

GM₁-ガングリオシドーシス, 幼児型, 若年型, 慢性型の脳脂質異常

笠 間 透

信州大学医学部附属順応医学研究施設生化学部門
(指導: 武富 保教授)

Abnormal Lipids in the Brain of GM₁-gangliosidosis : Infantile, Juvenile, and Chronic Type

Tooru KASAMA

*Department of Biochemistry, Institute of Adaptation Medicine,
Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Tamotsu TAKETOMI)*

Cerebral lipids of patients with GM₁-gangliosidosis of infantile, juvenile, and chronic types were studied comparatively. The brain sample of a patient (a 4-year-2-month old female), who had been clinically diagnosed as GM₁-gangliosidosis infantile type before death due to low β -galactosidase activity, contained a large amount of GM₁ and gangliotetraosylceramide. An amount of free fatty acid and a small amount of glycosphingolipids including glucosylceramide, lactosylceramide, globotriaosylceramide, and neolactotetraosylceramide were also found. Cholesterol, phospholipids, galactosylceramide, and galactosylceramideI^s-sulfate were greatly decreased in the brain. The brain of a GM₁-gangliosidosis juvenile type (a 5-year-5-month old male) showed a marked increase in GM₁ and a significant amount of gangliotriaosylceramide, gangliotetraosylceramide, and cholesterol ester. The finding of cholesterol ester as well as a small amount of cholesterol, phospholipids, galactosylceramide, and galactosylceramideI^s-sulfate suggested that slight myelination had occurred and was followed by demyelination. The brain of a male patient with no clinical definitive diagnosis, who died at 54 years and 1 month, showed an accumulation of GM₁ and gangliotetraosylceramide in the caudate nucleus and putamen where the pathological examination showed the storage of abnormal substances. In gray and white matter, which showed no pathological abnormality, GM₁ was slightly increased and gangliotetraosylceramide was faintly detected. These results indicated a localization of lesion in the brain of GM₁-gangliosidosis chronic type. *Shinshu Med. J.*, 32: 62-77, 1984

(Received for publication October 24, 1983)

Key words : GM₁-gangliosidosis, infantile, juvenile, and chronic type. cerebral lipids. lipid analysis. ganglioside GM₁. gangliotetraosylceramide

GM₁-ガングリオシドーシス, 幼児型, 若年型, 慢性型. 脳脂質. 脂質分析. ガングリオンドGM₁.
ガングリオテトラオシルセラミド

I 緒 言

GM₁-ガングリオシドーシスは比較的にまれな遺伝性脂質代謝異常症で、リソソームのβ-ガラクトシダーゼ欠損がその原因となっている。

1959年に Norman らが“Tay-Sachs disease with visceral involvement”と報告したものが第1例とされ、この名称が示すように当初は Tay-Sachs 病の亜型とみなされていた。その後、“pseudo-Hurler disease”²⁾、“familial neurovisceral lipidosis”³⁾などと呼称されたように、精神運動障害、骨変形、肝脾腫などの症状が生下時から認められる。1965年に O'Brien らは本疾患で蓄積する脂質がガングリオンド GM₁ であると決定し⁴⁾、さらに1968年に Okada と O'Brien は本疾患におけるβ-ガラクトシダーゼの欠損を示した⁵⁾。このことにより、様々に呼称された本疾患はβ-ガラクトシダーゼ欠損を原因とする GM₁-ガングリオシドーシスと確定した。

同じ1968年 Derry らは、臓器の異常を伴わない症例を報告し、それまでの臓器異常を伴うものをⅠ型(幼児型)、Ⅰ型より症状発現が遅く臓器異常を伴わないものをⅡ型(若年型)と分類、定義した⁶⁾。典型的な症例では、幼児型は出生時から症状が発現し生後1年以内に死亡し、若年型は生後1年までに症状発現を見て4~10歳までに死亡し、いづれも小児疾患で常染色体性劣性遺伝形式をとる。

しかし、1981年に、ジストニアを呈し27歳で死亡した男性の1症例を、Goldman らが病理、Kobayashi と Suzuki が生化学のそれぞれの観点から死後検案し、β-ガラクトシダーゼの欠損および大脳基底核へのガングリオンド GM₁ の蓄積を示した⁷⁾⁸⁾。このことにより GM₁-ガングリオシドーシスは前述の幼児型、若年型の他に、経過が長く、病変も大脳基底核に限局する慢性型が存在することが示された。

今回、この比較的にまれな GM₁-ガングリオシドーシスについて、臨床的に幼児型、若年型と診断された各1例、および臨床診断はされず剖検時脂質代謝異常症を疑われ生化学的に慢性型と診断された1例、の3例

略語；Gal：ガラクトース，Glc：グルコース，
GalNAc：N-アセチルガラクトサミン，
GlcNAc：N-アセチルグルコサミン。
糖脂質の名称は IUPAC⁹⁾により、一部に
慣用名、ガングリオンドに Svennerholm
の命名¹⁰⁾を併用した。

の剖検脳組織の脂質分析を行った。特に慢性型は前述の1症例しか報告がなく、本邦における第1例である。

II 材料および方法

A 材 料

1 症例1(幼児型)

症例は死亡時4歳2カ月の女児。胎生、分娩期に異常なし。生後6カ月以後、咳嗽、下痢、発熱を繰り返し、10カ月検診で精神発達遅滞を疑われ、某病院受診。その後精査目的で入院。入院時、反射亢進、四肢緊張低下、肝3横指触知、などが認められたが、眼底は正常であった。検査により白血球β-ガラクトシダーゼ活性の低下が認められ、本疾患との臨床診断を受けた。その後上気道感染を繰り返し死に至る。両親は従弟婚、同胞2名の第二子であるが同胞は正常。

剖検時得られた新鮮脳組織を凍結保存し、分析に供した。前頭部および側頭部の灰白質、白質に相当する各部位の間に薄層クロマトグラフィー上で脂質組成の差を認めなかったため、分析は全脳のまま行った。

2 症例2(若年型)

症例は死亡時5歳5カ月の男児。胎生、分娩期、新生児期に著変はなかった。定頻、匍匐など生後7カ月頃までは正常の発達が認められたが、誕生前後に至ってもつかまり立ちが認められず、生後2歳6カ月頃より強直性痙攣が出現し、3歳時某療育センターへ入院。入院後、病的反射、硬直、痙攣、運動機能低下は持続した。検査にて白血球β-ガラクトシダーゼ活性の低下が認められ、本疾患と臨床診断された。その後呼吸器感染症を繰り返し死に至る。両親は従弟婚、同胞3名の末子であり、両親および同胞1名の白血球β-ガラクトシダーゼ活性は正常人の約半分であった。また、母方従弟3名が類似症状を呈し、3~5歳時に死亡している。

剖検時得られた新鮮脳組織を凍結保存し、全脳のまま分析に供した。

3 症例3(慢性型)

症例は死亡時54歳1カ月の男性。7、8歳頃より構音障害、歩行障害が出現し、緩徐に進行した。小学校卒業後は軽作業に従事。42歳時某施設入療。この時、発語不能、筋固縮、寡動、歩行障害は認められたが、筆談は可能だった。後、神経症状は進行し、膀胱直腸障害が出現、低ナトリウム血症、低蛋白血症を来し、死に至る。生前確定診断はなく、死亡時は「ジストニアを主徴とする錐体外路疾患」と診断されていた。両親

