ラットの脳を部位別に分け、各部位の5、6匹分をまとめて 10 vol. w/v 0.3 M ショ糖溶液中でホモジナイズし、1,100×g 10分間遠心した。この上澄を37°C、15分間インキュベートし、30,000×g 20分間遠心した。このペレットを 40 vol. w/v の蒸留水または 50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) で洗浄した後 50,000×g 10分間遠心して上澄を捨てる操作を計4回繰り返し、最終的に 50 mM Tris 緩衝液で懸濁したものを −60°C で保存した。全操作は 4°C にて行なった。

(2) 脳部位の分離

Limbic forebrain の分離は Horn and Phillipson の方法に従った[5]。すなわち視交叉とその前方 2 mm で前額断を行ない，得られた組織片から側頭部皮質，線条体，脳梁を直視下に取り除いた。残りの組織中には側坐核，嗅結節，中隔，帯状皮質が辺縁系構造として含まれている。Limbic forebrain より吻側の皮質を frontal cortex として用いた。脳幹は正中線より左右 1 mm の部分を切り出して用いた。

(3) [^{3}H]5-HT 結合実験

レセプター標本を解凍後，Lowry 法で測定した蛋白量として 5～8 mg に相当する部分を 20 μM bacitracin を含む 5 倍量の Krebs-Ringer 液に希釈し，さらに TRH（酒石酸塩，試薬品）または溶媒を加えて 37°C 10 分間インキュベートした。その後レセプター標本を氷中にて速かに冷却し，50,000 ×g 10 分間の遠心で得られたペレットを Tris 緩衝液で再懸濁した後，以下の実験に用いた。結合実験にはレセプター標本 150 μl（蛋白量約 0.1 mg），50 mM Tris 緩衝液にて希釈した [^{3}H]5-HT 150 μl（クレアチニン硫酸塩，26.3 Ci/mmol, NEN，最終濃度 0.3～30 nM），50 mM Tris 緩衝液またはそれに非特異的結合測定のための d-LSD（最終濃度 10 μM）を含んだもの 300 μl を Eppendorf 試料管に加え，25°C で 60 分間インキュベートした。試料中にはまた 2 mM $CaCl_2$，2 mM $MgCl_2$，25 μM pargyline を加えた。その後試料の 500 μl を Whatman GF/B グラスファイバー沪紙上に陰圧にて沪過し，沪紙上の放射活性を測定した。

〈結果と考察〉

予備実験にて TRH は [^{3}H]5-HT 結合部位には結合しないことが認められた。Hippocampus を用いて行なった予備実験では 3 nM [^{3}H]5-HT の結合は対照群の 273 ± 5 fmol/mg protein (n=5, mean ± SEM) に対し，1 μM TRH 添加群では 295 ± 5 fmol/mg protein と増加傾向を示した (Student's paired t-test : $0.05 \leq p < 0.1$)。TRH はインキュベーション中に速かに分解される可能性があり，また TRH のカテコールアミン放出作用も 10 μM～1 mM で認められるので[7]，本実験では 100 μM TRH を用いた。

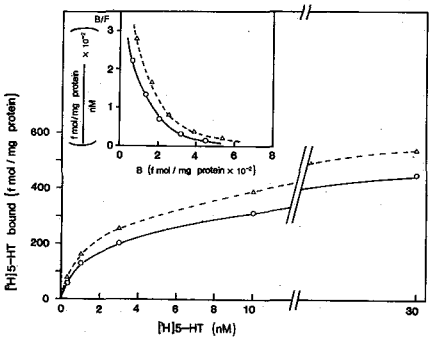


Fig. 1 Limbic forebrain での [^{3}H]5-HT 飽和曲線と Scatchard plot. ○—○：対照群，△--△：TRH 添加群．Limbic forebrain の実験は 4 回繰り返した。図にはそのうちの 1 回の結果を示す。各点は 3 試料の平均値を表わす。

Fig. 1 には [^{3}H]5-HT の limbic forebrain への結合に対する TRH の影響が示してある。この Scatchard plot は曲線となり，[^{3}H]5-HT 結合部位が多種性である可能性が示唆された。これはどの部位でも同様であった。我々のアッセイ条件下では 5-HT_1 レセプターが測定されたことになる[8]。5-HT_1 レセプターの Scatchard plot は直線を呈した報告と，曲線を呈した報告があるが，今回の曲線の Scatchard plot は，レセプター標本に crude membrane fraction を用いたことによるも

のかもしれない[3]。曲線のScatchard plotはRosenthalの方法に従って2成分に分けて検討を行なった(表1)。TRHはlimbic forebrainとhippocampusにおいて高親和性および低親和性5-HT1 receptorのBmaxを有意に増加させた。またfrontal cortexの低親和性5-HT1 receptorも増加させた。Kdはどの部位においても変化が認められなかった。Brain stemには5-HTニューロンの起始部である縫線核を含み，またTRHと5-HTの細胞内共存も認められてい

Region		High affinity [³H]5-HT binding sites		Low affinity [³H]5-HT binding sites	
		control	TRH-added	control	TRH-added
frontal cortex	Kd	0.45±0.08	0.59±0.04	9.3±1.2	11.3±0.9
	Bmax	101±27	109±27	350±45	428±36 *
limbic forebrain	Kd	0.44±0.07	0.48±0.10	17.5±1.9	20.8±3.4
	Bmax	118±20	138±21 *	461±49	541±69 *
hypothalamus	Kd	0.51±0.11	0.52±0.10	30.4±7.9	30.9±7.2
	Bmax	101±12	103±4	645±142	691±154
thalamus	Kd	0.45±0.15	0.50±0.18	24.0±4.1	27.1±3.0
	Bmax	70±10	74±3	610±91	680±81
striatum	Kd	0.45±0.30	0.42±0.26	21.7±17.2	20.7±11.3
	Bmax	47±17	44±16	423±198	465±205
hippocampus	Kd	0.67±0.11	0.61±0.13	14.1±3.4	13.3±3.8
	Bmax	91±10	111±7 *	410±51	502±62 *
amygdala	Kd	0.67±0.11	0.70±0.08	27.0±10.7	29.2±14.9
	Bmax	87±26	90±25	838±154	938±335
brain stem	Kd	0.24±0.01	0.32±0.06	12.0±2.5	10.2±0.4
	Bmax	57±7	60±6	302±89	319±86

表1. ラット部位別脳におけるTRHの5-HT1 receptorに与える影響。
Kd：nM
Bmax：fmol/mg protein
結果は2回(thalamus)または3～5回の実験のmean±SEMで示した。統計学的検定にはStudent's paired t-testを用いた。*値の右横の星印は$p<0.05$を表わす。

ることから5-HT1 receptorの何らかの変化が予想されたが，Kd，Bmax共変化は認められなかった。行動薬理学的および電気生理学的研究からは辺縁系がTRHの主な作用部位であろうと考えられているが，TRHによる5-HT1 receptorの調節がlimbic forebrainとhippocampusで見られたことはこの推測と一致する。しかしTRHによる5-HT1 receptor調節作用とreceptor密度の間には必ずしも関連性が認められない。脳内で最も高密度にTRH receptorの存在するamygdalaでは(結果未公表)5-HT1 receptorに変化は認められなかった。高濃度のTRHによっても5-HT1 receptorの増加は約20%に留まったことはこの現象の生理学的意味づけに関し，さらに検討を要するが，5-HT1 receptorのうち限られた一部分のみがTRHによって調節されている可能性も示唆している。

(文献) 1) Agnati, L.F., Fuxe, K., Benfenati, F., Zini, I. and Härfelt, T. (1983) Acta Physiol. Scand. 117 299-301. 2) Barbeau, H. and Bedard, P. (1981) Neuropharmacology 20 477-481.
3) Fillon, G.M.B., Rousselle, J.-C., Fillon, M.-P., Beaudoin, D.M., Goiny, M.R., Demiau, J.-M. and Jard, J.-J. (1977) Mol. Pharmacol. 14 50-59. 4) Härfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, Å., Lundberg, J.M. and Schultzberg, M. (1980) Nature 284 515-521. 5) Horn, A.S. and Phillipson, O.T. (1976) Eur. J. Pharmacol. 37 1-11. 6) Horányi, L., Whitmore, O.I., Sawyer, C.H. (1977) Exp. Neurol. 57 807-816. 7) 成実重彦，永井康雄，名川雄児 (1979) 用薬理誌 75 239-250. 8) Peroutka, S.J. and Snyder, S.H. (1979) Mol. Pharmacol. 16 687-699. 9) Pirola, C.J., Balda, M.S., Finkielman, S., Nahmod, V.E. (1983) Brain Res. 273 387-391. 10) Plotnikoff, N.P., Prange, A.J., Jr., Breese, G.R., Anderson, M.S. and Wilson, I.C. (1972) Science 178 417-418. 11) Renaud, L.P. and Martin, J.B. (1975) Brain Res. 86 150-154.

6　ラット部位別脳と下垂体におけるTRHレセプターの多様性

船津邦比古・手嶋茂紀・稲永和豊
（久留米大・医・精神科）

〔要　約〕

[^{3}H]Thyrotropin releasing hormone ([^{3}H]TRH)による結合実験を行ない，ラット脳と下垂体のTRHレセプターの分類を試みた。高親和性レセプター(Kd<3nM)は下垂体，視床下部，扁桃核，それに側坐核や中隔，帯状脳，嗅結節の集合体であるlimbic forebrainに認められた。中親和性レセプター(Kd：5-16nM)は前頭部皮質，海馬，線条体，視床および脳幹に認められた。低親和性レセプター(Kd：45-80nM)は視床下部，扁桃核，limbic forebrainに認められ，極低親和性レセプター(Kd=215nM)は下垂体に認められた。TRH類似体のひとつ，DN-1417を用いた実験ではTRHレセプターはDN-1417に対し高い親和性を有するものと，そうでないものとに分類された。DN-1417高親和性レセプターはすくなくともlimbic forebrainに認められたが，下垂体には認められなかった。またこのレセプターは[^{3}H]-(3-methyl-his)-TRHでは標識されなかった。以上の結果はTRHの中枢作用部位として辺縁系が重要であることを示唆しており，結合実験以外の方法にて側坐核や中隔野の重要性を指摘した先来の報告と一致する。DN-1417の実験結果はこの類似体のTRHより強力な中枢作用と極めて弱い向神経内分泌作用という，薬理学的スペクトラムとも一致する。レセプター密度は下垂体で最も高く，次いで扁桃核で高かった。

Key words：TRH receptor, DN-1417, limbic forebrain

Thyrotropin releasing hormone (TRH)は精神神経疾患への治療的応用が期待され，その目的のためにより強力な中枢作用を有するanalogueも合成されている。TRHが脳のどの部位で作用するかというのは特に興味ある課題であるので，我々は結合実験にてラット脳と下垂体のTRHレセプター分布を調べてみた。また上記analogueのひとつDN-1417(試用薬品)を用い，TRHレセプターのDN-1417に対する親和性についても検討してみた。

〈実験方法〉

(1) 脳部位の分離とレセプター標本の作製

本誌の別の演題にて述べたごとく行なった[2]。

(2) 結合実験

[^{3}H]TRH (100Ci/mmol, New England Nuclear)または[^{3}H]-(3-methyl-his)-TRH ([^{3}H]MeTRH, 70Ci/mmol, New England Nuclear)とレセプター標本，それに様々の濃度の非標識リガンドを0.02%アスコルビン酸，1mM EDTA，0.05%ウシ血清アルブミンを含む600μlの50mM Tris塩酸緩衝液(pH 7.4)中に混じ，氷中にて2時間インキュベートした。[^{3}H]TRHは飽和実験には0.5-20nMを用いた。検体中の蛋白量はLowry法によれば0.06～0.2mgであった。非特異的結合の測定には10μM TRH(酒石酸塩，武田薬品)を加えた。その後試料の500μlをWhatman GF/Cグラスファイバー沪紙上に吸引沪過し，10mlの氷冷Tris緩衝液で2回洗浄した後，沪紙上の放射活性を測定した。測定には3～4検体を用いたが，バラツキは5%以下であった。結果は平均値で示した。

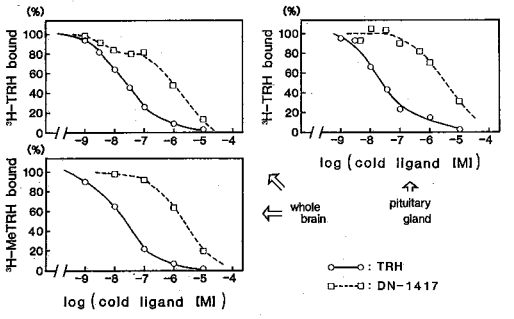


図1. TRHおよびDN-1417による置換曲線(全脳, 下垂体)
[³H]TRH：5nM [³H]MeTRH：5nM

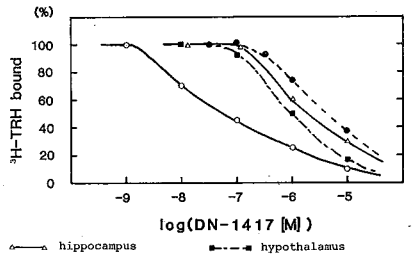


図2. DN-1417による置換曲線. [³H]TRH：5nM

〈結果と考察〉

レセプター標本に小脳を除く全脳を用いた場合の置換実験の結果を図1に示す。TRHによる置換曲線は全脳にて放射性リガンドとして[³H]TRHを用いた場合(左上)と[³H]MeTRHを用いた場合(左下)を比較しても，あるいは[³H]TRHを用いて全脳における曲線(左上)と下垂体における曲線(右)を比較しても相違が認められない。しかしDN-1417による置換曲線は左上図において2相性を示すことが，他の場合と異なっている。このことはTRHレセプターの中にはDN-1417に対して高い親和性を有するサブタイプがあり，この種のレセプターは[³H]MeTRHで標識されず，しかも下垂体にはなく脳に存在することを示している。脳を部位別に分けて検討してみると図2に見られるごとく，[³H]TRHに対するDN-1417のIC_{50}は limbic forebrain では約60nMであるのに対し，視床下部，下垂体，海馬では1～10μMであった。Limbic forebrain での曲線は，明らかに他の部位よりも傾斜が緩かである。Hill係数は他の3部位が約1.0なのに対し，limbic forebrain では0.51であり，レセプターの heterogeneity が示唆された。これは limbic forebrain が側坐核や中隔野，帯状皮質，嗅結節 の辺縁系に加え，内側前脳束等も含む集合体であることに由来するのではないかと考えられる。すなわちTRHの主要作用部位と考えられている側坐核や中隔野をとり出して用いればDN-1417に対し高親和性を有するTRHレセプターが比較的純粋に認められるのではないかとも考えられる。

各脳部位の[³H]TRH飽和実験の結果は Scatchard plot に変換して図3に示した。Plotの回帰は最小二乗法にて検討した。その結果前頭部皮質，線条体，視床，海馬，脳幹ではplotは直線となり，単一のレセプターの存在が示唆された。いっぽう limbic forebrain，扁桃核，視床下部，下垂体では Scatchard plot は曲線となり，多種類のレセプターの存在が示唆されたので，これを Rosenthal の方法を用いて2成分に分けて考えた。そしてその結果TRHレセプターを親和性によって4種類に分類することを試みた(表1)。
Limbic forebrain，視床下部，扁桃核のTRHレセプターは高親和性レセプター($Kd<3nM$)と低親和性レセプター(Kd: 45-80nM)に分類された。前頭部皮質，視床，線条体，海馬，脳幹 直線の Scatchard plot として認められたレセプターはいずれも中親和性レセプター(Kd: 5-16nM)に分類された。下垂体のレセプターは高親和性レセプターと極低親和性レセプターに分類された。

幾つかの脳部位にて Scatchard plot が曲線となることについては様々な解釈が考え

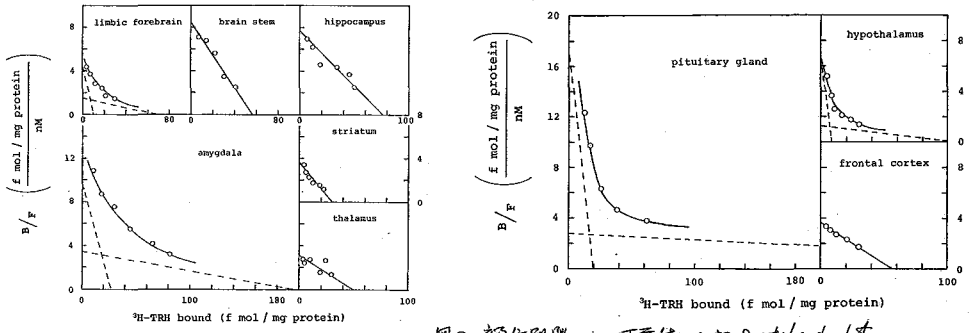


図3. 部位別脳および下垂体におけるScatchard plot.

られる。たとえば視床下部の高親和性レセプターはTRH産生細胞上のautoreceptorではないかという仮定も成り立つ。もう一つの問題はこれらの部位ではレセプターはほとんど高、低親和性2種類のみであるのかということである。全脳を用いたScatchard plotはやはり曲線となるが、その2分法による解析が適切な方法でないことは部位別脳の結果と照合すれば明らかである。ということはまたlimbic forebrainや視床下部のレセプターも2分法にて解析するのは必ずしも正しくなく、これらの部位にも中親和性レセプターが存在する可能性も否定出来ない。我々が得た高親和性レセプターの親和性は先来の報告と比較してもはるかに高いが、これは酵素による分解と低浸透圧ショックを用いてレセプター標本から内因性TRHを除去することに努めたことによるかもしれない。このような操作の重要性は[³H]5-HT結合実験においてすでに証明されている[5]。

側坐核や中隔野を含むlimbic forebrainにてTRHやDN-1417に対し高親和性を有するレセプターが認められたことは、TRHの主作用部位としてこれらの脳部位を示唆した先来の報告と一致する[3,4]。部位別脳のKdとBmaxを報告したものには[³H]MeTRHを用いたものがあるが[1,6]、我々の今回の結果は脳のTRHレセプターの研究には[³H]TRHの方が適していることを示唆している。

表1. 部位別脳と下垂体のTRHレセプターの親和性による分類

	High affinity TRH receptors	Intermediate affinity TRH receptors	Low affinity TRH receptors	Very low affinity TRH receptors
frontal cortex		Kd : 14.8 ± 3.3 Bmax : 48 ± 16		
limbic forebrain	Kd : 2.2 ± 0.2 Bmax : 10 ± 1		Kd : 47.2 ± 1.6 Bmax : 64 ± 8	
hypothalamus	Kd : 1.4 ± 0.3 Bmax : 10 ± 3		Kd : 78.4 ± 3.4 Bmax : 99 ± 8	
thalamus		Kd : 15.8 Bmax : 49		
striatum		Kd : 8.1 Bmax : 28		
hippocampus		Kd : 11.1 ± 1.6 Bmax : 82 ± 8		
amygdala	Kd : 2.8 ± 0.2 Bmax : 30 ± 2		Kd : 53.3 ± 5.7 Bmax : 196 ± 1	
brain stem		Kd : 5.8 ± 0.6 Bmax : 46 ± 10		
pituitary	Kd : 1.2 Bmax : 20			Kd : 215 Bmax : 680

mean ± SD , Kd : nM , Bmax : f mol / mg protein

〈文献〉

1) Burt, D.R. and Taylor, R.L. (1980) Endocrinology 106 1416-1423.
2) 飛津邦比古, 手嶋英紀, 前永和豊 (1984) 神経化学 23 (投稿中)
3) Miyamoto, M. and Nagawa, Y. (1977) Eur. J. Pharmacol. 44 143-152.
4) Miyamoto, M., Narumi, S., Nagai, Y., Shima, T. and Nagawa, Y. (1979) Jpn. J. Pharmacol. 29 935-947.
5) Nelson, D.L., Herbet, A., Bourgoin, S. Glowinski, J. and Hamon, M. (1978) Mol. Pharmacol 14 983-995.
6) Simasko, S.M. and Horita, A. (1982) Life Sci 30 1793-1799

7　視床下部視索上核，室旁核におけるβ－アドレナリン受容体の立体特異性と生理機能

津島宏美・森　眞由美・松田友宏
（名市大・医・薬理）

〔要　約〕

我々は、水負荷エタノール麻酔ラットに、バゾプレッシンニューロン細胞体が局在する視床下部視索上核（SON）と室旁核（PVN）に直接薬物を微量注入し尿量を測定するin vivoの実験系で、両神経核のβ－アドレナリン受容機構を検討した。β－アゴニスト、イソプロテレノール（ISO）のL体とDL体は共にSON、PVNにおいて用量依存性の抗利尿作用を発現させたが、D体は有意な変化を示さなかった。L体はDL体より強い作用を示した。PVNにおいてDL－ISOによる抗利尿作用発現時に尿の浸透圧は、バゾプレッシン静注による抗利尿作用発現時と同様上昇していた。SONにおいて血圧、心拍数、呼吸数、体温は変化しなかったが、PVNにおいては血圧が下降し心拍数は増加した。一方局所麻酔作用のないβ－アンタゴニスト、チモロールを単独で微量注入する時著明な利尿作用を示した。チモロールによるこの利尿時にSONでは心拍数、PVNでは血圧、心拍数が軽度抑制された。以上の結果より、これら神経核における尿量調節はin vivoで立体特異性のあるβ－受容体を介するバゾプレッシン遊離によることが示唆された。

Key words：　β-adrenoceptor, vasopressin, hypothalamus.

我々はバゾプレッシンニューロン細胞体が局在する視床下部視索上核（SON）と室旁核（PVN）に直接薬物を微量注入し、尿量を測定するin vivoの系において、これら両神経核における伝達物質受容機構を検討してきた。すでにアドレナリン受容体[1]、アセチルコリン受容体[2]、オピエート受容体[3]について報告した。今回、β－アドレナリン受容体の立体特異性とその生理機能について検討した。

〔実験方法〕

すでに報告した通りである[1~3]：実験前日より（約18時間）絶食したWistar系雄性ラット280－330gを用いた。実験当日、水（5ml/100g b.w.）を経口投与し、45分後同量の12％エタノールを経口投与した。ラットを脳定位固定装置に固定し、Königらのアトラス[4]に従いSON、PVNの位置を決定した。頸静脈カニューレより3％エタノール・ロック液を0.1ml/minの速度で持続注入し、膀胱カニューレからの尿流出量はドロップカウンターで10分毎に測定した。薬物投与後の尿量変化は一定の尿流出速度の投与前10分間の尿量に対する百分率であらわした。尿浸透圧はFiske Osmometer（Fiske Associates INC, USA）により測定した。血圧、心拍数、呼吸数、体温も測定した。脳内注入用カニューレの挿入部位は次の方法で確認した：1）実験終了後同一カニューレより脱分極量のKCl（400nmol）を注入し抗利尿作用が発現されること、2）実験終了後カニューレに通電しGomori法により神経核を染色し、カニューレの先端を形態学的に確認した。

〔実験結果〕

<u>イソプロテレノールの作用</u>：イソプロテレノールのL体、DL体、D体をそれぞれSONあるいはPVNへ微量注入し尿量への影響を検討した。L体とDL体は両神経核において

類似の時間経過を示す用量依存性の抗利尿作用を発現させた。この抗利尿作用の用量作用曲線をFig. 1 に示す。これらのED50値をTable 1 に示した。D体はSONへ80 nmol、PVNへ40nmol微量注入しても無効であった(Fig. 1)。DL体の作用はβ-アンタゴニストで完全に遮断された。Fig. 2 に40nmol DL体をPVNに微量注入し抗利尿作用が発現された時の尿浸透圧を示す。同量のDL体をSONに微量注入し抗利尿発現時には、血圧、心拍数、呼吸数、体温はいずれも変化しなかったが、PVNでは血圧は投与後30分より50分まで下降(約130mmHg → 100mmHg)し、心拍数は投与後20分より90分まで増加(約400/min → 450/min)した。これらはいずれも抗利尿作用と時間経過を異にしていた。

Fig.1. Dose-effect curves for antidiureses by isoproterenol.

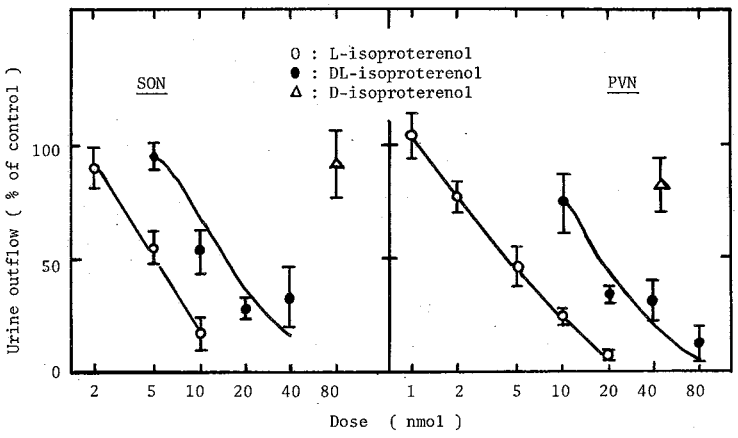


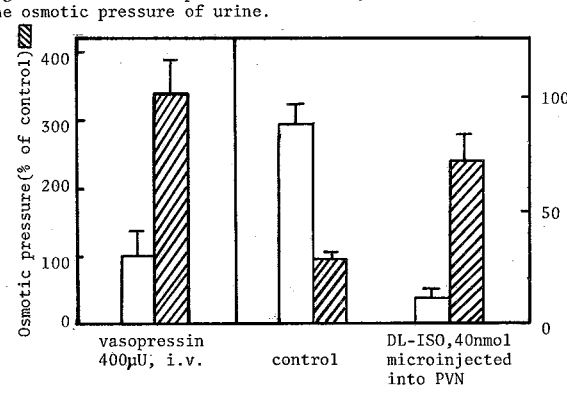
Table 1. ED50 values for antidiureses induced by isoproterenol.

isomers	microinjected into the SON	PVN
L-isomer	5.3(4.5-6.2)	4.6(2.8-7.7)
DL-form	16(8-32)	17(11-27)
D-isomer	> 80	> 40

Values were represented in nmol.
Values in the parentheses were limits of 95% confidence.

テモロールの作用：テモロールをSON、PVNへ微量注入する時、逆に著明な利尿作用が発現された(Fig. 3)。この利尿作用は、100nmol テモロールによってSONでは投与後30分に214 ± 15.8 %まで尿量が増加し、投与後120分でほぼ投与前の尿量に回復したがPVNではより持続性であった。テモロールによる利尿時にSONでは心拍数が、PVNでは血圧と心拍数が軽度抑制された。150 nmol プロプラノロール、80nmol フェノキシベンザミンはいずれも両神経核において尿量に影響を及ぼさなかった。

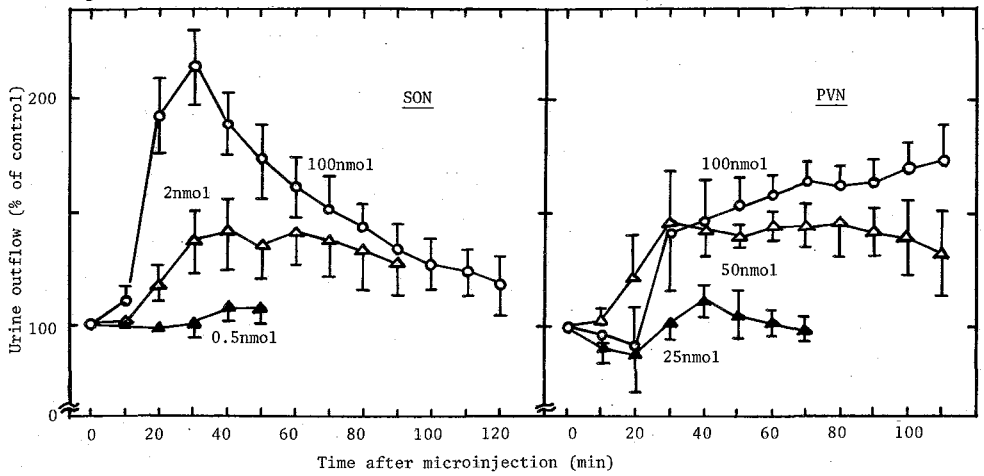
Fig.2. Effects of isoproterenol microinjected into PVN on the osmotic pressure of urine.



〔考察〕

ノルアドレナリンからアドレナリンを合成する酵素(フェニールエタノールアミン-N-メチルトランスフェラーゼ)の抗体を用い免疫組織学的にアドレナリン作働性ニューロンが視床下部の神経核、特にPVNに濃密に局在していることが報告されている[5,6]。本研究ではβ-アゴニスト、イソプロテレノールをSON、PVNに微量注入し、用量依存性に抗利尿作用がひきおこされること、その作用強度

Fig.3. Diuretic effects of timolol microinjected into SON and PVN.



が L体 > DL体 ≫ D体の順であることから、これら神経核のβ-受容体に明らかな立体特異性があることを示した (Fig. 1, Table 1)。

DL体のPVNへの微量注入によって抗利尿作用がおこる時、バゾプレッシンの静注による抗利尿効果と同様尿浸透圧が著明に上昇していることから、このβ-アゴニストによる抗利尿作用が抗利尿ホルモン(バゾプレッシン)の遊離を介していることを強く示唆するものであった (Fig. 2)。さらに薬物の注入部位はバゾプレッシンニューロン細胞体が局在していること、このβ-アゴニストの微量注入による抗利尿作用があらわれている時、循環系、呼吸系、体温調節中枢への影響が比較的軽度であることは上記の考えを支持するものであるが、目下バゾプレッシンの血中レベルを測定し確認している。

β-アンタゴニスト、プロプラノロールには強い局所麻酔作用がある。神経核へ注入しβ-遮断作用を調べるためには局所麻酔作用のないβ-アンタゴニストが望ましいが、その代表薬であるチモロールを両神経核に単独で微量注入した時、著明な利尿作用が認められた (Fig. 3)。恐らくは生理的に両神経核に局在するアドレナリン作働性神経によるβ-受容体を介する抗利尿作用がβ-遮断薬で遮断され利尿作用が発現されたものと思われる。

〔文献〕

1) 津島宏美、森眞由美、松田友宏 (1980) 神経化学, 19, 238-241.

2) Mori, M., Tsushima, H. and Matsuda, T. (1984) Japan. J. Pharmacol., 35, 27-36.

3) 津島宏美、森眞由美、松田友宏 (1981) 神経化学, 20, 488-491.

4) König, J. F. R. and Klippel, R. A. (1963) The Rat Brain, A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

5) Hökfelt, T., Fuxe, K., Goldstein, M. and Johansson, O. (1974) Brain Res., 66, 235-251.

6) Sawanson, L. W. and Sawchenko, P. E. (1983) Ann. Rev. Neurosci., 6, 269-324.

8 ラット脳における α_2－adrenergic receptor binding に関する問題点

辻村良太郎・太田深雪・中村豊紀・野村純一
（三重大・医・精神科）

〔要　約〕

(1) ラットの cerebral cortex を 50mM Tris-Hcl buffer, pH 7.7 を用いて P_2 membrane を分画し、同一 buffer で3回 washing したものを Fresh and washed P_2 として用いた。3回 washing する時に得られる Supernatant をプールし、それを lyophilize し蛋白量が約 30μg/100μl になるよう同一 buffer で溶解したものを Sup-2 とした。Sup-2 を ^{3}H-para-amino-clonidine binding system に加えると著明に抑制がかかり、Sup-2 を透析して加えると抑制は完全に消失した。この所見は P_2 membrane を充分洗浄しないと binding を阻害し、結果を大きく左右する因子が多数 P_2 membrane に附着していることを示している。(2) 10μM GTP を binding system に加えることにより、affinity は high affinity site, low affinity site ともに減少する (high affinity site, Kd 0.16mM → 0.32mM ; low affinity site, Kd 4.2mM → 7.8mM) が B_{max} は high affinity site, low affinity site ともに変らず、receptor 数に変化は認められなかった。Fresh and washed P_2 を用いると GTP により receptor が全て low affinity state になるという現象を確認できなかった。(3) ammonium ion は ^{3}H-para-amino-clonidine binding を著明に抑制し、その抑制効果は sodium ion の抑制効果と additive であった。

Key words : ^{3}H-para-amino-clonidine binding, guanine nucleotides, ammonium ion,

中枢神経系以外の末梢組織にある α_2-adrenergic receptor は Ni を介し adenylate cyclase と結合し、α_2-agonist により adenylate cyclase 活性が抑制されることがよく知られている。[4] 中枢神経系に於ては Neuroblastoma x Glioma Hybrid Cell (NG108-15) が α_2-agonist によって cyclase 活性が抑制されるという報告はあるが、[10] これ以外に α_2-agonist により adenylate cyclase が抑制され cAMP が減少するという報告はない。[5] 私達は中枢神経系に於て α_2-adrenergic receptor が adenylate cyclase と結合しているのか。結合しているのであれば何故 cyclase 活性が抑制されないのか。この疑問を解明する第一歩としてこの実験をした。

〔実　験　方　法〕

(1) P_2 membrane — Wistar系雄ラット (200~250g) の cerebral cortex を 50mM Tris-Hcl, pH 7.7 を用い、Polytron (set 6, 30 sec) で homogenize し Enna and Snyder の方法[3] で P_2 を分画した。この P_2 を同一 buffer に suspension し 48,000 x g で5分間遠心することにより membrane の washing を行ない、3回 washing したものを fresh and washed P_2 として binding assay に用いた。

(2) Sup-2 — P_2 membrane を 50mM Tris-Hcl buffer, pH 7.7 で3回 washing する時に得られる supernatant をプールして、これを lyophilize し蛋白量が約 30μg/100μl になるように同一 buffer に溶解したものを Sup-2 とした。プールした Supernatant を同一 buffer に対して 24時間透析したものを lyophilize し、Sup-2 と同一蛋白濃度になるように同一 buffer で溶解したものを Dialyzed Sup-2 として binding system に加えて影響を検討した。

(3) ^{3}H-para-amino-clonidine binding assay — 結合飽和実験は 1.0ml の P_2 membrane suspension, 最終濃度 0.25~10mM の ^{3}H-para-amino-clonidine 0.02ml, 50mM Tris-Hcl buffer, pH 7.7 0.96ml を 25°C で 20分間 incubation し、incubation mixture を Whatman GF/B filter 上で吸引ろ過し、buffer

10 ml で3回洗浄し、filter を Aquasol 10 ml にとかして β 線を測定した。10μM clonidine で displace される結合を特異的結合とした。^{3}H-para-amino-clonidine の specific activity は 48.5 Ci/mmol で 47% の efficiency で count した。specific binding は total binding の 70~80% であった。routine assay は最終濃度 0.5nM の ^{3}H-para-amino-clonidine を用いて行なった。

(4) 蛋白量は Lowry らの方法[9] で測定し、結合飽和実験の結果を Diop らの方法[2] で NEC-PC-9801 を用いて、コンピューターで Kd および Bmax を解析した。

〔結　果〕

Table 1 に示したごとく Sup-2 を binding system に加えると、著明に抑制が認められ、24時間透析した Sup-2 を binding system に加えると抑制は完全に消失する。この所見は binding assay に用いる P_2 membrane を充分洗浄しないと binding を阻害し、結果を左右する因子が多数 P_2 membrane に附着している事を示している。Sup-2 を透析して用いると抑制は完全に消失するので、inhibitor は低分子のもので、種々の Neurotransmiter, guanine nucleotides, 種々のイオン等であろうと考えられる。

Diop らの方法[2] で結合飽和実験結果をコンピューターで解析した結果が Table 2 に示されている。10μM GTP を binding system に加えると high affinity site, low affinity site ともに affinity は減少する。特に high affinity site では著明で対照群との間で有意差が認められた。Bmax は high affinity site, low affinity site とも変らず、全 receptor 数に変化は認められなかった。fresh and washed P_2 を用いると、GTP により receptor が全て low affinity state になるという従来の所見[11] を確認することが出来なかった。

ammonium ion の影響を検討するため種々の ammonium salts を binding system に加えた結果が Table 3 に示されている。anion 側を chloride, Fluoride, Sulfate, Bromide, Nitrate, Formate, Acetate に変えても binding を顕著に抑制するので ammonium ion が binding を著明に抑制するものと考えられる。結果は示さなかったが、ammonium ion は dose-dependent に inhibition をかける事が明らかになっている。α_2-adrenergic receptor binding を抑制する cation として sodium ion がよく知られている。[6][8] Fig. 2 に示されているごとく sodium ion の抑制効果と ammonium ion の抑制効果は additive であるので、その inhibition site 或いは抑制機構は異なるものと考えられる。

〔考　察〕

最近、朝倉らのグループは[11] ラット大脳皮質を用いコンピューター解析により、

Table 1: Effects of Sup-2 on ^{3}H-para-amino-clonidine binding to synaptic membranes in rat cerebral cortex

Conditions	Specific bound (cpm/mg protein)	% of control
Control	2825 ± 71 (n=5)	100
Sup-2 (0.56 ml)		
Untreated	1012 ± 32 (n=3)	36
Dialysis (1 day)	2794 ± 41 (n=3)	99

These binding assay were done at 0.5 nM ^{3}H-para-amino-clonidine.
Values are expressed as the mean ± S.E..

Table 2. Effects of guanine nucleotide on ^{3}H-para-amino-clonidine binding to synaptic membranes in rat cerebral cortex

	Control (n=5)	10μM GTP (n=5)
High affinity		
Kd (nM)	0.16 ± 0.05	0.32 ± 0.01*
B_{max} (f mole/mg protein)	49 ± 7	42 ± 3
Low affinity		
Kd (nM)	4.2 ± 0.7	7.8 ± 1.3
B_{max} (f mole/mg protein)	120 ± 6	119 ± 18

These binding assay were done at 0.5 nM ^{3}H-para-amino-clonidine.
Results are expressed as the mean ± S.E..
* Significantly different from control value, $P < 0.05$

α_2-adrenergic receptor が homogeneous な single receptor で、guanine nucleotide により high affinity state が全て low affinity state になると報告している。野村らのグループは[7] high affinity site と low affinity site がラット脳の異なる発育段階で現れ、10μM GTP により high affinity site の Bmax は著明に減少するが、low affinity site は Kd, Bmax ともに変らないと述べている。私達は P_2 membrane の作り方で binding assay の結果が大きく左右される事に気づき、P_2 membrane を3回洗浄したものを binding assay に用いてきた。P_2 membrane の washing によって得られた Sup-2 は Table 1 に示したごとく binding を著明に抑制し、Sup-2 を遠沈すると抑制効果は完全に消失する。この所見は P_2 membrane を充分洗浄しないと、binding を阻害した結果を大きく左右する因子が P_2 membrane に附着している事を示している。10μM GTP を binding system に加えてみると、high affinity site も low affinity site も affinity は減少し、特に high affinity site に於て対照群との間に有意差が認められた。Bmax はいづれも変らず、全 receptor 数に変化はなかった。この所見をどのように解釈すればよいのか私達はいまだ結論を出すことが出来ないが、この結果は翁会らの結果[11]ともまた野村らの結果[7]とも異なる。^{3}H-Yohimbine を用いた Rouot らの結果によれば[9] (-) adrenaline による阻害曲線より得た Pseudo-Hill-coefficient (n_H) は 0.54 で 100μM GTP を binding system に加えても n_H は 0.73 で receptor は heterogeneous である。また Yohimbine による阻害曲線より得た n_H は 0.93 で、この所見は receptor そのものが heterogeneous なものとして存在している可能性を示唆している。私達はまだ結論をだすまでにいたっていないが、^{3}H-Yohimbine を用いた結合阻害実験、結合飽和実験を fresh and washed P_2 で行なっているので、これまでにみられたいくつかの相異点を解明できるのではないかと考えている。α_2-adrenergic receptor binding を抑制する sodium ion と ammonium ion の抑制効果は Fig. 2 に示されたごとく additive であるので、その inhibition site 或いは抑制の作用機構は異なるものと考えられる。

Table 3: Effects of various ammonium salts on ^{3}H-para-amino-clonidine binding to synaptic membranes in rat cerebral cortex

Ammonium salts (40mM)	Specific bound (cpm/mg protein)		Inhibition
Control	3098	(n=19)	1.00
Chloride	789	(n= 9)	0.25
Fluoride	1087	(n= 5)	0.35
Sulfate	506	(n= 5)	0.16
Bromide	916	(n= 2)	0.30
Nitrate	688	(n= 2)	0.22
Formate	467	(n= 2)	0.15
Acetate	715	(n= 2)	0.23

These binding assay were done at 0.5 nM ^{3}H-para-amino-clonidine. Values are expressed as the mean and inhibition values are relative to control binding.

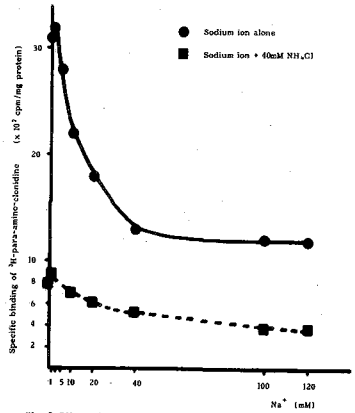


Fig. 2 Effects of sodium ion in the presence or absence of ammonium salt on ^{3}H-para-aminoclonidine binding to synaptic membranes in rat cerebral cortex

These binding assay were done at 0.5nM ^{3}H-para-amino-clonidine. Results are mean of two determinations.

〔文　献〕

1) Daly J.W., Cyclic Nucleotides in the nervous system, Plenum Press, New York, (1977). 2) Diop L., Dausse J.P. and Meyer P., J. Neurochem., 41,710, (1983). #3) Enna S.J. and Snyder S.H., Mol. Pharmacol., 13, 442, (1977). 4) LefkowitzR.J., De Lean A., Hoffman B.B. Kent R., Michel T. and Limbird., Adv. Cyclic Nucleotide Res., ed by Dumont J.E., Greengard P. and Robison G.A., Raven Press, New york, 16, 145, (1981). 5) Lowry O.H. Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.,J. Biol. Chem., 193, 265, (1951). 6) Michel T., Hoffman B.B. and Lefkowitz R.J., Nature, 288, 709, (1980). 7) Nomura Y., Kawai M., Mita K. and Segawa T., J. Neurochem., 42, 1240, (1984). 8) Rouot B.M., U'Prichard D.C. and Snyder S.H., J. Neurochem., 34,374, (1980). 9)Rouot B.M. and Schwartz J., Arch. Pharmacol.,321,254,(1982). 10). Sabol S.L. and Nierenberg M.,J.Biol. Chem.,254,1913,(1979). 11) 塚本徹, 神経精神薬理, 5, 815, (1983).

9　ラット脳内 α_2 受容体の可溶化とその性質

松井宏晃・朝倉幹雄・塚本　徹・今福　淳
伊野美幸・斉藤典子・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神科）

〔要　約〕

(1) α_2－受容体アゴニスト ^{3}H－clonidine（^{3}H－CLO）により同定されたラット脳膜成分に存在する α_2－受容体を 3－〔(3－choladmidopropyl)－dimethylammonio〕－1－propane sulfonate（CHAPS）処理により可溶化した。膜成分に存在する ^{3}H－CLO 結合部位の約 40％が 6mM CHAPS 処理により 100,000×g 1時間の遠心上清中に回収された。

(2) CHAPS 抽出液中の ^{3}H－CLO 結合部位は以下の理由により膜結合性 α_2－受容体の性質を保持していると考えられる。a) ^{3}H－CLO に対し高親和性（K_D = 0.92nM）および低親和性（K_D = 35 nM）成分が存在する。b) 抽出液と膜標品の各種 α_2－受容体リガンドに対する親和性がほぼ等しい。c) グアニンヌクレオチド，一価陽イオンさらに N－ethylmaleimide により ^{3}H－CLO 結合が濃度依存性に阻害される。

(3) Bio－Gel A－1.5m カラムによるゲル沪過より，可溶化された α_2－受容体の Stokes 半径は約 6.6nm と推定された。

以上の結果から，CHAPS 処理により可溶化された α_2－受容体は，グアニンヌクレオチドに対する感受性を保持しており，中枢 α_2－受容体－膜内共役物質（N 蛋白）相互作用を分子レベルで解析するのに有用であると考えられる。

Key words：　α_2－adrenergic receptor　receptor solubilization
guanine nucleotide binding regulatory component

〔緒言〕

我々は，イミプラミン，デシプラミン，ミアンセリン等の抗うつ剤やクロカプラミン，カルピプラミン等の抗精神病薬の中枢 α_2－受容体に及ぼす影響について，膜内共役物質（グアニンヌクレオチド結合調節蛋白（N 蛋白））との関連において検討した[1,5,6]。中枢 α_2－受容体機能に関しては，伝達物質遊離阻害作用，アデニル酸シクラーゼ（AC）活性への抑制性関与等が示唆されているが，その分子機構は明らかにされておらず，その生化学的研究はほとんどなされていない[4]。そこで今回我々は，中枢 α_2－受容体－N 蛋白－AC 系の調節機構を分子レベルで解析する第一歩として，ラット脳から α_2－受容体を 3－〔(3－chola－mido propyl)－dimethylammonio〕－1－propane sulfonate（CHAPS）[3]処理により可溶化し，グアニンヌクレオチド，金属イオン並びに N－ethylmaleimide（NEM）の ^{3}H－clonidine（^{3}H－CLO）結合に及ぼす影響について検討した。

〔方法〕

膜分画および可溶化分画の調製：既報[5]の方法により調製したラット脳膜分画を 4 容の 50mM トリス塩酸緩衝液に懸濁し，CHAPS を加え（終濃度 6mM），100,000×g 1時間遠心後の上清を可溶化分画（CHAPS 抽出液）として以下の実験に用いた。

結合実験：膜分画，可溶化分画ともに 25℃，30分間放射性リガンドとインキュベート後，polyethylenimine 前処理ガラス繊維沪紙（GF／B）を用いる Bruns らの方法[2]に準じて反応を停止させた。全結合から 1μM CLO 存在下での値を差し引いたものを特異的結合とした。

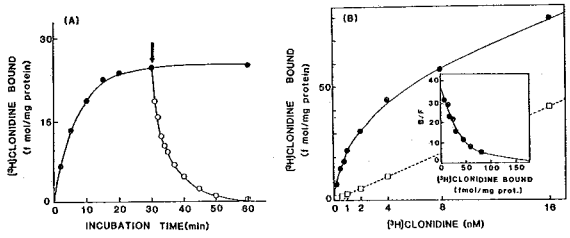


Fig. 1. [^{3}H]Clonidine binding to CHAPS-solubilized fractions.
(A) Association (●) and dissociation (○) of [^{3}H]clonidine binding. Arrow indicates the addition of 1 μM clonidine.
(B) Saturability of [^{3}H]clonidine binding. Binding assays were performed in the absence (●) and the presence of 10 μM clonidine (□). Inset, Scatchard analysis of [^{3}H]clonidine binding. The results shown are from one typical of 5 independent experiments.

〔結果と考察〕

可溶化条件：6mM CHAPS処理により約40%の^{3}H−CLO結合活性が可溶化された。しかし，Triton X−100，cholate，digitonin等は無効であった。

可溶化分画の^{3}H−CLO結合様式：可溶化分画の^{3}H−CLO結合は膜分画同様約20分で平衡に達し，1μM CLO添加により解離する可逆的な結合であった。(図1A)，結合は飽和性であり，Scatchard解析すると2相性を示し，高親和性成分のK_D=0.92nM，部位数35fmol／mg protein，低親和性成分のK_D=35nM，部位数195fmol／mg proteinと算出され，膜分画の値とほぼ一致した[7]（図1B）。

可溶化分画^{3}H−CLO結合部位の薬理学的性質：可溶化分画の^{3}H−CLO結合に対する各種薬物のIC_{50}値は膜分画のそれとほぼ等しかった（表1）。すなわち，^{3}H−CLO結合部位は，imidazoline化合物（α_2−アゴニスト）p−aminoclonidine，oxymetazoline，CLOに対し高い親和性を有し，α_1−アゴニストphenylephrineやβ−アゴニストiso proterenolに対する親和性は低かった。またα_2−アンタゴニストyohimbineに対する親和性は，α_1−アンタゴニストのprazosinに比して数百倍高かった。この結果は，CHAPS抽出液中の^{3}H−CLO結合部位がα_2−受容体の薬理学的特性を保持していることを示している。

Table 1
Characteristics of the inhibition of specific [^{3}H]clonidine binding to membrane and CHAPS-solubilized preparations by adrenergic agonists and antagonists

Adrenergic drugs	IC_{50} (nM) Membrane preparations	Solubilized preparations
Agonists		
p-aminoclonidine	1.6 ± 0.6	2.6 ± 0.7
oxymetazoline	2.5 ± 1.0	4.5 ± 0.7
clonidine	3.5 ± 1.1	5.6 ± 0.2
epinephrine	11 ± 1.7	7.7 ± 2.7
norepinephrine	17 ± 6.0	14 ± 1.2
dopamine	189 ± 29	193 ± 33
phenylephrine	209 ± 20	206 ± 11
isoproterenol	4400 ± 230	2600 ± 690
Antagonists		
yohimbine	144 ± 48	96 ± 15
prazosin	6200 ± 150	6900 ± 820
Other		
serotonin	6100 ± 380	6000 ± 720

To determine concentrations to inhibit the control 1 nM [^{3}H]clonidine binding by 50% (IC_{50}), six to seven concentrations of each drug were examined in triplicate. Results are means ± SEM of at least 4 independent experiments.

グアニンヌクレオチドの作用：GTP，GDP，5'−guanylylimido diphosphate（Gpp(NH)p）はいずれも膜分画のみならず，可溶化分画の^{3}H−CLO結合を濃度依存性に抑制し，IC_{50}は，1〜5μMであった（表2）。この抑制作用は，グアニンヌクレオチドに特異的であり，α_2−受容体−N蛋白相互作用が保持された状態で可溶化されたことを示している。

Table 2
Nucleotide regulation of [^{3}H]clonidine binding to membrane-bound and CHAPS-solubilized α_2-receptors

Nucleotide	Binding at molar concentrations (% of control) 10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
	Membrane-bound receptors			
GTP	94	72	28	26
GDP	98	84	39	32
Gpp(NH)p	95	61	44	33
ATP	103	99	85	40
	Solubilized receptors			
GTP	99	93	37	26
GDP	95	53	24	22
Gpp(NH)p	94	58	27	10
ATP	101	93	83	71

Results are expressed as the percentage of specific binding in the absence of nucleotides. The values are the means of three or more determinations.
Gpp(NH)p; 5'-guanylylimidodiphosphate.

一価陽イオンおよびNEMの作用：Na^+，Li^+，K^+等の一価陽イオン並びにSH基アルキル化剤NEMは膜分画のみならず可溶化分画の^{3}H−CLO結合を濃度依存性に抑制した（表3）NEMによる抑制はdithiothreitol（1mM）添加により拮抗さ

Table 3
Effects of cations and NEM on [^{3}H]clonidine binding to membrane-bound and CHAPS-solubilized α_2-receptors

Drugs	Binding at molar concentrations (% of control)					
	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
Membrane-bound receptors						
NaCl			98	90	73	27
LiCl			104	92	78	33
KCl			105	94	92	88
NEM	98	55	30	10		
Solubilized receptors						
NaCl			102	99	65	34
LiCl			103	88	80	45
KCl			97	93	90	55
NEM	103	73	44	17		

Data are the percentage of control specific 1 nM [^{3}H]clonidine binding in the presence of varying concentrations of drugs. The values are the means of three or more determinations.

れた（結果表示せず）。

可溶化α_2-受容体分子の大きさ：可溶化分画を濃縮後ゲル汙過を行なった。^{3}H-CLO結合活性で調べたα_2-受容体はStokes半径約6.6 nmの位置に単一ピークとして溶出した（図2）。

以上の結果は，CHAPS処理により脳内α_2-受容体がグアニンヌクレオチドや一価陽イオンに対する感受性を保持した状態で可溶化されたことを示している。今回の研究は脳内α_2-受容体システムの分子レベルの解析や，精製の基礎となるものと考えられる。

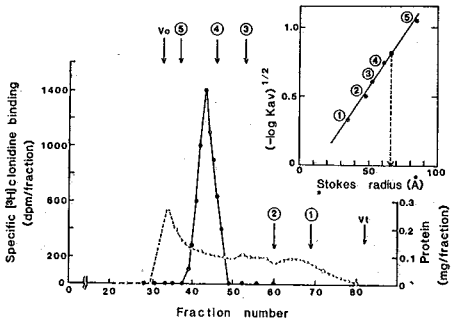


Fig. 2 Bio-Gel A-1.5 m column (1.0 x 50 cm) chromatography of solubilized fraction. Specific [^{3}H]clonidine binding (●) and protein contents (○) were measured. Standard proteins of known Stokes radii were chromatographed separately. Inset, data are expressed as $(-\log Kav)^{1/2}$ versus Stokes radius for each standard, where Kav = (Ve-Vo/Vt-Vo); Ve, Vo and Vt refer to the elution volume, void volume and total volume, respectively. The designated marker proteins and Stokes radii for both parts are: 1, bovine serum albumin (35.5 Å); 2, aldolase (48.1 Å); catalase (52.2 Å); 4, ferritin (61.0 Å); 5, thyroglobulin (85.0 Å).

〔謝　辞〕　p-aminoclonidine および clonidine を提供くださった日本ベーリンガーに感謝します。

〔文　献〕

1. Asakura, M., Tsukamoto, T., and Hasegawa, K. (1982) Brain Res. 235, 192-197
2. Bruns, R. F., Lawson-Wedling, K., and Pugsley, T. A. (1983) Analyt. Biochem. 132, 74-81
3. Hejelmeland, L. M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6368-6370
4. Sladeczek, F., Bockaert, J., and Rouot, B.M. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 1116-1121
5. 塚本　徹．朝倉幹雄．平田進英．今福　淳．松井宏晃．斉藤典子．長谷川和夫 (1983) 神経化学　22, 339-341
6. Tsukamoto, T., Asakura, M., Hirata, N., Imafuku, J., Matsui, H., Hasegawa, K. (1984) Biol. Psychiat. in press
7. U'Prichard, D. C., Bechtel, W. D., Rouot, B.M., and Snyder, S. H. (1979) Mol. Pharmacol. 16, 47-60

10 ラット大脳皮質 α_2 レセプター調節機構について — dopamine 処置による影響 —

河野康子 （久留米大・医・薬理）
野村靖幸 （富山医薬大・和漢薬研）
瀬川富朗 （広島大・医・薬効解析）

〔要 約〕

大脳皮質粗シナプス膜 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) 浮遊液に 0.1 ～ 100 μM dopamine (DA) を添加し 37 °C, 30 分間インキュベートすると, [^{3}H]clonidine で標識した α_2 レセプターが濃度依存的に増加したが, [^{3}H]WB4101, [^{3}H]DHA 結合でみた α_1 と β レセプターは変化しなかった。この DA 処置による α_2 レセプター増加はインキュベーションの温度と時間にも依存し, [^{3}H]clonidine 結合の高・低両親和性結合成分の Bmax の増加に基づいていた。DA の作用は pimozide, cis-flupenthixol で拮抗され, DA レセプター刺激, 殊に D_1 レセプターを介していると考えられた。一方, DA の作用は多くの脳部位より得た膜標本で一様に認められたので必ずしも DA レセプターを介さない他の機構, 例えば膜の流動性亢進などが関与することも考えられた。また Mn^{2+} も α_2 レセプターを増加するが, DA と Mn^{2+} の作用機序は異るらしい。さらに GTP 併用効果から DA の作用発現には促進性もしくは抑制性 G タンパク (それぞれ N_s, N_i) が一部関与する可能性が示されたが cyclic AMP の関与は認められなかった。以上の DA の作用は isoproterenol による α_2 レセプター増加作用の諸性質と類似しており, 中枢神経系では N_s を介してアデニル酸シクラーゼを活性化するアゴニストにより N_i に共役する α_2 レセプター数を増加する調節機構が存在することが示唆された。

Key words : α_2-receptor, dopamine, GTP regulatory protein

はじめに

中枢 α_2 レセプターはシナプスの前・後膜に存在し [^{3}H]clonidine で標識される。その機能としてアゴニスト作用時に細胞体で神経発火を抑制し神経終末部で noradrenaline (NA) 遊離を減少することがよく知られている。これに加えて最近 NA ニューロンのエフェクターサイドで抑制性 G タンパク (N_i) に共役してアデニル酸シクラーゼ活性を低下させる可能性が挙げられてきた。我々は従来よりラット大脳皮質粗シナプス膜で α_2 レセプターの調節機構を調べ, カチオン類や SH 基の影響, isoproterenol 処置後にみられる β レセプター刺激を介する α_2 レセプター増加機構などを報告した。[1,2] 今回はさらにシナプス膜を dopamine (DA) 処置し DA レセプターを介する α_2 レセプターの増加を認めたので報告する。

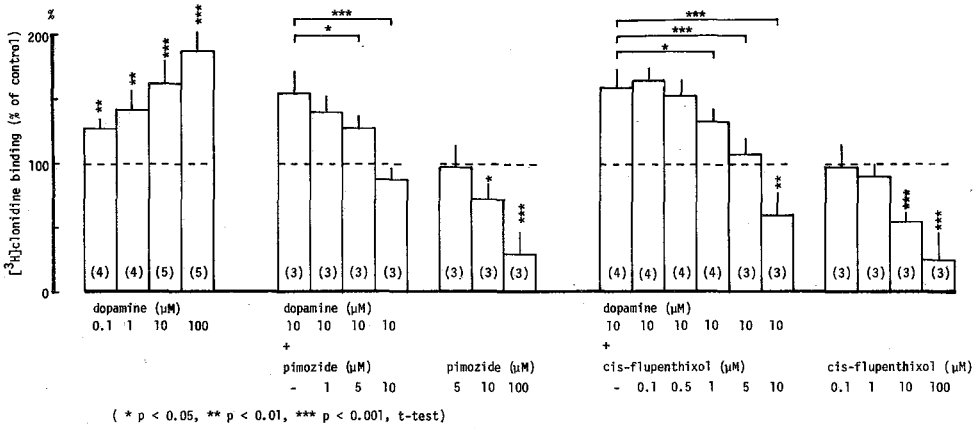
方法

1) 粗シナプス膜画分の調製とその薬物処置

実験には 150 ～ 220 g の Wistar 系雄性ラットを用いた。Simon らの方法[3] に準じて大脳皮質 P_2 画分より粗シナプス膜を得た。膜は 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) に浮遊させ 37 °C で 10 分間インキュベートした後に DA その他の薬物を添加し更に 30 分間インキュベートして遠心分離した。沈渣を buffer で 3 回洗浄し, α_1, α_2, β レセプターの変化を検討した。

2) [^{3}H]clonidine, [^{3}H]WB4101, [^{3}H]DHA 結合実験

薬物処置後の膜は 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) 懸濁液とした (0.6 ～ 1.0 mg protein/ml)。この膜標本 1.0 ml を用い 1.5 ～ 2.5 nM [^{3}H]clonidine 存在下で 25 °C, 30 分間インキュベートし, 1 μM clonidine で displace される結合を特異的結合とした。結合飽和実験では 0.1 ～ 20 nM [^{3}H]clonidine



(* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, t-test)

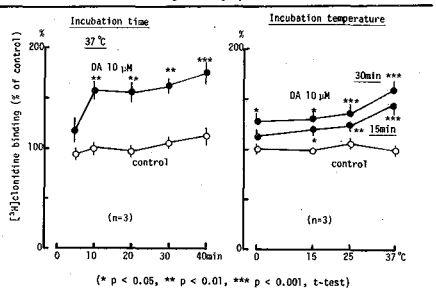
Fig.1 Changes in [^{3}H]clonidine binding to cortical synaptic membranes following drug pretreatments

を用い結果をScatchad plot[4]してRosenthal法[5]により2個の結合成分のKD, Bmaxを求めた。[3H]WB4101結合は膜標本0.8 mlに5 nM[3H]WB4101を加え25°Cで30分間結合反応を行った（displacerは100 μM NA）。また[3H]DHA結合は膜標本0.8 mlに1 nM[3H]DHAを添加し23°C, 30分間の結合反応で調べた（displacerは100 μM dl-propranolol）。タンパク濃度はLowryらの方法[6]で測定した。

結果と考察

1) 大脳皮質粗シナプス膜DA処置によるα2レセプター数の特異的増加

大脳皮質粗シナプス膜をDA処置すると濃度依存的に[3H]clonidine結合が増加したが（Fig.1）[3H]WB4101, [3H]DHA結合には影響しなかった（dataは提示していない）。従ってDAはアドレノセプターの中でもα2レセプターを特異的に増加させると考えられる。DAの[3H]clonidine結合増加作用はμMオーダで出現しpimozide, cis-flupenthixolで拮抗されるので（Fig.1）, DAレセプター, 中でもD1レセプター刺激を介してα2レセプターが増加すると思われる。pimozide, cis-flupenthixolは高濃度になるにつれてそれ自身が[3H]clonidine結合を抑制した(Fig.1)。



(* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, t-test)

Fig.2 Influences of incubation time and temperature on DA-induced increase in [^{3}H]clonidine binding

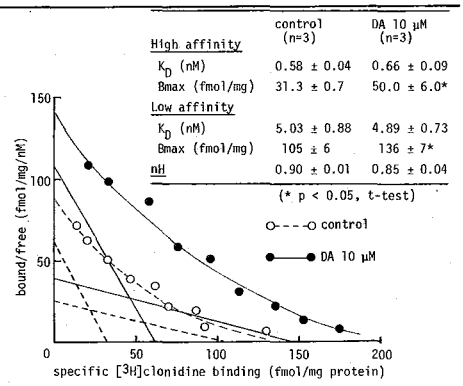


Fig.3 Scatchard plot of cortical [^{3}H]clonidine binding after pretreatment of DA

DAの[3H]clonidine結合増加作用はインキュベーションの時間と温度に依存しており(Fig.2)何らかの膜内機構を介していることが示される。さらにその作用をScatchard解析すると, 高・低両親和性結合成分のBmax値が有意に増加したがKD, nH値は変化しなかった(Fig.3)。従ってDA処置は対照群と同じ性質のα2レセプター分子数を増加することが示唆

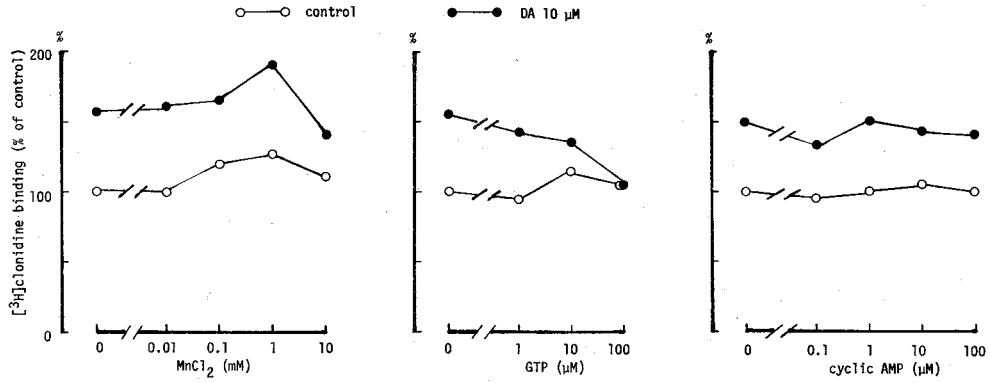


Fig.4 Influences of Mn^{2+}, GTP and cyclic AMP on DA-induced increase in [^{3}H]clonidine binding

される。先に報告[1,2]したように，isoproterenolによる[3H]clonidine結合増加は高親和性結合成分のBmax値上昇に基づいており低親和性結合成分は影響されないので，DAレセプタとβレセプター刺激で起るα2レセプター数増加には細部で差が認められる。

2) 大脳皮質粗シナプス膜DA処置効果におよぼすMn^{2+}，GTP，cyclic AMPの影響

$MnCl_2$は1 mMをピークとして[3H]clonidine結合を増加させるが，DAと$MnCl_2$を併用すると両者の作用が相加的に出現した(Fig.4)。従って膜におけるDAとMn^{2+}の作用部位は異ると考えられる。一方，GTPを添加するとDAの作用は減弱した(Fig.4)。この成績と1～100 μM DAが線条体シナプス膜のGTPaseを活性化するとの報告を合わせるとDA処置によるα2レセプター数増加にはGタンパクが介在する可能性が示された。cyclic AMPはDAの作用に影響しないのでアデニル酸シクラーゼ触媒単位は関与しないらしい。

3) 大脳皮質以外の脳部位膜標本でのDA処置効果

DA処置効果は他の7部位より得た膜標本でも認められた。その作用を対照群に対する比率でみるとD1レセプターが多く分布する線条体でも殆どない小脳でも大差なかった(dataは提示していない)。従ってα2レセプター数増加機構にはD1レセプター刺激以外の要因も含まれる。DAの作用は温度に依存しており(Fig.2)，phosphatidylethanolamine N-methyltransferase活性化が報告[8]されているので，他の要因として膜の流動性亢進によりマスクされていたα2レセプター分子が膜表面に露呈した可能性が考えられる。

4) まとめ

Isoproterenolおよび DA処置による結果から中枢神経系では促進性Gタンパク(Ns)を介してアデニル酸シクラーゼを活性化するアゴニストにより Nsに共役するα2レセプター数が増加する調節機構の存在が示唆された。

文献

1)Nomura, Y., Yotsumoto, I., Motomori, E., Kawai, M. and Segawa, T. (1983) Develop. Brain Res. 9, 381-384
2)Nomura, Y., Kawai, M. and Segawa, T. (1984) Brain Res. 302, 101-109 3)Simon, J.K., Contera, J.E. and Kuhar, M.J. (1976) J. Neurochem. 26, 141-147 4)Scatchard, G. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672
5)Rosenthal, H.E. (1967) Anal. Biochem. 20, 525-532 6)Lowry, O.H., Rosebrough, J.N., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol Chem. 193, 265-275 7)Onali, P., Olianas, M.C. and Costa, E. (1983) Eur. J. Pharmacol. 88, 279-280 8)Leprohon, C.E., Blusztajn, J.K. and Wurtman, R.J. (1983) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2063-2066

11 新生期，老化期ラット線条体シナプス膜 dopamine receptor—Ns (Ni)—adenylate cyclase 共役系機能

有馬　隆　（広島大・医・薬効解析）
野村靖幸　（富山医薬大・和漢薬研）
瀬川富朗　（広島大・医・薬効解析）

〔要　約〕

中枢神経系におけるドーパミンレセプター・アデニル酸シクラーゼ系の発育と加齢変化を明らかにする目的で、新生，成熟および老化のラット線条体シナプス膜アデニル酸シクラーゼ活性に及ぼすドーパミン (DA),NaF,forskolin,GppNHp および islet-activating protein (IAP) の影響を検討した。その結果，アデニル酸シクラーゼとリンクしているD-1レセプターは、新生期ですでに成熟に達しているが、老化期においては機能低下していること、また、これにカップルする促進性 GTP 結合調節タンパクにおいて、GTP に対する感受性は新生期では未熟であり、老化期で低下するが、NaF に対する感受性は新生期ですでに十分発育しており、加齢変化をうけないことが示唆された。さらに、GTP と NaF の作用部位が、Nsの異なる部位にあること。また触媒ユニットの forskolin に対する感受性は、新生期では低いが、成熟期より加齢に伴って変化しないことが示唆された。成熟期シナプス膜でforskolin により活性化されたアデニル酸シクラーゼは、GTP により抑制されたこと，このGTP の抑制効果は、IAP 前処置により消失したことから、線条体シナプス膜に抑制性 GTP 結合タンパク (Ni) が存在することが示唆された。

Key words : striatal dopamine receptor, GTP protein, adenylate cyclase

Ⅰ．緒言

ドーパミン(DA) レセプターは，アデニル酸シクラーゼを活性化する D-1 レセプターと、活性化しない D-2 レセプターに分類されていたが[1]、その後、促進性 GTP 結合調節タンパク (Ns) を介してアデニル酸シクラーゼを活性化する D-1 レセプターに対し、D-2 レセプターの刺激は抑制性 GTP 結合調節タンパク (Ni) を介してアデニル酸シクラーゼを抑制すると考えられるようになったが[5]、Ns,Niの存在，DA レセプター・Ns(Ni)・エフェクター系調節機構は不明である。今回，線条体シナプス膜DA レセプター・GTP タンパク・アデニル酸シクラーゼ系の機構，ならびにその発育と加齢変化を明らかにするため，7 日,70 日,2 年ラット線条体シナプス膜アデニル酸シクラーゼ活性に及ぼすDA の効果を調べるとともに，それぞれ活性化機構の異なる GTP,NaF,forskolinの効果についても検討した。さらにNi の存在およびアデニル酸シクラーゼ活性への関与を明らかにするため，forskolinにより活性化されたアデニル酸シクラーゼ活性に及ぼす GTP,GppNHp の影響と、IAP 前処置のこれらグアニンヌクレオチドの効果に及ぼす影響について検討した。

Ⅱ．方法

1)　実験動物および材料

a,　実験動物；　雌雄の Wistar系ラットを用いた。生後 7 日を新生ラット，約70 日を成熟ラット，約 2年を老化ラットとして用いた。

b,　材料；　IAP は北海道大学の宇井理生教授より分与されたものを使用した。

2)　粗シナプス膜調製；　線条体より粗シナプス膜をUsdinらの方法[6]に準じ調製した。

3)　IAP 処置；　IAP(最終濃度 25 μg/ml) を，20 mM dithiothreitol(DTT) で15 分間、

preactivating 後，粗シナプス膜と最終濃度 1 mM NAD,2 mM EDTA,1 mM ATP,10 mM thymidine,0.1 mM GTP と共に、30 分間incubate した。その後ice-cold buffer を加え、遠心分離し、3 回洗浄遠心をくりかえし、沈渣をアデニル酸シクラーゼ活性測定に用いた。

4) アデニル酸シクラーゼ活性測定： membrane suspension と各薬物を、40 mM TrisHCl(pH 7.4),4 mM $MgCl_2$,15 mM creatine phosphate,25 U/ml creatine kinase,0.6 mM EGTA,1 mM cAMP と共に、4°C で 20 分間放置し、最終濃度 1 mM ATP(1.3 μCi[^{3}H]-ATP 含有) を加え、30°C で 30分間 incubate した。なお、forskolin により活性化された本酵素活性に対する GTP の抑制活性の測定の場合には，さらに1 mM DTT,1 mM $CaCl_2$ を加え、基質として最終濃度 0.4 mM ATP(1.3 μCi[^{3}H]-ATP 含有) を用いた。反応液と等量の1 mM cAMP を添加，着沸し反応停止後遠心し、上清よりKrishnaらの方法[2]に準じてcAMP を分離しアデニル酸シクラーゼ活性を測定した。

5) タンパクはLowryらの方法により測定した。

Ⅲ. 成績

生後70日では，アデニル酸シクラーゼの basal activity は，325 ±12(pmol/min/mg.protein)，であり，100 μM DA, 100 μM GTP, 100 μM DA/100 μM GTP 10 mM NaF, 100 μM forskolin，によりそれぞれ約 1.4, 2, 2.6, 2.4, 10.8，倍有意に活性化された (Fig.1-B)。生後 7日においては、basal activity は、252±15(pmol/min/mg.protein)，であり、70日に比べて有意に ($P<0.05$)低かった。DA, DA/GTP, NaF, forskolin，によりそれぞれ約1.3, 1.5, 2, 7.1 倍有意に活性化されたが、GTP による活性化は認められなかった(Fig.1-A)。生後 2年において、basal activity は，208±12(pmol/min/mg.protein) であり、成熟期に比べ，有意に ($P<0.01$) 低下した。また、DA, GTP, DA/GTP，によりそれぞれ有意の影響を受けなかった。一方，NaF, forskolin，により約2.5, 12.2 倍と有意に活性化された(Fig.1-C)。

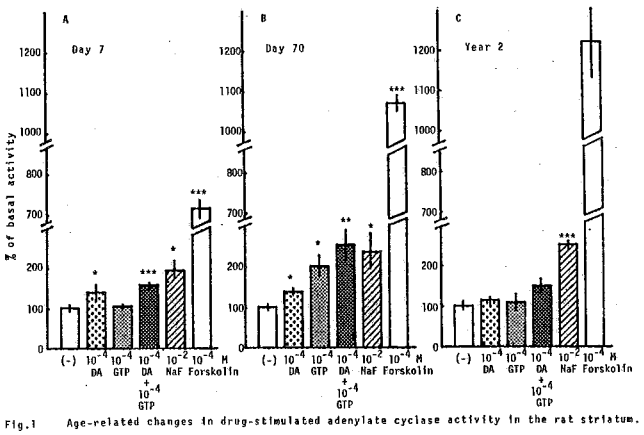


Fig.1 Age-related changes in drug-stimulated adenylate cyclase activity in the rat striatum.

成熟期シナプス膜アデニル酸シクラーゼ活性は、1 mM DTT, 1mM $CaCl_2$ 存在下 GTP, GppNHp, forskolin によりそれぞれ約 1.2, 1.8, 4.7 と有意に活性化されたが、forskolin/GTP 処置では forskolin 単独に比べて有意に低下し、forskolin /GppNHp 処置では、有意な活性化が認められた(Fig.2)。

forskolin によるアデニル酸シクラーゼの活性化は、1-100 μM GppNHp，添加によって有意に促進された(Fig.3-B)。1 μM GTP 添加により活性化の傾向が認められたが，10, 100 μM では有意な抑制効果が認められた (Fig.3-A) 。

IAP 処置膜での forskolin による活性化は、非処置膜のそれに比べ約 1.2 倍に増加した (成績略)。しかし、IAP 前処置膜では，アデニル酸シクラーゼ活性に対す

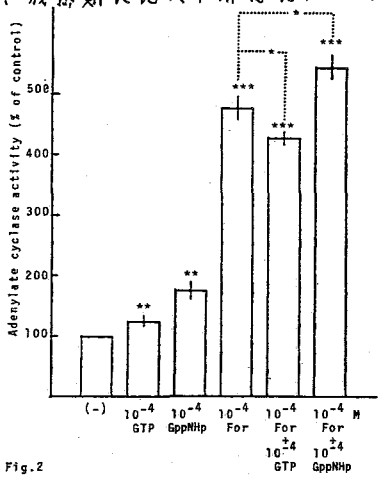


Fig.2 Effects of GTP,GppNHp and forskolin on striatal adenylate cyclase activity in adult rats. For: forskolin. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. control.

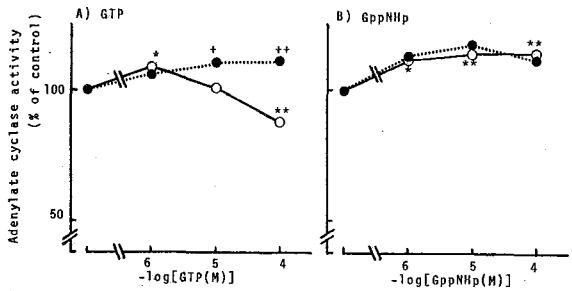


Fig.3 Effects of GTP and GppNHp on forskolin stimulated-activity of adenylate cyclase in control and IAP treated membranes.
○—○ control, ●·····● IAP treatment
* P<0.05, ** P<0.01 vs. GTP free(A) or GppNHp free(B).
+ P<0.05, ++ P<0.01 vs. control.
Control(forskolin 100 μM activated) adenylate cyclase activity was 158±3 pmol/min/mg.protein.

一は、7日ですでに機能しているが、これにカップルする促進性 GTP タンパク(Ns)は未発達であり、2年ではどちらも機能低下することが示唆された。

GTP は70日で有意に活性化したのに対し、7日,2年では活性化しなかった。NaFはいずれの時期においても同程度に有意に活性化した。このことより、Nsの機能として、NaFに対する感受性、ならびにNs-シクラーゼのカップリングは、7日ですでに十分発現しており、加齢変化をうけないことが示唆された。さらに、GTP と NaF の作用部位が、Nsの異なる部位にあるということも推定される。

forskolinは、S49 lymphomaのcyc⁻ mutantでもアデニル酸シクラーゼを活性化するという成績[3),4)]から、forskolinは触媒部位に直接作用することが示唆されている。したがって、触媒ユニットのforskolinに対する感受性は 7日ではまだ発現しないこと、さらに、加齢に伴う変化を受けないことが推定された。

成熟期の線条体シナプス膜において、forskolinによるアデニル酸シクラーゼの活性化は、10, 100 μM GTPの添加により抑制された。この相対的高濃度の GTPは、Niに作用しforskolin によって活性化されているアデニル酸シクラーゼ活性を抑制したのかもしれない。一方、GTP がforskolinの作用部位への作用を抑制する可能性も否定できない。しかし、NiをADP-リボシル化することにより特異的に失活させる IAP前処置すると、forskolinで活性化されたシクラーゼ活性に対する GTP の抑制効果が消失したので、GTP による抑制作用は、Niを介するものと考えられる。このことは、GTP と GppNHpに対し感受性の異なる2種の GTP タンパク,つまりNsとともに, GTP に感受性があり、GppNHp に感受性の低い、もしくは無い、Niが,線条体シナプス膜に存在することを示唆している。しかし、このNiは、D-2 レセプターにリンクするか否か不明であり、今後の重要な課題である。また、加齢による変化があるか否か、現在検討中である。

Ⅳ. 考察

DA, DA/GTP は、7日,70日で線条体シナプス膜アデニル酸シクラーゼを有意に活性化したが、2年では有意に活性化しなかった。また7日でDA/GTP は有意に活性化したが、DA単独の効果とほとんど変らず、GTP 単独の効果は認められなかった事実から、アデニル酸シクラーゼとリンクしている D-1 レセプタ

Ⅴ. 文献

1) Kebabian, J. W. & Calne, D. B. : Nature, 277, 93 (1979)
2) Krishna, G., Weiss, B. & Brodie, B. B. : J, Pharmacol. Exp. Ther., 163, 379 (1968)
3) Seeman, K. B. & Daly, J. W. : J. Biol. Chem., 256, 9799 (1980)
4) Seeman, K. B. & Daly, J. W. : J. Cyc. Nuc. Res., 7, 201 (1981)
5) Stoof, J. C. & Kebabian, J. W. : Nature, 294, 366 (1981)
6) Usdin, T. B., Creese, I. & Snyder, S. H. : J. Neurochem., 34, 669 (1980)

12 電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー（HPLC/ECD）を用いた脳内 acetylcholine, choline および acetylcholine turnover の測定

垣花　満・成実重彦・永岡明伸
（武田薬品・中研・生物研）

〔要　約〕

HPLC/ECD を用いた脳内 ACh および choline 量の簡便な測定法を確立した。脳組織を内部標準物質（EHC）を含む 0.05 N PCA+3.3 mM EDTA 溶液でホモジナイズした。遠心後、ACh および choline を共沈殿物 TEA 存在下 potassium periodide を用いて沈殿させた。遠心後、沈渣を acetonitrile に溶解し陰イオン交換樹脂（AG1-X8-Cl^-）を加え過剰の I_2 を除いた。Acetonitrile 溶液を N_2 ガスで濃縮乾固後、残渣を 100 μl の 0.02 M citrate phosphate buffer (pH 3.5) に溶解し、その 20 μl を HPLC/ECD に注入した。本方法の有用性を以下の実験で確認した。

1) 正常ラットの諸脳部位における ACh および choline 量を測定した結果文献値とよく一致した。

2) ACh turnover 測定への応用を試みた。ACh turnover は [^{3}H]-choline (1 mCi/kg, i.v.) 投与 1 分後の [^{3}H]-ACh/[^{3}H]-choline ratio に内因性 choline 量を掛けることにより算出した。Pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) 投与後 ACh 量は大脳皮質、海馬、線条体および小脳で有意に増加した。ACh turnover は測定したすべての脳部位で有意な減少あるいは減少傾向が認められた。Pentobarbital 投与後 TRH 類縁体 DN-1417 (5 mg/kg, i.v.) を処置することにより、これらの変化は拮抗された。

Key words : HPLC/ECD , ACh turnover , TRH analog DN-1417

脳内 ACh turnover を測定するには内因性およびアイソトープで標識された ACh と choline 量を同時に測定しなければならず、現在主に GC-MS を用いた方法[1]で行われている。しかし、装置が高価であることや前処理に時間を要することなどから、一般的な研究手段としては普及していない。1983年、Potter ら[4]は HPLC/ECD を用いた ACh および choline 量の測定法を開発し、この方法は ACh turnover 測定へも応用できることを指摘した。本研究では、Potter らの測定原理を利用し、脳からの ACh および choline の簡便な抽出、精製法を検討し、その方法を用いて 1) 正常ラットの諸脳部位における ACh と choline 量を測定した。2) ACh turnover 測定への応用を試み、ACh turnover を抑制することが報告[5]されている pentobarbital 睡眠時、および行動薬理学的に pentobarbital 睡眠に拮抗することが報告[3]されている DN-1417 処置時の ACh turnover を測定した。

〔実験方法〕

動物は 9-10 週令の雄性 Wistar ラットを用いた。Pentobarbital、DN-1417 および [^{3}H]-choline (80 Ci/mmol) は生理食塩水に溶解した。

ACh および choline の抽出、精製　ACh および choline の抽出、精製は Maruyama ら[2]の方法を改良して行った（Fig. 1）。脳組織を内部標準物質 EHC 5 nmol を含む 0.05 N PCA+3.3 mM EDTA 溶液でホモジナイズした。30000×g-15 分間遠心後、上清 500 μl 当り potassium periodide 溶液 100 μl および共沈殿物として 5 mM TEA 20 μl を添加し十分混和した。遠心後、

Abbreviations used: ACh, acetylcholine; DN-1417, γ-butyrolactone-γ-carbonyl-L-histidyl-L-prolinamide citrate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; EHC, ethyl-homocholine; HPLC/ECD, high-performance liquid chromatography with electrochemical detector; PCA, perchloric acid; TEA, tetraethylammonium chloride; TMA, tetramethylammonium chloride; SOS, sodium octyl sulfate; TRH, thyrotropin-releasing hormone

上清を吸引除去した。沈渣を800μlのacetonitrileに溶解し、陰イオン交換樹脂（AG1-X8-Cl^-）を加え撹拌することにより過剰のI_2を除いた。遠心後、上清400μlをN_2ガスで濃縮乾固した。残渣を0.02M citrate phosphate buffer (pH 3.5) 100μlに溶解し、その20μlをHPLC/ECDに注入した（但し、ACh turnover測定時は80μlを注入した）。

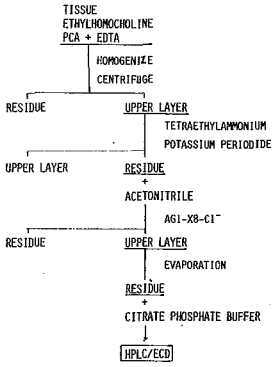


Fig. 1 Extraction procedure for acetylcholine and choline from brain tissue.

HPLC/ECD system　HPLC/ECDを用いたAChおよびcholineの定量はPotterら[4]の方法に準じて行った。分離用カラムは長さ10cm、内径4.6mmのChemcosorb 5-ODS-H (Chemco) を用いた。移動相は5.0 mg/l SOSおよび1.2mM TMAを含む0.01M sodium acetate buffer (pH 5.0) を用いた。

正常ラットの脳内AChおよびcholine量　ラットは頭部にmicrowave (5 kW、1.5 sec) を照射することにより屠殺した。脳を6部位に分け測定に用いた。

AChturnoverの測定　Pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) あるいは生理食塩水 (2 ml/kg, i.p.) 投与30分後およびpentobarbital投与10分後DN-1417 (5 mg/kg, i.v.) を投与しその20分後、[^{3}H]-choline 1 mCi/kgを尾静脈より注入した。1分後microwaveを照射して屠殺した。Fig. 1に従いAChおよびcholine量を測定した。測定後の流出液を1分毎に採取し、各分画に含まれる放射活性を測定した。AChturnoverはSchuberthら[5]の方法に従い[^{3}H]-ACh/[^{3}H]-choline ratioに内因性choline量を掛けることにより算出した。

統計処理　測定値はすべてmean±SEMで表わした。有意差検定には一要因分散分析およびその下位検定にTukey's testを用いた。

[結果および考察]

Fig. 2にはstandard溶液および線条体から抽出、精製したACh、cholineおよびEHCのクロマトグラムを、Fig. 3には検量線を示した。クロマトグラムよりcholine、EHCおよびAChのretention timeは各々4.2、8.2および13.8分であった。0.05N PCA + 3.3mM EDTA溶液500μlにEHC 5 nmolを加え、実際測定に使用するであろう範囲内でAChおよびcholine量を変化させた時、ACh/EHCおよびCholine/EHCのmole ratioとpeak height ratioとの間に直線関係が得られた。

正常ラットの大脳皮質、

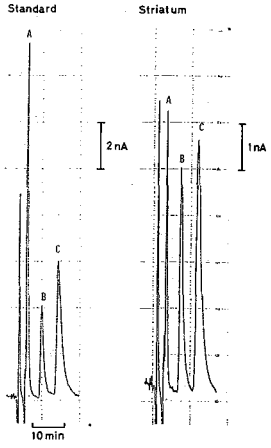


Fig. 2 Chromatograms of standard sample and brain tissue (striatum). Standard sample containing 5 nmols of acetylcholine (ACh), choline and ethylhomocholine (EHC) and tissue sample containing 5 nmols of EHC were extracted as described in Methods. Peaks shown are choline (A), EHC (B) and ACh (C).

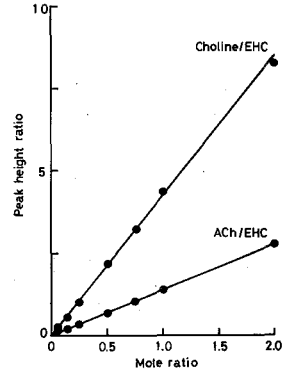


Fig. 3 Linearity of recoveries of ethylhomocholine (EHC) vs. acetylcholine (ACh) and choline. The quantity of EHC was constant (5 nmols).

海馬、線条体、間脳、小脳および脳幹におけるAChおよびcholine量をTable 1に示した。これらの値は我々がMaruyama ら[2]により報告された熱分解がスクロマトグラフィー法を用いて測定した値および文献値とよく一致した。

Table 1 The concentrations of acetylcholine (ACh) and choline determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detector (HPLC/ECD) and pyrolysis gas chromatography (PGC) in various brain regions of rats.

	HPLC/ECD	PGC[1]
	(nmol/g)	
Cerebral cortex		
ACh	17.4±0.5	22.0±0.7
Choline	17.2±0.5	19.8±0.6
Hippocampus		
ACh	26.1±1.7	30.9±1.4
Choline	20.9±0.6	25.3±1.0
Striatum		
ACh	59.9±4.1	65.0±2.7
Choline	25.3±1.5	31.6±1.7
Diencephalon		
ACh	32.5±1.4	34.1±0.5
Choline	18.7±0.1	22.7±0.9
Cerebellum		
ACh	7.4±0.5	7.5±0.5
Choline	18.8±0.3	22.5±0.8
Brain stem		
ACh	28.6±1.5	31.5±0.9
Choline	17.6±1.0	20.5±0.7
Number of rats	5	8

Values are the mean±SEM.
1) for details see ref. 2.

生理食塩水あるいはpentobarbitalを投与したラットおよびpentobarbital投与後DN-1417を処置したラットの諸脳部位におけるACh量、choline量、[^{3}H]-ACh/[^{3}H]-choline ratioおよびACh turnover値をFig. 4に示した。

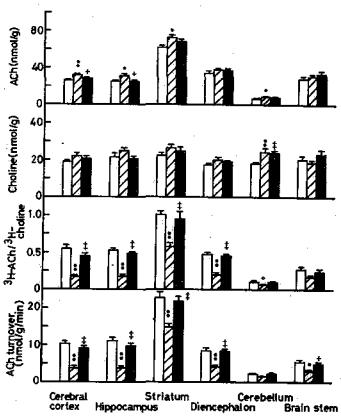


Fig. 4 Effect of DN-1417 on acetylcholine (ACh), choline and ACh turnover in various brain regions of pentobarbitalized rats. Values are the mean±SEM of 6-7 rats. Saline 2mL/kg (white column) or pentobarbital 40 mg/kg (striped column) was given i.p. 31 min before microwave irradiation. DN-1417 5 mg/kg (black colymn) was given i.v. 10 min after pentobarbital anesthesia. * p<0.05, ** p<0.01 vs saline. + p<0.05, ++ p<0.01 vs pentobarbital.

AChturnoverは脳部位で著しく異なり、生理食塩水投与群では線条体＞海馬＝大脳皮質＞間脳＞脳幹＞小脳の順であった。Pentobarbital睡眠時、ACh量は大脳皮質、海馬、線条体および小脳で有意に増加(18-27%)した。Choline量は小脳で有意に増加した。一方AChturnoverは大脳皮質、海馬、線条体、間脳および脳幹で有意な減少および小脳で減少傾向が認められた。減少の程度は脳部位で異なり大脳皮質(63%)および海馬(65%)で最も著しく、間脳(51%)、脳幹(44%)、線条体(35%)および小脳(25%)の順であった。Pentobarbital投与後DN-1417を処置した群では小脳のcholine量を除き、いずれの脳部位のACh量およびACh turnoverも生理食塩水投与群とほぼ同じレベルにまで回復した。

本研究では、脳からのAChおよびcholineの簡便な抽出、精製法を開発し、Potter ら[4]の原理を利用し、HPLC/ECDを用いたAChおよびcholine量の測定法を確立した。またこの方法でACh turnoverの測定が可能であることを示した。今後の神経化学的研究手段として役立つものと考えられる。

References

1) Jenden, D.J., Choi, L., Silverman, R.W., Steinborn, J.A., Roch, M. and Booth, R.A. (1975) Life Sci. 14, 55-63.
2) Maruyama, Y., Kusaka, M., Mori, J., Horikawa, A. and Hasegawa, Y. (1979) J. Chromatogr. 164, 121-127.
3) Miyamoto, M., Nagai, Y., Narumi, S., Saji, Y. and Nagawa, Y. (1982) Pharmac. Biochem. Behav. 17, 797-806.
4) Potter, D.J., Meek, J.L. and Neff, N.H. (1983) J. Neurochem. 41, 188-194.
5) Schuberth, J., Sparf, B. and Sundwall, A. (1969) J. Neurochem. 16, 695-700.

13 高速液体クロマトグラフィーによる人尿および動物組織中β－フェニルエチルアミンの定量

辻　元宏・大井　健・多賀千明・明神徹郎
高橋三郎

（滋賀医大・精神科）

〔要　約〕

高速液体クロマトグラフィーを用いた β-phenylethylamine (PEA) の高感度測定法を報告する。前処理として，Dowex 50, [H⁺] と Amberlite CG 50, [NH₄⁺] の2段階の PEA 分画の精製をおこなった。それらのイオン交換樹脂前処理の回収率は 98.2 ± 1.1 % であった。人尿および マウス組織に一定量の PEA を加えた回収率を求めたが同様な結果を得た。高速液体クロマトグラフィー系は，ODS カラム上で分離した PEA を O-phthal-aldehyde 溶液と反応させ，螢光検出器 (Ex 340 nm, Em-440 nm) で定量する系よりなっている。定量感度は 50pg－5ng の範囲で直線性を示した。この HPLC-FD系を用いたマウス各組織 (n=6) の PEA 濃度は，脳 5.62 ± 4.22，肺臓 15.23 ± 3.45，肝臓 14.70 ± 2.35，小腸 54.39 ± 13.11 ng/g wet tissue であり，心臓，脾臓，腎臓では検出不能であった。健常者尿中 PEA 濃度は，男性 (n=14, 30.6 ± 4.5才) は 7.31 ± 10.84 ng/mg cre.，女性 (n=20, 29.6 ± 9.1才) は 14.53 ± 13.67 ng/mg cre. であった。本法は既存の方法に比べ安価，簡便で小量の資料 (マウス脳 1コ，尿 0.1ml) を高感度に測定できる利点があり，今後 PEA の生理的意義の研究や，臨床応用の面で有用な手段と考えられる。

Key words : β-phenylethylamine, HPLC-FD, Human urine and animal tissues.

β-フェニルエチルアミン (PEA) は microamine の一種で，哺乳動物ではその存在が 1964年 Nakajima[1] ら，1973年 Edwards と Blau[2] により発見された。このアミンは，機能的に neuromodulator として作用していると言われ，アンフェタミンとの化学構造類似性から，精神分裂病や躁うつ病の病因物質として議論されている[3]。PEA は生体内に微量にしか存在しないアミン故にその定量法は困難をきわめるものであった[3]。現在までの定量法には，螢光法，ガスクロマトグラフィー法やガスマス法等があるが，螢光法は感度が低く，ガスマス法はランニングコストがかかり，またいずれの方法もアルカリ有機溶媒抽出を前処理でおこなうため煩雑さを伴なった。著者らは，PEA が Dowex 50 に強く吸着される性質を利用し 2段階の陽イオン交換樹脂を用いて PEA 分画を精製し，高速液体クロマトグラフィーによる PEA の安価，簡便で高感度の定量法を確立したので報告する。

＜材料と方法＞

材料．① JCR-ICR系マウスを断頭後すみやかに各組織を取り出し，－80℃に貯臓した。
② Pargyline 75 mg/Kg をマウスに投与し，経時的に脳を取り出し，PEA の定量に供した。
③ 健常者．男14名 (年齢 30.6 ± 4.5才，mean ± SD) および女性20名 (29.6 ± 9.1才) の尿を集め PEA の定量に供した。

試薬は一部アミノ酸分析用，螢光分析用の試薬を用いた。

尿中クレアチニン定量は Jaffe の変法によった。

マウス組織は g 当り 10 倍量の 7% メリクロロ酢酸でホモジネートし遠沈後その一部を Dowex 50 に吸着させた。人尿は 3ml を 0.3g の活性炭処理後その 2ml を Dowex 50 に吸着させた。

イオン交換樹脂；第1段階として Atack と Magnuesson[9] らの方法で活性化した Dowex 50, X8, 200～400 mesh, $[H^+]$, 1cm³ を用いた。第2段階として, Amberlite CG50, 100～200 mesh, $[NH_4^+]$ 1cm³ を用いた。カラムはいずれも BIO-RAD 社製目盛り付きショートカラムを用いた。

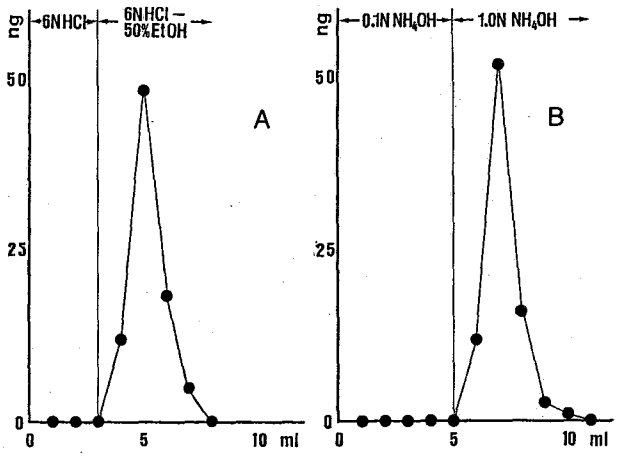


Fig 1. A: Dowex 50 $[H^+]$ 上の PEA の溶出パターン
B: Amberlite CG50, $[NH_4^+]$ 上の PEA の溶出パターン
いずれも PEA 100ng を用い, 液クロで定量

高速液体クロマトグラフィーの操作：島津社製 LC-5A を用い, カラムは Cosmosil (半井化学社製) 5 C_{18}-P, 4.6×150 mm, プレカラムとして 10 C_{18}, 4.6×50mm を用いた。カラム恒温槽 (CTO-2A) は 36°C で一定にした。移動層は 5% Acetonitril と 0.1mM EDTA を含む 0.05M クエン酸緩衝液, pH 4.5 で, 流速 0.8ml/min, カラム圧 62 kg/cm² で流した。反応系は, ポンプ (PRR-1A) と反応槽 (CRB) よりなり, 40°C の恒温で反応させた。反応液は, 1g/l o-phthalaldehyde と 2ml/l の 2-mercaptoethanol を含む 0.5M 炭酸緩衝液 pH 10.5 で流速 0.34ml/min で反応させた。螢光検出器 (RF-500) は, 励起波長 340nm, 螢光波長 440 nm で作用させ定量した。定量値の解析は, Chromatopac CR 2AX を用い, 2点検量線法 (100 pg ～ 5ng) で行なった。

<結果>

Fig 1, A に, Dowex 50, X8, 200～400 mesh $[H^+]$ 上の PEA の溶出パターンを示した。PEA は Dowex 50 に強く吸着され, 6 規定塩酸 3 ml では溶出されず, 6 規定塩酸－50% エタノール 5ml で溶出された。この分画を減圧乾固後, 小量の水に溶解し, Amberlite CG-50, 100～200 mesh $[NH_4^+]$ 上で展開させたのが, Fig 1 B である。1 規定アンモニア 6ml で溶出されるので, 減圧乾固し PEA 分画とした。PEA の回収率はそれぞれ 2 段階のイオン交換樹脂を用いた場合, 98.2±1.1% (n=8, 2.5ng) であった。脳 (n=8, 1ng; n=8, 5ng), 尿 (n=8

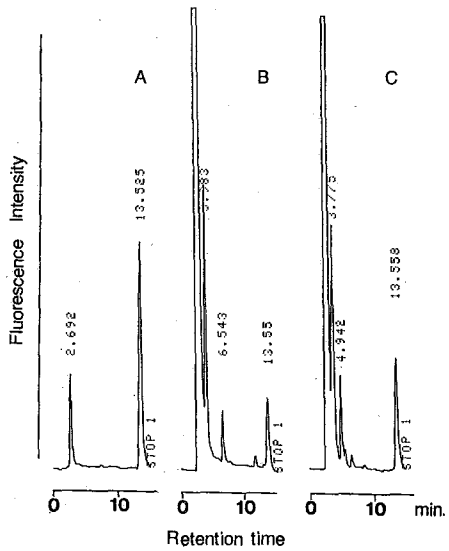
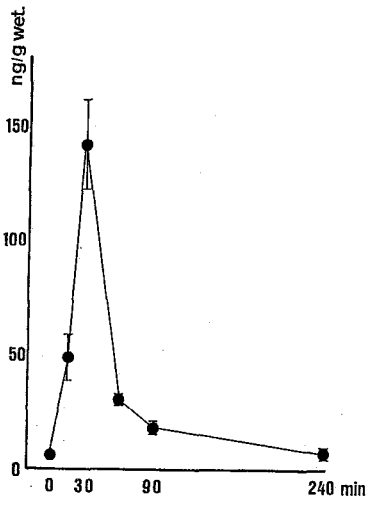


Fig 2 高速液クロの溶出パターン
A: PEA 1ng 標準液
B: 脳の PEA 分画
C: 尿の PEA 分画

, 10 ng) に PEA を一定量加えた回収率も同様の結果を得た。PEA 分画を 600 ul の移動層緩衝液に溶解し，脳の場合 25～50 ul，尿の場合 25ul，組織の場合 50～200 ul を液クロに注入した。Fig 2 に典型的なカラムパターンを示した。Fig 2 A は 1ng PEA 標準液のパターンであるが，レテンションタイムは 13.5 分であった。Fig 2. B，Fig 2. C はそれぞれマウス脳 (1コ，約 400mg)，の PEA 分画 50ul，尿 (2ml) の PEA 分画 25ul を注入した時のパターンを示すが，いずれも完全に Base line で分離され，PEA のレテンションタイムに溶出される夾雑物は認められなかった。この高速液クロ系における coefficient of variation は (PEA 1ng , n=8), 2.1% であり，高感度な再現性を示した。この液クロ系を用いてモノアミン酸化酵素阻害剤，Pargyline 75mg/kg をマウス腹腔内に投与し，脳内 PEA の経時的変化を追跡したのが Fig. 3 である。投与後 30 分で最大値を示し，以降急速に減衰した。人尿および動物組織中の PEA 濃度を Table 1 に示した。男子尿は，0.415～43.319 ng/mg cre. と大きなばらつきを示し，女子尿もまた 0.937～51.201 ng/mg cre. とばらついていた。また 1ml 中のクレアチニン値と PEA 濃度間には相関性は認められなかった。動物組織では，小腸が最も高値を示し他に，肺臓，肝臓，脳にみいだされたが，心臓，腎臓，膀臓では検出不能であった。

Fig 3. Pargyline の脳内 PEA 濃度への影響



Human Urine	Male	(n=14)	7.31 ± 10.84 ng/mg cre.
	Female	(n=20)	14.53 ± 13.67 ng/mg cre.
Mouse Tissues (n=6)	Brain		5.62 ± 4.22 ng/g wet.
	Lungs		15.23 ± 3.45 ng/g wet.
	Heart		n.d.
	Liver		14.70 ± 2.35 ng/g wet.
	Small Intestine		54.39 ± 13.11 ng/g wet.
	Kidneys		n.d.
	Spleen		n.d.

n.d. : not detectable.

Table. 1 各サンプル中の PEA の濃度

<考察>

今までの多くの PEA の測定法は，感度や経費の面で一長一短があり，しかも煩雑な有機溶媒抽出をくりかえすので，多数のサンプルの測定を短時間でおこなうのは不可能であった。著者らの方法は 1 人で 30 サンプルを 2 日間で定量することが可能で，高感度で安価であるため，今後 PEA の生理的意義の研究手段として，有効なものと考えられる。この定量系で最も重要なポイントは，Dowex 50 がそれ自体に強力な蛍光夾雑物を含むので，Atack と Magnusson による Dowex 50 の活性化が必要不可欠な条件であることである。

文献 1) Nakajima, T., Kakimoto, Y and Sano, I. (1964). J. Pharmacol. Exp. Ther. 143, 319.
2) Edward, D. J. and Blau, K. (1973). Biochem. J. 132, 95.
3) Usiu, E and Sandler, M (1976). Trace amine and the Brain, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel.
4) Atack, C and T. Magnusson (1978). Acta. Pharmacol. Toxicol. 42, 35.

14 肝再生におけるセロトニンの役割 — 分化増殖に関して

山田尚登・辻　元宏・高橋三郎
（滋賀医大・精神科）

〔要　約〕

セロトニンは、体内の各組織に存在し、中枢神経系では神経伝達物質として働いていると報告されているが、その他の生理的役割に関しては不明な点が多い。[1] 我々は、以前小脳失調モデルマウスを用いた実験で、[2] セロトニン系が分化増殖に関与するのではないかという仮説をもち、それを明らかにする為に再生肝のDNA合成，セロトニン及びその代謝物，MAOを測定した。

その結果、MAOには著明な変化は認められなかったが、5HIAAは肝部分切除後12時間で著明な増加を示し、3DNA合成も24時間で著明な増加を示した．そしてこの2つは類似の動態を示した。さらに5HOLは、肝再生のstopper情報が出されると考えられる時期に著明な増加を示した。これらの事は、セロトニン系が分化増殖に関与しているという仮説をより確かなものとし、5HIAAが分化の初期情報として、5HOLがstopperとして働いている可能性を示唆している．さらに、セロトニン系の神経支配を受けていない肝臓で、セロトニン及びその代謝物が著明に変化した事はセロトニン系が体液性の支配を受けている可能性を示唆している。

Key words： Regenerating liver, Differentiation and proliferation, Serotonin and its metabolites.

セロトニン（5HT）は．動物や植物組織中に広く分布しており、哺乳類ではこのアミンは．脳以外に小腸，血小板などの種々の臓器で大量に検出される。中枢神経系では、神経伝達物質として作用していると報告されているが、それ以外の生理的役割に関しては不明な点が多い。[1] 我々は以前、DNA－polymerase 阻害剤である、Cytosine arabinoside（Ara－C）を小脳ニューロン形成期に投与した小脳失調モデルマウスを用いて、小脳の萎縮と5HT及びその代謝産物である5－hydroxyindole acetic acid（5HIAA），5－hydroxy tryptohol（5HOL）の著明な変化を見い出した。[2] さらに、5HT及びその代謝物は、他の臓器に比べ小腸などの分化増殖が盛んに行なわれている臓器で高値をとっている事を見い出した。これらの事から5HT系が神経伝達物質としての役割だけでなく、他機能とくに分化増殖に何らかの関連をもつのではないかとの仮説をより明らかにする為に、肝再生時における(6－^{3}H)thymidine の肝への取り込み、5HT及びその代謝物，MAOの測定を行った。

〈方法〉

1）再生肝の作製：JCL－ICR系雄マウス10周令を用い、Higgins & Anderson[3] の方法を用いて肝を70%部分切除した。マウスは手術後断頭により、0，30分，1，2，6，12時間，1，2，3，6，9，15，23，46日に8匹づつ屠殺し、生理食塩水で還流後肝をとり出した。

2）DNA合成速度の測定：DNAの合成は、肝臓への（6－^{3}H）thymidine の取り込みによって測定した。10μCi の（6－^{3}H）thymidineを屠殺前2時間に腹腔内に注射した。取り出された肝臓は、5%TCA中でホモジネートし、遠沈後沈渣を10%TCAで3

回洗浄した後、5%TCA中90℃で水解した後遠沈し、その上清中の放射能を測定した。DNAはジフェニールアラニン法を用いて定量した。[4]

3) インドール体の定量：Falkowski[5]らの方法を一部改変して用いた。

4) MAOの測定：Axelrod[6]の方法を用いて測定した。肝臓をホモジネートし、その0.1 mlに^{14}C-セロトニン0.1μCiを加え、リン酸緩衝液中37℃で反応させた後3N塩酸で反応を止め、反応代謝物を酢酸エチルで抽出し、放射活性を計測した。蛋白量は、VIO RAD社のprotein assay kitを用いて定量した。

<結果>

約70%の部分肝切除後、残された肝臓の増殖を全湿重量で示したものがFig. 1である。肝重量は、手術後6時間から徐々に増加しはじめている。

肝細胞への(6-^{3}H)thymidineの取り込みによって調べられた部分肝切除後のDNA合成の速度の経時的変化はFig. 2に示される。肝切除後のDNAの合成は、24時間まで有意な変化を示さないが、24時間より著明に増加し2日で最大（1日と比べ23.1倍）となり、その後減少した。

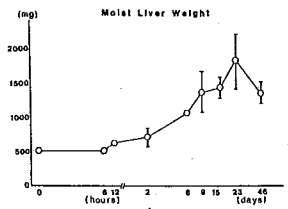


Fig. 1

The increase (mg) in weight of regenerating liver after partial hepatectomy.

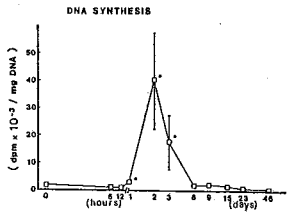


Fig. 2

The rate of DNA synthesis in regenerating liver after partial hepatectomy measured by determining the incorporation of (6-3H)thymidine into DNA. Statistically significant differences between value in 0 time and the other time are indicated as follows by Student-T (*P < 0.001).

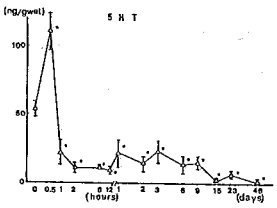


Fig. 3-a

Temporal pattern of concentration of 5-HT change in regenerating liver.

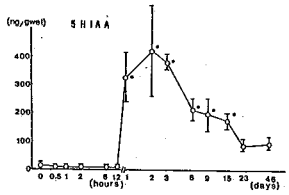


Fig. 3-b

Temporal pattern of concentration of 5-HIAA change in regenerating liver.

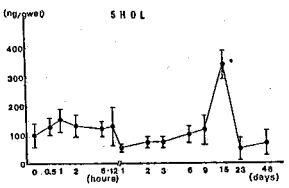


Fig. 3-c

Temporal pattern of concentration of 5-HOL change in regenerating liver. Statistically differences between value in 0 time and the other time are indicated as follows (*P < 0.001).

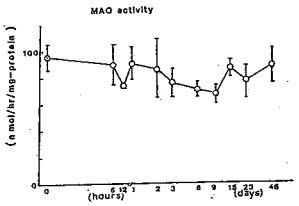


Fig. 4

Temporal pattern of MAO activity in regenerating liver. As a substrate, 5-HT was used.

肝切除後の5HT及びその代謝産物の経時的変化を示したものがFig. 3-a, 3-b, 3-cである。5HTは、部分肝切除後30分で0分値の2倍となり、その後減少していった。5HIAAは、部分肝切除後12時間までは有意な増加を示さないが、12時間から24時間にかけて著明に増加した。2日目にピークを示し湿重量あたり30倍となり、それ以後は次第に減少した。5HOLは、肝切除後9日目までは有意な増加を示さないが、9日から15日にかけて約3倍の増加を示し、その後減少した。

図4には部分肝切除後のMAO活性の変化を示しているが、上記の5HT及びその代謝物に著明な変化が認められるのにもかかわらず、MAO活性には有意な変化は認められなかった。

<考察>

胎児や中枢神経系の発達段階で、５ＨＴ及びその代謝物が重要な役割りを果たしているという報告もいくつかなされている。[7-10] 我々も以前、小脳天調モデルマウスでインドール体の著明な変化を観察し、インドール体が単に神経伝達物質として作用するだけでなく、分化増殖に関与する可能性を推察した。

今回の実験では、肝臓の再生期にＤＮＡの合成と５ＨＩＡＡの経時的変化が似た様な動きを示し、ＤＮＡ合成の著明な増加に先がけて５ＨＩＡＡの著明な増加が起こる事が明らかとなったが、この事は５ＨＩＡＡが肝再生の初期情報として重要な意義をもつ可能性を示している。さらに、５ＨＯＬが肝部分切除後９日目までは有意な変化を示さず、９日目より急に増加し15日で最大値を取った事は注目せねばならない。すなわち肝再生時のstopper情報が出ると考えられる時期に最大値をとった事は、その可能性を示唆するものである。

次に、セロトニン系の神経支配を受けていない肝臓で５ＨＴ及びその代謝物が著明に変化した事は興味深い所見である。この事は分化増殖の際に５ＨＴ及びその代謝物が体液性に働く可能性を示している。

今回の実験では、５ＨＴ系が分化増殖に関与しているのではないかという仮説をより確かなものとし、５ＨＩＡＡが初期情報として、５ＨＯＬが再生のstopperとして体液性に働く可能性を示唆した。しかしながら、５ＨＩＡＡならびに５ＨＯＬを誘導するＭＡＯに変化が見られなかった。この５ＨＴ系の代謝動態に関し、今後検討を加えていきたい。

REFERENCES

1. ANDRES GOTH, Medical Pharmacology, p. i98 (1978)
2. M. TSUJI, N. YAMADA et al, Development Brain Res. (in print)
3. G.M. HIGGINS and R.M. ANDERSON, Arch. Pathol. 12 186-202 (1981)
4. K. BURTON, Biochem. J., 62 315-323 (1956)
5. A.J. FALKOWSKY and R. WEI, Anal. Biochem., 115 311-317 (1981)
6. WURTMAN and AXELROD, Biochem. Pharmacol. 12 1439 (1963)
7. P.C. BAKER et al, Brain Res. 12 273-295 (1969)
8. G.A. BUZNIKOV et al, J. Embry. Exp. Morph., 12 563-573 (1964)
9. T. GUSTAFSON and M. TONEBY, Exp. Cell Res.., 62 102-117 (1970)
10. J.M. LAUDER, Psychoneuroendocrinology, 8 121-155 (1983)

15 細胞レベルにおけるカテコールアミン，モノフェノールアミン受容の薬理学的分類
— 軟体動物巨大神経細胞による —

庫　宝善・竹内　宏
（岐阜大・医・Ⅰ生理）

〔要　約〕
1．アフリカマイマイ神経節中に同定される8個の巨大神経細胞は，カテコールアミン（CA）あるいはモノフェノールアミン（MA）に感受性を持つ．これらの物質群に対するレセプターの薬理学的分類を細胞レベルで行なうために，8個の神経細胞に対する，CA，MA，フェニールアミンなどの作用を比較検定した．
2．巨大神経細胞5個（PON，TAN，l－VMN，VIN，d－RPeAN）はCAに，3個（FAN，d－LPeLN，d－LCDN）はMAに感受性を示した．
3．CAに感受性を持つ5個のうち，PONにはドーパミン（DA）が最も強い興奮作用を示し，エピニン（EP）がやや弱い同じ作用を呈した．TAN，l－VMNおよびd－RPeANの3個に対しては逆に，EPが最も強い抑制作用を示し，DAがやや弱い同じ作用を呈した．一方VINに対しては，4つのCAすなわちDA，EP，L－ノルエピネフリン，L－エピネフリンが，同程度に興奮作用を示した．
4．MAに感受性を示したFAN，d－LPeLN，d－LCDNに対するこれら物質群の構造活性連関は，よく似通っていた．d－LPeLNにはDL－オクトパミン（DL－OA）が最も強い興奮作用を，FANとd－LCDNにはDL－OAが最も強い抑制作用を示した．これらには，ついでDL－シネフリンが同じ作用を示した．
Key words: Catecholamines, Monophenolamines, Molluscan giant neurones.

Ⅰ．はじめに

アフリカマイマイ（Achatina fulica Ferussac）の神経節中には，自発発火を持ち，カテコールアミン（CA）あるいはモノフェノールアミン（MA）に感受性を示す神経細胞が，8個同定される（1，2，3，4，6，7）．

本研究では，これら物質群のレセプターの薬理学的分類を細胞レベルで行なうために，8個の神経細胞に対するCA，MA，フェニールアミン（PA）およびその関連物質の作用を，比較検定した．

Ⅱ．材料と方法

実験動物は，沖縄より空輸された（浦添市，コーヨー薬品K．K．の御好意による）．この神経節における8個の神経細胞の位置を，図1に示す．これらの細胞は，食道下（複合）神経節のなかでは，右体壁神経節にPON（periodically oscillating neurone）とTAN（tonically autoactive neurone），内臓神経節にl－VMN

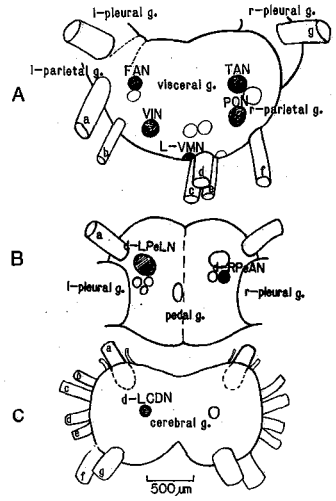


図1．本研究でもちいられた巨大神経細胞の位置．
A．食道下神経節背側面．
B．足神経節（食道下神経節）．
C．脳神経節背側面．

表Ⅰ．アフリカマイマイ神経節中に同定された８個の巨大神経細胞に対する，物質群

番号　物質名	――右体壁神経節――		――内臓神経節――	
	PON	TAN	1-VMN	VIN
1. L-Phenylalanine	(-:4)	(-:3)	(-:3)	(-:4)
2. β-Phenylethylamine	(-:3)	(-:4)	<0.0006(I/-:6)	(-:4)
3. DL-β-Phenylethanolamine+	(-:3)	(-:3)	(-:3)	(-:4)
4. L-Tyrosine	(-:4)	(-:3)	(-:3)	(-:5)
5. Tyramine	<0.06(E/-:4)	(-:4)	0.0006(I:4)	(-:4)
6. DL-Octopamine+	0.06(E:6)	0.06(I:11)	0.0006(I:19)	0.02(E:11)
7. DL-Synephrine+	0.06(E:5)	0.06(I:7)	0.0006(I:15)	0.03(E:5)
8. L-DOPA	(-:4)	(-:3)	<0.0006(I/-:4)	(-:3)
9. Dopamine	1.0(E:12)	0.3(I:15)	0.3(I:25)	1.0(E:23)
10. L-Norepinephrine	0.1(E:9)	0.1(I:13)	0.003(I:11)	1.0(E:16)
11. L-Epinephrine	0.1(E:8)	0.1(I:12)	0.03(I:11)	1.0(E:18)
12. Epinine	0.3(E:12)	1.0(I:17)	1.0(I:23)	1.0(E:15)
最も作用の強い物質の最小有効濃度	3×10^{-5} M	3×10^{-5} M	3×10^{-7} M	10^{-5} M

物質の作用は５ｘ１０$^{-4}$ Ｍのバス（bath）投与により，スクリーニングされた．括作用強度指数（EPR）．（Ｅ：），興奮性作用．（Ｉ：），抑制性作用．（Ｅ／－：）奮性作用，時々作用なし．（－），作用なし．（：括弧内の数字），実験例数．最もめ１０$^{-3}$ Ｍでスクリーニングされた．＊，これがＤＬ体のため，他のＤＬ体でない

(left-visceral multiple spike neurone)，ＶＩＮ (visceral intermittently firing neurone)およびＦＡＮ (frequently autoactive neurone)（以上図１，Ａ）足神経節にｄ－ＲＰｅＡＮ (dorsal-right pedal autoactive neurone)とｄ－ＬＰｅＬＮ (dorsal-left pedal large neurone)（同，Ｂ），また脳神経節のなかでは，ｄ－ＬＣＤＮ (dorsal-left cerebral distinct neurone)（同，Ｃ）である．

本研究で作用を検定された物質群を，表１に記す．これらはアフリカマイマイの生理溶液（５）に溶解し，バス（bath）投与により５ｘ１０$^{-4}$ Ｍの濃度でスクリーニングされた．各物質の作用の強さは作用強度指数（effective potency range,ＥＰＲ）により，標示された．これは最も作用の強い物質（ＥＰＲ：１．０）の作用強度を基準にして，定められた（作用強度が半分なら，ＥＰＲ：０．５）．

III．結果と考察

本研究で得られた実験結果を，表１にまとめた．またその大意を，「要約」の項に記した．

ＣＡに感受性を持つ５個の神経細胞は，ＣＡ，ＭＡの構造活性連関より，以下の３群に分けられる．（１）ドーパミン（ＤＡ）に最も強い反応を示し，ついでエピニン

の作用強度指数（effective potency range, ＥＰＲ）．

———	——足神経節———		脳神経節
FAN	d-RPeAN	d-LPeLN	d-LCDN
(-:6)	(-:4)	(-:3)	(-:3)
(-:3)	(-:4)	(-:3)	(-:3)
(-:3)	(-:4)	(-:3)	(-:3)
(-:7)	(-:5)	(-:3)	(-:3)
(-:4)	(-:4)	(-:3)	(-:3)
1.0(I:26)	0.03(I:23)	1.0(E:19)	1.0(I:20)
0.3(I:19)	0.01(I:21)	0.1(E:16)	0.3(I:10)
(-:6)	(-:3)	(-:3)	(-:3)
<0.2(I/-:13)	0.1(I:20)	<0.02(I/-:9)	0.1(I:20)
(-:8)	0.01(I:15)	<0.02(I/-:6)	0.03(I:18)
(-:8)	0.03(I:14)	<0.02(I/-:7)	0.03(I:17)
0.2(I:13)	1.0(I:21)	0.02(I:11)	0.03(I:12)
2×10^{-4} M*	10^{-6} M	2×10^{-5} M*	2×10^{-6} M*

弧外の数字，最も作用の強い物質との比較による各物質の，弱い抑制性作用，時々作用なし．（Ｉ／－：），弱い興作用の強い物質の数値には下線を引いた．＋，ＤＬ体のた物質の EPRは，この記載濃度の半分を用いて計算された．

（ＥＰ）に対してＤＡよりもやや弱い反応を示すもの（ＥＰＲ：０．３）（ＰＯＮ：興奮作用）．（２）ＥＰに最も強い反応を示し，ＤＡにはやや弱い反応を示すもの（ＥＰＲ：０．３－０．１）（ＴＡＮ，１－ＶＭＮ，ｄ－ＲＰｅＡＮ：抑制作用）．（３）ＤＡ，ＥＰ，Ｌ－ノルエピネフリン，Ｌ－エピネフリンに同等に反応するもの（ＶＩＮ：興奮作用）．

以上の３群のうち，とくにＥＰに強く反応する神経細胞には，ＣＡは抑制作用を示す．このことは，この両者の間に何らかの因果関係が存在することを，考えさせる．またある神経細胞では，ＤＡよりもＥＰの方が作用が強い（とくにｄ－ＲＰｅＡＮではＤＡのＥＰＲ：０．１）．このことから，ＤＡだけでなく，ＥＰにも神経伝達物質候補である可能性があると思われる．一般にＣＡ感受性細胞は，ＭＡにはきわめて弱い作用（ＥＰＲ：０．０３－０．０００６）があるに過ぎない．

ＭＡ感受性細胞（ＦＡＮ，ｄ－ＬＰｅＬＮ，ｄ－ＬＣＤＮ）には，いずれもＤＬ－オクトパミン（ＤＬ－ＯＡ）が最も強い作用を示した．ついでＤＬ－シネフリンが，ＤＬ－ＯＡと同じ作用（ＥＰＲ：０．３－０．１）を示した．これらに対するＤＡ，ＥＰなどのＣＡの作用は，細胞により異なるが，一般にＭＡよりもかなり弱かった．

ＰＡは本研究でもちいた８個の神経細胞には，ほとんど作用を示さなかった．

本研究の１部は，加藤記念医学生理学研究助成金により，支えられた．

References
(1) Ku, B. S. and Takeuchi, H. (1983) Comp. Biochem. Physiol., 75C, 103-110.
(2) Ku, B. S. and Takeuchi, H. (1983) Comp. Biochem. Physiol., 76C, 99-106.
(3) Ku, B. S. and Takeuchi, H. (1984) Comp. Biochem. Physiol., 77C, 315-321.
(4) Takeuchi, H., Mori, A. and Kohsaka, M. (1974) C. R. Soc. Biol. 168, 653-658.
(5) Takeuchi, H., Morimasa, T., Kohsaka, M., Kobayashi, J. and Morii, F. (1973) C. R. Soc. Biol. 167, 598-602.
(6) Takeuchi, H., Yokoi, I., Mori, A. and Kohsaka, M. (1975) Gen. Pharmacol., 6, 77-85.
(7) Yokoi, I. (1980) Comp. Biochem. Physiol., 65A, 513-516.

16 アミン合成阻害剤によるラット脳内部位別チアミンリン酸エステルの変化について

米川　賢　（広島大・医・精神科）
金谷俊則　（吉田総合病院・精神科）
真島宏海・更井啓介　（広島大・医・精神科）

〔要　約〕

通常飼料で飼育したラットにカテコールアミン代謝阻害剤の L-α-methyl-p-tyrosine, pargyline, およびフザリン酸とインドールアミン代謝阻害剤の parachlorophenylalanine を投与し，脳内部位別（大脳皮質，線条体，中脳，視床＋視床下部，小脳および橋＋延髄）の thiamine リン酸エステル濃度を HPLC で測定した。対照群の総 thiamine と thiamine monophosphate は部位間に差はなかった。thiamine diphosphate では小脳，橋＋延髄，大脳皮質が視床＋視床下部に比べて有意に高濃度であった。thiamine triphosphate では，小脳は線条体，中脳および視床＋視床下部に比べて有意に高濃度であった。更に代謝阻害剤による脳内 thiamine の代謝回転を総 thiamine に対する thiamine リン酸エステルの比で検討した。いずれの代謝阻害剤も，その種類にかかわらず thiamine 代謝回転を低下させた。また部位によって thiamine 代謝回転に差が認められた。これらの結果から脳内アミン代謝と thiamine 代謝との関連性が推測された。

Key words : Thiamine phosphate esters, Amine synthesis inhibitors, Rat brain.

thiamine は thiamine diphosphate の形で補酵素作用を示す以外に，神経系において神経伝導，神経伝達機構に何らかの形で関与していると考えられている[1]。この面での多くの研究が thiamine 欠乏動物を用いて行なわれたが，thiamine のリン酸エステルと神経伝達物質との関連は未だに明らかになっていない。今回，われわれはカテコールアミン，インドールアミン代謝阻害剤を通常飼料で飼育したラットに投与し，脳内部位別 thiamine リン酸エステルの変化を検討したので報告する。

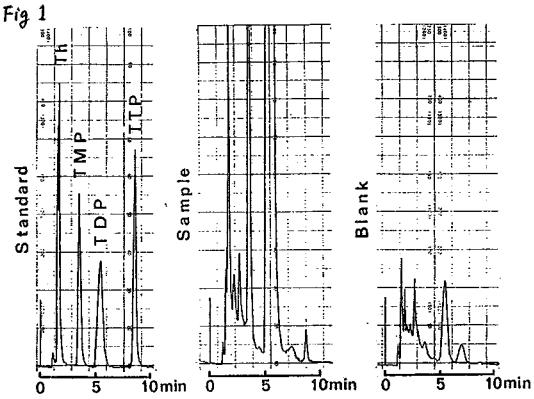
対象と方法

実験動物は Sprague-Dawley 系雄ラット（実験開始時体重 200～250 g）を用いた。飼育条件は実験開始前 2 週間，24℃の恒温室において 7～19 時を明期とする 12 時間毎の明暗サイクル下で，1 ケージに 5 匹ずつ入れて，オリエンタル酵素社製の MF 食で飼育した。カテコールアミン代謝阻害剤は L-α-Methyl-p-tyrosine（α-MT, 250 mg／Kg），pargyline（75 mg／Kg），フザリン酸（150 mg／Kg）をラットの腹腔内に投与し，α-MT 群は 12 時間後，pargyline 群は 45 分後，フザリン酸群は 4 時間後に断頭した。インドールアミン代謝阻害剤は parachlorophenylalanine（pcpA）250 mg／Kg を腹腔内に投与し，22 時間後に断頭した。対照群は無処置群を用いた。断頭後，すみやかに脳をとり出し，氷冷下で Glowinski らの方法に従い，大脳半球の大脳皮質，線条体，中脳，視床＋視床下部，小脳および橋＋延髄の 6 分画に分け，抽出まで－80℃で保存した。

抽出は Ishii ら[3]の方法を若干変更した。すなわち，2 匹分の各分画を 1 検体として重量を測定した後，3 倍量の 10% TCA を加え，ポリトロンヌは超音波破壊器でホモゲ

ナイズし，冷却遠心（20,000 g × 20分）を行なった。得られた上清にエーテルを等量加え，5分間攪拌し，TCAを除去した。この操作を3回くりかえした後，エーテル層を捨てた。得られた試料に対し，0.3M BrCN，つづいて1N NaOHを8/1/1（V/V/V）で加え，アルカリフロムシアン化を行ない，その20μlをHPLCに注入した。測定は螢光検出器を備えた日本分光trirotar II，FR110A型で，固定相はLichrosorb NH_2（10μ，4.6×250mm，メルク社）のカラムを用いた。移動相は0.1Mリン酸緩衝液（pH 8.1）/アセトニトリル（60/40）を1ml/minで流した。定量計算はchromatopac CR1-B（島津製）を用いて，thiamine（Th），thiamine monophosphate（TMP），thiamine diphosphate（TDP），thiamine triphosphate（TTP）のそれぞれ2 pmol/20μl injectionを標準物質にして，絶対検量線法を用いた（Fig1）。統計学的処理はt検定で行なった。

Fig 1



Chromatograms of thiamine and its phosphate esters

結果および考察

①対照群（n=7）の脳内部位別TMP，TDP，TTP濃度及び総thiamineに対するそれぞれのリン酸エステルの比率をtable 1に示す。TMPは部位間に濃度差は認められなかった。TDPは小脳，橋＋延髄，大脳皮質の順に高く，TTPは小脳，大脳皮質，橋＋延髄，線条体の順に高く，これらの結果はDreyfusの報告[2]と一致した。また総thiamineに対するリン酸エステルの比率はTMPでは線条体と中脳で高く，TDPは大脳皮質と小脳で高く，またTTPは大脳皮質，線条体および小脳で高かった。

Table 1
Regional thiamine phosphate esters concentration in control rat brain

	TMP	TDP	TTP	total thiamine
	(n moles/g wet weight)			
cortex	※1.88 ± 0.41 (17.4 ± 3.7)	8.45 ± 0.75 (78.3 ± 4.2)	0.16 ± 0.04 (1.5 ± 0.4)	10.78 ± 0.66
striatum	2.55 ± 0.64 (27.1 ± 6.6)	7.50 ± 0.58 (70.7 ± 5.4)	0.14 ± 0.03 (1.5 ± 0.4)	10.60 ± 0.35
midbrain	2.44 ± 0.31 (23.0 ± 2.1)	7.61 ± 0.77 (71.6 ± 2.0)	0.12 ± 0.02 (1.1 ± 0.1)	10.63 ± 1.03
thalamus + hypothalamus	2.14 ± 0.48 (21.3 ± 3.5)	7.35 ± 0.40 (73.8 ± 3.4)	0.12 ± 0.02 (1.1 ± 0.2)	9.97 ± 0.72
cerebellum	2.22 ± 0.22 (17.5 ± 1.6)	9.80 ± 0.34 (77.3 ± 2.7)	0.19 ± 0.03 (1.5 ± 0.3)	12.67 ± 0.27
pons + medulla	2.32 ± 0.34 (19.7 ± 4.2)	8.79 ± 1.16 (75.2 ± 4.1)	0.15 ± 0.03 (1.3 ± 0.2)	11.65 ± 1.05

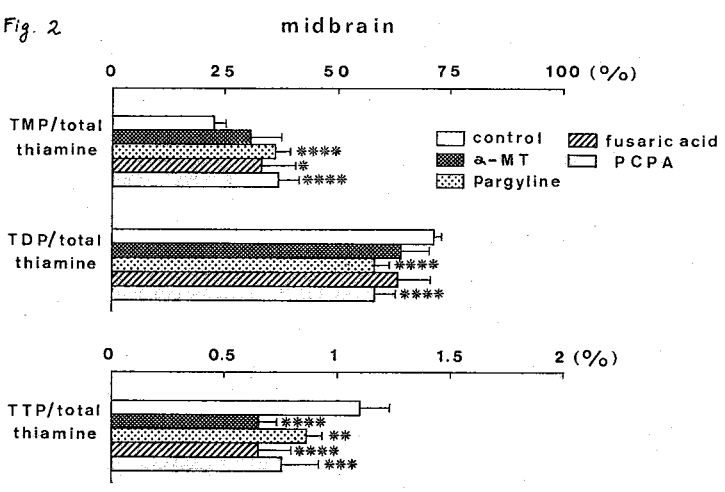
※Values represent the mean ± S.D. for 7 rats.
The number in parentheses refer to percentages of total thiamine.

②代謝阻害剤のthiamine代謝への影響を総thiamineに対するリン酸エステルの比率で検討した。結果の一部として中脳と線条体での変化をFig 2，Fig 3に示す。TMP/total thiamineはα-MT群では変化しなかったが，pargyline群，フザリン酸群およびPCPA群ではいずれも有意に増加した。その増加は線条体ではPCPA群が最も多く，中脳ではpargyline群，PCPA群で増加が著しかった。TDP/total thiamineはα-MT群の中脳と線条体，およびフザリン酸群の中脳では変化が認められなかった。線条体ではPCPA群の低下が最も大きく，中脳ではpargyline群とPCPA群が有意に低下した。

TTP／total thiamineの変化は中脳では全ての代謝阻害剤で有意に低下したが，線条体では対照群に比べて有意差は認められなかった。中脳における低下はα-MT群，フザリン酸群が著しかった。

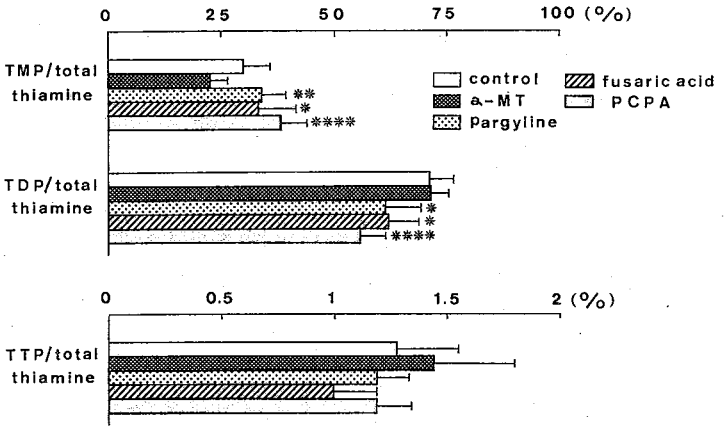
従来，thiamineとカテコールアミン代謝の関係はthiamine欠乏動物を用いて行なわれ，カテコールアミンの生合成と代謝回転の低下が生ずるとされ(4)，またインドールアミン代謝は亢進するとされている(6)。またMonoamine oxidase活性の低下も欠乏状態で生ずると報告されている(5)。一方，in vitroにおいて，thiamineとアセチルコリン，セロトニンとの関連も研究され，TDPとTTPの神経伝達物質への関連を示唆する報告もある(7)。今回の実験結果は，脳内アミンの変化がthiamine代謝に関与していることをうらづけるもので，今後，thiamineの神経機能に対する役割について検討を重ねる必要があると思われる。

Fig. 2



Effect of α-metyl-p-tyrosine(α-MT,250mg/kg,ip),pargyline(75mg/kg,ip), fusaric acid(150mg/kg,ip) and parachlorophenylalanine(PCPA,250mg/kg,ip) on the percentages of thiamine phosphate esters vs total thiamine in midbrain of rat brain. Values represent the mean±SD,(n=5-7).
*p<0.05, **p<0.01, *** p<0.005 and **** p<0.001 vs control.

Fig. 3



Effect of α-metyl-p-tyrosine(α-MT,250mg/kg,ip),pargyline(75mg/kg,ip), fusaric acid(150mg/kg,ip) and parachlorophenylalanine(PCPA,250mg/kg,ip) on the percentages of thiamine phosphate esters vs total thiamine in striatum of rat brain. Values represent the mean±SD,(n=5-7).
*p<0.05, **p<0.01, *** p<0.005 and **** p<0.001 vs control.

〈文献〉

1) Cooper,JR.et al.(1979)Neurochem,Res.4,223-239. 2) Dreyfus, PM.(1959)J,Neurochem.4,183-190. 3) Ishii,K.et al.(1978)Anal, Biochem.97,181-185. 4) Iwata,H. et al.(1980)J,Pharmacol.22,644-646. 5)木村美恵子ら(1970) ビタミン,43,335-338. 6) Plaitakis,A.et al(1978)J,Neurochem.31,1087-1089. 7) Plaitakis,A.et al,Neurology.28,691-698.

17 無麻酔ラット脳内モノアミン類のモニタリング：透析チューブを用いる新しい方法

加藤　武　（東工大・生命化学）
浅野昌雄　（東海医理科）

〔要　約〕

無麻酔下におけるラット脳内モノアミン類の経時的変化をモニターする方法の一つとして脳内に透析チューブを挿入し，連続的に透析液を集める方法が最近報告されている。

今回はこの方法を検討したところ，実験に充分使用出来ることを確認した。即ちラット線条体内に透析チューブを挿入し，数日後無麻酔下，透析液を灌流して透析液を直接または一旦集めて直ちに電気化学検出器と組合わせた高速液体クロマトグラフィー（HPLC－ECD）によって定量したところ少量のドーパミン（DA）と3，4－ジヒドロキシフェニル酢酸（DOPAC），5－ヒドロキシインドール酢酸（5－HIAA），ホモバニリン酸（HVA）が1～5pmol／100μl　回収できた。更にpargyline（モノアミン酸化酵素阻害剤）投与後のこれらの変化を調べたところ，DOPAC，HVAの減少が顕著であった。5－HIAAについても同様な傾向であった。一方DA量については変化が見られなかったが，3－O－メチルードーパミン（3－O－methylDA）量は著しく増加した。

以上の如く透析チューブを用いたin　vivo内モノアミン類のモニタリング法は，今まで測定されたin　vitroの結果と符号するものであり，無麻酔で連続的にモニターできる大変優れた方法である。

Key words：dialysis　in　rat　brain, monoamine, derivertives, pargyline,

in　vivo及びin　vitro内神経伝達物質の合成ならびに代謝をモニターすることは神経活動を理解する上で大変重要である。昨年の日本神経化学会(1)においてin　vivo　voltammetryによる脳内DA，5－HTの代謝物であるDOPAC，HVAそして5－HIAAが測定出来る微小電極を開発した。しかし，脳内のDAおよび5－HT自身をin　vivoにおいて測定できる微小電極の開発が必要であり，目下検討中である。最近Ungerstedtの研究グループ(2)や2，3の研究グループは脳内に透析膜またはチューブを挿入し，脳内モノアミン，アミノ酸，ペプチドを透析液内へ回収し，個々の物質の定量を行っている。この方法を用いれば，in　vivoにおける脳内モノアミンやその代謝物質を連続的にモニターできる。今回この方法の有用性を検討する目的でラット脳線条体に透析チューブを挿入して研究を行ったので以下に述べる。

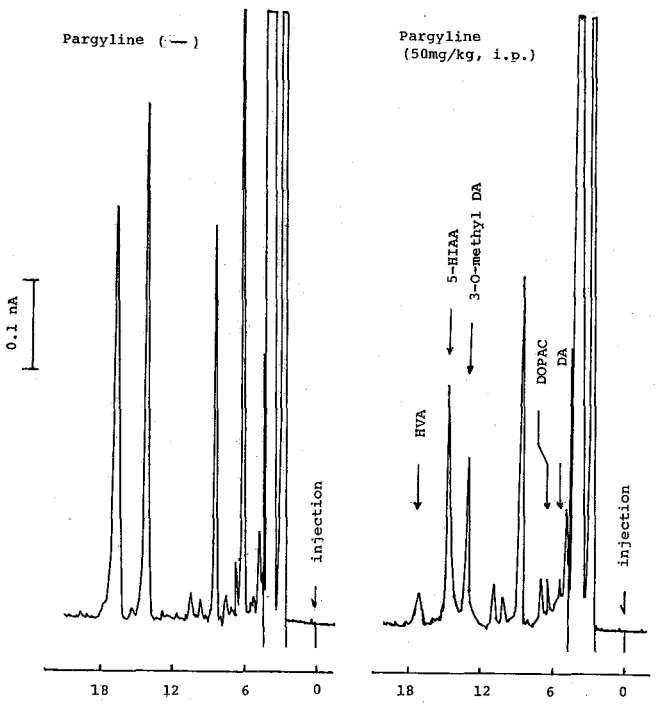
＜実験材料と方法＞

透析チューブは低分子量用と中分子量用の2種類を用いた。透析チューブはZetterstromらの方法(2)に従ってループ状に作製，ラット脳線条体にネンブタール麻酔下で挿入し，7～10日後に使用した。灌流液は147mMNa^+，2.3mMCa^{2+}，4mMK^+，155.6mMCl^-からなり，流速は5μl／minで行った。透析液は直接各々20分ずつ集めた後，直ちにHPLC－ECDにより分離定量した。

HPLC－ECDはBAS社のLC－4Bを用い，0.65V，カラムはケムコパック7ODS（4.6X250mm）を用い，溶出液は0.1mM　EDTA－Na，2%CH_3CN，1ml／minにて分析した。

また薬物投与ラットのコントロール値として3～4時間灌流液を流し，透析液中のDA，DOPAC，5－HIAA，HVAが正常なHPLC－ECDの溶出パターンであることを確認した。

図1．Dialysateの
HPLC－ECD



＜結果と考察＞

標準DA，DOPAC，3－O－methylDA，5－HT，5－HIAA，HVAはそれぞれ5.4，0.3，13.3，13.6，14.5，17.3分にピークを示した。透析チューブの透過率は約10%であり，この値はチューブの種類によって異なった。灌流開始1時間後から20分ごとに透析液を集め，HPLC－ECDによって分離した溶出パターンの1例を図1の左に示してある。またpargyline投与後の溶出パターンを図1の右に示した。DAは少なく，0.05～0.1pmol／100μlであった。一方DOPACは挿入した透析チューブにより1～5pmol／100μlの範囲でほぼ一定量透析内に回収された。5－HIAAにおいても同様であったが，HVAは1.5～6pmol／100μlとやや広範囲になった。しかし，いずれの場合も個々のラットについて図2,3のNo.1～5に示すような程度の変動が見られたのみで，ほぼ一定であった。脳内DA量を増加する目的で↓印の位置でpargyline（50mg／kg，i．p．）を投与したところ，DAは予想に反し透析チューブ内への回収は増加しなかった。しかし，図2の下位に示すように，pargyline投与後2時間後に13倍もの3－O－methylDAが増加した。そしてDOPACとHVAは1／20～1／30にまで顕著に減少した（図2,3）。一方5-HIAA

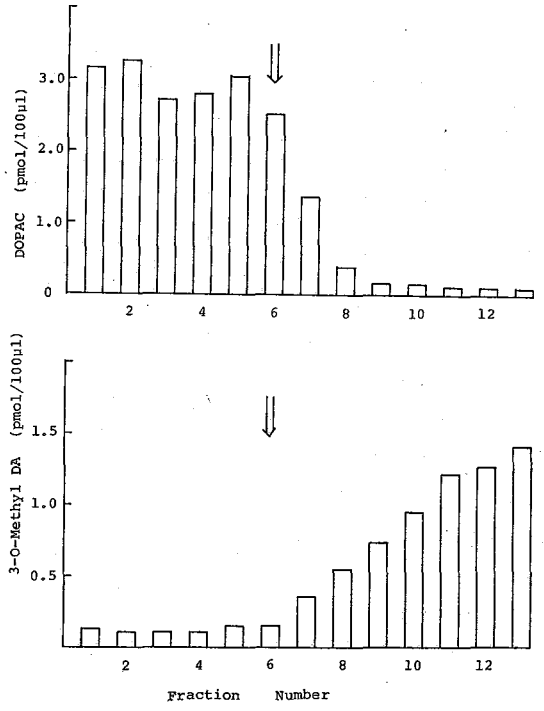
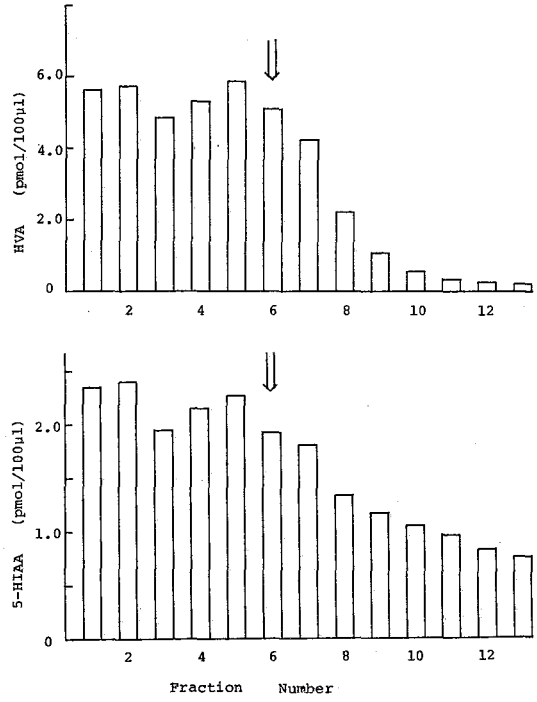


図2．ラット腹腔内pargyline投与に伴うin vivo線条体内DOPACと3-O-mehtylDA
↓：pargyline(50mg/kg,i.p.)投与

図３．ラット腹腔内pargyline投与に伴う
in vivo線条体内HVAと5-HIAA



はゆっくり減少していた。
ｐａｒｇｙｌｉｎｅ投与によりＤＡの増加が見られなかったことは意外であったが，透析チューブの周りのニューロンが透析チューブの移植により破壊され，グリア細胞が増加した為にＤＡの増加が見られなかった可能性もあり今後更に検討したい。

以上述べたように透析チューブによるモノアミン類の定量が可能となり，透析チューブを用いて種々の条件におけるモノアミン類の同定を行いつつ微小電極によるｉｎ ｖｉｖｏ ｖｏｌｔａｍｍｅｔｒｙをより有用なものに確立することができると考えている。また，行動を観察しながら，神経伝達物質或いはそれらの代謝物を定量することができ，近い将来神経化学研究にとってｉｎ ｖｉｖｏ ｖｏｌｔａｍ-ｍｅｔｒｙと共にこの方法は有用な手段となることを確信している。現在，アミノ酸及びアセチルコリンについても検討中である。

参考文献
1）加藤，石井．神経化学 ２２，２１９（１９８３）
2）Ｚｅｔｔｅｒｓｔｒｏｍ，Ｔ．Ｚ．Ｕｎｇｅｒｓｔｅｄｔ，Ｕ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ，９７，２９（１９８４）

18 ドパミンによる Ach を介するラット耳下腺からのアミラーゼ分泌

畑　文明・近藤悦夫・幸田直彦・石川康子
石田　甫

（徳島大・歯・薬理）

〔要　約〕

ドパミン（DA, ≧1μM）によりラット耳下腺組織切片からのアミラーゼ分泌が促進された。この効果はメディウムにアトロピンを添加することにより、最大限約50%抑制された。一方、抗Ch-E薬（エゼリン, 50μM）添加により DA の効果が促進された。ノルエピネフリン（NE）によるアミラーゼ分泌効果はアトロピンで影響されなかった。耳下腺への副交感神経の除神経により DA の効果は減少した。その減少の程度はアトロピンによる抑制の約60%だった。除神経により NE の効果は影響されなかった。[^{3}H]-choline を予め取り込ませた耳下腺組織からの[^{3}H]遊離は、高濃度K^+により著明に増加し、Ca^{++}除去によりその効果は激減した。このK^+刺戟に対応した[^{3}H]遊離は組織内で合成された[^{3}H]ACh を示すと考えられるが、DA(10~100μM)によっても[^{3}H]遊離が著しく増加し、Ca^{++}除去によってこの効果は消失した。以上のことから、DA によるアミラーゼ分泌の一部は副交感神経末端からの ACh遊離を介することが示唆された。アトロピンが NE の作用に無影響なこと、副交感神経の除神経により NE の作用が変化しないことから、DA の作用点には NE は働かず、DA に特異的な作用点であると思われる。

Key words : Dopamine, Parotid, Amylase

ラット耳下腺からのアミラーゼ分泌は、交感（α および β作用）および副交感神経刺戟により促進されることが知られている。一方、ドパミン（DA）の末梢での作用が種々の臓器で検討されてきている[2,4]。我々は最近、DA のラット耳下腺組織からのアミラーゼ分泌作用を認めた[3]。即ち、DA は濃度に依存して、イソプロテレノール、ノルエピネフリン（NE）に匹敵するアミラーゼ分泌効果を示し、この作用はハロペリドール、α-ブタクラモール等の DA-antagonist により抑制された。また DA が耳下腺組織の c-AMP 量を有意に変化させないこと、コカインの NE への作用（増強）と DA への作用（無影響）が異なること、等々から、DA の作用が NE と異っていること。また、α_1, β-agonist とも異った作用であることが示され、DA に特異的な作用が示唆された。今回この DA の作用機構を更に検討し、その作用の一部が副交感神経末端からの ACh遊離を介していることを示す成績が得られた。

［実験方法］　アミラーゼ分泌　Wistar系雄ラット（約300g）から得られた耳下腺組織の細片を作り、Krebs Ringer Tris（K.R.T.）液中で37°Cでインキュベートした。メディウム中に遊離されてくるアミラーゼ活性を Bernfeld の方法で測った。Ca^{++} free メディウムとして、$CaCl_2$ を添加しない K.R.T. に 1mM-EDTA を添加して用いた。高K^+の影響をみる際には、K.R.T. の KCl を 100mM とし、その分 NaCl を減少させた。　除神経　麻酔下に片側のみ Auriculo-temporal Nerve（耳介側頭神経）を咬筋と側頭筋の間で切断し、副交感神経の post-ganglionic な除神経を行なった[1,5]。一週間後アミラーゼ分泌実験に用いた。反対側を対照とした。　ACh遊離　約50mg のラット耳下腺組織細片を、予め、[^{3}H]choline（20nM）と1時間、37°Cでインキュベートし、[^{3}H]choline を取り込ませて、

[³H]ACh を合成させた。その後 K.R.T.（50 ml, 20 分）で洗浄後、[³H]遊離実験に用いた。5 分間隔で各 5 ml のメディウム中へ遊離してくる[³H]を計測した。遊離実験のメディウムには 10μM-HC-3 を添加した。

[結果] DA によるアミラーゼ分泌

DA は濃度に依存してラット耳下腺からのアミラーゼ分泌を促進した。EC_{50} は約 4 μM で、IPR（130nM）、NE（1μM）に比べ高濃度を要したが、100μM で最大効果が得られた。（図 1）。この DA のアミラーゼ分泌効果はメディウムにアトロピンを添加することにより部分的に抑制された。10μM-DA の効果は、100μM-アトロピンでほぼ半減されたが、濃度を充めてもそれ以上の抑制は認められなかった（図 2）。また抗 Ch-E 薬のエゼリン（50μM）を前処置することにより DA の効果は著明に促進された。この効果は 1μM-DA の効果に対して既に認められた。

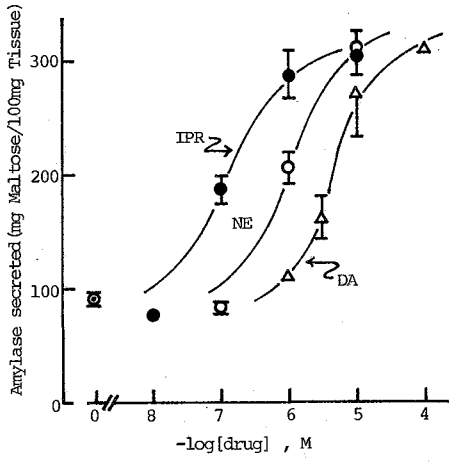


図 1. ラット耳下腺からのアミラーゼ分泌

一方、外から添加した ACh（30~100μM）の効果にはこの濃度のエゼリンは無影響だった。なお NE（1~10μM）によるアミラーゼ分泌はアトロピン（≦100μM）で影響されなかった。

除神経　耳介側頭神経を切断後、一週間経過後の耳下腺組織では DA のアミラーゼ分泌効果が減少した。アトロピンによる抑制の約 60% 程度の減少だった。なおアトロピンで抑制されない分泌は対照側と比べ差はなかった。（図 3）。また ACh（30, 100 μM）、NE（1μM）によるアミラーゼ分泌効果は著明には変化しなかった。

耳下腺組織からの ACh 遊離　予め [³H]choline を取り込ませた耳下腺組織からの[³H]遊離を調べた。K.R.T. で洗浄後の組織からの[³H]遊離は時間と共に減少するが、高濃

図 2. DA のアミラーゼ分泌に及ぼすアトロピン，エゼリンの影響

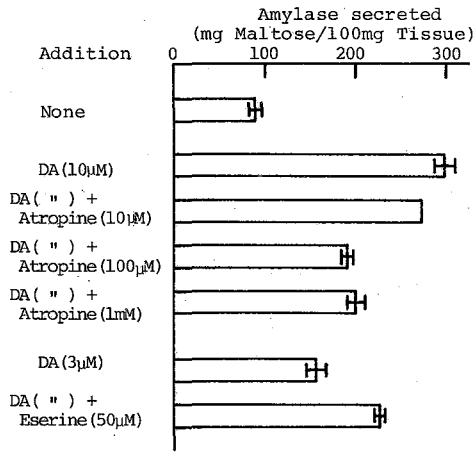
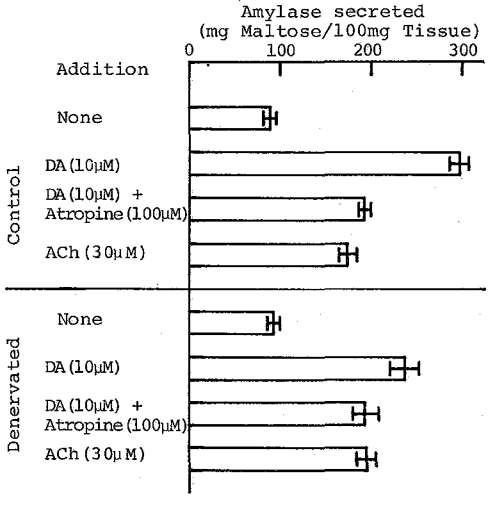


図 3. 副交感神経の除神経の影響



度K^+の刺戟により著明に増加した。この[^{3}H]遊離の増加はメディウム中のCa^{++}を除くことにより激減した。同様にメディウム中にDA(10~100μM)を添加することにより[^{3}H]遊離は著明に増加した。このDAの効果もCa^{++}を除去することにより、ほぼ完全に消失した(図4)。

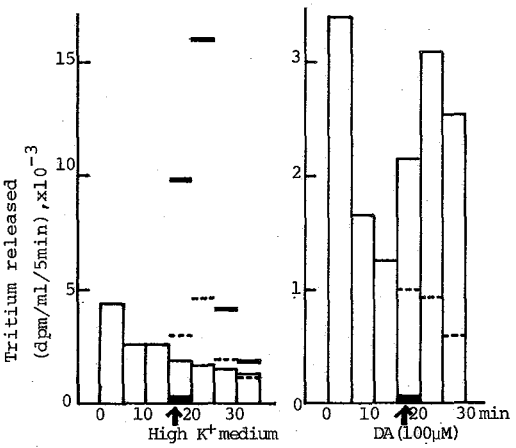


図4. 耳下腺組織からのTritium遊離
(左); コントロール(—), K^+刺戟(━), Ca^{++}free下のK^+刺戟(---) (右); DA添加(—), 同Ca^{++}free(---)

[考察] DAによるアミラーゼ分泌の約半分はアトロピンで抑制され、DA作用にはACh遊離を介していることが考えられる。事実DAの作用は抗Ch-E薬で増強された。なお、これは添加したAChのアミラーゼ分泌には影響せず、また添加したACh、例えば100μM-AChは10μM-アトロピンで殆んど抑制されるのに比べ、DA(≧3μM)の効果を抑制するには100μM-アトロピンを要した。これらのことは生理的に遊離されたAChと外から添加したAChとの違い、また添加したアンタゴニストの作用発現の違いを意味していると思われ興味深い。副交感神経除神経によりDAの効果が著しく減少したこともDAの作用がACh遊離を介していることを示すと思われる。用いた耳下腺組織は神経節を含まないので[1,5]、DAは副交感神経節後線維末端に働くと思われる。ただ除神経による効果はアトロピンによる抑制の約60%であった。これは除神経手術の問題か、何らかの代償性機転、等によるものか現在分らない。アトロピンで抑制されない部分は、除神経によっても同程度であり、アトロピンで影響されない残余のアミラーゼ分泌は、副交感神経を介さないことを示唆している。NEによるアミラーゼ分泌はアトロピンで影響されなかったこと、および副交感神経除神経によりNEの作用が変らなかったことから、本実験のDAの作用点にはNEは働かないと思われ、DAに特異的な作用点が存在すると思われる。[^{3}H]Cholineを取り込ませた組織片からの[^{3}H]遊離は、高濃度K^+への反応性、Ca^{++}除去効果から考え刺戟に応じた部分は合成された[^{3}H]AChを示すと考えられる。DA(≧10μM)で[^{3}H]遊離が増すこと、Ca^{++}除去でこれが消失することから、DAにより合成された[^{3}H]AChが遊離されてきたと考えられる。以上のことから、ラット耳下腺でDAはその作用の一部として副交感神経終末に作用し、そこからのACh遊離を介してアミラーゼ分泌をひき起すことが考えられる。アトロピンで抑制されない部分のDAの効果についてひき続き検討中である。

[謝辞] 除神経実験に際し御指導を賜った本学第2解剖学助教授・樋浦明夫氏に謝意を表します。

[文献] 1) Alm, P. and Ekström, J. (1976) Arch. Oral Biol. 21, 417-421 2) Bell, C. (1982) Neurosci. 7, 1-8 3) 畑他 (1984) 第57回日本薬理学会総会要旨集, 188 4) Lackovic, Z. and Neff, N.H. (1983) Life Sci. 32, 1665-1674 5) Talamo, B.R., Adler, S.C. and Burt, D.R. (1979) Life Sci. 24, 1573-1580

19 *El* − mouse 脳切片からの serotonin release について

平松　緑・加太英明・森　昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化）

〔要　約〕

痙攣誘発可能な El mouse（安静期）には，大脳皮質 serotonin（5-HT）量の低下，5-HT receptor binding の低下，[^{14}C]-5-hydroxytryptophanよりの大脳皮質 [^{14}C]-5-HT 合成の増加などが見い出され，El mouse には大脳皮質 5-HT neuron の機能異常があると推定されている。今回は El mouse 大脳皮質及び小脳の切片を McIlwain tissue chopper で作成し，O_2飽和状態で切片に[^{3}H]-5-HTを取り込ませた後，切片を superfusion chamber に移し，40 mM K^+により release される[^{3}H]-5-HT量を測定した。El mouseの対照にはその母系のddY mouseを使用した。その結果，無痙攣の El mouseの大脳皮質切片からの[^{3}H]-5-HT release は ddY mouseのものに比し著明に高値であったが，痙攣誘発可能になると，[^{3}H]-5-HT release は約½に低下していた。他方，小脳においては El mouse と ddY mouse との間に差がなく，また，痙攣準備性による相違も見出されなかった。痙攣準備性獲得にともなう[^{3}H]-5-HT releaseの著明な低値は，同時期に認められる 5-HT 値の著明な減少と対応するものと考えられる

Key words :　El mouse, 5-hydroxytryptamine release, cerebral cortex

われわれはさきに El mouse の脳内 serotonin (5-HT) 含有量は他の ll系統のマウスに比し最も高いが，痙攣準備性を獲得すると，それが低下すること，及び El mouse に 5-hydroxytryptophan（5-HTP）とMK486（末梢性脱炭酸酵素阻害剤）を投与して，脳内5-HT量を増加させると，放り上げ刺激による痙攣発作が抑制されることを認め，El mouse の発作発現機構に脳内の 5-HT neuron が関与している可能性を示唆した[1]。さらに，痙攣準備性を獲得した後の安静期には大脳皮質と脳幹の 5-HT 含有量及び 5-HT receptor binding が減少していること，[^{14}C]-5-HTP腹腔内投与後の脳内[^{14}C]-5-HT 合成は大脳皮質で増加していること，及び El mouse は L-DOPA 投与により痙攣閾値が低下するが，その際大脳皮質の 5-HT 量が

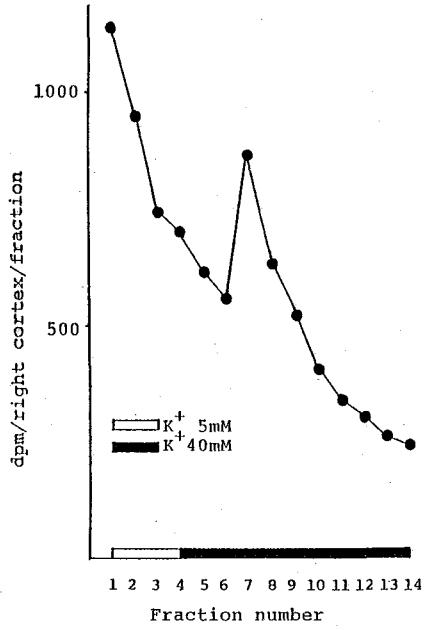


Fig 1. Time course of [^{3}H]-5-hydroxytryptamine release from cortex slices of ddY mouse. Each fraction for 3 min is 1.5 ml.

低下していることなどを見出し，El mouse 大脳皮質における 5-HT の異常を明確化してきた[2]。

今回は El mouse の 5-HT release の機能異常をさらに明確化するために ddY mouse，並びに El mouse の無痙攣群，及び放り上げ刺激により痙攣を誘発しうる群について，大脳皮質及び小脳の切片からの [^{3}H]-5-HT の release を検討した。

実験方法

実験動物。El mouse 及びその母系の ddY mouse を使用した。El mouse は当教室で飼育保存しており，ddY mouse は静岡実験動物より入手した。

El mouse の放り上げ刺激。El mouse を2群に分け，その1群については生後4週目より1週間に2回，板上約10 cmの高さに80回の放り上げ刺激を毎週行った。実験には毎回連続して痙攣を起こす mouse のみを使用した。

5-HT release の測定。

mouse を断頭後，氷上ですばやく大脳皮質と小脳を摘出し，McIlwain tissue chopper で 0.3mm の厚さの切片を作成した。5-HT release の測定は，Minchin ら(1984)[3]の方法に従って行った。すなわち，切片を 95% O_2-5% CO_2 中で5分 37°C で preincubate 後，最終基質濃度 12.3 nM の [^{3}H]-5-HT (1 μCi) を加え，再び15分 incubate した。ついで吸引3過後の切片を superfusion chamber に移し，37°C の酸素飽和中で 0.5 ml/min の速度で superfuse した。25分後，3分おきに4回 fraction を収集し，さらに 40 mM K^+ の buffer に切り換え，再び3分おきに30分 fraction を収集した。これらの fraction を放射能測定用 vial にとり Dotite Scintillator 6 ml を加え，その radioactivity を scintilation spectrometer で測定した。5HT release は

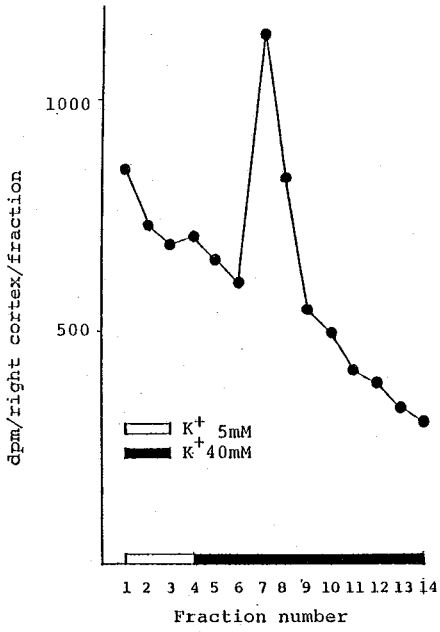


Fig 2. Time course of [^{3}H]-5-hydroxytryptamine release from cortex slices of El mouse (no stimulation). Each fraction for 3 min is 1.5 ml.

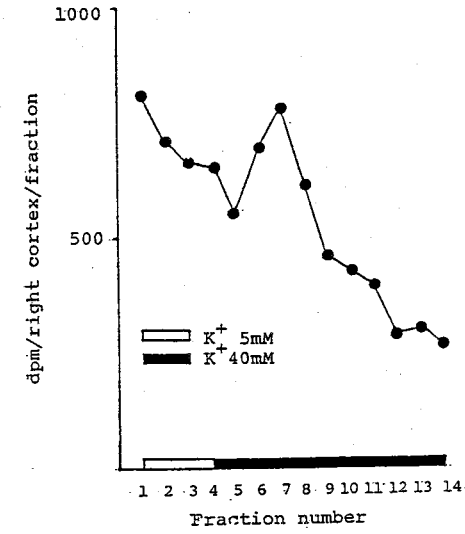


Fig 3. Time course of [^{3}H]-5-hydroxytryptamine release from cortex slices of El mouse (inter-ictal period of stimulated group). Each fraction for 3 min is 1.5 ml.

40 mM K^+ による release の増加量で示した。なお使用した buffer の成分は以下の如くであった。：NaCl, 150 mM; KCl, 5 mM; $MgSO_4$, 1.2 mM; $CaCl_2$, 1.2 mM; Na_2HPO_4, 1.2 mM; HEPES, 20 mM; p.H. 7.4, Nialamide, 10 μM; D-glucose, 5.6 mM; 0.05 mg/ml EDTA, 0.2 mg/ml ascorbate。

Table K^+-stimulated release of [^{3}H]-5-hydroxytryptamine from slices of cortex and cerebellum in mice

	K^+-stimulated release (% increase over baseline)			
	n	Cortex	n	Cerebellum
ddY mice	10	101.5±56.7	7	121.3±36.0
El mice Non-stimulated	7	221.1±69.2[a]	6	128.0±52.2
El mice Interictal period of stimulated group	9	106.2±29.4[b]	8	99.4±29.8

[a] $p<0.005$, compared with ddY mice
[b] $p<0.001$, compared with El mice (no stimulation)

実験結果

図1~3は ddY 及び El-mouse の大脳皮質切片からの 5-HT release の実験例を示している。まず ddY と El（無痙攣群）とを比較すると，大脳皮質切片からの ^{3}H-5HT の release は El（無痙攣群）の方が有意に高値であった。また無痙攣の El と痙攣誘発可能な El-mouse（安静期）のそのとを比較すると大脳皮質からの 5-HT release は後者が有意に低値であった（表1）。つぎに ddY 小脳切片からの 5-HT release の時間的経過を図4に示したが，小脳切片からの 5-HT release 量は、ddY，El無痙攣群及び痙攣誘発可能な El（安静期）間に有意差が認められなかった。

考察

すでに無痙攣の El-mouse と痙攣誘発可能な El-mouse（安静期）との間には脳内のモノアミン酸化酵素活性及び 5-HT 合成速度には有意な相異のないことが示されている[2]。無痙攣の El-mouse 脳内 5-HT 量が他の系統の mouse と比較して最も高いのに、痙攣誘発が可能になると 5-HT 量が著明に低下することから，El-mouse には脳内 5-HT release の異常があると推定されていたが，今回の実験から、El mouse 大脳皮質の 5-HT release は ddY mouse に比し，生来有意に高値であること，及び痙攣誘発可能な El-mouse（安静期）の大脳皮質 5-HT release はほぼ½に低下しているが，この時期には大脳皮質 5-HT 含有量自体も無痙攣のものと比し半減しているので，それに対応した放出量の低下と考えられる。

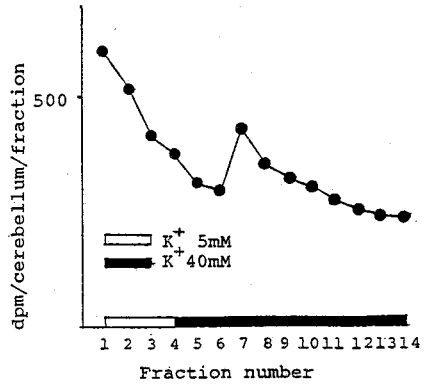


Fig 4. Time course of [^{3}H]-5-hydroxytryptamine release from cerebellum slices of ddY mouse. Each fraction for 3 min is 1.5 ml.

文献 1) Hiramatsu, M. Folia Psychiat. Neurol. Jpn 35, 261-266. 2) Hiramatsu, M. Neurochem. Res. 8, 1163-1175. 1983 3) Minchin M,C,W. et al. J. Neurochem. 40, 765-768, 1983

20 ノルエピネフリンの視床下部内持続注入による肥満の発生

嶋津　孝・野間めぐみ・斉藤昌之
（愛媛大・医・Ⅰ医化学）

〔要　約〕

視床下部神経核を慢性的に化学刺激する方法を開発し、この装置を用いてラットの腹内側核（ＶＭＨ）、外側核ならびに室旁核に７種類の神経伝達物質および神経ペプチドを５ヶ月間に亘って持続的に注入しどのような病態が引き起こされるかを追究した。その結果、ＶＭＨにノルエピネフリン（ＮＥ）を持続注入すると、高インスリン血症ならびに過食を伴った典型的な肥満が発生することが見出された。さらにＶＭＨ内へのＮＥの持続注入は褐色脂肪組織（ＢＡＴ）での脂肪酸合成速度を著しく低下させる一方、中性脂肪の蓄積をもたらすことから脂肪の代謝回転を悪化させることが判明した。このことはＢＡＴ本来の機能である熱産生能が低下していることを意味し、エネルギー消費の減少も本肥満の発生維持にかなりの寄与をしていることがうかがえる。ＶＭＨに対する上述のＮＥの慢性刺激効果は神経細胞の脱感受性に基づくＮＥの抑制作用に由来すると思われるが、視床下部内のＮＥ濃度の慢性的増加が肥満という代謝性病態を引き起こす事実は、代謝制御中枢としての視床下部の意義づけをより明確にした一証左とみなされる。

Key words：　Hypothalamus, Norepinephrine, Obesity

視床下部は内分泌中枢、自律神経中枢、本能行動の発現中枢としてだけでなく最近、内臓代謝の制御中枢としての働きが注目されている。例えば、肝における糖代謝、アミノ酸代謝、膵からのホルモン分泌、ならびに脂肪組織での脂質の分解と合成などは視床下部の機能亢進によって著明な影響を受け、これらの代謝調節作用は大まかにみて、腹内側核（ＶＭＨ）と外側核（ＬＨＡ）との相反的機能によって支えられている。更に、視床下部における神経伝達物質の特異的作用が代謝制御の上でも重要な役割を演じていることが明らかになってきた(7-9,11)。

それ故、視床下部における特定の神経伝達物質の濃度を慢性的に増加させると、内臓代謝の乱れを生じ、その結果、肥満とか糖尿病などの代謝性疾患を誘発する可能性が考えられる。この可能性を追究するため、本実験では視床下部を長期間に亘って化学的に刺激する装置を開発し、この装置を用いてＶＭＨならびにＬＨＡに種々の神経伝達物質および神経ペプチドを持続的に注入する時、どのような病態が発生するかを調べた。

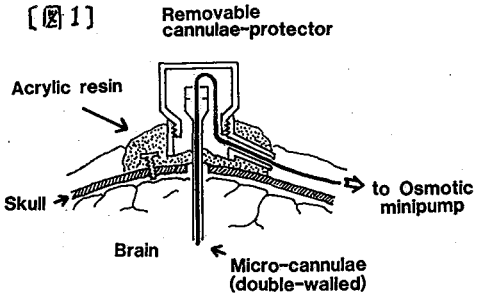
〔実験方法〕　新たに考案した視床下部長期化学的刺激装置（図１）は次の３つの部分から構成されている。（イ）視床下部に留置する微小カニューレ。（ロ）薬液を持続的に注入するための浸透圧ポンプ（２週間用）：浸透圧の作用によって持続的に毎時0.48μlの速度で薬液が注入されるようラットの背部皮下に埋没させる。（ハ）微小カニューレとミニポンプとの接続被覆部：脳内に留置した微小カニューレと背部のミニポンプとの接続離脱が容易に行なえるように考案したもので、同時に接続チューブを保護する役目をする。

実験には体重２７０ｇ前後の雌ラットを使用し、片側のＶＭＨあるいはＬＨＡに微小カニューレを植え込み、接続被覆部と共に頭蓋骨に固定する。術後３週間たってから、カニューレに薬液を満たしたミニポンプを接続して注入を開始する。その後、ミニポンプの交換を２週間毎

に行ない、最長5ヶ月間続けた。脂肪酸の合成速度を測定する実験では、ラットを予め24時間絶食させた後、5mCiの^3H_2Oを腹腔内に投与し、1時間後に屠殺して肩甲間褐色脂肪（BAT）、子宮旁白色脂肪（WAT）および肝を摘出、各組織より既報の方法(10)で脂肪酸を抽出して放射能を測定した。

［実験結果］ 7種類の神経伝達物質ならびに神経ペプチドの夫々をVMHあるいはLHAに20週間持続的に注入して体重変化を追跡した（表1）。食塩水を持続注入した対照群に比べてVMH内にノルエピネフリン（NE）を注入した群では著しい体重増加が認められ、エピネフリン注入群でも有意な体重増加を見たが、他の伝達物質、あるいはLHA内への持続注入群では著変がなかった。注入期間中、2週間ごとに尾静脈より採血して血中グルコースならびにインスリン濃度を測定したところ、VMH内にNEを注入した群では、血糖値はあまり変動しないが、インスリンレベルは比較的早期から上昇し、注入期間を通じて高レベルを維持することが判明した（図2）。上述のように、この群では体重が次第に増加し、10週間後には約600gに達し、典型的な肥満を来たすことが見出された。

［図1］



［表1］

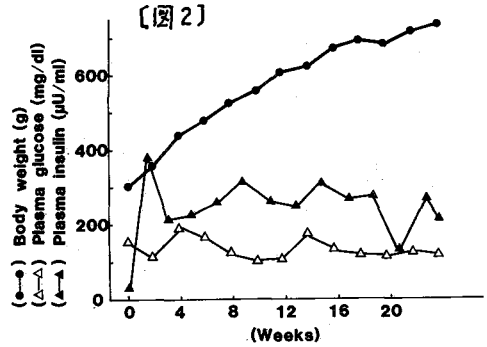
Changes in body weight after chronic infusions (20 wk) of neurotransmitters into rat hypothalamus

	Neurotransmitter	Concentration(mM)	Number of rat	Increment of body wt. (g)
VMH	Saline		8	50 ± 12
	Norepinephrine	50	10	329 ± 30
	Epinephrine	50	5	149 ± 15
	Acetylcholine	50	11	73 ± 9
	Bombesin	1	4	57 ± 14
	CCK-4	1	4	71 ± 15
LHA	Saline		5	44 ± 8
	Norepinephrine	50	10	40 ± 5
	β-Endorphine	0.5	4	55 ± 4
	met-Enkephalin	1	7	52 ± 6
	CCK-4	1	4	62 ± 10

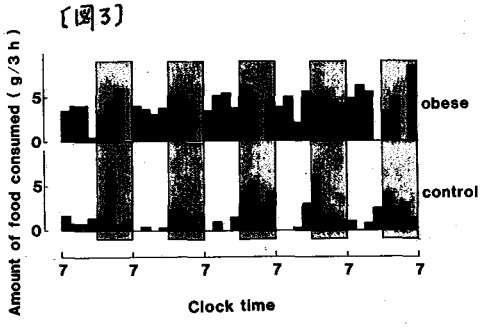
この肥満ラットについて摂食パターンを5日間に亘って連続的に調べた（図3）。肥満ラットでは1日の平均摂食量（26.1±2.1g）は対照ラット（15.5±0.8g）よりも有意に高く、しかも対照ラットでは1日の摂取量の中、72%を夜間に摂取する夜行性の摂食リズムを示すのに対し、肥満ラットでは摂食パターンの日内リズムがくずれ、昼夜差がなくなり、昼間の摂取量が著しく増加していることが判明した。

視床下部にNEを急性的に微量注入して摂食量を調べた報告によると(4)、摂食の誘発はVMHよりも室旁核（PVN）に注入する時、もっとも有効であるとされている。そこで、

［図2］



［図3］



ＰＶＮに慢性的にＮＥを持続注入して経過を観察したが、ＶＭＨの場合に認められるような肥満を引き起こすことは出来なかった。

次に、この新しいタイプの肥満の発生にエネルギー消費量の減少が寄与しているかどうかを調べるために、褐色脂肪組織（ＢＡＴ）の代謝活性の変化を追究した。ＢＡＴは非ふるえ熱産生を行なうことによって生体の過剰エネルギーを消費するのに重要な役割を果たしている組織として最近、肥満の発生との関連性が注目されている(3,6)。ＢＡＴでの熱産生はＶＭＨ－交感神経系の機能亢進によって増大し、その代謝機構の一環として脂肪酸の合成速度が亢進する(5,10)。表２はＶＭＨ内にＮＥを５週間持続注入したラットの肩甲間ＢＡＴの化学的組織を分析した成績である。既にこの時期で、ＢＡＴの重量は対照ラットに比べて2.5倍に増加し、単位重量当たりの蛋白ならびにＤＮＡ量は半減しているので細胞の肥大が起こっていると考えられる。事実、中性脂肪の含量はＮＥ注入群が有意に高い。このことはＢＡＴでの脂肪合成が

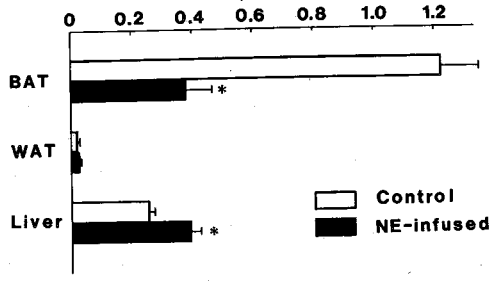
[表2]

Chemical composition of the interscapular brown adipose tissue (BAT)

	Control	NE-infused
Body weight (g)	284±14	481±17 *
Interscapular BAT		
Wet weight (mg)	400±44	1071±201*
Protein (mg/g)	80.8±9.0	33.4±3.1 *
DNA (mg/g)	1.24±0.08	0.64±0.06*
Triglyceride(mg/g)	462±38	665±45 *

Norepinephrine (NE) or saline was infused constantly into the VMH for 5 weeks

[図4] Rate of fatty acid synthesis (μmol fatty acid/g/h)



亢進しているかに思えるが、実際はその逆で図４に示す如く脂肪酸合成速度は対照ラットの１／３に低下していることが判明した（一方、肝では有意に上昇していた）。つまり、ＮＥ注入群でのＢＡＴでは中性脂肪の含量が高いにも拘らず脂肪酸合成速度が低いという事実は、中性脂肪の代謝回転が極端に低下していることを意味しており、ＢＡＴ本来の機能である熱産生によるエネルギー消費機構が十分に作動していないと考えられる。このことがまた、本報告で述べた肥満の発生維持に一定の寄与をしているものと推論される。

［考　察］　両側のＶＭＨを電気凝固によって人工的に破壊すると肥満が発生することはよく知られている。今回報告した肥満は片側のＶＭＨ内へＮＥを長期間持続的に注入した場合に認められるものであって、長期間の薬液注入のため注入局所の神経細胞はある程度の損傷変性を蒙ることは避けがたいが、同程度の片側ＶＭＨの損傷では肥満は起こらないので、破壊による効果とは考えにくい。しかし、ＮＥの慢性注入によって高インスリン血症ならびに過食を伴っていることはＶＭＨの破壊効果とよく似ている。おそらくＮＥの持続的注入によってＶＭＨニューロンの脱感受性が起こり、ＮＥがニューロン活動に抑制的に作用した結果であると思われる。ＮＥの濃度も作用発現に関係しているかもしれない。小脳あるいは嗅脳のスライスを用いてニューロンの活動に及ぼすＮＥの作用を調べた研究によると、ＮＥは促進的ならびに抑制的に作用し、その効果は濃度に依存すると報告されている(1,2)。

［文献］ 1) Basile, A.S. and Dunwiddie, T.V.(1984) Brain Res. 296, 15-25. 2) Collins, G.G.S. et al.(1984) Brain Res. 294, 211-223. 3) Himms-Hagen, J.(1983) Nutr. Rev. 41, 261-267. 4) Leibowitz, S.F.(1978) Pharmac. Biochem. Behav. 8, 163-175. 5) Perkins, M.N. et al.(1981) Nature 289, 401-402. 6) Saito, M. and Shimazu, T.(1984) FEBS Lett. 166, 151-154. 7) Shimazu, T.(1981) Diabetologia 20, 343-356. 8) Shimazu, T.(1983) Adv. Metabolic Disorders 10, 355-384. 9) Shimazu, T. and Ishikawa, K.(1980) Endocrinology 108, 605-611. 10) Shimazu, T. and Takahashi, A.(1980) Nature 284, 62-63. 11) Steffens, A.B.(1981) Diabetologia 20, 411-416.

21 低体温動物モデルにおける血漿ホルモンおよび脳内モノアミンの変動

奥田千恵子・斉藤朗子・宮崎正夫
（京府医大・麻酔科）
栗山欣弥
（同・薬理）

〔要　約〕

低体温時の生体反応変化を検討するため，従来より用いられているラットの拘束水浸ストレスモデルにおいて，水温を調節することにより体温を変化させ血漿ホルモン値および脳内モノアミンとその代謝産物含量に及ぼす影響を検討し，以下の結果を得た。

1. 直腸温は水温 30 ℃以下では水温の低下と平行して降下するが，その時 corticosterone（CS）は上昇，prolactin（PRL）は低下，TSH は軽度低体温時には上昇するがさらに体温が低下すると control 値にもどった。
2. 低体温時の PRL の低下は，TRH，D_2-antagonist の sulpiride，および GABA antagonist の bicuculline の前処置で阻止された。また TSH は TRH により上昇，bicuculline により低下した。CS はこれらの薬剤の影響を受けなかった。
3. 低体温時には，脳内各部位において norepinephrine，dopamine および 5-hydroxytryptamine 含量は低下，代謝産物の DOPAC，HVA および 5-HIAA は上昇する傾向がみられた。
4. 低体温時の血漿ホルモンおよび脳内 DOPAC の変化は復温により回復した。

以上の結果より，低体温時には上記血漿ホルモンの遊離が可逆的な変化を示し，少なくともその一部は，脳内モノアミン神経活動の上昇に起因していることが示唆される。

Key words：Hypothermia，plasma hormones，cerebral monoamines

単純表面冷却による超低体温法は，新生児，乳児に対する開心術に広く用いられているが，体温降下あるいは復温時に，生体にどのようなストレスが加わるか，またその時，どのような神経活動の変化が惹起されるかについての詳細な検討は，未だになされていない。したがって本研究では，従来より用いられているラットの拘束水浸ストレスモデル[2]において，水温を調節することにより体温を変化させ，血漿ホルモン値および脳内モノアミン含量の測定を行なうことにより，体温の変化と内分泌機能および中枢神経活動の変化の関係を求めようと試みた。

【実験方法】Wistar 系雄性ラット（180～220 g）の直腸に体温計を挿入したのち，拘束ケージに入れ，38 ℃の水槽に60分浸水し初期のストレス条件を一定にしたのち水温を38 ℃～15 ℃に変化させ，さらに60分後に，一部は断頭して血液を採取し，血漿分離後冷凍保存してホルモン測定に供した。他の動物はマイクロウェーブ照射後，脳を摘出し，Glowinski と Iversen[1]の方法に従って7分画したのち内部標準として DHBA を添加して，0.05 M PCA 中でホモゲナイズし，遠心後得られた上清をモノアミン測定に用いた。Corticosterone（CS）は，Mattingly[3]の方

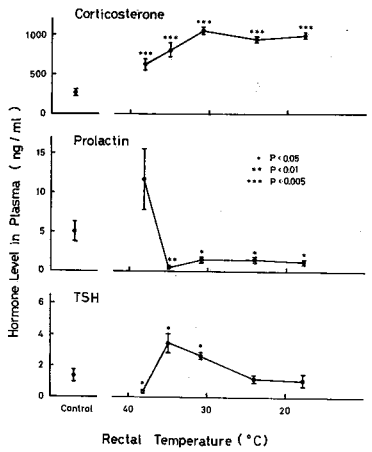


Fig.1. Effect of changes in rectal temperature on plasma levels of corticosterone, prolactin and TSH in rat restrained and immersed in water bath of various temperatures

法に準じて蛍光法により測定した。Prolactin(PRL)およびTSHはNIADD rat用kitを用いたRIA法により測定し，測定用standardとしてrPRL-RP-3およびrTSH-RP-2をそれぞれ使用した。またモノアミンとその代謝産物はWagnerら[4]の方法に準じた方法により，電気化学検出器を装着したHPLCにて測定した。また低体温および復温の影響の経時的測定に際しては，各温度での行動変化の観察も同時に行なった。

【実験結果】水温を38℃に保つと直腸温は正常に保たれるので，体温の低下をともなわない拘束水浸ストレスを加えた群と考え，normothermia群と呼んだ。水温の低下とともに体温は降下し，水温30℃以下では，ほとんど体温調節機構は働かず，水温に比例し直線的に体温は降下した。Fig 1は体温の低下が血漿ホルモン値におよぼす影響を示している。CSはnormothermia群においてcontrol値に比べ有意に上昇し，体温低下にしたがいさらに上昇した。PRLはnormothermia群においては上昇傾向を示したが，体温低下によりすみやかにcontrol値以下に低下した。TSHはnormothermia群で有意に低下したが，体温が軽度に低下した時点では逆に有意な上昇を示し，さらに体温が低下するとcontrol値にもどった。また脳内モノアミン含量に関しては，Fig 2に示した視床下部の場合，norepinephrine(NE)はnormothermiaおよび体温低下時にcontrol値より有意に低下し，dopamine(DA)および5-hydroxytryptamine(5-HT)は変化しなかったが，それらの代謝産物であるDOPAC，HVAおよび5-HIAAは体温の低下につれて徐々に上昇を示した。他の脳内部位においても同様の傾向を認めた。以上の結果より，低体温時の血漿ホルモン値の変動にこれら脳内モノアミンニューロン活動の上昇が関与している可能性が示唆される。さらにFig 3に示すごとく，TRH，sulpirideおよびbicuculline前処置により低体温時のPRLの低下が阻止され，TSHはTRHにより上昇し，bicuculline により低下したことから，モノアミンニューロンのみならず，脳内TRHニューロンやGABAニューロンの機能的変化がこれらの変化に関与している可能性も考えられる。

次にこれらの内分泌機能および中枢神経活動の経時的変化およびその可逆性を調べる目的で，Fig 4に示すような体温変化をさせたモデルを用い，これをhypothermia群と呼び，同時間38℃に保ったnormothermia群でみられる変化を比較検討した。両群とも270分間の拘束水浸ののちケージより解放し，さらに60分間体温測定および行

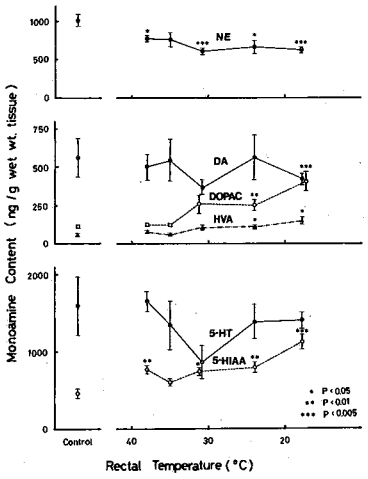


Fig.2. Effect of changes in rectal temperature on contents of monoamines and their metabolites in hypothalamus of rat restrained and immersed in water bath of various temperatures

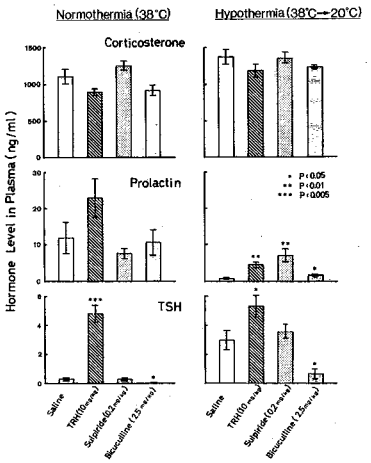


Fig.3. Effect of TRH, sulpiride and bicuculline on plasma levels of corticosterone, prolactin and TSH in rat restrained and immersed in water bath of 38°C and 38°C→20°C

動の観察を行なった。Hypothermia 群では，水温を20℃に低下させた120分後には，体温は約24℃に低下しており，この時ケージから解放すると明らかにataxiaの出現が観察された。また水温をさらに低下させて体温を21℃に低下させた場合には，完全に正向反射が消失した。体温が19℃以下になると復温が困難となり死亡したが，それ以上の体温の場合は，復温により行動はすみやかに正常にもどった。この時の血漿ホルモン値の変化はFig 5 に示したPRLの場合にみられるように，低体温中はnormothermia 群に比べて有意な低下を示すが復温と同時にcontrol 値にもどった。このような変化の可逆性はCSおよびTSHの場合にもみられた。またこれらの条件下における視床下部のNE, DAおよび5-HTとそれらの代謝産物の経時的変化をみると（Fig 6），NE,DAおよび5-HTの含量にはnormothermia群と比べて有意差を認めなかったが，DOPAC,HVAおよび5-HIAAは低体温時または復温完了時に上昇を示した。脳内の他の部位でも低体温時に上記神経伝達物質の含量の低下あるいはそれらの代謝産物の上昇傾向を認めた。

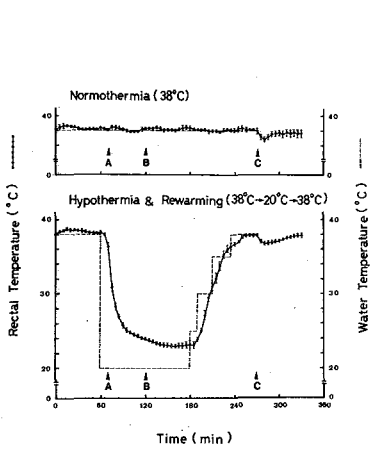


Fig.4. Changes in rectal temperature in rat restrained and immersed in water bath of 38°C and 38°C→20°C

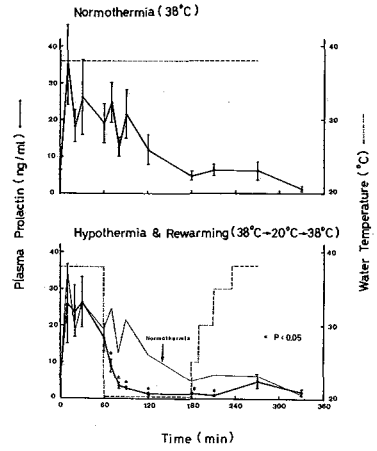


Fig.5. Changes in plasma level of prolactin in rat restrained and immersed in water bath of 38°C and 38°C→20°C→38°C

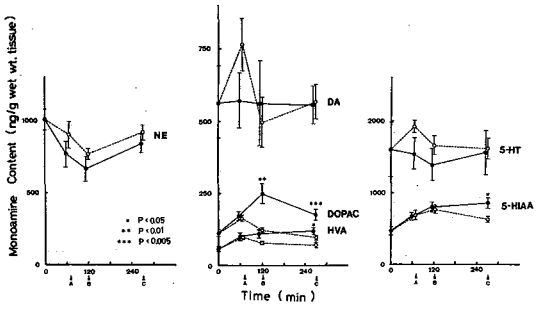


Fig.6. Changes in contents of monoamines and their metabolites in hypothalamus of rat restrained and immersed in water bath of 38°C (O------O) and 38°C→20°C→38°C (●——●). A,B and C indicate the points sacrificing animals for chemical determinations as shown in Fig.4.

【考察と結論】体温低下により惹起される行動や内分泌機能の可逆的な変化には脳内モノアミンニューロン活動の上昇が関与していると考えられるがDAニューロンの代謝回転の指標とされるDOPACのような中間代謝産物の含量の変化が復温によりすみやかに回復傾向を示すことから，低体温時の神経活動動態のよい指標になると思われる。また，低体温時にはGABAやTRHなどモノアミンニューロン以外の神経系の機能的変化も起っている可能性があるので，今後検討を加える必要があると思われる。

[References]
1) Glowinski,J. and Iversen,L.L. (1966) J.Neurochem. 13, 655-669
2) Kuriyama,K.,Kanmori,K. and Yoneda,Y. (1984) Neuropharmacology 23, 649-654
3) Mattingly,D. (1962) J.Clin.Pathol. 15. 374-379
4) Wagner,J.,Vitali,P.,Palfreyman,M.G.,Zraika,M. and Huot,S. (1982) J.Neurochem. 38, 1241-1254

22 ラット脳ミクロソームestradiol 2−hydroxylaseのcateholamineによる阻害の様式

塚本卓治・佐藤正雄・稲葉　喬
（佐賀大・農芸化学）

〔要　約〕

The mode of estradiol 2-hydroxylase inhibition by catecholamine in rat brain microsomes was investigated. An enzyme kinetic analysis indicated the catecholamine inhibition of estradiol 2-hydroxylase activity to be of a competitive type. Varying the cofactor ($NADH + H^+$) concentration in the range of 0.25 to 2.0 mM did not significantly influence the degree of catecholamine inhibition of rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase. Thus, the catecholamine inhibition of rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase may not involve competition with a cofactor. The lack of stereospecificity of catecholamine inhibition of rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase was evident, since the (-) and (+) isomers of catecholamines inhibited the enzyme to the same degree. The studies concerning the effct of various catecholamine analogues on rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase suggest that the inhibition of estradiol 2-hydroxylase by catecholamine may depend upon the catechol part of the molecule rather than the aliphatic side chain.

Key words : Estradiol 2-hydroxylase, Rat brain microsomes, Catecholamine.

It has been shown that catecholestrogens, the 2- or 4-hydroxylated derivatives of phenolic estrogens, are formed in various tissues including liver and placenta as well as such estrogen target organs as the central nervous system and anterior pituitary (1, 2). It was recently shown that catechol estrogens may play an important role in the control of LH and prolactin release (3, 4). We have previously demonstrated that catecholamines inhibit estradiol 2-hydroxylase activity in rat brain microsomes (5), a finding that suggests a role for catecholamines in the regulation of catecholestrogen formation in the rat brain. In the present study, we investigated the mode of estradiol 2-hydroxylase inhibition by catecholamine in rat brain microsomes.

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats weighing 150-200 g were sacrificed by cervical dislocation. The whole brain was removed with the exception of the cerebellum and was immediately homogenized in 10 mM Hepes buffer containing 0.32 M sucrose, pH 7.8, and the separations of the subcellular fractions to obtain microsomes were performed by standard procedures (6).

The assay of estradiol 2-hydroxylase was performed by the "Radiometric Assay" using (2-^{3}H) estradiol as the substrate (4). (2-^{3}H)estradiol was prepared by a previously described procedure (5). The reaction mixture (2.0 ml) consisted of 100 mM Tris buffer (pH 7.4), 5 mM glucose-6-phosphate, 2.0 units glucose-6-phosphate dehydrogenase, 1 mM NAD, 0.2-0.4 mg microsomal proteins and various concentrations of (2-^{3}H)estradiol. Incubations

were performed at 37°C for 10 min and ^3H_2O formed was isolated as described elsewhere(4).

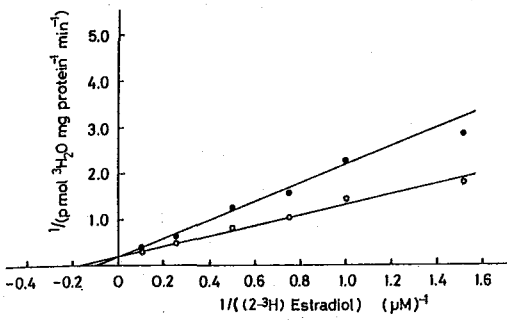


Fig. 1. Double reciprocal plot of velocity against (2-^{3}H)estradiol concentration in the absence (o) and presence (●) of 10 μM norepinephrine.

RESULTS

The mode of catecholamine inhibition of rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase.

In order to evaluate the mode of catecholamine inhibition of rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase, the effect of various substrate concentrations on estradiol 2-hydroxylase in the absence and the presence of catecholamine (10 μM norepinephrine) was investigated where a nearly saturating concentration (1 mM) of cofactor (NAD) was present. As shown in Figure 1, the result expressed by the usual double reciprocal plot of 1/v versus 1/ s indicates the competitive manner of the norepinephrine inhibition of rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase.

Effect of NAD concentration on catecholamine inhibition of rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase. The effect of various NAD concentrations on estradiol 2-hydroxylase activity in the absence and the presence of catecholamine (10 μM norepinephrine) is shown in Figure 2. The concentration of (2-^{3}H) estradiol used here was 2.5 μM. The degree of the inhibition of estradiol 2-hydroxylase was not significantly influenced by varying the NAD concentration.

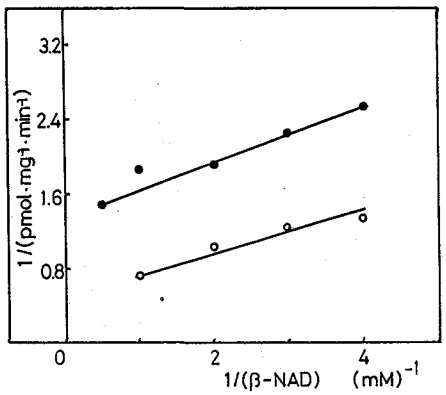


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of estradiol 2-hydroxylase inhibition by norepinephrine as a function of β-NAD cofactor concentration.

Specificity of catecholamine inhibition of rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase.

Table 1 shows the effect of various catecholamine analogues on estradiol 2-hydroxylase in rat brain microsomes. The concentration of (2-^{3}H) estradiol was 1 μM. Among the compounds tested, catecholamines were the most potent inhibitors of 2-hydroxylase. The only significant difference in the ability to inhibit estradiol 2-hydroxylase among catecholamines was seen in the case of norepinephrine, which had a rather high inhibitory potency. The lack of stereospecificity of catecholamine inhibition of estradiol 2-hydroxylase was evident (Figure 3). Pyrocatechol inhibited estradiol 2-hydroxylase significantly, although its inhibitory potency was less than that of catechol-

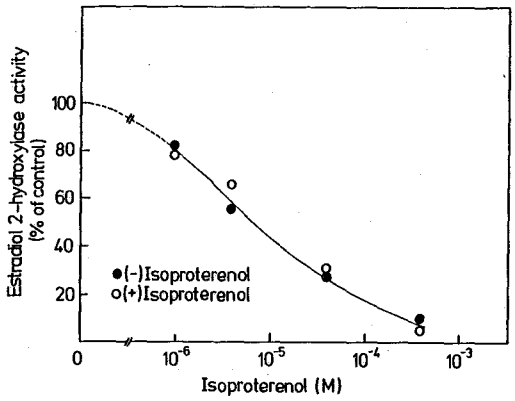


Fig. 3. Effects of (−) and (+) isoproterenol on estradiol 2-hydroxylase activity in rat brain microsomes.

Table 1. Effect of norepinephrine analogues on estradiol 2-hydroxylase activity

Compound	Concentration	Estradiol 2-hydroxylase Activity (% of control)
None (Control)	μM	100
(−) Norepinephrine	4	37
	40	20
(−) Epinephrine	4	75
	40	30
(−) Isoproterenol	4	68
	40	26
(+) Isoproterenol	4	69
	40	24
(−) Dopamine	4	56
	40	19
(−,+) Dopa	4	65
	40	22
Pyrocatechol	4	91
	40	38
(−,+) Normetanephrine	100	112
	1000	102
(−) Tyrosine	4	115
	40	112
(−) Phenylalanine	4	117
	40	113
(−) Phenylephrine	4	95
	40	102

amines (Table 1). Precursors such as phenylalanine and tyrosine, and a 3-O-methylated metabolite of norepinephrine had no significant effect on estradiol 2-hydroxylase activity. In addition, phenylephrine failed to inhibit estradiol 2-hydroxylase.

DISCUSSION

The present study indicates that the inhibition of rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase by catecholamine is of a competitive type. The catecholamine inhibition of estradiol 2-hydroxylase may not involve competition with a cofactor ($NADH + H^+$) required for enzymatic activity since the degree of the inhibition was not significantly influenced by cofactor concentration. The investigation regarding structural requirement for catecholamine inhibition of estradiol 2-hydroxylase seems to support the dependence of the inhibition on the catechol part of the molecule. The inhibition of brain microsomal estradiol 2-hydroxylase by catecholamine may imply a modulatory role of catecholamine for the action of estradiol as well as 2-hydroxyestradiol in the central nervous system.

REFERENCES

(1) Ball, P., Hoppen, H. O. and Knuppen, R. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1451-1462. (2) Fishman, J., Norton, B. and Krey, L. (1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 93, 471-477. (3) Franks, S., Maclusky, N. J., Naish, S. J. and Naftolin, F. (1981) J. Endocr. 89, 289-295. (4) Fishman, J. and Tulchinsky, D. (1980) Science 210, 73-74. (5) Tsukamoto, T., Sato, M., Yada, Y. and Inaba, T. (1983) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 22, 414-416. (6) Whittaker, V. P. (1965) Prog. Biophys. Mol. Biol. 15, 39-45.

23. ストレスによるラット脳内 noradrenaline 代謝回転亢進に対する diazepam の抑制作用
— Ro 15−1788 と picrotoxin による検討 —

井田能成・田中正敏・津田　彰・辻丸秀策
長崎信行
（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

Diazepamは、ストレスによる脳内各部位の noradrenaline (NA)代謝回転亢進を減弱する。この diazepam の作用に及ぼす benzodiazepines の拮抗薬である Ro 15-1788 と γ-aminobutyric acid (GABA)の拮抗薬である picrotoxin の影響について別々に検討した。Diazepam と Ro 15-1788 は 0.3% CMCに懸濁し、picrotoxin は saline に溶解し、いずれも腹腔内投与した。ストレスとして金網による拘束を 1 時間負荷し、脳内各部位の NA の主要代謝産物である 3-methoxy-4-hydroxphenyletyleneglycol sulfate (MHPG-SO_4) 含量を定量した。Diazepam は、検討した視床下部、扁桃核、海馬、大脳皮質、青斑核部でストレスによる MHPG-SO_4含量の増加を減弱したが、その減弱作用は Ro 15-1788 の 5−10 mg/kg の投与によりすべての部位で拮抗された。また、diazepam の作用は picrotoxin 4 mg/kg の投与により、検討した 3 部位中視床下部、青斑核部で拮抗されたが、扁桃核では拮抗されなかった。これらの結果から、diazepam のストレスによる脳内各部位の NA 代謝回転亢進を減弱する作用は、benzodiazepines の特異的作用であると考えられる。また diazepam は、視床下部、青斑核部では GABA 系ニューロンを介して、扁桃核ではそれを介さずに、ストレスによる脳内 NA 代謝回転亢進を減弱している可能性が示唆された。

Key words：rat brain noradrenaline turnover / stress / benzodiazepines

ストレス状況下におかれた動物の脳内各部位でnoradrenaline(NA)代謝回転が亢進することはよく知られており、演者らもその特性について報告してきた(3-5,11,12,13)。更に、benzodiazepine系の代表的抗不安薬であるdiazepamが、ストレスによってNA代謝回転亢進が生じた広範な部位のうち、視床下部、扁桃核、海馬、大脳皮質、橋＋延髄でのNA代謝回転亢進を減弱させることを報告した(3)。この結果から、ストレス状況下での動物の情動変化と脳内NA代謝回転亢進とが密接な関連性を有することを示唆したが(11,12)、さらにこの仮説を実証するためにはdiazepamのこの様な作用が、抗不安作用を有するbenzodiazepinesの特異的作用であることを確認する必要がある。Benzodiazepinesは脳内において、特異的かつ高親和性のbinding siteであるbenzodiazepine receptorsを介して作用すると考えられている(7,10)。もしストレス状況下でのNA代謝回転亢進に及ぼすdiazepamの作用がbenzodiazepinesに特異的な作用であるなら、benzodiazepinesのreceptorsレベルでの選択的拮抗薬であるimidazodiazepine誘導体のRo 15-1788(ethyl-8-fluoro-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-4H-imidazol[1,5-a][1,4]benzodiazepine-3-carboxylate)(2,8)により、diazepamの作用は拮抗されてよいことになる。さらに、脳内benzodiazepine receptorsはGABA receptors-chroride ionophore とcomplexを形成し、benzodiazepinesはこのcomplexを介してGABAの作用を増強することにより作用しているのではないかと考えられている(9)。もし、diazepamがbenzodiazepine receptorsに作用し、さらにGABAニューロンを介してストレスによるNA代謝回転亢進を減弱しているのなら、GABAの拮抗薬であるpicrotoxinによりdiazepamの作用が拮抗されてよいことになる。そこで今回は、diazepamのストレスによるNA代謝回転亢進の減弱作用に及ぼすRo 15-1788、さらにpicrotoxinの影響について検討した。

〔方　法〕

体重170-190g のWistar系雄性ラットを対象とした。Diazepam と Ro 15-1788 は 0.3% CMCに懸濁し、picrotoxin は salineに溶解し、いずれも腹腔内投与した。ストレスとしては、金網による拘束を 1 時間負荷した。2 つの実験を別々に行った。実験 1 では、(1)vehicle、(2)vehicle＋stress、(3)diazepam 5 mg/kg＋stress、(4)diazepam 5 mg/kg＋stress＋Ro 15-1788 5 mg/kg、(5)diazepam 5mg/kg＋stress＋Ro 15-1788 10 mg/kg、(6)Ro 15-1788 5 mg/kg＋stress、(7)Ro 15-1788 10 mg/kg＋stress の以上 7 群を設定し、Ro 15-1788はストレス開始 5分前、diazepamはストレス直前に投与した。実験 2 では、(1)vehicle、(2)vehicle＋stress、(3)diazepam 5 mg/kg＋stress、(4)picrotoxin 4 mg/kg＋diazepam 5 mg/kg＋stress の以上 4 群を設定し、picrotoxinはストレス開始15分前、diazepamはストレス開始 5 分前に投与した。実験 1、2 ともに各操作終了後、断頭し、脳を摘出し、Gispenらの方法(1)により各部位に分割し測定まで－45℃で保存した。各部位の NA の主要代謝産物である 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate (MHPG-SO_4)含量を Kohnoらの方法(6)で定量した。統計的解析はすべて、Sutudent's t-test(両側検定)を用いた。

[結 果]

実験 1 の結果を図 1 に示す。検討した 5 部位すべてで 1 時間の拘束により、vehicle 投与のみの群にくらべて MHPG-SO_4含量は有意に増加した。このストレスによる MHPG-SO_4含量の増加は、diazepam 5 mg/kg投与によりすべての部位で有意に減弱された。さらに、diazepam の減弱作用は、Ro 15-1788 5-10 mg/kg の投与によりすべての部位で有意に拮抗された。また、Ro 15-1788の投与のみではストレスによる MHPG-SO_4含量の増加に影響を及ぼさなかった。実験 2 の結果を表 1 に示す。検討した 3 部位すべてでストレスにより MHPG-SO_4含量は有意に増加し、その増加は diazepam 5 mg/kg により有意に減弱された。Diazepam の減弱作用は picrotoxin 4 mg/kg の投与に

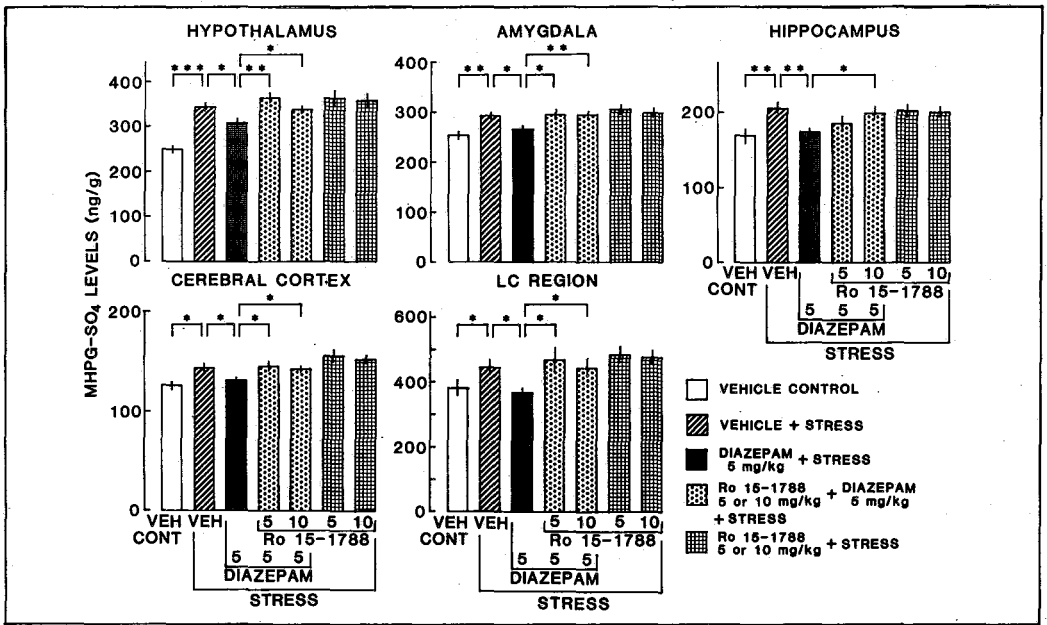


Fig 1. Ro 15-1788 antagonism of the diazepam effects on changes in MHPG-SO_4 levels in rat brain regions induced by immobilization stress for 1 hour.
*p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001.

