厚生省「神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究

三好班

昭和57年度研究報告書

昭和58年 3 月

研究報告書の作成にあたって

厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」班として，昭和57年度の研究報告書を作成する運びとなりました．

当研究班としては本年は昨年につづいて2年目であります．研究は，現象論ともいうべき病状，所見の把握，ついで実態論としての病態の解明，そして，これらを通しての本質論である成因の究明の3段階を意識して進めています．本症のように未だ究極の成因のみつかっていない疾患の研究にあっては，それぞれの研究の意味をこのように確認しながら行うことが大切であると思います．

本年度の研究成果はこの報告書に示されていますが，各自の自由の発想の中に総体として上述の意味でのひきしまりとまとまりがみられます．班員各位の不断の努力に班長として心からの敬意を表します．本報告書は当研究班の今後の研究に格段の飛躍を期待させるとともに，直ちに内外の本症の研究者や医師達に大きな影響を及ぼすものと思います．

報告書の作成に当っては，本年度はその出来を早めるために論文の提出時期を57年の12月に繰上げました．私もこの序文を班会議の終った時点で，緊張の中に，活発であったあの雰囲気を想い起しながら書いています．本年度の研究はなおつづいているところ，班員各位の御協力に謝意を申し述べます．

本研究班に賜った，厚生省当局，国立神経センター，そして日本筋ジストロフィー協会の深い御理解と多大の御支援に深く感謝致します．

昭和57年12月

〈班長〉　三　好　和　夫

目　　次

昭和57年度総括研究報告…… 7

昭和57年度総合班会議研究報告抄録…… 13

分担研究報告…… 25

I．実験動物…… 33

II．筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病理…… 87

a）遺　伝…… 89

b）臨　床…… 97

c）形　態…… 114

d）培　養…… 132

III．筋ジストロフィー症の病態生理…… 139

a）赤血球など…… 141

b）生　理…… 153

c）生化・代謝など…… 171

IV．いわゆる distal myopathy …… 225

昭和57年度研究班名簿…… 273

昭和57年度

総括研究報告

総括研究報告

班長　三　好　和　夫

〔はじめに〕

本年（昭和57年）12月4日(土)，5日(日)に当研究班の班会議を開催し，予め作られた抄録集に基づいて発表，討議された研究報告を論文にまとめて本報告書が作成された．51編が集録されている．

〔研究班の方針〕

当研究班の目的は筋ジストロフィー症の成因の発見と発症機序の解明であるので，研究はすべて独創的で新しいものでなければならない．

班では，本年6月，改めて班員各位に研究計画の提出を求めるに際し，班長の意向を次のように伝えた．

「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」を次の3段階に分けてみた．

1)症例の症状，所見の把握と解析からの新しい疾患，症型の発見と確立，2)筋の変性，崩壊，再生の実態の形態学的，生理学的，そして生化学的特徴の確立，3)本症遺伝子の表現としての蛋白質，酵素の異常の発見，である．

これらは本症の成因究明に対してそれぞれ1)現象論的，2)実態論的，3)本質論的な研究といえるが，その特徴は，これら3段階の研究が個別に成立するものではなく，現象を通して実態が，実態を通して本質が明らかにされることであると思う．

班員の各位は，本研究班のテーマからして1)，2)の研究を行いながら，少しく意識して3)の研究を施行されるようお願いしたい．

以上のとおりであるが，すでに昨年，昭和56年度の筋ジストロフィー症総合班会議では，当研究班からは，上述の1)，2)，3)に概当すると思われる研究テーマを一つずつ選んで代表演者らが発表した．

すなわち，1)いわゆる distal myopathies について（予報的 review，文献集を当班56年度報告書に掲載），2)筋ジストロフィー症における筋の変性と再生；a）壊死と Ca イオ

ン，b)再生，サテライト細胞，筋核のDNA合成とcell cycle，筋線維の構造蛋白，3)単一酵素（解糖系酵素）欠損によるミオパチー，である．

また，これらのうち，1)と2)は当研究班でこれまでに相当の業績をあげてき，次年度以降の当研究班のテーマとすることを昨年度に決定している．

〔分担研究報告〕

研究報告会議は，終始して学術的に緊張度の極めて高いものであった．

報告の内容は，(数字は概括数)1)新しい症例，病型に関するもの 15(うち，いわゆるdistal myopathies 10)，2)筋の再生　6，変性・崩壊　15，新しい研究手技　5，3)本症ならびに類縁ミオパチーの成因に関するもの　5，その他である．

各報告はしかし，常に本症の成因との関係を意識しながら行われた．また，内容的には相互に種々に重複し，それぞれの中に前述の3段階の要素を含んでいる．

いわゆるdistal myopathy：

例えば，distal myopathyについていえば，古典的Welander型と別に，本班で発見された狭義の筋ジストロフィー症ともいうべき末梢型が示され，これに対し，筋組織所見で空胞変性を伴ういくつかの症例と家系例が集積された．後者のものでは，空胞変性から筋崩壊の一つの具体的パターンが推定され，また，その中にはdebrancher enzyme deficiencyがその成因であることを思わせるものが発見された．

この部門においては，筋ジストロフィー症としての，遺伝・臨床型の確立，筋崩壊の機序，そして成因論がこの中だけで組み立てられているということができる．本症の末梢型に関するものであるが，筋ジストロフィー症自身の問題を包含し，国外に類をみないもので，本研究班における大きな成果といえる．

筋の崩壊：

また，別の例として筋崩壊に関しても，筋線維の変性(opaque fiberなど)所見，Caの細胞内への異常流入，そしてCANP，カテプシン，セリンプロテアーゼなどの各種の蛋白分解酵素の段階的な蛋白質分解の機序が関連づけられて解明されてきた．幾多の筋漿酵素や特殊な構造蛋白の血中への流出の機序を併せた筋崩壊の全貌が近く示されることであろう．

報告の概括と見通し：

班報告を総括的にいえば，新しい症例が家系例とともにそれぞれ遺伝・臨床型として整理され，筋の変性，再生と崩壊が，形態，生理，そして生化学，代謝の面から関連をもっ

て解明されてきた．この分野では，モデル動物を用いる研究が併せ行われている．そして，本症の成因の探求がいくつかの独特の着想から進められるとともに，すでに成因の決められている解糖系酵素の異常によるミオパチーでは，成因と実態の関連が明らかにされつつある．

これらの研究の中から本症の成因である筈の何らかの蛋白質，酵素の異常が発見されることが期待される．本研究班では，そのような態勢を十分に培ってきたし，その状況は換言すれば，ひとたび本症各型の一次的な成因が確認された時には，現状の研究成果は直ちにそれらに連結して，本症の症状，実態，成因の全体の解明が一挙にもたらされることが予測される．

〔本年度の総合班会議への参画〕

本年度（来春１月）の総合班会議での当研究班の課題は上述の研究成果を踏まえて，次のごとく決められた．

1．序論，2．罹患筋の再生能，3．筋壊死とプロテアーゼ，4．組織対応法による筋構造蛋白の分解，5．いわゆる distal myopathies，1)問題点，2)rimmed vacuole と封入体の特異性，3)distal myopathy と debrancher enzyme.

〔おわりに〕

筋ジストロフィー症の成因と発症機序の発見と解明を目標として，当研究班は目標に限りないアプローチを行うとともにその達成を意図している．そして当研究班はまた，そこで毎年，新しい本症の研究者と医師達が育ち，巣立ってゆく場であるということができる．

本研究報告書は筋ジストロフィー症に関する内外の研究者や医師達の今後の研究と臨床に大きく影響するものと思う．

昭和57年度厚生省神経疾患研究委託費

「筋ジストロフィー症」総合班会議

筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究

研究報告抄録

筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究
序　　論

三　好　和　夫
（冲中記念成人病研究所）

〔筋ジストロフィー症の発症〕

本症では，a）各病型の遺伝子に該当するそれぞれの異常蛋白質，酵素が在り，b）そのために筋細胞の崩壊，筋の萎縮がひき起され，c）結果として各病型の病者が生じる．

現在，a）は全く不明，b）では不明の点が多く，c）でも不明の部分が残されている．

〔本症の研究と当研究班〕

研究は，本症の成因の究明を目的とする意味合いからは，次の3段階，1）現象論的に，病者の症状，所見の把握から新しい症例や病型の発見，2）実態論的に，筋の変性，再生，崩壊の機序の解明，そしてこれらを通して，3）本質論的に，本症の病因の発見，が段階的に積み上げられて成就するものといえる．

筋ジストロフィー症のように，病因不明の疾患にとり組む場合には，各研究者の研究の意味がこのように明確にされながら進められることが大切である．当研究班ではこのことを意識して行い，1）と2）の研究で着実に実績をあげ，3）の目的達成をそれらを通して期するとともに，そのための独特のいくつかの研究を進めている．

〔本総合班会議におけるテーマ〕

当班で重点をかけてきたものの内から，「いわゆる distal myopathies」と「罹患筋の再生能」，「筋壊死とプロテアーゼ」をとりあげ，そして，「新しい手法」の1，2を加えた．

「distal myopathies」に関しては，その中に，まさに狭義の筋ジストロフィー症そのものとされる病型があり，別に，vacuoles の存在するものでは，筋崩壊の一つの具体的パターンが提示され，また，その中には酵素欠損（debrancher deficiency）をみるものがあるなど，このテーマには上述の3段階の研究のすべてが含まれている．

「罹患筋の再生能」，「筋壊死とプロテアーゼ」と「新手法」のテーマは，筋線維の変性（opaque fiber など），Ca の筋細胞内流入の異常，膜の透過性異常，筋の酵素，構造蛋白質の血中流出，など，着実に解明されつつある本症の筋崩壊の実態の全過程の中のそれぞれ部分としてとりあげた．

罹患筋の再生機能

黒　岩　義五郎
(九州大学医学部脳研神経内科)

DMP の罹患筋の再生現象に関して，今年度発表された研究成果についてのべる．

1．脱神経筋の再生現象：

埜中らはラットで坐骨神経切除後，未分化なタイプ2 C線維の割合の増加を認め，筋線維分化の遅れを指摘した．又筋衛星細胞は，脱神経でも融合しうることを認めた．小口らはマウスの腓腹筋で坐骨神経切除後の光顕ラジオオートグラフィーにて，筋衛星細胞の活性化を認めた．

2．実験的筋再生現象：

高瀬らは，ラットへのサポニン，ブピバカイン筋注，筋損傷実験等で，筋肉漿の細胞流出機序の存在で，筋再生過程が生じうると論じた．又中村らは，筋ジス鶏の再生は cold injury 後の再生実験で，再生筋線維タイプ分化の遅れ，又筋線維径が細いことを述べた．

3．培養実験：

宇尾野らは，筋ジス鶏筋で培養後大量の CPK 遊離を認め，筋細胞分化が特定の時期，条件で異常のあることを示した．又塚越らは，筋ジス鶏胸腺内 myoid cells で筋管細胞の横紋形成，自発収縮，Ach R 局在に異常を認めないが，筋管細胞の空胞が初期より筋ジス鶏で多く認める．

4．移殖実験：

若山らが，DMD 筋，対照筋をヌードマウスに移殖し，DMD 筋で，2週目に再生筋が有意に細い事を報告した．

5．筋衛星細胞のモルフォメトリー：

黒岩らは，DMD，多発性筋炎，対照群の生検筋にて，筋衛星細胞の細胞体及び核の面積，核の長さ，ミトコンドリア数が，対照群と比較して，多発性筋炎で有意に増加しているが，DMD 筋では，増加傾向のみであることを示した．

以上より，筋ジストロフィー症では，少なくとも筋再生能は存在するが，その発達過程に異常のある可能性が示唆された．今後，筋再生の初期の再生現象に関して詳細な検討が必要と考えられる．

筋壊死とプロテアーゼ

杉　田　秀　夫
(国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部)

1) 筋蛋白分解酵素及びその機構

DMDにおける筋蛋白分解にはCANP，カテプシン，セリンプロテアーゼなどのプロテアーゼが段階的に作用するものと想定される．これらのプロテアーゼがどのような関連をもって筋蛋白を分解するのかを実験モデルを用いて検索した．方法としては，plasmocidを直接ラットのヒラメ筋に注射し，筋蛋白の分解過程の時間経過を調べた．注射2～3時間後にDMDにおいて見られるのと同じopaque線維が出現し，又，GBHAで染出された．罹患筋の構造蛋白の変化を経時的に見ると，Z帯に存在するα-アクチニンは注射2時間後すでに40%に低下し，12時間で殆んど消失しその他の構造蛋白に比し著しく速く消失した．このようなZ帯の消失がCANPによるのか，或いはカテプシンによるのかを検索する為，EGTA或いはチオールプロテアーゼ阻害剤であるE-64-cと共に注射すると，罹患筋のα-アクチニンの減少は部分的ではあるが抑制された．

次にリソゾーム酵素であるカテプシンの時間経過を調べてみると，カテプシンB＆L，Dは注射3時間後は上昇せず，従ってα-アクチニンの選択的消失はCANPの作用によることが強く示唆される．

カテプシンB＆L，Dは48時間後には数倍に増加し，3日でピークに達する．この時間経過は筋線維崩壊の経過とよく一致している．各種リソゾーム酵素の中では著明な活性上昇のみられる群(カテプシンB＆L，β-グルクロニダーゼ）と弱い活性上昇しかみられない群（酸フォスファターゼ等）に分けられる．内因性チオールカテプシンインヒビターも著明な活性上昇がみられた．

さてこれらカテプシン系及びそのインヒビターの活性上昇が筋細胞自体のリソゾームに由来するのか，それとも組織に浸潤したマクロファージに由来するのか調べる為にカテプシンB抗体を用い，螢光抗体法で染色してみると活性はマクロファージのみにみられ，筋細胞は染色されなかった．又，ラット腹腔中のマクロファージを集めリソゾーム水解酵素活性と骨格筋の酵素活性とを比較した．筋蛋白の崩壊に伴い著しく上昇する酵素群はインヒビターを除きマクロファージにおいても強い活性を示した．以上の事実はマクロファージのカテプシンが重要な役割を果していることを示唆している．又興味あるのは蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミッドを腹腔内に投与するとカテプシンB＆L活性の上昇はみられず，又組織学的にも浸潤細胞の増加は抑制された．

以上の現象を総括してみるとplasmocidによる筋蛋白の分解は少なくとも2段階に分けられると思われる．即ち第1段階は，plasmocidにより恐らく表面膜が障害され，細胞外Caの流入によりCANPは活性化され限定分解を行いその結果，まずZ帯の消化，α-アクチニンの遊離が起り筋原線維のdisassemblyが生じる．

第2段階は，リソゾームカテプシン群によりdisassemblyされた筋原線維は非限定分解をうけ筋蛋白分解は更に進行する．この際浸潤したマクロファージ由来のカテプシンが重要な働きをすると考えられる．同時に肥満細胞由来のセリンプロテアーゼも関与すると思われる．このような機構は恐らくDMDの場合の筋蛋白分解の場合にもあてはまるものと想定される．

2) 筋ジストロフィー症の発症と活性酸素

筋ジストロフィー症における筋細胞変性を考える上で superoxide radical や peroxide による細胞障害を示唆するデータが特に鶏ジストロフィー（Dy チキン）罹患筋で注目されている．Dy チキン（line413）及びコントロール（line412）の浅胸筋について活性酸素の代謝に関連する superoxide dismutase（Cu-Zn, Mn），catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase の 5 つの酵素を孵化後経過を追って測定してみると，コントロールでは何れも成長と共にほぼ平行して漸減していくが，Dy チキンでは活性の絶対値の増加のみでなく成長に伴う活性の経時変化のパターンも異常であった．しかも未だ形態学的な変化が軽微である生後 1 週目より既に酵素系の上昇がみられ，発症初期に活性酸素系の代謝回転の亢進のあることが考えられる．これらの活性酸素は筋細胞膜を構成する脂質の過酸化を通じ筋細胞の機能障害をおこす可能性があり，本症の成因を追究する一つのアプローチと思われる．

組織対応法による筋構造蛋白の分析

荒　木　淑　郎
（熊本大学医学部第一内科）

【目的】

各種神経筋疾患の生検筋より目的とする筋線維のみを取り出し，生化学的に筋構造蛋白の分析を行う方法は，技術的に困難なこともあって，世界的にも殆んど着手されていなかったが，今回新しい試みとして福原ら，内野らがそれぞれ独自に病的筋線維の筋蛋白の分析を行う方法を開発したので，その分析方法，ならびに実験結果について概説する．

【対象及び方法】

(1)福原ら：対象は rimmed vacuole のみられる distal myopathy（3例）と rimmed vacuole を伴う Kearns-Sayre 症候群類似疾患（1例），ならびに nemaline myopathy（4例）．方法の概略は新鮮凍結生検筋を連続切片で Gomori, ATPase 染色を行い，続く20～30μm 厚さの組織片を－20℃真空吸引下で凍結乾燥し，染色標本との対応のもとに実体顕微鏡下に目的線維を切離した．同一筋線維を連続して，あるいはこれらをあわせて取り出し，マイクロ化した SDS ゲル電気泳動及び O'Farrell らの方法を modify した2次元電気泳動に供し，銀染色を行った．

(2)内野ら：Duchenne 型ジストロフィー症 (DMD)（12例）を対象とし，生検筋を氷冷の弛緩液中にて，実体顕微鏡及び偏光顕微鏡下に，いわゆる opaque fiber を single fiber として分離し，Laemmli の方法により SDS ゲル電気泳動を行った．

【結果】

(1)福原ら：

① Rimmed vacuole を有する筋線維は凍結乾燥切片で，i）暗色にみえるもの，ii）中心が明るいもの，iii）周囲と全く変わりないものの3種類であった．SDS 電気泳動では対照と比較して分子量5.5万の蛋白が増加しており，筋線維によって程度は異なっていた．また，周囲の rimmed vacuole を有しない線維でも同様の傾向が認められた．この蛋白は分子量と等電点から desmin と思われた．

② Nemaline myopathy では rod を認める type I fiber (R(+)I) と，rod を光顕上認めない type II fiber (R(−)II) とに分類して筋構造蛋白の分析を行ったが，正常筋 type I fiber では α-tropomyosin, myosin light chain (LC), troponin-C のそれぞれの slow form に加えて少量の fast form $LC_{2,3}$が認められ，type II でのそれぞれの fast form に slow LC_2が混じる hybrid pattern であった．Nemaline myopathy の R(+) I は正常筋 type I と同様パターンであり，rod 由来の異常スポットは認めなかった．R(−) II では2/4例で，LC_2の slow・fast form の量比が逆転していた．また，両タイプとも分子量5.5万の desmin と思われる band が増強していた．

(2)内野ら：Opaque fiber (OF) 9検体，正常横紋構造を有する対照筋線維 (NF) 19検体について比較検討したが，形態学的に OF としてとらえられる筋線維の約70%は NF と比較して筋構造蛋白の泳動パターン及び各筋構造蛋白の含有量に変化がなかったが，約30%の OF は myosin light chain をはじめ，actin を除く低分子蛋白の全般的な減少傾向が認められた．ただ，troponin-I・C は NF でも含有量が極めて微量であり，その増減について言及することは困難であった．

【考案ならびに結論】

(1)福原ら：Rimmed vacuole を有する筋線維で desmin の増加傾向が強いことは，vacuole 生成に関与している可能性を示唆するものである．Desmin が微細構造上のいずれに対応するか検索中であり，desmin 増加機序については今後検索が必要である．また nemaline myopathy では筋組織化学的所見から type I の分化過程での異常を想定したが，筋構造蛋白上は正常と差がなく，rod 由来の異常スポットも認められなかった．本症では type II の分布比が減少している例が多いが，今回 type II の LC に異常を認めたことは発生のより早期の障害が疑われ，type I 変化が type II 異常に伴う 2 次的なものである可能性も考えられる．

(2)内野ら：DMD の生検筋にみられる OF の一部は明らかに筋構造蛋白の変化を有しており，しかも泳動パターンの特徴から，その変化に CANP に代表されるある種の protease が関与していることが推定された．このことから OF は筋線維変性過程で生じる病的筋線維である可能性があり，今後 2 次元電気泳動による微量成分の解析も含めて更に検討する予定である．

いわゆる distal myopathies
1） 問 題 点

豊 倉 康 夫
（東京大学医学部脳研神経内科）

いわゆる distal myopathy は Gowers（1902）の提唱に始まる長い歴史にもかかわらず，未だに統一的な疾患分類上の位置の定まらない一群の筋疾患である．唯一の共通点は，四肢遠位部を主として侵すミオパチーで，既知の神経原性筋萎縮症や，筋緊張性ジストロフィー，多発性筋炎を除くということに過ぎない．したがって単一疾患単位としての distal myopathy はもはや存在せず，疾患群としての“distal myopathies”が問題である．発症年齢，遺伝型または孤発型，初発部位，筋萎縮の分布，進行の程度，筋病理所見には，これまでの報告例の中でも様々な異同があり，多くの論議がなされてきた．

これらのいわゆる distal myopathies の中で，本研究班ではとくに以下の問題が検討された．

1） 常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー（autosomal recessive distal muscular dystrophy）：三好（1974）によって提唱されたもので，他の臨床型と明らかに区別される筋ジストロフィーの一疾患単位として確立された．剖検例の検索により，特徴的な筋病変の分布様式が確認された．本症の臨床特徴は①常染色体劣性遺伝，②筋萎縮は下腿に始まり，もっとも強く，早期に爪先立ちができなくなる，③10歳後半～20歳台に発症，④進行性で，筋萎縮は下腿から大腿にも及ぶが上肢では軽い，⑤血清 CK 値が中等度～高度に上昇，⑥血清 CK 値が著しい上昇を示すホモ因子型のものと，軽度上昇を示すヘテロ因子型の 2 種類の生化学的保因者がある，⑦筋病変はジストロフィー変化で，vacuole はほとんど認めない．これらの特徴は，Welander 型の常染色体優性遺伝を示す晩発性遺伝性 distal myopathy のそれとは明らかに異なる．

2） 顕著な rimmed vacuoles あるいは封入体を伴う distal myopathies：これらの症例の中には，共通の臨床特徴を有するいくつかの疾患群があると思われる．ただし，この病理変化そのものには疾患特異性はないが，ライソゾーム系のなんらかの異常が示唆される．

3） 封入体筋炎，oculopharyngeal dystrophy，oculopharyngodistal myopathy，debrancher deficiency myopathy，等との関係も注目されている．

Rimmed vacuole と封入体の特異性

佐　藤　　猛
(順天堂大学医学部脳神経内科)

いわゆる distal myopathy の筋病変の特徴として rimmed vacuole が注目されてから，その特異性や疾患概念について本研究班でいくつかの報告がなされた．さらに rimmed vacuole 型 distal myopathy の罹患筋の筋鞘核内に微小細管状ないしフィラメント状封入体が見出されたため（葛原，1981；藤井，1982)，本疾患群と封入体筋炎との異同についても再検討された．

新しく提起された問題点を中心に本研究班の業績を総括して報告する．

1. Rimmed vacuole

Dubowitz & Brooke (1973) が oculopharyngeal dystrophy の筋病理における特徴的変化として rimmed vacuole を記載した．萎縮筋線維の中央ないし筋鞘下に比較的大きな空胞が認められ，縦断像でみると筋線維の全長に亘っていることが多い．空胞の辺縁には小顆粒が集積しており，trichrome 染色では赤染，H. E.では塩基性で，acid phosphatase 陽性である．Rimmed vacuole の形成にもかかわらず周辺の筋原線維の構造は比較的よく保たれている．電顕では自家融解空胞と無数の myoid body (multimembranous body, myelin-like figure) より成る．グリコーゲン顆粒の集積や粗大顆粒なども含まれている．かかる筋線維では同時に結晶状ミトコンドリア，小胞体や T-tube の蜂窩状変性，tubulomembranous structure, cylindrical laminated body なども認められ易い（福原，中西・葛原，埜中，佐藤・安野)．

