

# 脳疾患の法医病理診断

— 複合糖鎖・生理活性物質の利用 —

1 1 6 7 0 4 1 3

平成11年度～平成12年度

科学研究費補助金

(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 西 克治

(滋賀医科大学医学部医学科)

滋賀医科大学附属図書館



2000018561

# 目次

はしがき .....	1
研究組織 .....	2
研究経費 .....	2
研究発表	
学会誌 .....	3
口頭発表 .....	4
研究成果 .....	7

# はしがき

東北大学疫学研究チームの報告では、わが国の平均寿命は欧米に比して長いが高齢者に置ける痴呆患者比率は欧米に比して高く、高齢者の痴呆状態改善対策を講じないと多くの高齢者が痴呆状態で生き長らえている事になり兼ねない状況の招来が危惧されるという。法医学領域では、交通事故やドメスティックバイオレンス被害者の生前の状況、例えば、記憶障害、人格形成障害、痴呆状態などの有無を司法警察員、検察官、弁護士あるいは裁判官から尋ねられることが多くなってきている。

## 研究組織

研究代表者	西 克治	(滋賀医科大学医学部教授)
研究分担者	西村明儒	(滋賀医科大学医学部助教授)
研究分担者	山本好男	(滋賀医科大学医学部講師)
研究分担者	牛山郁子	(滋賀医科大学医学部助手)

## 研究経費

平成11年度	1,900千円
平成12年度	1,700千円
計	3,600千円

# 研究発表

## 学術誌

1. I. Ohkubo, Y-H. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane, K. Nishi  
Dipeptidyl peptidase III from rat liver cytosol: purification, molecular cloning and immunohistochemical localization  
Bilo. Chem. 380,1421- 1430, 1999.
2. K. Ikemoto, K. Kitahama, A. Nishimura, A. Jouvet, K. Nishi, R. Arai, M. Jouvet, I. Nagatsu  
Tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase do not coexist in neurons in the human anterior cingulate cortex  
Neuroscience Letters 269, 37-40, 1999
3. I. Nagatsu, K. Ikemoto, K. Kitahama, A. Nishimura, H. Ichinose, T. Nagatsu  
Specific localization of the guanoshine triphosphate(GTP) cyclohydrolase I-immunoreactivity in the human brain  
J Neuro Transm, 106, 607-617, 1999.
4. Y. Yamamoto, Y-H. Li, I. Ushiyama, A. Nishimura, I. Ohkubo, K. Nishi.  
Puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase from human liver cytosol: purification and characterization.  
Forensic Science International 113, 143-146, 2000
5. I. Ohkubo, Y-H. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane P-G Du, K. Nishi.  
Molecular cloning and immunohistochemical localization of rat dipeptidyl peptidase III  
Forensic Science International 113, 147-151, 2000
6. A. Nishimura, S. Sawada, I. Ushiyama, Y. Yamamoto, T. Nakagawa, A. Tanegashima, K. Nishi  
Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain.  
Forensic Science International 113, 265-269, 2000
7. K. Ikemoto, A. Nishimura, N. Okado, M. Mikuni, K. Nishi, I. Nagatsu  
Human midbrain dopamine neurons express serotonin 2A receptor: an immunohistochemical demonstration.  
Brain Research 853, 377-380, 2000

8. K. Ikemoto, R. Amano, A. Ishibe, A. Nishimura, K. Nishi, I. Nagatsu  
Quantitative analysis of tyrosine hydroxylase-, aromatic L-amino acid decarboxylase or phenylethanoamine-N-methyltransferase-immunoreactive neurons in the human medullary C1 region.  
Acta Histochem. Cytochem. 33, 259-265, 2000
9. A. Nishimura, S. Sawada, I. Ushiyama, A. Tanegashima, T. Nakagawa, K. Ikemoto, Y. Yamamoto, K. Sato, S. Rand, B. Brinkmann, K. Nishi  
Postmortem diagnosis of brain disorders : The histochemical detection of glycoconjugate deposition with lectins. Anil Aggrawal's Internet J of Forensic Medicine, [http://anil299.tripod.com/vol\\_001\\_no\\_002/paper003.html](http://anil299.tripod.com/vol_001_no_002/paper003.html), 2000
10. 澤田園、西村明儒、牛山郁子、中川季子、山本好男、西克治  
鍍金法と二重の免疫染色による三重染色の法医神経病理学的診断への応用  
法医病理 46 - 54、2000

## 口頭発表

1. 山本好男, 西克治, 李堯華, 大久保岩男  
哺乳動物のピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ  
第60回関西実験動物研究会, 京都, 1998年12月4日
2. 山本好男, 李堯華, 西村明儒, 牛山郁子, 大久保岩男, 西克治  
哺乳動物におけるピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼの諸性質の比較  
第83次日本法医学会総会, 広島, 1999年4月14-16日
3. 澤田園, 西村明儒, 牛山郁子, 中川季子, 山本好男, 西克治  
鍍銀法と二種類の免疫染色による三重染色の法医神経病理学的診断への応用  
第6回法医病理夏期セミナー, 福島, 1999年7月30-31日
4. 山本好男, 李堯華, 杜培革, 山根拓也, 大久保岩男, 西克治  
ヒトの Dipeptidyl peptidase II (DDP II) の単離と諸性質の検討  
第4回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 名古屋, 1999年8月20-21日
5. 李堯華, 前田利長, 山根拓也, 杜培革, 山本好男, 西克治, 大久保岩男  
ラット DDP III の大腸菌における発現  
第4回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 名古屋, 1999年8月20-21日

