

黄連解毒湯による PC12 細胞の神経様突起形成作用

藤田 興, 池亀 守, 坂本 秀生, 葛谷 博磁*

藤田保健衛生大学, 総合医科学研究所, 分子生物学研究部門

Neurite-like outgrowth by Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang)

Ko FUJITA, Mamoru Ikegame, Hideo Sakamoto and Hiroshi Kuzuya*

Division of Molecular Biology, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University

(Received April 2, 1992. Accepted July 10, 1992.)

Abstract

Neurite-like outgrowth of PC12 cells by treatment of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) was first demonstrated, and NGF in PC12 cells treated with Oren-gedoku-to was investigated immunochemically and immunocytochemically; NGF content increased as compared per unit of cells and the cells were positively stained by anti-NGF monoclonal antibody. The concentration of NGF in the conditioned medium of Oren-gedoku-to-treated cells did not increase to as high a level at which PC12 cells induce neurite outgrowth, and the addition of anti-NGF antiserum did not block neurite-like outgrowth produced by the Kampo medicines. Accordingly, it was suggested that the neurite-like outgrowth by Oren-gedoku-to was associated with the induction of NGF or NGF-like substances in PC12 cells. However, mechanisms by which NGF or NGF-like substances induce neurite-like outgrowth was different from that by which NGF exogenously added into the culture medium does.

Key words Nerve growth factor, Neurite outgrowth, Oren-gedoku-to, PC12 cell.

Abbreviations DMEM, Dulbeccos' modified eagle medium; FITC, Fluorescein isothiocyanate; IgG, Immunoglobulin G; NGF, Nerve growth factor; PBS, Phosphate-buffered saline; PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride; Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang), 黄連解毒湯; Toki-shakuyaku-san (Dang-Gui-Shao-Yao-San), 当帰芍薬散.

緒 言

向神経作用薬としての漢方薬は多数知られており, その作用機構を, 神経伝達物質との関係から解明しようとする研究が行われている。当帰芍薬散によるラット脳内ニコチン性アセチルコリン受容体とカテコールアミンの増加¹⁾, 黄連解毒湯による自然発症高血圧ラットの血中エピネフリンの低下²⁾, 釣藤散によるセロトニン 1A 受容体の阻害, およびセロトニン 2 受容体の促進³⁾, 柴胡桂枝湯加芍薬による細胞内カルシウム分布異常の正常化作用⁴⁾ 等が報告されている。著者らは, 高血圧症に有効な漢方薬の作用

機構を, カテコールアミン分泌の面から研究する目的で, ラット褐色細胞腫由来のクローン化細胞 (PC12 細胞) を用いて, 研究を行っていた。その過程で黄連解毒湯が, 神経様突起形成作用を有する事を見いだした。PC12 細胞は, 神経成長因子 (Nerve growth factor, NGF) により神経突起を形成する事が示されている⁵⁾。

そこで, 黄連解毒湯による神経様突起形成作用への NGF の関与とその機構について検討し, あわせて黄連解毒湯と構成が類似している漢方薬, 主な構成生薬のエキスおよびそれらの成分についても同様の検討を行った。

* 〒470-11 愛知県豊明市杏掛町田楽ヶ窪1-98
1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake,
Aichi 470-11, Japan

Journal of Medical and Pharmaceutical Society for
WAKAN-YAKU 9, 118-125, 1992

材料および方法

(1) 材料：黄連解毒湯、温清飲、三黄瀉心湯、黄連湯、黄連エキス、黄柏エキス、黄芩エキス、山梔子エキス、当帰芍薬散は、いずれもツムラの製剤（賦形剤を含まないもの）を使用した。コブチシンおよびベルベリンは和光純薬工業より購入した。PC12 細胞 (RCB009) は、理研ジーンバンクより入手した。

(2) PC12 細胞の培養：高グルコース Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco 430-2100 EA) にウシ胎児血清およびウマ血清をそれぞれ 7.5 % および 5.0 % になるように添加した。抗生物質は、ストレプトマイシンおよびペニシリンをそれぞれ最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 units/ml となる様に添加し、CO₂ 濃度 5 %, 飽和水蒸気中で培養した。一般的には 1 週間ではば一面に増殖するような密度に継代し、途中 1 回以上培養液を交換した。

