

8) 筋萎縮症マウスの血清遊出酵素と膜透過性について

松下 宏*

研究協力者 辻 繁勝*

研究目的

遺伝性筋萎縮症マウスの進行性筋ジストロフィー症に対する疾患モデルとしての有用性を多角的に開発する目的並びに種々の生理学的負荷を疾病マウスに加える事によって発生する新たな異常点を見出し、そこから疾患の真の成因を追求して行く事を目的としてこの研究を進めている。本年度は昨年来行なっている筋萎縮症マウスの血清中に遊出する α -hydroxybutyrate dehydrogenase (HBD) 及び pyruvate kinase(PK)等の活性変化を症状進行の指標として種々の生理学的負荷を与えた場合の疾病マウスの反応を調べる試みを更に発展させ、同時に萎縮筋中のイオン濃度の変化、赤血球膜中のATPase活性の変化、血中ガス分圧の変化等を調べ、血清酵素の漏出する機転と膜透過性の変化に就いて検討を行なった。

実験方法

実験に使用された動物はC57BL/6J-dy系統マウスで生後1~2ヶ月及び4~5ヶ月のものである。酵素活性の測定にはいずれも新鮮標品の4倍希釈血清、500倍希釈腓腸筋ホモジネート、200倍希釈肝臓ホモジネート、及び赤血球膜ゴーストが用いられた。運動強性負荷はトキワーF式実験動物体力測定装置(トレードミル)を用いて行なった。負荷条件は毎日1回、20分間に200m、毎日1回、10分間に100m、及び毎日1回、20分間に80m、の3通りを行なった。

アドレナリン投与実験は0.2mg/kg体重を、アセチルコリン投与実験は8mg/kg体重を、いずれも腹腔内に1回注射し、それぞれ90分後、20分後に各臓器を取出し、酵素活性を測定した。

酵素活性の測定は、分光光度計を用いて、HBDはRosalki法、PKはHarano等の方法、膜ATPaseはTausky法で反応させ、遊離したPiをFiske & SabbaRow法に従ってそれぞれ測定した。

血液中ガス分圧はコーニング社製血中ガス分析装置を用いて測定した。血液中並びに骨格筋中の各イオン濃度は主として比色定量法を用いて測定した。

結 果

筋萎縮症マウスの血清中の α -hydroxybutyrate dehydrogenase (HBD)活性は正常対照マウスの活性値と比較して有意に上昇している事が見い出された。(68%増加)一方骨格筋、心筋中の活性は正常マウスと比較して骨格筋では大幅に低下し(41%減少)、心筋では有意の変化が認められなかった事から、筋萎縮症マウス血清中のHBD活性変化は主として骨格筋からの漏出に由来するものと推測させる。

Pyruvate kinase(PK)活性に就いても、筋萎縮症マウス血清中では正常対照マウスと比較して、約2.7倍の活性値を示めす事が認められた。この酵素もやはり骨格筋(35%減少)、肝臓(8%減少)、赤血球(14%減少)等で正常マウスよりも活性低下している事から、血清中酵素活性の上昇は之等の臓器から漏出

*和歌山県立医科大学生理学教室

したものと考えられる。又、phosphoenol-pyruvate に対する K_m 値が比較的高い ($0.5 \times 10^{-3} M$) 事から、マウスの筋萎縮症では、血清中PK酵素活性の増加に赤血球型酵素 ($K_m = 0.7 \times 10^{-3} M$) の漏出が大きな影響を与えている事が示唆された。

一方、ヒト男子の Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の血清に就いてPK活性値を測定した所、対照正常男性に比較して約 3.2 倍の活性値が得られ、又保因者と思われる母親でも15%程の活性上昇が存在する事が判明した。この結果は筋萎縮症マウスで得られた血清PK活性の変動には gene dosage effect が存在すると云う事実とよく一致する。又、ヒト進行性筋ジストロフィー症血清で得られた結果では phosphoenolpyruvate に対する K_m 値が正常対照と同程度に低く ($0.08 \times 10^{-3} M$)、従って活性増加の大部分は骨格筋に存在するM型酵素の漏出に由来するものであろうと思われる。