6. Ohkubo, I., Li, Y-H., Maeda, T., Yamamoto, Y., Yamane, T., Du, P-G and Nishi, K.  
Molecular cloning and immunohistochemical localization of rat dipeptidyl peptidase III.  
IVth International Symposium Advances in Legal Medicine, Mainz, Germany, 1999/9/22-25
7. Nishimura, A., Sawada, S., Ushiyama, I., Yamamoto, Y., Tanegashima, A. and Nishi, K.  
Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain.  
IVth International Symposium Advances in Legal Medicine, Mainz, Germany, 1999/9/22-25
8. Ikemoto, K., Nishimura, A., Nishi, K., Amano, R., Arai, R. and Nagatsu, I.  
An immunohistochemical study of human monoamine neuronal systems using postmortem  
brains obtained by forensic autopsied cases.  
IV. International Symposium Advances in Legal Medicine, Mainz, Germany, 1999/9/22-25
9. Yamamoto, Y., Li, Y-H., Ushiyama, I., Nishimura, A., Ohkubo, I. and Nishi, K.  
Puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase from human liver cytosol: purification and char-  
acterization.  
IVth International Symposium Advances in Legal Medicine, Mainz, Germany, 1999/9/22-25
10. 山本好男, 李堯華, 山根拓也, 杜培革, 大久保岩男, 西克治  
ヒトの Dipeptidyl peptidase II (DDP II) の単離と生化学的諸性質  
第 72 回日本生化学会, 名古屋, 1999 年 10 月 6-8 日
11. 杜培革, 李堯華, 山根拓也, 加藤茂, 山本好男, 西克治, 大久保岩男  
ラット腎臓から Tripeptidyl peptidase I の精製とその生化学的諸性質  
第 72 回日本生化学会, 名古屋, 1999 年 10 月 6-8 日
12. 山本好男, 大久保岩男, 牛山郁子, 西村明儒, 西克治  
ヒト肝臓から Dipeptidyl peptidase II の精製とその組織局在  
第 84 次日本法医学会総会, 和歌山, 2000 年 4 月 19-22 日
13. 澤田園, 西村明儒, 牛山郁子, 山本好男, 西克治  
\* 非 Alzheimer 型変性痴呆についての検討  
第 84 次日本法医学会総会, 和歌山, 2000 年 4 月 19-22 日
14. 張輝, 山本好男, 李堯華, 朱宮正剛, 西克治, 可児一孝, 大久保岩男  
ラット眼球におけるプロテアーゼ: 先天性白内障における免疫組織化学的検討  
第 5 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 名古屋, 2000 年 8 月  
18-19 日

15. 杜培革, 李堯華, 前田利長, 山根拓也, 山本好男, 西克治, 大久保岩男  
ラット Tripeptidyl peptidase の cDNA のクローニング  
第5回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 名古屋, 2000年8月  
18-19日
16. 山本好男, 山根拓也, 李堯華, 牛山郁子, 西村明儒, 大久保岩男, 西克治  
ラット脳からのピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼの単離・精製  
第5回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 名古屋, 2000年8月  
18-19日
17. Yamamoto, Y., Yamane, T., Ushiyama, I., Nishimura, A., Ohkubo, I. and Nishi, K.  
Isolation and characterization of a dipeptidyl peptidase II from human liver cytosol and im-  
munohistochemical localization.  
18th congress international academy of legal medicine, santiago de Compostela, Spain, 2000/  
9/6-9
18. Nishimura, A., Sawada, S., Ushiyama, I., Tanegashima A., Yamamoto, Y., Nakagawa, T.,  
Ikemoto, K. and Nishi, K.  
The carbohydrate depositions in the molecular layer of the dentate gyrus in the hippocampal  
formation may perturb the memory of patients with brain disorder.  
18th congress international academy of legal medicine, santiago de Compostela, Spain, 2000/  
9/6-9
19. 杜培革, 李堯華, 前田利長, 山根拓也, 山本好男, 西克治, 大久保岩男  
ラット Tripeptidyl peptidase I cDNA のクローニング  
第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
20. 張輝, 山本好男, 李堯華, 朱宮正剛, 西克治, 可児一孝, 大久保岩男  
ラット眼球のプロテアーゼ: 先天性白内障における免疫組織化学的検討  
第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
21. 山本好男, 山根拓也, 大久保岩男, 西克治  
ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ: ラット脳からの単離と諸性質の検討  
第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
22. 山本好男, 大久保岩男, 西克治  
ラット脳からのピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼの単離・精製と諸性質  
の検討  
第68回関西実験動物研究会, 京都, 2000年12月1日