Table 1. Picrotoxin-reversal of the diazepam effects on changes in MHPG-SO_4 levels (ng/g) in rat brain regions induced by immobilization stress for 1 hour.

Region	Vehicle Control	Vehicle + Stress	Diazepam 5 mg/kg + Stress	Picrotoxin 4 mg/kg + Diazepam 5 mg/kg + Stress
Hypothalamus	247 ± 10	329 ± 7[a]	308 ± 6[b]	339 ± 10[c]
Amygdala	253 ± 6	307 ± 7[a]	274 ± 6[b]	269 ± 9[a]
LC region	362 ± 11	416 ± 16[a]	363 ± 14[b]	419 ± 17[c]

Each value is expressed as the mean ± S.E.M. of 7-8 rats.
Statistical significance are: a vs. vehicle control; b vs. vehicle + stress; c vs. diazepam 5 mg/kg + stress: $p < 0.05$ or less.

より、視床下部、青斑核部では有意に拮抗されたが、扁桃核では拮抗されなかった。

[考 察]

従来の報告(3-5,11,12)どおり、1 時間の拘束ストレスにより脳内各部位のMHPG-SO_4含量は有意に増加し、NA代謝回転が亢進することが示された。このストレスによるNA代謝回転亢進は前回の報告(3)と同様に、今回検討した 5 部位で diazepam により減弱された。さらに、diazepam のストレスによるNA代謝回転亢進を減弱する作用は、benzodiazepines の receptorsレベルでの選択的拮抗薬であるRo 15-1788(2,8)の投与により検討したすべての部位で拮抗されたことから、diazepam の作用は脳内 benzodiazepine receptorsを介するbenzodiazepines の特異的作用であると考えられる。また、Ro 15-1788 投与のみによりストレスによるNA代謝回転亢進が影響されなかったのは、今回使用した量の範囲では Ro 15-1788それ自体は薬理作用をほとんどしめさないという報告(2,8)と一致すると思われる。また実験 2 では、ストレスによるNA代謝回転亢進を減弱する diazepam の作用は、視床下部および青斑核部では picrotoxin 投与により拮抗されたが、扁桃核では拮抗されなかった。このことは、ストレス状況下において diazepam は視床下部や青斑核部位では GABA の作用を増強することにより、また扁桃核では GABA 系ニューロンを介さずに NA 代謝回転亢進を減弱している可能性が考えられた。今回の結果より、diazepam は benzodiazepines の特異的作用としてストレス状況下で脳内 NA 代謝回転亢進を減弱することにより、動物の情動亢進を一部緩和している可能性が示唆された。なお、ストレス状況下での脳内の NA 系ニューロンと GABA 系ニューロンとの interaction については、今後さらに検討を加える必要があると思われる。

(謝辞) Ro 15-1788を提供いただきました日本ロッシュ株式会社に感謝いたします。

尚、本研究の一部は、昭和59年度文部省科学研究費 (# 59770162)の助成によった。

[文献]

(1) Gispen,W.H., Schotman,P. & de Kloet,E.R.(1972) Neuroendocrinology, 9:285-296. (2) Hunkeler,W., Mohler,H., Pieri,L., Bonetti,E.P., Cumi,R., Schaffner,R. & Hafely,W.(1981) Nature, 290:514-516. (3)井田能成・田中正敏・津田彰・岸俊善生・長崎信行(1982)神経化学, 26:357-359. (4) Ida,Y., Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Iimori,K., Tsuda,A., Hoaki,Y. & Nagasaki,N. (1982) Neurobiol. Aging, 3:233-236. (5) Ida,Y., Tanaka,M., Tsuda,A., Kohno,Y., Hoaki,Y., Nakagawa,R., Iimori,K. & Nagasaki,N.(1984) Life Sci., 34:2357-2363. (6) Kohno,Y., Mastuo, K., Tanaka,M., Furukawa,T. & Nagasaki,N.(1979) Anal. Biochem., 16:315-319. (7) Mohler,H., & Okada,T.(1977) Science, 198:849-851. (8) Mohler,H., Burkard,W.P., Keller,H.H., Richards, J.G. & Hafely,W.(1981) J. Neurochem., 37:714-722. (9) Olsen,R.W.(1981) J. Neurochem., 37: 1-13. (10) Squires,R.F. & Braestrup,C. (1977) Nature, 266:732-734. (11) Tanaka,M., Kohno, Y., Nakagawa,R., Ida,Y., Iimori,K., Hoaki,Y., Tsuda,A. & Nagasaki,N.(1982) Life Sci., 30: 1663-1669. (12) Tanaka,M., Kohno,Y., Tsuda,A., Nakagawa,R., Ida,Y., Iimori,K., Hoaki,Y. & Nagasaki,N.(1983) Brain Res., 275:105-115. (12) Tsuda,A., Tanaka,M., Kohno,Y., Ida,Y., Hoaki,Y., Iimori,K., Nakagawa,R., Nishikawa,T. & Nagasaki,N.(1983) Pharmaco. Biochem. Behav., 19:393-396.

24 反屈束を介するラット脳内ドーパミンニューロンの抑制性制御

西川　徹　（東医歯大・医・神経精神科）
B. Scatton　（Synthélabo – L.E.R.S.）

〔要　約〕

反屈束（手綱核－脚間核路）を経由するニューロンの脳内ドーパミン神経伝達調節における役割を調べる目的で，ラットを用い，tetrodotoxinを両側反屈束に50mgずつ局所注入することにより急性にimpulse flowを遮断し，78分後の脳内ドーパミン代謝の変化を検討した。Tetrodotoxin投与群では脳内ホモバニリン酸量が著明に増加し，内側前頭皮質では対照群の197%，側坐核281%，嗅結節211%，線条体では220%となった。これに対してドーパミン量には変化がなかった。d-methyl-p-tyrosine（250mg/kg，腹腔内投与）によって90分間ドーパミン合成を阻害する条件下では，tetrodotoxin投与群の方が側坐核，嗅結節および線条体で有意に低いドーパミン値を示し，ドーパミン利用が亢進していることがわかった。手綱核を破壊し反屈束のimpulse flowを6日間阻止した動物では脳内ホモバニリン酸量に変化はなかったが，こうした動物の反屈束にtetrodotoxinを注入すると上記の脳内ホモバニリン酸量の増加が著しく抑制された。以上の結果から，反屈束内impulse flowの急性遮断によって脳内ドーパミン代謝が急速に賦活されることが示され，中脳皮質，中脳辺縁および中脳線条体系ドーパミンニューロンが，反屈束に含まれるニューロンによって緊張性に抑制性制御をうけていると考えられた。

Key words：　central dopaminergic transmission　　fasciculus retroflexus　　habenular nuclei

手綱核は視床上部に位置し，内側前頭葉皮質，中隔，側坐核，嗅結節，線条体などドーパミン（DA）神経終末の豊富な部位とは視床髄条を介して，これらのDAニューロンの起始核を含む腹側被蓋野あるいは黒質とは反屈束（手綱核－脚間核路）を通して，直接，間接に多くの神経線維連絡をもっている[2)3)]。さらに，全身投与したDAの作動薬や拮抗薬が手綱核に著明な糖利用変化をもたらすことも明らかにされている[6)]。したがって，視床髄条，手綱核，反屈束に含まれるニューロンが脳内DA神経伝達を調節している可能性が考えられてきたが，十分な研究はなされていない。そこで本研究では，この経路の脳内DAニューロン調節機構としての役割を調べる目的で，ナトリウムイオンチャンネル遮断薬であるtetrodotoxin（TTX）の脳内局所注入によって反屈束内のimpulse flowを急性に阻止した後，中脳皮質，中脳辺縁および中脳線条体系DAニューロンの終末部におけるDA代謝の変化を検討した。また，手綱核を破壊した動物の反屈束にもTTXを注入して，DA代謝への影響を比較した。

〔方法〕　実験にはSprague-Dawley雄性ラット（200－240g）を用いた。TTXの脳内注入：既報[7)]に従い，無麻酔の動物を拘束して実験5日前に装着しておいたガイドカニューラより注入針を挿入，0.5μlの生理食塩水に溶解したTTX 50mgを両側の反屈束内（A＋3.4, V－0.5, L±0.85; König & Klippel の図譜）に注入した。対照群は，ガイドカニューラをつけTTX投与群と同様の条件で拘束した動物とし，反屈束への機械的刺激を避けるため注入針の挿入は行わなかった。TTXのimpulse flowに対する効果を確認するため，反屈束内のアセチルコリンニューロン活性の指標[8)]として，断頭時の脚間核内アセチルコリン濃度を測定した。注入部位は連続脳切片によってたしかめた。手綱核の破壊：

既報[7]の通り，実験6日前に両側手綱核内（A＋4.0，V＋0.4，L±0.6）にステンレス製単極性電極を挿入し，3.5mAを15秒間通電することにより破壊した。対照群では，手綱核より3mm上方に電極を挿入，通電はしなかった。破壊部位は組織学的に検討するとともに，脚間核のコリンアセチルトランスフェレース（CAT）活性を測定して手綱核中のアセチルコリンニューロンの破壊状態を知ることにより確認した。DA代謝の検討：TTX注入後78分に断頭して脳をとり出し，嗅結節を切除した後－80℃冷凍庫内で保存した。次にクライオカット（－10℃）を用いて200μmの連続脳切片を作り，内側前頭葉皮質，側坐核および線条体を切り出した。脳組織は0.1N

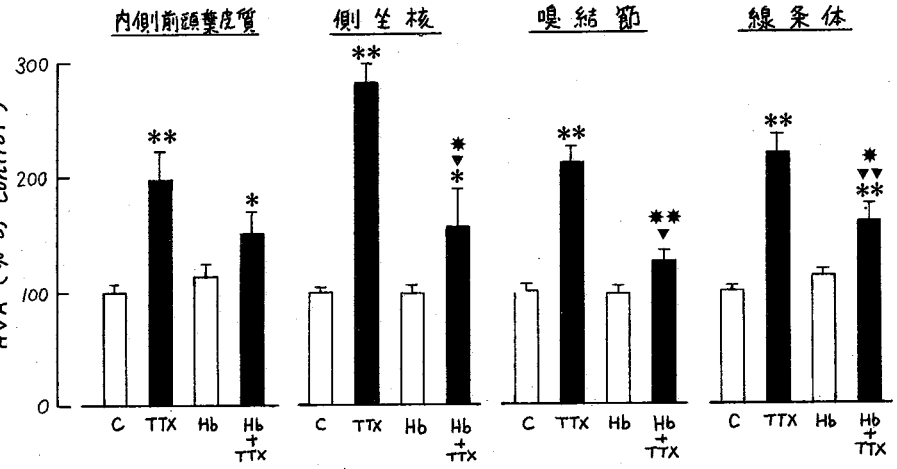


図1. Tetrodotoxinの両側反屈束内投与後のラット脳内HVA量
n＝5－8，平均値±標準誤差，＊ P<0.05，＊＊ P<0.01 は対照群（C）との比較を示す。手綱核破壊＋TTX投与群（Hb＋TTX）については，手綱核破壊群（Hb）に対する変化（▼ P<0.05，▼▼ P<0.01）および TTX投与群に対する変化（✱ P<0.05，✱✱ P<0.01）も示した。対照群のHVA量：内側前頭葉皮質 0.0627±0.039 mg/mg protein，側坐核 8.48±0.37 mg/mg protein，嗅結節 353.6±23.8 mg/g，線条体 11.08±0.49 mg/mg protein

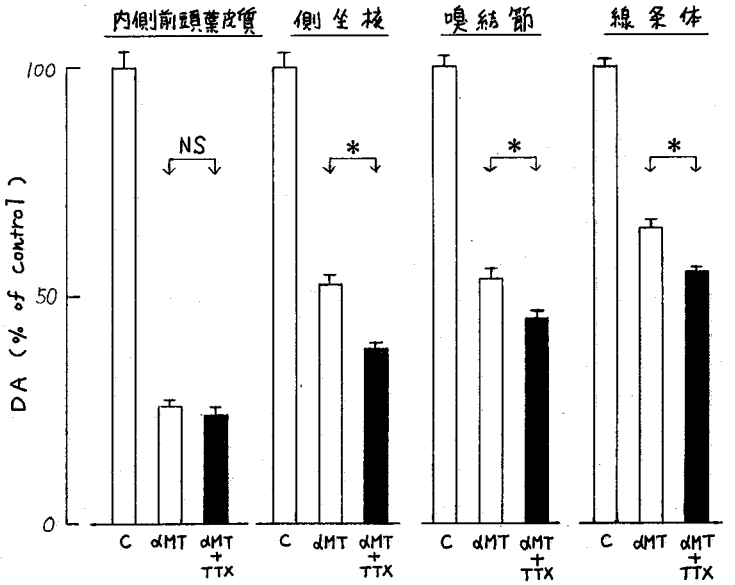


図2. Tetrodotoxinの両側反屈束内投与がラット脳内DA利用に与える影響
n＝11－12，平均値±標準誤差，＊ P<0.01，対照群（C）のDA量：内側前頭葉皮質 1.083±0.040 mg/mg protein，側坐核 107.5±3.6 mg/mg protein，嗅結節 8815.8±201.8 mg/g，線条体 135.0±2.3 mg/mg protein

perchloric acid を加えて超音波破砕し，20000 g で5分間遠沈した後上清を取り，DA および HVA の定量に用いた。一部の実験では，TTX 注入12分前に α-methyl-p-tyrosine (αMT) 250mg/kg を腹腔内投与し，DA合成阻害下の DA量減少を比較することにより，DA利用の変化を調べた。 生化学的測定：DA および HVA 量は Semerdjian-Rouquier ら[9]の方法により電気化学検出器付高速液体クロマトグラフを用いて測定した。アセチルコリン量は Guyenet らの方法の変法[8]，CAT 活性は Fonnum の方法[1]，蛋白量は Lowry ら[5]の方法に従い測定した。 統計：Student's t-test あるいは多重比較法（Duncan 法）を用いた。

【結果】1) TTX を反屈束内に注入した78分後，脚間核内のアセチルコリン量は対照群の160%に増加しており，アセチルコリンニューロンの活動性が著しく抑制されたことを示していた（対照群：2.10±0.14 (9)，TTX：3.37±0.12* (10)；n moles/mg protein，平均値±標準誤差 (n)，* P<0.001）。2) 手綱核破壊6日後，脚間核の CAT 活性は対照群の 8–10% に低下していた（対照群：443±12(8)，TTX:453±35 (8)，手綱核破壊:44±2*(8)，手綱核破壊+TTX:34±3*(5)；n moles/h/mg protein，* P<0.001 vs 対照群）。3) TTX を反屈束内に投与して78分後，脳内 HVA 量の著明な増加がみられ，内側前頭葉皮質では対照群の197%，側坐核 281%，嗅結節 211%，線条体 220% であった（図1）。手綱核破壊6日後の脳内 HVA 量は対照群と有意な差が認められなかったが，手綱核を破壊された動物では TTX の反屈束内投与による HVA 量の上昇が抑制され，手綱核破壊群に対して，内側前頭葉皮質 131%，側坐核 161%，嗅結節 125%，線条体 140% となった（図1）。TTX の反屈束内注入，手綱核破壊ともに脳内 DA量には有意な変化を与えなかった（data 省略）。5) 図2のように，αMT で前処置した動物では TTX 投与群の方が，側坐核，嗅結節，線条体で有意に低い DA値を示し，これらの部位で DA利用が高まっていることがわかった。

【考察】本実験から，反屈束内の impulse flow を急性に遮断すると脳内 DA 神経終末で HVA 量が著明に増加し，DA 代謝が著しく亢進することが明らかになった。側坐核，嗅結節および線条体で，同時に DA 利用が促進していたことを考えあわせると，DA ニューロンの活動が活発になり神経終末からの DA 放出が盛んになった結果，HVA 量の増加が引き起こされたと理解することができる。一方，手綱核を破壊して反屈束内の impulse flow を6日間持続的に阻害した場合には脳内 HVA 量の変化は見られず，DA ニューロンに対して代償的調節が働くためと考えられた。また，手綱核を破壊した動物では，TTX 投与による HVA 量の増加が抑制され，TTX 注入の DA 代謝への影響が非特異的なものでなく，おもに反屈束の impulse flow 遮断によることを支持していた。以上のことから，反屈束には中脳皮質，中脳辺縁および中脳線条体系 DA ニューロンを緊張性抑制性に制御するニューロンが含まれていると考えられる。しかし，手綱核破壊後に中脳皮質系 DA ニューロンにおける DA 代謝が選択的に亢進したという報告[4]もあり，更に検討を要する。脳内 DA 神経伝達の異常は種々の精神神経症状と関連すると考えられており，今後こうした緊張性抑制性調節の解剖学的，生化学的性状を明らかにしてゆくことは，精神神経症状の発現機構や治療薬の作用機序を解明する上で重要な一段階となるであろう。

【文献】1) Fonnum, F. (1969) Biochem. J. 115 465 2) Herkenham, M. and Nauta, W. J. H. (1977) J. comp. Neurol. 173 123 3) Herkenham, M. and Nauta, W. J. H. (1979) J. comp. Neurol. 187 19 4) Lisoprawski, A. et al. (1980) Brain Res. 183 229 5) Lowry, O. H. et al. (1951) J. biol. Chem. 193 265 6) McCulloch, J. et al. (1980) Brain Res. 194 117 7) Nishikawa, T. and Scatton, B. (1984) Brain Res. 304 157 8) Scatton, B. and Worms, P. (1979) N.-S. Arch. Pharmacol 289 419 9) Semerdjian-Rouquier, L. et al. (1981) J. Chromatog. 218 663

25 〔^{3}H〕SULPIRIDE及び〔^{3}H〕SPIPERONEのラット線条体 D_2 ドーパミン受容体に対する結合特性（Naイオン，GTP，N−ethylmaleimide の効果）

今福　淳・朝倉幹雄・塚本　徹・松井宏晃
伊野美幸・斉藤典子・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神科）

〔要　約〕

ラット線条体における ^{3}H-sulpiride及び ^{3}H-spiperone の結合特性を検討した。^{3}H-sulpiride 結合は，Na イオン依存性であり，100 mM NaCl存在下では非存在下と比較し著明な特異的結合の増加を示した。しかし ^{3}H-spiperone 結合には影響を及ぼさなかった。また ^{3}H-spiperone を用いた競合実験では，100mM NaCl 存在下で sulpiride の親和性は著明に増加したが，haloperidol, flupentixol, mianserin の親和性の変化は見られなかった。guanosine−5′− triphosphate（GTP）は，^{3}H-spiperone 結合には変化を与えなかったが，^{3}H sulpiride 結合を増加させた。N− ethylmaleimide（NEM）は低濃度で ^{3}H-sulpiride 結合を増加させ，^{3}H-spiperone 結合には影響を与えず，高濃度では両リガンドの結合を阻害した。これら，GTP，NEM，Na イオンの効果は，アデニル酸シクラーゼ（AC）活性を抑制する α_2 リセプター結合特性に対する作用に極めて類似している。したがって sulpiride 結合部位は D-$_2$ リセプターのアゴニスト低親和性状態である可能性が示唆された。

Key words：　D-$_2$ receptor,　^{3}H-sulpiride　^{3}H-spiperone

〔緒言〕　近年，ドーパミンリセプターのサブタイプ分類が様々行なわれてきたが，現在アデニル酸シクラーゼ活性の関与による分類が一般に受け入れられている[2]。抗精神病薬の作用部位として重要とされる D-$_2$リセプターは，アデニル酸シクラーゼと共役していないか，あるいは抑制性に働くといわれている[1,3]。今回我々は，臨床上抗精神病薬として用いられ，D-$_2$アンタゴニストである ^{3}H- sulpiride，^{3}H - spiperone を用い Na イオン，N−ethylmaleimide（NEM），guanosine−5′− triphosphate（GTP）の両リガンド結合に及ぼす影響から，D-$_2$ リセプターに対する両リガンドの結合特性を検討した。

〔方法〕　(1)受容体標品：Wistar 系雄性ラット体重 180−250 g を断頭屠殺後，線条体を分割し，20 容の 50 mM Tris−HCl buffer（pH 7.5, 25℃）にて Brinkman polytron によりホモジナイズし，50,000g 10 分間遠心分離した。沈渣は同 buffer で洗浄ののち，再び遠心し，得られた最終沈渣を同 buffer に懸濁したものを受容体標品とした。

(2)　^{3}H - Sulpiride，^{3}H - spiperone結合実験：NaCl, NEM, GTP, 及び各種薬物は，各々，0.3 nM　^{3}H - spiperone（19.0 Ci/mmol），3.0 nM　^{3}H - sulpiride（60.1 Ci/mmol）と共に 25℃ 40 分間インキュベートした。NEM前処置は，組織懸濁液とともに 37 ℃，15 分間，インキュベートしたのち，氷上に取り出し，NEM と同濃度の dithiothreitol（DTT）を加え反応を止めたのち，結合実験を行なった。最終容量は 1.5 ml～2.0 ml，非特異的結合は，100 μM haloperidol または 1.0 mM sulpiride 存在下で同様に行なった。試験管内容は Whatman GF/B フィルター上に吸引ろ過し，洗浄後 β 線を測定した。データは，コンピュータを用い，非線型最小 2 乗法により解析した。

〔結果及び考察〕 ^{3}H-spiperone および ^{3}H-sulpiride結合に対する各種薬物の影響

(1) アスコルビン酸およびEDTAの効果

D-$_2$リセプター結合実験にはアスコルビン酸およびEDTAを含むassay mediumを用いることが多い。0.1%アスコルビン酸＋5.0 mM EDTA存在下では，Tris bufferのみに比較し^{3}H-spiperone特異的結合は約30%に減少した。また，haloperidol, flupentixol, sulpirideによる^{3}H-spiperone結合阻害作用は，各薬物とも3～10倍親和性が低下した。このsulpirideの作用に対し100 mM NaClが拮抗した。(data not shown)。

(2) Naイオンの効果

^{3}H-sulpiride結合には，Naイオンが必要であり，Naイオン非存在下では特異的結合はほとんどないといわれている。Fig 1に示すとおり，100mM Naイオン存在下では，非存在下と比較し約10倍の特異的結合を認めた。一方 ^{3}H-spiperone結合は，Naイオンの濃度変化(10^{-9}～10^{-2}M)によっては，ほとんど変化を認めなかった。Naイオン存在下での^{3}H-spiperone結合阻害実験を行なった(Fig. 2)。Sulpiride

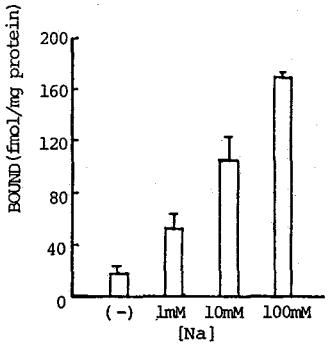


Fig. 1. Effect of sodium ions on specific [^{3}H]sulpiride binding in rat striatal membranes. Rat striatal membranes were incubated with 3 nM [^{3}H]sulpiride in the absence or presence of various concentrations of NaCl. Data shown are the mean ± S.E. of 3 experiments.

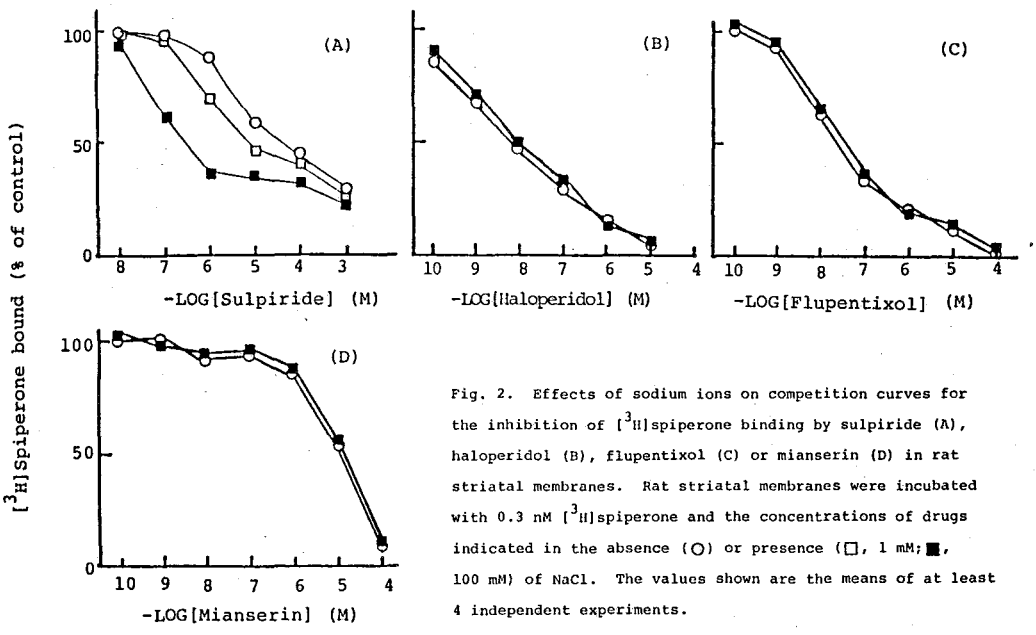


Fig. 2. Effects of sodium ions on competition curves for the inhibition of [^{3}H]spiperone binding by sulpiride (A), haloperidol (B), flupentixol (C) or mianserin (D) in rat striatal membranes. Rat striatal membranes were incubated with 0.3 nM [^{3}H]spiperone and the concentrations of drugs indicated in the absence (○) or presence (□, 1 mM; ■, 100 mM) of NaCl. The values shown are the means of at least 4 independent experiments.

は，Naイオン濃度依存性に親和性の増加が認められた（Fig. 2 (A)）。しかしhaloperidol，flupentixol等の抗精神病薬や抗うつ剤であり，serotonin-2（5-HT_2）リセプターのアンタゴニストのmianserinでは，変化は見られなかった。
（Fig. 2（B）（C）（D））

(3) NEMの効果

NEM各濃度で前処置した結果100μM～1mM NEM前処置で ^{3}H-spiperone結合は20～50%減少するが，^{3}H-spiperoneとNEMの共存下では1mM NEMで減少はみられない。（Fig. 3）。これはD-$_2$リセプターのSH基がリガンド結合に重要であることを示している。

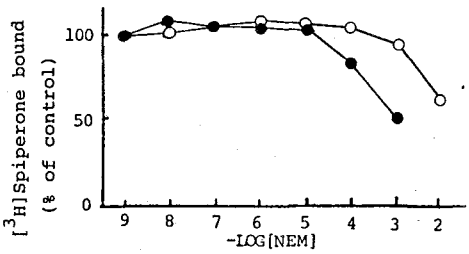


Fig. 3. Effects of N-ethylmaleimide (NEM) on specific [^{3}H]spiperone binding in rat striatal membranes.
●; pretreatment with NEM at 37°C for 10 min
○; without pretreatment

また，^{3}H-sulpirideはNEM共存下では，低濃度のNEMで結合増加を示し，高濃度では減少する。また，^{3}H-sulpiride NEM共存下では，低濃度のNEMで結合増加を示し，高濃度では減少する。

(4) GTPの効果

^{3}H-spiperone結合はGTPの濃度変化（10^{-9}～10^{-3}M）には影響されず，^{3}H sulpiride結合は増加傾向を認めた。

上記結果よりNaイオン，NEM，GTPの^{3}H-sulpiride結合に及ぼす効果は，AC活性に抑制性に作用するα$_2$リセプターのアンタゴニスト結合特性に類似している。したがってsulpiride結合部位はD-$_2$リセプターのアゴニスト低親和性状態である可能性が示唆された。

〔謝辞〕(+)-sulpirideならびに(−)-sulpirideを提供くださった藤沢薬品に感謝します。

〔文献〕

1. Cote, T. E., Greve, C. W., and Kebabian, J. W. (1981) Endocrinology, 180, 420-426
2. Kebabian, J. W. and Calne, D. B. (1979) Nature, 277, 93-96
3. Wreggett, K. A., and Seeman, P. (1984) Mol. Pharmacol. 25, 10-17

26 心理的ストレスによるラット脳内ノルアドレナリン代謝回転亢進に及ぼす電撃の先行経験の効果

津田　彰・田中正敏・井田能成・辻丸秀策
長崎信行
（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

心理的ストレス(電撃は直接受けないが、周囲の動物が電撃を受けるたびに示す鳴き声、跳び上がり、臭いなどの情動刺激に曝される)によって引き起こされるラット脳内noradrenaline(NA)代謝回転の亢進に対して、電撃の先行ストレス体験がどのような影響を及ぼすのか、脳内８部位のNA含量とその主要代謝産物である、3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate (MHPG-SO4)含量を蛍光法で測定することによって検討した。１時間の心理的ストレス負荷は視床下部、扁桃核、青斑核部と基底核のNA代謝回転を亢進させた。心理的ストレスの４８時間前に負荷した１時間の先行電撃も、視床下部、扁桃核と青斑核部のNA代謝回転を増加させた。しかし、心理的ストレスによる脳内NA代謝回転の亢進には、基底核を除いて、先行電撃は影響を与えなかった。今回の結果より、次のことが明らかとなった：(１)心理的ストレスは情動機能と密接に関連した脳部位(視床下部、扁桃核や青斑核部)のNA代謝回転を亢進させる；(２)これらの部位のNA代謝回転は、電撃を経験したラットが同一環境にもう一度戻されただけでも亢進し、この亢進は先行電撃の残存効果に原因したものではない；(３)このようなNA代謝回転の亢進に対して、後続の心理的ストレスは著明な増強作用を及ぼさない。

Key words : PSYCHOLOGICAL STRESS, RAT BRAIN NORADRENALINE TURNOVER, PRESHOCK EXPERIENCE

ストレス状況の心理的要因と脳内noradrenaline(NA)系神経活動との関連性を調べた研究が、近年数多くなされている(3,7,8)。私達は、出来るだけ身体要因の関与しない心理的ストレス状況を設定することで、電撃を自分では受けないが、周囲のラットが電撃を受けるたびに示す鳴き声、跳び上がり、臭いなどの情動刺激に曝されたラットの視床下部と扁桃核で、NAの代謝回転が亢進することを見出だし、この神経化学的変化が恐怖・不安といった情動性と密接に関係していることを示唆した(4)。

今回は、この仮説を検討するために、心理的ストレスをラットに負荷する前に電撃を先行体験させた時、心理的ストレスによって引き起こされる脳内NA代謝回転の変化はどのような影響を受けるのか検討した。恐怖の条件づけ理論(6)によれば、先行電撃を経験した後に心理的ストレスを受ければ、ラットの脳内NA系神経活動はそのような経験を有さないラットと比べて、より著明な亢進を示すものと思われる。

【方　　法】

被験体と装置

Wistar系雄性ラット(８週齢)を対象として、透明なアクリル板で２５の区画(8×19×53 cm)に仕切られた箱を装置として使用した(4)。電撃を床面のステンレス格子より与えたが、中央の８区画にはアクリル板が敷かれており、この区画に置かれる〝心理的ストレス〟ラットは電撃を受けずに、周囲の被電撃ラット(データの対象外)が示す種々の外部刺激(音や臭い)に曝される。

手続き

３２匹のラットを先行電撃条件と無電撃条件に半数ずつ分け、前者のラットに１時間の肢電撃(5 sec-on, 30 sec-off, 3.5 mA強度)を上述の装置で与え、後者のラットは電撃なしで装置に１時間

置いた。これらのラットを48時間後に再び、電撃を経験した(あるいは、置かれただけの)装置に戻し、半数のラットに対して1時間の心理的ストレスを負荷した。残りのラットは同じ時間だけ、心理的ストレスに曝されずに装置で過ごした。この処置後、断頭して脳を摘出し、Gispen et al. の方法(2)に準じて脳を8部位に分割した。脳内各部位のNA含量(青斑核部を除く)とその主要代謝産物、3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate (MHPG-SO4)含量及びdopamine(DA)含量(基底核のみ)を蛍光法で定量した(5)。また、先行電撃の脳内各部位のNA代謝回転に及ぼす後効果を調べる為に、16匹のラットの半数(残りは無電撃対照ラット)に電撃を負荷し、その48時間後に上述の要領で脳内8部位のNA含量とMHPG-SO4含量を測定した。データの解析には、2×2要因(先行電撃×心理的ストレス)分散分析を適用し、その後多重比較法($\alpha < 0.05$以下)で群間比較を行った。

【結　　果】

心理的ストレスによって、視床下部、扁桃核と青斑核部のMHPG-SO4含量ならびに基底核のNA含量が有意に増加した(Fig. 1, Fig. 2)。視床、中脳、海馬と大脳皮質のNA含量とMHPG-SO4含量は、心理的ストレスにより有意な影響を受けなかった。電撃の先行処置は、視床下部と扁桃核のNA含量を有意に減少させ、またこれらの部位と青斑核部のMHPG-SO4含量を有意に増加させた。しかしながら、電撃の先行処置は、心理的ストレスによって引き起こされる脳内NA含量あるいはMHPG-SO4含量に対して有意な変化を及ぼさなかった。基底核においてのみNA含量とDA含量がより一層増加したが、予想に反して、その他の部位ではこのような変化が起こらなかった。

脳内各部位のNA含量とMHPG-SO4含量に及ぼす先行電撃の後作用は、48時間後の時点では、測定したいずれの部位においても、認められなかった(Table 1)。

【考　　察】

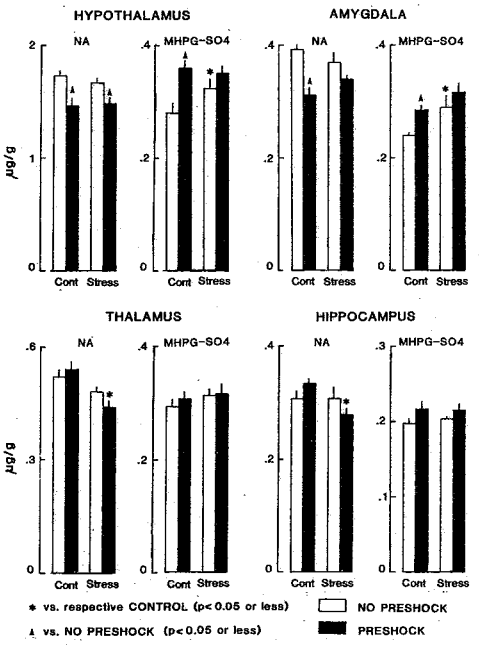


Fig. 1. Mean (± SEM) levels of NA and MHPG-SO4 in four brain regions for the preshocked and no-preshocked rats in the control and psychological stress conditions.

実際には電撃を受けなくとも、周囲のラットが電撃を被る情景を目撃し、そのラットが表出する情動反応(鳴き声、跳び上がり、臭いなど)に曝される、いわゆる"心理的ストレス"状況が視床下部、扁桃核、青斑核部と基底核のNA代謝回転の亢進を引き起こした。最初の3部位は恐怖や不安などの情動性と密接に関連し合っている部位であり(7)、この結果は私達の先の報告(4)と一致した。

しかしながら、心理的ストレスによって引き起こされたこれらNA代謝回転の亢進は、基底核以外の部位では、電撃の先行ストレス体験による影響を受けなかった。つまり、電撃への恐怖の条件づけ理論(6)に従って立てた仮説－電撃を経験したラットは他者の被電撃ラットが出す情動刺激に対して敏感に反応し、脳内NA代謝回転を亢進させる－は支持されなかった。このことは、先行電撃の嫌悪性が電撃を受けた装置などの環境要因に強く結びついて、脳内NA代謝回転の亢進が生じ、心理的ストレスを更に負荷しても、それ以上の反応を顕す余地が無かったことによる可能性が強い。

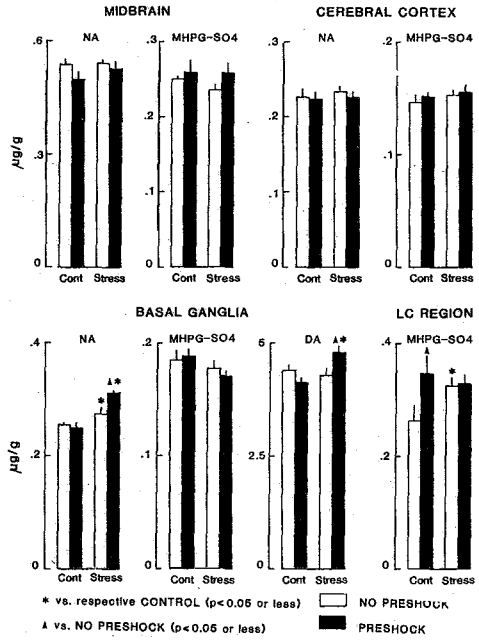


Fig. 2. Mean (±SEM) levels of NA and MHPG-SO4 in four brain regions for the preshocked and no-preshocked rats in the control and psychological stress conditions.

実際、先行電撃を経験したラットのNA代謝回転の亢進は、心理的ストレスに曝されなくとも、以前に電撃を経験した環境に再び置かれただけで生じた。この変化は、一度電撃に曝されたのみのラットの脳内NA代謝回転亢進が48時間後には回復することから、先行電撃の残存効果ではないように思われる。むしろ、電撃環境に対して条件づけられた般化恐怖によるものと考えられる。Cassen et al.(1)は、電撃ストレスによって引き起こされた脳内MHPG含量の増加が電撃に条件づけられた環境刺激に対して増感(sensitization)されたことを既に報告している。

今回の実験は、ストレス状況下での情動発現に果たす視床下部、扁桃核などの脳NA系神経活動の重要性を強調するTanakaらの仮説(4,7)をさらに支持するものと考えられる。

〔本研究の一部は、昭和58年度，昭和59年度文部省科学研究費(課題番号#58710089，#59710089)による援助を受けた。〕

TABLE 1. Mean (±SEM) levels of NA and MHPG-SO4 (μg/g) in various brain regions for shocked and nonshocked-control rats 48 hr after the 1-hr exposure of inescapable shocks.

	BRAIN REGIONS							
	Hypothalamus	Amygdala	Thalamus	Hippocampus	Midbrain	Cerebral Cortex	Basal Ganglia†	Locus Coeruleus Region
NA								
Shocked	1.51±0.03	0.39±0.02	0.54±0.02	0.31±0.02	0.59±0.03	0.26±0.02	0.27±0.01	
Control	1.53±0.04	0.39±0.02	0.54±0.02	0.31±0.02	0.57±0.01	0.24±0.01	0.25±0.01	
MHPG-SO4								
Shocked	0.28±0.01	0.25±0.01	0.29±0.02	0.17±0.01	0.21±0.01	0.11±0.01	0.14±0.01	0.27±0.01
Control	0.29±0.01	0.23±0.01	0.26±0.02	0.16±0.01	0.20±0.01	0.11±0.01	0.14±0.01	0.25±0.01

† Dopamine levels (μg/g): the Shocked rats - 3.74±0.13; Control rats - 3.84±0.07.

【引用文献】

1. Cassen, G., Roffman, M., Kuruc, M. et al. (1980) Science, 209: 1138-1140.
2. Gispen, W.H., Schotman, P. and de Kloet, E.R. (1972) Neuroendocrinology, 9: 285-296.
3. Ida, Y., Tanaka, M., Tsuda, A. et al. (1984) Life Sci., 34: 2357-2363.
4. Iimori, K., Tanaka, M., Kohno, Y. et al. (1982) Pharmacol. Biochem. Behav., 16: 637-640.
5. Kohno, Y., Matsuo, K., Tanaka, M. et al. (1979) Analyt. Biochem., 97: 352-358.
6. Miller, N.E. (1948) J. Exp. Psychol., 38: 89-101.
7. Tanaka, M., Kohno, Y., Tsuda, A. et al. (1983) Brain Res., 275: 105-110.
8. Tsuda, A., Tanaka, M., Kohno, Y. et al. (1983) Pharmacol. Biochem. Behav., 19: 393-396.

27 L－threo －3，4－dihydroxyphenylserine のラット脳 norepinephrine 代謝に及ぼす影響

仙波純一・高橋　良
（東医歯大・医・神経精神科）

〔要　約〕

人工的な norepinephrine (NE)前駆物質として期待される L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine (DOPS) を使用して、ラット脳内 NE 代謝への影響を検討した。DOPS 300-900 mg/kg i.p.投与1時間後、脳内 NE は約 20% の有意な増加をみた。脳各部位ごとにみると、前頭部皮質、脳幹部で有意に増加していた。NE の主要な代謝物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol (MHPG) は DOPS 投与で著明な増加をきたした。しかしNE,MHPG の増加はいずれも末梢性脱炭酸酵素阻害剤であるcarbidopa(CD) 20-80 mg/kg,i.p.の前処置で完全に抑制された。α-methyl-p-tyrosine, fusaric acid, FLA-63などによる NE 減少下で DOPS を投与すると、fusaric acidでのみ、CD 前処置後に NE の回復がみられた。reserpineを急性あるいは慢性に投与したところ、1.0 mg/kg/day 8日間投与の場合のみで、CD 前処置後にも NE の部分的な回復がみられた。以上の結果から、DOPS を投与しても生成する NE はわずかで、増加した NE の多くは脳血管内皮由来と考えられた。しかしある種の NE 減少下では、DOPS は脳内に移行し、NE に変化する可能性が示唆された。

Key words : L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine, norepinephrine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol

L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine (DOPS) は、体内に広く存在する L-aromatic amino acid decarboxylase (DCase)により脱炭酸され、生理的なl-norepinephrine (NE)を生成することから、NE の人工的な前駆体として期待されている。末梢投与した DOPS は中枢に入りにくいとの報告が多いものの (1,2)、NE 減少条件下では中枢に移行する可能性のあることも示されている (3,4,5)。今回の実験では、ラットを用いて各種の NE 減少状態を作製した後、DOPS を投与し、脳内の NE とその主要な代謝物である3-methoxy-4-hydroxyphenyl-ethylene glycol (MHPG)を測定し、DOPS の中枢移行性を検討した。

［方法］

Wistar系の雄性ラット（体重 170-220 g ）を使用した。DOPS とcarbidopa (CD)は、0.5% methylcelluloseに懸濁して、腹腔内に投与した。NE, total MHPGの測定は、既報の方法により、HPLC-EC 法で測定した (6,7)。

［結果］

1） DOPS 投与量を150-900 mg/kg で展開し、投与後1時間での全脳 NE と MHPG を測定した（図1）。NE は 300-900 mg/kg以上の投与量で、約 20%の有意な上昇を認めた。一方、MHPG は数倍にわたる著明な上昇がみられた。

2）末梢性DCase 阻害剤であるCDを DOPS (300 mg/kg) 投与30分前に、20-80 mg/kg 投与すると、NE と MHPG の増加は 20 mg/kg 以上で完全に抑制された。

従って、以下の実験では、DOPS 投与量を300 mg/kg 、CD を60 mg/kgと定め、それぞれ DOPS 投与群、CD 前処置群とした。

３）全脳を、前頭部皮質、線条体、視床下部、脳幹部に分割し、DOPS 投与による脳各部位での NE の変化を検討した。DOPS 投与で NE は前頭部皮質と脳幹部で増加していたが、CD 前処置を行なうと、いずれの部位でも NE の増加はみられなくなった（表１）。

４）NE 減少下における DOPS 投与の影響を検討した。（表２、３）

tyrosine hydroxylase 阻害剤である α-methyl-p-tyrosine（αMT）による NE の減少には DOPS は影響を与えなかった。fusaric acid, FLA-63による dopamine-β-hydroxylase（DBH）の阻害下で DOPS を投与すると、DOPS 投与群では NE の部分的あるいは完全な回復がみられた。しかし、CD 前処置でも回復がみられたのは、fusaric acidの場合のみであった。reserpine を急性あるいは慢性に投与したところ、いずれの場合でも DOPS 投与群では部分的な NE の回復がみられたが、1.0 mg/kg/day 慢性投与の場合のみ、CD前処置群でも回復がみられた。MHPG は、DOPS 投与群では著明に増加したが、CD 前処置でほぼcontrol の値になった。

［図 1］

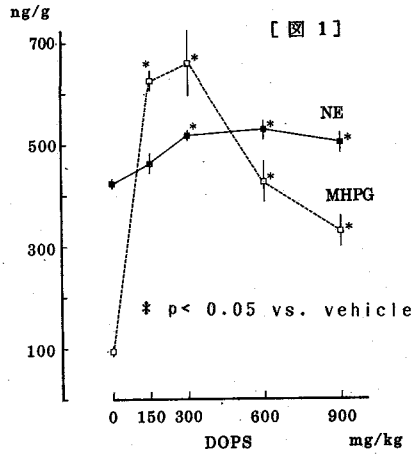


Table 1. Effect of DOPS administration on the norepinephrine contents in the discrete brain regions of rats

	vehicle	DOPS	Carbidopa + DOPS
frontal cortex	213 ± 9	282 ± 21*	234 ± 34
striatum	185 ± 39	211 ± 20	216 ± 32
hypothalamus	1471 ± 104	1413 ± 46	1269 ± 71
brain stem	545 ± 9	610 ± 17**	514 ± 23

Results are expressed as mean ± SEM (ng/g; N = 4-5).
* p< 0.05, ** p< 0.01 vs. vehicle (Student's t-test)

Table 2. Effect of DOPS on the depletion of norepinephrine in the rat whole brain induced by various drugs.

	hours after injection		vehicle	DOPS	carbidopa + DOPS
no pretreatment		NE	427 ± 8.7	522 ± 11**	415 ± 21
		MHPG	96 ± 6.8	664 ± 68**	104 ± 15
α-methyl-p-tyrosine (250 mg/kg)	5hr	NE	171 ± 12	174 ± 8.6	169 ± 12
		MHPG	33 ± 2.3	205 ± 12**	36 ± 2.0
fusaric acid (75 mg/kg)	3hr	NE	249 ± 31	430 ± 24**	465 ± 34**
		MHPG	100 ± 6.4	417 ± 19**	84 ± 3.7
FLA-63 (25 mg/kg)	5hr	NE	70 ± 8.4	153 ± 33*	86 ± 9.6
		MHPG	62 ± 1.4	83 ± 18	57 ± 2.5

Results are expressed as mean ± SEM (ng/g; N = 4-7). * p< 0.05, ** p< 0.01 vs. vehicle (Student's t-test)

［考察］

すでに Bartholini ら（1）は、L-threo-DOPS 500 mg/kg ,i.p. 投与で脳内の NE の軽度の上昇がみられるものの、末梢性 DCase阻害剤である benserazideの前投与で抑制されることから、上昇した NE は主に脳血管内皮由来であろうと考え、DOPSは脳実質に入らないか、あるいは入っても生成される NE はわずかであろうと結論した。われわれも CD を用いて、彼らとほぼ同様の結果を得た。脳内 MHPG についてみても、その増加は CD 前処置で完全に抑制された。

一般に血液脳関門の弱いとされている視床下部では DOPS が実質に移行し、NE の増

加が期待されたが、部位ごとの検索では全脳でのNEの増加は主に前頭部皮質や脳幹部に由来するようであった。

ところで、NE減少状態では、DOPSが脳内に移行する可能性のあることは現在までいくつか報告がある。αMT (3,4)やFLA-63 (5) をラットやマウスに投与した際のNE減少下で、DOPSを投与すると、NEの回復がみられるというものである。しかしわれわれは、彼らの結果を再現できなかった。彼らは、末梢性DCaseの前処置は行なっておらず、DOPS単独投与によるNEの回復が、はたして脳実質内で生じているかは今後の問題となろう。一方、FLA-63よりは弱いが同様にDBH阻害剤であるfusaric acidを用いた場合、CD前処置群でも、NEが回復することを確認した。急性のreserpine投与に対してはDOPSが無効であったが、比較的大量のreserpine 1.0 mg/kg/day, 8日間投与後には、部分的ではあるがNEの回復がみられた。

Table 3. Effect of DOPS administration on the norepinephrine metabolism in the whole brain of acutely and chronically reserpinized rats.

		vehicle	DOPS	carbidopa + DOPS
Acute				
1.0 mg/kg	NE	136 ± 13	132 ± 1*	131 ± 17
	MHPG	44 ± 2.6	408 ± 29**	56 ± 3.9*
Chronic				
0.5 mg/kg/day	NE	84 ± 12	122 ± 11**	79 ± 4.3
	MHPG	37 ± 2.0	284 ± 15*	45 ± 4.3
1.0 mg/kg/day	NE	81 ± 2.5	172 ± 19**	93 ± 8.6**
	MHPG	41 ± 0.2	336 ± 36*	57 ± 1.1**

Rats were injected i.p. with reserpine acutely or chronically. Two days after the last injection or 20 hours after a single injection of reserpine, DOPS (300 mg/kg) or vehicle was injected i.p. Carbidopa (60 mg/kg i.p.) was administered 30 min before DOPS. Results are expressed as mean ± SEM (ng/g; N = 4-7).
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle (Student's t-test)

Narabayashiら (9)は、Parkinson病のfreezing phenomenonにDOPSが有効であったとの臨床報告をしており、ヒトにおける中枢移行性が示唆されている。一部のうつ病では、中枢のNE減少がその病態ではないかと推定されているが、われわれはすでに5例のうつ病患者にCDを併用してDOPSを投与し、うち1例に有効であったことを報告した (10)。以上の動物実験の結果を考慮すると、うつ病のすべてにDOPSが有効かはともかく、一部のうつ病に対しては、NEのprecursor補充療法となることが期待される。

[文献]

(1) Bartholini, G., Constantinidis, J., Puig, M., Tissot, R. and Pletcher, A. (1975) J. Pharmacol. exp. Ther., 193, 523 (2) Benkert, O., Gluba, H. and Matussek, N. (1973) Neuropharmacol., 12, 177 (3) Creveling, CR., Daily, J., Tokuyama, T., and Witkop, B. (1968) Biochem. Pharmacol., 17, 65 (4) Cuello, AC., Scapagnini, U., Licko, V., Preziosi, P., and Ganong, WF. (1973/74) Neuroendocrinol., 13, 115 (5) Svensson, TH. (1970) Eur. J. Pharmacol., 12. 161 (6) 仙波純一、本橋伸高 (1983) 医学のあゆみ 125, 569 (7) 仙波純一 (1983) 精神経誌 85, 349 (8) Edwards, DJ. and Ritz, M. (1981) Prog. Neuro-Psychopharmacol. 5, 559 (9) Narabayashi, H., Kondo, T. Hayashi, A., Suzuki, T. and Nagatsu, T. (1981) Proc. Jpn. Acad. 57, Ser. 2, 351 (10) 高橋良、立石紀昭、高城昭紀、吉田秀夫、吉本静志、広中都朗、別府千賀子 (1983) 厚生省神経疾患研究委託費「そううつ病の生化学的成因、特に代謝障害に関する研究」昭和57年度報告書、pp. 17

28 長期ドーパ投与におけるラットの行動薬理的変化

溝渕睦彦・堀口　淳・川本立夫（愛媛大・医・神経精神科）
吉村裕之（同・薬理）
三宅正治（同・機器センター）
柿本泰男（同・神経精神科）

〔要　約〕

パーキンソン病における長期ドーパ療法の適否について検討するため、ラットにドーパを12ヶ月間投与し、行動薬理及び生化学的変化を調べた。ドーパ投与群の体重増加は投与開始から次第に遅延し、12ヶ月後には対照群に比し12％の体重減少を認めた。オープンフィールド法による自発的活動量を長期ドーパ群、対照群、ドーパ中止群、及び短期ドーパ群の4群について比較した。*grooming*, *rearing*, *locomotion* 共に対照群に比し他の3群は高く、特に*locomotion*は長期ドーパ群は対照群の約2倍の運動量を示し、ドーパ中止群においても運動量は維持されていた。回避学習は、長期ドーパ群、ドーパ中止群が対照群、短期ドーパ群に比し回避反応成功率は高く、最終6日目には80％以上に達した。したがって学習の獲得が長期ドーパ群で高いのは、*locomotion*の高いためではなく、学習能の老化防止によるものかもしれない。

なお、6ヶ月ドーパ投与による脳内コリンアセチルトランスフェラーゼ活性には差は認められなかった。

以上より、長期ドーパ投与は、自発運動量と回避反応成功率を高め、その効果は投与中止後も維持され、短期投与とは異なる効果があった。

Key words：
L-DOPA, behavioural effect, choline acetyltransferase,

現在パーキンソン病の治療薬として、主にL-DOPAが使用されているが、ここ数年L-DOPA療法の見直しがなされつつある。我々の研究室でも痴呆を伴うパーキンソン病患者の長期L-DOPA療法の是非について、CTスキャン、脳波、心理検査等から検討を加え、L-DOPA長期投与によりパーキンソン病患者の痴呆が促進される可能性を考えた[1,2]。

そこで、今回ラットにL-DOPAを長期投与し、オープンフィールド法を用いて自発的活動性を、学習行動は一方向回避学習法を用い行動学的に検討すると共に、近年学習機能や痴呆との関連が強く示唆されている大脳アセチルコリン系のマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼ活性を測定し、生化学的にも検討を加えた。

〔実験材料及び方法〕

動物及び薬物投与法：　ラットは生後8週のウィスター系雄ラットを用い、ドーパは1％カルボキシメチルセルロース液に懸濁し、0.5g 1日1回、18:00～20:00に胃ゾンデにより強制的に経口投与した。対照としては、1％カルボキシメチルセルロース液のみを投与した。ラットは以下の4群に分け、自発的活動性を測定した後回避学習を行わせた。

1)長期ドーパ群：　12ヶ月間ドーパを投与し、さらに行動実験中も投与を続けた。
2)対照群：　12ヶ月間カルボキシメチルセルロースを投与し、さらに行動実験中も投与を続けた。
3)ドーパ中止群：　12ヶ月間ドーパを投与後、カルボキシメチルセルロースのみを投与し8日目から行動実験を開始した。

4)短期ドーパ群： 12ケ月間カルボキシメチルセルロースを投与し、以後ドーパを投与し4日目から行動実験を行った。

自発的活動性の測定法： オープンフィールド法を用い、1日3分間、連続5日観察し、ビデオテープ収録後 grooming, rearing, locomotion の各項目について、頻度と継続時間を計測した。

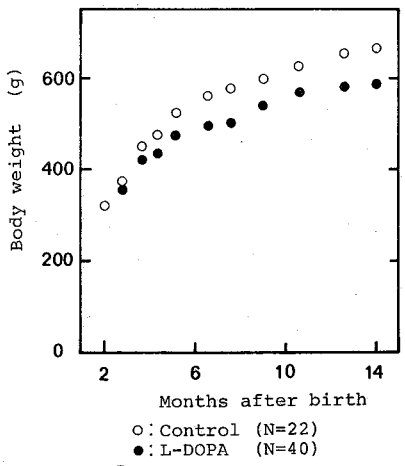
回避学習行動： 延滞条件づけによる一方向回避学習法を用い、7秒間先行するブザーによる条件刺激後、20秒間の無条件刺激（1mA通電）と条件刺激を加え、1日15試行、連続6日行った。なお、試行前に15分間ラットを箱に適応させた後に実験に移った。

コリンアセチルトランスフェラーゼ活性の測定は、Fonnum[2]の方法により、(1-^{14}C) acetyl CoA を用いて duplicate で測定した。

〔結果〕

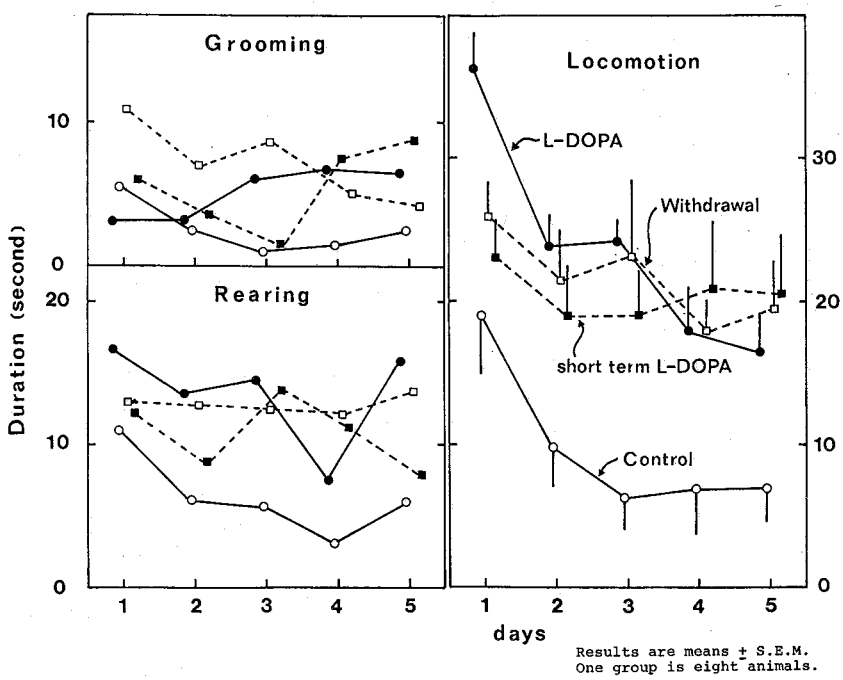
体重増加は、ドーパ投与開始後から次第に減少し、12ケ月後にはドーパ群が対照群に比し、12%の減少を示した（図1）。

図1 体重増加曲線



自発的活動量は、図2に示すように、grooming, rearing, locomotion 共に対照群が他の3群より低く、特に locomotion において最も顕著に認められ、ドーパ群は観察期間中常に対照群の約2倍の自発運動量が認められ、ドーパ投与中止後一週間以上経っても維持されていた。短期ドーパ投与群も、ドーパ群、ドーパ中止群とほぼ同程度の自発運動量を示した。なお、頻度においても同様の傾向を示し、各群とも1日目

図2、各4群の自発的活動量

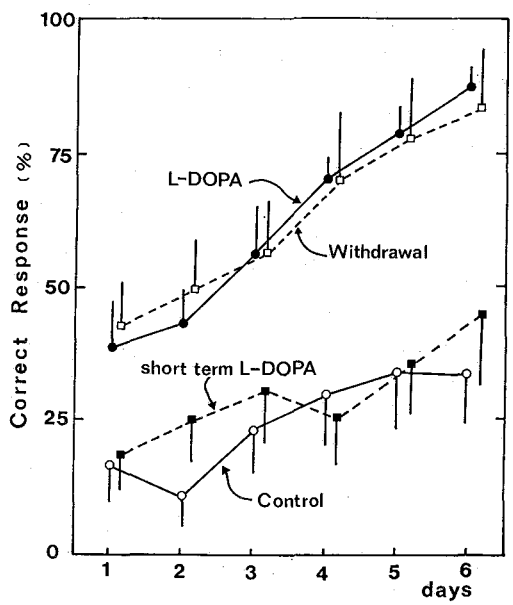


Results are means ± S.E.M.
One group is eight animals.

に自発運動量が高く、以後次第に減少し、4、5日目には定常状態に達した。

図3の縦軸は、15回試行中の回避反応成功率を表したもので、ドーパ群、ドーパ中止群ともに、1日目から約40%の成功率を示し、6日目には80%以上に達した。対照群と短期ドーパ群は、6日目でも成功率は50%以下であった。最終2日間（5日、6日目）ともに成功率80%以上の学習基準に達したラットは、8例中ドーパ群5例、ドーパ中止群6例であったが、対照群、短期ドーパ群には1例も認められなかった。すなわち、長期ドーパ投与による回避反応成功率の増大は、投与中止後も維持されている。一方、短期ドーパ投与の効果は、自発的活動性は増加させるが、回避反応成功率は増加させず、成功率の増加は活動性上昇によるものではないと考えた。なお、電気刺激に対する閾値は、グリッドの電流を次第に増加させ、*screaming*を指標として測定したが、各群とも差は認められなかった。したがって、成功率の差は閾値の差に基づくものではない。

図3．各4群の学習曲線



Results are means ± S.E.M.
One group is eight animals.

6カ月ドーパ投与中の脳内コリンアセチルトランスフェラーゼ活性は、表1に示したように大脳皮質、小脳とも差は認められなかった。さらに脳重にも差はなかった。

Rats (N=5)	Whole Brain (g wet tissue)	CAT activity (μ moles /g tissue/hour) cerebral cortex	cerebellum
Control	2.14 ± 0.10	5.85 ± 0.35	0.98 ± 0.12
L-DOPA	2.16 ± 0.04	6.03 ± 0.45	1.00 ± 0.10

All values are expressed as means ± S.D.

表1．6ヶ月ドーパ投与中の脳内コリンアセチルトランスフェラーゼ活性

〔考察〕

長期ドーパ投与により、健常ラットへの投与は自発運動量のみならず回避反応成功率をも上昇させた。この健常ラットへの効果は、*Cotzias* 等の報告したドーパによるマウス生存率上昇効果と類似のもので、生体の老化防止と関係している可能性もある。なお、ドーパ投与12ヶ月の脳内コリンアセチルトランスフェラーゼ及びアセチルコリンレセプターについても検討中である。

〔参考〕

1) Cotzias,G., Miller,S. et al (1977) Science 196, 549.
2) Fonnum,F. (1969) Biochem.J. 115, 465.
3) Horiguchi,J., Nakagawa,M. et al (1983) Jpn.J.Clin.Psychiatr. 12, 623.
4) Horiguchi,J., Inami,Y. et al (1984) Jpn.J.Clin.Psychiatr. 13, 199.

29 ストレプトゾトシン誘発性糖尿病動物モデルにおける網膜内ドーパミン・ニューロンの代謝と機能の変化について

栗山欣弥・西村千尋
（京府医大・薬理）

〔要　約〕

ストレプトゾトシン(STZ)を用いて作成した実験的糖尿病ラットの網膜における神経活性アミノ酸及びアミンの動態について検討を行い、以下の結論を得た。
1．ラット腹腔内にSTZ 30 mg/kgを5日間連続投与後9週目の時点で、網膜内valineの増加とphenylalanineの減少がみられたが、他の神経活性アミノ酸には変化がなかった。
2．網膜での主要な神経活性アミンであるdopamine (DA)は、STZ投与後3週目より有意な減少を示した。しかしながら,その前駆物質である[^{3}H]tyrosineの摘出網膜への取り込みやDA合成の律速酵素tyrosine hydroxylaseの活性には変化はみられなかった。
3．Aromatic L-amino acid decarboxylase阻害剤hydroxybenzylhydrazineや有機酸輸送阻害薬probenecidを用いたin vivoでのDA代謝の解析から、STZ投与動物では網膜内DOPA生成能に変化はないが、DAの代謝産物であるdihydroxyphenylacetic acidからhomovanillic acidへのメチル化の過程が糖尿病動物網膜で障害されていることが示された。
4．摘出網膜への[^{3}H]DA取り込み能に変化はみられなかったが、網膜組織からの[^{3}H]-DAの自発性遊離は、その速い遊離相において糖尿病動物で促進がみられ、さらに[^{3}H]-DAの反復光刺激に対応した放出が本病態で抑制されていることが見出された。

Key words： Streptozotocin-induced diabetes, Retina, Dopamine

一般に糖尿病患者の網膜電図(ERG)では、網膜症が検眼鏡的に認められない時点でもその半数以上に律動様小波の異常が存在することが報告されており(1,2)、糖尿病ラットを用いた実験でも同様の変化が認められている(3,4)。本網膜症に伴う律動様小波の変化には網膜血管系の病変の関与がまず考えられるが、眼底病変の見出されない早期からERG上の変化が観察されることから、網膜血管系の変化よりもむしろその律動様小波の起源である網膜アマクリン細胞に障害が存在する可能性が示唆されている(5)。そこで本研究では,膵臓ランゲルハンス島β細胞に選択的毒性を有するストレプトゾトシン(STZ)を用いて実験的糖尿病ラットを作成し、その網膜におけるアマクリン細胞の障害の可能性について、神経活性アミノ酸やアミンの代謝動態を中心とする神経化学的解析を試みた。

【実験方法】Wistar系雄性ラット(100-150 g)の腹腔内に30 mg/kgのSTZを5日間連続投与することにより高血糖ラットを作成し、その網膜内アミノ酸は高速液体クロマトグラフ・アミノ酸分析システムにより(6)、アミンは高速液体クロマトグラフ・電気化学検出器を用いてそれぞれ測定した。網膜内tyrosine hydroxylase (TOH)活性(7)及びaromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)活性(8)の測定にはアイソトープ法を使用した。さらに摘出網膜からの[^{3}H]dopamine (DA)の自発性遊離については、昼光下で摘出して15分間のpreincubationを行った網膜組織を37°C、20分間[^{3}H]DAとincubateし、以後は暗室電球のみを光源として,2分間隔で0.1 mMのascorbic acidと20 μMのpargylineを含むKrebs-Ringer緩衝液中に遊離される放射活性を測定することにより検討を行った。また光刺激には30 cmの距離から2-3 Hzで点滅する2灯の250 W copy lampを用いた。

【実験結果】STZ の連続投与後 9 週目までラットは 400-600 mg/dl という高血糖を維持し、その体重の増加も著明に抑制された。STZ 投与後 9 週の動物網膜では、valine (Val) 含量の増加と phenylalanine (Phe) の減少がみられたが、他の神経活性アミノ酸には有意の変化はみられなかった(Fig. 1.)。

一方、網膜における主たる神経活性アミンである DA は、STZ 投与後 3 週目より有意な含量の減少を示した(Fig. 2.)。この時 DA の D_2 受容体への結合を反映する [^{3}H]spiperone の網膜顆粒分画への結合能の検討を行ったが、糖尿病動物で上昇傾向を示すものの有意の変化は認められなかった。

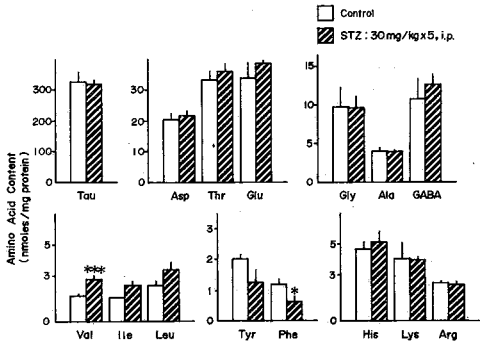


Fig. 1. Effect of STZ-treatment on amino acids content in retina

DA の前駆アミノ酸 [^{3}H]tyrosine の摘出網膜への取り込み及び遊離は糖尿病動物で変化を示さず、DA 生合成系酵素である TOH 並びに AADC 活性についても STZ 投与動物網膜において著変を示さなかった(Fig. 3.)。AADC 阻害剤、m-hydroxybenzylhydrazine (100 mg/kg, i.p.) 投与に伴う網膜内 DOPA の増量に関しても糖尿病動物群と対照群とでその増加率に差を認めず(Fig. 4.)、糖尿病動物モデルの網膜では DA 生合成系の変化はみられないことが明らかとなった。他方 AADC 阻害剤投与に伴う網膜内 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 含量の減少は、STZ 投与後 9 週目の網膜で有意な遅延を示した(Fig. 4.)。また有機酸輸送阻害薬 probenecid (200 mg/kg, i.p.) 投与による網膜内 homovanillic acid (HVA) の増量についても、糖尿病動物でその蓄積率に有意の低下を認め、本病態モデルの網膜において DOPAC から HVA への代謝的変換が障害されている可能性が示唆された。

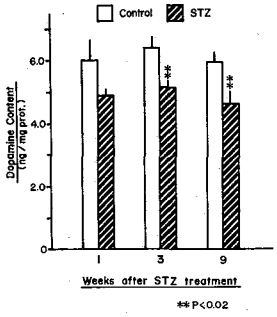


Fig. 2.
Effect of STZ-treatment on dopamine content in retina

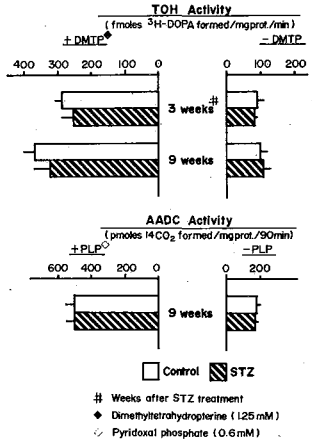


Fig. 3.
Effect of STZ-treatment on activities of TOH and AADC in retina

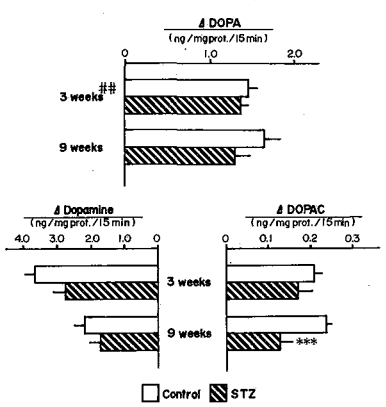


Fig. 4.
Effect of STZ-treatment on alteration of DOPA, DA and DOPAC contents in retina following administration of AADC inhibitor

摘出網膜への [^{3}H]DA 取り込み能に関しては、STZ 投与動物で対照群との間に差を認めなかった。次に網膜組織からの preload した [^{3}H]DA の自発性遊離 (efflux) について検討を行ったところ、その最初の速い遊離相 (rapid phase) は細胞外プールからの遊離を反映すると考えられる [^{14}C]inulin の遊離 pattern とは全く異なり、また [^{3}H]tyrosine の遊離曲線とも一致しないことが判明した。STZ 投与群ではこの速い相における $t_{1/2}$ の有意な短縮と rate constant の増大が見出された (Table 1.)。また網膜組織からの [^{3}H]DA 遊離が定常状態に近づく遅い遊離相 (slow phase) において 4 分間の光刺激を与えると、20-40 % の [^{3}H]DA 放出 (光刺激反応性放出) の増加がみられたが、STZ 投与後 3 週目のラット網膜ではこの 2 回目の光刺激に対応する放出の増加が有意に抑制されており、9 週目の網膜でも同じ傾向が認められた (Table 2.)。

Table 1. Effect of STZ-treatment on [^{3}H]Dopamine Efflux from Retina

		Rapid phase		Slow phase	
		Control	STZ	Control	STZ
Rate Constant	3#	1.60 ± 0.16	2.81 ± 0.11***	0.060 ± 0.005	0.073 ± 0.006
	9	2.26 ± 0.19	3.97 ± 0.77	0.115 ± 0.014	0.118 ± 0.010
$T_{1/2}$	3	5.1 ± 0.2	4.0 ± 0.1***	29.5 ± 1.2	26.7 ± 1.3
	9	4.9 ± 0.2	3.8 ± 0.3**	21.5 ± 1.5	20.8 ± 1.2

Rate constant (min^{-1}) and $t_{1/2}$ (min) in each kinetic phase were calculated from the compartmental analysis. Each value represents the mean ± S.E.M. obtained from 3 to 6 animals. # Weeks after STZ-treatment. ** P < 0.02, *** P < 0.01, compared with corresponding control value.

Table 2. Effect of STZ-treatment on Light-stimulated Release of [^{3}H]Dopamine from Retina

Stimulation		% Increase	
		Control	STZ
1st	3#	40.6 ± 13.8	25.8 ± 7.2
	9	21.7 ± 7.9	29.5 ± 12.5
2nd	3	30.4 ± 6.9	12.0 ± 3.5*
	9	33.5 ± 15.8	15.6 ± 8.9

Each value represents the mean ± S.E.M. obtained from 3 to 6 animals.
Weeks after STZ-treatment. * P < 0.05, compared with corresponding control value.

【考察】糖尿病モデル動物の網膜でみられた分枝アミノ酸 Val の増加は従来の報告(9)通り糖尿病動物における血漿中の変化を反映するかのと考えられ、網膜内 Phe の減少はこの分枝アミノ酸との競合的輸送阻害の結果、二次的に引き起されたと考えられる。しかしながら網膜アマクリン細胞で神経伝達にあずかるとされる GABA などには変化がみられなかった。一方、同じくアマクリン細胞の一部に局在し光の情報伝達に重要な役割を演じていることが知られる DA は、糖尿病動物の網膜で有意な低下を示した。STZ 投与動物網膜では in vitro でも in vivo でも DA 生合成系の変化が見出されなかったことから、この網膜 DA 含量の減少機構には DA の自発性遊離の特異的な促進が大きくかかわっていると考えられる。さらに反復光刺激に対応する DA 放出が糖尿病動物群で有意な低下をきたすことも明らかとなった。本研究で認められたこの様な網膜 DA ニューロンの変化は、糖尿病患者や糖尿病ラットで報告されている早期の ERG 上の変化と対応するものであり、その背景をなす重要な神経化学的変化の一つである可能性が示唆される。

【謝辞】本研究の一部は文部省科学研究費 (58770172) の援助のもとに行った。

【文献】

(1) Yonemura,D., Tsuzuki,K. and Aoki,T. (1962) Acta Ophthal.[Suppl.]70, 115-123. (2) Brunette,J.R. and Desrochers,R. (1970) Canad. J. Ophthal.5, 373-380. (3) 玉井嗣彦、田中清 (1973) 眼紀. 24, 847-850. (4) 田中一徳 (1981) 眼紀. 32, 1470-1480. (5) 米村太蔵 (1977) 日眼会誌. 81, 1632-1665. (6) Nishimura, C., Ida,S. and Kuriyama,K. (1983) in Sulfur Amino Acids (Kuriyama,K., Huxtable,R.J. and Iwata,H., eds) pp 233-250, Alan R. Liss, Inc., New York. (7) Hendry,I.A. and Iversen,L.L. (1971) Brain Res.29, 159-162. (8) Lloyd,K.G. and Hornykiewicz,O. (1972) J. Neurochem.19, 1549-1559. (9) Frayser,R. and Buse,M.G. (1978) Diabetologia 14, 171-176.

30 実験的糖尿病ラットの黒質－線条体系における神経伝達物質の変化について

左　萍萍・栗山欣弥
（京府医大・薬理）

〔要　約〕

Streptozotocin(STZ)の投与により作成したWistar系糖尿病ラット（STZ投与9週間後）の，黒質-線条体系におけるドーパミン(DA)およびGABAニューロンの代謝的ならびに機能的な変化を検討した．

(1) STZ 30 mg/kg, 5日間連続腹腔内投与を行うと，3週目から9週目まで400-600 mg/dlという著明な血糖上昇がみられ，これらの変化はインシュリンの連日投与により阻止された．

(2)糖尿病ラットの黒質においては，DAの代謝産物である3, 4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)およびhomovanillic acid (HVA)の有意な減少がみられ，一方，線条体においては，GABA 含量の有意な増加が認められた．

(3) GABA含量増加の観察された線条体においては，GABA合成酵素であるglutamic acid decarboxylase (GAD)ならびにcholine acetyltransferase (ChAc)の有意な活性上昇が見出されたが，カテコラミンの合成や代謝的分解に関連を有する諸酵素の活性には変化は認められなかった．

(4)糖尿病ラット線条体切片からの〔^{14}C〕DA放出をみると，放出の遅い相において抑制が存在し，対照群に比して有意な$t_{1/2}$の延長およびrate constantの低下がみられた．

(5) DAのD_2受容体への結合を反映する〔^{3}H〕スピペロンの線条体膜標品への結合は，糖尿病動物の場合対照群に比して37％の上昇を示した．

Key words：　diabetic rats ,　nigro-striatal pathyway ,　dopamine,GABA

近年糖尿病患者は漸増の傾向があり，その代謝障害の結果の一つとしての諸種の神経系の機能変化や病変が増加しつつあることは，よく知られた事実である．しかしながら，糖尿病に伴うこれらの神経障害，特に中枢神経系の障害の本態とその発現機序については，不明の点が多いのが現状である．我々は，糖尿病に伴う中枢神経系の変化，特に線条体DAニューロンの変化についての近年の報告(1)(2)に興味をもち，また，黒質－線条体系にはDAニューロンのみならず，GABAニューロンやコリン作働性ニューロンが局在し，機能的関連を有することを考慮して，糖尿病状態における上述の神経系の神経化学的変化について検討を加えた．

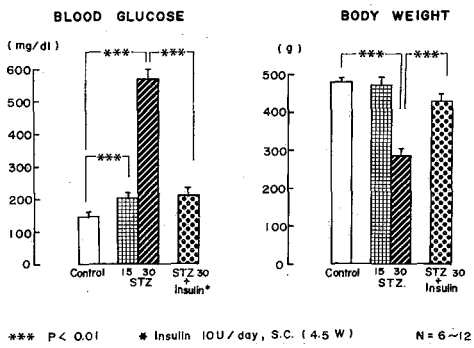


Fig.1 Alterations in blood glucose level and body weight in diabetic rats.

〔実験方法〕体重120-150 gのWistar系雄性ラットの腹腔内に30 mg/kg のSTZを5日間連続投与することにより，糖尿病ラットを作成した．インシュリン処置群には，STZ投与後4週目以後にインシュリン10単位/ラットの1日1回，連日皮下投与を行った．組織内のカテコラミン，インドルアミンおよびそれらの代謝産物の測定を行う場合には，動物をマイクロウエブ(5 Kw, 0.7秒)照射により致死させ，摘出した脳から黒質および線条体

Table 1. Changes in monoamines and its metabolites and amino acids contents in striatum and substantia nigra of diabetic rat

	Striatum		Substantia nigra	
	Control	Diabetic	Control	Diabetic
a DA	7.11 ± 0.78	8.31 ± 0.86	0.31 ± 0.04	0.42 ± 0.09
a NE	0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.05	0.28 ± 0.02	0.36 ± 0.02*
a DOPAC	0.58 ± 0.04	0.70 ± 0.08	0.27 ± 0.04	0.13 ± 0.03*
a HVA	0.59 ± 0.07	0.51 ± 0.07	0.16 ± 0.03	0.09 ± 0.01***
a 5-HT	1.30 ± 0.10	1.22 ± 0.05	0.69 ± 0.10	0.99 ± 0.13
a 5-HIAA	0.59 ± 0.06	0.48 ± 0.06	0.53 ± 0.07	0.44 ± 0.06
GABA	2.45 ± 0.14 b	2.95 ± 0.17* b	67.5 ± 2.50 c	61.25 ± 2.50 c
Glu	5.64 ± 0.48 b	5.76 ± 0.43 b	93.7 ± 6.30 c	86.25 ± 5.00 c

a: μg/g w.w., b: μmoles/g w.w., c: nmoles/mg prot.

組織を取り出して，0.05MのPCA液でホモジナイズし，遠心により得られた上清20μlを，高速液体クロマトグラフ電気化学検出器による定量に供した．GABAおよびグルタミン酸含量は既報の方法(3)に準じて測定した．線条体からの〔^{14}C〕DAの放出測定には組織切片を用いた．25℃で20分間medium(10mMグルコースを含むKrebs-Ringer緩衝液)の中でpreincubateしたのち，さらに30分間〔^{14}C〕DA(100 nM)及び100 μM pargylineを含むmediumの中でincubateすることにより〔^{14}C〕DAを取り込ませ，緩衝液により組織を洗浄したのち，各組織を3分間隔で順次移行させ，各medium中に放出された〔^{14}C〕DAの放射活性を測定した．また，〔^{14}C〕DA放出が安定したと考えられる遅い放出相において，30mMのKCl添加により高K^+刺激を行った一方，〔^{14}C〕DA放出に対するグルコースの影響を見る場合には，放出測定を開始する時点では，グルコースを除去したmediumを使用した．

〔実験結果〕Fig. 1に示したように，高用量(30 mg/kg)のSTZの連続投与群では，著明な血糖値の上昇と体重増加の抑制がみられ，これらの変化はインシュリン投与によって阻止された．このような高血糖状態における脳内神経伝達物質の変化についてみると，線条体ではGABA含量の有意な増加がみられ，黒質ではDOPAC及びHVAの有意な減少，および norepinephrine (NE) の有意な上昇が認められた (Tab. 1). 黒質におけるDOPAC及びHVAの有意な減少は少なくとも3週間目から観察され，線条体におけるGABAの増加は7週間目から認められた．さらに，線条体におけるGAD活性の上昇もGABA含量増加の時点と一致して出現し(Fig. 2),かつこのGAD活性の上昇は，補酵素であるピリドキサールリン酸の添加の有無に拘わらず認められるものであった．また同一の時点において，AChの合成酵素であるChAc活性の上昇も線条体において見出された(Fig. 2). 一方，カテコラミンの合成及び分解酵素のいづれについても，有意な活性変化を認めなかった．線条体切片からの〔^{14}C〕DA放出は，2 mMのグルコース添加により有意に抑制され(Fig. 3)，またこの抑制作用は，10 mMのdeoxyglucoseの添加により阻止された．しかしながら，DA放出の調節に関与するとされるD_2レセプターのアンタゴニストであるsulpiride 10 mMを添加しても，上述のグルコースのDA放出抑制作用には影響を与えなかった(Fig. 3)．一方，グルコースの添加は，線条体における〔^{3}H〕-GABA放出には影響を与えなかった．糖尿病動物から得た線条体切片からの〔^{14}C〕DA放出は明かな低下を示した

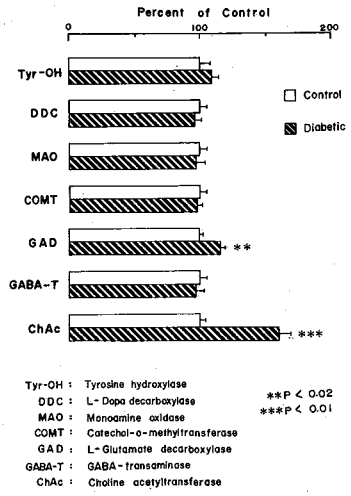


Fig.2 Alterations of various enzyme activities in striatum of diabetic rat

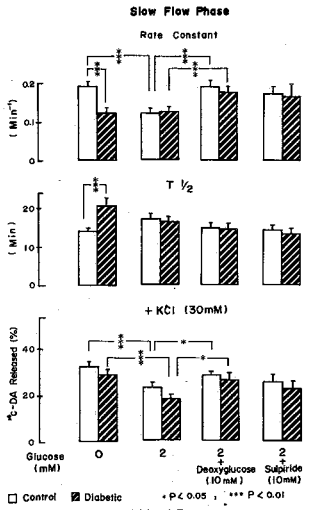


Fig.3 Alteration of striatal release of ^{14}C-DA in diabetic rat and its modification by glucose, glucose+deoxyglucose and sulpiride

が，rapid flow phase（速い放出相）には変化を認めず，slow flow phase（遅い放出相）において$t_{1/2}$の有意な延長（Fig. 3）ならびに rate constantの有意な低下が見出された．さらに，糖尿病ラットの線条体では，〔^{14}C〕DA 放出に対するグルコースの抑制効果が消失しているのが観察された．諸種の受容体に対する放射性リガンドを用い，線条体膜標品への結合能について測定した結果，D_2受容体への結合を反映する〔^{3}H〕スピペロンの結合は，糖尿病の場合37％と著明な上昇を示したが（Fig. 4），〔^{3}H〕muscimol，〔^{3}H〕diazepam 及び〔^{3}H〕QNBの結合には有意な変化がみられなかった．

〔考察〕本実験において得られた興味ある事実は，糖尿病動物の黒質－線条体系において，DAニューロンの機能低下とこれに伴うGABAニューロンの機能亢進を想定させる成績を得たことである．線条体におけるコリン作働性介在ニューロンの機能の指標となると考えられるChAc活性の上昇も，これらの機能変化を想定させる一つの根拠を与えるものと考えられる．DAニューロンの機能低下は，後シナプス膜に存在するDAレセプターのsuper-sensitivityを招来すること(2)を考えると，本研究で認められた線条体内DAレセプター結合の上昇も，糖尿病に伴う黒質－線条体DAニューロンの機能低下に起因するものと考えられる．一方，線条体のGABAニューロンの機能が黒質由来のDA作働性ニューロンによって制御されていることを示す成績が多くあり，また，黒質DAニューロン破壊により線条体内GADの著明な活性増加が誘発されること(4)を考えれば，GABA ニューロンの機能亢進は恐らくDAニューロンの機能低下に伴う二次的な変化ではないかと考えられる．現段階においては，糖尿病に伴う黒質－線条体ドーパミンニューロンの機能低下，特にドーパミンの代謝回転の低下を招来する機序の詳細は明かでないが，これらの錐体外路系における神経化学的変化の糖尿病に伴う神経症状発現における意義と共に，今後更に検討を加える必要があると思われる．

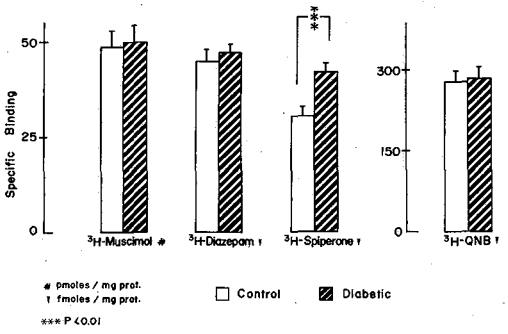


Fig.4. Alteration of various synaptic receptor bindings in striatal membrane of diabetic rat

〔文献〕

1) Lozovsky, D., Saller, C.F. and Kopin, I.J. (1981) Science, 214, 1031-1033.

2) Trulson, M.E. and Himmel, C.D. (1983) J. Neurochem., 40, 1456-1459.

3) Graham, L.T.Jr. and Aprison, M.H. (1966) Anal. Biochem., 15, 487-489.

4) Vincent, S.R., Nagy, J.I. and Fibiger, H.C. (1978) Brain Res., 143, 168-173.

31 ラット脳内ドパミン活動の日内動態

盛政忠臣・池田正明・庄盛敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化）
池田正人・永津俊治　（東工大・生命化学）

〔要　旨〕
明暗周期の下で自由運動を行なっているラットを用いて、脳内ドパミン終末部位におけるジヒドロフェニル酢酸（ＤＯＰＡＣ）量を、in vivo voltammetry 法によって、24時間にわたって経時的に測定した。
線条体、側坐核におけるＤＯＰＡＣ量は、暗期に高く明期に低い有意な日内変動を示した。これは、行動量の日内変動のパターンに対して約1時間の位相のずれ（遅延）を伴って一致するものと考えられた。大脳皮質前頭葉内側領野においても、暗期に高い有意な日内変動を示したが、その位相は、前記2部位に対して約2時間早いことが示された。黒質緻密層においては、逆に暗期に低値を示し、この領域におけるドパミン自己受容体に関する従来の知見に一致するものと考えられた。
ＤＯＰＡＣ量の日内変動幅（最大値／最小値の比率）は、いずれの部位においても約1.3の値を示した。このことは、ドパミン代謝回転の強弱の幅が、一定範囲内にあることを示唆するものと考えられた。

Key words : dopaminergic regions, circadian organization, in vivo voltammetry

多くの時間薬理学的な知見（５，７）によって、脳内ドパミン活動には日内変動のあることが示唆されてきた。それに対して、線条体などで、ドパミン・その受容体を測定した結果、明らかな日内変動を認めた報告（６、８）もあるが、否定的な見解も多い。日内変動を認めることができなかった理由としては、測定に用いた脳部位の大きさ、測定した時点が適切でない場合などが考えられる。
近年、in vivo voltammetry 法を用いることによって、モノアミン代謝産物を生きている動物の脳内で直接測定することが可能になった（３）。さらに、連続測定することによって、視交叉差上核（２）、縫線核（１）のセロトニン代謝産物量に明らかな日内リズムのあることが報告されている。
本研究では、この方法を用いて、ドパミン終末部位（線条体、側坐核、大脳皮質前頭葉、黒質）において、ＤＯＰＡＣ量を同時にかつ連続的に測定し、それぞれの部位の特徴に検討を加えた。

〔実験方法〕
ウィスター系雄ラット（９週令）は、12時間毎の明暗周期（点灯 5:00 am）下、室温 25°C、飼・水は自由に摂取できる条件下で飼育されているものを用いた。
in vivo voltammetry によるＤＯＰＡＣの測定方法は、既報（３）を応用した。麻酔下（Pentobarbital Na, 50mg／kg, i.p）で電極を埋込んだ２日後に実験に供した。電極は、König and Klippel のアトラス（４）を参照して、以下の４部位に挿入固定した：nucleus caudatus ; anterior（A）8620μm, lateral（L）2.0mm, vertical

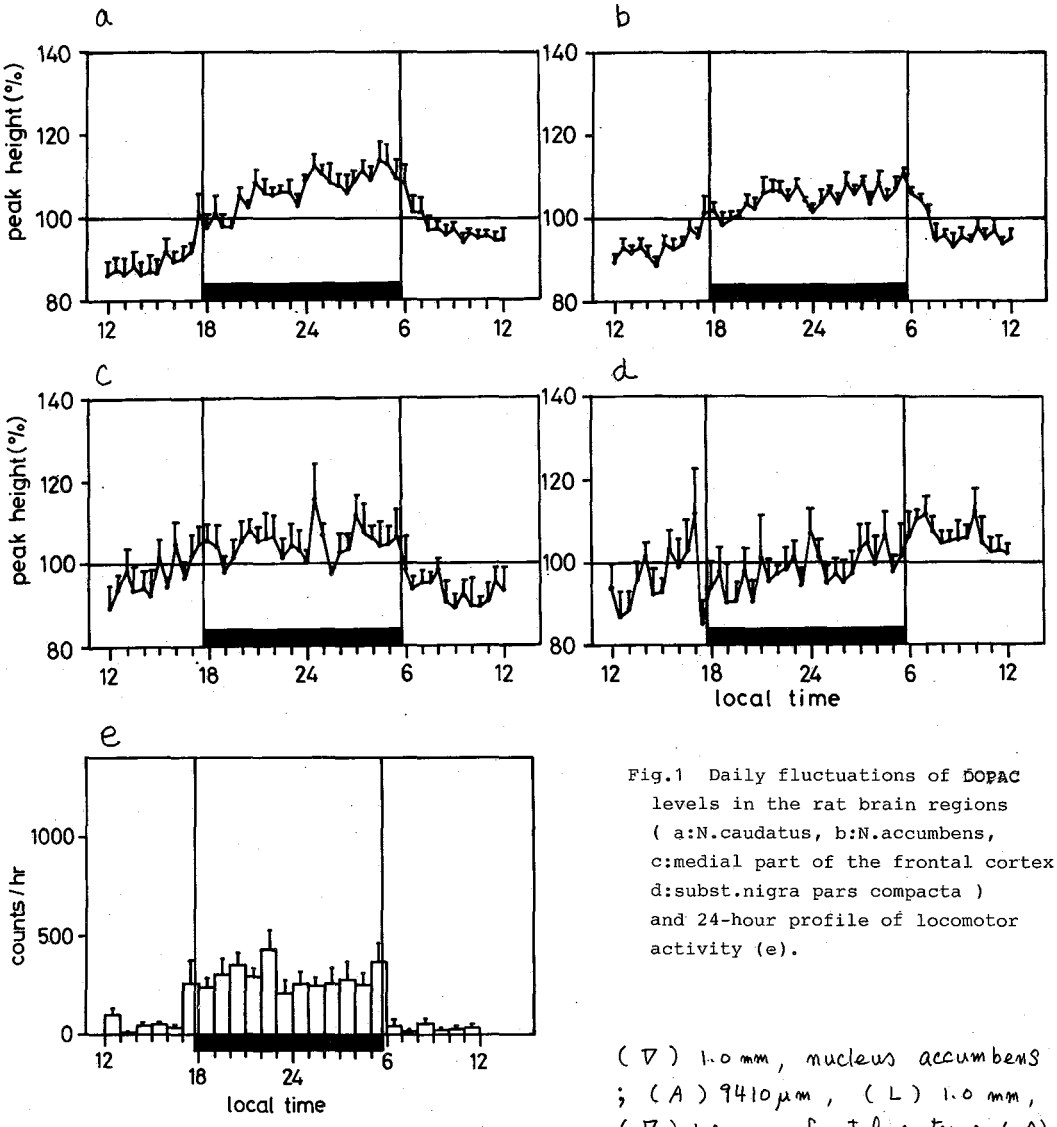


Fig.1 Daily fluctuations of DOPAC levels in the rat brain regions (a:N.caudatus, b:N.accumbens, c:medial part of the frontal cortex d:subst.nigra pars compacta) and 24-hour profile of locomotor activity (e).

Table 1 Amplitude (max/min:mean) of daily fluctuations of DOPAC levels.

frontal cortex med.	1.30
N.accumbens	1.25
N.caudatus	1.32
S.nigra p.compacta	1.32

(▽) 1.0 mm, nucleus accumbens ; (A) 9410 μm , (L) 1.0 mm , (▽) 1.0 mm , frontal cortex ; (A) 10050 μm , (L) 0.5 mm , (▽) 2.0 mm , substantia nigra pars compacta ; (A) 1950 μm , (L) 2.0 mm , (▽) 2.5 mm 。動物は自由に動ける状態にして、餌・水は自由に与え、30分毎24時間にわたって測定 (Prinston Applied Research Potarograph , 174 A を改変した装置) した。測定値は電極

間補正ができないので、それぞれ24時間の平均値に対するパーセントに換算した。行動量は、Automex-II (Columbus Instr. Internat. Corp.) を用いて、30分毎の積算値を求めた。統計学的な処理には、one-way ANOVA などを用いた。

〔結果と考察〕

DOPAC量も、脳内で直接測定した結果、測定した4部位のいずれにおいてもそれぞれ特徴的な日内変動のあることが示された。これらの結果は、ドパミンニウロンの活動を直接反映し得るものと考えられた。

線条体ならびに側坐核においては、互に類似した日内変動を示した(Fig 1a, b)明期から暗期に転ずる時点でDOPAC量は増加し、その後暗期を通じて高値を維持し、明転後次第に減少傾向を示した。明暗周期に伴って極端な変化を示す行動量の日内変化(Fig 1e)に対して、DOPAC量の変化は約1時間の遅延したパターンに一致した。これは、DOPAC(酸性代謝産物)は脳血液関門の透過性が悪く、脳内からの排泄が遅れた結果(9)と考えられることから、これらの部位におけるドパミン代謝は、行動量の変化に同調しているものと考えられた。

前頭葉皮質内側領野(Fig 1c)においても、暗期に高い値を示す有意な日内リズムを示した。この場合、増加および減少の位相が、前の2つの部位に対して約2~3時間ずれている(早期)ことから、この部位におけるドパミン代謝の時間制御機構は異なった支配下にあることが示唆された。

黒質緻密層(Fig 1d)においては、暗期に低値傾向を示す日内変動を示し、線条体における位相に対して逆転したパターンを示した。これは、この部位には、抑制的に作動するドパミン自己受容体の存在していることと一致した知見であると考えられた。この領域におけるDOPAC量の変動の特徴は、鞍頭の形を示している点であり、この部位におけるドパミン代謝の特徴を示すものと考えられた。

DOPAC量の日内変動の振幅(最大値/最小値の比率, Table 1)は、いずれの部位においても約1.3の値を示した。このことは、ドパミン代謝回転速度の振幅が、ある一定の範囲内に限定されていることを示唆するものであると考えられた。

以上の結果を、ドパミン神経の投射経路から見なおすと、時間制御的な機構は、黒質線条体路と中脳辺縁経路との間で類似しており、一方、同じ中脳(A10)から発する大脳皮質路は異なっていることが示された。

〔文献〕

(1)F.Crespi&M.Jouvet(1983)Brain Res.272,263-268.(2)H.Faradji et al.(1983)Brain Res.279, 111-119. (3)M.Ikeda et al(1984)Neurosci.Res.1(3),171-184. (4)J.F.R.Konig et al(1970) The rat brain,A stereotxic atlas,Krieger. (5)H.Kuribara et al(1982)Pharmacol.Biochem. Behav.17,1251-1256, (6)T.Morimasa et al(1982)Advances in the Biosciences vol.37 Pergamon (6)H.Nagayama et al(1979)Psychopharmacol.63,131-135, (7)A.Wirz-Justice(1981)Psychiat. Res.5,67-76, (8)B.K.Yamamoto et al(1982)Life Sci.30.2155-2162.

32 Thyrotropin−releasing hormone（TRH）および類縁体DN−1417のラット側坐核および線条体からのドパミン遊離の作用機序

成実重彦・永井康雄・佐治美昭・名川雄児
（武田薬品・中研・生物研）

〔要　約〕

中枢性ドパミン（DA）黒質−線条体系と中脳−辺縁系の各々の終末部位である線条体と側坐核のラット脳切片を使って，TRHおよびその類縁体DN−1417（γ−butyrolactone−γ−carbonyl−L−histidyl−L−prolinamide citrate）のDA遊離の作用機序の検討を行なった。

予め〔^{3}H〕−DAを取り込ませた切片からのDAの遊離，$^{45}Ca^{2+}$の切片への取り込み，cyclic AMP生成およびP_1（cell debris）画分の（$Na^+ + K^+$）−ATPase活性のいずれに対してもDN−1417およびTRHは側坐核に線条体より10～100倍感受性よく亢進作用を示した。しかし両切片における〔^{3}H〕−TRHのspecific bindingには両脳部位および両薬物間にほとんど差がなかった。上記のDN−1417およびTRHのいずれの促進効果も（$Na^+ + K^+$）−ATPase活性阻害剤のouabainでほぼ完全に抑制された。

以上の成績より，DN−1417およびTRHは主に側坐核のDA系シナプス前部で（$Na^+ + K^+$）−ATPaseを活性化し，$^{45}Ca^{2+}$の取り込みを促進させ，それによりDA遊離をひきおこし，シナプス後部において cyclic AMP生成を促進させ，種々の中枢作用をひきおこしている可能性が示唆される。

Key words：Thyrotropin−releasing hormone（TRH）analog DN−1417，Ca^{2+} uptake，（$Na^+ + K^+$）−ATPase

〔実験材料および方法〕

いずれの実験にも8～10週令の雄性Jcl：SD系ラットを1実験20匹使用し，断頭屠殺後直ちに線条体および側坐核を取り出して集め，0.5 mm切片（一方向）をMcIlwain tissue chopperを用いて作製した。

1. 表面灌流法による〔^{3}H〕−DAの遊離実験：作製した各切片を0.1 mM pargyline，1 mM ascorbic acid，10 mM glucoseを含む95％ O_2−5％ CO_2 飽和のKrebs−Ringer phosphate buffer（KRPB）で洗浄遠心し，その切片40 mg湿重量／tubeに1 μCi／3.7×10^{-8} molの〔^{3}H〕−DAを添加し，KRPB中で37℃で60分間インキューベートし，〔^{3}H〕−DAを切片に充分取り込ませる。この切片を灌流装置を用いてKRPBで流速0.2 ml／minで表面灌流し，5分毎に灌流液を採取し各々の灌流液中の放射活性を測定した。

2. $^{45}Ca^{2+}$の取り込み：Blaustein と Ector[1]の方法に従って，$^{45}CaCl_2$（1 μCi／344 nmol）を使って30℃で1～5分間インキューベートし，反応をEGTAを含むCa^{2+}除去KRPBで止め，遠心洗浄した切片を4％苛性ソーダに溶解して，その放射活性を測定した。

3. Cyclic AMP生成実験：0.25 mmに縦横に2回切断した切片を10 mM theophylline を含むKRPBに懸濁し，各種薬物と37℃で15分間インキューベートし，その後沸騰水浴中に浸漬して反応停止後，その遠心上清液の一部を分取し，ヤマサ cyclic AMP 測定キットを用いて生成した cyclic AMP 含量を定量した。

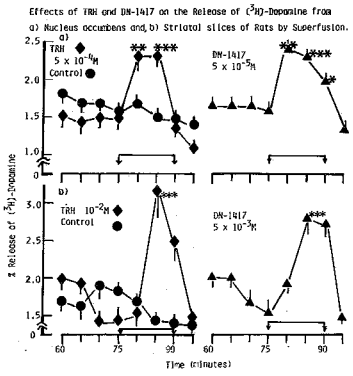
4. ATPase活性の測定法：P_1（900 g，10分間遠心）画分（蛋白量100 μg），5 mM ATP，5 mM $MgCl_2$，100 mM NaCl，20 mM KClを100 mM Tris−acetate buffer（pH 7.5）を37℃で20分間インキューベートし，生成した無機燐を高橋法[5]により測定した。

5. 〔^{3}H〕−TRH binding 測定法：〔^{3}H〕−TRH 0.5 μCi／20 nmol，切片 40 mg 湿重量，50μg bacitracin 含有KRPB 中で 37℃で 0 ～ 60 分間インキュベートした。Non−specific binding は 10^{-3}M TRH存在下で測定した。

〔実験成績〕

1. 〔^{3}H〕−DA 遊離に対する作用：図 1 a）に示すように，側坐核切片からの〔^{3}H〕−DA 遊離をDN−1417（5×10^{-5} M）およびTRH（5×10^{-4}M）はいずれも有意に促進した。b）の線条体切片からの同遊離に対してはDN−1417 は 100 倍，TRHは 20 倍各々高濃度を要した。側坐核切片からの DN−1417 およびTRHによるDA 遊離促進作用は，灌流液中の Ca^{2+} 除去あるいは（$Na^+ + K^+$）−ATPase 活性阻害剤の ouabain（5×10^{-3}M）添加によりほゞ消失した。

図 1



2. $^{45}Ca^{2+}$ の取り込みに対する作用：側坐核切片への $^{45}Ca^{2+}$ の取り込みをDN−1417（10^{-4}M），TRH（10^{-4}M）およびA−23187（10^{-6}M）はいずれも 30℃で 1 ～ 5 分間のインキュベーションで有意に促進作用を示した。これらの作用は ouabain（5×10^{-3}M）添加によりほゞ完全に抑制された。

3. Cyclic AMP 生成に対する作用：DN−1417（$10^{-6}-10^{-4}$M）およびTRH（$10^{-5}-10^{-3}$M）は側坐核切片における cyclic AMP 生成を濃度に応じて促進したが，線条体切片においては同生成をほとんど促進しなかった。

4. ATPase 活性に対する作用：側坐核の P_1（cell debris）画分の（$Na^+ + K^+$）−ATPase 活性をDN−1417 およびTRHいずれも $10^{-6}-10^{-4}$M添加により濃度に応じて有意に促進した。一方，線条体の同画分の（$Na^+ + K^+$）−ATPase 活性に対して両薬物とも有意の影響を与えなかった（表 1）。

表 1

Effects of DN-1417 and TRH on the activity of ATPase in cell debris fractions of nucleus accumbens and striatum of rat brain.

Treatments	Concentration (M)	ATPase activity (μmoles/mg protein/hr)					
		Nucleus accumbens			Striatum		
		Mg^{2+}	$Na^+ + K^+$		Mg^{2+}	$Na^+ + K^+$	
Control		8.2 ± 1.0	3.3 ± 0.3	(100)*	9.5 ± 1.6	4.8 ± 1.0	(100)*
DN-1417	10^{-6}	8.2 ± 0.9	3.9 ± 0.9	(118)	9.9 ± 1.5	4.4 ± 0.5	(92)
	10^{-5}	8.2 ± 0.6	5.8 ± 0.9*	(176)	10.2 ± 1.6	4.7 ± 1.3	(98)
	10^{-4}	8.9 ± 1.0	7.7 ± 0.9**	(233)	11.1 ± 2.5	6.6 ± 1.6	(138)
TRH	10^{-6}	8.6 ± 0.9	3.1 ± 0.2	(94)	8.9 ± 1.2	4.6 ± 1.2	(96)
	10^{-5}	8.2 ± 0.8	4.5 ± 1.2	(136)	10.6 ± 1.9	6.7 ± 1.7	(140)
	10^{-4}	8.2 ± 0.5	6.7 ± 1.5*	(203)	9.7 ± 1.2	7.8 ± 2.0	(172)

All values are the mean ± S.E. of 4 duplicate experiments.
*$P < 0.05$, **$P < 0.01$ vs each control group.

5. 〔^{3}H〕−TRH binding に対する作用：側坐核および線条体切片における〔^{3}H〕−TRHの total および specific binding は両切片でほとんど差がなかった。また両切片における〔^{3}H〕−TRHの specific binding に対して $10^{-6}-10^{-4}$ MのDN−1417 およびTRHは濃度に応じて抑制した。DN−1417 がTRH より軽度ながら常にその抑制の程度は強かった。

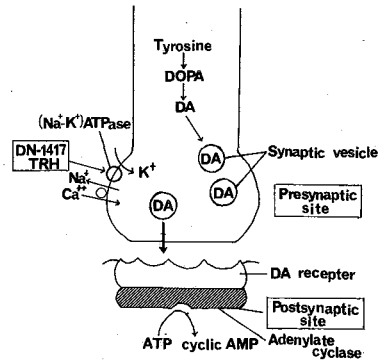
以上の成績を総括するとDN−1417 およびTRHは主に側坐核のシナプス前部において（$Na^+ + K^+$）−ATPase の活性化を引きおこし，Ca^{2+} の取り込みを促進し，その結果DA を遊離させ，その遊離したDA がシナプス後部において cyclic AMP 生成促進をひきおこし種々の中枢作用に結びついている可能性が示唆される。この作用様式を図 2 にまとめて示す。

〔考　察〕

ラットにおける行動薬理学的研究から，TRH および DN－1417 の自発運動亢進作用[2] は主に側坐核からの DA 遊離促進によること[3]，またこれより 10－20 倍の高用量を要するが 6－hydroxydopamine により一側線条体を破壊したラットにおける旋回運動誘起作用は線条体からの DA 遊離促進によると推定した。

図 2

Proposed mode of action of DN-1417 and TRH at Presynaptic and postsynaptic site in the striatum



このTRHおよびDN－1417の側坐核および線条体への感受性の差を各々の切片を使ってDA遊離に対する作用で検討した。その結果，線条体において側坐核より DN－1417で約100倍，TRHで約20倍の高濃度で初めて DA遊離を促進した。この成績は上述の行動薬理学的成績とよく一致した。DN－1417およびTRHによる側坐核切片からのDA遊離促進作用は，表面灌流液中の Ca^{2+} を除去するとほゞ完全に消失した。そこでDN－1417およびTRHの側坐核と線条体との感受性の差が $^{45}Ca^{2+}$ の取り込みおよび（$Na^+ + K^+$）－ATPase 活性にどのように反映されるかを検討した。その結果，10^{-4} M の DN－1417 および TRH は側坐核切片への $^{45}Ca^{2+}$ の取り込みを有意に促進したのに対して線条体切片への同取り込みに対してはほとんど促進作用を示さなかった。側坐核の P_1 画分の（$Na^+ + K^+$）－ATPase 活性を DN－1417 および TRH は有意に促進したが，線条体の同活性に対して両薬物とも有意の影響を与えなかった。側坐核切片における〔^3H〕－TRH binding に対する ouabain の影響を検討したところほゞ完全に抑制した。Cyclic AMP に関しては，DN－1417 および TRH は in vivo でも in vitro でもほとんどの脳部位でその含量を増加させ，その機序はその生成酵素の活性化ではなく，内因性の DA 系を介する作用であると推測した[4]。従って本報告でも DN－1417 および TRH の DA 遊離に対する側坐核および線条体の感受性の差がそのまゝ cyclic AMP 生成に対してあらわれた。

以上の成績より，DN－1417 および TRH は主に側坐核 DA 系シナプス前部で（$Na^+ + K^+$）－ATPase を活性化し，$^{45}Ca^{2+}$ の取り込みを促進させ，それにより DA を遊離させ，シナプス後部で cyclic AMP 生成を促進させ，種々の中枢作用をひきおこしていると思われる。

〔文　献〕

1. Blaustein, M.P. and Ector A.C. (1975) Mol. Pharmacol. 11, 369－378.

2. Miyamoto, M., Fukuda, N., Narumi, S., Nagai, Y., Saji, Y. and Nagawa, Y. (1981) Life Sci. 28, 861－869.

3. Miyamoto, M., Narumi, S., Nagai, Y., Saji, Y. and Nagawa, Y., (1984) Neuropharmacology 23, 61－72.

4. Narumi, S., Nagai, Y., Saji, Y. and Nagawa, Y., (1983) Japan.J. Pharmacol. 33, 915－926.

5. 高橋泰常（1955） 生化学 26, 690－698.

33 ラット線条体のドパミン代謝に対するopiopeptides の影響

米原典史 （阪大・歯）
D. H. Clouet
（NYS division of Substance Abuse Services Res. Lab.）

〔要　約〕

Opioid受容体subtype のagonist のdopamine(DA)神経に対する影響を生化学、薬理学の両面から検討した。生化学的研究として高速液体クロマトグラフィー／電気化学検出法（high-performance liquid chromatography/electrochemical detection:HPLC-EC）を用い、ラット線条体のDA turnover に対する影響を経時的に測定した。μ type agonist であるmorphiceptin、R peptide の大槽内投与によりDAレベルには変動が認られなかったが、DOPAC (dihydroxy phenylacetic acid)、HVA (homovanillic acid) レベルは減少傾向を示し、特に投与直後（投与2.5, 10 分後）において有意な減少を示した。3-MT (3-methoxytyramine)レベルは投与60分後において有意に減少した。δ type agonist: DADLE (d-ala^2,d-leu^5 enkephalin)、delta receptor peptideでは、投与直後DOPAC 、HVA レベルは減少し、以後経時的に増加60分後では著明な増加を示した。DA、3-MTレベルには変化が認られなかった。morphineの皮下注射では、δ type peptidesとほぼ類似したパターンを示した。μ type とδ type のDA turnoverに対する活性を比較した場合、δ type agonistsの方がより強い作用を示した。Locomotor activity、analgesia 等の薬理作用には、両type agonistsの間に著明な差は認られなかった。以上のことは、opiopeptides,opiatesはラット線条体のDA系に対し抑制的に作用することを示唆している。μ type agonist よりもδ type agonist の方がより強い作用を発現したことは、δ type peptide 即ちenkephalin系(met-enkephalin, Leu-enkephalin)が線条体DA神経に対し重要な役割を果たしているものと思われる。

Key words : Dopamine, Opiopeptides, HPLC-EC.

DA系神経路とopioid 受容体の分布の一致傾向(3,4,5)、カイニン酸あるいはカテコラミンニューロンを特異的に変性する6-OHDAの黒質内注入、黒質－線条体神経路の切断等の実験よりDA神経系と内因性opioid peptides 、opioid受容体が密接な関係を有することが示唆されている(10)。DA分泌、代謝に関する研究においてもopiates ならびにopiopeptidesが効果を及ぼすことが報告されている(1,6,8,11)、しかしながら実験条件（実験動物の種差、測定方法、行動効果との関連）等が異なり必ずしも成績の一致を見るに致っていない(2,7,9)。今回我々は、ラット線条体DA神経系に対するopiates ならびにopiopeptidesの影響を詳細に検討する目的で、opioid受容体のsubtype agonistsのDA turnover に対する影響を、高感度測定法であるHPLC-EC 法によって経時的に測定、各subtype の効果を比較検討すると同時に併せて行動効果との関連についても調べた。

［実験方法］

実験動物は雄性wister系ラット100-200gを用いた。morphineを除きopiopeptidesは全て生理食塩水5ul 中に3ug を溶解し、大槽内に投与した。morphineは30 mg/kgを腹くう内に投与した。薬物投与後、経時的にmicrowaveをラット脳に照射し、脳内酵素を不活性化後、線条体を氷令下摘出した。摘出線条体は、0.4M過塩素酸(100mg/ml EDTA, 50mg/100ml メタ重亜硫酸ナトリウムを含む)0.3ml中で超音波ホモジナイザーを用い組織破砕をした。10,000g 15分間遠心後、上清を0.2mm microfilter units(Bioanalytical System MF-1)でろ過後、ろ液を二分した。半量をDA、DOPAC 、HVA の測定のためHPLCに直接注入した。残り半量は、3-MT測定のためpHを7.5 に調整、Al_2O_3 10mgを添加、10分間振とう後MF-1 microfilterを用いろ過、ろ液をHPLCに注入した。HPLCの測定条件はTable 1 に示した。未知物質のピークの同定ならびに定量は、標準試料とのmixture あるいはsingle投与による溶出曲線、retention timeを比較検討することにより行った。 薬理作用： Locomotor activity は6 箇所に赤外線感知部位を有する直径61cm、高さ38cmのケージの中にラットを置き赤外線を遮る回数を測定した。生理食塩

水あるいは薬物投与直前５分間に、測定したactivityをcontrol activityとし、薬物効果は投与後5 分間隔で測定した。鎮痛効果は、51±1.0 ℃に維持したhot plate 上にラットを置き後肢の逃避反射の時間の延長を測定した(cut off time として30秒を用いた)。薬物は、μ type opiopeptides としてmorphiceptin(tyr-pro-phe-proNH$_2$)、R peptide(tyr-d-ala-gly-N-Mephe-met-O-ol)、δ type opiopeptidesとしてDADLE(d-ala^2,d-leu^5 enkephalin)、delta receptor peptide(tyr-d-ser-gly-phe-leu-thr)、opiateとしてmorphineHCl を用いた。

[Table 1]

	DA, DOPAC AND HVA	3-MT
COLUMN	C_{18} ULTRASPHERE-ODS 15 cm x 4.6 mm I.D.	CX ULTRASIL 25 cm x 4.6 mm I.D.
DETECTOR POTENTIAL	+ 0.75 V vs. Ag/AgCl.	+ 0.76 V vs. Ag/AgCl.
FLOW RATE	1.5 mL/min AMBIENT TEMP.	1.0 mL/min AMBIENT TEMP.
MOBILE PHASE	0.1M CITRATE-PHOSPHATE BUFFER (PH 3.5) (12.5% MeOH + 0.004% SOS + 2 x 10^{-5}M EDTA)	0.12M CITRATE-ACETATE BUFFER (PH 5.2)

[実験成績]

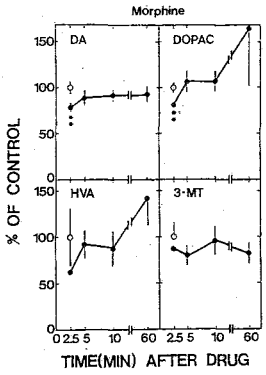
DA及びDA代謝物の経時変化：　Morphine (30mg/kg、i.p.) 投与により、投与後2.5分でDA及びDA代謝物(DOPAC,HVA,3-MT)は減少した。特にDA、DOPAC レベルで有意な減少が観察された。DOPAC 、HVA の経時変化は２相性を示し60分後には約50% の増加が認められた。3-MTレベルは、全ての測定時間で減少傾向を示した(Fig.1)。Opioid受容体のsubtype の一つであるμ type opiopeptide 、morphiceptinの大槽内投与により、DAレベルは、約20% 減少した。DOPAC 、HVA のいずれのレベルもDAの変動パターンに類似し、増加は認められず、特に投与直後（2.5 分、10分）で有意な減少が観察された。3-MTレベルもcontrol に比べ減少傾向を示し、投与60分後では有意な減少を示した(Fig 2)。Morphiceptinと同typeであるR-peptide の、DA、DOPAC 、HVA 、3-MTレベルの経時変化は、ほぼmorphiceptinの変動パターンと一致し、投与60分後のDOPAC レベルを除き有意な増加は認められなかった(Fig.3)。δ type opiopeptide、d-ala-d-leu enkephalinの投与では、DA、3-MTレベルの経時変化は、μ type agonist の変動パターンにほぼ類似したが、μ type agonistの投与で観察された60分後の3-MTレベルの著明な減少は見られなかった。DOPAC 、HVA レベルは、投与直後、両レベルの減少が認められるもののμ type agonistsと異り、60分後で著明な増加が観察された(Fig.4)。この変動パターンは、他のδ type agonist 、delta receptor peptideによっても観察された(Fig.5)。　薬理作用：　Locomotor activityは、morphineおよびμ、δいずれのtypeのopiopeptidesによっても抑制された(Fig.6)。Locomotor activityの抑制の強さは、morphine> R peptide> DADLE> delta receptor peptide> morphiceptinの順となり、morphine、μ type、δ type agonistの間には著しい差は認められなかった。鎮痛試験でもほぼ類似した結果が得られた(Fig.7)。Morphine及びR peptide は投与12分後に、latency 30秒以上の強い鎮痛効果を示し、ついでδ type agonist(delta receptor peptide,DADLE) 、morphiceptinの順となった。Morphiceptinの薬理作用は他のopiopeptidesに比べ弱いものであった。R peptide で、著明なcatalepsy が観察された。

[考察]

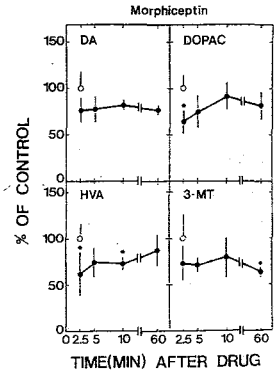
今回我々の実験成績は、opioid受容体subtype によってラット線条体のDA turnover に対する影響が異なりδ type peptidesがμ type に比し著明なturnover促進作用を発現することを明らかにした。このことは内因性δ type peptide(met-enkephalin,leu-enkephalin)がラット線条体DA神経系の調節に重要な役割を果たしていることを示唆している。Opiopeptides、opiateの投与直後、DA、DA代謝物は、多くの場合減少し、以後、特にδ type peptides投与群においてDA代謝物の増加が認められたこと、3-MTレベルの増加が認められなかったことから、内因性opioid peptideがDA神経終末上に存在するopioid受容体（δ type ?)を介しDA遊離を抑制、次いでGABAの遊離が抑制される結果、DAの代謝が促進されたものと考えられる。行動効果には、各subtype 間で著明な差が認められなかったことより、opiopeptidesによるDA turnoveの変動はlocomotor activity、analgesia 以外の行動

効果にも関与する可能性を示唆している。

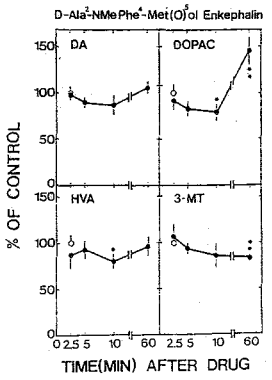
[文献] (1) Algeri,S. et al.(1978) Adv.Biochem.Psychopharmacol. 18, 199.
(2) Arbilla,S and Langer,S.Z.(1978) Nature 271,559.
(3) Atweh,S.F. and Kuhar,M.J.(1977) Brain Res. 124, 53.
(4) Atweh,S.F. and Kuhar,M.J.(1977) Brain Res. 129, 1.
(5) Atweh,S.F. and Kuhar,M.J.(1977) Brain Res. 134, 393.
(6) Biggio,G. et al.(1978) Science 20, 552.
(8) Loh,H.H. et al.(1976) Nature 264, 567.
(9) Lubetzki,C. et al.(1982) J.Pharmacol.Exp.Ther. 222, 435.
(10) Schwartz,J.C. et al.(1978) Ad. in Biochem. Psychopharmacol. eds. by E.Costa and M.Trabuchi, 18, 245. Raven Press, New York.
(11) Wood,P.L. et al.(1980) J.Pharmacol.Exp.Ther. 215, 697.



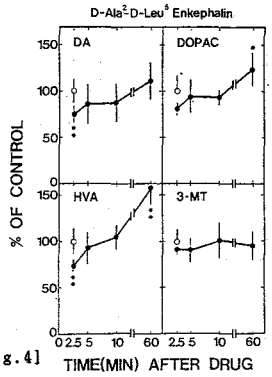
[Fig.1]



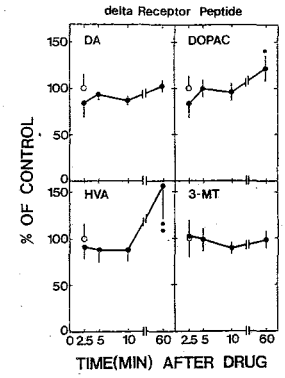
[Fig.2]



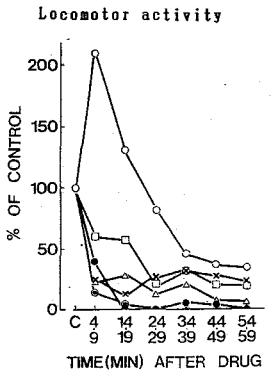
[Fig.3]



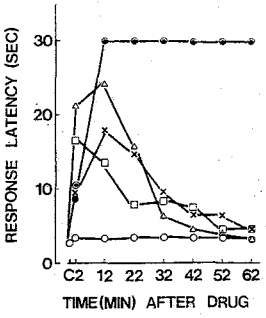
[Fig.4]



[Fig.5]



[Fig.6]



[Fig.7] Analgesia

× = D-Ala -D-Leu Enkephalin
△ = δ receptor peptide
◎ = R peptide
□ = morphiceptin
● = morphine

34 TRHアナログ・DN－1417の単回及び反復投与による中枢ドパミンニューロン系の変化

中原辰雄（九大・理）
内村英幸・松本　孝・平野　誠・中村　薫
石橋賢治・平野　均（国立肥前療養所）
横尾秀康（久留米大・医・精神科）

〔要　約〕

α-Butyrolactone-γ-carbonyl-histidyl-prolinamide citrate（DN-1417）を単回（20 mg/kg, i.p.）あるいは反復（20 mg/kg, ip, 7～21日間）投与したラットについて，運動量，脳各部位のドパミン（DA）代謝産物およびDA受容体変動を検討した。①DN-1417の単回投与によって，運動量は増加した。この運動量増強作用は21日間の反復投与後にもみられ，単回投与後の運動量と有意な差は認められなかった。②ホモバニリン酸（HVA）とジヒドロフェニール酢酸（DOPAC）は，DN-1417の単回投与により，前部帯状回皮質以外の7部位（前頭前野極野，内側野，外側野，側生核，嗅結節，扁桃核，線条体）で著明に増加した。しかし，7日間反復投与後，この急性効果は線条体を除くすべての部位で消失した。21日間の反復投与後でも，線条体のHVA，DOPACは増加したが，その増加は約20％にすぎなかった。③DN-1417の反復投与によって，前頭前野，側生核，嗅結節および線条体の ^{3}H-spiperoneと^{3}H-DA結合量の有意な変化は認められなかった。以上の結果より，運動量増加とDAニューロン活動との関連性を側生核における変化では説明しにくい。むしろ，黒質-線条体DAニューロン系の関与が考えられるが，他のアミン系との相互作用も検討する必要があろう。

Key words：　DN-1417　　DA metabolites　　DA receptors

TRHアナログの1つであるDN-1417は，マウスの自発運動量や旋回運動を増強し[5]，脳内ドパミン（DA）含量の減少[6]，脳切片からの^{3}H-DA[6]または内因性DA[7]の遊離促進，チロシン水酸化酵素活性の変動[8]などを惹起することから，その中枢作用にDAの関与が示唆されている。そこで，我々はラットの行動量，中脳-皮質・辺縁系および黒質線条体系のDA代謝産物とDA受容体に対するDN-1417の作用を検討した。

〔実験方法〕　Wistar系雄性ラット（7週令）を用いた。I）運動量測定：Automex（Columbus社）を用い，20μAの感度で運動量を測定した。測定装置上においたケージ（31×36×18 cm）内にラットを入れ，20分間隔で1時間運動量を測定した後，ラットをケージより取り出し，DN-1417（20 mg/kg, ip）または生理食塩水を投与して再びケージに戻した。以後20分間隔で4時間運動量を測定した。DN-1417の反復投与（20 mg/kg/day）群は，1, 7, 14および21日目に測定を行った。II）HVAとDOPACの定量：各投与群のラットを断頭後すみやかに脳を摘出した。-80℃で凍結後，クリオスタット（-12℃）で300 μmの連続切片を作り，前頭前野極野（FCP），内側野（FCM），外側野（FCL），前部帯状回皮質（ACC），側生核（AC），嗅結節（TO），中隔（SP），扁桃核（AM）及び線条体（CP）を切り出した。各試料を50 μMアスコルビン酸を含む0.1Mギ酸でホモジナイズした。ホモジネートを遠心し，上清に内部標準物質（HVA-d_5, 5.6 ng；DOPAC-d_5, 4.65 ng）を加え，酢酸エチル500 μlで抽出した。抽出液をN_2ガスで蒸発乾固し，HVA及びDOPACをPFP誘導体として，反応ガスクロマトグラフィー法を併用したSIM法で測定した。測定感度は10 pg/injectionであった。[4] 蛋白量はLowryらの方法で測定した。III）①^{3}H-Spiperone結合実験：組織を100倍容の50 mM Tris-HCl緩衝液（pH 7.7, 25℃）中

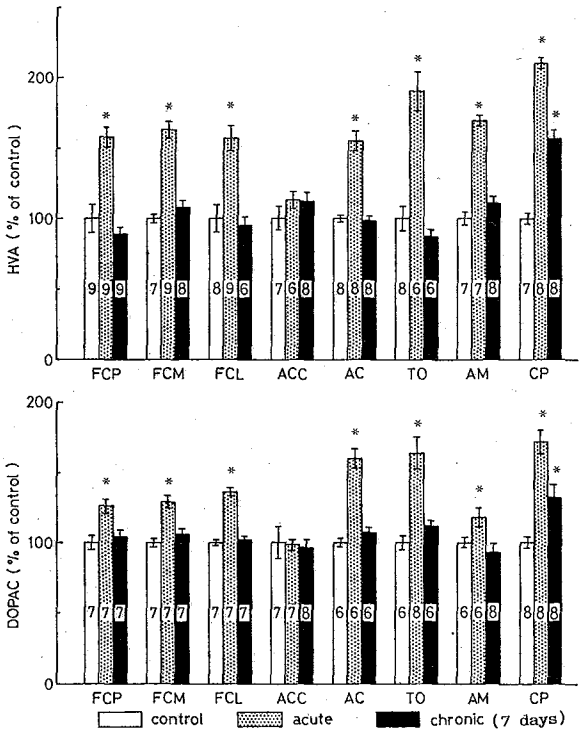


Fig. 1 Effects of acute and chronic treatment of DN-1417 on HVA and DOPAC levels in individual dopaminergic neuron system of rat brain.

*p < 0.01 when compared with controls (Dunnett t-test).

Table 1. Effect of chronic DN-1417 treatment on dopamine receptors in rat brain

Area / Treatment	^{3}H-SPIPERONE BINDING	^{3}H-DOPAMINE BINDING Preincubation: NONE D-2	NONE D-3	250 nM DA D-2	250 nM DA D-3
STRIATUM					
SALINE	293 ± 25	18 ± 3	106 ± 7	15 ± 3	102 ± 5
DN-1417	288 ± 18	29 ± 5	108 ± 3	25 ± 4	102 ± 4
FRONTAL CORTEX					
SALINE	4 ± 2	12 ± 4	27 ± 3	12 ± 1	22 ± 2
DN-1417	5 ± 2	15 ± 2	23 ± 4	13 ± 1	21 ± 1
N. ACCUMBENS					
SALINE	136 ± 14	46 ± 11	97 ± 26	51 ± 10	110 ± 9
DN-1417	147 ± 4	71 ± 11	72 ± 14	74 ± 10	104 ± 7
TUBERCULUM OLFACTORIUM					
SALINE	103 ± 6	49 ± 13	89 ± 21	18 ± 4	99 ± 6
DN-1417	101 ± 6	54 ± 17	86 ± 24	20 ± 6	85 ± 8

Mean ± SEM (fmol/mg protein) of 5-7 determinations.

でホモジナイズし，40,000×g，15分間遠心分離して得られた沈渣を同緩衝液で洗浄して標品とした。^{3}H-Spiperone結合は，50 mM Tris-HCl (pH 7.7, 25°C)，10 mM NaCl，1 mM EDTA，0.1 nM mianserin および ^{3}H-spiperone (0.2 nM) を含む 1 ml の溶液中で行い，10 μM sulpiride によって置換される ^{3}H-spiperone から特異結合量を求めた。②^{3}H-DA結合実験：凍結した組織を100倍容の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0, 25°C) 中でホモジナイズした。ホモジネートに 2 mM (最終濃度) $MgSO_4$ を加え，37°C で 30 分間インキュベートし，40,000×g，15分間の遠心分離で得られた沈渣を 2 回洗浄して標品とした。標品は 50 mM Tris-HCl (pH 7.0, 25°C)，10 mM $MgSO_4$，5 mM EGTA，10 μM pargyline および 2.0 nM ^{3}H-DA (47 Ci/mmol) を含む 1 ml の溶液中で 30 分間 (23°C) でインキュベートした。特異結合量は，30 nM spiperone (D-2)，さらに 10 μM (+)-butaclamol (D-3) で置換される ^{3}H-DA から求めた。[2]

［結果］ 運動量は DN-1417 (20 mg/kg) の投与後 4 時間にわたって有意に増加した。4 時間の総カウントは，対照群で 430±70，投与群で 1960±130 であった。この運動量増加は，反復投与後でもみられ，投与 7, 14, 21 日目の投与群の運動量は，それぞれ 1460±130, 1560±360, 1580±210 カウント／4 時間であり，運動量に対する DN-1417 の作用には耐性は生じなかった。

中枢DAニューロン系における HVA, DOPAC レベルは図 1 に示すごとく，DN-1417 単回投与により前部帯状回皮質を除く 7 部位（前頭前野極野，内側野，外側野，側坐核，嗅結節，扁桃核，線条体）で著明に増加した。しかし，反復投与 (20 mg/kg/day, 7 日

間）後，HVA, DOPACレベルは，線条体を除くすべての部位で対照のレベルに戻った。線条体では7日間反復投与でHVA, DOPACの増加は約60%で，21日間の反復投与では，HVA, DOPACの増加はそれぞれ25%，20%しか認められなかった。

^{3}H-Spiperone結合は，前頭前野，嗅結節，側坐核および線条体のいづれの部位においてもDN-1417反復投与（20 mg/kg/day，21日間）の影響を受けなかった（表-1）。30 nM Spiperoneで置換される^{3}H-DA特異結合（D-2）には，側坐核と線条体において増加する傾向がみられたが，有意な増加ではなかった。

［考察］　行動薬理学的研究において，TRHの中枢作用とDAニューロン系の密接な関連が示唆されている。TRHおよびそのアナログを両側の側坐核に注入すると運動量は増加するが，線条体に大量のTRHを注入しても運動量は変化しないと報告されている[1]。このことから，TRHやそのアナログ投与による運動量増加には中脳－辺縁系DAニューロン特に側坐核が関与していると考えられている。

今回，DN-1417単回投与による中枢各DAニューロン系への影響を検討した結果，前部帯状回皮質を除く皮質・辺縁系および線条体でHVA, DOPACレベルの著明な増加がみられた。このことは側坐核および線条体においてDN-1417がDAを遊離するという報告[7]やDA含量を減少させるという知見を支持する[6]。脳内DA代謝産物に対するTRHの影響については，全脳のHVAレベルは不変で[1]，線条体のHVAレベルは有意に増加する[3]という報告はあるが，今回の結果から，DN-1417は中脳－辺縁系や黒質－線条体DAニューロン系だけでなく中脳－皮質DAニューロン系まで広範囲にDA代謝産物レベルを増加させることが明らかになった。

DN-1417単回投与による中枢各DAニューロン系の機能亢進は，7日間反復投与によって耐性が生じた。DA代謝産物レベルは，線条体を除いた部位で完全に対照レベルまでもどっていた。7日間と21日間の反復投与で，線条体では徐々に耐性が形成されていた。今までの報告では，側坐核のDAニューロン系はラットの運動量増加に関与していると考えられている。しかし，DN-1417の反復投与により側坐核のDAニューロン系の機能亢進は完全に消失し，耐性が生じるにもかかわらず，運動量増加は単回及び反復投与では違いはなかった。そこで，DA受容体に変化が生じているかどうかを検討した。しかし，前頭前野，側坐核，嗅結節および線条体のDA受容体に有意な変化は見い出せなかった。これらの結果より，DN-1417による運動量増加は側坐核のDAニューロン系活動との関連性では説明しにくい。むしろ，黒質－線条体DAニューロン系の関与が考えられるが，線条体のDAニューロン系にも徐々に耐性が形成されており，他のアミン系との相互作用も含めて今後検討する必要があろう。

［文献］

1) Keller, H.H., Bartholini, G. and Pletscher, A. (1974) Nature 248, 528-529.
2) Leff, S.E. and Creese, I. (1983) Nature 306, 586-589.
3) Metcalf, G. (1982) Brain Res. Rev. 4, 389-408.
4) Matsumoto, T., Nakahara, T., Uchimura, H., Hirano, M., Yokoo, H., Nakamura, K. and Oomagari, K. (1984) Brain Res. (in press)
5) Miyamoto, M., Fukuda, N., Narumi, S., Nagai, Y., Saji, Y. and Nagawa, Y. (1981) Life Sci. 28, 861-869.
6) 成実重彦 他 (1982) 神経化学 21, 204-206.
7) 山田茂人 他 (1983) 神経化学 22, 297-299.
8) 横尾秀康 他 (1983) 神経化学 22, 294-297.

35 ドーパミンβ-ヒドロキシラーゼと中枢神経系作用薬との相互作用の研究：特にフェノチアジン系薬物の阻害作用について

嶋崎健一・小幡淳雄・山田紘一・川面博司
（城西大・薬）

〔要　約〕
ドーパミンβ-ヒドロキシラーゼ(DβH)に対する中枢神経系作用薬ジアゼパム(DAP)，イミプラミン(IMP)およびクロルプロマジン(CPZ)の阻害作用を調べた結果IMPは弱い阻害作用しか示さなかったが，DAPおよびCPZにやや強い阻害作用を認めた。CPZ系薬物として他にプロマジン(PMZ)，クロルフェネタジン(CFZ)，フェネタジン(FTZ)を調べた結果，アミン側鎖に3つのメチレン基を持つもの(CPZ，PMZ)はチラミン基質に対し非拮抗的であるが2つのメチレン基を持つもの(CFZ，FTZ)は拮抗的であった。この結果はフェノチアジン環を持つこれらの薬物のうちドーパミンやチラミンと同じ側鎖を持つものがDβHの活性部位と相互作用をしうることを示しているものと推測された。一方アスコルビン酸基質に対してはフェノチアジン環に塩素原子を有するもの(CPZ，CFZ)は混合型，塩素原子を持たないもの(PMZ，FTZ)は不拮抗型であった。これはCl付加によるフェノチアジン環の電荷分布の変化が，酵素－阻害剤複合体の形成を促進するものと考えられた。

Key words : dopamine β-hydroxylase , neuroleptics , chlorpromazine

〔序　言〕　ドーパミンβ-ヒドロキシラーゼ(DβH)はドーパミンのノルアドレナリンへの変化を触媒する銅含有酵素であるが酵素を構成するとされる糖蛋白の一次構造は勿論活性中心とされる銅部位の局所構造もまたほとんど不明である。しかしDβHは脳内ドーパミン代謝系を司る重要な酵素であることから，同酵素が触媒しうる基質類や阻害剤に関してはこれまで数多くの研究がなされてきている。(3,4,5) しかし演者等の知る限りでは中枢神経系作用薬とDβHとの相互作用に関する報告は未だ見当らずこの点を解明することは中枢神経系作用薬の作用機序の解明への一助となりうるばかりでなくDβHの活性部位の構造究明にも資しうると考えられるところから本研究に着手した。

〔方法および材料〕

(1)酵素の精製　ドーパミンβ-ヒドロキシラーゼは，A. Foldes(1)の方法に従い牛の副腎から精製した。牛副腎髄質を0.32Mの等張なショ糖溶液でホモジネートし，クロマフィン顆粒を分離取得した後，これをTriton X-100を加え可溶化しDEAE-セルロースカラムとBio-Gel A-1.5mカラムによってDβH留分を分画採取した。

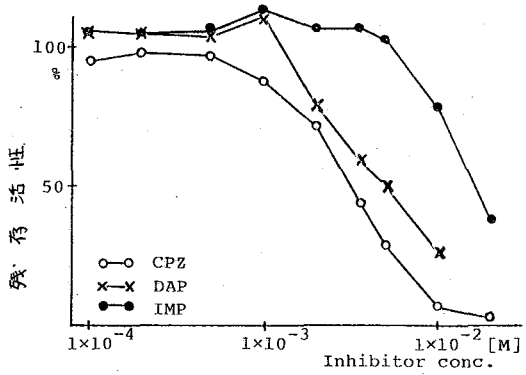
(2)酵素の活性測定　ドーパミンβ-ヒドロキシラーゼの活性はチラミンを基質としてNagatsu,T. and Udenfriend, S.(2)の方法に従い定量した。反応溶液は酢酸ナトリウム緩衝液PH 5.0，0.2M，チラミン2mM，フマル酸ナトリウム10mM，アスコルビン酸10mM，パージリン1mM，N-エチルマレイミド30mM，硫酸銅10μM，カタラーゼ500μg，酵素0.5～1.0μgを含み全量1mlとした。通常反応は37℃で30分インキュベーションをし，比活性は酵素1mg当り1分間に生成したオクトパミンの量(μmol/min/mg)で表わした。

(3)中枢神経作用薬によるDβHの阻害実験　クロルプロマジン(シグマ)，イミプラミン(シグマ)，

ジアゼパム(中外製薬)はそれぞれ再結晶により精製して用いた。プロマジン,フェネタジンはフェノチアジンに対応するアミン側鎖を導入することにより合成した。クロルフェネタジンはクロルフェノチアジンに対応するアミン側鎖を導入することにより合成した。合成した薬物は再結晶により精製し用いた。これらの薬物によるDβH阻害度はインキュベーション混合物中のDβH活性測定(前項参照)によった。

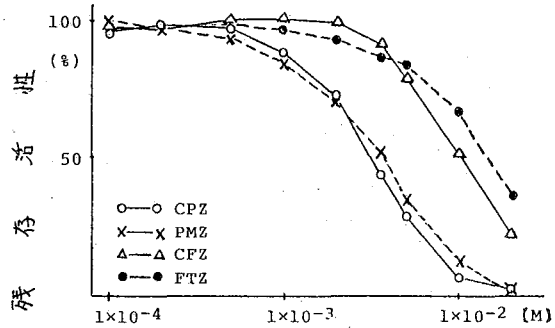
〔成　績〕

図1. 中枢神経作用薬とDβHの相互作用



Enzyme 0.5-1.0 μg, Catalase 500 μg, Ascorbate 10 mM, Sodium fumarate 10 mM, Pargyline 1.0 mM, Tyramine 2.0 mM, NEM 30 mM, $CuSO_4$ 10 μM.

図2　フェノチアジン系薬物のDβHへの阻害



反応条件は図1に同じ

(1) ジアゼパム(DAP),イミプラミン(IMP),クロルプロマジン(CPZ)とDβHとの相互作用

代表的中枢神経作用薬である1,4-ベンゾアゼピン系,ジベンゾアゼピン系およびフェノチアジン系薬物のそれぞれ代表として上記の3種の薬物を取り上げ,それらのDβHとの相互作用の有無を検討した。結果は図1に示すように抗うつ薬イミプラミンは弱い阻害作用($IC_{50}=1.6\times10^{-2}$M)を示すにとどまったが抗精神病薬のクロルプロマジン,抗不安薬のジアゼパムはイミプラミンより強い阻害作用を示しそれらのIC_{50}値はそれぞれ3.1×10^{-3}, 5.0×10^{-3}Mとなった。

(2) フェノチアジン系薬物の阻害作用

CPZの阻害作用が明らかになったのでフェノチアジン系薬物の阻害作用を検討するべくCPZに加えて次の3種の薬物,プロマジン(PMZ),クロルフェネタジン(CPZ),フェネタジン(FTZ),の阻害効果を検討した。結果は図2に示すように,その阻害効果の大きさはCPZ～PMZ＞CFZ～FTZとなった。

(3) フェノチアジン系薬物による阻害機作

フェノチアジン系薬物によるDβHの阻害が明らかになったのでそれらの阻害機作を調べるためにLineweaver-Burkプロットをおこなった。基質依存性は大気圧開放系で酸素濃度を一定とし,チラミンおよびアスコルビン酸濃度を変えて調べた。これらの結果を図3～6に示す。CPZは図3より明らかなようにチラミンに関し非拮抗(noncompetitive)型阻害を示すのに反し,CFZは典型的な拮抗阻害を示した。一方アスコルビン酸基質に対してはCPZは混合型(非拮抗と拮抗の混合)であるのに反し,PMZではほぼ不拮抗(uncompetitive)型を示す。4種の薬物についてこれらの結果を整理すると表1のようになる。表1にはそれぞれの阻害型を仮定して求められた阻害複合体の解離定数(K_iおよびK_i')を併記した。表1より明らかなことはまずチラミン基質に対しては,フェノチアジン環の側鎖が3つのメチレン鎖よりなるも

の(CPZ,PMZ)が非拮抗型であるのに対し2つのメチレン鎖よりなるもの(CFZ,FTZ)は拮抗型であることである。一方アスコルビン酸に対してはフェノチアジン環に塩素原子を有するもの(CPZ,CFZ)が混合型を示すのに対し塩素原子を持たないもの(PMZ,FTZ)はほぼ不拮抗型となっている。解離定数は(2)で定性的に示した阻害効果とほぼ対応している。

図3. CPZによるDβH阻害のL.B.プロット
(基質 チラミン)
1/V(μmol/min/mg)
1/S(mM)

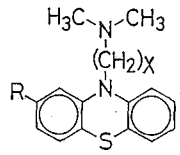
図4 CFZによるDβH阻害のL.B.プロット
(基質 チラミン)
1/V
1/S(mM)

図5 CPZによるDβH阻害のL.B.プロット
(基質 アスコルビン酸)
1/V
1/S(mM)

図6 PMZによるDβH阻害のL.B.プロット
(基質 アスコルビン酸)
1/V
1/S(mM)

表1 フェノチアジン系薬物によるDβHの阻害反応

阻害剤	阻害型式 および 解離定数 (mM)	
	チラミン	アスコルビン酸
CPZ	非拮抗型 K_i=2.0	混合型 K_i=0.6, K_i'=2.5
PMZ	非拮抗型 K_i=4.4	不拮抗型 K_i=4.4
CFZ	拮抗型 K_i=10.1	混合型 K_i=0.3, K_i'=8.1
FTZ	拮抗型 K_i=20.9	不拮抗型 K_i=13.1



R X
CPZ: Cl 3
PMZ: H 3
FTZ: H 2
CFZ: Cl 2

[考察]

チラミン基質に対する阻害剤の非拮抗,拮抗型の類別がそのメチレン鎖の長さに依存することは興味ある事実であり,メチレン鎖2個の(CFZ,FTZ)はドーパミンやチラミンと同じくDβHの活性点を占有することができるのに反し,メチレン鎖が3個となったCPZやPMZではもはや活性点の占有が困難になるものと推測される。アスコルビン酸基質ではCPZやCFZの如く,フェノチアジン環に塩素原子を有するものは混合型であるが塩素原子を持たないものは不拮抗型である。これらの原因は今の所明らかでないがα付加によるフェノチアジン環の電荷分布の変化が酵素-阻害剤複合体形成を促進していると考えられる点で興味があり,今後酸素基質に対する挙動と共に詳細に検討したい。

[謝辞]

DβHの精製単離方法に関し種々御教示頂きました東京工業大学永津俊治教授および同研究室の方々に厚く感謝申し上げます。

[文献]

1. Foldes,A., Jeffrey,P.L., Preston,B.N., and Austin,L. (1972) Biochem. J. 126,1209-1217.
2. Nagatsu,T., and Udenfriend,S. (1972) Clin. Chem. 18,980-983.
3. 永津俊治, 蛋白質,核酸,酵素 (1983) 26, 287-298.
4. Rosenberg,R.C., and Lovenberg,W. (1980) Essays Neurochem. Neuropharmacol. 4,163-209.
5. Villafranca,J.J. (1981) in Copper Proteins (Spiro,T.G., ed) pp.264-289.

36 メタンフェタミン逆耐性形成に及ぼすハロペリドールデカノエートの効果

柏原健一・藤原　豊・小川俊彦・福田賢司
原田俊樹・佐藤光源・大月三郎
（岡山大・医・神経精神科）

〔要　約〕

ラットを生食群、methamphetamine(MAP)群、haloperidol decanoate(HPD-D)前処置群に分け、前2群にはそれぞれ生食、MAPを21日間投与、HPD-D前処置群にはHPD-Dを前負荷して血中HPD濃度を持続性に上昇させた後、MAPを21日間投与した。4週間断薬後アポモルフィン負荷テストを行ったところ、MAP群では常同行動、HPD-D前処置群では自発運動量が亢進していた。この時のdopamine(DA)、DOPAC、HVA濃度を測定したところ、MAP群では中脳辺縁領域でDAが増加、HPD-D前処置群では線条体でDAが減少しており、HPD-D前処置群でのDA自己受容体数の増加が予想された。[³H]spiperone結合実験ではHPD-D前処置群でMAP群よりもDA受容体が増加していた。今までに私どもは、MAP逆耐性現象の発展に伴い、行動上は自発運動量の減少と常同行動の増加、[³H]spiperone結合実験では線条体でのDA受容体数の減少が生じることを報告してきた。今回の結果はHPD-Dの前処置により、これらの変化が逆転されることを示しており、HPDによる持続的なDA受容体遮断状態では逆耐性現象に関与するMAP性変化が抑制される可能性が示唆された。

Key words：Methamphetamine, Dopaminergic supersensitivity, Haloperidol decanoate

MAP反復投与でヒトの幻覚妄想状態や動物の異常行動が生じ易くなることが知られ、一方でMAPでひき起こされた異常状態が抗精神病薬で改善されることも知られている。そして、これらの現象の裏付けとしてMAP反復投与によるDA系の過感受性獲得と、抗精神病薬のD₂受容体遮断作用によるDA系過活動状態の抑制が考えられている。私どもはD₂受容体を遮断した状態ではMAPを反復投与してもDA系の過敏状態が生じない可能性を調べる目的で今回の実験を計画した。

〔方法〕　①行動実験：SD系雌ラット（生後6週，110～180g）を6匹ずつ3群に分け、12時間の明暗サイクル、一定の室温、湿度下で飼育した。3群を生食群、MAP群、HPD-D前処置群とし、生食群、MAP群にはそれぞれ生食1ml/kg/日またはMAP 4mg/kg/日を21日間腹腔内注射した。HPD-D前処置群には先ずHPD 5mg/kgを皮下注射し、30分後MAP4mg/kgを腹腔内注射したうえで更にHPD-D 100mg/kgを皮下注射し、翌日からはMAP 4mg/kg/日を20日間腹腔内注射した。各薬物投与期間中適宜行動観察を行い、MAP群とHPD-D前処置群の示すMAP性異常行動がHPD-D前処置群で有意に抑制されていることを確認した。投与後4週間断薬し、別の実験でHPD-D前処置群の脳内HPD濃度が1nMの検出限界以下であることを確認したうえで(6)アポモルフィン負荷実験を行った。負荷実験ではアポモルフィン0.25，0.5，1.0mg/kgを腹腔内注射し、Natsumexを用いて投与後15～20分の自発運動量を"total count"として測定し、同時に異常行動評価尺度を用いて行動を5段階に評価した(6)。

②DA, DOPAC, HVA定量：①で用いた3群にアポモルフィン負荷実験終了後、アポモルフィン0.5mg/kgを再負荷し、15分後より5分間行動評価を行い、25分後マイクロウェーブで処理した。速やかに脳をとり出し、線条体と中脳辺縁領域を切り出した。異常行動評価点は

①でアポモルフィン 0.5mg/kg投与時と同様の結果であった。DA、DOPAC、HVAは化施設に依頼し、高速液体クロマトグラフィーにて定量した。③[³H]spiperone結合実験：SD系雄ラット(生後8週、250~350g)を2群に分け、①と同じ条件下で飼育した。2群はMAP群、HPD-D前処置群とし、前者にはMAP 4mg/kg/日、後者にはHPD-D 100mg/kgを単回皮下注射のうえ3日目よりMAP 4mg/kg/日をそれぞれ21日間腹腔内注射した。投薬後4週間断薬して断頭し、氷上にて線条体、中脳辺縁領域を切り出し、[³H]spiperone結合実験に用いた。1μM d-butaclamolの存在、非存在下での結合の差として求めた特異結合を、Scatchard解析し、得られた一次回帰直線の係数からKd, Bmaxを求めた。蛋白濃度はLowry法に拠った。

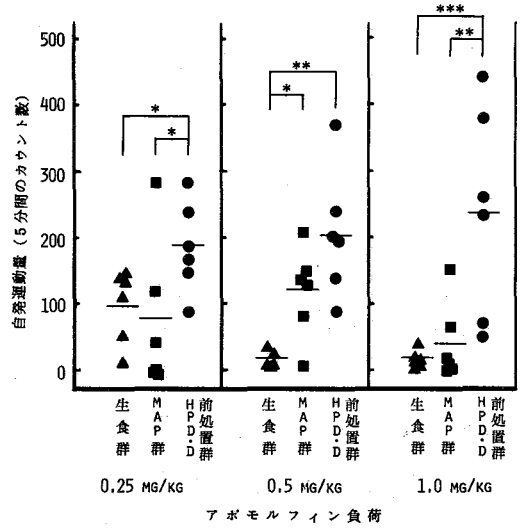


図1：アポモルフィン負荷時の自発運動量の変化
*; p<0.05, **; p<0.01, ***; p=0.001 by Mann-Whitney U test

〔結果と考察〕 ①行動実験：アポモルフィン負荷時、自発運動量はHPD-D前処置群で高値を示した(図1)。異常行動評価点はMAP群でアポモルフィン0.25mg/kg投与時にのみ生食群より有意に高く、その主体は常同行動であった(図2)。HPD-D前処置群は生食群と比べると有意な差はないがMAP群と比べると総ての用量で低値を示し、その主体は移所運動であった。アポモルフィンで生じる行動変化がDA系のシナプス後膜上の受容体感受性の状態を反映すると考えれば、MAP群では断薬4週間後も持続する常同行動に関係するDA受容体の過敏状態が存在し、HPD-D前処置群では移所運動に関する部分が特異的に過敏状態になっていることが考えられる。一般にMAP反復投与時には少量あるいは投与開始初期には移所行動が強く、より大量あるいは投与回数を重ねるにつれて常同行動が顕著となる(2)。脳部位別機能との関連では移所運動には側坐核、常同行動にはそれに加えて線条体の関与が大きいとする報告(1,3)があるが、これを考慮に入れると、HPD-D前処置群ではMAP群に比して線条体のDA

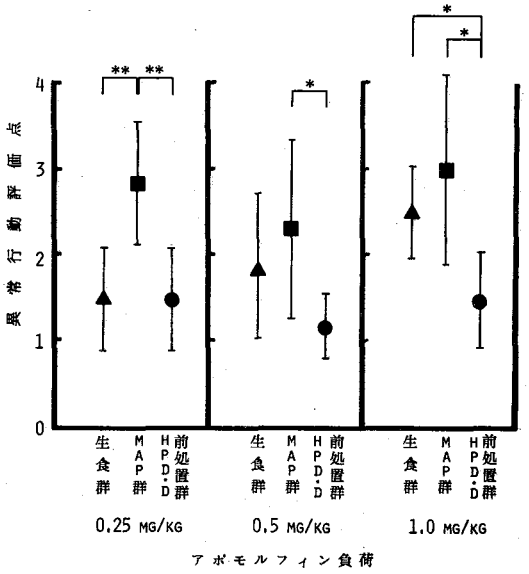


図2：アポモルフィン負荷時の行動の変化
*; p<0.05, **; p<0.01 Mann-Whitney U testによる

受容体過敏性の形成が阻害されるが、側坐核のDA受容体ではむしろ過敏になっている可能性が考えられる。②DA, DOPAC, HVA定量：図3に示したように、HPD-D前処置群では線条体でDAが減少していた。DOPAC, HVAは不変であった。一方、中脳辺縁領域ではMAP群でDAのみの有意な増加が認められた。これらの変化の機序ははっきりしないが、アポモルフィン負荷時のDA, DOPAC, HVAの変化はDA自己受容体によるDA合成、放出の抑制能力を反映すると考えられることから、線条体ではHPD-D前処置群でDA合成が抑制され、中脳辺縁領域ではMAP群でDA合成の抑制が他群よりも少ないと考えられる。つまり、MAP反復投与時には中脳辺縁領域の自己受容体が減少し、HPD-Dを前処置しておくと、MAPを反復投与しても自己受容体の減少は生じず、むしろ線条体を中心に自己受容体が増加している可能性が考えられる。③[³H]spiperone結合実験：[³H]spiperone結合は表1のようにBmaxのみで有意な差が認められ、HPD-D前処置群はMAP群に比べて線条体で150.6%、中脳辺縁領域で116.1%の高値を示した。別の実験でHPD-Dのみを投与し、同一時期に断頭したところ、HPD-D単独投与群は生食群に比べ、Kdは不変、Bmaxは144.6%に増加していたことや、MAP反復投与から1週間断薬後には、線条体のみでBmaxが12.3%減少していたことを考えると[5]、HPD-D前処置群ではMAP反復投与で生じるDA受容体数の変化とは逆に、受容体数が著しく増加していることが考えられる。一般にDA作動薬を反復投与するとシナプス前終末上の自己受容体が減少することが知られ、逆に抗精神病薬を反復投与すると、自己受容体も含めて受容体数が増加することが知られているが、今回の結合実験からはHPD-DがMAP反復投与によるDA受容体の減少を抑制するにとどまらずHPD-Dの薬理作用による著しい増加を生ぜしめる可能性がうかがわれる。この受容体数の増加が、シナプス前とシナプス後受容体のいずれに顕著であるかを本実験で区別することはできないが、線条体におけるDA減少の結果から、HPD-D前処置群の線条体では自己受容体の増加も推定される。HPD長期投与後に生じるDA受容体過感受性は線条体と中脳辺縁領域で異なる可能性があるとする報告(4)があるが、HPD-DがMAP反復投与による受容体の変化を抑制したうえでHPD-Dの持続的薬理作用による独自の変化を生じたと考えることが可能である。

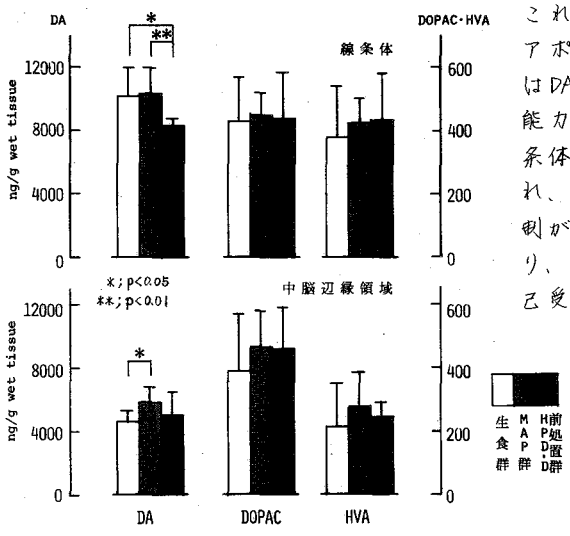


図3：アポモルフィン負荷時のDA, DOPAC, HVAの変化

表1 [³H]spiperone結合

	Bmax (mean ± SD)	
	MAP群	HPD-D前処置群
線条体	236.2 ± 36.7	355.9 ± 43.0*
中脳辺縁領域	142.8 ± 11.5	165.8 ± 9.1*

*; p<0.01

〔文献〕1. Costal, N. and Naylor, R.J. (1974) Eur. J. Pharmacol., 25: 121-129　2. 相原健一(1983) 薬物・精神・行動, 3: 137-148　3. Kelly, P.H., Seviour, P.W., and Iversen, S.D. (1975) Brain Res., 94: 507-522　4. Muller, P., and Seeman, P. (1977) Life Sci., 21: 1751-1758　5. 大月三郎(1983)精神分裂病の生物学的成因及び病態に関する研究, 昭和57年度研究報告書: 33-44　6. 佐藤光源, 相原健一, 原田俊樹, (1984) 精神経誌, 印刷中

37 胎内X線照射のラット胎仔及び新生仔大脳DNAの量及び組成に及ぼす影響

岩崎説雄・田中晴美・有馬正高
（国立神経センター・疾病Ⅱ）

〔要　約〕

発達脳における脳障害のメカニズムを生化学的に追求するため，妊娠13日100R照射されたラット胎仔より胎齢21日に大脳DNAを単離し，その過程における収率を比較し，さらにDNA塩基，ヌクレオシドをHPLCで分析すると共に，生後の脳発達への影響も検討した。(1) DNA単離過程におけるX線照射群の大脳湿重量当たりのDNA量はホモジネート(3.99 mg/g)，分離核(1.58 mg/g)で対照群に比べ有意に低下するが，除蛋白操作以後は逆に増加した。DNAの収率は分離核：40%，単離DNA：10%であった。RNA/DNAは変化せず，蛋白/DNAは分離核，単離DNAで高い傾向を示した。同時に行った母ラット大脳では照射による変化はなかった。(2) 胎内照射されたラットの生後の大脳重量は，生後15日でも有意($P<0.001$)に低下するが，DNA量の低下は生後5日までで以後回復した。RNA/DNAでは差はみられず，蛋白/DNAは生後5日で有意($P<0.05$)に増加した。(3) 酸及び酵素分解による大脳DNAの塩基及びヌクレオシドの総濃度は照射群でそれぞれ高い傾向がみられた。各塩基組成には照射による影響はみられなかったが，ヌクレオシド組成ではd-チミジン(29.6%)が低下し，d-アデノシン(29.6%)が増加した。照射による新たなピークは観察されず，GC含量に差は認められなかった。

Key words：　Cerebrum, DNA, X-irradiation

発達脳における脳障害のメカニズムを生化学的に解明するため，胎内X線照射胎仔ラットの大脳DNAを単離し，その過程における収量を比較すると共に，胎生期に照射を受けた新生仔の大脳発達をDNA，RNA，蛋白を指標として調べた。また胎仔大脳DNAの塩基，ヌクレオシド組成の照射による量的並びに質的変化をHPLCにより検討した。

〔実験方法〕

ウィスター系ラットを交配し，腟スメア中に精子の確認された日を妊娠0日とし，妊娠13日に100RのX線を全身1回回転照射し，対照は同時間回転のみ行った。胎仔は妊娠21日に帝切により摘出し，新生仔は出生日を1日として5，10，15日に供試した。大脳の核の分離はLøvtrup-Rein et al.(2)の方法，分離核からのDNAの単離はMarmur (3)の方法をそれぞれ改良して行った。DNA溶液は凍結乾燥後4 °Cに保存した。DNA，RNA，蛋白はそれぞれジフェニールアミン法，オルシノール法，Lowry法により定量した。DNAの塩基組成は塩酸(7)により，ヌクレオシド組成はDNase I，Phosphodiesterase I，Alkaline Phosphatase混液(1)によりそれぞれ分解しHPLCにより分析した。HPLCはμBondapak C_{18}を用い，リン酸緩衝液(pH 5.65)にアセトニトリルのgradientをかけて溶出し，254 nmで検出した。各塩基，ヌクレオシドの定量は内部標準物質にThbを用い，ピーク面積比により行った。有意性の検定はt-検定により行った。

〔成　績〕

胎仔大脳DNAの各単離過程における収量をTable 1に示した。X線照射(X)群の大脳湿

Abbreviations used: HPLC, high-performance liquid chromatography; C, cytosine; G, guanine; T, thymine; A, adenine; dCyt, deoxycytidine; dGuo, deoxyguanosine; dThd, deoxythymidine; dAdo, deoxyadenisine; Thb, theobromine

重量当たりの DNA 量はホモジネート(A)，分離核(B)で対照(R)群に比べ有意に低下したが，除蛋白後(C)，単離 DNA (D)では若干の増加傾向がみられた。DNA の収率には照射による影響はみられずBで約 40 %，Dで約 10 %であった。各過程の RNA/DNA は照射，非照射間に差は認められなかった。蛋白 / DNA は A, C では差はみられず，B, D では照射により増加傾向を示した。同時に行った母ラットの値は，照射により変化はみられなかった。

Table 1. Isolation of fetal cerebral DNA

	Homogenate (A)	Nuclei (B)	Deproteinized DNA (C)	Isolated DNA (D)
1. DNA	mg/g wet wt(%)	mg/g wet wt(%)	μg/g wet wt(%)	μg/g wet wt(%)
Rotate:	4.45 (100)	1.85 (41.6)	459 (10.3)	400 (9.0)
X-100R:	3.99**(100)	1.58**(39.5)	491 (11.6)	397 (9.5)
2. RNA/DNA				
Rotate:	1.00	0.17	0.50	0.18
X-100R:	1.04	0.18	0.51	0.20
3. Protein/DNA				
Rotate:	22.7	3.07	0.36	0.38
X-100R:	23.9	3.43*	0.39	0.45*

Mean (10 samples)
Significant difference between two groups, **: P<0.01, *: P<0.05

胎内 X 線照射を受けた新生仔ラットの大脳発達を Table 2 に示した。大脳重量は 5,10, 15 日齢とも照射により 16-20 % 低下した。湿重量当たりの DNA 量は生後減少し 5 日齢では X 群で低下したが，以後 R 群との差はみられなかった。RNA/DNA，蛋白/DNA とも生後増加し，照射により RNA/DNA では差はみられないが，蛋白/ DNA は 5 日齢では X 群が R 群に比べ有意に高かった。

Table 2. Development of postnatal cerebrum

Days after birth	5	10	15
1. Cerebrum wt(mg)			
Rotate:	381 (12)	737 (12)	1007 (10)
X-100R:	305***(19)	617***(14)	813***(12)
2. DNA(mg/g wet wt)			
Rotate:	2.52 (12)	1.61 (12)	0.99 (10)
X-100R:	2.25* (19)	1.56 (14)	1.08 (12)
3. RNA/DNA			
Rotate:	1.52 (12)	2.42 (12)	3.62 (10)
X-100R:	1.59 (19)	2.45 (14)	3.37 (12)
4. Protein/DNA			
Rotate:	36.9 (12)	62.5 (12)	116.7 (10)
X-100R:	40.7* (19)	64.9 (14)	104.9 (12)

Mean (No. of samples)
Significant difference between two groups,***: P<0.001, *: P<0.05

大脳 DNA の塩基及びヌクレオシド組成に対する X 線照射の影響を検討するため，酸及び酵素分解物を HPLC で分析した(Fig. 1)。酸分解物には 4 塩基に加え 6-7 の未知ピークが検出された。最終 DNA 濃度と DNA 乾燥重量から算出した，DNA 量当たりの各塩基の総濃度は X 群で高い傾向を示したが，その組成にはほとんど差は認められず，GC含量は 48-49 % であった(Table 3). 未知ピークの面積比でも明確な影響はみられず，ピークの質的変化はなかった。酵素分解物のクロマトグラムには 4 ヌクレオシドの主ピークの他に，微量の C, G, A と 2 つの未知ピークが検出された。各ヌクレオシドと 3 塩基の DNA 量当たりの総濃度は，照射によりやや増加した。組成に対する照射の影響は dThd でやや低下し，dAdo でやや増加した(Table 3)。GC 含量及び未知ピークの面積比には照射による影響はみられず，新たなピークの出現は観察できなかった。

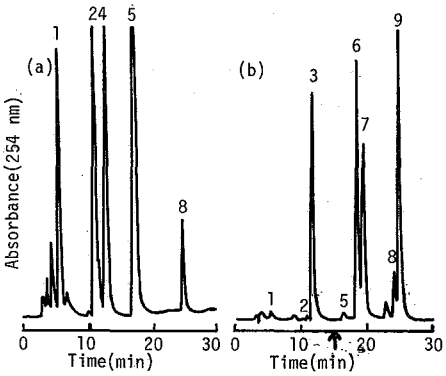


Fig. 1 Chromatograms of bases and nucleosides of fetal cerebral DNA.
(a) acidic hydrolysate (b) enzymatic hydrolysate
1:C, 2:G, 3:dCyt, 4:T, 5:A, 6:dGuo, 7:dThd, 8:Thb, 9:dAdo
Arrow shows the switching time of the sensitivity range from 0.05 a.u.f.s. to 0.1 a.u.f.s.

〔考　察〕

X線照射によりDNAの各単離過程での収率に差はみられないが，収量はホモジネート，分離核で低下し，その後の段階ではわずかに増加した。同条件で照射したSakuraba et al. (5)によるホモジネートの成績と比較すれば，DNA，RNA/DNA，蛋白/DNAともほぼ類似した値を示し，DNAが有意に低下するという同様の傾向が得られた。

Table 3. Base and nucleoside compositions of fetal cerebral DNA

1. Base composition	C	G	T	A	Total	GC content
Rotate: nmol/mgDNA	579	511	584	569	2242	
(%)	(25.9)	(22.8)	(25.7)	(25.6)		(48.7)
X-100R: nmol/mgDNA	693	631	730	689	2742	
(%)	(25.2)	(23.1)	(26.7)	(25.2)		(48.3)
2. Nucleoside composition	**dCyd**	**dGuo**	**dThd**	**dAdo**	**3 bases+ nucleosides**	**GC content**
Rotate: nmol/mgDNA	375	335	606	560	1961	
(%)	(19.3)	(16.2)	(31.5)	(28.4)		(39.2)
X-100R: nmol/mgDNA	572	561	883	884	2988	
(%)	(19.2)	(18.8)	(29.6)	(29.6)*		(40.1)

Mean (4 samples)
Significant difference between two groups, *: P<0.05

X線照射による核の小型化も推定できるため超遠心における1回目と2回目の収率を比較したが，照射による影響は認められなかった。またDNAの収率は除蛋白操作以後，照射群で高いことから，核膜の脆弱化が示唆された。蛋白/DNAは各単離過程とも照射群で高いが，これは放射線照射によりクロマチンでのDNA－蛋白crosslinkが増加する事実(4)と合わせて興味深い。照射による大脳重量の低下は生後15日でも観察されたが，同条件で行ったTakeuchi et al.の報告では60日齢でも回復されず(8)，その程度は線量に比例している(9)。大脳湿重量当たりのDNA量は，照射により生後5日まで低下し，10日以後回復した。DNA量は細胞の分裂，増殖を意味することから，妊娠13日100R照射によりニューロンの増殖は抑制されるが，その後のグリアの増殖には大きな影響を与えないものと推察された。単離DNAに対するRNA，蛋白の割合はそれぞれ0.2，0.4であった(Table 1)。最終DNA濃度と乾燥重量から算出した塩基，又クレオシドの総濃度は，有意ではないがX群で高い傾向がみられた。この傾向は特に酵素分解物で顕著であることから，DNase Iの作用を受け易いことが考えられた。酸分解により検出された各塩基に反ぼす照射の影響は質，量ともに認められなかった。酵素分解により検出された又クレオシド組成では，照射により　　dThdが低下したことから，カルボニル基の酸素数に比例して放射線損傷を受け易いという報告(6)を裏付けると共に，糖鎖部分への損傷が残存する可能性が示唆された。これらの変化と脳障害との関連が今後の課題であろう。

〔文　献〕

(1) Breter, H.J., Seibert, G. and Zahn, R.K. (1977) J. Chromatogr. 140, 251-256.
(2) Løvtrup-Rein, H. and McEwen, B.S. (1966) J. Cell Biol. 30, 405-415.
(3) Marmur, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 208-218.
(4) Mee, L.K. and Andelstein, S.J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2194-2198.
(5) Sakuraba, H. and Tanaka, H. (1983) Brain Dev. 5, 457-463.
(6) Schnable, H. (1976) Radiat. Res. 67, 184-186.
(7) Sharma, R.C. and Yamamoto, O. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 662-671.
(8) Takeuchi, I.K., Kawabata, M. and Takeuchi, Y.K. (1981) Cong. Anom. 21, 245-251.
(9) Weber, L., Schmall, W. and Kriegel, H. (1975) Stahlentherapie 155, 425-430.

38 Twitcher マウスの生化学研究

梅沢房代・河西悦子・井田博幸・所　敏治
衛藤義勝
（慈恵医大・小児科）

〔要　約〕

ヒトKrabbe病のgenetic modelであるTwitcher mouseを用いて，神経組織の脂質・蛋白分析を行い，同時に腎臓でのGalactocerebrosideの蓄積を形態的に観察した。又，Liposomeによる酵素療法に関して検討を加えた。

(結果)：1)脂質分析では，中枢・末梢神経共にcontrolとhomozygote間に有意差は認めなかった。2)蛋白分析では末梢神経に於て低分子蛋白の増加をみたが，本体は不明であった。3)Mouse腎では，Galactocerebrosideがcontrolの5～8倍量蓄積している事が判明し，その蓄積形態には，棒針状のものとMyelin様同心円状のものと二種類ある事が確認された。4)Liposomeによる酵素注入に於ては，目ざす脳での活性上昇はなく，形態的に白取り込みは確認できなかった。注入したLiposomeの大部分は細網内皮系に取り込まれ，その酵素活性は24～48時間持続した。

今後は，BBBをより選択的に通過し得るLiposomeの開発が必要と思われた。

Key words：　Twitcher mouse, Galactocerebroside, Liposome

ヒトKrabbe病は，乳時期の4－5ヶ月に痙攣・嘔吐・易刺激性等で発症し，生後2才以内に死亡する遺伝性脳変性疾患である。組織学的に脳白質の広汎な脱髄をきたし，Globoid cellを認めるのが特徴である。本症の発症原因として，myelinに多く存在するGalactocerebrosideの分解を司る，cerebroside β-galactosidaseの酵素欠損による事が明らかにされている。しかし，脱髄のおこる機構に関しては種々の仮説が報告されているが，今だに不明な点が多い。

今回我々は，1980年，Duchenら[1]により，ヒトKrabbe病のgenetic modelとして紹介されたTwitcher mouseを用い，神経組織及び内臓器に於ける生化学的・形態学的変化を調べると同時に，Liposome注入による治療効果について検討したので報告する。

(方法)：使用したmouseは，Jackson Laboratory，Bar Harbor Maineより入手したB6/CE Strainで，heterozygote同士のかけ合わせによりhomozygoteを得た。Homozygoteは，神経症状の明らかな生後30日令のものを選び，mouse tailを用い小林ら[2]の方法により酵素活性を測定した。

脂質分析は，材料として大脳半球，脊髄，末梢神経(坐骨神経)を用いた。脂質の抽出はFolchらの方法に従い，これをシリカゲル薄層クロマトにて展開し半定量的に脂質分画を検討した。糖脂質は，Sweelyらの方法によりガスクロマトグラフィーを用い分析した。蛋白は，Weber & Osbornの方法によりSDS polyacrylamide-gelにて電気泳動を行った。又，Liposomeは八木ら[3]の方法によりLecithin：Cholesterol：Sulfatideモル比を，7：2：1で作成しβ-galactosidaseを包埋した後腹腔内に注入した。注入後，12時間・24時間・48時間と経時的にmouse各臓器(脳・肝・脾・腎)に於ける酵素活性を測定した。

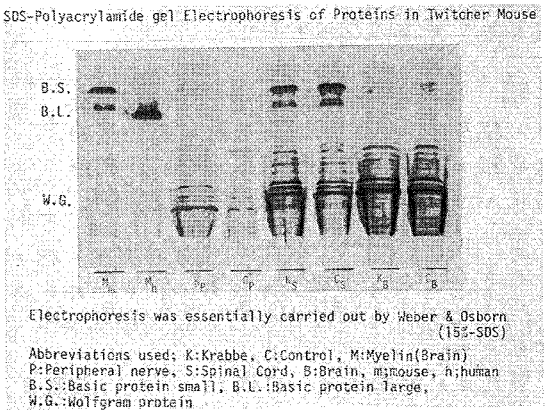
(結果)：1)神経組織の脂質分析の結果

大脳半球に於て、myelin脂質であるcerebroside, sulfatideの含量の低下は認められず, Densitometerによる分析でもcontrolとHomozygote間にpatternの変化は見られなかった。一方、病理学的所見が大脳に比し強いと言われている末梢神経に於ても、同様にcerebroside, sulfatideの含量の低下は明らかでなかった。

2)神経組織の蛋白分析の結果 (図1)

脱髄の経過を考える際、myelin蛋白がmyelin脂質の崩壊に先立つ可能性もある為, 神経組織の蛋白について検討を加えたが、中枢神経系ではその分画に有意差は見られなかった。が、末梢神経系に於てはHomozygoteで低分子蛋白の増加を認めた。

電顕に於ては、末梢神経のシュワン細胞・myelinは比較的良く保たれており、著明な脱髄像は認められなかった。



(図1)

3)内臓器の糖脂質分析の結果

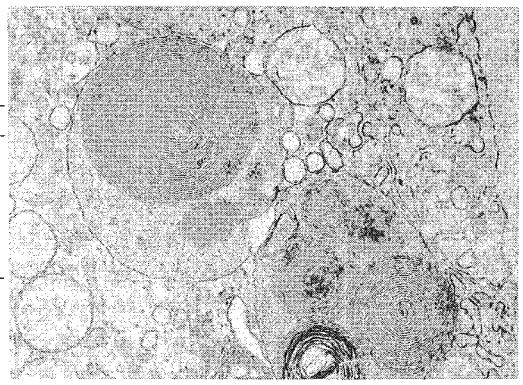
神経組織以外の各種臓器に於ける脂質分析では、特に腎臓に於て、ヒトではGalactocerebrosideの蓄積がみられないのに対し、Twitcher mouseではcontrol群の5～8倍量のGalactocerebrosideが蓄積している事が判明した(表2)。これを電顕で調べてみると、ヒト脳に認められるGloboid cell内のinclusionに似た棒針状のものと、全く形態を異にするmyelin様の同心円状のもの(図2)と、二種類の蓄積形態を示すことが判明した。

Table 2. Ceramide hexoside composition in kidney of Twitcher mouse

	Cer-gal	Cer-glc	CDH*	CTH**
Normal	13.8 14.7	10.5 12.0	25.2 20.3	10.5 16.0
Heterozygote	12.7 18.8	6.7 7.1	22.7 27.6	18.9 20.6
Homozygote	89.8 57.6	14.0 14.8	31.8 27.5	17.6 19.7

* CDH; cermide-gal-gal, ** CTH; ceramide-glc-gal-NAcgal
values are expressed as mg per 100 gr tissue.

(表2)



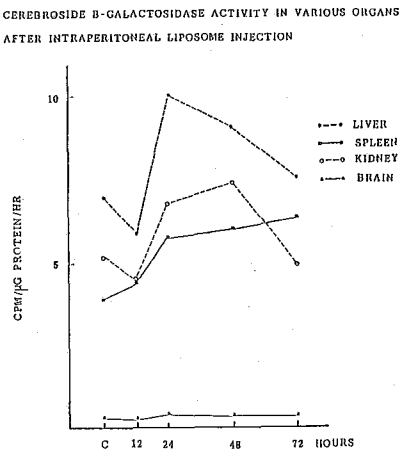
(図2)

4)Liposome注入による効果

Mouse homozygoteの腹腔内にLiposomeを注入したが、臨床症状の改善並びにLife spanの延長に効果は認められなかった。又、腎に蓄積したGalactocerebrosideも、Liposome注入後減少する傾向は見られなかった。

Liposome注入後の各臓器に於ける酵素活性は、24～48時間で高値を示した。臓器別

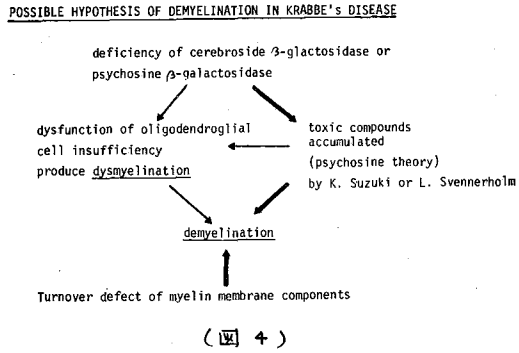
では腎臓での活性が最も高かったが、目ざす脳に於ては注入前後でほとんど変化がなく、Liposome自体が脳内へ取り込まれている可能性の低い事を示唆していた(図3)。形態的にも、肝kupper細胞・腎・脾にはLiposomeが認められたが、脳内には明確な像として捉える事ができなかった。



(図3)

(考察): Twitcher mouseは常染色体劣性遺伝で、臨床的には末梢神経麻痺の為、食物摂取困難となり1ケ月程で死亡する。病理学的にも、Macrophage様細胞を認め、その胞体中にはヒトKrabbe病のGloboid cellにみられるTwisted tubulesを有するといわれる。しかし、ヒトKrabbe病と異なる点として、脱髄が末梢神経系に著明である事が掲げられる。

今回我々の結果では、生後30日令では脂質分画に有意差が認められなかったが、これは脱髄の程度がまだ軽い為と思われた。Myelinの崩壊とGloboid cell内へのGalactocerebrosideの蓄積がバランス状態となり、見かけ上の蓄積が優位とならない可能性も考えられるが、形態的にOligodendrogliaも保たれている事より、脱髄の程度が弱い可能性の方が高いと考えられる。



(図4)

又、蛋白分析の結果からは、少くとも中枢神経に於けるmyelin蛋白に大きな変化はなかった事より、myelin蛋白の合成能は保たれていると考えてよいと思われる。図4は、現在Suzuki, Svennaholmらにより考えられているヒトKrabbe病の脱髄機構の仮説を示したものである。Krabbe病では、dysmyelinationか、demyelinationか、両者の合併であるか不明だが、myelin蛋白・脂質の明らかな低下がない事よりdemyelinationの可能性が高いと考えられる。

Liposome注入に於ける治療については、細網内皮系への取り込みが高く脳内への取り込みが低かった事より、今後は更に、BBBをより選択的に通過するLiposomeの開発が必要と思われた。

(文献)
1) Duchen LW et al.: Hereditary leukodystrophy in the mouse:The new mutant twitcher Brain 1980; 103:695
2) Kobayashi T et al.: The twitcher mouse:Determination of genetic status by galactosylceramidase assayed on clipped tail. Biochem. Med.1982; 27:8
3) Yagi K et al.: Effect of phospholipids on substrate specificity of β-galactosidase purified from aspergillus olyzae. Arch. Biochem. Biophys.1982; 215:157

39 先天性甲状線機能低下症マウス（*hyt*）のミエリン低形成に及ぼす甲状腺ホルモンの効果

杉崎哲朗・野口鉄也　（東邦大・医・Ⅱ生理）
佐藤　勇　（同・総研）
工藤玄恵　（同・病理）

〔要　約〕

先天性甲状腺機能低下症ミュータントマウス(hyt)の大脳にみられるミエリン低形成を甲状腺ホルモン単独投与により回復させ得るか否か，さらに，その回復可能な時期は脳発育のどの期間であるかを検討した。

甲状腺ホルモンの投与期間を，生下日から20日令まで，20日令から40日令まで，の二期間に分け，投与方法を経口，と非経口に分け，実験を行った。

その結果，

1) 先天性甲状腺機能低下症マウス（hyt）にみられる大脳ミエリン低形成は甲状腺ホルモン単独投与で完全に回復させ得た。
2) その時期は生下日から20日令までに限られていた。
3) 母体血清サイロキシン濃度が正常の2倍に維持されれば，母乳を介して仔マウスの低サイロキシン血症が改善され，甲状腺機能低下に伴うミエリン低形成を防ぎ得る。

以上のことが明らかとなった。

Key words : hyt mouse, myelination, T_4 treatment.

先天性甲状腺機能低下症は精神発達遅滞を伴う先天性代謝異常症のうち，最も高頻度の疾患として知られている。その精神発達遅滞には軽重の差があり，胎生期から出生後にかけての甲状腺ホルモンの欠損の程度に依るとされている。これに関して，母乳栄養児では精神発達遅滞は軽るく，人工栄養児では重症となるとの報告(3)も出されているが，これに反するもの(6)もあり一定していない。一方，母乳中のサイロキシン(T_4)含量については，抽出方法の差から，値は一定していないが，Möllerら(8)はガスマス分析を行うことによって，固定し，精度よく定量している。

そこで，われわれは大脳にミエリン低形成をみとめる(12)先天性甲状腺機能低下症ミュータントマウス(hyt)を用い，母乳を介しての甲状腺ホルモン単独投与を試み，哺乳期間のみの治療により，ミエリン形成が完全に回復することを認めた。

〔材　料　と　方　法〕

動物：　米國ジャクソン研究所より購入した hyt/hyt，hyt/+マウスを0.025%の甲状腺粉末(T-125, Sigma)を添加した繁殖用飼料で飼育した。交配は雄 hyt/hyt と雌 hyt/+ の間で行った。生下日に hyt/hyt，hyt/+の仔マウスをそれぞれ以下の7群に分け実験を行った。経口治療：(A)無処置群：　標準飼量飼育母マウスから哺乳を受け，離乳後，標準飼料で飼育されたもの。(B)母乳治療(Galactotherapy)群：　甲状腺粉末添加飼料飼育母マウスから生後20日間哺乳を受け，離乳後，標準飼料飼育されたもの。(C)食餌治療(Alimentotherapy)群：　標準飼料飼育母マウスから哺乳を受け，20日令以後20日間甲状腺粉末添加飼料飼育されたもの。(D)連続治療(Continuation Therapy)群：　甲状腺粉

未添加飼料飼育母マウスから哺乳を受け，離乳後，継続して添加飼料飼育されたもの。非至口治療：標準飼料飼育母マウスから哺乳を受け，離乳後も標準飼料飼育され，この間，時期を変えて，0.1μgT_4 皮下注射を連日受けたもの，(E) 対照群：生理的食塩水を投与されたもの。(F) 0-20群：出生後最初の20日間 T_4 投与を受けたもの。(G) 20-40 群：20日令から20日間 T_4 投与を受けたもの。尚，(C)，(D)群は41日令より2日間標準飼料飼育にかえ，全ての実験動物は42日令で屠殺し，T_4 レベルを測定することにより，hyt/hytとhyt/+を識別した。

CNPase 活性の測定：Tsukadaらの方法(13)によった。

蛋白定量：Lowryらの方法(7)によった。

血清及び胃内容物中の T_4 レベルの測定：血清は直接 T-4 RIAKIT II（ダイナボット）で測定した。胃内容物については，T_4 を0.037MHClを含む0.87Mエタノールで抽出し，抽出物を水飽和クロロホルムで洗浄後，同キットで測定した。

〔結　果〕

体重の変化：hyt/hyt マウスの体重増加は13日令ごろから緩徐となり，42日令ではhyt/+の体重の約60%にとどまっていた。しかし，至口治療によって，どの時期に行なわれても，有意に体重増加が認められ，中でも生後40日間の連続治療群で著しく，次いで母乳治療群，食餌治療群であった。一方，非至口治療では，0-20群で著明な体重の増加が得られたが，20-40 群では有意の増加は認められなかった（表1）

脳重の変化：生後の発育期を通じて，hyt/hyt マウスの脳重はどの部位でも hyt/+との間に差はなかった。また，治療による差もなかった（データは省く）。

CNPase 活性の変化：hyt/hytの大脳においてのみCNPase 活性は hyt/+ のそれの約60% に減少している。このCNPase 活性の低下の回復には，至口，非至口いずれの治療に於いても，生後の最初の20日間に行なわれる治療が効果を示し，42日令で hyt/+ のレベルに達した。しかし，後半の治療は全く回復効果をもたなかった（表2）

血清及び胃内容物中の T_4 含量：分娩後4日間甲状腺粉末添加飼料飼育の母マウス血清 T_4 含量及び哺乳を受けている正常仔マウスの血清及び胃内容物中の T_4 含量を測定した。甲状腺粉末添加飼料で飼育することにより母マウスの血清 T_4 含量は標準飼料飼育母マウスのそれに比較して約80%増加していた。この高 T_4 血症母マウスから哺乳を受けている仔マウスの血清 T_4 含量は標準飼育母マウスから哺乳を受けている仔マウスのそれの3.9倍に達し，さらに仔マウスの胃内容物中に高濃度の T_4 が含まれていることが明らかとなった（表3）

表1　RESPONSE OF BODY WEIGHT (g) OF THE 42-DAY-OLD NORMAL (hyt/+) AND MUTANT (hyt/hyt) MICE TO VARIOUS HORMONAL TREATMENTS.

Treatments			Genotype	
			hyt/+	hyt/hyt
None			21.8 ± 3.0 (50)	13.7 ± 1.5 (25)
Route		Period		
Peroral	Galactotherapy	0-20	21.4 ± 2.1 (7)	18.3 ± 1.9 (6)**
	Alimentotherapy	20-40	22.8 ± 2.0 (7)	16.6 ± 1.5 (7)**
	Continuation Therapy	0-40	20.1 ± 1.4 (14)	19.3 ± 1.4 (13)**
Parenteral	Injection	0-20	18.9 ± 1.2 (14)**	17.2 ± 1.1 (7)**
	Injection	20-40	18.1 ± 3.1 (11)**	14.8 ± 1.6 (8)*

Values are expressed as mean ± S.D., with the number of animals in parentheses.
All differences from the untreated animals were significantly by Student's t-test.
**: p<0.01, and *: p<0.05.

組織学的知見：表2

Golgi-Cox法によりhyt/+及びhyt/hyt大脳の神経細胞の形態につき検索を加えたが，樹状突起の発育，細胞体の大きさなどには全く差がみられなかった。一方，ミエリン塩基性蛋白(MBP)抗体を用いて脳梁部位のミエリン形成を免疫組織学的に観察したところ，hyt/hyt大脳で，発育後半にミエリン形成が行なわれる脳梁膨大部で著明に低形成が認められた。しかし，母乳治療群では明らかな回復が認められた(データは省く)。

RESPONSE OF CNPase ACTIVITY (μmole formed 2'-AMP/min/mg-protein of homogenate) OF THE 42-DAY-OLD NORMAL (hyt/+) AND MUTANT (hyt/hyt) MICE TO VARIOUS HORMONAL TREATMENTS.

			Genotype	
			hyt/+	hyt/hyt
None			2.24 ± 0.23 (50)	1.28 ± 0.25 (25)
Treatments				
Route		Period		
Peroral	Galactotherapy	0-20	2.23 ± 0.14 (7)	2.14 ± 0.13 (6)**
	Alimentotherapy	20-40	2.25 ± 0.09 (7)	1.30 ± 0.07 (7)
	Continuation Therapy	0-40	2.28 ± 0.12 (14)	2.15 ± 0.24 (13)**
Parenteral	Injection	0-20	2.30 ± 0.23 (14)	2.35 ± 0.25 (7)
	Injection	20-40	2.18 ± 0.13 (11)	1.38 ± 0.14 (8)**

Values are expressed as mean ± S.D., with the number of animals in parentheses. All differences from the untreated hyt/hyt were significant by Student's t-test. **: p<0.01.

〔考察〕

hytマウスはBeamerら(1,2)によって見出され，甲状腺発育不全は染色体12の異常による。したがって，胎生期からT4が欠損しているため先天性甲状腺機能低下症の好適なモデルである。本マウスを用いて，すでにわれわれは大脳にミエリン低形成のあることと，このミエリン低形成はSnell dwarf mouseの大脳にみられるグリア細胞の分裂低下による低形成(9-11)ではなく，ミエリン形成そのものに障害のあることを示している(12)。

すでに，甲状腺ホルモンが幼若期の脳に蓄積していること(4)，in vitroの系でミエリン形成をT4が促進すること(5)などが知られていることから，本実験で得られた結果は，甲状腺粉末添加飼料飼育により母マウスの血中T4レベルが上昇し，母乳中に分泌され，仔マウスの消化管から吸収されることにより，低T4血症が改善され，甲状腺機能低下に伴うミエリン低形成を回避したものと解釈出来る。

表3 T4 LEVELS OF SERA AND STOMACH CONTENTS OF THE PUPS ON THE 4th DAY OF THE PERORAL AND PARENTERAL THERAPIES.

Treatmants	Serum (μg/dl)	Stomach Content (ng/stomach)
None	dam 4.26 ± 0.08 (3)	----
	pup 0.23 ± 0.09 (20)	undetectable (20)
Galactotherapy	dam 7.62 ± 0.14 (3)**	----
	pup 0.89 ± 0.10 (24)**	3.44 ± 0.12 (20)
30 min after Injection	pup 2.86 ± 0.65 (4)**	----
60 min after Injection	pup 4.35 ± 0.70 (4)**	----

Values are expressed as mean ± S.D., with the number in parentheses. All differences from the untreated were significant by Student's t-test. **: p<0.01.

〔文献〕

(1) Beamer,W.G.,Cresswell,L.A.(1982) Anat.Rec. 202, 387-393. (2) Beamer,W.G.,Eicher,E.M.,Maltais,L.J., Southard,J.L. (1981) Science 212, 61-63. (3) Bode,H.H.,Vanjonack,W.J.,Crawford,J.D. (1978) Pediatrics 62, 13-16. (4) Cohan,S.,Ford,D.H.,Rhines,R.K. (1967) Acta Neurol. Scand. 43, 11-32. (5) Hamburgh,M. (1968) Gen. Comp. Endocrinol. 10, 198-213. (6) Letarte,J.,Guyda,H.,Dussault,J.H.,Glorieux,J. (1980) Pediatrics 65, 703-705. (7) Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.J.,Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275. (8) Möller,B., Bjorkhem,I.,Falk,O.,Lantto,O.,Larsson,A. (1983) J.Clin.Endocrinol.Metab. 56, 30-34. (9) Noguchi,T.,Sugisaki, T.,Tsukada,Y. (1982) J.Neurochem. 38, 257-263. (10) Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Takamatsu,K.,Tsukada,Y. (1982) J.Neurochem. 39, 1693-1699. (11) Noguchi,T.,Sekiguchi,M.,Sugisaki,T.,Tsukada,Y.,Shimai,K. (1983) Devl. Brain Res. 10, 125-138. (12) Noguchi,T.,Sugisaki,T. (1984) J.Neurochem. 42, 891-893. (13) Tsukada,Y.,Nagai,K.,Suda, H. (1980) J.Neurochem. 34, 1019-1022.

40 成長ホルモン単独欠損マウス（*lit*）の大脳ミエリン低形成について

野口鉄也・杉崎哲朗（東邦大・医・Ⅱ生理）
塚田裕三（慶大・医・生理）

〔要　約〕

EicherとBeamer (1976) に見出されたLittle mouse (lit)は下垂体成長ホルモンを単独欠損するため，ヒトのIsolated Growth Hormone Deficiency Type Iのモデルとなる。

このモデルマウスを用いて，成長ホルモン単独欠損が果して脳の発育を障害するか否かを検討した。その結果，以下のことが明らかとなった。

1) 40日令のlit/litマウスの大脳及び小脳の湿重量はいずれも対照の80%であった。
2) 40日令のlit/litマウスの大脳及び小脳の総DNA量は80%及び84%にそれぞれ減少していた。
3) lit/litマウス大脳及び小脳の総RNA量はDNA量の減少とほぼ平行していた。
4) CNPase活性はlit/litマウスの大脳でのみ減少していた（対照の74.4%）。
5) lit/litマウスの一日行動量は著明に減少し，その日内変動も明確ではなかった。

Key words : lit mouse, microcephaly, hypomyelination.

すでにわれわれはSnell dwarf mouse (dw) を用いて成長ホルモン (GH) が脳発育に効果をもつことを報告した (7-9,11)。次いで，先天性甲状腺機能低下症マウス (hyt) を用いて，dwマウスと異るタイプのミエリン低形成のあることを示した (10)。

すなわち，甲状腺刺激ホルモン (TSH)とGHを同時に欠損するdwマウスでは小頭症を呈し，生後に分裂増殖するグリア細胞が減少し，ミエリン低形成が導びかれている。一方，甲状腺ホルモンのみを欠損するhytマウスで小頭症を呈することなく，ミエリン低形成のみを示す。

このことはGHが単独に欠損するならば，dwマウスと程度の差はあれ，小頭症を呈し，ミエリン低形成を示す可能性が強く示唆される。すでに，LaronとGalatzerはヒトのIsolated Growth Hormone Deficiencyでは小頭症を呈し，IQの低下することを報告している (4)。

そこで，われわれはlitマウスを用い，これらにつき検討を加えた。

〔材　料　と　方　法〕

動物：　C57BL/6J 種の雄lit/+と雌lit/litを米国ジャクソン研究所より購入し，自家繁殖した。交配は雌lit/litと雄lit/+の間で行った。40日令で屠殺し実験に供した。尚，lit/litマウスの判定は下垂体を剔出し，SDSスラブゲル電気泳動上で分画しGHの欠損を確認した。

生化学的分析：　DNA,RNAの定量：SchmidtとThannhauserの方法 (13)により抽出し，RNAはMejbaumらの方法 (6)，DNAはBurtonの方法 (1)に従いそれぞれを比色定量した。

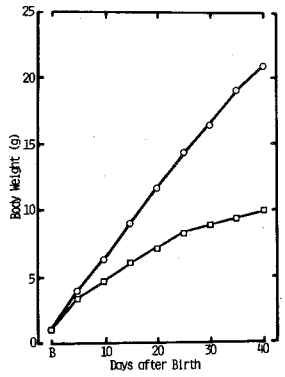
蛋白の定量： Lowry らの方法 (5) によった。CNPase 活性の測定： Tsukada らの方法 (14) によった。

行動量の測定： Animex-MK Meterを用いて測定した。

〔結 果〕

体重の変化： lit/lit マウスの発育に伴う体重の増加は著しく抑えられており，10日令で lit/+ マウスと有意の差を示すようになり，40日令で lit/+ マウスの約50%にとどまった(図1)。

MEAN DAILY WEIGHTS OF lit AND NORMAL LITTER MATES.



Each point represents the mean value of 10 animals. ○Controls □lit/lit

脳重： 40日令の脳各部位の湿重量を比較すると，lit/lit マウスでは，大脳で lit/+ マウスの81.5%，小脳で81.6%であった。しかし，脳幹では lit/+ マウスと差はなかった(表1)。

蛋白，DNA，RNA 含量： g湿重量当りの蛋白，DNA，RNA 量は脳各部位で lit/lit マウスと lit/+ マウスの間で有意の差はなかった。しかし，lit/lit マウス各脳部位当りの含量に換算すると，lit/+ マウスと比較して，DNA 含量は大脳で79.3%，小脳で84.4%，RNA 含量は大脳で70.0%，小脳で79.1%に減少していた。しかし，脳幹では差はなかった(表1)

CNPase 活性： 40日令脳各部位の CNPase 活性をみると，lit/lit マウス大脳でのみ活性が74.4%に減少していた(表1)

行動量測定： Activity Meter で測定した結果，1日行動総量，暗時行動量，明時行動量いずれも lit/lit マウスで減少しており，さらに，明暗にともなう行動量の日内変動もみられなかった(図2)

〔考 察〕

EicherとBeamer によって見出された lit ミュータントマウス(3)は下垂体での成長ホルモン合成を欠く(2)という劣性遺伝形質をもつ。したがって，ヒトでみられる成長ホルモン単独欠損症の好適なモデルとなる。他方，Laron と Galatzer は本疾患では低身長

表1

WEIGHTS, DNA AND RNA CONTENTS, RNA/DNA RATIO, AND CNPase ACTIVITIES IN DIFFERENT PARTS OF THE CNS OF 40-DAY-OLD lit/lit MICE.

Tissue	Genotype	Wet weight (mg)	Protein (mg/g wet wt)	DNA (μg/brain part)	RNA (μg/brain part)	RNA/DNA	CNPase Activity (μmole/mg protein of homogenate/min)
Cerebrum	lit/+	232 ± 10 (10)	111 ± 11 (10)	429 ± 41 (10)	848 ± 42 (10)	1.98	1.72 ± 0.18 (10)
	lit/lit	189 ± 16 (7)*	104 ± 7 (7)	340 ± 22 (7)*	594 ± 51 (7)*	1.75	1.28 ± 0.16 (7)*
Cerebellum	lit/+	53.2 ± 2.4 (10)	112 ± 11 (10)	302 ± 28 (10)	158 ± 19 (10)	0.532	1.92 ± 0.12 (10)
	lit/lit	43.4 ± 1.9 (7)*	111 ± 9 (7)	255 ± 30 (7)*	125 ± 12 (7)*	0.490	1.88 ± 0.15 (7)
Brain Stem	lit/+	139 ± 19 (10)	115 ± 6 (10)	239 ± 30 (10)	396 ± 20 (10)	1.66	3.94 ± 0.14 (10)
	lit/lit	136 ± 8 (7)	105 ± 4 (7)	221 ± 32 (7)	398 ± 18 (7)	1.80	3.76 ± 0.27 (7)

Values are expressed as mean ± S.D., with the number of animals in parentheses.
All differences from the control, lit/+, were significant by Student's t-test. *; $p<0.01$

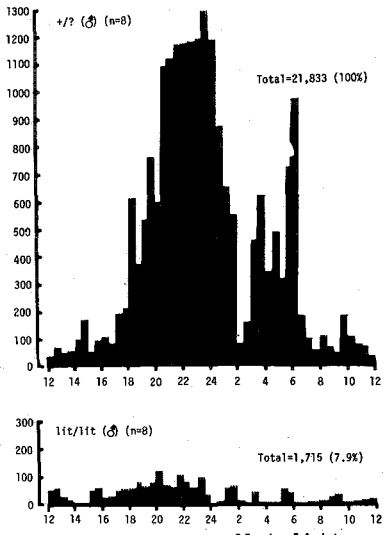
に加えて，小頭症とIQの低下を伴うことを報告している(4)。

われわれが検索した限りでは，lit/litマウス中枢神経系の異常として，大脳及び小脳の湿重量の減少，これに平行してのDNA，RNA含量の減少が認められ，明らかな小頭症を示していた。これに加えて，大脳でCNPase活性が低下し，ミエリン低形成が認められた。

細胞数の指標であるDNA含量が大脳と小脳で減少していることは，前者でグリア細胞数が減っていること，後者では内顆粒層細胞が減っていることを示している。マウス大脳のオリゴデンドログリアは生後に分裂増殖し，小脳とその時期を異にしている。したがって，lit/litマウス大脳のミエリン低形成はミエリン形成を司るオリゴデンドログリア細胞数の減少によると考えられ，この現象は，すでにわれわれが報告したdwマウス大脳にみられるミエリン低形成の発現機序と同一のものと考えられる。一方，GHは正常レベルに保たれ，甲状腺ホルモンを欠くhytマウスは大脳の細胞数は正常であるにもかかわらず，ミエリン低形成のみが発現してくる。

図2

SPONTANEOUS LOCOMOTION ACTIVITY OF lit MICE.



The light cycle was controlled; light was preset to come on at 6:00 and go off at 18:00. Each column represents activity counts during 30-min intervals. A total 24-h count is shown in the upper right corner of each panel.

Sarlieveら(12)はdwマウスを用い発育期のミエリン糖脂質合成酵素に対してGHとサイロキシンが異る効果をもつことを報告している。今回のわれわれの結果でも，血中サイロキシンレベルが正常で，GHのみが欠損するlitマウスでも脳発育障害が惹起されることが明らかとなり，両ホルモンが脳発育にそれぞれ独立して関与している可能性が示唆された。

〔文献〕

1). Burton,K. (1956) Biochem.J. 62, 315-323
2). Cheng,T.C.,Beamer,W.G.,Phillips,J.A.III.,Bartke,A.,Mallonee,R.C.,Dowling,C. (1983) Endocrinology 113, 1669-1678
3). Eicher,E.M.,Beamer,W.G. (1976) J. Heredity 67, 87-91
4). Laron,Z.,Galatzer,A. (1980) In Hormones and the Brain, pp.293-302, MTP Press.
5). Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L.,Randall,R.J. (1951) J.Biol. Chem. 193, 265-275
6). Mejbaum,W. (1939) Z. Physiol.Chem. 258, 117-120
7). Noguchi,T.,Sugisaki,T., Tsukada,Y. (1982) J. Neurochem. 38, 257-263
8). Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Takamatsu,K.,Tsukada,Y. (1982) J. Neurochem. 39, 1693-1699
9). Noguchi,T.,Sekiguchi,M.,Sugisaki,T.,Tsukada,Y.,Shimai,K. (1983) Devl.Brain Res. 10, 125-138
10).Noguchi,T.,Sugisaki,T.(1984) J. Neurochem. 42, 891-893
11).Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Tsukada,Y. (1984) Neurochem. Path. accepted
12).Sarlieve,L.L.,Bouchon,R.,Koel,C.,Neokovic,N.M. (1983) J. Neurochem. 40, 1058-1062
13).Schmidt,G.,Thannhauser,S.J. (1945) J. Biol. Chem. 161, 83-89
14).Tsukada,Y.,Nagai,K.,Suda,H. (1980) J. Neurochem. 34, 1019-1022

41 キンドリングてんかんモデルにおけるTRH機構の関与

梶田三郎・森分　隆・佐藤光源・大月三郎
（岡山大・医・神経精神科）
小川紀雄・広瀬由起子・森　昭胤
（同・脳研・機能生化）

〔要　約〕

てんかんにおける，脳内Thyrotropin—releasing hormone（TRH）機構の関与を調べるため，キンドリング形成ラットを用い，次の2つの実験を行なった。

実験1　キンドリング（K）形成ラットの脳室内にTRH誘導体である，γ—butyrolactone—γ—carbonyl—L—histidyl—L—prolinamide citrate（DN－1417）を投与したところ，後発射の持続時間の短縮とけいれん抑制を認めた。この抗けいれん作用は用量依存性がみられ，投与後30分でその作用は最大となり，24時間後にはほぼ消失した。

実験2　sham operation（SO）群，最終けいれんから48時間後（48hr.）のK群，最終けいれんから7日後（7d.）のK群の3群について7脳部位をとり出し，各脳部位別にTRH様免疫反応性（TRH—like immunoreactivity, TRH—LI），TRH受容体結合を測定した。TRH—LIには3群間に有意な変化はみられなかったが，TRH受容体結合は線条体においては，SO群に比し48hr.のK群では有意に増加し，7d.のK群ではさらに増加し，約2倍であった。扁桃核＋梨状葉皮質ではSO群に比し，7d.のK群でのみ有意な減少をみた。

以上の結果より，TRHは抗けいれん作用を有し，けいれん準備状態に対応する変化として，線条体でのTRH受容体結合の増加が重要であると考えられた。

Key words：TRH,　DN-1417,　Kindling,

緒言

TRHは視床下部のみならず広く脳部位に存在し，食欲，体温，睡眠，意識の調節等のさまざまな中枢作用をもつ事が報告されている。TRH誘導体が合成され，さらに脊髄小脳変性症，うつ病，精神分裂病への投与が試みられている。てんかんへの臨床応用は稲永ら[1]によって行なわれ，γ—butyrolactone—γ—carbonyl—L—histidyl—L—prolinamide citrate（DN－1417）が有効であった症例が報告されている。われわれはすでに，DN－1417を静脈内に投与し，抗けいれん効果を認めたと報告した[3)4)]が，今回脳室内投与によりその作用をさらに明確にし，キンドリングラットを用いて各脳部位別のTRH—like immunoreactivity（TRH—LI），TRH受容体結合を測定して，けいれん準備状態に対応するTRH機構の変化を検討したので，その成績を報告する。

実験方法

対象　SD系雄ラットを用い，室温24℃，12時間の明暗サイクルで飼育した。いづれのラットも左の扁桃核に慢性深部電極を挿入し，200μA，60Hz，正弦波の刺激を1日1回，1秒間加えた。運動発作症状はRacineの分類[7]に準じて次の5段階に分類した：Stage 1（S1）：口と顔面の掻搦，S2：点頭，S3：前肢の間代性けいれん，S4：後肢で立ち上がり間代性けいれんを示す，S5：後方への転倒を伴なう全身間代性けいれん。S5けいれんが5日連続してみられるようになったラットを，キンドリング完成ラットとした。以下このラットを用い，次の2つの実験を行なった。

実験1　DN－1417の脳室内注入

あらかじめ脳室内注入用に左側脳室上端より1mm上にガイドカニュラを挿入していたキンドリング完成ラットを用いて，DN－1417（10, 20, 40, 80μg／0.9%NaCl液2μl）または0.9%NaCl液2μlを脳室内に注入し，注入後異なった時間に扁桃核を刺激し，行動と脳波にみられるてんかん性反応の強さを評価した。

実験2　キンドリング完成ラットにおける部位別TRH—LIとTRH受容体結合

sham operation（SO）群，最終けいれんから48時間後（48hr.）のキンドリング（K）群，最終けいれんから7日後（7d.）のK群の3群について，断頭後直ちに脳を取り出し，Glovinski & Iversenの方法に準じて氷上で前頭部皮質，中隔野，線条体，視床下部，視床＋中脳，扁桃核＋梨状葉皮質，海馬の7脳部位にわけた。

次いで，脳部位別に既に報告した方法でradioimmunoassay（RIA）[8)9)]，radioreceptorassay（RRA）[5)6)]を行なった。

結果

実験1　DN−1417を20μg/2μl脳室内投与すると，キンドリングけいれんに伴なう後発射の持続時間が有意に短縮し，5匹中3匹のS5けいれんが抑制された。この抗けいれん作用には用量依存性がみられ，DN−1417の投与量を40μg以上に増量すると，扁桃核刺激によるてんかん性反応は完全に抑制された（Fig. 1）。

DN−1417の投与後の抗けいれん作用の推移をみると，10分後に同作用がみられはじめ，30分で最大となって扁桃核刺激によるてんかん性反応が完全に抑制された（Fig. 2）。DN−1417投与24時間後の扁桃核刺激では，7匹中5匹に再びS5けいれんが出現したが，他の2匹ではその後も出現せずそれぞれ投与5，7日後の扁桃核刺激でS5けいれんの再現をみた。

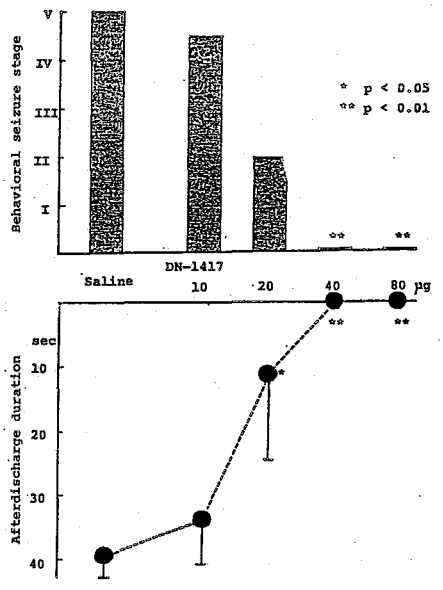


Fig.1 Dose-related response of anticonvulsant action

実験2　TRH−LIにはSO群，48hr.のK群，7d.のK群の間に有意な変化はみられなかった（Table 1）。TRH受容体結合は，線条体において最終けいれんより48時間後で有意に増加し，7日後ではその変化はさらに著明となり約2倍の増加を示した。扁桃核＋梨状葉皮質では，最終けいれんより48時間後では変化は認められなかったが，7日後では有意に減少していた（Table 2）。これらTRH受容体結合の増減が，親和性の変化によるものか，結合部位数の変化によるものかは現在検討中である。

考察

実験1では，TRH誘導体であるDN−1417をキンドリングラットの脳室内に投与し，用量依存性のある明らかな抗けいれん作用を認めた。これは，TRHの中枢薬理作用の1つとして抗けいれん作用があることを示唆している。Walczakら[10)]は，キンドリング形成ラットを用いS5けいれん48時間後における脳部位別TRH濃度を測定し，対照群と比べて梨状葉皮質で約6倍，帯状回皮質で約2.5倍，前頭部皮質，扁桃核，海馬で約2倍の増加がみられたという。Kubec & Stein[2)]の報告では，ラットに電撃けいれんをおこすと，その48時間後に海馬で約5倍，線条体で約2倍のTRHの増加がみられたという。われわれの今回の実験では，彼らが報告しているような，けいれん48時間後におけるTRH濃度の著明な増加は認められなかった。

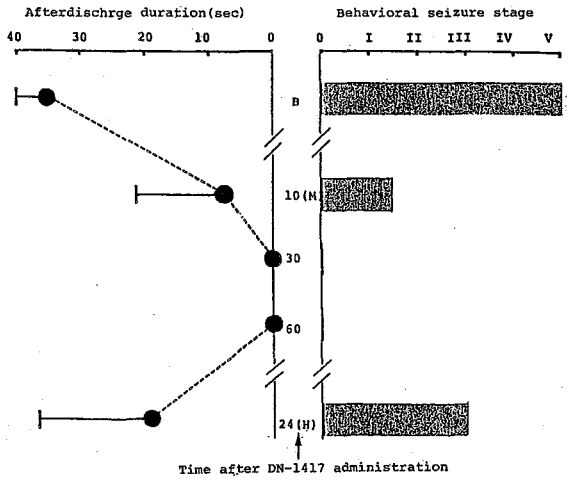


Fig.2 Chronological profile of anticonvulsant action

しかし，キンドリングラットを用いた予備実験で，われわれは，最終けいれんより30分後で中隔野，扁桃核＋梨状葉皮質，海馬でTRH濃度の増加傾向を見い出し，けいれん後のTRH濃度は増加はあるものの，Walczakらのいうほど長く続かないという結果を得ている。

キンドリングで安定した，けいれん準備性が形成された最終けいれんより7日後において，TRH濃度に変化がなくてTRH受容体結合が変化していることは注目すべきことと思われる。部分発作を反復しておこしている際，燃え上がり現象として形成されるけいれん準備性には，TRH濃度よりもその受容体側に明らかな変化が生

じていることが初めて示されたからである。扁桃核＋梨状葉皮質における受容体の変化は，そこが焦点部位であることと関係しているかもしれない。
線条体を含む錐体外路系が，てんかん発作全汎化の抑制系に属することが知られている。発作を抑制する作用が明らかにされたTRHの，その受容体が線条体で増加していたことは，キンドリング操作が線条体のTRH機構に持続性の変化を生じ，それが，けいれん準備性に強く関与している可能性がある。

Table 1 Regional TRH-LI(ng/mg protein) in kindled rat brains

Region	Sham treated controls	48 hours follwing the last seizure	7 days following the last seizure
Frontal cortex	173.4± 5.32	183.6±13.45	182.4±13.09
Septum	267.5±20.57	285.5±23.81	287.8±16.21
Striatum	277.3±13.59	295.7±24.39	283.8±14.69
Hypothalamus	718.1±27.63	759.9±46.04	665.7±21.06
Thalamus +Midbrain	135.7± 9.99	127.8± 9.41	132.4± 7.82
Amygdala +Piriform cortex	299.2±19.45	307.0±17.25	276.4±24.50
Hippocampus	212.5±14.88	198.1± 7.95	195.8±10.63

The data are shown as the mean ± SEM of 7 rats.

