

B-1 ライ症候群の発生機構に関する研究

—第3報、骨格筋と脳のミトコンドリアに 及ぼすオレイン酸の影響—

研究協力者 小川 昭之 (大分医大 小児科)

共同研究者 永見 真木子・平松 公三郎 大分医大 小児科

竹下 正純・吉田 敏 大分医大 生化学

島田 達生 (大分医大 解剖)

I 目的

昨年度の本研究会でライ症候群患者の生検筋ミトコンドリア (Mt) の変性、チトロムC酸化酵素活性低下、Mt脂肪酸組成中のオレイン酸著増という結果を報告²⁾したが、今回本症候群のMt障害のモデル系として、ウサギ骨格筋Mtと豚脳Mtに患者血清、及びオレイン酸を加え、その生化学的変化を検討したので報告する。

II 対象と方法

昭和59年1月1日より12月31日までに当科で経験してライ症候群2例 (A: 7ヵ月男子、B: 1歳7ヵ月男子) を対象とした。患者血清は各病日毎に採血後、血清分離し-80℃で凍結保存した。ウサギ骨格筋Mtは、Ernster¹⁾らの方法で精製した (図1)。即ち、家兎骨格筋を、筋膜や脂肪組織から分離した後、筋重量の10倍量のSolution Aに浸し、氷冷しながら、ハサミで細切しガラスホモジナイザーでホモジナイズした。これを2回遠心し、得られたMt分画を0.15M KClで懸濁液とした。

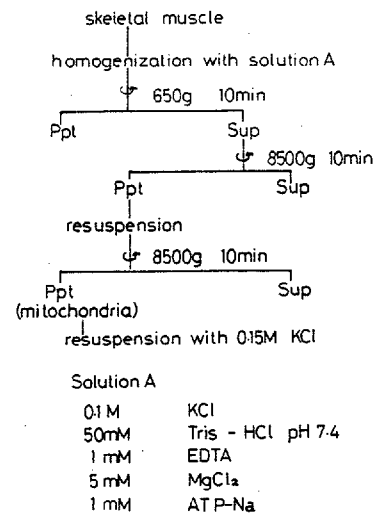


図1 骨格筋Mtの精製¹⁾

このMt懸濁液に患者血清と同年齢対照血清を一定量加え、[1] a)形態的变化を電子顕微鏡で観察し、b)チトクロムc酸化酸素活性を還元型チトクロムcの酸化で分光学的に測定した。

[2]オレイン酸を1%BSAに混じ、超音波処理を行ない、エマルジョンとして豚脳Mtに加え、チトクロムc酸化酸素活性を測定した。

Ⅲ 結 果

[1] a)Mt懸濁液 100 μ lに患者血清40 μ lを加え、37 $^{\circ}$ C30分間インキュベートすると、Mtがゲル化した。対照血清ではゲル化はおこらなかった。ゲル化したMtを電顕で観察すると、Mt自体に形態的な変化は余り認められないが、その周囲に微細なフィラメント物質が認められた(図2)。

