

## 原 著

## Menkes 病マウス脳におけるチトクローム・オキシダーゼおよびスーパーオキシド・ジスムターゼの活性低下と銅治療の効果

吉村 教暉\* 畑山 一郎\*\* 佐藤 清美\*\* 木田 和幸\*\*\* 臼谷 三郎\*\*\*

\*弘前大学医学部病理学第二講座、\*\*同 生化学第二講座、\*\*\*同 公衆衛生学講座

## Decreased Activity of Cytochrome Oxidase and Superoxide Dismutase in the Brain of the Brindled Mouse and the Efficacy of Copper Therapy

Noriaki Yoshimura\*, Ichiro Hatayama\*\*, Kiyomi Sato\*\*, Kazuyuki Kida\*\*\*, Saburo Usutani\*\*\*

Departments of Pathology\*, Biochemistry\*\* and Public Health, Hirosaki University School of Medicine

**要約** Menkes 病の脳変性と銅治療効果の機序を調べる目的で、銅治療前と後の brindled mouse (BM) 脳を組織学および組織化学的に調べるとともに、酵素活性と組織銅濃度の測定を行って、つぎの事実を明らかにした。

1. 非治療 BM 脳組織の cytochrome oxidase および superoxide dismutase 活性はそれぞれ正常対照の約 30%、80% のレベルしかないが、銅治療により、遅くとも 8 カ月後には完全に正常化し組織像も正常化する。

このうち cytochrome oxidase に関しては生化学的測定のみならず組織化学的方法によっても確認された。

2. 一方、BM 脳組織の銅濃度は銅治療により、ごくわずかに上昇傾向を示す。しかし治療後 6 カ月では正常対照の約 40% (減少率 60%) であり、正常化していない。これらの事実は本症の脳変性の機序および銅治療効果の機序を示すものと考えられる。

(臨床環境 1 : 95~100, 1992)

**Abstract** In order to elucidate the mechanism of brain degeneration in Menkes disease, we examined the brains of brindled mice before and after copper-therapy, from some different angles. The following results were obtained.

1. Cytochrome oxidase and superoxide dismutase activity levels in the brains of non-treated brindled mice showed about 30% and 80% of normal, respectively. By a single copper-injection at 7 days old, however, their activities were recovered completely after 8 months.

2. On the contrary, the copper-injection therapy could not normalize the copper level of brain tissue of brindled mice, which 6 months later showed only 40% of normal.

Although we have no data to explain this discrepancy at present, these facts may imply the mechanism of brain degeneration and efficacy of the copper-therapy in Menkes disease.

(Jpn J Clin Ecol 1 : 95~100, 1992)

**Key Words** : Menkes disease, Brain degeneration, Copper-dependent enzyme activity, Histochemistry, Tissue copper content

受付：平成 4 年 8 月 3 日 採用：平成 4 年 9 月 24 日／別刷請求宛先：吉村教暉 〒036 弘前市在府町 5 弘前大学医学部病理学第二講座

Received August 3, 1992 Accepted September 24, 1992／Reprint Requests to: Noriaki Yoshimura, MD, Department of Pathology, Hirosaki University School of Medicine, 5 Zaifu-cho Hirosaki, 036, Japan

## I. はじめに

Menkes 病は X-linked の劣性遺伝性の銅代謝異常症で、捻れ髪、低銅血症および進行性の脳障害などにより特徴づけられる<sup>1,2)</sup>。本症の根本的異常は、遺伝的に規定された、細胞内における銅の輸送障害と考えられているが、それをもたらず機序は不明である<sup>2-4)</sup>。一方、本症ではいくつかの銅依存酵素の活性低下が知られ、またミトコンドリアの形態異常も指摘されていることから、これらが本症の脳変性の発症に密接にかかわっていると推定されている<sup>2,5-7)</sup>。しかしこの脳変性の発症機序についてはまだ充分にはわかっていない。

