

学 位 論 文 題 名

ニホンウズラに新しく見出された神経疾患ミュータント (Quv) 系
に関する病理学的研究

学位論文内容の要旨

Quv 系ウズラは、ニホンウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) において新たに確立された常染色体性劣性遺伝性神経疾患ミュータント系である。本系の個体は、頭・頸部から全身に至る振戦を主徴とする神経症状を孵化直接より発現し、100%の発症率を示す。この症状は非進行性で、ウズラに致死的な影響を及ぼすことはない。また、成熟個体どうして繁殖が可能であるため、ホモ接合体のまま系統維持されている。

本研究はそのような Quv 系ウズラの疾患の本態を解明する第一歩として企画され、変異に伴う神経系の異常について、病理形態学的、免疫組織化学的、および生化学的側面から解析を行った。その結果、Quv ウズラは、ニューロフィラメント (NF) のみならずその他の中間径フィラメントを通じても初めての欠損動物であることが明らかにされた。以下に検索結果の概略を総括する。

第 I 章では、Quv 系ウズラが示す神経症状に対応する神経病変の所在および特徴を病理形態学的に明らかにすることを目的に研究を行った。供試動物としては、Quv 系および正常対照系 (TKP) ウズラを用いた。6 週齢 (若齢成熟) の時点で、両系各 10 羽を無作為に選び、左心室より灌流固定し、脳および、脊髄、視神経、坐骨神経を取り出し、パラフィンあるいはエポキシ包埋した。これらの材料について、光顕的、電顕的および形態計測学的に、中枢、末梢神経病変の質的および量的変化を解析した。

Quv 系ウズラは孵化直後より頭・頸部から全身に至る振戦を示し、その後、この症状は進行あるいは回復することなく、観察全期間 (8 か月齢まで) を通じ持続して認められた。両系統間の 6 週齢個体の体重に差はなかったが、Quv 系の脳重量および脳重量/体重比は有意に低かった。光顕的形態計測において、Quv 系の視神経、頸膨大白質および坐骨神経の断面積は、対照系に比較して概ね 30% 前後減少していた。白質に存在する有髄神経線維の軸索直径は著明に矮小化し、時折、髄鞘の拡張・崩壊、軸索の消失および球状腫大が認められた。検索した脳・脊髄の

全域にわたって、Quv 系の軸索は嗜銀性を示さず、同時に、免疫組織化学的に抗ニワトリ低分子量 NF 家兎血清に対する反応性を欠いていた。電顕検索の結果、いずれの部位の軸索内にも NF のコアは存在せず、微小管が増数していた。頸部側索有髄線維の電顕的形態計測では、平均軸索周囲長・面積の減少、軸索直径ヒストグラムの左方シフト、および有髄線維密度の増加がみられた。両系統間で、軸索真円率の平均値に有意差はなかった。髄鞘に関する変化としては、g-レシオの低下および軸索径に対する髄鞘スパイラル長あるいは髄鞘ラメラ数の増加が、軽度ながら検出された。

以上の所見から、Quv 系には、神経細胞の神経骨格である NF に一次的な欠損ないし著しい減少があり、その結果として軸索径の増大（成長）が阻害され、神経系の組織面積の低下がもたらされたことが強く示唆された。すなわち、Quv 系ウズラの病態の本質は、NF の欠損性形成不全に起因する軸索径の低発育であると解された。このような病態は、ヒトおよび動物を通じて未だ見出し出されておらず、軸索萎縮および軸索消失とは別の、`axonal hypotrophy、という新たな疾患概念に入れるべきであることが提唱された。

第 II 章では、Quv 系ウズラの NF 構造の消失に対応した蛋白レベルでの異常を明らかにするために、Quv 系における NF 蛋白サブユニットの発現状況を生化学的・免疫組織化学的に検索した。検索には Quv 系および対照系 (TKP) の成ウズラ (15-21 週齢) を供した。

SDS-PAGE およびイムノプロット解析により、脳の Triton-X100 不溶性分画、脊髄および坐骨神経全蛋白中の NF サブユニットの発現状況を検討した。NF サブユニットの組織内での分布は、脊髄凍結切片で免疫蛍光法により検索した。細胞骨格蛋白の検出プローブとしては、4 種類の抗ニワトリ NF サブユニット家兎血清 (抗 NF-L, 抗 NF-M130, 抗 NF-M160, および抗 NF-H) ならびに抗 β -チューブリンおよび抗微小管関連蛋白 (MAP) 2 モノクローナル抗体を使用した。また、免疫蛍光法の所見と対比するため、NF の合成および重合の場である神経細胞体の超微形態学的変化を脊髄の腹角運動神経細胞を中心に検討した。

ウズラ NF 蛋白は、哺乳類およびニワトリと同様に、三つの主要なバンドとして認められた。ただし、NF-H は NF-M と非常に近い位置に泳動された (NF-L は 70kDa, NF-M は 160kDa, NF-H は 170kDa)。Quv 系の脳、脊髄および坐骨神経のホモジネートの検索では、これら NF トリプレットに相当するバンドは極度に減少していた。しかしながら、抗 NF-M130 (ニワトリ脱リン酸化型 NF-M) 抗血清を用いたところ、脊髄材料中に比較的強いバンドが検出可能であった。免疫蛍光法では、Quv 系の脊髄に抗 NF-L の反応産物は検出できなかった。Quv 系の脊髄には、対照系とは異なって、抗 NF-M160 および抗 NF-H に反応する軸索はごく稀

にしか存在しなかった。しかし、対照系では反応の認められなかった腹角神経細胞体は、逆に陽性を呈した。Quv系の神経細胞体は、抗NF-M130を用いた場合には、対照系よりもむしろ強い反応を示した。 β -チューブリンおよびMAP2の染色パターンは、両系統間で大差なかった。電顕検索では、Quv系の腹角神経細胞の細胞質には、無構造な絮状物質が増加し、中間系フィラメントは明らかではなかった。変性変化は樹状突起に散見される程度であった。

