



## Menkes病モデル動物 “macular mouse” の病態に関する研究 ―第2報 核磁気共鳴を用いた脳代謝の検討―

|       |                                                                                                               |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2014-10-27<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 鶴井, 聡<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/1399">http://hdl.handle.net/10271/1399</a>                               |

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

|       |                                                                  |         |                |
|-------|------------------------------------------------------------------|---------|----------------|
| 学位記番号 | 医博論第 1 2 2 号                                                     | 学位授与年月日 | 平成 4 年 3 月 9 日 |
| 氏 名   | 鶴 井 聡                                                            |         |                |
| 論文題目  | Menkes 病モデル動物“macular mouse”の病態に関する研究<br>—第 2 報 核磁気共鳴を用いた脳代謝の検討— |         |                |

医学博士 鶴井 聡  
論文題目

Menkes 病モデル動物 “macular mouse” の病態に関する研究  
— 第2報 核磁気共鳴を用いた脳代謝の検討 —

論文の内容の要旨

〈はじめに〉 Menkes kinky hair 病 (メンケス病) は銅代謝異常を主因とするが、メカニズムに関しては不明である。西村によって発見された  $C_3H_7$ -MI 系マウスのヘミ接合体 (MI/y) は、メンケス病と同様な症状を持ち、銅の臓器分布状態も類似することよりモデル動物として考えられている。申請者は副論文においてこの動物につき銅関連酵素である cytochrome c oxidase (CCO) を測定し MI/y の脳、心臓での低下を明らかにし、進行性中枢神経障害の主要因としての可能性を示唆した。主論文においては、CCO の低下より予想される脳のエネルギー状態の変化を核磁気共鳴を用いて測定、検討した。

〈方法〉 本実験には  $C_3H_7$ -MI 系マウスの MI/y とコントロール群として normal litter mate (+/y) を用いた。脳代謝の測定は、日本電子社 NMR 分光機 (GSX-270 WB, 6.4 Tesla) を使用し、in vivo 下での  $^{31}\text{P}$ -nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum 分析、および in vitro 下での  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 分析によって行った。 $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum 分析; MI/y (日齢 9, 14 日目)、+/y (日齢 9 日目) をそれぞれ 5 匹ずつ頭部を無麻酔下で外径 10 mm の表面コイルに固定し、測定条件を共鳴周波数 109.5 MHz, パルス幅 15.0  $\mu\text{sec}$ , 積算回数 400 回として spectrum を得た。エネルギー状態は、各リン化合物のピーク面積を求め、互いの比でもって表した。脳内 pH は、phosphocreatine (PCr) と無機リン酸 (Pi) との化学シフトより算出した。 $^1\text{H}$ -NMR spectrum 分析; MI/y, +/y (日齢 9 日目) を 5 匹ずつ笑気ガスにて麻酔した直後、液体窒素中に落下させ瞬間凍結。ドライアイス上で全脳を取り出し粉碎後、0.1 N HCL/99% メタノールでホモジナイズし、0.3 N HClO<sub>4</sub> で抽出した。それらを 10,000 g  $\times$  10 min で遠沈、上清を 1.5 N KOH, 0.3 N KCL, 0.1 N K-phosphate で中和した。再度同条件で遠沈後凍結乾燥し、既知量の 3-trimethylsilylpropionate (TSP) と共に 0.1 N phosphate buffered D<sub>2</sub>O に溶解し、試料とした。そして 5 mm 管を用い共鳴周波数 270.5 MHz, パルス幅 4.2  $\mu\text{sec}$ , 積算回数 128 回でもって測定した。各物質の同定は標準物質 TSP との化学シフトおよびシグナルのパターンより求めた。定量分析は、Petroff らの方法に準じ、TSP に対するシグナル比でもって行った。

〈結果〉  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum 分析; 日齢 9 日目の MI/y と +/y の比較ではエネルギー状態を反映するとされている PCr/Pi は +/y 1.70, MI/y 1.15 と有意に MI/y で低値を示した。リンの総和に対する ATP の割合が有意に低下していること、PCr/ATP がほぼ同値であることより、PCr ばかりでなく ATP の低下も伴っていることが類推された。脳内 pH は +/y 7.35, MI/y 7.15 と MI/y で有意にアシドーシスに傾いていた。 $^1\text{H}$ -NMR spectrum 分析; 乳酸, PCr, creatine (Cr), および GABA, N-acetylaspartate を始めとする各種アミノ酸が同定可能であった。Cr, PCr は  $^{31}\text{P}$ -NMR の結果と一致して、MI/y は +/y に比較して Cr が高く、PCr は低い傾向を示した。また、乳酸は MI/y で有意に高く、in vivo で見られたアシドーシスは、乳酸の蓄積によるものと考えられた。各種アミノ酸においては、有意差を認める物質はなかった。

