3. 免疫増強剤 (Forphenicinel) 投与による Jimpy マウスの症状抑制効果

辻 繁 勝

和歌山県立医科大学 第二生理

Successful Treatment with Forphenicinel, an Immunomodifier, to Prevent the Defective Myelination in Jimpy Mouse

Shigekatsu TSUJI

Department of Physiology, Wakayama Medical College, Wakayama

Summary

Jimpy mouse is a neurological mutant characterized by a defective myelination in the central nervous system and the spontaneous occurrence of severe intention tremor, unsteady gait and generalized tonic-clonic seizures. The primary cause of the myelin deficiency has not yet been determined, although there have been numerous morphologic and biochemical studies.

In order to elucidate more clearly the disturbances of myelination in the central nervous system, we investigated the continuous administration of Forphenicinel, a small molecular weight immunomodifier isolated from the culture of actinomycetes, to Jimpy mouse at early postnatal age to find the preventive effects of this substance on the development of clinical manifestation of the behavioral abnormalities and early death. The results obtained were summarized as follows:

1) Continuous administration of Forphenicinel at early postnatal age resulted in a striking recovery of myelin associated CNPase and CEHase activities and of total myelin concentration in the central nervous system of the Jimpy mouse.

2) A complete restration from clinical symptoms of intention tremor and convulsive seizures are appeared in about sixty percent members of Forphenicinel administrated Jimpy mice. The recovering mice also showed a marked prolongation of their life span.

3) Synthesis of galactocerebrosides, a specific lipid component of the myelin structure which is practically absent in the central nervous system of Jimpy mice, are regained to normal after administration of Forphenicinel.

緒 言

Jimpy マウスは性染色体性劣性遺伝子 *jp* によって遺伝される半致死性突然変異体である。生後 10 日目頃から強い企図振顫、よろよろ歩き、後肢の麻痺などを発症し、しだいに重症になり、ついにはたび重なる痙攣発作による呼吸困難のため、すべての疾病個体が 1 カ月齢までに死亡する。病理学的変化としては中枢神経系全般に著しいミエリン鞘形成不全が認められ、これが痙攣発作の原因と考えられる。さらに、中枢神経系におけるミエリン膜の形成を担当している成熟 oligodendroglia 細胞の数が極端に減少しており、逆に astroglia 細胞が増加している状態が認められることから、Jimpy マウスではこれらの細胞群の分化およ

び増殖に異常がありこれが病因となっているという考え方が¹⁾あるが²⁾、同時に、また個々の oligodendroglia 細胞におけるミエリン膜形成能が正常個体に比較して著しく低下していることも事実²⁾であり、この疾患の第一義的な病因がどこにあるかは依然として不明である。われわれは成熟 oligodendroglia 細胞の数が減少する原因がどこにあるかを追求する目的で、放線菌培養液中で見いだされた Forphenicine の誘導体である Forphenicinel が *in vivo* において強い免疫増強効果³⁾を示すことに着目して、この物質を発症前の段階から Jimpy マウスに連続投与し、疾病に対する抑制効果を検討する実験を行った。

Fig.1 Recovery rate from the Jimpy syndrome and starting age of Forphenicicol administration.

実験材料および方法

実験には B6.CBA/J-*jp* 系マウスで 1970 年 Jackson 研究所より輸入し、以来、当教室で維持繁殖しているものが用いられた。*jp* 遺伝子は X-linked で毛色に関する *Ta* 遺伝子といっしょに継代されるので、*jp* hemizygote は毛色の変化によって発病前の生後 3 日目から正常マウスと区別できるようになる。

実験に使用した Forphenicicol 粉末は、微生物化学研究所青柳高明博士より供与されたものである。注射液調整は粉末を使用直前に生理食塩水で必要濃度に溶解し、1 日 2 回ずつ被検マウスの背部皮下に注射した (0.25~1.5 mg/day)。

酵素標品としてのミエリン分画は Norton 法⁶⁾によって分離精製し、ミエリン膜の非連続蔗糖密度勾配超遠心分画は Lapetina 等の方法⁵⁾によって実施した。

2',3' - Cyclic nucleotide 3' - phosphohydrolase (CNP) 活性は Sogin 法⁶⁾、Cholesterol-ester hydrolase (CEH) 活性は遊離したコレステロールを比色定量する方法⁷⁾によって測定された。

