

神経成長抑制因子 (Growth Inhibitory Factor) の動態

— 正常発達過程脳及び神経疾患脳における  
免疫組織化学的検討から —

指導教官名 井原康夫 教授

平成元年 4 月  
東京大学大学院医学系研究科  
第3種博士課程 (医学)  
第三基礎医学専攻 入学

大塚 成人

①

論文題目 神経成長抑制因子 (Growth Inhibitory Factor) の動態

---正常発達過程脳及び神経疾患脳における免疫組織化学的検討から---

指導教官名 井原 康夫 教授

平成元年4月

東京大学大学院医学系研究科

第3種博士課程(医学)

第三基礎医学専攻 入学

大塚 成人

目次

|                               | 頁     |
|-------------------------------|-------|
| 1 緒言                          | 2~4   |
| 2 対象                          | 5     |
| 3 方法                          | 6~9   |
| 4 結果                          | 10~15 |
| 5 考察                          | 16~19 |
| 6 まとめ                         | 20    |
| 7 謝辞                          | 21    |
| 8 文献                          | 22~25 |
| 9 図                           | 26~29 |
| 10 表                          | 30~33 |
| 11 グラフ                        | 34~36 |
| 12 写真                         | 37~68 |
| 13 各種神経疾患脳の抗GIF抗体による免疫組織化学的所見 | 69~82 |
| 14 対象としたヒト脳の一覧                | 83~86 |

## 1 緒言

ヒトの大脳皮質は百数十億個の神経細胞から構成され、これらの神経細胞は20歳代以降1日に10万個ずつ減少してゆくと言われている<sup>1</sup>。このような生涯を通じてゆるやかに進行してゆく生理的な神経細胞の減少によって、重篤な脳機能障害を生じることは一般にないものと考えられるが、種々の神経疾患では、特定部位における進行性かつ急速な神経細胞の脱落が生じ、様々な神経症状が出現する。このため神経疾患における神経細胞死の防止は、現代医学の重要な研究課題の一つとなっている。このような神経難病の代表格と言えるのが、昨今の高齢化社会の中で年々増加傾向にあり、社会問題ともなっているアルツハイマー病<sup>2</sup>である。アルツハイマー病脳においては、神経細胞の消失のみならず、老人斑<sup>3,4</sup>、アルツハイマー神経原線維変化<sup>5</sup>、アミロイド・アンギオパチー、neuropil threads<sup>6,7,8</sup>などの異常構造物の出現が見られる。このため、アルツハイマー病研究においては、神経細胞死の直接の原因の探究と並行して、このような異常構造物の解析が重要なアプローチとなっている<sup>9,10,11,12</sup>。また、これとは別に脳内活性物質の解析からのアプローチもされている。最近、神経系の組織培養の研究によって、ニューロンの生存や再生は、それぞれのニューロン群に特有な神経栄養因子によって維持・促進されることが明らかになってきた<sup>13</sup>。これらの成果をふまえて、神経変性疾患における神経細胞死は、神経栄養因子作用の減少、欠乏に起因するものではないかとの推測もなされるようになった<sup>14</sup>。特に、アルツハイマー病においては、最も早くから研究がなされている神経栄養因子であるNGFの変化に関して、多くの検討が加えられてきた<sup>15,16,17</sup>。遺伝子発現のレベルに関しては、アルツハイマー病脳と正常人脳のNGF mRNAレベル<sup>18</sup>、NGFレセプター mRNAレベル<sup>19</sup>を比較した検討では、両者の間に有意な差は認められていない。しかし、NGFレセプターに対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学により、アルツハイマー病患者や高齢者では、正常胎児期に見られるのと同様に、NGFレセプターが側頭葉第II層から第VI層の神経細胞に再出現しているとの報告もある<sup>15</sup>。また臨床的にも、アルツハイマー病患者の脳室内にマウスNGFを連続投与することにより、脳血流増加や物質代謝の改善とともに痴呆症状に一部回復が見られたとする報告もある<sup>20</sup>。

このようなアルツハイマー病脳における神経栄養因子の動態の解析の中で、

内田、朝長らは、新生ラット大脳皮質ニューロンの初代培養系にアルツハイマー病脳抽出液または正常老人脳抽出液を加えた群で、ニューロンの生存や突起形成の状態を比較し、アルツハイマー病脳抽出液を加えた群でニューロンの生存率、突起伸展が亢進することを見出した(Fig. 1A)<sup>21</sup>。この結果は、アルツハイマー病脳で神経栄養因子作用が低下しているであろうとする当初の予想に相反するものであった。さらに、アルツハイマー病脳では、神経栄養因子そのものが增加しているのではなく、神経成長抑制作用を持つ物質が減少し、その結果、見掛け上の神経栄養因子活性が亢進していることが判明した<sup>22</sup>。この神経細胞生存・突起進展抑制作用を有する物質はイオン交換カラム、高速液体クロマトグラフィーなどによる分離法を用いて正常老人脳より単離され、内田はこれを神経成長抑制因子(Growth Inhibitory Factor; GIF)と名付けた<sup>23</sup>。GIFは68個のアミノ酸からなる分子量約6kDの熱に安定な酸性蛋白であり、アミノ酸配列はメタロチオネイン(MTI, MTII)<sup>24, 25, 26, 27</sup>に酷似しているが、GIFにはN末端、C末端にそれぞれ1及び6アミノ酸残基の挿入のある点が異なっている(図1)。またGIFはヒト脳のみならずラット脳でもその存在が示され、cDNAクローニングの結果、ラットGIFはヒトGIFと高いホモロジーを示す分子であることが確認された<sup>28</sup>。さらに、極最近、ヒトGIFのgenomic DNAクローニングも行われた<sup>29</sup>。GIFはそのアミノ酸配列の類似性に加えて、既知のMTI, MTIIと共通する特徴を多く備えていることから、GIFをMTの一種(MTIII)であるとする考え方も提唱された<sup>29</sup>。内田らによる臓器ホモジェネートのイムノプロットを用いた初期の検討では、GIFは、正常脳において特別な局在部位を示すことなく脳全域から検出されたが、中枢神経系以外の臓器からは検出されなかった<sup>23</sup>。この点は、肝、腎に多いとされるMT<sup>24</sup>と対照的であった。また、脳内で、GIF免疫反応性(GIF immunoreactivity; 以下GIF-IRと略)を示す細胞はアストロサイトと考えられること、大脳では髄質より皮質に多く陽性細胞が見られることが示された<sup>23</sup>。そして、免疫組織化学により、アルツハイマー病脳では正常脳に比して大脳皮質内アストロサイトのGIF-IRが減弱していることが見出され、これが、アルツハイマー病脳抽出液のGIF生理活性の低下に対応する形態学的所見と考えられるに至った<sup>23</sup>。しかしながら、アルツハイマー病以外の神経疾患脳におけるGIFの变化はまだ全く検討されていない。またアルツハイマー病においても、従来の検

討は少数例についての大脳皮質の観察に限られており、GIFの低下がいかなる病理学的変化と関連して進行するのかについても詳細な検討はなされていない。

本研究ではGIFの存在が最初に示されたヒト脳を対象とし、抗GIF抗体を用いた免疫組織化学により、次の3点を中心に検討を行った。

- (1) 正常成人中枢神経系におけるGIFの局在と分布。
- (2) 正常発達過程脳におけるGIF-IRの出現パターン及びニューロン・グリア発生との関連。
- (3) アストロサイトの反応性変化を伴う各種神経疾患脳におけるGIF-IRの変化。

これらの検討結果に基づき、ニューロン・グリア関連に立脚したGIFの動態を推測した。

## 2 対象

検討の対象としたヒト脳は斯くの如くである。非神経疾患で死亡した正常成人脳30例、発達過程にあるヒト脳としては胎齡13週から生後15歳までの大脳（海馬を含む）65例、各種神経疾患脳92例（ヘルペス脳炎1例、亜急性硬化性汎脳炎1例、髄膜炎2例、クロイツフェルト-ヤコブ病10例、アルツハイマー型老年痴呆15例、筋萎縮性側索硬化症20例、汎発性Lewy小体病5例、ピック病5例、パーキンソン病3例、進行性核上性麻痺3例、多系統萎縮症（線条体黒質変性症）3例、ハンチントン舞蹈病1例、低酸素脳症1例、脳梗塞5例、原発性脳腫瘍15例、転移性脳腫瘍2例）。

なお、これらのヒト脳は、東大脳研病理所蔵のもの他に、以下の施設より提供していただいたものである。

東大病理： 正常成人脳、発達過程脳、脳梗塞、原発性及び転移性脳腫瘍

東京医大病理： 正常成人脳

九大脳研病理： クロイツフェルト-ヤコブ病

日赤医療センター中央検査部： 発達過程脳

ハーバード大神経疾患センター： 発達過程脳

横浜労災病院病理： 原発性脳腫瘍

### 3 方法

正常脳においては、前頭葉、後頭葉、頭頂葉、側頭葉、海馬、海馬傍回、尾状核、被殻、淡蒼球、視床、小脳、中脳、橋、延髄、脊髓を、また、神経疾患脳では、それぞれの疾患で特徴ある神経病理学的所見を呈している部位を観察の対象とした。脳は、10%緩衝ホルマリンにて1~3週間固定し(一部の材料は剖検時に厚さ5mm前後に切り出し、4°Cで48時間、periodate-lysine-paraformaldehyde(PLP)固定液<sup>3)</sup>で固定した)、その後脱水、パラフィン包埋を行い、厚さ6 $\mu$ mの切片を作製した。切片は、脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活性阻害のために0.3%過酸化水素含有メタノール中で20分間浸した。磷酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline;PBS)で10分3回洗浄後、10% calf serum (CS)で30分間標本中の非特異的抗体結合部分をブロックし、10%CSで至適濃度に希釈した各一次抗体と室温で12時間反応させた。PBSで10分3回洗浄後、ビオチン化二次抗体(Vector)を10%CSで400倍に希釈し室温で1時間反応させ、再度、PBSで10分3回洗浄後、avidin-biotin peroxidase complex(ABC;Vector Elite kit)を溶解したPBSと室温で30分反応させた。最終的にPBSで10分3回洗浄後、0.05%3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)-0.01%過酸化水素含有PBS中で3~5分間発色させ、反応停止後ヘマトキシリンで薄く対比染色を行い封入、検鏡した。またこれらの症例中の一部では、Zamboni変法(0.05%glutaraldehyde, 4%paraformaldehyde, 0.2%picric acid含有0.1M PB, pH7.4)で48時間固定後、厚さ50 $\mu$ mのピプラトーム切片を作製し、浮遊切片のまま上記と同様に免疫染色を行い、免疫電顕的検討に供した。これらの切片は免疫染色後、1.5%オスミウム酸で30分間、後固定し、脱水、置換後エボン包埋して超薄切片を作製し、電子顕微鏡(日本電子1200-EX II)にて観察した。

さらに、共焦点レーザー走査顕微鏡(confocal laser scanning fluorescence microscope;CLSM)を用い、二重免疫蛍光染色による観察を行った。切片を脱パラフィン後、10%CSで30分間標本中の非特異的抗体結合部分をブロックし、抗GIFウサギポリクローナル抗体と抗GFAPマウスモノクローナル抗体(DAKO)を10%CSに混和して至適濃度に希釈し、室温で12時間反応させた。PBSで10分3回洗浄後、ビオチン化抗ウサギIgG抗体(Vector)を10%CSで400倍に希釈し1時間反応させ、さらにPBSで10分間3回洗浄後、Texas Red結合抗マウスIgG抗体(Jackson)と

アビジン化 fluorescein isothiocyanate (FITC:Amersham) を 10%CS 中に各 50 倍に希釈して 1 時間反応させた。蛍光染色終了後、切片を PBS でよく洗浄し、抗退色剤として 0.1% p-phenylene-diamine を加えた 90% グリセリン含有 PBS で封入し、CLSM で観察を行った。CLSM としては、BIO-RAD 社製の MRC-600 システムをオリンパス 蛍光顕微鏡に接続して使用し、FITC, Texas Red 両者の励起光を、同時に二チャンネルに撮像後、両チャンネルの画像を疑似カラー表示を用いて融合し二重染色像を再構成した<sup>31, 32</sup>。対物レンズには 40x 油浸レンズを使用した。

使用した一次抗体は以下の三種類である。

(1) 抗 GIF N 末端ポリクローナル抗体 (図 1)

ラット GIF のアミノ酸配列<sup>28</sup>をもとに N 末端部分 (3-13, PETPCPTGGS; この部分は、MT との相違点である N 末端側の 1 残基の挿入 Thr-5 を含む。また、同部分のヒト GIF のアミノ酸配列は、PETPCPSGGGS である<sup>23</sup>。) のペプチドを固相法により合成、ペプチドの C 末端を keyhole limpet hemocyanin (KLH) に結合したものを抗原として用いた (不二家より KLH-conjugate として購入した)。この抗体は本研究の過程で著者が作製したものであり、その詳細については未発表であるので、characterization の結果を含めてこの項で記載する。

上記のペプチドを蒸留水で溶解し、ペプチド量として 0.5 mg/ml を等容量 (1 ml) の Freund's complete adjuvant (和光純薬工業) と混和後、ウサギの背部皮下に免疫した。一カ月後から二週間毎に、蒸留水で溶解した抗原 (ペプチド量として 0.25 mg/ml) と等容量 (1 ml) の Freund's incomplete adjuvant (和光純薬工業) と混和したものを追加免疫した。初回免疫から 5 カ月追加免疫を繰り返した時点で、抗 GIF N 末端ポリクローナル抗体が産生された。抗体産生の確認として、96 穴培養用プラスチック容器に各々 0.5  $\mu$ g の合成ペプチドを吸着させ ELISA 法で反応させたところ、この時点で 128000 倍希釈まで陽性反応が見られた。またウマ腎臓の MT (I, II) 及びウサギ肝臓の MT (I, II) を抗原として同様の方法で抗体を反応させたが、陰性であった。

この抗体をアフィニティーカラムを用いて精製した。アフィニティー支持体の作製は、アフィゲル 10 とアフィゲル 15 (BIO-RAD) とを各 0.5 ml ずつ等量に混ぜ合わせ、そこに、リガンドとして合成ペプチド 2 mg (ラット GIF のアミノ酸配列 2-13, DPETPCPTGGS) を 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 含有 0.2 M 3-[N-

Morpholino]propane-sulfonic acid(MOPS), pH7.0溶液1mlに溶かしたものを加えた。反応は、振盪機にてゆっくり攪拌しながら、4℃、12時間行った。その後、1M ethanolamine-HCl, pH8溶液0.1mlを加えて1時間反応させ、未反応活性基のブロッキングを行った。反応後、ゲルをカラムに摘めて、蒸留水、さらに、PBSで洗浄した。ウサギ抗血清を0.1%azide含有10%CSで5倍に希釈して、アフィニティーカラムに4℃、12時間で循環させ、吸着させた。吸着後、PBSでOD<sub>280</sub>が0.05以下になるまで洗浄した。カラムに吸着した抗体は、0.1M glycine-HCl, pH2.5溶液で溶出させた。その溶出液に、素早く2M Trizma溶液を加え中和した。

次に、これら各々の溶出液中の抗体の力価と純度を20%ヒト脳ホモジェネートのイムノプロットで調べた。SDS電気泳動<sup>33</sup>後、5%2-mercaptoethanol含有48mM Tris, 39mM glycine溶液中で150mA, 30分、イモビロン膜(0.22μm, Millipore, U.S.A)に転写した。転写後、イモビロン膜を3%gelatin (50mM Tris-HCl pH7.6, 0.15M NaCl溶液)で30分間ブロッキングし、一次抗体となる溶出液をそれぞれ10%CSで200倍に希釈して組織切片と同様にABC法で免疫染色した。その結果、2カラム溶出液が一番強く分子量約6kD付近の単一のバンドを染色した。この反応は、既にヒト脳においてGIF蛋白と特異的に反応することが明らかとなっている抗GIF C末端ポリクローナル抗体(次出)を用いたイムノプロットの反応パターンと全く同一のものであった。また、ヒト脳より精製したGIF、20%ラット脳ホモジェネート、20%マウス脳ホモジェネート、20%ヒト腎ホモジェネート、ウサギ肝より精製したMT、のイムノプロットも行い、抗GIF N末端ポリクローナル抗体で反応させた。その結果、この抗体は、ヒト脳より精製したGIFと反応し、20%ラット及びマウス脳ホモジェネートにも、ややヒトGIFに比して分子量は大きいと同様に単一のバンドが認められた。しかし、この抗体は、MTを多量に含有する20%ヒト腎ホモジェネートとウサギ肝より精製したMTとは、反応しなかった(Fig. 1B)。

吸収試験は、抗GIF N末端ポリクローナル抗体と抗原(抗体作製時に用いた合成ペプチド、PETCPCPTGGS)とをモル比1:100で混和し、4℃、12時間反応させ、12000rpmで15分遠心した上清を200倍に10%CSで希釈したものを一次抗体として用いた。その結果、上記のイムノプロットで見られたそれぞれの単一のバンドは消失した(Fig. 1C)。したがって、本抗体は、ヒト脳においてGIF蛋白と特異的

に反応し、MTとは交差しないことが解った。

(2) 抗 GIF C末端ポリクローナル抗体 (1991, 内田<sup>23</sup>) (図1)

ヒト脳GIFのアミノ酸配列を基にC末端部分(53-64, GGEEAAEEAEK;この部分はMTとの相違点であるC末端側の6残基の挿入EAAEEAEを含む。)のペプチドを固相法により合成、ペプチドのC末端をKLHに結合したものを抗原とし(不二家よりKLH-conjugateとして購入した)、作製されたウサギポリクローナル抗体。この抗体は、ヒトGIF蛋白と特異的に反応し、MTとは交差しないことが既に示されている(Fig.1D)<sup>23</sup>。

(3) 抗 GFAP モノクローナル抗体(DAKO)

ヒト脳由来のGFAPをマウスに免疫して作製されたモノクローナル抗体。ヒト、ウサギ、マウスのGFAPと反応するが、他の中間径フィラメントと反応せず、脳ホモジェネートのイムノプロットでGFAPに対応する50kDの単一のバンドを染色することが示されている。

#### 4 結果

正常成人脳、発達過程脳、神経疾患脳を通じ、抗GIF N末端ポリクローナル抗体と抗GIF C末端ポリクローナル抗体による免疫染色では、ほぼ同様の染色像が観察された (Fig. 2A, 2B)。この結果、GIF蛋白は全長の形で脳内に存在していることが示唆された。このため、抗GIF N末端及びC末端ポリクローナル抗体によるそれぞれの免疫染色を分けずに記載する。(以下に述べる免疫組織化学の結果は主として抗GIF C末端ポリクローナル抗体によるものである。) なお、GIF免疫反応性及びGFAP免疫反応性は、それぞれGIF-IR, GFAP-IRと略して記載する。また、ホルマリン固定材料に比しPLP固定材料ではGIF-IRが若干強い傾向が見られたが、その反応様式は基本的に同一と考えられたので、両者を分けて記載することは行わなかった。

