

# 蓄積症モデル動物としての運動神経変性マウス： レクチン結合性による蓄積物質についての検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9309">http://hdl.handle.net/2297/9309</a>

## 蓄積症モデル動物としての運動神経変性マウス

—レクチン結合性による蓄積物質についての検討—

金沢大学医学部医学科神経内科学講座 (主任: 高守正治教授)

駒 井 清 暢

運動神経変性マウス (motor neuron degeneration mouse, Mnd) は筋萎縮性側索硬化症のモデルとして報告され、最近リポフスチノーシスのモデルである可能性が示唆されている常染色体優性の遺伝形式を示す疾患動物である。本研究ではこのMndを対象に、組織における糖鎖の解析に有用とされる標識レクチンを用いて、神経組織における蓄積物質とその糖鎖についての解析を行った。この結果、Mndでは主に中枢神経系内のマクロファージと神経細胞、さらにIto細胞と考えられる肝臓内洞周囲非実質細胞にレクチン陽性物質が蓄積していた。この陽性物質には *Solanum tuberosum* 凝集素 (*Solanum tuberosum* agglutinin), *Vicia villosa* 凝集素 (*Vicia villosa* agglutinin), wheat germ 凝集素 (wheat germ agglutinin) の各レクチンが結合することから2ないし3個の連続したアセチルグルコサミンが存在し、*Abrus precatorius* 凝集素 (*Abrus precatorius* agglutinin), *Ricinus communis* 凝集素-I (*Ricinus communis* agglutinin-I) 陽性であることからラクトースとガラクトースも含まれることが推測された。さらにその一部はモノシアログングリオシド (monosialoganglioside, GM) であるGM3とグロボシド (globotetraose, globopentaose) を含む糖脂質であった。本研究結果は、Mndがリポフスチノーシスのモデルである可能性を支持せず、むしろ中枢神経系と肝臓に特徴的なレクチン結合性を有する糖脂質を含む複合糖質が蓄積する未知の蓄積症モデルであることを示唆する。

---

**Key words** Mnd mouse, lectins, lipofuscinosis, histochemistry, glycolipids

---

運動神経変性マウス (motor neuron degeneration mouse, Mnd) はC57Bl/6J由来で常染色体優性の遺伝形式を示す疾患動物であり、本来、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) のモデルとして報告された<sup>1)~3)</sup>。症候的には生後6から7ヶ月頃後脚に始まり徐々に前脚におよぶ運動機能障害を主体とし、末期には四肢屈曲麻痺となり10から12ヶ月で死亡する。最近このMndは、視力障害を伴い神経細胞内にリポフスチン様物質とミトコンドリアATP合成酵素 (ATP synthase, ATPase) のサブユニットCの蓄積が認められることなどから、若年型神経元セロイドリポフスチン症 (juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, JNCL) の動物モデルであるとの報告が相次いでいる<sup>4)~6)</sup>。しかし一方で糖脂質の蓄積症の可能性も示唆されており<sup>7)</sup>、その蓄積症の動物モデルとしての意義が注目されつつある。

神経元セロイドリポフスチン症 (neuronal ceroid lipofuscinoses, NCLs) は、病理学的に神経系や他臓器細胞内にリポフスチンないしはセロイドと呼ばれる蛍光物質の蓄積を認めることを特徴とし、少なくとも4つの臨床的亜型が知られて

いる一群の疾患である<sup>8)~10)</sup>。近年の精力的な研究によって、ドリコールやミトコンドリアATPaseサブユニットCの蓄積が生化学的、組織化学的に特異的指標となりうるとされたが<sup>11)~14)</sup>、その疾患特異性については否定的な報告もある<sup>15)~16)</sup>。いずれにせよこれら疾患群の生化学的な本態は未だ明らかでなく、臨床的にもかつまた生化学的、遺伝学的にも多型であるとされている<sup>9)~10)~17)</sup>。

標識レクチンを用いた組織化学は組織における糖鎖の解析に有用な情報を提供する方法として知られ、既にJNCLを含む多くの複合糖質蓄積病についての報告がなされている<sup>17)~20)</sup>。本研究では、ビオチン化レクチンを用いMnd組織における蓄積物質とその糖鎖についての解析を試みた。この結果、Mndでは主に中枢神経系内のマクロファージと神経細胞、更に肝臓内非実質細胞にレクチン陽性物質が蓄積していることを確認し、免疫組織化学と生化学的分析から蓄積物質の性質を解析することを試みた。さらにこの検討結果とNCLsでの報告を比較し、MndとNCLsの蓄積物質における糖鎖構造の相違と生化学的な背景について検討を行った。

---

平成10年1月6日受付, 平成10年5月22日受理

Abbreviations: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; APA, *Abrus precatorius* agglutinin; ATPase, ATP synthase; Cer, ceramide; ConA, concanavalin A; DAB, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DBA, *Dolichos biflorus* agglutinin; Gal, galactose; GalCer, galactosyl ceramide; GalNAc, N-acetylgalactosamine; Gb4, globotetraose; Gb5, globopentaose; GD, disialoganglioside; Glc, glucose; GluCer, glucosyl ceramide; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GM, monosialoganglioside; GT, trisialoganglioside; HPA, *Helix pomatia* agglutinin; JNCL, juvenile neuronal ceroid

## 材料および方法

## I. 実験動物

Mnd (8週齢から48週齢)と正常対照マウス (C57Bl/6J) はジャクソンラボラトリー (Bar Harbor, USA) から入手し, 米国国立衛生研究所の実験動物に関する指針に基づいて飼育管理した。

## II. 組織標本の作製法

十分な深麻酔下で, 0.1Mリン酸緩衝4%パラフォルムアルデヒドでマウス左心室より灌流した後, 脳, 脊髄, 坐骨神経, 骨格筋, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎を採取し, 同じ固定液で後固定を行った。パラフィン包埋の後マイクロトームで7 $\mu$ m厚パラフィン切片を作成し, HE染色, ルクソール・ファスト・ブルー (luxol fast blue, LFB) 染色, ナイル・ブルー (nile blue, NB) 染色, 過ヨウ素酸シッフ (periodic acid Schiff, PAS) 反応による病

理組織学的検索と免疫組織化学ならびにレクチン組織化学染色に供した。また肝臓の一部は新鮮凍結切片用に灌流固定を行わず液体窒素で冷却したイソペンタンによって凍結し, 10 $\mu$ m厚の切片を作成し免疫組織化学ならびにレクチン組織化学染色に用いた。

## III. 免疫組織化学染色

免疫組織化学として, ニューロフィラメント (Chemicon, Temecula, USA), ユビキチン (DAKO, Carpinteria, USA), デスマミン (Sigma, St. Louis, USA), モノシアログングリオシド (monosialoganglioside, GM) 1, GM2, GM3, グロボシド五糖 (globopentaose, Gb5), グロボシド四糖 (globotetraose, Gb4), シナプトフィジン (Chemicon) に対する抗体を用いて検討した (表1)。なおGM1, GM2, GM3, Gb5, Gb4に対する抗体はヴァージニア医科大学生化学教室有賀敏夫先生から提供された。方法は切片をキシレン-エタノール系列にて脱パラフィンの後,

Table 1. Antibodies used in this study

Antibody to	Dilution	Kind of antibody	Source
Neurofilament (NF-68)	1:100	Polyclonal	Chemicon
Ubiquitin	1:300	Polyclonal	Dako
Desmin	1:50	Monoclonal	Sigma
Synaptophysin	1:100	Monoclonal	Chemicon
GM1	1:50	Monoclonal	Dr. Ariga*
GM2	1:20	Monoclonal	Dr. Ariga*
GM3	1:10	Monoclonal	Dr. Ariga*
Gb4	1:20	Monoclonal	Dr. Ariga*
Gb5	1:10	Monoclonal	Dr. Ariga*

GM, monosialoganglioside; Gb4, globotetraose; Gb5, globopentaose

\* Department of Biochemistry, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University.

