

アセチルコリン抗体による
脳内コリン神経系の免疫組織化学

課題番号 63570029

平成元年度科学研究費補助金
一般研究 (C)
研究成果報告書

平成 2年 3月

研究代表者 木村 宏

(滋賀医科大学・分子神経生物学研究センター)
(分子神経形態学部門)

はしがき

滋賀医科大学附属図書館



1990025171

研究組織

研究代表者：木村 宏 （滋賀医科大学・分子神経研・神経形態学部門）

研究分担者：遠山 育夫 （滋賀医科大学・分子神経研・神経形態学部門）

研究経費

昭和63年度	1400千円
平成 元年度	800千円
計	2200千円

研究発表

- 1) 木村 宏: アセチルコリンの免疫組織化学, 医学のあゆみ, 143:127-128, 1987
- 2) 木村 宏, 植村 秀治: 神経伝達物質の免疫組織化学, Dementia 2:13-23, 1988
- 3) 木村 宏, 渡辺 賢: アミノ酸の免疫組織化学, 神経精神薬理, 10:189-200, 1988
- 4) 木村 宏, 狩山 博文: モノクローナル抗体を用いた神経伝達物質の研究, Medical Immunology, 16:537-545, 1988
- 5) Ohta Y, Mori S, Kimura H: Neuronal structures of the brainstem participating in postural suppression in cats, Neurosci. Res., 5:181-202, 1988
- 6) 木村 宏, 藤宮 峯子: 腸の自律神経支配の新しい展開, 医学のあゆみ, 147:320-326, 1988
- 7) Ienaga K, Higashiura K, Toyomaki Y, Matsuura H, Kimura H: Simple peptides. II. Synthesis and properties of taurine-dipeptides containing neutral alpha-amino acid, Chem. Pharm. Bull., 36:70-77, 1988
- 8) Ienaga K, Nakamura K, Higashiura K, Toyomaki Y, Kimura H: Simple peptides. III. Synthesis and properties of taurine-oligopeptides containing an acidic alpha-amino acid, Chem. Pharm. Bull., 36:2796-2801, 1988
- 9) Tohyama I, Kameyama M, Kimura H: Quantitative Morphometric analysis of two types of serotonin-immunoreactive nerve fibers differentially responding to p-chlorophenylalanine treatment in the rat brain, Neuroscience, 26:971-991, 1988
- 10) Araki M, McGeer PL, Kimura H: The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method, Brain Res., 441:319-330, 1988
- 11) 木村 宏: DNA合成修復, 医学のあゆみ, 150:6, 1989

研究成果概要

アセチルコリン神経系の形態学的研究は、本研究者らが開発したアセチルコリン合成酵素の免疫組織化学が普及することにより急速に進展をみた。しかし動的なコリン神経機能を形態学的に追求することは上記の手法では困難なため、伝達物質アセチルコリンそのものに対する抗体を作成し、その抗体を用いる免疫組織化学法の開発が必要と考えられた。本研究において、まず最初にこれまで作成が困難であるとされていたアセチルコリン抗体について、詳細な検索を行った。

その結果、従来の報告にみられるようなコリン抗体は特異性に欠け、実用に適さないことが認められた。さらに特異性が高く、抗血清の作成も再現性よくするという目的のもとに検討を加えたところ、サクシニルコリンの側鎖にアミノ基を結合したものとアルブミンのカルボキシル基とをグルタルアルデヒド架橋法によって複合体としたもの、あるいはアセチルチオコリンのSH基を介する結合法によって複合体としたもの、などをハプテン抗原とした場合に、家兎免疫血清中に抗体価の高い抗体が作られることを見いだした。このうち、優秀な抗血清はアセチルコリンと強く反応するが、生体に豊富に存在するコリンやその誘導体とはほとんど免疫交叉性を示さないことが認められた。このことにより、初段階の目的は成功をおさめたといえる。

次にこの抗血清を用いて免疫組織化学染色を試みたところ通常の組織固定切片では期待される程の染色結果が得られなかった。各種の組織固定法を現在もなお検討中であるが、組織内では非常に溶解度の高い状態で存在するアセチルコリンをいかにして細胞骨格タンパクなどと結合させるかにポイントがあると思われる。仏国在住の著名なコリン神経学者である辻博士とも討論を行い、タングステン酸塩がアセチルコリンと錯塩を作るという可能性が想定されたので、タングステン酸含有固定法について至適条件を検討中であり、一層の努力を続けたい。

なお、前掲した研究発表リストのうち、1) - 4) は免疫組織化学に必要なとされる基本的な技術および各種の神経伝達関連物質の形態学的特徴について詳述したものであり、これら多彩な技術と知識はアセチルコリンの免疫組織化学という難関に挑戦するための必須といえる経験的ちくせきである。5)、6)、10) は生体コリン神経系の理解にとって重要な解剖学的研究として本研究の成功を前提として行なったものである。また、8) と9) はアセチルコリンのハプテン抗原の作製成功に手がかりを与えてくれた物理化学的解析について触れたものであるので参照論文とした。最後の10) は、コリン神経における遺伝子異常と脳機能欠損とを念頭に置いた視点で本研究者が着手しはじめた考え方についてまとめたものである。

研究発表

- 1) 木村 宏: アセチルコリンの免疫組織化学, 医学のあゆみ, 143:127-128, 1987
- 2) 木村 宏, 植村 秀治: 神経伝達物質の免疫組織化学, Dementia 2:13-23, 1988
- 3) 木村 宏, 渡辺 賢: アミノ酸の免疫組織化学, 神経精神薬理, 10:189-200, 1988
- 4) 木村 宏, 狩山 博文: モノクローナル抗体を用いた神経伝達物質の研究, Medical Immunology, 16:537-545, 1988
- 5) Ohta Y, Mori S, Kimura H: Neuronal structures of the brainstem participating in postural suppression in cats, Neurosci. Res., 5:181-202, 1988
- 6) 木村 宏, 藤宮 峯子: 腸の自律神経支配の新しい展開, 医学のあゆみ, 147:320-326, 1988
- 7) Ienaga K, Higashiura K, Toyomaki Y, Matsuura H, Kimura H: Simple peptides. II. Synthesis and properties of taurine-dipeptides containing neutral alpha-amino acid, Chem. Pharm. Bull., 36:70-77, 1988
- 8) Ienaga K, Nakamura K, Higashiura K, Toyomaki Y, Kimura H: Simple peptides. III. Synthesis and properties of taurine-oligopeptides containing an acidic alpha-amino acid, Chem. Pharm. Bull., 36:2796-2801, 1988
- 9) Tohyama I, Kameyama M, Kimura H: Quantitative Morphometric analysis of two types of serotonin-immunoreactive nerve fibers differentially responding to p-chlorophenylalanine treatment in the rat brain, Neuroscience, 26:971-991, 1988
- 10) Araki M, McGeer PL, Kimura H: The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method, Brain Res., 441:319-330, 1988
- 11) 木村 宏: DNA合成修復, 医学のあゆみ, 150:6, 1989