Table 2 Regional specific binding of TRH (f mol/mg protein) in kindled rat brains

Region	Sham treated controls	48 hours follwing the last seizure	7 days following the last seizure
Frontal cortex	53.2±5.3	49.9±3.8	46.7±8.4
Septum	50.1±8.9	46.4±6.3	45.7±1.6
Striatum	18.6±2.4	28.9±2.0*	36.1±2.6**
Hypothalamus	75.9±2.3	81.2±8.8	73.1±2.8
Thalamus +Midbrain	36.6±2.5	36.9±5.1	36.8±2.7
Amygdala +Piriform cortex	126.6±2.7	110.0±8.2	93.7±9.2**
Hippocampus	61.4±4.9	52.1±3.3	55.3±6.7

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared to control rats (one-way ANOVA)
Samples of each receptor preparation were incubated with 12 nM[^{3}H]-TRH.
Values shown are the mean ± SEM of 5 rats.

References

1) Inanaga, K. et al. (1981) Kurume Med. J. 28, 201-210
2) Kubec, M. J. et al. (1984) Life Sci. 34, 1149-1152
3) 森本 清ら (1983) 脳神経 35, 501−504
4) 森本 清ら (1983) 脳神経 35, 787−793
5) Ogawa, N. et al. (1981) Brain Res. 205, 169-174
6) Ogawa, N. et al. (1982) Peptides 3, 669-677
7) Racine, R. J. (1972) Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 32, 281-294
8) Sato, M. et al. Life Sci. in press
9) Utsumi, M. et al. (1975) Endclinol. Japon. 22, 509-516
10) Walczak, J. L. et al. Soc. Neurosci. (abstr.)

42: 42 *El*マウス大脳皮質のシナプトソーム蛋白合成と発作の影響

古塚大介・山上　栄・千頭孝史・平山栄一
森　浩一・川北幸男
（大阪市大・医・神経精神科）

〔要　約〕

Elマウスの大脳皮質より分離したsynaptosomes画分は，acetylcholinesterase，5'-nucleotidase，Na-K ATPaseの高活性を示したが，NADPH cytochrome C reductase活性はみられなかったので，microsomeの混入は少ないものと考えられる。[^{14}C]-leucineのsynaptosomes蛋白への取り込みでは，30分まで直線的に上昇し，25mM KClと50mM NaCl添加で最大となった。Mg^{++}はCa^{++}より顕著に合成を促進し，至適蛋白濃度は0.5 mg/mlであった。Chloramphenicol，RNaseは合成阻害を起さなかったが，puromycinとouabainは顕著に合成を抑制した。Elマウスの放り上げ刺激による発作では，合成は発作直前に対照の137%まで促進するが，強直期には95%まで低下し，発作直後と30分後では逆に146と133%まで促進した。El(+)マウスと生後1度も発作を起させないEl(o)やddYマウスにbemegrideの14 mg/kg体重を腹腔内に注射し，発作を誘発させると，いずれの時期においても，El(+)とddYの蛋白合成能は顕著な抑制を示した。これらの結果はElマウスの固有の発作は，bemegrideによる発作と異なり，synapseでの膜蛋白の合成や酵素蛋白の合成に促進的な効果をもたらすものと考えられる。

Key words： synaptosomes, protein synthesis, seizures

Synapseの膜蛋白や伝達物質を調節する酵素は，局所的に合成されるといわれ[1,2,5,10,13]，脳機能との関連が注目されている[6,7,9]。前報[3]において，我々はElマウスのsynaptosomesで，Na-K ATPase活性が発作により変るとともに構造学的変化が起ることを予測した。今回は発作によりsynaptosomesの蛋白合成能がどのような影響を受けるかについて検討した。

〔方法〕 1) 実験動物：実験群としては，Elマウスを用い，放り上げ刺激により発作を誘発させた。対照には生後放り上げ刺激を与えないEl(o)とddYマウスを用いた。その他，3群のマウスの腹腔内にbemegride 14mg/kg体重を注射し，発作を誘発させた。発作の直前，強直期，直後，30分後にそれぞれ断頭し，実験に供した。2) synaptosomesの調製：断頭した脳から大脳皮質のみを取り出し，前報[3]に従って Ficoll-sucroseの密度勾配を用いてsynaptosomesを分離した。3) 酵素活性の測定：acetylcholinesterase，succinic dehydrogenase，Na-K-ATPase，NADPH cytochrome C reductase，5'-nucleotidaseなどの活性は，Ellmanら[4]，Kuffら[8]，Schwartzら[14]，Privat de Garilheら[12]，Sottocasaら[15]などの方法でそれぞれ測定した。4) In vitroにおけるsynaptosome蛋白への[^{14}C]-leucineの取り込み：incubation mixtureは0.25M-sucrose，15mM-$MgCl_2$，10mM-Tris-HCl (pH 7.4)，50mM-NaCl，25mM-KClに[U-^{14}C]-L-leucine (specific activity: 342 mCi/m mole)とsynaptosomesを加え，37℃，30分間incubationを行なった。反応後，10mM-leucineを含む10%-TCAを加え，生じた沈殿を常法[10]に従い蛋白画分を抽出し，GF/C filter上にのせ，放射能を計測した。

〔結果と考察〕 Table Iにsynaptosomesに含まれる酵素活性を示した。Na-K ATPase，acetylcholinesterase，5'-nucleotidaseなどはいずれも高い活性を示し，この画分が

良好な膜構造を保持することを示唆した。succinic dehydrogenase は僅かに活性が見られ，synaptosomal mitochondria によるものと思われる。NADPH cytochrome C reductase 活性は認められないので，microsomes の混入は少ないものと考えられる。[9] Synaptosomes の蛋白合成能におよぼす蛋白濃度（Fig. 1），反応時間（Fig. 2），イオン効果（Fig. 3）などを調べた。至適蛋白濃度と反応時間は 0.5 mg/ml と 30分で，Na^+, K^+, Mg^{++} イオンの至適濃度はそれぞれ 25mM, 50mM, 15mM であったが，Ca^{++} イオンは合成を促進しなかった。そのため，以下の実験には，これらの諸条件で反応を行なった。蛋白合成阻害剤の効果では（Table 2），RNase の添加はほとんど合成を阻害しなかったが，高濃度の Chloramphenicol は軽度に抑制をみた。Puromycin, ouabain は顕著に合成を抑制し，調製した synaptosomes の蛋白合成が ribosomes や mitochondria と異なり，独自なものであることを示している。El マウスの放り上げ刺激による発作では，強直期を除いたいずれの時期においても synaptosomes の蛋白合成能は著しく促進されたが（Fig. 4），bemegride 注射による発作誘発では，いずれの時期においても3群の蛋白合成が抑制された。その程度は，El(+) と ddY とが同じで，El(o) が最も抑制が少なかった（Fig. 4）。この

Table 1. Enzymes of synaptosomal fractions from El(+) mouse brain.

Enzymes	Specific activity	Relative specific activity
Na-K ATPase	H 10.8 ± 1.9 (3) S 36.4 ± 1.8 (3)	— 3.98 + 0.55 (3)
Acetylcholinesterase	H 7.52 ± 1.41 (7) S 11.2 ± 0.8 (5)	— 1.52 + 0.22 (5)
5'-nucleotidase	H 2.12 ± 0.19 (3) S 5.96 ± 0.48 (3)	— 6.22 + 0.78 (3)
Succinic dehydrogenase	H 1.09 ± 0.12 (3) S 0.5 ± 0.03 (5)	— 0.56 + 0.02 (5)
NADPH cytochrome C reductase	H 0.4 ± 0.06 S Nil	— Nil

H : homogenates, S : synaptosomes, Specific activity; μmoles substrate utilized per mg protein per h., Relative specific activity; % total activity per % total protein.

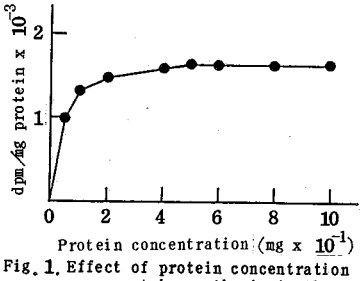


Fig. 1. Effect of protein concentration upon protein synthesis in the synaptosomes.

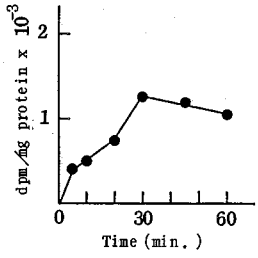


Fig. 2. Time course of protein synthesis in the synaptosomes

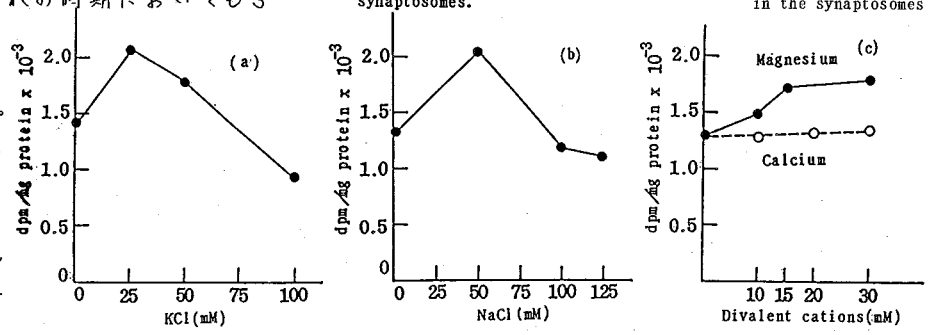


Fig. 3. Effect of potassium (a), sodium (b), and magnesium and calcium (c) ions upon protein synthesis in the synaptosomes.

ことは，Elマウス本来の発作は，Bemegride 発作と異なり，synapseでの膜々酵素の蛋白合成を活性化させ，この部における物質代謝の可逆的な回復に努めているとも解釈される。

Table 2. Effects of various inhibitors of protein synthesis upon synaptosomal protein synthesis in El mouse brain.

Inhibitors		dpm/mg protein	% of control
None		1679 ± 122	100
Ribonuclease	(10 μg/ml)	1473 ± 106	94.7
Chloramphenicol	(50 μg/ml)	1256 ± 107	74.9
Puromycin	(50 μg/ml)	425 ± 44	25.3
Ouabain	(1×10^{-3}M)	751 ± 68	44.7

〔文　献〕

1) Autilio L. A., Appel S. H., Pettis P. and Gambetti P. L. (1968) Biochemistry 7, 2615.
2) Bridgers W. F., Cunningham R. D. and Gressett G. (1971) Biochim. Biophys. Res. Comm., 45, 351.
3) 千頭孝史、山上栄、古塚大介、森浩一、川北幸男 (1983) 神経化学、22、396.
4) Ellman G. L., Courtney D., Andres Jr. V. and Featherstone R. M. (1961) Biochem. Pharmacol., 7, 88.
5) Jones L. R., Mahler H. R. and Moore W. J. (1975) J. Biol. Chem., 250, 973.
6) Jørgensen O. S. and Bolwig T. G. (1979) Science, 205, 705.
7) Jørgensen O. S., Dwyer B. and Wasterlain C. G. (1980) J. Neurochem., 35, 1235.
8) Kuff E. L. and Schneider W. C. (1954) J. Biol. Chem., 206, 677.
9) Mahler H. R. (1977) Neurochem. Res., 2, 119.
10) Morgan I. G. and Austin L. (1969) J. Neurobiology, 2, 155.
11) Morgan I. G. (1970) FEBS Letters, 10, 273.
12) Privat de Garilhe M. and Laskowski M. (1955) Biochim. Biophys. Acta, 18, 370.
13) Ramirez G., Levitan I. B. and Mushynski W. E. (1972) J. Biol. Chem., 247, 5382.
14) Schwartz A., Bachelard H. S. and McIlwain H. (1962) Biochem. J., 84, 626.
15) Sottocasa G. L., Kuylenstierna B., Ernster L. and Bergstrand A. (1967) J. Cell. Biol., 32, 415.

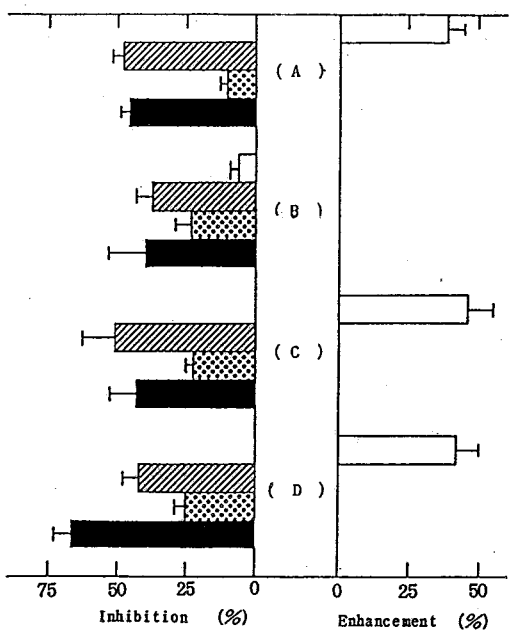


Fig. 4. Effect of seizures upon protein synthesis in synaptosomes. (A) : Preconvulsion, (B) : Tonic convulsion, (C) : Immediately after convulsion, (D) : 30 min. after convulsion, ▭ : tossed-up stimulation of El (+), ▨, ▩ and ■ : bemegride injection of El (+), (o) and ddy, respectively.

43 高血圧自然発症及び脳卒中易症ラットのカテコールアミンと学習行動変化

野村正彦・岡村邦博
（保健衛生大・医・生理）

〔要　約〕

脳卒中易発症ラット（ＳＨＲＳＰ）は高血圧自然発症ラット（ＳＨＲ）より更に血圧が高く，容易に脳卒中を起すことから，脳血管系を中心とした血圧調節機構を調べるのに適した疾患モデル動物である。　ＳＨＲおよびＳＨＲＳＰの脳内カテコールアミン（ＣＡ）の変動と学習行動の変化を観察し，血圧調節のみでなくＣＡのもつ多様な生体の機能の一端を明きらかにしようとした。　高血圧症を発症する原因の一つにＣＡ作動性神経系の異常が考えられ，血圧調節中枢のある孤束核及び血管運動中枢を含む延髄で，ＳＨＲ及びＳＨＲＳＰ両群のノルエピネフリン（ＮＥ）含有量の低下が認められた。

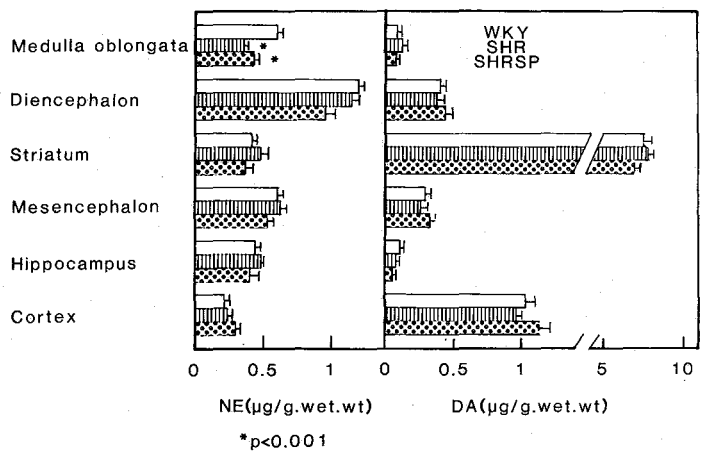
次に，これらのラットが行動学的にどのような変化を示すかを，オペラント型明度弁別学習 Mult VI-15 Extinction 課題下で行つた。　対照群である Wister Kyoto（ＷＫＹ）は第２０試行日目には，正反応率が８５％以上の成績を示した。　これに対して，ＳＨＲ及びＳＨＲＳＰはいずれも第３０試行日目まで，正反応率が８０％以下を示し，弁別能力が明らかに低下していた。また，定率強化学習課題では，ＳＨＲのみが常に反応率が高く，ＳＨＲＳＰはむしろ低い反応率を示した。これは遺伝的に存在する血圧調節異常がＣＡ神経を介して更に高次の神経活動に影響を及ぼしたと考えられる。

Key words：　ＳＨＲＳＰ．Norepinephrine．Learning Ability.

ＳＨＲおよびＳＨＲＳＰはともに高血圧を呈し，人の本態性高血圧症の疾患モデル動物として広く研究されている。遺伝的要因により起こるこれら動物の高血圧症は，降圧ニューロンとして孤束核（ＮＴＳ）にある作動神経系が，ＮＥ代謝回転の異常をはじめとするＮＥ作動神経系の障害に起因して発症しているものと考えられている。[1)13)]
今回はＳＨＲおよびＳＨＲＳＰのＮＴＳを含む脳の部位でのＣＡ含有量を測定し，ＣＡ特にＮＥの代謝異常の存在を確かめた。[3)4)7)11)]
また，ＣＡ代謝異常により発症したこれらラットがより高次な学習行動にどのうな変化を示すかを，オペラント型学習というより生理学的条件下での学習課題を使って検索した。[5)6)8)12)]

〔方法〕　１．実験動物　ＷＫＹ及びＳＨＲはCharles River 社のものを，ＳＨＲＳＰは近畿大学岡本教授より分与されたものを自家繁殖して飼育したものである。これら３群のラットは，ＣＡ定量には５から８匹を，また学習実験には１課題につき１群１０匹を其れぞれ使った。　２．脳内ＣＡ定量　各群のラットを１２週令時に断頭しゃ血後，脳を摘出し，Glowineki らの方法に従って脳を分けて，ＥＤＴＡを含む０．１Ｎ過塩素酸中でポリトロンでホモゲナイズした。遠心分離後，上清を低温下でアルミナに吸着させ，０．２Ｎ酢酸でちゅう出したものを検体とした。Bioanalytical Syetem社のＨＰＬＣでＮＥおよびDopemine（ＤＡ）を分離定量した。６％ Methanol, Octaneseulfonate を含む０．１Ｍ Phosphate Buffer ｐＨ３．０を用いた。　３，４ Dihydroxy benzyl emine（ＤＨＢＡ）を内部標準として使った。　３．学習実験　１１週令時のラットの血圧測定し，高血圧であることを確認後，個別ケージに移し

Fig.1 Regional changes of NE and DA in WKY,SHR and SHRSP



て，摂取する餌を制限して1週間で飽食時体重の85%になるよう体重を減らし，学習期間中このままの状態で維持した．12週令にオペラント型スキナー箱にあるレバーをラットが押して餌ペレットが獲得できる事を習得させた後，1群は明度弁別学習課題及び他の1群は定率強化学習課題の下に2種類の学習実験を始めた．明度弁別学習は Mult VI-1 5 Extinctionで1000対1の明度差の弁別を

Fig.2
THE SCORES OF BRIGHTNESS DISCRIMINATION LEARNING TEST

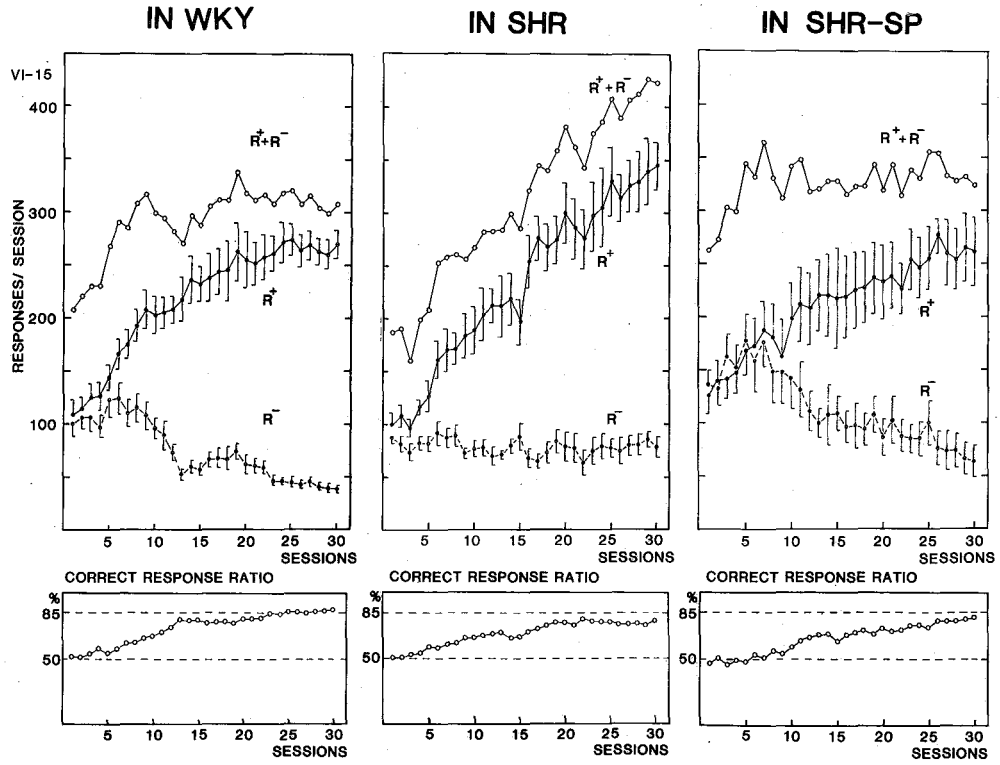
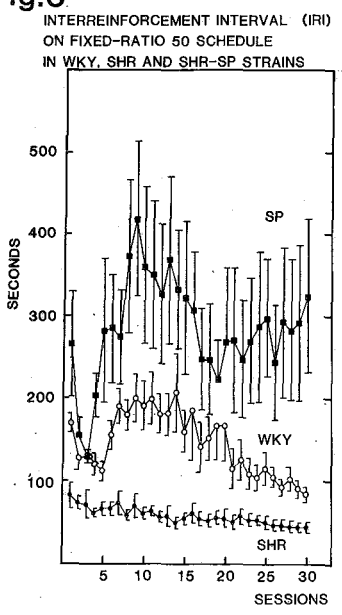


Fig.3



行った。[5)12)] 定率強化学習は Fixed Ratio 50 を20回行うのを1試行とし，1日1試行ずつ30日間連続して学習を行った。いずれの学習課題もマイクロコンピューター（SHARP MZ80）の制御の下に光刺激呈示，餌出し，レバー押し反応の計数，反応パターンの記録及び計算を行った。

〔結果及び考察〕 I．脳内NE及びDA含有量 WKY，SHR及びSHRSP3群のNE及びDA含有量を図1に示した。NE含有量は延髄で対照のWKYに比較してSHR及びSHRSPともに低く70%程度の値であった。SHR，SHRSP間には差はなかった。脳の他の部位では有意差はなかった。またDA含有量にも3群間で有意差はなかった。このことはNTSを含む延髄部位でSHR及びSHRSPの降圧神経系の不全を示唆するものである。[3)4)]

II．学習成績 1．明度弁別学習課題 3群間の成績は図2に示した。WKYの正の反応数（R+）は試行数の進行に伴い増加を示し，負の反応数（R−）は第10試行日から急激に減少を示した。従って正反応率（R+／R++R−）は第23試行日で85%以上を呈し，明度差の弁別完成が認められた。SHR及びSHRSPは共に低い正反応率を示し，第30試行日に到ってもなお80%以下の成績であつた。

2．定率強化学習課題（Fixed Ratio 50）3群の餌を獲得する時間（Interreinforcement Interval：IRI）を図3に示した。WKYはほぼ200から100秒の間で，1個のペレットを獲得したのに対し，SHRはいずれの試行間においても50秒前後で，活動性が著明に高かった。これに対し，SHRSPは200から400秒の間を著明に変動し，反応間隔の延長と各個体間および各試行間のばらつきが著明であった。以上の変化を単位時間当りに比較したところ，WKYは第1試行日には20回／分であつたのが，第30試行日には40回／分を示した。これに対して，SHRは40から70回／分，と試行数の進行に伴って急激に増加した。また，SHRSPは全30試行間をとおして10から20回／分の間を上下しており，試行数の進行に伴う学習曲線の変化は認められなかった。SHRのNE代謝異常に伴う血圧の上昇と弁別能力の低下及び活動性の増加は明らかである。またSHRSPが活動性の低下を示した事は，血圧が200mmHg以上にも達する為に，人の重症高血圧患者の症状を考えさせる現象である。[1)2)10)]

〔文献〕 1.Ciueh,C.C. & McCarty,R.(1981).Physiol.Behavior.26.85-89. 2. McCarty,R., Ciueh,C.C. & Kopin,I.J.(1978).Behavior.Biol.22.405-410. 3. Nagatsu,T.,Numata,Y.,Ikuta,K., Umezawa,H.,Matsuzaki,M.,Takeuchi,T.Nature.251.630.(1974). 4.Nakamura,K. & Nakamura,K.(1978). N.S.Arch. Pharmac.305.127-133. 5. Nomura,M., & Ohtsuji,M.(1982)."Hypertensive Mechanism" 658-661.Schattauer.P. 6. 野村正彦・大辻正高・岡村邦博.（1982）神経化学・21.147－149. 7. 大辻正高・野村正彦.（1983）神経化学.22.276－278. 8. Okamoto,K. & Aoki,K.(1963).Jap.Circ.J.27. 282-293. 9. Okamoto,K.,Yamori,Y. & Nagaoka,A.(1974).Circ.Res.34/35.143-153. 10. Schaefer,C.F. Brackett,D.J.,Gunn,C.G. & Wilson,M.F.(1978).Pavlov.J.Biol.Sci.13.211-216. 11. Saavedra,J.M., Grobecker,H. & Azelrod.J.(1978).Circ.Res.42.529-534. 12. Tsukada,Y.,Nomura,M.,Nagai,K., Kohsaka,S.,Kawahata,H.,Ito,M. & Mastutani,T.(1977).Behav.Neurochem.63-84.Spectrum 13. Yamori, Y.,Nagaoka,A. & Okamoto,K.(1974).Jap.Circ.J.38.1095-1100.

44 実験的脳発育障害ラットの脳内物質変化と学習機能 — MAMの胎生11～13日投与群について —

松谷天星丸・永吉道子・田丸政男・平田ゆかり
平林邦夫

（保健衛生大・医・総医研・発達生理）

〔要　約〕

胎生期における外因性の障害によって，成長後に生じる脳の生化学的及び機能的異常を，MAM投与による実験的脳発育障害モデル動物を用いて検索した。ラットの胎生11－13日にMAM（15mg/kg/day）を3日間連続投与したラットの生後30日における脳内物質の変化は，①脳当りのDNA量は，大脳半球，脳幹，小脳でそれぞれ81，84，86％に低下を示した。②大脳半球，脳幹，小脳の脳当りのモノアミン量は，NEは88，78，81％に，5-HTは68，75，71％にそれぞれ低下し，DAは大脳半球，脳幹でそれぞれ80，71％に低下した。③蛋白当りのCNPase比活性は，大脳半球で約10％の低下を示した。④FR30，FI60"複合スケジュールによる学習機能は，明条件下でFR30の遂行は対照より著しく劣り明暗を逆転させたスケジュールではFR30の成績は改善された。又MAM群はFRとFIの弁別が出来なかった。総運動量は対照とほぼ等しかったが，明状態では運動量は対照より劣った。以上の結果から，胎生11－13日投与ラットでは，大脳半球小脳におけるモノアミンニューロンの神経終末の発育の異常と，学習能力の低下の要因の一つが視覚系の異常にあるという二つのことが示唆された。

Key words：Methylazoxymethanol, Monoamine in rat brain, Mult FR, FI.

胎生期における種々の環境因子の障害によって，成長後出現する中枢神経系の異常像は，各組織の発育過程が異なるためその障害の時期に大きく影響される。私共は既に，胎生期のMethylazoxymethanol(MAM)投与のうちで，胎生11又は13日投与ラットの学習機能が他の投与時期のものより劣ることを報告した（8）。そこで今回は胎生11－13日にMAMの連続投与ラットを作り，その脳内物質変化と，FR30，FI60"複合スケジュールにより更に詳細に学習機能を検索した。

＜実験方法＞

①実験動物：動物は，Wistar-Imamichi系白鼠を用い，精子確認日を妊娠第一日とした。MAM(ASH Inc. Detroit)を生食水で10mg/mlの濃度に調整し，妊娠11-13日の母ラットに15mg/kgを1日1回，3日間連続投与した。対照群は，実験群と同容量の生食水を投与した。出生仔ラットはLitter sizeを8匹に揃え21日に離乳した。生後30日にエーテル麻酔下に浮血断頭し，摘出脳を大脳半球（CH），脳幹部（BS），橋・延髄（PM），小脳（Ce）の4部位に分け，ドライアイスで凍結後秤量し，－80°Cで保存し

表1 CHANGES OF BRAIN WEIGHTS AND DNA CONTENT IN VARIOUS BRAIN REGIONS OF RATS TREATED PRENATALLY WITH MAM

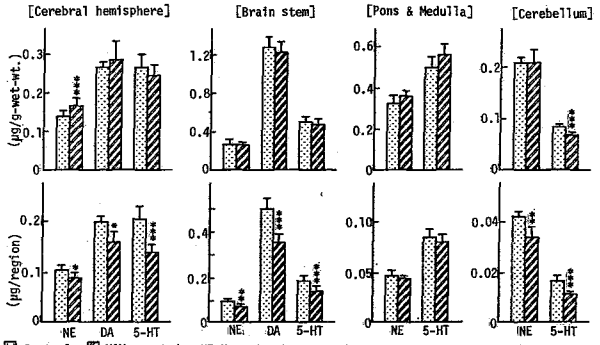
	Brain weight (g)	(%)	DNA content (mg/g-wet wt.)	(%)	(mg/region)	(%)
Cerebral hemisphere						
Control	0.765±0.031(40)	100	0.874±0.049(13)	100	0.669±0.038(13)	100
MAM-treated	0.559±0.029(17)***	73	0.975±0.050 (5)*	112	0.545±0.028 (5)***	81
Brain stem						
Control	0.372±0.031(40)	100	1.005±0.085(14)	100	0.371±0.030(14)	100
MAM-treated	0.293±0.017(17)***	79	1.066±0.083(10)	106	0.313±0.024(10)***	84
Pons & Medulla						
Control	0.149±0.009(40)	100	0.824±0.031 (5)	100	0.121±0.005 (5)	100
MAM-treated	0.127±0.006(17)***	85	0.902±0.034 (5)**	109	0.115±0.004 (5)	95
Cerebellum						
Control	0.193±0.011(40)	100	6.340±0.236 (5)	100	1.224±0.046 (5)	100
MAM-treated	0.162±0.009(17)***	84	6.463±0.215 (5)	102	1.047±0.035 (5)***	86

Animals were killed at 30 days after birth. Each value represents the means ±S.D. and numbers in brackets indicate numbers of animals. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 versus control.

次の生化学的測定に供した。

②生化学的測定：DNA量はSchmidt-Thannhauserの変法（４）により抽出後，Burton法（１）により，Protein量はLowryらの方法（７）により定量した。2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase(CNPase)の活性はTsukadaらの方法（１２）によりmicro HPLCにより測定した。Momoamineの定量は，Karasawaらの方法（６）により抽出分離後蛍光測定を行った。

図1 CHANGES OF MONOAMINE LEVELS IN VARIOUS BRAIN REGIONS OF RATS TREATED PRENATALLY WITH MAM



□:Control ▨:MAM-treated NE:Norepinephrine DA:Dopamine 5-HT:5-hydroxytryptamine
Animals were killed at 30 days after birth. Each bar represents the means ±S.D.
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 versus control.

③学習：学習テストはＦＲ３０ＦＩ６０"複合スケジュールを用いた（３）。１群雄５匹を用い，学習テストを開始前に飼料制限により体重を８５％に調整し，形成訓練（Shaping）を行った後本学習に移った。ＦＲ３０（fixed ratio，定率）強化スケジュールはライト（２４Ｖ，５Ｗ）が点灯した明るい状態で３０回目のレバー押しで１個のペレットが与えられ，FI60"（fixed interval，定時）強化スケジュールは暗い条件下で６０秒の待機の後，最初のレバー押しで１個のペレットが与えられ，６０秒経過以前の反応にはペレットは与えられない。ＦＲ３０とＦＩ６０"をそれぞれ２０強化（２０trial）とし，併せて４０強化（４０trial）をランダムにしかもそれぞれが３つ以上続かないように呈示した。１日１session（４０trial）とし，24 session終了後逆転学習（明暗の条件を逆にする）を行った。１日の自発運動量は，Automexにて測定した。

＜結果＞

①脳重，ＤＮＡ量：脳重及び脳当りのDNA量は，表１に示すように，ＣＨ，ＢＳ，Ｃｅ，は対照の約７５－８５％に減少した。減少の度合はＣＨが最も著しく対照の７３％(P<0.001)であった。脳内モノアミン量は，ＣＨではＮＥが対照より湿重量当りで約２０％の増加を示したが，脳当りのＮＥは対照の８８％，ＤＡは８０％，5-HTは６８％に減少した。ＢＳのＮＥ量は対照の７８％，ＤＡは７１％，5-HTは７５％に，ＣｅのＮＥは８１％，5-HTは７１％にそれぞれ減少を示した（図１）。蛋白当りCNPase比活性はＣＨで約１０％の低下が認められた（表２）。

表2 CHANGES OF CNPase ACTIVITIES IN VARIOUS BRAIN REGIONS OF RATS TREATED PRENATALLY WITH MAM

	CNPase activity (U/mg protein)	(%)
Cerebral hemisphere		
Control	2.06±0.19(8)	100
MAM-treated	1.83±0.13(9)*	89
Brain stem		
Control	4.18±0.13(5)	100
MAM-treated	4.05±0.24(5)	97
Pons & Medulla		
Control	5.65±0.32(5)	100
MAM-treated	5.82±0.15(5)	103
Cerebellum		
Control	2.81±0.19(5)	100
MAM-treated	2.84±0.17(5)	101

Animals were killed at 30 days after birth. (Means±S.D.)
*P<0.05 versus control.

②機能的変化：図２はＦＲ３０，ＦＩ６０"の１sessionの全経過を記録計により累積曲線で，７，１７，２４sessionについて示したものである。ＭＡＭ群は，１session（４０trial）の遂行のために，対照群より長い時間を要し，特に明条件下でＦＲ３０に要する時間及びそのPRP(post reinforcement pause)が対照群より延長した。明暗を逆転しての再学習によって，暗条件下ではＦＲ３０に要する時間及びそのＰＲＰは短縮された。しかし，ＭＡＭ群のＦＲ３０とＦＩ６０"の反応波形は，対照群で示されるよ

うな典型的な波形を示さず，FIRとFIの弁別はよく出来なかった(図3)。図4は運動量測定装置による，24時間の行動量を示した。MAM群の1日の総行動量は，対照群と殆んど差はなかったが，明状態，暗状態の行動量の比は，対照群の3：7に対し，MAM群は2：8の有意 ($P<0.05$) の変化であった。

図2 RESPONSE PATTERN OF CONTROL AND MAM-TREATED RATS ON MULT FR30, FI60" SCHEDULE

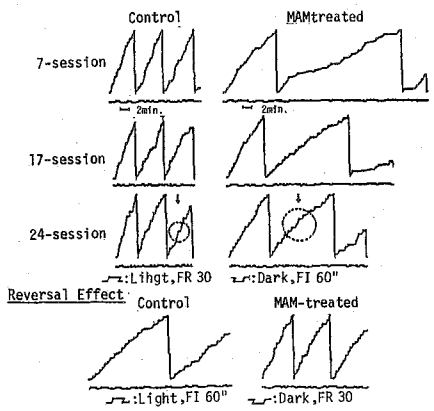
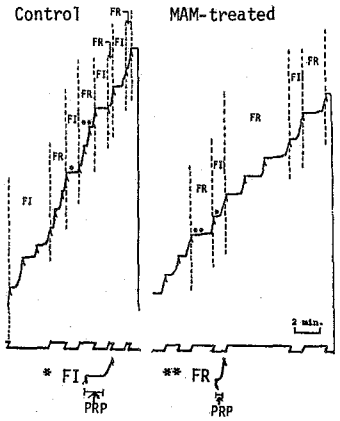


図3 THE LOCAL PATTERN OF FR AND FI IN CUMULATIVE RESPONSE CURVE



PRP:Post Reinforcement Pause

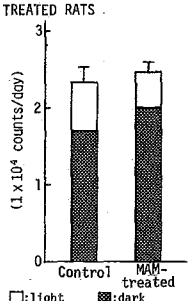
＜考察＞

① 実験群では，DNA量(mg/g-wet Wt.)が対照より高値であること，及び蛋白当りのCNPase比活性が約10%の低値を示すことは，実験群にやや発育の遅れのあることを示すものと考えられる。

② 脳幹当りのモノアミン量の低下は，MAM投与によるモノアミンニューロンの産生障害を示すものであるかもしれない（10）。したがって，大脳半球及び小脳における脳当りのモノアミン量の低下は，モノアミンニューロンの細胞体から，これらへ投射されるモノアミンニューロンの神経終末の発育異常が考えられる（9）。

③ 学習テストの明条件下で，FR30に要する時間が延長し，逆転学習によってこれらが改善されることは，弁別学習の手がかりとして用いた明暗識別能力に問題があり，弁別学習能力以前の光に対する対応の異常が考えられた。ラットでは網膜の異常が，MAM又はCytosine arabinoside等の出生前後の投与によって出現することが報告されている（2）（11）。一方，マウスの胎生10日前後のX線照射が，眼球や虹彩の発育異常をもたらすことが報告されている（5）。MAM群の総自発運動量は，対照群とほぼ等しかったが，明暗における運動量の分布が，明状態では対照群より減少していることからも，MAMの胎生11－13日投与ラットの学習機能の低下の要因の一つに視覚系の異常が示唆された。しかしこれが器質的欠陥であるか，又は機能的異常であるかについては，今後物質面との関連も含めて検索したいと考える。

図4 DAILY MOTOR ACTIVITIES UNDER THE LIGHT-DARK CYCLES IN MAM-TREATED RATS



Lighting condition: from 6 a.m. to 6 p.m.
Motor activities were counted with Automex.

＜文献＞

(1)Burton,K.(1956)Biochem. J. 62, 315-323. (2)Eiden,L.E. et al.(1981)Develop. Brain Res. 1, 425-428. (3)Fester,C.B. & Skinner,B.F.(1957)IN "Schedule of Reinforcement", Appleton-Century-Crofts, Inc., New York, pp. 503-579. (4)Fleck,A. & Munro,H.N.(1962)Biochem. Biophys. Acta 55, 571-583. (5)Hicks,S.P. & D'Amato,C.J.(1966)Adv. Teratology 1, 195-250. (6)Karasawa,T. et al.(1975)Japan. J. Pharmacol. 25, 727-736. (7)Lowry,O.H.(1951)J. Biol. Chem. 193, 265-275. (8)Matsutani,T. et al.(1977)Shinkeikagaku 16, 57-60. (9)Matsutani,T. et al.(1980)J. Neurochem. 34, 950-956. (10)Seiger,A. & Olson,L.(1973)Z. Anat. Entwickel.-Gesch. 140, 281-318. (11)Shimada,M. et al.(1975)Biol.Neonate 26, 359-366. (12)Tsukada,Y. et al.(1980)J. Neurochem. 34, 1019-1022.

＜謝辞＞
本実験の学習テストに関し，御教示，御助言を頂きました杉本助男教授（広大・総合科学部・人間行動）に感謝します。Automex の御貸与を頂きました本学医学部精神神経科学教室沢温先生の御厚意に感謝します。

45 Menkes' Kinky Hair Disease の大脳にみられた脂質及びタンパク質の異常

原　　厚・武富　保
（信州大・医・心脈管病研・脂質生化）

〔要　約〕

Menkes' kinky hair disease の大脳の脂質及びタンパク質の分析を行った。大脳全体として，各種の脂質含量の低下がみられたが，特に，myelin の主要構成糖脂質であるガラクトリピド（ガラクトシルセラミド，スルファチド）及びコレステロールの著減がみられた。また，全燐脂質含量も低下の傾向を示した。しかしながら，demyelination のマーカーとして考えられているコレステロールエステルの増加は認められなかった。ガングリオシドは含量及び組成ともに，正常に近い値を示した。灰白質及び白質のタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で分析したところ，灰白質は正常なパターンを示したのに対し，白質では通常のパターンに加えて，分子量約52,000のバンドが出現した。これらの結果は，患者の白質（myelin）に異常がより強く現れていること，さらに，コレステロールエステル値が正常値内であることから，demyelination による白質の異常より，むしろ dysmyelination による障害の可能性が示唆された。

Key words : Menkes' kinky hair disease,　cerebral lipids and protein,　dysmyelination

〔はじめに〕

Menkes' kinky hair disease は、X染色体劣性の遺伝形式をとる代謝疾患である。その病因は、腸管における銅の吸収障害によるものとされている。その臨床症状の特徴は、毛髪・骨・血管の異常と中枢神経系の変性が強いことであり，精神運動発達が著明に遅れ，重篤な神経症状を示し，通常2才前に死亡する。本疾患の大脳における脂質組成に関して，すでに異常が報告されているが（1,2），我々が本疾患の脂質及びタンパク質の分析を行ったところ，二三の新しい知見が得られたので報告する。

〔実験材料及び方法〕

患児（♂）は1才4ヶ月。剖検により得られ，－80°C に保存された大脳を用いた（昭和伊南総合病院小児科花岡康彦氏提供）。大脳約5gをクロロフォルム・メタノール混液で抽出後、一部はFolchの分配を行った後、コレステロール，コレステロールエステル及び燐脂質の分析に用いた。コレステロールは、5α-コレスタンを内部標準として，GLCで定量した。コレステロールエステルはメタノリシス後，同様にGLCで定量した。全燐脂質含量及び各燐脂質の定量はBartlett法で定量した。Total lipid の残りは、アルカリ処理でエステル結合した脂質を分解後、DEAE・セファデックスにより，スルファチドとガングリオシドよりなる酸性糖脂質画分と中性糖脂質画分に分けた。各糖脂質はTLCで分離後、脂肪酸はメチルエステル，糖はメチルグリコシドのトリメチルシリル誘導体としてGLC分析した。ガングリオシドのシアル酸はResorcinol 法によって定量した。

〔結果〕

1，単純脂質

図1のTLCに示すように，単純脂質のほとんどはコレステロールで，コレステロールエステルは，微量である。コレステロールエステルの含量は0.13μmol/g湿重量であり，正常値内であった。一方，コレステロール値は11.54μmol/g湿重量であり，この値は正常値の約½に相当する。この低い値は，全脳，とりわけ白質の障害を示していると考えられる。

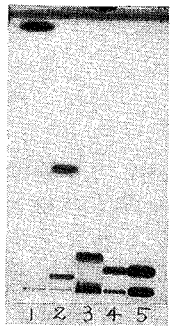


図1，単純脂質のTLC

1. コレステロールエステル(コントロール)
2. トリグリセリド(コントロール)
3. 遊離脂肪酸(コントロール)
4. コレステロール(コントロール)
5. 本症例

展開溶媒：ヘキサン・エーテル (80:20, v/v)

2．燐脂質

図2に燐脂質の二次元TLCを示した。全燐脂質含量は，32.7μmol/g湿重量であり，正常値の約½である。各々の燐脂質含量はフォスファチジルエタノールアミン(PE)が5.00(μmol/g湿重量)，プラスマローゲンPE(plas PE)が4.64，レシチン(PC)14.72，スフィンゴミエリン(SM)が3.73そしてフォスファチジルセリンが3.24であった。この燐脂質組成は，幼児脳に比して顕著な異常は認められなかった。しかし，全燐脂質量の減少は，脳の発育不全または障害を示唆しているものと考えられる。

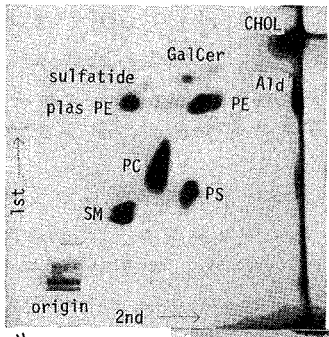


図2．燐脂質の二次元TLC

展開溶媒

1st：クロロフォルム・メタノール・2.5N アンモニア (60:35:6, v/v/v)

2nd：クロロフォルム・メタノール・アセトン・酢酸・水 (70:15:30:15:7.5, v/v/v/v/v)

3．糖脂質

ガングリオシドのTLCは図3に示した。総ガングリオシド量は443.3μgNeuAc/g湿重量でその組成は，GM3(0.9%)，GM2(2.8%)，GM1(24.3%)，GD3(4.7%)，GD1a(42.1%)，GD1b(11.2%)，GT1b(11.2%)，GQ1b(2.8%)であった。この組成は幼児の典型的なパターンであり，その全含量も全脳の値としては，顕著な異常は認められない。ガングリオシドは灰白質に多いことから，グリオーシスの影響も無視できないが，灰白質は，白質よりも障害の程度が少ないのではないかと思われる。一方，中性糖脂質のTLCを図4に示してある。この図では，大部分のガラクトシルセラミドはカラムで除き，二糖以上の糖脂質画分を濃縮してある。各糖脂質含量はガラクトシルセラミド(484.85nmol/g湿重量)，グルコシルセラミド(19.55)，ラクトシルセラミド(48.56)，グロボトリアオシルセラミド(10.34)，

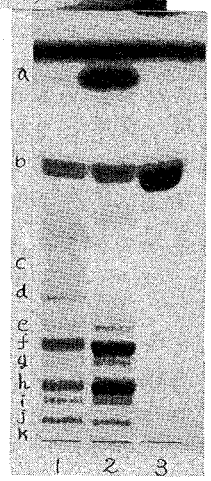


図3 酸性糖脂質

1. ガングリオシド(コントロール)
2. 本症例
3. スルファチド(コントロール)

(a)脂肪酸，(b)スルファチド，(c) GM4，(d)GM3，(e)GM2，(f)GM1，(g)GD3，(h)GD1a，(i)GD1b，(j)GT1b，(k)GQ1b

展開溶媒：クロロフォルム・メタノール・0.25% KCl (60:35:8, v/v/v)

ガングリオトリアオシルセラミド(6.05)，グロボテトラオシルセラミド(20.37)，ガングリオテトラオシルセラミド(13.38)そして，スルファチド(183.31)であった。白質(myelin)に特有のガラクトリピド(ガラクトシルセラミドおよびスルファチド)は非常に少なく，正常の約½程度であった。これらがラクトリピドの減少に比べ，グロボ系およびガングリオ系の中性糖脂質が多い傾向を示しているが，このことは神経細胞の未分化もしくは障害を示しているのかも知れない。ガラクトリピドの脂肪酸組成に異常は認められなかった。

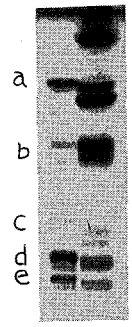


図4. 中性糖脂質
1. コントロール
2. 本症例
a. グルコシルセラミド
b. ラクトシルセラミド
c. グロボトリアオシルセラミド
d. グロボテトラオシルセラミド
e. フォルスマン糖脂質
展開溶媒：クロロフォルム・メタノール・水(65:25:4,v/v/v)

4. タンパク質

図5に灰白質，白質のタンパクのSDS-PAGEのパターンを示した。患児の灰白質は正常と同じで，異常は認められなかった。しかし，白質ではWolfgram proteinのdoubletの間に新しいバンド(MW. 52,000)が出現した。詳細な分析は得られていないが，白質の異常を示しているものと考えられる。

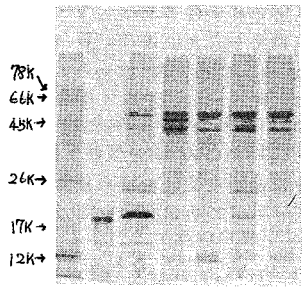


図5. 脳のタンパクのSDS-PAGEパターン
1. 分子量マーカー
2. 牛塩基性タンパク
3. ブタ脊髄
4. 本症例白質
5. 本症例灰白質
6. 正常白質
7. 正常灰白質

〔考察〕

Menkes' kinky hair disease では，銅を吸収できないことから，銅を含む酵素であるCytochrome oxidaseや脳の血管の異常によって，脳の障害が二次的に起きると考えられている。H. C. Lou ら(1)はコレステロールエステルの増加さらにガラクトリピドおよびプラスマローゲンを含むエタノールアミン燐脂質などのmyelinに特有な脂質の低下から，脱髄として脳障害をとらえている。しかし，我々は，同様にmyelinに特有な脂質の低下は認めたが，コレステロールエステルの増加は認めなかった。コレステロールエステルの増加は脱髄にともなってみられるので，本研究で得られた結果から，本症例の白質の異常は脱髄というよりもむしろmyelinの形成不全と考えるのが妥当のように思われる。灰白質では，タンパク質の異常のないこと，また，灰白質のガングリオシドに顕著な異常の認められないことから，障害は白質において，より強く出現していると考えられる。本疾患の脳の障害は，銅不足による二次的な結果として出現するものと考えられている。その障害の程度または，銅投与による治療期間などの要因の関与も考えられるので，demyelinationかdysmyelinationかの問題は勿論慎重に検討されなければならないであろう。

〔文献〕(1)H. C. Lou, G. K. Hølmer, E. Reske-Nielsen and P. Vagn-Hansen, J. Neurochem (1974) 22, 377-381
(2)J. S. O'Brien and E. L. Sampson J. Neuropathol. Exp. Neurol. (1966)25, 523-530

46 高圧酸素の中枢神経毒性

石田裕一・野田行文・松下浩司
（中外製薬・新薬研）

〔要　約〕

高圧酸素の中枢神経系におよぼす影響をラット脳のcholine acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase活性について検討した。

(1) 7気圧酸素を単回負荷すると，頭頂皮質のglutamic acid decarboxylase活性，線条体のtyrosine hydroxylase活性は酸素負荷直後に有意に低下したが，その後，徐々に回復し3－6日後には完全に回復した。頭頂皮質のcholine acetyltransferase活性は，有意な変動を示さなかった。(2) 7気圧酸素10回あるいは20回負荷2週間後のcholine acetyltransferase活性は頭頂皮質，□奥結節，線条体，淡そう球において軽度低下し黒質で軽度上昇した。Glutamic acid decarboxylase活性は頭頂皮質，海馬，線条体で軽度上昇したが，黒質，淡そう球では軽度低下した。Tyrosine hydroxylase活性は，20回負荷群の黒質で58%，線条体で45．1%，淡そう球で68．6%，側坐核で55．7%，奥結節で56．3%と顕著に低下したが，海馬，視床下部，橋＋延髄では上昇していた。線条体のtyrosine hydroxylase活性の低下は，補酵素6-methyltetrahydropterinの高親和性型，低親和性型の両方のVmaxが減少しており，リン酸化の違いではなく酵素蛋白量の減少によるものであった。(3) 高圧酸素負荷によるtyrosine hydroxylaseとcholine acetyltransferase活性の低下は，10週間後にも残存していたが，glutamic acid decarboxylase活性の上昇は消失していた。

以上の成績から，高圧酸素反復負荷の中枢神経系におよぼす影響は，脳各部位または神経伝達物質系で異なるが，特にドーパミン系に対して顕著な影響をおよぼすことが示唆された。

Key words：　oxygen at high pressure, tyrosine hydroxylase, choline acetyltransferase

酸素は，生体にとって不可欠なものであるが，一方，高濃度や高圧環境下あるいは生体の酸素処理機構の障害等によって，逆に生体に有害な影響をおよぼすことが知られている。ヒトや動物を高圧酸素下に暴露すると肺障害やけいれん発作が惹起される。また，高圧酸素に繰り返し暴露すると不可逆的な脳病変や運動麻ひの発生することが知られている（2）。

我々は，すでに高圧酸素負荷によりラット脳の過酸化脂質が増加すること，および，その増加の程度に脳部位による差異の存在することを報告した（8）。今回，高圧酸素の中枢神経におよぼす影響を神経伝達物質合成酵素活性を指標にして検討した。

［実験方法］

Fischer系F344雄性ラット（7－8週齢）を使用した。高圧酸素負荷は，85リットルの高圧タンクにラットを5－8匹入れ，100%酸素で15リットル／分の速度で5分間換気後，1．2気圧／分の速度で加圧し7気圧とした。10リットル／分で換気しながら加圧開始より20－25分高圧酸素負荷したのち減圧した。反復負荷する場合は，1日1回の高圧酸素負荷を10ないし20回負荷した。高圧酸素負荷一定時間後に脳を摘出し，600μmの厚さにスライスし氷冷下で，Konig & Klippel(5)のアトラスに従って，頭頂皮質（PC），海馬（HPC），黒質（SN），淡そう球（GP），線条体（CPU），側坐核（AC），□奥結節（TUO），視床下部（HT），橋＋延髄（PMO）を分取し，測定まで－90°Cに保存した。Choline acetyltransferase活性は，Fonnumの方法（4）に従って測定した。Glutamic acid decarboxylase活性は，Albers& Bradyの方法（1）に準じて測定した。またtyrosine hydroxylase活性はWaymireらの方法（10)により，0．1mM tyrosine，2mM 6-methyltetrahydropterin，pH 6．1の条件で測定した。蛋白量定量は，Lowryら（6）の方法を用いた。統計的解析には，student's t-testあるいはwelch's t-testを適用した。

［結果］

(1) 高圧酸素単回負荷後の酵素活性変化

7気圧酸素20分負荷後，一定時間後に頭頂皮質，線条体を採取しglutamic acid decarboxylase活性，choline acetyltransferase，tyrosine hydroxylase活性を測定した。頭頂皮質のglutamic acid decarboxylase活性は，高圧酸素負荷直後には対照の82．5％と有意(p<0．001)に低下したが，6時間後には91％まで回復し，3日後には完全に回復していた。頭頂皮質のcholine acetyltransferase活性には，高圧酸素負荷直後から10日後まで有意な変動を示さなかった。線条体のtyrosine hydroxylase活性は高圧酸素負荷直後に対照の84．9％（p<0．05)に低下したが，6時間後には92．8％に回復し，さらに6日後には99．7％と完全に回復していた。

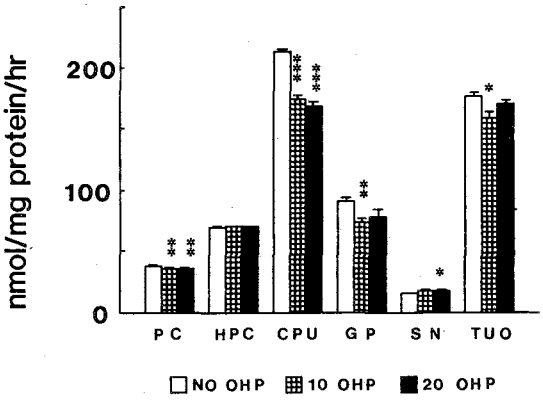


Fig.1 Choline acetyltransferase activity
*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

(2) 高圧酸素反復負荷後の酵素活性変化

7気圧酸素を10回あるいは20回負荷し，2週間後に脳各部位の酵素活性を測定した。Choline acetyl transferase活性は，高圧酸素反復負荷により，頭頂皮質，嗅結節，線条体，淡そう球において軽度低下を示したが，黒質では逆に軽度上昇していた（Fig．1）。Glutamic acid decarboxylase活性は，高圧酸素負荷により頭頂皮質，海馬，線条体で軽度上昇したが，黒質，淡そう球では逆に軽度低下していた（fig．2）。Tyrosine hydroxylase活性は，10回負荷群の黒質(71．3%，p<0．01)，線条体（59．8%，p<0．001)，側坐核（66．0%，p<0．001)，嗅結節（66．1%，p<0．01)，および20回負荷群の黒質(58．0%，p<0．001)，線条体(45．1%，p<0．001)，淡そう球(68．8%，p<0．001)側坐核(55．7%，p<0．001)，嗅結節(56．3%，p<0．001)と，黒質線条体系あるいは中脳辺縁系のドーパミン作動性ニューロンの存在する部位で著明に低下していた。一方，海馬，視床下部，橋＋延髄では，逆に上昇していた（Fig．3）。線条体tyrosine hydroxylase活性の著明な低下は，Kmの変化によるものではなく，Vmaxの減少によるであった（Table 1）。Tyrosineに対するVmax，および6－methyltetrahydropterinのhigh affinity，low affinityの両者のVmaxとも顕著な減少を示したことより，線条体のtyrosine hydroxylase活性低下は，酵素蛋白量の減少によるものであることが示唆された。

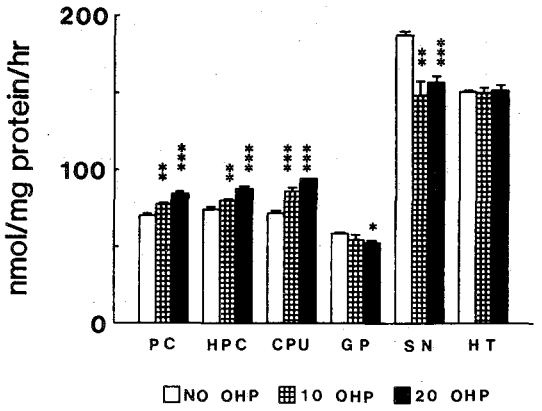


Fig.2 Glutamic acid decarboxylase activity
*p<0.05 **p<o.ol ***p<0.001

(3)高圧酸素反復負荷10週後の酵素活性変化

7気圧酸素を10回負荷し，10週後に脳各部位を採取して，酵素活性を測定した。Choline acetyltransferase活性は，線条体において対照の92％(p<0．001)と有意に低下していたが，頭頂皮質(94．9%)，海馬(95．8%)では有意な変化は認められなかった。Glutamic acid decarboxylase活性は，頭頂皮質(98．3%)，海馬(101．7%)，線条体(105．8%)，淡そう球(101．1%)，黒質(87．6%)と，いずれも対照と比較して有意な変動を示さなかった。Tyrosine hydroxylase活性は頭頂皮質(76．1%，p<0．05)，線条体(74．0%，p<0．01)，淡そう球(83．6%，p<0．05)，側坐核(82．8%，p<0．05)で有意に低下していたが，海馬(87．5%)，黒質(90．7%)，嗅結節(91．8%)では有意差は認められなかった。

［考察］

生体における酸素の毒性は，主に反応性の高い酸素ラジカル（スーパーオキサイド，ハイドロオキシル　ラジカル，一重項酸素など）によって起るものと考えられているが，生体内にはこれら酸素ラジカルに対する処理機構が存在し，酸素毒性から生体を防御している。今回我々が用いた高圧酸素負荷という方法は，生体の処理能力以上の酸素ラジカルを生成させて（3），酸素毒性を発現させるものと考えられる。しかし，高圧酸素を用いて中枢神経系に対する酸素毒性を検討する場合には神経細胞に対する直接効果以外にけいれんやストレスの影響，肺障害による2次的影響や脳血流変化による影響などを考慮する必要がある。

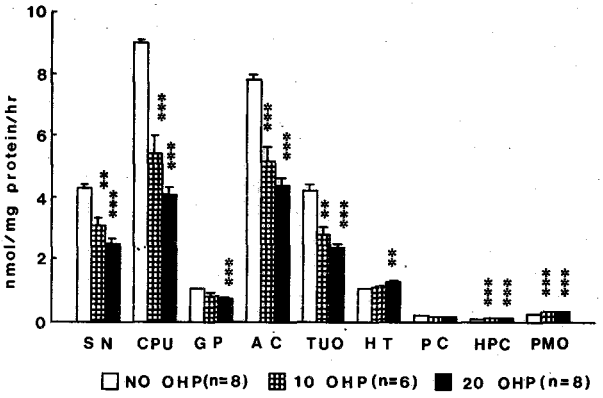


Fig.3 Tyrosine hydroxylase activity
*p<0.05　**p<0.01　***p<0.001

7気圧酸素を反復負荷したラット脳のcholine acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase活性を測定して，黒質線条体系および中脳辺縁系ドーパミン作動性ニューロンのtyrosine hydroxylase活性が顕著に低下していることを見いだした。tyrosine hydroxylaseには補酵素6-methyltetrahydropterinに対して高親和性と低親和性の二つの状態が存在し，酵素蛋白のリン酸化により低親和性型から高親和性型に移行することが知られている（7，9）。高圧酸素負荷した線条体のtyrosine hydroxylaseは，低親和性型，高親和性型の両方のVmaxおよびチロシンに対するVmaxが減少していることから酵素蛋白量が減少していることがわかった。このtyrosine hydroxylase活性の低下は高圧酸素負荷10週後においても認められ，単に酵素蛋白量の減少ではなく，ドーパミンニューロンの変性または脱落が起っている可能性が示唆された。一方，ノルアドレナリンニューロンが主と考えられる海馬，視床下部，橋＋延髄では逆にtyrosine hydroxylase活性が上昇している。Tyrosine hydroxylase失活の繰り返しに対するrebound現象や，ストレスによる酵素誘導などによって，ニューロン変性が隠蔽されている可能性や，ドーパミンニューロンとノルアドレナリンニューロンとで高圧酸素に対する感受性が異なる可能性などが考えられ，さらに詳細な検討を要する。

Table 1. Kinetic parameters of striatal tyrosine hydroxylase

	Km (μM)	Vmax (nmol/mgprotein/hr)
Tyrosine		
no OHP	59±5	15.2±0.9
20 OHP	50±7	5.5±0.8***
Cofactor		
High affinity		
no OHP	204±12	4.9±0.1
20 OHP	220±23	2.2±0.3***
Low affinity		
no OHP	1172±82	14.5±0.9
20 OHP	1045±59	5.6±0.5***

Mean±S.E.　n=5　*p<0.001

［文献］

(1) Albers, R. W. and Brady, R. O. (1959) J. Biol. Chem. 234, 926-928
(2) Balentine, J. D. and Gutsche, B. B. (1966) Am. J. Path. 48, 107-127
(3) Dirks, R. C. and Faiman, M. D. (1982) Brain Res. 248, 355-360
(4) Fonnum, F. (1975) J. Neurochem. 24, 407-409
(5) Konig, J. F. R. and Klippel, R. A. (1967) The rat brain
(6) Lowry, O. H. et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
(7) Matthew, M. A. et al. (1978) J. Biol. Chem. 253, 27-31
(8) Noda, Y. et al. (1983) J. Neurochem. 40, 1329-1332
(9) Vulliet, P. R. et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 92-96
(10) Waymire, J. C. et al. (1971) Anal. Biochem. 43, 588-600

47 Gunnラット小脳低形成に伴うライソゾームの変化

佐藤　浩・慶野宏臣・柏俣重夫
（愛知県コロニー・周生期）
山田博明・名取靖郎　（徳島大・医・栄養）

〔要　約〕

遺伝的に黄疸を発症するGunnラットでは生後10日頃から小脳の発育が停止し，ライソゾームの活性化が観察されている。Percoll を用いた密度勾配遠心による分布パターンの変化と酵素活性の測定とからこの時期におきているライソゾームの変化について調べた。生後20日の非黄疸ラット（対照）ではライソゾーム酵素の活性は密度勾配遠心により比重の重い位置（1.10 g/ml）と軽い位置（1.05 g/ml）の2ヶ所に分布した。軽い位置にはミトコンドリアやシナプトソームも分布していた。Arylsulfatase, cathepsin, β-glucuronidaseは大部分の活性が重い位置に見いだされた。一方，β-glycerophosphataseは逆に軽い位置に多くの活性が分布した。黄疸ラット小脳では重い位置に分布していた3つの活性が減少し，軽い位置の活性が増加した。生後15日で黄疸ラット小脳のタンパク量当りの酵素活性を対照と比べるとβ-glycerophosphatase, cathepsin, arylsulfatase は1.4, 1.7, 2.5倍に増加していた。β-glucuronidaseは12倍と他の酵素に比べて著しく活性が上昇していた。これらの結果から，ラット小脳ライソゾームにはheterogeneityがあり，低形成をおこしたGunnラット小脳では特定のライソゾームの割合が増加していることが示唆された。

Key words：　Lysosomes, Cerebellum, Bilirubin, Rat

先天性ビリルビン代謝異常により核黄疸を発症するGunnラットホモ接合体（j/j）ではビリルビンによる小脳発育障害（低形成）が生後10日頃より顕著となる。[1] この時期の小脳ではライソゾームのarylsulfatase活性が上昇し[2]，酸性ホスファターゼ活性増加も組織化学的方法で観察されている[3]。また著しく多量のコレステリールエステルが蓄積しており[4]，電子顕微鏡による観察でも脂質を含む大型のライソゾームが認められる[5]。本報告ではこの時期におこる変化をPercoll密度勾配遠心による分布パターンとライソゾームの酵素であるAcid phosphatase, cathepsin, arylsulfatase, β-glucuronidaseの活性変化から検討をおこなった。

〔実験材料と方法〕

生後15と20日のSprague-Dawley系Gunnラット[6]を用いた。実験には対照として同腹のヘテロ接合体（j/+）を使った。Percollの密度勾配によるライソゾームの分離はYamadaら[7]の方法を用いた。小脳を9 vol. の0.25 M Sucroseでホモゲナイズ後，340 x g，5分間，2回遠心し得られた上清を5分間，37°Cで2mM CaCl2とインキュベートして試料とした。1.08 g/mlで0.25 M Sucroseを含むPercoll溶液と試料を混合後，60,000 x g，60分間遠心した。Succinate-2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium-reductase (Succinate-INT-reductase), cathepsin (BとH), arylsulfatase (AとB), acetylcholinesterase, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNPase), NADPH-cytochrome c reductase, p-nitro

本研究の一部は厚生省神経疾患研究委託費（No.83-11）および昭和58年度文部省科学研究費（No. 5848150）の援助を受けた。

phenylphosphatase, β-glycerophosphatase, β-glucuronidase はそれぞれPennington[8], Barett[9], Milsom ら[10], Ellman ら[11], Aoki ら[12], Masters ら[13], Trouet[14], Hall[15], Fishman と Berfeld[16] の方法によって測定した。

〔実験結果と考察〕

Fig. 1. に生後20日の対照(j+)ラット小脳試料をPercollの密度勾配で分離後分画し，細胞内小器官の分布を標識酵素活性を測定することによって調べた結果を示す。ミトコンドリアの酵素であるSuccinate-INT-reductaseは分画5にピークとなって分布した。小胞体のrotenone-insensitive NADPH-cytochrome c reductase, ミエリンのCNPase, シナプトソームのacetylcholinesterase もミトコンドリアと同じく分画5に多く分布したがより軽い分画にもかなりの量が分布していた。それに比べてライソゾームのarylsulfataseは活性の大きなピークが分画2に，小さなピークが分画5に観察された。ホモゲナイズする条件を変えても同様な2相性の分布パターンが認められた。それぞれの活性ピークが位置する比重は約1.10と1.05 g/mlであった。Fig. 2. にjjとj+の小脳の試料を密度勾配遠心にかけ得られたライソゾーム酵素の分布パターンを示す。j+ラットのcathepsinはFig. 1. でarylsulfataseが示したと同様な分布であった。β-Glucuronidaseは対応する2つの活性ピーク以外に分画9 (1.03 g/ml) に第3のピークを示した。β-Glycerophosphataseは他の3つの酵素が比重の重い位置に大部分の活性が分布したのに比べて軽い位置に活性の多くが存在した。基質にp-nitrophenylphosphateを用いても同様な分布を示した。Fig. 2. の右側に黄疸jjラットのライソゾーム酵素の分布を示す。β-glycerophosphataseではあまりはっきりしないが他の3つの酵素では重い位置にくる酵素活性の割合が減少し，軽い位置にくる活性が増加した。Table 1. にjjとj+のライソゾームの酵素活性の差が最も大きくなる生後15日の各酵素の値を示した。β-glycerophosphatase, cathepsin, arylsulfataseはそれぞれjjでj+の1.4, 1.7, 2.5倍と増加していた。β-glucu-

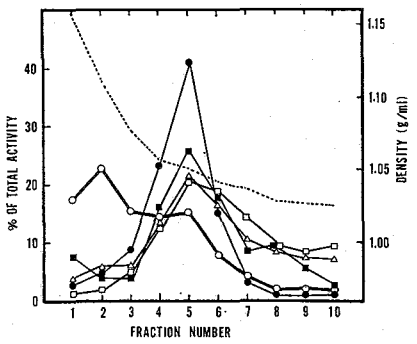


Fig. 1. Distribution of marker enzymes in Percoll density gradient. Arylsulfatase,○—○; Acetylcholine esterase,△—△; 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase,□—□; Rotenone-insensitive NADPH-cytochrome c reductase,■—■; Succinate-INT reductase,●—●; Density, ---- .

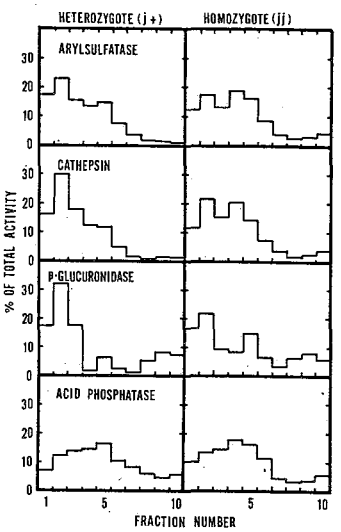


Fig. 2. Distribution patterns of cerebellar lysosomal enzymes of homozygous and heterozygous Gunn rats in Percoll density gradient.

ronidase は他の酵素に比べて12倍と著しく活性が増加していた。

Sellinger と Hiatt が脳のライソゾームにミトコンドリアとほぼ同じ比重をもつものとそれより重いものの2種類があることを[16]，Verity らはマウス脳の発達に伴うライソゾームの酵素活性の変化から脳のライソゾームに heterogeneity があることを示唆している[17]。

TABLE 1. LYSOSOMAL ENZYMES IN 15-DAY-OLD HETEROZYGOUS AND HOMOZYGOUS GUNN RATS

ENZYMES	HETEROZYGOTES (No. of Exp.)	HOMOZYGOTES (No. of Exp.)	HOMO./HETERO. (%)
β-GLUCURONIDASE (nmol/min/mg protein)	37.1 ± 8.9 (5)	439.0 ± 171.0 (3)	1184
ARYLSULFATASE (μmol/min/mg protein)	18.1 ± 1.3 (5)	45.2 ± 1.1 (3)	251
CATHEPSIN (nmol/min/mg protein)	0.189 ± 0.027 (5)	0.328 ± 0.025 (3)	173
βGLYCEROPHOSPHATASE (nmol/min/mg protein)	0.124 ± 0.015 (5)	0.173 ± 0.014 (3)	140

The values are expressed as means ± S. D.

Fig. 1 と2でみられたライソゾーム酵素の密度勾配での2相性の分布，酵素によりどちらの位置に多く分布するかが異なっていること，また jj Gunn ラットでライソゾーム酵素の増加の割合が各酵素により著しく異なっていることはラット小脳ライソゾームに heterogeneity があることを示しているものと思われる。軽いライソゾームが jj で増加していることは電子顕微鏡で脂質を含んだライソゾームが jj で増加していることと対応すると考えられる[5]。β-glucuronidase は比重が軽い場所に第3の活性ピークを示したがこれは小胞体由来のものと思われる[18]。また cathepsin 活性が上昇していることは jj 小脳でタンパク分解速度が増していることと一致している[19]。何故，β-glucuronidase が他の酵素に比べて著しく増加しているかは不明であるが Scrapie-affected のマウス脳でも acid phosphatase はあまり増えず，β-glucuronidase の活性が増加することが報告されている[20]。

〔文献〕

1. Schutta, H. S. and Johnson, L. (1967) J. Neuropath. Exp. Neurol. 26, 377-396
2. Aoki, E., Semba, R. K. and Kashiwamata, S. (1982) J. Neurochem. 39, 1072-1080
3. Keino, H. (1982) Cell Tissue Res. 223, 593-601
4. Kashiwamata, S., Keino, H., Semba, R. K. and Semba, R. (1983) Experientia 31, 1107-1108
5. Keino, H., Aoki, E. and Kashiwamata, S. Submitted to Cell Tissue Res.
6. Semba, R. and Kato, K. (1983) J. Neurochem. 39, 360-365
7. Yamada, H., Hayashi, H. and Y. Natori (1984) J. Biochem. 95, 1155-1160
8. Pennington, R. J. (1961) Biochem. J. 80, 649-654
9. Barrett, A. J. (1972) Anal. Biochem. 80, 280-293
10. Milsom, D. W., Rose, F. A. and Dodgson, K. S. (1972) Biochem. J. 128, 331-336
11. Ellman, G. L., Coutney, K. D., Andres, V. J. and Featherstone, R. M. (1961) Biochem. Pharmacol. 7, 88-95
12. Masters, B. S. S., C. H. Williams, Jr. and Kamin, H. (1960) Method. Enzymol. 10, 565-573
13. Trouet, A. (1974) Method. Enzymol. 31, 323-329
14. Hall, S. W. (1978) Method. Enzymol. 50, 439-456
15. Fishman, W. H. and Berfeld, P. G. (1955) Method. Enzymol. 1, 262-269
16. Sellinger, O. Z. and Hiatt, R. A. (1968) Brain Res. 191-200
17. Verity, M. A., Brown W. J. and Reith, J. A. (1968) J. Neurochem. 15, 69-80
18. Fishman, W. H., Goldman, S. S, and DeLellis, R. (1967) Nature 213, 457-460
19. Semba, R. K. and Kashiwamata, S. (1984) Neurochem. Path. (in press)
20. Hunter, G. D. and Nilson, G. C. (1966) J. Neurochem. 13, 375-383

48 メチル水銀中毒動物の神経系の研究

S.S. Haider ・ 沢口昭一 ・ 桑野良三 ・ 荒木一明
崎村建司 ・ 前田利長 ・ 薄井 宏 ・ 高橋康夫
（新潟大・脳研・神経薬理）

〔要 約〕

水俣病の病因はメチル水銀(MMC)に汚染した水産物の摂取によることは明らかであるがその神経症状発症のメカニズムはなお解明されていない。本実験の目的はMMCを投与した動物で認められる視覚障害及び後肢麻痺のメカニズムを追求することである。視覚障害の研究のためにHRPをモルモット眼内に注入し，視神経及び視索における軸索流を検索したが注入後2時間，3時間，4時間での分析ではtransportされるHRPがMMC群で上昇していた。また網膜での蛋白合成も軽度ではあるが上昇していた。今後経過時間の視覚中枢の検索が必要であると思われる。

後肢麻痺の研究の一部として後根神経節でのS-100及びNeuron-specific enolase (NSE)のmRNAレベルをcDNAプローブを利用したdot-blot hybridization法で分析した。その結果MMC群で低下している傾向があった。

Key words : Methylmercury, Poisoning, Protein

水俣病の病因はメチル水銀(MMC)に汚染した水産物の摂取によることは明らかであるがその神経症状発症のメカニズムについてはあまり解明されていない。我々もこれまでこの点を追求するためにいくつかの研究を行って来た(1,5)。本研究ではMMC投与した動物で視覚障害が認められるので，その発症メカニズムを追求するために網膜視神経系での変化一今回は特に軸索流の変化を検索しようと試みた。また一方我々はニューロン特異蛋白Neuron-specific enolase(NSE)及びグリア細胞特異蛋白S-100のcDNAクローニングを行い，そのクローンを得ることができた(2,4)。そこでこれらのクローンしたcDNAをプローブとして使用しMMC投与動物の後根神経節のmRNAレベルを測定しようと考えた。

方 法

5-5羽の家兎(2.5 kg－3.0 Kg)を使用した。MMC中毒の実験ではMMCを2.5 mg/kgの割合で毎日皮下注射すると家兎は15－20日の外で後肢麻痺状態を示し発症する。この家兎と対照家兎について以下の実験を行った。

軸索流の測定には^{35}Sメチオニン(100 μC/10 μl)を家兎の眼窩内にマイクロシリンジを使って注入した。注入後2，3，4時間で断頭し，眼，視神経，視索を取り出し，網膜を分離すると共に視神経，視索を2mmの断片にカットし，夫々一定量のlysis bufferでホモジェナイズしその一部をシンチレーションカウンターで測定すると共に，他の一部でSDS-PAGEフルログラフィーを行い分析した。前述の様にMMCを注射した家兎では発症後に同様に行った。

別に網膜の蛋白合成活性を in vivo, in vitro で ^{35}S メチオニンの TCA 不溶性分画への Incorporation から測定した。前者では生体軸索流の場合と同様に行ったが，後者の場合には網膜と ^{35}S メチオニン 5μC を Krebs-Ringer phosphate 液(pH 7.4, glucose 入り) 中 12 37°, 60 分 振とうさせて蛋白合成を行った。

視根神経節の実験では神経節摘取後，全 RNA を Guanidine chloride 抽出法により分離し試料として使用する。プローブの調整法は S-100, NSE の両者で若干異るが前者ではラット脳マイクロゾームから調製した poly(A) RNA を template として cDNA を合成し，pBR 322 と dC-dG tail 法で アニールし X 1776 を transform した。クローンの選別には合成 oligodeoxynucleotide をプローブとする colony hybridization を使用した。また NSE の場合には，mRNA を粗遊離ポリゾームから免疫化学的方法で濃縮し，これを template として cDNA クローニングを行ったが，クローンの選別には最も純度の高い cDNA をプローブとして使用した。このようにクローンした cDNA insert を nick-translation で ^{32}P ラベルしプローブとして使用した。上述の様に視根神経節から抽出した全 RNA を dot-blot hybridization 法で分析した(3)。

実験成績

1. 網膜視神経視索での研究一特に軸索流について

対照家兎で視神経視索における fast axonal flow を測定したがその flow rate は大体 200～250 mm/日であった。また神経内の ^{35}S は 90% 以上が蛋白として存在することを証明した。SDS-PAGE-フルログラフィーによる分析では M_r 約 26000 のバンドが特に強くラベルされている様である。アイソトープ注入後，2時間，3時間，4時間で視神経と MMC 群を比較してみると flow rate には有明な差異は見られなかった。しかし transport された ^{35}S のカウントは MMC 群が，2時間(各 6-8 例)，3時間(各 2 例)，4時間(各 3-4 例)の何れでも高値を示す傾向がある。図 1 に 3時間，図 2 に 4時間の実験例を示す。バーは S.D. である。

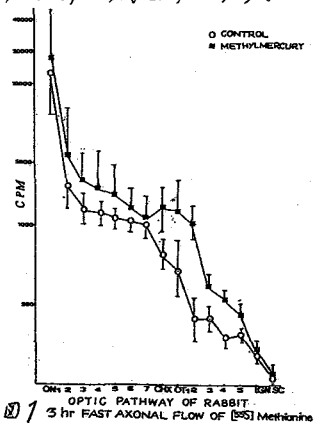


図 1

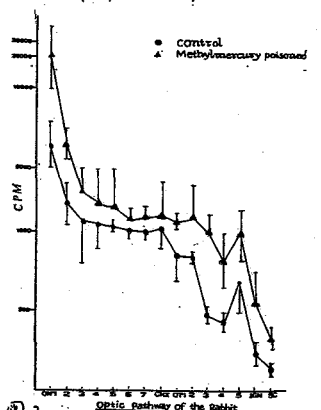


図 2

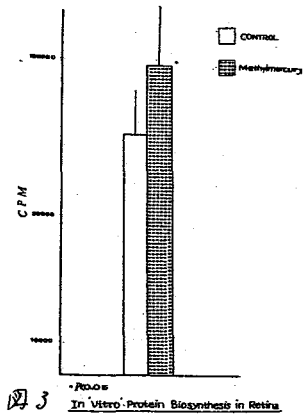


図 3

これらの変化の理由が或る MMC 投与による ^{35}S メチオニンの網膜による uptake 或は網膜細胞の蛋白合成活性の変化によるものでないかと考え方法の項で書いた様に in vitro で眼房内へ ^{35}S メチオニンを注入し(各 3-4 例)，一定時間後網膜を分離し，その全カウントと TCA 不溶性分画のカウントを測定した。全カウントに差は見

出そのなかったが全カラント TCA不溶性カウントの比から検討すると蛋白への取り込みは約1/6%の上昇がMMC群で観察された。そこでこの変化を更に検討するため12細胞を分離し，Krebs Ringer phosphate 中での^{35}Sメチオニンの蛋白への incorporation を測定した。その結果は図3のごとくでMMC群が約20%の上昇が見出された。この蛋白合成の上昇と transport とする^{35}Sの上昇との間に関連性があるのか定かでない。この様な結果は多分細胞現神経に蓄積したMMC量と関係があるかもしれない。このような成績は現象障害を説明するには十分なものとは考えられないので現在現覚中枢(後頭葉及び)での検索を考慮している。

2. 後根神経節での研究

我々の使用した家兎でのMMC投与群では後肢麻痺を惹起した。その故後根神経節の検索を試みた。この様での研究でS-100, NSEのmRNAレベルの変化を発達期の脳で検索する際にcDNAプローブは有用であることが証明されているので，このプローブを使用する dot-blot hybridization 法を応用しようと考えた。その成績はまだ完全でないが図4にS-100 mRNAの実験例を示す。MMC群でmRNAレベルが著明低下している様であった。現在なお検討中である。

考察

我々はメチル水銀中毒の神経症状発現のメカニズムを追求するために二つの方向から実験を行った。一つは現覚障害であり，他の一つは後肢麻痺である。前者に関連して細胞の蛋白合成及び transport とする^{35}Sメチオニンの上昇が認められたが，この様な蓄積したMMC量と関連があるか未知である。しかし現覚障害を説明するには不充分であり，それのみは後頭葉現覚中枢領野における蛋白合成，神経伝達物質その他の検討を行う必要がある。我々は以前，坐骨神経での軸索流の flow rate がMMC中毒時うっとう上昇することを報告したが，この成績はかなり高濃度のMMCの後根神経節における蓄積と関連があると思う。なおcDNAをプローブとするmRNAの分析についてはその有用性を記した報告にたがMMC中毒の検索にもまた有用であることが興味をひいた。

文献

1. Araki, K., Wakabayashi, M., Sakimura, K., Kushiya, E., Ozawa, H., Kamamoto, T., Takahashi, Y.: Neurotoxicology, 2, 557–566 (1981) ← control
2. Kuwano, R., Araki, K., Usui, H., Maeda, T., Fukui, T., Yamanari, N., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Takahashi, Y.: Abst of III Internat. Congress on Cell Biol. p. 364 (1984). ← MMC
3. Maniatis, T., Fritsch, F.F., Sambrook, J.: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1982) 図4 S-100 mRNA
4. Sakimura, K., Kushiya, E., Kuwano, R., Usui, H., Obinata, M., Odani, S., Takahashi, Y.: Abst of III Internat. Congress on Cell Biol. p. 364 (1984)
5. Wakabayashi, M., Araki, K., Takahashi, Y.: Brain Res. 117, 524–528 (1976)

49 プロテオリピドアポ蛋白によるモルモット実験的アレルギー性脳脊髄炎

由村健夫・国下龍英・田平　武
（国立神経センター・疾病VI）

〔要　約〕

中枢神経系ミエリンの主要蛋白の1つであるプロテオリピド蛋白(PLP)の起脳炎性を検討した。ウシ脊髄より抽出したPLPをゲル沪過により脱脂してアポ蛋白とし、感作に用いた。混入可能なミエリン塩基性蛋白(MBP)およびガラクトセレブロシドの最大値はアポ蛋白のそれぞれ0.014%, 0.13%と微量であり、それら自身では病変は惹起しないと考えられた。一匹あたり2.5 mg/mlのアポ蛋白100 μlと10 mg/mlの結核死菌を含むFreund's adjuvant 100 μlにてハートレー系モルモット8匹を感作し、60日目まで観察した。5匹に立ち直り反射の障害が一過性にみられた。2匹は感作後約45日に明らかな対麻痺を呈し、病理学的にも脊髄に著明な脱髄病変が確認された。対麻痺を呈した2匹を含む7匹にPLPに対する抗体価の上昇が見られたが、抗MBP抗体の増加は見られなかった。

PLPに起脳炎性があり、かつPLP単独で中枢神経系に脱髄を起こし得ることが示唆された。

Key words : Proteolipid protein , Guinea pig , Experimental allergic encephalomyelitis

実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)は多発生硬化症の実験モデルとして研究されており、MBPが主として抗原として用いられている。PLPは中枢ミエリン内にMBPより多量に存在するが、その起脳炎性については確定的ではなく、常にMBPの混入が問題とされてきた。最近Williamsらはウシ PLPによるウサギの脱髄を伴う慢性EAEを報告した[8]。彼らは、PLPへのMBPの混入は極めて微量であることを示し、EAEはPLPによるものと結論している。我々はPLPの起脳炎性の確認を主目的とし、モルモットにおいてもPLPはEAEを惹起し得るか、起るとすればいかなる性質のEAEかの検討を行なった。

〔方　法〕

1) PLPの抽出、精製[3]：ウシ脊髄を用い、Folch法により下層に抽出したPLPをエーテル-エタノール(3:2, V/V)で部分脱脂し、crude PLPとした。メチル化したセファデックスG-100カラム[4](5.0×59 cm)にcrude PLPを添加し、C-M-0.1N HCl (10:10:1, V/V/V)にて溶出した。水溶性PLPはSherman & Folchの方法[6]により得た。

2) PLPアポ蛋白中のMBP、脂肪酸、ガラクトース量

i) MBP：360 μgのPLPアポ蛋白を種々の濃度のウシMBPと共にSDS-PAGEにて電気泳動後、ニトロセルロース膜へブロットした。抗ウシMBP抗血清を用いたPAP法によりMBPを免疫染色し、混入MBP量を判定した。

ii) 脂肪酸、ガラクトース：5.7 mg PLPアポ蛋白をメタノリシスし、生成した脂肪酸エステルはヘキサンで抽出し、ガスクロマトグラフィーにより定量した。(15% DEGS, 2m, 190°C 内部標準C19脂肪酸メチルエステル)　残渣は中和後TMS誘導体とし

てマニトールに対して定量した。

3) モルモットへの感作：ハートレー系モルモット（277～980g, 8匹）に PLP アポ蛋白 250μg (100μl) と 10 mg/ml 結核死菌を含む Freund's adjuvant 100μl の乳濁液を足底皮内に注射した。対照として2匹に蒸留水 100μl と Freund's adjuvand 100μl を注射した。観察は60日まで続けた。重症度の判定は正常0、立直り反射障害0.5、軽い対麻痺1、強い対麻痺2、四肢麻痺3、死亡4とした。

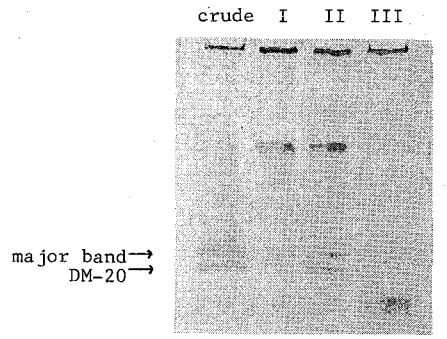
4) 病理学的検索：死亡したモルモットは10%ホルマリン固定、死亡直前のものは1.5%グルタールアルデヒド、0.5%パラホルムアルデヒド、0.08Mリン酸緩衝液 (pH 7.6) の混合液で、灌流固定し、パラフィンまたはエポン包理して光顕、電顕にて観察した。

5) 抗体測定：抗 PLP 抗体、抗 MBP 抗体ともに ELISA 法により O-phenylenediamine を基質とし、ペルオキシターゼを用いて行なった。

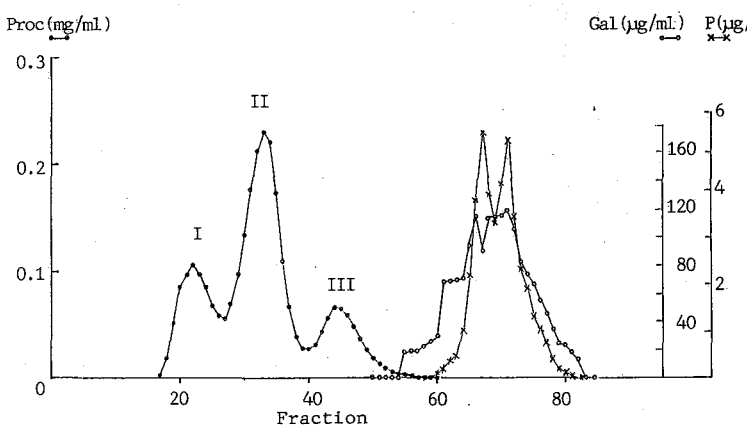
6) その他の定量：蛋白は Lowry、リンは Bartlett、糖は Anthrone 法によった。

〔結　果〕

1) 図－1に示すごとく crude PLP には分子量約30Kの major band と分子量約20KのDM-20と呼ばれるbandが存在し、小量の低および高分子量蛋白が混在する。メチル化セファデックスG-100（図-2）により脱脂されると同時に、低分子量蛋白が major band、DM-20 より分離された。感作には、major band、DM-20 を多量に含むピークII（図-2）を用いた。



（図-1）crude PLP、ゲル沪過各ピークの電気泳動パターン。各ピークは図-2参照



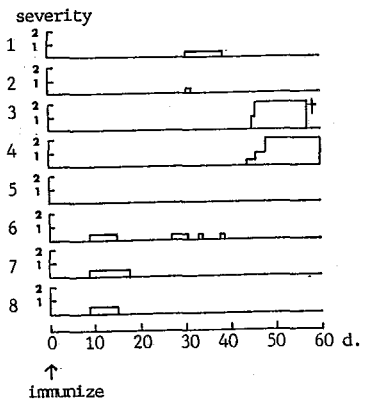
（図-2）crude PLP のメチル化セファデックス G-100 によるゲル沪過パターン

2) ピークIIのアポ蛋白は2.7% (W/W) の脂肪酸を含み、$C_{14:0}$、$C_{16:0}$、$C_{18:1}$ で全体の80%を占めた。混入 MBP 量はプロティング法の測定限界を越え、最大可能量で0.014%であった。ガラクトース量は0.03%（ガラクトセレブロシド0.13%）であった。

3) EAE は図-3に示すごとく、5匹に立直り反応障害が一過性にみられ、2匹は感作

後45日前後に著明な対麻痺を呈し、そのうち1匹は死亡、他の1匹は病理検索のため灌流固定した。

4) 対麻痺を呈したNo.3、No.4の脊髄は肉眼的に明瞭な点在病変を有し、光顕下では後索および前側索の軟膜直下に帯状の著明な脱髄病変を認めた(図-4)。無症状であったNo.5の脊髄、側脳室周囲、視交叉部の血管周囲に細胞浸潤と軽度の脱髄が見られた。他の動物は正常であった。



(図-3) EAE の臨床経過図



(図-4) 脊髄前索の電顕像

5) 抗PLP抗体は病理学的に病変を有した3匹を含む7匹に上昇がみられた。抗MBP抗体の増加は見られなかった。

〔考 察〕

PLPによるEAEはOlitsky ら[5] Goldstein ら[1] Waksman ら[7]の報告があるが、これらはいずれもMBPの混入が否定されておらず、抽出法からも混入の可能性が高い。Hashim ら[2]はMBPの混入はないとしているが、その発症様式はMBPによる急性EAEに類似しており、病理学的にも脱髄はみられていない。Williams らはMBPの混入を否定したPLPによって明らかな脱髄を伴う慢性EAEをウサギに起したと報告した。[8] 今回我々は、モルモットにおいても脱髄の明瞭な慢性EAEを起こしうることを示した。MBP、セレブロシドの混入は一匹注射量中にそれぞれ35ng、330ng、と極めて微量であり、それら単独ではEAEあるいは脱髄は起こし得ないと判断され、PLP単独で慢性EAEを惹起せた可能性が高い。

モルモットではMBP単独では慢性EAEも、強い脱髄も起こさない。今回の結果のごとくPLPが単独で脱髄の明らかな慢性EAEを生じるとすれば、PLPはMBPとは性質の異なる起脳炎性を有すると考えられる。現在、起脳炎性がmajor band, DM-20のどちらに存在するかの検討中である。

〔文 献〕

1) Goldstein, N.P. et al. (1953) Neurology 3, 609-614
2) Hashim, G.A. et al. (1980) Neurochem. Res. 5, 1137-1145
3) Helynck, G. et al. (1983) Eur. J. Biochem. 133, 689-695
4) Nyström, E.S. and Sjövall, J. (1965) Anal. Biochem. 12, 235-248
5) Olitsky, P.K. and Tal, C. (1952) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 50-53
6) Sherman, G. and Folch-Pi, J. (1970) J. Neurochem. 17, 597-605
7) Waksman, B.H. et al. (1954) J. Exp. Med. 100, 451-471
8) Williams, R.M. et al. (1982) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 41, 508-521

50 実験的アレルギー性神経炎とヒト脱髄性末梢神経疾患における細胞性免疫 — ウシP2蛋白とその合成ペプチド —

野村恭一・根岸輝彦・大野良三・濱口勝彦
（埼玉医大・神経内科）
〔要　約〕　鈴木　勝・植村慶一
（同・I生理）

実験的アレルギー性神経炎（EAN）およびヒト脱髄性末梢神経疾患(Guillain-Barré 症候群：GBS）患者において，P2蛋白およびその合成ペプチドSP$_{66-78}$，SP$_{70-78}$，SP$_{88-101}$などの末梢神経抗原を用いてリンパ球幼若化反応を経時的に施行し，細胞性免疫状態について比較検討した。

ウサギEAN動物では，発症時ないし直後にP2蛋白およびSP$_{66-78}$，SP$_{88-101}$に対する感作リンパ球の出現を認めた。GBS患者においては，疾患活動期ないし回復期にP2蛋白およびSP$_{66-78}$に対する感作リンパ球の出現を認め，SP$_{88-101}$を抗原とした場合では，明らかな細胞性免疫の成立を認めなかった。また，SP$_{70-78}$を抗原とした場合では，EANおよびGBSのいずれの群においても明らかな細胞性免疫の成立を認めなかった。

これらのことから，GBSにおいてもEANと同様にP2蛋白およびSP$_{66-78}$に対する細胞性免疫の成立を認め，GBSの原因とこれら感作リンパ球との関連が示唆された。

Key words： Cell-mediated immunity, P2 protein, Synthetized peptide

近年，末梢神経ミエリンのP2蛋白にルイスラットに対する実験的アレルギー性神経炎（EAN）の抗原性の存在することが明らかとなり，[4][8][11]またウシ，ヒトP2蛋白[5][12]の全アミノ酸配列が決定された。さらにウシP2蛋白の分解ペプチドCB2（21～113残基），CiT4（53～78残基）および合成ペプチド法よって得られたSP$_{66-78}$の13残基にEAN活性を認め，一方，CiT6（89～106残基），SP$_{70-78}$の9残基にはEAN活性を示さなかったことが報告[15]され，EAN活性部位についての検討が進んでいる。今回我々は，EAN動物およびヒト脱髄性末梢神経疾患患者において，細胞性免疫学的な立場からEAN活性部位とGBSの病因との関係について検討した。

実　験　方　法

Newzealand White rabbit 42羽を用い，ウシ末梢神経ミエリン（蛋白量500 μg/Kg）を接種してEANを作製し，ミエリン接種前，接種後7，14，21，28日目においてリンパ球幼若化反応を施行した。ヒト脱髄性末梢神経疾患としてGBS患者10例においても同様に経時的にリンパ球幼若化反応を施行し，また正常対照27例を用い比較検討した。

リンパ球幼若化反応については既報の方法[8]で施行し，Stimulation Index (SI)を算出した。リンパ球幼若化反応の抗原としては，EAN動物およびGBS患者の両群ともにウシP2蛋白，P2蛋白の合成ペプチドであるSP$_{66-78}$，SP$_{70-78}$，SP$_{88-101}$をもちいた。ウシP2蛋白はKitamuraらの方法[5]により調製した。またペプチドの化学的合成は液相法により，生成物は再結晶とカラムクロマトにより精製し，純度は元素分析，N末端アミノ酸分析，薄層クロマトによって均一であることを確かめた。

結　果

ウサギEAN動物における細胞性免疫反応の結果をFig. 1に示した。EANの

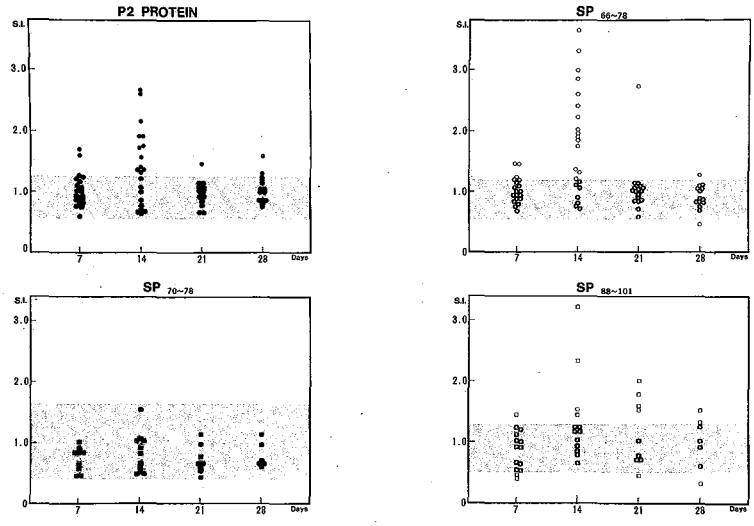


Fig. 1 Cellular hypersensitivity to P2 protein and several synthetized peptides (SP) in the different stages of experimental allergic neuritis (EAN). EAN was induced by bovine peripheral nerve myelin (500μg/kg) in rabbits. The stippled areas represent the normal range of the controls (M±2SD).

平均発症日数はミエリン接種後 13.8 日であった。ハーフトーンはミエリン接種前におけるSIのMean±2SD の範囲を示し，P2蛋白 1.26 (n=39)，SP_{66-78} 1.21 (n=37)，SP_{70-78} 1.66 (n=21)，SP_{88-101} 1.31 (n=22)以上を異常高値と判定した。EAN発症時ないし直後のミエリン接種14日目において，SIの正常範囲を越えたものの頻度は，P2蛋白を抗原とした場合では，21羽中12羽(57%)，SP_{66-78}では22羽中14羽(64%)，SP_{88-101}では13羽中4羽(30%)であった。またEAN発症後よりSIはこれら3抗原においては次第に正常範囲に集束する傾向を認めた。一方，SP_{70-78}を抗原とした場合では，いずれの時期においてもSIの異常高値を認めなかった。

経時的に検討し得たGBS患者10例におけるリンパ球幼若化反応の結果をFig. 2に示した。各症例とも各病期——急性期・回復期・慢性期——それぞれ1検体づつをプロットした。ハーフトーンは正常対照27例におけるSIのMean±2SDを示し，P2蛋白 1.16，SP_{66-78} 1.20，SP_{70-78} 1.60，SP_{88-101} 1.14 以上を異常高値と判定した。各抗原におけるSIの異常高値を示した頻度は，P2蛋白では10症例中8例，SP_{66-78}では10症例中9例であった。しかしながらSP_{70-78}，SP_{88-101}では1例を除き全て正常範囲内にあった。

考　察

EANにおける細胞性免疫反応の検討では，P2蛋白に対する感作リンパ球の出現は著者らを含め数例の研究者により確認されているが，[2][7][9][14] P2蛋白の合成ペプチドを抗原とした細胞性免疫状態を検討した報告はない。今回の成績では，EAN発症時ないし直後においてP2蛋白，SP_{66-78}およびSP_{88-101}に対する細胞性免疫反応の成立を認め，これら抗原がEAN発症に何らかの役割を演じているものと考えられた。SP_{70-78}ではルイスラットに対してEAN活性を示さなかった報告[15]と今回感作リンパ球の出現を認めなかったことは，EA

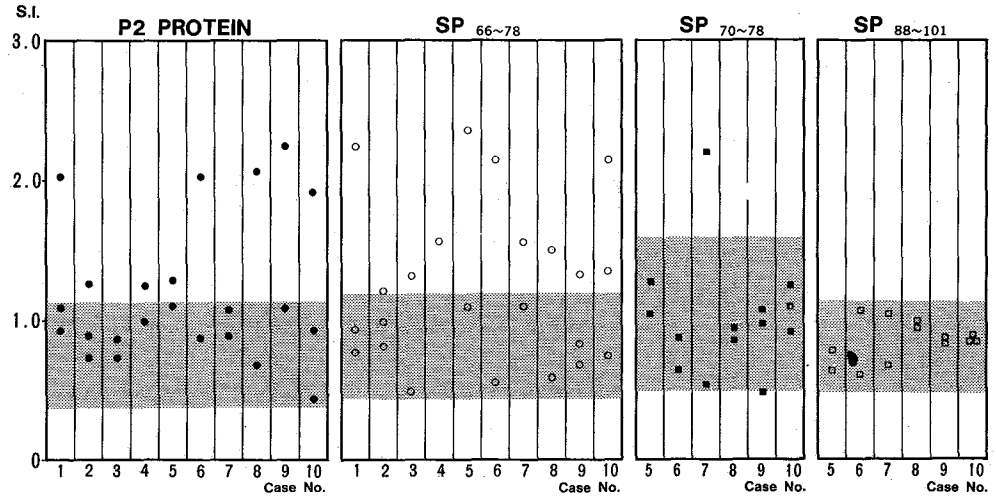


Fig. 2 Cellular hypersensitivity to P2 protein and several synthetized peptides (SP) in 10 cases with acute inflammatory polyradiculoneuropathy. The stippled areas represent the normal range of the controls (M±2SD).

N発症に必要な最少のアミノ酸配列の存在が示唆された。

GBS患者における細胞性免疫状態については多くの報告がなされてきたが，EAN催起性抗原であるP2蛋白を用いた報告は数少く，[1][3][13]未だ一定の結論が出ていない。既に著者らはGBSの疾患活動期ないし回復期のみにP2蛋白に対する細胞性免疫の成立を認め，P2蛋白がGBSの病因と関連を有するものと報告した。[10]今回はさらにP2蛋白の3種類の合成ペプチドを抗原としリンパ球幼若化反応を施行し，P2蛋白および66～78の13残基の合成ペプチドを抗原とした場合，高頻度にこれら抗原に対する感作リンパ球の出現を認めた。またSP$_{66-78}$残基の部分は，P2蛋白のアミノ酸配列をもとにしたPredictionによる研究からP2蛋白の67～79残基の親水性部分が外部環境に露出している構造を呈している[6]ことよりEAN活性部位として興味がもたれ，GBSの発症とSP$_{66-78}$との関連が示唆された。一方，70～78の9残基ではEAN動物とほぼ同様に明らかな細胞性免疫の成立を認めなかった。またSP$_{88-101}$に対しては全く感作リンパ球を認めず，ルイスラットに対するCiT6 (89-106) がEAN活性を有しなかった報告[15]と一致した。

文　献

1). Abramsky, O. et al.(1975) Neurology, 25, 1154-1159 2). Hughes, R.A.C. et al.(1981) J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 44, 565-569 3). Iqubal, A. et al.(1981) Ann. Neurol., 9,65-69 4). Kadlubowski, M. et al.(1979) Nature, 277, 140-141 5). Kitamura, K. et al.(1980) FEBS Lett., 115, 27-30 6). Martenson,R.E. (1981) In 8th Meet. Int. Soc. Neurochem. Nottingham, P276 (Abstr.) 7). Milek, D.J. et al.(1983) J. Neuroimmunol., 4, 105-117 8). Nomura, K.(1983) Saitama Medical Jour., 10, 7-16 9). Nomura, K. et al.(1984) In EAE: a good model for MS, ALAN.R.LISS, INC, P493-498 10). Nomura, K.(1983) 6th Asian and Oceanian Cong. of Neurology, P135 (Abstr.) 11). Suzuki, M. et al.(1980) Neurosci. Lett., 19, 353-358 12). Suzuki, M. et al.(1982) J.Neurochem., 39, 1759-1762 13). Sweiman, B. et al.(1983) Neurology, 33, 234-237 14). Szymanska, et al.(1981) J.Immnol. 126, 1203-1206 15). Uyemura, K. et al.(1982) J.Neurochem., 39,895-898

51 実験的脳梗塞gerbil脳の神経ペプチドと受容体

岸本　武・小川紀雄・広瀬由起子・森　昭胤
（岡山大・医・脳研）
高山晴彦
（同・皿内科）

〔要　約〕

砂ネズミの片側総頸動脈を結紮して実験的脳梗塞を作成し，その脳内の8種の神経ペプチドの濃度と，4種の受容体結合の変化を調べた。その結果，thyrotropin releasing hormone (TRH)，cholecystokinin-octapeptide，substance P，somatostatin，vasoactive intestinal polypeptide (VIP) の5種のpeptideの濃度は，stroke症状の有（S群）無（N群）にかかわらず，左右脳半球で差異が認められなかった。一方，opioid peptideはN群の脳では左右差がなく，S群の脳の虚血側でβ-endorphinの増加がみられたが，Met-enkephalin (ENK) とdynorphinの濃度は不変であった。受容体結合の検討ではTRHおよびVIPの受容体結合はいずれの群でも左右脳半球でも差異がなかった。一方，S群の虚血側脳のopioid receptor結合は，naloxone結合でみるとagonist siteの相対的な低下がみられ，ENK受容体結合は低下していた。このopioid receptor結合の変化はβ-endorphinの増加によってもたらされた可能性が考えられた。以上の結果から，神経ペプチドのうちではopioid peptide神経機構が脳梗塞の病態生理に関与しているものと考えられた。

Key words：　stroke，　neuropeptides，　CNS-receptor，

Baskin and Hosobuchiは人の脳虚血による神経症状がモルヒネ拮抗剤であるnaloxoneの投与により消失することを報告し，[1] さらに彼らは砂ネズミ (mongolian gerbil) を用いた実験的脳梗塞の神経脱落症状 (stroke症状) にも一過性ではあるがnaloxoneが有効であることを明らかにした。[1,4] 我々も同様の実験モデルを用いて，naloxoneばかりでなく，日本で臨床使用が許可されているlevallorphanも有効であることを報告した。[10] 今回は，実験的脳梗塞gerbil脳における生化学的変化を知る目的で，β-endorphin，Met-enkephalin，dynorphinなどのopioid peptideをはじめとする8種の神経ペプチド濃度の変化を測定し，さらに，4種類の受容体結合の変化についても検討したので報告する。

［方法］

実験的脳梗塞gerbilモデルの作成方法はすでに報告したが，[10] その概略は次のとおりである。体重70gのgerbilを使用し，ケタミン麻酔（50 mg/kg，ip）下で，右総頸動脈を5 mm間隔で2箇所結紮した。結紮後4時間目にstroke発症群（S群）と，stroke未発症群（N群）の2群に分類した。S群には明らかな片麻痺を認め，半昏睡状態のもの，歩行は可能であるが右旋回するものなどをまとめたが，後者については我々が開発したhanging stroke testで確認した。すなわち，左後肢をピンセットでつまみ，頭を下にして釣り下げたとき，片麻痺のために自分の体重を挙上することができないものをS群とした。strokeの発症は160匹中67匹で，41.9%の発症率であり，従来の報告とほぼ同様であった。[5,6]

脳内の神経ペプチドの濃度の定量は次のようにして行った。総頸動脈結紮5時間目に，gerbilをマイクロウェーブ照射により屠殺し，[9] 脳を取り出し，forebrain（全脳から小脳と橋・延髄を取り除いたもの）を正中線で左右の半球に2分した。直ちに10倍容の

Table 1. Neuropeptide levels (ng/mg protein) in gerbils with right-carotid ligation

		β-endorphin	ENK	dynorphin	TRH	CCK-8	substance-P	somatostatin	VIP
Stroke	(r)	4.2±0.8*	2.4±0.8	1.8±0.4	0.31±0.09	2.8±0.5	0.69±0.11	0.92±0.19	0.78±0.16
	(l)	2.3±0.6	2.1±0.3	2.3±0.4	0.33±0.10	2.7±1.5	0.74±0.15	0.98±0.15	0.79±0.30
Non-stroke	(r)	2.7±0.5	2.1±0.3	2.9±0.3	0.34±0.11	2.8±0.4	0.70±0.11	0.96±0.08	0.77±0.20
	(l)	2.6±0.5	2.4±0.7	2.5±0.2	0.32±0.08	2.3±0.5	0.76±0.09	0.98±0.08	0.78±0.13

Values are shown as the mean±SEM. Asterisks indicate statistical significance vs. contralateral side (*P<0.05, one-way ANOVA)

Table 2. CNS receptors in gerbils with right-carotid ligation

		Naloxone Binding (fmol/mg protein) without NaCl	Naloxone Binding (fmol/mg protein) with 100mM NaCl	ratio $+Na^+/-Na^+$	ENK Binding	TRH Binding	VIP Binding
					(fmol / mg protein)		
Stroke	(r)	59.9±5.5	170.5±6.0	2.87±0.2 *	30.5±3.5 *	45.2±5.2	29.6±2.8
	(l)	68.7±5.8	162.4±9.8	2.36±0.2 *	44.8±2.6 *	44.9±4.6	29.4±2.1
Non-stroke	(r)	67.6±9.1	161.5±8.1	2.40±0.5	45.2±1.9	43.8±3.2	30.1±3.1
	(l)	68.3±6.9	164.3±6.0	2.40±0.3	46.0±2.0	46.7±5.0	29.9±2.8

Values are shown as the mean±SEM of 6 gerbils. *P<0.05 (one-way ANOVA)

氷冷した酸-ethanol (ethanol : 0.1N HCl = 1 : 1) 中でホモゲナイズし, 4°C, 12,000×g で20分間遠沈, 上清を-20°Cで保存した。各サンプルは radioimmunoassay (RIA) 直前に, RIA 用 buffer で希釈して使用した。β-endorphin, met-enkephalin (ENK), dynorphin, thyrotropine releasing hormone (TRH), cholecystokinin-octapeptide (CCK-8), substance P, somatostatin, vasoactive intestinal polypeptide (VIP) の8種の神経ペプチドをRIAで測定した。[3,7,8,9,12,14] 従って, すべて測定値は各々の peptide-like immunoreactivity (LI) と称すべきであるが, 以下では簡単のためにLIを省略する。

脳内受容体結合の検討のためには, 総頸動脈結紮5時間後に断頭屠殺し, forebrain を左右の半球に分け, 粗膜分画を作成して opioid receptor 結合 ([³H]naloxone 結合, [³H]-D-Ala²-Met-ENK 結合), [³H]TRH 結合, [¹²⁵I]-VIP結合を, すでに報告した方法で特異的結合で調べた。[11,13,13]

〔結果〕

表1に8種の神経ペプチドの測定結果を示す。opioid peptide 以外の TRH, CCK-8, substance P, somatostatin, VIP の濃度は, S群 gerbil 脳の右側 (虚血側) と左側の間に有意な差異はみられず, N群の脳内の濃度との間にも差異は認められなかった。一方, opioid peptide は, N群の脳では左右差なく, S群の脳においてのみ左右脳半球で濃度に差がみられた。すなわち, S群脳の虚血側では有意な β-endorphin 濃度の上昇がみられたが, ENK および dynorphin 濃度は不変であった。このβ-endorphin濃度の変化は, 湿重量当たりに換算しても, 総含量として算出しても同様の結果であった。S群脳の酸-ethanol抽出物をゲル沪過して RIA で測定した β-endorphin の elution pattern には左右脳で差はみられず, processing の差ではなく, 量的な差異であった。

表2に受容体結合の変化をまとめて示す。ここでも, TRH 受容体結合, VIP 受容体

結合には変化がみられず，opioid receptor 結合に差異が認められた。naloxone 結合は 100 mM NaCl 存在下と非存在下，各々では有意差はみられなかったが，両者の比をとると有意な差が認められ，相対的な agonist site の減少と antagonist site の増加がみられた。ENK 結合は虚血脳で有意に減少しており，これは結合部位数の減少と親和性の低下とに依っていた。

[考按]

Opioid peptide 以外の神経ペプチドは脳梗塞の脳において変化がみられないという以上の結果は，stroke 症状の発症や，生命予後などにこれらのペプチドが関与している可能性が少ないことを示唆している。脳虚血による種々の症状には，脳内の opioid peptide，ことに β-endorpin が関与しているものと考えられる。すでに報告したように[10]，モルヒネ拮抗剤である naloxone や，levallorphan は，増加している β-endorphin が，opioid receptor に作用するのを遮断して治療効果を発揮するものと考えられる。しかしながら，モルヒネ拮抗剤が脳の虚血巣にまで到達できるか否かは不明で，増加した β-endorphin が流出して他の部位に作用するのをモルヒネ拮抗剤が阻止する可能性や，抗ショック作用[2]によって見かけ上の治療効果を示す可能などもむろん考慮されなければならない。

Opioid receptor 結合，ことに agonist site の減少は，TRH 受容体結合や VIP 受容体結合が減少していないことから，虚血による receptor 部位の破壊というよりは，虚血により増加した β-endorphin の放出あるいは漏出による opioid receptor の down regulate と考えられる。

以上の結果は，脳虚血の病態生理には，脳内の神経ペプチドのうち，ことに opioid peptide 機構が関与していることを示唆する。

(謝辞：抗 dynorphin 血清を御提供下さいましたエーザイ筑波研究所橘眞郎博士に感謝いたします。)

[文献]

1. Baskin, D.S. and Hosobuchi, Y. (1981) Lancet, II, 272-275.
2. Faden, A.J. and Holaday, J.W. (1979) Science, 205, 317-318.
3. Ghazarossian, V.E., Chavkin, C. and Goldstein, A. (1980) Life Sci., 27, 75-86.
4. Hosobuchi, Y., Baskin, D.S. and Woo, S.K. (1982) Science, 215, 69-71.
5. Kahn, K. (1972) Neurology, 22, 510-515.
6. Levine, S. and Payan, H. (1966) Exp. Neurol., 16, 255-267.
7. Ogawa, N., Thompson, T. and Friesen, H.G. (1977) Biochem. J., 165, 269-277.
8. Ogawa, N. (1979) Neurological Med. (Tokyo), 10, 393-395 (in Japanese).
9. Ogawa, N., Panerai, A.E., Lee, S., Forsbach, G., Havlicek, V. and Friesen, H.G. (1979) Life Sci., 25, 317-326.
10. Ogawa, N., Tsukamoto, S., Mizuno, S. and Mori, A. (1981) Jap. J. Neuropsychopharmacol., 3, 907-911 (in Japanese).
11. Ogawa, N., Yamawaki, Y., Kuroda, H., Nukina, I., Ota, Z., Fujino, M. and Yanaihara, N. (1982) Peptides, 3, 669-677.
12. Ogawa, N., Mizuno, S., Mori, A., Nukina, I. and Yanaihara, N. (1984) Peptide, in press.
13. Ogawa, N., Mizuno, S., Fukushima, M. and Mori, A. (1984) Peptides, in press.
14. Utsumi, M., Tateiwa, M., Makimura, H., Yamada, A., Mori, H., Kusaka, T., Sakoda, M. and Baba, S. (1975) Endocrinol. Japon., 22, 509-516.

52 内因性うつ病患者におけるclonidine投与時の血漿noradrenalineおよびHGHの変化

渡辺　厚・馬目太永・金子元久・沼田吉彦・
星野仁彦・菅野智行・熊代　永
（福島県医大・神経精神科）

〔要　約〕

内因性うつ病患者の中枢神経系におけるα_2-adrenergic receptor（α_2-receptor）の感受性を調べる目的で、内因性うつ病患者の未治療例6例（未治療群）、寛解例7例（寛解群）および正常者5例（対照群）に対して、clonidine hydrochloride 3μg／kgを経口的に投与し、その前後における、血漿noradrenaline（NA）human growth hormone（HGH）および血圧の変化を見た。その結果、（1）clonidine投与による血漿NAの減少は、未治療群および寛解群では、対照群より軽度であった。（2）血漿HGHの分泌反応は、対照群では5例中4例が陽性であったのに対し、未治療群では6例中2例、また、寛解群では7例中1例のみが陽性であり、うつ病の2群では、反応が欠如する傾向を示した。（3）血圧の変化は、各群の間に明らかな差異はみられなかった。

以上より、うつ病患者の病相期、寛解期においては中枢神経系における presynaptic α_2-receptorおよび postsynaptic α_2-receptorの感受性が低下していることが推測された。

Key words： depression, α_2-adrenergic receptor, clonidine

内因性うつ病の生化学的成因については、serotonin仮説とならんで、noradrenaline（NA）欠乏仮説が提唱されており、このNAが欠乏する機制の1つとして、NAの遊離に対して抑制的効果を示す presynaptic α_2-adrenergic receptor（α_2-receptor）の感受性亢進が推測されている(2)。そこで、今回我々は、うつ病患者に対して、α_2-receptor agonistであるclonidineを投与し、血漿中のNAとhuman growth hormone（HGH）および血圧などの変化を継時的に測定し、うつ病患者におけるα_2-receptorの感受性について検討したので報告する。

【　対象と方法　】　対象は、当科および関連病院を受診した内因性うつ病の未治療例6例（未治療群：男4例，女2例，年齢44－64歳，平均57歳）および寛解例7例（寛解群：男5例，女2例，年齢29－66歳，平均47歳）の計13例である。これらの症例は、Research Diagnostic Criteriaの内因性定型うつ病の診断基準を満たしたものである。服薬の有無については、未治療群では、2例がbenzodiazepine系の薬物を服用していたが、他の5例はいかなる薬物も服用していなかった。また、寛解群では、3カ月から13年にわたって三環系抗うつ剤や精神安定剤などの投与を受けていたが、本研究に際して1週間の washing out 期間をもうけた。正常対照群は、健康な本学学生5例で、年齢は19歳から22歳までで平均20歳である。被験者は、clonidine試験前日の夕食後より試験終了まで摂食せず、安静臥床を保った。clonidineの投与方法は試験当日の午前9時に3μg／kgのclonidine hydrochlorideを経口的に投与した。採血はclonidine投与前45分、15分、投与後30分、60分、120分、180分の計6回とし留置針で肘静脈より行なった。また、その後に

各時刻毎に血圧測定も行なった。採取した血液は２本の試験管に分注しそのうちの１本は EDTA-2Na ２５㎎と $Na_2S_2O_5$ １０㎎の入った血漿ＮＡ測定用のもので、これに血液７㎖をとって混和し、ただちに遠心して得られた上清を－８０℃で保存した。もう１本は、EDTA-2Na ２㎎入りの血漿ＨＧＨ測定用で、これに血液２㎖をとって混和し、遠心によって得られた上清を－２０℃で保存した。血漿ＮＡの測定は、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー（柳本高速液体クロマトグラフィーＬ－２０００，ボルタンメトリー検出器ＶＭＤ１０１）を用いて Goldstein らの方法(3) に準じて行ないまた、血漿ＨＧＨの測定は radioimmunoassay 法（ダイナボットHGH RIA KIT)) により行なった。

【　結果　】（１）血漿ＮＡの変化 (Fig.1): clonidine 投与１５分前の血漿ＮＡ濃度を基準値とすると、まず、対照群では投与３０分後に減少傾向が見られ、１２０分後に最低値を示した。これに対して未治療群では、投与３０分後に有意な減少 ($p<0.05$) が見られ、その後も減少を続け、最低値は１８０分後であった。一方、寛解群では、６０分後にはじめて有意な減少 ($p<0.05$) が認められ、またここで最低値を示していた。次に、各群の最低値について基準値からの減少率をみると、対照群では、69.8± 8.5% (Mean± SD) と基準値の 1/3以下となる著明な減少を認めたのに対して、未治療群では、30.8± 34.0% 、また、寛解群では、33.3± 24.0% といずれも減少率は軽度であった。すなわち、clo-

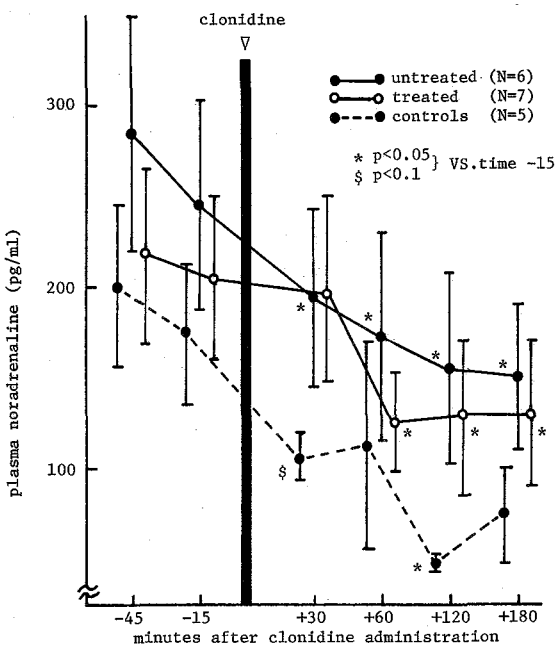


Fig.1. Effect of clonidine on plasma noradrenaline levels in depressive patients

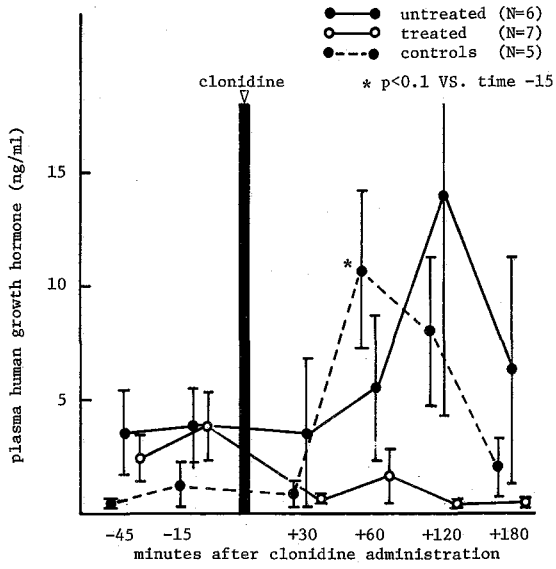


Fig.2. Effect of clonidine on plasma human growth hormone levels in depressive patients

nidine投与後の血漿ＮＡの減少は、対照群に比し、未治療群および寛解群では有意に少なかった($p<0.05, p<0.01$)。（２）血漿ＨＧＨの変化（Fig.2）：clonidineによるＨＧＨの分泌反応の判定基準として、５ng／㎖以上の増加を陽性とすると、対照群では、５例中４例が陽性であり また、その分泌反応のピークは投与６０分後に認められた。これに対して、未治療群では、６例中２例が陽性であり、他の４例では、分泌反応が欠如していた。また、寛解群でも７例中１例のみが陽性であったに過ぎず、他の６例では分泌反応が欠如していた。（３）血圧の変化（Fig.3）収縮期圧は３群とも１２０分後に最低値を示し、また、投与１５分前の値を基準値とした最低値の低下率では、３群の間に差異は認められ

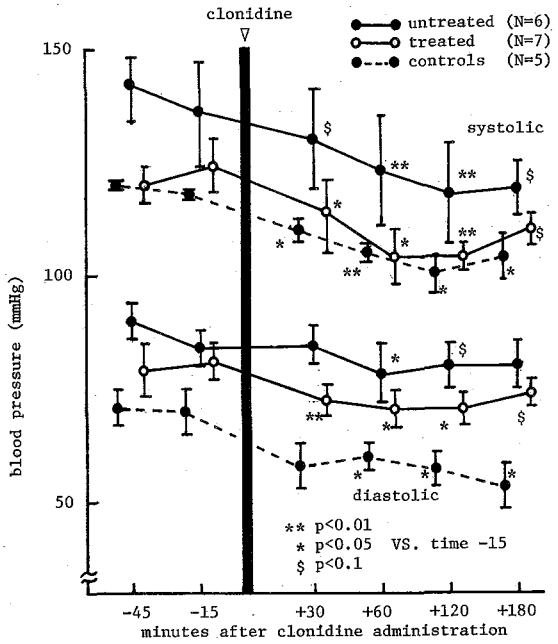


Fig.3. Effect of clonidine on blood pressure in depressive patients

なかった。一方、拡張期圧の最低値は、対照群では１８０分後、未治療群、寛解群では６０分後と異なった時刻に出現していたが、低下率には差は認められなかった。

【　考察　】　選択的 α_2-receptor agonist であり、また、中枢性の作用薬であるclonidineを投与して、内因性うつ病におけるα_2-receptor の感受性をみた今回の結果をまとめると、血漿ＮＡの減少は、対照群に比し、未治療群、寛解群とも軽度であり、また、ＨＧＨの分泌反応も、両群では欠如する傾向を示した。さて、血漿ＮＡは、大部分が末梢交感神経より分泌されるものであり、末梢交感神経活動を反映するものとされている(1)。しかし、clonidine の交感神経に対する効果は、中枢刺激による二次的な結果と考えられており、clonidine 投与時の血漿ＮＡの変化はpresynaptic α_2-receptor の感受性を間接的に反映していることも推測される。一方、clonidine によるＨＧＨの分泌反応は、視床下部における postsynaptic α_2-receptorの刺激によるものと言われている(4)。従って、今回の結果は、内因性うつ病においては、病相期、寛解期ともpresynaptic および postsynaptic の双方の α_2-receptor 感受性の低下を推測させるものであった。

【　文献　】

(1) Esler,M.,Zweifler,A.,Randall,O.,Julius,S. and De Quattro,V. (1977)Mayo. clin.Proc.52,379-382. (2)Garcia-sevilla,J.A.,Zis,A.p. ,Hollingsworth,P.J., Greden,J.F. and Smith,C.B.(1981)Arch.Gen.Psy.38,1327-1333.(3)Goldstein,D.S., Feuerstein,G. ,Izzo,J.L.Jr.,Kopin,I.J. and Keiser,H.R.(1981)Life Sci.28,467-475.(4)Terry,L.C. and Martin,J.B.(1981)Endocrinology 108,1869-1873.

53 Neuronal Ceroid Lipofuscinosisの生化学的検討

大橋十也・呉羽由利恵・衛藤義勝・前川喜平（慈恵医大・小児科）
後藤和利・熊谷公明（神奈川リハビリセンター・小児科）
山口修一（埼玉県小児医療センター）

〔要　約〕

Neuronal Ceroid Lipofuscinosis（NCL）は，neural cellを含む全身の細胞にceroid-lipofuscinと呼ばれる物質が蓄積する，familial cerebromacular degenerative diseaseである。今回我々は5例のNCLとコントロールについて尿中脂質分析を行い，NCL 2例に多量の螢光脂質を証明し1つの生化学的診断の指標になると思われ全螢光のChemical Natureにつき検討が必要と思われた。又1982年Kin，Wolfesによって報告されたNCLにおいて尿中にDolicholと呼ばれるpolyisoprenoidが大量に排出されるという結果にもとずき尿中Dolicholの定量を行なったが，有意な差は見られなかった。

Key words：1) Neuronal Ceroid Lipofuscinosis　3) Dolichol
2) Autofluorescence Lipids

Neuronal Ceroid Lipofuscinosis（NCL）は，neural cellを含む全身の細胞にceroid-lipofuscinと呼ばれる物質が蓄積し，眼底に網膜色素変性を認める，familial cerebromacular degenerative diseaseである。NCLは臨床的および病理学的見地より，Infantile type，Late infantile type，Juvenile type，Adult typeの4つのphenotypeに分類されている。今回我々は種々のNCLにつき尿中脂質の螢光強度を測定し，NCLのある例では，Control groupに比較して強い螢光強度の脂質が排泄されているという結果を得たので報告する。又1982年にKin，Wolfe(9)らにより報告されたNCLにおける尿中Dolichol増加にも検討を加えたのであわせて報告する。

〔材料並びに方法〕NCL 5例，コントロールとして同様の抗痙攣剤投与中のてんかん児2例，Alzheimer disease 1例，正常コントロール1例につき尿中脂質の螢光強度及びDolicholの測定を行なった。又尿中脂質の螢光スペクトルの測定も行なった。尿脂質の螢光強度測定は尿20mlより同量のchloroform-methanol（1:1，V/V）にて総脂質を抽出しExcitation 390nm，Emission 440nmにて測定した。螢光スペクトラムは尿200mlより同様の方法で総脂質を抽出し，Sephadex LH-50 columnにてchloroform-methanol（1:9，V/V）を移動層としてカラムク

ロマトグラフィーを行い，分離した脂質の最高螢光強度を示す分画のExcitation，Emission spectraを測定した。螢光光度計は日立Fluorometer model 650-40を用いた。尿中Dolicholの測定は，尿200 mlより上記と同様の方法で総脂質を抽出，その後boiling hexane 1 mlを加えevaporateし，hexane中にて4℃で一夜放置し，それを100 μl hexaneにとかし，10 μlを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（日本分光TRI-ROTAR SR-2）にて分析を行なった。移動層はmethanol-isopropanol（65:35, V/V）で流速は2 ml/minとした。

〔結果〕表-1は尿中脂質の定量値である。NCL groupにおいてControl groupに比して強い螢光を認めるものを5例中2例に認める。又Sephadex LH-50 columnにて分離した脂質のExcitation，Emission spectraはそれぞれ3つのピークが認められた。図-1はDolicholのHPLC profileである。Dolicholの定量もあわせて行なったが，NCL，Controlに差は認められなかった。

〔考案〕NCLは，neural cellを含む全身の細胞にceroid-lipofuscinと呼ばれる螢光物質が蓄積し，眼底に網膜色素変性を認めるfamilial cerebromacular degenerative diseaseである。その診断は電顕によって，脳，甲状腺(2)，皮膚(7)，直腸(6)，尿沈渣(3,4,5)，リンパ球(5)を材料として，その細胞内にfingerprint patternなどの特有のinclusion bodyを証明する事による。現時点ではその蓄積物質のchemical natureや本症におけるprimary Enzyme defectは確立されていない。蓄積物質については，1976年Wolfe(10)らは，そのchloroform-methanol insoluble residueはsmall peptideに結合したretinyl-polyeneとした。その蓄積物質が螢光を発するメカニズムとして，NCLにおいては不飽和脂肪酸の自動酸化がおこり，その二次産物中のmalondialdehydeがamine，phosphatydyl ethanolamie，nucleic acid，proteinと結合し，Shift baseを形成し，それが螢光を発するとの仮説がある。一方Enzymeについては1974年Armstrong(1)らはparaphenylendiamine specific peroxydaseの欠損をNCLの白血球において証明したが，現在のところ，その後のいくつかの追試により否定的となっている。Kin，Wolfe(9)(11)らは，NCLにて脳内，尿中にDolicholと呼ばれるpolyisoprenoidが増加しているとした。今回我々は尿中脂質ならびに尿中Dolicholの分析を行い，尿中Dolicholには差を認めず，2次的要因が示唆され，又あるNCLにおいては強い螢光をもつ脂質が尿中に排泄されており，これは1つの本症の生化学的指標になると同時に，今後，そのChemical natureにつき検討が必要と思われた。

Table 1

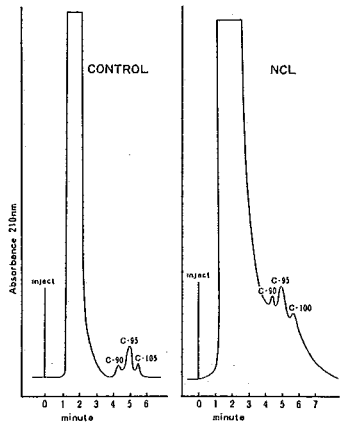
Quantitive determination of excreted amount of autofluorescence lipids in different neurological diseases.

Patient	O.D. per mg creatinine
NCL group	
Late Infantile type;	
Case 1	0.65
Case 2	0.54
Case 3	6.56
Juvenile type;	
Case 1	9.32
Case 2	0.98
Epilepsy	
Case 1	0.65
Case 2	0.10
Alzheimer disease	
Case 1	0.19
Control	
Case 1	0.10

Urinary lipids are dissolved in methanol and their autofluorescence were measured at 380 nm excitation and 440 nm emission. O.D. values are expressed as intensity of autofluorescence.

Fig. 1

CHROMATOGRAPHIC PROFILE OF DOLICHOLS FROM URINE: (CONTROL, NCL)



REFERENCE:

1) Armstrong, D., Domitt, S., and Van Wormer, D.E. (1974) Arch. Neurol. 30:144-152
2) Armstrong, D., Van Wormer, D.E., Nevile, H. Domitt, S., and Clingan, F. (1975) Arch. Pathol. 99:430-435
3) Armstrong, D., Wehling, C., and Van Wormer, D. (1977) Pathology 9:39-41
4) Baecque, C. (1975) N. Engl. J. Med. 292:1408
5) Dolman, C.L., McLeold, P.M., and Chang, E.C. (1980) Arch. Pathol. Lab. Med. 140:487-490
6) Elsner, B., and Prensky, A.L. (1969) Neurology 19:834-840
7) Joosten, E., Gabrels, F., and Stahouders, A. (1973) Neuropaediatrie 6:98-110
8) Martin, J.J., and Jacobs, K. (1973) Eur. Neurol. 10:281-291
9) Ng Ying Kin, N.M.K., and Wolfe, L.S. (1982) Pediatr. Res. 16:530-532
10) Wolfe, L.S., Ng Ying Kin, N.M.K., Baker, R.R., Carpenter, S., and Andermann, F. Science 195:1360-1362
11) Wolfe, L.S., Ng Ying Kin, N.M.K., Palo, J., andHaltia, M. (1983) Neurology 33:103-106

54 実験的神経原線維変化を生じた家兎脳およびアルツハイマー病脳におけるカテプシンD活性の変化と線維性蛋白質

武田雅俊・多田國利・播口之朗・西村　健
（阪大・医・精神科）

〔要　約〕

vinblastine脳内注入により神経原線維変化を生じた家兎脳内の、可溶性マイクロチュブル蛋白量と、脳内カテプシンD活性を測定し、さらに、アルツハイマー病剖検脳の6部位について、カテプシンD活性を測定し、対照健常脳と比較して以下の結果を得た。

（1）神経原線維変化を生じた動物脳では、可溶性マイクロチュブル蛋白は、重合・脱重合の反復により精製した場合も、硫安分画およびDEAEクロマトグラフィー法にて精製した場合にも同じ程度に減少していた。（2）神経原線維変化を生じた動物脳では、カテプシンD活性は、対照脳に比較して上昇していた。（3）カテプシンD分画は、脳内線維性蛋白であるマイクロチュブル蛋白、ニューロフィラメント蛋白を分解した。このカテプシンD活性はCaイオンの有無による影響を受けなかった。SDS電気泳動にて、カテプシンD作用後の線維性蛋白の変化を調べたが、いずれの場合にも分解産物と考えられる新しい蛋白バンドの出現は認められなかった。また、ニューロフィラメント蛋白にカテプシンD分画を作用させた時、ニューロフィラメント・トリプレットの各ペプチドは、一様に分解されたが、ニューロフィラメント精製時に伴なって精製されてくる50K蛋白は、ニューロフィラメント・トリプレットのバンドが消失してしまった後も残存していた。（4）アルツハイマー病剖検脳の6部位についてカテプシン活性は、健常人脳と比較していずれの部位においても高い値を示した。

Key words: cathepsin D / brain fibrous proteins / dementia

我々は、老年痴呆やアルツハイマー病などの脳において、線維性蛋白の代謝に著明な異常が生じていることを報告した[7]。今回、線維性蛋白の異常をさらに詳しく解明することを目的として、vinblastine脳内注入により実験的神経原線維変化を起こした家兎脳、およびアルツハイマー病剖検脳について、酸性プロテアーゼの一つであるカテプシンD(E.C.3.4.23.5)の活性を測定したところ、実験動物についてもヒト痴呆脳についても、対照脳に比べて高い活性を示すことを見出したので報告する。

（材料と方法）

1.実験的神経原線維変化の作製：成熟家兎(体重2.0－2.5Kg)の左大脳実質内にvinblastine(2mg/ml生食)0.1mlを注入し(対照脳には、生食水0.1mlの注入)、約48時間後に失調状態となった家兎を脱血、断頭し脳・脊髄を摘出した。神経原線維変化は、光顕(Bielshowsky法)、および電顕にて確認し、大脳から脊髄にいたる広範な領域に、直径10nmのニューロフィラメント様繊維の増生が証明された。

2.人剖検脳材料：アルツハイマー病脳は、死亡約5時間後の剖検にて得られた(61歳、女性、罹病期間約9年)脳で－80℃にて約3週間冷凍保存したものから前頭極.中心前回.上側頭回.上頭頂回.後頭極.海馬の6部位を切り出して用いた。対照人脳は、年齢を合わせたほぼ同条件の司法解剖例3例を用いた。

3.カテプシンD分画の調製：脳をMarksら[6]の方法に従い、10倍量の50mM citrate buffer(pH3.2), 0.2% Triton X－100を加え、ポリトロンにてホモジェナイズした後10,000xg、30分遠沈した。その上清を、硫安分画により、40－70%沈澱分画をとり、0.1M citrate buffer(pH3.5),1M NaClに溶かし、同液にたいして透析したものを、カテプシンD分画とした。

4.カテプシンD活性の測定：Serraら[8]の方法に従い、カテプシンD画分0.1mlを4mgの塩酸酸性にて変性させたヘモグロビンを基質として含んだ0.7mlの50mM citrate buffer(pH3.2),0.2%Triton X－100と共に加えて、40℃にてインキュベイトし、一定時間の後0.2mlの20%TCAを加えて遠沈し、そ

の上清中のアミノ酸残基をFolin－Lowry法にて定量し、カテプシンD活性を同等の発色を示すチロジン残基の量として表わした。

5.可溶性マイクロチュブル蛋白の精製： Jamesonら[5]の方法に基づき、重合・脱重合を3回繰り返して精製する方法(方法A)と、Eipperら[4]の方法に従って、硫安分画(35－50%)をDE52(Whatman)のカラムで分画精製する方法(方法B)との2通りの方法を用いた。

(結　果)

1．実験的神経原線維変化を生じた家兎脳の可溶性マイクロチュブル蛋白の減少

vinblastine脳内注入により失調状態を呈した家兎の脳ホモジェネイトの水溶性蛋白量は減少していた。また水溶性蛋白分画から方法Aと方法Bとの異なる方法で精製して得られたマイクロチュブル蛋白量は、それぞれ対照動物と比較して、同程度に減少していた(表　1)。

2．実験的神経原線維変化を生じた家兎脳のカテプシンD活性の上昇

vinblastine処置脳のカテプシンD活性を塩酸酸性にて変性させたヘモグロビンを基質として測定した。図1に示したように、vinblastine処置脳では対照脳と比べて高い活性を示した。それぞれのカテプシンD活性の至適pHは、図2に示したようにヘモグロビンに対しては、pH3.5であった。

3．マイクロチュブル蛋白、ニューロフィラメント蛋白を基質とした家兎脳カテプシンD活性

ヘモグロビンの代わりに牛脳マイクロチュブル蛋白を加えてカテプシンD活性を調べると、図3に示したようにマイクロチュブル蛋白を基質とした場合にも、vinblastine処置脳のほうがより高いカテプシンD活性を示した。このとき、カテプシンDの作用によって生じた分解産物をSDS電気泳動にて調べた。マイクロチュブル蛋白のバンドは明瞭に減少していたが、新たに生じた分解産物によると思われるバンドの出現は認められなかった。また、このときのカテプシンD活性は、EDT

TABLE 1 : Change of Soluble Proteins and Microtubule Protein in Vinblastine-treated Rabbit Brain

	n = 5 vinblastine (mg/g w.w.)	n = 5 control (mg/g w.w.)	ratio
soluble proteins	15.6±1.2*	18.2±2.6	0.86
microtubule (A)	1.09±.21*	1.47±.38	0.74
microtubule (B)	0.70±.12*	0.99±.16	0.71

(A) is obtained by cyclic polymerization/depolymerization
(B) is by ammonium sulfate precipitation & DEAE chromatography.
* $p < 0.05$

FIGURE 1
Cathepsin D activity of control and vinblastine-treated brain

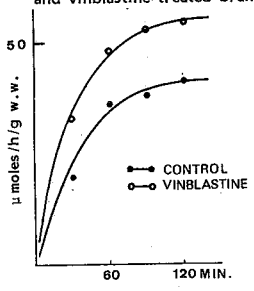


FIGURE 2
pH dependence of cathepsin D

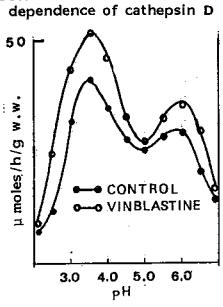


FIGURE 3
Cathepsin D activity from vinblastine-treated rabbit brain with microtubule and neurofilament proteins as substrates

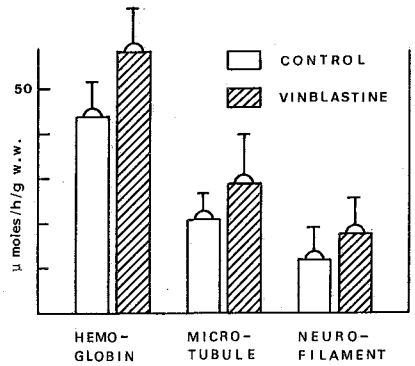
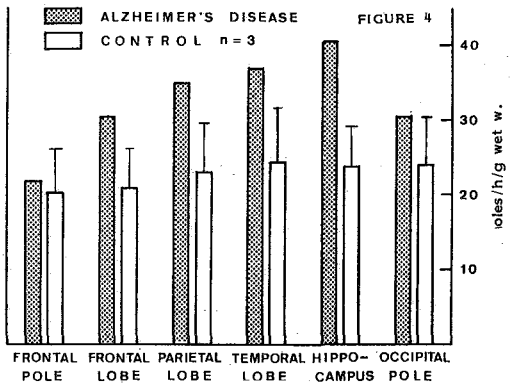


FIGURE 4



AあるいはCaCl₂の有無により影響を受けなかった。

ニューロフィラメント蛋白もカテプシンDの作用を受けることが示され、ニューロフィラメント蛋白を基質としたカテプシンD活性もvinblastine処置脳において対照脳より高値を示した(図3)。

ニューロフィラメント・トリプレット蛋白の分解産物をSDS電気泳動で調べると、ニューロフィラメント・トリプレットは、一様に分解されており、トリプレットペプチドの間には、カテプシンDの作用に対する差異は認められなかった。また、カテプシンDの作用により生じたと考えられる新しいバンドの出現も認められなかった。人脳ニューロフィラメント分画の精製に際しては、200K, 160K, 68Kのトリプレットと共に常に50K蛋白が伴なって精製されてくる。この50K蛋白バンドはカテプシンDの作用を受けず、6時間のインキュベイションで、ニューロフィラメント・トリプレットのバンドが完全に消失してしまった後も50Kバンドは残存していた。

4. アルツハイマー病剖検脳におけるカテプシンD活性の変化

アルツハイマー病剖検脳から得られた前頭極・中心前回・上側頭回・上頭頂回・後頭極・海馬の6部位についてカテプシンDの活性を測定し、対照健常人脳と比較した。図4に示したように、いずれの部位についてもアルツハイマー病剖検脳において、カテプシンD活性は、対照脳より高値を示した。

(考察)

酸性プロテアーゼであるカテプシンDは、従来、腎、肝、脳での存在が報告されているが、その至適pHが極端に酸性側に傾いていることや、その存在がlysozyme中とされていることなどから、その生体内での役割については明確な知見が少なかった。しかしながら、近年、カテプシンDがβ-リポトロピン、ソマトスタチン、サブスタンスP、ミエリン塩基性蛋白に作用することが報告され、カテプシンDの生物学的役割が注目され始めている。カテプシンDはプロテアーゼとして蛋白質を分解するだけでなく、肝臓においてDNA合成と細胞分裂を刺激するとの報告もある。今回、我々はvinblastine脳内注入により神経原線維変化を生じた家兎脳内およびアルツハイマー脳内でカテプシンDの活性が高まっていることを示したが、カテプシンDがどのような役割を果たしているのかは、現在のところ不明である。しかしながら、今回報告したように神経原線維変化形成時には、可溶性マイクロチュブル蛋白が減少していること、および、カテプシンDがマイクロチュブル蛋白やニューロフィラメント蛋白を分解することは、神経原線維変化が形成されるような病態においてカテプシンDが何等かの役割を果たしている可能性が示唆される。

<稿を終えるにあたり、貴重なアルツハイマー病気患者脳を提供していただきました兵庫医科大学精神神経科、三好功峰教授に感謝の意を表します。>

(文献) 1)E.Barat, A.Patthy, L.Graf(1979)Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76(12)6120 2)M.Benuck, N.Marks, G.Hasheim(1975)Eur.J.Biochem., 52, 615 3)M.Benuck, A.Grynbaum, N.Marks(1977)Brain Res., 147, 181 4)B.Eipper(1974)J.Biol.Chem., 249, 1378 5)L.Jameson, T.Frey, B.Zeeberg, F.Dalldorf, M.Caplow(1980)Biochem., 19, 2472 6)N.Marks, A.Lajtha(1965)Biochem.J., 97, 74 7)T.Nishimura, S.Hariguchi, K.Tada, M.Takeda(1983) in "Neuropsychiatric Disorders in the Elderly", Igaku-Shoin, 79 8)S.Serra, Grynhaum, A.Lajtha, N.Marks(1972)Brain Res., 44, 579

55 老年痴呆治療薬 pantoyl－GABA（ホモパントテン酸）によるコリン・アセチルトランスフェラーゼ活性の上昇および中枢アセチルコリン作働神経へのコリン取込の増加

中広全延・福地　勲・吉田　博
（阪大・医・Ⅰ薬理）

〔要　約〕

アルツハイマー病およびアルツハイマー型老年痴呆では、中枢アセチルコリン(ACh)作働性神経系の機能低下が推定されている。そこで我々は老年痴呆の治療薬として臨床応用されているpantoyl-GABAの、コリン取込およびACh合成酵素であるコリン・アセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性に対する影響を調べた。pantoyl-GABAは、その1mMを25mM K^+ 刺激時に反応液中に加える事により、ラット大脳皮質および海馬スライスへのコリン取込を増加させた。また、マウスにpantoyl-GABA 500 mg/kg i.p./day を連日1週間投与する事により大脳皮質および海馬のChAT活性は対照に比べて上昇した。今回用いた実験条件下ではコリンはACh作働性神経へ特異的に取込まれ、その取込はAChの放出を反映しAChの合成を調節していると考えられるから、pantoyl-GABAによるコリン取込の増加はこの薬物によるACh作働性神経におけるAChの代謝回転亢進を示していると推測できる。また、ChAT活性の上昇はその機序および意義は不明であるが、pantoyl-GABAによるAChの代謝回転の亢進と関係があるのではないかと想像される。

Key words：　pantoyl-GABA　　choline uptake　　choline acetyltransferase(ChAT)

アルツハイマー病およびアルツハイマー型老年痴呆では、アセチルコリン(ACh)の合成酵素であるコリン・アセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性の低下が報告されており、中枢ACh作働性神経系の機能低下が推定されている(10)。また、これらの疾患ではACh作働性神経へのコリン取込が減少している事が報告されている(8,9)。そこで我々は老年痴呆の治療薬として使用されているpantoyl-GABA(ホモパントテン酸)のコリン取込およびChAT活性への作用を調べた。

〔方法〕

1)コリン取込実験

ラット(120-150g)の大脳皮質および海馬のスライス(厚さ 350μm)を、95% O_2－5% CO_2 で通気しているKrebs-Ringer液中で 37°C 60分間 incubationした。K^+ 刺激するものは後半の30分間 K^+ 濃度を25mMに上昇させてincubationした。pantoyl-GABAはincubation 開始から60分間溶液中に加えた。この後、スライスを 1μM [^{3}H]cholineを含んだ溶液中で5分間 incubationし、取り込まれた ^{3}H 量を測定した。さらに、スライスの蛋白量を測定し単位蛋白量当たりのコリン取込を算出した。

2) ChAT活性測定

マウス(20-25g)にpantoyl-GABA 500 mg/kg i.p./day を1回のみ、または、各々 3、5、7、14日間連日投与した後、大脳皮質、海馬および線条体のChAT活性をFonnumが報告している方法(2)により測定した。投与期間によるChAT活性の変化の測定には、choline 8mM, acetyl-CoA 0.2mM を用いた。Vmax および Km 値の測

図.1 pantoyl-GABA(P-GABA)の大脳皮質および海馬へのコリン取込に対する作用

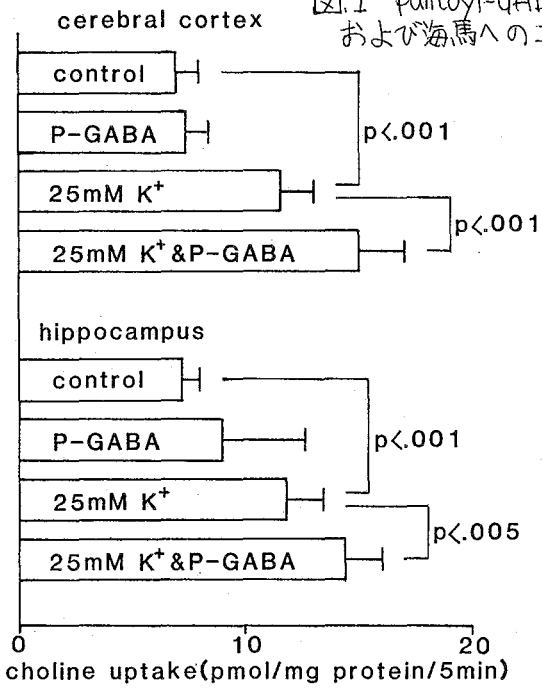


図.2-4においては
pantoyl-GABA　* p<0.01
control　** p<0.001

図.2 pantoyl-GABA長期投与の大脳皮質ChAT活性への影響

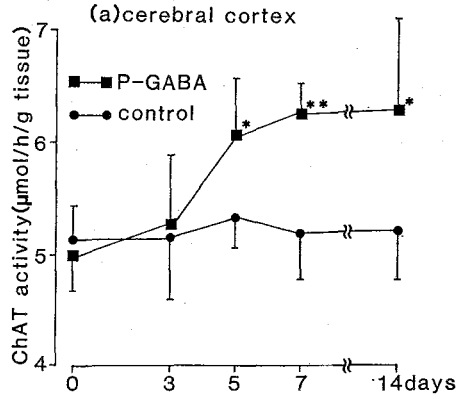


図.3 pantoyl-GABA長期投与の海馬ChAT活性への影響

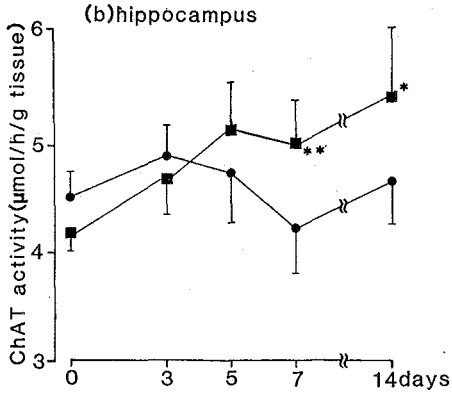


図.4 pantoyl-GABA長期投与の線条体ChAT活性への影響

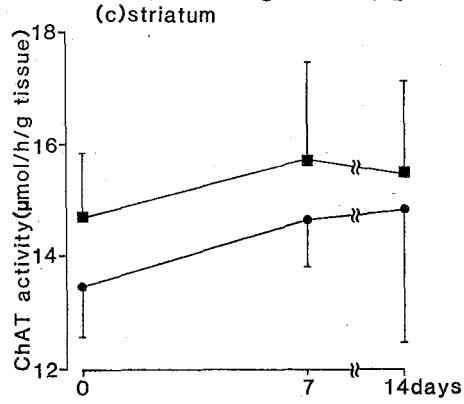


表.1 pantoyl-GABA長期投与の大脳皮質・海馬におけるChATのVmax・Km値への影響

	Vmax (μmol/hr/g tissue)	Km (μM) choline	Km (μM) acetyl-CoA
Cerebral Cortex			
P-GABA	8.18 ± 0.76*	443 ± 66	57.6 ± 6.2
Control	6.81 ± 0.46	431 ± 72	52.0 ± 5.5
Hippocampus			
P-GABA	6.99 ± 0.32*	439 ± 31	49.6 ± 6.6
Control	6.28 ± 0.30	442 ± 25	46.8 ± 5.6

* p<0.01

定にはpantoyl-GABAを7日間投与したマウスを用い、cholineに対するKm値の測定にはacetyl-CoAを0.8mMに固定しcholineの濃度を変化させ、acetyl-CoAのKm値の測定にはcholineを8mMに固定しacetyl-CoAの濃度を変化させて行なった。

〔結果〕

大脳皮質および海馬のスライスを25mM K^+で刺激しておくとコリン取込は対照に比べて有意に上昇し、pantoyl-GABA 1mMをK^+刺激時に加えておくとコリン取込はさらに上昇した(図.1)。pantoyl-GABAのみでは対照と有意な差はなかった。また、pantoyl-GABA 500 mg/kg i.p./dayを大脳皮質では5日間以上、海馬では7日間以上連日投与する事により、各々の部位のChAT活性は対照に比べて有意に上昇した(図2,3)。ChAT活性は7日間で最大に達し、14日間投与にてもより以上の上昇は見られなかった。線条体では14日間まで対照と有意な差はなかった(図.4)。また、大脳皮質および海馬におけるChAT活性の上昇は、Vmaxの増加によるもので cholineおよびacetyl-CoAに対するKm値には変化なかった(表.1)。

〔考察〕

今回実験に用いたコリン濃度(1mM)の範囲内では、コリンはACh作働性神経に特異的に取り込まれる事が示されており(5)、また この特異的コリン取込は、ACh放出の増加に伴いその結果として上昇する事が報告されている(6)。pantoyl-GABAを25mM K^+刺激時に存在させるとK^+刺激のみより大脳皮質および海馬へのコリン取込が増加する事より、pantoyl-GABAはこれらの部位からのACh放出を増加させたと考えられる。既に我々はpantoyl-GABAがラット大脳皮質および海馬スライスから25mM K^+刺激時にACh放出を増加させる事を報告している(7)が、今回の実験結果はこれとよく一致する。またこのコリン取込はACh合成の律速段階であると考えられる(3,4)から、pantoyl-GABAはAChの合成も促進している事が推測される。ゆえに、pantoyl-GABAはこれらの脳部位のACh代謝回転を亢進させていると言える。また、アルツハイマー病およびアルツハイマー型老年痴呆ではACh作働性神経へのコリン取込が減少している事が報告されている(8,9)が、これら疾患の患者脳においてもpantoyl-GABAがコリン取込を増加させているならば治療上有意義であると考えられる。pantoyl-GABA長期投与によるChAT活性上昇は、Km値に変化なくVmax値の上昇によるものであるからChATの量的な増加が推測される。またアルツハイマー病およびアルツハイマー型老年痴呆ではBasal Forebrainから大脳皮質および海馬へ投射するACh作働性神経系の関与が想定されている(1,11)ので、pantoyl-GABAが線条体ではChAT活性を上昇させず大脳皮質および海馬において上昇させる事はたいへん興味深い。

(1) Coyle, J.T., Price D.L. and Delong, M.R. (1983) Science 219, 1184-1190 (2) Fonnum F. (1975) J. Neurochem. 24, 407-409 (3) Haubrich, D.R. and Chippendale, T.J. (1977) Life Sciences 20, 1465-1478 (4) Kuhar, M.J. and Murrin, L.C. (1978) J. Neurochem. 30, 15-21 (5) Kuhar, M.J., Sethy, V.H., Roth, R.H. and Aghajanian, G.K. (1973) J. Neurochem. 20, 581-593 (6) Marchbanks, R.M. and Wannacott, S. (1979) Progress in Brain Research 49, 77-88 (7) 中丞全延,藤田典久,斉藤喜八,西村健,吉田博(1983)神経化学 22, 183-185 (8) Rylett, R.J., Ball, M.J. and Colhoun, E.H. (1983) Brain Research 289, 169-175 (9) Sims, N.R., Bowen, D.M., Allen, S.J., Smith, C.C.T., Neary, D., Thomas, D.J. and Davison, A.N. (1983) J. Neurochem. 40, 503-509 (10) Terry, R.D. and Davies, P. (1980 Ann. Rev. Neurosci. 3, 77-95 (11) Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark A.W., Coyle, J.T. and Delong, M.R. (1982) Science 215, 1237-1239

56 感情病，精神分裂病における血漿遊離MHPG，デキサメサゾン抑制試験，血清CPK

曽良一郎・西紋孝一・藤原　豊・原田俊樹・
佐藤光源・大月三郎

（岡山大・医・神経精神科）

〔要　約〕

感情病，精神分裂病で，視床下部－下垂体－副腎皮質系機能（ＨＰＡ），中枢，末梢交感神経の変動とその相互関連を検討するために，デキサメサゾン抑制試験（ＤＳＴ），血漿遊離3-methoxy-4-hydroxyphenel-glycol（ＭＨＰＧ），血清creatine phosphokinase（ＣＰＫ）測定を行ない，これらと病態，症状の関連をみた。

うつ病でＨＰＡの機能亢進が認められている。また，中枢性ノルエピネフリン（ＮＥ）機能の減弱でＨＰＡは機能亢進すると言われている。今回，感情病ではＤＳＴ後値が年齢との間に有意な正の相関，精神分裂病では逆相関を認めた。これは，両疾患の好発年齢に一致した傾向である。中枢性ＮＥ機能の減弱でＨＰＡ機能が亢進するという報告があるので，両疾患における中枢性ＮＥ機能の反映である可能性がある。血漿遊離ＭＨＰＧの高値は，うつ病中核症状との間に高い相関があり，精神分裂病でも抑うつ関連症状との相関を認めた。中枢性ＮＥ機能の低下が末梢性ＮＥ機能の亢進をもたらすという報告から，ＤＳＴの結果と共通性をもつ所見である。血清ＣＰＫは分裂病急性期の興奮状態で高値を示し，うつ病では正常範囲の値を示した。
分裂病性興奮では，中枢性ＮＥ機能の部分的亢進が推定される。

Key words： Plasma Free MHPG, DST, Serum CPK

感情病，精神分裂病など機能性精神病において，視床下部－下垂体－副腎皮質系機能（ＨＰＡ機能），中枢ならびに末梢性交感神経機能の変動とその相互関連が注目されている。臨床的に測定可能な生物学的指標としては，デキサメサゾン抑制試験（ＤＳＴ），血漿遊離3-methoxy-4-hydroxyphenelglycol（ＭＨＰＧ），血清creatine phosphokinase（ＣＰＫ）がある。これらの指標と病態ならびに症状との関連を検討した結果を報告する。　［対象と方法］　対象は，Research Diagnostic Criteriaによる分裂病23例，分裂感情病2例，躁病2例，大うつ病11例，小うつ病3例及び正常対照群11例であり，本研究の趣旨を説明し，協力の同意を得た。ＤＳＴと年齢との関係についてはＤＳＭ Ⅲ診断による感情病92例，分裂病133例を対象とした。
原則として，急性期と回復期の2回の検査を同一対象に行なった。
感情病は抗うつ薬，分裂病は抗精神病薬を，全例服用中であった。
早朝空腹時に血漿遊離ＭＨＰＧ，血清ＣＰＫの採血を行ない，同日午後4時にＤＳＴ前値の採血を行ない，午後10時にデキサメサゾン1mgを経口投与した。翌日午後4時にＤＳＴ後値の採血を行なった。検体は採血，血漿血清分離後，－80℃で測定まで保存した。臨床症状調査は，原則としてＭＨＰＧ採血の日に臨床経験3年以上の2人の臨床医が行ない，分裂病群は，Brief Psychiatric Rating Scale（ＢＰＲＳ），感情障害群は，Hamilton Depressive Rating Scale（ＨＤＲＳ）を用いた。血漿遊離ＭＨＰＧは，電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーで測定した。前処理はｐＨＢＡ（p Hydroxy benzyl alcohol）を内部標準とし，酢酸エチル抽出法を用いた。Cortisolは Radioimmunoassay法，血清ＣＰＫはオリバー変法，ＮＡＤＨ　Rate Assayを用いて測定した。統計処理はＳＰＳＳ（Statistical Package for Social Science）9版を使用した。
［結果］　(1) 背景因子との関連　性差は全疾患でみると血漿遊離ＭＨＰＧ，ＤＳＴ前値，後値でなかった。血清ＣＰＫのみ男性が有意に高値であった。年齢と血漿遊離ＭＨＰＧ，ＤＳＴ前値，血清ＣＰＫとの相関は全疾患群，分裂病群，大うつ病群いずれにおいてもなかった。しかしＤＳＴ後値はFig 1のように感情病92症例で年齢と有意な相関を示し，Fig 2のように分裂病133症例では有意な相関を示した。これを年齢階級別にみると，ＤＳＴ後値は20歳台で分裂病が有意に高く，50歳台，60歳台では逆に感情病が有意に高かった。
(2) 病期疾患別の結果　Tableのごとく急性期において，血漿遊離ＭＨＰＧは各疾患群の間に有意差傾向があり（ＡＮＯＶＡ），大うつ病は分裂病，正常対照群よりも有意に高かった。血清ＣＰＫは分裂病急性期に高値の

傾向がある。

ＤＳＴ前値，後値については，疾患別では差がない。血漿遊離ＭＨＰＧは大うつ病で回復期は急性期にくらべて有意に減少していた。分裂病でも，同一対象でくらべると，有意な減少となっていた。

(3) 臨床症状との関連

大うつ病でのＨＤＲＳの各項目と血漿遊離ＭＨＰＧの関係をSpearmanの順位相関でみると，抑うつ気分，行動制止，自殺念慮等のうつ病中核症状と強い相関を示した。精神的不安，身体的不安も強い相関を示した。ＤＳＴ後値もうつ病中核症状と相関がみられた。ＤＳＴ前値，血清ＣＰＫについては，ほとんどの項目で相関がみられなかった。一方，分裂病では，ＢＰＲＳの不安，罪業感，抑うつ気分，敵意など，抑うつ症状と有意な相関がみられた。血清ＣＰＫは興奮と衒奇症状と有意な相関を示した。

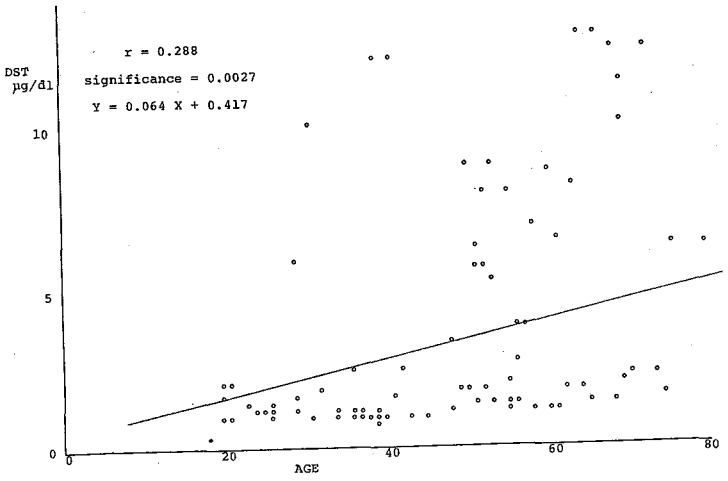


Figure 1, After Dexasamesazone cortisol and Age in Affective Disorder

［考察］　うつ病において，ＨＰＡの機能亢進があり，コーチゾール分泌過剰，ＤＳＴにおける抑制減退のある症例が比較的高頻度に認められている。ＨＰＡは中枢性ノルエピネフリン機能と関係し，ノルエピネフリン機能減弱で，ＨＰＡは機能亢進するとされている[5]。また，中枢性ノルエピネフリン活動は末梢性交感神経機能を抑制しているので[3]，中枢性ノルエピネフリン機能の減弱は，末梢性ノルエピネフリンあるいはその代謝物質であるＭＨＰＧを増加させる可能性が推定されている。

本研究において，感情面では，ＤＳＴ後値が年齢との間に有意な正の相関をみたことは，中枢性ノルエピネフリン機能の低下が，年齢とともに進むことを示唆するものである。うつ病が加齢とともに頻度を増すとともに難治性を示すことと何らかの関連を有するであろう。精神分裂病では年齢とＤＳＴ後値との間に逆相関が認められ，好発年齢と一致する傾向を示した。

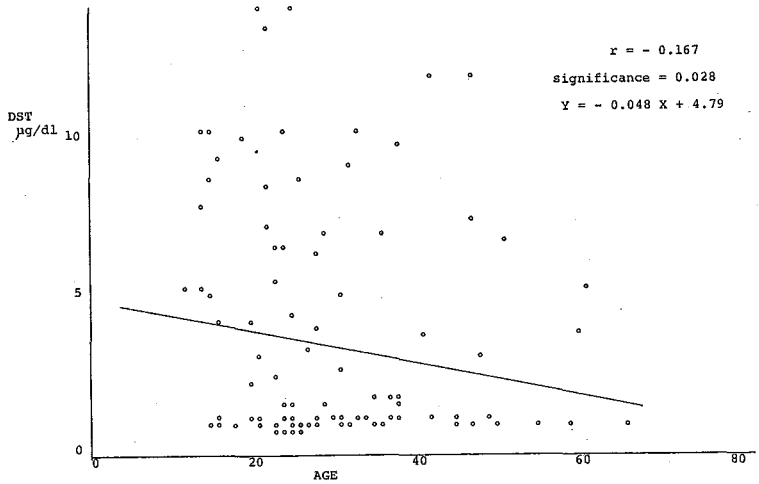


Figure 2, After Dexasamesazone cortisol and Age in Schizophrenia

血漿ＭＨＰＧは中枢性ノルエピネフリン代謝を部分的に反映するとされているが，末梢性ノルエピネフリン代謝の関与も大である。血漿遊離ＭＨＰＧの高値とうつ病中核症状との間に高い相関があり，また，精神分裂病の症状のうちでも，抑うつ関連症状との間に相関を示した。われわれは，すでに，うつ病においてＤＳＴ陽性者に血漿ノルエピネフリン高値を示すことを報告している[2]。これより，うつ病では末梢性ノルエピネフリン機能の亢進が起こっていることを示唆する。血清ＣＰＫは精神分裂病などの急性期興奮状態の時期に増大することが知

られており，今回も分裂病の急性期では高値の傾向を示し，興奮，衒奇症状と相関を認めた。
実験的に視床下部交感神経領域の電気刺激により血清ＣＰＫが上昇するという報告があり[4]，分裂病性興奮では中枢性ノルエピネフリン活動が部位によっては亢進している可能性が推定される。

以上のことよりＨＰＡ機能，中枢性，末梢性ノルエピネフリン機能は感情病，精神分裂病で症状による共通性と疾患別による差異がともに存在することが認められた。

Table , Diagnostic Difference of Plasma Free MHPG,Serum CPK in Acute and Recovered phase

Diagnosis	Free MHPG in acute phase	#	Free MHPG in recovered	CPK in acute phase	CPK in recovered phase
Sc	6.35 ± 0.56 (23)	#	4.77 ± 0.58 (16)	176.8 ± 50.2 (23)	73.8 ± 12.6 (16)
Schizo-Affective	9.38 (2)		7.14 (2)	70.5 (2)	99.5 (2)
Manic-Disorder	7.60 (2)		10.13 (1)	157.5 (2)	165.0 (1)
Major Depression	8.47 ± 0.85 (11)	**	3.94 ± 0.40 (10)	45.8 ± 4.8 (11)	56.0 ± 7.6 (10)
Minor Depression	5.86 (2)		5.71 ± 2.03 (3)	53.0 ± 14.0 (3)	51.3 ± 13.3 (3)
Normal control	5.38 ± 0.39 (11)				

MHPG ; Mean ± S.E.(ng/ml)　CPK ; Mean ± S.E. (IU/dl)
P=0.06　* P < 0.05　** P=0.001 ,
Sc ; Schizophrenia

［文献］

1) J. W., Mass (1983) "MHPG : Basic Mechanisms and Psycho-pathology"　Academic Press

2) 西紋孝一 他（1984） 精神薬療基金年報 第15集：256−262

3) Scriabine A. et al (1976) Annu. Rev. Physiol. 16 ; 113-123

4) 植田啓嗣 他（1977） 臨床神経 17：506

5) Weiner R. I., Ganong W. F. (1978) Physiol. Rev. 58 ; 905-976

57 ヒト及び白鼠急性脳炎感染脳におけるコレステロールエステルについて

小川希代子・阿部敏明・浦山久美子・平岩幹男
（帝京大・医・小児科）

〔要　約〕

脳組織のコレステロールエステルについて (1)急性ウィルス脳炎を含む種々の疾患脳，(2)実験的ウィルス脳炎動物の感染脳，(3)脳組織切片と血液成分とをインキュベートした組織，のコレステロールエステル含量．及び脂肪酸組成を検討した。

ヒト疾患脳では．シルダー病等の慢性疾患に加え 急性ウィルス脳炎であるヘルペス脳炎．日本脳炎で顕著な増加を示した。脂肪酸組成は C16-0, C18-1が多かった。

実験的ウィルス脳炎のうち．ヘルペスではコレステロールエステルの増加は認められなかったが．麻疹では著しい増加を示した(エステル比 約10～30%)。脂肪酸組成は．C16-0, C18-0, C18-1 が主成分であり．血清中コレステロールエステルの脂肪酸とは全く異なっていた。脳切片を血漿とインキュベートすると．コレステロールエステルは増加傾向を示したが．やはり血漿中コレステロールエステルの脂肪酸組成とは全く異なっていた。

Key words : Cholesterol esters, Acute encephalitis, Fatty acids

脱髄を伴なう慢性疾患において、脳白質中のコレステロールエステル含量が顕著に増加する事が認められているが(1)、このコレステロールエステル出現の機序については不明な点が多い。脱髄時に現われるコレステロールエステルは．血清中のそれと異なる脂肪酸組成比を示し、むしろ正常脳組織に微量成分として存在するコレステロールエステルの脂肪酸組成比に近い為、脳組織中で産成される可能性が指摘されている(2)。筆者らは．これまでにウィルス脳炎感染脳を含む種々の疾患の神経系組織の生化学的分析を行なってきたが．急性ウィルス脳炎等でもコレステロールエステルが現われる事を認めた(3)。本研究では 脳内コレステロールエステル出現機序を明らかにする為、実験的ウィルス脳炎動物の脳組織の分析，及び脳組織切片と血液成分とのインキュベーションによる組織中コレステロールエステルの分析等の基礎的検討を行なった。

[方法] 1.材料 (a) ヒト脳：ヘルペス脳炎、日本脳炎．SSPE．ALD．抗癌剤使用による白質変性症の患者より得た脳は．灰白質．白質に分けて脂質分析に供した。(b) 実験的ウィルス脳炎：I 麻疹脳炎ラット，Wistar系ラットの脳内(左側)に．麻疹ウィルス(CAMR/40 strain, $TCID_{50}=10^7$)を投与し、脳炎発症後．大脳を採取し分析に用いた。II ヘルペス脳炎マウス；DDDマウス脳内マは下唇にHSV(type I, Tomioka strain, 1×10^9 pfu/ml)を投与し発症させた。(c) 脳組織切片のインキュベーション：ウィスター系ラット脳slice(0.5mg)をTyrode溶液中(11mM Glc含有)．ラット血漿を加え37°C，1～12hr．インキュベートした。遠心、洗浄

脳の組織を分析に供した。

2、コレステロールエステルの分離：　脂質は組織を20倍量クロロホルム/メタノール(2:1,V/V)にて抽出し、得られた総脂質から stepwise 溶出のケイ酸カラムクロマトグラフィーによって複合脂質を除き、単純脂質分画を得た。更に調整用TLCにより、コレステロールエステルを精製した。

3、分析 (a) ガスクロマトグラフィー：試料は3% HCl-CH3OH 中、100℃、2時間メタノリシス後、脂肪酸メチルエステルをヘキサンで抽出した。カラムは、10% EGSS-X (Gaschrom Q)を用いて195℃(恒温)で分析した。

(b) 総コレステロールの定量は Zlatkis の方法(4)に従い、コレステロールに対するコレステロールエステルの比は、TLCデンシトメトリーにより求めた。

(c) TLCの展開溶媒は、石油エーテル/エーテル/酢酸(80/20/1, 90/10/1, by volume)を用いた。

[結果及び考察]

1、ヒト疾患脳コレステロールエステル　　表1に急性ウィルス性脳炎を含む種々の疾患から得たヒト脳組織のコレステロールエステル含量を示したが、コレステロールに対するエステル比は、脳内部位により広い分布を示した(10－65%)。ALD等慢性疾患に加え、急性のヘルペス脳炎、日本脳炎でも多量のコレステロールエステルが出現し、白質に限らず灰白質においてもコレステロールエステルが増加していた。各々の組織より得たコレステロールエステルの脂肪酸構成比は、C16, C18が多く、リノレン酸、アラキドン酸は少なかった。

2、実験的急性ウィルス脳炎

実験的に麻疹ウィルスにより脳炎をおこした脳炎においても、コレステロールエステルは顕著に増加し、エステル比は10～33%であった(表2)。脂肪酸組成比(表3)は、ヒト疾患脳と同様にC16、C18が多く、正常脳(ラット)のコレステロールエステル(5)と同様な傾向を示した。

一方、マウスヘルペスウィルス性脳炎の場合は、脳内のコレステロールエステルの増加は認められなかった。麻疹、ヘルペス共に急性脳炎であるが、コレステロールエステルの有無の違いは、両者の脳炎発症機序の差によるものかもしれない。

3、脳組織切片と血漿とのインキュベーション

脳炎発症時のコレステロールエステルの増加には、炎症時の血液流入

Table 1. Contents and fatty acid composition of cholesterol esters from human diseased brains.

	Herpes encephalitis (bleeding)		Japanese encephalitis	Leuco-dystrophy		Adreno-leuco-dystrophy	Subacute sclerosing panence-phalitis	normal	
	GM	WM	GM	WM	WM	WM	GM	GM	WM
total cholesterol*	17	26	17	22	17	18	12	22	28
free	13	21	15	8	8	13	9	22	28
esters	4	5	2	14	9	5	3	0	0
fatty acids**							nd	-	-
14:0	4	4	7	2	2	4			
16:0	33	34	28	18	18	22			
16:1	11	16	8	10	9	8			
18:0	14	12	14	6	16	6			
18:1	22	23	30	59	50	27			
18:2	5	5	7	2	2	2			
20:4	4	1	7	4	3	5			
24	-	-	-	-	-	21			

*Values were expressed as % of total lipids.
**Values were expressed as % of total fatty acids.

Table 2 Contents of cholesterolesters in normal and measles encephalitis-infected central nervous system tissues.

	Infected						Control			
Cerrebrum*	1L	1R	2L	2R	3L	3R	4L	4R	1L	1R	2L	2R
Total cholesterol**	12.7	15.3	10.7	9.1	11.3	12.0	9.7	10.6	12.1	11.8	9.3	10.7
free	8.6	11.2	8.7	7.2	9.2	10.9	8.8	9.3	12.1	11.8	9.3	10.7
ester	4.1	4.1	2.0	1.9	2.1	1.1	0.9	1.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* Experiments 1-4(infected) and 1-2(control) indicate separate exparaments with and without measles virus, respetively; L and R, left and right hemispheres.
** Values are expressed as percentages of total lipids.

5

Table 3 Fatty acid composition of cholesterol esters of rat brain with measles encephalitis

	Cerebrum			Serum
	1L*	1R	2:L+R	
14-0	6.1	2.0	10.3	tr
16:1	43.3	50.1	45.1	9.2
16:1	3.8	15.0	12.1	2.8
18:0	25.0	9.9	10.2	tr
18:1	21.4	17.9	17.6	8.0
18:2	tr	tr	tr	20.9
20:4	tr	tr	tr	56.8

Values are expressed as percentages of total fattyacids.
L and R, left and right hemispheres; tr, trace
* Experiments 1 and 2 indicate separate experiments with measles virus infection.

Table 4 Fatty acid composition of cholesterolesters from tissue slice incubation with plasma

cholesterolester	incubation		plasma
	ppt	sup	
14:0	4.8	tr	3.6
16:0	31.6	21.2	27.3
16:1	19.3	9.6	8.0
18:0	8.5	4.6	11.3
18:1	20.7	15.5	13.3
18:2	10.1	21.9	15.7
20:4	7.2	27.2	20.6

Values ae expressed as percentages of toal fatty acids.

による血清成分の混入が考えられるので．ラット脳組織を血漿とインキュベートしてその影響を検討した。ラット脳組織切片のインキュベートにより組織中コレステロールエステルは増加傾向を示した。この傾向は．添加血漿の増量．インキュベーション時間の長短等現在の実験条件下では大きく変動しなかった。インキュベート中．グルコースを添加しないと脂肪酸メチルエステルが増量してくるが(6)、コレステロールエステルについては顕著な増減は確認できなかった。血漿とインキュベートした脳組織中のコレステルの脂肪酸組成比(表4)は．C16，C18が多く．C18-2．C20-4が少なかった。血漿中コレステロールエステルの脂肪酸構成は．そのインキュベーションによって大きな変化がなく．C18-2．C20-4 が主成分であった。インキュベートした脳組織中のコレステロールエステルについての血漿成分による影響は少ないと考えられる。

種々の疾患脳でコレステロールエステルの増加が報告されており(1-7)、それが白質にみられる場合．ミエリンの崩壊がその出現と関係すると考えられている。灰白質については Creutzfeldt-Jakob 病(8)等で報告があるが．その由来は明らかでない。Ramsy らは脱髄脳の細胞下分画によりコレステロールエステルは floating layer又は可溶性画分に回収され．floating layer の形成のなかった正常脳．脳腫瘍とは存在形態が違うと推察している(2)。コレステロールエステル生成の担い手として マクロファージ等貪食細胞も推定されている(9)。本研究で示したウィルス性脳炎は．急性炎症であり．慢性．亜急性の場合の生成機構と異なる可能性もある。実験的ウィルス脳炎である麻疹．日脳ラット．ヘルペスマウスは共に激しい神経症状を伴なうが．コレステロールエステルの増加は．麻疹と日脳で観察されヘルペスでは認められなかった。麻疹ラットの脳炎症部位の光顕標本からは perivasular cuff が観察され．ヘルペスでは認められないので この様な違いが脂質変化と関係しているとも考えられる。

References

(1) Gestl B.L. et al,Arch.Neurol. 15, 603-614(1966)
(2) Ramsy R.B. et al J.Lipid Res. 15, 249-255(1974)
(3) Abe T. et al J.Neurochem. 41,281-283(1983)
(4) Zak B. Am.J.Clin.Pathol. 27, 583-588(1957)
(5) Eto Y.et al J.Neurochem. 19, 109-115(1972)
(6) Giusto N.M. et al Neurochem.Pathol. 1, 17-42(1983)
(7) Norton W.T. et al J.Neuropathol.Exp.Neurol. 25,582-597(1966)
(8) Tamai Y. et al J.Neurol.Sci., 35, 59-76(1978)
(9) Trotter J. et al, Exp.Prog.Clin.Biochem.Res.146,55-56(1984)

58 脳ミクロソームにおけるArahidoyl−CoA及びBehenoyl−CoA鎖長伸長反応の性質

吉田　敏・竹下正純
（大分医大・生化）

〔要　約〕

ブタ脳ミクロソームのC20:0-CoA鎖長伸長反応において，Radio gas chromatography によりその生成物を調べると，22:0以外に24:0も同程度に生成していた。さらに，内部基質の伸長の結果，18:0，18:1，22:4，24:4も生成していた。20:0-CoAの伸長によって生成した22:0と24:0の生成量の時間依存性，基質濃度依存性，pH依存性を詳細に検討した。24:0の生成量は，短い反応時間内にも22:0の量よりも多く，また基質（20:0-CoA）量の少ない状態でも，24:0が，22:0の量よりも多かった。また，22:0と24:0の生成の至適pHにも差があった。これらのことから，22:0と24:0の生成には，同じ基質を使っていても，異なる酵素系が関与している可能性があり，1) C20:0→C22:0　と　2) C20:0→(C22:0)→C24:0という独立した経路を考えた。一方，22:0-CoAを基質として使った場合，24:0の生成は，ほとんど検出できなかった。この反応を，幼若なブタ脳と，ラット脳について調べた所，程度の差はあるものの，いずれの場合も，20:0-CoAを基質に使った方が，22:0-CoAを使うより24:0の生成量が多かった。また，NADPHやNADHの要求性も，種間及び加令によって異なることが判明した。

Key words : Arachidoyl-CoA, Fatty acid elongation, Brain microsomes.

長鎖飽和脂肪酸は，ガラクトリピドの主要構成成分であるが，脳ミクロソームにおけるそれらの脂肪酸の合成には，少くとも2つの系があることが知られている。(1,2,3) 特にC20以上の脂肪酸の鎖長伸長活性が，ミエリン形成不全マウスに欠損していることから(2)，20:0-CoA伸長反応の性質と，その調節機構の研究は，ミエリン合成の機序を知る上で重要である。昨年の本学会等で(3,4,5)鎖長によってNADPHとNADH依存性が異なる事，及び，脳ミクロソームに特徴的な電子伝達系が存在することを報告したが，さらに，20:0-CoAや，20:4-CoAの伸長活性が脳において高く見られることや，飽和鎖と不飽和鎖では，NADPH依存性還元酵素の性状が異なることを明らかにした(6,7,8)。一方これまでラットやマウスにおける脳ミクロソームの脂肪酸伸長活性のNADPHやNADH依存性を調べた仕事では，C20以上の鎖長伸長に関してNADHは有効でない事が報告されたが，ブタ脳においては，NADHでもかなり有効であった(6)。今回は20:0-CoAの伸長反応を詳細に調べ，また，ラットと幼若ブタの脳ミクロソームの活性についても，ピリジンヌクレオチド依存性を調べたので報告する。

〔実験方法〕

(a)生後5~6ヶ月の通常のブタ脳ミクロソームの調整は，前に報告した方法(8)によった。幼若ブタは，正常なもので，食肉衛生検査所（大分）より入手し，生後4日間飼食した後，瀉血し，大脳を摘出した。生後23日目ラット脳ミクロソームも同様の方法で調整した。(3)

(b)脂肪酸組成と，鎖長伸長酵素活性の測定は，ラジオガスクロマト装置を用いFIDによる検出も同時に行なった。カラムは，10 % EGSS-X で Gaschrom P を担体として使用し，

カラム温度200°C, Heガス流量 50cm³/min で. Packard Model 894 でカウントした。標準反応組成は, 28.4 μM [2-^{14}C] malonyl CoA (4.3μCi/ mol), 40 μM acyl CoA, 500 μM NADPH or NADH, 0.1 M Pi (pH 7.4), 5 mg/ml BSA, 0.8 mM ATP, 1 mM $MgCl_2$, 1.5 mg microsomes である。メチルエステル化は, (3)で報告した方法によった。

〔結果と考察〕

20:0-CoAを外から加え, 鎖長伸長反応を成熟ブタ脳ミクロソームで調べた結果を, Fig.1に示した。20:0-CoAからは, 22:0 と24:0が出現しており, 18:0, 18:1, 22:4, 24:4 は, 内部基質から生じている。ここでは, NADPHを還元基質として用いた。Fig.2には, 20:0-CoA を基質として用いた時出現した22:0 と 24:0の生成量の時間依存性を示す。24:0は反応時間3分以内でも22:0の量よりも多かった。このパターンは, シュミレーションの結果, 20:0→22:0→24:0と反応が進み22:0

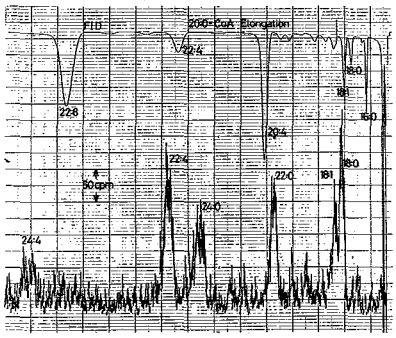


Fig.1. The radio activity and FID pattern of elongation products of 20:0-CoA and endogenous substrates.

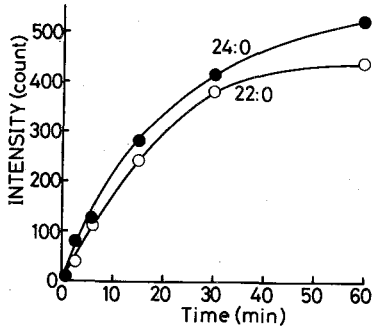


Fig.2. Time dependence of the synthesis of 22:0 and 24:0 from 20:0-CoA.

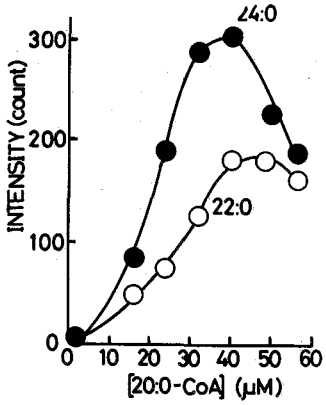


Fig.3. Substrate concentration dependence of the synthesis of 22:0 and 24:0 from 20:0-CoA.

は, 反応中間体として検出されていると考えては説明できなかった。この現象は, 1) 20:0→22:0 と, 2) 20:0→(22:0)→24:0 という2つの独立した反応を考えると説明可能であり, 2)の反応では, 22:0 の量が検出できない程 (22:0)→24:0 の反応が速いと考えられる。一方, Fig.3で示したように 20:0-CoA の濃度依存性を調べた時, sigmoidalな上昇カーブを示したが, やはり24:0の量が22:0の生成量を上回っていた。20:0-CoAが40μM 付近で最大活性を示した。またpH依存性を調べた結果, 22:0 生成の至適pH は 7.6 付近にあるが, 24:0 のそれは, 7.0 付近にあり, 明らかなずれが認められた。

22:0-CoAを基質に用いた場合, この成熟ブタでは, 24:0の生成はほとんど検出できなかった。なお, 24:0のがスクロマト上でのピークは同じ EGSS-Xでも, Lot.No. によって22:4のピークと重なることがあり, 見えにくくなることがあるが, 今回は明瞭に分離できている。以上のことより, ブタ脳ミクロソームにおけ

Table 1. NADH- and NADPH-dependent elongations and their differences among rat, new born pig and adult pig.

	$A^{3)}_{NADH}/A^{3)}_{NADPH}$ (%)		
	Adult pig[4)]	New born pig[5)]	Rat[6)]
C22:0[1)]	106	73	40
C24:0[1)]	145	69	43
C18:0[2)]	91	30	21
C22:4[2)]	55	27	≤5

1), elongated from C20:0-CoA. 2), elongated from endogenous substrates. 3), elongation activity obtained upon using 500 μM NADH or NADPH. 4), 5 to 6-months old. 5), 4-days old. 6) 23-days old.

Table 2. Differences in lignoceric acid synthesis when using C22:0-CoA and C20:0-CoA as substrates.

	$A^{1)}_{22:0\rightarrow 24:0}/A^{1)}_{20:0\rightarrow 24:0}$ (%)
Adult pig	≤5
New born pig	33
Rat	62

1), elongation activity of C22:0-CoA or C20:0-CoA to lignoceric acid.

る24:0の合成は，20:0から直接連続的に伸長されておこる経路が主であると考えられ，同じ基質を使うものであっても，22:0合成のシステムとは異なると考えられる。

20:0-CoAの伸長活性や，内部基質の伸長活性のNADPHとNADH依存性を，成熟と幼若ブタ及びラットで，同じ条件下で調べた所，これまでの報告と一致して，ラットでは，NADH依存性の鎖長伸長活性は低いが，成熟ブタではNADPHと同程度に伸長活性が見られる（Table 1）。さらに幼若ブタでは，成熟のものよりはNADH依存性伸長活性が低く出ているが，ラットの場合よりもNADHが有効であった。と畜場から手に入る成熟ブタの月令は均一ではないので，NADHとNADPHの有効性に関して我々のこれまでの結果でもバッチ毎で少し異なった結果を与えていたが(5)，これは月令のばらつきを反映しているのかも知れない。この結果は，種及び加令によって，ピリジンヌクレオチド依存性が変化していることを示しているが，ブタ脳においては，成熟度が高い程，NADH依存性の酵素系が増え，NADPH依存性伸長系を補なっているとも考えられる。

Table 2では，前述した20:0-CoAを基質にした時の24:0生成活性と，22:0-CoAを基質にした時の24:0の生成活性の比を，ブタ（成熟型と幼若型）とラットについて検討したものを示した。いずれの場合も，20:0-CoAを使った方が，22:0-CoAを使うより24:0の生成量が多いが，ラットの場合，22:0-CoAを使っても24:0の生成は検出できるが，成熟ブタではほとんど検出できない。幼若ブタでは1/3程の活性が，22:0-CoAを使った場合にも認められた。これらの事実も，24:0の生成には，20:0-CoAを基質に連続した伸長反応によってできる経路が主であるが，22:0-CoAに対する反応性は，種及び加令によって変化していることを示している。

なお，今まであまり調べられていない幼若ブタのミクロソームの脂肪酸組成や，鎖長伸長活性を，成熟ブタのものと比較した所，20:0-CoAの22:0や24:0への伸長活性は比活性で2～3倍幼若型の方が高く，内部基質の伸長によって生じた18:0や22:4は，4～6倍高かった。最も顕著には，24:4（←22:4）の生成活性が，幼若型で10倍近く高かった。また，幼若型では，ミクロソームにはω3系列の脂肪酸は少ないが，ω6系特に，22:4や22:5(ω6)が顕著に多かった。今後他の動物種（サル等）についても検討し，脳の発達度とピリジンヌクレオチドの要求性との関連を調べる予定である。

［文献］1. Goldberg, I. (1973) Science 182 497-499. 2. Murad, S. and Kishimoto, Y. (1978) Arch.Biochem. Biophys. 185 300-306. 3. 竹下,吉田,田村,指吸 (1983) 神経化学 22, 405-407 4. Takeshita,M. Tamura,M. and Yubisui,T. (1983) Biochem.J. 214 751-756. 5. 吉田, 指吸, 竹下 (1983) 神経化学 22 408-410. 6. Yoshida, S. and Takeshita, M. (1984) Biochim.Biophys.Acta, in press. 7. Yoshida, S., Yubisui, T. and Takeshita, M. (1984) Arch.Biochem.Biophys., in press. 8. Yoshida, S., Yubisui, T. and Takeshita, M. (1983) Biochem. Int., 7 291-298.

59 ラット脳ミクロソームにおける脂肪酸伸長酵素—NADPH依存性酵素の性状—

竹下正純・吉田　敏
（大分医大・生化）

〔要　約〕

脳ミクロソームの脂肪酸伸長反応に対するNADHおよびNADPH要求性は反応に関与する脂肪酸によって異なり、ラットにおいては一般に鎖長が長くなるに従ってNADPH依存性が強くなる傾向を示した。ラット肝ミクロソームのNADPH－チトクロムc還元酵素の抗体は脳ミクロソームの同名酵素活性を阻害したが、NADPH依存性$C_{22:0}$-CoA伸長活性の阻害は抗体が20倍量で30%程度であった。脳ミクロソームをトリプシン処理することによりNADPH－チトクロムc還元酵素活性は強く阻害されるが、NADPH依存性脂肪酸伸長活性の変動は基質脂肪酸によって異なり$C_{20:0}$-CoAを基質とした場合$C_{22:0}$, $C_{24:0}$の生成は還元酵素の阻害とよく似たプロフィルで強く抑制されるのに対して内在性の基質に由来する$C_{18:0}$, $C_{22:4}$, $C_{24:4}$等の生成阻害は弱く、還元酵素阻害と異ったプロフィルを示した。また$C_{16:0}$を基質とした$C_{18:0}$の生成抑制は還元酵素の場合と異り、トリプシン高濃度で比較的強い抑制を示した。$C_{22:0}$-CoAより$C_{24:0}$の生成抑制は弱かった。以上の結果からNADPH依存性長鎖脂肪酸の生成経路にNADPH-チトクロムc還元酵素系の関与するものとしないものがありうること、また添加した脂肪酸の伸長系と内在性基質による伸長系が異っている可能性が考えられる。

Key words : NADPH-cytochrome c reductase, fatty acid elongation, brain microsomes.

脳組織を構成する脂肪酸は、ミエリンに特有のvery long fatty acidを含むこともあって、その脂肪酸伸長酵素系は肝などに比し複雑である。脳ミクロソームの脂肪酸伸長について、BaumanらはC_{16}-CoAからC_{18}, C_{18}-CoAから$C_{20\sim24}$脂肪酸への2酵素系があることを示しており(2)、更にK. Blochらは$C_{18}\rightarrow C_{20}$, $C_{20}\rightarrow C_{22}, C_{24}$の2酵素系があると述べている(4)。一方肝のNADPH依存性C_{16}-CoA伸長反応にNADPH－cyt. P450 reductaseおよびcyt. b5が関与すること(5)、またこれが酵素系の最初の還元反応に関与していることが示されている(7)。

我々は、脳ミクロソームのNADH依存性C_{16}-CoA伸長にNADH-cyt. b5 reductase系の関与を明らかにし(9)、更にC_{18}以上の脂肪酸伸長反応について報告してきた(10)。ここではC_{20}以上の長鎖脂肪酸を中心に、NADPH依存性伸長反応について検討を加えた

＜実験方法＞

脳ミクロソーム(Ms)は、生後20－30日のWister系ラットの脳から前回発表の方法によって調製した(10)。

抗血清は、ラット肝Msから Omura & Takesue(8)の方法で電気泳動で単一にまで精製したNADPH－cyt.c reductaseを家兎に注射して、定法により調製した。抗血清によるMsの処理は、脳Msのタンパク当り20倍量までの抗血清を加え37°C 15 minの後、0°C 20min以上冷却し、0.32M sucrose, 0.1M K-phosphate, pH 7.5で希釈し、105,000×g 1時間遠心し、ペレットを同じsucrose-bufferにsuspendした。Preimmune血清、抗血清なしの場合も同様に処理した。

Trypsin 処理は、脳Msを0.32M sucrose - 0.1M K-phosphate, pH8.0に suspend し一定量の trypsin を加え25°C 30 min 反応させた後 trypsin と同量の soybean trypsin inhibitor を0.32M sucrose - 0.1M K-phosphate, pH7.5 に溶かして加え、同液で10倍程度に全体を稀釈し、105,000×g 1時間遠心する。Msを0.32M sucrose - 0.1M MES, pH7.0 に suspend した。

脂肪酸伸長活性の測定は既発表の方法に従った(11)。但し加えた基質の elongation を強調する場合は ATP および $MgCl_2$ を除いた。NADPH cyt. c reductase 活性は Omura and Takesue(8)に従って測定した。

〔実験結果および考察〕

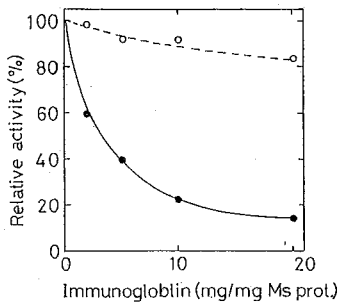
脳ミクロソームの脂肪酸伸長反応における基質脂肪酸の種類とNADH, NADPH依存性の関係を Table 1 にまとめて示した。モノ不飽和脂肪酸を含めて脂肪酸鎖長が長くなるに従いNADPH依存性が強くなる傾向が認められる。Aeberhard & Menkes (1)と Kishimoto (6), Bourre(3) らの pyridine nucleotide 依存性の差異は基質脂肪酸の差にあることがこの結果から考えられる。Endogenous 脂肪酸の場合は異なった比率をとっているように見える。そこで鎖長の長い脂肪酸を中心にNADPH依存性伸長反応の特性を調べた。

Table 1. Relationship between chain length of fatty acids and requirement of reduced pyridine nucleotide

Substrate	Product	Ratio of reaction rate (%) NADH/NADPH	
		From external substrate	From endogenous substrate
$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	77.8	21.0
$C_{18:0}$	$C_{20:0}$	62.4	
$C_{18:1}$	$C_{20:1}$	71.4	
$C_{20:0}$	$C_{22:0}$	40.0	
"	$C_{24:0}$	43.0	
$C_{22:0}$	$C_{24:0}$	≤2	
$C_{22:1}$	$C_{24:1}$	≤2	
Endogenous	$C_{22:4}$		≤5

ラット肝のNADPH-cyt.c reductase 抗体は小量で抗原の精製酵素活性を強く阻害するが、脳ミクロソームの場合はミクロソームタンパク当り10倍～20倍量で80%近い reductase 活性阻害であった(Fig.1)。NADPH-依存性 behenyl-CoA伸長活性の阻害は10倍量では殆んど認められず、20倍量で30%程度であった(Table 2)。すなわちこの反応に対するNADPHからの電子供与が必ずしも cyt.c reductase のみを経ているのではないことを示唆する。

Fig. 1. Effect of rabbit anti-rat hepatic NADPH-cyt. c reductase IgG on brain microsomal NADPH-cyt. c reductase. ○-○ preimmune IgG, ●-● anti-NADPH-cyt. c reductase IgG.



脳ミクロソームをトリプシン処理することにより cyt. b5 含量, NADH-cyt.c reductase 活性が低下することは前に示したが(9)、NADPH-cyt.c reductase 活性も強く低下する。(Fig.2)。これにともなうNADPH依存性脂肪酸伸長反応の変動を調べた。$C_{20:0}$・CoA を基質とした場合、吉田が別報に述べる如く $C_{22:0}$, $C_{24:0}$ を生成し、Endogenous 脂肪酸から $C_{18:0}$, $C_{22:4}$, $C_{24:4}$ の生成を見るが、$C_{22:0}$, $C_{24:0}$ の生成は低濃度トリプシンでも強く阻害され、cyt.c reductase 阻害とよく似たプロフィルを示した。これに対しendogenous 脂肪

Table 2. Effect of rabbit anti-NADPH-cyt. c reductase on NADPH-dependent behenyl-CoA elongation

IgG	mg IgG/mg Ms.	Behenyl-CoA elongation (%)
Preimmune	0	100
	10	102.6
	20	94.1
Anti-NADPH-cyt. c reductase	10	82.4
	20	66.7

酸からのelongationは強く阻害されなかった(Fig.3)。これに対して$C_{16:0}$を基質とする反応では$C_{18:0}$の生成はtrypsinの量に応じて、未処理の60%程度までほぼ直線的に抑制された。この系にはATPを加えてあるので、endogenous基質と加えた基質の両方から$C_{18:0}$を生成していることが関係している可能性がある。この場合もendogenous基質による$C_{22:4}$, $C_{24:4}$生成の抑制は少ない(Fig.4)。$C_{22:0}$を基質とするelongationをFig5に示した。この場合Endogenousからの$C_{22:4}$, $C_{18:0}$の生成に比して$C_{24:0}$の生成は少なく傾向ははっきりしないが、$C_{22:4}$, $C_{24:4}$生成の抑制がTrypsinの少ない所で比較的弱く、後で強いのに対して、$C_{24:0}$生成の抑制は比較的少ない所で強い傾向が認められている。これらの結果は外から加えた脂肪酸のelongationとendogenous脂肪酸のelongationが異った反応系によって起っていると考えて矛盾しない。

Fig. 2. Effect of trypsin treatment on NADPH-cyt. c reductase activity.

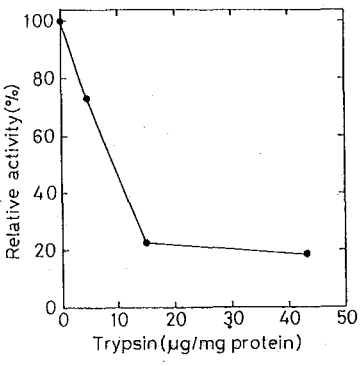


Fig. 3. Effect of trypsin treatment on fatty acid elongation with $C_{20:0}$-CoA as the substrate. The reaction mixture contained 28.4 μM[2-C^{14}]malonyl-CoA (4.3 μCi/mol), 40 μM $C_{20:0}$-CoA, 500 μM NADPH, 0.1 M K-phosphate, pH 7.4, 5mg/ml BSA, 1.25mg microsomes, Incubation at 37°C for 30 min.

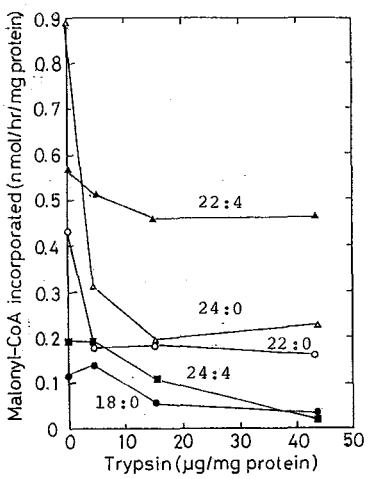


Fig. 4. Effect of trypsin treatment on fatty acid elongation with palmitoyl-CoA as the substrate. The reaction condition was as described in Fig. 3. Palmitoyl-CoA was used as substrate, and 0.8 mM ATP and 1 mM $MgCl_2$ were added into the raction mixture. Microsomes 1.04 mg, incubation for 20 min.

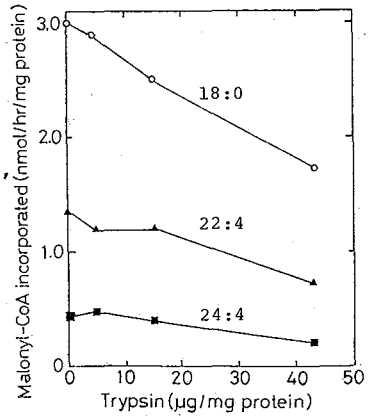
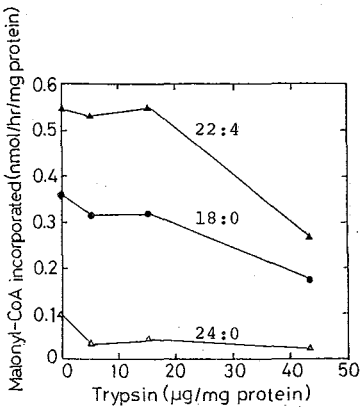


Fig. 5. Effect of trypsin treatment on fatty acid elongation with behenyl-CoA as the substrate. The reaction condition was as described in Fig. 4. $C_{22:0}$-CoA was used as the substrate. Microsomes 1.74 mg, incubation for 30 min.



1) Aeberhard, E., and Menkes, J. R. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3834-3840
2) Bourre, J. M., Pollet, S. A., Chaix, G., Daudu, O.L., and Baumann, N. A. (1973) Biochimie. 5, 1473-1479.
3) Bourre, J. M., Daudu, O. L., and Baumman, N. A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Comman. 63 1027-1034
4) Goldberg, I., Shechter, I., and Bloch, K. (1973) Science 182, 497-499. 5) Ilan, L., Ilan, R. and Cinti, D.L. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10066-10072. 6) Murad, Y., and Kishimoto, Y. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 185, 300-306 7) Nagano, M., Ishibashi, T., Okayasu, T. and Imai, Y. (1983) FEBS Lett. 155, 11-14. 8) Omura, T., and Takesue, S. (1970) J. Biochem. (Tokyo) 67, 249-257. 9) 竹下、田村、吉田、三木、指吸 (1982) 神経化学 21, 333-335 10) 竹下、吉田、田村、指吸 (1983) 神経化学 22, 405-407
11) Yoshida, S., and Takeshita, M. (1984) Biochim. Biophys. Acta, in press.

