

エタノールがラット脳ガングリオシドに及ぼす影響

安達倫子¹⁾・藤井明彦¹⁾・井戸達雄¹⁾・木村修^{—2)}

(¹⁾東北大・サイクロトロラジオアイソトープセンター, ²⁾昭和女子大・生活機構)

Effect of ethanol on rat brain gangliosides

Michiko ADACHI¹⁾, Akihiko FUJII¹⁾, Tatuo IDO¹⁾, Syuichi KIMURA²⁾

(¹⁾*Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University*

²⁾*Course of Science for Living System, Showa Women's University*

The effects of acute ethanol on rat brain gangliosides were investigated. 3g/kg of ethanol was administered intraperitoneally and the total amounts of N-acetylneuraminic acid (NANA) decreased only in serum, but not in brain regions at two hours after injection. Time course of amounts of total and gangliosidic NANA were determined, and the decrease of total NANA were only at 1 hr in cerebral cortex and returned to basal level at 4 hours. The amounts of gangliosidic NANA did not alter significantly. We investigated cleavage of NANA by using ³H labeled precursor of it, N-acetylmannosamine, -[N-mannosamine6H (N)]-. 48 hours after microinjection of precursor, dialysates were collected by microdialysis technique and were separated by HPLC system, and the radioactivity of NANA fraction were measured by liquid scintillation counter. Acute ethanol increased the liberation of NANA radioactivities by neuraminidase in striatum. Therefore, we speculated that the effect of acute ethanol is a conformational change of gangliosides or their surrounding areas.

エタノールは有史以前より広く用いられている嗜好品であり、その急性症状は酔い、あるいは酩酊などの体験を通じてよく知られている。エタノールの作用は中枢神経系のそれが最も顕著であるが、その作用は、血中濃度（低濃度では気分の発揚、注意力の低下、動物では運動活性の上昇を、高濃度では、鎮静作用、運動失調などをもたらす）及び急性、慢性の違いにより様々である¹⁾。また、薬理学的濃度においては、エタノールは膜の流動性の上昇、GABA アゴニスト作用の増強、セロトニン 3 レセプターを介したドパミン放出量の増加を引き起こす。一方、ガングリオシドはシアル酸を糖鎖の先端に有するスフィンゴ糖脂質で脳、特にシナプスに多く存在する。その機能としては、神経栄養因子様の作用や GD1a, GD3 などのポリシアロガングリオシドが Ca 存在下シナプトソームからのドパミンの放出量を増加させる効果などが報告されており、神経伝達系でのその役割が注目されている。私達は、このガ

ングリオシドの神経伝達系における機能を調べるべく、近年、Klemm ら²⁾によってガングリオシドを変化させると報告されているエタノールを用いて、そのガングリオシドに対する影響を検討したので報告する。

材 料 と 方 法

1) 実験動物及びエタノールの投与

実験には300±50gのウィスター系雄ラットを用い、Klemm²⁾らにしたがい、エタノールの投与量は3g/kg (30%溶液)とし、腹腔内投与した。

2) 血中エタノール濃度の測定

エタノール投与前及び投与後15, 30, 60, 120, 240分後において尾静脈より採血し血清を得、血中エタノール濃度測定キット (Sigma) を用いて定量を行った。

3) 総シアル酸及びガングリオシド性シアル酸の定量

i) 試料の調製

エタノールあるいは生理食塩水投与一定時間の後、採血、断頭し脳を採取した。脳を大脳皮質、線条体、海馬、視床下部及び小脳に分け、血液については血清とした。総シアル酸量の測定試料は各組織を0.1N硫酸でホモジナイズ、加水分解したものの上清を用いた。ガングリオシド性シアル酸の試料としては、各組織を、クロロホルム、メタノール (2:1, v/v) でホモジナイズ、抽出を行い、ケイ酸カラムクロマトグラフィーによりガングリオシド画分を得、これの加水分解後の上清を用いた³⁾。

ii) 試料の蛍光誘導体化及びHPLC測定条件

ついでこのようにして得られた試料30 μ lに、 α -ケト酸の選択的蛍光誘導化試薬である7 mM DMB (1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン) 溶液50 μ l、及び25mM硫酸20 μ lを加え、誘導体化を行った。これを以下に示す分析条件⁴⁾にて測定した。すなわち、カラム (nova-pack C18)、移動相 (メタノール, アセトニトリル, 水 (25:4:91)), 流速 (1.2ml/min) である。

