

主 論 文

中枢神経系の脱髄機序に関する研究

新潟大学脳研究所神経内科学教室（主任：宮武 正教授）

柳沢 勝彦

Study on the mechanism of demyelination in central nervous system

Katsuhiko YANAGISAWA

Department of Neurology, Brain Research Institute,
Niigata University
(Director: Prof. Tadashi MIYATAKE)

Calcium-dependent protease was extracted from human brain myelin membrane and partially purified on a phenyl Sepharose CL 4B column. It was activated by calcium ion in the millimolar range, and therefore was determined to be calpain II. This enzyme fraction was electrophoresed and immunostained with anti-chicken muscle calpain antibody, resulting in staining as a single band with apparent molecular weight of 80K. This protease degraded exogenous myelin-associated glycoprotein. From the present result, it is suggested that calpain is bound to myelin membranes and involved in the turnover of myelin proteins.

The vacuolar degeneration was produced by oral administration of triethyl tin (TET). The wet weight of brain stems which seems to reflect the degree of accumulation of water increased during the administration of the toxin, whereas the activity of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase altered less remarkably. When TET was withdrawn from the drinking water, the rats showed a dramatic clinical improvement along with reduction in wet weight of brain stems. Treatment with acetazolamide following TET inhibited the clinical improvement and reduction in wet weight of brain stems. The present results indicate that central myelin has plasticity in recovering from the vacuolar degeneration by removing the accumulated fluid and carbonic anhydrase is possibly involved in the dehydration of myelin in such a recovery phase.

Key Words: calpain (calcium-activated neutral protease)
human brain myelin
myelin-associated glycoprotein
triethyl tin
acetazolamide

Reprint requests to: Katsuhiko YANAGISAWA, Department of Neurology
Brain Research Institute, Niigata University
Niigata City, 951 JAPAN

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経内科学教室 柳沢 勝彦

はじめに

中枢性髄鞘はその形成細胞であるオリゴデンドログリアの細胞質膜が伸展延長し、神経軸索を多層性にとりまいたものであり、神経線維の電氣的シグナルの効率良い伝導（跳躍伝導）を維持するうえで重要な構造である。

髄鞘蛋白の構成は比較的単純であり、髄鞘塩基性蛋白（myelin basic protein, MBP）、proteolipid protein (PLP) および Wolfgram protein で全体のおよそ9割を占める。これらの蛋白は互いに髄鞘内の局在が異なり、細胞内機能も一様ではないと考えられるが、その詳細は不明である。これまでの研究から、MBP および PLP に関しては、遺伝的に欠損したミュータントが発見されており、それぞれ重篤な神経症状をしめすことが知られている(1,2,3,4,5)。髄鞘にはこの他、量的には全髄鞘蛋白の1%ながら、髄鞘と神経軸索との間に局在する糖蛋白（myelin-associated glycoprotein, MAG）があり、神経細胞とオリゴデンドログリアとの間の情報交換に重要な機能を果たしていると考えられる(6)。一方、中枢神経髄鞘には内因性中性蛋白分解酵素活性があり、MBP および MAG を分解することが知られており、Sato and Miyatake により内因性酵素はカルシウム依存性中性蛋白分解酵素

（calcium-activated neutral protease, CANP）類似の酵素学的特性をもつことが明らかにされた(7)。その後、われわれはヒト脳にCANP活性が存在すること、およびヒト脳より部分精製したCANPがMBPを分解することを報告した(8)。

本研究は、以上の研究成果をふまえて、ヒト脳髄鞘内因性蛋白分解酵素とCANPとの異同を酵素学的、および免疫生化学的に検討し、脱髄の生化学的機序を明らかにすることを第1の目的とした。さらに、白質における虚血、炎症、中毒などの病態で共通して観察される髄鞘層構造の破綻と髄鞘内浮腫、およびその修復機構を生化学的に解析し、白質障害性疾患の治療の可能性を探ることを第2の目的とした。

方法

ヒト脳ミエリンからのカルパイン分離・抽出

ヒト脳白質 (40 g) より Norton and Poduslo の方法(9)に従って、髓鞘を精製し凍結乾燥を行った。凍結乾燥髓鞘を氷冷 Buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 5 mM EDTA; 25 mM mercaptoethanol; 0.5% Triton X-100) 50 mlにて、Teflon-glass ホモジナイザーを用いてホモジサイズした。超遠心 (100,000 g, 90 分) 後、上清から Triton を除去するために Buffer A にて平衡化した Bio-Beads SM-2 column (Pharmacia) (0.9 x 9 cm) にかけて、充分量の Buffer A を用いて 0.3 ml/分のスピードで column を洗浄した。Column への非吸着成分を集め、固形塩化ナトリウムを 300 mM の濃度になるよう加え、溶解後、室温に 20 分間静置した。試料液を Buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.1 mM EGTA; 25 mM mercaptoethanol; 300 mM NaCl) にて平衡化した phenyl Sepharose column にかけて、充分量の Buffer B にて 50 ml/時間 のスピードで洗浄した。Column から Buffer C (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1.0 mM EGTA; 25 mM mercaptoethanol; 20% ethylene glycol) を用いて酵素活性分画を 50 ml/時間 のスピードで溶出させた。