以上の結果、Quv系の中枢・末梢神経組織には、見かけ上、三つの主要なNFサブユニットのすべてに著明な減少のあることが明らかになった。しかし、これらのうち、NF-MおよびNF-Hの二つのサブユニットは、主に神経細胞体に存在していた。したがって、NF-Lサブユニットに一次的な欠損があり、そのため他の二つのサブユニットは合成されても正常のNF構造に重合できず、かつまた軸索へ輸送されず、結果的に神経細胞体に留まっていることが、Quv系におけるNF形成不全の機序として強く疑われた。

神経細胞の基本的細胞骨格であるNFの機能および生物学的動向については、今なお不明な点が多い。Quv系ウズラに関する本研究により、NFと軸索径との間には密接な関係のあること、および軸索径(間接的にはNF)は正常な神経機能の遂行に不可欠であることが証拠づけられた。他方、NFの欠損はQuv系の個体およびその神経細胞自体に致死的に作用しないことから、NFはそれ以上の積極的な作用は持っていない可能性も示唆された。Quv系ウズラは過去に類例のない初めてのNF欠損動物であることから、今後、生物学的モデルとしての有用性が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	板倉	智敏
副査	教授	杉村	誠
副査	教授	菅野	富夫
副査	教授	斉藤	昌之

申請者を含む研究グループは、常染色体性劣性遺伝により、孵化時から生涯にわたる非進行性の全身性振戦を示すウズラの新しい系統(Quv)を確立した。この系統は、神経症状はあるが、正常に匹敵する寿命を全うし、常時対照と同等の体重を維持することも特徴である。申請者は、

この特異な Quv 系ウズラの神経系を形態学的並びに生化学的に解析し、本論文をまとめた。本論文は邦文77頁からなり、2章で構成されている。

第I章では、Quv 系が示す神経症状に対応する神経病変の特徴を形態学的に明らかにした。検索には、6週齢の Quv 系および正常対照 (TKP) 系ウズラ各10羽を用いた。光顕的形態計測の結果、Quv 系の視神経、頸膨大白質および坐骨神経の断面積は、対照系に比較して約30%減少していた。これらの領域の有髄神経線維の軸索は、直径が著明に矮小化し、嗜銀性を失い、免疫組織化学的には抗ニワトリ低分子量ニューロフィラメント (NF) 家兔血清に対し反応性を欠いていた。髄鞘および軸索の変性変化は稀であった。電顕検索の結果では、いずれの部位の軸索内にも NF のコアは存在せず、微小管が増数していた。電顕的形態計測では、平均軸索周囲長・面積の減少、軸索直径ヒストグラムの左方シフト、および有髄線維密度の増加がみられた。なお両系統間に、軸索真円率の平均値に有意差はなかった。

以上の所見から、Quv 系には、神経細胞の細胞骨格である NF に一次的な欠損ないし著しい減少があり、その結果として軸索径の増大 (成長) が阻害され、神経系の組織面積の低下がもたらされたものと解された。

第II章では、Quv 系ウズラの NF 構造の消失に対応した蛋白レベルでの異常を明らかにするために、Quv 系における NF 蛋白サブユニットの発現状況を生化学的・免疫組織化学的に検索した。検索には Quv 系および対照系 (TKP) の成ウズラ (15-21週齢) を用いた。検索の結果、ウズラ NF 蛋白は、哺乳類およびニワトリにおけると同様に、三つの主要なバンドとして認められた (NF-L は70kD, NF-M は160kD, NF-H は170kD)。Quv 系の脳、脊髄および坐骨神経のホモジネートの検索では、これら NF トリプレットに相当するバンドは極度に減少していた。しかしながら、抗 NF-M130 (ニワトリ脱リン酸化型 NF-M) 抗血清を用いたところ、脊髄材料中に比較的強いバンドが検出された。免疫蛍光法では、Quv 系の脊髄に抗 NF-L の反応産物は検出できなかった。Quv 系の脊髄には、対照系とは異なって、抗 NF-M160および抗 NF-H に反応する軸索はごく稀にしか存在しなかった。しかし、対照系では反応しなかった腹角神経細胞体が、逆に陽性を呈した。Quv 系の神経細胞体は、抗 NF-M130を用いた場合には、対照系よりも強い反応を示した。電顕検索では、Quv 系の腹角神経細胞の細胞質には、無構造な絮状物質が増加し、中間径フィラメントは認められなかった。

以上の結果、Quv 系の中枢・末梢神経組織には、見かけ上、三つの主要な NF サブユニットすべてが著明に減少していることが示された。しかし、これらのうち、NF-M および NF-H の両サブユニットは、主に神経細胞体に存在していた。したがって、NF-L サブユニットに一

次的な欠損があり、そのため他の二つのサブユニットは合成されても正常の NF 構造に重合できず、かつまた軸索へ輸送されず、結果的に神経細胞体に留まっていることが、Q_{uv}系における NF 形成不全の機序として強く疑われた。

申請者は、本論文の結論として、Q_{uv}系ウズラの本質的病態は NF の形成不全に基づく軸索径の低発育であり、これに対し「axonal hypotrophy」という新しい疾患概念を与えた。そしてまた、神経細胞の基本的細胞骨格である NF は、軸索径の発達に密接に関連していること、神経機能の発揮に不可欠であること、さらには個体の生命維持に必須ではないことを示唆した。以上の成果は、獣医学並びに人医学のみならず、生物学における細胞骨格研究の分野に大きく貢献するものである。よって審査員一同は、山崎洋氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。