生后約1ヶ月の極く軽症の筋萎縮症マウスにトレードミル式の運動強制負荷器によって、1日20分間に80mずつ毎日、計2週間にわたって運動負荷を行ない、負荷終了直後の血清中HBD活性並びにPK活性値を調べた所、HBD活性は無処置の筋萎縮症マウスの約2倍に上昇している事が認められた。又、PK活性値もやはり活性上昇が認められた。一方、正常同腹マウスには筋萎縮症マウスの場合の2.5倍量の運動負荷を与えて同様のテストを行なったが、両酵素共に殆んど活性値に変化がなかった。この結果から筋萎縮症マウスに於ける血清中酵素の活性変動は単に症状の進行に伴う萎縮筋細胞の損壊に由来するものばかりではなく、症状の極く軽い初期の段階で既に細胞膜の機能に脆弱性が存在し、その為に起った現象であろう事が推測される。この推測は、上記の運動負荷によって筋萎縮症マウスの骨格筋 (28%減少) 及び肝臓 (24%減少) 中のPK活性値が低下する事実からも裏付けられる。

次にアドレナリン、アセチルコリン等の体

液性因子の投与に対する筋萎縮症マウスの反応性を検討する実験を行なった。まず、生后約2ヶ月の筋萎縮症マウスに体重1kg当り0.2mgのアドレナリンを腹腔中に注射し、10分ごとに血清中のPK活性値の変化を調べた所、90分後に活性増加のピークが認められ、無処置マウスの活性値の約1.6倍に上昇した。又、その時点での各臓器中のPK活性変化を同時に見てみると、特に骨格筋 (16%減少)、腎臓 (16%減少) で著しい活性低下が認められた。この傾向は正常マウスの場合も同じであったが変化の大きさは筋萎縮症マウスの方が著しかった。肝臓中での活性値は筋萎縮症マウスではわずかに減少したのに対して、正常マウスでは10%程活性上昇している事が注目された。アドレナリン負荷によって生ずる変化は運動負荷後の変化と類似の傾向を示す事から、運動負荷による酵素漏出機構の変化にアドレナリン分泌亢進が関与している可能性、又筋萎縮症マウスの膜構造ではアドレナリンに対する感受性が増加している可能性等が推測される。

同様にアセチルコリンを体重1kg当り4mgずつ腹腔に注射し、20分後に血清、骨格筋を採出し、PK活性を測定した所、筋萎縮症マウスの血清中では大幅に活性が上昇し (29%上昇)、骨格筋では逆に低下する傾向 (33%低下) が認められた。この結果は、筋萎縮症マウスのendplate付近ではコリンエステラーゼ活性が著しく減少しているという McCallman 等の報告とよく一致するものと思われ、この疾患マウスでは、細胞膜機能に先天的な異常が存在すると云う可能性を示唆するものと考えられる。

そこで、萎縮骨格筋中のイオン組成に変動が存在する可能性が当然考えられたので、生后4~5ヶ月で症状がかなり進んだ末期状態の筋萎縮症マウスを用いて腓腸筋内の各イオン濃度を検査した。その結果正常対照マウスの腓腸筋と比較して K^+ 濃度が著しく減少し (29%減少)、 Na^+ 濃度が逆に増加している事 (38%増加) が確認された。そのため K^+ /

Na比は、正常個体で4.8であるのに対して萎縮症個体では2.5と大幅に低下していた。又、Ca、Clの濃度に関しても萎縮症個体で著しく増加している事が認められた。(Ca:80%増加, Cl:46%増加)この細胞内K量の低下と云う事実は、筋萎縮症マウスに認められている静止膜電位の低下と云う現象とよく一致するものと思われる。

次に、今度は生后1ヶ月で極く軽症のマウスを用い、透過性の膜機能異常を検査した。具体的な指標として膜の能動輸送に関与する酵素であるNa、K-activated ATPaseの活性変化に就いて、赤血球膜ゴーストを標品として測定した。その結果筋萎縮症マウスではMgイオン存在下での膜ATPaseは正常マウスよりむしろ高い活性値を示めすが(20%増加)、luabainによって失活されるNa、K-ATPaseは逆に正常値の60%程度に活性低下している事が判った。

即ち、生后1ヶ月で発症直後の症状の非常に軽い時期でも、筋萎縮症マウスでは骨格筋以外の臓器に就いても細胞膜の機能に異常が存在する事が明らかになったわけである。然し発病後の標品を用いているので、この結果から直ちにこの異常が先天的なもので、発病前から各臓器に潜在的に存在し、これが引金になって筋肉の萎縮をもたらすのか、或いは筋萎縮症状の進行に伴って派生する生理状態の変化によって惹起される現象であるかを判別する事は困難である。

