

原 著

福山型先天性筋ジストロフィーの脳グングリオシド分析

東京女子医科大学 小児科学教室 (主任: 福山幸夫教授)

* 現: 大分医科大学 小児科学教室 (主任: 小川昭之教授)

イズミ タツロウ マリア デ ルールデス ペレス ノ ボ
泉 達郎*・Maria de Lourdes Peres NOVOオオサワ マキコ サイトウ カヨコ フクヤマ ユキオ
大澤真木子・斎藤加代子・福山 幸夫

(受付 平成5年6月22日)

Analysis of Cerebral Gangliosides in a Patient with Fukuyama Type
Congenital Muscular Dystrophy (FCMD)Tatsuro IZUMI*, Maria De Lourdes Peres NOVO, Makiko OSAWA,
Kayoko SAITO and Yukio FUKUYAMA

Department of Pediatrics (Director: Prof. Yukio FUKUYAMA)

Tokyo Women's Medical College

*Present address: Department of Pediatrics, Oita Medical University, Oita

When compared with a Duchenne type progressive muscular dystrophy patient and a non-neuromuscular disease control, our FCMD patient showed a reduction of the total level of lipid-bound sialic acid and an unusual ganglioside pattern in the cerebral gray matter. However, G_{M4}, a marker ganglioside unique to central nervous system myelin and oligodendroglia, showed a relatively high percent distribution in the cerebral white matter.

緒 言

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は 1960年 Fukuyama らによって最初に報告され¹⁾, 本邦において特異的に多く, 小児期における罹患率は Duchenne 型進行性筋ジストロフィーのその約1/3に及ぶとの推定もある²⁾³⁾. FCMD は進行性筋ジストロフィーと中枢神経系の形成異常の併発が必須であり, 重篤な精神運動遅滞と著明な筋緊張低下, 早期よりの関節拘縮を特徴とし, 血族結婚率が高く常染色体劣性遺伝と考えられている. 神経病理所見は脳・小脳の小多脳回が広汎にみられ, 神経細胞層構築は不規則で層構造が失われ, 一部では分子層への錐体神経細胞の異所性突出を認める⁴⁾⁵⁾. 頭部 CT, MRI (T₁強調画像) では厚脳症, 小多脳回などの皮質異形成のほか, 大脳白質に一致した低吸収域を示すことが多い

が, 剖検脳の病理組織学的検索では, 大脳白質の髄鞘や軸索には著変はなく, 軽度の組織の粗鬆化や繊維性グリオシスを示す程度とされている^{4)~6)}.

このような特異的中枢神経病変にもかかわらず, 神経生化学的検討は極めて少なく, 脂質分析に関しては Eda ら⁷⁾の報告があるのみである. ガングリオシドは神経組織に高濃度に含有されており, 脳の成熟とともに変化し, その成長と病理にも関与していることが知られているため, FCMD の基礎的成因を究明する上でガングリオシドの分析は重要である. 我々は FCMD 患者の剖検新鮮凍結脳にてガングリオシドを分析したので報告する.

対象および方法

脳は17歳女性 FCMD と, 19歳 Duchenne 型進

行性筋ジストロフィー (DMD), 敗血症と播種性血管内凝固症候群で死亡した10歳女性の3症例の剖検時新鮮凍結したものを使用し, 分析時まで -80°C にて保存していた. FCMDの患者は典型的な臨床像と経過を示し, 剖検では両側前頭部から頭頂部にかけて小多脳回を認め, 右側頭部には厚脳回を認めた. 筋繊維膜表面ジストロフィンはFCMD例では一部染色が薄くなっている所もあったが存在し, DMDでは欠損していた.

ガングリオンドは3症例ともに前頭葉で分析した. ガングリオンドの抽出, 精製は Hirabayashi ら⁸⁾, Higashi ら⁹⁾の方法に準じた. 微量組織よりの抽出に有効である本法の概略を以下に示す. 各脳組織0.10~0.20gを融解後, 灰白質と白質に分離し, それぞれを2ml 蒸留水に浮遊させ, 脳神経組織を十分に超音波破壊させた後, 有機溶媒にて, それぞれ3回抽出した. クロロホルム/メタノール

(2/1, v/v) 混合液8ml, メタノール3ml, クロロホルム/メタノール混合液4mlにて, 順次, 十分に抽出し, 遠心した後, それぞれの上層, 上清, 上清液を取り, その混合液を窒素風乾し, 0.5N NaOH-メタノール2mlにて 37°C , 1時間のアルカリ水解をした. 酢酸にて中和後, 蒸留水にて透析, 凍結乾燥後, 更に, PBA60カラム (アミコン社, USA)にて糖脂質分画を精製した後, HPTLC (high performance thin layer chromatography, 高速薄層クロマトグラフィー) プレート (E Merck 社, ドイツ)にて展開した. 展開溶媒液はクロロホルム/メタノール/12mM MgCl_2 /15M NH_4OH (60/40/7.5/3 v/v)と, クロロホルム/メタノール/12mM MgCl_2 (50/40/9 v/v)にて, 同一方向にて連続展開した. レゾルシノール染色後, 二波長クロマトスキャナー (CS-3000, 島津製作所)にて, ガングリオンドを同定定量した. 総ガ

