

厚生省「神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究

第二班（三好班）

昭和53年度研究報告書

昭和54年 3 月

研究報告書の作成にあたって

厚生省心身障害研究助成金「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」の研究班は、昭和52年3月をもって一応終了し、昭和53年度からは新しく厚生省神経疾患研究委託費、筋ジストロフィー症研究班として再出発致しました。

新しい研究班は、主研究テーマに基づき4つの班で構成され、基礎、臨床、社会医学に亘る従来よりも更に広範囲な研究活動を開始致しました。厚生省当局、国立神経センター、日本筋ジストロフィー協会の御努力、御支援、御理解に深く感謝致します。

「筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究」班は、その内の第二班ですが、私が班長としてお世話をすることになりました。本研究班の特徴は筋ジストロフィー症を遺伝、臨床、病態生理、および生化学的見地から追求し、本症の原因を究明し、治療法の開発を目ざすものであります。

本研究班では、全班員がこれまでの各自の研究実績をふまえ、そこに幾つかの新しいアイデアを加え、研究の推進をはかりました結果、すでに、国際的な水準の研究発表がなされました。本年度の研究報告書は、その研究成果にその後のものを加えて完成を得たものであります。これは、本研究班の班員、並びに共同研究者各位の絶大な努力に負うものであり、班長として心からの敬意を表します。

筋ジストロフィー症の病因の究明と治療法の開発を目ざして、今後も不断の研究を続ける事は社会的にも、学問的にも私達に課せられた義務であり、その責任の重大さを痛感致しております。

昭和54年3月

〈班長〉 三 好 和 夫

目 次

分 担 研 究 報 告

I. 筋ジストロフィーチキン, マウスの研究.....	13
a) 筋ジストロフィーチキン.....	15
b) 筋ジストロフィーマウス.....	49
II. 筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病態生理.....	63
a) 遺伝.....	65
b) 臨床.....	76
c) 形 態.....	97
d) 生 理.....	134
e) 赤血球など.....	151
f) 生化・治療.....	175
昭和53年度研究班機構図及名簿.....	205

分 担 研 究 報 告

目 次

I. 筋ジストロフィーチキン, マウスの研究

- 1) ジストロフィーチキンの筋病理及びこれに対する食餌の影響.....15
東邦大学医学部第四内科 木下真男
- 2) 筋ジストロフィーチキンの発達過程に於ける形態学的観察.....21
九州大学医学部脳研神経内科 黒岩義五郎
- 3) 筋ジストロフィーチキン骨格筋の再生反応.....25
鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門 中村晴臣
- 4) 筋ジストロフィー鶏の骨格筋スキンドファイバー.....30
国立武蔵療養所神経センター 高木昭夫
- 5) 筋ジストロフィーチキンの赤血球, 栓球の細胞化学的研究.....34
都立府中病院神経内科 宇尾野公義
- 6) 筋ジストロフィーチキンに対する protease inhibitor (E-64)
の効果——形態学的側面——, 及び筋ジストロフィーチキン
骨格筋の組織化学的特徴.....40
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部 埜中征哉
- 7) 筋ジストロフィーチキンに対する protease inhibitor (E-64)
の効果——生化学的側面.....45
東京大学医学部脳研神経内科 杉田秀夫
- 8) ジストロフィーマウスに対する growth hormone の効果.....49
東邦大学医学部第四内科 木下真男
- 9) 筋ジストロフィー動物モデルにおける神経成長促進因子の研究.....52
(I)筋ジストロフィーマウスの頸部交感神経節細胞構築の定量的解析
(II)筋ジストロフィーマウスにおける頸部交感神経節への神経成長促
進因子の効果
京都大学医学部第二内科 井村裕夫
- 10) 筋ジストロフィーマウス筋肉中の神経成長促進因子様
免疫交叉性物質レベル.....58
京都大学薬学部生物化学講座 林 恭三

II. 筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病態生理

- 11) **Facioscapulohumeral syndrome : The non-hereditary variety**.....65
 日赤医療センター神経内科 古川 哲雄
- 12) 筋萎縮性疾患の遺伝分析.....68
 ——クーゲルベルグペランダー病 (KW病) について——
 鹿児島大学医学部衛生 古庄 敏行
- 13) 先天性ネマリンミオパチーの遺伝機構補遺.....72
 新潟大学脳研究所神経内科 近藤 喜代太郎
- 14) **Duchenne 型筋ジストロフィー症の母子発症例**.....76
 筑波大学臨床医学系神経内科 中西 孝雄
- 15) 自覚症状を欠き, 1例にパーキンソン病を合併した
 大腿四頭筋障害を主とするミオパチーの同胞例.....80
 信州大学医学部第三内科 塚 越 廣
- 16) 先天性筋ジストロフィー症の成因に関する研究.....86
 ——2症例の検討——
 東邦大学医学部第四内科 木下 真男
- 17) 成長障害, 骨変形を伴った筋緊張症の1例.....91
 ——特に, その筋生検所見について——
 大阪医科大学第一内科 茂在 敏司
- 18) 筋ジストロフィー症諸病型における筋病変の特徴について.....97
 虎の門病院神経内科 田 辺 等
- 19) 諸種神経筋疾患の筋病変における **fiber type** 異常と
motor unit 内局在病態との関連について..... 102
 虎の門病院神経内科 田 辺 等
- 20) 筋ジストロフィー症と鑑別困難な慢性多発性筋炎に関する検討..... 108
 虎の門病院神経内科 田 辺 等
- 21) **Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (DMD)** における
 横細管系 (**T-system**) の研究..... 111
 ——高圧電子顕微鏡による観察——
 信州大学医学部第三内科 小口 喜三夫
- 22) 各種筋疾患における **Freeze-fracture** 法による
 筋細胞膜の形態学的研究..... 115
 宮崎医科大学第三内科 荒木 淑郎

37) 筋ジストロフィー症におけるクレアチン代謝.....	175
徳島大学医学部第一内科 三好和夫	
38) Duchenne 型筋ジストロフィー症におけるカルニチン代謝.....	178
九州大学医学部脳研神経内科 黒岩義五郎	
39) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における cyclic nucleotides の動態について.....	180
大阪医科大学第一内科 茂在敏司	
40) 筋ジストロフィー症における筋膜脂質に関する研究.....	186
——筋ジストロフィー鶏の筋ガングリオシドについて——	
自治医科大学神経内科 宮武正	
41) 組織肥満細胞セリンプロテアーゼのインヒビターについて.....	189
徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門 真田幸弘	
42) 血清Mbを指標とする筋の筋弛緩剤に対する人ミオパチー筋感受性。 Isolated method による事前チェックの試み.....	192
徳島大学医学部第一内科 川井尚臣	
43) ネマリンミオパチーとその類縁疾患に認めた トリプトファン代謝異常.....	196
徳島大学医学部第一内科 八木田正聖	
44) 蛋白同化作用を有する膵エキスの精製とそれによる 筋ジストロフィー症の成因・治療に関する研究.....	201
長崎大学医学部第一内科 高岡善人	

I. 筋ジストロフィーチキン, マウスの研究

- a) 筋ジストロフィーチキン
- b) 筋ジストロフィーマウス

1) ジストロフィーチキンの筋病理及び

これに対する食餌の影響

木下真男*

研究協力者 石塚洋子* 亀井敦行*

1: ジストロフィーチキンの筋病理

我々は、ジストロフィーチキンの筋の病理変化が、どの時期から始まるか、前回にひきつづき経時的に追求してみたが、以下のような結果であった。

対象及び方法

対象として、実中研からジストロフィーチキンの孵卵の分与を受け、孵化させ、胸筋、腓腸筋の変化を観察した。観察には光顕を用いて、孵卵前期から後期にかけてと、孵化直後、2週目、3週目、4か月、15か月後の筋について行った。

結 果

孵卵前半期では、ジストロフィーチキンと対照との間に、明らかな筋病理所見の相違は見られず、孵卵11日目から14日目頃には両者共に、筋線維構造の変化と細胞浸潤が出現する。しかし、孵卵17日目になると、ジストロフィー、対照動物、両者に差がでてくる。すなわち、対照動物においては孵卵前半期にみられた、筋構造の変化と細胞浸潤は消失し、正常構造の線維が大多数を占め、筋核は筋線維の周辺部に移動しているものが多く、myotube期のものはジストロフィーに比較して少なかった。これに対しジストロフィーチキンでは floccular charge に phagocytosis を

伴う所見と、その他、小円形細胞、線維芽細胞などの細胞浸潤が認められた。これらの変化は胸筋、腓腸筋、両方に認められた。その後、これらの変化は漸次消失し、孵化直後になると筋線維は密に配列し、筋核も大部分が周辺部に移動する。対照動物においては、軽度の大小不同がみられるのに対し、ジストロフィーでは部分的に floccular change が認められ、また Gomori-trichrome 変法で赤染する、いわゆる ragged red fiber に近い所見もみられる。また、我々の経験した孵化直前のジストロフィーチキンの一例では、下肢全体の筋組織が脂肪組織に置換されていた。孵化後2週目になると、ジストロフィーの筋線維の大小不同は更に強くなり、大径線維が多くなる。この変化は胸筋でもっとも著明であった。また、筋線維肥大とともに、angulated fiber, ragged red fiber, 部分的な変性所見も認められた。PAS 染色では、筋線維は3種類に分別され、ところどころの筋線維に筋構築の変化と、小径線維の grouping が認められた。対照動物では、ジストロフィーに比較して変化は軽度であった。孵化後3週目では、2週目の変化が更に著明となる。また、孵化後3週目におけるジストロフィーチキンの胸筋の、銀染色によるときほぐし標本では、筋線維に節性的変性所見が認められた。孵化後4か月では、肥大線維は更に大きくなり、中心核の増加、筋線維の断裂が著しく、その他、筋線維大小不同, ragged red fiber, 小径線維の group-

* 東邦大学医学部第四内科

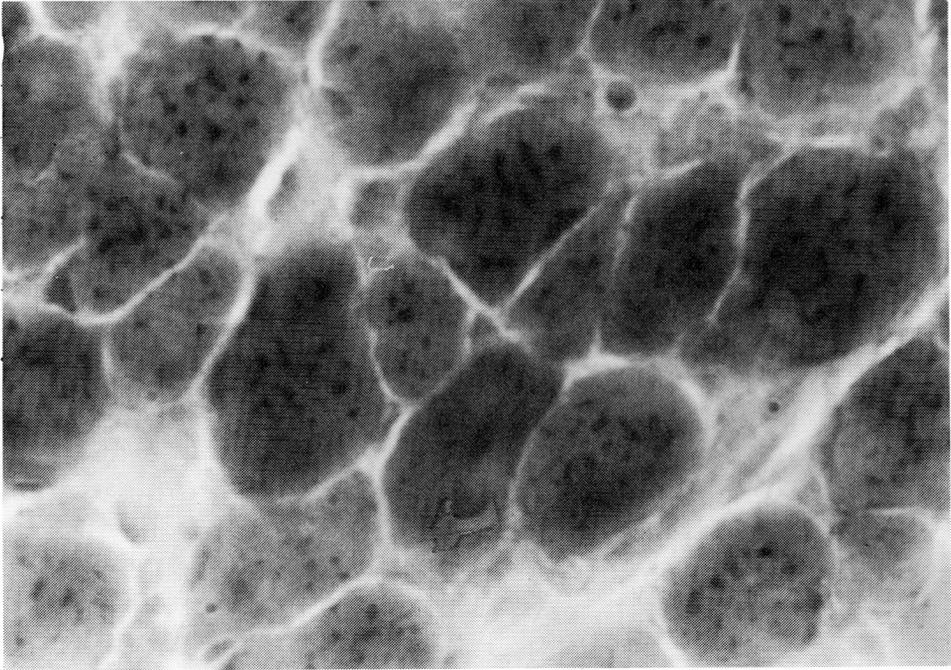


図1 孵化直後ジストロフィーチキン
Gomori-trichrome 染色×600

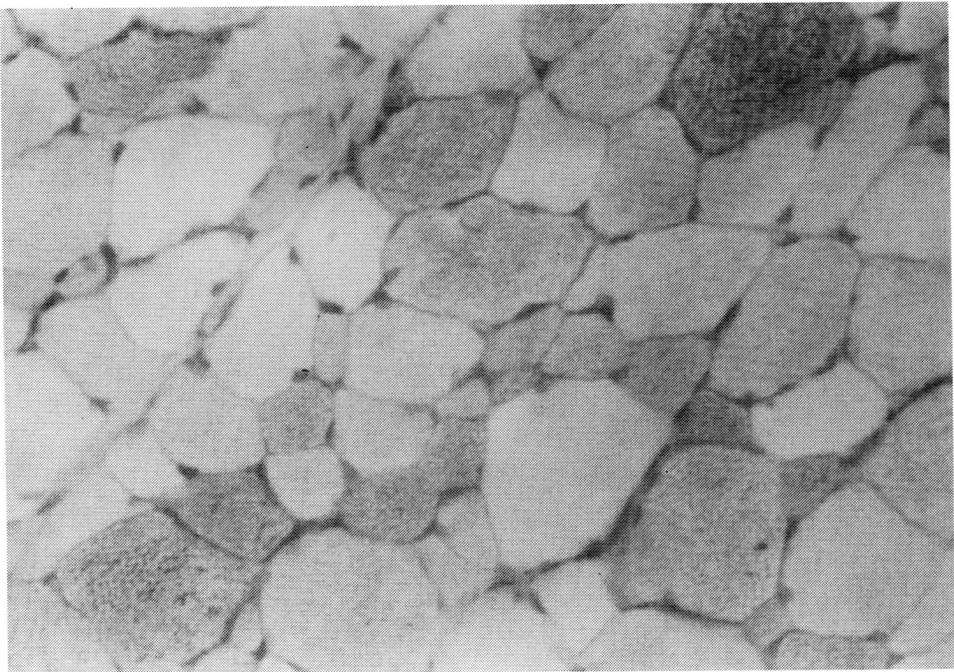


図2 孵化後2週目ジストロフィーチキン胸筋
PAS 染色×300

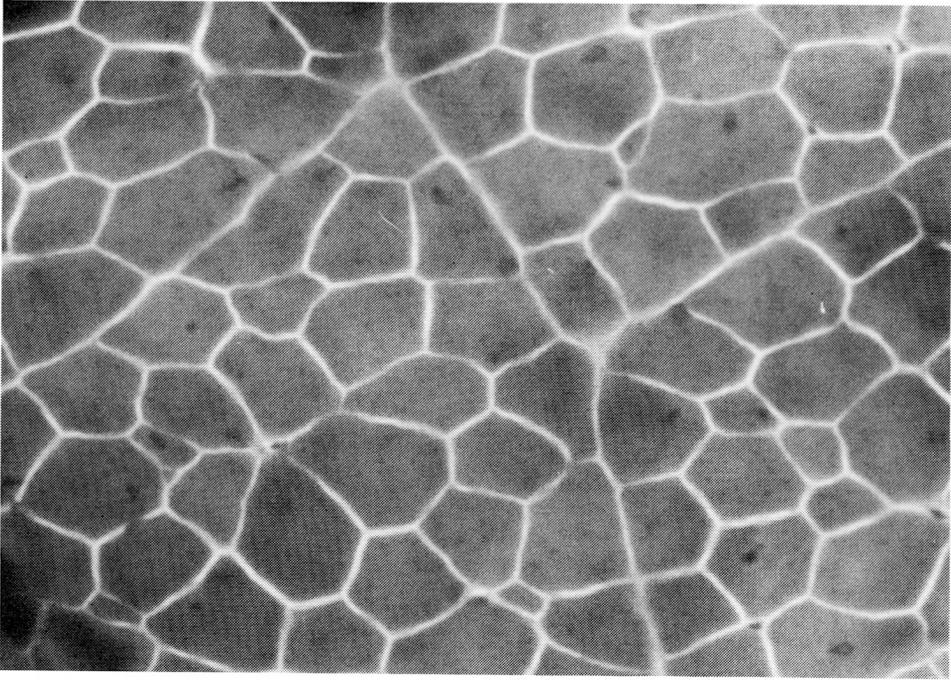


図3 孵化後2週目コントロールチキン胸筋
Gomori-trichrome 染色×300

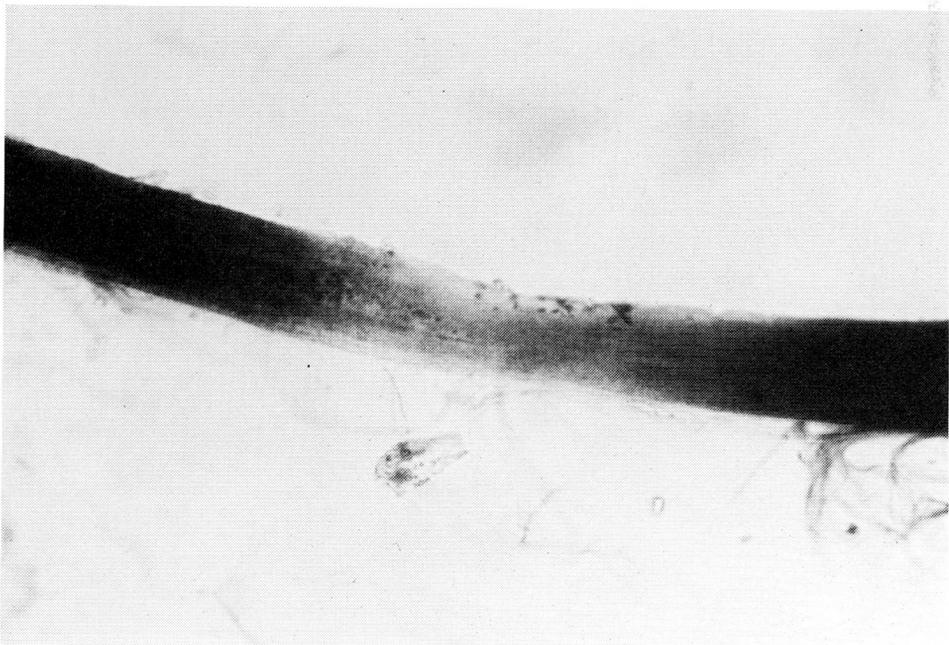


図4 孵化後3週目ジストロフィーチキン胸筋
銀染色×200

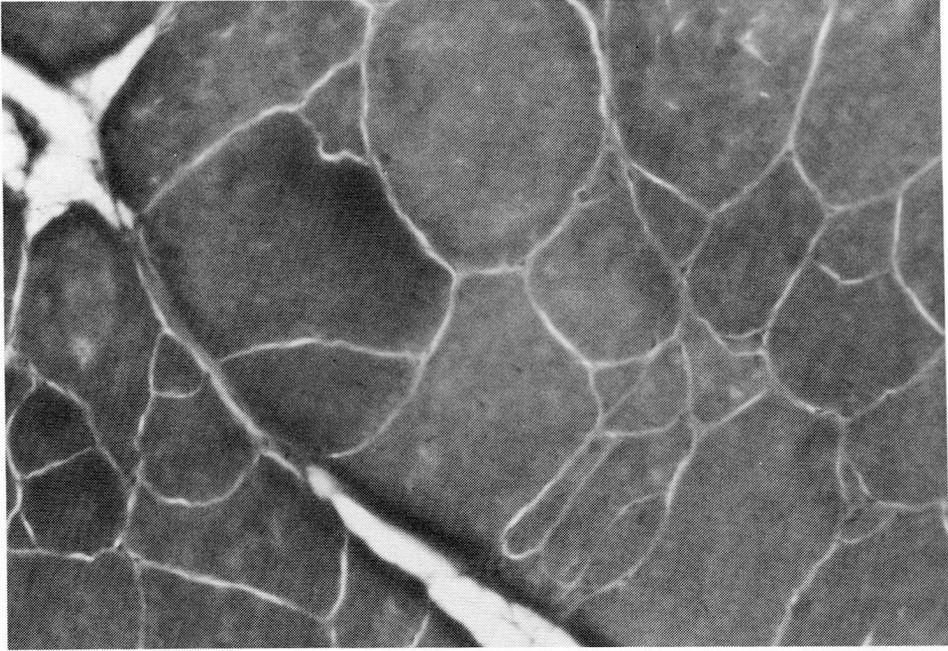


図5 孵化後4か月ジストロフィーチキン胸筋
Gomori-trichrome 染色×150

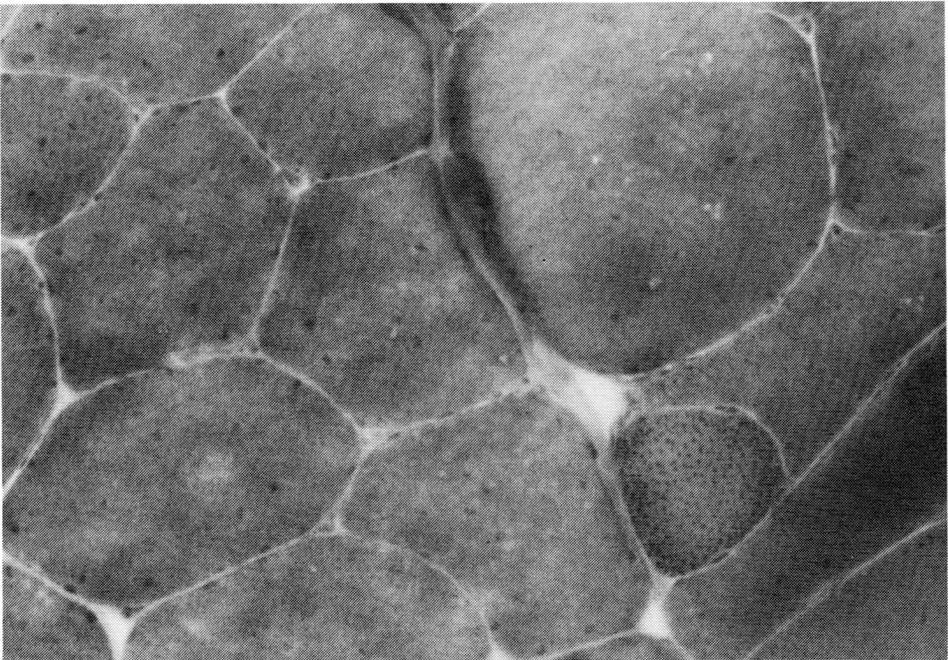


図6 孵化後15か月ジストロフィーチキン胸筋
Gomori-trichrome 染色×150

ingも同様に認められた。しかし以後は、比較的緩徐に経過し、15か月たっても基本的にはあまり著しい相違はみられなかった。

2：ジストロフィーチキンの病態に対する食餌の影響

ジストロフィーチキンは、臨床的には孵化後2週目前後に、仰臥位より立位への姿勢変換不能として気付かれるが、筋形態学的変化も同様に、2週目に胸筋の肥大線維を伴った、大小不同が著明となった。これらの筋変化に食餌が何らかの影響を及ぼすかどうかを確かめ、治療としての可能性の有無を知るため、以下の実験を行った。

対象及び方法

ジストロフィーチキンの孵化後、直ちに実験食を与え、従来の食餌によるジストロフィーチキンの発症状態と比較検討した。

今回の実験食としては

実験食1：日生研の飼料 $\frac{1}{2}$ と小麦胚芽 $\frac{1}{2}$ を混合したもの。

実験食2：日生研の飼料 $\frac{1}{3}$ と小麦胚芽 $\frac{2}{3}$ を混合したもの。

の2種類を使用した。

結 果

実験食群では1、2とも普通食群に比較して、体重増加は少なかったが、運動機能は比較的良く保たれ、孵化後7週目に施行した、仰臥位より立位への姿勢変換運動の10回の試験においては、同年齢群、及び同体重群に比較して、どちらに対しても、より良好な機能を示した(図7)。実験食の大まかな内容は表1の通りであるが、ジストロフィーチキンにおいては、食餌による治療は必ずしも不可能ではないとの印象を得た。

number of success in
rising off a flat surface
when laid on their backs

Muscular function and body weight in dystrophic chickens

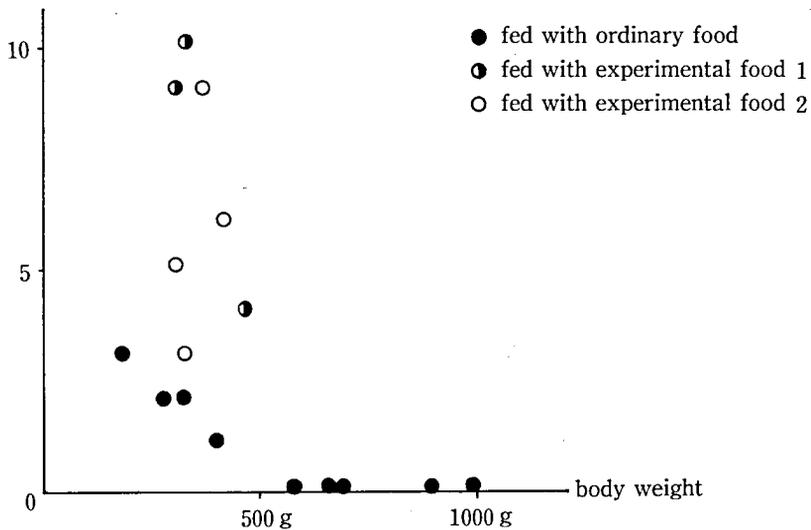


図7 実験飼料動物の運動機能

表 1 実験飼料内容

	A : ordinary food (per 100g of diet)	B : wheat germ
crude protein	20.48 (%)	32.13
crude fat	3.19	9.75
crude fiber	3.03	3.15
crude ash	6.88	4.63
vitamin E	30.00 (mg)	57.78
nicotinic acid	39.09	34.47
	vit. B, pantothenate	vit. B, pantothenate folic acid, dextrin

experimental food 1 : A 1/2 + B 1/2

experimental food 2 : A 1/3 + B 2/3

考 按

ジストロフィーチキンを食餌によって治療しようという試みは、これまでもあり、Petersonらは高蛋白飼料を用いて、胸筋の脂肪含有量の減少をみたという発表をし、また、Tureenらは、抗オキシダント剤と含硫アミノ酸欠乏食を、ジストロフィー、対照動物、両者に与え、ジストロフィーでは症状は著しく増悪し、また対照動物でも筋萎縮症状を発現したと報告し、それらの血中蛋白分画を測定し比較している。Tappelらも、ビタミンEの、不飽和脂肪酸の抗酸化作用に着目し、反すう動物の筋萎縮症にビタミンEが有効であると報告している。

今回の実験食には、自然界の中でもっとも多くビタミンEを含有し、その他に蛋白や、TCAサイクルでのATP生成に必要なビタ

ミンB群を多量に含み、かつ摂取、入手し易い小麦胚芽を選んだ。一応は、実験食群の方が良好な結果を得たが、問題は実験食群の体重が、いずれも同年齢の対照群に比較して小さい点である。この点はどう考えていいか不明であり、あるいは動物の嗜好に関係があるのか、または供給の面に問題があるのか、今後検討の必要がある。運動機能がよく残存していたのは、あるいは体重の差のためかも知れないが、対照動物で同じ位の体重のもの（これらの年齢は実験群より若い）に比較しても機能は良好であるので、今後、十分な数で慎重に判定する価値のある方法と考える。今回は、動物の機能が良好であったので、筋の病理検索は見合わせて、更に観察を続けることにした。

2) 筋ジストロフィーチキンの発達過程 に於ける形態学的観察

黒 岩 義五郎*

研究協力者 石 本 進 士* 後 藤 幾 生* 長 柄 均*

目 的

Dystrophy chicken 筋の dystrophic process は white fiber に於てより著明で、red fiber では少ないと報告されている¹⁾。しかし発達過程のどの時期より dystrophic process がいかに発現するかの形態学的検討は未だ充分とは言えない。従って私達は、dystrophic chicken 筋の発達過程における dystrophic process の発生について検討を加えた。

方 法

動物は dystrophic chicken (line 413) 及び control chicken (line 412) を用い、ふ化後、1日目、1週目、2週目、3週目、5週目、8週目にエーテル麻酔下にて頸動脈切断、脱血し、red fiber である前広背筋 (ALD) と white fiber である後広背筋 (PLD) の凍結標本を作製した。染色は、HE, DPNH diaphorase, SDH, MDH, phosphorylase, acetylcholine esterase 染色等を行なった。morphometry は、ふ化後、1日目から8週目迄の HE 染色標本を使用した。各々の時期の dystrophy chicken, control chicken の ALD 筋、PLD 筋標本から筋線維径100本ずつを計測し、グラフを作製した。DPNH diaphorase 標本では、ふ化後、1週目、2週目、3週目、5週目、8週目の時期の dystrophy chicken, control chicken 2匹ずつを使用し、PLD 筋

の high DPNH diaphorase fiber の百分率を経時的に示した。又、ふ化後、1日目、1週目、2週目、3週目の時期の DPNH formazan deposits 数を、ALD 筋、PLD 筋について、ほぼ同一の fiber diameter に対応して数え、その数を、dot で fiber diameter 毎に図に表示した。

結 果

1) Morphometry

White fiber である PLD 筋は、ふ化後2週目迄は、control 筋と著明な差はみられなかったが、ふ化後3週目になると、dystrophy 筋において、fiber size distribution が広くなり、control 筋と比し、径の大きい線維の増加が認められる様になった(図1)。さらに、5週

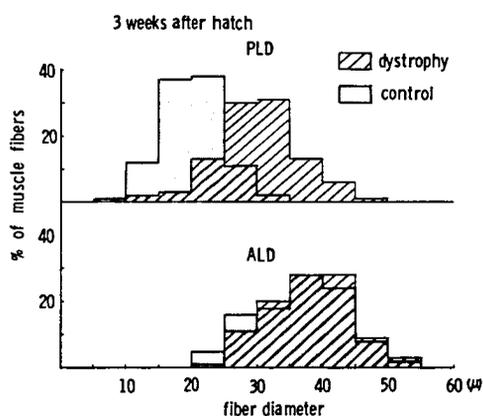


図1 Size distribution of muscle fibers

*九州大学医学部脳研神経内科

目、8週目になると、dystrophy筋の fiber size の広がり、より著明にみられた。red fiber である ALD 筋では、ふ化後8週目において、やや fiber size の distribution に差がみとめられる程度で、ふ化後初期には、差はみとめられなかった。

2) high DPNH diaphorase fiber の占める割合 (経時的推移)

PLD 筋の DPNH diaphorase 染色に於ては、こく染まる high DPNH fiber と、うすく

染まる low DPNH fiber が混在する (図2)。その内 high DPNH fiber の全体に対する割合を経時的にみると、ふ化後、1週目は、dystrophy筋、control筋共に約30%で差異は認めないが、control筋では、high DPNH fiber は、以後しだいに減少し、8週目で約5%になるのに反して、dystrophy筋では約20%を維持し著明な減少はみられなかった (図3)。又 ALD 筋は、dystrophy筋、control筋共に、これらの時期においては全て high

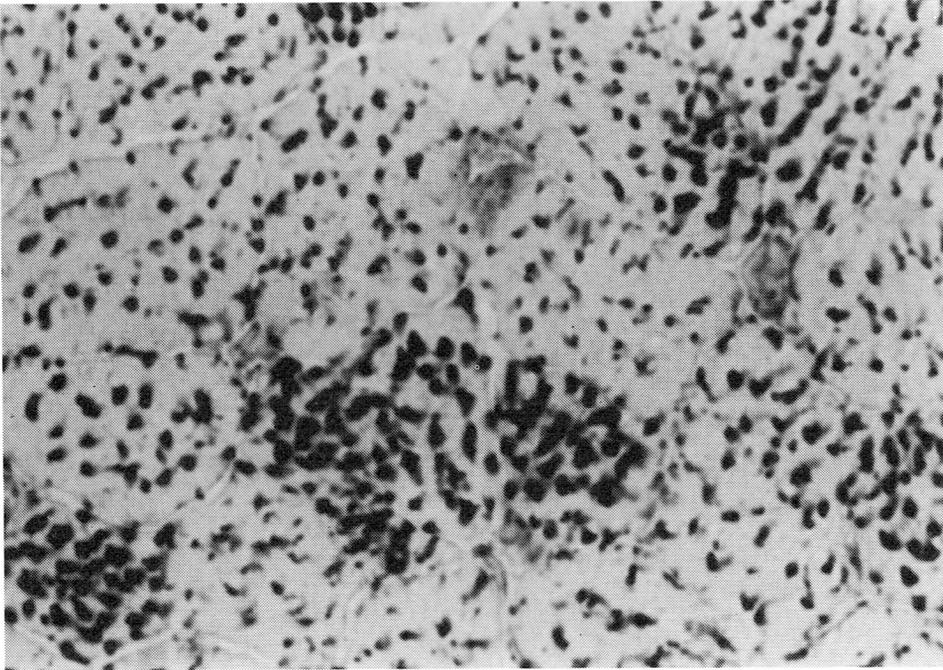


図2 DPNH diaphorase 染色 ×268

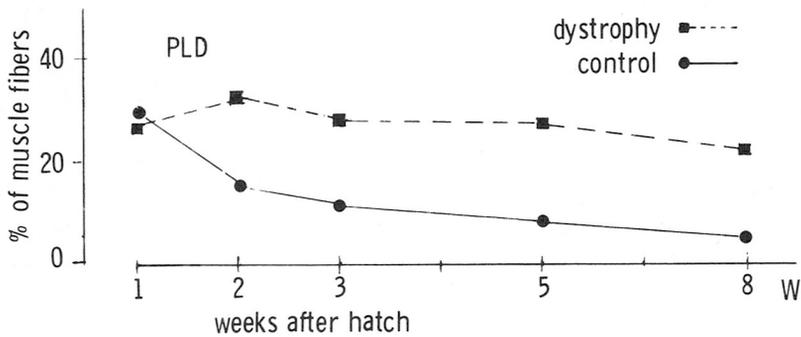


図3 Percentage of high DPNH diaphorase fibers

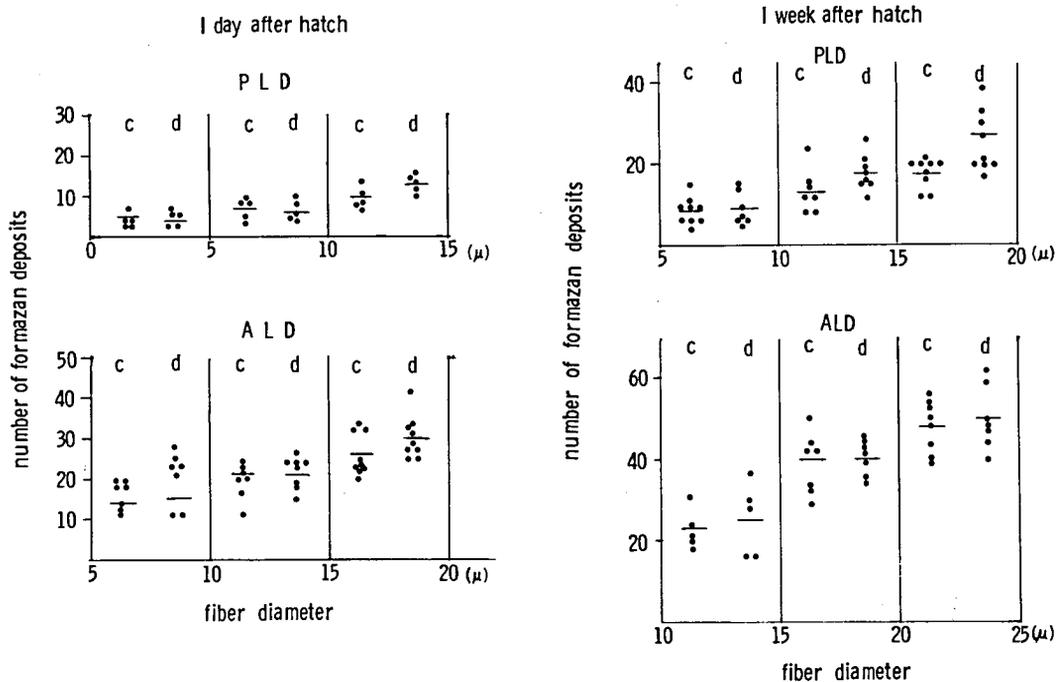


图 4 数量 of formazan deposits (NADH diaphorase)

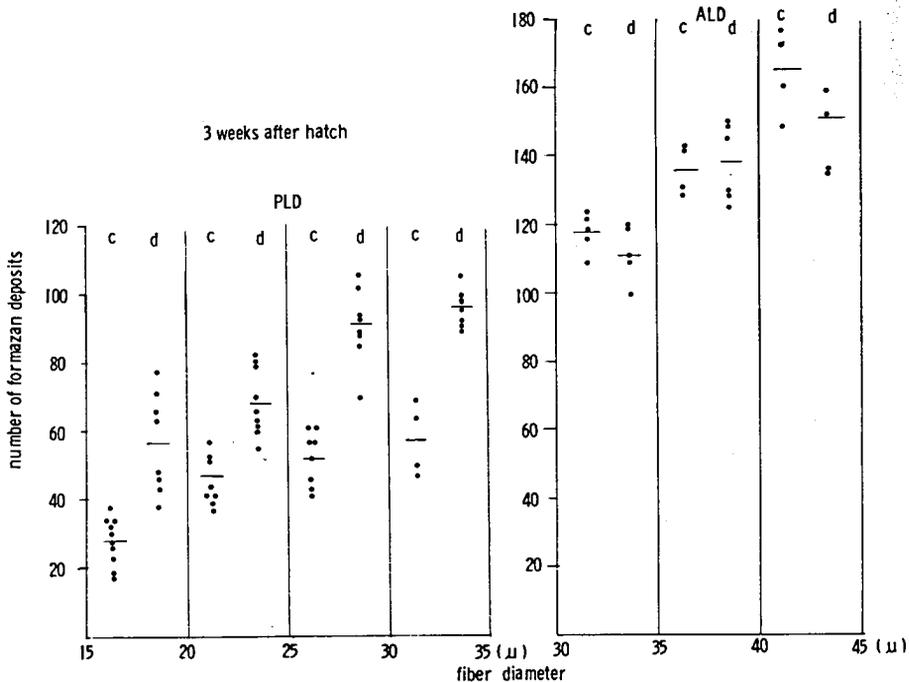


图 5 数量 of formazan deposits (NADH diaphorase)

DPNH fiber で占められ、差異はみとめられなかった。

3) DPNH diaphorase formazan deposits 数の経時的推移

ふ化後、1日目は、PLD筋の low DPNH fiber で、ほぼ同じ fiber diameter あたりの筋線維 1本あたりの formazan deposits 数には、control, dystrophy 筋の間に差をみとめないが、ふ化後1週目より、dystrophy 筋において、その数がやや増加する傾向がみられ(図4)、以後2週目、3週目には差異がより明らかとなった(図5)。一方、ALD筋においては、ふ化後、1日目より、PLD筋とくらべると、control, dystrophy 筋共にその数は多いが、ALD筋のみについては、dystrophy, control筋には差は認められなかった。又PLD筋においては、個々の formazan deposits 数の増加以外にも、dystrophy 筋では、個々の formazan deposit は、1週目以後やや不明瞭となり、筋線維中の配列も不規則となる傾向がみとめられた。

考 察

Dystrophy chicken では、white fiber は red fiber より、筋変性の程度が強く、早期より変化が生じるといわれている²⁾。又 chicken の control 筋では、embryo 時は、SDH 活性等の oxidative enzyme 活性が高く、生後、maturation と共に、しだいに減少するのに反して、dystrophy 筋では、SDH 活性が高いまま持続する傾向があり^{2,3)}、maturation arrest が示唆されている⁴⁾。今回の morphometry の結果からは white fiber である PLD 筋は 3 週目以後に fiber size distribution が増したのに反して、red fiber の ALD 筋にはあまり差を認めず、早期より white fiber に変化が生じやすい事を認めた。又 maturation の異常に関しては、dystrophy 筋の PLD 筋で high DPNH diaphorase fiber があまり減少しな

い事から、同じ結論が考えられた。しかし dystrophic process は embryo から持続しているのか、ふ化後のものかの検討は充分でない。今回、DPNH formazan deposits の数を計測した結果から、ふ化後1日目は正常だが、少なくともふ化後1週目迄の間には、変化があり、dystrophic process の発現は embryo の時期からではない可能性が考えられた。dystrophic process の発現機序に関しては、DPNH diaphorase の局在は主に、mitochondria である事(他 sarco tubular system)より、mitochondria の何らかの早期の異常が dystrophic process に関与している事が考えられる。PLD 筋における high DPNH fiber の高い割合の持続、及び low DPNH fiber における DPNH formazan deposits の数の増加と dystrophic process の関係は明らかではない。

文 献

- 1) Holliday, T. A., Julian, L. M., & Asmundson, V.S.: Muscle growth in selected lines of muscular dystrophic chickens. *Anat. Rec.*, 160: 207—216, 1968.
- 2) Cosmos, E.: Enzymatic activity of differentiating muscle fibers. *Develop. Biol.*, 13: 163—181, 1966.
- 3) Cosmos, E. & Butler, J.: Differentiation of fiber types in muscle of normal and dystrophic chickens. *Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders.* ed. A. T. Milhorat, Excerpta Media Foundation. 197—204, 1967.
- 4) Ashmore, C.R., & Doerr, L.: Oxidative metabolism in skeletal muscle of normal and dystrophic chickens. *Biochem. Med.*, 4: 246—259, 1970.

3) 筋ジストロフィーチキン骨格筋の再生反応

中 村 晴 臣*

研究協力者 頼 田 孝 男* 今 岡 健 次*

進行性筋ジストロフィー症では、筋線維の再生能が問題とされているが、生後約5週目の dystrophy chicken においても、筋線維の再生を示唆する所見が認められることを報告した(中村ほか, 1978)¹⁾。その根拠は、好塩基性筋線維の出現、衛星細胞(SC)の増加及びその筋細胞への分化などがみられたことである。本報告においては、SCの経時的変化に注目し、ジストロフィー筋の再生を検討した。

方 法

Dystrophy chicken (line 413) (以下 Dy チキン) 及び対照チキン (line 412) 夫々18羽を使用した。いずれも3羽ずつ6群に分け、孵化後5日目から40日目まで、7日間隔にて浅胸筋を摘出し、擦りガラス板に貼付して、磷酸緩衝液加2.5% glutaraldehyde (pH7.3) で固定した。その後、四酸化オスミウムによる再固定、あるいは lanthanum 染色 (Revel-Karnovski 法) を加えたのち、型の如く Epon 包埋超薄切片を作り、酢酸ウラニール、鉛塩の二重染色を施して、電顕的検索に供した。

SC核数および筋鞘核数の算定にあたっては、横断切片を低倍率電顕にて観察し、各動物ごとに約200本の筋線維について、これに関与しているSC核数と筋鞘核数とを数え、筋線維100本当りの核数に換算し、各群3匹ずつについての平均値と標準偏差を求めた。各群相互の比較には t-test を用いて検討した。

結 果

1. SC核数と筋鞘核数

筋線維100本当りのSC核数と筋鞘核数は表1の如くで、その平均値の変化を図1に示した。先ずSCについてみると、対照チキンでは、生後5日目以降、いずれも平均値は10以下で、かつ相互の間に有意差はなく、ほぼ一定の値を示している。これに反し、Dyチキンでは19日目以降、いずれも対照群に比し有意

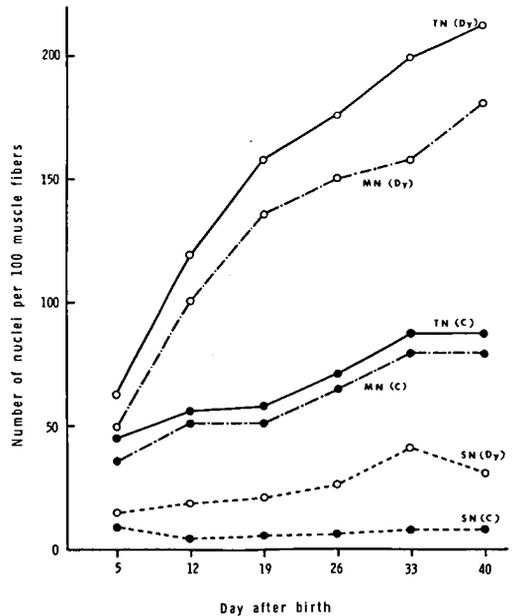


図1 Changes of mean values of satellite cell nuclei (SN), true muscle nuclei (MN) and of the total number (TN) in dystrophic chickens (Dy) and controls (C)

*鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門

表1 Number of nuclei counted within the basement membrane of developing superficial pectoralis muscle. Values are mean±S. D.

Day after birth	Number of nuclei per 100 cross cut muscle fibers					
	Total nuclei		Satellite cell nuclei		Muscle nuclei	
	C	Dy	C	Dy	C	Dy
5	46.2 ± 9.4	63.5 ± 10.2	9.6 ± 3.8	15.0 ± 6.2	36.6 ± 5.6	48.5 ± 5.1
12	56.1 ± 11.8	119.7 ± 6.3 ^{****}	4.4 ± 1.1	18.9 ± 6.4	51.7 ± 10.7	100.8 ± 3.9 ^{**}
19	58.0 ± 8.6	158.1 ± 13.4 ^{****}	6.1 ± 2.2	21.3 ± 2.8 ^{***}	51.9 ± 7.9	136.8 ± 12.4 ^{****}
26	71.2 ± 6.8	176.7 ± 30.0 [*]	6.3 ± 0.1	25.9 ± 7.3 [*]	64.9 ± 6.7	150.8 ± 22.7 ^{**}
33	87.7 ± 6.1	199.5 ± 32.6 [*]	8.2 ± 1.1	41.1 ± 7.7 ^{**}	79.5 ± 5.0	158.4 ± 39.9
40	87.5 ± 9.6	212.1 ± 36.5 [*]	8.5 ± 1.6	30.7 ± 4.1 ^{***}	79.0 ± 8.1	181.4 ± 33.0 [*]

* P < 0.05 ** P < 0.025 *** P < 0.01 **** P < 0.005

表2 Rate of satellite cell per total nuclei (%)

Day	Control	Dystrophy
5	20.3 ± 4.0	23.1 ± 6.5
12	7.8 ± 0.6	15.6 ± 4.7
19	10.5 ± 3.8	13.5 ± 1.7
26	8.9 ± 0.9	14.4 ± 1.9 [*]
33	9.3 ± 0.6	21.4 ± 7.2
40	9.7 ± 1.0	14.6 ± 1.5 ^{**}

Values are mean ± S.D. * P < 0.05, ** P < 0.025

の増加を示し、その平均値も 20 以上となる。

次に、全細胞数に対する SC の占める割合を求めると、表 2 及び図 2 の如くである。即ち、対照チキンでは生後 5 日目には SC が約 20 % を占めるが、その後急速に減少し、26 日目以後は、SC の占める割合は、いずれも平均値が 10 % 以下で、かつその変動も極めて少な

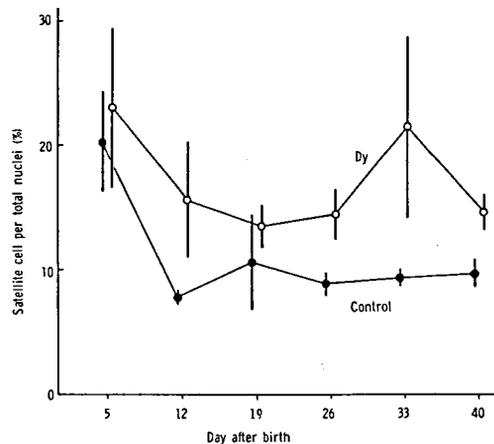


図2 Satellite cell population in total nuclei is significantly high in dystrophic chickens at 26 and 40 days after birth.

い。他方、Dy チキンに於ては、生後 5 日目では SC の割合が約 23 % で、対照との間に差はない。その後 SC の割合は低下するとはいえ、常に 10 % 以上の値を示し、特に 26 日目及び 40 日目の値 (夫々 14.4 ± 1.9 %、14.6 ± 1.5

%) は、対照チキンにおける値に比し、高値を示した (夫々 $p < 0.05$, $p < 0.025$)。

筋鞘核数の変動をみると、対照群では5日目以降、次第に増加の傾向を示すが、33日、40日目ではほぼ plateau に達す。Dy 群においては対照群よりもはるかに著しい増加傾向がみられ、12日目以降は、33日目を除き、いずれも対照群に比し、有意の増加がみられた。また、19日目以後の値はいずれも 100 以上であり、横断面において多核を示す筋線維の存在が明らかである。

SC 核数と筋鞘核数の和も、12日目以降、Dy 群で明らかに増加している。

2. SC の形態的变化

分裂像を呈す SC は、生後5日目では、Dy 群にも対照群にも少なからず認められる。しかし33日目以降では、分裂像は対照群で認められなくなるが、Dy 群ではなお少なからずみられた (図3)。一般に33日目以降の対照群 SC は、紡錘形を呈して細胞質に乏しく、静止状態にある SC の形をとることが多い。し

かし Dy 群では細胞体が腫大し、mitochondria, polysome, 粗面小胞体などの微小器管が増加し、核の円形化や chromatin の淡明化を伴い、active な SC、あるいは myoblast と考えられるものが少なからずみられる。caveolae の増加、横管系の出現などが明瞭にみられる SC や、同一基底膜内に parent fiber と共に数个連続してみられる SC の存在 (図4) は、myotube 形成へ向う分化の方向を示すものと考えられる。また、同一基底膜内に parent fiber、少数の小径線維、myoblast などが同居する状態 (図5) は、筋線維形成への過程を示唆するものである。myoblast、あるいは myotube の一部と考えられる胞体内には、多かれ少なかれ myofilament の束が認められるのであるが、多くの胞体では整然と配列した myofilaments がみられ、その走向の乱れたものは、極めて少数に過ぎない。また明らかに変性に陥ったと考えられる SC は見出しえなかった。

以上述べたような増殖と分化を示す SC

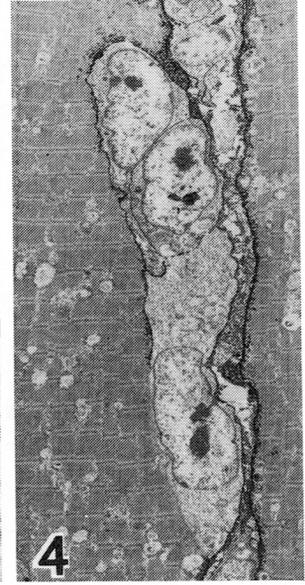
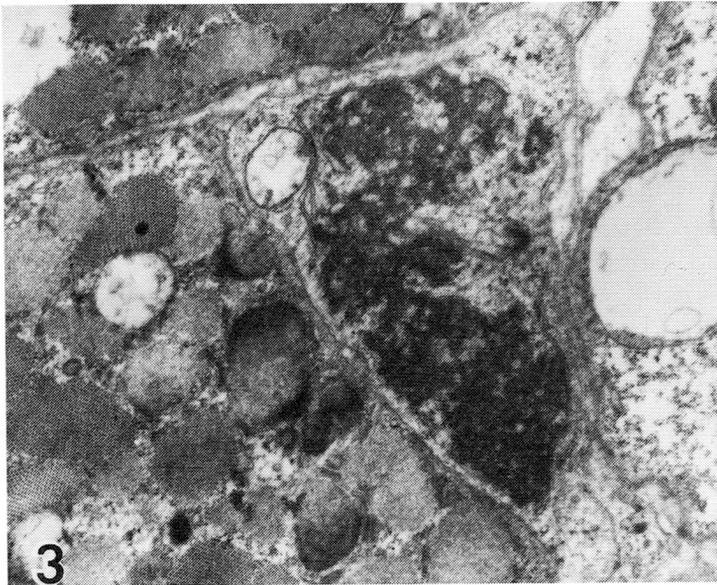


図3 A satellite cell in mitosis. 40-day-old dystrophic chicken. $\times 10,000$.

図4 Three activated satellite cells engulf each other their cytoplasm. 33-day-old dystrophic chicken. Lanthanum Stain $\times 1,700$

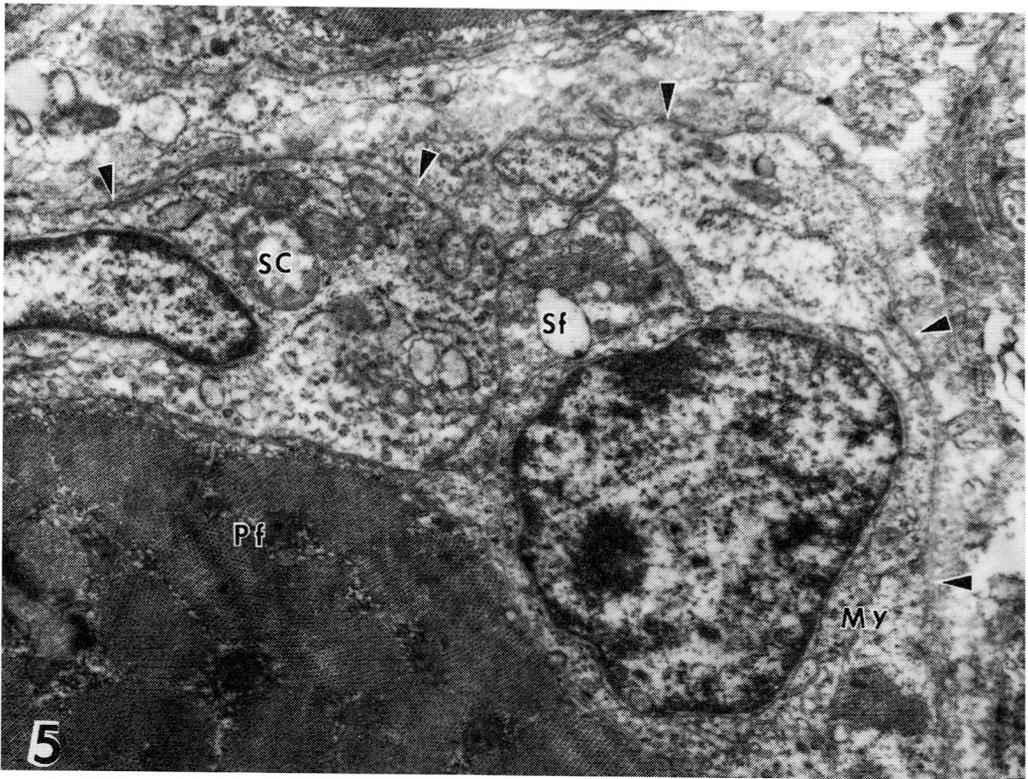


図5 An activated satellite cell (SC) , myotube (My) and small fiber (Sf) are beneath the same basement membrane (arrows) of a parent fiber (Pf). 40-day-old dystrophic chicken. $\times 19,000$

は、大小の空胞をもつ変性筋線維や、変性萎縮に陥った筋線維に接し、それらと同一の基底膜の内に存在する。しかし、それよりも頻回にみられる部位は、正常とみなされる筋線維の基底膜下である。即ち activate された SC は、必ずしも変性筋線維に接して出現するわけではない。

考 察

SC を筋鞘核から区別するには、電顕的検査が不可欠であるため、縦断した筋線維において、一定単位あたりの SC の数を計測することは、大変に困難である³⁾。そのため、筋横断面において、SC 数を算定せざるをえない。今回得られた結果からすれば、筋線維 100 本当たりの SC 数は、Dy チキンで明らかに増加していると言えよう。一般に SC 数に関しては、

基底膜内にみられる全細胞数との割合をもって論じられている。正常動物では出生時、SC は全細胞数の約 1/3 を占めているが、その後比較的速やかに減少して、成熟動物の割合に達するといわれる (Carlson, 1973)¹⁾。成熟動物の SC は、種を問わず、基底膜内の全細胞数の 5~10% を占めるとされる。今回の検索において、対照チキンでえられた SC の割合が、26 日以降約 8~9% であったことは、本検索結果にかなりの確実性を与えるものと解されよう。Dy チキンで SC の割合が、26 日以後もなお全細胞数の約 14% を占め、対照チキンより高値を示したことは、Dy チキンの SC が、高率に分裂、増殖を続けているものと考えられる。SC の分裂像が、33 日以降も Dy チキンに認められたことは、SC 数算定結果を支持するものといえよう。

形態学的にみて明らかに代謝の亢進を示す SC を activated SC と総称すれば、それは myoblast にほぼ一致するものであろう。勿論、SC の定義は myofilament をもたぬことであろうが、myoblast にみられる myofilaments は必ずしも多くはなく、この myofilaments が明確になるのは、myotube 形成後であるとされる (Carlson, 1973)¹⁾。今回観察された activated SC ないし myoblast の態度は、Dy チキンでも正常の分化を示しているものと思われるし、myotube や小径線維内にみられた myofilaments は、大部分のものでほぼ正常の配列を示していた。このことは、Dy チキンにおいて、myotube 形成までの分化過程がほぼ正常に進行するものと考えられる。神経原性因子が関与している dystrophy mouse においては、myofilaments の走行異常が約 50% の myotube で認められている (Summers & Parsons, 1978)⁵⁾。この所見は、Dy チキンが dystrophy mouse と異なる点の一つである。

横紋筋の発育において重要なことは、その線維数が出生時あるいはその直後において決定されており、その後の筋重量増加の 85% は筋線維の肥大による (Enesco & Puddy, 1964)²⁾。これに関与するものの一つは、SC の増殖、分化、myotube 形成、筋線維へのゆ合であり、他は筋線維内での蛋白合成、胞体小器管の増加であろう。対照チキンにみる如く、SC の増殖と分化は、生後約 4~5 週で不活発となるが、Dy チキンでは、なお活発な SC の増殖、分化が認められる。SC が増加しているだけでなく、筋鞘核数も対照に比し著しく増加していることは、activated SC が絶えずゆ合して、筋線維の多核化と肥大が進行しているものと考えられる。通常の傷害筋にみられる筋再生では、壊死に陥った筋線維の基底膜の内側で SC が増殖し、myotube 形成が生ずる。Dy チキンでも、かかる通常の筋再生像はみられるが、そのほかに、形態的に正常とおもわれる筋線維に接してみられる SC の増

殖、myoblast や myotube の形成は、Dy チキンの筋病変を特徴づけるものの一つである。類似の変化は dystrophy mouse にも見出されるもので (Summers & Parsons, 1978)⁵⁾、筋 dystrophy に特有な再生反応というべきものと考えられる。

結 論

Dy チキンの浅胸筋電顕像を、生後 5 日から 40 日に亘って経時的に検討し、対照と比較した結果は、1) 生後 40 日目においても、衛星細胞の増殖と分化が活発であり、その myotube 形成までの分化過程は、ほぼ正常筋と同様である。2) かかる衛星細胞の反応は、変性筋線維の出現部とは無関係に広範囲に認められ、筋ジストロフィーに特有な再生反応と思われる。

文 献

- 1) Carlson, B. M. : The regeneration of skeletal muscle — a review. *Am. J. Anat.*, 137 : 119, 1973.
- 2) Enesco, M. & Puddy, D. : Increase in the number of nuclei and weight in skeletal muscle of rats of various ages. *ibid.*, 114 : 235, 1964.
- 3) Moss, F. P. & Leblond, C. P. : Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat. Rec.*, 170 : 421, 1971.
- 4) 中村晴臣, 頼田孝男, 今岡健次, 埜中征哉 : ジストロフィーチキン骨格筋の経時的变化. 厚生省筋ジストロフィー症研究班昭和 52 年度報告書, 1978, p.95.
- 5) Summers, P. J. & Parsons, R. : Ultrastructural evidence of "abortive" regeneration in murine muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, 39 : 295, 1978.

4) 筋ジストロフィー鶏の骨格筋スキンドファイバー

高木 昭夫*

昨年に引続き、筋ジストロフィー鶏の骨格筋よりスキンドファイバー標本を作製し、筋細胞の機能を分析した。ジストロフィー筋の収縮系や筋小胞体の性質が対照と異なるか否かを重点的に検討した。昨年度は(1)ジストロフィー筋の収縮系のカルシウムイオン(Ca^{2+})による活性化には異常はみとめられない、(2)筋小胞体のCa摂取容量は正常である、の2点を明確にした。しかしジストロフィー筋が、単位断面積当り、正常な張力を発生するかどうかに関しては結論を保留した¹⁾。

方 法

生後12ヶ月以上の成鶏(筋ジス:line413, 対照:line412)の主として後広背筋(PLD)から、一部は浅大胸筋からsingle skinned fiberを作製した。最大張力(P_0)の測定には、サポニン²⁾あるいはEGTA³⁾で処理した化学的スキンドファイバーを使用した。single fiberの断面積の測定は、Blinksの理論に基づき⁴⁾、筋線維を静止長の1.5~2倍に伸長して筋径を計測して概算した。筋小胞体からのCa濾出の測定には、mechanically skinned fiberを使用した。測定法は図2に示してある。実験法の詳細や溶液組成は既法の如くである⁵⁾⁶⁾。

結 果

(1) Ca^{2+} による最大張力、張力を測定したsingle fiberの直径は対照では50~110 μm 、筋ジスでは70~125 μm に分布していた。直径100 μm 以上の筋線維は対照群には4本、筋ジスには12本あった。20℃における単位断面

積当りの最大張力は、

対照 (n=21) $1.4 \pm 0.2^* \text{kg/cm}^2$
(分布 0.7~3.2)

筋ジス (n=21) $1.1 \pm 0.2^* \text{kg/cm}^2$
(分布 0.4~3.2)

(平均・±標準誤差, $P > 0.1$)

であり、両者間に有意の差はみとめない。一部の実験では、クレアチン燐酸とクレアチンキナーゼのATP再生系を添加して張力を測定した。しかし添加された一価イオンのためかむしろ張力は低値を呈した。

(2) Ca^{2+} 摂取速度。白筋の筋小胞体は外液の

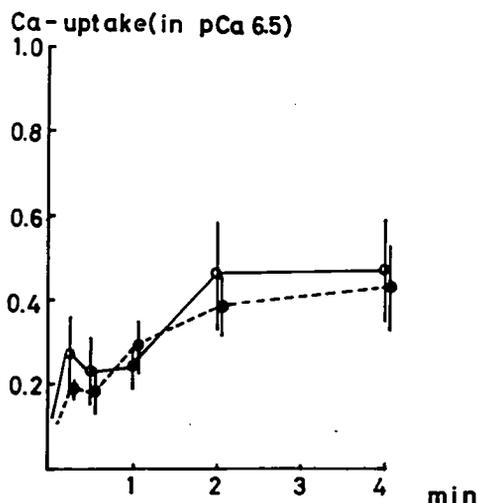


図1 スキンドファイバーを $3 \times 10^{-7} \text{M Ca}^{2+}$ を含む溶液に0.25~4分間接触させ、Ca摂取量をその後のカフェイン拘縮の大きさから測定した。 10^{-6}M Ca^{2+} のもとで2分間に摂取するCa量を1.0としてある。Ca摂取の時間経過は筋ジス(●)と対照(○)の間に差はない。

* 国立武蔵療養所神経センター

Ca²⁺が 10⁻⁷M以上となると Ca 摂取を行う。
 3 × 10⁻⁷M Ca²⁺ (pCa 6.5) の含む溶液中にて Ca 摂取速度を検討した (図 1)。15 秒から 4 分までの Ca 摂取の測定では筋ジスは有意の差を呈さない。

(3) 筋小胞体よりの Ca 濾出。pCa 6 の溶液中で 2 分間スキンドファイバーに Ca を取込ませた後、0.2 mM EGTA, 4 mM ATP 等を含む溶液 (G-0.2) に 5 分間接触させた。その間に外液中に濾出する Ca 量をカフェイン拘縮の大きさから推定した (図 2)。4 mM ATP を含む溶液中での Ca 濾出は (図 3)。

筋ジス 31 ± 4 % (n = 15)
 対 照 8 ± 2 % (n = 15) p < 0.001.

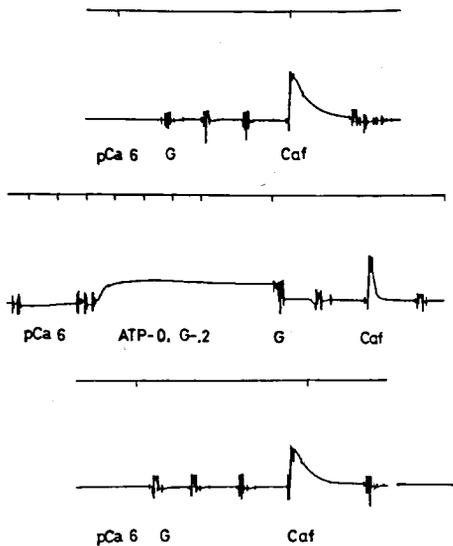


図 2 筋小胞体よりの Ca 濾出の程度の測定法を图示した。まず pCa 6 の溶液中にて 2 分間 Ca 摂取を行わせて後で、0.2 mM EGTA 等を含む溶液 (G-0.2) に 5 分間接触させた (中段の記録、この記録では ATP を除去してあるため rigor が発生している)。その後カフェイン拘縮を発生させ、その拘縮の大きさを上および下段の記録と比較して、Ca 濾出の程度を算出した。

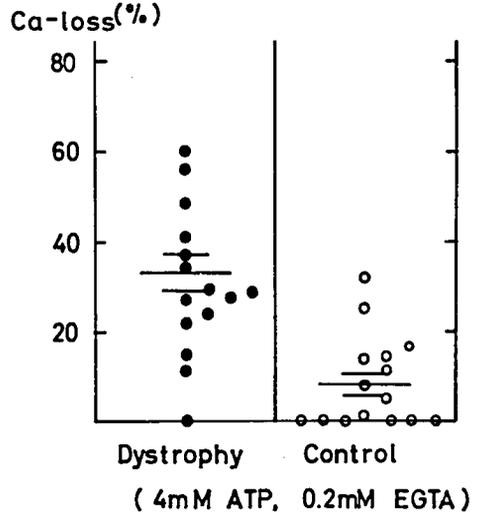


図 3 4 mM ATP, 0.2 mM EGTA 等を含む溶液 (G-0.2) 中で 5 分間に濾出する Ca 量を測定した (図 2 参照)。筋ジスでは対照より Ca 濾出は亢進していた (p < 0.001)。

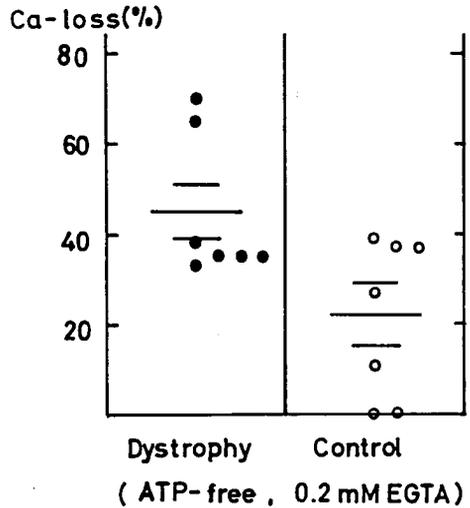


図 4 G-0.2 より ATP を除去した溶液中にて 5 分間に濾出する Ca 量を検討した。この場合も筋ジスにおいて有意に Ca 濾出は亢進していた (p = 0.05)。

ATP を除去した溶液中では (図 4),

筋ジス $45 \pm 6\%$ ($n = 7$)

対 照 $22 \pm 7\%$ ($n = 7$) $p = 0.05$,

筋ジストロフィーではいずれの溶液中においても Ca 濾出は亢進していた。

考 案

筋ジストロフィーの骨格筋は、機能的には筋脱力、組織学的には局所的筋細胞壊死 (segmental necrosis) や筋細胞間質の変化を特徴としている。しかしその生化学的あるいは生物物理的な側面に関する知見は、現時点ではきわめて乏しい。我々は、一見正常にみえる筋ジストロフィーの筋細胞に何か共通して存在する異常があるのか、もし存在するとすれば如何なる性格のものかに興味をもっている。もちろん、スキンドファイバー法は、収縮系や小胞体の機能の解析には適切であるが、筋ジストロフィーの研究上で焦点の 1 つである形質膜の解析には不適切である。

孵化後 1 年以上経過した筋ジス鶏の骨格筋には高度の脂肪化と結合織の増生がある。

single muscle fiber の作製もかなり困難である。後広背筋の方が大胸筋より single fiber の作製はより容易のようであった。分析に使用した single fiber は実体顕微鏡及び位相差顕微鏡下において明らかな損傷 (例えば splitting や局所的くびれ等) のない部分を選んだ。このように肉眼的に正常にみえる single fiber の機能は驚く程よく保持されているといえる。まず前報のごとくトロポニンの Ca 感受性は正常の反応を示した。 $3 \times 10^{-5} \text{M}$ Ca^{2+} により発生する最大張力は対照との間に有意の差を認めない。筋小胞体の Ca 摂取容量は、正常に保持されている。 $3 \times 10^{-7} \text{M}$ Ca^{2+} という比較的低濃度の Ca 中における Ca 摂取速度は対照と同程度である。この事実は従来の分離小胞体による成績とは異なっている。筋ジスの分離小胞体の Ca 摂取速度や容量は、低下ないし増加が報告されている⁷⁸⁾。この差異は充分には説明されない。筋ジスで

は小胞体が分離操作中に変質をうけやすい。

変性あるいは壊死途上の筋線維よりの小胞体は機能が障害されており、分離小胞体全体としてはこの部分の影響をうけてくる。筋ジスの分離小胞体は純度が低く、脂肪細胞や線維芽細胞よりの膜成分を含んでいる。等の理由が考えられる。本研究において観察されたのは、筋小胞体よりの Ca 濾出の亢進である。筋小胞体に Ca^{2+} を負荷後、外液の EGTA 濃度を $2 - 10 \text{mM}$ と上げると対照筋においても Ca 濾出が生ずる。 0.2mM あるいは 2mM EGTA 中での Ca 濾出の程度は、筋ジスにおいて有意に亢進している。この現象は外液中の ATP を除去した場合にもみとめられ、ATP の存在の有無とは無関係である。前述の如く Ca 摂取速度は筋ジスにおいても正常である事実より、筋小胞体の Ca 保持能力の低下を推定させるものと判断している。

最後に 1 ~ 2 の問題点を考察したい。筋小胞体の Ca 保持能力の低下の分子レベルでの機序は如何なるものであろうか。分離筋小胞体をエーテルで処理した際⁹⁾、あるいは実験的ミオパチーのある種のものでは¹⁰⁾、小胞体よりの Ca 濾出の亢進が報告されている。又、小胞体内腔に存在するとされる Ca 結合蛋白 (calsequestrin) の異常の可能性も考慮されるであろう。小胞体膜組成の分析は今後必要と思われる。筋小胞体の Ca 保持能力が低下した場合には、代償的に小胞体の Ca pump は、余分な回転をしいられるであろう。遂には静止筋において細胞質の Ca^{2+} 濃度が、正常の 10^{-8}M 附近よりは若干増加してくるかもしれない。このため μM レベルの Ca^{2+} により調節される細胞内諸機能の変調をきたすであろう。例えば、解糖系やアクトミオシン系の異常な活性化が生ずるかもしれない。静止時に筋小胞体に存在する Ca 量に関する情報は正常筋においても乏しい。しかしジストロフィー筋ではこの Ca 量が減少していることが予想される。単収縮の張力低下は¹¹⁾このためかもしれない。

この筋小胞体よりのCa濾出の亢進は、筋ジストロフィーの成長過程のどの時期より認められるかを決定することが重要であり、現在検討中である。この現象の病因論上の意義に関する手がかりを与えるものと期待している。

結 論

生後1年以上の成鶏でスキンドファイバーを作製し筋ジストロフィーにみられる異常を分析した。実体顕微鏡や位相差顕微鏡下で正常と見える筋線維においては、収縮系のCaイオンによる活性化には異常はない。筋小胞体に関しては、Ca摂取容量や摂取速度に異常はない。筋小胞体よりのCa濾出は外液のATPの存在の有無にかかわらず亢進していた。この現象の機序や意義につき考察した。

文 献

- 1) 高木昭夫：筋ジストロフィー鶏の肥大筋線維。Skinned fiber法による研究。「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」冲中班 昭和52年度研究報告書。p. 119.
- 2) Endo, M. : Effects of some detergents on surface-membrane and sarcoplasmicreticulum of skeletal muscle. *Folia Pharmacol. Jap.* 72 : 9p, 1976.
- 3) Wood, D.S. et al : Human skeletal muscle : Properties of the "chemically skinned" fiber. *Science* 187 : 1075, 1975.
- 4) Blinks, J.R. : Influence of osmotic strength on crosssection and volume of isolated single muscle fibers. *J. Physiol.* 177 : 42, 1965.
- 5) Takagi, A. and Endo, M. : Guinea pig soleus and extensor digitorum longus : a study on single-skinned fibers. *Exper. Neurol.* 55 : 95, 1977.
- 6) Takagi, A. et al : Single-skinned human muscle fibers : activation by calcium and strontium, *Neurology* 28 : 497, 1978.
- 7) Baskin, R. J. : Ultrastructure and calcium transport in dystrophic chicken muscle microsomes. *Lab. Invest.* 23 : 581, 1970.
- 8) Scales, D. et al : The involvement of sarco tubular membrane in genetic muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* 465 : 535, 1977.
- 9) Fiehn, W. and Hasselbach, W : The effect of diethylether upon function of vesicles of sarcoplasmic reticulum. *Europ. J. Biochem.* 9 : 574, 1969.
- 10) Seiler, D. and Kuhn, E. : The properties of sarcoplasmic vesicles from rats with 20,25-diazacholesterol induced myotonia, *Eur. J. Biochem.* 12 : 375, 1970.
- 11) Hoekman, T. B. : Isometric contractile properties of PLD muscle in normal and genetically dystrophic chickens. *Exper. Neurol.* 53 : 729, 1976.

5) 筋ジストロフィーチキンの赤血球, 栓球の細胞化学的研究

宇尾野 公 義*

研究協力者 別 府 宏 園* 八 木 皓 一* 平 野 寛**
西 山 文 朗** 中 島 元 夫***

緒 言

近年進行性筋ジストロフィー症 (DMP) を systemic membrane disease としてとらえる動きがみられ, 筋肉のみならず, 赤血球, 血小板にも共通した膜の異常があり, これによって疾患が成立すると言う観点から多くの報告がなされている¹⁾²⁾³⁾. また, このような観点は, その疾患モデルとされるジストロフィー (Dy) 鶏についても成立することを, 栓球のセロトニン取込の面から追求したのが, 昨年度の我々の報告であった⁴⁾. 今回はその延長として, 特定の糖鎖構造と結合する各種レクチンを利用して, Dy 鶏の血球膜に関する電顕の検索を行った.