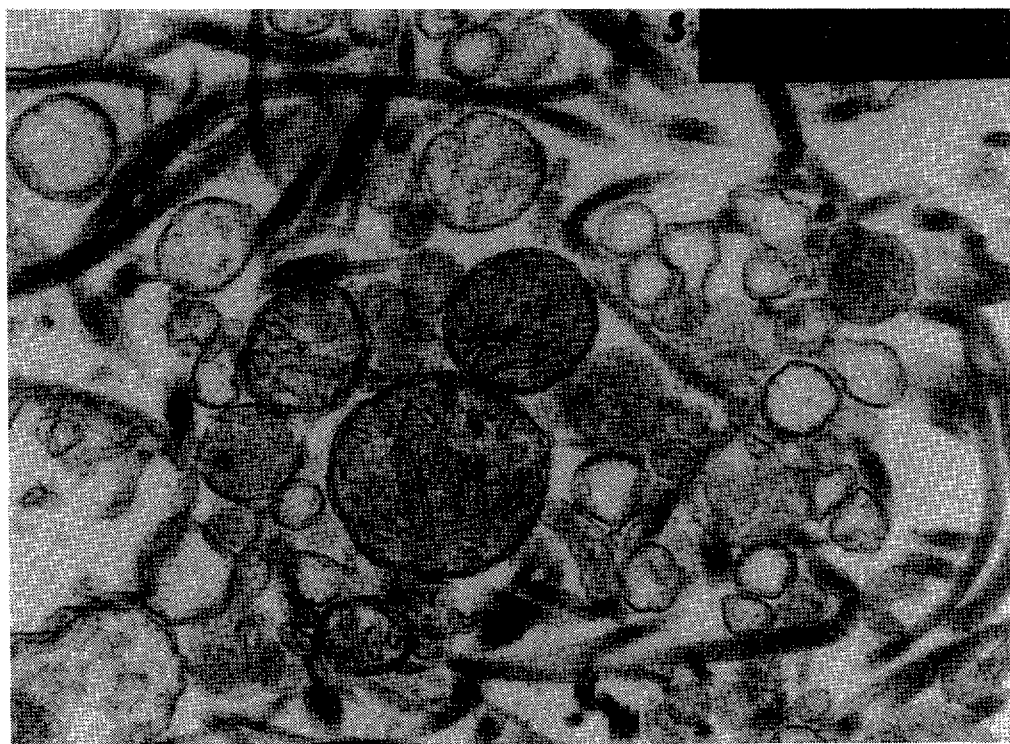


図2 骨格筋Mtと患者血清との混合によりゲル化したMtの電顕像(×20,000)

フィラメント物質は、さらに細かい繊維が集結しており、全体に規則正しい横縞がみられた。このゲル化は、50mMリン酸緩衝液を加えることにより阻止された。ゲル化したHtでは、次に述べるチトクロムc酸化酵素活性測定が困難となっているので、その際にはHt懸濁液に、50mMリン酸緩衝液を加えることが必要であった。

[1] b) 患者血清を、血清蛋白量で 0.4~ 1.6(mg /mg Ht protein)まで量を変化させ、Htに加え37°C 30分間インキュベート後、チトクロムc酸化酵素の反応初期速度 v を測定した(図3)。

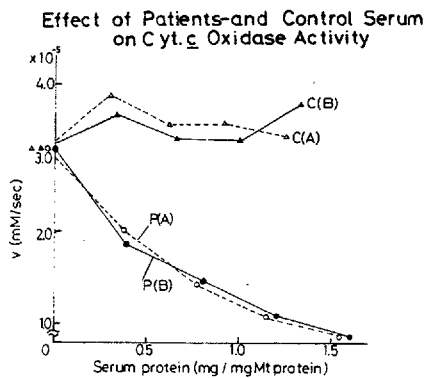


図3 ライ症患者血清と対照血清に対するチトクロムc酸化酵素の反応初期速度
P(A), P(B): 患者A, Bの血清
C(A), C(B): 対照正常児A, Bの血清
患者A: 7カ月、患者B: 1歳7カ月男子

対照血清(C(A), C(B))では、 v に余り変化は認められないが、患者血清(P(A), P(B))では加える血清量増加に伴ない、 v が減少した。また患者Aについて、第1, 2, 3病日血清をHtに加え、各々の K_m 値を測定すると(図4)、正常Htの $K_m=50.0 \mu\text{M}$ に比し、第1病日で K_m 減少、第2病日で K_m 増加、第3病日で再び K_m 低下がみられた。