正常成人脳において、GIF-IRは、脳全体にわたって、グリア細胞で比較的大きな円形の核を持ち、多数の放射状の突起を有する細胞、すなわちアストロサイトに局在して観察された。部位別に見ると海馬 (Fig. 2C) 及び線条体で他の部位より若干強い反応が見られた。大脳新皮質では、前頭葉 (Fig. 2D)、頭頂葉、側頭葉、後頭葉を通じて、GIF-IRの強度に差はなく、どの領域でも皮質の第II層から第VI層に多くのGIF陽性アストロサイトが観察された (Fig. 2E)。小脳では、分子層のベルグマングリア及び小脳系球 (glomerulus) にGIF-IRが見られた (Fig. 2F)。脳幹、脊髄では、特に灰白質のアストロサイトにGIF-IRが見られた (Fig. 2G)。中枢神経系内のいずれの部位においてもGIF-IRは灰白質が白質に比して強かったが、双方とも免疫反応性があり、この結果は、灰白質に多く存在している原形質性アストロサイト及び白質に多く存在している線維性アストロサイトの両方でGIFを有していることを示唆した。正常の原形質性アストロサイトにおいては、細胞体、突起の近位部のみならず、細い突起の隅々までGIFが見られ、灰白質のニューロビルに網目状の分布を示すのが観察された (Fig. 2H)。また一部のアストロサイトについては、その突起が、神経細胞、樹状突起、軸索あるいは脳実質内血管周囲 (血管足) に到達し、接している像が光顕的にも確認され、その接点に至るまでGIF-IRは同程度の強度を保ちつつ連続していた。免疫電顕による観察でも、神経突起と接しているアストロサイトの細い突起 (Fig. 2I)、血管外膜と接する血管足 (Fig. 2J) にGIF-IRが認められた。また対比染色

されたGIF-IR陰性構造物を注意深く検討したが、GIF-IR陰性のアストロサイトの存在は明らかでなく、ほぼすべてのアストロサイトがGIF-IRを示しているものと考えられた。また神経細胞を含めアストロサイト以外の中枢神経構成細胞にGIF-IRを示すものは見られなかった。脊髄と同時に観察された末梢神経根の部分では、シュワン細胞は、GIF陰性であった。今回正常成人脳として20歳から90歳までの症例を用いたが、GIF-IRには年齢による一定の変化は認められなかった。

一方正常成人脳で一定してGFAP陽性を示すのは、大脳髄質の線維性アストロサイトと大脳皮質第I層から軟膜に至る部分のアストロサイトであり、老年者ではこれらに加えて時に皮質内血管周囲の突起が陽性を示した。この分布は、GIFのそれとおおよそ相補的なパターンを示すものであった(Fig. 2E)。

発達過程脳では、胎齢13週の大脳において、既に海馬にGIF-IR陽性のアストロサイト(幼若アストロサイト、アストロblastなどの呼称もあるが、本論文では、アストロサイトと統一して記載する)が見られた(Fig. 3A)。胎齢20週を過ぎると、特に、海馬及び基底核に出現し始めたアストロサイトに、明らかなGIF-IRが見られるようになった(Fig. 3B, 3C)。またこの時期には、ependymal layer、intermediate layer及びprimordial cortical grayにも少数ながらGIF陽性アストロサイトが見られた(Fig. 3D)。さらに胎齢が増すごとにGIF陽性アストロサイト数はどの領域においても徐々に増加したが、妊娠後期に至るまでは、アストロサイトに見られるGIF-IRは細胞体と突起近位部に限られ、細い突起での反応は明らかでなかった。胎齢35週を過ぎる頃から、海馬、特にCAII、CAIIIの領域では、アストロサイトの細胞体と太い突起のみならず、ニューロビルに分布する細い突起まで網目状にGIF-IRが見られるようになった(Fig. 3E, 3F)。しかしながら、胎齢35週では、海馬のアストロサイトのGIF-IRは正常成人脳のそれと同等のパターンを示すものの、海馬傍回、外側後頭側頭回にかけてGIF-IRは、まだ、アストロサイトの細胞体と突起近位部に弱く観察されるに留まっていた(Fig. 3G)。出生時から生後2年前後にかけて、大脳新皮質のアストロサイトにも、細胞体及び突起近位部のみならず、ニューロビルに分布する細い突起に至るまで、正常成人脳に見られるのと同様の網目状にGIF-IRが完成された(Fig. 3H)。以後、大脳におけるGIF-IRは、正常成人脳のGIF-IRパターンを

呈した。

次に、神経疾患脳におけるGIF-IRを正常成人脳と対比しつつ記載する。正常成人脳に比して明らかなGIF-IRの増強の観察された疾患としては、クロイツフェルト-ヤコブ病(Fig. 4A)、ヘルペス脳炎、亜急性硬化性汎脳炎(Fig. 4B)、髄膜炎、低酸素脳症、陳旧性脳梗塞、転移性脳腫瘍(Fig. 4C, 4D)の周囲、などが挙げられる。これらの神経疾患脳では、病変部位の大脳皮質の肥胖細胞性アストロサイトの細胞体及び近位部の太い突起に、正常成人脳のGIF-IRに比してかなり強いGIF-IRが見られた。特にこの傾向は、クロイツフェルト-ヤコブ病、ヘルペス脳炎、亜急性硬化性汎脳炎、髄膜炎の大脳皮質に出現した肥胖細胞性アストロサイトにおいて顕著であった。さらに、ヘルペス脳炎の前頭葉皮質の免疫電顕では、膨化した細胞体中の細胞内小器官(ミトコンドリア等)やグリア細線維束にGIF-IRが観察された(Fig. 4E, 4F)。このような肥胖細胞性アストロサイトは、強いGFAP-IRを示した(Fig. 4C)。一方病変部位付近の髄質に出現している肥胖細胞性アストロサイトのGIF-IRは、検索した中の半数以上の症例で、皮質の肥胖細胞性アストロサイトのGIF-IRに比して明らかに弱かった(Fig. 4G)。髄質のGIF-IRが増強した症例としてはヘルペス脳炎(1例)が挙げられるが、この症例では、髄質に出現しているほとんどの肥胖細胞性アストロサイトにGIF-IRの増強が見られた。また、クロイツフェルト-ヤコブ病(5例)では、髄質の肥胖細胞性アストロサイトの約半数において、GIF-IRは皮質のものと同等に増強していた。

次に、変性疾患例について記載する。アルツハイマー型老年痴呆、ピック病では、神経細胞脱落の程度に応じて大脳皮質内反応性アストロサイトの増加が観察されたが、GFAP-IRは、前記の感染性疾患に比べて概して弱かった。GIF-IRに関しては症例毎にかなりの差異が見られた。すなわち、明らかにGIF-IRの全般的な低下の見られる症例(アルツハイマー型老年痴呆1例、ピック病1例)、アストロサイトの細胞体にはGIF-IRは見られるが、正常成人脳と同様の網目状の突起の染色性が見られない症例(アルツハイマー型老年痴呆5例、ピック病1例)、皮質全域に島状にGIF-IRの低下した領域が散在している症例(アルツハイマー型老年痴呆6例、ピック病1例)、正常成人脳と大きな差の認められない症例(アルツハイマー型老年痴呆3例、ピック病2例)など様々であった(Fig.

5A, 5B, 5C, 5D)。これらの症例で、GIF-IRの強弱、分布と脳内に出現する異常構造物（アルツハイマー型老年痴呆におけるアルツハイマー神経原線維変化、老人斑、neuropil threads、ピック病におけるピック球）の出現状況との間には、一定の関係は認められなかった（表1）。汎発性Lewy小体病5例では、皮質型Lewy小体出現の有無にかかわらず、GIF-IRに大きな差は見られなかった。5例中3例に海馬及び側頭葉皮質で、島状にGIF-IRの減弱した部分が散在していたが、大脳新皮質の他の部分および線条体のアストロサイトのGIF-IRは正常成人脳とほとんど変わらなかった。

次に、大脳基底核に病変の主座を置く疾患での所見を記載する。正常成人脳の線条体においては、GFAP陽性反応は、線条体を貫通する有髄線維束の線維性アストロサイトと血管周囲の突起のみに限局していたが、多系統萎縮症（線条体黒質変性症）、ハンチントン舞踏病の被殻においては、前記の部位以外にも線条体のニューロビルにGFAP陽性アストロサイトが多数出現していた。今回用いた多系統萎縮症（線条体黒質変性症）3例の被殻では、とくに外側部優位に高度の神経細胞脱落が見られ、病変の激しい部分の組織は高度に粗鬆化し、ほとんど反応性アストロサイトに置き変わっていた。これらの部位のアストロサイトの細胞体とその突起にGFAP-IRは強く見られたが（Fig. 5E）、GIF-IRはほとんど陰性であった（Fig. 5F）。一方、今回用いた一例のハンチントン舞踏病の線条体は、明らかな萎縮を示しているにもかかわらず、神経細胞はある程度残存していた。一般にハンチントン舞踏病では、アストロサイトの反応は他の疾患に比して弱いとされている<sup>34, 35, 36</sup>が、この症例では線条体ニューロビルのアストロサイトは、細胞体と突起近位部がやや腫大したGFAP陽性の反応性アストロサイトが大部分であった（Fig. 5G）。これらの反応性アストロサイトの細胞体と突起近位部にはGIF-IRがある程度保たれていたが、ニューロビルの網目状の染色性は消失していた（Fig. 5H）。なお、大脳基底核以外の部位として、ブルキンエ細胞の消失と顆粒細胞の減少が明らかな多系統萎縮症の小脳では、分子層のベルグマンガリアと小脳糸球の両者ともにGIF-IRは低下していた。

次に、パーキンソン病、進行性核上性麻痺の中脳黒質での所見について記載する。黒質緻密層メラニン含有神経細胞の軽度から中等度の脱落を認めた症例では、アストロサイトにGIF-IRは見られたが、神経細胞の高度脱落を認めた症

例では、ニューロヒルを埋める反応性アストロサイトのGIF-IRは明らかに減弱していた。また、同一症例内でも、黒質内側部の神経細胞が保たれ、中央部から外側部にかけて高度の神経細胞脱落が見られたパーキンソン病（症例1）では、黒質内側部のアストロサイトにはGIF-IRが保たれていたのに対し（Fig. 6A）、神経細胞脱落の強い中央部から外側部領域のアストロサイトにはGIF-IRの顕著な低下が見られた（Fig. 6B）。この症例に関しては、中脳右半側の黒質領域の残存神経細胞とGIF陽性アストロサイトをプロットで示した（図2）。その結果、神経細胞が存在している部位のアストロサイトのみGIF-IRが見られることが、一層明らかとなった。

さらに、筋萎縮性側索硬化症（ALS; 20症例）では、脊髄のGIF-IRを正常例と比較しつつ検討した。ALSでは、脊髄前角に様々な程度の神経細胞脱落とアストロサイトの増生が見られた。すべての症例で、前角の反応性アストロサイトのGFAP-IRの増強が見られたが（正常脊髄では、灰白質でGFAP-IRは陰性であった（Fig. 6C））、GIF-IRは、正常脊髄の前角と比較して若干強い症例からほとんど消失している症例まで様々であった。GIF-IRの保たれている症例では、前角細胞の脱落は軽度ないし中等度であり、ことに残存している前角細胞の周囲にGIF-IRを保ったアストロサイトが観察された（Fig. 6D, 6E）。また、GIF-IRの高度の低下を示す症例では、前角細胞のほとんどが消失していた（Fig. 6F, 6G）。図3、図4に示したように、前角細胞の脱落が軽度な症例（図3）と高度な症例（図4）の残存前角細胞とGIF陽性アストロサイトをプロットした結果も、前角細胞の残存している周囲の反応性アストロサイトに、GIF-IRが見られた。さらに、残存前角細胞数とGIF-IR強度の関係を各症例毎に詳細に検討し表2にまとめた。また、この表2を基に各症例を頸髄、胸髄、腰髄、に分けて残存前角細胞数とGIF-IR強度の関係をグラフ（1, 2, 3）に示した。その結果、前角細胞数の減少とともに、GIF-IRも減弱する傾向が明らかとなった。なお、神経細胞脱落のほとんど起こらない後角では、症例によらず正常脊髄と同等のGIF-IRが観察された。

最後に、神経上皮由来の原発性脳腫瘍である神経膠細胞腫のGIF-IRを検討した。様々な悪性度を示す15症例を検討したところ、腫瘍細胞そのもののGIF-IRは弱かった（Fig. 7A）。腫瘍塊中にGIF-IRが強い細胞の混在する症例も見られた

が、これらの細胞は腫瘍塊中に混在している非腫瘍性反応性アストロサイトと判定された (Fig. 7B)。なお腫瘍の悪性度と腫瘍細胞のGIFレベルとの間には一定の関係は見られなかった。

さらに転移性脳腫瘍とアルツハイマー型老年痴呆において、抗GIF抗体と抗GFAP抗体による二重免疫蛍光染色を行い、CLSMで観察した。転移性脳腫瘍では、腫瘍内の反応性アストロサイトは強いGFAP-IRを示したにもかかわらず、GIF-IRは微弱であった (Fig. 8A)。一方、腫瘍周囲の反応性アストロサイトは、前者と同等のGFAP-IRを示したにもかかわらず、GIF-IRは増強していた (Fig. 8B)。アルツハイマー型老年痴呆の大脳皮質でも、同等のGFAP-IRを示す反応性アストロサイトの中に、正常アストロサイトよりGIF-IRが弱いもの (Fig. 8C)と強いもの (Fig. 8D)とが混在していた。

すべての症例において、組織切片上で免疫プロットによる吸収試験と同様の方法により一次抗体の吸収試験を行った場合、また、一次抗体を非免疫血清に置換した場合、アストロサイトの細胞体及び突起に見られる染色性は完全に消失した。

なお個々の症例の所見の詳細については、巻末に一括して記載した。

## 5 考察

まず正常成人脳の検討から、GIFは主として灰白質の原形質性アストロサイトの細胞体と突起に広く分布する分子であることが再確認された。従来GIFの組織内局在は大脳において観察されてきたのみであったが、今回の検討でGIFは大脳皮質のみならず大脳基底核、脳幹、小脳、脊髄に至るまで、中枢神経系全域のアストロサイトに分布することが免疫組織化学的に確認された。灰白質、白質のアストロサイトはともにGIF陽性であったが、どの部位においても灰白質にGIF-IRが強く、密なアストロサイトの突起からなる網目状構造が観察された。この分布は、GFAP-IRが髄質および大脳皮質でも第I層（軟膜下）に、より強く分布する所見と相補的であり、GIF陽性アストロサイトと神経細胞体および樹状突起との密接な関連を想起させるものであった。今回の免疫電顕的検討でも、アストロサイトの突起内の細胞質には、神経突起に接する部分に至るまでGIF-IRが認められた。この所見は、GIFが実際に脳内で、アストロサイトの突起を介して神経突起（樹状突起および軸索）に伸展抑制作用あるいは安定化作用を及ぼしているという推測に矛盾しない。また、グリア細線維に付随してGIFが見られることより、神経突起だけでなくアストロサイトの突起にも何らかの作用を及ぼしている可能性もある。したがって、今後さらに、これらの作用の存在を *in vivo* で明らかにする必要がある。そのためには、アストロサイト内でのGIFの細胞内局在の検討は極めて重要である。今回用いた抗GIF抗体はともにヒト脳アストロサイトを組織切片上で染色するが、動物脳を染色しなかった（抗GIF N末端ポリクローナル抗体はラットGIFに見られる1アミノ酸残基の挿入を含む抗原を用いているが、ラット脳ホモジェネートのイムノプロットではラットGIFを認識したものの、ラット脳組織切片上では染色性が不安定であった）ため、免疫電顕にも死後変化の極めて著しいヒト脳剖検材料を用いざるを得なかった。またアストロサイトの突起は死後に空胞性変化が強く生じる部位であるため、今回ヒトGIFの細胞内局在の正確な同定には至らなかった。今後動物のGIFを組織切片上で免疫染色する抗体を作製して免疫電顕を再検する必要がある。

次に発生段階におけるGIFの変化について考察する。GIFは胎齢13週から既にアストロサイトに発現していることが確認された。ヒト脳において、アストロサイト出現の指標となる特異分子の発生的変動に関しては余り多くの検討がな

されており、わずかにGFAPが胎齡7週の神経管壁で既に発現しているとする報告<sup>37</sup>を見るのみであった。このように比較の対照には乏しいが、GIFもアストロサイトの発生段階でかなり早い時期から発現されている分子である可能性がある。従来の神経発生学的検討によれば、グリア細胞の分化は、神経細胞が神経上皮細胞からの分裂を完了した後に生じる現象であるとされる<sup>38, 39, 40</sup>。今回の結果からは、アストロサイトへの分化からどの程度の時間を経てGIFの発現が開始されるのかは不明と言わざるを得ないが、GIF陽性アストロサイトの見られはじめた領域では既に神経細胞の分裂、遊走はほぼ完了し、神経突起の形成が行われ始めているものと考えられる。神経突起の形成が盛んに行われている発生段階においては、神経突起伸展を促進する活性は成人脳よりも高いことが予想される。実際に脳内でGIFに神経突起伸展抑制作用があるとすれば、発生過程で、ある時期に至るまでは正常成人脳に見られるようなGIFの細かいニューロビル分布が出現しないという所見は、重要な示唆を含む可能性がある。発生期のヒト脳の各部位で樹状突起がどのような時間経過で形成されてゆくかに関し、従来ほとんど記述的な仕事がないが、出生時から生後2年にかけて正常成人脳に見られるような網目状のGIF陽性アストロサイト突起が徐々に完成されてゆくことは、皮質層構築がある程度完成した後、GIFがアストロサイトの突起を介してその構築を安定化させている可能性を示唆している。今後、神経突起の構築状態とアストロサイトのGIF-IRの関係を二重免疫染色等の方法を用いて解析するなど、この問題をさらに検討する必要がある。

最後に神経疾患脳におけるGIF-IRの検討結果について考察する。ヘルペス脳炎、クロイツフェルト-ヤコブ病などの感染症脳のように、強いアストロサイトの反応性変化が広汎に生じる疾患<sup>41, 42</sup>では、肥腫細胞性アストロサイトのGIF-IRは正常成人脳アストロサイトに比して明らかに増強していた。このように急性かつ激しいアストロサイトの反応性変化が生じる疾患の病変部位では、アストロサイトの肥大増生に際して、GFAPをはじめとする諸物質とともにGIFの産生も亢進するものと考えられる。この際に各種の炎症性メディエーター、免疫活性物質などがGIFの産生にどのような影響を与えているかは興味深い問題である。

一方、その他の神経疾患、ことに神経細胞脱落を伴う変性疾患では、必ずしもそこに出現する反応性アストロサイトのGIF-IRは増強しているとは限らな

った。特にGIF蛋白の発見の端緒となった疾患であるアルツハイマー型老年痴呆では、当初、アストロサイトが反応性変化を生じるとともにGIFが低下すると考えられていた。事実、辻らによるアルツハイマー病脳のGIF mRNAレベルの検討では、down regulationが生じていることが示唆されている<sup>43</sup>。しかし、今回の免疫組織化学的検討の結果では、アルツハイマー型老年痴呆やピック病では、GFAP陽性の反応性アストロサイトの出現状況にかかわらず、症例によりそのGIF-IRは様々であった。アルツハイマー型老年痴呆を抗GIF抗体と抗GFAP抗体とで二重染色した結果も、同程度にGFAP陽性のアストロサイトでありながら、GIFが減弱しているものと増強しているものとが混在していた。また、GIF-IRの程度と各疾患に特徴的な異常構造物の出現状況とに一定の関係は見出し難かった。そこで、アルツハイマー型老年痴呆とピック病との共通の神経病理学的変化である神経細胞死に着眼点を換え、神経細胞脱落とGIF-IRの関係を、これら神経変性疾患に比してより病変の系統性、限局性が明瞭である他の神経変性疾患で、同様に免疫組織化学的検討を行った。その結果、神経細胞脱落が中等度の部位では反応性アストロサイトのGIF-IRは増強している場合もあったが、神経細胞脱落がきわめて高度な部位では反応性アストロサイトのGIF-IRは著しく低下していた。この所見は、線条体黒質変性症の被殻、パーキンソン病・進行性核上性麻痺の黒質、そして筋萎縮性側索硬化症の脊髓前角など、複数の疾患の異なる部位で一定して認められるものであった。また、脳内で神経細胞を含まないがアストロサイトはある程度浸潤した腫瘍塊をもつ転移性脳腫瘍を、抗GIF抗体と抗GFAP抗体で二重染色して検討した結果でも、正常神経細胞と接触のない腫瘍内の反応性アストロサイトのGIF-IRは極めて弱く、腫瘍周囲の神経細胞の混在した部分の反応性アストロサイトには強いGIF-IRが観察された。