材料と方法

Dy 鶏 (413 ライン) 3 羽, 正常対照鶏 (412 ライン) 2 羽を用いた. 1% EDTA 添加緩衝生理食塩水 (PBS) 2 ml をあらかじめ含む注射器で頸静脈より 18 ml の血液を採取し, $400\times G$, 1 分間の遠心操作を反復し, 栓球と赤血球を分離した. Ca^{++} , Mg^{++} free Hanks 液にて洗滌したのち以下の実験を行った.

(i) コンカナバリン A による赤血球凝集活性の比較:

コンカナバリン A (Con A) の PBS 倍数稀釈系列を作製し, これに等量の赤血球浮遊液 ($4\times 10^7/ml$) を加え, ガラス板上で 30 分間, 室温にて密閉, 振盪後, 凝集の有無を以下の規準により判定した. 既ち, (+++) : 粗大な凝集塊の形成を見るもの, (++) : 肉眼的に明らかな凝集形成を見るもの, (+) : 実体顕微鏡下にて凝集形成の明らかなもの, (-) : 全く凝集の認められないもの, の四段階とし, 判定に迷うものはその中間の表示を行った.

(ii) 前固定血球のレクチン結合:

赤血球, 栓球を 2.5% グルタルアルデヒドにて前固定し, PBS で洗滌したのち, フェリチン標識した Con A またはヒマ凝集素 (Ricin communis agglutinin: 以下 RCA と略) と $37^{\circ}C$, 30 分間反応させ, 再び PBS にて洗滌し, 脱水, 包埋, 薄切標本を作製し, 透過電顕にて観察した.

(iii) 未固定血球のレクチン結合:

未固定の赤血球, 栓球を標識レクチンと, $4^{\circ}C$, 30 分間反応させ, Ca^{++} , Mg^{++} free Hanks 液で洗滌したのち, $37^{\circ}C$, 30 分間 incubate し, 2.5% グルタルアルデヒドで前固定, 1% オスミウム酸で後固定を行い, 脱水, 包埋, 薄切標本を作製した.

(iv) 赤血球の二次元展開標本による Con A 結合の観察:

赤血球をフェリチン標識 Con A と反応さ

* 都立府中病院神経内科

** 杏林大学医学部解剖

*** 東京大学薬学部生体異物研

せたのち、洗滌、水面に滴下、空気と水との界面にて破裂、細胞膜部分のみを水表面に二次元展開し、支持膜をはったグリッドにこれを拾い、透過型電顕で細胞膜表面に特異的に附着したフェリチン粒子の分布を観察した⁵⁾。

結 果

(i) Con A による赤血球の凝集活性：

正常鶏の赤血球が 1/4~1/8 mg/ml で凝集を示すのに対し、Dy 鶏では 1~1/2 mg/ml の濃度ではじめて凝集が見られた (表 1)。

(ii) 前固定血球のレクチン結合：

あらかじめグルタルアルデヒドで固定した Dy 鶏及び対照鶏の赤血球におけるフェリチン標識 Con A の結合を図 1 a, b に示す。対照鶏では (1a) フェリチン粒子が豊富に分布し、膜表面から高く伸び出たクラスター形成が観察されるのに対し、Dy 鶏では (1b) フェリチン粒子の分布が疎で、クラスター形成も乏しい。RCA に関しては Dy 鶏と対照との間に差がなく、均等・瀰漫性の結合部位の分布が観察された。

栓球については、Con A, RCA ともに、今回の検索では Dy 鶏と対照の差を見出し得なかった。図 2 a は正常鶏における、前固定栓球の RCA 結合を示す。形質膜表面に豊富なフェリチン粒子の結合が観察される。Dy 鶏においても同様な所見であった。

(iii) 未固定血球のレクチン結合：

未固定赤血球に Con A を反応させると凝

集が起る。正常鶏では特に凝集が顕著で、相接する膜の間には豊富なクラスター形成が認められる (図 3 a)。一方、Dy 鶏では凝集の程度がゆるやかで、クラスターの形成も乏しく (図 3 b)、前記凝集活性の比較結果(i)とよく対応している。RCA については未固定標本でも Dy 鶏と対照鶏の間に差を見出し得なかった。

未固定栓球に 4°C で RCA を反応させたのち 37°C、30 分間 incubate した結果が図 2 b である。細胞内の膜系 (surface connected system 及び dense tubular system) に豊富なフェリチン粒子の分布が見られるが、形質膜表面への結合は前固定標本で見た場合 (図 2 a) よりも、むしろ少なくなっている。これらの所見に関しても、Dy 鶏、対照鶏の間に差はなかった。

(iv) 二次元展開標本における観察：

包埋切片標本の観察で、Con A 結合の分布に関して Dy 鶏と対照の間に顕著な差が見出されたので、この違いをさらに明瞭にとらえたいと言う意図のもとに、二次元展開標本によるフェリチン標識 Con A の結合を観察した。図 4 a が対照鶏、4 b が Dy 鶏の赤血球である。対照鶏ではフェリチン粒子の分布が密で、クラスター形成も豊富であるのに対し、Dy 鶏では、疎な分布を示し、クラスター形成は少なく、包埋切片で細胞断面のみにて観察した結果みられた両者の差異を一層明瞭に裏づけることが出来た。

表 1 Con A による赤血球の凝集活性

Con A (2 mg/ml)	x 1	x $\frac{1}{2}$	x $\frac{1}{4}$	x $\frac{1}{8}$	x $\frac{1}{16}$	x $\frac{1}{32}$	x $\frac{1}{64}$
N ₁	+	++	+++	+	+	±	-
N ₂	++	+++	++	+	±	-	-
RBC (2 × 10 ⁷ /ml)							
D ₁	++	+	+	±	-	-	-
D ₂	+++	++	+	±	-	-	-
D ₃	++	+	±	±	-	-	-

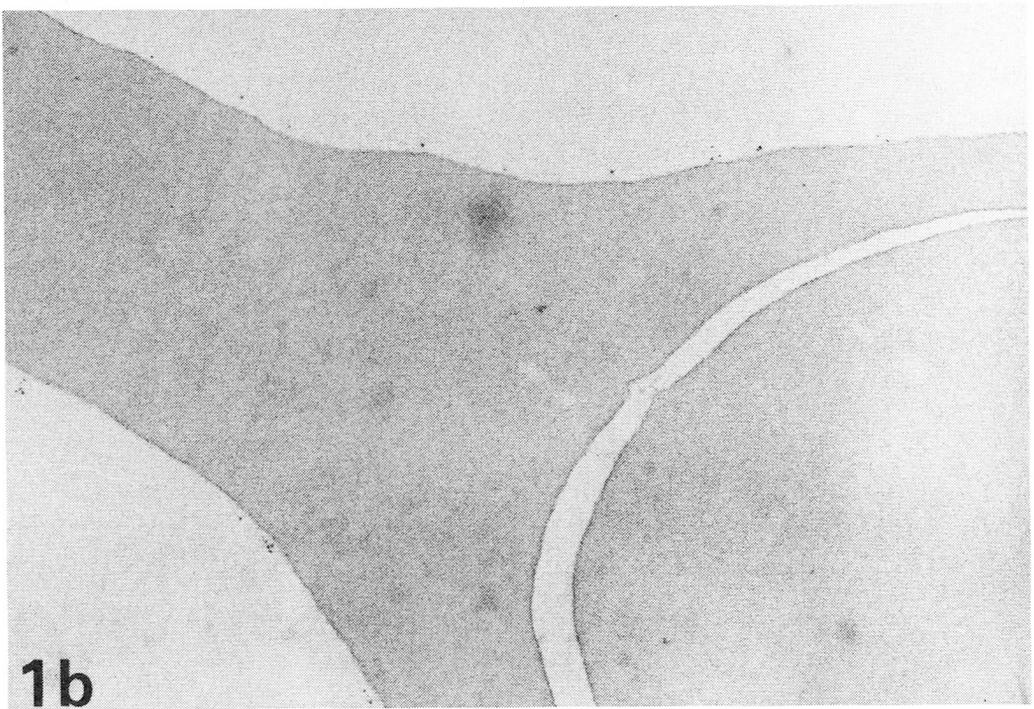
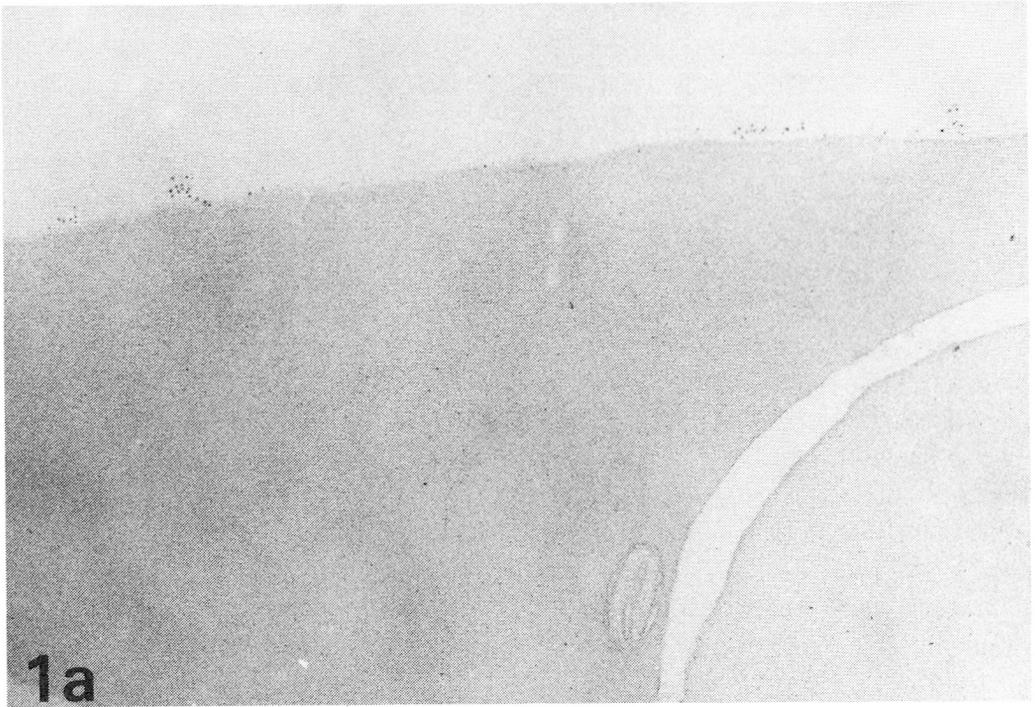


図1 前固定赤血球表面のフェリチン標識 Con A 結合
a : 正常対照鶏 (60,000×)
b : Dy 鶏 (55,000×)

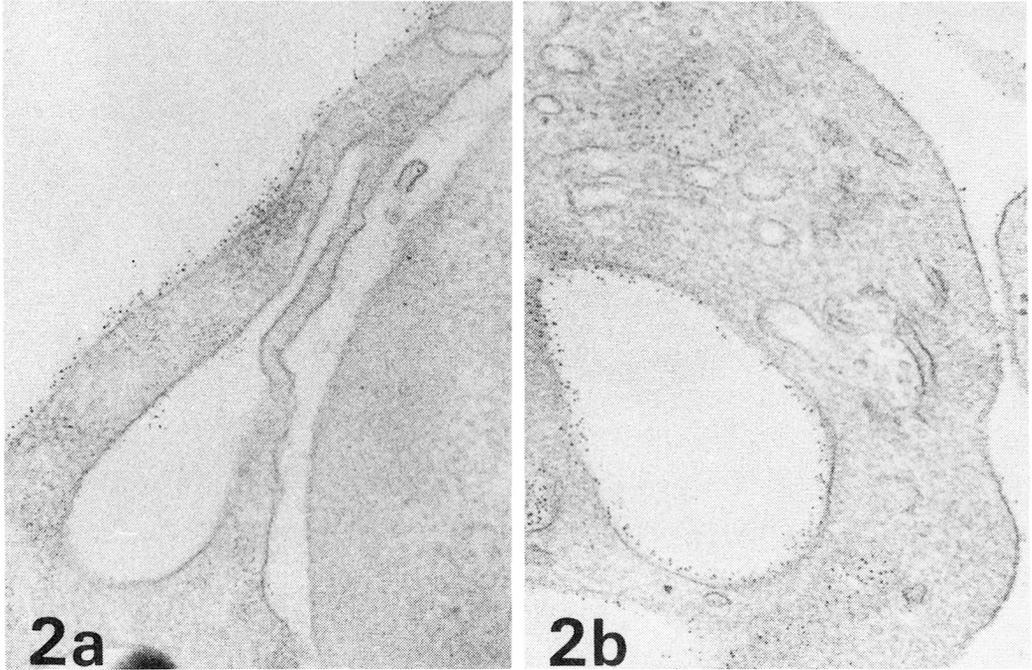


図2 栓球表面のフェリチン標識 RCA 結合

a : 前固定標本 (58,000×)

b : 未固定標本 (60,000×)

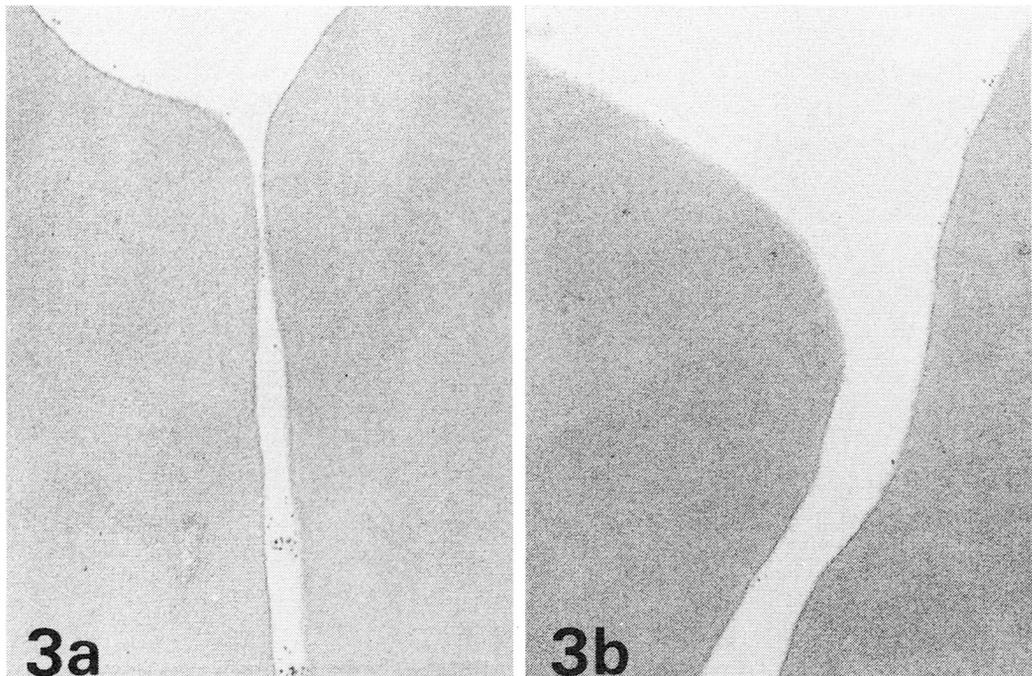


図3 未固定赤血球表面のフェリチン標識 Con A 結合

a : 正常対照鶏 (58,000×)

b : Dy 鶏 (58,000×)

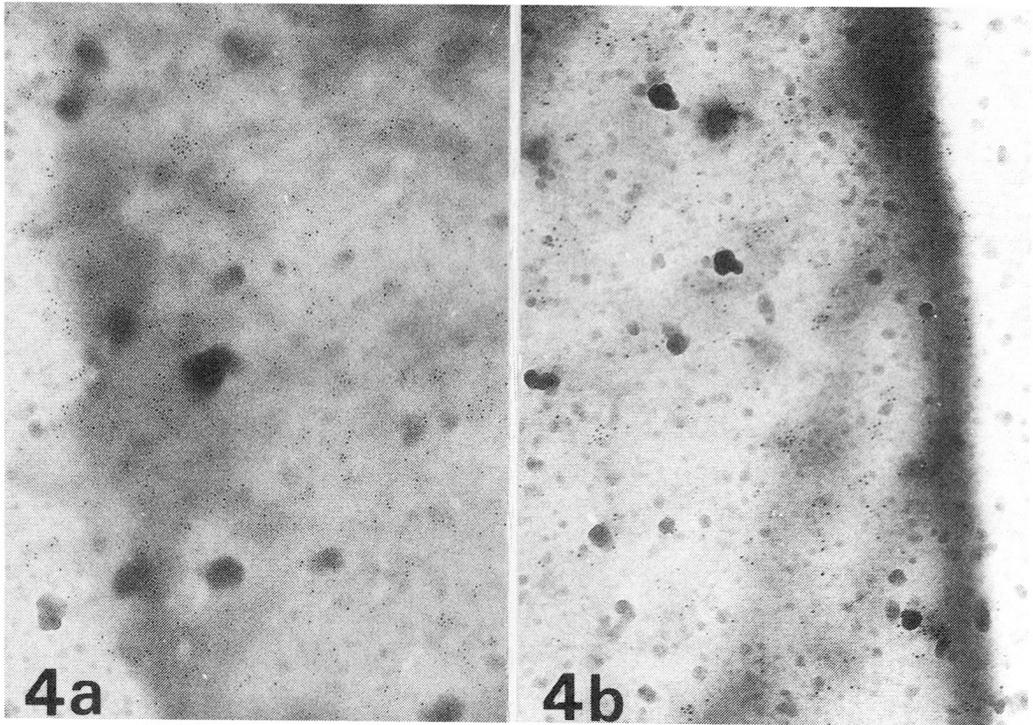


図4 赤血球の二次元展開標本におけるフェリチン標識 Con A の結合

a : 正常対照鶏 (47,000×)

b : Dy 鶏 (57,000×)

図の端にみられるフェリチン粒子の付着していない明るい部分は、支持膜のみの部分を示す。

考 察

生体膜の機能、殊にその糖鎖構造と関連して、各種レクチンを用いた研究により、多くの知見が得られている。我々も、培養筋細胞を用いて、筋の分化、変性などの過程でもたらされるレクチン結合分布の変化を観察し、横紋筋の成熟過程で RCA 結合の著しい減少が見られることを報告した⁶⁾。Bonilla ら⁷⁾は最近 Duchenne 型 DMP の生検筋にペルオキシダーゼ標識 Con A を反応させて、筋線維表面における Con A 結合に関して、正常筋との間に差があると報告している。彼らは6例の Duchenne 型 DMP 生検筋において129の筋線維を観察し、その33%に Con A 結合の異常を見出したと述べている。即ち、ペルオキシダーゼ標識 ConA を反応させた時、正常筋

は筋線維表面(基底膜+形質膜)を連続性に、均一なペルオキシダーゼ反応陽性の層が覆っているのに対し、Dy筋ではこのペルオキシダーゼ陽性層が所々局所的に途切れ、時にはこれに形質膜の中断を伴うと報告している。また、Schotland らは freeze fracture を用いて Duchenne 型 DMP 筋における膜内粒子の減少と分布の不均一を指摘しており⁸⁾、Wakayama らは赤血球に関して同様の所見を観察している⁹⁾。これらの形態学的差異は、機能的な差異を示す他の報告と合わせて、膜レベルの異常が DMP においても疾患の成立に重要な役割をはたしている可能性を示唆していると言えよう。

Con A 結合に関して、Dy 鶏の赤血球が対照のそれと異なることを観察した今回の実験結

果は、先に報告した Dy 鶏栓球におけるセロトニン取込の差⁹⁾と合わせて、Dy 鶏の systemic membrane disease としての側面を強調するとともに、その疾患モデルとしての意義を更に認識させる所見と考えられる。

また、用いた方法の点から更に論ずるならば、今回併用した二次元展開によるフェリチン標識レクチンの結合分布の観察法⁵⁾は、従来の包埋切片法による観察結果を補強する方法として極めてすぐれている。これに推計学的な処理を追加するならば、分布の違いを一層明確にとらえることが可能となろう。

今回は差異を見出し得なかったが、未固定標本を用いた場合の膜の internalization, surface connected system への標識レクチンの取込みなどを比較することにより、Dy と正常者との差を機能・形態の両面から追求する試みも必要と考える。

結 論

Dy 鶏の赤血球と栓球を用い、膜表面のレクチン結合に関する電顕的検索を行い、次の結果を得た。

- (1)一定濃度の Con A に対し、Dy 鶏の赤血球は、対照に比しより低い凝集活性を示した。
- (2)包埋切片標本においては、フェリチン標識 Con A の分布は Dy 鶏赤血球で対照に比し少なく、クラスター形成も乏しい傾向を示した。
- (3)二次元展開標本においても Dy 鶏赤血球の Con A 結合は、対照よりも疎な分布を示した。

文 献

- 1) Fisher, E., et al.: Increased erythrocytic osmotic fragility in pseudohypertrophic muscular dystrophy. *JAMA*. 236 : 955, 1976.
- 2) Murphy, D. L., Mendel, J. R. & Engel, W. K.: Serotonin and platelet function

in Duchenne muscular dystrophy. *Arch. Neurol.*, 28 : 239, 1973.

- 3) 福永秀敏, 堀真一郎, 佐橋功, 宇尾野公義: Duchenne 型筋ジストロフィー症における血小板セロトニンの生化学的組織化学的研究—保因者判定への新しい試み. *臨床神経*, 17 : 316, 1977.
- 4) 宇尾野公義, 別府宏圀, 八木皓一, 山田克浩: ジフトロフィーチキンにおける栓球セロトニンの異常. 厚生省心身障害研究「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」沖中班, 昭和 52 年度研究報告書: 143, 1978.
- 5) Irimura, T., Nakajima, M., Hirano, H. & Osawa, T.: Distribution of ferritin-conjugated lectins on sialidase-treated membranes of human erythrocytes. *Bioch. Biophys. Acta*, 413 : 192, 1975.
- 6) Beppu, H., Uono, M., Nishiyama, F. & Hirano, H.: Changes in number and distribution of lectin-binding sites on cultured muscle cells. *Acta Histochem. Cytochem.*, 10 : 139, 1977.
- 7) Bonilla, E., Schotland, D. L. & Wakayama, Y.: Duchenne dystrophy: focal alterations in the distribution of Concanavalin A binding sites at the muscle cell surface. *Ann. Neurol.*, 4 : 117, 1978.
- 8) Schotland, D. L., Bonilla, E. & VanMeter, P.: Duchenne dystrophy: alteration in muscle plasma membrane structure. *Science*, 196 : 1005, 1977.
- 9) Wakayama, Y., Hodson, A., Pleasure, D. et al: Alteration in erythrocyte membrane structure in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*, 4 : 253, 1978.

6) 筋ジストロフィーチキンに対する protease inhibitor (E-64) の効果——形態学的側面——, 及び筋ジストロフィーチキン骨格筋の組織化学的特徴

埜 中 征 哉^{*}

研究協力者 春 原 経 彦^{*} 石 浦 章 一^{*}

杉 田 秀 夫^{*,**} 高 田 邦 安^{***}

筋ジストロフィーチキン (line 413) はその組織学的特徴より人筋ジストロフィー症に近似のものみなされ、筋ジストロフィー症のよい実験モデルとして使用されている。しかし人、特に Duchenne 型筋ジストロフィー症とは組織学的、組織化学的にかなり異なる点もある。この相違は同じ病因であっても種の違いにより表現に差が出てくるのか、異なる病因によるものかは不明である。

ここではまず筋ジストロフィーチキンの組織学的、組織化学的特徴を簡単に記し、さらに筋プロテアーゼ活性を抑制する E-64 使用後の組織学的所見を記すことにする。

対象及び方法

対象としたのは生後 3 月目の健常チキン (line 412) 10 羽、筋ジストロフィーチキン (line 413) 4 羽、E-64 治療ジストロフィーチキン 9 羽である。E-64 は孵化後 7 日目より週 2 回 10 mg/kg 宛チキンの背部皮下に注射した。主として検索した筋は骨格筋の中で最も侵される浅胸筋で鎖骨直下、胸骨近位部で外表筋膜を含めその直下の部を選んだ。採

取した筋は液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結し、10 μ 切片を作成、H & E, Gomori's trichrome 変法, NADH-TR, PAS, menadione-linked α -glycerophosphate dehydrogenase (MAG), oil-red-O, phosphorylase, nonspecific esterase, acid phosphatase, ATPase (preincubation pH 9.4, 4.6, 4.5, 4.2), Ca 染色 (GBHA, von Kossa, alizarin red) を行ない各群での比較検討を行った。ヒストグラム作成については各例の H & E 染色より最終倍率 500 倍の写真を作成し、400 本の筋線維の直径を計測した。

結 果

1) 筋ジストロフィーチキンの組織学的、組織化学的所見

孵化後 3 月目の筋ジストロフィーチキンの浅胸筋 (白筋) は対照 (line 412) と比べると病変は明らかとなっていた。対照でも筋線維の大小不同はかなりあるが (図 1 A), ジストロフィーチキンではそれがさらに著明で、数多くの肥大線維、壊死線維、筋核の増加が認められた (図 1 B)。壊死線維が貪食細胞の強い浸潤をうけているのは、その浸潤細胞のほとんど全てが酸フォスファターゼ染色で陽性であることから証明された (図 1 C)。

* 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

** 東京大学医学部脳研神経内科

*** 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第二部

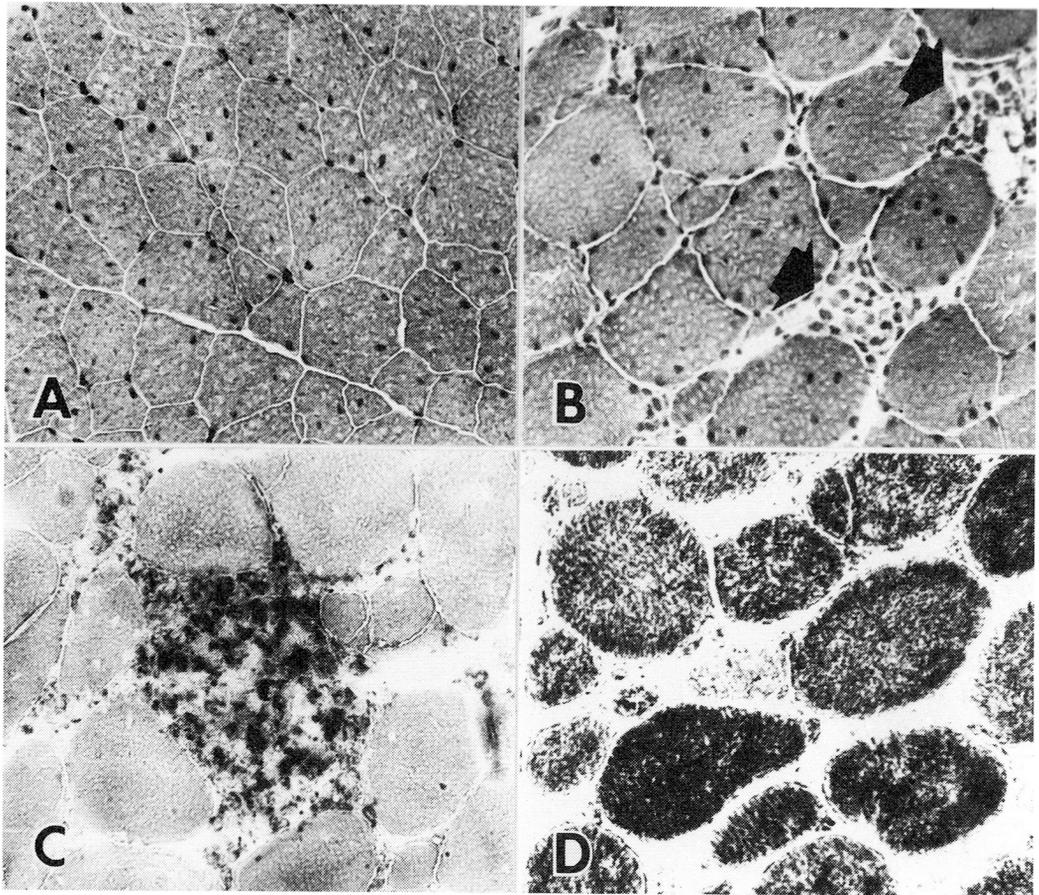


図1 孵化後3月目浅胸筋

対照(A)に比べ筋ジストロフィーチキン(B)では肥大線維が多く、単核細胞の集積した壊死線維(矢印)、筋核の増加がみられる。壊死線維に集積した単核細胞は酸フォスファターゼ強陽性で貪食細胞であることが分る(C)。また筋ジストロフィーチキンではミトコンドリア酸化酵素活性の高い線維が増加する(D)。A, B: H & E, C: acid phosphatase, D: NADH-TR, A ~ D: $\times 350$

人特に Duchenne 型筋ジストロフィーと異なり、H&Eや Gomori's trichrome 変法で濃染する線維 (hyperreactive, dark, opaque, hypercontracted 線維あるいは hyaline 線維とも呼ばれるもの) がチキンでほとんど全くといってよい程みられなかった。塩基性の胞体の中にやや大型の核 (しばしば明らかな核小体が見られる) を有する再生線維は人と同様チキンでもみられた。結合織や脂肪織は孵化後3月目迄はあまり著明でなかった。その

ほか、筋線維内の空胞, ring fiber, fiber splitting などもしばしばみられる所見であった。孵化後3月目の筋ジストロフィーチキンの線維径分布を対照と比較し図2に示した。

組織化学的所見; 対照健全チキンでも浅胸筋は ATPase のアルカリ側で活性が高く、酸性側 (preincubation pH 4.6 以下) で活性が低く、哺乳動物でのタイプ2 A 反応を示し白筋であることが示された。組織化学的に顕著な所見としてミトコンドリア酸化酵素染色

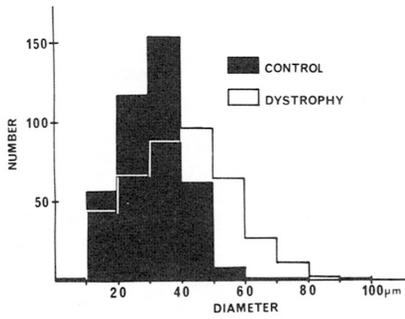


図2 孵化後3月目の健常 (line412) 及び筋ジストロフィーチキン (line413) 浅胸筋の筋線維径ヒストグラム

(NADH-TR) で濃染する線維が多いこと (図1D), PAS染色で濃染する線維が多いこと (図3C), nonspecific esterase など esterase 染色で活性の高い線維が存在し, しばしば angulated の形をした線維が高い活性を示し何らかの神経原性の要因が加味されていることを示唆する所見のあることなどが挙げられる. Ca 染色ではわずかに陽性を示す線維が存在するが, Duchenne 型筋ジストロフィーなどに比べるとはるかに少なく, 反応として弱い結果を得た.

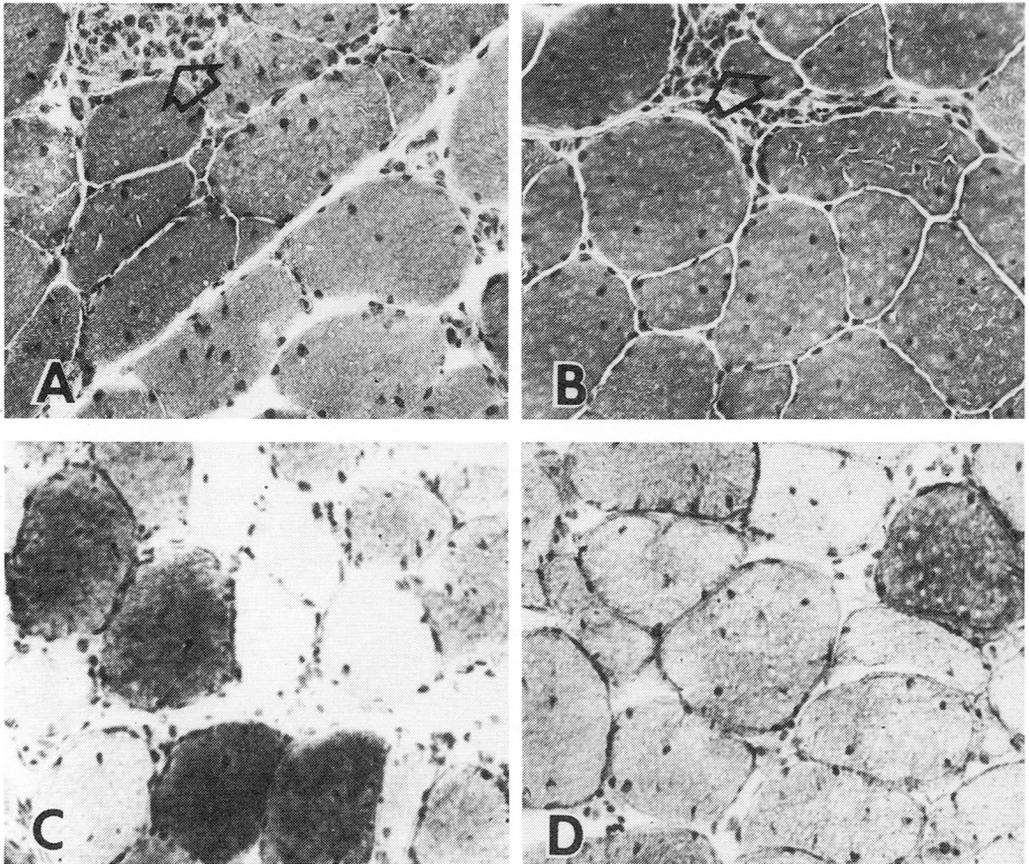


図3 孵化後3月目筋ジストロフィーチキン (A, C) 及びE-64治療後筋ジストロフィーチキン (B, D) の浅胸筋
E-64治療後のものも(B)対照(A)と同じく壊死線維(矢印)が存在しH&E染色では差がない, PAS染色では対照(C)に強陽性の線維が多いが治療後(D)ではそれが減少する傾向にある A~D: ×350

2) E-64 治療後の組織学的, 組織化学的所見

E-64 で治療した筋ジストロフィーチキンは組織学的には一見ほとんど差がなく, やはり肥大筋線維は数多くみられ, 貪食細胞の浸潤をうけている壊死線維は多数存在した (図 3 A, B). また筋核の数, 線維組織, 脂肪織にも差がみられなかった. 組織化学的には NADH-TR, oil-red-O, nonspecific esterase, ATPase などで治療群, 対照群で差は認められなかった. ただ PAS 染色では治療群で PAS に濃染する線維が減少し, 中等度陽性の線維が多い傾向にあった (図 3 C, D).

筋線維の直径を測定しヒストグラムを作成してみると図 4 のようになった. 60 μ 以上の

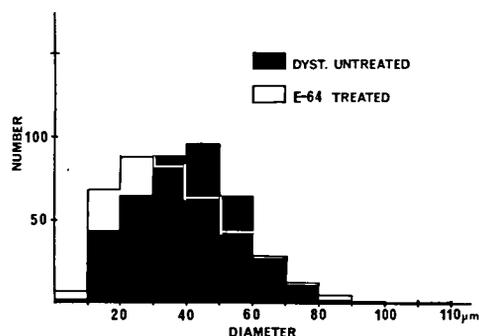


図 4 未処置筋ジストロフィーチキン及び E-64 で 3 月治療後の筋ジストロフィーチキン浅胸筋の筋線維径ヒストグラム

肥大線維の数はむしろ E-64 治療群に多いが, 全体の分布からみると治療群では小径の方に移動し健常チキンの分布へと近づいていることが分かった. 平均直径からみると筋ジストロフィーチキン未治療群では 45.66 ± 2.18 (SD) μ であり, E-64 治療群では 41.51 ± 4.51 (SD) μ となり治療群の方が小径化の傾向にあった ($P < 0.1$).

考 察

筋ジストロフィーチキンは人にかなり近い病理所見がみられ, 実験モデルとしては優れ

たものと思われるが, 人 (特に Duchenne 型) 筋ジストロフィーの所見とはかなり異なる所もあるので, 人筋ジストロフィー症と等価のものとして評価するにはまだ問題がある¹⁾. 筋ジストロフィーチキンではみられず, 人にかなり特異的と思われる所見はいわゆる opaque 線維 (modified Gomori's trichrome 染色で濃染する過収縮をきたしている線維) の存在である. この線維は Duchenne 型に多く筋線維の 1% 以上に及び診断的といっても過言でないが, 他の型 (顔面肩胛上腕型, 肢帯型) には少ない²⁾. この線維は Ca 染色 (GB-HA, von Kossa, alizarin red) で強く陽性に染まることが多い. 筋ジストロフィー症では膜系の異常により Ca の筋線維内への大量流入が起り, 筋線維は過度収縮し, そこに蛋白分解酵素 (例えば Ca 依存性中性プロテアーゼ (CANP)³⁾ など) が働き, Z 線の消失から次に筋原線維の消失をみ, 筋線維は壊死に陥っていくと考えられる⁴⁾. もしこの仮説が正しいとするならば筋ジストロフィーチキンにおける筋線維の変性過程は人とは異なっている可能性も考えられる.

そのほか筋ジストロフィーチキンではミトコンドリア酸化酵素染色 (NADH-TR) で濃染する線維や, PAS 染色で濃染する線維が人筋ジストロフィー症より著しく増加するの異なる点である. さらに esterase 染色 (nonspecific esterase, cholinesterase など) で筋線維の胞体が濃染する線維の多いことは神経原性の要因が加味しているのか⁵⁾, あるいは筋線維内でアセチルコリンエステラーゼの神経筋接合部への regulation が遅れているのか⁶⁾ 何れかの可能性が推定される.

以上のように組織学的, 組織化学的な差が人と筋ジストロフィーチキンの間に多少あっても, 筋ジストロフィーチキンでは CANP の活性が高く³⁾, 蛋白分解酵素が何らかの形で筋変性の過程に関与していることは十分に考えられる. そこで蛋白分解酵素の抑制物質 E-64 を筋ジストロフィーチキンへ投与しての

効果が期待されたが、今回の実験では明らかな病理学的所見の改善の結果は得られなかった。ただ筋線維径のヒストグラムからみると多少線維径が健常対照に近くなってはいたが、これをE-64の効果として評価すべきものか否かは決定し難く思われた。今後投与方法の検討、あるいはE-64以外の物質との併用など試みたいと考えている。

結 語

筋ジストロフィーチキンの組織学的、組織化学的所見を記し、それが人筋ジストロフィー症のそれと異なる点があることを指摘した。その差異は病因的に異なるものがあるためか、同一病因でも種による表現の違いなのかは不明である。蛋白分解酵素の活性を抑制するE-64による治療実験では筋線維径を健常対照にやや近い分布にもっていくが、組織学的、組織化学的に効果ありと判定する所見は今回は得られなかった。

文 献

1) 杉田秀夫, 他: 神経進歩 (印刷中).

- 2) Boxler, K. & Jerusalem, F.: Hyperreactive (hyaline, opaque, dark) muscle fibers in Duchenne dystrophy. *J. Neurol.*, 219: 63-72, 1978.
- 3) 石浦章一, 今堀和友: 筋カルシウム依存性蛋白分解酵素とその抑制物質について. *日本臨床*, 35: 3910-3914, 1977.
- 4) 埜中征哉, 杉田秀夫: 進行性筋ジストロフィー症にみられる“opaque”線維について. 第20回日本神経学会総会, 東京, 1979.
- 5) Engel, W. K.: Integrative histochemical approach to the defect of Duchenne muscular dystrophy, in *Pathogenesis of Human Muscular Dystrophy*, ed. by Rowland, L. P., Excerpta Medica, Amsterdam, 1977, pp. 277-309.
- 6) Patterson, G. T. & Wilson, B. W.: Distribution of extrajunctional acetylcholinesterase in muscle of normal and dystrophic chickens. *Exp. Neurol.*, 50: 214-225, 1976.

7) 筋ジストロフィーチキンに対する protease inhibitor (E-64) の効果——生化学的側面

杉 田 秀 夫^{* **}

研究協力者 石 浦 章 一^{**}

はじめに

デュシャンヌ型筋ジストロフィー症 (DMD) 罹患筋の筋構造蛋白のうち比較的初期から変化が現われるのはトロポニンである。即ちトロポニン亜分画のうち I.C. 分画が減少し T 分画が割に残存し、更に進行するとミオシン H 鎖の splitting が認められる¹⁾。

一方正常ニワトリグリセリン筋に Ca 依存性中性プロテアーゼ (CANP) を加え一定時間反応させた後トロポニン、ミオシンを抽出しゲル電気泳動法で調べてみると本質的に DMD の場合と同じパターンを示す事から我々は DMD に於ても例えば CANP の様なプロテアーゼが構造蛋白の変性に関与しているであろうと想定した。又 *in vitro* で CANP の構造蛋白に対する分解作用はロイペプチン、E-64 によって抑制される事を明らかにした²⁾。

本研究の目的は E-64 をジストロフィーチキン (line 413) に連続投与した場合罹患筋に如何なる影響が生じるかを生化学的に検索する事にある。

対象及び方法

ジストロフィーチキン (line 413) 及びコントロール (line 412) を用いた。投与方法は E-64 が生体内で徐々に吸収されるように corn oil に suspend し 10 mg/kg の割合で、孵

化後 7 日目より週 2 回背部皮下に注射した。未治療群は corn oil のみを注射した。

コントロール、未治療及び治療ジストロフィーチキン群何れも各 10 羽ずつである。注射期間は 3 ヶ月である。

経過中未治療ジストロフィーチキンのうち 6 羽は大腸炎の為死亡した。

臨床的観察にはチキンを背部を下にし床の上におき独力で起き上れるか否かの “flip test” を採用した。

検索項目は屠殺時頸静脈より採取した血液を用い血清 CPK 及び LDH を測定した。

罹患筋の生化学的検索には骨格筋の中で最も高度に侵されている胸筋を用い CANP 活性及び cathepsin D 活性を測定した。

結 果

1) Line 413 の胸筋 CANP 活性の経時変化

未治療 line 413 及びコントロール line 412 の胸筋について CANP 活性の孵化後の経時変化を図 1 に示す。即ち孵化直後の胸筋の CANP 活性は何れも低値を示し両者の間に殆ど差異を認める事は出来ない。しかし 1 ヶ月を過ぎる頃から両群の間には明らかな差が認められ 3 ヶ月後ではコントロールでは 4.5 U/gr に対しジストロフィーチキンでは 9.5 U/gr と約 2 倍に高値を示している事がわかる。

* 東京大学医学部脳研神経内科

** 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

Time Course of CANP Activity

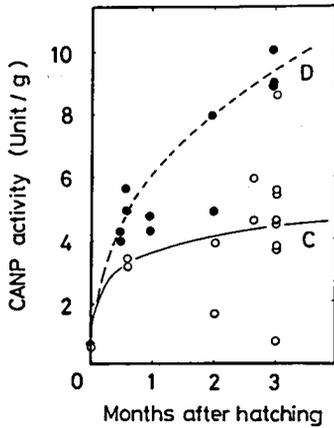


図1 筋ジストロフィーチキン line 413 (D) 及びコントロール line 412 (C) 胸筋 CANP 活性の経時変化
○……line 413 (D)
●……line 412 (C)

2) Line 413 についての E-64 投与群の胸筋 CANP 活性の経時変化

図2は未治療 line 413 と E-64 投与群の胸筋の CANP 活性の経時変化をみたものである。

投与1ヶ月では明瞭な活性の差異は認められないが2ヶ月後には両者に有意の差が出現し、3ヶ月後では未治療群の約60%即ち5.7 U/grに低下を示した。図3は3ヶ月投与後の CANP 活性を比較したものであるが治療群(T)は未治療群(D)に比し平均値は明らかに低下した。

なおT群のうち“flip test”は9羽中7羽80%に於て陰性であり、且つ“flip test”陽性であった2羽は何れも CANP 活性は高い値を示しており“flip test”と CANP 活性との間に相関のある事を示唆している。未治療群(D)は全例、“flip test”は陽性であった。

Time Course of CANP Activity in E-64 treated Dystrophic Chicken

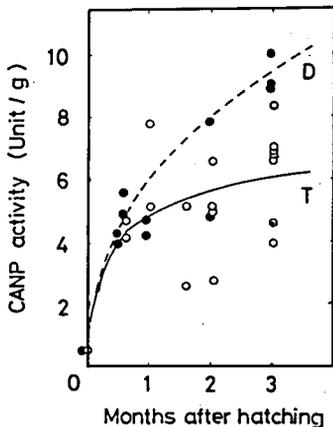


図2 E-64 投与 (T) 群及び未治療 (D) 群胸筋 CANP 活性の経時変化
○……E-64 投与筋ジストロフィーチキン line 413 (T)
●……未治療筋ジストロフィーチキン line 413 (D)

Activity of C A N P

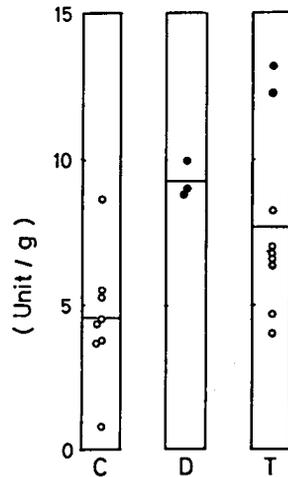


図3 孵化3ヶ月後胸筋の CANP 活性
T: E-64 投与筋ジストロフィーチキン line 413
D: 未治療筋ジストロフィーチキン line 413
C: コントロールチキン line 412
○……“flip test”陰性
●……“flip test”陽性

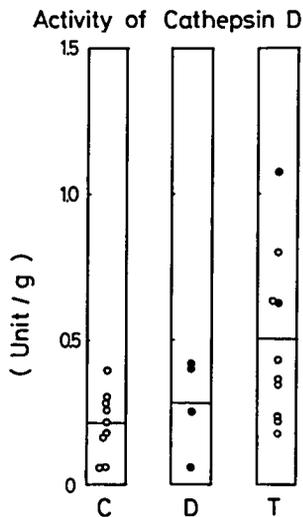


図4 孵化3ヶ月後胸筋の cathepsin D 活性略記号その他図3に同じ

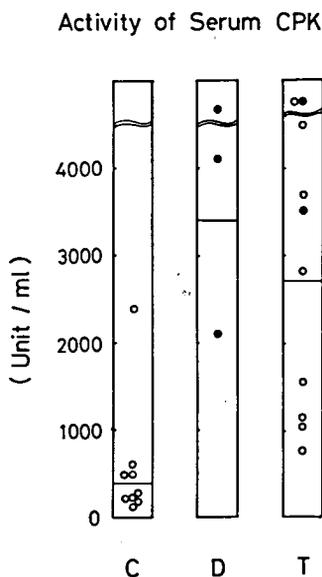


図5 孵化3ヶ月後チキン血清 CPK 活性略記号その他図3に同じ

次にライソゾーム酵素である cathepsin D についてみると line 412 と未治療 line 413 との間に著しい差はなく、E-64 投与 line 413 に於いては値はばらつきが著しく平均値はかえって未治療群より高値を示した。治療群で

も“flip test”陽性の2羽は cathepsin D 活性も特に高い値を示した(図4)。

血清 CPK 活性は line 413 は line 412 より高い値を示すが E-64 投与により統計的に有意の低下を示さなかった(図5)。同様の傾向は血清 LDH についても認められた。

考 案

ジストロフィーチキン line 413 の胸筋の CANP 活性の経時的変化をみるとコントロールの line 412 に比し経過と共に明らかに高値を示しており胸筋の筋蛋白の分解に CANP が関与している事を想定させる。

E-64 は *in vitro* では CANP の骨格筋構造蛋白に対する分解作用を抑制したが *in vivo* に於いても程度抑制する事が明らかになった。

この意味では E-64 は *in vivo* 投与でもその生物学的活性を発揮していると考え事が出来る。しかし血清 CPK, LDH など肉漿酵素活性には全く影響はなにかかる可溶性酵素の増加が人筋ジストロフィー症の場合と同様膜系の異常に起因すると考えるならば E-64 は膜系に対して何ら作用しないと考えられる。Stracher ら⁴⁾はロイペプチンとペプスタチンをジストロフィーチキンの胸筋に直接注射する方法により注射された筋肉の組織学的改善と共に血清 CPK が低下する事を報告しているがこの点我々の E-64 の結果と一致しない。

E-64 により CANP 活性は低下したがライソゾーム酵素である cathepsin D はかえって増加を示した。

この理由については現在明らかではない。

かかる薬剤投与の場合、その効果を判定するのに臨床的テスト即ち“flip test”は極めて重要である。

今回の“flip test”では E-64 投与群は3ヶ月後9羽中7羽は陰性、2羽のみ陽性であった。未治療 line 413 は3ヶ月後100%陽性となるのでこの結果は E-64 が臨床的に有効で

あり進行が遅延している事を想像させる。最近 Hudecki らは“flip test”をスコアで表わす方法を採用しており我々も今後彼等の方法で“flip test”を調べるべきであると考えている³⁾。

E-64 の投与量については全く経験的であり Stracher らのロイペプチンとの比較において今回は 10 mg/kg, 週 2 回法を用いたが、①投与量の増量, ②注射回数をふやす, ③注射期間の延長など今後検索すべき問題を残している。

副作用に関しては初回ないし 2 回目注射直後 2 羽が死亡した以外は認められなかったが勿論内臓諸臓器に対する副作用は慎重に調べる必要があろう。

更に CANP は本来骨格筋に存在しており, 生理的な筋蛋白の turnover に何らかの関与をしていると考えられるので CANP 活性を抑制した場合発育途上の骨格筋の蛋白合成にどのような影響が出るかは重大な問題である。Libby, Goldberg⁵⁾らはジストロフィーマウスを用い *in vitro* の系でロイペプチンは蛋白合成に影響せず分解を抑制すると報告しているが E-64 の場合に蛋白分解がどのような影響をうけるか今後検索する必要がある。

結 語

- ①筋ジストロフィーチキン (line 413) 胸筋の CANP 活性は孵化後経時的に増加し 3 ケ月目にはコントロールの約 2 倍になった。
- ②E-64, 10 mg/kg, 週 2 回背部皮下に連続注射し 3 ケ月目の胸筋の CANP 活性は未治療群の約 60% に低下したがなおコントロールよりは高値であった。

③“flip test”は治療群 9 羽中 7 羽は陰性であった。

④胸筋の cathepsin D は E-64 投与の影響を受けずかえって増加し血清 CPK 及び LDH も不変であった。

文 献

- 1) H. Sugita and Y. Toyokura : Alteration of Troponin Subunits in Progressive Muscular Dystrophy (DMP). I, II. Proceedings of the Japan Academy, 52 : 256—259, 260—263, 1976.
- 2) S. Ebashi and H. Sugita : The Role of Calcium in Physiological and Pathological Processes of Skeletal Muscle. Current Topics in Nerve and Muscle Research, 1979. p. 73—84.
- 3) M. S. Hudecki, C. M. Pollina, A. K. Bhargava, R. S. Hudecki and R. R. Heffner : Delayed Functional Disability in Dystrophic Chickens Receiving Chemotherapy. Muscle & Nerve, 2 : 57—67, 1979.
- 4) A. Stracher, E. B. McGowan and S. A. Shafiq : Muscular Dystrophy : Inhibition of Degeneration *in vivo* with Protease Inhibitors. Science, 200 : 50—51, 1978.
- 5) P. Libby and A. L. Goldberg : Leupeptin, a Protease Inhibitor, Decreases Protein Degradation in Normal and Diseased Muscles. Science, 199 : 534—536, 1978.

8) ジストロフィーマウスに対する growth hormone の効果

木下真男^{*}

研究協力者 山田信興^{*} 里吉菅二郎^{**}

現在、進行性筋ジストロフィー症に対する治療は解明されていない。

我々は、はじめに筋萎縮に対する成長ホルモンの効果に着目し、ジストロフィーマウスに対して、SOMACTON (bovine growth hormone) や、肢帯型ジストロフィー症患者2例、及び筋強直性ジストロフィー症患者2例、計4例に対して、ヒト成長ホルモンを投与してきたが、その間、若干の有効性を示唆する所見を得ている。特に女性肢帯型ジストロフィー症患者では、2年間以上にわたり、ヒト成長ホルモンを試みており、投与の期間中、明らかな症状の進行はみられず、直立時間、歩行時間、上肢水平位保持時間など、主として筋持久力の点で、若干の改善がみられている。又九州労災方式のADL評価では、高さ30cmのものをまたぐ歩行動作、浴そうの出入りをする入浴動作などで、数ポイントのスコアの改善があった。しかし、この結果が、全く偶発的なものか、ヒト成長ホルモンそのものによる効果なのか、明らかでない。この点について、より正確な知識をうるため、成長ホルモンの効果に関する基礎的実験である動物実験を施行している。

実験方法

実験1：

同時期(群によっては、2～5日ずれを

含む)、非発症、大きく雌雄、2群にわけて、各群をさらに4組にわけた。両群とも、各組に、生理的食塩水、SOMACTON 1 IE/kg, 5 IE/kg, 10 IE/kgを連日、皮下注射をし6～8週にわたり体重を観察し、実験終了後にすべてについて筋肉を採取し、組織学的、組織化学的検討を行った。各組とも、16～20匹を使用した。

実験2：

ジストロフィーマウスに対するSOMACTONの影響について実験を施行した。

マウスを4群にわけた。

I群：対照動物群。対照非ジストロフィーマウスに、生理的食塩水を注射。

II群：対照動物 SOMACTON 投与群。非ジストロフィーマウスに、SOMACTON 5 IE/kgを注射。

III群：ジストロフィー対照群。ジストロフィーマウスに、生理的食塩水を注射。

IV群：ジストロフィー SOMACTON 投与群。ジストロフィーマウスに SOMACTON 5 IE/kgを注射。

以上4群について生後50日前後より約5週間にわたり注射を続け、その間の体重の推移を測定した。実験終了後、筋肉を採取して、組織学的、組織化学的検討を行った。

* 東邦大学医学部第四内科

** 国立武蔵療養所神経センター

結 果

1. 体重の変動

実験1：実験終了時の各群の体重の平均は雄は23~26g,雌は16~19gと全体として、雄の方が大きかった。各組の違いでは、実験終了時では、それほど大きな差はないが、生後40~70日の間で、SOMACTON 1 IE/kg, 5 IE/kgに比べて、10 IE/kg注射した方が、やや体重の増加が大きい傾向がえられた。しかし統計学的には、有意な差はなかった。

実験2：第I群においては、飼育期間中、体重が9.5~13.5(平均11.8g)から24gまで、第II群においては、11.3gから22.5gまで、体重の増加を示した。両群とも、開始時に比べて、約200%の増加を示し、両者の間に有意な差はみられなかった。第III群においては、9.5gから11.7gに、第IV群においては、9.5gから11.6gに、増加を示した。それぞれ123%, 125%の増加で、両群の間に有意な差はみられなかった。非ジストロフィーマウス群とジストロフィーマウス群では、明らかに、前者の方が著明に増加を示した。

第III群、第IV群における、個々の体重の変化は、III群においては、3匹中2匹、IV群に

おいては、5匹中4匹で、開始時に比べて体重の増加がみられた。残りは、開始時と体重はかわりなかった。今回の実験では、投与期間が短期間であった事、供給マウス数が少なかったため、体重増が個体差にかくされてしまう可能性が考えられ、今後、供給マウスの増加と、長期間での投与観察が必要のように思われる。

2. 病理所見

実験1において採取した筋肉では、赤染物質の不規則な増加がみられた。しかし、性差及び投与量との間には、有意な差はみられなかった。

実験2において採取した筋肉では、III群、IV群において筋線維の大小不同、構造の著しい変化を認めた。両群の直径を測定してみた所、第III群においては、Type I線維は、 35.5 ± 4.0 ミクロン、Type II線維は 46.2 ± 5.3 ミクロン ($P < 0.05$)、第IV群においては、Type I線維は、 36.6 ± 1.9 ミクロン、Type II線維は、 61.8 ± 2.7 ミクロン ($P < 0.05$) との結果がえられた。SOMACTON 投与により、筋線維の肥大がえられ、特に Type II線維において著明であった。I群、II群において

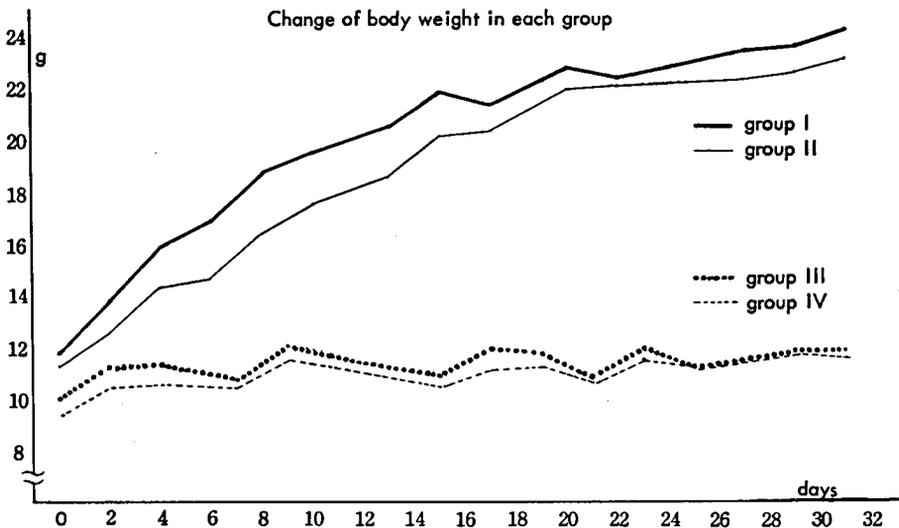


図 4 群間における体重増加の相違

も、同様な所見がえられた。IV群では、動物によって、幾つかの fascicle において、直径が、80~100 ミクロンに達するマウスとしては、著しく大きい筋線維が30~40本密集した部分がみられた。又、各群に、赤染物質の増加した筋線維が、みられたが、SOMACTON 投与によって、やや目立つ傾向がみられた。

結 論

今回の投与量の範囲では、SOMACTON は、非ジストロフィーマウスにおいても、ジストロフィーマウスにおいても、体重曲線に何らの影響を及ぼさなかった。病理学的には、

SOMACTON 投与により、筋線維の肥大傾向がえられたが、病勢の進行に明らかな作用はなかったように思える。臨床的に、女性肢帯型ジストロフィー症において、2年間以上の投与によって、はじめて、わずかであるが、改善がみられた事より考えると、今後、動物実験においては、長期間の観察が必要と思われる。成長ホルモンは、種特異性があることが知られており、その面からも、問題があるが、入手がむずかしい範囲では、同種間の実験は不可能である。筋線維の肥大が臨床上の何らかの利益をうんだか否かは、今回の観察では、明らかでなかった。

9) 筋ジストロフィー動物モデルにおける

神経成長促進因子の研究

(I) 筋ジストロフィーマウスの頸部交感神経節細胞構築の定量的解析

(II) 筋ジストロフィーマウスにおける頸部交感神経節への神経成長促進因子の効果

井村裕夫*

研究協力者 鈴木将夫* 林恭三** 古川昭栄**
大井長和* 西谷裕***

(I) 筋ジストロフィーマウスの頸部交感神経節細胞構築の定量的解析

目的

神経成長促進因子 (nerve growth factor, 以下 NGF と略す) は、ニワトリの胚や幼若マウス、ラット等の知覚及び交感神経節に特異的に働き、その分化・成長を促進する作用をもつ物質である¹⁾。

我々はマウス顎下腺より抽出した NGF 試料を、ニワトリの胚の知覚又は交感神経節の培養液中に混合し、この神経節周囲から伸びる神経線維の密度と長さの度合いで +1 から +5 までの段階に分け、+4 を示すときのサンプル濃度を 1 生物学的活性単位 (1 Biological unit) とし、筋ジストロフィーマウス顎下腺中の NGF 活性を測定すると、発症マウス (homozygous: dy/dy 以下ホモと略す) は発症していないマウス (heterozygous:

dy/+ 以下ヘテロと略す) に比べ、1/10 から 1/1000 と著明に低下していた²⁾。

我々はこの事実に注目して、さらに cytometry により、筋ジストロフィーマウスにおける上頸部交感神経節細胞の変化を検討した。

方法

生后 8 週の C 57 BL/6 J 種ホモ 2 匹 (オス, メス各 1 匹), ヘテロ・オス 2 匹, 対照として C 57 BL 種オス 1 匹を用いた。

摘出した上頸部交感神経節は直ちに 10% 中性ホルマリンで固定し、常法によりパラフィン包埋し、8 μm の連続切片を作成し、1% の cresyl violet で染色し、夫々の切片標本を 400 倍の写真に拡大した。交感神経節の容積は全ての写真よりプランメーターを用いて各切片の断面積を出し、高さ 8 μm の円錐台の集合体として測定した。ついで Carl-Zeiss の particle size analyser により、一つの交感神経節当りの細胞数と全細胞の核直径を実測した。特に一つの交感神経節に含まれる細胞数

* 京都大学医学部第二内科

** 京都大学薬学部生物化学

*** 国立療養所宇多野病院神経内科

については、Hendry の統計的解析法に従い、測定した核数の修正を行った⁹⁾。この方法は、一つ一つの神経細胞の形は様々であるが、一つの神経細胞はほぼ球形とみなされる1個の核を有しており、連続切片では細胞核が大きくなると標本の厚さとの関係から核の一部を二重・三重に overcount しているのを、これ

を修正するための統計的手法である。我々はこれをプログラムに組み、大型コンピューターを用いて実際の計算を行った。

結 果

表1に夫々のマウスの体重、神経節容積、実測及び修正した細胞核数、平均核直径を示

表1 Morphometric analysis of superior cervical ganglia of 8 week old dystrophic and normal mice

		counted				corrected		number / mm ³
		body weight	ganglion volume	neuronal nuclear number	nuclear diameter (um)	neuronal nuclear number	nuclear diameter (um)	
		(g)	(mm ³)					
control	m	24.3	0.131	15548	9.912	7597	9.717±4.598	57990
dy/+	m	20.7	0.083	11309	7.558	6240	7.657±1.973	75180
dy/+	m	17.5	0.080	9050	7.912	5015	8.003±1.871	62690
dy/dy	m	11.2	0.099	11512	8.806	5855	8.893±2.918	59140
dy/dy	f	10.2	0.058	6242	7.619	3413	7.772±1.781	58840

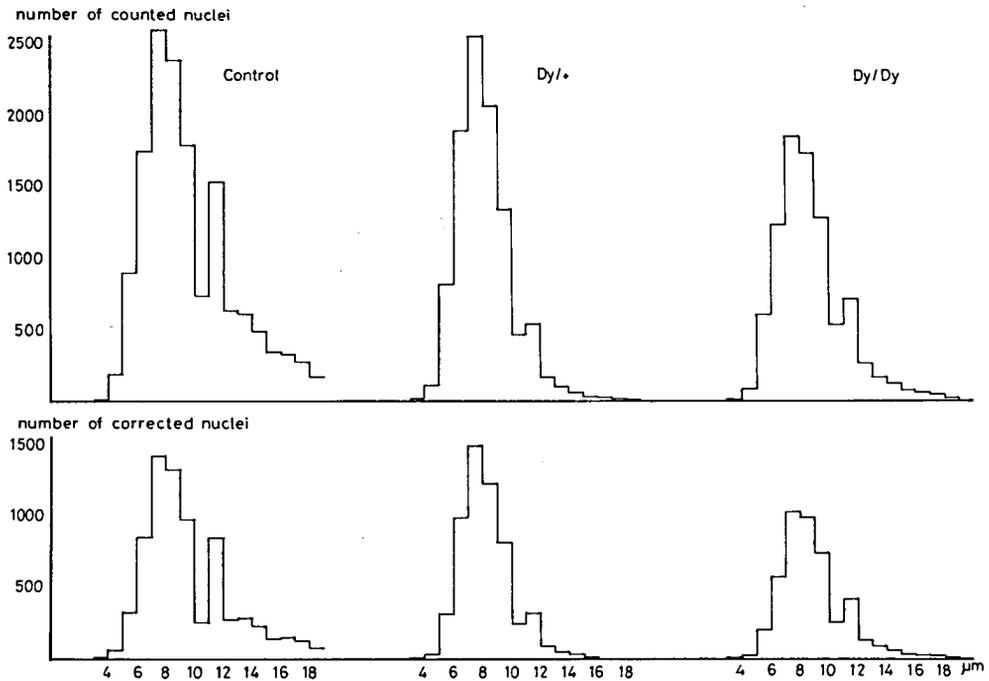


図1 Distribution of diameter of sympathetic ganglial nuclei in dystrophic and normal mice

す。ホモはヘテロ及び対照に比べ、体重は約1/2で、ホモ・メスでは神経節容積、細胞核数の著明な低下をみたが、核直径では大差なく、ホモとヘテロでの有意差はみられない。これを対照と比較すると、細胞核数は18~55% ($P < 0.5$)と著明に低下しているが、核直径では10~20% ($P < 0.1$)の減少に過ぎない。次に核直径のヒストグラムを図1に示す。上段が実測細胞核数、下段が修正細胞核数の分布である。比較を簡明にするためにホモ、ヘテロでは1匹当りの平均分布を示した。この図から、対照に比してホモでは大型及び小型核直径細胞の平均的な減少がみられ、ヘテロでは小型に比して大型核直径細胞の減少がみられた。

考 察

1960年 Levi-Montalcini⁴⁾らは幼若マウスにNGFを投与し、上頸部交感神経節の増大を来すことを報告したが、定性的な内容であった。1975年 Aloe⁵⁾らは幼若ラットを用いて、交感神経節1個当りの細胞数を算定し、NGF投与群は非投与群に比して約2倍の増加を示したと報告した。しかし、1976年 Hendry³⁾は測定細胞核数の統計学的修正を行い、幼若ラットのNGF投与によって細胞核数の増加(20%)より、核直径の増加(50%)に強く作用したと報告している。又、1977年 Banks⁶⁾らは14日齢マウスを用いて、核直径の増加(15%)より、細胞数(neuron density)の増加(50%)に強く作用したと報告している。

我々は筋ジストロフィーマウス顎下腺中のNGFのbioassayの成績から、筋ジストロフィーマウスの発症に交感神経節又はNGFの関与することを作業仮説として本研究を進めた。幼若マウスではNGFが交感神経節の核直径の増大と細胞数の増加をもたらす点からすれば、NGF活性の著しい低下がみられた筋ジストロフィーマウスでは交感神経節の発育阻害がみられることを期待していた訳であ

るが、我々の細胞構築の数量的解析の結果は確かに正常コントロールに比して細胞数及び核直径の減少はある程度はみられたが、本動物モデルの顎下腺におけるNGF活性の著明な低下に対応する程には著しいものではなかった。この点は筋ジストロフィーマウスにおける顎下腺NGF含量が交感神経節にどのように作用するかという根本的な作用機序の精細が不明な段階では、これ以上の推定は困難であり、今後の研究の展開を待ちたい。

これらのことから、交感神経節細胞構築に対してはNGFはその発育段階過程で異なった作用パターンをとる可能性がある。

我々は今後例数をふやすことと、NGF投与の影響や、その他の因子についても検討する予定である。

文 献

- 1) 林恭三, 古川昭栄: 神経成長促進因子の研究—最近の動向—. 生化学 49: 389, 1977.
- 2) Furukawa, S., Nishitani, H., and Hayashi, K.: Level of the nerve growth factor activity in the submaxillary glands of genetically dystrophic mouse (C57BL/6J). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 1202, 1977.
- 3) Hendry, I. A.: A method to correct adequately for the change in neuronal size when estimating neuronal numbers after nerve growth factor treatment. *J. Neurocytology* 5: 337, 1976.
- 4) Levi-Montalcini, R., and Booker, B.: Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 46: 373, 1960.
- 5) Aloe, L., Mugnaini, E., and Levi-Montalcini, R.: Light and electron microscopic studies on the excessive growth of sympathetic ganglia in rats injected

daily from birth 6-OHDA and NGF.
Arch. Ital. Biol. 113 : 326, 1975.

- 6) Banks, B. E. C., and Walter, S. J. : The effects of postganglionic axotomy and nerve growth factor on the superior cervical ganglia of developing mice. J. Neurocytology 6 : 287, 1977.

(II) 筋ジストロフィーマウスにおける頸部交感神経節への神経成長促進因子の効果

目 的

我々は筋ジストロフィーマウスでは顎下腺の神経成長促進因子 (nerve growth factor 以下 NGF と略す) の生物学的活性が発症していないマウス (heterozygous : dy/+ 以下ヘテロと略す) に比し、発症マウス (homozygous : dy/dy 以下ホモと略す) で著明に低下していることを見出した¹⁾。

そこで NGF 投与の筋ジストロフィーマウスへの影響を上頸部交感神経節への作用を中

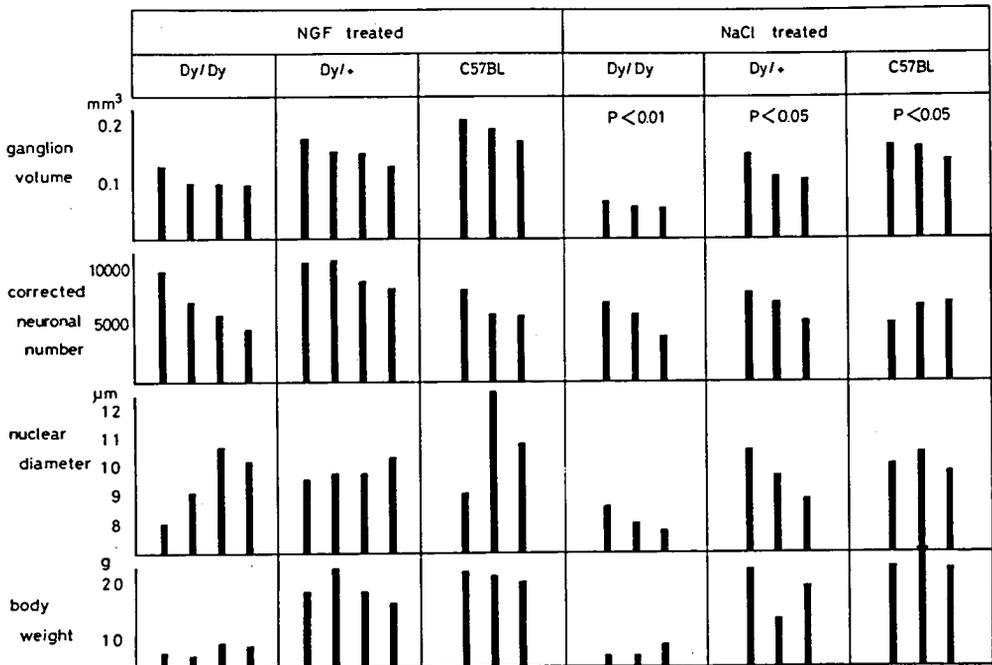
心に検討した。

方 法

4週齢の筋ジストロフィーマウス、ホモ4匹、ヘテロ4匹、C57BLマウス3匹に7 SNGF²⁾20 μ g/g を毎日7日間頸部皮下に注射した。対照として同齢ホモ3匹、ヘテロ3匹、C57BL 3匹に生食を7日間投与した。最終投与より24時間後に上頸部交感神経節を摘出、10%中性ホルマリンで固定し、8 μ m の連続切片を作成、1%の cresyl violet で染色した。夫々の切片標本を400倍の写真に拡大し、Carl-Zeiss の particle size analyser で一つの交感神経節当りの細胞核数と全細胞の核直径を実測した。略球形の核が大きくなると標本の厚さとの関係から重複計測するため、Hendry³⁾の統計的解析法に従い測定した核数を修正した。

結 果

図1に NGF 投与と対照として生食投与の



Each black column represents measured profiles of one mouse.

図1 Morphological changes of superior cervical ganglia after NGF treatment

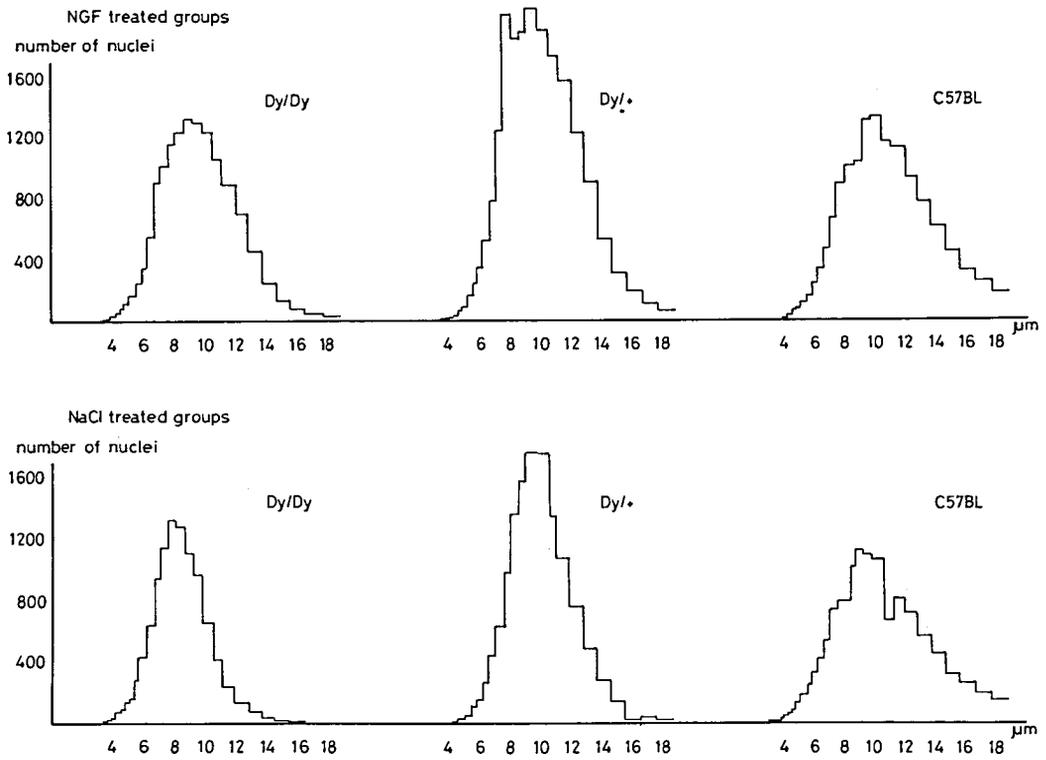


図2 Distribution of counted nuclear diameters in each group

結果を示した。NGF投与で体重の変化はほとんどみられなかった。神経節容積はNGF投与でホモ78% ($P < 0.01$)、ヘテロ28% ($P < 0.05$)、対照24% ($P < 0.05$)と増加した。修正細胞核数はNGF投与で、ホモ23% ($P > 0.5$)、ヘテロ42% ($P < 0.1$)と増加したが、対照では5%の増加にとどまった。修正平均核直径はホモで16% ($P < 0.5$)増加したが、ヘテロ1%、対照7%の増加であった。

図2は測定核直径のヒストグラムである。夫々の群で一部匹数が異なるため1匹当りのヒストグラムとして図示した。NGF投与群で、ホモ、ヘテロ共大型細胞の増加がみられたが、対照ではほとんど変動がみられなかった。

考 察

正常幼若ラットやマウスにNGFを投与すると、上頸部交感神経節の容積や細胞数の増加、細胞の大型化が起ることが知られている³⁴⁾。一方筋ジストロフィーマウスにおいては4週齢、8週齢(前章参照)共、上頸部交感神経節の大型細胞が減少していた。今回のNGF投与実験によって大型細胞が増加し、神経節容積が増大することを観察した。これらの成績は、林らによって示されたホモ顎下腺中のNGF減少と照合すると興味ある所見である。しかし4週齢ではすでにホモマウスは臨床症状が進行しており、NGF投与によってもその症状改善効果は認められなかった。上頸部交感神経節の大型細胞の増加がmaturationと関係しており、この maturati-

on が発病と何らかの関係を持つのであれば、マウスの age によって NGF の影響程度が異なる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Furukawa, S., Nishitani, H., and Hayaishi, K. : Level of the nerve growth factor activity in the submaxillary glands of genetically dystrophic mouse (C57BL/6J). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76 : 1202, 1977.
- 2) Varon, S., Nomura, J., and Shooter, E. M. : The isolation of the mouse nerve growth factor protein in a high molecular weight form. *Biochemistry* 6 : 2202, 1967.
- 3) Hendry, I. A. : A method to correct adequately for the change in neuronal size when estimating neuronal numbers after nerve growth factor treatment. *J. Neurocytology* 5 : 337, 1976.
- 4) Bank, B. E. C., and Walter, S. J. : The effects of postganglionic axotomy and nerve growth factor on the superior cervical ganglia of developing mice. *J. Neurocytology* 6 : 287, 1977.

