

サル中枢神経系における神経成長因子の分布とその発達

(分担研究：相互作用と乳幼児の心理・行動発達
に関する基礎的研究)

林 基治*, 大島 清*

要約 マカク属サルの中枢神経系における神経成長因子(NGF)の分布と発達を調べる為、高感度酵素免疫測定法を開発した。本測定法の測定限界は、0.5 pgであった。またカニクイザル中枢神経組織抽出液の各希釈液とマウスNGFの標準曲線には、平行性があった。

成熟カニクイザル大脳皮質には、 316.2 ± 45.9 (運動前野) - 561.7 ± 130.8 (下側頭回) pg/g 組織存在し、特に視覚関連領野には他の領野の約1.4倍存在した。海馬、視床下部、中隔野、マイネルト基底核、尾状核、扁桃核及び小脳は、それぞれ 832.2 ± 51.8 , 476.3 ± 78.8 , 257.3 ± 55.3 , 371.1 ± 63.9 , 227.7 ± 59.9 , 387.8 ± 57.3 及び 366.9 ± 112.7 pg/g 組織であった。脊髄、小脳核、黒質は測定感度以下であった。

NGFは、大脳皮質視覚野において、胎生120日から新生児期まで、又海馬では生後60日までに約1.7倍と増量した。一方小脳では胎生120日から新生児期まで高濃度存在していたが、生後60日では約 $\frac{1}{3}$ に減少し、成熟時とはほぼ同量となった。

以上、NGFは、霊長類中枢神経組織に存在し、その発達に深く関与する事が示唆された。

見出し語：サル、神経成長因子、中枢神経系、発達

研究目的 従来、神経成長因子(NGF)は、末梢神経細胞(交感、知覚神経細胞)の生存、発達及び機能維持に不可欠な栄養因子として知られていた¹⁾。しかし近年、高感度酵素免疫測定法が報告され²⁾、ラット等の下等哺乳類の中枢神経系に本因子が存在する事実が明らかにされた³⁾。興味深い事に本因子は、アルツハイマー型老人痴呆症において萎縮の起こるコリン作動性神経の細胞体の存在する領野(マイネルト基底核、中隔野)及び投射領野(大脳皮質、海馬)に存在した。以上の事実から現在NGFは、アルツハイマー型老人痴呆症の治療薬としても期待されて来ている。

さて、現在までにヒトを含む高等霊長類神経系におけるNGFの分布とその発達動態は全く明らかにされていない。本研究においては、NGFの高感度酵素免疫測定法を開発し、成熟のカニクイザル中枢神経系におけるNGFの分布特性を明確にした。更に大脳皮質視覚野、海馬、小脳におけるNGFの発達動態を明らかにした。

研究方法 NGFは200ピキのオスマウス顎下腺よりSuda等⁴⁾の方法に従って抽出純化した。抽出純化したNGFは、Reisfeld, pH 4.0の系で単一バンドを示した。成熟家兎2羽に0.1mg NGFを2週間おきに6回免疫した。NGF抗体が作られている事はオークタロニー法で確認した。抗NGF-IgGはStöckel等⁵⁾の方法に従いNGF-アフィニティーカラムを用いて精製した。

* 京都大学霊長類研究所 (Primate Research Institute, Kyoto University)

抗NGF-IgGを直径1mmのガラスビーズにグルタルアルデヒドで結合させた。抗NGF-IgGと β -ガラクトシダーゼはm-マレインイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニイミドエステルを用いてカップリングさせた。

胎生期120日(4例)、胎生期140日(4例)、新生児(4例)、生後60日(3例)及び成熟期(6例)のカニクイザル中枢神経組織を採取し、 -80°C に保存した。組織をタンパク分解酵素阻害剤を含む4倍量の100mM Tris/Hcl pH7.0, 0.4M NaCl, 0.1% NaN_3 , 2%BSA, 2%ゼラチンでホモゲナイズ後、3000g, 30分遠心し、その上清を試料とした。

NGFの定量は以下の如く行なった。試料と標準マウスNGFを前述したガラスビーズと一昼夜反応させた。ついで抗NGF-IgGと β -ガラクトシダーゼの結合物を 37°C 、2時間反応させた。ガラスビーズに反応した β -ガラクトシダーゼ活性を4メチルウンベルフェリル β -ガラクトシドを基質とし生ずる4メチルウンペロフェロンを蛍光法(Ex.360nm, Em.450nm)で測定した。