幸いヒトの Menkes 病とそっくりなマウスの Menkes 病が知られており、その代表的なものが brindled mouse である<sup>8,9)</sup>。この mutant mouse (brindled mouse hemizygote, 以下 BM と略) は普通に飼育すると、生後15日前後で脳変性が進んで必ず死亡する<sup>8,9)</sup>。しかし、生後7日目に 50  $\mu$ g の CuCl<sub>2</sub> を唯一回皮下注射することにより劇的延命効果が得られ、正常同胞と同等の生活を営めるようになることが知られている<sup>10)</sup>。

本研究の目的は、治療前と後の BM を比較検討することにより、脳変性および銅治療効果の機序を調べることである。

## II. 材料と方法

### (1) 組織銅濃度の測定

生後13日齢の非治療 BM とその正常同胞の 5 対、および銅治療延命させた 6 カ月齢 BM とその正常同胞の 5 対を用いて、それらの脳組織の銅濃度を、低温灰化の後、原子吸光法にて測定した。

### (2) チトクローム・オキシダーゼ (cytochrome oxidase, 以下 CyO と略す) 活性染色

生後13日齢の非治療 BM とその正常同胞の 5 対、および銅治療延命させた 8 カ月齢 BM とその正常同胞の 5 対を用いて脳組織の CyO 活性染色を Seligman の DAB 法<sup>11)</sup>にて行った。方法の詳細は既に他<sup>12)</sup>で述べたので省略する。

### (3) チトクローム・オキシダーゼ (CyO) 活性の測定

(2)と同様の材料について Smith の方法 (spectrophotometry)<sup>13)</sup>で CyO の活性の測定 (assay) を行った。

### (4) スーパーオキシド・ジスムターゼ (superoxide dismutase, 以下 SOD と略す) 活性の測定

(3)と同様の材料について Fridovich 法 (spectrophotometry)<sup>14)</sup>により、SOD の活性を測定した。

### (5) 銅治療法

生後7日目の BM に 10  $\mu$ g / g (体重) の CuCl<sub>2</sub> を唯一回皮下注射した<sup>10)</sup>。

なお、brindled mouse の由来、入手経路などについてはすでに他<sup>12)</sup>で述べたので省略する。

## III. 結果

### (1) 脳組織の銅レベル

非治療13日齢 BM 脳組織の銅レベルには正常対照のその 34.4% (減少率65.6%) に低下していた (表1)。一方、銅治療し延命させた 6 カ月齢の BM 脳組織では正常対照のその 40.7% (減少率59.3%) に低下していた。

13日齢の非治療群の値と銅治療延命させた 6 カ月齢群の値との間で有意差検定をしたところ、両者間に有意差はなかった。しかし、治療により銅レベルの上昇のきざしがうかがえるといえるかもしれない。

表1. 銅治療前と後における brindled mouse (Mo<sup>br</sup>/Y) の脳の組織銅濃度

Age	Mo <sup>+</sup> ( $\mu$ g / g) <sup>1</sup>	Mo <sup>br</sup> /Y ( $\mu$ g / g) <sup>1</sup>	Mo <sup>br</sup> /Y/Mo <sup>+</sup> (%) <sup>2</sup>	% difference from normal (%) <sup>3</sup>
非治療				
7日齢群	7.15 ± 0.50	0.75 ± 1.10	10.5	-89.5
13日齢群	9.45 ± 1.55	3.25 ± 2.55	34.4	-65.6
銅治療				
6カ月齢群	6.61 ± 1.07	2.69 ± 0.24	40.7	-59.3

1.  $\mu$ g / g (乾燥重量) ± 標準偏差, 各群の n = 5

2. 正常同胞雄 (Mo<sup>+</sup>) の値に対する brindled mouse hemizygote (Mo<sup>br</sup>/Y) の値の割合 (%)