4) マイクロダイアリシス法による測定

i) ガイドカニューラの挿入手術: マイクロダイアリシスに先立ち、Paxions and Watson⁵⁾のラット脳アトラスに基づいてガイドカニューラをラット脳線条体 (bregmaより前方0.7mm, 正中より側方3.0mm, 深さ4.0mm) に埋め込み、義歯用セメントで固定した。

ii) [³H]-N-アセチル-D-マンノサミンのマイクロインジェクション: 手術後約2日の回復期間をおいた後、マイクロインジェクションプローブを用いて、N-アセチル-D-マンノサミン, N-[マンノサミン-6-³H (N)]-(44.7Ci/mmol, NEN) 50 μ Ci (1.85MBq) を50 μ lの生理食塩水に溶解し、0.5 μ l/minで目的部位に注入した。

iii) マイクロダイアリシス法による透析液の採取及び分析: 前駆化合物注入から48時間後、透析プローブ (BDP-I-8-03, エイコム) をガイドカニューラに挿入しリンゲル液を1 μ l/minで灌流し、60分を1フラクションとして透析液を採取した。透析開始3時間後にエタノールを腹腔内投与し、さらに2時間後にシアル酸加水分解酵素であるノイラミニダーゼをマイクロインジェクションし4時間透析を続けた。

シアル酸画分の分取は Yohe ら⁶⁾にしたがい、陽イオン交換樹脂カラム Aminex HPX-87H (Bio-Rad) を用い、あらかじめ非標識化合物により求めた保持時間をもとに行った。

iv) シアル酸画分の放射能の測定：得られたシアル酸画分に液体シンチライト ACS-II (Amersham) を加え、攪拌後約10時間放置した後、液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。

v) 脳オートラジオグラフィー：マイクロダイアリシス終了後、採取、 -80°C にて凍結した脳から厚さ $20\mu\text{m}$ の切片を作成し、ポリカルボネートの薄板に密着乾燥させた。

結果及び考察

血中エタノール濃度の経時変化を測定した結果、エタノール投与後2時間で尾静脈中のエタノール濃度は最高に達し、その後は一定の速度で消失している。また、最高値は0.17%でいわゆる“酔い”の ED_{50} 値を越えていた (Fig.1)。そのため、エタノール投与後2時間における脳各組織及び血清での全シアル酸量を測定した。

その結果、血清の全シアル酸量がアルコール投与群において減少しているものの、脳各部位においては全シアル酸量に変化はみられなかった (Table 1)。しかし、この方法では、細胞内ガングリオシドと膜表面のそれとを区別できないため、次にマイクロダイアリシス法を用いて細胞間隙でのシアル酸の遊離量測定を行った。

マイクロダイアリシス法により、透析液を採取し、透析液中のシアル酸量を DMB により蛍光誘導体化する方法で測定を行った。しかし、血中シアル酸の混入によるシアル酸濃度のばらつきや、濃度が検出限界を下回ることもしばしばであった。そのため、さらに高感度で血中シアル酸を無視できるトリチウム体シアル酸前駆化合物の脳内投与によるシアル酸複合体の生体内標識化を行った (Fig.2)。