結果 NGFの酵素免疫測定法

図1に示すように今回開発した測定法においては、NGFの測定限界は0.5pgであった。カニクイザル大脳視覚野及び海馬の抽出物の希釈液との間には平行性があった。この結果からカニクイザル中枢神経組織中に、マウスNGFと極めてよく似た分子種が存在することが証明された。

サル中枢神経組織におけるNGFの分布

図2に示すように、NGFは海馬に大脳皮質の約2倍と最も多く存在していた。大脳皮質では全ての領野で確認された。特に視覚関連領野(7.8.9)が他の領野の約1.4倍存在した。視床下部、扁桃核、小脳、マイネルト基底核には、大脳皮質と同程度含有されていた。

更にNGFは中隔野、尾状核、被殻、淡蒼球に存在したが、脊髄、小脳核及び黒質には存在しなかった。

サル中枢神経組織におけるNGFの発達

図3に示すように、NGFは視覚野、海馬において胎生期120日ですでに成熟時の70-80%存在していた。その量は、視覚野では、新生児期、海馬では生後60日までに約1.7倍と増量した。両領野において成熟時では最大値の約80%に減少した。

小脳においては、胎生120日から新生児期まで成熟時の約3倍量と高濃度存在していたが、生後60日では成熟時と同程度に減少した。

考察 サル中枢神経組織におけるNGFの分布

NGFがサル中枢神経組織に存在する事実が高感度酵素免疫測定法を用い、今回初めて明らかにされた。NGF量は、我々がこの数年來測定している神経ペプチド類⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾の約1/500-1/1000と極めて少量である事が特徴的であった。中枢神経組織における分布は、ラットですでに報告されている知見とよく類似していた。しかし、海馬、中隔野ではラットの $\frac{2}{3}$ - $\frac{1}{2}$ と少ない。一方視床下部、基底核ではラットの約3倍と多量存在していた。視床下部に多い点で、サルではNGFが内分泌ホルモンとして作用する可能性が考えられる。大脳皮質各領野では視覚関連領野が多かった。サルは視覚系が極めて発達している哺乳類であるが、その事と関連があるのかもしれない。今回扁桃核にNGFが存在する事、黒質、小脳核には全く存在しないという新事実も明らかにされた。黒質に存在しないという事は、NGFが線状体から黒質へ投射する神経の栄養因子ではない事を示唆している。一方線状体には存在しているが、これは内因性のコリン作動性神経の栄養因子としてNGFが作用しているものと解釈される。

サル中枢神経組織におけるNGFの発達

図2で示したようにNGFは海馬、大脳視覚野において胎生120日に成熟時の約80%と高濃度存在していた。両領野における発達動態は異なっており、視覚野は新生児期、海馬では生後60日に最大値を示した。海馬は短期記憶に関わる領野として注目されている。NGF量が生後も増加するという今回の結果は、海馬の発達が生後も引き続き起こる事と関連していると思われる。

る。両領野で、成熟時NGFが減少したが、これはNGFが逆行輸送¹⁰⁾され投射域から除去される為と考えられる。

一方、小脳では、NGFは生前に高濃度存在し、生後に減少した。1988年Schatteman等¹¹⁾は、胎生130日アカゲザル小脳のプルキニエ細胞、顆粒細胞にNGFレセプターが強く発現し、その後消失する事を報告している。NGFが小脳に、生前多い今回の結果とレセプターが発現している事実から、NGFが小脳のプルキニエ細胞、顆粒細胞の発達に関与する事が予想される。

文献

- 1) Thoenen, H. and Barde, Y.-A. : Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.*, 60, 1284-1335, 1980.
- 2) Korsching, S. and Thoenen, H. : Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat : correlation with density of sympathetic innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 3513-3516, 1983.
- 3) Korsching, S., Auburger, G., Heumann, R., Scott, J. and Thoenen, H. : Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO J.*, 4, 1389-1393, 1985.
- 4) Suda, K., Barde, Y.A. and Thoenen, H. : Nerve growth factor in mouse and rat serum : correlation between bioassay and radioimmunoassay determinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 4042-4046, 1978.
- 5) Stoeckel, K., Gagnon, C., Guroff, G. and Thoenen, H. : Purification of nerve growth factor antibodies by affinity chromatography. *J. Neurochem.*, 26, 1207-1211, 1976.
- 6) Hayashi, M. and Oshima, K. : Neuropeptides in cerebral cortex of macaque monkey (*Macaca fuscata fuscata*) : regional distribution and ontogeny. *Brain Res.*, 364, 360-368, 1986.
- 7) Hayashi, M., Yamashita, A., Shimizu, K. and Oshima, K. : Ontogeny of cholecystokinin-8 and glutamic acid decarboxylase in cerebral neocortex of macaque monkey. *Exp. Brain Res.*, 74, 249-255, 1989.
- 8) 林 基治, 大島 清 : サル中枢神経系における神経活性物質の発達。昭和61年度厚生省心身障害研究報告書, 29-32.
- 9) 林 基治, 大島 清 : サル小脳における神経活性物質の発達。昭和62年度厚生省心身障害研究報告書, 19-22.
- 10) Schwab, M.E., Heumann, R. and Thoenen, H. : Communication between target organs and nerve cells : retrograde axonal transport and site of action of nerve growth factor (NGF). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 46, 125-134, 1982.
- 11) Schatteman, G.C., Gibbs, L., Lanahan, A.A., Claude, P. and Bothwell, M. : Expression of NGF receptor in the developing and adult primate central nervous system. *J. Neuroscience* 8, 860-873, 1988.

