

---

## 動物の摂食と細胞殖因子様活性

### Feeding and growth factors

- 代表研究者 九州大学理学部生物学教室・  
九州大学医学系研究科分子生命科学系助手 花井 一 光  
Res. Assoc., Dept. of Biol. Fac. of Science, Kyushu Univ.  
and Dept. of Mol. Biol., Grad., School of Med. Science, Kyushu Univ.  
Kazumitsu HANAI
- 協同研究者 九州大学理学部生物学教室大学院生 坂口 雅 彦  
Grad. Stud., Dept. of Biol., Fac. of Science, Kyushu Univ.  
Masahiko SAKAGUCHI
- 九州大学医学部附属病院医員 岩橋 徳 二  
University Hospital, Fac. of Medicine, Kyushu Univ.  
Tokuji IWAHASHI

Platelet-derived growth factor (PDGF), acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF, bFGF) and related factors depress the feeding response elicited by glutathione in *Hydra*. Analyzing these effects, we can define apparent components of the response (R1-R5). These factors specifically and potently depress subsets of these components: PDGF depresses R2 with  $ED_{50}$  0.17  $\mu$ M; aFGF R4 with  $ED_{50}$  0.01  $\mu$ M; bFGF R3 and R5 with  $ED_{50}$  0.5  $\mu$ M, R2 with  $ED_{50}$  0.55  $\mu$ M. The modulation of R2 by PDGF is very specific, and can be successfully utilized to estimate PDGF levels in serum from several kinds of adult animals.

We raised monoclonal antibodies which specifically depress subsets of the response to uncover molecular mechanisms relevant to the multiple components. Six different monoclonals were successfully isolated: J245 depresses R2, R4 and R5; J24 R2 and R4; J5 and J5/1 R5; J1 R1; J13 R1 and R3. Immunocytochemical studies with these monoclonals reveal that the receptors mediating R2 and R4 are located on cnidocils of nematocytes and that receptors mediating R5 are on the apical surface of the nematocytes. Though we cannot identify cell types with regard to R1 and R3, numerous spots on the animal surface can be seen with J1 or J13.

The R2 and R4 depressing activities were markedly elevated after food intake in human serum and in cerebrospinal fluids from the third ventricle of chronically catheterized rats. These activities were closely related to PDGF and aFGF, respectively, on the basis of the hydra response, the effect of anti-PDGF IgG, and the chromatographic behavior on a heparin-Sepharose column. In spite of these elevated activities, however, the elevated mitogenic activities were not observed in these samples. Administration of highly purified aFGF into the intracerebroventricular space significantly reduced the size of food intake. Focal administration of aFGF greatly suppressed the electrophysiological activities of glucose-sensitive neurons in the lateral hypothalamic area, an important site in the regulation of food intake. These studies suggest that aFGF or closely related substances may participate in the regulation of food intake in mammalian animals.

---

### 研究目的

動物は食物を取って生きている。これはあたりまえのことであるが、その内容について栄養・味覚の観点から考えられているが、よく理解できな

い点も多い。我々の経験するところでは、食事と病気とは何かつながりがあるように思われ、これが栄養学的にすべて理解できるものかどうかははっきりしない。このような点は古来食事と体質

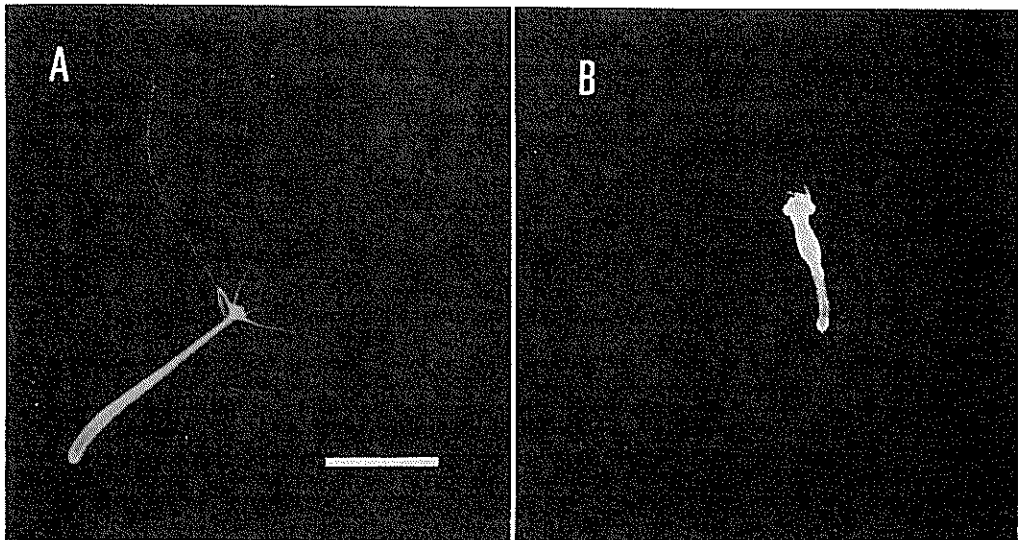


図1. ヒドラの摂食応答(触手球形形成応答). A) 休止状態のヒドラ. 触手は伸びており, あまり動かない. B) S-メチルグルタチオン(GSM)を受容して触手球形形成応答状態のヒドラ. 触手は折れ畳まれ, 頭部(口丘)のところで球状になっている. 白線は2 mm.

といったような内容のはっきりしない言葉で語られている。一方、動物が食物を取った後、体内でどのようなことが起こるのかについても我々の知識は十分とはいえない。食物は消化器官で分解され吸収される。そして肝臓で必要な処理を受け、蓄積・分配されて体各部の栄養要求を満たしている。しかし消化・吸収は遅い過程である。我々が食物を取っている時、ある程度食べれば、満腹感を感じて食べるのを止めるが、このときには消化・吸収の過程は一部が進行しているにすぎない。満腹感は胃の物理的拡張のみでは得られず様々な化学受容の過程が働いている結果と理解されている。しかしその内容は不明の点が多い。

筆者らは、神経系を備えた動物中では最下等と考えられている淡水産腔腸動物ヒドラの摂食応答を研究している。ヒドラでは外界中の還元型グルタチオンが摂食応答を誘発する。ヒドラは生きている動物性プランクトンのみを食する。ヒドラは餌に対し、まず刺胞を発射して捕捉する。この際、餌の傷口から還元型グルタチオンが漏出すれば、ヒドラはこれを食べられると判断し捕食する。生きている動物細胞中には還元型グルタチオンが高濃度に存在し、死とともにすみやかに酸化されて

しまう。ヒドラが還元型グルタチオンで摂食応答を誘発することは、生き餌しか捕食しないことをよく説明できるものと考えられている。

さて、ヤマトヒドラ (*Hydra japonica*) では、還元型グルタチオンや S-メチルグルタチオン (GSM と略す) を受容すると触手球形形成応答 (図1) を起こす。この応答の特続時間を測定することによって摂食応答を定量的に調べることができる。この方法によって我々は高等動物由来の細胞増殖因子がヒドラの摂食応答を強く抑制することを見いだした。また、高等動物 (ヒト・ネズミ) の血清や脳脊髄液中には食後一過的に細胞増殖因子類似の活性が著明に増加することも見いだした。細胞増殖因子は細胞の増殖に必須な微量因子として発見され細胞の癌化、動脈硬化などの疾病において、その発症の過程で重要な役割を果たしているものと考えられている。また、酸性型線維芽細胞増殖因子 (aFGF) は細胞増殖を必要とせず再生力も弱いとされる脳組織に大量に見いだされるが、その脳内での役割は不明である。このような因子は神経細胞の生存・維持に必要な因子 (栄養性因子) として働いているのではと想像されている。細胞増殖因子の生体内での動態については