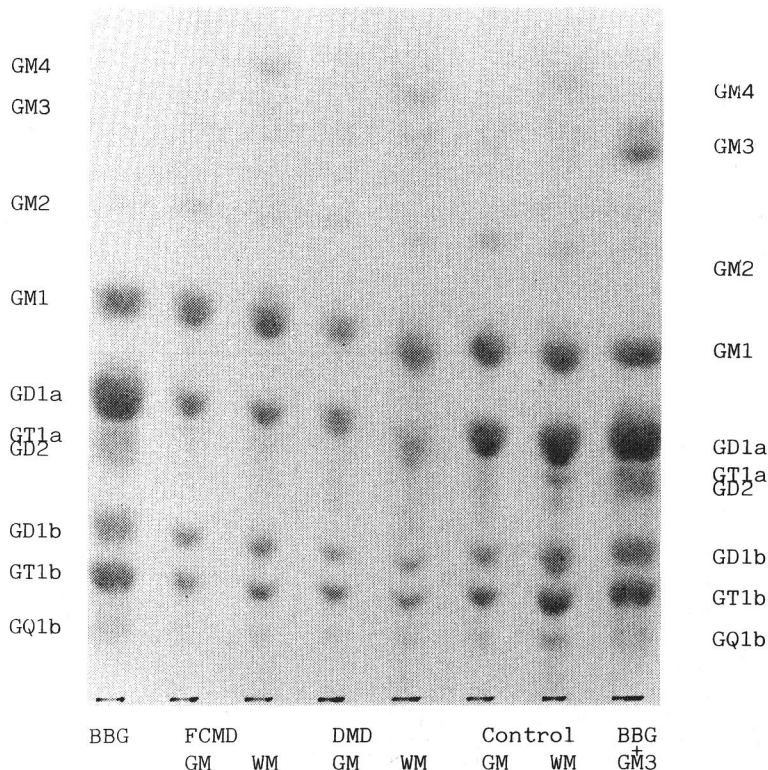


図 ガングリオンド HPTLC 分布型

BBG: 牛脳ガングリオンド, FCMD: 福山型先天性筋ジストロフィー, DMD: Duchenne 型進行性筋ジストロフィー, GM: 灰白質, WM: 白質.

ングリオンドはPBA60カラム後, Suzukiの方法にて脂質結合シアル酸量として定量した¹⁰⁾.

結 果

対象患者3症例の前頭葉灰白質と白質のガングリオンドHPTLC分布型と含有量, 分布比率を分析し, 図と表に示した.

FCMD患者においては灰白質, 白質ともに脂質結合シアル酸の総量は他の2例に比して低下していた. DMD例のシアル酸総量は非神経筋疾患対照例に比して, わずかに低下していた. 灰白質ではFCMDにおいては G_{M1} が最大%分布を示し, G_{M1}/G_{D1a} 比はFCMDでは, 他の2例に比して増大していた. ただ G_{Q1b} はFCMD例では低下していた. 白質では, G_{M4} の%分布がFCMD例では他の2例よりも高値を示していた. FCMDにおける G_{D1a} や G_{Q1b} は灰白質同様に, 他の2例に比して低下していた.

考 察

FCMDの基礎的病因や遺伝子座はいまだに不明ではあるが, 中枢神経病変と進行性筋ジストロフィーの併発を主要症状とする独立疾患として認識されている¹⁾⁻³⁾. 我々が分析したFCMD患者の脳病理では, 従来の報告と同様に⁴⁾⁻⁶⁾, 大脳の小多脳回, 大脳皮質神経脂肪層構築の不規則性や軟

膜下の有髄線維を持ったグリア間葉組織の増殖を認めた. FCMD患者における脂質結合性シアル酸総量の減少は神経組織の成熟障害を示し, 灰白質で G_{D1a} ではなく G_{M1} が最大分布比率を占めていることはEdaらの報告と一致し⁷⁾, ガングリオンド分布型の異常を示し, 脳の成熟障害を示唆している¹¹⁾¹²⁾. G_{Q1b} はシナプス形成後より神経細胞に増加し, 加齢とともに増加してくる事が指摘されているが¹²⁾, FCMD患者灰白質における G_{Q1b} の減少はシナプス形成の異常を示唆していると思われる. CTやMRI T₁強調画像で大脳白質に一致した低吸収域を示すことが知られている. 森松, 佐藤ら⁶⁾による白質の神経病理学的研究では, 白質の狭小化と, 髄鞘や軸索の淡明化, 白質の線維性グリオーススを認め, 電顕では相当年齢対照例に比して有髄神経線維の小径化の傾向を示すも髄鞘形成は軸索の太さに対応して保持されたと報告している. 神経生化学的には G_{M4} は髄鞘やオリゴデンドログリアにのみ特異的に存在し, その量は髄鞘形成の量的標識になりうる事が知られている¹³⁾. Edaらの報告では⁷⁾, Folch法にて脂質を抽出し¹⁴⁾, 異なった分析法のために G_{M4} は検出されなかったものと思われる. 今回, FCMD患者脳の G_{M4} 分布率が増大していたことは, 上記の神経病