酵素活性測定

Guroff の方法(10)に準じて、アルカリ変性カゼインを基質に用いて カルパイン活性を測定した。活性測定溶液 (300 ml) は以下の組成より作成した。反応溶液 (3% アルカリ変性カゼイン; 20 mM Tris-HCl pH 7.5; 25 mM mercaptoethanol) 145 μ l, 酵素活性分画 145 μ l および 150 mM 塩化カルシウム溶液 10 μ l ないしは 3 mM EGTA 溶液 10 μ l。酵素反応は 60分間、22度Cで行い、100 μ l の 氷冷 tri-chloroacetic acid を加えることにより止めた。氷中に15分間静置した後、遠心 (3000 g, 30 分間) を行い、上清の吸光度 (280 nm) を EGTA添加反応液上清に対して測定した。酵素活性 1 単位は、上記反応により吸光度 (280 nm) 1.0 の上昇をもたらすものと定義した。

髓鞘関連糖蛋白 (MAG) 分解反応

ヒト脳白質より、Quarlesらの方法(11)に従って髓鞘関連糖蛋白 (MAG) を精製した。MAG (200ng) を 牛血清アルブミン (BSA) (20 μ l, 0.25%) に溶解し、カルパイン活性分画 (20 μ l, 0.01単位)、反応溶液 (25 μ l, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5; 25 mM mercaptoethanol) および 塩化カルシウム溶液 (10 μ l, 37.5 ml)、EGTA溶

液 (10 μ l, 7.5 mM) ないしは E-64 溶液 (100 μ M) と 18 時間、37°C で反応させた。

Gel electrophoresis および Immunoblotting

酵素活性分画 (50 μ g) を凍結乾燥し、Laemmli and Favre の方法(12)に従って、7.5% SDS-polyacrylamide gel にて電気泳動を行い、Towbin らの方法(13)に準じてニトロセルローセ紙にブロットした。ブロットを Tris-buffer saline で溶解した 3% BSA 内に、室温下で一晩浸透した後、抗鶏骨格筋カルパイン抗体 (東京都臨床研、鈴木絃一博士恵与) (1 x 250) を 25°C で 1 時間反応させ、洗浄後、ビオチン化・山羊抗家兎 Ig-G (Vector, 1 x 250) を 25°C で 1 時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ抱合・アビジン-ビオチン複合体 (Vector, 1 x 200) と 25°C で 1 時間反応させた。洗浄後、4-chloronaphthol を基質として用いて発色させた。

酵素活性分画と反応させた MAG 溶液を上記と同様に、電気泳動およびブロットを行い、抗MAG-モノクローナル抗体 (D7E10, Doberson ら、1985) を用いて免疫染色を行った。

Triethyl tin 中毒ラットの作成

8 週令の Sprague-Dawley ラット (雌) を triethyl tin (TET) (Organisch Chemisch Inst., Utrecht, The Netherlands) 10 mg/L 含有飲料水で飼育した。ラットは毎日観察し、運動機能障害を Pettinelli らの方法(14)に従って評価し点数化した。飼育開始、60 日後にエーテル麻酔下に断頭して殺し開頭後、脳幹部を摘出し湿重量を測定した後、生化学用試料と組織学的検索用試料を分けて保存した。

一部のラットは 30 日間 triethyl tin を与えたのち、50 mg acetazolamide (Lederly Japan) を 0.04 N 水酸化ナトリウム液で溶解し、腹腔内注射した。水酸化ナトリウム液のみの注射ラットを対照群とした。

Cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP) 活性測定

Prohaska らの方法(15)に準じて、2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) 活性を測定した。酵素活性 1 単位は 1 分間に、2',3'-cyclic AMP から 1 μ mol の 2'-AMP を産するものとした。

形態学的観察

Triethyl tin 投与期間中における髄鞘内浮腫の評価を、生存下で magnetic resonance imaging (MRI) で観察した。髄鞘の超微形態は、断頭後、電子顕微鏡学的に行った。

結果

Phenyl-Sepahrose CL 4B column クロマトグラムを図1に示した。酵素活性は column を Buffer C で洗浄後、急峻な立ち上がりをもって溶出された。本実験に用いた一段階 column 操作はカルパインを髄鞘から効率良く分離し、再現性も良好であることが確認された。酵素活性は、column 処理前の髄鞘ホモジネート内では検出されなかった。ホモジネート内に存在し、カルパインに対して特異的な阻害作用を有するカルパスタチン (calpastatin) が、そのhydrophobicityの違いによってカルパインから分離されたものと考えられた。

酵素の活性化に必要なカルシウムイオン濃度を検討したところ、0.1 mM から 5 mM のカルシウムイオン濃度の範囲において、50% の活性化には 1 mM のカルシウムイオンを必要とした (図2)。さらにチオールプロテアーゼ阻害剤である E-64 による抑制効果を検討したところ、100 μ M の E-64 により 0.1 単位の酵素活性は完全に抑制された。以上より、ヒト脳髄鞘より分離・抽出した蛋白分解酵素はカルパイン II (calpain II, mCANP) であることが酵素学的に確認された。

酵素活性分画内蛋白の抗鶏骨格筋カルパイン抗体を用いた Western blot analysis の結果、分子量 80K の単一バンドを認めた (図3)。この分子量は、Vitto and Nixonによりヒト脳より精製されたカルパインの分子量と一致した。

ヒト脳よりの精製 MAG と本酵素との反応の結果、以下の結果を得た。5 mM のカルシウムイオンの存在下で本酵素は MAG を分解した。分解産物中には、分子量を 10 K 減じた derivative MAG (dMAG) も含まれていた。MAG の分解は、100 μ M の E-64 および 1 mM の EGTA により有意に抑制された (図4)。

