

厚生省「精神・神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と
治療法開発に関する研究

荒木班

平成2年度研究報告書

平成3年3月(1991年)

研究報告書の作成にあたって

厚生省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法開発に関する研究」班は、平成2年4月に発足し、平成3年3月を以て満1年を終え、ここに初年度の研究報告書を作成する運びとなりました。

平成2年9月、西ドイツで開催された、第7回国際神経筋学会と筋ジトロフィー協会世界会議に出席しましたが、分子生物学的研究の演題が増加し、今日、筋ジストロフィー研究には、分子遺伝学に最も大きな関心が払われていることを認識することができました。またわが国の筋ジストロフィーの研究は、国際的にも高い評価を得ていることに自信と喜びを感じました。

本研究班の初年度の目標は、筋ジストロフィーの各病型におけるジストロフィンの発現様式の検討、mdx マウスを用いた病態解明、ミトコンドリア脳筋症の分子遺伝学的解析および治療法の開発でありましたが、各班員の努力によって立派な成果をあげることが出来ました。班長として心から感謝を申し上げます。

筋ジストロフィー及び関連疾患の成因の解明と治療法の開発に向って今後とも、班員各位の一層の努力と研究の発展を期待したいと存じます。おわりに、本研究に対し終始懇切な御指導を賜りました国立精神・神経センターの里吉榮二郎総長、杉田秀夫研究所長、厚生省の関係各位と日本筋ジストロフィー協会の深い御理解と御支援に感謝申し上げます。

平成3年3月

〈班長〉 荒 木 淑 郎

目 次

平成2年度総括研究報告	7
平成2年度総合班会議研究報告抄録	13
分担研究報告	23
I. 筋ジストロフィー(1)	33
II. 筋ジストロフィー(2)	51
III. 筋ジストロフィー(3)	73
IV. 遺伝子	101
V. ミトコンドリア脳筋症(1)	123
VI. mdx マウスほか	165
VII. 生 化 学	209
VIII. ミトコンドリア脳筋症(2)	231
平成2年度研究班名簿	267

平成 2 年度

総括研究報告

総括研究報告

主任研究者 荒木 淑郎

研究目標

本研究班は、杉田班（昭和59年～平成元年に及ぶ筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究）の後をうけて、筋ジストロフィーおよび関連疾患（とくにミトコンドリア脳筋症）の成因の解明と治療法の開発を目標として分担研究者を再編成して、平成2年4月に発足した。平成2年度は、新しい班の初年度に当たるため、目標に向かって班員各自の研究を進展させた。班長は荒木淑郎、班員38名および顧問3名の計42名である。

1年度の研究目標は次の如くである。

- 1) 各病型におけるジストロフィンの発現様式の検討
- 2) mdx マウスを用いた病態の解明
- 3) ミトコンドリア脳筋症の分子遺伝学的解析
- 4) 治療法の開発

1. 筋ジストロフィーと筋細胞膜のジストロフィン

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) はX染色体劣性遺伝を呈する進行性の筋萎縮症で、20歳台前半で死亡するが、Becker 型 (BMD) は、予後良好である (良性型)。両者とも、同じX染色体短腕でコードされるジストロフィンの欠損によって生じることが明らかにされた。ジストロフィンは、筋細胞膜に局在する分子量427KDの巨大タンパク質で細胞骨格の一種である。ジストロフィン cDNA の全構造は解明され、現在まで、DMD/BMD の60%以上が遺伝子欠損によって生じることが解明されている。

本年度は、ジストロフィン抗体を用いて、DMD, BMD, 肢帯型ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィー、筋緊張型ジストロフィーなど各病型におけるジストロフィンの発現様式が検討された。またジストロフィンのヒト臓器分布が検討された。これらの成績は以下の如くである。

- 1) 筋ジストロフィー各病型におけるジストロフィンの発現様式
- (1) DMD: 欠損

(2) BMD：減少

(3) 肢帯型：正常 (87%)

(4) 福山型先天性筋ジストロフィー：正常 (94%)

(5) 先天性筋緊張性ジストロフィー：生後10ヵ月以下は染色不良，生後1歳6ヵ月以後は正常

2) ジストロフィンのヒト各臓器における発現

正常 (+)，DMD (-)，BMD (多様性)

2. 筋ジストロフィーマウス (mdx マウス) による病態の研究

1) 筋小胞体からの Ca 漏出亢進が phenytoin で抑制されること，2) 筋核の DNA 量を経時的に測定し，DNA 合成の面から筋細胞の変性，分裂，再生を検討し，これらの変化と密接な関係があることを認め，3) Immobilization による筋変性への影響をしらべ，DMD の運動制限は病気の進行遅延をおこす可能性があること，4) 筋ジストロフィーハムスターの神経筋接合部の未熟性を電顕で明らかにし，5) 筋再生と成長因子 (fibroblast growth factor) との関係を検討し，mdx マウスとコントロール群の組織中の basic FGF (bFGF) の量に差がないことなどを明らかにした。