3. Mo<sup>+</sup> 値を正常値 (100%) としたときの Mo<sup>br</sup>/Y 値の正常値からのずれ (%)

## (2) CyO 活性染色

非治療13日齢 BM 群の脳組織の CyO 活性 (染色性) は正常対照群のそれに比べ明らかに低下していた (図 1 a, 1 b)。正常対照群ではアストロサイトは常にニューロンよりずっと弱く染まり、したがって明かなアストロサイトの輪郭は一般に認め難かった。これに対しニューロンは、小脳プルキンエ細胞 (図 1 a) や脳幹の大型神経細胞、大脳皮質細胞、がよく染まり次いで基底核や視床の神経細胞がよく染まった。非治療 BM 脳組織

での CyO 活性の低下は大脳でも小脳脳幹でも全般にわたり一様に起っていた。それはこれらニューロン全体の CyO 活性低下のみによるものか、アストロサイトの CyO 活性の低下も加わっているものか、判然とはしないが、おそらく後者であろうと考えられた。しかし非治療 BM 脳組織の中で脈絡叢の上皮細胞のみは明かな染色性 (活性) の低下を示さず、したがって対照群のものとの間に染色性 (活性) の相違は認められなかった。

一方、銅治療し延命させた 8 カ月齢の BM 群の脳組織

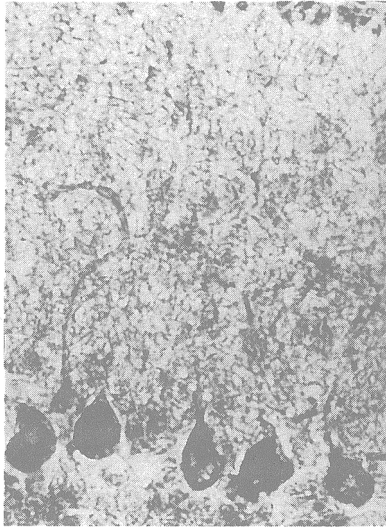


図 1 a. 13日齢正常マウスの小脳皮質

プルキンエ細胞とその樹状突起および分子層は高いチトクローム・オキシターゼ活性を示す。

10  $\mu\text{m}$ 凍結切片、チトクローム・オキシターゼ活性染色 $\times 420$

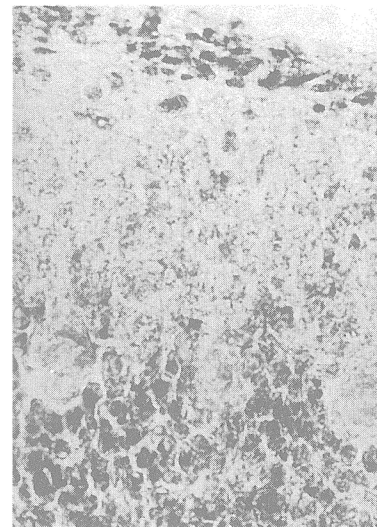


図 1 b. 13日齢非治療 BM の小脳皮質

プルキンエ細胞とその樹状突起および分子層はチトクローム・オキシターゼ活性の著しい低下を示す。

10  $\mu\text{m}$ 凍結切片、チトクローム・オキシターゼ活性染色 $\times 420$

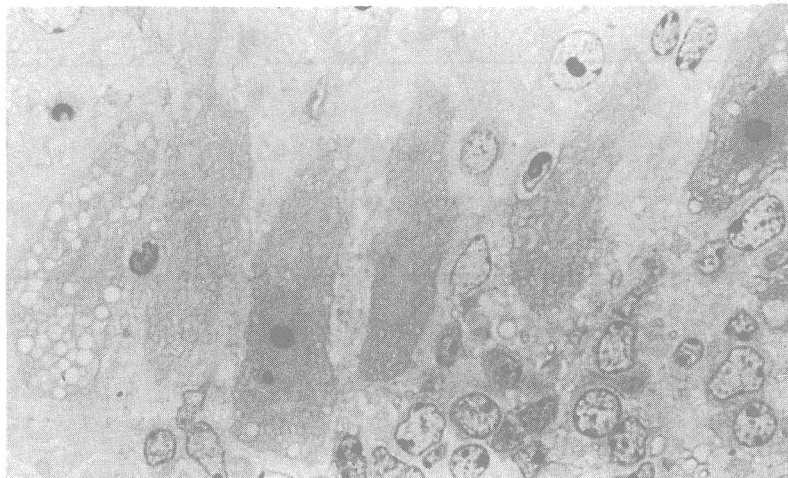


図 1 c. 13日齢非治療 BM の小脳皮質

プルキンエ細胞はしばしば顕著な空胞変性を示す。

1  $\mu\text{m}$ エポソド包埋切片、トルイジン・ブルー染色 $\times 1600$

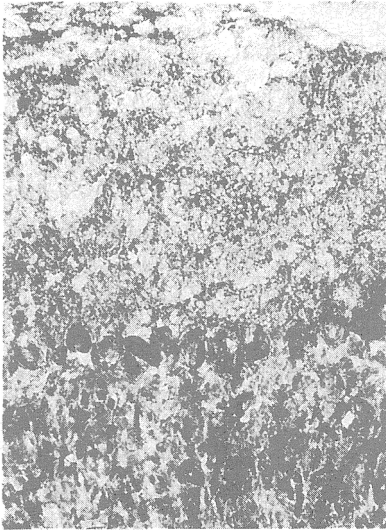


