

3) 進行性筋ジストロフィー症におけるセロトニン代謝の生化学的研究 (第2報)

宇尾野 公 義*

研究協力者 別 府 宏 圀* 佐 橋 功*
福 永 秀 敏* 堀 真一郎**

目 的

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) は、伴性劣性遺伝性疾患である。そのため女性保因者を正確に指摘することは、病因の追求とともに重要であり、血清 CPK 値をはじめ、筋電図、筋生検、身体総カリウム量の測定などが行なわれている¹⁾が、どの検査法も決定的なものはなく、適当な検査法を組み合わせ、互いに補足させてその信頼性の向上につとめているのが現状である。

ところで近年、DMD とアミン代謝との関係が注目されており、DMD における serotonin 代謝が種々の観点から検討されている。既に我々は、患者血小板、5-hydroxytryptamine (5-HT) の異常低値、及び代謝異常を確認している。

今回は、DMD 患者の母親の血小板、5-HT の生化学的定量、及び血小板への ¹⁴C-5-HT のとりこみと遊離、また 5-HT の最終代謝産物である 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) について検索し、保因者の判定と発生病理につき、若干の考察を加えた。

方 法

対象は DMD 患者の母親、16例である。年齢構成は、31歳から55歳 (平均38.8歳) で Pearse の保因者分類では、definite carrier 1例、probable carrier 2例、possible ca-

rier 13例である。対照としては、健常人女性、8例 (33歳から44歳で平均41歳) につき検討した。なお 5-HT の動態に影響を及ぼすと思われる薬物を服用している人は除外した。

方法は、3.8%クエン酸ナトリウム 2 ml 加注射器で静脈血 18 ml 採血、700g、4分間、0℃で遠心し、platelet rich plasma (PRP) を分離。血小板数は、Bretcher-Cronkite法を用いて位相差顕微鏡で算定した。血小板中の 5-HT 含量は、PRP 1 ml を、1600g、20分間、0℃で遠心し、その沈渣に 3N HCl 1 ml を加え、直ちに蛍光分光光度計 (Farrand Model, MK-1, excitation wave, 300m μ emission wave, 540m μ) で蛍光強度を測定することにより定量した。

血小板への ¹⁴C-5-HT のとりこみは、PRP 1.75 ml に bovine serum albumin (4g/dl) を含む modified Krebs Ringer 液 (pH, 7.4) 1.68 ml を加え、(薬物を加える時は、これに 10 mM reserpine 0.007 ml を加えた。) 10分間前処置したのち、10⁻³M ¹⁴C-5-HT 0.07 ml を加え、37℃で浸漬した。次に、0、20、90分毎にそれぞれ 1 ml ずつ取り出し、1600g、10分間、0℃で遠心後、その沈渣に蒸留水 1 ml を加え、10秒間超音波処理を行った。これに toluene scintillator 10 ml を加え liquid scintillation counter (Packard Model 3320) で算定した。一方血小板からの ¹⁴C-5-HT の遊離は PRP 2 ml に Krebs Ringer 液 1.92 ml、10⁻³M ¹⁴C-5-HT 0.08 ml を加え、37℃、90分間浸漬後、1600g、10分間、0℃で遠心

* 都立府中病院神経内科

** 東京都神経研

し、その沈渣を求めた。そして沈渣に Krebs Ringer 液 4 ml を加え、十分懸濁し、37°C で浸漬しながら、0, 20, 60分毎に 1 ml ずつ取り出し、1600 g, 10分間、0°C で遠心し、沈渣をもとめ、とりこみと同様の操作で、血小板中に残存している¹⁴C-5-HT量を算定した。その他、同時に江橋法による血清 CPK 値の測定と、CPK 値が異常値を示した母親のうち4例で、一日の尿中エピネフリン、ノルエピネフリン (TH I 蛍光法)、5-HIAA (1-nitroso, 2naphthol 比色改良法) を測定した。なお、血小板への¹⁴C-5-HTのとりこみや遊離を規定すると思われる、浸漬液の組成、pH、温度、5-HT や血小板の濃度等については、濃縮ヒト血小板による基礎実験で、条件を設定した。

結果

①、保因者と対照者の 10^9 個血小板あたりの5-HT含量は、平均値と標準偏差それぞれ、 $0.355 \pm 0.094 \mu\text{g}$ 、 $0.481 \pm 0.099 \mu\text{g}$ であり、有意の差 ($P < 0.01$) で保因者は低値を示した。また対照者の平均値より低値を示した保因者は、16例中15例 (94%) であり、対照者の最低値より低値を示した保因者は、16例中8例 (50%) であった。