Table 2. Lectins used in this study

Lectin (acronym)	Concentration ( $\mu$ g/ml)	Carbohydrate specificity
<i>Abrus precatorius</i> agglutinin (APA)	10	Lactose, $\beta$ -D-galactose
Concanavalin A (Con A)	10	$\alpha$ -D-mannose, $\alpha$ -D-glucose
<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin (DBA)	20	$\alpha$ -D-GalNAc
<i>Helix pomatia</i> agglutinin (HPA)	20	GalNAc
<i>Lycopersicon esculentum</i> agglutinin (LEA)	20	GlcNAc- $\beta$ -(1-4)-GlcNAc
<i>Limulus polyphemus</i> agglutinin (LPA)	15	NeuNAc
Peanut agglutinin (PNA)	20	Terminal $\beta$ -galactose
<i>Ricinus communis</i> agglutinin-1 (RCA-1)	20	Lactose, Galactose
Soybean agglutinin (SBA)	20	$\alpha$ -D-GalNAc, $\alpha$ -D-galactose
<i>Solanum tuberosum</i> agglutinin (STA)	20	[ $\beta$ -(1, 4)-GlcNAc] <sub>1,3</sub>
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-1 (UEA-1)	20	$\alpha$ -L-fucose
<i>Vicia villosa</i> agglutinin (VVA)	20	$\alpha$ -D-GalNAc,
Wheat germ agglutinin (WGA)	20	[ $\beta$ -(1, 4)-GlcNAc] <sub>1,4</sub> , NeuNAc

GalNAc, N-acetylgalactosamine; NeuNAc, N-Acetylneuraminic acid (sialic acid); GlcNAc, N-Acetylglucosamine.

lipofuscinosis; Lac, lactose; LEA, *Lycopersicon esculentum* agglutinin; LFB, luxol fast blue; LPA, *Limulus polyphemus* agglutinin; Man, mannose; Mnd, motor neuron degeneration mouse; NB, Nile blue; NCLs, neuronal ceroid lipofuscinoses; PAS, periodic acid Schiff; PNA, peanut agglutinin; RCA-1, *Ricinus communis* agglutinin-1; SBA, soybean agglutinin; STA, *Solanum tuberosum* agglutinin; UEA-1, *Ulex europaeus* agglutinin-1; VVA, *Vicia villosa* agglutinin; WGA, wheat germ agglutinin

0.3% 過酸化水素水添加メタノールによって内因性ペルオキシダーゼを阻止し、正常ヤギ血清による非特異的反応を抑制後、60分間一次抗体と反応させた。一次抗体との反応後、二次抗体として1000倍に希釈したビオチン標識抗マウス-抗ウサギIgG抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, USA), ついでアビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体と反応させた。発色はジアミノベンチジン (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) により行い、ヘマトキシリンで核染色を行った。

#### Ⅳ. レクチン組織化学

表2に示すビオチン化レクチン (EY Laboratories, San Mateo, USA) を用いた。免疫組織化学染色と同様に切片を脱パラフィンした後、内因性ペルオキシダーゼを阻止、室温で90分間ビオチン化レクチンと反応させた。ビオチン化レクチンは2価陽イオン (Ca, Mg, Mn) を各0.2mEq/l ないし2mEq/l 含む0.02% トライトンX-100 トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に最終濃度2, 5, 10, 20 $\mu$ g/ml となるよう溶解して使用した。ついでアビジン

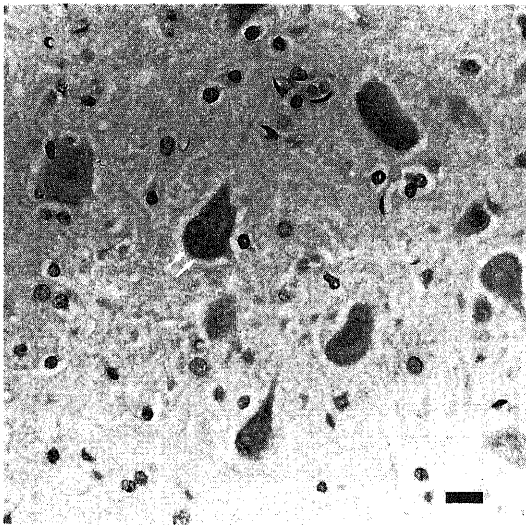
ン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体と反応させ、DABによる発色の後、ヘマトキシリンで核染色を行った。

#### Ⅴ. 組織糖脂質と糖蛋白分析

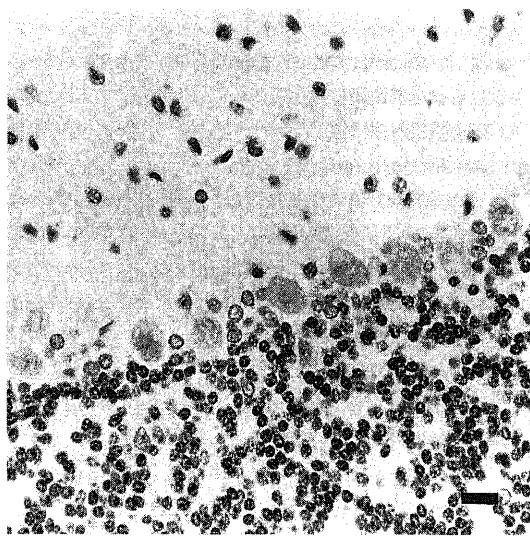
生化学的分析には、採取直後から分析まで-75℃で保存した脳と肝臓を用いた。糖脂質分析はYuら<sup>26)</sup>による方法に従い、10倍容のクロロホルム、メタノール、(2:1, 1:1, v/v) とクロロホルム、メタノール、蒸留水 (30:60:8, v/v) で半定量的に抽出した総脂質分画からガングリオシドなどの酸性脂質と中性脂質をDEAEセファデックスA25カラムによって分画した。この後クロロホルム、メタノール、0.2% CaCl<sub>2</sub>水 (60:35:8, v/v) を溶媒として薄層クロマトグラフィー (high performance thin layer chromatography) 上に展開し、オルシノールまたはレゾルシノール試薬によって発色させて既知の成分と比較検討した。

また蛋白成分は、凍結標本を10倍容の4% SDS, 5%メルカプトエタノール, 50mM トリス緩衝液 (pH7.5) に可溶化し、蛋白濃度を調整した後、SDS-PAGEを行なった<sup>27)</sup>。ゲルはクマシ

A



B



C

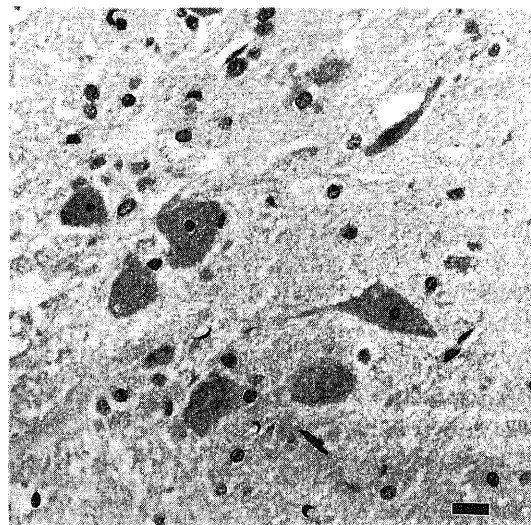


Fig. 1. Histology of motor neuron degeneration mouse (Mnd) central nervous system (CNS). (A) HE staining of 32-week-old Mnd spinal cord. Autofluorescent and periodic acid schiff (PAS)-positive granules (arrows) are widely distributed in the large motor neurons of spinal cord and brain stem. (B) HE staining of 32-week-old Mnd cerebellum. Purkinje cells are relatively spared. No autofluorescent, luxol fast blue (LFB)-positive and PAS-positive granules are seen in Purkinje cells. (C) HE staining of 40-week-old Mnd spinal cord. Although large neurons are mainly involved, no appreciable swelling or deformity is seen in the motor neurons. No obvious difference is detected quantitatively in the neuronal population between Mnd and control mice in any anatomical location. Original magnifications are x280 for (A) to (C) and each horizontal bar indicate 5  $\mu$ m.

ブルーで染色,あるいはニトロセルロース膜に転写し<sup>28)</sup>,糖蛋白とビオチン化レクチンとの結合を指標にして比較検討した<sup>29)</sup>.さらにマウス肝臓から非実質細胞を分離した後<sup>30)</sup>,可溶化し同様に蛋白成分の比較を行った.