表 大脳ガングリオンドの分布比率

	FCMD ^a		DMD ^b		control patient	
	GM ^c	WM ^d	GM	WM	GM	WM
Sialic acid ($\mu\text{g/g wet wt.}$)	441	383	652	450	752	552
G_{M4}	1.1	11.6	1.9	9.4	0.6	4.9
G_{M3}	2.1	1.8	2.2	1.6	1.5	0.2
G_{M2}	3.3	2.4	3.6	2.0	5.1	3.8
G_{M1}	37.1	37.5	29.6	38.0	31.0	26.5
G_{D1a}	29.3	19.5	30.5	24.9	37.2	31.0
$G_{T1a} + G_{D2}$	0.2	0.7	1.4	0.8	1.2	2.1
G_{D1b}	14.2	12.7	13.2	10.4	9.9	11.0
G_{T1b}	11.8	12.3	16.3	11.2	11.7	17.7
G_{Q1b}	0.9	1.5	1.3	1.7	1.8	2.8

a: FCMD, Fukuyama type congenital muscular dystrophy,

b: DMD, Duchenne type muscular dystrophy,

c: GM, gray matter, d: WM, white matter,

c & d: Cerebral gangliosides were isolated from the frontal lobe white and gray matters.

理所見が示すように髄鞘形成の保持を生化学的にも確認した。ただ、 G_{M4} の絶対値が他の2例に比して増加しているわけではなく、組織学的には髄鞘形成の増大を示しているわけではないと思われる。临床上CTやMRI T1強調画像で見られる白質低吸収域は5歳頃には消失することより、有髄線維や髄鞘化の小径化や遅滞を認めるも髄鞘化は相対的に保持され、変形脱髄はないことが G_{M4} の分析からも示唆された。

DMD患者脳の脂質結合シアル酸総量がFCMDと非神経筋疾患対照例の中間に位置し、対照例に比して低下している理由は現在不明ではあるが、今後、症例を追加して検討すべき問題と思われる。

文 献

- 1) **Fukuyama Y, Kawazura M, Haruna H**: A peculiar form of congenital progressive muscular dystrophy—Report of fifteen cases. *Pediatr Univ Tokyo* 4: 5-8, 1960
- 2) **Fukuyama Y, Osawa M, Suzuki H**: Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type—Clinical, genetic and pathological consideration. *Brain Dev* 3: 1-29, 1981
- 3) **Osawa M, Arai Y, Ikenaka H et al**: Fukuyama type congenital progressive muscular dystrophy. *Acta Paediatr Jpn* 33: 261-269, 1991
- 4) **Kamoshita S, Konishi Y, Segawa M et al**: Congenital muscular dystrophy as a disease of the central nervous system. *Arch Neurol* 33: 513-516, 1976
- 5) **Takada K, Nakamura H, Tanaka J**: Cortical dysplasia in congenital muscular dystrophy with central nervous system involvement (Fukuyama type). *J Neuropathol Exp Neurol* 43: 395-407, 1984
- 6) 森松義雄, 佐藤順一, 水谷俊雄ほか: 発育期脳障害による精神遅滞の臨床神経病理学的研究: 精神遅滞の大脳白質病変—特に福山型先天性筋ジストロフィー症について—. 厚生省神経疾患研究委託事業 発育期脳障害による精神遅滞の本態と発生予防に関する研究, 昭和60年度研究報告書: 164-166, 1985
- 7) **Eda I, Takashima S, Ohno K et al**: Lipid composition of the cerebral gray and white matter in a case with Fukuyama type congenital muscular dystrophy. *Brain Dev* 7: 523-525, 1985
- 8) **Hirabayashi Y, Koketsu K, Higashi H et al**: Sensitive enzyme-immunostaining and densitometric determination of ganglio-series gangliosides on thin-layer plate: pmol detection of gangliosides in cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta* 876: 178-182, 1986
- 9) **Higashi H, Hirabayashi Y, Fukui Y et al**: Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer. *Cancer Res* 45: 3796-3802, 1985
- 10) **Suzuki K**: A simple and accurate micromethod for quantitative determination of ganglioside pattern. *Life Sci* 3: 1227-1233, 1964
- 11) **Svennerholm L, Boström K, Fredman P et al**: Human brain gangliosides: Developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochim Biophys Acta* 1005: 109-117, 1989
- 12) **Seyfried TN, Miyazawa N, Yu RK**: Cellular localization of gangliosides in the developing mouse cerebellum: Analysis using the weaver mutant. *J Neurochem* 41: 491-505, 1983
- 13) **Yu RK, Iqbal K**: Sialosylgalactosyl ceramide as a specific marker for human myelin and oligodendroglial perikarya: Gangliosides of human myelin, oligodendroglia and neurons. *J Neurochem* 32: 293-300, 1979
- 14) **Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH**: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-507, 1957