白質障害の生化学的メカニズムを明かにするために、非炎症性脱髄モデルである TET中毒ラットを作成した。TET投与ラットは TET含有水にて飼育約 7日後に、尾および後肢の運動麻痺を示した。運動麻痺は、TET投与継続にてその後 2 ないし 3 週間進行し、TET投与中に約 1 割のラットが死亡した。TET 投与を 60 日で中止し、

通常飲料水に変更したところ、運動麻痺は約10日間で軽減・消失した(図5)。
TET投与 30 日後および 60 日後にエーテル麻酔下に断頭にて殺し、開頭後脳湿重量を部位別に測定した。30 日後、60 日後のいずれにおいても脳幹部の湿重量は対照群に比して、有意に増加していた(図6A)。TET投与ラットにおける小脳および大脳半球の湿重量の変化は脳幹部に比して軽度であった。脳幹湿重量はTET投与中止後、運動麻痺の回復と平行して減少し対照値に近付いた(図6A)。

脳幹より精製した髄鞘の収量はTET投与ラットにおいて、対照群と比較して有意に減少を示し、TET投与中止2週間後の回復期においては収量の回復を認めた(図6B)。脳幹ホモジネート内の CNP 活性は対照群に比して有意に低下していたが、その変化は湿重量の変化に比して軽度であった(図6C)。ホモジネート内 MAG および髄鞘塩基性蛋白(myelin basic protein, MBP)を抗-MAG、抗-MBP ポリクローナル抗体を用いて Western blot analysis にて定量を行ったが、有意な変化を認めなかった。以上より、その後の病変重症度の定量的マーカーとして脳幹湿重量を用いた。

電顕による形態学的観察により、60日間TET投与ラット脳幹において最も顕著であった形態学的所見は、髄鞘層構造(myelin lamellar structure)の解離(splitting)および解離した髄鞘内への浮腫液貯留であった(図7A)。血管周囲の細胞浸潤等の炎症性変化は認められなかった。TET投与中止2週間後の回復期のラット脳においては、貯留液の減少は認められたが、髄鞘層構造の解離は依然観察された(図7B)。

TET 投与中止後、炭酸脱水酵素阻害剤である acetazolamide を投与したラットにおいては、運動麻痺の回復は観察されなかった。これらのラットの脳幹湿重量はTET投与中止直後に断頭したラットのそれと変化を認めなかった。一方、acetazolamide 単独を投与したラットでは運動麻痺も脳幹湿重量の増加も認めなかった(図8)。

以上より、TET中毒による髄鞘内浮腫の修復過程には炭酸脱水酵素が関与しているものと考えられた。

考察

カルパインは、これまでの研究から様々な組織、細胞から精製され精力的に研究が進められているが、その生理的機能は依然不明である。通常カルパインは細胞質内酵素として理解されているが、細胞質膜および細胞内小器官膜に関連して存在している可能性も報告されている(16, 17)。本研究の結果、ヒト脳髄鞘にもカルパイン (myelin-associated calpain II, MAC-II) が存在することが明らかとなった。MAC-IIは髄鞘の major dense line、即ちオリゴデンドログリアの細胞質側に存在し、同部位に存在する MBP を分解すると考えられる。神経軸索周囲においては、膜貫通性糖蛋白である MAG を膜貫通ドメイン直下で分解するものと考えられる。In vitro における MAG の髄鞘内因性蛋白分解酵素による分解は分子量10万減じた分解産物 (derivative MAG, dMAG) を生じることが知られているが、先にわれわれはヒト脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF) 内にdMAGと同一の分子量を示すMAG分解産物を認めており(18)、MAC-IIによるMAGの分解は生理的にも起きていると考えられる。健常人CSF内におけるdMAGの濃度は通常10ng/ml程度であるが(18)、脳内にMAGの約50倍存在するMBPのそれが2ng/ml以下であることを考慮すると、MAGの分解は非常に活発であることがわかる。MAGは神経細胞とオリゴデンドログリアとの間にあって情報交換を行っており、MAC-IIはその生理的調節を担っていると考えられる。

1984年、Sato らはヒトの代表的脱髄疾患である多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 患者脳において、本酵素によるMBPの分解およびMAGからdMAGへの変換が亢進していることを報告した(19)。脳内にあって、髄鞘蛋白を分解するプロテアーゼは、カルパイン以外にも cathepsin B, cathepsin D などが知られている(20)が、これまでのところ、MAG から dMAG への変換はカルパインのみによって可能であることから、病的な髄鞘蛋白分解においてもカルパインが中心的役割を果たしていると考えられる。MS においてMAC-IIによる蛋白分解が亢進している機序は不明であるが、可能性としては、オリゴデンドログリア内カルシウムイオン濃度の上昇、内因性阻害因子 (カルパスタチン) の減少、髄鞘蛋白のリン酸化によるMAC-IIに対する感受性の亢進、さらにはMAC-II遺伝子発現の増加などが考えられる。そのうちカルシウムイオン濃度の変化についてはこれまでのMS脳に関する研究から否定的である。最近、HTLV-1 感染リンパ球において、カルパインIIの蛋白量および活性が増加していることが報告された (文部省総合研究; 細胞内プロテアーゼ系の遺伝子発現と病態)。HTLV-1は高度の脊髄障害をきたし、HTLV-1 associated myelopathy (HAM) を引き起こす。OhamaらはHAM患者脊髄において炎症性細胞浸潤が極めて軽度

にもかかわらず、高度の脱髄所見を呈した剖検例を報告した(21)。Ohamaらの報告は、HTLV-1感染を受けたオリゴデンドログリアにおいてもカルパイン活性が亢進している可能性を示す事実として重要である。今後、HAM、MS患者神経組織に関してカルパインの発現を *in situ hybridization* などで詳細に検討する必要があると思われる。