(3) 試料の調製および添加：漢方製剤および生薬エキスについては、0.1 g に蒸留水 10 ml (10 mg/ml) を加え、約 75°C の温浴中で 6 時間振とうした。不溶物を遠心分離により除去し、その上清を、0.22 μm の限外濾過膜により濾過滅菌した。このようにして調製した試料を 10 mg/ml 溶液と表し、一般的には 2 日毎に、培養液の交換とともに新しく添加した。コブチシンおよびベルベリンは、DMEM に 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に溶解し、同様に濾過滅菌した。

(4) NGF の定量：培養液上清中の NGF を定量する際には、0.1 M Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を終濃度 0.5 mM になるように培養液上清中に加え、測定時まで -80°C に保存した。細胞内の NGF を定量する際には、生理的食塩水 (Phosphate-buffered saline, PBS) で 3 回洗浄後、PBS を加えて細胞を超音波破壊し、それに 0.1 M PMSF を終濃度 0.5 mM になるように加え、測定時まで -80°C に保存した。NGF の定量は、Korsching および Thoenen の方法⁶⁾ により行った。すなわち小ポリスチレンチューブに、アフィニティ精製ウサギ抗 NGF 抗体を吸着固定した径 1 mm のガラスビーズを入れ、これに試料 25 μl , 反応緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.2 M NaCl, 0.05 % NaN₃, 0.1 % Triton X-100, 1 % ウシ血清アルブミン, 1 % ゲラチン) 25 μl およびプロテアーゼ阻害剤混合液 (20 mM benzamidine hydrochloride, 40 mM EDTA, 40 kallikrein units/ml aprotinin, 2 mM PMSF) 5 μl を加え、室温で 20 時間反応させた。別に標準とし

て、血清を含む培養液に溶解した既知量の NGF を含む標準液 50 μl をとり同様に処理した。盲検用対照としては、正常ウサギ免疫グロブリン G (Immunoglobulin G, IgG) IgG をガラスビーズに吸着固定したものを使用した。上記の方法で処理したガラスビーズを洗浄緩衝液 200 μl で 3 回洗浄後、10 % ラット血清を含む反応緩衝液に溶解した抗 NGF 抗体-ガラクトシターゼ複合体 (Korsching および Thoenen の方法⁶⁾ により調製した) 50 μl を加え、37°C, 2 時間反応させた。その後洗浄緩衝液 200 μl で 2 回洗浄、さらに 1 mM MgCl₂ を含む pH 7.3 の 0.1 M リン酸緩衝液 150 μl で 1 回洗浄し、50 μl の基質 (200 μM Methylumbelliferyl-galactoside/0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.3/1 mM MgCl₂) を入れた小ポリスチレンチューブにガラスビーズを移しかえて、室温で 20 時間、暗所で反応させた。そこへ 650 μl の pH 10.3, 0.15 M グリシン (水酸化ナトリウムで pH 調整) を加えることにより反応を停止後、励起波長 364 nm で 448 nm の蛍光強度を測定した。

(5) NGF の免疫蛍光染色：PC12 細胞を、低速 (約 100 × g) で 10 分間遠心分離して採取後、直ちに O. C. T. Compound (Tissue Tek, Miles) 中に凍結し、4-6 μm に薄切した。薄切後、切片をドライヤーで 30 分以上乾燥させ、Zamboni 液にて 4°C で 1 時間固定した。それを冷 PBS で 5 分間、3 回洗浄後、アフィニティ精製ウサギ抗マウス NGF 抗体と 37°C で 1 時間反応させた。その後冷 PBS で、5 分間、3 回洗浄し、抗ウサギ IgG-FITC を 37°C で 1 時間反応させ、さらに冷 PBS で 5 分間 3 回洗浄後に 50 % 無蛍光グリセリン/PBS で封入し切片の蛍光染色を観察した。抗体の中和は、いずれも 1 mg/ml 抗体と NGF (β) を 2:1 の割合に混和し、37°C で 60 分間反応させて行った。