# 研究成果

東北大学疫学研究チームの報告では、わが国の平均寿命は欧米に比して長いが高齢者に置ける痴呆患者比率は欧米に比して高く、高齢者の痴呆状態改善対策を講じないと多くの高齢者が痴呆状態で生き長らえている事になり兼ねない状況の招来が危惧されるという。法医学領域では、交通事故やドメスティックバイオレンス被害者の生前の状況、例えば、記憶障害、人格形成障害、痴呆状態などの有無を司法警察員、検察官、弁護士あるいは裁判官から尋ねられることが多くなってきている。

本研究では、①生化学的検討、②解剖学的検討、③糖鎖組織学的検討の3分野から、研究目的遂行を行った。

## ①生化学的検討

生化学的検討では、法医病理学的検査に応用可能な生理活性物質の精製と性状の検討を行い、それらの物質の生体での分布を検討した。生理活性物質として、脳組織に豊富に存在している酵素を選んだ。また、病理学的検査に用いるべく、それらに対する抗体の作成を行った。

Dipeptidyl Peptidase III ; この酵素は、Dipeptidyl aminopeptidase や enkephalinase B としても知られているものがある。精製後、生化学的性状と cDNA クローニングをおこない、さらに、兔免疫抗体を作成、各臓器での酵素存在部位を検討したところ、脳では chorioid epitheliu に多く存在し、neuroglia cell, Purkinje cell, myelinated fiber にも普遍的に発現され、pyramidal cell, axon, dendrite などにも発現が確認された。

Puromycin-sensitive analyl aminopeptidase ; この酵素は、Puromycin を加えることにより酵素活性がなくなる性質をもっており、脳内enkepharinとの関連において脳神経科学分野においても注目を浴びているものである。ヒト肝臓から酵素を抽出精製し、生化学的性状と cDNA クローニングを行い、抗体作成し、各臓器での酵素分布を検討した。作成抗体は各方面から分与の依頼があり、ベルギーを初め各国に郵送した。

これらの検討から、酵素の脳内異常沈着と脳浮腫との関連性が示唆され、脳疾患を有する患者脳でのこれら酵素活性部位の異常出現も確認された。酵素の逸脱を指標にした死後経過時間推定の可能性などを検討中で、今後、法医病理診断分野での応用範囲が広がるものと判断している。

## ②解剖学的検討

解剖学的検討では、共同研究者らが作成した脳内酵素に対する抗体を用いて脳神経細胞でのそれら酵素の発現を精神病との関連から検討すべく主に蛍光顕微鏡を用いて検索した。Serotonin 2A -受容体と tyrosine hydroxylase が venral tegmental area と substantianigra 神経細胞に共存していることを明らかにし、中脳ドーパミン神経細胞がセロトニン 2 A 受容体を発現していることを明らかにした。 tyrosine hydroxylase と aromatic L-aminoacid

decarboxylase は anterior cingulate cortex の神経細胞には共存しないことを明らかにした。

Medullary C1 領域では、tyrosine hydroxylase 発現神経細胞が最多で、aromatic L-aminoacid decarboxylase発現神経細胞がこれに次ぎ、phenylethanolamine-N-methyltransferase 発現神経細胞数が最も少なかった。tyrosine hydroxylase と phenylethanolamine-N-methyltransferase の共存神経細胞と tyrosine hydroxylase のみを発現している神経細胞が見られた。Guanosine triphosphate cyclohydrase I と tyrosine hydroxylase は substantia nigra, ventral tegmental area, locus coeruleus, dorsal raphe, や zona incerta の神経細胞に共存し、これらの神経細胞の大部分に aromatic L-aminoacid decarboxylase の共存も見られたが dorsomedial hypothalamic nucleiには Guanosine triphosphate cyclohydrase I と tyrosine hydroxylase の発現のみが見られた。

### ③糖鎖組織学的検討

糖鎖組織学的検討では、法医解剖後の病理検索として行われている脳組織の染色時にレクチン染色、免疫染色を加え、検討を行った。

検討により、鍍金染色により確認されていた老人斑と神経原線維変化、また由来不明の corpora amylacea がレクチン染色により明瞭に染色されることを見いだした。また、ダウン症や老人性痴呆患者脳では脳白質部に2種類の沈着構造物がレクチン染色で見いだされた。一つは血管周囲に他の一つは、脳白質部に見られ。いずれも現段階では成因、病的意義は不明だが、脳浮腫時の脳血管関門の破綻との関連が考えられる。

この二つの変化は、これまで報告されていない糖鎖の沈着で、この部分への他の構造物の関与をさらに検討しなければならない。さらに海馬歯状回分子層に球形を示す未報告の糖鎖関連沈着がレクチン染色や抗コンドロイチン硫酸抗体を用いた免疫染色で見いだされた。記憶の場である海馬歯状回分子層での神経ネットワークに何らかの悪影響を生じている可能性が否定できず、更なる検討を進めている。また、神経原線維変化や老人斑を鋭敏に検出方法である Gallyal-Braak 法に免疫組織化学的方法を加えた三重染色方法も開発し、脳神経変性を1枚の切片で観察することに成功した。