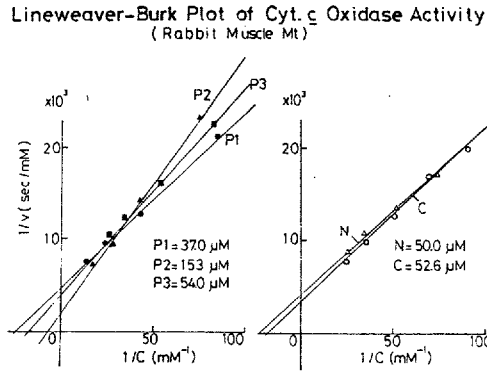


図4 ライ症候群（7カ月の男子）の第1、2、3病日のチトクロムc酸化酵素活性Km値
P1、P2、P3はそれぞれ、第1、2、3病日の血清を示す

[2] 患者Aでは第2病日、患者Bでは第4病日に大腿四頭筋より筋生検を行ない、組織学的に、脂肪滴浸潤、Mt膨化という初見を得た。生検筋のMt分画の脂肪酸組成を調べたところ、前回の報告²⁾の症例と同様、オレイン酸の著増がみられた（図5）。次に、オレイン酸をMtに加え、チトクロムc酸化酵素活性を測定したところ、オレイン酸2 μmol/mg Mt proteinでは、初期反応速度 $v = 0.24 \mu\text{m/sec}$ から $0.44 \mu\text{m/sec}$ へ増加し、濃度が20 μmol/mg Mt proteinになると、 $v = 0.16 \mu\text{m/sec}$ とvの低下がみられた（図6）。

Fatty Acid in Muscle for Reye's Syndrome and Control Subject

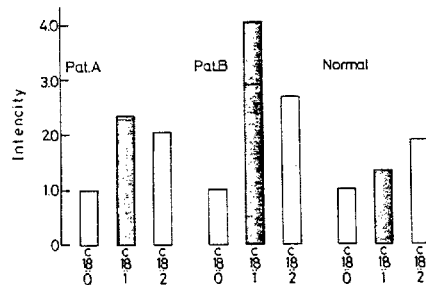


図5 ライ症候群（1歳7カ月男子）の第4病日生検筋のMt分画脂肪酸組織

Effect of Oleate on Cyt. c Oxidase Activity

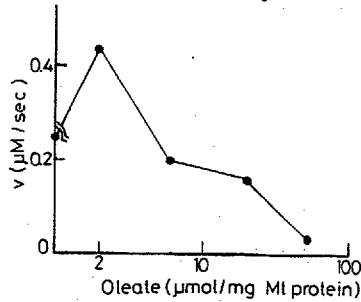


図6 チトクロムC酸化酵素活性に対するオレイン酸の影響

IV 考按と結論

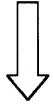
患者血清のMtに対する影響として、Mtのゲル化とチトクロムC酸化酵素活性低下がみられた。Mtのゲル化の原因は、電顕で観察されたフィラメント物質と思われるが、この物質が何であるかは、血液中の繊維成分である可能性があり、凝固系の異常が考えられる。個々の症例につき、凝固系異常も含めてこの物質の検索をすすめる必要がある。また、患者血清中には、このフィラメント物質との関係は定かではないが、何らかのMt障害因子が含まれている可能性が示唆された。

また、患者生検筋Mtで著増していたオレイン酸も一定濃度以上になると、チトクロムC酸化酵素活性を阻害した。このことから、オレイン酸も、Mt障害因子の1つである可能性が示されたと考える。今後、患者血清の脂質組成などの分析や、オレイン酸及びその誘導体のMtに対する影響を詳細に調べる必要がある。

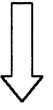
文 献

(1) Ernster, L and Nordenband, K: Skeletal muscle mitochondria. "Methods in Enzymology." 10:86-9 4, 1967

(2) 小川昭之他: ライ症候群の発生機構に関する研究、第1編ライ症候群における生検筋の形態学的生化学的検討、厚生省心身障害者研究報告書(昭和58年度) 8-1:44-49, 1959



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

昨年度の本研究会でライ症候群患者の生検筋ミトコンドリア(MT)の変性、チトロムC酸化酵素活性低下、MT脂肪酸組成中のオレイン酸著増という結果を報告²⁾したが、今回本症候群のMT障害のモデル系として、ウサギ骨格筋Mtと豚脳MTに患者血清、及びオレイン酸を加え、その生化学的変化を検討したので報告する。