(6) その他：NGF (β) はオスマウス顎下腺から、Bocchini らの方法⁷⁾ により分離し、さらに PBS で平衡化した TSKgel-G3000SW (東ソー) によりゲル濾過した。抗血清の作製は、NGF 2 mg (1 ml 中) に等量のフロイントの完全アジュバントを懸濁化したものを、ペントバルビタール麻酔下の約 2.5 kg のウサギ背側の皮下に注射しさらに、20 日後に不完全アジュバントと懸濁した NGF 2 mg を、その 1 週間後に同量を皮下注射した。最終免疫後 1 週間目から採血し、抗体の産生を調べた。抗体は、アフィニティカラムにより精製した。NGF の単クローン抗体は、NGF を Balb/c マウスに免疫し、抗体産生後 NS-1 ミエローマ細胞と融合させ、クローン化した。

タンパク質の定量は、細胞を超音波処理後の遠心沈澱沈査を、0.1 N 水酸化ナトリウムに溶解し、ウシ血清アルブミンを標準として、Lowry らの方法⁸⁾により測定した。

結 果

1. 神経様突起の形成

NGF (Fig. 1, B, 50 ng/ml), 当帰芍薬散 (Fig. 1,

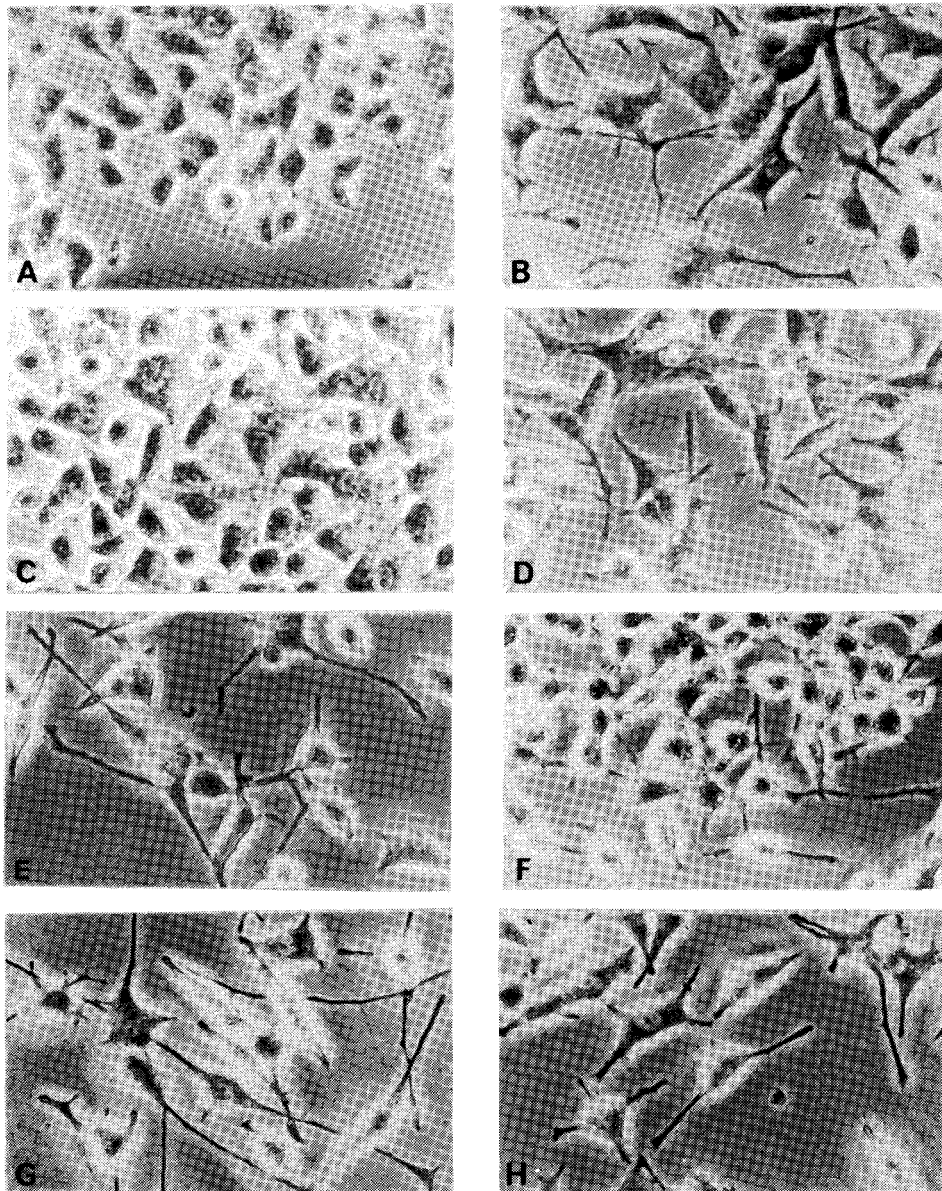


Fig. 1 Neurite-like outgrowth of PC12 cells induced by NGF, Kampo medicines, or their components. Cells were treated according to the indicated method described in the text. A, Control; B, NGF; C, Toki-shakuyaku-san; D, Oren-gedoku-to; E, Oren-extract; F, Obaku-extract; G, Coptisine; H, Berberine.