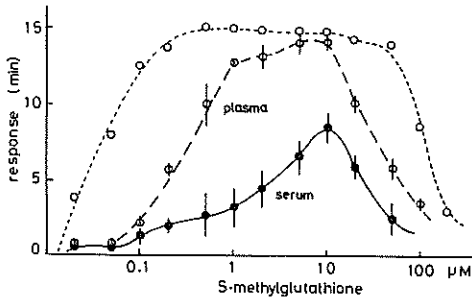


図2. 血清・血漿存在下での応答。人の血清(●), 血漿(○)存在下(いずれも1%)でGSM濃度を変えたときの応答。(○)はコントロールの応答。縦軸は応答の接続時間(分)を示し, 横軸はGSM濃度を示す。1回の応答には10匹使用し, 各点は3回の平均, 各点の棒は標準偏差を示す。

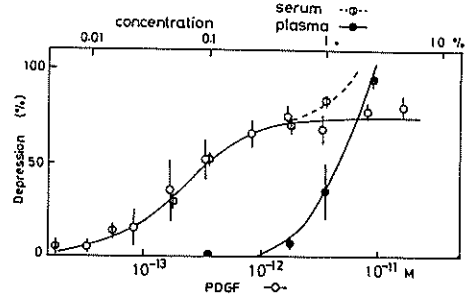


図3. 人の血清, 血漿および精製PDGFの応答抑制活性。0.2 μM GSM刺激に対して人の血清(○), 血漿(●), 精製PDGF(○)の抑制効果を示している。縦軸は応答の抑制を示す。抑制はコントロールの応答に対して試験物質存在下で減少した応答の割合を%で示す。

不明の点が多いが, 細胞の増殖・維持に対する絶体的な役割を考え合わせると, 食後一過的に類似的の活性が増加することは非常に興味深い。このことは細胞増殖因子類似物質が, 様々の本能および情動行動を制御する新しい体液性因子として機能していることを示唆し, また食事と様々の疾病, ストレス, 老化, 痴呆を考える上で重要な視点を提供する可能性を示唆している。そこで本研究ではまず研究の基盤の確立に力を注ぐべく, ヒドラのグルタチオン化学受容の細胞増殖因子による修飾について理解を深めると同時に, ネズミについてその摂食行動と細胞増殖因子との間の関連について詳しく調べてみた。ネズミに関する実験は九大・医・第一生理学教室大村裕教授および同教室員一同の全面的な協力を得た。

#### 研究成果

##### 細胞増殖因子によるヒドラのグルタチオン応答の修飾

ヒドラはGSMで刺激してやると0.02より100 μMの濃度範囲で強い応答を示す。この際外液中に低濃度の血清が存在すると, 応答は著しく減ぜられる(図2)。血清のかわりに血漿を使用すると抑制の程度は軽くなる。このことより抑制因子は血小板より放出される因子であることがわかる。血小板より放出される因子をヘパリンセファローズカラムで分画してみると, ヒドラの応答を

抑答を抑制する因子は血小板由来細胞増殖因子(PDGF)と同じ位置に溶出した。そこで高度に精製されたPDGF(Drs. E. W. Raines & R. Rossより供与 Univ. of Washington, Seattle, WA)の効果調べてみると, ED<sub>50</sub>(最大抑制効果の50%の抑制が観察される濃度)は0.17 pMであった(図3)。一方, 抑制効果が飽和しているPDGF濃度の存在下でGSMの濃度を変えて応答を調べてみると, 0.1-1 μMの狭い濃度範囲のみで応答の抑制で観察された(図4a)。

PDGF以外の血小板蛋白でも類似の活性は見出された。β-トロンボグロブリン, 血小板第IV因子, 表皮細胞増殖因子ではED<sub>50</sub>は15~20 nMで, PDGFより10<sup>5</sup>倍ほど高濃度であった。一方塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)(Dr. Andrew Bairdより供与, The Salk Institute, San Diego, CA)は0.2 μM GSMに対する応答の抑制のED<sub>50</sub>は0.55 pMであったが, 2 μM GSM応答に対してはED<sub>50</sub>は0.50 aM(5.0×10<sup>-19</sup> M)であり強力な抑制物質であった。bFGF存在下でヒドラの応答を調べると, GSMに対する濃度応答曲線はPDGFの場合とまったく異なっていた(図4b)。0.26 fM bFGF存在下ではGSM 2 μMを中心とする領域と50 μM以上の領域で応答は強く抑制される。aFGF存在下ではGSM 10 μMを中心とする領域の応答のみが抑制された(図4c)。aFGFの10 μM GSM応答に対する抑制の

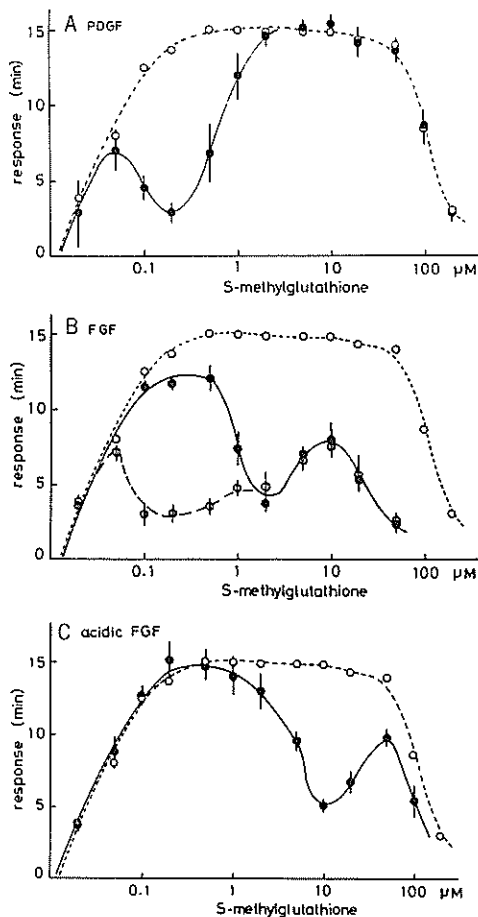


図4. 細胞増殖因子存在下での応答. A) PDGF (3.3 pM) 存在下での応答 (●). B) bFGF (○, 2.6 pM; ●, 0.26 M) 存在下での応答. C) aFGF (●, 1aM) 存在下での応答.