60 ラット脳中性スフィンゴミエリネースの精製と免疫学的性質

野口悦子
（国立神経センター・疾病Ⅱ）

〔要　約〕

脳に局在する膜結合性の中性スフィンゴミエリネース（Sph'ase）をラット脳ミクロゾームより精製し、ウサギを用いて抗体を作製して諸性質を明らかにした。酵素精製は1%トリトンによる可溶化、$(NH_4)_2SO_4$分画、アセトンパウダー、パウダーからの1%トリトンによる抽出、$(NH_4)_2SO_4$分画、Sepharose CL-6Bクロマトグラフィー、クロマトホーカシングにより、ミクロゾーム画分より96.4倍、収率15%、比活性54,000 n mol/hr/mg蛋白、SDS-PAGEによる分子量67,000の標品を得た。Immunoelectro-blotting法によりこの蛋白バンドに一致して蛍光が認められた。精製酵素はダンシル化法によるN-末端分析でε-danasyl lysineのみが検出された。本酵素は酸性Sph'ase活性はなく、Mg^{2+}非存在下では活性は得られなかった。部分精製抗体（160 μg）と反応させることにより、遠心後上清の活性は90%減少した。Ouchterlony法により精製酵素と可溶化したミクロゾーム画分、ミエリン、脳P_2画分、肝P_2画分（酸性Sph'ase rich画分）のクロステストを行った。それらは完全に融合する沈降線が1本のみ形成され、同一の抗原決定基を有する蛋白を持つことがわかった。さらに解析するために交差免疫電気泳動を行った結果、中性Sph'ase活性のみ得られたミエリン、および精製酵素は左右対称のベル型の沈降線が1本形成され、中性、酸性Sph'ase活性のある脳P_2画分、肝P_2画分は2本の沈降線を形成した。以上、精製中性Sph'aseが生化学的、免疫学的に均一であることを示し、酸性Sph'aseも中性Sph'aseと同じ抗原性を有する可能性を考察した。

Key words:　ラット脳ミクロゾーム，中性スフィンゴミエリネース，酸性スフィンゴミエリネース，

スフィンゴミエリン水解酵素としてライソゾームに存在する酸性Sph'aseと脳で特に活性の高いMg^{2+}要求性の中性Sph'aseがある。酸性Sph'aseはNiemann-Pick病においてその欠損がいわれ、酵素精製の仕事も数多い。しかし中性Sph'aseの詳細は明らかではない。そこでまず、中性Sph'aseを生化学的に明らかにし、ひいては治療法への新たな展開のために酸性Sph'aseの機能を担うような中性Sph'aseのconversionの可能性があるかどうかを探ることにした。1昨年度本会で中性Sph'aseは膜結合性が強く、非常に失活しやすいが、可溶化し、部分精製した酵素は等電点電気泳動によって、活性を保って他蛋白と分離できることを報告した(7)。その後検討を重ねた結果、均一標品を得て、抗体を作製することに成功したので諸性質を明らかにした。

〔実験方法〕

酵素活性の測定：　中性Sph'aseはすでに記載した方法に従い、行った(7)。酸性Sph'ase活性は0.1M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）、トリトン（0.02-0.2%）、Mg^{2+}無添加とし、その他の点は中性Sph'aseと同じように操作した。

精製標品の作製：　以前報告した方法(7)を次のようにかえた。最初のトリトンによる可溶化は、蛋白濃度6.2 mg/mlで行い、2回の硫安分画を30%飽和とし、Sepharose CL-6Bを用いてゲル濾過を行った。クロマトホーカシングではTris-HCl緩衝液（pH 7.4）を開始バッファーとしMg^{2+}は添加しなかった。またpH勾配をpH 4まで充分下げた後、0.4M NaClで溶出した。どの緩衝液もトリトン濃度を0.1%とした。

精製酵素の抗体作製および免疫同定法：　抗原として500 μgの精製中性Sph'aseを

Freund complete adjuvant と1:1に混合し，ウサギ1羽につき1mlを背皮内に注射し感作させた。10日ごとに3回注射し，感作前，後の血清をpoolして凍結保存した。血清は$(NH_4)_2SO_4$で3回分画し，透析後，部分精製抗体として使用した。Ouchterlony二重拡散法(6)はトリス緩衝液に0.1%トリトン，1%アガロース混合プレート上で行った。交差免疫電気泳動はclarke(3)の方法を応用し，0.1M Glycine，38mM Tris (pH 8.7)，0.2%トリトンを含んだアガロースゲル上で，1次元目を10V/cmで1時間，2次元目は同じ組成のゲルに抗体を添加して，1次元目と直角方向に3V/cmで24時間泳動を行った。

電気泳動：　1%SDSを含む7.5%ゲルを用いてミニスラブ電気泳動装置で行った。Immuno-electro-blottingは主にGershoni(4)の方法に従った。

蛋白定量：　Bradford(1)あるいはBramhall(2)の方法に従って測定した。

〔結果と考察〕

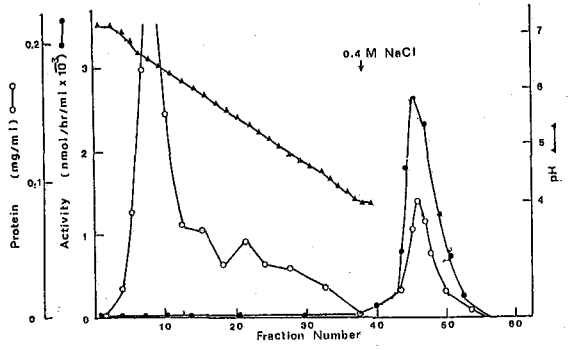
中性Sph'aseの精製：　Table 1はラット脳30匹より得られたミクロソームの中性Sph'aseの精製法の概要である。すべての操作は極力低温下で行い，緩衝液に25%グリセロールを添加しておくことが必須であった。Fig. 1はクロマトホーカシングのパターンである。素通り部分に酵素活性はなかった。溶出酵素は活性測定時に安定化剤として添加しているBSAを除くと著しい活性の低下を示した。蛋白濃度0.5mg/ml以下では4°Cでも失活が激しいためクロマトホーカシング溶出後はすぐに濃縮し，実験によっては透析して用いた。この精製法で54,000 nmol/hr/mg蛋白の比活性を有し，ミクロソームから約96倍，収率15%の精製標品を得た。

Table 1. Purification of neutral sphingomyelinase from rat brain microsomes

Purification steps	Volume (ml)	Total protein (mg)	Specific activity (nmol/hr/mg protein)	Total activity (nmol/hr x 10^{-3})	Recovery (%)	Purification fold (fold)
Microsomes	37.6	620	560	347	100	1
100,000 x g sup. after 1% Triton X-100 extraction	100	88.4	3,670	324	93.4	6.54
Acetone powder (0.72 g)						
30,000 x g sup. after 1% Triton X-100 extraction	65.0	15.4	13,700	210	60.5	24.4
Ammonium sulfate	8.00	5.79	17,100	99.2	28.6	30.5
Sepharose CL-6B	6.40	4.48	19,500	87.5	25.2	34.8
Chromatofocusing	4.30	0.964	54,000	52.1	15.0	96.4

中性Sph'aseの生化学的性質：　精製標品の均一性およびN-末端アミノ酸を調べるため本酵素をダンシル化後塩酸加水分解してPolyamide layer sheet上で同定を試みた。ε-dansyl lysineのみがスポットとして得られた。本酵素のN-末端はblockされていると考えられた。本酵素標品中の酸性Sph'aseの混在を調べるため酸性Sph'ase活性を測定したが酸性Sph'ase活性は得られなかった。本酵素活性測定時にはMg^{2+}を添加するが，粗標品では内在する結合型のMg^{2+}のためMg^{2+}無添加でも活性が少し出現する。しかし精製標品ではMg^{2+}無添加では活性は得られなかった。従って活性出現にMg^{2+}が必須であることがわかった。

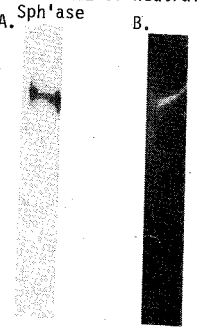
Fig. 1.　Chromatofocusing of rat brain microsomal neutral sphingomyelinase



特異抗体の産生： Ouchterlony二重拡散法でトリトンによって可溶化したミクロゾームの上清および精製酵素は完全に融合する沈降線を1本のみ形成した。

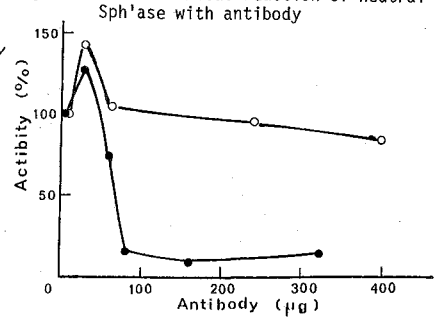
サブユニットとその抗原性： Fig.2.A.は精製Sph'aseのSDS-PAGEのグーマシーG250による染色像である。約30Kgの蛋白を泳動した。本酵素のサブユニットの抗原性を調べるためImmuno electro-blotting法によりFITC標識IgGを用いて抗体染色を行った。蛋白バンドに一致して蛍光が検出されその抗原性が確かめられた(Fig.2.B.)。

Fig. 2. SDS-PAGE of neutral Sph'ase



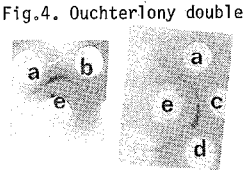
中性Sph'aseと抗体の反応性： 部分精製抗体を用いて本酵素と抗体との免疫化学的反応性を調べた。酵素と抗体を4℃, 24時間放置後, Protein A-Sepharoseと振盪後、遠心し上清の活性を測定した。コントロールは感作前の血清を同様処理して行った。Fig.3.に示すように酵素(約50μg)は160μgの抗体により上清の活性が約90%減少した。

Fig. 3. Immunochemical reaction of neutral Sph'ase with antibody



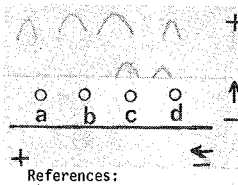
免疫拡散および交差免疫電気泳動： 作製した抗ラット脳ミクロゾーム中性Sph'ase抗体と他画分の酵素とのcross-reactivityを調べるためOuchterlony法を行った。精製酵素および中性Sph'ase活性の得られたミエリン, 酸性Sph'ase活性を混在するラット脳P_2画分(酸性Sph'ase活性は中性Sph'ase活性の約20%), そして中性Sph'ase活性を混在するラット肝P_2画分(中性Sph'ase活性は酸性Sph'ase活性の約15%)をそれぞれ可溶化しテストした。Fig.4.に示すようにそれらは完全に融合する1本の沈降線を形成した。従ってこれらの画分の中性Sph'aseは同一抗原決定基を持つことがわかった。さらにこの沈降線を解析するために交差免疫電気泳動を行った(Fig.5)。精製酵素とミエリンはベル型の沈降線を1本のみ形成した。しかし, 中性, 酸性両活性を持つ脳P_2画分, 肝P_2画分は2本の沈降線を形成した。その陰極側(1次元目)の沈降線は, 酸性Sph'aseが陽極側に泳動しにくく, かつ中性Sph'aseと同一抗原性を有しているために生じたとも推察された。酸性Sph'aseとの関連性について、昨年度、ゲルより抽出したラット脳P_2画分の中性Sph'aseのアミノ酸組成を分析し, Jonesら(5)の酸性Sph'aseの分析値と酷似していることを報告した(8)。従って, 両酵素の蛋白的, 免疫学的同一の可能性をさらに追求する必要がある。現在, 酸性Sph'aseの精製を進めている。

Fig.4. Ouchterlony double diffusion analysis



a: purified neutral Sph'ase
b: solubilized rat brain myelin
c: solubilized rat brain P_2 fraction
d: solubilized rat liver P_2 fraction
e: antibody

Fig. 5. Crossed immuno-electrophoresis



a: purified neutral Sph'ase
b: solubilized rat brain myelin
c: solubilized rat brain P_2 fraction
d: solubilized rat liver P_2 fraction

References:
1). Bradford. M. M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254
2) Bramhall, S., Noack, N., Wu, M. and Loewenberg, J.R. (1969) Anal. Biochem. 31, 146-148
3) Clarke, H. G. M. and Freeman, T.(1966) Prot. Biol. Fluids (ed. Peters,H.), 14, 503-509
4) Gershoni, J.M. and Palade, G.E.(1982) Anal. Biochem. 124, 396-405
5) Jones, C.S., Shankaran, P., Alfred, P. and Callahan, J. W. (1983) Biochem. J.209, 291-297
6) Ouchterlony, O. (1962) Progr. Allergy 6, 30-36
7) 野口, 桜川, 有馬 (1982) 神経化学 21, 345-347
8) 野口, 桜川, 有馬 (1983) 生化学 55, 8. 983

61 ラット脳におけるH_2－レセプターを介するhistamineの膜リン脂質のメチル化促進作用

小澤孝一郎　（広島大・医・薬効解析）
野村靖幸　（富山医薬大・和漢薬研）
瀬川富朗　（広島大・医・薬効解析）

〔要　約〕

ラット脳粗シナプス膜画分を S-adenosyl-[methyl-^{3}H]methionine とインキュベートし、histamine(5,10 μM) で刺激することにより、膜リン脂質への [^{3}H]メチル基の一過性のとりこみ促進が認められた。histamine(HA) 刺激による膜リン脂質への [^{3}H]メチル基のとりこみ促進は、HA添加45秒後に極大に達し、その後60秒にはbasal levelに低下した。

HAにより促進された [^{3}H]メチル基とりこみ量は、1.0mg protein/100 μl まで蛋白依存性に増加した。また、温度依存性、HAの濃度依存性が認められた。脂質抽出物のTLC分析の結果、[^{3}H] メチル基は主に phosphatidyl-N-monomethylethanolamine, phosphatidyl-N,N-dimethylethanolamine, phosphatidylcholine にとりこまれていることがわかった。HA (10 μM)による膜リン脂質への [^{3}H]メチル基のとりこみ促進は、H_2- アンタゴニストの cimetidine (0.1 - 10 μM), famotidine (0.01 - 10 μM) により濃度依存的に有意に抑制されたが、H_1- アンタゴニストの mepyramine, diphenhydramine (0.1 - 10 μM) によっては抑制されなかった。以上の結果より、ラット脳粗シナプス膜画分において、膜リン脂質のメチル化反応がhistamineにより、H_2- レセプターを介して、一過性に促進されることが示唆された。

Key words : rat brain - phospholipid methylation - histamine H_2-receptors

近年、中枢神経系において、histamine(HA)が神経伝達物質として働いていることを示唆する報告が多くなされている。[1][2] さらに、脳内においてHAがH_2- レセプターを介して adenylate cyclase を活性化し cyclic AMP を蓄積させることも報告されている。[3] しかし、H_2- レセプターと adenylate cyclase 間の情報伝達のメカニズムについては、いまだ不明である。一方、Hirata らにより[4] ラット網状赤血球ゴーストにおいて、β－アゴニストによるβ－レセプターの刺激により、膜リン脂質のメチル化反応が促進され膜の流動性が増加し、β－レセプターと adenylate cyclase のカップリングが促進されることが証明されて以来、多くの情報伝達物質と生化学的反応の間の生体膜における情報の受容伝達機構の1つに、膜リン脂質のメチル化反応が関与していることが報告されている。[5] 中枢神経系においても、Leprophon らにより[6]、シナプトゾームでドーパミンによる膜リン脂質のメチル化促進が報告されている。そこで我々はラット脳粗シナプス膜において、H_2-レセプターと膜リン脂質のメチル化反応との関係を検討した。

〔実験方法〕 1. ラット脳粗シナプス膜画分の調製：Wistar系雄性ラット(160 - 200g)の小脳を除く全脳より、Enna ら[7]の方法に従って得た P2画分を、6mM Tris-HCl buffer(pH8.0)中に懸濁させ、氷中で90分間放置し低張処置をおこなった。サスペンジョンを8,000g x 20 min 遠心し、得られた上清をさらに48,000g x 20 min 遠心して粗シナプス膜画分を得た。この粗シナプス膜画分を、酸素で飽和された modified Krebs-Ringer液(pH 7.4, NaCl 126.5mM, KCl 2.4mM, $MgCl_2$ 0.83mM, $CaCl_2$ 1.1mM, Na_2SO_4 0.5mM, $NaHCO_3$ 27.5mM, KH_2PO_4 0.5mM, glucose 5.9mM, ATP 0.1mM)で2回洗浄し、同液中に再懸濁させ、ただちにとりこみ実験に使用した。2. リン脂質への[^{3}H]メチル基とりこみ量測定：膜リン脂質への[^{3}H]メチル基

のとりこみ量の測定は、Hirata ら[4]の方法を一部変更しておこなった。粗シナプス膜画分を modified Krebs-Ringer 液中に懸濁し (0.4 -0.5 mg protein/ 100μl)、2 μCi の S-adenosyl-[methyl-^{3}H]methionine (15 Ci/mmol) を加え、37℃で30分間プレ・インキュベートした後 HA (5,10 μM) を加え37℃で15秒～5分間インキュベートした。アンタゴニストは HA (10 μM) を加える10分前に加え、HA添加後45秒間インキュベートした。反応は氷冷10 % TCA/10 mM Met 溶液 0.9 ml を加え停止した。25,000g x 2 min 遠心し沈殿について、n-heptane/2M HCl (7:3 vol/vol) 1 mlで、nonpolar lipid を抽出した。n-heptane層を除去後、chloroform/methanol (2:1 vol/vol) 2.7 ml を加え、5分間振とう後、15分間室温放置して chloroform 抽出をおこなった。水層を除去後、chloroform層を 0.5 M KCl in 50% methanol 1.5 mlで2回洗浄し、得られた chloroform 層の一部をサンプリングし放射活性を測定した。メチル化された脂質の同定は Hirata ら[4]の方法に準じて TLC 分析でおこなった。

3. タンパク定量：牛血清アルブミンを外部標準とし Lowry らの方法により測定した。

(成績) HA (10 μM)により、添加45秒後を極大として脳粗シナプス膜脂質画分への一過性の [^{3}H] メチル基のとりこみ促進が認められた(Fig. 1)。この脂質画分への [^{3}H] メチル基のとりこみ促進は、HA無添加時には認められず(Fig. 1)、温度にも依存していた (成績略)。また、HA(5 μM)と45秒間インキュベート後の [^{3}H] メチル基のとりこみ量は、0.37±0.02 pmol/mg protein であり、HAの濃度にも依存していた。さらに、HA添加60秒以降にみられる急激な [^{3}H] メチル基とりこみ量の減少は、quinacrine (0.1 mM) の添加、あるいは、メディウムより Ca^{2+} の除去により認められなくなった (成績略)。脂質画分への [^{3}H] メチル基の最大とりこみ量は、1.0 mg protein/100 μl まで蛋白量に依存して増加した(Fig. 2)。一方、chloroform抽出された脂質画分を TLC により分析したところ、Fig. 3. に示すように、[^{3}H] メチル基は、主に標品の phosphatidyl-N-monomethyl-ethanolamine(PME), phosphatidyl-N,N-dimethylethanolamine(PDE), phosphatidylcholine(PC)と Rf 値が一致する画分にとりこまれていた。また、HA(10 μM)による脂質画分への [^{3}H] メチル基のとりこみ促進 (45秒間インキュベート) は、H_2-アンタゴニストの cimetidine, famotidine により、濃度依存的に有意に抑制されたが、H_1-アンタゴニストの mepyramine, diphenhydramine によっては抑制されなかった (Table 1)。

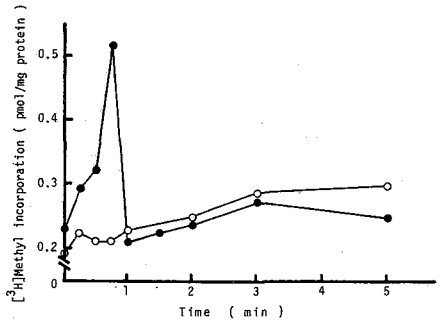


Fig. 1. Efffect of histamine on phospholipid methylation in crude synaptic membranes of rat whole brain. ○—○ , without histamine; ●—● , with 10 μM histamine

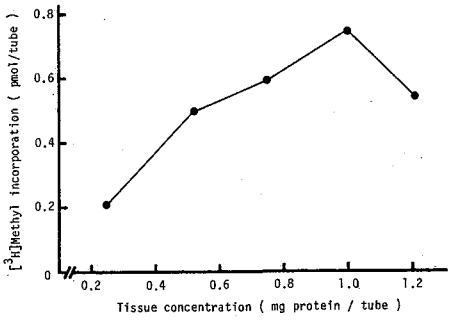


Fig. 2. Influence of tissue concentration on histamine-induced phospholipid methylation in crude synaptic membranes of rat whole brain. The reaction was started by the addition of 10 μM (●) (final concentration) histamine and stopped 45 sec later.

（考察） HAによるラット脳粗シナプス膜リン脂質への[^{3}H]メチル基の一過性のとりこみ促進は、蛋白依存性、温度依存性、HAの濃度依存性が認められたことから、酵素的過程によるものであると推定された。さらに、TLC分析により、[^{3}H]メチル基が主に、リン脂質(PME＞PDE＞PC)にとりこまれていることから、HAによる膜リン脂質への[^{3}H]メチル基のとりこみ促進は、シナプス膜のphospholipid methyltranseferasesの活性化によるものであることが推定された。HA添加後60秒以降にみられる、[^{3}H]メチル基とりこみ量の急激な減少は、quinacrine (0.1 mM)添加、あるいはメディウムよりCa^{2+}の除去により認められなかったこと、および、実験に膜画分を用いていることなどから、極大後の急激なとりこみ量の減少は、膜中のphospholipase A_2の活性化によるものであると推定された。一方、HAによる膜リン脂質への[^{3}H]メチル基のとりこみ促進は、H_2-アンタゴニストのcimetidine, famotidineにより、濃度依存的に抑制されたがH_1-アンタゴニストのmepyramine, diphenhydramineにより抑制されなかった。したがってHAによる膜リン脂質への[^{3}H]メチル基のとりこみ促進は、H_2-レセプターを介していることが推定された。以上の結果より、ラット脳粗シナプス膜画分において、HAによりH_2-レセプターを介して膜リン脂質への[^{3}H]メチル基のとりこみが一過性に促進されることが示唆された。

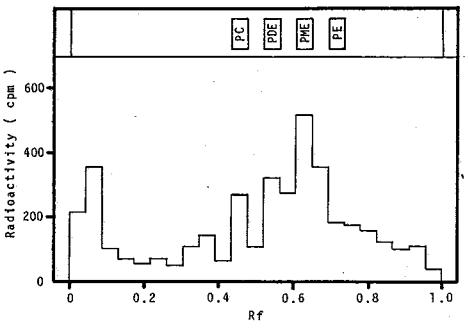


Fig. 3. Chromatografic pattern of the [^{3}H]-methylated phospholipids after the incubation of crude synaptic membranes of rat whole brain with 1.3 μM S-adenosyl-(methyl-^{3}H)methionine. The lipids isolated after 45 sec of incubation in the presence of 10 μM histamine were separated on silica gel G plates with a solvent system of propionic acid/n-propyl alcohol/chloroform/water, 2:2:1:1(vol/vol).

Table. 1. Effect of H_1- and H_2-antagonists on histamine-induced phospholipid methylation in crude synaptic membranes of rat brain

Addition	Final concentration (μM)	Histamine-induced phospholipid methylation (pmol/mg protein)
none		0.242 ± 0.024
cimetidine	0.1	0.057 ± 0.005**
	1.0	0.020 ± 0.003***
	10.0	0.010 ± 0.002***
famotidine	0.01	0.106 ± 0.010**
	0.1	0.031 ± 0.007**
	1.0	0.009 ± 0.006***
mepyramine	0.1	0.291 ± 0.011
	1.0	0.242 ± 0.026
	10.0	0.224 ± 0.068
diphenhydramine	0.1	0.250 ± 0.081
	1.0	0.259 ± 0.037
	10.0	0.203 ± 0.021

The reaction was started by the addition of 10 μM (final conc.) histamine and stopped 45 sec later. The value for [^{3}H]methyl incorporated during the preincubation was substracted from the experimental values. Significance; ** P<0.01; *** P<0.001 vs. none.

（参考文献）

1) Schwartz, J. C., Pollard, H. & Quach, T. T. (1980) J. Neurochem. 35, 26-33.
2) Taylor, J. E. (1982) Neurochem. Int. 4, 89-96.
3) Kanof, P. D. & Greengard, P. (1979) J. Pharmac. exp. Ther. 209, 87-96.
4) Hirata, F., Strittmatter, W. J. & Axelrod, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 368-372.
5) Hirata, F. & Axelrod, J. (1980) Science 209, 1082-1090.
6) Leprophon, C. E. & Wurtman, R. J. (1983) Pro. Natl. Acad. Sci. 80, 2063-2066.
7) Enna, S. J. & Snyder, S. H. (1977) Mol. Pharmacol. 13, 442-453.

62 アメフラシにおける糖脂質：神経組織に特異的に見られた phosphonoglycosphingolipids

阿部幸子・荒木恵子・熊西敏郎・佐武　明
（新潟大・脳研）

〔要　約〕

アメフラシ，*Aplysia kurodai* の神経系に特異的に存在する *phosphonoglycosphingolipids* (FGL-II) を分離し、以下の研究を行った。

(1). FGL-II は2種類の *phosphonoglycosphingolipids* よりなり、構成糖として1つは *Fuc*, *GalNAc*, *Gal*, *Glc* (FGL-IIa) より、他は *GalNAc*, *Gal*, *Glc* (FGL-IIb) よりなることがわかった。

(2). FGL-II に対して抗血清を作った。2次元TLC上 *radioimmunodetection* 法による抗原の同定を神経線維及び皮膚で行うと、神経線維は9つの、皮膚では3つの糖脂質が反応した。

(3). 酵素抗体法によるアメフラシ各組織の検索では、神経系が主として染色された。神経節周囲に見られる近位末梢神経束及び皮下組織、筋肉組織内に散在する遠位末梢神経が強く染色された。又、神経節内の *neuropil* にも染色が見られた。

Key words：　Aplysia nervous tissue, Phosphonoglycosphingolipids, Gangliosides

糖脂質は一般に細胞膜2分子層の外側分子層に局在し、細胞間識別、情報の授受、応答更に細胞の分化、増殖、悪性変化等々において、重要な役割をはたしているのではないかとみられているが、確証は未だ得られていない。　私共はアメフラシ神経組織及び皮膚において、一群の新しいタイプの糖脂質 (*phosphonoglycosphingolipids*) を発見し、その皮膚および神経組織に共通に存在するものの1つについて、構造、組織内分布について明らかにした。(1)(2)(3)(4)

本報告では、アメフラシ神経系に特異的に存在する *phosphonoglycosphingolipids* (FGL-II) に対して抗体を作成することができたので、それの化学的特徴及び免疫組織化学の結果を報告する。

〔実験方法〕

糖脂質の抽出及び精製：　アメフラシ神経系（神経節、神経線維）よりの糖脂質は Araki 等(1) に従い粗糖脂質分画を得た。　その後、C-M-H_2O 系及び n-proH-NH_4OH-H_2O 系による2段階イヤトロビーズカラムクロマトグラフィーにより FGL-II を精製した。

TLC上 *radioimmunodetection* 法による抗原の同定 (RITLC)：　アメフラシ神経線維及び皮膚の粗糖脂質分画を C-M-0.2% $CaCl_2$ (55-45-10, v/v) 及び n-proH-NH_4OH-H_2O (75-5-25, v/v) の系で2次元展開を行い、その後、Magnani 等の方法(5)を若干改良し、間接法で抗原の同定を行った。

免疫組織化学：　アメフラシ各組織を10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋を行い切片にした。　脱パラフィン後、正常ヤギ血清で希釈した抗FGL-II血清で1次反応（3時間）を行い、次いで HRP-ヤギ抗ウサギ IgG で2次反応（1時間）を行い、DAB-H_2O_2 で

呈色した。

［結　果］

(1) FGL-Ⅱの化学的性質

図1はアメフラシ神経線維及び皮膚の粗糖脂質分画の2次元 thin layer chromatography (HPTLC) の結果を示している。C-M-H_2O (55-45-10, V/V) 及び n-proH-NH_4OH-H_2O (75-5-25, V/V) の系で展開した。私共の前報に従って命名し、図中、主な糖脂質にラベルした。尚、すでに報告した如く、FGL-Ⅲ と SGL-Ⅱ は同じ物であり、量が多量に取れることより SGL-Ⅱ を使って構造式を決定した。FGL-Ⅱは検査したアメフラシ組織（肝臓，皮膚，神経組織）のうち、神経系に特異的に存在するが、NMR分析、C-M-1.25M NH_4OH (60-40-9, V/V) の系で20cm展開させることにより2成分 (a,b) よりなることがはっきりした。(図2-A，1 lane)　a,b の糖組成はGC分析の結果、aは Fuc, GalNAc, Gal, Glc からなり、bは GalNAc, Gal, Glc からなることが明らかとなった。今回、免疫には FGL-Ⅱ (a,b) を分けずに使用した。

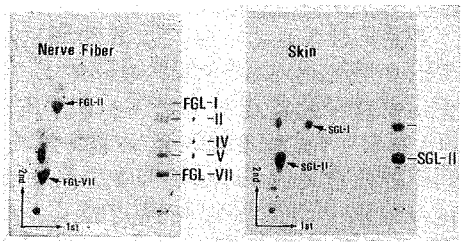


図1. 1st.; C-M-0.2% $CaCl_2$ (55-45-10, V/V)
2nd.; n-proH-NH_4OH-H_2O (75-5-25, V/V)

(2) 抗血清の免疫化学的性質

図3は各種糖脂質及び糖ペプチド (asialo GM_1, GM_1, Globoside, Glycopeptide (a,b), FGL-Ⅱ, HF treated FGL-Ⅱ, SGL-Ⅱ, HF treated SGL-Ⅱ) を polygram, plastic sheet 上展開し、得られた抗体とRITLCを行ったものである。Aがアンスロン発色、Bが23時間露出したオートラジオグラフィーの結果を示している。それによると、asialo GM_1, GM_1, Glycopeptide (b), SGL-Ⅱ, SGL-Ⅱ(HF) は反応しなかったが、Globoside 及び Glycopeptide (a) がかすかに反応し、FGL-Ⅱ 及び FGL-Ⅱ(HF) は強く反応した。

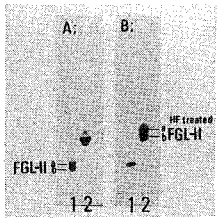


図2.
A; C-M-1.25M NH_4OH (60-40-9, V/V)
B; BuOH-AcOH-H_2O (3-1-1, V/V)
1; FGL-Ⅱ
2; HF treated FGL-Ⅱ

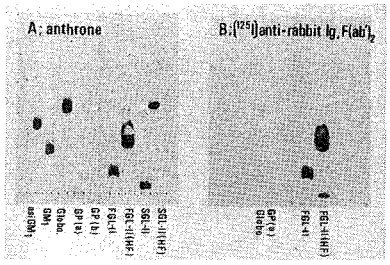


図3. C-M-0.2% $CaCl_2$ (55-45-10, V/V)

図4はアメフラシ神経線維及び皮膚より抽出した粗糖脂質を polygram 2次元TLCを行い、その後RITLCを行い、8時間露出した結果を示している。A,Cが神経線維、皮膚のアンスロン発色、B,Dが神経線維、皮膚のオートラジオグラフィーの結果を示している。それによると、神経線維の方ではマイナーのスポットも含めて9つの糖脂質が反応した。(図4-B)。　糖脂質として、一番多量に存在する FGL-Ⅲ (=SGL-Ⅱ) は反応しなかった。しかし、次に量の多い FGL-Ⅳ 及び FGL-Ⅱ は強く反応した。FGL-Ⅰも強く反応した。抗体と反応したその他の糖脂質は量的に少いため現在の所、同定についてはむずかしい。

皮膚ではアンスロンで同定される糖脂質に相当する所にはラベルは見られなかった。（図4－D）.

(3) 免疫組織化学

酵素抗体法によるアメフラシ各組織の検索では、神経系が主として染色された。頬部、腹部神経節周囲にみられる近位末梢神経束及び（図5－A, B）、皮下組織・筋肉組織内に散在する遠位末梢神経が強く染色された。（図5－C）. 頬部神経節内のneuropilにも染色がみられた。
他の組織には明らかな染色は認められなかった。

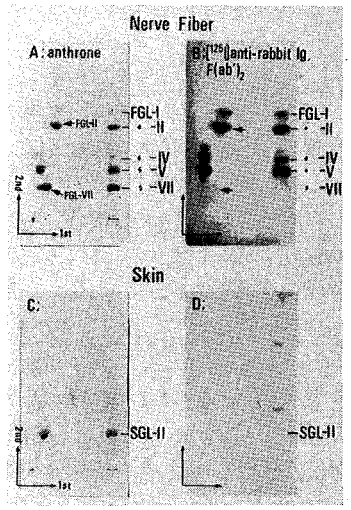
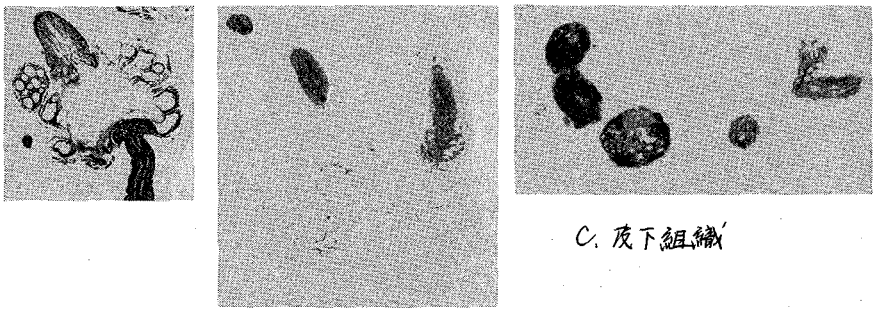


図4.

〔考察〕

以上のことより、今回得られた抗体はアメフラシ神経系、特に末梢神経を特異的に染色した。
これら染色された膜の抗原特異性に、asialo GM1 (Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer) 及び HF treated SGL-II (3-O-MeGal-GalNAc-Gal-Glc-Cer) が反応しないことより、fucose を Gal 構成々分とすることが重要であることを示唆している。今後、FGL-II a,b の分離精製、糖たんぱく質の同定、電子顕微鏡による検索等々の実験により膜の性質及び帰属を明らかにしていきたい。



C. 皮下組織

B. 腹部神経節

図5

〔文献〕

(1) Araki, S., Komai, Y. and Satake, M. (1980) J. Biochem. 87, 503-510

(2) Araki, S. and Satake, M. (1981) Neurosci. Lett. 22, 179-182

(3) Araki, S. and Satake, M. (1984) in preparation

(4) Abe, S., Kumanishi, T., Araki, S. and Satake, M. (1984) Brain Res. (in press)

(5) Magnani, J.L., Smith, D.F. and Ginsburg, V. (1980) Anal. Biochem. 109, 399-402

63 胎児GM_1－ガングリオシドーシス1型及び2型の脳糖脂質

石川幸辰・館　延忠・南　良二
（札幌医大・小児科）

〔要　約〕

GM1-gangliosidosis Ⅰ型及びⅡ型の羊水診断より、各々、罹患胎児を得、その脳糖脂質を分析した。その過程で、正常胎児脳（22～23週）を分析したところ、脳中性糖脂質で、正常小児脳では検出されないGlobo系（$GbOse_3Cer$、$GbOse_4Cer$）、Ganglio系（$GgOse_3Cer$、$GgOse_4Cer$）、Lactoneo系（$LcnOse_4Cer$）などが、確認された。本症Ⅰ型及びⅡ型の小児でも、Globo系糖脂質が確認されており、この事は、developmental changeで正常胎児脳に内在したGlobo系、Ganglio系の代謝経路が、本症でのGM1-ganglioside の蓄積により、Ⅰ型、Ⅱ型小児脳で顕在化したものと考えられた。胎児脳の中性糖脂質では、対照脳と罹患脳で明らかな差は認めなかった。一方、type 1 fetusでは、脂質結合総シアル酸は、2.9倍、GM1-gangliosideは、4.3倍と顕著に増加していたが、type 2 fetusでは、各々1.5倍、1.6倍と軽度の増加を示すのみで、この事実は、本症Ⅰ型とⅡ型の臨床的な違いは、GM1-gangliosideの蓄積速度の違いが一因となっていることを示唆している。

Key words：GM1－gangliosidosis type 1 and 2、affected fetus.

はじめに：GM1-gangliosidosisは、リソゾーム水解酵素の1つである、GM1－β－galactosidaseの欠損により、中枢神経系のほか、全身諸臓器に、GM1－gangliosideの蓄積する遺伝性リソゾーム蓄積性疾患の1つである。現在、本症は臨床的に、発症・死亡年齢、顔貌異常、骨変化、肝脾腫及びCherry-red spotの有無に基ずき、Ⅰ型とⅡ型に分類されている。最近では、成人型も報告されている。一方、本症の出生前診断も報告されている。以前、我々は、本症Ⅰ型及びⅡ型の小児の脳糖脂質を分析し、正常対照脳では提出されないGlobo系糖脂質（$GbOse_3Cer$、$GbOse_4Cer$）の増量を確認し、GM1－gangliosideの蓄積によるGlobo系糖脂質に関わる代謝経路の顕在化と推定した。(1)

今回、我々は、従来あまり報告のない胎児期での脳中性糖脂質組成について、明らかにするとともに、本症Ⅰ型及びⅡ型の出生前診断で得られた罹患胎児の脳糖脂質について、若干の知見を得たので報告する。

症　例

症例1：第1子が、生後3か月頃、眼振と肝腫大に気づかれ、Cherry-red spot、骨変化、末梢リンパ球空胞を認め、その後、退行性変化が進行、4歳3か月で死亡。臨床経過より、本症Ⅰ型と考えられた。第2子は、妊娠第15週でamniocentesisを施行、培養羊水細胞でのβ-galactosidase欠損により、本症と診断され、妊娠第22週に、治療的人工流産がなされた。（type 1 fetus）

症例2：第1子が、1歳6か月頃より退行性変化をきたし、骨変化を軽度認めるも顔貌異常、肝脾腫、Cherry-red spotなどは認めなかった。その後、徐々に退行性変

化が進行し、8歳3か月、肺炎で死亡した。臨床経過より、本症Ⅱ型と考えられた。次の第2及び3子とも、妊娠第17週でamniocentesisを施行、培養羊水細胞中のβ-galactosidase欠損を認め、治療的人工流産がなされた。(type 2 fetus)

実験方法

糖脂質の分離・精製：治療的人工流産で得られた胎児全脳は、分析まで-70℃で保存した。妊娠第22～23週の胎児脳(n＝5)150gを対照として用いた。type 1 fetusは、4g、type 2 fetusは、1.5g用いた。脱水をかねて、各々3容量の冷アセトンでホモジネート後、アセトン可溶画分を除き、アセトンパウダーを得た。パウダーは、クロロホルム：メタノール(以下C：M)2：1及び1：2(V/V)、各々3容量で脂質を抽出した。次にLedeenらの方法に従って、DEAE-Sephadex A 25カラム(酢酸型)にapplyし、中性及び酸性画分に分画した。中性脂質は、アセチル化後、Florisilカラムにより、アセチル化糖脂質画分を分離し、脱アセチル化、透析した。一部を用いて、フェノール硫酸法により、hexoseを定量、また、C:M:W 65:25:4(V/V/V)の展開系でTLCを行ない、オルシノール硫酸で発色後、既知の糖脂質のRf値と比較して、各糖脂質の構造を推定した。対照脳(n=5)は、さらに、Iatrobeadsカラム(容積50 mℓ)にapplyし、C:M:W 83:16:0.5から55:42:3(V/V/V)の直線濃度勾配で溶出し、6画分に分画した。先のDEAEカラムは、1容量のメタノールで洗浄後、3カラム容量の0.2Mメタノール性酢酸ナトリウムで、酸性画分を溶出し、弱アルカリ水解、透析した。さらに、Iatrobeadsカラムにapplyし、3カラム容量のクロロホルム及びC:M 85:15(V/V)でコンタミを除き、6カラム容量のC:M 1:1でガングリオシドを画分を得た。一部を用いて、シアル酸を定量、C:M:W 60:30:8(V/V/V)の展開系でTLCを行ない、レゾルシノールで発色した。

糖脂質組成：中性糖脂質に対しては、島津2波長クロマトスキャナCS-910型にて、サンプル540nm、対照800nm、scan速度40cm/min、slit 10×0.1nmでlinear scanし、標準糖脂質を用いて、定量を行なった。ガングリオシドに対しては、GM1-ganglioside標準物質として、サンプル580nm、対照800nm、scan速度20cm/min、slit 0.25×0.1nmでlinear scanした。

結果

中性糖脂質：Fig. 1に、中性糖脂質画分のTLCを示す。Lane 6に示すGM1-gangliosidosis Ⅰ型の幼児脳と比較して、明らかにRf値の異なるbandが認められた。Rf値より、Globo系糖脂質(GbOse$_3$Cer、GbOse$_4$Cer)が確認された。GbOse$_3$CerとGbO$_4$se Cerの間に位置するbandは、TLCでのRf値より、LcnOse$_4$Cerと推定された。Table 1に、各中性糖脂質の組成比、含量を示す。type 1 fetusで軽度、総hexose量の増加る認めるも、asialo誘導体であるGgOse$_3$Cer、GgOse$_4$Cerの増加は認めなかった。

ガングリオシド：Fig. 2に、ガングリオシド画分のTLCを示す。また、Table 2に総シアル酸量、GDlaに対するGM3からGD3までの各々のモル比を示す。総シアル酸量では、type 1 fetusで2.9倍、type 2 fetusで1.5倍の増加を認め、さらにtype 1では、GM1-ganglioside は4.3倍に増加していた。しかし、type 2では、1.6倍と軽度の増加を示すのみであった。

考按

今回、我々は、GM1-gangliosidosis Ⅰ型、Ⅱ型の出生前診断で得られた罹患胎児の脳

糖脂質を分析した。胎児脳中性糖脂質については、Svennerholm らの報告(2)があるのみで不明の点が多い。対照胎児脳の分析で、Globo系（$GbOse_3Cer$、$GbOse_4Cer$）の他、Ganglio系（$GgOse_3Cer$、$GgOse_4Cer$）、Lactoneo系（$LcnOse_4Cer$）などが確認された。我々の検索した正常小児脳では、これらの系列の糖脂質は検出されず、脳における糖脂質代謝の developmental change と考えられた。本症Ⅰ型、Ⅱ型の小児脳では、GM1-β-galactosidase 欠損により、Ganglio系の蓄積を認めるほか、Globo系も相当量存在しており、正常胎児脳でもこれらの系列の存在が確認されたことより、GM1-ganglioside の過剰な蓄積によるこれらの系列の代謝経路の顕在化と考えられた。さらに、正常及び罹患胎児脳の中性糖脂質含量は、総 hexose 量で比較すると、正常成人脳の 1/10 程度と微量であるが、Globo系、Ganglio系及びLactoneo系と多彩であり、むしろ代謝上は活発であると考えられた。正常及び罹患胎児で、中性糖脂質含量、組成において、明らかな差は認めなかったが、ガングリオシドに関しては、type 1 fetus で総シアル酸量、GM1-ganglioside の顕著な増加を認めたが、type 2 fetus では軽度であった。この事実は、本症Ⅰ型、Ⅱ型の出生後の臨床像の違いは、GM1-ganglioside の蓄積速度の違いが一因であることを示唆している。

文　献

(1) Ishikawa, Y., Makita, A., and Minami., R. (1983) Proc. J.C.B.L. 25, 459－462

(2) Svennerholm., L. (1964) J. Neurochem. 11, 839－853

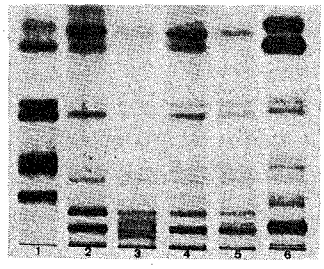


Fig. 1 Thin-layer chromatogram of total neutral glycolipids of fetal GM1-gangliosidosis brains. 1, Standard mixture (GalCer, LacCer, GbOse3Cer, GbOse4Cer); 2, Control fetuses(22-23W); 3, Control fetus(24W); 4, type 1 fetus; 5, type 2 fetus; 6, type 1 infant.

Table. 1 Composition and contents of neutral glycolipids from fetal GM1-gangliosidosis brains

Glycolipids on TLC	Proposed structure	control fetus (n=5, 22-23W)	type 1 fetus (22W)	type 2 fetus (24W)
A	Gal- & Glc-Cer	26	31	23
B	Lac-Cer	19	17	15
C	GbOse3Cer	5	3	2
D	GgOse3Cer	10	8	18
E	GbOse4Cer	tr	2	n.d.
F	LcnOse4Cer	21	18	22
G	GgOse4Cer	19	21	20
		(content %)		
Total hexose μg/g wet tissue		43.0	54.4	45.3

Abbreviations used: tr, trace; n.d., not detected.

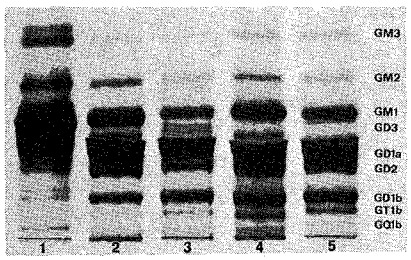


Fig. 2 Thin-layer chromatogram of gangliosides of fetal GM1-gangliosidosis brains. 1, type 1 infant; 2, normal infant (6M); 3, control fetuses (n=5, 22-23W); 4, type 1 fetus; 5, type 2 fetus.

Table. 2 Composition and contents of gangliosides from fetal GM1-gangliosidosis brains

gangliosides	control fetus (n=5, 22-23W)	type 1 fetus (22W)	type 2 fetus (24W)
	molor ratios (GD1a=100)		
GM3	3.2	7.4	4.0
GM2	24.6	20.1	13.8
GM1	98.4	148.6	104.8
GD3	8.8	12.8	10.6
Total NANA μg/g wet tissue	272.2	781.1	406.4

64 マウスにおける脳とNatural Killer 細胞の共通抗原としてのGA$_1$（Ganglio－N－tetraosylceramide）のミエリン局在性

楠　進・辻　崇一　（東大・医・Ⅱ生化）
永井克孝　（同・Ⅱ生化：新潟大・脳研）

〔要　約〕

GA$_1$（Ganglio-N-tetraosylceramide）は，その免疫学的反応性からマウスの脳とNatural Killer細胞（NK細胞）の共通抗原として知られ，その重要性が注目されているが，正常成熟マウス脳においてその存在は化学的に確認されておらず，脳内における局在性についても分っていない。そこで我々はまずマウス脳の凍結切片を，精製抗GA$_1$ IgGを用いた酵素抗体法により染色した。その結果マウス脳の白質が特異的に染色された。そこで次に白質の主要構成成分であるミエリンについてGA$_1$の存在を検索した。マウス脳からミエリン分画をとり，脂質を抽出してカラムクロマト法により主要糖脂質成分であるcerebrosideを除いた中性糖脂質画分を得た。得られた画分の薄層クロマトグラムにて，精製したGA$_1$と同じ移動度を示すbandが検出され，また薄層クロマトプレート上でのperoxidase anti-peroxidase法により，このbandの抗GA$_1$抗体との反応性も確認された。このbandの糖脂質について，糖鎖部分の構成糖のモル比をしらべ，GA$_1$と同一であることがわかった。以上よりミエリン分画におけるGA$_1$の存在が化学的に確認された。ミエリンとNK細胞の共通抗原の存在は今後免疫性神経疾患の病態を考えるうえで新たな手がかりを提供する可能性があると思われる。

Key words：　GA$_1$，myelin，natural killer cell

GA$_1$（Ganglio-N-tetraosyl ceramide，アシアロGM$_1$）は，その免疫学的反応性からマウス脳とNatural Killer細胞（NK細胞）の共通抗原として知られている。[1] 一方ヒトの神経疾患であるCNS-SLE（中枢神経症状を伴った全身性エリテマトーデス），ニューロベーチェット病や多発性硬化症などでは，この物質に対する抗体価の上昇が報告されており，神経系と免疫系の共通抗原としてのGA$_1$は免疫性神経疾患の病態に何らかの役割を果している可能性がある。しかし従来，GA$_1$はある種の先天性代謝異常患児の脳には多量に存在するが，正常脳についてその存在を化学的に確認した報告はヒトの乳幼児についてあるのみであり，正常成熟マウス脳についてのそのはない。我々は，GA$_1$が正常成熟マウス脳に実際に物質として存在するのか否かを確認し，そしてするとすればどのような分画に存在するのかを検索することが，脳と免疫系との相互作用の解析に，ひいては免疫性神経疾患の病態解明に大変重要な意味をもつ可能性があると考えて以下の検索を行った。まずわれわれは脳ホモジェネート全体について検索したのではGA$_1$が微量なため検出できない可能性があるので，精製したGA$_1$に対する抗体を用いて免疫組織化学的にマウス脳における抗原の局在をしらべ，局在の見られた分画についてGA$_1$の存在を化学的にしらべるという手順をとった。そしてその結果マウス脳のミエリン分画にGA$_1$の存在を確認したので報告する。

〔材料と方法〕

①抗GA$_1$ IgG抗体

精製したGA$_1$を免疫して得られたウサギ血清から，Taki et al.[3]の方法に従って抗GA$_1$IgG抗体を得た。得られた抗体については2種類の糖脂質につきcross reaction

の有無をしらべ，反応がないことを確かめた。

②マウス脳免疫組織染色

クリオスタットを用いたマウス(C57BL，8週令オス)脳凍結切片を，抗GA1 IgG抗体とperoxidase標識抗ウサギIgG抗体を用いて酵素抗体法により染色した。発色にはdiaminobenzidineを用いた。対照として正常ウサギIgGと抗GA1 IgGをGA1で吸収したものについてもしらべた。

③マウスミエリン中性糖脂質の分析

マウスの脳ホモジェネートからNorton and Poduslo[3]の方法に従ってミエリン分画をとり，chloroform-methanol-waterにより脂質を抽出した。得られた脂質からDEAEセファデックスA-25カラムにより中性画分を分離し，アセチル化したのちフロリジルカラムによって中性スフィンゴ糖脂質画分を分離した。その際に微量成分であるGA1を検出しやすくするため，大量に存在するcerebrosideを1,2-dichloroethane-methanol 9.6:0.4にて予め溶出しておき，その後に1,2-dichloroethane-methanol 9:1にて残りの中性スフィンゴ糖脂質を溶出した。

得られた画分をchloroform-methanol-water 55:45:10を溶媒としてsilica gel 60薄層クロマトプレート上に展開し，オルシノール試薬で発色を行った。また同じサンプルをプラスチック薄層クロマトプレート上に展開し，その上で抗GA1 IgG抗体を用いたperoxidase anti-peroxidase(PAP)法を行いdiaminobenzidineを用いて発色させて抗GA1抗体との反応性をしらべた。

薄層クロマトプレート上でGA1と同じ移動度を示す糖脂質につき，プレート上からかきとって精製し，ガスクロマトグラフィーを用いて構成糖のモル比を分析した。

[結果]

Fig.1aは大脳のfrontal sectionを抗GA1 IgGで染めたものであり，corpus callosumが濃く染っているのがわかる。Fig.1bは小脳のhorizontal sectionを抗GA1 IgGで染めたもので，小脳白質が染っている。一方正常ウサギIgG，およびGA1で抗GA1 IgGを吸収したものでは白質の染色は認められなかった。

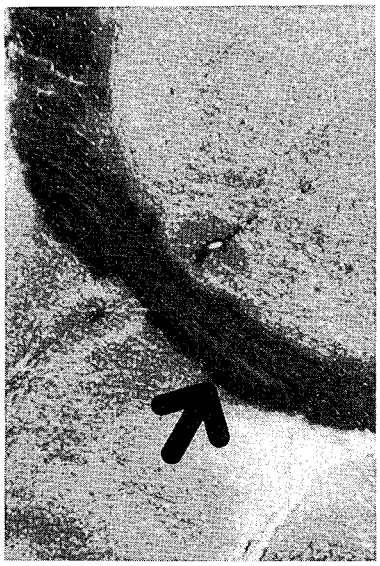
以上より抗GA1 IgG抗体によりマウス白質が特異的に染色されることがわかったため白質の主要構成成分であるミエリンについてGA1の存在を化学的に検索した。

Fig.2aはマウスミエリン分画の中性スフィンゴ糖脂質についての薄層クロマトグラム(TLC，オルシノール試薬による発色)である。精製GA1と同じ移動度のbandが見られる。Fig.2bは同じ検体のプラスチック薄層プレート上でのPAP染色である。精製GA1と同じ移動度を示すbandのみが抗GA1 IgG抗体と反応して染っている。

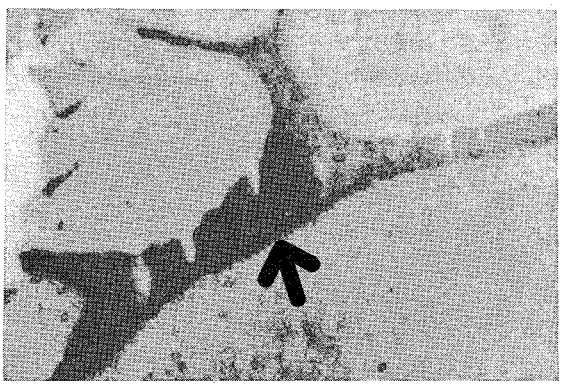
薄層プレート上から，このbandに相当する部分をかきとって精製し，ガスクロマトグラフィーにより，その構成糖のモル比をしらべたところ，ガラクトース対グルコース対NアセチルガラクトサミンがI.9:1.0:1.0であり，GA1と同一の糖組成であることが確認できた。

[考察]

以上の結果はマウスNK細胞のマーカーとされるGA1がマウス脳のミエリン分画に存在することを示唆している。すなわちGA1はマウスミエリンとNK細胞の交叉抗原であると考えられる。今回は免疫組織化学的に白質が抗GA1抗体で染色されたことか



〈Fig. 1a〉



〈Fig. 1b〉

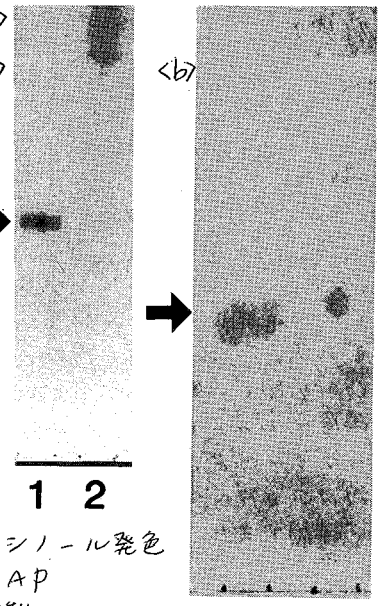
Fig.1a：マウス大脳 frontal section
corpus callosum が染色されている。
（矢印）

Fig.1b：マウス小脳 horizontal section
白質が染色されている。（矢印）

ち，ミエリンに焦点をあてて検索した。今後ミエリン以外の subcellular fraction についてもしらべることが必要であろう。またGA1以外にGA1と同じ抗原決定基をもった糖蛋白質などの物質の存在の有無を検討する必要があろう。

先にも述べたように抗GA1抗体はいくつかのヒトの免疫性神経疾患において上昇することが報告されている。その意義は不明であるが神経系と免疫系の共通抗原という観点と合わせて考えると，これらの疾患の病態解明に新たな手がかりを与えるものと思われる。その意味でミエリンとNK細胞の共通抗原としてのGA1の存在は興味深いものといえよう。

〈Fig. 2〉



〈a〉オルシノール発色
〈b〉 PAP
1：精製GA1
2：ミエリン中性糖脂質
（cerebroside を除く）

〔文献〕

1) Kasai,M., Iwamori,M., Nagai,Y., Okumura,K. and Tada,T. (1980) Eur.J.Immunol. 10,175-180.
2) Norton,W.T. and Poduslo,S.E. (1973) J.Neurochem. 21,749-757.
3) Taki,T., Abe,M. and Matsumoto,M. (1982) J.Biochem. 91,1813-1816.

65 ラットの中枢ノルアドレナリン神経終末の神経毒物による変性に対するGM_1ガングリオシドの効果

小島秀樹（久留米大・医・脳研）・G. Jonsson（カロリンスカ研究所）
A. Gorio（Fidia）・山田茂人・提 哲之・安楽茂己（久留米大・医・脳研）・稲永和豊（同・精神科）

〔要 約〕

カテコラミン神経毒物の6-hydroxydopamine(6-OH-DA)を持続的にラットの大脳皮質内に注入して作製した中枢ノルアドレナリン(NA)神経終末の変性に対するGM_1ガングリオシド(GM_1)の投与の効果を生化学的、蛍光組織化学的に調べた。

NA神経終末の変性モデルはラットの皮下に植えこまれた浸透圧ミニポンプから、6-OH-DA(2mM)を3-7日間注入することにより得られた。6-OH-DAの注入点の周囲数mmの範囲内にてNA神経終末の消失とNAの減少を認めた。

GM_1(30mg/kg/day,i.p.)の7日間の投与は6-OH-DAによって生じたNAの減少に対して、わずかな効果を示したに過ぎなかったが、6-OH-DA注入の前、3日間のGM_1の前処置とその後のGM_1の連続投与(7-14日間)はNAの有意な増加を来した。このNA量の有意な増加はNA神経終末の数の増加として蛍光組織化学的にも確認された。

以上の生化学的、組織化学的事実は外因性のGM_1が中枢NA神経終末の修復に促進的に作用することを示している。

Key words： GM_1ganglioside, 6-hydroxydopamine, noradrenaline

〈緒言〉

損傷を受けた神経の再生とその機能の回復に関する機序を明らかにするために、現在、多大の努力がなされているが、得られた知識は断片的で不完全である。ごく最近GM_1の神経修復促進作用を示唆する報告(1,3,7,8,10,11)が増えつつあり、GM_1の本作用は基礎および臨床の面からも大変興味が持たれている。しかしGM_1の本作用の詳細については現在不明である。

今回の研究目的はGM_1の投与がラット大脳皮質内のNA神経終末の6-OH-DAによる変性の修復に促進的に作用するかどうかを明らかにすることである。

〈実験方法〉

雄性アルビノラット（Sprague-Dawley、実験開始時の体重は150-160g）を使用した。ラットの大脳皮質内にカニューレの植えこみを行った後、個別に飼育した。

GM_1（Fidia）は生食に溶解し腹腔内投与した。対照には生食を同じく投与した。両側の上頸神経節の切除は実験開始の3日前にエーテル麻酔下で行った。

6-OH-DAの大脳皮質内注入：Kasamatsuら(12,13)によって開発された後頭葉皮質内微量注入法を本実験に応用した。ペントバルビタール麻酔下に頭蓋骨を露出し右側（bregmaの外側3mm、後方3mm）の点に穴(1mm)をあけ金属カニューレ（20-gauge皮下針）を皮質内に刺入した（カニューレの先端は右頭頂葉皮質内、深さ1-1.5mmに位置していた）。カニューレを歯科用セメントで頭蓋骨に固定した後、浸透圧ミニポンプ（Alzet, 2001；1μl/h）に接続した。6-OH-DA-HCl(2mM;AB Hässle)とアスコルビン酸(1.0mg/ml)を無菌生食

に溶かしその140 µl を浸透圧ミニポンプにつめ、これを背部皮下に埋めこんだ。埋めこんだポンプは3又は7日後にエーテル麻酔下にとり出した。6-OH-DA は本条件下で少くとも7日間は安定していることが知られている(2)。

NA の生化学的分析：断頭後、速やかに脳をとり出した後、氷上で左右の大脳皮質を水平断にスライスし、これをさらに約1mm幅の小スライスに10等分した（左右の小スライスには前頭葉の方から番号をつけた）。6-OH-DA の注入点（スライスNO.7)は皮質上の黒点として容易に識別された。各サンプルはただちに320 µl の冷却した0.1M PCA（27 pmol internal standard；α-methyl-DA を含む）中に入れ-20°Cで保存した。NAの定量は Keller ら(14) Jonsson ら(9)の方法に準じて行い酢酸－クエン酸Buffer（pH 5.2）を20-30 ml/h の流速でカラム（陽イオン交換樹脂；Waters CX/carasil ）に流し、ECD のついたHPLC で分析した。

NAの蛍光組織化学的分析： Falck-Hillarp 法（4，6）に準じた。

動物を MAO 阻害剤［Pargyline HCl(100mg/kg,i.p.,2-3 h)］で前処置した後、4％ホルムアルデヒド・リン酸 buffer (0.1M, pH 4.5, 150 ml,4°C) で脳の還流を行った。大脳皮質のみをスライスし、これを凍結－乾燥、ホルムアルデヒドガス処理（80°C，1h）、パラフィン包埋、連続切片 (10 µm) とし、大脳皮質内のNA蛍光を透過型の蛍光顕微鏡（Zeiss ）で観察した。

〈結果〉

大脳皮質内NA神経終末の 6-OH-DA による局所的損傷の特徴：

6-OH-DA の一側皮質内注入により、注入点の周囲のNA量の著明な減少とそれに一致した神経終末の減少を認めたが、この現象は注入点の後方においてより著しかった（Fig.1）。

6-OH-DA によるNAの減少は反対側の皮質内においては全く観察されなかった。このことは6-OH-DA の神経毒性作用の拡がりが注入側に限られていることを示す。6-OH-DA を3日間注入した場合のNAの減少率と7日間の場合のそれとはほぼ同じであった。この事実はNA神経に対する6-OH-DA の神経毒性効果が注入3日目で最大に達することを示している。

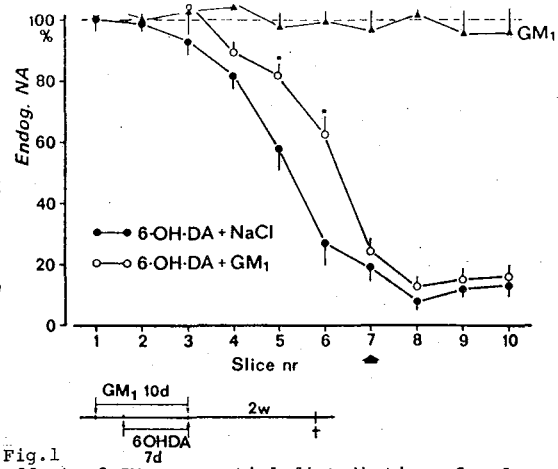


Fig.1
Effect of GM_1 on spatial distribution of endogenous NA in the cerebral cortex in fronto-occipital direction after unilateral infusion of 2mM 6-OH-DA for one week. Each point shows the mean ± S.E.M.(n=6-7),expressed as %of non-infused control side.GM_1(▲—▲)values represent NA levels in non-infused side GM_1treatment,expressed as % of the same side from saline treated rats.
*= 0.05 p 0.01; (Student's t-test).

(1) GM_1 の 6-OH-DA のNA神経毒性に対する検討：GM_1（30 mg/kg/day,i.p.）の投与は、6-OH-DA の皮質内注入の前に3日間、注入開始後も引きつづきなお3日間（合計6日間）行った。6-OH-DA を3日間注入し翌日、皮質内のNA減少

の分布を調べたが、GM_1の投与はNAの減少に何んら影響を与えなかった。このことは、GM_1の投与が、6-OH-DAのNA神経毒性作用そのものを変えないことを示唆している。

(2) GM_1の6-OH-DAによるNA神経終末の変性に対する効果：GM_1(30 mg/kg/day i.p.)を6-OH-DAの注入(3日間)終了後から7日間連続して投与した場合、GM_1の投与により、6-OH-DAのNA減少は回復する傾向を示したが有意差は認めなかった。しかし、GM_1を6-OH-DAの注入開始の前、3日間そして注入開始後7日間投与した場合、NAの減少の逆転が注入点の吻側で有意に見い出された(Fig.1)。さらにGM_1の投与期間を延長して合計17日間(Fig.2)とした場合、NAの減少の有意な回復が、注入点の吻側のみならず尾側でも観察された(Fig.2)。GM_1の投与は健側皮質内のNAを変化させなかった。このことから、GM_1の投与は正常な神経内のNAレベルには何んら影響しないことが示唆された。処で、脳に損傷が生じた場合、交感神経節後線維が脳内にて成長する(5)。又、GM_1は交感神経線維の成長を促進することが知られているので、上頸神経節を両側とも除いた動物を用いて、再度上述の実験(Fig.2)を行い、Fig.2と同様の結果を得た。この結果から、GM_1投与によるNA減少の逆転は上頸神経節後線維の脳内成長には無関係であると考えられた。

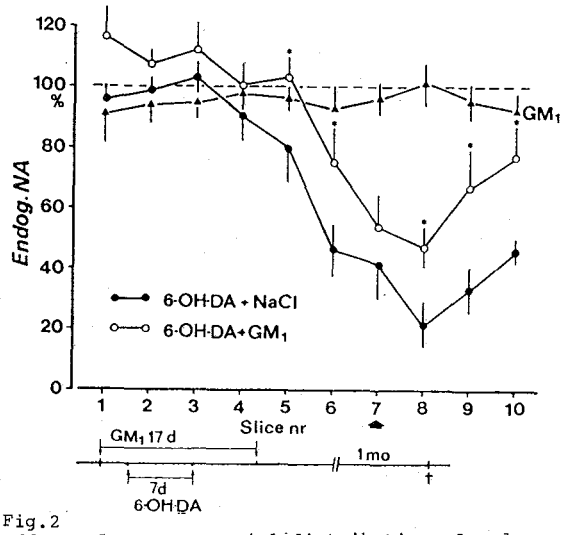


Fig.2
Effect of GM_1 on spatial distribution of endogenous NA in the cerebral cortex in fronto-occipital direction after unilateral infusion of 2mM 6-OH-DA for a week. The rats were sacrificed 1 month after termination of GM_1 treatment. Each point shows the mean ± S.E.M. (n=4-6), expressed as % of non-infused control side. GM_1 values (▲—▲) indicate NA levels in non-infused side after GM_1. * = $0.05 > p > 0.01$; (Student's t-test).

Fig.1と同じ条件で処理した動物を蛍光組織化学的に分析した場合、GM_1の投与後6-OH-DAの注入点から1～2 mmの吻側部位にてNA神経終末の蛍光量の増加を認めた。

以上の事実はGM_1の投与が中枢NA神経終末の修復に促進的に作用することを示している。

〈文献〉

1. Agnati,L.F.,Fuxe,K.,Calza,L.,Benefenati,F.,Cavicchioli,L.,Toffano,G.andGoldstein,M. (1983)Acta physiol.scand.in press.
2. Bear,M.F.,Clinton,R.J.,Jr.and Haycock,D.A.(1983)Soc.Neurosci.,9,352:2.
3. Ceccarelli,B.,Aporti,F.and Finesso,M.(1976)In Advances in Experimental Medicine and Biology,71,275.
4. Corrodi,H. and Jonsson,G.(1967)J.Histochem.Cytochem.,15,65.
5. Crutcher,K.A.,Brothers,L. and Davis,J.N.(1981)Brain Res., 210,115.
6. Falck,B.,Hillarp,N.-A.,Thieme,G.and Torp,A.(1962)J.Histochem.Cytochem.,10,348.
7. Gorio,A.,Carmignoto,G.,Facci,L.and Finesso,M.(1980)Brain Res.,197,236.
8. Gorio,A.,Marini,P. and Zanoni,R.(1983)Neuroscience,8,417.
9. Jonsson,G.,Hallman,H.,Mefford,I.and Adams,R.N.(1980)In Central Adrenaline Neurons,59
10. Jonsson,G.,Gorio,A.,Hallman,H.,Janigro,D.,Kojima,H.and Zanoni,R.(1984)in press.
11. Karpiak,S.E.(1983)Exp.Neurol.,81,330.
12. Kasamatsu,T.,Pettigrew,J.D.and Ary,M.(1979)J.Comp.Neurol., 185,163.
13. Kasamatsu,T.,Itakura,T.and Jonsson,G.(1981)J.Pharmacol., 217,841.
14. Keller,R.,Oke,A.,Mefford,I.and Adams,R.N.(1976)Life Sci.,19,995.

66 ラット脳プロスタグランディンD合成酵素の精製及び免疫組織化学

裏出良博・藤本　昇・渡辺恭良・早石　修
（新技術開発事業団・早石プロジェクト）
金子武嗣・水野　昇　（京大・医・I解剤）

〔要　約〕

Prostaglandin（PG）D合成酵素はRat及び人の中枢神経系の主なPGであるPGD_2の生合成を触媒する酵素である。今回我々はRat脳よりSDS電気泳動及び超遠心分離分析上均一なPGD合成酵素の精製法を開発した。精製酵素の分子量，等電点，Vmax，基質であるPGH_2に対するKm値はそれぞれ26,000, 4.6, 4.7 μmol/min/mg, 8 μMであった。次にこの精製酵素を兎に免疫し抗体を調製した。得られた抗体は，Ouchterlonyテストにおいて精製酵素及びRat脳Homogenateと連続した1本の沈降線を形成し，免疫滴定試験では4℃，2時間の反応後，Rat脳・脊髄中の90%以上の酵素活性を吸収した。又，定量的免疫沈降試験の結果，抗体過剰域での抗原抗体結合比は1：4，酵素に結合可能な特異抗体含量は22%以上であった。更にRat脳HomogenateのSDS電気泳動後のImmunoblottingでは，この抗体は精製酵素と同一の移動度の蛋白Bandのみを検出した。この抗体を用いてRat脳におけるPGD合成酵素の免疫組織化学的検索を行なった結果，幼若Ratでは主として大脳皮質の大型神経細胞に本酵素の局在が認められるが，成熟Ratではそれらの神経細胞の陽性所見は消失し，Oligodendrogliaと思われる小型の細胞へその局在が変化するという興味深い知見を得た。

Key words：Prostaglandin D Synthetase, Purification, Immunohistochemistry

Prostaglandin（PG）D_2はRat及び人の中枢神経系における主なPGであり体温調節や睡眠誘発などの中枢作用を示す生理活性物質である。PGD_2の生合成反応を触媒するPGD合成酵素及び分解反応を触媒する15-hydroxy PGD_2脱水素酵素は共に脳・脊髄に特異的に分布している(1)。今回我々はPGD合成酵素の大量精製法を開発し本酵素の酵素学的諸性質を調べ，さらに本酵素に対する抗体の調製を行ない酵素抗体法による免疫組織化学的研究を行なった。

〔結果及び考察〕PGD合成酵素はRat脳より7段階の操作により25%の収率で2600倍に精製された（Table 1）。精製酵素はSDS電気泳動後の銀染色において数μgまで単一Bandを示し，その均一性は沈降平衡による超遠心分離でも確認された。本酵素の分子量は26,000，等電点は4.6，Vmaxは4.7μmol/min/mg，Turn over numberは約120，基質であるPGH_2に対するKm値は8μMであった。次に我々は大量精製したPGD合成酵素を兎に免疫し抗体の調製を行なった。得られた抗血清はOuchterlony免疫二重拡散テストにおいて精製酵素及びRat脳Homogenateとの間に一本の連続した沈降線を示したが，本酵素と同様の反応を触媒するGlutathione要求性PGD合成酵素を高濃度に含むRat脾臓Homogenateに対して沈降線を形成しなかった（Fig. 1）。

Table 1. Purification of Prostaglandin D Synthetase from Rat Brain

	Specific Activity (nmol/min/mg)	-fold	Yield (%)
Crude extract	1.8	1	100
P-cellulose	1.9	1	95
Acid (pH4.5)	7.2	4	86
Am.Sulf. 65-85%	23.0	13	68
Phenyl-Sepharose	378.0	210	49
DE52-cellulose	550.0	306	31
CM52-cellulose	4680.0	2600	25

従ってRat脳のPGD合成酵素とRat脾臓のPGD合成酵素は免疫学的に異なり，この抗血清はRat脳の合成酵素を特異的に認識することが示された。この抗血清より回収した抗体(IgG画分)を用いてRat脳・脊髄中のPGD合成酵素活性の免疫滴定を行なうと，これら臓器中の本酵素活性は加えた抗体量に対し同一の滴定曲線を示し，脳・脊髄中の本酵素活性は免疫学的に同じものであることが明らかになった

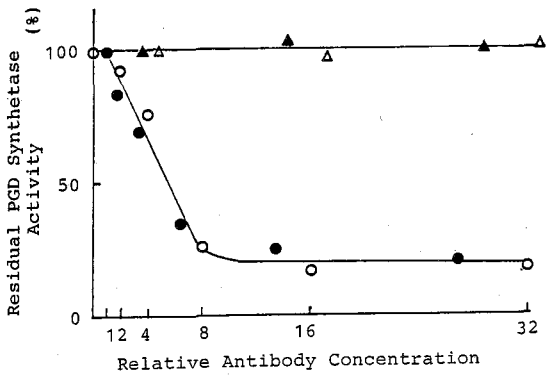


Fig.2 Immunotitration of Prostaglandin D Synthetase Activity in Brain Homogenate (○,△) or Spinal Cord Homogenate (●,▲).

The homogenates containing a given enzyme activity were incubated with various amounts of the antibody. After the incubation at 4°C for 2h, the enzyme activity was determined in the supernatant after the centrifugation at 10K x g for 20 min. Triangles represent the values after the incubation with nonimmunized IgG.

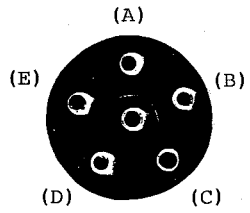


Fig.1 Ouchterlony Double Immunodiffusion Test

Well(A), Purified prostaglandin D synthetase; Well(B), Rat brain homogenate; Well(C), Rat spleen homogenate; Well(D), Saline; Well(E), Nonimmunized rabbit serum; Center well, Anti-prostaglandin D synthetase serum.

(Fig.2)。又，充分量の抗体との incubation により90％以上の酵素活性が免疫沈降物に吸収されることから，本抗体はRat中枢神経系のPGD合成活性のほとんど全ての成分を認識することが証明された。本抗体と精製酵素による定量的免疫沈降試験を行なった結果 (Fig. 3)，抗体過剰域での抗原抗体結合モル比は1：4.06，Equivalent pointより求めた本酵素に結合可能な特異抗体含量は全IgG中の22％であり，本抗体はPGD合成酵素に対する結合性も高く特異抗体含量も高いことが示された。さらに本抗体の特異性を決定づけるためにImmunoblottingによる解析を行なった (Fig.4)。その結果Rat脳Homogenateのlaneにおいて

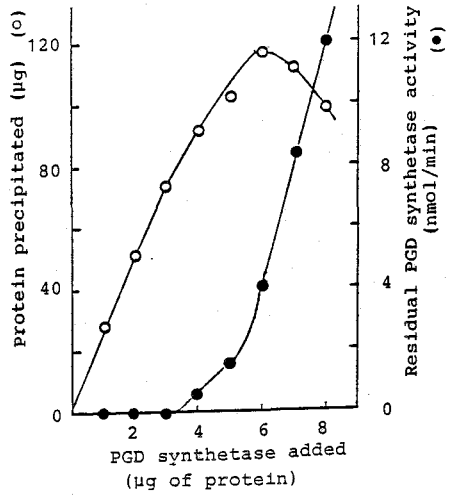


Fig.3 Quantitative Immunoprecipitin Test

A given amount of the antibody (490μg) was incubated with various amounts of the purified enzyme at 4°C overnight. After the centrifugation at 10K x g for 20 min, the protein content (○) of the immunoprecipitin and the enzyme activity (●) in the supernatant were determined.

精製酵素と同一の位置にのみ一本の陽性Bandが検出された。さらに夾雑蛋白を除去するためにHomogenateと本抗体との免疫沈降物で同様の実験を行なったが，本抗体との結合反応に帰因する陽性Bandは上記のBand以外に検出されなかった（lane 8で分子量5万の位置に出現するBandは免疫染色の二次抗体として抗兎IgG抗体を用いたことによる兎IgGのHeavy鎖に由来する染色Bandである)。従って本抗体はPGD合成酵素に対し高度の特異性を有することが証明された。そこでこの抗体を用いRat中枢神経系における

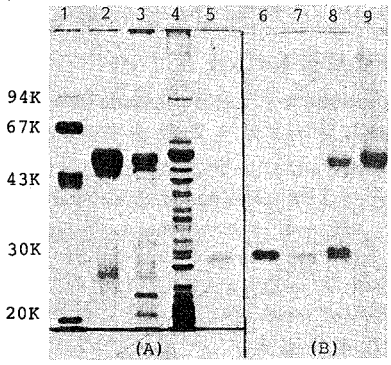


Fig.4 Immunoblotting after SDS-gel Electrophoresis of Brain Homogenate by Anti-prostaglandin D Synthetase IgG

Each sample was electrophored in 10% polyacrylamide gel. After the electrophoresis, the gel was separated into two parts. The half (A) was used for the silver staining and the other half (B) for the electrophoretic blotting. The membrane transfer was immunostained with anti-prostaglandin D synthetase antibody by the avidin-biotin-peroxidase complex method. (1), Marker protein; (2,9), Anti-prostaglandin D synthetase antibody; (3,8), Immuno-precipitate formed by the incubation of brain homogenate with the antibody; (4,7), Brain homogenate; (5,6), Purified prostaglandin D synthetase.

PGD合成酵素の免疫組織化学的検索を行なった（Fig. 5)。Bouin又はZamboni液による灌流固定及び後固定後，40μm凍結切片を用いてPAP法及びABC法で染色した。生後一週から三週齢では主として大脳皮質の大型神経細胞に陽性所見が認められたが，成熟Ratでは神経細胞の所見は消失し，小型（長径8−10μm）の突起の少ない円型から楕円型の細胞に陽性所見が認められた。この細胞は，Glial Fibrillary Acidic Proteinとの二重染色の結果からAstrocytesとは別種の細胞であり，白質・灰白質を問わず中枢神経系に広く分布し，Myelin Basic Protein陽性線維と類似の分布を示すことからOligodendrogliaである可能性が高い。このような幼若Ratでの神経細胞から成熟Ratでの神経膠細胞へのPGD合成部位の変化はPGD_2の中枢神経系での機能の解明のための重要な知見であるばかりでなく中枢神経系の成熟という見地からNeuron-Glia相関に対し新しい見解を導入するものと考えられる。

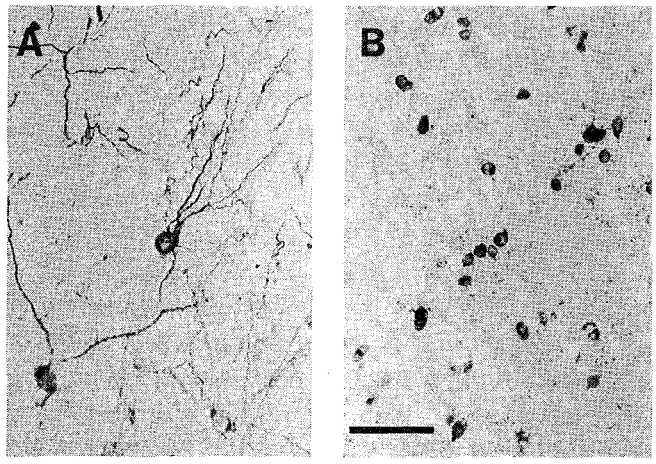


Fig.5 Immunohistochemical Staining of Prostaglandin D Synthetase. Neurons in the neonatal rat brain (A) and glial cells in the adult rat brain (B) are stained. Bar;50um

〔文献〕(1) Hayaishi, O. (1983) in Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research, Vol. 12, (Samuelsson, B., Paoletti, R., and Ramwell, P., eds.) pp.333-337, Raven Press, New York

67 嗅覚系中枢とプロスタグランジン

渡辺恭良（新技術開発事業団・早石プロジェクト）
森憲作・今村一之・高木貞敬（群馬大・医・Ⅱ生理）
早石修（新技術開発事業団・早石プロジェクト）

〔要　約〕

ヒトをはじめ多くの哺乳動物の嗅球～嗅脳には，プロスタグランジン（ＰＧ），殊にPGD_2が多く含まれ，PGD_2合成酵素活性・分解酵素活性ともに，脳内でも高値を示す。これらの点から，PGD_2結合蛋白に対するオートラジオグラフィーを行ったところ，嗅球では，僧帽細胞層に密に見られ，又，梨状皮質や扁桃核・内嗅皮質などにも非常に多いということが判明した。これらは，嗅覚の１次～高次中枢として知られ，我々は嗅覚におけるPGD_2の役割について，今回，ウサギの嗅球で，僧帽細胞（ＭＣ）と顆粒細胞（ＧＣ）とのシナプス連関を中心に解析した。まず，ＭＣのＩＰＳＰのdurationを見るため，lateral olfactory tract（ＬＯＴ）をpair刺激し，field potentialを追跡した。ＰＧの合成阻害剤であるインドメサシンを耳静脈より投与すると，約15分後よりpair刺激に対するＩＰＳＰのdurationが次第に増大し，90～100分後に最大となり，その後も180分迄持続した。一方，一定の嗅覚刺激物質に反応するＭＣのユニット電気活動に対するPGD_2の影響をイオントフォレーシスによって観察したところ，例数は未だ少ないが，ＭＣによっては興奮性が高まる細胞があることが判明し，ＭＣとＧＣとのシナプス間でのPGD_2の調節作用が示唆された。

Key words： olfactory bulb, prostaglandin, IPSP

プロスタグランジン（ＰＧ）は，ヒトをはじめ多くの哺乳動物の脳に含まれ，様々な中枢作用を示すことが知られてきた(1)。その受容体（結合蛋白）の局在をオートラジオグラフィーによって検討したところ，PGD_2結合蛋白が，睡眠中枢や体温中枢である視束前野に多いことや，痛覚中枢である中脳水道周囲灰白質や脊髄膠様質に多いことが判明した(2)。事実、PGD_2は，睡眠導入作用(3)や体温降下作用(4)，また，鎮痛作用(5)を示すことが明らかとなり，結合蛋白の局在とその作用との連関が示唆された。また，ＰＧ結合活性の高い視床下部や，海馬・扁桃核では，PGD_2，PGE_2，$PGF_{2\alpha}$の３者の間で結合蛋白が全く異なる局在を示すことが見い出された(6)。これらの研究とその中枢作用との相関性について，種々の方向性を持った研究が開始されているが，今回第１歩として，嗅覚系におけるＰＧの役割について，PGD_2を中心に検討した。

〔方法〕

1. 受容体局在の解析

ラットやウサギ，サル脳を２％パラホルムアルデヒドを含む冷生理食塩水で灌流固定し，10μmの連続凍結切片を作製し，〔^{3}H〕ＰＧを用いて，4℃で結合実験を行ない，オートラジオグラフィーを行なった。詳細な方法については，文献(2)や昨年の本学会での発表（6,7）を参照されたい。

2. 電気生理学的方法

ウレタン麻酔下，ウサギ（約３㎏）に気管挿管し，臭い刺激を与えるため上行性に鼻腔までカニューレを挿入し，このカニューレをポンプにつないで，呼吸を作り臭い物質を規則的に投与する。lateral olfactory tract（ＬＯＴ）に刺激電極を刺入し，

逆行性刺激により嗅球のMCを興奮させ，細胞外記録電極でモニターして細胞層を同定し，後の記録を行なう。詳細は，文献（8, 9）を参照のこと。

(i) field potential の記録

external plexiform layer 下部に記録電極を刺入し，MCとGCの dendro-dendritic synapses の電気活動を記録する。耳静脈内にPG合成阻害剤であるインドメサシン（1 mg/kg）やPGを投与し，LOTへの pair 刺激による回復時間を見ることにより，IPSP の duration や amplitude を測定する。

(ii) unit potential の記録

臭い刺激により興奮するMCを捜し，その unit に対して，イオントフォレーシスでPGD_2やPGE_2を与え，効果を検定する。イオントフォレーシスに供するPGは，NaOHにより中和して溶かし，中性域（pH 6.5－7.5）で0.5 M付近の溶液とし，溶液にした後，3時間以内に使用した。－100 nA，20 sec で1回のイオントフォレーシスを行なった。

〔結果〕

〔^{3}H〕PGD_2の特異的結合に対するオートラジオグラフィー像をニッスル染色像と比較し，嗅球では僧帽細胞層に，更に中枢では，梨状皮質，扁桃核外側基底核～副外側基底核，内嗅領野に局在することが判明した。これらは，いずれも嗅覚系の伝播系路にあたり，それぞれのレベルで入力を process していると考えられる。

今回は，殊にMCとGCとのシナプスが僧帽細胞層に密であることから，ここに焦点を絞り，PGD_2がどのような作用を担っているのかを知るために，LOTの pair 刺激によってMCのIPSPに対しての効果を調べた。まず，インドメサシン投与前にコントロールとして，7～207 msec（最終的には，450 msec まで）の間で10～20 msec 刻みに，pair 刺激の interval を変え，1回目の刺激から，2回目の刺激までに，どの程度，volley amplitude の回復が見られるかを%表示した。この曲線は，図1の●－●で表わしたものであり，50%回復迄のC－T interval が57 msec である。これに対し，インドメサシン投与後15分以内に変化が表われ，22分後では，50%回復の interval が64 msec，52分後には，83 msec，82分後には，110 msecと大幅に延長し，IPSPの duration が亢進した。しかしながら，この亢進は可逆的であり，120分を越える辺りから，IPSPの duration が短縮する傾向を示した。一方，ウサギに臭い物質をかがせて，反応し

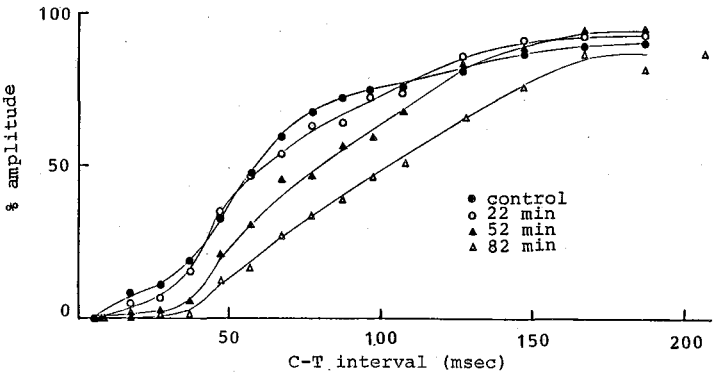


図1. インドメサシン投与後のLOT pair 刺激に対するIPSPの durationの増加

たMCに対し，PGD_2 を−100 nA，20 secイオントフォレーシスを行なうと，細胞によっては，再現性良く興奮性が増大することが判明した。

〔考察〕

MCとGCとの間のシナプスについては，Shepherd（10）によって研究が進められ，reciprocal synapseとして興味深く，様々のことが明白になっており，その作用機序も考え易い。今回の実験結果を基にして考えると，この dendro-dendritic reciprocal synapse（図2）で、PGがGCよりMCへの synapse ①の伝達を活性化するか，MCよりGCへの synapse ② を抑制するか，その2つの可能性が考えられる。現在のところ，このどちらの作用が主であるか判断は下せないが，初回刺激を anterior commissure より与えて，GCのみを興奮させ，次いでLOTを刺激するというより明確な実験系で更に研究を進めたい。また，今回得た結果を評価するために，インドメサシン投与後の効果発現までの time course とPG減少の time course とが合致するものかどうか検討したい。この系は，木村・岡本らによって研究された小脳スライスの系（11）と同様，比較的 in vivo に近く，PGD_2 の作用機構について研究する上で理想的な系であると考えられる。

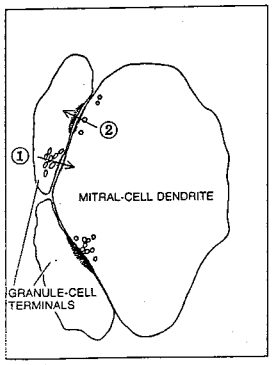


図2. Mitral cell と Granule cell との reciprocal synapse(10)

〔謝辞〕

PGのイオントフォレーシスに関する助言・討論に対し，当プロジェクトの上野隆司博士に感謝致します。

〔文献〕

1. 渡辺恭良，早石　修（1983）　代謝　20，303−312.
2. Yamashita, A. et al. (1983)　Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 6114−6118.
3. Ueno, R. et al. (1983)　Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 1735−1737.
4. Ueno, R. et al. (1982)　Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 6093−6097.
5. Horiguchi, S. et al. (1984)　Abstract of Kyoto Conference on PG, in press.
6. 渡辺恭良ら（1983）　神経化学　22，153−155.
7. 山下　明ら（1983）　神経化学　22，150−152.
8. Mori, K. and Takagi, S. F. (1978)　J. Physiol. (Lond.)　279, 569−588.
9. 高木貞敬（1984）　生体の科学　35. 67−79.
10. Shepherd, G. M. (1978)　Scientific American　238, 92−103.
11. Kimura, H. et al. (1983)　含硫アミノ酸　6，15−20.

68 脂肪細胞のS-100蛋白放出機構について — 免疫電顕的研究を中心に —

灰本　元（名大・医・病理）
加藤兼房・鈴木富士子（愛知県コロニー・生化）
名倉　宏（名大・医・病態研）

〔要　約〕

S-100蛋白の脂肪細胞からの放出機構を細胞生物学的に明らかにする目的で，雄4月齢ウィスター系ラットより摘出した副睾丸脂肪組織片をepinephrine (Ep) をふくむKrebs Ringer液でincubateして継時的に溶液中および組織中のS-100蛋白濃度をEIA法で測定した。同時に脂肪組織を継時的にPLP固定し，酵素抗体直接法に準じて電顕的に観察した。また種々の薬剤のS-100蛋白放出に対する抑制効果を生化学的に検討した。EpのS-100蛋白放出作用は，vesicular transport阻害剤のvinblastine, colchicine, cytochalasin B, monensinで抑制されなかったことから，vesicular transportを介さないことが明らかとなった。一方，免疫電顕的に観察すると，Ep処理前にはS-100蛋白は，細胞質のpolysome, 核内に顆粒状に密に局在し，また細胞膜上，mitchondria膜上，さらに脂肪滴周囲，microvesicle膜上にも局在が認められた。Ep処理後継時的に細胞質や核のS-100蛋白陽性顆粒は減少し，新たに出現する小脂肪滴周囲や増加するmicrovesicleの膜およびその周囲に集合した。さらにS-100陽性microvesicleは細胞膜とゆ合し頻繁にexocytosis様の開口像が観察された。これらの生化学及び免疫電顕所見と，従来より超微形態的に想定されている脂肪酸の放出モデルから，S-100蛋白はその疎水基で脂肪酸と結合して脂肪酸-S 100 complexとなり形態学的に観察可能なmicrovesicleを形成する。さらにこれは細胞膜とゆ合し放出される。すなわちmicrovesicleを介する脂肪酸とS-100蛋白の輸送放出機構の存在が強く示唆された。

Key words： S-100 protein, Adipose tissue, Immunohistochemistry.

〔緒言〕Mooreらによって発見されたS-100蛋白は，分子量2万の酸性蛋白で，グリア細胞に局在する神経特異蛋白と考えられていた[1]。しかし最近，S-100蛋白は脂肪細胞や軟骨細胞などの非神経組織にも局在することが免疫組織化学的に証明され，我々の確立した高感度EIA法[2]によってもこれらの非神経組織に神経組織に匹敵する高濃度のS-100蛋白が証明された[3,4]。さらに我々は，脂肪組織のS-100蛋白がepinephrine (Ep) やACTHの投与によって放出され[5,6,7]，放出されたS-100蛋白は血中に現われること[7]，またこの放出機構はcyclic AMPを介すること[5,6,7]などを報告してきた。今回は，脂肪細胞におけるS-100蛋白の放出機構を細胞生物学的に明らかにする目的で，ラット副睾丸脂肪組織片を用いて放出機構をさらに検討するとともに，Ep処理前後の脂肪組織の免疫電顕を行い，S-100蛋白の細胞内局在の正確な把握とその動態を超微形態レベルで観察した。また従来より数多くの報告があるEp投与による脂肪細胞の超微形態変化と比較検討した。

〔材料・方法〕雄4月齢ウィスター系ラットの副睾丸脂肪組織を摘出し，5％ CO_2，95％ O_2 飽和Krebs Ringer含5 mMグルコース，0.5％ BSA±ホルモン，薬剤などの入った溶液中で37℃にて振とうした[5,6,7]。組織ならびに反応液中のS-100蛋白濃度は継時的にenzyme immunoassay[2]にて測定した。免疫組織化学的検索は，10 μM Ep存在下でincubate（1～2時間）した脂肪組織と対照脂肪組織を，periodate-lysine-4％ paraformaldehyde (PLP) で固定し，洗浄後，OCT compoundで凍結包埋した。Cryostatで15 μmの凍結切片を作成し，Nakaneの酵素抗体直接法[8]に準じて光顕，電顕的に染色した。Peroxidase (HRP) 標識抗S-100抗体は，ウサギIgG Fab′をマレイミド法[9]によって作成し使用した。コントロール染色は，非免疫ウサギIgG Fab′にHRPを標識したものと，HRP標識抗S-100抗体をS-100蛋白で吸収したものを使用した。また，glutaraldehyde固定による通常電顕法およびPLP固定，パラフィン切片を用いた酵素抗体間接法もあわせ行った。

〔結果〕ラット副睾丸脂肪織片をEp 10μM存在下でincubateすると，Fig.1に示すようにlypolysisが促進されグリセロールが放出されるが，同時にS−100蛋白の放出も促進される。Epによる S−100蛋白の放出促進作用は，β−blockerであるpropranololによって完全に阻止され，insulinによって部分的に抑制される[5,6,7]。S−100蛋白がいわゆるvesicular transportによって放出されているか否かを，colchicine, cytochalacin B, monensin, vinblastineなどのvesicular transport阻害剤を加えてさらに検討したが，これらの阻害剤はEpによるS−100蛋白の放出促進作用を阻止しなかった(Table 1)。光顕レベルの免疫組織化学的検索では，Ep投与前ではS−100蛋白は脂肪細胞の細胞質および核にびまん性に局在したが，Ep投与後には，細胞質の染色性は著しく減弱した(Fig.2a, 2b)。免疫電顕的に観察すると，Ep処理前ではS−100蛋白は，細胞質のpolysome上やその周囲および核内にきわめて密な顆粒として局在した。またmitchondria膜上，細胞膜上ならびにそれらの周囲，さらに脂肪細胞に特に多いmicrovesicle表面にも顆粒状に局在し，ときに細胞膜からexocytosis様の放出像が観察された。(Fig. 3a) しかし，細胞内小胞，粗面小胞体やゴルジ装置などのvesicular transportに関与するorganelleには局在は全く認められなかった。Ep処理後120分では，細胞質および核のS−100蛋白陽性顆粒は減少し，Ep処理により新たに出現しその数を増す小脂肪滴周囲やmicrovesicleの膜とその周囲に局在が集中していた。さらにS−100蛋白陽性のmicrovesicleは，細胞膜直下に数珠状に配列し，細胞膜とゆ合し，exocytosis様の開口像が頻繁に観察された(Fig. 3b)。

〔考察〕Ep処理後の脂肪細胞の超微形態変化は，細胞質内に小脂肪滴とmicrovesicleが増加し盛んな開口像が出現することが従来より多くの形態学者によって報告されている[10,11]。すなわち，microvesicleを介する脂肪酸(FFA)の輸送，放出機構が存在し，FFAは疎水基を有する未知の細胞質蛋白と結合，包囲されて輸送されるというモデルが想定されている[10,11]。今回の免疫電顕法によるS−100蛋白の細胞内局在の観察によって，①S−100蛋白はリボゾームで産生され細胞質，核，mitchondria膜周囲，microvesicle膜周囲および細胞膜に密に局在している。②Ep投与によって脂質が分解されると，S−100蛋白は，新たに出現する脂肪滴周囲に集合し，さらに形態学的にはmicrovesicleとしてFFAと疎水基で結合しFFA−S 100 complexを形成する。③FFA−S 100 complexは細胞膜とゆ合し，FFAと共にS−100蛋白も細胞外へ放出される。このようなmicrovesicleを介するFFA−S 100 complexの輸送放出機構の存在が強く示唆された。このような細胞質蛋白の放出機構は，我々が既に免疫電顕法によって形態学的に証明したRNAウイルスのM蛋白の分泌機構ときわめて類似している[12]。一般に外分泌や内分泌蛋白は，粗面小胞体，ゴルジ装置及びvesicleを介するいわゆるvesicular transportであり，colchicine cytochalasin B, monensin, vinblastineなどのvesicular transport阻害剤によって特異的に分泌は抑制されることが知られている[13]。しかしS−100蛋白の放出はこれらの阻害剤では全く抑制されず，β−blockerとinsulinによってのみ抑制されることが今回生化学的に証明された。これらの生化学データと免疫電顕法による観察から，細胞質蛋白のS−100蛋白がいわゆるvesicular transportとは異なった輸送放出機構，すなわちmicrovesicleを介しFFA−S 100 complexによる輸送放出機構の存在が明らかとなった。この機構はグリア細胞にも存在することが予想され，生化学的ならびに免疫電顕的に現在検討中である。

REFERENCES (1) Moore, B. W., 1975 Adv. in Neurochem., 1, 137-155. (2) Kato, K., et al., 1982 Biomed. Res., 3, 24-28. (3) Suzuki, F., et al., 1982 J. Biochem., 92, 835-838. (4) Kato, K., et al., 1983 Int. J. Biochem., 15, 609-613. (5) Suzuki, F., et al., 1983 J. Biochem., 94, 1707-1710. (6) Suzuki, F., et al., 1984 J. Neurochem., in press. (7) Kato, K., et al., 1983 J. Biochem., 94, 1009-1011. (8) Nakane, P.K., 1975 Ann. NY. Acad. Sci., 254, 203-211. (9) Yoshitake, S. et al., 92, 1413-1424. (10) Williamson, J.R., 1964 J. Cell. Biol., 20, 57-74. (11) Carpentier, J.L., 1976 J. Lipid Res., 17, 335-342. (12) Nagai, Y., et al., 1983 Microbiol. Immunol., 27, 531-545. (13) Allison, A.C., 1973 Ciba Foundation Symposium, 14 (new series), Elsevier, Amsterdam. P. 109.

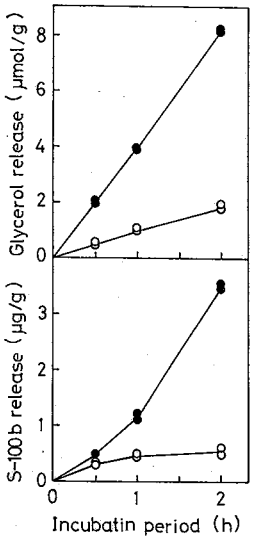


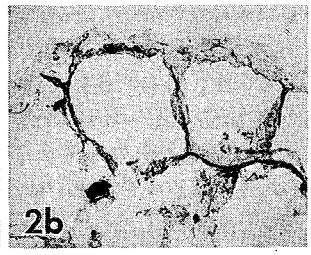
Fig. 1. Release of S-100 protein or glycerol from rat epididymal fat pad fragments. (●), with 10 μM epinephrine; (○), control

Table I. Effect of inhibitors for vesicular transport on S-100 release.

	S-100b (μg/2hr/g tissue)		Glycerol release
	remaining	released	(μmol/2hr/g tissue)
Control	5.13*	0.444*	1.62*
Epinephrine (10 μM)	2.55	3.70	6.82
+ Vinblastine (10 μM)	1.00	4.00	5.56
+ Monensin (5 μM)	1.00	3.97	4.68
+ Cytochalasin B (21 μM)	2.39	2.76	4.87
+ Colchicine (10 μM)	1.83	3.37	6.28

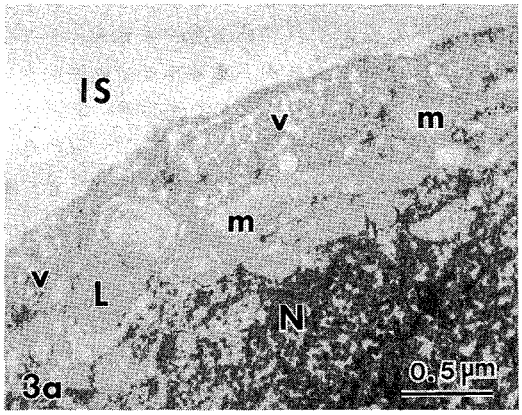
The fat pad fragments obtained from a single rat were incubated in duplicate at 37°C for 2 hr with or without additions. *Mean of duplicate assays.

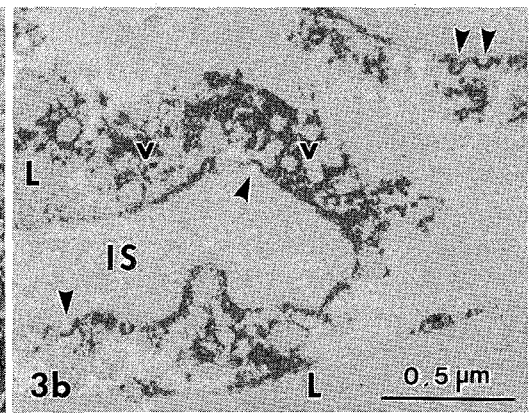




Immunohistochemical staining (**Fig. 2**) and immuno-electron-microscopy (**Fig. 3**) of rat fat pads.

a) incubated without Ep; **b**) incubated with Ep for 2 h.
N, nucleus; **m**, mitochondria; **L**, lipid droplet; **v**, microvesicle; **IS**, interstitium; **arrow heads**, exocytosis.





69 2′, 3′—環状ヌクレオチド3′—フォスフォジエステラーゼ（CNP；EC 3.1.4.37）のイムノブロッティング

栗原　正・高橋康夫
（新潟大・脳研・神経薬理）

〔要　約〕

CNPはSDS-PAGEで分子量約45,000の移動度がわずかに異なる2つの成分から構成され，これら2成分はミエリンのWolfgram proteinのdoubletに相当するとされる．一方，エラスターゼで可溶化してえられるCNPは分子量30,000のsingle polypeptideで，親タンパクが可溶化時に切断されて生じた断片であると考えられる．この分子量30,000の断片とintactなCNPの2成分が構造的にどのような関係にあるかを明らかにするための一助として次のような実験を行った．ウシミエリンタンパクをSDS-PAGEにかけ，電気泳動的にニトロセルロース膜に移行させたのち，分子量30,000のウシCNP断片に対する抗血清で処理した．その結果はWolfgram proteinのdoubletの両方がこの抗血清で染まった．したがって，(1) Wolfgram proteinのdoubletがCNPであることがあらためて確認された．(2) intactなCNPの2成分の両方が分子量30,000のCNP断片と共通の抗原基を持っていると結論される．(3) CNPの2成分は化学的にきわめてよく似ていると指摘されているが，免疫学的にも区別できないことが示された．

Key words：　2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, Wolfgram proteins, Immunoblotting

CNPはSDS-PAGEで分子量約45,000の移動度がわずかに異なる2つの成分から構成され，未変性の状態では分子量約100,000の会合体になっている．これら2成分はミエリンのWolfgram proteinのdoubletに相当するとされる[2,3]．一方，エラスターゼで可溶化してえられるCNPは分子量30,000のモノマーで，親タンパクが可溶化時に切断されて生じた断片であると考えられる[4]．この分子量30,000の断片が親タンパクの2成分のどちらから由来したものであるかは不明である．今回われわれは分子量30,000のCNP断片とintactなCNPの2成分との構造的関係をさぐるために次のような実験を行った．ウシミエリンタンパクをSDS-PAGEにかけ，電気泳動的にニトロセルロース膜に移行させたのち，分子量30,000のCNP断片に対する抗血清を用いてニトロセルロース膜を染色した．

〈実験方法〉

ミエリンはウシ脳からWaehneldt and Malotka[5]にしたがって調製した．分子量30,000のウシCNP断片に対する抗血清はすでに報告したようにして調製した[6]．SDS-PAGEはLaemmli[7]にしたがった．ニトロセルロース膜への移行はTowbinら[8]にしたがった．ただし0.1% SDSを共存させ，メタノール濃度を15%に減じた[9]．ミエリンタンパクを移行させたニトロセルロース膜は分子量30,000のウシCNP断片に対する抗血清を用いてPAP法[10]で染色した．

〈実験結果〉

図1はSDS-PAGEで泳動したウシミエリンタンパクを，ニトロセルロース膜に移行させたのち，分子量30,000のウシCNP断片に対する抗血清と反応させた結果である．ウシWolfgram protein W1*, W2*に対応して2つのバンドが染まった．ウシの場合W1よりW2が多く，PAP染色の結果もこれに対応していた．なお，免疫前の血清では全く反応しなかった．この結果から，(1) Wolfgram proteinのdoubletがCNPであることがあらためて確認された．(2) intactなCNPの2成分の両方が分子量30,000のCNP断片と共通の抗原基を持っていると結論された．このことは分子量30,000のCNP断片がintactなCNP2成分の両方から由来したと考えるのが自然であろう．CNPの2成分は化学的にきわめてよく似ていると指摘されているが[1]，免疫学的にも区別できないことが示された．

〈考察〉

CNPは塩酸グアニジンで可溶化することにより1978年はじめて単離され，分子量100,000，分子量50,000の同じsubunitからなるダイマーであると報告された[1,2]．しかし当初subunitと考えられた2成分がSDS-PAGEでわずかに移動度がちがうこと，2成分の量比が異なることが示されて，現在ではsubunitとは考えられていないようである．一方われわれはCNPをエラスターゼで可溶化して分子量30,000のモノマーを得た[4,6]．これは分子量が小さくsingle polypeptideであるゆえ，構造研究に直接使うことができる．しかしCNPの全体の構造を明らかにするにはこの断片とintactなCNPとの構造的な関係をしらべる必要がある．今回の実験はそのための予備実験の1つである．

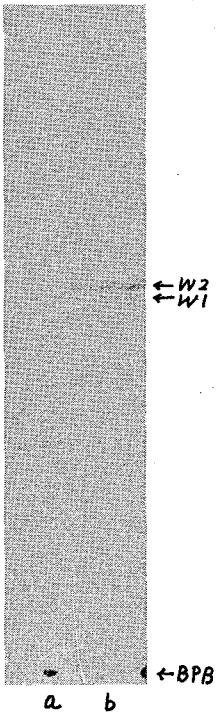


図1 SDS-PAGE (10%ゲル)で泳動したウシミエリンタンパクと分子量30,000のウシCNP断片に対する抗血清との反応(b)．免疫前血清では全く反応しない(a)．

* Waehneldt and Malotka[5]の命名にしたがう．彼らはNussbaumら[7]の命名によると書いているが，Nussbaumら[7]のラットのW2はtubulinに相当する．Drummond and Dean[2]のW1a, W1bはそれぞれSprinkleら[3]のW1, W2である．

〈文献〉

1 Drummond, R. J. (1979) J. Neurochem. 33, 1143-1150
2 Drummond, R. J. & Dean, G. (1980) J. Neurochem. 35, 1155-1165
3 Sprinkle, T. J., Wells, M. R., Garver, F. A. & Smith, D. B. (1980) J. Neurochem. 35, 1200-1208
4 Nishizawa, Y., Kurihara, T. & Takahashi, Y. (1980) Biochem. J. 191, 71-82
5 Waehneldt, T. V. & Malotka, J. (1980) Brain Res. 189, 582-587
6 Kurihara, T., Nishizawa, Y., Takahashi, Y. & Odani, S. (1981) Biochem. J. 195, 153-157
7 Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685
8 Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 4350-4354
9 田部一史 (1983) 細胞工学 2, 1061-1068
10 Sternberger, L. A., Hardy, P. H., Cuculis, J. J. & Meyer, H. G. (1970) J. Histochem. Cytochem. 18, 315-333
11 Nussbaum, J. L., Delaunoy, J. P. & Mandel, P. (1977) J. Neurochem. 28, 183-191
12 Drummond, R. J., Hamill, E. B. & Guha, A. (1978) J. Neurochem. 31, 871-878

70 末梢神経ミエリン糖蛋白（P0蛋白）の脂肪酸結合ペプチドについて

坂本　安・北村邦男・王　堯・植村慶一
（埼玉医大・Ⅰ生理）

〔要　約〕

牛末梢神経ミエリンＰ０蛋白の可溶化とトリプシン消化ペプチドの分離精製を試み以下の結果を得た。

１）Ｐ０蛋白は疎水性の高い内在性膜糖蛋白であるが、低濃度のトリエチルアミンに可溶であることを見いだし、トリプシン消化を可能とした。

２）トリプシン消化ペプチドはトリエチルアミンやSDS溶液を溶出液とするゲルロ過法にても分離は不良であったが、巨大網状型ポリスチレン樹脂（Hitachi 3013樹脂）を用いた高速液体クロマトによる分離は良好であり、Ｎ－末端ペプチド、糖鎖結合ペプチドおよび脂肪酸結合ペプチドを得ることが出来た。

３）脂肪酸結合ペプチドは共有結合しているパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸を8:3:2（モル比）の割合で含有しており、全脂肪酸量は 0.9mole/moleペプチドであった。

４）脂肪酸含有ペプチドはLeu,Val,Glyに富む極めて疎水性の高いペプチドで、Hitachi 3013樹脂上で 4つのpeakに分離し不均一性をしめしたが、各々の脂肪酸組成及び含有量に有意な差は認められなかった。

Key words： Myelin, Membrane protein, Fatty acid

中枢神経ミエリンは膜内在性蛋白質としてプロテオリピド蛋白（ＰＬＰ）が、膜外在性蛋白質として中枢ミエリン塩基性蛋白（ＭＢＰ）が主成分であり、一方、末梢神経ミエリンには内在性のものとしてＰ０蛋白およびＰＡＳ-II 蛋白、外在性のものとしてＰ２蛋白が主成分蛋白として存在する。ＭＢＰ、ＰＬＰ、Ｐ２蛋白についてはその全一次構造が明らかとなっており、それらの構造的特徴を基にミエリンの層状構造形成機構が推測されつつある。Ｐ０蛋白は極めて不溶性の膜蛋白でありその構造的知見は乏しく、N-末端部分と糖鎖結合部分のアミノ酸配列が報告されているのみである。今回我々はＰ０蛋白が低濃度のトリエチルアミンで可溶化され酵素的な分解が可能であることを見いだし、これらの消化ペプチドの分離に巨大網状型ポリスチレン樹脂を用いた高速液体クロマトが有効であったので報告する。又、得られたペプチド中に脂肪酸が結合しているものを見いだしその分析を行なった。

方法

Ｐ０蛋白のトリプシン消化：　Ｐ０蛋白は既報の方法に従い、ウシ末梢神経ミエリンよりＳＤＳゲルろ過法にて精製した。Ｐ０蛋白（85mg）を15mlの0.1%トリエチルアミン溶液に可溶化後1M重炭酸アンモニウムを加え0.1Mとした（pH 8.4）。TPCK処理したトリプシン 0.75mgを加え37℃ 1時間消化した。

トリプシン消化ペプチドの高速液体クロマトによる分離：　凍結乾燥したトリプシン消化ペプチドを 1%SDSを含む0.1%トリエチルアミン溶液（トリフルオロ酢酸にてpH 8としたもの）中100 ℃ 3分または90℃10秒加温可溶化した後、直接巨大網状型ポリスチレン樹脂（Hitachi 3013樹脂：0.46×25cm）を用いた高速液体クロマト　で分離した。溶出は60℃

にて0.1%トリフルオロ酢酸溶液中のアセトニトリルの直線的濃度勾配（17－80% ／60min ）で行なった。

アミノ酸配列分析：　手動 Edman分解およびsequencer(JEOL JAS 47K) によるアミノ酸配列分析は既報の方法に従った　。

脂肪酸分析：　各ペプチド中の脂肪酸は 1N NaOH(0.1ml) 80℃ 30min のケン化の後 0.1mlの 2N HClを加え、ヘキサン抽出物を1N　塩酸－Methanolにて80℃ 30min のメチルエステル化を行なった　。各脂肪酸の同定は CHROMPACK CP Sil 5(0.32mm ID ×10m)を用いたGC-MS (JEOL DX 300)を用い、流速0.5ml/min 、105 ℃－270 ℃（8 ℃／min ）の昇温で分析した。

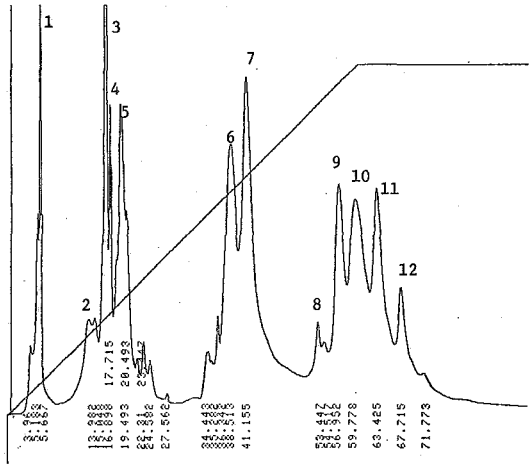


Fig 1　HPLC pattern of tryptic peptide from PO protein

Column size	:	250 x 4.6 mm I.D.
Flow rate	:	0.5 ml/min
Detection	:	280 nm (range 0.64)
Primary solvent	:	0.1% TFA, 10% acetonitrile
Secondary solvent	:	0.1% TFA, 99.9% acetonitrile
Gradient	:	10% to 80% secondary solvent for 60 min 80% secondary solvent for 30 min
Column temp.	:	60°C

結果と考察

ＰＯ蛋白（28K ）は、8M尿素、6Mグアニジン塩酸、トライトンX100等の溶液にも極めて溶けにくく、蟻酸、トリフルオロ酢酸、SDS 溶液等の苛酷な条件でのみ可溶化が可能であったが、後二者では希釈すると再び不溶化するなど、酵素的な消化は困難であった。しかし、トリエチルアミン蒸気下にＰＯ蛋白の懸濁液を放置するとＰＯ蛋白が可溶化することを見いだしたので、トリエチルアミン可溶化ＰＯ蛋白についてトリプシン消化を試みた。このようにして得られたトリプシン消化ペプチドはTEA やSDS 溶液を溶出液とするゲル過（G75,G150）でも、そのほとんどが凝集し効果的には分離しなかった。しかし1% SDS含有 TEA溶液にて可溶化後直接Hitachi 3013樹脂を用いた高速液体クロマトにて分離したところ、少なくとも12のpeakに分離された（Fig.1 ）。各peakの成分ペプチドについてアミノ酸分析およびアミノ酸配列分析で検討したところ、peak 7にはN-末端ペプチドとともに SDSが溶出されており（ガスクロで同定）

Table 1.　Amino acid composition of fatty acid-linked peptides(FAP)

	FAP-I (peak 9)	FAP-II (peak 10)	FAP-III (peak 11)	FAP-IV (peak 12)
	molar %			
Asp	4.6	4.1	2.8	3.4
Thr	4.9	5.3	5.1	5.1
Ser	4.5	3.4	3.5	4.0
Glu	8.8	5.9	7.5	6.0
Pro	2.6	2.5	3.0	2.6
Gly	13.8	12.7	12,1	13.2
Ala	6.3	5.6	6.2	5.3
Cys*	3.8	3.4	3.5	3.0
Val	11.3	15.1	13.9	14.4
Met	0	0	0	0
Ile	3.8	4.1	3.8	4.0
Leu	14.8	15.9	17.8	17.4
Tyr	6.1	7.1	6.3	6.6
Phe	3.7	4.2	4.1	4.2
His	0	0	0	0
Lys	3.4	2.8	2.3	3.1
Arg	7.6	7.9	8.1	7.8

* Cysteine was determined as cysteic acid.

peak 6にはグルコサミンが認められたことから糖ペプチドの存在が示唆され、そのアミノ酸配列中には、P0蛋白のプロナーゼ消化で得られた糖ペプチドの配列が認められた（Fig. 3）。peak 9,10,11,12 はLeu,Val,Gly に富む極めて疎水性の高いペプチドでそのアミノ酸の組成はよく似ていることならびにN-末端部アミノ酸配列は同じであるこ

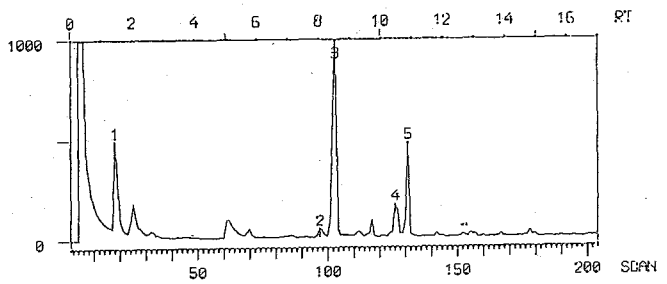


Fig 2 RIC pattern of fatty acid methyl ester from FAP-IV
Column : Chrompack CP Sil 5 (10 mm x 0.32 mm I.D.)
Flow rate : 0.5 ml/min (He)
Column temp. : 105 - 270°C, 8°C/min

Peak 7 (N-terminal) Ile-Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Lys-Glu-Val-His-Gly-Ala-Val-Gly-Ala-Leu-Val-

CHO

Peak 6 (Glycopeptide) Asp-Gly- X -Ile-Val-Ile-His-Asn-Leu-Asp-Tyr-Gly-Asp-Asn-Gly-Thr-Phe- X -Cys-Asp-Val-

Peak 12 (FAP) Thr-Ser-Gln-Val-Thr-Leu-Tyr-Val-Phe-Glu-Lys-Val-Pro-Thr-Arg-Tyr-Gly-Val-Val-Val-Gly-Ala-Val-

Fig 3 Amino acid sequence of tryptic peptides from P0 protein

とから、同一のペプチドが何等かの理由で分離したものと考えられた（Table 1）。P0蛋白には脂肪酸が結合していることが知られているが、各ペプチドの脂肪酸を調べたところpeak 9,10,11,12 にパルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸の存在を認めた（Fig. 2）。各peak中の脂肪酸の組成比は殆ど等しく、順に8:3:2(molar ratio)でAgrawal らの結果とほぼ一致した。全脂肪酸量でみると0.9mole/moleペプチドであった。これらの結果はpeak 9からpeak 12 の分離の理由が脂肪酸の含有量若しくは組成比によるものではなく他の理由によるものと考えられ、脂肪酸結合位置の同定とともに現在検討中である。P0蛋白に脂肪酸が結合していることの意義は不明であるが、末梢神経ミエリン中に存在するP2蛋白は脂肪酸結合能を有すること を考慮すると、P0蛋白とP2蛋白が脂肪酸を介しての蛋白間相互作用が推測され、ミエリンの層状構造形成の生化学的な基盤をなすと考えられる。

文 献

1)Carnegie, P.R.(1971) Nature, 229, 25-28
2)Stoffel, W., Hillen, H., Schroder, W. and Deutzmann, R.(1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 1455-1466
3)Kitamura, K., Suzuki, M. and Uyemura, K.(1981) Biomed. Res., 2, 347-363
4)Ishaque, A., Roomi, M.W., Szymanska, I., Kowalski, S. and Eylar, E.H.(1980)Can. J. Biochem., 58, 913-921
5)Kitamura, K., Suzuki, A., Suzuki, M. and Uyemura, K.(1979) FEBS Lett., 100, 67-70
6)Kitamura, K., Suzuki, M. and Uyemura, K.(1976)Biochim. Biophys. Acta, 455, 806-816
7)Isobe, T., Ishioka, N., Masuda, T., Takahashi, Y., Ganno, S. and Okuyama, T.(1983) Biochem. Internat., 6, 419-426
8)Agrawal, H.C., Schmidt, R.E. and Agrawal, D.(1983) J. Biol. Chem., 25, 6556-6560
9)Uyemura, K., Yoshimura, K., Suzuki, M. and Kitamura, K.(1984) Neurochem. Res., 9, 1501-1506

71 ラット脳上清蛋白の脂肪酸結合能

千丈雅徳・石橋輝雄・今井　陽
（北大・医・Ⅱ生化）

〔要　約〕

ラット脳細胞質よりFABPをゲル沪過及び等電点電気泳動により298倍にまで精製した。精製標品はディスク電気泳動にてsingle bandを示し，分子量は11,000~12,000，等電点は7.50であった。又，本標品を標識Palmitateとincubateした後，ディスク電気泳動を行うと，蛋白染色で示されるsingle bandと一致して単一の放射活性のピークが得られた。本標品による脂肪酸結合能は，反応時間，FABP濃度，基質脂肪酸濃度に依存して上昇し至適pHは7.2であった。又，種々の非標識脂肪酸及びCoA誘導体を予めFABPとpre-incubationし，その後，標識Palmitateとの結合能をみると，Palmitate及びOleateのCoA誘導体やOleateが強い阻害を示した。尚，遊離のCoAは標識Palmitateの結合を殆ど阻害しなかった。本標品は，ラット肝細胞質より精製したZ proteinに対する抗体と免疫沈降線を形成しなかった。以上の結果から，脳にも脂肪酸結合蛋白が存在することが確認され，又，肝FABP(Z protein)とは分子量は近似するが，等電点を異にし，更に，免疫学的にも異なるものであることが示唆された。

Key words：　Rat Brain, Fatty Acid Binding Protein, Z protein

種々の組織の細胞質中に脂肪酸結合蛋白(FABP)が存在することが知られており，特に肝に於けるZ proteinについては詳細な研究がなされ，最近その二次構造も報告されている(1,2)。心筋のFABPに関しては最近報告されたが(3)，脳については，FABPの存在の有無，Z proteinとの異同について詳細は知られていない。今回，我々は，標識Palmitateを用いてラット脳細胞質よりFABPを分離・精製し，その諸性質を検討した。以下，得られた知見を報告する。

――実　験　材　料　と　方　法――

脂肪酸結合能の測定：予めアセトンに溶かしたTween 80 (final 0.07%)と，石油エーテルに溶かした[1-^{14}C]Palmitate (55 nmol)を混じて，N_2下でevaporateした後，試料100 μlを加えて37°C, 10分間incubateした。次に，200 μlのcharcoal-dextranの混合液(5% charcoal, 1% dextran, w/v, 10 mM Tris-10mM KCl-1 mM EDTA)を加え，約5秒間振とうし反応を停止した後，15,000 gで10分間遠心し，得られた上清の一部100 μlをとり(4)，その放射活性を測定した。

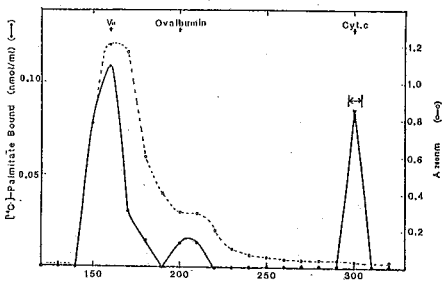
ラット脳FABPの精製：10匹のラット（体重約200 g)から得た脳（約7 g）に10倍容のBuffer (10 mM Tris-10 mM KCl-1 mM EDTA-1mM DTT)を加え，Potter homogenizerにてhomogenizeした後，105,000 gで90分間遠心する。上清を濃縮した後，10 mM KPB (pH 7.4)で平衡化したSephadex G-75カラム(2.5 x 90 cm)にapplyし，ゲル沪過を行う。各溶出画分の脂肪酸結合能を，上記の方法で測定し，活性ピークを集め，pH 5~8の等電点電気泳動(4°C, 500 V, 30時間)を行う。活性の高い画分を集めて，10 mM KPB (pH 7.4)に対し透析し，精製標品とした。

――結　果――

I FABP の精製

Sephadex G-75 カラムによるカラムクロマト：ラット脳の 105,000 g 上清をゲル沪過し溶出された各画分の脂肪酸結合能をみると(Fig. 1)，Void の位置と後に include される小分子(Cyt. c, M.W. 11,300の位置に相当)の位置に活性ピークがみられた。前者は contaminated serum albumin との結合によるものと思われる。後者を FABP としてプールした。

Fig. 1. Sephadex G-75 Column Chromatography



等電点電気泳動：Sephadex G-75 のゲル沪過によって得られた画分を等電点電気泳動を行うと(Fig. 2) pI = 7.50 の位置に脂肪酸結合能の高いピークが得られた。この画分を集め，透析後，FABP の最終標品とする。精製度は 298 倍，収率は 0.9% (Table I)。

Fig. 2. Isoelectric Focusing

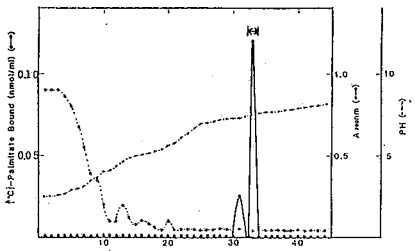


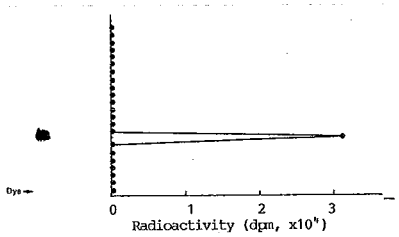
Table I Purification of FABP from Rat Brain Supernatant

Procedure	Volume (ml)	Protein (mg)	Total Units	Yields (%)	S.A. (Units/mg)	Purification
Supernatant (105,000g)	60	1644	406800	100	247.4	1
Sephadex G-75	10	1	25500	6.3	25500	103
Isoelectric Focusing	1	0.05	3692	0.9	73840	298

II 精製標品の純度

得られた精製標品と [^{14}C]Palmitate を incubate 後，ディスク電気泳動を行うと，蛋白染色で single band となり，更にその蛋白部分に一致して単一の放射活性のピークが得られた(Fig. 3)。

Fig. 3. Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of the purified FABP bound [^{14}C]-Palmitate



III FABP の諸性質

得られた精製標品による脂肪酸結合能は，FABP 濃度(Fig. 4-A)，基質脂肪酸濃度(Fig. 4-B)，反応時間(Fig. 4-C)に依存して上昇した。Incubation 温度を 20°C まで下げると結合能は消失し(TableII)反応至適 pH は 7.2 であった(Fig. 5)。又，種々の非標識脂肪酸及び CoA 誘導体を予め FABP

Fig. 4. Properties of FABP

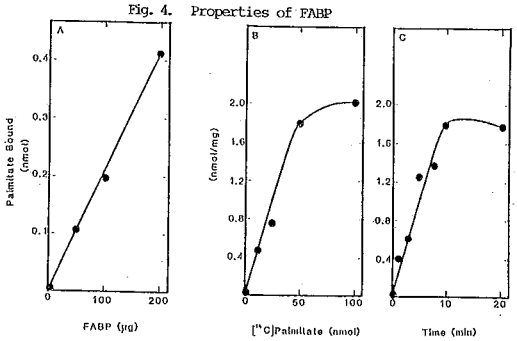


Fig. 5. Optimal PH

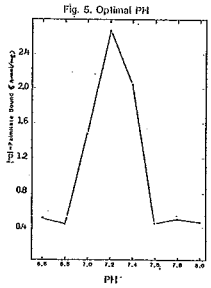


Table II Effect of Incubation Temperature

Temperature (°C)	[^{14}C]-Palmitate Bound (nmol)
0	2.75
20	3.0
37	11.0

Table III Inhibition of [^{14}C]-Palmitate Binding to FABP

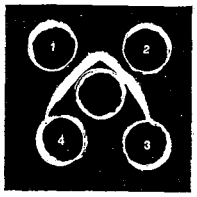
Analogues examined (250 nmol)	Inhibition (%)
Palmitate	23.8
Stearate	12.5
Oleate	40.0
Linoleate	11.7
Arachidonate	11.3
Palmityl-CoA	50.0
Oleyl-CoA	62.5
CoA	2.5

と preincubation し (37°C, 5分), その後 [^{14}C]Palmitateとの結合能をみると, Oleoyl-CoA, Palmitoyl-CoA, Oleateが強い阻害を示した。尚, 遊離の CoA は [^{14}C]Palmitate の結合を殆ど阻害しなかった (Table III)。

IV ラット脳 FABP とラット肝 Z protein の間の免疫学的相違

本標品は, ラット肝細胞質より精製の Z protein に対する抗体と免疫沈降線を形成せず (Fig. 6), 脳 FABP は肝 Z protein とは, 免疫学的にも異なることが示された。

Fig. 6. Double Immunodiffusion Analysis



The center well: antibodies (1.0mg) to rat liver Z Antigen
well 1: DE II fraction of rat liver Z (50μg)
2: DE III fraction of rat liver Z (50μg)
3,4: purified rat brain FABP (5.0μg and 50 μg, respectively)

——考 察——

FABP は種々の組織で見出され, その精製が行われているが, それぞれの構造上の関係及び作用機序についての詳細は未だ不明の点が多い。今回の我々の実験により, ラット脳にも FABP が存在し, しかも, 肝の FABP (Z protein) とは, 等電点及び免疫学的相違から, 異なると考えられる。

Ockner らはラット肝, 脂肪組織, 小腸から得られた FABP は免疫学的にそれぞれ同一のものであると報告している (5)。一方, Said らは, ラット心筋から得られた FABP は基質特異性, 電気泳動上の性質, 免疫学的性質などの点から肝 FABP (Z protein) とは異なるものと報告している (3)。これらの報告からみると, 肝, 小腸, 脂肪組織のように脂質合成のさかんな組織は同じ FABP (Z protein) を有し, それ以外の組織には, Z protein とは異なった FABP が存在しているという説明 (3) も可能である。このような説明の是否は今後の課題として残されている。一方, Dempsey らは, Z protein と SCP (Sterol Carrier Protein) とが同一の蛋白であると報告している (7)。SCP は Squalene 以降の Cholesterol 合成に関与するミクロソーム局在の酵素群に対して, その幾つかのステップの促進作用を示し, 外因性に加えた脂溶性基質の膜内への担体としての役割りの他, 膜内に random に分布する基質を酵素の活性中心に集約させる働きも有する (8)。これらの知見から, 脳 FABP も, 脂質代謝系の中で, Cholesterol 及びその前駆体, 脂肪酸などの代謝に何らかの生理的な役割りをもっている可能性もあるが, 基質を細胞質中に単に store しておくだけなのか, 担体として働くのか, あるいは, 膜酵素との係わりの中で作用するのか, 究明されるべき課題として残されている。

——謝 辞——

ラット肝 Z protein, 抗 Z protein 抗体を恵与して頂いた新潟大・医・オニ生化小野教授に心より深謝致します。

——文 献——

1. Takahashi, K., Odani, S., and Ono, T. (1982) *FEBS Lett.* 140, 63-66
2. Takahashi, K., Odani, S., and Ono, T. (1983) *Eur. J. Biochem.* 136, 589-601
3. Said, B., and Schultz, H. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 1155-1159
4. Lee, L., and Wiggert, B. (1984) *J. Neurochem.* 42, 47-53
5. Ockner, R.K., and Manning, J.A. (1974) *J. Clin. Invest.* 54, 326-338
6. Levi, A.J., Gatmaitan, Z., and Arias, I.M. (1969) *J. Clin. Invest.* 48, 2156-2167
7. Dempsey, M.E., McCoy, K.E., Baker, N.N., Dimitriadou-Vafiadou, A., Lorsbach, T., and Howard, J.B. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1867-1873
8. Ishibashi, T., and Bloch, K. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12962-12967

72　ウシ脳 GABA-modulinの精製とその性質

黒須泰行・門屋利彦・石岡憲昭・磯辺俊明・奥山典生（都立大・理・化学）
栗岡　晋・松田　誠（慈恵医大・生化）

〔要　約〕

1. Guidottiらがラット脳より精製したGABA-modulin（MW 16,500）と同じタイプのタンパク質を、全く異なる方法で、ウシ脳の膜タンパク質より、大量かつ簡便に精製した。
2. このタンパク質は、アルギニン含量が高く、分子量は16,000であった。また、N末端はブロックされていた。アミノ酸組成において、ラット脳GABA-modulinとよく一致した。
3. このタンパク質は、GABAレセプターに対して阻害効果を有しており、また、flunitrazepamの結合活性に対するGABAの促進効果に影響を与えた。
4. 以上、タンパク質化学的分析及び生物学的分析より、このタンパク質をウシ脳GABA-modulinと同定した。

Key words：　GABA, GABA-modulin, brain protein

シナプス膜画分にGABAレセプターが存在し、その生理的な役割とともに、制御機構の研究あるいはレセプター自身のアフィニティークロマトグラフィーなどによる分離精製が一つの話題となっている。一方、Guidottiらは、そのようなレセプターにはその作用機構を制御する因子があることを想定し、いろいろな方法で精製を試みてきた(1～5)。Guidottiらは、ラット脳より調整した新鮮な膜画分とそれをさらに凍結融解し、Triton X－100処理を行った後に遠心して沈殿として得られた膜画分について、[3H]GABAのNa非依存性の特異的結合活性を比較した(1)。一般的に物質のシナプス膜画分との特異的結合はTriton X－100処理によって著しく減少するはずであるが、GABAレセプターは例外で、Triton X－100処理を行った後でも、シナプス膜構造にとどまっており、結合活性は逆に増大する。この理由はTriton X－100処理によって、新鮮なシナプス膜画分に含まれている内在性の抑制因子が除かれるためであると考えた。この抑制因子は熱に安定な分子量15000の酸性タンパク質と発表したが、後に分子量16500の塩基性タンパク質と訂正した。この因子は一応GABA-modulinと命名されたのであるが、その物質的な基礎資料は充分に調査されていない。一方、我々の研究室では、化学的指標に基づいて、"Brain Protein Index"の作製が行なわれている。この一連の研究より、我々はGuidottiらとは全く異なる方法で、ウシ脳の膜タンパク質より、GABA-modulinと同じタイプのタンパク質を大量かつ簡便に精製した(6)。このタンパク質の分子量は約16,000であり、アルギニンの含量が多い。そのタンパク質化学的分析及び生物学的分析より、GABA-modulinと同定した。

〔実験方法〕

1) 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法；逆相HPLCにおいては、巨大網状型ポリスチレン樹脂（Hitachi Gel, #3013, 0.46 I.D. × 25 cm）を用いた[7-9]。溶離条件は、0.1 % TFA中において、CH_3CN濃度を20 %から75 %へ上昇させる直線型勾配溶出法を用いた。流速は0.5 ml/min。検出にはUV 210 nm及び280 nmの2波長検出を用いた。ゲル浸透HPLCにおいては、ポリビニルアルコール重合体（Asahipak, GS 520, 0.76 I.D. × 25 cm）を用いた。溶離条件は、0.1 % TFAを含む50 % CH_3CNを用いた。流速は0.5 ml/min。検出にはUV 210 nm及び280 nmの2波長検出を用いた。

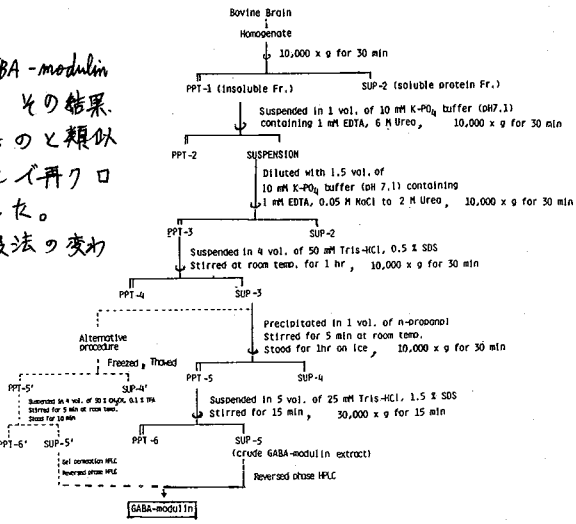
2) HPLC法の大規模化；一度に数10 mgのタンパク質を処理するために、大容量の逆相カラム（Hitachi Gel, #3013, 1.6 I.D. × 20 cm）を用いた。流速2.0 ml/min。他の分析条件は1)に準ずる。

3) 結合活性の測定法；GABAレセプター（Triton X-100処理膜）は、ラット脳より、0.05 % Triton X-100処理したものを使用し、[^{3}H]GABA結合及び[^{3}H]flunitrazepam結合を測定した(10,11)

〔結果と考察〕

精製操作過程をFig. 1に示した。ウシ脳2個(900g)を1 mM EDTAを含む0.1 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.1)で磨砕した後、10,000 g, 30分間遠心し、上清と沈殿に分離した。この沈殿に2～3 M尿素を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.1)を加え、60分間撹拌後、10,000 g, 30分間遠心し、骨格タンパク質類を充分に除去した。この沈殿に0.5 % SDSを含む50 mM tris-HCl (pH 7.1)を加え、1時間撹拌し、タンパク質を抽出した(SUP-3)。その抽出液に等量のn-プロパノールを加え、生じた沈殿を再び1.5 % SDS含む25 mM tris-HClで抽出した。その抽出液(SUP-5)を逆相HPLCにより精製した(Fig. 2)。その結果、3画分が得られた。その3画分のアミノ酸組成をGuidottiらの精製したラットGABA-modulinのアミノ酸組成と比較した(table 1)。その結果、分画IIのアミノ酸組成がGuidottiらのものと類似していた。そこで、分画IIを逆相HPLCで再クロマトグラフィーを行い、さらに精製した。

Fig. 1
Extraction scheme of GABA-modulin from bovine brain



別法として、n-プロパノール沈殿法の変わりにSUP-3を凍結保存後、融解する方法によって、沈殿部分を得、その沈殿に0.1 % TFAを含む40 % CH_3CNを加え、タンパク質を抽出する方法を同時に確立した。その抽出液(SUP-5')をゲル浸透HPLCにより分離した。その主ピークを逆相HPLCにより、さらに精製した。

Guidottiらは、ラット脳より、数100 μgのGABA-modulinを精製しているが、大容量カラム(1.6 I.D. × 20 cm)を用いる我々の方法では、ウシ脳より、100 mg以上の目的タンパク質を精製できる。

この精製したタンパク質のSDS電気泳動図をFig.3に示した。比較のため、尿素抽出後の沈殿PPT-3の電気泳動図を示した。PPT-3には、かなり高分子量のタンパク質が含まれているのに対し、逆相HPLCにより精製を行ったものは、分子量16,000の単一のバンドになった。また、このタンパク質のN末端分析を行った結果、N末端はブロックされていた。以上、タンパク質化学的分析において、分画IIは、Guidotti らのラットGABA-modulinと一致した。

Fig. 2
Purification of GABA-modulin from bovine brain using reversed phase high performance liquid chromatography

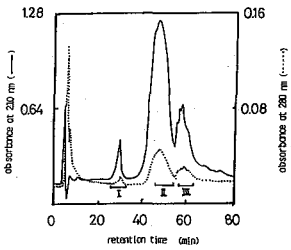
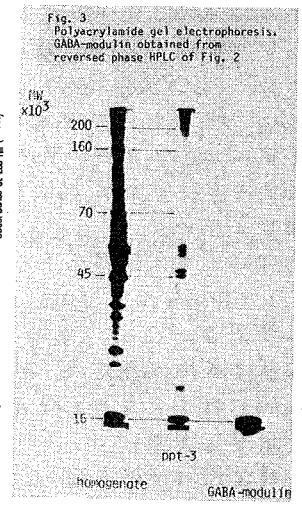


Fig. 3
Polyacrylamide gel electrophoresis. GABA-modulin obtained from reversed phase HPLC of Fig. 2



そこで、このタンパク質のGABAレセプターに対する阻害効果（Fig.4）及びGABAのflunitrazepamの結合活性の促進効果に対する影響（Fig.5）を調べた(10,11)。その結果、このタンパク質は、GABAレセプターに対する阻害効果を有し、また、flunitrazepamの結合活性に対するGABAの促進効果に影響を与えていることがわかった。

結論として、タンパク質化学的分析及び生物学的分析より、ウシ脳の膜タンパク質画分より、SDS抽出したこのタンパク質はGABA-modulinであると同定した。この精製法は、Guidotti らの方法と比較すると、操作が少なく、簡便かつ大量に精製を行うことができた。

Table 1
Amino acid composition of fraction I, II, III (Fig. 2-1) from bovine brain

Amino acid	I	II	III	GABA-modulin (from rat brain)
Lys	4.8	10.3	3.9	8
His	3.0	8.5	0.5	7
Arg	5.8	13.8	2.6	15
Asp	9.0	9.0	9.0	9
Thr	6.0	5.7	4.2	8
Ser	11.6	12.6	2.5	13
Glu	13.9	9.3	10.5	10
Pro	7.0	12.9	1.6	11
Gly	16.4	18.4	5.3	14
Ala	8.8	11.5	3.8	7
Cys	0.0	0.0	0.0	0
Val	4.0	1.9	3.3	4
Met	0.9	1.3	0.1	2
Ile	2.4	2.0	3.4	3
Leu	6.3	7.9	4.2	6
Tyr	2.2	3.4	0.8	2
Phe	4.0	6.8	3.0	6

Fig. 4
Effect of GABA-modulin from bovine brain on [³H] GABA binding to synaptic membrane

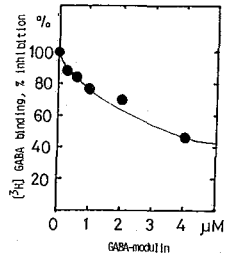
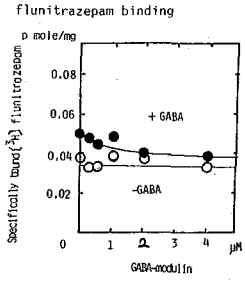


Fig. 5
Effect of GABA-modulin from bovine brain on the GABA induced stimulation of [³H] flunitrazepam binding



REFERENCES
1. Guidotti,A., Konkel,D.R., Ebstein,B., Corda,M.G., Wise,B.C., Krutzsch,H., Meek,J.L. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 6084-6088
2. Wise,B.C., Guidotti,A., Costa,E. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 886-890
3. Corda,M.G., Guidotti,A. (1983) J. Neurochem. 41, 277-280
4. Toffano,G., Guidotti,A., Costa,E. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 45, 4024-4028
5. Toffano,G., Leon,A., Massotti,M., Guidotti,A., Costa,E. (1980) Receptors for Neurotransmitters and Peptide Hormones, p133-142
6. Kurosu,Y., Ishioka,N., Isobe,T., Okuyama,T., Kurioka,S., Matsuda,M. (1983) International Symposium on "neurotransmitter receptor regulation, interactions and coupling to the effectors", section II
7. Kurosu,Y., Kawasaki,H., Chen,X., Amano,Y., Fang,Y., Isobe,T., Okuyama,T. (1984) Bunseki Kagaku, 33, 301-308
8. Isobe,T., Kurosu,Y., Fang,Y., Ishioka,N., Kawasaki,H., Takai,N., Okuyama,T. (1984) J. Liq. Chromatogr. 7, 1101-1115
9. Kurosu,Y., Kametani,F., Kawasaki,H., Isobe,T., Okuyama,T., in preparation
10. Kurioka,S., Kimura,Y., Matsuda,M. (1981) J. Neurochem. 37, 418-421
11. Kurioka,S., Matsuda,M. (1981) J. Neurochem. 36, 313-316

73 Myelin-associated glycoprotein（MAG）とヒトのT細胞性白血病由来のcell line（HSB-2）との共通抗原

佐藤修三・田中正美・宮谷信行・馬場広子・宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

〔要　約〕

HSB-2 はヒトのT細胞性白血病由来のcell line であり，ヒトのnatural killer(NK)細胞のマーカーであるHNK-1 モノクローナル抗体の免疫原である。先に我々はHNK-1 がヒトのミエリン中のmyelin-associated glycoprotein(MAG)を認識したことを報告し，ＭＡＧとNK細胞との共通抗原の存在を示唆した。ここでは抗ＭＡＧ抗体がHSB-2 細胞のＭＡＧとは異なる分子量の蛋白分子を認識したので報告する。まず，酵素免疫測定法(ELISA) によって，HSB-2 が抗ＭＡＧ抗体（家兎に免疫して得られた多クローン性抗体，および多発性神経炎を伴い，単クローン性抗ＭＡＧ抗体を有する米国の患者よりの血清）とHNK-1 を吸収したことを示した。対照として用いたcell line,Molt-4とK-562 はこれらの抗体を全く吸収しなかった。インムノブロッティング法により，HBS-2 細胞のホモジネート中の蛋白の約130KDaと80KDa の部分を，HNK-1 および抗ＭＡＧ抗体が認識した。これらの分子量はＭＡＧ（約100KDa）およびその分解物であるderivative of ＭＡＧ（ｄＭＡＧ：約90KDa)とは異なっていた。HSB-2 細胞のＭＡＧとの共通抗原はＭＡＧとは異なった分子上にあり，それぞれの分子の一部が抗原決定基を共有している可能性が示唆された。

Key words： Miyelin-associated glycoprotein(MAG), Leukemia cell line, Natural killer cell

我々[1,2]およびHcGarry ら[3]はHNK-1 モノクローナル抗体がヒトのmyelin-assciated glycoprotein（ＭＡＧ）を認識したことを報告した。HNK-1 はヒトのnatural killer(NK)細胞のマーカーと考えられており，ＭＡＧとNK細胞との共通抗原の存在が示唆された。我々は[4]家兎に免疫して得られた抗ヒトＭＡＧ血清によって，健康成人の末梢血リンパ球の約９％が染色され，二重染色法によると，それらのリンパ球はそのほとんどが，HNK-1 にても染色されたことを報告した。しかしNK細胞上のＭＡＧと共通抗原性を有する部分の化学的特性は不明である。HSB-2 はヒトのT細胞性白血病由来のcell line であり，HNK-1 の免疫原であることより，HNK-1 はもちろん抗ＭＡＧ抗体もHSB-2 細胞上の抗原を認識することが予測された。ヒトのNK細胞を多量得ることは困難であるが，HSB-2 細胞は培養が容易であることより，ＭＡＧと共通抗原をもっているリンパ球上の抗原の検索の手がかりとして，本細胞を用いた。

［方法］ミエリンはNortonらの方法により，ヒト脳白質より精製した。ＭＡＧはlithium diiodosalicyate-phenol法およびゲル濾過にて純化した[5]。抗ＭＡＧ抗体は精製ＭＡＧ250 g を家兎に３回免疫して得れた。ヒトのモノクローナル抗ＭＡＧ血清は，IgM型ｱ -グロブリン血症と多発性神経炎を有する患者（米国例）より得られた。HSB-2,Molt-4およびK-562 などのcell line は10％FCS 含有のRPHI1640にて３日間培養し，phosphate buffer saline(PBS)にて３回洗浄し，ホモジナイズ後，蛋白量として4mg/ml もしくは10mg/ml に調製した。各組織のIgG Fc receptor は熱凝固ヒトIgG(AHG)と４℃，２時間インキュベーションすることによってブロックした。各抗体は 0.05% Tween20と2%BSA 含有PBS,pH7.1(BSA-PBS)にて１： 500に希釈して使用した。ミエリン，赤血球膜，および各培養細胞は各種濃度に希釈してその50μlを希釈した各抗体50μlと混和して，４℃，18時間インキュベーションし，抗体の吸収を行った。インキュベーション後，100μl のBSA-PBS と混和後，1000g 10分遠心し，上清をELISA の一次抗体として使用した。ELISA は先の報告[1]に準じた。精製ＭＡＧを1μg/ml の濃度にPBS に溶解し，マイクロプレートの各ウェルに100μl 加え，４℃，18時間インキュベートし抗原を吸着させた。各ウェルを 0.05%Tween20 含有のPBSで洗浄した後，各種の抗体を最終希釈濃度に1:2000として，その100μl を各ウェルに加え25℃ ，１時間インキュベーションした後，再び洗浄した。二次抗体としては1:1000希釈のペルオキシダーゼ標識抗体（抗マウスIgM,抗ウサギIgG もしくは抗ヒトIgM)を使用し，5-アミノサルチル酸を色原体として使用し，25℃

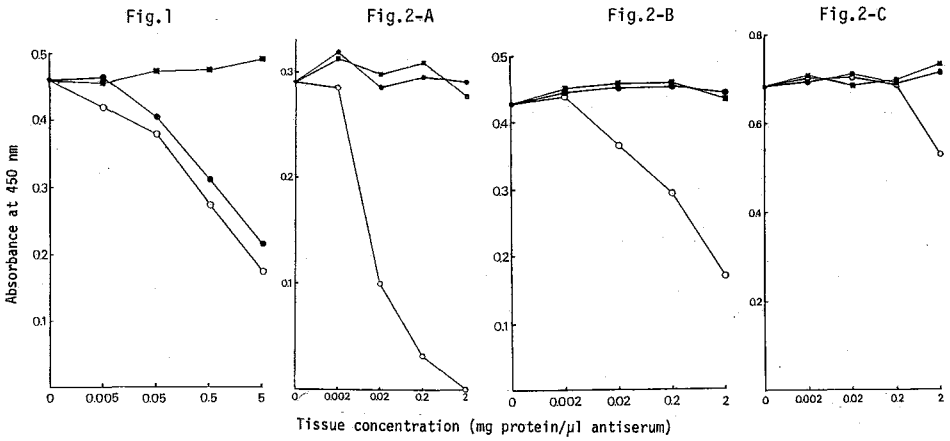
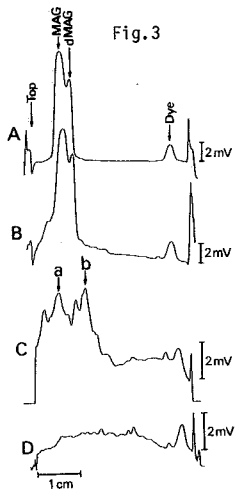


Fig.1, Absorption analysis by ELISA. The rabbit polyclonal anti-human MAG was absorbed by various human tissues (,HSB-2 cells; ,myelin; and ,red blood cell ghosts) after blocking of IgG Fc receptor. Fifty microliters of diluted antiserum (1:500) were mixed with 50μl of the tissue suspension in various concentrations (10,1,0.1 and 0.01 mg protein/ml). The final dilution of the first antibody was 1:2000. The absorbance was measured at 450 nm after 1h incubation at 25°C with substrate solution.

Fig.2-A,B and C, Absorption of anti-HNK-1(A), the rabbit polyclonal(B) and the human monoclonal(C) anti-MAG antisera by various cultured leukemia cell lines (,HSB-2; ,Molt-4; and ,K-562). Fifty microliters of diluted antibodies (1:500) were mixed with 50μl of the cell homogenates in various concentrations (4,0.4, 0.04 and 0.004 mg protein/ml). The final concentration of the first antibody was 1:2000. The absorbance was measured at 450 nm after 1h incubation at 25°C.



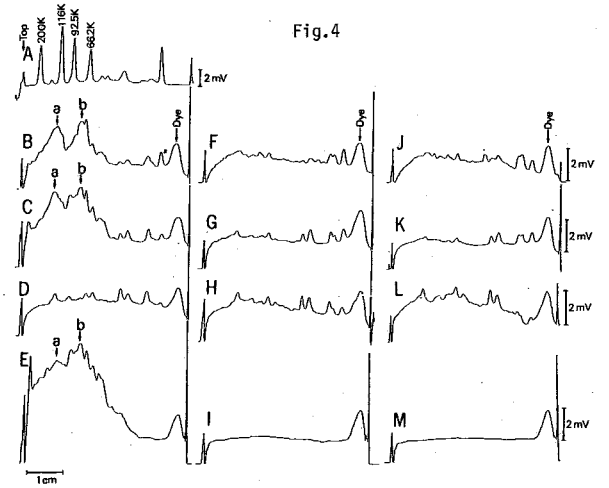


Fig.3, Delipidated CNS myelin (A and B) and HSB-2 cell homogenate (C and D) were electrophoresed on a 7.5% SDS-polyacrylamide slab gel and transferred to nitrocellulose sheet (blot). The blots were stained immunologically by peroxidase-antiperoxidase (PAP) method using the human monoclonal (A), the rabbit polyclonal (B and C) anti-MAG antisera and control rabbit serum (D) as the first antibodies. Two major peaks in HSB-2 cell homogenate (C-a and b) were stained by the rabbit anti-MAG antiserum.

Fig.4, Molecular weight standard (A) and cell homogenates (80μg protein) of HSB-2 (B,C,D and E), Molt-4 (F,G,H and I) and K-562 (J,K,L and M) were electrophoresed and blotted as described in legend to Fig.3. The blots were stained by PAP method using the human monoclonal (B,F and J), the rabbit polyclonal anti-MAG sera (C,G and K), the rabbit control serum (D,H and L) and anti-HNK-1 (E,I and M).

1時間インキュベーション後，450nm にて吸光度を測定した。ゲル電気泳動，ブロッティングおよびその免疫染色：ミエリンはエーテル：エタノール(3:2) にて脱脂した。Laemmli の方法で調製した 7.5%SDS-ポリアクリルアミドゲルにて，蛋白量として40μgのミエリンおよび80μgの培養細胞のホモジネートを分析した。泳動後，Towbinらの方法でニトロセルロース膜へブロットした。分子量スタンダードはアミドブラックで染色した。ミエリンおよび各培養細胞のブロットは，3もしくは4段階peroxidase-antiperoxidase (PAP)法にて免疫染色を行った。まず3%BSA/0.9%NaCl/10mM Tris-HCl(BSA-saline)にて40℃，2時間ブロッキングを行い，一次抗体，二次抗体，三次抗体，PAP をそれぞれBSA-salineにて希釈し，1時間インキュベーションした。発色はdiamino benzidine を色原体として用いた。各ブロットはクロマトスキャナーにてスキャンした。

［結果］ELISA による検討では，IgG Fc receptor をブロックした各組織のうち，HSB-2 細胞のホモジネートとミエリンはウサギの抗ＭＡＧ抗体を吸収したが，赤血球膜は全く吸収しなかった(Fig.1) 。HBS-2 細胞は蛋白量あたりでは，ミエリンよりも多く抗ＭＡＧ抗体を吸収した。HNK-1,ウサギの抗ＭＡＧ抗体，ヒト単クローン性抗ＭＡＧ抗体のいずれもが，HBS-2 により吸収されたが，Molt-4およびK-562 はそれらの抗体を全く吸収しなかった(Fig.2-A,B,C) 。ブロットの免疫染色では，ミエリンはヒトの単クローン性抗MAG 抗体(Fig.3,A) およびウサギの抗ＭＡＧ抗体(Fig.3,B) にて，derivative of ＭＡＧ（ｄＭＡＧが染色された。 HSB-2 のブロットはウサギの抗ＭＡＧ抗体にて，いくつかのピークが染色された(Fig.3,C が，対照血清では全く染色されなかった(Fig.3,D) 。繰り返し実験によると，２つの主なピーク(Fig.3 と4,C,ピークａとｂ) が常に染色された。ピークａはＭＡＧより分子量がやや大きく蛋白スタンダード(Fig.4,A) と比較すると約130KDaであり，ピークｂはｄＭＡＧよりも小さく，約80KDa であった。ヒトの単クローン性抗ＭＡＧ抗体(Fig.4,B)およびHNK-1(Fig.4,E)にても同様なピークが染色された。Molt-4とK-562 は全く染色されなかった。

［考案］ＭＡＧはミエリン蛋白の中では微量成分であるが，多発性硬化症（ＭＳ）の患者脳の脱髄巣周辺で著しく減少していることや[6~7]，ＭＳ脳より精製したミエリン中では中性プロテアーゼ活性が高く[8]，それがＭＡＧをｄＭＡＧへ分解し水溶性となること[9]などより，ＭＳの病因におけるＭＡＧの重要性が示唆されている[10]。また最近欧米にて，多発性神経炎を伴ったIgM 型γ－グロブリン血症の患者のＭ蛋白がＭＡＧの抗体であった報告があり注目されている。先に述べたように，我々およびMcGarry らはＭＡＧとNK細胞との共通抗原の存在を示唆する報告をしたが，NK細胞の抗原の化学的特性については不明であった。KubagawaらはHSB-2 やMolt-4などのHNK-1 抗原陽性細胞を検索し，HNK-1 が分子量約110KDaの付近を認識したと報告した。今回の結果はHNK-1 がMolt-4を認識しなかった点，HSB-2 のHNK-1 が認識した抗原の分子量が異なるなどの相違があるが，その理由は不明である。最近ＭＡＧがミエリンやオリゴデンドロサイト以外の細胞，網膜のミュラー細胞もしくはアストロサイトと抗原決定基を共有するとの報告があるが，その抗原の検索はなされていない。我々の結果がHNK-1 と抗ＭＡＧ抗体がHSB-2 細胞中のＭＡＧやｄＭＡＧとは異なった分子量の蛋白を認識したことを示したことから，それぞれの分子の一部が共通抗原決定基となっているものと思われた。

［文献］ 1. Sato,S., H.Baba, M.Tanaka, K. Yanagisawa et al. Biomed.Res.,4(1983)489-494.
2. Tanaka,K., M.Tanaka, S.Sato et al. Biomed. Res. 5 (1984) 225-228
3. McGarry,R.C., S.L.Helfand, R.H.Quarles et al. Neture, 306 (1983) 376-378.
4. Tanaka,M., S.Sato and T. Miyatake , Japan. J. Exp. Med., 54 (1984a) 9-15.
5. Quarles,R.H., G.R.Barbarash, D.A.Figlewicz et al. Biochem.Biophys.Acta.,757(1983)140-143
6. Johnson,D., S.Sato, R.H. Quarles, et al. J.Neuropathol. Exp. Neurol., 40 (1981) 308.
7. Itoyama,Y., N.H.Sternberger, H.deF.Webster et al. Ann.Neurol., 7 (1980) 167- 177.
8. Sato,S., R.H.Quarles, R.O.Brady et al. Ann. Neurol., 15 (1984a) 264-267.
9. Sato,S., R.H.Quarles and R.O.Brady, J.Neurochem., 39 (1982) 97-105.
10. Braun,P.E., D.E.Frail and N.Latov, J. Neurochem., 39 (1982) 1261-1265.

74 ヒト脳内のpeanut agglutininリセプターについて

桃井真里子　（自治医大・小児科）
桃井　隆　（国立神経センター・V部）
鴨下重彦　（自治医大・小児科）

〔要　約〕

ミエリンの生成、及び破壊の過程の解析にはミエリン膜構成分子の詳細な情報を必要とする。我々は膜表面において糖鎖構造が膜の種々の認識機構に関与していることに注目し、peanut agglutinin (PNA) の認識する糖鎖、即ち、末端Gal (β1→3) GalNAc構造を有する糖鎖のヒト脳内局在及び、上記糖鎖を持つ分子の生化学的性状を検討した。ヒト脳においては、PNA・リセプターはMr110,000の糖ペプチドであり、かつ、ミエリン画分に局在することが示された。他組織においては胸腺にのみ存在し、肝、脾などの組織には存在しなかった。即ち、末端Gal (β1→3) GalNAc構造を持つオリゴ糖鎖はMr110,000の糖ペプチドに特異的に存在し、かつ、ミエリン・胸腺共通糖蛋白であることが明らかとなった。PNA・リセプター精製の過程で、0.1%Triton X−100中では強い凝集性を示した事から、ミエリン膜上に特異的に存在する凝集性の糖蛋白、PNA・リセプターがミエリン生成過程に何らかの機能を果たす可能性を示唆した。又、ヒト・リンパ球抗原を認識するAnti−Leu− 7 モノクローナル抗体とPNA・リセプターが強く反応した事も、ミエリン・胸腺共通抗原であることと合わせて、PNA・リセプターのミエリンの免疫学的破壊過程への関与も示唆した。

Key words :

PNA receptor　　myelin　　thymus

目的：ミエリンはミエリン形成細胞の形質膜が神経軸索を中心に層状構造を成す、特殊に分化した生体膜であり、その特異的膜成分の生化学的、免疫学的性状を追求することは、ミエリンの形成機構、及び脱髄の病態解析に必須である。我々は細胞表面のオリゴ糖鎖が膜の相互作用を含めた種々の認識機構に関与している点に注目し、かつ生体内では多くのオリゴ糖末端はシアル酸で置換されていることから、セリン（スレオニン）結合糖鎖の内、末端にシアル酸を有さないGal (β1−3)GalNAc 構造を有するオリゴ糖鎖の脳内局在を検討した。即ち、非還元末端のGal (β1−3)GalNAc 構造を認識するpeanut agglutinin （ＰＮＡ）を用い、ＰＮＡ・リセプターの脳内局在をラット脳において検討した。その結果、成熟ラット脳においてはＰＮＡ・リセプターは白質のミエリン上にのみ局在することが示され、ＰＮＡ・リセプターはミエリンに特異的な生化学的マーカーであることが示唆された。(1) ミエリン形成前の胎生期ラット脳においては脳室壁の上衣細胞上にのみ存在し、ミエリン形成細胞の上衣細胞由来を示唆した。(3) 本研究は、ミエリン特異的なオリゴ糖鎖を有するＰＮＡ・リセプターの生化学的性状を、ヒト脳において明らかにすることを目的とする。

方法：ヒト大脳は成人剖検脳の内、脳に器質的病変のないものを選択し、−80°C に保存。融解後、ＰＢＳ中でホモジェナイズし100,000 Ｘｇ、60 分間遠心後、沈査を等量の2 %TritonX −100 -PBS にて4°C 、3 時間抽出し、同様に遠心後、上清を粗抽出液とした。ＰＮＡ・リセプターは96 孔マイクロプレート上にて測定した。ＰＮＡ・リセプターを含むサンプル（50 μl ）を加え37°C、12 時間反応させ、たん白をプレートに吸着させる。Buffer A （0.05 %Tween 20、PBS ）で洗浄後、Peroxidase−ＰＮＡ（E −Y Lab.,CA,USA ） 50 μl を加え37°C、2 時間反応後、同様に洗浄し、O −dianisidine にて発色し、OD490 nm で測定した。ヒト脳からのミエリンはNorton らの方法 (4) により分離した。ミエリン画分からのＰＮＡ・リセプターは上記と同様に、2 %Triton X −100 にて抽出された。ＰＮＡ・リセプターの糖ペプチドとしての性状はTransblot 法 (5) により示された。全脳、又はミエリン画分からの粗抽出液（50 μl）を2 %SDS、5%2-mercaptoethanol 中にて100°C、2 分間加熱後、10%SDS−ポリアクリルアミドゲル上にて泳動。泳動後、直ちにNitrocellulose 膜上に30 V にてTransblot し、5 %BSA -Tris-saline

で表面をブロック後、Peroxidase －ＰＮＡと37℃ 2時間反応させ、Buffer Aにて洗浄後O －dianisidineにて発色した。ヒト胸腺細胞におけるＰＮＡ・リセプターの存在は、同様に2 %TritonX-100で抽出した画分についてマイクロプレート法、Transblot法にて検討した。又、肝、脾、各組織においても同様の検討を行なった。

ＰＮＡ・リセプターの精製にはヒト全脳100 gからのTritonX-100抽出液をＰＮＡ－アガロース・ゲル、50 ml (1 mg ＰＮＡ／ml Sepharose4B) と4℃、3時間反応後、カラムにパック、洗浄し、結合リセプターを0.2Mlactose、0.1%TritonX-100－PBSにて溶出した。溶出画分を濃縮後、更にSephacryl Ｓ－３００ (1.5cm X 95cm) カラムにて精製した。精製ＰＮＡ・リセプターは ＳＤＳ－ポリアクリルアミド・ゲル上で分析すると同時に、 Transblot 法で確認した。

ヒト・リンパ球抗原を認識するモノクローナル抗体 Anti －Leu-7 とＰＮＡ・リセプターの反応性はELISA 法によった。精製リセプター画分50μlを96孔マイクロプレートに加え、37℃、12時間反応、Buffer Aにて洗浄後、稀釈 Anti －Leu-7 100μl と37℃、2時間反応。洗浄後、Peroxidase －抗マウスＩｇ (Ｅ－Ｙ Lab., CA, USA) と37℃、2時間反応後、洗浄し、発色後、OD 490nmにて測定した。 Anti －Leu －7 モノクローナル抗体は Becton Bickinson Monoclonal Center,Inc,USA を用いた。

結果：ヒト脳内のＰＮＡ・リセプターは2 %TritonX －100 中に抽出され、還元条件下でSDS-ポリアクリルアミド・ゲル上に泳動後、Transblot された後、Peroxidase －ＰＮＡと反応し、Mr 110,000 の糖ペプチドとして検出された。Nitrocellose 膜上に検出するには全脳からの粗抽出液たん白量500μg 以上をゲル上に必要としたことから、ＰＮＡ・リセプターはヒト脳内の微量成分であることが推定された。ミエリン画分たん白量約50 μg を同様にNitrocellulose 膜上にTransblot しPeroxidase －ＰＮＡと反応させると、ほぼ等しい濃さのMr 110,000 が検出された。即ち、ＰＮＡ・リセプターはヒト脳内でミエリン上に局在すると推定された。胸腺からも同様にしてMr 110,000が検出されたが、肝、 脾 からは検出されなかった。(表1)

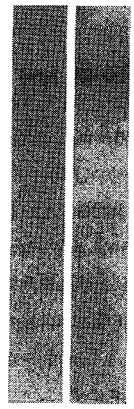
ＰＮＡ・アガロース・カラムから0.2M lactose によって溶出された画分はたん白量6 μg の微量でNitrocellulose膜上にＰＮＡリセプターを検出しえ、更にSephacryl Ｓ－300 カラム上で精製された。Sephacryl カラムからは幅広いピークとしてvoid volume に近く溶出され、ＰＮＡ・リセプターは0.1 %Triton X －100 中では凝集し易い糖たん白であることが示唆された。精製ＰＮＡ・リセプター画分 (10 μg／ml) はマイクロプレート上にてAnti －Leu －7 と強い反応性を示した。

結論・考察：ラット脳においてＰＮＡ・リセプターがミエリン、及びミエリン形成細胞と思われる 胎生期上衣細胞の特異的マーカーであることは、Gal (β1-3)GalNAc 末端を有するオリゴ糖鎖がミエリンに特異的に表現されていることを示している。(表2) 糖たん白糖鎖の内、セリン、又はスレオニンに結合するO －配糖体型の糖鎖構造は複雑であり、従って特異性を示しうる構造が多い。ラット脳にO －配糖体型糖鎖が存在するという報告はあるが[1]、その詳細は不明であった。ここに、ラット、及びヒト脳内のO －配糖体型糖鎖の一つがＰＮＡ－リセプターであり、かつミエリン・マーカーであることを示した。ヒトにおいてはＰＮＡ・リセプターは脳、胸腺以外には検出されず、ミエリン・胸腺共通糖たん白といえる。このＰＮＡ・リセプターは還元条件下ではMr 110,000 の糖ペプチドであった。 即ち、ＰＮＡが認識する糖鎖は主に一糖たん白上にのみ表現されているといえる。抽出され精製されたＰＮＡ・リセプターは0.1 %Triton X－100 では強く凝集していた。ミエリン膜上に凝集性の高い糖たん白が特異的に存在することは、ミエリン形成におけるＰＮＡ・リセプターの機能を考える上で重要な点といえよう。精製ＰＮＡ・リセプターとヒト・リンパ球抗原を認識するAnti －Leu －7 の反応性は、Anti －Leu －7 の認識する抗原構造がＰＮＡ・リセプター上に存在することを示している。Anti-Leu －7 はMyelin assosiated glycoprotein (MAG) を抗原とすることが最近示されたが[2]、抗体はIg M でもあり、抗原がＰＮＡ・リセプターの糖鎖に存在する可能性も検討中である。Gal (β1 －3)GalNAc 末端を有する糖脂質であるasialo －GM 1 もＰＮＡ・リセプターである可能性、及び、ＰＮＡ・リセプターとMAG の異同も検討中である。特異的糖鎖を有するＰＮＡ・リセプターがミエリン・胸腺共通抗原であることは、ミエリン形成、及びミエリンの破壊の過程で重要な生物学的意義を有する可能性があり、その機能の解明は今後の課題である。

表1　ヒト組織中のＰＮＡ・リセプター

全脳	＋＋
ミエリン画分	＋＋＋
胸	＋
肝	－
骨格筋	－
	－

図1 ヒト脳内のＰＮＡ・リセプター



Ａ：全脳，　Ｂ：ミエリン画分

表2　ラット脳内のＰＮＡ・リセプターの局在

	上衣細胞	白質（ミエリン）	灰白質	choroidal plexus	hyppocampal nuclei
胎生14-19 日	＋	－	－	－	－
成熟脳	－	＋＋＋	－	－	－

文献：

(1) Finne, J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 412:317-325

(2) McGarry, R.C., Helfand, S.L., Quarles, R.H., and Roger, J.C. (1983) Nature 306:376-377

(3) Momoi, M, Momoi, T., and Kurata, T. (1984) in prep.

(4) Norton, W., and Poduslo, S. (1973) J. Neurochem. 21:749-757

(5) Towbin, H. Staehelin, T., and Gordon, T. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4351

75 ミエリン形成障害マウス（Trembler）におけるMyelin associated glycoprotein（MAG）およびその他の蛋白について

犬塚　貴　（新潟大・脳研・神経内科）
J. Heath, B.D. Trapp, R.H. Quarles　（N. I. H.）

〔要　約〕

Tremblerミュータントマウスは Schwann細胞の異常により末梢神経系の著しいミエリン形成障害をきたすことが知られている。ここでは成熟Tremblerの坐骨神経ホモジネート中の MAGおよびその他の蛋白を測定した。 MAG濃度は 1.4ng/μg prot. で正常対照の 127%であった。一方PoとBPはそれぞれ正常対照の27%，20%と減少していた。P2protein もImmunoblotで著しい減少が見られた。2',3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase(CNP)活性は正常対照の65%であった。またTrembler坐骨神経中の MAG分子が正常対照より大きいことがImmunoblotで示された。尚Trembler脳中の MAG分子の大きさは正常対照と同じであった。20日令マウスにおいても成熟マウス同様の結果を得た。 MAGの局在について最近議論があるが，compact myelinがほとんどないTremblerにおいて，主なミエリン蛋白がかなり低下するにもかかわらず， MAGが低下しないことは MAGのperiaxonalな局在を支持するものといえる。またTrembler坐骨神経中にみられた分子の大きな異常 MAGがこのマウスの変異と深くかかわっている可能性がある。

Key words : Myelin associated glycoprotein(MAG), Trembler mouse, Myelin

Tremblerミュータントマウスは末梢神経系(PNS) のミエリン形成障害を有し，常染色体優勢遺伝の形をとる。この末梢ミエリン障害は坐骨神経片移植実験によりSchwann 細胞の異常によることが知られている。[1] これまでにTremblerのミエリン蛋白については，いくつかの報告がある[2)3)]が[4)]MAGについてはなかった。最近このミエリンの微少蛋白である MAGに対する家兎血清抗体がつくられ，Radioimmunoassay(RIA) による MAGの定量，[5)] SDSゲルのimmunoblot上での検出，免疫組織染色[6)]が可能となった。そこで MAGのPNS における構造，機能を窺い知るために、これらの方法を用い MAGおよび他の蛋白について検索した。

材料と方法；Trembler mice(C57BL/6J-ReTr strain) の成熟マウスと20日令マウスより脳幹と坐骨神経を取り出し，ホモジネートを作成し以下の方法によって検索した。

1．POglycoprotein-Coomassie Blue 染色 SDSゲルのdensitometry, Immunoblot 分析。

2．Basic proteins(P1, Pr etc.)-RIA, Immunoblot 分析。　3．CNP-酵素活性測定。　4．MAG-RIA, Immunoblot分析。　5．P2protein-immunoblot分析。　6．免疫組織染色(PO, MAG)。電気泳動はLaemmli の方法に従った。ImmunoblottingはTowbinらの方法に従い，染色は PAP法を用いdiaminobezidine 又は 4-chloronapthol で発色した。

結果；1．成熟Trembler mice の坐骨神経蛋白の定量－坐骨神経の蛋白の電気泳動ゲルをFig. 1に示し，各蛋白の定量値を Teble1に示した。POとBasic proteins(BP)は正常対照の30%以下でP2はImmunoblot上で検出できなかった。 CNP活性は正常対照の65%に減少していた。一方はMAG は正常対照より増加していた。またTremblerの脳幹のBasic protein CNP, MAG のレベルは正常対照と変わりなかった。

2．成熟Trembler mice の坐骨神経蛋白のImmunoblotによる分析－抗PO家兎血清によるImmunoblotでは28Kに主染色帯がみられた。また約60Kにも染色帯がありPOのdimer と考えられた。この染色帯は抗アル

ブミン家兎血清に染まる約68Kのバンドより明らかに電気泳動度が速かった。28K染色帯と約68K染色帯の染色度の割合は対照と変わりなかった。抗BP家兎血清による染色帯は21K，18.5K，17K，14Kにみられたが染色度はいずれも対照に比して低かった。抗P2家兎血清による染色帯は検出できなかった。抗 MAG家兎血清による染色帯の電気泳動度は対照に比してやや遅く，Tremblerの末梢 MAG分子が対照より異常に大きいことが示された。（Fig.2）染色帯の染色度は対照とほぼ同様であった。脳幹における MAGの染色帯は電気泳動度も染色度も対照と同様であった。

3．20日令Trembler mice の坐骨神経蛋白一一般に成熟マウスで得られた結果と同様であった。しかしPO,BP の対照に対する減少の程度は成熟マウスにおけるものより軽度であった。また CNP活性は対照と有意な差はなかった。 MAGのレベルは成熟マウスの2倍近くであった。しかしTremblerと対照の間に有意な差はなかった。(Table.2) この成熟に伴う坐骨神経中の MAGの減少は正常ラットでもすでに観察されている。[7] 抗 MAG家兎血清によるImmunoblotでは20日令Tremblerでも分子の異常に大きな MAGが示された。

4．免疫組織染色－成熟Trembler坐骨神経ではPOの染色域が著しく減少し， MAGは軸索周囲に濃染する完全又は不完全リング状の染色域がみられた。隣接薄層切片の電顕による検索によれば濃染した部分は多層のuncopacted myelin spiralであった。

TABLE 1 QUANTITATION OF PROTEINS IN ADULT TREMBLER SCIATIC NERVES

	Control	Trembler	Percent of Control
PO glycoprotein	350 ± 48.4 (5)	95 ± 15.0 (5)	27
Myelin basic proteins	59 ± 8.5 (5)	12 ± 1.4 (8)	20
C N P	79 ± 2.3 (5)	51 ± 4.7 (5)	65
M A G	1.1± 0.06 (3)	1.4± 0.05 (5)	127

PO was quantitated by densitometric scanning of gels, Basic proteins and MAG by radioimmunoassay, and CNP by enzyme assay. The level of each protein is expressed as ng per μg of total nerve protein, expect for the activity of CNP which is expressed as umol/h/mg protein. The values are given as means ± S.E.M. for the number of animal indicated.

TABLE 2 QUANTITATION OF PROTEIN IN 20-DAY TREMBLER SCIATIC NERVES

	Control	Trembler	Percent of Control
PO glycoprotein	349 ± 11.1 (5)	144 ± 13.6 (5)	41
Myelin basic proteins	51 ± 6.5 (5)	20 ± 2.6 (8)	39
C N P	110 ± 8.2 (6)	103 ± 9.4 (5)	94
M A G	1.9± 0.08 (6)	2.0± 0.29 (3)	105

Method of measurement and means of expressing the results are the same as for Table 1.

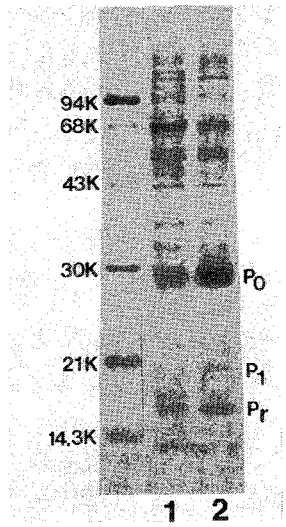


Fig. 1



Fig. 2

Fig.1 Coomassie blue staining of proteins in whole homogenate of sciatic nerves of adult Trembler (Lane 1) and control mouse (Lane 2). Each lane was loaded 30μg of total protein.

Fig.2 Immunostaining with MAG antiserum of whole homogenate of sciatic nerves of adult Trembler (Lane 1) and control mouse (Lane 2). Each lane was loaded125μg of total protein.

考按；P0, BP, P2の著明な減少はTrembler坐骨神経におけるおけるcompact myelinの著しい低下を反映していると思われる。TremblerにおけるCNP の減少の程度が軽度であったことは，CNP がPNS のcompact myelinよりもSchwann 細胞膜により多く存在していることを示唆している。Compact myelinがほとんどないTembler のPNS で MAGが不変又は増加しているという定量結果は，MAGが軸索周辺のUncompacted myelin spiral に主に存在していることを示唆している。最近Webster らは電顕レベルの免疫染色で MAGがConpact myelinにのみ存在するとしているが[8]、本実験ではCompact myelinでの MAG の存在はむしろ考えにくく軸索周辺，Schmidt-Lanterman 切痕，Lateral loop又はouter mesoaxonに存在するという これまでの報告を 支持[6]するものと思われる。MAGが減少していないことは，MAG がCompact myelinの構成要素でないということで多くは説明できるが，更にTremblerの MAGを含むuncompcted myelin spiralが増加していることも一因と思われる。Schwann 細胞膜であるuncompacted myelin spiral のcompactionをMAGが妨げていて，compactionがおきるには MAGの除去を必要とするという仮説[9] があることから，Trembler でみられた大きな異常 MAGはMyelinの成長を何らかの形で阻害している可能性もある。しかし一方この変異マウスのミエリン形成障害の二次的な効果である可能性もある。Tremblerの大きな異常 MAGは成長中ラット脳の未熟ミエリン中にみられる大分子 MAGを想起させるが，正常な成長中マウスではこのような大分子は観察されていない。一方Quaking マウス（CNS とPNS のミエリン形成障害）でCNS とPNS 双方に同様な大きな異常 MAGが観察されている （Inuzuka et al:unpublished)のは興味深い。未熟ラット脳での大分子 MAGや，変異マウスでの大きな異常 MAG出現の理由は不明であるがpost-translational glycosidic 又はproteolytic processingの変化，あるいは最近成長中のマウスとラット脳で示されたように２つの大きさの違う MAGをコードしたm-RNA の存在による可能性[10]が考えられる。

References; 1)Aguayo et al.(1977)Nature265,73-75 2)Matthieu et al.(1979)Proc.Int.Soc.Neurochem.7,475 3)Matthieu et al.(1980)J.Neurochem35,1345-1350 4)Bourre et al.(1982)J.Neurochem.38,643-649 5)Johnson et al.(1982)J.Neurochem.39,1356-1362 6)Sternberger et al.(1979)Nat.Acad.Sci.(USA)76,1510-1514 7)Johnson et al.(1982)Trans.Amer.Soc.Neurochem.13,213 8)Webster et al.(1983)J.Neurochem.41,1469-1479 9)Trapp et al (1982)J.Cell Biol.92,877-882 10)Frail et al.(1984)Trans.Amer.Soc.Neurochem.15,93

76 顆粒細胞欠損マウス（*weaver*）の小脳の形態学的並びに生化学的研究：GFAP, MBP, S−100, セロトニンの免疫組織化学並びに二次元電気泳動法による解析

御子柴克彦・岡野栄之・藤城正敏・高松　研（慶大・医・生理）
木村　宏（滋賀医大・解剖）・塚田裕三（慶大・医・生理）

〔要　約〕

weaver マウスは常染色体性不完全優性遺伝様式をとり、小脳の顆粒細胞の欠損を伴う。weaverマウス小脳をGFA, MBP, S-100, セロトニンの抗体による免疫組織化学的解析と二次元電気泳動による解析を行い、以下の結果を得た。

1) 二次元電気泳動法により、weaver の小脳では減少ないし欠損する蛋白と増加するスポットが観察された。水溶性分画、顆粒性分画いずれも pI 5.3～6 の領域で分子量が20K～50K ダルトンに変化の大部分がみられた。

2) S-100陽性細胞は、無秩序に散在し、Bergmann 細胞体の位置も極度に乱れていた。GFAP陽性のBergmann線維の反応性は強く、短く、太いもの、屈曲するものなどもみられたが正常に近いものもみられた。

3) MBP 陽性線維は正常では、白質から顆粒層へ突起を伸ばしているが、weaver 小脳では、MBP 陽性線維の密度は非常に高く、突起は屈曲しながらプルキンエ細胞体をとり囲み、線維の走行変化が観察された。

4) セロトニン陽性線維の密度は高く、小脳のいずれの部位においても線維がからみ合いながら分布しており、プルキンエ細胞をとりかこんでいる像が観察された。

Key words： weaver mutant mice, granule cell, cerebellum

はじめに：小脳は古くから形態学的研究が進められ、構成する各々の細胞の同定も可能であり、また電気生理学的解析も強力に進められ、各々のニューロン間の連絡も明らかにされている。さて近年神経系に突然変異を起こした100種以上にものぼるマウスが報告されているが、それらのうちで、weaverマウスは小脳の顆粒細胞が変性脱落し、小脳の低形成を示しており、強い小脳性運動失調を伴う。そこで我々はweaver の小脳の病態像を明らかにするため、免疫組織学的並びに二次元電気泳動法による解析を進め若干の知見を得たので報告する。

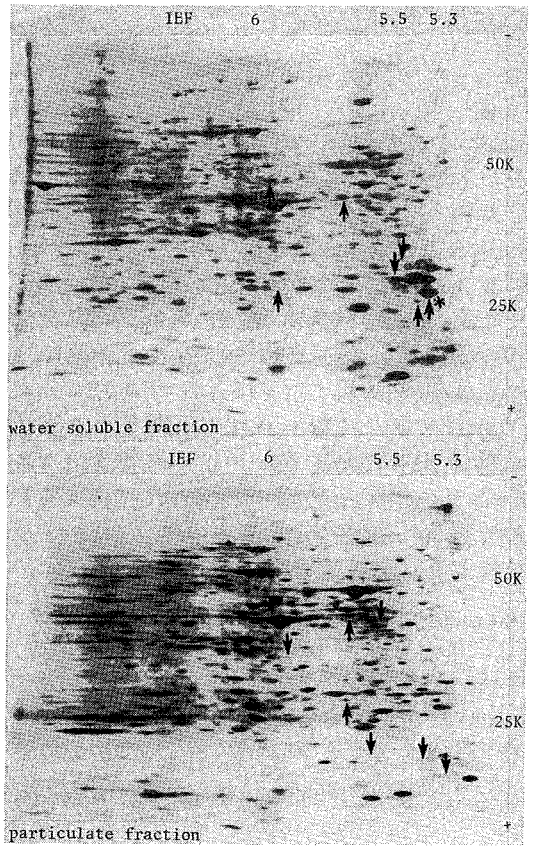
材料および方法：weaverマウスは当教室において飼育繁殖を行ったものを用いた。通常ヘテロ接合体(wv/+)の雌雄の交配により、ホモ接合体(wv/wv)を得た。

免疫組織化学　GFAP(glial fibrillary acidic protein), MBP(myelin basic protein), S-100蛋白、並びにセロトニンに対する抗血清を用いてSternberger ら[1]のPAP法を用いて免疫組織化学的反応を行なった。二次元電気泳動法　O'Farrell の方法[2]に従って電気泳動を行なった。10倍量組織ホモジェネートを105000×g 60'遠心した上清と、沈渣を lysis buffer で処理した105000×g 上清をサンプルとして用いた。二次元目ゲルは7.5％－20％ linear polyacrylamide gel を用いた。電気泳動後、鍍銀染色をほどこした。

結果及び考察；小脳のプルキンエ(pK)細胞に特異な蛋白の研究は数多く報告されているが[3-6]、顆粒細胞に関する蛋白解析は、ほとんど報告されていない。そこで我々は顆粒細胞の欠損を伴うweaverと正常マウス小脳の蛋白を二次元電気泳動法により分離し、鍍銀染色により解析を行なった。水溶性蛋白のうちで正常小脳に比して減少ないし、欠損を示す蛋白としてpIが約5.5で分子量が30K及び35Kダルトンの蛋白がみられ、増

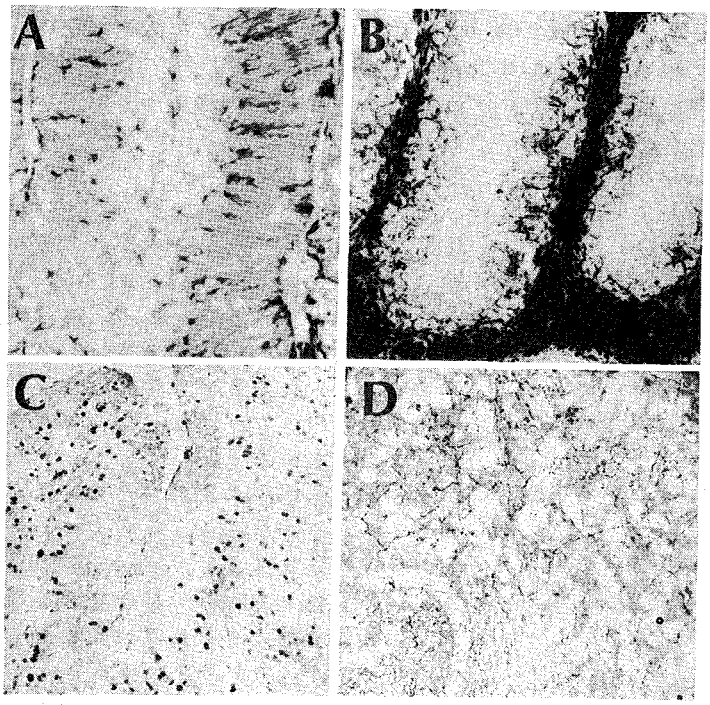
加するものとして、pIが5.3〜6で27Kから50Kにまたがる数種の蛋白がみられた(図1)。一方weaverの小脳の沈渣のうちでlysis buffer可溶分画には、分子量20K位のpIが5.3〜5.5の3つの蛋白とpI 5.3〜6で、分子量80Kから45Kにまたがる数種類の蛋白が減少ないし欠損していた。蛋白の増加が観察されるものには、pI 5.3・分子量27Kの蛋白の他、pI 5.7〜6.0の領域の27Kから50Kに散在する蛋白があった。これら変化のあった蛋白はいずれもpIが5.3〜6の領域にあった。pI 5.3 27Kの蛋白(図1上段中*)はプルキンエ(Pk)細胞に局在するspot 35[4]に相当するがweaverでは相対的にプルキンエ(pk)細胞の占める割合が高いため増加したと考えられる。しかしこの蛋白は、大脳やpk細胞欠損マウス(nervousとpcd)においてもCoomasie Brilliant Blueでは検出不能であったが鍍銀法ではいずれでも大きなspotとして検出され、必ずしもpk細胞に特異的なものではないことが示された。今回の解析で増加していた蛋白は、顆粒細胞の欠損に伴う小脳の低形成のため、相対的に他の細胞成分の占める割合が増加した結果によるものと考えられる。またweaver小脳内で減少する蛋白が多数検出されたが、これは何らかの形で、顆粒細胞と関連があるものと考えられる。

Fig. 1. Protein profiles by silver staining of the water soluble fraction (A) and particulate fraction soluble to lysis buffer (B) of the weaver mutant cerebellum separated by two dimensional gel electrophoresis. Proteins increased (↑) or decreased (↓) in the weaver cerebellum are indicated by arrowheads.



次に、免疫組織化学的解析を行なった。まず、S-100蛋白は、正常では、pk細胞体の間に位置するBergmann細胞体と、白質内にあるグリア細胞体に局在し[7]、顆粒層中には反応陽性細胞は、比較的少なく、分子層中にはほとんど観察されない。weaverでは、S-100陽性細胞は、分子層にはほとんどみられないが、他の部位では無秩序に分散しており、Bergmann細胞体の配列も乱れていた(図2C)。GFAP抗血清により正常では、Bergmann線維が、小脳表層に垂直に伸びていることが観察される。weaverマウス小脳では、GFAP陽性のBergmann線維は反応性が強く、正常ではBergmann細胞体はほとんど反応しないが細胞体もGFAP陽性となっていた(図2A)。又、weaverでは分子層が薄いのに対応してBergmann線維は短く、かつ径が太いものもみられ、部位的には屈曲する線維もみられた(図1)。ほとんど正常に近い部位も観察されたが、その領域においても、顆粒細胞の脱落が観察された。最近のキメラによる解析結果[8]と考え合わせても、Bergmann線維に異常が

Fig. 2. Immunohistochemical staining of the weaver cerebellum using antisera against GFAP (A), MBP (B),S-100 protein (C) and serotonin (D).



あるために顆粒細胞が移動ができず変性脱落する[8]と考えるよりは、顆粒細胞そのものに変異がおきて変性する可能性[9][10]の方が強いと考えられる。次にミエリン塩基性蛋白の抗体を用いてミエリンを染め出して、有髄神経線維の走行を調べた。正常では、白質から顆粒層へ向かって放射状にMBP陽性線維が伸びているにもかかわらず、PK細胞へはほとんど伸びて行かない。そしてMBP陽性線維の大部分は苔状線維から構成されていることが知られている[11]。weaver小脳ではMBP陽性線維の密度が高く、しかもその突起は、屈曲しながら、pk細胞体をとりかこんでいた(図2B)。既に電気生理学的にweaverでは正常にはみられない苔状線維とプルキンエ細胞とのシナプスが形成されることが報告されており[12]、この連絡は機能的に意味のあることが2-deoxyglucose法の導入により明らかにされている[13]。今回得られたMBP陽性の苔状線維の走行変化は、顆粒細胞変性に対応する小脳のplasticityの一つであるとも考えられる。

セロトニン作働性線維は生体内でmodulator的役割を果していることが示唆されているが、weaver小脳内では、その分布密度は非常に高く小脳のいずれの部位においてもからみ合いながら、プルキンエ細胞も強く取り囲んでいる像がしばしば観察された(図2D)。このセロトニン作働性線維も顆粒細胞欠損に伴う小脳内機構の代償的な役割を果しているのか否か、その作用機構の解明は今後の課題である。

文献：

1. Sternberger, L.A. et al. J. Histochem. Cytochem. (1970) 18 315-333
2. O'Farrell, P.Z. et al. Cell 12 1133-1142
3. Mikoshiba, K. et al. Dev. Neurosci. (1979) 2 254-275
4. Yoshida, Y. and Takahashi, Y. Neurochem. Res. (1980) 5 81-96
5. Reeber, A. et al. Brain Res. (1981) 229 53-65
6. Mallet, J. et al. Dev. Biol. (1979) 72 308-319
7. Mikoshiba, K. et al. Dev. Biol. (1980) 79 64-80
8. Rakic,P. & Sidman,R.L. Proc. Natl. Acad Sci. (1973) 70 240-244
9. Mullen, R.J. & Herrup,K. in "Neurogenetics" Elsevier 173-196
10. Sotelo,C. & Changeux, J.P. Brain Res. 67 519-526
11. Mikoshiba, K. et al. Dev. Neurosci. (1984) 6 101-110
12. Crepel, F. & Mariani,J. J. Neurobiol. (1976) 7 579-582
13. Mikoshiba, K. et al. J. Neurochem. (1981) 37 186-191

77 ニューロフィラメントと微小管の結合

徳武　哲
（都精神研・神化）

〔要　約〕

(1) ニューロフィラメント(NF)と微小管(Microtubule, MT)は、神経細胞中で細胞骨格形成あるいは運動機能の面から、相互に親和性あるいは関連性を持っているものと考えられることから、NFを構成している三成分(Triplet, P200, P160, P68)のうち、どの成分がMTに親和性を持ち、MTとの結合に関与しているかについて検討した。
(2) 再構成したNFの三成分の共存下で、MTをassembleさせ、MTとの親和性を電顕で観察したところ、P68およびP160線維とMTの結合には特異性が見られず、NF線維が集合して塊になった部分でMTとからみ合っているように見えたが、それは機械的なからみ合いであり、線維間の親和性によるものとは思われなかった。これに対し、P200線維とMTとの結合には特異性が見られ、線維間の親和性により結合しているように思われた。さらにこの性質について遠心法と電気泳動法により調べた。
(3) Phospho-cellulose columnでMAPs(Microtubule-Associated Proteins)を除いたTubulinについて同様な実験を行なってみたが、MAPsがないTubulin線維にはP200線維も結合しなかった。以上のことからNFとMTの結合には、P200とMAPsが関与しているのではないかと推察された。

Key words：　Neurofilament,　Microtubule,　Cytoskeleton

ニューロフィラメント(NF)と微小管(Microtubule, MT)は、神経細胞中での分布状態に並行性が見られるし、また、電顕的観察により結合部位が見出されることから(2,10)、細胞骨格形成および運動機能の面で相互に関連性を持っているものと推定される。MTを構成している主要成分はTubulinとMAPs (Microtubule-Associated Proteins)であり(18)、NFはTriplet (P200, P160, P68)から構成されているが(7)、昨年の本大会で、演者らは、NFの単離、精製された各成分が、再構成により各々特徴ある線維を形成し、電顕により観察されたそれらの形態が、免疫電顕法により推測された各成分のNF上での分布状態(11,19)、およびnativeなNFの観察から得られた結果(10)とよく一致することを報告した(14,16)。すなわち、P68はNFの線維中心を形成すると思われる、表面が滑らかな長い線維を形成し、P160は、それらを螺旋状にとり巻いていると思われる表面が荒い線維を形成し、P200は、側鎖を形成すると思われる短い線維を形成した。そこで本実験では、再構成されたNFの各成分とMTとの結合性を電顕による観察や、遠心分離法とゲル電気泳動法により調べ、その結果について考察した。

〔実験法〕

(1) Microtubuleの調製。　MTは牛脳を0.75 volの0.1M MES-0.5M $MgCl_2$-1mM EGTA(pH8.8)のReassembly Buffer (RAB)でhomogenizeして得られた抽出液に4M glycerolと1mM GTPを添加し、36°Cでassembleさせ、また0°Cでdisassembleさせる方法を繰り返す方法により調製した(12)。Tubulinはphospho-cellulose columnによりMAPsと分離した(18)。

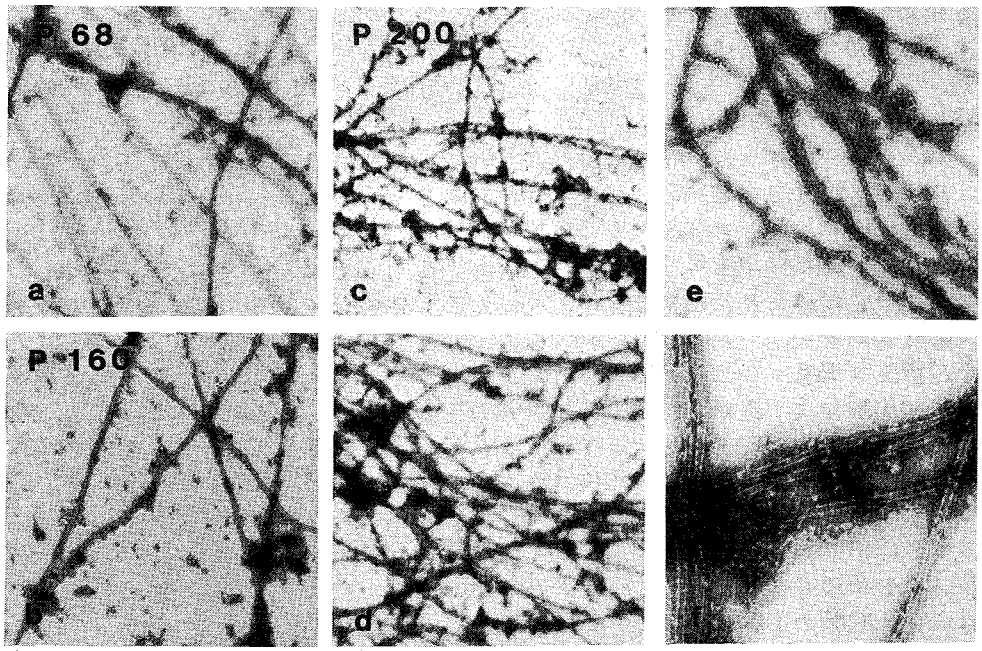


Fig. 1. 線維化した Neurofilament 成分と Micro-tubule との結合

(2) Neurofilament Triplet の精製　牛脳を 2.5 vol の 10mM NaH_2PO_4 - 1mM EDTA - 0.1M NaCl - 0.85M sucrose (pH6.8) でゆるやかに homogenize し、Liem らの方法に従い、axon floatation と 1% Triton X-100 存在下の等張分解法により粗 NF を調製した(7)。Triplet の精製は 8M 尿素溶液に溶解した粗 NF を hydroxy-apatite を用い batchwise 抽出法により精製し、Triplet 各成分の分離は、6M 尿素溶液を用いた DE-52 column chromatography により行なった(1.5.6.13.15)。

(3) NF 成分線維存在中での MT の再構成　NF 各成分 (1mg/ml) は、10mM NaH_2PO_4 - 1mM EDTA (pH6.8) (nonassembly buffer, NAB) に 2mM $MgCl_2$ と 0.1M NaCl を添加して 0°C で 24h 静置して assemble させた。MT は 8M glycerol を含んだ RAB で -20°C で保存しておいた溶液 (4mg/ml) に、等容積の assemble した NF 成分の溶液を加え、更に $MgCl_2$ と GTP を 1mM 添加し、36°C で 30分間加温し、直ちに 2% 酢酸ウラニル溶液を用いた negative 染色法により電顕で観察した。残りの溶液は、100,000g で 30分間遠心し、沈渣と上清について Laemmli 法により (3)、7.5% ゲルを用いた SDS-ゲル電気泳動を行なった。

〔結果〕

(1) 電顕による観察　電顕による観察の結果は図1に示した。1a および 1b より、P68 および P160 線維と MT の結合は均一性が少なく、NF 線維の塊の部分で MT とからみ合っているが、NF 線維とほとんど結合していない MT も観察され、NF と MT の結合は、線維間の親和性よりも機械的なからみ合いによるものと思われた。これに対し、P200 と MT では、1c～1f に示したように、MT のすべての部分にほぼ等しく NF

線維が結合しており、MT線維も密集するようになっている。このようにP200線維とMTは、機械的なからみ合いよりも、線維間の親和性により結合しているように思われた。

(2) SDS-ゲル電気泳動による分析結果　上の結果から、MTとNF成分線維の混合物を遠心した時には、P200はMTと共沈し、P160とP68はあまり共沈しないのではないかと予測されたが、遠心分離後の沈澱と上清のSDS-ゲル電気泳動による分析の結果は、予測とはむしろ異なっていた。これは機械的なからみ合いによるものは共沈するが、P200とMTの親和力はあまり強いものではなく、MTが沈澱し、NFが沈澱しないような遠心条件下では、NFとMTは再び分離するのではないかと思われた。

(3) MAPsのないTubulin線維とNFの結合　MAPsをPC-columnにより除いたTubulin (2mg/ml)を高Mg中あるいはTaxolの存在下で線維化し(17)、NFとの結合性を調べたが、MAPsを欠いたTubulin線維は、P200とも結合しなかった。以上のことから、MTとNFの結合には、MAPsとP200が関与しているものと思われたが、その結合はあまり強いものではないと考えられた。

〔考察〕

他の研究者の結果との比較　MTとNFの結合性や相関々係については、Leterrierや南、酒井等の報告がある(7,8,9)。南、酒井等は、NFの存在下にTubulinをassembleさせた時、NFが一定濃度以上になると、溶液の粘性や吸光度が急激に上昇することから、NFがMTのassemblyを促進するだけでなく、MTとNFの間に網状構造が形成されると推定しており、さらにTriplet中のP200が、その作用を持つことを明らかにした(8,9)。これに対し、Leterrierらは、disassembleしたMT溶液にNFを加えた後、NFを遠心により除くと、MAPsがNFと結合して除かれるため、MTのassemblyは阻害されると報告している(4)。二つの実験結果は、一見相反するようにも見えるが、両者の実験条件は厳密に同じではなく、それぞれMTのassemblyに関与するある要因についてその特性を明らかにしている。すなわち、南らの実験は、Tubulinに対し、P200がMAPsと類似した作用と親和性を持ちうることを示唆している。また、Leterrierの実験は、MAPsがNFと親和性を持ち、MTとNFの結合に関与している可能性を示している。本実験で得られた結果も、MTとNFの結合にはP200とMAPsが必要なことを示唆しており、既報の実験結果を支持するものと思われる。

〔文献〕 (1) Geisler, N., & Weber, K. (1981) J. Mol. Biol. 151, 565-571 (2) Hirokawa, N. (1982) J. Cell. Biol. 94, 129-142 (3) Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685 (4) Leterrier, J-F., Liem, R. K. H., & Shelanski, M. L. (1982) J. Cell. Biol. 95, 982-986 (5) Liem, R. K. H. (1982) J. Neurochem. 38, 142-150 (6) Liem, R. K. H., & Hutchison, S. B. (1983) Biochemistry 21, 3221-3226 (7) Liem, R. K. H., Yen, S-H., Salmon, G. D., & Shelanski, L. M. (1978) J. Cell. Biol. 79, 637-645 (8) Minami, Y., Murofushi, H., & Sakai, H. (1982) J. Biochem. 92, 889-898 (9) Minami, Y., & Sakai, H. (1983) J. Biochem. 94, 2023-2033 (10) Rice, R. V., Roslansky, P. F., Pasco, N., & Houghton, S. M. (1980) J. Ultrastruct. Res. 71, 303-310 (11) Sharp, G. A., Shaw, G., & Weber, K. (1982) Exp. Cell. Res. 137, 403-413 (12) Shelanski, M. L., Gaskin, F., & Cantor, C. R. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 765-768 (13) Tokutake, S. (1984) Anal. Biochem. 140 (in press) (14) Tokutake, S., Liem, R. K. H., & Shelanski, M. L. (1984) Biomed. Res. 5 (in press) (15) Tokutake, S., Hutchison, S. B., Patcher, J. S., & Liem, R. K. H. (1983) Anal. Biochem. 135. 102-105 (16) 徳武 哲、門田健、石井毅 (1983) 神経化学 22、138-140 (17) Vallee, R. B. (1982) J. Cell. Biol. 92, 435-442 (18) Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S-H., & Kirschner, M. W. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 1858-1862 (19) Willard, M., & Simon, C. (1981) J. Cell. Biol. 89, 198-205

78 Marquardt 法による軸索流速度の数量的解析 — 亜慢性鉛中毒ラットを例として —

横山和仁・荒記俊一
（大分医大・公衛）

〔要　約〕

遅い軸索流（以下軸索流と略す）の速度を数量的に解析するために，^{35}S]メチオニンをラット腰髄前角に注入して2週後の坐骨神経中の累計放射能を(1)軸索流で運ばれた累計放射能（f_x）および(2)累計バックグラウンド放射能（g_x）の和として近似した：近似式は $f_x = a\{1 - \exp(-bx)\}$ および $g_x = cx$（x は脊髄からの距離，a, b および c は定数）。定数 a, b および c の値を非線型最小二乗法（Marquardt 法）で算出した。これより $f_x = a/2$ となる x の値（D50）を算出し，軸索流の速度の指標とした。

D50 は平均17（範囲7-24）mm であることが 0.1-2.0% の酢酸鉛を含む飲料水で15週間飼育した21週齢の Wistar 系雄ラット7匹（血中鉛 25-56γ，平均 171 μg/100g）で見出された。同様に，平均28（範囲21-39）mm であることが同週齢・性の対照ラット4匹（血中鉛 1-16，平均9 μg/100g）で観察された。D50 は両群間で有意差があったので（Wilcoxon 順位和検定，$p<0.05$），鉛吸収により軸索流速度が低下することが明らかとなった。

Key words : slow axonal flow, Marquardt's method, lead

遅い軸索流（以下軸索流と略す）の速度の算出にはこれまで，放射能値およびフルオログラムにより測定した放射能標識たん白の軸索内の移動距離が用いられてきた（4,5,6）。しかしこの測定は肉眼によるので客観的でない。今回，新たに軸索流の速度をより客観的に算出する方法を考案し，これにより鉛吸収による軸索流の低下を見出したので報告する。

〔対象と方法〕

6週齢の Wistar 系雄ラット各2匹を 0.1, 0.5, 1.0 および 2.0%(W/V) の酢酸鉛を含む飲料水で飼育した（鉛投与ラット）。同様のラット4匹を酢酸鉛を与えず飼育した（対照ラット）。13週後，^{35}S]メチオニンを既報の方法（8）でラットの左腰髄前角に注入した。2週後，体重測定ののち心臓血中の鉛濃度（BPb）を湿式灰化－フレームレス原子吸光光度法で測定した。第5腰神経前根（L5）の脊髄への付着部から脛骨－総腓骨神経分岐部までの左坐骨神経を取り出し，6mm ごとの計15個の連続切片とし，各切片中の放射能を既報の方法（8）で測定した。

〔軸索流速度の解析方法〕

L5 の脊髄への付着部から $x$mm までの神経中の累計放射能を(1)軸索流により運ばれた放射能（f_x）と(2)バックグラウンド放射能（g_x）の和と考えた。g_x は主に遅い軸索流で運ばれた放射能が軸索内に残留したものであろう（3）。軸索外の成分に取り込まれた放射能は微量と考えられるので(5)無視した。f_x と g_x を，$f_x = a\{1 - \exp(-bx)\}$ および $g_x = cx$ で近似した（a, b および c は正の定数）。定数 a, b および c を非線型最小二乗法（Marquardt 法）（7）で計算し，$f_x = a/2$ となる x（以

下 D50 と表わす）を算出した。D50 は軸索流で運ばれた全放射能の半分が移動した距離を意味するので，軸索流速度の指標として使用する。

［軸索流速度の解析結果］

対照および鉛投与ラットの累計放射能の測定値とこれより推定した f_x および g_x の近似曲線を図1に示す。なお，累計放射能の測定値とその推定値（f_x+g_x）との相関はいずれのラットでも有意であった（すべて $P<0.001$）。D50 の推定値は表1のようになった。鉛投与ラットの D50 は対照ラットより有意に小さかった（Wilcoxon 順位和検定，$P<0.05$）。なお，その BPb は有意に高かった（$P<0.01$）。体重は有意差がなかった（$P>0.05$）。

［考察］

今回の方法で推定した累計放射能はその測定値と有意な相関があった。従って D50 値は実際の軸索流速度を良く反映すると考えられる。

鉛投与ラットで体重が有意に減少しなかったので，軸索流の速度低下は全身衰弱の結果とは考えられない。鉛が軸索終末から軸索内に取り込まれるとの報告がある（1）。従って軸索内の鉛が直接軸索流に影響すると考えられる。細胞内のエネルギー産生の鉛による阻害が脳，腎および肝で観察されている（2）。軸索内でもこの阻害がおこり軸索流に必要なエネルギーが減少する結果，その速度が低下すると推定される。

［謝辞］

Marquardt 法について助言をいただいた都立大学古郡康介助手に感謝します。

表1　対照および鉛投与ラットの血中鉛（BPb）および体重と，a，b，c および D50 の推定値。†

ラット‡		BPb ($\mu g/100g$)	体重 (g)	a ($\times10^4$ dpm)	b ($\times10^{-2}$ mm^{-1})	c (dpm)	D50 (mm)
対照ラット	1	1	480	1.84	3.06	21.83	23
	2	9	420	65.10	2.51	73.60	28
	3	9	460	15.65	1.76	0	39
	4	16	520	12.18	3.31	0	21
	平均値	9	470				28
鉛投与ラット	1	25	490	2.85	3.69	32.16	19
	2	51	450	13.95	3.59	0	19
	3	86	450	28.08	3.78	76.13	18
	4	77	350	1.08	2.86	16.49	24
	5	124	380	7.23	3.87	7.30	18
	6	269	380	3.49	9.39	22.92	7
	7	564	370	9.79	4.33	0	16
	平均値	171	410				17

† a，b，c および D50 は 本文参照。

‡番号は図1と同じ。

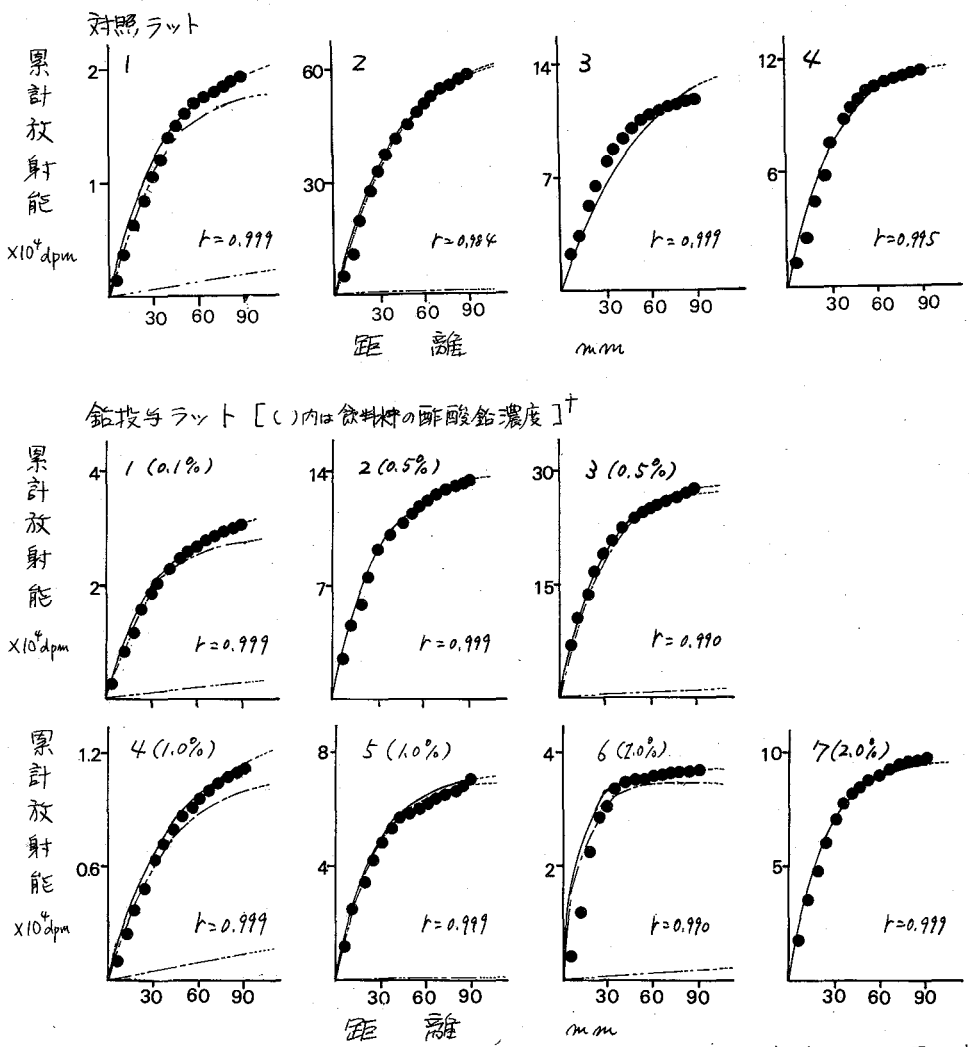


図1　対照および鉛投与ラットの坐骨神経内の累計放射能の測定値（●）と速い軸索流で運ばれた累計放射能（f_x，——）および累計バックグラウンド放射能（g_x，- - - -）の近似曲線。—— $= f_x + g_x$ 。距離(x)は坐骨神経の脊髄への付着部から測定した。r = 累計放射能の測定値とその推定値（$f_x + g_x$）の相関係数（$N = 15$）。†0.1%鉛投与ラットの低はレ感知メチオニンが注入できなかったため除いた。

［文献］

1) Barnah, J.K. (1981) Neurology 31, 612-616. 2) Bull, R.J. (1980) in Lead Toxicity (Singhal, R.L., and Thomas, J.A., eds) pp. 119-168, Urban & Schwarzenberg, Baltimore. 3) Cancalon, P., and Beidler, L.M. (1975) Brain Res. 89, 225-244. 4) Hoffman, P.N., and Lasek, R.J. (1980) Brain Res. 202, 317-333. 5) Lasek, R.J. (1968) Exp. Neurol. 21, 41-51. 6) Lasek, R.J., and Hoffman, P.N. (1976) in Cell Motility (Goldman, R.J., Pollard, T., and Rosenbaum, J., eds) pp. 1021-1049, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 7) Marquardt, D.W. (1963) J. Soc. Ind. Appl. Math. 11, 431-441. 8) Yokoyama, K., Tsukita, S., Ishikawa, H., and Kurokawa, M. (1980) Biomed Res. 1, 582-589.