## 成 績

### I. 一般組織化学

#### 1. Mnd中枢神経組織

HEでは8週齢から16週齢までコントロールとの差は明らかでなかった.24週齢から48週齢では,自己蛍光,LFB陽性,PAS陽性,NB陽性顆粒が皮質,海馬,基底核神経細胞と脳幹脊髄運動神経に認められ(図1A),週齢とともに増加した.これらの変化は主に大型の神経細胞に見られたが,プルキニエ細胞は比較的保たれ(図1B),脊髄前角運動神経にも著明な腫脹,変形は認められなかった(図1C).自己蛍光,LFB陽性,PAS陽性,NB陽性顆粒は中枢神経内の貪食細胞に最も強く認めら

れ,多くの神経細胞では核周囲に局在し,神経細胞は腫張せず数にも変化がなかった.コントロールマウスではこのような変化は認められず,コントロールと比較して神経細胞数の減少も認められなかった.また少数のマクロファージを除きグリアの増殖は中枢神経内で認められなかった.

#### 2. Mnd腹腔臓器

HE染色では腎臓,副腎,脾臓,副腎および骨格筋に正常対照と異なる点はなかった(図2A).肝臓では中心静脈の周囲に肝細胞よりやや核が小型で細胞体が淡明な円形の細胞の集合が認められた(図2B).これらの細胞はLFB,NBおよびPASで染色され,週齢が増すとともに増加した(図2C).対照肝臓には同様の細胞の集合は認められなかった.また肝細胞は対照と差がなく,線維化も認められなかった.

### II. 免疫組織化学およびレクチン組織化学

#### 1. Mnd中枢神経組織

ユビキチン陽性顆粒は主に神経細胞周囲に分布し,細胞質内

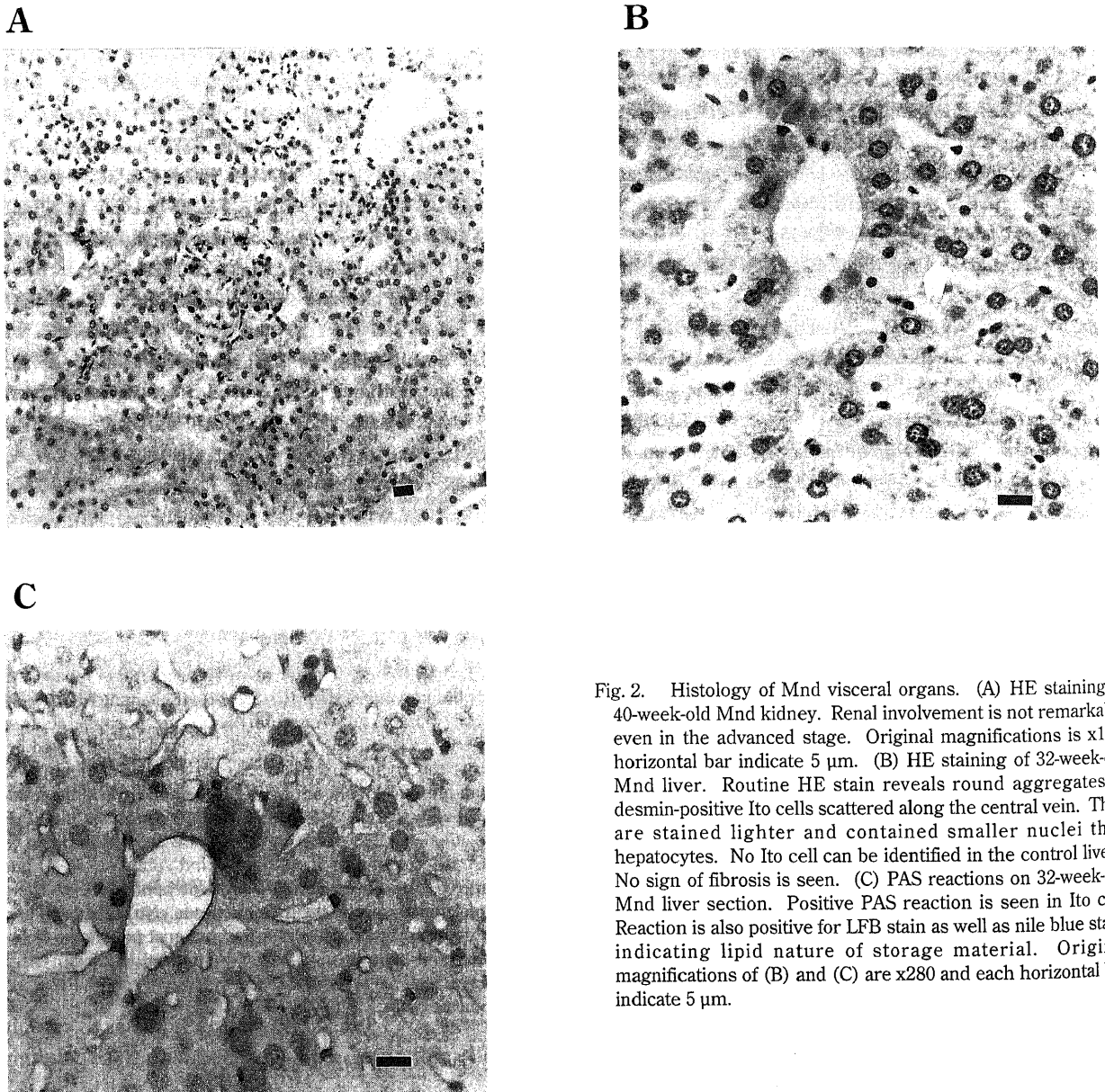


Fig. 2. Histology of Mnd visceral organs. (A) HE staining of 40-week-old Mnd kidney. Renal involvement is not remarkable even in the advanced stage. Original magnifications is x140, horizontal bar indicate 5  $\mu$ m. (B) HE staining of 32-week-old Mnd liver. Routine HE stain reveals round aggregates of desmin-positive Ito cells scattered along the central vein. They are stained lighter and contained smaller nuclei than hepatocytes. No Ito cell can be identified in the control livers. No sign of fibrosis is seen. (C) PAS reactions on 32-week-old Mnd liver section. Positive PAS reaction is seen in Ito cell. Reaction is also positive for LFB stain as well as Nile blue stain, indicating lipid nature of storage material. Original magnifications of (B) and (C) are x280 and each horizontal bar indicate 5  $\mu$ m.

にはほとんど認められず、正常対照では全く認められなかった。このユビキチン陽性顆粒はシナプス関連蛋白であるシナプトフィジンとは一致しなかった。さらにレクチンでは神経細胞より貪食細胞が強く染色され(図3A, B), これらの細胞はマクロファージであると判断した。これらのマクロファージは *Helix pomatia* 凝集素 (*Helix pomatia* agglutinin, HPA), *Lycopersicon esculentum* 凝集素 (*Lycopersicon esculentum* agglutinin, LEA), *Ricinus communis* 凝集素 (*Ricinus communis* agglutinin-1, RCA-1), *Solanum tuberosum* 凝集素 (*Solanum tuberosum* agglutinin, STA), *Vicia villosa* 凝集素 (*Vicia villosa* agglutinin, VVA), wheat germ 凝集素 (wheat germ agglutinin, WGA) によって染色されたが(図3C, 3D), 同様の陽性染色は主に大脳皮質と基底核神経細胞の核周囲に軽度陽性となるものの、脊髄運動神経には

わずかであった。コンカナバリン A (concanavalin A, ConA) の陽性染色はこれらの細胞質内蓄積物質とマクロファージには認められなかった。表3にレクチン組織化学の結果をまとめる。これらレクチン陽性物質は中枢神経内の貪食細胞に最も強く認められ、大脳皮質と基底核および脊髄運動神経細胞には腫張や変形はなく、数にも変化がなかった。

## 2. Mnd腹腔臓器

肝細胞と肝静脈周囲の淡明な胞体の細胞にはユビキチン陽性顆粒は全く認められなかった。肝静脈周囲の細胞はデスミン陽性で、Ito細胞と考えられた<sup>31)</sup>。抗GM3, 抗Gb4, 抗Gb5抗体では、凍結切片でのみこれらの細胞体に顆粒状に染色された(図4A)。抗GM1, 抗GM2抗体では、Ito細胞は染色されなかった。レクチン組織化学染色ではこれらの細胞体はWGAによ