Abstract

Regional distribution and ontogeny of nerve growth factor in monkey central nervous system.

Motoharu Hayashi,* Kiyoshi Oshima*

A sensitive and specific enzyme immunoassay for nerve growth factor (NGF) was developed to determine the regional distribution and ontogenic change in macaque monkey (*Macaca fascicularis*) central nervous system. The standard curve of mouse NGF paralleled the dilution curve of monkey cerebral extract.

At adult stage, the highest level of NGF was in hippocampus, with relatively high levels also in hypothalamus, cerebral cortex, amygdala, basal nucleus of Meynert, septal nucleus, cerebellum and caudate nucleus. No detectable amounts occurred in spinal cord, substantia nigra or dentate nucleus.

Between embryonic 120 days (E120) and new-born stages, NGF level in occipital cortex increased about 1.7-fold and after that it gradually decreased until adult stage. In hippocampus, the level increased about 1.7-fold between E120 and postnatal 60 days (P60). In the cerebellum, NGF level was high during prenatal period and decreased to 1/3 at P60. The high prenatal level of NGF suggests that NGF plays a role in development of primate central nervous system.

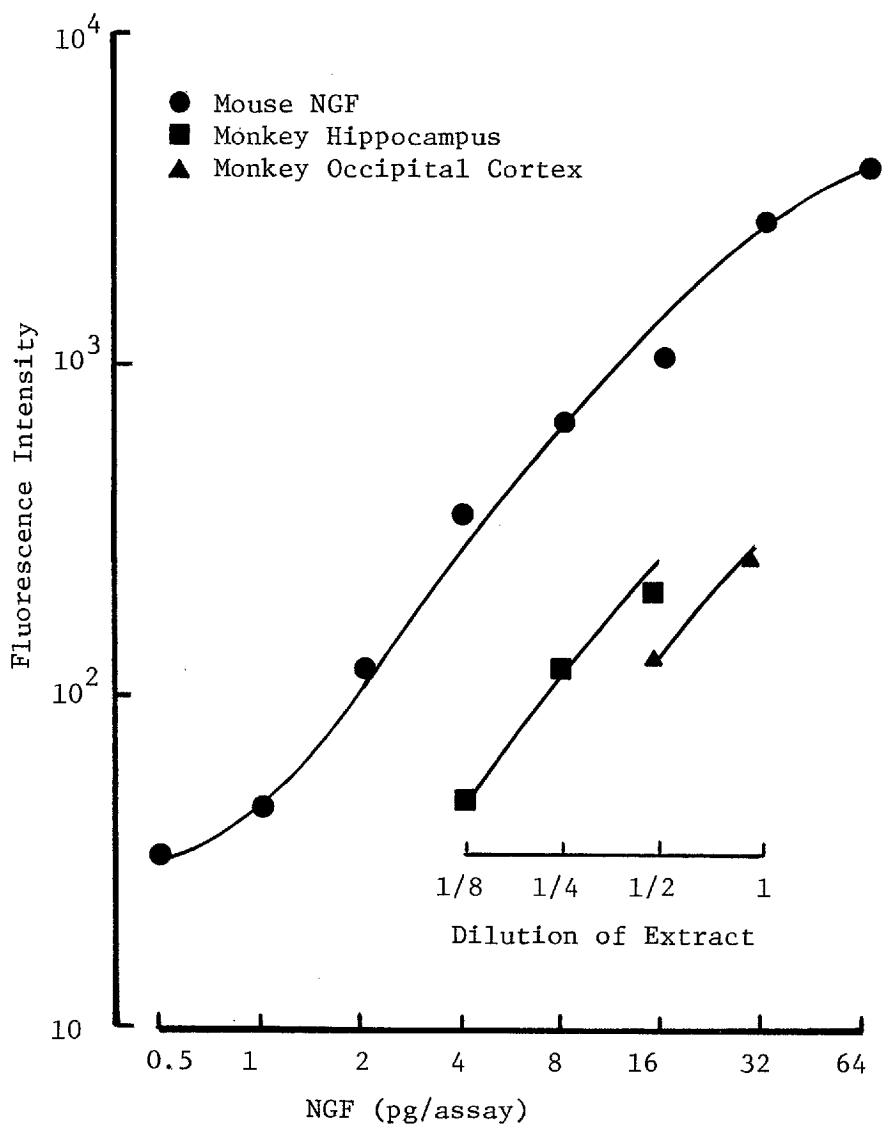


Fig. 1. Standard curve for mouse NGF and dilution curves for the extracts of monkey hippocampus and occipital cortex.

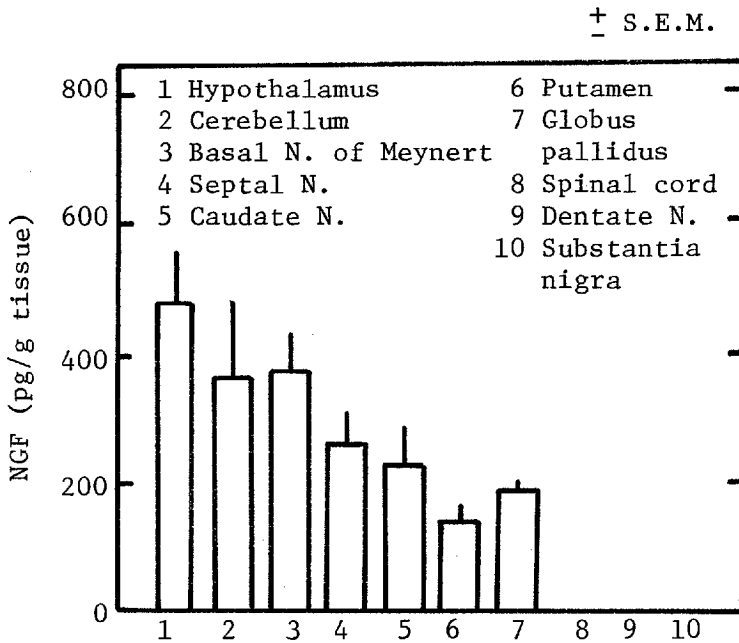
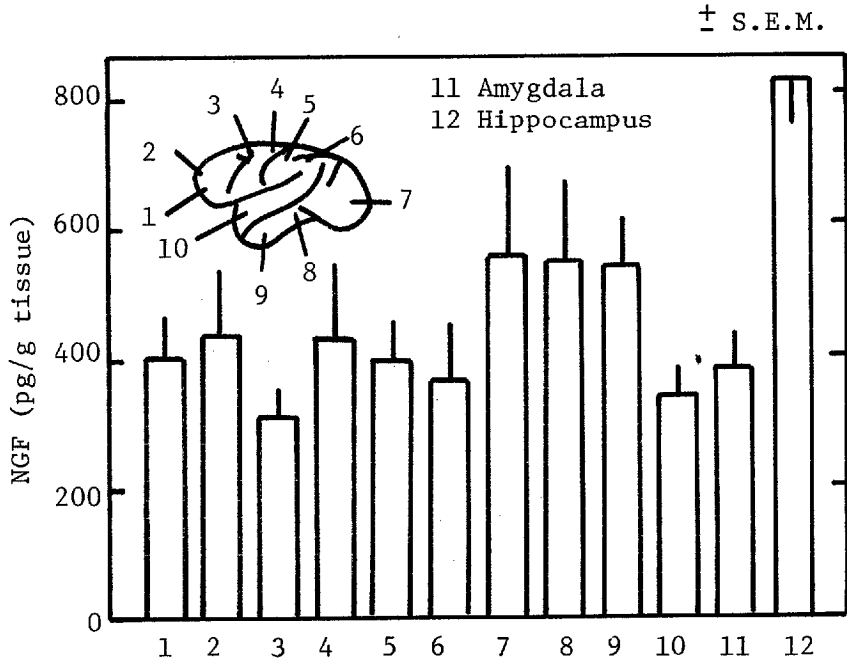


Fig.2. Distribution of NGF in adult monkey central nervous system.