は従弟婚，同胞1名の第二子。生存同胞5名中男子3名が類似した臨床像を呈し，白血球 β -ガラクトシダーゼ活性の低下が，本症例の剖検診断の後確認された。

剖検時得られ凍結保存されていた半球の切片から，灰白質，白質および，病理学的に膜様構造を持つ不正な円形蓄積構造の存在が確認された尾状核，被殻の4部位を切り出し分析に供した。尾状核，被殻は小さいため，それぞれ周辺組織を含めて切り出した標本について別に分析した。

B 方法

1 各脂質分画の調製

脳標本を組織湿重量の20倍量のクロロホルム-メタノール混液(C-M, と略, 2:1, v/v)でホモジナイズ後濾過し，残渣はさらにクロロホルム-メタノール-水混液(C-M-W, と略, 1:2:0.15, v/v/v)でホモジナイズ後濾過し，濾液を合わせ減圧下で乾燥後一定量のC-M(2:1)に溶かし，これを総脂質とした。総脂質の一部を用い，単純脂質，リン脂質の分析を行った。

減圧乾固した総脂質に10倍量ずつのクロロホルムと1N KOHのメタノール溶液を加え，室温で一夜放置し，反応液を蒸留水に対し透析後減圧乾固し，スフィンゴ脂質とした。症例3の尾状核，被殻は標本が少ないため，さらに分けることはしなかった。

スフィンゴ脂質は Ledeen らの方法¹¹⁾に従い，DEAE-セファデックスA-25(酢酸型, Pharmacia Fine Chemical 社製)にのせ，C-M-W(30:60:8, v/v/v)で中性脂質を溶出させ，酸性脂質は原法を少し変え，0.5N酢酸アンモニウムのメタノール溶液で溶出した。中性脂質は Saito と Hakomori の方法¹²⁾に従いアセチル化した。アセチル化した中性脂質から，フロリジル(和光純薬社製)またはシリカゲル60(Merck 社製)のカラムを用い，アセチル化糖脂質を分離した。フロリジルカラムにのせた場合は，1, 2-ジクロロエタンで単純脂質を溶出させた後，1, 2-ジクロロエタン-アセトン混液(1:1, v/v)でアセチル化中性糖脂質を溶出した。シリカゲル60カラムでは，ヘキサントルエン混液(1:1, v/v)で単純脂質を溶出後，C-M(8:2, v/v)でアセチル化中性糖脂質を溶出した。アセチル化中性糖脂質にアンモニウム性メタノールを加え一夜放置して脱アセチル化し，メタノールを加え減圧乾固して中性糖脂質を得た。

酸性脂質は蒸留水に対し透析後，減圧乾固して，酸性糖脂質とした。酸性糖脂質の一部は Ledeen らの

方法¹¹⁾に従い，シリカゲル40(Merck 社製)にのせ，クロロホルムで単純脂質を溶出後，C-M(8:2)でスルファチドを，ついでC-M-W(6:4:1, v/v/v)でガングリオシドを溶出した。

2 薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography, TLC)

TLCはシリカゲル60プレート(Merck 社製, 5721)および，高性能 TLC (High-Performance TLC, HPTLC, Merck 社製, 5631)を適宜用いた。GalCer と GlcCer の分離用に2.4%ホウ酸ナトリウムのメタノール溶液を TLC プレートに充分噴霧した後熱風で風乾して，ホウ酸含有プレートを調製した。

単純脂質は，ベンゼン-エチルエーテル-エタノール-酢酸(50:40:2:0.2, v/v/v/v)で原点から1.5cmまで展開後風乾し，さらにヘキサノール-エチルエーテル(80:20, v/v)で展開した。

総脂質の展開には二次元 TLC を用いた。プレートの左下方を原点とし，上方へクロロホルム-メタノール-2.5Nアンモニア水(60:35:8, v/v/v)で展開，風乾後，塩化水素ガスにさらし，風乾して，右方へクロロホルム-メタノール-アセトン-酢酸-水(75:15:30:15:7.5, v/v/v/v/v)で展開した。

中性糖脂質はC-M-W(65:25:4, v/v/v)，ガングリオシドはクロロホルム-メタノール-0.25%塩化カリウム水溶液(60:35:8, v/v/v)で展開した。

バンドの検出には，ヨウ素，BTB 試薬，酢酸銅リン酸試薬，アンスロン試薬，レゾルシノール塩酸試薬を適宜用いた。

3 単純脂質の分析

総脂質を TLC で展開し，標準物質との移動度の比較で同定した。コレステロールの定量は Zak 法¹³⁾，または安息香酸コレステロールを内部標準としてガスクロマトグラフィー(gas-liquid chromatography, GLC)で1%OV-1カラム($\phi 3\text{mm} \times 0.5\text{m}$)を用い，カラム温度を190°Cから毎分4°C昇温させ300°Cに達してから32分維持して行った。遊離脂肪酸，コレステロールエステルの構成脂肪酸は，3%塩酸メタノール中80°C 3時間メタノリシスをして，ヘキサノールにより抽出されるメチルエステル誘導体を，15%DEGSカラム($\phi 3\text{mm} \times 2\text{m}$ ，カラム温度は180°C)を用いた GLC で分析した。定量を同時に行う時は内部標準として C21:0 メチルエステルを加えた。

4 リン脂質の分析

総脂質から二次元 TLC を用い各リン脂質を分離

同定した。リンの定量は Bartlett 法¹⁴⁾により、構成脂肪酸の分析は単純脂質と同様に行った。ただし Plasmalogen の alkenyl 基由来のアルデヒドは TLC から溶出しそのまま同じカラムで160°Cで分析した。

5 糖脂質の分析

中性糖脂質、酸性糖脂質を TLC で展開し各糖脂質を分離、同定した。各バンドを100°Cでメタノリシス後、構成脂肪酸はメチルエステル誘導体として分析を、構成糖はメチルグリコシドのトリメチルシリル化誘導体としてマンニトールを内部標準にし分析、定量を、それぞれ GLC で行った。糖は 2% OV-1 カラム ($\phi 3\text{mm} \times 2\text{m}$) を用い、140°C から毎分2°C の昇温で分析した。脂肪酸は同じカラムで210°C の恒温、または、キャピラリカラム FQ OV-101 ($\phi 0.2\text{mm} \times 25\text{m}$) を220°C から毎分2°C 昇温させ250°C に達してから16分維持して行った。

構成糖の結合位置の分析はメチル化法によった。Phillips と Fraser の方法¹⁵⁾を糖脂質に応用し、ジメチルスルホキシド中で、ジメチルスルホキシドと水素化カリウムから調製したジメチルカリウムと反応させヨウ化メチルを加え完全メチル化糖脂質を得た。得られた完全メチル化糖脂質は Yang と Hakomori の方法¹⁶⁾に従いアルジトールアセテート誘導体とし、部分メチル化糖アルジトールアセテートを GLC で分析した。中性糖の誘導体は 3% OV-225 カラム ($\phi 3\text{mm} \times 2\text{m}$) を170°C を32分維持してから毎分5°C 昇温させ200°C に達してから16分維持させて、アミノ糖の誘導体は 2% OV-17 カラム ($\phi 3\text{mm} \times 1\text{m}$) を180°C から毎分1°C 昇温させ200°C に達してから32分維持させて、それぞれ分析した。

