

氏名(本籍)	よしざわとしひろ	吉澤利弘(神奈川県)
学位の種類	医学博士	
学位記番号	博甲第778号	
学位授与年月日	平成2年3月23日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項に該当	
審査研究科	医学研究科	
学位論文題目	神経生理活性ペプチド探索の新しいストラテジーとその応用 (Dissertation形式)	
主査	筑波大学教授	医学博士 工藤典雄
副査	筑波大学教授	医学博士 草刈潤
副査	筑波大学教授	医学博士 三輪正直
副査	筑波大学助教授	医学博士 細谷安彦
副査	筑波大学助教授	医学博士 吉井与志彦

論文の要旨

〈目的〉

近年、内因性活性物質である種々のペプチドが神経系の伝達物質として、あるいは、伝達機構の調節物質として機能していることが明らかになりつつある。しかしながら、神経ペプチドに関する研究の歴史は浅く、神経系の機能に重要な役割を営んでいる多くの未知の神経ペプチドが存在することが十分予想される。そこで、本研究では、まず、新しい神経ペプチドを見いだすためのスクリーニングのシステムを末梢及び中枢神経系で確立することを目的とした。さらに、それらの方法の一部と、免疫組織学的方法及びラジオイムノアッセイ法を応用して、血管内皮細胞由来ペプチドであるエンドセリンが新しい神経ペプチドであるかどうかを検討した。

〈方法〉

まず、末梢神経系の複合活動電位に対する種々の活性物質の効果を検討するアッセイ系を作成した。ラットから摘出した坐骨神経を、中央に活性を検討する物質を入れる薬物槽(容積125 μ l)を組み込んだ実験槽に固定した。神経中枢端をパラフィンを満たした槽内で刺激し、複合活動電位を末梢槽より air gap 法を用いて記録した。薬物槽にはサブスタンスP、その拮抗薬であるスパンタイト及びリドカインを投与した。

中枢神経に作用する神経ペプチドをスクリーニングするためのアッセイ系として生後4~6日の幼若ラットの脊髄摘出標本を用いた。標本は Krebs 液を灌流した実験槽に固定し、活性物質の作用は、当該物質の灌流液投与によって誘発される(1)腰髄前根電位、(2)後根電位、(3)脊髄下行性線維を刺激

して腰髄前根に誘発される下行性応答の変化，(4)脊髄反射応答の変化の4つの指標によって評価した。ペプチドとしては既知の18種類の神経ペプチド，及びブタ脊髄50kgからアセトン抽出と逆相HPLCによって得たペプチド分画を用い，特徴的な分画については，さらに活性の検討とHPLCによる分画を繰り返し，単離，構造決定を行った。

エンドセリンが神経ペプチドであるかどうかを検討するため，エンドセリンを上記の幼若ラット脊髄標本に灌流投与し，その活性を評価した。さらに，ブタ脊髄および脳におけるエンドセリンの局在を特異抗体を用いた免疫組織化学とラジオイムノアッセイにて検索した。脳については *in situ* ハイブリダイゼーション法をあわせて行なった。

〈結果と考察〉

(1) ギブスタンスPは末梢神経の伝導に影響しないが，スパンタイドはラット坐骨神経の複合活動電位を容量依存的に抑制した。この抑制作用の機構は局所麻酔薬であるリドカインの伝導遮断の機構とは異なることが示唆された。本研究で用いた実験系は複合活動電位を長時間安定して記録でき，また，極く微量な薬物投与によってもその効果を判定できることが立証され，末梢神経への活性物質の検定に有効なバイオアッセイ系であると結論された。

(2) 既知の18種類の神経ペプチドの中樞作用について上述の4つの効果を指標として分類した。ブタ脊髄から抽出し，分画した各ペプチドについても4つの指標に対する効果を検討し，既知のペプチドで得られたバタンと比較した。この内，前根及び後根電位を誘発し，脊髄下行性の応答を増大させるというサブスタンスPに特徴的な活性を示す分画からは，実際にサブスタンスP(6-11)を単離し，構造決定することができた。今回単離したペプチドといずれも既知のものであったが，このアッセイ系は神経ペプチドのスクリーニングの精度を大幅に改善し，未知の作用を持つ分画の同定と，その活性ペプチドの単離に有効な手段と成り得ると考えられた。

(3) エンドセリンを灌流投与すると脊髄の前根電位が容量依存的に誘発された。また，ブタ脊髄のエンドセリン抗体を用いた免疫組織化学的検索では，脊髄の後角及び前角のニューロンと後角の神経線維に陽性反応が認められた。さらに，ブタ脊髄から抽出したペプチド分画からもラジオイムノアッセイによりエンドセリンが証明された。これらの結果は，エンドセリンが神経ペプチドとして機能していることを示唆している。

(4) 脳内におけるエンドセリンの免疫組織化学的検索では，ブタ及びラットの視床下部室傍核及び視索上核のニューロンと下垂体後葉の神経終末に高い免疫活性が見いだされた。ブタ視床下部からの逆相HPLCによるペプチド分画をラジオイムノアッセイにより検索した結果ではHPLC上エンドセリンと同じ位置に免疫活性のピークが存在していた。さらに，ラットの下垂体後葉のエンドセリン様免疫活性は脱水刺激により著明に減少したことから，エンドセリンが生理的条件下で後葉から放出されていると考えられる。これらの結果からエンドセリンは脳内において視床下部-下垂体後葉系に局在し，神経内分泌系に属する新しい神経ペプチドである可能性が示唆された。

審 査 の 要 旨

本研究において確立した活性物質の中枢作用に関するアッセイ系は、4つの作用を対象にして、その効果のパターンによって未知の神経生理活性ペプチドをスクリーニングしようとするものであり、従来の1, 2の効果を指標とした方法に比べて、格段に精度の高い、優れた効果的な手法であると評価される。このアッセイ系を用いた既知の多数のペプチドに関する詳細な解析結果は、今後の神経生理活性ペプチドの探索に際し、貴重な基本データを提供している。また、エンドセリンに関する研究は、この物質が血管収縮のみならず、神経系の機能の調節に関与する神経ペプチドであることを初めて明らかにしており、新たな神経系の調節機構の存在を示唆するものとして極めて高く評価される。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格があるものとみとめる。