髄鞘構成蛋白の分解以外のメカニズムによる白質障害としては、髄鞘層構造の解離およびその結果としての髄鞘内浮腫がある。髄鞘内浮腫は障害の原因によらず、非特異的に、また可逆的に起こることが知られている。髄鞘内浮腫の可逆性の問題は、髄鞘蛋白の崩壊に至る以前の段階での機能修復を検討するうえで重要であり、また臨床的にも意味がある。

本研究により、中枢性髄鞘は髄鞘解離とそれに引き続く髄鞘内浮腫に対して旺盛な修復力を有することが確認された。さらに、貯溜した浮腫液の除去においては炭酸脱水酵素が深く関与していることが明かとなった。炭酸脱水酵素は発達期ラット脳において、髄鞘の成熟に平行して活性が上昇すること、およびTET中毒による白質障害の程度は部位別に観察して炭酸脱水酵素活性と逆比例することから、同酵素は生理的および病的状態において、髄鞘より自由水を除去 (dehydration) し、髄鞘の電気生理学的機能を維持しているものと想像される(22)。髄鞘関連の炭酸脱水酵素の調節の可能性は、白質障害治療の道を開くものとして臨床的に重要なテーマであると考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました恩師宮武正教授に感謝の意を表します。また、私を脳研究に導き、直接ご指導下さいました神経内科学教室講師佐藤修三先生に深謝いたします。

本研究は以下の方々の協力のもとに行われました。ここに感謝の意を表します。
神経内科学教室、 犬塚貴先生、 石黒英明先生、 金子清俊先生、 NIH、
Dr. R. H. Quarles.

参考文献

1. Dopouey, P., Jacque, C., Bourre, J.M., Cessinlin, F., Privat, H. and Braumann, N. Immunochemical studies of myelin basic protein in Shiverer mouse devoid of major dense line of myelin. *Neurosci. Lett.* 12:113-1979.
2. Koeppen, A.H., Ronca N.A., Greenfield, E.A. and Hans M.B. Defective biosynthesis of proteolipid in Pelizaeus-Merzbacher Disease. *Ann. Neurol.* 21:159-170, 1987.
3. Yanagisawa, K. and Quarles, R.H. Jimmy mice: Quantitation of myelin associated glycoproteins and other proteins. *J. Neurochem.* 47:322-325, 1986
4. Yanagisawa, K., Duncan, I.D., Hammang, J.P. and Quarles, R.H. Myelin-deficient rat: Analysis of myelin proteins. *J. Neurochem.* 47:1901-1907, 1986.
5. Yanagisawa, K., Moller, J.R., Duncan, I.D. and Quarles, R.H. Disproportional expression of proteolipid protein and DM-20 in the X-linked, dysmyelinating shaking pup mutant. *J. Neurochem.* 49:1912-1917, 1987.
6. Quarles, R.H. The biochemical and morphological heterogeneity of myelin and myelin-related membranes. in *Biochemistry of Brain* (Kumar S. ed) Pergamon Press, New York, 1980
7. Sato, S. and Miyatake, T. Degradation of myelin basic protein by calcium-activated neutral protease (CANP)-like enzyme in myelin and inhibition by E-64 analogue. *Biomed. Res.* 3:461-464, 1982

8. Yanagisawa, K., Sato, S., Amaya, N. and Miyatake, T. Degradation of myelin basic protein by calcium-activated neutral protease (CANP) in human brain and inhibition by E-64 analogue. *Neurochem. Res.* 8:1285-1293, 1983.
9. Norton W.T. and Poduslo S.E. Myelination of rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.* 21:749-757, 1973.
10. Guroff G. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* 239:149-155, 1964.
11. Quarles, R.H., Barbarash, G.R., Figlewicz, D.A. and McIntyre, L.J. Purification and partial characterization of the myelin-associated glycoprotein from adult rat brain. *Biochim. Biophys. Acta.* 757:140-143, 1983.
12. Laemmli, U.K. and Favre, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* 80:575-599, 1973.
13. Towbin, B.D. Staehelin, T. and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4350-4354, 1979.
14. Pettinelli, C.B. and McFarlin, D.E. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: Requirement for Lyt1+2- T lymphocytes. *J. Immunol.* 127:1420-1423, 1981.
15. Prohaska, J.R., Clark, D.A. and Wells, W.W. Improved rapidity and precision in the determination of brain 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Anal. Biochem.* 56:275-282, 1973.

16. Siman, R., Braudry, M. and Lucy, G. Purification from synaptosomal membranes of calpain I, a thiol protease activated by micromolar calcium concentrations. *J. neurochem.* 41:950-956, 1983.
17. Hatanaka, M., Yoshimura, N., Murakami, T., Kannagi, R. and Murachi, T. Evidence for membrane-associated calpain I in human erythrocytes. Detection by an immunoelectrophoretic blotting method using monospecific antibody. *Biochemistry* 23:3272-3276, 1984.
18. Yanagisawa, K., Quarles, R.H., Johnson, D., Brady, R.O. and Whitaker, J.N. A derivative of myelin-associated glycoprotein in cerebrospinal fluid of normal subjects and patients with neurological disease. *Ann. Neurol.* 18:464-469, 1985.
19. Sato, S., Quarles, R.H., Brady, R.O. and Trounstein, W.W. Elevated neutral protease activity in myelin from brains of patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 15:264-267, 1984.
20. Yanagisawa, K., Sato, S., Miyatake, T., Kominami, E. and Katsunuma N. Degradation of myelin proteins by cathepsin B and inhibition by E-64 analogue. *Neurochem. Res.* 9:691-694, 1984.
21. Ohama, E., Horikawa, Y., Shimizu, T., Morita, T., Nemoto, K., Tanaka, H. and Ikuta, F. Demyelination and remyelination in spinal cord lesions human lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Acta Neuropathol* (in press)
22. Sapirstein, V.S., Lees, M.B., and Trachtenberg, M.C. Soluble and membrane bound carbonic anhydrase from rat CNS: Regional development. *J. Neurochem.* 31:283-287, 1978.