以上の研究は，いずれも mdx マウスを用いての骨格筋の壊死と，再生機構，筋 DNA 合成と筋の機能などを検討した重要な所見である。

3. ミトコンドリア脳筋症

ミトコンドリア脳筋症とは，骨格筋内に異常形態を示すミトコンドリアが認められる疾患の総称で，筋生検にて ragged-red fiber (崩壊赤色線維) を認める。狭義のミトコンドリアミオパチーは骨格筋のみの障害を呈するが，広義のミトコンドリア脳筋症は，骨格筋の症状だけでなく脳や心臓など多彩な症状を伴うものをいう。ミトコンドリア脳筋症の臨床的特徴は，Kearns-Sayre 症候群，ミトコンドリア異常を伴うミオクローヌスてんかん (MERRF) および脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症 (MELAS) に代表される。

近年，慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO, KSS) において，ミトコンドリア (mt) DNA の欠失が見いだされ，さらに欠失様式 (単一欠失あるいは多重欠失と正常 mtDNA の混在)，欠失機構 (反復配列を含む slipped mispairing など)，および欠

失 mtDNA とその筋病変である ragged-red fiber さらに cytochrome c oxidase 欠損線維との関係などが明らかにされてきたが、今年度は、ひきつづき、これらの研究が進められ、また KSS 以外の疾患における欠失 mtDNA の検討なども報告された。

また、MERRF や MELAS においては、以前から mtDNA の異常が示唆されていたが、今回、MERRF においては tRNA^{Lys}、MELAS においては tRNA^{Leu} の点突然変異が報告され、それぞれの変異は、患者群においてのみ特異であることから、病因であることが示唆された(図 1)。また MELAS 多数例における臨床、病理、生化学的検討や mtDNA 以外の原因でおこるミトコンドリア異常症の遺伝子レベルでの解析などが報告された。

MERRF の tRNA^{Lys} (8344) の発見、MELAS の tRNA^{Leu} (3243) の発見は、わが国の研究者によって成功されたことは、本研究が世界的に最先端に位置することを示したものといえよう。

4. 筋ジストロフィーの治療

今年度は治療に関する研究は、1) ジストロフィー筋への正常 myoblast の注射成績と、2) dantrolene sodium の投与効果を検討する研究がみられたにすぎない。dantrolene sodium は、筋細胞膜の安定作用をもつ抗痙縮薬で、血清 CK を減少させる作用を有している。ジストロフィー患者に対する影響は今後の研究テーマとなろう。

5. 1年後の研究成果の要約

平成2年度の研究は、第1年目に当り、班員の協力によって、1) PMD におけるジストロフィンテストの応用と問題点を明らかにし、2) mdx マウスに筋ジストロフィーの病態の解明に当り、3) ミトコンドリア脳筋症の分子遺伝学的解析では、MERRF では tRNA^{Lys} (8344)、MELAS では tRNA^{Leu} (3243) の点突然変異の発見という世界的な業績をあげ、4) 治療の開発では、移植の実験と、dantrolene sodium などの検討が行われた。

6. 2年後の研究計画としては、次のテーマを考えている。

1) ジストロフィンテストの適用

(1) 普及化：どの抗体を用いれば充分か。

(例：N末端とC末端領域)