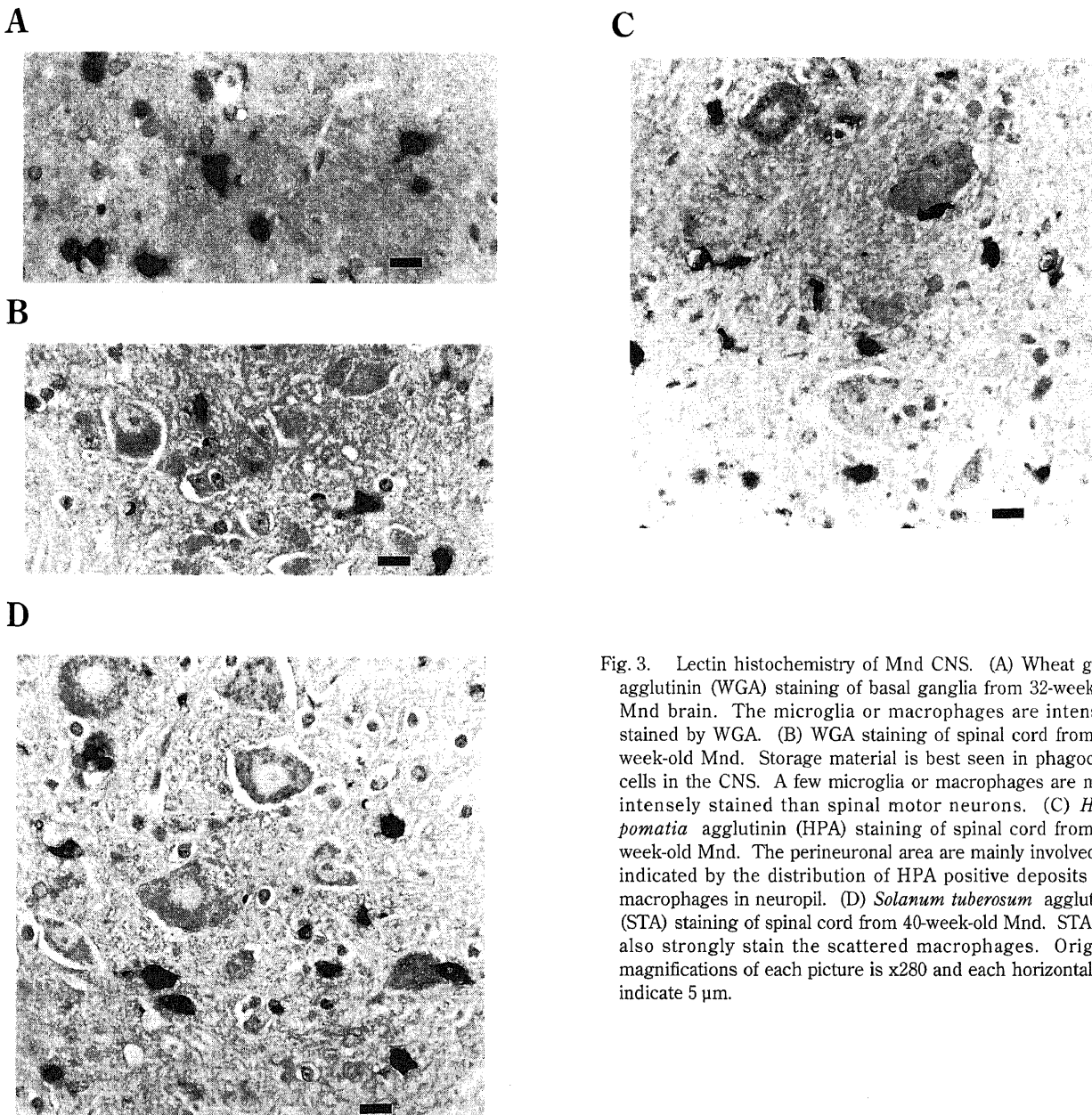


Fig. 3. Lectin histochemistry of Mnd CNS. (A) Wheat germ agglutinin (WGA) staining of basal ganglia from 32-week-old Mnd brain. The microglia or macrophages are intensely stained by WGA. (B) WGA staining of spinal cord from 40-week-old Mnd. Storage material is best seen in phagocytic cells in the CNS. A few microglia or macrophages are more intensely stained than spinal motor neurons. (C) *Helix pomatia* agglutinin (HPA) staining of spinal cord from 40-week-old Mnd. The perineuronal area are mainly involved, as indicated by the distribution of HPA positive deposits and macrophages in neuropil. (D) *Solanum tuberosum* agglutinin (STA) staining of spinal cord from 40-week-old Mnd. STA can also strongly stain the scattered macrophages. Original magnifications of each picture is  $\times 280$  and each horizontal bar indicate 5  $\mu\text{m}$ .

Table 3. Binding of lectins to storage materials in Mnd tissue cells

Lectin	Binding to				
	Ito cell	Cortical neurons	Basal ganglia	Motor neurons	Macrophage
APA	+	-	-	-	-
Con A	-	-	-	-	-
DBA	-	-	-	-	-
HPA	+	±	±	-	+
LEA	+	-	-	-	+
LPA	-	-	-	-	-
PNA	-	-	-	-	-
RCA-1	+	±	±	-	+
SBA	-	-	-	-	-
STA	+	+	+	+	+
UEA-1	-	-	-	-	-
VVA	+	±	±	±	+
WGA	++	±	±	±	+

The degree of lectin bindings to Mnd tissue cells: ++, strongly positive; +, moderately positive; ±, weakly positive; -, negative.

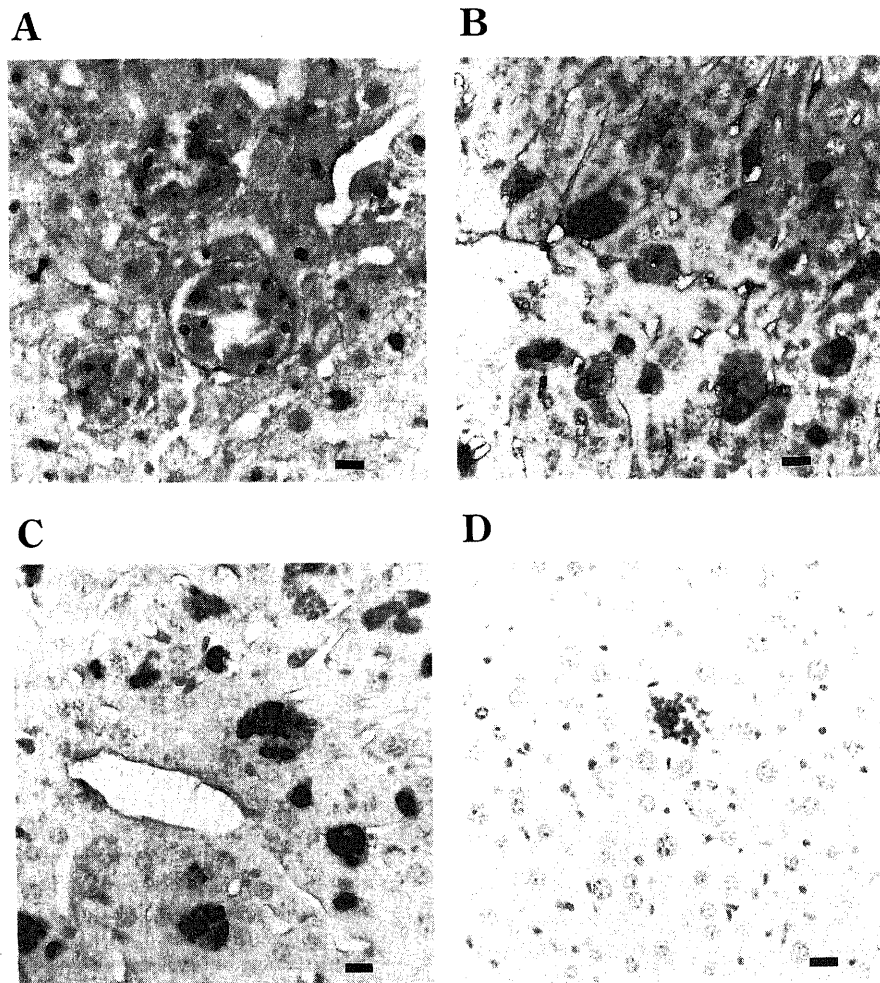


Fig. 4. Immunohistochemistry of Mnd liver. (A) Immunohistochemistry of 36-week-old Mnd liver using anti-globopentaose (Gb5) monoclonal antibody. Positive staining of Gb5 is identified in frozen sections with swollen Ito cells. (B) WGA staining of 36-week-old Mnd liver. WGA is continuously and intensely bound with storage material in Ito cells in both frozen and paraffin sections. Hepatocytes are not involved in the storage at all. Kupffer cells and Pit cells are not increased and Ito cells are the only cells involved in storage activity in the liver. (C) HPA staining of 36-week-old Mnd liver. HPA can bind positively with Ito cells. (D) Limulus polyphemus agglutinin (LPA) staining of 36-week-old Mnd liver. LPA does not stain Ito cells (arrow). Original magnifications of each pictures is x280 and each horizontal bar indicate 5 µm.

