

26) 進行性筋ジストロフィー症患者の赤血球膜の膜流動性と脂質分析

祖父江 逸 郎*

研究協力者 足 立 皓 岑* 小長谷 正 明* 室 賀 辰 夫*
向 山 昌 邦* 小 泉 昕 也** 小 泉 恵 子**
山 中 直 樹** 太 田 和 雄**

1972年, Singer と Nicolson¹⁾により細胞膜構造に関して fluid mosaic model が提唱されて以来, 細胞膜機能と膜成分の流動性との関連性が注目されている. そこで我々は進行性筋ジストロフィー症患者の赤血球膜脂質層の流動性を中心に検索する事によりその動的病態の解析を試みた.

対象及び方法

対象は正常者11例, Duchenne dystrophy 12例, myotonic dystrophy 5例, Carrierと思われる者10例の合計38例である.

方法: (A) Lipidmicroviscosityの測定

(1)新鮮血を5-8 ml phosphate buffered saline (PBS) に採血し, 赤血球を2,500回転, 10分間にて遠心分離し volume 比 1:40 の 5 mM Na-phosphate buffer pH 8.0 にて溶血した. (2)次いで得られた ghost を 13,000 回転, 15分間遠心分離しながら溶血液にて4回洗浄をした. (3)ghostのprotein量をphenol法にて定量し, protein量にして200~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の ghost を PBS + 5 mM MgCl_2 + 10^{-6} MDPH (1.6 diphenyl - 1, 3, 5-hexatriene) の incubation medium にて 25°C, 30分間 incubate した. (4)その後 ghost を

13,000 回転, 15 分間にて遠心分離し, その lipidmicroviscosity を 蛍光偏光解消法を原理とする Microviscosimeter Model MV-1a²⁾ にて測定した.

(B) Carbamylcholine 添加による lipidmicroviscosity の変動の測定

正常者 5 例, Duchenne dystrophy 5 例において測定した. 上記と同様の方法にて得られた ghost を同じ incubation medium に終濃度にして $1.3 \times 10^{-5} \text{M} \sim 10^{-9} \text{M}$ の Carbamylcholine を添加し, 37°C, 5分間 incubate し各濃度下における lipidmicroviscosity を測定した.

(C) 脂質分析

Folch 法³⁾にて抽出した脂質を 2次元薄層クロマトグラフィーにて分離した. まず chloroform-methanol-7 N ammonia (volume 比 90:54:11) にて展開し, 次に chloroform-methanol-acetic acid-water (volume 比 90:40:12:1) にて分離した. 得られた spot のリンを Bartlett 法⁴⁾にて測定した. またコレステロールは Courchain 法⁵⁾にて測定した.

結 果

(1)各群における lipidmicroviscosity 値 (単位は P 値で表示) は表 I の如く, 正常者で 293.82 ± 4.26 , Duchenne dystrophy で $290.$

*名古屋大学医学部第一内科

**愛知県がんセンター化学療法部

表 I Lipid Microviscosity of Erythrocyte Membrane (means \pm se)

I. Normal (II)	293.82 \pm 4.26 (P)
2. Duchenne type (I2)	290.92 \pm 2.67 (P)
3. Myotonic dystrophy (5)	291.50 \pm 9.03 (P)
4. Carrier (I0)	291.30 \pm 4.36 (P)

92 \pm 2.67, myotonic dystrophy で 291.50 \pm 9.03, Carrier では 291.30 \pm 4.36 で 4 者間には有意差は認められなかった。

(2) Carbamylcholine 添加による lipid microviscosity 値の変動は図 1 のようであった。

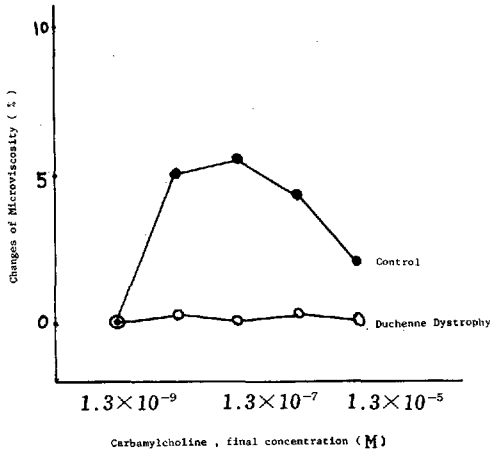


図 1 Effect of Carbamylcholine on Microviscosity

グラフは典型例を示す。両者ともに Carbamylcholine の無添加時を基準にしその変動率を % で表わしてある。正常者では Carbamylcholine 濃度 1.3×10^{-7} M 付近をピークにはほぼ左右対称の単峰性曲線を描き、その最大変動