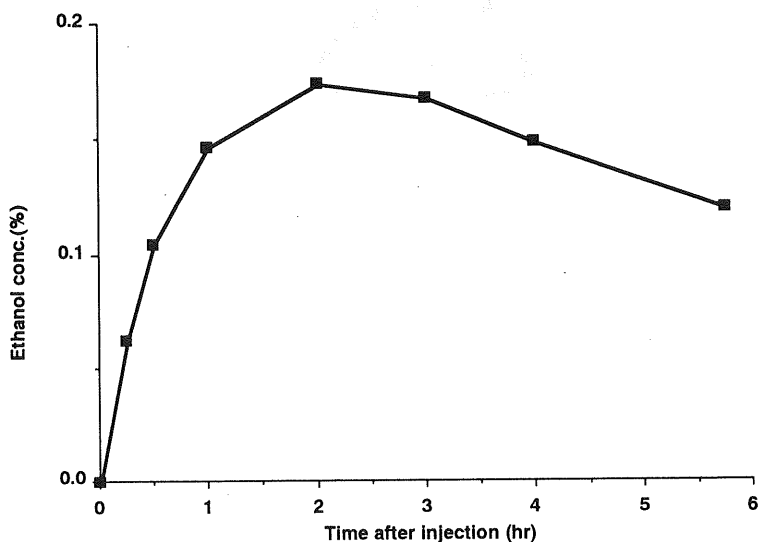
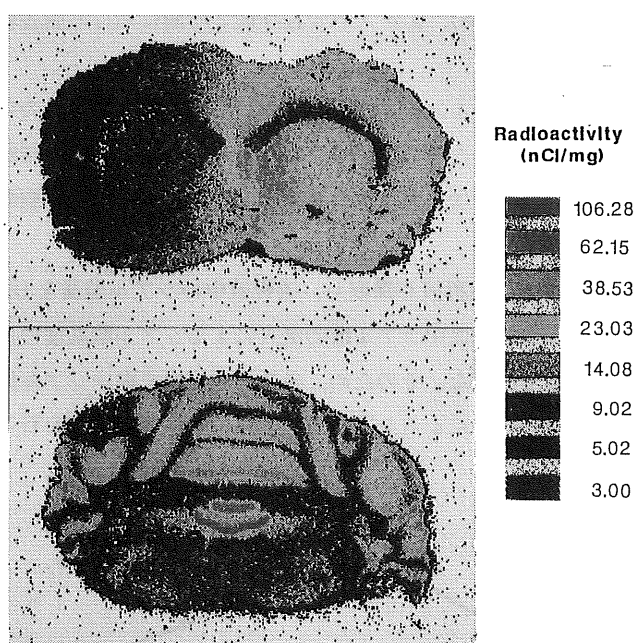


Fig. 1. Time course of serum ethanol concentration after 3g/kg ethanol intraperitoneal injection

Table 1. Amount of total N-acetylneuraminic acid (NANA) in various brain areas and serum at two hours postinjection of 3g/kg ethanol

	Control ($\mu\text{mol/g}$ wet tissue)	Alcohol ($\mu\text{mol/g}$ wet tissue)
Cerebral cortex	4.47 ± 0.19	4.64 ± 0.07
Striatum	4.41 ± 0.13	4.35 ± 0.13
Hippocampus	4.26 ± 0.13	4.45 ± 0.05
Cerebellum	3.29 ± 0.15	3.19 ± 0.03
	($\mu\text{mol/ml}$)	($\mu\text{mol/ml}$)
Serum	4.01 ± 0.06	$3.13 \pm 0.17 *$

Values are means $\pm$ s. d. (n = 3) * : $P < 0.05$

**Fig. 2.** Autoradiograms of striatum (top) and Cerebellum (bottom) at 5 days after microinjection of $[^3\text{H}]$ -N-acetylmannosamine

その結果、線条体において、エタノール投与のみによってはシアル酸放射能の増加はみられない、すなわち、エタノールにはシアル酸複合体からシアル酸を遊離させる作用がないことがわかった。さらに、シアル酸加水分解酵素であるノイラミニダーゼを測定部位に注入したところ、線条体においては、酵素反応により放出される放射能の増加がエタノールにより増加することがわかった (Fig.3)。

このようにエタノールによってシアル酸の遊離が起らないことがわかったため、時間を追って総シアル酸及びガングリオシド性シアル酸の定量を行った。その結果、エタノール投与後1時間の大腦皮質の総シアル酸量がコントロールに比し減少しているが、それ以外は総シアル酸及びガングリオシド性シアル酸量に変化がないことがわかった (Fig.4)