79 軸索内チューブリン輸送の二型

田代朋子・小宮義璋・黒川正則
（東大・医・脳研・生化）

〔要　約〕

1. ラット第4腰髄(L_4)神経節にL-[^{35}S]メチオニンを注入し、遅い軸索内輸送で坐骨神経知覚繊維内を運ばれる標識チューブリンを分析した。チューブリンは、最も遅いニューロフィラメント蛋白(1.7mm/日)と、アクチン(4.5mm/日)にまたがる広い速度分布を示す。速い部分は1% Tritonで抽出されるが、ニューロフィラメント蛋白と同じ速度を持つ遅い部分はTriton不溶性である。二次元電気泳動でその組成を比較すると、遅い部分には速い部分にみられない特有の蛋白"NAP"が存在する。

2. NAPは、チューブリンに似た分子量，等電点域にあるが、α,βサブユニットの何れとも異るペプチドマップを示し、Triton不溶性であることからも、ニューロフィラメント関連の蛋白と考えられる(neurofilament-associated protein)。

3. 脊髄前角細胞－坐骨神経運動繊維の系を用い、β,β'-iminodipropionitrile (IDPN)によってニューロフィラメント蛋白の輸送を選択的に阻害した場合、NAP及びチューブリンの一部がニューロフィラメントとともに阻害をうけ、著しく速度が減少する。

4. 以上のように、軸索内チューブリンには、ニューロフィラメントとの相互作用の程度の差によって生ずると考えられる二つの成分の存在がみとめられる。

Key words： axonal transport, tubulin, neurofilaments

神経軸索内には、微小管やニューロフィラメントを主体とする繊維構造が発達しており、軸索の伸長，再生，軸索内輸送などに重要な役割を果すものと考えられている。これら細胞骨格を構成する蛋白は、遅い軸索内輸送(1日数mm)によって細胞体から供給されている(5, 8, 9)。ニューロフィラメント蛋白は常に最も遅いグループを形成するが、微小管構成蛋白チューブリンの輸送は用いる系によって様子が異り、ニューロフィラメント蛋白と同じ速度で動く場合、より速いアクチンとの中間の広い速度分布を示す場合などがあり、視神経を用いた研究から提唱されているような微小管－ニューロフィラメント・ネットワーク(1)の形で輸送されるとは限らない。

我々は、ラット坐骨神経を用いた実験から、軸索内を輸送されるチューブリンには、輸送速度だけでなく、溶解性及びサブユニット組成の異る二成分が存在することを見出した(13, 14)。二つの成分は、ニューロフィラメントとの相互作用の程度の差をあらわしていると考えられ、軸索内微小管の存在形態を解明する上で重要な手がかりを与えるものと期待される。

〈方法〉

チューブリンの軸索内輸送：ウィスター系ラット(7週齢，雄)の第4腰髄(L_4)神経節にL-[^{35}S]メチオニン 30～40μCi (0.25μl)を注入し、坐骨神経知覚繊維内を輸送される蛋白を放射標識した(6)。1～4週後に、坐骨神経，L_4神経節，L_4後根をとり出し、3mmの連続切片に切断し、各切片に含まれる標識蛋白をSDS電気泳動(7)により分析した。二次元電気泳動分析(10)には、神経切片をエアー・ハンマーにより凍結破砕した後，2% Nonidet

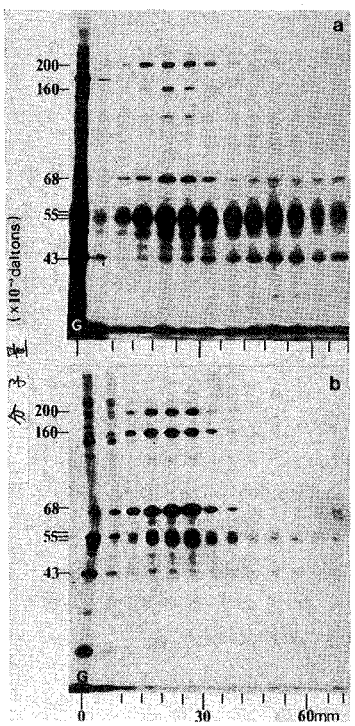


図1：放射標識2週間後に坐骨神経知覚繊維内を輸送されている蛋白。a)全標識蛋白。b)Triton抽出後に残った細胞骨格蛋白。

P-40, 9.5M尿素を含む試料液で抽出した。電気泳動後、フルオログラフィー(2)によって標識蛋白を検出した。

神経小片の Triton 抽出：放射標識2週間後の坐骨神経（両側）をとり出し、6mmの連続切片に切断し、左右一対の切片を合せてエアー・ハンマーで凍結破砕して、1% Triton X-100, 50mM Tris (pH 7.5), 25mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 5mM EGTA, 5mM β-メルカプトエタノール を含む Triton-緩衝液でホモジェナイズした。4°C, 1時間撹拌後、2M蔗糖を含む Triton-緩衝液を等容加え、77,000 g, 2時間遠心して、細胞骨格蛋白の沈澱を得た。

放射標識された脳チューブリンの調製：L-[^{35}S]メチオニン 150μCi をラット脳室内に注入し、3時間後にとり出した脳より、重合・脱重合を2回くり返して標識チューブリンを分離した(12)。

IDPN 投与動物における軸索内輸送：ラット脊髄前角（L_3-L_5）に L-[^{35}S]メチオニンを注入し、直後に 1.5g/kg の IDPN を腹腔内投与した。5週間後にとり出した坐骨神経及び前根について、前述と同様の電気泳動分析を行った。

〈結果と考察〉

チューブリンの二つの輸送成分の存在：図1.aに示すように、速い軸索内輸送は、ニューロフィラメント蛋白（分子量200K, 160K, 68K の三種のサブユニットから成る）, チューブリン(~55K), アクチン(43K)を主成分としている。アクチンは4.5mm/日とニューロフィラメント蛋白(1.7mm/日)より速い速度で輸送される。坐骨神経知覚繊維の系では、チューブリンはこのように両者にまたがる広い速度分布を示す。

SDS電気泳動上で、55K付近には3本のバンドが識別されるが、それらの量比は速度分布につれて変化しており、速い部分と遅い部分ではチューブリンのサブユニット組成に差異があることを示している。

神経切片を Triton 抽出後、残った細胞骨格標品についてみると、速いチューブリン部分はほぼ完全に抽出されるのに対し、ニューロフィラメント蛋白と同じ速度を示す遅い部分は Triton 不溶性で、速度分布だけでなく溶解性の上でも明らかに異る二つの成分の存在が確認された（図1.b)。

更に、二次元電気泳動により二成分のサブユニット組成を比較したところ、遅い成分では速い成分にみられない蛋白(NAP)が主成分の一つとして含まれることがわかった（図2)。このような差異は、放射標識後の時間（2, 3, 4週）とも、細胞体からの距離とも無関係に常に存在することから、輸送の途中で二成分が生じる可能性は少ない。

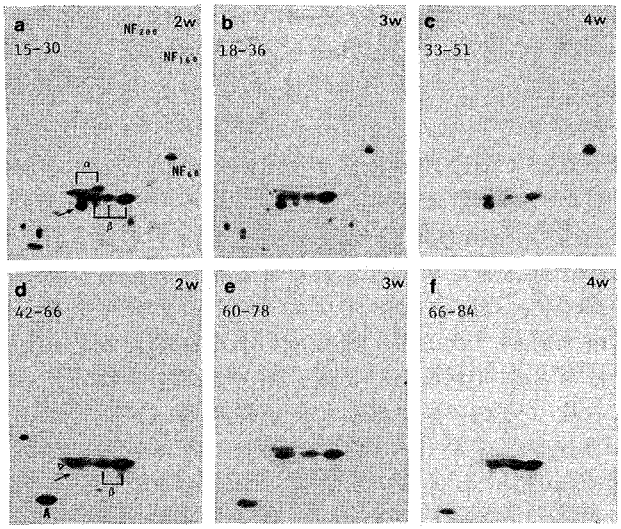


図2：二次元電気泳動によるチューブリン二成分のサブユニット組成分析。a,b,cはニューロフィラメント蛋白とともに動く遅い成分。d,e,fはより速い成分。各々、放射標識後、2週(a,d)，3週(b,e)，4週(c,f)の坐骨神経のうち、図中に示した神経節からの距離(mm)に相当する部分を泳動した。α：α-チューブリン　β：β-チューブリン　NF_{200}，NF_{160}，NF_{68}：ニューロフィラメント蛋白　A：アクチン

遅い成分特有の蛋白 NAP：二次元電気泳動上のα,β-チューブリンは、各々、限定分解によるペプチドマップ法(3)で同定した(図3；Staphylococcus aureus V8 protease を使用。各スロット当り5ng)。NAP は、αともβとも異るパターンを示し、チューブリンには属さないことが明らかである。Triton 不溶性ともあわせて、ニューロフィラメント関連の蛋白と考えられる。

IDPN 投与動物における軸索内輸送：坐骨神経運動繊維の系では、IDPN によってニューロフィラメント蛋白の輸送が選択的に阻害されることが知られている(4, 11, 15)。この条件下では、NAP 及びチューブリンの一部がニューロフィラメントとともに著しく遅くなり、本来の速度で輸送される大半のチューブリンと完全に分離されることがわかった。

以上、チューブリンには、ニューロフィラメントとは独立して動く速い成分と、ニューロフィラメント蛋白との相互作用によって減速すると考えられる遅い成分の二成分が確認された。

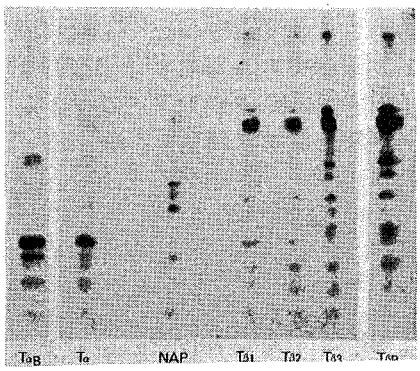


図3：限定分解によるペプチドマップ。$T\alpha_B$，$T\beta_B$：脳より分離したα-及びβ-チューブリン。Tα：軸索内α-チューブリン。$T\beta_1$，β_2，β_3：軸索内β-チューブリンの三種のサブユニット。NAP：遅い成分特有の蛋白。

へ文献ヘ

1) Black M.M. & Lasek R.J.(1980) *J.Cell Biol.*, *86*, 616
2) Bonner W.M. & Laskey R.A.(1974) *Eur.J.Biochem.*, *46*, 83
3) Cleveland D.W. et al.(1977) *J.Biol.Chem.*, *252*, 1102
4) Griffin J.W. et al.(1978) *Science*, *202*, 633
5) Hoffman P.N. & Lasek R.J.(1975) *j.Cell Biol.*, *66*, 351
6) Komiya Y. & Kurokawa M.(1978) *Brain Res.*, *139*, 354
7) Laemmli U.K.(1970) *Nature (Lond.)*, *227*, 680
8) Lasek R.J. & Hoffman P.N.(1976) in *Cell Motility*, 1021
9) Mori H. et al.(1979) *J.Cell Biol.*, *82*, 174
10) O'Farrell P.H.(1975) *J.Biol.Chem.*, *250*, 4007
11) Papasozomenos S.Ch. et al.(1981) *J.Ce.. Biol.*, *91*, 866
12) Shelanski et al.(1973) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, *70*, 765
13) Tashiro T. & Komiya Y.(1983) *Biomed.Res.*, *4*, 443
14) Tashiro T. et al.(1984) *J.Neurochem.*, *43*, in press
15) Yokoyama K. et al.(1980) *Biomed.Res.*, *1*, 537

80 小脳発育障害で著増するラット小脳50Kタンパク（GR－50）とGFAPとの関連について

青野幸子・佐藤　浩・仙波禮治・柏俣重夫
（愛知県コロニー・周生期）
L.F. Eng
（スタンフォード大・医・病理）

〔要　約〕

分子量 50Kのタンパク（GR-50）は、高ビリルビン血症を示す Gunn ラット ホモ接合体（jj）小脳で著増するタンパクである。分子量≒二次元電気泳動図から、GR-50はグリア細胞に存在する glial fibrillary acidic protein (GFAP) と同一のタンパクである可能性が示唆された。改良した immunoblotting法および免疫学的手法を用いて検討したところ、二次元電気泳動された小脳タンパクのなかで GR-50は抗 GFAP 抗血清で染色される唯一のタンパクであることが証明された。抗 GFAP 抗血清で小脳組織を染色したところ、低形成となった jj 小脳では垂小葉（小葉 IX）を境に明らかな染色性の違いがみられ、組織学的に障害の高度な小葉 I~IXbでは対照のヘテロ接合体（j+）に比べて反応性の増大が観察された。また Bergmann グリアの線維のみならずその細胞体も強く染色された。障害の少ない小葉 IXb~X では両者の間に違いはみられなかった。グリア細胞は cAMP 存在下で分化し GFAP の増加を示すことが報告されているが、16日齢 jj小脳では j+に比べてタンパク量あたりの cAMP 量は増加し、cGMP量は逆に減少していることがわかった。最後に、小脳異常ミュータント staggererマウス小脳で増加していた分子量 47Kのタンパクも抗 GFAP 抗血清で反応した。

Key words： Gunn rat, Glial fibrillary acidic protein (GFAP), Cerebellar protein

遺伝的に高ビリルビン血症を示す Gunn ラット ホモ接合体（jj）では、ビリルビンが原因で小脳低形成が誘発される。[6,11,12,14,18] 低形成の生じた小脳では、SDS 電気泳動上分子量 250Kのタンパク（GR-250）の減減および分子量 50Kのタンパク（GR-50）の著増がみられる。[1,5] GR-250は、小脳プルキニエ細胞に特徴的とされる P_{400} タンパク[8]と同一の Con A 結合タンパクであることが明らかとなっている[1]が、GR-50 は分子量[5]や二次元電気泳動図[1]より、グリア細胞に存在する glial fibrillary acidic protein (GFAP)[3,7] であることが示唆された。今回、改良 immunoblotting 法および免疫組織化学的手法を用いて GR-50 と GFAP との同一性について検討を行なった。

小脳異常ミュータントの一つである staggererマウスはやはり小脳低形成をおこし[17]その小脳では GR-50に比べてやや分子量の小さいタンパク（47K; SG-47）が増加していた[1]が、このタンパクと GFAP との異同についても検討を行なった。

培養系で、グリア細胞の分化が dibutyryl-cAMPによって促進され、グリアフィラメントおよび GFAP の増加がおきることが報告されている[16]ので、GFAPと同一のタンパクである可能性の強い GR-50が増加している jj 小脳での cAMP 量を測定するとともに、小脳に高濃度に存在する[21] cGMP 量についてもあわせ検討を行なった。

〔実験材料および方法〕

動物：immunoblotting 法による GR-50, SG-47 の同定のためには、おのおの 30 日齢の Slc:SD 系ラット，Jcl:ICR 系マウスを用いた。免疫組織化学的分析には、8, 15,

本研究の一部は、昭和 59 年度文部省科学研究費（No. 58480150）および厚生省神経疾患研究委託費（No. 83-11）の援助を受けた。

20日齢および成熟 SD系 Gunn ラット[15](SDGR)を用いた。cAMP量，cGMP量は16日齢の SDGR を用いて測定した。Immunoblotting：採取した小脳を9倍量の 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2)中でホモゲナイズし，105,000×gで 60分遠心分離し，その沈渣を SDS で可溶化し (最終濃度 1%) 二次元電気泳動用試料とした。二次元電気泳動は既報の方法[1]．blotting は Towbin ら[24]の方法に従って行なった。nitrocellulose 膜上に泳動されたタンパクを 2,4-dinitrofluorobenzene を用いて修飾した[25]後，GFAP，DNP に対する抗血清を用いて二重染色を行なった。免疫組織化学：Schmechel ら[13]の方法によって固定し，polyethylene glycol に包埋[9]した小脳を 3 μm の厚さに切り，抗 GFAP 抗血清を用いて PAP法[22]により染色した。cAMP，cGMP量の測定：液体窒素で凍結したラットより採取した小脳から cAMP，cGMP を過塩素酸で抽出し，Steinner ら[19,20]によって報告されている radioimmunoassay法に従い，cAMP，cGMP-assay kit (Yamasa)を用いて測定した。

〔結果〕

Immunoblotting：GFAPに対する抗血清では，ラット，マウスともに一つのタンパクスポットのみが反応した (Fig. 1A, 2A)。対照の非免疫ウサギの血清では反応するスポットはみられなかった (Fig. 1B, 2B)。GFAP抗原以外のタンパクを検出するために，DNP に対する抗血清で二重染色したところ，対照 (Fig. 1D, 2D) に比べて濃く染色されたスポットがみられた (Fig. 1C, 2C)。このスポットの位置はそれぞれラットでは GR-50[1]，マウスでは SG-47[1]の二次元電気泳動図中の位置と一致していた。免疫組織化学的分析：対照群である SDGR ヘテロ接合体 (J+)の小脳は整然とした層構造をもつのに対し，15日齢以後の jj 小脳では分子層が薄く，プルキニエ細胞および内顆粒細胞の消失が多くみられた。GFAPに対する抗血清を用いて染色したところ J+ では白質および内顆粒細胞層中に GFAP 抗原が検出され，Bergmann グリアではその突起だけが染色された。15日齢以後の jj 小脳では，重小葉 (小葉 IX)を境に染色性が異なった。すなわち小葉 I~IXb は組織学的にも障害の高度な部分である[12,23]が，抗血清による反応性も著しく高く，Bergmann グリアでは太く短くなった線維のみならずその細胞体も強く染色された。Mikoshiba ら[10]も同様の所見を報告している。一方，小葉 IXb~X は障害も少なく，抗血清による染色性は対照と略同程度であった。8日齢の小脳では jj, J+ 間で著しい差はみられなかった。cAMP，cGMP量：16日齢の jj 小脳では対照の J+ に比べ，cAMP は約 37% の増加，cGMP は約 40% の減少がみられた (Table 1)。

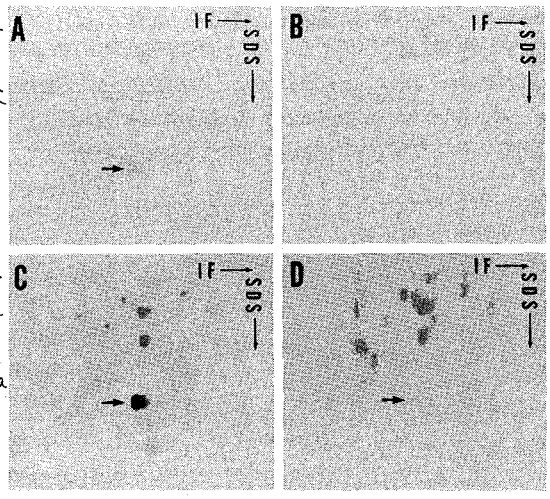


Fig. 1. Electroblots of 30-day-old rat cerebellar proteins from two-dimensional gels. Sample load was about 60 μg (60 μl) per gel and the concentration of polyacrylamide was 10 %. Each nitrocellulose membrane was immunostained with following sera with dilutions in parentheses. A, antiserum to GFAP (1:4000); B, rabbit serum (1:4000); C, antisera to GFAP (1:4000) and DNP (1:250); D, rabbit serum (1:4000) and antiserum to DNP (1:250).

〔考察〕

GFAPに対する抗血清に反応したタンパクスポットの二次元電気泳動図上での位置は、ラット (Fig. 1C)では GR-50[1]、マウス (Fig. 2C)では SG-47[1]の位置と一致しており、このことにより GR-50 および SG-47 は GFAP と同じタンパクである可能性が強く示唆された。また GR-50 は jj 小脳で著しく増加するタンパクである[1,5]が、GFAPに対する抗血清を用いて染色した jj 小脳ではその反応性が j+ に比べてより強くみられたという事実は、この2つのタンパクが同一のタンパクであるという考えを更に支持するものである。

ビリルビンは細胞毒性が強く[4]、その侵入により障害をうけた jj 小脳ではプルキニエ細胞の変性がみられる[4]。cGMP は小脳ではプルキニエ細胞の機能と密接な関連のあることが報告されている[2]が、本実験でも対照に比べ jj 小脳で cGMP が有意に減少しており (Table 1)、GR-260 (プルキニエ細胞に特徴的とされている P_{400}[9]と同一のタンパク) の減少[1,5]と共にプルキニエ細胞の障害を示す生化学的所見といえよう。一方、cAMP は jj 小脳で逆に増加するが、このことは GR-50 (GFAP)の増量と合せ考えると、dibutyryl-cAMP存在下でグリア細胞が分化し GFAP の増加がみられるという報告[3]とよく一致するものである。高濃度にビリルビンが存在する小脳[12]で神経細胞は障害をうけ、グリア細胞は障害をうけにくいという事実は、二種類の細胞のビリルビンに対する感受性の違いを示唆しており、解明すべき今後の重要な課題と考えられる。

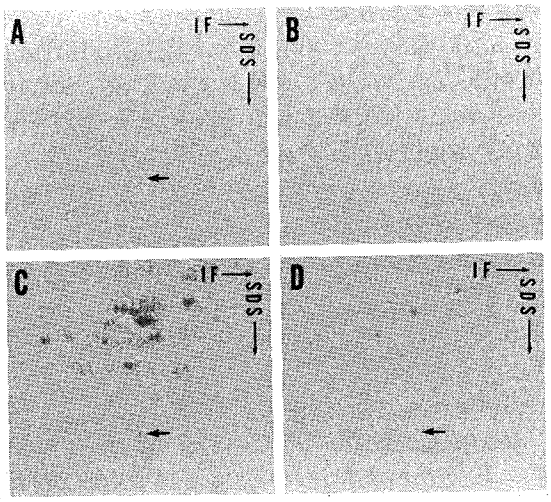


Fig. 2. Electroblots of 30-day-old mouse cerebellar proteins from two-dimensional gels. Sample load was about 60 µg (60 µl) per gel and the concentration of polyacrylamide was 10 %. Each nitrocellulose membrane was immunostained with following sera with dilutions in parentheses. A, antiserum to GFAP (1:8000); B, rabbit serum (1:8000); C, antisera to GFAP (1:8000) and DNP (1:250); D, rabbit serum (1:8000) and antiserum to DNP (1:250).

Table 1. Contents of cAMP and cGMP in the cerebella of 16-day-old homozygous (jj) and heterozygous (j+) Gunn rats

	cAMP (p moles/mg protein)	cGMP (p moles/mg protein)
j+	8.7 ± 1.5 (8)	1.0 ± 0.2 (6)
jj	12.0 ± 1.2** (6)	0.6 ± 0.2* (5)

Mean ± S.D. with the number of animals in parentheses.
* P<0.025; ** P<0.001.

〔謝辞〕

cAMP・cGMP量の測定に際して愛知県コロニー・形態学部の佐野護博士にご指導をいただき深謝致します。

(1) Aono, S., Sato, H., Semba, R., and Kashiwamata, S. (1983) Neurochem. Res. 8, 743-756. (2) Biggio, G., Brodie, B. B., Costa, E., and Guidotti, A. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3592-3596. (3) Eng., L. F., Vanderhaeghen J. J., Bignami, A., and Gerstl, B. (1971) Brain Res. 28, 351-354. (4) Karp, W. B. (1979) Pediatrics 64, 361-368. (5) Kashiwamata, S., Aono, S., and Semba, R. K. (1980) Experientia 36, 1143-1144. (6) Keino, H. (1982) Cell Tissue Res. 223, 593-601. (7) Ludwin, S. K., Kosek, J. C., and Eng. L. F. (1976) J. Comp. Neurol. 165, 197-208. (8) Mallet, J., Huchet, M., Pougeois, R., and Changeux, J.-P. (1976) Brain Res. 103, 291-312. (9) Mazurkiewicz, J. E. and Nakane, P. K. (1972) J. Histochem. Cytochem. 20, 969-974. (10) Mikoshiba, K., Kohsaka, S., Takamatsu, K., and Tsukada, Y. (1980) J. Neurochem. 35, 1309-1318. (11) Sato, H., Semba, R. K., and Kashiwamata, S. (1977) Biol. Neonate 32, 158-165. (12) Sawasaki, Y., Yamada, N., and Nakajima, H. (1976) J. Neurochem. 27, 577-583. (13) Schmechel, D. E., Brightman, M. W., and Marangos, P. J. (1980) Brain Res. 190, 195-214. (14) Schutta, H. S. and Johnson, L. (1967) J. Neuropath. Exp. Neurol. 26, 377-396. (15) Semba, R. and Kato, K. (1982) J. Neurochem. 39, 360-365. (16) Sensenbrenner, M., Devilliers, G., Bock, E., and Porte, A. (1980) Differentiation 17, 51-61. (17) Sidman, R. L., Lane, P. W., and Dickie, M. M. (1962) Science 137, 610-612. (18) Sisson, T. R. C., Goldberg, S., and Slaven, B. (1974) Pediat. Res. 8, 647-651. (19) Steiner, A. L., Parker, C., and Kipnis, D. M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1106-1113. (20) Steiner, A. L., Parker, C., and Kipnis, D. M., (1972) J. Biol. Chem. 247, 1114-1120. (21) Steiner, A. L., Ferrendelli, J. A., and Kipnis, D. M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1121-1124. (22) Sternberger, L. A. (1979) Immunohistochemistry, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York. (23) Takagishi, Y. and Yamamura, H. (1978) Acta Anat. Nippon. 53, 131 (Abst.). (24) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354. (25) Wojtkowiak, Z., Briggs, R. C., and Hnilica, L. S. (1983) Anal. Biochem. 129, 486-489.

81 糖蛋白合成阻害剤投与によるラット小脳ミエリン異常について

高坂新一・三田浩一・須田治彦・塚田裕三
（慶大・医・生理）

〔要　約〕

糖蛋白合成阻害剤であるTunicamycin(TM)を出生直後のラット脳内に投与し、小脳内ミエリン形成について検討した。TMを出生直後1回投与した群では、小脳内CNPase活性は2週目で低値を示し、その後3週、4週では対照群との間に変化はみられなかった。一方、TMを出生直後から週2回づつ合計6回投与したTM-MI群では、3週間目に於いてもCNPase活性は有意に低下していた。このTM-MI群3週令の小脳の細胞下分画を行い、各分画のCNPase活性を測定した。TM-MI群では対照群に比し、P_1及びP_2A分画の活性が低下しており、逆にP_2B及びP_3分画で上昇していた。P_2A分画の蛋白パターンをポリアクリルアミド電気泳動により調べてみると、TM-MI群ではWolfgram蛋白が対照群に比し相対的に減少しており、PLP蛋白が相対的に増加していることが示された。次にTM-MI群3週令の小脳切片を用い、CNPase及びMAGの免疫組織を行った。CNPase抗血清では、対照群,TM-MI群いずれの白質も強く染色されたが、顆粒細胞層内の染色性がTM-MI群で著明に低下していた。一方MAG抗血清ではTM-MI群の染色性は対照群に比し全般的にかなり低下していた。これらのことから糖蛋白合成阻害によりミエリン形成は障害を受け、ミエリンの質的変化も生じていることが示唆された。

Key words： Tunicamycin, Glycoprotein, CNPase

末梢神経系のミエリンには、P_0、23K、P_2, PAS-Ⅱ等の糖蛋白が豊富に存在し[12]、又、中枢神経系のミエリンに於いてもMyelin Associated Glycoprotein (MAG)の存在[8]が知られているが、ミエリン形成に於けるこれらの糖蛋白の役割については今だ不明の点が多い。我々は昨年度の本学会に於いて、新生児ラット脳内に糖蛋白合成阻害剤であるTMを投与した場合、その後の小脳の発育が著しく障害されることを報告した[2][4]。そこで、今回は、TM投与ラットの小脳内ミエリン形成について更に検討を加えた。

〈実験方法〉

実験動物：TM1回投与群にはTM(0.2μg)を前報の如く[2][4]脳内投与した。又、TM頻回投与群(TM-MI群)では出生直後TM(0.2μg)を投与した後、週2回のペースでTM(10μg/kg)を5回投与した。対照群には0.001N NaOH, 0.9% NaClを同量投与した。

生化学的実験：小脳の細胞下分画はGray & Whittakerの方法[1]をmodifyして行い、核分画(P_1)、ミエリン分画(P_2A)、シナプトソーム分画(P_2B)、ミトコンドリア分画(P_2C)及び、ミクロソーム分画(P_3)を得た。CNPase活性は、Tsukadaらの方法[11]で測定した。但し、細胞下分画でのCNPase活性の測定では、Bufferは100mM Tris-MES pH6.2、基質は20mM 2',3'-cAMPを用い、37°C、5分反応を行った[10]。ミエリン分画の電気泳動はLaemmliの方法[5]に準じた。蛋白定量はLowryの方法[6]に従った。

免疫組織化学：ラットを4% Paraformaldehyde, 50mM PBSにて灌流固定した後、小脳を剔出し、同固定液で一晩固定した。6μmパラフィン切片を作製し、Sternbergerらの方法[9]に準じて、CNPase及びMAGの免疫組織化学的検索を行った。抗ウシCNPase血清の作製は以前報告した[3]。抗ラットMAG血清は糸山泰人博士(九大神経内科)より供与されたものを

用いた。又、抗ウサギIgG、ウサギPAPはMiles社製のものを用いた。

〈結果及び考察〉

糖蛋白合成阻害剤であるTMを出生直後に1回投与した群で経日的に小脳のCNPase活性を測定した。表1.に示した如く、2週間目の時点でTM投与群の活性が有意に低下していた。しかしながら、このCNPase活性の減少は3週間目、4週間目の時点では対照群との間に有意差はみられなくなった。長池ら[7]は、小脳の培養系で^{14}C-leucineの蛋白への取込みに対する^{3}H-fucoseの取込みの比を検討した結果、in vivoの5~7日に相当する時期にピークを持ち、これはミエリン形成開始時期に一致しており、ミエリン形成に於ける糖蛋白合成の重要性を示唆した。このことを考え併せると、出生直後のTM1回投与が生後5~7日目にピークを持つ糖蛋白合成を阻害しているとは考え難く、むしろ、出生直後のオリゴデンドログリアの分化、成熟を抑制した結果2週間目までのミエリン形成が障害あるいは遅延したものと考えられる。そこでミエリン形成が盛んな時期に糖蛋白合成を抑制する目的で、出生直後から週2回づつ合計6回のTMを投与した群(TM-MI群)を作製し、3週間目のCNPase活性を測定してみると、表1.の如くTM-MI群で有意な減少がみられた。このことから、糖蛋白合成はミエリンの形成過程に重要な役割を担っているものと考えられた。

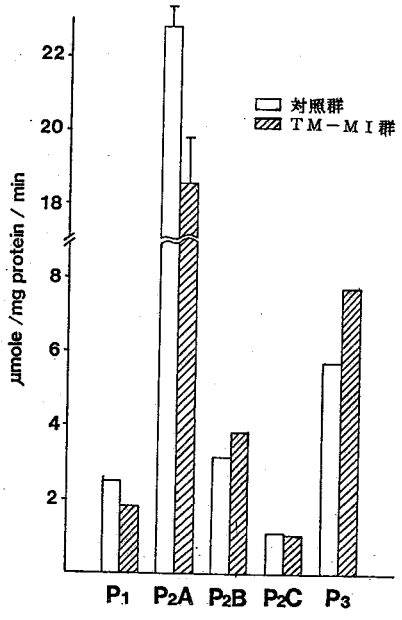
[表1.] ラット小脳CNPase活性 (μmole/mg protein/min)

Single injection	Control	TM
1 week	0.19±0.08	0.20±0.09
2 weeks	0.96±0.06	*0.74±0.04
3 weeks	2.38±0.08	2.25±0.07
4 weeks	2.44±0.07	2.56±0.07
Multiple injection	**Control**	**TM**
3 weeks	2.34±0.05	*1.97±0.09

Mean±S.E.M., * $P < 0.01$

次にTM-MI群の3週間目の小脳の細胞下分画を行い、各分画のCNPase活性を測定した。図1.に示した如く、ミエリン分画(P_2A)のCNPase活性は有意に低下していた。又、P_1分画のCNPase活性も約25%減少していた。一方P_2B及びP_3分画の活性は逆にTM-MI群で21%及び33%高い値を示した。これらのことはP_2Aに回収されてくるミエリンに関しても蛋白、脂質等に質的な変化のあることを考えさせる。又、本来P_2Aに回収されるべきミエリンが質的変化あるいは構造上の変化によりP_2BあるいはP_3分画に回収されたことを示唆しているものと考えられる。

[図1.] 小脳細胞下各分画のCNPase活性.



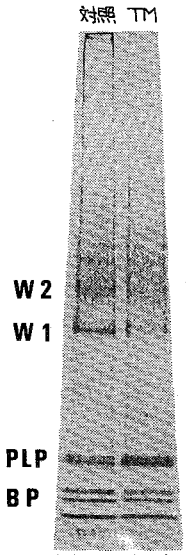
そこでP_2A分画の電気泳動を行い、その蛋白パターンについて解析を行った。TM-MI群のP_2Aの蛋白パターンをみてみると、図2.に示した如くWolfgram蛋白に相当するバンドが著しく減少して

おり、逆にPLP蛋白が相対的に増加していることが明らかとなった。このことから、TM処置によりミエリン蛋白の組成にもなんらかの変化の生じていることが示唆された。

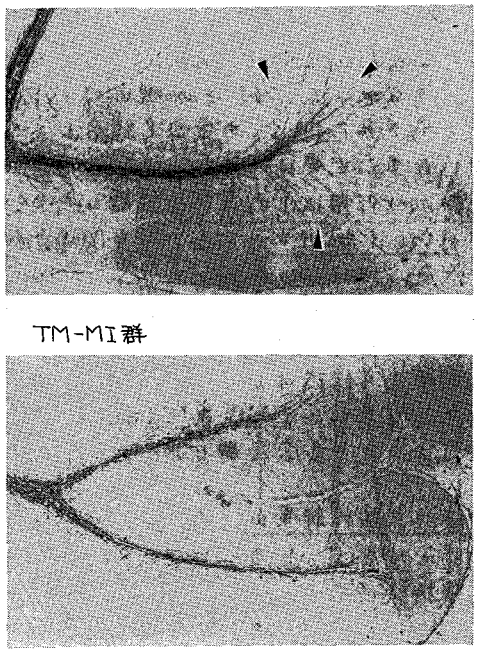
次にTM-MI群3週間目の小脳パラフィン切片を用いてCNPaseおよびMAGの免疫組織化学的検索を行った。図3.に示した如く対照群ではCNPase抗血清により白質部分が強く染色され、又顆粒細胞層内にもCNPase陽性線維が放射状に多数認められた(矢印)。一方、TM-MI群では、白質部分はやはり濃染されていたが、顆粒細胞層内の放射状の染色性は著しく低下していた。このことから、TM処置により小脳内顆粒細胞層のミエリン形成が特に障害を受けているものと考えられた。最後に、TM処置をした場合、ミエリン糖蛋白であるMAGはいかなる変化を示しているかを検討するため、MAG染色を行った。対照群ではMAGにより主に白質部分が強く染色されてきたが、TM-MI群では白質部分の染色性が全般的に著しく低下していた(写真当日供覧)。このことから、CNPaseに陽性のミエリンでもMAGに関してはかなり減少していることが示唆された。

以下のことから、糖蛋白合成を阻害した場合、ミエリン形成がかなり障害され、又、一見正常にみえるミエリンにも、蛋白、脂質等の質的変化の生じていることが考えられた。

[図2.] 小脳ミエリン分画の電気泳動パターン
(CBB染色)
(7.5~20% SDS アクリルアミドゲル)



[図3.] CNPase抗血清による免疫組織化学



〈謝　辞〉

抗ラットMAG血清を提供して頂いた九州大学医学部神経内科、糸山泰人博士、又、有意義な御討論を賜わりました新潟大学脳研神経内科、佐藤修三博士に深謝致します。形態学的実験に御協力頂いた陸田美加子女史に感謝致します。

〈文　献〉

(1) Gray E.G. and Whittaker V.P. (1962) J. Anat., 96, 79-88 (2) 高坂新一ら (1983) 神経化学, 22, 288-290 (3) Kohsaka S. et al. (1983) J. Neurochem. 41, 434-439 (4) Kohsaka S. et al. (1984) J. Neurochem. 43, in press. (5) Laemmli U.K. (1970) Nature 227, 680-685 (6) Lowry O.H. et al. (1951) J. biol. Chem. 193, 265-275 (7) 長池一博、堀田祐三 (1982) 神経進歩 26, 1074-1084 (8) Quarles R.H. et al. (1973) J. Neurochem. 21, 1177-1191 (9) Sternberger L.A. et al. (1970) J. Histochem. Cytochem. 18, 315-333 (10) Suda H. et al. (1984) J. Neuropathol. 2, in press. (11) Tsukada Y. et al. (1980) J. Neurochem. 34, 1019-1022 (12) 植村慶一 (1982) 神経進歩 26, 288-301

82 神経終末ドーパミン結合性蛋白質の研究［続報］

都築紀宏
（名市大・医・生化）

〔要　約〕

ラット脳神経終末可溶性分画に含まれるドーパミン（DA）結合性蛋白について研究した（関連研究 ref. 1-3）。

(a) この蛋白のDA結合に対するKmは9-10 μMであった。(b) 中野らの方法(4)を用いて，DAを基質にしてmonoamine oxidase (MAO)の活性を測定した。DA結合蛋白を加えるとMAO活性は見かけ上抑制され，Ca^{2+}によってこの抑制作用は弱められた。これらの結果より，DAはcytosol poolにおいてもMAOの作用から保護されていると思われる。

(c) TyramineとDAはこの蛋白に対して拮抗結合を示した。(d) Reserpineはこの DA結合に対して有意な作用を及ぼさなかった。しかし、ミトコンドリアのCa^{2+}取込みを著しく阻害したので，reserpineには細胞内Ca^{2+}レベルを増大させる可能性が考えられる。

(e) これらの実験に基づいてcytosol poolからのDA放出機構を検討した。

Key words：　Dopamine binding proteins; Monoamine oxidase (MAO); Releasing mechanism of neurotransmitter.

神経伝達物質の放出機構には大きく分けて①貯蔵顆粒（Synaptic vesicles）による開口放出説と，②Cytosol poolから直接放出されるという2説がある。放出には神経終末へのCa^{2+}の流入が必須であるがCa^{2+}の作用機序は不明である。私は現在までにa) 神経終末cytosolで合成されたドーパミン（DA）のSynaptic Vesiclesへの移行はそれ程速やかでないこと，b) その理由はcytosolにはDA結合性酸性糖蛋白が存在し，新しく合成されたDAはこの蛋白と結合した形でcytosolに存在する為であること，c) Ca^{2+}が存在すると蛋白に結合していたDAが遊離する事等を報告し，これらの結果よりCa^{2+}のtrigger作用はこの蛋白に結合したDAを遊離DAに変える点にあり，遊離されたDAがcytosol poolから放出されるという仮説を提唱して来た(1-3)。一般に顆粒内カテコラミンはmonoamine oxidase (MAO)から保護されているがcytosolのDAが常時MAOの作用に曝されているか否かはこの仮説の性質上明らかにする必要がある。今回の実験はDAを基質にしてMAO活性を測定したもので，上述の酸性糖蛋白にはDAをMAOの作用から保護する能力があること，逆にCa^{2+}にはこの保護作用を損なう効果がある事が知られた。この現象は上記b, cの結果で説明され得る。Tyramine, reserpineの作用についても言及してある。

材料と方法

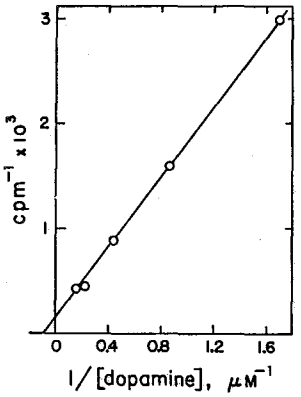
神経終末酸性糖蛋白。ラット脳神経終末分画(P_2)を低張処理し膜成分，synaptic vesicleを遠心除去後，上清をDEAE-Sephadex A-50に吸着させ，吸着成分を0.4M NaClで溶出し透析後使用した。MAO標品と活性測定。上記P_2分画低張処理後の膜分画を酵素標品（2mg, ppt）とした。活性はDAを基質にして中野・永津・河合の方法(4)に基づいて測

定した。反応液：80 mM Tris-maleate, pH 7.3, 3.0 ml ; 10 mM G-SH (グルタチオン) ; 5 units G-SH peroxidase ; 1 mM DA, and P_2 膜分画。32°C, 30分反応 (shaking in air) 後加熱。32°C に冷却後, 0.8 unit G-S-S-G reductase ; 0.2 mM $NADPH_2$ を加え5分間反応。遠心後 340 nm にて, 残存 $NADPH_2$ 量を測定 (原法は蛍光測定)。

^{3}H-DA 結合量。酸性蛋白と ^{3}H-DA を混合後 Sephadex G-25 で, 結合・非結合DAを分離し蛋白結合 ^{3}H-DA を液シン測定した。$^{45}Ca^{2+}$ の取込み。ミクロソーム分画, ミトコンドリア分画と $^{45}Ca^{2+}$ を ATP 存在下で反応後 (pH 7.0, 29°) 遠心分離し沈渣に含まれる $^{45}Ca^{2+}$ 量を液シン測定した。ミトコンドリア分画は P_2 分画を 0.8-1.2 M 蔗糖密度勾配遠心後, 1.2 M 層に回収した。酵素。G-S-S-G reductase (from yeast), オリエンタル酵母 (株); G-SH peroxidase (from bovine red cell), TOYOBO Enzymes (株) よりそれぞれ購入した。

結果

酸性蛋白と ^{3}H-DA 結合の Km。^{3}H-DA の濃度を 0.59 μM ~6.7 μM まで変えて蛋白への結合量を調べると, 結合は飽和性を示し, その Km は図1に示した如く pH 7.3, 25° にて 9.1 ~ 10.0 μM であった。



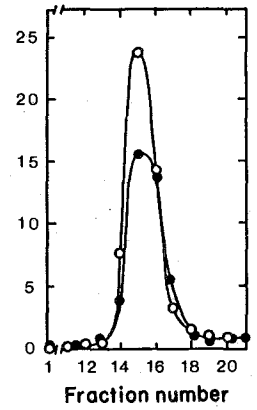
酸性蛋白と ^{3}H-DA 結合の MAO 活性への影響。上述の様に新しく合成された DA は酸性蛋白と結合した状態で細胞質プール に存在すると思われる。この蛋白に結合する事によって DA が MAO の作用から保護されるか否かは興味がある。表 I には DA を基質にした場合の MAO 活性とそれへの酸性蛋白の影響が示してある。MAO 活性は蛋白添加によって見かけ上 40-45% 抑えられた。Ca^{2+} (5 mM) にはこの蛋白の DA 保護作用を損なう効果, 即ち MAO 活性の回復が見られた。Ca^{2+} conc. については ref(1) Fig 1 参照。

Table I. Effects of DA-binding protein(s) and Ca^{2+} on MAO

Addition	(%) activity
Control	100
Proteins (+) Calcium (-)	52-58
Proteins (+) Calcium (+)	73-76

酸性蛋白と ^{3}H-DA 結合への tyramine の影響。Tyramine amphetamine などの間接的 symphathomimetic amines による DA の放出には, 細胞外液には Ca^{2+} を必要としないし (貯蔵 DA ではなく) 新たに合成された DA が優先的に放出される (5,6)。Cytosol pool で酸性蛋白と結合している DA が tyramine と置換の結果遊離型 DA に成るならば上述の tyramine の DA 遊離作用は説明され得る。図2には蛋白に結合した ^{3}H-DA の tyramine による遊離が示してある (-o- → -●-)。約 1000 倍量の tyramine によって DA と蛋白との結合は 35-40% 抑えられ, DA のこの蛋白への結合は tyramine と拮抗した。

図2 Tyram. による DA の遊離。DA, 1.18 μM Tyram., 1.2 mM, pH 7.3, 0°C。G-25 ゲルろ過パターン -●- tyram. (+)



Ca^{2+} 取込みに対する tyramine の影響。Tyramine による DA 放出には前述の様に外液に Ca^{2+} を必要としないが終末内オルガネラ内に貯えられている Ca^{2+} が利用される可能性がある。Ca^{2+} レベルを調節するオル

かネラにはミクロソーム，ミトコンドリアがある。図3，4には脳ミクロソーム分画，ミトコンドリア分画による Ca^{2+} 取込みに対するtyramineの影響が示してある。どの場合もtyramineは殆ど作用を及ぼさないと思われる。Reserpineの影響。図5に示した様にミトコンドリアの Ca^{2+} 取込みに対してreserpineは著しい阻害を示した。この結果よりreserpine投与時には神経終末の Ca^{2+} レベルが増大する可能性が考えられる。

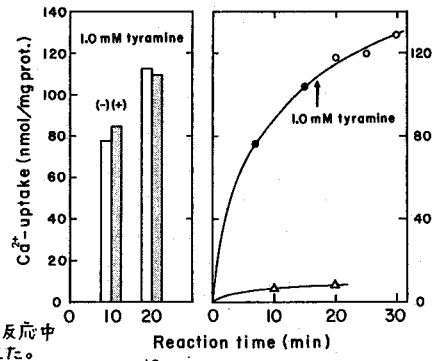
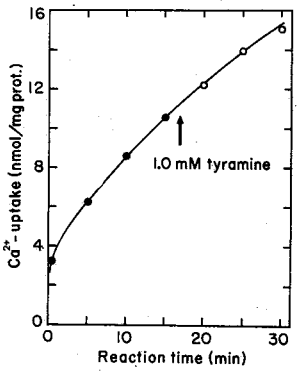
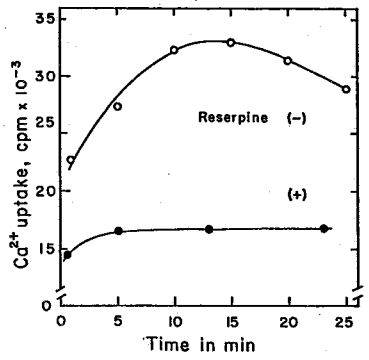


図3，ミクロソームの Ca^{2+} 取込：-o-，反応中にtyram.を加えた。
図4（右図），ミトコンドリアの Ca^{2+} 取込：-o-，tyram.(+)。



考察

神経伝達物質の放出機構を解明する上で伝達物質の細胞内プールを理解することは殊に重要である。DAについても少くとも2種のプールがある。1つは大きなプールで ^{3}H-DAで容易にラベルされず，顆粒内プールと考えられる。他方は小さく ^{3}H-DAでラベルされ易く，刺激に対して枯渇され易い。もし後者がcytosol poolと仮定するならばMAOに対してどの様に保護されているであろう。DA結合蛋白のDAに対するKmは10μMであった。MAOのカテコラミンに対するKmは一般に大きく100-200μMである(7)。又，DAはチロシン水酸化酵素に対してproduct inhibitionを示すが，そのKiは10μMの範囲(8)であるので終末cytosolでのDAレベルが100-200μMまで増大する可能性は少ない。Synaptic vesiclesとDA間のKmは～3μM以下が多い。これらの値から判断するとcytosol中のDAも，上述の蛋白と結合することによってMAOから保護されていると考えても良いであろう。DA遊離と Ca^{2+} 濃度関係は既報(3)。Reserpineにはsympathomimeticな作用は殆ど見られず，DAのMAO代謝産物が増加する。Reserpineがどの様な機構で顆粒内に貯えられているカテコラミンまで枯渇させるかは明らかでないが，上述の如くもし Ca^{2+} レベルの増大をもたらすならば顆粒からcytosolへのカテコラミンの遊離が見られるかも知れない。



1) 都築紀宏 (1982) 神経化学 21, 159-161. 2) Tsudzuki, T. (1981) J. Biochem. 90, 1341-1349. 3) Tsudzuki, T. (1983) J. Biochem. 93, 599-606. 4) 中野完，永津俊治，河合聡 (1982) 生化学 54, p. 537 (1B-a16). 5) Besson, M.J., Cheramy, A., Feltz, P., & Glowinski. J. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. 62, 741-748. 6) Kamal, L.A., Arbilla, S., & Langer, S.Z. (1981) J. Pharmacol. Exp. Ther. 116, 592-598. 7) Szutowicz, A., Kobes, R.D., & Orsulak, P.J. (1984) Anal. Biochem. 138, 86-94. 8) Mann, S.P. & Gordon, J.I. (1979) J. Neurochem. 33, 133-138.

83 培養毛様体神経節ニューロンに働く神経突起伸展因子 — 部分精製と活性蛋白質の同定 —

林 要喜知・三木直正
（金沢大・がん研・薬理）

〔要 約〕

培養毛様体神経節（CG）ニューロンに働き、神経突起伸展を著明に誘導する因子（神経突起伸展因子、NOF)をニワトリ成体砂のう平滑筋組織より部分精製し、活性蛋白質を同定した。筋抽出液に硫安塩析（0-35%)、DEAE celluloseイオン交換、Sepharose CL－6Bゲルロ過、Concanavalin A Sepharose、及びDEAE－Toyopearlイオン交換などの分画操作を施すことにより、NOF の比活性が約2,100 倍上昇した。最終NOF 標品では、 1 ng protein/well(80 μl)でCGニューロンより著しい突起伸展を誘導した。ポリアクリルアミド(1.2%)を含むアガロース(0.5%)電気泳動法では、幅の広い一本の蛋白バンドが認られ、そこにNOF 活性が局在していた。SDS-ポリアクリルアミド(3－15% 濃度勾配) 電気泳動法(非還元条件下) では、分子量700 kdおよび93 kd の蛋白質バンドとして検出された。ニワトリ砂さのうNOF は、分子量、サブユニット構造、突起伸展活性強度、あるいは免疫学的性質などから判断して、ニワトリファイブロネクチンやマウスラミニンとは明確に異ることが明らかとなった。以上、NOF は、神経系をとりまく微小環境下でニューロンの分化、再生に関与すると推察される。

Key words : Neurite Outgrowth Factor, Ciliary Ganglionic Neurons, Gizzard Extract

末梢神経細胞の発生・分化あるいは再生過程において，神経突起の伸展は，神経錐が接触し得る細胞表面あるいは細胞間隙マトリクス上で起こることが知られている。しかし，突起伸展を誘導する因子それ自体については，不明な点が多く残されている。最近，基底膜構成成分であるラミニンあるいはファイブロネクチンなどの高分子糖蛋白質が，in vitroの神経細胞の再生に強い促進効果を有することが報告されており[2)5)]，ニューロンをとりまく微小環境下にも同様な蛋白質の存在が示唆されている。

私達は，先に，培養毛様体神経節(CG)細胞の神経突起伸展を著明に誘導する糖蛋白質(神経突起伸展因子，NOF)がニワトリ砂のう平滑筋に存在することを見い出した[4)]。今回，砂のう筋よりNOFの単離を試み，活性蛋白質を同定したので，その精製結果，およびラミニンやファイブロネクチンとの比較について報告する。

〔実験方法〕

CGニューロンの培養：8日齢ニワトリ胚よりトリプシン処理(0.05%, 37°C, 20 min)にて調整したCGニューロンを，ポリオルニチン塗布皿(マルチウエル, 96穴)に加え，37°C, 10% CO_2／Air 下で培養した[3)]。培養液には，DMEM(GIBCO社)，牛胎児血清(10%)および眼球抽出液(10%)からなる混液を等量のPBS(-)で希釈したものを用いた。眼球抽出液の調整は，Adlerらの方法に従った[1)]。

NOF活性の測定：ポリオルニチン塗布皿に，連続的に希釈した砂のう筋抽出液(各精製ステップの標品)を加えて2時間37°Cでプレコートした。水洗後，ニューロンを加えて16時間培養した。NOF活性は，全生存ニューロン数に対する突起伸展ニューロン数の割合を求め，プレコートした蛋白量に対してプロットして求めた。比活性は，最大

突起伸展(90%)の半値を与える蛋白量の逆数で表示した。

砂のう抽出液の調整：成体ニワトリ砂のう筋を5倍量(W/V)の高濃度NaCl溶液(3.4M NaCl + 50mM Tris-HCl, pH 7.5)中で破砕し，-80℃で凍結させた。融解後，遠心沈査(10000 RPM, 30min)を0.5M NaClを含むTris-HCl buffer(50mM)で溶解させた。更に，硫安塩析(0-35%)を施し0.14M NaClを含むTris-HCl buffer(20mM)で透析した。この硫安分画をNDF精製に供した。

〔結果〕

砂のうNDFの精製：砂のう抽出液(硫安分画)をDEAE-cellulose カラムに載せた後に，0.5M NaCl溶液(20mM Tris-HClを含む)で溶出した。その後，限外ロ過(アミコン，XM300フィルター)で濃縮した。この標品をSepharose CL-6Bを用いてゲルロ過を行い(図1)，その活性フラクション(F26-33)をConcanavalin A Sepharose カラムクロマトグラフィーに供した(図2)。0.5M α-Methyl Mannosideおよび0.5M α-Methyl Glucosideからなる溶液により，NDFは溶出された。その後，再度ゲルロ過操作を繰り返し(図3)，その活性分画にDEAE-Toyopearlを用いたイオン交換クロマトグラフィーを施した(図4, 1st)。フラクション93-105を回収し再度同じ操作を繰り返したところ，蛋白ピークと活性ピークが完全に一致した(図4, 2nd)。各精製段階のNDF標品を用いて，CGニューロンの突起伸展を調べた(図5)。表1に精製結果をまとめた。最終NDF標品では，1ng protein/well(80μl)の蛋白質量でCGニューロンより最大突起伸展を誘導した。また，活性NDFの回収率は6%であり，約2,100倍の比活性の上昇を認めた。

Fig. 1

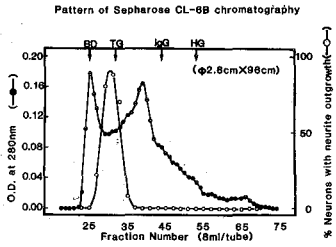


Fig. 2

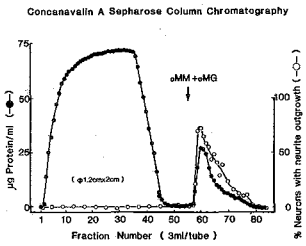


Fig. 3

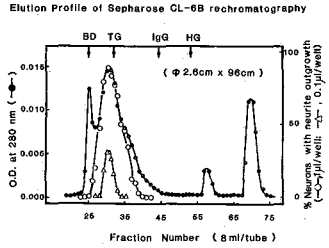
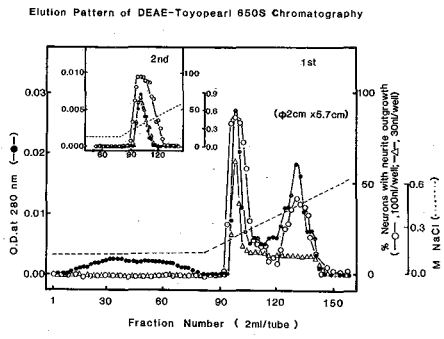
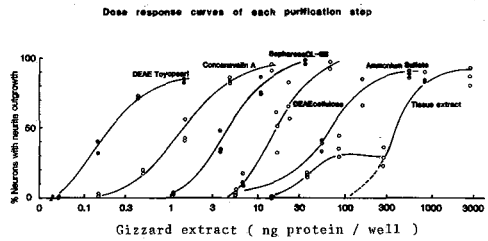


Fig. 4



電気泳動法によるNDF標品の分析：最終NDF標品をポリアクリルアミド(12%)を含むアガロース(0.6%)電気泳動法で分析した(図6A)。図6Bには，泳動後のゲル中に存在するNDF活性を示した。幅広い1本の蛋白質バンドとNDF活性の局在がほぼ完全に対応した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE，非還元条件下)では，分子量約700 kdおよび93 kdの2本のバンドが検出された(図7NR)。この2つの蛋白質は，ゲルロ過やイオン交換クロマトグラフィー，あるいはショ糖やCsClを用いた密度勾配遠心法による分画でも同じ挙動を示した。

Fig. 5



マウスラミニン，ニワトリファイブロネクチ

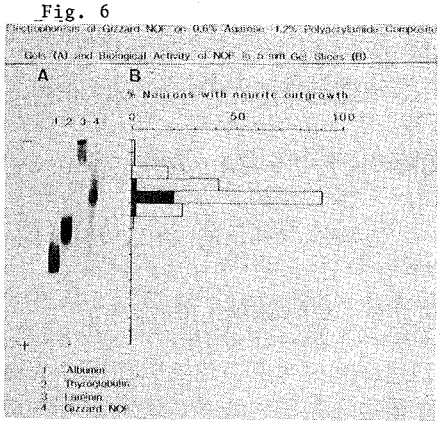
ンとの比較：砂のうNOFは，ゲル口過法では分子量1,100 – 1800 kdと考えられ(図1)，SDS-PAGEでは700 kd(および93 kd)から成った(図7)。還元条件下でのSDS-PAGEでは，700 kdの230 kdへの移行が認められた(図7R)。ラミニンは，ゲル口過では限界排除容積に，ファイブロネクチンは，サイログロブリンより後に溶出された。一方，NOFによるCGニューロンの突起伸展誘導は，ラミニンやファイブロネクチンによる誘導より，それぞれ50および600倍以上良好であった。また，部分精製を施したNOF標品に対する抗血清は，精製したNOF活性を完全に阻害したが，ラミニンやファイブロネクチンの活性には全く抑制作用を示さなかった。

Table 1

Summary of purification of NOF from chicken gizzard

Purification step	Total protein (mg)	Half maximal neurite outgrowth (ng protein/well)	Recovery of activity (%)	Fold purification
Tissue extract	16580	360	100	1
Ammonium sulfate	9330	65	306	5.5
DEAE cellulose	3140	14.5	461	24.8
Sepharose CL-6B	550	4	29	90
Concanavalin A	15	1.35	24	266
DEAE Toyopearl	0.5	0.17	6	2117

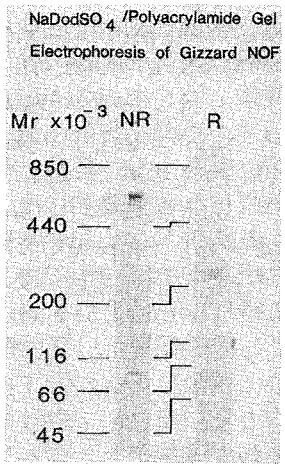
Fig. 6



〔考察〕

ニワトリ砂のう筋より単離したNOFは，非変性条件下での電気泳動法によりほぼ一本の蛋白質として認められ，SDS-PAGEでは二本のバンドから成りたつ。この二つの蛋白質は，同一の挙動をすることより，結合している可能性が示唆される。しかしながら，NOFに対する抗血清の作用，あるいは，アガロース電気泳動から得たNOF活性バンドのSDS-PAGEの結果より，700 kdにNOF活性が存在すると推察された。この点をさらに明らかにするため，現在，700 kd蛋白質に対する抗体作製を進めている。

Fig. 7



砂のうNOFは，サブユニット構造，変性・非変性蛋白質の分子サイズ，突起伸展活性の強さ，および抗原性の差異などの点より，ラミニンやファイブロネクチンとは明確に異なる，全く新しい蛋白質と考えられた。しかし，基本的な物理化学的諸性質における類似点も多く，同じ範疇に属する糖蛋白質と想像される。

〔文献〕

1) Adler,R., Landa,K.B., Manthorpe,M. and Varon,S. (1979) Science 204 1434-1436
2) Evercooren,A.B.-V., Kleinman,H.K., Ohno,S., Marangos,P., Schwartz,J.P. and Dubois-Dalcq,M.E. (1982) J. Neurosci. Res. 8 179-193
3) Hayashi,Y., Higashida,H., Kuo,C.-H. and Miki,N. (1984) J. Neurochem 42 504-512
4) Miki,N., Hayashi,Y. and Higashida,H. (1981) J. Neurochem 37 627-633
5) Rogers,S.L., Letourneau,P.C., Palm,S.L., McCarthy,J. and Furcht,L.T. (1983) Dev. Biol. 98 212-220

84 網膜VISININの局在とmRNAによる生合成

畠中幸子（金沢大・がん研・薬理）
木山博資・遠山正弥（阪大・医・高次研・解剖）
三木直正（金沢大・がん研・薬理）

〔要　約〕

我々はニワトリ網膜の加齢に伴なう蛋白質の量的変化について、特にその可溶性分画に注目し検討したところ、分子量約24,000の蛋白（visinin）が、ふ卵14日目以降その加齢に伴ない著明に増加することを見い出し報告した。今回はこのvisininに対する抗血清を用い、網膜内での局在及びその合成について検討し、次のような結果を得た。

1) visininはニワトリ網膜の主として視細胞の内節に存在する。
2) 他の動物網膜では、視細胞では錐体細胞にのみvisinin様物質が認められ、杆体細胞では認められなかった。
3) 免疫電顕より、visininはニワトリ網膜の錐体細胞の内節に一様に分布していたが、杆体細胞では認められなかった。
4) mRNAを用いて、in vitroでの蛋白合成を行なったところ、visininはニワトリ胚網膜mRNAよりほぼmatureなものとして合成された。

以上のことより、visininは錐体細胞に多量存在することが確認された。

Key words : visinin, cone cell, immunohistochemistry

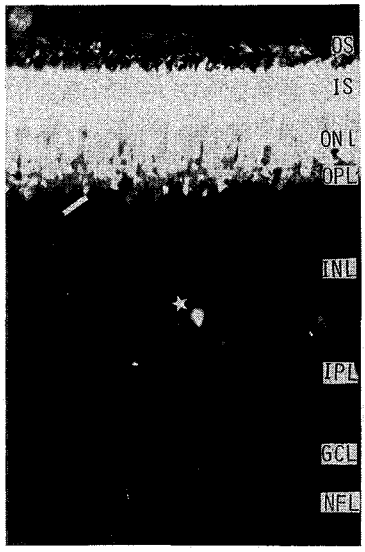
ニワトリ網膜の発達に伴なう蛋白質の量的変化について，特にその可溶性分画に注目し検討を加えたところ，分子量約24,000、等電点約5.5の蛋白（visinin）がふ卵14日目以降その加齢に伴ない著明に増加すること、そして大脳，視蓋，色素上皮及び硝子体ではこのvisininが認められなかったことより、visininは網膜に特異的に存在しその発達に伴ない増加することがわかった[2]。今回は抗visinin血清を用い，網膜内での局在及び、発達に伴なう変化について、またmRNAを用いてのin vitroでの蛋白合成について検討した。

〈方法〉1) visininの精製：生後約3ヵ月のニワトリ（成体）網膜を摘出し、0.32M蔗糖中ホモゲナイズ後、10万×g，90分遠心しその上清を可溶性分画として得た。その後ゲルろ過（Sephadex G-75）及びイオン交換（DEAE-セルロース）クロマトグラフィーより部分精製し、更に電気泳動的に精製した。　2) 抗visinin血清の作製：電気泳動的に精製したvisinin（600μg蛋白/ml）を同量の完全Freundアジュバンドと混合したものを抗原としてウサギで作製した。　3) 免疫組織化学：ⓐ光顕：ニワトリ胚及び生後約1～2週のニワトリをZamboni液[4]で灌流固定後眼球を摘出し、同液で後固定を行ない10～20μmの凍結切片を作製し、Coonsら[1]の間接螢光抗体法にて染色した。ⓑ電顕：PAP法による染色後超薄切片を作製した。　4) mRNAの抽出：各組織より6Mグアニジウム液でRNA分画を抽出し、oligo(dT)-セルロースカラムよりpoly(A)$^+$mRNA分画を得た。　5) in vitroでの蛋白合成：[^{35}S]-メチオニン存在下ウサギreticulocyte lysateを用い、30℃、90分行なった。合成産物の解析は、抗visinin血清及びプロテインA sepharoseを加えたのち、免疫反応生成物を1 N酢酸で抽出、凍結乾燥後、

SDS-PAGE[3]を行ないDMSO-PPO法によるフルオログラフィーにより行なった。

〈結果〉ニワトリ網膜内でのvisininの局在：まず生後約1～2週のニワトリ網膜で検討した。視細胞層に最も強い螢光が認められ、特に外顆粒層（ONL）に比べ内節（IS）が強かった（図1）。しかし視細胞の外節（OS）には有意な螢光は認められなかった。また内顆粒層（INL）のアマクリン細胞（図1★印）及び神経節細胞層（GCL）の異所性アマクリン細胞にも螢光が認められ、アマクリン細胞からは内網状層（IPL）へ突起がのびていた。すでに報告しているように、visininは網膜の発達に伴ない著明に増加する。そこで次に網膜の発達に伴なうれvisinin 血清の染色パターンの変化について検討した。ふ卵4日目ではまだ有意な螢光は認められなかったが、ふ卵7日目になると将来視細胞に分化すると考えられる細胞にも螢光が認められるようになった。ふ卵11日目以降将来INLの神経細胞に分化すると考えられる細胞にも螢光が認められるようになった。ふ卵16日目以降では螢光のパターンは孵化後のものとほとんど差が認められなかった。またいずれの胚齢においても、色素上皮層及びMüller細胞には螢光は認められなかった。

Fig. 1 Indirect immunofluorescent staining of chick retina



★ :amacrine cell
anti-serum dilution at 1: 80000

2)他の動物網膜：前記の結果よりvisininは主として視細胞に存在することが示された。またニワトリ網膜では視細胞には錐体細胞が優位と言われることより、visininは錐体細胞に多量存在すると考えられるが、ニワトリ網膜では視細胞の螢光が非常に強く、錐体細胞と杆体細胞の判別は不明確である。そこで錐体細胞と杆体細胞が適当な比で存在するといわれるヒト，ネコ，カエル及びコイ，またニワトリとは逆に杆体細胞が優位といわれるマウス，ラット及びウシの網膜について、抗visinin血清による染色を試みた（表1）。ヒト及びネコの網膜では、視細胞層では錐体細胞にのみ螢光が認められ杆体細胞には認められなかった。また一部のアマクリン細胞や異所性アマクリン細胞にも螢光が認められた。カエル及びコイの網膜でもやはり錐体細胞にのみ螢光が認められた。しかし他の神経細胞には螢光は認められなかった。これとは逆にマウス，ラット及びウシの網膜では、視細胞には有意な螢光は認められなかった。

Table 1
Immunohistochemical localization of visinin in various vertebrate retinae

animals	chick	human cat	carp frog	bovine,rat mouse
photoreceptor cell type	cone cell dominant	cone and rod cells mixed		rod cell dominant
visinin -(like) immunoreactiviry	P A DA	P(C) A DA	P(C)	A H DA

P: photoreceptor cell
C: cone cell
A: amacrine cell
DA: displaced amacrine cell
H: holizontal cell

3)ニワトリ網膜の電顕によるvisininの細胞内局在：PAP法による免疫電顕を行なったところ、visininは錐体細胞の内節に一様に分布しており、杆体細胞ではその存在はほとんど認められなかった（図2）。

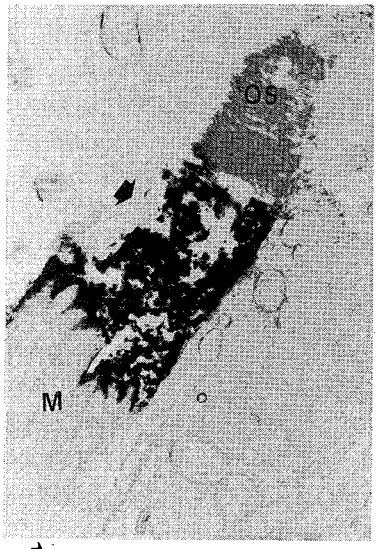
4) mRNAによるvisininの合成：ニワトリ胚網膜、大脳及び小脳よりpoly(A)$^+$mRNAを抽出し、in vitroでのvisininの合成について検討した。ふ卵16日目胚網膜mRNAでは抗visinin血清と反応する蛋白は認められなかったが、ふ卵16日目以降、ほぼ精製visininと同じ分子量の蛋白が抗血清と反応するようになり加齢に伴ないその合成が増大した（図3）。なおこの蛋白は抗血清との反応時に精製visininを過分量添加したところほとんど認められなくなった。またいずれの日齢の脳全画mRNAによっても抗血清と反応する蛋白は得られなかった。

〈考察〉 以上ニワトリ網膜では、visininがその加齢に伴ない著明に増加すること、また主として視細胞の錐体細胞内節に多量存在することがわかった。また他の動物の網膜について検討したところ、視細胞では錐体細胞にのみvisinin様物質が認められたことより、visininは錐体細胞のよいマーカーになりうると考えられる。なおvisinin様物質が一部のアマクリン細胞や水平細胞にも認められることは、visininそれ自身がこれらの細胞に存在し抗血清と反応した可能性と、一部のアミノ酸配列がvisininと類似した蛋白が存在し、これが抗血清と交差反応した可能性が考えられる。この点については、visininの一次構造の解析より明らかにする予定である。またin vitroでの蛋白合成より、visininは網膜でほぼmatureなものとして合成されることがわかった。

現在他の神経組織でのvisinin様物質の分布について、免疫組織化学的手法及び、抗体カラムを用いた生化学的手法により検討中である。

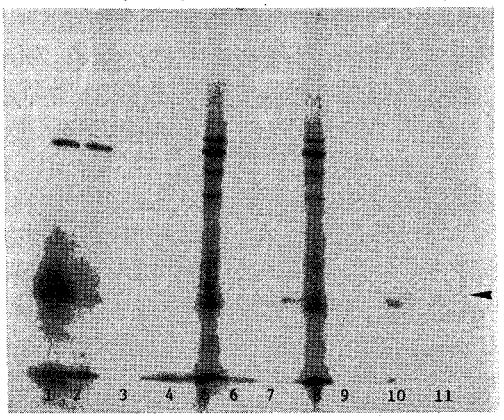
なおvisininの機能については現時点では不明である。

Fig. 2 Electron microscopic immunohistochemical localization of visinin in chick retina.



: inner segment (cone cell)
OS: outer segment
M: mitochondria

Fig. 3 Fluorogram of newly synthesized polypeptides conducted by embryonic chick retina mRNA.



1: no mRNA
2: 12th day embryonic chick retina mRNA
3: 2 + control serum
4: 2 + anti-visinin serum
5: 16th day embryonic chick retina mRNA
6: 5 + control serum
7: 5 + anti-visinin serum
8: 19th day embryonic chick retina mRNA
9: 8 + control serum
10: 8 + anti-visinin serum
11: 8 + anti-visinin serum + purified visinin
► comigrated position of purified visinin

[文献]

1) Coons,A.H.(1958): General Cytochemical Methods 399-422.
2) Hatakenaka,S., Kuo,C-H., Miki,N.(1983):Dev. Brain Res. 10, 155-163.
3) Laemmli, U.K.(1975):J. biol. Chem. 250, 4007-4021.
4) Zamboni,L.,De Martino,C.(1967): J.Cell Biol. 35, 148A.

85 神経細胞及びグリア細胞に特異的なモノクロナル抗体

天野武彦・小嶋端代
（三菱化成生命研・脳神経化学）

〔要　約〕

神経細胞としてPC12細胞を神経成長因子で8日間処理したもの，グリア細胞としてC6 Bu1細胞のホモジネートを抗原としてモノクロナル抗体をつくり免疫化学的，免疫組織化学的にその特異性をしらべた。さらにC6 Bu1細胞の分泌する蛋白，ラット大脳，小脳，背髄の膜分画を抗原としてモノクロナル抗体をつくり比較した。

1) C6 Bu1細胞の抗体は主に小脳のグリア細胞（アストロサイト）を認識した。この細胞の分泌する蛋白の抗体は小脳分子層のグリア線維，顆粒層のアストロサイトを認識した。C6培養細胞では細胞体に偏在してみられた。

2) 抗PC12抗体は中枢神経系，末梢神経系の殆んどの細胞を認識した。

3) 背髄由来のモノクロナル抗体11F2a，大脳由来のモノクロナル抗体CA8dは大型の神経細胞と線維に抗原の局在を示した。免疫化学的に11F2aはニューロフィラメントのサブユニット70Kと145Kを認識していると考えられる。

4) これらのモノクロナル抗体を用いてラット大脳，小脳の胎児組織の培養に於て神経細胞とグリア細胞の識別を行いトリプシン処理による遊離細胞の培養に於ては高密度の細胞培養に於てのみ神経細胞が生存することを見出した。

Key words：

Neuron, Glia, Monoclonal Antibodies

神経系に特異的な蛋白に対する抗体を用いて神経組織を標識することはすでに神経細胞に特異的なテタヌストキシンに対する抗体，Neurofilament（NF），エノラーゼ抗体，アストロサイトに特異的なGlial fibrillar acidic protein（GFAP），オリゴデンドロサイトに特異的なGalactocerebroside（GC）あるいは特異的な酵素に対する抗体等が報告されている。[9] これらの中には成熟した細胞しか染めないもの（GC，GFAP）等があり特に培養系を用いて研究する場合には結果の判定に注意を要する。我々は中枢神経系のモノクロナル抗体を作成する過程で数種の興味ある抗体を得たので報告する。

[実験方法]

抗原としてラット大脳，小脳，背髄の粗膜分画をBALB/cマウス1匹あたり蛋白量200 μgを完全アジュバンドと共に腹腔内注射，4週間おきに不完全アジュバンドと共にbooster 各，腹腔内に抗原注射後4日目にP3U1ミエローマ細胞と50% PEG（分子量1500）で細胞融合，HAT培養液でハイブリドーマを得クローニングを1回以上行った。[2]

PC12細胞（サブクローンA14）[4]はNGF 100 ng/mlで8日間処理した細胞をグリコデオキシコール酸0.125%，NaCl 1M，Tris Buffer 50 mM，pH 7.5で20°C 30分間処理後，100,000×g，60分間遠心，上清をSephadex G10で脱塩したものを抗原とした。C6 Bu1細胞は超音波処理30秒でホモジネートをつくり抗原とした。C6の分泌する蛋白として定常期の細胞をDulbecco's modified Eagle's medium（DME）/F12（1：1），10% newborn calf serum（NCS，Nakashibetsu）で培養し，血清のないDF mediumで3回洗った後，Insulin 5 μg/ml，Transferrin 5 μg/mlを加えたDF medium[3]で48時間培養したものを0.45 μ・メンブレンフィルターで口過後この液を直接BALB/c腹腔細胞 1×10^8

個と室温で15分間作用させた後，20％ fetal calf serum (FCS) を含むDF medium とBALB/C胸腺細胞の培養液を1：1の割合に混合した液で4日間培養した後，P3U1細胞と融合させた。[6] 抗体産生ハイブリドーマの検定はELISA法と組織切片を用いる螢光抗体法を行った。抗原の電気泳動は7.5％―15％のスラブゲル(4×3cm)を用いてTowbinの方法により[8] Immunoblot を行い，一次抗体を作用させた後ベクスタティンABCキットを用いてアビジンビオチン法により発色させた。ラットヌはマウスの脳は凍結切片作成後，パラフォルムアルデヒド固定ヌはアセトン固定後一次抗体を作用させFITC-Anti-mouse IgG で局在をしらべた。

〔実験結果〕

Anti-PC12抗体はラット大脳，小脳，脊髄の神経細胞及び一部の神経線維を免疫組織化学的に染め出した。抗原の調製方法から表面抗原と考えられImmunoblot では分子量95K，100Kのものがみられた。

Anti-C6細胞の抗体はラット小脳ホモジネートを抗原としたものと一部似ており分子，顆粒戸のグリア線維とアストロサイトの抗原を認識した。又プルキニエ細胞と分子の線維に局在するものもみられた。プルキニエ細胞は神経細胞であるがグリア細胞と一部蛋白抗原として共通なものを持っていると考えられ M. Schachner[5] らの報告とも一致する。C6細胞の分泌する蛋白に対するモノクロナル抗体は(C6i)，分子の表面より垂直に走るグリア線維，顆粒戸のアストロサイトと思われる線維を認識した。Immunoblotにより分子量約90Kの附近に2本のバンドが得られた。(C6i56, C6i24d) C6培養細胞では約30％の細胞の細胞体に局在しているのがみられ，70％の細胞では陰性であった。これは細胞の周期に関係して分泌蛋白が変動していると考えられる。

マウスニューロブラストーマN18では予想に反して約50％の細胞の細胞体に偏在して染色されるのが観察された。この抗体は組織切片の神経細胞は認識しないので"ニューロブラストーマの未分化な性質を示すものと思われる。PC12細胞をNGFで8日以上処理して分化した神経細胞に近いものでは現在検討中である。 Stallcup[11] らはPC12細胞でウサギを免疫したポリクロナル抗体が神経細胞とグリア細胞を認識すると報告しておりモノクロナルのグリア指向が神経細胞由来の神経芽細胞に共通抗原が存在することは興味深い。ラット脊髄を抗原とするものクロナル抗体11F2a，13H8a，については一部すでに報告したがラット脳，C6グリア細胞，PC12細胞のNGFで分化したもの，ホモジネートをTowbinの方法により同時にImmunoblotして11F2aでは図の如くラット脳では145K，PC12細胞では70Kの部位に抗原を検出した。NFはトリプレットで200K，145K，70Kから成っておりラット脳では3個存在するはずであり11F2aで145Kのみ認識した原因は明らかでない。この実験ではラット脳として粗膜分画(細胞核等を低速遠心で除いた10,000×g，30分遠心のペレット)を用いており脳全体のホモジネートを用いる各種のNF調製法を用いて検討中である。PC12細胞では70Kのみを認識したがこれがクローン細胞ないしは未分化な神経細胞におけるNFの1つの表現型なのか検討中である。(図1) 13H8aはラット脊髄を抗原としたモノクロナル抗体で組織切片では神経細胞のみ認識しImmunoblotでC6細胞と交叉せず神経細胞に特異的と考えられる。CA8d抗体はラット大脳由来の抗原によるモノクロナル抗体で大脳，小脳，脊髄のほとんどの神経細胞と神経線維を認

識した。これらのモノクローナル抗体を用いてラット胎児16日及び17日の大脳小脳のトリプシン処理による神経細胞の分散培養を試みた。0.25%トリプシン処理5分間37°C処理した組織をDNase 20 μg/mlで細胞懸濁を除き遠心後ポリDリジンコートしたファルコンシャーレ(No 3001, 直径35mm)に細胞数2×10⁶/シャーレ, 培養液はDFメディウムに5%FCSと5%馬血清を加えたものを用いた。培養後4−7日で固定したものでは抗PC12抗体で神経細胞らしきものが染色されたが他の11F2aでは染色されず, 13H8aで線維のみ染色された。コントロールとしてMONOSAN社(フナコシ)の抗NF抗体(70K)とAmersham社のAnti-GFAP抗体を用いNE抗体ではすべての細胞に陰性でAnti-GFAPは約10%の細胞が染色された。C6と24d抗体では培養細胞の95%が染色され染らない細胞は円形で突起のないものが多かった。細胞密度を2倍にして4×10⁶個/シャーレとすると11F2aで染色されるものが現れた。現在この事実を検討中であるが予備実験で細胞間の相互作用が必要であるという結果を得ている。

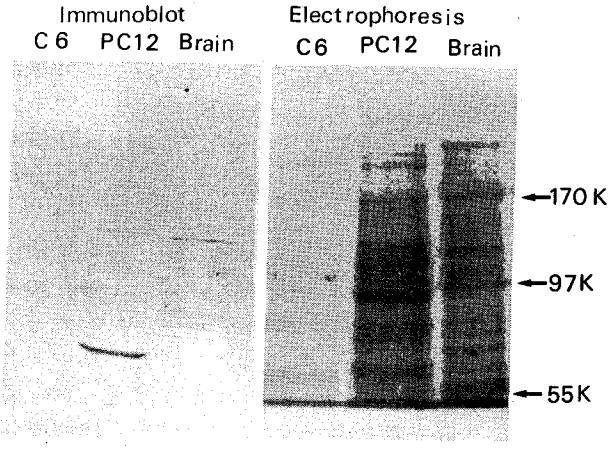


図1. 11F2aモノクローナル抗体による抗原の検出. 7.5%アクリルアミドゲルを用い3×4cmのスラブゲルで約2時間泳動後Immunoblotした。

Antibodies	C6	N18	PC12 (+NGF)	rat embryonic brain 16 days	19 days	19 days
C612b	+	+	- ?		cell bodies +	fibers +
C6124d						
13H8a	-	+	-	neuronal fibers +	+	+
11F2a	-	-	-	-	-	+
PC12 (+NGF)	-	-	+		+	+
CA8d	-	-	+ ?	-	- (tissue section ++)	+ ?
Anti-neurofilament (70K)	-	-	+	-	- (tissue section ++)	+ ?
Anti-GFAP (Amersham)	+				+	
	Paraformaldehyde fixation					ethanol or acetone fixation

図2. モノクローナル抗体の細胞に対する特異性の要約

References

1) T. Amano et al. Exp. Cell Res. 85,399 (1974)
2) 天野武彦他 第25回日本神経化学会抄録集 21, 369 (1982)
3) D. Barnes and G. Sato,Anal. Biochem. 102,255 (1980)
4) L. Greene and A . Tischler, Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 2424 (1976)
5) C. Lagenauer et al. Develop. Biol. 79,367 (1980)
6) R. Pardue et al. J. Cell Biol. 96,1149 (1983)
7) W. Stallcup et al. J. Neurosci. 3, 53 (1983)
8) Towbin et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 76,4350 (1979)
9) Cold Spring Harbor Reports: Monoclonal Antibodies to Neural Antigens (1981)

86 ニワトリ胚におけるニューロフィラメント大，中サブユニットおよび関連物質の分布

藤田　忍・小幡邦彦
（群馬大・医・薬理）

〔要　約〕

1. ニワトリ胚の視神経ホモジネートを抗原として，免疫組織化学的に神経繊維を染める多様なモノクローナル抗体が得られ，その一つ，抗体82E10は調べたすべての脊椎動物において神経繊維を強く染めた。
2. 抗体82E10はニワトリ胚神経組織に対するイムノブロット分析において分子量約16万のダブレットバンド，およびその近傍の数本のバンドに特異的に結合した。また本抗体は精製されたヒトニューロフィラメント大および中サブユニットに強く結合したが小サブユニットには全く結合しなかった。これらより，抗体82E10はニューロフィラメントの大および中サブユニットに特異的に結合すると考えられた。
3. ニワトリ胚初期発生において神経管に神経繊維が出現する以前に一部の細胞に本抗体で染まるものが認められ，そのような組織に対するイムノブロット分析においてニューロフィラメント中サブユニットの位置にダブレットバンドが検出された。
4. ニワトリ胚赤血球への抗体82E10の弱い結合が認められ，赤血球およびそのゴーストのホモジネートに対するイムノブロット分析において分子量20万以上の位置にバンドが検出された。

Key words： neurofilament, monoclonal antibody, development

ニューロフィラメント(NF)は分化した神経細胞に特徴的な中間径フィラメントであるが，その細胞生物学的および神経生物学的機能を理解するためには，胚発生におけるNF各サブユニットの分布と消長を明らかにすることが重要である。我々は昨年本学会で報告したようにニワトリ胚中枢神経系において特徴的な結合分布を示す多様なモノクローナル抗体(MAb)を得ているが(3,4)，その一つMAb82E10はNFの大および中サブユニットに結合することが判明したので，胚におけるこれらサブユニットの分布を免疫組織化学的および生化学的に検索した。今回は①神経分化に先立って初期胚の一部の細胞にNF中サブユニットが発現しており，②胚赤血球においてNF大中サブユニット様の高分子量タンパクが発現していると考えられる結果を得たので報告する。

〔方法〕

MAb82E10はニワトリ8日胚視神経ホモジネートを抗原として得られたがその詳細についてはすでに報告した(3,4)。本抗体はIgG3である。免疫組織化学は間接螢光抗体法によった。ニワトリ胚は10%ホルマリン/PBS中で一晩固定したものを30%スクロース/PBSに浸め，13μmの凍結切片として抗体染色に供した。染色方法については別に詳しく述べた(2)。二次抗体はフルオレセイン結合ヤギ抗マウスIgG(H+L)(Cappel社)を70倍希釈で用いた。イムノブロットは基本的にBurnetteの方法(1)により，HRP結合ヤギ抗マウスIgG(H+L)を用いクロロナフトールを発色基質としてバンドを検出した(7)。

〔結果と考察〕

抗体の組織学的特異性　図1にニワトリ17日胚の脊髄腹側部断面の染色像を示す。灰白質中の細胞体は染まらないが神経繊維が強く染まる。このように後半期の胚においては中枢末梢を問わず神経繊維に特異的な結合が認められた。ヒト，ラット，ウシ，ウサギ，ショウジョウバエにおいても神経繊維が染色された。ウシ脊髄の太い軸索では光顕でもアクソプラズムに特異螢光が認められたので本抗体に対する抗原分子は細胞内に存在すると予想された。さらに培養神経細胞の免疫電顕法による観察では中間径フィラメントへの抗体の結合が示唆された（小幡と中島，未発表）。

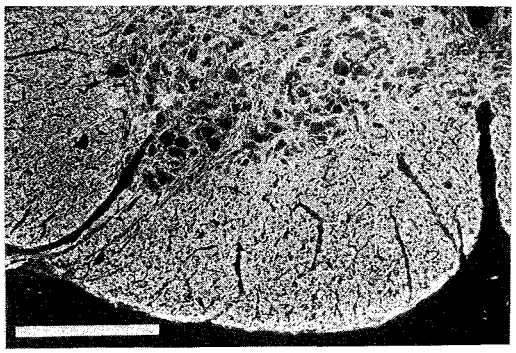


図1．MAb 82E10によるニワトリ17日胚脊髄腹側部断面の染色像。スケール=300μm.

生化学的特異性　図2.のa～dはニワトリ胚組織のホモジネートをSDS電気泳動したものをニトロセルロース膜にブロットし，MAb 82E10でプローブした結果である。dは11日胚の全脳で分子量約16万の位置にダブレットバンドが認められる。17日胚（c）ではさらに分子量約18万のバンドが認められる。ニワトリのNFサブユニットの分子量は7，16，18万とされており(11)，新生ラット脳において大サブユニットの出現が遅れること(10)，また大および中サブユニットに交叉反応するMAbが報告されている(5,8)ので，本抗体はNFの大および中サブユニットに結合していることが考えられた。そこで中里博士より分与された精製ヒトNFサブユニットに対してイムノブロット分析を行なった結果，図2e～gに示すように，小サブユニットには全く結合しないが，中および大サブユニットに強い結合が認められた。従ってMAb 82E10はNF大および中サブユニットに高い特異性を示すと考えられた。

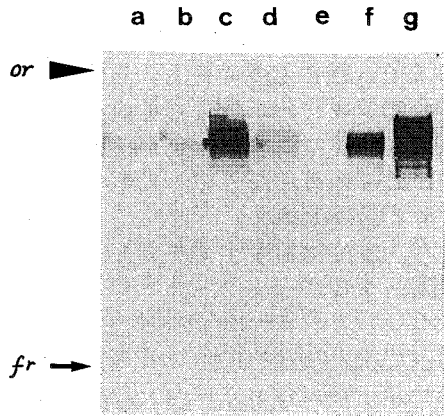


図2．ニワトリ胚組織および精製ヒトNFサブユニットに対するMAb 82E10のイムノブロット分析。a，2日胚全体．b，4日胚視蓋．c，17日胚脊髄．d，11日胚全脳（以上各約20μg），e,f,gはそれぞれヒトNF小，中，大サブユニット（各約3μg）。8%ポリアクリルアミドゲル。

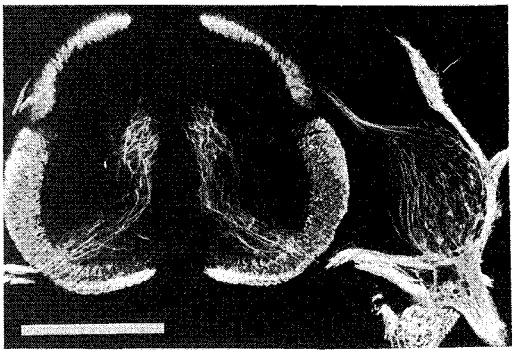


図3．ニワトリ6日胚脊髄断面のMAb 82E10による染色像。スケール=300μm．右端は脊髄神経節。

胚発生におけるNFサブユニット　ニワトリ6日胚の脊髄における抗体染色像を図3に示した。脊髄索(白質)の部位により染まる繊維の密度が異なり，灰白質中にはほぼ交感神経節前繊維が染まるのみであるが，成熟に近ずいた17日胚脊髄では図1のごとく白質にも灰白質にもほぼ均一に染まる繊維が認められるようになった。小脳においてはすでに報告したように(9)初期にはプルキンエ細胞が染まり，胚発生20日頃にプルキンエ細胞の染色性が低下してくると登上繊維が染まりはじめ，成体においてはバスケット細胞繊維が染まった。平行繊維は胚13~16日頃に染まるのみであった。一般に胚中枢神経系において染色される繊維のパターンは発生とともに変化した。これらの現象は，大中サブユニットを含まない神経繊維の存在か，さもなければMAb82E10を結合しない大中NFサブユニットの存在と分子的多様性の可能性を示唆し，またそれらの発現がニューロンのサブタイプごとにダイナミックに制御されていることを示すと考えられる。

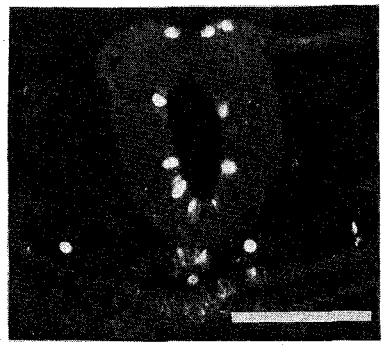


図4. 2日胚神経管断面におけるMAb82E10による染色像。スケール=150μm.

発生6日以前のニワトリ胚においては，MAb82E10により神経繊維以外にも脊髄胚芽層および脳室沿いの細胞に弱い染色が認められた。特に初期の胚においては一部の細胞は強く染まり，2日胚においては予定神経部位以外にもそのような細胞が認められた(図4)。そこで神経繊維が分化する以前の2日胚のホモジネートについてイムノブロット分析を行なったところ，図1のaに示すようにNF中サブユニットの位置にバンドが検出された。従って神経分化に先立って一部の細胞ではNF中サブユニットが発現していると考えられる。

ニワトリ胚赤血球にはNF小サブユニットが存在することが知られている(6)。そこでニワトリ胚血液のスメア標本に対してMAb82E10の結合を調べたところ特異的螢光が認められた。さらに赤血球とそのゴーストのホモジネートに対してイムノブロット分析を行なったところ，いずれも分子量20万以上の位置に特異バンドが検出された。従ってニワトリ胚赤血球においてはNFの小サブユニットのみならず，大中サブユニットに類似性をもった高分子量タンパクが存在すると結論された。

【謝辞】ヒトNFの精製サブユニットを分与下さり，本抗体のサブクラスを決定された群馬大学医学部病理学教室　中里洋一博士に感謝します。

【参考文献】

1. Burnette, W. N. (1981) Anal. Biochem. 112, 195-203.
2. 藤田忍 (1983) 生体の科学 34, 474-478.
3. 藤田忍, 小幡邦彦 (1983) 神経化学 22, 378-380.
4. Fujita, S.C. & Obata, K. (1984) Neurosci. Res. 1, 131-148.
5. Goldstein, M.E. et al. (1983) P.N.A.S. 80, 3101-3105
6. Granger, B.L. & Lazarides, E. (1983) Science 221, 553-556.
7. Hawkes, R. et al. (1982) P.N.A.S. 79, 2410-2414.
8. Lee, V. et al. (1982) P.N.A.S. 79, 6089-6092.
9. Obata, K. & Fujita, S.C. (1984) Neurosci. Res. 1, 117-129.
10. Shaw, G. & Weber, K. (1982) Nature 298, 277-279
11. Tapscott, S.J. et al. (1981) Develop. Biol. 86, 40-54.

87 グリア細胞成長因子（Glia Maturation Factor, GMF）により誘導されるglioblast の細胞骨格の変化

鈴木龍雄・加藤泰治・田中　亮　（名市大・医・I生化）
藤井敏弘　（信州大・繊維・機能高分子）

〔要　約〕

GMFによるglioblastの形態変化において細胞骨格成分の含量およびそれらの構築に特異的な変化が観察された。タンパク質成分としては分子量60kおよび51Kの含量の増加がみられた。これらはそれぞれvimentinおよびglial fibrillary acidic protein (GFA)であることが示唆された。actin含量の増加はみられなかった。またglioblast+細胞骨格中のtubulin含量は低く、GMFによる変化はみられなかった。電顕グリッド上に培養した細胞をTriton X-100などで処理して得られた細胞骨格の観察からは、intermediate filament, microtubule, microfilamentのすべての構築に変化がみられた。網目状に分布していたintermediate filamentは長い突起の軸方向に束を形成するようになり　核の周囲に放射状に配列しているmicrotubuleにも再配列がみられた。網目状に分布するmicrofilamentは減少し、またstress fiberの減少もみられた。突起先端部ではactinからなると考えられる接着構造がみられ、この部で基質と接着していた。

Key words: glia maturation factor (GMF), cytoskeleton, differentiation

INTRODUCTION

GMFは分子量23,000のタンパク質で、glioblastに対しDNA合成および細胞分裂をひきおこすとともに特有の形態変化をひきおこす。我々は従来、牛脳からGMFを部分精製しその物理化学的性質および、glial cellやneuroblastoma-glioma hybrid cellに対する生物学的作用について報告してきた[2),3)]。今回は、GMFによるglioblastの形態変化を細胞骨格の変化としてとらえ、細胞分化誘導における細胞骨格の関わりを追求した。

METHODS

glioblastの培養：在胎17日目の胎児ラット脳をtrypsin処理後、20%胎児牛血清(FCS)含有F-10培地で一次培養した。7日後からは10%新生児牛血清含有F-10培地で二次培養を行った。二次培養はformvar膜を貼った電顕用金製gridを置いたペトリ皿中で行なった。二次培養の7日目に培地中にGMFを添加し、2日後、あるいは10日(この場合、3日目ごとのmedia changeの際に新しいGMFを添加している)の変化を調べた。

細胞骨格標品の調整および電顕用試料の作成：Schliwa and van Blerkomの方法[4)]に従った。電顕用gridに付着したglioblastを0.15% Triton X-100を含むPHEM buffer (60mM PIPES, 25mM HEPES, 10mM EGTA and 2mM $MgCl_2$, pH 6.9)で0°C 2分間処理した。actinなどの抽出には、Triton処理のあと、低-高-低イオン強度のbufferで処理した。microtubuleをみるためには、低-高-低イオン強度buffer処理の前に1μg/mlのtaxolで処理を行なった。F-actinを固定化する場合には、0.1% N-lauroyl sarcosinateでの抽出前に、10μg/mlのphalloidinでpreincubationを行なった。種々の抽出操作後にgridに残る細胞骨格を1% glutaraldehydeで固定後、osmiumで後固定、EtOH-H_2Oで脱水したのちCO_2の臨界点で乾燥させ、検鏡した。

タンパク分析：ペトリ皿上に二次培養したglioblastをTriton X-100で室温下、2分間処理したあと十分に洗った後に残る細胞骨格をSDSゲル電気泳動で分析した。

RESULTS

1) Triton不溶性細胞骨格：GMFにより扁平なglioblastが突起を出し、体積および表面積の減少がおこった。またwebやknobもみられる様になった。核領域は電子密度が高く、内部構造は観察困難であった。controlの細胞骨格は、粗な網目状構築であったが、GMF添加後には、密になり、束を形成する様になった。

2) TritonX-100→低-高-低イオン強度処理後の細胞骨格：controlではintermediate filamentに富む微細な網目構造が細胞全体にわたって分布していた(図1,a)。核領域の電子密度は1)に比べ減少していた。GMF添加後には、微細な網目構築が減少し、太い突起中にbundle形成がみられた(図1,b)

3) taxol→TritonX-100→低-高-低イオン強度処理後の細胞骨格：taxolにより microtubuleを安定化した場合、2)のcontrol(図1,a)でみられる構造の他に核周辺部から辺縁部に放射するセンイ構造が残存していた(図2,矢印)。この放射状構造は核matrixと連続していた。GMF添加後には核の長軸に垂直方向の放射状構造は消失したが、長軸方向のものは残存していた。GMFによってできたbundle成分は微細な網目構築の成分に連続している様であった。web様構造は残存しなかった。

4) phalloidin→N-lauroyl sarcosinate処理後の細胞骨格：これによって残る細胞骨格は2),3)のものとは異なっていた。また、時にstress fiber様構造がみられた(図4)。細胞周辺部には縁取りがみられた。GMF刺激後にはbundleがみられた。webがみられ、bundleから続くセンイが微細な網目を形成していた。

5) GMFによる細胞骨格タンパクの変化：図5にTriton不溶性の細胞骨格を構成するタンパク質の変化を示した。またその量的変化を分析した結果を表1に要約した。

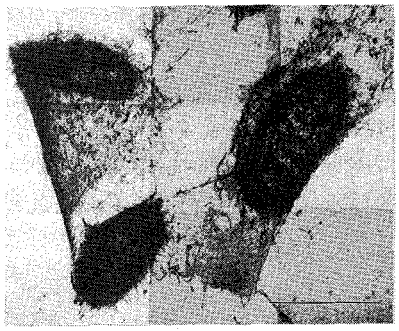


図1,a　GMF(−)　Bar, 10μm

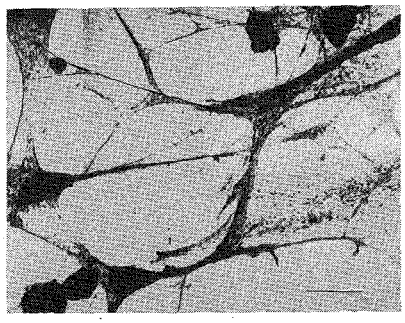


図1,b　GMF(+)　Bar, 10μm

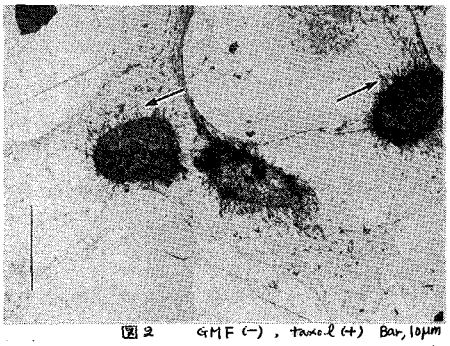


図2　GMF(−), taxol(+)　Bar, 10μm

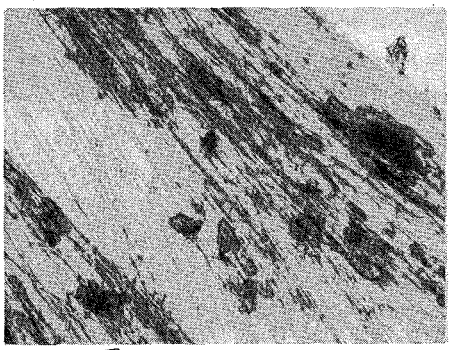


図3　GMF(+)

DISCUSSIONS

GMFによってglioblastに分化が誘導される際の細胞骨格成分の量的および構築上の変化が明らかになった。主要なタンパク質成分のうち、分子量60Kと51Kのものが刺激後2日，10日において増加していた。免疫酵素学的方法により、これらはそれぞれVimentinとglial fibrillary acidic protein (GFA)であると推定された。actinの量的変動はみられなかった。これらの結果はGMFにより、VimentinやGFAといったintermediate filamentの構成タンパクの生合成が誘導されて、形態変化に深く関わっていることを示唆している。文献的にはVimentinの生合成とリン酸化が細胞増殖と相関するという報告があり[1]、興味が持たれる。いくつかの細胞骨格タンパクはGMF刺激後2日目には増加するが10日目には、その増加はみられない(表1, 2)。これらは細胞維持に伴う二次的変化であって、GMFによる分化発現とは関係がないと考えられた。glioblast中のtubulin含量は低値であった。細胞骨格の3次元的構築にも変化がみられた。変化はintermediate filament, microtubule, microfilamentのすべてにみられた。

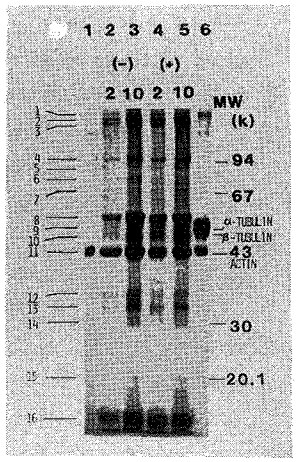
以上の結果から、GMFにより誘導される形態変化は細胞骨格成分の量的、構築上の変化に基づくものであることが示された。細胞骨格成分のうち、astrocyteの分化の生化学的markerとされるGFAが増加していることは、GMFによって誘導される形態変化が、単なる一過性の変化ではなく、in vivoでのglioblastの分化発現にひじょうに近いものであることを強く示唆している。



図4 GMF(−), phalloidin (+)
Bar, 10μm

表1

Characteristics	Band number
1) Proteins increased both 2 and 10 days after GMF stimulation	8, 10
2) Proteins increased 2 days but unchanged 10 days after GMF stimulation	1, 13, 16
3) Proteins unchanged by GMF	2, 3, 4, 11, 12



REFERENCES

1.Ben-Ze'ev, A. (1983) J. Cell Biol. 97, 858-865.
2.Higashida, H., Kato, T., Kano-Tanaka, K., Okuya, M., Miyake, A., and Tanaka, T. (1981) Brain Res. 214, 287-299.
3.Kato, T., Yamakawa, Y., Lim. L., Turriff, D. E., and Tanaka, R. (1981) Neurochem. Res. 6, 401-412.
4.Schliwa, M. and van Blerkom, J. (1981) J. Cell Biol. 90, 222-235.

88 ウシ脳micro glutamic acid-rich proteinの一次構造，免疫化学的性質とneurofilament 68K ―タンパク質との関係

礒辺俊明・真鍋　敬・門屋利彦・奥山典生
（都立大・理・化学）
中島　孝（国立がんセンター・病理）・加藤兼房（愛知県コロニー・生化）

〔要　約〕

1. ウシ脳 micro glutamic-acid rich protein（MGP）の一次構造を決定した。一次構造から計算したMGPのアミノ酸組成は，Asp(4), Thr(2), Ser(1), Glu(39), Gln(2), Pro(2), Gly(7), Ala(15), Lys(10) で，合計82残基，分子量は8,992であった。
2. MGPの一次構造は，ブタ脳由来の neurofilament 68K-タンパク質のC末端82残基のアミノ酸配列と8ヶ所を除いて一致した。観察された差異は，種差に基づくアミノ酸置換と考えられた。
3. MGPに対する特異抗体を調製し，種々の細胞骨格タンパク質に対する反応性を2次元電気泳動－immunoblotting 法で検討した。MGP抗体は68K-タンパク質と反応し，また分子量150～200K，等電点5.5～6.0の領域に5つのスポットを与えた。
4. MGP抗体を用いた組織染色では，中枢および末梢神経組織のニューロンが明瞭に染色された。MGPの分布は neurofilament triplet タンパク質の分布と一致した。
5. 以上の結果から，MGPは neurofilament 68K-タンパク質を先駆体として，そのC末端ドメインの限定的な酵素分解により生成すると結論した。またその意義について考察した。

Key words：

micro glutamic acid-rich protein, neurofilament, sequence and immunoblotting

―― はじめに ――

micro glutamic acid-rich protein（MGP）は，ウシ脳可溶性画分に存在する低分子量の酸性タンパク質である(4)。MGPは9種類のアミノ酸残基のみから構成され，構成アミノ酸の50%がGlu，疎水性アミノ酸は含まない特異なアミノ酸組成をもっている。これと同様のタンパク質（Glu-50）は Nomataらによりヒト脳からも分離されている(9)。この報告では，一次構造決定と免疫化学的研究を通じて，MGPが神経細胞に特異的に存在する neurofilament の68Kタンパク質（NF-68）を先駆体として生成することを明らかにした。

材料と方法

1) MGPの精製；MGPはウシ脳から既報の方法(4)で調製し，ポリスチレン樹脂を用いるHPLC(5)で最終的に精製した。

2) 一次構造決定；MGP（0.5～1 mg）を200 μl の0.05M NH_4HCO_3 (pH8.1) に溶解し 1/50～1/100量の trypsin または *Trimeresurus flavoviridis* 由来のプロテアーゼ（辛研・佐藤，山河博士より恵与された）で分解した。生成したペプチドは逆相HPLCで分離精製した。アミノ酸分析と配列分析は既報の方法(3)を微量化して行なった。

3) 抗体の調製；MGP（0.3～0.5 mg）をメチル化アルブミン（1 mg）と共に等量の Freund complete adjuvant と混合し，Japanese white rabbit の皮内に注入した。抗体産生は酵素抗体法で追跡し，得られた抗血清は50%硫安分画ののち MGPをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

4) 2次元電気泳動と immunoblotting；ミクロ2次元泳動と，タンパク質スポットのニト

ロセルロース膜への転写，抗MGP IgG-peroxidase法による検出（immunoblotting）は，いずれもManabeらの方法(7,8)で行なった。骨格タンパク質画分は門屋らの方法(6)で調製した。

5) 組織染色法；ヒト末梢神経組織のパラフィン包埋切片（3μm）を酵素抗体法（ABC法）で染色した。

── 結果と考察 ──

1. 精製；ウシ脳から精製したMGPは各種のHPLC系で単一ピークを示し，2次元電気泳動でもS100やカルモジュリンの近傍に単一のスポットを与えた（図1）。スポットの位置から計算した分子量は約12,000，等電点は3.9であった。

2. 一次構造；MGPをトリプシン処理すると，まずLys-60とLys-79で選択的に切断され3種類のフラグメント（T1~60, 61~79, 80~82）が生成した。さらに分解を続けると，T1~60とT61~79はさらに切断され，新たに7種類のペプチドが生成した（図2）。以上で得られた10種類のペプチドと，T. flavodiridis プロテアーゼ消化で得られたペプチドの構造，MGPのN末端配列(4)を基礎としてMGPの一次構造を決定した（図3）。一次構造からの残基数は82，分子量は8,992であった。

3. NF68との構造比較；NF68は，ニューロフィラメント（NF）を構成する"triplet proteins"の1つであり，その構造は，塩基性アミノ酸に富むN末端ドメイン，フィラメント形成に直接関与する中間ドメイン（~330残基），親水性で酸性アミノ酸に富むC末端ドメインの3つのドメインから構成されている(2)。N末端および中間ドメインの一次構造は，desminやvimentinなどの他の10nmフィラメント構成タンパク質の構造とよく似ており，一方，C末端ドメインはNFに特有な構造と考えられている。

図4には，ウシ脳MGPの一次構造をNF68のC末端ドメインの構造と比較して示した。2つの構造は，種差（NF68；ブタ）に基づくと考えられる8ヶ所のアミノ酸残基を除いて完全に一致し，MGPがNF68を前駆体とするproteolysisで生成することが明らかになった。

4. 細胞骨格タンパク質画分のMGP抗体による染色；

ミクロ2次元電気泳動によりウシ脳骨格タンパク質画分の2次元マップを作成した（図5A）。得られたマ

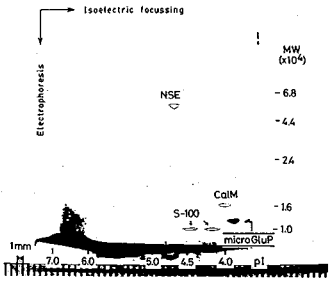


Fig. 1. 2-D electrophoresis of MGP

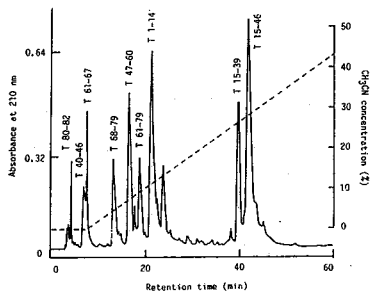
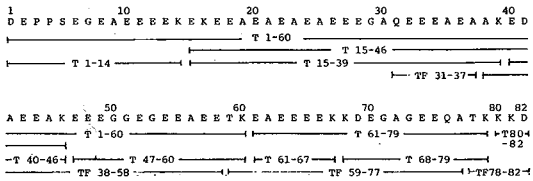


Fig.2. HPLC of the tryptic digest of MGP sample; 1 mg, column; Finepak-sil ODS eluant; 0.1% TFA- 50%CH_3CN/0.1%TFA flow rate; 1 ml/min.

Fig. 3. The amino acid sequence of bovine brain MGP, and peptides needed for the sequence determination.



ッフ°をニトロセルロース膜に転写して抗MGP IgG-peroxidase で染色した(図5B)。MGP抗体はNF68に反応し，また分子量150～200Kの領域に5つのスポットを与えた。マップ上に存在するGFAやアクチン，チュブリンなどとは反応しなかった。

5，MGP抗体による組織染色；MGP抗体により末梢神経ニューロンが明瞭に染色された(図6)。MGPの分布はNF tripletと同様であった。

6，結論；一次構造決定とMGP抗体を用いた研究により，MGPがNF68から生成することを明らかにした。この結果は，Weberらの議論(10)を支持している。kelatinやdesmin，vimentinとの構造比較によれば，MGPはNFの"特異性"を決定している構造部分と考えることができる。NFがCa^{2+}に依存して酵素的な分解を受けることはよく知られており，その生理的意義についても議論されている(1)。しかしこれに関与する酵素やその特異性はよく知られていない。MGPが除去された場合のNF68の構造変化やNFの形態変化，あるいは生成したMGPの生理的意義は今後の課題である。

Fig. 4.

Comparison of the sequence of bovine brain micro glutamic acid-rich protein (MGP) with the sequence of the carboxyterminal 106 residues of the neurofilament 68kDa protein (NF) from porcine brain

```
                                        ↓
   -24   -20        -10        -1 1       10        20
NF:  TSHVQEEQIEVEETISAAKAEEAKDEPPSEGEAEEEGKEKEEEAEAEAEA
MGP:                            DEPPSEGEAEEEEKEKEEEAEAEAEA

     30        40        50        60        70
NF:  EEEGAQEEEEAAEKESEEAKEEEGGEGEQGEETKEAEEEEKKDEGAGE
MGP: EEEGAQEEEEAAEKEDAEEAKEEEGGEGEEAEETKEAEEEEKKDEGAGE

     80
NF:  EQATKKKD
MGP: EQATKKKD
```

Fig. 5. 2-D electrophoresis of cytoskeletal protein fraction (A) and (B) its immunoblot (anti-MGP staining)

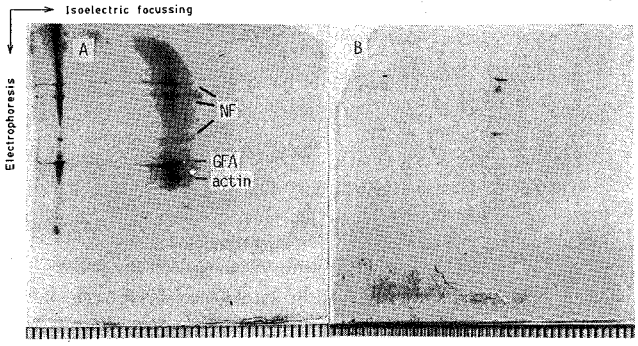
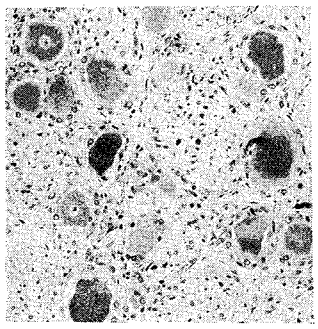


Fig. 6. Immunohistochemical localization of MGP (anti-MGP-ABC)



REFERENCES
1. Calvert,R. (1982) nature, 300, 580-581.
2. Geisler,N. et al. (1983) EMBO J. 2, 1295-1302.
3. Isobe,T. & Okuyama,T. (1981) Eur. J. Biochem. 116, 79-86.
4. Isobe,T. et al. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 997-1004.
5. Isobe,T. et al. (1984) J. liq. Chromatog. 7, 1101-1115.
6. Kadoya,T. & Okuyama,T. (1983) Bunseki Kagaku, 32, 664-669.
7. Manabe,T. et al. (1982) Clin. Chem. 28, 824-827.
8. Manabe,T. et al. (1984) in Electrophoresis '83 (Hirai,H. ed) pp. 179-187, Walter de Gruyter, Berlin.
9. Nomata,Y. et al. (1983) J. Biochem. 93, 825-831.
10. Weber,K. & Geisler,N. (1983) FEBS Lett. 164, 129-131.

89 シビレエイ電気器官の界面活性剤可溶型アセチルコリンエステラーゼ：精製と性質

酒井三千三・西須英雄・腰越直也・阿部輝雄
（新潟大・脳研）

〔要　約〕

Narke japonica および *Torpedo californica* 電気器官の界面活性剤可溶型アセチルコリンエステラーゼ（AChE）の精製を行い，その性質を調べた。

(1)界面活性剤可溶型AChEは，低イオン強度下でのTriton X-100抽出物をAChEに対するモノクローナル抗体（Nj-601）を用いたイミュノアフィニティー・クロマトグラフィーによって，容易に，収率よく精製できた。

(2)精製酵素はともに界面活性剤存在下では6S成分として存在し，非存在下では凝集を起こす。また，還元アルキル化した状態では4.4S成分となった。

(3)SDS電気泳動でともに分子量66Kの主成分とごく少量のその非還元性二量体（分子量130K）からなっていた。非還元状態では130K成分のみが観察された。

(4)以上の結果から，界面活性剤可溶型AChEは疎水性蛋白質である66K成分のS-S結合を介した二量体として存在する事が明らかである。

(5)両精製酵素は互いに類似したアミノ酸組成を示した。また，両者はともに重量にして10％以上の糖を有する酸性の糖蛋白質である。

Key words：　Acetylcholinesterase,　Electric organs,　Electric rays

シビレエイ電気器官には，低塩濃度可溶型（low salt-soluble form），非対称型（asymmetric form）[4]および界面活性剤可溶型（detergent-soluble form）の3種のAChEが存在する。我々はすでに，*Narke japonica*（以下N.j.）および*Torpedo californica*（以下T.c.）の電気器官から，コラーゲン様の尾を持つ非対称型AChEを精製し，その比較を行った[5]。界面活性剤可溶型AChEの通常の低分子リガンドによるアフィニティー・クロマトグラフィーは必ずしも容易ではない。Leeら[3]の報告した精製標品には低塩濃度可溶型AChEの大部分が含まれており，両者の区別は不可能である。我々はAChEに対するモノクローナル抗体を用いたイミュノアフィニティー・クロマトグラフィーによって，界面活性剤可溶型AChEを精製し，その性質を調べたので報告する。

〔実験方法〕

<u>モノクローナル抗体Nj-601の調製</u>：　すでに報告した[1,2]Nj-501と同様に，N.j.電気器官の神経終末膜分画をBALB/cに注射して免疫した後，ハイブリドーマ技術によって得られた。Nj-601はIgG_1であって，N.j.およびT.c.の全ての型のAChEと反応する。ハイブリドーマ培養上清より，硫安沈殿および抗マウスIgGを用いたアフィニティー・クロマトグラフィーによって精製した。

<u>界面活性剤可溶型AChEの精製</u>：　N.j.およびT.c.の電気器官（各30g）を150mlの溶液A（20mM Tris-HCl-2mM EDTA, pH7.6）中にてポリトロンでホモジナイズし，ナイロンメッシュを通した後，10^5gで1時間遠心後の沈渣を得る。T.c.の場合は，これを300mlの溶液B中でホモジナイズした後，最終濃度1％（w/v）のTriton X-100を加えて，1時間

撹拌する。N.j.の場合には，非対称型の混入を防ぐため，最初の沈渣を60 ml の溶液E（20 mM Tris-HCl-2M $MgCl_2$, pH7.6）中でホモジナイズした後，120 ml の溶液Dを加えて 10^5 g で1時間遠心する。この操作をもう一度繰り返して得られた沈渣を60 ml の溶液Dで1回洗う。この沈渣を300 ml の溶液Dに懸濁して，上と同様にTriton X-100を加える。N.j.・T.c.ともTriton X-100懸濁液を 10^5 g で1時間遠心して上清を得る。これに最終濃度0.1M のNaClを加える（これをTriton X-100抽出物と呼ぶ）。Triton X-100抽出物を0.9×2.5-30 cm のNj-601-Sepharose 4Bカラム（8mg Nj-601/ml ゲル）に一晩かけてのせ，カラム容積の10倍量の溶液F（20mM Tris-HCl-0.1M NaCl-2mM EDTA-0.2% Lubrol PX, pH7.6）で洗う。次に3倍容の溶液G（20mM Tris-HCl-0.5M NaCl-2mM EDTA-0.2% Lubrol PX, pH7.6）で洗った後，溶液F（3倍容）で再び洗う。カラムに結合したAChEは溶液H（0.1M Glycine-HCl-0.2% Lubrol PX pH2.8）で溶出する。AChEの酸による失活を防ぐため，各試験管にあらかじめ0.2 ml の1M Tris-HCl, pH8.0 を加えておき，0.5 ml の溶出液と直ちに混合する。

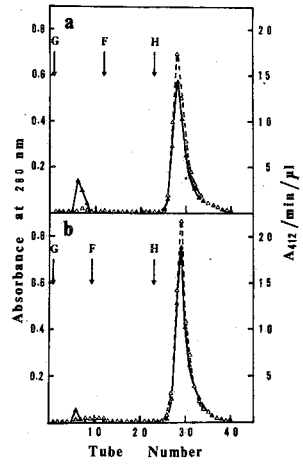


図1. AChEのNj-601-Sepharoseカラムからの溶出。
a, N.j.; b, T.c. ▲ 280 nmの吸収，△ AChE活性（A_{412}）

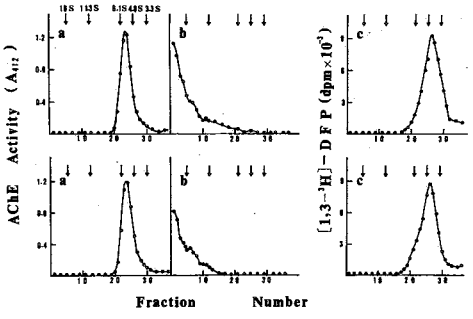


図2. 精製AChEの庶糖密度勾配遠心。
上段，N.j.; 下段，T.c. 10mM ナトリウムリン酸緩衝液 pH7.2，1M NaCl および0.1%(W/V) Triton X-100を含む5-20%（W/V）の庶糖密度勾配にかけ 10^5 g で19h 遠心。a, Native AChE. b, Triton X-100の非存在下での沈降。c, [3H]-DFPで標識したAChEを1mMのジチオスレイトールで還元後，ヨード酢酸でアルキル化したもの。

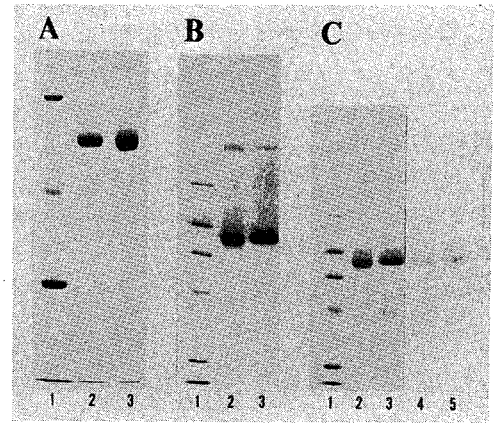


図3. 精製AChEの電気泳動とDFP標識
A, 2-メルカプトエタノール(ME)非存在下でのSDS電気泳動。B, ME存在下での泳動。C, [3H]-DFPによる標識。SDS電気泳動後のブロットのオートラジオグラフ。A, B, Cともに1:分子量マーカー。2: N.j. 3: T.c. 4, 5: 2, 3のオートラジオグラフ。

〔結果と考察〕

AChE の精製　すでに報告した様に[2,5]、*N.j.* では非対称型 AChE が多いのに対し、*T.c.* では界面活性剤可溶型 AChE が主である。*N.j.* の場合は、非対称型をなるべく除くため 2M $MgCl_2$ を含む溶液であらかじめ抽出した後に、Triton X-100 による抽出を行った。*N.j.*-601-Sepharose にかけた AChE の総活性のうち、83-93% がカラムに結合した。蛋白質を 280 nm で追うため、カラムの洗いおよび溶出には Triton X-100 に代えて Lubrol PX を用いた。図1にカラムからの溶出の例を示す。溶液Gによって、少量の蛋白質が溶出されるが、AChE活性はほとんど出てこない。pH 2.8（溶液H）によって、カラムに結合した AChE 活性の 80-93% が溶出された。3.5M NaSCN による溶出も試みたが、AChE が不可逆的に失活した。30g の *N.j.* および *T.c.* の電気器官から、それぞれ 0.50-0.63 mg、0.89-1.20 mg の精製 AChE が得られた。最終標品の比活性は *N.j.* と *T.c.* では大きな差はなかった。

精製 AChE の性質　両電気器官から精製した界面活性剤可溶型 AChE は、界面活性剤存在下での庶糖密度勾配遠心で単一の 6S ピークを与えた（図2a）。しかし、界面活性剤が存在しないと、図2bに示される様に多分散を示し、凝集していることがわかる。精製酵素をジチオスレイトールで還元した後、モノヨード酢酸でアルキル化したものは、6S より小さなピーク（4.4S）を与えた。また、精製酵素は非対称型 AChE とは異なり、コラーゲン様の尾を持たないため、コラゲナーゼ処理によって沈降定数は変化しない。

精製酵素標品は還元剤の非存在下で SDS 電気泳動を行うと、分子量約 130K のバンドのみを与えるが、還元された状態では、66K のバンドとごく少量の 130K のバンドを与える（図3A,B）。66K および 130K の成分とも DFP によって標識されるので、ともに触媒サブユニットである（図3C）。還元剤存在下での 130K のバンドは 66K の非還元性二量体である。上述の結果から、界面活性剤可溶型 AChE は分子量 66K の疎水性蛋白質が S-S 結合を介して二量体を形成したものである事が示される。

両電気器官から精製した酵素の 66K 成分は過ヨウ素酸－シッフ染色に陽性であるので、糖蛋白質である。中性糖はマンノースに換算して 6-7 モル% であった。それゆえ、精製酵素は重量にして 10% 以上の糖を持つ。グルコサミンも 3 モル% 程存在しており、AChE の糖鎖の少なくとも一部は、多くの糖蛋白質と同様に、グルコサミンを介してアスパラギン残基に結合しているものと思われる。*N.j.*, *T.c.* の酵素は互いによく似たアミノ酸組成を持ち、類似した一次構造を有しているものと考えられる。両精製酵素の等電点は用いた条件下でともに 5.1 であった。したがって、界面活性剤可溶型 AChE は均一の酸性な触媒サブユニットから成っている。

最近の研究によって、界面活性剤可溶型 AChE のかなりの部分が、電気器官の神経終末の形質膜上に存在する事が示唆されている。したがって、この型の AChE は基底膜に大部分存在する非対称型 AChE と異なった機能を果している可能性がある。本研究によって、この型の基本的性質は明らかになったが、今後更に詳しい研究が必要である。

〔文献〕 1) 阿部輝雄他(1982)神経化学 21, 392-374. 2) Abe, T. et al. (1983) Neurosci. Lett. 38, 61-66. 3) Lee, S.L. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, 12302-12309. 4) Massoulié, J. & Bon, S. (1982) Ann. Rev. Neurosci. 5, 57-106. 5) 酒井三千三他(1983) 神経化学 22, 213-215.

90 *mld* ミュータントマウスにおけるミエリン塩基性蛋白のモザイク発現について

御子柴克彦・岡野栄之・藤城正敏・高松　研（慶大・医・生理）
井上芳郎（北大・医・解剖）・塚田裕三（慶大・医・生理）

〔要　約〕

myelin deficient (mld) ミュータントマウスは、常染色体性劣性遺伝様式をとり、ミエリン形成不全を特徴としており企図振戦、痙攣、異動失調等 shiverer マウスと極めて類似した症状を呈する。最近、mld は shiverer マウスの allelic mutant であることが明らかにされている。mld マウスの中枢神経系のミエリン形成につき、ミエリン塩基性蛋白 (MBP) を中心に神経化学的解析を進め、以下の結果を得た。

1) MBPは、中枢神経系のいずれの部位においても著明な減少を示した。
2) MBP抗体を用いて、脊髄全ホモジェネート顆粒成分を電気泳動後 immunoblotting したところ、mld ではほとんど反応がみられなかった。
3) mld マウス大脳を細胞下分画法により各分画を得て、電気泳動的に解析したところミエリン分画 (P_{2A}分画) にほぼ特異に4本のMBP の蛋白バンドが著明な減少を示し、他の分画の蛋白パターンには有意な差がみられなかった。
4) 免疫組織化学では、mld の脳において、MBP のモザイク状発現が観察された。
5) mld では CNPase 活性は、shiverer 同様正常と有意な差を示さなかった。

Key words : myelin deficient(mld), allelic mutant, myelin basic protein(MBP)

はじめに：　ミエリン形成の過程は、ミエリン形成細胞がニューロンの軸索を認識する細胞認識の過程と、ミエリン構成成分が集合して密な膜を形成する分子集合の過程からなることが知られている。近年このミエリン形成の過程に障害を伴う突然変異マウスが数多く報告され、これまでに報告されてきた jimpy, quaking, twitcher, shiverer, mld, msd などはそのミエリン形成の障害をおこす機序が各々異なることが知られている (1-8)。我々は既に、shiverer に於てはミエリン塩基性蛋白 (MBP) の欠損を伴うことを明らかにしてきた。又、shiverer に於て MBP 遺伝子の欠失変異があることが知られている[9]。shiverer は、mld と同座性を示すため shi^{mld} とも記されている[10]。そこで今回は、mld につき、shiverer と比較検討を加えながら解析を進め、ミエリン塩基性蛋白の発現機構に関し、若干の知見を得たので報告する。

材料および方法：　動物 mld は当研究室に於て飼育繁殖したものを使用した。mld は常染色体劣性遺伝様式をとり、通常 mld/+ あるいは mld/mld の雄と mld/+ の雌の交配により得られた mld/mld を用いた。形態学的観察；10% フォルマリン緩衝液 (pH 7.4) にて灌流固定後、神経組織を摘出し、更に同溶液にて数日間固定し、パラフィン包埋後、5 μm 切片を作製した。免疫組織化学は、Sternberger らの PAP法[11]を用いた。電子顕微鏡所見に関しては、4% パラホルムアルデヒド、0.5% グルタールアルデヒドを含む Millonig 緩衝液を用いて灌流し、オスミウム固定したものについて得た。

CNPase 活性：Tsukada らの方法[12]に従い高速液体クロマトグラフィーにより測定を行なった。細胞下分画法：小脳を除いた新鮮脳組織を出発材料として、既報の方法[6]で分画を行なった。電気泳動：Laemmli の方法[13]に従った。

結果及び考案：

大脳外套部、脳幹部、小脳、脊髄の各部位のホモジェネートの105000×g 遠心沈渣と視神経のホモジェネートをSDSポリアクリルアミドゲル（10%～20% linear gradient）電気泳動法により解析したところ、いずれの分画においても、ミエリン塩基性蛋白に相当するバンドがほぼ欠損に近い状態であった。しかし、MBPの分子量がmldにおいて変化している可能性も考えられるのでMBP抗体による immunoblotting を行なった。野生型マウス(+/+)とmldホモ接合体(mld/mld)の脊髄全ホモジェネートの顆粒分画を用いて、電気泳動後、nitrocellulose membrane filter に移し、MBP抗体を用いて反応を行った結果、MBPが特異的に減少していることが明らかとなった。次に大脳を分画し、各分画につき電気泳動により観察したところ、P_{2A}分画に著明なMBPの減少が観察され、P_{2B}, P_{2C}, P_3分画の蛋白パターンには有意な差が見られなかった。shiverer では、MBPの欠損とともに、PLP (proteolipid protein) の減少もみられた[3]が、mld においても同様にPLPの含量は減少していた。

ミエリン塩基性蛋白の抗体を用いて+/+, mld/mld の両マウスの神経系パラフィン切片を用いてPAP法により反応を調べたところ、mld/mld では、部分的に完全にミエリン塩基性蛋白陽性のミエリンと、全く反応のみられないミエリンと、わずかにミエリン塩基性蛋白の反応がみられるものとがモザイク状に観察された（図3）。この点全く陽性反応がみられないシバラーマウス（shi/shi）とはミエリン塩基性蛋白の遺伝子発現という見地からみると根本的に異なる点である。shiverer の中枢神経系のミエリンでは、オリゴデンドロサイトの内膜が融合して形成される major dense line が欠除していることからもミエリン塩基性蛋白が major dense line を構成していると考えられている[4,14,15]。そこで mld/mld の中枢神経のミエリンを電子顕微鏡により観察したところ、一つのミエリンに major dense line のある部位と無い部位とが観察され、また、全く major dense line のみられないミエリン更に正常タイプのミエリンも観察された（図4）。このように免疫組織化学的にも電顕レベルでもmldでは、ミエリン塩基性蛋白の遺伝子は存在しているが、その発現機構に障害があるため部分的な発現に

Fig. 1. Protein profiles of the subcellular fractions of the brain from the mld (M) and the control (C) mice. Arrows (▶) indicate the MBPs, and double arros (▶▶) indicates PLP. MBPs are almost missing the PLP is decreased in the mld mutant mice.

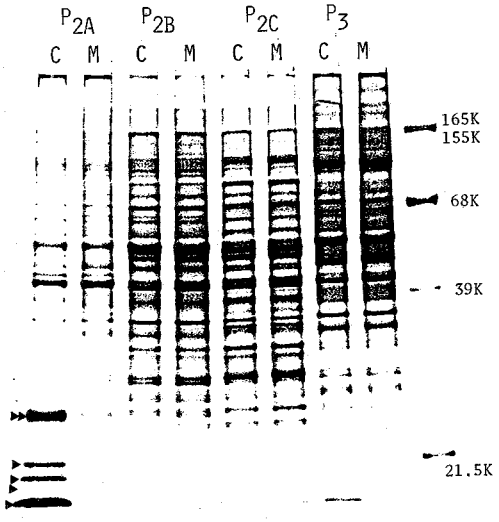


Table 1. CNPase activities of various parts of the central nervous system from the mld (mld/mld) and the control (+/+) mice.

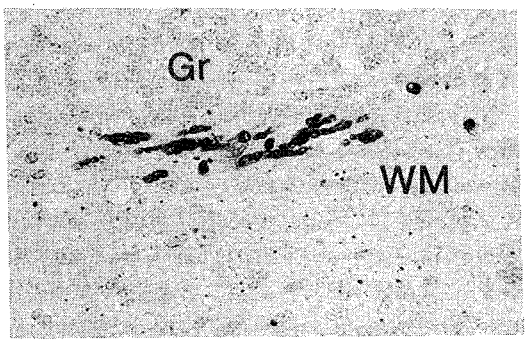
	mld/mld	+/+
Pallium cerebri	2.01 ± 1.63	2.23 ± 1.21
Brain Stem	4.13 ± 2.02	4.58 ± 2.31
Cerebellum	2.88 ± 1.51	3.32 ± 1.82
Spinal Cord	7.82 ± 1.88	7.68 ± 2.52

CNPase activity (μmoles 2',AMP formed/min/mg protein)



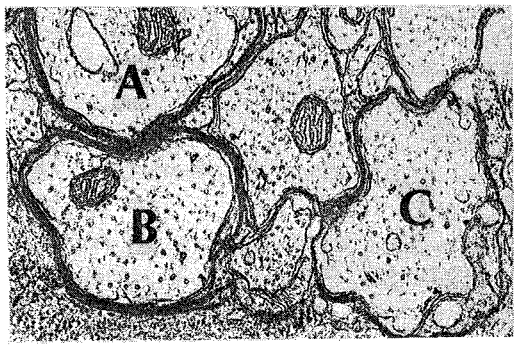
Fig. 2. Immunoblott hybridization of the particulate fraction of total homogenates of the spinal cord from the mld (M) and the control (C) mutant mice. MBP bands are clearly positive in the control but the reaction is very weak in the mld.

Fig. 3. Mosaic expression of myelin basic protein in the central nervous system of the mld mutant mice. Gr: granular layer, WM: white matter. Some of the myelins are MBP positive.



とどまっていることが示された。そしてCNPaseはミエリン形成と強い相関を示し、ミエリン形成障害ミュータントのjimpy, quaking, twitcherで、いずれも著明な活性低下がみられるが[1,2,16]、shiverevでは、低値を示さなかった[3-4]。すなわちミエリン形成障害があるにも拘らずCNPase活性は正常値である唯一の例外であると考えられていた[3,4]が、mldも同様にミエリン形成障害にもかかわらず、CNPase活性が正常であった。mldはshiverer同様に突然変異による障害は、MBPに限定されており、CNPaseはintactであるものと考えられる。MBP陽性でMajor dense lineのある正常なミエリンが電顕的にも免疫組織化学的にもモザイク状の発現であっても存在していたことから、mldはshivererとは違って、MBP遺伝子そのものは存在してその遺伝子の発現機構に障害があるものと考えられた。

Fig. 4. Presence of three types of myelin in the CNS of mld mutant mice. A: normal type compact myelin with major dense line. B: mixed-type myelin. Within the same myelin major dense line is observed and no major dense line in other part of the myelin. C: shiverer-type myelin whith no major dense line.



文献:

1. Mikoshiba, K. et al. J. Neurochem. in press
2. Mikoshiba, K. et al. Brain Res. (1979) 177 287-299
3. Mikoshiba, K. et al. Brain Res. (1980) 192 195-204
4. Mikoshiba, K. et al. J. Neurochem. (1980) 35 465-470
5. Mikoshiba, K. et al. Brain Res. (1981) 204 455-460
6. Mikoshiba, K. et al. Develop. Brain Res. (1983) 7 71-79
7. Mikoshiba, K. et al. Nature (1982) 299 357-359
8. Mikoshiba, K. et al. Develop. Brain Res. (1984) in press
9. Kimura, M. et al. J. Neurochem. (1984) in press
10. Lachapelle, F. et al. in "Neurological Mutations affecting Myelination" Elsevier, (1980) 27-32
11. Sternberger, L.A. et al. J. Histochem. Cytochem. (1970) 18 315-333
12. Tsukada, Y. et al. J. Neurochem. (1980) 34 1019-1022
13. Laemmli, U.K. Nature (1970) 227 680-685
14. Inoue, Y. et al. Brain Res. (1981) 219 85-94
15. Inoue, Y. et al. Anat. Embryol. (1983) 168 159-171
16. 御子柴克彦ら. 神経化学 (1983) 22 48-50

91 myelin deficient (*mld*) マウスにおけるMBP遺伝子とその転写の解析

岡野栄之・御子柴克彦・宮脇敦史・塚田裕三
（慶大・医・生理）

〔要　約〕

myelin-deficient（以下 mld と略す）は、中枢神経系においてミエリン形成不全を示すミュータントマウスである。その原因はミエリン塩基性蛋白 MBP の著しい減少にあると考えられるが、その遺伝子発現レベルでのメカニズムは不明である。そこで我々は、MBP の c-DNA[4),5),6)] を probe として mld の RNA-blot 解析、染色体 DNA の Southern-blot 解析を行い、以下のことを明らかにした。

① RNA の dot-hybridization 及び Northern-blot 解析の結果、mld では野生型に比べ MBP RNA に著しい減少（1/20 以下）が認められた。

② mld の染色体 DNA は Southern-blot 解析の結果、banding pattern に野生型のものと有意な差が認められなかった。

以上のことは、我々の mld における蛋白の解析と合わせて考えると、mld の MBP 減少が MBP 遺伝子の転写の障害に基づく可能性を示唆するものと考えられた。

Key words： myelin-deficient(mld),MBP-gene,transcription.

形態形成の一つであるミエリン形成の過程は、強く遺伝的規制をうけていると考えられている[14)]。従って、ミエリン形成障害を伴う突然変異マウスを分子生物学的に解析することは、重要であると考えられる。我々は手始めにミエリン形成不全マウスと正常の野生型マウスにおける MBP 遺伝子構造とその発現に関して解析を進め、以下の知見を得た。

〔実験材料及び方法〕

実験動物

突然変異マウスの quaking(qk/qk),jimpy(jp/Y),shiverer (shi/shi),mld(mld/mld) 及び対照としての jimpy litter mate(X/Y),Balb/c(+/+),C57BL(+/+)はすべて当研究室において飼育繁殖したものを使用した。

RNA及びDNA の抽出

脳の全RNA は、生後16日から17日にかけての野生型(Balb/c) マウス及び mld より、vanadyl-ribonucleoside-complex 存在下[1)]で SDS-phenol粉末法により抽出した。染色体DNA は実験動物の項に記してあるすべてのマウスの肝より Blin&Stafford の方法[2)]により抽出した。

Southern-blot 解析[16)]

各種マウスより得られた染色体 DNA 10 μg を制限酵素 PstI 切断後、0.7% Agarose 電気泳動を行った。常法に従いニトロセルロース filter(BA85,Schleicher & Schüll) へ transfer 後、ラベル化した probe と hybridize させ、Kodak XRP-5 フィルムに増感スクリーン (Cronex Lightning Plus) とともに4日間露光した。

Northern Blotting and RNA dot hybridization[17)]

Thomas の方法に従った。glyoxal 及び DMSO で変性した RNA を電気泳動的に分離し、ニトロースfilter にtransfer した。又、種々の濃度のRNA をニトロセルロースfilter に spot した。ラベル化したprobe と RNA を hybridize させた後、増感スクリーン存在下で60時間露光した。

C-DNA probe の構造・ラベル化

pMBP-2[5),6)] (Fig-1) は、1.9 Kb の挿入部分をもち、381 bp にわたる small MBP (MW 14K) の全 coding 領域を含むものである。1.9Kb 挿入部分の1.2 Kb 及び0.6 Kb の PstI fragment を電気泳動的に分離精製した。精製した DNA fragment は、^{32}P-α-dCTP (Amersham:3000Ci/m mol) を用いて、Nick translation kit (Amersham) によりラベル化し、比活性が 5×10^{7} へ 2×10^{8} cpm/μg の probe DNA が得られた。

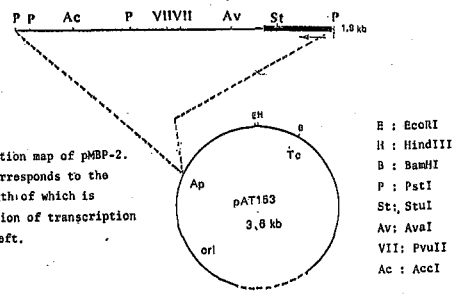


Fig-1 Restriction map of pMBP-2. The thick line corresponds to the coding region, length of which is 381 bp. The direction of transcription is from right to left.

〔結果及び考察〕

中枢神経系のミエリン形成障害を示す突然変異マウスとして mld, shiverer, quaking, jimpy が報告されているが、shiverer では MBP の構造遺伝子に欠失変異[5),6),15)]があり、MBP の合成障害がミエリン形成不全の主たる原因と考えられる。quaking では MBP は合成されるが、ミエリン膜に組み込まれないという assembly defect が示されている[3)]。

さて今回解析した mld では、①オリゴデンドロサイトが存在するにもかかわらず、MBP によって構成される major dense line が大部分欠損している[13)]。②ミエリン分画の蛋白の中で MBP のみが著しい減少を示し、PLP は軽度の減少、相対的な増加を示す蛋白もある。③ CNPase 活性は正常である。④組織学的に脱髄像がほとんど見られない。これらのことは、mld における MBP の減少が脱髄による二次的なものではないことを示している。以上の mld の所見[13)]は shiverer と酷似するものであり、他のミエリン形成障害ミュータント[8)~12)]にはみられないことである。さらに、mld と shiverer は allelic なミュータントである[17)]ということからも mld における MBP の著しい減少がミエリン形成不全の主たる原因であることが示唆された。そこで我々は、mld における MBP の遺伝子の構造及びその発現の解析を行った。

① RNA dot blot 解析の結果、mld において、MBP RNA が wild type の5% 以下に減少していることが、

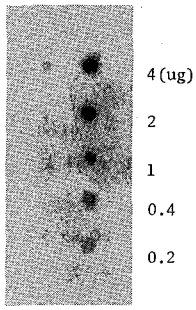


Fig-2 Estimation of MBP RNA by dot blot analysis with a pMBP-2 cDNA probe.

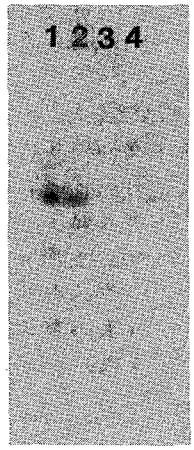
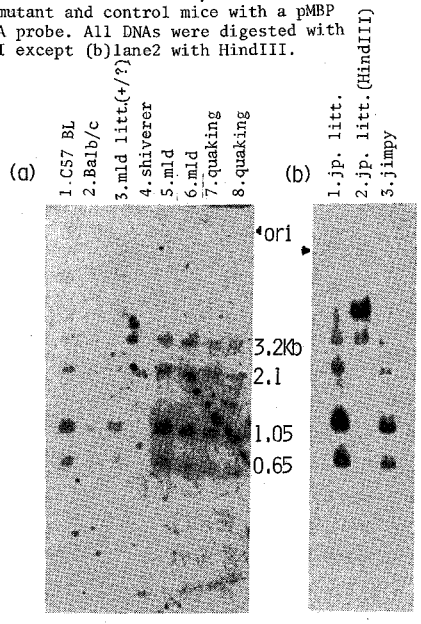


Fig-3 Northern blot analysis of total RNA from the brain with a pMBP-2 cDNA probe. Lanel,10 μg of Balb/C RNA; lane2 20 μg of Balb/C RNA; lane3,10 μg of mld RNA; lane4,20 μg of mld RNA.

認められた。又Northern blot 解析により wild type 及び mld において約2300 nucleotidesのRNAが検出された。しかしmld では、このRNA が著しく減少していることが確認された。これは、mldにおいてSDS 電気泳動法により そして免疫組織化学的に認められるミエリン塩基性蛋白の減少[13]と矛盾しないものである。

Fig-4 Southern blot analysis of DNAs of mutant and control mice with a pMBP cDNA probe. All DNAs were digested with PstI except (b)lane2 with HindIII.



② 次に、染色体 DNA Southern blot 解析の結果をFig-4 に示す。PstI により切断した染色体DNA断片の場合、mld においても野生型マウスと同様に4本のバンド(3.2, 2.1, 1.05, 0.65 Kb)が検出された。又、jimpy, quaking においても、同様の結果を得た。shiverer においては、mld とは異なる banding pattern を示している。このことは、mld においては MBP 遺伝子のcDNA と対応する部分に、野生型との間に大きな差がないことを示している。mld は shiverer と、allelic な mutant であり、phenotypic にも酷似し、MBP の RNA が著しく減少している[6,15]という共通点を持ちながらも、MBP の遺伝子の構造は異なるという興味深い結果を得た。今後このMBP RNA の減少の機構に関して解析して行きたい。

〔謝辞〕

御助言、御協力をいただいた宮蔵、猪子、勝木、木村(慶大・医、分子生物学)の諸先生方に感謝いたします。

〔文献〕

1) Berger et al. (1979) Biochemistry 18 5143-5149
2) Blin and Stafford (1976) Nucl.Acids.Res. 3 2303-2308
3) Campagnoni et al. (1984) J.Neurochemistry 42 733-739
4) 木村繁ら. 第6回 日本分子生物学会年会講演要旨集 P.102
5) Kimura et al. (1984) J.Neurochemistryin press
6) Kimura et al. (1984) Nucl.Acids.Res. submitted
7) Lachapelle et al. (1980) Inserm symp. 14 27-32
8) Mikoshiba et al.(1979) Brain Res. 177 287-299
9) Mikoshiba et al.(1980) Brain Res. 192 195-204
10) Mikoshiba et al.(1980) J.Neurochemistry 35(2) 465-470
11) Mikoshiba et al.(1981) Brain Res. 204 455-460
12) Mikoshiba et al.(1984) J.Neurochemistry in press
13) 御子柴克彦ら 神経化学 Vol.23 投稿中
14) Nagaike et al.(1982) Genet. Appr. Neurobiol.247-268
15) Roach et al. (1983) Cell 34 799-806
16) Southern (1975) J.Mol.Biol. 98 503-517
17) Thomas (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77 5201-5206

92 網膜に特異的なcDNAのクローニング — PCR18の解析 —

中川勇三・郭　哲輝・三木直正
（金沢大・がん研・薬理）

〔要　約〕

完全長の網膜に特異的なcDNAクローンを得る目的で、Okayama-Berg法による牛網膜cDNAライブラリーからスクリーニングを行なった。

1）網膜に特異的なcDNA（pCR17）クローンをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行なった結果、約12000個のトランスフォーマントの約1%のクローンがハイブリダイズした。次にそれらのクローンを再スクリーニングし、最終的に22個のクローンを得た。そのうち、1個のクローン（pCR18）のみ約1000塩基対の長さで、残りは400～600塩基対であった。2）pCR18クローンの制限酵素地図は、pCR307やpCR17とは異なるものであった。3）RNAブロットハイブリダイゼーションにおいて、pCR18クローンは、牛網膜とのみハイブリダイズし、脳と肝は反応しなかった。4）pCR18クローンのmRNAのサイズは、約13S（1100塩基）であった。

以上の結果より、得られたpCR18クローンは、ほぼ完全長の網膜組織に特異的なcDNAであることが明らかとなり、現在、その塩基配列を決定中である。

Key words：　Molecular cloning,　Retina specific cDNA,　Neural retina

神経系において、シナプスでの情報伝達の多様性や個々の神経細胞の特性化に特異的に関与するタンパク質やペプタイドホルモンなどの一部は単離・同定され、機能およびその受容体が明らかにされているが[1)2)3)]、まだ多くの未知物質の存在が考えられる。我々は中枢神経組織の一つである網膜に着目し、その網膜に特異的に発現される未知タンパク質を解明する目的で、その網膜組織に特異的なcDNAのクローニングの試みをすでに報告した[4)]。しかし、得られたcDNAクローンの長さが短かく解析が困難であるため、今回は、完全長のcDNAを得る目的でOkayama-Berg法によるcDNAライブラリーから新らたにクローニングを行なった。その結果、ほぼ完全長の網膜に特異的な一つのcDNA（pCR18）クローンが得られたので報告する。

〔実験方法〕

RNAの調製：牛の網膜や脳または肝などの組織は、グアニジンチオシアネート法によって全RNAを抽出し、オリゴ（dT）セルロースカラムクロマトグラフィーによってpoly(A)$^+$RNAを得た。　cDNAライブラリーの調製：牛網膜cDNAライブラリーは、プラスミドpBR322を用いたOkayama-Berg法[5)]に従って調製した。poly(A)$^+$RNAから逆転写酵素でscDNA合成を行ない、ターミナルトランスフェラーゼでのdC鎖の付加，HindⅢによる切断後、dG鎖リンカー存在下でDNAリガーゼを働かせ環状化し、最終的にRNAをDNAに置換することによって得た。このリコンビナントプラスミドをカルシウムショック法によって、大腸菌（HB101）をトランスフォームした。以上の操作で得られた菌を50倍容の培養液中で振とう培養し、アンピシリン（100μg/ml）を加えさらに一昼夜培養を行なったものをcDNAライブラ

リーとした。 プラスミドの単離：最初の制限酵素による分析に用いるプラスミドは、10ml培養液から boiling 法によって得た。また大容量のプラスミドDNAはリゾチーム・トライトンX-100溶菌法によって単離したのち、塩化セシウム平衡密度勾配遠心により閉環状DNAを単離した。 [32P]標識DNAプローブの調製：DNAフラグメントを低融点アガロースゲルから回収し、得られたDNAを[32P]αCTPを用いてニックトランスレートした。 コロニーハイブリダイゼーション：ニトロセルロースフィルター上にコロニーを形成させ、次にクロラムフェニコールを含んだプレート上でプラスミドの増幅を行なった後、フィルター上にプラスミドDNAを固定し、そのフィルターと標識DNAとをハイブリダイズさせ、オートラジオグラフィーによってポジティヴなコロニーを同定した。 RNAブロットハイブリダイゼーション：牛網膜，脳および肝から抽出したpoly(A)⁺RNAを1%アガロースゲル電気泳動にかけたのち、ニトロセルロースフィルターにブロットした。8時間のプレインキュベーション後、[32P]標識DNAフラグメントと17時間ハイブリッド形成させた。フィルター上のDNA-RNAハイブリッドを−70°C，5日間のオートラジオグラフィーで検出した。 制限酵素地図：種々の制限酵素処理したプラスミドを、1～1.5%アガロースゲル電気泳動を行なって決定した。

〔実験結果〕

Okayama-Berg法による牛網膜cDNAライブラリー約4,000個のコロニーから、pcR307のPst Iフラグメントをプローブとしてスクリーニングを行なった。ここで得られたpcR17クローンの制限酵素地図は、pcR307と同様の、Bam HI，Bgl II，EcoR I，Hinc II，Sal I切断部位が存在した。しかし、cDNAの長さは約600bpで、3'側にのみ約120bp延長したものにすぎなかった。

次に、pcR17のHinc II - Pvu IIフラグメントをプローブとして用い、新らたに牛網膜cDNAライブラリーの約12,000個のトランスフォーマントのなかからスクリーニングを行なった。（図1）

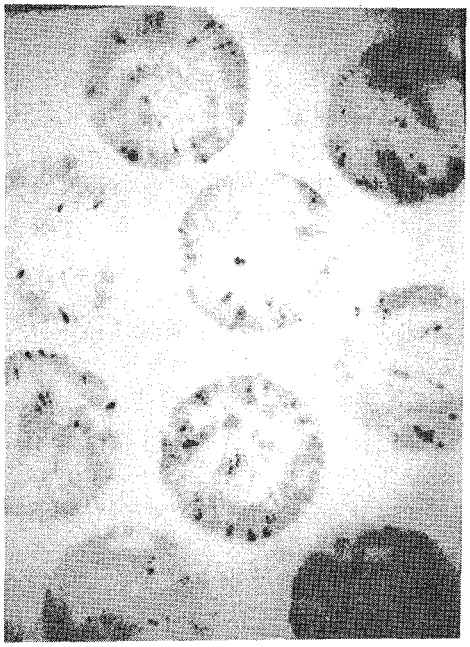


図1. コロニーハイブリダイゼーション

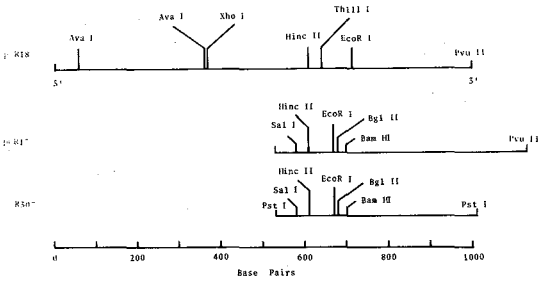


図2. 制限酵素地図

その結果、約1%(132個)のコロニーがハイブリダイズした。そのうち30個のコロニーを再スクリーニングにかけ、最終的に22個の単一コロニーを得た。これらのクローンからリコンビナントプラスミドを単離し、インサートの長さを調べた。一個のクローン(pCR18)のみ約1000 bpのインサートを有するもので、残りは、約400～600 bpの長さであった。

次に、制限酵素地図を作成した。図2に示す通り、pCR18クローンは、EcoRI, TthIII I, HincII, XhoI, と2つのAvaIの切断部位が認められ、pCR17とは異なる地図を示した。

そこで、pCR18クローンが網膜組織に特異的であることを確認するために、RNAブロットハイブリダイゼーションを行なった。その結果は図3に示す通り、pCR18は牛網膜のpoly(A)$^+$RNAとハイブリダイズしたが、脳や肝のpoly(A)$^+$RNAとはハイブリダイズしなかった。また、同一泳動条件下でのサイズマーカーのプロットから求められた標準曲線から、RNAのターゲットサイズを求めたところ、図4に示す様に、約13S(1100塩基)であった。

以上のことから、pCR18は、ほぼ完全長の網膜組織に特異的なcDNAクローンであることが明らかとなった。

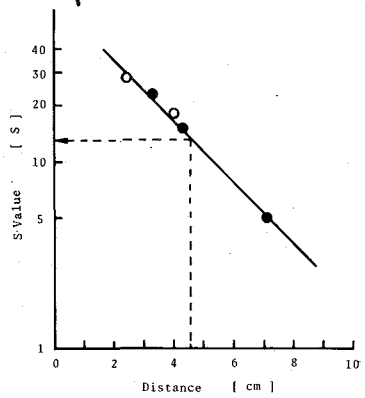


図4. m-RNAのサイズの決定
—•— 大腸菌RNA (23S, 15S, 5S)
—○— 牛網膜RNA (28S, 18S)

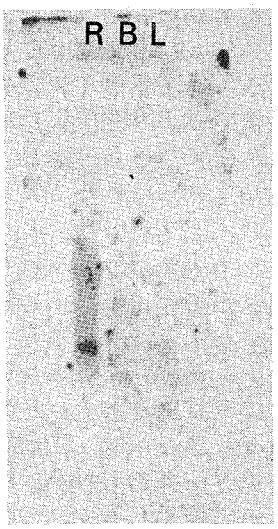


図3. RNAブロットハイブリダイゼーション
R: 牛網膜
B: 牛脳
L: 牛肝臓
5 μg の poly(A)$^+$ RNA を用いた。

〔考察〕

プローブにしたクローンと異なる制限酵素地図を有するクローンをピックアップした例は、チトクローム P-450 のcDNAのクローニングでも認められており、[6] pCR17とpCR18は、おそらく非常にホモロジーがあるDNAファミリーである可能性が考えられる。現在、得られたpCR18クローンのMaxam-Gilbert法によるDNA塩基配列の決定を行なっている。

〔文献〕

1) Watson,J.D.et al.(1983)Cold spring harbor symposia on quantitative biology,48, 1
2) Higashida,H., Nakagawa,Y. and Miki,N.(1984) Brain Res., 295, 113-119
3) Nakagawa,Y., Higashida,H. and Miki,N.(1984) J. Neurosci., 4, 1653-1661
4) 郭哲輝, 三木直正 (1983) 神経化学 22, 321-323
5) Okayama.H. and Berg,P.(1982) Mol. Cell. Biol., 2, 161-170
6) Yabusaki,Y.et al.(1984) Nucleic Acids Res., 12, 2929-2938

93 電位依存性カルシウムチャンネルに対するキナクリンの阻害機構

太田　章・尾上浩隆・馬場明道・岩田平太郎
（阪大・薬・薬理）

電位依存性カルシウムチャンネルに対する quinacrine（QC）の阻害機構について明らかにする目的で、シナプトゾームを脱分極した時の phospholipase A_2（PLA_2）活性に対するQCの効果と、QCの誘導体 quinacrine mustard（QCM）を用いてQCの作用しうる蛋白について検討した。シナプトゾームの PLA_2 活性を、内因性のリン脂質が分解して生じるリゾリン脂質を [^{3}H]-arachidonate でラベルする方法で測定したとき、veratridine（Ver.）による脱分極により活性化される PLA_2 活性がみとめられた。シナプトゾームを Ver. で脱分極することにより、lysophosphatidylethanolamine の生成がみとめられ、60秒で最大を示したが、高濃度のカリウム（High K^+）による脱分極によっては lysoPE の生成はみられず、また他のリゾリン脂質の生成の増大は High K^+, Ver. いずれの脱分極刺激によってもみとめられなかった。電位依存性カルシウムチャンネルを抑制した 30μM QCは、この lysoPE の生成の増大を抑制しなかった。一方、QCMは QC と同様電位依存性カルシウムチャンネルを阻害したが、QCMの阻害は不可逆的であった。そこでQCMで処置したシナプス膜をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分析したところ、分子量 37,000 と 32,000 の蛋白が特異的に標識されることをみとめた。

Key words : quinacrine, phospholipase A_2, affinity labeling.

抗マラリア薬として開発されたQCが PLA_2 阻害作用を有していることから、QCを用いることにより細胞の刺激応答における PLA_2 の役割について明らかにする試みが行なわれてきた（2,5,8,9）。我々も同様な目的でQCを用い、シナプトゾームからの ACh の遊離をQCが抑制すること、この抑制が電位依存性カルシウムチャンネルをQCが阻害することによるものであることを明らかにしている(1)。そこでQCの電位依存性カルシウムチャンネルの阻害作用がQCの PLA_2 阻害作用と関連があるか否かについて明らかにするため、シナプトゾームを脱分極したときの PLA_2 活性に対するQCの効果について検討した。一方これまでにQCの作用している蛋白について明らかにする目的で、QCの誘導体QCMをアフィニティーラベル試薬として用い検討がなされている（3,6）。そこでQCの電位依存性カルシウムチャンネルの阻害作用に関してQCMを用い、その作用点について検討した。

≪方　法≫

シナプトゾームおよびシナプス膜はラット大脳皮質よりショ糖不連続密度勾配法により調製し(7)、Krebs-Ringer HEPES buffer(KR)(1)にて suspend し fatty acid free BSA にて洗浄し反応を行なった。

図　1

Preparation of 2-[^{14}C]-linoleoyl-phospholipid

[^{14}C]-Linoleic acid (55 mCi/mol)	10 μCi
Linoleic acid	2 μmol
Lysophospholipid	8 μmol
ATP	20 μmol
Coenzyme A	0.5 μmol
$MgCl_2$	10 μmol
Sodium phosphate buffer (pH 7.4)	20 μmol
Rat liver microsomal fraction	2.4 mg protein
↓ Total volume	5 ml

↓
Incubation was carried out for 3 hr at 37°C.
↓
The mixture was extracted with chloroform/methanol.
The extracted phospholipid was separated by preparative TLC on a silica gel plate.
↓
The radiolabeled phospholipid was eluted from the plate and used as the substrate for phospholipase A_2 assay.

2位に[^{14}C]-linoleateを有するリン脂質は図1のように合成し基質として用いた。基質の放射活性の96～98%は2位に存在していた。PLA$_2$の活性の測定 1)標識したリン脂質を超音波でミセルとし、シナプトゾーム懸濁液に加えて反応し、遊離する放射活性を測定した。2)内因性のリン脂質より遊離する脂肪酸をガスクロマトグラフィーにて測定した。3)内因性のリン脂質より生じるリゾリン脂質をATPとCoAの存在下に、[^{3}H]-arachidonateでアシル化し生じるリン脂質の放射活性を測定した。QCMによるaffinity labeling シナプス膜を30μM QCMで5分間処置し、遠沈し洗浄後、SDS-PAGE(12.5%)(4)にて分析した。ゲルの蛍光強度は島津CS-900にて測定した。

≪結果と考察≫ シナプトゾームのPLA$_2$活性の測定とそれに対する脱分極の影響について検討した。1)の方法では、30秒のincubationにより phosphatidylethanolamine(PE)からの[^{14}C]-linoleateの遊離がみられたが、脱分極により遊離量に変化はみとめられなかった(図2)。Phosphatidylcholineを基質として用いた場合にもほぼ同様な結果が得られた。2)の方法では、図3に示すように各遊離脂肪酸の量に脱分極は影響しなかった(図3)。これら従来から用いられている方法では、脱分極により活性の変化するPLA$_2$活性はみとめられなかった。3)の方法を

図 2

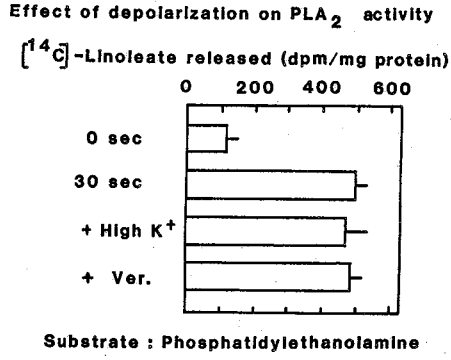


図 3

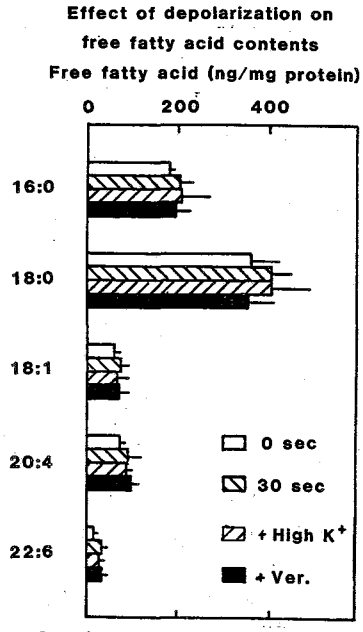


図 4

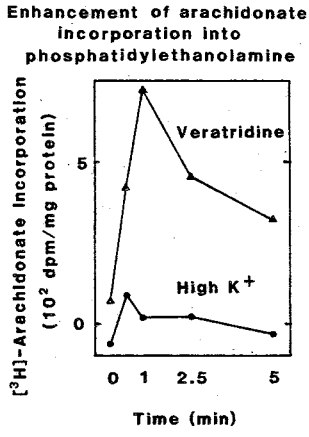


図 5

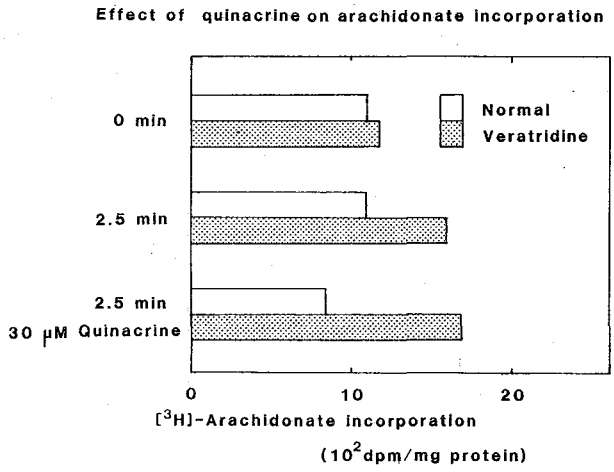
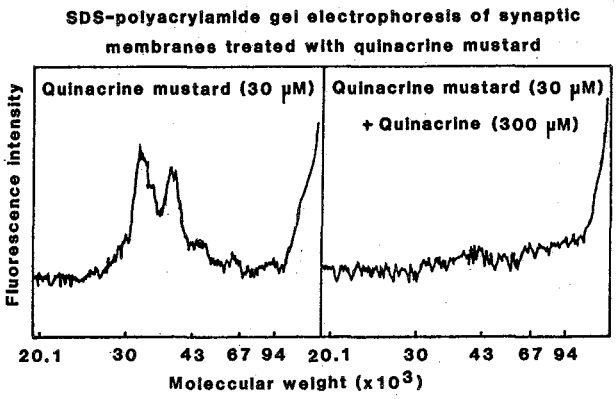


図 6



用いたところ、lysoPE の生成を示す PE への [³H] arachidonate incorporation が Ver. により増加した(図4)。しかし High K⁺ では Ver. のような変化はみられなかった。また phosphatidyl choline, phosphatidyl inositol への [³H] arachidonate incorporation は High K⁺, Ver. いずれによっても変化しなかった。この Ver. による PE への [³H]-arachidonate incorporation の増加は、電位依存性カルシウムチャンネルを抑制した 30μM QC により変化しなかった (図5)。またシナプス膜の PLA_2 活性も 30μM QC により変化しなかった (data not shown)。これらの結果は Ver. による脱分極により lysoPE が特異的に増加すること、つまり PE に特異的な PLA_2 が Ver. により活性化されることを示している。さらに QC の電位依存性カルシウムチャンネル阻害作用が QC の PLA_2 阻害作用とは関連がないことが明確となった。

次に、QCM を用いて QC の作用点の検討を行なった。QCM は QC と同様に電位依存性カルシウムチャンネルを阻害したが、KR で洗浄した後 QC の阻害作用が 60% 消失するのに対し、QCM の阻害作用は変化しなかった (data not shown)。このことは、QCM が QC と同様の作用点で電位依存性カルシウムチャンネルを阻害し、その作用点に QCM が不可逆的に結合していることを示している。そこで QCM で処置したシナプス膜を SDS-PAGE で分析したところ、分子量 37000, 32000 の位置に QCM の蛍光のピークがみられた(図6左)。この蛍光のピークは trypsin, chymotrypsin で処置することにより消失し、また QCM で処置するときに 10 倍量の QC を共存させることにより消失した(図6右)。このことから QCM でラベルされた分子量 37000, 32000 の蛋白が QC の作用部位であると考えられる。しかしこのラベリングが calcium channel blocker によって影響されなかったことから、QCM ひいては QC が calcium channel blocker とは異なった作用点を有していると思われる。QCM でラベルされた蛋白は電位依存性カルシウムチャンネルの機能に密接に関連している蛋白であることが考えられる。

REFERENCES

1) Baba, A. et al. (1983) J. Neurochem. 40, 1758-1761. 2) Chan, A. C. (1982) Biochim. Biophys. Acta 713, 170-172. 3) Kaldany, R.-R. J. and Karlin, A. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6232-6242. 4) Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685. 5) Lapetina, E. G. et al. (1981) Nature 292, 367-368. 6) Lauffer. L. et al. (1979) Biochim. Biophys. Acta 587, 42-48. 7) Matsuda, T. and Cooper, J. R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5886-5889. 8) Naor, Z. and Catt, K. J. (1981) J. Biol. Chem. 256, 2226-2229. 9) Spies, C. et al. (1980) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311, 71-77.

94 ジャコウネズミの加令に伴うシナプトソームのカルシウムとりこみの消長

山口知子　（東女医大・生化）
山口　仁　（昭和大・医・神経科）

〔要　約〕

ジャコウネズミ(Suncus Murinus)は、霊長類に近縁関係をもつ最も原始的な哺乳類であり、かつ大脳では特殊化の著しい霊長目以外の実験動物に較べて、この食虫目とより近縁関係が求められ、中枢神経系の実験動物として興味がもたれる。Fisherラットに対比を求めて、Suncusのコリン作動性シナプトソームの加令による神経化学的変化を、シナプトソームによるカルシウムの消長を調べたところ、14ヶ月令では、カルシウムのとりこみは低下し、モジュレーターとしてラットのシナプトソームによるカルシウムのとりこみを賦活することが知られている3,4-ジアミノピリジンが加令による機能低下を賦活することがSuncusでも認められた。カルモジュリン拮抗薬としてのフェノケアジン薬剤としてクロルプロマジンはシナプトソームによるカルシウムのとりこみを阻害し、その阻害効果はTRHの添加によって打ち消された。これら神経系のモジュレーターのコリン作動性シナプトソームに対する一つの薬理効果の実験系として、カルシウムのとりこみ実験の有効性が示唆される。タンパクの加令による変化はSDS-PAGEをスラブゲルからニトロセルロース膜にブロットし、ニューロンおよびグリアマーカーのNSE-Enolaseおよび S-100の抗体を用いてペルオキシダーゼ酵素抗体染色法で実施した。

Key words : Calcium Uptake, Synaptosomes, Aging, 3,4-Diaminopyridine, Suncus Murinus.

加令に伴う神経系の変化は数多く報告されているが、特にコリン作動性シナプスをとりまくさまざまな変化が加令による個体の高次神経機能の低下をもたらせている[1]。シナプス伝達の機能はカルシウムのホメオスタシスの加令による変化が誘因となるとも考えられており、ラットの大脳皮質から調製したコリン作動性シナプトソームによるカルシウムのとりこみは加令と共に低下し、成熟脳の対照を6ヶ月令として比較すると、15ヶ月令，更に27ヶ月令では著しい低下が認められ、3,4-ジアミノピリジン(DAP)によって対照6ヶ月令に近いとりこみの賦活が，加令と共に顕著に認められるとの報告に基き[2]，近年実験動物としてさまざまな点で霊長類に近縁関係の知られてきているジャコウネズミ(Suncus Murinus)が，神経系における加令の変化を観察する実験動物としての有効性の検討に、シナプトソームによるカルシウムのとりこみの消長を検討した。

〔実験方法〕

Fischerラットおよびジャコウネズミ(Suncus)大脳皮質および皮質下全脳(Suncusの場合は小脳)からBoothら[3]の手法に準じて、生物活性の高いシナプトソームを短時間で調製し、タンパク量10-25mg/mlになるように等張液に懸濁し、その20μlをカルシウムとりこみのインキュベーションに用いた。インキュベーションmediumは2.3mM $^{45}CaCl_2$ (0.5μCi/vial) / Rinse buff，に50mM塩化コリン，5mMグルコースを加え，その0.8mlを酸素化し、50nMに調製したモジュレーターを0.2ml添加，37°Cでインキュベートした。とりこみの停止は7.5μMルテニウム・レッド，30mM EGTA (pH7.4) の100μlを加え、直ちに、ミリポアフィルター上でシナプトソームをRinse buff (pH7.4，141mM NaCl，1.3mM $MgSO_4$，10mM Na_2HPO_4，5mM KCl) で3ml 3回吸引洗浄後、フィルターをバイア

ルに移して、0.5ml プロトゾルを加え、シンチレーター 10ml を加えてとりこみを計測した。タンパクの定量は Lowry 法によって実施した。脳のホモジネート、及びシナプトソームのタンパクの分析は Laemmli 法に準じ、7.5-20%の直線勾配 SDS-PAGE スラブゲルによりタンパク量 50～150μg で実施した。同時に泳動した二枚のゲルのうち一枚は直ちに CBB でタンパクを染色し、一方はニトロセルロース膜に1～2晩ブロットし タンパク染色では識別出来ない特異タンパクの消長をペルオキシダーゼ酵素抗体染色法で実施した。抗体にはニューロン特異タンパクとして知られる γ-Enolase およびグリアマーカーとしての S-100 を用いた。

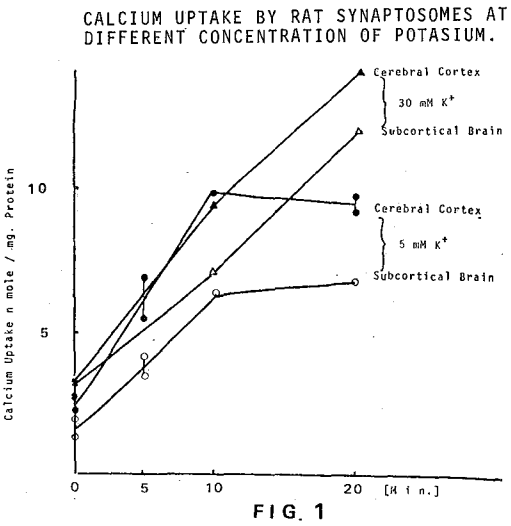


FIG. 1

[結果・考察]

シナプトソームによるカルシウムのとりこみを Fischer ラット 6ヶ月令の大脳(コリン作動性)と大脳皮質下全脳から調製したシナプトソームを用いて K^+の低濃度(5mM)と高濃度(30mM)で調べた Time course study が図-1に示されている。低カリウムでのとりこみは10分で飽和に達し以降そのレベルが維持されるが、生理的に脱分極の起こる高カリウム中では更にとりこみの増加が経続する。大脳皮質シナプトソームによるカルシウムのとりこみは、脳幹に皮質下から調製したシナプトソームより、とりこみの比活性が高い。Suncus の2ヶ月令、8ヶ月令 および14ヶ月令の大脳皮質から調製したシナプトソームによるカルシウムのとりこみを高カリウム medium 中で20分インキュベートして得た結果が I 表に示してある。加令によるとりこみの消長は8ヶ月令で高く、2ヶ月令ではまだ成熟脳のレベルに達していないことが分る一方 加令動物としては十分な月数に達していないとはいえ、14ヶ月令では8ヶ月令に比べて既に著しいカルシウムのとりこみの比活性が低下している。Fischer ラットで知られている加令によるとりこみの低下を賦活する 3,4-ジアミノピリジンをインキュベーション中に 10nM 加えると、とりこみの生理的盛んな時期にはむしろ阻害効果が認められるのに反し、14ヶ月令では最も旺盛な8ヶ月令のレベルには達しないものの、明らかにとりこみの上昇を認めた。フェノチアジン系薬物はカルモジュリン以外のカルシウム結合タンパクと作用し、カルシウムのとりこみを阻害するといわれている。[4] クロルプロマジン(CPZ)を添加してみたところ、対照の無添加のとりこみに較べて、10nM で阻害効

TABLE I

CALCIUM UPTAKE IN THE AGING SUNCUS SYNAPTOSOMES AND THE EFFECT OF SOME MODULATORS.

EFFECTOR 10 nM	2 M/O	8 M/O	14 M/O
	n moles/ mg protein.		
NONE	7.8±0.3	10.3±0.4	4.9±0.3
3,4-DAP	4.9±0.2	8.8±0.5	6.0±0.4
TRH	n.d.*	7.3±0.3	3.4±0.2
CPZ	n.d.*	7.1±0.4	4.0±0.3

n.d.*= not determined.

PROTEIN PROFILES IN AGING FISCHER RAT BRAIN BY SDS-PAGE.

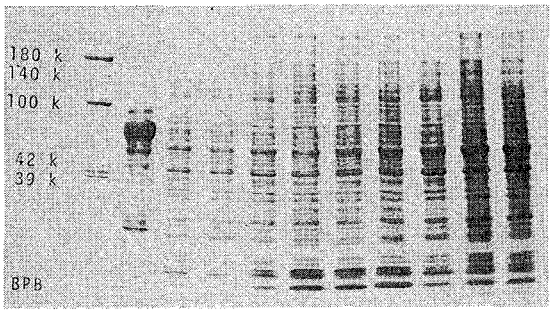


FIG. 2

PROTEIN PROFILES IN AGING SUNCUS MURINUS BRAIN BY SDS-PAGE.

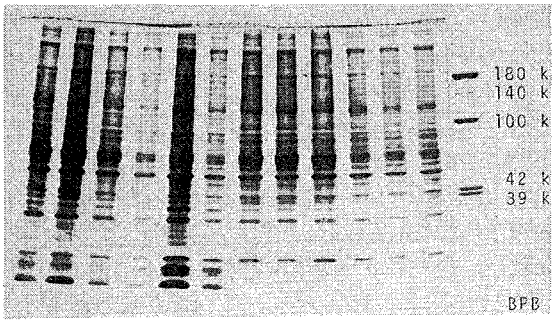


FIG. 3

が認められた。また神経系に さまざまな モジュレーター効果をもつTRHは種差で分布や効果が異り、Suncusではカルシウムの とりこみに関して、CPZと同程度の阻害効果が認められた。2図には大脳、小脳ホモジネートおよび大脳皮質より調製したシナプトソームのSDS-PAGEによるタンパクの分離像が示されている。Fischerラットの1ヶ月令 2ヶ月令および6ヶ月令は未だ加令に達していないがマーカーとしてRNA polymerase Bおよびヒト血漿の泳動像と共に示した。3図には同様に、Suncusのシナプトソームによるカルシウムのとりこみが加令において低下する事実から、既に加令に達していると思われる14ヶ月令を2ヶ月令と8ヶ月令で対比検討した。加令によって減少することが知られているカルモジュリン[5]始め、多くの機能の変化を捉る塩基性、酸性タンパクの消長があると思われる(加令と減少)が、それらの同定、定量には、タンパクを分画して詳細に検討する必要がある。加令によるニューロンの変性によって減少すると思われるNa-Enolaseおよびグリアマーカーの S-100 の抗体を用いて、SDS-PAGEで分離したタンパクをニトロセルロース膜にブロットし、ペルオキシダーゼ酵素抗体染色法を実施して、タンパク染色では同定比較不可能な微量の、しかも神経機能を直接反映すると思われるタンパクの同定を実施した。Suncusとfischerラットではシナプトソームのカルシウムとりこみに対するモジュレーター効果が異っており、ヒトとの位置付けに興味がもたれる。

[REFERENCES]
(1)Bartus,R.T.,Dean III,R.L.,Beer,B and Lippa,A.S.(1981) Science,217,408-417.
(2)Peterson,C. and Gibson,G.E.(1983) J.Bio.Chem. 258,11482-11486.
(3)Booth,R.F.G. and Clark,J.B.(1978) Biochem.J. 176,365-370.
(4)Marshak,D.R.,Watterson,D.M. and Van Eldick,L.J.(1981)Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 78,6793-6797.
(5)Severson,J.A. and Finch,C.E.(1981) Soc.Neurosci. Abstr. 11,186.

95 電位依存性カルシウムチャンネルによるカルシウム流入のアデノシンによる調節

黒田洋一郎（都神経研・生化）
吉井光信・角尾彰信・楢橋敏夫
（ノースウェスタン大・医・薬理）

〔要　約〕

1．ニューロブラストーマ細胞を吸引電極でwhole cell clampと，電位依存性のCaチャンネルを通るCa^{2+}（またはBa^{2+}）電流を記録した。
2．細胞外の灌流液にアデノシンアゴニストを加えると，これらのイオン電流は可逆的に完全に抑制された。
3．このとき，同じ細胞のNaチャンネルを通る電流は，ほとんど抑制を受けなかった。
4．アデノシン除去後，Caチャンネルを通るイオン電流は，コントロールよりもやや大きくなり，アデノシン処理時間をのばすと，この増大はより顕著になった。
5．アデノシンによるシナプス伝達の抑制は，シナプス前アデノシン受容体（ADO-1）による，脱分極に伴うカルシウム・イオン流入の抑制によるとの提唱が支持された。
6．アデノシン処理中に細胞内サイクリックAMPは増加しなかったので，アデノシン処理による促進が，サイクリックAMPを介したCa^{2+}流入の促進である可能性も強まった。

Key words：Ca channel, adenosine, presynaptic inhibition.

Ca^{2+}イオンの電位依存性Caチャンネルを介した流入は，神経伝達物質の遊離をはじめ，さまざまな重要な生理反応を引き起こす[1]。しかし，Caチャンネルの分子レベルの実体はいまだに不明のままである。Caチャンネルの研究には，その機能を測定することが重要であり，このためには電気生理学的方法を用いる必要がある。

近年，Nehrらによって開発されたパッチ・クランプ法によるSingle-channel recordingの技術は，1分子のイオン・チャンネルの開閉を“アッセイ”できるもので，チャンネル蛋白の分子レベルの研究に画期的な進歩をもたらしつつある。この技術を用いて，細胞全体を膜電位固定（いわゆるwhole cell clamp）を行い，その細胞全体に分布するチャンネルの開閉をアッセイすることも，薬物の投与の効果や，細胞全体の動きを観察するのに有用である。

濱着らは，モルモット脳のシナプス伝達をアデノシン類が抑制することを見出し[4]，その抑制が，高濃度のカルシウムで拮抗されることなどから，アデノシンは神経終末のCaチャンネルに作用し，脱分極によるCa^{2+}流入を抑制することにより，伝達物質の遊離量を減少させるものと考えた[2]。

今回は，アデノシンが本当に脱分極で開く，電位依存性Caチャンネルを抑制するかどうかを，ニューロブラストーマ細胞を使ったwhole cell clamp法によりCaチャンネルを通るイオン電流へのアデノシンアゴニストの効果を見ることによって始めた。

〔方法〕

Neuroblasloma N1E 115 はDMSO（2％），牛胎児血清（10％）を含むDulbeccos'

modified Eagle medium 中で7~10日培養したものを用いた。whole cell clamp の方法はLeeらがカタツムリのニューロンで行ったもの[3]と本質的に同じである。吸引ガラス電極の内液はICa, IBa の場合, Cs-glutamate (145mM), EGTA (2mM), HEPES (20mM), pH7.4, 細胞外液は, $CaCl_2$ (50mM), NaCl (30mM), CsCl (5mM), Tetraethylammonium·Cl (TEA; 25mM), Tetrodotoxin (TTX; 0.5μM), glucose (25mM), HEPES (20mM), pH7.4 を用いた。細胞を吸引し, giga-ohm-sealを行ったのち, 電極のチップ (抵抗 1~3 MΩ) 内の細胞膜を破壊してwhole cell clampを行った。INaの場合には, TTXなどを除きそれぞれのイオンを置き換えた。通電により, 膜電位を-80 mVにholdingし, 任意の大きさのpulse (duration; 120m sec) を与えて, 10mVおきに電圧を変化させ, 流れる電流をsingle channel recording用のアンプを使って測定した。これから得られたI-V curve (略) により, leakageの変化が少なく, 大きなCa電流が観察できる-20mVにおけるCa電流の大きさを, 毒素添加前後に10秒おきに測定した。実験は室温で行われた。

〔結果と討論〕

図1でみられるように, ニューロブラストーマ細胞からは, peak currentが約1nA位のCaチャンネルを通るBa電流が記録された (図の左列)。100μMの2クロロアデノシンを灌流液に加えると, Ba電流は3分以内に消失した (図の中央列)。その後, 灌流液からアデノシンを除去すると, IBaはすみやかに回復し, 2分後にはほぼもとのレベルまで回復した (図の右列)。Naチャンネルを通るINaを別の細胞で記録すると, 2クロロアデノシン処理でわずかにpeak current は減少するものの, 大部分の電流は残っていた。

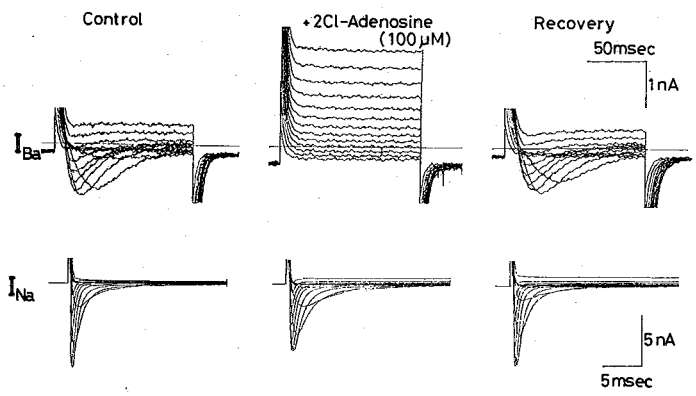


図1 whole cell clampしたニューロブラストーマ細胞でのバリウム電流(IBa) とナトリウム電流(INa)に対する2クロロアデノシンの効果。 (-80mVにholdingしておき120 m secのパルスを与えて10mV おきに変化させたトレースを重ねてある。)

これらの-20mVに膜電位をシフトされたとき得られるIBaの変化を時間をおって, plotしたのが図2である。2クロロアデノシンの添加に伴い, すみやかにIBaは減少するが, それに伴って Gleak と表示してある外向きの電流も増加している。興味あることに, この Gleak はIBaが0になっても増え続け, wash outによりIBaが回復

レ始めてから減少する。さらに興味深いことに，wash out後の I_{Ba} は第1回のapplyのときにもコントロールよりわずかに大きく，第2回目のより長いスクロロアデノシンでのインキュベーションにより，コントロールに比べ20%ほど大きくなった。

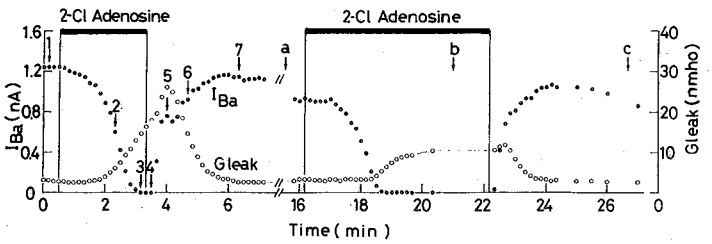


図2　I_{Ba} のスクロロアデノシン処理による時間変化

これらの結果は，①アデノシンが，Caチャンネルを選択的に抑制すること，②アデノシン処理によって，Caチャンネルのmodificationが起こり，チャンネルを通るイオン電流がふえることを示している。①はシナプス前アデノシン受容体（ADO-1）が，Caチャンネルとカップルしていることを示唆し，②はこの変化がアデノシン処理中に細胞内で増加したサイクリックAMPがチャンネルをmodifyした可能性がある。

［文献］

(1) Hagiwara, S., and Byerly, L. (1981) Ann. Rev. Neurosci. 4, 69-125.
(2) Kuroda, Y. (1983) in Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives. eds J. Daly et. al., 245-256, Raven Press, New York.
(3) Lee, K.S., Akaike, N., and Brown, A.M. (1978) J. gen. Physiol. 71, 489-507.
(4) Okada, Y., and Kuroda, Y. (1975) Proc. Japan Acad. 51, 491-494.

96 受容体刺激に共役したCa^{2+}の動態とサイクリックGMP生成の関連性

大迫俊二・出口武夫
（都神経研・医化）

〔要　約〕

神経芽細胞腫N1E115細胞を用いて、伝達物質によるCa^{2+}の動態とサイクリックGMP生成の関連性について解析した。カルバコール、ヒスタミンおよびプロスタグランジンE_1を細胞に作用させると、細胞内サイクリックGMPが顕著に増加し、これと平行して、$^{45}Ca^{2+}$の流出、膜結合性Ca^{2+}の遊離（クロルテトラサイクリン蛍光の減少）および細胞内遊離Ca^{2+}の濃度の増加（Quin 2蛍光の増加）が観察された。これら反応の時間変化、細胞外Ca^{2+}依存性、受容体阻害剤による阻害およびヒスタミンに対する濃度依存性はよく類似していた。これらの結果は、細胞内サイクリックGMP生成に、Ca^{2+}の動態、特に細胞内遊離Ca^{2+}の増加が密接に関与することを示唆する。

Key words： receptor, cyclic GMP synthesis, Ca^{2+} mobilization.

神経伝達物質やホルモンによる細胞内サイクリックGMP（cGMP）上昇には、細胞外Ca^{2+}が必須であることが、種々の組織で知られている。細胞外Ca^{2+}を除去すると、神経伝達物質等によるcGMP上昇は、部分的に或いは完全に阻害される。また、Ca^{2+}イオノフォア、A23187も細胞内cGMPを増加させる(3)。このように、cGMP生成におけるCa^{2+}の重要性は確立されているが、神経伝達物質によるcGMP上昇とCa^{2+}の動態の関連性はまだ明らかでない。我々は以前に牛副腎髄質細胞において、ムスカリン受容体の刺激が$^{45}Ca^{2+}$の流出を促進しcGMPの生成を引き起こすことを示した(4)。Ca^{2+}の動態とcGMP生成の関連性をさらに詳細に調べるため、神経芽細胞腫N1E115細胞を用い、伝達物質の刺激による$^{45}Ca^{2+}$の流出、膜結合性Ca^{2+}の遊離【クロルテトラサイクリン（CTC）蛍光の減少】および細胞内遊離Ca^{2+}の濃度の変化（Quin 2蛍光の増減）を解析したので、ここに報告する。

〔実験方法〕

(1)細胞培養：既に記載した方法に従って行なった(5)。

(2)測定方法：$^{45}Ca^{2+}$の流出及びcGMP量定量は、既に記載した方法(4,5)に従った。CTCによる膜結合性Ca^{2+}の動態は、Naccacheらの方法(7)に、Quin 2による細胞内遊離Ca^{2+}の濃度はTsienらの方法(8)に従い測定した(6)。

〔結果〕

神経芽細胞腫に、カルバコール、ヒスタミンおよびプロスタグランジンE_1（PGE_1）

を作用させると細胞内cGMPが顕著に増加する。これらの物質が、$^{45}Ca^{2+}$の細胞内への取り込みを促進するかどうか調べたが、顕著な取り込みは観察されなかった。一方、あらかじめの細胞に$^{45}Ca^{2+}$を取り込ませた後、これら伝達物質を作用させると、$^{45}Ca^{2+}$の流出が15秒以内に顕著に促進された。カルバコールとヒスタミンによる$^{45}Ca^{2+}$の流出は、受容体阻害剤であるアトロピンとピリラミンによって完全に阻害され、$^{45}Ca^{2+}$の流出がそれぞれの受容体を介した反応であることを示唆した。

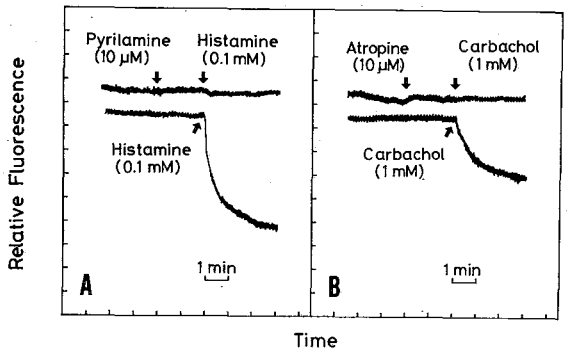


Fig. 1. Effect of histamine and carbachol on the steady-state fluorescence of cell-associated CTC.

$^{45}Ca^{2+}$の流出が、cGMP増加の結果であるかどうかを調べるため、cGMP、ジブチリルcGMP、ニトロプルシッドを細胞に加えたが、$^{45}Ca^{2+}$の流出は促進されず、従ってcGMPの増加は、$^{45}Ca^{2+}$の流出の原因ではないと考えられた。

標識された細胞から流出する$^{45}Ca^{2+}$の源として、膜結合性Ca^{2+}と細胞内遊離のCa^{2+}が考えられる。これを調べるために、膜のCa^{2+}およびMg^{2+}と複合体を形成する蛍光色素CTCを用いて膜結合性Ca^{2+}の変動を測定した。[7] ヒスタミンとカルバコールを加えると、CTC蛍光は急速に減少し、この変動はピリラミンとアトロピンによって阻止された（図1）。PGE_1もCTC蛍光の減少を引き起こした。

これらの受容体の刺激により、膜結合性Ca^{2+}の一部が細胞外に放出され、他の一部が細胞内に取り込まれ、その結果、細胞内遊離のCa^{2+}の濃度（$[Ca^{2+}]_i$）が増加する可能性が考えられる。そこで、Ca^{2+}指示蛍光試薬Quin 2により$[Ca^{2+}]_i$を測定した。[8] ヒスタミン、カルバコールおよびPGE_1を細胞に作用させると$[Ca^{2+}]_i$が100nMからそれぞれ150、110、125nMに増加し、2分以内にもとの濃度に下がった。この時間変化は、cGMP量の変化とよく一致した。ヒスタミンとカルバコールによる$[Ca^{2+}]_i$の増加もまた、ピリラミンとアトロピンによって阻害された。カルバコールによる$[Ca^{2+}]_i$の増加はヒスタミンによるものに比べて少ないが、これはカルバコールによるcGMPの上昇がヒスタミンによるものよりも少ないという観察事実と一致する（図2）。

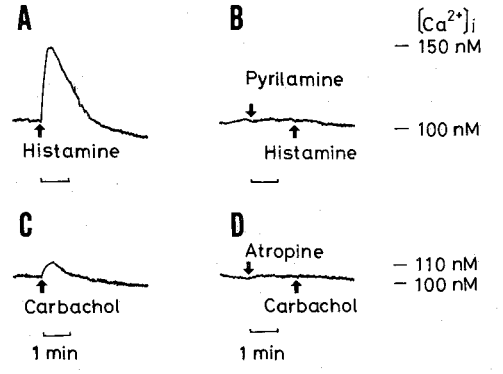


Fig. 2. Effect of histamine and carbachol on $[Ca^{2+}]_i$ in neuroblastoma cells as indicated by Quin 2 fluorescence.

$[Ca^{2+}]_i$の増加とcGMP生成の関係を明らかにするため、Quin 2蛍光とcGMP量の変化に対するヒスタミン濃度の効果を調べた（図3）。Quin 2蛍光とcGMP量の変化は、ヒスタミン60 μMでほぼ最高値に達し、両者は同様な濃度依存性を示

した。

ヒスタミンによるCTC蛍光の減少と$[Ca^{2+}]_i$の増加は、ともに細胞外Ca^{2+}に依存し、Ca^{2+}無添加EGTA(1mM)含有溶液中では、両反応は阻害された。

〔考察〕

神経芽細胞腫NIE115細胞において、カルバコール、ヒスタミンおよびPGE$_1$は、$^{45}Ca^{2+}$の流出、膜結合性Ca^{2+}の遊離および$[Ca^{2+}]_i$の増加を促進することが明らかになった。カルバコールとヒスタミンによるこれらの反応はすべてアトロピンとピリラミンによって阻害され、cGMP増加と同様に、特定の受容体を介したものであることが示唆された。時間変化、細胞外Ca^{2+}依存性、ヒスタミンに対する濃度依存性は、cGMP生成とCa^{2+}の動態の間で類似しており、これらの反応が密接な関連性をもつことを示唆する。ミトコンドリアからのCa^{2+}の遊離を促進する[1]脱共役剤CCCPは、細胞内cGMPを増加させず、ミトコンドリアがcGMP生合成に必要なCa^{2+}の貯蔵庫とは考えにくい。細胞外Ca^{2+}で平衡化される細胞のCa^{2+}プール、おそらく膜結合性Ca^{2+}が、cGMP生合成にとって重要な生理的Ca^{2+}貯蔵庫であろうと思われる。受容体刺激によって、膜結合性Ca^{2+}は部分的に細胞外に流出し、他が細胞内に取り込まれ、その結果$[Ca^{2+}]_i$が増加する。このようにして増加した$[Ca^{2+}]_i$は、おそらくL-アルギニンと共働して、グアニレース・サイクレースを活性化するものと考えられる[2]。

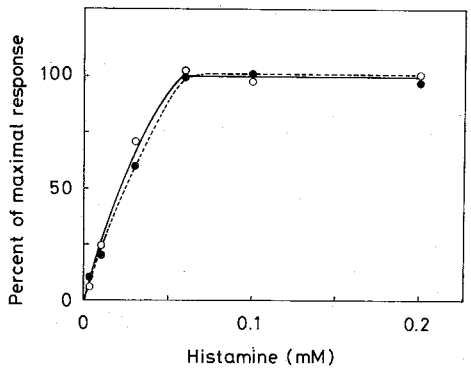


Fig. 3. Effect of histamine concentration on the response of Quin 2 fluorescence and cyclic GMP contents in neuroblastoma cells.

〔文献〕

1. Blackmore, P.E., Hughed, B.P., Shuman, E.A. and Exton, J.H. (1982) J. Biol. Chem. 257, 190-197.
2. Deguchi, T. and Yoshioka, M. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10147-10151.
3. Goldberg, N.D. and Haddox, M.K. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 823-896.
4. Ohsako, S. and Deguchi, T. (1983) FEBS Lett. 152, 62-66.
5. Ohsako, S. and Deguchi, T. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10945-10948.
6. Ohsako, S. and Deguchi, T. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. in the press.
7. Naccache, P.H., Showell, H.J., Becker, E.L. and Sha'afi, R.I. (1979) J. Cell Biol. 83, 179-186.
8. Tsien, R.Y., Pozzan, T. and Rink, T.J. (1982) J. Cell Biol. 94, 325-334.

97 C－キナーゼによる平滑筋ミオシン軽鎖リン酸化反応の調節機構について

伊藤正明・田中利男・日高弘義
（三重大・医・薬理）

〔要　約〕

カルモデュリン阻害剤 N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide(W-7)およびその誘導体を用いて，C-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化反応の活性化機構を検討した。W-7の誘導体である N-(6-phenylhexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (NCM-119)は，カルモデュリン阻害作用が消失したが，phosphatidylserine (PS)非存在下で，C-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化反応を Ca^{2+} 依存性に促進させた。NCM-119をPSと比較検討した場合，C-キナーゼの Ca^{2+} に対する apparent Km値は，ほぼ同じ値 (1.5×10^{-4}M)であったが，その反応速度はPSに比して，著明に上昇していた。さらに，12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を微量 (100ng/ml)加えることにより，Ca^{2+} 濃度が 1×10^{-7} M程度でも，NCM-119によるC-キナーゼのミオシン軽鎖リン酸化反応の活性化が認められた。NCM-119のC-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化反応の活性化は，W-7によって阻害された。以上，W-7，NCM-119 をはじめとする Naphthalenesulfonamide は，ミオシン軽鎖リン酸化反応に対するC-キナーゼの活性化機構を検討する上で，非常に有用であると考えられた。

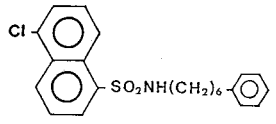
Key words : Protein kinase C, Myosin light chain phosphorylation, W-7 and its analogue. (NCM-119).