10) 筋ジストロフィーマウス筋肉中の神経成長 促進因子様免疫交叉性物質レベル

林 恭 三^{*}

研究協力者 古川 昭 栄^{*} 大井 長 和^{**}
井村 裕 夫^{**} 西谷 裕^{***}

神経成長促進因子 (nerve growth factor : NGF) は交感神経節細胞および胎生期の知覚神経節細胞に作用しその分化, 成長, 機能維持に必須の物質であり¹⁾²⁾, すでにいくつかの神経疾患患者血清中の NGF レベルが測定され疾患との関連性が示唆されている³⁾⁴⁾⁵⁾.

通常 NGF 活性はニワトリ胚の知覚神経節の組織培養によって測定される⁶⁾が組織中あるいは血清中の NGF 含量はその測定限界がそれ以下で正確な定量は困難である。そこで著者らは微量定量を目的として種々 NGF の radioimmunoassay 法について検討した。その結果, 血清中には ¹²⁵I-βNGF と強く結合する高分子量物質の存在が明らかとなり, assay 系からこの物質を除去することが必須と考えられた。このため著者らは NGF 特異抗体で被覆したポリスチレンチューブを用いて生体試料中の NGF 量を測定する one-site radioimmunoassay 法を検討し, 生体内の微量の NGF を定量することに成功した。

この方法を用いて筋ジストロフィーマウス後肢骨格筋中の NGF 様免疫交叉性物質 (NGF-like immunoreactivity : NGF-LI) を定量した。その結果, 発症マウスの骨格筋中の NGF レベルは発症していないマウス

のその約 1/2 に低下していることを見出した。

材料と方法

筋ジストロフィーマウス：生後 4 週から 11 週の筋ジストロフィーマウス (C57BL/6J) は実験動物中央研究所から入手した。後肢筋肉に冷却した phosphate buffered saline (PBS) を 25 % W/V となるように加えホモジナイズした。ホモジネートは 3500 rpm で 15 分間遠心し, 上清中の NGF レベルを測定した。

マウス顎下腺 βNGF 抗血清の調製：生後 80 日齢のオスマウス顎下腺より Varon らの方法⁷⁾で精製した 7S NGF を CM-Sephadex G-50 カラムクロマトグラフィーにより各サブユニットに分離し均一な βNGF (βサブユニット) を得た。この βNGF 100 μg を Vaitukaitis ら⁸⁾の方法によりウサギ (ニュージーランドホワイト種) の皮下に等容量の Freund's Complete Adjuvant とともに 3 週間間隔で 4 回投与した。Ouchterlony⁹⁾法により βNGF のみの特異性を確認したのち耳静脈より採血し, 血清を分離した。

βNGF 特異抗体の分離精製：分離した抗 NGF 血清を 33 % 飽和硫酸で塩析した沈殿を 0.05 M リン酸緩衝液で透析した後, CNBr-Sepharose 4 B (7 ml) にマウス顎下

* 京都大学薬学部生物化学講座

** 京都大学医学部第二内科

*** 国立療養所宇多野病院神経内科

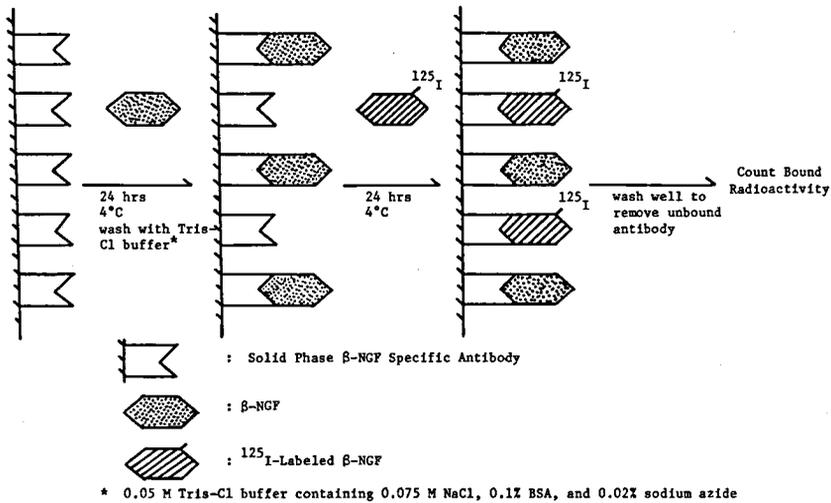


図1 Outline of protocol for one-site radioimmunoassay of β -nerve growth factor (NGF)

腺 7S NGF (10 mg) を結合させた NGF-Sepharose カラムを用い Stoeckel¹⁰⁾らの方法に従い β NGF 特異抗体を精製した。

^{125}I - β NGF の調製: β NGF 10 μg (10 μl), 0.4 M リン酸緩衝液 pH 7.4 (50 μl), ^{125}I -NaI mCi (10 μl) を混合し, クロラミン T 10 μg (10 μl) を加え 30 秒間反応後, Sephadex G-50 カラムにより遊離の ^{125}I を除去した。 ^{125}I - β NGF の比活性は 30~60 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ で, 特異抗体との免疫学的結合は 80% 以上であった。

one-site radioimmunoassay: β NGF の特異抗体を 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 pH 8.5 で 1 μg ~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製し, ポリスチレンチューブに 200 μl ずつ分注する。4°C で一夜放置した後過剰の抗体溶液は回収する。回収した抗体は数回くり返して使用可能である。ついで 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 pH 8.0 (0.075 M 塩化ナトリウム, 0.1% ウシ血清アルブミン, 0.02% アジ化ナトリウム) で 2 回洗浄し, 乾燥後低温で保存する。この特異抗体被覆チューブに測定試料を 200 μl ずつ加え 4°C で 24 時間放置する。試料を除き上記緩衝液で 2 回洗浄する。次に ^{125}I - β NGF を 200 μl (約 20,000 cpm) 加え 4°C で 24

時間放置した後, 同じ緩衝液で 2 回洗浄し, チューブに残った放射活性をダイナボット Auto LOGIC γ カウンターで測定した。図 1 にその模式図を示す。

結 果

正常ヒト血清 320 μl と ^{125}I - β NGF (12, 000 cpm) を混合し, 中性条件下で Sepharose

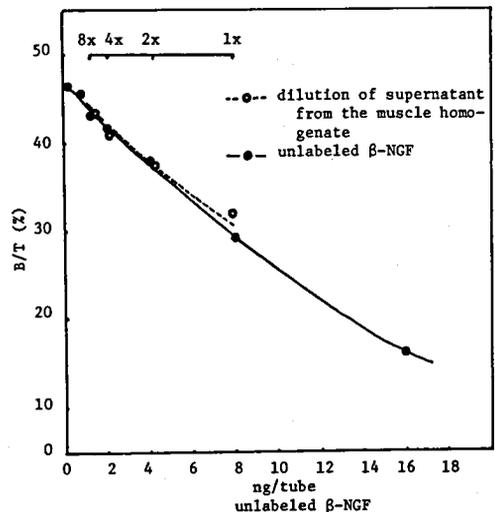


図2 Calibration curve using a varying concentration of unlabeled mouse β -nerve growth factor

CL6B カラムによるゲル濾過を行った結果が図3(実線)である。 $^{125}\text{I}-\beta\text{NGF}$ のみのゲル濾過(破線)では単一のピークが見られたが血清の存在下では高分子量領域にかなりの放射活性が観察された。この結果から血清中に $^{125}\text{I}-\beta\text{NGF}$ と結合する物質が存在するものと考えられた。このような現象は $^{125}\text{I}-\beta\text{NGF}$ の1000倍量の非標識 βNGF 存在下でもみられ、この物質は βNGF と非特異的に結合し、しかも βNGF との結合量の著しく高い物質であると推定される。さらにこの物質と結合した $^{125}\text{I}-\beta\text{NGF}$ は βNGF の特異抗体との抗原抗体反応性が著しく低下することも観察された。これらの結果から、血清あるいは微量の血清が混入した動物組織を試料として radioimmunoassay を行う場合、これらの試料と $^{125}\text{I}-\beta\text{NGF}$ を共存させないことが必須である。著者らの one-site radioimmunoassay 法は図1に示すごとく特異抗体をチューブ表面に吸着、不溶化する方法のため、試料、 $^{125}\text{I}-\beta\text{NGF}$ を順次洗浄後に assay 系に加えることが可能である。

図2は one-site radioimmunoassay 系を用いたときの非標識 βNGF による $^{125}\text{I}-\beta\text{NGF}$ のチューブへの結合阻害をみた標準曲線(実線)で約2 ng/ml まで測定可能である。今回測定したマウス筋肉ホモジネート上清の倍数希釈曲線を破線で示したが βNGF の標準曲線とほぼ同じ阻害勾配を示し、この方法により NGF レベルの定量が可能であることがわかった。

この測定法により3群の週齢の発症マウスおよび発症していないマウス後肢骨格筋中の NGF-LI レベルを測定した結果を図4に示す。顎下腺でみられるような雌雄¹⁾²⁾差は全く認められず、すべての週齢で発症マウス骨格筋中の NGF-LI レベルは発症していないマウスのそれより低い値を示したがその差は若い群ほど大きいことが明らかとなった。すなわち10~11週齢、7~8週齢ではその差は約2倍であったが4~5週齢では4倍以上

であった。

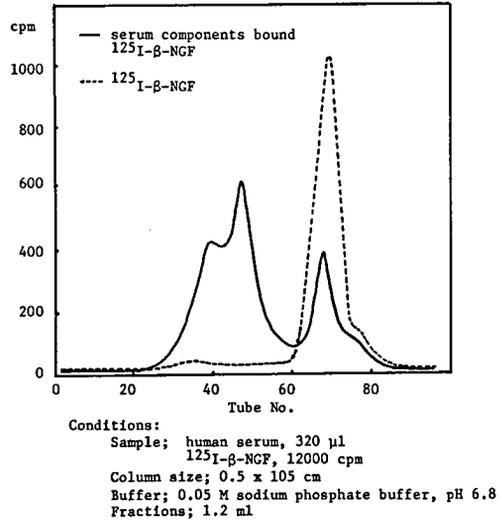


図3 Gel filtration of the incubation mixture of human serum and $^{125}\text{I}-\beta\text{NGF}$ on a column of Sepharose CL 6B

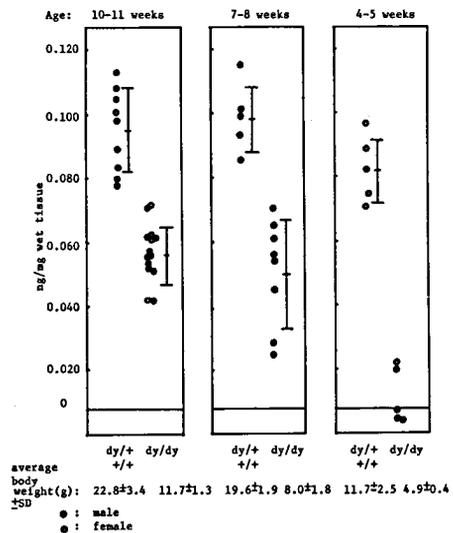


図4 Level of the crossreacting material (s) with β -nerve growth factor in the muscle of dystrophic mouse (C57BL/6J)

考 案

血清中には¹²⁵I-βNGFと結合する高分子量物質が存在し、radioimmunoassay法によってNGF-LIレベルを測定する際の大きな障害となる。

著者らはβNGF特異抗体でポリスチレンチューブを被覆したβNGF特異抗体不溶化チューブを用いることによりこの高分子量物質と¹²⁵I-βNGFの相互作用を抑え、筋肉組織中のNGF-LIの測定に成功した。しかし血清中のNGF-LIレベルは測定感度に問題がありより高感度な測定法の開発とともに血清中に存在するNGFと非特異的に結合する物質との反応性や、さらに血流中のNGFの存在形態を明らかにすることが急務である。

NGFはマウスでは顎下腺に大量に含まれているが他の多くの組織にも微量ながら存在する。Murphy¹¹⁾らは培養ラット骨格筋細胞がマウスβNGFと生物学的、免疫学的にきわめて類似した物質を産生することを報告している。しかし現在のところ、産生されたNGF様物質が筋組織中でのどのような役割を担っているのか明らかではない。今回、筋ジストロフィー発症マウスと発症していないマウスの骨格筋におけるNGF-LIレベルに明確な差が見い出された。発症マウス骨格筋中にはCa依存性中性プロテアーゼ¹²⁾やセリンプロテアーゼの活性の上昇が報告¹³⁾されており、NGF-LIレベルに何らかの影響をおよぼしている可能性も考えられる。しかし発症直後のマウス(4~5週齢)で特にNGF-LIが低いことや、すでに著者らが報告した²¹⁴⁾ように7~8週齢のマウス顎下腺中のNGF活性レベルにも著しい差が見い出されていることなどを考えあわせると、筋ジストロフィー症と骨格筋におけるNGF-LIレベルとの間に何らかの相関性が示唆される。

文 献

1) Levi-Montalcini, R. & Angeletti, P.

U.: Nerve Growth Factor, *Physiol. Rev.*, 48: 534-569 (1968)

- 2) 林恭三, 古川昭栄: 神経成長促進因子——最近の動向——*生化学*, 49: 389-410 (1977)
- 3) Siggers, D. C., Rogers, J. G., Boyer, S. H., Margolet, L., Dorkin, H., Banerjee, S. P. & Shooter, E. M.: Increased Nerve Growth Factor β-chain Cross-Reacting Material in Familial Dysautonomia, *N. Engl. J. Med.*, 295: 629-634 (1976)
- 4) Bigazzi, M., Revoltella, R., Casciano, S. & Vigneti, E.: High Level of a Nerve Growth Factor in the Serum of a Patient with Medullary Carcinoma of the Thyroid Gland, *Clin. Endocrinol.*, 6: 105-112 (1977)
- 5) Fabricant, R. N., Todaro, G. J. & Eldridge, R.: Increased Levels of a Nerve Growth Factor Cross Reacting Protein in "Central" Neurofibromatosis, *Lancet*, i: 4-7 (1979)
- 6) Varon, S., Nomura, J., Perez-Polo, J. R., Shooter, E. M. & Kennedy, J. P. Jr.: The Isolation and Assay of the Nerve Growth Factor Proteins, *Methods of Neurochemistry* (ed. Fried, R.) Vol. III: 203-228, Marcel Dekker, New York (1972)
- 7) Varon, S., Nomura, J. & Shooter, E. M.: The Isolation of the Mouse Nerve Growth Factor Protein in a High Molecular Weight Form *Biochemistry*, 6: 2202-2209 (1967)
- 8) Vaitukaitis, J., Robbins, J. B., Nieslag, & Ross, G. T.: A Method for Producing Specific Antisera with Small Dose of Immunogen, *J. Clin. Endocrinol.*, 33: 988-991 (1971)
- 9) Ouchterlony, O.: Antigen-Antibody

- Reactions in Gels. IV. Types of Reactions in Coordinated Systems of Diffusion, *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl.* 32: 231—246 (1953)
- 10) Stoeckel, K., Gagnon, C., Guroff, G. & Thoenen, H. : Purification of Nerve Growth Factor Antibodies by Affinity Chromatography, *J. Neurochem.*, 26: 1207—1211 (1976)
- 11) Murphy, R. A., Singer, R. H., Saide, J. D., Pantazis, N. J., Blanchard, M. H., Byron, K. S., Arnason, B. G. W. & Young, M. : Synthesis and Secretion of a High Molecular Weight Form of Nerve Growth Factor by Skeletal Muscle Cells in Culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 4496—4500 (1977)
- 12) 今堀和友：細胞内蛋白質分解酵素の新しい役割 (1979) 第20回日本医学会総会 (東京) 講演要旨集, p16
- 13) Katunuma, N., Yasogawa, N., Kito, K., Sanada, Y., Kawai, H. & Miyoshi, K. : Abnormal Expression of a Serine Protease in Human Dystrophic Muscle. *J. Biochem.* 83: 625—628 (1978)
- 14) 古川昭栄, 西谷 裕, 林恭三：筋ジストロフィーマウス顎下腺中の神経成長促進因子 (nerve growth factor) の活性レベル, *医学のあゆみ*, 109: 143—145 (1979)

II. 筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病態生理

- a) 遺 伝
- b) 臨 床
- c) 形 態
- d) 生 理

11) Facioscapulohumeral syndrome: The non-hereditary variety

古川 哲雄*

顔面肩甲上腕 (FSH) 型筋萎縮分布を示す疾患には、進行性筋ジストロフィー症以外にも、神経原性筋萎縮症、多発性筋炎、代謝性筋疾患などが知られており、1症候群を形成する¹⁾。この中には、さらに新しい疾患が含まれている可能性も残されている。

次に記載する症例は、従来の報告とは異なった特徴を有する。

症例 1 27才、女性

胎生期、出産後の発育は正常であったが、18カ月の時、40℃近くの発熱があった。扁桃腺炎の診断をうけ、治療により1週間ほどで解熱した。1ヵ月後、顔がまがっていることに気づかれ、同時に左上下肢の力が弱いことに気づいた。家庭医により、ポリオと左側のBell麻痺との診断をうけた。10才、医師に翼状肩甲を指摘された。15才、大学病院でFSH型筋ジストロフィー症を疑われたが、筋電図では高振幅電位がみられ、左三角筋の生検では特別な変化はみられなかった。19才、左大腿四頭筋生検でもこれという変化が認められなかった。27才、図1のような筋萎縮分布を示し、特に左側に著しい。顔面筋も弱く、兔眼がみられる(図2)。血清CPK値は237(正常<100)。筋電図では、軽度の神経原性の変化を認めた。家族歴はない。

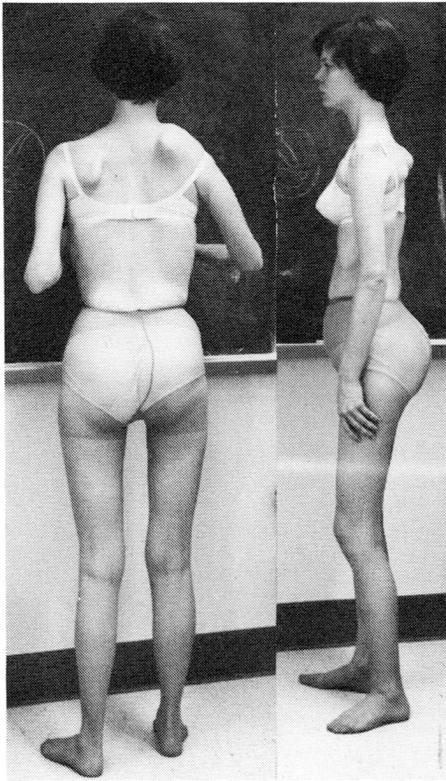


図1 症例1全身



図2 症例1顔面

*日赤医療センター神経内科

症例 2 15才, 女性

生後15ヶ月の時、馬蹄腎を発見され手術を受けた。退院時、立ち上がるのに力が弱いのに気づき、両親は顔面の表情が乏しいことに気づいた。3才、大学病院で顔面筋力低下、尖足、Gowers 徴候陽性を指摘された。筋電図では神経原性変化が疑われたが、右前脛骨筋生検では特別な変化はみられなかった。

以後、顔面筋の筋力低下は徐々に回復し、15才では、わずかに認められる程度である。四肢、軀幹の筋萎縮は jump type を示し、右側の方に強い(図3)。血清CPKは29。家族歴はない。

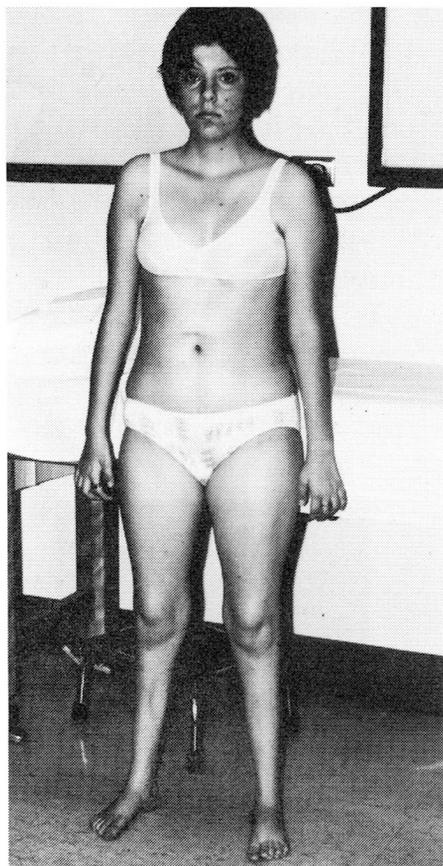


図3 症例2全身

症例 3 49才, 女性

5才1ヵ月の時、高熱、嘔気、嘔吐があり、数日で回復した。2ヶ月後、母親は、彼女が右足をひきずり、背中がまっすぐでないことに気づいた。また、一人で立ち上れず、笑顔が作れなかった。家庭医は“小児麻痺”と診断した。その後、筋力低下はあまり進まなかったが、四肢、軀幹の変形に対し、種々の整形外科的手術を受けた。49才、顔面筋は弱く、両側の兎眼がみられた。口笛がふけない。肩甲、上腕、腰部部、前脛骨筋に著しい萎縮を認めた。血清CPKは40。筋電図では polyphasic unit のみを認めた。家族歴はない。

以上3症例は、いずれも発症がはやく、発熱、あるいは手術後に亜急性に発症し、最初の診断はいずれもポリオとされている。特に初期には、はっきりとした左右差がみられている。その後の進行は、非常にゆっくりで、一部の症状は軽快を示している。家族歴は詳しく調べてもいずれも陰性で、血族結婚もない。

1965年、神林ら²⁾は、3才時、百日咳(?)に罹患後発症した神経原性の顔面、軀幹、四肢近位筋萎縮症を発表しており、この症例は上記の3例と酷似している。さらに発症がはやいと考えられる例には、片側顔面神経麻痺を伴ったFSH型神経原性筋萎縮症の双生児例³⁾があり、これも近縁である可能性がある。HansonとRowland⁴⁾は、Möbius症候群を呈したFSH型筋ジストロフィー症を記載しており、彼らは、発症のはやいこと、左右差の強いこと、進行のおそいこと、家族歴のない点を共通の特徴として強調している。同様の例は、宮崎ら⁵⁾によっても報告されている。

上記の3症例の発症には、初期に何らかの感染が関与している可能性も考えられるが、診察した時点ではそのような所見は得られなかった。これらが、はたして gene-determined の病気でないかどうかは、さらに検討を要するが、とりあえず、FSH syndrome の中の

non-hereditary variety として記載しておきたい。詳細は別に報告した⁶⁾。

文 献

- 1) Furukawa, T. and Peter, J. B. : The muscular dystrophies and related disorders. *J. A. M. A.*, 239 : 1537—1542, 1654—1659, 1978.
- 2) 神林敬一郎, 室根郁男, 白川健一, 近藤喜代太郎, 椿忠雄, 貝津徳男, 古川哲雄, 吉田皆迪 : Facial diplegia syndrome と proximal muscular atrophy を合併した 3 症例. *臨床神経*, 5 : 658, 1965 (抄録).
- 3) 岩本奈津, 高昌星, 小口喜三夫, 柳沢信夫, 塚越広 : 双生児に認められた先天性
- 一側性顔面神経麻痺を伴った顔面肩甲上腕型神経原性筋萎縮症. 第 67 回日本神経学会関東地方会発表. 東京. 1978. 11.25.
- 4) Hanson, P. A. and Rowland, L. P. : Möbius syndrome and facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Arch. Neurol.*, 24 : 31—39, 1971.
- 5) 宮崎真佐男, 俵哲, 寺尾章, 荒木淑郎, 調輝男 : 幼児期より congenital facial diplegia を呈した非定型性顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症の 1 例. *臨床神経*, 16 : 32—38, 1976.
- 6) 古川哲雄 : 神経筋疾患における遺伝学的問題点. *神経進歩*, 1979 (印刷中).

12) 筋萎縮性疾患の遺伝分析

——クーゲルベルグベランダー病 (KW病) について——

古 庄 敏 行^{*}

研究協力者 金 久 禎 秀^{**} 中 島 洋 明^{**}
 納 光 弘^{***} 井 形 昭 弘^{***}

著者らは、昨年の班会議において進行性筋ジストロフィー症¹⁾(Limb-Girdleタイプ)およびその類縁疾患²⁾(Charcot-Marie-Tooth病, 脊髄小脳変性症, 痙性脊髄麻痺, 重症筋無力症, Kugelberg-Welander 病)の6疾患について、家系調査を行い、遺伝分析を試みた結果を報告した。本年度は鹿児島県内発症の Kugelberg-Welander 病 (以下 KW 病と略) をとりあげ、さらに詳細な家系調査を行い、遺伝様式の解析と遺伝子型と環境の相互作用の解明を試みたので報告する。

資 料

1971年1月から1978年10月までの期間に把握した、鹿児島県内のすべてのKW病を発端者として家系調査を行った(32家系, 患者数42名)。KW病の診断にあたっては、臨床症状および臨床経過、血清酵素学的検査、筋電図および可能な限りの筋生検を行い、総合的に判断した。その結果、1)主として近位筋をおかして遠位筋におよび、2)経過は長く予後は良好で、3)筋電図および筋生検所見は主として神経原性変化をしめすなどの条件をみたまものをKW病と定義した。

* 鹿児島大学医学部衛生

** 国立療養所南九州病院神経内科

*** 鹿児島大学医学部第三内科

なお、一般集団の人口は1975年施行の国勢調査による鹿児島県人口とした。

資料の分析

(1)単純遺伝様式の仮説への適合性の検定

本資料収集は、ほぼ単独確認によるので、両親とも正常の家系資料を用い、発端者をも含めた同胞の総数によって表1の如く集計

表1 KW病の分離比の検定
 正常×正常 (いとこ結婚率:12.5%)

同胞群の 大きさS	家系数 Ns	同胞総数 SNs	患者数
2	6	12	8
3	6	18	7
4	7	28	10
5	4	20	4
6	5	30	8
7			
8	1	8	1
9	3	27	4
合 計	N=32	T=133	R=42

$$\text{分離比 } P^* = \frac{R-N}{T-N} = 0.0991$$

$$\text{誤差 } S.E.P^* = \sqrt{\frac{(T-R)(R-N)}{(T-N)^3}} = 0.0297$$

し、分離比 (P^*) および標準誤差 ($S.E_{P^*}$) を推定したところ $P^*=0.0991$, $S.E_{P^*}=0.0297$ が得られた。これは分離比の期待値 0.25 に比べ、著しく低く、その差は統計的有意水準に達し、したがって本仮説に適合しない。

(2)近親婚率

両親とも正常な家系で、いとこ結婚率を求めると 0.125 ± 0.0585 が得られた。これを鹿児島県集団のいとこ結婚率 (約 0.04) に比べると著しく高い。

(3)多因子遺伝の仮説への適合性の検定

一般集団 (1975 年度鹿児島県人口) 中の KW 病の頻度を性別、年齢別に調査したところ、表 2 の如くである。性別、年齢別に KW

病の頻度が著しく異なるが、ここでは必ずしも資料数が充分でないので、これらを無視して、一般集団中の KW 病の頻度 (P_g) を 0.00195~0.00465 % とする。

本資料から同胞再現率 (Q) は 0.1786 ± 0.0512 が得られた。

多因子遺伝仮説への適合性は、 $Q = \sqrt{P_g}$ から推定するが、分析結果は $Q > \sqrt{P_g}$ の関係がみられ、本仮説にも適合しない。

(4)非遺伝性の可能性の確認

資料の KW 病のうち、一部は非遺伝性のもも含まれることも考えられるので、次の 2 つの方法で検討を行った。

表 2 年齢別、性別一般集団中の KW 病の頻度

年 令	男	女	合 計
5—9		2 (0.0029942%)	2 (0.0015269%)
10—14	3 (0.0038489%)	1 (0.0013349%)	4 (0.0026169%)
15—19	4 (0.0056027%)	2 (0.0028654%)	6 (0.0042496%)
20—24	1 (0.0021269%)	1 (0.0016632%)	2 (0.0018667%)
25—29	5 (0.0089844%)	1 (0.0016599%)	6 (0.005177%)
30—34			
35—39	2 (0.0039567%)		2 (0.0018369%)
40—44	1 (0.0016697%)	1 (0.0014792%)	2 (0.0015687%)
45—49			
50—54	3 (0.0065294%)	1 (0.0015767%)	4 (0.0036573%)
合 計	19 (0.00465 ±0.00107)	9 (0.00195 ±0.00065)	28 (0.00322 ±0.00061)

表 3 単発同胞群の観察値と期待値

同胞数	同胞群数	KWが単発した同胞群数(観察数)	KWが単発する同胞群の期待数	
S	Ns	A	B	A-B
2	6	4	5.14	-1.14
3	6	5	3.28	1.72
4	7	4	4.32	-0.32
5	4	4	4.05	-0.05
6	5	3	2.19	0.81
	28	20	18.98	1.02

(a)単発同胞群について

KW病が単発した同胞群数とその期待数の比較を行ったものである。KW病がすべて単一劣性遺伝子によると仮定して、KW病を生む確率を $p=1/4$ 、正常者を生む確率を $q=3/4$ とすれば、ヘテロ同士の結婚でS人の子のうちKW病を1人もださなかった家系の頻度 q^s 、1人だけKW病である家系の頻度 Spq^{s-1} 、KW病を1人も生まなかった結婚は含まれないから、これを除いた $1-q^s$ だけ発見され、そのうち Spq^{s-1} 家系がKW病の単発する確率になる。したがって、いまS人の同胞のうちKW病を少なくとも1人出した同胞群数を N_s とすると、KW病を1人しか含まない同胞群の期待数は、 $N_s Spq^{s-1} / 1 - q^s$ であたえられる。

本資料について分析した結果、表3の如く、KW病が単発した同胞群数(A)とKW病が単発する同胞群の期待数(B)との差は著しく小さいが、数字の上ではAがBより大きい

値が得られた。

(b)親の年令効果

一般に遺伝性疾患あるいは先天性異常の出現に出生時の親の年令効果がみられる場合がある。KW病についてもこの点を検討するため出生時の親の年令別に頻度を求めたところ、表4の如き結果を得た。調査資料が少ないためか分布の変動が大きく、決定的なことはいえないが数字の上からは出生時の親の年令が若年層の方に多い傾向がみられる。

(5)発病年令分布

遺伝的異質性のものが混入するため、分離比や同胞再現率を乱していることも考えられるので、発病年令を検討し異質性の検定を行った。すなわち図1で示したように、KW病のほとんどは20才頃までに発病するが、その後も発病し、若年令層群と高年令層群が存在するようでもあるが、資料が必ずしも多くないのでこの点ははっきりしない。

表4 出生時の親の年令分布

(正×正)

出生時		母 年 令						計	
		15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44		45-49
父 年 令	15-19	$\frac{0}{1}=0.000$						$\frac{0}{1}=0.000$	} $\frac{2}{5}=0.400$
	20-24	$\frac{1}{1}=1.000$	$\frac{1}{3}=0.333$					$\frac{2}{4}=0.500$	
	25-29	$\frac{0}{4}=0.000$	$\frac{7}{16}=0.438$	$\frac{5}{10}=0.500$				$\frac{12}{30}=0.400$	} $\frac{21}{64}=0.328$
	30-34	$\frac{1}{3}=0.333$	$\frac{4}{9}=0.444$	$\frac{3}{16}=0.188$	$\frac{1}{6}=0.167$			$\frac{9}{34}=0.265$	
	35-39		$\frac{1}{5}=0.200$	$\frac{2}{6}=0.333$	$\frac{1}{7}=0.143$	$\frac{2}{5}=0.400$		$\frac{6}{23}=0.261$	} $\frac{7}{27}=0.259$
	40-44				$\frac{0}{1}=0.000$	$\frac{1}{3}=0.333$		$\frac{1}{4}=0.250$	
	45-49				$\frac{1}{1}=1.000$		$\frac{1}{3}=0.333$	$\frac{0}{1}=0.000$	$\frac{2}{5}=0.400$
50-							$\frac{0}{1}=0.000$	$\frac{0}{1}=0.000$	
計		$\frac{2}{9}=0.222$	$\frac{13}{33}=0.394$	$\frac{10}{32}=0.313$	$\frac{3}{15}=0.200$	$\frac{3}{8}=0.375$	$\frac{1}{3}=0.333$	$\frac{0}{2}=0.000$	$\frac{32}{102}=0.314$
		$\frac{15}{42}=0.357$		$\frac{13}{47}=0.277$			$\frac{4}{13}=0.308$		

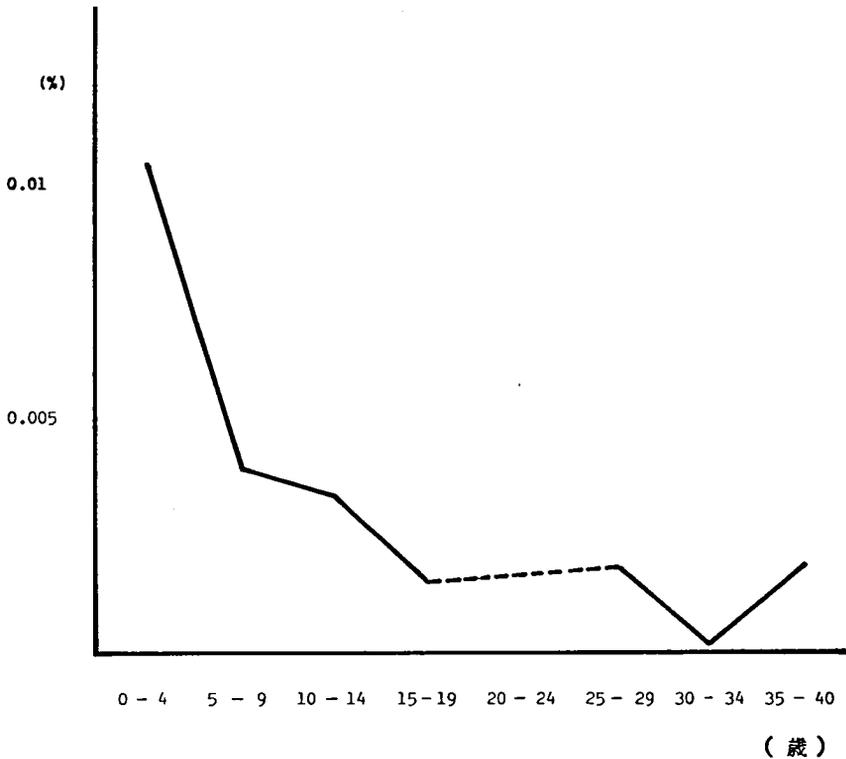


図1 KW病者の発病年齢分布

考察およびまとめ

KW病が遺伝性疾患であることはすでに述べた如く、(1)同胞再現率および同胞罹病率が一般集団の頻度に比べて著しく高いこと、(2)KW病の両親が共に正常の組合せのいとこ結婚率が一般集団のいとこ結婚率に比べて著しく高いことなどから疑いない事実と思われる。昨年来、本病の遺伝機構の解析を試みてきたが、単一遺伝子仮説および多因子仮説のいずれにも統計的に適合しなかった。しかし、本病のいとこ結婚率が一般集団のそれに比べて著しく高いことから劣性遺伝形式をとることが予想されないではない。人の遺伝形質は血液型を除き多くは不完全浸透する場合が多い。もし本病が単一劣性遺伝で不完全浸透をすると仮定すれば、浸透率は $0.0991/0.25=0.3964$ である。しかし、浸透率が0.7よ

り小さい場合は単一遺伝仮説に問題があることはよく知られている。今後、調査例数を増して、遺伝的異質性、非遺伝性など充分考慮して分析する必要がある。

文 献

- 1) 古庄敏行, 福山幸夫, 大沢真木子, 小川加代子, 塚本明子, 近藤喜代太郎: 先天型進行性筋ジストロフィー症の遺伝的分析. 冲中班「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」昭和51年度研究報告書91-94, 1977.
- 2) 古庄敏行, 納光弘, 井形昭弘: 筋萎縮性疾患の遺伝分析. 冲中班「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」昭和52年度研究報告書197-200, 1978.

13) 先天性ネマリンミオパチーの遺伝機構補遺

近藤 喜代太郎*

本症(CNMとする)の臨床像は均一で大量のネマリン小体によって特徴づけられているが、遺伝的には異種性といわれる。しかし私共は計35同胞群を分析し、つぎの結果を得、当班の前身である「沖中班」昭和52年度班会議で報告した；1)CNMには幼児期の死亡例が多いが、のちに安全となり、子をもつ患者もある、2)無症状の近親者にネマリン小体をもつものがある、3)染色体異常、単劣性、伴性劣性は否定できる、4)単優性を仮定し、1)に伴う淘汰の様相と2)による遺伝子の伝達、集団内保有への影響に配慮すれば、CNMの家族性発生をほぼ説明できる²⁾。

今回の報告の目的は、その後の資料を加えてこれらを再検討し、CNMがもし単一疾患であればいかなる遺伝機構をもつかをより確実に推定することである。

材料と方法

遅発性例を除き、筋生検で確認された定型例、男24、女26を発端者とする計44家系47同胞群を用いた。うち3家系は湯浅ら(1977)が報じた自験例であり、残りは日本をふくむ各国の症例報告のほとんどすべてに相当する。図1はこの資料を図示したものである。

この資料について、CNMの臨床像、とくに死亡状況、家族性発生の特徴、無症状の近親の筋生検所見などを総合的に検討し、後述する種々の発病機構と比較し、各機構ごとに理論的に期待される特徴と、観察された特徴との矛盾のもっとも小さいものをひとつ選んだ。

*新潟大学脳研究所神経内科

結 果

1. 患者数と臨床の特徴および近親者

発端者は男24、女26で性差がなく、年齢はゼロから30才代にわたっていた。発端者の兄弟5、姉妹4、母3、母方祖母1はCNMを有していた。この他、母1、母方祖母1、同叔父1、同叔母2、兄弟1に種々の非特異的な神経筋症状を認めたが、これらは直ちにはCNMと診断しなかった。また、ほぼ無症状の父2、母2、母方祖母1、姉妹1の筋生検で、ネマリン小体が認められた。

臨床症状はほぼ定型的で変動は比較的少なかったが、発端者とその罹患同胞計59中15が死亡しており、しかもその2/3は5才未満におき、死因はつねに呼吸筋力低下であると推定された。

2. 否定できる発病機構

染色体は2例で調べられ、ともに正常であった。出生前因子は記載のあった26中、2に性器出血、3に難産、各1に悪疽、抗生物質使用、人工中絶の試み、があるだけであった。出生順位効果はなかった。

伴性劣性遺伝は患者数に性差がなく、父方から伝わった男児例があることから否定された。

単劣性遺伝は罹患親がかなりあること、両親の近親婚の増加がないことから否定された。

3. 直ちには否定できない発病機構

かかる可能性にはつぎのふたつがある。

伴性優性、病的遺伝子がX染色体にあると
1) 患父の娘はすべて罹患するが、息子は正常、2) 患母の子は性と関係なく1/2が罹患、

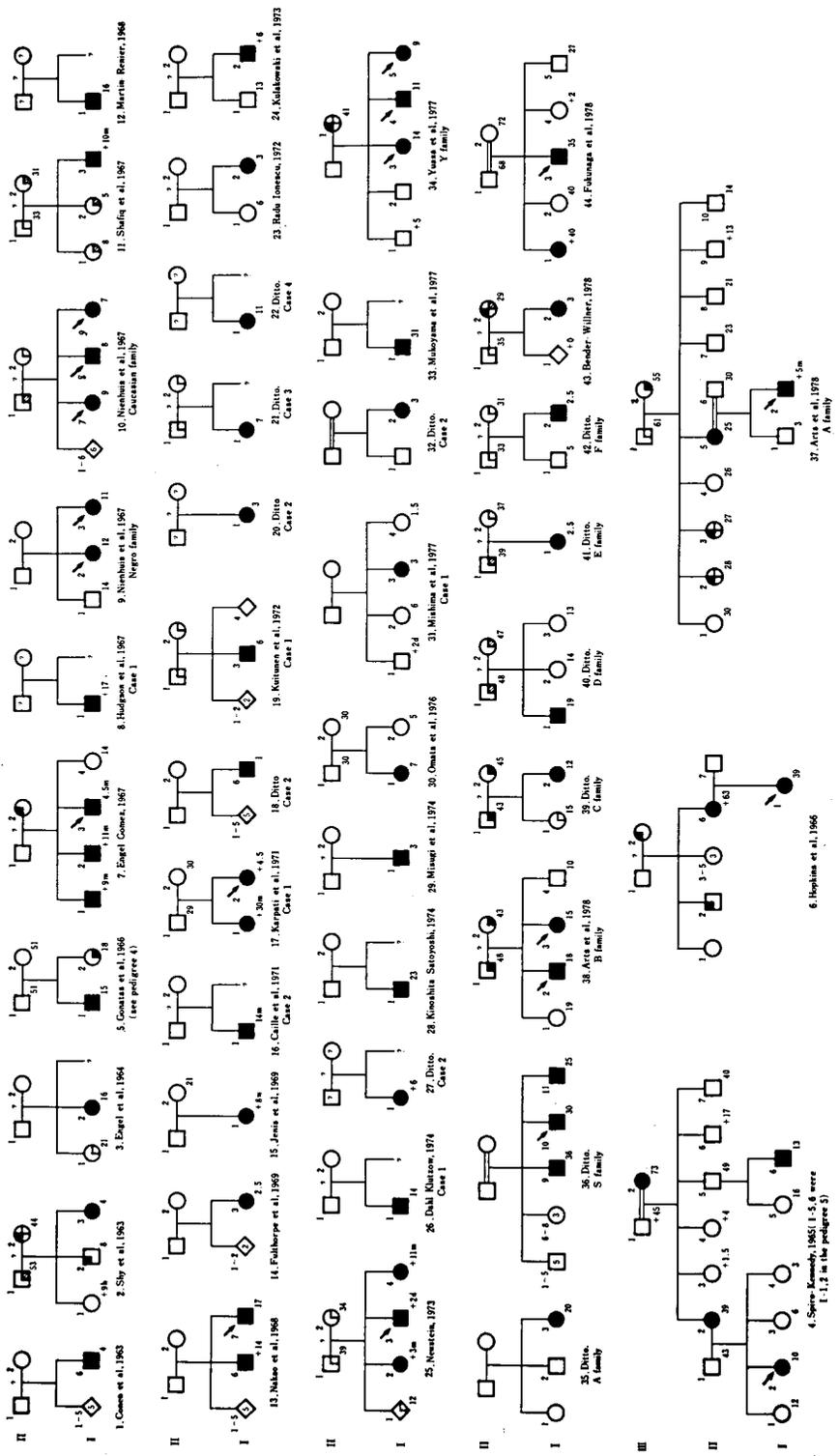


図1 ネマリニンミオパチーの家系資料
 生検で確認された定型例を発端とする44家系を年代および著者のabc順に配列した。男は四角、女は丸、性不明者は菱形で示し、黒は本症患者、左上黒はかるい筋症状態保有者とした。患者以外で筋生検を行ったものは右下を区分し、ネマリニン小体があれば黒、ないがなんらかの異常があれば斜線、正常なら白でその所見を示した。

3) 孤発例の男女比は 1:2 となる。CNMでは 1) の事例はなく、またネマリン小体または非特異的神経筋症状の保有までをふくめた患母 12 の息子は 6/17 (35.3%), 娘は 8/24 (33.3%) が罹患するので、50%に達しない点を除けば、2) は満足される。孤発例と考えられるものは男 15, 女 14 で、3) は満足されない。ただし、患親はすべて母であり、ネマリン小体または非特異的な症状の保有者も圧倒的に母方に多いことが偶然でないなら、CNMには母方から遺伝しやすい機序があるのかもしれない。

細胞質遺伝。遺伝物質が細胞質にあれば、精子は後者を欠くので、遺伝はつねに母方を通じておき、発病傾向に性差がなければ、母自身と息子、娘の同数が侵される。前節でのべたように CNMにはこの特徴があるが、父方に患者のある Gonatas ら¹¹⁾(1966)の家系は細胞質遺伝とは両立しない。

結局、上記の 2 機構は直ちには否定できないが、積極的根拠もない。

4. 肯定すべき発病機構

冒頭でのべたように、単優性遺伝がこれであることが前報で示唆されている。この場合、一般に 1) 片親罹患、2) 近親婚の増加はない、3) 子は性と関係なく 1/2 が罹患、4) 孤発例の男女比は 1:1、などが期待される。しかしこれらは生殖期後におきる良性の疾患では観察されるが、単優性疾患がきわめて悪性で子がのこらない場合は 1), 3) はみられず、患者は新突然変異による孤発例のみで、その頻度は突然変異率の 2 倍になるにすぎない。

CNM は幼小児期の死亡率が高いが、成人した患者の一部は子をもち、また無症状のネマリン小体保有者によっても遺伝子が次代に伝えられるので、上述の両極端の間にあるといえる。そこで CNM が単優性なら、1) 一部の発端者の片親は罹患するがかるい、2) 父母は同様に罹患する、3) 分離比は 0.5 より小さい、4) 表現動揺性が大きい、5) 近

親に無症状のネマリン小体保有者がある、6) 孤発例が多い、7) 多世代の家系が少ない、などの特徴が期待される。

資料をみると、1), 3), 4), 5), 6), 7), は明白に成立する。分離比は、片親が CNM、小体または非特異的症状をもつ 10 同胞群を用い、Weinberg 法で計算すると、CNM について $0.2 (p \pm 1.96 \sqrt{Vp})$ は $0.076 \sim 0.324$ 、非特異的症状を CNM とみなして患者にふくめても $0.3 (0.158 \sim 0.442)$ で、0.5 との差は有意であった。一方、期待と観察が合わないのは 2) で、父母は同数に侵されるべきであるのに、CNM、小体または非特異的症状をもつ母 9 に対し、父には小体保有が 2 あるにすぎなかった。かかる差は偶然にもおきようが、前節でのべたような、母を通ずる遺伝機構も排除できない。しかし他の筋萎縮症にも例があるように、おなじ障害があっても、女子は結婚の機会に恵まれやすいため、かかる結果になったともおもわれるので、2) がみられないだけで単優性を否定し得ない。

考 察

症例報告の統計的分析から疾患の本体に迫る方法には問題点もあるが、CNM のような極稀な疾患では有用である。本研究は CNM の諸特徴を総合して、もし CNM が単一疾患ならばどのような発病機構を考えればもっとも合理的であるかを推定するものである。

本研究では CNM の発病機構として 7 つの仮説を挙げ、観察された諸特徴をもっともよく説明できるのは単優性遺伝であることを示した。

多くの単優性疾患は比較的良性であるが、これは、人類の歴史のなかで生じた多くの優性突然変異のうち、淘汰されずに今日に伝えられるのは子がのこるような疾患に限られたためである。CNM は早期死亡が多い点ではこの条件を欠くが、重症度の変動がきわめて大きいので、軽症患者の一部は子をもち、また無症状のネマリン小体保有者は淘汰と中立に

なって、上記の条件を満たす。CNM が単優性であることが認識しにくかったのは、かかる特殊性のためとおもわれる。

結 論

CNM は単優性遺伝に従うと考えるのが合理的である。早期死亡のためつよい淘汰をうけるが、軽症者、無症状者によってその遺伝子が次代に伝えられる。

文 献

- 1) Gonatas, N. K., Shy, G. M., Godfrey, E. H. : Nemaline myopathy, the origin of nemaline structures. N. Engl. J. Med. 274 : 535—539, 1966.
- 2) 椿忠雄, 近藤喜代太郎, 福原信義, 湯浅竜彦 : Nemaline myopathyの遺伝. 厚生省「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」昭和52年度研究報告書, 1973, pp.206—208.

14) Duchenne型筋ジストロフィー症の母子発症例

中西孝雄*

研究協力者 玉城允之* 葛原茂樹*

Duchenne型筋ジストロフィー症(以下DMDと略す)の女性Carrierにおいて血清CPKの上昇, 腓腹筋の仮性肥大, 又生検筋にmyopathyに相当する所見がみられることがあるのは比較的良好に知られたことであるが¹⁾, 臨床的に筋力低下, 筋萎縮等のmyopathyとしての症状を示すことは極めて稀であり, Emery²⁾, 古川ら³⁾のCarrierの報告例においても動揺性歩行, 軽度の筋力低下を示す程度である。最近, 岩本ら⁴⁾は筋萎縮を伴った明らかなmyopathyの症状と筋鞘核内封入体を認めたCarrierの例を報告している。今回, 我々もDMDのCarrierと考えられる母親に著明な筋萎縮と筋力低下がみられ, その症状の重いことと障害された筋の分布にも特徴がみられ, 稀有な症例と考えたので報告した。

家系図は図1の如くであり, 血族結婚はなく, CPKの上昇も以下報告する2例以外には認められなかった。

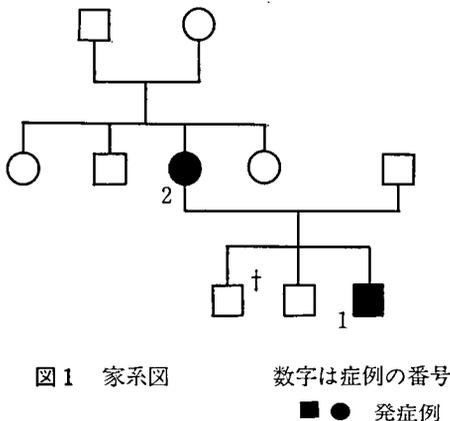


図1 家系図

数字は症例の番号

■ ● 発症例

症例1 発端者は2歳3ヶ月の男子。出産は正常, 発語は1歳6ヶ月と遅く, 1歳5ヶ月の時の保健所検診でハイハイしかできず, 運動機能の発達遅延を指摘された。処女歩行は2歳である。当院入院時, 身長84.7cm, 体重12.5kg, 頭部の変形(-), 胸腹部に異常所見(-), 神経学的所見として動作性IQ64, 脳神経領域に異常所見はみられないが, 肩甲下部, 上腕の筋萎縮と肩甲帯, 腰帯に4の筋力低下が認められた。また腓腹筋に仮性肥大あり, 登はん性起立, 動揺性歩行がみられた。検査所見ではCPK2000単位以上(正常値20単位以下), アルドラーゼ6単位, GOT164単位, GPT183単位と上昇, 筋電図では四肢でlow-amplitude, short duration motor unit potentialが認められた。左大腿四頭筋の筋生検では筋線維の円形化, 大小不同, 中心核の増加が目立ち, opaque fiberも多数認められた。またperimysial, endomysialの結合織の増加が著明でfiber necrosis, phagocytosisも散見された。電顕ではmitochondriaの異常, nemaline等は見出されなかった。

症例2 (発端者の母) 35歳女性。

生下時の異常なし, 処女歩行は2歳, 乳幼児期より走れず, 小学校入学時は階段が昇れず, 中学校卒業時, 歩行中よくつまずき, 転倒しやすかった。28歳の時両下肢の痛みの為近医受診, 筋萎縮を指摘された。2年前より貧血出現, 最近, 全身倦怠感, 息苦しさが悪化した。又昭和53年夏頃より出現した右鼠径部腫瘍のため, 当院外科を受診, 右大腿ヘルニアと診断された。その際筋ジストロフィー

*筑波大学臨床医学系神経内科

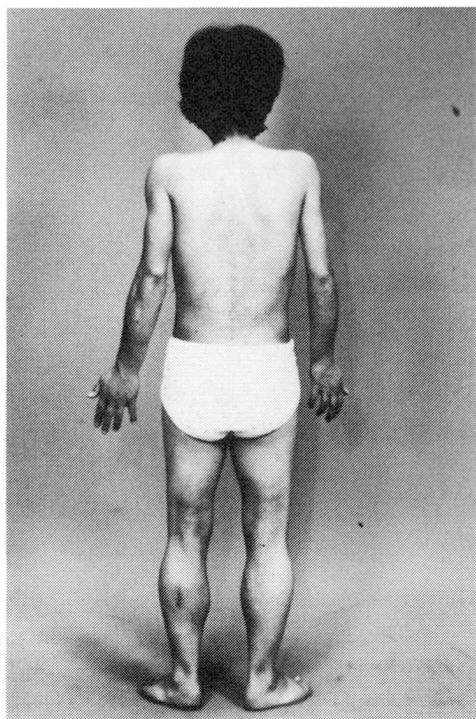


図2 症例2の全身像
肩甲, 上肢帯, 腰, 大腿近位部に筋萎縮,
両腓腹筋に仮性肥大を認める。

一が疑われ, 当院神経内科受診。

全身蒼白で結膜, 口唇, 爪に貧血(+), 心尖部中心に Levine II度の収縮期雑音あり, 神経学的には顔面筋に軽度, 両肩甲帯, 上肢近位部, 腰帯, 大腿近位部に著明な筋萎縮を認め, 萎縮した筋群で3⁺~4程度の筋力低下がみられた。両下腿腓腹筋に仮性肥大があり, 硬くゴツゴツした感じとしてふれた。深部反射はアキレス腱を除いて消失し, 登はん性起立と動揺性歩行がみられた(図2)。

H.N. 35 F.

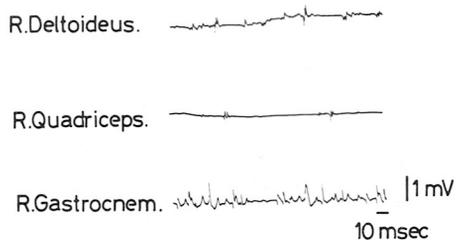


図3 症例2の筋電図。近位筋に short duration, low amplitude motor unit potential がみられる。

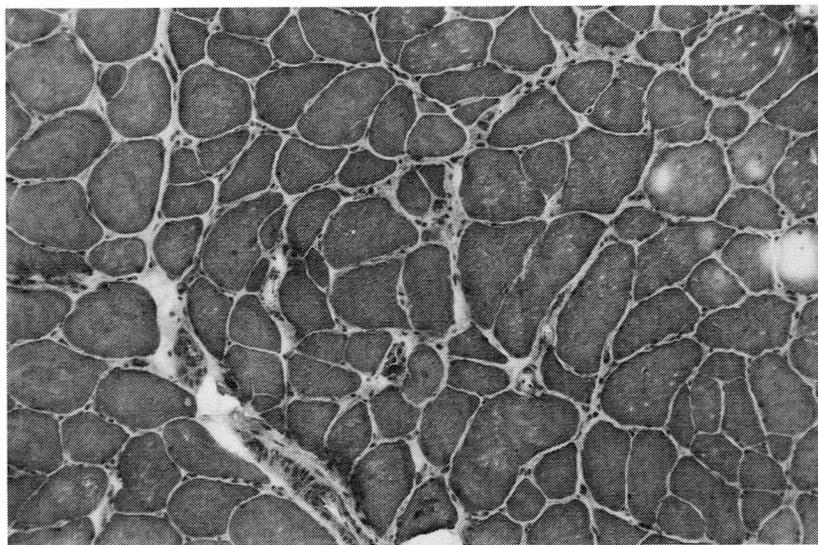


図4 症例2の左腓腹筋生検。染色 H. E. ×100
筋線維の大小不同, 中心核の増加, 筋線維の fiber splitting 脂肪組織の増加がみられる。

検査所見では Hb 7 g/dl, 赤血球数 306 万と減少, CPK は 582 単位 (正常値 20 単位以下), GOT 37 単位, GPT 45 単位, LDH 736 単位と高値を示した。心電図, 染色体の数および形に異常なし。筋電図では四肢近位筋に著明な short-duration, low amplitude motor unit potential がみられた (図 3)。左腓腹筋の筋生検では肥大線維と萎縮線維が入りまじり, 筋線維の大小不同が目立った。又中心核の増加, 筋線維の fiber splitting, 脂肪組織の増加もみられたが筋の変性像, phagocytosis の所見はなかった (図 4)。ATPase 染色でも fiber type は分化しており, atrophy の type predominancy は認められず, 比較的良性の myopathy と考えられた。又電顕でも, nemaline, mitochondria の異常等, 特殊な congenital myopathy の所見は認められなかった。

考 察

症例 1 の男子は 1 歳 5 ヶ月の時既に, 運動機能の発達遅延が認められ, 2 歳 3 ヶ月の現在, 肩甲帯, 腰帯の筋力低下, 腓腹筋の仮性肥大を認め, 登はん性起立と動揺性歩行を示し, 血清 CPK 値の著明な上昇と, 筋電図, 筋生検の所見から Duchenne 型筋ジストロフィー症と考えられる。また, 症例 2 の母にも臨床症状を認めたが, 本家系には血族結婚はなく肢帯型筋ジストロフィー症は考えにくく症例 2 については DMD の女性保因者の発症例 (manifesting carrier) と考えた。

三好³⁾, Penn⁴⁾らは DMD の女性発症者については否定的な報告を行っているが, DMD の女性保因者 (Carrier) に CPK の上昇, 腓腹筋の仮性肥大, 筋生検上 myopathy の所見は比較的よく認められる。臨床症状を示す DMD の女性保因者については Emery の報告以来注目されるようになった。即ち Emery の報告した 2 例は腰帯中心の筋力低下と, 腓腹筋の仮性肥大, CPK の軽度上昇をみたが, 筋萎縮は認められなかった²⁾。また, 古川らの報告した第 1 例は幼児期に発症, 以後進行せ

ず, 36 歳の時上肢近位部の筋力低下を示し, 以前あった筋の仮性肥大が消失した。第 2 例は 35 歳で発症, 上肢三角筋, 大腿四頭筋の筋力低下と CPK の上昇を認めた³⁾。我々の経験した症例の如く, 著明な筋萎縮を示し, CPK 値の中等度以上の上昇を示した例は極めて少なく, 最近報告された岩本らの例⁴⁾に似ている。又障害筋の分布が肢帯型筋ジストロフィー症に類似していることも注目すべき点と思われるが, これについては岩本らの報告例も同様である。岩本らの報告例に比べ, 本症例は, 発症年齢が早いことが異なる。岩本らの症例も同様であるが, 症状の進行が殆んど認められない時点で, なお CPK のかなりの上昇のみられることおよび筋萎縮の分布の特徴については, 今後の検討を待ちたい。

結 語

Duchenne 型筋ジストロフィー症の女性保因者と考えられる母に明らかな myopathy の症状を認めた症例を報告した。症例は処女歩行 2 歳で, 幼児期に発症し, 肢帯型筋ジストロフィー症に近い筋萎縮の分布を示し, 筋電図で筋原性的変化を, 又, 筋生検で, 明らかな myopathy に相当する所見を得た。進行が殆んどみられない現時点でなお, CPK が 582 単位 (正常値 20 単位以下) とかなりの高値を示している点を含め, 注目すべき稀有な症例と考えられる。

文 献

- 1) 杉田秀夫: 酵素学的 (Creatine Phosphokinase, Aldolase) に見た神経筋疾患の臨床的ならびに実験的研究 [1] 臨床的研究 (進行性筋ジストロフィー症を中心として) 精神神経誌 62: 106, 1960.
- 2) Emery, A. E. H.: Clinical manifestations in two carriers of Duchenne muscular dystrophy. Lancet: 1126, 1963.
- 3) 古川哲雄ら: Duchenne 型筋ジストロフ

- ィー症の女性保因者に関する遺伝学的考察, 臨床神経 5:628, 1965.
- 4) 岩本奈津ら: 母および娘の保因者に myopathy, 母に筋鞘核内封入体を認めた Duchenne 型筋ジストロフィー症の一家系, 臨床神経 19:112, 1979.
- 5) 三好和夫ら: 進行性筋ジストロフィー症女性 Carrier における Myoglobin 亜分画の異常, 人類遺伝誌 13:150, 1968.
- 6) Penn et al: Muscular dystrophy in young girls, Neurology 20:147, 1970.

15) 自覚症状を欠き、1例にパーキンソン病を合併した 大腿四頭筋障害を主とするミオパチーの同胞例

塚 越 廣*

研究協力者 馬 目 太 三* 小 林 高 義*

目 的

従来 Quadriceps myopathy として若干の報告があるが、我々はこれに類似し、より軽症で自覚症状を欠く2同胞例で、1例にパーキンソン病の合併をみたので、Quadriceps myopathy との関連を検討した。

症 例

家族歴 この家系では発端者及び長兄以外には脱力を認めない。パーキンソン病を認めたのは発端者のみで、近親結婚を認め、両親

がいとこ同志である(図1)。

症例1 発端者

秋○英○, 39歳, 男(三内4920-78)

主訴: 右上肢のふるえ, 動作緩慢

既往歴: 35才 脂肪肝(肝生検にて診断)

現病歴: 小学校頃から動作緩慢, 下腿肥大があり, 昭和51年, 右上肢の動作時振戦が出現。靴下を中腰の姿勢でははけないことを指摘された。昭和53年7月動揺性歩行を指摘され, 左上肢のこわばった感じがあったため10月18日, 信州大学第3内科を受診。Parkinson-

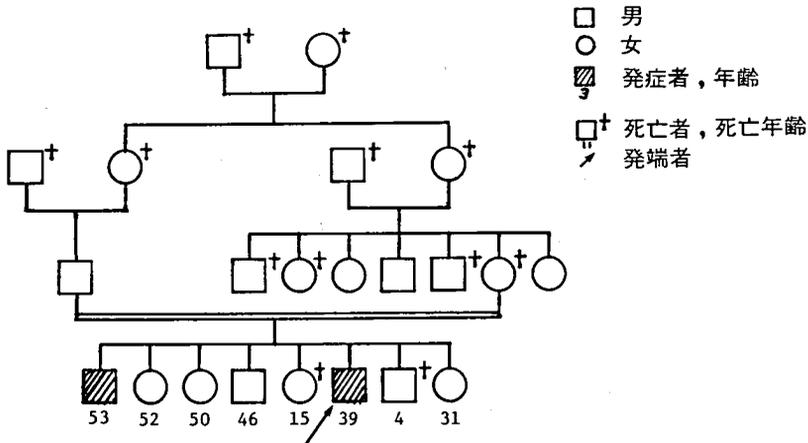


図1 家系図

両親がいとこ同志で、発端者および長兄に脱力を認め、発端者のみパーキンソン病の合併を認めた。

* 信州大学医学部第三内科

ism, 大腿筋萎縮, 下腿三頭筋の肥大を認めたため, 11月27日同科に入院した. 経過中脱力はまったく自覚していない. なお外来でL-DOPA投与後, 振戦は著しく減少した.

入院時現症: 一般内科的に心・肺・腹部は異常なく, 腰椎前彎を認める. 神経学的には, 知能は正常で, 右顔面の筋力低下と右に強い仮面様顔貌, Myerson 徴候を認める. 筋萎縮が両側大腿前面に軽度あり, 下腿三頭筋の肥大を認める(図2). また両側上肢, 頸部に軽度の筋固縮と右側にやや強い振戦を認める. 筋力は上肢ではほぼ正常で, 大腿四頭筋に軽度の筋萎縮と脱力のほか, 大・中臀筋に軽度の筋力低下があり, 右上肢の深部反射の低下と両側膝蓋腱反射の低下を認めた. ミオトニア, 感覚障害はなく, 腹をつき出して歩く動揺性歩行の傾向はあるが, 登はん性起立は認めない. 検査所見では赤沈は1-4 mm/hと正常だが血清CPKは756国際単位(正常値30-230)と軽度上昇し, GOT 41, GPT 43, γ -GTP, ChEは正常. 耐糖能, 甲状腺機能は正常である. 筋電図では, 左右の大臀筋で short duration, low amplitude NMU, 他の

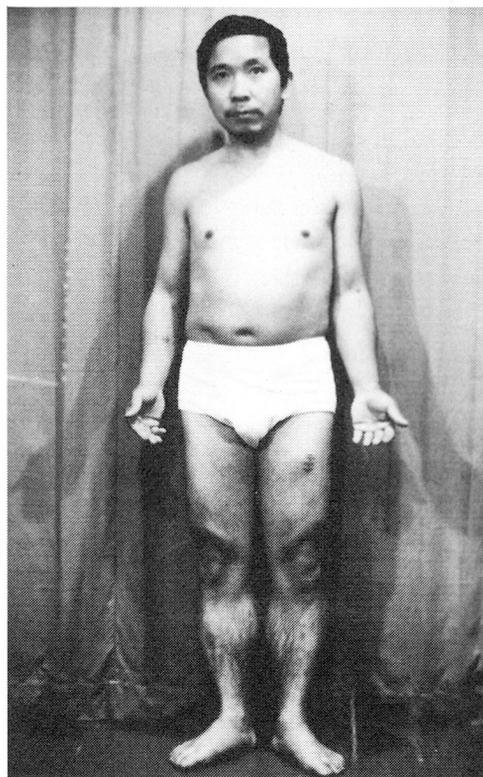


図2 症例1の全身像, 仮面様顔貌, 両側大腿前面の軽い筋萎縮, 下腿三頭筋の肥大を認める.

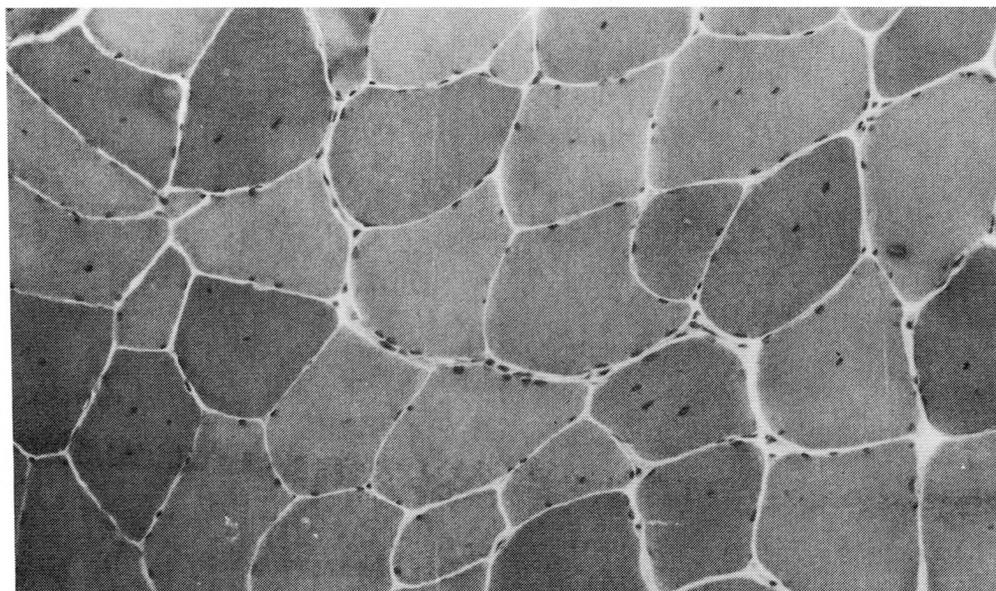


図3 大腿四頭筋生検所見, 中心核をもつ筋線維が53%と増加している. また軽度の間質結合織の増加があるが, 筋線維の壊死, phagocytosisはない. $\times 100$ HE染色

上下肢筋の多数で持続時間の短い polyphasic NMU を認めた。運動神経最大伝導速度は右尺骨神経で 61.8 m/sec, 右脛骨神経で 48.8 m/sec と正常であった。脳波では θ 波が頻発したが、髄液・CT スキャンは正常であった。左大腿四頭筋生検の結果は、HE 染色では筋束の基本構築は良く保たれ、筋線維自体の壊死、phagocytosis などの変化はなかった (図 3)。しかし、筋線維直径のヒストグラムでは 80~140 μ の大径線維の増加が著明であった (図 4)。また中心核をもつ線維が 53% と増加していた。軽度の間質結合織の増加と脂肪浸潤はあるが、炎症所見はなかった。ATPase 染色では萎縮線維は Type I fiber, Type II fiber にともに認められ、mosaic pattern がみられ、Type I fiber 12%, Type

II fiber 88% と著明な Type II fiber predominance を示した (図 4)。Gomori の trichrome 染色では軽度の間質結合織の増加をみるが、ミトコンドリア異常を疑わせる所見はなく、電顕的にもミトコンドリアの異常、特殊物質の沈着などは認めなかった。

症例 2 発端者の長兄

古○重○, 53 歳, 男

現在農業に従事し、自覚症状は全くない。小学校頃から登山・運動後しばしば下腿がつつぱり歩けなかった。また体格は同胞内では最も発端者に類似している。加齢につれ、腓腹筋部のつつぱりと疼痛の発作は軽減した。

現症：筋萎縮を両側大腿に軽度に認め、下腿三頭筋の肥大も認める。筋緊張は正常で、筋力は上肢筋は正常であるが、大腿四頭筋、

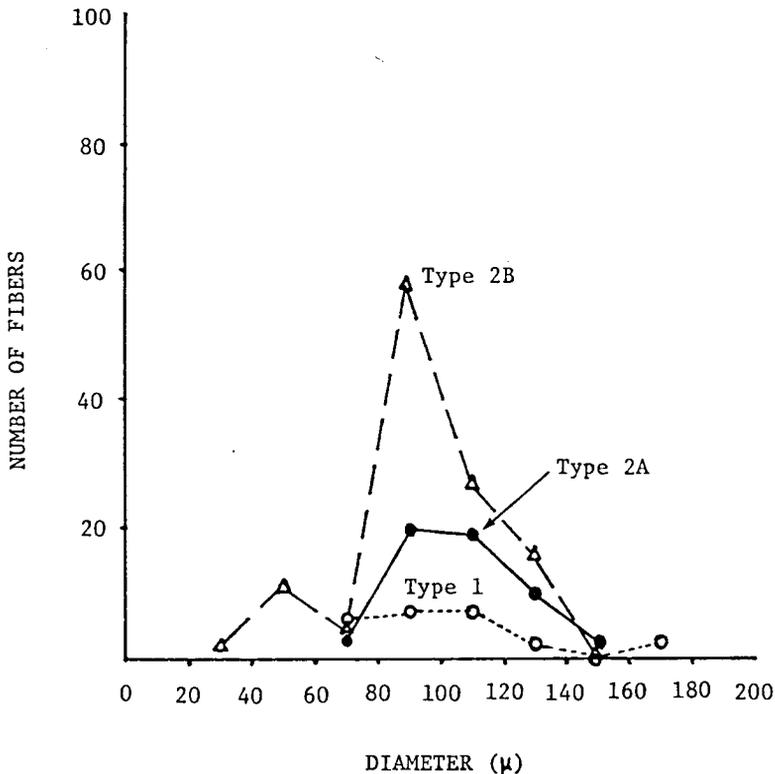


図 4 Histogram of fiber sizes in a muscle biopsy (Quadriceps femoris muscle)

80~140 μ の大径線維の増加が著明で、Type I fiber 12% Type II fiber 88% と Type II fiber predominance を示した。

大臀筋でごく軽度低下している。下肢遠位筋力は正常。ミオトニア、動揺性歩行、登はん性起立はない。検査所見では血清CPKは674国際単位と軽度上昇し、GOT 62, GPT 39。筋電図では前腕筋で short duration, low amplitude NMU を認め (図5), 上下肢の多数の筋で持続時間の短い polyphasic NMU を認めた。

rt M. brachioradialis

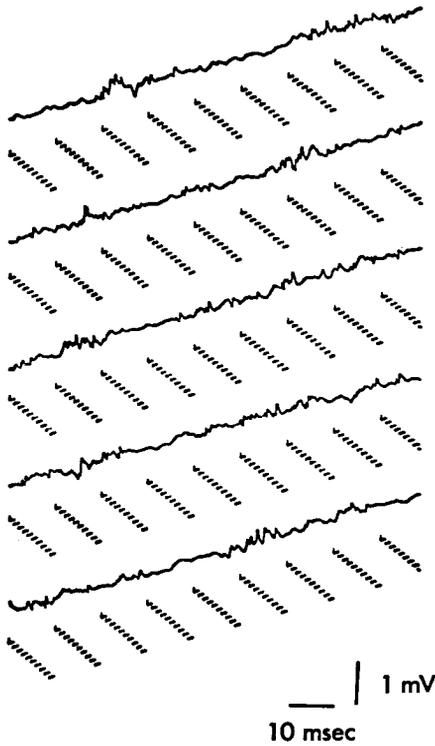


図5 症例2の前腕筋で short duration, low amplitude NMU を認めた。

以上をまとめると次のようになる。

1. 同胞8名中2名に大腿四頭筋を主とする軽度の筋力低下と筋萎縮, 下腿三頭筋の肥大を認めた。
2. 筋電図で上肢にもミオパチーが疑われた。
3. 筋生検で筋原性変化と Type II fiber

predominance を認めた。

4. 発端者にパーキンソン病の合併を認めた。

5. 遺伝型式は常染色体性劣性遺伝が考えられた。

考 察

本症例2例の臨床的特徴は、自覚症状を欠いているが、大腿四頭筋の軽い萎縮と脱力をきたし、周辺の下肢近位筋の軽い脱力、下腿三頭筋の肥大を認め、1例にパーキンソン病を合併していることである。大腿四頭筋は種々のタイプの進行性筋ジストロフィー (以下DMPと略す)、多発筋炎、nemaline myopathy, central core diseaseなどの先天性ミオパチー、その他種々のミオパチーでおかされ、近位性脊髄性筋萎縮症でもおかされる。このうち成人に発症する多発筋炎では、大腿四頭筋に限局して慢性進行性に増悪する例が報告されている。1939年Denny-Brown¹⁾は42才の女性の大腿四頭筋に、5年の経過の限局した脱力と筋萎縮を認め、20年後TurnerとHeathfield²⁾は、同一患者で脱力と筋萎縮が三角筋、上腕二頭筋にも進展していることを確認している。筋生検では、炎症所見がないにもかかわらず、筋線維直径の大小不同・壊死が認められ、慢性多発筋炎と診断されている。またNevin³⁾のlate onset muscular dystrophy, ShyとMcEachern⁴⁾のmenopausal muscular dystrophyでは大腿四頭筋のほか、臀筋、肩甲帯筋もおかされ、筋生検はDenny-Brownの例とほぼ同じ所見で、多発筋炎と考えられている。我々の症例は同胞発症例で遺伝的負荷が考えられ、筋生検でも炎症細胞浸潤、筋線維の壊死が認められず、多発筋炎の可能性は少ない。

1922年Bramwell⁵⁾は中年発症で、大腿四頭筋の萎縮、脱力を主とする2症例を報告し、以後同様の筋萎縮の分布を示す疾患群はquadriceps myopathyと呼ばれるようになった。彼の例は大腿四頭筋のうちでも、萎縮部

と肥厚部が混在しているのが特徴で、歩行障害が強い。それ以前に Erb⁹⁾が DMP の一型として報告した例は、59 才の男性で 12 年の良性経過をとり、大腿筋の脱力・筋萎縮と下腿三頭筋の肥大を認めている。この例は上肢は全く正常で、詳細は不明であるが、筋萎縮・筋肥大の分布は我々の症例に類似している。また Walton⁷⁾は大腿四頭筋のうち vastus medialis の萎縮と vastus lateralis の肥大を認めるが、大腿四頭筋力の著明な低下を示す 2 症例を報告し、肢帯型 DMP の forme fruste と位置づけている。これらの報告例は、いずれも筋萎縮・脱力が強いのにに対し、我々の症例では、①幼小児期に既に下腿三頭筋の肥大があり、発症していた可能性があること、②成人になっても自覚症状がまったくないことから非常に良性の経過をとるミオパチーと考えられる点異なる。Walton⁸⁾は DMP を “Progressive, genetically determined, primary degenerative myopathy” と定義している。我々の症例は進行性がほとんどないが、遺伝的に常染色体性劣性遺伝が疑われ、筋電図上、上肢筋にも筋原性変化が認められる点を考えれば、Walton⁸⁾のいう肢帯型 DMP の forme fruste である可能性は否定できない。同時に今まで注目されていない良性のミオパチーである可能性もある。Van Wijngaarden⁹⁾、Espir¹⁰⁾は、quadriceps myopathy で家族内発症の例を報告しているが、このうち Espir¹⁰⁾らの例は経過が非常に良好で、自覚症状が軽微であり、大腿四頭筋以外の骨格筋もおかされる点で我々の例に類似しているが、常染色体性優性遺伝が考えられる点で異なる。

また症例 1 の筋生検による ATPase 染色では Type II fiber predominance を認めた。Type II predominance は神経原性筋萎縮症でしばしば認められる。Furukawa¹¹⁾は chronic neurogenic quadriceps amyotrophy として 2 例の報告を行い、Kugelberg-Welander 病の forme fruste と位置づけている。

Kugelberg-Welander 病の場合、筋生検で中心核、肥大筋、結合織、脂肪織の増加などの筋原性変化を混在することもあるが、group atrophy, angulated atrophied fibers などの神経原性変化を認めるのが一般的で、Type II fiber predominance を示す。症例 1 では筋電図的にも神経原性変化が明らかでなく、筋生検で group atrophy も認められず Furukawa の例とは異なる。本例の Type II fiber predominance については、三好¹²⁾は Becker 型 DMP の近位萎縮筋において、Type II fiber predominance を示した例を報告しており、ミオパチーでも Type II predominance を示す例があることを示している。この点で症例 1 は三好らの例に類似しており、本症例の特徴となりうるかもしれないが、本態は不明である。またパーキンソン病で Brooke¹³⁾は Type II fiber atrophy を認めているが、症例 1 でパーキンソン病がどの程度、筋生検所見に關与しているか不明であり、今後検討を要する¹⁴⁾¹⁵⁾。

ミオパチー、特に DMP に錐体外路症状を合併した例は我々の調べた限りではほとんどなく、Westphal¹⁶⁾が DMP でミオクロノス、舞蹈病アテトーゼなどを合併した例を報告しているにすぎず、症例 1 のようにパーキンソン病を合併している例の報告はない。家系内で他のパーキンソン病発症者がいないので、ミオパチーとパーキンソン病との偶然的合併である可能性が考えられるが、ミオパチーが軽度であるため、パーキンソン病の筋固縮が出現して来院したと考えられる。今後更に、ミオパチーとパーキンソン病との症状の進行を観察してゆく予定である。

結 論

Quadriceps myopathy に類似し、自覚症状を欠き、1 例にパーキンソン病を合併した 2 同胞例を報告した。遺伝性、臨床および検査所見から肢帯型進行性筋ジストロフィーないし良性のミオパチーの可能性が考えられたが

パーキンソン病については偶然の合併の可能性が考えられた。

文 献

- 1) Denny-Brown, D.: Myopathic weakness of quadriceps. Proc. R. Soc. Med., 32 : 867, 1939.
- 2) Turner, J. W. A. & Heathfield, K. W. G.: Quadriceps myopathy occurring in middle age. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 24 : 18, 1961.
- 3) Nevin, S.: Two cases of muscular degeneration occurring in late adult life, with a review of the recorded cases of late progressive muscular dystrophy (late progressive myopathy). Q. J. Med., 5 : 51, 1936.
- 4) Shy, G. M. & McEachern, D.: The clinical features and response to cortisone of menopausal muscular dystrophy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 14 : 101, 1951.
- 5) Bramwell, E.: Observation on myopathy. Proc. R. Soc. Med., 16 : 1, 1922.
- 6) Erb, W. : Dystrophia muscularis progressiva ; Klinische und pathologisch-anatomische Studien. Dtsch. Z. Nervenheilkd., 1 : 13, 1891.
- 7) Walton, J. N.: Two cases of myopathy limited to the quadriceps. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 19 : 106, 1956.
- 8) Walton, J. N. & Gardner-Medwin, D.: Disorders of voluntary muscles. ed. 3. Churchill Livingstone, Edinburgh & London, 1974, p. 563.
- 9) Van Wijngaarden, G. K., Hagen, C. J. et al: Myopathy of the quadriceps muscles. J. Neurol. Sci., 7 : 201, 1968.
- 10) Espir, M. L. E. & Matthews, W. B.: Hereditary quadriceps myopathy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 36 : 1041, 1973.
- 11) Furukawa, T., Akagami, N. et al: Chronic neurogenic quadriceps amyotrophy. Ann. Neurol., 2 : 528, 1977.
- 12) 三好和夫, 日下香苗ら: 近位萎縮筋において Type II fiber predominance を認めた Becker 型筋ジストロフィー症と思われる 2 家系 3 症例. 厚生省心身障害研究費補助金「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」, 昭和 52 年度研究報告書, p. 245, 1978.
- 13) Dubowitz, V. & Brooke, M. H.: Muscle biopsy: A modern approach, ed. by Walton, J. N., Vol.2, Major Problems in Neurology, W. B. Saunders Co., London, Philadelphia, Toronto, 1973, p. 79.
- 14) 朝長正徳, 田辺等: パーキンソン病生検筋にみられたミトコンドリア異常. 医学のあゆみ, 79 : 368, 1971.
- 15) 朝長正徳, 田辺等: パーキンソン病における骨格筋の変化: とくに電顕像について. 臨床神経学, 13 : 111, 1973.
- 16) Westphal, A.: Weiterer Beitrag zur Frage "Dystrophia musculorum progressiva und extrapyramidaler Symptomenkomplex". Klin. Wochenschr., 5 : 198, 1927.