実験成績

発症前の生後 1 週間ぐらいから Forphenicicol 溶液の皮下注射を開始した Jimpy マウスの群中でいったん発症した軽い企図振顫が消失し、痙攣発作の発現が抑止されるマウスが出現することが見いだされた。これらの個体は離乳期にいったん極度の痩身状態を呈するが、その後体重も増加し、2 カ月を越えると正常マウスと同じ状態で生存する。Table I は、これら回復マウスの出現率を 1 日投与量の変化で示したものであり、1.0 mg/day の投与量が最も有効であった。さら

Table I

Relation between survival rate of Jimpy mice and daily dose of Forphenicicol administration

Dose (mg/day)	0.25	0.5	1.0	1.5
Numbers of treated	8	161	13	6
Numbers of survival	0	18	8	1
Survival rate (%)	0	11.2	61.5	16.7

Starting age : 2-6 days after birth.

に回復マウス出現率と投与開始日齢の関係を 0.5 mg/day の投与量について検討したところ Fig.1 のごとく投与開始が早いほど出現率が高く、7 日齢以降に投与を開始しても、もはや回復マウスは得られないことが判明した。

そこで、このような臨床症状の消失が実際に中枢神経系におけるミエリン膜形成不全の改善に基づいて起こっているものか否かを検討するために、脳中ミエリン分画に局在する CNP ならびに CEH 酵素の活性変化について、回復マウスと無処置マウスで比較する実験を行った。Table II は生後 3 日目から Forphenicicol 投与 (0.5 mg/day) を開始した約 3 週齢の Jimpy マウス脳中の CNP および CEH 酵素の活性変化を同齢の無処置 Jimpy マウスおよび正常マウスのそれと比較したものであるが、回復マウスでは両酵素ともに活性が上昇し、ほぼ正常レベルにまで到達していることがわかる。

そこで、これら酵素の日齢による活性変化を知るために、生後 3 日目に投与を開始した Jimpy マウスおよび対照マウスについて、日を追って活性の測定を行った。Fig. 2 は 5 日齢以降の投与 Jimpy マウス、無処置 jimpy マウス、および無処置正常マウスの脳ミエリン分画中の CNP 活性 (a) ならびに CEH 活性 (b) を日齢順にプロットしたものであるが、正常マウスの CNP 活性はミエリン形成の始まる 10 日齢頃から急激に上昇するのに対して無処置の Jimpy マウスではほとんど活性の上昇が見られない。一方、投与 Jimpy マウスではミエリン形成初期の 2 週齢頃からほぼ正常並みの活性増加が見られる個体群と、ほとんど活性増加を示さない個体群があることが認められる。さらに CEH 活性についてもほぼ同じ変化が見られるが、投与マウスの酵素活性のグループ化があまり明瞭でなく中間型の個体が多く認められる。

次に回復マウス脳のミエリン膜分画について、量的

Table II
Effects of Forphenicicol administration on myelin CNP
and CEH activities in brains of Jimpy mice

		Saline	Forphenicicol	F/S	Pr.
CNP	Jimpy	6.6±3.4	39.8±11.3	6.0	$p < 0.01$
	Normal	43.3±13.6	—	—	N. S.
CEH	Jimpy	4.1±2.3	29.1±12.9	7.1	$p < 0.01$
	Normal	25.6±13.1	—	—	N. S.

Units : CNP, $\Delta E/\text{mg protein/min}$; CEH, $\text{mg cholesterol/g protein/min}$.

Fig.2. Myelin CNP(a) and CEH(b) activities in the developing brains of Jimpy and normal mice.

変化を知るため蔗糖密度勾配法による超遠心分画を行った。Fig.3はその写真を示したものであるが、0.8 M 濃度の成熟ミエリン膜分画が無処置 Jimpy マウスではまったく欠如しているのに対して、回復マウスでは正常並みに存在しており、回復マウスでは成熟ミエリン膜の形成が行われていることを示している。

さらに、Jimpy マウス脳中ではミエリン構成脂質中の複合脂質、とくにセレブロシドおよびサルファタイドが特異的に欠如していることが知られているので⁸⁾、投与マウス脳におけるこれら脂質の量的変化について検討を行った。Fig.4は脳の Folch 抽出液中の複合脂質についてシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行っ

Fig.3. Photograph of the gradient of M_1 fraction made in the transparent centrifuge tubes of the swing rotor.

jp, jimpy brain; N, normal brain; jp+F, Forphenicicol administrated Jimpy brain.