ED<sub>50</sub>は0.01 aMに達した。これは活性を測定する際の溶媒の溶積を考慮すると、aFGF分子は数十個程度しか存在していないことになり、ヒドラの応答を利用すればaFGFを超高感度に検出できる。図4で得られた結果よりヒドラの触手球形成応答には少なくとも見掛け上5種類の応答成分(R1-R5)があると考えられる(図5)。PDGFはR2応答、bFGFは低濃度ではR3、R5応答、aFGFはR4応答をそれぞれ特異的に抑制すると考えられる。ある濃度のグルタチオン刺激で観察される応答は、R1-R5応答の総和と考えられる。逆にある特定のグルタチオン濃度で応答を測定す

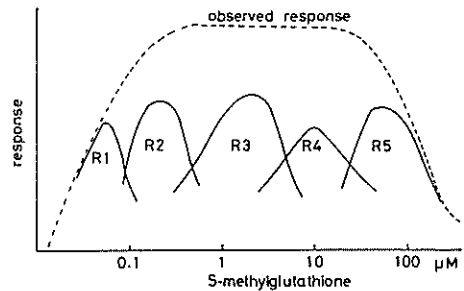


図5. グルタチオンによって誘発される応答の5成分. 各応答成分(R1-R5)はある特定のせまいグルタチオン濃度範囲のみで誘発される. 観察される応答は、これらの各成分の総和と考えられる.

れば、ある特定の応答のみを選択的に測定できる。R1応答を測定するためには0.05 μM GSM刺激、R2応答は0.2-0.3 μM、R3応答は2-3 μM、R4応答は10 μM、R5応答は50 μM GSM刺激が最適であることがわかる。末梢感覚器では、複数の感覚ユニットがあり、それぞれのユニットは限定された刺激域に対してのみ応答し、全体の感覚ユニットが統合されて始めて全刺激域に対して応答できるようになっていることが多い。これは受容域分割(range fractionation)と呼ばれる。ヒドラのグルタチオン応答は化学刺激の刺激濃度に関して見いだされる受容域分割の初めての例と思われる。

次に細胞増殖因子によるヒドラの応答の修飾の特異性はどうか。PDGFによるR2応答抑制活性について詳しく調べてみた。抗PDGF抗体(ヒツジIgG分画, Drs. E. W. Raines & R. Rossより供与)の効果を検討してみた。この抗体は精製蛋白のうちではPDGFによる抑制活性のみを拮抗した(表1)。低濃度の人の血清による抑制活性もほぼ完全に拮抗され、ヒドラのR2応答を抑制する血清中の主な因子はPDGFと考えられる。さらにDrs. E. W. Raines & R. Rossの協力で、いくつかの動物血清について、そのPDGF含量をPDGF定量法として確立されている放射受容体法とヒドラのR2応答抑制による方法とで比較してみた。後者では、異なった濃度の血清存在下でR2応答を測定し、抑制の血清濃度依存性と

表1. 血小板蛋白及び血清の抑制に対する抗 PDGF 抗体の効果.

		抑制 <sup>1)</sup>		
		-	+抗 PDGF IgG <sup>2)</sup>	+コントロール IgG <sup>2)</sup>
None	-	0.0(reference)	0.3 ± 6.3 (4)	ND <sup>3)</sup>
PDGF	33 pM	59.8 ± 6.5 <sup>4)</sup>	0.0 ± 1.5 (4) <sup>4)</sup>	64.9 ± 1.7 (5)
bFGF	2.6 pM	69.6 ± 1.8 (6)	73.9 ± 4.9 (5)	ND <sup>3)</sup>
EGF	40 nM	77.6 ± 2.0	75.4 ± 11.8 (3)	ND <sup>3)</sup>
PF4	84 nM	45.1 ± 3.2 (3)	47.7 ± 0.7 (3)	ND <sup>3)</sup>
βTG	39 nM	50.3 ± 1.3 (3)	57.9 ± 6.7 (3)	ND <sup>3)</sup>
人血清	0.1%	52.0 ± 3.3 (4) <sup>4)</sup>	5.2 ± 4.3 (4) <sup>4)</sup>	54.6 ± 6.4 (4)
	1%	83.4 ± 0.8 (4) <sup>4)</sup>	32.3 ± 5.9 (4) <sup>4)</sup>	ND <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> ヒドラは 0.1 μM GSM (血小板蛋白の場合) あるいは 0.2 μM GSM (血清の場合) で刺激された. データは平均 ± 標準偏差で示す. ( ) 内は測定回数. <sup>2)</sup> 抗PDGF IgG は 41.9 μg/ml で使用. コントロール IgG には, ヒツジ抗マウス IgM 血清 IgG 分画を, 42 μg/ml で使用. <sup>3)</sup> ND: 測定していない. <sup>4)</sup> Student's *t* テストで有意 ( $p < 0.01$ ) に異なる.

表2. 各種動物血清中の PDGF 含量—ヒドラの R2 抑制からの値と放射受容体法による値との比較

動物血清	PDGF 含量	
	R2 抑制 <sup>1)</sup>	放射受容体法 <sup>2)</sup>
牛胎児	204 ± 44 ng/ml	0.93 ± 0.20 ng/ml
人	22.3 ± 9.4	20.4 ± 3.3
牛	1.2 ± 0.2	0.65 ± 0.11
マウス	10.0 ± 3.4	11.9 ± 2.2
馬	0.40 ± 0.1	0.17 ± 0.05

<sup>1)</sup> 0.2 μM GSM 刺激に対する応答を異なる濃度の動物血清存在下で調べ, その抑制の程度により PDGF 含量を求めた (図3参照.) 値は平均 ± 標準偏差. <sup>2)</sup> R2抑制法で調べた同一の動物血清試料について, 放射受容体法で PDGF を定量した.

精製 PDGF のものと比較して PDGF 含量を推定する (図3参照). 牛胎児血清を除けば, 両者の値はよく一致した. 牛胎児血清の場合, R3 応答抑制活性 (bFGF 様活性) が非常に強く, bFGF は高濃度では R2 応答も抑制するので, これの寄与が大きいために一致しないものと考えられた. 以上の結果を考え合わせると, R2 抑制活性はほとんどの場合 PDGF に特異的に考えられる. R3 抑制活性 R4 抑制活性についてはそれぞれ bFGF, aFGF に特異的と考えられるが PDGF の場合ほど詳しく解析できなかった.

他の細胞増殖因子関連物質についても, 精製さ

れたものが入手できる場合には, R1-R5 応答をどのように修飾するかを調べてみた. その結果, 細胞増殖因子およびその関連物質はそれぞれ特異的にヒドラの R1-R5 応答を抑制することがわかった (表3). 未知の因子についても, R1-R5 の抑制を調べればそれがどのようなものであるか推測ができそうであることがわかる.

#### R1-R5 を特異的に抑制するモノクローナル抗体の開発

細胞増殖因子の効果を解析することによって見掛け上 R1-R5 の応答成分があることがわかった. これらはそれぞれ異なる受容体で媒介されているものと考えられる. このことをはっきり示すため, またヒドラのグルタチオン応答がいかなる機構で非常に鋭敏に細胞増殖因子類を検出できるのかを明らかにするためには, 分子レベルでの研究が不可欠である. その第一歩として, R1-R5 を特異的に抑制するモノクローナル抗体を開発した.

グルタチオンの光親和標識誘導体である S-(*p*-アジドフェナシル) グルタチオン (GSPAP) の存在下でヒドラを近紫外光にさらすと R2-R5 が著しく抑制される. このことより GSPAP は R2-R5 受容体と反応して不活性化させるものと考えられる. <sup>35</sup>S-GSPAP を利用して標識される蛋白を調べてみると触手の膜分画を可溶化して得られ

表3. 各細胞増殖因子及びその関連物質によるヒドラのグルタチオン応答に対する効果.