カルシウム依存性ミオシン軽鎖リン酸化反応は，平滑筋や非筋細胞の重要なカルシウム調節機構と考えられている。我々は，すでに平滑筋細胞および非筋細胞（血小板）のミオシン軽鎖がミオシン軽鎖リン酸化酵素だけではなく，C-キナーゼによりカルシウム依存性にリン酸化され，そのリン酸化部位が違うため，生理的作用が異なることを明らかにした。カルモデュリン阻害剤W-7は，ホスファティディールセリンに対して拮抗的に阻害し，C-キナーゼの Ca^{2+} に対する感受性を低下させるが，今回その誘導体であるNCM-119がC-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化反応を著しく促進させることが見い出された。NCM-119のC-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化促進作用について，Ca^{2+}，TPA，リン脂質との関係を検討したので報告する。

［実験材料と方法］

W-7およびNCM-119は日高らの方法により合成した。W-7およびNCM-119の化学構造式をFig. 1に示す。C-キナーゼは，家兎脳より，ミオシン軽鎖は，ニワトリ砂嚢より精製した。C-キナーゼ活性は以下の条件下で測定した。全量200μl，25mM Tris-HCl (pH 7.0)，10mM $MgCl_2$，60μg ミオシン軽鎖，10μM [γ-^{32}P ATP] (4×10^5 cpm)，0.5μg C-キナーゼ，30°C，15分インキュベーション後20% TCAにて反応を停止した。Ca^{2+}，PS，およびTPAは，各Figureにその分量を示した。Free Ca^{2+} 濃度は，$CaCl_2$，ethyleneglycol bis (β-

NCM-119：



W-7：

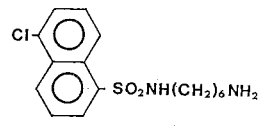


Fig 1：NCM-119 および W-7 の化学構造式

aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid (EGTA)緩衝液より算出した。

［結果］

Fig2に示すごとく，NCM-119は，Ca^{2+}(1×10^{-6}M)，PS(50μg/ml)，TPA(100ng/ml)存在下で，C-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化反応を促進し，300μMでControlに比して約2倍の酵素反応速度が得られた。一方W-7は，リン酸化の阻害が認められた。ミオシン軽鎖リン酸化酵素によるミオシン軽鎖リン酸化反応に対しては，Ca^{2+}カルモデュリンの存在，非存在にかかわらず，NCM-119は酵素反応速度に影響をほぼさなかった。

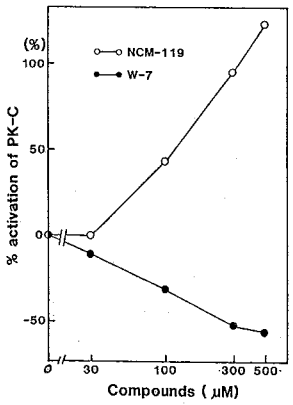


Fig.2：NCM-119及びW-7のC-キナーゼ活性に対する効果
assay：Ca^{2+} 1×10^{-6}M，PS 50μg/ml，TPA 100ng/ml

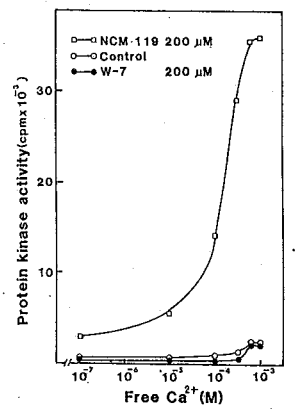


Fig.3：NCM-119のC-キナーゼ活性に対するCa^{2+}の効果
assay：PS(-) TPA(-)

C-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化反応速度におけるCa^{2+}濃度の影響を検討すると(Fig.3)，NCM-119は，PS，TPA非存在下で，C-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化反応をCa^{2+}依存性に促進した。NCM-119，PS共にCa^{2+}濃度が7×10^{-4}M程度で，反応速度はほぼプラトーとなり，その時の反応速度は，NCM-119 200μMで17.8 pmole P/min，PS 50μg/mlで6.2 pmole P/minであった。

TPAの作用を，Ca^{2+}，NCM-119の存在下で検討すると，TPA濃度100ng/ml，Ca^{2+} 1×10^{-6}Mで，C-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化速度は14 pmole P/minであり，低濃度Ca^{2+}にても，TPAによりミオシン軽鎖リン酸化反応が認められた。

C-キナーゼのミオシン軽鎖リン酸化反応におけるNCM-119とPSの相互関係を検討すると(Tab.1)，PSを漸増することにより，NCM-119で得られるリン酸化速度は漸減し，PSにて得られる反応速度に近づく傾向が認められた。

更にNaphthalenesulfonamideであるW-7とNCM-119の相互作用を調べると，NCM-119によって，Ca^{2+}

PS (μg/ml)	0	25	50	100
MLC phosphorylation without NCM-119 (pmole P/min)	1.2	4.0	4.5	5.2
MLC phosphorylation with NCM-119(200μM) (pmole P/min)	9.8	7.3	5.8	5.5

Tab.1：C-キナーゼのミオシン軽鎖リン酸化反応におけるNCM-119及びPSの相互作用
assay：Ca^{2+} 5×10^{-4}M

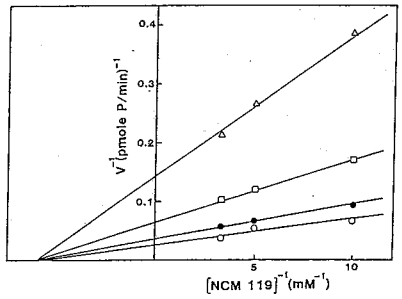


Fig.4：NCM-119により促進されたC-キナーゼのミオシン軽鎖リン酸化反応のW-7による阻害(Dixon plot)
assay：Ca^{2+} 7×10^{-4}M

依存性に活性化されたC-キナーゼ活性をW-7は阻害し，その阻害様式は，Fig.4に示すごとく，NCM-119に対してW-7は非拮抗的阻害を示した。

トリプシン処理によって，Ca^{2+}，PS非存在下で活性を示すC-キナーゼに対しては，Ca^{2+} 1×10^{-7}Mで，NCM-119およびW-7は300μMまで，ほぼC-キナーゼ活性に影響をほぼ与えなかった。

［考察］

NaphthalenesulfonamideであるNCM-119により，Ca^{2+}依存性にC-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化反応が促進されることが明らかとなった。NCM-119をPSと比較検討した場合，Ca^{2+}依存性にC-キナーゼを活性化し，TPAにより低濃度Ca^{2+}でもリン酸化反応をおこし，C-キナーゼのCa^{2+}に対するapparent Km値もほぼ同じ値である点が類似している。しかし，反応速度がほぼピークとなるCa^{2+}濃度（7×10^{-4}M）で酵素反応速度を比較した場合，NCM-119 200μMによりおこる酵素反応速度は，ほぼPSで出しうる最大反応速度の約3倍であり，ミオシン軽鎖リン酸化反応速度にその相異点を見い出すことができる。NCM-119およびCa^{2+}にて促進されるC-キナーゼのミオシン軽鎖リン酸化反応が，PSの添加によりその酵素反応速度が抑制され，PS過剰にて，PSで活性化される反応速度まで低下する所見は，PSとNCM-119との相互反応に起因するとも考えられるが，PSとNCM-119の相互作用がないとしても，PSとNCM-119の酵素反応速度にほぼ差違により，NCM-119過剰の時はNCM-119による酵素反応速度を反映し，PSが相対的過剰になるとPSによる酵素反応速度を反映した結果とも考えられる。W-7をはじめとするカルモデュリン阻害剤は，Phospholipidと競合して，C-キナーゼ活性を阻害すると考えられているが，NCM-119およびCa^{2+}にて促進されたミオシン軽鎖リン酸化反応に対しても，W-7はPhospholipid以外のactivatorであるNCM-119に対しても，阻害効果を示したことより，C-キナーゼ活性化に対して，phospholipid以外の部位に阻害効果を示す可能性があり興味深い。以上，C-キナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化反応の機構を研究する上で，NCM-119，W-7等のNaphthalenesulfonamide誘導体は，非常に有用な手段となりうると考えられた。

［文献］

1) Endo,T.,Naka,M.,and Hidaka,H. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 105,942-948.
2) Hidaka,H.,Asano,M.,Iwadare,S.,Matsumoto,I.,Totuka,T.,and Aoki,N. (1978) J.Pharmacol. Exp.Ther. 207,8-15.
3) Inoue,M.,Kishimoto,A.,Takai,Y.,and Nishizuka,Y. (1977) J.Biol.Chem. 252,7610-7616.
4) Naka,M.,Nishikawa,M.,Adelstein,R.S.,and Hidaka,H. (1983) Nature 306,490-492.
5) Nishikawa,M.,Hidaka,H.,and Adelstein,R.S. (1983) J.Biol.Chem. 258,14069-14072.
6) Perrie,W.T., and Perry,S.V. (1970) Biochm.J. 119,31-38.
7) Tanaka,T.,Ohmura,T.,Yamakado,T.,and Hidaka,H. (1982) Mol.Pharmacol. 22,408-412

98 Ca^{2+}，カルモデュリン依存性蛋白質リン酸化反応による微小管重合調節とcAMP依存性反応との比較

山本秀幸・福永浩司　（熊本大・医・Ⅰ薬理）
後藤　恵　（同・脳外科）
田中越郎・宮本英七　（同・Ⅰ薬理）

〔要　約〕

ラット脳細胞上清分画より精製したCa^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ（64万酵素）は、分離したチューブリン、MAP2、タウ因子を燐酸化した。各々の微小管蛋白質の燐酸化反応の微小管重合に及ぼす影響を調べ、cAMP依存性の燐酸化反応と比較、検討した。1）MAP2とタウ因子のいずれの燐酸化も微小管の重合を阻害した。2）この効果は、燐酸のとりこみ量に相応して増加した。3）64万酵素により燐酸化されたチューブリンに、MAP2、タウ因子のいずれを加えても重合は阻害された。阻害効果は、重合の最終程度よりも、初速度により強く認められた。4）64万酵素は、Aキナーゼの触媒サブユニットに比べて、3－5倍、より多い燐酸のとりこみを示した。5）64万酵素の各基質に対するK_m値は、触媒サブユニットに比べて、4－24倍の低値を示した。6）64万酵素は、触媒サブユニットと異なるペプチドを燐酸化した。7）触媒サブユニットは基質のセリン残基のみを燐酸化したが、64万酵素はセリン、トレオニン両残基を燐酸化した。これらの結果は、64万酵素による微小管蛋白質の燐酸化が、cAMP系に比較してより効率良く微小管の重合を調節しうることを示唆している。

Key words : Microtubule assembly-disassembly, Microtubule proteins, Brain Ca^{2+}- and calmodulin-dependent protein kinase

微小管は細胞骨格蛋白質の1つであり、細胞の形態維持や機能発現に重要な役割を演じている。私達は、脳の細胞上清分画より精製したCa^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ（64万酵素）が微小管蛋白質であるチューブリン、MAP2、タウ因子を燐酸化することを見出した（1,2）。さらに、64万酵素によるMAPs燐酸化反応が微小管重合を阻害することを明らかにし、この反応が低濃度のカルモデュリンによって活性化される特異性の高いものであることを報告した(2,3)。今回、分離したチューブリン、MAP2、タウ因子を用いて、各々の64万酵素による燐酸化反応の微小管重合に及ぼす影響を調べ、cAMP依存性微小管蛋白質燐酸化反応との比較、検討を行なった。

〔実験材料と方法〕

実験材料；カルモデュリンは既報の方法(4)．微小管蛋白質は豚大脳よりShelanskiらの方法(5)により調製した。チューブリンはWeingartenらの方法(6)、MAPsはKimらの方法(7)により微小管蛋白質から分離した。MAP2とタウ因子は祖父江らの方法(8)によりMAPsから分離した。64万酵素は、ラット脳から既報の方法(1)により、cAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットは既報の方法(9)により精製した。

実験方法；酵素活性は既報の方法(10)に従い測定した。SDS電気泳動はLaemmliの方法(11)に従い、オートラジオグラフィーは既報の方法(12)に従い行なった。微小管蛋白質の燐酸化と微小管重合は既報の方法(2)によった。ペプチドマップはClevelandらの方法(13)により行なった。燐酸化されるアミノ酸残基は既報の方法(14)により決定した。

Preincubation time (min)	MAP2			Tau Factor		
	MAP2 Phosphorylation (mol/mol MAP2)	MT. Assembly		Tau Factor Phosphorylation (mol/mol Tau)	MT. Assembly	
		Rate (%)	Extent (%)		Rate (%)	Extent (%)
0	0	100	100	0	100	100
1	4.4	78.5	85.9	3.1	74.5	75.8
5	14.1	66.7	71.9	6.5	63.8	65.8
30	21.2	52.2	65.7	9.7	61.7	53.3

表1，燐酸化と重合阻害反応の関係

〔実験結果と考察〕

1)微小管蛋白質燐酸化反応の微小管重合に及ぼす影響；分離したMAP2、タウ因子、チューブリンは全て、64万酵素により燐酸化された。各々の燐酸化反応の微小管重合に及ぼす影響について検討した。MAP2とタウ因子のいずれの燐酸化も微小管重合を阻害した。燐酸化の程度と重合阻害効果との関係を検討した(表1)。燐酸化の反応の時間を変え、とりこまれる燐酸量を変化させた。[γ-^{32}P]ATPを用いて測定すると、MAP2とタウ因子にとりこまれる燐酸量は、30分まで増加し、どちらも複数の部位が燐酸化された。同様の条件下で燐酸化反応を行なった後の重合反応の結果を表1に示した。重合の初速度(rate)と最終程度(extent)は、とりこまれた燐酸量の増加とともに減少し、両者の間に、強い相関性が見出された。チューブリンの燐酸化の微小管重合に及ぼす影響を調べた(図1)。64万酵素により、チューブリンも複数の部位が燐酸化された。燐酸化されたチューブリン(1.2 mol Pi /mol tubulin)にMAP2を加えて重合を開始させると対照(0.14 mol Pi /mol tubulin)に比べて、重合が抑制された。同様の実験を4回行ない、対照に比べて初速度は30.2±16.8%、重合の最終程度は51.2±14.6%に減少した。阻害効果は重合の最終程度より、初速度に強く現われた。タウ因子を加えて、重合を起こさせると初速度が69－76%に、最終程度が73.4－73.6%に減少した。触媒サブユニットによるチューブリンの燐酸化では、微小管重合の阻害を認めなかった。

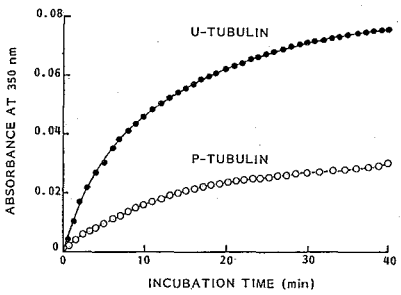


図1，チューブリンの燐酸化による重合阻害

2)cAMP依存性微小管蛋白質燐酸化反応との比較；cAMP依存性微小管蛋白質燐酸化反応によっても、微小管重合が阻害されるので、両酵素による微小管蛋白質燐酸化反応について比較、検討した。a)燐酸化部位の個数；64万酵素と触媒サブユニットによる微小管蛋白質の燐酸化は、それぞれ、30分と90分で最大に達した。表2にとりこまれた燐酸の量を示した。各々の基質について、64万酵素は触媒サブユニット(C-Subunit)に比べて、3－5倍、より多い燐酸のとりこみを示した。b)KmとV_{max}の比較；両酵素の各々の基質に対するKmとV_{max}を逆数プロットより求めた(表3)。64万酵素はタウ因子を基質として用いた場合、触媒サブユニットはMAP2を基質として用いた場合に、最も高いV_{max}を示した。64万酵素の微小管蛋白質に対するKmはミオシン軽鎖(MLC)に対するKmに比べ、5－84倍の低値を示した。64万酵素の各基質に対するKmは触媒サブユニットに比べ4－24倍の低値を示した。こ

表2，燐酸化部位の個数

Protein component	640K enzyme	C-subunit
	mol/mol species	
MAP2	14.8	4.6
Tau factor	19.1	4.7
Tubulin	3.1	0.6

Substrate	640K enzyme		C-subunit	
	Vmax	Km	Vmax	Km
	nmol/mg/min	μM	nmol/mg/min	μM
MLC	317.3	59.5	n.d.	n.d.
Histone	n.d.	n.d.	141.7	37.3
MAP2	740.7	1.6	793.7	18.6
Tau factor	2430.0	0.7	264.6	16.7
Tubulin	105.8	11.3	53.4	45.4

表3，各基質に対するKmとVmaxの比較

れらの結果は、微小管蛋白質が、両酵素の良い基質であること、64万酵素に対してより親和性が高いことを示している。 c) MAP2とタウ因子のペプチドマップの比較；両酵素によるMAP2とタウ因子の燐酸化部位をペプチドマップ法により検討した。 各基質を[γ-^{32}P]ATPを用いて両酵素で燐酸化させた後、V-8プロテアーゼで処理し、15%のSDS-PAGEで分離し、オートラジオグラフィーで検出した。 両基質のペプチドマップは、両酵素で異なったパターンを示し、両酵素の基質特異性の異なることが示された。 同様の結果は、α-キモトリプシンで処理した場合にも得られた。 d) MAP2とタウ因子の燐酸化されるアミノ酸残基の比較；両酵素により燐酸化されるアミノ酸残基について検討した。 64万酵素は両基質のセリンとトレオニン両残基を燐酸化したが、触媒サブユニットは、セリン残基のみを燐酸化した。 ろ紙より両残基の部位を切り、含まれている放射活性を直接測定すると、セリンとトレオニンの比は、MAP2が0.25、タウ因子が0.04を示した。

以上の結果は、微小管蛋白質が、脳の両酵素の良好な基質として役立つこと、微小管重合が、Ca^{2+}、カルモデュリン系とcAMP系によって二重に調節され、その作用様式が互いに異なることを示唆している。 Ca^{2+}、カルモデュリン系によるMAP2とチューブリンの燐酸化反応の微小管重合、脱重合に対する影響については、山内らによっても報告がなされている(15,16)。 また今回の実験により、微小管蛋白質が、触媒サブユニットに比べて64万酵素により親和性が高いこと、64万酵素によるチューブリンの燐酸化が重合阻害効果をもつことがわかった。 これらの結果は、64万酵素による微小管蛋白質燐酸化反応が、cAMP系に比較して、より効率良く微小管重合を調節しうることを示唆するものと思われる。

本研究の一部は、第57回日本薬理学会総会で報告した。

REFERENCES

1) Fukunaga, K., Yamamoto, H., Matsui, K., Higashi, K. and Miyamoto, E. (1982) J. Neurochem. 39, 1607-1617.
2) Yamamoto, H., Fukunaga, K., Tanaka, E. and Miyamoto, E. (1983) J. Neurochem. 41, 1119-1125.
3) 山本喜幸, 福永浩司, 田中越郎, 宮本英七 (1983) 神経化学 22, 69-71.
4) Miyamoto, E., Hideshima, Y., Teshima, Y., Yamazaki, R. and Kakiuchi, S. (1977) J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 85-94.
5) Shelanski, M.L., Gaskin, F. and Cantor, C.R. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 765-768.
6) Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y. and Kirschner, M.W. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1858-1862.
7) Kim, H., Binder, L.I. and Rosenbaum, J.L. (1979) J. Cell Biol. 80, 266-276.
8) Sobue, K., Fujita, M., Muramoto, Y. and Kakiuchi, S. (1981) FEBS Lett. 132, 137-140.
9) Miyamoto, E., Petzold, G.L., Kuo, J.F. and Greengard, P. (1973) J. Biol. Chem. 248, 179-189.
10) Miyamoto, E., Miyazaki, K., Hirose, R. and Kashiba, A. (1978) J. Neurochem. 31, 269-275.
11) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
12) Miyamoto, E., Fukunaga, K., Matsui, K. and Iwasa, Y. (1981) J. Neurochem. 37, 1324-1330.
13) Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1102-1106.
14) Miyamoto, E. and Kakiuchi, S. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2769-2777.
15) 山内卓, 藤沢仁 (1982) 神経化学 21, 75-77.
16) 山内卓, 藤沢仁 (1983) 神経化学 22, 72-74.

99 マウス脳の発達におけるカルモデュリンの免疫組織化学的局在

大島章子・北島哲子・佐野　護（愛知県コロニー・形態）
加藤兼彦（同・生化）
水谷　昭（同・形態）

〔要　約〕

神経機能に重要な役割をはたしていると考えられるカルシウム結合蛋白、カルモデュリンの特異的抗体を作成し、マウス脳におけるカルモデュリンの免疫組織化学的局在を調べた。

成体では、脳のほぼ全域にわたり、反応陽性の細胞が認められた。反応陽性を示す細胞は、主として神経細胞であった。発達過程における反応性をみると、神経細胞の成熟が早いといわれる延髄に最も早く反応陽性細胞が出現し、発達の遅れる海馬、小脳では反応性出現も遅かった。大脳皮質では、マトリックス細胞、移動層及び、新しく形成された皮質原基内の細胞は反応陰性であり、成体にみられる層を形成したところから反応陽性の細胞があらわれた。小脳でも未分化細胞である外顆粒層の細胞、及び移動細胞は反応陰性であった。神経細胞の成熟とともに発現すると考えられている神経特異的エノラーゼの局在を、同様に免疫組織化学的に調べ、カルモデュリンと比較したところ、発達過程の脳における両者の発現には、類似点が認められた。これらの結果から、カルモデュリンは、神経特異的エノラーゼと同様に、神経の何らかの成熟とともに発現してくると考えられる。

Key words：　Calmodulin, Immunohistochemistry, Neuronal development

カルモデュリンは、神経伝達物質の生合成、分泌など、神経系の機能に重要な役割をはたしているカルシウムの作用の少なくとも一部に、寄与していると考えられている。脳にはカルモデュリンが高濃度存在しているが、脳全体におけるカルモデュリンの局在を調べた報告は少ない[1,4,5]。我々は、牛脳より精製したカルモデュリンで家兎に免疫し、カルモデュリン－セファロースを用いて特異的抗カルモデュリン抗体を得た[3]。この特異的抗体を用い、マウス脳におけるカルモデュリンの免疫組織化学的局在及び、脳の発達に伴う局在の変化を調べた。その結果、カルモデュリンが、神経の発達に密接な関係があると考えられる所見を得たので、報告する。

［材料及び方法］

マウスは抱水クロラールで麻酔後、塩溶液、次いで3%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒド、0.01%塩化カルシウムを含むPIPES緩衝液で環流固定した。固定液中で一晩固定した脳から、ビブラトームで厚さ25μmの切片を作成し、以下の免疫組織化学的検索に用いた。マウス胚に関しては、妊娠マウスを同様に麻酔し、とりだした胚を灌流固定後、脳をとり、以下同様におこなった。免疫組織化学の手順を以下に示す。

切片
↓
10%ヤギ血清を含むトリス緩衝液への浸漬
↓
抗カルモデュリン抗体との反応（洗浄）
↓
ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ血清との反応（洗浄）
↓
DAB反応

なお、この抗体による反応は、カルモデュリンを用いた吸収実験で消失することから、カルモデュリン特異的と考えられる。

[結果]

マウス成体の脳では、ほぼ全域にわたり反応陽性細胞が認められた。神経特異的エノラーゼ(NSE)、或いは、S-100の免疫組織化学的局在と比較すると、カルモデュリン抗体に対して反応陽性を示す細胞は、主として神経細胞であった。

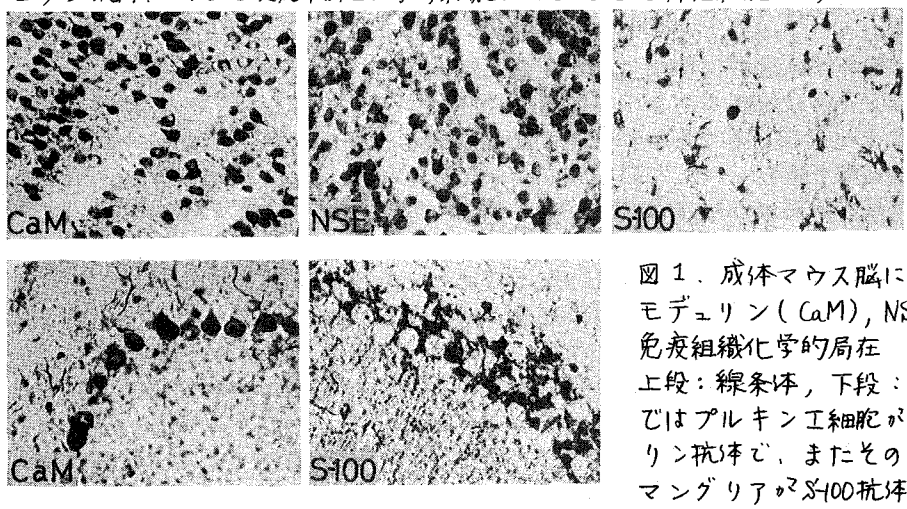


図1. 成体マウス脳におけるカルモデュリン(CaM), NSE, S-100の免疫組織化学的局在
上段:線条体, 下段:小脳(小脳ではプルキンエ細胞がカルモデュリン抗体で、またその間のベルグマングリアがS-100抗体でそまる。)

次に、これらの反応性が、脳の発達過程でどのように発現してくるかを調べた。

15日胚では、延髄に少数の反応陽性細胞が出現する。反応陽性細胞は数を増し、17日胚になると、その領域には多数の明瞭な陽性反応を示す細胞が認められるようになる。一方、大脳皮質では、マトリックス細胞、及びそこから連なって上方に移動する細胞には反応が全く認められない。移動した細胞は皮質原基を形成するが、その際に存在する細胞も陰性であった。そこから成体にみられる層構造が認められるようになると、その領域に反応陽性細胞が出現してくる。大脳皮質の反応陽性細胞の数は増加しやがて伸びてくる突起も陽性になり、成体での像に近づくが、それらの時期は、大脳皮質の部域により、少しずつ異なっていた。小脳では、外顆粒層の細胞は大脳皮質のマトリックス細胞同様、全く反応性を示さない。そこから移動する細胞も反応陰性である。生後7日になると、プルキンエ細胞が反応陽性を示すようになり、それ以後、反応性を示すプルキンエ細胞の数、及び反応の強さが増し、成体の像に近ずく。成体での小脳核の細胞は強い反応性を示すが、これらは17日胚ですでに明瞭な反応性を示し、小脳の他の細胞と異なった挙動を示した。海馬では、生後0日に、錐体細胞の一部が反応陽性となるが、歯状回の顆粒細胞の外側部分がうすい反応性を示すようになるのが生後7日であり、全体が反応陽性を示すのは、それより更に後になる。

以上のべてきたように、カルモデュリンの抗体に対する反応性の発現の時期は、脳の部域により異なっていた。一方、NSEの抗体に対する反応性の発現はカルモデュリン同様、延髄で早かった。また、大脳皮質での反応陽性細胞の出現、小脳のプルキンエ細胞や、海馬の錐体細胞、歯状回の顆粒細胞などの反応性発現の時期を比較する

と、カルモデュリンとNSEとではよく似ていることがわかった。

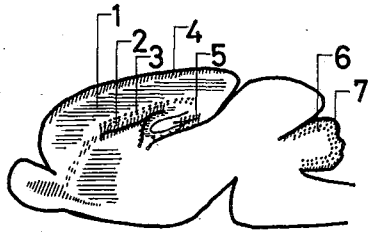


図2、生後0日のマウス脳におけるカルモデュリンの免疫組織化学的局在
細胞がすべて反応陰性の部分(////,:)と、陰性細胞の多い部分(≡)を模式的に示した。
1:大脳皮質第VI層, 2:大脳皮質マトリックス細胞層, 3:大脳皮質移動細胞, 4:海馬歯状回, 5:小脳移動細胞, 6:小脳外顆粒細胞層

[考察]

カルモデュリンの発現の時期は、脳の部域によって異なっているが、その時期をみると、神経の何らかの成熟と関連していると考えられる。一方、NSEは神経の成熟に伴ない発現すると考えられているが、発現の契機となる成熟段階としては、代謝の変化、興奮性の発現、シナプス形成などが説としてあげられている[2)]。カルモデュリンの発現の契機は何であろうか。成体マウスの大脳基底核で、カルモデュリンがカルモデュリン結合蛋白であるホスファターゼ、カルシニューリンと共にシナプス部位に存在すると報告されている[7)]。カルモデュリンの発現がシナプス形成と関わっている可能性は大きいが、マウス幼児期に大脳皮質の移動細胞の近傍、或いは皮質-視床路にみられる陽性反応などもあり、他の可能性も含め今後の課題である。ところで、パラフィン包埋した人脳での所見が報告されている[6)]が、我々も人脳の剖検材料で、カルモデュリンの局在を認めることができた。人の脳の神経系の発達を調べる一方法になりうるのではないかと考えられる。

[文献]

1. Kakiuchi,S., Yasuda, S., Yamazaki, R., Teshima,Y., Kanda,K., Kakiuchi,R. and Sobue,K. (1982) J. Biochem. 92, 1041-1048.
2. 加藤 兼房 "蛋白質, 核酸, 酵素" (印刷中)
3. Kitajima,S., Seto-Ohshima,A., Sano,M. and Kato,K. (1983) J. Biochem. 94, 559-564.
4. Seto-Ohshima,A., Keino,H., Kitajima,S., Sano,M. and Mizutani,A. (1984) Acta Histochem. Cytochem. 17, 109-117.
5. Seto-Ohshima,A., Kitajima,S., Sano,M., Kato,K. and Mizutani,A. (1983) Histochem. 79, 251-257.
6. Tabuchi,K., Ohnishi,R., Nishimoto,A., Isobe,T. and Okuyama,T. (1984) Brain Res. 298, 353-357.
7. Wood,J.G., Wallace,R.W., Whitaker,J.N. and Cheung,W.Y. (1980) J. Cell Biol. 84, 66-76.

100　ラット網膜に存在するカルモデュリン依存性アデニル酸シクラーゼ

佐野　護
（愛知県コロニー・形態）

〔要　約〕

ラット網膜を神経網膜と色素上皮を含む結合組織に分け、その膜分画のアデニル酸シクラーゼ活性を調べ、次の様な諸結果を得た。

Ⅰ　神経網膜の酵素は比活性が高く、そのレベルは脳組織の酵素に匹適する。　カルモデュリン、ドーパミンによって強い促進を受けた。　一方、色素上皮分画では、カルモデュリンにもドーパミンにも反応性がなく、弱いβ－アドレナリン感受性を認めた。

Ⅱ　神経網膜のアデニル酸シクラーゼは、カルシウムのみには反応せず、カルシウム、カルモデュリンの存在下で、7～8倍の活性を示した。　カルモデュリン濃度0－5 nM と5－40 nM で、活性促進の2相性が見られた。

Ⅲ　フォルスコリンは、カルモデュリンによる酵素の活性化に対し、相加的以上の効果を示した。

Ⅵ　ドーパミンによる活性化は、カルモデュリンによる活性化とほぼ相加的関係を示し、2つの制御機構の独立性が伺われた。

Key words：Adenylate Cyclase, Retina, Calmodulin

脳組織のアデニル酸シクラーゼは、カルシウムとカルモデュリンによって制御されている。脳以外でも、ラット小腸上皮細胞、肺、膵臓、ウシ子宮平滑筋などで、カルモデュリン依存性アデニル酸シクラーゼの存在が報告されている（1,4,8,5,12）。

しかし、これらの酵素のカルモデュリンに対する反応性は決っして高くはなく、脳組織以外では、むしろ例外的な存在と解釈すべきである。　従って、カルモデュリン依存性アデニル酸シクラーゼの研究は、過去そのほとんどが脳組織の酵素を用いて行われてきた。

今回筆者は、ラット網膜のアデニル酸シクラーゼが、脳組織と同様あるいは脳以上に顕著なカルモデュリン感受性を示す事実を認めた。　現在、アデニル酸シクラーゼのホルモンによる制御機構については、詳細に解明されつつある（6、3）。　一方、カルモデュリンによる本酵素の制御機構は、ホルモンの場合とは異り、グアニンヌクレオチド結合蛋白を介在しない事実より、その作用点は触媒ユニット又はその近傍と考えられている（7、9）。

ラット神経網膜のアデニル酸シクラーゼは、ドーパミン感受性が認められた。　また、フォルスコリンにより著しい活性化が見られた。　本稿では、網膜アデニル酸シクラーゼのカルモデュリン感受性、ドーパミン感受性、更にフォルスコリンに対する反応性について調べ、又それらの関係について考察する。

実験方法　　ラット網膜組織は、低温で分離後－80℃で保存した。　冷凍した組織は、10倍溶の20 mM Tris-HCl（pH 7.5）、0.25 M庶糖、1 mMDTT、1 mMEDTA 溶液とポリトロンでホモゲナイズし、ガーゼでロ過後37000×g、20分の遠心沈殿を、更に2回洗う。

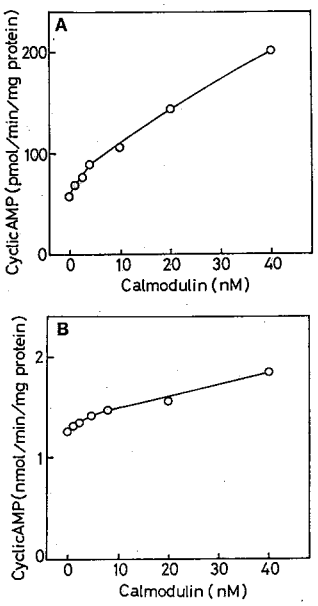
沈殿は更に100 mM PIPES (pH 7.5)、0.25 M庶糖、2 mM DTT 溶液で更に3回洗浄後同溶液に懸濁し、−80℃で保存する。

アデニル酸シクラーゼは、Salomon らの方法を用いた。反応系は、150 ul 中に、0.25 mM [^{32}P]ATP、25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM $MgSO_4$、5.5 mM KCl、1 mM IBMX、1 mM cAMP、20 mM フォスフォクレアチン、80 ug のクレアチンキナーゼ、50−100 μg の酵素分画を加え、37℃、10分の反応を行った。その他の方法は、別記のとおり行った (10)。

結果と考察　ラット網膜の神経網膜の部分と結合組織を含む色素上皮部分より得た膜分画のアデニル酸シクラーゼ活性を比較した（表1）。神経網膜の酵素は高い比活性を示し、ドーパミンとカルモデュリンに明確な活性化作用が認められた。

一方、色素上皮を含む分画の酵素は、これらのリガンドに反応しなかった。網膜のアデニル酸シクラーゼについては、ウサギ、マウス等を用いて、EGTA による活性阻害が、網膜の部分によって異る事を示し、カルシウム依存型、非依存型酵素の存在を示唆した Ferrendelli らの報告がある（2）。しかし、網膜のアデニル酸シクラーゼが、カルモデュリンによって制御されている事を示す結果は、本稿がその最初の報告である。しかも、脳以外では、これ程顕著なカルモデュリン感受性アデニル酸シクラーゼの報告例はない。

微量のカルシウムの存在下で、ラット精巣より精製したカルモデュリン、1−4 nM と 4−40 nM の別の濃度依存性が見られ、活性化の2相性が認められた（図1）。



Ligands (10 uM)	Adenylate Cyclase Activity	
	Neural Retina	Pigmented Epitherium
	pmol/min/mg protein	
control	73.5 + 4.7	9.8 + 0.2
Isoproterenol	104.9 + 5.7	15.3 + 2.4
Histamine	77.8 + 3.2	12.1 + 0.5
Dopamine	123.5 + 2.5	8.9 + 0.2
Seretonin	82.1 + 7.6	9.6 + 1.3
Adenosine	78.2 + 2.4	9.5 + 0.4
PGE_1	86.0 + 6.0	10.5 + 0.3
PGE_2	83.3 + 3.3	8.7 + 1.6
Calmodulin(5 ug)	230.7 + 0.1	8.5 + 0.2

Assay contains 5 uM GTP and 10 uM free Ca^{2+}

表1　ラット網膜アデニル酸シクラーゼに対するホルモンおよびカルモデュリンの効果。

図1　神経網膜アデニル酸シクラーゼに対するカルモデュリンの濃度依存性。　A無添加　Bは10 uM フォルスコリンの添加、反応系は10 uM カルシウムを含む。

フォルスコリンとカルモデュリン

アデニル酸シクラーゼの新しい活性化物質、フォルスコリンによって、10倍以上の活性促進が認められた（図1、2）。フォルスコリンは、脳組織の酵素に対し特にその作用が高く（11）、網膜の酵素は、この点に於ても脳組織の酵素と似ている。

フォルスコリンとカルモデュリンを同時添加すると、2種の促進因子の効果は、相加的かそれよりも高い活性質を示した（図1、2）。脳のカルモデュリン依存性酵素に於ても同じ傾向が示されている（10）。

ドーパミンとカルモデュリン

網膜のアデニン酸シクラーゼは、ドーパミンの濃度依存的に活性化が認められた。低濃度カルシウム存在下で、カルモデュリンの濃度を変化させても、ドーパミンによる活性促進には変化がなく（図3）、カルモデュリンとドーパミンによる活性化も互に独立している事が推察される。

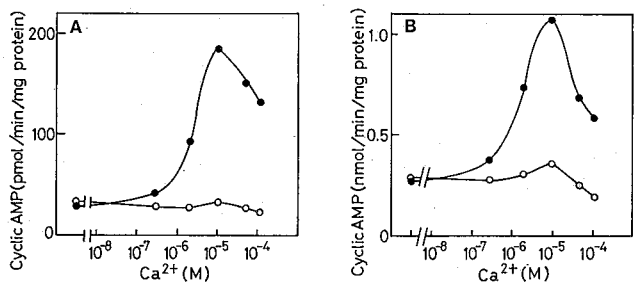


図2　神経網膜アデニル酸シクラーゼに対するカルシウムの濃度効果。　A 無添加　B 10 uM フォルスコリン　● 5 ug カルモデュリン

従ってドーパミンの効果は、カルモデュリンによる活性促進がない状態の方が顕著である。

網膜には、カルモデュリンによって制御される酵素とドーパミンによって制御される酵素が少くとも2種類存在し、別々に制御されている可能性が示唆された。

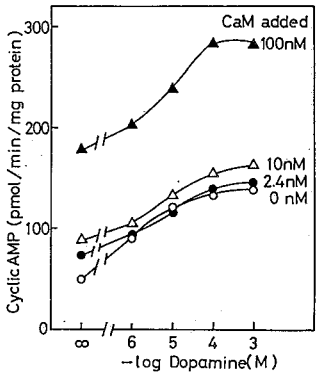


図3　網膜アデニル酸シクラーゼに対するドーパミンとカルモデュリンの効果。

参考文献

1. Amiranoff, B.M. et al. (1983) Eur. J. Biochem. 130, 33
2. Ferrendelli, J.A. et al. (1982) J. Neurochem. 38, 753
3. Gillman, A.G. (1984) Cell, 36, 577
4. Ofulue, I. et al. (1981) Biochem. J. 200, 475
5. Piascik, M.T. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258, 10913
6. Ross, E.M. (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 533
7. Salter, R.S. et al. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9830
8. 佐野 護(1981) アデニル酸シクラーゼ。日高。垣内編 カルモデュリン。講談社
9. Sano, M. & Drummond, G.I. (1981) J. Neurochem. 37,558
10. Sano, M. et al. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 220, 333
11. 佐野 護(1983) フォルスコリンとアデニル酸シクラーゼ。蛋白質 核酸 酵素 28, 943
12. Valverde, I. et al. (1979) Science, 206, 225

追記、本稿印刷後、類似した内容を含む研究論文が発表された。学会に於てはこれについても議論する。(Gnegy et.al. 1984 J. Neurochem. 42, 1632)

101　培養グリオーマ細胞の分化とカルモデュリンおよびS−100

北島哲子・大島章子・佐野　護　（愛知県コロニー・形態）
加藤兼房　（同・生化）
東田陽博　（金沢大・がん研・薬理）

〔要　約〕

C6グリオーマ細胞をフォルスコリンを添加し培養すると、形態の著しい変化と同時にS-100蛋白の増大が認められ、グリア性の細胞分化が誘導される。この分化の際、もう一つのCa^{2+}結合蛋白であるカルモデュリンの量を調べた所、S-100の場合の様な増加は認められなかった。

このC6グリオーマを用いて、カルモデュリンとS-100の細胞内局在について、免疫組織化学の手段を用いて検討した。カルモデュリンは核を除き　細胞質中の繊維状構造に分布する事が認められ、S-100は核と細胞質ともに存在し、やはり繊維状構造が認められた。

フォルスコリンによる細胞の分化に於けるカルモデュリンとS-100の変化についても、免疫組織化学的検討を行った。カルモデュリンは形態変化を起こした細胞に特異な変化を認める事が出来なかったが、S-100蛋白は、形態変化を起こした細胞では、特異に濃く染色された。

生化学的に認めたS-100の増大は、分化していない細胞を含む平均値であり、1個の細胞の分化に伴うS-100量の変化は、更に大きいものである事が示唆された。

Key words : C6GLIOMA,　CALMODULIN,　S-100

フォルスコリンは、細胞や組織のアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP依存性の生理現象を再現又は増強する事が知られる(7,9)。C6グリオーマ細胞は、cAMPを上昇させる因子により、CNP活性、S-100等のグリア細胞の性質を示す機能の増大を伴う細胞分化が誘導される(4,5,6)。我々は、既にC6 B-1細胞を用いて、フォルスコリンが細胞の形態変化を起こし、S-100を増大させる事実を認めた(2)。今回、我々はこの細胞の分化の際、神経細胞に多い、もう一つのCa^{2+}結合蛋白、カルモデュリンの挙動に興味を持った。酵素抗体法による両蛋白の定量と免疫組織化学的方法による細胞内局在を調べ、細胞分化に伴う変化を形態学的にも検討した。

〔実験方法〕

細胞培養は、5%牛胎仔血清、DMEMを用い、37℃、5%炭酸ガス中で行った。100 mmのコーニングのディッシュを使用し、免疫組織化学用には、18×18 mmのカバスリップを底に並べて培養した。カルモデュリン、S-100抗体の作製、両蛋白の酵素抗体法による定量については、既に報告した(3,10)。免疫組織化学は間接免疫Peroxidase法を用いた。方法の詳細は、既に報告した(9)。αチュブリン抗体は、アマシャム製モノクローナル抗体を使用した。二次抗体は、Miles製Peroxidaseラベル抗ウサギまたは抗マウスIgGを用いた。

〔結果と考察〕

フォルスコリンをC6 BU-1細胞培養液に1~100μM添加すると、濃度依存的に数時間で著しい形態変化を起こす。12時間後には、各細胞が長い細胞突起を出し、細胞体は小さくなっている（図2）。形態変化に伴って、増殖速度は少し低下する。

図1aは、10μMフォルスコリン添加後、細胞中のS-100蛋白の量を時間経過を追って測ったものであるが、10時間を過ぎて、単位蛋白あたりのS-100の増大が判別される。一方、カルモデュリンは、フォルスコリン添加による顕著な変化が認められなかった。単位蛋白あたりのカルモデュリンがやや減少する傾向は、細胞密度との関係であるかも知れない(図1b)。このグリオーマ細胞は、グリア性機能を増加する細胞分化において、S-100は増加するが、カルモデュリンはあまり変化しないものと考えられる。

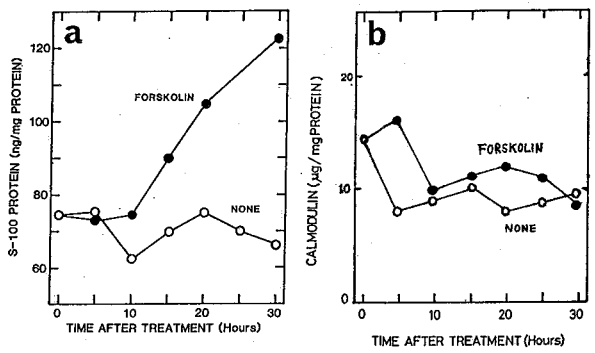


図1、フォルスコリン添加後のC6BU-1細胞抽出液中のS-100(a)およびカルモデュリン(b)の含量。

<u>カルモデュリン、S-100の免疫組織化学</u>

C6グリオーマ細胞をカルモデュリン、チュブリン、S-100について、それぞれ間接免疫Peroxidase法で染色した(図2)。カルモデュリンは、既に3T3などを用いた報告(1,11)にある様に、間期の細胞では、細胞質内網目状構造の上に見られ、分裂期には、スピンドル、ポールが強く染色された。

一方、S-100は、カルモデュリンと異なり、核にその存在が観察されるが、細胞質中では、カルモデュリンと同様、網目状構造上に分布している。分裂期の細胞では、カルモデュリンと異なり、染色体が濃く染まった。この現象については、現在その意義は不明である。

10μMのフォルスコリンを添加し、24時間経過した細胞について、カルモデュリン、S-100、チュブリンの染色を行った。形態変化の著しい典型的な細胞では、S-100が特に強く染まった。しかし、混在する対照群と同様の形状をした細胞では、特に強く染まっていない。カルモデュリンの場合も、変形した細胞はやや濃く染まる傾向を示したが、比較の為に行ったチュブリンの場合も、変形した細胞では、細胞が縮小した分だけ濃縮された様に見える。カルモデュリンとチュブリンは、分布状態の違いからやや濃く見えるが、S-100の様に顕著な量的変化があるとは解釈し難い。

S-100の場合、細胞集団中の増加は、決して均一ではなく、フォルスコリンの影響により、形態学的に分化した細胞では著しく増加しているが、集団中には未反応の細胞も多く含まれている事が推察出来る。従って、生化学的に定量した全体量の変化は恐らく過小に変化を観察している事になり、1個の細胞の変化に伴うS-100の増加は、更に大きいものと考えられる。

フォルスコリンによる細胞分化の不均一性の理由は、恐らく、フォルスコリンに対する感受性の差と考えられる。それは、細胞の周期を同調する事によって克復出来るかも知れない。この事は、細胞の分化誘導のトリガーを探る意味でも、是非検討すべき課題と考えられる。

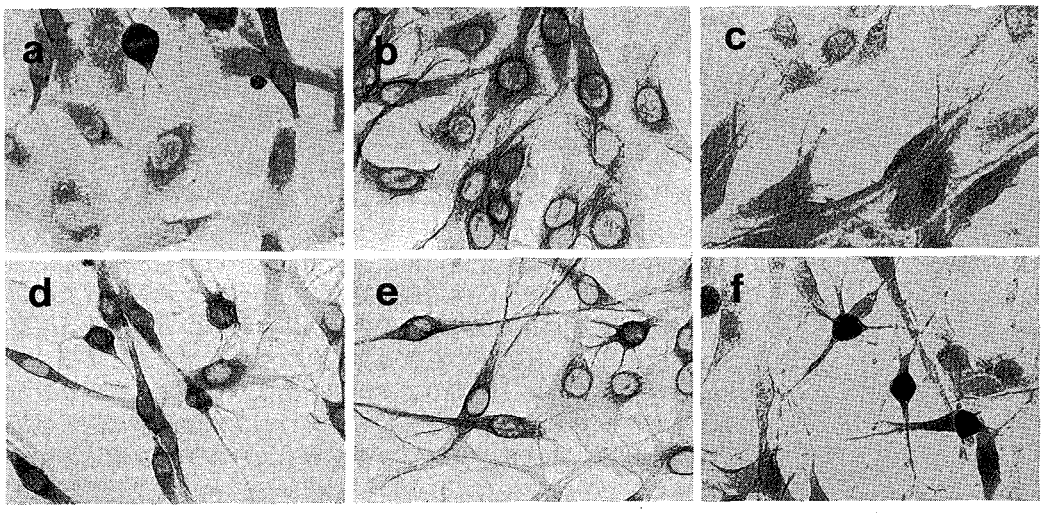


図2、C6BU-1グリオーマ細胞のフォルスコリンによる細胞分化の誘導と免疫組織化学。
10μMのフォルスコリンを添加して、24時間培養した細胞(d,e,f)と対照群(a,b,c)。
a,d:カルモデュリン、b,e:チュブリン、c,f:S-100の間接免疫Peroxidase法による染色。

〔文献〕

1. Dedman, J.R., Welsh, M.J. & Means, A.R. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7515
2. Higashida, H., Sano, M. & Kato, K. (in press) J. Cell. Physiol.
3. Kitajima, S., Seto-Ohshima, A., Sano, M. & Kato, K. (1983) J. Biochem. 94, 559
4. Labourdette, G. & Mandel, P. (1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 96, 1702
5. Maltese, W.A., Reiltz, B.A. & Volpe, J.J. (1980) 192, 709
6. McMorris, F.A. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4501
7. 佐野護、蛋白質・核酸・酵素 (1983) 28, 943
8. Sano,M., Kato, K., Seto-Ohshima, A. & Mizutani, A. (1984) Acta, Histochem. Cytochem. 17, 251
9. Seamon,K.B., Padgett, W. & Daly, J.W. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 3363
10. Suzuki, F., Nakajima, T. & Kato, K. (1982) J. Biochem. 92, 835
11. Welsh, M.J., Dedman, J.R. & Means, A.R. (1979) J. Cell. Biol. 81, 624

102　牛副腎髄質細胞の凍結保存・二次培養法

高橋正身・畠中　寛　（三菱化成生命研）
熊谷鴻之助　（上智大・生命研）
溝部文夫　（老人研）

〔要　約〕

ウシ副腎髄質細胞をさらに扱いやすい実験材料として使う可能性を求め，凍結保存法の可否を検討した．コラゲナーゼ／ＤＮアーゼＩ灌流法により単離しパーコール法等により分画したウシ副腎髄質細胞をいったんバクテリア用Petri Dish中で２－３日間，半浮遊培養をした後，１０％ＤＭＳＯを含む準胎児牛血清中で凍結保存した．再び常温の培養液に戻した細胞の生存率は６０％前後に安定していた．二次培養に移した凍結保存細胞を抗チロシン水酸化酵素抗体で染色してみたが，形態的には凍結前の初代培養細胞との差異は認められなかった．凍結保存後の細胞内のノルエピネフリン含量には，凍結保存の影響は見られなかったが，エピネフリン含量は約２分の１に減少した．しかし，その後５日間の二次培養中には，ノルエピネフリンおよびエピネフリン含量には大きな変化が見られなかった．一方，チロシン水酸化酵素活性は培養日数に従い若干の増大傾向を示した．二次培養副腎髄質細胞もカテコールアミン取込み能および脱分極依存性の分泌能を保持しており，カルバミルコリンおよびベラトリジン感受性もまた有していた．以上の結果は，副腎髄質細胞を扱う上で凍結保存－二次培養法は一つの有効な手段であることを示している．さらに，この方法は，新生牛副腎髄質からの髄質細胞の調製にも用いることができた．

Key words：Bovine Adrenal Chromaffin Cell, Secondary Culture, Catecholamine

神経分泌の分子機構を研究する上で単離したウシ副腎髄質細胞は非常に有用な研究材料として近年益々多くの研究者によって用いられるようになってきている（１，２）．その理由として，分泌細胞系として，ほぼ均一な細胞集団を比較的容易に得ることができることが考えられる．例えば，４対の成牛副腎から髄質細胞は10^8個以上を得ることが可能である（３－５）．しかし，ウシ副腎髄質細胞の調製は，かなりの専門的技術を要し，かつ，得られる細胞はロット毎にある程度のバラツキが生じるのは避けられない（３－５）．今回，私たちはこの系のロット差を無くし，多数の研究者が同じロットの細胞を用いて様々な実験を行なえるように，いったん培養した細胞を凍結保存して，その後，二次培養が可能か否かを試みた．このことにより正常組織由来の細胞を株細胞と同じように取り扱える事も可能となるであろう．即ち，成牛からコラゲナーゼ／ＤＮアーゼＩ処理により単離した髄質細胞をいったん培養し様々な条件下で凍結保存した後培養下においた場合正常な細胞機能を保持しているか否かを検討した．副腎髄質細胞の分化を調べる目的で，新生牛副腎髄質からも細胞の調製を試みた．

【実験方法】　ウシ副腎髄質細胞の調製はLivettらの方法（３）およびWaymireらの方法（５）を一部改良し行った（６，７）．屠殺場より氷冷下に持ちかえった副腎から直ちに皮質と髄質を分離し，静脈出口にカニューレをさし込みLocke液で室温，１０分程度の予備灌流した後，０.５mg/mlコラゲナーゼ（和光純薬）および２７μg/mlＤＮアーゼＩ(Sigma)を含むHanks液で，６０－９０分灌流消化を行った後，さらに機械的な細断によって細胞懸濁液を作った．これをナイロンメッシュ(80μm)で口過した残査をさらに３０分間，上記と同組成の酵素液で処理した．得られた単離細胞を遠心で集めた後，パーコール法あるいは再遠心法によってcell debrisや赤血球を除いた．髄質細胞の分画を２－５Ｘ10^5 cells/mlの１０％準胎児牛血清（三菱化成）を含むＤＦ培地（ＤＭＥ／Ｆ１２（１：１）にHepes,Seを含む）に懸濁した後，１０cm径のPetri Dish(Falcon,#1005)に１０－３０ml加え２－３日間培養した．Petri Dishは親水性のコートがないため細胞はほとんど接着せず，半浮遊しており数回のピペッチングにより

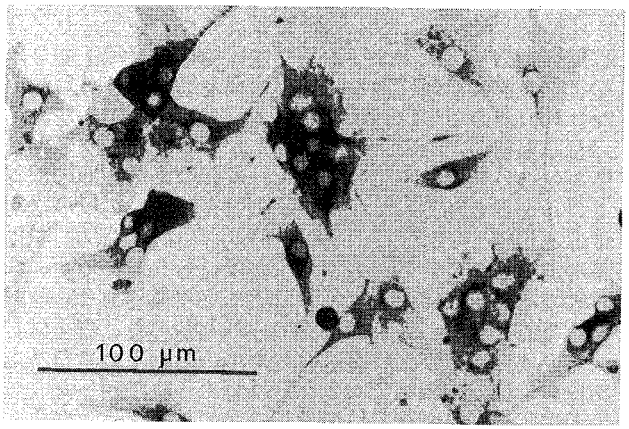


図1　二次培養副腎髄質細胞の抗ＴＨ抗体染色．凍結保存より再び培養下に戻し，コラーゲンでコートした３５mm Culture Dishに，５%準胎児牛血清と５%非動化馬血清を含むＤＦ培地で２日間培養した．細胞はＰＢＳで洗った後，４%パラホルムアルデヒトで固定した後，抗ＴＨモノクローナル抗体（ＰＣＴＨ－７）で染色した．発色はマウスＰＡＰ(Jackson)に対して4-Chloro-1-naphthol(Bio-rad)を基質として行った．

細胞を容易に回収できた．また，結合組織由来の細胞は接着しないで生育することが難しいのでほとんど増殖しない．遠心して集めた細胞は１０%ＤＭＳＯを含む血清に懸濁し分注して凍結した．凍結は発泡スチロール性の容器を用い－８０度C迄ゆっくりと１日かけて温度を下げ，その後，液体窒素に移した．細胞を戻す時は，凍結した細胞を速やかに融解し，遠心でＤＭＳＯを除いた後，５%準胎児牛血清と５%非動化馬血清(Gibco)を含むＤＦ培地に懸濁し，コラーゲンでコートした３５mm径のCulture Dish(Falcon,#3001)にまき培養した後，種々のアッセイを行った．カテコールアミンは０．２N過塩素酸抽出後，アルミナ脱着の後，ＨＰＬＣで分離後，ボルタメトリー検出器で定量した．細胞からのカテコールアミン分泌は ^{3}Hノルエピネフリンをあらかじめ取りこませた細胞を用い遊離する ^{3}Hを測定した（８）．チロシン水酸化酵素（ＴＨ）活性は脱炭酸法で測定した（９）．蛋白量はLowry法で求めた．

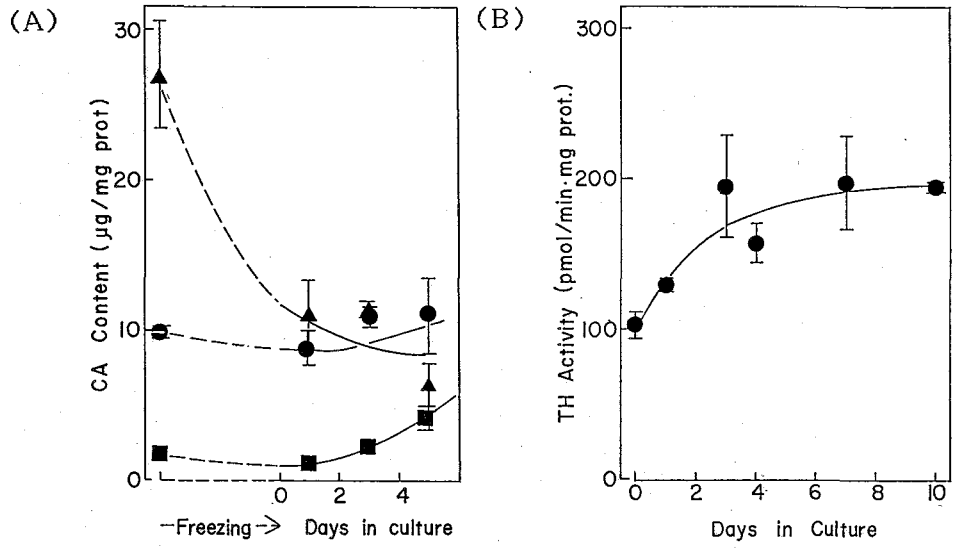


図2　凍結保存前後での培養副腎髄質細胞のカテコールアミン含量（A）およびチロシン水酸化酵素活性（B）の変化．　A．凍結保存時の（３日間初代培養細胞）および凍結より戻して再び培養下におき横軸の期間二次培養した細胞内のカテコールアミン含量．　▲，エピネフリン；　●，ノルエピネフリン；　■，ドーパミン．
B．二次培養後の細胞におけるチロシン水酸化酵素活性の培養日数による変化．

【結果と考察】　ウシ副腎髄質よりコラゲナーゼ／ＤＮアーゼＩ処理の結果，単離した副腎髄質細胞のアセチルコリン感受性は細胞調製後１－２日間は低下しているとの報告がある．このような酵素処理による細胞の損傷を回復させる目的で，私たちは単離した細胞を２－３日間Petri Dish中で半浮遊培養をした後，細胞の凍結を試みた．細胞の凍結には，１０％ＤＭＳＯ／９０％血清を標準として用いたが，ＤＭＳＯを５％に減少させても，また，血清の代りに血清を含むＤＦ培地を用いても，一週間程度の短期の保存の場合，戻した細胞の生存率は大差なく５５－６５％であった．長期の保存については今後明らかにする予定である．初代培養を半浮遊とせず１０cm径のCulture Dish(Falcon,#3003)を用い，その後，トリプシン処理で細胞を集め凍結した場合でも生存率に差は見られなかった．図１は凍結保存後培養下においた副腎髄質細胞を抗ＴＨ抗体（１０）で染めた写真である．凍結保存し二次培養した細胞も形態的には初代培養細胞と顕著な差は認められなかった．表１は，初代および二次の培養細胞でのカテコールアミン含量，組成を比較したものである．蛋白あたりのノルエピネフリン（ＮＥ）量は凍結保存の前後の細胞で大きな差は認められなかった．しかし，エピネフリン（Ｅ）の含量については二次培養細胞では減少し，Ｅ／ＮＥ比は３から１前後に減少した．図２は，二次培養下の副腎髄質細胞のＴＨ活性とカテコールアミン含量の培養日数に伴う変化を示したものである．ＴＨ活性は，培養５日目まで徐々に増大し，その後一定した．一方，ＮＥおよびＥ含量は培養日数にかかわらずほぼ一定の値を示した．図３は，二次培養の副腎髄質細胞からのカテコールアミン遊離の時間経過を示したものである．二次培養下の細胞も外液からのカテコールアミンを取込み，高カリウム，ベラトリジンおよびカルバミルコリン刺激に応じて遊離する能力を保持していた．以上の結果は単離副腎髄質細胞は細胞機能の多くを失うことなく凍結保存でき，二次培養を行なうことができることを示している．

成牛からの副腎髄質細胞の調製のみならず，私たちは，新生牛からの副腎髄質細胞の凍結保存ー二次培養法がまた可能であることを明らかにしている．

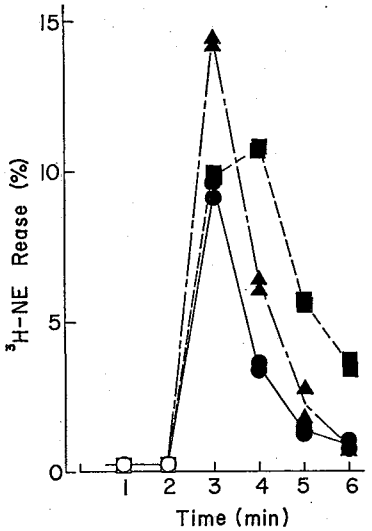


表１　凍結保存前後の副腎髄質細胞のカテコールアミン含量．

Cells in culture	Catecholamine contents NE	E	DA
	(μg/mg protein)		
Primary for 3 days	3.18±1.11	15.80±0.05	0.57±0.03
Secondary for 1 day	3.12±0.07	8.65±0.59	N.D.
3 days	5.67±0.08	9.61±0.07	1.12±0.15
Primary for 2 days	9.87±0.30	26.90±3.50	1.65±0.22
Secondary for 1 day	8.81±1.15	13.30±0.92	1.10±0.19

図３　二次培養副腎髄質細胞（２日間培養）からのカテコールアミン遊離．^{3}Hノルエピネフリンをあらかじめ取りこませた細胞からの^{3}Hの遊離を１分毎の外液の交換によって測定した．%遊離はそれぞれの時点での細胞に存在していた総^{3}Hに対する値で示した．●，５１.４mM ＫＣｌ；■，５０μMベラトリジン；▲，３００μMカルバミルコリン．

【文献】

1. B.G. Livett, P. Boksa, D.M. Dean, F. Mizobe & M.H. Lindenbaum, J. Auto. Nerv. System, 7, 59-86 (1983)
2. H.-Y.T. Yang, T. Hexum & E. Costa, Life Sci., 27, 1119-1125 (1980)
3. E.M. Fenwick, P.B. Fajkiga, N.B.S. Howe & B.G. Livett, J. cell Biol., 76, 12-30 (1978)
4. K. Unsicker, G.-H. Griesser, R. Lindmar, K. Loeffelholz & U. Wolf, Neurosci., 5, 1445-1460 (1980)
5. J.C. Waymire, W.F. Bennett, R. Boehme, L. Hankins, K. Gilmer-Waymire & J.W. Haycock, J. Neurosci. Methods, 7, 329-351 (1983)
6. 熊倉禎之助，『クロム親和性細胞』宮武，黒田編，科学評論社.1984年，印刷中
7. 溝部　文夫，『クロム親和性細胞』宮武，黒田編，科学評論社.1984年，印刷中
8. M. Takahashi, Y. Ohizumi & T. Yasumoto, J. biol. Chem., 257, 7283-7289 (1982)
9. H. Hatanaka, Brain Research, 222, 225-233 (1981)
10. H. Hatanaka & Y. Ariamtsu, Neurosci. Res., 1, in press (1984)

103 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞における神経分泌の動態Ⅱ：細胞外液中の2価陽イオンによる調節作用

小原美佳・中川　豊・熊倉鴻之助
（上智大・生命研）

〔要　約〕

牛副腎髄質から調整した初代培養クロマフィン細胞を用いて，Cell Bed Closed Perfusion (CBCP) system による灌流実験を行ない，分泌動態を電気化学検出器 (ECD) により直接測定して Acetylcholine (ACh) 刺激への分泌応答と KCl による脱分極刺激への分泌応答に及ぼす2価陽イオンの作用を比較検討し，それぞれの分泌応答の機能調節機構に考察を加えた。

培養細胞に一定濃度の ACh または KCl 刺激を連続的に加え，応答能が不活性化された後灌流液中の Ca 濃度を急激に低下させると，脱分極刺激の存在下に限って一過性の分泌応答が引き起こされた。この現象は Ca を他の2価陽イオン(Mg,Sr)で置き換えても同じように得られ，その大きさは急激に低下するイオンの濃度差に依存していた。またこの一過性の応答は，灌流液に 20 mM の Mg を加えることによって阻止されることから，クロマフィン細胞では細胞の表面電荷が voltage sensitive Ca channels の機能調節に関与している可能性が示唆された。

これに対し，ACh 連続刺激に対する応答能が不活性化された状態ではこのような表面電荷の変動は何の影響も持たず，ACh receptor channels と voltage sensitive Ca channels の機能調節における表面電荷の関与様式が異なることが示唆された。

Key words：　Adrenal chromaffin cells,　Secretory function,　Surface charges

培養クロマフィン細胞に持続的に ACh 刺激或いは KCl による脱分極刺激を加えるとカテコールアミン (CA) 遊離が引き起こされるが，その応答は数分以内に不活性化に至る。前報[4]において我々は CBCP system と ECD の連動によって分泌応答の動態を直接観察できることを示し，クロマフィン細胞において ACh 刺激への分泌応答の不活性化と，脱分極刺激への不活性化とは，それぞれ異なる機構によって引き起こされる可能性を示唆した。

今回の研究では，ACh 刺激と脱分極刺激へのそれぞれの分泌応答の不活性化状態の異同をより明確にするために，ACh 刺激への分泌応答と脱分極刺激への分泌応答に対する細胞外2価イオンによる調節作用を検討した。

［実験方法］

(1) クロマフィン細胞の培養　牛副腎髄質より Waymire らの方法[7]に従って単離調製し，培養3～10日の細胞を実験に用いた。

(2) CBCP-ECD system による測定　CBCP system による実験は既報[3,4]の方法に従った。即ち，2枚の membrane filter にはさまれた約 10^7 個の細胞を 0.3ml の space に保持し，この cell bed を Locke's 溶液，2ml/min で灌流した。ACh または KCl による連続刺激を与える際は灌流液を刺激物質溶液に置き換えて与えた。ECD は bas 社製 LC-4B を用い，電極に 450 mV の固定電位を印加し，灌流液中に遊離された物質の電解電流 (I/nA) を測定し，電流一時間曲線として記録した。

(3) HPLC system による測定　ECD セルを通過した後，CBCP system の灌流液は fraction collector により分取し，各 fraction に含まれる CA 量を HPLC 法により定量した。[4]

［結果］

CBCP system 灌流液の Ca^{2+} 濃度を 23 mM([Cation 1])にして KCl 刺激を持続的に与えると，通常の Ca^{2+} 濃度(2.3mM)の場合と全く同様に培養細胞の分泌応答は鋭い立ち上がりを見せた後，直ちに不活性化状態に移る。充分に不活性化が進行した後に脱分極刺激を与え続けながら灌流液中の Ca^{2+} 濃度のみを急激に 2.3 mM ([Cation 2])に落とすと，再び一過性の鋭い分泌応答が得られた(図-1)。KCl 刺激では広範囲の K^+ 濃度に渡って同じ現象が見られたが，2価陽イオン濃度を急激に[Cation 2]に落とした時の応答のピーク高を[Cation 1]における分泌応答のピーク高に対する比(Relative Response)で表わして分泌応答の大きさをみると，K^+ 濃度が 30 mM 付近で特に大きな応答が得られた。[Cation 2]への切替えによって引き起こされる一過性の分泌応答は，[Cation 2]に 20mM の Mg^{2+} を加えることによって完全に阻害され(図-2)，この分泌応答は voltage dependent Ca^{2+} entry[2,5] を介していることが示された。

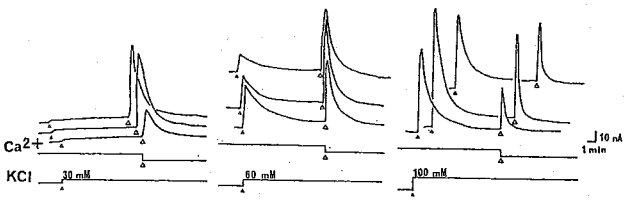


図-1 KCl 連続刺激への分泌応答の動態と Ca 濃度の低下によって引き起こされる分泌応答：Δで灌流液中の Ca 濃度を 23mM から 2.3mM に低下させた。

一方，ACh 連続刺激についても同様の実験を行なった。図-3 に示すように，異なった濃度の ACh 連続刺激の存在下で充分不活性化を進行させた後，灌流液の Ca^{2+} 濃度を 23mM から急激に 2.3mM に下げても KCl 刺激で見られたような一過性の分泌は引き起こされず，それぞれの不活性化の性格に大きな相違があることを示している。

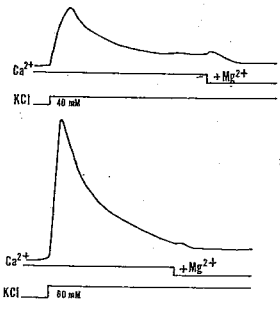


図-2 Mg^{2+} 20 mM による分泌応答の阻害

一定の K^+ 連続刺激中で Ca^{2+} 濃度の急激な下降によって引き起こされる一過性の分泌応答の大きさは，[Cation 1]と[Cation 2]の濃度差に依存する(図-4)。しかし[Cation 1]が23 mM の場合に比べて，23 mM 以下の[Cation 1]から[Cation 2]に低下させた場合，同じ濃度差の低下で引き起こされる分泌応答はより大きな Relative Response を示した。

このような現象における Ca^{2+} の作用部位を明確にする為に，他の2価陽イオンがこの外液 Ca^{2+} の代用をし得るか否かを検討した。クロマフィン細胞からの CA 分泌に対する Mg^{2+} の阻害作用は Ca^{2+} 濃度を上げることにより打ち消される[1]。そこで，10mM の Mg^{2+} によっても全く阻害を受けない事が知られている Ca^{2+} 濃度 1.3 mM を基に，Mg^{2+} 及び Sr^{2+} をそれぞれ 0～10 mM 加えて[Cation 1]の濃度を 13～23 mM の間に設定し，KCl 60mM の連続刺激存在下で Ca^{2+} 2.3 mM を含む[Cation 2]に切り替えた場合の一過性の分泌応答の Relative Response 値を求め，既に図-4 に示した Ca^{2+} のみの濃度差依存曲線と比較した。図-5 から明らかなように，Mg^{2+}, Sr^{2+} を含む灌流液の陽イオン濃度を[Cation 1]から[Cation 2]に急激に下げた場合も，Ca^{2+} のみの場合と全く同じ一過性の分泌応答が得られ，しかもその Relative Response 値－濃度差曲線は

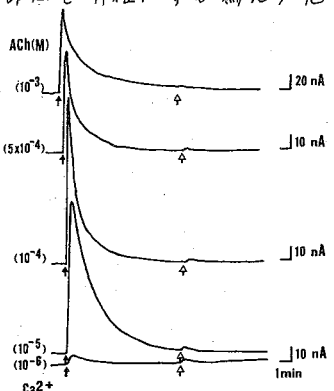


図-3 Ach 連続刺激への分泌応答に与える Ca^{2+} 濃度低下の影響

良く近似していた。すなわち，この一過性の分泌応答における細胞外Ca^{2+}の作用はMg^{2+}, Sr^{2+}の2価陽イオンによってほぼ同等に置き換えられることが明らかとなった。

1価の陽イオンであるLi^+について同じ実験を行なった所，Li^+では2価陽イオンで見られた一過性の応答は引き起こされず，Li^+濃度に全く関係なく，[Cation 1]がCa^{2+}

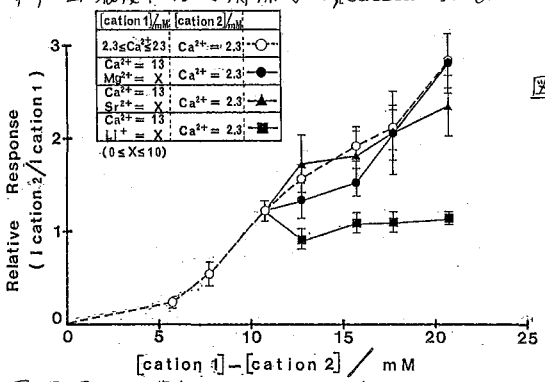


図-5 陽イオン濃度の低下によって引き起こされる分泌応答の大きさと濃度差の関係 (KCl=60mM)

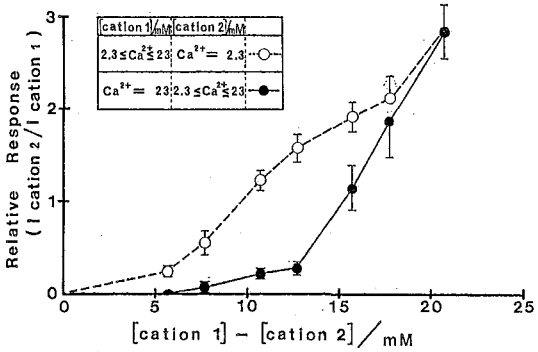


図-4 Ca^{2+}濃度の低下によって引き起こされる分泌応答の大きさと濃度差の関係 (KCl = 60mM)

13 mMの場合のRelative Responseと同じ応答が示された(図-5)。しかし図-5に示した実験の灌流液にはLi^+以外に高濃度のNa^+とK^+が含まれており，この結果から直ちに1価陽イオンの影響を否定はできない。そこで，灌流液のNa^+をsucroseに置き換えてNa^+-freeとし，更に脱分極刺激を与えるK^+濃度を15 mM分泌応答の大きさと濃度差の関係(KCl=60mM)に減少させてLi^+の影響を調べた所，Li^+濃度を20.7 mM低下させると，Relative Response=1.1を持つ一過性の分泌応答が得られ，1価陽イオンも2価陽イオンと同じ作用を示すことが示唆された。しかし，60mM KClによる脱分極刺激を加えた場合は，このようなLi^+の作用は全く見られず，この点で2価陽イオンと異なった。

[考察]

CBCP systemでクロマフィン細胞に一定濃度のAch又はKCl連続刺激を与え，応答能が不活性化された後，灌流液中のCa^{2+}濃度を急激に低下させると，脱分極刺激の存在下に限って一過性の分泌応答が得られた。外液Ca^{2+}の作用はMg^{2+}, Sr^{2+}によってほぼ等しく置き換えられること，及び分泌応答の大きさは低下する外液イオンの濃度差に依存することから，この一過性の応答は副腎の臓器灌流実験[6]で示唆されているのと同じく，2価陽イオンが細胞表面電荷を変化させた結果であると考えられる。更に，この応答は20 mM Mg^{2+}によって完全に阻害されることからvoltage dependent Ca^{2+} entryを介しているものと考えられ，表面電荷の変化が不活性化で閉じたvoltage dependent Ca channelsを一過性に開かせた(再活性化した)結果であると推察される。またこのCa^{2+}channelsの開閉は膜電位変化を伴なわない開閉であることが実験から推察される。一方，ACh連続刺激の場合の結果と合わせて考えると，ACh receptor channelsとvoltage dependent Ca channelsの機能調節における表面電荷の関与様式に違いがあることが推察される。

文献
1. Douglas,W.W. & Rubin, R.P. (1963) J.Physiol.,167;288-310.
2. Kidokoro,Y. & Ritchie,K. (1980) J.Physiol., 307;199-216.
3. Kumakura,K., Sasakawa,N., Oizumi,N., Kobayashi,K., & Kuroda,Y. (1982) In: Synthesis, Storage and Secretion of Adrenal Catecholamines, (eds. F.Izumi, M.Oka and K.Kumakura), Pergamon Press, Oxford, England, pp.79-86.
4. 飯倉鴻三郎，小原秀雄，中川里，関谷真，藤原三二，佐藤弘．(1983) 神経化学，22;126-128.
5. Schneider,A.S., Cline,H.T., Rosenheck,K. & Sonenberg,M. (1981) J.Neurochem.,37;567-575.
6. Sorimachi,M. & Nishimura,S. (1982) Brain Res.,246;150-153.
7. Waymire,J.C., Waymire,K.G., Boehme,R., Noritake,D. & Waedell,J. (1977) In: Structure and Function of Monoamine Enzymes, (eds. E.Usdin, N.Weiner and M.B.H.Youdim). Dekker, N.Y. pp.327-363.

104　クロマフィン細胞アセチルコリンエステラーゼのベラトリジン刺激による細胞膜からの遊離

溝部文夫
（老人研）

〔要　約〕

牛副腎髄質からクロマフィン細胞を単離し、単層培養した。この培養細胞が、刺激によりアセチルコリンエステラーゼ（AChE）を細胞外へ放出すること、放出AChEのうち一部は細胞膜表面に由来すること、等をこれまでに報告してきた。このことをさらに確かめるために、BW284C51（BW）とジイソプロピルフルオロリン酸（DFP）を組み合わせて選択的に細胞内AChEを修飾阻害した培養細胞を使い、放出実験を行なった。

（1）BW+DFP処理により、培養クロマフィン細胞では、全AChEのうち67±2%(n=7)が細胞膜表面に存在することが明らかになった。

（2）細胞膜表面AChEのみが活性をもつようBW+DFPで処理した培養細胞をベラトリジン刺激すると、未処理対照細胞の場合の約30%にあたるAChE活性が放出された。

（3）一方、同時に測定したカテコールアミン（CA）放出量とドーパミン-β-水酸化酵素（DBH）放出量には、BW・DFP処理による影響はまったく見られなかった。

これらの結果から、ベラトリジン刺激により培養クロマフィン細胞から放出されるAChEのうち一部（30±5%, n=6）は細胞膜表面に由来することが、再確認された。

Key words：　Adrenal chromaffin cells, Acetylcholinesterase release, Plasma membrane

神経細胞から、興奮に伴なってAChEが放出される事実が報告されている。[1X10]　このAChE放出の機構を明らかにするため、発表者らは培養牛副腎髄質クロマフィン細胞を使って研究を進めている。これまでに、（1）ニコチン・ベラトリジン等の刺激により、外液中のCa^{2+}に依存して、AChEがCAと並行して放出されること[6,7]、（2）細胞膜表面AChEを選択的に修飾阻害した培養細胞での実験結果より、この放出AChEの一部は細胞膜表面に由来すること[3X5]、を報告した。今回は、細胞内AChEを選択的に修飾阻害した培養細胞での実験により、放出AChEの一部が細胞膜表面に由来することを再確認しえたので、その結果について報告する。

［実験方法］

クロマフィン細胞の培養　クロマフィン細胞を、コラゲナーゼ処理等により牛副腎髄質から単離し、DMEM-10%牛胎児血清培養液中で単層培養した[7]。

DFPによる培養細胞AChEの修飾阻害とBWによる阻害からの保護　培養細胞（培養開始後7-10日）をPBS液（Phosphate-buffered saline）にてよく洗った後、PBS液に溶かしたDFP（2.5×10^{-5}M）を室温で作用させ、培養細胞AChEの修飾阻害反応を行なった。AChEをこの阻害反応から保護する際は、まずBW（2.5×10^{-5}M）を1.5分間作用させ、その後、BW存在下でDFPを作用させた。反応後、細胞をよく洗い、未反応DFPおよびBWを取り除いた。0.25% Triton X-100にてAChEを抽出し、その残存活性を測定した[4]。

培養細胞からのAChE・CA・DBHの放出　BW・DFP処理培養細胞あるいは未処理の対

照細胞に、KRH液(HEPES-buffered Krebs-Ringer saline)に溶かしたベラトリジン(10^{-4} M)を作用させて、AChE・CA・DBHの放出実験を行なった。37°Cにて12分間作用させた後、KRH液を回収、遠心分離し、その上清分画中のAChE活性・CA量・DBH活性を測定した。自発的放出量(basal release)は、ベラトリジンを含まないKRH液で同様の実験を並行して行ない、求めた。ベラトリジン作用下での全放出量から、自発的放出量を差し引き、刺激による放出量として結果を表わした。

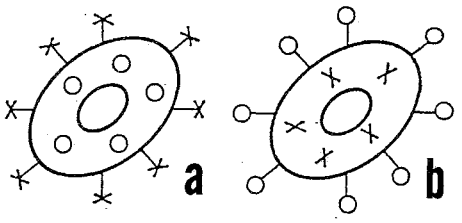


図1　フォスフォリン(a)およびBW+DFP(b)による細胞AChEの修飾
○は活性をもつ、×は失活したAChEを表わす。

測定法　AChE活性は^{3}H-AChを基質とするJohnsonら[2]の方法により、CAはRenziniら[9]の螢光法により、DBH活性はNagatsuら[8]の方法により、それぞれ測定した。

[実験結果ならびに考察]

BW+DFP処理による細胞内AChEの選択的修飾阻害

前大会においては、フォスフォリンによる細胞膜表面AChEの選択的修飾阻害(図1a)およびこの処理を施した培養細胞におけるAChE放出について報告した[3]。これは、フォスフォリンの、(1)AChEと反応して共有結合を作り失活させる、(2)細胞膜を通過できない、という性質を利用したものであった。AChE阻害剤には、フォスフォリンとはまったく異なる性質をもつものがある。例えば、BWはAChEの活性中心と可逆的に結合して、また、DFPは活性中心にあるアミノ酸残基と共有結合して、それぞれ活性阻害をひきおこし、かつ、BWは細胞膜を通過できないが、DFPは通過できる、という具合である。したがって、BW存在下で細胞をDFP処理し、その後BWと未反応DFPを洗い去ると、細胞内AChEのみがDFP修飾を受けて失活することになる(図1b)。今回は、BW+DFP処理による細胞内AChEの選択的修飾阻害を行ない、この処理を施した培養細胞におけるAChE放出について検討した。

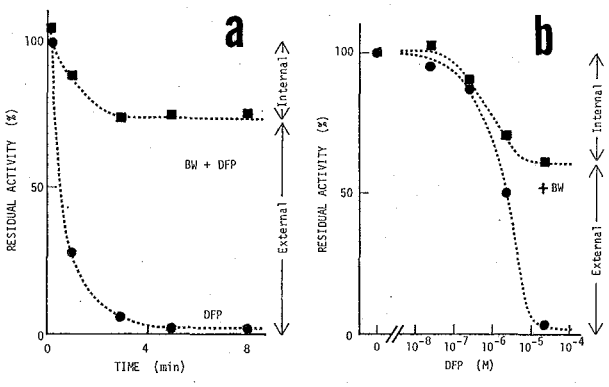


図2　DFPによる培養細胞AChE修飾阻害とBWによる保護. (a)時間経過　(b)DFP濃度の影響

培養細胞をDFP処理すると、AChE活性は、急速にかつほぼ完全に失われた。しかし、BW存在下では、失活は約35%にとどまった(図2)。これは、すでに述べた理由により、BWが細胞膜表面AChEをDFP修飾反応から保護したためと考えられる。事実、細胞表面に存在する活性のみを測定する方法を用いると、BW存在下ではDFP処理によるAChE活性の阻害はまったく認められなかった[4]。培養クロマフィン細胞では全AChEのうち67±2%(n=7)

が細胞膜表面に存在することが、このような実験により明らかになった。この値は、フォスフォリン処理により得られた値とよく一致した（表1）。

BW・DFP処理細胞からのAChE放出

BW+DFP処理により細胞膜表面のみのAChEが活性をもつ細胞（図1b）を、BW処理により細胞内・膜表面両方のAChEが活性をもつ細胞を、DFP処理により全AChEが失活した細胞をそれぞれ作り、これらの細胞からのベラトリジン刺激によるAChE・CA・DBH放出について調べた。その結果（図3）、

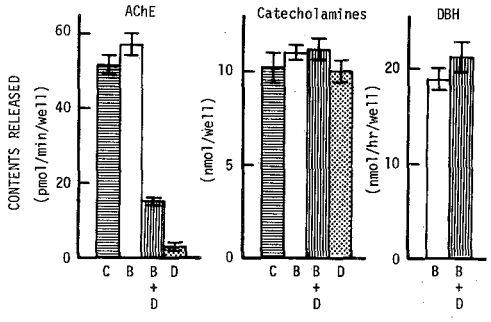


図3　BW・DFP処理培養細胞からのベラトリジン刺激によるAChE・CA・DBHの放出
C,無処理；B,BW処理；B+D,BW+DFP処理；D,DFP処理

（A）BW処理細胞からは未処理対照細胞と同量の、BW+DFP処理細胞からは対照の約30%量のAChE活性が放出された。（B）これらの細胞の間では、CA放出量およびDBH放出量に関しては差はなかった。

これらは、（1）BW・DFP処理は細胞のベラトリジン刺激に対する感受性に影響を与えない、（2）ベラトリジン刺激により、細胞内からばかりでなく細胞膜表面からも少量ながらAChEが放出される、ことを示している。このような実験により、ベラトリジン刺激で培養クロマフィン細胞から放出されるAChEのうち、30±5%（n=6）は細胞膜表面に由来することが明らかになった。この値は、フォスフォリン処理細胞で得られた値とよく一致した（表1）。

クロマフィン細胞が、刺激を受けてCAやDBHをクロマフィン顆粒からエキソサイトーシスにより分泌することは周知のことである。今回の実験は、エキソサイトーシスと並行して、細胞膜表面からAChEを放出する機構が、クロマフィン細胞において働いていることをさらに確かなものにした。

表1　フォスフォリン処理細胞とBW+DFP処理細胞とでの実験結果の比較

	細胞膜表面に存在するAChEの割合	放出AChE活性のうち膜表面由来が占める割合
フォスフォリン処理	64±1%（13）	28±4%（8）
BW+DFP処理	67±2%（7）	30±5%（6）

mean±s.e.m.

[文献]

1) Greenfield, S., Cheramy, A., Leviel, V. and Glowinski, J. (1980) Nature 284, 355-357
2) Johnson, C.D. and Russell, R.L. (1975) Anal. Biochem. 64, 229-238
3) Mizobe, F. (1983) Shinkeikagaku 22, 123-125
4) Mizobe, F. and Iwamoto, M. (1983) Biomed. Res. 4, 543-548
5) Mizobe, F. and Iwamoto, M. (1984) Biomed. Res. 5, 83-88
6) Mizobe, F., Iwamoto, M. and Livett, B.G. (1984) J. Neurochem. 42, 1433-1438
7) Mizobe, F. and Livett, B.G. (1983) J. Neurosci. 3, 871-876
8) Nagatsu, T. and Udenfriend, S. (1972) Clin. Chem. 18, 980-983
9) Renzini, V., Brunori, C.A. and Valori, C. (1970) Clin. Chim. Act. 30, 587-594
10) Skau, K.A. and Brimijoin, S. (1978) Nature 275, 224-226

105 PC 12 Pheochromocytoma 細胞の突起形成の Na^+ 依存性

小池達郎
（佐賀医大・化学）

〔要　約〕

Pheochromocytoma PC 12細胞の突起形成の細胞外液一価イオン（Na^+, K^+, Cl^-）に対する影響を調べた。神経成長因子（NGF）による突起形成は外液の Na^+ をコリンに置換すると阻害された。突起を持つ細胞は外液の Na^+ 濃度にほぼ比例してその数が増加した。浮遊培養であらかじめNGF処理した細胞の突起形成は 60～150 mM Na^+ では正常であったが，60m M以下では外液の Na^+ に依存性を示した。Cyclic AMPによる突起形成は同様に Na^+ 依存性を示したが，NGF前処理は効果なかった。一方NGFによる突起形成は外液の K^+ には依存しなかった（5～106 m M）。この結果は種々のイオノフォアを用いた実験によっても確めた。Cl^- を NO_3^- 又は SO_4^{2-} 又は 2-hydroxy ethane sulfonate で置換しても突起の成長は観察された。これらの結果から細胞外液の Na^+ が突起成長の調節にかかわっている事が明らかになった。Ca^{2+} 感受性蛍光色素により細胞質 Ca^{2+} 濃度をモニターすると Na^+ 除去により細胞内 Ca^{2+} は 0.21±0.02 μM（平均±SD; n=6）より 0.09±0.01 μM (n=4) に減少したがその時間経過は Na^+ 除去による突起形成阻害のそれとよく似ていた。この結果およびその他の事から Na^+ 除去は細胞質 Ca^{2+} の低下を引きおこし突起の形成を阻害したと考えられた。

Key words : Neurite Formation, Pheochromocytoma, Nerve Growth Factor, Cyclic AMP, Na^+, K^+, Cl^-.

Rat Pheochromocytoma PC 12細胞は神経成長因子（NGF）又はCyclic AMPに応答して突起を生ずる事が知られ（1～3），電顕による研究からこの突起は交感神経節細胞のそれと似ている事が示された（1, 4, 5）。Burstein と Greene（6）によるとNGFによるPC 12細胞の突起形成はRNA合成に依存する過程と依存しない過程から成り，NGFを前処理した細胞の突起の成長は後者の過程のみに依存すると言う。NGFによるPC 12細胞の突起成長は温度，pH，細胞外液の組成等に依存する（7～9）。細胞外液のイオン組成の内 Ca^{2+}, Mg^{2+} および K^+ についてはその効果が既に報告されている（7, 10～12）が Na^+ イオンの影響については調べられていない。本報告ではPC 12細胞の突起形成の Na^+ 依存性を細胞内カルシュム濃度との関連に於いて議論した。

〔実験方法〕

培地：116m M NaCl，5.4mM KCl，6 mM $NaHCO_3$，0.1% glucose，1mM $MgCl_2$，0.8mM $CaCl_2$，0.88g/l MEM用アミノ酸ビタミン培地（日水），4%(v/v) 透析牛胎児血清，15mM HEPES pH 7.2 をベースに NaCl を当量の choline chloride，KCl，$NaNO_3$，Na_2SO_4，Sodium 2-hydroxy ethane sulfonate で置換した。培地中の Na^+ および K^+ 濃度は atomic absorption / flame emission spectrophotometer (Shimadzu AA 646) により求めた。

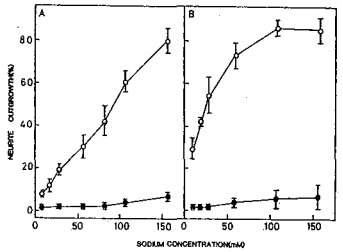


Fig. 1. Effect of extracellular Na^+ concentration on NGF-induced neurite formation of PC12 cells under normal (A) and modified (B) culture conditions. PC12 cells were scraped from the surface, washed twice in choline medium, and suspended in media containing various Na^+ concentrations as shown in this figure. The cells were plated onto polylysine-coated plastic plates (35 mm), and incubated at 37°C for 17 h in the presence (○), or in the absence (●) of 50 ng/ml NGF. Five independent experiments, each consisting of the measurements of 300–500 cells, were carried out for this purpose and the limits of S.D. are indicated. Under modified cultural conditions, cells were first exposed to NGF in suspension culture for 2 days, washed thoroughly, and then suspended in media described above. Cultural conditions were the same as described for the cells under normal conditions.

アッセイ方法：PC12細胞を上記のアッセイ培地で洗浄後，poly D-lysine (Sigma) コートした plastic plates へまき (5×10^3/plate)，37°C 17時間 (O_2 incubator 内で培養後写真を撮影し，突起の有無を確認した。NGFは2.5Sを50 ng/ml加えた。突起は細胞体の直径以上の長さを十とした（文献7及び図の説明参照）。

細胞内Ca^{2+}濃度の測定：細胞内Ca^{2+}はTienらの方法（13）に従い，2×10^6/mlの細胞をHEPES-buffer pH 7.1中，50 μM Quin2/AM存在下で37°C 30分インキュベートし，細胞を洗浄後蛍光分光光度計で490 (5) nmの蛍光を測定することにより行った。濃度は次式により求めた。

$$[Ca^{2+}] = Kd\ (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

Kdは色素Ca^{2+}結合物の解離定数，F_{max}及びF_{min}はそれぞれジギトニン処理後及び200mM EGTAをさらに加えた後の細胞懸濁液の蛍光強度である。

［結果］

突起成長のNa^+依存性：図1AはNGFによるPC12細胞の突起形成のNa^+依存性を示している。細胞外液のNa^+の減少に伴なって突起を持つ細胞数は減少し，14mM NaClでは8±2%（平均±SD; n=8）となる。一方浮遊培養で予めNGF処理した細胞はRNA合成蛋白合成を必要とせずに突起を形成する事ができるが（7），この場合60mM以下のNaClでは突起を持つ細胞は減少した（図1.B）。Cyclic AMPによる突起形成もほぼ似たNa^+依存性を示したが，図2に示された様にNGF前処理の効果は観察されなかった。

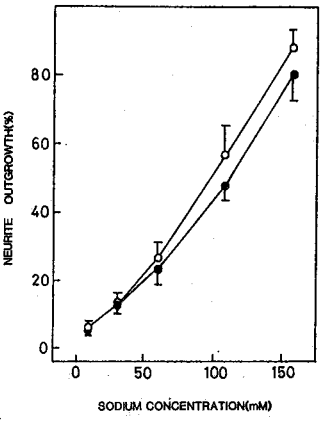


Fig. 2. Effect of extracellular Na^+ concentration on cyclic AMP-mediated neurite formation of PC12 cells under normal (●) and modified (○) culture conditions. Neurite formation caused by 1 mM cyclic AMP was evaluated according to the same method described for NGF-induced neurite extension. Under modified culture conditions, cells were treated with NGF in suspension culture for 2 days, and then subjected to evaluation of neurite outgrowth caused by cyclic AMP. Three independent experiments were performed and results are presented together with S.D.

突起形成に与えるK^+及びCl^-の効果：突起形成は5～106 mMの範囲ではKCl濃度に依存しなかった（NGF存在下では106mM K^+で69±8% (n=4)，83 mM K^+で70±7% (n=3)，44 mM K^+で76±6% (n=3) であり，対照は各々7±6% (3)，6±4% (3)，10±5 (3) であった。膜電位が突起形成に影響を与えないことはイオノフォアを用いた結果（表I）からも明らかである。Cl^-をNO_3^-又はSO_4^{2-}又は2-hydroxyethane sulfonateで置換したが何の変化もなかった。この事から細胞外液の一価イオンの内Na^+が重要な役割を果していると考えられた。

TABLE I

EFFECT OF IONOPHORES ON NEURITE OUTGROWTH OF PC12 PHEOCHROMOCYTOMA CELLS UNDER NORMAL CULTURE CONDITIONS

Number of independent experiments is indicated in the parenthesis. Each experiment comprised of measurements of 400–500 cells for the presence or absence of neurites and the limits of standard deviation are given.

Concentration ionophore applied	NGF (50 ng/ml)	Neurite formation (%)
	−	7±2(9)
	+	73±6(7)
Valinomycin, $1\cdot10^{-8}$ M	−	5±3(3)
	+	63±4(3)
Valinomycin, $1\cdot10^{-7}$ M	−	3±1(3)
	+	42±4(4)
Veratridine, $1\cdot10^{-4}$ M	−	7±4(3)
	+	74±3(4)
Gramicidin, $1\cdot10^{-6}$ M	−	9±3(3)
	+	72±2(3)

Na^+除去効果の時間経過：図3に本実験条件下における突起形成の時間経過を示した（● Ep）。コリン培地では突起は形成しない（Δ Ep）。1日コリン培地で培養した細胞はNa^+存在下正常

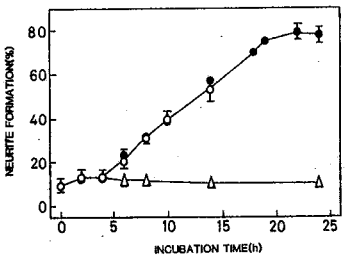


Fig. 3. Time-course for neurite formation of PC12 cells under normal conditions. PC12 cells having neurites in normal (●) and in choline (Δ) media in the presence of NGF were counted at the indicated time intervals. The cells previously exposed to choline medium without NGF for 24 h followed by transfer to normal medium were also examined for their time-course of neurite formation in response to NGF (○). Three independent experiments, each consisting of the measurements on 300 cells, were performed and the limits of standard deviation are indicated.

に突起を形成し，コリン培地の toxicity は観察されない．図4から Na^+ 除去効果は8～10時間培養後にあらわれることが判る．

細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定：細胞外 Na^+ をコリンで置換すると細胞内 Ca^{2+} は 0.21±0.02 μM (n=6) から 0.09±0.01 μM (n=4) へと減少し（図5），その経過は図4とよく似ている．

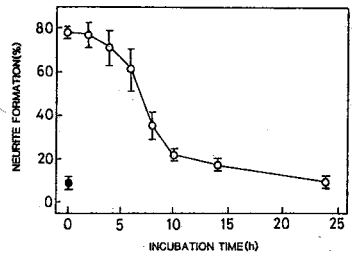


Fig. 4. Effect of treatment of the cells with NGF in choline medium on the subsequent neurite formation in normal medium. PC12 cells were treated with NGF first in choline medium, and then in normal medium during the incubation period of 24 h, and finally subjected to evaluation for the presence or absence of neurites. In this figure, incubation time denotes the period during which the cells were exposed to NGF in choline medium. For example, incubation for 10 h means that cells were first incubated in choline medium for 10 h in the presence of NGF, and then the medium was changed to normal medium, and incubated for a further 14 h in the presence of NGF. Neurite formation in the absence of NGF is presented (●).

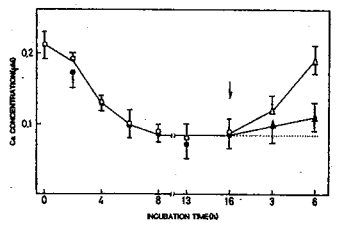


Fig. 5. Change of cytoplasmic Ca^{2+} concentration upon treatment with choline medium. Intracellular Ca^{2+} concentration was measured by a fluorescent dye, Quin2/AM. At zero incubation time, cells were exposed to choline medium in the absence (○) or in the presence (●) of NGF, and Ca^{2+} concentration was measured at the incubation time indicated. After incubating the cells in choline medium for 16 h (indicated by an arrow in this figure), the cells were returned to normal medium. A quick recovery of cytoplasmic Ca^{2+} was observed for the cells cultured in choline medium in the absence of NGF (△). Contrary to this, Ca^{2+} concentration for the cells cultured in choline medium in the presence of NGF showed little recovery during subsequent incubation in normal medium for 6 h (▲). The average of four or five independent measurements is presented together with S.D.

この Ca^{2+} 濃度の減少は NGF 存在下と否とに拘らず観察されたが，Na^+ 培地に戻した時の Ca^{2+} 濃度の回復は対照時に比較して NGF 処理した細胞では著しく おくれた．

〔考察〕

突起成長の Na^+ 依存性を説明するには次の4つの可能性がある．即ち ① NGF の P.C 12 細胞への結合が Na^+ 依存性である．② NGF の細胞質への transport が細胞外 Na^+ の存在を必要とする．③突起形成は Na^+ 依存性の細胞過程より成り立っている．④ Na^+ 除去は細胞質 Ca^{2+} 濃度の低下を招き突起形成を阻害する．①については証拠がない．もし NGF の transport が律速で Na^+ 依存性とすると，突起形成の時間経過（図3）での lag period は NGF 濃度に依存するはずであるが事実と合わない．③に関しては glucose およびアミノ酸の一部がその取り込みが Na^+ に依存することが知られている．突起形成は glucose がなしでも起こる事，蛋白合成を必要としない突起形成が Na^+ 依存性であることから④の可能性が最も良く事実を説明すると考えられる．Na^+ 除去は improved mitochondrial Ca^{2+} binding によって細胞内 Ca^{2+} イオン濃度を減少させ，突起形成を阻害すると考える事ができる．

〔文献〕

1) Greene, L. A., and Tischler, A. S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73,2424-2428. 2) Schubert, D., Heinemann, S., and Kidokoro, Y. (1977) ibid. 74,2579-2583. 3) Schubert, D., LaCorbiere, M., Whitlock, C., and Stallcup, W. (1978) Nature 273, 818-823. 4) Luckenbill-Edds, L., Van Horn, C., and Greene, L. A. (1979) J. Neurocytolo. 8, 493-511. 5) Chiba, T., Murata, Y., and Koike, T. (1981) Biomedical Res. 2, 618-628. 6). Burstein, D. E., and Greene, L.A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 6059-6063. 7) Koike, T. (1983) Brain Res. 289, 293-303. 8) Koike, T. (1983) Biochim. Biophysica Acta 763, 258-264. 9) Koike, T. (1984) Cell Biology: Interantional Report 8(June)in press. 10) Stach, R. W., Stach, B. M., and West, N. R. (1979) J. Neurochem. 33, 845-855. 11) Lasher, R.S., and Zogan, I. S. (1972) Brain Res. 41, 482-488. 12) Chalazonitis, A., and Fishbach, G. D. (1980) Develop. Biol. 78, 173-183. 13) Tien, R. Y., Pozzan, T., and Rink, T. J. (1982) J. Cell Biol. 94, 325-334.

106 ヒトおよびラット培養グリオーマ細胞に及ぼすプロスタグランディンD_2の影響

本田千穂・田渕和雄・藤原　敬・入江恵子・
吉岡純二・植田清隆・大本堯史
（香川医大・脳外科）

〔要　約〕

プロスタグランディンD_2（PGD_2）は、脳内に比較的多く分布していることが知られているが、今回我々は、PGD_2がヒト及びラット培養グリオーマ細胞に及ぼす影響について、コロニー形成法並びに細胞増殖曲線により、殺細胞及び細胞増殖抑制効果を検討し、さらにflow cytometryによりDNAヒストグラムの経時的観察を行なった。PGD_2は、両細胞に対して濃度依存性に増殖抑制効果を示したが、4μg/ml以下の濃度ではその効果は可逆的であった。また両細胞間でPGD_2に対する感受性に差が認められ、24時間作用における50%殺細胞濃度は、ヒトKY細胞で2.5μg/ml、ラットC6細胞で5.0μg/mlであった。またPGD_2を作用させた後24時間以内では、時間依存性の殺細胞効果も認められた。一方、DNAヒストグラムの経時的観察では、PGD_2作用3時間後よりS期細胞の減少傾向が認められ始め、時間経過と共にS期及びG_2+M期細胞が減少し、12時間後にはほとんどすべての細胞がG_0+G_1期に集積された。これは、PGD_2がDNAの合成を阻害し、G_0+G_1−S期でのブロックが生じた結果、細胞がG_0+G_1期に留まるためと考えられる。しかしこうした変化は可逆的であった。これらのことより、PGD_2は濃度並びに時間依存性に、培養グリオーマ細胞に対して、S期に特異的な抗腫瘍効果を及ぼすものといえる。

Key words：Prostaglandin D_2, Glioma cells, DNA histogram

［はじめに］

約50年前に初めて精液中に発見されたプロスタグランディン（以下、PG）は、その後の研究により、生体内に広く分布し、多彩な生理活性を有することが明らかとなりつつある。PGF、PGE、PGAシリーズなどに細胞増殖調節作用があることは10数年前より既に知られていたが、1982年、Fukushimaらは、PGD_2に白血病細胞の増殖抑制作用があることを報告した[3]。PGD_2はPGEの異性体で、従来不活性と考えられていたが、1977年、ラットの脳の主要なPGはD_2であることが報告されて以来[1)7)]、種々の動物で脳内分布が研究され、その生理活性が次第に注目されてきつつある。今回我々は、ヒトおよびラット培養グリオーマ細胞を用いて、in vitroにおける、PGD_2のグリオーマ細胞に対する増殖抑制効果並びに細胞周期に及ぼす影響について検討を行ったので、若干の考察を加えて報告する。

［材料および方法］

用いた細胞は、我々がヒトglioblastoma症例より確立し、継代維持しているKY細胞と、ラットにmethyl-nitrosoureaで誘発されたC6グリオーマ細胞である。培養液は、10%牛胎児血清及び抗生物質を含むEagle's MEMを用い、Falconプラスチックシャーレ（3002、3003）にて、37℃、5%炭酸ガス中で細胞の静置培養を行った。PGD_2（フナコシ）は、使用直前に99.5%エタノールに溶解し、エタノールの最終濃度が0.1%になるように培養液中に加え、ミリポアフィルターで濾過後使用した。コントロールには、0.1%のエタノールを含む培養液を用いた。まず、PGD_2の殺細胞効果をみるため、colony formation assayを行った。細胞をシャーレに接種して24時間後、細胞の対数増殖期にPGD_2を含む培養液に交換し、3～24時間培養したのち、0.05% Tripsin＋0.02% EDTAで細胞を遊離させ、コロニー形成能をみた。生細胞率は、

コントロールとPGD_2処置細胞のコロニー形成数の比より求めた。次に、1×10^5個の細胞をシャーレに接種し、24時間後にPGD_2を含む培養液に交換し、そのまま培養液を交換することなく培養を続け、24時間ごとに細胞数を算定して細胞増殖曲線を作成した。また、PGD_2の細胞周期に及ぼす影響を調べるため、同様に細胞接種24時間後にPGD_2と接触させ、経時的に細胞を遊離して、flow cytometer (Ortho Cytofluorograf System 50H) によるDNAヒストグラムの観察を行った。DNAの染色は、Ethidium bromideを用いたVindelφwら[8]のpH 10 methodによって行った。なお、G_0+G_1期、S期、G_2+M期の各々の細胞数の全細胞数に対する割合は、Fried[2]の式によるコンピューター処理によって算出した。

[結果ならびに考察]

PGD_2を24時間作用させたのち、colony formation assayを行って殺細胞効果をみた結果を、図1に示した。PGD_2は、ヒトKY細胞、ラットC6細胞いづれに対しても濃度依存性に殺細胞効果を示した。しかし、PGD_2に対する感受性には差があり、50%殺細胞濃度は、KY細胞では約2.5μg/ml、C6細胞では約5.0μg/mlであった。KY細胞の50%殺細胞濃度は、Fukushimaらのマウス白血病細胞での結果[3]、Sakaiらのヒト神経芽細胞での結果[5]とよく一致しているが、C6細胞は、これらの細胞よりPGD_2に対して抵抗性であると考えられる。酒井ら[6]は種々のヒト悪性腫瘍細胞に対するPGD_2の効果を調べ、肺癌、大腸癌細胞はPGD_2に対し比較的感受性が低いことを示し、腫瘍細胞の由来臓器によりPGD_2の抗腫瘍効果が異なることを報告している。今回の我々の結果は、動物の種差によってもPGD_2に対する感受性が異なる可能性を示唆しているものと考えられる。

次に、KY細胞について、PGD_2の作用時間を種々変えて殺細胞効果の変化をみた結果を図2に示す。比較的低い濃度（1.25μg/ml）では、作用時間を延長しても殺細胞効果の増強はみられなかったが、高い濃度（5.0μg/ml）では、作用3時間目の早期から70%以上の強い殺細胞効果がみられ、時間経過とともに殺細胞効果が増強するのが認められた。2.5μg/mlの濃度では、作用24時間までは時間依存性に効果の増強がみられたが、48時間後には逆に殺細胞効果の低下傾向が認められた。これは図3に示す如く、細胞増殖曲線の変化から推測できるように、2μg/ml以下の濃度の場合は、24時間で細胞増殖抑制効

図1

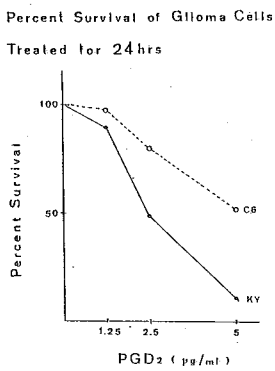


図2

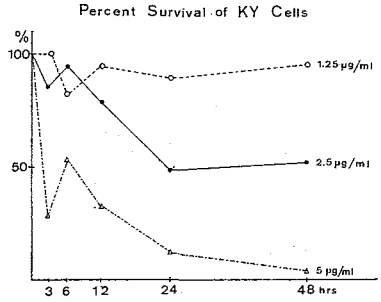
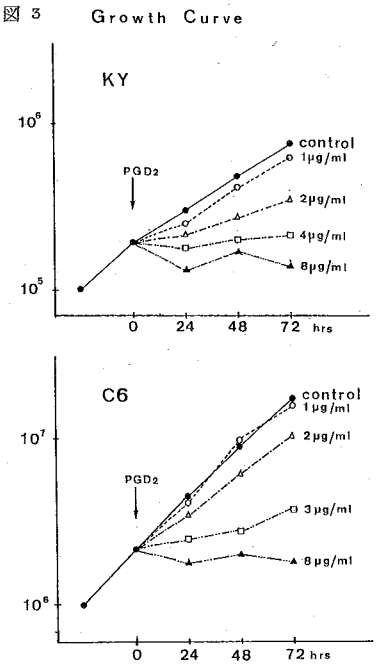


図3



果がみられるものの、その効果は可逆的で、24時間以後には再び対数増殖を示しており、4μg/ml以上の濃度で初めて持続的な増殖抑制がみられている。C6細胞の場合も、感受性は異なるものの同様の傾向を示した。

2.5μg/ml の PGD_2 を作用させたKY細胞について、DNAヒストグラムの変化を経時的にみた結果を図4に、さらに G_0+G_1、S、G_2+M 期各々の細胞の割合の経時的変化を図5に示した。作用3時間後よりS期細胞の減少傾向が認められ、12時間後には G_0+G_1 を示す1ピークのパターンとなるが、このことは、PGD_2 によりDNAの合成が阻害された結果、G_0+G_1-S 期ブロックが惹起されたためと考えられる。しかし、24時間後にはコントロールパターンへの回復傾向が認められた。次に5.0μg/ml の PGD_2 を作用させた場合の変化をみると、図6に示す如く、同様の傾向はみられるものの、各期の細胞の割合に有意の差はみられなかった。これは、5.0μg/mlという比較的高い濃度では大部分の細胞が早期に死滅し、細胞回転が停止してしまうためと思われた。これまでPGの細胞周期に及ぼす影響については、細胞増殖抑制効果を示すといわれている PGE_2 により、G_2+M 期への細胞集積が起ることが報告されているが[4]、PGD_2 によるDNAヒストグラムの変化についての報告はみられない。Fukushimaら[3]やSakaiら[5]は、^{3}H-thymidineの細胞内への取込みの変化から、PGD_2 がDNA合成を抑制していることを示しており、このことは本実験で得られたDNAヒストグラムの変化の結果とよく符合していると考えられる。PGD_2 の細胞増殖抑制効果は、DNA合成阻害に基づくものであることが明らかとなったが、今後その作用機序の解明に関しては、より詳細な検討が必要と思われる。

図4 Chronological Change of DNA Histogram of KY Cells Treated with PGD_2 (2.5μg/ml)

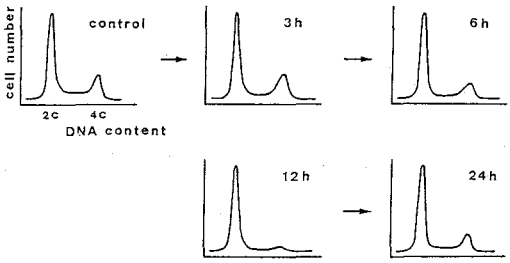


図5

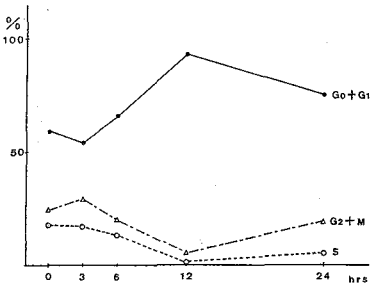
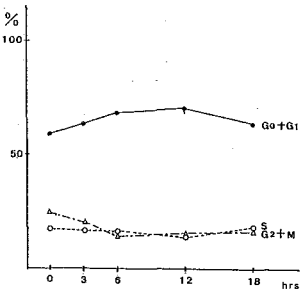


図6



［文献］

1) Abdel-Halin, M. S. et al (1977) Prostaglandin 14:633
2) Fried, J. et al (1976) J. Cell. Biol. 71:172—181
3) Fukushima, M. et al (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 105:956—964
4) Mayschak, D. T. et al (1982) Prostaglandins and Related Lipids 2:385—389
5) Sakai, T. et al (1983) Cancer Letters 17:289—294
6) 酒井敏行 et al (1984) 医学のあゆみ 128:309—311
7) Sun, F. F. et al (1977) Prostaglandins 14:1055
8) Vindelφw, L. (1977) Virchows Arch. B. Cell. Path. 24:227—242

107　胎生期及び生後ラット脳を用いた初代培養系の継時的変化とCNPase 活性について

岩崎紀子・阿相皓晃・金本和男・平野修助
（東邦大・医・II生理）

〔要　約〕

胎生期及び生後ラット脳の dissociation cell により、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのみならず、ニューロンも長期生存可能な培養系を確立した。これらの培養系では、ミエリンの指標酵素である、2′3′-cyclic nucleotide 3′phosphohydrolase (CNPase, E.C 3·1·4·37.) 活性の上昇が認められ、抗CNPase血清によるPAP染色においてもミエリン形成が認められた。そこで、この培養系を用い、ミエリン形成と cell maturation との相互関係を検討した。我々の培養系においては、生後3,5,8日目のラット脳による初代培養系でも充分CNPase活性の上昇が認められた。胎生期ラット脳からの初代培養系におけるCNPase値と比較すると、培養10日目までは、生後脳からの培養系の方が高値を示した。しかし生後脳では以後活性はプラトーとなり、胎生期からのものは培養50日目頃まで急上昇し、以後プラトーという経過を示した。これらの結果より、胎生期の脳を用いると、培養系において細胞がmaturationするため、長期にわたる活性の上昇及び高値が認められ、生後脳では、培養系での cell maturation が難しいため、長期にわたる活性上昇及び高値が得られなかったと思われる。このことは、初代培養に用いられる脳の発育のStageの違いが、培養系におけるミエリン形成及びCNPase活性の継時的変化の差として現われるものと考えられ、さらに詳しく追究を進めていきたい。

Key words : Immunocytochemistry, 2′,3′-cycric nucleotide 3′-phosphohydrolase(CNPase), Myelination,

脳の複雑な機構を細胞レベルで解析する上で、培養系での研究は非常に有用である。従来から腫瘍性のクローン化細胞を用いた研究は盛んであるが、nomal な脳の初代培養系での研究は、方法、維持、分化が困難である為限られたものであった。我々は、ラット大脳からの初代培養、しかもブロックからではなく、dissociation cell により培養を行い、ニューロン、グリア細胞の長期生存のみならず、ミエリン形成も認められる培養系を確立した。そこで胎生期及び生後のラット脳から初代培養を行い、その CNPase 活性を中心に、ミエリン形成と cell maturation との相互関係を検討したので報告する。

〈実験方法〉

1. 初代培養：　胎生18日目及び生後ラット（Wistar系）大脳を取り出し、軟膜及び血管類を取り除いた後、ステンレススクリーンメッシュ（胎生期：pore size 140ミクロン，生後：pore size 230~380ミクロン）を通し、細胞を単離、培養液で3回洗浄（800rpm, 10min）後，ポリ-L-リジンをコートした glass dish (75cm²) にまいた。培養液としては、15%新生仔牛血清，600mg/dl Glucose を含む、Eagle's MEM（ニッスイ）を用いた。

2. 抗血清の調製：　抗GM₁血清は、Naiki(3)の方法に準じて New Zealand White Rabbit に皮下注射することにより得た。本抗血清は、asialo ganglioside GM₁ と交叉反応する。抗CNPase血清は、慶応生理学教室より供与を受けた。

3. 免疫組織化学：　前述の方法で glass coverslip 上に培養し、4% パラホルムアルデヒドで30分固定後、Sternbergerら(7)の方法に従い、PAP染色を行った。

4. CNPase活性の測定：　培養細胞を PBSで3回洗浄後、ラバーポリスマンでかき取り、ヒストコロンでホモゲナイズしたものを試料とした。測定は Sprinkle (6) の方法に従い、[8-³H]2′3′

C-AMPを基質として、生成される〔8-^{3}H〕-2'AMPの放射活性で調べた。
5. 蛋白質の定量： Lowryら(2)の方法に従った。
6. ガングリオシドの定量： Rösner(4)の方法に従い、テトラハイドロフランで抽出し、HPTLCにより分離、レゾルシノールで発色した。

〈実験結果及び考察〉

I. 胎生18日目のラット脳を用いた初代培養の経時的変化

胎仔脳を用い、約80日間初代培養を行った。形態学的観察を、種々の染色で行ったところ、アストロサイトのみならず、オリゴデンドロサイトやニューロンも多数生存が認められた。Fig-1に示した写真は、培養35日目のBodian染色像であり、矢印はニューロンを示している。また、ニューロン及びオリゴデンドロサイトは、ガングリオシドが高濃度に存在しており、特にGT1b, GD1a, GM_1の占る割合が多い。Fig-2に示した様にin vivo(0)～培養30日目まで、その構成パタンは変化せず、培養50日目でも、GM_1やポリシアロガングリオシドが存在していた。このことは、ニューロン、オリゴデンドロサイトの長期生存と、培養系が同じ状態で長期間保たれている事を示している。また形態学的にもニューロン、オリゴデンドロサイトにGM_1が存在している事が確かめられた。(Fig-3) アストロサイトについては、抗GFA血清によるPAP染色で同定し、グルタミン合成酵素も生体と同レベルに認められた。後述するミエリンの指標酵素、CNPaseも長期にわたって高値を示した。以上のことからこの培養系における脳構成細胞の長期生存、生理的な機能の維持、ミエリン形成が示唆された。

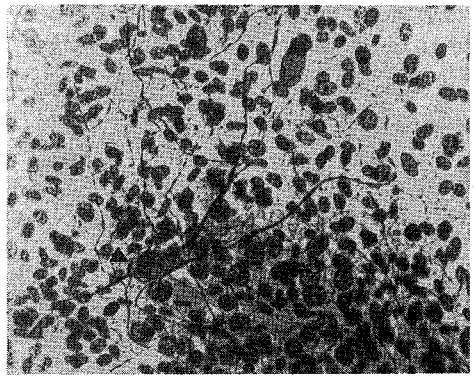


Fig.1:35-day-old primary culture of embryonic rat brain (Bodian-staining)

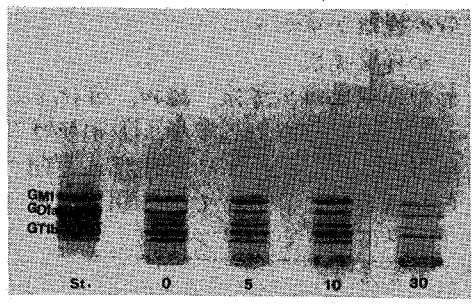


Fig.2:Gangliosides contents in primary cultured cells of fetal rat brain(days in culture:0-30)

II. 初代培養系におけるCNPase活性の継時的変化

i) 胎仔ラット脳を用いた場合

胎仔ラット脳からの初代培養系におけるCNPase活性の報告は極めて少なく、胎仔マウス脳を用いた、dissociation cell cultureにおいて、Bhatら(1)は、培養25～30日目でCNPase活性はプラトーになると報告している。今回の80日間にわたる結果を見ると、(Fig-4：値はmean±S.Eで示す) 培養30日目位までの活性値(約800nmol/mg-prot/min)は、Bhatらと一致しているが、その後さらに活性値は上昇し、60日目位よりプラトーとなっていった。すなわち培養初期の活性の上昇はゆっくりであり、後半(40日

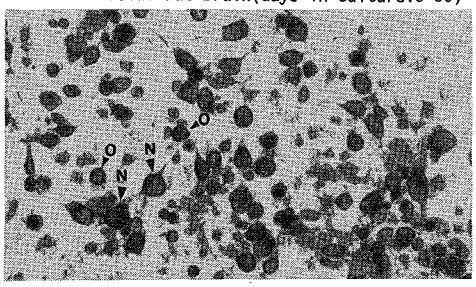


Fig.3:Immunoperoxidase staining for GM_1-ganglioside in 10-day-old primary culture of embryonic rat brain, N: neuron O: oligodendrocyte(putative)

すぎ）は著しく増加を示した。また抗CNPase血清によるPAP法染色においても（発表当日供覧）平行して走る2本のラインが培養15日目頃より染め出された。これらより、形態学的、生化学的に胎生期ラット大脳の dissociation cell からの、培養系におけるミエリン形成が認められた。

ii) 生後ラット脳を用いた場合

胎生期の脳を用いた培養において、CNPase活性が高値であるにもかかわらず、New born からの培養では活性が低く直線性が得られない。(5) この様に cell maturation とミエリン形成には相互関係があると思われ、New born から生後15日目までのラット大脳からの培養において、CNPase活性を詳しく検討した。Fig-5 に示す様に、New bornにおいては培養0日(in vivo)で 50 nmol/mg-prot/min であり、培養10日目で 420 nmol/mg-prot/min と急上昇し、以後活性はプラトーになった。また、生後3日目では、培養0日(in vivo)で 61 nmol/mg-prot/min と、New born と同様に低値で、培養10日目で 709 nmol/mg-prot/min と急上昇、以後やや増加しながらもプラトーとなっていった。この値は、生後5日目の脳からの結果とほぼ等しい。さらに生後8日目の脳からの培養において、CNP活性は高値（培養15日目で 884、20日目で 1251 nmol/mg-prot/min）を示し、ミエリンの形成像も認められていた。しかしながら CNPase活性が 1157 nmol/mg-prot/min と高値を示している生後15日目の脳からの初代培養系では、細胞の生存がかなり困難であった。

以上のように、胎生期の脳を用いると、その初期には活性が低く、増加も徐々であるが、培養系において細胞が maturation するため、長期にわたって活性の上昇が認められ、高値を示すようになったと考えられる。生後の脳では、特に生後15日目以降になると、培養系での cell maturation が難しいため、長期にわたる活性の増加、及び高値は認められがたいと考えられる。しかし生後8日目までの脳においては、CNPase活性の上昇もミエリン形成像も認められるという事、また CNPase活性は10日目頃でプラトーになっていくという事は、ミエリン形成と cell maturation の相互関係を明らかにする上で興味のもてることと考える。

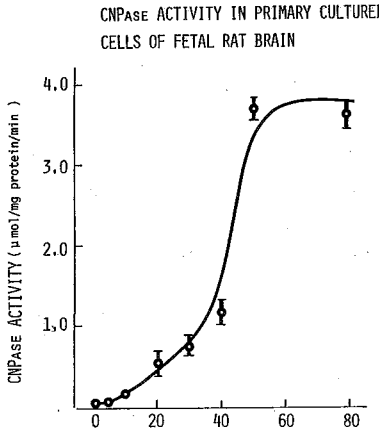


Fig. 4

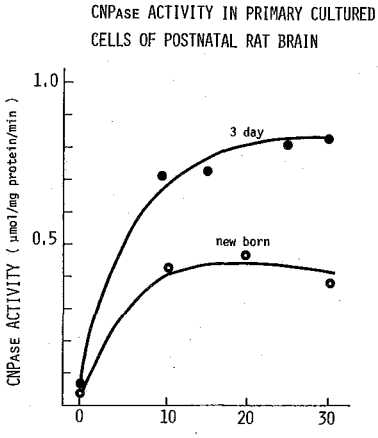


Fig. 5

REFERENCES
(1)Bhat,N.R.(1981) J.Neurochem.37,695-701. (2)Lowry,O.H. et al.(1951) J.Biol.Chem.193, 256-275. (3)Naiki,M.et al.(1974) J.Immunol.113,84-93. (4)Rösner,H.(1980) Analyt.Biochem. 109,437-442. (5)Sarlieve,L.L.(1980) Brain.Res.189,79-90. (6)Sprinkle,T.J. et al.(1978) Analyt.Biochem.88,449-456. (7)Sternberger,L.A.(1979) Immunocytochemistory,(2nd. ed.) 104-169.

108 培養神経細胞における各種ホルモンのミエリン脂質合成に及ぼす影響

呉羽由利恵 （慈恵医大・小児科）
辛島 仁 （同・Ⅱ内科）
衛藤義勝 （同・小児科）

〔要 約〕

鶏胚神経培養組織を用い，Insulin，Thyrotropin Releasing Hormone(TRH),Growth Hormone(GH), Glucagon等各種ホルモンがミエリン構成成分合成に及ぼす効果について検討した。^{3}H-galactose を加えた培養液中に Insulin あるいはＴＲＨを加えて，24時間後にセレブロシド及びスルファチド合成を測定した結果，中枢神経細胞では，対照と比較してセレブロシドにおいては2倍以上，スルファチドにおいても約1.5倍の放射能測定値を示した。しかしＧＨ及び Glucagon を添加した細胞では，特に有意な上昇を示さなかった。また脊髄後根神経節を用いて，同様の実験を行なった結果，いずれのホルモンもセレブロシド，スルファチドの合成を増加させず，Insulin，ＴＲＨのミエリン構成成分合成に及ぼす効果は中枢においてのみ有効で，末梢では無効だった。以上のことから Insulin 及びＴＲＨの中枢における役割の一つとして，ミエリン代謝に何らかの形で影響を及ぼすのではないかと考えられた。

Key words： Myelin Cerebroside Sulfatide

【まえがき】

各種ホルモンについて，その中枢神経系へ及ぼす効果及び作用機序の研究がなされてきた。特に Insulin については，Nerve Growth Factor（ＮＧＦ）としての作用を有すること[6]，中枢神経系での Insulin 濃度を血漿での濃度と比較すると10倍の高値を示し[2]，中枢神経系と末梢の標的組織ではインスリンレセプターに構造上の相違があることが報告されている[3]。またＴＲＨについても Cerebral Noradrenaline のturn overを促進するとの報告があるが[4]，これらのホルモンの中枢神経系にて果たす役割は，いまだ解明されていない。また培養神経組織を用いて，各種ホルモンが神経細胞に与える影響についても様々な研究がなされており，先に述べたごとく，Insulin は survival factorとして，またＬ－３，５，3′－ triiodothyronine（T_3）は myelin lipids の合成に関与すると報告されている[1]。今回われわれは，培養神経細胞を用いて，Insulin, TRH, GH, Glucagon のセレブロシド，スルファチド合成に与える影響について，中枢神経系及び末梢神経系両者にて検索し，培養期間との関連性についても比較検討したので報告する。

【実験方法】

1)培養条件

孵卵9日の鶏胚脳及び脊髄後根神経節を無菌的に摘出し，脳は82μのナイロンメッシュを通した後，機械的操作にて細胞を分離し，直径5㎝のプラスチックシャーレ内に入れた cover slips の上で培養した。cover slips は poly-L-lysine でおおったものを使用した。脊髄後根神経節は拡大顕微鏡下で採取し，paly-L-lysine でおおった cover slips の上に

explantsで植えた。培養液の組成は，Eagle'sＭＥＭメジウム７０％，牛胎児血清３０％，ゲンタシン1.6 mg/dl，グルコース６００mg％であり，末梢用にはさらにＮＧＦ（Sigma）を１０μg/mlの濃度で加えた。
培養温度は３７℃に調節し，培養液の交換は３日毎に行なった。

2) セレブロシド及びスルファチド合成の測定

Eagle's ＭＥＭメジウムにゲンタミン1.6 mg／dl，グルコース６００mg％を加えて，^{3}H-galactoseを5 μCi/mlの濃度で添加し，６日間ないしは13日間培養した組織を24時間インキュベートした後，洗浄，ホモジナイズをして，クロロホルム：メタノール２：１で脂質の抽出を行ない，２０μg coldのセレブロシドあるいはスルファチドを加えシリカゲル薄層クロマトグラフィーにて展開し，セレブロシド及びスルファチドに相当する画分を採取して，放射能を測定した。蛋白量の測定にはLowryの方法を用いた。

【結果】

13日間培養した中枢神経組織にInsulin，ＴＲＨ，Glucagon，ＧＨをそれぞれ濃度を変えて添加し，24時間後にセレブロシド及びスルファチドの合成を測定した結果をFig 1に示した。Insulin 7.5 μg ml^{-1}及びＴＲＨ1.3 μg ml^{-1}の濃度で加えた時，セレブロシドは対照と比較して約２倍，スルファチドも約1.5倍の合成を示した。Glucagsn，ＧＨの添加濃度はFig 1に示してあるが，これらホルモンを加えてもセレブロシド，スルファチドともに有意な上昇は示さなかった。中枢神経組織を６日間培養したものに，Insulin 7.5 μg ml^{-1}，ＴＲＨ1.3 μg ml^{-1}をそれぞれ添加して，やはり24時間後に，セレブロシド及びスルファチドの合成を測定した結果をFig 2に示した。Fig 1 培養期間13日のものと比較して，６日間の培養ではセレブロシド及びスルファチド共に合成は，低値を示し，特にスルファチドの合成はは極めて微量であった。しかし，InsulinＴＲＨ添加にて，セレブロシドはやはり約２倍に上昇しており，スルファチドも微量ながら，上昇傾向を示した。次に，13日間培養した脊髄後根神経節を用い，Insulin 3.0 μg ml^{-1}，7.5 μg ml^{-1}及びＴＲＨ1.3 μg ml^{-1}をそれぞれ培養液中に加えて，セレブロシド及びスルファチドの合成を測定した結果をFig 3に示した。培養中枢神経組織と比較して，セレブロシド，スルファチドともに，合成は低値であり，Insulin，ＴＲＨを添加しても，特に有意な上昇を示さなかった。

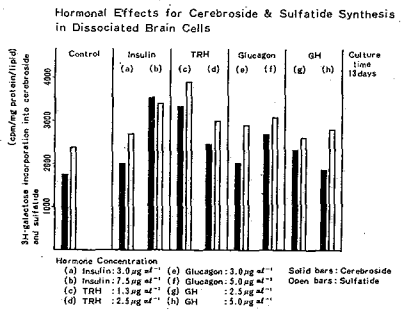
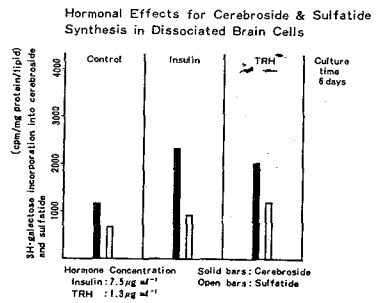


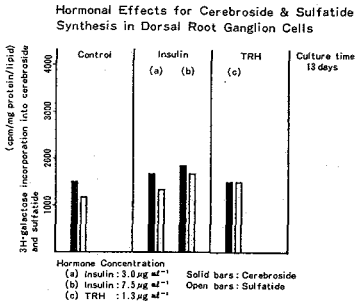
Fig 2



【考察】

ミエリン形成細胞の分裂時期及びミエリン形成に伴なう生化学的変化について，培養神

経細胞を用い，様々な研究がなされてきた。 Fig 3
今回我々は中枢神経系における役割について，
いまだ解明されていないInsulin及びＴＲＨ
について，ミエリン構成成分であるセレブロ
シド，スルファチド合成に及ぼす影響を検索
したところ，中枢においては，培養初期から，
合成を増加させる作用を有していることが認
められた。培養期間６日と13日で比較してみ
と，培養期間が長くなるにつれて，セレブロ
シドに対するスルファチド合成の増加を認め



る。これはミエリン形成細胞において，スルファチドはセレブロシドより遅れて合成されることを示唆させる。１９８０年，Sarlieveら[5]が胎生15日のマウスを用いて，培養２週目頃より，セレブロシドに対するスルファチドの合成の比が高くなると報告した。我々の得た結果は彼らの報告を支持しうるものと思われる。また脊髄後根神経節を用いての実験では,Insulin, ＴＲＨ共にミエリン構成成分合成に影響を及ぼさなかった。これは脊髄後根神経節をexplantsで植えたことによる為か，あるいはホルモン濃度に対しての感受性に差がある為か，明らかではないが，いわゆるsurvival factorとしての働きとは別に，中枢においてはミエリン代謝にも何らかの形で影響を及ぼしているのではないかと考えられた。これは神経細胞自体がspecific receptor を有し，これらのホルモンが細胞膜に付着することで，培養液中のグルコース及び他の栄養物の取り込みを増加させるといった二次的作用による為か，あるいはミエリン合成経路のどこかに直接作用する為か，又他のグリア系細胞を介しての機序であるのか今後の研究が望まれる。

(1) Bhat, N.R., Sarlieve, L.L., Rao, G.S. and Pieringer, R.A.
J. Biol. Chem., 254:9342-9344, 1979.

(2) Havrankova J., Schmechel, D., Roth, J. and Browstein, M.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:5737-5741, 1978.

(3) Heidenreich, K.A., Zahniser, N.R., Berhanu, P., Branderburg, D. and Olefsky, J.M.
J. Biol. Chem., 258:8527-8530, 1983.

(4) Keller, H.H., Bartholint, G. and Pletscher, A.
Nature, 248:528-529, 1974.

(5) Salieve, L.L., Rao, G.S., Campbell, G.L. and Pieringer, R.A.
Brain Reserch, 189:79-90, 1980.

(6) Snyder, E.Y. and Kim, S.U.
Neuroscience Letters, 13:225-230, 1979.

109　ニワトリ脳の単離オリゴデンドロサイトの培養とそのミエリン塩基性蛋白（MBP）と2′, 3′－cyclic nucleotide 3′－phosphodiesterase（CNPase）の発達に伴う変動

熊谷博道・佐藤七枝・今澤正興・宮本侃治
（国立神経センター・代謝）

〔要　約〕

ニワトリ脳より，中枢神経系のミエリン形成細胞とされるオリゴデンドロサイトをパーコール密度勾配遠心法を用いて分離した。これは位相差顕微鏡，電子顕微鏡観察および抗ガラクトセレブロシド(Gal-C)血清を用いた間接ケイ光抗体法などにより90%以上の純度で得られた。21日胚脳のオリゴデンドロサイトの収量は約2.8 X 10^6 cells / g 新鮮組織であった。オリゴデンドロサイト細胞当たりのMBP含量およびCNPase活性は、ミエリン形成期に平行して増加することが認められた。MBP含量の最大値は孵卵21日胚で160pg/ 10^4 cells, CNPase活性のそれは19日胚で0.13 nmoles Pi/ min/ 10^4 cells であった。培養には14日胚脳および17日胚脳より単離したオリゴデンドロサイトを用い、20%ウマ血清を含むEagle's MEM培地により行った。細胞は培養後2-3日でシャーレに接着し、その後突起を伸展した。この細胞は抗Gal-Cとの反応性を示し、オリゴデンドロサイトとして確認された。17日胚脳より単離したオリゴデンドロサイトを用い、培養中のMBP含量およびCNPase活性の変動を観察すると、CNPase活性は培養に伴い顕著に増加(培養9日目で0.16 nmoles Pi/ min/ 10^4 cells)するが、MBP含量の増加は少ないことが認められた。

Key words： isolated oligodendrocytes, myelin basic protein (MBP), 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)

オリゴデンドロサイトは、中枢神経系においてミエリンの形成と維持に関与しているグリア細胞とされている。またミエリンを構成する蛋白としてミエリン塩基性蛋白(MBP)、proteolipid protein (PLP)、Wolfgram蛋白(WP)、2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)、myelin-associated glycoprotein (MAG) などが知られ、これらの成分がオリゴデンドロサイトに含まれていることが免疫化学的に示されている(1-3)。われわれはニワトリ脳のミエリン形成期におけるミエリン脂質、およびMBPについて検討してきた(4,5)が、今回ニワトリ脳のオリゴデンドロサイトを単離し、その培養系を確立するとともに、培養オリゴデンドロサイトのMBPならびにCNPaseを指標としてその成熟過程を生化学的に検討したためその一部を報告する。

材料と方法

材料：白色レグホン有精卵を38.5℃、湿度90%の条件下で孵卵し、目的時期の脳（小脳、脳幹部を除去）を得た。

オリゴデンドロサイトの単離と培養：Lisakらの方法(6)を改変して行った。詳細はFig.1に示した。単離した細胞 4.5 X 10^6 cells をゼラチンまたは poly-L-lysine コートの60mmディッシュに播種した。この細胞は20%ウマ血清、100 μg/ ml streptomycin, 100 units / ml penicillin を含むEagle's MEM培地を用い、数週間の培養が可能であった。夾雑細胞の増殖を制御するために7 μM cytosine arabinoside (Ara-C)または20 μg/ ml methylazoxymethanol (MAM) を添加した。

間接ケイ光抗体法：細胞を1% glutaraldehydeによって固定し、ウサギ抗Gal-C血清

(1:8希釈)と反応させ、0.65 M NaCl を含む PBS により洗浄後、さらにFITC-抗ウサギ IgG と反応させ、蛍光顕微鏡により観察した。

MBPおよびCNPase活性：MBP 含量は前報(7)のワサビ Peroxidase を MBP に標識した抗原を用いた酵素イムノアッセイにより測定した。CNPase活性測定は Spinkle らの方法(8)を改変して行い、遊離したリン酸は Chenらの方法(9)により定量した。

電子顕微鏡観察：1.5% glutaraldehyde、1% osmium tetroxide により固定、uranyl acetate および lead citrate により染色した。

Fig.1 Isolation of oligodendrocytes

chick brain
↓mince
↓Trypsin (0.01%), DN 100 (10 μg/ ml) in PBS
↓37°C, 30 min
↓add 20% horse serum-MEM
↓1,000 rpm, 5 min
ppt
↓PBS
↓nylon mesh (147 μm), stainless mesh (74 μm and 40 μm)
↓1,000 rpm, 5 min
ppt
↓PBS
↓add an equal volume of 80% percoll in PBS
↓13,000 g, 60 min
intermediary fraction (oligodendrocyte fr.)
↓PBS
↓2,000 rpm, 10 min
ppt

結果および考察

(1)オリゴデンドロサイトの分離と培養：ニワトリ胚脳および孵化直後の脳より Fig.1に示した方法を用いてオリゴデンドロサイト画分を得た。この画分は位相差顕微鏡観察、およびオリゴデンドロサイトの表面膜に存在するガラクトセレブロシドの抗血清を用いた間接ケイ光抗体法により、オリゴデンドロサイトとして90%以上の純度を示した。電子顕微鏡により大型の核、ゴルジ体やミトコンドリアに富んだ小細胞質が観察され、オリゴデンドロサイトとしての像を示した。

得られた細胞は20%ウマ血清を含む培地を用い、数週間維持することが可能であった。培養細胞はプレーティング2日～3日後にディッシュに接着し、その後突起を伸展させることが観察された。またこの培養細胞は抗 Gal-C 血清との反応性を示し、オリゴデンドロサイトであると確認された。夾雑細胞の増殖を防ぐ目的で添加した Ara-C や MAM は、オリゴデンドロサイトの形態には何ら影響を及ぼさなかった。この培養オリゴデンドロサイトの突起は、抗チューブリン血清と強く反応し、オリゴデンドロサイト内に微小管が多いという電子顕微鏡観察と一致した。in vitro において微小管と MBP が相互作用することも認められ、微小管がミエリン形成に果たす役割が示唆される。

(2)単離オリゴデンドロサイト内の MBP 含量、CNPase 活性の発達過程における変動：脳の発達の各時期のオリゴデンドロサイトを単離し、細胞当たりの MBP 含量および CNPase活性を測定すると(Fig.2)、ミエリン形成開始前の14日胚でともに低値を示し、17日胚以後顕著に増加することが認められた。この結果はニワトリ脳におけるミエリン形成が17日胚頃から開始されるという従来の報告と一致する。CNPase活性は19日胚脳のオリゴデンドロサイトで 0.13 nmoles Pi/ min/ 10^4 cells の最大値を示し、MBPは CNPase より1-2日遅れ孵卵21日目で 160 pg/ 10^4 cells という最大値を示した。両者ともその後減少することが認められたが、この理由として、形成されつつあるミエリンに MBP、CNPase が取り込まれる経過を反映する可能性も想定される。

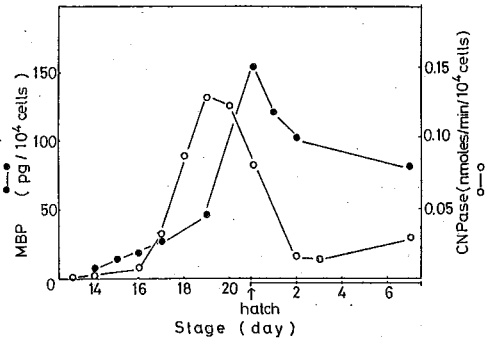


Fig.2 Developmental changes in MBP content and CNPase activity in the isolated oligodendrocytes

(3)培養オリゴデンドロサイトのMBP含量、およびCNPase活性の変動：オリゴデンドロサイトのMBP含量、CNPase活性の培養に伴った変動をFig.3に示す。ミエリン形成初期の17日胚脳より単離したオリゴデンドロサイトを用いた場合、培養細胞のCNPase活性は最初の3~4日間で顕著に増加し、その後も徐々に上昇し、培養9日目に0.16 nmoles Pi/min / 10^4 cellsとなった。この値は19日胚からの単離オリゴデンドロサイトのCNPase活性とほぼ等しい(Fig.2)。この結果オリゴデンドロサイトが培養系に移された場合も、in vivoと同様のスケジュールでCNPase合成が続けられていることを示唆する。これに対してMBP含量は培養3日後に50 pg/ 10^4 cellsまで増加したが、培養9日間は顕著な増加が認められなかった。ミエリン形成開始前の14日胚より単離したオリゴデンドロサイトを用いた場合もCNPase活性が培養に伴って増加したが、MBP含量はほとんど変動しなかった。

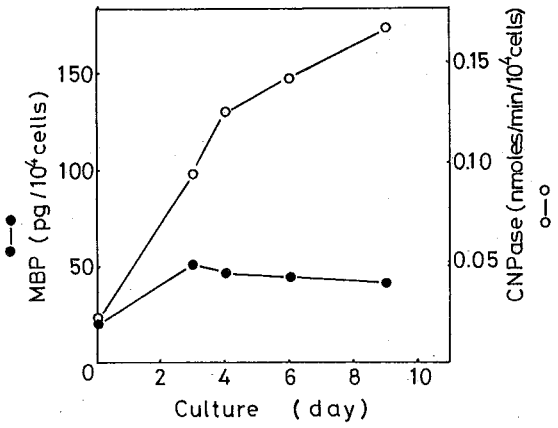


Fig.3 The MBP content and CNPase activity in the cultured oligodendrocytes

今回ニワトリ胚脳オリゴデンドロサイトの培養系を用いてMBP、CNPaseを指標として、オリゴデンドロサイトの成熟過程について検討した。われわれの用いた培養条件下では、CNPaseの発現がin vivoと同様に起こることが認められたが、MBPの発現は不十分であった。この結果よりMBP合成に必要な成熟化因子の可能性も推察され、現在検討中である。

抗Gal-C血清を提供して下さった東京大学、医学部、第二生化学教室 佐内豊博士、抗チューブリン血清を提供して下さった愛知ガンセンター、佐藤周子博士、および電子顕微鏡的観察を行って下さった国立神経センター、疾病第6部 田平武部長に厚く感謝する。

文献

(1) Sternberger,N.H.,Itoyama,Y.,Kim,M.W. and deF Webster,H. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci.USA.75,2521-2524.
(2) Hartman,B.K.,Agrawal,H.C.,Agrawal,D. and Kalmbach,S. (1982) Proc.Natl.Acad.Sci.USA.79,4217-4220.
(3) Nishizawa,Y.,Kurihara,T. and Takahashi,Y. (1981) Brain Res. 212, 219-222.
(4) Nakajima,K.,Oizumi,N.,Imazawa,M. and Miyamoto,K. (1983) J.Neurochem. 41, S46B.
(5) 今澤正興、宮本俶治 (1983) 神経化学 22, 384-386.
(6) Lisak,R.P.,Pleasure,D.E.,Silberberg,D.H.,Manning,M.C. and Saida,T.(1981) Brain Res. 223,107-122.
(7) Shinomiya,Y.,Kato,N.,Imazawa,M. and Miyamoto,K. (1982) J.Neurochem. 39, 1291-1296.
(8) Sprinkle,T.J.,Zaruba,M.E. and McKhann,G.M. (1978) J.Neurochem. 30, 309-314.
(9) Chen,P.S.,Toribara,T.Y. and Warner,H. (1956) Anal.Chem. 28, 1756-1758.

110 培養アストログリア細胞におけるガングリオシドGM_1の変化について

阿相皓晃・岩崎紀子・原田　寧・平野修助
（東邦大・医・II生理）

〔要　約〕

胎生期からと新生児ラット大脳半球からのprimary cultureを使用してganglioside GM_1の動態を調べた。ニューロンやオリゴデンドログリアにはGM_1が存在していたがアストログリアには存在しなかった．また培養液中にGM_1 gangliosideを添加してCultureしてもアストログリアにはGM_1がとり込まれなかった。このことはニューロンやオリゴデンドログリアの細胞膜の構造や機能とアストログリアのそれとが著しく異なることを示唆した。しかし何回もトリプシン処理して長期間培養を続けたアストログリアではGM_1ガングリオシドの存在が認められた。
このことはこれらの細胞がGM_1ガングリオシドを合成する能力をもってきたことや，normalなアストログリアに比べてさらに膜の変化が起こってGM_1をとり込むようになったことが考えられ，細胞のdifferentiationやSpontaneousなtransformationにも関係する興味ある知見が得られた。

Key words：
Ganglioside GM1，　Cultured astrocytes，　ABC methods

N-Acetylneuraminic acidを含む糖脂質のGangliosidesは神経組織の細胞膜にきわめて多く存在し，negative charge基をもつCarbohydrate Chainを細胞外に出していることから膜表面negative Chargeと細胞のionic microenviromentに関与しているのみならず，Cell-Cell interactionや細胞表面における recognitionにも大きな役割を果しているものと考えられていて近年ますます注目をあつめている。これまでに私達はgangliosideの存在様式をprimary cultureのtechnigueを応用しcellular levelで明らかにしてきた。[1][4] その結果AstrocytesはNeuronsとoligodendrocytesと存在様式が異なり，特にGM_1-gangliosideがほとんど存在していなかった。そこで今回はastrocytesに注目し，differentiationやpassageによるSpontaneousなtransformationあるいはagingしたastrocytesを用いて，GM_1-gangliosideの動態をimmunocytochemical，histochemical，biochemicalな方法によって調べた。

〈実験方法〉

(1) Primary culture conditions：　胎生18日目のラット大脳半球を使用したCultureの方法はこれまでの方法[3][4]に準じたがScreen meshだけは100 mesh，140μ opening sizeのものを使用した。またcellのpassageには0.2% trypsin (in PBS) solutionを使用した。

(2) Immunocytochemical staining：　PAP-techniqueはSternbergerの方法に従い，cell-typesのidentificationにはすでに報告した方法[3]に加えて，2-3の新らたな抗血清（Anti-NF. Anti-FN. Anti-Thy1.1. etc...）を使用した。

(3) Avidin-biotin-peroxidase complex method：　GM_1 gangliosideをhistochemicallyに同定するために biotin-choleragen-avidin-peroxidase complex formationを使用した[4]。

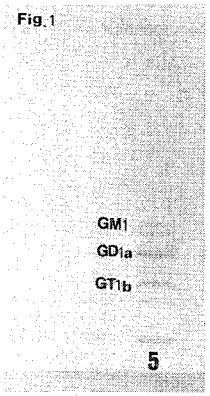
(4) Ganglioside analysis：　lyophilized cellsをphosphate-buffered-tetrahydrofuran法

にて抽出した。その後 Rösner の方法に従いHPTLCを用いて調べた。蛋白は Lowry 法で測定した。

< 実験結果 >

Dissociated cell culture から分離固定した gangliosides のパターンを図-1に示した。In vivo からの gangliosides の像と同様に脳に多く存在している主な gangliosides が認められ特に GD1a, GT1b, GM1 の量が多かった。(Densitometric scaning については当日あわせて報告する)

この場合の cell culture は neuron も oligodendrocyte も astrocyte も含んだ mixed cell population であり培養後5日目の ganglioside 像である。



Thin layer chromatograms of separated gangliosides obtained from primary cultured cells. (5-day-old primary culture) The lipids applied to the TLC was obtained from 1.7 mg cell protein. Chromatograms were developed as described under materials and methods.

次に Immunocytochemistry 法を用いて Astrocytes-dificient culture における GM_1 の localization を調べた。Astrocytes-dificient な culture は cytotoxic effect と 5-fluorodeoxyuridine を用いて作製した(図-2)。これまでの我々の結果と同様に neuron や oligodendrocyte は Anti-GM_1 serum で強く染めだされたが cytotoxic や mitotic reagent で処理された後に残った一部の Astrocyte も GM_1-negative であった。

また長期にわたって培養を続けた culture の場合でも GM_1-ganglioside は neuron や oligodendrocyte には存在しているが Astrocyte には biotin-avidin complex 法で調べても検出されなかった。(図-3)。

さらに medium 中に GM_1-ganglioside を 50μg/ml 加えて培養後、PBS で medium を洗い流したのちに biotin-choleragen-avidin-peroxidase 法で染色し GM_1 の局在を細胞レベルで調べた(図-4)。Astrocytes には全く medium からの GM_1 がとり込まれることがなく neuron や oligodendrocyte にとり込まれることがわかった。そしてそのとり込みは cell body のみならず突起の部分にも強い dense をもった particles が存在していた(図4の矢印)

今回表にはしていないが ^3H-GM_1 ganglioside を使用して同様の実験を行なったところ Astrocytes だけの culture ではそのとり込みが非常に少なかった。このことは Astrocyte の plasma membrane は neuron や oligodendrocyte のそれと異なり exogenous な GM_1 ganglioside を insert するのが困難であることを示唆していると思われる。



Astrocytes dificient primary culture(10-day-old) form embryonic derebral hemispheres. Positively stained dark cells are neuron(n) and putative oligodendroglia(p). Magnification x160

次に primary culture から trypsin 処理をすることで cell を passage して6ケ月以上培養した細胞を使用して ganglioside GM_1 の動態を調べた。この場合の cell population は neurons や oligodendrocytes は消失し、残るのは Astrocytes だけになる。しかも GFA protein-positive な cell であり astrocytes の特徴は十分に備えているものと考えられる(図-5)。このような cell での ganglioside GM_1 の存在を PAP 法

やAvidin-biotin-Complex techniqueで調べたところいづれの方法によってもこの細胞は強く染めだされてきた。(図-6)このことはtrypsin処理によるpassage effectのために、あるいはagingを起こしたためにAstrocytesのmembraneに大きな変化が生じたか、GM_1を合成するCapacityを持つことになったためとも考えられ、いづれの場合もcellのspontaneousなtransformationを含めて興味のある結果を得た。

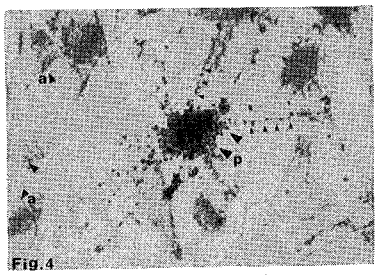


Fig.4 Cells in 10-day cultures of newborn rat brain that had been labeled by the formation of a biotin-choleragen-avidin-peroxidase complex. The cells had been incubated with 50 μg/ml gangliosideGM1 for 8h. A putative neuron(p) stain positively for ganglioside GM1. Astroglia(a) do not stain. Magnification x 320

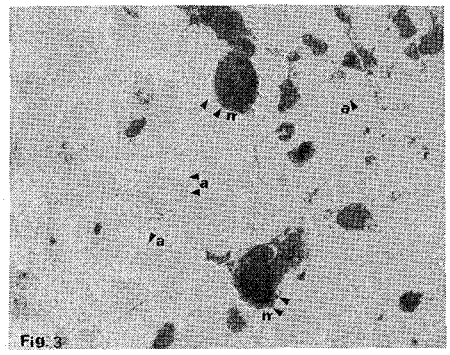
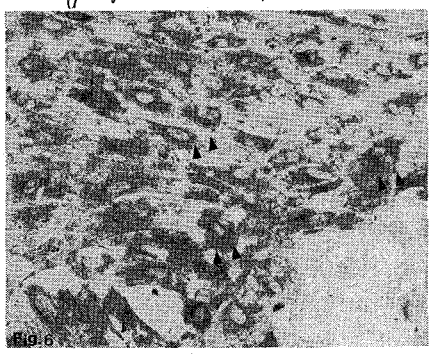
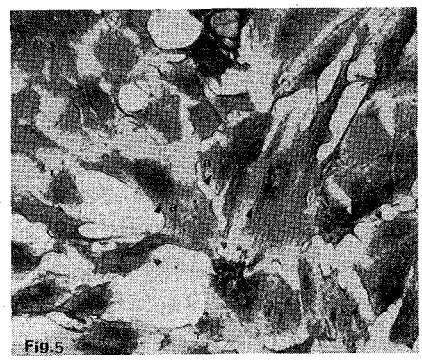


Fig.3 35-day-old primary culture of dissociated cells from fetal rat brain. The biotin-avidin complex provided a dense brown stain that served to identify the neurons(n). Astroglial cells(a) did not stain. Magnification x320

〈考察〉

これまでに newbornからの primary cultureを使用して、Astrocytesは neuronや Oligodendrocyteと gangliosidesの分布やその合成能では異なることを報告したが、今回胎生期からの primary culture系を使用しても同様の結果が得られたことから、少なくともnormalなAstrocyteではGM_1-gangliosideは存在しないことがわかった。これtrypsin処理して長期間の培養を続けているAstrocyteではnormalと異なる結果が得られたことは、Astrocyteの Reactive, neoplastic な面にも関与してくる問題なので今後さらに詳細なる検討をするつもりである。


Fig.6 GM1-positive cells from dissociated fetal rat cerebral hemisphers :Passage 9,14 days in culture, x160 (arrowheads indicate)


Fig.5 GFA-positive cells from dissociated fetal rat cerebral hemisphers:Passage 6,10 days in culture, x160

〈文献〉

1) Asou, H. and Brunngraber,E.G.(1983) Neurochem.Res. 7, 1045-1057.
2) Asou, H. and Brunngraber,E.G.(1983) Neurochem.Int. 6, 81-89.
3) Asou, H.,Brunngraber,E.G.and Delpech,B.(1983) J.Neurochem. 40,589-591.
4) Asou, H.,Brunngraber,E.G. and Jeng,I.(1983) J.Histochem.Cytochem.31,1375-1379.

111　ラット中隔中心核培養組織に対する海馬可溶性因子のNeurotrophic effects

小鹿幸生・山本正彦　（名市大・医・II内科）
田中　亮　（同・I生化）
S.H. Appel　（Baylor大・内科）

〔要　約〕

要約：末梢神経系では，標的組織が逆行性のtrophic effectsをその求心性神経に与えているとする幾多の事実が報告されているが，中枢神経系に於てはほとんど知られていない。我々は胎児脳より摘出した中隔中心核を無血清培養液で培養し，海馬細胞とのCo-Cultureや海馬組織抽出成分を添加，その培養組織の発育・分化に及ぼす影響を形態的変化と神経伝達物質産生能を示標に観察した。その結果，①本培養組織系に於て神経組織は発育し，神経伝達物質産生への分化も認められる。また，培養9日目に測定されたAchの産生能は②Co-Cultureで著明に促進され，更に③類似した促進効果は海馬組織の可溶性及び不溶性いづれの成分でも認められるが，④両成分の混合実験より両者の促進効果はその作用機序を異にすると思われた。⑤不溶性成分による促進効果は海馬以外の組織成分でも認められ，非特異的と考えられたが，⑥可溶性成分による効果は比較的海馬に特異的であった。また，この可溶性成分に含まれる発育・分化促進因子は⑦生後2週目頃までのラットに多く含まれ，⑧酸性溶液中で熱に対し安定で，⑨超限外漏過及びカラム分画，蛋白分解酵素による消化実験などから，この因子は分与量約1000 daltonのポリペプチドであると考えられた。

Key words：
〔Neurotrophic factor, Hippocampus, tissue culture〕

緒言：末梢神経系では，鶏胚標的組織の除去により対応する神経細胞の自然消失が促進され，他部に標的組織を移植すると移植部に対応する神経細胞の自然消失は減少する（1，2），また，成鶏動眼神経の末端を切断，他外眼筋に移接すると元来の外眼筋に向かって再生が起ること（3）などから，シナップス前神経細胞の発育，分化，維持にシナップス後の標的組織が重要な役割を果している事が知られていた。更に，末梢性交感神経及び知覚神経にtrophic effectsを与える標的組織由来高分子蛋白(NGF)が発見された事（4）により，他の末梢神経系に於ても類似の作用を有する物質の検討がなされるようになった（5，6）が，中枢神経系に於てはほとんど検討されていない。ラット中隔核の主細胞はcholine（Ch）作動性神経で，一部の皮質，海馬，視床等に遠心路を分布している。殊に海馬内に分布するCh作動性神経の85％は中隔中心核からの遠心路に基づく事から，我々はこの系を組織培養法で検討し，末梢神経系に類似する現象の実証を試みた。

方法：〔培養〕胎令16日目のラット脳から中隔中心核を摘出し細片とする。この細組織20−30片をPoly-L-Lysineを塗布した35mm plastic culture disheに植付け，Bottenstein等の改変N2培養液で培養した。CO-Cultureは海馬組織を機械的にdissociationし，低速遠心にて得られた沈渣細胞1×10^6を中隔組織30片と共に，1％胎仔牛血清を加えた培養液で培養した。培養液の交換は3日目毎に行った。後根神経節及び上頸部交感神経節の培養には胎令15日目のラットを使用し，1％胎仔牛血清を加えた培養液で培養した。〔組織成分調整〕各発育段階に於ける海馬及び他組織を6−7倍量の氷冷PBS中でhomogenizeした後，超遠心法（90分，100,000g）にて上清の可溶性成分と沈渣に分離した。沈渣は更に10倍量のPBSで数回洗浄後不溶性成分とした。可溶性成分は場合に応じAmicon YM5 filterによる陽圧超限外漏過あるいは凍結乾燥後0.2N酢酸に溶解，Bio−Gel P_2 カラムにて分画を試みた。各成分は3日及び6日目の培養組織に添加，生物学的活性を検討し，成分の蛋白濃度はLowry法に従った。

〔酵素による消化〕海馬可溶性成分を0.1%(V/W)のTrypsinで37℃，30分 incubation 後，0.15%(V/W)の Soybean trypsin inhibitor で反応を停止，培養組織に添加した。また，海馬可溶性成分と各種 insoluble proteases とを至適条件下で incubation 後，遠沈法で酵素を除去，可溶性成分の生物学的活性の有無についても検討した。〔Cholinergic activity 測定〕Cholinacetyl transferase (CAT) 活性は培養組織を洗浄後，培養 dish に含まれる全ての組織を集め，少量の緩衝液中で homogenize し Fonnum 法(7)に従い測定した。また，培養組織の Ch uptake 及び Ach 産生能は Johnson 等の法(8)に従った。これらCholinergic activity の測定には9日目の培養組織を使用した。

実験結果及び考察：本実験条件で培養組織は発育し3日目以後の培養組織で Ch uptake，Ach 産生能，CAT の測定が可能となる。中隔中心核と海馬 との CO-Culture 群に於ける Ach産生能は，それぞれの培養組織単独群に比し有意に高く($P<0.001$)，各々の群の総和の2倍の産生能を示した(table 1)。この Ach 産生促進効果の本質を探るべく，生後2週目のラット海馬を可溶性成分と不溶性成分に分離，各々の成分単独または両者同時に中隔中心核培養組織に添加，Ch 作動性神経の発育，分化に及ぼす影響を検討した。両成分共に Ach 産生を促進したが，同時に Ch uptake 及び CAT の活性亢進も認められたことから，この Ach 産生促進効果はこれらの総和的結果と考えられた。また，Ach の両成分による産生促進効果は濃度依存性で，共に蛋白濃度 20−25 μg/ml で飽和を示した。 可溶性及び不溶性成分の飽和量を同時に培養組織に添加した際，その Ach 産生能は両成分を別々に添加した群より高く，両群の総和又はそれ以上の値を示した(table 2)ことから，両成分に含まれる Ach 産生促進因子はその作用機序を異にするものと考えられた。

Table 1 Co-Culture effects on Ach synthesis

	Ach synthesis (fmol/dish)
1. Hippocampal cell culture	15.9± 3.1
2. Medial septal culture	31.0± 3.4
3. Co-Culture (1+2)	91.7±15.2

海馬可溶性成分の飽和量を全ての培養組織に添加，種々の組織より得た不溶性成分を一定量加えその組織特異性を検討したところ，海馬不溶性成分の Ach 産生促進効果は他組織に比し高い傾向を示したが，肝臓，脊髄など他組織由来不溶性成分でも明らかな促進効果が認められた($P<0.01$)。一方，可溶性成分の組織特異性の検討には，全ての培養組織に海馬不溶性成分の飽和量を添加，種々の組織由来可溶性成分の Ach 産生能を比較した。培養組織の Ach 産生は海馬可溶性成分で著明に促進されたが，他の組織成分群では軽微で両群の間にも明らかな相異が認められた($P<0.005$)(table 3)ことから，以後可溶性成分の特性の検討は非特異的要因を除外する目的で，飽和量の海馬不溶性成分を全ての培養組織に添加し実施した。

Table 2 Effects of hippocampal supernatant and particulate on Ach synthesis of medial septal nucleus culture

	Ach synthesis (fmol/specimen)
1. PBS Control	2.5±0.5
2. Supernatant(25 μg/ml)	6.5±0.7
3. Particulate (30 μg/ml)	6.0±1.1
4. Combination (2+3)	14.0±1.2

Table 3 Effects of various tissue supernatant (20 μg) and particulate (20 μg) on Ach synthesis of medial septal nucleus culture

Ach synthesis (fmol/specimen)

(tissue source)	supernatant	particulate
1. PBS control	5.1± 0.5	3.1± 0.7
2. Hippocampus	13.5± 1.7	9.1± 2.0
3. Cerebellum	6.1± 1.0	6.6± 1.1
4. Spinal cord	7.4± 0.6	7.0± 1.3
5. liver	6.1± 0.7	8.0± 1.2
6. muscle	5.9± 0.6	3.8± 1.0

海馬可溶性成分に NGF が含まれ(9)，NGFが大脳皮質の Ch 作動性神経の発育を助長するとする 報告(10)が認められるが，海馬可溶性成分を後根神経節あるいは上頸部交感神経節培養組織に投与した際，NGFによって惹起される形態的変化は認められなかった。また，NGF を中隔中心核培養組織に添加しても Ach の産生は促進されず， 海馬可溶性成分を抗NGF抗体で前処理後中隔中心核培養組織に添加した場合でも，その Ach産生能の促進効果は影響を受けなかった事から，中隔中心核 Ch 作動性神経の発育・ 分化を助長する因子は

NGFではないと考えられた。

ヒト，家兎，仔牛などの海馬可溶性成分にもラット中隔中心核のAch産生を促進する効果が認められたことから，種特異性は乏しいものと思われた。また，各成長段階に於けるラット海馬可溶性成分のAch産生促進能は新生時期及び2－3週令の海馬で明らかに高値を示したが，成長が進むに従い低下傾向を示した。この結果とラット中隔神経の海馬でのシナップス形成時期（11）とが一致する事は，シナップス形成時期に特異な可溶性物質がシナップス前神経の発育に影響を与えている可能性を示唆するものと思われた。

海馬可溶性成分に含まれるAch産生促進因子は酸性溶液中で熱に対し比較的安定で，amicon YM5 filterを通過することが確認され，漏液の蛋白濃度は漏過前の約1/10で，濃度依存曲線によるその飽和量は約3μg/mlであった。また，海馬可溶性原液及びYM5 filter漏液中のAch産生促進因子は使用した蛋白分解酵素に対し感受性を示し（table 4），YM5 filter漏液をP_2カラムで分画した結果，Ach産生促進因子はVitamin B_{12}とNADHとの間に回集されたことから，この海馬特異因子は分子量約1000 daltonのpolypeptideであると考えられた。

Table 4 Effect of proteares on Ach synthesis actevity of hippocompal supernatant and YM5 filtrate in medial septal nucleus culture

(Supernatant 25 μg)	Ach synthesis (fmol/specimen)	(YM5 filtrate 3 μg)	Ach synthesis (fmol/specimen)
1. PBS Control	5.9± 0.7	1. PBS Control	6.2± 1.3
2. Original Supernatant	12.4± 1.4	2. YM5 filtrate	15.2± 1.9
3. Soybean trypsin inhibitor	11.6± 1.3	3. Carboxypeptidase A (Agrarose)	8.7± 1.2
4. Trypsin (+ inhibiter)	6.6± 1.2	4. Chymotrypsin A (CM)	8.4± 0.5
5. Insoluble protease (Streptomyces griseus)	5.1± 1.0	5. Papain (CM)	9.1± 0.3

〔文献〕

(1) Hamburger, V. et. al (1949), J. Exp. Zool. 111, 457−501.

(2) Hollyday, M. et. al. (1976), J. Comp. Neurol. 170, 311−320.

(3) Sperry, R.W. (1963), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 50, 703−710.

(4) Cohen, S. (1960), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 46, 302−311.

(5) Smith, R.G., et al. (1981), in Abstracts of molecular and Celluar Control of muscular development (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) p.119.

(6) Manthorpe, M. et. al. (1980), J. Neurochem. 34, 69−75.

(7) Fonnum, F. (1968), Brochem. J. 115, 465−472.

(8) Johnson, D.A. et. al. (1980), J. Physrol. (London) 299, 605−619.

(9) Crutcher, K.A. et. al. (1982), Science 217, 67−68.

(10) Honegger, P. et. al. (1982) Dev. Brain. Res. 3, 229−238.

(11) Nadler, J.V., et. al. (1974), Dev. Biol. 36, 142−154.

112　新生仔および成熟ラット大脳皮質切片における β－水酸化酪酸の利用

安藤雅史・伊藤忠雄
（鳥取大・医・臨床薬理）

〔要　約〕

新生仔および成熟ラットの大脳皮質切片を，グルコースまたはβ-水酸化酪酸を基質とした，あるいは基質を含まないメディウムで，好気的にインキュベートしたときの，脳組織ATP，酸可溶性アミノ酸ならびにメディウムに遊出したアミノ酸を測定した。

グルコースを基質とした場合，脳組織ATPは維持されたが，無基質の場合には著しく減少した。β-水酸化酪酸を基質とした場合，成熟脳の組織ATPはグルコース基質の場合と無基質の場合とのほぼ中間値を示したが，新生仔脳ではグルコース基質の場合と有意差を認めなかった。また脳組織ATPが減少すると，成熟脳では脳切片のグルタミン酸（Glu），グルタミン（Gln），GABAが減少し，アスパラギン酸（Asp）が増加し，脳切片からメディウムに遊出したGlu，Aspは増加し，Glnは減少した。また新生仔脳では，脳組織ATPの減少に伴い，脳切片のGlu，Glnが減少し，Aspが増加した。この脳組織ATPと，成熟脳および新生仔脳のアミノ酸，成熟脳切片からメディウムに遊出したアミノ酸との間に，高い相関がみられた。また成熟脳では，高カリウムメディウム（105 mM）およびモノヨード酢酸（0.1 mM）による脳組織ATPの減少によっても，同様の傾向がみられた。

Key words：　ß-Hydroxybutyrate, Amino acid, ATP

新生仔脳は，成熟脳に比しケトン体をエネルギー源としてより利用しうることが知られている[1,2,9]。先に伊藤ら[3]は，新生仔ラット大脳皮質切片が，グルコースとほぼ同程度にアセト酢酸を基質として利用しうることを，酸素消費，脳組織ATP，^{14}C-グルコースによるアミノ酸代謝等を指標として明らかにした。今回は，新生仔および成熟ラット大脳皮質切片が，グルコース，β-水酸化酪酸を基質としたときの，脳組織ATPと脳アミノ酸の変化について，脳エネルギー代謝の観点から検討した。

〔実験方法〕

動物は，体重200-250 g のWistar系雄性成熟ラット（7-8週齢）および自家繁殖による新生仔ラット（生後3日）を用いた。大脳皮質切片は，ラットを断頭屠殺後，脳をすみやかに取り出し，成熟脳はStadie-Riggs型組織スライサーにて，新生仔脳は用手的に作成した。直ちに湿重量（50-60 mg）を測定後，グルコース（5 mM）またはβ-水酸化酪酸（5 mM）を基質とした，あるいは無基質のKrebs-Ringer phosphateメディウム（2 ml），pH 7.4，37 °C中で好気的に60分間インキュベートした。また高カリウムメディウム（105 mM）およびモノヨード酢酸（0.1 mM）を含むメディウムについても検討した。インキュベーション後，脳切片は0.5N氷冷過塩素酸でホモジナイズし，遠沈後その上清のATP含量はBücker法によるATPテストキット（Boehringer-Mannhaim）を用いて，また酸可溶性アミノ酸は上清を水酸化カリウムによりpH 2.0として4 °Cにて遠沈後，その上清を835型日立アミノ酸自動分析計により測定した。メディウム中のアミノ酸は，遠沈後の上清をスルホサリチル酸（最終濃度0.5%）を用いてpH 2.0とし，再度遠沈した上清を測定に供した。

〔 実験結果 〕

1．脳組織ATPに及ぼす基質の影響： グルコース，β-水酸化酪酸基質および無基質のメディウムでインキュベートした場合の脳組織ATPは，成熟脳では 1.67，1.11 および 0.66（μmoles/g 組織湿重量），新生仔脳では 2.66，2.51 および 1.56 であり，グルコース基質の場合には維持されていたが，無基質の場合には著しく減少した。β-水酸化酪酸を基質とした場合には，成熟脳ではグルコース基質の場合と無基質の場合とのほぼ中間値を示したが，新生仔脳ではグルコース基質の場合と有意差を認めなかった（表1,2）。

2．脳アミノ酸に及ぼす基質の影響： 60分間インキュベートした成熟脳の皮質切片のGlu，Gln，GABA，Aspは，断頭屠殺後直ちに測定した脳組織アミノ酸と比較すると，グルコース基質の場合にはよく保持されたが，無基質の場合にはGlu，Gln，GABAの減少，Aspの増加がみられた。β-水酸化酪酸基質の場合，脳アミノ酸はグルコース基質の場合と無基質の場合とのほぼ中間値を示した。新生仔脳ではβ-水酸化酪酸とグルコース間に有意差はみられなかった（表1,2）。

Table 1. Amino acid and ATP in resting and high potassium stimulated adult rat brain

		Aspartic acid tissue	Aspartic acid medium	Glutamic acid tissue	Glutamic acid medium	Glutamine tissue	Glutamine medium	GABA tissue	GABA medium	ATP
glucose	K_5	3.20	0.15	9.55	0.16	3.59	2.67	2.51	n.d.	1.67
	K_{105}	1.67	0.40	7.93	1.04	4.04	1.81	2.92	1.01	1.07
ß-OH	K_5	5.76	0.30	8.36	0.21	1.62	2.05	2.23	n.d.	1.11
butyrate	K_{105}	6.55	3.58	2.54	2.89	0.26	1.33	1.20	0.89	0.66
no	K_5	8.10	0.62	4.08	0.49	0.65	1.45	1.80	0.03	0.66
substrate	K_{105}	5.95	4.83	1.30	2.43	0.14	0.96	0.58	0.77	0.54
immediately after decapitation		3.02		12.66		4.77		1.87		

n.d.: not detected (μmoles/g wet wt)

Table 2. Amino acid and ATP in resting and high potassium stimulated infant rat brain

		Aspartic acid tissue	Aspartic acid medium	Glutamic acid tissue	Glutamic acid medium	Glutamine tissue	Glutamine medium	GABA tissue	GABA medium	ATP
glucose	K_5	3.12	0.06	4.41	0.13	0.33	0.80	0.55	n.d.	2.66
	K_{105}	4.35	0.18	1.85	0.23	0.26	1.06	0.61	0.15	1.76
ß-OH	K_5	4.39	0.11	4.02	0.13	0.21	0.71	0.61	n.d.	2.51
butyrate	K_{105}	5.56	0.29	1.92	0.23	0.26	1.06	0.52	0.11	1.19
no	K_5	6.51	0.19	1.17	0.16	0.11	0.66	0.50	n.d.	1.56
substrate	K_{105}	6.18	0.27	1.06	0.24	0.21	0.97	0.46	0.10	0.85
immediately after decapitation		2.06		5.58		2.71		0.74		

n.d.: not detected (μmoles/g wet wt)

3．皮質切片からのアミノ酸遊出に及ぼす基質の影響： グルコース基質，β-水酸化酪酸基質および無基質の各条件下でインキュベートした場合，成熟脳では大脳皮質切片からメディウムに遊出したアミノ酸は，グルコース基質に比し，β-水酸化酪酸基質および無基質において，Glu，Aspでは遊出が増加し，Glnでは減少したが，無基質の場合，より著明であった。新生仔脳では無基質の場合，グルコース基質に比しGln遊出は減少したが，それ以外では有意差はみられなかった（表1,2）。

4．脳組織ATPとアミノ酸との相関： 脳組織ATPと脳組織内アミノ酸およびメディウムに遊出したアミノ酸との間に高い相関がみられた。すなわち脳組織ATPの減少に伴い，成熟脳の大脳皮質切片ではGlu，Gln，GABAの減少，Aspの増加がみられた（図1）。新生仔脳の皮質切片においてもGlu，Gln，Aspで同様の相関がみられた（図3）。また脳組織ATPの減少に伴い，成熟脳の皮質切片からメディウムに遊出したGlu，Aspは

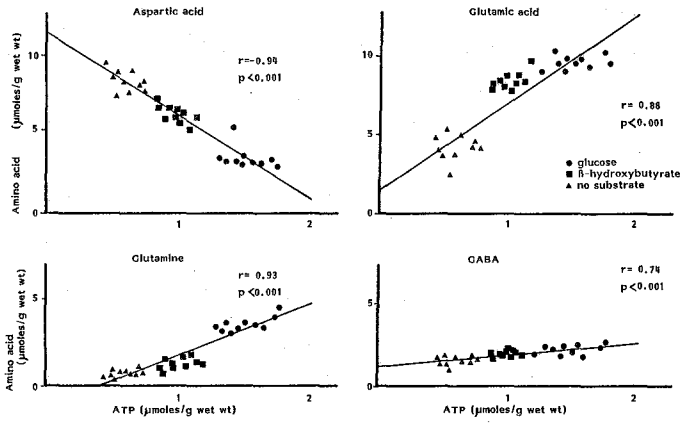


Fig. 1 Relationship between ATP and amino acid in adult rat cerebral slices

増加し，Glnは減少した（図２）。新生仔脳では，脳ATPとメディウムに遊出したアミノ酸との間に有意の相関は認められなかった。

５．高カリウムメディウムおよびモノヨード酢酸の影響：　高カリウムメディウム（105 mM）およびモノヨード酢酸（0.1 mM）により脳組織ATPを減少させた場合，成熟脳では脳組織ATPの減少に伴い，皮質切片のGlu，Gln，GABAの減少とAspの増加，メディウムに遊出したAsp，Gluの増加とGlnの減少をそれぞれ認めた。

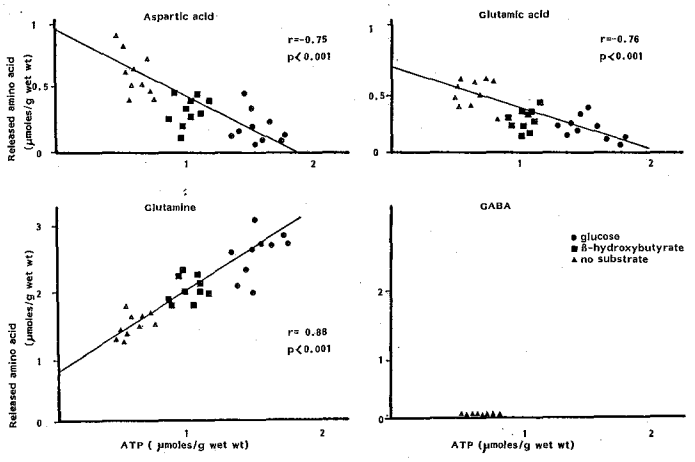


Fig. 2 Relationship between ATP in adult rat cerebral slices and released amino acid in the medium

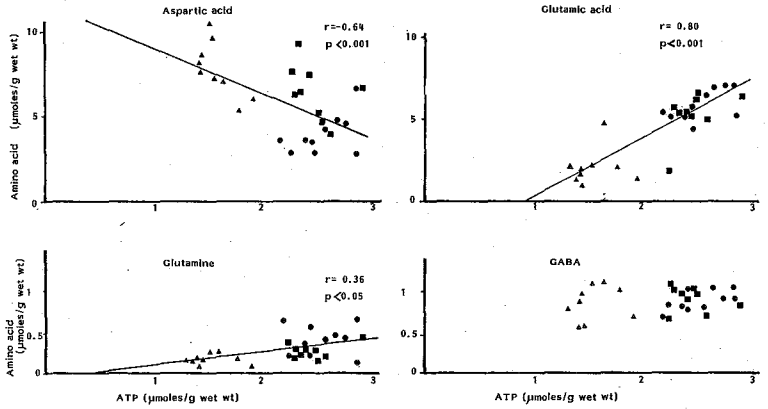


Fig. 3 Relationship between ATP and amino acid in infant rat cerebral slices

〔考察〕

今回の実験結果より，成熟脳ではβ-水酸化酪酸を基質として利用しうるが，その利用性はグルコースより乏しいと考えられた。一方新生仔脳では，グルコース基質とβ-水酸化酪酸基質の場合と比較して，脳組織ATP，皮質切片およびメディウムに遊出したアミノ酸に有意差がみられないことより，従来の報告にみられるように，グルコースとほぼ同程度にβ-水酸化酪酸を基質として利用しうることが示唆された。また脳組織ATPと脳アミノ酸との間に高い相関がみられたこと，しかも高カリウムメディウムおよびモノヨード酢酸による脳組織ATPの減少によっても同様の相関がみられることより，脳組織ATPは，GABAシャントを含む脳アミノ酸の維持機能に対し，重要な役割を演じていると考えられた。

〔文献〕

1. DeVivo, D. C., Leckie, M. P. and Agrawal, H. C. (1975) J. Neurochem. 25,161-170.
2. Hawkins, R. A., Williamson, D. H. and Krebs, H. A. (1971) Biochem. J. 122,13-18.
3. Itoh, T. and Quastel, J.H. (1970) Biochem. J. 116,641-655.

113　白鼠上頸部交感神経節へのα－aminoisobutyric acid（AIB）の取込みとNa^+, K^+－ATPase活性におよぼす神経成長促進因子（NGF）の促進効果

安藤正人・永田　豊　（保健衛生大・医・生理）
堀　真一郎　（都神経研・神経生化）

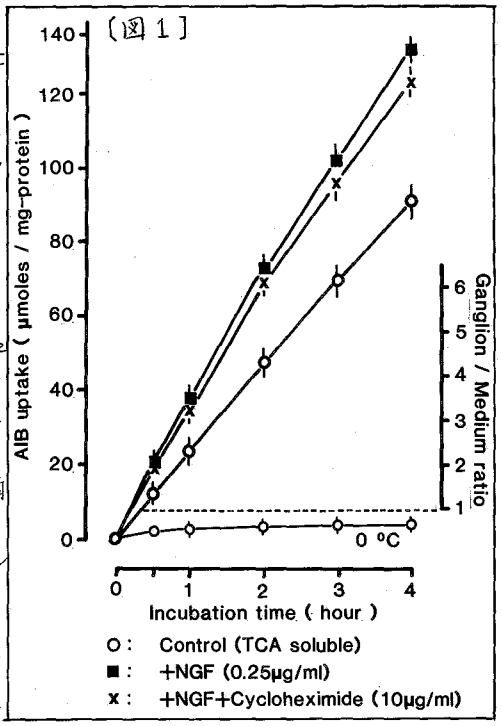
〔要　旨〕

摘出白鼠上頸交感神経節（SCG）を in vitro でグル、好気的にincubateして生体内で代謝されないα－aminoisobutyric acid（AIB）の取込みに及ぼすNGFの効果を調べた。AIBのSCG内への取込みは、4時間迄直線的に増大したが更にその溶液中にNGF（0.25μg/ml）を添加すると有意な（約1/3倍）取込みの促進効果がみられた。この効果は、タンパク合成阻害剤〔cycloheximide（10μg/ml）〕によっては全く影響されず、ouabain（50μM）の添加で、有意に抑制されたことからNGFは膜の能動的物質輸送系の活性化を引き起こすことが示唆された。この際NGFは、AIB取込みの見かけのKm値を変化させることなくVmax値を増大（2倍）させた。さらに、細胞膜のtransport enzymeのNa^+, K^+-ATPase活性も、NGFの添加によって著明（6.5倍）に上昇した。したがって、NGFは細胞内Na^+の排出に関与して、AIBの細胞内への取込み亢進がおこっているものと理解される。一方、節後神経切断手術（axotomy）によりSCG内neuronの変性・脱落を来した標本では、NGFによる取込み促進効果は全く消失した。これらの成績から、NGFの作用はgliaよりもneuron細胞膜に特異的に作用して、Na^+, K^+-ATPaseを活性化してNa^+排出と共役したアミノ酸の取込み過程を促進していると考えられる。

Key words：α-Aminoisobutyric acid uptake, superior cervical sympathetic ganglia, nerve growth factor

神経成長促進因子（Nerve growth factor, NGF）の生物学的作用は、数日間培養した交感神経節や後根神経節細胞の軸索の伸長を促進することが知られている。しかし、交感神経系の機能維持に最も基本的に関連している核酸やタンパクの基質となる糖あるいはアミノ酸の細胞内への輸送系に対する短時間の効果[5]については、未だ充分調べられていない。白鼠交感神経節（Superior cervical sympathetic ganglia, SCG）は、節前神経線維が節後神経細胞とsynapse結合しており、その周囲をglia細胞が囲んでいる比較的単純な神経組織で、生体から摘出後も長時間に亘って、活発な物質代謝系を有することが知られている。そこで、我々は摘出SCGを用いてin vitroでincubateしながら、アミノ酸（α－アミノイソ酪酸、AIB）の取り込みにおよぼすNGFの効果を調べ、さらに膜の輸送酵素として知られるNa^+, K^+-ATPase活性との関連性を検討した。更に、節後神経を抑制して逆行性にSCG内neuronの変性、脱落させ

〔図1〕



に標本を用いてNGFのAIB取込みにおよぼす効果の細胞面在性を明らかにしようと試みた。

〔実験材料および方法〕

[1] SCGの摘出，節前（denervation）あるいは節後神経切断（axotomy）手術はWistar系白鼠（体重200-220g）を用い，既報[1]に従い実施した。

[2] NGFは，Bocchiniらの方法[2]に従い成熟マウスの顎下腺から2.5Sのタンパク質として抽出精製して実験に用いた。

[3] 摘出SCGのアミノ酸取込み実験：　組織内へのアミノ酸取込みを測定するincubation溶液は，HEPESを含むKrebs-Ringer（5.5mM glucose含む）pH7.3中[4]に，tracerとしてα-[methyl-^{3}H] amino isobutyric acid (AIB, 1.25μCi) ならびにcarrier AIB (100μM)を添加した。好気的に37°でincubationしたSCGは，細胞外液中のAIBを除去するため冷生食水で1分間洗浄後5% TCA中でhomogenizeし，遠心後，上清に回収された放射活性を計測し，細胞内AIB取込み量を求めた。

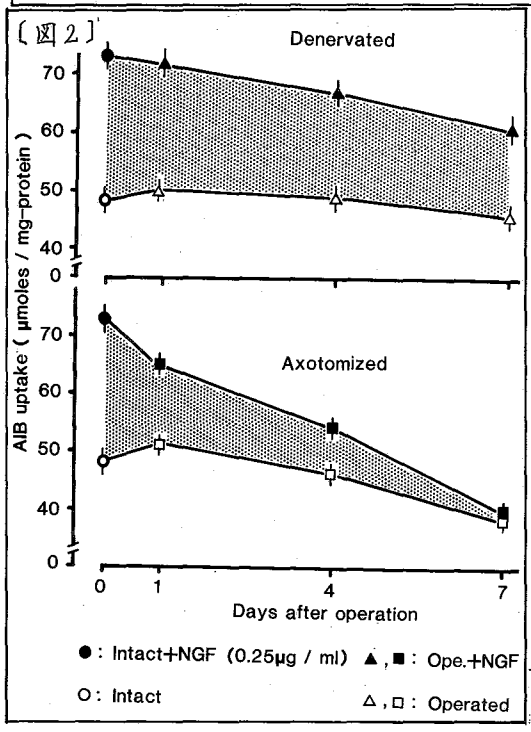
[4] Na^+, K^+-ATPase活性の測定：　Gibbs etalの方法[3]に従いSCG homogenateの〔Mg^{2+}, Na^+, K^+〕ATPase活性から〔Mg^{2+} or ouabain resistant〕ATPase活性を差引いた無機リンの生成量[8]の差から活性を表示した[6]。試料タンパク含量はLowry etalの方法で測定した。

〔表1〕
摘出SCGによるAIB取込みのKineticsの比較

Conditions	Intact SCG		Denervated SCG		Axotomized SCG	
	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax
- NGF	0.92	0.56	0.91	0.54	1.06*	0.47**
+ NGF (0.25μg/ml)	0.93	0.96*	0.93	0.71*	1.05*	0.48**

*Increase of Km and Vmax values, **Decrease of Vmax value.

〔図2〕



〔実験結果および考察〕

[1] AIBのSCG内への取込みにおよぼすNGFの促進効果：　中性アミノ酸のAIBは生体内で代謝・分解されないことから膜のアミノ酸輸送系を調べるのに好適である。AIBがSCG組織内に取込まれる時間経過を調べると，4時間迄はほぼ直線的に取込みの増大が示された（図1）。AIBのSCG内に取込まれた量とmedium内の濃度との比（ganglion / medium ratio）は，約20分以上incubationを続けると，1.0以上になり，また0°CでのincubationではSCG内への取込み蓄積が全く見られないことから，この過程は能動的なものである。溶液中にNGF（0.25μg/ml）を添加してincubationをおこなうと，4時間にわたって有意なAIBのSCG内への取込みの促進

効果がみられた。この効果はタンパク合成阻害剤（cycloheximide, 10μg/ml）の添加では全く影響されなかったことから，この過程はタンパク代謝の亢進に起因するものではなく，むしろ細胞膜における energy 代謝過程と共役する物質輸送系の活性化に基づく可能性が考えられる。次に，NGF による AIB 取込みの促進効果について速度論的解析を試みた。即ち，取込みの最大初速度（Vmax）および見かけの Km 値を夫々 Lineweaver-Burk の変形 Eadie plot から求めるとその high affinity component は，見かけの Km 値 0.92 mM, Vmax 0.56 μmol/min/mg-protein であった。更に，この系に NGF を添加すると，Km 値は全く変化せずに Vmax 値のみ約2倍に上昇するのが示された。この傾向は，PC12 細胞のアミノ酸取込み系についての解析結果[7]とよく一致していた。即ち，摘出 SCG 標本のアミノ酸取込みの NGF による促進作用は，取込み部位やその carrier の性質には影響を及ぼさずに，その量だけが著しく増大することによって生ずることが明確となった（表1）。

Varon ら[10]は，NGF が細胞内 Na^+ の積極的な排出過程の調節に緊密に関与していることを報告している。そこで，NGF が SCG 標本の Na^+, K^+-ATPase 活性に及ぼす影響について調べた。表2に示すごとく，15分間の NGF 添加刺激によって，SCG の酵素活性が著明に上昇（6.5倍）するのがみられた。また，incubation 溶液中に ouabain（50μM）を添加して酵素活性を阻害すると，AIB の取込みも著しく減少した[9]。したがって，NGF は，細胞の Na^+, K^+-ATPase 活性を促進して，その結果 Na^+ の排出に共役して AIB など trophic な物質の細胞内への取込みを積極的に高めているものと理解されよう。

〔表2〕 摘出 SCG の Na^+, K^+-ATPase 活性におよぼす NGF の効果

Conditions	Intact SCG	Denervated SCG	Axotomized SCG
- NGF	1.34 ± 0.12 (8)	0.66 ± 0.22 (6)*	1.12 ± 0.18 (6)
+ NGF (0.25μg/ml)	8.65 ± 1.26 (8)***	6.88 ± 1.73 (4)***	2.01 ± 0.66 (4)

*p < 0.05, ***p < 0.001, μmoles/mg-protein/30 min

[2] NGF による AIB 取込み促進効果の細胞局在性：一般に，neurotrophic factor は，その生理的役割を理解する上で，target 細胞との相関に興味が持たれている。図2に示すように，節前末端の Waller 変性を生じている denerrated SCG では，術後1週を経過しても AIB 取込みは殆んど影響されなかった。しかし，axtomy を施して，節後 neuron の変性・脱落と反応性 glia 細胞の増殖を来したSCGでは AIB 取込みの有意な低下が見られた。また，術後1週間の axotomized SCG では，NGF 添加によって生ずる AIB の能動的取り込みの促進効果は全く消失した。このことは，表1に示すように，AIB 取込みの Vmax 値の著しい低下（0.96 → 0.48）によっても裏付けられる。一方，SCG の Na^+, K^+-ATPase 活性は，glia の増殖した axotomy SCG でも intact SCG とほぼ同程度にみられたが，NGF 添加による酵素活性の反応性は組織内の neuron の減少と共に失われた（表2）。これらの実験成績から，NGF が glia よりも neuron の細胞膜に作用して神経機能発現と維持に緊密に関与していることが強く示唆された。

〔文　献〕

(1) Ando, M., Miwa, M., Kato, K. & Nagata, Y. (1984) J. Neurochem. 42: 94-100 (2) Bocchini, V. & Angeletti, P.U. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 64: 787-794 (3) Gibbs, R., Roddy, P.M. & Titus, E. (1965) J. Biol. Chem. 240: 2181-2187 (4) Greene, L.A. & Rein, G. (1977) Brain Res. 129: 247-263 (5) Horii, Z. & Varon, S. (1977) Brain Res. 124: 121-133 (6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275 (7) MacGuire, J.C. & Greene, L.A. (1979) J. Biol. Chem. 254: 3362-3367 (8) Martin, J.B. & Doty, D.M. (1947) Analyt. Chem. 21: 965-966 (9) Nagata, Y., Ando, M. & Hori, S. (1985?) Neurochem Res. in preparation. (10) Varon, S. & Skaper, S.D. (1983) TIBS. 8: 22-25

114　ラット脳内の種々の部位で^{3}H－プトレスチンより生合成された^{3}H－GABAの遊出に関する研究 — Push-Pull Perfusion Systemを用いて —

能登　直・橋本泰道・上村　宏　（京府医大・精神科）
加藤伸勝　（都立松沢病院）・中嶋照夫（京府医大・精神科）

〔要　約〕

無麻酔下で自由に動き回れるラットを用い脳内の12部位での，プトレスチンより生合成されたGABAの遊出量をPush-Pull Perfusionを用いて調べた。^{3}H－プトレスチンでラベルし10分後より同じ部位を25分間還流し，その還流液中の^{3}H-GABAを陽イオン交換クロマトグラフィーと高圧ロ紙電気泳動を用いて分析した。

その結果，^{3}H-GABAの遊出はCaudate-Putamen, Median Forebrain Bundle, Paraventricular Nucleusで多く，N. Accumbens, Central Amygdaloid N., Anteromedial N. of Thalamus, Reuniens N. of Thalamus, Medial Geniculate Bodyで少なかった。大脳皮質，Globus Pallidus, Ammon's Horn of Hippocampus, Dentate Gyrus of Hippocampusでの^{3}H-GABAの遊出は中間の値を示した。

^{3}H-GABAの遊出に関して，高い値を示した部位および中間の値を示した部位と低い値を示した部位の間に有意差が認められた。

Key words：GABA Release, Putrescine, Rat Brain

γ-aminobutyric acid(以下GABA)は中枢神経系において，グルタミン酸から生合成され抑制性の神経伝達物質として作用していることはよく知られている(4,5,6)。過去20年にわたって，GABA作働性ニューロンを分析する目的でサル(17,18)，ラット(2,3)，ネコ(6)，人(1,14)等の中枢神経系のGABAの分布が研究されている。GABAのもう一つの前駆物質はプトレスチンであり，このプトレスチンから生合成されるGABAに関しては，特に中枢神経系における生理的意義に関してはあまり研究がなされていない。その大きな理由の一つはGABAの前駆物質であるプトレスチン量が中枢神経系において，グルタミン酸量に比べ非常に少いことである。(15,16)。しかし，もしプトレスチンから生合成されるGABAがグルタミン酸から生合成されるGABAと同じプールに取り込まれるならば，中枢神経系において抑制性神経伝達物質として作用している可能性が考えられる。この可能性を証明するためには中枢神経系においてプトレスチンからGABAが生合成されることを明らかにすることが不可欠である。本研究はPush-Pull Perfusion法を用いてラット脳内の種々の部位においてプトレスチンからのGABAの生合成を明らかにすることを目的とした。

〔実験方法〕　実験には体重300~350gのウィスター系雄ラットを使用した。動物は12時間の明暗サイクルおよび室温23~26℃で，飼料と水を自由に与えて飼育された。

〈ガイドカニューレの植え込み手術〉　40~50mg/kgのペントバルビタール麻酔下で20ゲージ，12mmの長さのステンレスカニューレをMyersの方法(9)を用いて植え込んだ。すなわち海馬のAmmon's horn（以下AH），Dentate Gyrus（以下FD），および内側膝状体（以下GM）用のガイドカニューレの先端はPellegrinoらのラット脳図譜(13)に従ってAP;24,

L;3.0, HV;4.6㎜の部位に慢性的に植え込まれた。同様にして視床のAnteromedial nucleus(以下AM), Reuniens nucleus(以下RE), およびParaventricular nucleus(以下PVH)用にはAP;6.0, L;1.0, HV;4.6㎜に, 大脳皮質, Globus pallidus (以下GP), およびCentral amygdaloid nucleus(以下ACE) 用にはAP;6.4, L;3.5, HV;4.5㎜に, さらにN. Caudatus-putamen (以下CPU), N. Accumbens (以下ACB)およびMedian forebrain bundle (以下MFB)用にはAP;8.0, L;2.5, HV;5.0㎜に慢性的にガイドカニューレが植え込まれた。

〈脳内各部位のPush-Pull Perfusion〉 Push-Pull Perfusionは手術後少なくとも1週間経てから開始された。まず還流部位に2.0μci, 1.0μℓの^{3}H-プトレスチン(sp. act. 21.4Ci/mmol)を注入し, 10分後より還流を開始した。還流は前回の報告(12)と同じ人工CSF液を用い, 流速25μℓ/minで25分間行った。還流方法はMyers(9)に準じた。還流液をバイアルに集め, その内20μℓを総カウント測定に用いた。

〈還流液の分析〉 集められた還流液の残りを0.5mℓのAmberlite CG120, H^{+}-form, 200-400meshのカラムに通し, 水洗いの後2.5mℓの1M-ピリジンにて中酸性アミノ酸分画を溶出した(11)。溶出液を凍結乾燥した後, 残渣物を40μℓの0.1%GABA溶液に溶かし、その内の20μℓを用い高圧ロ紙電気泳動を行った。ロ紙電気泳動はピリジン-サク酸緩衝液中で, 電圧17ボルト/㎝で60分間展開した。ロ紙を乾燥した後アミノ酸を0.2%ニンヒドリンのアセトン溶液にて発色させた。発色したGABAの部分を切り出し, シンチレーションバイアルに移し, 1.0mℓの50%エタノール溶液を加え抽出したのち, さらに10mℓのシンチレーター(10)を加え放射能をPackard TRI-CARB 460C Automatic Liquid Scintillation Systemを用いて測定した。この方法によるGABAの回収率は90.7±1.8%であった。

〈還流部位の同定〉 実験終了後, 脳を0.9%食塩水と5%ホルマリン溶液で還流固定したのち, 脳の連続切片を作製し, 還流部位をクレシルバイオレットで染色し同定した。

〔結果〕 〈CPU, ACBおよびMFBにおける^{3}H-GABAの遊出〉 CPUおよびMFBにおいてプトレスチンより生合成された^{3}H-GABAの遊出は他の部位における遊出に比較して非常に多く, 視床のAM, REおよびGMからの遊出に比して有意に高値を示した(Fig 1)。ACBからの^{3}H-GABAの遊出はCPUおよびMFBからの遊出に比較して低値を示したが, GMからの遊出に比して有意に高値を示した(Fig 1)。

〈大脳皮質, GPおよびACEにおける^{3}H-GABAの遊出〉 大脳皮質においてプトレスチンより生合成された^{3}H-GABAの遊出は今回還流した12部位の内では中間の値を示したが, 標準偏差が大きいためどの部位からの遊出の値とも有意差は認めなかった(Fig 1)。GPからの^{3}H-GABAの遊出は中間の値を示し, ACE, AM, REおよびGMからの遊出に対して有意に高い値を示した(Fig 1)。ACEからの^{3}H-GABAの遊出は低値を示し, 上記のGPからの遊出に対して有意に低値を示した(Fig 1)。

〈AM, REおよびPVHにおける^{3}H-GABAの遊出〉 視床のAMおよびREからの^{3}H-GABAの遊出は非常に少く, AMにおいてはCPU, MFB, GP, PVH, AHおよびFDからの遊出に比して有意に低値を示した(Fig 1)。又, REにおいてはCPU, MFBおよびGPにおける値に比して有意に低かった(Fig 1)。PVHからの^{3}H-GABAの遊出は高値を示し, AMおよびGMからの遊出に比し有意に高い値を示した(Fig 1)。

〈AH, FDおよびGMにおける^{3}H-GABAの遊出〉 海馬のAHおよびFDにおけるプトレスチンよ

り生合成された^{3}H-GABAの遊出は中間の値を示し，AMおよびGMにおける遊出に対して有意に高値を示した（ Fig 1 ）。GMにおける^{3}H-GABAの遊出は最も少く，CPU, ACB, MFB, GP, PVH, AHおよびFDにおける遊出に比し有意に低値を示した（ Fig 1 ）。

〔考察〕 GABAは脊髄，小脳，大脳皮質，海馬，嗅脳，視床下部等において神経伝達物質として作用していると考えられているが，無麻酔下で動きを制限されていない状態で脳内の特定部位からGABAのReleaseを証明した研究は殆んどない(8)。今回用いたPush-Pull Perfusion法は無麻酔下の動物の脳の種々の部位における物質の相対的動態を知るのに敏感でしかも簡便な方法である。今回の研究で脳の各部位でプトレスチンからGABAが形成されていること，さらに脳内各部位で生合成されたGABAの量に有意の差があることが判明した。このことからプトレスチンから生合成されたGABAも中枢神経系で何らかの働きをしていることが推測される。事実GABAのReleaseに及ぼす電解質の影響を調べた実験からCPUにおいてプトレスチンから生合成されたGABAのReleaseが high K^{+}により促進されることが判明した。このことはプトレスチンからのGABAが中枢神経系においてグルタミン酸からのGABAと同様に神経伝達物質として働いている可能性を示唆していると思われる。

〔文献〕 1) Awapara J., Landua A. J., Fuerst R. and Seale B. (1950) J. biol. Chem. 187. 35-39. 2) Baxter C. F. and Roberts E. (1959) Proc. Soc. exp. Biol. Med. 101,811-815. 3) Baxter C. F. and Roberts E. (1960) Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104,426-427. 4) Baxter C. F. (1970) in Handbook of Neurochemistry(Lajtha A., ed.) Vol. 3, pp. 289-335. Plenum Press. New York. 5) Curtis D. R. and Johnston G. A. R. (1974) Ergebn. Physiol. 69,94-188. 6) Krzalic K., Mandic V. and Mihaildvic L. (1962) Experientia 18,368-369. 7) Kuriyama K., Sisken B. and Roberts E. (1968) Brain Res. 9, 165-168. 8) Meeker R. and Myers R.D. (1979) Neuroscience 4,495-506. 9) Myers R.D. (1972) in Method in Psychobiology(Myers R.D., ed) Vol. II, PP. 196-211. Academic Press, London. 10) Nakajima T., Noto T. and Kato N. (1980) Physiol Chem. Physic. 12,401-410. 11) Noto T., Tanaka T. and Nakajima T. (1978) J. Biochem. 83,543-552. 12) 能登直，Myers R. D.，中嶋照夫，加藤伸勝 (1983) 神経化学 22,204-206. 13) Pellgrino L. J., Pellgrino A. S. and Cushman A. J. (1967) A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain, Plenum Press, New York. 14) Perry T. L., Berry K., Hansen S., Diamond S. and Mok C. (1971) J. Neurochem. 18,513-519. 15) Seiler N. (1973) in Polyamines in Normal and Neoplastic Growth (Russell D. H., ed) PP. 137-156. Raven Press, New York. 16) Seiler N. and Lamberty U. (1975) J. Neurochem. 24,5-13. 17) Singh S. I. and Malhotra C. L. (1962) J. Neurochem. 9, 37-42. 18) Sytinskii I. A. and Thinh N. J. (1964) J. Neurochem. 11,551-556.

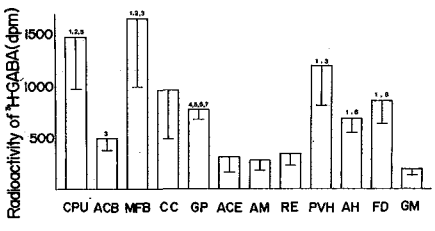


Fig 1 ^{3}H-GABA synthesis from ^{3}H-Putrescine in 12 sites of rat brain. Values show Means ± SEM of radioactivity(dpm). 1: $p<0.05$ CPU, MFB, PVH, AH & FD versus AM. 2: $p<0.05$ CPU & MFB versus RE. 3: $p<0.05$ CPU, ACB, MFB & PVH versus GM. 4: $p<0.05$ GP versus ACE. 5: $p<0.005$ GP versus AM. 6: $p<0.025$ GP versus RE. 7: $p<0.001$ GP versus GM. 8: $p<0.025$ AH & FD versus GM.
CC; Cerebral Cortex.

1 115 ラットCaudate-Putamenにおいて^{3}H-プトレスチンより生合成された^{3}H-GABAのreleaseに及ぼすK^{+}, Ca^{++}の影響について — Push-Pull Perfusionを用いて —

能登 直・橋本泰道・中尾純治 (京府医大・精神科)
加藤伸勝 (都立松沢病院)・中嶋照夫 (京府医大・精神科)

〔抄録〕

無麻酔下で自由に動き回れるラットのCaudate-Putamen (CPU)において，^{3}H-プトレスチンより生合成された^{3}H-GABAのReleaseに及ぼすK^{+}, Ca^{++}の影響をPush-Pull Perfusionを用いて調べた。^{3}H-プトレスチンでCPUをラベルし，10分後より同部位を5分毎に5回還流し，集めた還流液中の^{3}H-GABAを陽イオン交換クロマトグラフィーと高圧ロ紙電気泳動を用いて分析した。

その結果，^{3}H-GABAのRelease はCa^{++} 2.5mMを含む56mMのhigh K^{+} solutionによる還流で有意に促進されたが，Ca^{++}を含まないhigh K^{+} solutionによる還流では促進効果は認められなかった。このことからラットCPUにおいて^{3}H-プトレスチンから生合成された^{3}H-GABAのReleaseに対するhigh K^{+}の促進効果はCa^{++}依存性であると考えられた。

Key words : GABA Release, Putrescine, high K^{+}

神経系におけるGABA Releaseに関する研究はin vitroで数多くなされている (2,3,7,9, 13, 17)。近年内因性のGABAを定量しRelease実験を行った報告(5,6,16, 17, 19)もあるが，数多くの研究は外因性に取り込ませた放射性GABA，あるいは放射性グルタミン，放射性グルタミン酸より組織内で生合成された放射性GABAを測定することにより行われている (1,4,7,14, 18)。麻酔下で行ったin vivoの研究(4,5,8,19)もあるが，無麻酔下でで自由に動き回れる条件で行われた研究は見当らないし，さらにGABAのプレカーサーとしてプトレスチンを用いたGABAのRelease実験は未だ報告されていない。今回プトレスチンから生成されるGABAの生理的意義を調べる目的で無麻酔下で自由に動き回れるラットのCaudate-Putamen (以下CPU)に^{3}H-プトレスチンを注入し，生合成された^{3}H-GABAのReleaseをPush-Pull Perfusion法で検討し興味ある知見を得たので報告する。

〔実験方法〕 実験には300～350g，ウィスター系雄ラットを用いた。ラットは12時間の明暗サイクルおよび室温23～26℃の条件下で飼育され，エサと水は自由に与えられた。

〈ガイドカニューレの植え込み手術〉 40～50mg/kgのペントバルビタール麻酔下で20ゲージ，12mmの長さのステンレスカニューレの植え込み手術をMyersの方法(10)で行った。Nucleus Caudatus-Putamen (CPU)を還流するため，カニューレの先端をPellegrinoらのラット脳図譜(15)におけるAP; 8.0, L; 2.5, HV; 5.0mmに位置するように植え込んだ。ガイドカニューレの先端は大脳皮質内にあり還流部位の上方3.7mm位置している。

〈CPUのPush-Pull Perfusion〉 Push-Pull Perfusionはガイドカニューレ植え込み手術後，少なくとも1週間経てから開始した。還流部位を29ゲージのステンレスカニューレを用いて，還流開始10分前に，2.0μci，1.0μlの^{3}H-プトレスチン(Specific activity, 21.4Ci/mmol)でラジ

オラベルした。還流は25 μl/minの流速で5分間，5回行った。還流と還流の間の時間は3分間とした。還流液は原則として前回の報告(12)と同じNa^+;127.65, K^+;2.55, Ca^{++};1.26, Mg^{++};0.93, Cl^-;134.58mMの人工CSF液を用いたが，第3番目の還流液にはNa^+;71.72, K^+;56.00, Ca^{++};2.50, Mg^{++};0.93; Cl^-;134.58mMあるいはNa^+;76.72, K^+;56.00, Ca^{++};0, Mg^{++};0.93, Cl^-;134.58mMも用いた。Push-Pull PerfusionはMyersの方法(10)に準じて行った。5分毎に集めた還流液の内20 μlを総カウント測定に用いた。〈還流液の分析〉集められた還流液の残りをAmberlite CG 120, に通し，1M-ピリジンにて中酸性アミノ酸分画(11)を溶出した。溶出液を凍結乾燥したのち，残渣を0.1%GABA溶液にて溶かしその半量を用い高圧ロ紙電気泳動(11)を行った。泳動後ニンヒドリン発色し，GABAに相当する泳動部位を切り出し，シンチレーションバイアル中で，50%エタノールにて^3H-GABAの抽出を行い，シンチレーター(11)を加え放射能を測定した。5分毎の還流液中の^3H-GABA量は2番目の還流液中の^3H-GABA量を100として，Percent表示した。この方法によるGABAの回収率は$\overset{90.7}{\pm 1.8}$%であった。還流部位の同定は実験終了後，脳を0.9%食塩水と5%ホルマリン溶液で還流固定し，連続切片を作製して行った。

〔結果〕〈コントロール還流〉この還流に用いた還流液は全て前回報告した人工CSFであり，そのイオン含量は実験方法の項に記した。2番目の還流液中の^3H-GABAの量を100とし，1～5番目の還流液中の^3H-GABA量を%表示した(Fig 1)。1番目の還流液中の^3H-GABAの量が最も多く，ついで漸次低下し5番の還流液中で最低値を示した。〈Ca^{++}を含む high K^+ solutionによる還流〉1番目，2番目，4番目および5番目の還流はコントロール還流と同じ還流液を用いたが，3番目の還流時にNa^+;71.72, K^+;56.00, Ca^{++};2.50, Mg^{++};0.93, Cl^-;134.58 mMを用いた。すなわちコントロール還流液に比しK^+が2.55mMから56.00mMに，さらにCa^{++}が1.26mMから2.50mMにイオン濃度が増加している。還流液中の^3H-GABAの量は1番目が最も多く，2番目は低下するが，還流液中のCa^{++}とK^+濃度が増加した3番目では，2番目よりも^3H-GABAの量が増加していた。(Fig 2)。〈Ca^{++}を含まない high K^+ solutionによる還流〉上記の還流と同様に3番目の還流液としてNa^+;76.72, K^+;56.00, Ca^{++};0, Mg^{++};0.93, Cl^-;134.58mMを用いた。この還流はコントロール還流とほぼ同じパターンを示し，^3H-GABA含量は1番目の還流液中に最も多く，次第に少くなり5番目の還流液中で最も少なかった(Fig 3)。〈還流液中のK^+およびCa^{++}イオンの影響〉Fig 4にそれぞれの還流における3番目の還流液中の^3H-GABA量を2番目の還流液中の^3H-GABA量を100として相対的に示した。Ca^{++}イオンを含む high K^+ solutionによる還流液中の^3H-GABAの相対量はコントロール還流液中の^3H-GABAの相対量より有意に高い値を示した($t=4.67$, $P<0.005$)。さらに，Ca^{++}イオンを含まない high K^+ solutionによる還流液中の^3H-GABAの相対量に対しても有意に高い値を示した($t=4.08$, $P<0.005$)。したがって high K^+により^3H-GABAのReleaseが促進され，そのReleaseの促進はCa^{++}イオンに依存していると考えられる。

〔考察〕中枢神経系においてプトレスチンから生合成されるGABAの生理的意義に関してはほとんど未知といって過言でない。今回の研究よりCPUにおいて^3H-プトレスチンより生合成された^3H-GABAのReleaseがCa^{++}依存性に high K^+により促進されたこと，さらに，ラット脳内の種々の部位でプトレスチンからGABAが生合成され，しかも部位間で生合成された^3H-GABA量に有意差があることから，プトレスチンから生合成され

たGABAが脳内で何らかの機能を果たしている可能性が考えられる。今後グルタミン酸から生合成されるGABAと同様の，つまり抑制性神経伝達物質として中枢神経系で作用しているか否かに関し検討してゆきたい。

〔文献〕 1) Besson M. J., et al. (1982) Brain Res. 241, 241-248. 2) Fan S. G., et al. (1982) Brain Res. 235, 265-270. 3) Haycock J., et al. (1978) J. Neurochem. 30, 1113-1125. 4) Kemel M. L., et al. (1983) Brain Res. 272, 331-340. 5) Korf J. and Venema K. (1983) J. Neurochem. 40, 946-950. 6) Kubota M., et al. (1983) Brain Res. (1983) 270, 190-192. 7) Minchin M. C. W. and Iversen L. L. (1974) J. Neurochem. 23, 533-540. 8) Moroni F., et al. (1982) J. Neurochem. 39, 582-584. 9) Mulder A. and Snyder S. H. (1974) Brain Res. 76, 294-308. 10) Myers R. D. (1972) in Method in Psychobiology (Myers R. D., ed.) Vol II, PP. 196-211, Academic Press, London. 11) Noto T., et al. (1978) J. Biochem. 83, 543-552. 12) 能登直ら (1983) 神経化学 22, 204-206 13) Okada Y. and Hassler R. (1973) Brain Res. 49, 214-217. 14) Olsen R. W., et al. (1977) J. Neurochem. 28, 299-305. 15) Pellegrino L. J., et al. (1967) A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain, Plenum Press, New York. 16) Person J. D. M. and Sharman D. F. (1975) J. Neurochem. 24, 1225-1228. 17) Smith C. C. T., et al. (1983) Brain Res. 269, 103-109. 18) Szerb J. C. (1983) Neurochem. Res. 8, 341-351. 19) Van der Heyden J. A. M., et al (1980) J. Neurochem. 34, 1648-1653.

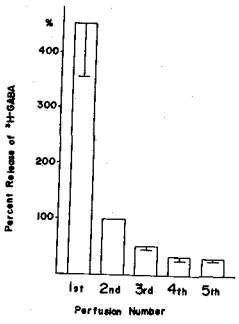


Fig 1 Percent release of ^{3}H-GABA in control perfusion. Values show Means ± SEM of % release of ^{3}H-GABA (3rd/2nd perfusion). n=6

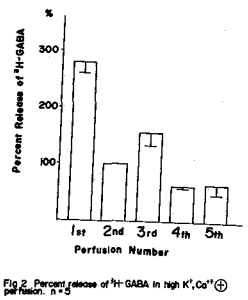


Fig 2 Percent release of ^{3}H-GABA in high K$^+$, Ca^{++}⊕ perfusion. n=5

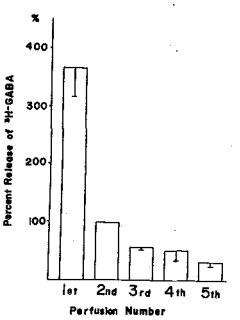


Fig 3 Percent release of ^{3}H-GABA in high K$^+$, Ca^{++}⊖ perfusion n=5

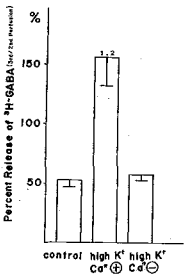


Fig 4 The effect of high K^+ and Ca^{++} on % release of ^{3}H-GABA in CPU. Values show Mean ± SEM. 1; $p < 0.005$ % release of ^{3}H-GABA in high K^+, Ca^{++}⊕ perfusion versus in control. 2; $p < 0.005$ % release of ^{3}H-GABA in high K^+, Ca^{++}⊕ perfusion versus in high K^+, Ca^{++}⊖.