2) ジストロフィンの欠損部位と臨床との対比

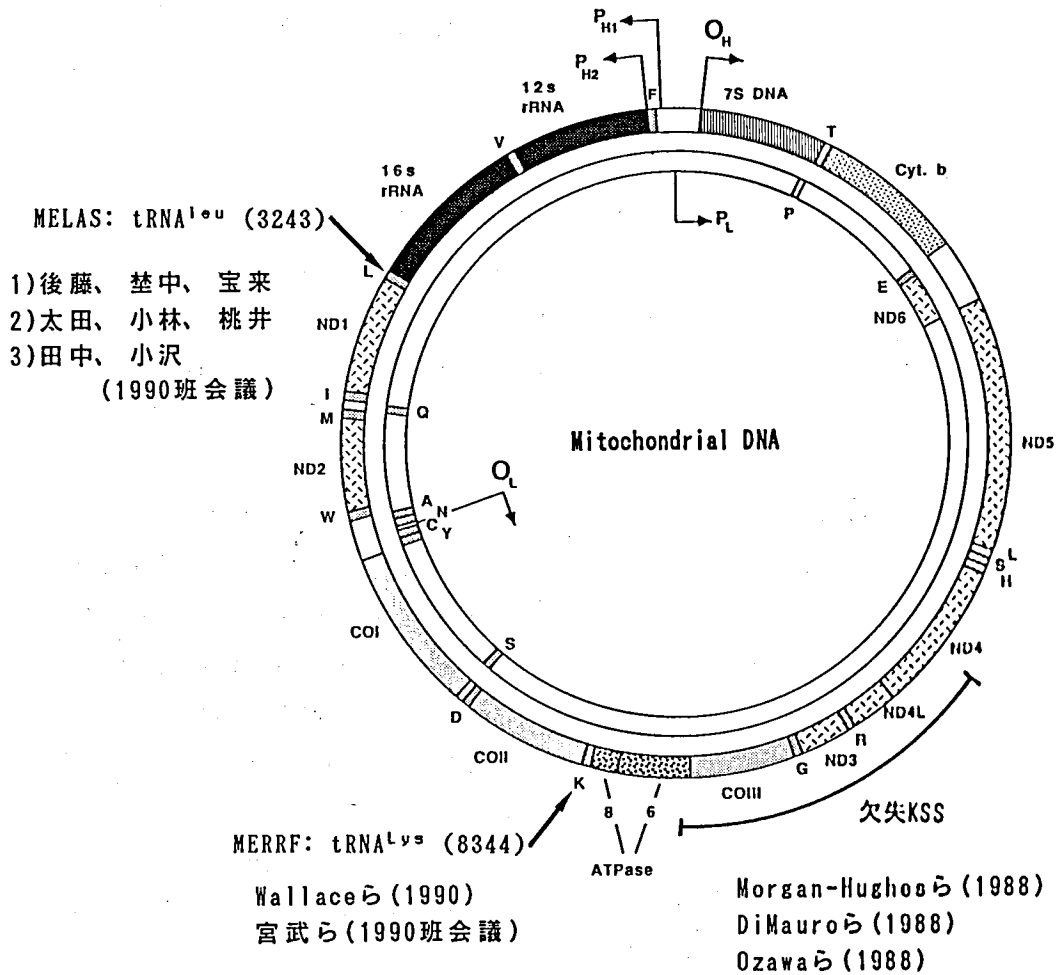
3) ジストロフィーの成因：mdx マウスの利用

4) ミトコンドリア脳筋症：分子遺伝学と臨床との対比

5) 治療法の開発：dautrolene sodium など治療薬の検討

以上の他に、新しい薬があれば取り上げて前進したい。

ミトコンドリア脳筋症とミトコンドリアDNA異常



平成2年度厚生省精神・神経疾患研究委託費

「筋ジストロフィー」総合班会議

筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法に関する研究

研究報告抄録

PMDにおけるジストロフィンテストの 応用と問題点

荒畑 喜一

(国立精神・神経センター神経研究所)

ジストロフィン遺伝子のクローニング (Monaco, Kunkelら; 1985), 全 cDNA 塩基配列の決定とジストロフィン分子モデルの発表 (Koenig, Kunkelら; 1987), さらにジストロフィンの発見 (Hoffman, Kunkelら; 1987) とジストロフィンの筋組織における局在様式 (Sugita, Arahataら; 1988) が相次いで報告されたのは我々の記憶に新しい。これらを筋ジストロフィー研究の新たな幕開けととらえるならば、今や我々はジストロフィン研究の第二段階に入ったといえる。今後ジストロフィンの全貌が明らかにされて行く過程の中で、筋ジストロフィー (PMD) の病因と病態機序がより具体的に解明されるであろうが、ここで PMD におけるジストロフィンテスト (①免疫組織化学, ②イムノブロット, ③ multiplex-PCR) の臨床応用と問題点を整理しておくことも有意義であろう。

1. 抗ジストロフィン抗体

ジストロフィンの免疫組織化学イムノブロットテストには、特異抗体が必要である。抗体を使用する際に注意すべき事柄は、昨年度の総合班会議で述べてあるので詳細は省略する。大切なことは、① 特異的な抗体を用いることと、② ジストロフィン分子上の異なるドメインを認識する複数の抗体を用いて一つの生検筋を検索する事である。後者の理由は、仮に欠失遺伝子部分がコードするペプチドを抗原とした抗体を用いた時には、ジストロフィンの検出が不能となるからである (false negative)。具体的には、モノクローナル抗体 2-5E2, 3-4E5, 4-4C5 の 3 者を用いれば、ほぼ目的を達する。Nicholson らの Dy8 (C 末) は有用であるが、Dy4 (ロッド部分) は特異性に若干の問題を残す。また van Ommen らの P-20 は DMD 筋の動静脈や筋細胞質をも染色するので、やはり特異性に疑問を残している。Kunkel らの 30k と 60k は有用であるが、ポリクローナル抗体のため結合組織のバックグラウンドが高く出るので注意深い観察が必要である。

2. ジストロフィンの免疫組織化学と臨床診断

臨床診断的側面で特筆すべきは、これまで必ずしも容易では無かった、① DMD と BMD の鑑別、② DMD と Fukuyama 型筋ジストロフィーの鑑別、③ DMD といわゆる肢帯型筋ジストロフィー (一般にジストロフィンは正常) の鑑別などが可能になった点であろう。また、④ DMD 保因者のうち、臨床症状を有する manifested carrier ではモザイクパターンが必ず出現しているので、これを肢帯型筋ジストロフィーとの鑑別のポイントとすることが可能である。さらに、⑤ 大腿四頭筋ミオパチーには BMD が相当数存在する可能性が報告されている。