インシュリン	効果なし	(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) <sup>1)</sup>
TGF $\beta$ (トランスフォーミングファクタ $\beta$ )	効果なし	(2 ng/ml) <sup>1)</sup>
EGF (表皮細胞増殖因子)	R2, R3, R5	ED <sub>50</sub> =15 nM
$\beta$ TG ( $\beta$ トロンボグロブリン)	R1, R2, R3, R5	ED <sub>50</sub> =15 nM
PF4 (血小板第IV因子)	R1, R5	ED <sub>50</sub> =20 nM
2.5sNGF (神経細胞成長因子)	R1, R3	ED <sub>50</sub> =70 pM
PDGF (血小板由来細胞増殖因子)	R2	ED <sub>50</sub> =0.17 pM
bFGF (塩基性型線維芽細胞増殖因子)	R2	ED <sub>50</sub> =0.55 pM
	R3, R5	ED <sub>50</sub> =0.50 aM
aFGF (酸性型線維芽細胞増殖因子)	R4	ED <sub>50</sub> ~0.01 aM
TNF (ガン壊死因子)	R5	ED <sub>50</sub> ~0.01 aM
IL- $\beta$ (インターロイキン $\beta$ )	R2, R4	ED <sub>50</sub> ~0.01 aM
BSF-2/IL-6 (B 細胞分化因子)	R1, R3	ED <sub>50</sub> ~0.01 aM

<sup>1)</sup> 調べられた因子の濃度, <sup>2)</sup> 因子の入手先.  $\beta$ TG, PF4, 加藤久雄博士 (国立循環器病センター研究所); TNF, 組換え DNA 法による標品, 大日本製薬, 井上博士; IL- $\beta$ , 組換え DNA 法による標品, 大塚製薬, 菊本芳和博士; BSF-2/IL-6, 平野俊夫博士, 岸本忠三博士 (阪大細胞工学センター); PDGF, Drs. E. W. Raines and R. Ross (Univ. Washigton, Seattle, WA); aFGF, bFGF, Dr. A. Baird (The Salk Institute, San Diego, CA). これら以外のものは市販品を使用.

るガラクトース結合蛋白 (45-70 KDa) に著しい放射活性が見いだされた。体軸部分からもガラクトース結合蛋白は得られるが、こちらにはほとんど放射活性は見いださなかった。グルタチオン受容体は触手にたくさんあると考えられるので、この結果より、触手膜分画より得られるガラクトース結合蛋白が受容体の有力な候補と考えられる。なお、標識された蛋白は様々の分子量の成分を含む混合物であった。

モノクローナル抗体の作製は通常の方法に従った。雌 BALB/C マウスを触手膜分画由来のガラクトース結合蛋白で免疫した後、脾臓を摘出し、脾臓細胞とミエローマ P3U1 とをポリエチレングリコール存在下で融合しハイブリドーマを得た。ハイブリドーマの選別は抗原蛋白に対する ELISA 法による抗原抗体反応、ヒドラの全載標本での免疫蛍光抗体法による組織化学的検索によった。有用なハイブリドーマについてはクローニングを行なった。

このようにして6種類のモノクローナル抗体 J1, J13, J24, J245, J5, J5/1 を得た。これらの抗体のグルタチオン応答に対する効果を調べてみた。ハイブリドーマ培養液上清中には様々の細胞増殖

因子が含まれ、上清をそのまま加えて行動応答を測定しても、増殖因子由来の強い抑制のために、抗体の効果を調べることはできない。そこで次のようにした。最初ヒドラと20倍希釈のハイブリドーマ培養液上清と5分間保温し、応答測定緩衝液 (1 mM PIPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.2) で洗い、その後2000倍に希釈した第二抗体 (ヒツジ抗マウス IgG あるいは IgM 抗体, IgG 分画) の存在下で応答を測定する。細胞増殖因子による強い抑制作用は、ヒドラを洗ってやることによって見掛け上消失した。一方、培養液上清中の抗体の効果は第二抗体の存在下で十分検出することができた。表4はこのようにして得られた結果を示している。応答はR1を除いて、各応答の寄与がそれぞれ相対的に大きくなる刺激濃度で調べた。上述した方法で応答を測定すると、R1を調べるのに相当と考えられる0.05  $\mu\text{M}$  GSM 刺激に対して十分大きな応答を得ることができなかった。そこで、0.1  $\mu\text{M}$  GSM 刺激による応答を測定し、それと0.3  $\mu\text{M}$  GSM 刺激による応答 (R2 応答) とを比較することによって、R1に対する効果がR2に対する効果を判定した。

P3U1 培養液上清中には抗体は含まれないの

表4. ヒドラの行動応答に対するモノクローナル抗体の効果.

	応答 <sup>1), 4)</sup>				
	GSM: 0.1 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M
P3U (コントロール)	10.2 $\pm$ 0.98	10.9 $\pm$ 0.96	11.0 $\pm$ 0.90	10.5 $\pm$ 1.09	9.4 $\pm$ 1.41
16-15 <sup>2)</sup>	10.7 $\pm$ 1.02	10.5 $\pm$ 0.69	10.4 $\pm$ 1.14	10.8 $\pm$ 0.29	10.5 $\pm$ 0.50
NMS <sup>3)</sup>	10.3 $\pm$ 0.45	10.9 $\pm$ 0.73	10.8 $\pm$ 0.27	11.2 $\pm$ 0.54	10.5 $\pm$ 0.46
J245	7.5 $\pm$ 3.04	3.8 $\pm$ 0.98*	8.3 $\pm$ 0.87	3.7 $\pm$ 0.69*	3.7 $\pm$ 0.89*
J24	7.7 $\pm$ 3.09	4.2 $\pm$ 0.65*	8.3 $\pm$ 1.18	3.1 $\pm$ 0.31*	8.6 $\pm$ 0.97
J5	9.2 $\pm$ 0.49	10.0 $\pm$ 0.78	10.7 $\pm$ 0.23	9.6 $\pm$ 1.24	4.0 $\pm$ 1.59*
J1	2.9 $\pm$ 0.69*	10.8 $\pm$ 1.67	9.9 $\pm$ 2.40	12.0 $\pm$ 1.98	10.8 $\pm$ 1.51
J13	3.8 $\pm$ 2.60*	9.2 $\pm$ 1.51	3.9 $\pm$ 0.80*	9.2 $\pm$ 1.10	9.6 $\pm$ 0.61

<sup>1)</sup> 応答は触手球形成応答の接続時間(分)を平均 $\pm$ 標準偏差で示す。P3U1, 16-15, NMSは4回の測定, それ以外は3回の測定。 <sup>2)</sup> 16-15はヒドラとは無関係な抗原に対するIgM抗体を含む培養液上清。 <sup>3)</sup> NMS: 未免疫マウスの血清の200倍希釈液でIgGの各サブクラス, IgM抗体を含む。\*はStudent's *t* テストで有意( $p < 0.01$ )に異なることを示す。