これらの結果から、GIFの発現は、一般にアストロサイトが反応性変化を生じる場合には増加するものと思われる。しかし、GIFの発現維持には、神経細胞の存在が必須であり、神経細胞とアストロサイトは通常の接触を保ち続ける必要があるのではないかと考えられる。事実、神経細胞が消失し、神経細胞との接触がなくなったアストロサイトには、GIFは発現しない。この事から、アストロサイトが神経細胞およびその突起と接触を保つことで、何らかのニューロン・アストロサイト間の相互作用<sup>44</sup>が維持されていることが、GIFの発現のための前

提条件ではないかと推測するに至った。このように考えると、各種の神経変性疾患において、病変の軽度な部分ではGIFの増加が見られるのに対し、高度の神経細胞脱落を生じた部位では、GIFが著減していることは、アストロサイトと残存神経細胞の接触がどの程度保たれているかの相違によって説明できる。今回のアルツハイマー型老年痴呆やピック病の検討では、GIF-IRは様々であり、疾患特異的な一定の変化は認められなかった。しかし、GIFの発現が神経細胞とアストロサイトの接触状況に依存しているのなら、アルツハイマー型老年痴呆やピック病で比較的GIF-IRが保たれていた症例も、仮に、罹患年数が延び、さらに著しい神経細胞脱落をきたしていたとすれば、GIFの発現も、低下していたのではないかと考えられる。(ただし、アルツハイマー型老年痴呆においては、皮質内アストロサイトの反応は他疾患に比して強く、特異な反応様式をとるとの指摘もある<sup>45,46</sup>。当初より指摘されてきたアルツハイマー型老年痴呆におけるGIFの減少<sup>23</sup>が、本症独自のアストロサイトの病的変化に起因する現象であるかどうかについては検討が必要である。)

結論として、アストロサイトにおけるGIFの発現レベルは、外的刺激によるアストロサイト蛋白発現全般の亢進と、GIF特有の神経細胞との接触状況に依存する調節機構のバランスによって規定されているのではないかと考えた。

また、今回対象としたすべてのヒト脳の免疫組織化学的検討によるGIFの動態を通して、GIFの発現には神経細胞が必要であるが、同時に、神経細胞の生存維持に、GIFは必要不可欠な分子ではないかと推測した。

この仮説を検証するためには、ニューロン・アストロサイト混合培養系での検討や、神経疾患脳アストロサイトにおけるGIFの遺伝子発現の変化についての検討などが今後必要である。さらに、ニューロンからアストロサイトに伝達されるGIF産生刺激シグナルがいかなるものかを解明せねばならない。また、神経疾患脳内で、GIFの変化がその病態をどのように修飾しているかも興味のもたれる問題である。このように、GIFは、神経細胞の存在下でアストロサイトに発現し、ニューロン・アストロサイトの相互作用の中で重要な役割を果たしている分子と考えられる。今後、その生物学的側面と病態への関与をさらに検討してゆきたい。

## 6 まとめ

- (1) ヒト脳においてGIFは中枢神経系、特に灰白質のアストロサイトに局在し、アストロサイトの放射状の突起が重なり合い、網目状の免疫反応性を示す。
- (2) GIFは、既に胎齢13週でアストロサイトに出現している。当初、その細胞体と突起近位部のみに局在するが、皮質層構築の完成に伴ってニューロビルに網目状に分布するようになる。生後2歳で成人と同様の分布様式をとる。
- (3) GIFは、反応性アストロサイトに強く発現し、その傾向は感染症脳で最も顕著である。しかし、神経細胞が消失するとアストロサイトは、GIFを発現しえない。すなわち、GIFの発現は、ニューロン・アストロサイトの相互作用に依存している。

## 7 謝辞

本研究を終始懇切丁寧にご指導下さった東大脳研病理・井原康夫先生に深謝いたします。抗GIF C末端抗体をご恵与下さり、また数々の貴重なご教示をいただいた東京都老人総合研究所神経病理・内田洋子先生に厚くお礼申し上げます。また本研究で用いた数多くのヒト脳病理標本は、東大脳研病理所蔵のもの他に、東大病理・町並陸生先生、東京医大病理・嶋田裕之先生、九州大学脳研病理・立石潤先生、日赤医療センター中央検査部・武村民子先生、ハーバード大神経疾患センター・K.S. Kosik先生、横浜労災病院病理・田代征夫先生をはじめとする多数の先生方のご理解とご協力により収集し得たものであり、ここに深く感謝いたします。これらの標本の作製を介助いただいた東大脳研病理・最勝寺順子技官をはじめ、数々のご協力を賜った東大脳研病理各員に深甚の謝意を表し、擲筆いたします。

## 8 文献

1. 朝長正徳: 神経細胞のサイズ、とくに老化、アルツハイマー病と関連して。脳神経 40:57-64, 1988
2. Alzheimer A: Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. Ztschr f d ges Neurol u Psychiat 4: 356-385, 1911
3. Glenner GG, Wong CW: Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. Biochem Biophys Res Commun 122: 1131-1135, 1984
4. Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik K-H, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325: 733-736, 1987
5. Kidd M: Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. Nature 197: 192-193, 1963
6. Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K: Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. Neurosci lett 65: 351-355, 1986
7. Ihara Y: Massive somatodendritic sprouting of cortical neurons in Alzheimer's disease. Brain Res 459: 138-144, 1988
8. Yamaguchi H, Nakazato Y, Shoji M, Ihara Y, Hirai S: Ultrastructure of the neuropil threads in the Alzheimer Brain: their dendritic origin and accumulation in the senile plaques. Acta Neuropathol (Berl) 80: 368-374, 1990
9. Selkoe DJ, Ihara Y, Salazar F: Alzheimer's disease: Insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea. Science 215: 1243-1245, 1982
10. Ihara Y, Abraham C, Selkoe DJ: Antibodies to paired helical filaments in Alzheimer's disease do not recognize normal brain proteins. Nature 304: 727-730, 1983
11. Nukina N, Ihara Y: One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. J Biochem 99: 1541-1544, 1986

12. Mori H, Kondo J, Ihara Y: Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 235: 1641-1644, 1987
13. Thoenen H, Edgar D: Neurotrophic factors. *Science* 229: 238-242, 1985
14. Appel SH: A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism, and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 10: 499-505, 1981
15. Mufson EJ, Kordower JH: Cortical neurons express nerve growth factor receptors in advanced age and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 569-573, 1992
16. Kozlowski MR, Spanoyannis A, Manly SP, Fidel SA, Neve RL: The neurotoxic carboxy-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor binds specifically to a neuronal cell surface molecule: pH dependence of the neurotoxicity and the binding. *J Neurosci* 12: 1679-1687, 1992
17. Milward EA, Papadopoulos R, Fuller SJ, Moir RD, Small D, Beyreuther K, Masters CL: The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 9: 129-137, 1992
18. Goedert M, Fine A, Hunt SP, Ullrich A: Nerve growth factor mRNA in peripheral and central rat tissues and in the human central nervous system: lesion effects in the rat brain and levels in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 1: 85-92, 1986
19. Goedert M, Fine A, Dawbarn D, Wilcock GK, Chao MV: Nerve growth factor receptor mRNA distribution in human brain: normal levels in basal forebrain in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 5: 1-7, 1989
20. Olson L, Nordberg A, von Holst H, Bäckman L, Ebendal T, Alafuzoff I, Amberla K, Hartvig P, Herlitz A, Lilja A, Lundqvist H, Långström B, Meyerson B, Persson A, Viitanen M, Winblad B, Seiger Å: Nerve growth factor affects <sup>11</sup>C-nicotine binding, blood flow, EEG, and verbal episodic memory in an Alzheimer patient. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 4: 79-95, 1992
21. Uchida Y, Ihara Y, Tomonaga M: Alzheimer's disease brain extract stimulates the survival of cerebral cortical neurons from neonatal rats. *Biochem Biophys Res Commun* 150: 1263-1267, 1988

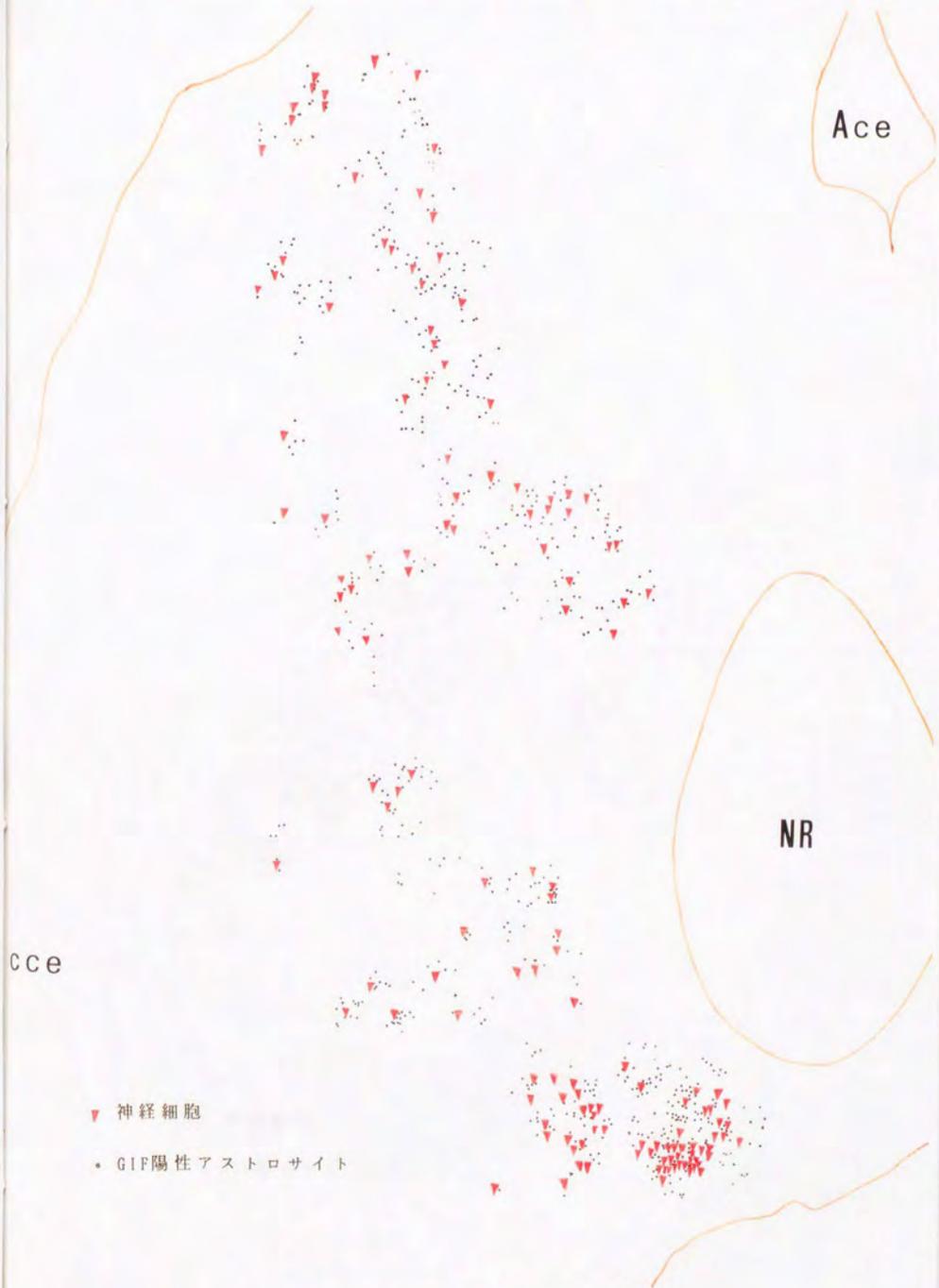
22. Uchida Y, Tomonaga M: Neurotrophic action of Alzheimer's disease brain extract is due to the loss of inhibitory factors for survival and neurite formation of cerebral cortical neurons. *Brain Res* 481: 190-193, 1989
23. Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M: The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7: 337-347, 1991
24. Kägi JHR, Schäffer A: Biochemistry of metallothionein. *Biochem* 27: 8509-8515, 1988
25. Karin M: Metallothioneins: proteins in search of function. *Cell* 41: 9-10, 1985
26. Hamer DH: Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55: 913-951, 1986
27. Dunn MA, Blalock TL, Cousins RJ: Metallothionein. *Proc Soc Exp Biol Med* 185: 107-119, 1987
28. Kobayashi H, Uchida Y, Nakajima K, Kohsaka S, Miyatake T, Tsuji S: Molecular cloning of cDNA for the rat homologue of the human growth inhibitory factor. submitted
29. Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM: MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6333-6337, 1992
30. McLean LW, Nakane PK: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 22: 1077-1083, 1974
31. Iwatsubo T, Hasegawa M, Esaki Y, Ihara Y: Lack of ubiquitin immunoreactivities at both ends of neuropil threads. Possible bidirectional growth of neuropil threads. *Am J Pathol* 140: 277-282, 1992
32. 岩坪 威: アルツハイマー病脳、老年者脳における neuropil threads および神経原線維変化の免疫細胞化学 - 共焦点レーザー顕微鏡による観察 - *神経進歩* 36: 511-523, 1992
33. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
34. Lange H, Thorner G, Hopf A, Schroder KF: Morphometric studies of the neuropathological changes in choreatic diseases. *J Neurol Sci* 28: 401-425, 1976

35. Roos RAC, Bots GThAM, Hermans J: Neuronal nuclear membrane indentation and astrocyte/neuron ratio in Huntington's disease. A quantitative electron microscopic study. *J Hirnforsch* 26: 689-693, 1985
36. Roos RAC, Bots GThAM, Hermans J: Quantitative analysis of morphological features in Huntington's disease. *Acta Neurol Scand* 73: 131-135, 1986
37. Reske-Nielsen E, Oster S, Reintoft I: Astrocytes in the prenatal central nervous system. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A* 95: 339-346, 1987
38. Ikuta F, Ohama E, Yamazaki K, Takeda S, Egawa S, Ichikawa T: Morphology of migrating glial cells in normal development, neoplasia and other disorders. *Prog Neuropathol* 4: 377-405, 1979
39. Turner DL, Cepko CL: A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328: 131-136, 1987
40. Gray GE, Glover JC, Majors J, Sanes JR: Radial arrangement of clonally related cells in the chicken optic tectum: lineage analysis with a recombinant retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7356-7360, 1988
41. 山崎一徳、大浜栄作、生田房弘: Creutzfeldt-Jakob病およびSSPE由来培養astrocyteの増殖力。 *Neuropathol* 6: 379-386, 1985
42. Manuelidis L, Tesin DM, Sklaviadis T, Manuelidis EE: Astrocyte gene expression in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5937-5941, 1987
43. Tsuji S, Kobayashi H, Uchida Y, Ihara Y, Miyatake T: Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease. *EMBO J* 11: 4843-4850, 1992
44. Vernadakis A: Neuron-glia interrelations. *Internat Revi Neurobiol* 30: 149-224, 1988
45. Delacourte A: General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology* 40: 33-37, 1990
46. Frederickson RCA: Astroglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol aging* 13: 239-253, 1992

図1 GIFとMTのアミノ酸配列

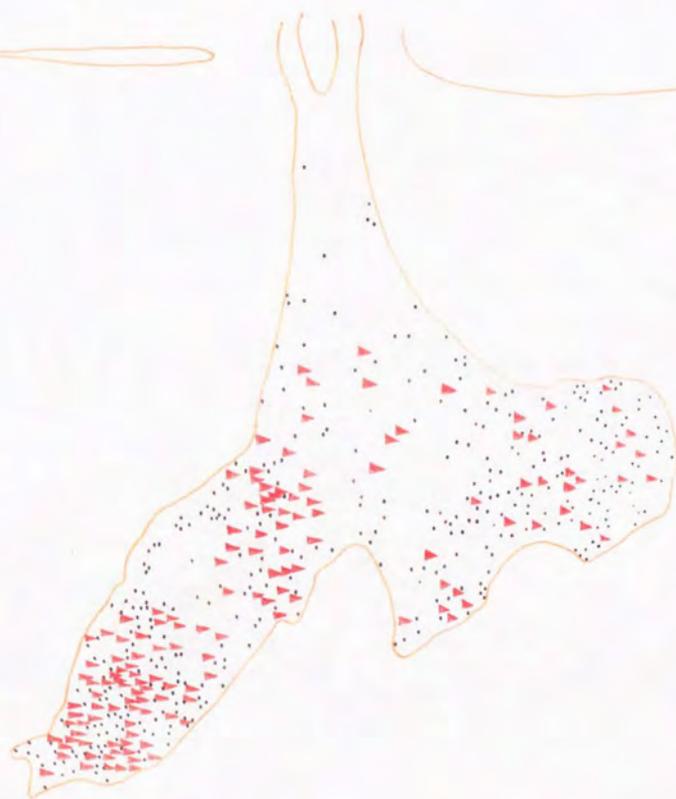
|          | 1         | 10     | 20    | 30     | 40     | 50     | 60      |         |       |      |      |     |    |      |       |     |
|----------|-----------|--------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|-------|------|------|-----|----|------|-------|-----|
| ヒトGIF    | MDPETCP   | PSGG   | STCAD | SCKCEG | CKCTSC | CKKSCC | SCCPAEC | EKCAKDC | VCVKG | GGEA | AEAE | AEK | CS | CCQ  |       |     |
| ラットGIF   | MDPETCP   | PIGG   | STCS  | DKC    | -----  |        |         |         |       |      |      |     |    |      |       |     |
|          | GIF N末端抗体 |        |       |        |        |        |         |         |       |      |      |     |    |      |       |     |
| ヒトMT I a | MDPN      | CSCAT  | GGST  | CTGT   | GSCK   | CKE    | CKNS    | CKKSC   | CCPM  | SCAK | CA   | QGG | CI | CKGA | SEKCS | CCA |
| MT I b   | MDPN      | CSCTT  | GGSC  | ACAG   | SKCKE  | CKCT   | SKKCC   | CCSV    | GCAC  | KA   | QGC  | V   | CK | GS   | SEKCR | CCA |
| MT I e   | MDPN      | CSCAT  | GGST  | CTAG   | SKCKE  | CKCT   | SKKSC   | CCPV    | GCAC  | KA   | QGG  | CV  | CK | GA   | SEKCS | CCA |
| MT I f   | MDPN      | CSCAAG | VSTC  | AGSK   | CKE    | CKCT   | SKKSC   | CCPV    | GCAC  | KA   | QGG  | CV  | CK | GA   | SEKCS | CCD |
| MT II    | MDPN      | CSCAAG | DSCT  | CAGS   | CKE    | CKCT   | SKKSC   | CCPV    | GCAC  | KA   | QGG  | CI  | CK | GA   | SDKCS | CCA |
| MT II a  | MDPN      | CSCAAG | VSTC  | ASSC   | CKE    | CKCT   | SKKSC   | CCPV    | GCAC  | KA   | QGG  | CI  | CK | GA   | SEKCS | CCA |