〈まとめ〉 核磁気共鳴を用い、MI/y での PCr/pi, ATP の低下, アシドーシス, 乳酸の蓄積等エネルギー代謝の低下を明らかにした。PCr/Pi の低下のみでなく ATP の低下も示したことは重篤なエネルギー低下状態が考えられ中枢神経障害の原因としてミトコンドリア呼吸鎖障害のみでなく複数の要因 (free radical の増加・カテコラミン系異常・血管障害等) によるもの、あるいは早期 (胎児期) よりすでに障害が進行していると推測される。

論文審査の結果の要旨

本論文は核磁気共鳴法 (NMR) を用い、メンケス・キンキー・ヘアー病 (メンケス病) のモデル動物で

あるマクラーマウスの脳内代謝を測定し、メンケス病の中枢神経障害の発生機序について検討したものである。その結果、マクラーマウスでは、in vivo でも in vitro でもエネルギー代謝が低下していることが分かった。

#### 〔方法〕

モデル動物としてはマクラーマウスのヘミ接合体である M1/y を、対照として正常同腹仔 (+/y) を用いている。NMR シグナルの測定には日本電子社製 NMR 分光器 (モデル GSX-270WB) を用いている。in vivo の脳代謝の測定は  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトロスコピー、in vitro のそれは、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトロスコピーに依っている。in vivo の分析ではホスホクレアチン (PCr)、ATP、無機リン酸 (Pi)、リン酸モノエステル (PME) 等の相対量が各化合物の特徴的シグナルの面積比によって求められている。また in vitro の分析では既知量の内部基準物質を加えることにより、乳酸、PCr、クレアチン (Cr)、GABA、アミノ酸等の定量が行われている。

#### 〔結果〕

1) 日齢 9 日目のマクラーマウスと対照マウスについて in vivo での NMR 解析が行われ、PCr/Pi 比が求められた。同比はモデル動物で 1.15、対照動物で 1.70 ( $P < 0.05$ ) と、モデル動物で明らかに低下していた。(ATP)/(ATP+PCr+Pi+PME) 比もマクラーマウスで低下していた。PCr/ATP 比は変わっていないので PCr と ATP 濃度は平行していると結論される。また、PCr と Pi のケミカルシフト変化から求めた脳内 pH は酸性に傾いていた。

2) 日齢 9 日目のモデル動物と対照動物の瞬間凍結脳の磨砕物からえられた抽出液について乳酸、PCr、Cr 等が定量された。

乳酸 [(1.63 $\pm$ 0.11)  $\rightarrow$  (2.26 $\pm$ 0.35) ( $P < 0.01$ )] と

Cr [(2.23 $\pm$ 0.34)  $\rightarrow$  (2.98 $\pm$ 0.34) ( $P < 0.05$ )] は増加傾向を示し、

PCr [(1.67 $\pm$ 0.54)  $\rightarrow$  (1.50 $\pm$ 0.17)] は減少傾向を示した。

#### 〔考察〕

マクラーマウスは日齢 9 日目においてすでに脳内エネルギー代謝の低下をきたしていることが明らかとなった。この組織エネルギーレベルの低下はシトクローム c 酸化酵素の活性阻害をはじめ複数の要因によるものと思われるが、すでに胎児期から始まっている可能性が考えられ、メンケス病の中枢神経障害の主な原因の一つだとされる。

以上の発表に引き続き、以下の諸点について試問が行われた。

1.  $^{31}\text{P}$ -NMR における  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ピークの意味
2. 対照動物の頭部固定について
3. 日齢 9 日目を選んだ根拠
4. マクラーマウスの死亡の直接の原因
5. ADP は測定したか
6. 銅の皮下投与の効果
7. カテコールアミン代謝への影響
8. 腎臓への銅の蓄積のメカニズム
9. ポルフィリン代謝への影響
10. メンケス病児の治療法

これらの質疑に対する申請書の応答はおおむね適切であった。以上から本論文は博士 (医学) の学位論文としてふさわしいものであることを全員が一致して判断した。

論文審査担当者 主査 教授 藤 田 道 也

副査 教授 五十嵐 良 雄

副査 助教授 小 林 明

副査 教授 藤 瀬 裕

副査 助教授 西 村 正 彦