3. イムノブロット法による DMD/BMD の診断

前述した免疫組織化学法はある意味では主観的な検査法であるので、これを補完する意味からも、並行してジストロフィンのイムノブロットテストを実施することが必須である。現在われわれの研

究室では、ルーチンの組織化学用凍結切片20枚からジストロフィンのウエスタン・プロットを実施している。BMDの場合ジストロフィンは存在するが、分子量とタンパク量のいずれか或いは両者に異常が見いだされている。

4. multiplex-PCR 法による遺伝子診断

PCR法 (Polymerase Chain Reaction) によって微量のサンプルからでも遺伝子診断が出来るが、とくに Chamberlain と Beggs により調製された36個のプライマーを用いて multiplex-PCR 法を実施すれば、サザンプロットで見いだされる遺伝子欠失の98%が発見出来るので臨床診断的価値は高い。我々の研究室では現在、筋生検材料の一部から、または末梢血リンパ球から DNA を抽出して PCR 解析を実施している。前述の、免疫組織化学法、イムノプロット法と並び、極めて重要なテストである。

5. ジストロフィンの欠陥によって生ずる臨床像の多様性

おなじジストロフィン遺伝子に欠陥を持っていても、実際の臨床像は様々である。DMD と BMD の差異はよく知られているが、このほかにも高CK血症と筋の cramp を見る X-linked myalgia 家系の存在や、大腿四頭筋ミオパチー等の報告もある。また一方のみが臨床症状を呈した一卵性双生児の姉妹例 (skewed inactivation の存在を示唆する) も知られている。さらにジストロフィンの46%が欠損していても臨床的には mild なミオパチーに止どまる家系も報告されているし、BMD 兄弟例で臨床的経過が大きく異なる症例等も存在する。

我々の最近の検索では、ジストロフィンテストを実施しない場合、いわゆる肢帯型筋ジストロフィーと臨床診断されている孤発症例の中には、男性の31%に BMD が、女性の12%に DMD 保因者が含まれていた。かかる症例については、適切な遺伝相談の資料としてジストロフィンテストが不可欠である。

mdxマウスによる筋ジストロフィー病態研究

高木 昭夫
(虎の門病院神経内科)

Dystrophin 遺伝子や蛋白の発見以来, Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 研究は大きく前進した。しかし, dystrophin 欠損と筋変性・壊死の関係については未だ充分解明されているとはいえない。荒木班においては mdx マウスを DMD のモデルとして使用したこの分野の研究が10編近く報告された。ここではその一部を紹介するとともに, 焦点となる ion channel の問題につき言及したい。

川井らは筋核の DNA 量を分析して, cell cycle の時間経過を追求した。mdx では30日齢と60日齢では S 期と G₂M 期の筋核が増加しており, この時期の壊死・再生の亢進を示している。90日齢では S 期と G₂M 期の核は減少していた。mdx の筋障害が非進行性であるのは, 加齢とともに筋壊死が発生しなくなるためと推論した。

田邊, 水野らは mdx マウスを使用して, 筋壊死の発生に影響する因子を分析した。前年までは tetanus toxin 使用による不動化により筋壊死が抑制されることを明らかにしている。本年は小さなケージ内で拘束飼育して, 運動量を制限した。運動量制限により筋壊死が抑制されることを明らかにした。

栗原らは横隔膜標本を使用して微小電極による細胞内記録を行った。mdx では静止膜電位低下が観察され, 33%の筋線維に electrical myotonia が出現した。この myotonia は phenytoin や mexiletine により回復した。薬理学的分析から, 筋細胞には複数の ion channel の異常が推定された。すなわち, dystrophin 欠損のために膜構造の異常をきたし, 多チャンネル異常が発生する可能性を指摘した。

寺尾は筋芽細胞移植による実験的治療を行っている。host マウスの全身 X 線照射後に移植を行うと, dystrophin 陽性細胞は0.4%から2.2%に増加した。しかしまだ陽性細胞の比率はかなり低く, 治療応用への展望は開けない。この理由として, 注射の技術的問題, 拒絶反応, 移植細胞の移動能などが考慮された。

Morandi らは DMD 保因者において dystrophin 欠損線維と筋変性の関連を分析している。細胞内に albumin や calcium (Ca) の侵入した変性線維は dystrophin を欠損する線維に多かった¹⁾。

Turner らによると mdx の静止時筋細胞内 Ca 濃度は92nM と対照の2.3倍に増量していた。また mdx myotube で Ca leak channel の open probability の増加が観察され, Ca 濃度増加の原因と推定している²⁾³⁾。

吉田らは3週齢と16週齢の mdx マウス長趾伸筋の Ca イオン濃度は35-80nM (50-130nM) であり, 対照との間に差を認めなかった。後述のように筋小胞体(SR)の Ca 摂取能を分析すると, mdx と対照の両者において, 100nM Ca 附近で強力なポンプ作動を示した。したがって非変性筋線維において Ca 濃度が上昇してくるとは考えにくい。