(A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; G, Gly; K, Lys; M, Met; P, Pro; Q, Gln; S, Ser; T, Thr; V, Val; GIFとMTの異なるアミノ酸配列の部分を、強調文字で示す)



- ▼ 神経細胞
- GFAP陽性アストロサイト

図 2 パーキンソン病 (症例 1、中脳)



- ▶ 神経細胞
- GIF陽性アストロサイト

図 3 筋萎縮性側索硬化症（症例 6、胸髄）



▶ 神経細胞

• GIP陽性アストロサイト

図 4 筋萎縮性側索硬化症（症例 18、胸髄）

表1 アルツハイマー型老年痴呆の脳内異常構造物とGIF-IRとの関係

異常構造物（NFT、老人斑）の出現の程度を3種類に分類する。

3+ 異常構造物が、多いもの

2+ 異常構造物が、中等度のもの

1+ 異常構造物が、少ないもの

GIF-IRの強度については、4種類に分類する。

A 明らかにGIF-IRの全般的な低下の見られるもの。

B アストロサイトの細胞体にはGIF-IRは見られるが、網目状の突起の染色性が消失しているもの。

C 皮質全域に島状にGIF-IRの低下した領域が散在しているもの。

D 正常成人脳のGIF-IRと大きな差が認められないもの。

| 症例 | NFT | 老人斑 | GIF-IR |
|----|-----|-----|--------|
| 1  | 3+  | 3+  | B      |
| 2  | 3+  | 3+  | A      |
| 3  | 3+  | 3+  | C      |
| 4  | 1+  | 2+  | C      |
| 5  | 2+  | 2+  | B      |
| 6  | 3+  | 3+  | D      |
| 7  | 1+  | 1+  | B      |
| 8  | 1+  | 1+  | C      |
| 9  | 2+  | 2+  | B      |
| 10 | 3+  | 3+  | C      |
| 11 | 1+  | 2+  | D      |
| 12 | 1+  | 3+  | B      |
| 13 | 1+  | 2+  | C      |
| 14 | 1+  | 2+  | C      |
| 15 | 2+  | 2+  | D      |

表 2 筋萎縮性側索硬化症の前角細胞数とGIF-IRとの関係

残存している前角細胞数を3段階に分類する。

3+ 残存している前角細胞数が、頸髄10以上、胸髄6以上、腰髄15以上のもの

2+ 残存している前角細胞数が、頸髄6-9、胸髄3-5、腰髄9-14のもの

1+ 残存している前角細胞数が、頸髄5以下、胸髄2以下、腰髄8以下のもの

GIF-IRの強度については、4段階に分類する。

3+ 正常成人脳のアストロサイトに見られるGIF-IRと変わらないもの

2+ 網目状の染色性は消失してもアストロサイトの細胞体及び突起近位部にGIF-IRが見られるもの

1+ 網目状の染色性の消失、且つGIF陽性アストロサイトの密度も低下しているもの

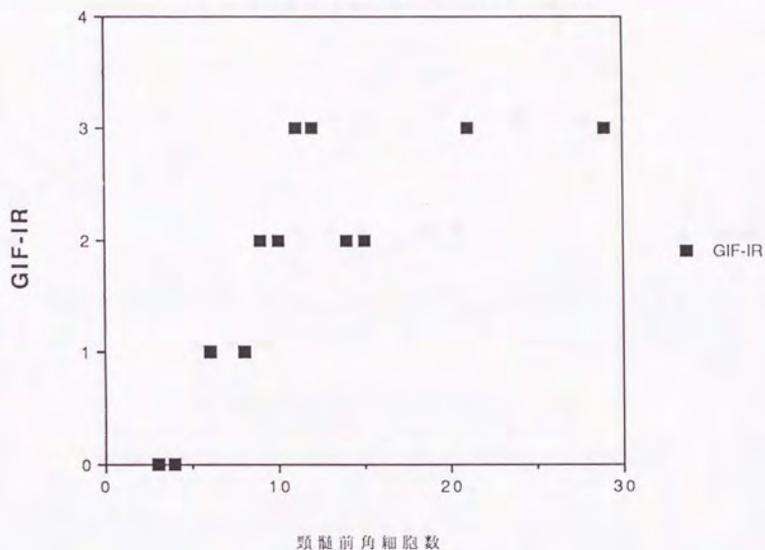
- アストロサイトのGIF-IRがほとんど消失しているもの

| 症例 |    | 前角細胞数 | GIF-IR |
|----|----|-------|--------|
| 1  | 胸髄 | 3+    | 2+     |
|    | 腰髄 | 1+    | -      |
| 2  | 胸髄 | 2+    | 1+     |
|    | 腰髄 | 1+    | -      |
| 3  | 頸髄 | 3+    | 2+     |
|    | 胸髄 | 3+    | 2+     |
|    | 腰髄 | 3+    | 3+     |
| 4  | 頸髄 | 2+    | 1+     |
|    | 胸髄 | 2+    | 1+     |
|    | 腰髄 | 2+    | 1+     |

| 症例 |    | 前角細胞数 | GIF-IR |
|----|----|-------|--------|
| 5  | 頸髓 | 1+    | -      |
|    | 胸髓 | 1+    | -      |
|    | 腰髓 | 3+    | 2+     |
| 6  | 頸髓 | 3+    | 3+     |
|    | 胸髓 | 3+    | 3+     |
| 7  | 胸髓 | 3+    | 2+     |
|    | 腰髓 | 1+    | 1+     |
| 8  | 頸髓 | 2+    | 2+     |
|    | 胸髓 | 3+    | 2+     |
|    | 腰髓 | 3+    | 3+     |
| 9  | 頸髓 | 2+    | 2+     |
| 10 | 胸髓 | 1+    | -      |
|    | 腰髓 | 1+    | -      |
| 11 | 頸髓 | 1+    | -      |
|    | 胸髓 | 2+    | 1+     |
|    | 腰髓 | 1+    | 1+     |
| 12 | 胸髓 | 3+    | 2+     |
| 13 | 頸髓 | 3+    | 2+     |
|    | 胸髓 | 2+    | 2+     |

| 症例  |     | 前角細胞数 | GIF-IR |
|-----|-----|-------|--------|
| 1 4 | 胸 髓 | 3+    | 3+     |
|     | 腰 髓 | 3+    | 3+     |
| 1 5 | 胸 髓 | 2+    | 1+     |
|     | 腰 髓 | 1+    | 1+     |
| 1 6 | 頸 髓 | 3+    | 3+     |
| 1 7 | 頸 髓 | 3+    | 3+     |
|     | 胸 髓 | 3+    | 2+     |
| 1 8 | 頸 髓 | 3+    | 2+     |
|     | 胸 髓 | 2+    | 1+     |
| 1 9 | 頸 髓 | 3+    | 3+     |
|     | 胸 髓 | 3+    | 3+     |
| 2 0 | 頸 髓 | 2+    | 1+     |
|     | 胸 髓 | 3+    | 2+     |
|     | 腰 髓 | 2+    | 2+     |

グラフ1 頸髄前角細胞数とGIF-IR

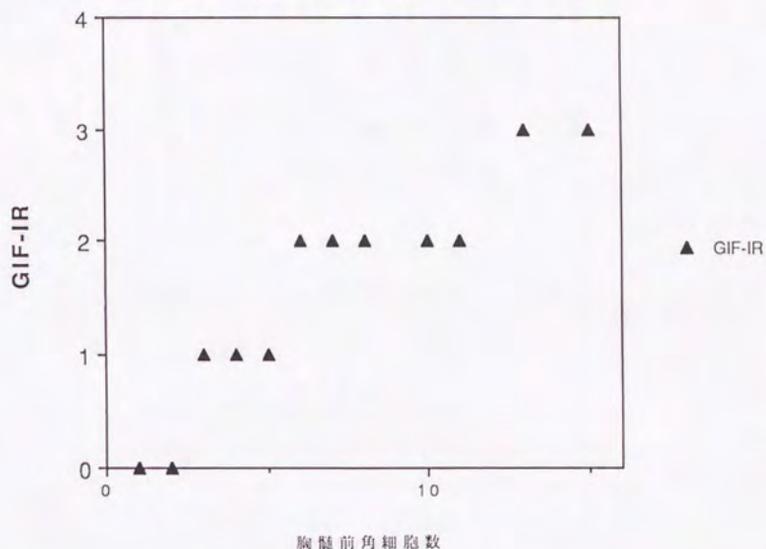


前角細胞脱落が中等度までは、GIF-IRに変化は見られないが、さらに高度の脱落が生じると、ほぼGIF-IRは前角細胞の減少に伴い減弱してゆく。

なお、GIF-IRの強度は、以下の4段階に分類した。

- 3+ 正常成人脳のアストロサイトに見られるGIF-IRと変わらないもの。
- 2+ 網目状の染色性は消失しても、アストロサイトの細胞体と突起近位部にGIF-IRが見られるもの。
- 1+ 網目状の染色性の消失、且つGIF陽性アストロサイトの密度も低下しているもの。
- 0 アストロサイトのGIF-IRがほとんど消失しているもの。

グラフ 2 胸髄前角細胞数とGIF-IR

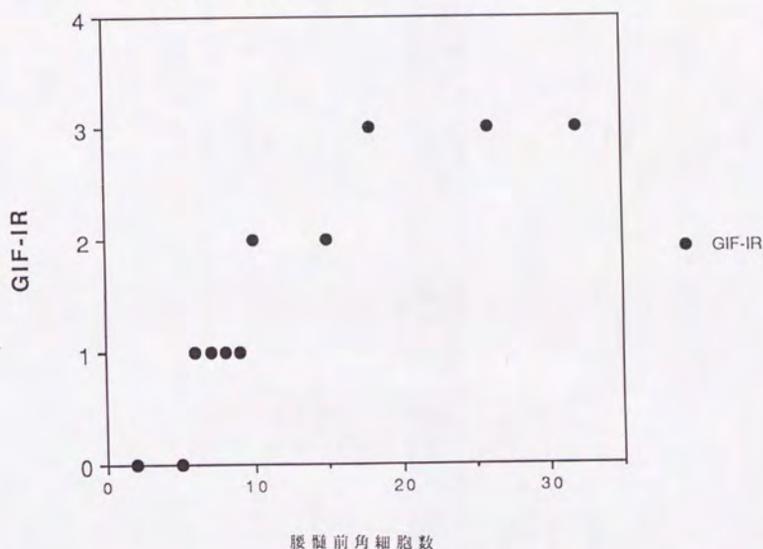


前角細胞脱落が軽度であれば、GIF-IRに変化は見られないが、さらに、脱落が進行すると、GIF-IRは前角細胞の減少に伴い減弱してゆく。

なお、GIF-IRの強度は、以下の4段階に分類した。

- 3+ 正常成人脳のアストロサイトに見られるGIF-IRと変わらないもの。
- 2+ 網目状の染色性は消失しても、アストロサイトの細胞体と突起近位部にGIF-IRが見られるもの。
- 1+ 網目状の染色性の消失、且つGIF陽性アストロサイトの密度も低下しているもの。
- 0 アストロサイトのGIF-IRがほとんど消失しているもの。

グラフ3 腰髄前角細胞数とGIF-IR



前角細胞脱落が中等度までは、GIF-IRに変化は見られないが、さらに高度の脱落が生じると、GIF-IRは前角細胞の減少に伴い減弱してゆく。

なお、GIF-IRの強度は、以下の4段階に分類した。

- 3+ 正常成人脳のアストロサイトに見られるGIF-IRと変わらないもの。
- 2+ 網目状の染色性は消失しても、アストロサイトの細胞体と突起近位部にGIF-IRが見られるもの。
- 1+ 網目状の染色性の消失、且つGIF陽性アストロサイトの密度も低下しているもの。
- 0 アストロサイトのGIF-IRがほとんど消失しているもの。

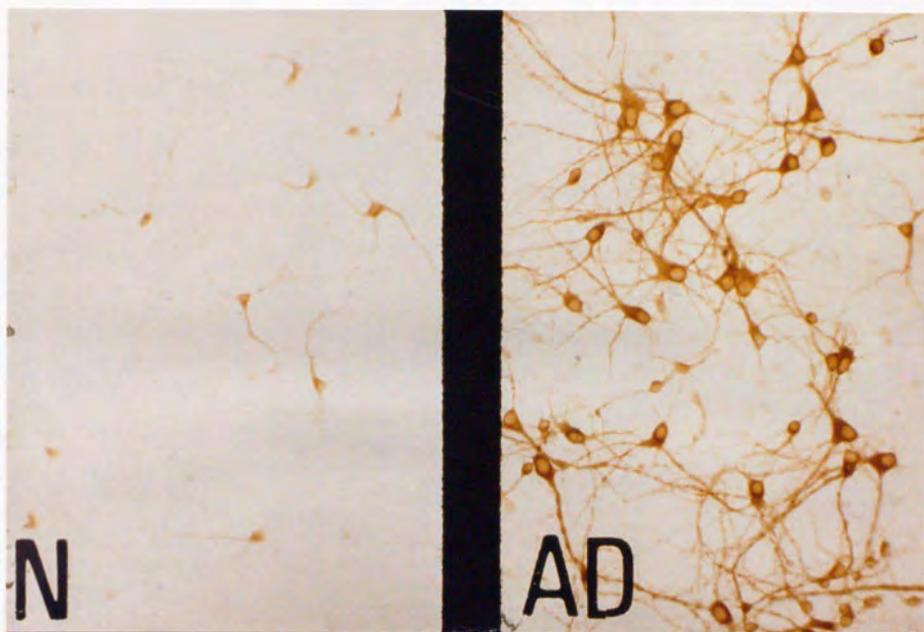


Fig. 1A 新生ラット大脳皮質ニューロンの初代培養

正常老人脳抽出液（写真左）とアルツハイマー病脳抽出液（写真右）をそれぞれ加え、7日間培養したものである。両方ともMAP2で免疫染色を行っているが、アルツハイマー病脳抽出液を加えた方は、7日間培養した後も神経細胞はほとんど消失しておらず、神経突起の伸展も見られる。

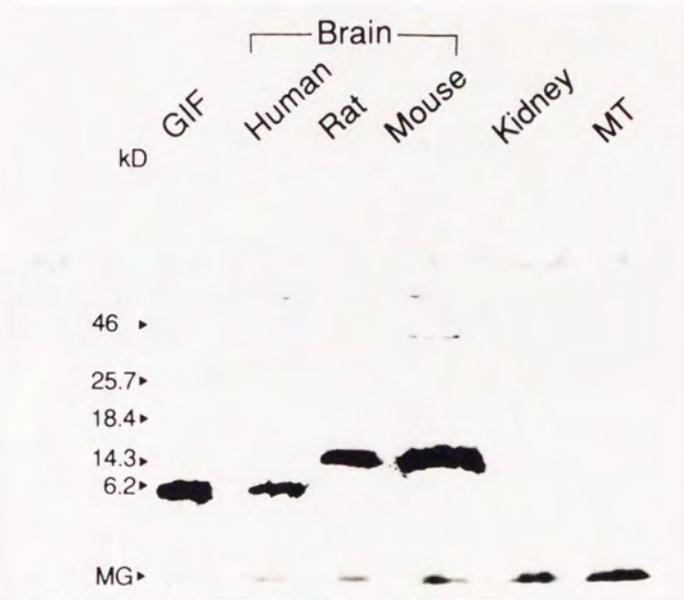


Fig. 1 B 抗GIF N末端抗体によるイムノブロット

この抗体は、GIF（ヒト脳より精製）を認識し、Human（20%ヒト脳ホモジェネート）で、GIFと同一分子量蛋白（すなわちGIF）のみを認識している。Rat（20%Rat脳ホモジェネート）、Mouse（20%Mouse脳ホモジェネート）についても単一のバンド（分子量に違いが見られるがGIF蛋白である）を認識している。しかし、MTの含有量が多いとされるKidney（20%ヒト腎ホモジェネート）、MT（ウサギ肝より精製）は認識しない。

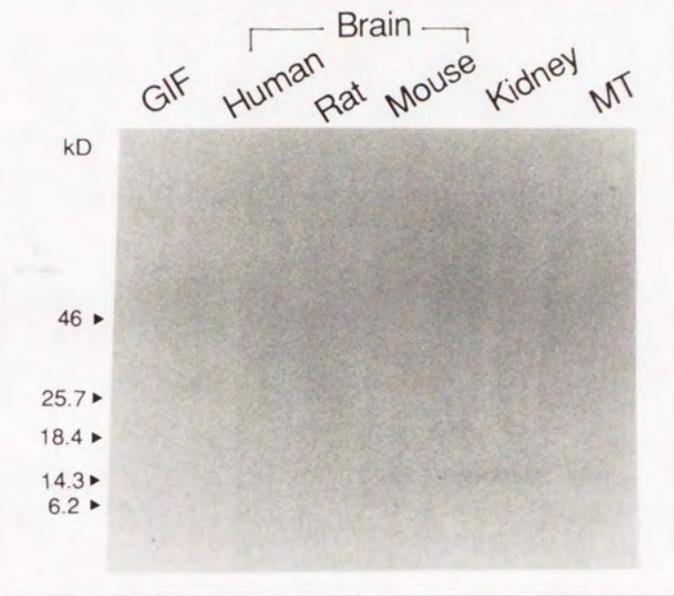


Fig. 1C 抗GIF N末端抗体吸収試験のイムノブロット

1Bで見られたGIF、Human、Rat、Mouseの単一のバンドは消失している。よって、この抗体はGIFを特異的に認識する抗体であると考えられた。

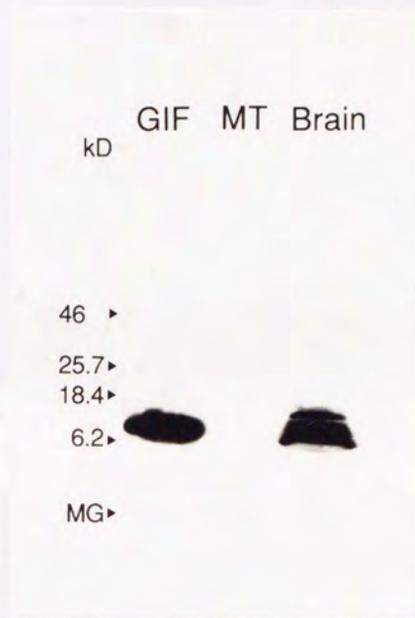
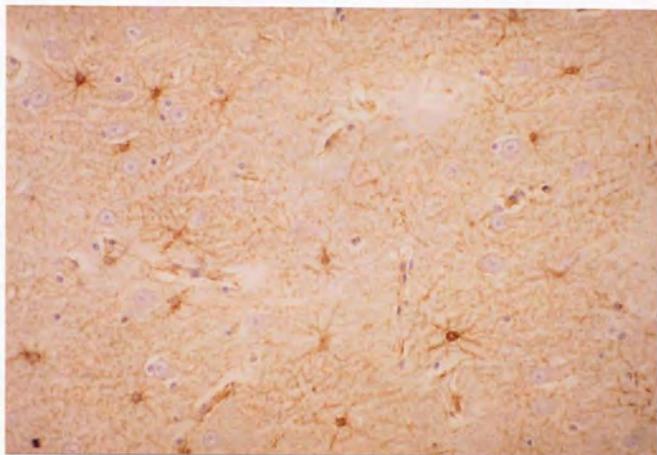
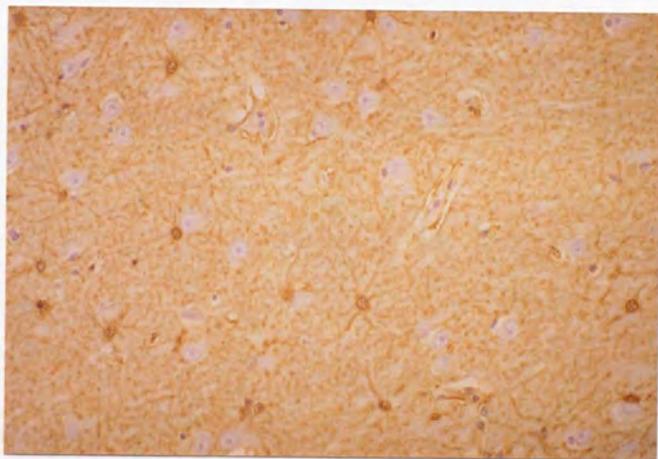