C, 培養液 1 ml 当り 10 mg/ml 溶液 20 μ l, 製剤として 200 μ g を作用させた。以下重量で示す), 黄連解毒湯 (Fig. 1, D, 200 μ g/ml), 黄連エキス (Fig. 1, E, 50 μ g/ml), 黄柏エキス (Fig. 1, F, 200 μ g/ml), コプチシン (Fig. 1, G, 10 μ g/ml), およびベルベリン (Fig. 1, H, 10 μ g/ml) を作用させた結果を示す。Fig. 1, A は, 何も作用させない PC12 細胞 (対照) である。

NGF を作用させると, 6 日目において明かな神経突起の形成が認められた。黄連解毒湯添加では, 6 日目においてわずかに変形が認められ 14 日目では, 明かな神経様突起が認められた。黄連解毒湯の構成生薬である黄連エキスおよび黄柏エキスでは, 作用後 6 日目でも明らかに形成が認められ, 黄連の成分であるコプチシン, 黄連および黄柏の成分であるベルベリンでは, 作用後 6 日目でより明瞭に認められた。しかし, 同じ様に向神経作用のある当帰芍薬散では, 神経様突起形成作用は認められなかった。

これらの神経様突起形成作用は, 黄連解毒湯, 黄柏エキスでは 20 μ g/ml の濃度で作用が認められ, 濃度依存的にその作用が強くなり, 400 μ g/ml の濃度では死細胞と思われる浮遊細胞が多数認められるようになる。黄連エキスでは 5 μ g/ml で作用が現れ, 濃度依存的に作用が強くなり 100 μ g/ml で浮遊細胞が認められるようになる。コプチシンおよびベルベリンは溶解度が小さいので直接 DMEM に溶解した。前者は 20 μ g/ml, 後者では 10 μ g/ml が溶解する限度であった。この両者は, 5 μ g/ml では神経様突起形成作用は僅かに認められる程度で, 10



Fig. 2 Reversibility of neurite-like outgrowth by Oren-extract. Four days after deprivation of Oren-extract from the culture medium after neurite-like outgrowth by Oren-extract (6-day treatment at a concentration of 200 μ g/ml).

μ g/ml が明らかに作用を発揮する最低濃度と思われる。

黄連および黄柏のいずれか, あるいはその両者を含む漢方製剤は程度の差はあるが, いずれも神経様突起形成作用が認められた。他方, 黄連解毒湯の前記以外の構成生薬である黄芩エキス, 山梔子エキス (いずれも 200 μ g/ml の濃度) および黄連の前記以外の成分であるフェルラ酸, クロロゲン酸は 50 μ g/ml の濃度でも, 神経様突起形成作用を示さなかった。

つぎに, これらの神経突起形成作用の可逆性について検討した。黄連エキス (200 μ g/ml) を作用させてから 7 日目に, 黄連エキスを含まない培養液に交換し, さらに 4 日間培養すると神経様突起は退行

Table I NGF content in PC12 cells treated for 6 days.

Treatment	Cell No. $\times 10^5/\text{cm}^2$	NGF/MEDIUM		NGF/CELLS	
		NGF/ml pg/ml	NGF/Cells pg/ 10^5	NGF pg	NGF/Cells pg/ $\times 10^5$
Control	1.51	18	3.3	7.4	0.19
NGF	1.60	4000	701.8	180	4.51
Oren-gedoku-to	1.18	22	5.2	8.0	0.27
Toki-shakuyaku-san (Dang-Gui-Shao-Yao-San)	1.62	15	2.6	4.4	0.11
Coptisine	0.488	16	9.2	11.9	0.98
Berberine	0.480	15	8.8	12.7	1.06
Ferulic acid	1.40	15	3.0	6.2	0.34
Chlorogenic acid	1.57	14	2.5	5.6	0.14

Values are mean from three 25-cm² flasks (Medium, 7 ml). NGF content and cell numbers were determined three times for each flask. The content of NGF in medium shows values in the conditioned medium cultured from 4th to 6th day.