図の説明

図1 : phenyl Sepharose CL 4B column クロマトグラフィー

髄鞘粗抽出液を、Bio-beads SM-2 column (Pharmacia) で Triton を除去した後、Buffer B にて平衡化した phenyl Sepharose CL 4B column に吸着させた。(1)において、column を Buffer B で洗滌し、(2)において、酵素活性分画を Buffer C にて溶出させ、3 ml毎分取した。各Bufferの組成は本文中に記載した。

図2 : カルシウムイオン活性化作用

酵素活性化に必要なカルシウムイオン濃度を、0.1 mM から 5 mM の範囲で検討した。

図3 : 抗カルパイン抗体・イムノプロット

酵素活性分画 (50 μ g) を抗鶏骨格筋カルパイン抗体 (lane a)、コントロール血清 (lane b) で免疫染色した。

図4 : 抗MAG抗体・イムノプロット

MAG と酵素活性分画との反応溶液を抗MAGモノクローナル抗体 (D7E10, Doberson, 1985)を用いて免疫染色した。 lane 1; 150 ng ヒト脳精製MAG, lane 2; 0.01 単位 酵素活性分画, lane 3-5; MAG および 酵素活性分画, さらに、lane 3; 1 mM EGTA, lane 4; 5 mM 塩化カルシウム, lane 5; 5 mM 塩化カルシウム および 100 μ M E-64 を加えた。反応は 37度Cで 18時間行った。

図5 : TET中毒ラットにおける運動障害の経過

TET中毒ラットにおける運動障害の程度を Pettinelliらの方法 (1981) に従ってスコアー化した。

図6：60日間TET投与実験

(A) 脳幹湿重量、(B) 髄鞘収量、(C) CNP活性、各 column は対照群平均値に対するパーセントとして表示した。

C; 対照ラット、T; 60日間TET投与ラット、R; TET投与中止10日後ラット
* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$

図7：TET投与ラット脳梁の電顕像 (x 12,000)

(A) 60日間TET投与ラット、髄鞘の解離と髄鞘内空胞(v)を認める。

(B) TET投与中止14日後ラット、髄鞘解離(矢印)は依然認められるが、髄鞘内貯留液の減少を認める。

図8：Acetazolamide回復抑制実験

30日間のTET投与後、3日間 acetazolamide を投与し、脳幹湿重量を測定した。各columnは、対照群の平均値に対するパーセントとして表示した。

C; 対照ラット、T; TET投与中止直後ラット、R; TET投与中止3日後、回復期ラット、A/T; TET投与中止後、3日間 acetazolamideを投与したラット、A; 3日間 acetazolamide のみを投与しラット

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

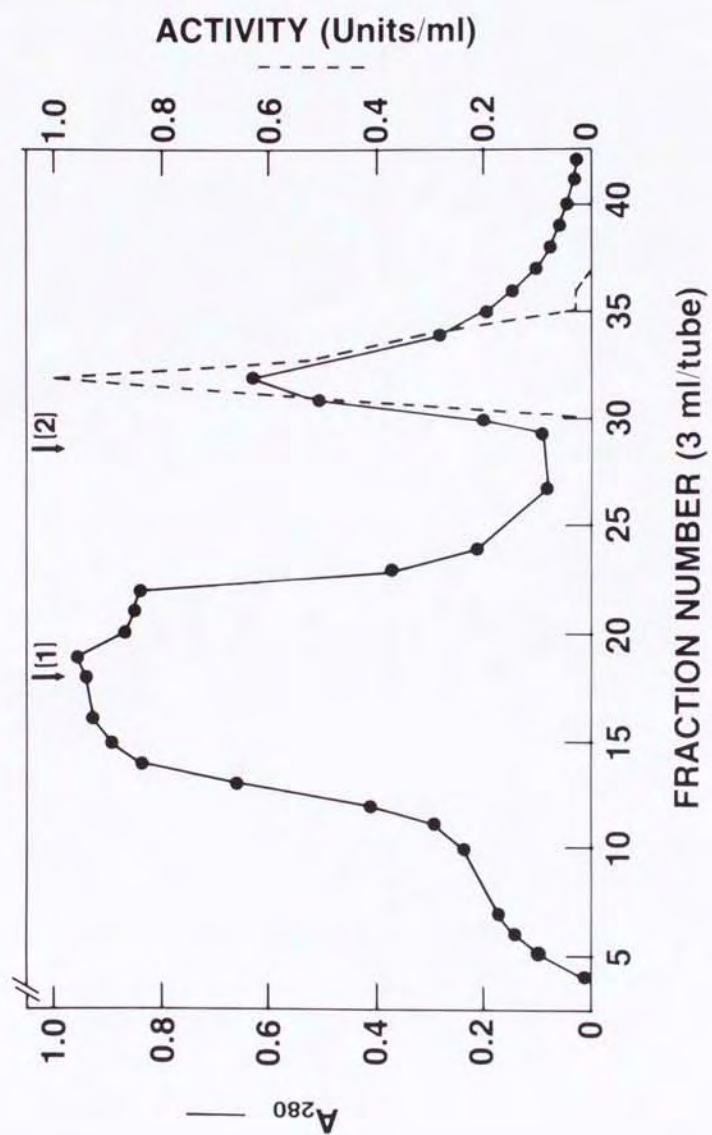


Fig 1.