図2. 銅治療後8カ月齢のBMの小脳皮質  
 プルキンエ細胞、分子層、および顆粒層のいずれもが高い酵素活性を示す。  
 10 $\mu$ m凍結切片、チトクローム・オキシターゼ活性染色 $\times$ 210

のCyO活性(染色性)は正常対照群のそれと比べ、神経細胞でもニューロピルでも何ら差は認められなかった(図2)。即ち、正常対照群と同等の染色性(活性)を示した。

### (3) 脳組織のCyO活性レベルとSOD活性レベル

非治療13日齢BMの脳組織のCyO活性レベルおよびSOD活性レベルは正常対照のそれぞれ30%(減少率70%)および80%(減少率20%)であった。一方、銅治療し延命させた8カ月齢BMの脳組織のCyO活性レベルおよびSOD活性レベルはそれぞれ正常対照との間に有意差が認められず、したがって推計学的には完全に正常化していた(表2, 3)。

## IV. 考 案

### (1) BM脳組織の銅濃度に関して

生後のBMの脳を経日的に組織学的観察を行うと、7日目を過ぎる頃から大脳皮質および小脳皮質の神経細胞のミトコンドリアに風船様の腫脹(ballooning)が起こり始めること、以後この変化は日ごとに顕著になりやが

表2. Brindled mouse (Mo<sup>br</sup>/Y) とその正常同胞 (Mo<sup>+</sup>) の  
 脳組織のチトクローム・オキシターゼ活性レベル

Age	Mo <sup>+</sup> (u/gww) <sup>1</sup>	Mo <sup>br</sup> /Y (u/gww) <sup>1</sup>	Mo <sup>br</sup> /Y/Mo <sup>+</sup> (%) <sup>2</sup>	%difference from normal (%) <sup>3</sup>
非治療				
13日齢群	26.6 $\pm$ 3.2	8.0 $\pm$ 1.3	30.1	-69.9
銅治療				
8カ月齢群	27.7 $\pm$ 1.2	27.5 $\pm$ 4.9	99.3	-0.07

1, Smith法, 各群のn=5, u/gww=単位/湿重量(g)

2, 3, は表1と同じ

表3. Brindled mouse (Mo<sup>br</sup>/Y) とその正常同胞 (Mo<sup>+</sup>) の  
 脳組織のスーパーオキシド・ジスムターゼ活性レベル