って強く染色され (図4B), さらに *Abrus precatorius* 凝集素 (*Abrus precatorius* agglutinin, APA), HPA, LEA, RCA-1, STA, VVAでも染色されたが (図4C), ConA, *Dolichos biflorus* 凝集素 (*Dolichos biflorus* agglutinin, DBA), *Limulus polyphemus* 凝集素 (*Limulus polyphemus* agglutinin, LPA), ピーナッツ凝集素 (peanut agglutinin, PNA), 大豆凝集素 (soybean agglutinin, SBA), *Ulex europaeus* 凝集素 (*Ulex europaeus* agglutinin-1, UEA-1) では染まらなかった (図4D).

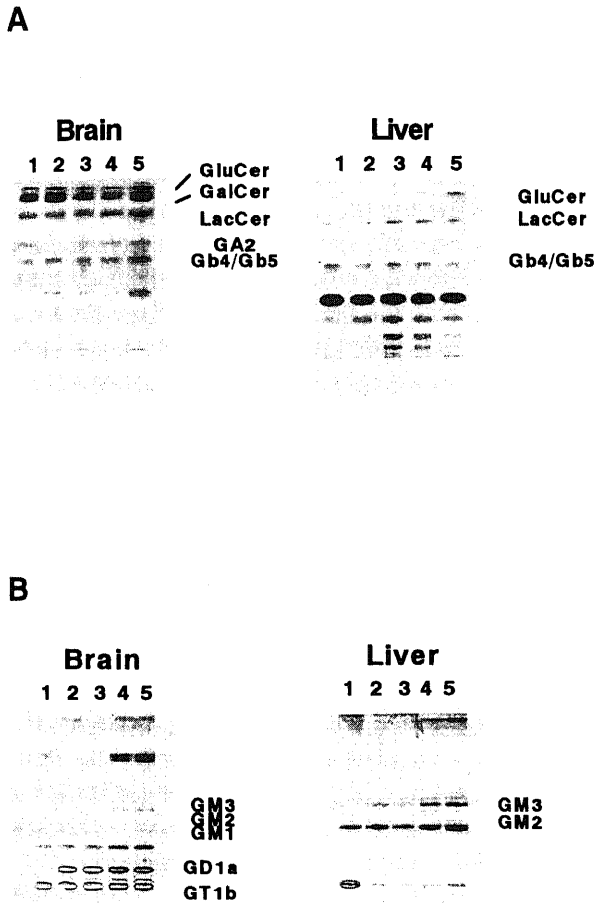


Fig. 5. Glycolipid composition of brains and livers. Glycolipids of brains (left) and livers (right) are as shown in high performance thin layer chromatography plates. (A) Neutral glycolipid composition of brains and livers from Mnd and control mice. Neutral glycolipids bearing glucosyl ceramide (GluCer), galactosyl ceramide (GalCer) and lactosyl ceramide (LacCer) are the major components of brain. The compositions of neutral glycolipids are essentially similar in all Mnd and control brains. However, in Mnd livers, both GluCer and LacCer increase progressively with age. Asialoganglioside 2 (GA2), globotetraose (Gb4) and globopentaose (Gb5) are not remarkable. (B) Acidic glycolipid composition of brains and livers from Mnd and control mice. The major components of acidic glycolipid are monosialoganglioside (GM) 1, disialoganglioside (GD) 1a and trisialoganglioside (GT) 1b. Those are slightly decreased in the Mnd brains, while there is a slight increase of GM3 in some Mnd brains and livers. Lane 1, 16-week-old control mouse; Lane 2, 16-weeks-old Mnd; Lane 3, 32-weeks-old control mouse; Lane 4, 32-week-old Mnd mouse; Lane 5, 40-week-old Mnd mouse.

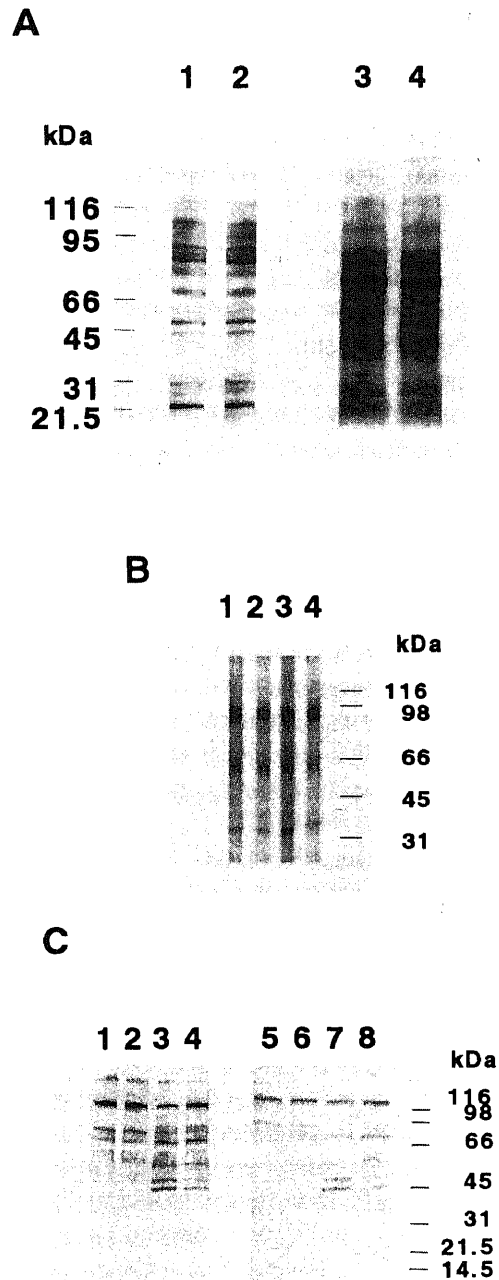


Fig. 6. SDS-PAGE and Lectin blot of brain and liver homogenate. (A) SDS-PAGE of brain and liver homogenate. Lane 1, brain of 32-week-old control mouse; Lane 2, brain of 32-week-old control mouse; Lane 3, liver of 32-week-old control mouse; Lane 4, liver of 32-week-old Mnd mouse. (B) Lectin blot analysis on nitrocellulose membrane of the brain homogenate. Lane 1, HPA blot of control brain (36 weeks old); Lane 2, HPA blot of Mnd brain (36 weeks old); Lane 3, STA blot of control brain (36 weeks old); Lane 4, STA blot of Mnd brain (36 weeks old). (C) Lectin blot analysis on nitrocellulose membrane of the liver homogenate. Lane 1 to 4, lectin blot of whole liver homogenate; Lane 5 to 8, lectin blot of liver stellate cell fraction; Lane 1 and 5, HPA blot of control (36 weeks old); Lane 2 and 6, HPA blot of Mnd (36 weeks old); Lane 3 and 7, STA blot of control (36 weeks old); Lane 4 and 8, STA blot of Mnd (36 weeks old). SDS-PAGE and lectin blot analysis are not remarkable.



### Ⅲ. 糖脂質分析

脳から得られた中性糖脂質ではグルコシルセラミド (glucosyl ceramide, GluCer), ガラクトシルセラミド (galactosyl ceramide, GalCer), ラクトシルセラミド (lactosyl ceramide, LacCer) が主成分だったが, 対照と Mnd との間に明らかな差はなかった (図 5A). 肝臓から得られた中性糖脂質では 6 個以上のオリゴ糖を有する成分が主だったが, 正確な糖鎖は同定できなかった. Mnd では GluCer と LacCer の増加が認められ, 過齢が増すとその傾向はより明らかとなった (図 5A). 酸性糖脂質では著明な差はなかったが, 一部の脳と肝で GM3 の増加の認められることがあった (図 5B).