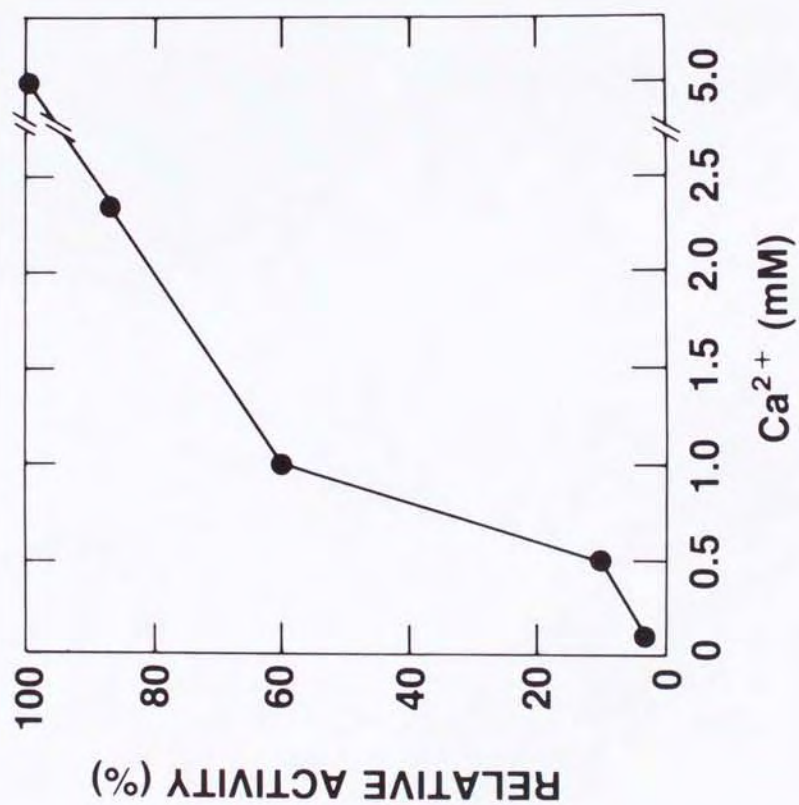


图 2

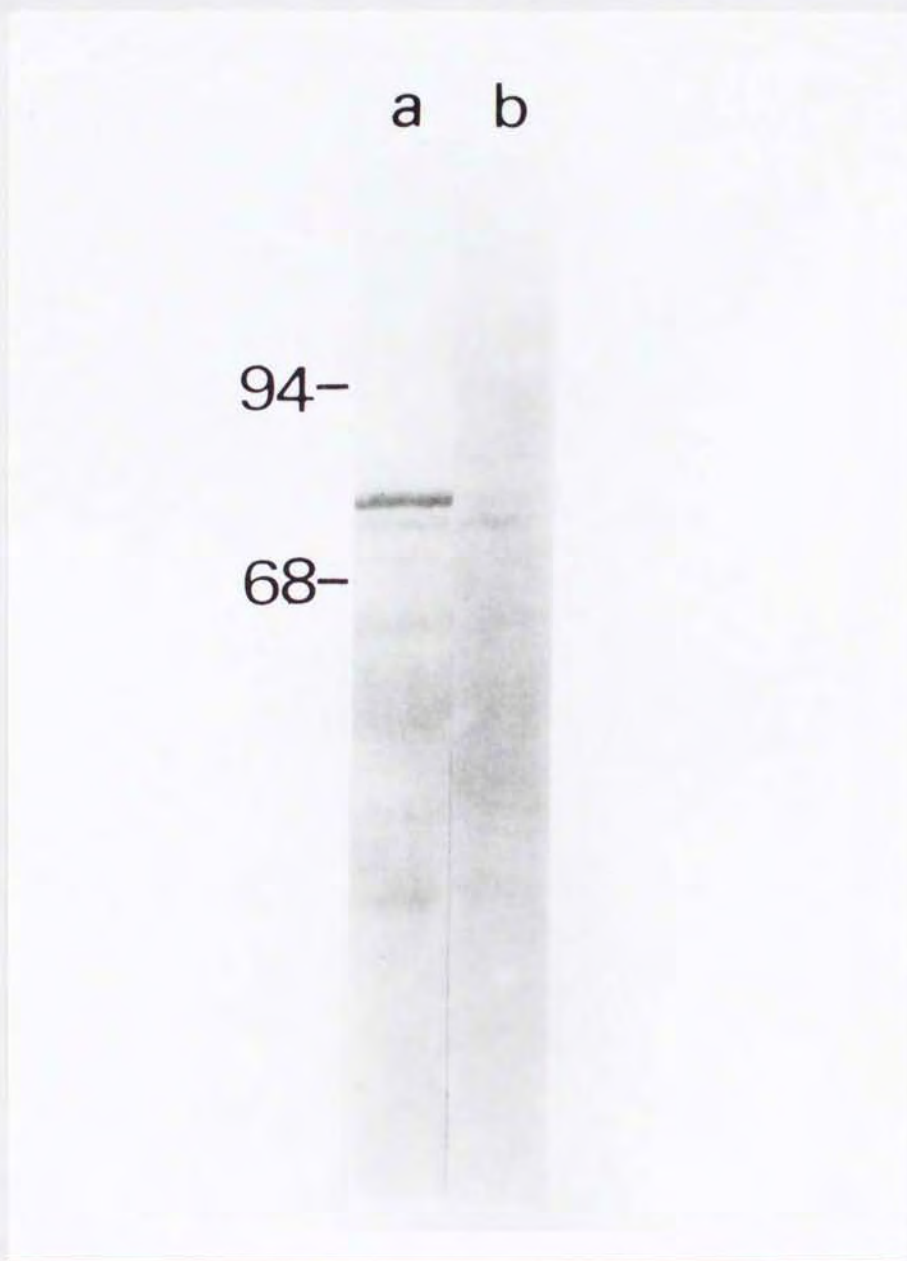


図 3