高木らは4週齢の mdx において, SR の Ca 摂取能と Ca 誘発性 Ca 遊離(CICR)は正常であることを示した。しかし EGTA を含む溶液中での Ca 漏出は mdx で亢進していた。この異常は phenytoin により修復された。

これらの報告を総合すると, mdx マウスで dystrophin 欠損のため複数の ion channel に異常が生じており, 細胞内環境の維持には余分のエネルギー消費が必要と推定される。

この homeostasis は種々の要因により破綻され, 細胞壊死が発生する。運動負荷が誘因となる可能性も指摘され, 本症の治療に関して重要な問題を提起している。

文 献

- 1) Morandi L et al: Ann Neurol 28: 674, 1990
- 2) Turner PR et al: Nature 335: 735, 1988
- 3) Fong P et al: Science 250: 673, 1990

ミトコンドリア脳筋症分子遺伝学的解析 —MBRRF

宮 武 正

(新潟大学脳研究所神経内科)

Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) は、ミオクロヌス、てんかん、小脳失調、ミオパチーを主徴とする疾患で、その他足変形を伴う。骨格筋生検で ragged-red fiber が認められ、血中乳酸及びピルビン酸が増加することから、ミトコンドリアの酸化的リン酸化酵素系の異常、さらに本症が母系遺伝を呈することからミトコンドリア DNA (mtDNA) の異常が病因と推定されていた。

しかし、これまで Southern blot では mtDNA の欠失はなく一塩基置換ないしは Southern 解析では検出できない程度の小さな欠失が病因である可能性が示唆されていた。

そこで我々は、本症の病因解明を目的に分子遺伝学的解析を行った。

〔対象及び方法〕

分析対象は、本症の疾患概念が最初に提唱された際に報告された2例、及び他の母子例の4例である。このうち1例の生検骨格筋より genomic DNA を抽出し、PCR で増幅した後、direct sequence 法あるいは、pUC19ないしは pBlue Script KS-plasmid vector に subcloning し、mDNA の全 sequence を検討した。

〔結果及び考察〕

患者骨格筋 mtDNA の98%の領域について塩基配列を解析した。これを Anderson らによって報告されている正常ヒト mtDNA の塩基配列と比較したところ、33箇所単塩基置換が見いだされた。このうちの23箇所が蛋白質の coding region であった。この蛋白質 coding region のうち、12箇所がアミノ酸の置換をきたすものであり、3箇所の塩基置換(塩基番号6,547の T→C, 11,718の G→A, 14,858の G→A)が human, bovine, mouse 間で保存されたアミノ酸を置換するものであった。さらに D-loop に7箇所、rRNA (12S) 領域に2箇所、tRNA 領域に1箇所の塩基置換が見いだされた。D-loop 領域の3箇所は、正常ヒト mtDNA の塩基置換として報告されており、また、rRNA 領域の塩基置換も MERRF 以外の疾患で認められていることから、これらの部位が本症の病因である可能性は低い。

一方、tRNA^{Lys} 塩基番号8,344の A→G の置換は、この塩基が human, bovine, mouse, rat, xenopus 及び cod で広く保存されているため、この部位での塩基置換は重要である。

以上より、本症の病因になり得る塩基置換として、蛋白質 coding region の3箇所と tRNA^{Lys} 領域の1箇所の置換が考えられた。

そこで、これらの置換が MERRF 患者で共通に存在するかどうかを検討した。その結果、tRNA^{Lys} 塩基番号8,344の A→G の置換のみがすべての患者で存在し、正常コントロール15例では全く認められなかったため、この塩基置換を本症の病因と考えた。

この置換は tRNA^{Lys} の T ϕ C loop の stem の3'側より2塩基下流に位置する。本症の病因とし

て、この T ϕ C loop の塩基置換が tRNA の構造を変化させ、その結果 mtDNA で code される酵素蛋白サブユニットの合成が障害され、本症が発症する機序が考えられた。

MELAS の分子遺伝学的解析

後藤雄一* 埜中征哉* 宝来 聡**
小林葉子*** 桃井真里子*** 太田成男****
田中雅嗣***** 小澤高將*****

(*国立精神・神経センター神経研究所, **国立遺伝学研究所

自治医科大学小児科, *同生化学, *****名古屋大学生化学)

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) は、脳卒中様発作を特徴とするミトコンドリア脳筋症の一病型で、患者数も多く、重症度も高い。今年度、我が国の3グループがそれぞれのアプローチで独立に MELAS の変異遺伝子の同定を試み、同一の結論に達した。さらに、遺伝様式、組織間分布、変異遺伝子の役割について明らかにされたので報告する。

(1) mtDNA の変位遺伝子の同定 (1, 2)