16) 先天性筋ジストロフィー症の成因に関する研究

—— 2 症例の検討 ——

木下真男*

研究協力者 岩崎泰雄* 石塚洋子* 瀬川昌也**

先天性筋ジストロフィー症の成因については、猶種々の論議のあるところであり、家族歴を認めながらも遺伝性疾患とするよりは、感染との関連性を考える報告も見られる。我々は、最近副腎皮質ステロイドに反応を示す2例を経験したので本症の発症機序を考える上で、興味ある2例と考へ報告する。

症例1

3歳4ヶ月の男児、満期正常分娩、両親に血縁なし、患児の兄は出生期、多発性関節拘縮を有し、生後9ヶ月で死亡。本例は、出産時、全身性の筋の低緊張を指摘され、その翌日より少し筋が固く、受動運動に抵抗を示す様になってきた。肘、手、股、膝、足の諸関節に、いずれも軽度の伸展障害を認め、それぞれわずかつ可動域の制限を認める。腱反射はすべて消失している。その後の精神運動発達は著しく遅延、3歳4ヶ月現在、発語は「パパ」「ママ」「ある」「ない」など、数える程であり、しかも、いずれも極めて不明瞭、第三者にははっきり聞きとれない程である。しかし、理解力の方はやや良く、話かける言語はある程度了解し、身体各部の問いかけに、指で指して答える。起坐は可能、起立、歩行不能、全身の筋の低緊張、脱力は著しく、特に肩、腰の症状は強く、筋量も高度に減少し

ている。

諸検査成績では、Creatine phospho kinase (CPK) については後述する。生後2ヶ月で行った生検では(図1)線維直径の大小不同、変性に加え、著しい炎症細胞の浸潤を認める部分が、かなり広範囲で存在した。その他の生化学的検査などは、特に変化はなし。CTスキャンでは、白質を中心としたびまん性の著しい低吸収域を認めた(図2)。

症例2

3歳7ヶ月男児、満期正常分娩、両親血縁なし、第一子で同胞はなし。新生児以後の精神運動発達は遅延、処女歩行は2歳頃であったが、腹を前に、尻を後に突き出し、著しい動揺性歩行を呈した。2歳9ヶ月初診時、発語わずか3語、走行、跳躍全く不能、臥位より起立時登はん性起立を認める。腱反射は膝蓋腱のみ陽性で、他は陰性、四肢近位筋の低緊張、脱力、萎縮が明らかであり、膝関節の軽度伸展制限、足関節の背屈制限を認む。CPK 12,400単位。生検所見では(図3)線維直径の大小不同、変性に加えて、小血管を中心とする細胞浸潤が明らかであり、この様な部分が標本中かなり広汎に存在した。又一部は、小径線維のグループが散在していた。

〈ステロイド投与に対する反応〉

筋生検に両例とも明らかな炎症所見が、存在した事を根拠に、両例に副腎皮質ステロイド治療を試みた。

* 東邦大学医学部第四内科

** 瀬川小児神経学クリニック

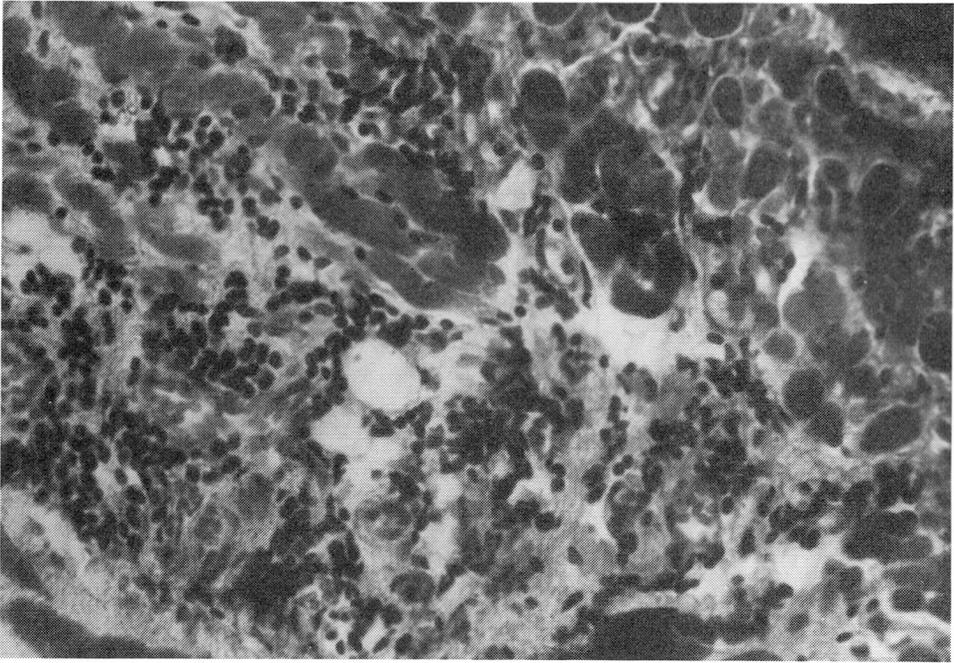


図1 症例1 筋生検所見 H.E.×200
間質中心に著しい炎症細胞の浸潤を認める部分がある。

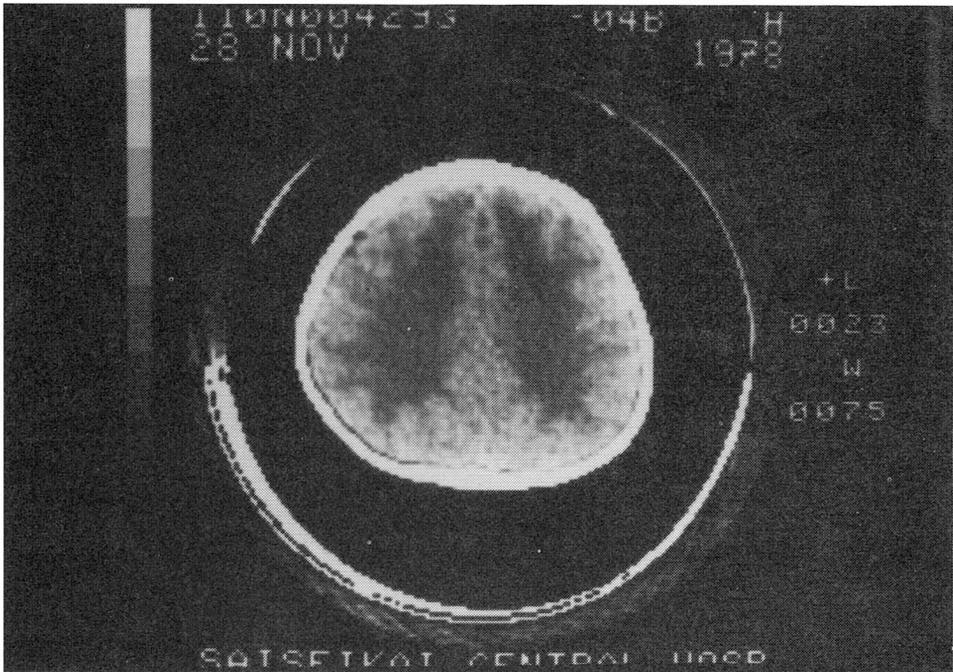


図2 症例1 脳CT スキャン像
白質中心に low density area が diffuse に認められる。

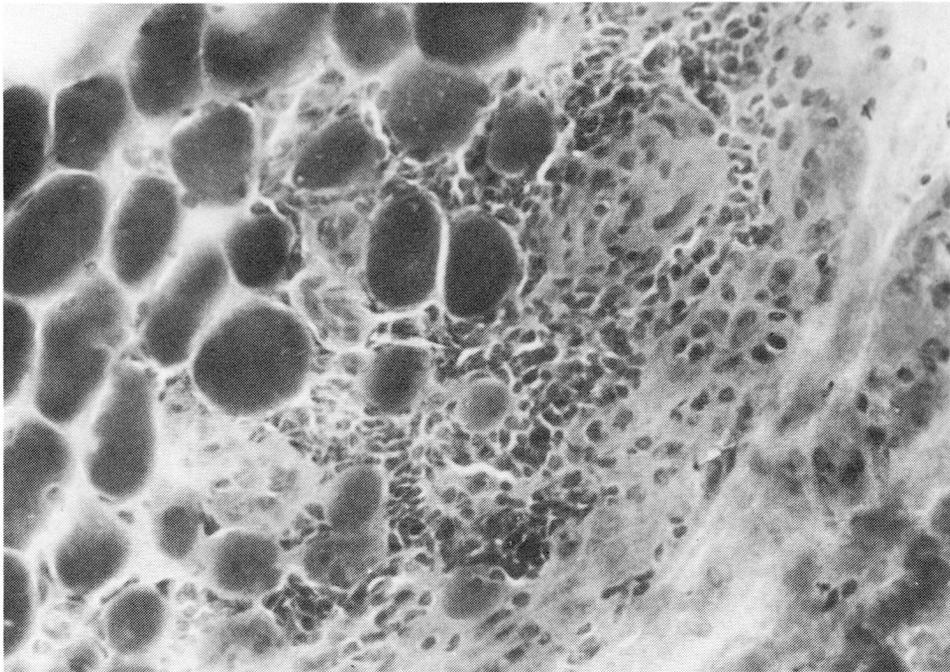


図3 症例2 筋生検所見 H. E.×200
 非特異的ミオパチー像に加えて炎症細胞の浸潤が著明な部分が多い。

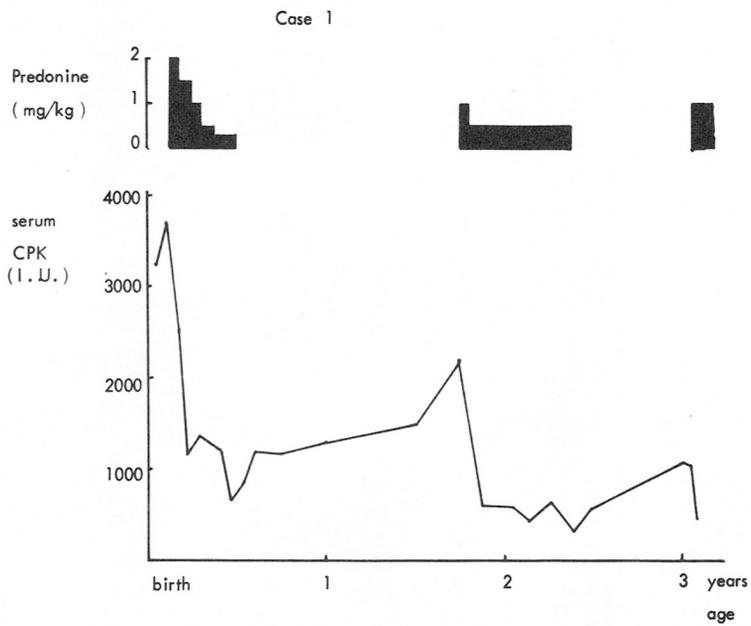


図4 症例1 副腎皮質ステロイド
 投与後の血清 CPK の変化

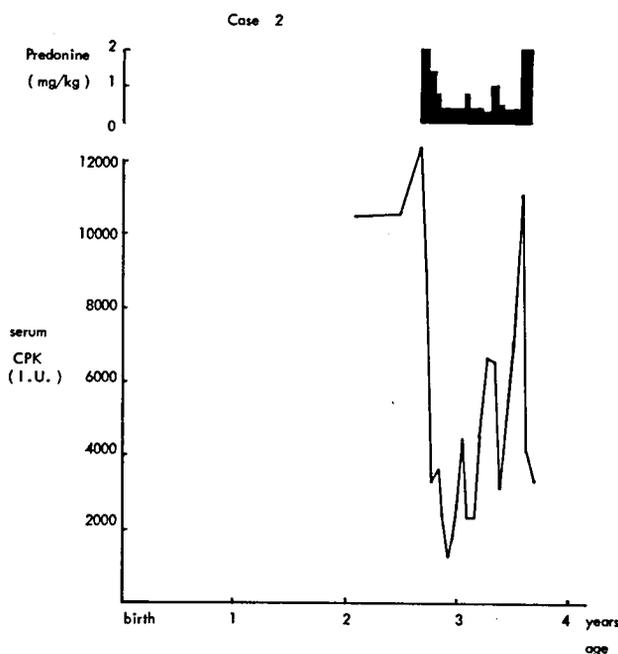


図5 症例2 副腎皮質ステロイド
投与後の血清CPKの変化

症例1では、生後3ヶ月目より、体重1 kg 当り、2 mg のプレドニンを投与開始、1 週間継続後、CPK は 3655 単位より、2500 に低下、続いて次の1 週間で1147 となり、CPK 活性に関しては著しい効果がありと判定した。しかし、臨床的には明らかな効果不明のため約4 ヶ月で漸減、最終的には、CPK 616 の時点で投与を中止したが、CPK は、再上昇をし始め、1 歳9 ヶ月頃2235 の時点で再びプレドニンを開始し、最低365 になった。しかし、この時点における臨床的な改善は明らかでなく中止する。3 歳を過ぎてから、また、1099 となったため、第3 回目の使用を開始して経過観察している(図4)。

症例2 に関しては、2 歳9 ヶ月時、CPK 12400 の時点で、2 mg/kg のプレドニンを開始し、1 週間で8913、2 週間で3293 となり、最低1266 までになったが、投与量を漸減すると、CPK が上昇し、投与量を増加すると、CPK が低下する傾向が続き、11400 になった

時点において、再び2 mg/kg とすると明らかな低下を示した(図5)。

一方、臨床的にも改善が見られ、約10 ヶ月投与を続けた時点において歩行はかなり改善され走る事も可能になってきている。しかしこの間、身長が全く伸びずステロイドの成長抑制と考えて、投与量を調節してはいるが、投与量を減らすと、必ずCPK が上昇するため、今後の方針に何らかの工夫が必要と考えている現状である。

考 案

以上2 症例に関して、まず問題となるのは福山型先天性筋ジストロフィー症と診断するか否かであるが、中枢神経症状、筋症状、CPK などから見て、診断は可能と考えられ、特に症例1 は、同胞発症歴もあり、臨床的には、福山型先天性筋ジストロフィー症に相違する点はないと考えられる。ただ問題は、筋生検所見であり、従来福山型先天性筋ジスト

ロフィー症に細胞浸潤を認めた報告がなく、この点のみが福山型筋ジストロフィー症にしては、問題になると考えられる。先天性筋ジストロフィー症の脳 CT スキャンの所見として福山らがまとめた報告の中に白質にびまん性に low density を認めた 3 例があり、本例の CT 像はそれとほぼ一致するものと考えられる。

第 1 例に比較すると第 2 例は家族歴もな

く、小児の多発筋炎にしばしば見る per fascicular atrophy などからも非常に早期に発症した多発筋炎と考えることもできる。

以上、臨床的には福山型先天性筋ジストロフィー症に相違する点はないと思われる症例と、同じく先天性発症であるが、家族歴のない症例とを報告し、両者におけるステロイド投与の効果を述べ、先天性筋ジストロフィー症の発現の機序に関する一考察とした。

17) 成長障害, 骨変形を伴った筋緊張症の1例

——特に, その筋生検所見について——

茂 在 敏 司^{*}

研究協力者 小 西 慎 吾^{*} 増 井 義 一^{*}
竹 中 正 純^{*} 福 田 市 蔵^{*}

Schwartz-Jampel 症候群は, 特異な顔貌, 低身長, 骨および関節の異常と筋緊張亢進を伴う症候群として現在までに 26 症例 23 報告 (但し Catel らが 1951 年に報告した例では筋緊張亢進については記載がない) がみられ, わが国では, 井形, 納らにより第 1 例が報告されている。我々は, 同様症例を検索する機会を得, かつ筋生検において興味ある所見を得たので文献的考案を加えて報告する。

症例: 男児, 7 歳。

主訴: 低身長と歩行障害。

家族歴: 両親は, 従兄妹結婚, 母方の祖母も血族結婚である。家系内に同病者は認められない。

既往歴: 満期安産, 出生時体重は 3.1 kg で乳児期の発育に異常を認めない。

現病歴: 歩行開始は, 1 年 2 ヶ月, 4 歳時に歩行時に足をひきずり, 階段の上昇が困難となる。5 歳時, 他の子供に比し動作が遅く, かつぎこちなく, 低身長に気付く。その後動作の遅れが目立つようになり, 昭和 53 年 8 月 14 日大阪労災病院小児科入院に至る。

現症: 身長 103.4 cm (-3.36 SD), 体重 16.2 kg (-1.90 SD), 体格は筋肉質で, ハト胸, blepharophimosis を伴う特異な顔貌を呈し, 歩行時に一見運動失調を思わせるがごと

き, 全身の非常にぎこちなく遅い動作を示し, また手を強く握らせた後の手指の開排の遅延を認めた。これは寒冷に影響を受けず, percussion myotonia は認められなかった。安静時の骨格筋は, 非常に緊張し, 触れると硬い。この筋緊張亢進は全身麻酔時やや軽減するが, 不十分である。筋力低下は明らかでない。IQ は 107 で, 脳神経系, 知覚系には異常を認めない。深部反射は一様に低下し, 病的反射は認められなかった。その他, 内科的にも特記すべき異常を認めなかった。

血液, 血清学的検査所見: CPK が 241 IU BB 0%, MB 2%, MM 94%, Alb 4% と軽度増加を示し, IgA が 10 mg/dl 以下と低値を示す以外には, 血液一般検査, 血沈, 血液化学, S-GOT, S-GPT, LDH, Al-p, アルドラーゼ, など血液酵素に異常を認めなかった。

内分泌検査所見: 副腎機能, 甲状腺機能に異常を認めず, TRH 負荷試験, LH-RH 負荷試験, 50 gGTT, L-DOPA 負荷による GH 刺激試験を行ったが, いずれの検査にも異常を認めなかった。

他, 尿検査, 髄液検査, 脳波, 心電図, 染色体検査にも異常を認めなかった。

レ線検査所見: 頭蓋骨の変形と顔面骨の低形成 (図 3) 腰椎側彎, 寛骨臼の変形 (図 1) が認められた。

* 大阪医科大学第一内科

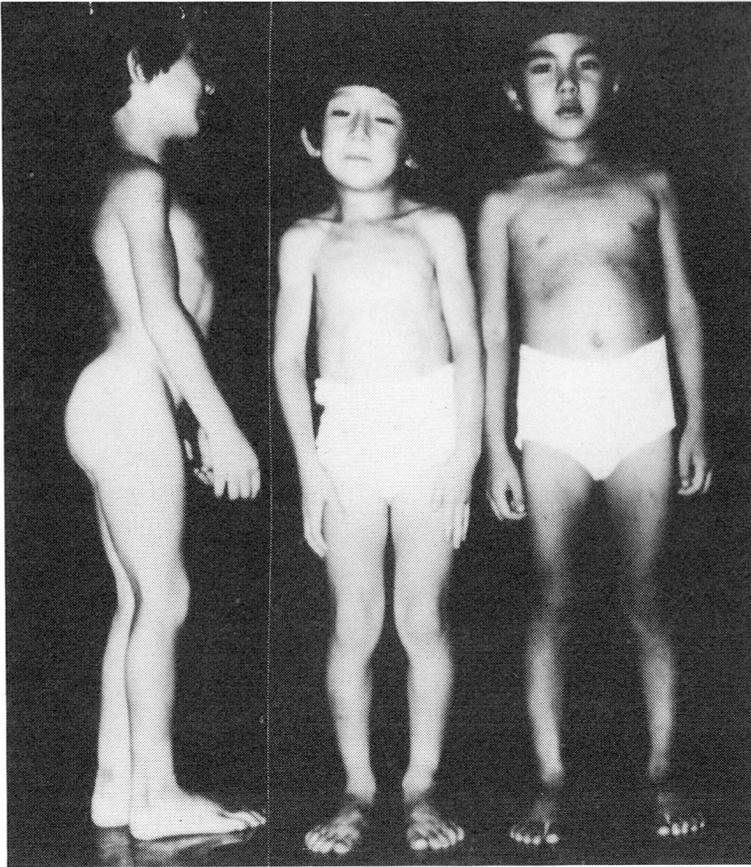


図1 本症例の全身像
向って左、側面像
中、正面像
向って右、1歳低年齢の正常児。

症例 M. H. 7歳 ♂



図2 本症例に認められた myotonic discharge

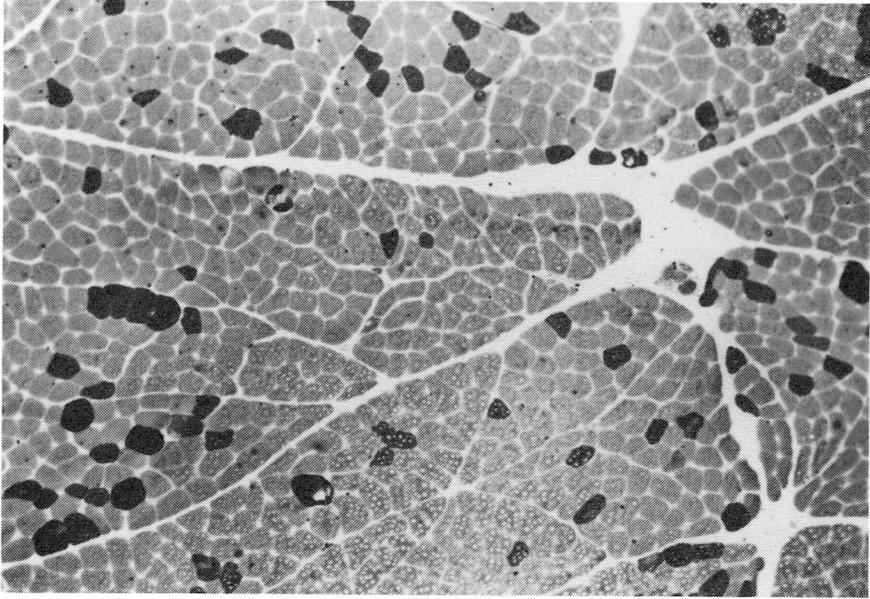


図3 ATPase 染色 (preincubation pH 9.4)×40
 著明な type I fiber predominance を認める。

筋電図検査所見：検査針挿入および機械的
 刺激に続いて典型的な myotonic discharge
 を認めた (図2)。しかし随意最大収縮時の
 interference pattern には異常を認めず、弱収
 縮時の個々の NMU の性状は正常であった。

筋生検所見：右大腿四頭筋にて施行。

(I) 光顕所見 (組織学的, 組織化学的)：

①少数ではあるが、散在性に肥大傾向を示
 し、HE 染色で無構造にエオジンに濃染する
 変性線維が認められた。その他、核の中心移
 動、あるいは endomysial fibrosis を伴う小径
 変性線維の小集団の存在も認められた。

② ATPase 染色 (preincubation pH 9.4,
 4.6, 4.2)にて筋線維径は 10~60 μ の間に分
 布し、平均線維径は type I fiber 30.4 μ , type
 II fiber 31.8 μ であった。即ち各型線維の大
 きさは年齢的にはほぼ正常範囲にあり、特に肥
 大傾向はみられなかった。しかし筋線維の型
 別頻度をみると type I fiber が 74 % をし
 め、著明な type I predominance を認めた
 (図3)。

③ Cholinesterase 染色にて、運動終板の多
 くは変形し、elongation がみられた (図4)。

④ NADH-TR 染色にて軽い moth-eaten
 様像を呈する線維もみられた。

⑤ Phosphorylase 染色、PAS 染色では、特
 記すべき所見を認めなかった。

(II) 電顕所見：図5のごとく mitochondria
 の腫脹、破綻、空胞化、および crista の形
 態の変化などが認められ、一部に myelin 様
 構造物の形成がうかがえた。また一部に Z-
 lines の消失が認められた。

myelin 様構造物は、mitochondria 内のも
 のの他、sarcolemma に近接して sarcoplas-
 ma 中にも比較的多く認められ、また極少数
 ではあるが、核内にも核膜に近接して認めら
 れた。しかし、myofibril は、全般にその構造
 がよく保たれていた。

以上が、本症例の筋組織の電顕観察による
 主なる変化であるが、いずれも非特異的なも
 ので、myotonic syndrome の他、種々の疾患
 において認められるものである。



図4 Cholinesterase 染色×400
運動終板の elongation が認められる。

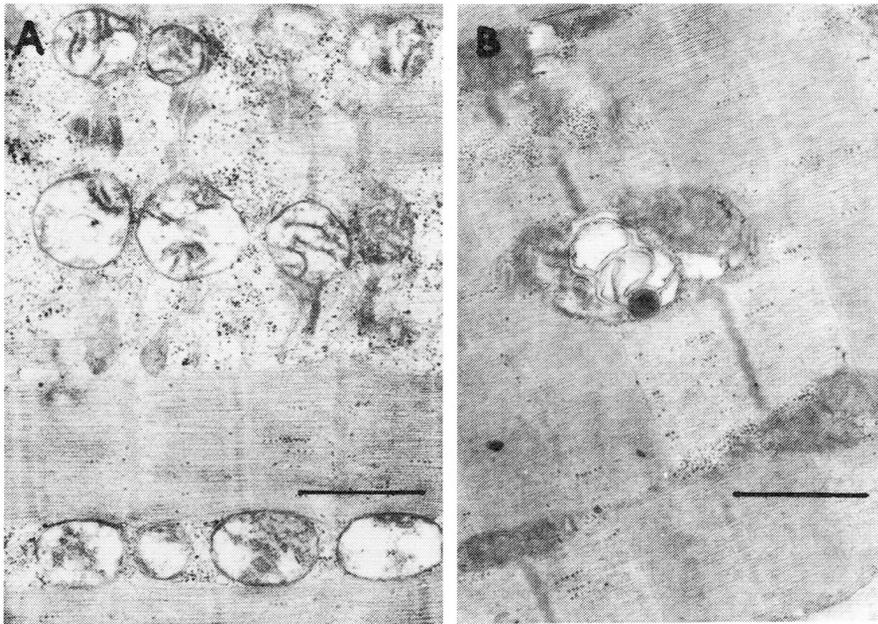


図5 右大腿四頭筋電顕像
A. mitochondria の腫脹および破綻, Z-lines の消失が認められる。
B. mitochondria の crista の形態の変化が認められ, 一部に myelin 様構造物の形成がうかがえる。

考 案

本症例は典型的 myotonic discharge を伴う全身性筋緊張亢進に blepharophimosis を伴う特異な顔貌、低身長、頭蓋骨を含む骨格の異常を合わせ持ち、1962年 Schwartz および Jampel¹⁾により報告され、現在一般的に Schwartz-Jampel 症候群と呼ばれているものに相当するものである。本症例において認められた筋生検所見の特徴は、①軽度の筋原性変化、②組織化学的検索 (ATPase 染色) で認められた、著明な type I fiber predominance、③コリンエステラーゼ染色による運動性筋終板の elongation である。このような所見の1つ1つは色々な場合にみられる非特異的变化である。しかし著明な type I fiber predominance および運動性終板の変形は、現在の一般的な考えからは支配神経異常の存在を示唆するものである。特に、筋構成線維型の配分の異常は実験的に交叉神経支配によりもたらされ得ることはよく知られている。しかし、本症例の筋電図検査では、脱神経や reinnervation を示す神経原性異常所見は認められていない。従って、本症例にみられる type I fiber predominance は、いかなる病態にもとづくものか、本症例群の病態、あるいは、筋構成線維型を規定する因子と関連して興味ある所見である。

さて、Schwarz-Jampel 症候群の臨床的特徴は blepharophimosis を伴う表情にとぼしい特有の顔貌や骨異常のほか特に病態生理学的に注目されるのは marionette like gait, windiny doll などと表現される特有な動作の異常である。これは先天性筋緊張症や筋緊張性ジストロフィー症に認められる stiffness と比べると、よく似てはいるが、その筋硬直が全身性であり、運動により軽減し難く、長く持続する性質が強い点でやや異なっているように思われる。1961年 Isaacs²⁾は、全身の筋硬直を主徴とし、異様な歩行障害を呈し、筋電図で spontaneous continuous activity を呈する症例を報告している。これは現在

syndrome of the continuous muscle fiber activity, armadillo man, neuromyotonia, pseudomyotonia, quntal squander などと呼ばれているものである。Schwartz-Jampel 症候群の臨床的特徴は、顔面をのぞいてその全身性、持続性の点からみると、いわゆる myogenic myotonia の患者にみられる筋緊張亢進よりも、この neuromyotonia にむしろ近いように思われる。事実、Schwartz-Jampel syndrome の報告例の多くに (9例) 電気生理学的に myotonic discharge の他に、neuromyotonia に似た spontaneous activity が認められている。すなわち Schwartz-Jampel 症候群では、多くの例で電気生理学的に myogenic myotonia と neuromyotonia に近い状態を合わせもっていると云えるであろう。この電気生理学的異常性によって、Schwartz-Jampel 症候群の異様な歩行その他の動作の障害は理解されるものである。我々の例では、myotonic discharge は認めているが、残念ながら、まだ spontaneous activity の有無に関して十分な観察がおこなわれていない。また既に報告されている Schwartz-Jampel 症候群例の中にも、spontaneous continuous activity の記載のない例がみられるが、これらにおいてもまた我々の例においても本症候群を形成する重要な症状—異様な動作障害—の基本的病態として spontaneous continuous activity の存在することは当然である。

以上に述べた、臨床病態、電気生理的病態と筋組織化学との関連で注目されるのは、Salmans ら (1969)³⁾、Romanul ら (1974)⁴⁾ の実験である。彼らは、家兎の common peroneal nerve を 10/sec の頻度 (normal slow red muscle fiber の活動時にみられる神経の impulse の頻度に相当するという) で持続的に刺激すると 4週から 8週で、本来ほとんどが fast fiber (白色筋) よりなる前脛骨筋が組織学的にも電気生理学的にも slow fiber (赤色筋) に変化することを報告している。この観察は筋線維の型が、持続する電気生理学的状

態の変化により変りうる事を示すものであり、極めて興味深いものである。Schwartz-Jampel 症候群例および neuromyotonia 症例で、筋について組織化学的な検索が行なわれているものは少なく、かつ筋線維型の配分状態に必ずしもふれられてはいない。しかし Schwartz-Jampel 症候群で、Fariello (1978 年)⁵⁾の報告例では type I fiber predominance (type I fiber—約 63%) が認められ、又 neuromyotonia 症例において Black (1972 年)⁶⁾は、type II fiber が完全に欠損し、type I fiber しか認められなかったことを報告している。

以上の事より、本症例において認められた type I fiber predominance は一電気生理学的観察が、現時点では、不十分ではあるが一諸症状をひきおこしていると思われる電気生理学的異常にもとづきひき起こされたものである可能性が大きいと考えられる。

筋線維の型は交叉神経支配実験にみられる如く、支配神経によりその型を変えることはよく知られており、そこに支配神経からの trophic factor の存在が考えられている。

上述の如き考察からすれば神経の筋に対する電気生理学的影響そのものが trophic factor の一つであることを推測せしめるものである。

結 論

(1) Schwartz-Jampel 症候群の 1 例を呈示した。(2) 生検筋の検索において、特に著明な type I fiber predominance が認められた。(3) type I fiber predominance の原因として臨床症状の中核をなす異様な動作障害の基本としての電気生理学的異常——恐らくは、neuromyotonia に近い病態——が関与している可能性を文献的に考察した。

本症例の直接診療に当られ、かつ我々に検

索する機会を与えるとともに、当研究班にて発表する事を許可された、大阪医科大学小児科、美濃 真教授、大阪労災病院小児科、林正樹、岡林良三両先生に深謝致します。

文 献

- 1) Schwartz, O. and Jampel, R. S. : Congenital blepharophimosis associated with a unique generalized myopathy. Arch. Ophthalmol, 68 : 52, 1962.
- 2) Isaacs, H. : A syndrome of continuous muscle fiber activity. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 24 : 319, 1961.
- 3) Salmons, S. and Vrbová, G. : The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. J. Physiol, 201 : 535, 1969.
- 4) Romanul, F. C. A., Sréter, F. A., Salmons, S. and Gergely, J. : The effect of changed pattern of activity on histochemical characteristics of muscle fibers. In : A. T. Milhorat (Ed.), Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy II (Proceeding of an International Conference, Carefree, Arizona, October, 1973) (International Congress Series, No. 333), Excerpta Medica, Amsterdam. 1974. p. 344.
- 5) Fariello, R., Moloff, K., Murphy, E. G., Reilly, B. J. and Armstrong D. : A case of Schwartz-Jampel syndrome with unusual muscle biopsy findings. Ann Neurol, 3 : 93, 1978.
- 6) Black, J. T., Garcia-Mullin, R., Good, E., and Brown, S. : Muscle rigidity in a newborn due to continuous peripheral nerve hyperactivity. Arch Neurol, 27 : 413, 1972.

18) 筋ジストロフィー症諸病型における筋病変の特徴について

田 辺 等^{*,†}

研究協力者 野 沢 胤 美^{*} 内 潟 雅 信^{*}
塩 沢 瞭 一^{*} 原 満^{**,†}

目 的

筋ジストロフィー症 (DMP) の臨床病型には、周知のごとく、Duchenne 型, benign Duchenne 型~Becker 型, 肢帯 (LG) 型 [malignant LG 型 (三好) を含む], 顔面肩甲上腕 (FSH) 型, 先天型 (福山型); 眼筋型・眼筋咽頭型・遠位型ミオパチーなどがあり, それらの呼称が臨床診断としても用いられている。これらの分類上, その病態要素として遺伝形式・発症時期・筋障害部位特異性などの点については, それぞれにある程度明確な差異を認め得る。然し, それらの臨床病型に対応する筋病変については, 各病型ごとの差異を見出すのは一般に困難とされ, 業績にも乏しい。我々はこの観点から再検討を試み以下の知見を得たので報告する。

対象および方法

自験 DMP (虎の門病院, 入院・外来・集団・居宅検診例, 1970 年以降) 約 350 例のうち, 適応を考慮して筋生検を施行した病型診断確定例 (いずれも入院例) 42 症例につき提示した。内訳は Duchenne 型 11, 肢帯型 16, 顔面肩甲上腕型 5, 先天 (福山) 型 10 例であった。尚別に筋強直性 (筋緊張性) ジストロフィー 31 例の筋病変とも対比した。

* 虎の門病院神経内科

** 虎の門病院病理学科

† 沖中記念成人病研究所

筋病変の検索は, 一般病理組織学的 (パラフィン切片による HE, Azan, PAS, KB 各染色, Bodian 鍍銀法など), 組織化学的 (クリオスタット切片による HE, trichrome 変法などの一般染色を併せ, 主として酵素組織化学的に DPNH-TR, SDH, myosin ATPase, phosphorylase, cholinesterase など), 電顕的方法 (グルタル・オスミウム二重固定法) によりおこなった。また各病型ごとの臨床経過, 重症度, 他検査所見 (筋電図, 血清 CPK 値および isozyme 分画, その他の一般検査など) と対比検討した。筋生検により検索した部位は, 症例ごとに一般原則上最も適した筋を選んだが, 結果的には全例四肢近位筋のうちそれぞれ 1 か所で, 42 検体の内訳は上腕二頭筋 6, 上腕三頭筋 9, 三角筋 5, 大腿四頭筋 14, その他 8 であった。

結 果

DMP 全体に共通する変化としては, 筋線維大小不同 (萎縮・正常大・肥大線維を含む散在性変化するいわゆる spectrum 型の histogram), 筋線維構築異常 (myolysis, moth eaten 様変化, ミトコンドリア異常など), 反応性病態 (少数の phagocytosis, ごく一部の血管周囲性小円形細胞浸潤など), 中心核, endomysium の線維化, 脂肪浸潤などがあげられる。

DMP 諸病型ごとに比較的特色ある病変としては, 次下の諸点があげられる (図 1)。

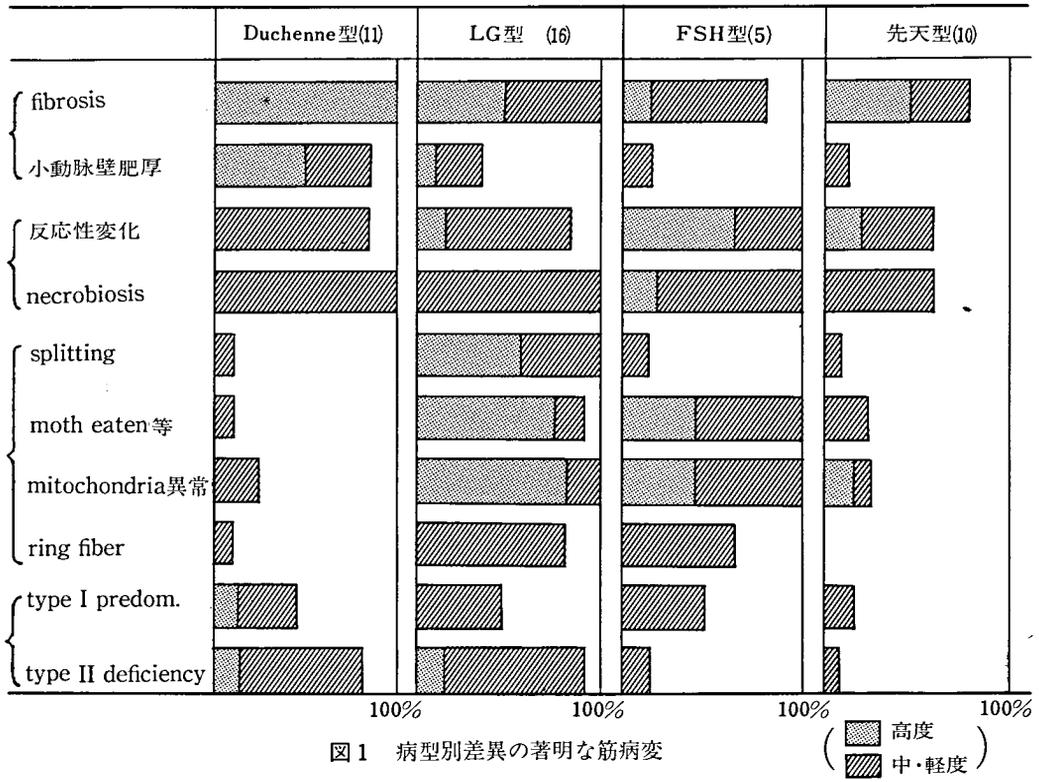


図1 病型別差異の著明な筋病変

(■ 高度
▨ 中・軽度)

1) Duchenne 型：①間質とくに endomysium, また perimysium, epimysium にも線維化がとくに著明で偽小葉状の筋線維束が形成される。②間質の線維化の著明な部位にみられる小動脈壁は肥厚し、とくに中膜筋層の厚さの増大をみとめる。③進行による筋病変の程度の差が、症例ごとに、あるいは部位ごとに目立っている。④筋 fiber type については全体として sameness property を示すことが多いが、症例により type I predominance, type II deficiency, 中間型 fiber type の混在をみることがある。⑤筋線維の splitting, moth eaten 状構築異常, ミトコンドリア異常, ring fiber, myolysis・necrobiosis, 反応性変化なども時にはみられるが、LG型や FSH 型に比して出現率は低い。

2) LG 型：① splitting がとくに高率にみられ、②再生現象が目立ち、③ mitochondria 異常を伴う萎縮線維 (moth eaten 様変化な

ど)が多く、④ type I predominance, type I atrophy, fiber type 分別異常などがみられ易い。⑤変化の軽い筋では間質線維化に乏しくむしろ small angulated fiber がモザイク様に配列している像のみみられることがある。

3) FSH 型：① LG 型に類似した特徴 (前項①～⑤) があるが、とくに②反応性小円形細胞浸潤や phagocytosis が他型に比し相対的に目立ち、③ fiber type 分別異常, type II hypertrophy もみられた。

4) 先天(福山)型：① Duchenne 型に比し、初期より、また同年代でその病変の程度ははるかに高度である。②筋線維径は全体として一様に細く、③構築上の network が粗で、④ fiber type の未分化性を示唆する分別異常がしばしば認められる (②③④は未分化性を示唆する所見)。⑤一部にごく僅かの神経原性変化が加味されているが一般的な所見ではない。

各病型の筋病変 histogram について：前記 4 病型について megahistogram (各例ごとに筋線維 300 個以上計測したものの合成) を作製したものを総括的に観察すると、次のような特徴があげられる (図 2)。

① Duchenne 型は約 55μ を中心としたほぼ典型的な spect-

rum pattern を示すが、② LG 型では肥大線維の比率が高く右方への延長をみる、③ FSH 型では平均直径は前 2 者よりやや高いが、萎縮線維としての左方推移が目立っている。④ 先天 (福山) 型では前述のように平均直径が低いことが示される。

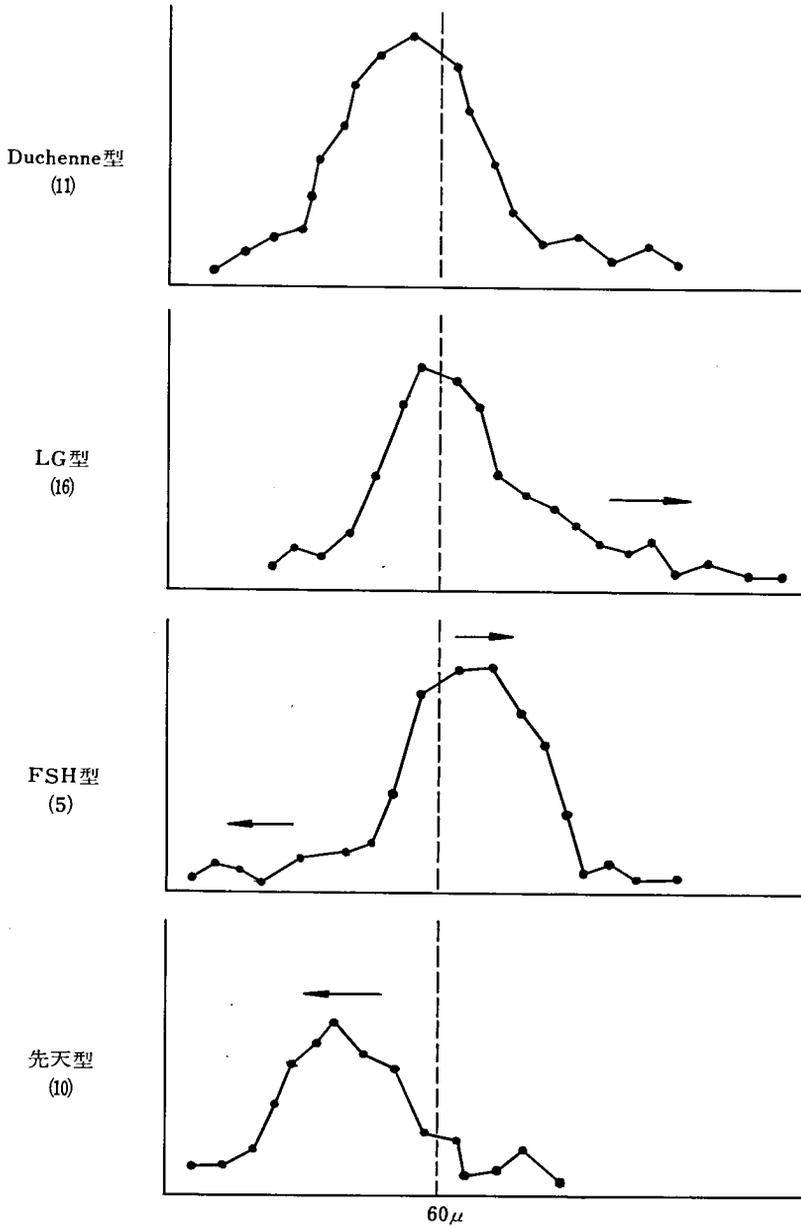


図 2 Megahistogram 上の特徴 (5 μ 巾単位)

考 察

「目的」の項に示した趣旨で検索した結果を検討し次の如く考察を加えた。

1) 筋ジストロフィー各病型のうち、代表的な上記4型について示したが、臨床病態(症状・経過・CPK値などの検査所見や、遺伝形式)の差異ほどの明確な対比は得にくかった。然し、病型ごとの筋病変の共通点以外に前記のような重要ないくつかの相違点を見出し得たことも事実である。それを小括すれば、① Duchenne型における fibrosis と血管病変(とくに壁の肥厚)と特異な fiber type 異常、反応性変化ないし再生現象、② LG型における splitting, moth eaten 状構築変化, mitochondria 異常など、③ FSH型における反応性変化(細胞浸潤・phagocytosis など)と構築異常、④ 先天型における未分化性の遺残などがあげられる。また megahistogram 上の差異についても注目される。

2) 以上の変化のうち、fibrosis は筋ジストロフィー全体に共通の問題であるが、疾患病型による一般的な差異は単に重症度や経過のみの問題ではなく、やはり筋病変を構成する諸要素の多系統性における比率の差異であることが示唆され、多系統性遺伝における phenotype の出現度の差に帰し得る問題とも考えられる。但し血管病変については、fibrosis の特に著明な部位の小動脈に中膜の肥大を認め、年齢に関係なくむしろ Duchenne 型にこの傾向が強いことから、fibrosis の結果硬化した外膜方向への圧力学的な影響で中膜筋層の真性肥大が生じた過程とも考えられる。他の構築異常な fiber type 異常についても多系統性遺伝における phenotype 上の差と考えられる所見が多い。

3) また一般に、筋ジストロフィーにおける反応性病変については、狭義の炎症ではなく、myolysis 等によって生じた筋線維の変性に対し組織反応を起した要素と、necrobiosis における再生現象とがこれに相当する背景と考えられる。鑑別診断上は日常の診療でまぎ

らわしい面もあるが、別の本報告(演題20)において慢性型多発性筋炎の側から論ずる。

4) 筋ジストロフィーと、いわゆる神経原性病態の関係は、とくに筋電図上 high amplitude, long duration などの要素が混在すると症例報告の蓄積や、筋病変における“群集萎縮”的要素の指摘などが、その混在説の論拠となっている。然し真の神経原性変化の合併のない大部分の筋ジストロフィーにおいては、上記の見かけ上の神経原性要素は、先ず非特異的な二次的病態と考える方向が先ず重要と思われる。たとえば、fibrosis に伴う血管肥厚などのため筋内循環障害をおこした結果、小区域の虚血性萎縮巣が群集萎縮様変化を示している可能性、また組織反応により筋束内末梢神経に影響を与えたり(多発性筋炎の病態の一部に類似)、fibrosis そのものが筋内神経の障害を起したりする場合が考えられる。さらに二次的側彎や、筋萎縮のための骨・靱帯への負荷なども根障害としての神経原性変化を惹起する可能性もある。以上の神経原性変化とは、motor unit 内の2次運動ニューロン障害という意味のいわゆる“classical neurogenic pattern”であるが、もちろん広義には、fiber type の分化、筋線維内 myosin の酵素活性賦与と調節、myotule の分化などに神経性因子の関与していることは周知のごとくで、その意味においては神経原性因子を考え今後の筋病態追究の思考過程に導入してゆくべき知見であろう。

5) 筋強直性(筋緊張性)ジストロフィーでは、他のDMP群に比し、中心核と鎖状配慮列、筋鞘核増加、ring fiber, sarcoplasmic massなどが著明に出現する。個々の所見は特異的ではないにしても、これらが程度と出現頻度とにおいて他病型よりもはるかに差異のあることは周知の事実である。この点も、やはり前述の多系統遺伝上の phenotype の特徴として捉えることが可能と思われる。また Becker 型 DMP (いわゆる benign Duchenne) については、Duchenne 型の病変と LG

型の病変とを併有している印象が強いが、むしろ後者に類似している。

結 語

以上代表的な筋ジストロフィー諸病型の筋病変を比較再検討した。共通的病態の他に、病型による差異もいくつか捉え得ることを示し、それが、より本質的な phenotype 上の差であるか、非特異的な二次的病態であるかという点を中心に考察を加えた。

参 考 文 献

- 1) 田辺等：筋ジストロフィー症における筋生検。神経内科，3：209—219，1975。
- 2) 田辺等：筋生検。総合臨床，24：845—867，1975。
- 3) Dubowitz, V. & Brooke, M. H. : Muscle biopsy : A modern approach. Saunders, London, Philadelphia, Toronto, pp168—252, 1973.
- 4) Engel, W. K. : Duchenne muscular dystrophy. A histochemically based ischemia hypothesis and comparison with experimental ischemia myopathy. In "The striated muscle" (eds : Pearson, C. M. and Mostofi, F. K.) , Williams & Wilkins, Baltimore, p453. 1973.

19) 諸種神経筋疾患の筋病変における fiber type 異常と motor unit 内局在病態との関連について

田 辺 等^{*,†}

研究協力者 野 沢 胤 美^{*} 内 潟 雅 信^{*}
塩 沢 瞭 一^{*} 原 満^{**,†}

目 的

神経筋疾患の診療上、適応に叶った筋生検は有力な補助手段の一つである。とくに、筋病変に結果として現われた特徴から、逆に「その原因病態の主座が motor unit 内のどこにあるか」を生前に推定することは、とくに重要と考えられ、従来神経原性・筋原性の2大別がその表現として用いられている。我々は、さらに、筋線推大小関係のパターンの再検討から、とくに2次ニューロン内局在の推定に役立ついくつかの基本型を区別し（古典的神経原性・筋原性の“横割り”的分類のうち神経原性の部分の細分化）、また一方、筋 fiber type 異常（いわゆる“縦割り”的分類）のうち、とくに再生現象等と比較検討したので報告する（図1）。

対象及び方法

対象は、確定診断の得られた諸種神経筋疾患のうち、高度の破壊病変など要素分析上特異性の低いものを除き、本目的に適した840例を対象とし、主として組織学的・組織化学的方法により検討した。筋 fiber type 異常については840例全例につき検索したが、この

うち、筋線維大小関係の検討（motor unit 内神経原性病態のうち、前角細胞・前根・以下の末梢神経各部障害との対応）については、更に症例を厳選して172例について総括した。その内訳は、筋萎縮性側索硬化症(ALS) 24, 脊髄性進行性筋萎縮症 (SPMA) 16, Kugelberg-Welander 病 (KW) 12, Werdnig-Hoffmann 病 (WH) 5, Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) 8, 脊髄小脳変性症 (SCD) 各病型で筋病変を有するもの 19, 脊髄空洞症 5, Guillain-Barré 症候群 (GB) 9, 多発性神経炎 11, neuropathy を加味した多発性筋炎症候群 12, 糖尿病性 neuropathy 12, 平山病 4, 頸椎症 9, その他 26 であった。

方法上、筋病変は主として regular の組織学的・組織化学的方法により検索し、当初の発端例（約30例）より得られた作業仮設を、以後の自験例の臨床的検討、既存の知見との対比などにより、帰納法的に実証ないし修正して現在に至っている。また診断は、筋病変上は従来よりの“神経原性”変化としてのみの情報を含め、臨床症状・経過・他検査所見・遺伝形式などを総合的に検討し確定したもので、その上で作業仮設をふまえた下記の検討を行った。一方盲検的に筋病変のみを解析した推定病態を逆に確定診断と対比し、90%以上の適中を経験した。

* 虎の門病院神経内科

** 虎の門病院病理学科

† 中中記念成人病研究所

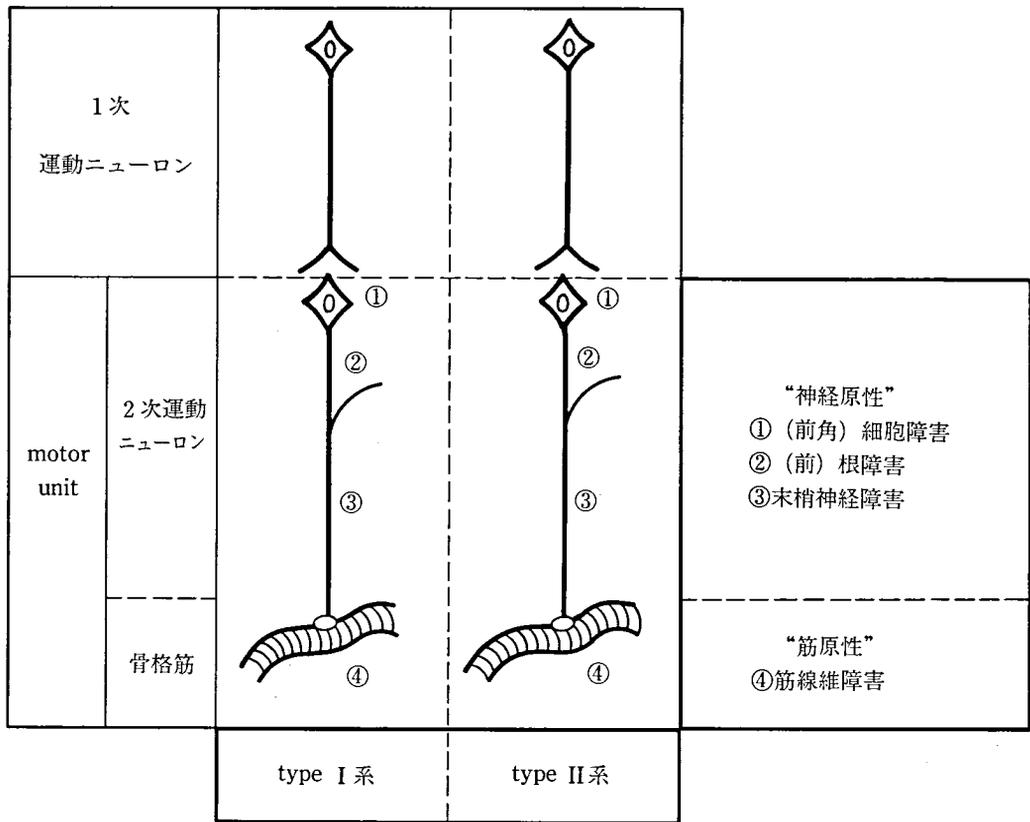


図1 筋病変に反映する motor unit 内局在因子 (模式図)

結 果

一般に筋病変を特徴づける要素は多彩であるが、我々はこのうち、とくに群集萎縮、即ち histogram で2峯性を示す、いわゆる神経原性変化に着目し、初期像より認められる基本的パターンとして、発端例より図2の上部に示した5種類を抽出し、作業仮設とした。

1) 筋線維大小関係の基本的パターン：① “小群集萎縮の多発”(萎縮角化線維2～3個ないし数個程度の群集が、ほぼ均等に散在する。進行すると一部が癒合して一見大群集萎縮に類似するようにみえるところもあるが、本質的には他部に小群集萎縮の基本が観察される。とくに ALS, SPMA では、この小群集萎縮の形は経過中よく保たれている。また萎

縮線維の mitochondria の酵素濃縮現象が明らかである)、②(a) “大群集萎縮”(初期より、筋小束単位程度の大きさの群集萎縮がみられる。本質は萎縮の程度よりもその群をなす萎縮線維数の数の大きいことにある)、(b) “なだらかな移行性”(大群集萎縮に近いが程度が軽く、且つ小束毎に明らかな区画に乏しい移行を示す)、(c) “極度の萎縮線維”の散在・群集(初期像よりやや開大した間質中に、一見核のみと誤認されるような、あるいは細胞質部の僅かに附着しているようなごく細い萎縮線維より成るが、周辺を詳細に観察することにより確実に萎縮線維であることがわかるやや軽度の萎縮筋線維との移行性が見出され)、③小角化線維の散在、一部群集(初期像

よりモザイク状に軽度～中等度の小角化線維が散在することがむしろ特徴で、進行するにしたがって小群集～大群集へ移行する。以上のうち、作業仮設としては、①は前角細胞障害、②は前根障害(a, b, c), ③はそれ以下の末梢神経障害と考えられた(但し脳幹部運動神経に対比するときは前角→脳幹部起始細胞, 前根→脳幹部起始根とする)。

2) 検索症例の確定診断との対比: 前記諸疾患の大部分を●=1例としてプロットしたところ図2の下部に示したような結果が得られた。このうち*印は各疾患について質的・量的に最も著明で特徴的なパターンであったことを示す。① ALS, SPMA では、初期より経過中、小群集萎縮の多発が本質的な所見で、これが前角細胞障害とその経過を反映するパターンであることが示唆され、作業仮設が支持された。小群集萎縮部の各筋線維は mitochondria 酵素の濃縮現象を示すが、fiber ty-

pe に関しては sameness property が主体で、再生現象は一部に存在するにしても(少数例の小規模な fiber type groupingのみ)むしろ例外的な所見であった。次に WH, GB, 平山病, 頸椎症等では②a), b), c) 3種の所

表1 Fiber typeに関する筋病変

- A. 非選択的变化 (Sameness property)
- B. 選択的变化 (Differentness property)
 - 1) 単系統性異常 (Dysproportion)
 - (i) type I } ①萎縮 (atrophy)
 - (ii) type II } ②肥大 (hypertrophy)
 - } ③構築異常 (structural change)
 - 2) 分布異常 (Abnormal distribution)
 - (i) type I } ①群集 (grouping)
 - (ii) type II } ②群集萎縮 (grouped atrophy)
 - } ③混在率増加 (predominance)
- C. 分別異常 (Abnormal discrimination)
 - 1) 再生過程 (Regenerating process)
 - 2) 分化障害 (Disturbance of differentiation)

表2 筋病変における motor unit 内局在病態因子 (まとめ)

大小関係パターン・内訳		motor unit 内 推定病態局在**	fiber type grouping	target (targetoid) fiber	"筋原性要素" 加味	
"神経原性" 変化 (2峯性) two population	◀小群集萎縮の多発 (小角化線維よりなる)	ALS SPMA KWの一部など	前角細胞障害	—~(+)	—~+	—~+
	◀大群集萎縮	WH (KW・CMTの 一部)	前根障害	+~++	—~++	—~+
	◀なだらかな移行性	平山病 頸椎症				
◀極度の萎縮線維 (散在・群集)	G-B 症候群 (KW・CMTの 一部)					
	◀小角化線維の散在 (一部群集)	CMT 諸種ニューロパ チー (KWの一部)	末梢神経障害	+~++	—~++	+
"筋原性" 変化 (鏡像型) (純粋な型) (spectrum)*		DMP その他の ミオパチー	筋線維障害	—	—	(純粋型)

* ヒストグラム所見

** 疾患名は代表的なものを例示

見のいずれかが全例にみられ、前根障害とその性状との間に密接な関係が示唆される。とくに WH では②a)のパターンと、fiber type の分別異常（未分化性および再生現象両者の要素が考えられる）、非萎縮線維の著明な群集肥大が特徴的であった。GBではむしろ浮腫状に肥大した筋線維と、浮腫状に開大した間質（とくにendomysium）中に②c)のパターンが存在することが特徴的と言える。平山病・頸椎症では②の各パターンがそれぞれ種々の程度に混在する。各種 neuropathy では③のパターンが共通である。以上のうち、KW と CMT では、むしろ①②③の各特徴が症例によりかなり混在している所見が得られることが多い。KW の中には病変の軽度の筋では fiber type grouping（再生現象）のみを示し、大小関係パターンのみではとくに異常を認めない場合も少なくない。target fiber, targetoid fiber の出現率は、末梢神経障害、前根障害と考えられる病変に高い傾向がある。

3) 筋 fiber type 異常との関係：筋 fiber type の種類については、著者らは表 1 のごとく分類しているが、このうち、fiber type grouping, fiber type grouped atrophy, および fiber type 分別異常の一部は re-innervation を反映した所見として神経原性病態の診療上重要である。この点を加味して以上の所見を表 2 に総括した。

考 察

1) 以上の結果より、作業仮設が実証されつつあるが、今後の症例の対比・蓄積により監査修正の要もあろうかと思われる。然し前述のように、その基本的着眼点としては日常の診療上有用な面が多いと考えられる。とくに盲検による筋病変の解析と確定診断との間に合致率が高いことから支持されている。

2) 古くから、筋電図と同様、この方面の区別としては、神経原性、筋原性の 2 大別に止まっていたのは、意味のあることであった

と考えられる。すなわち、所見の“読みすぎ”による誤診の自粛であった。然し、逆に得られた意味のある所見を逃さず臨床に還元する趣旨から言えば、この点を再検討する必要もあると考えられる。そのためには①所見を充分把握するに足る良質の標本を得ることと、それに基く解析に習熟することが先ず重要であろう。パラフィン切片のみならず、優れたクリオスタット切片で、組織化学的アプローチを含めた解析が必要で、その上で“読みすぎ”を抑えて所見を抽出することであろう。②次に、生検部位の選択を充分事前に検討し、（経過と疾患の性状を考慮して）optimal な部位 1 筋を原則として選定することであろう。程度はすべての症例で一致することはむしろ考えにくく、本質的な変化と、程度の差とを区別することにも習熟する必要がある。

3) また疾患により、前記の仮設として分類した motor unit 内局在病態が、比較的限局していると考えられる場合(ALS, SPMA; WH, GB など)と、各部位に共存する病態が考えられる場合(KW, CMT など)とが存在することも、逆にこの結果から示唆される。たとえば KW は、神経原性・筋原性要素の混在と一般に言われているが、症例により、また経過によりその部位的因子の関与の比率はかなり変化に富んでいるものと考えられる。

4) これらの基本的な大小関係パターンの成因の相違については、人体における“疾患”と同様な実験的裏付けは困難であるが、二次ニューロンの神経細胞の分布、神経線維の走行、病変の性状・経過、再生現象などが互いに密接に関連し合っているものと考えられる。また、target(targetoid) fiber, fiber type 異常に反映された再生現象や、いわゆる筋原性要素の加味などは末梢神経障害にとくに、また一部の前根障害に優位に認められることも、motor unit 内局在推定上併せて参考となる指標と考えられる。

結 語

以上我々は、①表題の検討をおこない、筋病変より2次ニューロン内の局在病態を推定する指標の一端を得た。②筋 fiber type との関係、③その他 target fiber, 筋原性要素の加味などを含め、臨床的意義を考慮して報告した。④筋ジストロフィーの成因・治療に関する研究の上からも、これらの研究が直接・間接に貢献し得るものと考えられる。

参考文献

- 1) 田辺等, 内潟雅信, 大石英俊, 塩沢瞭一, 野沢胤美: 筋病変における motor unit 内障害部位因子の検討——172例についての解析——, 第20回日本神経学会総会, 東京, 1979.
- 2) 田辺等: 筋生検. 神経学 (冲中重雄: 監修), vol 2, p.369, 南江堂, 東京, 1976.
- 3) 田辺等: 神経疾患診断上の問題点, とくに“神経原性・筋原性”病変, および“fiber type 選択性”筋病変について. 脳と神経 26: 274, 1974.

20) 筋ジストロフィー症と鑑別困難な慢性多発性筋炎に関する検討

田 辺 等^{*,†}

研究協力者 野 沢 胤 美^{*} 内 潟 雅 信^{*} 塩 沢 瞭 一^{*}
原 満^{**,†} 北 村 元 仕^{***,†}

目 的

筋ジストロフィーの孤発例と慢性多発性筋炎とは、日常その鑑別が困難である場合が少なくない。とくに筋ジストロフィーに関する基礎的研究で、臨床診断に基いて症例が蓄積されて新知見が得られた場合でも、その基になる臨床総合診断に誤りがあった場合に重要な問題を残す。以下筋ジストロフィーと、慢性多発性筋炎とで、相互に当初鑑別困難であった例で、精査の結果診断の確定したものにつき、その鑑別上有用であった点を抽出して報告する。(継続研究)

対象および方法

対象は、虎の門病院入院精査例のうち(いずれも孤発例)、①当初筋ジストロフィーを疑い、後に慢性多発性筋炎であることが判明した22例と、②当初慢性多発性筋炎を疑い、後に筋ジストロフィーであることが判明した5例、計27例で、その内訳は表1に示す。

方法上、それぞれの症例につき、詳細に病歴聴取・現症・経過・一般検査所見・家系調査等を再検討し、とくに筋電図・血精CPK値・筋生検等と対比して解析考察した。筋病変は組織学的(パラフィン切片一般染色と、

表1 検討対象(計27例、いずれも孤発例)

1) DMP	→慢性多発性筋炎: 22
Duchenne	→ 3
LG型	→ 4
FSH型	→ 2
先天型	→ 3
病型不明	→ 10
2) 慢性多発性筋炎	→ DMP: 5
	→ LG型 3
	→ FSH型 2

クリオスタット切片によるHE, trichrome変法等), 組織化学的(パラフィン切片によるレギュラーの酵素組織化学), 電顕的(グルタール・オスミウム2重固定法)を併用して検索した。

結 果

1) 病態類似性・相違性に関する臨床的着眼点: ①孤発性の筋ジストロフィーの場合(とくに精査を要することが多い), ②筋ジストロフィーの発症年齢, ③発症状況, ④進行状況に問題があるとき, ⑤部位特異性(筋萎縮・筋力低下・腱反射異常等の分布の特徴)に問題のあるとき, ⑥血清CPK値とそのisozyme分画にとくに問題があるとき(急性多発性筋炎または筋線維破壊を伴う型では血清CPK総活性上昇, 回復初期にMB分画の一過性上昇を示すが, 血管間質型ないしは慢

* 虎の門病院神経内科

** 虎の門病院病理学科

*** 虎の門病院臨床化学科

† 冲中記念成人病研究所

性多発性筋炎の場合には CPK 値上昇は乏しい), ⑦筋電図上, myogenic pattern の分布が patchy であったり, 明らかな神経原性変化が混在するとき, ⑧筋病変(別項), ⑨治療上, ステロイド療法・リハビリテーション効果などが, 予想以上に筋ジストロフィーとして良好であった場合などは, 当初筋ジストロフィーを疑った場合でも慢性多発性筋炎との鑑別を十二分におこなう必要のあることが強調される(表2).

表2 筋ジストロフィーと慢性多発性筋炎との病態類似性・相違性に関する主要着眼点

1. 孤発型(全例)	22例
2. 発症年齢(DMPとして非典型型)	14
3. 発症状況(比較的急激)	12
4. 進行状況(途中で緩徐化)	13
5. 部位特異性(不規則・非定型)	18
6. 血清CPK(程度の異常, MB比率)	12
7. 筋電図(neurogenic混在)	10
8. 筋病変[別示]	20
9. 治療効果(良好)	18

表3 慢性多発性筋炎の鑑別に有力な所見

- ①筋線維束の変化にむらが多い
- ②しばしば大なり小なり群集萎縮をみる
- ③ type II atrophy を示すことが多い
- ④筋構築異常の種類が多彩
- ⑤間質の線維化が不規則(とくに血管周囲に強い)
- ⑥脂肪浸潤が比較的少ない
- ⑦血管周囲の滲出・浮腫が想定され易い
- ⑧血管壁の肥厚・空胞化・線維化を認め易い
- ⑨一部の明らかな細胞浸潤をみる人が多い
- ⑩血管周囲の筋線維の変化がとくに強い
- ⑪蛍光抗体所見(γ -G: IgG, A, M 陽性など)

2) 筋病変についての検討: a) 筋ジストロフィーにおいても, fibrosis, 動脈壁肥厚, 再生現象, phagocytosis, 少数の細胞浸潤(小円形細胞浸潤を主とするが, 血管周囲性ないし myolysis の周囲など)は慢性多発性筋炎と同様に認められる. b) 然し, 両者の鑑別上, 慢性多発性筋炎については, 次の諸項目が比較的特徴的であった(表3). このうち, 要約すれば, 慢性多発性筋炎における, 反応性病態の特徴, 筋の虚血性病変の特徴, 神経原性変化(筋内または筋外末梢神経障害が主体)の混在, type II atrophy, patchy な病変などが強調される.