### Ⅳ. 蛋白解析

SDS-PAGE では脳, 肝ともに分離パターンは同一で (図 6A), 異常バンドの出現は認められなかった. STA ならびに HPA 結合性を指標とした検討では脳, 肝臓, 非実質細胞分画ともに明らかな変化はなかった (図 6B, 6C).

## 考 察

Mnd は本来 ALS のモデルとして Messer ら<sup>1)~3)</sup>により報告された. しかし Chou ら<sup>7)</sup>はこの Mnd が運動神経だけでなくほとんどの神経に糖脂質が蓄積する一種の蓄積病である可能性を指摘した. さらに最近, Mnd は視力障害を伴い<sup>32)</sup>, 神経細胞内にリポフスチン様物質とミトコンドリア ATPase のサブユニット C の蓄積が認められることなどから, JNCL のモデルである可能性が示唆されている<sup>30)38)</sup>.

今回の検討では Pardo ら<sup>9)</sup>, Chou ら<sup>7)</sup>の報告と同様, 自己蛍光陽性, LFB 陽性, PAS 陽性物質が多く神経細胞, グリア細胞とマクロファージに集積していることが確認された. さらに Chou ら<sup>7)</sup>が指摘したように肝臓内の Ito 細胞にも自己蛍光陽性, LFB 陽性, PAS 陽性物質が蓄積していることが明らかとなった. これらから Mnd は中枢神経だけでなく全身の糖質と脂質を含む物質の蓄積が主病態と推測された. また Messer ら<sup>1)2)33)</sup>, Callahan ら<sup>34)</sup>の報告とは異なり, 脊髄運動神経は比較的保たれ, 筋にも著明な萎縮は認められなかった. また形態学的に他の中枢神経系神経細胞にも腫脹, 変性, グリオシスはほとんどなく, ALS 等の系統変性疾患とは明らかに異なっていた. さらにユビキチン陽性反応も, 神経細胞周囲にむしろ多く認められた. この点について最近 ALS で初期病変として注目されているシナプスの病変<sup>35)~37)</sup>を疑ったが, シナプスの指標となるシナプトフィジンの染色性はコントロールと変化なかった. 同時にシナプトフィジンの免疫染色反応はユビキチン陽性部位とも一致せず, シナプス関連蛋白の神経細胞体周囲での変性は明らかでなかった.

レクチン組織化学の結果から, これら蓄積物質にはレクチン結合部位がある事が明らかとなった. この所見は主に中枢神経内のマクロファージと Ito 細胞に見られ, しかも臨床症状の現れる以前から認められ月齢とともに増加した. このレクチン結合部位には, WGA, STA, LEA が結合することから 2 ないし 4 個の連続したアセチルグルコサミン (*N*-acetylglucosamine, GlcNAc) の存在することが考えられた. さらに APA, RCA-1 の結合からは, ラクトース (lactose, Lac) とガラクトース (galactose, Gal) が含まれることが推測された. しかしシアル酸とマンノース (mannose, Man) は含まれないかきわめて少量であると考えられた.

レクチン組織化学はいくつかの複合糖質蓄積病で診断のために特徴的な染色パターンを示すことが知られている<sup>17)~25)</sup>. ガングリオシドーシスでは ConA, DBA, SBA, UEA-1 による陽性染色が報告され, 動物種とサブタイプによって若干染色性が異なるものの, Mnd と最も異なる点は WGA の陽性染色がなく, ConA 陽性物質がほとんど全てに認められる点にある<sup>20)21)</sup>. この他にヒトあるいは動物の GM1 ガングリオシドーシス<sup>19)</sup>, グロボイド細胞白質ジストロフィー (クラッペ病)<sup>19)</sup>, ファブリ病<sup>23)</sup>, ニーマン・ピック病<sup>23)</sup>, ニーマン・ピック病 C 型<sup>24)</sup>, ゴーシェ病<sup>23)24)</sup>,  $\alpha$ -マンノシドーシス<sup>38)</sup>, スフィンゴミエリン脂質症<sup>39)</sup>, 成犬発症ライソゾーム蓄積症<sup>40)</sup>,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症<sup>41)</sup>,  $\alpha$ -ノイラミニダーゼ欠損症<sup>41)</sup>, バルブ C マウスにおける糖蛋白蓄積症<sup>42)</sup>などが報告されている. しかし, Mnd と同一のレクチン陽性パターンを呈した他の蓄積病の報告は, 調べ得た範囲では全くない. 動物種によって蓄積症のレクチン染色性は異なる可能性があると考えられるが<sup>20)</sup>, これまでのヒトの NCL や動物モデルでの検討では共通して ConA 染色が強く陽性とされている<sup>43)44)</sup>. NCLs の亜型であるクフス病における我々の検討でも, 同様に ConA は強く染色されるものの WGA には染まらず, これらの報告と同じ結果であった<sup>45)</sup>. 従ってヒトと動物の NCLs に共通して認められるべき ConA 陽性染色がない点は, Mnd に際だった特徴と言える. これらのことから, Mnd が JNCL やガングリオシドーシスあるいは既知の蓄積症モデルである可能性は極めて低いと思われた.

さらに Wisniewski ら<sup>43)</sup>は JNCL 神経細胞には SBA, PNA, UEA-1 に結合する物質が蓄積し, これらの陽性物質は正常コントロールにはなく, また加齢によってもこのような陽性物質は出現しない事から JNCL に特異的な染色性であると報告した. SBA はアセチルガラクトサミン (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc) を, PNA は Gal の結合した GalNAc を, UEA-1 はフコースに最も強く結合するとされる<sup>23)25)</sup>, Mnd ではこれらレクチンに陽性となる蓄積物質は認められなかった. このことから少なくとも Mnd 組織にはこれらの糖鎖を有する物質の蓄積はないか, 極めて少量しか存在しないと考えられ, この結果も Mnd が JNCL のモデルであるとの説を支持しなかった.

これまでの報告で NCLs に生化学的に蓄積していることが証明されている ATPase サブユニット C は糖鎖をもたないことが知られているため<sup>12)46)</sup>, レクチン結合性はないと考えられる. 同じように NCLs と Mnd で蓄積が認められるオリゴ糖鎖の結合したドリコールは, ペプチドの N 型糖鎖形成に重要であり, 複数の Man と GlcNAc を含むとされている<sup>9)9)10)</sup>. つまりこのようなドリコールの細胞内蓄積がみられる病態では, WGA, STA, LEA は GlcNAc に結合し, 細胞内に陽性染色となって現れ得ると思われる. しかしドリコールに含まれる Man に対しては ConA が結合するため<sup>35)</sup>, オリゴ糖鎖の結合したドリコールの蓄積があるならば ConA 染色陽性となる. 事実, これまでドリコールの蓄積が確認されている NCLs での ConA 陽性染色は, ドリコールに結合した Man が ConA 結合性を反映していると理解されている<sup>9)11)43)44)</sup>. Mnd で生化学的にドリコールの増加が報告されている<sup>9)</sup>にも関わらず ConA の結合性が認められなかったことは, Man を含む物質が量的に少ないか, あるいは Mnd での蓄積の過程でレクチン結合能を失っている可能性があると思われる.