し、細胞は増殖した (Fig. 2)。この可逆性は、神経様突起形成作用を有する前記のすべての薬物について認められた。

2. NGF の定量

黄連解毒湯、当帰芍薬散 (以上 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、コプチシン、ベルベリン、フェルラ酸、クロロゲン酸

(以上 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、および NGF (50 ng/ml) を作用させた場合の、培養液および細胞中の NGF 量を Table 1 に示す。試料作用後の細胞数に差があるために、濃度を細胞数当りに換算したところ黄連解毒湯では培養液中、細胞中いずれについても僅かに、またベルベリン、コプチシンでは培養液中で 2 倍以

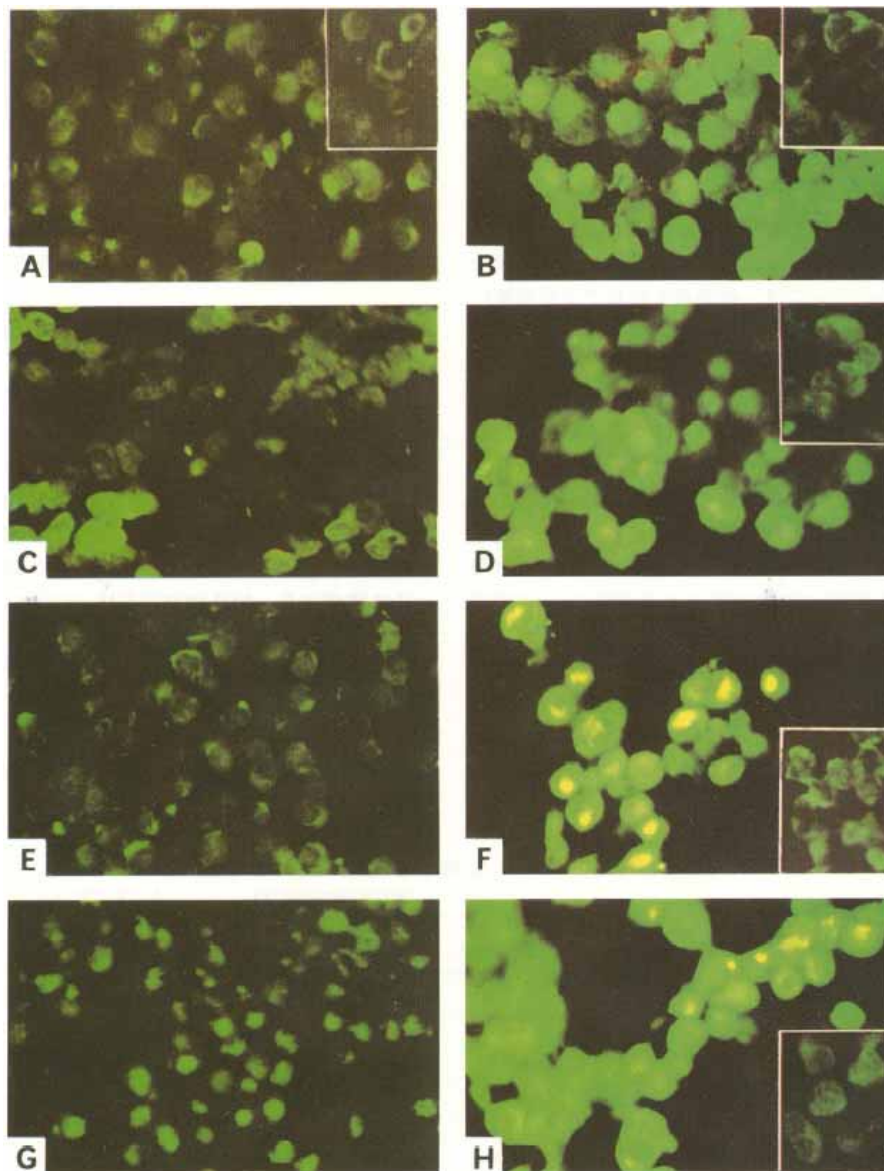


Fig. 3 NGF-like immunoreactivity in PC12 cells treated with NGF, Kampo medicines, or their components. Indirect immunofluorescent staining was carried out, and cells were treated according to the method described in the text. A, Control; B, NGF; C, Toki-shakuyaku-san; D, Oren-gedoku-to; E, Sanshishi (山梔子), *Gardeniae Fructus*, *Gardenia jasminoides* ELLIS; F, Oren-extract; G, Ferulic acid; H, Coptisine.