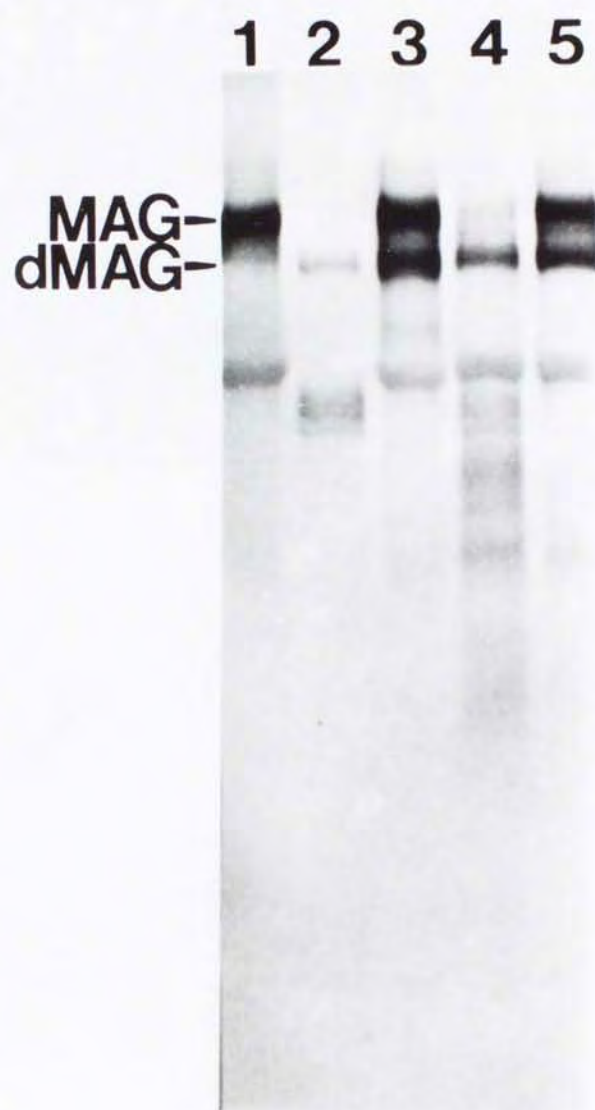


図 4

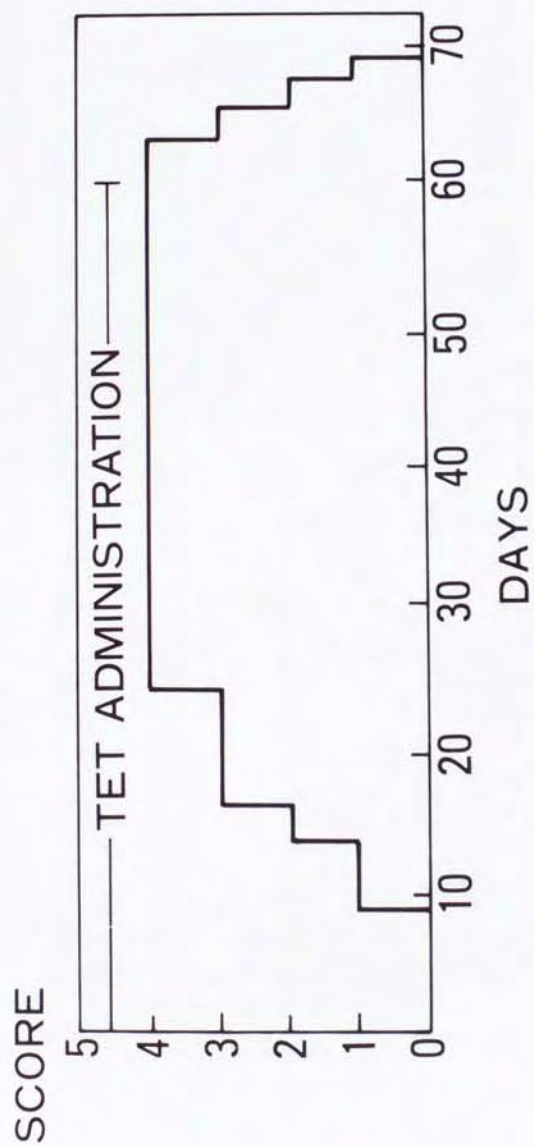