ガングリオシドの一部は Svennerholm らの方法¹⁷⁾に従い、脱シアル酸化しアシアロ体を調製した。

脂質結合性シアル酸の定量は レゾルシノール塩酸法¹⁸⁾によった。

症例3のガングリオシド構成は、スフィンゴ脂質の HPTLC をレゾルシノール塩酸試薬で発色後、デンシトメーターで測定した。

III 結 果

A 症例1 (幼児型)

図1に示した総脂質の二次元 TLC で、リン脂質として、Sphingomyelin (SM), Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylserine (PS), Ethanolamine Plasmalogen (plas-PE), Phosphatidylethanol-

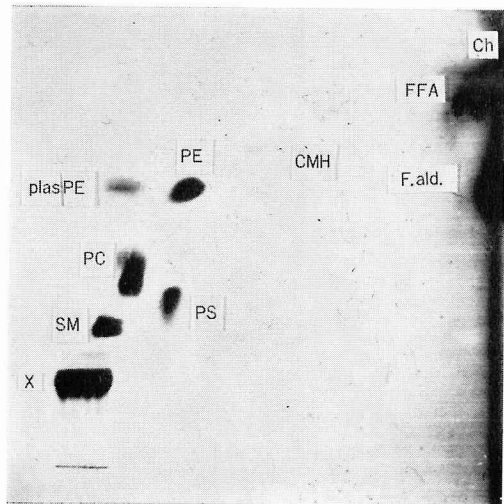


図1 症例1の総脂質の二次元薄層クロマトグラム
原点から上方へ
C-M-2.5N NH₄OH (60:35:8, v/v/v)
で展開後、風乾し塩化水素ガスにさらしてから
風乾し、右方へ
C-M-アセトン-酢酸-水 (75:15:30:15:
7.5, v/v/v/v/v) で展開
発色: 酢酸銅リン酸試薬

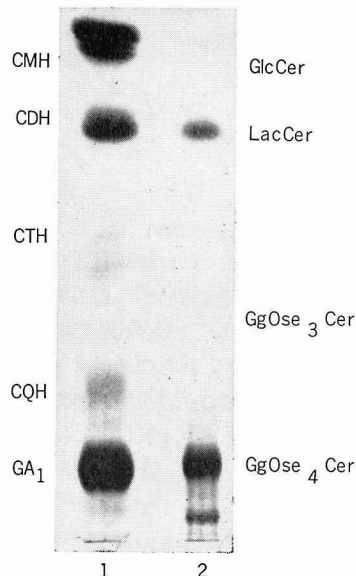


図2 症例1の中性糖脂質の薄層クロマトグラム
1: 症例1の中性糖脂質
2: 症例1のガングリオシドの弱酸水解物
展開: C-M-W (65:25:4, v/v/v)
発色: 酢酸銅リン酸試薬

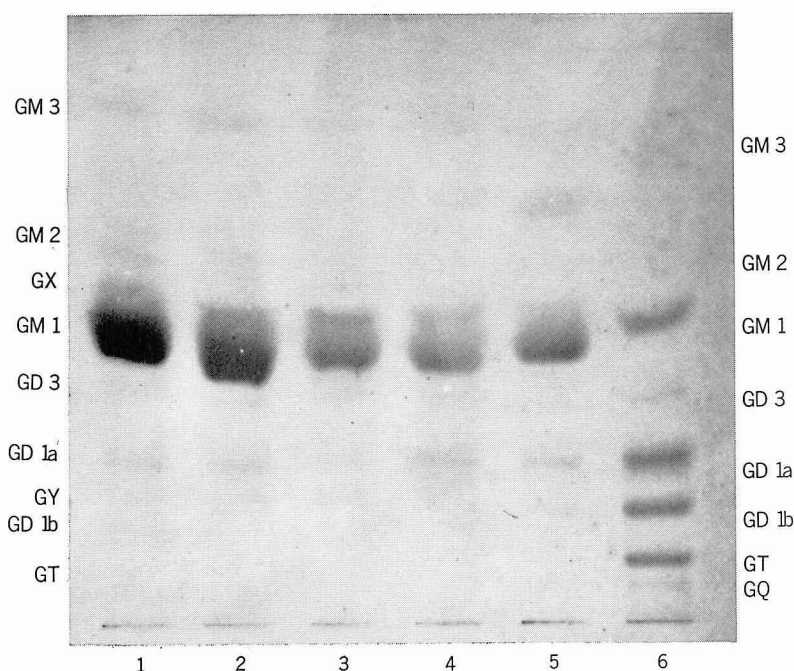


図3 症例1の各部位のガングリオシドの高性能薄層クロマトグラム

- 1：前頭部の灰白質相当部
- 2：前頭部の白質相当部
- 3：側頭部の灰白質相当部
- 4：側頭部の白質相当部
- 5：症例2のスフィンゴ脂質
- 6：正常成人脳のガングリオシド

展開：C-M-0.25%KCl (60:35:8, v/v/v)

発色：レゾルシノール塩酸試薬

amine (PE) が確認された。単純脂質ではコレステロール (Ch) のほか、遊離脂肪酸に相当するスポットが認められ、一次元 TLC で遊離脂肪酸 (FFA) であることが確認された。これらのスポットのほかには、本疾患で蓄積する糖鎖の長い中性糖脂質およびガングリオシドと思われるスポットX以外に明確な糖脂質のスポットは見られなかった。ミエリン形成がなされている脳の場合、セレブロシド (GalCer) とスルファチド (I^3 -HSO₃-GalCer, CSE) がリン脂質と同程度認められるが、本症例では、GalCer の移動度に相当する Ceramide monohexoside (CMH) のスポットが辛じて認められるに過ぎず、CSE はまったく認められなかった。

これら糖脂質の異常を解析するため、方法で述べたように、中性糖脂質と酸性糖脂質に分けて分析した。

図2に見られるように、中性糖脂質からは CMH, Ceramide dihexoside (CDH), Ceramide trihexoside (CTH), Ceramide tetrahexoside (CQH), のほか、GgOse₄Cer に相当するバンド (GA₁) が検出された。CMH はホウ酸含有 TLC で分析すると GalCer と GlcCer に分離した。検出された中性糖脂質のうち GalCer 以外は正常脳ではほとんど検出されていない。

各中性糖脂質の糖鎖構造の決定のため、構成糖の分析およびメチル化分析を行い、その結果、CMH は GalCer と GlcCer から成り、CDH は LacCer, CTH は GbOse₃Cer, CQH は nLcOse₄Cer と同定され、GA₁ は GgOse₄Cer と確認された (表1)。

図3に示したガングリオシドの HPTLC で見られるように、前頭部および側頭部の灰白質、白質に相当

表1 症例1の中性糖脂質のメチル化分析

	2,3,4,6- Gal	2,3,4,6- Glc	2,4,6- Gal	2,3,6- Gal	2,3,6- Glc	4,6- GalNAc	3,6- GlcNAc		
CMH	0.31	:	1						
CDH	0.91				:	1			
CTH	1.16			:	0.90	:	1		
CQH	0.80	:	0.90		:	1	:	0.62	
GAI	1.02			:	1.00	:	1	:	0.92

2,3,4,6-Gal : 2,3,4,6-tetra-0-methyl-1,5-di-0-acetylgalacitol
 2,3,4,6-Glc : 2,3,4,6-tetra-0-methyl-1,5-di-0-acetylglucitol
 2,4,6-Gal : 2,4,6-tri-0-methyl-1,3,5-tri-0-acetylgalacitol
 2,3,6-Gal : 2,3,6-tri-0-methyl-1,4,5-tri-0-acetylgalacitol
 2,3,6-Glc : 2,3,6-tri-0-methyl-1,4,5-tri-0-acetylglucitol
 4,6-GalNAc : 4,6-di-0-methyl-2-deoxy-(N-methyl) acetamide-1,3,5-tri-0-acetylgalacitol
 3,6-GlcNAc : 3,6-di-0-methyl-2-deoxy-(N-methyl) acetamide-1,4,5-tri-0-acetylglucitol

表2 症例1の脂質含量 (μmoles/g w. w.)