上に、細胞中では約5倍の NGF 量の増加を認め、当帰芍薬散、クロロゲン酸では増加しなかった。フェルラ酸では培養液中では増加しなかったが、細胞中では僅かに増加した。

3. NGF の間接免疫蛍光染色

黄連解毒湯 (Fig. 3, D), 当帰芍薬散 (Fig. 3, C), 黄連エキス (Fig. 3, F), 山梔子エキス (Fig. 3, E) (以上 $200 \mu\text{g/ml}$), コブチシン (Fig. 3, H) フェルラ酸 (Fig. 3, G) (以上 $10 \mu\text{g/ml}$), および NGF (Fig. 3, B, 50 ng/ml) を作用させた場合の細胞を免疫蛍光染色した結果を示す。神経様突起形成作用を有する薬物を作用させた細胞では、そうでない細胞に比べて明らかに細胞全体が強く染色された。染色像の特徴としては黄連解毒湯, 黄連エキス, コブチシンを作用させた細胞では、核の一部あるいは核周囲部に強く染色される細胞が多数認められ、NGF を作用させた細胞の染色像とは、幾分異なっていた。神経様突起形成作用のない薬物の内、当帰芍薬散, 山梔子エキスの場合は細胞全体に弱く染色され、何も作用させない対照 (Fig. 3,

A) の染色像とよく似ていた。しかしフェルラ酸の場合は、核らしき部分が弱く染色されたのみで、細胞質に染色は認められなかった。尚、NGF による中和抗体ではいずれも染色されなかった。

4. 神経様突起形成に及ぼす抗 NGF 抗体の影響

これらの神経様突起形成が抗 NGF 抗体により阻止されるか否かを調べた。Fig. 4, A および Fig. 4, C は、それぞれ NGF (50 ng/ml) および黄連エキス ($50 \mu\text{g/ml}$) を6日間作用させて神経突起形成後、抗 NGF 抗血清を 1.0% 濃度に追加した結果である。NGF による神経突起は、抗血清添加3日後には退行したが (Fig. 4, A), 黄連エキスを作用させた場合は、抗血清添加3日後においても退行しなかった (Fig. 4, C)。Fig. 4, B および Fig. 4, D は対照実験で、前者は NGF による、後者は黄連エキスによる神経様突起形成後に、抗血清のかわりに正常ウサギ血清を 1.0% 濃度に添加した結果を示す。いずれも神経様突起形成作用には、影響を及ぼさなかった。

