

8) 筋萎縮症マウス神経組織の脂質変化

松下 宏*

研究協力者 辻 繁勝*

本年度は昨年に引続き筋萎縮症マウスの病因を基本的な膜構造の異常に求めようとする立場から、種々の年齢に於ける疾病マウスの脳及び脊髄神経組織中の膜構造の量的質的变化に就いて検討を行なった。

材料と方法

実験には C57BL/6J-dy 系の 4 乃至 11 週令の筋萎縮症マウス及び同腹正常マウスを使用した。断頭沔血後速やかに脳及び脊髄神経組織を採出し超遠心分画用には 0.32M 蔗糖液中で、脂質分析用には Folch のクロロフォルム・メタノール混合液 (2 : 1) 中でホモジナイズしそれぞれの使用に供した。神経組織中の膜成分の超遠心分画は Lapetina 等¹⁾及び Inoue 等²⁾の方法に準じて不連続蔗糖密度勾配超遠心分画法によって行なった (図 1)。脂質成分の定量分析には上記の Folch のクロロフォルム・メタノール抽出液³⁾を用い、それぞれの比色定量法によって測定された。⁴⁾

結 果

脳及び脊髄神経組織中の膜成分の分画を 4 週令、7 週令、11 週令のマウスに就いて行なった。手順は 0.32M 蔗糖液ホモジネートを 900G で 10 分間遠心して得た沈殿を 4 回洗浄し之を核分画とし、更に上清を 11,500G、30 分間遠心して得た粗ミトコンドリア分画を 2

回洗浄後低張処理を行ない 20,000G で 30 分間遠心沈殿させたものを M₁ 分画とした。これらの分画に就いて更に図 1 の様式で細分画を実施し、それぞれの膜成分に就いて正常対照個体のそれと比較観察を行なった。その結果、発症後間もない生後 4 週間の筋萎縮症マウスでは脊髄神経組織中の M₁ 分画でミエリン細分画が著しく減少している事が見出された。脳の標品ではミエリン分画及び M₁ 1.2 のシナプス膜分画にわずかな減少の傾向が認められたが脊髄標品ほどの大きな変化は見られなかった。一方生後 7 週間のやや症状の進んだ筋萎縮症マウスに就いて M₁ 分画の small myelin 及び nuclear 分画の large myelin の量的変化を見てみると、やはり脊髄標品で、両者共に著しい減少が認められた。シナプス膜分画にも量的減少が認められた。更に生後 10 週間の脊髄標品では M₁ 分画の small myelin に減少が認められたが正常との差異は 7 週令のもの程大きくなく、加齢と共に縮小して行く事がうかがわれた。又この時期の M₁ シナプス膜分画は逆に正常よりも増加している状態が認められた。

次に生後 6 ~ 11 週間のマウスに就いてこれ等神経組織の Folch 抽出液中の脂質分析を行なった所筋萎縮症マウスの脊髄標品で総脂質量の著しい低下が認められた (表 1)。更にコレステロール、糖脂質、蛋白脂質、磷脂質に就いてそれぞれの含量を測定した所、糖脂質の含量が著しく低下している事が判った

*和歌山県立医科大学第二生理

Nuclear fraction 53,000g, 120 min.	M ₁ fraction 50,000g, 120 min.	M ₁ fraction 50,000g, 120 min.
Sucrose Gradient	Sucrose Gradient	Sucrose Gradient
-0.32 M	-0.8 M M ₁ 0.8 Myelin	-0.32 M
-0.8 M Large myelin	-0.9 M M ₁ 0.9 Synaptic membrane and myelin	-0.8 M M ₁ A Small myelin
-1.2 M Cell debris	-1.0 M M ₁ 1.0 Synaptic membrane	-1.2 M M ₁ B Synaptic membrane
	-1.2 M M ₁ 1.2 Synaptic membrane	M ₁ C Mitochondria
	M ₁ P Mitochondria and some membrane	

图1 Subfractions of Nuclear and M₁ on the discontinuous sucrose gradient in the RPS40 Swing Rotor

表1 Data on animals of C57BL/6J-dy strain

	Dystrophic	Normal
Age of animals	6 - 11 weeks	6 - 11 weeks
Sex	both	both
Body weight (g)*	16.0 ± 0.85	20.3 ± 0.82
Brain weight (mg)*	363 ± 22	396 ± 26
Total lipids (mg/g tissue)		
Brain	83.1 ± 11.2	84.0 ± 13.1
Spinal cord**	132.1 ± 8.3	146.2 ± 8.1