116　ウシ大脳皮質 GABA / ベンゾジアゼピン受容体の精製とその抗体生成

田口淳一・栗山欣弥（京府医大・薬理）
木村　宏（滋賀医大・Ⅱ解剖）

〔要　約〕

ベンゾジアゼピン(BZP)の一種である1012-Sを固定化リガンドとしたアフィニティーゲルを用い，ウシ大脳皮質よりGABA／BZP受容体を精製すると共に，本受容体に対する抗体作成を試みた。ウシ大脳皮質のシナプス膜より1% Nonidet P-40によって可溶化した分画をアフィニティーカラムに適用したのち，1mM 1012-Sによる特異的溶出を行うと，約900倍の平均精製率をもったGABA受容体が溶出された。このうち特定の分画では3,800倍の精製率が得られた。一方，NaSCN(1~2M)による非特異的溶出を行なってもGABA受容体が得られたが，その精製率は約300倍であった。また両溶出分画において，[³H]muscimol結合に比して活性は低いが，[³H]flunitrazepam([³H]Flu)結合が認められた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うと，1012-S溶出分画では分子量53,000と57,000の部位にバンドの存在が認められたが，NaSCN溶出分画の場合，さらに数本のバンドの存在が認められた。また[³H]Fluによるフォトアフィニティーラベリングを行うと，分子量53,000と57,000の両バンドに結合能が認められた。この精製受容体タンパクを抗原としてマウスに投与すると，抗体の生成が認められたが，小脳切片を用いた免疫組織化学的検討などを行うことにより，本抗体がGABA/BZP受容体に特異的な抗体であると考えられる結果を得た。

Key words：　GABA/benzodiazepine receptors, Affinity column chromatography, Antibody formation

γ－アミノ酪酸(GABA)受容体は，マイナートランキライザーであるベンゾジアゼピン(BZP)誘導体に対するBZP受容体と高分子タンパク複合体を形成していると考えられている(2,3,4,9,10)。我々は才26回の本学会において，BZPの一種で，BZP受容体に高い親和性を持つ1012-Sを固定化リガンドとしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーによるラット脳GABA／BZP受容体の精製について報告した(7)。今回は，ウシ大脳皮質について同様な受容体の精製を試みると共に，本精製受容体に対する抗体作成を試みた。

〔実験方法〕 1)シナプス膜分画の調製と可溶化：ウシ脳の摘出後1時間以内に大脳皮質を分離細切し，24時間以上凍結(-80℃)したものを用いた。Zukinらの方法(13)に従ってシナプス膜を調製し，バシトラシン(40μg/ml)存在下，1% Nonidet P-40を含む50mM Tris緩衝液中で90分間4℃にてインキュベートしたのち，105,000×gで90分間遠心分離し，その上清を可溶化分画とした。2)結合実験：GABA受容体に対する[³H]muscimol([³H]Mus,10nM)結合およびBZP受容体に対する[³H]-flunitrazepam([³H]Flu,1nM)結合の測定は，可溶化あるいはクロマトグラフィーによって得られた受容体標品を[³H]リガンドと0℃にてそれぞれ30分，60分間インキュベートしたのち，50%ポリエチレングリコール(分子量：6,000)沈殿法と吸引沪過法を用いて行なった。3)SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)：10%トリクロロ酢酸で沈殿させ再可溶化した濃縮タンパクを，Laemmliの方法(6)に従って10%ポリアクリルアミドスラブゲル中で泳動させた。4)[³H]Fluを用いたフォトアフィニティーラベリング：[³H]Flu(5nM)とインキュベートした精製受容体標品にUV照射を行い電気泳動

させたのち，ゲルを2mmの幅でスライスして放射活性を測定した。5)タンパク定量：ウシ血清アルブミンを外部標準とし，Bradford法(1)により行なった。6)精製受容体による免疫：濃縮した1012-SあるいはNaSCN溶出受容体標品(10μg protein)をアジュバントと混和してエマルジョン化し，ICR雄性マウスに皮下注射した。以上の操作を2週間毎に10回行い，その都度4日後に採血して抗体生成を検討した。7)免疫組織化学：ラット脳を灌流脱血し，Kimuraらの方法(5)に従い，4%パラホルムアルデヒド(FA)と0.35%グルタルアルデヒドによる前固定を行なったのち脳を摘出し，4%FAによる後固定後，クリオスタットで20μmの切片を作成し実験に用いた。染色操作は，オニ抗体としてビオチン化マウスIgG抗体を用いたABC法により行い，ジアミノベンジジンの呈色反応を観察した。

〔結果〕1)GABA／BZP受容体の精製：カラムに適用したタンパクの84%がRun-through分画に回収されたが，このタンパクは25%の[³H]Mus結合能しか持たず，[³H]Flu結合能に関しては全く検出されなかった(Fig.1)。NaClで洗浄後，1mM 1012-Sによる特異的溶出を行うと，タンパクの溶出が0.03%であるのに対して，[³H]Mus結合はカラム適用時の31%が溶出され，本分画の平均精製率は約900倍であった。このうちNo.13～16においては，約3,800倍の精製率が得られた。NaSCN(1～2M)による非特異的溶出を行うと，27%の[³H]Mus結合能を持ったタンパクが溶出されたが，本分画の平均精製率は約300倍であった。またこれら溶出分画における[³H]Flu結合の回収率は0.1%以下であったが，DEAE-Sephacelによるイオン交換クロマトグラフィーを行うと，[³H]Flu結合の増加が認められた。以上の1012-SおよびNaSCN溶出分画についてSDS-PAGEを行うと，前者の場合，分子量53,000と57,000の部位に2個のバンドが認められ，後者においてはこれに加えて数本のバンドが認められた(Fig.2)。また，[³H]Fluによるフォトアフィニティーラベリングを行うと，1012-S溶出分画にみられた2本

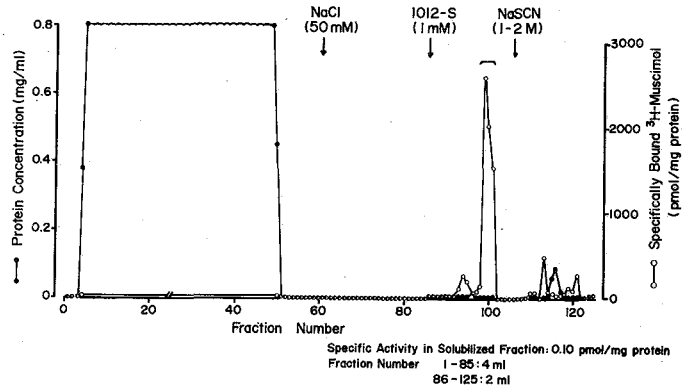


Fig.1 Affinity column chromatography using 1012-S—acetamide adipic hydrazide Sepharose 4B of solubilized fraction from bovine cerebral cortex with 1% Nonidet P-40

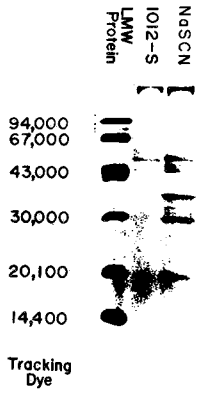


Fig.2 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of 1012-S and NaSCN-eluted receptor fractions

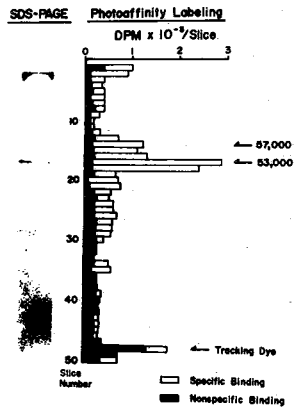


Fig.3 Photoaffinity labeling of 1012-S-eluted receptor fraction with [³H]flunitrazepam

のバンドにのみ[³H]Flu結合活性が認められた(Fig.3)。
2)精製受容体に対する抗体生成：1012-S溶出受容体標品を抗原(1012-S抗原)として免疫したマウスのうち2匹(マウスNo.1,5)の血清(1012-S血清)が，二重免疫拡散法で単一沈降線を形成した(Fig.4)。一方，NaSCN溶出受容体標品を抗原(NaSCN抗原)とした際の血清では，沈降線が不明瞭であった。スポット試験では，1012-S血清は1012-S抗原に対して強い，またNaSCN抗原に対して弱い免疫反応性を示した(Fig.5)。後者に対する反応性は血清希釈率を高めることにより消失したが，前者への反応性はなお強く残った。ラット小脳において本抗体を用いる免疫組織化学的検索を行うと，顆粒細胞層のみが特異的に染色された(Fig.6)。

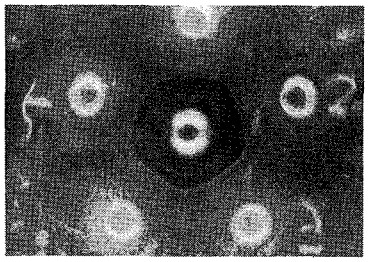


Fig.4 Double immunodiffusion plate method
Center:Purified receptor protein
Outer :Antiserum obtained from immunized mouse with purified receptor protein

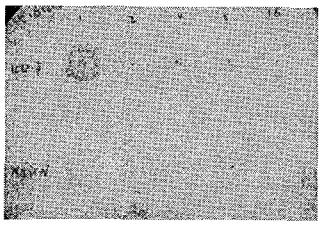


Fig.5 Spot test of purified receptor protein using ABC method
Upper:1012-S-eluted receptor protein
Lower:NaSCN-eluted receptor protein

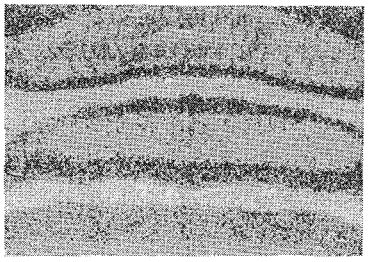


Fig.6 Immunohistochemistry in rat cerebellum with ABC method

[考察] 1012-S－アフィニティーカラムを用いることによりラット脳の場合と同様，ウシ大脳皮質でも高度に精製されたGABA／BZP受容体を得ることができ，この精製受容体を抗原とすることにより，本受容体に対する抗体をマウスで作成し得ることが明らかになった。しかしながら，ラット脳の場合，精製受容体の構成サブユニットの分子量が48,500と54,500で，このうち前者のみが[³H]Flu結合部位を有していたのに対し(7,8)，ウシ脳の場合には，分子量53,000と57,000の二種類のサブユニットで構成され，しかも両者に[³H]Flu結合部位の存在が観察された。これらの事実は，GABA／BZP受容体の構造が動物種によって異なることを示唆すると考えられる。一方，ラット小脳切片を用いた免疫組織化学の結果は，ラット小脳切片を用いた[³H]Fluおよび[³H]GABAによるオートラジオグラフィーの結果(11,12)と同一の傾向を示すことから，本抗体がウシとラットに交叉反応性の抗原認識部位をもった，GABA/BZP受容体に特異的な抗体であると推測される。

[文献] 1) Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254. 2) Gavish, M. and Snyder, S. H. (1980) Nature 287, 651-652. 3) Geller, H. M. et al. (1980) Federation Proc. 39, 3016-3023. 4) Ito, Y. et al. (1981) in Problems in GABA Research 316-327. 5) Kimura, H. et al. (1981) J. comp. Neurol. 200, 151-201. 6) Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685. 7)田口淳一，栗山欣弥 (1983) 才26回神経化学会抄録集 p.174-176. 8) Taguchi, J. and Kuriyama, K. (1984) Brain Res. in press. 9) Sieghart, W. and Karobath, M. (1980) Nature 286, 285-287. 10) Tallman, J. F. et al. (1978) Nature 274, 383-385. 11) Unnerstall, J. R. et al. (1981) J. P. E. T. 218, 797-804. 12) Wilkin, G. P. (1981) Nature 294, 584-587. 13) Zukin, S. R. et al. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 4802-4807.

117　モルモット大脳皮質組織における伝達物質グルタミン酸の動態

高垣玄吉郎・小長谷初枝
（都神経研・神経生化）

〔要　約〕

グルタミン酸およびアスパラギン酸の神経伝達物質としての動態を探ろうとして、ラベルした非代謝性のD－グルタミン酸とD－アスパラギン酸を用い、モルモット大脳皮質スライスとシナプトゾーム画分（P_2画分）について、取り込みと放出の特徴を解析した。（1）シナプトゾーム画分にD－グルタミン酸は著しく低い親和性(Km = 1.13 mM)で、D－アスパラギン酸は高い親和性(Km = 21.1 μM)で、いずれもsingle-componentの系で取り込まれる。D－グルタミン酸とD－アスパラギン酸の取り込みはたがいに非競争阻害を示す。（2）シナプトゾーム画分に取り込まれたD－グルタミン酸およびD－アスパラギン酸の大部分は、高K^+メジウム中で放出されるが、スライスでは取り込まれた量の20％程度が放出されうるのにすぎない。スライスでは、高K^+メジウム中でも活発な取り込みが認められる。（3）スライスへのタンパク量当りでの取り込み量は、とくにメジウムに加えたアミノ酸濃度が高い場合(1 mM)に、シナプトゾーム画分への取り込みに比べて著しく大きい。（4）スライスに取り込まれたD－グルタミン酸とD－アスパラギン酸の組織学的局在と脱分極によって伝達物質として放出されるアミノ酸の動態との関係を考察する。

Key words： neurotransmitter. amino acid. transport.

グルタミン酸とアスパラギン酸は哺乳動物の中枢神経に高濃度に存在し活発に代謝されるアミノ酸であるが、また興奮性伝達物質の非常に有力な候補である(1)。その伝達物質としての動態を探ろうとして、モルモット大脳皮質のシナプトゾーム画分およびスライスについてラベルした非代謝性のD－グルタミン酸とD－アスパラギン酸の取り込みと放出の特徴を解析した。

〔方法の概要〕D-[^{14}C]グルタミン酸はNENからえたDL-[^{14}C]グルタミン酸にグルタミン酸デカルボキシラーゼ（協和醱酵）を作用させたのちカラムクロマトで分離したもの、その他の放射性アミノ酸はAmersham

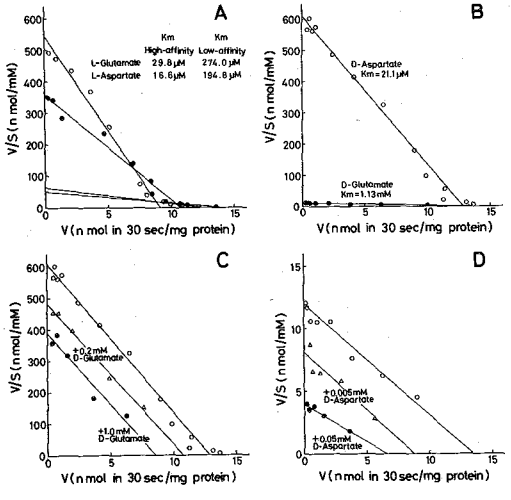


Fig. 1: Scatchard plot of the rate of uptake of L- and D-glutamate and aspartate into P_2 fraction. P_2 fraction(approx 1 mg protein per ml) was incubated in Krebs-solution (glycylglycine buffer, pH 7.4; glucose, 5 mM) with the labeled amino acid. After 30 sec incubation, the P_2 fraction was separated from the medium by suction through a Millipore filter(pore size, 0.65 μm), and washed with 0.15 M-NaCl, and the radioactivity was measured. A. Uptake of L-[^{14}C]glutamate and L-[^{14}C]aspartate; B. Uptake of D-[^{14}C]glutamate and D-[^{3}H]aspartate; C. Inhibition of the uptake of D-[^{3}H]aspartate by D-glutamate; D. Inhibition of the uptake of D-[^{14}C]glutamate by D-aspartate. The points are means of 5 independent experiments. The lines represent the best fits to the data by the method of least squares.

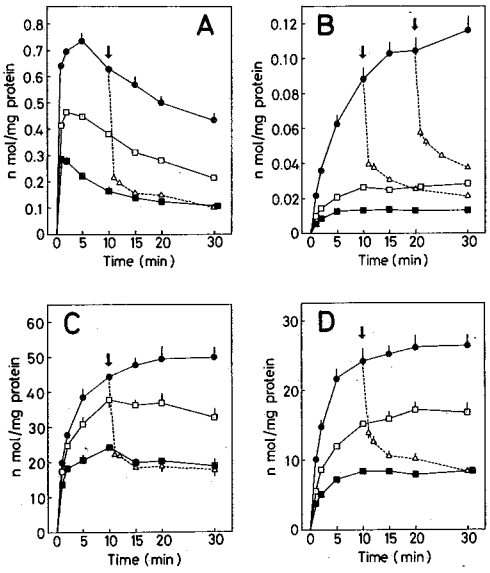


Fig. 2: Time-course of the accumulation of D-glutamate and D-aspartate into P_2 fraction, and the release by 50 mM-KCl(↓). For the incubation conditions, see the legend to Fig. 1. The labeled amino acid was added to the medium at the following concentration: A. D-[^{3}H]aspartate, 1 μM; B. D-[^{14}C]glutamate, 1 μM; C. D-[^{3}H]aspartate, 1 mM; D. D-[^{14}C]glutamate, 1 mM.
●, accumulation in control medium;
△, release by 50 mM-KCl; ■, accumulation in 50 mM-KCl-medium; □, accumulation in 0.05 mM-ouabain-medium. Means of 5 experiments are plotted with S.E.

からえたものを用いた。シナプトゾーム（P_2画分）の分画はWhittaker & Barker(2)の方法に準じた。P_2画分およびスライスのincubationは37° C，好気条件で行った。個々の実験の条件などは図の説明のうちに記載してある。

〔成績と考察〕 1、D－グルタミン酸とD－アスパラギン酸の取り込み（輸送）系は共通ではなくて、別々なものであるらしい(Fig. 1)。 P_2画分にL－グルタミン酸とL－アスパラギン酸は親和性の異なるtwo-component systemで取り込まれるが、D－グルタミン酸は著しく低い親和性(Km = 1.13 mM)で、D－アスパラギン酸は高い親和性(Km = 21.1 μM)で、いずれもsingle-componentの系で取り込まれる。D－グルタミン酸とD－アスパラギン酸の取り込みはたがいに非競争阻害を示す。

2、取り込み系の特徴(Fig. 2 & 3)。 D－アスパラギン酸の取り込みはD－グルタミン酸の取り込みに比べてouabain抵抗性であり、またP_2画分への取り込みはスライスへの取り込みに比べてouabain抵抗性である。P_2画分への 50 mM-K^+メジウム中での取り込み（蓄積）は著しく小さいが、スライスへの取り込みは活発で5 mM-K^+メジウム中での取り込みとあまり違わない。

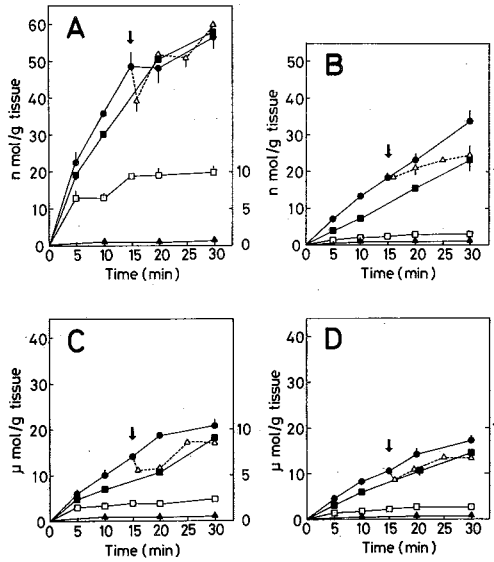


Fig. 3: Time-course of the accumulation of D-glutamate and D-aspartate into cerebral slices, and the release by 50 mM-KCl(↓). Slices(approx 20 mg) were incubated in 2 ml Krebs-solution(glucose, 5 mM) with the labeled amino acid at the following concentration: A. D-[^{3}H]aspartate, 1 μM; B. D-[^{14}C]glutamate, 1 μM; C. D-[^{3}H]aspartate, 1 mM; D. D-[^{14}C]glutamate, 1 mM. After the incubation, the slices were separated from the medium with suction, then homogenized and extracted with 3.5 % PCA, and the radioactivity of the extract was measured.
●, accumulation in control medium;
△, release by 50 mM-KCl;
■, accumulation in 50 mM-KCl-medium;
] For ordinate, use left-side scale.
□, accumulation in 0.05 mM-ouabain-medium;
▲, accumulation in Na-free medium.
] For ordinate, use right-side scale.
Means of 5 experiments are plotted with S.E.

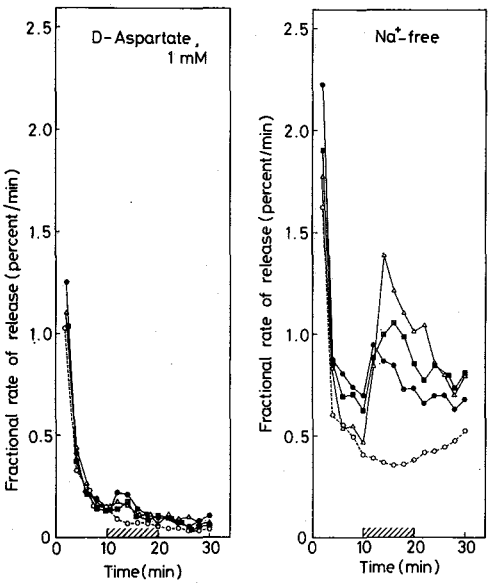


Fig. 4: Release of D-aspartate from preloaded cerebral slices(superfusion experiment). After preloading slices with D-[^{3}H]aspartate(1 mM) in standard Krebs-solution for 15 min, they were superfused at a rate of 2 ml per min with standard medium(left-side figure) and Na-free medium(right-side figure). Over a 10-min period indicated by hatching, the superfusion medium was switched to that containing 50 mM-KCl. The fractional rate of release per min was calculated from radioactivity in the superfusate. Data of 3 independent experiments are plotted.
O, Superfusion was continued without switching to 50 mM-KCl-medium.

3、高K^+による放出(Fig. 2, 3, 4 & 5)。P_2画分に取り込まれたD－グルタミン酸およびD－アスパラギン酸の大部分は、50 mM-K^+メジウム中で放出されるが、スライスではあまり著明な放出は認められない。ところが、ふつうのメジウム(128 mM-NaCl; 5 mM-KCl)中でスライスにアミノ酸を取り込ませたのち、Na^+-freeメジウムで灌流し50 mM-KClを加えると、著明な放出がおこる。50 mM-K^+を含むNa-freeメジウムで灌流をつづけたときに放出される量は、はじめに取り込まれた量の20％ほどにすぎない。スライスへのアミノ酸の取り込みにはNa^+の存在が必要であるから、Na^+を含むメジウム中で50 mM-K^+によって著明な放出が認められないのは、いちど放出されたアミノ酸がふたたび取り込まれるためであろう。

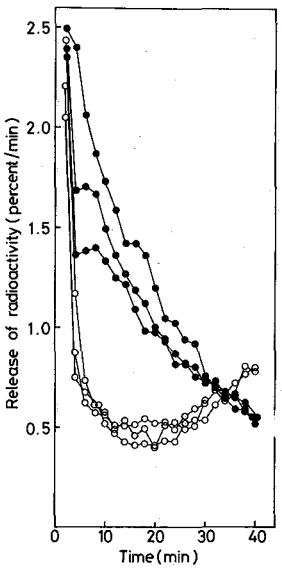


Fig. 5: Release of D-glutamate from preloaded cerebral slices to Na-free media containing 5 mM- and 50 mM-KCl(superfusion experiment). For the experimental conditions, see the legend to Fig. 4. Data of 3 independent experiments are plotted.
●, Release to Na-free medium containing 50 mM-KCl;
O, Release to Na-free medium containing 5 mM-KCl.

4、ニューロンとグリア細胞。以上の成績は、スライスに取り込まれたD－グルタミン酸とD－アスパラギン酸がほとんどグリア細胞に蓄積されることを示唆している。スライスへの取り込みは50 mM-K^+によってほとんど阻害されずouabainによって強く阻害され、P_2画分への取り込みと著しく異なっている。P_2画分への取り込みは神経終末部（ニューロン）への取り込みをより反映しているだろう。D－グルタミン酸とD－アスパラギン酸のスライスへのタンパク量当りの取り込み量は、P_2画分への取り込みよりも大きく、とくにメジウムに加えたアミノ酸濃度が高い場合(1 mM)に著しく大きい。グルタミン酸やアスパラギン酸はあまり強力な興奮性物質ではないから、その作用の不活性化機構としての取り込みにはグリア細胞が主役を演じているということになる。

〔文献〕

(1) Fonnum, F.(1984): J.Neurochem. 42, 1-11.
(2) Whittaker, V.P. & Barker, L.A.(1972): in: Methods of Neurochemistry, Vol. 2, 1-52.

118　ラット卵管内のグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD, EC 4.1.1.15）活性とγ－アミノ酪酸（GABA）濃度の分布とその性周期による変動

村島善也・加藤尚彦
（東大・医・脳研）

〔要　約〕

改良したGADの微量測定法を用いて、ラット神経系以外の種々の臓器を調べ、卵管にのみGADとGABAが高い濃度で存在することを見出した。また卵巣には両者とも見出せなかった。

（1）　発情期ラットの卵管では、峡部[GAD,7.97mmol 生成 GABA /kg 乾燥重量/ 時； GABA ,12.7 mmol/kg 乾燥重量；以下同じ] は膨大部[4.5;11.9]に比べて GAD,GABA ともに多く含まれ、接合部[0.3; 2.25] には少なかった。また各部分とも筋層にくらべて粘膜層の GAD活性と GABA濃度は高く、しょう膜層にはほとんど見出せなかった。

（2）　性周期の各相における GADと GABA の変動を峡部について調べると、粘膜層では発情期にのみGAD 活性[15.4]がみいだされたが、GABA 濃度は各相ではほぼ一定[63-79] であった。筋層のGAD 活性は発情期[2.4] では他の相[1.3-1.6] に比べて高く、 GABA 濃度は後期と休止期に高い傾向を示した。

（3）　卵管を支配する神経を切断すると、卵巣側より卵管に入る神経を切断した時はGABA/creatine kinase比　と　GAD/creatine kinase 比は50 %減少したが、子宮側より接合部を経て卵管に入る神経を切断した時は、両者とも殆ど変化しなっかった

Key words： glutamate-decarboxylase, γ-aminobutylate, oviduct

神経系のGABA作動性機能を把握するためには、神経系以外の場所でのその機能(6,4) を理解することが有用である。そこで近年報告されている卵巣と卵管におけるGABAの存在(4,11,15) の意味と、その裏づけとなる GAD活性の分布を、既に報告したGABAおよび GADの微量測定法(12)を用いて、組織化学的なレベルで定量的に分析した。また GAD活性とGABA濃度が、性周期の各相において特徴的な変動を示し、GABA作動性神経が卵管を支配することを示唆する結果を得た。

実験方法

［卵管および卵巣試料］　ウイスター系ラット（メス、200-220g）を断頭した後開腹し、卵巣ととぐろをまいた卵管の塊を採取して直ちに液体窒素中に投入する。瞬間凍結した組織魂よりクリオスタット中で凍結切片（10μm）を切り出し、凍結乾燥した(9)。卵巣と卵管の種々の部分の横断面を含む乾燥切片から、顕微鏡下で卵巣の一部と卵管の３つの部分（膨大部、峡部、接合部）を分離し、さらに卵巣から卵胞を、また卵管の各部分からは３つの層構造（しょう膜、筋層、粘膜）を切りわけて標品とした。各標品（0.11-0.6μg）を高感度水晶系バランス（感度、±13 ng ）を用いて秤量した後、そのまま反応液に加えて(7,9)、 GAD活性とGABA濃度を測定した。また開腹採取した卵巣と卵管から、20 mM Tris-HCl,pH 8.0 中で10%ホモジェネートを調製して標品とした。

［性周期各相の同定］　10日間午前10時にちつ粘膜のスメアを調製し、ギムザ染色により細胞成分を観察して、４つの相（発情前期、発情期、発情後期、休止期）を同定した(13)。

［ GADおよびGABA測定法］　卵巣および卵管の切片標品は、170 nlの反応液（5mM グルタミン酸ナトリウム，100 μM ジチオスレイトール，100 μM ピリドキサールリン酸，1mM EDTA,25mM リン酸カリウム緩衝液，pH7.0 ）中に加えて38℃で３時間反応させた。生成されたGABAを過剰量のNADP$^+$ の存在下でGABA－ase [aminobutylate transaminase (EC 2.6.1.19) とsuccinate semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1

.16)の混合標品]により相当量のNADPH に転換する。このNADPH を "NADPサイクリング"(8) を用いて、2,000 倍量のNADPH に増幅転換して、蛍光測定を行なった。従来の方法では高いブランク値が得られるため、低い活性値をもつ標品の測定は不可能であったが、本方法においてはブランク値を従来の1/10に下げることが出来たので、低活性をもつ微少量の卵管標品の測定が可能となった(詳細は 12)参照)。 本方法ではGAD により生成されたGABAと、標品に内在するGABAの合計量が測定される。卵管標品の GAD活性は低く、3時間反応を行なって生成されるGABA量を増やし、最終的な測定値から内在性 GABA を差し引いた値からGAD 活性を計算した(表1参照)。内在性GABAを測定するときは、 GAD反応液に0.2 NHClを前もって加えて標品を加えても反応が進まぬようにし、 GAD活性測定と平行して GAD反応停止後と同じ処理を行ない、測定を行なった。ホモジェネートは30μl-50μl 反応液に加えて GAD反応を行ない、最終的に反応液の一部 (1.21μl)を用いてNADPサイクリングによる増幅測定を行なった。

結果および考察

[ラット臓器の GAD活性およびGABA濃度] 神経系以外では卵管にのみ GADもGABAも有意な値を示した(表1)。特に従来のアミノ酸分析機を用いる測定でGABA濃度が高いとされていた卵巣(4,11,15) では、GABA濃度は低く GAD活性も殆ど認められず、凍結乾燥切片より分離した卵胞中にも活性は見出せなかった。ラットの卵管は卵巣中に埋もれているため、従来の報告ではその混入によるGABAを測定していたと思われる(10)。

[卵管組織内の GADおよびGABAの分布] 2匹の発情期ラットの卵管切片標品を測定すると、峡部 [GAD,7.97;GABA,12.7±1.5(測定標品数, 22) ; 単位および表現法は表1と同じ] は、膨大部 [4.5;11.9±2.6(6)] や接合部[0.3;2.55 ±0.38(18)] にくらべて GAD活性もGABA濃度も高かった。そこで峡部標品を3層に分けて測定すると、粘膜層[GAD,23.6;GABA,70.2±7.6(7)] は筋層[5.30,11.4±0.8(7)] よりもGAD,GABA両者とも5倍高く、しょう膜層[0.59;2.45±0.57(8)]には両者とも著しい低値を示した。膨大部粘膜層[4.00;47.5±6.7(8)] と接合部粘膜層[2.38;9.96±1.47(6)]にも GADとGABAが他の層にくらべて多く含まれており、両者を含む細胞が粘膜固有の細胞であるのか、またGABA作動性神経終末が粘膜に達しているのかという2つの可能性が考えられた。

	GABA (mmol/kg湿重量 ±SEM) (A)	GABA+GAD (+mmol/kg湿重量 /2時間±SEM) (B)	GAD (mmol/kg湿重量 /時) (B-A)/2
卵管	0.673 ±0.040 (14)*	1.19 ±0.07 (16)	0.258
卵巣	0.071 ±0.003 (15)	0.124 ±0.004 (15)	0.026
子宮	0.135 ±0.008 (8)	−	−
腎臓	0.185 ±0.010 (8)	−	−
肝臓	0.134 ±0.004 (8)	−	−
		(+mmol/kg 湿重量/時)	(B-A)
大脳皮質	2.48±0.06 (8)	25.5 ±0.3 (8)	23.0

*, 動物の数, −, 測定せず

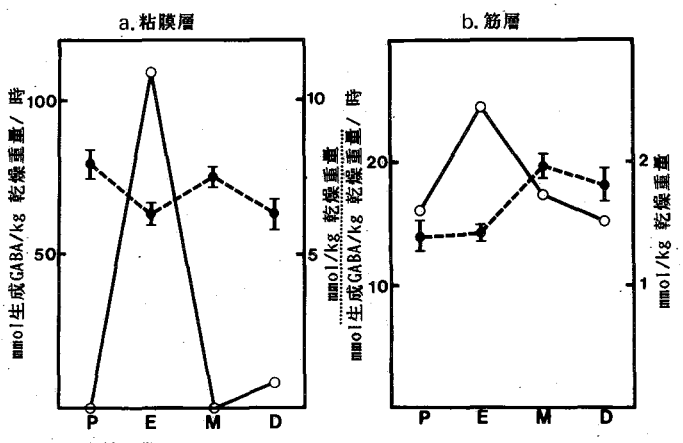
表1. ラットの各臓器ホモジェネートのGAD 活性とGABA濃度

[性周期による変動] 卵管粘膜は卵を子宮へ向かって運ぶ繊毛細胞や、卵を養う分泌細胞を豊富に含み、性周期にしたがってエストロゲンの影響をうける。最近ラット卵管内のGABA濃度が、性周期や妊娠の影響を受けて変動することが報告されている(1,10)。そこでGAD およびGABAを多く含みまた粘膜と筋層が厚く分離しやすい峡部を選び、性周期各相における GADとGABAの変動を調べた(図1. a,b)。粘膜層ではGABA濃度のレベルは各相でほとんど一定であるが、 GADはエストロゲンの影響下にある発情期にのみ高い活性値を示した。筋層でも GAD活性は発情期に増加するが、他の相ではほぼ一定である。筋層では、GABA濃度は後期、休止期で高値を示す傾向が見られた。これらの結果は、 GADとGABAを含む粘膜固有の細胞を想定するより、 GADを含むGABA作動性神経終末が筋層を貫いて粘膜に達しており、発情期にとくにこの神経終末が粘膜内で増殖すると考える方が妥当であろう。

[除神経による影響] 卵管を支配する神経は、卵巣動脈にそって卵巣側から、また子宮動脈枝にそっ

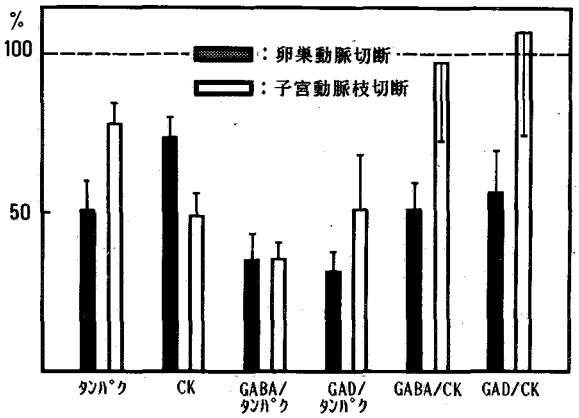
て接合部から卵管に分布し、動脈と神経を分離することは出来ない。そこで卵巣門で左側卵巣動脈を切断し、右側は手をふれないで対照としたラットと、右側子宮動脈枝を接合部で卵管とともに切断し、左側は切断せずに対照としたラットの2群（各7匹）の除神経動物を用意した。動脈切断後の卵管は、血流が減少するため萎縮を起こすので、除神経後のGAD活性とGABA濃度はﾀﾝﾊﾟｸ当たりで表わす他に、筋層の指標であるcreatine kinase (CK, EC 2.7.3.2) を測定してその活性当たりで表わした（図2）。除神経後1週間目に卵管のホモジェネートを調製して測定すると、両群のラットともﾀﾝﾊﾟｸ, CK,およびﾀﾝﾊﾟｸ当たりのGAD活性とGABA濃度は減少するが、CK当たりの値は子宮動脈枝の切断によってはほとんど影響されず、卵巣動脈切断により50%減少した。したがってGABA作動性神経は卵巣側より卵管を支配すると思われる。 男性生殖器の前立腺、精巣上体にはGABAは殆ど含まれておらず、精巣粘膜には低い濃度で認められた。また卵管粘膜に構造が類似している気管と腸管の粘膜や、唾液腺の腺小胞にもGABAは見いだせなかった。従って、GABA作動性神経が分布しているという事実は、卵管粘膜に特徴的であると言えよう。最近、卵管や卵巣にGABA受容体が見出され(2,3,15)、卵管の筋層がGABAにより収縮すること(5)が報告されているが、卵管におけるGABAの機能を明きらかにするためには、免疫組織化学的検索を含めて、広範な研究が必要であろう。

図1． 性周期によるラット卵管粘膜層，筋層のGAD および GABA の変動



P，発情前期； E，発情期＊； M，発情後期； D，発情休止期
＊，Mの初期にはスミアーにEとおなじ角化上皮が混入するので、EはMの初期をふくむ。●上の線分はSEM を表わす。
○，GAD ；●，GABA

図2． 除神経による卵管のGAD および GABA の変化。



除神経の方法については本文参照。CKは creatine kinase を意味し、ﾀﾝﾊﾟｸ濃度、CK比活性、および GABA濃度／CK比活性とGAD 比活性／CK比活性 の値を、対照を100として縦軸にあらわす。棒上の線分はSEM を表わす。

文献

1)Erdo,S.L. (1984) Life Sci.34,1879-1884. 2)Erdo S.L. and Lapis,E. (1982) Eur.J. Pharmacol.85,243-246. 3)Erdo,S.L. and Lapis,E. (1982) Neurosci.Let.,33,275-279. 4)Erdo,S.L.,Rosdy,B. and Szporny,L.(1982) J.Neurochem. 38,1174-1176. 5)Erdo,S.L.,Riesz,M.,Karpati,E. and Szporny,L. (1984) Eur.J.Pharmacol.,99, 333-336. 6)Kaplita,V.P.,Waters,H.D. and Triggle,D.J. (1982) Eur.J.Pharmacol.79,43-51 . 7)Kato,T. and Lowry,O.H.(1973) J.Neurochem.20,151-163. 8)Lowry,O.H.,Passonneau,J.V.,Schulz,D.W. and Rock,M.K. (1961) J. biol.Chem. 236,2746-2755. 9)Lowry,O.H. and Passonneau,J.V. (1972) A Flexible System of Enzymatic Analysis, pp.223-266,Academic Press,New York. 10)Martin del Rio,R (1981) J.biol.Chem. 256,9816-9819. 11)Martin del Rio,R. and Caballero,A.L. (1980) J.Neurochem,34,1584-1586. 12)村島善也，加藤尚彦(1983)神経化学 ，22，228-230 頁.13)日本実験動物研究会編(1975)実験動物テキスト各論ラット，8-9 頁，東京大学医科学研究所. 14)Okada,Y. Taniguchi,H. and Shimada,C.(1976) Science,194,620-622. 15)Shaffer,J.M.and Hsueh,A.J.W.(1982) Life Sci.30,1599-1604.

119　抗GABA抗血清を用いたGunnラット小脳の免疫組織化学とglutamate decarboxylase活性の加齢変化について

青木英子・千波禮治・慶野宏臣・柏俣重夫
（愛知県コロニー・周生期）

〔要　約〕

小脳低形成を伴う高ビリルビン血症Gunnラット小脳を用い、glutamate decarboxylase（GAD）活性および抗GABA抗血清による免疫組織化学上の加齢変化について検索した。小脳重当りのGAD活性は5および10日齢のホモ(-/-)とヘテロ(+/-)接合体間で差がみられなかったが、15日齢-/-ラットは+/+ラットの約64%と有意な低値を示し、10日齢からの活性上昇の割合は+/+ラットと比べて遥かに少なかった。+/+ラットのゴルジ細胞とプルキンエ細胞は8日齢ですでに抗血清で染色され、10日齢になるとゴルジ細胞の突起、プルキンエ細胞の樹状突起、かご細胞も染色された。20日齢ではゴルジ細胞の軸索がglomerulusに至り、星状細胞も反応を示すようになった。一方-/-ラットでは8日齢のプルキンエ細胞の多くに変性像が認められ、10日齢になると変性細胞の数も増し障害の程度も高度になった。15日齢ではゴルジ細胞が変性に陥っているが抗血清との反応性は保たれ数の減少もみられなかった。プルキンエ細胞はすでに崩壊し消失しているものが多く、かご細胞数もかなり少なかった。以上のことより、生後10日から15日齢にかけてのGAD活性の増加の停滞はプルキンエ細胞あるいはかご細胞がビリルビンによって直接的あるいは間接的に障害されるために生じたものと考えられ、ゴルジ細胞障害による可能性は低いと思われた。

Key words：
GABA，GAD，小脳

我々は以前にWistar系Gunnラットで小脳glutamate decarboxylase（EC 4.1.1.15，GAD）の加齢変化を検討したところ、高度な小脳低形成を示すホモ接合体(-/-)の小脳重あたりのGAD活性（GAD濃度）は10－13日齢の間でほとんど増加せず、それ以後は+/+とよく似たパターンをとって上昇するという結果を報告した[1,2]。今回このGAD濃度増加の停滞が小脳抑制性神経細胞のうちのどの神経細胞の障害によって起こるのかを検索するために抗GABA抗血清を作製して免疫組織化学的に加齢に伴う変化を検討した。また小脳小葉間で個体発生学上の差があり[3]、例えば虫部でみると小節、垂、小舌、中心小葉では発達が早く、隆起、山腹では比較的遅いことが知られているので7ヶ所ずつの虫部組織切片を用いて観察を行った。

〔実験材料および方法〕

ラットはWistar系Gunnラットの遺伝子をSprague-Dawley系ラットに移したSD Gunnラット（SDGR）[4]を用いた。GAD活性の測定は基本的にはWuらの方法[5]に準拠した。酵素活性は小脳重当りで表示した。抗GABA抗血清は、GABA－ウサギ血清アルブミン複合体をcomplete adjuvantと混和してウサギに免疫して得られた抗血清を500倍希釈して用いた[5]。組織切片はポリエチレングリコール切片（3μm）あるいはパラフィン切片（20－30μm）を用い、組織の免疫染色はSternbergerの方法[6]に依った。作製した抗血清にはプルキンエ細胞、ゴルジ細胞、かご細胞、星状細胞が反応し（図1）、抗GABA抗血清が得られていることが確かめられた。

本研究の一部は昭和58年度文部省科学研究費（NO、58480150）および厚生省神経疾患研究委託費（NO、83－11）の援助を受けた。

〔実験結果〕

GAD活性は5日、10日齢のjj、j+ラット間で有意差はみられなかった(Table 1)。組織での抗GABA反応は8日齢両ラットでゴルジ細胞が強く染色された。同日齢j+ラットのプルキンエ細胞は細胞体が染色されているが、jjラットでは多くのプルキンエ細胞がすでに障害を受けている像がみられた。10日齢になるとjj、j+ラットともゴルジ細胞の突起は顕著に発達し、強い抗GABA反応を示した(図2)。またj+ラットで調べると垂、小節のように早期に発達する小葉のプルキンエ細胞で、第三次樹状突起(tertiary dendrites)の形成まで見られたが抗血清に対する反応性は強いものではなかった。この場合、プルキンエ細胞の抗血清に対する反応性は陰性と陽性のものがみられ、Chan-Palayらによって報告されている抗GAD抗血清を用いてのプルキンエ細胞のheterogeneityの存在と一致する所見が得られた[7]。jjラットではあまり障害されていない小葉(垂後部と小節)を除く他小葉において、ほとんどのプルキンエ細胞に著しい変性像がみられたが抗血清への反応性は比較的よく保たれていた。かご細胞は両ラットとも垂、小節で反応を示し、樹状突起を少し伸ばしているものがみられたが、山腹ではまだ反応する細胞数はわずかであった。15日齢になるとjjラットのGAD比活性はj+ラットの64.1%で有意に低い値を示した($p<0.005$)。組織学的には、小脳の体積が増加しているのにゴルジ細胞の増殖はすでに終わっているのとその細胞数はかなりまばらな印象を受ける。10日齢でみられた太い突起は伸長し細くなっている。jjラットでは多くのゴルジ細胞に障害像がみられるが、抗血清への反応は強い(図3)。j+ラットのかご細胞は樹状突起、軸索ともに反応を示し、軸索終末はプルキンエ細胞を囲み強い反応がみられた。jjラットの山腹小葉ではかご細胞がほとんどみられず、また多くのプルキンエ細胞は変性、壊死して消失してしまっている。20日齢のj+ラットではゴルジ細胞の軸索がglomerulusに至り、プルキンエ細胞を囲んだかご細胞の軸索終末はpinceauを形成し(図4)ともに強く反応した。星状細胞も濃く染色された。j+ラットでは抗GABA抗血清への反応でみる限りにおいては、20日齢でほぼ成熟ラットのレベルに達していた。30日齢のjjラットでは、プルキンエ細胞が壊死し細胞体が空胞化をおこしていても、まわりのかご細胞軸索に反応がみられるものが観察された。また山腹小葉にはゴルジ細胞がほとんどみられなかった。

TABLE 1 CHANGES OF CEREBELLAR GAD ACTIVITIES DURING THE POSTNATAL DEVELOPMENT IN HOMOZYGOUS (jj) AND HETEROZYGOUS (j+) GUNN RATS

Age (days)	Genotype	Number of animals	Cerebellar weight (mg)	Specific activity (nmol/min/g wet weight)
5	jj	3	35.4 ± 3.2	20.4 ± 3.1
	j+	3	34.2 ± 1.5	22.9 ± 9.1
10	jj	4	58.3 ± 5.1*	35.4 ± 4.2
	j+	7	80.9 ± 10.4	47.0 ± 11.1
15	jj	3	44.6 ± 1.6*	58.9 ± 6.7*
	j+	3	138.4 ± 3.1	92.0 ± 5.9

Values are expressed as the averages ± S.D.
Statistical significance was tested by t-test.
* $p<0.01$

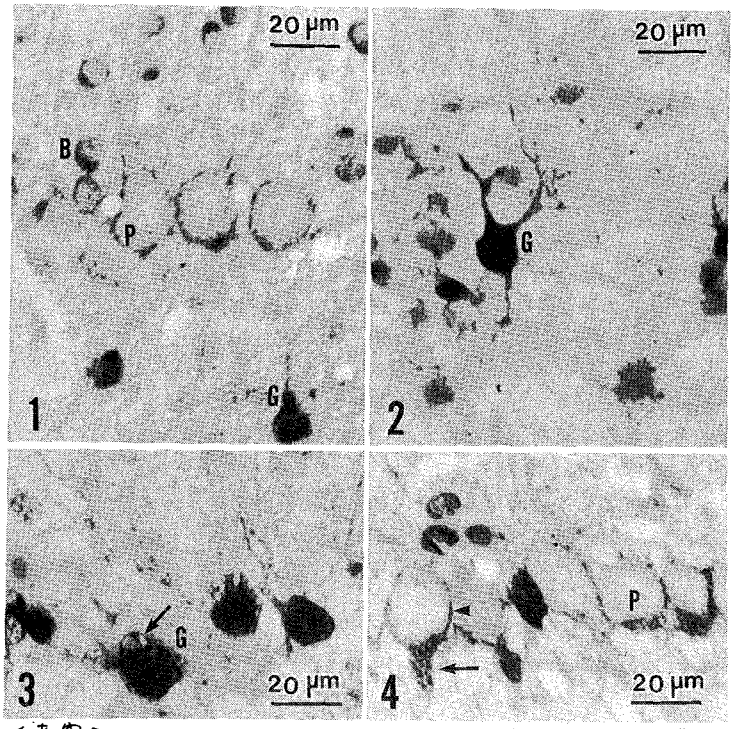


図1、20日齢ラット小脳かご細胞(B)、プルキンエ細胞(P)、ゴルジ細胞(G)が抗GABA抗血清に染まっている。

図2、10日齢ラット小脳ゴルジ細胞(G)が突起をよく伸ばしている。

図3、15日齢ラット小脳細胞内に多数の空胞(矢印)をもつ変性ゴルジ細胞(G)。抗GABA抗血清への反応性はよく保たれている。

図4. 30日齢ラット小脳かご細胞軸索がプルキンエ細胞を囲み(矢印)、pinceauを形成している(矢頭印)。

〔考察〕

すでにわれわれは高度な低形成を示すWistar系ラットで、GAD活性の増加が10日から15日齢にかけて見られないことを報告したが、これはこの時期の小脳内に存在する抑制性神経細胞(星状細胞を除いた3つの細胞、すなわちゴルジ細胞、プルキンエ細胞、かご細胞)が、ビタミンによって直接的あるいは間接的に障害される結果であろうと推定した[1,2]。今回SDGRのGAD活性の加齢変化はWistar系Gunnラットで得られた結果を確認するものであった。免疫組織化学的観察からみる限り、ラットのゴルジ細胞は15日齢で変性像を示すが、抗GABA抗血清には強い反応を示し、細胞数もHラットに比べて減少していない。15日齢ラットではプルキンエ細胞は消失してしまったものが多く、かご細胞も小脳小葉などではほとんどみられなかった。したがってラットにおけるGAD活性上昇の停滞はプルキンエ細胞あるいはかご細胞が受ける障害のためと考えられ、ゴルジ細胞障害による可能性はうすいものと思われる。またプルキンエ細胞とゴルジ細胞の変性はビタミンによる直接的な障害と考えられるが、かご細胞障害はプルキンエ細胞変性の二次的な結果であろうと推察している。

REFERENCES
1. Aoki, E., Semba, R.K. and Kashiwamata, S. (1982) J. Neurochem. 39: 1072-1080.
2. 青木英子、仙波りつ子、柏俣重夫 (1980) 神経化学 19:186-189
3. Altman, J. (1972) J. Comp. Neurol. 145:353-398; 145:399-464; 145:465-514.
4. Semba, R. and Kato, K. (1982) J. Neurochem. 39: 360-365.
5. Storm-Mathisen, J. et al. (1983) Nature 301:517-520.
6. Sternberger, L.A. (1974) Immunocytochemistry, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs.
7. Chan-Palay, V. et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:7787-7791.

120 GABA抗体の精製と免疫組織化学

斎藤尚亮・雲井一夫　（神戸大・医・薬理）
木村　宏　（滋賀医大・Ⅱ解剖）
田中千賀子　（神戸大・医・薬理）

〔要　約〕

γ－アミノ酪酸(GABA)は、抑制性神経伝達物質としてよく知られているが GABA神経の形態学的研究はGABA合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)を用いた免疫組織化学によるものだけであった。近年、Storm-MathisenらはGABAに対する抗血清を作製したが同時にその抗血清はGABA以外に一部のアミノ酸に交叉性を示すことが報告された。我々はStorm-Mathisenらの方法で類似の性質をもつ抗血清を作製し、その血清からGABA特異的単一抗体を精製する為、アフィニティクロマトグラフィーを用いた。アミノ酸結合アフィニティカラムは抗体精製に有効であり適切なスペーサーを導入したアガロースゲルを選択することが重要であった。このようにして得られた精製抗体を用いてラット脳において免疫組織化学を行い光顕的、電顕的に観察した。GABA神経細胞の局在は既報のGADの免疫組織化学による神経細胞の局在とほぼ一致するが、一部新しいGABA神経を含む部位が観察された。また、電顕的にも神経末端の小胞内にも免疫陽性反応が認められ、これらの結果よりこの精製抗体はGABAを特異的に認識することを強く示唆する。

Key words : GABA antibody, immunohistochemistry, rat brain

＜緒言＞

γ-アミノ酪酸(GABA)が抑制性神経伝達物質として働いていることは多くの研究者によって証明されてきた。しかしGABAの免疫組織学的報告はGABAの合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)による免疫組織のみであった[2]。1983年、Storm-Mathisenらにより GABA 抗体の作製の報告がなされたが[3]、今回我々も同様の方法で、GABA 抗血清を作製し、アフィニティクロマトグラフィーによって、抗血清の交叉性を検討し、また GABA 特異抗体を精製した。その精製抗体を用いて GABA の免疫染色を行い光顕的、電顕的に観察しGABA-like-immunoreactvity の神経内局在を確認し、GABAニューロンの脳内分布を検索した。

＜方法＞

Storm-Mathisen らの方法により GABA をグルタールアルデヒド(GA)存在下で BSA と conjugate し、抗原（BSA-GA-GABA）としてウサギに免疫した。抗体価を免疫組織学的に検定しながら、免疫後 5～11 ヶ月の血清を今回使用した。

1)免疫染色法：側脳室内に 1 mg/kg のコルヒチンを注入したウィスター系ラットを 2日後に 4 % パラホルムアルデヒド（FA），1 % GA，0.2 % ピクリン酸（PA）を含む固定液で灌流し脳を摘出した。脳を 4 % FA，0.2 % PA を含む液に 2 日間浸漬し、15 % しょ糖液で洗浄後クリオスタットまたはビブラトームで切片を作製した。この切片を 4 日間 0.3 % トリトン-X を含む液に浮遊させた後、浮遊状態で PAP 免疫法をほどこした[1]。また電顕的観察にはこの免疫染色後の試料を 1 % オスミウム酸固定し薄切切片をエポンに平板式包埋した。

2)免疫化学的抗体価定量法：アガロースゲルに　適切な蛋白を　スペーサーとして導入し GABA もしくは他のアミノ酸を固定化した。このアガロースゲルに抗体を吸着させ PAP 法により発色させ、エチレングリコールで浮遊状態として吸光度を測定した。

3)交叉性測定法：適切な蛋白を　スペーサーとして導入し、各種アミノ酸を固定化したアガロースゲルを用いて抗血清のアフィニティクロマトグラフィーを行い各種の非吸着液を得た。この非吸着液を用いて免疫化学的抗体価測定を行った。

4)抗体精製法：適切なスペーサー及びリガンドを用いたアフィニティゲルを用いて抗血清を吸着または溶出することにより精製した。

＜結果と考察＞

Ａ．抗体の性質

1）吸収反応：抗血清を用いると免疫染色で免疫反応陽性神経細胞が観察されるが、抗血清を免疫に用いた抗原（BSA-GA-GABA）で吸収すると免疫反応は陰性となった。抗原（BSA-GA-GABA）を固定化したアフィニティゲルまたは、適切なスペーサーを導入して GABA を固定化したアフィニティゲルを用いたアフィニティクロマトグラフィーで、回収した非吸着液は免疫染色で反応を起さなかった。

2）免疫交叉性：各種アミノ酸をリガンドとしたアフィニティゲルクロマトグラフィーにより得た非吸着液で交叉性の検定を行った結果 、抗血清は一部のアミノ酸と交叉性を持つことがわかった。

3）特異抗体の精製：適切なスペーサーを導入し適切なリガンドを固定化したアフィニティゲルを用い、抗血清を吸着、溶出し、一部アミノ酸との交叉性を除いた GABA 特異抗体では、免疫染色で反応が陽性となった。

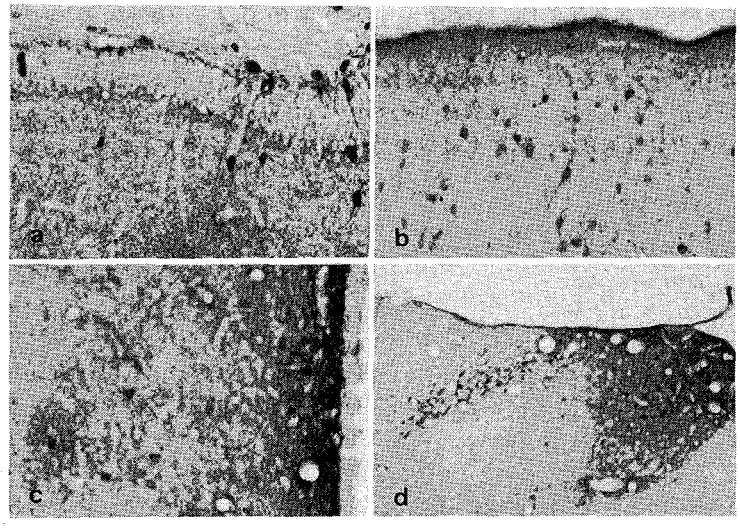


図１．GABA抗体を用いたラット脳の免疫染色、光顕像

ａ．歯状回

ｂ．頭頂葉皮質

ｃ．視床下部背内側核

ｄ．孤束核と迷走神経背側核（弱拡大）

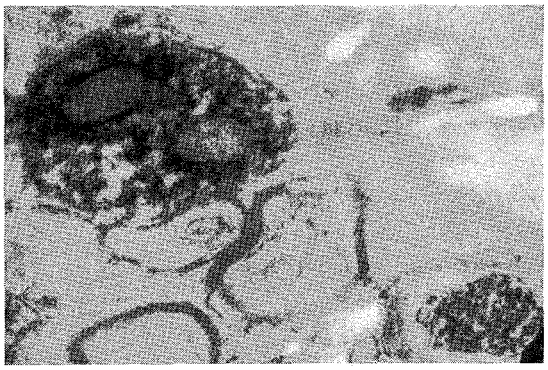


図３．GABA抗体を用いるラット脳の免疫染色、電顕像

大脳皮質第３層に認められたGABA陽性神経終末(左上)。シナプス小胞に一致して陽性反応が観察される。右下に有髄のGABA陽性線維を認めるが、反応産物はneurofilamentやneurotubuleに一致して認められる。

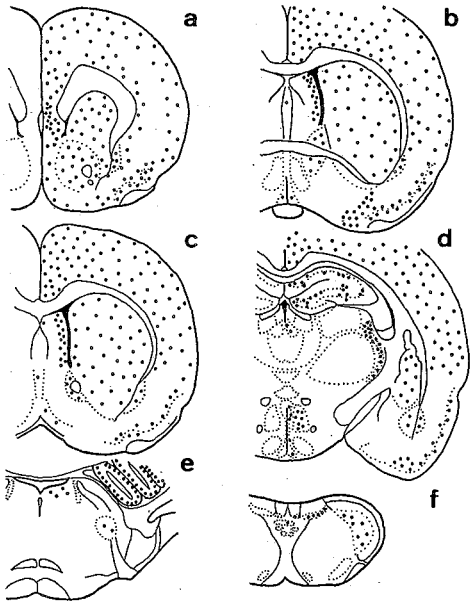


図２．GABA抗体によるPAP免疫組織化学
ラット脳前額断切片、吻側(ａ)→尾側(ｆ)
黒丸印はGABA陽性神経細胞体を示す

Ｂ．GABA抗体による免疫組織化学

光顕的観察においてGABA神経の局在、存在形式は既報のGADによる免疫反応の局在、存在形式とほぼ一致するが（図１、２）、深部小脳核、視床下部、等に新しくGABA様の免疫反応が認められた。さらに電顕的にも神経末端の小胞内に免疫反応が認められた事などからこの精製抗体が特異的にGABAを認識していることが強く示唆される。

＜文献＞

1) Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. and McGeer, E.G. (1981) J. Comp. Neurol. 200, 151-201
2) McLaughlin, B.J., Wood, J.G., Saito, K., Barber, R., Vaughn, J.E., Roberts, E. and Wu, J.-Y. (1974) Brain Research 76, 377-391
3) Storm-Mathisen, J., Leknes, A.K., Bore, A.T., Vaaland, J.L., Edminson, P., Haug, F.M.S. and Ottersen, O.P. (1983) Nature 301, 517-520

121 キンドリングけいれんに対するGABA－containing Liposomeの抑制効果

森　則夫・熊代　永
（福島県医大・神経精神科）

〔要　約〕

γ-aminobutyric acid（GABA）はけいれんに対して抑制性に作用することが知られている。しかしながら、末梢投与では脳血液関門（BBB）に遮断され脳への充分な作用を発現させることが困難であった。今回我々は、BBBを通過し得る担体liposome（LIPO）にGABAを封入した複合体（GABA-L）を作製し、さらに、GABA-Lの末梢投与によるけいれん抑制効果をキンドリング動物を用いて検討した。

まず、ウィスター系雄性ラットに左側扁桃核焦点キンドリングを作製し、全身けいれん誘発閾値を求めた。これらのてんかんモデルラットにGABA，LIPO、GABA-Lを腹腔内に投与し、その1時間後に全身けいれん誘発閾値刺激を加えた。

その結果、GABAのみ、LIPOのみの末梢投与では明らかな抗けいれん作用はみられなかったが、GABA-Lの末梢投与では強力な抗けいれん作用が認められた。以上から、GABA-LがBBBを通過することによりGABAが脳内に搬入され、その結果GABAがけいれんを抑制したものと考えられた。

Key words：　liposome, γ-aminobutyric acid (GABA), kindling

γ-aminobutyric acid（GABA）はてんかん性けいれん発作に対して抑制性に作用する神経伝達物質として知られている[5]。しかし、GABAそのものは脳血液関門（BBB）を通過しにくいため、けいれんなどに対するGABA系の関与を検討するにはそのcatabolizing enzymeであるGABA-transaminase（GABA-T）のinhibitorを用いるのが一般的であった[3,6,8]。その場合GABA-T inhibitorは確かにけいれんに対して抑制性に作用するが、その反面ではparoxysmal dischargeを誘発することも指摘されている[3,6,8]。

最近、Loebら[4]は種々の薬物の担体として用いられ同時にBBBを通過するといわれるliposome[2]にGABAを封入した複合体（GABA-L）で前処置すると（i.p.）penicillineけいれんが抑えられることを報告した。本研究では、ラットの扁桃核キンドリング[1]を用いてGABA-Lの抗けいれん作用について検討し、あわせてparoxysmal discharge誘発の有無や脳組織に対する損傷の有無についても検討したので報告する。

実験方法

ウィスター系雄ラット12匹を用い、ペントバルビタール麻酔下に（40 mg/kg, i.p.）、刺激用と脳波記録用の慢性電極を左側扁桃核に留置した。1週間の回復期間の後、1秒間の電気刺激（1-ms間隔、60-Hz、矩形波）を1日1回の割合で連日加えた。発作発展のstageはRacine[8]にもとづいて次のように分類した。stage 0、no behavioral sign；stage 1、masticatory movement；stage 2、head nodding；stage 3、forelimb clonus；stage 4、rearing；stage 5、falling。stage 5のけいれんが10回連続して出現した時点をキンドリングの完成とした。その後、毎日20 μAづつ刺激強度を下げて全身けいれん誘発閾値（minimal stimulus intensity，MSI）を求めた。

ラットは4匹づつA.B.Cの3群に分け、Fig.1に示す方法でGABA、liposome(LIPO)、GABA-Lを1週間間隔で投与した。いずれの処置をする場合もその3日前からMSIを求め、すべてのラットにおいて安定した値が得られることを確認した(Tab.1)。

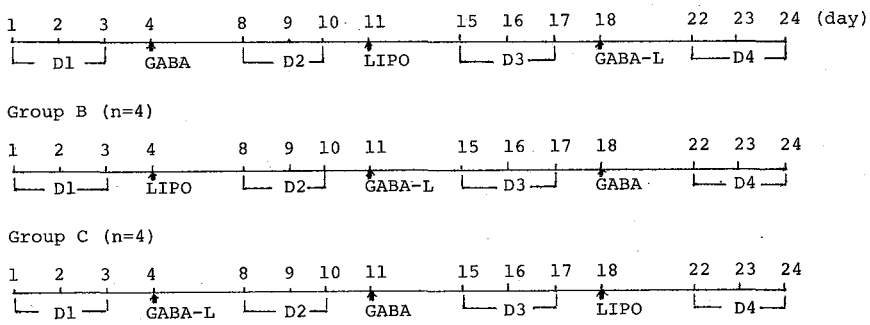


Fig.1 Anticonvulsant testing schedule in Group A,B,C.
D: determination of minimal stimulus intensity.
LIPO: liposome. GABA-L: GABA-containing liposome
See text for explanation

GABAは脱イオン水に溶解し(0.5 g/kg)、LIPO、GABA-Lは次の要領で作製した。まず、L-α-phosphatidylcholine 80 μmol、stearylamine 22.8 μmol、cholesterol 11.4 μmolをクロロホルムに溶解した。その後、窒素ガスでクロロホルムを除去してphospholipidを作製し、これに脱イオン水またはGABA水溶液(0.5 g/kg、脱イオン水に溶解)8 mlを加えて撹拌した。[^{3}H]-GABAを用いてこの方法によるliposomeへの封入率を検定したところ、その値は14-18 %であった。これらは全て投与1時間前に作製し、電気刺激の1時間前に8 ml/kgの量を腹腔内に投与した。

	Minimal Stimulus Intensity (M±SD μA)			
	D1	D2	D3	D4
Group A (n=4)	45.0±8.8	45.0±8.8	45.0±8.8	45.0±8.8
Group B (n=4)	35.0±8.7	35.0±8.7	35.0±8.7	35.0±8.7
Group C (n=4)	50.0±17.3	50.0±17.3	50.0±17.3	50.0±17.3

Tab.1 Minimal stimulus intensity for eliciting the stage 5 seizure of three day experiments.

実験終了後Cresyl Violet染色を行ない、電極の位置を確認するとともに神経細胞の損傷の有無を調べた。

成績と考察

Tab.2に示す如くGABA-Lの末梢投与により12例中9例がstage 0まで抑制された。残

Treatment	N	Seizure Stage*					
		0	1	2	3	4	5
GABA	12	-	-	-	-	-	12
LIPO	12	-	-	-	-	-	12
GABA-L	12	9	-	-	1	-	2

Tab.2 The effects of GABA, LIPO and GABA-L against kindled amygdaloid seizures.
Results show GABA and LIPO did not suppress the stage 5 seizure. GABA-L caused a total reduction of the stage 5 seizure in 9 of 12 animals. In GABA-L treatment stidies, one of Group A showed stage 3, and one of Group A and one of Group B showed stage 5.
*: Seizure stage was rated accoding to a Racine's: 0, no behavioral sign; 1, masticatory movement; 2, head nodding; 3, forelimb clonus; 4, rearing; 5, falling.

りろ例のうち1例はstageろまで抑制され、2例はstage5にとどまった。しかレ、これらのけいれん発作は通常のものよりは弱いものであった。これに対レて、GABA単独またはLIPO単独の末梢投与ではけいれん発作stageに対する抑制性の影響は認められなかった。

従って、GABA-Lによってみられたけいれん抑制効果は、GABAがliposomeに封入されliposomeを担体として BBB を通過することが容易となり、その結果高濃度のGABAが脳内に搬入されたことを示唆レている。さらに、今回のてんかんモデル動物で用いたGABA-Lの投与量は脳内でliposomeから放出されるGABA量がけいれんを抑制するに足るものであったことを示レている。

これらの処置により脳波上にparoxysmal dischargeは出現せず、また組織学的検索においても明らかな神経細胞の損傷は認められなかった。従って、この作用は生理的濃度内における薬物の特異的作用によるものと考えられる。

GABA-T inhibitor はけいれんの抑制にレばレば用いられるが、その意図に反レて脳内のGABA濃度をコントロールすることが困難である。恐らくはこの理由でparoxysmal discharge が出現しやすいことがこの治療法の欠点となっていた。この解決すべき課題に対して、GABA-Lのけいれん発作抑制効果はひとつの手段を提供レているものと考えられる。すなわち、脳内GABA濃度の調整はGABA-T inhibitor 療法に比レ容易であること、さらに、inhibitor の他酵素系に対する非特異的作用による副作用の恐れがないことがGABA-Lの特長である。事実、我々の実験系ではparoxysmal dischargeなどのparadoxicalな作用はみられていない。今後、肝臓や腎臓における解毒や排泄を含めた末梢への薬理学的毒性実験を重ねることにより臨床応用への道が開かれるものと考えられる。

文献

1. Goddard, G.V. et al. (1969) Exp. Neurol., 25, 295-330
2. Gregoriadis, D. (1976) New Engl. J. Med., 295, 704-710
3. Le Gal La Salle,G. (1979) Can. Phtsiol. Pharmacol., 58, 7-11
4. Loeb, C. et al. (1982) Neurology, 32,]234-]238

5. Maynert, E.M. et al. (1975) The role of the neurotransmitters in the epilepsies. Advances in Neurology ed. by Friedlander, W.J., Raven Press, New York, pp 79-147

6. Myslobodsky,M.S. et al. (1979) Pharmacol. Biochem. Behav., 11, 265-281

7. Myslobodsky,M.S. et al. (1980) Epilepsia, 21, 163-175

8. Racine, R.J. (1972) Electroencephalogr. cli Neurophysiol., 32, 281-295

122　セファロスポリン系抗生剤により誘発される痙攣とγ－アミノ酪酸

堀　誠治・栗岡　晋・松田　誠　（滋恵医大・医化学）
嶋田甚五郎　（同・Ⅱ内科）

〔要　約〕

近年，多くの抗生剤が開発され，感染症の治療に用いられているが，その中のあるものは，神経毒性を有している。セファロスポリン系抗生剤（CEPs）が痙攣を誘発することは臨床的にも，実験的にも認められている。そこで，CEPsのγ－アミノ酪酸（GABA）量ならびに同レセプターに及ぼす影響について検討し，下の様な結果を得た。

1.CEPs，とくにセファゾリンをマウスに投与すると，ビタミンB$_6$欠乏時に類似した痙攣をおこす。

2.その時の全脳，シナプトソームでのGABA量には，変化がみられなかった。

3.CEPsは，in vitro でGABAレセプターに対する〔^{3}H〕GABA結合を濃度依存的に阻害した。IC_{50}は次の通りである。CEZ：1.6×10^{-3} M，CER：2.8×10^{-3} M，CEX：5×10^{-2} M

4.この結合量の減少は，GABA レセプターの最大結合量が減少するためであることが明らかとなった。

以上の結果より，CEPsは，抑制性伝達物質であるGABAのレセプターへの結合を阻害し，中枢神経系の興奮性を増大させ，痙攣を誘発させるものと考えられる。

Key words：　cephalosporins, convulsion, GABA receptor.

近年，多くの抗生剤が開発され，種々の感染症の治療に用いられている。しかし，それらの多くは，何らかの副作用を有している。ペニシリン系抗生剤（PCs ）では，痙攣が誘発されることは知られており（5，8），その痙攣誘発機序として，抑制性伝達物質であるγ－アミノ酪酸（GABA）との関連，特にGABAの放出（ 6）と受容体への結合を阻害（ 3）する事が報告されている。一方，PCs と類似の構造を有するセファロスポリン系抗生剤（CEPs）では，腎機能低下時の大量投与により（4,13），また未熟児に対する髄腔内投与により（12），痙攣が誘発されることが報告されている。さらに，脳室内にCEPsを投与することにより痙攣状態を誘発できることが実験的にも認められている（7，9）。PCs との構造の類似性から，CEPsにより誘発される痙攣発現機序として，GABAとの関連が考えられるしかし，CEPsの投与により， chick脳幹でGABA量の減少が認められmuscimolにより痙攣がおさえられたという報告がある（ 9）ものの，明らかな関連性を神経化学的に示したものはない。そこで，我々は，CEPsの脳内GABA量及びGABAレセプターに及ぼす影響を検討したので報告する。

－方　法－

1．GABA量の測定

CEPsをマウス（DD系，♂，体重約20g ）の腹腔内に投与し，痙攣が誘発されたのち断頭し，全脳及び既知の方法（10）により調製したシナプトソームにおけるGABA量をダンシル化により求めた（11）。

2．マウス脳シナプス膜の調製

マウス脳P_2分画より Zukinらの方法（14）により得た粗シナプス膜を120mM NaCl を含む 10mMカリウム・リン酸緩衝液で５回洗浄し，シナプス膜標品を得た。

３．〔^{3}H〕GABA結合の測定

リガンドとして〔^{3}H〕GABAを用い，特異的結合を遠心法により求めた。

－結　果－

セファゾリン（CEZ,3.5g／kg），セファロリジン（CER,4.5g／kg）及びセファレキシン（CEX,4.5g／kg）をマウスの腹腔内に投与し，10分後から５分間隔で音刺激を加えると，CEZでは注射後約30分で，CEXでは約35分で，ビタミンB_6（ＶＢ$_6$）欠乏時にみられるものと酷似した痙攣が誘発されるが，CERでは，20分後に刺激により飛びはねる型の痙攣が誘発された。コントロール群では，もちろん音刺激により痙攣は誘発されなかった。

痙攣直後のマウスを断頭し，全脳及びシナプトソームにおけるGABA量を測定した。表１に示す様に，CEZ,CEX,CER 投与により全脳，シナプトゾーム共に，GABA量に変化は認められなかった。

Table 1. Effect of intraperitoneal injection of CEPs on GABA content in whole brain and synaptosomes.

	GABA content	
	whole brain (μmol/g brain)	synaptosomes (nmol/g brain)
control	2.46 ± 0.20 (6)	364 ± 43 (11)
CEZ (3.5g/Kg)	2.57 ± 0.29 (5)	349 ± 22 (4)
CER (4.5g/Kg)	2.57 ± 0.18 (3)	344 ± 28 (3)
CEX (4.5g/Kg)	2.65 ± 0.11 (3)	378 ± 16 (3)

CEZ:cefazolin, CER:cephaloridine, CEX:cephalexin
Each value represents mean ± S.D.

そこで，CEZ,CEX,CERに加え，ペニシリンＧ（PCG），アミノベンジルペニシリン（ABPC）のGABAレセプター結合に及ぼす影響を，5nM〔^{3}H〕GABAをリガンドとしてもちい，in vitro で検討した。５剤ともに，〔^{3}H〕GABA結合を濃度依存的に阻害するが，CEZおよびCER が比較的強い阻害効果を示した（図１）。CEZ,CERおよびCEXに対するＩＣ$_{50}$はそれぞれ，1.6×10^{-3} Ｍ，2.8×10^{-3} Ｍ，5×10^{-2} Ｍであった。最も強い阻害効果を示すCEZを用いて,Scatchard plotによる解析を行った。リガンドとしては，5～150nM〔^{3}H〕GABAを用いた。図２にその一例を示す。このリガンドの濃度範囲では，GABAレセプターは一種類のサイトとして認められ，CEZ（10^{-3} Ｍ）の存在で，最大結合量が減少し，親和性には変化のないことが明らかとなった。その結果をまとめて表２に示す。CEZ の添加により最大結合量（Bmax は，59％に減少していたが，親和性（Kd）には変化が認められなかった。

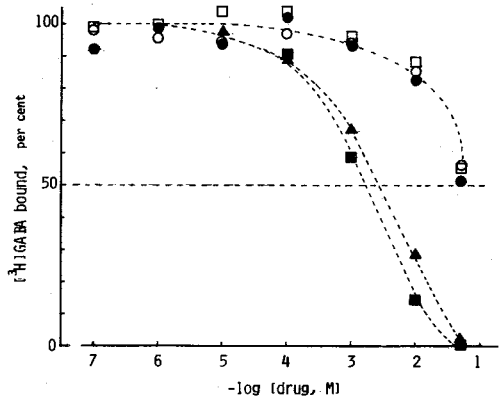


Fig. 1 Effect of penicillin G (□), aminobenzyl penicillin (○), cefazolin (■), cephaloridine (▲), and cephalexin (●) on GABA receptor binding.

－考　察－

近年，CEPsによる痙攣の報告が臨床的にも（4,12,13），また実験的にも（7，9）なされているが，その神経化学的機序はまだ明らかとなっていない。ＶＢ$_6$欠乏時の痙攣誘発とシナプトソームにおけるGABA量の減少との間に密接な関連のあることは既

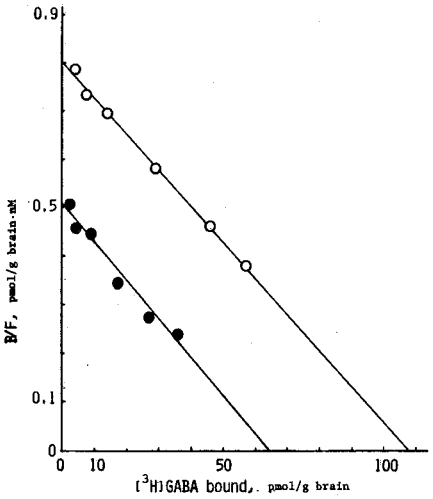


Fig. 2 Scatchard analysis of GABA receptor in the presence (●) or in the absence (○) of cefazolin (10^{-3}M).

Table 2. Effect of CEZ on Bmax and Kd of GABA receptor.

	Bmax (pmol/g brain)	Kd (nM)
control	98.0 ± 11.3	121 ± 11
CEZ (10^{-3}M)	58.0 ± 4.2	112 ± 7

CEZ:cefazolin
Each value represents mean ± S.D. for three experiments.

に報告されている（1，2）。CEPsにより誘発される痙攣は，その形式がＶＢ。欠乏時のものと類似しておりGABAの関与が推測される。しかし，CEPs投与により，全脳及びシナプトソームのGABA量には変化がみられなかった（表１）。そこで，CEPsの影響をレセプターレベルで検討したところ，GABAのレセプターへの結合をCEPsは阻害することが明らかとなった（図１）。最近，Kamei らは，各種CEPsを脳室に投与し，脳波及び行動の変化をみているが（７），その際の痙攣誘発作用のＥＤ$_{50}$は，CEZ＜CER≪CEXの順であった。この結果は，GABA 結合に対するＩＣ$_{50}$の値とよく相関している。このことから動物に投与されたCEPsは，GABAレセプターを阻害することにより，痙攣をおこすものと考えられる。さらに，このGABAレセプターの阻害は，その最大結合量が減少するためであることが明らかとなった。

以上の結果から，CEPsは，GABAレセプターの最大結合量を減少させることにより，同レセプターを阻害し，GABA作動性抑制性伝達の低下をまねき，痙攣を誘発するものと考えることができる。

－謝　辞－

本研究にあたり，セファゾリンＫ塩を提供下さいました藤沢薬品工業株式会社に深謝いたします。

－文　献－

1. Abe M. and Matsuda . *J. Biochem.* 82, 195-200, 1977.
2. Abe M. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 24, 419-427, 1978.
3. Antoniadis D.R., Muller W.E. and Wollert U. *Neurosci. Lett.* 18, 309-312, 1980.
4. Bechtel T.D., Slaughter R.L. and Moore T.D. *Am. J. Hosp. Pharm.* 37, 271-273, 1980
5. Curtis D.R., Game C.J.A., Johnston G.A.R., Muculloch R.M. and Maclachlan R.M. *Brain Res.* 43, 242-245, 1972.
6. De Boer Th., Stoof J.C. and Van Duyn H. *Brain Res.* 192, 296-300, 1980.
7. Kamei C., Sunami A. and Tasaka K. *Epilepsia* 24, 431-439, 1983.
8. Raichle M.E., Kutt H., Louis S. and McDowell F. *Arch. Neurol.* 25, 232-239, 1971.
9. Rotoroti D., De Sarro G.B., Musolino R. and Nistico G. *Prog. Clin. Biol. Res.* 124, 129-144, 1983.
10. Sellström Å., Sjoberg L-B. and Hamberger A. *J. Neurochem.* 25, 393-398, 1975.
11. Von Seiler N. and Weichmann M. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 349, 588-594, 1968.
12. Yoshida H., Nambu H., Fujita M. and Uehara H. *Infection* 3, 123-124, 1975.
13. Yost R.L., Lee J.D. and O'Leary J.P. *Am. Surg.* 43, 417-420, 1977.
14. Zukun S.R., Young A.B. and Snyder S.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 4802-4807, 1974.

123　質量分析法による神経組織のペプチドの分析

植村慶一・坂本　安・高野宏美・西島樹重
（埼玉医大・Ⅰ生理）

〔要　約〕

質量分析法（ガスマスおよびFABマス法）と高速液クロを用いて、神経組織のペプチドの高感度、迅速な分析、同定法を検討し次の様な結果を得た。

1）低分子酸性ペプチドについて：ウシ脊髄の酸アセトン抽出液をBioGel-P2カラムで予備分画した後、陰イオン交換系3013N樹脂を用いた高速液クロでP5-AおよびP5-Bの2画分を得た。これらの画分は共にAsxとGlxを1対1の割合で含むペプチドであり、パーメチル化後のガスマス分析により、P5-BはN-Acetyl-Asp-Glu、P5-AはpGlu-Asnと推定された。N末端ブロックのペプチド分析にガスマス法が有用であることが明らかとなった。

2）活性ペプチドについて：脊髄の酸アセトン抽出液をSP-Sephadex、BioGel-P2カラムで分画後、Diphenyl系逆相高速液クロによって、EF-B65-D46およびCD-B64-D44の2画分を得た。それぞれをＦＡＢマス法によって分析した結果、前者は分子量1437のSubstance-Pと一致するペプチド、後者は分子量1257および1239の２種のペプチドの存在が推定された。このようにＦＡＢ法によって、μgレベルのペプチドの分析が可能であることが示された。

Key words：　Mass Spectrometry, Peptide, Spinal Cord.

神経組織に化学的伝達物質やモジュレーターとして重要な活性をもつペプチドが続々と発見されつつあり、今後ますますペプチド研究の重要性を増すものと予想される。本研究では最近めざましい技術的進歩を示しつつあるガスマス、ＦＡＢマス法などの質量分析法を用いて、神経組織のペプチドの高感度で迅速な分析を試みた。

［実験方法］

1）ペプチドの分離：ウシ脊髄1.5 Kgを２倍量のアセトン－1N塩酸（100:3 ,v/v）で抽出し、濃縮した（2,6）。次に松尾らの方法（4)に従って抽出液をSP-Sephadex樹脂へ吸着させ、バッチ法で.1M酢酸（AB),2Mピリジン（CD),2Mピリジン－2M酢酸（pH 5.0）(EF)画分に分離した。各画分のペプチドをBioGel-P2（2.5×100cm）カラムで分画し、その画分を陰イオン交換樹脂（日立3013N）又は逆相Diphenyl樹脂（Whatman-Protesil-300）による高速液クロ（島津LC4A）によって分離した。

2）質量分析法：a）ガスマス分析；低分子ペプチドについては原理的にRoseの方法（9）によるパーメチレーションの後、ガスマス分析を行った。P5-B画分はSE-30（3m×3mm）IDガスクロカラムを用いCI法で、P5-A画分についてはOV-17（1m×3mm）IDガスクロカラムを用いEI法で分析を行った。

b）FABマス分析；高分子ペプチドについてはFAB法(1,3)によりマスに試料を直接導入し分析を行った。いずれも日本電子ガスマス装置JMSDX-300を用いた。

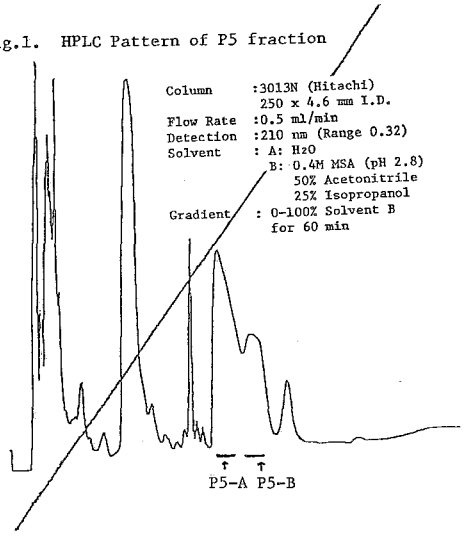
3）Bioassay：モルモットの回腸を用い、Inhibitorとして Atoropin 1 $\times 10^{-7}$ M、Trypyamin 1 $\times 10^{-6}$M、Pyrilamin 2 $\times 10^{-5}$ M 存在下での収縮活性を測定した（2)。

本研究は一部文部省科研費（試験研究）の援助をうけた。

［実験結果と考察］

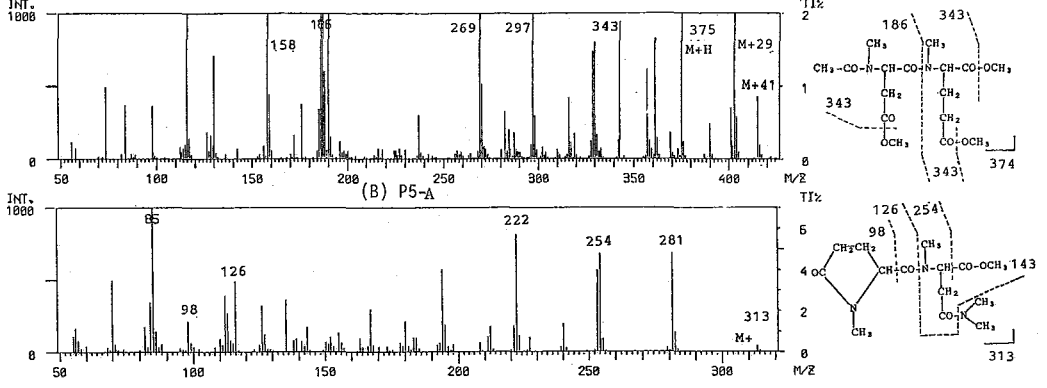
1）低分子酸性ペプチドの分析：抽出濃縮液を、BioGel-P2 カラムにかけ，Kav=0.6付近の230nm 吸収ピーク（P5）を分取し、日立3013N 樹脂による高速液クロを用い第1図に示した条件で分離した（第1図）。P5-AおよびP5-B画分はアミノ酸分析の結果いずれもAsx:Glx=1:1 の割合で含有していた。P5-Bのガスマスパターン（第2図A）はM+H ＝375 の親ピークの他Clに特徴的なM+29＝403,M+41＝415,更に343,186,158 の分解フラグメントが見出されNAcetyl-Asp-Glu であると推定された（第2図A）。このペプチドは以前、宮本、柿本らによって同定され(8)、最近グルタミン酸Receptorへ強い親和性をもつ内因性物質として注目されている(10)。またP5-AのEI法によるガスマスパターンは第2図Bに示した。一般にEI法では親ピークはフラグメントイオンに分解して、観測が困難となる場合がある。この場合も313 の親ピークがわずかに認められ、p-Glu 化合物に特有の98,126ピークおよび281,254,222 分解フラグメントが観察された。この結果より、このペプチドはpGlu-Asnと推定された（第2図B）が、pGlu-Asp-NH2の可能性ものこされている。このペプチドについての報告はなく、ヘビ毒にpGlu-Asn-Trpの存在が知られているにすぎない（5)。我々は既にN末ブロックの蛋白のN末端ペプチドを FD-マス分析法を用いて決定した(7)が、N末ブロックのペプチドの分析にガスマス法は極めて有用である。

Fig.1. HPLC Pattern of P5 fraction

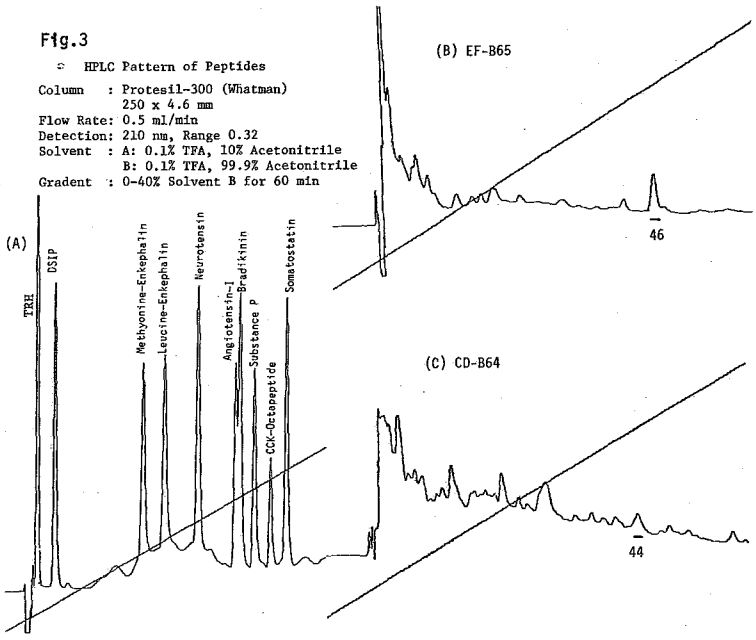


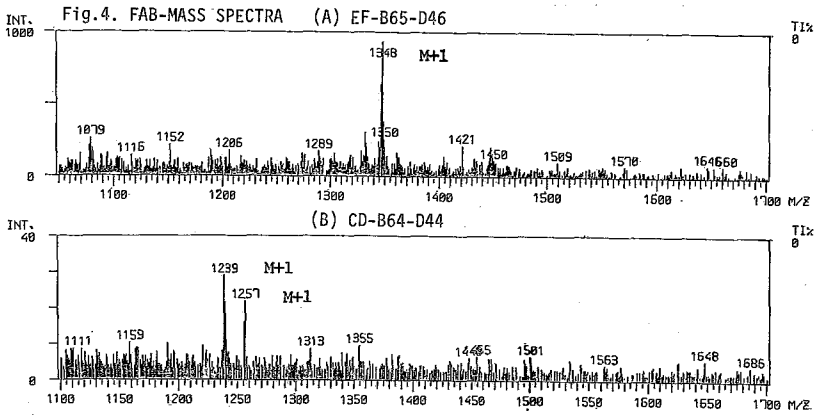
2）活性ペプチドの分析：脊髄の抽出液について、SP-Sephadex,BioGel-P2 カラムクロマトおよびDiphenyl系逆相高速液クロを行った。この系の高速液クロによって10種の標準活性ペプチドは第3図Aに示す様に効果的な分離を示した。但しBradikininとBombesinの分離は困難であった。SP-Sephadex のEF画分のBioGel-P2-65画分(Kav ≒

Fig.2. GC-MS SPECTRA (A) P5-B



0.3）のProtosil-300高速液クロカラム46分溶出画分（EF-B65-D46）（第３図Ｂ）は回腸のBioassayで陽性を示したので、FAB-マス分析を行ったところ、1348の親ピークを示し、Substance-P$^{(M+1)}$の分子量$^{(1437)}$と一致した（第４図Ａ）。一方CD-B64-D44画分はBioassayで弱い活性を示したが、1257および1239の２本の親ピークを示し２種のペプチド$^{(M+1)}$の存在を示唆した$^{(M.W.1256,1238)}$（第４図Ｂ）。これらのペプチドの化学的分析は現在進行中であるが、FAB-マス法によって、μｇレベルのペプチドの分析が可能であることが示された。今後 FAB法によるフラグメントイオンの検出およびリンクドスキャン法の応用によってペプチドのアミノ酸配列の情報が得られることが期待される。





文献
1) Barber,M.,Bordoli,R.S.,Sedgwick,R.D. & Tyler,A.N. (1981) Nature 293,270-275. 2) Chang,M.M. & Leeman,S.E. (1970) J.Biol.Chem. 245,4784-4790. 3) Gibson,B.W.,Gillom,R.D.,Whitaker,J.N. & Biemann,K.(1984) J.Biol.Chem. 259,5028-5031. 4) Kangawa,K.,Minamino,N.,Fukuda,A. & Matsuo,H. (1983) Biochem.Biophys.Res. Commun. 114,533-540 5) Kato,H.,Iwanaga,S. & Suzuki,T. (1966) Experientia 22,49-50. 6) Kimura,S.,Okada,M., Sugita,Y.,Kanazawa,I. & Munakata,E. (1983) Proc.Jap.Acad.59B,101-104. 7) Kitamura,K.,Suzuki,M.,Suzuki,A. & Uyemura,K. (1980) FEBS Lett. 115 27-30. 8) Miyamoto,E.,Kakimoto,Y. & Sano,I. (1966) J.Neurochem.13,999-1003. 9) Rose,K.,Simona,M.G. & Offord,R.E. (1983) Biochem.J. 215,261-272. 10) Zaker,R.,Koller,K.,Cotter,R., Heller,D. & Coyle,J.T.(1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 80,1116-1119.

124 エンケファリンそのものを固相用抗原とするメチオニン－エンケファリンのenzyme－linked immunosorbent assay：直接法と拮抗法

武居能樹・小崎康子
（名大・環境医研）

〔要　約〕

メチオニン- エンケファリンは，従来より主として，ラジオイムノアッセイによって測定されている。しかし，測定感度の点で満足できるエンザイムイムノアッセイが利用できるならば，費用や安全性の面からこの方が望ましいであろう。最近，Zamboni et al.（Anal. Biochem.（1983）130，83）は高分子物質に共有結合させたエンケファリンを固相抗原として用いるenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）を報告した。この方法は，抗体作成に用いたものとは異なる高分子物質－ペプチド複合体を調製する必要があるだけでなく，拮抗法に限られている。私達は，エンケファリンそのものをミクロイムノプレート固相に効率よく吸着させ，さらに吸着エンケファリンを高感度で検出できる条件を見いだした。これによって，固相への吸着に用いた標品中のエンケファリンの濃度を定量する直接的ELISA を開発した。その感度は5 fmol／ウェルであった。また，固相エンケファリンへの抗体の結合が遊離抗原により阻害されることを利用して，拮抗的ELISA を開発した。この場合の感度は44 fmol／ウェルであった。これらの感度はラジオイムノアッセイのそれに匹敵するものである。

Key words： Methionine-enkephalin, Enzyme-linked immunosorbent assay, Enkephalin

現在，神経ペプチドの微量定量は主にラジオイムノアッセイ（RIA）に依っている。しかし近年，RIA に比べて，費用も安く，危険性も少ないだけでなく，測定感度も劣らないエンザイムイムノアッセイが多くの微量物質の測定に開発されてきている。神経ペプチドであるエンケファリンやサブスタンスPについても，最近，Stjernchantz et al.（2）とZamboni et al.（4）が，それぞれ，enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）を報告した。彼等の方法は高分子物質に共有結合させた神経ペプチドを固相用抗原として用いる拮抗法である。そのため，抗体作成に用いたものとは異なる高分子物質－ペプチド複合体を用意する必要がある。私達は，エンケファリンそのものを効率よく固相に吸着させ，また固相抗原への抗体の結合を感度よく検出することができるならば，高分子物質に結合したエンケファリンを用意する必要もなく，直接的にも，あるいは拮抗的にも，エンケファリンを定量することができるであろうと考え，条件を検討した結果，RIA に匹敵する感度をもつELISA を開発することができたので，ここに報告する。

実験材料と方法

Met-エンケファリン（ME）に対する抗血清はKingとMillarの方法（1）でグルタルアルデヒドを用いて牛血清アルブミンに結合させたMEでウサギ（JW-NIBS ／Y）を免疫して作成した。用いた5羽とも抗体価の高い抗血清を生じた（図1）。免疫スケジュールがやや異なるが同様にして免疫したニュージランドホワイト種（NW）の場合に比べて，抗体価が高く，個体差が小さいのが注目される。本実験ではその内で抗体価が最高の抗血清，JW-NIBS ／Y-2，を使用した。

ELISA の基本的手順はつぎの通りである。

（1）直接法　96穴ミクロイムノプレート（Nunc製，平底）のウェルを緩衝液に溶かしたME溶液50μlで4℃，数日間コートした。その後，洗浄液（0.05% Tween 20, 0.15M NaCl, 0.1M 燐酸ナトリウム緩衝液，pH 7.0）で洗浄したウェルに抗血清50μlを加えて，4℃に1日静置した。洗浄後，（a）HRP-抗ウサギIgG（Miles），または（b）ビオチン-抗ウサギIgG／アビジン-ビオチン-HRP（Vectastain™ ABCキット）を作用させた。固相に結合したペルオキシダーゼ活性はABTS法で測定した。

（2）拮抗法　上述のようにMEをコートしたウェルに洗浄液に溶かした標準又は測定試料となるべき遊離ME40μlと同じく洗浄液で希釈した抗血清10μlとを添加し，4℃に10時間以上静置した。洗浄後，固相MEに結合した抗体に洗浄液で1：10000に希釈したHRP-抗ウサギIgG 50μlを25℃で2--4hr作用させた。ペルオキシダーゼ活性は螢光法（基質，p-ヒドロキシフェニル酢酸）又はABTS法で測定した。

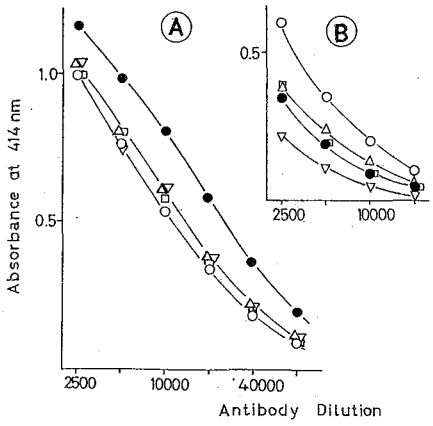


Fig. 1. Titer of antisera to ME.

Rabbits used: A, JW-NIBS/Y; B, NW.

実験結果と考察

Zamboni et al.（4）は，MEそのものを直接ポリスチレンウェルをコートした場合，吸着MEを抗体／HRP-抗IgG で滴定してもペルオキシダーゼ活性は殆ど検出できないので，MEそのものは固相用抗原として使用できないと報告している。しかし，私達の条件下ではMEは効果的に固相に吸着した（図2）。この違いの原因は，彼等が抗体の非特異的な吸着を防ぐために，ふつうELISA で用いられている牛血清アルブミンを含む洗浄液を使用したことにあると思われる。MEの代わりにLeu-エンケファリンでコートしたウェルに抗ME抗血清を作用させた場合には1μMでもペルオキシダーゼ活性は検出されなかった。MEのウェルへの吸着は1日でほぼ平衡に達した。MEの吸着は，ELISA でよく使用される緩衝液である0.1M $NaHCO_3$(pH 9.6) よりも0.1M 燐酸ナトリウム（pH 8.0）の方が高く，これに1M NaCl を加えると吸着量は更に増加した。最適条件下では0.1 nM ME（5 fmol／ウェル）でコートしたときの呈色度はブランク値に対して有意の差を示した。高速液体クロマトグラフィーなどでかなり精製された標品のME定量にはこの直接法が利用出来るであろう。実際，外から加えたMEの血清に

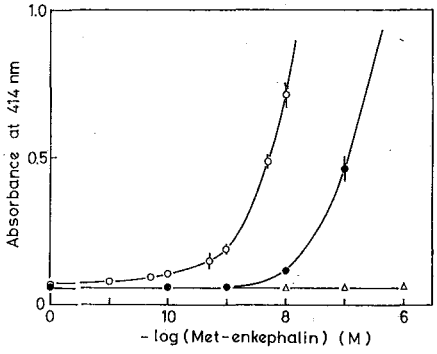


Fig. 2. Titration of ME bound to the solid phase

Immunoplate wells were coated with different concentrations of unconjugated ME in 0.1M $NaHCO_3$ (pH 9.6) (●) or 0.1M Na phosphate (pH 8.0) + 1M NaCl (○). Bound ME was titrated with anti-ME/HRP-anti-IgG (●) or Vecstain ABC kit (○). △, wells coated with Leu-enkephalin.

よる分解は，除蛋白，Sep-Pak C_{18} (Waters) 処理した反応液にこの方法を適用することによりその時間経過を追うことができる。

固相MEへの抗体の結合は，抗体と共に添加する遊離MEによって阻害され，その阻害度はウェルのコートに用いたME溶液の濃度および試料として用いた遊離ME液の濃度に依存した（図３）。抗血清やHRP-抗ウサギIgG の量や反応時間などは測定感度と全体の操作の便宜とを勘案して実験的に決定したものである。本実験条件下では 0.1μM MEでコートしたときに最高の感度が得られた。このとき，44fmol／ウェルの遊離MEは約10％（10.8±2.3％）の有意の（$P < 0.05$）阻害を示した。測定値の変動係数の平均は4.7 ％であった。感度をあげるためにつぎの実験を行ったが，どれもよい結果を与えなかった。

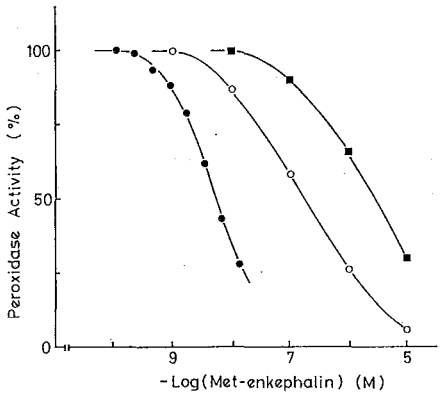


Fig. 3. Competitive ELISA for ME.

Immunoplate wells were coated with 10 (■), 1 (○) or 0.1 (●) μM unconjugated ME. Antiserum dilution: ■, ○, 1:10000; ●, 1:25000.

（ａ）抗体の非特異的吸着を防ぐために，ふつう行われている洗浄液または／及び抗血清への無関係な蛋白の添加。（ｂ）Zamboni et al.(4)がよい結果を与えたと述べている，遊離ME，HRP-抗IgG 及び抗血清の同時添加。（ｃ）サブスタンスＰのELISA に関して，Stjernschantz et al.(2)がよい結果を得たとしている，遊離MEと抗血清のプレインキュベーション（その後で固相MEと反応させる）。ブランク値も含めて，呈色度を全体的に下げる効果はあっても，どの場合も感度をあげるようなことはなかった。

抗体の非特異的吸着を防ぐためには，通常用いられているような蛋白含有の洗浄液を使用する必要はない。むしろ，そのような洗浄液は望ましくない。サブスタンスＰのELISA でもStjernschantz et al.（２）はこのペプチドそのものは固相用抗原としてあまり有効ではないと報告しているが，彼等もまた非特異的吸着防止のためにオブアルブミンを使用している。私達の実験結果は，本実験に用いたのと同じ洗浄液を使うとサブスタンスＰも高分子物質に結合させる必要もなく，それ自身で固相用抗原として有効であることを示している（３）。固相に吸着したこれらの蛋白は低分子神経ペプチドと抗体との反応を立体障害的に阻害するのであろう。

謝辞

抗体作成に用いたウサギ，JW-NIBS ／Y,を御恵与下さった水谷　誠博士（日本生物科学研究所，山梨）に深謝します。

文献

1. King, J. A. and Millar, R. P. (1980) Peptides, 1, 211-216. 2. Stjernschantz, J., et al. (1983) J. Neurochem. 38, 1323-1328. 3. 武居　能樹，田村　良子 (1984) 名大環研年報，35, 220-221. 4. Zamboni, G., et al. (1983) Anal. Biochem. 130, 83-87.

125 Cholecystokinin－8－sulfate の酵素免疫測定法

山本秀子・恵美安裕・加藤　武
（東工大・総理工・生命化学）

〔要　約〕

固相化抗原を用い、二抗体競合法による簡便、高感度かつcholecystokinin-8-sulfate(ＣＣＫ-８Ｓ)に特異的なenzyme immunoassay(ＥＩＡ)を開発した。固相化抗原としてpoly-L-glutamic acidに結合させたＣＣＫ-８ＳをポリスチレンマイクロプレートにⅠ理吸着させたものを用い、測定試料をＣＣＫ-８Ｓ　Ｎ末認識抗体とglass tube内で結合させた後、マイクロプレートの固相化抗原と競合させ、トラップされた抗体にperoxidase標識抗体を結合させて固相に残存した酵素活性の低下により、ＣＣＫ-８Ｓを定量する方法である。この方法により５ pg/wellが測定可能であり、ＣＣＫ-８ＳとＣＣＫ-４またはＣＣＫ-８- non sulfate(ＣＣＫ-８ＮＳ)との交差反応は５０％阻害において５％であった。故にこの方法が高感度かつＣＣＫ-８Ｓに選択的である事が認められた。ラット脳組織のメタノール抽出物は０．２４ mgまで直線性を示し、内部、外部変動係数は５０％阻害において１０％以下であり、組織内ＣＣＫ-８Ｓについても正確に測定できた。また、ラット脳部位のＣＣＫ-８Ｓを定量した所、従来のＲＩＡによる数値とほぼ一致し、この測定法が安価であり、簡便である事からその有用性が示唆された。

Key words：　enzyme immunoassay, ＣＣＫ-８Ｓ, brain tissue

脳神経系における伝達物質または修飾物質としてのＣＣＫ-８Ｓに関する知見は数多く報告されているが、最近、特にnegative symptomを伴う患者の脳及びＣＳＦ中のＣＣＫ量の変動が報告されており、ＣＣＫ-８Ｓの合成アナログの投与による症状の改善も報告されるなど、このニューロペプチドの臨床分野における重要性が示唆されている。ＣＣＫ-８Ｓは大脳皮質、線条体、側坐核に多く含まれており、薬理的な知見は集積されつつあるが、その生理的意義は未だ明らかにされていない。脳にはまた、ＣＣＫ-８ＳとＣ末端を同じくするＣＣＫ-８Ｓの分解生成物と考えられるＣＣＫ-４またはＣＣＫ-８ＮＳと、前駆体と考えられるＣＣＫ-３３及びＣＣＫ-３９が含まれており、その他にもＣＣＫのC末端ペプチドを含むガストリンも存在し、ＣＣＫ-８Ｓを特異的に測定する事が必要である。従来、ＣＣＫ-８Ｓの測定法としてＲＩＡ(1-5)とＨＰＬＣ－ＥＣＤ(6)が報告されているが、前者は放射性同位元素を必要とし、後者は感度が不十分である。近年、微量測定法としてＥＩＡがペプチドにも応用され、Substance Ｐ及びendorphinのＥＩＡが報告された(7) そこで我々はＣＣＫ-８ＳのＮ末端に特異的な抗体とＣＣＫの低分子のみ抽出するメタノール抽出法を組み合わせ、ＣＣＫ-８Ｓに特異的なＥＩＡを確立した。

＜実験材料と方法＞

抗血清の作製

ＣＣＫ-８ＳをLiuらの方法(8)によりkeyhole limpet hemocyanineと結合させ、hashimuraらの方法(9)により家兎に免疫した。抗原は２週間おきに８回 皮内注射した。その２及び３回目の注射の３日前に同様に作製したＣＣＫ-４とD-glutamic acidとD-lysineの共重合体との結合物を腹腔内投与し（ＣＣＫ-４として６．２５mg）、ＣＣＫ-８ＳのＮ末端認識抗体を作製した。抗血清は硫安分画とDEAE column chromatographyにより、部分精製し、IgG 画分を得た。

測定操作

ＣＣＫ-８Ｓとpoly-L-glutamic acidを1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimideにより脱水縮合させ、５０ｍＭ bicarbonate-carbonate buffer, pH 9.6に溶解する（約１μg/ml)。この溶液をマイクロプレート（Nunc immunoplate I, 96穴)中に250μl/wellずつ分注し、室温で２時間反応後、プレートを0.05％のTween-20(v/v)を含む20ｍＭ phosphate-buffered saline, pH 7.4(ＰＢＳ-ＴＷ）で２回洗い、１mg/mlの牛血清アルブミンを含むＰＢＳ-ＴＷ(ＰＢＳ-ＴＷ／ＢＳＡ)を満たして１時間室温に保存した。これを固相化抗原として用いた。glass tube(Pyrex, culture tube)に10000倍に希釈したIgGと測定試料または標準ＣＣＫ-８Ｓを加えて37℃ 1～2時間反応後、マイクロプレートに移して更に４℃、一夜、反応させた。その後、マイクロプレートをＰＢＳ-ＴＷで４回洗い、peroxidaseを結合させたヤギの抗兎IgGの700倍希釈液を分注し、37℃、２時間反応させた。その後、0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6で４回洗い、固相上に結合したperoxidase活性を測定した。基質として0.4 mg/mlのo-phenylenediamineと0.01％ H_2O_2を含んだ0.1M phosphate-citrate buffer, pH 5.0を用い、室温で反応後、２M H_2SO_4で反応を停止させ、試料波長 492 nm, 参照波長 400 nmの２波長分光光度計で測

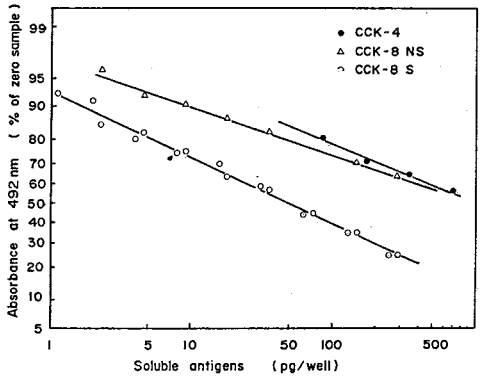


Fig.1. Standard curve of ELISA with the inhibition of antibody binding to solid phased CCK-8 by various concentrations of CCKs. The ordinate scale is probability, and the abscissa is logarithmic.

Table 1. REGIONAL DISTRIBUTION OF CCK-8S IN RAT BRAIN, AS MEASURED WITH ELISA (PRESENT DATA) AND RIA (PUBLISHED DATA)

Tissue	ELISA (ng/mg protein)		RIA (ng/mg protein)	
Frontal cortex	7.76±0.68 (7)	5.3±0.21	3.6±0.4[a]	17.6±4.74[b+]
Striatum	8.45±0.69 (7)	1.9±0.22	13.6±3[a]	
Hippocampus	2.70±0.35 (7)	2.6±0.20	1.2±0.23[c++]	5.1±0.56[c+++]
Hypothalamus	1.84±0.17 (7)	1.8±0.10	8.5±3.35[b]	
Septum	6.08±0.89 (7)	3.4±0.24		
N.accumbens	11.95±1.07 (6)	2.5±0.31	12.9±2.0[d]	

Results were expressed as mean±SEM (n). a:from Beinfeld et al., refer. (1). b:from Salerno et al., refer. (2); +, cortex. c:from Beinfeld and Palkovits, refer. (3); ++,CA1; +++,CA3. d:from Dupont et al., refer. (4). Data not affixed of RIA from Govoni et al., (5).

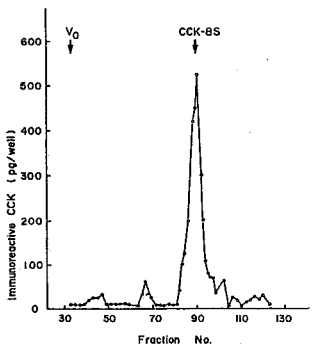


Fig.2. Sephadex G-50 chromatography of methanol extracts of brain cerebrum.

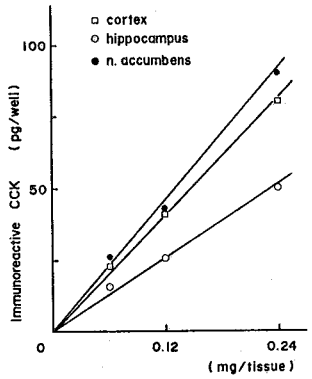


Fig.3. The dilution curve of the tissue extract.

定した。

試料作製

ラット脳組織は氷上、90％メタノール中、超音波破砕器で破砕後、1000×g上清を減圧乾固した後、ＰＢＳ-ＴＷ／ＢＳＡに溶解したものを用いた。

＜結果及び考察＞

この測定法で用いた温度及び時間はそれぞれ最適なものを選んだ。合成ＣＣＫ-８Ｓ，ＣＣＫ-４，ＣＣＫ-８ＮＳの検量線を図１に示した。試料を加えないwellの吸光度を100とし、試料を加えたwellの吸光度を割った値をlogit変換値を縦軸に試料中のＣＣＫの値のlogを横軸にとると各々のペプチドについてほぼ直線が得られた。これより、ＣＣＫ-８Ｓの感度は約５pg/wellであり、50％阻害におけるＣＣＫ-８ＮＳ及びＣＣＫ-４との交差反応は５％であった。次にラット脳組織中のＣＣＫ-８Ｓの測定を試みた。まず、脳に含まれるＣＣＫ-３３，ＣＣＫ-３９を除くために９０％メタノールで抽出した（回収率は90％）。この大脳抽出液をSephadex G-50 fine column chromatographyにかけてＣＣＫ-immunoreactiveな分子がどの程度存在するかをみたのが図２である。主なピークは１本で標準ＣＣＫ-８Ｓと一致し、この測定法がほぼＣＣＫ-８Ｓ分子を認識している事がわかった。この測定系にラット脳抽出物を種々の容量加えてみると0.24 mg tissue/wellまで比例関係がみられた（図３）。また、ラット脳抽出液を用いて再現性を調べた所、内部変動係数は４７％，４５％，５８％阻害において、9.97, 5.94, 15.05％(n＝4)であり、外部変動係数は同じ阻害を示す点において、7.35, 5.25, 6.64％(n＝3)であった。この方法により、ラット脳各部位のＣＣＫ-８Ｓを測定したのが表１である。ＥＩＡによる値とＲＩＡによる値はかなり変動はみられたもののほぼ一致した。この差異は抗原認識部位の違いと組織の調製法が異なるためと考えられた。

我々は高感度かつ選択性の高いＣＣＫ-８Ｓの測定法を開発した。その感度はＲＩＡとほぼ同じか、やや劣る程度であり、操作性及び時間はより簡便で少い時間で測定可能であった。そこでＥＩＡはニューロペプチド及び他の小分子の研究にとり有力な道具となると思われた。

＜参考文献＞

1. Beinfeld,M.C., Meyer,D.K., Eskay,R.L., Jensen,R.T., and Brownstein,M.T.(1981) Brain Res., 212, 51－57.
2. Salerno,F., Bonato,C., Panerai,A.E., Martini,A., and Malesci,A.(1983) Life Sci., 33, 377－381.
3. Beinfeld,M.C., and Palkovitz,M.(1981) Neuropeptides, 2, 123－129.
4. Dupont,A., Merand,Y., Savard,P., Leblanc,J., and Dockray,G.J.(1982) Brain Res., 250, 386－390.
5. Govoni,S., Yang,H.-Y.T., Bosio,A., Pasinetti,G., and Costa,E.(1982) Regulatory Peptides, 33, 437－443.
6. Sauter,A., and Frick,W.(1983) Anal. Biochem., 133, 307－313.
7. Stjernschantz,J., Gregerson,D., Brausher,L., and Sears,M.(1982)J.Neurochem.,38, 1323－1328.
8. Liu,F.T., Zinnecker,M., Hamaoka,T., and Katz,D.(1979)Biochemistry, 18, 690－697.
9. Hashimura,E., Shimizu,F., Nishino,T., Imagawa,K., Tateishi,K., and Hamaoka,T. (1982) J.Immunological Methods, 55, 375－387.

126　ストレスによるラット脳内ノルアドレナリン放出亢進の抑制作用からみたオピオイド・ペプチド類の差違

田中正敏・井田能成・津田　彰・辻丸秀策・
長崎信行
（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

ラットの拘束ストレスによる脳各部位のnoradrenaline (NA) 放出亢進に及ぼすα-endorphin (α-END), γ-endorphin (γ-END), δ-endorphin (δ-END)の影響を、脳各部位のNAの主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate (MHPG-SO_4)含量を定量することにより検討した。各薬物はsalineに溶解し、per rat あたり 1μg もしくは 10μg を慢性的に植え込んだカニューレより脳室内に投与した。薬物もしくはsaline投与直後より1時間の金網による拘束ストレスを負荷した。その結果、拘束ストレスにより、視床下部、扁桃核、海馬、視床、中脳、locus coeruleus(LC)部のすべてで、MHPG-SO_4含量が有意に増加した。γ-ENDは視床を除く5部位で、ストレスによるMHPG-SO_4含量の増加を有意に抑制した。α-END及びδ-ENDは、視床でストレスによるMHPG-SO_4含量の増加を逆に増強させた以外には有意な変化を及ぼさなかった。これらの結果を従来の演者らの結果と合わせて考えると、従来より演者らが主張しているように、opioid peptidesはストレスによるNA放出亢進に対して、脳各部位、特に視床下部や扁桃核で、抑制的に作用すると考えられるが、peptidesの種類により作用が異なる。このシリーズで検討した6種類のopioid peptidesで最も顕著に抑制するのは、β-END, Met-ENK, γ-ENDで、中等度に抑制するのは、Leu-ENK、ほとんど抑制しないか部位によっては逆に促進するのがα-ENDおよびδ-ENDであると考えられる。

Key words : Opioid peptides, Noradrenaline release, Immobilization stress

ラット脳各部位のnoradrenaline(NA)及びその主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO_4)含量を測定することにより、ストレス状況下では広汎な脳部位でNAの放出が亢進すること、ならびにその際の諸特性について明らかにしてきた (3,6-11)。ところで、拘束ストレスで生じるNA放出亢進は、naloxone前処置により視床下部、扁桃核、視床の3部位で選択的に増強されることから、ストレス曝露中に放出される内在性opioid peptides が、ストレスによるNA放出に対して抑制的に作用していることを示唆した(7,8)。この仮説は強力なopiateであるmorphineがnaloxoneとは逆にこれら3部位の他に海馬、中脳でもストレスによるNA放出亢進を抑制することから支持された(8)。さらに、脳室内投与したβ-endorphinやMet-enkephalinが視床下部、扁桃核、海馬、視床、中脳で、Leu-enkephalin が視床下部、扁桃核、海馬で、ストレスによるMHPG-SO_4 含量の増加を有意に抑制する事実から、これら opioid peptides がストレスによるNA放出亢進に対して抑制的に作用することを示した(10)。しかし、opioid peptidesの種類により抑制する部位は異なっている。そこで今回は、α-endorphin(α-END)、γ-endorphin(γ-END)、δ-endorphin(δ-END)の作用について検討することにより、前回の結果と合わせてpro-opio-melanocortin群に属する4種類、及びpro-enkephalin A 群に属する2種類、合わせて6種類のopioid peptidesのストレスによるNA放出亢進に対する作用のプロフィールを明らかにすることを目的とした。さらに、前回報告しなかったNAニューロンのcell body sitesであるlocus coeruleus(LC)部についても検討した。

【方法】

Wistar系雄性ラット(170-180 g)を対象とし、de Wiedの方法(2)により、右側脳室にポリエチレン・カニューレを植え込み、術後4日して実験した。次の8群を設定した。(1) saline control,

(2) saline＋stress，(3)α-END 1μg＋stress、(4)α-END 10μg＋stress，(5)γ-END 1μg＋stress，(6)γ-END 10μg＋stress、(7)δ-END 1μg＋stress，(8)δ-END 10μg＋stress。投与量はいずれもper ratあたりの量であり、Uedaら(12)による鎮痛作用を起こす量及び前回の結果(10)を参考にした。薬物はいずれもsalineに溶解し、5μl/ratをカニューレより1分かけてストレス負荷直前に脳室内投与した。ストレスとしては従来の報告(6-10)どおり金網による拘束を1時間負荷した。Saline control群は、saline脳室内投与後ストレスを負荷せず1時間後に断頭した。各操作終了後断頭し、脳を摘出し、LC部以外はGispenらの方法(1)で、LC部はReisとRossの方法(5)で各部位に分割し、測定まで -45° Cで保存した。各部位のMHPG-SO_4含量はKohnoらの方法(4)で蛍光法で測定した。統計的解析はすべてStudent's t-test(両側)で検定した。

【結果】

結果は図1にまとめて示す。今回検討した6部位すべてで1時間の拘束ストレスにより、saline stress群にくらべて、MHPG-SO_4含量は有意な増加を示した。α-END及びδ-ENDは、1μg投与時にストレスによるMHPG-SO_4含量の増加を視床で有意に増強させた以外には、1μg、10μgともいずれの部位でもストレスによるMHPG-SO_4含量の増加には有意な変化を及ぼさなかった。これに対して、γ-ENDは1μg投与時に扁桃核で、1μg及び10μg投与時に海馬とLC部で、10μg投与時に視床下部と中脳で、ストレスによるMHPG-SO_4含量の増加を有意に減弱させたが、視床のそれには有意な変化を示さなかった。

【考察】

今回検討した6部位すべてで1時間の拘束ストレスによりMHPG-SO_4含量は有意に増加し、従来の報告(6-10)のように、拘束ストレス下でこれらの部位のNA放出が亢進することが示された。これら

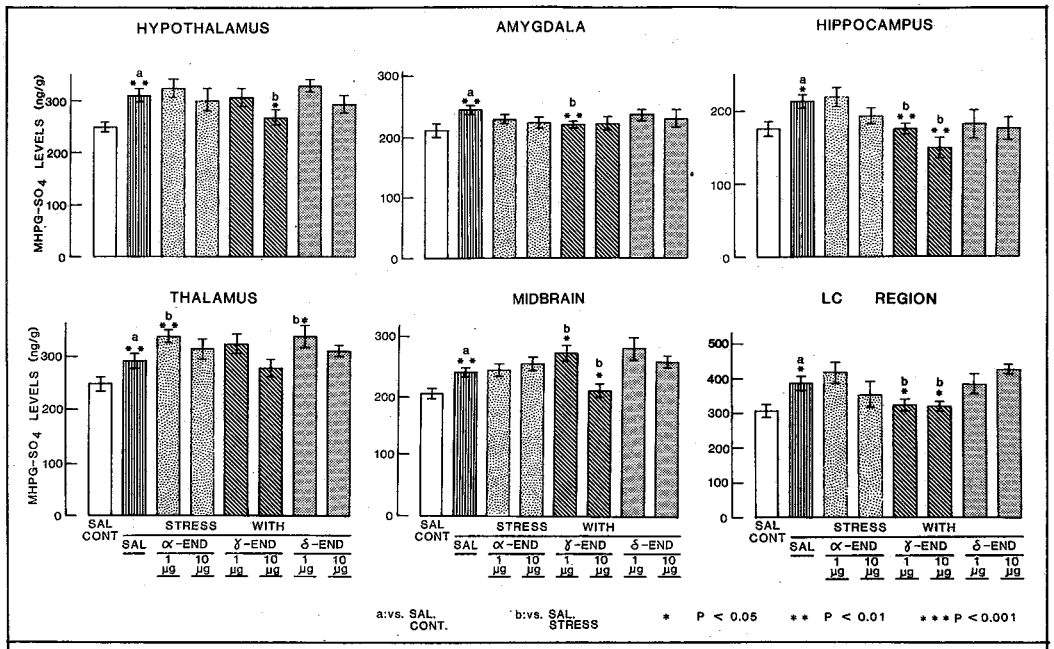


Fig. 1. Changes in MHPG-SO_4 levels in the rat brain regions caused by 1-hour immobilization stress and their modifications by α-endorphin (α-END), γ-endorphin (γ-END) and δ-endorphin (δ-END).

Table 1. Effects of Various Opioid Peptides and Morphine on Stress-Induced Increases in MHPG-SO_4 Levels in The Brain Regions in The Rat

		Hypothalamus	Amygdala	Hippocampus	Thalamus	Midbrain	LC Region
α-Endorphin	1 μg				▒		
	10 μg						
β-Endorphin	1 μg			▨			
	10 μg	▨	▨	▨	▨	▨	▨
γ-Endorphin	1 μg		▨	▨		▒	▨
	10 μg	▨		▨		▨	▨
δ-Endorphin	1 μg				▒		
	10 μg						
Met-Enkephalin	100 μg	▨	▨	▨			▨
	200 μg	▨	▨	▨	▨	▨	
Leu-Enkephalin	100 μg	▨	▨	▨			
	200 μg	▨					
Morphine	10 μg	▨	▨	▨	▨	▨	

▒ Enhancement　▨ Attenuation　□ Unchange

のストレスによるMHPG-SO_4含量の増加に対する各opioid peptidesの作用を、今回と前回の結果並びに前回報告しなかったLC部についてまとめて表1に示した。これらの結果から、ストレスによるNA放出亢進に対して、少なくともβ-END，γ-END，Met-ENK、Leu-ENKは抑制的に作用し、それに対してα-END，δ-ENDはほとんど作用しないか、作用しても視床では促進的であるという結果が示された。特にα-ENDとγ-ENDの場合、C末端のLeuの有無でこのような差異が生じることは興味深いことである。Morphineは脳室内投与により5部位で抑制を示したが、LC部では10μgでは有意な抑制は示さなかった。しかし、同部でβ-END，γ-END，Met-ENKは有意な抑制を示した。このようなストレスによるNA放出抑制作用から、検討した6種のopioid peptidesを分けてみると、(1) very sensitive.....β-END，Met-ENK，γ-END，(2) moderately sensitive....Leu-ENK，(3) non or low sensitive....α-END，δ-ENDのようになると考えられる。又、NA放出亢進が抑制される脳部位は視床下部、扁桃核、海馬などの大脳辺縁系などであり、これらの部位のストレスによるNA放出の亢進、及びopioid peptidesによるその抑制がストレス曝露中の動物の情動と密接に関連している可能性が強いと思われる。(本研究の一部は文部省科学研究費#59570093の助成によった)

【文献】

1. Gispen,W.H., Schotman,P. and de Kloet,E.R. (1972) Neuroendocrinolgy, **9**:285-296
2. de Wied,D. (1976) Life Sci., **19**:685-690
3. Ida,Y., Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Iimori,K., Tsuda,A., Hoaki,Y. and Nagasaki, N. (1982) Neurobiol. Aging, **3**:233-236
4. Kohno,Y., Matsuo,K., Tanaka,M., Furukawa,T. and Nagasaki,N. (1979) Anal. Biochem., **97**: 352-358
5. Reis,D.J. and Ross,R.A. (1973) Brain Res., **57**:307-326
6. Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Ida,Y., Takeda,S. and Nagasaki,N. (1982) Pharmacol. Biochem. Behav., **16**:315-319
7. Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Ida,Y., Iimori,K., Hoaki,Y., Tsuda,A. and Nagasaki, N. (1982) Life Sci., **30**:1663-1669
8. Tanaka,M.,Kohno,Y., Tsuda,A., Nakagawa,R., Ida,Y., Iimori,K., Hoaki,Y. and Nagasaki, N. (1983) Brain Res., **275**:105-115
9. Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Ida,Y., Takeda,S., Nagasaki,N. and Noda,Y. (1983) Pharmacol. Biochem. Behav., **19**:543-547
10. 田中正敏，津田彰，井田龍成，辻丸秀策，長崎信行 (1983) 神経化学，**22**:366-368
11. Tsuda,A., Tanaka,M., Kohno,Y., Nishikawa,T., Iimori,K., Nakagawa,R., Hoaki,Y., Ida,Y. and Nagasaki,N. (1982) Physiol. Behav., **29**:337-341
12. Ueda,H., Amano,H., Shiomi,H. and Takagi,H. (1979) Europ. J. Pharmacol., **56**:265-268

127　血圧調節に関する脊髄Substance Pニューロンとその受容体

高野行夫・神谷大雄　（福岡大・薬・薬理）
A.D. Loewy　（ワシントン大・医・Anatomy & Neurobiology）

〔要　約〕

中枢からの血圧調節に関与する神経として、延髄腹側部（Ventral medulla oblongata）から脊髄への下行性Substance Pニューロンに注目して実験を行なった。麻酔下でラットの延髄腹側部をカイニン酸で刺激すると血圧（mean arterial pressure）は著しく上昇した。この血圧上昇に対応して脊髄灌流液中への内在性Substance P like immunoreactivity（SP）の遊離量は約2倍に増加した。Serotoninの神経毒である5,7-dihydroxy-Tryptamine（5,7,-DHT）前処置後のカイニン酸刺激によっても、血圧上昇、SP遊離増加が認められたことから、この反応はSerotonin系の関与とは無関係であろう。さらに脊髄の円柱細胞中間外側部（Intermediolateral Cell Column, IML）の超薄切片を用いた^{3}H-Substance P結合実験から、この部位に高親和性のSubstance P受容体の存在が明らかになった（K_D = 1.28nM, Bmax = 22.2 fmole/mg protein）。以上の実験結果より、延髄腹側部に細胞体を持ち脊髄のIMLに終末を投射する下行性Substance Pニューロンの血圧調節機構が示唆された。

Key words：　Substance P, Blood pressure, Spinal cord.

脊髄のIMLにはSPが比較的多く存在し、その約75%のSPは延髄腹側部位に起源していると考えられている（3）。しかも延髄腹側部位は中枢性血圧調節に大切な部位と考えられており、この部位を刺激すると血圧、拍数ともに上昇し、この反応はSubstance Pのantagonistである〔D-Pro^{2}, D-Trp$^{(7)}$〕Substance Pで抑制される（4）。またIMLは交感神経節前神経の源であり、この部位へのSubstance Pの投与は電気生理的興奮を引きおこす（2）。そこで今回の実験で我々は興奮性薬物であるカイニン酸により、延髄腹側部位を刺激し、血圧変化とin situでの脊髄からの内在性SPの遊離量を調べた。さらにIMLにおけるSubstance P受容体についてその性質を研究した。

〔実験方法〕

1）血圧測定；体重350～500gの雄性Sprague-Dawleyラットを用い、Pentobarbital（35mg/kg i.p.）麻酔下のもと大腿動脈より血圧を測定した。

2）SPの遊離；ポリエチレンチューブをラット脊髄のL1～L2の位置に挿入し、ポンプで毎分50μlの灌流液（0.02% BSA, 5μg/ml bacitracin, 1.3mM $CaCl_2$含有のPBS）をsuperfusionした。灌流した溶液は脊髄T1の位置挿入したチューブで10分毎に回収し、すばやく凍結して、後にRIAでSP量を測った。灌流開始50分後に1μlのカイニン酸を左の延髄腹側部に投与した（図1）。

3）SPの定量；遊離したSP量はすでに報告したように（7）Leemanらの方法（5）に従ってRIAで行ない、測定感度は6.5～9.0 pg/tubeであった。

4）^{3}H-Substance P結合；ラット脳および脊髄を取り出し、すばやく凍結し25μmの凍結切片を作成して結合実験に供した。^{3}H-Substance Pの結合はQuirion et al（6）の方法

に従って行なった。すなわち切片を15分間のPreincubationの後、室温にてさらに30分間^{3}H-Substance P存在下でincubationした（0.02% BSA、40μg/ml bacitracin、4μg/ml leupeptin、2μg/ml chymostatin、3mM $MnCl_2$ 含有の50mM Tris-HCl Buffer）。非特異的結合には5μMのSubstance Pを用いた（8）。

5)交感神経破壊；生後1週間の雄性Sprague-Dawleyラットに3週間にわたりguanethidineを皮下投与した（50mg/kg/day）。

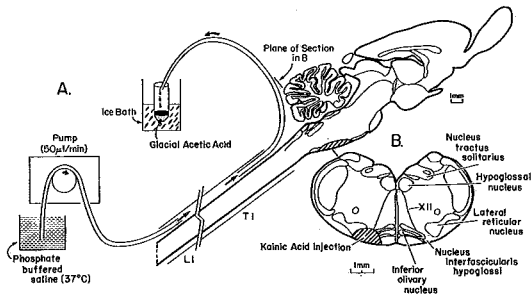


図1. ラット脊髄灌流実験法(A)，カイニン酸投与部位（B）

［実験結果］

1)延髄腹側部へのカイニン酸刺激；40mM カイニン酸の1μlを一側性に延髄腹側部に投与すると血圧はただちに上昇し、投与前に比べ約80 mmHgも増加した（図2，A）。この反応はSubstance P antagonistの［D-Pro^4, D-Trp^{9}］Substance P(4-11)で抑えられた。同時にSPの脊髄からの遊離量も10 pg/10分から20 pg/10分と約2倍に増加した（$P<0.01$，図2，B）。この増加は約20分間継続した。次に延髄腹側部から脊髄へのSubstance Pニューロンの一部はserotoninと共存していることが報告されているので、5,7-DHTによりserotoninニューロンを破壊した後、同様にカイニン酸を延髄腹側部に投与した。図2，C,Dに示されるように5,7-DHT処置群および対照群ともにカイニン酸投与により血圧上昇とSP遊離増加が認められた。

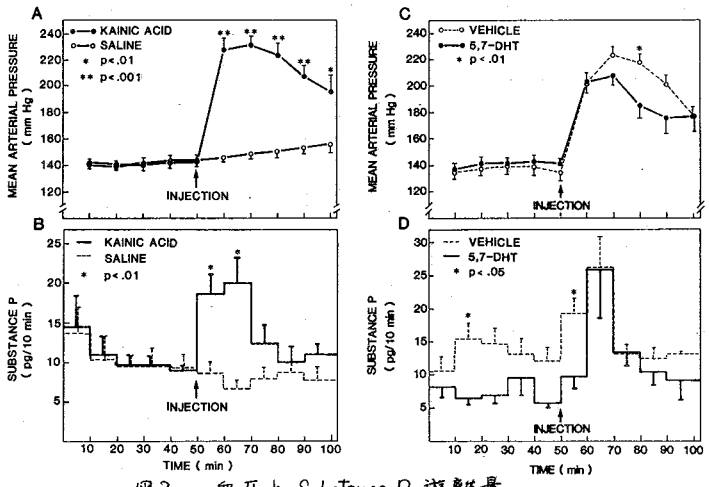


図2　血圧とSubstance P遊離量

2) ^{3}H-Substance P結合実験；

延髄腹側部に細胞体を持つSubstance Pニューロンは IMLに終末を形成していると考えられているので（3）、脊髄のIML切片を用いてSubstance P受容体の性質を調べた。Scatchard解析よりSubstance P受容体は単一のBinding siteをもつことが示された（K_D=1.28 nM，Bmax=22.2 fmol/mg protein，図3）。

図4にSubstance Pとアミノ酸配列の類似したTachkininによる阻害効果について示した。IC_{50}は以下の値のようである。すなわちSubstance P=1.7×10^{-9}, Physalamin=8.0×10^{-9}, Substance K=5.0×10^{-7}, Eledoisin=8.0×10^{-7}, Kassinin=1.6×10^{-6}, ［D-Pro^4, D-Trp^{9}］Substance P(4-11)=9.0×10^{-6}(M)。次にIMLが交感神経節前神経の主な源であることから（1），我々はguanethidineによる交感神経破壊を行ないIMLのSubstance P受容体について検討した。

guanethidine 処置ラットでは脊髄IMLのみが対照ラットに比べて ^{3}H-Substance 結合量が有意に減少していた(34%, $P<0.005$)。脊髄の他の部位後角(Dorsal Horn)、前角(Ventral Horn)および脳線条体の ^{3}H-Substance P結合量は変化がなかった。IMLによる ^{3}H-Substance Pの結合量の減少は、図3に示されるようにBmaxの減少で、K_Dには変化はなかった。同時に形態的観察より、IMLにおける神経細胞の数、面積ともにguanethidine処置により有意に減少していた(対照群; 222±19 cell/mm^2, 229±11 μm^2, guanethidine処置群; 162±5 cell/mm^2, 157±12 μm^2)。

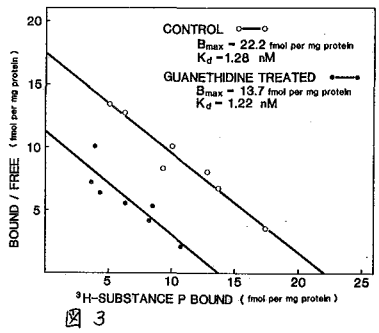


図3

〔考　察〕

カイニン酸による延髄腹側部刺激にともなって、血圧が上昇し、同時に脊髄灌流液中のSP遊離量が増加したことから、延髄腹側部から脊髄IMLに投射している下行性Substance Pニューロンが血圧調節に関与している可能性が示唆された。しかもこれらの反応は5,7-DHT処置によっても影響をうけなかったことから、このニューロンはSubstance PとSerotonin共存ニューロンの可能性は少ないと思われる。またIMLには高親和性のSubstance P受容体が存在し、Physalaeminに対してより親和性のあるSubstance P-Pタイプ受容体と考えられる。そしてIMLのSubstance P受容体は交感神経破壊によって影響を受ける交感神経節前神経上に存在することが示唆され、中枢からの血圧調節の情報はこの受容体を介していると考えられる(図5)。

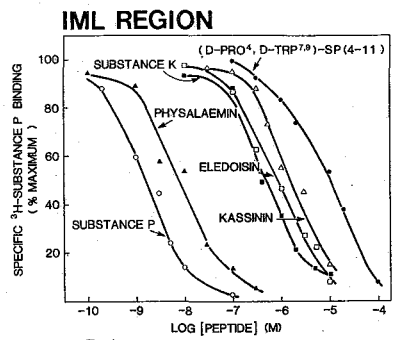


図4

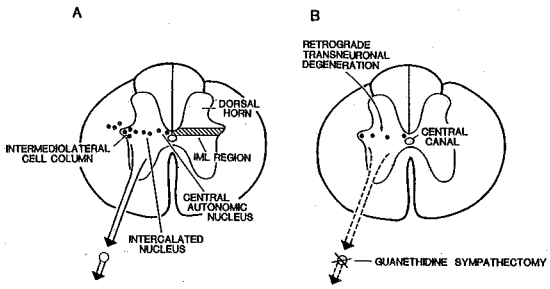


図5

〔謝辞〕本研究において Substance P抗体(RAG-3)を提供し、御指導をあおぎましたDr. S. E. Leemanに深謝いたします。

〔文　献〕

1) Chung,J.M., Chung,K. and Wurster,R.D., Brain Res. 91 (1975) 126-131.
2) Gilbey,M.P., McKenna,K.E. and Schramm,L.P., Neurosci. Lett. 41 (1983) 157-159.
3) Helke,C.J., Neil,J.J., Massari,V.J. and Loewy,A.D., Brain Res. 243 (1982) 147-152.
4) Loewy,A.D. and Sawyer,W.B., Brain Res. 245 (1982) 379-383.
5) Mroz,E.A. and Leeman,S.E., Substance P, Academic Press (1979) 121-137.
6) Quirion,R., Shults,C.W., Moody,T.W., Pert,D.B., Chase,T.N. and O'Donohue,T.L., Nature 303 (1983) 714-716.
7) Takano,Y., Martin,J.E., Leeman,S.E. and Loewy,A.D., Brain Res. 291 (1984) 168-172.
8) Takano,Y. and Loewy,A.D., Brain Res. (1984) in press.

128 Effects of alpha-fluorometylhistidine on ACTH, Vasopressin, and Oxytocin in the Hypothalamo-Hypophyseal System and Plasma.

R. Cacabelos （阪大・医・精神科）・大和谷厚・渡辺建彦（同・Ⅱ薬理）
高木 哲・谷沢 修（同・産婦人科）・播口之朗・西村 健（同・精神科）
和田 博（同・Ⅱ薬理）

〔要 約〕

SUMMARY

The effects of alpha-fluoromethylhistidine on the levels of ACTH, vasopressin and oxytocin in the hypothalamo-hypophyseal system and plasma of adrenalectomized rats were examined. Long-term administration of alpha-fluoromethylhistidine at a dose of 100 mg/kg/day i.p. prevented the increases of plasma ACTH, vasopressin, and oxytocin observed in untreated animals when examined 7 days after adrenalectomy. This drug seemed to inhibit both the syntheses of the neuropeptides in the anterior hypothalamic region and the releases of vasopressin and oxytocin from the neurohypophysis. On the contrary, it increased the levels of vasopressin and oxytocin in the posterior hypothalamic region. Since this drug specifically inhibits histidine decarboxylase, these findings provide indirect evidence that histamine plays an important role as a comodulator between the corticotropinergic and vasopressinergic systems in physiological conditions.

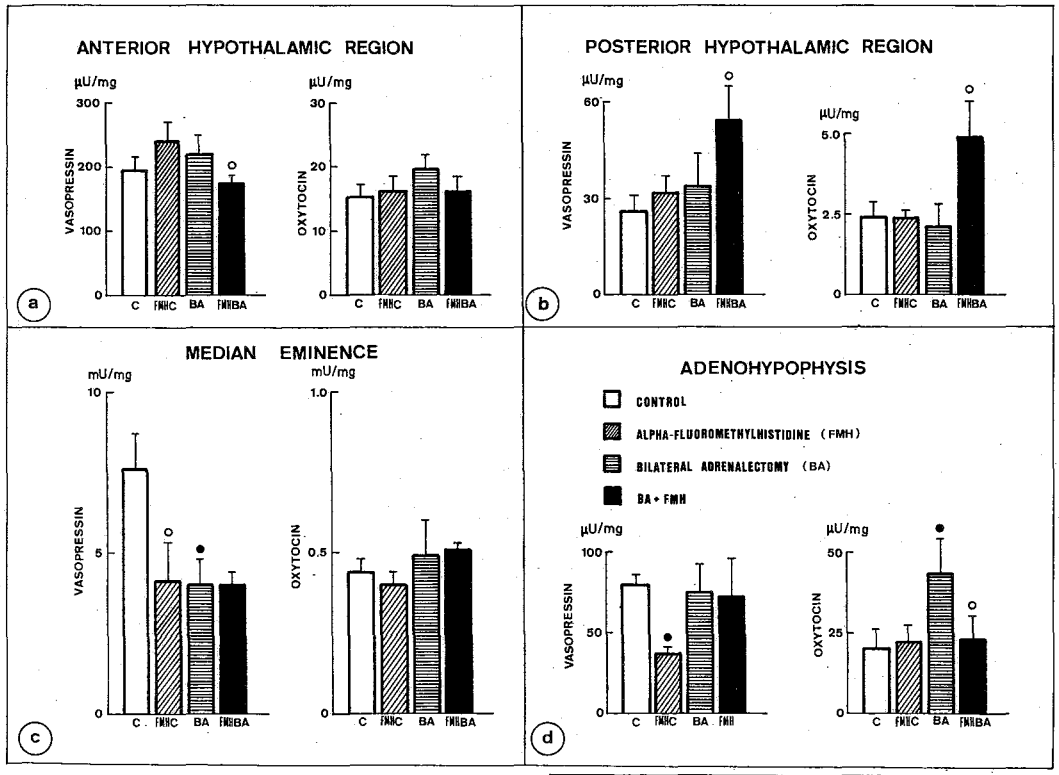
Key words : ACTH, vasopressin, oxytocin, hypothalamo-hypophyseal system, plasma, adrenalectomy.

INTRODUCTION

The concentration of histamine (HA) in the hypothalamo-hypophyseal system (HhS) is known to change after adrenalectomy (2,3). It is also known that HA is a potent vasopressin releaser (4,9). On the basis of a cybernetical model, it was proposed that HA acts as a comodulator between the corticotropinergic and vasopressinergic systems. To verify this hypothesis by biological methods, we studied the chronological changes of ACTH, vasopressin (VP), and oxytocin (OT) in the HhS and plasma of adrenalectomized rats treated with alpha-fluoromethylhistidine (FMH), a specific inhibitor of histidine decarboxylase, that reduces the neuronal histamine level to nearly zero (7).

MATERIALS AND METHODS

Female Wistar rats weighing 150 to 200 gr were treated with alpha-fluoromethylhistidine (FMH) at a dose of 100 mg/kg/day i.p. from 5 days before adrenalectomy (BA). Animals were sacrified under pentobarbital anesthesia (40 mg/kg i.p.) 1 hr, 1 day, and 7 days after surgical intervention at 10:00 a.m. Blood was taken from the abdominal aorta and mixed with 50 µl/ml of ortho-phenanthroline solution. Then brain was removed and the HhS was cut in five blocks: (1)anterior hypothalamic region (AHR); (2)posterior hypothalamic region (PHR); (3)median eminence (ME); (4)adenohypophysis (Ah); and (5)neurohypophysis (Nh). Brain tissue was homogenized in 1 ml of 0.25% acetic acid and tissue samples, as well as plasma, were stored at -80°C until assayed. Plasma ACTH was determined by radioimmunoassay (RIA) using an ACTH-kit purchased from CEA through the APAM-Green Cross. The contents of VP and OT in the HhS and plasma were determined by the RIA system developed in our laboratory (10).



RESULTS

Concentration of vasopressin in the hypothalamo-hypophyseal system

Seven days after bilateral adrenalectomy, VP was decreased 19.8% in the AHR (fig.1a) and increased 71.1% in the PHR (fig.1b) relative to the levels in BA animals. In animals adrenalectomized FMH does not seem to exert any significant effect on VP in the ME (fig.1c). On the contrary, FMH tends to increase the levels of VP in the Nh (88.3%)(fig.1e).

Concentration of oxytocin in the hypothalamo-hypophyseal system

The changes in OT in the AHR (fig.1a), PHR (fig.1b), and ME (fig.1c) were rather similar to those of VP. In the Ah the OT level in animals after BA and treatment with FMH was lower than that in animals after BA only (fig.1d). No significant change was found in the level of OT in the Nh after these treatments (fig.1e).

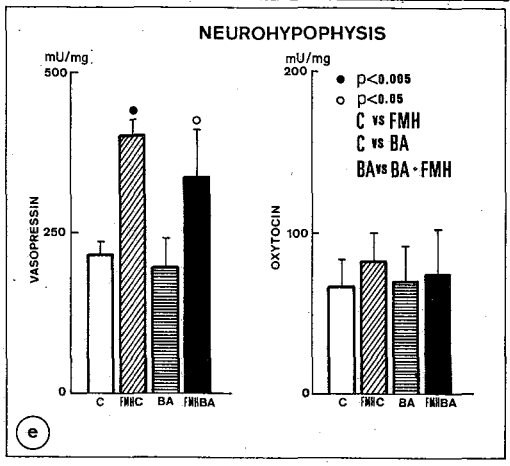


FIGURE 1.-Concentrations of vasopressin and oxytocin in the hypothalamo-hypophyseal system of controls (C), animals treated with alpha-fluoromethylhistidine (FMH), animals bilaterally adrenalectomized (BA), and animals treated with FMH and adrenalectomized (FMH+BA).

Concentration of ACTH, vasopressin, and oxytocin in the plasma

The plasma ACTH, VP, and OT were decreased 93.72%, 55.86%, and 36.68%, respectively, seven days after BA in animals treated with FMH (fig.2a,b).

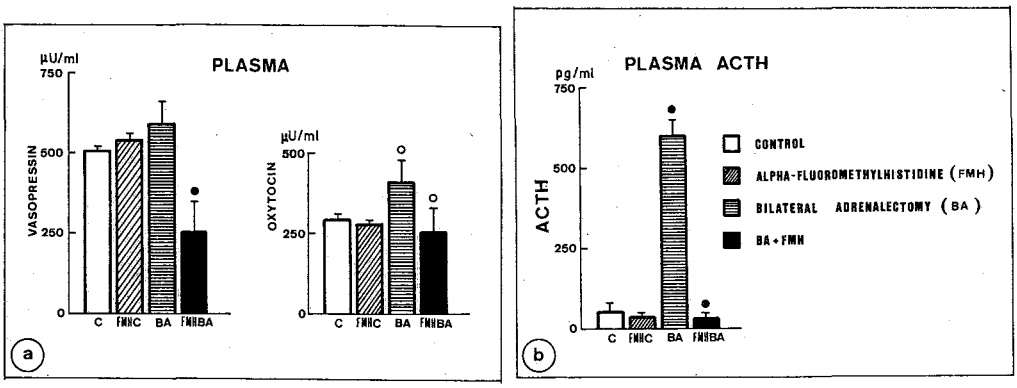


FIGURE 2.-Concentrations of vasopressin, oxytocin, and ACTH in plasma.

Controls

FMH produced a significant increase ($p \leq 0.005$) in the level of VP in the Nh (fig.1e) and decrease in the level of VP in the ME and Ah (fig.1c,d). No significant differences were found in the levels of VP, OT, and ACTH in other parts of the HhS or the plasma (fig.1a,b and 2a,b).

DISCUSSION

In bilaterally adrenalectomized animals the sequential changes of VP and HA in the HhS are almost mirror images. This fact suggests some relation of HA,VP, and ACTH. After long-term administration of FMH, the plasma levels of ACTH, VP, and OT were found to decrease. Inhibition of the syntheses of these neuropeptides was observed in the AHR, where the neurosecretory cells are located (1,6,8). Retention of the hormones in the Nh was also observed. This could mean that besides inhibition of the syntheses of these peptides at the hypothalamic level, there is also a block of their release from the Nh when the negative-feedback mechanism of the corticotropinergic system is broken, and, additionally, a load of FMH is added to impede the participation of HA in restoring the neuroendocrine homeostatic equilibrium lost by adrenalectomy. These results confirm that HA is an important biogenic amine for neuroendocrine function (5) and a comodulator of the association between the corticotropinergic and vasopressinergic systems for common actions shared by both axes.

REFERENCES

(1) BUIJS,R.M., Pharmac. Ther. 22:127-141 (1983).
(2) CACABELOS,R. et al., Bull. Jpn. Neurochem. Soc. 22:342-344 (1983).
(3) CACABELOS,R. JANO Medicina y Humanidades, (in press) (1984).
(4) DOGTERON,J. et al., Experientia 15:659-660 (1976).
(5) DONOSO,A.O., ALVAREZ,E.O., Trends in Pharmacol. Sci. 5:98-100 (1984).
(6) FUX,K. et al., In: The renin-angiotensin system in the brain; GANTEN et al Eds. Springer-Verlag, Berlin. pp.208-232 (1982).
(7) MAEYAMA,K. et al., J.Neurochem. 41:128-134 (1983).
(8) SWANSON,L.W. et al., Neuroendocrinol. 36:165-186 (1983).
(9) TUOMISTO,L. et al., Eur.J.Pharmacol. 63:15-24 (1980).
(10) YAMAJI,K. et al., Psychoneuroendocrinol. 6:347-353 (1981).

129　向精神薬投与後のラット脳内サブスタンスPの変化

三ツ汐　洋・高嶋端夫・融　道男
（国立神経センター・疾病Ⅲ）

〔要　約〕

脳内サブスタンスP（SP）に対する向精神薬の影響をラットを用いて検討した。L-DOPA急性投与では黒質と線条体でSPは減少し、ハロペリドール（HAL）の併与はこれを一部回復した。メタンフェタミンはほぼ用量依存的に線条体のSPを減少させたが、黒質のSPには影響を与えなかった。HALは急性投与では影響を与えず、40日間投与で黒質および線条体でSPを減少させたが80日間投与後ではこれは回復する傾向がみられた。トリヘキシフェニディールは急性投与でも慢性投与でもSPに影響を与えず、HALと併与してもHALによるSPの変化に影響しなかった。カルバマゼピン（CBZ）は慢性投与で黒質および線条体でSPを用量依存的に増加させ、HALの併与はこれに拮抗した。以上の変化はドーパミン（DA）系と関連の少ない縫線核領域ではみられなかった。これらのことから、DAニューロンに作用する薬物によるSPの変化がコリン系ニューロンを介している可能性は少なく、DAアゴニストによるSPの変化にコリン系が関与しているとする従来の見解を支持することができなかった。CBZはリチウムと同様に躁うつ病相の予防効果を持つが、リチウムでも慢性投与でSPの増加作用が報告されており、興味深い事実と思われる。

Key words：　Substance P,　Psychotropic drugs,　Rat brain

サブスタンスP（SP）は中枢神経系において神経伝達物質、あるいは神経修飾物質として働いていると考えられるが、その脳内における機能についてはまだ充分明らかにされていない。今回数種の中枢神経系に働く薬物を急性あるいは慢性に投与して脳内SPに対する影響を検討したので報告する。

［方法］

実験にはWistar系雄性ラットを用いた。脳は0°Cの冷凍箱内で速やかに取り出し−80°Cで凍結保存した。既報[4]に従って線条体、黒質、縫線核領域を−15°Cの冷凍箱内で切り出しRIAで測定した。用いたSP抗血清はSPのC端フラグメントとは交叉せず、SPのMet残基の酸化型にも還元型にもほぼ同等の反応性を示した。ラット全脳抽出物をHPLCで分画して測定したところ、免疫反応性はSP$_{(1-11)}$の位置のみにみられた。

薬物投与方法　1．L-DOPA急性投与：L-DOPAをメチルセルロースに懸濁し、250mg/kg または500mg/kg を腹腔内投与し、2時間後に断頭した。またハロペリドール（HAL）1mg/kgをL-DOPA 500mg/kgと併用投与した群を設けた。このとき同時に行動の観察を行った。すべての群にL-DOPA投与前30分に benserazide 5mg/kgを腹腔内に投与した。　2．メタンフェタミン（MAP）急性投与：MAPを2,4,6,10mg/kg 腹腔内に投与し、30分後に断頭した。また6mg/kgでは、投与後15分後と120分後、10mg/kgでは120分後に断頭する群を設けた。このとき同時に行動観察を行った。　3．HAL，トリヘキシフェニディール（TR），カルバマゼピン（CBZ）の単独あるいは併用投与：急性投与群はHALとTRは1mg/kg，CBZは

50mg/kgを単独あるいはＨＡＬ＋ＴＲ，ＨＡＬ＋ＣＢＺとして腹腔内に投与した。慢性投与群は、飼料 1kgにＨＡＬ 50mg，ＴＲ 50mg，ＣＢＺ 1.25，2.5，5，10 gを混入し、急性投与群と同じく単独あるいは併用投与し、40日間もしくは80日間飼育し断頭した。薬物摂取量は表4，表5 に示した。

表１．L-DOPA腹腔内投与２時間後のラット脳内ＳＰ量

MEAN±SEM (fmol/mg prot.)

	Striatum	Substantia Nigra	Raphe	N
Control	647±58	4230±280	1440± 66	7
DOPA 250	491±55	3400±200*	1420± 46	6
DOPA 500	413±27*	2680± 87***	1290± 31	6
DOPA 500 + HAL 1	456±28	3060±160**	1330± 67	6

***: p<0.001, **: p<0.01, *: p<0.05 vs. Control

［結果］

１．L-ＤＯＰＡ急性投与では線条体および黒質で用量依存性のＳＰの減少がみられ、この変化は黒質で大きかった（表１）。ＨＡＬの併用投与はこれを一部回復した。縫線核領域では有意の変化はなかった。このときL-ＤＯＰＡ250mg/kgでは移所行動の増加がみられ、500mg/kgではすべての動物で常同行動がみられ、ＨＡＬとの併用投与群では常同行動はみられなかった。　２．ＭＡＰ急性投与では、ＤＡニューロン終末のある線条体においてのみ変化がみられた。常同行動の出現しないＭＡＰ 2mg/kgで18%減少し、常同行動が出現する4，6，10 mg/kgでは用量依存性に 12，16，21%の減少がみられた（表２）。ＭＡＰ 6mg/kg投与では、15分後の常同行動の始まる時点では 27%、30分後は16%減少していたが、常同行動の終了した 120分後にはこの減少は回復していた。一方ＭＡＰ 10mg/kgでは120分後でも常同行動が続いており、このとき23%の減少がみられた（表３）。ＭＡＰは黒質のＳＰには影響を与えなかった。

表２．メタンフェタミン腹腔内投与３０分後の脳内ＳＰの用量依存性変化

MEAN±SEM (fmol/mg prot.)

	Striatum	Substantia Nigra	N
Saline	435±18	2950±220	7
MAP 2	355±13***	2640±110	8
MAP 4	383±25*	2850±230	7
MAP 6	366±18**	2870±270	8
MAP 10 mg	345±13****	2560±190	7

*: p<0.05, **: p<0.02, ***: p<0.005, ****: p<0.002 vs. Saline

表３．メタンフェタミン腹腔内投与後の脳内ＳＰの時間経過による変化

	Striatum			Substantia Nigra		
(min)	15	30	120	15	30	120
Saline	416±20	435±18	394±22	2860±160	2950±220	2630±120
MAP 6	305±16***	366±18*	432±25	2540±170	2870±270	2660± 96
MAP 10	—	345±13**	302±23*	—	2560±190	2820±360

MEAN±SEM (fmol/mg prot.) *: p<0.05, **: p<0.002, ***: p<0.001 vs. Saline

３．ＨＡＬ，ＴＲ，ＣＢＺの急性投与では線条体、黒質、縫線核のいずれの部位でも変化はみられなかった。慢性投与では線条体と黒質でほぼ同様の変化があった。40日間投与でＨＡＬは線条体で 17%、黒質で 29%ＳＰを減少させたが、80日間投与後にはこの減少は消失していた。ＴＲは慢性投与でも変化はみられなかった。ＨＡＬとＴＲの併用投与はＨＡＬ単独と同様の変化を示した。ＣＢＺ 5gでは 40日間投与で線条体 18%，黒質 20%、80日間ではそれぞれ 15%，43%の増加を示し、ＨＡＬの併与はこの増加に　抗していた（表４）。また、ＣＢＺの投与量展開では 40日間投与後で用量依存性のＳＰの増加がみられた（表５）。縫線核領域では、慢性投与でもＳＰの有意な変化はみられなかった。

表4．ハロペリドール、トリヘキシフェニディール、カルバマゼピンの40日間および80日間慢性投与後の脳内SP量　MEAN±SEM (fmol/mg prot.)

	40 Days				80 Days		
	Drug Intake	Striatum	Substantia Nigra	Raphe	Drug Intake	Striatum	Substantia Nigra
Control	(mg/kg/day)	551±26	3310±160	2110±130	(mg/kg/day)	566±15	2970±190
HAL	4.1	455±25[a]	2340± 95[c]	2130± 97	3.5	542±30	2490±130
HAL+TR	3.9+3.9	399±22[b]	2380±140[c]	1970±140	2.7+2.7	504±34	2730± 74
TR	4.1	534±29	3230±120	2070± 74	3.7	601±41	3190±190
HAL+CBZ	3.8+380	469±20	2690± 80[d,e]	2160±160	4.4+440	496±22	2830±170
CBZ	440	648±17[a]	3970±120[d]	2280± 66	390	649±37[f]	4240±290[g]

表5．カルバマゼピン40日間慢性投与後の脳内SPの用量依存性変化　MEAN±SEM (fmol/mg prot.)

	Drug Intake	Striatum	Substantia Nigra	Raphe
Control	(mg/kg/day)	509±11	3040±170	1660±110
CBZ 1.25	95	474±22	3320±180	1410± 41
CBZ 2.5	210	521±16	3620±130*	1810± 90
CBZ 5	390	555±16*	3550±140*	1570± 87
CBZ 10	640	686±49***	4580±300**	2030±110*

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.005 vs. Control

a: p<0.05 vs. Control
b: p<0.01 vs. Control or TR
c: p<0.001 vs. Control or TR
d: p<0.01 vs. Control
e: p<0.01 vs. CBZ
f: p<0.05 vs. HAL+CBZ
g: p<0.005 vs. others

［考察］

ドーパミン（DA）アゴニストのSPに対する作用に関しては、apomorphineによって黒質で減少し線条体では変化がないこと[1]，d-amphetamineでは黒質で変化なく線条体で減少すること[5]が報告されているが、今回MAPではd-amphetamineと同様に線条体のみで減少し、L-DOPAでは線条体と黒質の両部位で減少することが見出された。これらの事実はDA終末部に選択的に働くアゴニストは線条体のみに、選択性のないアゴニストはむしろ黒質に強く働くことを示唆すると考えられる。SPの変化と行動との関係については、今回の結果からは明らかな関連は見出せなかった。一方DAのアンタゴニストのHALは、急性投与ではSPを変化させず、Hongらの報告[2]どおり40日間の投与では減少がみられたが、80日間の長期投与後には回復する傾向のあることが分かった。TRがHALによるSPの変化に影響を与えなかったことは、DA受容体に作用する薬物によるSPの変化に、コリン性ニューロンが介在している可能性は少なく、Hongら[2]の慢性投与したクロザピンが黒質のSPを変化させないことからDAアンタゴニストによるSPの変化にはコリン系が関与しているとする見解は、われわれの実験からは必ずしも支持できなかった。CBZは臨床的には抗てんかん薬として知られているが、最近ではリチウムと共に躁うつ病相の予防効果を持つことが知られている。両者ともその作用機序は不明であるがリチウムも線条体や黒質などのDAと関連した部位で慢性投与でSPを増加させること[3]が知られており、SPに対して共通の作用を持つことは興味深いと思われる。

［文献］1) Hanson, G. et al. (1980) Neuropharmacol. 20, 541-548
2) Hong, J. S. et al. (1978) Neuropharmacol. 17, 83-85
3) Hong, J. S. et al. (1983) J. Pharmacol. Exp. Ther. 224, 590-593
4) 三ッ汐 洋 他 (1983) 精神薬療基金研究年報, 15, 192-198
5) Pettibone, D. J. et al. (1980) Brain Res. 186, 409-419

130　精神分裂病死後脳，前頭前野，側頭葉，辺縁系のコレシストキニン免疫活性

渋谷治男・深間内文彦・高橋　良（東医歯大・医・神経科）
三ツ汐洋・野田恭平・高嶋端夫
（国立神経センター・疾病Ⅲ）
〔要　約〕　市川宏伸（都梅ケ丘病院）・融　道男（国立神経センター・疾病Ⅲ）

精神分裂病死後脳13例（男8，女5，DSM-Ⅲ分類：解体型8，緊張型1，妄想型1，未分化型3）と対照群10例（男7，女3）を用いて前頭前野（内側前頭皮質，眼窩前頭皮質，眼球運動領域および眼窩皮質），側頭葉（外側後頭側頭回，中および下側頭回，上側頭回），辺縁系（梨状葉皮質前部および後部，島）のcholecystokinin(CCK)免疫活性を測定した。前頭前野について水抽出液中CCK免疫活性（主にCCK-8）と酸抽出液中免疫活性（CCK-8を含むより分子量の大きいCCK）を測定した結果分裂病群眼窩前頭皮質のCCK-8免疫活性が有意に増加していた。非服薬群の酸抽出液中CCK免疫活性は有意に減少していた。そこで眼窩前頭皮質の水抽出液と酸抽出液のCCK免疫活性の比を対照群と比較すると有意に増加していた。このことは分裂病者眼窩前頭皮質のCCK代謝に何らかの変化があることを示唆している。側頭葉皮質，梨状葉皮質，島のCCK免疫活性は分裂病群と対照群の間に差がなく，分裂病側頭葉皮質でCCK免疫活性が低下しているというRobertsらの知見は確認できなかった。CCK免疫活性と既に報告した脳内測定物質との相関の検定から，多くの脳部位でCCKがMet-Enkephalinやsubstance-Pと正の相関を，グルタミン酸と負の相関を有することが示された。

Key words：　post-mortem schizophrenic brain, cholecystokinin immunoreactivity
water and acid extraction,

中枢神経系のcholecystokinin（CCK）は機能的，解剖学的にドーパミンと密接な関係を有することから，CCKの欠乏がドーパミン系の過剰活動を起こし，分裂病の病態につながるのであろうとの考えがある。CCKの生成はprogastrinからCCK-58，CCK39，CCK-33，CCK-8へと分解され脳内では大部分がCCK-8である。我々は水抽出法，酸抽出法を用いて，前者で主にCCK-8を後者でCCK-8を含まないより分子量の大きなCCKを抽出できることを確認したので，分裂病者死後脳の前頭前野のCCK免疫活性を両抽出法を用いて，側頭葉，梨状葉皮質，島のCCK免疫活性を水抽出法を用い測定検討してみた。

〔対象と方法〕　分裂病者男8，女5の計13例（Table 1）の死亡時平均年令は60.1才であった。DSM-Ⅲ分類で解体型8，緊張型1，妄想型1，未分化型3例からなり，うち7例は死亡前40日間は抗精神病薬を服用していなかった（非服薬群）。対照群（Table 2）は10例で死亡時平均年令は66.7才であった。死亡から脳凍結までの時間は分裂病群11.3±2.1，対照群5.3±1.2時間であり分裂病群が6時間長かった（$P<0.05$）。

脳の分割法：　脳はクライオカット（-10°C）を用いて連続切片を作製し，冷凍箱内（-15°C）で各領域を切り出した。前頭前野皮質は視床背内側核からの投射を考慮して内側前頭皮質（Brodmannの領野9.10.46），眼窩前頭皮質（領野45.47），眼窩皮質（領野11.12），眼球運動領域（領野8）を取り出した。大脳辺縁系として梨状葉皮質前部（領野28.34）梨状葉皮質後部（領野28の一部と27.35）島皮質を得た。側頭葉皮質は上側頭回（領野22.38.41.42.52）中および下側頭回（領野20.21）外側後頭側頭回（領野36）を切り出した。取り出した脳組織を3倍容の氷冷0.32M庶糖溶液を加え，ポリトロンホモジナイザーでホモジネートを作り，100°C 20分間煮沸して-80°Cに保存した。

TABLE 1. Case History of Schizophrenic Patients

	Age	Sex	Type and course (DMS-III)	Cause of death
△S1	50	M	disorganized	Myocardial infarction
△S2	62	F	undifferentiated type, subchronic with acute exacerbation	Myocardial infarction
△S3	41	M	catatonic type, chronic with acute exacerbation	Pneumonia, Convulsions
▲S5	46	F	paranoid type chronic	Sudden death
▲S6	54	M	undifferentiated	Spinal caries panperitonitis
▲S7	64	F	disorganized type, chronic	Cardiac thrombosis
△S11	70	M	disorganized type, chronic	Myocardial infarction
▲S12	69	M	disorganized type, chronic	Cardiac failure
△S13	73	M	disorganized	Stomach cancer
▲S14	53	F	disorganized type, chronic	Ovarian cancer
▲S15	68	M	undifferentiated type, chronic	Suffocation
△S16	75	F	disorganized type, chronic	Pancreatic cancer
△S17	56	M	disorganized type, chronic	Pneumonia, Respiratory insufficiency

TABLE 2. Case History of Controls

	Age	Sex	Cause of death
C1	53	M	Sudden death, Convulsion
C3	67	M	Ileus
C4	73	M	Pancreatic cancer, G.I.tract bleeding
C5	52	F	Breast cancer
C7	71	F	Renal failure, Cardiac failure
C11	73	M	Colon cancer
C12	61	M	Lung cancer, Renal failure
C14	74	F	Pancreatic cancer
C15	69	M	Common bile duct cancer
C16	74	M	Disseminated intravascular coagulation

▲:on drug △:off drug

測定法：10倍あるいは20倍量の水を加え稀釈した木モジネートを100°C 20分間煮沸後超音波破砕し、遠心(16000×g 30分)して水抽出液を得た。沈渣に0.5N酢酸を加え超音波破砕、遠心して酸抽出液を得．水および酸抽出液中のCCK免疫活性をRIAにより測定した。RIAは標準CCK-33(0.6から10,000 fmol/tube)あるいは抽出液，CCK抗血清(最終稀釈12,000倍)，^{125}I-CCK-33(20,000 cpm/tube)を含む緩衝液(0.05 M Na_2HPO_4, 0.02 M EDTA-2Na, 0.25% BSA, 0.05% NaN_3, pH 7.6)総量500 μlとして4°Cで2日間インキュベーションした後第2抗体法でB・F分離を行った。使用したCCK抗血清は標準CCK-8(sulfated)，CCK-33に等しく感受性を示すが，交叉感受性はCCK-39に84.6%，CCK-8(non-sulfated)，caerulein，CCK-4，gastrin 17-Iには0.01%以下である[1]。CCK-33の最小感受性は10 fmolである。Sephadex G-50カラムを用いてラット脳CCK免疫活性の組成を調べると，水抽出液中のCCK免疫活性は68.3%がCCK-8に相当し，CCK-33は含まれない(以下水抽出液中の免疫活性をCCK-8と呼ぶ)。一方酸抽出液中にはCCK-8は検出されず，23.3%がCCK-33に相当し残りはより分子量の大きな不明の物質であった(以下酸抽出液中の免疫活性をCCK-33と呼ぶ)。測定値の検定はMann-Whitneyの U-testで行い，相関係数の算出にはSpearmanの順位相関を用いた。

TABLE 3. CCK-like Immunoreactivity in Frontal Cortex of Post-mortem Schizophrenic Patients

	Medial Frontal Cortex	Orbito-frontal Cortex	Eye Movement Area	Orbital Cortex
CCK-8				
Control	2372±115 (9)	1339±150 (8)	1707±134 (6)	1949±113 (8)
Schizophrenic	2704±225 (12)	1851±171 (12)*	1742±201 (11)	2305±198 (11)
Off Drug	2717±403 (6)	1736±219 (6)	1560±220 (6)	2291±327 (5)
On Drug	2693±245 (6)	1967±275 (6)	1961±359 (5)	2317±269 (6)
CCK-33				
Control	427±25 (9)	587±33 (8)	300±35 (6)	463±35 (8)
Schizophrenic	481±32 (11)	497±27 (11)	345±30 (10)	386±42 (10)
Off Drug	438±52 (5)	471±23 (5)**	340±58 (5)	390±106 (4)
On Drug	518±37 (6)	519±47 (6)	349±28 (5)	383±30 (6)

Mean±SEM f mol/mg protein, *p<0.05 vs. Control, **p<0.02 vs. Control.

[結果] Table 3, 4を参照。1) 前頭前野皮質のCCK-8は分裂病群の眼窩前頭皮

質で有意に増加していた。しかし、内側前頭皮質、眼球運動領域、眼窩皮質については差異は認めなかった。分裂病服薬群、非服薬群の間にも差がなかった。2）眼窩前頭皮質のCCK-33は分裂病非服薬群で対照群に比較し有意に減少していた。3）側頭葉皮質、梨状葉皮質および島のCCK-8は対照群と分裂病群の間に有意な差は認めなかった。しかし中下側頭回皮質においては分裂病服薬群の値が対照群よりも高い値を示した。

TABLE 4. CCK-8-like Immunoreactivity in Limbic and Temporal Cortex of Post-mortem Schizophrenic Patients

	Control	Schizophrenic
Pyriform Cortex		
Anterior	1642±225 (7)	1513±259 (7)
		Off 1046±265 (3)
		On 1863±323 (4)
Posterior	784±122 (9)	1317±401 (8)
		Off 804±128 (4)
		On 1831±746 (4)
Insula	972±163 (8)	1417±577 (5)
		Off 718±167 (3)
		On 2467 (2)
Temporal Cortex		
Occipitolateral	1977±203 (9)	2771±559 (7)
		Off 1994±198 (4)
		On 3806±1081(3)
Inf. and Med.	1946±211 (8)	2631±243 (7)
		Off 2234±190 (4)
		On 3161±311 (3)*
Superior	1386±133 (9)	1568±273 (8)
		Off 1305±286 (4)
		On 1831±469 (4)

Mean±SEM, f mol/mg protein, *p<0.02 vs Control

［考察］　前頭前野皮質におけるCCK-8は内側前頭皮質で最も多く、眼窩前頭皮質で低値を示した。しかしCCK-33分布はほぼCCK-8と平行せるほぼ均一であった。CCK-8/CCK-33の比は対照群で2.35～6.27の間にあり、眼窩前頭皮質で最も低値を示した。この比を分裂病群と対照群の間で比較してみると分裂病群眼窩前頭皮質のCCK-8/CCK-33のみが有意に増加していた。このことは分裂病眼窩前頭皮質でCCK代謝が低下していることを示唆しているのかもしれない。しかし、服薬群、非服薬群の間でCCK-8、CCK-33、CCK-8/CCK-33の有意な差は認めなかった。側頭葉皮質のCCK-8は分裂病者非服薬群で対照群と差異がない。抗精神病薬服用群で高い傾向を示した。このような所見は分裂病側頭葉皮質でCCK免疫活性が有意に低下していたとするRoberts ら[2]の報告と異なる。これは症例を増やし再検討することが必要であるか、抽出法やCCK抗血清の相違に由来するのかもしれない。既に報告した[3,4,5,6,7]測定物質とCCK免疫活性との相関を脳各部位で検定してみると、前頭前野皮質4部位のCCK-8は多くの場合Met-Enkephalin免疫活性と有意な正の相関を示した。その他眼窩前頭皮質においてsub-P免疫活性（sub-P）と、眼球運動領域ではカイニン酸結合Kdと正の相関を示した。眼窩皮質CCK-8は同部位および側頭葉皮質のsub-Pと正の相関を認めた。眼窩前頭皮質および眼球運動領域のCCK-33は尾状核、側坐核のチロシン水酸化酵素活性と負の相関を示した。梨状葉皮質前部、後部のCCK-8は辺縁系、視床尾状核のグルタミン酸と負の相関が、前頭前野皮質のCCK-8と正の相関があった。側頭葉皮質については、多くの脳部位のCCK-8、sub-P、チロシン水酸化酵素活性と正の相関を、グルタミン酸とは負の相関を認めた。このような所見はCCKがドーパミン代謝のみならずMet-Enkephalin, substance-Pと機能的関連を有することを示唆している。

CCK抗血清の恵与とご指導を頂いた大塚アッセイ研究所橋村悦朗博士に感謝致します。

［文献］. 1）Hashimura, E. et al (1982) J. Imm. Method, 155, 375　2）Roberts, G.W. et al (1983) Brain Res., 228, 199　3）渋谷治男（1983）臨床精神医学, 12, 713　4）融道男他.（1981）精神経誌 83, 430　5）融道男他（1982）精神経誌 84, 947　6）融道男他（1983）精神経誌 85, 527.　7）融道男他（1984）精神経誌 印刷中

131　精神分裂病死後脳，側頭葉，大脳辺縁系のdynorphin関連ペプチドおよび神経伝達物質の分析

市川宏伸（都梅ケ丘病院）　三ツ汐洋・野田恭平・
高嶋端夫・俣賀宣子・小川篤子・渡辺修三・
融　道男（国立神経センター・疾病Ⅲ）　松尾寿之
（宮崎医大・Ⅱ生化）

〔要　約〕

精神分裂病患者死後脳９例、対照群１０例を用いて海馬４部位、扁桃体２部位、梨状葉皮質２部位、側頭葉皮質３部位、島皮質の計１２部位について、神経伝達物質、神経ペプチドを測定した。Noradrenaline(NA), dopamine(DA),homovanillic acid(HVA),γ-aminobutyric acid(GABA),glutamic acid(Glu),choline acetyltransferase(CAT),substance P(SP),α-neoendorphin(α-NE),dynorphin(1-8)[PH-8P]を測定した。NA,DA,HVAは扁桃体において有意差はなかった。GABAは分裂病群の海馬後部で有意に低下していた。CATは分裂病群の扁桃体皮質内側核で有意な高値を示した。Gluは側頭葉の上側頭回において、分裂病群が有意に低下していた。SPは海馬アンモン角、梨状葉皮質で分裂病群が有意の高値を示した。α-NEは島皮質において分裂病群が有意の低下を示した。PH-8Pは梨状葉皮質後部において、分裂病群が有意の低下を示した。PH-8Pはα-NEと共にpreproenkephalinBに属し、組織化学的には脳内分布における大きな違いは見出されていない。対照群の値を用いて計算したα-NE/PH-8Pの濃度比は３－４であり、ラットの海馬、全脳での濃度比１－１，５よりも大きかった。

Key words : Dynorphin-related peptides, Neurotransmitters, Schizophrenic temporal lobe

側頭葉機能の脱落あるいは刺激により起こる精神症状は、錯覚、幻覚、記憶障害、人格障害、言語障害がある。これらの症状は側頭葉皮質とともに、海馬、扁桃体を含む大脳辺縁系に関係したものと考えられる。機能性精神病の一つである精神分裂病においても側頭葉皮質、大脳辺縁系機能の障害が想定されている。死後脳の生化学的分析の一環として、今回、側頭葉、大脳辺縁系について、神経伝達物質、神経ペプチドの分析を行った。

［対象と方法］　分裂病者９例（S2,3,5,7,11,12,15,16,17；男５、女４例：DSMⅢ分類：解体型５、緊張型１、妄想型１、未分化型２例）と対照群１０例（C1,3,4,5,7,11,12,14,15,16；男７、女３例）について分析を行った。これら分裂病者、対照者の背景については、既報[1]通りである。分裂病者群のうち、死亡前３５日以上抗精神病薬をのんでいなかった症例を非服薬群とした。

脳部位の分割：分析に用いた脳は、前方が側頭葉先端、後方が視床枕後端までの切片である。ｉ）側頭葉：Brodmann(BA)22,38,41,42,52を上側頭回、BA20,21を中、下側頭回、BA36を外側後頭側頭回として切出した。同時に島輪状溝より上方を島皮質として切出した。ii）扁桃体：扁桃体は、基底外側核群、皮質内側核群、中心核の３部位に分割し、前２部位を分析した。iii）海馬：海馬溝で境される歯状回を一塊として切出し、残りは海馬溝の入口部から水平の割面を作り、背側部はアンモン角として切出し、下方腹側部は側脳室の延長上までの皮質を海馬支脚とした。脳弓後端より後方に位置する海馬は、海馬後部として切出した。iv）梨状葉皮質：BA28,34を前部とした。BA28野の一部と27,35野が含まれる部位を後部とした。

測定法：NA，DA，HVA，GABA，Glu，CAT，SP，α-NEは既報[1,3,4]で測定した。PH-8P様免疫活性は、α-NEに準じて測定し，蛋白はLowry法によった。PH-8Pはα-NEと免疫交差活性を認めなかった。

表１．分裂病(S)，対照(C)の側頭葉、島皮質における伝達物質の変化

		Temporal gyrus			Insula
		Superior temporal gyrus	Medial and inferior temporal gyrus	Lateral occipito-temporal gyrus	
Glutamic acid	C	36.09±2.41(10)	36.17±2.23(10)	30.73±2.27(10)	34.27±1.54(8)
(n moles/mg protein)	S	29.28±2.32(9)*	35.01±1.51(9)	31.51±3.03(9)	30.15±2.09(6)
Substance P	C	30.9±7.99(10)	35.4±2.90(10)	42.9±3.83(10)	57.4±8.75(8)
(f moles/mg protein)	S	35.6±4.62(9)	41.3±5.04(9) on:51.8±7.64(4)*	50.3±6.45(9) on:64.9±9.96(4)*	53.5±6.77(6)
α-Neoendorphin	C	101.9±62.5(10)	119.0±54.4(10)	191.2±76.5(10)	127.0±29.8(8)
(f moles/mg protein)	S	10.3±2.9(8)	22.3±6.2(9)	46.2±10.1(9)	58.7±4.0(6)*** on:63.2±7.0(3)* off:54.1±3.0(3)***
Dynorphin (1-8) (PH8P)	C	25.6±4.4(9)	31.5±5.5(10)	57.8±11.1(10)	
(f moles/mg protein)	S	18.6±2.1(9)	23.2±2.3(8)	41.9±5.2(9)	

*P<0.05, ***p<0.01

［結果と考察］

（表１-３参照）NA，DA，HVAは扁桃体２部位で測定したが、有意差は見出せなかった。GABAは、今まで有意差を見出したことはなかったが、今回の測定で海馬後部で有意に低い値が認められた。辺縁系のうち扁桃体のGABAの低下は報告されている[2]が、海馬の変化については知られていない。しかし、側坐核、視床などで報告された減少と同方向の変化であった。Gluも従来の測定で差がみられなかった物質の一つであるが、測定値を内側前頭皮質の^{3}H-カイニン酸受容体特異結合との間で相関をみると、脳内のかなりの部位のGluとの間に有意な負の相関が認められたことから、分裂病脳では神経伝達物質として働いているGluのプールに減少があると推定される上側頭回のGluの値は年齢と正の、死後凍結までの時間とは負の相関があったのでデータの意味づけは慎重を要する。CATはSpokes[2]が多数例の死後脳１０部位で対照との間に差がないと報告している。

表２．分裂病(S)，対照(C)の海馬の伝達物質の変化

		Hippocampus			
		Dentate gyrus	Cornu Ammonis 1-3	Subiculum	Posterior portion
γ-Aminobutyric acid	C	41.21±3.70(10)	35.50±2.14(10)	29.55±2.33(10)	32.12±2.21(10)
(n moles/mg protein)	S	31.51±2.88(9)	35.26±2.77(9)	30.01±3.39(9)	24.07±1.63(7)*
Glutamic acid	C	36.55±2.25(10)	35.67±2.21(10)	49.77±1.90(10)	48.43±3.84(9)
(n moles/mg protein)	S	36.49±3.53(9)	34.31±2.88(9)	48.63±3.51(9)	38.97±3.30(7)
Choline acetyltransferase	C	16.2±4.1(10)	16.6±1.4(10)	11.9±1.5(10)	15.9±1.6(9)
(n moles/hr/mg protein)	S	14.1±3.2(9)	19.0±4.6(9)	12.3±1.8(9)	12.5±2.0(7)
Substance P	C	239±25.7(10)	154±12.0(10)	113±10.2(10)	157±15.0(9)
(f moles/mg protein)	S	311±45.1(9) on:419±45.0(4)**	254±39.4(8)* on:328±56.9(4)**	139±15.6(9) on:177±14.3(4)**	125±20.6(7)
α-Neoendorphin	C	688.5±284.9(10)	199.0±58.6(10)	121.0±50.1(10)	404.8±148.9(9)
(f moles/mg protein)	S	423.0±127.5(9)	168.4±18.3(9)	119.0±19.7(9)	264.7±84.2(7) on:127.2±19.0(3)**
Dynorphin (1-8) (PH8P)	C	109.8±13.1(10)			
(f moles/mg protein)	S	100.4±11.6(9)			

*p<0.05, **p<0.02

今回の測定で扁桃体の内側皮質核で有意な高値が得られたが、この部位の分析例数が少ないので今後の検討を要する。SPは海馬アンモン角、梨状葉皮質前部で有意な高値がみられた。後者の値は年齢との間に負の相関がみられた。SPは脳内のいくつかの部位で分裂病群で高いが、服薬群でより高い傾向があり現在検討中である。α-NEは島

皮質で、PH-8Pは梨状葉皮質後部で分裂病群で低い値を認め、非服薬群の値も有意に低かった。α-NEとPH-8Pは共通に測定した6部位で正の相関を示した（表4）。この結果は両ペプチドが同じprepro-enkephalin B系列に属し、ラットにおける組織化学的な研究により脳内でほとんど同じ分布を示す事実[5]をヒトで確かめたといえよう。ただし6部位で両者の濃度比を調べると、α-NE/PH-8Pは3-4であり、ラット脳の1-1.5[5]より高かった。またα-NEの値は視床、赤核などのNAと有意な負の相関を示し、PH-8Pも視床、赤核のNAや赤核のチロシン水酸化酵素と負の相関を示し、これらのペプチドとカテコールアミンとの関連が示唆された。

表3．分裂病(S),対照(C)の扁桃体、梨状葉皮質の伝達物質の変化

*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.01		Amygdala		Pyriform cortex	
		Corticomedial nucleus	Basolateral nucleus	Anterior portion	Posterior portion
Noradrealine	C	3.75±1.04(3)	10.1±2.17(6)		
(p moles/mg protein)	S	3.97±1.13(4)	6.60±1.01(6)		
Dopamine	C	0.41±0.07(3)	2.30±0.70(7)		
(p moles/mg protein)	S	2.91±1.04(4)	3.01±1.11(6)		
Homovanillic acid	C	38.3±3.00(6)	39.2±8.10(8)		
(p moles/mg protein)	S	36.8±9.29(5)	56.5±9.70(6)		
γ-Aminobutyric acid	C	40.54±5.19(7)	25.44±1.86(8)		
(n moles/mg protein)	S	34.84±3.46(5)	25.51±3.06(6)		
Glutamic acid	C	54.05±6.49(7)	42.87±1.73(8)	41.47±2.84(8)	31.93±2.18(10)
(n moles/mg protein)	S	48.78±6.46(5)	43.48±2.13(6)	37.71±1.52(8)	35.68±1.74(9)
Choline acetyltransferase	C	4.02±0.80(6)	10.2±2.5(8)		
(n moles/hr/mg protein)	S	7.56±0.59(5)*	14.4±23.2(6)		
Substance P	C	96.3±14.8(7)	80.2±9.34(8)	82.4±5.73(8)	65.5±7.33(10)
(f moles/mg protein)	S	127±11.1(5)	94.6±7.40(6)	144±20.4(8)*** on:156±25.2(4)**	85.2±14.5(9)
α-Neoendorphin	C	331.6±55.9(7)	269.2±39.8(6)	236.2±132.1(8)	248.4±97.9(10)
(f moles/mg protein)	S	281.8±57.7(5)	194.8±22.0(6)	69.2±27.0(8)	79.2±15.9(9)
Dynorphin (1-8) (PH8P)	C			62.7±15.1(7)	84.0±11.2(8)
(f moles/mg protein)	S			47.1±5.9(4)	54.5±4.8(9)* off:50.4±7.7(5)*

表4．分裂病、対照脳内6部位におけるα-NeoendorphinとDynorphinの相関

Dynorphin (1-8) \ α-Neoendorphin		Temporal gyrus: Superior	Temporal gyrus: Medial and inferior	Temporal gyrus: Lateral occipito-	Hippocampus: Dentate gyrus	Pyriform cortex: Anterior	Pyriform cortex: Posterior
Superior temporal gyrus		r=0.887 p<0.01	r=0.651 p<0.01	r=0.665 p<0.01	N.S.	N.S.	r=0.565 p<0.02
Medial and inferior temporal gyrus		r=0.728 p<0.01	r=0.899 p<0.01	r=0.655 p<0.01	N.S.	r=0.518 p<0.05	r=0.589 p<0.01
Lateral occipito-temporal gyrus		r=0.806 p<0.01	r=0.719 p<0.01	r=0.875 p<0.01	N.S.	r=0.679 p<0.01	r=0.777 p<0.01
Hippocampus, dentate gyrus		r=0.806 p<0.01	N.S.	N.S.	r=0.760 p<0.01	N.S.	N.S.
Pyriform cortex	Anterior portion	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	r=0.754 p<0.01	N.S.
	Posterior portion	r=0.615 p<0.01	r=0.591 p<0.01	r=0.544 p<0.02	N.S.	N.S.	r=0.862 p<0.01

［謝辞］お世話いただいた次の方々に厚く感謝します。岸　清、兼谷　俊、内藤　真、小泉　隆徳、野村　博、藤森　岳夫、松田　治、猪瀬　正、安藤　烝、高橋　信介、島田　均、森岡　洋、沼倉　泰二、南野　直人、仙波　純一先生

文献　1）市川宏伸　他（1983）神経化学 22, 315　2）Spokes, E. G. S.（1980）Brain 103, 179　3）融　道男　他（1982）精神経誌 84, 947　4）融　道男　他（1982）精神経誌 85, 527　5）Neber, E. et al.（1982）Nature 299 77

132 Pentylenetrazolけいれんにおける脳内TRH機構の関与

広瀬由起子・小川紀雄・小原節子・森　昭胤
（岡山大・医・脳研）
梶田三郎・佐藤光源
（同・精神科）

〔要　約〕

Pentylenetetrazol (PTZ) けいれん時の脳内 thyrotropin releasing hormone (TRH) 神経機構の関与について検討した。PTZ 75mg/kg 腹腔内注射前、注射後40秒、150秒、24時間後のラット脳内 TRH-like immunoreactivity (TRH-LI) と TRH 受容体とを、各脳部位別に並行して定量した。その結果 PTZ 注射40秒後、150秒後には Septum において TRH 含量の著名な上昇が見られ150秒後にはさらに thalamus/midbrain においても有意な上昇が見られた。一方、TRH受容体結合は、けいれん前、中、後すべての時期においても有意な変動が認められなかった。TRH 受容体が減少していないことから、PTZけいれん時には、TRH含量は上昇するものの、TRHのシナプス間隙への放出は必ずしも増加していないものと考えられた。そこで前もって TRH を脳室内に投与して TRH 受容体に作用させておいたところ、TRH 60μg の脳室内投与では、PTZによる全身けいれんは完全に阻止され、20μg脳室内投与では、PTZ誘発けいれんは起こるものの、その潜時は対照にくべ、有意に延長しており、TRHにはPTZ誘発けいれん阻止能力があった。以上の実験成績は、PTZけいれん時には脳内TRH神経機構の機能が低下している可能性を示唆している。

Key words : pentylenetetrazol (PTZ), throtropin releasing hormone (TRH)-like immunoreactivity, TRH receptor binding.

最近、けいれんと thyrotropin releasing hormone (TRH) との関係が注目されている。すなわち、ある種のてんかん患者に TRH 及びその誘導体が、臨床的に抗けいれん効果を示すという報告がなされており[1]、また、電撃けいれん時に脳内の TRH 濃度が著しく上昇することが報告されている[2]。しかしながら、けいれんと脳内 TRH 受容体との関係については、まだ報告がなされていない。そこで、今回我々は、pentylenetetrazol (PTZ) けいれんモデルを用いてけいれん前、中、後、における脳内TRH 濃度と、TRH 受容体結合とを並行して測定し、さらに、PTZ けいれんに対する TRH の拮抗作用についても、合わせて検討したので報告する。

〔方法〕

1. PTZ の全身けいれん誘発作用：SD系ラット（200～230g）を用いて、PTZ 75mg/kg を腹腔内投与し、全身けいれん（generalized seizure）が起こるまでの時間を測定した。また、ラットを用いて既に報告した方法によって脳波を記録し[3]、PTZ 75mg/kg 腹腔内投与後の spike discharge についても検討した。

2. 脳内 TRH-like immunoreactivity (TRH-LI) の定量：PTZ 75mg/kgをSD系ラットの腹腔内に注射し、その前、40秒後、150秒後、24時間後にそれぞれ断頭屠殺し、直ちに脳を取り出し、表1に示す各脳部位に分け、直ちに10倍容の酸エタノール（エタノール：0.1N塩酸＝1：1）でホモゲナイズした。ホモジネートを4°C 12000gで20分間遠心し、その上清を－20°Cで保存した。この抽出液を radioimmunoassay (RIA)による測定直前にRIA用リン酸緩衝液（0.14Mリン酸緩衝液、25mM EDTA、0.5% BSA、PH 7.4）で希釈した。TRH－RIA は2抗体法で行った[5]。

3. TRH受容体結合の定量：TRH-LI測定の場合と同様にPTZを注射し、同様のタイムスケジュールでラットを断頭屠殺し、脳部位に分け、既に報告した、receptor binding法を用いて[4] TRH受容体結合を測定した。TRH受容体結合は、12nMの[^{3}H]-TRH存在下における特異的結合として表示した[4]。

4. PTZ誘発けいれんに対するTRHの拮抗作用の検討：SD系ラットをketamine麻酔（50mg/kg腹腔内投与）下で、定位脳手術台に固定し、右側脳室内に生理的食塩水4μlあるいはTRHを投与し、30分後にPTZ 75mg/kgを腹腔内投与し、全身けいれんの有無、あるいは全身けいれんが起こるまでの時間を測定した。

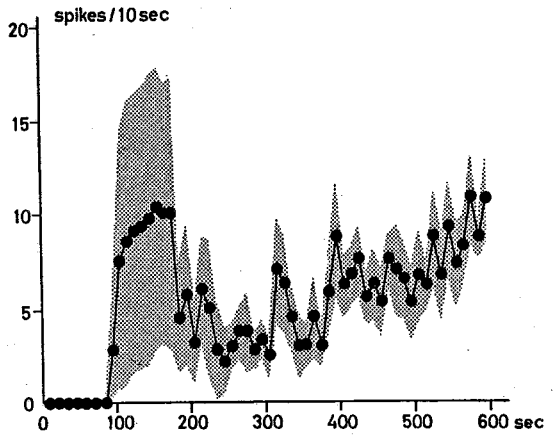


Fig. 1 Spike discharges induced by PTZ. Spike discharges were counted in each 10 sec and were shown as the mean±SEM (solid circles and shadowed area) of 6 rats.

〔結果〕

1. PTZによるけいれん誘発：PTZによる全身けいれん発現までの時間は91±5秒（mean±SEM；N=30）であり、60秒以内に全身けいれんを起こした例は存在しなかった。また、脳波記録でのspike dischargeの出現についても図1に示すように、全身けいれんの観察による結果とほぼ同様で、spike dischargeの出現は60秒を過ぎてからであった。以上のことから以下の実験には、PTZ投与前と、全身けいれんが起こる直前である40秒と、すべてのラットが全身けいれんを起こしている最中である150秒と、充分にけいれん発作が治ま

Table 1
Effects of PTZ on TRH-like immunoreactivity (pg/mg protein) in discrete regions of rat brain.

	frontal cortex	septum	striatum	hypothalamus	thalamus +midbrain	hippocampus	hindbrain
before (N=6)	194.9± 5.4	1576.4± 42.6	269.0±19.4	648.6±32.2	124.3±9.8	156.0±13.9	168.7±32.1
40 sec (N=6)	212.7±21.3	1926.0±118.8*	281.7±19.9	630.6±52.2	146.6±8.2	209.3±18.7	177.8± 9.7
150 sec (N=6)	218.3±14.1	2407.6±262.8*	301.5±21.7	729.1±56.6	161.5±7.7*	191.9±11.7	135.5± 5.6
24 hr (N=4)	205.5±21.0	2367.4±362.7	285.6±27.8	560.6±31.0	107.6±6.1	187.2±14.1	137.6±11.1

Values are shown as the mean±SEM. *P<0.05 (one-way ANOVA)

Table 2
Effects of PTZ on the TRH receptor binding (fmol/mg protein) in discrete regions of the rat brain.

	frontal cortex	septum	striatum	hypothalamus	thalamus +midbrain	hippocampus	hindbrain
before	42.5±5.2	47.8± 4.5	22.6±2.8	71.6±7.1	38.2±2.6	63.0± 5.6	31.6±4.7
40 sec	49.4±2.9	44.0±14.0	17.6±2.6	70.1±5.9	37.6±2.2	62.4± 4.4	29.4±3.2
150 sec	45.0±6.7	41.7±10.8	21.8±1.8	60.9±7.8	33.7±3.5	59.6± 6.8	26.5±1.7
24 hr	38.9±5.4	35.6±17.8	20.6±1.8	70.7±2.5	36.9±1.8	69.1±11.6	29.8±3.8

The data are shown as the mean±SEM of 6 rats.

た時間である24時間後の4時点で生化学的な検討を行うこととした。

2. TRH-LI 濃度の変化：TRH-LI 濃度の測定結果を表1に示した。この表から明らかな様にPTZ投与40秒後にseptumにおいて、TRH濃度の著しい上昇が見られけいれん発作中である150秒後にはさらに著しい増加が見られた。24時間後にもこのseptumにおけるTRHの濃度の上昇傾向は見られたが、少数例のためか有意差は見られなかった。さらに、thalamus/midbrainでも150秒でTRH濃度の有意な上昇が見られた。その他の脳部位ではTRH濃度の大きな変化は見られなかった。

3. TRH受容体結合（表2）：TRH受容体結合を脳部位別に検討したが、全身けいれん直前の40秒及び全身けいれん中の150秒あるいは24時間後においても、いずれの脳部位においてもTRH受容体結合には有意な変化がみられなかった。TRH濃度の大きな変化の見られたSeptumにおいても全経過を通じてTRH受容体結合には変化が見られなかった。

4. PTZ誘発全身けいれんに対するTRHの拮抗効果：ketamine麻酔下で右側脳室内に生理的食塩水を4μl注入し、30分後にPTZを注射した場合にも無処置でPTZを注射した場合とほぼ同様の潜時で全身けいれんが出現した。すなわち潜時は77±5秒であった。一方60μgのTRHを前もって側脳室に注射しておくと全例PTZけいれんの発現が抑制された。TRH 20μgの側脳室内注射では、PTZによる全身けいれんは誘発されるが、その潜時は143±25秒であり、生理的食塩水注射群と比較して有意に延長していた。この様にTRH側脳室内投与は容量依存的にPTZ誘発全身けいれんに拮抗作用を示した。

〔考按〕

PTZ誘発けいれんにおける脳内TRH濃度はseptum及びthalamus/midbrainにおいて有意な上昇が見られた。既に電撃けいれん時に脳内TRH濃度が上昇することが報告されている。[2] しかし、このTRH濃度の上昇がけいれん誘発の原因であるのか、けいれんを止めようとする生体の防御機構の一側面であるのかは明らかでない。しかも、TRH濃度の測定のみでは脳内TRH神経機構全体として機能の亢進があるのか低下があるのかを明らかにすることができない。そこで、今回我々はTRHの作用点であるTRH受容体についても検討したところ、PTZ誘発けいれん中にTRH濃度の上昇は認められるもののTRH受容体にはなんら変化が認められなかった。もしTRH濃度の上昇とともに、多量のTRHがシナプス間隙に過量に放出されると仮定するならば、通常TRH受容体結合は減少するはずである。従ってけいれん時に増加したTRHはTRH放出の増加を伴う機能亢進と考えるよりは、むしろTRH含有神経系の機能低下によってTRHが貯留しているとも理解される。そこで、この点を確かめるために前もってTRH受容体にTRHを作用させておいた場合にPTZ誘発けいれんが起こるか否かを検討したが、TRHの脳室内投与によってPTZ誘発けいれんが容量依存的に完全抑制あるいはけいれん発作までの潜時が延長すると言う結果を得、上記の考え方が正しいことが示唆された。以上の様に、神経ペプチドの含量と、それらの受容体を並行して測定することはその神経ペプチド系機構が機能亢進を来しているのか、機能低下を来しているかを想定する一助となるものと考えられる。

〔文献〕
1. Inagawa, K. and Inoue, Y. (1981) Kurume Med. J., 28, 201-210.
2. Kubec, M. J. and Stein, A. (1984) Life Sci., 34, 1149-1152.
3. Ogawa, N., Tsukamoto, S., Yokoi, I., Mizuno, S. and Mori, A.(1982) Neurosciences, 8, 311-321.
4. Ogawa, N., Mizuno, S., Nukina, I., Tsukamoto, S. and Mori, A. (1983) Brain Res., 263, 348-350.
5. Utsumi, M., Takeiwa, M., Makimura, H., Yamada, A., Mori, H., Kusaka, T., Sakoda, M. and Baba, S. (1975) Endocrinol. Japan., 22 509-516.

133　培養クロマフィン細胞におけるメチオニンエンケファリンの取り込み

竹田二美代・竹田　稔・西田　均・島田明範（昭和大・医・生化）
相内敏弘・中村泰治（同・薬・生化）　紺野邦夫（同・医・生化）

〔要　約〕

牛副腎髄質よりクロマフィン細胞を単離し、初代培養した。この培養細胞を使い、(^{3}H)Met-enkephalin(Met-enk)の取り込み機構について検討した。
①取り込みは、25℃，20分で最大活性を示し、4℃以下では殆んど取込まれなかった。②取り込み反応系に存在する一価陽イオンであるNaClのNaイオンをCholineあるいは、Lithiumに代えた場合には、Met-enkの取り込み阻害が認められ、NaCl（137mM）の場合の取り込みを100％とすると、Lithium cholide では60.7％，Choline cholideでは76.7％の取り込みであった。③Na ionophoreである Monensin（20μM）により強い取り込み阻害が起り、この取り込み機構にはNaイオンに特異的に依存しているものと考えられる。④Carbonyl cyanide m-chloro-phenylhydrazone(CCCP)や、2.4-dinitrophenol(DNP)などのUncouplerにより取り込みは強く阻害され、CCCP でcontrolの54％，DNP で58％であった。⑤high K やVeratrinにより細胞膜表面を脱分極状態にさせた場合のMet-enkの取り込みは、KCl（60mM)では取り込み阻害が認められたが、Veratrin では変化は認められなかった。以上の結果からクロマフィン細胞によるMet-enkの取り込みには、細胞内ATP及びNaイオンの細胞外→内、Kイオンの内外の勾配が必須であることが示唆された。

Key words：Cultured adrenal chromaffin cells, (^{3}H)Met-enkephalin uptake, Na-ionophore

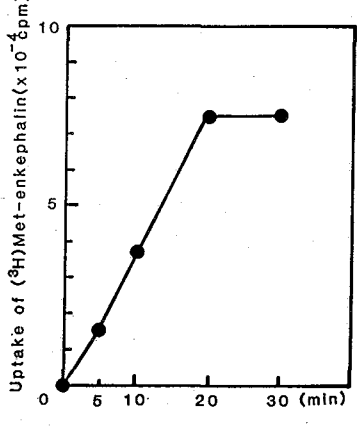
Neurotransmitter又は、Neuromodulator[1]として作用するMet-enkは中枢[3]および、末梢組織[7]に存在する。副腎髄質クロマフィン顆粒は、Catecholamine(CA)の貯蔵顆粒として知られているが、近年enkephalinのprecursorのprocessingが副腎髄質で解明されて以来[2,5]、この顆粒でのenkとCAの共存が注目されてきた。我々は先の学会で、牛脳尾状核のsynaptic vesicleへのLeu-enkの取り込み機構[4]並びに、牛副腎髄質クロマフィン顆粒膜へのMet-enkの取り込み機構[8]を報告してきた。今回、牛副腎髄質クロマフィン初代培養細胞を使って(^{3}H)Met-enkの取り込みについて解析を行ったので、その結果について報告する。

（実験方法）

クロマフィン細胞の培養　クロマフィン初代培養細胞は、Waymireらの方法[9]に従って行なった。0.025％Collagenaseと0.0013％DNase処理により牛副腎髄質から単離し、遠心分離により細胞を集め、Culture mediumに10％FCSを加えたmedium中で培養し、培養後3日以降から実験に用いた。

エンケファリンの取り込み条件　細胞（培養後3～10日）をCa^{++},Mg^{++}freeのPBS (PBS(-))／10mM Hehes buffer pH=7でよく洗った後、再び同液に浮遊させ、反応液200μl中に、細胞数1×10^{7}個、2mM PMSF，5.5×10^{-8}M (2.5μCi)(^{3}H)Met-enkephalinを含む系で、25℃，20分間のincubationを行なった。反応停止は、ice-cold

Fig.1　Time course



PBS(-)/Hepes B. を加え、直ちにGF/C filter(Millipore)を用いて沪過を行い、5 ml のice-cold PBS/Hepesで2回洗い、filter上のRIのカウントを測定した。

エンケフアリンの抽出及びTLC　細胞内に取り込まれたMet-enkの抽出は、1M-HAc/20mM-HCl/0.1%-MeEtOH/1μg/ml-PMSF で行ない、抽出液をHPTLC(Merk) にスポットし、n-BuOH Pyridine,Acetic acid,Water(15,10,3,12)で展開した。尚standard として(^{3}H)Met-enk及び(^{3}H)-Methionine,(^{14}C)Tyrosineを用いた。

（結果と考察）

培養クロマフイン細胞へのMet-enkの取り込みは、Fig.1に示す様に反応開始後、5分から直線的に取り込まれ、20分でプラトーに達した。half-maximal levelは10分であった。200μl中のincubation medium 中に細胞数を1×10^{6}個から1×10^{8}個と増やした場合のMet-enkの取り込みは、1×10^6~1×10^{7}個までは直線的に取り込まれた(Fig2)。温度依存性を検討してみると、4~10℃では殆んど取り込みが認められなかったが、25℃から37℃で強い取り込みがみられ、4℃の約20倍であった。50℃では取り込みは認められない(Fig3)。以上の結果から、取り込みの反応は以後25℃，20分の条件で行なった。この反応条件下でクロマフイン細胞に取り込まれた放射能活性がMet-enkそのものであるか。あるいはその分解産物であるかを検討する目的で、取り込み反応後、反応液中及び細胞中の(^{3}H)Met-enkと、その分解物についてTLC にて分析した結果、細胞内には、ほぼ完全にMet-enkの形で取り込まれているのが判明した。そこでこの取り込みに対する種々の薬物の効果を検討した(Table I)。通常、反応系には一価の陽イオンとして、137mM-NaCl と2.7 mM-KCl が存在しているが、Naイオンの代りに137mM-lithium あるいはcholineにした場合は、いずれも各々約40%と、23%の阻害が認められた。Naイオンを全てKイオンに代え60 mM-KCl にした場合も、27%の取り込み阻害があった。Naイオンのionophoreであるmonensineを反応系に存在させた場合も、controlに比べ強い阻害が認められ、この取り込みにはメデイウム中のNaイオンおよびKイオンが関与しているものと示唆され、特にNaイオンの細胞外から細胞内への濃度勾配、およびKイオンの細胞内から細胞外への勾配がペプチドの取り込みに強く作用していると考えられる。同様の結果がsynaptosome へのノルアドレナリンの取り込み[10]あるいは synaptosomeへのGABAの取り込み[6]で報告されている。しかしこのNa$^+$,K$^+$の

Fig.2 Relative amount of cell

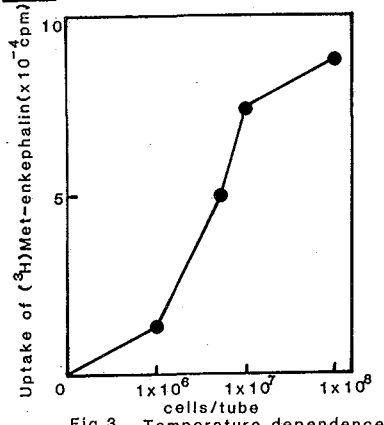


Fig.3 Temperature dependence

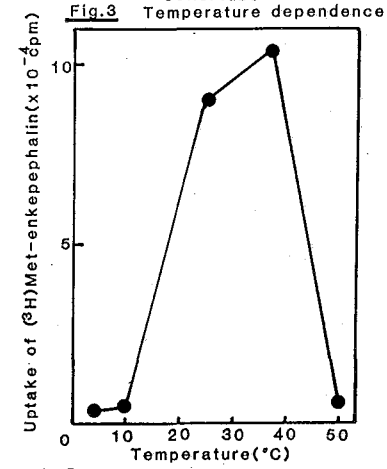


Table I
Replacement by monovalent cations

Component	% of control
Control	100
LiCl (137mM)	60.7
Choline cholide(137mM)	76.7
KCl (60mM)	72.9

本質がATPaesを介しているものか、あるいは、膜電位に対する効果によるものであるかは明らかではない。このクロマフイン初代培養細胞によるMet-enkの取り込みに対する種々のアンカップラーあるいは、ATP阻害剤、Reserpineの効果を検討した(Table II)。0.1 mM-DNPで取り込みはcontrolの58.3%、又CCCPで54.3%と強い阻害効果を認めた。モノヨード酢酸(1 mM)あるいは、ナトリウムアザイド(1 mM)では、阻害はわずかであった。Colchicine(0.1 mM)では阻害が認められなかったが、Reserpine(1μM)存在下では取り込みはcontrolの86.3%であった。この様にMet-enkのクロマフイン細胞への取り込みはアンカップラーによって強く阻害され、細胞内のATPが取り込みに大きな役割を果していることが示唆された。ロテノンやAntimysin Aでは取り込み阻害は認められず、これはこれらの薬物下でも、細胞内にプールされているATPが作用し得るためであると考えられる。現在取り込みに対するCa^{++},Mg^{++}などの効果及び、取り込みにenkephalinのsubcellula localizationについて検討中である。

Table II

Effects of Reagent

Component	% of control
Control	100
CCCP(5μM)	54.3
DNP(1mM)	58.3
Iodoacetic acid(1mM)	87.0
Sodium azide(1mM)	98.6
Reserpine(1μM)	86.3

References

1. Frederickson,R.C.A.,(1977)Life Sci.,21,23-42
2. Gubler,U.,Seeburb,P.,Hoffman,B.J.,Goge,L.P.and Udenfriend,S.(1982)Nature,295,206-208
3. Hughes,J.,Smith,T.W.,Kosterlitz,H.W.,Fothergill,L.A.,Morgan,B.A.and Morris,H.R.,(1975)Nature,258,577-579
4. Matsumoto,F.,Takeda,M.,Takeda,F.,Nakamura,Y.and Konno,K.(1980)Bulletin Jap.Neurochem. Soc.,19,38-41
5. Noda,M.,Furutani,Y.,Takahashi,H.,Toyosato,M.,Hirose,T.,Inayama,S.,Nakanishi,S.and Numa,S.(1982)Nature,295,202-206
6. Pastusgko,A.,Wilson,D.F.and Erecinska,M.(1982)J.Biol.Chem.,267,7514-7519
7. Stern,A.S.,Lewis,R.V.,Kimura,S.,Rossier,J.,Gerber,L.D.,Brink,L.,Stein,S.and Udenfriend,S.(1979)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76,6680-6683
8. Takeda,F.,Takeda,M.,Shimada,N.,Aiuchi,T.,Nakamura,Y.and Konno,K.(1983)Bulletin Jap. Neurochem.Soc.,22,198-191
9. Waymire,J.C.,Waymire,K.G.,Boehme,R.,Noritake,D.and Waedell, J.in Structure and Function of Monoamine Enzymes(eds. Usdin,E.,Weiner,N.and Youdin,M.B.H.)(1977) Dekker,New York,pp.327-363
10. White,T.D. and Keen,P.(1970)Biochem.Biophys.Acta 196,285-295

134 Serotonin ニューロン破壊時の神経ペプチドの変化について

小川紀雄・広瀬由起子・小原節子・加太英明・
森　昭胤（岡山大・医・脳研）　貫名　至　（同・医・Ⅲ内科）

〔要　約〕

アミン系神経機構とペプチド系神経機構の相互関係を明らかにする一助として、ラット側脳室内に 5,7-dihydroxytriptamine (5,7-DHT) を投与して2週間後の脳内 serotonin 量と、6種の神経ペプチドの量を測定した。その結果、serotonin 量は半減し、脊髄と hippocampus では対照のわずか15%にまで減少した。一方 bulbospinal serotonergic neuron 中に存在すると言われている thyrotropin releasing hormone (TRH) と substance P のうち、前者は著減した。従って、少なくとも脊髄では TRH と serotonin とは共存している可能性がある。dynorphin を除く4種のペプチド：substance P, somatostatin, cholecystokinin-octapeptide, Met-enkephalin はそれぞれの peptide に応じて脳内の異なった部位で有意な増加がみられた。従来の神経ペプチドの serotonin 神経機構に対する作用に関する報告を考慮すると、これら神経ペプチドの増加は、減少した serotonin を補償しようとする生体の防御反応である可能性が考えられた。以上の結果は、アミン類と神経ペプチドの共存の生理的意義を追求すると同時に、アミン類を変化させた時の神経ペプチド系神経機構の影響を積極的に調べるべきことを示唆する。

Key words : serotonin, 5,7-dihydroxytriptamine, neuropeptides.