後藤らは、ミトコンドリア DNA (mtDNA) は母性遺伝することから、明らかに母性遺伝を示した患者骨格筋の mtDNA の tRNA 領域の塩基配列を決定した。その結果、tRNA-Leu(UUR) の塩基番号3243のAがGに置換していることを見いだした。この置換によって、制限酵素切断部位 Apal が生じ、容易に変異の有無を判断できた。患者31例の骨格筋 DNA を調べると26例に変異塩基が認められた。いずれの例でも変異 mtDNA と正常 mtDNA は混在しており、その比率は、50から92%と患者によって異なっていた。

小林らは、同一 MELAS 患者骨格筋より筋芽細胞株を確立し、酵素活性染色と培養液依存性から呼吸鎖の変異株と正常株を選択した。この二つの培養細胞株の全 mtDNA の塩基配列を比較することによって、変異塩基とミトコンドリア異常の因果関係を明らかにした。塩基配列を決定すると全 mtDNA のなかで僅かに一塩基のみが異なっていた。この塩基置換は、前述の変異と同じで、9患者で変異 mtDNA が認められた。

田中らは、二人の MELAS 患者の mtDNA 塩基配列を比較することで同じ結論に達した。

(2) 変異 mtDNA の遺伝様式および分布

さらに、小林らは、7例中6例の患者のリンパ球細胞に変異 mtDNA を検出し、血球細胞を用いて家系調査が行われた。例外なく母親には、患者より少量の変異 mtDNA が検出され、発症していない兄弟姉妹の大部分にも変異 mtDNA が認められた。その変異 mtDNA の量は、母親と患者の間であった。父親には、変異 mtDNA はいずれも認められなかった。このことは、明瞭にキャリアの母親から患者へと変異 mtDNA が遺伝したことを示している。剖検一例では、大脳に最も変異 mtDNA が蓄積しており、脾臓は最も少なく、組織間で変異 mtDNA の分布が異なっていた。

(3) 呼吸鎖欠損の分子機構

変異塩基は tRNA-Leu (UUR) 遺伝子上に位置しており、ミトコンドリア内でのタンパク質合成が阻害されることが想像された。前述の呼吸鎖欠損株と正常株のタンパク質合成を比較することによって変異 tRNA の役割を分子レベルで調べると、変異 tRNA も tRNA としての機能は正常であ

った。ところが、特定のタンパク質の合成のみが低下しており、呼吸鎖の欠損の原因は全体のタンパク質合成低下ではなく、特定のタンパク質合成の低下に基づくと考えられた。この分子機構は現在検討中である。

ミトコンドリアのRNA合成の制御機構は特殊で、リボソームRNAとmRNAの比率は転写終結因子の結合によって調節される。変異のあった領域はこの終結因子の結合部位でもあり、tRNA-Leu(UUR)遺伝子は二重機能を持つ。RNA合成の調節に関しては、通常状態ではrRNAとmRNAの比率は変異株でも正常であったが、酸素濃度の低下による制御は変異株では正常に働かず、mtDNAの変異によってRNA合成の調節能が欠如することが明らかとなった。

(1) Goto Y, Nonaka I and Horai S: Nature 438: 651, 1990.

(2) Kobayashi Y et al: Biochem Biophys Res Comm, 1990.

分 担 研 究 報 告

目 次

- I. 筋ジストロフィー(1)
- 1) Duchenne 型筋ジストロフィーおよび筋緊張性ジストロフィーにおける
部検内喉頭筋の組織学的ならびに免疫組織化学的検討……………33
東京都立神経病院神経内科 田 邊 等
- 2) 筋ジストロフィー及び多発筋炎における筋 MRI ……………37
九州大学医学部脳研神経内科 後 藤 幾 生
- 3) 筋エコー法による中間広筋障害の検討……………39
信州大学医学部第三内科 庄 司 進 一
- 4) 筋ジストロフィー症における Dantrolene Sodium の
血清 CPK 値に及ぼす影響 ……………43
京都大学医学部神経内科 梶 龍 児
- 5) 骨格筋ライアノジンリセプターのオートラジオグラフィー (ARG) ……45
虎の門病院神経内科 高 木 昭 夫
- II. 筋ジストロフィー(2)
- 6) ジストロフィン・テストによる肢帯型筋ジストロフィーの再検討……………53
国立精神・神経センター神経研究所 荒 畑 喜 一
- 7) Dystrophin：ヒト臓器分布並びに Becker 型筋ジストロフィーにおける
発現様式について……………56
国立療養所再春荘病院神経内科 内 野 誠
- 8) 各種筋ジストロフィーにおける抗ジストロフィン抗体による
免疫組織化学的検討……………60
鹿児島大学医学部第三内科 納 光 弘
- 9) 先天性筋緊張性ジストロフィーにおけるジストロフィン発現様式の
免疫学的解析……………64
東京大学医学部脳研神経内科 清 水 輝 夫
- 10) Becker 型筋ジストロフィーにおけるジストロフィンの動態 ……………68
（助）東京都神経科学総合研究所分子研究系神経生化学 堀 眞一郎