考 察

1) 筋ジストロフィーの場合, 遺伝性の明らかな場合は鑑別は容易である. 然し多発性筋炎でも, アトピー性皮膚炎や気管支喘息等に共存するものは稀に家系内発症を示すものもある.

2) 反応性病態については, 筋炎の場合はいわゆる液性免疫・細胞性免疫の関与で, その本質的な病態となっているが, 筋ジストロフィーでも, 再生現象としてもかなり類似の所見を示し, また, myolysis をおこした組織の局所的非特異的反応としていわゆる炎症所見に一部類似する病態が得られることがある. この意味でも, 表3に示した諸要素の総合判断は重要であろう.

3) 両者の鑑別があくまでも困難な場合には, ステロイド療法やリハビリテーションによる治療を試み, また経過を観察する. この場合治療は充分に行う必要があり, 例えばステロイド投与の量・期間が乏しい場合, とくに慢性型筋炎では充分に成果の上らないことが少なくない. 両者をもし誤るのであれば, 筋炎をジストロフィーと誤るよりも, ジストロフィーを筋炎と誤った方が実際の治療・care の面で患者のためには相対的に有益であろう. 然し臨床総合診断をもとにして, 患者直接の病態につき基礎研究を展開してゆく場

合には、その診断は確実でなければならない。
やむを得ず判定保留となることもあるが、本
検討が、その一端に資し得れば幸である。

結 語

以上、日常の筋ジストロフィーの診療上、
とくに孤発例につき問題となる、慢性多発性
筋炎との鑑別につき検討し、知見を整理して
報告した。

参 考 文 献

- 1) 田辺等：多発性筋炎症候群。内科，31：
1206，1973。
- 2) 田辺等：多発性筋炎症候群(その1)，脳
と神経，26：854，1974；(その2)，26：
950，1974。
- 3) 田辺等，野沢胤美，内潟雅信，大石英俊，
山根清美：多発性筋炎150例の臨床的検
討および知見補遺。第19回日本神経学会
総会，東京，1978。

21) Duchenne型進行性筋ジストロフィー症(DMD) における横細管系 (T-system) の研究

— 高圧電子顕微鏡による観察 —

小 口 喜三夫*

目 的

ランタン金属を tracer とする Revel-Karnovsky 法による電顕の観察から膜構造物のひとつである T-system が DMD において形態的異常を示すことを報告してきたが、今回は同法により、1~1.5 μ の厚い epon-araldite 包埋無染切片を高圧電顕 (200 kV) を用いて検索し、T-system の変化を観察することを目的とした。

対象及び方法

DMD 3 例および正常コントロール 2 例、routine の方法により生検された筋を Revel-

Karnovsky 法によりランタン金属を T-system 内に浸入させ、シリーズアルコールとプロピレンオキサイドで短時間脱水後、epon-araldite に包埋した。厚さ 1~1.5 μ の標本作製し、この標本を無染色のまま高圧電顕日立 H-700 を用い 200 kV の加速電圧で観察した。

結 果

〈コントロール〉 無染厚切片で観察した T-system は A 帯と I 帯の移行部に存在し、標本が 1 μ 以上の厚さがあるため、超薄切片では破線として観察された T-system は、上下、左

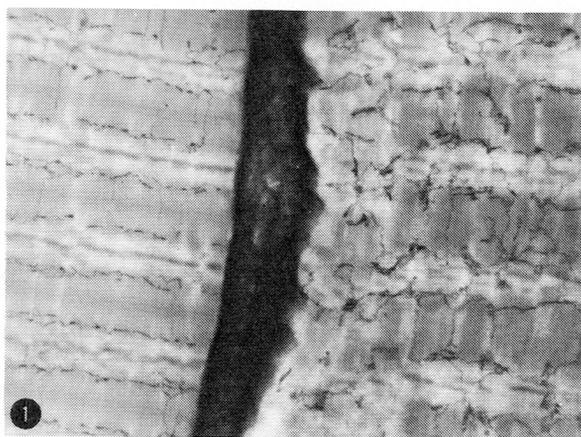


図 1 DMD. 左側筋線維では正常に近い T-system が観察される。右側筋線維の plasma membrane は凸凹を示すが、ランタン金属が plasma membrane を通過することはない。不規則な T-system の走行と多数の縦走 T-system がみられ、管径動揺も著しい。 (×6,000)

*信州大学医学部第三内科

右の隣りどうしの T-system と連続性を持った網状管状構造として観察された。T-system の径は triad の部位で 2～3 倍の大きさとなり、かつ他部より high density を示した。筋原線維と平行に走行する T-system も少なからず観察された。

〈DMD〉 正常の筋線維も観察されるが(図 1 左側筋線維)、他に電顕観察上、T-system 以外の微細構造の変化のないと思われる筋線維において、T-system の規則的な走行性は全く失なわれている。plasma membrane は不規則な凸凹を示すが、ランタン金属が plas-

ma membrane を通過することは、調べ得た限りではみとめられなかった(図 1, 右側線維)。筋原線維と平行に走る T-system の頻度が増し、多くの縦走 T-system の径は、A 帯の両端部では数倍の太さとなっていた(図 2)。更に T-system の走行が著明に不規則となり、糸くず様の形態を示すものがみられた(図 3)。多くの T-system と連続性を持ち、T-system よりも low density で、かつ広い面積をもつ region があり(図 4)、さらにレース網状構造を示すものが観察された(図 5)。

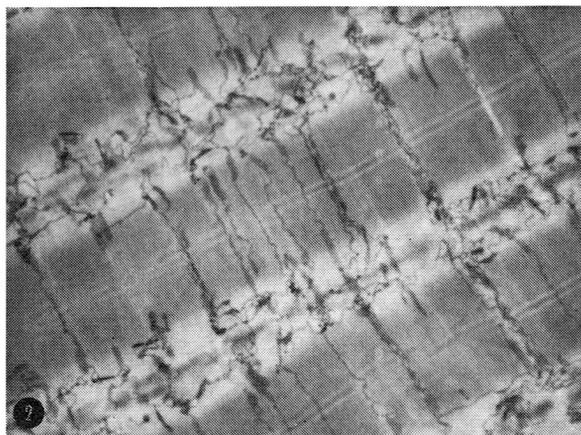


図 2 DMD. 縦走 T-system の増加がみられる。多くの縦走 T-system は A 帯の両端で太くなっている。(×11,500)

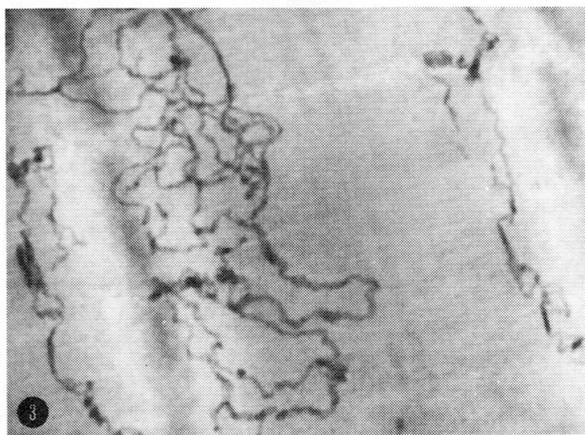


図 3 DMD. T-system は糸くず様走行を示している。(×26,000)

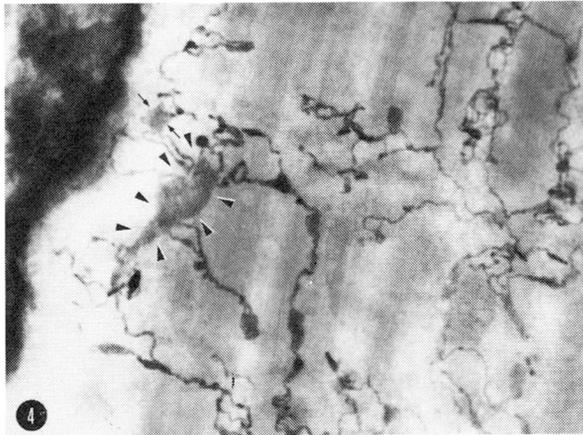


図4 DMD. T-system よりも low density でかつ広い面積をもつ region (arrow heads, arrows) がみられる. (×16,500)

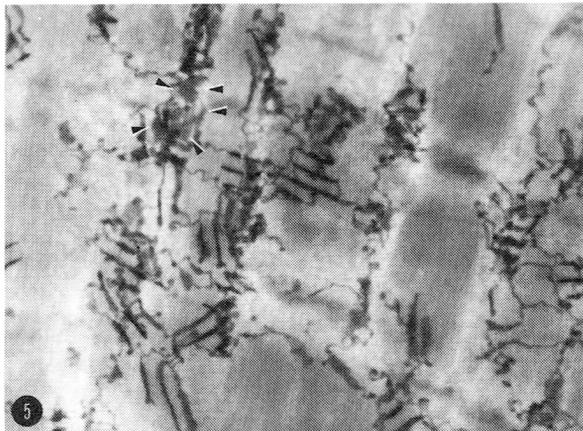


図5 DMD. T-system は著明な不規則性を示している. T-system より low density でレース網状様構造がみられる region (arrow heads) がみられる. (×16,000)

考 察

近年高圧電子顕微鏡の発達に伴い、立体的構造を持つ器官は、 1μ 以上の厚い標本で、three dimensionalな観察が可能となった。

Peacheyら¹⁾²⁾はカエルの筋を用い、高圧電顕でT-systemの立体的構造を明らかにした。石川ら³⁾はmouseの横隔膜を用い、new bornからのT-systemの加齢的变化および赤筋白筋の相違を報告した。即ちnew bornのmouseではT-systemの発達が悪く、縦走T-systemが多い。成長するに従いT-sys-

temはA-I junctionに規則正しく配列するようになる。また、赤筋の方が白筋よりもT-systemの発達は悪いと述べている。Obaら⁴⁾はdystrophic mouseのT-systemはコントロールに比較し、発達が悪いことを報告している。我々⁵⁾はRevel-Karnovsky法で処理した超薄切片の電顕による観察で、ヒトDMDにおけるT-systemの異常、即ちT-systemの分布異常、走行異常、管径の動揺増加、さらにT-system-SRのanastomosisの存在について報告した。今回の $1\sim 1.5\mu$ の厚い無

染色切片の高圧電顕 (200 kV) による観察でも同様の変化がみとめられた。

特に T-system と連続性を持ち、かつ T-system よりも low density でレース網状構造をもつものが観察されたが (図 4, 5), これは T-system-SR の anastomosis によりランタン金属が SR 内に浸入したものと考えられる。Fahimi ら⁶⁾は、熱外傷を加えた病的状態で SR 内にランタン金属の浸入をみとめている。

Waugh ら⁷⁾は mouse の横隔膜の観察で、SR 内へのランタン金属浸入を報告した。彼らは T-system-SR の anastomosis はみとめておらず、SR と細胞外との連続性を推定している。

我々の観察ではヒトのコントロールにおいて検索した限り、超薄切片でも厚切片の高圧電顕の観察でも SR 内へのランタン金属の浸入はみとめられなかった。標本はランタン金属処理を行なう前にグルタルアルデヒドにより固定されておりランタン金属処理中の artifact の可能性はないと考えられる。従って T-system の変化、および T-system-SR の anastomosis は DMD 筋における重要な異常所見と思われる。

DMD で観察された T-system の異常が、筋の発生期から存在したものなのか、あるいは一旦正常に発達した T-system が、変化を起したものが問題となる。石川ら³⁾の報告によると、発達初期に縦走 T-system が多く存在し、かつ T-system の位置の不規則性があることなどから、DMD における T-system の変化、すなわち分布異常、縦走 T-system の存在は発生期からの T-system の異常に、さらに管径の動揺、T-system-SR の anastomosis などの変化が加わったものと考えられる。

今後、DMD の筋組織培養を使用し、T-system の発生発達に異常が存在するか究明する必要がある。

文 献

- 1) Peachey, L. D. : In Dower, D. B. (Ed.), *The Basic Neuroscience*. Raven Press, New York, 1975, p.81.
- 2) Peachey, L. D. & Eisenberg, B. R. : Helicoids in the T system and striations of frog skeletal muscle fibers seen by high voltage electron microscopy. *Biophys. J.*, 22 : 145, 1978.
- 3) Ishikawa, H. & Tsukita, S. : Three-dimensional distribution of the T-system in mouse skeletal muscle. *Proc. Fifth Int. Conf. on High Voltage Electron Microscopy*, Nakanishi Print Co., Kyoto, 1977, p.359.
- 4) Oba, T., Kanie, R., et al. : Electromechanical and morphological observations on single muscle fibers in developing dystrophic mouse. *Exp. Neurol.*, 62 : 214, 1978.
- 5) 小口喜三夫, 塚越広 : 進行性筋ジストロフィー症およびその他の神経筋疾患における T-system の電顕的研究, *臨床神経*, 18 : 266, 1978.
- 6) Fahimi, H. D. & Cotran, R. S. : Permeability studies in heat induced injury of skeletal muscle using lanthanum as a fine structural tracer. *Am. J. Pathol.*, 62 : 143, 1971.
- 7) Waugh, R. A., Spray, T. L., et al. : Fenestrations of sarcoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, 59 : 254, 1973.

22) 各種筋疾患におけるFreeze-fracture法による筋細胞膜の形態学的研究

荒木 淑郎*

研究協力者 岡本 定昭*

進行性筋ジストロフィー症 (PMD) の原因は不明であるが最近、患者赤血球膜の異常が形態学および生化学的見地から注目されており、我々も昨年の本班会議総会においてPMD患者赤血球を走査電顕を用い検索し、正常者の赤血球に比し容易に変化しやすいことを報告した。

今回、細胞膜の変化をより詳細に検索する目的で、生検筋を対象にFreeze-fracture法を用いた電顕でその微細構造について検索したので報告する。

対 象

対象は全て生検により得られた骨格筋を用いた。その内訳は筋ジストロフィー症 (MD群) 5名 (PMD 2名、筋強直性ジストロフィー症 3名)、運動ニューロン疾患 (MND群) 6名、それに筋疾患のない患者 3名から外科手術中に得られた筋を control とした。

方 法

生検筋を 2.5% グルタルアルデヒドで固定後、30% グリセリンで処理し、真空蒸着装置を用い、液体窒素で約 -110°C 、 $2\sim 8 \times 10^{-6}\text{Torr}$ の真空下で切断を行ない、白金パラジウム、カーボンで蒸着し、電顕的に検索した。検索方法として protoplasmic surface (dense, 且 packed particle より成る; P

面)、及び extracellular surface (粗な particle より成る; E面) を at random に 10ヶ所ずつ 1μ 平方あたりの particle の数を数え、MD群、MND群、正常群で比較検討を行なった。

結 果

1) 正常群の P 面の particle の数は $274 \pm 18/\mu\text{m}^2$ 、E 面の particle の数は $164 \pm 11/\mu\text{m}^2$ であった。

2) MD 群の P 面の particle の数は $126 \pm 24/\mu\text{m}^2$ 、E 面の particle の数は $68 \pm 13/\mu\text{m}^2$ であった。

3) MND 群では P 面の particle の数は $240 \pm 24/\mu\text{m}^2$ 、E 面の particle の数は $143 \pm 11/\mu\text{m}^2$ であった。

即ち、正常群と MD 群との間には、P面、E面共に減少しており、それに比し MND 群では正常群と差は認められなかった。

考 按

進行性筋ジストロフィー症 (PMD) の原因の 1つとして患者赤血球膜の異常が生化学及び形態学的見地から注目されている。形態学的異常としては 1974 年 Matheson ら¹⁾ の報告以来、多くの報告がなされているが、未だ確証は得られていない。

我々も昨年の本班会議総会において走査電顕を用い患者赤血球について検討し、正常赤

* 宮崎医科大学第三内科

血球に比し、容易に変化しやすいことを報告した²⁾。

はたして細胞膜の異常がPMDで存在するのか否かをさらに検討する目的で今回我々はFreeze-fracture法による生検筋の細胞膜の検討を行なった。

Freeze-fracture法の導入は1966年Branton³⁾がこの方法により細胞単位膜の内面がりビッド2重層の間で破断され、その表面が観察可能であると報告して以来、この方法が膜の内表面(破断面)の観察に最適であることが立証された。

PMDにおいてFreeze-fracture法を用いた研究としては1977年Schotlandら⁴⁾、1978年Wakayamaら⁵⁾の報告があるにすぎない。

Schotlandら³⁾は生検筋を用い検討しており、PMDのP面、E面では正常に比しparticleの分布が均一ではなく、且減少していることを報告し、このことはPMDではmuscle surface membraneの異常があり、その変化は膜の内部分子構造にある可能性を示唆した。

最近Wakayamaら⁵⁾はDuchenne型PMD患者赤血球について検討し、赤血球膜のP面、E面でも同様の粒子の減少を報告し、generalized membrane abnormalityの存在を強調している。

我々の成績でも対照群に比し、PMD群ではP面、E面共にparticleの減少がみられている。さらに我々はMNDの患者との比較を行なった結果正常対照群と何ら異なる所見はみられなかった。このような神経原性の筋萎縮と比較検討した研究はまだなされていない。

しかしながら、検索したPMDの症例数は

未だ少数例であり、今後さらに症例数を増やすと共に赤血球についても検討を加える予定である。

ま と め

1) PMD及びMND、正常者での生検筋をFreeze-fracture法を用い筋細胞膜の形態学的研究を行なった。

2) PMD群では正常群に比し、P面、E面のparticleの数の減少がみられた。

3) MND群では正常群との間に差をみいだしえなかった。

文 献

- 1) Matheson, D. W. & Howland, J. L. : Erythrocyte Deformation in Human Muscular Dystrophy. *Science* 184 : 165, 1974.
- 2) 荒木淑郎, 岡本定昭, 北野正二郎 : 進行性筋ジストロフィー症患者の赤血球膜に関する形態学的研究. 筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究, 冲中班, 昭和52年度研究報告書, p.311.
- 3) Branton, D. : Fracture faces of frozen membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 55 : 1048, 1966.
- 4) Schotland, D. L., Bonilla, E. & Van Meter, M. : Duchenne Dystrophy : Alteration in Muscle Plasma Membrane Structure. *Science* 196 : 1005, 1977.
- 5) Wakayama, Y., Hodson, A., Pleasure, D., Bonilla, E. & Schotland, D. L. : Alteration in Erythrocyte Membrane Structure in Duchenne Muscular Dystrophy. *Ann. Neurol.* 4 : 253, 1978.

23) 福山型先天性筋ジストロフィー症の脳皮質病理

—verrucose dysplasiaにおける血管構築学的研究—

豊倉 康夫*

研究協力者 岩田 誠* 栗崎 博司* 飯田 政雄**

福山型先天性筋ジストロフィー症においては、脳皮質の verrucose dysplasia がしばしば認められるが、この奇型を正面から扱った研究は少なく未だ不明の点も少なくない^{1) 2)}。

われわれは、14歳と19歳で死亡した2例の福山型先天性筋ジストロフィー症の剖検例³⁾の脳皮質表面に広汎に見られた verrucose dysplasia につき、主としてその血管構築に関する検討を行った。

これらの例では脳表全体にわたり脳回は一見疣状の verrucose nodule でおおわれ、ぶつぶつとした魚子状を呈している。個々の nodule はその直径が数 mm 程度に及ぶ円形の隆起をなしている。

組織学的に見ると、これらの nodule は、皮質第2層の顆粒細胞の消失と、第3層の錐体細胞の表層への“吹き出し”から成っており nodule の周囲には、microsulcus を形成する傾向が見られる。これに対し、第4層以下には目立った変化がない。特徴的なことは、nodule の中心に見られる太い血管の存在であり、このような血管の壁は、ほとんど内皮細胞のみから成り、sinusoid 状である。

Morel と Wildi⁴⁾は、本奇型におけるこのような異常血管に初めて注目し、この nodule を unité neuro-vasculaire と呼んだ。彼らは、中心血管は白質内から逆行する動脈であり、

皮質内では分枝を出さず、皮質表面にまで達しないで消失する、と記載したが、その後 Grcevic ら²⁾もこれをほぼそのまま認めている。すなわち、第2層の消失と第3層の“吹き出し”そして中心動脈、これが、これまでの verrucose dysplasia に対する考えである、と言える。

この点を再検討するため、われわれは、脳半球内側面の precuneus 附近の皮質を、脳表に対して vertical および tangential の方向に連続切片とし、nodule の細胞構築と血管構築の関係を立体的に把握することを試みた。

Tangential な割面で見ると、nodule の表面近くでは、直径 100~150 μ の sinusoid 状血管をとりまいて、halo 状の細胞体のない領域があり、その外に、方向性を失った錐体細胞が不規則な集団をなしている。その更に外側には microsulcus を形成する分子層様の部分があり、この中に、tangential に走る動脈が見られる。更に表層に達すると、中心血管は 90° 方向を変換し、皮質表面に沿って走るようになり、ついには軟膜の静脈につながるのが観察される。

中心血管の軟膜静脈への連絡は、丹念に探せば vertical section でも観察することができる。これに対し、中心血管が動脈につながるような像は、今回の検索からは全く見出し得なかった。

中心血管を逆に皮質深層に向って辿っていると、第3層に達するまではほとんど分枝を

* 東京大学医学部脳研神経内科

** 国立療養所下志津病院

出さず、中心血管のまわりは、細胞体のない halo 状の分子層様の部分がとりまいている状態が続く。更に深層に至ると、このような halo 状部分はなくなり、分枝を出すようになるが、これらの分枝は毛細管、または、ampulla を有する venule であり、動脈枝との吻合は全く見られない。中心血管は、更に白質にまで追跡できるが、ここでもこの血管は未だ静脈の性質を備えており、検索し得た範囲では、動脈との吻合は見られなかった。

図1は、検索した中心血管の1本を、細胞構築と共に模式的に示したものである。左端に、表面からの深さを μm で示してあり、その隣りには、相隣り合う領域の vertical section から推定した。この部分の正常状態での細胞構築を示してある。これに対し右側には、tangential section で、中心血管のまわりに見られる neuron の形態から再構築した nodule 部の細胞構築を示してある。中心血管は軟膜静脈とつながり、動脈とは関係していないため、中心静脈 (central vein) と呼ぶべき種類のものである。この部分では、第4層以下はほぼ正常と同じであるにもかかわらず、第

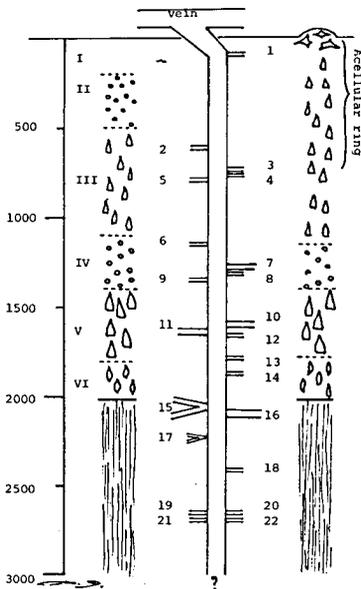


図1 中心血管の模式図

2層がなく、第3層は外表に“吹き出し”ている。すなわち、Morel と Wildi 以来の記載とは、血管の解釈において正反対の結果が得られたわけである。

図2は、われわれの得た結果を示す模式図である。中心静脈を囲むようにして verrucose nodule が生じている。

このような dysplasia の中核をなす第3層の“吹き出し”は、発生初期より存在し、脳表を seal-off している glial limiting membrane の破壊によるものではないかと思われるが、中心静脈の存在は、そのような脳表の破壊が、主として静脈周囲性に生じている可能性を示唆するものではないかと考えられる。

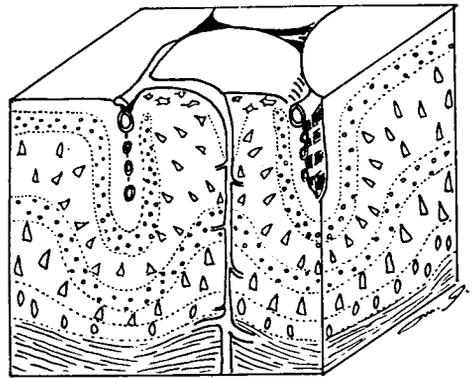


図2 verrucose nodule の構造を示す模式図

文 献

- 1) Morel, F. & Wildi, E.: Dysgénésie nodulaire disséminée de l'écorce frontale. Rev. Neurol. (Paris), 87: 251-270, 1952.
- 2) Grcevic, N. & Robert, F.: Verrucose dysplasia of the cerebral cortex. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 20: 399-411, 1961.
- 3) 栗崎博司, 高津成美, 井上聖啓, 岩田誠, 豊倉康夫, 原田健司: 先天性筋ジストロフィー症の2剖検例. 第20回日本神経病理学会総会, 1979年5月24日.

24) Central coreに関する筋病理学的研究

—臨床例と tenotomy の実験から—

納 光 弘*

研究協力者 福永秀敏* 徳永秀次* 大勝洋祐*
井形昭弘* 北野治男**

はじめに

最近、われわれは極めて特異な病像を示す親子例で、母親では筋生検上明らかな core を認めるにもかかわらず、同様な臨床的特徴を有する子供 2 人においては core を見出し得なかった症例を経験した。そこで、ここに central core disease の自験例について検討し、並びに tenotomy による core の生成実験を行ったので、両者の成績を対比しつつ core の成因について筋病理学的考察を行った。

症 例

症例 1 : N. S. 56 歳, 女性, 鹿大 3 内 78—0232

主訴 : 上肢挙上困難, 歩行障害

家族歴 : 本例並びに本例の両親はいずれも血族結婚ではないが、図 1 の様に家系内に、ここに呈示する 3 例を含めて 7 例、略同様の病像を示す人を認める。

既往歴 : 7 歳の時, trachoma に罹患し, 51 歳の時, 虫垂切除術をうけている。

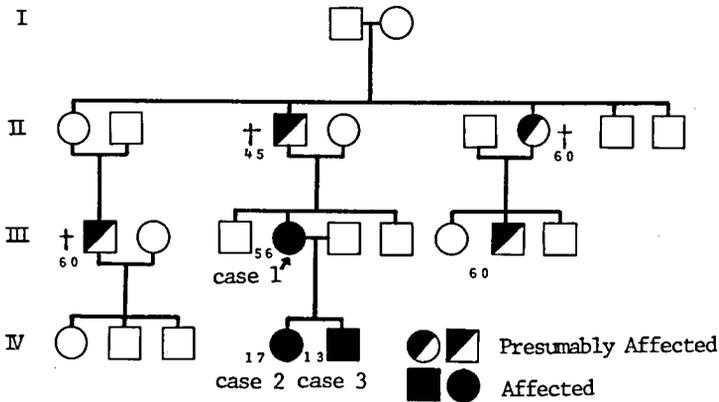


図 1 家系図

* 鹿児島大学医学部第三内科

** 国立療養所宇多野病院神経内科

現病歴：乳幼児期の知的並びに身体的発育は正常であったという。15歳頃から起立時、少し筋脱力を覚えるようになり、また歩行は遅かった。24歳頃から上肢の挙上が困難となり、その後徐々に筋力低下は進行し、42歳頃には階段昇降が困難となった。現在も歩行は短距離なら可能である。

現症：一般内科的には、身長145cm、体重35kgとやせている。脊柱は胸腰椎とも左に側彎があり、翼状肩甲が著明で、漏斗胸、右股関節脱臼、右膝関節の軽度屈曲制限、外反膝などの種々の筋骨格系の異常を認める。

神経学的には、知能は正常で、視力、視野、眼球運動、眼底、聴力は全く異常なく、高口蓋も認めない。筋萎縮、筋力低下は全身にわたっているが、側頭筋、口輪筋、胸鎖乳突筋で軽度から中等度、三角筋、上肢近位筋、肩甲諸筋、母指球筋で中等度、骨間筋で強度、また下肢では遠位筋、近位筋とも軽度であるが、外転は中等度侵されていた。

検査成績：末梢血、尿、血清電解質、血清蛋白、肝機能、甲状腺機能は全て正常であった。GOT32, GPT19, LDH376, CPK26(正常値は25以下), HBD150単位。

筋電図では、骨間筋でcomplex NMUを認めたが他の筋では低電位で振幅の短かい筋原性の変化であった。運動神経伝導速度は、腓骨神経で45m/sec, 正中神経で49m/secと正常範囲であった。

症例2：U.S. 17歳、女性、鹿大3内、78-0231

主訴：上肢挙上困難

既往歴：特記すべきことなし

現病歴：症例1の長女である。正常分娩で乳幼児期の知的並びに身体的発育は正常。小学校の時のかけっこは遅い方であった。13歳頃から高い所の物を取る時、手の上げにくいことに気付いた。その後、筋力低下は上肢を中心に緩徐に進行している。

現症：一般内科的には身長165cm、体重43kg。筋骨格系では、高口蓋、漏斗胸、腰椎

側彎、両股関節の内転制限を認め、また翼状肩甲が見られた。神経学的には、知能は正常で、眼球運動を含む脳神経には特に異常はなかったが、側頭筋、眼輪筋、口輪筋、胸鎖乳突筋に軽度の筋力低下を認めた。また肩甲筋、上肢近位筋に中等度の筋萎縮と筋力低下も認め、下肢では内転が弱く、下肢近位筋に軽度の筋力低下を認めた。

検査成績：末梢血、尿、電解質、血清蛋白、甲状腺機能は全て正常。GPT17, LDH505, CPK 65 (正常値25以下)。

筋電図は、胸鎖乳突筋、三角筋、大腿四頭筋で筋原性の変化を示した。運動神経伝導速度は、前脛骨神経で51m/secと正常であった。

症例3：N.S. 13歳、男性、鹿大3内、78-1607

現病歴：症例1の長男である。幼少時の発育は異常なく、小学校時、徒歩は中位で、現在でも学校の運動は普通通り行っている。

現症：体格は普通で、一般内科的には特に異常を認めない。神経学的には、眼輪筋、口輪筋、胸鎖乳突筋、肩甲筋に軽度の筋力低下がみられ、また翼状肩甲と高口蓋を認めた。四肢はややslenderであるが、上肢近位筋に極めて軽度の筋力低下がある。しかし日常生活には全く不自由はない。

検査成績：末梢血、尿、電解質、肝機能、甲状腺機能は全く正常である。GOT 45, GPT 26, LDH 558, CPK 81 (正常は35以下)。

筋電図では、上肢近位筋で筋原性変化が認められた。

筋生検

症例1：光顕的には筋線維は比較的良好に保たれており、脂肪化や線維化は軽度であった。筋線維の直径は20 μ から90 μ に及び、大小不同と軽度の中心核の増加が認められた。またTrichrome染色やHE染色では、明らかなcoreは指摘できなかったが、coreと思われる部に一致して筋断裂を多数認めた。さらに、

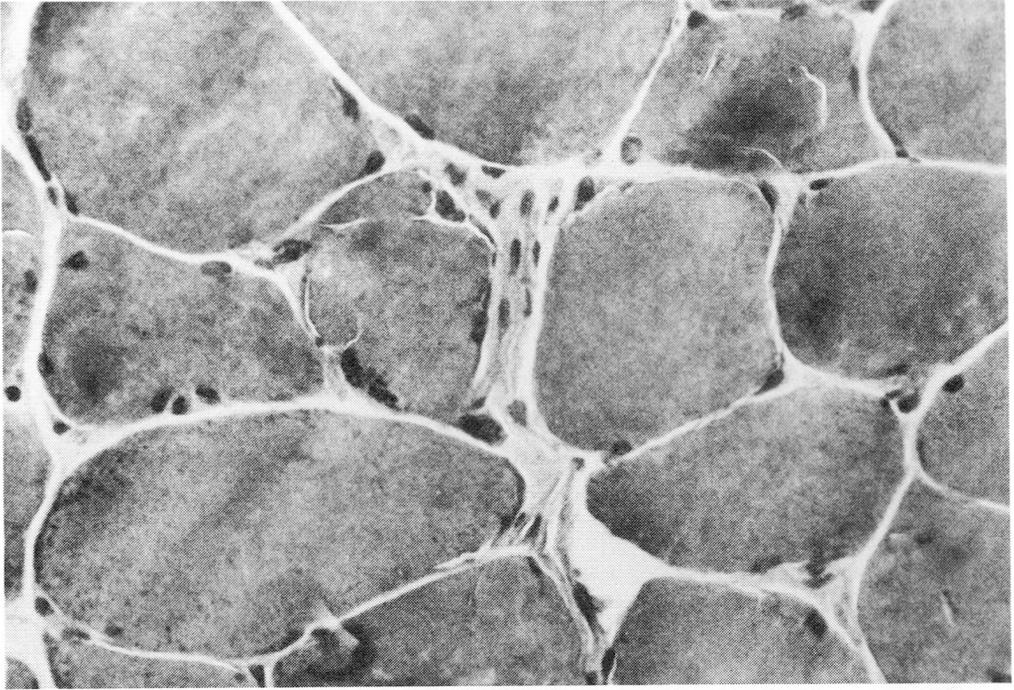


図2 症例1, 大腿四頭筋, 横断像
筋の大小不同, 筋断裂, 中心核の増加, nemaline rod を認める. Gomori's
Trichrome 染色, ×250

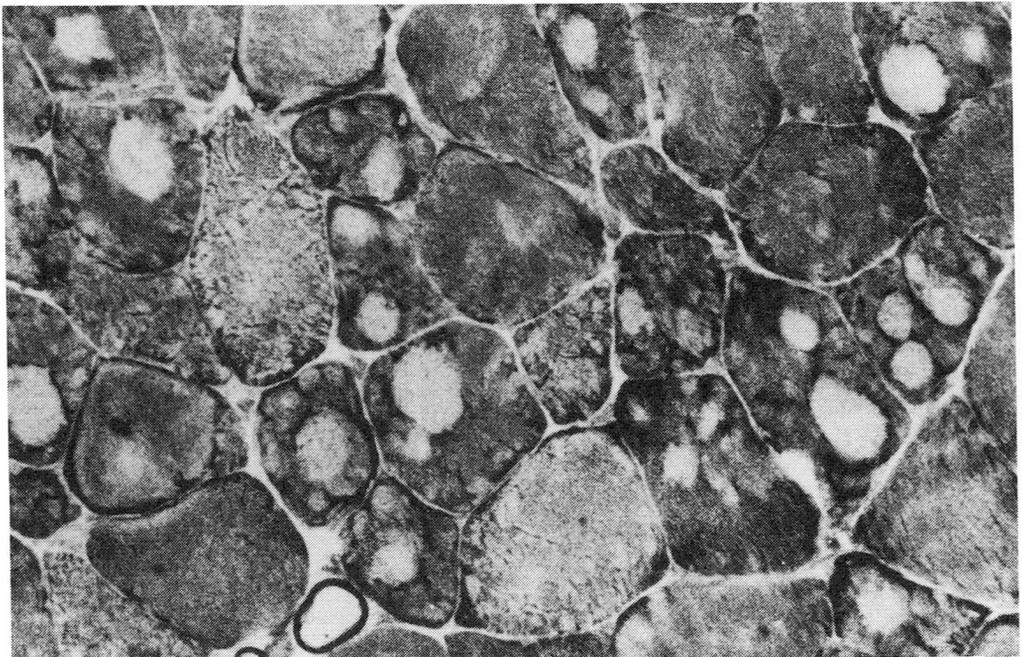


図3 症例1, 大腿四頭筋, 横断像
多数の core を Type 1 線維に認める. NADH 染色, ×250

Trichrome染色ではrodと思われる赤染する小顆粒の集合(図2)とまれに辺縁の赤染する筋線維を認めた。

一方、NADH染色では多数の明らかなcoreをtype 1線維にのみ認めた。1個の筋線維あたりのcoreの数は1個のものから数個のものまで多数にわたっていた(図3)。

また筋線維の縦断像ではcoreは、筋線維の縦断面の全長に亘るものから部分的なものまで多彩であった。

次にATPase(pH 9.4)染色ではcoreの部分もよく染色され、分別も良好でヒストグラムではtype 1線維77%、type 2線維23%とtype 1線維優位であった。

電顕的には、筋原線維の構築はcoreの部分以外では異常なく、またcoreの部分でも比較的良く保たれていたが、まれに筋原線維の破

壊やZ帯の消失が観察された。更にcoreの部分ではミトコンドリアやsarcoplasmic reticulumは明らかに減少していた(図4)。

次にcore部及びそれ以外にも筋鞘下に多数のrodが観察された。

症例2：光顕的には、筋線維はよく保たれており、脂肪化や線維化はなく軽度の大小不同が認められた。NADH染色では散在性に縞様のムラのある筋線維も観察されたが、coreは認めなかった。ATPase染色ではtype 2線維優位で、かつやや小さい傾向にあった。

電顕的には、筋原線維の構築は特に異常なく、軽度のグリコーゲン顆粒の増加とsarcoplasmic reticulumの拡大がみられた。

症例3：筋線維はよく保たれており、脂肪化や線維化はなく、筋線維の軽い大小不同とまれに変性した筋線維を認めた。NADH染

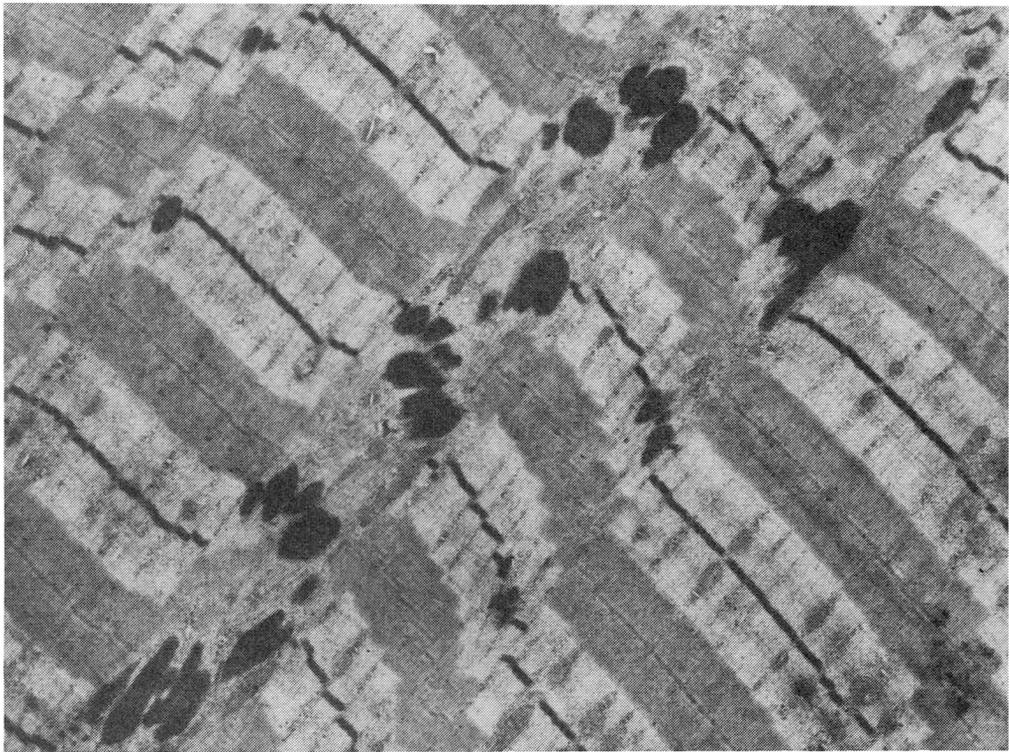


図4 症例1, 電顕像
core部に多数のrodを認める。×6750

色では、筋構築はよく保たれており core は認められなかった。PAS 染色では、筋鞘下で活性の強い部分が見られた。ATPase (pH 9.4) 染色では type 2 線維優位であった。

電顕的には、筋原線維の構築は正常で core や rod は観察されず、筋鞘下に多数のグリコーゲン顆粒と筋原線維間に空胞が観察された。

実 験

方法：体重 250~300 gm のラット (Sprague-Dawky 系) をエーテル麻酔後、アキレス腱を完全に切断し、再び連結しないようにセロハン紙で断端をくるんだ。腱切断後、1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 56 日目にそれぞれ数匹ずつ剖検し、ヒラメ筋を isometric clamp で固定後切断した。その後、急速凍結しクリオスタットで 10 μ の連続切片を作成した後、組織化学的検討を行った。対照は、アキレス腱切断を施行していない対側後肢のヒラメ筋を使用した。

結果：腱切断後のヒラメ筋の組織化学的変化を経時的に観察すると、切断後 1 日目で、既に type 1 線維に筋構築の乱れと思われる

蛇行像を認め、3 日目では snake coil 様の筋線維とともに少数の core が出現し、5 日目では、明らかな core とともに空胞を持つ筋線維も観察された。7 日目になると core の内径は最大となり、また Trichrome 染色では core の内部に、rod と思われる赤色の顆粒が出現し、14 日目では core の内径はやや小さくなった。21 日目では core はますます小さくなり、core の消失した筋線維もみられる様になり、56 日目では core は全く認められず、ほとんど正常に近い筋線維となっていた。

そこで core が出現し消失していく過程を数量的に表現するため各々の時期で 50 個の横断像について core の最小直径と core を有する筋線維の最小直径をそれぞれ計測した。

腱切断後、5 日目では core の最小直径の平均とその標準偏差は 11.66 ± 1.79 μ m、7 日目では 9.48 ± 2.03 μ m、14 日目では 3.73 ± 1.55 μ m であった。また筋線維の最小直径との比を求めると 5 日目では 0.60、7 日目では 0.65、14 日目では 0.28 となり、腱切断後 7 日目に core の大きさは筋線維に比し、最大となることが判明した (図 5)。

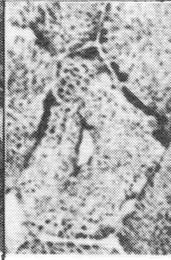
days after tenotomy	2	5	7	14	21
					
a		11.66 ± 1.79	9.48 ± 2.03	3.73 ± 1.55	
b		19.34 ± 2.16	14.52 ± 2.45	13.10 ± 2.15	
a/b		0.60	0.65	0.28	

図 5 腱切断後のラット、ヒラメ筋の組織化学的変化

ま と め

臨床的には、顔面肩甲上腕型の筋ジストロフィー症に類似した病像を呈する親子3例を経験した。

筋生検では、母親では type 1 線維優位で、かつ type 1 線維に多数の core を認めたが、子供2人ではいずれも type 2 線維優位で core は見出し得なかった。

そこで core の持つ意味について検討する目的で、ラットを使用して tenotomy の実験を行った。腱切断後のヒラメ筋の経時的観察を行うと core は腱切断後3日目より出現し

7日目に core の内径は最大となり、その後次第に消失し56日目には core は全く消失することが明らかとなった。

つまり core の出現は可逆的なものであり、筋萎縮などに伴う再生現象の一つとして出現するものである事が推察され、われわれの臨床例における筋生検像の差異も、この様な経時的経過の表現と理解されうる。

また、症例1では core とともに rod も同時に認められ、両者は密接な関連があり、いずれも筋再生の非特異的表現である事を推論した。

25) 実験的ガングリオシッド・ミオパチーの 電子顕微鏡的研究

佐藤 猛*

研究協力者 永井克孝** 井口由美子**

筋ジストロフィー症では筋線維の変性の初期において形質膜や筋小胞体膜の異常が起こるのではないかということが推定されている。一方、筋線維からの筋原線維、筋小胞体、ミトコンドリアなどの各分画を抗原として動物に実験的アレルギー性筋炎をつくり、光学顕微鏡的に筋病変を観察した研究は報告されている。ガングリオシッドは筋線維の膜構成脂質のひとつとして重要であるが、筋ジストロフィー症あるいは多発性筋炎の際の変化についてはほとんど知られていない。

われわれは家兎筋から抽出したガングリオシッドを抗原としてモルモットを感作した場合、筋線維にいかなる変化が起こるかを明らかにするため、血清中 CPK 測定および骨格筋の電子顕微鏡による検索を行ったので、現在までに得られた成績について報告する。

方 法

実験 1 : Folch の方法により家兎筋からガングリオシッドを抽出し、抗原を次の 4 種類に分け、等量の Freund's complete adjuvant (FCA) と混合、各群 5 匹のモルモットの背部皮下に 2 回注射した。

第 1 群 : 家兎筋ガングリオシッド 1 mg,
牛血清アルブミン (BSA) 1 mg.

第 2 群 : 家兎筋ガングリオシッド 1 mg,

卵レシチン 4 mg, コレステロール 10 mg, メチル化 BSA 1 mg (人工膜)。

第 3 群 : グルコサミン含有ガングリオシッド 1 mg, 卵レシチン 4 mg, コレステロール 10 mg, メチル化 BSA 1 mg.

第 4 群 : 家兎筋クロロホルム・メタノール抽出残渣。

実験 2 : 抗原と FCA との等量混合物をモルモットの皮下に 2 週間間隔で 3 回注射した。

第 1 群 : Mycobacterium tuberculosis (MB) 50 μ g のみ。

第 2 群 : MB+mono-sialo ガングリオシッド 160 μ g.

第 3 群 : MB+di-sialo ガングリオシッド 200 μ g.

第 4 群 : MB+tri-sialo ガングリオシッド 200 μ g.

結 果

実験 1, 2 とともに最終回の注射後正常の 10 数倍におよぶ著明な血清 CPK の上昇がみられたが、実験 2 の第 1 群のように adjuvant だけを注射したモルモットでも CPK の上昇が起こった。

光学顕微鏡にて腓腹筋、大腿直筋および大腿屈筋群を観察した。大体の傾向として筋線維の変化の程度は腓腹筋より近位筋の方が強かった。

* 順天堂大学医学部脳神経内科

** 東京都老人総合研究所基礎生化学

(実験1) 第1, 2, 3群では好塩基性を呈する変性線維が散在していた。第1群が最も変化が強く、第2群、第3群の順で軽度になっていた。このような好塩基性線維内に微細あるいはやや粗大な大小の顆粒が多数出現していた。しかし、筋原線維の横紋構造は比較的よく保たれていた。なかには筋鞘核の増加、macrophageの侵入、myoblastの出現などを伴っているものもあった(図1A)。

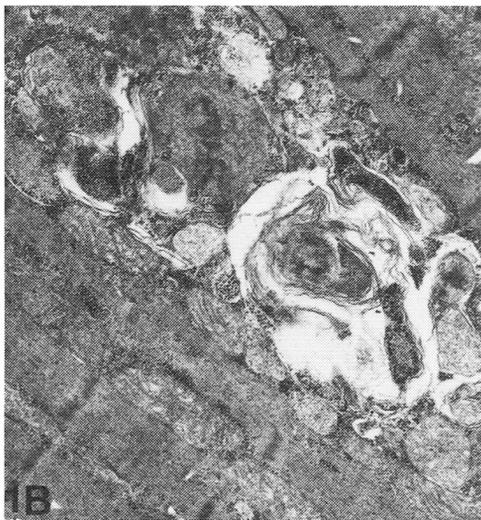
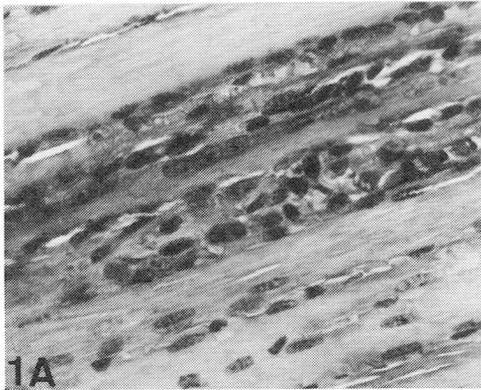


図1 実験1(A)第1群の好塩基性変性線維 (H. E.)
(B)第2群の電頭 多数のミエリン小体 (×7,000)

実験1の第4群では1匹のみに強い筋線維の壊死がみられた。即ち、筋原線維の蛇行、凝縮、hypercontractionなどが著明で、いわゆる segmentalあるいは floccular degenerationを呈し、myophagiaが著明であった(図2A)。

血管周囲のリンパ球浸潤は第1群で2匹、第3群では1匹のみに極めて軽度のものが認められるに過ぎなかった。

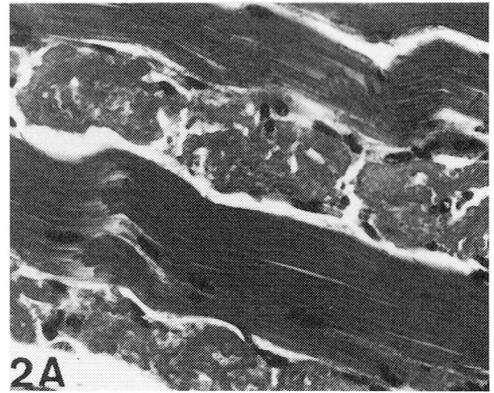


図2 実験1(A)第4群の筋原線維の壊死 (H. E.)
(B)筋フィラメントの崩壊 (×9,000)

電子顕微鏡で観察すると、第1、2、3群では筋形質内に多数の粗大顆粒やミエリン様小体が出現していた(図1B)。これらの形成過程は、ミトコンドリアの外膜や筋小胞体膜の電子密度が増大し、次いでこれらの膜が層状、さらに渦巻状に重層していわゆるミエリン様小体を形成する。このミエリン小体の内部には変性したミトコンドリアやグリコーゲン顆粒を含む筋形質の一部が取りこまれていた。リソゾーム内にもこれらの変性したオルガネラが取り込まれていることもあり、さらに自己融解空胞が形成されていた。筋鞘膜部の形質膜も同様に変性し、ミエリン小体と連続しているものもみられた。

第1、2、3群ではこのようにオルガネラの変性が強いにもかかわらず、筋原線維の構造は比較的良好に保たれていた。粗大顆粒が無数に形成され、筋形質内に充満しているようなものではじめて筋原線維の崩壊が認められた。このような特異なオルガネラの変化は第1、2群が強く、第3群では5匹中1匹だけにみられた。

第4群では他群とは対照的に筋原線維の変性の方が著明であった。即ち筋原線維の正常配列は全く乱れ、筋フィラメントは糸屑状の集塊となっていた(図2A)。このような筋原線維の変化のはじまりは、Z帯構成線維の蛇行、筋原線維束からの筋フィラメントの離開などから始まる。ミトコンドリアの数が異常に増加している筋線維も多数認められた。筋原線維が全く崩壊しているものではミトコンドリア、筋小胞体などのオルガネラも濃縮、変性していたが、ミエリン小体の形成などは認められなかった。

(実験2) 第1群は adjuvant だけの注射にもかかわらず、1匹は高度、他の4匹は軽度ないし中等度の筋線維の変性がみられた。好塩基性顆粒を有する線維、あるいは筋原線維の崩壊の方が強い floccular degeneration が混在していた。しかし、間質の細胞浸潤はみられなかった。

第2群では筋原線維の変化は軽度であった。しかし、1匹にのみ間質に多数のリンパ球浸潤がみられた(図3)。

第3、4群では筋原線維の強い変性が全例にみられた。好塩基性変化が主体を占めていたが、第4群では2匹に floccular degeneration を示す線維も多数混在していた。また全例において筋線維内にカルシウム沈着と思われる好塩基性物質が出現していた。

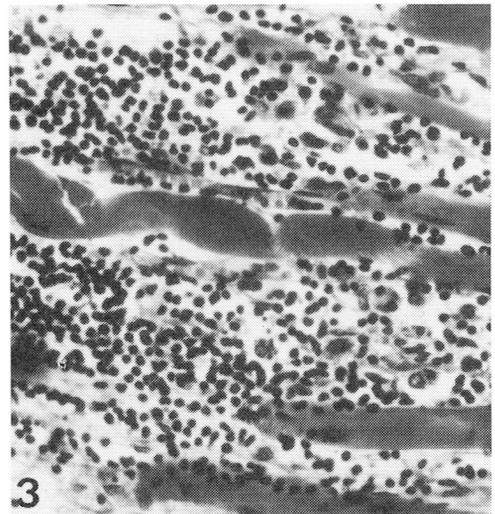


図3 実験2 第2群の細胞浸潤 (H. E.)

考察と結論

神経組織から抽出したガングリオシッドで家兔を免疫すると末梢神経の特異な変性が起こることが報告されている(永井, 1976)¹⁾。本研究では筋肉から抽出したガングリオシッドでモルモットを免疫した場合、筋線維のオルガネラに特異な変化が起こることを明らかにした。また予備的な報告をしたように²⁾、ガングリオシッドを抽出した残渣、即ち蛋白成分を主としたもので免疫した場合、筋原線維の方に変性が先に起こることが分った。換言すれば抗原の種類が異なると、筋線維の変性様式が異なるであろうことを示唆した。

さらにガングリオシッドの中で、di-あるいは

は tri-sialo ガングリオシッドの方が筋線維変性効果が大きかった。

しかしながら、実験 2 の第 1 群のように、adjuvant だけを注射した対照群でも程度は軽くなるが、筋線維の変化がみられ、adjuvant 自体にも筋線維傷害性があることが分った。そのため今後は合成 adjuvant を使用するなどしてガングリオシッドの特異性をさらに詳細に検索する予定である。

文 献

- 1) Nagai, Y., Momoi, T., Saito, M., Mitsu-zawa, E., & Ohtani, S. : Ganglioside syndrome, a new autoimmune neurologic disorder, experimentally induced with brain gangliosides. *Neurosci. Letter* 2 : 107—111, 1976.
- 2) 佐藤猛 : ミオパチーおよび多発性筋炎の超微形態学, 日内会誌 66 : 784—792, 1977.

26) 筋肉内ウイルス様粒子の細胞化学的研究

福原信義*

はじめに

Picornavirus 様粒子が筋肉中で観察されたという報告は多数あるが、これがウイルスそのものであるとして、筋疾患の病因と結びつけて考えるものと、ウイルスではなく、非特異的な構造物であるとするものがある。また、Hanson & Urizar (1975) のように、死後変化である可能性を示しているものもある。今回、交通事故による複雑骨折のため切断した下肢の腓腹筋で、多数の picornavirus 様粒子を観察した。¹⁾ この粒子が、果して、ウイルスである可能性があるのかどうか検討するため、細胞化学的に核酸の検出を試みた。

方法と材料

症例：35才男、既往歴・家族歴には特別のことはない。交通事故により右大腿部の複雑骨折をうけ、3時間後に右下肢の切断をうけた。腓腹筋の一部を切断後30分以内に、2.5%グルタルアルデヒドで固定した。

核酸の検出に用いた方法は：

A) Heinen (1978)²⁾の方法：

① 1%オスミュウム酸で後固定後、エボン・アラルダイト混合樹脂に包埋し、超薄切片を作製

② 超薄切片を cis-dichlorodiammine platinum (II) (1 mg/ml in 0.01 M-NaClO₄) に入れ、37℃ 3日間暗室で反応

③ 水洗後、無染色で電顕観察

B) Bernhard (1969)³⁾の方法：

① 1%オスミュウム酸で後固定、または

グルタルアルデヒド固定のみで後固定せず、エボン・アラルダイト混合樹脂に包埋し、超薄切片を作製

② 超薄切片を 0.5~5% uranyl acetate で1分間染色

③ 0.01~0.2 M-EDTA で30分~1時間反応

④ Lead citrate で5秒~1分間染色

⑤ 水洗後電顕観察

比較のため、acid-maltase deficiency の患者(45才女性)の右上腕二頭筋の生検材料で同様の染色を行って観察した。

結 果

1) 光顕的観察：凍結切片の Gomori trichrome 染色では、angular fibers が散在し、ごく少数の“opaque fibers”，“fiber-splitting”，“rimmed vacuoles”がみられたが、筋線維の壊死、細胞浸潤は認められなかった。間質の結合織、血管にも異常はなかった。アラルダイト包埋縦断標本では、基本構築に異常はみられないが、intermyofibrillar space がやや開き、微細顆粒状物質が散在してみられた。

2) 電顕的観察：固定の遅れのため、糸粒体、T-system はやや膨化していたが、myofibrils の基本構築はよく保たれていた。Myofibrils の間に図1のように、平均直径22 nm の高電子密度の粒子が密集し、三角形または六角形の結晶構造の配列をしていた(図1)。各粒子の平均中心間距離は25 nm であった。このいわゆるウイルス様の結晶構造は、subsarcolemmal で、Z帯の近くに位置することが

*新潟大学脳研究所神経内科

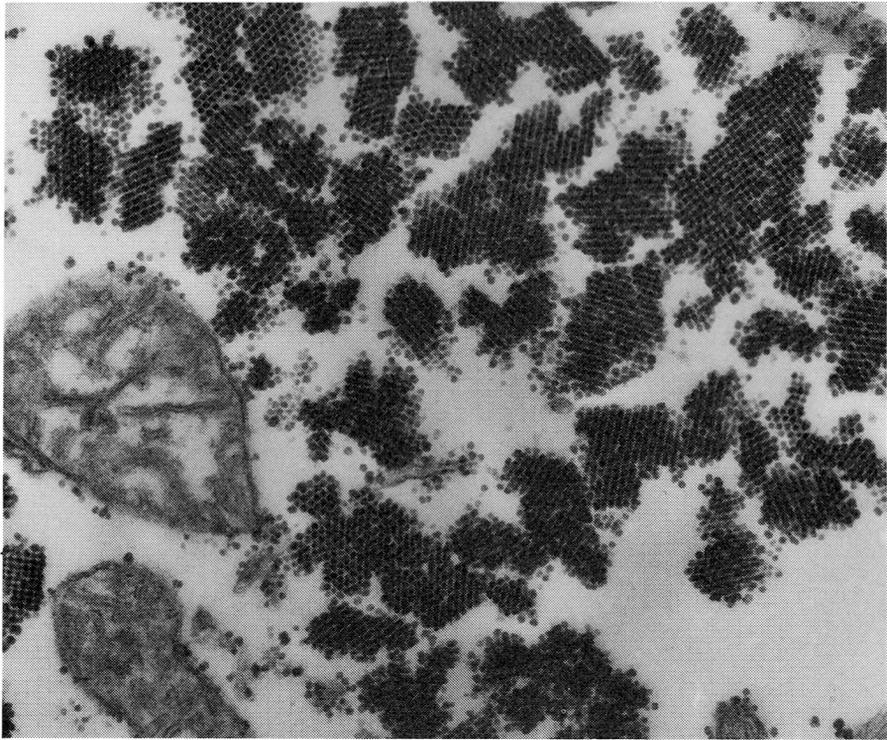


図1 ウイルス様粒子

×43,000

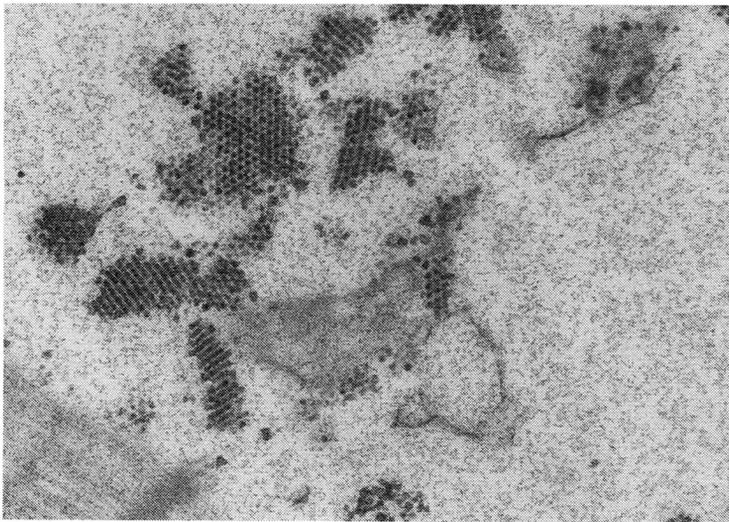


図2 cis-platinum (II) 染色

×52,000

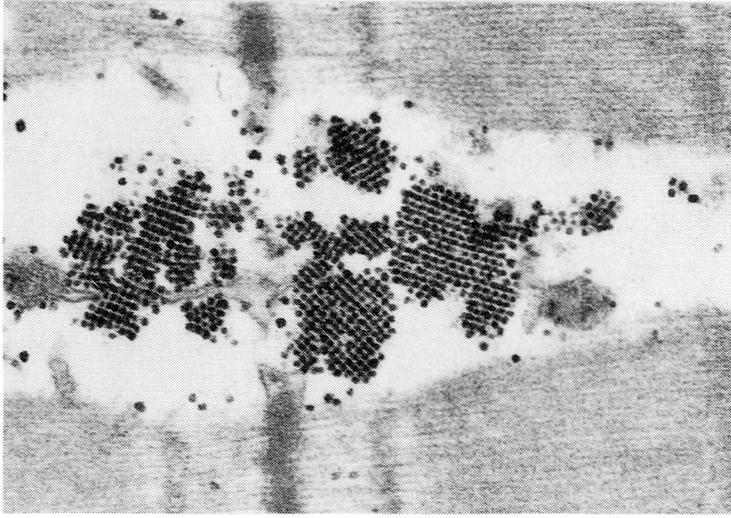


図3 Bernhard 染色

×57,000

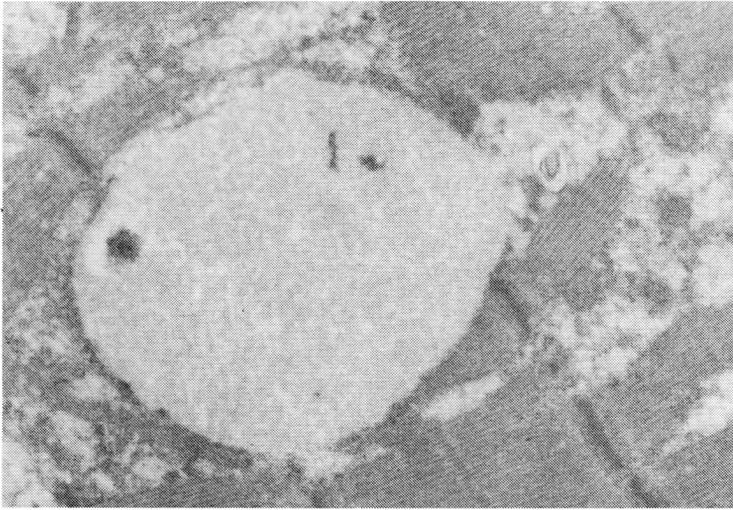


図4 acid-maltase deficiency の cis-platinum (II) 染色

×18,000

多く、筋鞘核の中にはみられなかった。

3) 細胞化学的染色：

1) Cis-platinum (II) 染色 (Heinen の方法)：Myofibrils, 糸粒体は, cis-platinum (II) にはほとんど染まらないが, ウイルス様結晶粒子は濃染してみえた (図2)。リボゾーム, 核クロマチンも同様に濃く染まった。一方, 対比に用いた acid-maltase deficiency の筋肉のグリコーゲン, 染まらなかった (図3)。

したがって, このウイルス様粒子は明らかに核酸を有するものと考えられた。

2) Bernhard 染色：用いた uranyl acetate, EDTA の濃度により, ウイルス様結晶粒子の染色性はわずかに濃度が, 0.5% uranyl acetate 1分間, 0.2 M-EDTA 1時間, Lead citrate 5秒間の組み合わせでも濃染しており (図4), RNA を有するものと考えられた。

考 察

筋肉中に、この症例のようなウイルス粒子様の結晶配列をなす構造物がみられたという報告は、表1の如く、今までに34例の報告がみられる。形態的には、picornavirusの粒子に似た配列をなしているために、Chou & Gutmann (1970)をはじめとして、ウイルス粒子そのものと推定している報告が多い。しかし、筋からのウイルス分離の試みは今まで5例でなされているが、Tang et al (1975)の1例でのみ分離に成功しているにすぎない。Tang et al (1975)の例は、生検筋の組織培養によりCoxsackievirus type A9を分離したため、筋ジストロフィー症の臨床診断であったが、慢性多発性筋炎であろうとしている。しかし、多発性筋炎、または皮膚筋炎と診断されているのは、今までの報告34例中、9例のみであり、あとはALS、熱暑病など筋のウイルス感染とは関係のなさそうなものばかりである。また、Hanson & Urizar (1975)

の症例のように、剖検時の骨格筋で多数のウイルス様粒子をみだしたのに、剖検の3週間前になされた筋生検では、全くウイルス様粒子がみられなかったとし、このウイルス様粒子の出現は、死後変化または、死戦期の非特異的現象であるとしているものもある。

このウイルス様粒子の細胞化学的性質については、①グリコーゲンではなく (Oshiro, 1976)、DNAか? (Chou, 1971⁴⁾)、②グリコーゲンである (Collins & Gilbert, 1977)の相反する2説があった。すなわち、Oshiroは、エボン包埋標本のアミラーゼ処理で、このウイルス様粒子は消化されないで、グリコーゲンではないと結論し、Collins & Gilbert (1977)は同様の方法でグリコーゲンであると結論している。Chou (1971⁴⁾)は、著者の用いたBernhardの方法により、このウイルス様粒子の染色性が低下したので、グリコーゲンではないが、RNAでもないとした。Picornavirusは、RNA virusであるので、Chouの

表1 筋肉における picornavirus 様粒子の報告について

Author (Year)	Patient Age, Sex	Clinical Dx.	Examined muscle	Size of particles (Periodicity)	Culture
Schmalbruch (1967)	22 y. F		Biceps	N 14 nm (20 nm)	
Caulfield et al (1968)	72 y. F	Ruptured aneurysm	Superior rectus m.	N 25 - 30	
Burch et al (1968)	M	Heat stroke	Upper arm	N 19 (20)	
Morris et al (1969)	50 y. F	Myositis E herpes zoster	Gastrocnemius	B	
	53 y. M		Deltoid.	B } 25 - 35	
Chou & Gutmann (1970)	74 y. F	Polymyositis	Sternocleidomastoid.	B	
	67 y. M	Dermatomyositis	Pectoral.	B } 17 - 22 (24)	
Mastaglia & Walton (1970)	22 y. F.	Polymyositis	Rect. femor.	B 16 - 24	
Ben-Bassat & Michtey (1972)	12 y. F	Dermatomyositis		N 15 - 20	
Schiller & Hair (1974)	17 y. F	Malignant hyperthermia	Vastus lateralis	B	
	14 y. F			B } 14	
Culebras & Merk (1975)	72 y. F	Uremia & pneumonia	Superior rectus m.	N 20 - 27	
Tang et al (1975)	11 y. F	Muscular dystrophy		N 19 - 23	(+)
Alvira & Mendoza (1975)	(2 cases)	Reye's syndrome	Psoas	N 18 - 23 (25 - 38)	
Hanson & Urizar (1975)		Reye's syndrome		N* 20 - 30	
Oshiro et al (1976)	52 y. M	ALS		N 20 - 24	(-)
Sato (1977)	65 y. M	Dermatomyositis		N 17 - 20	
Collins & Gilbert (1977)	4m.-11 y. (6 cases)	Reye's syndrome	Psoas	N,B	(-)
	10d.-63 y. (6 cases)	Congenital anomalies, Leukemia, ---	Psoas, Quadr. femor., Diaphragm	B } 17 - 20 (30 - 31) N	
De Reuck et al (1977)	20 m. F	Polymyositis	Quadr. femor.	B 21 - 23	
Fukuyama et al (1977)	11 m. F	Polymyositis E myoglobinuria	Rect. femor.	B 20 (25)	
Tomonaga et al (1978)		ALS	Superior rectus m.	N 20	
Fukuhara (1979)	35 y. M	Traffic accident	Gastrocnemius	N 22 (25)	

N: Necropsy, B: Biopsy

成績ではそれまで推定されていた picornavirus ということは否定されることになる。

著者の用いた cis-platinum(II) 染色は, cis-dichlorodiammine platinum (II) が核酸と $O^6(Gua) \cdot N_7(Gua)$ chelation をなすことを利用するもので, 特異性が非常に高く, 核酸以外では, ムコ多糖類の硫酸基が cis-platinum (II) に反応する位のものである。核クロマチン, リボゾームは濃染するが, 蛋白はわずかにみえるのみであり, グリコーゲンはこの実験でも明らかなように全く染まらない。細胞化学的研究方法としては, 染まることに意味のある positive の方法はよいが, 染まらないことに意味のある negative の方法は, その物質が果して染まらないのか, それともはじめからその切片に存在しないのかが常に問題となる。従って, アミラーゼ処理, RNAase による反応などは結果の判定に注意を要する。対比のために用いた acid-maltase deficiency の筋肉では, 多数のグリコーゲン顆粒が膜に囲まれて出現するのが特徴であり, その構造から判断してグリコーゲン顆粒が多数存在していながら, cis-platinum (II) により染まらなかったと判定できる。

以上のことから, この症例でみられたウイルス様粒子はグリコーゲンではなく, RNA よりなっていると考えられ, picornavirus またはリボゾームであろうと考えられる。いずれにしても, 今までの報告例の分析からは,

病因に結びつけて考えるのは困難であり, 非特異的变化と思われる。

ま と め

交通事故により切断した下肢の腓腹筋に三角形または六角形の結晶様配列をなすいわゆるウイルス様粒子が多数みられた。cis-platinum (II) 染色と Bernhard の染色により, この粒子は RNA を有すると考えられた。

文 献

- 1) Fukuhara, N. : Electron microscopical demonstration of nucleic acids in virus-like particles in the skeletal muscle of a traffic accident victim. *Acta. neuropathol. (Berl.)*, 47 : 55, 1979.
- 2) Heinen, E. : Cis-dichlorodiammine platinum (II) as stain for electron microscopic preparations. *Histochemistry*, 51 : 257, 1977.
- 3) Bernhard, W. : A new staining procedure for electron microscopical study. *J. Ultrastruct. Res.*, 27 : 250, 1969.
- 4) Chou, S. M. : Prospects of viral etiology in polymyositis. In : *Clinical studies in myology* (ed. B. A. Kakulas), p. 17, Amsterdam : Excerpta. Medica., 1971.