広義の神経伝達物質は、最近ではアミノ酸系、アミン系、ペプチド系の三系に大別されることが多い。それぞれの系については多くの研究があるにもかかわらず、これら三つの系の相互間の関係のくわしい研究は比較的少ない。一方、最近では免疫組織学的研究から、古典的神経伝達物質と神経ペプチドとが同一のニューロン内に共存している可能性も指摘されているので[7]、両者の相互関係は興味ある、しかも重要な研究課題と考えられる。そこで、5,7-dihydroxytriptamine (5,7-DHT) を用いて serotonin ニューロンを破壊した場合に、共存していることが報告されている thyrotropine releasing hormone (TRH), substance P をはじめとする6種の神経ペプチドの変化について検討した。

〔方　法〕

Baumgarten らの方法[1]に準じて Nembutal 麻酔下で、SD系ラットの右側脳室内に 50μg の 5,7-DHT（対照群には生理食塩水）を注入し、2週間後に断頭屠殺した。脳と脊髄を取り出し、Table 1 に示す7部位に分けた。組織中の serotonin 含量は、Curson and Green の方法[2]で抽出し、HPLC で定量した[6]。脳組織からの神経ペプチド抽出は Yoshimasa ら[4]の酸-ethanol 抽出法を用い、希釈して radioimmunoassay (RIA) での測定に供した。TRH, substance P, somatostatin, cholecystokinin-octapeptide (cck-8), Met-enkephalin, dynorphin の濃度はそれぞれ RIA で測定した[5,9,10,12]。得られた結果は peptide-like immunoreactivity と表現するのが正しいが、以下では簡単のために、peptide の名称のみで表示する。

〔結果と考按〕

5,7-DHT を側脳室内に注射した群と生理食塩水を注射した対照群の2週間後の各脳部位の重量には有意な差はなかった（Table 1）。5,7-DHT 処置群では、検討した全ての脳部位

Table 1. Effects of icv 5,7-dihydroxytryptamine injection on serotonin levels in rat CNS.

Region	wet weight (mg)		serotonin (pg/mg wet weight)	
	control	5,7-DHT treated	control	5,7-DHT treated
cerebral cortex	281.2±13.2	292.8± 8.5	440.2±22.9	281.2±19.3**
striatum	127.2± 6.9	129.8± 4.8	408.4±32.1	268.5±22.1**
hippocampus	137.0± 3.7	136.3± 3.2	314.2± 4.9	38.8± 3.9**
hypothalamus	59.8± 4.2	66.8± 3.3	780.8±16.1	403.8±25.2*
thalamus+midbrain	209.6±10.6	193.0± 6.1	739.0±36.2	330.8±18.5**
hindbrain	213.8± 3.2	218.0± 4.8	568.6±13.6	451.0±28.1*
spinal cord	322.0±10.0	329.7±20.0	540.0±15.3	68.9± 8.2**

The data are shown as the mean ± SEM of 6-8 rats.
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared to control rats (one-way ANOVA)

で Serotonin 含量が半減し，ことに脊髄と hippocampus では対照のわずか 15% にまで減少した（Table 1）。

Table 2 に神経ペプチドの定量結果をまとめて示す。一見して明らかなように Serotonin 含量がすべての脳部位で著しく減少しているのに対して、神経ペプチドの濃度は種類によって変動がさまざまである。bulbospinal serotonergic neuron に TRH が共存していることが免疫組織化学的に証明されているが[7] RIA による定量でも、5,7-DHT 処置による脊髄の Serotonin 濃度の減少と共に TRH も著しく減少した。一方，同じく bulbospinal serotonergic neuron に共存しているとされる Substance P は，脊髄で減少傾向はみられるものの有意差は認められなかった。これは、脊髄の Substance P の大部分が一次知覚神経から脊髄後角に終る神経に含まれたものであるために，たとえ延髄から脊髄にかけての Substance P が減少しても、有意な減少として捕えられなかったのかもしれない。Emson ら[3]は 5,7-DHT 処置で脊髄において Serotonin と共に Substance P も減少したと報告している。しかし，彼らは 5,7-DHT と 200μg という大量脳室内注入しており，このような大量では Serotonin ばかりでなく、norepinephrine も著しく減少することが知られているので[1] norepinephrine の減少の影響を否定できない。我々の成績との差異はおそらく，5,7-DHT の投与量の差によるものと考えられる。Striatum と thalamus/midbrain において、Substance P は 5,7-DHT 処置で増加した。Substance P は in vitro では striatum 片からの K^+ による Serotonin 放出を促進するとの報告[11]があ

Table 2. Effects of icv 5,7-dihydroxytryptamine injection on neuropeptide levels (ng/mg protein) in rats CNS.

	TRH	substance P	somatostatin	CCK-8	Met-enkephalin	dynorphin
cerebral cortex	0.21±0.01	0.82±0.06	2.06±0.06	2.38±0.08	1.54±0.33	1.12±0.060
	0.20±0.02	0.86±0.05	2.64±0.22*	2.65±0.13	2.13±0.50	1.05±0.078
striatum	0.22±0.01	0.96±0.12	1.15±0.25	1.08±0.05	7.24±0.37	0.85±0.014
	0.22±0.01	1.38±0.01**	1.24±0.18	1.36±0.09**	9.01±0.92	0.88±0.044
hippocampus	0.19±0.02	0.09±0.01	1.46±0.21	1.40±0.09	0.58±0.14	1.13±0.060
	0.22±0.01	0.11±0.01	1.40±0.12	1.44±0.11	0.39±0.12	1.11±0.052
hypothalamus	0.84±0.03	3.27±0.17	4.39±0.52	0.24±0.02	5.55±0.81	1.42±0.076
	0.80±0.04	3.64±0.34	5.03±0.54	0.32±0.02*	7.68±0.62*	1.57±0.080
thalamus/midbrain	0.16±0.02	3.16±0.26	1.10±0.14	0.38±0.03	3.51±0.43	0.87±0.064
	0.15±0.01	4.38±0.19**	1.39±0.12	0.47±0.04	2.52±0.43	0.98±0.098
hindbrain	0.16±0.02	2.50±0.23	1.05±0.14	0.01±0.01	1.84±0.20	0.72±0.044
	0.16±0.01	2.75±0.24	0.90±0.12	0.03±0.01*	3.44±0.38**	0.86±0.100
spinal cord	0.24±0.02	2.44±0.20	0.73±0.06	0.04±0.01	2.56±0.21	0.56±0.060
	0.08±0.01**	2.21±0.19	1.01±0.09*	0.05±0.01	2.43±0.26	0.65±0.068

The data are shown as the mean ± SEM of 8 rats.
Upper lines indicate control rats and lower lines indicate 5,7-DHT treated rats.
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared to control rats (one-way ANOVA)

るので，減少したserotoninを出来るだけ放出させるべくsubstance Pがstriatumで増加しているのかもしれない．somatostatinは，cerebral cortexと脊髄で有意に増加した．脳室内にsomatostatinを投与すると脳内各所でserotonin合成，利用を増加させることから，[4] somatostatinの増加は減少したserotoninを補償しようとする生体の防御反応とも考えられる．5,7-DHT処置によりCCK-8はstriatum, hypothalamus, hindbrainで有意に増加した．serotoninと動物の行動に関しては必ずしも意見の一致をみていないが，アンフェタミンに対する動物の反応性の一部はserotonin系によって調節されているという報告[8]もみられることと，CCK-8とdopamineとの共存の報告[7]とを併せて考えると，dopamine系ばかりでなく，serotonin系やCCK-8の関与を考慮すれば，アンフェタミンの作用をより詳かに出来るかもしれない．opioid peptideのうち，dynorphin濃度には変化がみられなかったが，Met-enkephalinは5,7-DHT処置によりhypothalamusとhindbrainで著増した．モルヒネは脳内serotonin代謝回転を亢進させることはよく知られており，β-endorphinの大槽内注入により脳幹部と視床下部でserotonin代謝回転が亢進することが報告されている[13]．これらを考慮すると，上記の神経ペプチドの変化と同様に，ここでもserotoninの減少に対して，生体がMet-enkephalinの増加を通じてserotoninの代謝回転を亢進させて補おうとする代償機構とも解釈される．

従来，神経ペプチドのアミン系への影響が調べられて来たのに対して，以上の結果はアミン系が変化したときに，神経ペプチド系が大きな影響を受けることを示している．両者の共存の生理的意義を追求すると同時に，アミン系を変化させたときの神経ペプチド系への影響の研究を積極的に行うべきであろう．

（謝辞：抗dynorphin血清を提供して下さった エーザイ筑波研究所 橋 眞郎博士に感謝します．）

〔文献〕

1. Baumgarten, H.G., Björklund, A., Lachenmayer, L. and Nobin, A. (1973) Acta Physiol. Scand., Suppl. 391, 1-19.
2. Curzon, G. and Green, A.R. (1970) Br. J. Pharmacol., 39, 653-655.
3. Emson, P.C., Gilbert, R.F.T., Bennet, G.W., Marsden, C.A. and Hunt, S.P. (1983) In E.C. Griffiths and G.W. Bennet (Eds.), Thyrotropin-releasing Hormone, Raven Press, New York, pp. 33-43.
4. Garcia-Sevilla, Magnusson, T. and Carlsson, A. (1978) Brain Res., 155, 159-164.
5. Ghazarossian, V.E., Chavkin, C. and Goldstein, A. (1980) Life Sci., 27, 75-86.
6. Hiramatsu, M. (1981) Folia Psychiat. Neurol. Japon., 35, 261-266.
7. Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, Å., Lundberg, J.M. and Schultzberg, M. (1980) Nature, 284, 515-521.
8. Isaacson, R.L., Fish, B.S., Lanier, L.P. and Dunn, A.J. (1977) Life Sci., 21, 213-219.
9. Ogawa, N., Thompson, T. and Friesen, H.G. (1977) Biochem. J., 165, 269-277.
10. Ogawa, N. (1979) Neurological Med. (Tokyo), 10, 393-395 (in Jananese).
11. Starr, M.S., James, T.A. and Gaytten, D. (1978) Europ. J. Pharmacol., 48, 203-209.
12. Utsumi, M., Tateiwa, M., Makimura, H., Yamada, A., Mori, H., Kusaka, T., Sakoda, M. and Baba, S. (1975) Endocrinol. Japon., 22, 509-516.
13. Van Loon, G.R. and de Souza, E.B. (1978) Life Sci., 23, 971-978.
14. Yoshimura, T., Nakao, K., Ohtsuki, H., Li, S. and Imura, H. (1982) J. Clin. Invest., 69, 643-650.

135　ヒト脳におけるLeumorphinの存在，及びその生物活性について

須田光明・中尾一和・坂本　誠・森井成人・
吉政孝明・菅原　照　（京大・医・Ⅱ内科，RI総合センター）
矢内原昇　（静岡薬大）　井村裕夫　（京大・医・Ⅱ内科）

〔要　約〕

ブタleumorphinはneo－endorphinとdynorphinの共通前駆体であるpreproenkephalinBのcDNAの塩基配列の解析の結果、その存在が想定された新しいopioid peptideである。最近、私達はブタleumorphinがブタ下垂体中後葉に存在し、opioid κ受容体にagonistとして作用することを報告した。更にヒトpreproenkephalinBの遺伝子の全構造の解析から、ヒトleumorphinはブタleumorphinと3アミノ酸残基が異なることが判明した。今回、私達は、ヒトにおいてleumorphinが新しい内因性opioid peptideであるか否かを、leumorphinのradioimmunoassay(RIA)を用いて検討した。また、2つのbioassay系を用いて、ヒトleumorphinの生物活性とopioid受容体の選択性について検討した。逆相高速液体クロマトグラフィー、高速ゲル濾過とヒトleumorphinのRIAを組み合わせ、蛋白分解酵素阻害剤を加えた沸騰水中で抽出したヒト脳線条体抽出物中に、rimorphinと共にleumorphinの存在を認めた。また、ヒト脳内のleumorphin様免疫活性の分布は、共通前駆体に由来するdynorphin様免疫活性の分布と平行していた。更に、ヒトleumorphinは、モルモット回腸縦走筋標本において、IC_{50}値3nMと強力なモルヒネ様生物活性を呈し、opioid κ受容体のみを含有するウサギ輸精管標本においても生物活性を呈した。これらの結果から、ヒトleumorphinがヒト中枢神経系において重要な生理的役割を担うペプチドであることが示唆された。

Key words : human leumorphin, opioid peptide, preproenkephalinB, opioid k receptor.

[目的]　ブタleumorphinはneo－endorphinとdynorphinの共通前駆体であるpreproenkephalinBのcDNAの塩基配列の解析の結果、その存在が想定された新しいopioid peptideである(図1)(1)。最近、私達はブタleumorphinがブタ下垂体中後葉に存在し(2)、強力なモルヒネ様生物活性を有し、opioid κ受容体にagonistとして作用すること(3，4)を報告した。更に、ヒトpreproenkephalinBの遺伝子の全構造の解析から、ヒトleumorphinはブタleumorphinと3アミノ酸残基が異なることが判明した。(図2)(5)。今回、私達は、ヒトにおいてleumorphinが新しい内因性opioid peptideであるか否かを、leumorphinのradio－immunoassay(RIA)を用いて検討した。また、2つのbioassay系を用いて、ヒトleumorphinの生物活性とopioid受容体の選択性について検討した。

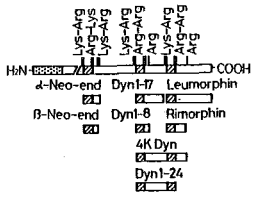


Fig.1 Schematic representation of porcine preproenkephalin B.

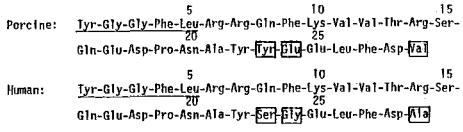


Fig.2 Amino acid sequences of porcine and human leumorphin.

[方法]　1)RIA:ヒトleumorphinとdynorphinのRIAは既に報告した方法に従った(2，6)。抗血清HLM－Ⅱ－802は ^{125}I－rimorphinをtracerとする今回の系では、rimorphinをヒトleumorphinよりモル比で2．3倍多く認識し、4K dynorphinとは10%の交叉率を有した。

2)組織抽出:死後3時間以内の剖検で得られた神経疾患を有しないヒト脳を対象とした。組織は最初に、7種の蛋白分解酵素阻害剤を含む水溶液中で煮沸後homogenizeし、遠心分離後の上清を水抽出物とした。沈渣はIM酢酸で再抽出し、遠心分離後の上清を酸抽出物とした。脳内分布の検討は、酸－methanol抽出物にて行なった(6)。

3)高速ゲル濾過(HP－GPC)及び逆相HPLC(RP－HPLC):HP－GPCはTSK－GEL G2500PWカラムを、RP－HPLCはTSK－GEL 120T ODSカラムを用いて行なった。

4)Bioassay:モルモット回腸縦走筋標本とウサギ輸精管標本を用いた(3, 4)。

[結果] 1)ヒトleumorphinの存在:図3aに示す様に、水抽出物のHP－GPCでは、3つのleumorphin様免疫活性 (－LI)のpeakが認められ、各々合成の4K dynorphin(peak A)、ヒトleumorphin(peak B)とrimorphin(peak C)の溶出位置に一致した。水抽出物のRP－HPLCでは、見かけ上2つのpeakが認められ、各々合成ヒトleumorphinとrimorphinの保持時間に一致した(図3b)。

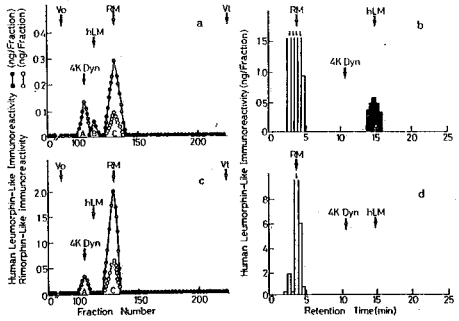


Fig.3
High performance gel permeation chromatographic (HP-GPC) and reverse-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) profiles of water and acid extracts of a human striatum.
(a) a HP-GPC profile of a water extract,
(b) a RP-HPLC profile of the water extract,
(c) a HP-GPC profile of an acid extract,
(d) a RP-HPLC profile of the acid extract.
Vo (void volume), 4K Dyn (4000 dalton dynorphin), hLM (human leumorphin), RM (rimorphin), Vt (salt).

RP－HPLC上ヒトleumorphinと同一の保持時間に溶出されたleumorphin－LIを、HP－GPCにて rechromatographyを行なうと、合成ヒトleumorphinの溶出位置に一致した(図3a, peak B)。RP－HPLCでrimorphinと同一の保持時間に溶出されたleumorphin－LIをHP－GPCで分析すると、これは2つの異なる分子sizeを持つpeptideからなり、合成rimorphinと図3aのpeak Aに相当した。

一方、酸抽出物のHP－GPCでは、 2つのleumorphin－LIのpeakが認められた(図3c)。 酸抽出物のRP－HPLCでは合成ヒトleumorphinと4K dynorphinの保持時間にleumorphin－LIは検出されなかった。 しかし、 合成rimorphinとrimorphinより少し早い保持時間にleumorphin－LIのpeakが検出された(図3d)。

ヒト脳線条体におけるleumorphinとrimorphinの含量を、HP－GPCとRP－HPLCにて分析後の、水および酸抽出物のleumorphin－LIの合計として計算すると、各々4．8ng／g、15．8ng／gであった。

2)leumorphin－LIの脳内分布:視床下部、線条体に最も高濃度のleumorphin－LIが検出され、その分布は、共通前駆体に由来するdynorphin－LIの脳内分布と平行していた(表1)。

3)Bioassay:モルモット回腸縦走筋標本で、合成ヒトleumorphinの、IC_{50}値は3nMとブタleumorphin、rimorphinと同等の値を呈した。また、合成ヒトleumorphinは κ受容体のみを含有するウサギ輸精管の収縮を抑制した(表2)。

TABLE I. Regional distribution of leumorphin- and dynorphin-like immunoreactivities in human brain.

	Leumorphin-LI (ng/g tissue)	Dynorphin-LI (ng/g tissue)
Hypothalamus	164.5	56.0
Hippocampus	62.7	7.8
Caudate nucleus	152.3	30.0
Putamen	231.7	60.8
Frontal cortex	< 0.5	< 1.0

TABLE II. IC_{50} VALUES OF OPIOID PEPTIDES TESTED WITH THE GUINEA PIG ILEUM MYENTERIC PLEXUS-LONGITUDINAL MUSCLE PREPARATION AND THE RABBIT VAS DEFERENS

The IC_{50} values were determined by testing the effects of 3 or more doses and by interpolating the linear regression line on the semi-logarithmic plots. Values are mean ± S.E. of 3-6 experiments. *No significant inhibition at a concentration of 10^{-4}M.

Peptide	IC_{50} (nM)	
	Guinea pig ileum	Rabbit vas deferens
Human leumorphin	3.05± 0.62	38.8± 10.1
Porcine leumorphin	3.42± 0.54	39.4± 9.2
Rimorphin	3.23± 0.35	41.3± 8.8
Leu^5-enkephalin	204 ±69	Inactive*
Met^5-enkephalin	61 ±18	Inactive*

[考察] 私達は、ＲＩＡとＨＰ－ＧＰＣ，ＲＰ－ＨＰＬＣを組み合わせヒト脳に既に報告したrimorphinと共に(７)leumorphinが存在することを明らかにした。ブタleumorphinと同様に、ヒトleumorphinは酸性よりも中性条件で抽出された。この結果はneo－endorphin、dynorphinやrimorphinが塩基性アミノ酸を多く含むのに対し，leumorphinは酸性アミノ酸を多く含む為と考えられる。同様の観察が、ＣＣＫ８とＣＣＫ３３の抽出過程でなされている(８)。

今回の研究のもう１つ興味深い結果は、ヒトleumorphin，４Ｋ dynorphinに近い分子sizeを有し，ＲＰ－ＨＰＬＣ上，疏水性の低いペプチドの存在である。この結果は，ヒトleumorphinないし４Ｋ dynorphinの．posttranslational processingに於ける化学修飾の可能性を示唆している。この点で、ラット等の脳線条体にＯ－sulfated [Leu]－enkephalinが存在するとの報告は興味深い(９)。また、ヒトleumorphinの－Ser^{15}－Gln^{16}－Glu^{17}－と－Ser^{23}－Gly^{24}－Glu^{25}－配列中のＳer残基は、リン酸化を受ける可能性がある(１０)。

ヒトleumorphinが脳線条体に存在し(１１)、強力なモルヒネ様生物活性を有し、κ 受容体のagonistとして作用する(１２)との今回の結果は、ヒト脳にはmultiple opioid binding sitesのうち、κ binding siteが多く存在するとの報告(１３)と考え合わせると、ヒトleumorphinがヒト中枢神経系において重要な生理的役割を担うペプチドであることが示唆された。

1. Kakidani, H., Y. Furutani, H. Takahashi, M. Noda, T. Morimoto, T. Hirose, M. Asai, S. Inayama, S. Nakanishi and S. Numa. 1982. Cloning and sequenec analysis of cDNA for porcine β-neo-endorphin/dynorphin precurosr. Nature (Lond.). 298:245-249.
2. Nakao, K., M. Suda, M. Sakamoto, T. Yoshimasa, N. Morii, Y. Ikeda, C. Yanaihara, N. Yanaihara, S. Numa and H. Imura. 1983. Leumorphin is a novel endogenous opioid peptide derived from preproenkephalin B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 117:695-701.
3. Suda, M., K. Nakao, T. Yoshimasa, Y. Ikeda, M. Sakamoto, N. Yanihara, S. Numa and H. Imura. 1983. A novel opioid peptide, leumorphin, acts as an agonist at the κ opiate receptor. Life Sci. 32:2769-2775.
4. Suda, M., K. Nakao, T. Yoshimasa, Y. Ikeda, M. Sakamoto, N. Yanaihara, C. Yanaihara, S. Numa and H. Imura. 1983. Comparison of the action of putative endogenous κ-agonists, leumorphin and rimorphin in vitro. Life Sci. 33, Suppl. I:275-278.
5. Horikawa, S., T. Takai, M. Toyosato, H. Takahashi, M. Noda, H. Kakidani, T. Kubo, T. Hirose, S. Inayama, H. Hayshida, T. Miyata, and S. Numa. 1983. Isoaltion and structural organization of the human preproenkephalin B gene. Nature (Lond.). 306:611-614.
6. Nakao, K., T. Yoshimasa, S. Oki, I. Tanaka, Y. Nakai, M. Wakimasu, M. Fujino and H. Imura. 1981. Presence of dynorphin-like immunoreactivity in rat pituitary gland and hypothalamus. Regul. Peptides. 6:163-168.
7. Nakao, K., T. Yosimasa, M. Suda, M. Sakamoto, Y. Ikeda, K. Hayashi and H. Imura. 1983. Rimorphin (dynorphin B) exists together with α-neo-endorphin and dynorphin (dynorphin A) in human hypothalamus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 113:30-34.
8. Dockray, G.J. 1981. Cholecystokinin. In Gut Hormones. S.R. Bloom and J.M. Polak, editors. Churchill Livingstone, Edinburgh. 228-239.
9. Unsworth, C.D., J. Hughes and J.S. Morley. 1982. O-sulphated Leu-enkephalin in brain. Nature (Lond.). 295:519-522.
10. Mains, R.E., B.A. Eipper, C.C. Glembotski and R.M. Dores, 1983. Strategies for the biosynthesis of bioactive peptides. Trends in Neuroscience. June:229-235.
11. Suda, M., K. Nakao, M. Sakamoto, T. Yoshimasa, N. Morii, N. Yanaihara, S. Numa and H. Imura. 1984. Leumorphin is a novel endogenous opioid peptide in man. Biochem. Biophys. Res. Commun. in press.
12. Suda, M., K. Nakao, T. Yoshimasa, M. Sakamoto, N. Morii, Y. Ikeda, C. Yanaihara, S. Numa and H. Imura. 1984. Human leumorphin is a potent, kappa opioid receptor agonist. Neurosci. Lett. in press.
13. Pfeiffer, A., A. Pasi, P. Mehraein and A. Herz. 1982. Opiate receptor bindng sites in human brain. Brain Research 248:87-96.

136 拘束ストレスによるモルモット脳内 methionine－enkephalin, leucine－enkephalin, methionine－enkephalin－Arg^6－Gly^7－Leu^8 および methionine－enkephalin－Arg^6－Phe^7 含量の変化について

池田淑夫・伊島正次・鈴木孝尚　（保健衛生大・医・精神神経科）
木村英司（同・共利研）・中尾一和・井村裕夫（京大・医・Ⅱ内科）
中沢恒幸　（保健衛生大・医・精神神経科）

〔要　約〕

モルモットに拘束ストレスを負荷し、enkephalin 前駆体 Proenkephalin A に由来するオピオイドペプチドである methionine-enkephalin (Met-Enk), leucine-enkephalin (Leu-Enk), methionine-enkephalin-Arg^6-Gly^7-Leu^8 (Met-Enk-Arg-Gly-Leu), methionine-enkephalin-Arg^6-Phe^7 (Met-Enk-Arg-Phe) の脳における含量の変化について検討した。モルモットを金網で拘束し、拘束前、拘束後30分、1時間、3時間、6時間に断頭し、視床下部、線条体、前頭葉皮質を摘出し、Met-Enk, Leu-Enk, Met-Enk-Arg-Gly-Leu, Met-Enk-Arg-Phe を各々特異的ラジオイムノアッセイで測定した。その結果、前頭葉皮質、線条体では、測定した4種のオピオイドペプチド含量がいずれも拘束3時間で有意に平行して増加することが明らかになった。これに対して視床下部においては、拘束30分で、4種のペプチドすべてが減少したが、1、3時間拘束では、上昇する傾向を示した。以上より拘束ストレス負荷によりモルモット脳では、同じ前駆体 Proenkephalin A に由来する Met-Enk, Leu-Enk, Met-Enk-Arg-Gly-Leu, Met-Enk-Arg-Phe が互いに平行して変化していることが明らかになった。又、拘束ストレスに対するこれらオピオイドペプチドの反応性において脳の部位による差異が認められた。

Key words : stress, enkephalin, proenkephalin A

ストレス状態と内因性モルフィン様ペプチドの変化に密接な関係のあることが知られている(4,5)が、ストレス状態における中枢神経系のオピオイドペプチドの作用機序、動態については中枢モノアミンとの関連を含めまだ十分に明らかにされていない。一方、ウシ副腎髄質由来の enkephalin 前駆体 Proenkephalin A には、4個の Met-enkephalin (Met-Enk) と各々1個の Leu-enkephalin (Leu-Enk), Met-enkephalin-Arg^6-Gly^7-Leu^8 (Met-Enk-Arg-Gly-Leu), Met-enkephalin-Arg^6-Phe^7 (Met-Enk-Arg-Phe) の構造が、塩基性アミノ酸ペアに囲まれて含まれていることが知られている。我々は既に、ヒト、ウシの視床下部、尾状核およびモルモット、ラット、ハムスターの全脳、さらにモルモット脳各部位に Met-Enk, Leu-Enk, Met-Enk-Arg-Gly-Leu, Met-Enk-Arg-Phe が Proenkephalin A に含まれている比率 (Met-Enk : Leu-Enk : Met-Enk-Arg-Gly-Leu : Met-Enk-Arg-Phe = 4 : 1 : 1 : 1) に極めて近似して共存していることを報告した(1,2,3)。

今回は、ストレス状態におけるこれら4種のオピオイドペプチドの中枢神経系での生理的意義を明らかにする目的で、モルモットを対象に、金網拘束ストレス下におけるこれらのペプチドの脳における含量の変化について検討した。

［対象と方法］

体重300－350g の Hartley 系雄性モルモットを対象として用い、金網による拘束ストレスを加えた。①コントロール群 (N=6)、②金網拘束30分群 (N=3)、③同1時間群 (N=6)、④同3時間群 (N=6)、⑤同6時間群 (N=3) と経時的に5群に分けた。拘束に用いた金網は、直径1cm の wire mesh で各モルモットの大きさに合わせ円筒状とし、前後を結紮して固定した。各群ともストレス負荷直後に断頭し、Glowinski, Iversen の方法に準

じ、速やかに前頭葉皮質、視床下部線条体を摘出した。既報に従い(6)、湿重量測定後、10倍量の0.1N塩酸－60%メタノール中で1分間、polytron homogenizer で homogenize し、4℃で10分間加温後、45000×gで30分間冷却遠心して得られた上清を各組織抽出物とし、－30℃で保存した。Met-Enk 様免疫活性(Met-Enk-LI)、Leu-Enk-LI、Met-Enk-Arg-Gly-Leu-LI、および Met-Enk-Arg-Phe-LI は既に報告した各々特異的ラジオイムノアッセイで測定した(1,7,8)。

［結果］

拘束ストレス負荷直後の視床下部線条体、前頭葉皮質の Met-Enk, Leu-Enk, Met-Enk-Arg-Gly-Leu, Met-Enk-Arg-Phe 様免疫活性含量の経時的変化を Fig 1 に示す。図上段に示した視床下部での経時的変化では、拘束30分群において、Met-Enk, Leu-Enk, Met-Enk-Arg-Gly-Leu, Met-Enk-Arg-Phe の4種のオピオイドペプチド含量のすべてがコントロール群に比し、20-25%減少し、Met-Enk, Met-Enk-Arg-Gly-Leu, Met-Enk-Arg-Phe で、$P<0.05$ の有意差を認めた。拘束1時間群、同3時間群ではコントロール群に比し増加する傾向を示し、Met-Enk-Arg-Phe において $P<0.05$ の有意差が認められたが、Met-Enk, Leu-Enk, Met-Enk-Arg-Gly-Leu では有意差は認められなかった。線条体における経時的変化は、図中段に示したように3時間拘束により、各々4種のペプチド含量はコントロール群に比し50%以上の増加を示し、$P<0.01$ の危険率で有意であった。しかし30分拘束では各4種のペプチドともコントロール群に比し僅かに減少し、また1時間拘束ではコントロール群に比し増加傾向を示したがいずれもコントロール群との間に統計的有意差は

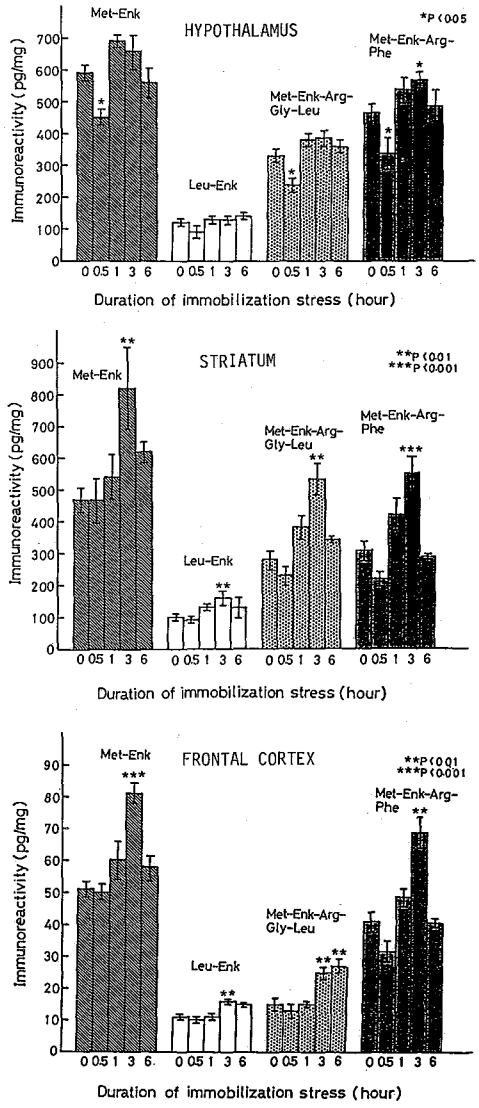


Fig. 1. Contents of Met-Enk-, Leu-Enk-, Met-Enk-Arg-Gly-Leu- and Met-Enk-Arg-Phe-LI in extracts from hypothalamus, striatum and frontal cortex of guinea pig stressed by immobilization.

認められなかった。図下段に示した前頭葉皮質の経時的含量変化においては、30分、1時間拘束群ともコントロール群に比し有意な変化は認められなかったが、3時間拘束群においてMet-Enk, Leu-Enk, Met-Enk-Arg-Gly-Leu, Met-Enk-Arg-Pheの含量すべてにおいてコントロール群に比し50%以上の増加を示し統計的にも有意な増加が示された（$P<0.01$）。

[考察]

拘束ストレス負荷により、視床下部、線条体、前頭葉皮質に、これら4種のオピオイドペプチドの含量の経時的変化をきたすことが明らかになった。これらペプチドの含量は互いによく平行して変動し、ストレス負荷後のMet-Enk, Leu-Enk, Met-Enk-Arg-Gly-Leu, Met-Enk-Arg-Pheの含量の比は、ストレスにより増加した群、減少した群、ともに、ストレスをかえないコントロール群における比率に類似し、これらペプチドの共通前駆体であるPhoenkephalin Aに含まれている比率（Met-Enk：Leu-Enk：Met-Enk-Arg-Gly-Leu：Met-Enk-Arg-Phe＝4：1：1：1）にほぼ一致する結果であった。従って各脳部位のペプチド含量の比率には、ストレスによる明らかな変化は認められなかった。又、既に我々は、ラット副腎髄質クロマフィン細胞の培養細胞灌流系を用いた実験で、Ach刺激により、Met-Enk, Leu-Enk, Met-Enk-Arg-Gly-Leu, Met-Enk-Arg-Pheの4種のオピオイドペプチドおよびその関連ペプチドが灌流液中に同時に平行して放出されることを報告している(9)が、今回脳において4種のペプチドが同時に平行して増減した結果は、これら共通前駆体から由来するペプチドの放出、分泌調節の点から注目すべき所見と思われる。更に脳の部位により含量の経時的変化のパターンが異ったことから、拘束ストレスに対するこれらオピオイドペプチドの反応性が脳の部位により異っていることが明らかになった。

REFERENCES

1. Ikeda, Y., Nakao, K., Yoshimasa, T., Yanaihara, N., Numa, S. and Imura, H. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 656-662.
2. Ikeda, Y., Nakao, K., Yoshimasa, T., Sakamoto, M., Suda, M., Yanaihara, N. and Imura, H. (1983) Life Sci. 33, 65-68.
3. Ikeda, Y., Ijima, M., Suzuki, T., Nakazawa, T., Nakao, K., Yoshimasa, T., Sakamoto, M.,Suda, M., Morii, N. and Imura, H. (1983) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 22, 195-197.
4. Madden,J., Akil, H., Patrick, R.L. and Barchas, J. D. (1977) Nature. 265, 358-360.
5. McGivern, R.F., Mousa, S., Couri, D. and Berntson, G.G. (1983) Life Sci. 33, 47-54.
6. Nakao, K., Yoshimasa, T., Oki, S., Tanaka, I., Nakai, Y., Wakimasu, M., Fujino, M. and Imura, H. (1981) Regul. Peptides. 2, 201-208.
7. Sakamoto, M., Nakao, K., Yoshimasa, T., Ikeda, Y., Suda, M., Takasu, K., Shimbo, S., Yanaihara, N. and Imura, H. (1983) J. Clin. Endocrinol. Metab. 56, 202-204.
8. Yoshimasa, T., Nakao. K., Ohtsuki, H., Li, S. and Imura, H. (1982) J. Crin. Invest. 69, 643-650.
9. Yoshimasa, T., Nakao, K., Sakamoto, M., Suda, M., Morii, N., Ikeda, Y., Kumakura, K., Sasagawa, N., Kato, R. and Imura, H. (1983) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 22, 207-209.

137　Cholecystokinin とその mRNA 及び受容体の脳内分布

長谷川まこと　（新潟大・医・精神科）
桑野良三　（同・脳研・神経薬理）
浜岡利之　（阪大・医・癌研）
高橋康夫　（新潟大・脳研・神経薬理）

〔要　約〕

Cholecystokinin (CCK) は脳腸ペプチドとして知られているが，現在では神経伝達物質あるいは神経調節物質として機能しているのではないかと推定されている。

本研究においてはCCKの脳内部位別濃度をRIA法で，そのmRNAをクローン化したcDNAをプローブとしたdot blot hybridization法で調べた。またその受容体活性を[3H]-CCK8を用いて測定した。その結果，脳内CCK濃度は前頭皮質，海馬，線条体，中脳辺縁系の順に高かった。dot blot hybridizationによるmRNA分布でも前頭皮質で高濃度を示した。受容体の測定でも，類似の傾向が認められた。

更にメトアンフェタミン，ハロペリドールの連続投与による影響もみたが，メトアンフェタミン投与動物の前頭皮質で[3H]-CCKの特異的結合の低下を認めた。次に発達期脳でCCK mRNAの変化も調べたが，生後次第に増加していく傾向があった。以上CCKは脳内で重要な生理的機能を持つことが示唆された。

Key words：　Cholecystokinin, Receptor, mRNA

Cholecystokinin（CCK）は当初消化管ホルモンとして見い出されたが，最近脳にも高濃度に存在することが明らかになり，それ以来脳腸ペプチドとして考えられるようになってきた。脳においてCCKは恐らく神経伝達物質あるいは神経調節物質として働いているものと思われる。そして中脳辺縁系でドーパミンと同一ニューロンに共存しているということ[2]，さらには，臨床的にもある種の精神分裂病者でCCK類似物質が治療上効果があると報告されたこと[4]などから広く興味をもたれるようになってきた。我々はこれまでまず免疫組織化学的方法による脳のCCKの局在，RIAによる定量などについて研究を行ってきた[1]。また最近にはそのcDNAクローニングを行った。

今回ラット及びモルモット脳を使用してCCK濃度の測定，cDNAをプローブとしてのmRNAの測定，その発達による変化，さらに受容体の脳内分布について発表したい。ついでメトアンフェタミン，ハロペリドールなどの連続投与による影響に関しても報告したい。

実験材料と方法

動物としては200～300gのウィスター系の雄性ラットと300～400gの雄性モルモットを使用した。

CCKの定量にはラットを使用し5kW，1.5秒のマイクロウェーブ照射で屠殺して断頭。脳を取り出し各部位に分けて10倍量の熱湯抽出後，次回らの方法でRIAを行った。

CCK mRNAの測定は既報の方法でクローニングしたCCKのcDNAをnick-trans-

lation 法で ^{32}P ラベルし，ラット（モルモット）の脳各部位からフェノール-クロロフォルム法で抽出した細胞質RNAとdot blot hybridizationさせることによって行った。

受容体は N-Succinimidyl [2,3-^{3}H] Propionate CCK8 (Sulphated, 73 Ci/m mole) をリガンドとして使用し，主として斉藤らの方法[57]に従ってモルモット脳各部位から分離した膜分画を用いて特異的結合を測定した。膜標品は原則として凍結せずに即座にアッセイした。インキュベーション後遠心法を用いて結合ペプタドと遊離ペプタドの分離を行った。

実験結果

1 CCK濃度分布（ラット）

予備実験によるとCCK濃度はマイクロウエーブ処理をしたラットの脳の方が無処理で得た脳の3～5倍も高い値を示す。この方法を使用してCCKを測定した論文はあまりないので，同法を用いてラット脳各部位のCCK濃度を測った。その結果を図1に示すが，前頭皮質で高値であるのがわかる。ハロペリドール投与群（1mg/kg 2～3週連日腹腔内投与）では前頭皮質と中脳辺縁系で，メトアンフェタミン投与群（7mg/kg 2～3週連日腹腔内投与）では海馬でそれぞれCCK濃度が減少していたが推計学的に有意ではなかった。

	Control group	Haloperidol group	Methamphetamine group
Frontal cortex	1992±488	1750±332	1808±325
Striatum	1103±184	998±174	1012±121
Mesolimbic area	385± 25	313± 77	418±117
Hippocampus	830±264	732±259	690±208

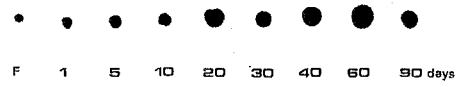
図1 CCK Concentration (ng/g tissue)

2 CCK mRNAの測定，発達期における変化

CCK cDNAクローニングは既報の如く[31]行った。要約するとラット脳マイクロゾームRNAからpoly(A)RNAをオリゴ(dT)セルロースクロマトグラフィーで分離し，このpoly(A)RNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成する。このcDNAとVectorとしてのPBR322をdC-dG法でアニールし大腸菌χ1776をtransformした。CCK8の部分にあたる14merのオリゴヌクレオタイドを合成し，^{32}P でラベルしてプローブとし，colony hybridizationにより陽性コロニーを選別した。この陽性コロニーを培養してプラスミドを分離，insert部分のcDNAの塩基配列をMaxm-Gilbert法で決定した所，718塩基の配列が明らかになった。

そこでこれらのcDNAをnick translation法で ^{32}P ラベルし，これをプローブとして用い発達期ラット脳から抽出した細胞質RNAをdot blot hybridization測定した結果は図2に示す通りである。ラット脳の発達によるCCK mRNAの変化を示すものだが，胎生期，新生期には微量にしか存在しないが，生後次第に増加していくことが明らかになった。次にモルモット脳各部におけるCCK mRNAの分布を同様の手法を用いて検討したが，CCK濃度の高い前頭皮質でmRNAも高値となっている

図2 Developmental changes of CCK mRNA



ことがわかった。（図3）

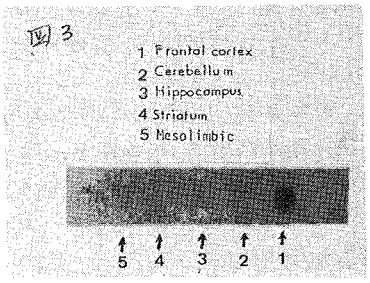


図3

3CCK受容体の分布（モルモット）

予備実験の結果，CCK受容体の測定にラット脳の膜分画を使用すると非特異的結合が高く，好ましくないことがわかった。そこでモルモット脳を用いて結合を検討することにした。図4は[3H]CCK 8, 0.25nMの濃度におけるモルモット脳各部位の特異的結合を示している。前頭皮質で高く，線条体，海馬では低い。中脳辺縁系にはさらに低くなっている。コントロール群とメトアンフェタミン投与群（7mg/kg 11~16日間連日腹腔内注射したもの）とを並べて示してあるが，メトアンフェタミン群で前頭皮質の特異的結合が有意に低下しているのがわかる。

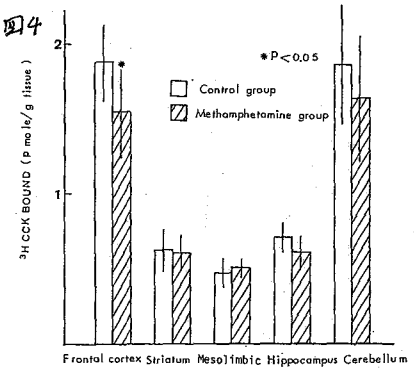


図4

[3H]CCK 8の濃度をかえて両群の結合を検討し，Scatchard plotで比較してみるとKd値に有意差はなく，Bmax値と低下があることがわかった。

考察

以上脳内CCK濃度，CCK mRNA，CCK受容体をそれぞれ調べてみると，小脳では例証もあるようだが，前頭皮質ではいずれも高い濃度の分布を示している。また，CCK mRNAが脳の発達とともに増加することが認められた。これらの事はCCKの脳内で果している重要な何らかの働きを示唆している。我々はこれまでも，メトアンフェタミン，ハロペリドール等の薬物を用いて，CCKの脳内動態を調べてきたが，今後，例えば，今回用いたcDNAプローブなども使用して，さらに研究をすすめていきたいと思っている。

文献

1. 長谷川まこと・薄井宏 高橋康夫・岩永敏彦・浜岡利之(1982) 精神衛生基金研究年報 14, 138
2. Hökfelt, T. et al. (1980) Nature 284, 476
3. Kuwano, R. et al. (1984) J. Biochem. (in press)
4. Moroji, T. et al. (1982) Arch. Gen. Psychiat. 39, 485
5. Saito, A. (1981) J. Neurochem. 37, 483

138　ラット線条体－黒質路の切断による各種ペプチダーゼ活性の変化

岡田正路・加藤　武
（東工大・総理工・生命化学）

〔要　約〕

線条体のカイニン酸破壊に伴なった線条体および黒質における酵素活性の低下から、ペプチダーゼ,angiotensin converting enzyme(ACE)、prolyl endopeptidase(Pro－EP)および aminopeptidase(AP),が線条体－黒質路のニューロン中に存在する可能性が示唆され、この可能性をさらに検討するために、線条体－黒質路をナイフで切断し、尾状核・被殻,淡蒼球および黒質で種々のペプチダーゼ活性を測定した。

尾状核・被殻ではペプチダーゼ活性の減少は見られず、この部位へ投射している上行性のニューロンには今回測定したペプチダーゼは含まれていないと考えられる。淡蒼球においては、ACEおよび Ala－AP活性の減少が見られた。このことは、ACEおよび Ala－APが尾状核・被殻－淡蒼球路のニューロン中に存在している可能性を示唆している。また、黒質では ACE,Pro－EPおよび AP活性が減少した。このことは、これらのペプチダーゼが線条体－黒質路のニューロン中に存在している可能性をさらに支持するものである。

Key words : Striatonigral pathway, Neuronspecific peptidases

昨年の日本神経化学会では、ラット線条体に一側性にカイニン酸を注入し、両側の線条体および黒質での種々のペプチダーゼ活性の変化について報告した(1)。そこでは、ニューロンの破壊・脱離に伴なって特異的に変化するペプチダーゼが脳内に存在することを示した。また、angiotensin converting enzyme (ACE)、prolyl endopeptidase(Pro－EP)および aminopeptidase(s)(AP)活性は、注入部位の線条体および黒質で低下し、これらのペプチダーゼは線条体－黒質路のニューロン中に存在していることが示唆された。しかし、カイニン酸はグルタミン酸様レセプターを介した神経の過剰な興奮による細胞破壊であり、二次的な神経の変性を伴なうことがある。そこで今回は、ナイフによる線条体－黒質路の切断を行ない、尾状核・被殻、淡蒼球および黒質でのペプチダーゼ活性の変化を調べた。

〈 実験方法 〉

Wistar系ラット(♂ 220－280 g)を Nembutal(50 mg/kg、i.p.)麻酔下に固定し、以下の方法で線条体－黒質路を切断した(Fig.1)。

(1－A) Rostrolateral cut：4 mm 巾のナイフをBregma －0.2、Lateral 2.0 の位置で骨表面から 9 mmの深さまで挿入。

(1－B) Rostromedial cut：5 mm 巾のナイフを Bregma －0.2、Lateral 1.0 の位置で骨表面から 9 mm の深さまで挿入。

(2) Caudal cut：5 mm 巾のナイフを　Bregma －1.8、

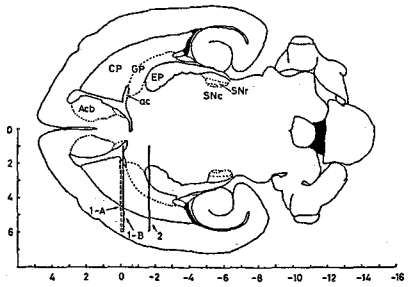


Fig.1 Schmatic representation of a horizontal section of rat brain. Contours of the nuclei are reconstructed from the atlas of Paxinos and Watson(2). 1-A: rostrolateral cut; 1-B: rostromedial cut; 2: caudal cut.

Lateral 1.0 の位置で骨表面から 9 mm の深さまで挿入。

切断後 7、35日目にそれぞれラットを断頭し、両側の尾状核・被殻、淡蒼球および黒質を取り出して、−80℃に保存した。この組織を 10 mM NaPB、pH 7.2中でホモジナイズし、酵素活性の測定に用いた。

Substance P(SP)量、dipeptidylaminopeptidase(DAP),Pro−EPおよび ACE活性測定は、昨年の報告(1)と同じ方法を用いた。AP活性は Ala-p-nitroanilideを基質として pH 6.5(Ala−AP)で、あるいは Leu-4-methylcoumarinamide(Leu−MCA)を基質として pH 6.0(Leu−AP)で測定した。Cathepsin B様活性(Arg−EP)は Boc-Phe-Ser-Arg-MCAを基質として pH 4.2で測定した。

〈 結果と考察 〉

Intact sideにおける SP量および酵素活性はsham operated ratsのものと変わらなかったので、以下の結果は intact sideを対照とした。

尾状核・被殻

SP： (1−A),(1−B) および (2)のいずれの 切断によっても手術後 7日目では変化は見られなかった。しかしながら、rostrolateral cut 後35日目で対照側に比べ、29％の増加が見られた。

Ala−AP： Rostral cutにより、7日目で約 20％の活性の増加が見られたが、35日目では対照側と同程度にまで回復していた。Caudal cutでは変化は見られなかった。

DAP： Rostral lesionにより 7日目に活性の著しい増加が見られた(medial cut,＋106％；lateral cut,＋49％)。Rostrolateral cut後 35日目では対照側と同程度に回復していた。Caudal cutでは活性の増加傾向を示したが、有意な変化ではなかった。

Arg−EP： (1−A),(1−B)および(2)のいずれの切断によっても手術後 7日目に活性の増加が見られた(それぞれ ＋41％,＋125％,＋52％)。Rostrolateral cut後 35日目には活性は、対照側と同程度に回復していた。

淡蒼球

ACE： Rostral cutにより、手術後 7日目で対照側と比べ約40％活性が減少した。Rostro−lateral cut後35日目においても、同程度の活性の減少が見られた。

Ala−AP： Rostromedial cutにより、手術後 7日目で対照側で21％活性が減少した(Table.1)

DAP： Rostral cutにより、手術後 7日目で約2倍活性は増加した。Rostrolateral cut後 35日目においても依然として活性の増加(＋68％)が見られた。

Arg−EP： DAPと同様 rostral cut後 7日目に約4倍と著しい活性の増加が見られた。Rostrolateral cut後 35日目においても約2倍の活性の増加が見られた。

Table I

Changes in the peptidase activities in the globus pallidus at 7 days after the surgical lesions

The values shown are means ± S.E.M. (n=7). Lesioned side was compared with intact side by paired t-test. *p < 0.05, **P < 0.01. A percentage change is indicated with the enzyme which activities in the lesioned side differed significantly from those of control sides.

	Peptidase activity (nmol/min/mg protein)					
	ACE	Pro-EP	Leu-AP	Ala-AP	DAP	Arg-EP
Intact side	0.533 ± 0.048	3.66 ± 0.05	4.86 ± 0.27	2.51 ± 0.11	3.06 ± 0.10	0.587 ± 0.064
Lesioned side	0.320 ± 0.037** − 40 %	3.58 ± 0.11	4.16 ± 0.16	1.99 ± 0.06* − 21 %	8.96 ± 1.03** + 193 %	3.20 ± 0.68* + 445 %

黒質

SP： (1−A),(1−B)および(2)のいずれの切断によっても手術後 7日目で対照側と比べ SP量は減少し

た。Rostrolateral cut後 7日目と 35日目では、ほぼ同程度の減少(約－40％)が見られた。Caudal cutはrostral cutよりも著しい減少(－90％)を引き起した。

ACE： いずれの切断によっても手術後7日目で破壊側の活性は減少した。Rostrolateral cut後 7日目で－25％、35日目では－46％とさらに活性は減少した。

Pro－EP： ACEと同様にいずれの切断によっても手術後 7日目で活性の減少が見られた。Rostrolateral cut後 7日目では 15％の活性の減少で、35日目では減少の程度は縮少したが、依然として有意(－5％)であった。Caudal cutは rostral cutよりも大きな活性の減少(－29％)をもたらした。

Leu－AP： Rostrolateral cutにより手術後35日目で活性は有意に減少(－10％)した。Rostromedialおよび caudal cutでは 7日目でそれぞれ 14％,32％の活性の減少が見られた。

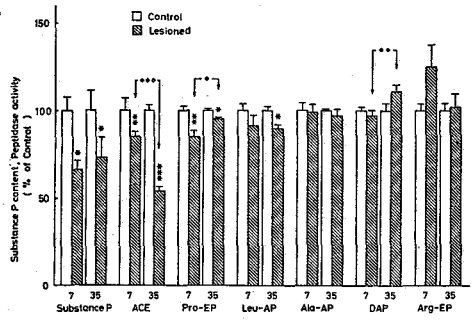


Fig.2 Changes in the peptidase activities and substance P content in the substantia nigra at 7 and 35 days after the rostrolateral cuts. Values are expressed as per cent of those from intact control side. Each bar represents the mean ± S.E. of values obtained from six and five animals at 7 and 35 days, respectively, after the lesion.
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs control (paried t-test)
◆P<0.05, ◆◆P<0.01, ◆◆◆P<0.001 (Student's t-test)

Ala－AP： Rostromedialおよび caudal cutにより手術後 7日目で対照側に比べ、それぞれ 9％, 20％の活性の減少が見られた。

DAPおよび Arg－EP活性は caudal cutにより 7日目で増加傾向が見られたが、いずれも有意な変化ではなかった。

以上の結果より、ACE,Pro－EP,Ala－AP および Leu－APの少なくとも一部は線条体－黒質路のニューロン中に存在している可能性が示唆された。しかし、線条体－黒質路の伝達物質である SPとこれらの酵素の黒質での経時的変化を比較すると、カイニン酸破壊に伴なう変化(1)と同様に今回の結果もいずれの酵素の場合でも SP量の減少と平行には変化していなかった。このことは、これらがそれぞれ異なったニューロン中に存在するかまたは存在状態に違いがあるためと考えられる。また、線条体で見られた DAPおよびArg－EP活性の増加は、切断による損傷部位でのグリア細胞の増殖に伴なったものと考えられる。

ACEは線条体－黒質路のニューロン中に存在している可能性が示唆されている酵素(3,4)であるが、今回の結果はその可能性を強く支持し、さらに本酵素が尾状核・被殻－淡蒼球路のニューロン中に存在する可能性も示唆している。Pro－EPは ACEと同様に神経ペプチドとの関連が示唆されている酵素であり、また AP(s)は、Greenfieldら(5)によって線条体あるいは黒質のニューロンから放出されることが報告されている。本研究の結果はこれらの酵素と神経機能との結びつきをさらに支持するものである。線条体－黒質路には SPや dynorphinなどの神経ペプチドを含有したニューロンが存在することが知られており、これらと今回の特定のペプチダーゼを持ったニューロンとの関連性については今後さらに検討が必要とされる。

〈 文献 〉

1. 越谷 和雄, 知久馬 敏行, 加藤 武 (1983) 神経化学, 22, suppl. 417-4192.
2. Paxions,G. & Watson,K. (1982) "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates" Academic Press
3. Arregui,A., Emson,P.C., Spokes,E.G. (1978) Eur. J. Pharmaco. 52,121-124
4. StrittmEtter,S.M., Lo,M.M.S., Javitch,J.A. & Snyder,S.H. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci. 81, 1599-1603
5. Greenfield,S.A., Grunewald,R.A., Foley,P. & Shaw,S.G. (1983) J.Comp.Neurol. 214, 87-92

139　牛脊髄細胞骨格に存在するカルシウム依存性プロテアーゼの精製と性質

石崎泰樹・黒川正則　（東大・医・脳研・生化）
高橋健治　（京大・霊長類研・生化）

〔要　約〕

牛脊髄をトライトンX-100で処理して得られる細胞骨格標品は，主としてニューロフィラメント蛋白（分子量200K，160K，68K），GFA蛋白（51K），およびアクチン（43K）から構成されている。すでに報告したラット脊髄細胞骨格標品の場合と同様，牛脊髄細胞骨格標品にもカルシウム依存性プロテアーゼが含まれている。この酵素をカゼイン分解能，電気泳動像を指標として，アフィニティクロマトグラフィー（有機水銀-セファロース，カゼイン-セファロース）およびゲル濾過（セファロースCL-6B）によって精製し，牛脊髄可溶分画から精製したカルシウム依存性プロテアーゼと比較した。両酵素ともゲル濾過上の分子量は100kで，SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によると分子量79Kと20Kの2つのサブユニットから構成されている。両酵素ともカゼイン分解には0.2mM以上のカルシウムを要し，反応の至適pHは7~8，種々のチオール-プロテアーゼ阻害剤により強く阻害される。細胞骨格蛋白を分解する活性は，可溶分画からの酵素では0.05~0.1mM Ca^{2+}，細胞骨格からの酵素では0.2~0.5mM Ca^{2+}により活性化される。

Key words：neural cytoskeleton / calcium-activated protease

カルシウム依存性プロテアーゼは種々の組織に存在するが，その細胞内局在はまだ充分には検討されていない（総説10）。神経組織においても殆どの報告は可溶分画からの精製であるが（1,4,6,12,13），最近シナプトゾーム膜分画からの精製が報告された(8)。我々はすでにラット脊髄の可溶分画及び細胞骨格標品の両者にカルシウム依存性プロテアーゼが存在することを報告したが（3,9），その後牛脊髄でも同様の知見を得たので，牛脊髄可溶分画及び細胞骨格のそれぞれから酵素を精製し，性質を比較した。

実験方法

カゼイン分解活性の検出　酵素精製に際してはカゼイン分解活性を指標とした。酵素試料（5~50μl）を基質溶液（0.5%カゼイン／10mMβ-メルカプトエタノール／0.1M Kcl／0.05% NaN_3／20mM Tris-Hcl, pH 7.5）と反応させた後（25°C，5分），0.1M $CaCl_2$ 25μl（終濃度5mM）を加えて反応を開始し，60分後に4%PCAを1ml加えて反応を停止，遠心上清のO.D.280を測定した。対照としてはEDTA（終濃度5mM）をふくむ反応溶液を用いた。25°C，60分間にO.D.280を1.0増加させる酵素活性を1単位とした。

細胞骨格蛋白分解活性の検出　0.6MKclで酵素活性を除去した牛脊髄細胞骨格標品を酵素試料と反応させた後，SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行ない，ポリペプチドの染色像を検討した（3,9）。

結果と考察

牛脊髄細胞骨格からのカルシウム依存性プロテアーゼの精製（表1）　牛脊髄（1750g）を

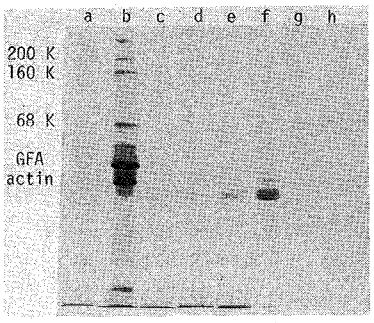
4lの50mM Tris-HCl pH 7.5／25mM KCl／10mM $MgCl_2$／5mM β-メルカプトエタノール／5mM EGTA溶液でホモジェナイズした。ホモジネートではプロテアーゼ活性を検出できないが，これは可溶分画に内在性の阻害因子が存在するためと思われる(9)。ホモジネートにTriton X-100及び蔗糖をそれぞれ終濃度1%，1Mになるように加え4°Cで90分間攪拌した後77,500g 2時間遠心し，沈渣を細胞骨格標品とした。これは主としてニューロフィラメント蛋白（分子量200K，160K，68K)(2,7)，GFA蛋白（分子量51K)(5,11)，アクチン（分子量43K）から構成されており，またプロテアーゼ活性を含んでいる。細胞骨格標品を1200mlの高塩濃度溶液（50mM Tris-HCl pH 7.5／600mM KCl／10mM $MgCl_2$／5mM β-メルカプトエタノール／5mM EGTA）でホモジェナイズした後77,500g 90分遠心すると，活性の殆どは上清に回収される。上清を低塩濃度の溶液（20mM Tris-HCl pH 7.5／5mM β-メルカプトエタノール／1mM EDTA／1mM EGTA）に対して透析した後再び77,500g 90分遠心すると，細胞骨格標品に含まれていた活性の約70%が沈渣に回収される。沈渣を300mlの高塩濃度溶液でホモジェナイズした後，20mM Tris-HCl pH 7.5／150mM NaCl／1mM EDTA／1mM EGTA 溶液（溶液A）に対して透析し，溶液Aで平衡化した有機水銀セファロース4Bカラムにかけ，溶液Aで充分に洗浄した後1，20，40，100mMのβ-メルカプトエタノールを含む溶液Aで溶出した。活性は主として1mM β-メルカプトエタノールにより溶出されたが，20mM β-メルカプトエタノールでも小さな活性ピークが溶出された。これらの活性フラクションを限外濾過で濃縮した後$CaCl_2$を終濃度5mMになるように加え，20mM Tris-HCl pH 7.5／5mM $CaCl_2$／150mM NaCl／5mM β-メルカプトエタノール溶液で平衡化したカゼイン・セファロース4Bカラムにかけ同溶液で充分に洗浄した後20mM Tris-HCl pH 7.5／10mM EGTA／150mM NaCl／5mM β-メルカプトエタノール溶液で溶出した。この操作で比活性は細胞骨格標品中の酵素活性に比べて790倍に増加したが収率は4.1%と低かった。これはカラム操作中に酵素の自己消化がおこるためと思われる。活性フラクションを限外濾過で濃縮した後，20mM Tris-HCl pH 7.5／150mM NaCl／5mM β-メルカプトエタノール／1mM EDTA／1mM EGTA 溶液で平衡化したセファロースCL-6Bカラムにかけ，同溶液で溶出した。このゲル濾過上活性は100Kの位置に溶出された。

表1. 牛脊髄細胞骨格標品からの酵素精製（牛脊髄1750g）

	蛋白(mg)	活性(Unit)	比活性(Unit/mg)	収率(%)	精製倍率
a. ホモジネート	120892	N.D.			
b. 細胞骨格標品	19200	672	0.035	100	1
c. 細胞骨格の0.6MKCl抽出液	8138	*	*	*	*
d. cを低濃度溶液に対して透析した後に遠心した沈渣	4200	454	0.108	67.6	3.09
e. dの0.15M NaCl抽出液	910.8	336.7	0.37	50.1	10.57
f. 有機水銀セファロース4B	243.2	253.4	1.04	37.7	29.71
g. カゼイン・セファロース4B	1.0	27.6	27.6	4.1	788.6
h. セファロースCL-6B	0.22	25.7	116.8	3.8	3337

N.D. 検出不能。 * カゼイン分解活性は検出されなかったが細胞骨格蛋白は分解した。

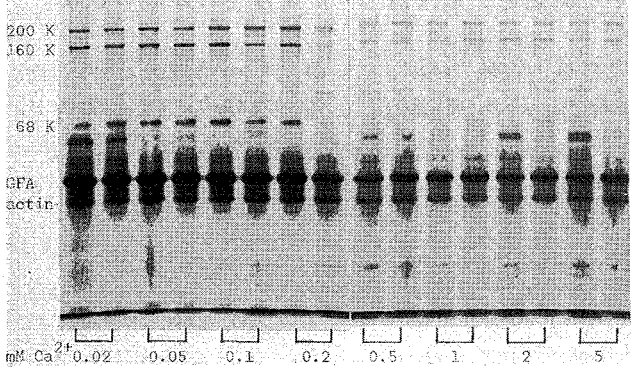
図1. 表1 a-hのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像（15%アクリルアミド）



牛脊髄可溶分画からのカルシウム依存性プロテアーゼの精製　牛脊髄（1115g）を3lの4mM EDTA pH 7.5／15mM βメルカプトエタノール溶液でホモジェナイズし，14000g 30分遠心した後ガーゼで濾過して可溶分画を得た。可溶分画をDEAE-セルロースと混合し撹拌した後20mM Tris-HCl pH 7.5／5mM β-メルカプトエタノール／1mM EDTA／1mM EGTA 溶液で充分洗浄しカラムに充填，NaCl濃度勾配（0~0.5M）で溶出した。活性は0.2M NaCl近辺で溶出された。この活性フラクションから，上述の有機水銀セファロース4B，カゼイン-セファロース4B，セファロースCL-6Bの3段階のカラム操作でカルシウム依存性プロテアーゼを精製した。

細胞骨格から精製した酵素と可溶分画から精製した酵素の比較　両酵素ともゲル濾過上では分子量100Kの位置に溶出された。SDSゲル泳動上，両酵素とも分子量79Kの濃いバンドと20Kの薄いバンドから構成されていた（細胞骨格結合酵素については図1）。両者ともその活性はE-64，ロイペプチン，アンチパイン，キモスタチンなどのチオールプロテアーゼ阻害剤によって強く阻害された。両者ともカゼイン分解活性の発現には0.2mM以上のカルシウムを必要とした。細胞骨格に結合した状態の酵素は0.1mM Ca^{2+}で活性化されニューロフィラメントの160K蛋白を選択的に分解するが，細胞骨格から精製した酵素は活性化に0.2~0.5mM Ca^{2+}を必要とし，200K，160K，68Kを同程度に分解した。一方，可溶分画から精製した酵素は0.05~0.1mM Ca^{2+}の存在下でニューロフィラメントの160K及び68Kを選択的に分解する（図2）。以上のように細胞骨格から精製したプロテアーゼは分子種としては可溶分画から精製した酵素との間に大きな差異は認められない。しかし細胞骨格蛋白に対する作用様式に差異が認められることから，細胞骨格標品中に含まれる酵素活性は可溶分画中の酵素の混入によるものとは考えられない。

図2.細胞骨格からの精製酵素と可溶分画からの精製酵素による細胞骨格蛋白の分解（左：細胞骨格酵素 右：可溶分画酵素）



文献

1. Hirao,T.& Takahashi,K.(1984) J.Biochem.(Tokyo) in press
2. Hoffman,P.N.& Lasek,R.J.(1975) J.Cell Biol.66,351-366.
3. Ishizaki,Y.,Tashiro,T.& Kurokawa,M.(1983) Eur.J.Biochem.131,41-45.
4. Kishimoto,A.,Kajikawa,N.,Shiota,M.& Nishizuka,Y.(1983) J.Biol.Chem.258,1156-1164.
5. Liem,R.K.H.,Salomon,G.D.& Shelanski,M.L.(1978) J.Cell Biol.79,637-645.
6. Malik,M.N.,Fenko,M.D.,Iqbal,K.& Wisniewski,H.M.(1983) J.Biol.Chem.258,8955-8962.
7. Mori,H.,Komiya,Y.& Kurokawa,M.(1979) J.Cell Biol.82,174-184.
8. Siman,R.,Baudry,M.& Lynch,G.(1983) J.Neurochem.41,950-956.
9. Tashiro,T.& Ishizaki,Y.(1982) FEBS Lett.141,41-44.
10. Waxman,L.(1981) in Methods in Enzymology (Lorand,L.,ed.) Vol.80,pp664-680, Academic Press, New York.
11. Yokoyama,K.,Mori,H.& Kurokawa,M.(1981) FEBS Lett.135,25-30.
12. Zimmerman,U.-J.P.& Schlaepfer,W.W.(1982) Biochemistry 21,3977-3983.
13. Zimmerman,U.-J.P.& Schlaepfer,W.W.(1984) J.Biol.Chem.259,3210-3218.

140 コート小胞のカゼイン・キナーゼ

宮崎則幸・豊田直二・門田朋子・門田　健
（都精神研・神経化学）

〔要　約〕

1．牛大脳皮質シナプトゾームから得たコート小胞(Sy-CV)にはカゼイン・キナーゼII活性が存在し、分子量52000の内在性蛋白質(c-52)を燐酸化した。c-52，カゼイン，ホスビチンをATP，GTPで燐酸化し、この反応はヘパリン，2.3-DG(2.3-diphosphoglyceric-acid)で抑制された。　2．このコート小胞(Sy-CV)にはカゼイン・キナーゼI活性も存在すると思われ、これは分子量48000の内在性蛋白質(c-48)を燐酸化した：ATPのみで燐酸化され、ヘパリン，2.3-DGには抑制効果がなかった。3．このコート小胞(Sy-CV)のカゼイン・キナーゼII,I活性は次の物質で抑制された（ATP:燐酸供与体):①プリン及びプリン塩基②ピロ燐酸及びピロ燐酸結合をもつ化合物。　4．牛大脳皮質ミトコンドリア後上清から調製したコート小胞(Py-CV)にも同様なカゼイン・キナーゼII、I活性がみられた。しかしこの場合c-52の燐酸化は弱かった。　5．このコート小胞(Py-CV)のカゼイン・キナーゼII，I活性に対して以下のものは作用を示した（ATP:燐酸供与体）：　①血清蛋白質（促進または抑制）　②ある種の薬物（促進または抑制）。

Key words：　Bovine Brain;　Synaptosomal and Perikaryal Coated Vesicles;　Endogenous Casein Kinase II and I Activities

全脳組織、肝臓から分離されたコート小胞に内在性蛋白キナーゼ活性の存在が知られている(5,6,8)。このキナーゼは添加したカゼイン，ホスビチンをATPで燐酸化する。その活性は環状ヌクレオチド，Ca^{2+}/Calmodulin(CaM)に依存しない(5,8)。牛大脳皮質シナプトゾームから調製したコート小胞(Synaptosomal Coated Vesicles; Sy-CV)にも同様なキナーゼ活性が存在する(7)。このSy-CVのキナーゼの性質を更に詳しく検討した。その結果を報告する。なおミトコンドリア後上清から調製したコート小胞(Perikaryal CV; Py-CV)についても検討したので、合わせて報告する。

〔材料と方法〕

1．コート小胞の分離　牛大脳皮質シナプトゾームから分別、連続庶糖密度勾配遠心法で調製した(Sy-CV)(4)。同様な手法でミトコンドリア後上清からPy-CVを調製した。

2　SDS-PAGEとオートラジオグラフィー　前回と同様に行なった(7)。γ-^{32}P-ATPまたは-GTPと$MgCl_2$共存下、コート小胞及び試験物質を加えた(37°C, 10min, PH7.4)。この後ゲル電気泳動し(Laemmli法)、オートラジオグラフィを行なった。

3．内在性基質蛋白の燐酸化量の測定　蛋白のバンドをゲルから切り出し、液体シンチレーション・カウンターで測定。分子量48.000の蛋白(c-48)と58,000の蛋白(c-52)に主力をおいた。

〔結果〕

1．添加したホスビチン，カゼインはATP,GTPのいづれでも燐酸化された。この燐酸化反応はヘパリンで抑制された(Sy-CV)(Fig-1&2)。2.3-DG(2.3-diphosphoglyceric acid)もこの燐酸化反応を抑制した。　2．内在性基質蛋白の一つ、c-52はホスビチン，カ

→

ゼインと同じように燐酸化され、また燐酸化が抑制された（Sy-CV）（Fig.1&2）。

3．内在性基質蛋白の他の一つ、C-48の燐酸化反応はATPのみで行われ、これはヘパリンで抑制されなかった（Sy-CV）（Fig.1&2）。2.3-DGも抑制効果をもたなかった。

4．プリンおよびプリン塩基はカゼインキナーゼ活性を抑制した（Sy-CV）（Table 1）。

5．ピロ燐酸およびピロ燐酸結合をもつ多くの化合物（補酵素などを含む）は、ATPによるC-52、C-48の燐酸化を抑制した（Sy-CV）（Table-2）。

6．ミトコンドリア後上清から得たコート小胞（Py-CV）にも同様のカゼイン・キナーゼⅡ、Ⅰ活性がみられた。しかしここではC-52のATPによる燐酸化は弱かった（Py-CV）。

7．ポリアミンはカゼインキナーゼⅡ活性に対して促進作用をもたなかった（Py-CV）Table-3）。

8．血清蛋白質，薬物の中には、カゼイン・キナーゼⅡ、Ⅰ活性を促進、抑制するものがあった（Py-CV）（Table 4&5）。

Fig-1

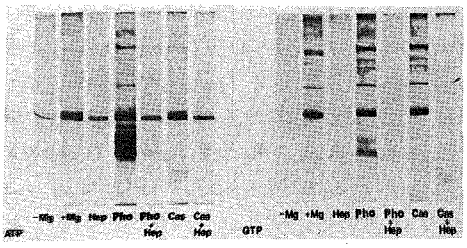


Fig-2

Table 1

Inhibition of the Phosphorylation of CV Endogeneous Proteins by Purines and Purine Nucleotides

(Sy-CV)		(% of control)	
	Tatal	C-52	C-48
-Mg	52	44	33
+Mg	100	100	100
100 μM GTP	65	62	34
GDP	85	107	69
GMP	90	95	76
Guanosine	93	92	80
Guanine	92	94	81
ADP	65	55	38
AMP	100	103	90
Adenosine	87	68	83
Adenine	86	104	76
10 μM Uracil	103	109	99

Table 2

Inhibition by Compounds with Pyrophosphate Bonds

(Sy-CV)	(% of control)		
	Total	C-52	C-48
-Mg	52	44	33
+Mg	100	100	100
10 mM $Na_2P_2O_7$	49	40	29
100 μM Acetyl-CoA	84	49	67
CoA	92	58	81
Adenosine			
5'-DP-ribose	97	53	82
ADPGlu	86	46	72
10 mM FAD	81	53	65
FMN	90	67	75
100 μM F-1,6-P	91	66	78
5 mM NAD	76	69	69
NADH	86	72	87
NADP	90	82	82
NADPH	66	67	51
100 μM NMN	93	71	78
Reduced NMN	91	50	83
TPP	93	59	86

Table 3

Effects of Polyamines on the Phoshorylation of CV Endogeneous Proteins

(Py-CV)	(% of control)	
	5 mM $MgCl_2$	0.5 mM $MgCl_2$
+Mg	100	100
2.5 mM Cadaverine	100	88
Ornitine	94	78
Putrescine	101	90
Spermidine	93	86
Spermine	90	81

Table 4

Effects of Serum Proteins on the Phosphorylation of CV Endogeneous Proteins

(Py-CV)	(% of control)		
	Tatal	C-52	C-48
-Mg	45	35	25
+Mg	100	100	100
100 μg/ml Albumin	137	110	150
100 μM Ceruloplasmin	113	108	115
100 μM Complement-3	121	144	129
100 μg/ml Transferrin	121	112	134
40 μg/ml ACTH	58	49	49
Heparin	79	53	76
100 μM Fibronectin	72	55	39
100 μg/ml NGF	57	52	31

Table 5

Effect of Drugs on the Phosphorylation of CV Endogeneous Proteins

(Py-CV)	(% of control)		
	Total	C-52	C-48
-Mg	40	39	26
+Mg	100	100	100
100 μg/ml Nopate	134	194	128
Tunicamysin	131	154	140
UDP-NAcGluNH	151	207	143
Vinblastine	116	136	124
100μM Colchicine	91	87	91
Diphenylhydantoin	92	66	79

〔考察〕

1．神経終末由来のコート小胞（Sy-CV）の蛋白キナーゼは、多くの臭で諸種細胞の細胞内小器官に分布しているカゼイン・キナーゼⅡに一致する（3）（結果1．と前回の結果でみられたMg^{2+}要求性、環状ヌクレオタド・Ca^{2+}/CaMに対する非感受性など）。ポリアミン、K^+による活性促進効果をもたないこの内在性カゼイン・キナーゼⅡは、内在性蛋白のひとつ、C-52，を燐酸化する。なお、このC-52はα-tubulinと同定されている（6）。

2．コート小胞（Sy-CV）のもうひとつの内在性蛋白質（C-48）は見かけ上カゼイン・キナーゼⅠ（2）で燐酸化される。しかしキナーゼⅡとⅠの関係はなお精査を要するであろう。相互独立のものとなれば、コート小胞にはカゼイン・キナーゼⅠ，Ⅱが共存していることになる。

3．Sy-CVとPy-CVのカゼイン・キナーゼⅠ，Ⅱはよく似ているが、キナーゼⅡ

において少し相違がある。前者のC-52はATPで強く燐酸化されるのに、後者では弱い。なんらかの機能的相違に対応するのかも知れない。

4、プリン、ピロ燐酸、ピロ燐酸結合を含む物質による燐酸化の抑制はC-52, C-48でその程度に大差はない。抑制機序としてもっとも簡単な説明はATPとの競合であろう。アデニン部分だけでなくピロ燐酸部分でも競合があるのであろう。2.3-DG の抑制効果も同様の機序によるのかも知れない。これらの化合物による抑制の生理的意味は未だ不明である。

5、血清蛋白質、薬物の効果については作用スペクトラムに規則性を見出しえなかった。多くの血清蛋白質がレセプター介達性エンドシトーシスによって、コート小胞によって細胞内に搬入されることが知られているが(1)、この現象とコート小胞のカゼイン・キナーゼIIおよびI(?)と直接結びつけられる結果は今回はえられなかった。

References 1. Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W., and Brown, M.S. Nature 279, 678-684 (1979) 2. Hathaway, G.M., Tuazon, P.T., and Traugh, J.A. Methods Enzymol. 99, 308-317 (1983) 3. Hathaway, G.M. and Traugh, J.A. ibid. 99, 317-331 (1983) 4. Kadota, K., Toyota, N., Miyazaki, N., and Kadota, T. Biomed. Res. 4, 421-424 (1983) 5. Paulion, A., Bernier, I., and Jolles, P. Biochim. Biophs. Acta 799, 238-245 (1984) 6. Pfeffer, S.R., Durbin, D.G., and Kelly, R.B. J. Cell Biol. 97, 40-47 (1983) 7. 豊田直二, 宮崎則幸, 山本明宏, 岡田 健, 岡田勝子 神経化学 22, 57-59 (1983) 8. Usami, M., Takahashi, A., and Kadota, K. Biochim. Biophys. Acta 798, 306-312 (1984)

141　筋組織の発育分化ならびに脱神経退化と筋型エノラーゼアイソザイム

加藤兼房・清水温子　（愛知県コロニー・生化）
仙波禮治　（同・周生期）・佐藤豊彦　（愛院大・歯・生理）

〔要　約〕

おもに速筋（Ⅱ型線維）と心筋に分布するββ、αβエノラーゼと非特異的ααエノラーゼについて、(1)新生児ラット筋組織（心臓、舌、横隔膜、下肢筋）の発育分化に伴う変動と、(2)成熟ラット下肢筋（前脛骨筋、外側腓腹筋、長指伸筋、ヒラメ筋）での坐骨神経切断に対する応答を、高感度エンザイムイムノアッセイ法を用いて解析した。

1）出生直後の筋組織（特に心臓）はかなりのααを含有するが、その後3カ月で激減した。一方、ββは下肢筋、横隔膜、舌ですでに出生時にαα、αβより多量存在したが、組織の機能的発育に伴ってさらに増量した：下肢筋では、1カ月で約600 pmolまたは50 μg／mgタンパクの高濃度に達し、以後そのレベルを維持したが、舌では10～20日目の哺乳の盛んな時期に一致して極大値（370 pmol／mg）を示し、以降漸減して成熟ラットでは150 pmol／mgの濃度であった。αβは横隔膜以外では、観察期間中に大きな変動は示さなかった。

2）成熟ラットの坐骨神経を切断すると、前脛骨筋、腓腹筋、長指伸筋中のββ（800～900 pmol／mg）は、2週間で約500 pmol／mg、4週間で300～400 pmol／mgに減少した。しかし、ααとαβは見かけ上増加する傾向を示した。遅筋（Ⅰ型線維）の占める割合の高いヒラメ筋ではββ含量は少く、ββの減少率もやや少なかった。

以上の結果より、横紋筋組織におけるββの含量は、組織の機能状態と密接に関連していることが示唆された。

Key words：Enolase, Muscle, Denervation

動物組織に分布するエノラーゼは、三種類のサブユニット（α、β、γ）よりなる二量体で、αα、αβ、ββ、αγ、γγの五種類のアイザイムが存在する[1,2]。ααは全身組織に分布するのに対し、γ－エノラーゼ（αγとγγ）はおもに神経細胞と神経内分泌細胞に分布し[3]、β－エノラーゼ（αβとββ）は心筋と骨格筋に局在する[1]。神経組織のγ－エノラーゼは、神経系の機能的発育とともに増量する[4-6]。胎生期の筋組織のエノラーゼはααが主成分であるが、筋組織の分化に伴ってβ－エノラーゼに置換されると報告されている[4]。我々は、筋型β－エノラーゼが筋組織の発育分化ならびに神経切断による退化の過程でいかに応答するかを、最近確立したラットαββの高感度イムノアッセイ法を用いて検討したのでその結果を報告する。β－エノラーゼの測定法および成熟ラット組織におけるβ－エノラーゼの分布に関しては、第57回日本生化学会大会にて報告した。

〔方法〕

エノラーゼアイソザイムのイムノアッセイ系：ヒトββの精製法[7]に準じてラット骨格筋より精製したββをウサギで免疫して抗β血清を得、ββ結合セファローズカラムを使って抗血清から特異抗体を精製した。この抗β抗体とすでに報告している[8]抗α抗体を使って、β－ガラクトシダーゼを標識酵素として用いるサンドイッチEIAを作製した。すなわち、ββは抗β抗体を用い、αβは抗αと抗βを併用して測定した。ααも類似の測定系[8]にて定量した。αβは、ααとββの測定系に部分的に交叉したが、交叉率補正計算してαα、ββ値を得た。測定の際に標準として用いたαβは、精製したααとββを混合し解離、再会合させ、生じたαβを分離して[7]使用した。

組織材料：ウイスターラット（生後90日までは雌雄、成熟ラットは雄）の各組織を断頸瀉血後直ちに採取し、分析するまで2～3日間－80℃で保存した。成熟ラットの片側坐骨神経

をネンブタール麻酔下で露出し、大腎神経と腓骨神経分岐部の中間部で切断した。切開部皮膚を縫合して、2～4週間後に前脛骨筋、外側腓腹筋、長指伸筋、ヒラメ筋を分離採取した。各組織は、9倍量の0.05Mリン酸ナトリウム、pH 7.0、含5 mM $MgSO_4$ 中でホモジナイズし、20000g、20分間遠沈上清を得てアイソザイムを分析した。免疫組織化学的染色は、精製抗β抗体を使い間接法[9]にて（ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG を使用）行った。

〔結果〕

β－エノラーゼの組織分布：雄90日齢ラット各組織におけるαβとββの分布を表Ⅰに示した。骨格筋、横隔膜、食道、舌などの横紋筋組織ではββが100 pmol（または10 μg/mg タンパク以上の高濃度で、αβもその$\frac{1}{5}$～$\frac{1}{20}$の濃度で分布している。すでに報告されているように、心筋のβ－エノラーゼは大部分がαβであることが確認された。しかし、膀胱、腸管などの平滑筋組織や他の臓器ではわずかに存在する程度で、骨格筋の約0.1%の濃度であった。ところが軟骨組織である剣状突起中にはかなりのβ－エノラーゼが分布することがわかった。免疫組織化学的には、β抗原はⅡ型筋線維と軟骨細胞中に存在することが明らかになった。

筋組織の分化に伴うエノラーゼアイソザイムの変動：下肢筋、舌、横隔膜、心臓におけるαα、αβ、ββの濃度分布を生後3カ月間に亘って測定した結果を図1に示した。なお、これらの筋組織にはγ－エノラーゼはほとんど存在しない。ββは、出生時の下肢筋ではすでに約60 pmol/mg タンパクで、αα、αβよりも多く含まれているが、生後1カ月間はさらに直線的に増加し、約10倍の600 pmol/mg と成熟ラットのレベルに達することがわかった。横隔膜のββも同様の傾向を示し、3カ月に亘って漸増した。ところが舌では、出生時に180 pmol/mg とすでにかなり高値を示し、生後さらに増加して10～20日目の哺乳の盛んな時期に一致して最大値（370 pmol/mg）に達したが、離乳のためか以降は漸減して、成熟

REFERENCES (1) Rider C C et al 1974 Biochim Biophys Acta **365** 285-300 (2) Fletcher L et al 1976 Biochim Biophys Acta **452** 245-252 (3) Marangos P J et al 1979 J Neurochem **33** 319-329 (4) Fletcher L et al 1978 Develop Biol **65** 462-475 (5) Kato K et al 1984 Neurochem Int **6** 51-54 (6) Kato K et al 1983 J Neurochem **40** 1076-1081 (7) Shimizu A et al 1983 Biochim Biophys Acta **748** 278-284 (8) Kato K et al 1981 J Neurochem **37** 998-1005 (9) Nakane P K et al 1966 J Histochem Cytochem **14** 929-931 (10) Ibi T et al 1983 Muscle Nerve **6** 661-663

Table I Distribution of αβ and ββ enolases in rat tissues

Tissues	Enolase Isozymes (pmol/mg protein) αβ	ββ
Brain	0.44 ± 0.66*	0.07 ± 0.10*
Spleen	0.14 ± 0.02	0.03 ± 0.01
Lung	0.20 ± 0.04	0.06 ± 0.02
Liver	0.13 ± 0.03	0.002 ± 0.002
Adrenal	0.30 ± 0.07	0.47 ± 0.27
Thymus	0.20 ± 0.07	0.55 ± 0.21
Adipose tissue	0.45 ± 0.11	0.48 ± 0.18
Bladder	0.53 ± 0.07	0.78 ± 0.21
Small intestine	0.23 ± 0.04	0.03 ± 0.02
Colon	0.32 ± 0.06	0.45 ± 0.14
Stomach	0.22 ± 0.02	0.68 ± 0.60
Xiphoid process	2.82 ± 0.39	10.6 ± 5.5
Heart	18.5 ± 1.9	2.20 ± 0.27
Tongue	23.5 ± 2.9	144 ± 12
Esophagus	16.1 ± 3.6	247 ± 4
Diaphragm	23.2 ± 6.0	320 ± 38
Leg muscles	25.4 ± 1.6	582 ± 58
Serum	0.06 ± 0.03**	0.011 ± 0.009**

*Mean of 4 rats ± S.D. **pmol/ml

Table II Effect of denervation on the levels of enolase isozymes in four leg muscles

Muscles	Weeks of denervation	No. of samples	Enolase Isozymes (pmol/mg protein) αα	αβ	ββ
M. tibialis anterior	0	12	2.4 ± 1.4*	71.4 ± 8.4	782 ± 88
	2	6	7.0 ± 1.9	97.4 ± 9.0	489 ± 62
	4	6	8.7 ± 3.9	71.4 ± 10.9	318 ± 33
M. Gastrocnemius lateralis	0	12	2.8 ± 1.3	49.7 ± 6.9	860 ± 92
	2	6	8.0 ± 1.7	82.0 ± 7.5	510 ± 26
	4	6	8.5 ± 1.9	74.8 ± 4.4	383 ± 36
M. Extensor digitorum longus	0	12	2.6 ± 2.2	72.2 ± 16.1	856 ± 90
	2	6	6.2 ± 2.1	104 ± 21	431 ± 33
	4	6	6.3 ± 2.4	85.3 ± 23.9	293 ± 43
M. Soleus	0	12	6.2 ± 3.1	74.7 ± 15.4	142 ± 18
	2	6	17.4 ± 2.6	105 ± 18	107 ± 11
	4	6	19.8 ± 3.1	83.8 ± 14.1	83.6 ± 22.8

*Mean ± S.D.

ラットでは150 pmol／mgの濃度であった。心筋中のエノラーゼは出生時は大部分がαα（270 pmol／mg）であるが、1カ月以内に$\frac{1}{10}$近くの濃度になった。この減少に伴ってαβとββが多少増加した。心臓以外の横紋筋組織でもααは生後減少する傾向を示した。αβは、横隔膜では生後1カ月で$\frac{1}{4}$に減少したが、他の組織では観察期間中は大きな変動を示さなかった。

脱神経筋のエノラーゼアイソザイム：成熟ラットの片側坐骨神経切断後に起る4種類の下肢筋（前脛骨筋、外側腓腹筋、長指伸筋、ヒラメ筋）のエノラーゼアイソザイムの変化を表Ⅱに示した。対照として反対側のそれぞれの筋を用いた。未処置の状態でヒラメ筋のββ（140 pmol／mg）が他の3筋（約800 pmol／mg）にくらべて少ないのは、この筋は比較的遅筋（Ⅰ型線維）の占める割合が大きくⅡ型線維が少ないためと思われた。β－エノラーゼは速筋であるⅡ型線維に高濃度に局在することがヒトの骨格筋で証明されている[10]。坐骨神経を切断すると、ヒラメ筋以外の筋のββは2週間で対照の50～60%、4週間で約40%の濃度に減少した。ヒラメ筋のββは、それぞれ75%と60%で減少率がやや低い傾向を示した。脱神経支配によって下肢筋中のββが激減するのに対し、ααとαβは見かけ上増加する傾向を示した。

〔考察〕

横紋筋組織のエノラーゼはββ型が主成分で、しかも組織の機能状態に対応して増減し、筋機能との密接な関連が示唆された。筋組織でのββの合成が、軸索流を介してneurotrophicに調節を受けているかどうか、あるいは筋収縮運動自体がββ合成促進の要因になっている可能性等について今後明らかにして行きたい。

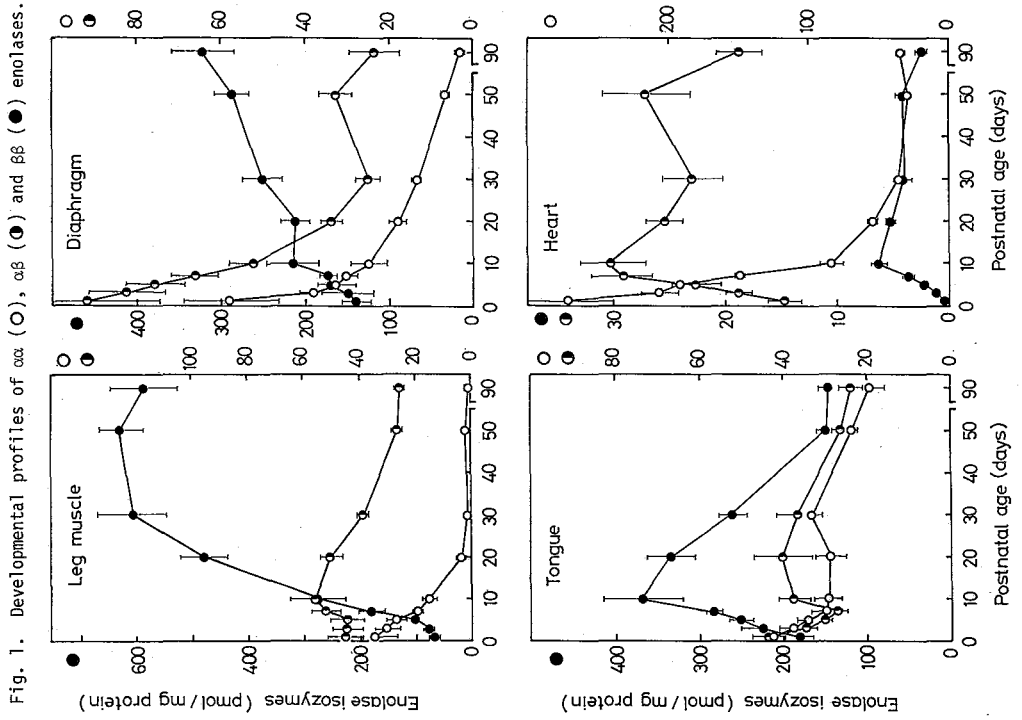


Fig. 1. Developmental profiles of αα (○), αβ (◑) and ββ (●) enolases.

142 Estrogenの脳内グルコース代謝率におよぼす影響 — Quantitative autoradiographic [^{14}C] deoxyglucose法を用いて —

難波宏樹 （千葉大・医・脳外科）
L. Sokoloff （LCM, NIMH）

〔要　約〕

[^{14}C] deoxyglucose 法を用いて，pharmacological doses の estrogen の局所脳グルコース代謝率（LCGU）におよぼす作用を調べた。卵巣摘出 rat に estradiol benzoate 10 ng（EB-10），または 100 ng（EB-100）を静注し，2時間後に LCGU の測定を開始した。血漿 estrogen 値は EB-10 で 270 ± 60 pg/ml（mean ± S.E.M.），EB-100 で 2800 ± 300 pg/ml と正常雌 rat の peak value（約 100 pg/ml）より高かった。LCGU は脳内 60 部位にて定量的に測定された。EB-100 では median eminence を除くすべての脳部位で LCGU の増加を認め，その内 38 部位において統計的に有意であった。EB-10 においては，EB-100 と Control の中間値の LCGU を示す部位が多かった。脳全体を平均した LCGU は，EB-100 では 81 ± 1 μmol/100 g of brain/min と，Control の 69 ± 2 μmol より有意に高かったが，EB-10 では 70 ± 2 μmol であった。Estrogen は脳内で catecholamine 代謝酵素阻害物質である catechol estrogen に転換されることが知られており，高濃度の血中 estrogen は脳内 catecholamine の増加をきたし，ひいては脳代謝の亢進をひきおこすと考えられる。

Key words : estrogen, brain metabolism, [^{14}C] deoxyglucose

てんかんを持つ女性において，その発作の重症度と，血漿 estrogen 値との間に関係があることが報告されている。動物実験においても，estrogen が脳波を賦活することヒ，電気刺激によるけいれん発作の閾値を下げることなどが知られている。また最近，米国において，premenstrual syndrome という概念が話題になっており，estrogen と脳機能との関係には興味深いものがある。脳において，その機能活動とグルコース代謝との間には密接な関係がある(1)。このたび，Sokoloffらの [^{14}C] deoxyglucose 法 (2) を用いて局所脳グルコース代謝率 (LCGU) におよぼす pharmacological doses の estrogen の作用を調べた。

［材量と方法］　卵巣摘出後 2 - 3 週の雌性 S - D 系成 rat（BW: 250 - 300 g）16 匹を用いた。Halothane 麻酔下に大腿動静脈に polyethylene catheter を挿入，石膏ギプスにて動物の下半身を固定し，麻酔覚醒のため，最低2時間待期した。Estradiol benzoate (EB) を少量の ethanol に溶解し，生理食塩水にて希釈し，estrogen 溶液を作成した。次の3群の動物において，estrogen の経静脈投与2時間後より LCGU の測定を開始した。第1群（Control, n = 7）：生理食塩水 iv，第2群（EB-10, n = 5）：EB 10 ng iv，第3群（EB-100, n = 4）：EB 100ng iv。LCGU の測定は [^{14}C] deoxyglucose（[^{14}C] DG）125 μCi/kg の経静脈投与により開始される。45 分間の実験時間中に経時的に動脈血を採取し，血漿 [^{14}C] DG 濃度およびグルコース濃度を測定する。[^{14}C] DG 投与 45 分後に，動物を屠殺し，すばやく脳を取り出し，凍結する。Cryostat にて 20 μm の連続切片を作成し，あらかじめ濃度のわかっている [^{14}C] standard とともに autoradiograph を作成し，microdensitometer により，局所組織 [^{14}C] 濃度を定量的に測定する。以上のように測定された，動脈血漿 [^{14}C] DG 濃度およびグルコース濃度の経時的変化と局所組織 [^{14}C] 濃度により，Sokoloff の式を

用いて LCGU を算出した。

［結果］　実験中，平均動脈圧，ヘマトクリット，体温の測定，血液ガス分析がおこなわれたが，いずれの動物も正常範囲内で，3群間に有意の差を認めなかった。興奮，抑制などの行動的変化も，いずれの動物においても見られなかった。Radio-immunoassay にて血漿 estradiol 値を測定した。EB-10 では 270 ± 60 pg/ml (mean ± S.E.M.)，EB-100 では 2800 ± 300 pg/ml であり，正常雌 rat の peak value (約100 pg/ml) より高かったが，Control では痕跡 level であった。脳内 60 部位にて，LCGU は測定された。各群の動物の平均値および標準誤差を TABLE I に示す。EB-100 においては，median eminence 以外のすべての部位にて，Control より高い LCGU 値を示し，その内 38 部位にて，統計的に有意な増加が認められた。これらの増加は，hypothalamus や limbic system 等 estrogen receptor の豊富な部位より，むしろ cerebral cortex, thalamus, cerebellum, white matter 等 estrogen receptor の少ない部位に強く見られた。EB-10 では，Control と EB-100 の中間値を示す部位が多く，この傾向も estrogen receptor の少ない部位に強かった。脳全体を平均した LCGU は Control の 69 ± 2 μmol/100 g of brain tissue/min に対し，EB-10 では 70 ± 2 μmol であったが，EB-100 では 81 ± 1 μmol と有意に高かった。

［考察］　Estrogen が dose-dependent に，比較的非選択的に，脳全体のグルコース代謝率を上昇せしめることを，定量的[^{14}C] DG法により示した。血中の estrogen は，速やかに血液脳関門を通過し，脳内のあらゆる部位に分布する。Estrogen の 2-hydroxylation により形成される catechol estrogen は，estrogen の主要代謝経路であることが示されており，この catechol estrogen を形成する酵素も，脳内に比較的均等に分布している。Catechol estrogen は catecholamine 代謝酵素である catechol-O-methyltransferase の強力な inhibitor であることも知られている。以上のことより，高濃度の血中 estrogen 下では，脳組織中の catechol estrogen も上昇し，ひいては脳内 catecholamine も増加するであろう。この現象が二次的に脳全体の代謝を高めていると考えられる (3)

REFERENCES

1. Sokoloff, L.,J.Neurochem., 29(1977) 13-26
2. Sokoloff, L., Reivich, M. et al., J.Neurochem., 28(1977) 897-916
3. Namba, H., Sokoloff, L., Brain Res., 291(1984) 391-394

TABLE I

Local glucose utilization in ovariectomized adult rat brain treated with estradiol benzoate (10 and 100 ng iv.).
(μmol/100g/min, mean ± S.E.M.)

Structure	Control (7)	EB-10 (5)	EB-100 (4)
Cerebral cortex			
Frontal	96 ± 3	116 ± 7*	119 ± 6*
Olfactory	106 ± 5	118 ± 6	128 ± 5*
Cingulate	107 ± 3	111 ± 3	139 ± 1**
Sensorimotor	101 ± 4	104 ± 5	120 ± 5*
Parietal	115 ± 4	135 ± 6*	149 ± 7**
Auditory	136 ± 5	152 ± 8	172 ± 4**
Visual	102 ± 4	114 ± 6	136 ± 4**
Thalamus			
Lateral thalamic n.	99 ± 5	105 ± 3	125 ± 2**
Ventral thalamic n.	82 ± 3	92 ± 3	100 ± 4**
Medial geniculate n.	103 ± 5	129 ± 6*	132 ± 8*
Lateral geniculate n.	84 ± 4	87 ± 4	94 ± 4
Medial habenula	62 ± 3	71 ± 5	79 ± 2**
Lateral habenula, medial part	99 ± 5	115 ± 7	133 ± 5**
Lateral habenula, lateral part	124 ± 6	138 ±10	152 ± 6*
Hypothalamus			
Suprachiasmatic n.	59 ± 2	53 ± 3	76 ± 2**
Preoptic area, medial	45 ± 2	44 ± 1	50 ± 2
Preoptic area, lateral	67 ± 2	70 ± 2	75 ± 2*
Preoptic area, magnocellular	87 ± 3	87 ± 4	95 ± 1
Supraoptic n.	77 ± 4	74 ± 3	94 ± 2*
Anterior hypothalamus	47 ± 1	48 ± 2	59 ± 3**
Lateral hypothalamus	69 ± 3	69 ± 3	83 ± 2
Paraventricular n.	59 ± 2	64 ± 3	69 ± 5
Medial forebrain bundle	60 ± 3	59 ± 3	70 ± 3
Ventromedial n.	42 ± 2	45 ± 2	51 ± 3*
Dorsomedial n.	52 ± 2	52 ± 2	61 ± 3*
Arcuate n.	44 ± 2	39 ± 1	46 ± 3
Median eminence	72 ± 2	61 ± 7	54 ± 9
Posterior hypothalamus	61 ± 2	64 ± 2	70 ± 2*
Medial mamillary n.	112 ± 6	124 ± 4	128 ± 4
Limbic system			
Dorsal hippocampus	71 ± 3	67 ± 2	84 ± 2*
Ventral hippocampus	75 ± 2	77 ± 2	87 ± 5*
Dentate gyrus	69 ± 3	66 ± 2	76 ± 6
Medial amygdala	43 ± 2	48 ± 2	51 ± 3
Cortical amygdala	59 ± 3	57 ± 2	70 ± 5
Lateral septum	55 ± 3	52 ± 2	61 ± 3
Medial septum	71 ± 6	72 ± 6	86 ± 5
Nucleus of the diagonal band	70 ± 4	74 ± 4	83 ± 3
Interstitial n. stria terminalis	58 ± 2	55 ± 2	74 ± 3**
Extrapyramidal			
Caudate n.	110 ± 6	113 ± 3	131 ± 4*
Globus pallidus	49 ± 3	53 ± 3	67 ± 4**
Accumbens n.	94 ± 6	106 ± 3	111 ± 2*
Substantia nigra, zona compacta	69 ± 3	65 ± 2	78 ± 4
Substantia nigra, zona reticulata	57 ± 2	54 ± 2	61 ± 3
Red nucleus	73 ± 3	78 ± 3	88 ± 5
Brainstem			
Interpeduncular n.	99 ± 6	110 ± 7	125 ± 6*
Inferior colliculus	180 ± 7	208 ± 9*	213 ± 6*
Superior colliculus	82 ± 4	92 ± 4	104 ± 2**
Central gray	65 ± 2	73 ± 3	87 ± 4**
Pontine gray	58 ± 2	62 ± 2	69 ± 2**
Dorsal raphe	85 ± 3	84 ± 1	107 ± 4**
Medial raphe	101 ± 4	92 ± 4	113 ± 4
Lateral lemniscus	102 ± 3	119 ± 8	123 ± 8
Superior olive	148 ± 8	167 ± 7	157 ± 3
Vestibular n.	109 ± 4	129 ± 6	147 ± 4**
Cochlear n.	145 ± 8	152 ± 7	157 ± 4
Cerebellum			
Cortex	49 ± 2	54 ± 2	59 ± 2**
Dentate n.	88 ± 3	98 ± 4	117 ± 2**
White matter			
Corpus callosum	29 ± 2	29 ± 2	34 ± 1
Internal capsule	31 ± 2	36 ± 1	39 ± 3*
Cerebellar white	33 ± 1	34 ± 1	41 ± 1**

*$p < 0.05$; **$p < 0.01$

143　ヒト脳及び赤血球のHypoxanthine guanine phosphorisyltransferaseの精製と免疫学的相同性

丹野　修（早大・応用化学）・池田和正（早大・応用化学，日大・医・生化）
鈴木晴男（早大・応用化学）・中川滋木（日大・医・生化）

〔要　約〕

Lesch-Nyhan症候群における先天的欠損で知られるHypoxanthine guanine phosphoribosyltransferaseをヒト脳から精製し、これを抗原としてマウスに免疫し抗血清を調製した。精製は、熱処理とGMP-Sepharose affinity chromatography の２段階で行われた。精製酵素の比活性は出発粗抽出物に対して2640倍となり回収率は19.2% であった。免疫はｄｄＹマウスを用いW/O/W エマルジョンとして一週間のインターバルで２回のブースターを行った。次にヒト赤血球から本酵素の精製を行った。精製法はヒト脳と同様に熱処理とGMP-Sepharose columnの２段階で行い、出発溶血赤血球に対して555 倍の比活性を得、回収率は8.5%であった。オクタロニー法によりヒト脳，赤血球両者からの本酵素と抗ヒト脳ＨＰＲＴ血清との沈降反応を観察したところ両者はフユーズした。抗ヒト脳ＨＰＲＴ血清は両酵素とそれぞれ混合後37°C 1時間のインキュベーションを行うと両者ともに80 %以上の活性の阻害が認められた。これらの結果からLesch-Nyhan 症候群の神経学的症状を直接ひきおこすと考えられる脳のＨＰＲＴは赤血球ＨＰＲＴと免疫学的には同一のものであり、構造上の類似性が示唆された。

Key words： Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase, Purification, Anti human brain HPRT serum

Hypoxanthin guanine phosphoribosyltransferase はヒポキサンチンまたはグアニンを基質とし、それぞれＩＭＰ，ＧＭＰを合成するサルベージ酵素である。本酵素の欠乏はLesch-Nyhan 症候群の神経病学的症状と深いかかわりあいがあると考えられている 1) 。本症の患者の赤血球中のＨＰＲＴ活性は正常人に対して1 %程度であることが知られている2)。赤血球中のＨＰＲＴは精製され、その一次構造が明らかにされた 3) 。一方 Lesch-Nyhan症候群患者の赤血球中から機能の非常に低い突然変異性のＨＰＲＴがＧＭＰ-Sepharose affinity columnや免疫吸着カラムにより精製され 4)、その一次構造が明らかにされた。その結果Ｎ末端より50番目 5)、103番目、109番目6)のうちいずれか１つのアミノ酸が正常のものと異なっており、低機能の原因が示された。 Lesch-Nyhan 症候群患者の赤血球中で示されたＨＰＲＴの mutation が脳内ＨＰＲＴとどのような関連を持つかは未だ判明していない。我々は脳内の正常ＨＰＲＴの精製を行い抗血清による酵素の阻害率の測定あるいはオクタロニー法により、脳内酵素と赤血球酵素との免疫学的相違を比較した。

実験材料及び方法

(1)ヒト脳はAutopsy時に入手し、-20°C に保存しておいたものを2ヶ月以内に使用した。

(2)ＨＰＲＴのAssay法

８－14Ｃ-hypoxanthneを基質として用い生成された14Ｃ-IMP量を Gutenshonの方法により測定した。酵素の 1Unitは１分間あたりに生成するIMPのnmol数で表した。

(3) ヒト脳ＨＰＲＴの精製法

ヒト脳100gを 5倍溶の 1mM $MgCl_2$、1mM DTE、1mM KCl、1mg/l polyvinyl pyrrolydone25 を含む50mM Tris-HCl buffer pH7.4の溶液でホモジナイズ後105000xgで遠心分離し可溶性分画を得る。この粗抽出液は 50°C 1時間の熱処理を行い変性タンパクを遠心分離により除去後、ホモジネートbufferで平衡化したGMP-Sepharose affinity column にかけた同bufferで十分洗浄後 5mM GMPを含むホモジネートbufferで溶出を行った。

精製酵素はDavis の方法によるポリアクリルアミド電気泳動によって精製度を調べた。

(4) ヒト赤血球からのＨＰＲＴの精製

ヒト血液20mlを採血後ただちに遠心分離により赤血球を分離し、1,2 回生食水により洗浄後50mlの 0.01M Tris-HCl buffer pH 7.5を添加し溶血、ポリトロン処理の後の105000xgの遠心分離上清を粗抽出液とした。50°C 1時間の熱処理後及びGMP-Sepharoseのaffinity column は脳のものと同様にして精製を行った。

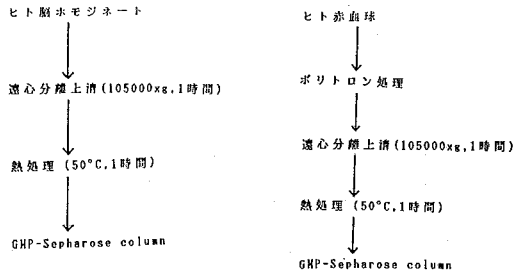


図1 精製法

(5) 抗ヒト脳ＨＰＲＴ血清の調製法

溶出したヒト脳からの精製酵素はただちに連続濃縮をくり返して生食水で置換した。置換した酵素液をFreund完全アジュバントと等量混合し、sonicationにより得たwater in oil (W/O)エマルジョンに2% Tween 80-PBSを加え、さらにsonicationを行いwater in oil in water(W/O/W)としてｄｄＹマウス 2匹に免疫し抗血清を得た。

(6) 抗ヒト脳ＨＰＲＴ血清の同定法

抗ヒト脳ＨＰＲＴ血清の同定は、1%寒天を支持体として用いたオクタロニーの二重拡散法及びＨＰＲＴ活性の阻害を調べることによって行った。ＨＰＲＴ活性の抗血清による阻害は、ＨＰＲＴと抗血清を4:1 の割合で混合し37°Cで、 1時間のインキュベーション後それぞれの可溶性分画の活性を測定した。

結果

(1) ＨＰＲＴの精製

ＨＰＲＴの精製結果は表1 及び表2 に示したようになった。Typical な精製法による精製ヒト脳ＨＰＲＴの比活性値は、出発ホモジネートに対して2640倍となり回収率は19.2% であった。GMP-Sepharose の affinity columnが最も重要なステップでありこの一段階で 519倍に比活性が上昇した。赤血球ＨＰＲＴは出発ホモジネートに対して比活性が 555倍、回収率8.5%であった。ヒト脳ＨＰＲＴは図２に示すように電気泳動上ほとんど単一であることが示された。SDS-PAGEによる分子量測定の結果、分子量は約 25000となり、ヒト赤血球のものとほぼ一致した。

(2)抗ヒト脳ＨＰＲＴ血清の同定

図３に示すように抗ヒト脳ＨＰＲＴ血清は、ヒト脳ＨＰＲＴ、赤血球ＨＰＲＴのど

表1　ヒト脳からのHPRTの精製

	総活性 (unit)	総タンパク量 (mg)	比活性	精製度	回収率 (%)
ホモジネート	8080	6300	1.28	1	100
遠心分離上清 (105000×g)	4590	2040	2.26	1.76	57.0
熱処理後	4500	691	6.51	5.09	55.8
GMP-Sepharose column	1550	0.459	3380	2640	19.2

表2　ヒト赤血球からのHPRTの精製

	総活性 (unit)	総タンパク量 (mg)	比活性	精製度	回収率 (%)
ポリトロン処理	752	1460	0.515	1	100
熱処理後	685	1220	0.556	1.08	91.0
GMP-Sepharose column	64	0.224	286	555	8.5

ちらとも反応して沈降線を生じ、それぞれの沈降線はフューズした。また抗ヒト脳HPRT血清は、ヒト脳HPRT、赤血球HPRTのどちらも阻害した。阻害率は表3に示した。赤血球、ヒト脳どちらのHPRTも同様に阻害を受けることは両者の酵素が免疫学的に同じであることを示している。

考察

精製はGMP-Sepharose affinity columnによりほぼ単一な酵素がヒト脳より得られたが、赤血球酵素に関しては未だ精製が十分になされていない。従来本酵素はテトラマー、トリマー、ダイマー等種々の形態を精製中にとることが知られており、最終ステップでPRPPとインキュベーションすることによって電気泳動

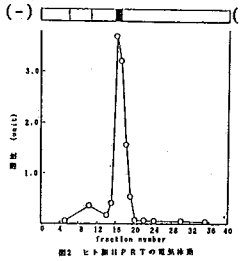


図2　ヒト脳HPRTの電気泳動

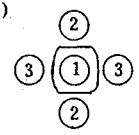


図3
オクタロニー二重拡散法
1:抗ヒト脳HPRT血清
2:ヒト脳HPRT
3:ヒト赤血球HPRT

表3　抗ヒト脳HPRT血清によるHPRT活性の阻害

	インキュベーション時間(分)	正常血清 活性 (unit)	抗血清 I 活性 (unit)	抗血清 I 阻害率 (%)	抗血清 II 活性 (unit)	抗血清 II 阻害率 (%)
脳HPRT	0	2.73	2.30	15.8	1.33	51.3
	60	2.91	0.589	79.8	0.295	89.9
赤血球 HPRT	0	4.68	3.98	15.3	4.54	3.00
	60	5.25	1.00	80.9	0.620	88.2

的に単一なバンドを得ている。我々はこの最終ステップの操作をせずに、なるべく短時間で精製することによってほぼ単一のバンドを得た。Lesch-Nyhan 症候群におけるHPRT活性の先天的欠損は、DNA レベルにおける一塩基の突然変異によるものであることが示されている5),6) が、これらはすべて赤血球中の酵素について論じられているものである。本症では赤血球中のHPRTが正常値の1%程度となるが、線維芽細胞中では0.6~7% 8) と赤血球とは若干異なる含量となっている。本症で実際に神経学的症状をきたすより直接的な原因となりうるであろう脳内のHPRTが、赤血球の酵素と同じものであるかについては未だ論じられていなかった。今回の実験により免疫学的には同じであると考えられたが、Lesch-Nyhan 症候群にみられるmutationした酵素のアミノ酸がただ一つだけ異なるにすぎないにもかかわらず、機能においては大きな差があることから考えて、一次構造の違いについてさらに研究を進めなければならないであろう。

参考文献

(1) Kelley, W.N. and Wyngaarden, J.B. (1983) in The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th edn., In Stunbury, J.B. and Frendrickson, D.S. eds. (McGraw-Hill ,New York) p.1115-1143
(2) De Bruyn CHMM (1976) Hum. Genet. 31, 127-150
(3) Wilson, J.M., Tarr, G.E., Mahoney, W.C. and Kelley, W.N. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10978-10985
(4) Wilson, J.M., Baugher, B.W., Landa, L. and Kelly, W.N. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10306-10312
(5) Wilson, J.M., Kobayashi, R., Fox, I.H., and Kelley, W.N. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6458-6460
(6) Wilson, J.M., Tarr, G.E. and Kelley, W.N. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 870-873
(7) Gutensohn, W. and Guroff, G. (1972) Anal. Biochem. 47, 132-138
(8) Kelley, W.N. and Meade, J.C. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2953-2958

144　キサンチン－キサンチン酸化酵素系によるセロトニンの代謝産物の分離とその若干の性質

植村富彦
（都精神研・神経化学）

〔要　約〕

キサンチン-キサンチン酸化酵素(X-XO系)とセロトニン(5-HT)をO_2とFe-EDTA complex存在下にpH 10.2でincubateした後、セファデックスLH-20ゲルクロマトグラフィー、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)および逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、5-HT由来の黄色代謝産物(Yellow Substance, Y.S.)を分離した。この物質の水溶液および酸性緩衝液中の可視部スペクトルは、400nmに単一のピークを示したが、弱アルカリにするとこの単一ピークは、390と440nmにピークを示す二峯性吸収スペクトルに変換した。3N HCl中での蛍光スペクトルは、励起波長を295nmにセットすると、Y.S.の最大蛍光波長は、5-HTのそれより約10nm短波長側にshiftして535nm附近に現れた。弱アルカリ溶液中では、5-HTと異って二つの蛍光ピーク(376と540nm附近)を示した。Y.S.の発色反応では、Ehrlich陽性(very slowly blue)、Pauly陽性であるが、Xanthydrol陰性、α-ニトロソナフトールとニンヒドリン反応も陰性であった。従って、Y.S.はインドール核をもってはいるが特異な変化をしているものと考えられる。活性酸素によるこの5-HT由来の黄色代謝産物の化学構造式の同定は、現在進行中である。

Key words：　5-HYDROXYTRYPTAMINE (5-HT, SEROTONIN);　YELLOW SUBSTANCE (Y.S.);　ACTIVE OXYGEN

(序論) 従来私共は、活性酸素によるインドールアミンの酸化反応を追求しているが、前回の本学会では、スーパーオキシドアニオン(O_2^-)生成系としてキサンチン酸化酵素(XO)系を用いて、この系にセロトニン(5-HT)又はメラトニンを加えると化学発光が生じること、および、O_2とFe-EDTA Complex存在下に、XO系と5-HTをpH 10.2でincubateすると、5-HTの蛍光の減少に伴なう赤色物質の出現を報告した[1,2]。5-HT由来の代謝産物の分離を試みたところ、赤色物質以外に種々の反応代謝産物を生じたが、今回はその中の黄色を呈する物質を分離したので、その若干の性質を報告する。これらの結果の一部は、本年度生化学総会で既に報告した[3]。

(実験方法) 反応系：反応液は全量16.65ml中、50mMグリシン-NaOH緩衝液(pH10.2)、100μM EDTA-K_2、100μM $FeSO_4$、12mg 5-HT塩酸塩、66μMキサンチン、1.35Uミルク XO(Boehringer)を含む。30°Cで20分間、O_2ガスを0.5ℓ/minでbubblingさせながらincubationした後、60% PCA 0.96mlを加え反応停止後、2.5M K_2CO_3 2mlにて中和する。上記反応系を2本準備。遠沈後上清(reddish brown)を、50%メタノールで平衡化したセファデックスLH-20(1×70cm)にかける[4]。50%メタノールで溶出し赤色分画と黄色分画(5-HTの直前に溶出)を得た。なお溶出は氷室で遮光して行った。上記の操作を6回くり返し黄色分画を集めた。得られた黄色分画を濃縮後メタノールに溶かしTLC(シリカゲルG, 0.5mm, 溶媒：n-ブタノール/酢酸/水 65/15/25)にかけ、黄色ゾーン(R_f=7.8~8.5)をメタノールで抽出する。このTLC操作を3回くり返した後、(3回目で5-HT, R_f=6.5~6.9の混入は完全に除かれる)メタノールをとばしYellow Substance (Y.S.)を400μlの水に溶かし、更に純化の目的でHPLCにかけた。HPLC：カラムサイズ4mm×250mm, 充てん剤は、日立

3056 ODS 系を使用。溶媒は、アセトニトリル/水/ギ酸 600/400/1.5, pH 2.9 を使用。流速 0.7 ml/min, 温度 27°C, 日立 638-50 型。検出器は UV モニターにより 230 と 270 nm で検出。精製は、1回 20 μl 注入を 20 回くり返し黄色物質のピークを分取後、rotatory evaporator で濃縮乾燥した後 dessicator に入れ遮光、氷室に保存。

(結果) HPLC パターン：図1に示す如く、当実験条件下では、5-HT の retention time は約8分、Y.S. のそれは約12分で二物質はよく分離されている。Y.S. のピーク部分を集め濃縮後、分光学的性質および発色反応を検索した。

分光学的性質：図2aは、HPLC にて精製された Y.S. 水溶液の可視および紫外部吸収スペクトルを示している。可視部では、400 nm に単一のピークを示し本物質が黄色を呈するゆえんである。紫外部では、266 と 234 nm に肩を示すのみで 5-HT の UV ピーク (275 nm) は消失している。図2bは、Y.S. の示す 400 nm のピークが、アルカリ溶媒中では二峯性 (390 と 440 nm) に分裂することを示している。crude sample (セファデックス LH-20 溶出後の黄色分画) を用い、50% メタノール中で分光学的に pKa を求めるとほぼ pKa = 6.1 であった。図3には、Y.S. の蛍光スペクトル (実線) を 5-HT のそれ (点線) と比較して示した。3N-HCl 中では (図3a)、295 nm で励起すると、Y.S. の最大蛍光波長は 535 nm 附近にあり、5-HT のピーク波長 (545 nm)[5,6] より約 10 nm 短波長にずれている。励起波長を 270, 230 nm にかえても 535 nm の波長位置は不変であるので Y.S. の最大蛍光波長は確かに 535 nm といえる。又 535 nm に蛍光波長を固定し Y.S. の励起スペクトルを見ると 400 nm に最大ピークを示した。これは可視部スペクトルとほぼ一致する (図2a)。一方、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中 (図3b) では、295 nm の励起で 5-HT は 364 nm に蛍光ピークを示すのに対し、Y.S. は2つの蛍光ピーク (376 附近と 540 nm) を示した。励起波長を 270, 230 nm とかえても両ピーク波長の位置はほぼ変らないので、両波長共蛍光波長といえる。又蛍光波長を 540 nm に固定し Y.S. の励起スペクトルを見ると、452 nm に最大励起波長を示した。これは前述した如く、アルカリ溶液中では、Y.S. の可視部の 400 nm のピークが二つに分裂 (390 と 440 nm) することと関連している。

発色反応：精製後の Y.S. をシリカゲル G の TLC で各種溶媒で展開し、Rf 値と各種発色反応を 5-HT と比較して検討した。Rf 値は当日供覧する。発色反応では、Ehrlich 反応は very slowly ではあるが陽性であり、Pauly 反応も陽性であったが、Xanthydrol は陰性であり、ニンヒドリン、α-ニトロソナフトール反応も陰性であった。

(考察) 分光学的性質について：5-HT のベンゼン環5位のフェノール性水酸基の pKa は約 11 と報告されている[7]。Y.S. の 50% メタノール中での pKa は、約 6.1 であることや、5位の水酸基に特異的とされている α-ニトロソナフトール反応[8] が陰性であったことから、Y.S. の解離基は5位の水酸基ではないと考えられる。次に Y.S. の蛍光スペクトルが、強酸性では 535 nm に、弱アルカリ性でも 540 nm に最大蛍光ピークを示したことは、5-HT のそれが弱アルカリでは 364 nm にあることと大いに異っている。5-HT の強酸中での蛍光スペクトルは、1位の NH 基の protonated form によると報告されている[9]。Y.S. は弱アルカリでも 540 nm に蛍光ピークを示すのは (図3b)、中性又は酸性溶液中の可視部吸収極大 (400 nm) の一部が弱アルカリ性でも残存していることに由来するのであろう。

発色反応について：Ehrlich 反応が非常に遅いのが陽性 (約1日, blue) に現われる。Pauly

も陽性であったので、本物質はインドール環をもつと考えられる。しかし、インドール核構造の確認に使われるXanthydrol反応[10]は陰性であった。ゆえ、Y.S.はインドール核をもってはいるが特異な変化をしているものと思われる。また、ニンヒドリン反応陰性であったことから、エチルアミン側鎖にも何らかの変化が生じていると考えられる。これに関連して、Tryptophan Side Chain Oxidaseによる反応生成物は、Ehrlich反応が陽性ではあるが遅く発色することおよびニンヒドリン陰性であると報告されている[11]ことは興味深い。最近5-HIAAや5-HTのcolored products (pinkやyellow)のHPLCによる分離が報告されているが、その化学構造式は未決定である[12]。Y.S.の分子量と化学構造式を現在検討中である。

生化学的活性について：将来の問題であるが、5-HTはgood electron donorと言われている[13]。本来可視部に吸収をもたない5-HTが活性酸素により黄色物質に変換する。即ち、5-HTより更にelectron richな分子へと変換するので、5-HTよりも一層よきelectron donorになり得る可能性があり、目下この点についても追求中である。

(文献) [1]植村富彦(1984)第26回日本神経化学会抄録集, 22号, 頁411-413 [2] Uemura, T. and Kadota, K. (1984) in Progress in Tryptophan and Serotonin Research (Schlossberge, Kochen, Linzen, Steinhart eds.) pp.673-676, Walter de Gruyter. Berlin, New York [3]植村富彦(1984)第57回日本生化学会総会抄録集 [4] Nelson, D. R. and Huggins, A. K. (1975) Biochem. Pharmacol. 24, 181-192 [5] Udenfriend, S., Bogdanski, H. F. and Weissbach, H. (1955) Science, 122, 972-973 [6] Lovenberg, W. and Engelman, K. (1971) in Methods of Biochem. Analysis. Suppl. Vol. on Biogenic Amines (Glick, D. ed.) Interscience Publishers, pp.1-34 [7] Vane, J. R. (1959) Brit. J. Pharmacol. 14, 87-98 [8] Hanson, A. (1966) in Handbook of Exp. Pharmacol. Vol. XIX (Erspamer, V. ed.) pp. 66-122 [9] Chen, R. F. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 598-605 [10] Jepson, J. B. (1960) in Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. I. (Smith, I. ed.) pp. 183-211, Wiley-Interscience, New York [11] Noda, Y., Takai, K., Tokuyama, T., Narumiya, S., Ushiro, H. and Hayaishi, O. (1977) J. Biol. Chem. 4413-4415 [12] Fornstedt, N. (1983) J. Chromatogr. 270, 359-365 [13] Szent-Gyorgyi, A. (1960) in Introduction to a Submolecular Biology, pp.75-91, Academic Press

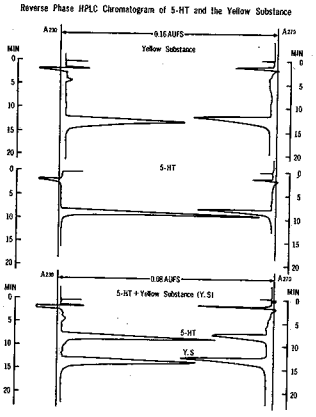


図1

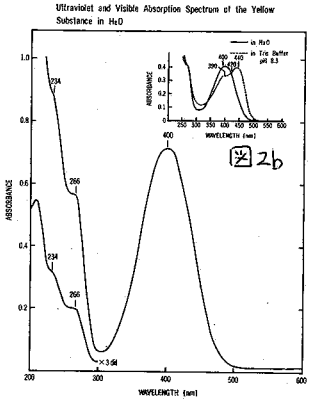
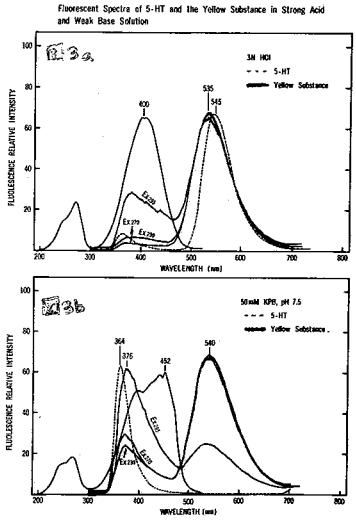


図2b



145 Aging によるラット脳内MAO活性の変動

荒井裕一朗（昭和大・医・薬理）
A. Stenström（Umeå 大・薬理）
L. Oreland（Uppsala 大・Biomedical Center ・薬理）
杵鞭宏育（昭和大・医・薬理）

〔要　約〕

Young ラット（7~9週令）および aged ラット（95~106週令）の脳 striatum のホモジネートを用い dopamine（DA）の synaptosome への uptake を検討した。その結果，aged ラットでは約20％の DA uptake の低下が認められた。また MAO-A と MAO-B 活性を 5-HT および PEA を基質として用い測定した結果 aged ラットでは約20％の MAO-A 活性の低下と，逆に約40％の MAO-B 活性の増加が認められた。次に intra- と extrasynaptosome 中の全MAO活性を測定した結果 extrasynaptosome では全く変化は認められなかったが aged ラットの intrasynaptosome では MAO活性は約15％低下した。さらに intra- と extrasynaptosome 中の MAO-A と MAO-B 活性をそれぞれ測定すると aged ラットでは extrasynaptosome の MAO-B 活性は約33％増加したが intrasynaptosome 中の MAO-A活性は逆に低下していた。次に young および aged ラットの forebrain を用い MAO-A および MAO-B の kinetic parameter（Km，Vmax値）および濃度を求めた結果，Km値には変化は認められなかったが MAO-A の Vmax 値は aged ラットでは低下が認められた。MAO-A および MAO-B 濃度は aged ラットの MAO-A でやや上昇の傾向が認められたが有意ではなく，MAO-B は aged ラットで約25％の有意な増加が認められた。

Key words： MAO, Aging, Brain

Monoamine oxidase（MAO, EC 1.4.3.4）は monoaminergic neuron で化学伝達物質とされる monoamine を代謝してその濃度を調節する重要な酵素の一つとしての役割が注目されている。MAO は特異的阻害薬に対する感受性の相違から MAO-A と MAO-B の2種類に分類され，多くの臓器ではこの両タイプMAOが各々異なった割合で存在している[1]。たとえばラット脳ではいずれの部位でも MAO-A 活性が高く，一方，ヒト脳では反対に MAO-B 活性が高いことがよく知られている[2]。ヒト脳の MAO 活性は加令に伴い変化し，さらに Alzheimer's disease[3], Huntington's disease[4] や Parkinson's disease[5,6] でも MAO活性が著しく変化することが報告されている。加令に伴いヒト脳 MAO-B で著しい活性の増加が認められるが MAO-A にはほとんど影響がないことが知られている[7,8]。一方ラット脳では MAO-A は主に intraneuronal に，また MAO-B は extraneuronal に分布する[9-13] ので加令に伴う脳内 MAO-B 活性の増加は extraneuronal に由来するものと予測される。

今回，我々は加令に伴うラット脳内MAO活性の変化が extra- または intraneuronal に由来するのかを検討するため MAO-A および MAO-B の両方の基質となる dopamine（DA）を用い striatal synaptosome への uptake を homogenate を用い観察し，この点を検討すると共に加令による forebrain MAO活性の変化が MAO の性質の変化によるのか，あるいは MAO 分子の増減によるのかをも併せて検討した。

実験方法

実験動物：実験には Sprague-Dawley ラット（Young として7または9週令，Aged として95または106週令）を用いた。

脳synaptosomeへのDAのuptake：前記ラット脳よりcorpora striata（caudate, putamen, globus pallidus）を摘出しホモジネートを作製した。このホモジネートをアスコルビン酸（0.2mg/ml）および MAO阻害薬 nialamide（1μM）を含むKrebs-Hensleit溶液中で37°C 5分間 preincubationを行い，続いて[^{14}C]-DA（最終濃度 0.1μM）を添加し，さらに37°C 2分間 incubationを行った。反応を停止させるため氷冷し，速かに 7,000×g 10分間の遠心分離を行い synaptosome を含む沈殿をtissue solubilizerで可溶化し，uptakeされた[^{14}C]-DAのradioactivityを計測した。なおuptakeされたDA量はcocaine（25μM）の非存在下と存在下のradioactivityの差より算出した[14]。

Intra- および extra synaptosomal MAO-A と MAO-B 活性の測定（"Low substrate concentration"法）：本実験にはneuronのモデルとしてその性質が良く類似しているsynaptosomeを用いた。ラット脳striatumのホモジネートを酵素標品とし，またDA uptakeの阻害剤としてcocaine（25μM）および MAO-A阻害剤としてはuptake機構を介して取り込まれる特異的MAO-A阻害剤 FLA 336(+)（10μM）を使用した。基質として[^{14}C]-DA（0.1μM）を使用し37°C 10分間のincubationを行い，その代謝物のradioactivityよりintra- および extra-synaptosomal MAO-A と MAO-B 活性を求めた。またstriatum全体のMAO活性の測定は0.1mMの5-hydroxytryptamine（5-HT）を基質としてMAO-A活性を，0.02mM β-phenylethylamine（PEA）を基質としてMAO-B活性を求める一般的な方法により測定した（"High substrate concentration"法）。

ラット forebrain MAO-A と MAO-B 濃度の測定：MAO-A濃度の測定にはclorgylineを，またMAO-B濃度の測定にはl-depreny1を"titre"として使用する滴定法にて測定した[15-17]。

蛋白質量の測定：蛋白質量はBSAを標準としてMarkwellらの方法に従い測定した[18]。

実験結果

Agedおよびyoungラットのstriatal synaptosomeへのDAのuptakeを検討した結果，agedラット（21.9±6.7 pmole/mg protein/min）ではyoungラット（26.9±5.6 pmole/mg protein/min）に比し約20%（$p<0.05$）のuptakeの低下が認められた。"High substrate concentration"法によりstriatumホモジネート中のMAO-AとMAO-B活性を測定した。Agedラットでは約20%のMAO-A活性の低下と反対に約40%のMAO-B活性の増加が認められた。一方，"low substrate concentration"法によりラットstriatumでのintra- およびextrasynaptosome中のMAO活性を求めたところ，agedラットではyoungラットの約87%に低下し（Table 1のT），またDA代謝の約85%はintrasynaptosomal MAOによるものであった（Table 1のI）。この低下をさらに検討するためintrasynaptosome中のMAO-AとMAO-B活性を測定した。その結果，両MAO活性は共に低下したがMAO-A活性の低下はMAO-Bに比しより著明であっ

Table 1 Intra- and Extrasynaptosomal MAO Activity

	T	E	I	E_A	E_B	I_A	I_B
Young rats (n=16)	18.9 ± 2.0	3.1 ± 0.5	15.8 ± 1.8	2.5 ± 0.5	0.6 ± 0.1	14.4 ± 1.5	1.4 ± 1.0
Aged rats (n=8)	16.4 ± 2.3**	3.2 ± 0.7	13.2 ± 1.9**	2.4 ± 0.6	0.8 ± 0.2**	12.1 ± 1.6**	1.1 ± 0.6

Activities are given as pmoles/mg prot/min and values represent means ± S.D. Abbreviations T: total DA oxidation by extra- and intra-synaptosomal MAO; E: extrasynaptosomal DA oxidation; I: intrasynaptosomal DA oxidation; E_A: DA oxidation by extrasynaptosomal MAO-A; E_B: DA oxidation by extrasynaptosomal MAO-B; I_A: DA oxidation by intrasynaptosomal MAO-A; DA oxidation by intrasynaptosomal MAO-B.

Significant differences by Student's t-test; ** ($p < 0.01$)

Table 2 Kinetic Parameters and Concentration of MAO

n=4	MAO-A (sub.: 5-HT)		MAO-B (sub.: benzylamine)	
	Young	Aged	Young	Aged
Km	71.7 ± 2.91	63.0 ±2.31	72.7 ±2.96	68.3 ± 2.67
Vmax	413.6 ±11.58	375.2 ±5.45*	505.0 ±6.83	551.7 ±21.36
MAO Concentration	4.37± 0.246	4.85±0.279	4.17±0.310	5.21± 0.283*

Km, Vmax and MAO concentration are expressed as μM, pmole/mg protein/min, and pmole/mg protein, respectively, mean ±S.E.M. * : $p < 0.05$

た (Table 1 の I_A と I_B)。一方, extraneuronal MAO 活性は反対に aged ラットで MAO-B の活性のみ約33%増加した (Table 1 の E_B)。この MAO-B 活性の増加は "high substrate concentration" 法でみられた MAO-B 活性の増加 (約40%) とよく一致している。Young および aged ラットの forebrain MAO の kinetic parameter (Km, Vmax) および濃度を滴定法で求めた結果を Table 2 に示した。両群 MAO の Km 値には変化は認められず, aged ラットでは MAO-A の Vmax 値の低下と MAO-B 濃度の有意の増加がみられた。

考　察

5-HT や PEA は低濃度の場合選択的に MAO-A や MAO-B の基質となるが高濃度になるに従い 5-HT は MAO-B, PEA では MAO-A により代謝される割合が大きくなり基質特異性が不明確になることが知られている[19]。この現象は DA でも同様で使用する濃度により異なった MAO-A/-B 比が得られる。DA を基質としてラットおよびヒトの forebrain および striatum の MAO-A/-B 比を求めた結果ラットでは A : B = 9 : 1[13,20] で, この比は本実験の成績 (9 : 1) とよく一致する。一方, ヒト脳の A/B 比は約 1 : 1 から 1 : 2 であり,[21-23] ラットとは大きく相違する。今回, DA を基質とした際の A/B "活性比" は約 9 : 1 であったが滴定法による A/B "濃度比" はほぼ 1 : 1 で両者では著しい差異がみられた。この相違は上述の DA を用いたため生じた可能性が強く, 従って滴定法による再検討の必要性を示唆している。本実験で DA の uptake mechanism を用い測定した高い intraneuronal MAO-A 活性の成績はこれまでのラット脳での結果[10,13,24,25] とよく一致する。Table 1 に示した加令によるラット脳 DA 代謝の低下はこの intraneuronal MAO-A 活性の低下が主な原因で, これは 1) DA の uptake 率の低下, 2) DA 代謝に寄与する MAO 活性の低下が考えられる。本実験ではこの 2 点のいずれもが認められたのでこれら 2 者が同時に関与する機構, すなわち DA 神経終末の density の低下によるものと推察される。

Aged ラットでみられた約40%の MAO-B 活性の増加は主に extraneuronal で, この現象は加令のみならず Alzheimer's disease[3] や Huntington's disease[4] でもみられる。従ってこれらの疾患では加令でみられる過程が疾患により急速に発現したもので, 神経終末に代って MAO-B を多量に含むグリア細胞が増殖するためと考えられる。

文　献

1) Mantle,T.J.,Garrett,N.J.and Tipton,K.F.(1976)FEBS Lett.64,227. 2) Oreland,L.,Arai,Y.and Stenström,A.(1983)Acta Neurol. Scand.Suppl.95,81. 3) Adolfsson,R.,Gottfries,C.G.,Oreland,L.,Wiberg,Å. and Winblad,B.(1980)Life Sci.27,1029 4) Mann,J.J., Stanley,M.,Gershon,S.and Rossor,M.(1980)Science 210,1369. 5) Schneider,G.,Oepen,H.and von Wedel,H.R.(1981) Arch. Psychiatr. Nervenkr.230,5. 6) Riederer,P.and Jellinger,K.(1982)Exp.Brain Res.suppl.5,158. 7) Eckert,B., Gottfries,C.G., von Knorring,L., Oreland,L.,Wiberg,Å.and Winblad,B.(1980)Prog.Neuro-Psychopharmacol.4,57. 8) Fowler,C.J.,Wiberg,Å.,Oreland,L.,Marcusson,J.and Winblad,B.(1980)J.Neural.Trans.49,1. 9) Student,A.K.and Edwards,D.J.(1977)Biochem.Pharmacol.26,2337. 10) Demarest,K.T. and Azzaro,A.J.(1979)In:Monoamine oxidase:structure,function and altered functions, Singer,T.P.,von Korff,R.W.and Murphy,D.L.(Eds.) Academic Press(pp.423) 11) Oreland,L.,Fowler,C.J.,Carlsson,A.and Magnusson,T.(1980)Life Sci.26,139. 12) Carlsson,A.,Fowler, C.J.,Magnusson,T.,Oreland,L.and Wiberg,A.(1981)Arch.Pharmacol.316,51. 13) Oreland,L.,Arai,Y., Stenström,A.and Fowler,C.J.(1983) In: Monoamine oxidase and its selective inhibitors. Beckmann,A.and Riederer,P.(Eds.)Mod. Prob.Pharmacopsychiat.19,246. 14) Ross,S.B.,Renyi,A.L.and Ogren,S.O.(1972) Eur.J.Pharmacol.17,107. 15) Kinemuchi,H.,Hayashi,N.,Shin,S.,Uchida,E.,Ueda,T.,Oreland, L.and Kamijo,K.(1980)Bull.Japan.Neurochem.Soc.19,402. 16) Fowler,C.J.,Oreland,L.and Callingham,B.A.(1981)J.Pharm.Pharmacol.33, 341. 17) Egashira,T.,Ekstedt,B., Kinemuchi,H.,Wiberg,Å.and Oreland,L.(1976) Med.Biol.54,272. 18) Markwell,M.A.K., Haas,S.M., Bieber,L.L.and Tolberg,N.E.(1978) Anal.Biochem.87,206. 19) Kinemuchi,H., Fowler,C.J.and Tipton,K.F.(1984)In:Monoamine oxidase and disease.Tipton,K.F., Dostert,P.and Strolin Benedetti,M.(Eds.)Academic Press. 20) Fowler,C.J.and Strolin Benedetti,M.(1983) J.Neurochem.40,1534. 21) Riederer,P.,Reynolds,G.P., Youdim,M.B.H.and Jellinger,K.(1982)In:Monoamine Oxidase-Basic and Clinical Frontiers (Kamijo,K.,Usdin,E.and Nagatsu,T.,Eds.)pp.345,Excerpta Medica. 22) Fowler,C.J.(1982)Drugs Future 7,501.
23) O'Carroll,A.M.,Fowler,C.J.,Phillips,J.P., Tobias,I.and Tipton,K.F.(1983)Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol.322,198.
24) Demarest,K.T.,Smith,D.J.and Azzaro,A.J.(1980)J. Pharmacol.exp.Ther.215,461. 25) Oreland,L.,Arai,Y.and Stenström,A.(1984)In: Monoamine oxidase and disease. Tipton,K.F.,Dostert,P.and Strolin Benedetti,M.(Eds.)Academic Press. 26) Fowler,C.J.,Oreland,L., Wiberg,Å.,Carlsson,A.and Magnusson,T.(1979) Med.Biol. 57,406.

146　基質アナログによるラット脳内MAO活性の阻害作用

杵鞭宏育・荒井裕一朗・豊島良枝
（昭和大・医・薬理）

〔要　約〕

ラット脳中MAO-AおよびMAO-Bの特異的で強力な阻害剤を見出すため3種類のα-methyl基質アナログと6種類のハロゲン化基質アナログについてその阻害作用を検討した。その結果，MAO-Aに対するbromoethylamineとbromopropylamineの弱い阻害作用以外には用いた各種化合物はいずれも用量依存的にMAO活性を阻害した。IC_{50}およびKi値より求めた最もとも強力で特異的なMAO-A阻害剤は両type MAOの基質tryptamineのα-methyl誘導体α-methyltryptamineで，反対に最もとも強力で特異的なMAO-B阻害剤はMAO-Bの基質であるbenzylamineのハロゲン化合物p-chlorobenzylamineであった。これらこ種類の化合物によるMAO阻害作用様式はいずれのtypeのMAOに対してもcompetitiveで，また各種の時間のpreincubationを行っても阻害率の増加は認められなかった。

これらの実験成績と他のα-methyl誘導体でMAO-Aの特異的阻害剤との関係，並びにMAO以外の別のamine oxidase（semicarbazide-sensitive amine oxidase; SSAO）との関連性についても若干ふれた。

Key words：Rat brain MAO, Inhibition, Substrate analogue.

Monoamine oxidase（MAO）（EC 1.4.3.4）はミトコンドリア外膜に局在しneurotransmitter monoamineのdopamine, 5-HT, norepinephrineのほか数多くのアミンを酸化分解する重要な酵素である。現在MAOは"suicide reaction"によりMAOを非可逆的に阻害するclorgyline, l-deprenylに対する感受性の相違からMAO-AとMAO-Bに分類されている[1]。これら両MAOのうち一方のみを比較的低濃度で阻害する"特異的阻害剤"の開発は臨床応用面の必要性から多く試みられている。この特異的阻害剤は作用様序から可逆的と非可逆的阻害剤とに大別される。可逆的で特異的MAO-Aの阻害剤の多くはいずれも化学構造上基質に類似したα-methyl誘導体が多い[例えばamphetamine（α-methyl-β-phenylethylamine）[2]，FLA 336(+)（4-dimethylamino-2,α-dimethylphenethylamine）[3]，mexiletine（1-methyl-2-(2,6-xylyloxy)ethylamine[4]など]。さらに阻害剤のMAO阻害作用にはstereo-selectivityがみられ例えばd体の2,3-dichloro-α-methylbenzylamineはl体に比しMAO-Aをより特異的に阻害し，反対にl体はMAO-Bをより特異的に阻害する[5]。現在MAO-Aの特異的阻害剤は主に抗うつ薬として，またMAO-B阻害剤は他剤と併用しParkinson's diseaseの治療薬としての有用性が指摘されている[6]。

今回，われわれはラット脳中MAOの新しい特異的阻害剤を見出すため9種類の基質アナログによるMAO阻害作用を検討した。

実験方法

酵素標品の作成：　実験には体重230-250 gのWistar系雄性ラットを使用した。酵素標品はラットを断頭後素早く摘出した全脳を0.25 M sucrose - 0.01 M phosph-

ate buffer (pH 7.8) で10%ホモジネートを作成し 600×g, 10分間の遠心で得た上清分画を使用した。

MAO活性の測定：MAO-A活性の測定には 100 μM [^{14}C] 5-HT を基質として使用し，MAO-B活性の測定には 100 μM [^{14}C] benzylamine (BZ) を基質として使用し37°C，10分間の incubation で生成する代謝産物の radioactivity を計測する RI法にて行った[7][8]。

蛋白量の測定：BSA を標準物質として Markwell らの方法[9] で測定を行った。

実験結果および考察

本実験では次の9種類の基質アナログを用いMAO阻害作用を検討した；α-methyltryptamine (α-MT)，d-α-methylbenzylamine (DMB)，l-α-methylbenzylamine (LMB)，o-chlorophenylethylamine (OCPEA)，p-chlorophenylethylamine (PCPEA)，o-chlorobenzylamine (OCBZ)，p-chlorobenzylamine (PCBZ)，bromoethylamine (BREA)，bromopropylamine (BRPA)。これら9種類の化合物 10^{-3}–10^{-8} M の濃度を用いラット脳中 MAO-A と MAO-B 活性に対する阻害作用を検討した。その結果，脂肪族ハロゲン化合物の BREA と BRPA では高濃度 (10^{-3} M) でも軽度の MAO-A 阻害作用しか示さなかったが他の化合物ではいずれも用量依存的に両 type MAO 活性を強く阻害した。Table 1 には各化合物による MAO 阻害作用の IC_{50} を示した (Table 1)。この表より明らかなごとく両 type MAO の基質 tryptamine の α-methyl 誘導体 α-MT では約900倍の特異的な MAO-A 阻害作用がみられ，反対に MAO-B の選択的な基質の p-chloro 誘導体 PCPEA ではわずかながら特異的な MAO-B の阻害作用が認められた。

Table 1 IC_{50} values for inhibition of rat brain MAO

	IC_{50} (μM)		
	MAO-A	MAO-B	IC^{A}_{50}/IC^{B}_{50}
α-MT	1.0	870	0.0011
D-MB	190	280	0.68
L-MB	1000	>1000	-
OCPEA	43	7.8	5.5
PCPEA	100	6.4	15.6
OCBZ	165	81	2.04
PCBZ	49	9.5	5.16
BREA	n.i.	>1000	-
BRPA	n.i.	220	-

n.i.; no inhibitery effect at a concentration of 10^{-3} M

Lineweaver-Burk plot 法より各化合物の MAO 阻害様式を各 type MAO について検討した。その結果，大部分の化合物による阻害様式はいずれの type の MAO の場合も competitive であった。従って前述の IC_{50} 算出の際に用いた基質 5-HT (MAO-A) と BZ (MAO-B) の濃度により特異性もまた阻害強度も大きく影響をうける。また MAO の基質特異性は用いる基質が高濃度の場合と低濃度の場合では大きく変化することが知られている[10]。例えば本実験に用いた 5-HT と BZ は低濃度の場合のみ MAO-A (5-HT) または MAO-B (BZ) により代謝されるが，高濃度では他の type の MAO による代謝も関与する[10]。これらの諸点を考慮して両基質の低濃度 (10–100 μM) を使用して Lineweaver-Burk plot 法よりこれら化合物存在下と非存在下の kinetic parameter を測定しその secondary replot よりもとめた各 type MAO に対する K_i 値を Table 2 に示した (Table 2)。また各化合物による阻害作用の特異性を比較するため各々の MAO に対する K_i 値の比をもとめその結果も Table 2 に表示した (Table 2)。今回実験に使用した化合物（基質アナログ）のうち最もよく強力な MAO-A 阻害剤は IC_{50} の成績と同様に α-MT (K_i = 0.82 μM) で続いて D-MB，

Table 2 Ki values for inhibition of rat brain MAO

	Ki value (μM)		
	MAO-A	MAO-B	K_i^A/K_i^B
α-MT	0.82	150	0.0055
D-MB	24	60	0.40
L-MB	220	625	0.352
OCPEA	37	15	2.47
PCPEA	68	20	3.40
OCBZ	-	48	-
PCBZ	60	2.8	21.43
BREA	-	-	-
BRPA	-	330	-

害する[12]。従ってこれら別個のamine oxidaseのactive siteの類似性が示唆される。

OCPEAと続き，一方MAO-Bに対して最もも強力な阻害剤はPCBZ（Ki=2.8μM）で続いてOCPEA，PCPEAの順であった。両MAOに対するKi値の比より求めた最も特異性の高いMAO-A阻害剤はα-MTで（ratio=0.0055），反対にMAO-BではPCBZ（ratio=21.43）であった。本実験でみられたα-methyl誘導体による強力なMAO-A阻害作用はこれまでの多くのα-methyl誘導体が特異的にMAO-Aを阻害する事実と一致する。しかし，α-methyl化合物で強力なMAO阻害剤FLA 336(+)[11]，FLA 288(+)[11]やMD 780236はMAO阻害剤に抵抗性をもちsemicarbazideで阻害されるsemicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO)をも強く阻

文　献

1) Kinemuchi,H. and Kamijo,K. (1980) Protein, Nucleic acid and Enzyme, 25, 1069.
2) Mantle,T.J., Tipton,K.F. and Garrett, N.J. (1976) Bichem. Pharmacol., 25, 2073.
3) Fowler,C.J. and Oreland,L. (1981) J. Pharm. Pharmacol., 33, 403.
4) Callingham,B.A. (1977) Brit. J. Pharmacol., 61, 118p.
5) Fuller,R.W. and Hemrick,S.K. (1978) Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol., 20, 199.
6) Fowler,C.J. (1982) Drugs Future, 7, 501.
7) Fowler,C.J., Ekstedt,B., Egashira,T., Kinemuchi,H. and Oreland,L. (1979) Bichem. Pharmacol., 28, 3063.
8) Fowler,C.J. and Oreland,L. (1980) Biochem. Pharmacol., 29, 1177.
9) Markwell,M.A.K., Haas,S.M., Bieber,L.L. and Tolberg,N.G. (1978) Anal. Bichem., 27, 206.
10) Kinemuchi,H., Fowler,CJ. and Tipton,K.F. (1984) in Monoamine oxidase and disease, Tipton,K.F., Dostert,P. and Strolin Benedetti,M.(Eds), Academic Press, N.Y.
11) Ask,A.-L., Hogberg,K., Schmidt,L., Kieling,H. and Ross,S.B. (1982) Biochem. Pharmacol., 31, 1401.
12) Kinemuchi,H., Morikawa,F. and Ueda,T. (1984) submitted for publication.

147　マウス脳内 Monoamine Oxidase 活性に対する Methamphetamine の影響

江頭　亨・清永由子・山中康光
（大分医大・薬理）

〔要　約〕

マウスに d-Methamphetamine（MP）5mg/kg を4週間連続投与した場合の，シナプトソーム中の Monoamine Oxidase（MAO）活性に対する影響を検討した。集団飼育群では約10～20％の MAO 活性が低下したが，隔離飼育群では，この低下は起らず，MP による集団毒性が認められた。MP 投与による MAO 活性の低下は，投与後3週目頃から有意に認められ，MP 投与を中止すると，1週目で著明な MAO 活性の増大が認められた。MP 投与によりいずれの MAO 基質を用いても，Km 値の増加が認められたが，Vmax には有意な差はなかった。一方，退薬により Km 値の回復又はわずかな低下が認められた。MP 投与による MAO 活性の減少と，退薬による MAO 活性の増加は，特異的 MAO の阻害剤による阻害効果の検討から，MAO の酵素量の変動によるものでない事が判明した。MP およびその代謝物である amphetamine，p-hydroxymethamphetamine，p-hydroxyamphetamine は dopamine，serotonin，β-phenylethylamine の順に MAO 活性を強く阻害した。MP は in vivo では A および B 型 MAO を同程度に阻害したが，in vitro では，A 型 MAO に選択的であり，特にその代謝物で強く A 型 MAO を阻害した。

Key words：　methamphetamine,　monoamine oxidase,　mouse brain synaptosome

Methamphetamine（MP）および Amphetamine（AP）による異常行動や幻覚妄想状態の発現について，行動薬理学的および生化学的見地から検討され，シナプスにおけるカテコールアミンの放出促進と再吸収の抑制によるとされ，特にドーパミン神経系の関与が数多く報告されている。[1][8] 又，その結果，二次的にカテコールアミンの生合成促進や，アミンの分解酵素の活性抑制にも関与していると思われる。MP および AP は in vitro で Monoamine Oxidase（MAO）を阻害することから，in vivo においても何らかの作用を発現する事が推察される。そこで今回，マウスに d-MP を長期連続投与する事により，マウス脳 MAO 活性にいかなる変化が惹起されるかを検討した。

〔実験方法〕

実験動物として雄性 ddY 系マウス（体重16～18g）を用いた。マウスは6時から18時を明期とする12時間明暗サイクルで飼育した。マウスを隔離飼育群および集団飼育群に分け，d-MP（5mg/kg/day）を毎日11～12時に1日1回腹腔内に4週間連続投与した。対照群には同容量の生理食塩水を反復投与した。退薬群は，MP 4週間投与後，次の日から MP の代りに生理食塩水を3週間連続投与した。

酵素溶液の調整：一定期間 MP および生理食塩水を投与後，断頭し，大脳を取り出し，これを氷冷下 0.32 M sucrose（pH 7.2）溶液で10％ homogenate を作製した。これを常法どおり遠心して粗 mitochondria を得，これを Gray 等[4]の方法による ショ糖不連続密度勾配遠心沈殿法により，0.32～0.8 M ショ糖層で得られた synaptosome 分画を MAO の酵素標品として用いた。MAO 活性測定：MAO 活性測定には ラジオアイソトープ法を用い，^{14}C-5-hydroxytryptamine（5-HT），^{14}C-dopamine（DA），^{14}C-β-phenylethylamine

(β-PEA)基質の場合，既報の方法[2]を用い，^{14}C-norepinephrine (NE)基質では Goridis 等の方法[3]に準じた。 MAO活性に対するMPの in vitro の実験で，MPの代謝物である p-hydroxymethamphetamine (OH-MP) および p-hydroxyamphetamine (OH-AP)は当教室で合成した。 蛋白量の測定：酵素標品の蛋白量は，Lowry法[7]に準じて測定した。

〔結果および考察〕

MP 5mg/kg/day を4週間腹腔内投与後の各群のMAO活性を4種の基質を用いて測定した(表1)。 MP隔離マウス群では，5-HT, β-PEA および DA 基質でいずれも対照群に比較し，有意な差は認められなかった。 一方，MP集団群では，いずれの基質を用いても10～20%のMAO活性の低下が認められた。 MP群と対照群を同一ケージで飼育した場合，いずれの群でも対照群のみと比較して著明な差は認められなかった。 すなわちMP集団マウスのみでは，MAO活性の低下が認められるにもかかわらず，MP集団マウスを対照集団と同一ケージで飼育すると，MP集団マウスのMAO活性の低下が出現しなかった。 一般的にMPは集団毒性を示す薬物として知られている。 今回のMAO活性に於いてもMP隔離群に比較し，MP集団群にMAO活性の低下が認められた事は，MPの集団毒性発現機序にMAO活性が何らかのかかわりを持っている事を示唆している。 MP投与によるMAO活性の低下がマウスを集団で飼育した時にのみ認められたので，この現象について詳細に検討した。 オ1図に見られる様に，投与後3週目附近からいずれの基質を用いてもMAO活性の有意な低下が認められた。 4週間投与後，MP投与を中断すると，一週目で著明なMAO活性の増大を示し，その後も持続した。 一方，DA基質では，退薬後，徐々に活性の回復が起り，3週目に対照値に戻った。 次にMP連続投与による脳内MAO活性の低下および退薬後の増加のメカニズムについて酵素化学的に検討した。 対照群，4週間MP投与群および4週間MP投与後退薬3週目群のsynaptosomeを用い，4種のMAO基質におけるKmおよびVmax値を比較した(表2)。 MP投与により，いずれの基質を用いても著明なKm値の増加が認められたが，Vmaxには有意な差は認められなかった。 また退薬群では，5-HT, DA およびβ-PEAで，Km値の回復又はわずかな低下を示したが，NEの場合，Kmおよび Vmax値の増加が認められた。 MP退薬後に認められた著明なMAO活性の増大のメカニズムに関しては，ほとんど知られていない。 MPを反復

表1． マウス各飼育群の MAO 活性の比較

synaptosome	5-HT	DA	β-PEA	NE
対照隔離マウス	579.3±10.9	418.8±8.2	1758.5±71.8	82.5±3.8
対照集団マウス	535.1±10.8	399.5±10.2	1739.6±48.3	79.5±4.8
MP隔離マウス	585.7±11.4	425.6±9.0	1802.7±63.6	89.4±2.8*
MP集団マウス	526.1±8.7*	339.4±7.4*	1505.1±33.8*	67.4±3.8*
対照集団中MPマウス	608.0±20.2	423.0±17.6	1675.5±132.4	93.3±4.6*
MP中対照マウス	560.9±10.9	368.2±5.8*	1595.5±76.0	78.1±4.6

MAO activity : pmole/min/mg of protein, *p<0.05

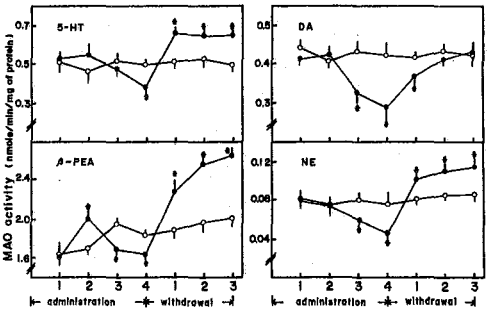


図1． MP 4週投与および退薬による MAO 活性の変動
○—○ 対照群 ●—● MP投与群 * P<0.05

表2． 各群の Km , Vmax 値

	control		MP-treated		MP-withdrawal	
	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax
5-HT	96.4±1.8	1638±108	131.9±5.0*	1714±189	97.3±1.2	1645±95
DA	296.9±14.8	2350±115	433.1±30.1*	2390±98	310±10.4	2095±138
β-PEA	6.2±0.2	1992±161	10.1±0.8*	2199±147	5.2±0.2*	2319±253
NE	266.6±15.2	190.6±15.8	304.1±11.8	223.3±20.5	433.4±21.3*	381.8±56.8*

Km : μM , Vmax :pmole/min/mg of protein, * p<0.05

投与し，長期断薬後にMPの少量投与で，及復投与時の症状が再現される事が観察され，この現象は，ドーパミン機構の感受性亢進に基づくものと考えられている。MP退薬後にMAO活性の増加が認められた事も，synaptosome中のMAO自身の感受性の亢進によるかもしれないが，退薬後のMAOの親和性はそれ程亢進しておらず，又，DAを基質とした場合には，対照値に戻ったのみである事から，その他の機序が考えられる。又上述の現象は，NE，DAニューロン系のみで現われることなく，5-HTニューロン系も関与している可能性がある。又，この現象はMP投与により，MAOの量的変化によるものであるか否かを，上述の3種の酵素を用いて，A型およびB型MAOの阻害剤（clorgyline，deprenyl）に対する阻害効果を比較検討したところ，3群酵素間には，有意な差は認められなかった（data not shown）。この事は，MP投与および退薬後におこるMAO活性の増減は，MAO酵素の量的変化によるものでなく，Km値の変動に見られる様に，質的変化によるものと思われる。この質的変化の原因の一つとして，MP又はその代謝物による直接的あるいは間接的な影響が考えられる。MP 5mg/kgを1回マウス腹腔内に投与した場合，脳内MP濃度は30分で最高となり（約4.9μg/g），そのhalf-lifeは約56分で，3時間後でも約0.84μg/gのMPが脳中に残存していた[10]。

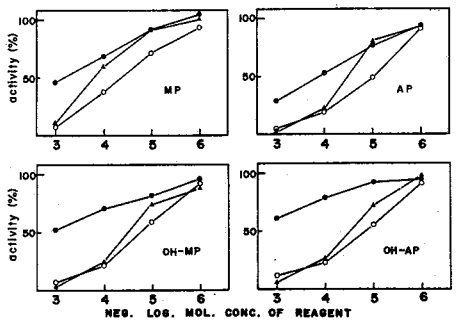


図2．MPおよびその代謝物によるMAO活性に対する影響
●—● β-PEA，▲—▲ 5-HT，○—○ DA

又，MP投与でMPはAP，OH-MP，OH-APに代謝される事が知られている。そこでこれら4種の薬物について，in vitroでMAO活性への影響を検討した（第2図）。APはその他の薬物に比較して強いMAO阻害作用を示した。又，いずれの薬物の場合も，DA，5-HT，β-PEAの順に強い阻害作用が見られた。5-HT，DAを基質とした場合，MPに比較して，その代謝物であるAP，OH-MP，OH-APによって強く阻害され，特にDAの場合，それら薬物の低濃度で著明であった。d-MPはin vitroで，APはin vivo，in vitroでA型MAOを選択的に阻害する事が報告されている[6][9]。今回の実験に於いて，MPはin vivoではAおよびB型MAOともに同程度の阻害を示したが，in vitroではA型MAO選択的であり，特にその代謝物で著明であった。一般にMPの作用は，シナプスにおいてカテコールアミンの合成および放出を促進し，再吸収を抑制し，結果的に神経伝達を著明に促進することにある。しかし，その他にシナプスにおけるカテコールアミンの過剰放出に，シナプス内のMAOの阻害，特にA型MAOの阻害も関与していると思われる。又特にその代謝物が強いA型MAO阻害作用を有している事も注目に値する事であろう。最近，MP連続大量投与により，ラット脳線状体ドーパミンニューロンが損傷を受ける事が報告されており[6]，MAO活性低下と何らかの関係があるかもしれない。

〔文献〕(1)Akiyama,K.et al.(1982)Biol.Psychiat. 17,223-231 (2)Egashira,T.et al.(1978)Arch. Biochem.Biophys. 191,714-718 (3)Goridis,C.et al.(1971)Br.J.Pharmac. 43,814-818 (4)Gray,E.G. et al.(1962)J.Anatomy 96,79-88 (5)Green,A.L.et al.(1978)J.Pharm.Pharmac. 30,262-263 (6) Lorez,H.et al.(1980)Life Sci. 28,911-916 (7)Lowry,O.H.et al.(1951)J.biol.Chem. 193,265-275 (8)Scheel-Kruger,J.et al.(1967)Life Sci. 6,1389-1398 (9)Suzuki,O.et al.(1980)Biochem. Pharmac. 29,2071-2073 (10)Yamanaka,Y.et al.(1983)Japan.J.Pharmac. 33,33-40

148 6時間明暗条件下のラット脳神経核レベルにおけるモノアミン酸化酵素活性の日内リズム

国元憲文・挾間秀文・原田　豊・水川六郎
（鳥取大・神経精神科）

〔要　約〕

ラットを6時間毎の明暗周期条件下で3週間群居飼育した後，1日8時点で断頭，各種指標の日内リズムについて検討した。指標とした項目は，血中corticosterone，行動量および脳神経核レベルでのmonoamine oxidase(MAO)活性である。MAO活性の測定は，N. suprachiasmaticus(SCN)，N. ventromedialis(VMH)，pineal gland(PG)，stratum griseum superficiale colliculi superioris(SGS)の4部位について，serotonin(type A)およびphenylethylamine(type B)をそれぞれ基質として行われた。

その結果，corticosterone量は暗期低下明期上昇，行動量は暗期中2峰性上昇明期低下の日内リズムがみられた。MAO活性は，SCN，VMHにおいて両typeともに暗期上昇明期低下の日内リズムがtype別に位相差を持ち出現，PGではtype Bのみに暗期低下明期上昇，SGSでは両typeともに暗期低下明期初期上昇の日内リズムを認めた。

これらの結果は，計時機構を有するとされるSCNで明暗周期に応じた2相性リズムが出現している点で興味深く，また12時間明暗周期条件下の場合と比較して，SCNのtype A MAO活性リズムの位相，VMHでの日内リズム出現などの点で異なっており，これらの点を中心として考察を加えた。

Key words：diurnal variations of monoamine oxidase, 6—hour daily photocycle, suprachiasmatic nucleus and ventromedial nucleus.

〔はじめに〕

われわれは，これまで各種条件下におけるラット脳神経核レベルでのmonoamine oxidase (MAO) 活性の日内リズムについて検討を加えてきた。[1][3] また，近年これら日内リズムに関する生化学的研究も多くなされている。[7][8] MAO活性の日内リズムについては光刺激によってリズムを示すと考えられる部位，恒暗条件下でもリズムのfree runningを示す部位，あるいは摂食行動と関連してリズムを生じてくると考えられる部位などが，明らかにされてきている。[1][3]

今回は，それらの脳神経核レベルにおけるMAO活性の日内リズムが，6時間毎の明暗周期交代によってどのような影響を受けるかについて調べるとともに，生体リズムの他の指標として血漿中corticosterone量と行動量についても測定し，若干の興味ある知見を得たので考察を加えて報告する。

〔実験方法〕

9週齢のWistar系雄性ラットを，恒温恒湿の飼育室で外部と隔離し群居飼育した。2時消灯，8時点灯，14時消灯，20時点灯の6時間周期の明暗サイクル条件下で3週間飼育，この間摂食・摂水は自由とした。その後，2時，5時，8時，11時，14時，17時，20時，23時の1日8時点でそれぞれ6匹ずつ断頭，採血するとともに脳を摘出し液体窒素で固定，クリオスタット内で60～90 μmの連続切片として凍結乾燥した。この切片から1.0～7.0 μgの神経核を切り出し，重量測定後MAO活性を測定した。

MAO活性の測定は，McCamanらの方法[4]を改変した既報の方法[1][3]により，type A MAOの基質にはserotonin (5-HT) を最終濃度0.98mMで，type B MAOの基質には，phenyl-

ethylamine (PEA)を最終濃度18.3 μM で用いた。

血中corticosterone の定量はHPLC法[6]により，行動量は別に同一条件で飼育したラットについて，3週目を中心に4日間連続してAutomexを用いて測定し，1時間毎の運動量として記録した。

〔結果〕

① corticosterone の日内リズム

2時に最高値，5時に最低値を示し，暗期低下明期上昇の明暗周期に同調した日内リズムが認められた(Fig. 1左，n＝6，平均値を示す。図の見易さのため標準誤差を省略したが，平均値の2～8％の範囲内であった。以下，Fig. 1右，Fig. 2についても同様)。

② 行動量の日内リズム

6時間の暗期の中で消灯直後と点

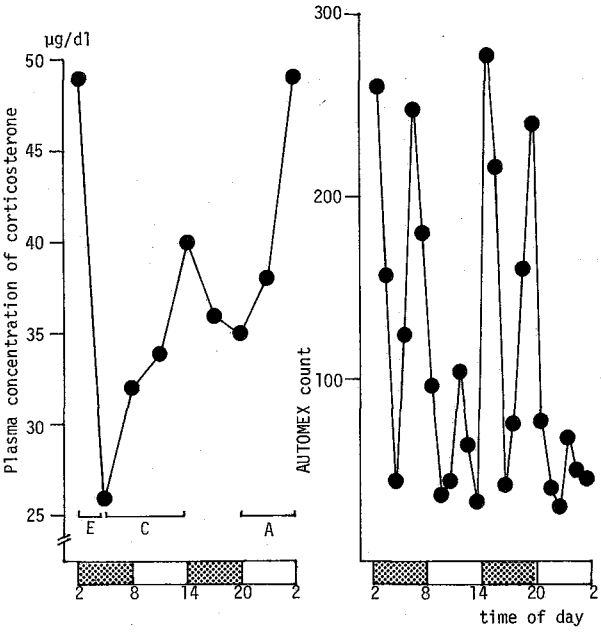


Fig. 1. The diurnal variations of plasma concentration of corticosterone and of locomotor activities

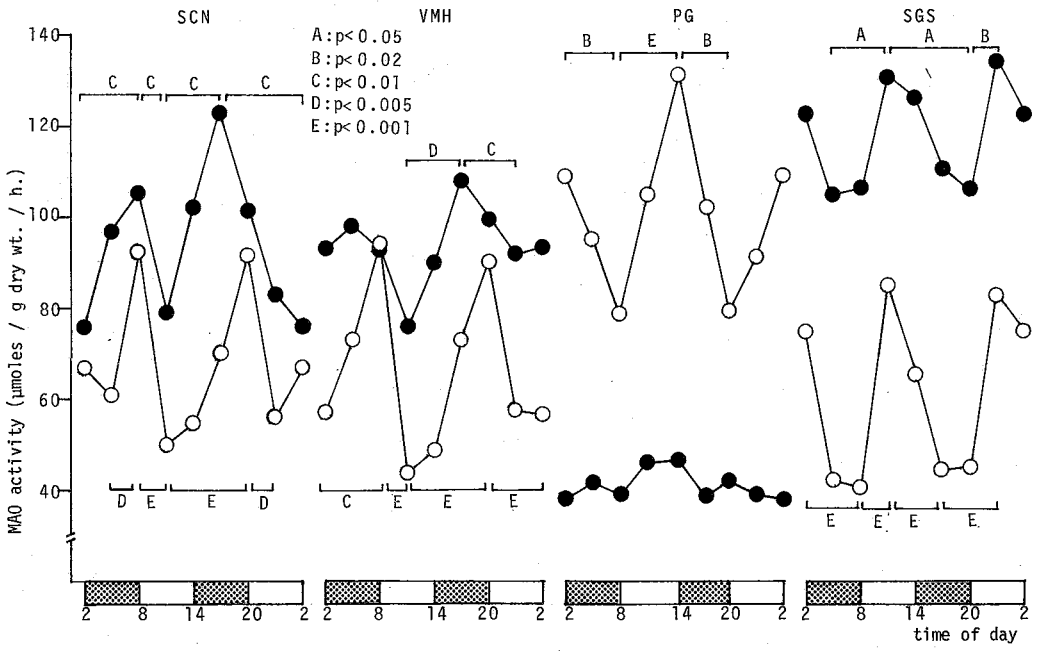


Fig. 2. The diurnal variations of monoamine oxidase activity
5-HT MAO (type A) ●—●, PEA MAO (type B) ○—○, n=6. SCN: Nucl. suprachiasmaticus, VMH: Nucl. ventromedialis, PG: pineal gland, SGS: stratum griseum superficiale colliculi superioris

灯直前の2回に著明な行動量増加を示し，明期での行動量は低値である。これも明暗周期に同調した日内リズムを示している(Fig. 1 右)。

③ MAO活性の日内リズム

SCNでは，type A MAOは暗期に高く明期に低いリズムを示しているが，各2回の暗期・明期の中ではそれぞれ変動のあり方が異っている。2時～8時の暗期を通して上昇した活性は，次の明期11時に一度低下した後に明期中から上昇をはじめ，暗期17時に最高値を示した後に暗期中から低下，次の20時～2時の明期中も低下し続ける。type B MAOは，暗期から明期に移る時点(8時と20時)に高活性を示し，明期に入った3時間後(11時と23時)に活性は急激に低下している。

VMHにおいては，SCNにおける変化と類似した日内リズムがtype A,type Bともにみられ，type B MAOにより著明に暗期中上昇，明期で急激な下降が認められた。

PGではtype A MAO活性は低値で日内リズムは認められないのに対し，type B MAOでは暗期中低下，明期中上昇の，明暗周期に一致した日内リズムが認められた。

SGSにおいては，type A，type Bともにほぼ同様の変動を示している。すなわち，暗期中低値にとどまる活性は，暗期から明期への変化後3時間目(11時と23時)に急上昇した後，明期後半にはすでに低下しはじめている(Fig. 2)。

〔考察〕

corticosterone量および行動量については，明らかに6時間周期の影響を受け，明暗の影響は12時間周期の場合[1][3]と同様である。しかしcorticosterone量は，夜間に高く早朝低いという12時間周期下の日内リズムも残存している。行動量のリズムからは，摂食・摂水は1日2回に分断して行われているものと考えられる。

SCNに計時機能の存在していることは，多くの研究で知られている事実である。[2][7][8] MAOについても，恒暗条件下でSCNにおける活性の日内リズムはfree runningを示すとされている。[1] 今回の6時間周期条件下でのSCNにおいて，12時間周期条件下の場合[1]に比し位相が後方移動するとともに，2峰性日内リズムが出現している。これは，光刺激が同調因子として作用したものと考えられる。

VMHは飽食中枢とされる部位である。この部位でのMAO活性には元来日内リズムは存在しない[1]が，1日2時間に摂食制限をすると両typeともに日内リズムを生ずること，摂食中枢であるlateral hypothalamic area(LH)ではそのような変化が生じないことをわれわれは見出した。[3] 大村ら[5]はSCN，VMH，LHの関係について，SCNはVMHを促進しLHを抑制するとしている。今回の明暗条件は，一種の摂食制限または強制摂食の状況を作り，SCNの計時機構を介してVMHにもMAO活性の日内リズムが生じてきているものではないかと推測される。

いずれにせよ，これらcircadian rhythmsの生化学的指標としてMAO活性も意義が高いものと思われ，今後リズムの発生機構等について十分検討を行なう予定である。

〔文献〕

(1) Kamase, H. Folia Psychiat Neurol Jpn34:481, 1980. (2)川村浩．神経進歩25:966, 1981. (3)国元憲文，他．神経化学20:420, 1981. (4) McCaman, R. E. et al J. Neurochem 12:15, 1965. (5)大村裕，他．蛋白質核酸酵素27:391, 1982. (6)田村辰祥，他．米子医誌35:487, 1984. (7)融道男．蛋白質核酸酵素23:1093, 1978. (8)融道男．神経進歩25:1007, 1981.

149 N－methyl－4－phenyl－1,2,3,6－tetrahydropyridineによるラット線条体スライスチロシン水酸化酵素系の阻害

平田洋子・永津俊治
（東工大・生命化学，名大・医・Ⅰ生化）

〔要　約〕

ラット脳切片を用い、N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) のチロシン水酸化酵素 (TH) 活性に対する影響について調べた。TH 活性はラット線条体切片を NSD-1055（芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素阻害剤）を含む Krebs 液中で反応後、生成した L-DOPA を定量することによって測定した。線条体における L-DOPA 生成量は MPTP により用量依存的に減少し、その 50% 阻害濃度は約 5 μM であった。Krebs 液中に nomifensine（ドーパミン取り込み阻害剤）を同時に加えると、MPTP の L-DOPA 生成に対する効果は阻害された。sulpiride は MPTP の効果に何ら影響を与えなかった。また、MPTP は側座核でも線条体とほぼ同程度に L-DOPA 生成を阻害したが、視床下部では線条体や側座核に比してその程度は弱かった。MPTP は TH の精製酵素を阻害せず、Ca^{2+}-カルモデュリン依存性及び cAMP依存性の TH の活性化に対しても影響を与えなかった。以上の結果より、MPTP はラット脳切片においてカテコールアミン生合成の律速段階であるチロシンの水酸化を阻害し、その阻害効果はドーパミン作動性神経で顕著であることが示された。また MPTP 処理により細胞内でジヒドロビオプテリンが増加していることが明らかになったので MPTP はTH と共役して働らくジヒドロプテリジン還元酵素を阻害してテトラヒドロビオプテリンを減少させ TH を阻害することが推定された。

Key words： Tyrosine hydroxylation, MPTP, Dihydropteridine reductase

N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) は最近ヒトやサルの黒質線条体系ドーパミンニューロンを変性させパーキンソン病様の症状を起こす薬物として注目されている（1，2，3）。しかしその作用機序についてはドーパミンの取り込みの阻害（4）やジヒドロプテリジン還元酵素の阻害（5，6）などの報告があるものの依然不明である。今回、ラット脳切片を用いてチロシンの水酸化に対する MPTP の影響を調べ、その作用機序について検討した。

〈実験材料及び方法〉

ラット線条体切片の作製：Wistar 雄性ラット（200～300 g）を断頭後、ただちに線条体を取りだし McILWAIN tissue chopper にて厚さ約 0.2mm の切片を作製した。

切片中チロシン水酸化酵素活性の測定：線条体切片を NSD-1055 を含む Krebs 液中で薬物とともに 1 時間 incubation した後、超音波破砕によりホモジェナイズし、除たんぱく後内在性チロシンから生成した L-DOPA を HPLC-ED 法（7）により測定した。

ビオプテリン量の測定：Nagatsuらのラジオイムノアッセイ法（8）により測定した。

チロシン水酸化酵素活性の測定：0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.3)、1 mM 6-メチルプテリン、0.1 mM L-チロシン、20 μg catalase、0.1 M 2-メルカプトエタノール及び酵素を含む反応液 0.2 ml を 37° C、10分間 incubation し生成した L-DOPA を HPLC-ED 法（9）により測定した。

〈結果〉

Figure 1 に示したようにラット線条体切片中の DOPA 生成量は、MPTP により用量依存的

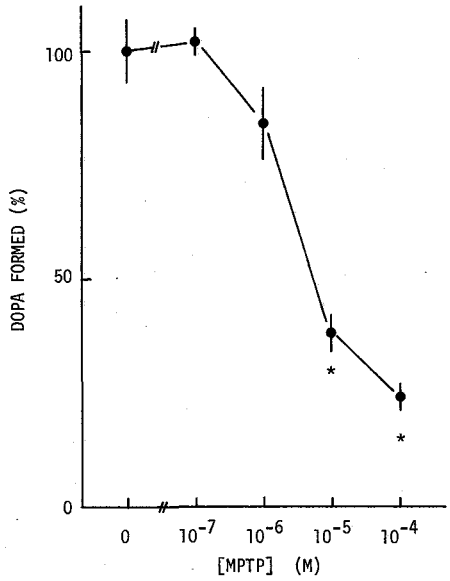


Fig. 1 Effect of MPTP on formation of DOPA in rat striatal slices. * $p < 0.01$

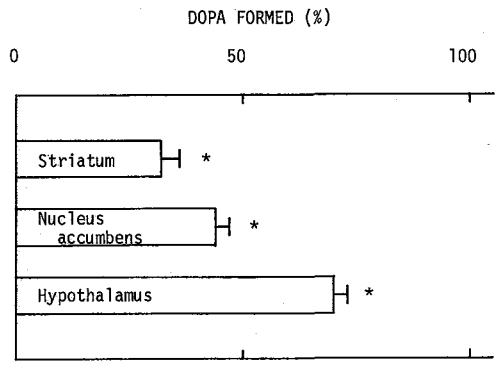


Fig. 2 Effects of MPTP (10^{-5} M) on the formation of DOPA in rat brain tissue slices.
* $p < 0.01$

に減少した。その 50% 阻害濃度はほぼ 5 μM であった。また、この減少はドーパミン取り込み阻害剤の nomifensine (10 μM) とともに処理することによって回復したが、sulpiride (10 μM) では回復しなかった。

Figure 2 は側座核及び視床下部の切片を MPTP (10 μM) と incubation した結果を示した。ドーパミン神経が多い側座核では DOPA の生成は約 60% 阻害され、線条体における MPTP の効果とほぼ同様の成績であったが、ノルエピネフリン神経の多い視床下部では約 30 % の阻害にとどまった。

さらに詳細に MPTP の作用を調べるために MPTP (10 μM) を含む Krebs 液中で incubation した組織をホモジェナイズした後 in vitro の TH 活性を測定したが、活性に変化はみられなかった。MPTP は牛副腎から単一に精製した TH (10) の活性も阻害しなかった。また、脳切片中の TH 活性はカルモデュリンや cAMP などの調節をうけているので MPTP がこれらの因子を介して TH 活性を阻害する可能性も考えられる。そこでラット線条体の 30,000×g上清を Sephadex G-25 でゲルろ過したんぱく画分を酵素標品とし、Ca -カルモデュリン依存性及び cAMP依存性の TH の活性化 (11) に対する MPTP の効果を調べた。しかし MPTP はこれらの活性化に対しても影響を与えなかった。ところが、ラット線条体切片を MPTP (10 μM)と incubation し総ビオプテリン量及びジヒドロビオプテリン量を測定したところ MPTP 処理によって、ジヒドロビオプテリン量の増加が観察された。

〈考察〉

ラット線条体切片中のチロシンの水酸化反応が MPTP により用量依存性に阻害され、その

阻害効果は 50% 阻害濃度が 5 μM とかなり強いものであった。視床下部切片でこの阻害効果が小さいことは MPTP がドーパミン神経により強い affinity をもっていると考えられる。また、sulpiride を MPTP と同時に処理しても DOPA 生成量の減少が回復しないことから MPTP はドーパミン神経の終末に存在する dopamine autoreceptor を刺激して DOPA の生合成を阻害しているのではないと思われる。nomifensine を同時に処理すると MPTP の阻害効果が回復したことは、nomifensine が MPTP の神経内への取り込みを阻害したためと考えられる。nomifensine と MPTP の構造が似ていることからも両者が拮抗している可能性がある。

MPTP の作用機序について調べたところ 精製 TH の酵素分子に対する直接の影響は見られなかった。また脳切片中の TH 活性を調節し得るカルモデュリン及び cAMP などの因子にも MPTP は作用を示さなかった。

TH の補酵素であるテトラヒドロビオプテリンは、チロシンから DOPA の反応に必須であり、神経細胞内の濃度もきわめて低いことからカテコールアミン生合成の調節に重要であると考えられている。MPTP 処理により細胞内のジヒドロビオプテリンが増加したことから、テトラヒドロビオプテリンの利用率が減少したために切片中の TH 活性が阻害されたと思われる。したがって MPTP は TH と共役して働くジヒドロプテリジン還元酵素を阻害することが推定される。Blair ら（5）は in vitro で MPTP（約 10μM）がジヒドロプテリジン還元酵素を阻害することを報告しているが、Abell ら (6) は MPTP のジヒドロプテリジン還元酵素 50% 阻害濃度は約 1mM であるが、MPTP の水酸化体のそれは約 1μMであると報告しており、MPTP の代謝物が生理作用をもっている可能性も考えられ、さらに検討を要する。

また、神経細胞内には通常ジヒドロビオプテリンはほとんど存在しないので、この増加が神経の変性につながるかどうかは興味深い。

〈引用文献〉

1.Langston,J.W et al.; Science 219,979-980,1983.

2.Burns,R.S. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80,4546-4550,1983.

3.Langston,J.W. et al.; Brain Res. 292,390-394,1984.

4.Denton,T. and Howard,B.D.; Biochem. Biophys. Res. Comm. 119,1186-1190,1984.

5.Blair,J.A. et al.; Lancet 167,1984.

6.Abell,C.W. et al.; Science 224,405-407,1984.

7.Hirata et al.; J. Neurochem. 40,1585-1589,1983.

8.Nagatsu,T. et al.; Anal. Biochem. 110,182-189,1981.

9.Nagatsu,T. et al.; J. Chromatogr. 163,247-252,1979.

10.Oka et al.; Biochem. Int. 7,387-3 ,1983.

11.Yamauchi,T. and Fujisawa,H.; Biochem. Int. 1,98-104,1980.

150　チロシン水酸化酵素の活性調節機構 — カテコールアミンとサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素による新しい調節機構 —

奥野幸子・藤沢　仁
（旭川医大・I生化）

〔要　約〕

ラット線条体のチロシン水酸化酵素の活性調節機構を検討し、以下の結果を得た。
(1). 粗酵素のチロシン水酸化酵素は生理的なpHである中性付近での活性が強く抑制されていて殆んど活性を示さないが、酸性変性等によって部分精製するとこの抑制が解除されて活性が現われ、至適pHを中性領域に示すようになる。
(2). 部分精製酵素は、酵素とほゞ当量（10^{-8}M）のドーパミン等のカテコールアミンとインキュベーションすることにより、再び中性付近の活性が抑制された不活性型酵素になる。
(3). ドーパミンによって不活性型となった酵素はサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素によって活性化され、中性付近に著しい活性が現われる。
以上の結果から、チロシン水酸化酵素は自らの反応生成物であるドーパミンによって平時は不活性化されており、カテコールアミン合成が必要になるとサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素によって燐酸化され、活性型に転換される可能性が考えられる。

Key words：　tyrosine 3-monooxygenase, dopamine, cyclic AMP dependent protein kinase

チロシン水酸化酵素はカテコールアミン生合成の律速酵素であり(1,2)、酵素活性の調節機構は極めて重要である。昨年の本大会で我々はラットの脳のチロシン水酸化酵素が生理的pHでは活性が抑制されて不活性型の酵素で存在していること、不活性型酵素はサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素によって燐酸化を受けると活性型の酵素に転換される可能性を示唆する研究結果を報告した(3)。チロシン水酸化酵素の不活性型 ⇄ 活性型の相互転換に基く活性調節機構についてさらに研究を進めた結果、以下のような興味ある結果を得たので報告する。

〔実験方法〕

ラット線条体のチロシン水酸化酵素の調製　ラットの線条体を湿重量の3倍容のプロテアーゼ阻害剤(ロイペプチン,キモスタチン,ペプスタチン、各20μg/mg)を含む5mM NaPB pH7.5でホモゲナイズし、10万×g、60分の遠心上清をBioGel P-10でゲル濾過した標品を粗酵素とした。粗酵素標品はさらにpH5.0処理を行ない、沈澱画分に回収される酵素をDE52のイオン交換クロマトグラフィーを用いて部分精製した。

ウシ心筋のサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素の触媒サブユニットの調製　Sugdenらの方法(5)に従ってウシ心筋よりDE52、ヒドロキシアパタイトカラムを用いて精製し、SDSゲル電気泳動で単一なバンドを示す酵素を得た。

チロシン水酸化酵素活性の測定　0.1M Hepes pH7.0、90μgカタラーゼ、1mM DTT、50μM硫酸アンモニウム鉄、1mM 6-メチルプテリン、0.2mM チロシン-1-^{14}C、及び酵素を含む反応液を用い、非酵素的脱炭酸法(4)により測定した。1ユニットは1分間に1nmole生成する活性として示した。

ドーパミンによるチロシン水酸化酵素の不活性化　5mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1mM DTT 存在下にドーパミン及びチロシン水酸化酵素を加えて30℃でインキュベーションし，チロシン水酸化酵素活性を測定した。

サイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素の触媒サブユニットによるチロシン水酸化酵素の活性化反応　4mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1mM EGTA, 0.1mM ATP, 5mM 酢酸マグネシウム，3mMホスホエノールピルビン酸，20μg ピルビン酸カイネース，触媒サブユニット及びチロシン水酸化酵素を含む反応液0.2mlを30℃でインキュベーションし，チロシン水酸化酵素活性を測定した。

単クローン抗体によるチロシン水酸化酵素蛋白の定量　ラットのチロシン水酸化酵素に対する単クローン抗体を用いて既報のように(3)粗酵素と部分精製酵素の Immunotitration を行ない，チロシン水酸化酵素蛋白量を定量した。

〔結果及び考察〕

ラット線条体のチロシン水酸化酵素は中性付近で殆ど活性を示さないが(図3A)，酸性沈澱等により部分精製すると中性付近に著しい活性化がみられた(図3B)．この部分精製酵素をドーパミン(DA)とインキュベーションするとDA濃度に依存して，またインキュベーション時間に依存してpH7でのチロシン水酸化酵素活性が低下した(図1)．DAによるチロシン水酸化酵素の不活性化は，Immunotitration から求めたチロシン水酸化酵素濃度(1.7×10^{-8}M)とほぼ当量という極めて低い濃度で認められた．同様なチロシン水酸化酵素の不活性化は，表1に示すようにDAの他にノルアドレナリン(NA)，アドレナリン(A)，DOPEG等によっても認められた。この DA 等による不活性化は従来報告されているものに比べ，桁違いに低い濃度で認められ，また酵素とのインキュベーションを必要とすること，充分量(1mM)の補酵素6-メチルプテリン存在下でも認められることなどから，これまでに報告されてきた補酵素プテリンに拮抗したカテコールアミンの阻害とは全く違った機構によるものであると考えられる．DOPA もこれらのカテコールアミンの約100分の1程度の阻害効果を示したが，部分精製酵素中には粗酵素の約0.5%程度のドーパ脱炭酸酵素が残存しているので，この阻害は DOPA から生じた DA による可能性が考えられる．生体内でのドーパ脱炭酸酵素の活性はチロシン水酸化酵素に比べると強いので，チロシン水酸化酵素の反応によって生成されたDOPA が直ちにDAとなってチロシン水酸化酵素を不活性型に転換すると考えられる．図2はチロシン水酸化酵素の DA とサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素によるpH7での活性変化を示したものである．10^{-6}M の DA と30℃で20分間インキュベーションして活性の低下

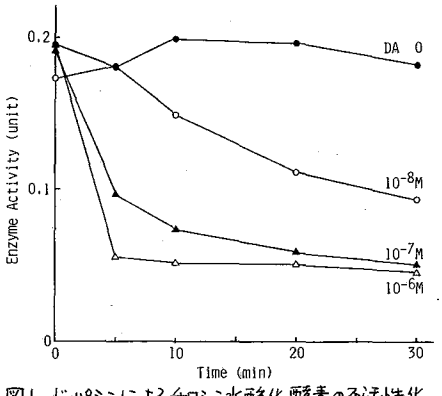


図1. ドーパミンによるチロシン水酸化酵素の不活性化の経時変化

Additions		Enzyme Activity	
		unit	(%)
none		0.182	(100)
DA	10^{-9} M	0.167	(92)
	10^{-8} M	0.093	(51)
	10^{-7} M	0.050	(27)
	10^{-6} M	0.045	(25)
DOPA	10^{-6} M	0.102	(56)
NA	10^{-6} M	0.043	(24)
A	10^{-6} M	0.043	(24)
DOPEG	10^{-6} M	0.049	(27)
DOPAC	10^{-6} M	0.142	(78)
5HT	10^{-6} M	0.169	(93)

表1. カテコールアミンによるチロシン水酸化酵素の不活性化．
30℃で30分間プレインキュベーションした後，pH7で酵素活性を測定した．

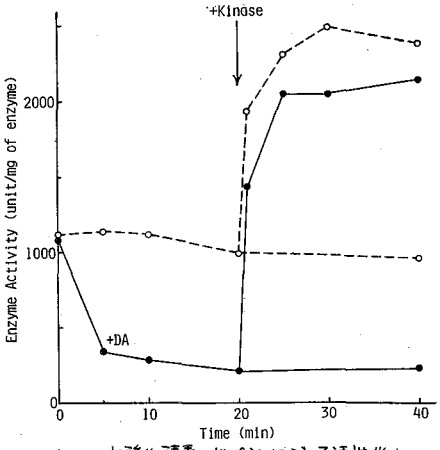


図2. チロシン水酸化酵素のドーパミンによる不活性化とサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素による活性化.

した酵素に、ウシ心筋より精製したサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素の触媒サブユニット 6.2ユニット(1ユニットは30°Cでヒストン IIA を1分間に1nmole 燐酸化する活性)を燐酸化条件下で加えるとpH7での活性は著明に上昇し、DAによって不活性型に転換されていたチロシン水酸化酵素はサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素によって燐酸化されると活性型に変化することが示された。図3はこれらの様々な状態にある酵素の活性のpH依存性を示したものである。粗酵素は至適pHが5.4であってpH7付近には活性を殆んど示さないが(A)、この酵素を部分精製すると中性付近の活性の抑制が解除されて至適pHを中性に示す(B)。この酵素に 10^{-6}M DA を作用させると酸性領域での活性は変化しないが中性付近での活性は再び低下する(C)。この酵素にサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素を作用させると中性での活性は著明に増加する(D)。

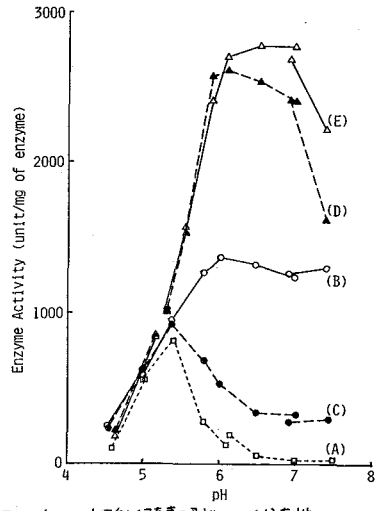


図3. チロシン水酸化酵素活性のpH依存性.
(A) ラット線条体の粗酵素. (B) 酸性沈澱等によって部分精製した酵素. (C) 部分精製酵素Bに 10^{-6}M DA を添加して 30°C, 20分間インキュベーションしたもの. (D) Cに触媒サブユニット 12.4 ユニットを添加して燐酸化条件下で 30°C, 10分間インキュベーションしたもの. (E) Bに触媒サブユニット 12.4 ユニットを添加して燐酸化条件下で 30°C, 10分間インキュベーションしたもの. 縦軸は単クローン抗体を用いて定量したチロシン水酸化酵素蛋白当りの比活性で示されている.

これらの結果はチロシン水酸化酵素が生体内では反応生成物であるごく微量の DA によって不活性型に保たれていて、カテコールアミン合成が必要になるとサイクリックAMP依存性蛋白質燐酸化酵素によって活性型に転換されるという新しい調節機構を考えさせるものである。

〔文献〕

1. Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A. and Udenfriend, S. (1965) J. Pharmacol. Exp. Ther. 148 1-8
2. Nagatsu, T., Levitt, M. and Udenfriend, S. (1964) J. Biol. Chem. 239 2910-2917
3. 奥野幸子, 藤沢仁 (1983) 神経化学 22 375-377
4. Okuno, S. and Fujisawa, H. (1983) Anal. Biochem. 129 405-411
5. Sugden, P.H., Holladay, L. A., Reimann, E. M. and Corbin, J. D. (1976) Biochem. J. 159 409-422

人名索引 (ABC順)

〔番号は掲載頁を示す〕

(A)

阿部幸子 …… 204
阿部輝雄 …… 285
阿部敏明 …… 189
相内敏弘 …… 418
秋本義雄 …… 30
天野武彦 …… 273
安藤雅史 …… 354
安藤正人 …… 357
安楽茂己 …… 213
青木英子 …… 375
青野幸子 …… 258
Appel, S.H. …… 351
荒井裕一朗 …… 454•457
荒木一明 …… 162
荒木恵子 …… 204
荒記俊一 …… 252
有馬正高 …… 129
有馬隆 …… 51
朝倉幹雄 …… 45•93
浅野昌雄 …… 69
阿相皓晃 …… 339•348

(B)

馬場明道 …… 297
馬場広子 …… 237

(C)

Cacabelos, R. …… 403
千頭孝史 …… 24•144
Clouet, D.H. …… 117

(D)

出口武夫 …… 306

(E)

江頭亨 …… 460
恵美安裕 …… 393
Eng, L.F. …… 258
衛藤義勝 …… 132•177•342

(F)

藤井敏弘 …… 279
藤本昇 …… 216
藤沢仁 …… 469
藤城正敏 …… 246•288
藤田精一郎 …… 24
藤田忍 …… 276
藤原敬 …… 336
藤原豊 …… 126•186
深間内文彦 …… 409
福地勲 …… 183
福田賢司 …… 126
福永浩司 …… 312
船津邦比古 …… 33•36
古塚大介 …… 144

(G)

Gorio, A. …… 213
後藤和利 …… 177
後藤恵 …… 312

(H)

Haider, S.S. …… 162
灰本元 …… 222
濱口勝彦 …… 168
浜岡利之 …… 430
原厚 …… 153
原田俊樹 …… 126•186
原田寧 …… 348
原田豊 …… 463
播口之朗 …… 180•403
長谷川和夫 …… 45•93
長谷川まこと …… 430
橋本泰道 …… 360•363
橋本謙二 …… 30
畑文明 …… 72
畠中寛 …… 324
畠中幸子 …… 270
早石修 …… 216•219
林要喜知 …… 267
挾間秀文 …… 463
Heath, J. …… 243
日高弘義 …… 309
東田陽博 …… 321
平林邦夫 …… 150
平岩幹男 …… 189
平松緑 …… 75
平野均 …… 120
平野誠 …… 120
平野修助 …… 339•348
平田洋子 …… 466
平田ゆかり …… 150
平山栄一 …… 144
広瀬由起子 141•171•415•421
本田千穂 …… 336
堀誠治 …… 384
堀真一郎 …… 357
堀口淳 …… 102
星野仁彦 …… 174

(I)

市川宏伸 …… 409•412
井田博幸 …… 132
井田能成 …… 87•96•397
伊島正次 …… 427
池田和正 …… 448

池田正明 …… 111
池田正人 …… 111
池田淑夫 …… 427
今福淳 …… 45•93
今井陽 …… 231
今村一之 …… 219
今澤正興 …… 345
井村裕夫 …… 424•427
稲葉喬 …… 84
稲永和豊 …… 33•36•213
伊野美幸 …… 45•93
井上修 …… 30
井上芳郎 …… 288
犬塚貴 …… 243
入江恵子 …… 336
石橋賢治 …… 120
石橋輝雄 …… 231
石田甫 …… 72
石田裕一 …… 156
石川康子 …… 72
石川幸辰 …… 207
石岡憲昭 …… 234
石崎泰樹 …… 436
礒辺俊明 …… 234•282
伊藤正明 …… 309
伊藤忠雄 …… 354
岩崎紀子 …… 339•348
岩崎説雄 …… 129
岩田平太郎 …… 297

（J）

Jonsson, G. …… 213

（K）

加太英明 …… 75•421
門田健 …… 439
門田朋子 …… 439
門屋利彦 …… 234•282
梶田三郎 …… 141•415
垣花満 …… 54
柿本泰男 …… 102
郭哲輝 …… 294
上村宏 …… 360
神谷大雄 …… 400
鴨下重彦 …… 240
金谷俊則 …… 66
金子元久 …… 174
金子武嗣 …… 216
金本和男 …… 339
菅野智行 …… 174
辛島仁 …… 342
河西悦子 …… 132
柏原健一 …… 126
柏俣重夫 …… 159•258•375
加藤兼房 …… 222•282•315•321•442
加藤伸勝 …… 360•363
加藤泰治 …… 279
加藤尚彦 …… 372
加藤武 …… 69•393•433
川口賢治 …… 24
川北幸男 …… 24•144
川本立夫 …… 102
川面博司 …… 123
慶野宏臣 …… 159•375
木村英司 …… 427
木村宏 …… 246•366•378
杵鞭宏育 …… 454•457
岸本武 …… 171
北島哲子 …… 315•321
北村邦男 …… 228
木山博資 …… 270
清永由子 …… 460
小幡邦彦 …… 276
小池達郎 …… 333
小島秀樹 …… 213
小嶋瑞代 …… 273
小宮義璋 …… 255
小長谷初枝 …… 369
近藤悦夫 …… 72
紺野邦夫 …… 418
腰越直也 …… 285
幸田直彦 …… 72
河野康子 …… 48
高坂新一 …… 261
工藤玄恵 …… 135
熊谷博道 …… 345
熊谷公明 …… 177
熊倉鴻之助 …… 324•327
熊西敏郎 …… 204
熊代永 …… 174•381
雲井一夫 …… 378
国元憲文 …… 463
国下龍英 …… 165
庫宝善 …… 63
呉羽由利恵 …… 177•342
栗原正 …… 225
栗岡晋 …… 234•384
栗山欣弥 …… 81•105•108•366
黒田洋一郎 …… 303
黒川正則 …… 255•436
黒須泰行 …… 234
楠進 …… 210
桑野良三 …… 162•430

（L）

Loewy, A.D. …… 400

（M）

前田利長 …… 162
前川喜平 …… 177
真島宏海 …… 66
真鍋敬 …… 282

馬目太永 …… 174
正岡昭 …… 27
俣賀宣子 …… 412
松田誠 …… 234•384
松田友宏 …… 27•39
松井宏晃 …… 45•93
松本孝 …… 120
松尾寿之 …… 412
松下浩司 …… 156
松谷天星丸 …… 150
三木直正 …… 267•270•294
御子柴克彦 …… 246•288•291
南良二 …… 207
三田浩一 …… 261
三ツ汐洋 …… 406•409•412
三宅正治 …… 102
宮本英七 …… 312
宮本侃治 …… 345
宮武正 …… 237
宮谷信行 …… 237
宮脇敦史 …… 291
宮崎正夫 …… 81
宮崎則幸 …… 439
溝部文夫 …… 324•330
溝渕睦彦 …… 102
水川六郎 …… 463
水野昇 …… 216
水谷昭 …… 315
桃井真里子 …… 240
桃井隆 …… 240
森昭胤 …… 75•141•171 415•421
森憲作 …… 219
森浩一 …… 24•144
森眞由美 …… 39
森則夫 …… 381
森井成人 …… 424
盛政忠臣 …… 111
森分隆 …… 141
村島善也 …… 372
明神徹郎 …… 57

(N)

永井克孝 …… 210
永井康雄 …… 114
永岡明伸 …… 54
長崎信行 …… 87•96•397
永田豊 …… 357
永津俊治 …… 111•466
名川雄児 …… 114
永吉道子 …… 150
中川滋木 …… 448
中川豊 …… 327
中川勇三 …… 294
中原辰雄 …… 120
中広全延 …… 183
中島孝 …… 282
中嶋照夫 …… 360•363
中村薫 …… 120
中村豊紀 …… 42
中村泰治 …… 418
中尾純治 …… 363
中尾一和 …… 424•427
中沢恒幸 …… 427
名倉宏 …… 222
難波宏樹 …… 445
楢橋敏夫 …… 303
成実重彦 …… 54•114
名取靖郎 …… 159
根岸輝彦 …… 168
西田均 …… 418
西島樹重 …… 387
西川徹 …… 90
西紋孝一 …… 186
西村千尋 …… 105
西村健 …… 180•403
野田恭平 …… 409•412
野田行文 …… 156
野口悦子 …… 198
野口鉄也 …… 135•138
野間めぐみ …… 78
野村純一 …… 42
野村恭一 …… 168
野村正彦 …… 147
野村靖幸 …… 48•51•201
能登直 …… 360•363
貫名至 …… 421
沼田吉彦 …… 174

(O)

小幡淳雄 …… 123
小川篤子 …… 412
小川希代子 …… 189
小川紀雄 141•171•415•421
小川俊彦 …… 126
小原美佳 …… 327
小原節子 …… 415•421
小鹿幸生 …… 351
岡田正路 …… 433
岡村邦博 …… 147
岡野栄之 …… 246•288•291
奥田千恵子 …… 81
奥野幸子 …… 469
奥山典生 …… 234•282
尾上浩隆 …… 297
大橋十也 …… 177
大井健 …… 57
大本堯史 …… 336
大野良三 …… 168
大迫俊二 …… 306
大島章子 …… 315•321

太田　章 …… 297
太田深雪 …… 42
大月三郎 …… 126•141•186
Oreland, L. …… 454
王　堯 …… 228
小崎康子 …… 390
小澤孝一郎 …… 201

（Q）

Quarles, R.H. …… 243

（S）

左　萍 …… 108
西須英雄 …… 285
斉藤朗子 …… 81
斉藤昌之 …… 78
斎藤尚亮 …… 378
斉藤典子 …… 45•93
佐治美昭 …… 114
酒井三千三 …… 285
坂本　誠 …… 424
坂本　安 …… 228•387
崎村建司 …… 162
迫　昭子 …… 21
佐野　護 …… 315•318•321
更井啓介 …… 66
佐武　明 …… 204
佐藤　浩 …… 159•258
佐藤　勇 …… 135
佐藤正雄 …… 84
佐藤光源 126•141•186•415
佐藤七枝 …… 345
佐藤修三 …… 237
佐藤豊彦 …… 442
沢口昭一 …… 162
Scatton, B. …… 90
瀬川富朗 …… 48•51•201
関谷　真 …… 21
仙波純一 …… 99
仙波禮治 …… 258•375•442
千丈雅徳 …… 231
渋谷治男 …… 409
島田明範 …… 418
嶋田甚五郎 …… 384
嶋崎健一 …… 123
嶋津　孝 …… 78
清水温子 …… 442
Sokoloff, L. …… 445
曽良一郎 …… 186
Stenström, A. …… 454
須田治彦 …… 261
須田光明 …… 424
菅原　照 …… 424
杉崎哲朗 …… 135•138
鈴木富士子 …… 222
鈴木晴男 …… 448
鈴木　勝 …… 168
鈴木孝尚 …… 427
鈴木龍雄 …… 279
庄盛敏廉 …… 111

（T）

田平　武 …… 165
田渕和男 …… 336
館　延忠 …… 207
多田國利 …… 180
多賀千明 …… 57
田口淳一 …… 366
高垣玄吉郎 …… 369
高木貞敬 …… 219
高木　哲 …… 403
高橋健治 …… 436
高橋正身 …… 324
高橋　良 …… 99•409
高橋三郎 …… 57•60
高橋康夫 …… 162•225•430
高松　研 …… 246•288
高野宏美 …… 387
高野行夫 …… 400
高嶋瑞夫 …… 406•409•412
高山晴彦 …… 171
竹田二美代 …… 418
武田雅俊 …… 180
竹田　稔 …… 418
竹下正純 …… 192•195
武居能樹 …… 390
武富　保 …… 153
竹内　宏 …… 63
田丸政男 …… 150
田中千賀子 …… 378
田中越郎 …… 312
田中晴美 …… 129
田中正美 …… 237
田中正敏 …… 87•96•397
田中　亮 …… 279•351
田中利男 …… 309
谷沢　修 …… 403
丹野　修 …… 448
田代朋子 …… 255
手嶋茂紀 …… 33•36
所　敏治 …… 132
徳武　哲 …… 249
融　道男 …… 406•409•412
遠山正弥 …… 270
豊田直二 …… 439
豊島良枝 …… 457
Trapp, B. D. …… 243
津田　彰 …… 87•96•397
辻　元宏 …… 57•60
辻　崇一 …… 210
辻丸秀策 …… 87•96•397

辻村良太郎 …… 42
塚田裕三 …… 138・246・261・288・291
塚本卓治 …… 84
塚本徹 …… 45・93
角尾彰信 …… 303
津島宏美 …… 27・39
堤哲之 …… 213
都築紀宏 …… 264

(U)

内村英幸 …… 120
植田清隆 …… 336
植松直道 …… 24
植村慶一 …… 168・228・387
植村富彦 …… 451
梅沢房代 …… 132
裏出良博 …… 216
浦山久美子 …… 189
薄井宏 …… 162

(W)

和田博 …… 403
渡辺厚 …… 174
渡部修三 …… 412
渡辺建彦 …… 403
渡辺恭良 …… 216・219

(Y)

山田博明 …… 159
山田紘一 …… 123
山田尚登 …… 60
山田茂人 …… 213
山上栄 …… 24・144
山口仁 …… 300
山口修一 …… 177
山口知子 …… 300
山本秀子 …… 393
山本秀幸 …… 312
山本純 …… 27
山本正彦 …… 351
山中康光 …… 460
大和谷厚 …… 403
山崎統四郎 …… 30
矢内原昇 …… 424
横尾秀康 …… 120
横山和仁 …… 252
米原典史 …… 117
米川賢 …… 66
吉田敏 …… 192・195
吉田博 …… 183
吉井光信 …… 303
吉政孝明 …… 424
吉村裕之 …… 102
由村健夫 …… 165
吉岡純二 …… 336

神経化学　Vol. 23

第 27 回　日本神経化学会大会論文集

昭和59年11月15日(木)
16日(金)
17日(土)

日本都市センター
全国都市会館（東京）