Fig. 1 D 抗GIF C末端抗体によるイムノプロット

この抗体も、抗GIF N末端抗体と同様に、GIF、Humanは認識するが、MTは認識しない。また、吸収試験でGIF、Humanで見られた単一のバンドが消失することを確認している。よって、この抗体もGIFを特異的に認識する抗体であると考えられた。



F i g . 2 A 抗GIF N末端抗体の免疫反応（正常成人脳；海馬）  
アストロサイトの核、細胞体、突起にGIF-IRが見られる。GIF-IRは、細い突起にも見られ、網目状となっている。x66



F i g . 2 B 抗GIF C末端抗体の免疫反応（正常成人脳；海馬）  
2Aと同一症例の同一部位である。GIF-IRは、N末端抗体とほぼ同様である。  
x66

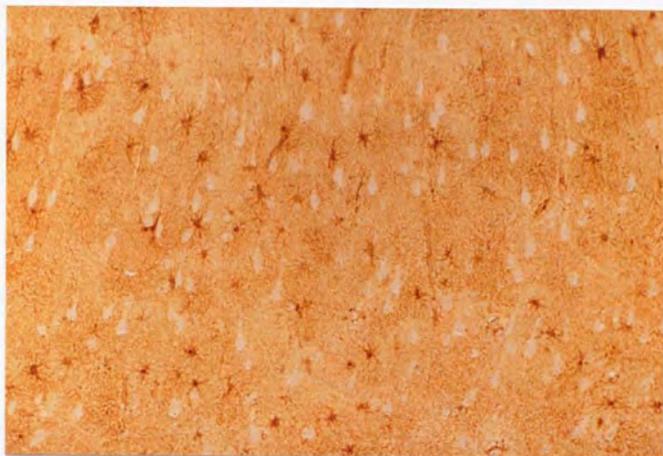


Fig. 2C 正常成人脳；海馬

アストロサイトの、細胞体、突起にGIP-IRが見られる。さらに、隈なくニューロビルに、網目状のGIP-IRが見られる。染色されていない部分は神経細胞体である。x25



Fig. 2D 正常成人脳；前頭葉

2Cと同一症例であるが、2Cに比して、若干GIP-IRが弱い。x25



Fig. 2 E 抗GFAP抗体と抗GIF抗体の免疫反応（正常成人脳；前頭葉）

左側が抗GFAP抗体による免疫染色であるが、皮質第I層と髄質にGFAP-IRが見られるのに対し、右側の抗GIF抗体による免疫染色では、皮質第II層から第VI層にかけて強くGIF-IRが見られる。x3.3

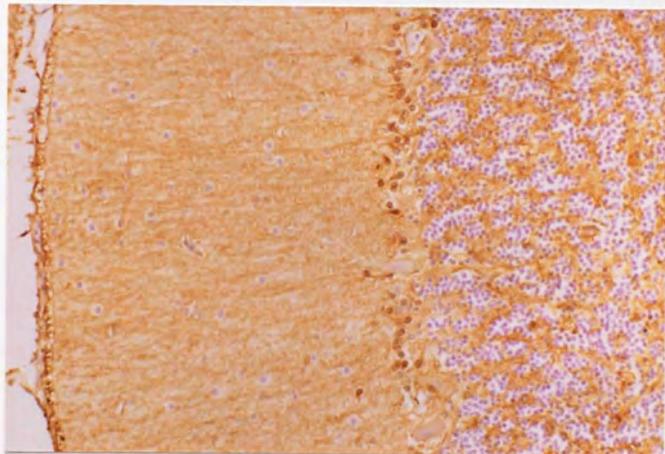


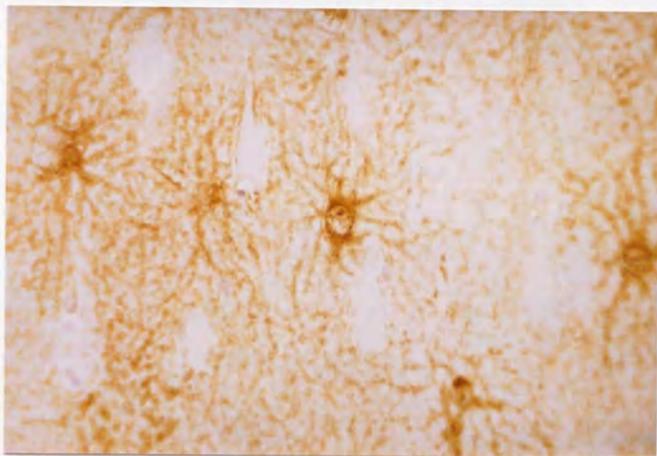
Fig. 2 F 正常成人脳；小脳

ベルグマングリアと小脳糸球にGIF-IRが見られる。x25



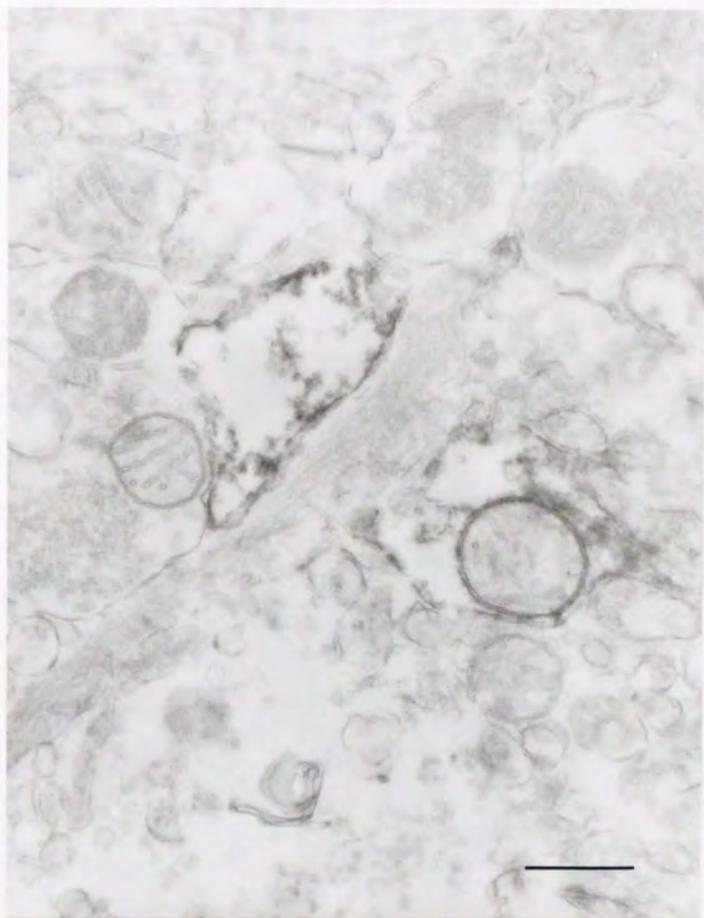
F i g. 2 G 正常成人脳；脊椎

灰白質のアストロサイトには、前角、側角、後角を問わずGIF-IRが見られる。また、白質のアストロサイトにもGIF-IRが見られる。x10



F i g. 2 H 正常成人脳；海馬

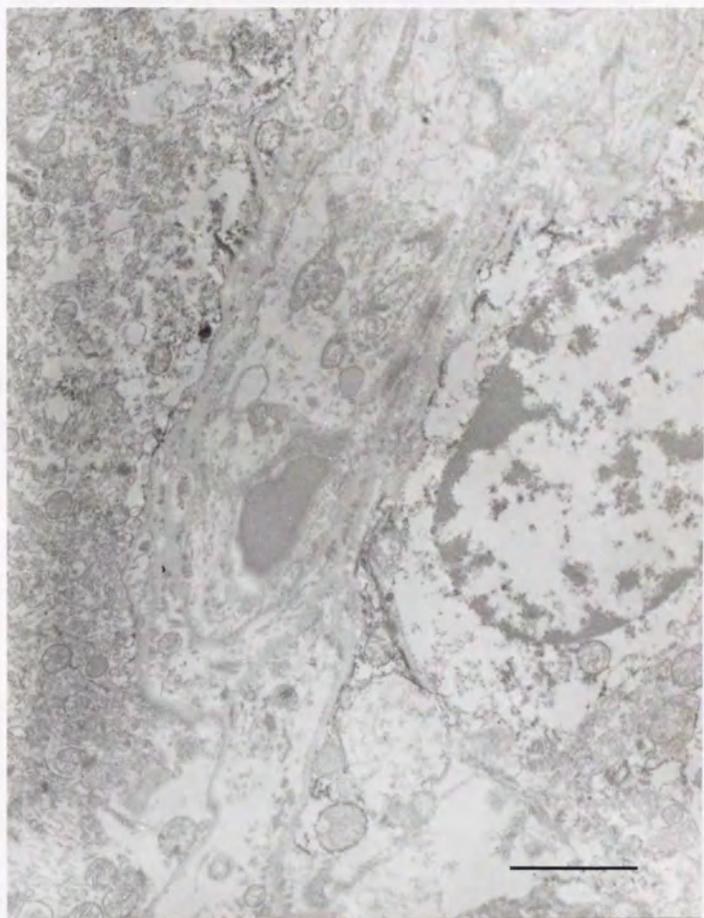
GIF陽性のアストロサイトの細い突起がニューロビルに分布している。免疫反応は、顆粒状を呈している。



F i g. 2 I 正常成人脳の免疫電顕；大脳皮質

GIF-IRの見られるアストロサイトの突起が、樹状突起に接している。x30K

— 400nm



F i g. 2 J 正常成人脳の免疫電顕；血管周囲

血管外膜と接触するアストロサイトの血管足（神経膠性血管周囲限界膜）に  
GIF-1Rが認められる。x6000 —— 2 $\mu$ m

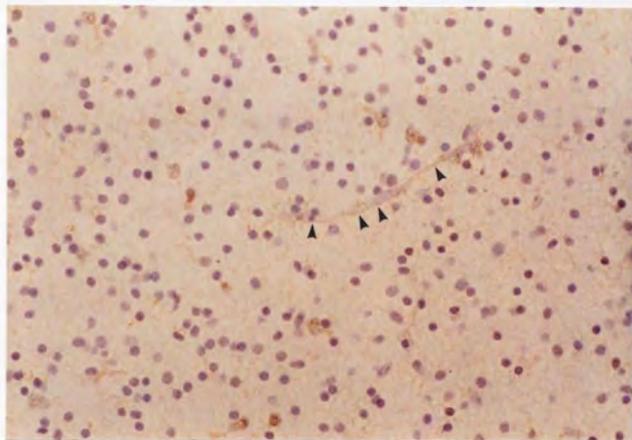


Fig. 3 A 胎齡13週；海馬齒状回

神経細胞の間に、比較的大きな核を持ったGIF陽性アストロサイトが見られる。また、GIF-IRは血管周囲（血管足）にまで達している。（矢印は血管を指す）  
x66

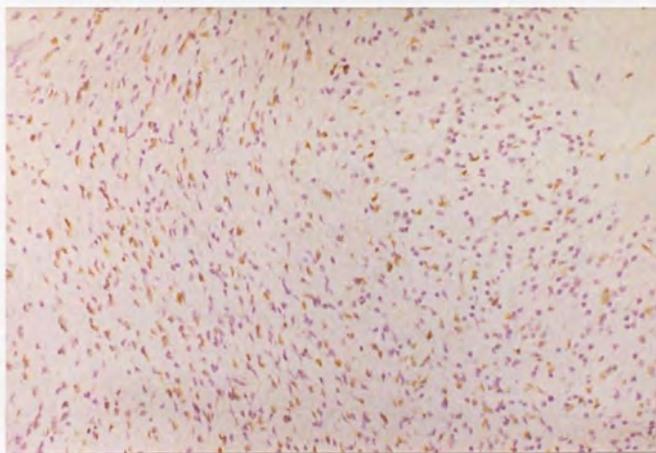
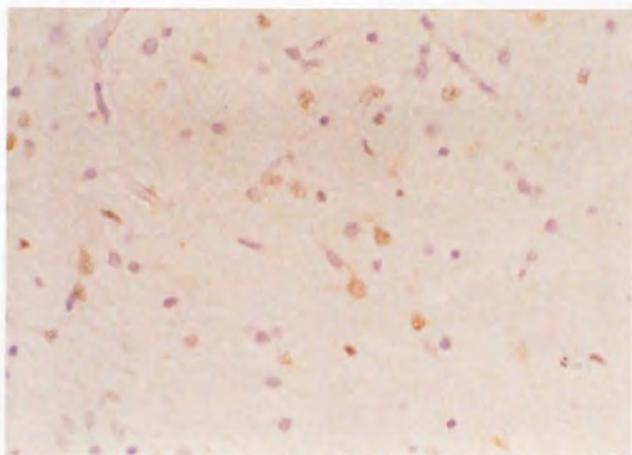


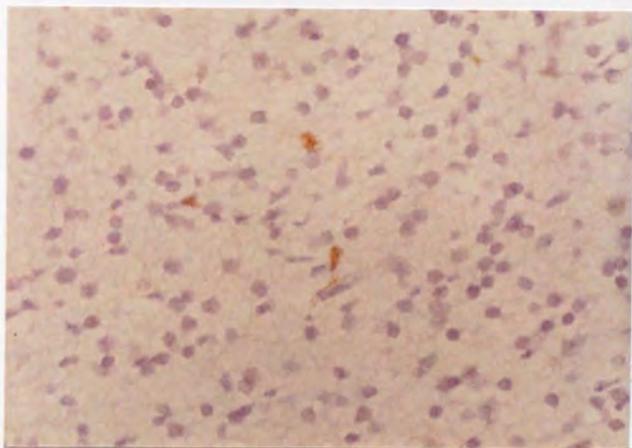
Fig. 3 B 胎齡20週；海馬

胎齡13週に比して、GIF陽性アストロサイトは増加している。x50



F i g. 3 C 胎齡20週；被殻

細胞体と突起にGIF-1Rの見られるアストロサイトが、多数出現している。  
x100



F i g. 3 D 胎齡20週；Cortical gray

明らかにGIF-1Rのあるアストロサイトが、3個見られる。これらの細胞のGIF-1Rは、細胞体と突起に見られる。x100

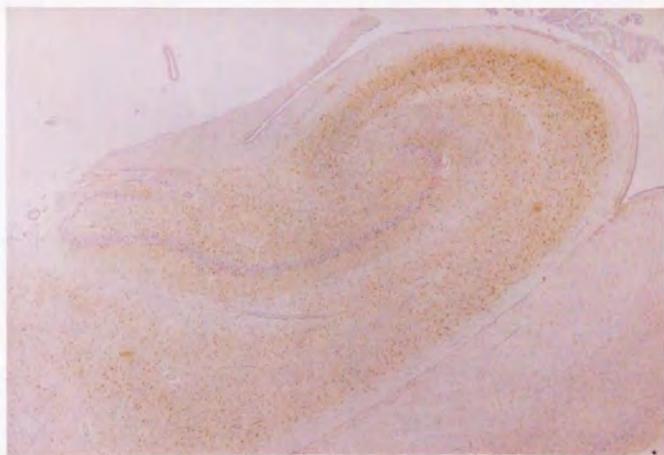


Fig. 3E 胎齡36週；海馬

海馬CAII, CAIIIの領域では、他の領域よりGIF-IRが強い。x5



Fig. 3F 胎齡36週；海馬

3Eの拡大。海馬CAII, CAIIIの領域では、正常成人脳のアストロサイトに見られるGIF-IRとほとんど変わらない網目状の免疫反応を呈している。x25

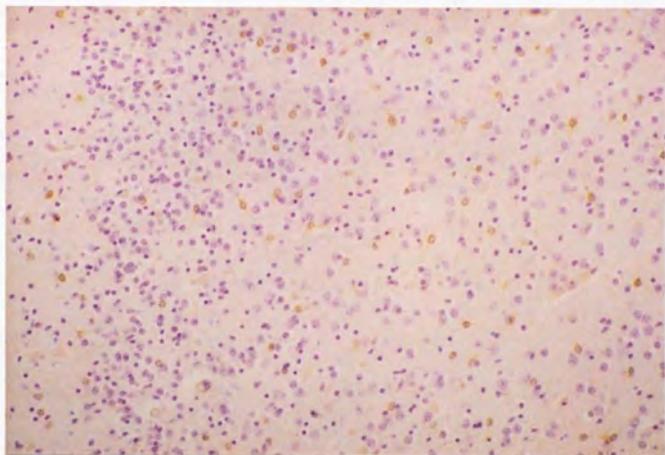


Fig. 3 G 胎齡36週；外側後頭側頭回

3Eと同一切片。まだ、GIF-IRは、網目状を呈していない。（写真左が浅層）  
x50

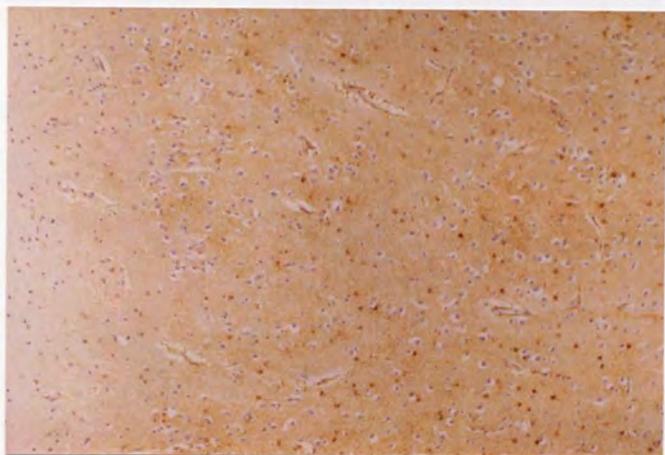


Fig. 3 H 1歳6カ月；前頭葉

正常成人脳とほとんど変わらないGIF-IRを呈している。（写真左が浅層）  
x25



Fig. 4 A クロイツフェルト-ヤコブ病（症例1）；大脳皮質  
反応性アストロサイトにGIF-IRが強く見られる。x50

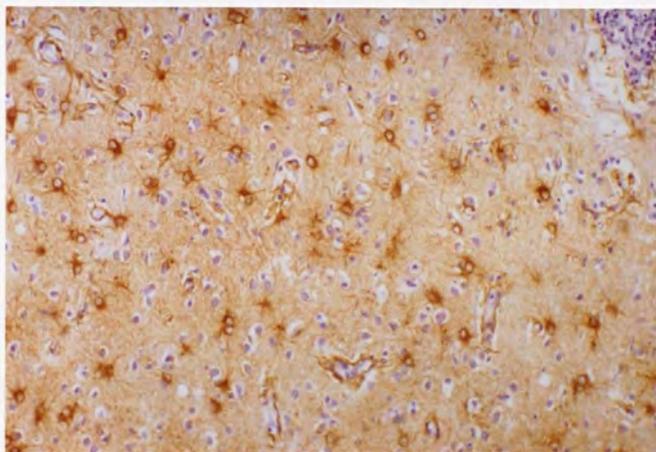
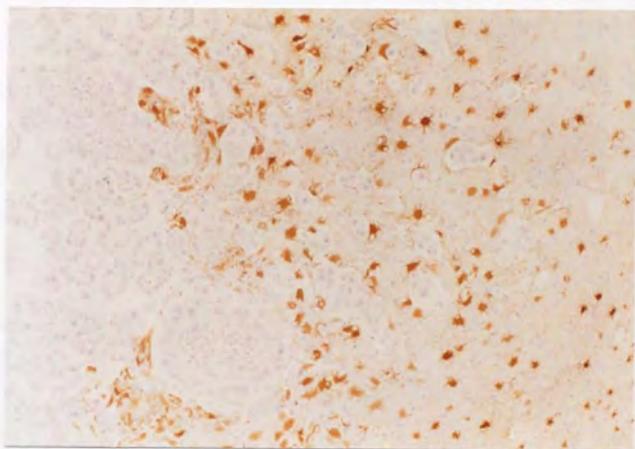
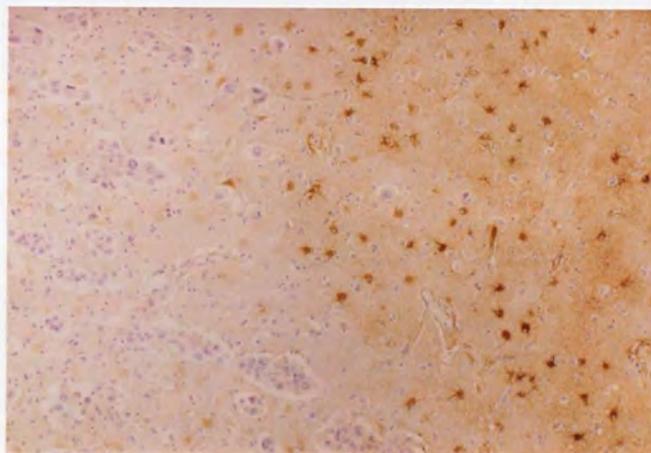