Rimmed vacuole は疾患特異性はなく，すでに Pompe 病や封入体筋炎で autophagic vacuole (Engel, 1968；佐藤，1971)，lined vacuole (Carpenter, 1978) として記載されているものと同一構造である．しかし，三好型以外の distal myopathy, oculopharyngeal dystrophy, 封入体筋炎に高率に出現し，debrancher deficiency myopathy (納，1981)，quadriceps myopathy (佐藤・安野，1981) にも比較的多く認められている．その他の疾患では多発性筋炎，myotonic dystrophy, Kugelberg-Welander 病，DMP (L-G, FSH)，SPM などにも少数は見出されている (福原，1980；田辺，1982)．

2. 筋鞘核内封入体

慢性多発性筋炎の罹患筋の筋鞘核内に微小細管状の封入体が見出され，はじめ myxovirus 様構造として報告された (Chou, 1967；佐藤，1969)．その後の検討で既知の paramyxovirus とは大きさ，配列などが若干異なること，筋炎以外のミオパチーにも見出されることなどから，核内の特殊な変性産物と推定されている．しかし，封入体筋炎からのウイルス分離例も報告されており (Gamboa, 1969；Mikol, 1982)，封入体の本態はなお不明である．また封入体筋炎として報告された文献を再検討すると前述の rimmed vacuole 型 distal myopathy, quadriceps myopathy, debrancher deficiency などが含まれている可能性が指摘されている．また封入体には 2 種類あることが明らかにされた．

①微小細管状構造：外径130～180 Åであり，横断像では halo が認められる．核がかかる封入体で充満しているものでは核膜の重積像や断裂がみられ，断裂部を通じ，筋形質内へも流出しているような像がみられることもある．このような封入体は rimmed vacuole 型の変性筋線維に見出され易

い．②フィラメント状封入体：直径60Åの繊細な直線状フィラメントが核内に束状に認められる．典型的な急性多発性筋炎や皮膚筋炎に高率に見出される．動物の実験的筋炎にもみられ，非特異的と考えられる（表）．

3. Distal myopathy の筋病理の問題点

① Angulated fiber が群化傾向を示す．② Type 1 fiber predominancy を示す症例がある．③ rimmed vacuole 型変性の特異性．④核内封入体の意義．⑤筋電図にて denervated pattern が認められるのに筋肉内末梢神経の形態変化は軽微である．

	Microtubular (130-180A)	Filamentous (60A)	
	No. of cases		
Inclusion myositis	11		11
Neuromyopathy	4		4
Distal myopathy	4		4
Quadriceps myopathy	3		3
Oculopharyngeal dystrophy	8		8
Polymyositis: chronic	6		6
acute, subacute		9	9
Dermatomyositis: chronic	2		2
acute, subacute		2	2
Others			
Carrier of Duchenne	1		1
Debrancher deficiency	1		1
	40	11	51

Distal myopathy と debrancher enzyme

納　光　弘
(鹿児島大学医学部第三内科)

Debrancher enzyme の deficiency の認められる myopathy すなわち debrancher deficiency myopathy (DDM) の成人例は Brunberg ら (1971) の報告以来すでに10余例を数えるが，発症年齢も幼児～52歳と多様で，筋萎縮の分布も遠位優位～近位優位とまちまちである．我々が報告した DDM の 4 例[1~4] も 1 例は近位優位，他の 3 例は遠位優位で，この後者の 3 例は筋病理の主体が rimmed vacuole を有すること，かつ筋線維核内外に約20nm の異常フィラメント集塊を有すること，かつ炎症細胞浸潤を認める部位も存在することにより，病理的には inclusion body myositis (IBM) とよびうるものであり，臨床病理的にはいわゆる "rimmed vacuole を伴う distal myopathy (DMRV)" に該当する症例といえる[2,3]．しかし，IBM や DMRV の全てが DDM であるかは疑問で，実際我々も debrancher が正常の IBM をも経験している．しかし，IBM や DMRV の表現型をとる症例の中に DDM が少なくとも存在していることは診断上，また今後の治療への検索上重要と考える．我々の指摘により，現在幾つかの施設で IBM または DMRV の debrancher の検討がなされつつあり，それらのどれぐらいに DDM が混じているかは今後明らかになると期待される．

本年度班会議で埜中班員により，DMRV で同一症例における 2 個所の生検筋における測定で，障害の強い部位では debrancher 活性が 1 /10以下であったが，障害の殆んどない部位では正常活性を示したこと，かつまた，DMRV で debrancher 活性正常例をみたことが追加発言され[6]，このことも今後 DMRV または，IBM の DDM との関連を考えていく上で重要と考える．

〔関連文献〕

(1) Osame, M., et al.: Familiar muscle type amylo-1, 6-glucosidase deficiency, 4th International Congress on Neuromuscular Diseases, Sept. 1978, in Montreal, Abstract 207
(2) 納　光弘，他：Debrancher Deficiency Myopathy——Inclusion Body Myositis との関連—. 第23回日本神経学会総会抄録 IIIC-14 (258) (1982年 5 月東京)
(3) Osame, M., et al.: Is "Inclusion Body Myositis" "Debrancher Deficiency Myopathy"?——The relationship between "Debrancher Deficiency Myopathy" and "Inclusion Body Myositis"——. 5th International Congress on Neuromuscular Diseases, Sept. 1982, in Marseilles, Abstract WE 63
(4) 納　光弘，他：Inclusion Body Myositis の筋病理を呈した Debrancher Deficiency Myopathy の同胞例．代謝19巻10号：1321，1982
(5) 納　光弘，他：Debrancher Deficiency Myopathy——inclusion body myositis あるいは rimmed vacuole を伴った distal myopathy との関連——．昭和57年度三好班，演題番号35
(6) 埜中：(5)への追加

分 担 研 究 報 告

目　　次

Ⅰ．実験動物

1）筋線維の発育分化に対する神経の関与……35
国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部　埜　中　征　哉

2）筋ジストロフィーチキン骨格筋の修復能……40
鳥取大学医学部脳研神経病理　中　村　晴　臣

3）神経切断による筋衛星細胞の活性化について
——光顕ラジオオートグラフィーによる検討——……44
信州大学医学部第三内科　小　口　喜三夫

4）実験的再生筋に関する研究……48
東北大学医学部脳研脳神経内科　高　瀬　貞　夫

5）筋萎縮の発現機序に関する研究
1）ステロイド萎縮筋(2)……53
東邦大学医学部第四内科　木　下　真　男

6）不動化による実験的筋萎縮の病態……57
国立武蔵療養所神経センター　高　木　昭　夫

7）胸腺腫自然発症ラット（Buffalo／Mna rat）の下腿筋における
組織化学的検討……61
名古屋大学医学部第一内科　飯　田　光　男

8）正常及び筋ジストロフィー鶏胸腺内 myoid cells の形態学的検討……68
東京医科歯科大学医学部神経内科　塚　越　　廣

9）ジストロフィー鶏・培養筋細胞からの CPK の遊離……75
都立神経病院神経内科　宇尾野　公　義

10）ジストロフィー鶏発育早期における superoxide dismutase,
catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase 活性
の異常について……78
自治医科大学神経内科　水　野　美　邦

11）Dystrophy mouse 及び dystrophy hamster 組織中の
Enkephalin 様免疫活性……83
京都大学医学部第二内科　井　村　裕　夫

II. 筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病理

12) 筋萎縮性疾患の遺伝分析
——Duchenne 型ジストロフィー症について—— …… 89
杏林大学保健学部疫学　古　庄　敏　行

13) Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝補遺
——突然変異率と親の年齢…… 92
東京都神経科学総合研究所臨床神経学研究部　近藤　喜代太郎

14) Emery-Dreifuss muscular dystrophy の一例…… 97
熊本大学医学部第一内科　荒　木　淑　郎

15) 筋緊張性ジストロフィー症における脳 CT・脳波・WAIS
を中心とした臨床的研究……103
虎の門病院神経内科　田　辺　　等

16) Rigid spine syndrome の臨床型について ……107
九州大学医学部脳研神経内科　黒　岩　義五郎

17) 軽度かつ持続的な運動により筋硬直を呈する家族性ミオパチー……109
浜松医科大学第一内科　西　村　嘉　郎

18) 骨格筋の組織病理学的研究
——特に肥大線維，中心核，Fiber splitting について——……114
大阪医科大学第一内科　茂　在　敏　司

19) Duchenne ジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験
——再生筋直径の定量的検討——……118
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

20) 各種神経筋疾患における satellite cell の検討 ……124
九州大学医学部脳研神経内科　黒　岩　義五郎

21) Carbonic anhydrase III (CA III) の人骨格筋における
局在について……126
北海道大学医学部脳神経外科　田　代　邦　雄

22) 生検筋の primary culture の確立とその応用について ……132
神戸市立中央市民病院小児科　吉　岡　三恵子

23) 糖脂質の神経筋培養に与える影響……135
国立療養所宇多野病院臨床研究部　斎　田　孝　彦

III. 筋ジストロフィー症の病態生理

24) Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球の
polyphosphoinositide の同定 ……141
国立武蔵療養所神経センター　吉　田　瑞　子

25) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の赤血球カルシウム含量 ……144
信州大学医学部第三内科　庄　司　進　一

26) Myotonic dystrophy における赤血球膜脂質構成 ……149
国立赤坂療養所神経内科　馬　渡　志　郎

27) Duchenne 型筋ジストロフィーの筋小胞体機能：
スキンドファイバー法による再検討……153
国立武蔵療養所神経センター　高　木　昭　夫

28) 筋ジストロフィー症及びその他の神経筋疾患におけるM波の研究……158
宮崎医科大学第三内科　栗　原　照　幸

29) A23187-induced myopathy におけるカルモデュリン・プロスタグランジンの役割に関する生理学的検討……164
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

30) 筋病変とミオグロビンの局在
——酵素抗体法（PAP 法）による観察—— ……171
熊本大学保健管理センター　出　田　　透

31) 血清ミオグロビンの変動パターンからみた筋・心筋疾患
ならびに運動時の筋崩壊量の推定……174
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

32) 筋におけるクレアチン代謝
筋ホモジュネートによる 1-^{14}C 標識クレアチンからの
1-^{14}C 標識サルコシンの産生 ……179
冲中記念成人病研究所　三　好　和　夫

33) 筋肉酵素の漏出について……184
愛媛大学保健管理センター　植　田　啓　嗣

34) Duchenne 型ジストロフィー症の線維芽細胞および
白血球の生化学的研究……188
国立赤坂療養所神経内科　馬　渡　志　郎

35) 神経筋疾患における白血球 proteolytic enzymes の検討 ……192
九州大学医学部脳研神経内科　後　藤　幾　生

36) 筋タンパクの崩壊とリソゾームチオール性プロテアーゼ……195
徳島大学医学部酵素研酵素化学　木　南　英　紀

37) Plasmocid による実験的ミ·オパチーの筋蛋白分解機構
——筋ジストロフィー症との関連——……198
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部　杉　田　秀　夫

38) Duchenne 型筋ジストロフィー症にみられる opaque fiber の
筋構造蛋白に関する研究……202
熊本大学医学部第一内科　荒　木　淑　郎

39) 筋糖原病の病態分析
——新しいスクリーニング指標物質について……206
大阪大学医学部第二内科　垂　井　清一郎

40) 多発性筋炎における抗ミオシン抗体の診断的意義について……210
大阪大学医学部第二内科　垂　井　清一郎

41) 核磁気共鳴による筋ジストロフィー症の研究
(1)筋の発育に伴う proton 緩和時間ならびにナトリウム量の変化……214
新潟大学脳研究所神経内科　宮　武　　正

42) 組織対応法による nemaline myopathy の生化学的研究……219
新潟大学脳研究所神経内科　福　原　信　義

IV. いわゆる distal myopathy

43) 筋線維束からみた rimmed vacuole を伴う distal myopathy
の筋病変……225
東京大学医学部脳研神経内科　豊　倉　康　夫

44) 筋病変における rimmed vacuole ないしはその類似所見について　…231
虎の門病院神経内科　田　辺　　等

45) Filamentous inclusion, Tubulomembranous inclusion と
Rimmed vacuolar degeneration について……237
筑波大学臨床医学系神経内科　中　西　孝　雄

46) Autosomal recessive distal muscular dystrophy（常染色体劣性
末梢型筋ジストロフィー症）の特徴と文献的考察（附）1剖検例……242
冲中記念成人病研究所　三　好　和　夫

47) 特別発言：常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症（三好）の1剖検例·248
徳島大学医学部第一病理　檜　澤　一　夫

48) Debrancher Deficiency Myopathy ——inclusion body myositis
あるいは rimmed vacuole を伴った distal myopathy との関連—— ・255
鹿児島大学医学部第三内科　納　光　弘

49) Distal および Quadriceps myopathy における筋電図ならびに
末梢神経の電子顕微鏡所見……259
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　猛

50) いわゆる「封入体筋炎」における筋鞘核内封入体の特異性……264
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　猛

51) Rimmed vacuole を有する筋線維の電気泳動的研究 ……269
新潟大学脳研究所神経内科　福　原　信　義

I. 実 験 動 物

1）筋線維の発育分化に対する神経の関与

埜　中　征　哉

研究協力者　　岡　田　理　美*

骨格筋は大きく赤筋と白筋に分けられる．ATPase染色により赤筋はタイプ1線維，白筋はタイプ2線維とよばれている．タイプ2線維はさらにタイプ2Aと2B線維に分けられる．ヒト正常成人骨格筋ではこのタイプ1，2A，2Bの3種類の筋線維がほぼ1/3ずつモザイク状に分布する[1]．この3種の筋線維タイプの決定は，筋線維を支配する神経によって左右される[2]．神経支配を受ける以前，すなわち胎児筋は未分化で生化学的にも組織化学的にも白筋，赤筋の区別なく両者の中間的特徴を示す．このような未分化な線維はタイプ2C線維とよばれている．すなわち未分化なタイプ2C線維がタイプ1運動神経に支配されると，次第に分化し，生理学的，生化学的，組織学的にタイプ1線維の特徴を備えるようになる．同じことが，タイプ2A，2B線維にもいえる．もし筋線維がタイプ2C反応を示す未分化な時，神経支配を遮断したら筋線維ははたしてどのような態度をとるのかそれをみるため本実験を行った．

対象・方法

1．新生児期脱神経筋の組織化学的検索

Sprague-Dawley系ラットを使用した．生後24時間以内の新生児ラットの右坐骨神経を約5mmの長さ切除し，切除後10，15，20，30日目に各5匹ずつ（計20匹）について，赤筋であるヒラメ筋，白筋である長指伸筋をとり出し，凍結固定した．凍結切片にhematoxylin and eosin（HE）はじめ各種の組織化学的染色を行った．筋線維をアルカリ前処理ATPase（routine ATPase）染色で活性なく淡染するタイプ1線維と，活性あって濃染するタイプ2線維に分け，さらに酸性側前処理ATPase染色でタイプ2線維をタイプ2A，2B，2C線維に分けた．4種の筋線維の頻度と分布をしらべ，線維径を測定した．

2．筋衛星細胞の頻度

上の組織化学的検索と同じく，生後24時間以内に右坐骨神経の切除を行い，術後5，10，15，20，30日目に各々5匹ずつ計25匹から，右側ヒラメ筋と長指伸筋をとり出し，グルタール液固定後，オスミウム酸にて後固定した．電子顕微鏡写真より，各個体から（今回はヒラメ筋のみ）約500本の筋線維の筋核，筋衛星細胞，筋衛星細胞核数を数えた．左側の筋を正常対照として使用した．

3．pmaマウス[5]の萎縮筋

pmaマウスで総腓骨神経の完全欠如例から前脛骨筋，長指伸筋をとり出し，各種組織化学的染色を行いその分化の状態をみた．

結　　果

1．新生児期のラットの骨格筋は未分化で全てタイプ2C線維であったが，脱神経を行わない正常筋は生後3～5日目よりタイプ1線維が出現しはじめ，以後急速に分化していった[3]．

新生児期に神経切除すると筋線維の分化は著明に遅延した（図1）．脱神経をうけたヒラメ筋は（表1）生後10日目でも全て未分化なタイプ2C線維であり，以後ゆっくりと分化するがタイプ2B線維までで，タイプ1や2A線維には分化しなかった．線維径も細く正常対照と比べて生後30日目では1/3以下であった．脱神経した長指伸筋（表2）もヒラメ筋と同じく，タイプ2B線維へは分化したが，タイプ1，2A線維には分化しなかった．

* 国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部

表1　新生児期脱神経筋の筋線維タイプ分布と筋線維径（ヒラメ筋）

日齢	筋線維タイプ分布（%）				筋　線　維　径±S.D.（μ）			
	1	2A	2B	2C	1	2A	2B	2C
10	(50.4)			100.0 (49.6)	(9.4±2.3)			7.0±2.5 (7.3±2.6)
15	(55.9)		16.0 (0.4)	84.0 (43.7)	(14.3±3.6)		10.2±2.1 (13.0±2.2)	9.4±4.5 (12.0±2.4)
20	(58.3)	(10.8)	28.4 (15.4)	71.6 (15.6)	(18.8±3.2)	(18.7±3.0)	7.6±1.9 (16.1±1.9)	9.2±5.3 (15.6±4.5)
30	(70.1)	(19.4)	46.2	53.8 (10.5)	(21.1±5.0)	(18.1±4.8)	6.9±2.3	5.7±4.5 (19.3±4.8)

（　）内は正常対照

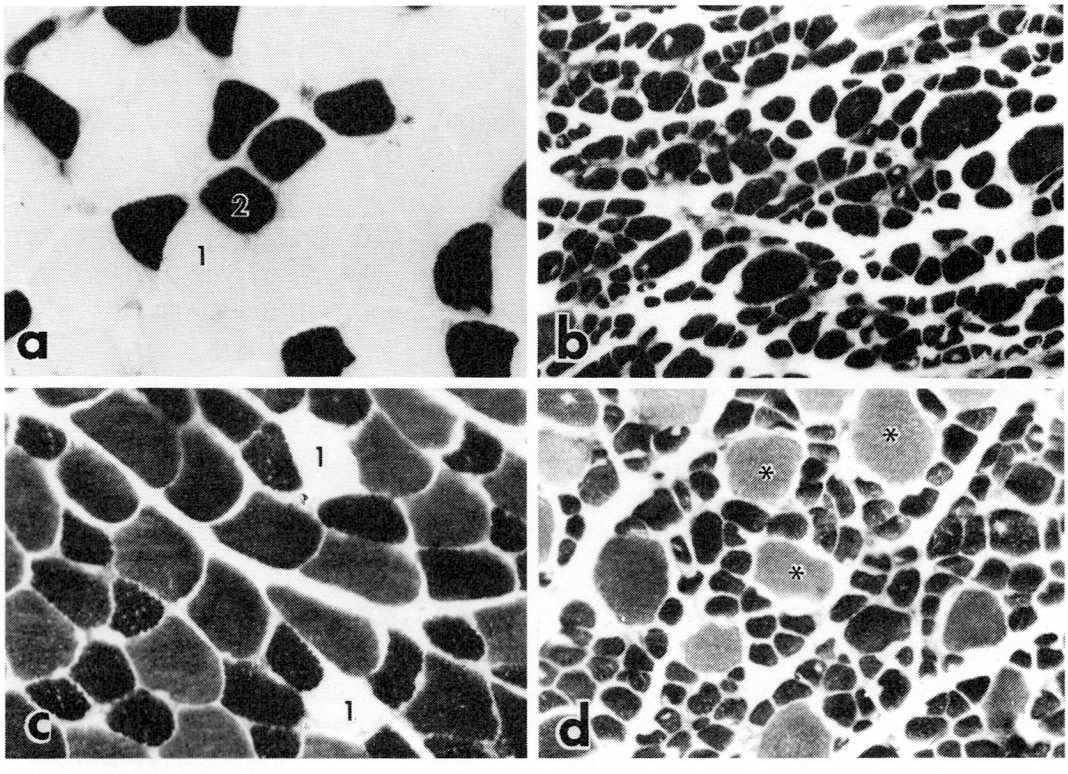


図1　生後30日目ラットのヒラメ筋（a，b）と長指伸筋（c，d）の routine ATPase 染色.
新生児期に脱神経をうけたヒラメ筋（b）も，長指伸筋（d）も対照（a，c）に比べ細く，ほとんど全てタイプ2線維である．脱神経長指伸筋（d）には肥大線維（星印）あり，タイプ1(1)と2(2)線維の中間的反応を示す．
a－d：×350

表2　新生児期脱神経筋の筋線維タイプ分布と筋線維径（長指伸筋）

日齢	筋線維タイプ分布（%）				筋線維径±S.D.（μ）			
	1	2A	2B	2C	1	2A	2B	2C
10	(7.4)		22.8 (46.4)	77.2 (46.3)	(10.9±2.8)		12.7±3.5 (9.5±1.8)	8.8±2.7 (6.3±1.5)
15	(7.7)	(64.4)	66.7	33.3 (27.9)	(14.4±2.3)	(12.8±3.6)	10.5±4.5	11.0±3.2 (9.3±2.6)
20	(7.4)	(20.5)	86.1 (70.3)	13.9 (1.7)	(16.1±2.3)	(12.5±1.8)	7.5±3.1 (15.4±2.9)	11.5±6.1 (10.8±1.7)
30	(6.3)	(19.1)	86.1 (72.5)	13.9 (2.1)	(18.6±4.0)	(15.2±6.0)	7.0±3.4 (17.8±3.7)	12.2±10.7 (12.8±2.3)

（　）内は正常対照

ヒラメ筋と異なり，少数の肥大線維の存在をみたが，これらは routine ATPase でやや淡染し，タイプ1線維に近いタイプ2C反応を示した．

2．筋衛星細胞は新生児ラットでは非常に多い．ヒラメ筋では衛星細胞核は全核（筋核＋衛星細胞核）の約30%であったが，年齢とともに減少し，生後1月には15%程度であった．脱神経筋でも，衛星細胞の頻度には差はなかった(図2)．形態学的には脱神経筋の衛星細胞の方がやや大型で円形に近かった．

3．pma マウスの萎縮筋は対照の1/10以下と細く，結合織の増加のためか白く，弾力性に乏しかった．切片でみると筋線維は10μ 径以下であり，結合織や脂肪織が著明に増加していた．また胞体の