Simple lipids	
Free fatty acid	2.52
Cholesterol	6.84
Phospholipids	
Sphingomyelin	2.8
Phosphatidylcholine	11.7
Phosphatidylserine	0.2
Ethanolamine plasmalogen	1.2
Phosphatidylethanolamine	5.8
Neutral glycosphingolipids	
GalCer	0.12
GlcCer	0.31
LacCer	0.37
GbOse ₃ Cer	0.15
nLcOse ₄ Cer	0.22
GgOse ₄ Cer	1.67
Acidic glycosphingolipids	
I ^a -HSO ₃ -GalCer	0.02
Gangliosides	4.01
GM3	0.09
GM2	0.12
GX	0.58
GM1	2.85
GD3	0.14
GD1a	0.10
GY	0.07
GD1b	0.04
GT	0.02

する各部位の間に、明らかな差は認められず、いずれも GM₁ が蓄積していた。また、症例2、正常成人脳では検出されない GX, GY が存在した。

以上のように分離同定された各脂質の定量および脂肪酸分析を行い、定量の結果を表2に、単純脂質とリン脂質の脂肪酸構成を表3に、糖脂質の脂肪酸構成を表4に示した。

これらの分析結果は、GM₁ と GgOse₄Cer の蓄積が著明で、本疾患の特徴をよく表している。さらに GgOse₄Cer のほかにも正常ではほとんど検出されない中性糖脂質が検出され、これらの脂肪酸構成は C18:0 が多く、ガングリオシドの脂肪酸構成によく似ていた。

ガングリオシドでは GM₁ の著明な増加のほか、モノシロガングリオシドが相対的に多いことが特徴であった。GX 以外のガングリオシドの構成脂肪酸は C18:0 が多く、このことは正常脳で見られる特徴と一致する。GX は他に比し C18:0 以上の長鎖のものが多くことが特徴的であった。これは図3で見られるように GM₁ とよく分離しないため同定困難であったが、中性糖脂質で検出された nLcOse₄Cer にシアル酸が結合した IV^aNeuAc-nLcOse₄Cer と思われる。GY は微量のため同定しなかった。

GM₁ と GgOse₄Cer の著明な増加の反面、正常成分のコレステロール、リン脂質、GalCer, CSE は減少し、特にミエリンの脂質である GalCer と CSE の減少は顕著であった。個々のリン脂質と GalCer の脂肪酸構成に大きな異常は認められなかった。この結果から、本症例ではミエリン形成不全を伴う脳発育の異常が示唆される。

表3 症例1の単純脂質とリン脂質の脂肪酸構成 (weight %)

	16:0	16:1	18:0	18:1	20:0	20:4	22:0	22:6	24:0	24:1
Simple lipid										
Free fatty acid	30.3	6.8	13.1	32.3	10.6					
Phospholipids										
Sphingomyelin	10.4		61.5		2.5		3.7		3.1	16.0
Phosphatidylcholine	51.8		4.9	32.9		6.2				
Phosphatidylserine	3.2		44.3	44.4		5.9				
Ethanolamine plasmalogen alkenyl	19.8	33.0	19.2	28.1						
acyl	3.5		7.5	26.5		45.0		15.3		
Phosphatidylethanolamine	13.4		24.4	37.4		17.1		4.5		

表4 症例1の糖脂質の脂肪酸構成 (weight %)

	16:0	18:0	20:0	22:0	22:1	23:0	24:0	24:1	25:0	25:1
Neutral										
GalCer normal	5.0	14.3	1.9	3.1	1.1	1.8	7.8	8.3	4.9	1.1
hydroxy				6.5		8.2	25.8	3.4	2.9	
GlcCer	4.3	49.9	6.0	8.0	1.0	1.1	6.7	22.2		
LacCer	3.5	69.1	6.9	5.0			7.3	7.3		
GbOse ₃ Cer	3.7	49.6	3.9	1.2		7.7	5.7	28.2		
nLcOse ₄ Cer	3.1	50.2	5.8	8.9	4.4		5.7	21.2		
GgOse ₄ Cer	1.1	81.4	5.5	1.8			1.3	8.4		
Gangliosides										
GM3	9.8	71.8	7.8	3.8			2.1	3.7		
GM2	6.7	76.7	6.6	3.6			1.3	4.4		
GX	2.7	60.5	6.9	3.1	2.6		3.1	21.1		
GM1	0.9	80.0	8.8	1.9			0.9	6.9		
GD3	3.1	82.2	6.0	1.8			1.1	4.3		
GD1a	3.9	77.4	11.0	3.1			2.3	3.9		
GY	2.4	77.4	9.0	3.2			1.6	5.8		
GD1b	5.7	71.1	10.4	4.1			2.0	6.2		
GT	4.8	81.4	8.1	1.9			0.8	1.7		

B 症例2 (若年型)

図4に総脂質の二次元 TLC を示した。リン脂質がそれぞれ認められるほか、症例1でははっきり認められなかった CMH と CSE のスポットも明らかに検出された。単純脂質はコレステロールの移動度に相当するスポットがあり、これは別の一次元 TLC で分析するとコレステロール (Ch) とコレステロールエステ

ル (ChE) から成っていることが明らかになった (図5)。さらに、糖鎖の長い中性糖脂質およびガングリオシドと思われるスポット X が、症例1と同様に明瞭に認められた。したがって症例1と同様にさらに分析を進めた。

図6に示すように、中性糖脂質では、本症例の総ガングリオシドの弱酸水解によって生じた GlcCer,

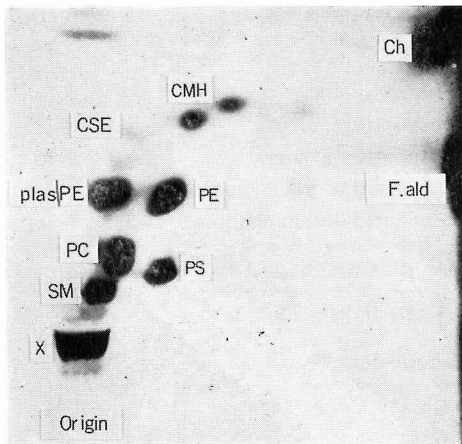


図4 症例2の総脂質の二次元薄層クロマトグラム
展開, 発色: 図1と同じ

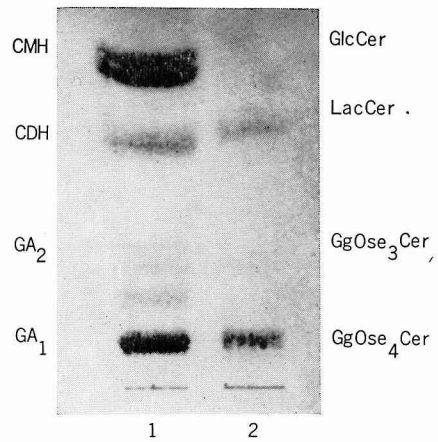


図6 症例2の中性糖脂質の薄層クロマトグラム
1: 症例2の中性糖脂質
2: 症例2のガングリオンドの弱酸水解物
展開: C-M-W (65:25:4, v/v/v)
発色: アンスロン試薬