27) 筋ジストロフィー症の単一筋線維筋電図

西 谷 裕*

研究協力者 小 西 哲 郎* 北 野 治 男* 池 上 佳 典*

目 的

Single fiber EMG は個々の筋線維の活動電位を分離してとらえることができ、その各々の活動電位の時間的変動を解析するのに適している。従ってこれらを用いて、筋ジストロフィー症の筋線維異常の病態生理を解析することが可能となる。今回は昨年度の班会議に引き続いて jitter 現象及び平均棘波間距離 (mean interspike interval : MISI) を筋ジストロフィー症、各種神経筋疾患において検討し、その特徴を明らかにすることを試みた。

方法と対象

電極直径 25μ の単一筋線維筋電図針を用いて、随意的弱収縮下の一側総指伸筋で単一筋線維筋電図を得た。対象は進行性筋ジストロフィー症 (Duchenne 型, 肢帯型, myotonic) 及び他の神経筋疾患である。一部の症例では筋発射間隔 (interdischarge interval : IDI) と同一神経支配下の 2 つの筋線維の棘波間距離 (interpotential interval : IPI) との関連を検討するため不均一な筋反射を行なわせて IDI を変動させ、得られた pair の活動電位を data recorder (TEAC R410) に記録し、再生して分析した。長い IPI を持つ late component の jitter 現象が、一定の sweep speed ($500\mu\text{sec}/\text{cm}$) で観察できるように dual sweep speed の方式を採用した。jitter 値の

算出は従来通り MCD 値として用手的に計測した。

筋線維密度 (Fiber Density : F. D.) は at random の 20 ケ所以上のポイントにおける振幅 $200\mu\text{V}$ 以上で rise time $300\mu\text{sec}$ 以内の同一神経支配下の sharp な棘波成分を平均して求めた。

平均棘波間距離 (MISI) は同一神経支配下の 2 個以上の multiple action potential において、最大棘波間距離をその間に含まれる棘波数から 1 を引いた値で割って求めた。この場合約 5 msec 以上の時間的遅れを示す活動電位 (late component) は他の棘波群より離れて孤立的に出現するため MISI の計算より省いた。ここでは同一個人より得られた 10 個~20 個の MISI を平均した値を MISI と呼ぶことにした。

IPI と IDI との関係は図 1 に示す。図 1 の上段は 1 つの potential pair の通常連続記録を示している。下段左側は pair の最初の action potential で trigger して一定の sweep speed ($500\mu\text{sec}/\text{cm}$) で sweep し、記録用紙を $20\text{cm}/\text{sec}$ の speed で raster mode で記録したものである。この記録方法では現象は上方に向かって I, II, III, IV の順に同一 pair が記録されている。pair の IPI と IDI の関係は下段右図に示すように 1 つの IPI (例えば II) を横軸にとり、その直前に出現する pair (I) との時間的間隔 (IDI : 即ち I と II の間隔) を縦軸にとってその交点を II としてプロットする。このような操作を同一 pair におい

* 国立療養所宇多野病院神経内科

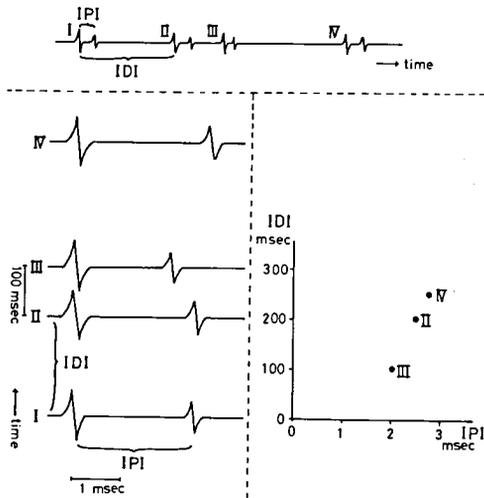


図1 Correlation of interpotential interval (IPI) with interdischarge interval (IDI)

て100~200個の点をプロットしてIPIとIDIの関係を検討した。

結 果

筋線維密度 (F. D.) は正常対照 20 例では 1.42 ± 0.23 (mean \pm 2SD) で、筋ジストロフィー症では有意に F. D. の増加がみられ、昨年度の報告と同じく、myotonic dystrophy,

Duchenne 型、肢帯型の順で F. D. が高値を示す傾向がみられた。

同一個人より観察された 10~20 個の MISI の平均値を MISI としてプロットすると (図 2), 正常対照と F. D. の増加する運動ニューロン疾患 (ALS 及び KWD) では有意差がないが、筋ジストロフィー症では MISI が有意に長くなり、多発性神経炎では正常と筋ジストロフィー症の中間の値を示した。

IPI と IDI の関連では、対照の pair では、IDI の変動でわずかの IPI の短縮又は延長が観察されることがあるが顕著ではない。全身型重症筋無力症患者での pair では、IDI と関係なく非常に大きな IPI の変動がみられる。

筋ジストロフィー症より得られた pair では IDI の変動で IPI が明らかに短縮又は延長する pair が多くみられる。IDI の変動につれて電極の位置がわずかに移動することがあるが、この場合には、ずれの前後で pair の互いの振幅が変化し、IPI が不連続的に短縮又は延長するため、電極のずれによる IPI の変動であることが解る。

筋ジストロフィー症より得られた約 5 msec 以上の時間的遅れを持って出現する late component の IDI と IPI の関係は図 3 で、

(Cases)	MISI [msec]	0.5	1.0	1.5	2.0
Normal (10)		•••••			
Duchenne Dystrophy (13)			•••••	•••••	••
Limb-girdle Dystrophy (7)			•••••	•••••	•
Myotonic Dystrophy (3)			•••••	•••••	
Motor Neuron Disease (8)		•••••			
Polyneuropathy (8)		•••••	•••••		

図2 Mean interspike interval (MISI) of various disorders

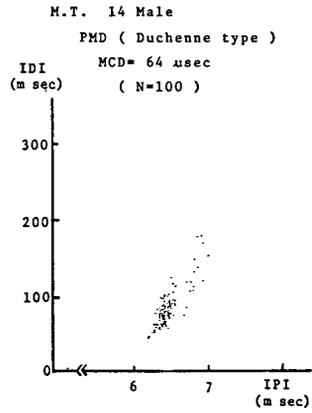
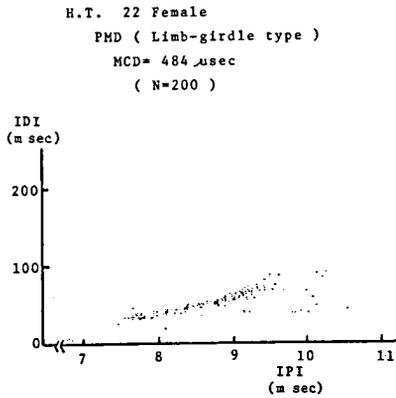
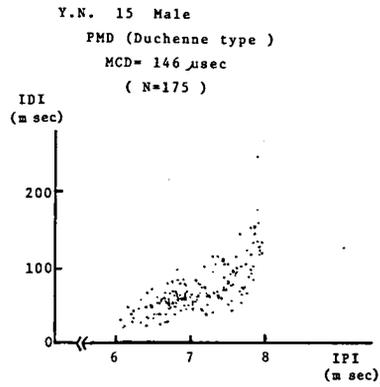
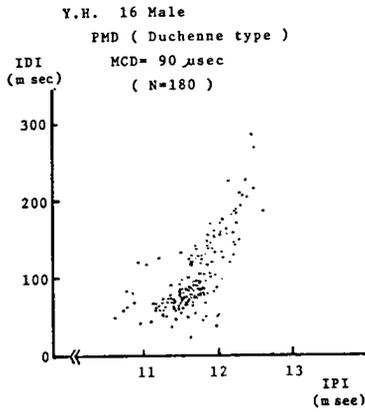


图3 Correlation of interpotential interval (IPI) with interdischarge interval (IDI) Late component of progressive muscular dystrophy (PMD)

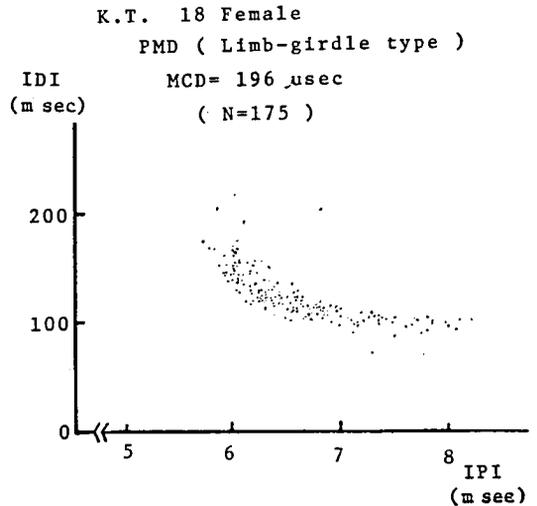
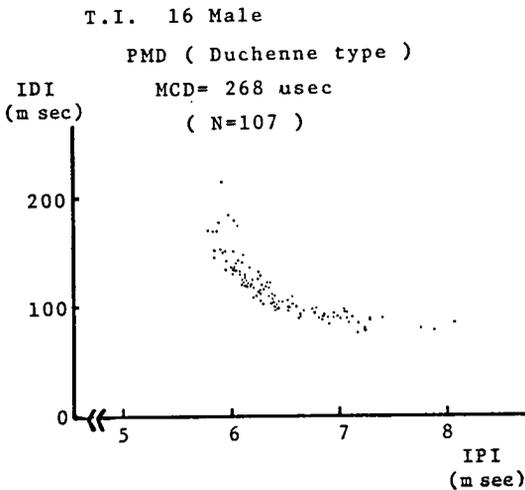


图4 Correlation of interpotential interval (IPI) with interdischarge interval (IDI) double discharge

IDIの短縮によって顕著にIPIが短縮する。late componentと近似したdouble dischargeがDuchenne型で時に観察されるが、この場合には、IDIの短縮に伴って顕著にIPIが延長し(図4)、IDIが100~80 msec以下になると活動電位が消失してしまう。又、double dischargeは以下の特徴を持っていた。(1)先に出現する活動電位の波形と近似しているが振幅は小さい。(2)電極の位置をわずかに動かすと、late componentの多くは電極が2つの活動電位の中間に位置しているため、一方の活動電位の振幅が小さくなる(電極が筋線維より遠ざかる)と、他方の振幅が大きくなり(電極が筋線維に近づく)、いわゆるシーソー現象を示す。double dischargeの場合は同一筋線維由来のため電極をわずかに動かすとシーソー現象は示さず、両者共振幅は大きくなるか小さくなるかで、同一の動きを示す。

考 察

筋線維密度は筋ジストロフィー症及び各種神経疾患で増加がみられ、これは直径 25μ の電極がpick upしうる半径約 300μ の半球内に同一神経支配下の筋線維が増加する事を意味している。末梢神経障害によるcollateral sproutingなどのreinnervationや、muscle splitting, muscle atrophyなどの筋の形態異常の程度が筋線維密度の増加に反映される。

筋線維密度が顕著に増加する運動ニューロン疾患ではMISIは正常と差がなく、各種筋ジストロフィー症では有意にMISIの延長がみられた。これは筋ジストロフィー症の筋線維の大小不同の形態を反映していると考えられる。即ち小径の筋線維は大径に比べ筋線維伝導速度が遅いため大径線維の活動電位より遅れて出現する¹³⁾。

Jitter現象は同一神経支配下の2つの筋線維のIPIが時間の経過でゆれる現象であり、正常では主に神経・筋接合部のtransmission timeのvariabilityに由来すると考えられている。筋ジストロフィー症においては約20%

のpairにjitter現象の異常がみられblocking現象を示すものもみられる²⁾。特にlate componentのjitter値は大きい傾向を示し、神経・筋接合部由来のjitter現象の他に、筋線維伝導のvariabilityに由来するjitter現象(myogenic jitter)の関与が示唆された²⁾。

Stålbergは対立する電極を有する多極針を用いて不均一な間隔で筋線維を刺激して同一筋線維のpropagation velocityを観察し、propagation velocityが変動する現象を見出してvelocity recovery function(VRFと略)と名付けた¹⁾。このVRFは正常筋でも認められるが、筋ジストロフィー症においては顕著なVRFを示す筋線維が増加すると報告している³⁾。しかし彼の用いた多極針では筋線維のせいぜい $200\sim 300\mu$ の長さの状態を観察しているにすぎない。我々はend plateから電極に達するまでの筋線維におけるVRFを2つの筋線維のVRFの差として、IPIの変動を指標にして観察した。そしてlate componentではIDIの短縮でIPIが顕著に短縮し、late componentのVRFが顕著であることが明らかとなった。VRFの顕著なpairのIDIとIPIとの関係を模式的に図5に示す。図中の

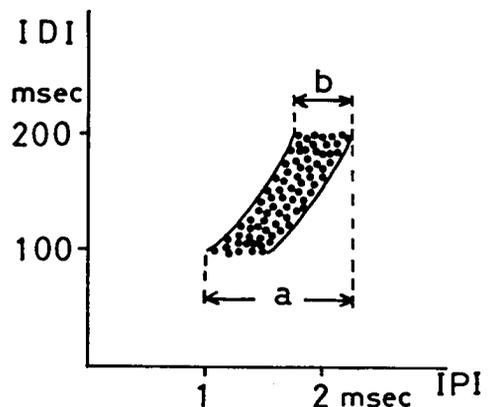


図5 Correlation of interpotential interval (IPI) with interdischarge interval(IDI)

bで示される IPI の変動は IDI が一定の時の variability であり、この時は VRF は関与せず神経・筋接合部由来の jitter 現象と考えられる。図中の a に相当する IPI の variability は b に VRF 即ち myogenic jitter が加わったため IPI の変動が大きくなったと考えられる。特に late component では IDI のわずかの変動で total の jitter 現象は大きくなり、このため late component の jitter 値が大きくなると考えられる。

Double discharge では遅れて出現する活動電位は先に出現する活動電位と同一筋線維由来のため、IDI が短縮すると IPI は延長しついに遅れて出現する活動電位が筋線維の refractory phase にはいるため消失すると考えられる。この時 IDI が 80~100 msec 以下になると消失することは Denslow⁴⁾の指摘する所と一致している。

ま と め

(1)各種筋ジストロフィー症では平均 MISI は対照に比べ有意に高値を示し、筋線維の大小不同の形態によると考えられる。

(2)筋ジストロフィー症の jitter 現象には VRF 由来の myogenic jitter が加わり、jitter 値が大きくなる。特に VRF が顕著な late component ではわずかの筋発射間隔の変動

で jitter 値は大きくなる。

(3)late component と近似した double discharge は Duchenne 型でよく観察され、電極の位置のずれに対する振幅の変動に特徴がみられたこと他に、IDI に対する IPI の変動が late component とは反対で、IPI が充分短くなると消失することが明らかとなった。

文 献

- 1) E. Stålberg : Propagation velocity in human muscle fibers in situ. Acta Physiol. Scand., 70 : Suppl. 287 : 1—112, 1966.
- 2) 西谷裕, 小西哲郎他 : 筋ジストロフィー症の単一筋線維筋電図 (Single fiber EMG). 筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究 (沖中班) 昭和 52 年度報告書 pp276—281.
- 3) E. Stålberg : Electrogenesis in human dystrophic muscle, in Pathogenesis of human muscular dystrophies. pp 570—587, Excerpta. Medica. Amsterdam. (1977).
- 4) J. S. Denslow : Double discharges in human motor units. J. Neurophysiol. 11 : 209—215, 1948.

28) ミオトニーの発生機序に関する電気生理学的研究

——微小電極法による実験的ミオトニー——

栗原照幸*

はじめに

ミオトニーは種々の疾患に伴って起る他¹⁾、先天性にヤギにもみられ、又種々の化学薬品²⁾³⁾によっても起ることが知られている。微小電極を用いて筋細胞内記録を行うためには、対象となる筋肉は筋腹で切断せず、腱から腱までの全長が必要で、ヒトからこのような標本を得ることは困難な場合が多い。本研究ではラットの横隔膜標本を用いて、アントラセン-9-カルボン酸でミオトニーを *in vitro* で作成し、ミオトニーにみられる種々の興味ある現象を微小電極を用いて記録した。特に myotonic burst, warming-up 現象, microoscillation, ミオトニーの筋細胞膜における微小な脱分極 (myotonic micropotentials) について検討を加えた。ガラス管微小電極によって細胞内連続記録を可能とするためには、著者らの開発した哺乳動物骨格筋に対する E-C Uncoupling の方法⁴⁾⁵⁾⁶⁾により筋収縮を阻止した。

方 法

体重 150—250 g のウィスター系ラットの横隔膜標本を Krnjevic 等⁷⁾の方法でつくり、95% O₂ と 5% CO₂ の混合ガスを用いて標本を酸素化した。ミオトニーを *in vitro* でつくるためには上記標本にアントラセン-9-カルボン酸を 1×10^{-4} M/L の濃度でタイロース液中に混合した溶液に浸した。

ミオトニーにみられる種々の現象を筋収縮

による artifact なしに細胞内記録をするためにはミオトニーをつくる以前にあらかじめ筋の triad を選択的に破壊した⁸⁾。それには 400 mM glycerol 溶液に横隔膜標本を 60 分浸し、次に Ca と Mg を夫々 5 mM ずつ加えたりんご液に 20 分浸し、最後に 5 mg/L の濃度で dantrolene sodium を加えたタイロース液に 20 分浸す。Triad の破壊は高張の glycerol 溶液から等張のりんご液に横隔膜標本を移す時 osmotic shock で起こり、これのみでも 98% の等尺性張力を阻止できるが、更に残りの 2% の張力を除くために 5 mg/L の濃度で dantrolene sodium をタイロース液に加えた溶液へ浸すと 99.7% の等尺性張力を除くことができる⁹⁾。これによって筋収縮の機械的動きによる筋膜の傷害電流を起さなくすることが可能となり、又本法は筋細胞膜より末梢で筋収縮を阻止するため、筋細胞膜で起る電気生理学的変化には影響を与えずに myotonic burst 等の細胞内連続記録ができる。

筋細胞内記録はガラス管微小電極を自作し、抵抗 5—15 megohm のものを選んで実験に用いた。膜電位はオシロスコープより読みとり、筋活動電位、myotonic burst 等は一旦テープレコーダーに記録して後にキモグラフで写真をとり計測した。

結 果

膜電位、微小終板電位に対する上記の E-C Uncoupling の影響は表 1 A 及び B に示す様に E-C Uncoupling の前後で膜電位を比較しても差がなく、又 mepp の quantum size に

* 富崎医科大学第三内科

ついても 10ヶ所の endplate で各々100 個ずつの mepp より quantum size を計算したが統計的に有意差を認めなかった。つまり E-C Uncoupling を本法で行っても膜電位及び微小終板電位には悪影響なく筋収縮を阻止できることを確認した。

Myotonic burst を E-C Uncoupling せず

に記録すると図 1—A の様に上下 2 つの筋細胞内記録でどちらとも筋収縮の artifact のため基線の動揺がありよい記録ができない。これに対して E-C Uncoupling の後に (図 1—B), burst を記録すると筋収縮による artifact なしに burst の最後まで記録でき、myotonic burst の最中にゆっくりした脱分極が

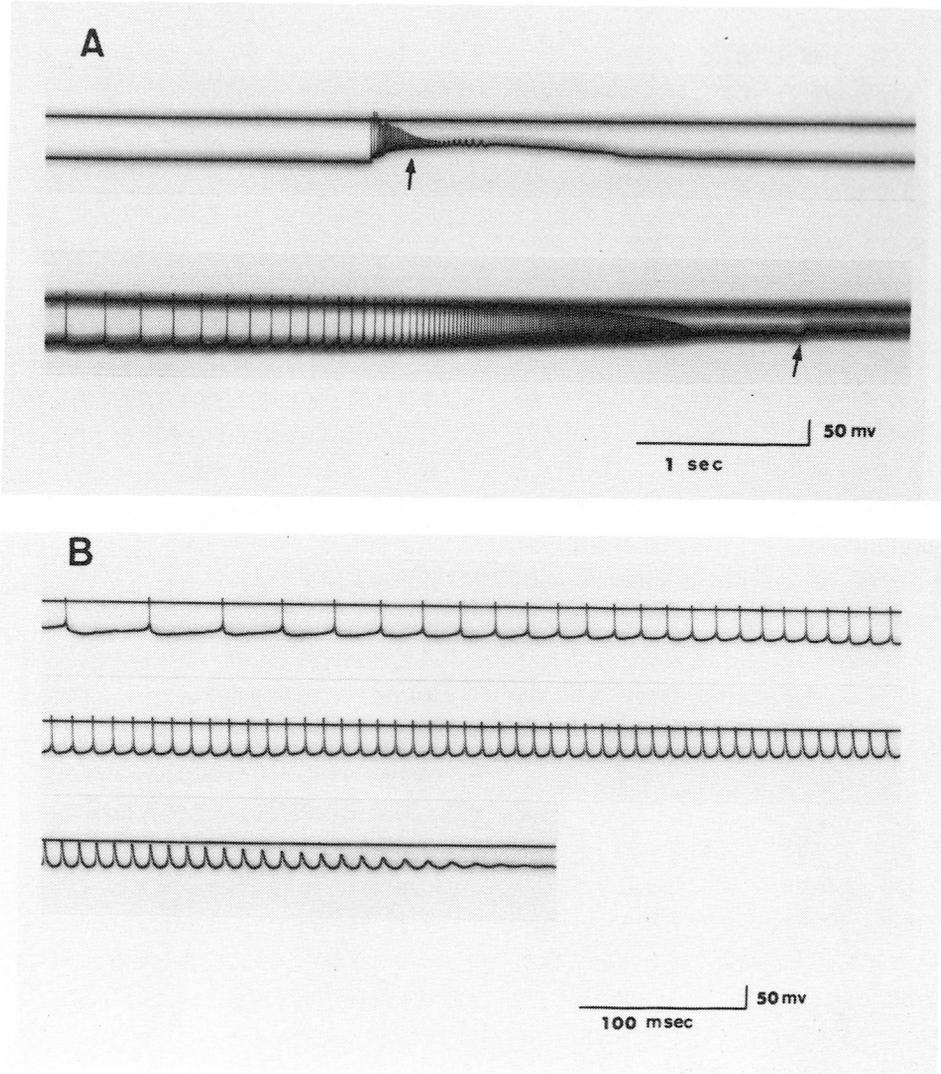


図 1 Aは E-C Uncoupling をせずに myotonic burst を記録すると、筋収縮のため基線の動揺 (矢印) がみられた。

Bは E-C Uncoupling の後に myotonic burst を記録すると、筋収縮の artifact なしに burst の最後まで記録できた。

表 1 A : E-C Uncoupling の前後で膜電位を比較したが有意差はなかった。
 B : E-C Uncoupling の前後で微小終板電位 (mepp) を比較したが有意差はなかった。

A. Resting Membrane Potential (mV)

	No. of Muscle Fibers	Mean ± S.D.
Control	107	-83.8 ± 5.2
After E-C Uncoupling	50	-81.3 ± 6.2

B. Mepp quantum size (10 endplates)

Control quantum ± 1 S.D.		After E-C Uncoupling quantum ± 1 S.D.	
1.	0.57 ± 0.12 mV	1.	0.73 ± 0.16 mV
2.	0.47 ± 0.10	2.	0.75 ± 0.14
3.	0.48 ± 0.10	3.	0.93 ± 0.23
4.	0.37 ± 0.10	4.	0.49 ± 0.10
5.	0.62 ± 0.16	5.	0.45 ± 0.12
6.	0.49 ± 0.11	6.	0.58 ± 0.29
7.	0.53 ± 0.17	7.	0.59 ± 0.18
8.	0.57 ± 0.13	8.	0.63 ± 0.20
9.	0.39 ± 0.10	9.	0.69 ± 0.16
10.	0.75 ± 0.16	10.	0.48 ± 0.10
mean	0.52 ± 0.11 mV	mean	0.63 ± 0.14 mV

あり、やがて abortive spikes, microoscillation で burst が終わっている。

次に warming-up 現象については、約 1 秒に 1 回の slow myotonic discharge が起っている時に 10Hz の神経刺激を行うと、膜電位は図 2 の様に hyperpolarization を起し、slow myotonic discharge も一時消失し、次にゆっくりと脱分極を起して膜電位が元の -72 mV にもどると再び myotonic discharge が起っている。つまり warming-up には反復神経刺激による hyperpolarization が関係しているように考えられる。次にオシロスコープの channel 1 を高増幅、channel 2 を低増幅で myotonic burst を記録すると、高増幅記録では膜電位の動揺がみられ (図 3)、burst の起っている最中にも microoscillation が認められた。そして 5mV 以上の oscillation があると action potential の burst が続き、3 mV 程度では閾値以下と考えられて action potential を伴わない状態がみられた。

又図 4 の様に、ミオトニーの筋細胞膜には一見 mepp の様な微小な脱分極波を記録した。この図は 3 つの myotonic muscle fiber より記録したもので、終板以外の部位で記録され、又振幅も 1.04~2.11 mV と mepp より大きく、頻度も 0.78~14.52 回/秒認められ、

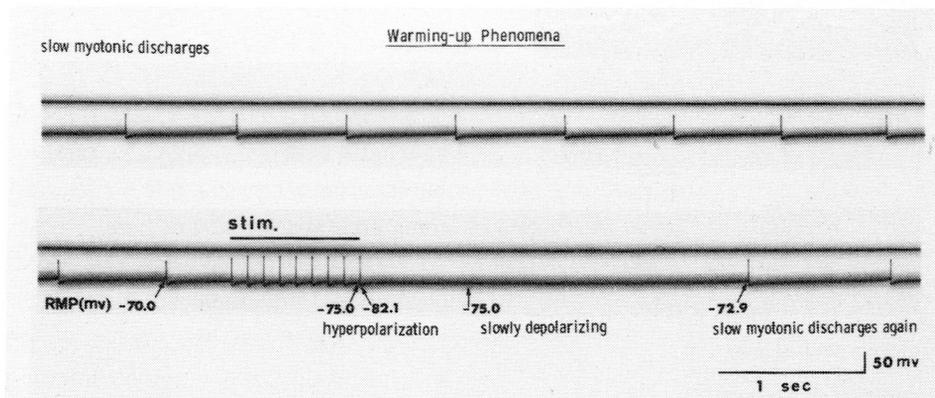


図 2 緩徐なミオトニーの発火が起っている際に、10Hz の神経刺激を行うと、hyperpolarization を起して、上記の発火は一時消失し、放置すると再び脱分極がゆっくり起って緩徐なミオトニーの発火が始った。Warming-up 現象と膜電位の変化をみた。

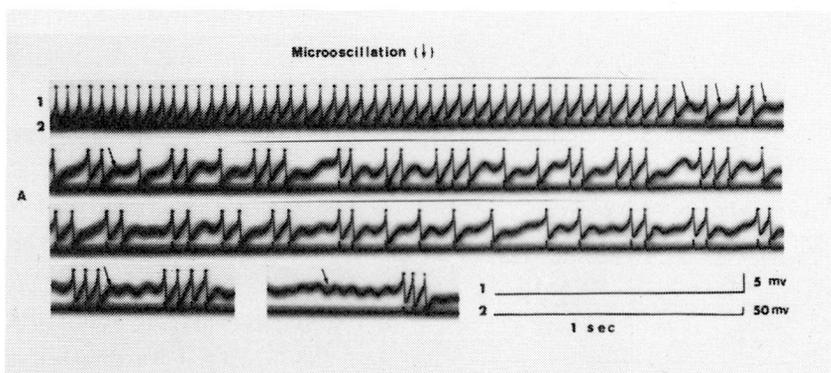


図3 オシロスコープの channel 1 を高増幅, channel 2 を低増幅で myotonic burst を記録すると, 高増幅記録では膜電位の動揺がみられ(矢印), myotonic burst の起っている最中にも microoscillation が認められた。

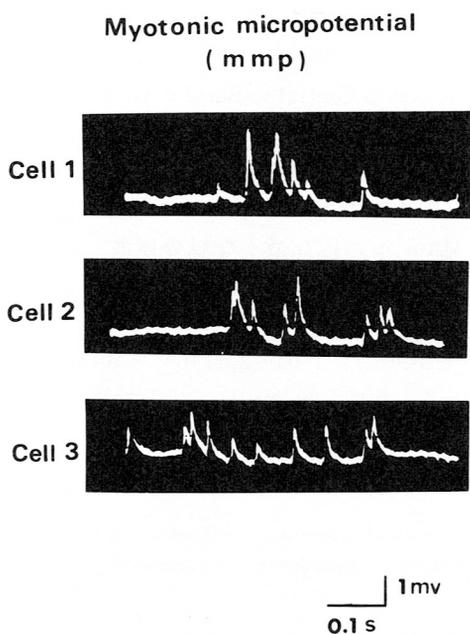


図4 3つの myotonic muscle fiber より記録された微小な脱分極波で終板以外の部位で記録される点 mepp と異り, myotonic micropotential と称した。

波の分布も Katz の quantum theory に従わない点等 mepp と明らかに異なるため myotonic micropotential と称した。

考 察

本研究では化学薬品によって実験的に *in vitro* で作成したミオトニーについて電気生理学的検討を加えた。ヒトにみられるミオトニーと今回の実験モデルとの間にどのような共通点があるか、又どの点で異なるかについては今後更に明らかにしなければならない。

ヒトのミオトニーにおいて筋細胞膜のクロールイオンに対する透過性が減少しているという Lipicky 等⁸⁾の報告があるが、アントラセン-9-カルボン酸によっても筋細胞膜のクロールイオンに対する透過性が減少することが明らかにされており、この点に関しては共通点がある。

本研究で明らかとなった点は(1)ミオトニーは triad を破壊しても起ること、(2)Myotonic burst には膜電位の低下を伴うこと、(3)Warming-up 現象を *in vitro* で作成し、この現象には膜電位の変化が関係すること、(4)Microoscillation と myotonic burst との関係を見たこと、(5)終板と無関係な微小な脱分極波を新たに記録し、これを myotonic micropotential と称したことである。

以上の5項目に関して次に考察する。

(1)ミオトニーは triad を破壊しても起るということは、筋の興奮収縮連関の一連の経過

で筋細胞膜より末梢において収縮を阻止してもミオトニーの電気的変化は起るということである。ミオトニーは神経筋伝達遮断剤を用いても起ることは以前から知られているのでこの事実と本研究結果を合わせて考えると、ミオトニーは筋細胞膜の生理的異常で起ることが実験的に証明されたことになる。

(2) Myotonic burstには膜電位の低下を伴うということは、本実験でE-C Uncouplingにより筋収縮を阻止してから微小電極記録を行っているので傷害電流によるものではなく、膜電位の低下が本当に起ると考えられ、膜電位が低下すれば筋活動電位の振幅も減じ、abortive spikeやmicrooscillationとなつてmyotonic burstが終ることが説明できる。これはミオトニーに特徴的な放電として“dive bomber sound”という表現があるが、その電気生理学的本態としては膜電位が漸減するため筋活動電位が徐々に小さくなって、スピーカーで聞かざれば降下爆撃音としてとらえることが説明できる。臨床筋電図では多数の筋線維で夫々独立に、発火頻度と振幅の漸減が起っている状態が複雑に重なり合っているので、単一筋細胞内記録によるmyotonic burstより複雑な音の変化となる。

(3) Warming-up現象には膜電位の変化が関係する。神経を反復刺激すると正常の筋肉でも膜電位は増加し、これをposttetanic hyperpolarizationと呼ぶ。ミオトニーの標本でも神経反復刺激により膜電位が増加し、安定化して神経刺激前にみられたミオトニーのspontaneous burstが一時止まり、又神経刺激による筋活動電位も刺激前より大となり、それもhyperpolarizationにより説明できる。つまりミオトニーにみられるwarming-up現象は、一般に認められるposttetanic hyperpolarizationという現象がミオトニーについても起り、一過性に起るhyperpolarizationがその本態であると考えられる。

(4) Microoscillationとmyotonic burstとの関係

Microoscillationはmyotonic burstの終りに近くなってから認められる以外myotonic burstの最中でも高増幅記録によれば認められる。Microoscillationにひき続いて筋活動電位が生じている場合のmicrooscillationの振幅は 5.03 ± 0.28 (S.D.) mVで、microoscillationに筋活動電位がひき続いて起っていない場合の振幅は 3.46 ± 0.42 (S. D.) mVと後者の方で低値である。Microoscillationがある振幅以上で筋の興奮閾値以上であれば、myotonic burstを生じる可能性があると考えられる。

(5) 終板とは無関係な微小な脱分極波

微小電極を用いた細胞内記録を行うと、ミオトニーの標本だけに、終板部位とは無関係に、meppとは異なる新たな脱分極波を記録した。この振幅は1.04~2.11 mVで頻度は0.78~14.52回/秒であり、myotonic micropotential (mmp)と称した⁹⁾。その意義は微小電極周囲に起る小さな脱分極で、対象筋ではみられないことからミオトニーの筋膜の異常によるものと考えられるが、今後の検討を要する。ヒトのミオトニーに関してはmicrooscillationの報告はあるが¹⁾、mmpについては未だ記載がない。ヒトのミオトニーについて微小電極法による分析が必要で、実験的ミオトニーと対比させながら今後検索を続けることが大切である。

結 語

ラットの横隔膜標本に、アントラセン-9-カルボン酸を用いてミオトニーを*in vitro*で作成し、微小電極法を用いてミオトニーの発生機序に関して電気生理学的に検討した。特にmyotonic burst, warming-up現象, microoscillation, 及びミオトニーの筋細胞膜における微小な脱分極myotonic micropotential (mmp)について述べた。

御校閲をいただいた宮崎医科大学第三内科、荒木淑郎教授に深謝します。

文 献

- 1) McComas, A. J. & Mrozek, K. : The electrical properties of muscle fibre membranes in dystrophia myotonica and myotonia congenita. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 31 : 441, 1968.
- 2) Winer, N., Martt, J. M. et al. : Induced myotonia in man and goat. *J. Lab. & Clin. Med.*, 66 : 758, 1965.
- 3) Bryant, S. H. & Morales-Aguilera, A. : Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. *J. Physiol.*, 219 : 367, 1971.
- 4) Kurihara, T. & Brooks, J. E. : Excitation-contraction uncoupling : The effect of hyperosmolar glycerol solution and dantrolene sodium on mammalian muscle in vitro. *Arch. Neurol.*, 32 : 92, 1975.
- 5) Kurihara, T. & Brooks, J. E. : The mechanism of neuromuscular fatigue : A study of mammalian muscle using excitation-contraction uncoupling. *Arch. Neurol.*, 32 : 168, 1975.
- 6) Kurihara, T., Araki, S. et al. : Electron microscopic studies of the t-system : The effects of hyperosmolar glycerol and dantrolene sodium on mammalian muscles. *Folia Psychiatr. Neurol. Jpn.*, 30 : 179, 1976.
- 7) Krnjevic, K. & Miledi, R. : Adrenaline and failure of neuromuscular transmission. *Nature*, 180 : 814, 1957.
- 8) Lipicky, R. J., Bryant, S. H. et al. : Cable parameters, sodium, potassium, chloride, and water content, and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. *J. Clin. Invest.*, 50 : 2091, 1971.
- 9) Kurihara, T. : Experimental Myotonia. *Folia Psychiatr. Neurol. Jpn.*, 31 : 653, 1977.

29) セロトニンと神経筋に関する生理学的研究

高 守 正 治*

研究協力者 井 手 芳 彦* 森 健一郎*

緒 言

われわれは、コリン作働性シナプス伝達がアミンの影響も受け、複雑な機構の下にあることを明らかにし、また神経筋伝達、骨格筋収縮弛緩とアミンとの関係の上で、 Ca^{++} や cyclic nucleotides が情報伝達物質として介在することを提唱して来た^{1)~4)}。筋ジストロフィー症の病因、病態に関連しても、骨格筋とアミンの関係が論じられており、われわれは²⁾ヒト・ジストロフィー筋張力のエピネフリンに対する異常反応を、Mawatari ら⁵⁾はエピネフリンによる adenyl cyclase activation が異常であることを報告、アミンがジストロフィー筋小胞体、細胞膜異常に関与していることが示唆される。セロトニンもこの点で論じられているアミンの一つである。病理組織学上 Duchenne 型ジストロフィー症類似の実験的ミオパチーが、セロトニンと動脈結紮⁶⁾あるいはセロトニンとイミプラミンの投与⁷⁾によってつくられ、その成立に血管説⁸⁾および筋に対する直接作用説⁹⁾の両論がある。またヒト・ジストロフィー症との類似性について議論の余地が残されている⁹⁾。MAO inhibitor (Pargyline) による Duchenne 型ジストロフィー症類似の実験的ミオパチーの報告¹⁰⁾もあり、その成立については、ノルエピネフリン増加による過剰アセチルコリン原因説¹¹⁾、血管性影響および筋直接作用の可能性があるが、セロ

トニンの介在も示唆されている。本研究では異論の少なくない血管説 (ischemic myopathy theory) を離れ、セロトニンの神経筋伝達、筋に対する直接作用を調べ、セロトニン・ミオパチー成立のメカニズムを検討した。

方 法

in vivo 生理学的実験は、ネブタール麻酔 (20 mg/kg) 下の家兎を用い、その下肢を血液循環を阻害しないよう膝および足関節でよく固定した上、腓骨神経—前脛骨筋で行った。筋温度は 30°C に一定とした。筋収縮に関する実験では、前脛骨筋および腱の一端を周囲から切り離して free としたものに、水平方向にステンレス綱線を掛けて isometric strain gauge myograph に連結し、耳介静脈より持続微量クラール液注入下で筋直接刺激によって誘発される最大単収縮張力および最大強縮張力 (100 Hz 刺激で誘発) を記録した。単収縮張力曲線からは、最大単収縮力 Pt, 張力発生から Pt を経てその 1/2 の張力まで弛緩する時間 $T_{1/2R}$, 活動電位発生時から張力の一次微分ピーク値までの時間 $T_{derivat}$, 張力の二次微分ピーク値 (最大加速度) d^2Pt/dt^2 を測定し、強縮張力 (P_0) 曲線からは、その一次微分ピーク値 dP_0/dt を算出した。*in vitro* 実験には、正常リンゲル液 (95% O_2 + 5% CO_2 , 33°C) 灌流下で、ラット横隔膜神経筋標本を準備し、細胞内電極法で自発性微小終板電位 (MEPP) 振幅、放電頻度、および静止

*長崎大学医学部第一内科

膜電位を記録した。骨格筋内血流は、Electromagnetic flow-meter を用いて、家兎前脛骨筋からの venous outflow をインク書きオシログラフ上に記録して測定した。

結果および考按

〔神経筋伝達〕ネブタール麻酔下家兎の一方の耳介静脈から 0.03% d-Tubocurarine を微量持続注入器で投与、0.35 Hz の低頻度反復神経刺激で誘発する前脛骨筋活動電位振幅が 50% 低下するブロック状態を維持した。次に他方の耳介静脈からセロトニン 5 mg/kg を注入した結果、直後ブロックの部分的回復 (original amplitude の 67~80%) をみたのち、ブロックが悪化 (original amplitude の 5~14%) する二相性反応 (anti-curare および curare-potentiating) がみられた (図 1)。同様の二相性反応は、エピネフリン (5 μ g/kg) 投与でもみられ (図 1)、別報¹³⁾で報告したわれわれの検討によれば、anti-curare 作用は α -adrenergic receptor を介した presynaptic のアセチルコリン遊離促進作用によるものであり、curare-potentiating 作用は β -

adrenergic receptor を介した postsynaptic の hyperpolarization 作用による。そこでセロトニン効果の場合について検討したところ、前者は α -blocker (phentolamine 0.1 mg/kg) で消失、後者は β -blocker (propranolol 1 mg) で消失、Lysergic acid diethylamide (10 mg/kg) は何らの影響ももたらさなかった。従ってセロトニンの神経筋伝達に及ぼす作用は serotonin-induced epinephrine release¹²⁾ のメカニズムが働いているものと推察される。

次にラット横隔膜神経筋標本を用いた細胞内電極法で、MEPP に対するセロトニンの影響を観察した (図 2)。灌流液中 40 μ g/ml セロトニン添加によって、presynaptic acetylcholine release を表現する MEPP 放電頻度は増大し、postsynaptic effect の指標としての MEPP 振幅は増大、静止膜電位は過分極に傾く所見を得、前述 *in vivo* の場合と矛盾しないものであった。また、これはエピネフリン 5 μ g/ml 添加で得られる所見 (図 2) と同じであった。しかし、この *in vitro* 実験の結果には、serotonergic receptor の介在が

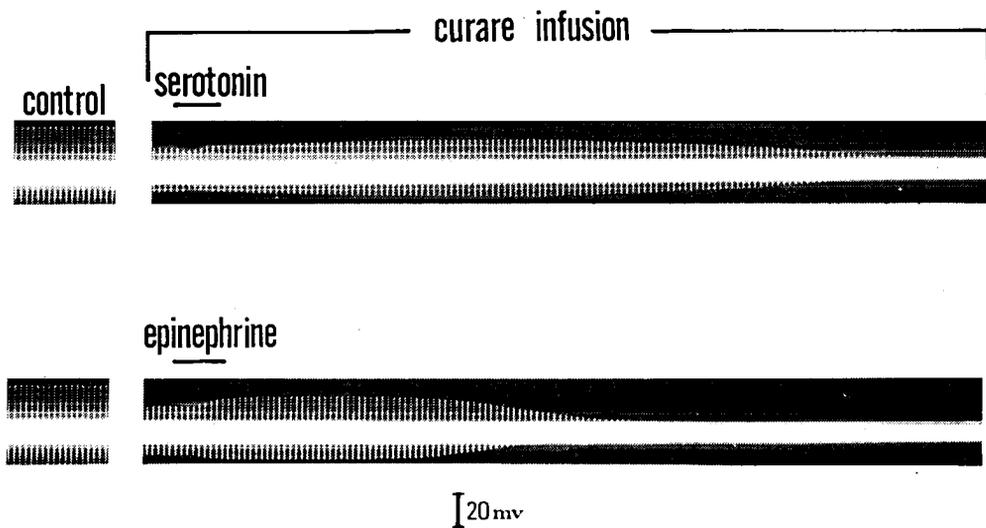


図 1

MEPP

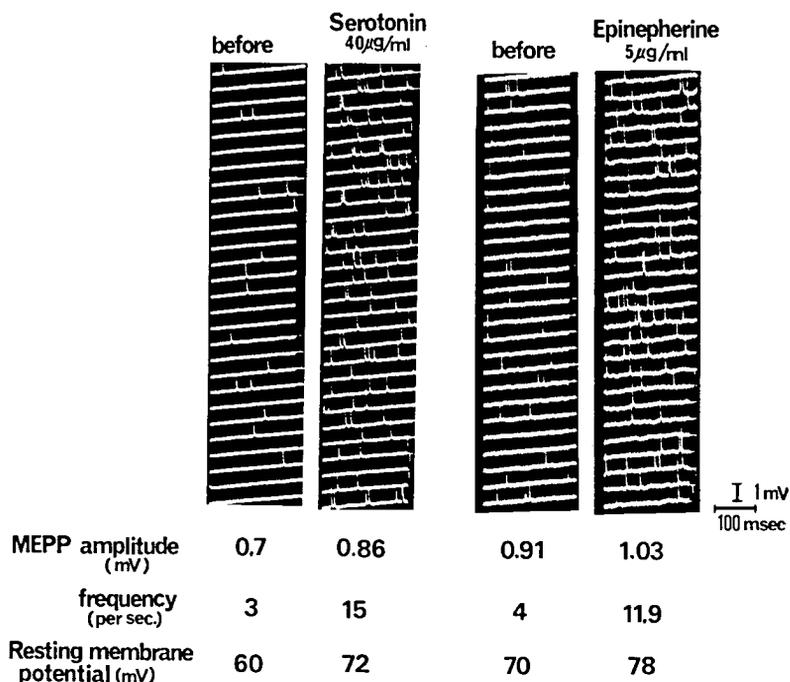


図 2

考慮されなければならないかもしれない¹³⁾。

〔筋細胞内要素〕骨格筋細胞内収縮弛緩要素に対するセロトニンの作用を、 β -adrenergic stimulant (isoproterenol) effect と対比して検討した。家兎前脛骨筋をクラール微量持続注入下で直接電気刺激し、活動電位にひきつづいて誘発される等尺性単収縮張力、強縮張力およびそれらの一次、二次微分曲線を記録、分析した(図3)。それぞれの指標の意義付けには“active state”の概念を導入した¹⁴⁾。時間要素としての active state duration および decay はそれぞれ $T_{dPt/dt}$ 、 $T_{1/2R}$ で表現、つよき要素としての active state intensity of shortening は d^2Pt/dt^2 、active state intensity of load-bearing は P_0 であらわした。 dP_0/dt は、直列弾性要素に異常がなければ、力-速度関係、cross-bridge 形成率を示すものとした。耳介静脈の一方からセロト

ニン 5 mg/kg を投与すると、活動電位不変のまま、 d^2Pt/dt^2 減少に伴った単収縮力 Pt 低下が最も顕著な変化で、強縮力 P_0 および dP_0/dt の変化は軽ないし中等度低下にとどまった。この twitch depressant action は Lysergic acid diethylamide (10 mg/kg) で阻止され、 α -、 β -adrenergic blockers の影響は受けなかった。効果は注入後 20~30 分でピークに達し、約 1 時間で投与前レベルに復した。対比した isoproterenol (5 μ g/kg) の効果は、逆に twitch potentiating action であり、 $T_{1/2R}$ の延長に伴うものであった。active state の他の要素には変化をみなかった。効果は 5~10 分でピークに達し、20 分後までに消失した。図 4 は 15 例の検討の結果をまとめたものである。セロトニンの twitch depressant action の主要原因となった d^2Pt/dt^2 の低下は、active state の概念に従えば、

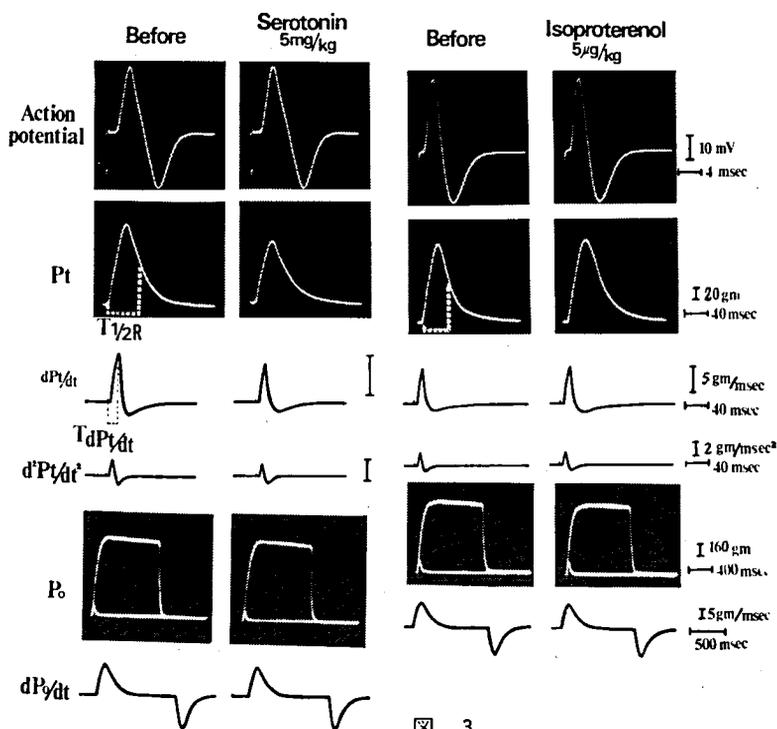


図 3

Effect of drugs on contractile properties

properties	Pt	TdP/dt	T _{1/2R}	dP/dt	Po	dP/dt
0		•••••	•••••		•	••
Serotonin (5 mg/kg) decrease	-10	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
	-20	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
	-30	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
	-40	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
Isoproterenol (5 µg/kg) increase	+20	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
	+10	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
	0	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••

図 4

興奮収縮連関発生に際しての筋小胞体 Ca^{++} 遊離を反映するものであり⁴⁾, subcellular Ca^{++} transport system 異常を暗示し, 近年 Thorpe & Boegman¹⁵⁾による生化学面からのセロトニン作用研究の結果とも矛盾しない。また軽, 中等度の強縮張力曲線に対するセロトニンの影響は, actomyosin の Mg^{++} -activated ATPase 活性に対する抑制作用を生化学的に証明した報告¹⁶⁾と矛盾しない。一方 isoproterenol の twitch potentiating action の原因となった $T_{1/2R}$ の延長は, activator Ca^{++} と troponin によって modulate される cross-bridge turnover に対する β -adrenergic stimulant の影響⁴⁾を示唆している。

〔骨格筋内血流〕 Electromagnetic flowmeter を用いて, セロトニン, α -, β -stimulants 投与時の前脛骨筋からの venous outflow を測定した(図5)。セロトニンも isoproterenol も増大作用を示した。神経筋伝達についていえば, 両アミンとも筋内血流に対して mono-

Effects of Drugs on Venous Outflow from M. Tibialis anterior (Rabbit)

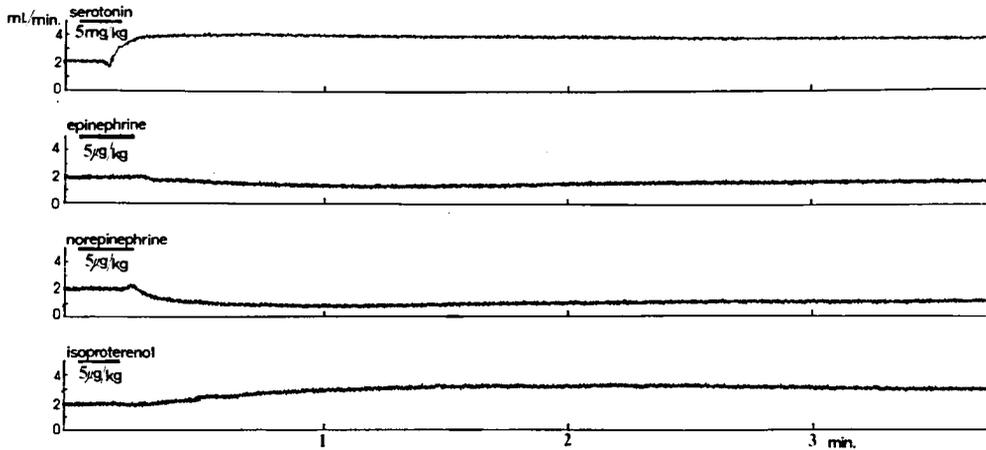


図 5

phasic 作用であるのに、神経筋伝達には二相性の影響をもたらした。筋細胞内要素についていえば、一方は twitch depressant 他方は twitch potentiating 作用であるのに、筋内血流に対する影響は両アミン同一である。これらの事実から、セロトニンの神経筋に対する作用は血管性因子を介したのではないことが推察される。

結 語

セロトニンが1つの myopathy 成立の上には役割を演ずるとすれば、そのメカニズムには血管性因子の関与しない以下の3つがあることを示唆する：(1)presynaptic action to release excessive acetylcholine, (2)postsynaptic action to alter polarization of the muscle fiber membrane, (3)inhibitory effect on the subcellular calcium transport system and actin-myosin interaction.

文 献

1) Takamori, M., et al. : The role of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in neuromuscular transmission, Arch.

Neurol. 29 : 420—424, 1973.

2) Takamori, M. : Contractility and supersensitivity to adrenaline in dystrophic muscle. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 38 : 483—492, 1975.

3) Takamori, M. : Nerve, muscle, and serotonin. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 40 : 89—96, 1977.

4) Takamori, M., et al. : Active state properties of denervated and immobilized muscle : Comparison with dystrophic muscle. Neurology 28 : 603—608, 1978.

5) Mawatari, S., et al. : Adenyl cyclase in normal and pathologic human muscle. Arch. Neurol. 30 : 96—102, 1974.

6) Mendell, J. R., et al. : Duchenne muscular dystrophy : Functional ischemia reproduces its characteristic lesions. Science 172 : 1143—1145, 1971.

7) Mendell, J. R., et al. : Imipramine-serotonin induced myopathy. Neurology 26 : 968—974, 1976.

8) Meltzer, H. Y. : Skeletal muscle necro-

- sis following membrane-active drugs plus serotonin. *J. Neurol. Sci.* 28 : 41—56, 1976.
- 9) Munsat, T. L., et al. : Experimental serotonin myopathy. *Neurology* 27 : 772—782, 1977.
- 10) Yu, M. K., et al. : Pargyline-induced myopathy with histochemical characteristics of Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 24 : 237—244, 1974.
- 11) Fenichel, G. M., et al. : An experimental myopathy secondary to excessive acetylcholine release. *Neurology* 24 : 41—45, 1974.
- 12) Douglas, W. W., et al. : Effect of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells : An analysis employing techniques of tissue culture. *J. Physiol.* 188 : 107—120, 1967.
- 13) Dretchen, K., et al. : Interactions of serotonin with neuromuscular blocking agents. *Eur. J. Pharmacol.* 18 : 121—127, 1972.
- 14) Takamori, M., et al. : Contractile properties of human skeletal muscle : Normal and thyroid disease. *Arch. Neurol.* 25 : 535—546, 1971.
- 15) Thrope, W. R., and Boegman, R. J. : Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum of functionally ischemic muscle. *Exp. Neurol.* 42 : 238—240, 1974.
- 16) Mothersill, C., et al. : Inhibition of actomyosin ATPase by high concentrations of 5-hydroxytryptamine. *Enzyme* 21 : 480—487, 1976.

30) 筋ジストロフィー症の細胞膜の物理化学的研究 I

赤血球の形態

吉田 瑞子*

研究協力者 岩崎 祐三* 安藤 一也*

本研究は、疾患による赤血球膜の物理化学的性質の変化を明らかにすることを目的とし、その一環として、本年は特に赤血球形態についての研究を行なった。

Matheson 等¹⁾が 1974 年に筋ジストロフィー症患者の赤血球の走査電子顕微鏡像の異常を発表して以来、今日迄筋ジストロフィー症患者の赤血球形態について、種々研究され討議が続けられてきた。しかし、研究者により赤血球の形態観察の条件や試料作製の方法が異なるため、今まで発表された研究の結果を比較検討することは困難である。試料作製法の相違とは、①採血法の異なり、②使用溶液の相違、および③採血後形態観察までの処理方法の相違である。③には採血後に全血液を固定し赤血球を得る場合と、赤血球を洗滌後固定する場合の 2 通りがある。

我々はまず正常者の血液で上記②および③による赤血球形態変化を明らかにし、その結果を基にして、疾病者と正常者の差異を比較検討した。

実験方法

血液は正常成人 1 名、Duchenne 型筋ジストロフィー症患者 5 名、およびほぼ同一年齢の正常対照者 4 名よりヘパリン採血した。

採血直後、1/2 量の血液は、その 10 倍量の使用溶液中に浮遊し、3 回洗滌過程を経て、同じ溶液で作られた 1% glutaraldehyde

溶液中で固定した。残りの 1/2 量の血液をその 10 倍量の 1% glutaraldehyde を含む同じ溶液中で固定した。固定は 30 分から 2 時間半おこなった。固定液は使用する直前に窒素封入 70% glutaraldehyde を用いて調整した。溶液種は表 1 に示される 7 種類を使用し、水はパイレックス容器による再蒸溜水を用いた。

溶液の浸透圧はセミマイクロオズモメーター (Knauer 社 SNOI) で測定した。赤血球と溶液は遠沈法 (700 rpm, 10 分間) で分離した。

固定された赤血球は、再蒸溜水で洗滌後、2, 2-dimethoxypropan, 次いで 100% acetone で脱水した。acetone を isoamyl acetate に置換後、isoamyl acetate 中の赤血球を plastic cover slip の上にのせ、更に isoamyl acetate を液体炭酸ガスで置換して、臨界点乾燥を行なった (日立-HCP-2)。Ion-coater (Eiko IB-3) で Pt-Pd を coating したあと日立-S-430 型走査電子顕微鏡を用いて、0 度から 70 度間の最適角度に試料台を傾斜して観察、写真撮影を行なった。電顕的観察に用いた試料の一部を固定する前に光学顕微鏡でも観察、走査電顕像との対比を行なった。

赤血球異常形態は、Bessis 等²⁾の分類方法に従い echinocyte I 以上, stomatocyte I 以上の変形を異常とした。ただし表 1 では、正常形 (discocyte) 以外を異常形態とみなし、異常赤血球の出現率を求めた。“+”は 0 から数%，“+++”はおおよそ 50%。

* 国立武蔵療養所神経センター

表 1

	pH	Osmotic pressure m Osm/l	Occurrence of deformed RBC	
			Fixation without washing	Fixation after washing
Plasma	7.3	290		
Alsever's solution	6.0	331	+	+
Phosphate buffered saline containing Mg ⁺⁺ and Ca ⁺⁺	7.4	281	+	+
1/15 M Phosphate buffer	7.4	150	++	+++
0.9 % NaCl	5.5	284	+	++++
Ringer's solution	5.5	288	+	+++++
1/15 M Phosphate buffer containing 5.4% dextrose	7.4	442	+++	+++++
1/7 M Veronal buffer	7.0	348	+++++	+

“+” : zero to several percents, “+++” : approximately 50% and
“+++++” : almost 100% of RBC's are deformed.

“+++++” は 100 % 近い異常変形の出現率を示す。

結 果

表 1 に示すように血液保存に使われる Alsever 溶液と Ca²⁺, Mg²⁺ が含まれるリン酸緩衝食塩水 (PBS(+)) 中の赤血球は採血直後に固定した場合も、洗滌後固定した場合にも共に異常形態の出現率が非常に少なかった。一方、1/15 M リン酸緩衝液、0.9 % NaCl, Ringer 溶液を用いた場合には、採血直後に固定した場合も、洗滌後固定した場合にも stomatocyte 型の異常形態が出現した。洗滌後固定した場合に多く出現したが、特に Ringer 溶液で洗滌した場合は 100 % 近くの赤血球が stomatocyte 型となった。1/15 M リン酸緩衝液 + 5.4 % ブドウ糖溶液の場合、採血直後固定した赤血球に偏平型を示すものが多かった。さらに洗滌過程を経ると、100 % 近い赤血球が偏平型に突起を生じた型を示した。1/7 M Veronal 緩衝液で採血直後固定した場合、総ての赤血球が echinocyte I, II を示した。しかし洗滌した赤血球は正常の discocyte を示した。以上見るように、生体細胞の実験にしばしば使われる溶液で処理した上で、赤血

球の形態異常を起こす場合があることに注意すべきである。また同じ溶液で採血直後に固定した場合と洗滌した場合に赤血球異常変形の出現がまったく異なる場合がある。Alsever 溶液と PBS(+) 中の赤血球異常変形の出現は、いずれの場合も非常に少なかった。しかし採血後 4 °C で、24 時間を経過すると PBS(+) 中の赤血球に echinocyte 型が増加して来た。以上の結果、調べた 7 種類の溶液中、Alsever 溶液がもっとも赤血球形態の異常を起こしにくいことが解った。

そこで Alsever 溶液を固定液及び洗滌液に使用して、5 名の Duchenne 型筋ジストロフィー症患者と 4 名の正常対照者の赤血球形態を、採血直後に 1 % glutaraldehyde 溶液で固定した場合と、溶液中に浮遊し、6 時間、4 °C で放置後 3 回洗滌過程を経て固定した場合について比較検討した。Alsever 溶液の組

表 2 Composition of Alsever's solution

Sodium Citrate	8.0 g/l
Sodium Chloride	4.2
Dextrose	20.5
Citric Acid	0.55

表3 Percentage of abnormal erythrocytes in Duchenne patients and controls

	age	severity of the disease	fixed immediately in 1% glutaraldehyde solution		6 hours in Alsever's solution	
			stomatocyte %	echinocyte %	stomatocyte %	echinocyte %
Controls	18		4.2	3.2	3.2	3.6
	10		2.0	3.7	4.1	1.4
	9		1.5	1.8	2.7	1.1
	6		8.0	5.3	13.7	3.5
Duchenne	18	8	5.9	1.1	2.2	6.8
	17	8	3.1	0.1	2.6	1.1
	14	8	0.6	1.5	1.9	2.6
	12	5	1.1	1.0	2.3	0.7
	9	5	3.9	0.4	6.8	1.3

成は表2の如く、クエン酸ナトリウム、クエン酸、塩化ナトリウム、ブドウ糖で、溶液のpHは6.0、浸透圧は約330 mOsmである。

その結果を、赤血球の異常形態 echinocyte I 以上と stomatocyte I 以上を統計処理し、表3に示す。患者と対照者の赤血球は処理過程のいかんにかかわらず数パーセントの異常形態を示した。しかし患者と対照者の赤血球異常形態出現率に差は認められなかった。

またヘパリン採血の血液中の赤血球を光学顕微鏡で観察したが、患者と対照者の赤血球形態の差はまったく認められなかった。

考 察

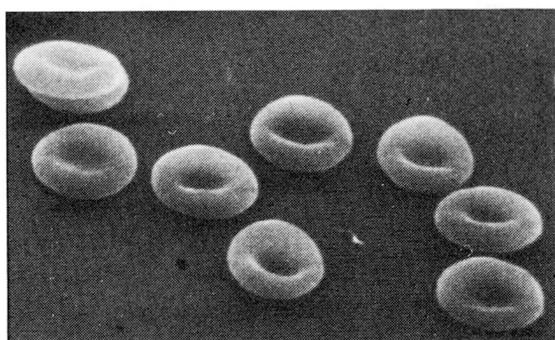
1974年以来現在まで患者の赤血球形態異常の議論が続いたのは、それぞれの研究者によって試料の処理方法が異なっていたことが重要な原因のひとつであると考えられる。すなわち赤血球の処理条件が、赤血球の種々の形態異常を起こし、それが疾患による形態異常に重複して現われている可能性がある。

本研究では、まず赤血球形態に、処理条件と疾患による影響ができる限り重複しない赤血球処理条件を選び出した。その結果、生体細胞にしばしば使用される溶液の中にも、正常赤血球の顕著な形態異常を起こすものがあることが判明した。調べた溶液の中、血液保

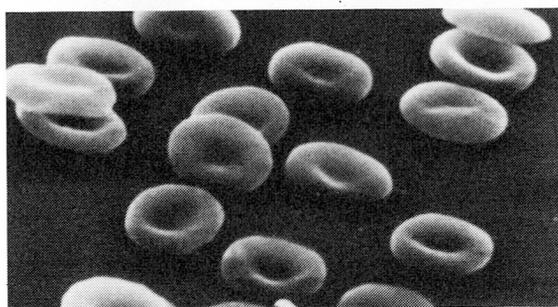
存に使用される Alsever 溶液を用いた時に、赤血球を採血直後に固定した場合、洗滌過程を経た場合、さらにその溶液中で24時間放置後のいずれの場合にも、赤血球異常形態の出現が少ないことが解った。この溶液を用いて、患者と対照者の赤血球形態を比較検討した結果、両者間にはまったく差は認められなかった。その赤血球形態の1例を写真(図)で示す。重症度8のDuchenne型ジストロフィー症の患者と対照者の赤血球で、採血直後に固定したものである。

Miller等⁹⁾は赤血球形態のpH依存性を調べて、患者の赤血球は正常対照者のそれに比べてpHの変化を受けやすく、異常形態の出現が増加すると述べている。特に低いpHでは、stomatocyte型が増加することを、Duchenne型、Myotonic型ジストロフィー症の患者の赤血球(pH6の溶液)について示した。しかし本研究において、pH6.0のAlsever溶液中で、患者の赤血球も正常なdiscocyte型を示し、stomatocyte型は数パーセントにすぎなかった。残念ながらMiller等はpH6の溶液の組成を示していないので、我々の結果と比較検討はできないが、Miller等の結果には溶液による影響が重複していると考えられる。

また1% glutaraldehydeが加わると、Al-



Patient
×2,000



Normal control
×2,000

図 Erythrocytes of a patient with Duchenne muscular dystrophy and of normal control. Fixed immediately after bleeding with 1% glutaraldehyde in Alsever's solution (pH6.0, 430 mOsm). Note the dominance of typical discocytes in both preparations.

sever 溶液の浸透圧は 430~450 m Osm となり、生理的浸透圧——約 300 m Osm より高圧となるが赤血球の形態異常は認められなかった。

また光学顕微鏡下で患者の血液中の赤血球の形態に異常が認められなかったが、この結果は生体中에서도赤血球は正常な形態を保っていると予想される。

1974 年以來の多くの研究者によって、患者の赤血球は非生理条件の影響を受けやすい可能性があることを指摘されているので、今後赤血球の脆弱性とその原因を調べる予定である。

結 論

走査電子顕微鏡像による、Duchenne 型筋ジストロフィー症患者と正常対照者の赤血球形態に差は認められなかった。

最後に患者の血液を提供下さった、国立療養所東埼玉病院 石原傳幸先生、正常対照者の血液を提供下さった、東京女子医科大学 金子行子先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Matheson, D. W. & Howland, J. L. : Erythrocyte Deformation in Human Muscular Dystrophy. *Science* 184 : 165 (1974)
- 2) Bessis, M., Weed, R. I. & Leblond, P. F. : Red Cell Shape : Springer-Verlag, New York, Heidelberg (1973)
- 3) Miller, S. E., Roses, A. D. & Appel, S. H. : Scanning Electron Microscopy Studies in Muscular Dystrophy. *Arch. Neurol.* 33 : 172 (1976)

31) Duchenne dystrophyの赤血球膜におけるK⁺動態

飯田 光 男*

研究協力者 足立 皓 岑* 小長谷 正 明* 室 賀 辰 夫*
祖父江 逸 郎* 向 山 昌 邦**

はじめに

Duchenne dystrophyの赤血球についての病態の検索は数多くみられるが、その大部分はghostを使つての結果である。そこで我々は細胞レベルにおける病態生理の解析を目的にKイオン動態を検索した。

対象および方法

対象はDuchenne患者8例、同年代正常男子8例である。検索はヘパリン採血し遠心分離して得た赤血球を二つの異なる条件下にて行った。(I)赤血球を0.15 M塩化コリンー10mM Tris-HCl buffer pH7.4 (A溶液)で洗浄し、次にA溶液内での赤血球からのKイオン透過量を経時的に測定した。(II)生食水を洗浄液として得た赤血球を360 mM sucrose+15 mM NaCl+0.1 mM KCl (B溶液)に

浮遊させ、同様にしてKイオン透過量を測定した。Kイオン量はオリオン社製Kイオン電極 model 93-19にpHメーターを接続し、その電位変化をX-Yレコーダーに記録した。赤血球の分離は0-4℃下において行い、Kイオン測定は37℃の容器内に赤血球を浮遊させ、攪拌しながら測定した。また各測定毎に酢酸鉛溶液を添加する事により溶血の有無を確認した。

結 果

A溶液内におけるKイオン透過量は図1の如くであった。両群共に測定開始後1分以内はKイオン透過量はカーブを描いて増量し、以後はゆるやかな勾配の直線を示した。測定開始1分での透過量 (ng±SE/10⁴ヶ赤血球)は正常者群で48.76±3.37、患者群では70.

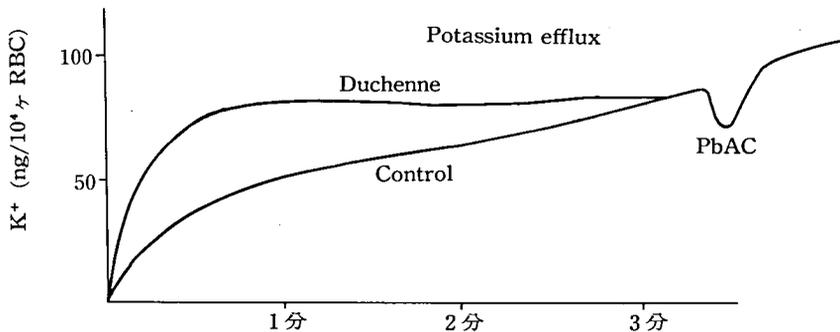


図1 A溶液内におけるKイオン透過量

*名古屋大学医学部第一内科

**国立武蔵療養所神経センター

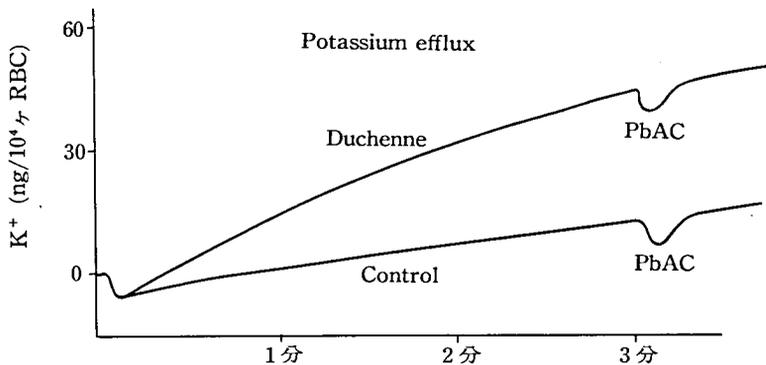


図2 B溶液内におけるKイオン透過量

93±8.14で両群間には明らかな差がみられた。しかし1分以後は両群間の差はしだいに減少し、3分の時点ではそれぞれ77.82±6.20と77.34±7.50で差はなくなり、以後は両群ともほぼ等しい勾配の直線でわずかずつ増量した(PbACは酢酸鉛)。

B溶液内での結果は図2の如くであった。両群共に透過量は直線勾配を示した。測定開始1分以内では両群間の透過量差は判別出来なかったが、以後しだいに差が認められるようになり、3分後の透過量は正常者群で20.41±1.95、患者群で56.04±5.5で両群間に明瞭な差が生じた。3分以後も差は持続して認められたが、両群ともに0.1mMウアバイン添加による透過量変化はみられなかった。

考 察

我々の結果によると、Duchenne dystrophy患者群の赤血球膜からのKイオン透過量は正常者群とは明らかに差がみられた。しかもincubation mediumにNa、Kイオンが存在する場合もしない場合も共にみられた事は、この変化は受動輸送のみならずNa-Kポンプの関与する機構にも存在する可能性が推測されうる。

Duchenne dystrophy患者の赤血球の細胞レベルにおけるイオン動態については若干の報告¹⁾³⁾がある。それらには異常を肯定する報告と否定する報告とがみられる。しかしそれらの結果の不一致は全て同じ操作方法に基づ

く比較ではない点によるとも推定されうる。従って赤血球のイオン動態の変化はその検索方法の内容との関連から検討する必要があるように思われる。

ま と め

- (1) Duchenne dystrophy患者の赤血球からのKイオンeffluxをincubation mediumにNa、Kイオンを含む条件下と含まない条件下とで検索した。
- (2) 赤血球からのKイオン透過量について両条件下ともに患者群と正常者群との間に差異がみられた。

文 献

- 1) Probstfield, J. L., Wang, Y., Arthur, H. L.: Cation transport in Duchenne muscular dystrophy erythrocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., vol.141, 479-481, 1972.
- 2) Howland, J. L.: Abnormal potassium conductance associated with genetic muscular dystrophy. Nature, vol.251, October 25, 724-725, 1974.
- 3) Shāafi, R.I., Rodan, S. B., Hintz, R. L., Jernandez, S. M., Rodan, G. A.: Abnormalities in membrane microviscosity and ion transport in genetic muscular dystrophy. Nature, vol.254, April 10, 525-526, 1975.

32) デュシェンヌ型進行性筋ジストロフィー症における赤血球膜カルシウム・フラックス

庄 司 進 *

要 約

デュシェンヌ型進行性筋ジストロフィー症の患児赤血球について形態上・生化学上の異常が報告されているが、これらの多くが血球内カルシウム濃度上昇を示唆している。これを直接確かめるため、赤血球への Ca^{2+} の passive influx と ATP を消費する efflux を個々に測定した。Ca-pump ATPase を block しないで Ca^{2+} の取り込みをみると、cytosol, membrane の各 TCA soluble fraction では 2.5 mM の medium に比べ 0. 数% と低く、対照との間に有意差はなかった。LaCl₃ 250 μM で Ca-pump ATPase を block すると Ca^{2+} の取り込みは数十倍に増え、特に membrane TCA soluble fraction の方が cytosol TCA soluble fraction の 2 倍位になった。これでもデュシェンヌの患児の赤血球と対照とは有意差はなかった。Ca efflux の速度は細胞内 Ca^{2+} 濃度と相関し、1 mM 前後でプラトーに達した。これもデュシェンヌと対照とで有意差はみられなかった。

目 的

デュシェンヌ型進行性筋ジストロフィー症 (DMD) の患者の赤血球について、 Na^+ 、 K^+ の transport を行なう ATPase の異常、 K^+ の influx・efflux の亢進、形態異常 (echinocyte や spherocyte の増加)、変形能の低下等が報告されている。一方赤血球内のカルシウムイオン濃度上昇によって上記の異常は全て

説明可能である^{1)~4)}。そこで DMD 赤血球はカルシウムイオン濃度が上昇する機序が働いているかどうかを passive influx と Ca-pump ATPase の働きで行なわれる efflux とを個々に測定することにより検討した。

材料及び方法

患者は DMD で 8 歳から 19 歳、対照は同性同年齢の筋や血液疾患のない患者を用いた。患者と対照とからの採血はペアで行ない同一日、同一時刻、同一処理で実験した。

静脈採血後直ちに 1/10 vol. のヘパリンを加え混和、0℃ に保存実験室へ運搬した。

赤血球の洗浄は水冷した 0.16 M NaCl の 5 vol. 以上を用い 3 回行なった。

influx experiment: 洗浄後の赤血球を 2 vol. の 0.16 M NaCl, ⁴⁵Ca²⁺, 2.5 mM Ca²⁺, $\pm 250 \mu\text{M}$ LaCl₃ の medium に浮遊させ、振盪下に 37℃ で 90 分間 incubate 後 aliquot を取り、さらに 4℃ で 100 時間 incubate して aliquot を取った。aliquot は直ちに 4℃ で 10,000 \times g, 1 分の遠心にて血球と medium を分離し、血球は 0.16 M NaCl で 3 回洗浄後、1 ml の 0.1% saponin を加え溶血させ、17,000 \times g, 30 分の遠心にて ghosts と cytosol を分離した。medium, ghosts, cytosol のそれぞれの TCA-soluble fraction を下記の scintillation fluid に加え液体シンチレーションカウンターで測定した。

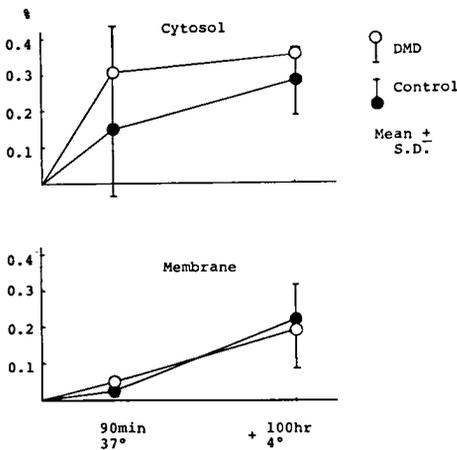
scintillation fluid: toluene 1000ml, triton x-100 500ml, POP 4g, POPOP 0.1g の処方で作製した。

* 信州大学医学部第三内科

efflux experiment : 洗浄後の赤血球を、2/3 vol.の0.16 M choline chloride, 0.15 mM Tris-HCl (pH 7.0 at 37°C), 2 μM A 23187 (gift from Lilly), 1.5~7.5 mM Ca²⁺, ⁴⁵Ca²⁺に浮遊させ37°C, 2分間 incubate 後直ちに0.16 M choline chloride, 0.5 % human serum albumin で1回, 0.16 M KCl, 0.5 % human serum albumin で2回洗浄。Ca²⁺を load した赤血球を120 mM KCl, 15 mM NaCl, 2 mM Ca²⁺, 15 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 37°C)に浮遊させ、37°C振盪下に incubate. 前, 2分, 7分, 12分に aliquot を取り直ちに10,000×g, 1分間の遠心で medium と血球を分離, 以下 influx experiment と同様に medium, ghosts, cytosol の各 TCA-soluble fraction を得て count した。

結果

influx experiment : 6 pairsの結果を図1と図2に示す。図1はLaCl₃を加えない medium で incubate した場合の cytosol と membrane の各 TCA-soluble fraction の Ca²⁺濃度の medium の TCA-soluble fraction の Ca²⁺濃度との比を%で表わしてある。0.数%の order で DMD と対照の間に有意差は無かった。図2はLaCl₃を250 μM 加えて

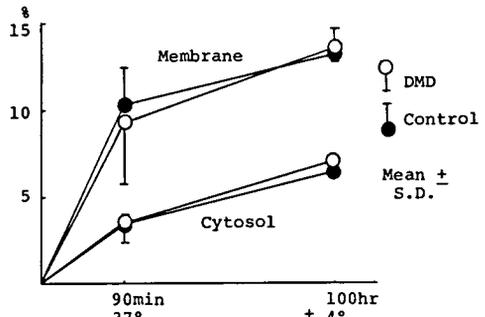


Calcium Influx : washed RBC was incubated in 0.16M NaCl, 2.5mM KCl, 2.5mM Ca²⁺, and ⁴⁵Ca²⁺

図1 Calcium influx

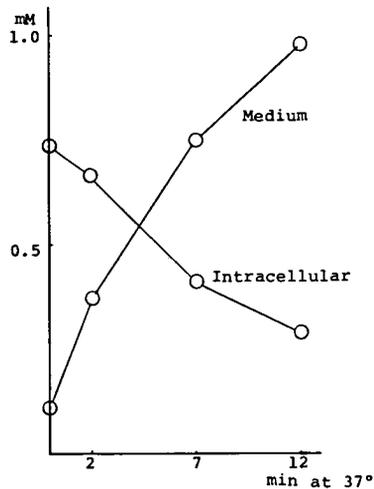
Ca-pump ATPase を block した場合を示し、図1の場合より数十倍 influx が増加しており、特に membrane の TCA-soluble fraction に cytosol より多く influx が認められた。これでは明らかに DMD と対照との間に差が認められなかった。

efflux experiment : 図3に一例を示す。incubation により load された Ca²⁺は intracellular から medium に efflux されて来る。



Calcium Influx : washed RBC was incubated in 0.16M NaCl, 2.5mM KCl, 2.5mM Ca²⁺, ⁴⁵Ca²⁺, and 250 μM LaCl₃

図2 Ca-pump ATPase の blocker を用いた場合の calcium influx



Calcium Efflux : Ca-loaded RBC was incubated in 120mM KCl, 15mM NaCl, 2mM Ca²⁺, 15mM Tris-HCl (pH 7.4 at 37°)

図3 Calcium efflux の一例

この間 membrane TCA-soluble fraction の Ca^{2+} は不変であった。medium の Ca^{2+} 増加速度と intracellular の Ca^{2+} の減少速度から算出した Ca-efflux 測定は良く一致した。この efflux 測定値と intracellular の Ca^{2+} 濃度は相関を示した。図 4 にこの関係を示した。これは intracellular calcium 濃度で約 1 mM で efflux speed がプラトーに達することを示している。それでも DMD と対照との間に差は認められなかった。

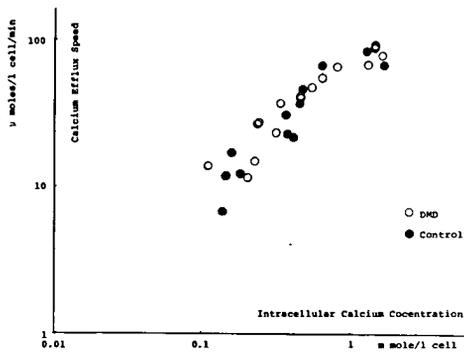


図 4 Calcium efflux speed と intracellular calcium concentration

考 察

行なった条件下では DMD と対照の間に差は認められなかった。従来 DMD の calcium flux に関する報告は、1977 年の Dise らが Ca uptake を $0.15 \mu\text{M}$ A23187 が無い条件下と有る条件下で測定し、対照と DMD で差がないと報告した⁵⁾ものと、やはり 1977 年 Hodson と Pleasure が Ca-pump ATPase の活性を ghost で測定し DMD で対照に比べ 21% 上昇していたこととこの酵素が MgATP に対照より大きな affinity を有していたという報告⁶⁾がある。前者の influx の値は $1.59 \mu\text{moles/l cells}/10 \text{ min}$ at 37°C で medium が 1 mM なので、今回の LaCl_3 を加えない calcium influx の cytosol の値に対応している。しかし Ca-pump ATPase を block していないので真の influx と言うよりは (influx-efflux) をみていると言える。後者の報告は eff-

lux が DMD で上昇している可能性を示唆したが今回の結果はそれと対立するものと言える。

今回の efflux speed の値は従来の報告⁷⁾と良く一致していた。

なお今後 protein bound calcium の動きを検討する必要がある。

文 献

- 1) Dunn, M. J. : Red blood cell calcium and magnesium : Effects upon sodium and potassium transport and cellular morphology, *Biochim. Biophys. Acta* 352 : 97—116, 1974.
- 2) Blum, R. M. and Hoffman, J. F. : Ca-induced K transport in human red cells : Localization of the Ca-sensitive site to the inside of the membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46 : 1146—1152, 1972.
- 3) Weed, R. I. and Chailley, B. : Calcium-pH interactions in the production of shape change in erythrocytes, *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 12 : 775—788, 1972.
- 4) Weed, R. I. et al. : Metabolic dependence of red cell deformability, *J. Clin. Invest.* 48 : 795—809, 1969.
- 5) Dise, C. A. et al. : Enhanced sensitivity to calcium in Duchenne muscular dystrophy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79 : 1286—1292, 1977.
- 6) Hodson A. and Pleasure, D. : Erythrocyte cation-activated adenosine triphosphatases in Duchenne muscular dystrophy, *J. Neurol. Sci.* 32 : 361—369, 1977.
- 7) Sarkadi, B. et al. : Transport parameters and stoichiometry of active calcium ion extrusion in intact human red cells, *Biochim. Biophys. Acta* 464 : 93—107, 1977.