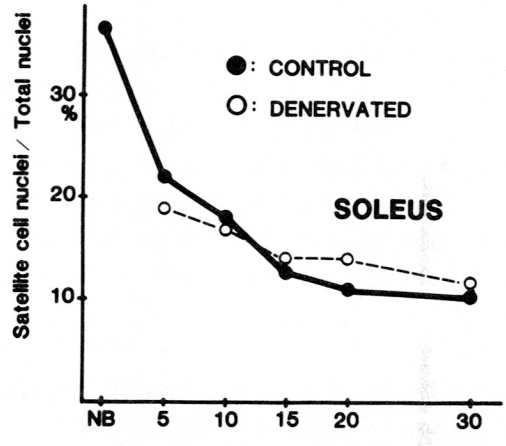
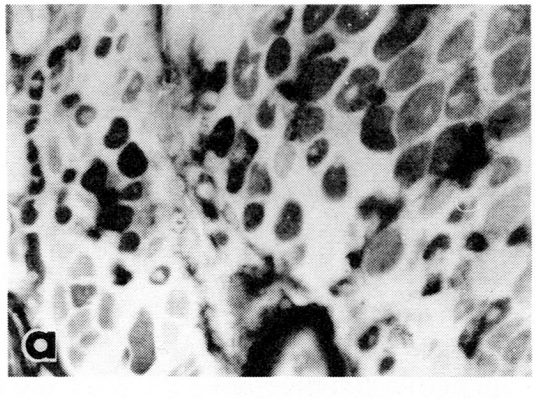


図2　新生児期脱神経筋（ヒラメ筋）の筋衛星細胞の頻度．



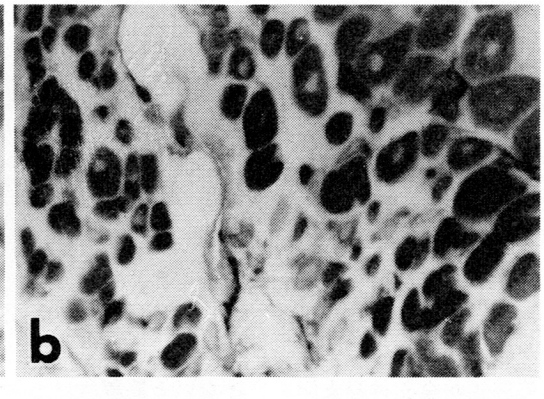


図3　生後60日目 pma マウスの前脛骨筋．
筋線維は細く routine ATPase 染色（a）でも，pH4.6 前処理 ATPase 染色（b）でも活性あり，タイプ2C反応を示す．中心部に核のある線維が多く，その線維では中央部に活性がない．a，b：×350

中心に核のある線維が多かった．ほとんどの小径筋線維はATPase染色で未分化なタイプ2C反応を示した(図3)．電子顕微鏡的には筋線維は細く，中心にしばしば核をもっていた．myofibrilの形成はあったが帯構造の形成はまだ十分でなかった．筋衛星細胞の増加はなかった．

考　　察

ヒトやラットの骨格筋はATPase染色でみると未分化なタイプ2C線維からタイプ1線維へ，あるいはタイプ2B線維を経てタイプ2A線維へと分化する．すなわちタイプ1あるいは2A線維が最も分化した形である．タイプ2B線維は2A線維へと分化するが，正常成人には約1/3，また成熟ラットにも多く存在しているので，この線維は未分化な線維とはいえない．ヒラメ筋では長指伸筋より分化は遅く生後1月をすぎても多くのタイプ2C線維が存在する．これは多分タイプ2A線維が脱分化してタイプ2C線維へとなり，さらにタイプ1線維へと変換する時のタイプ2C線維が主であって，胎生期から存続したものとは限らない．

このような筋線維の分化には神経因子が必要である．ラットの骨格筋は生下時にまだ未分化で全てタイプ2C線維であり，多くの筋管細胞が存在する[3]．この時期に脱神経を行うとタイプ2C反応が長く続くが緩徐にタイプ2B線維へと分化する．しかしタイプ1あるいはタイプ2A線維へとは分化しない．ラット骨格筋は生下時に未分化ではあるが，神経支配をすでに受けているのでタイプ2B線維までは分化すると思われる．脱神経を行った長指伸筋にはやや肥大した線維が存在し，これはroutine ATPaseでやや淡染しタイプ1線維的であるが，染色性からはやはりタイプ2C線維に属し，ゲル電気泳動でも赤筋と白筋の両者のmyosin light chainの分布を示し未分化であることが証明されている[4]．

筋線維が全く神経支配をうけないと筋線維はどのようになるのか知るため，pma (peroneal muscular atrophy) マウスの骨格筋を検索した．このpmaマウスは遺伝性疾患で総腓骨神経の先天的欠如により，その支配下の筋（前脛骨筋，長指伸筋）などが極めて細く未発達のまま残る動物である[5]．総腓骨神経は肉眼的にも欠如していて，神経筋接合部に存在するアセチルコリンエステラーゼ活性が認められない．坐骨神経では有髄神経の数も正常で逆行性の病変もみられないことから，総腓骨神経へ分岐する時の異常で，総腓骨神経はおそらく腓腹神経など他の神経へと誤って走りこんでいると考えられている．このように骨格筋が一度も神経支配をうけないでいる時は，筋線維は未熟でほとんどの筋線維は生後1月でも2月でもタイプ2C線維のまま存続する．

以上のような実験結果からみて，Werdnig-Hoffmann病にみられる多くのタイプ2C線維は多分筋がまだ未分化である時に脱神経をうけた結果であろうと考えられる[6]．しかし大半の筋線維はタイプ2Bあるいはタイプ1線維へと分化するので，萎縮筋線維は一度は神経の支配をうけ，早期に脱神経をうけたものと考えられる．先天性非進行性ミオパチー（ネマリンミオパチーなど）にも，その若年者には多くのタイプ2C線維がみられることは，脱神経のような古典的な意味での神経原性要因が存在しなくても何らかの神経因子の関与を推定させる材料である．

Werdnig-Hoffmann病罹患筋には多くの筋衛星細胞が存在するとの報告がある[7]．胎児の筋など幼若な筋にはこの細胞が多く存在することはよく知られている．また筋衛星細胞は筋芽細胞とほぼ同じ意味をもつ．本細胞がWerdnig-Hoffmann病のような神経原性萎縮筋で多いとなると，筋の発育期に筋芽細胞が融合し筋の成熟に協力するためには何らかの神経因子の関与が必要ということになる．そこで脱神経筋で筋衛星細胞の頻度を経時的に追求してみた．今回の実験結果からは，筋衛星細胞の数は正常対照筋と変らず減少した．Werdnig-Hoffmann病や先天性ミオパチーの重症例に高頻度にみられる筋衛星細胞の存在は神経因子以外の別の要因が加味している可能性を考えねばならない．

ま と め

筋線維の発育分化には神経因子の関与が必要であり，筋線維が未分化な時脱神経をうけるとATPase染色で未分化なタイプ2C反応を長く続け，赤筋でも白筋でもタイプ2B線維までは分化するが，タイプ1，2A線維へとは分化し難いことが分った．もし筋線維が一度も神経支配をうけないとタイプ2C線維の状態がより長期に持続した．筋衛星細胞が筋の成熟に協力するためには神経因子の関与は必要でないように思われた．

文 献

1) Brooke, M. H. & Kaiser, K. K.：Muscle fiber types：How many and what kind？Arch. Neurol., 23：369, 1970.

2) Brooke, M. H., Williamson, E. & Kaiser, K. K.：The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle. Arch. Neurol., 25：360, 1971.

3) 岡田理美，埜中征哉，石浦章一，ほか：ラット筋線維の発育・分化に関する組織化学的研究．神経内科，15：363，1981.

4) Ishiura, S., Nonaka, I., Sugita, H., et al.：Effect of denervation of neonatal rat sciatic nerve on the differentiation of myosin in a single muscle fiber. Exp. Neurol., 73：487, 1981.

5) 江崎孝三郎，安田幸雄，中村昌広，ほか：遺伝性前・外側下腿筋萎縮マウス．実験動物，30：151，1981.

6) 埜中征哉，Chou, S. M.：Werdnig-Hoffmann病罹患筋の組織化学的検討——実験動物との対比を中心として——．臨床神経，18：491，1978.

7) van Haelst, U.：An electron microscopic study of muscle in Werdnig-Hoffmann disease. Virchows Arch. A. Pathol. Anat., 351：291, 1970.

2) 筋ジストロフィーチキン骨格筋の修復能

中 村 晴 臣*

研究協力者　金 藤 大 三*　高 田 邦 安*　田 中 順 一*

目　的

発育期の筋ジストロフィーチキン（Dy チキン）骨格筋には，筋線維の変性に伴って筋線維の再生が認められるほか，筋線維の分化が遅延している事実がみられる（Yorita, et al, 1980[1]；Nonaka, et al, 1982[2]）．しかしながら，再生された幼弱筋線維が，如何なる経過をへて成熟し，あるいは変性していくのかは，いまだ充分には判明していない．前年度は筋線維の再生能を検討する目的で，受傷後の筋線維変化を経時的に追究し，受傷後1週以内の Dy チキンに，対照と同様の筋再生像を認めた（中村ほか，1982[3]）．本研究においては，受傷1週以後の再生線維の変化を，電顕並びに組織化学的に検討することを目的とする．

方　法

ふ化後3週目の Dy チキンと対照チキン夫々24羽を用い，両側の後広背筋（PLD）を露出し，その筋腹に，ドライアイス-アセトンにて冷却した幅1 mm の金属板を2分間圧着して cold injury を加え，術後1週目より5週目に亘り，経時的に3羽ずつの PLD を摘出した．以下の検索は，受傷中央部の筋腹横断面について行った．

片側 PLD は，10μ クリオスタット切片に H-E, trichrome, PAS, NADH-TR, ATPase 染色を施した．対側 PLD は，0.1Mカコジール酸緩衝液加 0.5% glutaraldehyde (pH7.3) で固定後，lantanum 染色 (Revel-Karnovsky 法) を施し，超薄切片に酢酸ウラン・鉛塩の重染色を加え，電顕的検索に供した．筋線維の数及び直径の測定にあたっては，NADH-TR および PAS 染色標本から at random に250倍写真を作製し，各動物当り500本の筋線維について，画像解析装置（Summagraphics 社）を用いて計測した．

結　果

受傷後1週目の傷害中央部には，壊死組織はみられず，幼若筋線維，筋芽細胞および myotube が多数集合してみられ，それらは核小体の明瞭な明るい核をもった衛星細胞(activated satellite cell)を伴っている(図1)．これらの所見は，対照と比較して明らかな差異をみない．

受傷後2週以後も幼若筋線維，小径線維が多数みられた．これらの筋線維には，明白な変性像を認められなかった．傷害中央部には，強い fibrosis もみられなかった．

再生筋を組織化学的に検索すると，受傷後1週目では，Dy チキン，対照チキン共に，すべて αR 線維から成り立っている．これら再生筋の直径は Dy チキン18.1±8.5μ，対照22.7±6.4μ で，両者間に有意の差はみられない．また，筋線維直径の histogram においても，Dy チキン，対照の間に明らかな差はみられなかった（図2）．

再生筋の分化の状態を知るため，αW 線維の出現率をみると(図3)，対照チキンでは急速に αW 線維が出現し，受傷2週目では68%を占め，3週および5週目では夫々，82.8%，83.2%にみられた．これに反し，Dy チキンにおいては，受傷後2週目でも再生筋はすべて αR 線維で占められ，3週目で初めて αW 線維が35.7%に認められたが，5週目でも42.2%に過ぎず，過半数の再生筋は αR 線維で占められていた（図4）．

* 鳥取大学医学部脳研究施設神経病理

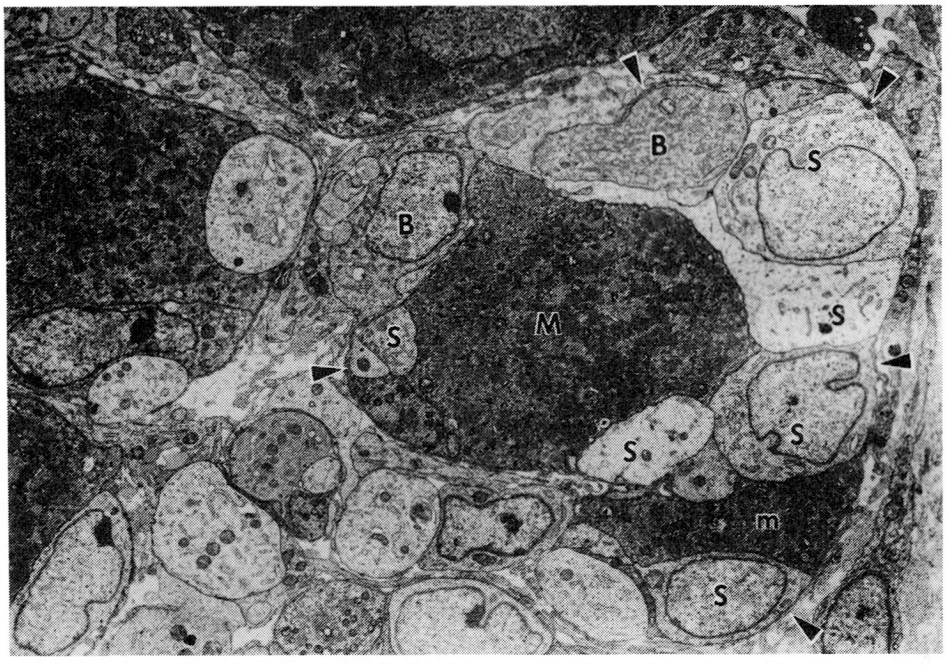


図1　受傷後1週目のDyチキンPLD．幼若筋線維(M)の周囲にactivated satellite cell(S)，myoblast(B)，幼若小径筋線維(m)などが付随している．矢頭印：基底膜．×3,600.

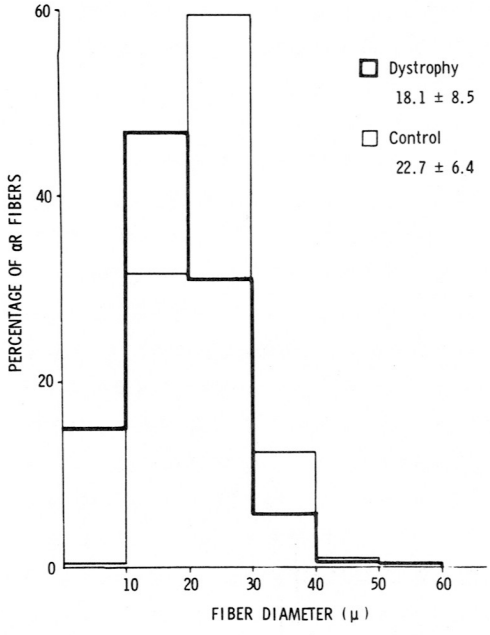


図2　受傷後1週目の再生筋線維（α R線維）のhistogram.

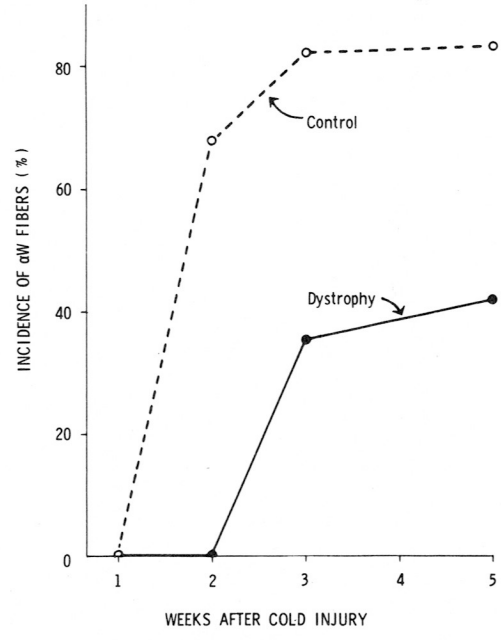


図3　再生筋におけるα W線維出現率の推移.

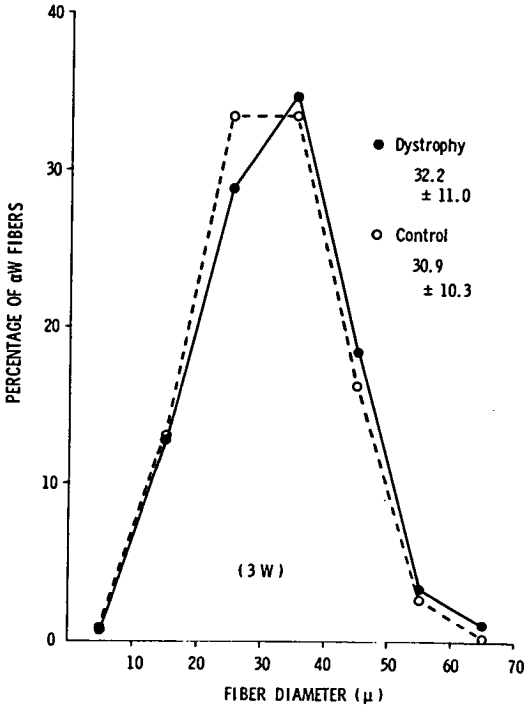


図4　受傷後3週目の α W線維直径分布.

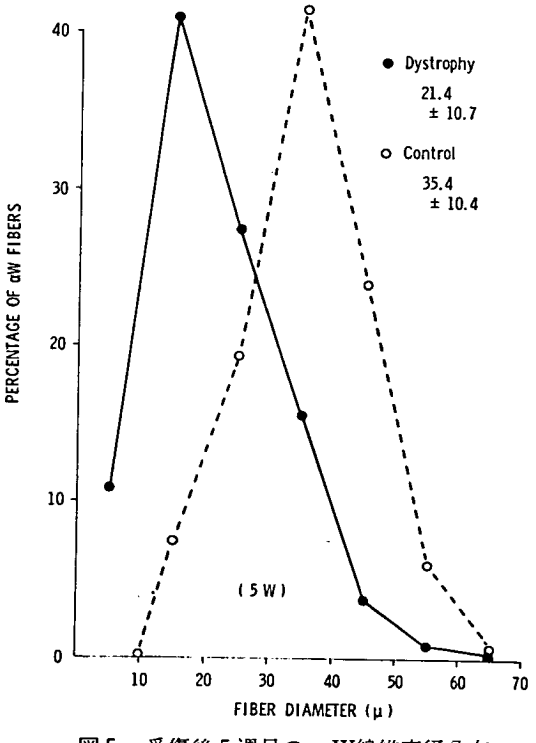


図5　受傷後5週目の α W線維直径分布.

これらの αW 線維の直径を比較すると，受傷3週目では Dy チキン32.2±11.0μ，対照30.9±10.3μ で両者間に有意の差はない．またその直径分布においても，両者間に明らかな差異をみない（図4）．5週目の筋線維直径は，Dy チキン21.4±10.7μ，対照35.4±10.4μ であり，Dy チキンの αW 線維直径にやや小さい傾向がみられたが，対照との間に有意差はない．またその直径分布の pattern にも，Dy チキン，対照間に明確な差はみられなかった（図5）．

考　　察

PLD の如き小さな筋線維に cold injury を加えると，受傷部では殆ど総ての組織成分が壊死に陥り，再生筋の precursor としての衛星細胞も壊死を免れえない．筋線維の再生は受傷周辺部より急速に出現するため，検索部位を一定にて比較検討することが，重要である．本研究では筋腹の受傷中央部を選んで検索し，検索部位の一定化に努めた．

受傷後1週目においては，受傷初期にみられる壊死は全くなく，activated satellite cell を伴った幼若筋線維およびその前段階の細胞群で満され，2週以後も再生筋線維の増大がみられた．

対照チキンとして使用した line 412 の白筋は αR 線維と αW 線維とからなり，ふ化後急速に αR 線維から αW 線維への変換が進み，ふ化後4ヶ月後の PLD では，αW 線維が約80%を占める．Dy チキンではその変換が遅れ，4ヶ月目でもなお70%以下である（Nonaka, et al, 1982[2]）．かかる Dy チキン白筋における分化の遅延は，再生筋線維にも認められ，受傷後2週目でも αW 線維はみられず，3週以後の αW 線維出現率も低く，対照に比し，αR 線維から αW 線維への変換が遅れ，あるいは変換が不充分であった．

しかしながら，受傷1週目の αR 線維直径およびその分布は，対照と差はなく，3週以後の分化した αW 線維においても，線維直径および分布は，Dy チキンと対照とは殆ど同じであるといいうる．

総　　括

受傷後1週から5週までのDyチキンPLDにおいては，対照と同様の活発な再生現象がみられるが，再生筋のαR線維よりαW線維への変換が遅延している．しかし変換したαW線維の直径は対照との間に有意の差はない．従って，発育期Dyチキン骨格筋には，明らかに筋再生が存在するが，再生筋線維の分化は遅延している．また，受傷後5週までは，再生筋線維に変性像はみられない．

文　　献

1) Yorita, Y., Nakamura, H. & Nonaka, I.: Satellite cells and muscle regeneration in the developing dystrophic chicken. Exp. Neurol., 70: 567, 1980.

2) Nonaka, I. & Nakamura, H.: Muscle differentiation and regeneration in chicken muscular dystrophy. In "Muscular Dystrophy", (ed. by Ebashi, S.), Univ. Tokyo Press, Tokyo, 1982, pp. 63—77.

3) 中村晴臣，金藤大三，高田邦安，田中順一：筋ジストロフィーチキン骨格筋の修復能．厚生省筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究（三好班），昭和56年度研究報告書，1982, pp. 20—24.