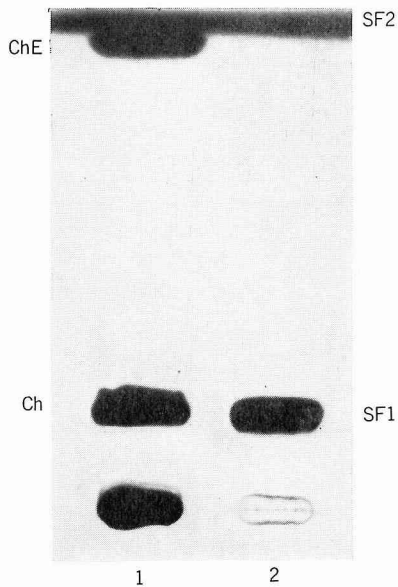


図5 症例2の単純脂質の薄層クロマトグラム
1: 症例2の総脂質
2: コレステロール
ベンゼン-エチルエーテル-エタノール-酢酸 (50:40:2:0.2, v/v/v/v) で SF1 まで展開, 風乾後
ヘキサソ-エーテル (80:20, v/v) で SF2 まで展開

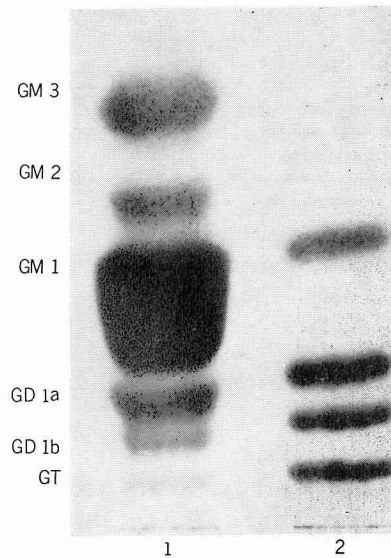


図7 症例2のガングリオンドの薄層クロマトグラム
1: 症例2のガングリオンド
2: 正常成人脳のガングリオンド
展開: C-M-0.25% KCl (60:35:8, v/v/v)
発色: 酢酸銅リン酸試薬

表5 症例2の脂質含量 ($\mu\text{moles/g w.w.}$)

Simple lipids		Phospholipids		32.7
Cholesterol	29.6	Sphingomyelin		5.2
Cholesterol ester	17.5	Phosphatidylcholine		13.7
Free fatty acid	trace	Phosphatidylserine		3.3
		Ethanolamine plasmalogen		4.9
		Phosphatidylethanolamine		5.6
Neutral glycosphingolipids		Acidic glycosphingolipids		
GalCer	4.71	I ^s -HSO ₃ -GalCer		8.35
GlcCer	2.14	Gangliosides		6.21
LacCer	1.78	GM3		0.44
GgOse ₃ Cer	1.10	GM2		0.25
GgOse ₄ Cer	4.27	GM1		4.87
		GD1a		0.39
		GD1b		0.17
		GT		0.88

表6 症例2の単純脂質とリン脂質の脂肪酸構成 (weight %)

	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:0	20:4	22:6	24:0	24:1
Simple lipid										
Cholesterol ester	25.3	10.6	5.7	53.3						
Phospholipids										
Sphingomyelin	11.9		63.9			2.9		4.0	12.6	
Phosphatidylcholine	54.5		10.4	28.7			1.5			
Phosphatidylserine	10.9		50.8	25.0			4.0	2.8		
Ethanolamine plasmalogen										
alkenyl	15.1	13.8	23.4	26.2	16.1					
acyl	5.9		14.2	17.4			31.2	22.4		
Phosphatidylethanolamine	10.9		40.5	17.0			17.2	10.1		

LacCer, GgOse₃Cer, GgOse₄Cer, に相当するバンド CMH, CDH, GA₂, GA₁, がそれぞれ検出された。構成糖の分析の結果, GMH は Gal : Glc = 2 : 2 : 1, CDH は Gal : Glc = 1 : 1, GA₂ は Gal : Glc : GalNAc = 1 : 1 : 1, GA₁ は Gal : Glc : GalNAc = 2 : 1 : 1 であった。これらの結果から, CMH は GalCer と GlcCer から成り, CDH は LacCer, GA₂ は GgOse₃-Cer, GA₁ は GgOse₄Cer と同定した。

図7に見られるように, ガングリオンドでは GM₁ が圧倒的に多く, 本疾患の特徴をよく表している。ま

た, モノシアログングリオンドも増加していた。

それぞれ同定された脂質の定量および脂肪酸分析を行った。定量結果を表5に, 単純脂質とリン脂質の脂肪酸構成を表6に, 糖脂質の脂肪酸構成を表7に, それぞれ示した。

症例1と同様に, GM₁ と GgOse₄Cer が著明に増加し本疾患の特徴をよく表している。また, GgOse₄Cer を始めとして正常ではほとんど検出されない中性糖脂質が同定され, これらの脂肪酸構成は C18:0 を主体とし, ガングリオンドの脂肪酸構成によく似ていた。

表7 症例2の糖脂質の脂肪酸構成 (weight %)

	16:0	18:0	20:0	22:0	24:0	24:1	24h:0	24h:1	H-FA*
Neutral									
GalCer	2.3	8.0	1.1	3.7	12.5	6.4	48.3	6.2	58.1
GlcCer	14.4	61.6	5.7	8.0		5.5			0
LacCer	2.6	72.5	7.5	4.6	4.8	6.4			0
GgOse ₈ Cer	4.3	76.9	8.0	10.7					0
GgOse ₄ Cer	0.8	90.3	7.7	1.2					0
Acidic									
I ³ -HSO ₃ -GalCer	5.4	13.8	2.1	3.7	19.0	9.7	8.4	6.0	21.5
Gangliosides									
GM3	4.3	79.1	7.6	7.7	1.3				0
GM2	2.8	77.4	11.5	8.3					0
GM1	1.1	84.7	12.0	2.2					0
GD1a	1.1	82.7	11.6	4.6					0
GD1b	2.4	83.6	9.4	4.6					0
GT	16.0	53.7	7.2	23.2					0

* : 全脂肪酸に対するハイドロキシ酸の割合

表8 症例3の各部位のガングリオンド構成 (mole %)

	Gray matter	White matter	Caudate nucleus	Putamen
GM4	2.2	15.2		
GM3	4.6	12.1	12.7	14.4
GM2	3.8	2.6	5.6	6.8
GM1	34.9	31.1	49.4	52.5
GD3	5.4	5.0	3.6	3.2
GD1a	18.5	13.0	10.7	10.2
GD1b	14.1	9.8	9.9	6.0
GD2	3.9	2.1	1.6	1.6
GT	10.3	6.6	5.3	4.2
GQ	2.2	2.4	1.4	1.1

図8をデンストメーターで測定した。

ガングリオンドでは GM₁ の著明な増加のほか、モノシロガングリオンドが増加しているが、脂肪酸構成は C18:0 を主体としていた。

症例1と同様に、GM₁ および GgOse₄Cer の異常な蓄積とは逆に、コレステロール、リン脂質、GalCer、CSE は減少していた。しかし、その減少は症例1程ではなく、コレステロールエステルも存在したことから、本症例では若干のミエリン形成後脱髄が生じたこ

とが示唆される。

C 症例3 (慢性型)