Fig. 4 B 亜急性性硬化性汎脳炎（症例1）；大脳皮質  
肥満細胞性アストロサイトに強いGIF-IRが見られる。x50



F i g. 4 C 転移性脳腫瘍（症例1）；大脳皮質

腫瘍内、腫瘍周囲を問わず肥胖細胞性アストロサイトには、強いGFAP-IRが見られる。x25



F i g. 4 D 転移性脳腫瘍（症例1）；大脳皮質

腫瘍内に存在する肥胖細胞性アストロサイトには、GFAP-IRは、ほとんどなく、腫瘍周囲の肥胖細胞性アストロサイトに強いGFAP-IRが見られる。x25

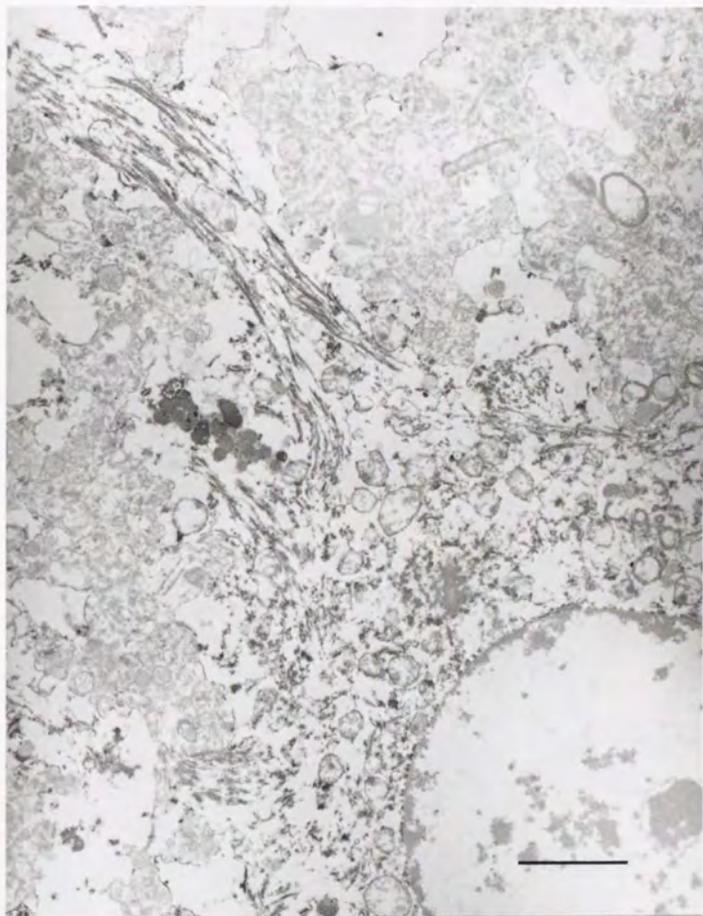


Fig. 4 E ヘルペス脳炎（症例1）；大脳皮質の免疫電顕  
アストロサイトの細胞体と突起にGIF-IRが見られる。

x5000 ——— 2 $\mu$ m

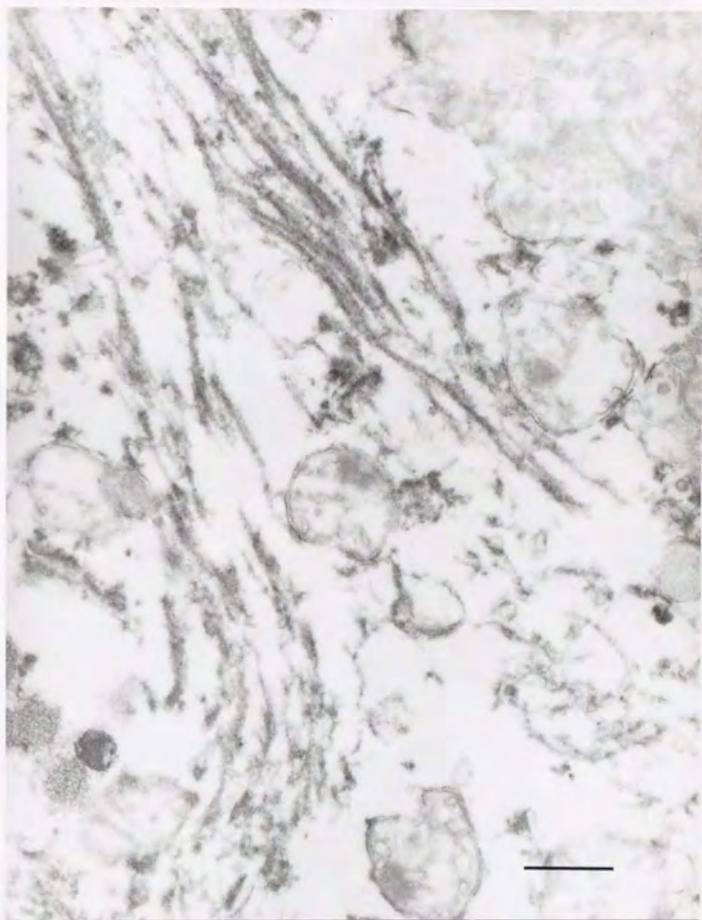
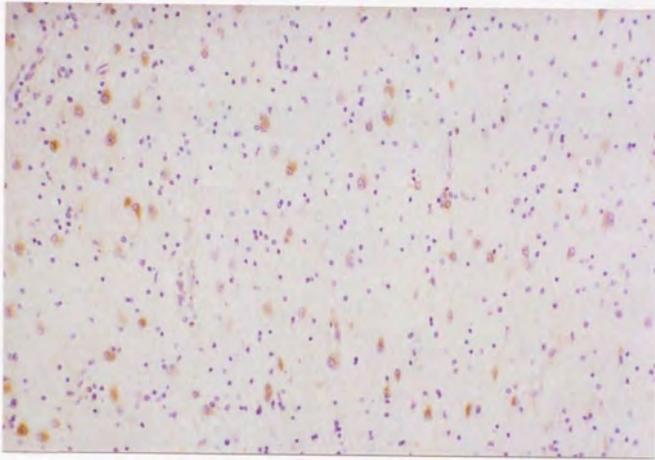


Fig. 4F ヘルペス脳炎（症例1）；大脳皮質の免疫電顕

4Eの拡大。GIF-IRはミトコンドリアの表面とグリア細線維に付随して見られる。x20K ——— 400nm



F i g. 4 G 亜急性硬化性汎脳炎（症例1）；深部髄質  
皮質のGIF-IRに比して髄質のGIF-IRは弱い。x50

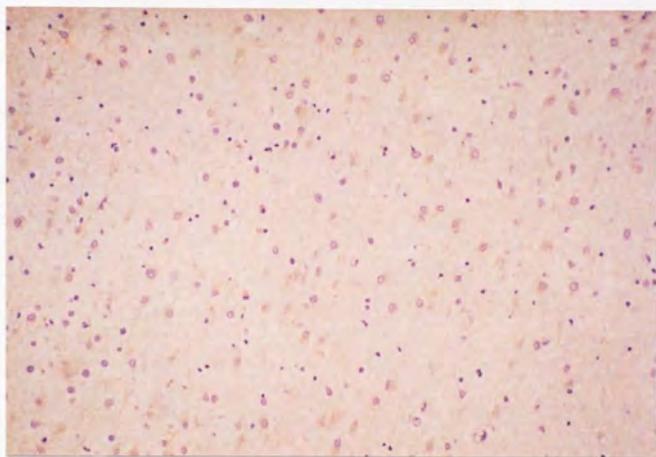


Fig. 5 A アルツハイマー型老年痴呆 (症例2) ; 側頭葉

極めて強い大脳萎縮を認めた症例であり、神経細胞は、ほとんど消失して反応性アストロサイトに置き変わっている。これらのアストロサイトにGIF-IRは、見られない。x50

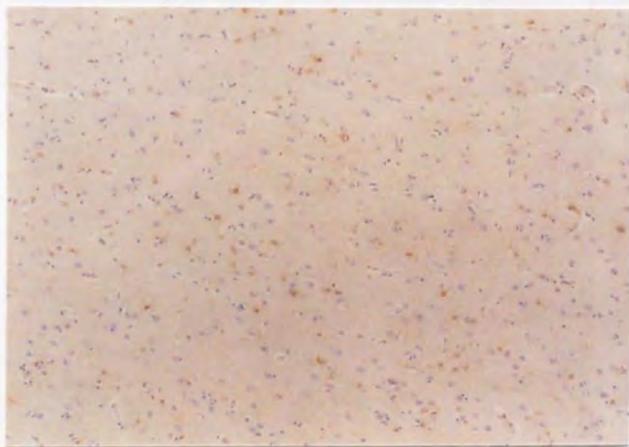


Fig. 5 B アルツハイマー型老年痴呆 (症例1) ; 前頭葉

アストロサイトの核、細胞体、細胞体付近の太い突起にGIF-IRが見られる。正常成人脳に見られる網目状のGIF-IRは見られない。x25



Fig. 5 C アルツハイマー型老年痴呆 (症例3); 側頭葉  
皮質全域に島状にGIF-IRの低下した領域が散在している。x10



Fig. 5 D アルツハイマー型老年痴呆 (症例6); 海馬  
ニューロビルに網目状のGIF-IRも見られ、正常成人脳と大きな差が認められ  
ない。x25

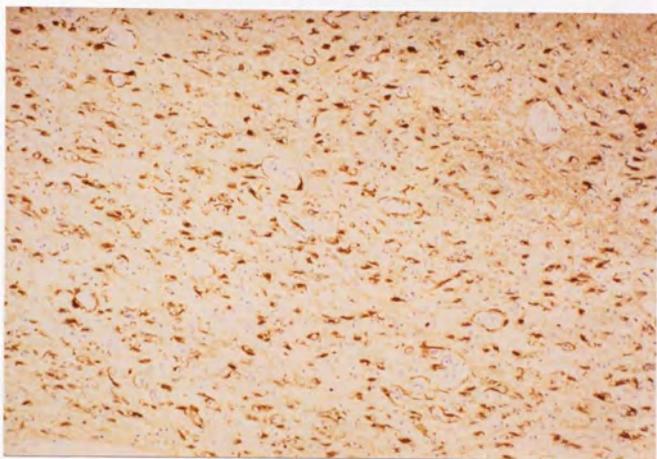


Fig. 5 E 多系統萎縮症（線条体黒質変性症）（症例1）；被殻  
高度の神経細胞脱落が見られ、ほとんど反応性アストロサイトに置き変わっ  
ている。その細胞体、突起には、GFAP-IRが強く見られる。x25



Fig. 5 F 多系統萎縮症（線条体黒質変性症）（症例1）；被殻  
5Eと同一部位であるが、GFAP-IRは、ほとんど見られない。x25

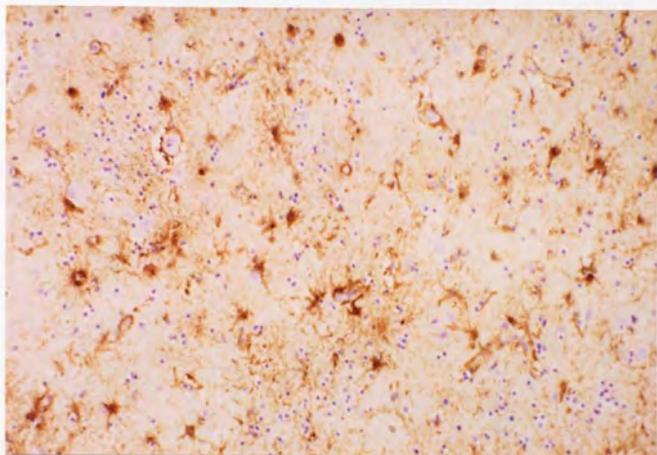


Fig. 5 G ハンチントン舞踏病（症例1）；被殻  
線条体ニューロピルに、GFAP陽性反応性アストロサイトが見られる。x50

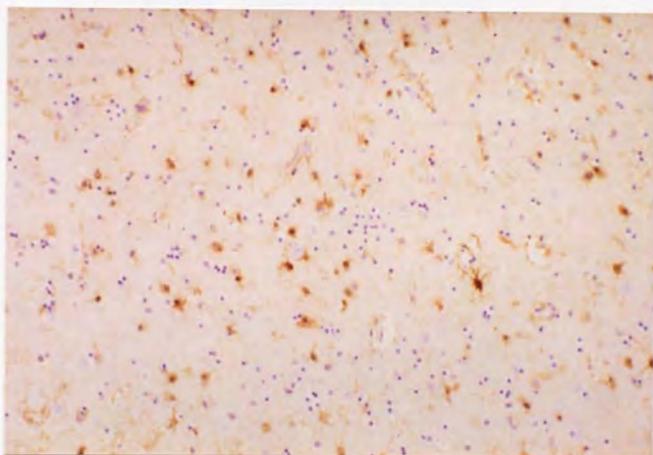


Fig. 5 H ハンチントン舞踏病（症例1）；被殻  
アストロサイトの細胞体と突起近位部にGIF-1Rが見られる。x50

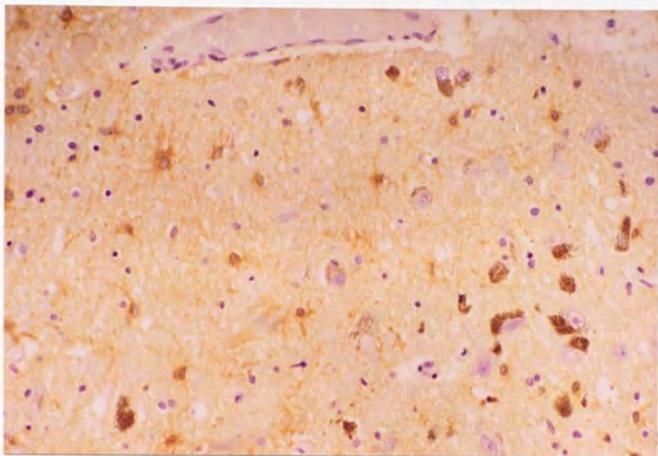


Fig. 6 A パーキンソン病（症例1）；中脳黒質内側部  
反応性アストロサイトにGIF-IRが見られる。x66

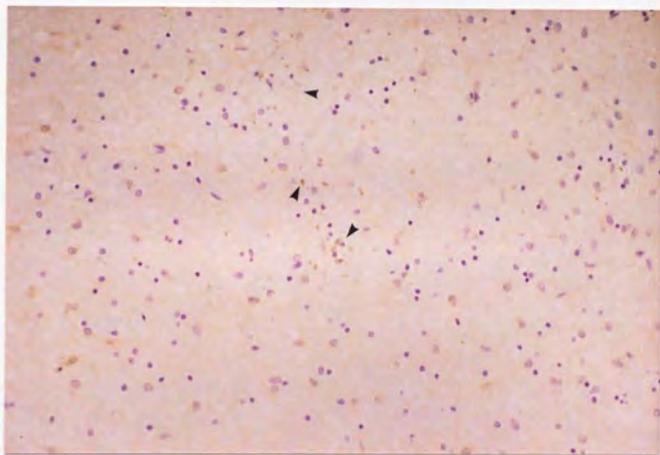


Fig. 6 B パーキンソン病（症例1）；中脳黒質外側部  
メラニン含有神経細胞が消失し、ニューロピル内にメラニン顆粒が放出されて沈着している（矢印）。アストロサイトのGIF-IRはほとんど消失している。  
x50



F i g. 6 C 正常成人脊髓；頸髓

GFAP-IRは白質で見られるが、神経細胞が存在する灰白質では見られない。

x5



Fig. 6 D 筋萎縮性側索硬化症（症例7）；頸髄

前角細胞脱落は軽度であるが、灰白質にはGFAP陽性反応性アストロサイトが  
増生している。（写真上が後角、下が前角）x10



Fig. 6 E 筋萎縮性側索硬化症（症例7）；頸髄

6Dの隣接切片。前角領域のGFAP-IRは、保たれている。x10



Fig. 6F 筋萎縮性側索硬化症（症例19）；頸髄

前角細胞は、ほとんど消失しており、灰白質にはGFAP陽性反応性アストロサイトが増生している。（写真上が後角、下が前角）x10

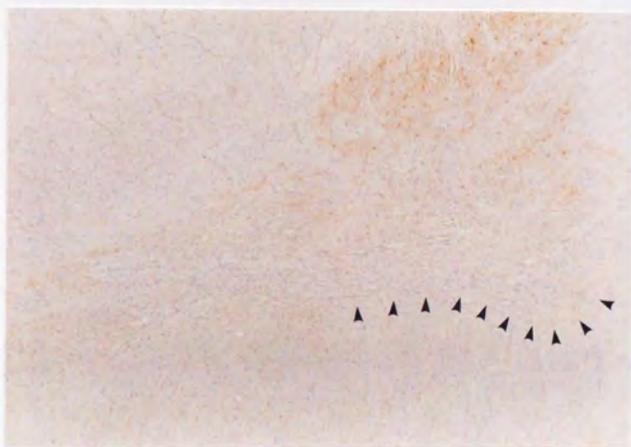
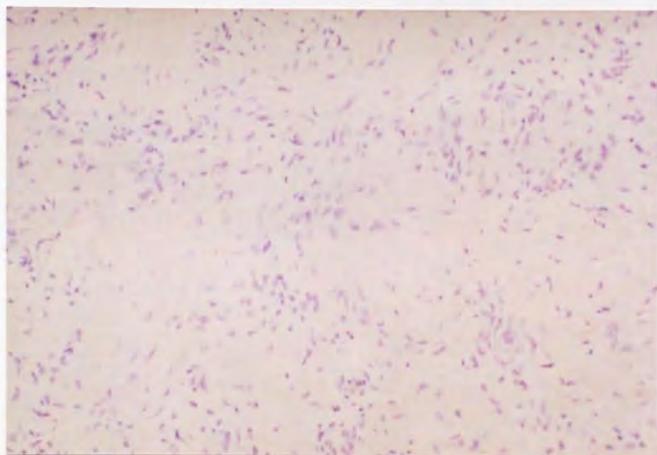
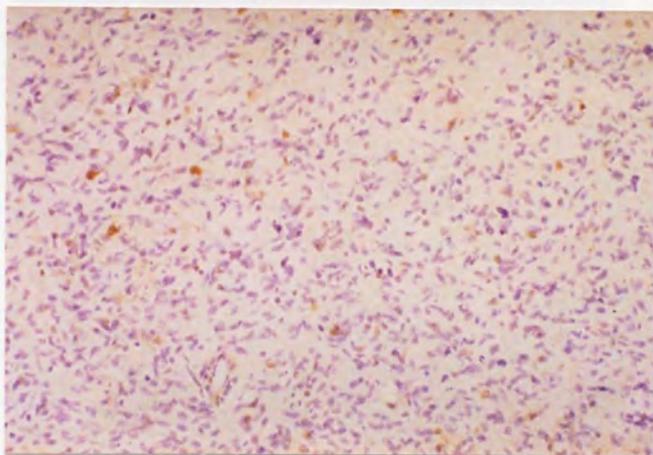