3）神経切断による筋衛星細胞の活性化について

——光顕ラジオオートグラフィーによる検討——

小　口　喜三夫*

研究協力者　羽　生　憲　直*　柳　沢　信　夫*

筋線維の再生に重要な役割を果している筋衛星細胞（satellite cell）[1]は，筋ジストロフィー症，多発筋炎等のミオパチー[2),3),4)]で数が増加していることが明らかとなって来た．このsatellite cellがmyoblastへ分化してゆく能力を持つかどうか検討する方法のひとつにラジオオートグラフィーが挙げられ，^{3}H-Thymidine（^{3}H-TdR）ラジオオートグラフィーによりDNA合成中のsatellite cellを検索できることを私達は報告した[6)]．今回は本法により，satellite cellの神経切断による脱神経の効果を検討したので報告する．

方　法

生後15日のddy系雄マウス10匹を使用．右坐骨神経を，エーテル麻酔下で切断．切断24時間後から，^{3}H-TdRを体重g当り50μCiを6時間毎に4回腹腔内に注射した．最終注射6時間後，すなわち神経切断から48時間後に屠殺し，直ちに神経切断側とコントロールとして非神経切断側からgastrocnemiusを採取，5％グルタールアルデヒドで固定した．カコジレート緩衝液中にて24時間以上洗滌後，1％オスミウム酸で1時間固定．シリーズアルコールとプロピレンオキサイドで脱水

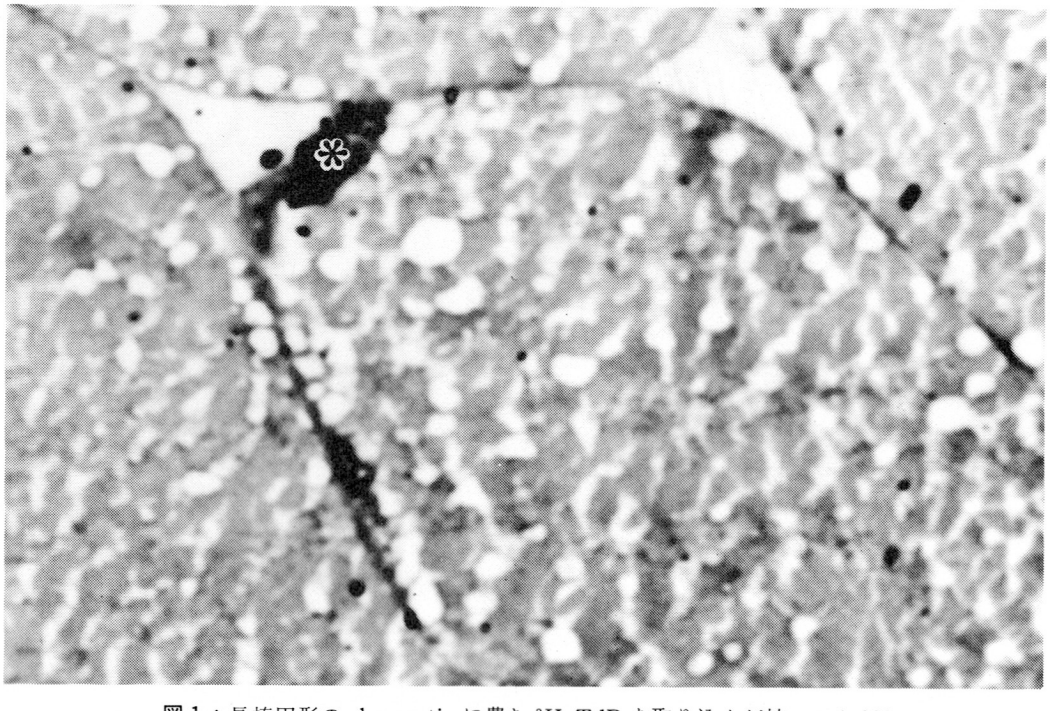


図1＊長楕円形のchromatinに豊む^{3}H-TdRを取り込んだ核．×1,000

＊信州大学医学部第三内科

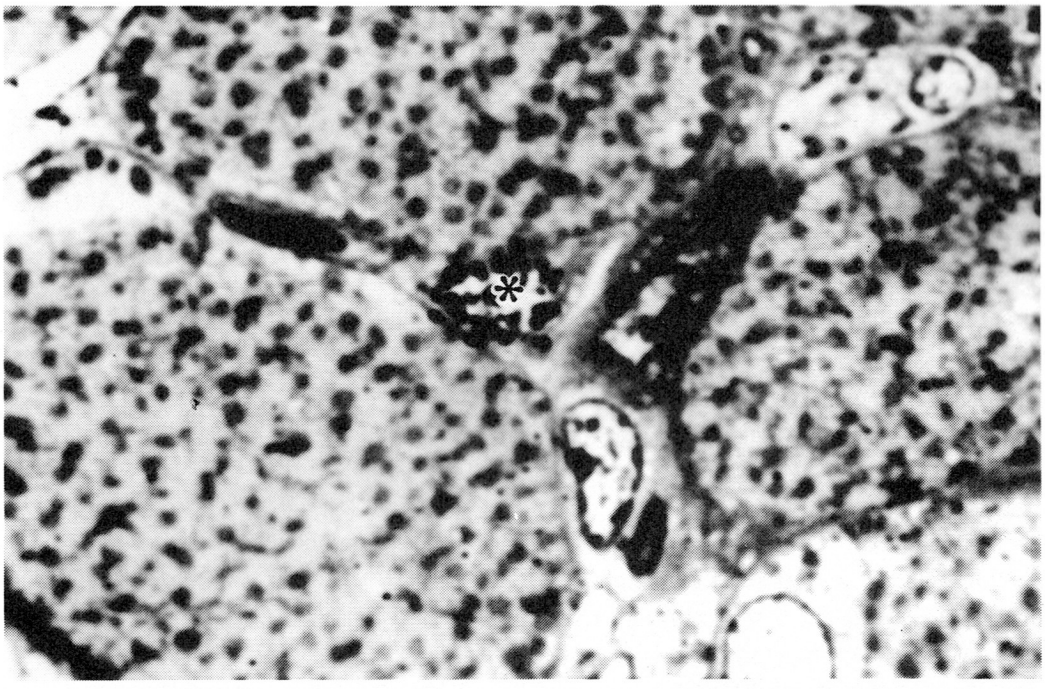


図2　＊ ^{3}H-TdR が取り込まれた比較的 chromatin の少ない核．×1,000

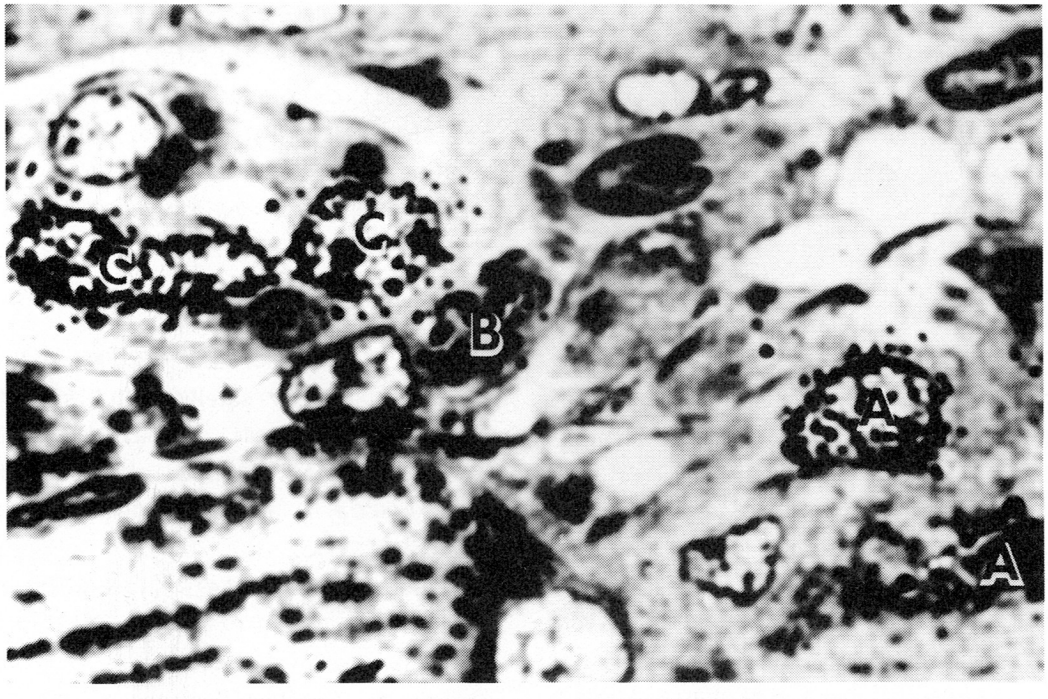


図3　A：筋線維内の^{3}H-TdR 取り込みの核．
B：Fibroblast.
C：血管の内皮細胞．　×1,000

後 epon-araldite に包埋．厚さ 1 μm の標本を作製しスライドガラス上に載せ，dipping 法により SAKURA NR-M_2 を塗布した．4 ℃の冷蔵庫内で30日間露出．SDX-1 現像液，20℃，4 分間現像，定着後トルイジンブルーで淡い染色を施行した．

標本は油浸レンズで観察し，1 資料につき100視野を検索した．次の labelling index に従い activated satellite cell の出現頻度を算出し，さらに光顕的形態観察を行った．

$$\text{Labelling index} = \frac{\text{1視野中の}^3\text{H-TdR によって label された核数}}{\text{1視野中に観察された総ての核数}} \times 100$$

結　　果

Labelling index は神経切断側の gastrocnemius で1.36±0.32, コントロール側の gastrocnemius で0.23±0.06であった．形態学的観察では，神経切断側の筋線維に変化は認められなかった．^{3}H-TdR が取り込まれた核は，長楕円形あるいは楔形の形態で，chromatin に豊むものが大部分であったが，一部に大きな核で chromatin の少ないものも観察された．神経切断側では，Schwann 細胞核，fibrocyte, fibroblast の核に^{3}H-TdR の取り込みがコントロールよりも多く認められた（図1，2，3）．

考　　察

Mauro[1] による satellite cell の存在の報告以来，この細胞がミオパチーにおいて数の増加がみられること，さらに satellite cell が myoblast に移行することが，Nonaka[2], Wakayama[3], Chou[4] らにより明らかにされて来た．しかし筋萎縮性側索硬化症では，コントロールと差がなく（石本，1982），malnutrition では低下している（Hansen-Smith, 1979）といわれている．

今回私達は，satellite cell の脱神経による影響を神経切断により検索したが，コントロールに比較し，satellite cell の核への^{3}H-TdR の取り込みは，神経切断側で明らかに増加していた．さらに神経切断側で fibrocyte, fibroblast, Schwann 細胞の核にも^{3}H-TdR の取り込みが観察された．McGeachie ら[5] は，^{3}H-TdR を用い，神経切断と腱切断による satellite cell の活性化を報告しているが，切断後24時間では，コントロールと差がなく，48時間後から，神経切断側の satellite cell の核への^{3}H-TdR の取り込みが増加し，結合織の核への取り込みも増加していたとしている．

^{3}H-TdR が取り込まれた核，すなわち，thymidine を取り込み DNA を合成している核は，形態学的に 2 群に分けられた．長楕円形と楔形で chromatine に豊む核と，大きく，丸い核で chromatin の少ないものである．前者は明らかに satellite cell と電顕により形態学的に同定できた（小口ら，1981）が，後者は，satellite cell が分裂した核と myoblast の核と考えられる．コントロールでも同様の核が観察されたが，正常筋線維でも一定の再生は行われていることを示すものである．

脱神経で satellite cell が活性化されることは明らかとなったが，48時間以後の satellite cell の動態に興味が持たれる．McGeachie ら[5] は神経切断 7 日目でも satellite cell の核の^{3}H-TdR の取り込みは増加していると報告しているが，筋線維の形態学的検索はなされていない．今後脱神経が satellite cell を一時的に賦活するのみか，あるいは再生まで関与するのか形態学的検索を含め，検討する必要がある．

ま と め

1．マウスにおいて，坐骨神経切断により脱神経を行い，48時間後の satellite cell の活性化を^{3}H-TdR を指標にして検討した結果，神経切断側の labelling index は1.36±0.32，コントロール側は0.23±0.06であり，神経切断側の satellite cell が活性化されていた．

2．Labelling された核の多くは長楕円形，楔形で chromatin に豊むものであり，一部円形大型の chromatin の少ない核も観察された．神経切断側の fibrocyte, fibroblast, Schwann 細胞の核に^{3}H-TdR の取り込みが認められた．

文　献

1) Mauro, A. : Satellite cell of skeletal muscle fibers. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9 : 493-495, 1961.

2) Nonaka, I., Miike, T., et al. : An ultrastructural observation of satellite cells in the biopsied muscles of congenital muscular dystrophy. Brain Develop. (Japanese), 5 : 520-529, 1972.

3) Wakayama, Y. : Electron microscopic study on the satellite cells in the muscle of Duchenne muscular dystrophy. J. Neuropath. Exp. Neurol., 35 : 532-540, 1976.

4) Chou, S. M. & Nonaka, I. : Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscles. J. Neurol. Sci., 34 : 131-145, 1977.

5) McGeachie, J. & Allbrook, D. : Cell proliferation in skeletal muscle following denervation or tenotomy. Cell Tiss. Res., 193 : 258-267, 1978.

6) 小口喜三夫，永田哲士：ジストロフィーチキンにおける activated satellite cell について——光顕ラジオオートグラフィーによる検討——. 筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究（三好班），昭和54年度研究報告書，1980, p. 37-40.

4）実験的再生筋に関する研究

高　瀬　貞　夫*

研究協力者　小　林　和　夫*　小　暮　久　也*

はじめに

筋ジストロフィー症（DMP）においては，赤血球膜の異常や筋細胞膜の異常が報告され，細胞膜異常説が注目されている．また一方ではDMP筋の組織学的所見の特徴には筋再生所見と変性所見が混在し，本症では筋成熟過程における異常も考えられている．そこで我々は筋細胞膜に満遍なく微細な穴をあけるとされているサポニン[1),2)]をラット前脛骨筋肉内に投与し，骨格筋の変性再生過程を検索し，更に塩酸ブピバカイン筋注，homogenized muscle筋注，筋線維切断，凍結損傷時における筋変性再生過程についても検索し，正常筋における筋再生の病因病態について検討したので報告する．

対象・方法

200gのウィスター系雄ラットの前脛骨筋を無菌的に露出し，①サポニン（50，500μg/ml，pH7.4，293mOsm/L）を0.2ml筋注，②0.5%塩酸ブピバカイン0.2mlを筋注，③homogenized muscleの筋注（左側前脛骨筋を生食によりhomogenizedして0.2mlを右側に筋注），④筋線維切断（約5 mmの横切開を加える），⑤凍結損傷（ドライアイスで30秒間の損傷を加える），⑥生食0.2ml筋注（対照）を行ない，サポニンについては30分，5，12，24時間，3，7，10日後に，その他については1，3，7，10日後に各々3匹から病変部の筋肉を採取した．凍結切片を作製し，HE染色，RNA染色（methyl green-pyronine）を行ない光顕的に観察した．

* 東北大学医学部脳研脳神経内科

結　　果

1）サポニン投与群

A）500μg/mlサポニン筋注：30分後では，サポニン液により筋線維間が開大し，eosinophilicな過収縮した壊死線維，いわゆるopaque fiberが多数みられた．しかし間質の細胞反応はまだみられない（図1-A）．5時間後にはopaque fiberは中心部よりpaleとなり，いわゆるpale staining fiberがしだいに増加してくる．間質には多核白血球が多数出現し，一部壊死線維内にもみられる（図1-B）．12時間後には間質の浮腫が最も著明になり，macrophageも間質及び壊死線維内に認められる（図1-C，D）．

24時間後にはopaque fiberは減少して，ほとんどがpale staining fiberとなる．また多核白血球も減少し，macrophageに混入してRNA染色で軽度陽性所見を示す細胞質のeosinophilicな単核細胞が多数出現してくる（図2-A，B）．3日後では残存する壊死線維をかこんで，胞体がbasophilicなmyocyte，myotubeが出現し，それらの細胞では著明なRNA活性がRNA染色で認められた（図2-C，D）．7日及び10日後には中心核をもつ未熟筋線維に発達するが，RNA染色では活性の減少傾向を示した（図3-A，B，図4）．

B）50μg/mlサポニン筋注：500μg/mlサポニン筋注に比較して変性再生所見は軽度であるが，変性再生の時期，変性の様式等において差異はみられなかった（図3-C，D）．

2）塩酸ブピバカイン筋注でも24時間後に，pale staining fiberと共にeosinophilicな壊死線維が散見され，3日後にRNA活性が著しい筋線維の

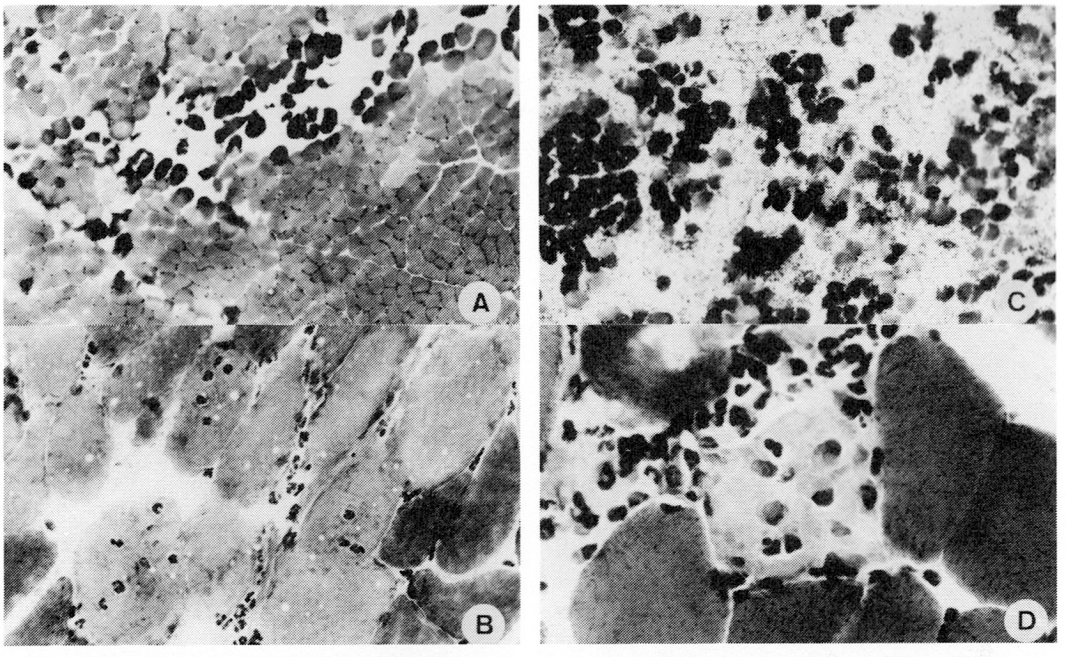


図1　サポニン500μg/ml 筋注における筋病変
A；筋注30分後（HE 染色，×40）
B；筋注 5 時間後（HE 染色，×200）
C；筋注12時間後（HE 染色，×40）
D；筋注12時間後（HE 染色，×400）

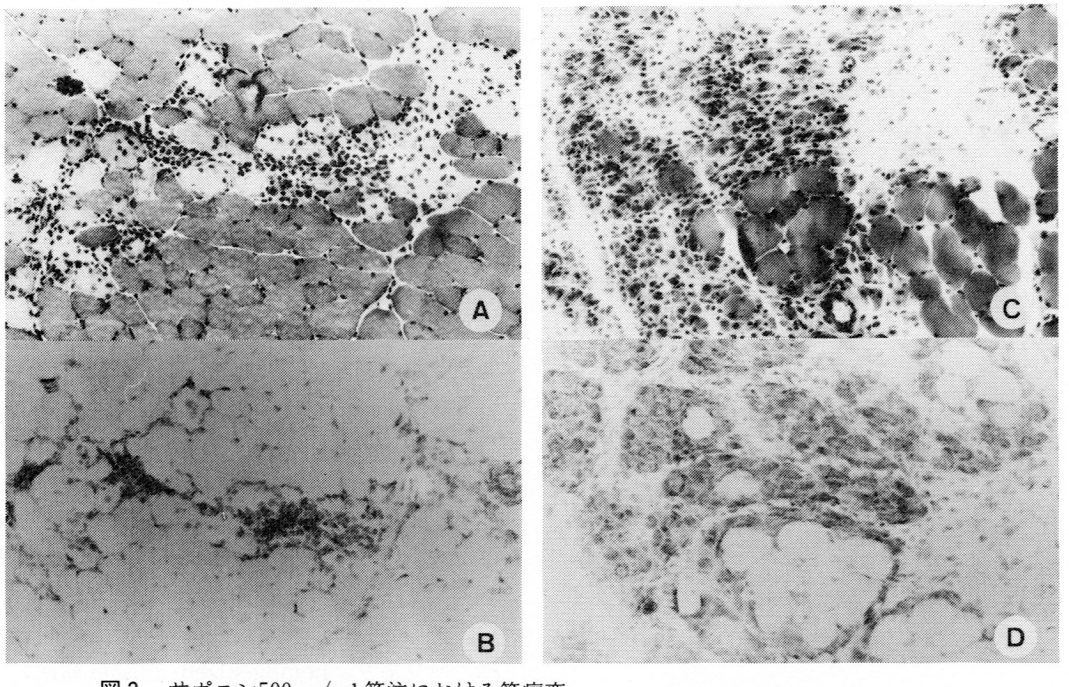


図2　サポニン500μg/ml 筋注における筋病変
A；筋注 24時間後（HE 染色，×100）
B；筋注 24時間後（RNA 染色，×100）
C；筋注 3 日後（HE 染色，×100）
D；筋注 3 日後（RNA 染色，×100）

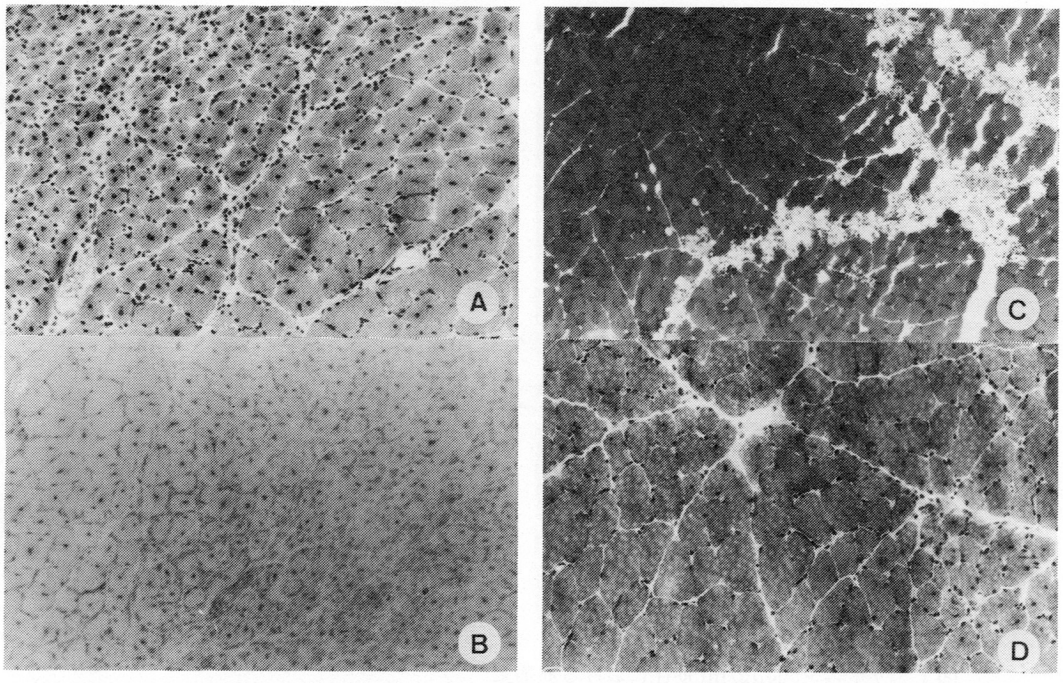


図3　サポニン筋注における筋病変
A；500μg/ml 筋注10日後（HE 染色，×100）
B；500μg/ml 筋注10日後（RNA 染色，×100）
C；50μg/ml 筋注24時間後（HE 染色，×40）
D；50μg/ml 筋注10日後（HE 染色，×100）

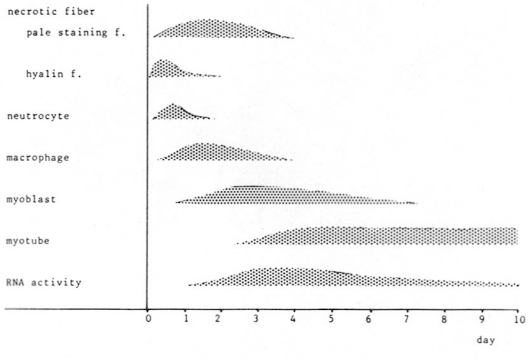


図4　Pathological change after saponin injection（500μg/ ml）

再生所見が得られる（図5）．7日以後にはRNA活性は低下傾向を示し，サポニン筋注と同様の変性再生過程を示した．

3）凍結損傷では壊死線維はほとんど pale staining を呈し，eosinophilic fiber は少なかった．その後の再生過程はサポニン筋注と同じで，7日以後に RNA 活性が低下傾向を示した．

4）筋線維切断ではサポニン筋注に比し，再生筋の出現，成熟過程はいくぶんおくれて，術後7日目でも RNA 活性は著明にみられ，10日後に低下してくる．

5）homogenized muscle 筋注では1日後に穿刺部位に一致して軽度の細胞浸潤，数個の壊死線維がみられるが，3日以後には異常所見はみられない．対照としての生食筋注においても穿刺部に同様の所見あり，homogenized muscle 筋注と対照とでは明らかな差異は認められなかった．