33) 赤血球膜Ca-ATPase活性と筋ジストロフィー症

植田 啓 嗣*

研究協力者 畑 中 良 夫* 佐々木 重 雄* 野 島 元 雄**

目 的

1967年, Brownらは Duchenne型筋ジストロフィー症の赤血球膜の Na-K-ATPaseの活性に異常があることを指摘した¹⁾が, その後, Pearsonらはこの異常が血清因子によって示唆した²⁾.

その後, 我が国でも荒木ら³⁾, 馬渡ら⁴⁾の報告がみられるが, 各報告者によって成績が異なり, 赤血球膜に果たして異常があるのか, ないのか, 異常があるとすれば, それが primaryなものか, secondaryなものか, 現在まだ結論は得られていない.

1972年, Nicolsonらは赤血球膜は二層の phospholipid よりなり, その中に横断する蛋白, 外層にのみ存在する蛋白, 内層にのみ存在する蛋白などが存在しているとの model⁵⁾を提示した(図1)が, 私共はこれからみて, 赤血球膜で一致した成績が得られ難い理由としては,

①赤血球膜の Na-K-ATPaseの活性値はもともと極めて低いために, 本 ATPaseは膜

を横断して存在していて, 普通の処理法では, 活性中心がマスクされているのではないか.

②Na, Kの膜の transferに couplingして働くときされる ATPaseは ouabainによって阻害される性質を有するとされているが, ouabainの薬理効果が明瞭に現われる心筋や脳とは違って, 赤血球では ouabainによって阻害される部分は極めて少なく, Na-K-ATPaseの活性の大部分が, non-specificな ATPaseによっている.

ためと理解される.

そこで私共は, この2点に留意し, 新たに膜 ATPase活性を測定する方法を考案して⁶⁾, Duchenne型の膜 ATPaseに果たして異常が認められるか否かについて検討を加えてみることにした.

方 法

血液 1 ml をへパリン tube に注入し, 血清並びに白血球層を除いた赤血球層を, 生理食塩水で3回洗滌し, 次で 20 mM histidine-Imidazole-Tris-buffer (pH 7.2) を加えると, 溶血を来たすが, この試料では活性が極めて低いために, freezing-thawing の操作を3回繰り返して活性値測定のための試料とした. 次で 0.2 mM EDTA を含む上記 histidine-Imidazole-Tris-buffer で洗滌をくり返して, Hb の色の消えた試料を膜試料として使用した.

ATPase の assay system には, ATP-Tris 3 mM, MgCl₂ 3 mM, NaCl 80 mM, KCl 15 mM, CaCl₂ 0.1 mM, それに 20 mM histidine-Imidazole-Tris-buffer と sample を加

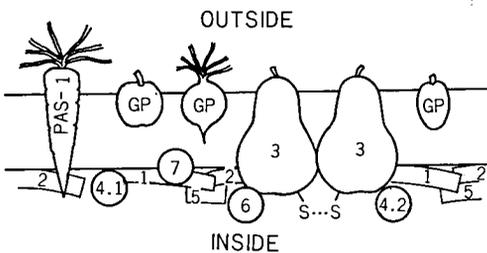


図1 Nicolsonのモデル⁵⁾

* 愛媛大学保健管理センター

** 愛媛大学医学部整形外科

えて total 1 ml (pH 7.2) とし, 37°C, 1 時間 incubate して遊離するリン酸を Fiske-Subbarrow の方法⁷⁾によって測定して, 活性値を求めた。

結果・考察

溶血させたのみの試料とそれに freezing-thawing を 3 回くり返した試料について活性値を比べてみた (表 1)。assay system には Na, K, Mg, Ca と全てのイオンを加えているので, この値は total ATPase と表示しているが, freezing-thawing によって, 活性値は 8.9 倍にまで増加した。目的の項で予測したように単に溶血のみさせた試料では ATPase の活性値は極めて低く, その活性中心は mask されているものと理解される。

表 1 Effects of freezing-thawing on total ATPase activities (hemolyzed red blood cells)

no freezing	1	1.5	} (1.0)
	2	1.0	
	3	0.6	
freezing	1	9.1	} (8.9)
	2	8.9	
	3	8.1	

μ moles ATP hydrolyzed/hr/ml

次に freezing-thawing によって活性値が増量する酵素は他に無いものかを検討してみた (表 2)。

frozen させた活性値を non-frozen の活性値で割った値に 100 を掛ける, つまりこの値では, freezing-thawing させて活性値に影響を与えなければ 100 に近い値がでてくるはず

表 2 Effects of freezing-thawing on cell membrane enzymes

	activities frozen/non-frozen × 100
aldolase	99—103
acetylcholine esterase	96—109
total ATPase	879—1183

であるが, 膜の内側に局在するとされる aldolase を Lehninger 法⁸⁾で, 膜の外側に局在するとされる acetylcholine esterase を Ellman 法⁹⁾で測定して検討してみると, 両者はいずれも 100 に近い値を示した。しかし ATPase は 879—1183 と著明に上昇したので, ATPase のみが, freezing-thawing によって活性値に上昇がもたらされるものと考えられる。

以上はいずれも hemolysate による成績であったが, これが膜の如何なる ATPase を測定していることになるのか, また Mg-ATPase, Na-K-Mg-ATPase, あるいは Ca-Mg-ATPase との関係はどうなっているかを検討してみた。値はいずれも Lowry 法¹⁰⁾によって測定した蛋白量で割った比活性として表示している (表 3) が, total ATPase でみると, 膜試料は hemolysate 試料に比べ約 13 倍に精製されている。

表 3 ATPase activities of the frozen hemolysate and membranes

	activities	
	hemolysate	membrane
ATP	8	35
ATP, Mg	33	289
ATP, Mg, Na	36	328
ATP, Mg, K	35	325
ATP, Na, K	11	35
ATP, Mg, Na, K	36	373
ATP, Mg, Ca	43	416
ATP, Mg, Na, K, Ca	46	607

n moles ATP hydrolyzed/hr/mg protein

hemolysate に ATP のみを加えたものでは 8, それに Mg を加えると 33, Na, K, Mg を加えると 36, Ca, Mg を加えると 43, metal を全部加えると 46 と活性値は増加しているが, これらのイオンに対する類似の response は膜試料についても認められるので hemolysate についての成績はそのまま膜の成績を示唆しているものと考えた。

ところで Duchenne 型の ATPase である (表 4) が, 平均値をみると, Duchenne 型が 369, 父親が 462, 母親が 378 の値を示した。父親の値に比し, 患児は低値をとっている。

表 4 Total ATPase activities (Duchenne type) $\Delta OD_{660}/60\text{min}$

No.	patients	fathers	mothers
1)	346	493	282
2)	(435) (476)	(452)	(282)
3)	380	497	440
4)	/	/	431
5)	333	427	318
6)	345	/	523
7)	304	/	424
8)	379	444	379
9)	328	/	329
average	369 (345)	462 (465)	378 (390)

ここで次の 2 点が問題になるものと考えられる。第 1 は母親も低値を示している点であるが, この場合, 患児の値が比較的揃っているのに対し, 母親には大きなバラツキが認められるので, 母親では stroma に含まれる何か, おそらくその中の activator によって値が調節を受けていることが推測される。

第 2 の点であるが, () で示した患児の兄弟例では, 父親とほぼ等しい値が認められた。この場合, 本症例が果たして Duchenne 型であるのか, 肢帯型であるのかの検討が更に必要なものと考えている。

結 論

Duchenne 型の赤血球膜に異常が認められたとする報告は数多く認められるが, 又, 逆の成績も多い。

そのため, 成績不一致の機構を解析して, 新しい ATPase 活性測定法を考案し⁶⁾, それによって Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球膜の異常の有無を検討してみた。

その結果, 患児と同年齢の小児でも父親と

同程度の値をとっているので, primary か, secondary かは尚不明であるが, Duchenne 型の hemolysate の ATPase, ひいては, その膜 ATPase 活性に異常が存在するものと考ええる。

文 献

- 1) Brown, H. D., Chattopadhyay, S. K. and Patel, A. B. : Erythrocyte abnormality in human myopathy. *Science*, 157 : 1577, 1967.
- 2) Peter, J. B., Worsfold, M. and Pearson, C. M. : Erythrocyte ghost adenosine triphosphatase(ATPase) in Duchenne dystrophy. *J. Lab. Clin. Med.*, 74 : 103, 1969.
- 3) Araki, S. and Mawatari, S. : Ouabain and erythrocyte-ghost adenosine triphosphatase. *Arch. Neurol.*, 24 : 187, 1971.
- 4) Mawatari, S., Schonberg, M. and Olarte, M. : Biochemical abnormalities of erythrocyte membranes in Duchenne dystrophy. *Arch. Neurol.*, 33 : 489, 1976.
- 5) Steck, T. L. : The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J. Cell Biol.*, 62 : 1, 1974.
- 6) Ueda, K., Lawrence, P. J. and Tyler, F. H. : A rapid and convenient assay for the total membranous ATPase content of red blood cell hemolysates. in press
- 7) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. : The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66 : 375, 1925.
- 8) Sibley, J. A. and Lehninger, A. L. : Determination of aldolase in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 177 : 859, 1949.
- 9) Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Fleatherstone, R. M. : A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7 : 88, 1961.
- 10) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265, 1951.

34) Duchenne型筋ジストロフィー症の赤血球ATP

馬 渡 志 郎*

研究協力者 伊規須 英輝** 後 藤 幾 生** 黒 岩 義五郎**

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー症(DMD)における赤血球の種々の異常の報告の中には、adenosine triphosphate(ATP)と密接な関係があるものが多い。例えば、ATPase¹⁾、adenylate cyclase²⁾、および protein kinase²⁾はATPを基質とする酵素であり、adenine⁴⁾はATPの前駆物質である。さらにATPは赤血球の形態³⁾とも関係が深い。これらのことから、DMDにおいては、赤血球のATPの含有量やその動態に異常がある可能性は考えられる。したがって、私共はDMD赤血球のATP量を測定し、合わせて赤血球においては唯一のATP再産生系である解糖代謝(glycolysis)の最終産物である乳酸の量も測定した。さらに、これらATPおよび乳酸に対するブドウ糖、ウアバイン、プロプラノロールの影響を検討した。

対象および方法

DMDの対照として、DMD患者と同施設に入院中の同性、同年齢群の脳性麻痺患者を選び、血液はDMD患者と同日、同時刻に採血し、成人男子血液も同日、同時刻ごろに採血し、ともに同時に同様の処理および測定を行った。これら血液の一部からCoulter Counter Model Sを使用して平均赤血球容積など(MCV, MCH, MCHC)も測定した。

血清を分離後、赤血球は120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂を含んだ30 mM

Tris-HCl (pH 7.4) 溶液で3回洗浄した後、同溶液に、ヘマトクリット値が約40%となるように再浮遊した。反応させた場合は、いずれも37°C, 2時間で、場合によって5 mM ブドウ糖, 0.1 M ウアバインあるいは1 mM プロプラノロールを加えた。反応は冷温の0.6 N 過塩素酸で停止させ、ATPおよび乳酸はベーリンガー・マンハイム社製の測定キットを使用して測定した。

結 果

血清CPK値はDMD患者では、いずれも増加していたが、対照ではすべて正常範囲であった。血清ブドウ糖値はDMDと対照群との間に差がなかった。

赤血球のATPおよび乳酸の量はDMDと同年齢対照群との間には有意差がなかった。しかし、成人と子供(DMDおよび同年齢対照)と間には差があり、子供が高値であった(表1)。37°C, 2時間の反応(incubation)で、赤血球のATPは減少し、乳酸は増加したが、5mMブドウ糖を添加したものは、ATPはほとんど減少せず、乳酸はさらに増加した。ウアバインはATPの減少(消費)および乳酸の増加の傾向を明らかに抑制した。プロプラノロールは、ウアバインと全く逆の影響をし、促進的に作用した。しかし、いずれにおいても、同年齢対照群とDMDとの間には有意差を認めなかった(表2, 表3)。

平均赤血球容積(MCV)および平均赤血球ヘモグロビン(MCH)においても、DMDと同年齢対照群との間には差がなかったが、子

*九州工業大学保健管理センター

**九州大学医学部神経内科

表1 赤血球のATP (μ moles/gHb)

	DMD	子供対照	成人対照
人数	10	12	7
年齢	11.2 \pm 4.5	11.5 \pm 3.2	36.7 \pm 8.0
ATP (平均 \pm S. D.)	3.92 \pm 0.16	3.98 \pm 0.16	3.28 \pm 0.14*

※子供 (DMD および子供対照) と成人の有意差 ($p < 0.01$)

表2 DMDと対照患者赤血球の反応 (37°C, 2時間) 前後のATP値
(μ moles/gHb, 平均 \pm S.E.)

	D M D (9例)	子供対照 (7例)
反応前	4.08 \pm 0.16	3.86 \pm 0.18
反応後		
(a) ぶどう糖 (-)		
薬物 (-)	2.60 \pm 0.13	2.68 \pm 0.12
1 mM propranolol (+)	2.13 \pm 0.08	1.96 \pm 0.15
0.1 mM ouabain (+)	3.22 \pm 0.15	3.27 \pm 0.12
(b) 5 m Mぶどう糖(+)		
薬物 (-)	3.62 \pm 0.14	3.65 \pm 0.15
1 mM propranolol (+)	3.30 \pm 0.12	3.23 \pm 0.13
0.1 mM ouabain (+)	3.96 \pm 0.10	3.86 \pm 0.16

表3 DMDと対照患者赤血球の反応 (37°C, 2時間) 前後の乳酸値
(μ moles/gHb, 平均 \pm S. E.)

	D M D (9例)	子供対照 (7例)
反応前	4.23 \pm 0.27	4.45 \pm 0.36
反応後		
(a) ぶどう糖 (-)		
薬物 (-)	10.86 \pm 0.53	11.51 \pm 0.67
1 mM propranolol (+)	11.37 \pm 0.55	12.01 \pm 0.67
0.1 mM ouabain (+)	10.07 \pm 0.51	10.76 \pm 0.66
(b) 5 mMぶどう糖(+)		
薬物 (-)	15.69 \pm 0.31	16.13 \pm 0.72
1 mM propranolol (+)	18.89 \pm 0.45	19.53 \pm 0.61
0.1 mM ouabain (+)	13.14 \pm 0.29	13.60 \pm 0.67

表4 DMDにおける平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン

	人数	年齢 (平均±S.D.)	MCV (f ₁)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)
D M D	11	10.8±4.5	83.5±3.1	27.9±1.2	33.2±0.5
子供対照	11	11.6±3.3	84.3±2.7	27.9±1.3	33.0±0.9
成人対照	7	36.6±8.0	90.6±2.4*	30.7±0.8*	33.8±0.9

*子供 (DMD および子供対照) と成人との有意差 (p<0.001)

供と成人男性との間には MCV, MCH に有意差があった (表4)。

考 察

本研究は、DMD と同施設に入院中の同性、同年齢対照群とを、同日、同時刻に採血し、同時に処理および測定した結果を比較したものである。しかしながら、赤血球 ATP および乳酸の量にも、ブドウ糖、ウアバインおよびプロプラノロールの作用においても、DMD と同年齢対照群との間には有意差を認めなかった。私共の結果は、最近の Danon ら⁹⁾の報告と異なっている。彼らは、DMD においては赤血球の ATP 量が多く、ブドウ糖添加における乳酸の産生が高いと報告している。この矛盾の原因は不明であるが、Danon らは対照群の血液は DMD と同日、同時には採取していない。

0.1 mM ウアバインは、DMD 赤血球の ATP の消費および乳酸の産生を抑制し、しかも対照群と差を認めなかった。このことは、DMD の赤血球膜 (ghost) における Na⁺+K⁺ ATPase はウアバインに対する反応性が正常と異なるという多くの報告とは矛盾している。この矛盾の理由も当面明らかではないが、本研究では、膜ではなくて洗浄赤血球を用いたものである。赤血球膜の作製には、種々の人為的条件が加わり、その作製の方法の差により、DMD と対照との間には差を生じる可能性は否定出来ない。

私共の結果は、DMD 赤血球における ATP 量および ATP の産生と消費には、少なくとも

も著しい特異的異常はないことを示している。しかし、成人と子供との間には、いくつかの明らかな差があり、DMD 赤血球の研究においては対照群の選択とその材料の処理には配慮を要することを示している。

文 献

- 1) Brown, H. D., Chattopadhyay, S. K. et al.: Erythrocyte abnormality in human myopathy. *Science* 157: 1577, 1967.
- 2) Roses, A. D., Herbstreich, M. H. et al.: Membrane protein kinase alteration in Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 254: 350, 1975.
- 3) Mawatari, S., Schonberg, M. et al.: Biochemical abnormalities of erythrocyte membranes in Duchenne muscular dystrophy: ATPase and adenyl cyclase. *Arch. Neurol.* 33: 489, 1976.
- 4) Solomons, C. C., Ringel, S. P. et al.: Abnormal adenine metabolism of erythrocyte in Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 268: 55, 1977.
- 5) Matheson, D. W., Howland, J. L.: Erythrocyte deformation in human muscular dystrophy. *Science* 184: 165, 1974.
- 6) Danon, M. J., Marshall, W. E., et al.: Erythrocyte metabolism in muscular dystrophy. *Arch. Neurol.* 35: 592, 1978.

35) デュシャンヌ型ジストロフィー症保因者の赤血球アデニレートサイクレース活性及び測定における新しい試み

高橋 桂一*

研究協力者 高尾 尚* 後藤 和子* 陣内 研二*
難波 紀久子* 藤田 拓男*

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の保因者の検出は優生学的に極めて重要である。従来、血清 CPK, LDH₅, 心電図, 筋電図, 生検筋の組織学や蛋白合成, 赤血球膜の磷酸化, リンパ球の cap 形成, 筋力テスト, 体内カリウムの測定などがその目的に用いられている。51 年馬渡らは本症の赤血球膜のアデニレートサイクレース (AC) の基礎値の高値とエピネフリン (E) に対する反応の低下を報告し、母親でも同様の傾向があると述べているが、保因状況との関連など不詳である¹⁾。ここでは、¹⁴C-ATP を基質とした AC の新しい測定法を開発し、これを用いて保因者及び正常女性の赤血球について比較検討した結果を報告する。また最近開発した Radio-immunoassay (RIA) とサンプルのアセチル化及びアルミナのバッチ法を組合せた AC の測定方法も紹介する。

対象および方法

8 名の保因者と同年齢の正常者 8 名を検索した。赤血球をデキストラン法で分離し、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 1 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM ジチオスレイトールで溶血洗滌したものをを用いた。AC の

測定条件は、

1) ¹⁴C-ATP を用いる方法

トリス塩酸緩衝液	40 mM, pH 7
MgCl ₂	10 mM
cAMP	1 mM
テオフィリン	5 mM
8- ¹⁴ C-ATP	0.5 mM (1 μCi, 比活性 29.2 mCi/mmol)
クレアチン燐酸	20 mM
クレアチンキナーゼ	100 u/ml
赤血球ゴースト	0.3~0.65 mg (50 μl)

全容量 150 μl を、37°C, 20 分間インキュベートし、8 mM cAMP 50 μl を加え直ちに 100°C で 3 分間煮沸し遠沈し、上清の一定量を下記のカラムにかける。

2) アルミナ, Dowex 1 × 8 蟻酸型カラム。0.8 g のアルミナカラム (0.5 × 4 cm) に反応液上清を吸着させ 0.05 M のトリス蟻酸緩衝液 (pH 7.5) 10 ml で溶出し、溶出液を直接予め同緩衝液で平衡化した Dowex 1 × 8 (200~400 メッシュ, 0.5 × 3 cm) に吸着させる。アルミナカラムをはずし、5 ml の蒸留水で Dowex 1 × 8 のカラムを洗う。更に 0.05 N の蟻酸 10 ml で溶出後、2 N の蟻酸 3~4 ml で cAMP を溶

* 神戸大学医学部第三内科

出する。一部を稀釈して 265 μm で吸光度を測定し、既知の cAMP 溶液と比較して回収率を計算する。他の一部を適当なシンチレーションカクテル (例えば modified Tritosol など) と混じり液体シンチレーションカウンターで 10 分間計測する。

3) RIA による方法

上記の ^{14}C -ATP を用いる方法の cAMP, テオフィリンを除き 0.25 mM の塩酸パペリンを用いる。 ^{14}C -ATP の代りに 1 mM の ATP を用い全容量 200 μl で 37°C, 30 分間インキュベートし, 100°C で 3 分間煮沸する。遠沈し上清をアセチル化し, アルミナに吸着させ, pH 6.2 の 50 mM 酢酸緩衝液で溶出し RIA を行った。詳細は別に報告予定。

赤血球膜の蛋白量は Lowry 法で測定した。

結 果

^3H -cAMP を用いて複合カラムの回収率を計算すると 95.3 \pm 0.9% (平均 \pm 標準誤差, 検数 5) で吸光度により計算した回収率ともよく相関し, 後者の実用性が証明された。AC の反応は 30 分迄略直線的に増加した。膜蛋白量は検索した 0.1~0.45 mg/試験管の間で cAMP の生成量と比例した。カラムの溶出パターンを既知の化合物で検討すると, 0.05 M トリス蟻酸緩衝液と蒸留水によりアデノシン, アデニンのすべてとヒポキサンチンの大部分が溶出され, 0.05 N の蟻酸により残りのヒポキサンチンとイノシンが溶出されることが明らかになった。この方法により 8- ^{14}C -ATP を用いても盲検値が 100~140 cpm となり赤血球の如き低活性の AC も測定可能となった。この方法を用いて測定した正常人の赤血球 AC の基礎活性値は 1.38 \pm 0.24 pmole/mg 蛋白/20 分 (平均 \pm 標準誤差), イソプロテレノール (0.1 mM) 存在下で 1.49 \pm 0.44, NaF (10 mM) 存在下で 57.21 \pm 10.64, 保因者の AC はそれぞれ 3.14 \pm 0.43, 2.94 \pm

0.58, 66.70 \pm 8.58 であり, 後者の基礎活性値は有意 ($p < 0.01$) に高く, paired test でも $P < 0.05$ で有意であった。保因者分類, 血清 CPK と AC の値の相関は明らかでなかった。3) の RIA による方法で 105 μl の反応液に対し乾燥アルミナを 150 mg~300 mg 用いると ATP は 98.8% 以上吸着され ^3H -cAMP の回収率も 84.6% 以上で良好であった。この吸着法とアセチル化を組合せた RIA で極めて特異性の高い 10^{-15} mole オーダーの cAMP の測定が可能となり, これを用いて赤血球膜の AC 活性の測定がより正確に行なえるようになった。

考 案

ヒト赤血球膜の AC 活性及びそのカテコラミン感受性の有無はその極めて低い活性のために種々論議されたが²⁾, Kaiser らによってその存在が確かめられた³⁾, 従ってその測定には高感度且つ特異性が要求される。現在広く用いられている方法は Solomon らの方法で⁴⁾, α - ^{32}P -ATP を用い α 位ラベルの特異性を利用して Dowex 50 (OH) とアルミナカラムを用いて生成した ^{32}P -cAMP を検出するものであるが, ^{32}P -ATP の入手, 放射能減衰の計算, 計測誤差などに問題がある。ここではルーティン化も考慮して ^{14}C -ATP を基質に用いる方法を開発し上述の如く特にヒポキサンチンの混入をさける方法を得て実用化した。

我々は先に DMD の筋膜 AC 活性の異常を報告した⁵⁾⁶⁾。馬渡らも筋膜 AC の E に対する反応低下を報告し⁷⁾, 更に本症の赤血球膜 AC の基礎活性の上昇と E に対する反応低下を報告した⁸⁾。その際母親の赤血球の AC 活性の高い傾向があり, E に対しては一定の傾向がみられない結果を記載している。しかし保因者分類や保因状況との関連は不詳である。ここではこれらのことを明らかにし保因者検出の目的に AC 活性が用い得るか否かを検討し上記の結果を得た。E に対する赤血球 AC の反

応は正常者でも様々であり（未発表）現在更に検討を進めている。

DMDの保因者の赤血球ACの基礎値が高いことはDMD患者のそれと共通の所見であり遺伝的異常が想定されるが、DMDの赤血球膜ATPase異常が血清や緩衝液の条件で影響されることを考えると⁸⁾、上記の所見についてもその解釈は慎重であらねばならない。paired testで $p < 0.05$ の危険率で保因者の判定が可能なる結果を得たが、更に特異な反応が見出されて、これが利用出来ることが望ましい。保因者分類、血清CPKとACとの関係も更に症例を増やして検討する余地がある。

結 論

¹⁴C-ATPを基質とするAC活性測定とアルミナバッチ法とサクシニル化を組合せRIAを行なうAC活性の測定法を開発した。前者を用いてDMDの保因者の赤血球のACを同時操作で測定し、保因者のAC基礎値が有意に高いことを見出した。保因状況との関連も検討した。

文 献

- 1) Mawatari, S., Schonberg, M., Olarte M. : Biochemical abnormalities of erythrocyte membranes in Duchenne dystrophy. Arch. Neurol. 33 : 489—493, 1976.
- 2) Sheppard, H., Burghardt, C. : Adeny-

late cyclase in non-nucleated erythrocytes of several mammalian species. Biochem. Pharmacol. 18 : 2576—2578, 1969.

- 3) Kaiser, G., Quiring, K., Gauger, D., Palm, D., Becker, H., Schoeppe, W. : Occurrence of adenylate cyclase activity in human erythrocytes. Blut. 29 : 115—122, 1974.
- 4) Solomon, Y., Londos, C., Rodbell, M. : A highly sensitive adenylate cyclase assay. Anal. Biochem. 58 : 541—548, 1974.
- 5) Takahashi, K., Takai, T., Imura, H. : Cyclic AMP and cyclic GMP in skeletal muscles. Proc. Symp. Chemical. Physiol. Pathol. (JSCC), 13 : 19—21, 1973.
- 6) Takahashi, K., Takao, H., Takai, T. : Adenylate cyclase in Duchenne and Fukuyama Type muscular dystrophy. Kobe J. Med. Sci. 24 : 193—198, 1978.
- 7) Mawatari, S., Takagi, A., Rowland, L. P. : Adenylate cyclase in normal and pathologic human muscle. Arch. Neurol. 30 : 96—102, 1974.
- 8) Siddiqui, P. Q. R., Pennington, R. J. T. : Effect of ouabain upon erythrocyte membrane adenosine triphosphate in Duchenne muscular dystrophy. J. neurol. Sci. 34 : 365—372, 1977.

36) Myotonic dystrophyにおけるリンパ球異常について

垂井 清一郎*

研究協力者 平岡 諱* 高橋 光雄* 木谷 照夫*

序

進行性筋ジストロフィー症や筋緊張性ジストロフィー症の原因は未だ不明であるが、最近、患者赤血球の異常、特に膜異常の存在が報告されて以来、これら疾患における全身的な膜系の変化が想定されている。

私共はこれらの患者の末梢白血球を電顕形態学的に観察した所、筋緊張性ジストロフィー症患者リンパ球内に、高頻度に、膜系の変化を示唆する異常ミエリン様構造物を初めて見出したので報告する。さらに生体膜の重要成分であるコレステロールの合成阻害剤、20, 25-Diazacholesterol (DAC と略) の投与によりラットで、drug-induced myotonia を発現せしめたが、この時点での末梢血リンパ球内にヒトの症例と類似のミエリン様構造物の出現を観察したので合わせて報告する。

対象ならびに方法

筋緊張性ジストロフィー症：検索した症例は12家系13例、年齢は16歳から51歳まで、内女性3例で、4例にはっきりした遺伝関係を認めた。全症例とも理学的検査でミオトニア現象が明らかであり、筋電図を施行した10例全例にmyotonic dischargeを確認した。また内分泌学的検索を施行し得た8症例全例に何らかの内分泌異常がみられ、また血清免疫グロブリン、特にIgGの低値を5症例に認めた。対照として健常者5例の他、進行性筋ジ

ストロフィー症 Duchenne 型2例、肢帯型7例、先天性筋緊張症 (Thomsen) 1例についても検索した。

Drug-induced myotonia : Wister 系雄性ラット、体重230~280 gにDAC (G. D. Searle & Co.より供与) 10 mg/kg/day (一部のラットには3週後よりDAC 40 mg/kg/dayに増量)を腹腔内に投与した。1週毎にNembutal麻酔 (Nembutal Sodium 20 mg/kg, 腹腔内) 下に筋電図を施行し、股動脈より採血を行った。

電顕試料作製には、ヘパリン加採血後、デキストランにて白血球を分離し、2% GA 固定45分、1% OsO₄後固定1時間後上昇エタノール系にて脱水し、エポン包埋を行った。なおいずれの過程も、遠沈、再浮遊を繰り返し free cell の状態で操作を行った。酸性ホスファターゼ反応は Gomori の方法に準じた。

結果

筋緊張性ジストロフィー症：13例中7例の末梢血リンパ球内に異常ミエリン様構造物がみられた。遺伝関係の明らかな症例のリンパ球には高頻度にみられた。正常対照および進行性筋ジストロフィー症、先天性筋緊張症ではこの様なミエリン様構造物はみられなかった。

異常ミエリン様構造物の多くは細胞質内に遊離して存在する様に見える。しかし多数のミエリン様構造物を観察すると、その一部は生理的に存在する細胞小器官と関連している

*大阪大学医学部第二内科

ことが明らかとなった。図1は粗面小胞体との関連を示すミエリン様構造物を示している。densityの高い顆粒は parallel tubular array と呼ばれる構造を示し、これは正常対照リンパ球にもみられるものである。図2 a は、周囲の細粒子状内容物と共に、一層の膜にとり囲まれたミエリン様構造物を示す。これは secondary lysosome と考えられる。多数の parallel tubular array の構造を示す顆粒の他に、小さいミエリン様構造物がみられるが、これらは膜に囲まれておらず、細胞基質中に遊離して存在する。図2 b は、lysosome の marker enzyme である酸性ホスファターゼ反応を施したリンパ球を示している。反応物を明瞭に識別するため、Ur 染色のみを行っているので全体に density が低い。上端にミエリン様構造物を含む膜に反応を認め、これ

が lysosomal nature であることを示している。

以上の所見はミエリン様構造物が終りには、lysosome 内にとりこまれ、恐らく分解を受けるであろうことを示唆している。本症リンパ球にみられたミエリン様構造物を、細胞内膜系より現われて lysosome 内での分解に至る一連の過程としてみた場合、図3の矢印の様な過程が考えられた。すなわち、小胞体や核膜という既存の膜系よりできたミエリン様構造物が、同部より切り離され細胞質内に遊離型となり、終りには lysosome 内にとりこまれ分解されるという過程である。このような異常ミエリン様構造物の存在は、本症のリンパ球における膜系の異常を強く示唆している。

ミエリン様構造物が、GA 固定時の人工産

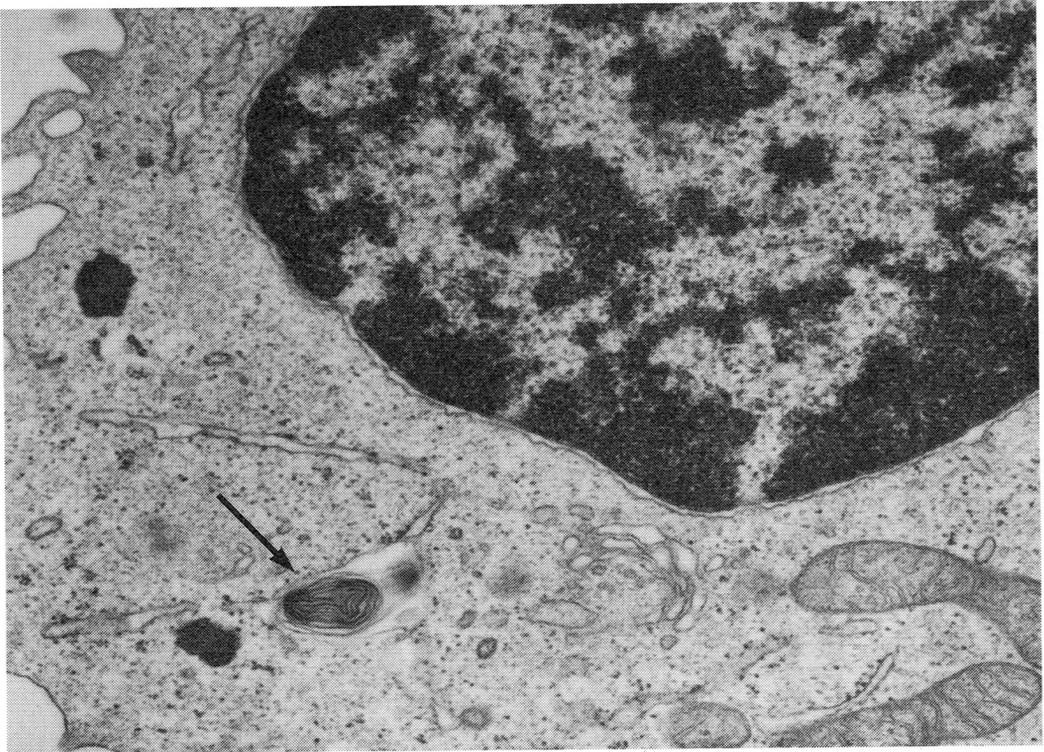


図1 筋緊張性ジストロフィー症患者のリンパ球
粗面小胞体との関連を示す異常ミエリン様構造物 (矢印)

×32,000

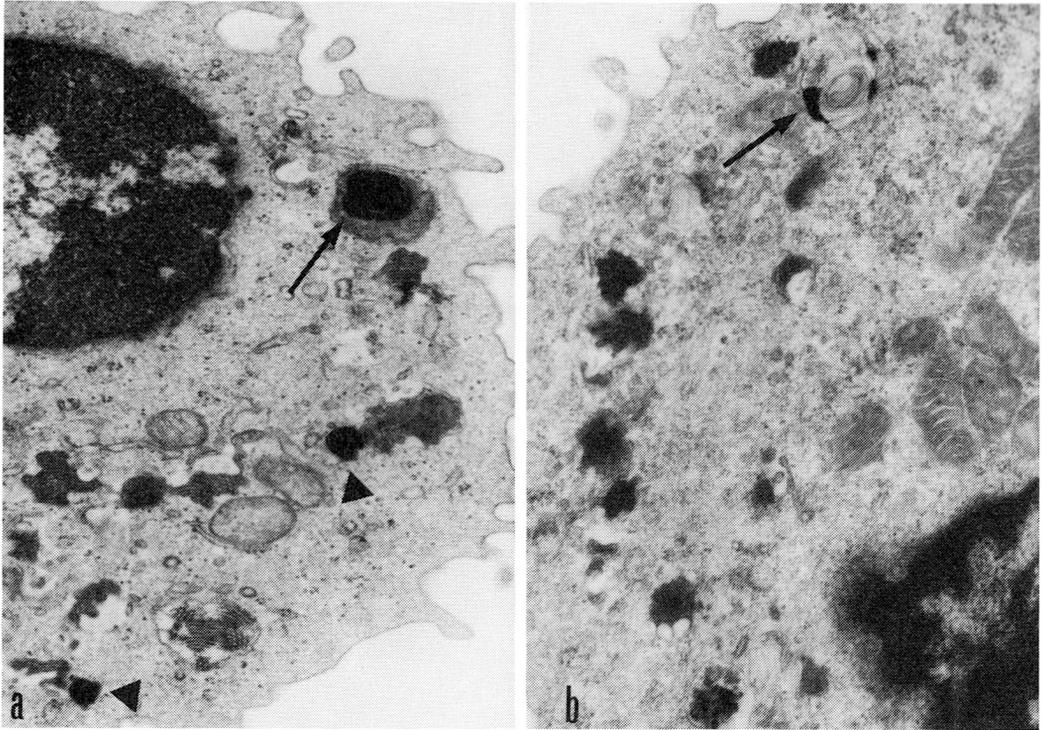


図2 同症患者のリンパ球

- (a) secondary lysosome と思われる顆粒内にあるミエリン様構造物 (矢印) と細胞基質内に遊離しているミエリン様構造物 (△印) ×27,500
 (b) 酸性ホスファターゼ反応, ミエリン様構造物を入れる顆粒 (矢印) に反応がみられる。 ×26,000

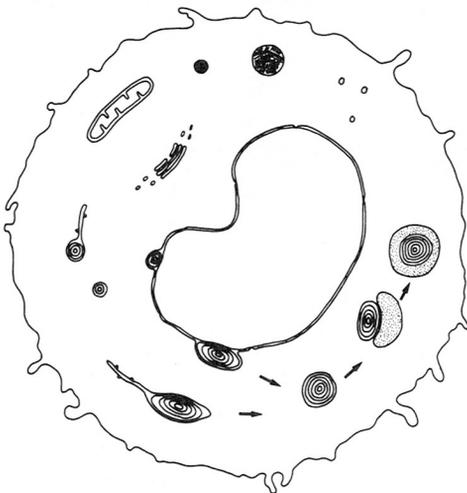


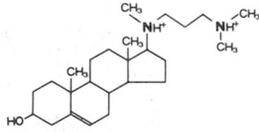
図3 同症患者のリンパ球内の異常ミエリン様構造物の生成, 分解過程 (矢印).

物として生じ得ることは周知の事実である。しかし、私共は固定および包埋の全過程を free cell の状態で行っている為、この様な人工産物は対照では全くみられない。さらに組織片を用いた時にもこの様な人工産物が生じないとされている GA, OsO₄ の同時二重固定法を施し、本症のミエリン様構造物が、人工産物でないことを確認している。

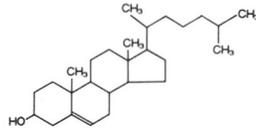
なお、本症のリンパ球以外の血球には異常がみられなかった。

Drug-induced myotonia: 投与開始 3~4 週後に insertion voltage の延長が、そして 5 週後には全てのラットに図 4 に示す様に myotonic discharge が明らかに観察された。図 5 a は投与開始 5 週後のリンパ球を示す。ヒ

20, 25-Diazacholesterol



Cholesterol



10 mg of 20, 25-Diazacholesterol/kg of b.w./day intraperitoneally to rats



Prolongation of the insertion voltage with myotonic discharge after 5 weeks of the treatment

図4 20, 25-Diazacholesterol 投与ラットの筋電図

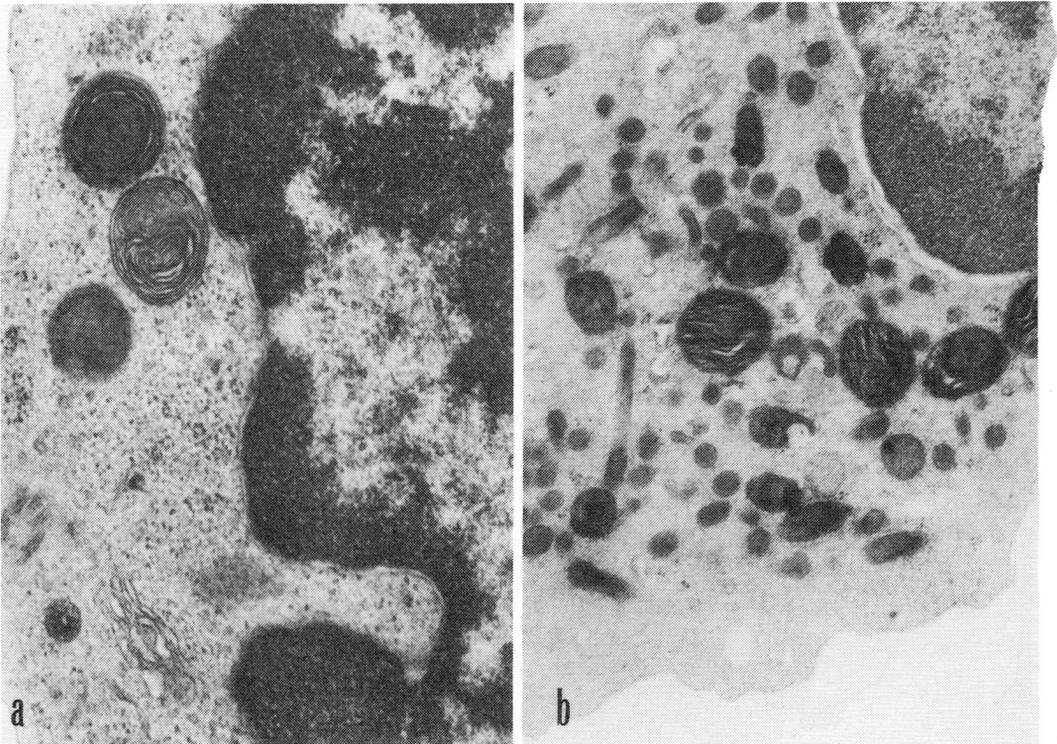


図5 (a) 20, 25-Diazacholesterol 投与ラットのリンパ球内ミエリン様構造物 ×26,000
(b) 同好中球のzebra body 様構造物 ×28,500

トの症例と近似のミエリン様構造物を認め
る。これらは対照ラットおよび投与開始4週
後までは認められなかった。図5bは投与開
始5週後の好中球を示すが、いわゆる zebra
body 様の層状構造がみられた。ヒトの症例で
は好中球に異常がみられず、ヒトの症例との
違いを示した。

考 案

筋緊張性ジストロフィー症は筋症状の他に
多くの臓器に異常のみられる系統的な疾患で
ある。本症の免疫学的異常としては血清 γ -
globulin 低値がよく知られている。 γ -globu-
lin の半減期の短縮¹⁾、IgG の代謝亢進²⁾が証明
されているが、その本態は不明である。最近
の報告³⁾で、本症において、破傷風トキソイド
や Salmonella typhi H antigen に対する特
異的な抗体産生能の低下が示されたが、これ
はリンパ球の膜系の異常と関連するのかも知
れない。

1972年、Singer と Nicolson により細胞膜
構造に関して fluid mosaic model が提唱さ
れて以来、細胞膜機能と流動性との関連が注
目されているが、本症リンパ球の細胞膜の流
動性については興味あるところである。これ
に関して、最近本症末梢リンパ球の細胞膜上
のリセプターの capping 現象をみた報告⁴⁾が
なされたが、正常リンパ球と差が無いとされ
ている。一方進行性筋ジストロフィー症では、
いずれの型でも、また保因者にも capping 現
象の低下がみられ、細胞膜の異常が示唆され
ている。私共が白血球を形態学的に検索した
進行性筋ジストロフィー症は、Duchenne 型
2例、肢帯型7例と例数は少ないが、これら
では異常がみられず、膜系異常の現われ方は、
筋緊張性ジストロフィー症と進行性筋ジスト
ロフィー症とでは異なっている。

DAC (図4) はコレステロールの生合成を
デスモステロールの段階で阻害し、血中コレ
ステロール値を下げるため、高コレステロー
ル症患者に使用された。副作用としてミオト

ニア現象、脱毛等の出現がみられた。動物実
験にても、ミオトニア、白内障をおこすなど
ヒト筋緊張性ジストロフィー症のモデルとし
て研究されている。私共の結果は、ミオトニ
アの出現と平行して、末梢血リンパ球に、ヒ
トの症例に類似の変化が生じ得ることを示
し、ヒトの症例でのリンパ球の形態学的変化
が、筋細胞でミオトニアをおこしていると同
一の膜異常に起因していることを示唆してい
る。ヒトの症例と異なり、好中球にも変化の
みられた事は、生理・化学的成績から既に指
摘されているように、DAC-induced myoto-
nia とヒト筋緊張性ジストロフィー症が、必
ずしも全く同一の病態でないことを示してい
るであろう。

Drug-induced myotonia をおこす薬剤と
しては、DAC の他に Triparanol, Chloro-
quine, Clofibrate 等が報告されている。私共は
既に Triparanol, Chloroquine をラットに投
与することにより、末梢血リンパ球にミエリ
ン様構造物の出現、好中球の顆粒変化をきた
すことを報告した⁵⁾。この事はミオトニアとリ
ンパ球内ミエリン様構造物の出現が、DAC 投
与のみに限られた現象ではないことを考えさ
せる。

結 語

(1)筋緊張性ジストロフィー症13例中7例
の末梢血リンパ球内に異常ミエリン様構造物
を認めた。進行性筋ジストロフィー症 Duch-
enne 型2例、肢帯型7例、先天性筋緊張症1例
ではみられなかった。

(2)異常ミエリン様構造物は、既存膜系に由
来し、その病的変化の表現と考えられた。

(3)20, 25-Diazacholesterol 投与によりラ
ットに drug-induced myotonia を作製した。
ミオトニア出現と平行して末梢血リンパ球内
にミエリン様構造物の出現、好中球顆粒の
zebra body 様の変化がみられた。

(4)以上の所見は、筋緊張性ジストロフィー
症において、形態学的にも膜系異常を認めた

最初の報告と考えられる。

文 献

- 1) H. H. Zinneman and J. Rotstein : A study of gamma globulin in dystrophia myotonica. *J. Lab. & Clin. Med.* 47 : 907, 1956.
- 2) R. D. Wochner, G. Drews, W. Strober and T. A. Waldmann : Accelerated breakdown of immunoglobulin G (IgG) in myotonic dystrophy : a hereditary error of immunoglobulin catabolism. *J. Clin. Invest.* 45 : 321, 1966.
- 3) D. I. Grove, S. J. O'Callaghan, T. O. Burston and I. J. Forbes : Immunological function in dystrophia myotonica. *Brit. Med. J.* 3 : 81, 1973.
- 4) N. A. Pickard, H-D. Gruemer, H. L. Verrill, E. R. Isaacs, M. Robinow, W. E. Nance, E. C. Myers and B. Goldsmith : Systemic membrane defect in the proximal muscular dystrophies. *N. Engl. J. Med.* 299 : 841, 1978.
- 5) 木谷照夫, 山本 章, 多胡 基, 米沢 毅, 平岡 諱, 倉田義之, 那須輝史, 西川光夫 : 薬物による白血球顆粒の形態変化について. *日本血液学会雑誌* 36 : 242, 1973.

37) 筋ジストロフィー症におけるクレアチン代謝

三好和夫*

研究協力者 平良章* 吉田健三* 宇賀茂敏*
金沢孝治* 今井幸三* 吉川学*
伊勢浩* 八木田正聖*

creatine-creatine phosphate 系は、筋収縮エネルギー供給系に必須であり、筋ジストロフィー症とくに Duchenne 型 (DMD) では、creatinemia, creatinuria, 逆に尿中 creatinine の排泄減少が特異である。私たちはその理由を creatine の分解過程に求めて研究を行なった。結果としては、まず、creatine → sarcosine + urea に働く creatinase (creatine amidinohydrolase, EC 3, 5, 3, 3,) の人骨格筋中における存在をはじめて明らかにし、また、DMD 筋においてはこの活性が低下していることを示した。

対象と方法

対象は、健常人および DMD を中心とする各種筋疾患である。資料は、剖検または生検によりえた骨格筋である。この資料について、筋中遊離アミノ酸分析と creatinase 活性の測定を行なった。筋中遊離アミノ酸の分析には日立アミノ酸自動分析器 KLA 5 型を用いた。筋資料は、4%過塩素酸を加えて homogenize し、水酸化カリウムにて中和し、その減圧蒸留乾固物をクエン酸リチウム緩衝液に溶解したものをを用いた。

creatinase 活性測定用筋資料は、生理的食塩水を加えて homogenize し、遠心分離した上清を用いた。creatinase 活性は、creatine を

基質として、0.1 N リン酸緩衝液 pH 7.0, 30°C, 1 時間に生成される urea 量を diacetylmonoxime-thiosemicarbazide 法を用いて測定した。

筋蛋白質量の測定は、biuret 法を用いた。

結果

1) 筋中遊離アミノ酸分析結果 (図 1)

健常人骨格筋の多くに sarcosine の peak が確認され、その計測値は 20~100 μ moles/100 g wet wt. である。また、urea は、40~110 平均 70 mg/100 g wet wt. であり、血中 urea (5~15 mg/dl) よりも高かった。これに対し、DMD 筋 2 例では、sarcosine の peak はみられず、urea も 4~8 mg/100 g wet wt. と低下していた。図 1 に、健常人骨格筋代表例のアミノ酸自動分析計による pattern を上段のアミノ酸標準混液と対比して示した。sarcosine は、ニンヒドリン反応が弱く、右となりの glycine よりも、実際には μ mole にして 3 倍に多い。

2) 筋 creatinase 活性測定の成績 (表 1)

表 1 に、creatine 充分量の存在下、30°C, 1 時間に生成する urea 量の実際の O. D. の一部を示した。健常対照では、いずれも酵素液 (筋抽出液) 量に depend した urea の生成がみられ、量的には 60~90 μ moles/g protein/hour であった。下段の脊髄性進行性筋萎縮症 (SPMA) 筋では、高濃度の資料での数値が

*徳島大学医学部第一内科



図1 正常骨格筋における sarcosine の存在 (アミノ酸自動分析計による)

欠けているが、ほぼ同様の成績と思われる。これに対し、DMD筋では、 $0.10 \sim 0.25 \mu\text{moles/g protein/hour}$ と誤差範囲内に低く、酵素液量に depend した urea の生成はみられ

表1 生成 urea 量からみた筋 creatinase 活性 (creatine を基質とする)

(diacetylmonoxime thiosemicarbazide 法, OD_{525 nm})

Case	筋抽出液 希釈系列	creatine + 筋抽出液	水 + 筋抽出液
健常対照 Ni., M.	20X	0.170	0.030
	40X	0.116	0.010
	80X	0.084	0.010
	160X	0.038	0
健常対照 Ok., Y.	20X	0.192	0.020
	40X	0.100	0.010
	80X	0.060	0
	160X	0.025	0
D M D Ko., M.	20X	0.081	0.067
	40X	0.070	0.034
D M D Mi., N.	20X	0.083	0.061
	40X	0.074	0.030
	80X	0.066	0.023
S P M A It., T.	40X	0.113	0.020
	80X	0.070	0.010

* creatine 純品 0.019

* standard (urea 30mg/dl) 0.523

なかった。

考 察

本研究は、はじめに述べたように、DMDにおける特異な creatinuria に着目し、その原因を creatine の分解過程に求めて行なったものである。creatine の分解は、creatinine の他に、sarcosine と urea に分解される経路があり、これに creatinase が働く。creatinase は pseudomonas では知られている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾が、人筋中でその存在を指摘した報告はこれまでにない。私たちは、人骨格筋において、creatinase の存在をはじめて明らかにした。

即ち、まず、筋中遊離アミノ酸の分析により、人骨格筋中に sarcosine の存在すること、血中よりも high level の urea の存在することを確認した。次いで私たちは、健常人骨格筋において、creatine を基質とする筋 homogenate 反応系で酵素量に depend した urea の生成のみられることを確かめ、creatinase 反応のあることを知った。

この筋 creatinase は、まだその酵素学的性格が充分つかめておらず、本実験でえられた活性値は本酵素の真の活性値よりは過小とな

っていることが考えられる。

これに対し、DMD 筋では、筋中遊離アミノ酸分析における sarcosine の peak は認められず、urea も低下していた。また、creatinase は誤差範囲内に低く、酵素液量に depend した urea の生成がみられず、creatinase の減少もしくは活性低下を思わせたが、筋の萎縮も強いので、なお検討中である。

人骨格筋に creatinase が存在するという本研究における成績に基づいて、私たちは creatine の新しい代謝経路を、仮に creatine pseudo-urea cycle と名付けて、推定した(図 2)。

肝からきた creatine は、筋で creatine kinase により phosphorylation を受ける。ここで、CK 逆反応によって high energy phosphate がとれる際、一部はともに水 1 分子がとれて creatinine ができると考えられる。一方、creatine は、creatinase によって sarcosine と urea に分解される。この urea は尿中へ排泄されるが、このことは現在知られている肝中の ornithine cycle の他に、筋中に、こういう別の形の urea cycle のあることを示したことに他ならない。ついで、sarcosine は、sarcosine dehydrogenase により、glycine

と formaldehyde に分解される。また、glycine は、腎で transamidinase により arginine と結合して glycoylamine となり、肝で methionine よりメチル基をうけて再び creatine に戻る。これが私たちの推定した cycle である。なお、formaldehyde は、あるいは active carbon として active methionine の生成に働くかもしれない。

結 論

1) 正常人骨格筋中に sarcosine の存在すること、血中よりも high level の urea の存在することを確認し、さらに creatine を基質とする筋 homogenate 反応系で urea の生成が認められることから、creatinase が人骨格筋中に確かに存在することを明らかにした。このことから、人骨格筋中に新しい creatine 代謝経路、即ち、creatinase pseudo-urea cycle とも称すべきものの存在を推定した。

2) DMD 筋では、この代謝経路の中で、creatinase の減少もしくは活性低下を思わせる成績がえられたが、筋の萎縮も強いので、なお検討中である。

文 献

- 1) Akamatsu, S., Kanai, Y.: Bacterial decomposition of creatine, I. Creatinase, *Enzymologia*, 15: 122 (1951)
- 2) Akamatsu, S., Miyashita, Y.: Bacterial decomposition of creatine, III. The pathway of creatine decomposition, *Enzymologia*, 15: 173 (1951)
- 3) Appleyard, G., Woods, D. D.: The pathway of creatine catabolism by *Pseudomonas ovalis*, *J. Gen. Microbiol.*, 14: 351 (1956)
- 4) Yoshimoto, T., Oka, I., Tsuru, D.: Purification, Crystallization, and some Properties of Creatine Amidinohydrolase from *Pseudomonas putida*, *J. Biochem.*, 79: 1381 (1976)

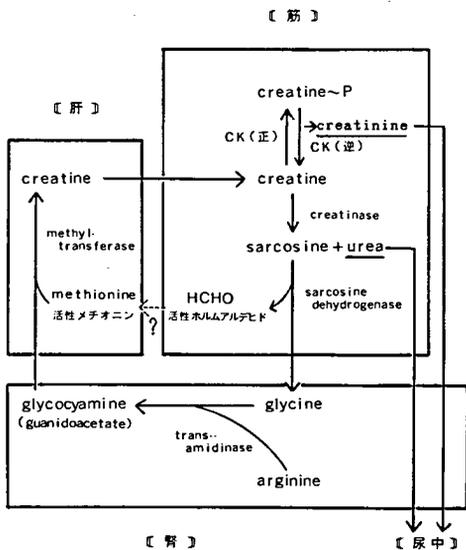


図 2 creatine pseudo-urea cycle (仮称)

38) Duchenne型筋ジストロフィー症における カルニチン代謝

黒岩 義五郎*

研究協力者 後藤 幾生* 小林 卓郎** 馬渡 志郎***

はじめに

カルニチンは筋肉のエネルギー源としてかなりの部分を占める脂肪酸、とくに長鎖脂肪酸のミトコンドリア内のとりこみに関与している¹⁾。すなわち脂肪酸は CoA と結合したのうち、ミトコンドリア内のカルニチンアシルトランスフェラーゼ I のもとでアシルカルニチンになり、ミトコンドリアに入りこみ、さらにアシルカルニチントランスフェラーゼ II によりアシル CoA となる。これが β -酸化をへて、エネルギー源となる。このようにカルニチンは筋肉代謝に大きく関与し、また骨格筋や心筋に大量に含まれる²⁾。

筋ジストロフィー症は筋肉の破壊を伴う疾患であり、その代謝障害が示唆されるが、今までに Maebashi ら³⁾は筋ジストロフィー症の尿中カルニチン排泄が有意に低値を示すと報告している。一方、DiMauro ら⁴⁾はコントロールと全く差がないと報告している。そこで、我々は血中および尿中カルニチンを測定し、性および年齢の同一対照例と対比したので報告する。

対象および方法

対象は Duchenne 型筋ジストロフィー症 19 名 (6~17 歳)、コントロールとして慢性気管支喘息の男児 12 名 (7~14 歳)、女児 10

名 (7~13 歳) を用いた。

方法は Pearson ら⁵⁾の方法に従い、DTNB の呈色反応にて測定した。試料としてはヘパリン採血の血漿 0.5 ml および尿 0.5 ml を用いた。尿中カルニチンの値は日差変動があるため、3 日連続採尿を行い、その平均値を用いた。クレアチンおよびクレアチニンは Bonsnes ら⁶⁾の方法で測定した。

結 果

正常コントロールの血中および尿中カルニチン量は DiMauro らおよび Maebashi らの値とほぼ一致した。また尿中カルニチンの男女差は見られなかった。Duchenne 型筋ジストロフィー症においても、血中、尿中ともにカルニチンの量はコントロールと差は見られなかった。同時に測定した尿中クレアチンは有意に筋ジストロフィー症に増加していた。血中、尿中カルニチン値は Duchenne 型筋ジストロフィー症の CPK、クレアチン、重症度などとは全く相関を認めなかった (表 1)。

考 案

今回我々は Duchenne 型筋ジストロフィー症の血中および尿中カルニチンを測定したが、コントロールと差は見られなかった。この結果は DiMauro ら⁴⁾の報告と一致し、Maebashi ら³⁾の報告と異なる。この差の原因は不明であるが、検査方法の差および尿のサンプリングに差があると思われる。またここで

*九州大学医学部脳研神経内科

**国立赤坂療養所

***九州工業大学保健管理センター

表1 Plasma and urinary carnitine in Duchenne muscular dystrophy and controls

	DMD (n=19)	Control boys (n=12)	Control girls (n=10)
<u>Plasma carnitine</u>			
μ mols/100ml	4.02 \pm 1.03	4.10 \pm 0.91	n. d.
(range)	(1.62--5.63)	(2.83--5.98)	
<u>Urinary carnitine</u>			
μ mols/day	66.0 \pm 34.6	63.9 \pm 67.3	53.1 \pm 27.9
(range)	(17.3--148.7)	(5.1--256.3)	(16.4--89.6)
μ mols/100ml	7.6 \pm 7.8	11.3 \pm 8.2	7.6 \pm 3.3
<u>Urinary creatinine</u>			
g/day	0.13 \pm 0.06	0.55 \pm 0.14	0.56 \pm 0.26
<u>Urinary creatine</u>			
g/day	0.40 \pm 0.17	0.12 \pm 0.07	0.13 \pm 0.11

Values are shown as mean \pm S. D.

DMD : Duchenne muscular dystrophy

n. d. : not determined.

注目されるのは、筋ジストロフィー症でクレアチンとカルニチンが全く異なる動態を示すことである。クレアチンとカルニチンはほぼ同じ分子量をもち、肝臓でアミノ酸より合成あるいは食物より体内に入り、筋肉内に高濃度で存在する点非常によく類似しているが、このように差が見られるのは興味深く、さらに検討を要すると思われる。

以上、我々は Duchenne 型筋ジストロフィー一症において血中、尿中カルニチンを測定したが、差が見出せなかった。

文 献

1) Fritz, I. B. : (1963) Advance in Lipid Res., Academic Press, New York, pp.

285-334.

2) Cederblad, G., Lindstedt, S. and Lundholm, K. : (1974) Clin. Chim. Acta 53 : 311-321.

3) Maebashi, M., Kawamura, N. and Yoshinaga, K. : (1974) Nature 249 : 173-174.

4) DiMauro, S. and Rowland, L. P. : (1976) Arch. Neurol. 33 : 204-205.

5) Pearson, D. J., Chase, J. F. A. and Tufts, P. K. : (1969) Methods Enzymol. 14 : 612-622.

6) Bonsnes, R. W. and Taussky, H. H. : (1945) J. Biol. Chem. 158 : 581-591.

39) Duchenne型進行性筋ジストロフィー症における cyclic nucleotidesの動態について

茂 在 敏 司*

研究協力者 福 田 市 蔵* 木 曾 昭 彦* 河 崎 正*
頼 経 元* 吉 田 照 雄*

はじめに

近年, Duchenne型進行性筋ジストロフィー症 (DMD) において赤血球, リンパ球, 血小板などの血球成分にも異常が指摘され, 骨格筋障害とあわせ, DMDの成因に関連して systemic membrane defect¹⁾の存在が注目されている。我々は既に, DMD患者血小板凝集能の低下について報告²⁾してきたが, 今回は, この凝集能と関係が深く, かつ, 筋の分化, 脱分化および細胞膜透過性とも密接な関係があるとされている cyclic nucleotidesの動態について検討した。

対象並びに方法

対 象: DMD 109 症例で平均年齢は 14.5 ± 4.3 歳である。その内訳は, 厚生省機能障害度分類による II 度 4 例, III 度 2 例, IV 度 3 例, V 度 39 例, VI 度 38 例, VII 度 17 例, VIII 度 6 例である。脊椎胸廓変形度は脊椎前後彎, 同側彎および胸廓変形の三所見をもとに, 変形のない <-> 群 (57 例) から変形合併異常数に従い <+> 群 (17 例), <++> 群 (22 例), <+++> 群 (13 例) に区分した。また, 虚血性心電図変化に注目し, QT 時間幅の単独延長例を QT 延長群 (37 例), ST 低下のみられるものを ST 下降群 (27 例) およびそれらのみられないものを正常範囲内群 (45 例) とした。

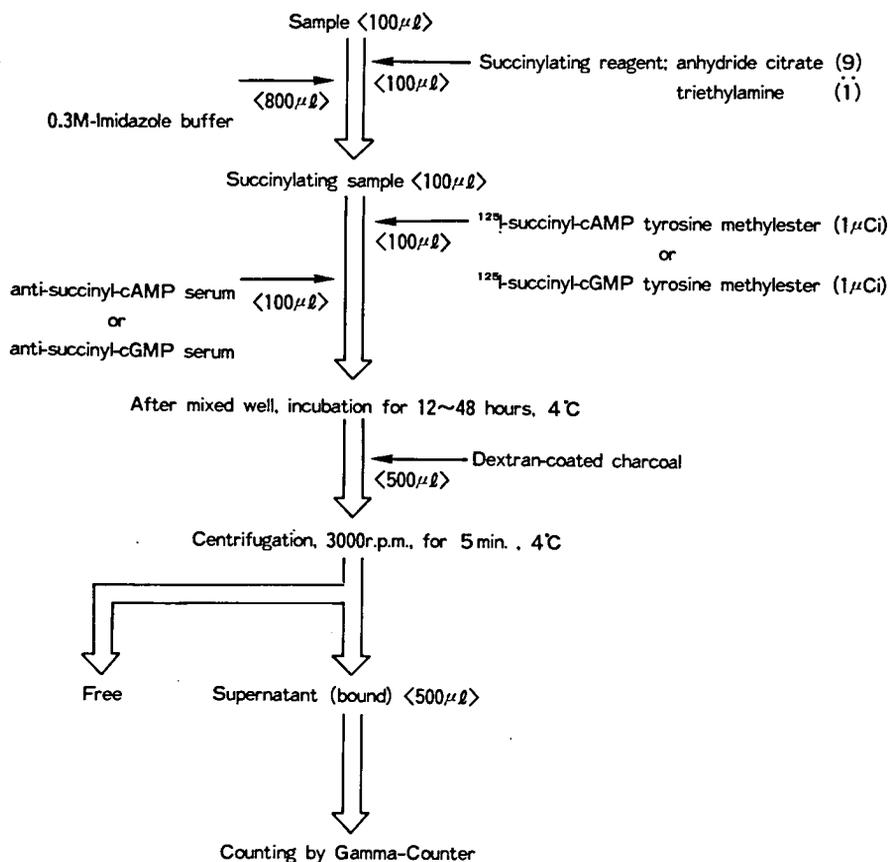
方 法: 早朝空腹時安静臥位で採血した静脈血を, 500 mM EDTA-4Na 液入りの容器に分注混和後, 4 °C, 2,123 × g, 10 分間遠沈して得られた末梢静脈血血漿 (PVP), 並びに 4 °C, 191 × g, 20 分間遠沈して得られた多血小板血漿 (PRP) に超音波処理を加え, 血小板を破壊した試料について, YAMASA cAMP, cGMP assay kit を用い radioimmunoassay 法にて測定した。なお, PRP は血小板凝集能測定に用いるのとほぼ同一条件下で得られるようにした (表 1)。得られた cyclic nucleotides 値と骨格筋病変進展度, 心電図所見との対比検討を行った。

結 果

DMD 109 症例の PVP-cAMP, cGMP 値, cAMP/cGMP 比各平均値は各々 18.3 ± 3.8, 7.1 ± 3.0 (pmol/ml), 2.8 ± 0.9 で, 健常対照群では各々 20.3 ± 4.5, 4.4 ± 1.7 (pmol/ml), 5.1 ± 1.7 であり, DMD 群において cAMP 値, cAMP/cGMP 比は対照群に比しともに有意に低下し (P < 0.001), 逆に cGMP 値は有意の増加をみた (P < 0.001)。一方, PRP 中の濃度は DMD 群では各々 23.7 ± 7.0, 6.0 ± 2.6 (pmol/ml), 4.5 ± 1.8, 対照群では各々 23.7 ± 5.1, 4.3 ± 1.5 (pmol/ml), 5.9 ± 1.6 であり, cAMP 値は両者間に差をみず, cGMP 値は DMD 群が軽度の高値を示した (P < 0.001)。また, PVP, PRP 間の濃度比較では, DMD

* 大阪医科大学第一内科

表1 Competitive radioimmunoassay methods for cAMP and cGMP



群においてcAMP値はPRP中で ($P < 0.001$), cGMP値は逆にPVP中でより高値を示した ($P < 0.01$).