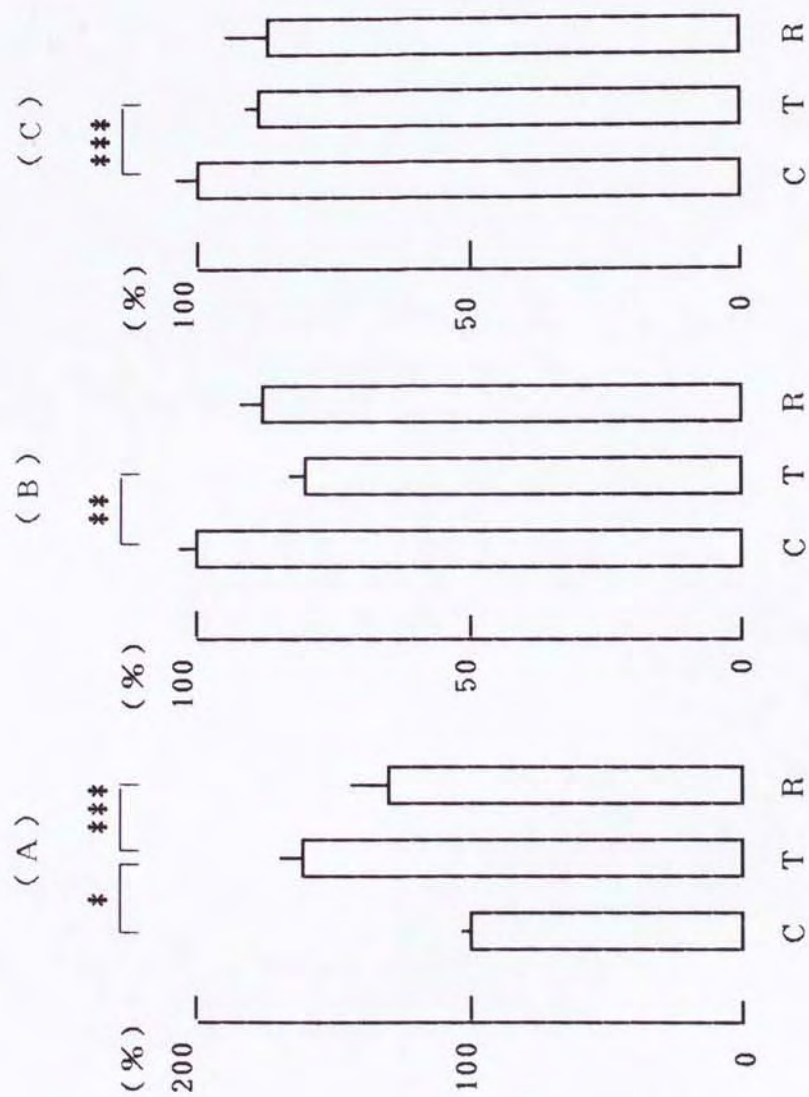


图 5



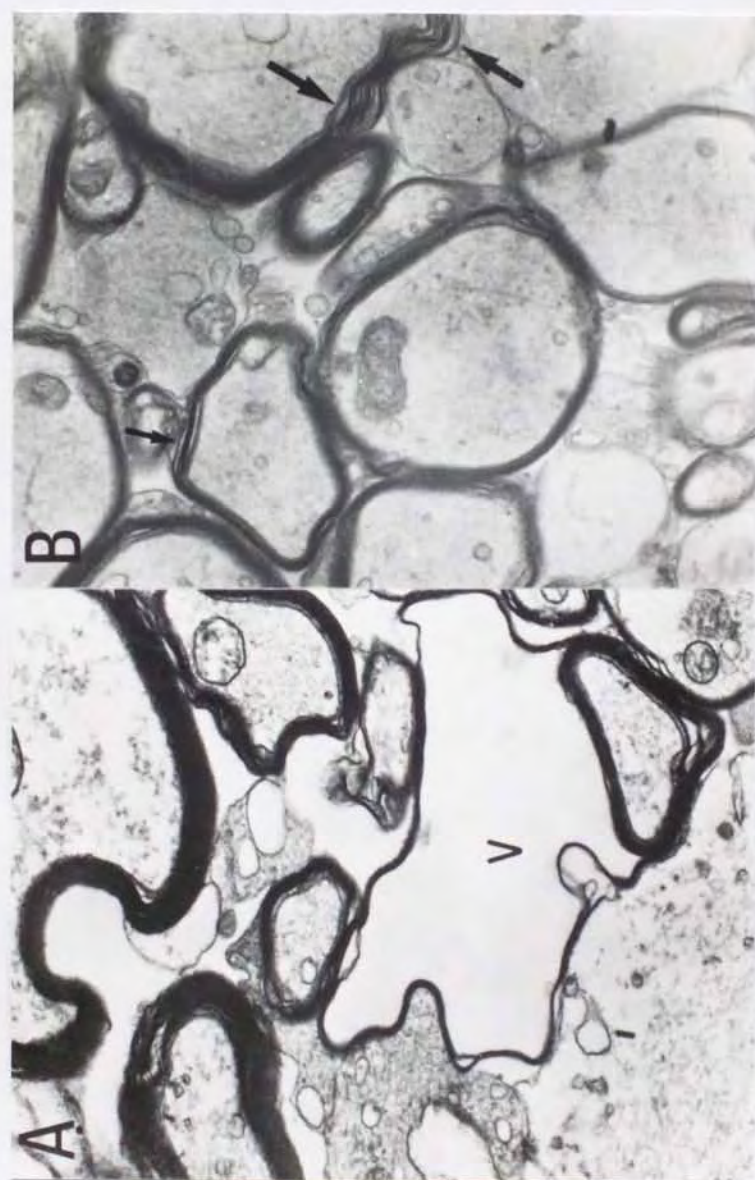


圖 7