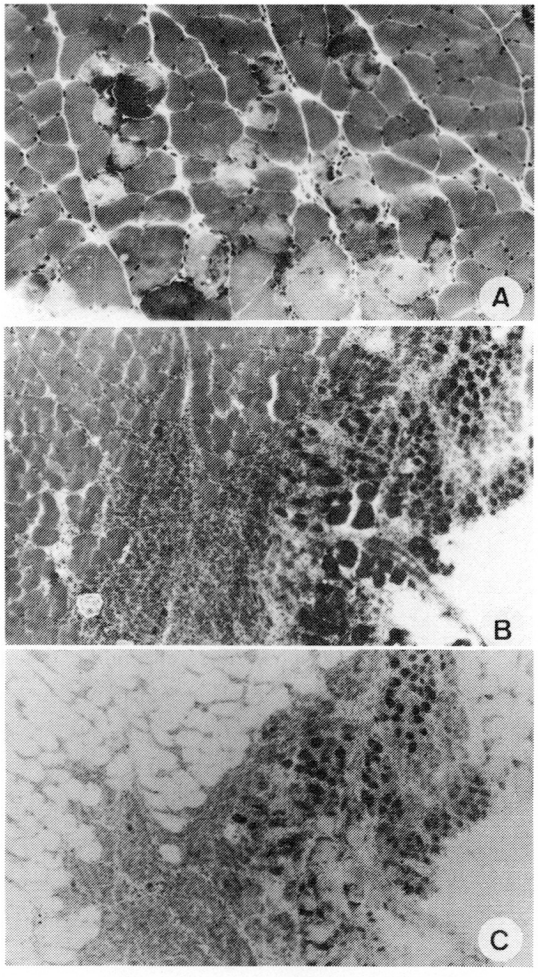


図5　塩酸ブピバカイン筋注における筋病変
A；筋注24時間後（HE染色，×100）
B；筋注3日後（HE染色，×40）
C；筋注3日後（RNA染色，×40）

考　　察

近年筋ジストロフィー症（DMP）において，Schotlandらは凍結割断法により筋細胞膜の異常を[3]，Mokriらは初期DMPの筋細胞膜からのペルオキシダーゼ漏出を報告しており[4]，筋細胞膜の異常がきわめて注目されてきている．さらに実験的に筋細胞膜に物理的，代謝的障害を加えDMPとの比較検討もなされつつある．Strunkらはtype A clostridium perfringens toxinをモルモットの皮下に投与した場合，筋細胞膜を一次的に障害し，形態的にDMPの筋病変と類似している事を指摘している[5]．Publicoverらは筋細胞膜でのカルシウムの取り込みを促すA23187を含む溶液で骨格筋を処理し，DMPの筋病理所見との類似性を報告している[6]．

そこで我々は細胞膜に微細な穴をあけるとされているサポニンを実験的に使用してみた．サポニンは数分子の糖とステロイド化合物であるサポゲニンよりなり，細胞膜の穿孔作用を有するため，最近骨格筋，平滑筋，心筋，神経の細胞膜の研究に応用されている[1),7)]．また消化管から吸収されず，静注では溶血を引き起こす．したがって筋肉内に直接投与する事により筋病変の観察を試みた．

*In vitro*の実験としては低濃度であるとされている[1)] 50μg/mlの筋肉内投与でも変性再生過程がみられ，500μg/mlでは更に強い再生現象がみられ，今後の再生筋の研究にも役立ちうると思われた．また本実験で①変性初期にopaque fiberが多数みとめられ，②活発な再生筋の出現など，DMPの特徴とされる病理的所見が得られた事は，DMPの細胞膜障害説を考える上で興味ある結果である．

サポニンの細胞膜の穿孔作用は，Endoらの単一筋線維を用いた薬理学的実験によると，10～50μg/mlのサポニンでは筋細胞膜のみ障害し，150μg/ml以上では筋小胞体も障害する事を報告している[1)]．一方DMPにおいては細胞膜の障害か，横管系，筋小胞体の障害によるものかが問題とされている．そこで50μg/ml及び500μg/mlサポニンにて病理所見を比較してみた．しかし変性再生過程での量的な差異はあるが，質的な差異はみい出せなかった．さらに今後種々の選択的膜障害物質による実験的研究が必要であろう．

またDMPにおいては多発性筋炎と共に筋肉漿の細胞外流出がさかんで，再生も著しく活発である事が明らかになってきた[8)]．そこで筋再生現象を賦活するのは細胞外に流出した筋肉漿にあるとも考えられるため，homogenized muscleの筋注を試みた．しかし再生筋は得られず，一方筋細胞膜の障害をきたすサポニン，ブピバカイン筋注，筋線維切断，凍結損傷などでは，すみやかな再生所見が得られた（**表1**）．これらの事より筋再生の

表1　種々の実験的再生筋における変性と再生

	degeneration	regeneration
saline injection	−	−
saponin injection　50μg/ml	+	+
500μg/ml	++	++
bupivacaine injection(0.5%)	++	++
homogenized muscle injection	−	−
cold injury	++	++

賦活に筋細胞膜の損傷が大きく影響していると考えられる．今後さらに再生筋を促す機構について詳細に研究する事が重要な課題であろう．

ま と め

(1)ラット前脛骨筋にサポニン500μg/mlを筋注した結果，30分後にopaque fiber，12時間後にpale staining fiber，多核白血球の出現をみた．更に12時間後よりmacrophage，24時間後よりmyoblastもあらわれる．3日後にはmyocyte，myotubeが多数みられ，RNA活性が最も著明となる．その後活性は減弱する過程を示した（図4）．又50μg/mlと500μg/mlサポニン筋注での病理所見からは量的な差異はあるが質的な差異はみられなかった．

(2)筋肉漿の細胞外流出機序が存在する筋線維切断，凍結損傷，ブピバカイン，サポニン筋注の場合には筋再生過程がみられ，一方生食並びにhomogenized muscleを筋注した場合は筋再生はおこらなかった．

(3)サポニン，ブピバカイン筋注において，変性初期にopaque fiberが出現した点はDMPの筋病変と類似していた．

文　　献

1) Endo, M. & Iino, M.：Specific perforation of muscle cell membranes with preserved SR functions by saponin treatment. J. Muscle Res. and Cell Motility, 1：89, 1980.

2) 江橋節郎，大槻磐男，ほか：ニワトリ骨格筋培養細胞のサポニン感受性．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，1978，p. 23.

3) Schotland, D. L., Bonilla, E., et al.：Duchenne dystrophy：Alteration in muscle plasma membrane structure. Science, 196：1005, 1977.

4) Mokri, B. & Engel, A. G.：Duchenne dystrophy. Electron-microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plama membrane of the muscle fiber. Neurology (Minneap.), 25：1111, 1975.

5) Strunk, S. W., Smith, C. W., et al.：Ultrastructural studies on the lesion produced in skeletal muscle fibers by crude type A Clostridium perfringens toxin and its purified alpha fraction. Amer. J. Path., 50：89, 1967.

6) Publicover, S. J., Duncan, C. J., et al.：The use of A 23187 to demonstrate the role of intracellular carcium in causing ultrastructural damage in mammalian muscle. Cell Tiss. Res., 185：373, 1977.

7) Blaustein, M. P., Ratzlaff, R. W., et al.：Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. I, Evidence for involvement of non-mitochondrial ATP-dependent sequestration mechanism. J. Gen. Phisiol., 72：15, 1978.

8) 高瀬貞夫，小林和夫，ほか：筋ジストロフィー症におけるRNA activityについて．筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究（三好班）昭和56年度研究報告書，1982，p. 214.

5) 筋萎縮の発現機序に関する研究

1) ステロイド筋萎縮(2)

木 下 真 男*

研究協力者　若 田 宣 雄*　荒 木　洋*　河 村 裕 子*

ステロイドホルモンによる筋障害は，ステロイドミオパチーとしてよく知られている．

我々はこの筋障害が組織学的には筋の変性ではなく，萎縮が主体であることから，この発現機序を解明することで，広く筋萎縮性疾患の病態を解明する手がかりが得られる可能性を考え，萎縮のひとつの実験モデルとしてステロイド筋萎縮を作製し，これまで検討を加えてきた．

ステロイドによる筋萎縮は，筋の組織化学的タイプ分類と密接な関係があることは以前からよく知られていた．従ってステロイド筋萎縮機序解明には，タイプ別の検討が重要である．最近，我々は家兎のヒラメ筋，腓腹筋，長趾伸筋を用いて各タイプにおける脂質含量と脂酸構成の分析をおこない，その正常値を決定しえたので[1]，この手技を利用してステロイド筋萎縮の各タイプの脂質代謝を検討した．

方　法

体重3 kg前後の雄家兎6羽に，cortisone acetate 20mg/kg/day，4週間連続して背筋に筋注した．終了後エーテル麻酔下に屠殺し，ヒラメ筋，腓腹筋，長趾伸筋を採取し実験に供した．対照群10羽も同じ部位を採取した．

組織化学的には，PAS，Gomori-trichrome, NADH, Phosphorylase, myosin-ATPase染色をおこない，組織学的に観察するとともに，連続切片をDubowitzの方法にしたがってタイプ分類をおこない[2]，また各筋線維直径も測定した．生化学的にはLowry法により総蛋白を，Zak-Henly変法により総コレステロールを，またFolchの方法[3]により総脂質を抽出後，薄層クロマトグラフィーで個々の中性脂肪を分離し，定量および脂酸構成を測定した．

結　果

まず正常対照家兎群であるが，ヒラメ筋では，88%がタイプI線維で，10%がタイプII a線維，2%がタイプII b線維であった．腓腹筋では，17%がタイプI線維，19%がタイプII a線維，64%がタイプII b線維であった．長趾伸筋では，6%がタイプI線維，36%がタイプII a線維，58%がタイプII b線維であった（表1）．

表1　各筋のファイバータイプ

Muscle ＼ Fibre type	I	IIa	IIb
Soleus	88	10	2
Gastro.	17	19	64
EDL	6	36	58%

Gastro.＝Gastrocnemius

EDL＝Extensor digitorum longus

生化学的には，筋の総蛋白量は，ヒラメ筋で29.72±0.29mg/g wt，腓腹筋で26.99±1.94mg/g wt，長趾伸筋で27.00±1.98mg/g wtと有意差はなく，Triglycerideは，ヒラメ筋で6.30±0.14 mg/g wt，腓腹筋で1.83±0.88mg/g wt，長趾伸筋で1.50±0.05mg/g wtと，赤筋と後者2筋との間に有意差が認められた（表2，3，4）．

Triglycerideの脂酸構成は，いずれの筋においても，主要成分は，C16パルミチン酸，C18：1

*東邦大学医学部第四内科

表2　ヒラメ筋　脂質含有量

	control	steroid treated
Total protein (mg/gwt)	29.72±0.29	26.87±0.62 *
TG (mg/gwt)	6.30±0.14	9.09±1.44 **
TG/TP (mg/mg protein)	0.21±0.03	0.34±0.06 ***
Cholesterol (mg/gwt)	4.37±0.47	5.03±0.35 *
Chole./TP (mg/mg protein)	0.15±0.03	0.19±0.01 *
Cholesterol ester (mg/gwt)	0.35±0.16	0.40±0.18
CE/TP (μg/mg protein)	11.88±5.39	14.75±6.88

* P＜0.05　** P＜0.02　*** P＜0.01

TG : Triglyceride　TP : Total protein
Chole. : Cholesterol　CE : Cholesterol ester

表3　腓腹筋　脂質含有量

	control	steroid treated
Total protein (mg/gwt)	26.99 ± 1.94	23.92 ± 4.09**
TG (mg/gwt)	1.83 ± 0.88	3.76 ± 1.59***
TG/TP (mg/mg protein)	0.07 ± 0.03	0.17 ± 0.08***
Cholesterol (mg/gwt)	4.41 ± 0.42	4.46 ± 0.70
Chole./TP (mg/mg protein)	0.15 ± 0.01	0.19 ± 0.03*
Cholesterol ester (mg/gwt)	0.24 ± 0.08	0.21 ± 0.02
CE/TP (μg/mg protein)	8.55 ± 2.65	8.36 ± 1.58

* P＜0.05　** P＜0.02　*** P＜0.01
CE : Cholesterol ester　TG : Triglyceride

表4　長趾伸筋　脂質含有量

	control	steroid treated
Total protein (mg/gwt)	27.00±1.98	30.52±3.67
TG (mg/gwt)	1.50±0.05	2.87±1.39
TG/TP (mg/mg protein)	0.05±0.02	0.10±0.05
Cholesterol (mg/gwt)	3.85±0.30	4.37±0.30 *
Chole./TP (mg/mg protein)	0.14±0.02	0.14±0.02
Cholesterol ester (mg/gwt)	0.34±0.16	0.43±0.29
CE/TP (μg/mg protein)	12.37±4.96	15.11±10.38

* P＜0.02

TG : Triglyceride　TP : Total protein
Chole. : Cholesterol　CE : Cholesterol ester

表5　各筋の線維直径

		control	steroid treated
Soleus	Type I	68.37 ± 12.12	77.65 ± 11.37 *
	Type II	82.44 ± 11.75	72.20 ± 10.98 *
Gastro	Type I	47.80 ± 7.64	55.20 ± 7.81 *
	Type II	76.73 ± 17.31	58.90 ± 8.06 *
EDL	Type I	59.65 ± 10.91	48.45 ± 7.17 *
	Type II	67.90 ± 8.13	51.90 ± 9.51 *

* P＜0.001
Gastro = Gastrocnemius
EDL = Extensor digitorum longus

オレイン酸，C18：2リノール酸などであり，ヒラメ筋と長趾伸筋を比較すると，C18：1，C18：2，C18：3リノレイン酸などは，ヒラメ筋に多く含まれ，これに対し，C22：4ドコサテトラノン酸，C24：2テトラジェノン酸，C24：5テトラコサペンタノン酸などは長趾伸筋に多く含有され，互いに有意差が認められた．

これらの結果をもとにタイプI，IIの筋線維一本一本が一応は等しい質量を有していると仮定して，各筋線維のTriglyceride含量を算出してみると，タイプI線維は6.86mg/g wt，タイプII a線維は2.58mg/g wt，タイプII b線維は，0.26mg/g wtと，タイプI線維にTriglycerideが多く含まれ，タイプII b線維に少ないことが明らかとなった．

次に実験群との比較検討であるが，組織化学的に，線維直径は，ヒラメ筋でタイプI線維は68.37±12.12μから77.65±11.37μと肥大し，タイプII線維は82.44±11.75μから72.20±10.98μと萎縮が認められた．腓腹筋ではタイプI線維は47.80±7.64μから55.20±7.81μと肥大し，タイプII線維は76.3±17.31μから58.90±8.06μと萎縮が認められた．長趾伸筋では，タイプI線維は59.65±10.91μから48.45±7.17μ，タイプII線維で67.90±8.13μから51.90±9.51μと共に萎縮が認められた（表5）．

タイプ分類では実験群と対照群との間には有意差は認められなかった．

生化学的には，ヒラメ筋では実験群で26.87±0.62mg/g wtと総蛋白量は減少し，Triglycerideは9.09±1.44mg/g wtと対照群と比較して有意に増加していた（表2）．

腓腹筋では総蛋白量は23.92±4.09mg/g wtとヒラメ筋と同様に減少し，Triglycerideは3.76±1.59mg/g wtと増加していた（表3）．

長趾伸筋では総蛋白量に大きな変化なく，Triglycerideも2.87±1.39mg/g wtとやや増加傾向を示すにとどまった（表4）．

Triglycerideの脂酸構成は，長趾伸筋で最も変動が著明で，実験群でC16，C18：1，C18：2で増加，C22：2，C22：4，C24：2，C24：

表6　Triglyceride 脂酸構成

	(Soleus)		(Gastrocnemius)		(Extensor digitorum longus)	
	control	steroid treated	control	steroid treated	control	steroid treated
C 14	3.07±0.39	3.05±0.63	2.56±0.64	3.81±1.03****	2.84±0.21	2.13±1.03
:1	1.01±0.30	0.98±0.08	0.64±0.49	0.76±0.09	0.43±0.23	0.48±0.17
C 16	29.49±2.14	30.84±1.89	31.69±2.22	38.59±1.45**	31.14±1.90	36.17±2.66**
:1	9.74±1.94	7.52±0.55	5.64±1.73	4.35±2.08	6.23±2.72	6.36±1.26
C 18	6.09±0.68	5.86±0.40	8.30±1.37	8.26±1.02	6.03±0.90	6.72±1.33
:1	28.84±1.06	26.87±1.31	24.35±6.00	20.05±0.89	16.92±1.59	22.47±1.79*
:2	13.34±1.56	17.54±1.52**	10.40±1.22	13.78±3.22	7.00±2.00	11.98±2.77*
:3	4.50±0.45	4.89±0.30	3.29±0.81	3.52±0.69	2.33±0.77	3.30±0.98
C22	0.78±0.54	0.46±0.12	0.65±0.66	0.16±0.01	0.77±0.51	0.95±0.42
:2	0.26±0.19	0.38±0.21	1.10±0.80	1.04±0.71	5.48±0.76	2.28±1.28*
:4	0.36±0.42	0.38±0.21	1.16±1.12	0.53±0.36	2.66±1.45	0.67±0.26**
C24:2	0.53±0.23	0.15±0.03	1.25±0.80	2.21±1.46	5.23±1.74	1.10±0.74*
:4	0.49±0.29	0.46±0.22**	0.80±0.45	0.37±0.32	1.18±0.75	1.32±0.62
:5	0.69±0.44	0.18±0.04***	5.14±3.92	0.63±0.08	9.55±2.84	3.06±1.73**

* $P < 0.001$　** $P < 0.01$　*** $P < 0.02$　**** $P < 0.05$

5の減少が認められた（表6）.

タイプ別の Triglyceride 含有量は，タイプⅠ線維は6.86mg/g wt から10.02mg/g wt と約1.5倍の増加を示し，タイプⅡa線維は2.58mg/g wt から2.22mg/g wt とやや減少し，タイプⅡb線維は0.26mg/g wt から2.53mg/g wt と約10倍の増加を示した.

考　　案

ステロイドによる筋萎縮は周知のごとく，一般組織学的には，筋線維の萎縮，大小不同，空胞変性，間質の線維化，脂肪化などがみられ，組織化学的にはタイプⅡ線維の選択的萎縮が報告されている．しかしながらこれらの変化はミオパチーの代表である進行性筋ジストロフィー症と比べてみても，臨床症状の割には変化が軽く，また通常ミオパチーでは CPK の上昇をきたすものが多いが，ステロイドによる筋萎縮ではあまり大きな変化はなく，これらの点からも通常のミオパチーとは発現機序が異なっている可能性が示唆される.

本症の発現機序に関する報告は，タイプⅡ線維の選択的萎縮が認められることから，嫌気的解糖系の代謝障害や，蛋白代謝の異常[4]が報告されているが，いまだ明確な結論は得られていない.

今回の我々の結果からはステロイドによる筋障害では，生化学的には，筋線維中に中性脂肪，特に Triglyceride が増加し，しかもその変動はタイプⅡa線維よりタイプⅡb線維に明らかであった．また，脂肪構成の変動も，Ⅱb線維の割合の多い長趾伸筋に著明で，C18：3までの脂肪酸の増加，およびC22：2以上の長鎖脂肪酸の減少が認められた.

タイプⅡa線維とタイプⅡb線維の生理学的な機能の差異は，いまだ明らかではないが，嫌気的解糖系がエネルギー産生の主体と考えられている長趾伸筋に中性脂肪，特に Triglyceride の増加，および脂酸構成の変動が著明に認められたことは，タイプⅡb線維における筋収縮の機序の障害の結果とも考えることができる.

以上の結果からステロイドによる筋障害は組織学的にはタイプⅡ線維，および一部では，タイプⅠ線維にも障害をおよぼすが，生化学的，特に脂質の面からみるとタイプⅡb線維に異常が強く認められたが，前回報告したように末梢神経の障害か，タイプⅡb線維を選択的に障害したかどうかは不明である.

ま　と　め

ステロイドホルモン投与による筋障害では主にタイプⅡ線維の障害が認められ，生化学的にはタイプⅡb線維に Triglyceride が増加し，この線維の多い長趾伸筋の変動が著しく，筋萎縮の発現機

序に，好気的燐酸化が何らかの関与のある可能性が示唆された．これらの点を更に検討することで，筋萎縮という疾患の解明に何らかの手がかりが期待される．

文　献

1) 若田宣雄，ほか：家兎赤筋および白筋の組織化学的および生化学的研究．臨床神経，22：690-695，1982．

2) Folch, J. & Lees, Metal. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226 : 497, 1957.

3) Dubowitz, V. & Brook, M. H.："Muscle Biopsy：A Modern Approach" W. B. Saunders, London, 1973, p. 51.