III. 筋ジストロフィー(3)

- 11) 福山型先天性筋ジストロフィーにおけるジストロフィンの研究……………75
国立精神・神経センター神経研究所 荒畑喜一
- 12) dystrophin およびその遺伝子の検討 ……………78
国立療養所下志津病院神経内科 松村喜一郎
- 13) ジストロフィン cDNA に基づく cysteine-rich および C 末端領域
各種合成ペプチドの抗原性と抗体の反応性について……………81
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山吉弘
- 14) ラット脊髄付加ヒト培養筋細胞に於ける dystrophin の発現, 局在に
関する免疫組織化学的, 電顕的検討……………85
東京医科歯科大学医学部神経内科 小林高義
- 15) 急速凍結・ディープエッチング (QF-DE) 法による培養筋管
細胞内 dystrophin の三次元的局在 ……………90
東京医科歯科大学医学部神経内科 小林高義
- 16) Deep etching replica 法によるマウス骨格筋細胞膜関連細胞骨格の研究
——化学固定と無化学固定標本の差異について——……………96
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山吉弘

IV. 遺伝子

- 17) 女性筋ジストロフィー患者細胞の X 染色体における脱メチル化と
DNA 複製パターンについて ……………103
東京医科歯科大学医学部難治疾患研究所細胞遺伝 斎藤深美子
- 18) ミトコンドリア脳筋症の病因解明
——ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症における変異遺伝子解析—— 107
徳島大学医学部小児科 黒田泰弘
- 19) 筋ジストロフィー組織ジストロフィンファミリーと生体膜機能 ……………112
宮崎医科大学衛生学 濱田稔
- 20) 筋ジストロフィー家系における分子遺伝学的検討 ……………116
東京女子医科大学小児科 斎藤加代子

V. ミトコンドリア脳筋症(1)

- 21) ミトコンドリア DNA 配列からみたヒト上科の子進化125
国立遺伝学研究所 宝 来 聰
- 22) MELAS におけるミトコンドリア tRNA^{Leu} (UUR) 変異129
名古屋大学医学部第二生化学 小 澤 高 将
- 23) COX 部分欠損を伴った Leigh 症候群の生化学的分子遺伝学的検討 ...134
東京大学医学部脳研神経内科 清 水 輝 夫
- 24) 筋緊張性ジストロフィーにおけるミトコンドリア DNA 異常138
愛知医科大学第四内科 佐 橋 功
- 25) 家族性労作性ミオグロビン尿症におけるミトコンドリア DNA 変異 ...142
名古屋大学医学部神経内科 高 橋 昭
- 26) ミトコンドリア・ミオパチーにおける末梢神経障害148
筑波大学臨床医学系神経内科 水 澤 英 洋
- 27) 家族性進行性外眼筋麻痺症候群の 2 剖検例における
多重欠失ミトコンドリア DNA の臓器分布153
順天堂大学医学部脳神経内科 佐 藤 猛
- 28) Kearns-Sayre 症候群におけるミトコンドリア DNA の解析157
大阪大学医学部第二内科・神経内科 垂 井 清一郎
- 29) 慢性進行性外眼麻痺症候群における欠失 mitochondrial(mt)DNA の
解析
——非 RI 標識 mtDNA probe を用いての検討——161
熊本大学医学部第一内科 荒 木 淑 郎

VI. mdx マウスほか

- 30) mdx マウス骨格筋におけるカルシウム (Ca) 濃度調節167
虎の門病院神経内科 高 木 昭 夫
- 31) MDX マウス骨格筋の強収縮状態に於ける細胞内 Ca²⁺濃度170
国立精神・神経センター神経研究所 吉 田 瑞 子
- 32) mdx マウスの電気生理学的及び治療的研究172
東邦大学医学部第四内科 栗 原 照 幸

- 33) 筋細胞膜モデルによるミオトニー発生機序の数理的解析 ……………177
東邦大学医学部第四内科 栗原照幸
- 34) Heterozygote mdx mouse の筋細胞における dystrophin の発現と
筋核との関係 ……………181
徳島大学医学部第一内科 川井尚臣
- 35) mdx mouse の骨格筋における DNA 合成 ……………186
徳島大学医学部第一内科 川井尚臣
- 36) 「Immobilization」による mdx マウス筋変性への影響
——第2報—— ……………191
東京都立神経病院神経内科 田邊 等
- 37) 筋ジストロフィーハムスターにおける神経筋接合部の電顕的研究 ……197
国立療養所犀潟病院 福原信義
- 38) ジストロフィー筋への正常 myoblast の注射に関する研究
——X線照射の効果—— ……………200
帝京大学医学部第一内科 寺尾寿夫
- 39) 骨格筋特異的蛋白発現に関する神経ペプチドの研究 ……………204
金沢大学医学部神経内科 高守正治
- 40) 筋再生と成長因子 ……………207
九州大学医学部脳研神経内科 後藤幾生
- VII. 生化学**
- 41) 筋細胞死とリソゾームプロテアーゼ群 ……………211
順天堂大学医学部生化学第一講座 木南英紀
- 42) 骨格筋筋原繊維の構成成分である c-蛋白質を変換する因子について …215
財団法人京都神経科学総合研究所神経生化学 堀 眞一郎
- 43) clofibrate の骨格筋の速筋と遅筋グルコース・アップテイクに
対する影響 ……………219
信州大学医学部第三内科 庄司進一
- 44) 蛋白質のミトコンドリア移行とその異常 ……………222
熊本大学医学部遺伝医学研究施設 森 正敬
- 45) 一次元ならびに二次元電気泳動による connectin の免疫化学的析：
福山型先天性筋ジストロフィーにおける変性・分解の検討を中心に …226
国立療養所下志津病院神経内科 松村喜一郎