Age	Mo <sup>+</sup> (u/gww) <sup>1</sup>	Mo <sup>br</sup> /Y (u/gww) <sup>1</sup>	Mo <sup>br</sup> /Y/Mo <sup>+</sup> (%) <sup>2</sup>	%difference from normal (%) <sup>3</sup>
非治療				
13日齢群	113.2 $\pm$ 7.3	90.2 $\pm$ 10.5	79.7	-20.3
銅治療				
8カ月齢群	176.9 $\pm$ 12.2	163.7 $\pm$ 3.8	92.5	-7.5

1. Fridovich法, 各群のn=5, u/gww=単位/湿重量(g), 測定値はCu/Zn-SODとMn-SODを合わせた全SODの活性値を示す

2, 3, は表1と同じ

て細胞は著しい空胞変性をきたし壊死に陥ること(図1c)、動物は空胞変性の進行とともに痙攣を頻発し、15日前後には必ず死ぬこと、がすでに知られている<sup>15,16)</sup>。

このように Menkes 病マウスの進行性の神経細胞変性(脳変性)は実は進行性のミトコンドリア変性に起因しているため、これは BM の脳組織の低い銅濃度<sup>17,18)</sup>に関係あるものと推定される(表1)。

そこで、組織銅濃度の低下とミトコンドリアの進行性の変性を結びつけるものとして、銅依存酵素でかつミトコンドリア内膜に局在する CyO、および細胞質に存在する Cu/Zn-SOD(活性中心に銅と亜鉛をもつ SOD)、の活性を測定した(表2, 3)。一方 CyO 活性については活性染色による組織化学的解析をも行った(図1a, 1b, 2)。

#### (2) BM 脳組織の CyO の活性に関して

銅治療しない13日齢 BM 群の脳組織の活性染色による CyO 活性(染色性)は、正常対照群のそれと比べ著しい低下を示した(図1a, 1b)。しかし、銅治療し8カ月齢まで延命させた BM 群の脳組織の CyO 活性は正常対照群のそれと比べ明かな相違は認められなかった(図2)。同様に行ったこれら材料の CyO 活性レベルの生化学的測定の結果は、上記の組織化学的結果と極めてよく一致した(表2)。即ち、非治療13日令 BM の脳組織の CyO 活性レベルは正常対照のそれの30%(減少率70%)であるが、治療後8カ月齢 BM 脳組織の CyO 活性レベルは正常対照との間に有意差が認められず、したがって完全に正常化していた。

このことにより、生後7日目に10 $\mu$ g/g(体重)の CuCl<sub>2</sub>を一回注射することでおそらく、BM の銅代謝回転がある程度正常に近づき、遅くとも8カ月たつと脳の CyO 活性レベルが正常化するものと推定される。

#### (3) BM 脳組織の SOD 活性に関して

CyO と同様に測定した非治療13日齢 BM 脳組織の SOD 活性レベルは正常対照の80%(減少率20%)であった(表3)。これより脳組織の銅レベルの低下に伴う銅依存酵素の活性低下の程度は個々の酵素によりさまざまであることが知られた。また治療後8カ月齢 BM 脳における SOD 活性レベルの測定から、BM 脳の SOD 活性レベルは遅くとも治療後8カ月には完全に正常化することが明らかになった。

#### (4) 組織銅レベルと銅依存酵素活性レベルの回復のちがいに

銅治療後の BM 脳組織の銅レベルは軽度上昇するのみで、順調な回復はみられない(表1)。もっと長期の観

察が必要ではあるとしても、少なくとも治療後6カ月では正常対照の約40%(減少率60%)であり、正常化していない。一方、銅依存酵素(CyO と SOD)活性は銅治療後順調に回復し、遅くとも8カ月後には正常化する(表2, 3)。この事実は生命維持に不可欠な CyO や SOD の銅が優先的に辛うじて補給されるのみで、脳の組織銅レベルの正常化は起こらないことを意味しているように見える。この点に関し、注射により与えられた銅は、血液脳関門(BBB)を通過できないためではないかとの考えもある。いずれにせよ、本症の脳変性の機序および銅治療効果の機序をさぐる上の要点と考えられる。