Ito 細胞は傍類洞星状細胞 (perisinusoidal stellate cell) あるい

は脂肪蓄積細胞 (fat-storing cell) とも呼ばれる非実質細胞の一つであり、脂肪とレチノール酸の代謝、保存に重要な役割を果たし、コラーゲンや細胞外マトリックスの産生を行い、肝線維化に関わっているとされる<sup>47)~51)</sup>。肝実質細胞と非実質細胞のレクチン組織化学については、癌組織との対比<sup>52)~54)</sup>や正常と薬物負荷との比較<sup>55)</sup>、あるいは細胞外マトリックスの糖鎖<sup>56)</sup>などで報告されている。これらの報告によれば、肝実質細胞の細胞質には今回の検討に用いたレクチンの結合性は観察されることがなく、クップファー細胞の細胞質にWGA, SBA, PNA陽性染色が観察されうるとされる。これまで蓄積症におけるIto細胞の増加と染色性の変化が見出された報告はなく、Ito細胞の増殖はMndに極めて特異的かつ特徴的な所見といえる。Ito細胞の増殖はレチノール酸過剰状態で認められるとされる<sup>47)</sup>、レチノール酸は自己蛍光を発し<sup>57)</sup>、Mndにみられる蓄積した自己蛍光物質の一部を構成している可能性は否定できない。さらにレチノール酸は神経細胞の分化と増殖に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた<sup>58)</sup>、過剰状態での神経細胞の変化についてのレクチン組織化学的検討は検索し得た範囲で報告がないため、Mndとの異同は不明である。

Ito細胞には免疫組織学的にGM3とGb4, Gb5の存在が確認できた。これらの糖脂質はセラミド (ceramide, Cer) にGal, Glc, GalNAcが結合しているため、レクチン陽性の一部は説明可能である。しかしMndに特徴的なWGAの結合性は説明できず、これら糖脂質の存在は直ちにこれら糖脂質代謝障害を示唆するものではないと考えた。

生化学的に脳、肝臓では明らかなレクチン結合蛋白の増加は認められず、糖脂質定量では肝臓で一部中性糖脂質の増加が認められたが、脳でこのような変化はなく、対照との差は検出し得なかった。また肝臓で増加していた糖脂質では組織学的なレクチン結合部位を説明することができず、他の微量糖脂質成分も検討する必要があると思われる。さらに今回の検討ではSDS-PAGEとレクチンプロットングでレクチン結合蛋白の異常が明らかではなかった。これは蛋白としての蓄積物質の単位組織重量あたりの総量が少ないか、効果的に抽出されなかった可能性、選択したゲルでは分離が得られなかった可能性などが考えられた。

Ito細胞の増殖と蓄積物質の性質とレクチン組織化学の結果から、肝Ito細胞分画や中枢神経由来マクロファージを対象として、細胞内の脂質代謝と細胞外マトリックスなどの関係をより詳細に検討すべきではないかと思われる。

## 結 論

ALSのモデルとして報告され、NCLsのモデルである可能性が示唆されているMndを対象に、組織における糖鎖の解析に有用とされる標識レクチンを用いて、神経組織における蓄積物質とその糖鎖についての解析を行い、以下の結果を得た。

1. Mndでは主に中枢神経系内のマクロファージと神経細胞、さらにデスミン陽性のIto細胞と考えられる肝臓内洞周囲非実質細胞にレクチン、すなわちHPA, LEA, RCA-I, STA, VVA, WGA陽性物質が蓄積していた。これらのレクチン陽性物質には2ないし4個の連続したGlcNAc, LacとGalが含まれることが推測された

2. Ito細胞にはGM3, Gb4, Gb5が免疫組織学的に証明され、レクチン陽性物質の一部は糖脂質であると考えられた。

3. レクチンを指標とした脳および肝由来糖蛋白解析では、Mndと対照との間には明らかな差は検出し得なかった。

4. 組織化学的にMndに認められたレクチン結合性はNCLsとは全く異なっており、少なくとも蓄積物質の糖鎖構造の点からは、NCLsとは別の代謝異常の存在を示唆するものと思われた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師高守正治教授に深甚なる謝意を表します。またMndマウスとレクチン組織化学研究の機会を与えていただき、終始御指導、御助言を賜りましたForbes Norris ALS Research Center (San Francisco, USA), Dr. Samuel M Chou博士に深謝いたします。最後に各種糖脂質に対する抗体を提供いただいたヴァージニア医科大学生化学教室有賀徹夫先生に御礼申し上げます。なお本論文要旨の一部は第46回米国神経学会 (1994, Washington DC) ならびに第8回国際神経筋疾患学会 (1994, 京都) で発表した。

## 文 献

- 1) Messer A, Flaherty L. Autosomal dominance in a late-onset motor neuron disease in the mouse. *J Neurogenet* 3: 345-355, 1986
- 2) Messer A, Strominger NL, Mazurkiewicz JE. Histopathology of the late-onset motor neuron degeneration (Mnd) mutant in the mouse. *J Neurogenet* 4: 201-213, 1987
- 3) Messer A, Plummer J, Maskin P, Coffin JM, Frankel WN. Mapping of the motor neuron degeneration (Mnd) gene, a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Genomics* 13: 797-802, 1992
- 4) Bronson RT, Lake BD, Cook S, Taylor S, Davisson MT. Motor neuron degeneration of mice is a model of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease). *Ann Neurol* 33: 381-385, 1993
- 5) Faust JR, Rodman JS, Daniel PF, Dice JF, Bronson RT. Two related proteolipids and dolichol-linked oligosaccharides accumulate in motor neuron degeneration mice (mnd/mnd), a model for neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* 269: 10150-10155, 1994
- 6) Pardo CA, Rabin BA, Palmer DN, Price DL. Accumulation of the adenosine triphosphate synthase subunit C in the mnd mutant mouse. A model for neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am J Pathol* 144: 829-835, 1994
- 7) Chou SM, Nakamura S, Norris FH. Lectin histochemistry on storage material in the CNS and liver of Mnd mouse. *Brain Pathol* 3: 315-316, 1993 (abst.)
- 8) Boustany RM, Kolodny EH. Neurological progress. The neuronal ceroid lipofuscinoses: a review. *Rev Neurol Paris* 145: 105-110, 1989
- 9) Hall NA, Lake BD, Patrick AD. Recent biochemical and genetic advances in our understanding of Batten's disease (ceroid-lipofuscinosis). *Dev Neurosci* 13: 339-344, 1991
- 10) Wisniewski KE, Kida E, Patxot OF, Connell F. Variability in the clinical and pathological findings in the neuronal ceroid lipofuscinoses: review of data and observations. *Am J Med Genet* 42: 525-532, 1992
- 11) Hall NA, Lake BD, Palmer DN, Jolly RD, Patrick AD. Glycoconjugates in storage cytosomes from ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease) and in lipofuscin from old-age brain. *Adv Exp Med Biol* 266: 225-241, 1989