4) 庄司進一：ステロイドミオパチー：成因に関する生化学的解明．神経進歩，20：98-108，1976．

6）不動化による実験的筋萎縮の病態

高　木　昭　夫*

研究協力者　宮　沢　　寛*　米　本　恭　三*　助　川　卓　行*
埜　中　征　哉*　石　浦　章　一*

筋萎縮の病態生理を明らかにする目的で，関節を不動化することにより実験的萎縮筋を作製し検索を行なった．また，筋萎縮の予防や治療の試みの1つとして，不動化した筋に対して電気刺激を与えその効果について検討した．

方　　法

体重約300 gのウイスター系成熟雄ラットの一側後肢足関節を，キルシュナー鋼線を用いて尖足位並びに背屈位に固定した．このようにしてヒラメ筋を弛緩位あるいは伸展位に固定した後経時的にラットを屠殺し，固定側ヒラメ筋及び対照として非固定側ヒラメ筋を採取して以下の検索に供した．

1．筋湿重量の測定

ラットを断頭，しゃ血した後ヒラメ筋を摘出し直ちに湿重量を測定した．筋湿重量の変化は，非固定側に対する固定側の割合をパーセントで示した．

2．組織化学的検索

液体窒素で－160℃に冷却したイソペンタン中でヒラメ筋を凍結後，クリオスタットで厚さ10 μmの切片を作製した．Dubowitz ら[1]の方法に従ってATPase染色を行ない筋線維タイプを分類した．1つのヒラメ筋ごとに最低200本，通常300～400本の筋線維のタイプ分類をしてヒラメ筋の構成を調べた（表1）．

3．生理学的検索

スキンドファイバー法を用いて単一筋線維が各種濃度のカルシウムイオンやストロンチウムイオンに対して発生する張力を測定し，その反応の違いにより筋線維タイプを分類した[2]．

4．電気刺激

足関節の尖足位固定（ヒラメ筋の弛緩位）後より，1日15分間ずつ2週間にわたって電気刺激を行なった．電気刺激は坐骨神経を介する間接刺激によったが，次の2つの方法を採用した．

1）心臓ペースメーカーを応用した，刺激電極を

表1　Fiber type analysis of immobilized soleus (4－8 weeks)

	Fiber Type*	Contralateral(%)	Disuse (%)	D/C
Plantarflexion	1	90.2	60.5	0.7
	2A	4.1	20.9	5.1
	2B	0.0	0.0	－
	2C	5.7	18.6	3.3
Dorsiflexion	1	81.5	84.3	1.0
	2A	13.6	3.4	0.3
	2B	0.0	0.0	－
	2C	4.9	12.3	2.5

* by ATPase Staining

表2　Effect of electrical stimulation on immobilized soleus

	Wet Weight*	Fiber Type	Cont.(%)	Imm.(%)
(A) Imm. only	55.5 ± 6.9	1	78.0	66.0
		2A	14.5	23.4
		2B	0.0	0.0
		2C	7.5	10.6
(B) Imm.+E.S.	48.0±10.1	1	71.7	69.3
		2A	17.3	20.0
		2B	0.0	0.0
		2C	11.0	10.6
(C) Imm.+E.S.	52.0±6.6	1	70.7	77.9
		2A	15.5	13.2
		2B	0.0	0.0
		2C	13.8	8.9

* Imm./Cont.×100

* 国立武蔵療養所神経センター

持つ小型の受信器をラットの背部皮下に埋め込み，電極を坐骨神経の脇に平行に置いて体外より刺激を無線的に加えた．電気刺激の条件は，10Hz，持続2 msec，電圧約14Vの矩形波である（**表2のB**）．

2)刺激電極を大腿部皮膚上に置き，経皮的に坐骨神経に刺激を加えた．条件は10Hz，持続0.2msec，電圧約30Vである（**表2のC**）．

以上のようにして電気刺激を行なった結果を，関節固定だけをして電気刺激を行なわなかったもの（**表2のA**）と比較検討した．

結　　果

1．筋湿重量の経時的変化（図1）

弛緩位固定（Plantarflexion）と伸展位固定（Dorsiflexion）との間には著明な相違が見られた．弛緩位固定では，湿重量は固定後1週で健側の65.0%にまで急速に減少し，以後は漸減していって4週以降はあまり変わらず8週で45.5%であった．これに対して伸展位固定では，固定後1週から3週までは湿重量はむしろ増加し，その後は減少したが8週でも69.0%と，弛緩位固定と比較し減少率は1%の危険率をもって有意に少ない結果となった．

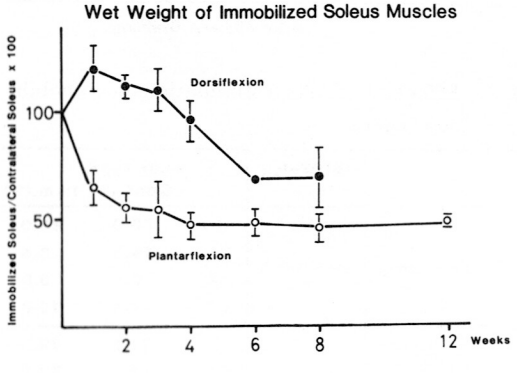


図1　筋湿重の経時的変化

2．組織化学的検索

筋線維は，赤筋であるタイプ1線維と白筋であるタイプ2線維とに大別される．タイプ2線維は更に2A，2B，2Cに分類される．ラットの場合筋肉によって相違があり，前脛骨筋や長趾伸筋などではこの4つのタイプに分類できるが，ヒラメ筋にはタイプ2B線維はない．

成熟ウイスター系ラットの場合，ヒラメ筋では通常タイプ1線維が70～90%を占め5～15%がタイプ2A，5～10%がタイプ2Cである[3]．ところが，弛緩位に固定しておくとこの各タイプ別の割合に変化が生じ，タイプ2A及びタイプ2Cの増加とタイプ1の減少が認められた（**図2**）．すなわち，タイプ1からタイプ2への転換が推定される．これは固定後1週では認められず2週より顕著となった．

伸展位固定では，弛緩位固定と同様にタイプ2C線維は増加したが，タイプ2Aは減少しタイプ1はわずかに増加した（**図3**）．結果は**表1**にまとめて呈示した．

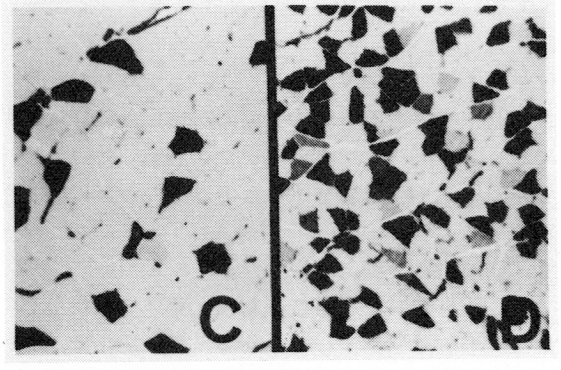


図2　尖足位固定4週．C：非固定側　D：固定側
ATPase染色 pH9.4

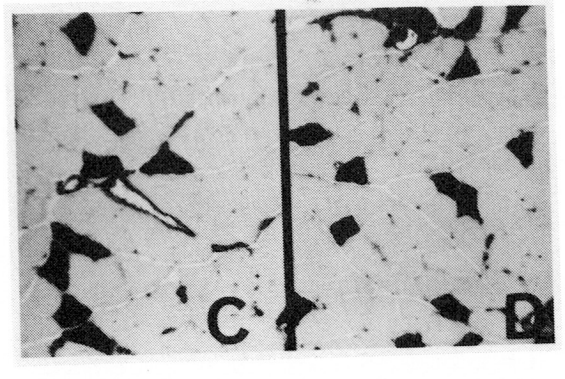


図3　背屈位固定4週．C：非固定側　D：固定側
ATPase染色 pH9.4

3．生理学的検索

弛緩位固定による萎縮筋において，タイプ2線維及び中間型の反応を示す線維の増加が認められた．

4．電気刺激（表2）

弛緩位固定後2週でヒラメ筋の湿重量は55.5%に減少した．不動化筋に電気刺激を与えた場合でも湿重量は同程度に減少した．1日15分間の低頻度電気刺激は，不動化による筋萎縮を阻止しなかった．

筋線維タイプの分化に対する電気刺激の影響を検討した．弛緩位固定によりタイプ1の減少とタイプ2A，2Cの増加が認められたが，電気刺激を行なった群ではこのような変化は少ないか，むしろタイプ1が増加しタイプ2A，2Cが減少する傾向が見られた．

考　　察

今回の実験では足関節を尖足位あるいは背屈位に不動化し，ヒラメ筋は弛緩位あるいは伸展位と両極端の状態に固定された．その結果両者には顕著な相違が見られた．すなわち，伸展位固定の方が弛緩位固定よりも有意に重量減少は少なく，また筋線維タイプの転換，すなわち，脱分化や再分化の程度も軽度であった．筋に一定の張力が加わることが，筋の栄養や分化に重要である事実を再確認したわけである[4),5)]．重要な問題は，緊張状態あるいは張力発生がいかなる機序で作動するかという点であろう．筋細胞自体に直接作用し，内部環境の変化から遺伝子発現を調節しているのかも知れない．あるいは，筋紡錘などの関与する反射弓を介しての神経栄養因子による調節かも知れない．今後のテーマであると思われる．

ただ，固定後一定期間を過ぎると変化は一種の平衡状態となり，それ以上進展することはなかった．この成因は不明であるが，骨格筋長軸方向でサルコメア数の増減による一種の調節が生じ，過度の緊張や弛緩状態が修復されるためかも知れない．

今回の実験は，ラットヒラメ筋においてタイプ1線維からタイプ2線維への転換，あるいはその逆の転換が容易に誘発されることを明らかにした．転換の途上では筋線維は組織化学的ATPase染色で2Cの反応を呈するものと推定された．この脱分化・再分化の過程では筋細胞内で既存の古い蛋白が新しい蛋白に連続的に置換されていくものと推定している[6)]．この可塑性はヒラメ筋のみの特徴なのか，あるいは他の骨格筋にも同様に存在するのかは興味ある点である．

電気刺激は筋の脱分化の阻止に有効であった．しかし萎縮の進行は阻止しなかった．もし電気刺激を長時間行なえば，あるいは萎縮を阻止したかも知れない．今回の電気刺激の条件下では，筋重量変化と筋タイプ分化とは明瞭に異なった反応を呈した．このことは両者が異なった因子で調節されている可能性をも推定させた．

結　　論

1．ラットの一側後肢不動化による実験的萎縮筋を検索した結果，弛緩位固定に比べ伸展位固定の方が有意に萎縮は少なかった．

2．筋萎縮と共に，ヒラメ筋の筋線維タイプの転換が生じたが，これも弛緩位固定では著しく伸展位固定では少なかった．

3．不動化した筋に対する低頻度電気刺激は，筋萎縮を阻止しなかった．しかし筋線維タイプの脱分化や再分化を有意に阻止した．

文　　献

1) Dubowitz, V. & Brooke, M. H.：Muscle biopsy. A modern approach. Saunders, London Philadelphia Tronto, 1973.

2) Takagi, A. & Endo, M.：Guinea pig soleus and extensor digitorum longus：a study of single skinned fiber. Exp. Neurol., 55：95-101, 1977.

3) Mizusawa, H., Takagi, A., Sugita, H. & Toyokura, Y.：Coexistence of fast and slow types of myosin light chains in a single fiber of rat soleus muscle. J. Biochem., 91：423-425, 1982.

4) Jolesz, F.,Sreter, F. A., Mabuchi, K., Pinter,

K. & Gergely, J. : Effect of various forms of hypo-and inactivity on slow muscle. Adv. Physiol. Sci. 24 : 57-68, 1980.

5) Tabary, J. C., Tabary, C., Tardieu, C., Tardieu, G. & Goldspink, G. : Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. J. Physiol., 224 : 231-244, 1972.

6) 助川卓行，米本恭三，宮沢　寛，ほか：廃用性萎縮筋の病態——微細構造と収縮蛋白の変化について（会）．第23回日本神経学会総会抄録，p. 254，1982.

7) 胸腺腫自然発症ラット(Buffalo/Mna rat)の下腿筋における組織化学的検討

飯田光男*

研究協力者　衣斐　達*　古閑　寛*　祖父江逸郎*
松山睦司**　佐橋　功***

要　約

胸腺腫自然発症ラット（Buffalo/Mna rat）は他ラットに比べ運動量が低下している．我々は本ラットの下腿筋について経時的に組織化学的定量的検討を行ない，次の結果が明らかになった．

1)　胸腺腫が発生する以前，さらにrotor loadで運動量が低下するより前に，type II線維のhypotrophyが認められた．

2)　本ラットのひらめ筋においてはtype I線維にも病変があることが示唆された．

緒　言

Buffalo/Mna ratは胸腺腫自然発症ラットとして知られており，継代15代以後の雄ラットにはほとんど100%胸腺腫が発症する[1)2)3)4)]．また本ラットは他ラットと比べ体動が減少しており，rotar loadでのperformance timeが生後10週より急激に低下する[1)]．本ラットの骨格筋病変については，電気生理学的検討[5)]および病理学的検討[1)6)]がいくつかなされているが，明確な結論はまだ出されていない．今回我々は本ラットの下腿筋について経時的組織化学的定量的検討をおこなったので若干の考察を加え報告する．

対象および方法

対象として胸腺腫自然発症ラットBuffalo/Mna rat（以下Bラットと略す）を用い，対照として純系ACIラット（以下Aラットと略す）を用いた．各ラットは成長段階に応じ，I群：6週齢（Bラット：5匹，Aラット：3匹），II群：12～13週齢（Bラット：6匹，Aラット：6匹），III群：21～38週齢（Bラット：5匹，Aラット：6匹），IV群：70～81週齢（Bラット：6匹，Aラット：5匹）の4段階に分け，各ラットより下腿筋を採取した．下腿筋は伸筋として長趾伸筋（以下EDLと略す），前脛骨筋，腓骨筋を，屈筋としてひらめ筋（以下Sol.と略す），腓腹筋を採取した．なおBラットでは下腿伸筋欠損のあるものが約4%の頻度で生まれるが，今回欠損ラットは検索の対象より除いた．

採取した各筋は筋重量を測定し，体重差の影響を無くすため，筋重量／体重比（以下MW/BWと略す）を算出した．さらに採取筋はイソペンタンドライアイスで凍結し，連続切片を作製し各種組織化学的染色を行なった．染色はH-E，トリクロム変法，NADPH-TR，menadione linked α glycerophosphate dehydrogenase，cholin esterase，ATPase（pH10.5，4.5，4.2）である．またEDLとSol.についてはATPase染色標本を顕微鏡写真撮影後，最終倍率を125倍および250倍とし，Zeiss TGA10粒度分布測定器にてfiber type別に筋線維径を測定し%ヒストグラムを作成した．さらに各群別に%メガヒストグラムを作成した．またtype I線維の占める比率，平均type II線維径／平均type I線維径比（以下MDRと略す），fiber type別に標準偏差／平均筋線維径比（以下VIと略す）を算出した．

* 名古屋大学医学部第一内科
** 愛知県がんセンター研究所超微形態部
*** 愛知医科大学第四内科

結　　果

下腿各筋における MW/BW を表1，図1に示す．即ち type II 線維が大部分を占める EDL や前脛骨筋などは MW/BW は B ラットで有意に低下し，type I 線維が多数を占める Sol.では有意差が見られなかった．また EDL における B ラットと A ラットの MW/BW の差は各群間でほぼ一定であった．

組織学的には，B ラットのいずれの群においても，筋線維の変性，再生所見や，炎症所見，結合

表1　筋重量／体重比（MW/BW）

		Buffalo/Mna	A C I
EDL	(10^{-6})	369.6 ± 28.5 *	506.9 ± 21.5
Tibalis ant.	(10^{-5})	150.7 ± 8.5 *	202.2 ± 8.4
Peroneus	(10^{-5})	100.6 ± 5.4 *	114.6 ± 6.0
Gastrocnemius	(10^{-5})	490.7 ± 37.5 *	593.0 ± 43.8
Soleus	(10^{-6})	436.2 ± 32.0	473.4 ± 43.9

* $p < 0.005$

表2　長趾伸筋（EDL）およびひらめ筋（Sol.）における type I 線維の比率．平均 type II 線維径／平均 type I 線維径（MDR），標準偏差／平均線維径（VI）

EDL

	I	II	III	IV
% of type I fiber				
Buffalo	4.92 ± 1.03	10.51 ± 3.58	3.28 ± 1.60	3.88 ± 1.27
ACI	5.73 ± 3.77	8.72 ± 2.06	2.75 ± 1.88	5.02 ± 5.51
II mean diameter/I mean diameter				
Buffalo	1.11 ± 0.05*	1.03 ± 0.09***	1.38 ± 0.05**	1.17 ± 0.09**
ACI	1.18 ± 0.05	1.23 ± 0.04	1.47 ± 0.04	1.38 ± 0.11
SD/mean diameter (10^{-3})				
Type I fiber				
Buffalo	129.2 ± 6.2*	149.3 ± 28.1	110.4 ± 21.1	132.0 ± 7.4
ACI	114.0 ± 2.9	160.0 ± 34.1	138.3 ± 14.1	139.0 ± 33.2
Type II fiber				
Buffalo	214.4 ± 6.3	175.2 ± 9.1**	195.2 ± 15.4**	193.4 ± 7.9
ACI	200.0 ± 13.1	206.8 ± 19.9	227.8 ± 9.4	177.0 ± 24.1

* $p<0.1$　** $p<0.05$　*** $p<0.005$　Mean ± SD

Sol.

	I	II	III	IV
% of type I fiber				
Buffalo	64.0 ± 3.0*	84.8 ± 2.9***	80.8 ± 4.4***	78.0 ± 3.7
ACI	57.5 ± 4.7	64.5 ± 2.4	68.7 ± 3.0	77.0 ± 2.4
II mean diameter/I mean diameter				
Buffalo	.785 ± .042***	.858 ± .050***	.994 ± .024	.872 ± .105*
ACI	.927 ± .013	1.022 ± .042	.966 ± .032	.972 ± .034
SD/mean diameter (10^{-3})				
Type I fiber				
Buffalo	158.0 ± 11.7	185.0 ± 15.2**	180.8 ± 11.8**	186.8 ± 24.4*
ACI	164.0 ± 8.0	153.6 ± 9.9	155.6 ± 10.0	154.4 ± 13.1
Type II fiber				
Buffalo	133.5 ± 7.3	163.2 ± 12.7**	145.8 ± 33.2	206.2 ± 57.2*
ACI	127.0 ± 5.1	137.0 ± 13.4	125.0 ± 3.4	130.2 ± 21.3

* $p<0.1$　** $p<0.05$　*** $p<0.005$　Mean ± SD

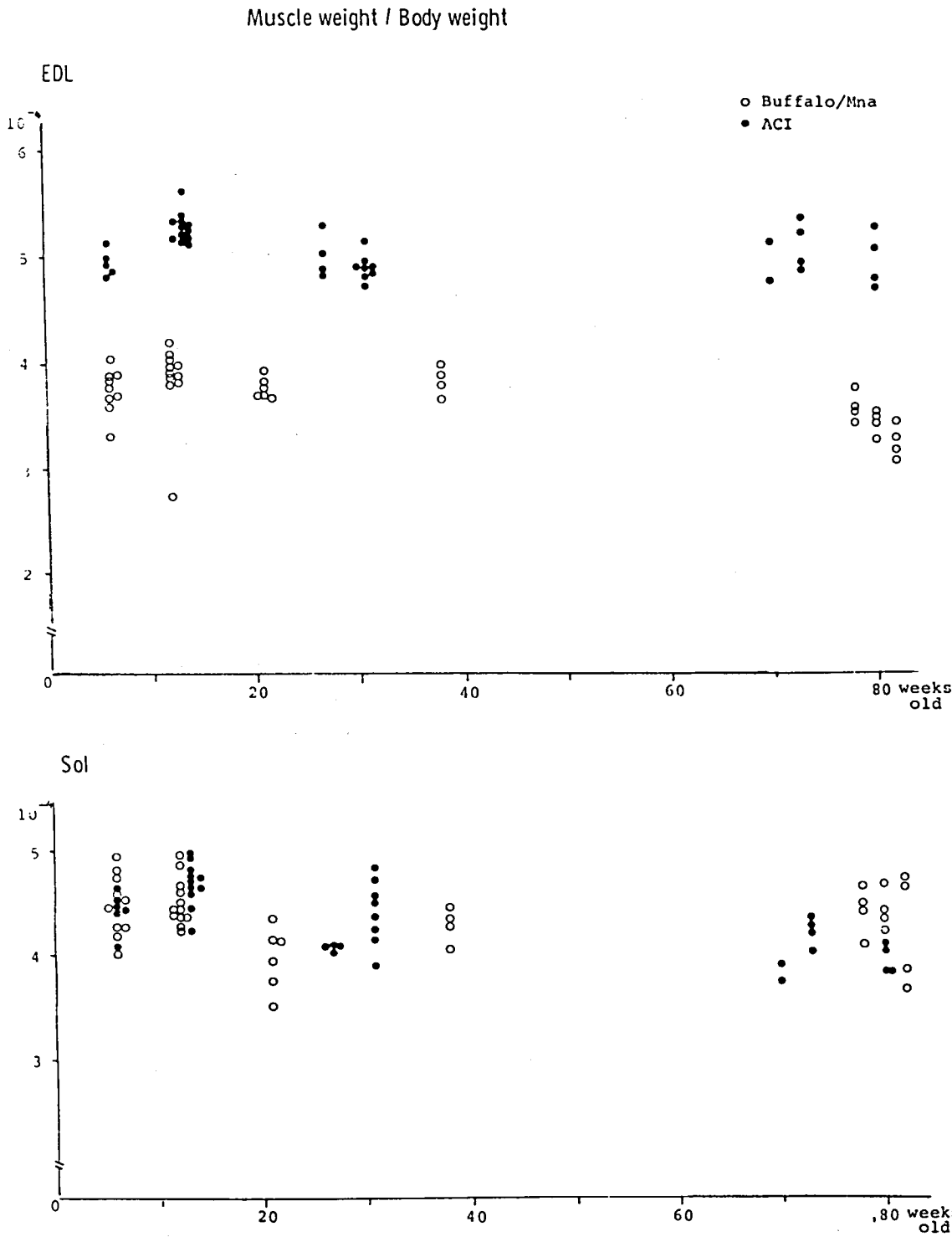


図1　長趾伸筋(EDL)およびひらめ筋(Sol.)における筋重量／体重比（MW/BW）

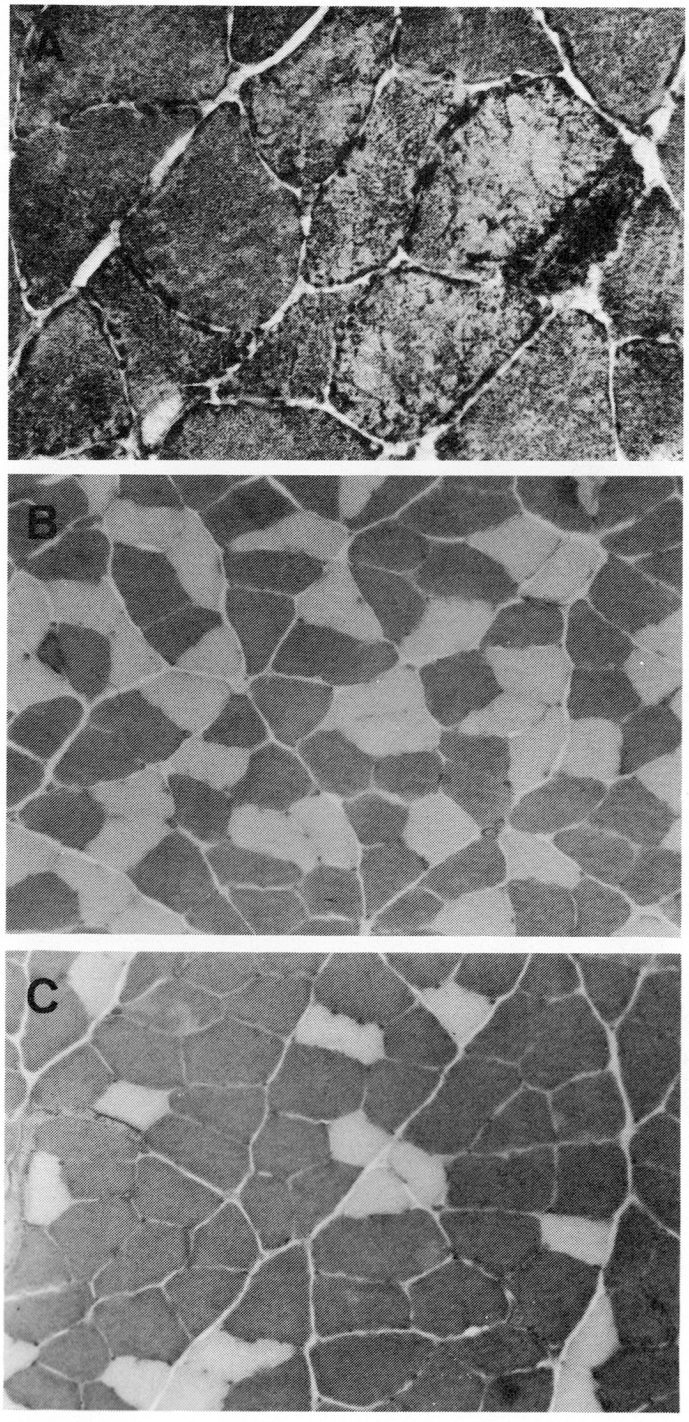


図2　A：Bラット第IV群ひらめ筋のNADPH-TR染色　（原図，×200）
B：Aラット第II群ひらめ筋のATPase pH4.5染色（原図，×100）
C：Bラット第II群ひらめ筋のATPase pH4.5染色（原図，×100）