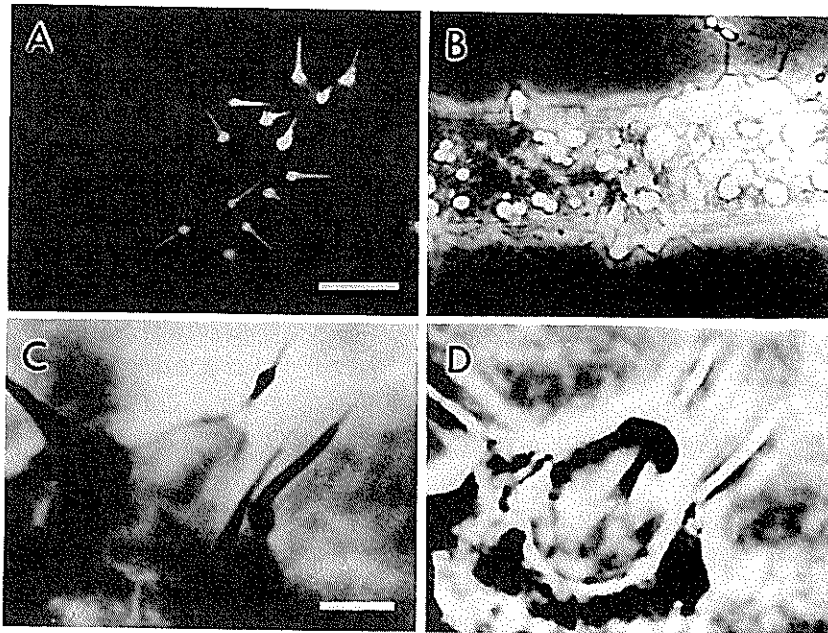


図6. 抗体 J245 による染色像.

A) ヒドラ触手全載標本での蛍光抗体法による染色像。デズモネム刺胞細胞の刺針とそれに接する細胞頂部が蛍光を発している。白線は 20  $\mu$ m。B) A と同じ視野の位相差像。C) HRP-ストレプアビジン・ビオチン法による染色像。デズモネム刺胞細胞の指針とともに、ステノーテル刺胞細胞の刺針が染色されている。白線は 5  $\mu$ m。D) C と同じ視野の位相差像。

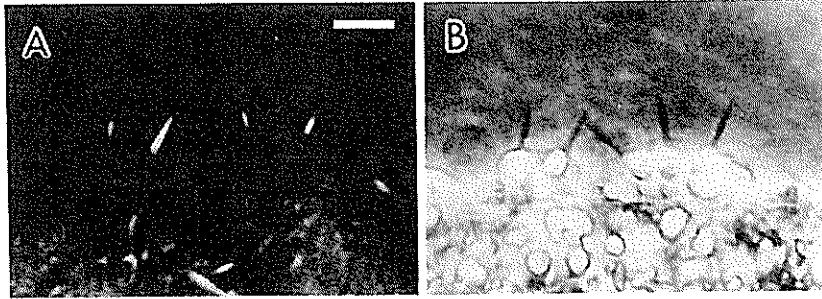


図7. 抗体 J24 による染色像. 触手の全載標本での蛍光抗体法による染色像 (A), 同一視野の位相差像 (B). デズモネム刺胞細胞の刺針のみが蛍光を発している. 白線は 10  $\mu$ m.

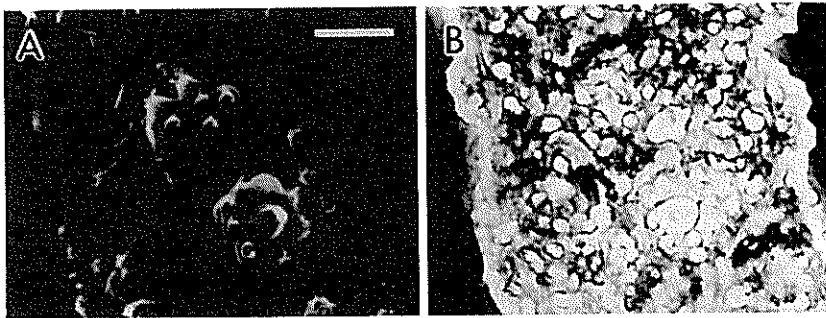


図8. 抗 J5 による染色像. 触手の全載標本での蛍光抗体法による染色像 (A), 同一視野の位相差像 (B). 刺胞細胞 (デズモネム, ステノーテル) の細胞の頂部が蛍光を発している.

で、これと前保温した場合の応答はコントロールとみなされる。ハイブリドーマ 16-15 はヒドラとは無関係な抗原に対する IgM 抗体を産生する。免疫していないマウスの血清中には、ヒドラとは無関係な IgM, IgG 抗体等を含んでいる。これらの抗体液では R1-R5 に有意な抑制は見いだされなかった。一方、ヒドラの抗原に対して得られたハイブリドーマ培養液上清では R1-R5 が有意に抑制された。ハイブリドーマ J1 では R1 を抑制し、J13 は R1, R3 を抑制、J24 は R2, R4 を抑制、J245 は R2, R4, R5 を抑制、J5, J5/1 はいずれも R5 を抑制した。

次にこれらの抗体がヒドラのどの部位に結合するのかを免疫蛍光抗体法、酵素抗体法で調べてみた。

図6に J245 による染色像 (図 6A, C) および位相差像 (図 6B, D) を示す。図 6A は触手の蛍光抗体法による像である。ここでは、デズモネム刺

胞細胞の刺針とそれに接する細胞の頂部が蛍光を発している。図 6C は酵素 (西洋ワサビペロキシダーゼ) 抗体法による染色像であるが、A より強拡大であり、デズモネム刺胞細胞とともにステノーテル刺胞細胞の刺針が染色されている。

図7に J24 による染色像 (A) と同じ視野の位相差像 (B) を示す。J24 は刺胞細胞の刺針の部分のみに結合する。図8に J5 による像を示す。J5 は刺胞細胞の頂部 (外界に面している) のみに結合した。応答の抑制の結果を考え合わせると、R2, R4 受容体は刺胞細胞の刺針のところに局在し、R5 受容体は刺胞細胞の頂部に局在しているものと考えられる。

J1, J13 による染色像を図9に示す。これらの抗体はヒドラの体表面にスポット状の染色像を示したが、これらのスポット構造がどの細胞に由来するものかは同定できなかった。J1 と J13 で同じ構造を染色しているのかも不明であった



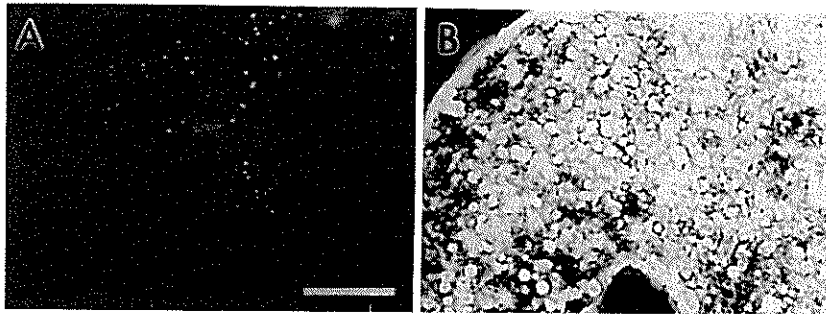


図9. 抗体 J13 による染色像. 全載標本での蛍光抗体法による染色像 (A), 同一視野の位相差像 (B). 写真は触手-口丘の連結部分を示している. 白線は 50  $\mu\text{m}$ .

