

|         |   |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 朴 眞紗美 (大韓民国)  |
| 学位の種類   | 博士(医学)  |
| 学位記番号   | 博士第348号   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当  |
| 学位授与年月日 | 平成12年3月27日  |
| 学位論文題目  | Ontogeny of (D-Ala <sup>2</sup> )-deltorphin I-like immunoreactive neurones in foetal rat brain<br>(胎生期ラット脳におけるデルトルフィン含有ニューロンの個体発生) |
|         | 審査委員 主査 教授 可 児 一 孝<br>副査 教授 遠 山 育 夫<br>副査 教授 木 村 宏  |

## 論文内容の要旨

### 【目的】

(D-Ala<sup>2</sup>)-deltorphin-I (DADT-I) は南アフリカ産のカエルの皮膚より抽出された(1)δレセプターに親和性の高いオピオイドペプチドである(2)。(Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly・NH<sub>2</sub>) の7つのアミノ酸から構成されておりC末端から2つ目にD-アミノ酸を含んでいる。DADT-Iは運動機能、社会行動、記憶力の向上の作用が報告されており、D1ドパミンレセプターとの関連が言われている。一方、脳内の細胞の局在を調べるには抗体を用い免疫組織化学法がおこなわれるが、この抗体の作成は共著者である、木村、遠山らにより1992年に作成された(3)。そして成熟ラット脳では主に中脳ドパミン含有ニューロンと共存しており(4)、また嗅球、淡蒼球、海馬などにおいては生後2週間の間にその発現が消失する(5)ことが、ポリクローナル抗体を用いて調べられた。今回我々は胎生期のラット脳での発現について免疫組織化学的に検討した。

### 【方法】

妊娠 Wister 系妊ラットにネンブタールを腹腔内に投与し、帝王切開にて胎仔ラットを取り出し、左室より0.01M リン酸緩衝液にて脱血を行い、続いて固定液(4%パラフォルムアルデヒド、2%ピクリン酸、0.35%グルタルアルデヒド)で固定後、脳組織を摘出、ゼラチン包埋の後に、クライオスタットにて切片(25μm)を作成した。抗DADT-I抗体に4℃3日間放置し、ビオチン化された抗ラビット抗体を第2次抗体として用い、ABC法にて発色を行った。染色された切片はゼラチンスライドの上で脱水包埋した。

### 【結果】

DADT-I含有ニューロンが初めて脳内に観察されるのは、胎生13日の中脳腹側被蓋野の上皮層内であり、その後外套層に広がり、中脳ドパミンニューロン群(A8~A10)と同じ分布様式を示した。胎生15日にはその吻側の上乳頭体核に陽性細胞群が現れた。胎生15~17日には中前脳束やマイネルトの反屈束に陽性線維が現れ、線条体、側坐核、嗅球、前頭前野に投射した。これら中脳の細胞群は発達とともに免疫染色の数、強さを増していった。中脳以外の陽性細胞としては、網膜においてもっとも多く胎生12日目より陽性細胞を認め、15日目以降はその数は減少し、胎生末期にはほとんど認めず、網膜から上丘に投射していた陽性線維も胎生後期には減少し始めた。また、嗅球、淡蒼球、海馬、延髄の網様体にも胎生期に一過性に現れる細胞体を少数認めた。

### 【考察】

DADT-I細胞群は以下の3群に分けられる。中脳ドパミン細胞と共存する黒質や腹側被蓋野に現れる細胞群(第1期)。上乳頭体に現れドパミンとは共存しない細胞群(第2群)。そして嗅球、淡蒼球、海馬、延髄の網毛体、網膜などに現れ、生後2週間までの間に消失していく細胞群(第3群)である。第1と第2群は中脳に属し成熟脳でも認められるもので、胎生13日に初めて脳内に出現し、中脳腹側被蓋野の上皮層から発したものである。この時期のドパミン細胞は上皮層内に認めるが

DADT-I細胞の外側に位置する。成熟脳において黒質ではほとんど全てのDADT-I細胞にドパミンが共存するのに対し、腹側被蓋野では半分しか共存せず、また上乳頭体においてはドパミンは存在せずDADT-Iしか含まれていないことより(4)、胎生期13日~14日頃に上皮層内の正中部に現れる細胞は上乳頭体ないし腹側被蓋野に移動し、それより外側に現れる細胞は腹側被蓋野から黒質にかけて移動したと推測できる。すなわち中脳の中で上皮層の正中部は前方及び正中に、少し外側部の細胞は後方及び外側部に移動する傾向があるのかもしれない。また、第三群の細胞群は2週まででその発現は消失したが、脳の発達、レセプターの形成などに関与しているのではないかと推測される。

#### 【結 論】

アミンと共存するペプチドの個体発生について調べたが、両者の比較により、発生期の細胞の移動について立体的な考察ができた。DADT-Iは脳組織の他にも発生期の腸管、肺にも認められる(6、7)。オピオドの作用の他に、神経の成長や分化、器官の形成に関与していると考えられる。

(1) Erspamer et al., PNAS 86: 5188-5192, 1989 (2) Renda et al., Neuroreport 4: 1143-1146, 1992 (3) Abe et al., Neuroreport 3, 669-672, 1992 (4) Tooyama et al., PNAS 90: 9635-9639, 1993 (5) Nonomura et al., J. Comp. Neurol. 349: 223-243 (6) J Matsui., J. Hist. Cytochem. 42, 1377-1381, 1994 (7) S Matsui et al., J. Histochem. 26, 648-654, 1994

## 論文審査の結果の要旨

デルトルフィン-Iは $\delta$ オピオイド活性を持つペプチドで、脳のもつ運動および記憶機能に関与し、特定の脳ニューロンに局在することなどが、幼若および成熟ラットにおいて報告されている。本研究では、胎生期ラット中枢神経系における発現様式を免疫組織化学的に検索し、次の結果を得た。

最も早期(胎生12日)の発現は網膜上方の網膜が細胞全体に認められたが、15日以降になると陽性の細胞は次第に減弱し、生後数日で消失した。脳でも、胎生期に一過性に出現する少数のニューロンが嗅結節、淡蒼球、海馬、延髄網様体に見出された。一方、出生後に成熟するとされる陽性ニューロンの起源は胎生13日で初めて検出され、中脳神経上衣層の腹側正中部において発生することが証明された。これらの陽性細胞は、発育とともに外套層へと遊走し、その多くは中脳ドパミン細胞群と酷似する分布様式を示した。しかし、他の残り少数は胎生15日以降において、非ドパミン性の上乳頭体核に定着することが明らかとなった。

本研究は、成熟脳ドパミン神経系に共存するデルトルフィン-Iの機能解析にとって重要な基礎知見を提供し、さらに一過性発現による網膜の成熟機構への役割を指摘した点において、博士(医学)の学位授与に値するものと評価された。

なお、最終試験は平成12年2月7日に実施し合格と認められた。