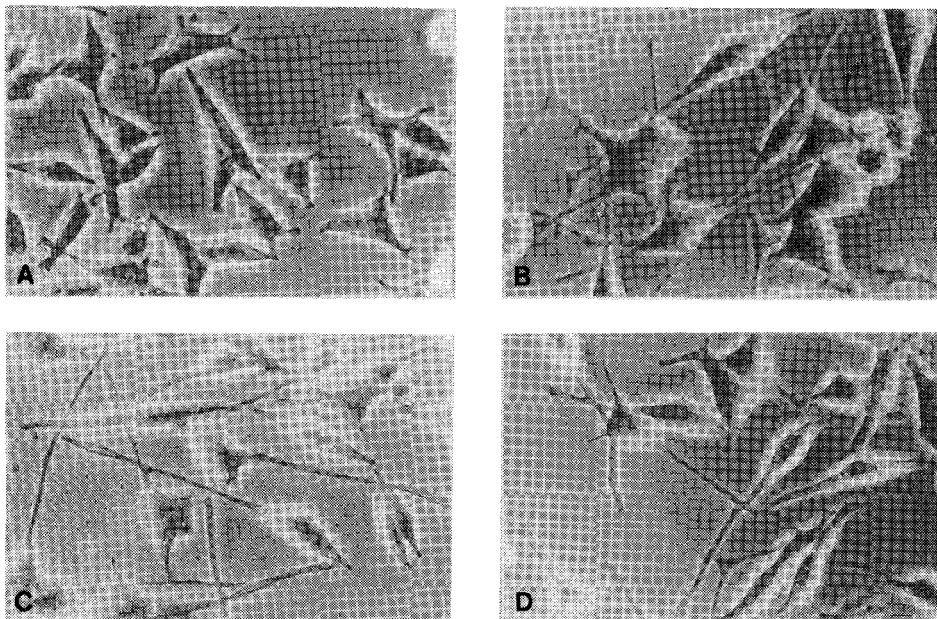


Fig. 4 Effects of anti-NGF antiserum on neurite-like outgrowth. Three days after addition of anti-NGF rabbit antiserum (A) and normal rabbit serum (B) with NGF into the culture medium after neurite outgrowth by NGF (6-day treatment at a concentration of 50 ng/ml). Three days after addition of anti-NGF rabbit antiserum (C) and normal rabbit serum (D) with Oren-extract into the culture medium after neurite-like outgrowth by Oren-extract (6-day treatment at a concentration of $50 \mu\text{g/ml}$).

考 察

PC12 細胞はラット褐色細胞腫からクローン化された細胞で、⁶⁾ NGF により神経細胞様に分化し、顕著な形態学的変化として神経突起の形成が観察される⁹⁾ ことから、神経細胞分化の実験モデルとして用いられている。神経様突起の形成は NGF 以外にも、線維芽細胞成長因子、¹⁰⁾ cAMP アナログ¹⁰⁾ および src, ras 等のガン遺伝子¹¹⁾ によっても誘導される。この研究では黄連解毒湯、温清飲、三黄瀉心湯、黄連湯、これらの構成生薬である黄連エキス、黄柏エキス、さらにこれら生薬中に含まれるコブチシンおよびベルベリンが、PC12 細胞に対して神経様突起形成作用を有することを、初めて明らかにした。この作用を、PC12 細胞に対する代表的な分化因子である NGF の作用との関連で検討した。

薬物作用後の細胞中の NGF 量 (細胞数当たり) は、神経様突起形成作用を有する薬物では増加し、この作用をもたない当帰芍薬散およびクロロゲン酸では、対照に比べて大きな差はなかった。(Table 1)。他方、抗 NGF 単クローン抗体による間接免疫蛍光染色では、神経様突起形成作用を有する薬物を用いた細胞では、この作用をもたない薬物を用いた細胞および何も作用させない対照と比較して、明らかに強い染色性を示した (Fig. 3)。これらの結果から、黄連解毒湯等による神経様突起形成作用は細胞内の NGF の増加との関連性を有することが示唆された。神経様突起形成作用をもたないフェルラ酸も細胞中の NGF 量を僅かながら増加させた。しかしフェルラ酸を用いた細胞では、神経様突起形成作用を示した薬物よりは弱い染色が、核あるいは核周囲部に認められたのみである。

NGF は細胞膜のレセプターに結合し、そのシグナルが細胞質を経て核に伝達され作用を発現すること、ならびにその最低作用濃度は 10^{-11} – 10^{-9} M 程度⁹⁾ であることが示されている。しかし、この研究において黄連解毒湯等によって突起形成が認められた細胞の培養液中の NGF 濃度は、それよりはるかに低く、対照の濃度とほぼ同じであった (Table I)。また、抗 NGF 抗体を培養液中に添加しても、神経様突起の形成は阻止されなかった。一方前述の様に細胞内では、免疫染色法によって黄連解毒湯が NGF 濃度を上昇させることが明かとなった。これらのことから黄連解毒湯により細胞内で NGF が生合成され、神経様突起を形成することが予想される。しかしながら、マイクロインジェクションされ

た NGF- β は作用を発揮できない¹³⁾ ことから、従来知られている作用機構とは別の機構で細胞内で直接、その作用を発揮出来るのかもしれない。

カテコール化合物、¹⁴⁾ ベンゾキノン化合物¹⁵⁾ 等が、線維芽細胞、アストログリア細胞、シュワン細胞における NGF 生合成および分泌を促進する事が知られている。しかし PC12 細胞が、NGF を生合成しているとする報告は現在まで得られていない。もし NGF 生合成が促進されるならば、黄連解毒湯による脳血管障害に対する効果は、その一部は NGF 生合成の促進による可能性が考えられる。この研究で示された PC12 細胞の神経様突起形成が、細胞内で生合成された NGF によるものか否か、タンパク質および mRNA レベルで検討しなければならない。さらに、機能的にも神経細胞様に分化するか否かについても検討しなければならない。