- 12) Fearnley IM, Walker JE, Martinus RD, Jolly RD, Kirkland KB, Shaw GJ, Palmer DN. The sequence of the major protein stored in ovine ceroid lipofuscinosis is identical with that of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive proteolipid of mitochondrial ATP synthase. *Biochem J* 268: 751-758, 1990
- 13) Hall NA, Lake BD, Dewji NN, Patrick AD. Lysosomal storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in Batten's disease (ceroid-lipofuscinosis). *Biochem J* 275: 269-272, 1991
- 14) Kominami E, Ezaki J, Muno D, Ishido K, Ueno T, Wolfe LS. Specific storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in lysosomes of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease). *J Biochem Tokyo* 111: 278-282, 1992
- 15) Kida E, Wisniewski KE, Golabek AA. Increased expression of subunit c of mitochondrial ATP synthase in brain tissue from neuronal ceroid lipofuscinoses and mucopolysaccharidosis cases but not in long-term fibroblast cultures. *Neurosci Lett* 164: 121-124, 1993
- 16) Kida E, Wisniewski KE, Connell F. Topographic variabilities of immunoreactivity to subunit c of mitochondrial ATP synthase and lectin binding in late infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Am J Med Genet* 57: 182-186, 1995
- 17) Goebel HH. Neuronal ceroid-lipofuscinoses: the current status. *Brain Dev* 14: 203-211, 1992
- 18) Alroy J, Orgad U, Ucci AA, Pereira ME. Identification of glycoprotein storage diseases by lectins: a new diagnostic method. *J Histochem Cytochem* 32: 1280-1284, 1984
- 19) Alroy J, Ucci AA, Goyal V, Woods W. Lectin histochemistry of glycolipid storage diseases on frozen and paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem* 34: 501-505, 1986
- 20) Alroy J, Goyal V, Warren CD. Lectin histochemistry of gangliosidosis. I. Neural tissue in four mammalian species. *Acta Neuropathol Berl* 76: 109-114, 1988
- 21) Alroy J, Adelman LS, Warren CD. Lectin histochemistry of gangliosidosis. II. Neurovisceral tissues from patients with Sandhoff's disease. *Acta Neuropathol Berl* 76: 359-365, 1988
- 22) Alroy J, De Gasperi R, Warren CD. Application of lectin histochemistry and carbohydrate analysis to the characterization of lysosomal storage diseases. *Carbohydr Res* 213: 229-250, 1991
- 23) Lageron A. Characterization by lectin binding of the sugar moiety of glycoconjugates stored in inherited diseases. *Histochem J* 19: 419-425, 1987
- 24) DeGasperi R, Alroy J, Richard R, Goyal V, Orgad U, Lee RE, Warren CD. Glycoprotein storage in Gaucher disease: lectin histochemistry and biochemical studies. *Lab Invest* 63: 385-392, 1990
- 25) Spicer SS, Schulte BA. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *J Histochem Cytochem* 40: 1-38, 1992
- 26) Yu RK, Ledeen RW. Gangliosides of human, bovine, and rabbit plasma. *J Lipid Res* 13: 680-686, 1972
- 27) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- 28) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354, 1979
- 29) Fatehi MI, Gerhart DZ, Myers TG, Drewes LR. Characterization of the blood-brain barrier: glycoconjugate receptors of 14 lectins in canine brain, cultured endothelial cells, and blotted membrane proteins. *Brain Res* 415: 30-39, 1987
- 30) Yamada M, Blaner WS, Soprano DR, Dixon JL, Kjeldbye HM, Goodman DS. Biochemical characteristics of isolated rat liver stellate cells. *Hepatology* 7: 1224-1229, 1987
- 31) Tsutsumi M, Takada A, Takase S. Characterization of desmin-positive rat liver sinusoidal cells. *Hepatology* 7: 277-284, 1987
- 32) Messer A, Plummer J, Wong V, Lavail MM. Retinal degeneration in motor neuron degeneration (mnd) mutant mice. *Exp Eye Res* 57: 637-641, 1993
- 33) Callahan LM, Wylen EL, Messer A, Mazurkiewicz JE. Neurofilament distribution is altered in the Mnd (motor neuron degeneration) mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 50: 491-504, 1991
- 34) Messer A, Plummer J. Accumulating autofluorescent material as a marker for early changes in the spinal cord of the Mnd mouse. *Neuromuscul Disord* 3: 129-134, 1993
- 35) Matsumoto S, Goto S, Kusaka H, Ito H, Imai T. Synaptic pathology of spinal anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *J Neurol Sci* 125: 180-185, 1994
- 36) Sasaki S, Maruyama S. Decreased synaptophysin immunoreactivity of the anterior horns in motor neuron disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 87: 125-128, 1994
- 37) Ince PG, Slade J, Chinnery RM, McKenzie J, Royston C, Roberts GW, Shaw PJ. Quantitative study of synaptophysin immunoreactivity of cerebral cortex and spinal cord in motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 673-679, 1995
- 38) Castagnaro M. Lectin histochemistry of the central nervous system in a case of feline  $\alpha$ -mannosidosis. *Res Vet Sci* 49: 375-377, 1990
- 39) Kamiya S, Yamagami T, Umeda M, Sugiyama M, Daigo M. Lectin histochemistry of foamy cells in non-nervous tissues of feline sphingomyelinosis. *J Comp Pathol* 105: 241-245, 1991
- 40) Knowles K, Alroy J, Castagnaro M, Raghavan SS, Jakowski RM, Freden GO. Adult-onset lysosomal storage disease in a Schipperke dog: clinical, morphological and biochemical studies. *Acta Neuropathol (Berl)* 86: 306-312, 1993
- 41) Murnane RD, Ahern Rindell AJ, Prieur DJ. Lectin histochemistry of an ovine lysosomal storage disease with deficiencies of  $\beta$ -galactosidase and alpha-neuraminidase. *Am J Pathol* 135: 623-630, 1989
- 42) Weintraub H, Alroy J, DeGasperi R, Goyal V, Skutelsky E, Pentchev PG, Warren CD. Storage of glycoprotein in NCTR-Balb/C mouse. Lectin histochemistry, and biochemical studies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 62: 347-352, 1992
- 43) Wisniewski KE, Maslinska D. Lectin histochemistry in

- brains with juvenile form of neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten disease). *Acta Neuropathol (Berl)* 80: 274-279, 1990
- 44) Elleder M. Lectin histochemical study of lipopigments with special regard to neuronal ceroid-lipofuscinosis. Results with concanavalin A. *Histochemistry* 93: 197-205, 1989
- 45) Komai K, Makifuchi T, Sakaji-ri K, Takamori M. Lectin histochemistry in Kufs' disease. *Brain Pathol* 7: 1097, 1997 (abst.)
- 46) Palmer DN, Fearnley IM, Medd SM, Walker JE, Martinus RD, Bayliss SL, Hall NA, Lake BD, Wolfe LS, Jolly RD. Lysosomal storage of the DCCD reactive proteolipid subunit of mitochondrial ATP synthase in human and ovine ceroid lipofuscinoses. *Adv Exp Med Biol* 266: 211-22, 1989
- 47) Davis BH, Pratt BM, Madri JA. Retinol and extracellular collagen matrices modulate hepatic Ito cell collagen phenotype and cellular retinol binding protein levels. *J Biol Chem* 262: 10280-10286, 1987
- 48) Blomhoff R, Wake K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J* 5: 271-277, 1991
- 49) Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 46: 155-168, 1992
- 50) Pinzani M. Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmacol Ther* 66: 387-412, 1995
- 51) Wisse E, Braet F, Luo D, De Zanger R, Jans D, Crabbe E, Vermoesen A. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol Pathol* 24: 100-111, 1996
- 52) Zhang SM, Wu MC, Chen H, Zhang XZ. Expression of glycoconjugates in intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 415: 395-401, 1989
- 53) Zhang SM, Wu M, Chen H, Zhang X. Changes of glycoconjugates in human hepatocellular carcinoma. *Histochemistry* 92: 171-175, 1989
- 54) Murakami I, Sarker AB, Hayashi K, Akagi T. Lectin binding patterns in normal liver, chronic active hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study. *Acta Pathol Jpn* 42: 566-572, 1992
- 55) Witt M, Klessen C. Lectin binding sites in normal and phenobarbitale/halothane treated rat liver. A histochemical study. *Histochemistry* 90: 391-397, 1989
- 56) Ichida T, Sugitani S, Satoh T, Matsuda Y, Sugiyama M, Yonekura K, Ishikawa T, Asakura H. Localization of hyaluronan in human liver sinusoids: a histochemical study using hyaluronan-binding protein. *Liver* 16: 365-371, 1996
- 57) Wolfe LS, Kin NM, Baker RR, Carpenter S, Andermann F. Identification of retinoyl complexes as the autofluorescent component of the neuronal storage material in Batten disease. *Science* 195: 1360-1362, 1977
- 58) Maden M, Holder N. The involvement of retinoic acid in the development of the vertebrate central nervous system. *Development* 2 (suppl): 87-94, 1991

**Motor neuron degeneration mouse as a Model of Storage Disease. — Histochemical and Biochemical Analysis Using Lectins** — Kiyonobu Komai, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, 107, 203 — 213 (1998)

**Key words** Mnd mouse, lectins, lipofuscinosis, histochemistry, glycolipids

#### Abstract

The autosomal-dominant motor neuron degeneration mouse (Mnd) was originally reported as an animal model for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Recent studies suggested, however, that Mnd might be a model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (JNCL). We applied biotinylated lectins to Mnd tissue to reveal the oligosaccharide residues in storage materials. Biochemical analysis was also performed to further characterize the glycolipid and glycoprotein components in the livers and central nervous systems (CNS) of Mnd compared to a control group. The accumulation of luxol fast blue (LFB) and periodic acid Schiff (PAS) positive materials, mostly in the neurons, glial cells and macrophages was confirmed in the Mnd mice. Also, we found characteristic changes in liver Ito cells containing LFB and PAS positive materials and autofluorescent intracytoplasmic storage material, while no Ito cells were identified in the normal control livers. Immuno- and lectin histochemistry clearly identified that glycolipids and lectin positive granules accumulate mainly in macrophages in the CNS and Ito cells of liver colocalized with LFB/PAS positive materials. A biochemical study showed that both glucosyl ceramide and lactosyl ceramide contents in the liver increased progressively with age. It is suggested the sugar component of storage material contains glucosamine in oligomers as seen by positive staining with Wheat germ agglutinin, *Solanum tuberosum* agglutinin and *Lycopersicon esculentum* agglutinin. It might also contain lactose and galactose residue as shown by binding with *Abrus precatorius* agglutinin, *Ricinus communis* agglutinin-1 and *Vicia villosa* agglutinin. Our lectin histochemistry did not support the feasibility of using Mnd as a model of JNCL. We conclude instead that the Mnd carries a complex storage disease of glycolipids and oligosaccharide conjugates of yet undefined nature in the CNS and liver.