Fig. 6G 筋萎縮性側索硬化症（症例19）；頸髄

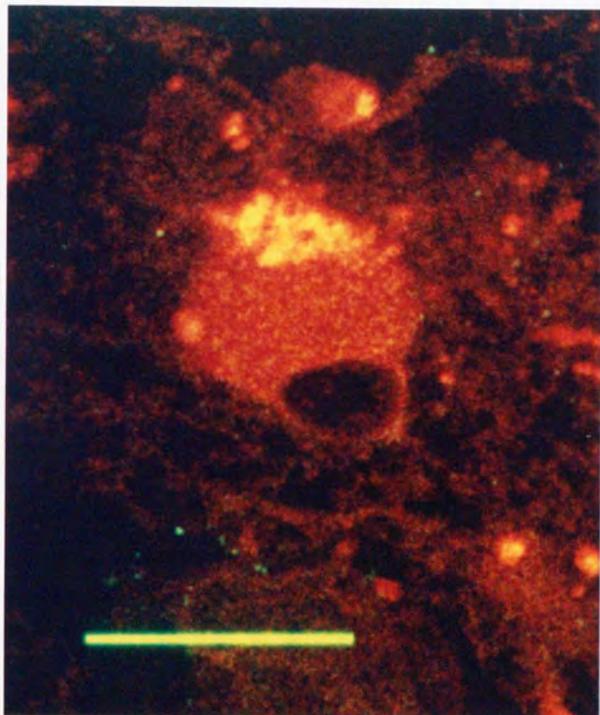
6Fの隣接切片。前角領域のGIF-IRは、高度に低下し、後角のみにGIF-IRは見られる（矢印は、前角を指す）。x10



F i g. 7 A 原発性脳腫瘍（症例1）； astrocytoma grade I  
腫瘍細胞のGIF-IRは、ほとんど見られない。x50

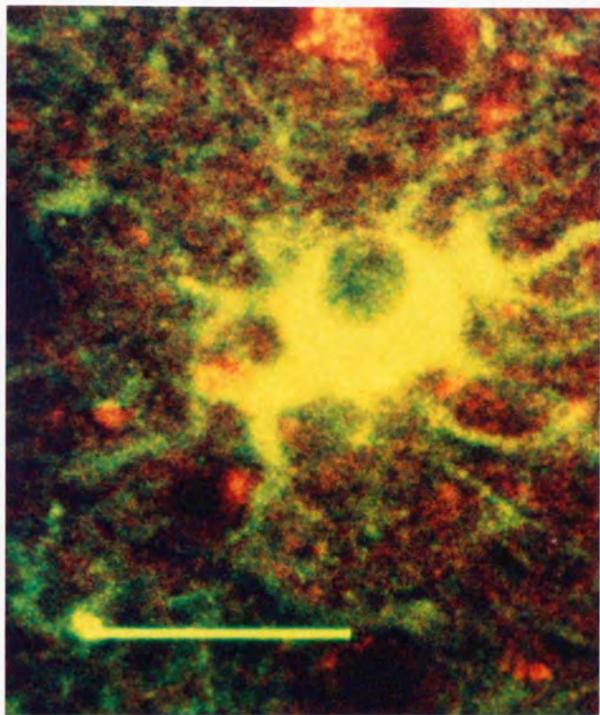


F i g. 7 B 原発性脳腫瘍（症例3）； astrocytoma grade III  
腫瘍細胞内にGIF-IRが明らかに見られる細胞が混入している。x50



F i g. 8 A 転移性脳腫瘍の蛍光免疫染色（症例1）；腫瘍内

Texas redの蛍光のみ見られる。すなわち、この細胞は、GFAP-IRのみ認められる。 ——— 25  $\mu$  m



F i g. 8 B 転移性脳腫瘍の蛍光免疫染色（症例1）；腫瘍周囲  
FITCとTexas redの両方の蛍光が見られる。すなわち、この細胞は、GIF-1Rと  
GFAP-1Rの両方を認める。 — 25  $\mu$  m

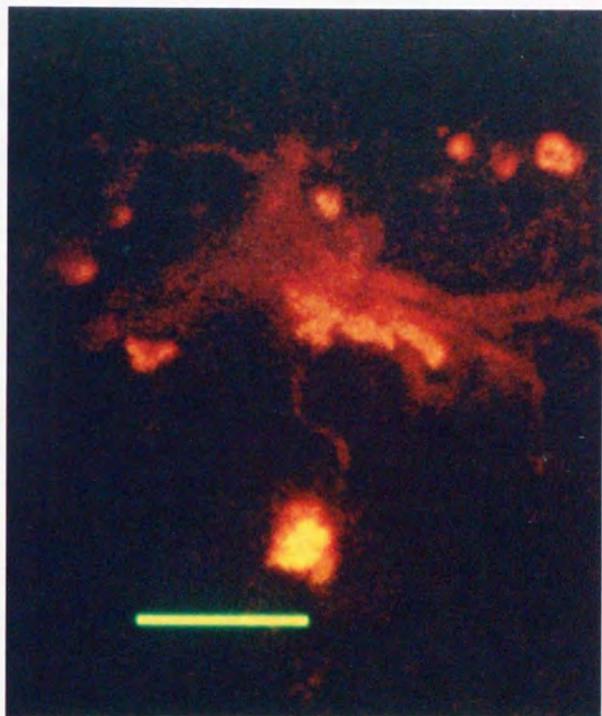


Fig. 8 C アルツハイマー型老年痴呆の蛍光免疫染色（症例12）；前頭葉  
8Aと同様に、この細胞は、GFAP-IRのみ認められる。 —— 25  $\mu$ m

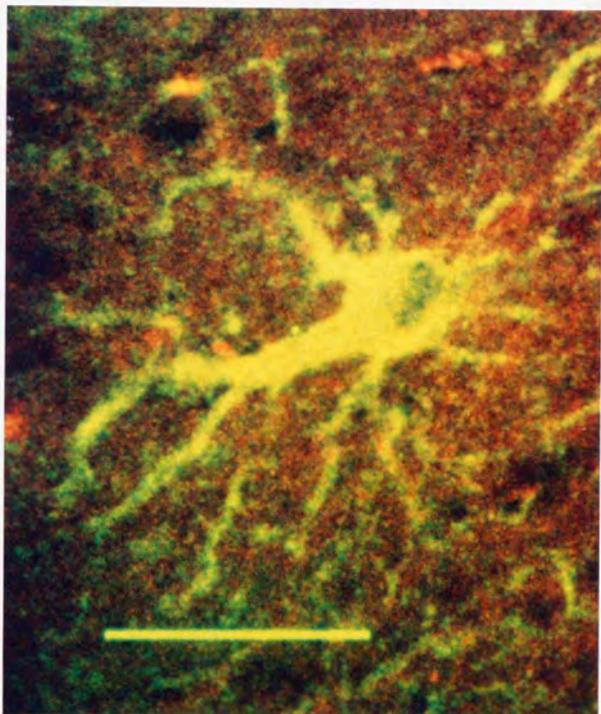


Fig. 8D アルツハイマー型老年痴呆の蛍光免疫染色（症例12）；前頭葉  
8Bと同様に、この細胞には、GIF-IRとGFAP-IRの両方を認める。

— 25  $\mu$  m

## 各種神経疾患脳の抗GIF抗体による免疫組織化学的所見

### ヘルペス脳炎

#### 症例 1 (58歳、男)

大脳皮質及び大脳髓質の両方に肥腫細胞性アストロサイトが多数出現しており、それらの細胞にGIF-IRは強く見られた。反応は、皮質と髓質で変わらなかった。

### 亜急性硬化性汎脳炎

#### 症例 1 (24歳、男)

大脳皮質全層にわたって肥腫細胞性アストロサイトが多数出現しており、それらの細胞にGIF-IRは強く見られた。髓質にも肥腫細胞性アストロサイトは出現していたが、GIF-IRは、皮質に比して弱かった。

### 髄膜炎

#### 症例 1 (58歳、男)

大脳皮質の浅層に肥腫細胞性アストロサイトが出現しており、その細胞には皮質深層及び髓質に存在している正常アストロサイトに比して、強いGIF-IRが見られた。

#### 症例 2 (78歳、男)

大脳皮質全層に肥腫細胞性アストロサイトが多数出現しており、それらの細胞に強いGIF-IRが見られた。髓質には、肥腫細胞性アストロサイトは見られず、GIF-IRも、正常成人脳の髓質と変わらなかった。

## クロイツフェルト-ヤコブ病

### 症例 1 (47歳、女)

大脳皮質及び髄質は海綿状態を呈し、反応性アストロサイトが多数出現していた。GIF-IRは、皮質と髄質の両方の反応性アストロサイトに強く見られた。

### 症例 2 (49歳、男)

大脳皮質及び髄質は海綿状態を呈し、反応性アストロサイトが多数出現していた。また、それらの細胞には、GIF-IRが強く見られた。髄質のGIF-IRは、皮質のGIF-IRに比して弱かった。

### 症例 3 (58歳、男)

症例2と同様に、大脳皮質及び髄質は海綿状態を呈し、反応性アストロサイトが多数出現していた。GIF-IRは、皮質と髄質の両方の反応性アストロサイトに強く見られた。

### 症例 4 (59歳、女)

大脳皮質は海綿状態を呈し、反応性アストロサイトが多数出現していた。それらの細胞には、GIF-IRが強く見られた。

### 症例 5 (61歳、女)

大脳皮質は海綿状態を呈し、反応性アストロサイトが多数出現していた。髄質にも反応性アストロサイトは出現していたが、GIF-IRは、皮質の反応性アストロサイトに強く見られた。

### 症例 6 (68歳、男)

大脳皮質及び髄質は海綿状態を呈し、反応性アストロサイトが多数出現していた。GIF-IRは、皮質の反応性アストロサイトで強く見られた。

症例 7 (68歳、男)

大脳皮質及び髄質は海綿状態を呈し、反応性アストロサイトが多数出現していた。GIF-IRは、皮質の反応性アストロサイトと髄質の一部の反応性アストロサイトに強く見られた。

症例 8 (70歳、女)

症例7と同様に、大脳皮質及び髄質は海綿状態を呈し、反応性アストロサイトが多数出現していた。GIF-IRは、皮質の反応性アストロサイトと髄質の一部の反応性アストロサイトに強く見られた。

症例 9 (75歳、男)

クロイツフェルト-ヤコブ病に老年変化を伴った症例で、海綿状態は、他の症例に比較すると弱く、反応性アストロサイトは多数出現していたが、胞体の膨化はほとんど見られなかった。GIF-IRは、皮質の反応性アストロサイトに強く見られた。

症例 10 (75歳、男)

大脳皮質及び髄質は海綿状態を呈し、反応性アストロサイトが多数出現していた。GIF-IRは、皮質と髄質の両方の反応性アストロサイトに強く見られた。

低酸素脳症

症例 1 (58歳、男)

大脳皮質および髄質には、肥細胞性アストロサイトが多数出現していた。GIF-IRは、皮質と髄質の両方の肥細胞性アストロサイトに強く見られた。

## 脳梗塞

### 症例 1 (53歳、男)

新鮮梗塞を起こし、梗塞巣は凝固壊死に陥っており、アストロサイトの反応は見られなかった。GIF-IRも梗塞内では見られなかった。

### 症例 2 (54歳、男)

梗塞内は、マクロファージが出現しており、組織崩壊が激しく、アストロサイトの反応も見られなかった。梗塞周囲の反応性アストロサイトには、正常組織内のアストロサイトより、GIF-IRが強く見られた。

### 症例 3 (70歳、男)

新鮮梗塞を起こし、梗塞内ではアストロサイトの反応は見られなかった。GIF-IRも梗塞内では見られなかった。

### 症例 4 (71歳、男)

新鮮梗塞を起こし、梗塞巣は凝固壊死に陥っており、梗塞内ではアストロサイトの反応は見られなかった。GIF-IRも梗塞内では見られなかった。

### 症例 5 (73歳、男)

梗塞内は、マクロファージが出現しており、組織崩壊が激しく、アストロサイトの反応も見られなかった。しかし、周囲には、反応性アストロサイトが多数出現しており、それらの細胞には、GIF-IRは強く見られた。

アルツハイマー型老年痴呆

(脳内の異常構造物の出現が、多いとき3+、中等度のとき2+、少ないとき1+、無いとき-と記載する。なお、NFTは、アルツハイマー神経原線維変化を示す。)

症例 1 (52歳、女) NFT 3+、老人斑 3+

脳の部位によらずアストロサイトの細胞体にGIF-IRは見られたが、突起のGIF-IRは低下していた。

症例 2 (54歳、男) NFT 3+、老人斑 3+

高度の脳萎縮があり、大脳にはほとんど神経細胞は残存しておらず、GIF-IRは高度に低下していた。

症例 3 (55歳、女) NFT 3+、老人斑 3+

前頭葉、海馬でGIF-IRは低下していた。後頭葉においては、GIF-IRの保たれているアストロサイトも多数存在していたが、皮質層全体では、島状にGIF-IRが低下していた。

症例 4 (64歳、男) NFT 1+、老人斑 2+

皮質層全体では、島状にGIF-IRが低下していた。

症例 5 (67歳、女) NFT 2+、老人斑 2+

脳全体として、アストロサイトの細胞体のGIF-IRは保たれていたが、突起には、網目状のGIF-IRは見られなかった。

症例 6 (68歳、女) NFT 3+、老人斑 3+

脳全体として、正常成人脳と同じくらいのGIF-IRが見られた。

症例 7 (69歳、男) NFT 1+、老人斑 1+

脳全体として、アストロサイトの細胞体のGIF-IRは保たれていたが、突起のGIF-IRはほとんど見られなかった。

症例 8 (71歳、男) NFT 1+、老人斑 1+

GIF-IRは保たれていたが、皮質層全体で見ると島状にGIF-IRが低下していた。

症例 9 (72歳、女) NFT 2+、老人斑 2+

アストロサイトの細胞体のみGIF-IRが見られたが、突起のGIF-IRは低下していた。

症例 10 (80歳、女) NFT 3+、老人斑 3+

正常に近いGIF-IRを保ったアストロサイトも見られ、それらは突起のGIF-IRも網目状を呈していた。しかし、皮質層全体で見ると島状にGIF-IRが低下していた。

症例 11 (82歳、男) NFT 1+、老人斑 2+

海馬、海馬傍回のGIF-IRは低下していたが、新皮質のGIF-IRは比較的良く保たれていた。

症例 12 (84歳、男) NFT 1+、老人斑 3+

大脳皮質の浅層のGIF-IRが非常に低下していた。GIF-IRの比較的保たれている深層も島状に低下していた。

症例 13 (88歳、女) NFT 1+、老人斑 2+

GIF-IRが正常とほとんど変わらないアストロサイトも見られたが、皮質層全体としては、島状にGIF-IRが低下していた。

症例 14 (88歳、男) NFT 1+、老人斑 2+

GIF-IRは良く保たれていたが、皮質層全体では島状にGIF-IRが低下していた。

症例 15 (88歳、男) NFT 2+、老人斑 2+

正常成人脳の GIF-IR とほとんど変わらない GIF-IR が見られた。

#### ピック病

症例 1 (42歳、男)

脳萎縮が強い部分では、皮質浅層に残存神経細胞はほとんど見られなかった。その部位には、反応性アストロサイトが多数出現しているが、GIF-IR も見られなかった。しかし、皮質深層のまだ神経細胞の残存している部位では、GIF-IR は良く保たれていた。いずれの部位も、反応性アストロサイトは、GFAP 陽性であった。脳萎縮の比較的軽い部分では、GIF-IR は正常成人脳と変わらなかった。

症例 2 (61歳、女)

脳萎縮は軽度で、皮質の GIF-IR は島状に低下していた。

症例 3 (63歳、男)

脳萎縮は強く、全体的に GIF-IR は低下していた。海馬では、ピック球も多発して皮質はほとんど反応性アストロサイトに置き変わっていたが、GIF-IR は新皮質と変わらなかった。ピック球出現部位と出現していない部位で GIF-IR に差は見られなかった。

症例 4 (63歳、男)

脳萎縮は軽度で、GIF-IR は正常成人脳とほとんど変わらなかった。海馬錐体細胞は、ピック球を有していたが、その部位の GIF-IR は他の部位と比して差は見られなかった。

症例 5 (69歳、女)

脳萎縮は軽度で、GIF-IR は皮質浅層で若干低下していたが、脳全体としては、比較的良く保たれていた。

#### 汎発性Lewy小体病

(皮質型Lewy小体と老人性変化としての老人斑及び海馬、海馬傍回に出現するアルツハイマー神経原線維変化が多いとき3+、中等度のとき2+、少ないとき1+、無いとき-、と記載する。なお、LBは、皮質型Lewy小体を示し、NFTは、アルツハイマー神経原線維変化を示す。)

症例 1 (75歳、男) LB 2+、老人斑 3+、NFT 3+

前頭葉、線条体でのGIF-IRは、正常成人脳と変わらなかった。海馬で多少のGIF-IRの低下が見られた。

症例 2 (75歳、男) LB 3+、老人斑 2+、NFT 2+

前頭葉、線条体、側頭葉でのGIF-IRは、正常成人脳と変わらなかった。

症例 3 (80歳、女) LB 2+、老人斑 3+、NFT 2+

前頭葉、線条体でのGIF-IRは、正常成人脳と変わらなかった。側頭葉では、GIF-IRは、島状に低下していた。

症例 4 (84歳、男) LB 3+、老人斑 3+、NFT 3+

前頭葉、線条体でのGIF-IRは、正常成人脳と変わらなかった。側頭葉では、GIF-IRは、島状に低下していた。

症例 5 (85歳、男) LB 3+、老人斑 2+、NFT 2+

前頭葉、線条体、側頭葉でのGIF-IRは、正常成人脳と変わらなかった。

## 多系統萎縮症（線条体黒質変性症）

### 症例 1 （58歳、男）

大脳皮質のGIF-IRは、正常成人脳と変わらなかった。被殻は高度に萎縮し、神経細胞はほとんど消失し、GIF-IRの反応も消失していた。また、被殻の部分はGFAP陽性の反応性アストロサイトに置き変わっていた。小脳においては、ブルキンエ細胞の中等度の脱落が見られ、ベルグマングリアが増生していた。GIF-IRは、分子層と小脳糸球とともに保たれていた。（増加したベルグマングリアに対応してGIF-IRの反応は、分子層で正常より強い傾向にあった。）脳幹では、GIF-IRは良く保たれており、橋核の軽度脱落している部位においても、そこに出現した反応性アストロサイトにGIF-IRが見られた。