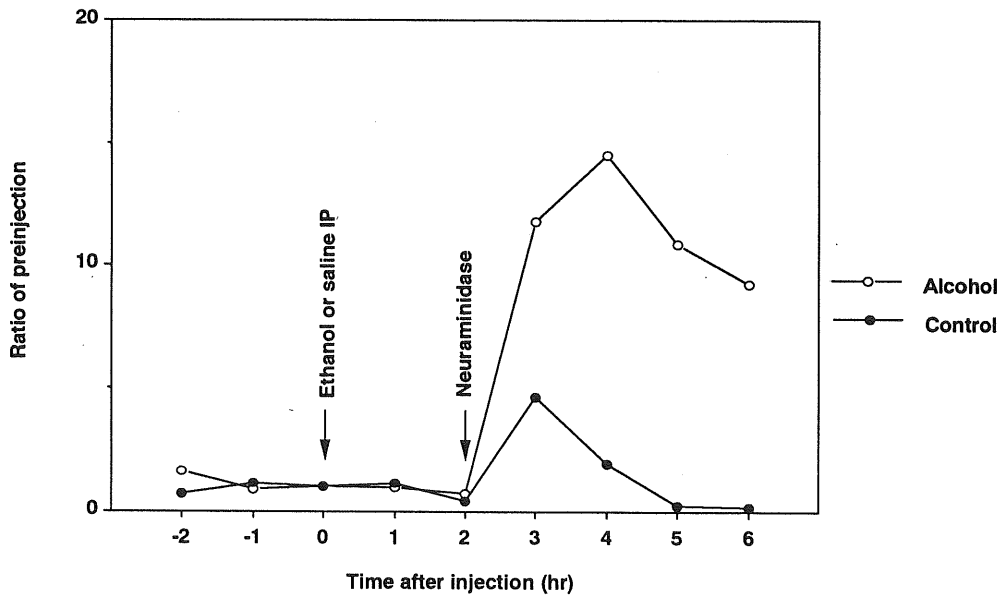


Fig. 3. Time course of radioactivity of N-acetylneuraminic acid after ethanol and neuraminidase injection in striatum

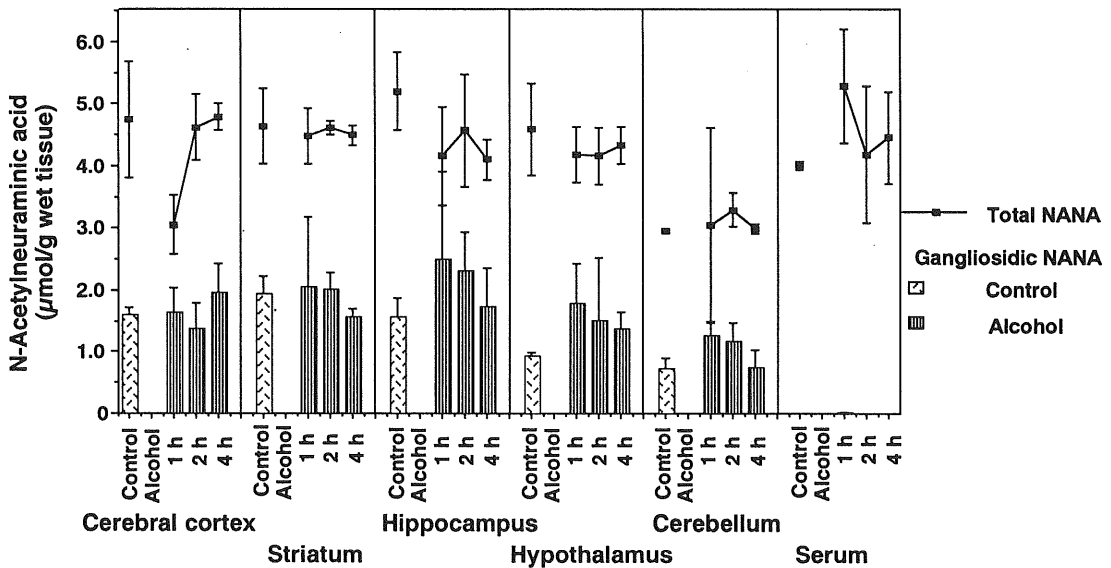


Fig. 4. Amount of total and gangliosidic N-acetylneuraminic acid at 1, 2 and 4 hours post-injection of 3g/kg ethanol. Values are means $\pm$ s. d. (n=3)

このことから、急性エタノールの投与は、投与後一時間での大脳皮質の総シアル酸量を減少させるほかは、脳組織中のシアロ糖蛋白及びガングリオシド量を変化させないことがわかった。また、エタノールは、ガングリオシドからのシアル酸の遊離を促すのではなく、外因性の遊離酵素によるガングリオシドからのシアル酸の遊離量を線条体において増加させることがわかった。従って、エタノールのガングリオシドへの作用は膜表面の微小部分におけるガングリオシドの立体的変化によるものと推測された。

文 献

- 1) LITTLE, H. J. (1991) Prog. Neurobiol. 36 : 171
- 2) CHERIAN, L. and W. R. KLEMM (1991) Alcohol 8 : 389
- 3) IRWIN, C. C. and L. N. IRWIN (1979) Anal. Biochem. 94 : 335
- 4) HARA, S., Y. TAKEMORI, M. YAMAGUCHI, M. NAKAMURA and Y. OHKURA (1987) Anal. Biochem. 164 : 138
- 5) PAXIOS, G. and C. WATSON, (1982) : The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, New York
- 6) YOHE, H. C., K. UENO, N-C CHANG, G. H. GLASER and R. K. YU (1980) J. Neurochem. 34 : 560