率は 4.5% ~ 6% であったのに対し、Duchenne dystrophy では大部分のケースで変動率が小さくほぼ直線で、最大変動率を示したケースでも 3% で両者間には明らかな差がみられた。

(3) 各群におけるコレステロールとリン脂質量を protein 量あたりのモル濃度で計算し両者間の比を出した。その結果平均で、正常者は 0.869, Duchenne dystrophy で 0.867, myotonic dystrophy で 0.866, Carrier で 0.868 で 4 者間には大きな差異は認めなかった。

考 察

螢光偏光解消法を原理とする Microviscosimeter Model MV-Ia による膜流動性の研究^{2), 6), 7)}は ①この方法により得られる lipid microviscosity 値はいくつかの基礎的データから細胞膜脂質層全体の平均値を表わしている事 ② lipid microviscosity の調節はコレステロールとリン脂質の相互作用によるところが大である事を示している。

従って我々の今回の検索により Duchenne dystrophy, myotonic dystrophy, Carrier と正常者間には赤血球膜脂質層全体からみた viscosity およびその重要な調節因子に関しては有意差のない事が認められた。

一方、赤血球膜には acetylcholine recep-

tor が存在し何らかの機能を有し, receptor の機能発現と膜脂質層の流動性との相関関係が報告⁸⁾されている。我々の検索によると Duchenne dystrophy における赤血球膜の acetylcholine receptor と膜脂質層の流動性との相互作用が正常者に比べ明らかに異なっていた。この事は Butterfield^{9),10)}らによる spin label 法に基づく細胞膜のより限局した部位における膜流動性の検索にて, Duchenne dystrophy, myotonic dystrophy, congenital myotonia において認められた異常所見と符号する。

こうした一連の結果は, Duchenne dystrophy 症患者における生体膜での機能異常の存在の可能性を推定させる。

ま と め

(1) Duchenne dystrophy, myotonic dystrophy, Carrier および正常者の赤血球膜 lipidmicroviscosity について 4 者間に有意差は認められなかった。

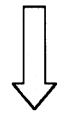
(2) 同じく赤血球膜のコレステロールとリン脂質とのモル比についても 4 者間に有意差はみられなかった。

(3) Duchenne dystrophy 赤血球膜の acetylcholine receptor と膜脂質層との相互作用に異常が認められた。

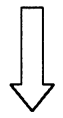
文 献

- 1) Singer S. J, Nicolson G. L. : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175 : 720-731, 1972.
- 2) 小泉恵子, 小泉昶也, 山中直樹, 太田和雄 : 蛍光偏光解消法による細胞膜の超微流動性測定器 (Microviscosimeter Model MV-1a) の紹介と膜流動性に関する最近の展望. 癌と化学療法, 4 : 1137-1147, 1977.

- 3) Folch J. M., Sloane Stanley L. and G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem. 226 : 497-509, 1957.
- 4) Bartlett, G. R. : Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234 : 466-468, 1959.
- 5) Courchaine A. J., Miller W. H., Stein D. B. Jr. : Rapid semimicro procedure for estimating free and total cholesterol. Clin. Chem. 5 : 609-614, 1959.
- 6) Shinitzky M, Inbar M. : Difference in microviscosity induced by different cholesterol levels in the surface membrane lipid layer of normal lymphocytes and malignant lymphoma cells. J. Mol. Biol. 85 : 603-615, 1974.
- 7) Shinitzky M, Inbar M : Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes. Biochim. Biophys. Acta. 433 : 133-149, 1976.
- 8) Huestis W. H, Mcconnell H. M : A functional acetylcholine receptor in the human erythrocyte. Biochem. Biophys. Res. Commun. 57 : 726-732, 1974.
- 9) Butterfield. D. A, Chesnut. D. B, Appel S. H, Roses A. D. : Spin label study of erythrocyte membrane fluidity in myotonic and Duchenne muscular dystrophy and congenital myotonia. Nature. 263 : 159-161, 1976.
- 10) Butterfield D. A. : Electron spin resonance investigation of membrane proteins in erythrocytes in muscular diseases. Biochim. Biophys. Acta. 470 : 1-7, 1977.



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



1972年, Singer と Nicolson)により細胞膜構造に関して fluid mosaic model
が提唱されて以来, 細胞膜機能と膜成分の流動性との関連性が注目されている.
そこで我々は進行性筋ジストロフィー症患者の赤血球膜脂質層の流動性を中心
に検索する事によりその動的病態の解析を試みた.