A. 厚生省機能障害度との対比 (表2)

CPK, aldolase, LDHなどの血清遊出酵素総活性値は、各障害度群症例数にバラツキがあるが、障害度の進行と密接な関係を示し、III, IV群でピークをとり、以後障害度の進行に伴い漸減する。PVP, PRP中のcAMP, cGMP濃度も障害度III, IV群で高い値がみられた。但し、この群の症例数が少ないため更に症例を増し、検討する必要がある。また、cGMP値に関しては障害度VII, VIII群でも高値傾向がみられた。

B. 脊椎胸廓変形度との対比 (表3)

血清遊出酵素値は変形の進行に伴い漸減する傾向が明らかであったが、PVP, PRPいずれにおいてもcyclic nucleotidesの濃度と脊椎胸廓変形度の間には密接な関係はみられなかった。

C. 心電図所見との対比 (表4)

前述の心電図区分三群間における対比では、cAMP値はPVP, PRP中ともに三群間に有意差をみなかった。一方、cGMP値はPVP, PRP中ともにST下降群で高値を示し、その結果、cAMP/cGMP比はST下降群で低値となった。因みに、ST下降は一般に疾患の進展とともにその頻度を増すものである。一方、

表2 Behavior of serum enzymes & cyclic nucleotides correspond to dysfunction grading criteria of the Ministry of Health, Japan in 109 patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD)

Laboratory items Subject	n.	Age (yr.)	CPK (mU·mL)	Aldolase (mU·mL)	LDH (mU·mL)	PVP-cyclic nucleotides			PRP-cyclic nucleotides		
						cAMP (pmol·mL)	cGMP (pmol·mL)	cAMP cGMP	cAMP (pmol·mL)	cGMP (pmol·mL)	cAMP cGMP
Controls	80	24.2 ±4.1	43.8 ±10.6	2.7 ±1.0	143.7 ±18.5	20.3 ±4.5	4.4 ±1.7	5.1 ±1.7	23.7 ±5.1	4.3 ±1.5	5.9 ±1.6
Dysfunction gradings	II (3.7%)	4 ±5.6	692.8*** ±510.0	11.6*** ±3.5	621.0*** ±463.8	18.3 ±2.2	6.4* ±1.1	2.9* ±0.3	23.4 ±4.2	5.7 ±0.5	4.2 ±0.8
	III (1.8%)	2 ±0	1,234.5*** ±157.7	25.7*** ±7.0	1,146.0*** ±100.4	23.4 ±4.3	8.8*** ±2.8	2.8 ±0.4	32.5* ±12.0	8.6*** ±2.8	3.8 ±0.2
	IV (2.7%)	3 ±1.5	1,110.0*** ±336.5	16.7*** ±6.8	1,018.0*** ±150.7	21.6 ±2.0	7.5** ±1.0	2.9* ±0.1	32.2** ±7.8	6.2* ±0.8	5.2 ±0.9
	V (35.8%)	39 ±3.3	795.1*** ±323.4	10.1*** ±5.6	670.8*** ±229.4	17.3*** ±4.4	6.3*** ±2.0	3.0*** ±1.0	21.2* ±6.3	5.1* ±1.9	4.6 ±1.7
	VI (34.9%)	38 ±4.4	545.8*** ±274.8	6.1*** ±3.1	497.9*** ±150.5	18.4* ±2.8	6.9*** ±2.9	2.9*** ±0.8	23.8 ±6.0	5.7*** ±2.4	4.8 ±2.1
	VII (15.6%)	17 ±2.9	296.9*** ±226.6	3.9** ±2.3	337.0*** ±78.4	19.1 ±4.1	8.7*** ±4.0	2.5*** ±0.8	26.4 ±8.0	7.7*** ±3.0	3.7 ±1.3
	VIII (5.5%)	6 ±2.3	170.2*** ±37.0	2.5 ±1.1	306.5*** ±27.4	18.0 ±4.5	8.6*** ±4.0	2.5*** ±1.0	24.1 ±8.8	8.2*** ±6.0	3.6 ±1.5
	Total	109 ±4.3	609.0*** ±366.5	7.8*** ±5.7	555.0*** ±251.3	18.3*** ±3.8	7.1*** ±3.0	2.8*** ±0.9	23.7 ±7.0	6.0*** ±2.6	4.5*** ±1.8

*** P < 0.001 PVP=peripheral venous plasma
 ** P < 0.01 (vs. controls) PRP=platelet rich plasma
 * P < 0.05

表3 Behavior of serum enzymes & cyclic nucleotides correspond to chest and spinal column deformity gradings in 109 patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD)

Laboratory items Subjects	n.	Age (yr.)	CPK (mU·mL)	Aldolase (mU·mL)	LDH (mU·mL)	PVP-cyclic nucleotides			PRP-cyclic nucleotides		
						cAMP (pmol·mL)	cGMP (pmol·mL)	cAMP cGMP	cAMP (pmol·mL)	cGMP (pmol·mL)	cAMP cGMP
Controls	80	24.2 ±4.1	43.8 ±10.6	2.7 ±1.0	143.7 ±18.5	20.3 ±4.5	4.4 ±1.7	5.1 ±1.7	23.7 ±5.1	4.3 ±1.5	5.9 ±1.6
Chest & spinal column deformity gradings	(-) (52.3%)	57 ±4.0	768.4*** ±376.0	10.2*** ±6.4	668.8*** ±273.2	18.3** ±4.1	6.8*** ±2.7	2.9*** ±0.9	23.5 ±7.5	5.7*** ±2.4	4.6*** ±1.7
	(+) (15.6%)	17 ±4.1	564.6*** ±246.3	7.5*** ±2.8	518.6*** ±114.5	18.4 ±4.1	8.1*** ±3.3	2.5*** ±0.8	23.7 ±6.3	6.8*** ±2.6	3.8*** ±1.3
	(#) (20.2%)	22 ±3.0	453.3*** ±260.8	4.7*** ±3.4	415.2*** ±157.8	18.1* ±3.4	6.8*** ±2.7	2.9*** ±0.8	23.2 ±6.3	5.8*** ±2.2	4.5** ±2.1
	(##) (11.9%)	13 ±3.2	231.7*** ±164.8	3.5* ±1.8	339.6*** ±99.0	18.3 ±3.5	7.7*** ±4.0	2.7*** ±0.9	24.9 ±7.4	6.5*** ±3.7	4.6* ±2.3
	Sub total (47.7%)	52 ±3.7	434.3*** ±264.0	5.3*** ±3.3	430.1*** ±146.5	18.3** ±3.5	7.4*** ±3.2	2.7*** ±0.8	24.2 ±6.8	6.2*** ±2.8	4.6** ±3.1
Total	109 ±4.3	609.0*** ±366.5	7.8*** ±5.7	550.0*** ±251.3	18.3*** ±3.8	7.1*** ±3.0	2.8*** ±0.9	23.7 ±7.0	6.0*** ±2.6	4.5*** ±1.8	

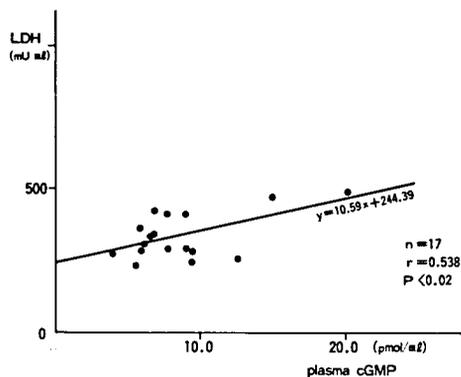
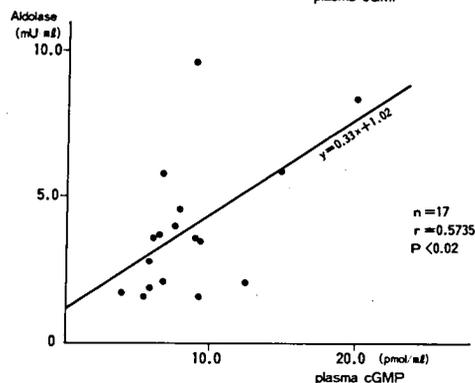
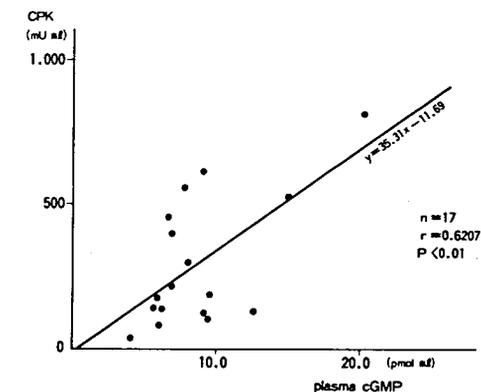
*** P < 0.001 PVP=peripheral venous plasma
 ** P < 0.01 (vs. controls) PRP=platelet rich plasma
 * P < 0.05

表4 Correlations between ECG findings and laboratory findings in 109 patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD)

Laboratory items	n.	Age (yr)	CPK (mU/ml)	Aldolase (mU/ml)	LDH (mU/ml)	PVP-cyclic nucleotides cAMP (pmol/ml)	cGMP (pmol/ml)	cAMP/cGMP	PRP-cyclic nucleotides cAMP (pmol/ml)	cGMP (pmol/ml)	cAMP/cGMP	Fibrinogen (mg/dl)
ECG findings												
Controls	80	24.2 ± 4.1	43.8 ± 10.6	2.7 ± 1.0	143.7 ± 18.5	20.3 ± 4.5	4.4 ± 1.7	5.1 ± 1.7	23.7 ± 5.1	4.3 ± 1.5	5.9 ± 1.6	325.0 ± 125.0
D No QT prolongation & No ST changes	45 (41.3%)	13.4 ± 4.2	591.4*** ± 348.7	7.5*** ± 4.8	570.7*** ± 280.8	18.6* ± 4.3	6.7*** ± 1.9	2.9*** ± 0.9	23.4 ± 7.0	5.5*** ± 1.8	4.6*** ± 1.6	352.0 ± 81.9
D QT prolongation	37 (33.9%)	14.1 ± 3.6	672.2*** ± 376.3	9.0*** ± 7.2	566.9*** ± 236.8	17.8** ± 3.5	6.7*** ± 2.8	2.9*** ± 0.7	23.9 ± 7.4	5.6** ± 2.7	4.8** ± 2.2	315.7 ± 135.2
M ST-depression with or without QT prolongation	27 (24.8%)	16.9 ± 4.5	551.8*** ± 382.7	6.9*** ± 4.4	499.6*** ± 212.0	18.6 ± 3.6	8.4*** ± 4.2	2.6*** ± 0.9	23.7 ± 6.7	7.3*** ± 3.2	3.7*** ± 1.3	322.7 ± 103.1
D Total	109	14.5 ± 4.3	609.0*** ± 366.5	7.8*** ± 5.7	550.0*** ± 251.3	18.3*** ± 3.8	7.1*** ± 3.0	2.8*** ± 0.9	23.7 ± 7.0	6.0*** ± 2.6	4.5*** ± 1.8	324.5 ± 114.5
D Q waves	31 (28.4%)	13.1 ± 5.3	669.5*** ± 409.2	8.3*** ± 4.8	610.5*** ± 284.1	18.3* ± 3.4	7.2*** ± 3.0	2.8*** ± 0.8	23.9 ± 7.3	6.0*** ± 2.5	4.4*** ± 1.4	
D R/S _{v1} ≥ 1.0	79 (72.5%)	14.2 ± 4.3	622.6*** ± 378.4	8.0*** ± 5.8	575.2*** ± 268.0	18.0*** ± 3.6	7.0*** ± 2.4	2.7*** ± 0.7	23.5 ± 6.8	6.0*** ± 2.3	4.3*** ± 1.5	
M R/S _{v1} ≥ 1.5	56 (51.4%)	14.3 ± 4.3	611.9*** ± 358.3	7.6*** ± 4.7	568.7*** ± 275.1	17.7*** ± 3.6	7.0*** ± 2.7	2.7*** ± 0.7	23.5 ± 6.9	6.0*** ± 2.5	4.3*** ± 1.3	
D I-RBBB	21 (19.3%)	15.9 ± 3.4	565.9*** ± 396.2	7.2*** ± 4.5	504.5*** ± 254.1	18.6 ± 3.1	7.2*** ± 2.1	2.7*** ± 0.7	24.5 ± 7.5	6.2*** ± 1.9	4.4*** ± 1.9	

***P<0.001 (vs. controls) PVP=peripheral venous plasma
 **P<0.01 PRP=platelet rich plasma
 *P<0.05

表5 Correlations between plasma cGMP levels and serum CPK levels in 17 patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD) —Dysfunction grading criteria VII of the Ministry of Health, Japan.—



異常Q波, R/Sv₁の増大, 不完全右脚ブロックは疾患の早期からしばしばみられ, DMD 心筋における病理学的所見と対比してDMDにおける特徴的心電図所見とされている。しかし, これら心電図所見を呈する症例におけるPVP, PRP 中の cyclic nucleotides 濃度は, DMD 一般と全く同じであった。

D. 血清遊出酵素値との対比 (表5)

血清CPK, aldolase, LDH 総活性値およびLDH アイソザイム分画との対比を行ったが, cyclic nucleotides との間には, 全体的には有意な関係はみられなかった。機能障害度各群間個別での対比を行うと, 軽症群では相関傾向を示すもこの群の症例数が少ないため有意差は得られなかった。ただ, 障害度VII群でのみPVP-cGMP値と血清CPK, aldolase, LDH 各総活性値との間に有意な正相関がみられたが, その意義, 機序は不明で更に検討を要す。

考 案

DMD 患者において, PVP 中のセロトニン (5-HT) 濃度は正常域にあるが, 血小板中では異常低値を示す。この所見から, DMD では血小板凝集能に異常をきたし, 一過性血栓形成による筋肉の虚血性壊死をきたすとの考え⁹⁾もある。しかし, 我々はDMDにおける血小板凝集能はむしろ低下しており, かつ, 血小板解離現象を高率に認めることを昭和50, 51年度の報告⁴⁾において明らかにした。

一般に, cAMPはカルシウムを介して血小板凝集能を抑制し, cGMPは促進的に作用するとされており⁹⁾, また, 血小板cGMP-phosphodiesterase 活性と凝集能との間に有意の負の相関がみられるとの報告⁹⁾もある。我々の成績では患者PVP-cAMP値は対照群に比し有意に低下するも, PRP-cAMP値は両者間に差がなかった。このPVPとPRP中のcyclic nucleotides 濃度の差に関しては, 血小板の有無と関連して考えられるものであり, かつ, このことが患者血小板凝集能低下, 血小

板解離の高頻度出現の一つの要因となっている可能性も推測される。血小板トロンボステニンは骨格筋のアクチンと非常に似かよった性質を有するとされ, microfilamentの形で血小板膜と近接して存在し, 膜機能と密接な関係があると推測されている⁷⁾。この膜機能とcyclic nucleotidesの間にも密接な関係があり, cAMPは膜透過性を亢進させるとされている。然るに近年, DMDの成因に関してsystemic membrane defectの概念が注目されているが, 血小板における異常と同様の機構が骨格筋にも存在し, 骨格筋障害発生の一因となっている可能性もあり, その意味でも, 採取が比較的簡単な血小板レベルにおける研究は有意義であり, 更に詳細な研究が待たれる。DMD筋においてはcAMP濃度の低下がみられ, このことがクレアチン尿やアミノ酸尿の原因の可能性があるとする報告⁸⁾や, DMD筋ではadenyl cyclase, phosphodiesterase 双方の活性値の低下がみられ, 他の筋変性疾患に比し特徴的であるとする報告⁹⁾もある。これに対し, ジストロフィーラット, ジストロフィーチキンでは逆にこれら両者の活性値は亢進しているとする報告¹⁰⁾もあり, X-linked dystrophy (DMD) と他の筋変性疾患では, 筋内の代謝面でなんらかの本質的な差異が存在している可能性が推測される。一方, DMD患者血漿についてcyclic nucleotidesを検討した鬼頭らはDMD症例においてPVP-cAMP値は重症度の進行に伴い低値を示し, PVP-cGMP値は軽症群で高値をとると報告¹¹⁾している。しかし, 我々の成績では少なくとも脊椎胸廓変形度とPVP中cyclic nucleotidesの濃度との間には特別の関係はみられず, わずかに日常生活機能障害度III, IV群においてcAMPが, III, IVならびにVII, VIII群においてcGMPが高値をとる傾向を示したに留まる。細胞内ではcAMPは主に細胞膜部に, cGMPは主に核内に局在するとされているが, III, IV群におけるPVP-cAMP, cGMP値の増加は筋細胞中におけるcAMP, cGMPの血中へ

の遊出を示すものかもしれない。しかし、DMDにおけるPVP中cyclic nucleotidesに関しては対照に比し平均的にcAMPは低く、cGMPは高い値を示していることは興味深い。このようなcyclic nucleotidesのDMDと正常対照群との差は自律神経系の関与によるものか、循環異常を反映するものか、肝などにおける代謝異常によるものか、あるいはDMDにおけるなんらかの本質的な異常と関連するものか色々な場合が想定され、今後の研究が必要である。

結 論

- 1) 健常対照群に比しDMD患者では、PVP-cGMP値が高値を示した。
- 2) PVP-cAMP値は健常対照群に比しDMD群で低値を示したが、PRP中では差をみなかった。

文 献

- 1) Pickard, N. A. et al. : Systemic membrane defect in the proximal muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.*, 229 : 841, 1978.
- 2) Fukuda, I., Mozai, T. et al. : Studies on hemorheological factors in pseudohypertrophic muscular dystrophy. *Bull. Osaka Med. Sch.*, 24 : 23, 1978.
- 3) Murphy, D. L. et al. : Serotonin and platelet function in Duchenne muscular dystrophy. *Arch. Neurol.*, 28 : 239, 1973.
- 4) 茂在敏司, 他 : Duchenne型進行性筋ジストロフィー症におけるHemorheological factorについて ; 進行性筋ジストロフィー症におけるHemorheological

factorの検討。厚生省心身障害医療研究「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」昭和50, 51年度冲中班研究報告書, 209, 1976 ; 159, 1977.

- 5) Mills, D. C. B. et al. : 血小板受容体 : 血小板—生理と病態— (編集 Gordon, J. L., 監訳山中学, 日本メディカルセンター), 143, 1978.
- 6) 山崎博男, 他 : 脳卒中と血小板凝集能。内科, 36 : 576, 1975.
- 7) Berridge, M. J. : The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity (Blood platelets). *Advances in cyclic nucleotides research*, Raven Press, New York, 6 : 54, 1975.
- 8) KHOKHLOV, A. P. et al. : Pathogenesis of creatinuria and aminoaciduria in neuromuscular disease. *ZH. NEUROPATHOL. PSIKHIATR. IM. S. S. KORSAKOVA*, 77 : 1025, 1977.
- 9) Canal, N. et al. : The metabolism of cyclic-3'-5'-adenosine monophosphate (cAMP) in diseased muscle. *J. Neurol.*, 208 : 259, 1975.
- 10) Horvath, B. Z. et al. : Adenyl cyclase in the pectoral muscle of normal chickens and chickens with hereditary muscular dystrophy. *Enzyme*, 13 : 311, 1972.
- 11) 鬼頭昭三, 他 : 筋疾患における血漿中および筋内cyclic AMP, cyclic GMPに関する研究。厚生省心身障害医療研究「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」昭和50年度冲中班研究報告書, 185, 1976.

40) 筋ジストロフィー症における筋膜脂質 に関する研究

——筋ジストロフィー鶏の筋ガングリオシドについて——

宮 武 正*

研究協力者 渥 美 哲 至* 前 沢 政 次** 有 賀 敏 夫***

筋ジストロフィー症における筋線維崩壊の原因として膜異常の存在を示唆する数多くの研究がなされている¹⁾。著者らは筋ジストロフィー症の患者および筋ジストロフィー鶏の赤血球について、形態、膜脂質および膜酵素の検討を行ない報告した²⁾³⁾。ガングリオシドは、膜の脂質二重層の外表面に存在する糖脂質であり、免疫学的抗原、コレラ、テタヌストキシンなどの受容体として機能し、さらに膜表面の荷電にも重要な役割をはたしている。最近ヒト及び動物（ネズミ、トリ）の筋ジストロフィー症において、赤血球の電気泳動度が異なる報告がある⁴⁾。シアル酸含有物質の異常が疑われるため筋ジストロフィー鶏およびプロテアーゼ・インヒビター治療を行った筋ジストロフィー鶏を用いて、筋組織ガングリオシドの分析を行ない、さらに治療による影響の検討を行なった。

方 法

1. 材料

筋ジストロフィー鶏、プロテアーゼ・インヒビター治療筋ジストロフィー鶏および対照鶏の各々3、8、8羽の前胸筋を用いた⁵⁾。

2. ガングリオシドの分析

筋をホモゲナイズし Ando ら⁶⁾の方法に従って粗ガングリオシドを得て総ガングリオシドを定量、薄層クロマトグラフィーを行って個々のガングリオシドに分離後、島津二波長クロマトスキャナーを用いて定量した。

結果及び考案

鶏筋ガングリオシド含量及びそのパターンは表1、および図1(2, 3, 4)に示す如くである。鶏ガングリオシドについての報告はまだ見あたらないが、対照鶏筋のガングリオシド含量は、Puro ら(1969)⁷⁾のラット、ウサギ、ブタや Lassaga ら(1972)⁸⁾のウサギ及び Max ら(1970)⁹⁾のネコ、ウサギ、ラットなどの筋ガングリオシド含量とほぼ同じである。そのパターンは、GM₃が最も多くその他に GD₃、GM₁、GT_{1a}、および未知成分 X の計5ケのガングリオシドが主である。ヒト筋ガングリオシド(図1の10)とは GM₃、GD₃ は共通するがその他は異なっており、種による差が認められる。Lassaga ら(1972)⁸⁾のウサギや、Max ら(1970)⁹⁾のネコ、ウサギ、ラットでは、hematoside が主なガングリオシドであるとしていることと一致する。しかし Max ら⁹⁾はネコ、ウサギ、ラットでは種が異なってもガングリオシドパターンは類似していると報告しており、種の違いによる異同は今後さらに明らかにされるべき点であろう。

* 自治医科大学神経内科

** 自治医科大学第一内科

*** 都立臨床医学総合研究所中間代謝部門

表1 Gangliosides in chick muscles

	Control n=8 µg/g Protein	non treated dystrophy n=3 µg/g Protein	treated dystrophy n=8 µg/g Protein
GM ₃	8.8 ± 0.7	25.3 ± 11.2	15.6 ± 3.0
GD ₃	5.1 ± 0.4	12.1 ± 5.3	10.6 ± 1.5
GM ₁	5.7 ± 0.4	10.7 ± 4.7	8.1 ± 1.6
GT _{1a}	4.0 ± 0.3	12.1 ± 5.4	8.2 ± 1.6
X	3.5 ± 0.3	12.5 ± 5.5	7.5 ± 1.5
Total	27.2 ± 2.1	72.7 ± 32.2	50.0 ± 9.7

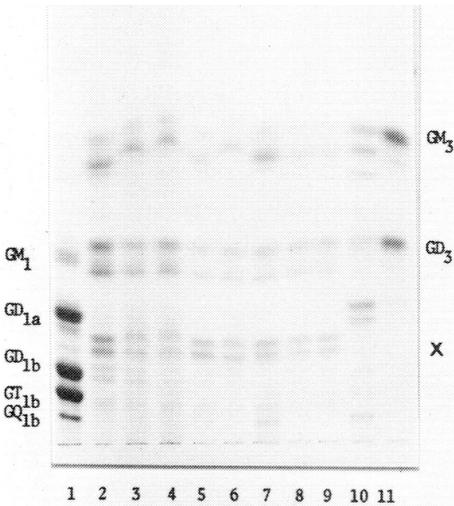


図1 ガングリオシドの薄層クロマトグラフ
1:脳 2, 3, 4:対照鶏筋 5, 6,
7:筋ジストロフィー鶏筋 8, 9,:プロ
テアーゼ・インヒビター治療筋ジスト
ロフィー鶏筋 10:ヒト筋 11:ヒト培
養線維芽細胞。

筋ジストロフィー鶏の筋ガングリオシド含
量は、対照鶏に比し2.6倍と明らかに増加
し、そのパターンではGM₃の増加が著しく、

ついでX, GT_{1a}, GD₃, GM₁の順に増加して
いる。GM₁の増加率は最も少ない(表1及び
図1の5, 6, 7)。

Maxらはウサギ脱神経筋においてGM₃を
主とするガングリオシドが増加し⁹⁾,筋ジスト
ロフィーラットの筋では逆にガングリオシド
の減少を報告している¹⁰⁾。一方 Albarracinら
(1974)¹¹⁾はビタミンE欠乏によるウサギの
実験的ジストロフィー症の筋ガングリオシド
が2倍に増加していると報告している。筋ガ
ングリオシドの増加の意味については、筋の
膜成分の増加やガングリオシド代謝の変化な
どが想定される。今後分離筋膜でのガングリ
オシドの分析が必要である。

プロテアーゼ・インヒビター治療をした筋
ジストロフィー鶏の筋ガングリオシドの含量
は、未治療群よりは低い傾向にあったが対照
に比し明らかに増加していた。ガングリオシ
ドの増加パターンは未治療群と類似してい
た。筋ガングリオシドの増加は治療群で未治
療群より低い傾向にあったが、検定の結果、
有意差は認められなかった。今後治療の時期、
期間などを変えて検討してみることも必要と
考えられる。

文 献

- 1) Rowland, L. P. : Pathogenesis of muscular dystrophies. *Arch. Neurol.* 33 : 315—321, 1976.
- 2) 渥美哲至, 宮武正, 大林民典他 : Duchenne 型ジストロフィー症の赤血球の形態および生化学的研究. 筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究, 冲中班, 昭和 51 年度報告書, 173 頁.
- 3) 吉田充男, 渥美哲至, 宮武正他 : 筋ジストロフィー赤血球膜に関する研究. 筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究, 冲中班, 昭和 52 年度報告書, 141 頁.
- 4) Bosmann, H. B., Gersten, D. M., Griggs, R. C., et al. : Erythrocyte surface membrane alterations. *Arch. Neurol.* 33 : 135—138, 1976.
- 5) 杉田秀夫他 : 筋ジストロフィーチキンに対する protease inhibitor (E-64) の効果. 本報告書, 45 頁.
- 6) Ando, S., Chang, N. C. and Yu, R. : High performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species. *Anal Biochem.* 89 : 437—450, 1978.
- 7) Puro, K., Maury, P. and Huttunen, J. K. : Qualitative and quantitative patterns of gangliosides in extraneural tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 187 : 230—235, 1969.
- 8) Lassaga, F. E., I. Albarracin de Lassaga and Caputto, R. : Rabbit muscle gangliosides. *J. Lipid Res.* 13 : 810—815, 1972.
- 9) Max, S. R., Nelson, P. G. and Brady, R. O. : The effect of denervation on the composition of muscle gangliosides. *J. Neurochem.* 17 : 1517—1520, 1970.
- 10) Max, S. R. and Brady, R. O. : Alteration of the ganglioside composition of skeletal muscle in murine muscular dystrophy. *Nature* 233 : 55—56, 1971.
- 11) Albarracin, I., Lassaga, F. E. and Caputto, R. : Changes of gangliosides and other lipids in skeletal muscle from rabbits with experimental dystrophy. *J. Lipid Res.* 15 : 89—93, 1974.

41) 組織肥満細胞セリンプロテアーゼの インヒビターについて

真 田 幸 弘*

研究協力者 勝 沼 信 彦* 野 田 隆 遠 藤 文 夫**

はじめに

我々がラット骨格筋より抽出、結晶化した¹⁾セリン性プロテアーゼが筋ジストロフィー症において異常な活性上昇を示すことは、すでに報告した^{2,3)}。このプロテアーゼが個々に分離精製した筋構成蛋白質の中で、ミオシン、トロポニン、トロポミオシンを比較的好く分離し⁴⁾、さらには native な筋原線維に対しても非常に高い分解能を有する⁵⁾ことから筋ジストロフィー症における異常な筋蛋白減少に本酵素が関与しているのではないかと示唆してきた。最近本酵素の一次構造分析や免疫学的性質を検討した結果、このプロテアーゼが組織肥満細胞由来の酵素である⁶⁾ことが判ると同時に蛍光抗体法によっても筋細胞間質に散在する肥満細胞の顆粒中に強く活性が存在することが認められた⁷⁾。筋ジストロフィー症における本酵素活性の上昇は Bois⁸⁾がすでに本症の骨格筋において肥満細胞が増加すると報告している事実と一致し、肥満細胞顆粒中に大量に存在するこのプロテアーゼの生理的意義を追求することは本症における筋蛋白減少機構の解明に役立つものと考えられる。

本酵素の種々のインヒビターについてはすでに報告⁹⁾されているが今回は更に本酵素の血清中インヒビターを含めた新しいインヒビターについて報告する。

実験と材料

キモスタチン及び水溶性キモスタチンは微生物化学研究所の青柳高明先生より提供されたものを使用した。ヘパリン、Compound 48/80 は各々和光純薬工業株式会社、Sigma Chemical 社製のものを使用した。本プロテアーゼ活性測定は Katunuma⁹⁾らの方法に従った。酵素蛋白量は $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (280 nm) = 10.2 を用いた。ポリアクリルアミドディスク電気泳動は、Davis¹⁰⁾の方法に従って行なった。

結果と考察

表 1 に本プロテアーゼに対する種々のインヒビターを ID_{50} 値で示した。キモスタチンは水溶性も含めて強力なインヒビターであり、また肥満細胞顆粒中に多量に含まれるヘパリンも本酵素を阻害することがわかった。肥満細胞の脱顆粒因子の 1 つである Compound 48/80 は本酵素を全く阻害しなかった。ラット血清中にも強力なインヒビターが存在しており、これを通常ポリアクリルアミドディスク電気泳動法で分離すると図 1 に示す様に少なくとも 3 成分のインヒビターが血清中には存在することがわかった。このうち第 3 のピークはその移動度から判断して¹¹⁾、 α_1 -anti-trypsin であると考えられた。

水溶性キモスタチンおよびヘパリンの本酵素に対する反応阻害様式を分析した結果、両者共、酵素に不可逆的に結合して阻害をおこすことが判った。

* 徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門

** 熊本大学医学部小児科

表1 Inhibitors of the skeletal muscle protease

INHIBITOR	ID ₅₀
	NG/μG PROTEASE
CHYMOSTATIN	
INSOLUBLE*	1.2
SOLUBLE*	9.6
HEPARIN	44.0
	μL/μG PROTEASE
RAT SERUM	20.0
COMPOUND 48/80	NO EFFECT

* IN WATER

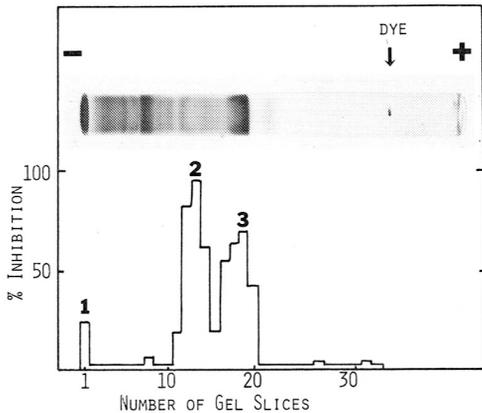


図1 Inhibitory effects of rat serum proteins after polyacrylamide gel disc electrophoresis

ラット血清 50 μl をポリアクリルアミドディスク電気泳動を行った後にゲルを均等に分離し、氷冷の酵素反応緩衝液に4時間放置した後に各々の分画の酵素反応阻害度を測定した。

次にこれらのインヒビターを直接ラットに投与して *in vivo* でこのプロテアーゼ活性を抑制しようと試みた。水溶性キモスタチンについては、0.1 mg~2.0 mg/100 g 体重当り、ヘパリンは 10 mg/100 g 体重当り、3~7日

間連続投与したが、骨格筋中の本酵素活性の低下は認められなかった。これらの物質の阻害様式を考え合わせると恐らくこれらの物質は *in vivo* においてその細胞膜透過性が悪いためにその効果が現われないと考えられた。Compound 48/80 投与の効果については勝沼ら⁷⁾が報告している。

このプロテアーゼが組織内での蛋白分解過程にどの様に関与しているかを調べるために予備的な実験を行なったが現在のところ肥満細胞顆粒に含まれるヘパリンやこのプロテアーゼの様な高分子物質が脱顆粒を起こした後にどの様な移行をし、どの場所でその生理的反応を行なうのか全く不明である。本プロテアーゼについてはもし脱顆粒後直ちに血中に移行するとすれば血中に大量に存在するこのプロテアーゼインヒビターと結合して不活性化されるであろう。しかしながら脱顆粒後血中に移行以前にその周辺組織で本酵素が作用するとすれば本酵素が容易に native な筋原線維を分解する作用を有している⁹⁾ことから、筋蛋白分解に関与する可能性も充分考えられる。またその時は同時に顆粒中に大量に含まれる本酵素のインヒビター、ヘパリンとの相互関係も重要な意味を持つてくるであろうと考えている。

文 献

- 1) Sanada, Y., Yasogawa, N. and Katunuma, N.: Crystallization and amino acid composition of a serine protease from rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82: 108, 1978.
- 2) Sanada, Y., Yasogawa, N. and Katunuma, N.: Serine protease in mice with hereditary muscular dystrophy. *J. Biochem.* 83: 27, 1978.
- 3) Katunuma, N., Yasogawa, N., Kito, K., Sanada, Y., Kawai, H. and Miyoshi, K.: Abnormal expression of a serine

- protease in human dystrophic muscle. J. Biochem. 83 : 625, 1978.
- 4) Yasogawa, N., Sanada, Y. and Katunuma, N. : Susceptibilities of various myofibrillar proteins to muscle serine protease. J. Biochem. 83 : 1355, 1978.
 - 5) Sanada, Y., Yasogawa, N. and Katunuma, N. : Effect of a serine protease on isolated myofibrils. J. Biochem. 85 : 481, 1979.
 - 6) Woodbury, R. G., Everitt, M., Sanada, Y., Katunuma, N., Lagunoff, D. and Neurath, H. : A major serine protease in rat skeletal muscle : Evidence for its mast cell origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 5311, 1978.
 - 7) 勝沼信彦, 真田幸弘, 野田 隆, 遠藤文夫 : 昭和 53 年度厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の基礎的研究」班会議
 - 8) Bois, P. : Mast cells and histamine concentration in muscle and liver of dystrophic mice. Amer. J. Physiol. 206 : 338, 1964.
 - 9) Katunuma, N., Kominami, E., Kobayashi, K., Banno, Y., Suzuki, K., Chichibu, K., Hamaguchi, Y. and Katunuma, T. : Studies on new intracellular proteases in various organs of rat (1) Purification and comparison of their properties. Eur. J. Biochem. 52 : 37, 1975.
 - 10) Davis, B. J. : Disc electrophoresis II, Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 : 404, 1964.
 - 11) Travis, H., Johnson, D. and Pannell, R. : Properties of human α_1 -antitrypsin. Proteinase Inhibitor, Eds. Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J. and Truscheit, E., p.31-39, Springer-Verlag, Berlin, 1974.

42) 血清Mbを指標とする筋の筋弛緩剤に対する 人ミオパチー筋感受性. Isolated arm method による事前チェックの試み

川井尚臣*

研究協力者 岩朝 勝* 近藤 彰* 末広 正*
虫本 光徳* 今井 幸三* 林 正*
稲垣 稔** 三好 和夫*

私達は全身麻酔時の Succinylcholine chloride (SCC) が筋に中毒性に作用し、血中のミオグロビン (Mb) が上昇することを別に発表してきた¹⁾。また、SCC を中心とする筋弛緩剤の筋中毒作用に対する感受性が筋の発達分化と関連があることを述べた²⁾。

本文では、SCC などによると考えられる悪性高熱などを麻酔施行前にチェックするための私達の試みについて述べる。isolated arm method を用いて、血清 Mb を指標とするものであるが、その方法と、それによる健常人、ならびに筋ジストロフィー症 (PMD) の成績について述べる。

対象と方法

対象は健常成人 volunteer (7 例)、Duchenne 型 PMD (DMD) 症例 (9 例) および手術麻酔例 (6 例) などである。

血中 Mb の測定は当科にて開発³⁾したラジオイムノアッセイ (二抗体法) によった。感度は 1 ng/ml、血清の正常値は 30 ng/ml 以下である。

SCC に対する感受性テストは Feldman ら³⁾、岩月ら⁴⁾の isolated arm method を私達

が独自に改変応用したものである (図 1)。すなわち、手背と前腕内側の静脈に注射針を刺し入れておき、上腕をマンシエツトで水銀柱 200 mmHg (小児の場合は 160 mmHg) まで上げ駆血する。次いで手背静脈より生理的食塩水 (以下生食) で希釈し 0.025~0.5 mg/ml とした SCC 溶液 20 ml (小児では体重に応じて減量する) を静注し、5 分以後前腕内側より 2 分 30 秒毎に 15 分まで、および駆血帯解除後に採血 (2~4 ml) し、血中 Mb を測定した。症例によっては SCC 静注 5 分後に駆血圧を最高血圧-10 mmHg に下げ、前腕の血流がわずかに生じるように工夫した。

このテストを健常人ならびに DMD 例、次いで GOF (G: 笑気, O: 酸素, F: フローレン) 全身麻酔下の手術麻酔例で試みた。

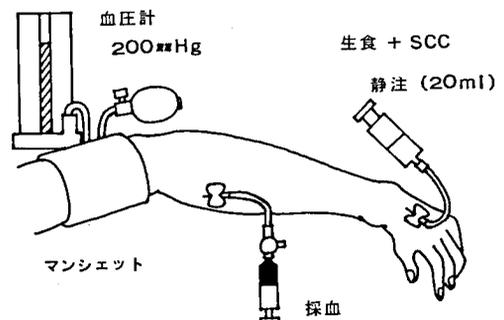


図 1 Isolated arm method

* 徳島大学医学部第一内科

** 徳島大学医学部麻酔科

成 績

健常成人 (volunteer) と DMD についての感受性テスト (前述) の成績を述べる。SCC の静注量は、体重 50 kg の人において 0.5 ~ 5.0 mg/前腕とした。体重の差異によってこの量を増減したが、以下それぞれ 50 kg 体重当量の表現法を用いる。

1) 無麻酔での isolated arm method

健常成人 (7例) では、Mb は SCC 溶液静注 5 分後一時下降し、15 分および駆血帯解除後で上昇の傾向を示した。しかし、SCC 静注前値に比べ明らかな上昇を示さなかった。図 2 に各種静注量の成績を示した。

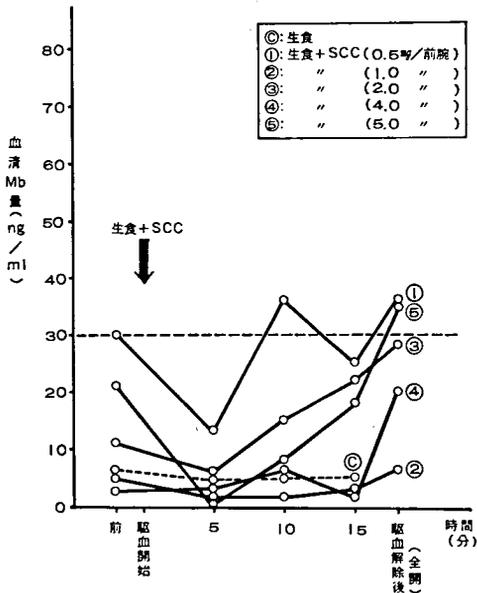


図 2 健常成人における SCC 投与後の血清ミオグロビン量の変動

— Isolated arm method —

DMD (7例) では血清 Mb は、SCC (0.5 ~ 5.0 mg 当量/前腕) 静注例で溶液静注後 5 分で一時下降し、その後上昇し、15 分ないし駆血帯解除後では SCC 静注前値 (100 ~ 270 ng/ml) に比べ上昇 (300 ~ 500 ng/ml) を示し

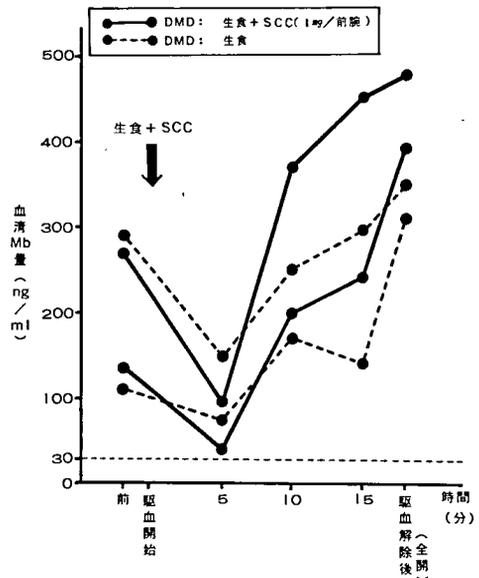


図 3 Duchenne 型筋ジストロフィー症における SCC 投与後の血清ミオグロビン量の変動

— Isolated arm method —

た。しかし、生食のみ静注した対照例 (2例) でも SCC 静注例に近い上昇 (300 ~ 350 ng/ml) がみられた。図 3 に DMD の 1.0 mg 当量/前腕の成績を示す。

2) GOF 麻酔下での isolated arm method
SCC 静注のみでは健常成人ならびに DMD で Mb の明らかな上昇がみられなかったため、このテストを GOF 麻酔下の成人手術麻酔例で行った。

6例を検索したが、うち 4例は SCC 静注後 5 分、血圧を少し下げた後より上昇し始め、最高値に達する時間は 7 分 30 秒 ~ 17 分で検索例によってやや異なるが、値は 52 ng/ml ~ 210 ng/ml と明らかな上昇を示し、駆血帯解除後 (全開) 急速に前値近くに復した (図 4)。他の 2例も上昇の傾向を示したが、正常値 (30 ng/ml) を越える上昇はみられなかった。

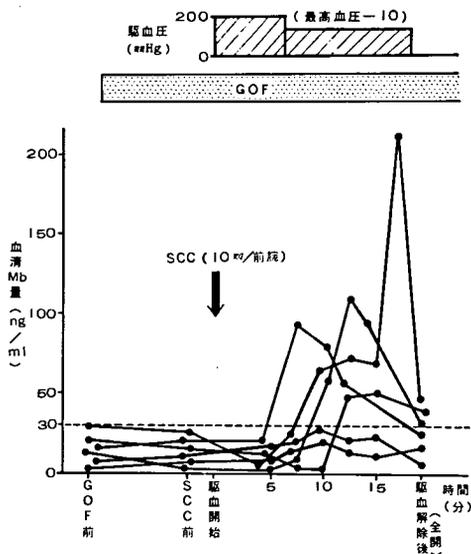


図4 手術麻酔例における SCC 前腕投与後の血清ミオグロビン量の変動
— Isolated arm method —

考 察

私達は血清 Mb の上昇を指標として手術麻酔時 SCC が筋に中毒性に作用することを別に発表してきた¹⁾。また SCC による血清 Mb の上昇が年齢によって異なり、小児では高く (200~2000 ng/ml)、成人では低く (100 ng/ml 前後)、筋の発達分化と関連があるとの考えをすでに述べてきた⁷⁾。

SCC などによって惹起されると考えられる手術麻酔時の悪性高熱および亜悪性高熱 (私達の仮称で手術麻酔時に筋硬直、発熱、あるいは着色尿をきたし、発熱の程度が悪性高熱にくらべ軽く、予後のよいもの) ではともに血清 Mb の著しい高値が見られたので血清 Mb を指標としてこれらの疾患を麻酔前に捉えるため筋の SCC に対する感受性テストを試みている。方法は前述したごとく、isolated arm method を応用し、SCC に対する筋の感受性を血清 Mb の上昇によって捉えるものである。

健常成人で SCC の静注量を種々変えて本感受性テストを行ったが血清 Mb の上昇は捉えられなかった。

また、さきに私達は、女性 DMD の手術麻酔時に GOF+SCC によって血清 Mb の著しい上昇をみており⁹⁾、DMD 筋は SCC に感受性が高いと考えているところである。このテストを DMD 症例でも試み、健常成人より高い血清 Mb 値をえた。しかし、その程度は特異的でなく、GOF を併用しての成績を待って結論をえたい。

このように健常成人、DMD ともに単に SCC のみの静注では血清 Mb の上昇が認められなかったので Fluothane を併用しないと Mb は上昇しないのではないかと考え、GOF 麻酔下の手術麻酔例についてこのテストを試みた。そしてこの場合には成績に示したように Mb の明らかな上昇を認めた。すなわち、この isolated arm method によって、SCC 単独静注では血清 Mb は上昇せず、GOF を併用することによって始めて Mb が上昇するという新しい事実を明らかにした。これは GOF 麻酔によって SCC の筋中毒作用が増強されることを示すものである。

すでに述べたように SCC 投与の小児手術麻酔例では成人例にくらべ血清 Mb が高く上昇する。従って本感受性テストでも同じく、小児例の方が Mb 値は高くなるはずであり、目下、小児例でも GOF 麻酔下の手術麻酔例で方法に工夫を加えながら本テストを試行しつつある。結果は別に発表したい。

現在試行中の SCC に対する感受性テストは現在まだ、開発途上のものであり今後さらに方法を改良し、悪性高熱や亜悪性高熱の感受性テストを完成させ、併せて、他のミオパチー筋の SCC に対する感受性を検索したいと考えている。

結 論

1. 悪性高熱や亜悪性高熱を麻酔前に捉えるため試みている血清 Mb を指標とした SC

Cその他に対する感受性テスト法を述べ、本法が使用にたえることを示した。

2. 健常人ならびにDMDで本テストを用いてSCCに対する感受性を検索したがSCCのみでは特異的な血清Mbの上昇は認めなかった。しかし、手術時のGOF全身麻酔例で本テストによるSCCの感受性を検したところ、はじめてMbの上昇を認めた。このことよってGOFがSCCの筋中毒作用を増強させることが明らかになった。

文 献

- 1) 三好和夫, 川井尚臣, 岩朝 勝, 近藤 彰, 齊藤隆雄, 稲垣 稔: 血清ミオグロビンの上昇を指標とする薬剤中毒性ミオパチー. 臨床神経, 18: 835—836, 1978.
- 2) Miyoshi, K., Saito, S., Kawai, H., Kondo, A., Iwasa, M., Hayashi, T. and Yagita, M.: Radioimmunoassay for human myoglobin: methods and results in patients with skeletal muscle or myocardial disorders. J. Lab. Clin. Med., 92: 341—352, 1978.
- 3) Feldman, S. A. and Tyrrell, M. F.: A new theory of the termination of action of the muscle relaxants. Proc. Roy. Soc. Med., 63: 692—695, 1970.
- 4) 岩月賢一, 橋本保彦, 嶋 武: 新しい筋弛緩薬 AH 8165 について. 麻酔 26: 342—344, 1977.
- 5) 三好和夫, 川井尚臣, 日下香苗, 八木田正聖, 平良 章, 福永恵一, 高田泰治, 仁木伸二: Duchenne 型筋ジストロフィー症の女性発病者とその胎児. 筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究. 厚生省冲中班昭和 52 年度研究報告書, p.222—226, 1978.
- 6) 岩月賢一: 私信
- 7) 三好和夫, 川井尚臣, 岩朝 勝, 近藤 彰, 末広 正, 虫本光徳, 今井幸三, 林 正, 稲垣 稔: 血清 Mb を指標とする筋弛緩剤感受性. 文部省特定研究「難病」班, 難病の発症機構に関する基礎的研究. 昭和 53 年度研究業績, p.211—214, 1979.

43) ネマリンミオパチーとその類縁疾患に認められたトリプトファン代謝異常

八木田 正 聖*

研究協力者 平 良 章* 中 平 晴 仁* 亀 山 和 人*
土 肥 康 伸* 詫 間 通 央* 日 下 香 苗*
川 井 尚 臣* 三 好 和 夫*

著者らは、さきに、ネマリンミオパチーの病者と一見健常な母親にトリプトファン代謝異常所見のあることを見出し、一部発表した¹⁾²⁾。その後、症例を増やしてこのことを確認するとともに、本症と類縁のミオパチーにもそれぞれ若干異なる同様な代謝異常をみとめた³⁾。本文は、本症ならびに類縁のミオパチーをトリプトファン代謝のキヌレニン経路の各種酵素の欠乏ないし欠損症とみなす立場でのべらる。

対象と方法

対象症例は、臨床所見と筋生検組織像より診断つけたネマリンミオパチーの4家系(自験2, 木下ら経験1, 井形ら経験1)および先天性筋線維タイプ不釣合1家系, ビタミンB₆依存性ミオパチーと診断した1家系, Hartnup類似症1家系の病者とそれぞれの一見健常な両親およびその他の家系員である。疾患対照としては、筋ジストロフィー症, 神経原性筋萎縮症をしらべた。

トリプトファン代謝の検索方法

L-トリプトファン 100 mg/kg (但し, 体重 50 kg 以上は 5 g) を経口負荷し, その前と

後の各 24 時間尿中の kynurenic acid (KA), xanthurenic acid (XA) を Satoh, Price 法で測定した。同時に kynurenine など数種の中間代謝産物を併せて測定した。また, XA の高い例では, ビタミンB₆欠乏の影響を除去するため, 予め pyridoxal phosphate (PALP) を投与した。

成 績

1. ネマリンミオパチーおよび類縁のミオパチーの症例

1) ネマリンミオパチー

本症 4 家系の 4 病者 (S. K. 15 歳 F, O. T. 9 歳 M, M. T. 29 歳 M, I. K. 28 歳 M) は, 幼少時より歩行障害あり, 全身性の筋萎縮と dysmorphic face, 高口蓋, 尖足, 凹足などの骨格系の異常を認め, 生検筋組織で, 小~中群萎縮, タイプ I 線維優性で, 多数の筋線維中にネマリンロッドを認めた。それぞれの母は一見健常 (1 例に高口蓋あり) であった。父は健常である。

2) 先天性筋線維タイプ不釣合

症例 Sig. T. 3 歳 M, 生下時より floppy infant で処女歩行 1 歳 11 ヶ月, その後も登はん性起立, 動揺性歩行を呈したが非進行性であった。全身の筋萎縮とくに四肢近位筋に萎縮が目立ち, 仰臥位での頭部挙上不能で, dys-

* 徳島大学医学部第一内科

morphic face, 高口蓋を認めた。生検筋組織では、小群萎縮、タイプI線維の軽度の萎縮とタイプII線維の著明な肥大がみられた。しかし、ネマリンロッドはみられなかった。

本症例では父も病者であり、同様の臨床所見と筋組織所見がみられた。

3) ビタミンB₆依存性ミオパチー (著者ら)

症例 Sir., H.56歳M, 幼少時より全身性にやせて細長い体形であったが、筋力低下には気づかなかつた。52歳より、両下肢の筋こわばり感と歩行障害を来たした。全身性に筋萎縮があり、仰臥位での頭部挙上不能、顔面細長く高口蓋の傾向を認めた。生検筋組織では、タイプII線維の萎縮があり、しかし、ネマリンロッドは認めなかった。

4) Hartnup 類似症 (著者ら仮称)

症例 1 Sin., T.22歳M (弟例) と症例 2 Sin., M.25歳M (兄例)。

両親は近親婚で一見健常である。兄弟両例とも10歳頃より失調性歩行と知能低下に気づかれ、以後、増悪、寛解がみられ、小脳失調、知能低下(IQ弟38, 兄39)と四肢筋萎縮、側彎症、尖足があり、インジカン尿(+), アミノ酸の尿中排出増加は認めなかった(中性アミノ酸の排出はむしろ減少していた)。腓腹筋生検組織では、いわゆる神経原性変化と筋原性変化が混在してみられた。ネマリンロッドは認めなかった。

2. ネマリンミオパチーおよび類縁のミオパチーにおけるトリプトファン代謝(表1)

1) 健常対照におけるKA, XA尿中排出量

健常人では、負荷前1日排出量はKA, XAともに0.5 μ moles/kg/day以下であった。負荷後はKA, XAとも排出が増加して、KA 2.0~5.0, XA 0.7~2.0であった。

2) ネマリンミオパチーにおけるKA, XA尿中排出量

本症では、負荷前排出量はKA, XAともに正常範囲であった。

負荷後のKA, XA排出量は、Sak. 家病者(15歳F)では、KA 17.1, XA 1.3とKAの著明な増加を認め、XA正常であった。一見健常なその母(40歳F)もKA 13.9, XA 1.6とKAの排出増加を認めた。父はKA 1.8, XA 0.9とともに正常値であった(表1)。他の3家系も同様成績であり、O家病者(9歳M), KA 8.0, XA 1.9, 一見健常なその母KA 10.0, XA 2.0とやはり病者と母にKAの排出増加を認め、父は正常値であった。M家では、病者(29歳M) KA 11.5, XA 2.5, 母KA 8.9, XA 1.3とその母KA 12.3, XA 1.2と病者、母とその母にKAの排出増加を認めた。I家でも病者とその母にKAの排出増加(8.7, 12.5)がみられた。

すなわち、本症病者および一見健常なその母にトリプトファン負荷後、KAの尿中異常排出増加が認められた。

なお、その他の筋疾患Duchenne type of muscular dystrophy, Charcot-Marie-Tooth病, spinal progressive muscular atrophyでは、負荷前値はKA, XAとも正常範囲であり、負荷後もDMD KA 2.6, XA 1.0, CMT KA 3.4, XA 2.2, SPMA KA 2.7, XA 1.3といずれも正常値であった。

3) 先天性筋線維タイプ不釣合

Sig. 家は、父、息子が本症の発症例であり、息子病者(3歳M)では、負荷後、KA 10.0, XA 3.7とKAの著明な排出増加、XAの軽度増加を認めた。このXAの増加はVB₆投与によっても正常化しなかった。父病者もKA 9.3, XA 2.2と同様成績であった。息子病者の母は、KA 5.3, XA 1.6とほぼ正常値であった。

4) ビタミンB₆依存性ミオパチー (著者ら)

Sir.家の病者(56歳M)はKA 10.7, XA 22.8とKAの排出増加とさらに著明なXAの排出増加を認めた。このKA, XA, とくにXAは大量のVB₆の投与により影響をうけ減少した。病者の娘(一見健常)もKA 11.3,

表1 ネマリンミオパチーと類縁ミオパチーにおけるキヌレン酸、キサンツレン酸尿中排出量

(L-トリプトファン 100mg/kg 負荷)

症 例	年齢	性	キヌレン酸	キサンツレン酸	
ネマリンミオパチー Sak.家 病者	15	F	17.1	1.3	
	40	F	13.9	1.6	
	43	M	1.8	0.9	
先天性筋線維タイプ不釣合 Sig.家 病者	3	M	10.0	3.7	
	33	M	9.3	2.2	
	30	F	5.3	1.6	
ビタミンB ₆ 依存性ミオパチー Sir.家 病者	56	M	10.7	22.8	
			8.0	15.3	
	PALP { 10mg/day投与 300mg/day	28	F	8.3	5.1
				11.3	15.7
				30	M
Hartnup 類似症 Sin.家 弟病者	25	M	1.0	0.7	
	22	M	0.1	0.1	
	51	M	0.6	0.4	
	50	F	0.1	0.2	
健 常 対 象			2.0~5.0	0.7~2.0	

($\mu\text{moles/kg/day}$)

XA 15.7と同様成績であった。息子(健常)はKA3.5, XA1.9とともに正常値であった。

5) Hartnup 類似症 (著者ら仮称)

Sin.家において、弟病者は負荷後 KA 1.0, XA 0.7, 兄病者は KA 0.1, XA 0.1と両例とも KA, XA の排出が異常低値であった。また、両親(近親婚)は父 KA 0.6, XA 0.4, 母 KA 0.1, XA 0.2とともに異常低値であった。しかし、トリプトファンの吸収は正常であった。

考 察

ネマリンミオパチーとその類縁のミオパチーに、それぞれ若干異なるトリプトファン代謝異常のあることを明らかにした。

トリプトファンのキヌレン代謝経路を図1に示し、前述の各疾患をこの経路の酵素の欠損症とみなす立場から、それぞれに推定される障害部位を酵素に対応させて本図に書き込んである。

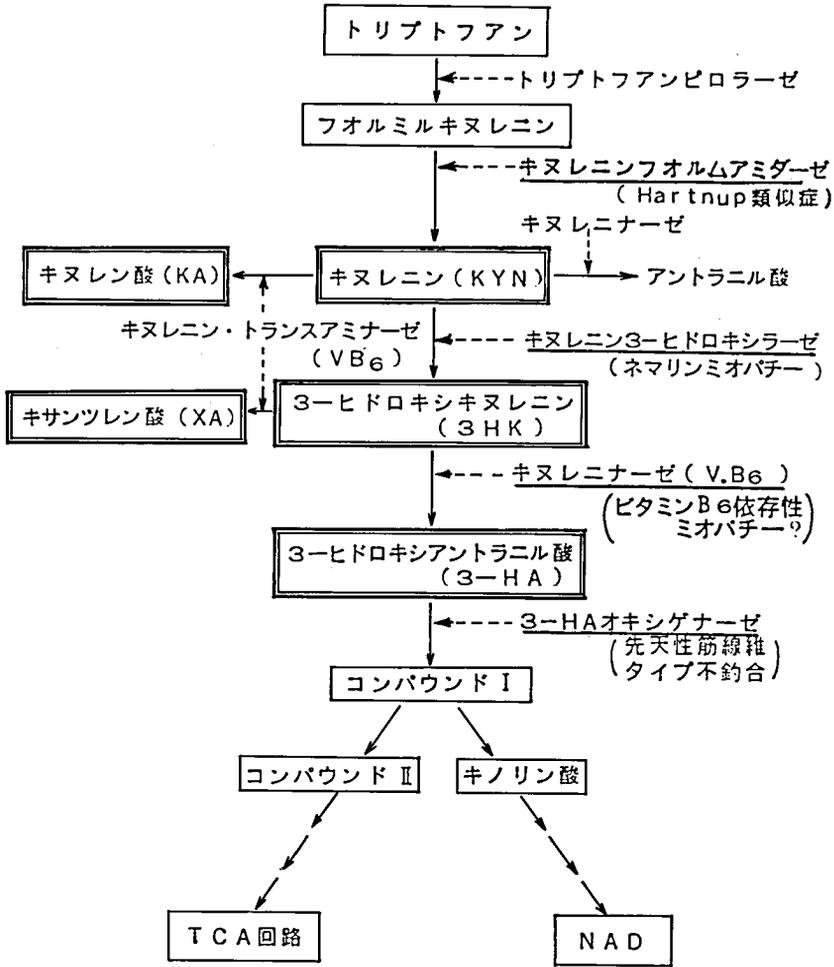


図1 トリプトファン代謝経路

ネマリンミオパチーにおけるトリプトファン代謝異常の特徴は、トリプトファン負荷後尿中にKAの著しい排出増加を認めたことであり、さらに、本症病者のみならず一見健康な母、さらにその母にも同様代謝異常を認めたことである。著者らはこの代謝異常を考慮に入れて、本症の遺伝型をX染色体優性と考えた⁴。本症におけるこのKAの排出増加の機序として、KAのみ増加し、XAが正常であることから、キヌレニン→3-ヒドロキシキヌレニンの反応を触媒するキヌレニン→3-ヒドロキシラーゼ欠損症を考えた。

先天性筋線維タイプ不釣合は、臨床所見の

上ではネマリンミオパチーを思わせたが、生検筋組織でType I fiber atrophyとType II fiber hypertrophyを認め、nemaline rodは発見出来なかった。本症のトリプトファン代謝は、ネマリンミオパチーと異なり、トリプトファン負荷後、KAの排出増加に加えてXAの排出増加を認めた。この機序として、3-ヒドロキシアントラニル酸→コンパウンドIの反応を触媒する3-ヒドロキシアントラニル酸オキシゲナーゼないしそれ以下の障害を考えた。なお、本症の遺伝型は父、息子が病者であることから常染色体優性と思われる。

ビタミンB₆依存性ミオパチー(著者ら)は、

臨床的に一見ネマリンミオパチーとは異なるが、頭部挙上筋力低下や高口蓋などの類似所見もある。本症では、トリプトファン負荷後、KA, XA とくに XA の著明な排出増加があり、この XA は VB₆ の大量投与で影響をうけ低下した。本症は VB₆ 酵素であるキヌレニナーゼの VB₆ 依存症と推定した。なお、遺伝型は不明である。

Hartnup 類似症 (著者ら仮称) の兄弟例は、主症状は小脳失調と知能低下であるが、下腿の筋萎縮と側彎症、尖足がある。臨床症状で類似の Hartnup 病とはアミノ酸尿がない点で異なる。トリプトファン代謝は、負荷後、KA, XA に加えてキヌレニン以下の中間代謝産物の尿中排出量が異常に低値であり、トリプトファン尿がなくキヌレニンフォルムアミダーゼ欠損症を推定した。遺伝型は常染色体劣性と思われる。

以上、各疾患に推定した各酵素異常が該当疾患の発症にいかに関結しているかは、現時点では不明である。しかし、これら疾患に関しては、従来、特殊な代謝異常は知られておらず、著者らが明らかにしたそれぞれに特徴あるトリプトファン代謝異常とこれに基づいて推定した特異な酵素異常の考えは、この種の疾患の本質的解明に意義あるものと思う。

結 論

1. ネマリンミオパチーおよびこれと類縁のミオパチーの病者とその家系員に、L-トリプトファン 100 mg/kg を経口負荷し、負荷前と後の 24 時間尿中の KA, XA の排出量を測定した。

2. その結果、1) ネマリンミオパチーでは、負荷後、KA の排出増加を認め、XA 正常。一見健常な母とその母も同様成績であった。父は正常であった。2) 先天性筋線維タイプ不釣合では、KA の増加と XA の軽度増加を認め、父病者も同様成績であった。母は正常値であった。3) ビタミン B₆ 依存性ミオパチー (著者ら) では、KA の増加とさらに著明な

XA の増加があり、これらとくに XA は VB₆ の大量投与により低下した。一見健常な娘も同様成績であった。4) Hartnup 類似症 (著者ら仮称) では、兄弟病者と近親婚の両親に、KA, XA 両者の異常低値を認めた。

3. 以上の成績より、これらのミオパチーをキヌレニン経路の酵素異常とみる立場から、つぎのごとく推定した。1) ネマリンミオパチーは、X 染色体優性、キヌレニン-3-ハイドロキシラーゼ欠損。2) 先天性筋線維タイプ不釣合は、常染色体優性、3-ハイドロキシアントラニル酸オキシゲナーゼないしそれ以下の障害。3) ビタミン B₆ 依存性ミオパチーは、遺伝型不明、キヌレニナーゼ異常。4) Hartnup 類似症は、常染色体劣性、トリプトファンピロラーゼ異常、と推定した。

文 献

- 1) 三好和夫, 八木田正聖, 詫間通央, 中平晴仁, 原田秀夫, 上里隆信, 日下香苗, 川井尚臣: ネマリン・ミオパチーのトリプトファン代謝. 文部省特定研究「難病」班, 昭和 52 年度研究業績, 241~245 p.
- 2) 三好和夫, 八木田正聖, 詫間通央, 中平晴仁, 原田秀夫, 上里隆信, 日下香苗, 川井尚臣: ネマリン・ミオパチーに認めたトリプトファン代謝異常. 第 19 回日本神経学会総会, 昭和 53 年 5 月東京. 臨床神経 18: 842, 1978.
- 3) 三好和夫, 八木田正聖, 平良章, 日下香苗, 中平晴仁, 詫間通央, 川井尚臣, 他: トリプトファン代謝異常からみるネマリンミオパチーと類縁ミオパチー. 第 76 回日本内科学会講演会, 昭和 54 年 4 月東京.
- 4) 三好和夫, 八木田正聖, 中平晴仁, 龜山和人, 詫間通央, 平良章, 日下香苗, 川井尚臣: ネマリン・ミオパチーの遺伝. 日本人類遺伝学会第 23 回総会, 昭和 53 年 10 月新潟.

44) 蛋白同化作用を有する豚エキスの精製と それによる筋ジストロフィー症の成因・ 治療に関する研究

高岡善人^{*}

研究協力者 一瀬 允^{*} 辻 畑 光 宏^{*} 江 口 勝 美^{*}
南 野 直 人^{*} 福 田 孝 昭^{*} 森 一 毅^{**}
追 龍 二^{**} 松 尾 壽 之^{***}

目 的

昨年8月から新しく共同研究者となった宮崎医大第2生化学松尾壽之教授(1977年度ノ一ベル賞受賞者となったDr. SchallyのためLH-RHのアミノ酸組成を最終的に決定した),南野直人らは私どもの念願である粗製豚エキス(PX)の完全精製を実現する。彼等の得た力価の高い精製PXを量産化できれば,これを用いて高岡らはDMP患者の臨床実験の有効,無効をdouble blindによって完結する。それまでは従来通り部分的精製PXをDMP患者に応用して臨床観察を続ける。

方 法

昨年度報告したPXの新抽出法(ブタ臍臓をpH9.0,80℃,3分間加熱して抽出した液からpH4.0沈澱を除去,pH2.0の上清中から限外濾過で分子量10,000~1,000の分画を集める)で得る凍結乾燥品を粗製PXとする。その一部分は当教室で精製,臨床サンプルとする。残りの大部分は松尾らが精製し,得た分画の力価は当教室のBioassay(家兎)と組織培養(L-cells)で検定する。

PXの臨床観察は従来通り,当教室,川棚DMPセンター,米国の3ヶ所で続行中である。

成 績

松尾らが精製中のPXは生物学的検定法で従来の約1/10量の蛋白含量でほぼ同等の力価の分画を得つつある。しかもその再現性はきわめて高いので今後純粋単離と量産化の問題も徐々に解決しうる見込みである。今回はまだ実験段階であるため,その詳細は省略する。

次にPX連用5年以上のDMP患者の経過について述べる。国内の患者の成績(表1)は,ほぼ昨年と同じである。PX効果判定の規準として(++)を症状の一部が改善したか,進行が停止に近いもの,(+)を症状の悪化が遅くなったもの,とすると顔肩上腕筋型4名は全例(++)であり,その中一番PX使用期間の長い第1号患者を後で示す。肢帯型18名中10名(+),デュセンヌ型21名中2名(内1名は後述する米国人)は(++),別の2名が(+)で残りは無効であった。

毎年報告しているPX,第1号のFSHは図1の如く装具着用による起立時間は60分から70分に延長,下肢挙上時間もなお上昇中で

^{*}長崎大学医学部第一内科

^{**}国立療養所川棚病院

^{***}宮崎医科大学第二生化学

表1 PX 5年以上連用のDMP患者に対する臨床効果

病型	例数(男, 女)	発症年齢 (平均)	PX 開始年齢 (平均)	PX使用期間	効果 (*)		
					++	+	-
F S H	4 (1, 3)	10-19 (14.8)	19-37 (28.0)	6, 3-8, 9	4	0	0
L - G	18 (8, 10)	4-27 (14.2)	12-42 (28.4)	5, 5-7, 11	0	10	8
Duchenne	21 (21, 0)	1-6 (3.6)	5-17 (10.4)	5, 5-8, 1	2	2	17

(*) 効果 ++; 症状の一部が改善したか、進行が停止に近いもの。
+; 症状の悪化が遅くなったもの。

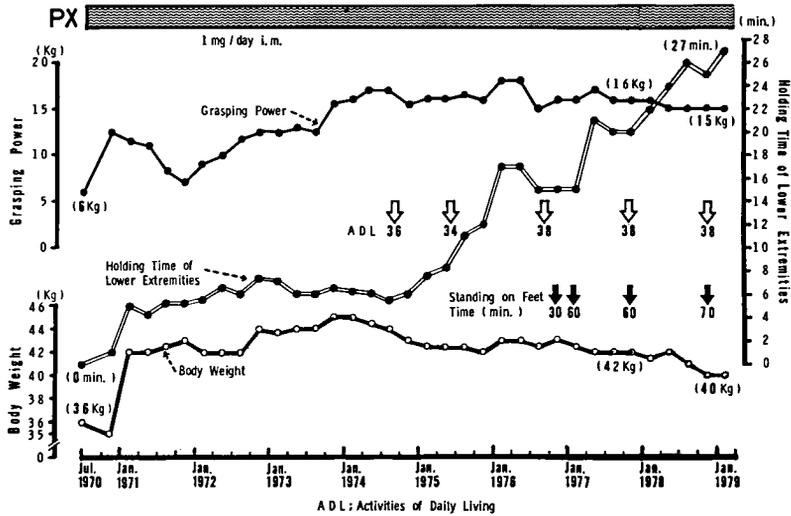


図1 Facioscapulohumeral dystrophy aged 45, female

あるが、握力、体重はむしろ減少気味である。その理由としては次のことが考えられる。従来は、カルシウムと尿素窒素の両因子が強く減少する力価の高いサンプルを国内では最も永くPXを使用している8名(本患者を含む)と米国の患者10名に使用していた。しかるに昨年度は色々の悪条件が重なってこれらの患者にもカルシウム因子は強いが尿素因子が強い普通のサンプルを使わざるを得なかった。これを契機にPX No.1の患者と別のFSH 1名および米国の患者2名からサンプルが変

って以来調子が良くないと訴えてきた。このことは、私どもに尿素因子の重要性を認識させる結果ともなった。現在松尾、南野らによって尿素因子について再現性の高い抽出法が確立されつつある。この量産化が実現される時こそDMPの治療法の根本的解決につながるものと期待している。

川棚DMPセンターで観察中の比較的力価の高いPXとその約6割の力価のPXを使用しているA、B両群の間にも効果の点でまだ有意差はみられない。

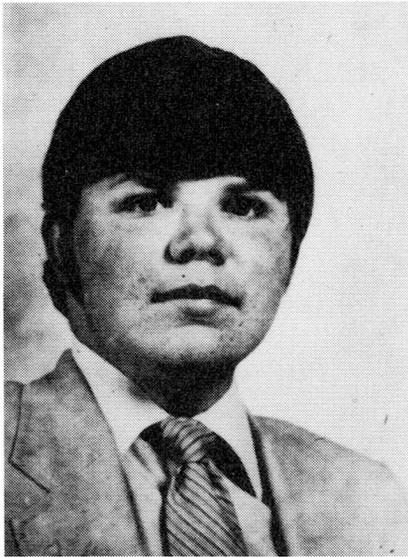
写真1の米国人デュセンヌ型患者(R. T.)はすでに報告した如く、17歳で症状悪化の一途をたどり20歳まで生きられないとされ昭和47年6月車椅子に乗って両親に附添われて長崎までたどりついた。以来6年8ヶ月(現在23歳6ヶ月)となり昨年夏休みには法律勉強のため、スウェーデン迄旅行できた。

彼の話題が縁となってPX注射を希望してきた米国人DMP患者の中 follow-up してくれる神経専門医のきまった10名を volunteer として選び、PXを送っている。5年間連用中のデュセンヌ型4名はR. T.君のように芳しい成績ではなく、10歳未満でPX注射を開始した2名も10歳を過ぎるとともに車椅子を必要とした。

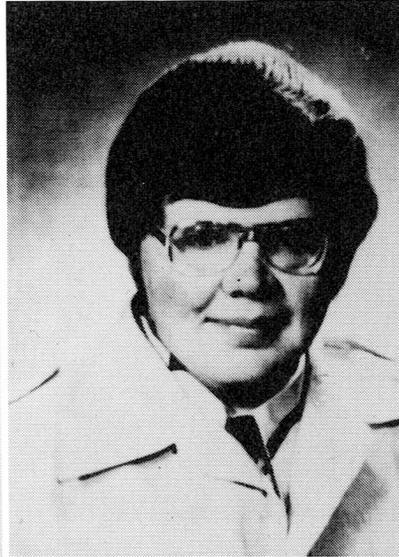
しかるにFSHの一家系は祖母以下3世代にわたり7人の同病患者がいるが、生存中の6人中5人(表2)がPX使用中である。2

ヶ月に1回受診している神経専門医が臨床経過の報告を送ってくるが、経過は日本人FSHと同じく良好である。すなわちT家の母と息子(発端者)が4年3ヶ月と6ヶ月、H家の伯母とその息子、娘の3人が4年1ヶ月、PXを連用中で表2はその一覧表であり、写真2はH家の伯母である。

このT家を follow-up 中の Dr. Norman (表2)の紹介でPXを始めた E. G.氏は大戦中海兵隊員であった。その後次第に臥床の状態となり米国 NIH に入院した。Myopathy of unknown etiology とされていたが、PX開始1ヶ月で夫人も医師も驚くほど性慾が異常に亢進し筋力も向上している。この性慾亢進は昨年度、7歳と8歳のデュセンヌ型坊やがPXで penis の肥大をみた私どもが報告したことと一致している。



17才の時(PX開始時)20才まで
生きないとされていた。



22才

写真1 米国人デュセンヌ型DMP(R. T. 君)

表2 米国のA家系 (K家, T家) : FSH Dystrophy

	氏名	続柄	年齢	性	PXの使用期間	臨床症状の改善点	医師
K家	S. K.	伯母	64	♀	年 月 4 1	上肢筋力増強	Paul Palmbaum
	R. K.	息子	41	♂	4 " 1 "	上腕二頭筋筋力増強	Ernst J. Penka
	J. H.	娘	34	♀	4 " 1 "	頭頂迄上肢挙上可能となる	Paul Palmbaum
T家	J. T.	母	55	♀	4 " 3 "	口笛が吹けるようになる 起立時間延長	Donald E. Norman
	P. T.	息子 (発端者)	33	♂	4 " 6 "	0.5マイル歩行可能となる 体重 10 ポンド増加	

(1979, 3)



(K家の伯母 64才 女性)
PXを4年1ヵ月使用中

写真2 米国 FSH Dystrophy の一例

結 論

永い間 try and error の連続で力価の変動に悩んでいた PX の抽出も新しい化学者の協力を得て急速に純粹単離, 量産化完成という最終目標に向って進行中である. DMP 患者に対する PX の効果も FSH 型については米国においても日本同様良好の成績と考えられるがデュセンヌ型についてはさらに力価の強い PX で challenge したいと考えている.

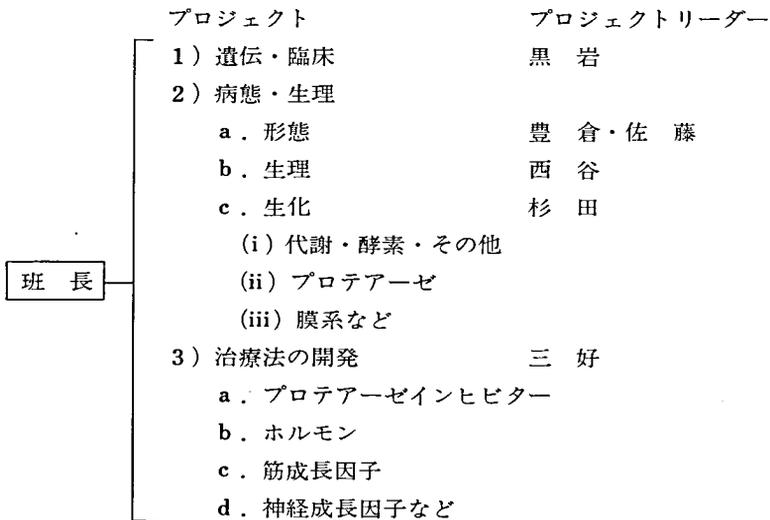
昭和53年度研究班機構図及名簿

厚生省神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー研究班

班 名	研 究 課 題	班 長
第 一 班	筋ジストロフィー症の基礎的研究	江 橋 節 郎
第 二 班	筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究	三 好 和 夫
第 三 班	筋ジストロフィー症の臨床病態および疫学的研究	祖父江 逸 郎
第 四 班	筋ジストロフィー症の療護に関する臨床社会学的研究	中 島 敏 夫

昭和53年度第二班（三好班）機構図



昭和53年度第二班（三好班）名簿

区 分	氏 名	所 属 施 設 名 地 所 在 地	所 属 にお ける 地位	連 絡 の 際 の 電 話
班 長	三 好 和 夫	徳島大学医学部第一内科 〒770 徳島市蔵本町3-18-15	教 授	0886-31-3111
幹 事	黒 岩 義五郎	九州大学医学部脳神経病研究施設神経内科 〒812 福岡市東区馬出3-1-1	教 授	092-641-1151
	豊 倉 康 夫	東京大学医学部脳研究施設神経内科 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	教 授	03-815-5411
	佐 藤 猛	順天堂大学医学部脳神経内科 〒113 東京都文京区本郷2-1-1	助 教 授	03-813-3111
	西 谷 裕	国立療養所宇多野病院神経内科 〒616 京都市右京区鳴滝音戸山町8	副 院 長	075-461-5121
	運 営 幹 事	杉 田 秀 夫	東京大学医学部脳研究施設神経内科 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	助 教 授
班 員	古 庄 敏 行	鹿児島大学医学部衛生学 〒890 鹿児島市宇宿町1208-1	助 教 授	0992-64-2211
	近 藤 喜代太郎	新潟大学脳研究所神経内科 〒951 新潟市旭町通一番町754	助 教 授	0252-23-6161
	古 川 哲 雄	日赤医療センター神経内科 〒150 東京都渋谷区広尾4-1-22	部 長	03-400-1311
	塚 越 廣	信州大学医学部第三内科 〒390 松本市旭3-1-1	教 授	0263-35-4600
	木 下 真 男	東邦大学医学部第四内科 〒153 東京都目黒区大橋2-17-6	教 授	03-468-1251
	埜 中 征 哉	国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部 〒187 東京都小平市小川東町2620	室 長	0423-41-2711
	福 原 信 義	新潟大学脳研究所神経内科 〒951 新潟市旭町通一番町754	助 手	0252-23-6161
	小 口 喜三夫	信州大学医学部第三内科 〒390 松本市旭3-1-1	講 師	0263-35-4600
	中 村 晴 臣	鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設神経病理部門 〒683 米子市西町86番地	教 授	0859-33-1111
	高 守 正 治	長崎大学医学部第一内科 〒852 長崎市坂本町7-1	助 教 授	0958-47-2111
	高 木 昭 夫	国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部 〒187 東京都小平市小川東町2620	室 長	0423-41-2711
	中 西 孝 雄	筑波大学臨床医学系神経内科 〒300-31 茨城県新治郡櫻村大字妻木字天久保	教 授	0298-53-3500
	栗 原 照 幸	宮崎医科大学第三内科 〒889-16 宮崎県宮崎郡清武町木原5200	講 師	09858-5-1510
	茂 在 敏 司	大阪医科大学第一内科 〒569 高槻市大学町2-7	教 授	0726-83-1221

区 分	氏 名	所 属 施 設 名 地 所 在 地	所 属 に お け る 地 位	連 絡 の 際 の 電 話	
班 員	垂 井 清一郎	大阪大学医学部第二内科 〒553 大阪市福島区福島1-1-50	教 授	06-451-0051	
	植 田 啓 嗣	愛媛大学保健管理センター 〒790 松山市道後樋又10-13	教 授	0899-24-7111	
	宇尾野 公 義	東京都立府中病院神経内科 〒182 東京都府中市武蔵台2-9-2	副 院 長	0423-23-5111	
	庄 司 進 一	信州大学医学部第三内科 〒390 松本市旭3-1-1	講 師	0263-35-4600	
	八木田 正 聖	徳島大学医学部第一内科 〒770 徳島市蔵本町3-18-15	助 手	0886-31-3111	
	川 井 尚 臣	徳島大学医学部第一内科 〒770 徳島市蔵本町3-18-15	講 師	0886-31-3111	
	馬 渡 志 郎	九州工業大学保健管理センター 〒804 北九州市戸畑区仙水町1-1	助 教 授	093-871-1931	
	高 橋 桂 一	神戸大学医学部第三内科 〒650 神戸市生田区楠町13・14合併地	講 師	078-341-7451	
	飯 田 光 男	名古屋大学医学部第一内科 〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65	講 師	052-741-2111	
	荒 木 淑 郎	宮崎医科大学第三内科 〒889-16 宮崎県宮崎郡清武町木原5200	教 授	09858-5-1510	
	宮 武 正	自治医科大学神経内科 〒329-04 栃木県河内郡南河内町大字薬師寺331-1	助 教 授	02854-4-2111	
	吉 田 端 子	国立武蔵療養所神経センター疾病研究第四部 〒187 東京都小平市小川東町2620	研 究 員	0423-41-2711	
	高 岡 善 人	長崎大学医学部第一内科 〒852 長崎市坂本町7-1	教 授	0958-47-2111	
	井 村 裕 夫	京都大学医学部内科第二講座 〒606 京都市左京区聖護院川原町54	教 授	075-751-3111	
	林 恭 三	京都大学薬学部生物化学 〒606 京都市左京区吉田下阿達町	助 教 授	075-751-2111	
	真 田 幸 弘	徳島大学医学部附属酵素研究施設 酵素化学部門 〒770 徳島市蔵本町3-18-15	助 教 授	0886-31-3111	
	田 辺 等	虎の門病院神経内科 〒107 東京都港区赤坂虎の門2-2-2	部 長	03-583-6871	
	納 光 弘	鹿児島大学医学部第三内科 〒890 鹿児島市宇宿町1208-1	講 師	0992-64-2211	
	経理事務担当者	小 川 秀 雄	日本筋ジストロフィー協会 〒162 東京都新宿区西早稲田2-2-8	理 事	03-203-1211