

Title	グルタミン酸脱水素酵素活性低下を示した脊髄小脳変性症例の白血球及び皮膚線維芽細胞におけるグルタミン酸代謝について
Author(s)	巽, 千賀夫
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36657
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	たつみ 巽	ち 千	か 賀	お 夫
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8411	号	
学位授与の日付	昭和63年12月26日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	グルタミン酸脱水素酵素活性低下を示した脊髄小脳変性症例の白血球及び皮膚線維芽細胞におけるグルタミン酸代謝について			
論文審査委員	(主査) 教授	垂井清一郎		
	(副査) 教授	西村	健	教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

〔目 的〕

脊髄小脳変性症の病因については不明な点が多いが、一部の症例では、白血球グルタミン酸脱水素酵素（以下GDH）活性の低下していることが知られている。GDHはグルタミン酸代謝に関与する酵素であり、グルタミン酸は潜在的神経毒として知られている。従ってGDH活性低下によりもたらされるグルタミン酸代謝の異常が細胞変性に関与している可能性が考えられる。本論文ではGDH活性低下を伴った脊髄小脳変性症の病態生理を解析することを目的として、白血球を用いて本症患者をスクリーニングし経口的グルタミン酸負荷による生体内代謝異常を解明した。また線維芽細胞を用いて、GDH活性の低下を証明し、さらにこのような線維芽細胞にあたるグルタミン酸の毒性およびその機序について検索した。

〔方 法〕

実験対象は脊髄小脳変性症または錐体路症状を伴う非定型的パーキンソンズム21例、有疾患対照として中枢神経系変性疾患以外の神経疾患11例、対照として健常成人8例について検討した。グルタミン酸負荷試験は水溶性グルタミン酸（120mg/kg）を経口負荷し、30分後の血液にてアミノ酸分析した。白血球は、ヘパリン採血後、6%デキストランを混合して静置し、上清を遠沈した。ペレットを生理的食塩水にて洗浄し、 -80°C で凍結保存した。線維芽細胞は、トリプシンを用いてculture flaskより剥離した後、生理的食塩水で洗浄して -80°C で凍結保存した。GDH活性測定は30mM ammonium acetate, 8mM α -ketoglutarate, 80 μM NADH, 2.5mM EDTA, 10mM ADP, 2.5 μM rotenoneを含む75mM Tris-HCl (pH8.6) (総量600 μl) である。この反応液にホモゲネート10 μl を加え、反応

開始1, 2, 5分後に1N塩酸40 μ lを加えて反応を停止させた。さらに8N水酸化ナトリウム800 μ lを加えて、NAD量を蛍光的に測定した。

線維芽細胞におけるグルタミン酸耐性の検討は、線維芽細胞を実験培養液にて24時間処理後、トリパンブルー染色液で5分間染色して生存細胞数を計測した。線維芽細胞内アミノ酸およびグルタチオン含量の分析は、線維芽細胞を実験培養液で8時間処理後、除蛋白し、遠沈後の上清液を中和し測定した。アミノ酸測定にはHitachi 835 autoanalyserを使用した。グルタチオンの測定は、0.2mM DTNB (5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid), 1 mM HCl, 1 mM EDTA, 0.1M sodium phosphate buffer (pH7.0) (総量800 μ l) に sample を含む反応液に、5 mM NADPH, 0.3U glutathione reductase (総量200 μ l) を加え、生成されたTNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid) 量を分光光度計にて計測した。

〔結果〕

白血球GDH活性は実験対象群で二峰性の分布を示し ($0.50 \pm 0.082 \mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{hr}$; 0.25 ± 0.034), 活性低下群は対照, 有疾患対照群と比べて有意に低下していた。(いずれも $P < 0.01$)。経口グルタミン酸負荷試験では、GDH活性低下群は正常群に比べ血中グルタミン酸値が上昇していた(正常対照群 $252 \pm 52 \mu\text{mol}/\text{L}$, GDH活性低下群 618 ± 172)。白血球GDH活性低下を認めた症例では、線維芽細胞でもGDH活性低下を認めた(正常対照細胞, 1.21 ± 0.17 , GDH活性低下細胞 0.74 ± 0.11)。線維芽細胞のグルタミン酸耐性の検討では10mM, 30mMグルタミン酸培養液中で、GDH活性低下線維芽細胞は活性正常細胞に比べて生存細胞数の割合は低下していた(10mM: 正常細胞88%, 低下細胞70%, 30mM: 68%, 32%)。線維芽細胞内アミノ酸分析では、10mMグルタミン酸含有培養液にて処理後、細胞内グルタミン酸濃度を測定したが、GDH活性低下線維芽細胞では活性正常細胞に比べて上昇していた(正常細胞 $22.4 \pm 4.5 \text{nmol}/\text{mg prot.}$, 低下細胞 42.5 ± 9.7)。0-30mMグルタミン酸含有培養液で処理後の細胞内グルタチオン濃度は、GDH活性低下線維芽細胞では正常細胞に比べて、著大な低下を示した(0mMの場合を100%として、10mM: 正常細胞86%, 低下細胞74%, 30mM: 68%, 32%)。

〔総括〕

脊髄小脳変性症21例中、5例に白血球GDH活性低下を認めた。GDH活性低下例では、経口グルタミン酸負荷試験にて血中グルタミン酸値の異常な上昇を認めた。白血球GDH活性低下症例の生検皮膚より得られた線維芽細胞は、すべてGDH活性低下を示すとともに、グルタミン酸に対する耐性が低下しており、さらに細胞内グルタミン酸濃度が上昇し、グルタチオン含量は減少していた。以上より、GDH活性低下例における細胞変性過程にグルタミン酸毒性が関与している可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、白血球グルタミン酸脱水素酵素活性低下を示す脊髄小脳変性症の臨床的特徴、及び同酵素活性低下の病因的意義について解析したものである。その結果、本症は臨床的にオリブ橋小脳萎縮症

のサブグループとして存在することを確認した。また、培養皮膚線維芽細胞を用いた実験により、グルタミン酸耐性の低下、細胞内グルタミン酸濃度の異常な上昇、細胞内グルタチオン含量の減少を証明し、本症における細胞変性にグルタミン酸毒性の関与が大きいことを示唆した。以上の結果は、本症の発症機構を解明するうえで重要な知見と考えられ、医学博士の学位に値する業績と考える。