*, P < 0.01

** , P < 0.05

表2 Lipid composition of the spinal cord of dystrophic and normal mice

	dystrophic	normal
Cholesterol	21.5*	16.2
Galactolipids** (hexose)	15.4	25.4
Proteolipids (protein)	6.63	7.61
Phospholipids (Pi)	3.16	3.92

*, average values (mg/g) from 10 animals

** , P < 0.05

表3 Lipid composition of the brain of dystrophic and normal mice

	dystrophic	normal
Cholesterol	22.0*	22.2
Galactolipids (hexose)	8.75	8.79
Proteolipids (protein)	5.26	5.03
Phospholipids (Pi)	2.37	2.28

*, average values (mg/g) from 10 animals

表4 Total sphingosine and cerebroside sulfatides in brain and spinal cord of dystrophic mice

		dystrophic	normal
Sphingosine*	Brain	10.7	12.4
	Spinal cord	29.0	34.3
Sulfatides**	Brain***	3.64	4.71
	Spinal cord***	3.13	4.35

unit; *, 0.D./100 g wet tissue weight
 **, n moles/ g wet tissue weight
 ***, $P < 0.05$

(表2). 脳標品の場合は正常マウスとの間に有意な差異は認められなかった(表3). そこでスフィンゴミエリン, 糖脂質等の構成成分であるスフィンゴシン及び硫酸セレブロンに就いてその含量を脳及び脊髄標品で測定した結果, 筋萎縮症マウスでは両神経組織共に硫酸セレブロン含量が著しく低下している事が判明した(表4). スフィンゴシンも減少傾向を示したが有意差は無かった.

考 察

生後4週間の筋萎縮症マウス脊髄神経組織

ではミエリン分画の著しい減少が存在する事実に認められた. この変化は脳組織ではそれ程顕著ではなかった. 又生後11週間になるとこの差異は殆ど消失する事から考えて, この現象は筋萎縮症状の進行に伴って派生する変化ではなく, むしろ末梢神経の発生分化の過程に認められる欠損或いは遅滞の結果であろうと思われる. 従って臨床症状の現われる以前からの変化であり, dy 遺伝子の直接又はそれに近い段階での影響を受けて引き起こされている可能性が推測される. 更に筋の分化形成の過程で末梢の motor nerve の影響を

強く受ける事実⁵⁾から考えて、この時期に末梢神経の膜構造に異常が存在すれば、筋の正常な分化、形成が著しく阻害されるものと考えられる。

更に脳及び脊髄神経組織中の脂質構成成分の分析により、筋萎縮症マウスではいずれも糖脂質特に硫酸セレブロン⁵⁾の著しい減少が存在する事が認められた。又磷脂質、スフィンゴシン、コレステロール等の他のミエリン構成要素にも変化が見られた。これ等の事実は超遠心分画法によって得られた脊髄神経組織に於けるミエリン分画の減少と云う結果とよく一致し、原因の一つとしてSchwann細胞に於ける硫酸セレブロン形成能の低下が示唆される。更に血清中の総磷脂質含量も有意に低下している事 (dy 216.3, N249.5, mg/dl, $P < 0.01$) から、筋萎縮症マウスに存在する一般的な膜構造の異常の一つとして末梢神経組織の変化が発現されている可能性も否定出来ない。

文 献

1) Lapetina, E. G., Sato, E. F. and

De Robertis, E. : Gangliosides and acetylcholinesterase in isolated membranes of rat brain cortex. *Biochem. Biophys. Acta.* 135 : 33-43, 1967.

- 2) Inoue, T., Deshmukh, D. S. and Pieringer, R. A. : The association of the galactosyl diglycerides of brain with myelination. *Jour. Biol. Chem.* 246 : 5688-5694, 1971.
- 3) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Jour. Biol. Chem.* 226 : 491-509, 1957.
- 4) Tsuji, S., Yasuda, T. and Kitano, K. : Alterations of lipid composition in the brains of MSD mouse and Jimpy mouse. *Wakayama Med. Rep.*, 20 : 65-71, 1977.
- 5) McComas, A. J., Sica, R. E. P. and Currie, S. : Muscular dystrophy : Evidence for neural factor. *Nature* 226 : 1263-1264, 1970.

↓ 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用 ↓
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

本年度は昨年に引続き筋萎縮症マウスの病因を基本的な膜構造の異常に求めようとする立場から、種々の年齢に於ける疾病マウスの脳及び脊髄神経組織中の膜構造の量的質的变化に就いて検討を行なった。

-