次にやはり生后1ヶ月で軽症の筋萎縮症マウスを用いて、心房から採取した血液中の PO_2 及び PCO_2 を測定した。その結果、筋萎縮症マウスの血液では明らかに O_2 が欠乏し、(46%減少) CO_2 が過剰(20%増加)である事が判った。更に、2週間の運動負荷を加えると無処置のマウスと比較して PO_2 で10%程度増加し、 PCO_2 では11%程減少する結果を得た。又、筋萎縮症マウスのヘマトクリット値は47%で正常値と有意差が無く、ヘモグロビン含量も約13.5 g/dl bloodと正常範囲であった。

要 約

今年度得られた結果を要約すると下記の如くである。

- (1)筋萎縮症マウスでは血清中のHBD、PK両酵素活性が著しく上昇する事実に認められたが、ヒトのDuchenne型ジストロフィー症の血清でも非常に高いPK活性値が得られた。又保因者と思われる母親での活性は正常値に比較してやや高い値を示した。
- (2)アドレナリン、アセチルコリンを筋萎縮症マウス腹腔に注射すると血清中PK活性はいずれも上昇を示した。一方、萎縮筋、腎、赤血球等の臓器での活性はそれに対応して減少を示した。
- (3)筋萎縮症マウス腓腸筋中の各種イオン濃度を測定した所、K量が大幅に減少し、Na、Ca、Cl、量が増加している事が認められた。
- (4)赤血球膜ゴーストでの膜ATPase活性はNa、K、Mg存在下では筋萎縮症マウスの方が正常マウスより高い活性を示したが、Ouabainによって失活される所謂Na、K-ATPaseは逆に低下している事が認められた。
- (5)心臓からの採血によって得られた血液中の PO_2 、 PCO_2 を測定した所、筋萎縮症マウスでは PO_2 の著しい減少及び PCO_2 の増加が認められた。又、これに2週間の運動負荷を加えるとわずかに PO_2 の増加、 PCO_2 の減少が見られたが、正常値にまでは回復しなかった。

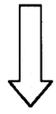
総 括

マウス筋萎縮症に於て血清中のHBD、PK両酵素活性が発症後間もない軽症の時期に既に正常個体よりも高い値を示めす事及びヘテロ正常個体で運動負荷による活性上昇率が正常より高い事等の事実から、血清中のこれら酵素の活性変化をこの疾患の指標として利用出来る事が唆された。又、ヒトDuchenne型進行性筋ジストロフィー症に於ても血清中PK活性が著しく上昇し、且つ、保因者でも正常値より高い値が得られた事はマウスで得られた事実を強く支持するものと考えられ

る。

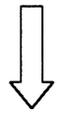
腓腸筋ホモジネート中の各種イオン濃度の異常及び赤血球膜ゴースト中の膜 ATPase 活性の変動、並びに、運動強制負荷、アセチルコリン、アドレナリン等の投与等による血清中への酵素漏出の異常増加等の結果から、

筋萎縮症マウスでは骨格筋を中心として各種臓器の膜構造、特に透過性に異常が存在する可能性が強く示唆された。又、慢性的な hypoxia がこの原因の一つとして関与している可能性が推測された。



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



研究目的

遺伝性筋萎縮症マウスの進行性筋ジストロフィー症に対する疾患モデルとしての有用性を多角的に開発する目的並びに種々の生理学的負荷を疾病マウスに加える事によって発生する新たな異常点を見出し,そこから疾患の真の成因を追求して行く事を目的としてこの研究を進めている.本年度は昨年来行なっている筋萎縮症マウスの血清中に遊出する γ -hydroxybutyrate dehydrogenase(HBD)及び pyruvate kinase(PK)等の活性変化を症状進行の指標として種々の生理学的負荷を与えた場合の疾病マウスの反応を調べる試みを更に発展させ,同時に萎縮筋中のイオン濃度の変化,赤血球膜中の ATPase 活性の変化,血中ガス分圧の変化等を調べ,血清酵素の漏出する機転と膜透過性の変化に就いて検討を行なった.