②、血小板への¹⁴C-5-HTのとりこみは、浸漬後、20分と90分で測定した。これは、濃縮ヒト血小板による基礎実験から、20分が初

期速度、90分がとりこみの最大量と考えられたからである。最初の20分間にとりこまれた量は、保因者、 $3.62 \pm 1.08 \text{ nmol}$ 、対照者、 $5.15 \pm 0.71 \text{ nmol}$ で、90分間では、保因者、 $8.40 \pm 1.88 \text{ nmol}$ 、対照者 $12.00 \pm 1.10 \text{ nmol}$ であり、保因者は、対照者に比し有意の差 (20分間、 $P < 0.02$, 90分間、 $P < 0.01$) で低値を示した (図1)。

またreserpineを加えた場合は、とりこみは当然抑制され、20分間では、保因者 $2.63 \pm 0.74 \text{ nmol}$ 、対照者 $3.68 \pm 0.79 \text{ nmol}$ 、90分間では保因者 $4.91 \pm 1.92 \text{ nmol}$ 、対照者 $6.86 \pm 1.27 \text{ nmol}$ と保因者は対照者に比し、いずれも低値を示した。

③、血小板からの¹⁴C-5-HTの遊離は、20分と60分後に測定したが、保因者と対照者の間には、特に差異はみられなかった。

④、血清 CPK 値は、対照者では全例正常範囲を示したが、保因者では、16例中7例 (43.8%) で異常値を認めた。また血清CPK値が、異常を示す例では、血小板中、5-HT含量も低値を示す傾向にあるが、一方では、CPK値は正常にかかわらず、5-HT含量が低値を示す例が4例あった (図2)。

⑤、血清 CPK 値が異常値を示した4例の尿中代謝産物 (エピネフリン、ノルエピネフリン、5-HIAA) は、いずれも正常範囲を示し、全身的なアミン代謝障害を思わす所見は得られなかった。

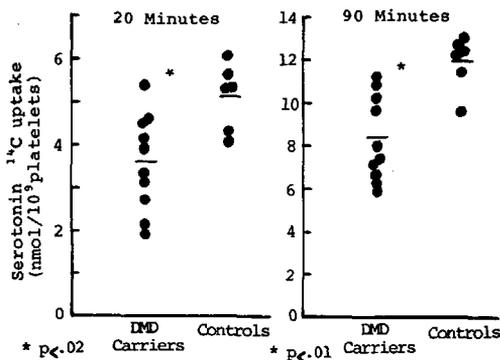


図1 Serotonin ¹⁴c uptake into platelets from carriers of DMD and controls.

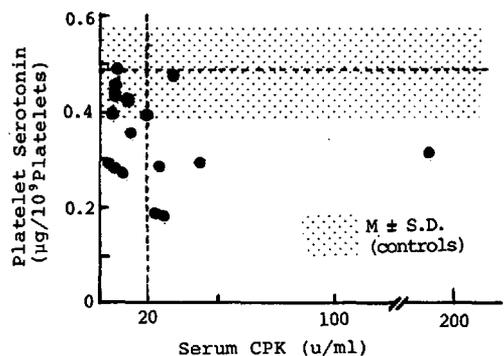


図2 Relationship between serum CPK and serotonin content in platelets.

考 察

DMDの発生病理に関しては、従来筋自体にprimary defectが存在するという考え方が一般的であったが、Cazzato²⁾は組織所見より、血管系の変化がprimaryであり、筋の変化は二次的なものであると考えた。またMendell³⁾⁴⁾らは、ラットを用い、腹部大動脈結紮後、5-HTを腹腔内に注入することにより、DMDと類似した筋の組織変化と、CPKなどの諸酵素の上昇を認め、5-HTなどの生体アミンの存在下での血管系の異常に注目している。その後DMDの発生病理に対して、5-HTなどのアミン類の役割を強調する報告もいくつか出されている。Murphy⁵⁾らは、DMD患者血小板中の5-HT量が対照に比し低値を示し、また血小板へとりこまれる¹⁴C-5-HTの速度が遅延する実験結果から、次のように推論した。すなわち、血小板へとりこまれる5-HTの速度が低下すれば、血小板の凝集に変化が生じ、一過性の血管閉塞がおこりやすくなり、ひいては骨格筋に壊死が生じる可能性を示唆している。また一方では、血小板でのアミンの輸送機構が筋内小血管の自律神経終末と類似しているとの仮説に立ち、シナプス間隙に放出されたアミンの神経終末へのとりこみが遅延することは、アミンの作用効果を延長させ、骨格筋の血管床で機能的な虚血状態がおこるものと考えている。しかし最近Bradley⁶⁾らは、運動や動脈血阻血などの負荷を加えた時の筋の血流量が、Xenon, 133 clearanceを指標として測定した時、対照に比し、差異を認めないことなどから、血管説に疑義を唱えている。