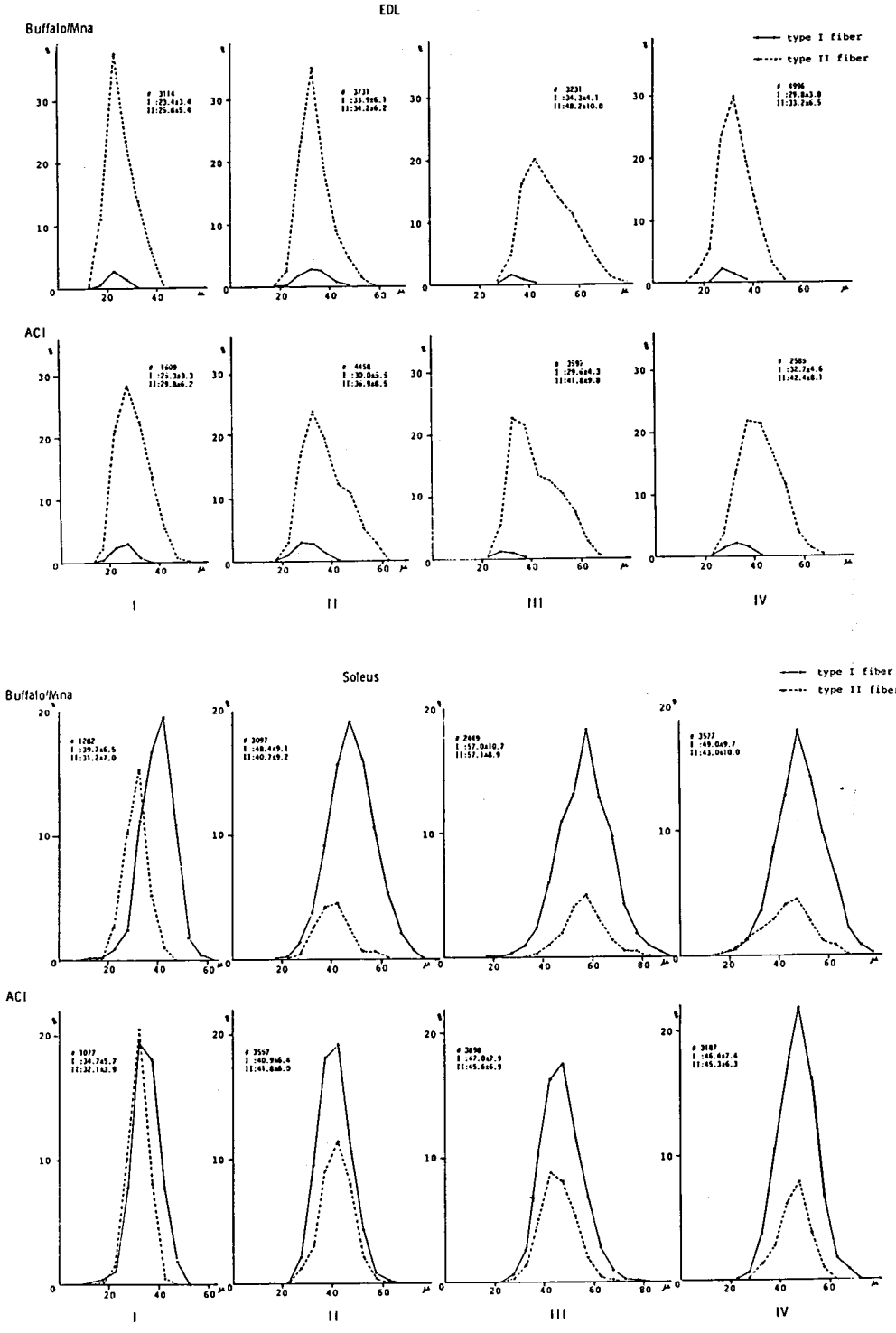


図3　長趾伸筋（EDL）およびひらめ筋（Sol.）での各群別％メガヒストグラム.

織の増生などの病的所見は見られず，筋原性あるいは神経原性病変を積極的に示唆する所見も見られなかった．また運動終板におけるコリンエステラーゼ活性も，両者間に差は見られなかった．しかし，BラットIV群のSol.では酸化酵素活性のパターンの乱れのある筋線維が増加していた（図2A）．

EDLおよびSol.における各群別%メガヒストグラムを両ラット間で比較すると(図3)，EDLにおいては各ヒストグラムのパターンに明らかな差異は認めなかったが，Sol.ではBラットにおいて，type I線維の占める比率が増加しtype II線維がtype I線維より小径となり，両typeの線維の分布幅が広がっていた（図2 B，C）．

Type I線維の占める比率を両ラット間で統計学的に比較してみると，EDLでは有意差はないが，Sol.のI群，II群，III群において，Bラットで有意に増加していた（表2）．

MDRを検討すると，III群のSol.を除き，EDL，Sol.ともBラットで有意に低下していたが，この比率はBラットの成長に応じて増減する傾向は見られなかった（表2）．

VIを各fiber type別に比較するとSol.において，Bラットで増加している傾向が見られた（表2）．

考　　察

Bラットの胸腺は生涯を通じてWister系ラットやACI系ラットより大きく，生後30週齢頃より胸腺の腫瘍化がおこり，18ヶ月齢の雄ラットではほぼ100%に胸腺腫がみられ，胸腺重量は20gまでになる．胸腺腫は腫瘍性に増殖した上皮細胞内に非腫瘍性のリンパ球が充実性に存在する形態をとる[1)2)3)4)]．

本ラットは他ラットと比べ体動が減少しており，rotor loadによるperformance timeが胸腺腫発症前の生後10週齢頃より急激に低下し，その後はほぼ低い能力でplateauに達する[1)]．

下腿筋における電気生理学的検索では高頻度反復刺激で重症筋無力症とは異なった筋の易疲労性，収縮力の低下が見られる[5)]．

本ラットの骨格筋の病理所見については，外眼筋，大腿四頭筋のパラフィン標本や電顕標本で，筋線維の変性所見があることが報告されている[1)]．しかし下腿筋における組織化学的検索では非特異的変化しか見られないという報告がなされている[6)]．

今回我々の行なったEDLとSol.についての観察では光顕的に明らかな筋原性あるいは神経原性病変は見られなかったが，組織化学的定量的に検討してみると，1)type II線維が大部分を占めるEDLでは，MW/BWがBラットで6週齢ですでにAラットより小さく，その後もほぼ一定の比率を保つ．一方，type I線維が多数を占めるSol.では有意差が見られない．2)MDRが，BラットでEDL, Sol.の両筋において有意に小さい．以上の結果より，Bラットでは胸腺腫が発生する以前，さらにはlotor loadで運動量が低下するより前に，type II線維のhypotrophyがあることが明らかになった．つまり，fast twitch muscleであるtype II線維に見られるような変化により，胸腺腫発症の影響とは関係なく，Bラットの運動量が低下するものと考えられる．

またBラットのSol.では，type I線維の占める比率がAラットに比べ増加しており，メガヒストグラムの分布幅が広がっており，酸化酵素活性パターンの乱れのある筋線維が増加していることより，さらに赤筋線維においても何らかの病変（筋原性？）が存在することが示唆される．

なおBラットの約4%に，下腿伸筋群がほとんど欠損したものが生まれ，これをbrother sister matingさせると5匹中4匹に下腿伸筋ラットが生まれた．しかし，第2世代以後は致死となり，得られていない．胸腺腫を引きおこす遺伝子と，下腿伸筋欠損を引きおこす遺伝子とは相異なるものと推測され，下腿伸筋欠損ラットの確立と，その病理学的検討は今後の課題である．

文　　献

1) Matsuyama, M., Amo, H., et al.：Motor dysfunction and musclar abnormalities in rats of the high thymoma Buffalo/Mna strain. ed.

by Satoyoshi, E., University of Tokyo Press, Tokyo, 1981, p. 81.

2) 松山睦司，天羽引行，ほか：Buffalo/Mna 系ラットにおける自然発生胸腺腫．Exp. Anim., 30：67, 1981.

3) Matsuyama, M. & Amo, H.：Host origin of lymphoid cells in thymomas developed from subcutaneous thymus grafts in Buffalo rats. Gunn, 68：293, 1977.

4) Matsuyama, M., Suzuki, H., et al.：Ultrastructure or spontaneous and urethan-induced thymomas in Buffalo rats. Cancer Res., 35：2771, 1975.

5) Kato, F. & Watanabe, M.：Motor dysfunction in spontaneous thymoma rats, Buffalo/Mna. J. Pharm. Dyn., 5, 727, 1982.

6) 佐橋　功，衣斐　達，ほか：自然発生胸腺腫ラットにおける骨格筋の組織化学的研究．厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班．昭和56年度研究報告書，1982, p.96.

8) 正常及び筋ジストロフィー鶏胸腺内 myoid cells の形態学的検討

塚越　廣*

研究協力者　小林高義*　松本容秋*

椎橋美智子**　水平敏知**

筋ジストロフィー症のモデル動物である筋ジストロフィー鶏（筋ジス鶏）は，浅胸筋などの白筋を主体として筋原性変化をおこすことはよく知られた事実である．一方，最近筋ジス鶏胸腺内の mast cell, histamine の減少[1]，T細胞機能異常[2]が報告されているが，胸腺内 myoid cell の検討はほとんどなされていない．今回我々は，正常及び筋ジス鶏胸腺内 myoid cells の形態学的変化を比較検討すると共に，培養下での胸腺及び大胸筋切片からの筋の再生及び Acetylcholine receptor（AChR）の局在について検討を加えたので報告する．

実験材料及び方法

(1)正常及び筋ジス鶏の胸腺重量の比較

正常（line412）及び筋ジス鶏（line413）のふ化直前の鶏胚を各々3羽ずつ取り出し，体重を Mettler H35 AR で測定．実体顕微鏡下で甲状腺を確認し，眼下まで充分周囲の組織を剝離し脂肪織を完全に取り去り，一層の被膜をかぶった胸腺組織のみを取り出し，胸腺重量を同様に測定し，全胸腺／体重比を比較検討した．

(2)正常及び筋ジス鶏胸腺内 myoid cell の形態学的検討

正常及び筋ジス鶏胚21日目及びふ化8日目の胸腺をとり出し，クリオスタットで切片を作成．H・E, Gomori-trichrome などの組織学的染色を行い両者を比較検討した．更に，各々の鶏胚10，14，18, 21日目及びふ化1日目及び1年以上の成鶏（老鶏と略）の胸腺を取り出し，2.5% glutaraldehyde 固定，2％ osmium 酸で後固定，脱水包理．光顕標本は toluidine blue 及びサリー染色を行い，電顕標本は酢酸ウラン，水黒鉛で二重染色後日立H-800にて電顕的観察を行った．

(3)正常及び筋ジス鶏胸腺と大胸筋の組織培養

鶏胚14，16，18，21日目，ふ化1，3日目及び老鶏の各々の胸腺及び大胸筋を取り出し，周囲の脂肪織，結合織を充分取り去り（胸腺は周囲の組織が付着していないことを電顕的にも確認した），各々約0.5mm³ に細切し，コラーゲン塗布カバースリップに explant した．培養液は，Eagle's MEM with Hanks' salts 80%，馬血清15%，Embryo Extract 5％, penicillin potassium 200 u/ml (glucose として 6 g/l) を使用し，週2～3回培養液を交換し，経時的に位相差顕微鏡で観察．適宜固定し，Jenner-Giemsa 染色を行った．

(4)正常及び筋ジス鶏胸腺と大胸筋由来筋細胞上の AChR の局在の検討

培養3週目の正常及び筋ジス鶏胸腺及び大胸筋の explant culture を使用．PBS で洗浄後，2％ paraformaldehyde で前固定．PBS/BSA で preincubation．5 μCi/ml ^{125}I α-Bungarotoxin（α-BGT）に1時間 incubate．PBS/BSA, PBS で各3回充分に洗浄した後，2.5% glutaraldehyde＋tannic acid で後固定し，脱水後自然乾燥．サクラ NRM 2乳剤をカバースリップ上に均一に塗布．4℃，5週間暗室に保存．コニドールXにて20℃，4分間感光させた．オイキットで包埋

＊東京医科歯科大学医学部神経内科
＊＊東京医科歯科大学難治疾患研究所超微構造部門

後，現像銀粒子を光顕的に観察し，AChR の分布を比較検討した．対照として，preincubation 及び incubation 時に，10^{-2} M d-tubocurarine(d-TC) を添加した阻害実験及び，α-BGT で incubation しない標本を作成し人工産物の有無を検討した．

結　　果

(1)正常及び筋ジス鶏の胸腺重量の比較

正常，筋ジス鶏ともふ化直前の体重は平均約40 kg．胸腺は，この時期では左右各々4～6葉に分かれており，6羽中4羽で左葉が右葉より重かった．胸腺の総重量はやや筋ジス鶏の方が重い傾向があったが，胸腺重量／体重比では，夫々0.091 %，0.112%と有意差は認めなかった（表1）．

(2)正常及び筋ジス鶏胸腺内 myoid cell の形態学的検討

正常，筋ジス鶏胚10～14日では，胸腺組織は疎にリンパ系，上皮系の細胞が分布し，myofilament をはっきり有する myoid cell をみつけるのは困難であった．しかし，ふ化前後では，髄質及び皮髄境界を中心に，類円形，長方形あるいは長く帯状に伸びた myoid cells が認められ（図1-A），電顕的に hexagonal structure（図1-B），あるいはZ帯を有し，明らかな横紋筋構造を認めた．しかし，myoid cell の数は，同時期の White Leghorn 種に比し少なかった．一方，正常，筋ジス鶏とも老鶏においても myoid cell はかなり存在し（図1-C，E），両者ともZ帯を有する myofilament が細胞内に錯綜して認められ（図1-D，F），myoid cell の数，細胞内の構造に明らかな差は認められなかった．

(3)正常及び筋ジス鶏胸腺と大胸筋の組織培養

正常及び筋ジス鶏大胸筋の explant culture では，鶏胚では，24時間以内に myoblast は融合し，1～2日で筋管細胞が explant より放射状に伸び出し，早いものでは4～6日に横紋を形成した．ふ化後の鶏大胸筋の explant から筋管細胞が伸び出すのは数日かかり，初期の筋管細胞の出現とその伸びはむしろ筋ジス鶏大胸筋の方が良好であるが，その後の横紋形成の時期，自発収縮に明らかな差は認められなかった．一方，筋ジス鶏大胸筋は，比較的初期より正常に比し空胞が多い傾向があった．

正常及び筋ジス鶏胸腺では，explant 直後よりリンパ球が遊出し，24時間以内に単核細胞が遊走し始めた（図2-A）．5～6日には融合した多核の筋管細胞が出現し始め（図2-B），10日頃には急速に筋管細胞の数は増し，2週目には横紋を形成し一部自発収縮のある成熟した骨格筋細胞を認めた（図2-C，E）．筋細胞の出現の有無，数は同一の鶏胸腺の explant culture 間でもかなり差があり，これは myoid cell の胸腺内の存在に局在があるためと考えられた．Explant によっては，上皮性細胞が sheet している外側の線維芽細胞との境界から筋細胞が伸び出している像もみられ（図2-D），これは皮髄境界に myoid cell が多く存在することと一致する所見と思われた．胸腺より再生された筋細胞は，正常及び筋ジス鶏のいずれの時期でも，その横紋形成，自発収縮に明らかな差は認められなかったが，筋ジス鶏胸腺由来筋細胞は，筋ジス鶏大胸筋由来筋細胞と同様に，比較的初期より著明な空胞を有する細胞が認められた（図2-F）．

一方，老鶏では，正常鶏大胸筋及び両者の胸腺の explant から良好な筋細胞の再生を認めたが，筋ジス鶏大胸筋からの再生は極めて少数であった．

表1　正常及び筋ジス鶏の胸腺重量の比較（鶏胚21日目）

	体　重 (g)	胸腺重量 (mg)	胸腺重量／体重比 $\times 10^{-1}$ %
筋ジス	40.4 ± 3.46	45.9 ± 9.9	1.12 ± 0.16
正　常	40.3 ± 1.14	36.7 ± 6.3	0.91 ± 0.16

n = 3

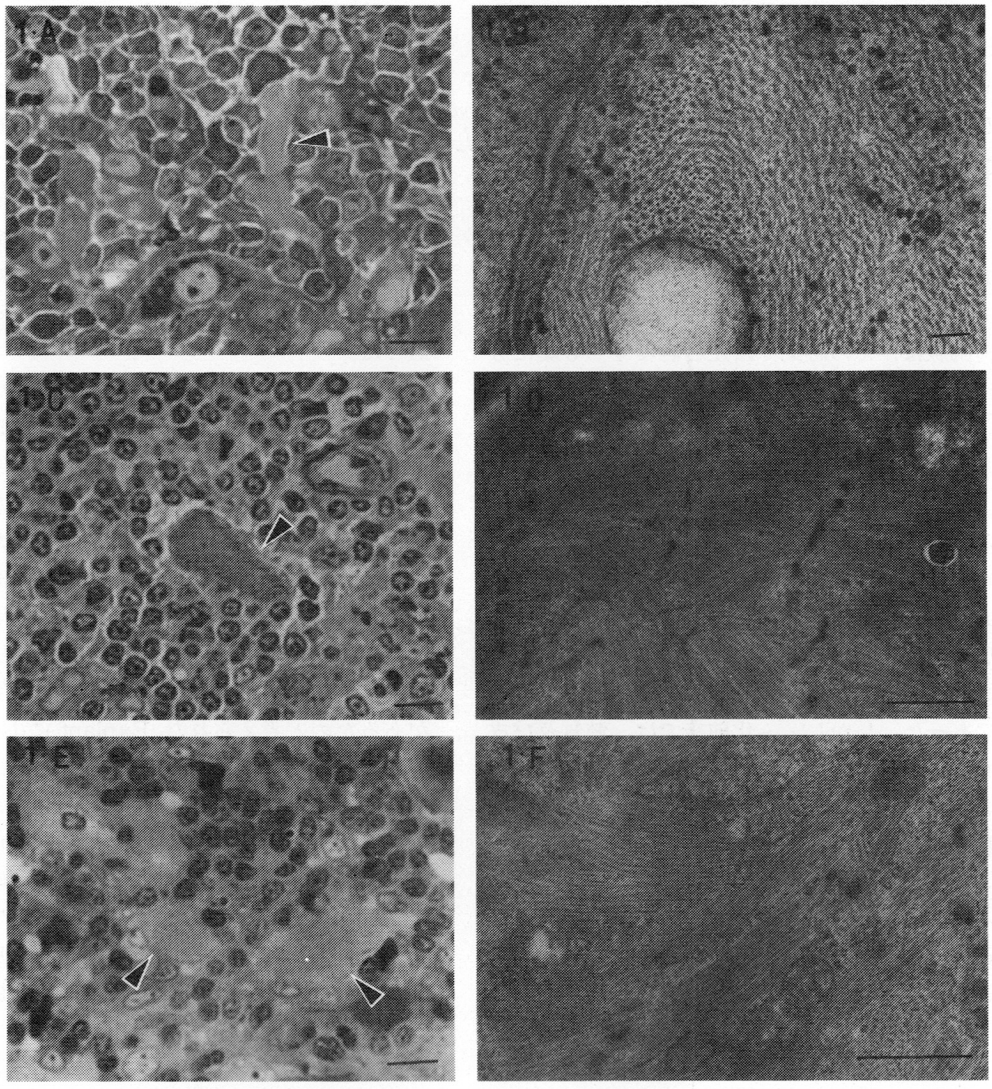


図1　正常及び筋ジス鶏胸腺内 myoid cell の光顕及び電顕写真

A, B. 筋ジス鶏ふ化後1日目の胸腺. A：帯状の myoid cell を認める（矢印）. Toluidine blue 染色. Bar＝10μm. B：Myoid cell 内に myosin filament のまわりに6個の actin filaments が配列する hexagonal structure を有する myofilaments が存在する. Bar＝0.1μm. 酢酸ウラン・水黒鉛二重染色.

C, D. 正常鶏ふ化後1年以上経た胸腺. C：長方形で一部に横紋を有する myoid cell を認める（矢印）. サリー染色. Bar＝10μm. D：myoid cell 内にZ帯を有する myofilaments が錯綜して存在する. Bar＝1 μm. 酢酸ウラン・水黒鉛二重染色.

E, F. 筋ジス鶏ふ化後1年以上経た胸腺. E：類円形の myoid cells を認める（矢印）. Toluidine blue 染色. Bar＝10μm. F：myoid cell 内にZ帯を有する myofilaments が，正常鶏と同様に存在する. Bar＝1 μm. 酢酸ウラン・水黒鉛二重染色.

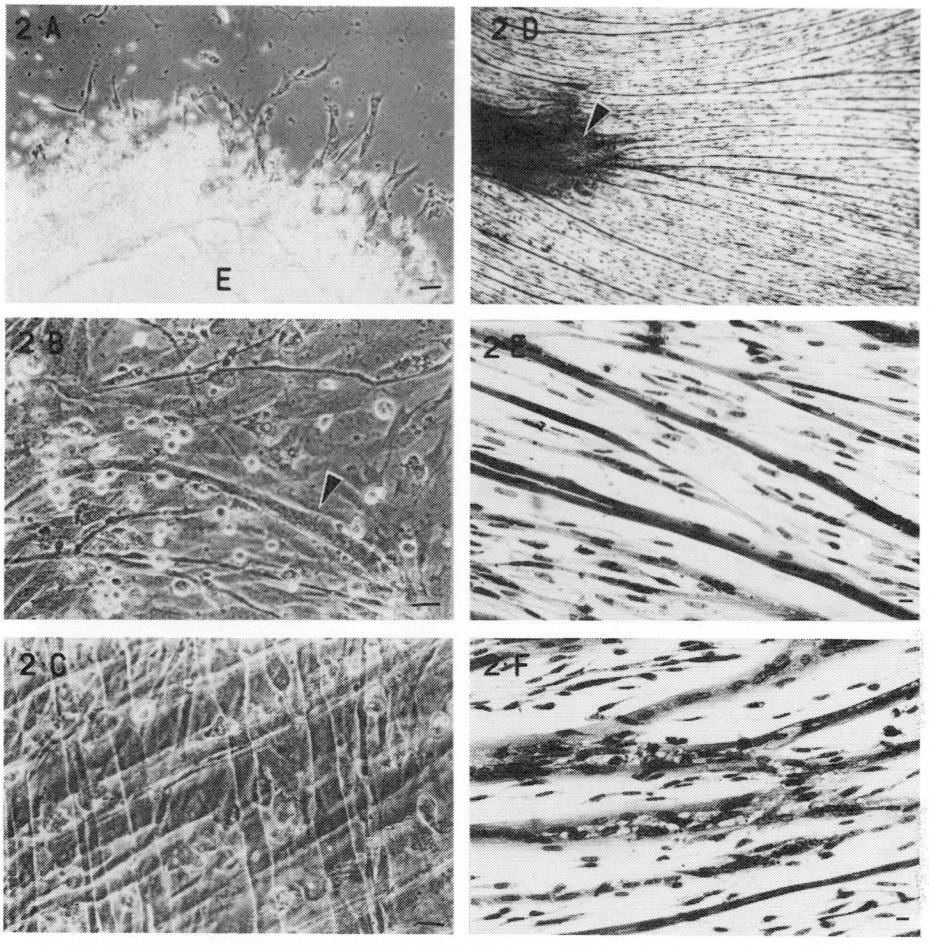


図2　正常及び筋ジス鶏胸腺の組織培養所見

A, B, C．正常及び筋ジス鶏胸腺の組織培養の位相差顕微鏡写真．

A：正常鶏胸腺培養1日目．Explant(E)よりリンパ球系の浮遊細胞が遊出し，単核の細胞が遊走し始めている．Bar＝10μm.