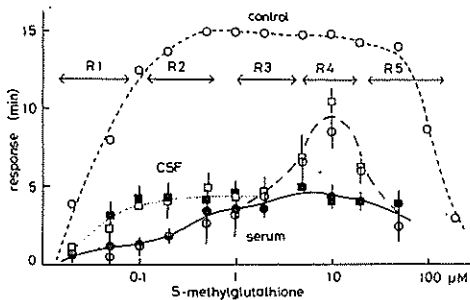


図10. 食前食後の血清 (人), 脳脊髄液 (ネズミ) 存在下でのヒドラのグルタチオン応答. 血清 (○, ●) は 0.1%, 脳脊髄液 (□, ■) は 0.001% 外液中に加えた. 食前の試料 (白ぬき記号) では R4 抑制活性が弱い (殆どない) が, 食後の試料 (黒記号) は R4 抑制活性を含む.

が, 染色像は類似していた. したがって, R1, R3 受容体はこれらスポット状の部位に局在しているものと考えられる. これらの結果より, R1-R5 はそれぞれ異なる受容体に媒介される応答であると考えられる. これまで, 刺胞細胞はグルタチオン化学受容には関与していないというのが大方の見解であったが, 本研究の結果では, 少なくとも応答の一部は刺胞細胞が受容細胞として働いていると考えられる.

摂食に伴って高等動物体液中にヒドラによって検出される因子

高等動物血清中には R1-R3, R5 を抑制する因子が存在し, R2 抑制因子は PDGF と考えられることを示した. 食事後採血した血液より調製した血清中には更に R4 を抑制する因子がある (図10). このことはネズミの第Ⅲ脳室より慢性カ

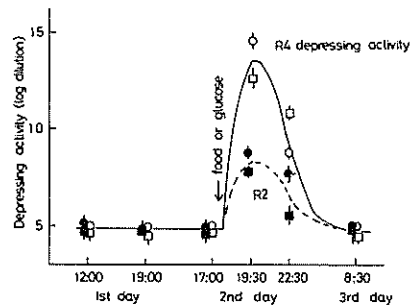


図11. 経時的に採取されたネズミ脳脊髄液中の R2, R4 抑制活性. 抑制活性は 0.25% 牛血清アルブミン溶液で希釈していった最大抑制の 50% の抑制活性が観察される希釈度 (R2 抑制活性), あるいは抑制が観察される最大希釈度 (R4 抑制活性) の対数で示している (縦軸). 横軸には採取した時核を示す. 2 日目の 17:00 までは食物を与えていない, その後食物を与える (□, ■) か, グルコース (300 mg/kg 体重) を腹腔内に投与 (○, ●) した. 白ぬき記号は R4 抑制活性を示し, 黒記号は R2 抑制性を示す. 脳脊髄液は慢性カニューレより採取した (Carlos R. Plata-Salaman 氏による). 各点は 6-7 試料の平均値と標準偏差を示す.

ニューレを介して得られた脳脊髄液試料でも同様だった. 図 11 に同一の個体より経時的に得られた脳脊髄液試料について R4 抑制活性の変化を示している. 抑制活性は試料を順次 0.25% 牛血清アルブミン液で希釈していった際, 抑制が検出される最大希釈倍数の対数で示している. 脳脊髄液中の R4 抑制活性は食後  $10^8$  倍以上増加し, 数時間後には元のレベルに戻っている. 他の抑制活性について調べてみると, R1, R3, R5 はほとんど変化しないが, R2 抑制活性はやはり変化した (図

表5. 食後増加する R2 抑制活性に対する抗 PDGF 抗体の効果.

試料	抑制 <sup>1)</sup>		
	-	+抗 PDGF 抗体	+コントロール抗体
人血清 <sup>2)</sup>	68.2±9.2 %	-2.6±5.5 <sup>4)</sup>	71.5±5.5 %
ネズミ脳脊髄液 <sup>3)</sup>	76.6±5.2	34.5±8.6 <sup>4)</sup>	72.4±2.6

1) 抑制の表示 抗体の使用法等は表1に同じ. 2) 食後30分の人血清4人分をプールして44,000倍に希釈して使用. 3) 第三脳室より食後採取した脳脊髄液を $4.0 \times 10^6$ に希釈して使用. 4) Student's t-test で有意.  $p < 0.01$

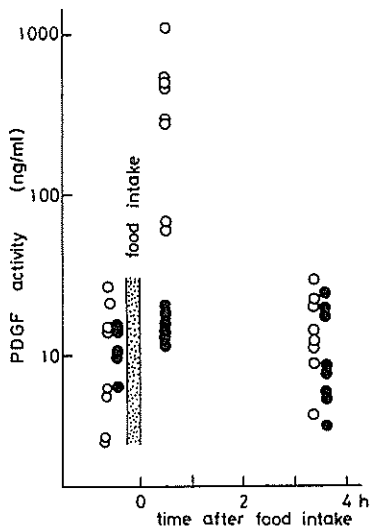


図12. 食事に伴う人血清中の PDGF 含量の変化. 朝食前に採血し, 軽く食事を与えた後30分, 3.5時間後に採血した. この血液試料より血清を調製し, その PDGF 含量をヒドラの R2 抑制活性 (○), 放射受容体法 (●) で調べた. 放射受容体法による PDGF 含量の定量は Dr. E. W. Raines & R. Ross による. 被検者は健康な男女 (21-40 歳) であらかじめ同意を得ている.

11). 同様の变化は人の血清についても見いだされたが, 同時に調製された血漿中にはこのような活性は見いだされなかった. 食後血漿中にはグルコース, グルカゴン, カルシトニン, インシュリン, ある種の有機酸などが増加することが知られているが, 抑制活性が血漿中には見いだされないことから, 抑制活性はこれらの物質に媒介されているのではないことがわかる.

さて, R2, R4 は PDGF, aFGF でそれぞれ強く

表6. 食後増加する R4 抑制活性のヘパリンーセファローズカラムでの振舞い.

溶出液		
0.6 M NaCl	1.0 M NaCl	2.0 M NaCl
<0.001%	170%	<0.001%

脳脊髄液 5  $\mu$ l をヘパリンーセファローズカラム (0.5 ml) に乗せ, 0.6 M NaCl/10 mM Tris pH 7.0, 1.0 M NaCl/10 mM Tris pH 7.0, 2.0 M NaCl/10 mM Tris pH 7.0 で溶出した. 溶出後ただちに各分画 (5~8 ml) に含まれる R4 抑制活性を調べ, 最初の脳脊髄液中の活性に対する割合を%で示した.

修飾されるが, 食後増加する抑制活性はこれら細胞増殖因子といかなる関係にあるであろうか. R2 抑制活性については抗 PDGF 抗体の効果調べてみた. 人の血清の場合食後増加する R2 抑制活性は抗 PDGF 抗体によって完全に中和される (表5). この効果は抗 PDGF 抗体以外では観察されず特異的である. ネズミ脳脊髄液の場合でも有意に抑制活性が中和される. この結果から, 食後増加する R2 抑制活性は PDGF 関連物質と考えられるが, 食前食後に得られた血液より調製した人の血清中の PDGF 含量は, 放射受容体法では変化していなかった (図12, Drs. Raines & Ross 私信). また, マウス, 人線維芽細胞に対する増殖促進能でも食前食後の血清に変化は見いだされなかった. したがって食後増加する R2 抑制活性はヒドラによってのみ検出される PDGF 関連物質と考えられる.