図8に、剖検時異常を指摘された尾状核、被殻と、正常とされた灰白質、白質より抽出したスフィンゴ脂質の HPTLC を示した。正常成人脳に比べ、尾状核、被殻では GM₁ が著明に増加し、さらに GgOse₄Cer の存在も認められた。この HPTLC をデンストメーターで測定した結果を表8に示した。尾状核、被殻で

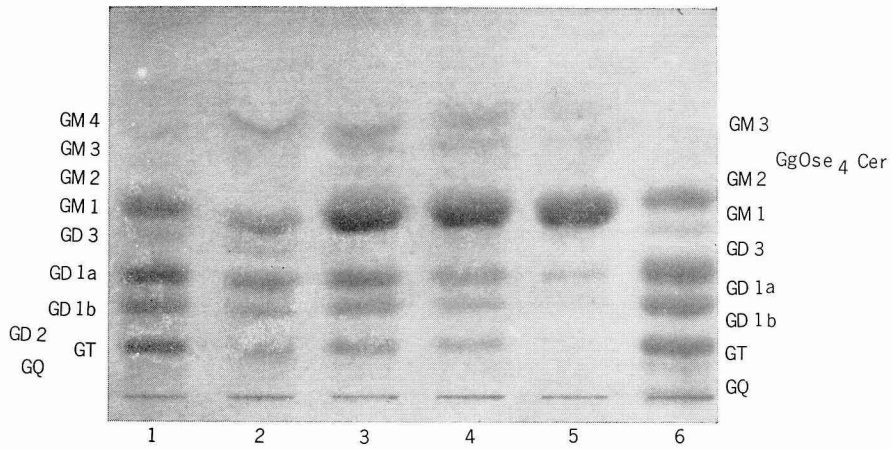


図 8 症例 3 の各部位のガングリオンドの高性能薄層クロマトグラム
スフィンゴ脂質を展開した
1 : 灰白質 2 : 白 質 3 : 尾状核
4 : 被 殻 5 : 症例 2 6 : 正常成人脳のガングリオンド
展開, 発色 : 図 3 と同じ

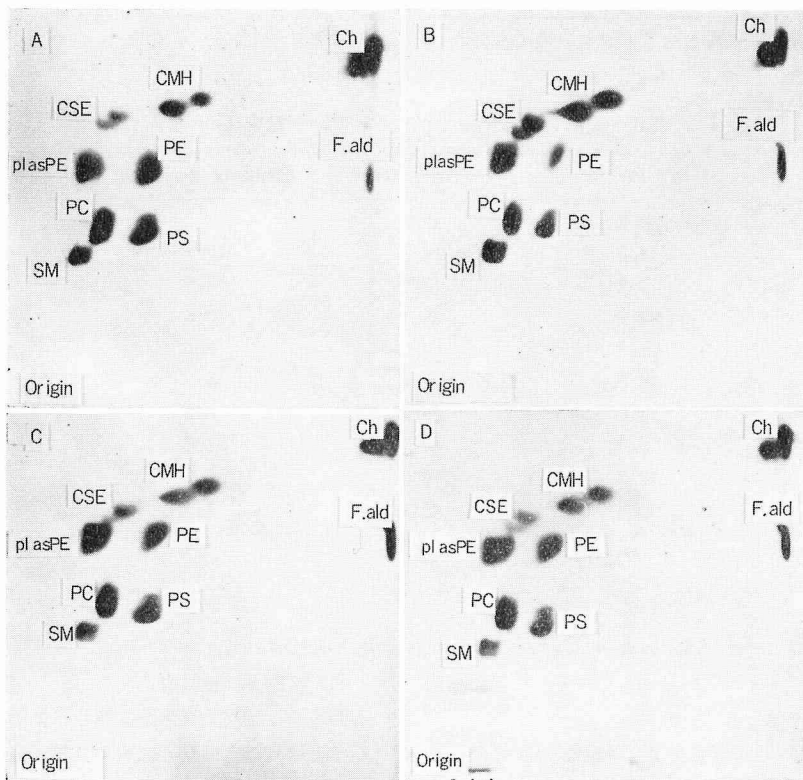


図 9 症例 3 の各部位の総脂質の二次元薄層クロマトグラム
A : 灰白質 B : 白 質
C : 尾状核 (周囲組織を含む) D : 被殻 (周囲組織を含む)
展開, 発色 : 図 1 と同じ

表9 症例3の各部位の脂質含量 (μmoles/g w. w.)

	Gray matter	White matter	Caudate nucleus*	Putamen*
Simple lipids				
Cholesterol	32.00	78.30	44.82	39.28
Cholesterol ester	n. d.	n. d.	trace	trace
Phospholipids	48.00	75.04	48.86	53.54
Sphingomyelin	5.21	13.12	7.89	8.40
Phosphatidylcholine	19.32	17.97	15.15	20.20
Phosphatidylserine	4.50	10.36	7.21	6.70
Ethanolamine plasmalogen	11.91	27.15	12.94	12.30
Phosphatidylethanolamine	7.06	6.43	4.88	5.94
Neutral glycosphingolipids				
GalCer	5.18	37.01	18.84	16.79
GlcCer	0.02	0.06	0.02	0.05
LacCer	0.22	0.69	0.45	0.40
GbOse ₃ Cer	0.02	0.05	0.04	0.02
nLcOse ₄ Cer	0.01	0.02	0.04	0.02
GgOse ₄ Cer	0.01	0.04	0.31	0.27
Acidic glycosphingolipids				
I ³ -HSO ₃ -GalCer	2.39	6.30	5.17	5.70
Gangliosides	2.40	0.89	1.80	2.46
GM4	0.09	0.14	0.02	trace
GM3	0.21	0.14	0.27	0.37
GM2	0.17	0.03	0.13	0.13
GM1	1.15	0.36	1.05	1.49
GD3	0.19	0.02	0.05	0.06
GD1a	0.32	0.08	0.11	0.15
GD1b	0.19	0.07	0.10	0.15
GT	0.07	0.04	0.05	0.08
GQ	0.01	0.01	0.02	0.03

* : 周辺組織を含む

n. d. : 検出されなかったことを示す

は GM₁ が50%を占め、灰白質、白質でも30%以上を占めていることが注目された。

つぎに、尾状核、被殻のみでは得られる試料があまりに少ないため、周辺組織を含めた試料（〔尾状核〕、〔被殻〕と表す）を得、これについて脂質分析を行った。

図9にその二次元 TLC を示した。灰白質（A）、白質（B）、〔尾状核〕（C）、〔被殻〕（D）のいずれも大きな差はないが、〔尾状核〕と〔被殻〕で症例1（図1）

と症例2（図4）のスポットXに相当すると思われるスポットがかすかに認められるほかに、白質程顕著ではないが灰白質に比し Ethanolamine plasmalogen (plasPE) が Phosphatidylethanolamine (PE) より多いことが注目された。