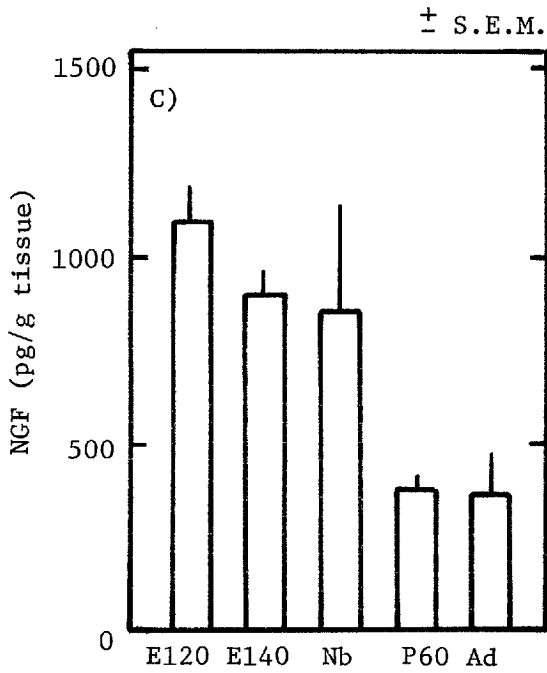
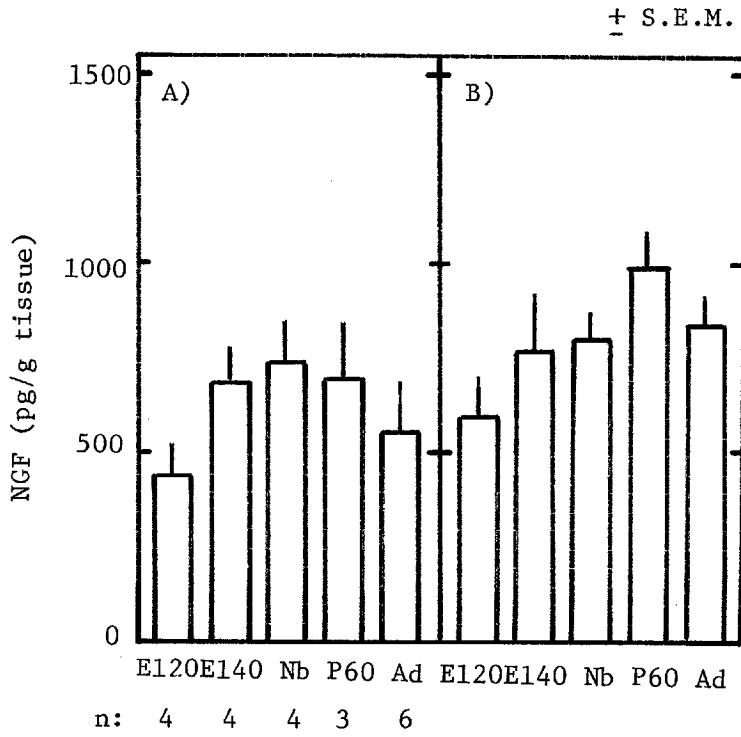


Fig. 3. Development of NGF in monkey central nervous system.

A) Occipital cortex

B) Hippocampus

C) Cerebellum

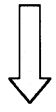
E 120: embryonic 120 days

E 140: embryonic 140 days

Nb: new-born stage

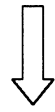
P60: postnatal 60 days

Ad: adult stage



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約 マカク属サルの中樞神経系における神経成長因子(NGF)の分布と発達を調べる為、高感度酵素免疫測定法を開発した。本測定法の測定限界は、0.5pgであった。またカニクイザル中枢神経組織抽出液の各希釈液とマウス NGF の標準曲線には、平行性があった。

成熟カニクイザル大脳皮質には、316.2±45.9(運動前野)ー 561.7 ± 130.8(下側頭回)pg/g 組織存在し、特に視覚関連領野には他の領野の約 1.4 倍存在した。海馬、視床下部、中隔野、マイネルト基底核、尾状核、扁桃核及び小脳は、それぞれ 832.2±51.8,476.3±78.8,257.3 ± 55.3,371.1 ± 63.9,227.7±59.9,387.8±57.3 及び 366.9 ± 112.7pg/g 組織であった。脊髄、小脳核、黒質は測定感度以下であった。

NGF は、大脳皮質視覚野において、胎生 120 日から新生児期まで、又海馬では生後 60 日までに約 1.7 倍と増量した。一方小脳では胎生 120 日から新生児期まで高濃度存在していたが、生後 60 日では約 1/3 に減少し、成熟時とはほぼ同量となった。

以上、NGF は、霊長類中枢神経組織に存在し、その発達に深く関与する事が示唆された。