R4 抑制活性については, 脳脊髄液での変化が著明であるので, これについてヘパリンーセファローズカラムでの振舞いを調べてみた. aFGF は

表7. 食前食後に採取した脳脊髄液中の細胞増殖促進活性.

採取した時核 <sup>1)</sup>	2日目		
12:00	17:00	17:00	19:30
ユニット			
39.2±9.9 <sup>2)</sup>	40.6±11.0	38.2±15.3	30.4±6.2

<sup>1)</sup> 最初の日と次の日の17:00まではエサを与えずに脳脊髄液を採取。2日目の17:00の試料を採取した後、300-500 mg/kg体重のグルコースを腹腔内に投与して、19:30に脳脊髄液を採取。グルコースの投与はエサを与えるのと同じ効果をもつ(図11参照)。

<sup>2)</sup> 細胞増殖促進活性はBALB/3T3細胞での<sup>3</sup>Hチジン取り込み促進能で測定。1%牛血清の増殖促進能を1ユニットとした。各測定は5匹分の脳脊髄液についての5回の測定平均値と標準偏差を示す。西川克三博士(金沢医大・生化)によるデータ。

へパリンに高い親和性を示す。へパリンカラムに吸着したaFGFは1 M NaClで溶出し、bFGFは2 M NaClで溶出する。脳脊髄液をへパリンカラムにかけ、0.6 M NaCl, 1 M NaClで溶出した。R4抑制活性はへパリンカラムに吸着し、1 M NaClで検出され、aFGFと同じように振舞った(表6)。一方、BALB/3T3線維芽細胞に対する脳脊髄液の増殖促進能を調べてみた(金沢医大・西川克三教授に依頼)。R4抑制活性の強さから考えて、抑制活性の本態がaFGFそのものであるならば、増殖促進能は十分検出されると考えられるに

もかわらず、食前食後で脳脊髄液の増殖促進能は変化しなかった(表7)。これらの結果より、食後一過的に増加するR4抑制活性はaFGFそのものではないが、密接に関連したものであろうと考えられる。

上記結論は、aFGFを脳室内に投与してその摂食に対する効果を調べる実験からも支持された。高度に精製されたaFGFを慢性カニューレを介して第Ⅲ脳室に投与した。摂食などの本能行動、情動行動の中枢は視床下部にあり、第Ⅲ脳室はこれらの中枢に近い脳室である。aFGFを投与すると、有意に摂食量は減少した(表8)。加熱して不活性化したaFGFではこのように摂食量の減少は見いだされなかった。また、摂食の調節で中心的な役割をしていると考えられる中枢の一つである視床下部外側野に、多連電極を利用してaFGFを局所的に投与してその神経活動を記録した。するとaFGFの投与の後の中枢内のグルコース感受性ニューロンの自発放電は強く抑制される。しかししばらくすればまた自発放電は回復する。これらの結果は、食後増加するR4抑制活性はaFGFに非常に類似したものがあ、これが中枢内で摂食の制御に関与していることを示唆している。

#### 今後の課題

本研究では下等動物の摂食応答の研究を通して、その詳細な知見のみならず、高等動物の摂食

表8. aFGFの脳室内投与による摂食量の減少.

グループ <sup>1)</sup>	時間 <sup>2)</sup>	前日の摂食量 (g)	投与日の摂食量 (g)
aFGFを投与(6匹)	20:00-22:00	6.8±1.4	4.6±1.1**
106 ng/rat	20:00-08:00	23.8±3.2	18.5±1.7*
aFGFを投与(10匹)	20:00-22:00	6.1±1.3	4.0±1.0*
220 ng/rat	20:00-08:00	21.3±1.3	17.2±3.8*
熱処理aFGFを投与(10匹)	20:00-22:00	5.7±1.0	5.6±1.6
220 ng/rat	20:00-08:00	21.9±2.1	21.3±2.6

<sup>1)</sup> 第Ⅲ脳室に慢性カニューレを装着し、1週間から10日間復させたネズミを使用。

<sup>2)</sup> 20:00-22:00は最初の2時間の間の摂食量を示し、20:00-08:00は一晚の摂食量を示す。

\*  $p < 0.01$  (paired-sample student's  $t$  テスト)

\*\*  $p < 0.02$

Carlos R. Plata-Salaman 氏による(九州大学医学部第一生理)

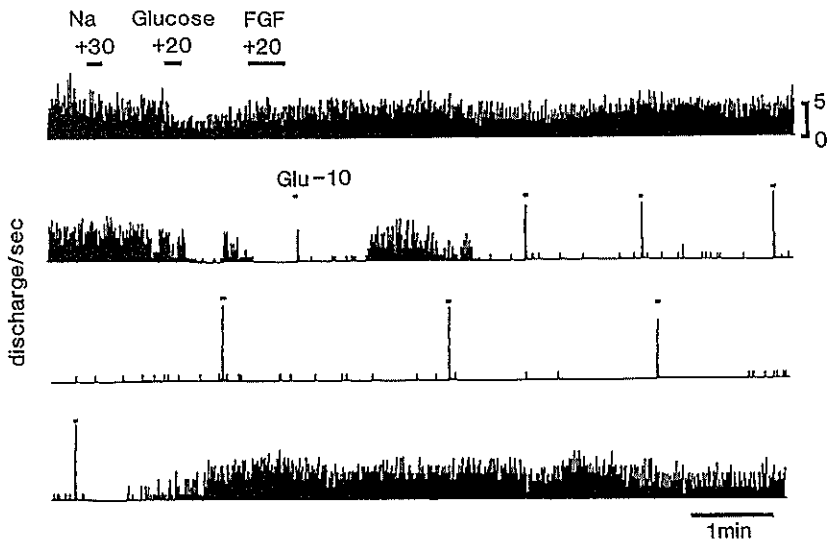


図13. 視床下部外側野のグルコース感受性ニューロンに対するaFGFの効果。

視床下部外側野の視神経細胞の活動を電気生理学的に記録している。横軸は時間の経過を示し、縦軸は自発放電の頻度を示している。各試薬は多連電極で電気泳動的に投与している（各試薬の下の横線が投与した時間を示し、数字は流した電流 (nA) を示す。Na 投与では活動は変化しないが、グルコース投与で自発放電が減少している。これはグルコース感受性ニューロンからの記録であることを示している。次に aFGF を投与すると長い潜時 (8.5 分) の後自発放電はほとんどなくなっているが 18 分後に回復している。しかしこの間もグルタミン酸 (Glu) の投与で放電が起こっている。(九大・医・第一生理 大村研究室 甲斐之尋氏による)

の調節機構に対して新知見が得られたのは大きな成果である。この際、摂食と細胞増殖因子との間の関係が示唆されたことは、細胞増殖因子が、発癌、動脈硬化、脈管形成、内皮細胞の増殖、神経細胞の栄養性因子などその広範囲な生物学的活性を考えると、食事と疾病、心身症、肥満、老化、痴呆、学習などの理解に今後新局面を切り開くことが考えられる。このような観点から考えた場合、以下の諸点は今後の課題であろう。