図10に同じ部の中性糖脂質の TLC を示した。多量の CMH が見られる以外に、ほかにもバンドが検出され、特にすべての部の CDH、〔尾状核〕および〔被

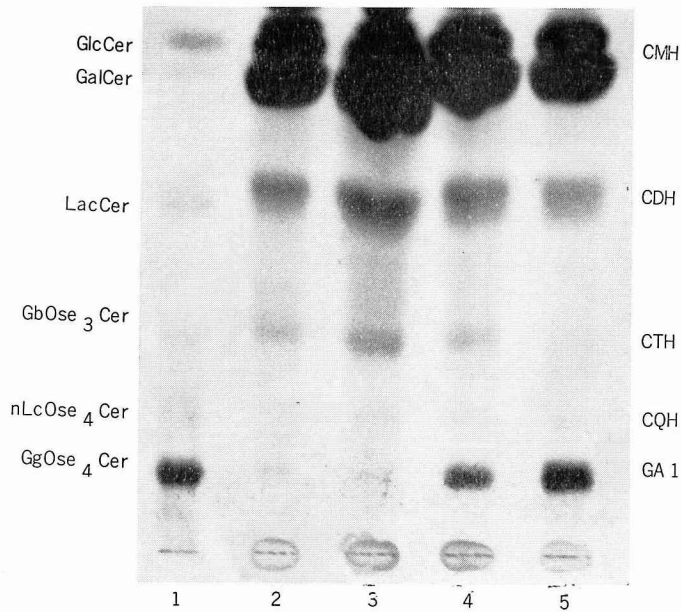


図10 症例3の各部位の中性糖脂質の薄層クロマトグラム
1: 症例1の中性糖脂質 2: 灰白質 3: 白 質
4: 尾状核(周囲組織を含む) 5: 被殻(周囲組織を含む)
展開, 発色: 図2と同じ

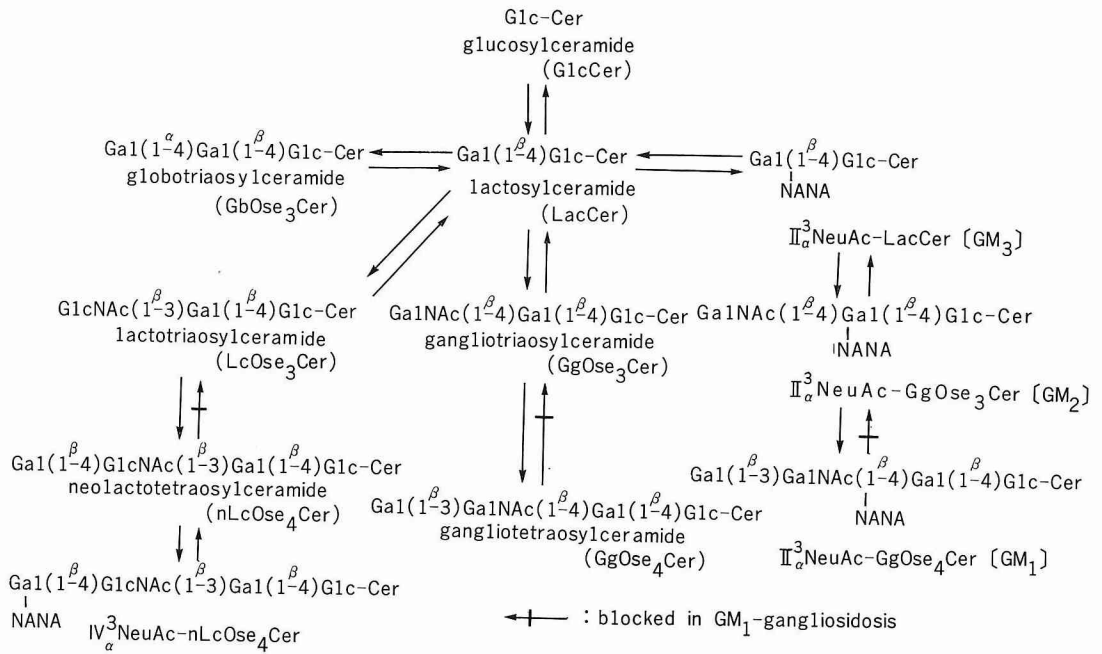


図11 GM₁-ガングリオシドーシスで検出された糖脂質の代謝模式図
名称は IUPAC⁹⁾による。[] は Svennerholm の命名¹⁰⁾による。

殻]での GA₁ が明瞭に認められた。CMH は極少量の GlcCer を含んでいたが、ほとんどは正常な形の GaiCer であった。構成糖の分析、症例 1 から得られた中性糖脂質との移動度の比較から、CDH は LacCer, CTH は GbOse₃Cer, CQH は nLcOse₄Cer, GA₁ は GgOse₄Cer と推定した。

表 9 に分析結果を示した。正常に存在する脂質については、ガングリオンドを除き、あまり顕著な異常は認められず、GlcCer 以下の正常ではほとんど検出されない中性糖脂質の存在および GM₁ の増加を特徴とするガングリオンド構成の異常が認められた。しかし、灰白質、白質は正常のものに見られるように分化をも認められた。本来は灰白質に相当する尾状核、被殻は、周辺の白質を含む〔尾状核〕、〔被殻〕として分析したことを考えあわせると、正常ではないものの症例 1, 2 程は異常がない、と考えられた。

この結果から、病変は尾状核、被殻に限局してはいるが、病理学的に正常とされた灰白質、白質にも若干の異常があることが示唆される。

IV 考 察

正常に見られるコレステロール、リン脂質およびミエリン脂質のセレブロンド、スルファチドから見ると、症例 1 ではそれらが少なく(表 1)、また、リン脂質の構成は胎児のもの¹⁹⁾に似ている。これに比べて症例 2 はこれら正常で存在する脂質は症例 1 より多く(表 4)、若干のミエリン形成はなされていたと考えられる。臨床経過から見ても症例 2 は生後 7 カ月頃まで正常に発育したと思われる、この点とも矛盾しない。症例 3 では、表 8 で見られたように灰白質、白質の分化も示されていて、この点臨床経過とよく相関する。

本疾患の原因は前述したように β -ガラクトシダーゼ欠損であり、いづれの型においても、白血球を用いた分析でその活性は一様に低い。また、この酵素は、様々なアイソザイムがあると言われ²⁰⁾²¹⁾、その基質特異性などの性質については十分解明されていない。したがって、本疾患における各型の差をこの酵素 β -ガラクトシダーゼで説明することは現在のところできないと考えられる。

次いで各型の病像の差であるが、幼児型、若年型、慢性型はそれぞれこの順に症状発現が遅く、また進行も緩徐である。脳の発育、分化の指標となる脂質構成の観点からもこの傾向は支持される。特に慢性型については、病変が脳基底核に限局する傾向がアメリカ

における第 1 例⁶⁾⁷⁾、症例 3 ともに見られる。ガングリオンド GM₁ の蓄積により正常細胞の機能が破壊され、その結果症状発現を見るとすれば、幼児型ではかなり早期に細胞がその機能を失ない出生直後から異常が見られ、若年型ではやや緩徐なため若干のミエリン形成などの発育を示すと考えられる。この観点に立つと、より緩徐に進行する慢性型では、脳基底核(症例 3 では尾状核と被殻)がほかに比し早く細胞がその機能を喪失した可能性も考えられる。しかし、異染性白質ジストロフィー慢性型で、中枢神経系内できわめて無作為的に病変部が散在していた症例があり²²⁾、症例 3 でも単に尾状核、被殻が強い障害を受けた可能性もある。しかし、前述の第 1 例⁶⁾⁷⁾でも病変が脳基底核に限局していたことを考え合わせると、旧皮質という大脳基底核の特殊性によるものと考えの方がより妥当である。