VIII. ミトコンドリア脳筋症(2)

- 46) MERRF 様症状を呈した MELAS におけるミトコンドリア DNA の解析 ……233
筑波大学臨床医学系神経内科 水澤英洋
- 47) Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers(MERRF) の
病因に関する分子遺伝学的研究 ……238
新潟大学脳研究所神経内科 宮武正
- 48) MELAS における遺伝子異常の発見 ……242
国立精神・神経センター神経研究所 埜中征哉
- 49) Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels (SSV) の
診断的意義 ……246
国立精神・神経センター神経研究所 埜中征哉
- 50) MELAS におけるミトコンドリア DNA の点変異によるタンパク質,
RNA 合成の変化 ……250
自治医科大学大学生化学 太田成男
- 51) MELAS 症候群の臨床的検討とミトコンドリア DNA の解析 ……254
大阪大学医学部小児科 岡田伸太郎
- 52) MELAS 母娘例におけるミトコンドリア DNA の解析 ……258
自治医科大学神経内科 西澤正豊
- 53) MELAS の遺伝子変異：骨格筋ミトコンドリアにおける点変異 ……261
自治医科大学小児科 桃井真里子

I. 筋ジストロフィー(1)

1) Duchenne型筋ジストロフィーおよび筋緊張性ジストロフィーにおける剖検内喉頭筋の組織学的ならびに免疫組織化学的検討

田 邊 等*

研究協力者 磯 崎 英 治* 高 元 喜代美*
宮 本 和 人* 小 田 雅 也**

緒 言

我々は、これまで種々な神経筋疾患における内喉頭筋（声帯開大筋および声帯閉鎖筋）の組織学的変化を検討してきた。その結果、声帯麻痺を伴った多系統萎縮症では声帯開大筋のみの¹⁾、また筋萎縮性側索硬化症では全ての内喉頭筋において、神経原性変化を認めるなど、疾患や病態により特徴的な所見を呈することを報告してきた。今回は筋ジストロフィーを対象とし、組織学的所見とともに免疫組織化学的染色（ジストロフィン染色）も行ったので併せて報告する。

対象および方法

対象は、Duchenne型筋ジストロフィー(DMD) 1例(死亡時18歳)、筋緊張性ジストロフィー(MD) 2例(死亡時46歳および52歳)で、何れも末期まで発声・嚥下機能は保たれていた。方法は、剖検時、内喉頭筋(前筋、横筋、後筋)、横隔膜および大腿四頭筋を採取し、生検材料に準じて凍結切片の作製および組織学的染色を行い、併せてジストロフィン染色も行った。ジストロフィン抗体は、味の素株式会社および富士レビオ株式会社から供与されたc末端に対する4-4c5モノクローナル抗体を使用した。

結 果

図1は、DMD例の横隔膜および内喉頭筋である。横隔膜では、明らかな大小不同、横断面の円形化、間質の増大、脂肪浸潤、opaque fiberを認め典型的なDMDの所見を認めた。それに対し、内喉頭筋ではいずれにおいても少数のopaque fiberの散在、筋鞘核の増加を認めるものの、横隔膜に比し全体として極めて変化は軽度であった。

図2は、MD例である。横隔膜では脂肪浸潤を伴ったいわゆるmyopathic changeに加え、多数の中心核を認め、MDに特徴的な所見を呈する。同様な変化は内喉頭筋(後筋、前筋)においても認められる。他のMD例についても基本的には同様の結果を示した(表)。

図3は疾患コントロールすなわち脳梗塞で死亡した例における各筋のジストロフィン染色を示す。大腿四頭筋では、各筋線維はいずれも全周性に染色され正常パターンを示した。しかし、内喉頭筋においてはほとんどの筋線維はジストロフィン陰性であり、横隔膜においても、ごく一部に不完全な陽性線維を認めるものの、基本的には内喉頭筋と同様、大部分が陰性線維だった。図4はMD例の内喉頭筋および横隔膜である。いずれもコントロール例よりは陽性線維の数も多く、全体としてモザイク様に染色されたが、やはり陰性線維を認めた(表)。

* 東京都立神経病院神経内科

** 東京都立神経病院検査科病理