## V. 結 論

1. 非治療 BM 脳組織の CyO および SOD の活性はそれぞれ正常対照の約30%、80%のレベルしかないが銅治療により遅くとも8カ月後には完全に正常化し、組織像も正常化する。このうち、CyO に関しては生化学的測定のみならず、組織化学的方法によっても確認された。
2. 一方、BM 脳組織の銅レベルは銅治療により、ごくわずかに上昇傾向を示す。しかし、少なくとも治療後6カ月では正常対照の約40%(減少率60%)であり、正常化していない。
3. これらの事実は、本症の脳変性の機序および銅治療効果の機序を示すものと考えられる。

## 文 献

- 1) Menkes JH, Alter M, et al: A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics* 29: 764-779, 1962
- 2) Danks DM, Stevens BJ, et al: Menkes' kinky hair disease: Further definition of the defect in copper-transport. *Science* 179: 1140-1142, 1973
- 3) Goka TJ, and Howell RR: Copper metabolism in Menkes' disease. *Monogr Hum Genet* 10: 148-155, 1978.
- 4) Rennert OM, Chan W-Y: Menkes' metallothionein and copper metabolism. *Pediatr Res* 13: 204-205, 1979
- 5) French JH, Sherard ES, et al: Trichopolydystrophy 1. Report of a case and biochemical studies. *Arch Neurol* 26: 229-244, 1972
- 6) Yoshimura N, Kudo H: Mitochondrial abnormalities in Menkes' kinky hair disease(MKHD). Electron microscopic study of the brain from an autopsy case. *Acta*

- Neuropathol (Berl)* 59 : 295-303, 1983
- 7) Matsubara O, Tanaka H, et al: An autopsy case of Menkes' kinky hair disease. *Acta Pathol Jpn* 28 : 585-594, 1978
  - 8) Hunt DM: Primary defect in copper transport underlies mottled mutants in the mouse. *Nature* 249 : 852-854, 1974
  - 9) Hunt DM: Catecholamine biosynthesis and the activity of a number of copper-dependent enzymes in the copper deficient mottled mouse mutants. *Comp Biochem Physiol[C]* 57 : 79-83, 1977
  - 10) Mann JR, Camakaris J, et al: Copper metabolism in mottled mouse mutants. Copper therapy in mottled mouse mutants. *Biochem J* 180 : 605-612, 1979
  - 11) Seligman AM, Karnovsky MJ, et al: Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J Cell Biol* 38 : 1-14, 1968
  - 12) Yoshimura N: Neuronal degeneration in the brain of the brindled mouse. Histochemical demonstration of decreased cytochrome oxidase activity in the cerebellum and brain stem. *Acta Pathol Jpn* 38 : 705-712, 1988
  - 13) Wharton DC, Tzagoloff A: Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods in Enzymology* 10 : 245-250, 1967
  - 14) Beauchamp C, Fridovich I: Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analyt. Biochem* : 44 : 276-287, 1971
  - 15) Yajima K, Suzuki K: Neuronal degeneration in the brain of the brindled mouse. An ultrastructural study of the cerebral cortical neurons. *Acta Neuropathol (Berl)* 45 : 17-25, 1979
  - 16) Nagara H, Yajima K, et al: An ultrastructural study on the cerebellum of the brindled mouse. *Acta Neuropathol (Berl)* 52 : 41-50, 1980
  - 17) Camakaris J, Mann JR, et al: Copper metabolism in mottled mouse mutants. Copper concentrations in tissues during development. *Biochem J* 180 : 597-604, 1979
  - 18) Wenk G, Suzuki K: The effect of copper supplementation on the concentration of copper in the brain of the brindled mouse. *Biochem J* 205 : 485-487, 1982