ここで述べた 3 例では、正常脳には存在しない様々な中性糖脂質が検出されたが、これらの存在について考察する。図 11 に示したように、糖脂質は非還元末端の糖が順次結合、解裂して合成、分解がなされ、代謝される。本疾患における酵素欠損により阻害されると考えられる部位は図 11 に示した通りである。また、GM₈、GM₂、GM₁ は正常脳の構成成分であり、正常ではこれら以外のものはほとんど検出されない。このことの説明は、証明はなされていないが、以下のようなことが推定される。

1) 正常でもこれらの代謝経路はあるが、代謝速度が非常に早いために検出されない。本疾患の場合、GgOse₄Cer, nLcOse₄Cer はその分解がなされないため蓄積することは考えられるが、GbOse₃Cer に関しては説明不能である。

2) 脳の細胞として分化する以前には、これらの代謝経路が存在し、分化するに従い代謝経路が消失し、最後に選択的なものが残る。本例では未分化なため、本来なら消失すべき代謝経路が残存している。

3) 十分に分化していないため、体液など外因性の物質が混入した可能性。しかし一般に臓器の糖脂質の構成脂肪酸は C_{18:0} より長鎖のものが多くは知られており、この点いづれの症例とも一致しない。

最後に慢性型の遺伝形式については、女性の臨床例の存在(柳沢信夫私信)から、必ずしも伴性劣性遺伝形式は否定し切れないが、常染色体性劣性遺伝形式と推定される。この点は症例数が増えることで容易に解決される問題である。

V 結 語

GM₁-ガングリオシドーシスの3型、幼児型、若年型、慢性型の脂質分析を行い、以下の結果を得た。

1) 幼児型：正常成分の脂質は少なく、脳が暦年齢に比し非常に幼若と考えられる分析結果であった。本疾患の特徴である GM₁ と GgOse₄Cer の著明な蓄積のほかに、正常では検出されない様々な中性糖脂質が検出された。

2) 若年型：幼児型と同じ傾向であるが、若干のミエリン形成を示唆し、暦年齢に対する幼若さは幼児型程ではなかった。

3) 慢性型：病理学的に異常とされた尾状核、被殻において、GM₁ と GgOse₄Cer のはっきりとした蓄積が認められ、正常とされた灰白質、白質でも GM₁ の増加と GgOse₄Cer の存在が認められた。しかし、

いずれの部位でも正常成分の脂質はかなり存在した。また、いずれの部位でも LacCer を始め正常では検出されない中性糖脂質が検出され、病変が必ずしも尾状核、被殻に限局していないことが明らかになった。

本研究を進めるにあたり御指導いただいた信州大学医学部附属順応医学研究施設生化学部門教授武富 保博士、ならびに各型の脳組織および臨床歴を御提供下さいました、長野県立木曽病院小児科山田幸宏、東京都立府中療育センター脳神経外科篠原 猛、長野県厚生農業協同組合連合会佐久総合病院神経内科近藤清彦の各先生に深く感謝いたします。

本研究の一部は1981年7月第21回日本脂質生化学研究会（東大阪）および1982年11月第25回日本神経化学会（東京）で発表した。

文 献

- 1) Norman, R.M., Urich, H., Tingey, A.H. and Goodbody, R.A. : Tay-Sachs disease with visceral involvement and its relationship to Niemann-Pick's disease. *J Path Bacteriol*, 78 : 409-412, 1959
- 2) Landing, B.H. and Rubinstein, J.H. : Biopsy diagnosis of neurologic disease in children with emphasis on lipidosis. In : Aronson, S.M. and Volk, B.W. (eds.), *Cerebral Sphingolipidosis*, p.1, Academic Press, New York, 1962
- 3) Landing, B.H., Silverman, F.N., Craig, J.M., Jacoby, M.D., Lahey, M.E. and Chadwick, D.L. : Familial neurovisceral lipidosis. *Am J Dis Child*, 108 : 503-522, 1964
- 4) O'Brien, J.S., Stern, M.B., Landing, B.H., O'Brien, J.K. and Donnell, G.N. : Generalized gangliosidosis-another inborn error of ganglioside metabolism? *Am J Dis Child*, 109 : 338-346, 1965
- 5) Okada, S. and O'Brien, J.S. : Generalized gangliosidosis, β -galactosidase deficiency. *Science*, 160 : 1002-1004, 1968
- 6) Derry, D.M., Fawcett, J.S., Anderman, F. and Wolfe, L.S. : Late infantile systemic lipidosis: major monosialogangliosidosis, delineation of two types. *Neurology*, 18 : 340-348, 1968
- 7) Goldman, J.E., Katz, D., Rapin, I., Purpura, D.P. and Suzuki, K. : Chronic GM₁ gangliosidosis presenting as dystonia : I. Clinical and pathological features. *Ann Neurol*, 9 : 465-475, 1981
- 8) Kobayashi, T. and Suzuki, K. : Chronic GM₁ gangliosidosis presenting as dystonia : II. Biochemical studies. *Ann Neurol*, 9 : 476-483, 1981
- 9) IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature : The nomenclature of lipids. *Lipids*, 12 : 455-468, 1977
- 10) Svennerholm, L. : Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J Neurochem*, 10 : 613-623, 1963
- 11) Ledeen, R.W., Yu, R.K. and Eng, L.F. : Gangliosides of human myelin : sialosylgalactosylceramide (GM₄) as a major component. *J Neurochem*, 21 : 829-839, 1973
- 12) Saito, T. and Hakomori, S. : Quantitative isolation of total glycosphingolipids from animal cells. *J Lipid Res*, 12 : 257-259, 1971
- 13) Zak, B. : Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. *Am J Clin Pathol*, 27 : 583-588, 1957

- 14) Bartlett, G.R. : Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*, 234 : 466-468, 1959
- 15) Phillips, L.R. and Fraser, B.A. : Methylation of carbohydrates with dimethyl potassium in dimethyl sulfoxide. *Carbohydr Res*, 90 : 149-152, 1981
- 16) Yang, H. and Hakomori, S. : A sphingolipid having a novel type of ceramide and lacto-N-fucopentaose III. *J Biol Chem*, 246 : 1192-1200, 1971
- 17) Svennerholm, L., Månsson, J.-E. and Li, Y.-T. : Isolation and structural determination of a novel ganglioside, a disialosylpentaohexosylceramide from human brain. *J Biol Chem*, 248 : 740-742, 1973
- 18) Miettinen, T. and Takki-Lukkainen, I.-T. : Use of butyl acetate in determination of sialic acid. *Acta Chem Scand [B]*, 13 : 856-858, 1959
- 19) Kunishita, T. and Taketomi, T. : Brain lipids of a still-born 28-week-old fetus from a pregnant woman with severe hydramnion. *Jpn J Exp Med*, 51 : 157-164, 1981
- 20) O'Brien, J., Ho, M.W., Wilson, J.F., Meyers, G., Opitz, J.M., ZuRhein, G.M., Spranger, J.W., Hartman, H.A., Heneberg, B. and Grosse, F.R. : Juvenile GM₁ gangliosidosis : clinical, pathological, chemical and enzymatic studies. *Clin Genet*, 3 : 411-434, 1972
- 21) Tanaka, H. and Suzuki, K. : Lactosylceramide β -galactosidase in human sphingolipidoses. *J Biol Chem*, 250 : 2324-2332, 1975
- 22) Taketomi, T., Kasama, T., Hara, A. and Mizushima, S. : Abnormality of Sphingolipids in correlation with histological damages in the central and peripheral nervous systems of a patient with adult form of metachromatic leukodystrophy. *Jpn J Exp Med*, 51 : 237-246, 1981

(58. 10. 24 受稿)