1. ヒドラのグルタチオン受容の分子機構の解明: 高等動物の中核組織内部で働いていると考えられる因子が、神経系を備えた中では最下等動物でもやはり摂食を調節する因子として働くことは、摂食調節機構には動物界全般で共通する部分があることを示唆している。このことは逆にヒドラのような下等動物での知見が、高等動物で働いている機構を探る上で有益であることを示唆している。一方、ヒドラは高等動物に比べればその行動の種類も少なく、餌を取っては増える(個体数

の増加も結局は構成細胞の増殖の結果とみなせる) だけでも極言できそうに単純であり、細胞増殖因子の効果も極微量を外液中に投与するだけで観察できる。幸い、現在得られているモノクローナル抗体はグルタチオン受容体に対する抗体である可能性が高い。現在、免疫抑制剤を利用してさらに特異性の高い抗体の開発も行なっており、R1-R5 のそれぞれにモノスペシフィックな抗体もほぼ開発できている。今後これらの抗体を手掛かりにして、受容機構を分子レベルで解明したいと考えている。

2. 食後脳脊髄液中に増加する R2 抑制活性、R4 抑制活性を生化学的に解明すること: R2, R4 抑制活性はそれぞれ PDGF, aFGF に類似していることが示されたが、その本態はまだ明らかでない。これをはっきりさせることは急務であり、そのゴールには我々が一番近くにいる。この活性はヒドラのみ超高感度に検出され、他のいかなる方法でも検出できないからである。様々の状況証拠

から、R4 抑制活性は aFGF の部分ペプチドではないかと考えている。できるだけ早くこれをはっきりさせ、より一般的な検出法を確立し、その神経生理学的作用の検討に着手したいと考えている。aFGF は細胞増殖を必要とせず再生力も弱いとされる脳組織に大量に見いだされるが、その脳内での役割は不明である。したがって aFGF の部分ペプチドが本能行動や情動行動を調節する体液性因子として働くというのは魅力的な仮説である。このペプチドの活性調節機構（活性発現、不活性化）は複雑なものが想像され、その各段階での異状が様々な病態につながる事が考えられるからである。

3. 下等動物での内因性細胞増殖因子：ヒドラでは摂食の調節に細胞増殖因子が直接に関与しているのはありそうなことである。ヒドラでは古くより、摂食後数時間後に分裂中の細胞数が顕著に増加することが知られている。このことから摂食に伴って細胞増殖因子が放出されていることが示唆される。また予備的な実験によると、ヒドラを体軸のところで切断すると BALB/3T3 細胞で検出される細胞増殖促進活性が放出される。この活性は摂食直後ではかなり増加するという結果も得ている。これらの事実より、摂食に伴って細胞増殖因子が放出され、それが摂食の調節にも関与していると考えられる。本研究によれば、これに類似した機構が高等動物の中枢でも働いているわけであるから、下等動物の細胞増殖因子がどのようなものであるかは興味あるところである。このような知見は、細胞増殖因子の生物学を考える上で重要であり、動物を理解する上で新しい視点を提供すると期待される。

4. 細胞増殖因子様活性の活性調節機構：細胞増殖因子は多く auto crine, または paracrine に分泌される。一般に体液中には多量の結合蛋白（不活性化蛋白）があり、その活性はきわめて短時間のみ局所的に作用する。例えばサルの血液中に多量の PDGF を注入しても、5分以内にその活性は循環系から消失してしまう。血清中のみ、R2, R4 抑制活性が見いだされるが、これらの活性調節機構は複雑であることを示唆している。こ

れらはやはり血小板由来のものと考えられるが、血小板内の蛋白が食後すみやかに増加することはとても理解できない。これは血漿中にこれらの活性発現を制御する重要な因子があると考えられるであろう。したがって、食後血清中に増加する細胞増殖因子様活性の活性発現の機構は複雑なものが予想される。そしてこの機構の解明は食事と病態を考える上で重要な鍵を提供することが期待される。

今後老年人口が増加する一方で社会の生産性も高めなければならないという要求のもとでは、これまでの治癒する医療から予防する医療にも力を注ぎ、あるいはもう一歩すすめて人がその能力を最大限発揮しつつ健康に暮せる社会を作り出してゆかねばならない。食事に関する事柄の検討はこのための重要な柱の一つと考えられる。本研究の今後の課題として、この点を科学的に検討できる新しい視点を確立することが最重要と考えられる。

#### 謝 辞

本研究を執行するにあたり日産科学振興財団よりの援助に感謝します。また九州大学医学部第一生理、大村裕教授および同研究室一同には実験に協力していただきましたことを感謝します。特に Carlos R. Plata-Salaman 氏には小生とともに苦勞していただき感謝します。また次の方々に貴重な精製試料を供与していただいたり、一部の実験をしていただきましたので感謝します； Drs. E. W. Raines and R. Ross (Dept. Pathology, Univ. of Washington, Seattle, WA). Dr. A. Baird (The Salk Institute, San Diego, CA), 加藤久雄博士（国立循環器病センター研究所）、西川克三博士（金沢医大・生化学）、菊本芳和博士（大塚製薬）、井上了博士（大日本製薬）、平野俊夫博士・岸本忠三博士（阪大・細胞工学センター）。また著者らを終始励まし、有益な議論をされました森田弘道教授に感謝します。

#### 文 献

Hanai, K. 1981: A new quantitative analysis of the feeding response in *Hydra japonica*: stimulatory effects of amino-acids in addition to reduced

- glutathione. *J. Comp. Physiol.*, 144: 503-508.
- Hanai, K. and M. Kitajima 1983: The effects of lectins on the feeding response in *Hydra japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76A: 283-287.
- Kitajima, M. and K. Hanai 1983: Two different components of the feeding response elicited by trypsin in *Hydra japonica*. *J. Comp. Physiol.*, 150: 521-527.
- Hanai, K. and M. Kitajima 1984: Two surface amine receptors modulating the feeding response of *Hydra japonica*: the depressing action of dopamine and related amines. *Chem. Sens.*, 9: 355-367.
- Hanai, K. and M. Kitajima 1986: *In vivo* photoaffinity labelling of glutathione receptors mediating the tentacle ball formation, a response associated with the feeding of Hydra. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83A: 313-316.
- Hanai, K., M. Sakaguchi, S. Matsuhashi, K. Hori and H. Morita 1987: Monoclonal antibodies to multiple glutathione receptors mediating the feeding response of Hydra. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 510, 335-337.
- Hanai, K., H. Katou, S. Matsuhashi, H. Morita, E. W. Raines and R. Ross 1987: Platelet proteins, including platelet-derived growth factor, specifically depress a subset of the multiple components of the response elicited by glutathione in Hydra. *J. Cell Biol.*, 104 (6): 1675-1681.
- Sakaguchi, M., K. Hanai, S. Matsuhashi, K. Hori and H. Morita: Monoclonal antibodies which depress a behavioral response elicited by glutathione and immunocytochemical localization of their antigens in Hydra. manuscript in preparation.
- Hanai, K., C. R. Plata-Salaman, Y. Oomura, Y. Kai, K. Nishikawa and H. Morita: A substance related to acidic fibroblast growth factor may participate in the regulation of food intake in higher animals. manuscript in preparation.