結 論

向神経作用を有する漢方薬のうち、黄連解毒湯、温清飲、三黄瀉心湯、黄連湯が、PC12 細胞に対して神経様突起形成作用を有する事を認めた。さらに黄連解毒湯が、PC12 細胞中の NGF 量を増加させる事を、酵素免疫化学的定量および間接免疫染色により認めた。しかし培養液中の NGF 量は増加せず、また抗 NGF 抗体によっても、上記薬物による神経様突起形成は阻止されなかった。NGF が、細胞膜表面のレセプターに結合して作用を発揮する機構の他に、細胞内で生合成された NGF が直接、細胞内で作用を発現させる機構の可能性が示唆された。

文 献

- 1) 萩野信義, 小山嵩夫: 当帰芍薬散 (TJ-23) による脳内ニコチンアセチルコリン受容体合成の促進, In: Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicines. Excerpta Medica International Congress Series (ed. by Hosoya, E. and Yamamura Y.) 854: pp. 144-149, Excerpta Medica, Amsterdam, 1988.
- 2) 内田真嗣, 丹羽正美, 尾崎正若: 黄連解毒湯の脳卒中発症にたいする予防効果—脳卒中易発症ラット (SHRSP) を用いた検討—, 精神神経薬理 12, 209-215, 1990.
- 3) 山脇成人: 釣藤散, 抑肝散の中枢セロトニン受容体機能に及ぼす効果: 抗うつ作用の可能性を探る, 漢方医学 10, 20-25, 1986.
- 4) 菅谷英一: 柴胡桂枝湯加芍薬 (SK. TJ-960) の抗痙攣作用のメカニズム, 精神神経薬理 12, 237-245, 1990.
- 5) Greene, L. A. and Tischler, A. S.: Establishment of a

- noradrenergic clonal line rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* **73**, 2424-2428, 1976.
- 6) Korsching, S. and Thoenen, H.: Two-site enzyme immunoassay for nerve growth factor. In: *Method in Enzymol.* (ed. by D. Baren and D. A. Sirbasku) **147**, Academic Press, New York, pp. 167-185, 1987.
- 7) Boccini, V. and Angeletti, P.: The nerve growth factor: Purification as a 30,000-molecular-weight protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* **64**, 787-794, 1969.
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-273, 1951.
- 9) 畠中 寛: 神経成長因子 (NGF) (総説). 蛋白質・核酸・酵素 **29**, 1937-1954, 1984.
- 10) Togari, A., Dickens, G., Kuzuya, H. and Guroff, G.: The effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *J. Neurosci.* **5**, 307-316, 1985.
- 11) Alema, S., Cassalbone, P., Agostini, E. and Tato, F.: Differentiation of PC12 pheochromocytoma cells induced by v-src oncogene. *Nature* **316**, 557-559, 1985.
- 12) Noda, M., Ko, M., Ogura, A., Liu, D. G., Amano, T., Takano, T. and Ikawa, Y.: Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell lines. *Nature* **318**, 73-75, 1985.
- 13) Seeley, P. G., Keith, C. H., Shelanski, M. L. and Greene, L. A.: Pressure microinjection of nerve growth factor and anti-nerve growth factor into the nucleus and cytoplasm: Lack of effect on neurite outgrowth from pheochromocytoma cells. *J. Neurosci.* **3**, 1488 - 1494, 1983.
- 14) Furukawa, Y., Fukazawa, N., Miyama, Y., Hayashi, K. and Furukawa, S.: Stimulatory effect of 4-alkylcatecols and their diacetylated derivatives on the synthesis of nerve growth factor. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 2337-2342, 1990.
- 15) Takeuchi, R., Murase, K., Furukawa, Y., Furukawa, S., and Hayashi, K.: Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion by 1,4-benzoquinone and its derivatives in cultured mouse astroglial cells. *FEBS* **261**, 63-66, 1990.