### 症例 2 （61歳、女）

大脳皮質では、GIF-IRは正常成人脳と変わらなかったが、被殻においては、GIF-IRは見られなかった。また、被殻は、ほとんど神経細胞が消失し、GFAP陽性の反応性アストロサイトに置き変わっていた。小脳においては、ブルキンエ細胞の脱落は見られたが、ベルグマングリアの増加は、見られなかった。GIF-IRは、分子層と小脳糸球で低下していた。脳幹のGIF-IRは保たれていた。

### 症例 3 （69歳、女）

大脳皮質のGIF-IRは正常成人脳と変わらなかったが、被殻においては、ほとんどGIF-IRは見られなかった。また、被殻は、神経細胞が消失し、GFAP陽性の反応性アストロサイトに置き変わっていた。小脳においては、ブルキンエ細胞は比較的良く保たれており、ベルグマングリアの増加も見られなかった。GIF-IRは、分子層で変わらず、小脳糸球で若干低下の傾向にあった。

## ハンチントン舞蹈病

### 症例 1 (66歳、女)

大脳皮質において、GIF-IRは正常成人脳とほとんど変わらなかった。線条体の神経細胞は、被殻も尾状核もともに脱落していたが、両方を比較してみると被殻の神経細胞脱落の方が、強かった。しかし、両方とも残存している神経細胞は多数見られ、アストロサイトの細胞体と太い突起にはGIF-IRが見られた。GIF-IRは、被殻と尾状核で差は見られなかった。GFAP-IRは、被殻にも尾状核にも見られたが、特に被殻で強かった。一般に、ハンチントン舞蹈病は、線条体において、アストロサイトの反応は弱いとされているが、この症例においては、明らかに反応が弱いとは認められなかった。

## パーキンソン病(黒質)

### 症例 1 (72歳、男)

メラニン含有神経細胞の脱落は、中等度であり、比較的メラニン含有神経細胞の残存している部位で、反応性アストロサイトにGIF-IRが見られた。神経細胞の脱落が強い部位では、GIF-IRは低下していた。

### 症例 2 (73歳、男)

GIF-IRは、メラニン含有神経細胞の残存している部位では見られたが、その神経細胞が消失している部位では低下していた。

### 症例 3 (95歳、女)

メラニン含有神経細胞の脱落は高度であり、残存している神経細胞はほとんど見られなかった。GIF-IRも低下していた。

## 進行性核上性麻痺

### 症例 1 (65歳、男)

黒質において、メラニン含有神経細胞の中等度の脱落があり、GIF-1Rは、残存している神経細胞の周囲の反応性アストロサイトに見られた。赤核においては、GIF-1Rは、正常成人脳の赤核に見られる反応と変わらなかった。

### 症例 2 (73歳、女)

黒質において、メラニン含有神経細胞の脱落は高度であり、その部位の反応性アストロサイトのGIF-1Rは低下していた。赤核においては、軽度神経細胞の脱落があり、反応性アストロサイトも出現していたが、GIF-1Rは、正常成人脳の赤核に見られる反応と変わらなかった。

### 症例 3 (72歳、女)

黒質において、メラニン含有神経細胞の中等度の脱落があり、GIF-1Rは、残存している神経細胞の周囲の反応性アストロサイトに見られた。赤核においては、GIF-1Rは、正常成人脳の赤核に見られる反応より若干強い傾向にあった。

## 転移性脳腫瘍

### 症例 1 (55歳、男)

腫瘍内にも腫瘍周囲にもGFAP陽性のアストロサイトが出現しているが、腫瘍塊内の反応性アストロサイトには、GIF-IRは見られなかった。しかし、腫瘍周囲の反応性アストロサイトには、腫瘍転移のない正常組織内のアストロサイトより、強くGIF-IRが見られた。

### 症例 2 (71歳、男)

転移巣が小さく、アストロサイトの反応も、症例1より弱かった。GIF-IRの反応も腫瘍周囲の反応性アストロサイトには強く見られたが、その数は、症例1より少なかった。

## 原発性脳腫瘍

(神経上皮由来腫瘍をWHOの分類に従い、I、II、III、IVで表記する。)

### 症例 1 (4歳、女) G I

腫瘍細胞にGIF-IRは、全く見られなかった。

### 症例 2 (16歳、男) G II

GIF-IRは、症例1と同様全く見られなかった。

### 症例 3 (16歳、男) G III

腫瘍細胞でGIF-IRは、低下していた。

### 症例 4 (18歳、女) G IV

ほとんどの腫瘍細胞にGIF-IRの反応は見られなかったが、一部の細胞にGIF-IRが見られた。

症例 5 (24歳、男) G II

腫瘍細胞にGIF-IRは、全く見られなかった。

症例 6 (35歳、男) G IV

腫瘍細胞のGIF-IRは、低下していた。

症例 7 (35歳、女) G II

腫瘍塊の中には、反応性アストロサイトが多数出現し、GIF-IRの見られる細胞と見られない細胞が混在していた。

症例 8 (39歳、女) G II

腫瘍細胞にGIF-IRは見られなかったが、腫瘍細胞周囲に反応性アストロサイトが出現しており、その細胞には、GIF-IRの反応が見られた。

症例 9 (43歳、男) G IV

腫瘍細胞にGIF-IRは、全く見られなかった。

症例 10 (43歳、男) G IV

腫瘍内の血管周囲の腫瘍細胞にGIF-IRの見られる細胞が僅かに存在していたが、その他の腫瘍細胞に、GIF-IRは見られなかった。

症例 11 (57歳、女) G III

腫瘍細胞のGIF-IRは、低下していた。

症例 12 (60歳、男) G III

腫瘍細胞のGIF-IRは、低下していたが、腫瘍周囲では反応性アストロサイトが見られ、その細胞には、GIF-IRが見られた。

症例 13 (62歳、男) G II

腫瘍細胞にGIF-IRは、全く見られなかった。

症例 14 (71歳、女) G II

腫瘍細胞のGIF-IRは、一部の細胞で見られたが、ほとんどの腫瘍細胞で、GIF-IRは低下していた。

症例 15 (73歳、女) G III

腫瘍細胞のGIF-IRは、ほとんど見られなかったが、腫瘍塊の中に反応性アストロサイトが混在しており、その細胞には、GIF-IRが見られた。

対象としたヒト脳の一覧

正常成人脳

|    | 死亡時年齢 | 性別 | 病理診断                |
|----|-------|----|---------------------|
| 1  | 20    | 男  | デュシャンヌ型進行性筋ジストロフィー症 |
| 2  | 21    | 男  | 急性リンパ球性白血病          |
| 3  | 21    | 男  | (来院時心肺停止状態)         |
| 4  | 22    | 男  | 胆管癌                 |
| 5  | 24    | 女  | 福山型先天性筋ジストロフィー症     |
| 6  | 26    | 女  | 骨肉腫                 |
| 7  | 45    | 男  | 先天性表皮水疱症            |
| 8  | 47    | 男  | 肺癌                  |
| 9  | 50    | 男  | 肺癌                  |
| 10 | 51    | 男  | 肺癌                  |
| 11 | 52    | 男  | 口腔底腫瘍               |
| 12 | 55    | 男  | 肺癌                  |
| 13 | 56    | 女  | 乳癌                  |
| 14 | 56    | 男  | 肝硬変                 |
| 15 | 56    | 男  | 全身性强皮症              |
| 16 | 57    | 男  | 大腸癌                 |
| 17 | 58    | 女  | 小腸平滑筋肉腫             |
| 18 | 59    | 男  | 悪性黒色種               |
| 19 | 60    | 男  | 胆管癌                 |
| 20 | 62    | 男  | 下咽頭癌                |
| 21 | 68    | 男  | 前立腺癌                |
| 22 | 70    | 男  | 肝細胞癌                |
| 23 | 71    | 男  | 肺癌                  |
| 24 | 71    | 男  | 肺癌                  |
| 25 | 75    | 男  | 肺癌                  |
| 26 | 76    | 男  | 肺癌                  |
| 27 | 82    | 男  | 肝硬変                 |
| 28 | 85    | 男  | 肺炎                  |
| 29 | 86    | 男  | 大腸癌                 |
| 30 | 90    | 男  | 甲状腺癌                |

発達過程脳

|     | 死亡時胎齡  | 性別 |     | 死亡時出生後齡 | 性別 |
|-----|--------|----|-----|---------|----|
| 1   | 13週    | 男  | 3 4 | 0日      |    |
| 2   | 13週    | 男  | 3 5 | 1日      | 男  |
| 3   | 16週    | 男  | 3 6 | 2日      | 男  |
| 4   | 19週    | 男  | 3 7 | 2日      |    |
| 5   | 19週    |    | 3 8 | 2日      |    |
| 6   | 19週 3日 | 女  | 3 9 | 3日      | 女  |
| 7   | 21週    | 女  | 4 0 | 13日     |    |
| 8   | 21週 3日 | 男  | 4 1 | 17日     |    |
| 9   | 21週 4日 | 男  | 4 2 | 2カ月     | 男  |
| 1 0 | 22週    | 男  | 4 3 | 2カ月     | 女  |
| 1 1 | 22週    | 女  | 4 4 | 3カ月     | 男  |
| 1 2 | 22週 6日 | 男  | 4 5 | 3カ月     | 男  |
| 1 3 | 22週 6日 | 男  | 4 6 | 5カ月     |    |
| 1 4 | 22週 6日 |    | 4 7 | 1歳      | 女  |
| 1 5 | 23週    |    | 4 8 | 1歳 6カ月  |    |
| 1 6 | 23週 6日 | 男  | 4 9 | 1歳 9カ月  | 男  |
| 1 7 | 26週    | 女  | 5 0 | 2歳      | 女  |
| 1 8 | 27週    | 男  | 5 1 | 2歳      | 男  |
| 1 9 | 30週 2日 | 男  | 5 2 | 2歳 11カ月 | 男  |
| 2 0 | 30週 2日 |    | 5 3 | 7歳      | 男  |
| 2 1 | 31週    | 女  | 5 4 | 7歳      | 男  |
| 2 2 | 32週 1日 |    | 5 5 | 7歳      | 男  |
| 2 3 | 32週 6日 |    | 5 6 | 8歳      | 男  |
| 2 4 | 33週 2日 |    | 5 7 | 8歳      | 男  |
| 2 5 | 33週 6日 | 女  | 5 8 | 8歳      | 女  |
| 2 6 | 34週 6日 |    | 5 9 | 8歳 10カ月 | 女  |
| 2 7 | 36週    | 女  | 6 0 | 12歳     | 男  |
| 2 8 | 36週    | 女  | 6 1 | 13歳     | 男  |
| 2 9 | 37週 3日 |    | 6 2 | 14歳     | 男  |
| 3 0 | 38週 4日 |    | 6 3 | 14歳     | 男  |
| 3 1 | 38週 6日 |    | 6 4 | 15歳     | 男  |
| 3 2 | 39週 5日 |    | 6 5 | 15歳     | 男  |
| 3 3 | 40週    | 男  |     |         |    |

## ヘルペス脳炎

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 58歳   | 男  |

## 亜急性硬化性汎脳炎

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 24歳   | 男  |

## 髄膜炎

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 58歳   | 男  |
| 2 | 78歳   | 男  |

## クロイツフェルト-ヤコブ病

|    | 死亡時年齢 | 性別 |
|----|-------|----|
| 1  | 47歳   | 女  |
| 2  | 49歳   | 男  |
| 3  | 58歳   | 男  |
| 4  | 59歳   | 女  |
| 5  | 62歳   | 女  |
| 6  | 68歳   | 男  |
| 7  | 68歳   | 男  |
| 8  | 70歳   | 女  |
| 9  | 75歳   | 男  |
| 10 | 75歳   | 男  |

## ハンチントン舞蹈病

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 66歳   | 女  |

## 多系統萎縮症(線条体黒質変性症)

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 58歳   | 男  |
| 2 | 61歳   | 女  |
| 3 | 69歳   | 女  |

## 低酸素脳症

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 58歳   | 男  |

## 脳梗塞

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 53歳   | 男  |
| 2 | 54歳   | 男  |
| 3 | 70歳   | 男  |
| 4 | 71歳   | 男  |
| 5 | 73歳   | 男  |

## 転移性脳腫瘍

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 55歳   | 男  |
| 2 | 71歳   | 男  |

## 原発性脳腫瘍

|    | 手術時年齢 | 性別 |
|----|-------|----|
| 1  | 4歳    | 女  |
| 2  | 16歳   | 男  |
| 3  | 16歳   | 男  |
| 4  | 18歳   | 女  |
| 5  | 24歳   | 男  |
| 6  | 35歳   | 男  |
| 7  | 35歳   | 女  |
| 8  | 39歳   | 女  |
| 9  | 43歳   | 男  |
| 10 | 43歳   | 男  |
| 11 | 57歳   | 女  |
| 12 | 60歳   | 男  |
| 13 | 62歳   | 男  |
| 14 | 71歳   | 女  |
| 15 | 73歳   | 女  |

アルツハイマー型老年痴呆

|    | 死亡時年齢 | 性別 |
|----|-------|----|
| 1  | 52歳   | 女  |
| 2  | 54歳   | 男  |
| 3  | 55歳   | 女  |
| 4  | 64歳   | 男  |
| 5  | 67歳   | 女  |
| 6  | 68歳   | 女  |
| 7  | 69歳   | 男  |
| 8  | 71歳   | 男  |
| 9  | 72歳   | 女  |
| 10 | 80歳   | 女  |
| 11 | 82歳   | 男  |
| 12 | 84歳   | 男  |
| 13 | 88歳   | 女  |
| 14 | 88歳   | 男  |
| 15 | 88歳   | 男  |

ピック病

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 42歳   | 男  |
| 2 | 61歳   | 女  |
| 3 | 63歳   | 男  |
| 4 | 63歳   | 男  |
| 5 | 69歳   | 女  |

汎発性Lewy小体病

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 75歳   | 男  |
| 2 | 75歳   | 男  |
| 3 | 80歳   | 女  |
| 4 | 84歳   | 男  |
| 5 | 85歳   | 男  |

パーキンソン病

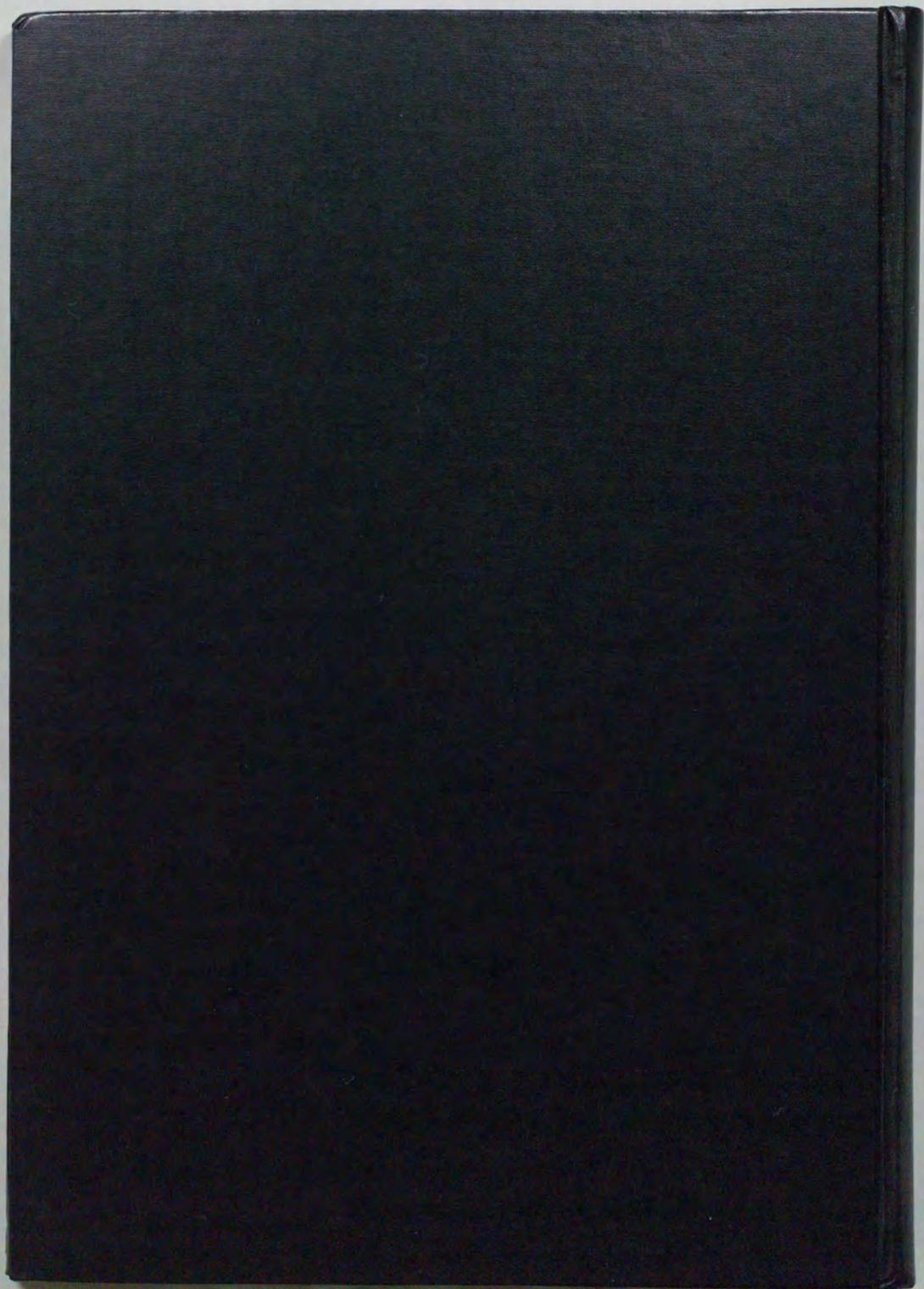
|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 72歳   | 男  |
| 2 | 73歳   | 男  |
| 3 | 95歳   | 女  |

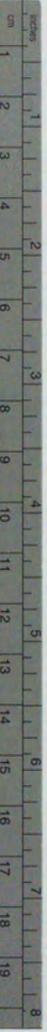
進行性核上性麻痺

|   | 死亡時年齢 | 性別 |
|---|-------|----|
| 1 | 65歳   | 男  |
| 2 | 73歳   | 女  |
| 3 | 73歳   | 女  |

筋萎縮性側索硬化症

|    | 死亡時年齢 | 性別 |
|----|-------|----|
| 1  | 33歳   | 女  |
| 2  | 48歳   | 女  |
| 3  | 52歳   | 女  |
| 4  | 53歳   | 男  |
| 5  | 55歳   | 男  |
| 6  | 55歳   | 男  |
| 7  | 55歳   | 男  |
| 8  | 55歳   | 女  |
| 9  | 58歳   | 男  |
| 10 | 60歳   | 男  |
| 11 | 60歳   | 男  |
| 12 | 61歳   | 男  |
| 13 | 62歳   | 男  |
| 14 | 63歳   | 男  |
| 15 | 63歳   | 男  |
| 16 | 68歳   | 男  |
| 17 | 69歳   | 男  |
| 18 | 70歳   | 男  |
| 19 | 72歳   | 男  |
| 20 | 72歳   | 女  |





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