今回我々は、臨床的には筋力低下や筋萎縮を全く認めない患児の母親である保因者でも、血小板中5-HT含量が低下し、また血小板への¹⁴C-5-HTのとりこみが低下していることが明らかとなった。このことは、血小板への5-HTのとりこみが低下することと、筋病変の成立とを直接的に結びつけがたく思われ、何か別の要因の関与があった時はじめて、筋に組織変化がおこるものと考えられる。

また一方では、DMDを全身性疾患としてとらえる考え方もあり、例えば筋肉だけでなく、DMD患者の赤血球膜でもATPaseのウアバニンに対する反応態度や、赤血球膜の脂質構成が正常人と異なることが明らかにされており、⁷⁾血小板でのアミンの代謝障害も、一連の膜の異常として全身性疾患の部分現象とも考えられる。

ところでDMDの遺伝形式は、伴性劣性遺伝とされており、患者と保因者で血小板中の5-HT含量が低値を示すことはLyon仮説で説明可能である。すなわちDMDの病的遺伝子をもつX染色体をX^dとすると、女性保因者の遺伝子型はX^dXであるが、その体細胞は、X^dO/XOのモザイクであり、X^dOの細胞が多くなれば、血小板中の5-HT含量もそれだけ低値を示す訳である。⁸⁾ただ各々の保因者分類による保因者の5-HT含量のばらつきはいかなるものか、また個々の血小板中での5-HTの動態の検討が、今後の課題と考える。

一方、血小板の5-HT含量の測定は、女性保因者発見のために、よりprimary defectに近い現象での方法として有効と思われるが、今後、症例の蓄積とCPK値などとの比較検討が必要である。

結 語

①、保因者の血小板中5-HT含量は、対照者に比し、有意に低値を示すことから、血清CPK値と共に、保因者判定の一方法として有効と思われる。

②、保因者にみられる血小板への¹⁴C-5-HTのとりこみの低下は、保因者において、血小板のアミンとりこみ機構の異常を示唆させる。

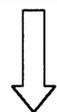
③、血小板への5-HTのとりこみは、血小板細胞膜と、dense bodyと呼ばれる貯蔵顆粒の2つのレベルで考える必要があり、今後、種々の薬物を作用させたり、また電顕的観察により、血小板における5-HTのsubcellularの動態を検討する必要がある。

文 献

- 1) Radu, H., Migea, S., Török, Z., Bordeianu, L. & Radu, A. : Carrier detection in X-linked Duchenne type muscular dystrophy. A pluridimensional investigation, *J. neurol. Sci.*, 6 : 289, 1968.
- 2) Cazzato, G. : Considerations about a possible role played by connective tissue proliferation and vascular disturbance in the pathogenesis of progressive muscular dystrophy, *Europ. Neurol.*, 1 : 158, 1968.
- 3) Mendell, J. R., Engel, W. K. & Derrer, E. C. : Duchenne muscular dystrophy : Functional ischemia produces its characteristic lesions, *Science*, 172:1143, 1971.
- 4) Mendell, J. R., Engel, W. K. & Derrer, E. C. : Increased plasma enzyme considerations in rats with functional ischemia of muscle provide a possible model of Duchenne muscular dystrophy, *Nature*, 239 : 522, 1972.
- 5) Murphy, D.L., Mendell, J.R. & Engel, W. K. : Serotonin and platelet function in Duchenne muscular dystrophy, *Arch. Neurol.*, 28 : 239, 1973.
- 6) Bradley, W.G., O'Brien, M.D., Walder, D. N., Murchison, D., Johnson, M. & Newell, D.J. : Failure to confirm a vascular cause of muscular dystrophy, *Arch. Neurol.*, 32 : 466, 1975
- 7) Brown, H.D. & Cattopadhyay, S.K. : Erythrocyte abnormality in human myopathy, *Science*, 157 : 1577, 1967.
- 8) 杉田秀夫 : ミオパチーの遺伝——進行性筋ジストロフィー症を中心に—— 内科 25 : 611, 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



目的

Duchenne 型筋ジストロフィー症(DMD)は,伴性劣性遺伝性疾患である.そのため女性保因者を正確に指摘することは,病因の追求とともに重要であり,血清CPK 値をはじめ,筋電図,筋生検,身体総カリウム量の測定などが行なわれている¹⁾が,どの検査法も決定的なものはなく,適当な検査法を組み合わせ,互いに補足させてその信頼性の向上につとめているのが現状である.