たものであるが、無処置の Jimpy マウスではセレブロシドの spot がまったく欠如しているのに対して、回復マウスでは正常並みの spot が認められる。また投与マウスで症状消失に失敗した個体でもある程度のセレブロシド形成があることがわかった。

そこで、これらの Forphenicicol 投与の効果は oligodendroglia 細胞の分化、増殖の阻害状態を解消することにあると推測されるので阻害状態の一つの可能性として考えられる脳中の acid protease 活性について測定を行った。結果は Table III のごとく、Jimpy マウス脳では対照マウスに比較して有意に活性が上昇していることが認められた。

総括

ミエリン形成不全を発症する Jimpy マウスに、発病前の3日齢から Forphenicicol を連続投与し、症状

Fig.4. Silica gel thin-layer chromatograms from lipids extracts of brains of Jimpy (*jp*), normal (*N*) and Forphenicicol administrated jimpy (*jp*+F) mice.

1, Sphingomyelin; 2, Sulfatides and Lecithin, 3, Cerebrosides; and 4, Cholesterol. Appropriate standard compounds are shown (st).

Table III
Acid protease activities in brains of Jimpy mice and their normal littermates

	Enzyme activity	(J/N) × 100	Pr.
Jimpy	31.2 ± 4.1 (13)	129.5	$p < 0.01$
Normal	24.1 ± 3.0 (13)		

Unit: $\Delta E/\mu g$ protein.

Average age of mice used is 19 days.

発現に対する抑制効果の有無を検討する実験を行った。その結果、1週齢までに1日量 1.0 mg の皮下投与を開始した Jimpy マウスの約 60% に tremor の消失, convulsion 発症の完全抑止, 寿命の著しい延長などの改善効果が認められた。また、症状の完全に消失した回復マウス脳中では、ミエリン膜局在の CNP および CEH 酵素の活性が正常域に達していること、ミエリン膜に特異的な複合脂質である cerebrosides の

合成が正常並みに回復していることなどから、成熟ミエリン膜の形成能力が正常並みに回復していることが証明された。

以上の結果から、Forphenicicol を発症前から投与することによって Jimpy マウスのミエリン形成不全症が完全に抑制されることが明らかになった。

考 察

ミエリン形成不全を発症する Jimpy マウスに微生物由来の protease inhibitor である Bestatin あるいは Leupeptin を発症前の幼弱期から連続投与すると、脳中のミエリン分画局在の CNP および CEH 酵素の活性がミエリン形成初期に一致して一時的に増加することが認められるが、症状進行に対する抑制効果および延命効果は見られないという報告⁹⁾などから、Jimpy マウスでは、protease 活性の増加によってミエリン構成蛋白が過剰に分解を受けることがあるかもしれないが、そのことだけで疾病の発現が行われるわけではないことが示唆される。

今回 protease inhibitor としての作用はないが、免疫増強物質である Forphenicicol を投与することによってこの疾患が回復するという実験結果が得られたことによって、Jimpy マウス脳中におけるミエリン形成不全の主要な原因の一つに、oligodendroglia の分化、増殖に対する何らかの阻害作用が存在するという可能性がより大きくなったものと考えられる。また、あまり著しくないが、Jimpy マウス脳中で acid protease 活性が有意に高くなっているという事実から、これらの阻害要因に autophagia, ないしは microglia などの免疫担当細胞群の異常がある可能性が強く示唆される。

(本研究の一部は文部省科学研究費、課題番号 58570969, の補助によって行われた。)

文 献

- 1) Privat, A., Valat, J., Lachapelle, F., Baumann, N. and Fulcrand, J.: *Dev. Brain Res.*, **2**, 411 (1982)
- 2) Sandru, L., Siegrist, H.P., Wiesmann, U.N. and Herschlowitz, N.: *Neurological Mutations Affecting Myelination*, INSERM Symposium, No. 14 (Baumann, N., ed.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 469-474 (1980)
- 3) Aoyagi, T., Yamamoto, T., Kojiri, K., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: *J. Antibiot.*, **31**, 244 (1978)

- 4) Norton, W.T. and Poduslo, S.E. : *J. Neurochem.*, **21**, 749 (1973)
- 5) Lapetina, E.G., Sato, E.F. and DeRobertis, E. : *Biochem. Biophys. Acta*, **135**, 33 (1967)
- 6) Sogin, D.C. : *J. Neurochem.*, **27**, 1333 (1976)
- 7) Richmond, W. : *Clin. Chem.*, **19**(12), 1350 (1973)
- 8) Tsuji, S., Yasuda, T. and Kitano, K. : *Wakayama Med. Rep.*, **20**, 65 (1977)
- 9) Tsuji, S., Domoto, Y. and Matsushita, H. : *J. Physiol. Soc. Jpn*, **45**, 467 (1983)