B：筋ジス鶏胸腺培養5日目．多核の筋管細胞が形成され始めている（矢印）．Bar＝10μm.

C：正常鶏胸腺培養32日目．横紋を形成した成熟した筋細胞が密集し，重層して認められる．

D, E, F．筋ジス鶏胸腺培養13日目．Jenner-Giemsa 染色．

D：Explant よりモザイク状に上皮性細胞が遊走し（矢印），上皮性細胞が sheet している外側の線維芽細胞との境界から筋細胞が勢いよく伸び出している．Bar＝100μm.

E：F, D, の筋細胞の拡大像．

E：横紋を形成した筋細胞を多数認める．Bar＝10μm.

F：一部の筋細胞に著明な空胞を認める．Bar＝10μm.

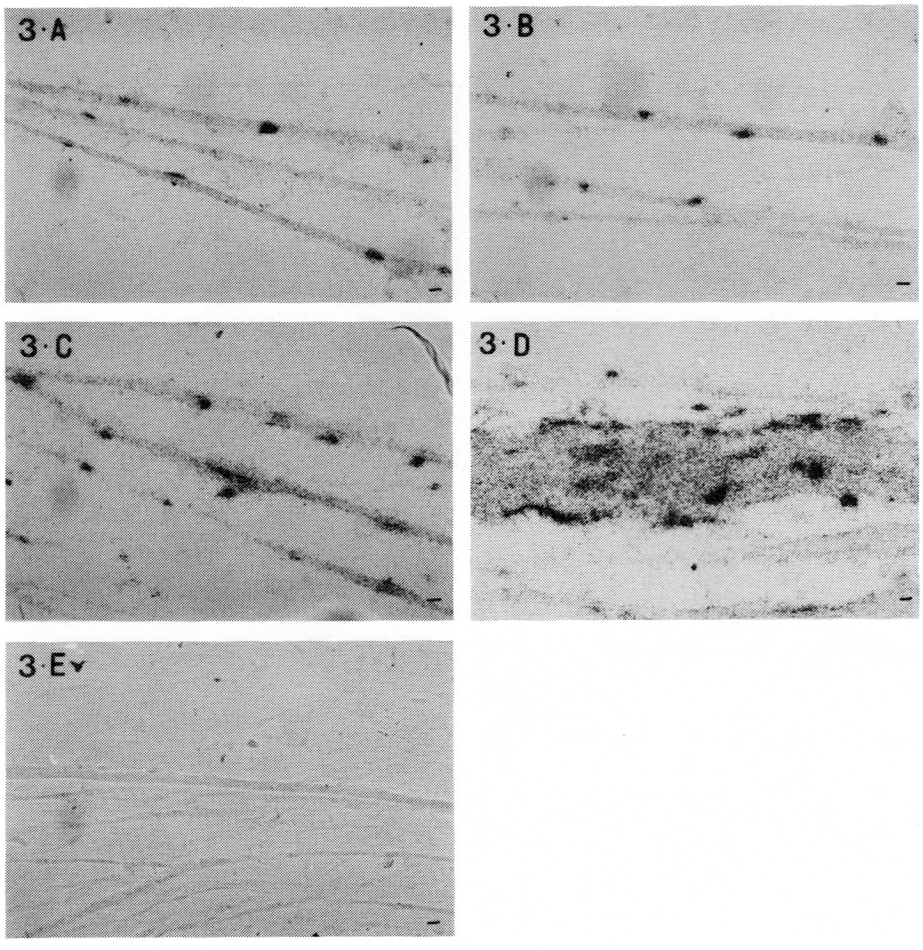


図3　正常及び筋ジス鶏胸腺と大胸筋由来筋細胞上の AChR の局在
正常及び筋ジス鶏胸腺と大胸筋培養 3 週後^{125}Iα-BGT によるオートラジオグラフィー．無染色．
A：正常鶏大胸筋由来筋細胞．B：筋ジス鶏大胸筋由来筋細胞．
C：筋ジス鶏胸腺由来筋細胞．
A～C，いずれも筋細胞上にび慢性に AChR を認め，一部に AChR の集中した hot spots を認める．Bar＝10μm.
D：筋ジス鶏胸腺由来筋細胞の中には著しく幅の広い筋細胞を認め，その上にもび慢性に AChR を認める．Bar＝10μm.
E：正常鶏大胸筋由来筋細胞．Preincubation，α-BGT の incubation 時に10^{-2} M d-tubocurarine を添加した阻害実験では，筋細胞上に現像銀粒子は全く認められない．Bar＝10μm.

(4)正常及び筋ジス鶏胸腺と大胸筋由来筋細胞上のAChRの局在の検討

培養3週目の正常及び筋ジス鶏胸腺と大胸筋由来筋細胞上には，いずれの場合にもび慢性にAChRが存在し，所々にAChRの集中したhot spotsが認められた(図3-A，B，C)．また，筋ジス鶏胸腺由来筋細胞で，90μm以上の幅の広い筋管細胞が存在したが，その細胞上にもび慢性にAChRが存在した(図3-D)．一方，10^{-2} M d-TCを添加した阻害実験（図3-E）及び，α-BGTを添加しない実験では，現像銀粒子はカバースリップ上に存在せず，本実験で筋細胞上のAChRに結合したα-BGTは，特異的結合と考えられた．

考　　察

筋ジス鶏胸腺重量は，正常鶏よりも軽いことが今までにE. Cosmosら[3]，K. Klineら[2]によって報告されている．K. Klineらは，New Hampshire種のN_3 strain筋ジス鶏と，White Leghorn種由来のHy-line SC strainを正常鶏とし，ふ化後25日，100日，365日以上で比較検討し，いずれも筋ジス鶏胸腺が正常に比し体重比でも減少していると報告している．我々のline412及びline413によるふ化直前の測定では，両者に差は認められなかった．このことは，今までの報告が種差による相違なのか，ふ化後ある時期以後差が生じてくるのか今後の検討が必要と思われる．

正常及び筋ジス鶏胸腺内myoid cellに関しては，K. Klineらが，ふ化後25，100日目の胸腺の組織化学的，免疫組織学的検討を行っている．彼らは，両者のmyoid cellともSDH染色で強く染まり，ATPase染色では弱くしか染まらず，好気性代謝であるとし，myosinを間接螢光法で染め，正常及び筋ジス鶏胸腺内のmyoid cellの形，数，分布に明らかな差を認めなかったとしている．今までに，正常及び筋ジス鶏胸腺内myoid cellの電顕的検討及び1年以上経た成鶏の比較検討はなされていないが，我々の今回の検討においても，組織学的，電顕的に鶏胚，ふ化前後，老鶏において明らかな差は認められなかった．

正常，筋ジス鶏胸腺内myoid cellは，Z帯を有するもののmyofilamentは細胞内で錯綜しまだ未熟な段階にあると思われるが，*in vitro*では，両者の胸腺からいずれも横紋を形成し，自発収縮のある成熟した骨格筋が出現し，AChRの分布も全く大胸筋由来筋細胞と同様であり，胸腺内myoid cellは本来骨格筋に分化する能力をもっていると考えられる．また，観察した限り心筋細胞は認められなかった．Masakiら[4]は，幼若な鶏骨格筋には白筋，赤筋，心筋myosinが存在すると報告しており，Sugitaら[5]も鶏胸腺myoid cellには，免疫抗体法で，myosinの白筋，赤筋，心筋型heavy chainが存在すると報告している．これらの形態学的，免疫学的事実は，本来胸腺内myoid cellは骨格筋に分化する能力を有しているものの，生体内では未熟な状態で長期に存在していることを意味していると思われる．一方，培養下では，筋ジス鶏胸腺由来筋細胞は，大胸筋由来筋細胞と同様に比較的初期より正常に比し，空胞が多く存在することから考えると筋ジス鶏骨格筋の性格を有すると思われる．しかし，胸腺内では長期に未分化のまま存在しているため，大胸筋が年と共に変性壊死に陥り，1年以上経た筋ジス鶏大胸筋では，筋細胞が再生し難いのに比し，再生能力のある細胞が正常と同様に存在しているものと考えられる．

結　　論

正常及び筋ジス鶏胸腺内myoid cellは，生体内で形態学的に明らかな差を認めなかった．培養下では，両者の胸腺より成熟した骨格筋が出現し，その細胞上のAChRは大胸筋由来筋細胞と明らかな差を認めなかった．しかし，筋ジス鶏胸腺由来筋細胞は筋ジス鶏大胸筋由来筋細胞と同様に，比較的初期より空胞の多い傾向を認めた．また1年以上経た成鶏では，筋ジス鶏大胸筋からは筋が再生し難いのに比し，正常鶏大胸筋及び両者の胸腺からは良好な筋細胞の再生を認めた．

文　　献

1) Befus, A. D., Johnston, N., Neilson, L., et al.: Thymic mast cell dificiency in avian muscular

dystrophy. Thymus, 3 : 369, 1981.

2) Kline, K. & Sanders, B. G. : Demonstration of a cellular defect in the thymus of hereditary muscular dystrophic chicken. Thymus, 4 : 9, 1982.

3) Cosmos, E., Percy, D. Y., Butler, J., et al. : Thymic-muscle interaction : a nonneural influence on metabolic differentiation of anaerobic muscle of normal and dystrophic phenotype. Differentiation, 9 : 139, 1977.

4) Masaki, T. & Yoshizaki, C. : Differentiation of myosin in chicken embryos. J. Biochem., 76 : 123, 1974.

5) Sugita, H., Nonaka, I., Ishiura,S., et al. : Biochemical and immunological studies of myoid cells in chicken thymus. In "Myasthenia Gravis" (edited by Satoyoshi, E.) , University of Tokyo Press, Tokyo, 1981, p. 321.

9) ジストロフィー鶏・培養筋細胞からのCPKの遊離

宇尾野　公　義*

研究協力者　　黒　田　洋一郎**　高　元　喜代美*

目　　的

血中CPK量は筋ジストロフィー症診断の重要な指標となっている．また血清中に遊離されるCPKは，Duchenne型筋ジストロフィー症の胎児臍帯血中でも高値を示し，ジストロフィー症がすでに胎生期に発症していることを示唆している．我々は，筋ジストロフィー症は筋の発生分化のどのような時期にどのような形で発症するのか，またそれはCPKの遊離という現象とどのようにかかわるのかを明らかにする目的で，ジストロフィー鶏胚胸筋と対照正常鶏胚胸筋を同じ条件下で初代培養し，培養液中に遊離されるCPK及び他の関連酵素の活性を測定し，比較検討した．

使用したジストロフィー鶏はLine413で，常染色体劣性の筋ジストロフィー遺伝子をもつ．対照正常鶏はLine412で，両者とも問題の遺伝子に関してhomozygoteであり[1]，筋ジストロフィー遺伝子の発現による筋細胞の変化の差をとらえる目的には好適と考えられた．

方　　法

1．筋細胞の培養

ジストロフィー鶏（Line413）および対照正常鶏（Line412）の10日胚胸筋を取り出し，0.2%コラゲナーゼ(Sigma)で5分間37℃で処理後，機械的に単離し浮遊細胞とした．約6×10^5cellを35mm径のコラーゲンを塗布したculture dishにまいた培地はDulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO)に5%馬血清(GIBCO)と3.5% Chick Embryonic Extract（正常鶏の9～10日胚から調製)を加えたものを1.5mlずつ使用し，37℃のCO_2培養器中で培養した．

2．サンプリングと酵素活性の測定

2日に1回ずつ培養液を交換し，古い培地は遠心管に移しサンプルとし，等量の新しい培地を加えた．サンプルの培養液は3000rpm10分間冷凍遠心し，上清を酵素活性の測定まで−20℃で凍結保存した．CPK，LDH，GOT，GPT活性はすべて同じサンプルを用いて，自動測定機（ATAC705）で同時に測定した．細胞非存在のdishに2日間同様にincubateした培地の活性を測定し，これをbasal活性として，サンプルとの差を酵素活性遊離量とした．3～5枚の同条件のdishについてそれぞれ各酵素活性を測定し，平均値と標準偏差を計算し，ピーク値に関してはt検定を行った．

結　　果

1．筋細胞の培養状態

単離細胞は培養開始1日後頃から融合を始め，3～4日後までにmyotubeを形成した．7日後頃からfibroblastの増加がみられ，11日目にはdishの底にほぼ一面に拡った．光学顕微鏡による観察では，ジストロフィー鶏培養筋細胞と対照正常鶏培養筋細胞の間で，細胞数，形態とも顕著な差は見出し得なかった．

2．酵素活性の総遊離量

培養19日までに培養液中に遊離した酵素活性の総量を表1に示した．ジストロフィー鶏由来の培養筋細胞から遊離されたCPKの総量は対照と比較して約1.9倍に達した．これに対し，LDHはジストロフィー鶏からの方がやや多いものの，有意な差は見られなかった．GOT，GPTにも有意な差はみられなかった．GPTは細胞存在下では，遊離よりも分解が顕著でマイナスの値を示した．

* 都立神経病院神経内科
** 東京都神経科学総合研究所神経生化学研究室

表1　Release of enzyme activities from embryonic chicken pectoralis muscle cultures

	Total Release (IU) x 10^3			
	CPK	LDH	GOT	GPT
Normal (line 412)	134	2396	522	-28
Dystrophy (line 413)	253	2580	472	-27
Dys / Nor	1.89	1.08	0.90	0.97

Initial cell no.; 6 X 10^5, 19 days in culture.

3．酵素活性遊離の時間経過

2日毎に測定したCPK活性の遊離量を図1に示した．ジストロフィー鶏の培養筋細胞では培養開始後からCPK遊離は増加し，7～9日で急増し，それ以後激減した．対照正常鶏でも低量ながら遊離量は培養日数とともに増加し，7～9日に最大値に達し，以後は低レベルでの変動を示した．7～9日でのCPK遊離量のジストロフィー鶏と正常鶏の差は大きく，0.1%の危険率で有意であった．

同じサンプルを用いて同時に測定したLDHの遊離量の変化を図2に示した．LDH活性の遊離

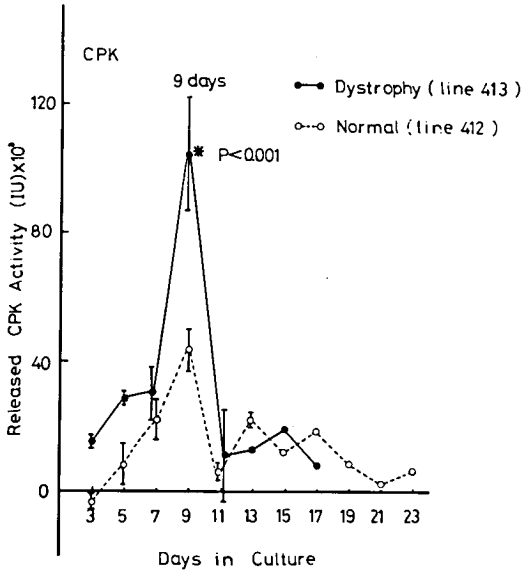


図1　筋ジストロフィー鶏胚胸筋培養細胞からのCPKの遊離
（6×10^5cellで開始したdish当りの活性）

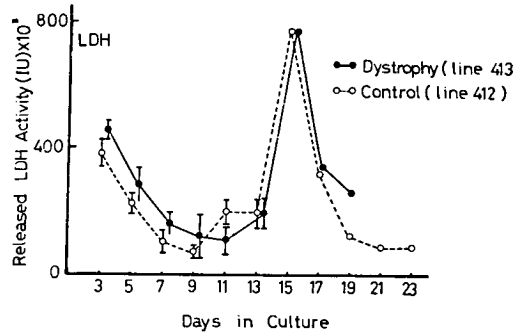


図2　筋ジストロフィー鶏胚胸筋培養細胞からのLDHの遊離
（6×10^5 cellで開始したdish当りの活性）

量はジストロフィー鶏培養筋細胞からのものが正常鶏に比べてやや絶対量が多い傾向があるものの，全く同じような時間経過で変化した．すなわち，培養開始後から7～9日まで次第に減少し，13～15日で著明に増加し，以後減少した．CPK活性の遊離が最大であった7～9日のサンプルで，LDH活性の遊離量は全く増加しておらず，むしろ最少値を示した．

GOT, GPTは特に大きな変化は示さず，7～9日のサンプルでも遊離量の増加はなかった．

考　　察

ジストロフィー鶏胸筋の初代培養を用いてCPKの遊離を測定した報告はWeinstockら[2]，Ionasescuら[3]，宮武ら[4]がある．これらはfibroblastの増殖をコントロールしていない条件下や，限られた1，2の時点でのサンプリングにより，ジストロフィー鶏からのCPK遊離量が正常鶏と比較し多いことを示したものであるが，fibroblastの増殖を極力押えた条件下で，CPK遊離量の時間的変化を他の酵素も比較しながら綿密に追った本研究でもジストロフィー鶏筋からのCPK遊離は確認できた．

本研究で使用したジストロフィー鶏（Line413）の血中CPKレベルは対照正常鶏（Line412）に比して約4倍で，またLine413の筋異常はまず胸筋に顕著に起こることが知られている[1)5)]．本研究でLine413の胸筋初代培養からのCPK活性の総遊

離量がLine412の約2倍であったことは，血中CPK量の増加の少なくとも一部は胸筋を構成している細胞群からのCPKの遊離によるものであることを示している．ジストロフィー鶏Line413の培養筋細胞と正常鶏Line412の培養筋細胞は，形態的にほとんど区別できない[5]，本研究の培養条件下でも，形態学的に差がない状態でもLine413においてはCPKの遊離を引き起こすようなジストロフィーの発症に関連すると思われる異常がすでに起こっていたことを示している．

CPKの遊離は図1に示したように培養7～9日に顕著に見られた．しかし同じ時期に細胞内酵素の代表であるLDHをはじめ，GOT，GPT遊離量の増加は全くみられなかった．これらの事実は，①CPKの遊離が細胞の壊死などによる細胞内酵素の非特異的な遊出によるものでないこと，②CPKの遊離が筋細胞の発生分化の特定のステージか，細胞間の相互作用など特定の生理条件下に起こったことを示している．

CPKの遊離は，myotubeがdish底面に一面にひろがっていて，まだfibroblastの増殖がみられない7～9日までに起こり，それ以後はfibroblastの増殖とは無関係にむしろ減少したままなので，CPKの遊離の源はmyotubeであろうと考えられる．しかし現段階ではmyotube以外の細胞から起こっている可能性も否定することはできない．宮武ら[4]は56年度の本班報告において，CPKアイソザイムの検討を行ない，12～13日胚培養筋ジス鶏筋では，CPKのB型からM型への移行に遅れがあることを示している．Fibroblastのみの培養を調べたり細胞内CPKのアイソザイムごとの量的変化を遊離されたものと対照しながら，今後検討する必要がある．

またLine413ジストロフィー鶏血中において正常鶏と比して著しく増加しているPK，Aldolase[5]などの他の酵素を調べ，CPK遊離の特異性を確認できれば，そのメカニズムの解明は「なぜ特定の酵素蛋白質だけが細胞膜を通過するのか」という疑問となり，生体膜の基礎研究としても興味ある課題となるであろう．

さらにジストロフィー鶏胸筋初代培養で特定の時期にCPKの遊離が起こるとすれば，それ以前に生じているジストロフィー発症に関係した変化をとらえる目安となり，この培養細胞系はジストロフィー発症機序の解明に有益な情報をもたらすことが期待できる．

文　献

1) Wilson, B.W., Randall, W.R., Patterson, G. T. & Entrikin, R.K.：Major physiologic and histochemical characteristics of inherited dystrophy of the chicken. Ann. N.Y. Acad. Sci., 317：224－246, 1979.

2) Weinstock, I.M., Jones, K.B. & Behrendt, J. R.： Development of normal and dystrophic chick muscle in tissue culture. J. Neurol. Sci., 39：71－83, 1978.

3) Ionasescu, V., Ionasescu, R., Witte, D., Feld, R., Cancilla, P., Kaeding, L., Kraus, L. & Stern. L.：Altered protein synthesis and creatine kinase in breast muscle cell culture from dystrophic chick embryos. J. Neurol. Sci., 46：157－168, 1980.

4) 宮武正，宮谷信行，湯浅龍彦；培養ジストロフィーチキン筋細胞のCPKアイソザイム．厚生省・筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究，三好班，昭和56年度研究報告書，1982，pp. 31-33.

5) 江橋節郎，ほか：ジストロフィーチキンについての予備的観察．厚生省・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，1976，pp. 9-14.

10）ジストロフィー鶏発育早期における superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase 活性の異常について

水　野　美　邦*

はじめに

筋ジストロフィー症の発症機序はなお不明であるが，活性酸素による細胞障害を考える仮説があり，その根拠として筋ジストロフィー生検筋における glutathione peroxidase 活性の上昇や[1]，動物モデルである鶏ジストロフィー罹患筋における superoxide dismutase, glutathione peroxidase の活性上昇があげられている．我々はこの仮説が正しいなら，発症早期よりこれらの変化が出現していなければならないと考え，ジストロフィー鶏を用いて発育早期の活性酸素関連諸酵素の検索を行った所，生後1週目より既にこれら諸酵素活性がジストロフィー鶏で有意に上昇しており，活性酸素系の代謝異常を示す所見を得たので報告する．

方　法

対象動物は New Humpshir 系ジストロフィー鶏（line 413）とその対照（line 412）で受精卵を実験動物中央研究所（山梨）より入手，孵化後1週目，2週目，4週目，4ヶ月目に4羽宛断頭屠殺し，浅胸筋の一部にて酵素活性を測定した．今回測定した酵素並びに方法は，superoxide dismutase は Misra & Fridovich[5] の方法，catalase は Cohen ら[6] の方法，glutathione peroxidase は Paglia & Valentin[7] の方法，glutathione reductase はその応用によった．蛋白は Lowry らの方法によった．

結　果

ジストロフィー鶏の可溶性蛋白濃度は，対照に比し有意に低かったので（表1），結果は蛋白当りの比活性，および，湿重量当りの総活性両方で比較した．結果は表2，3にまとめてあるが，superoxide dismutase に関しては，シアンにより不活化される Cu-Zn superoxide dismutase と抵抗を示す Mn superoxide dismutase 2つの isozyme が知られているので，最初に総活性を求め，それから Mn superoxide dismutase 活性を引いたものを，Cu-Zn superoxide dismutase 活性としたが，後者について見ると，対照では発育と共に，活性が比活性でも総活性でも漸減してゆくのに対し，ジストロフィー鶏では対照より有意に活性が高く，しかも4週齢にピークを示す特異なコースを示している．Mn superoxide dismutase に関しては，

表1　10倍量ホモジェネート上清成分の蛋白含量

	700g 上 清			100,000g 上 清		
	Dystrophy	Control	t 検定	Dystrophy	Control	t 検定
第 1 週	5.93±0.44	7.41±0.34	p<0.01	4.28±0.38	5.86±0.53	p<0.01
第 2 週	7.21±0.34	8.38±0.30	p<0.01	4.95±0.16	6.57±0.43	p<0.01
第 4 週	6.91±0.51	8.60±0.50	p<0.01	4.85±0.21	6.27±0.21	p<0.01
4 ヶ 月	5.84±0.42	8.18±0.42	p<0.01	5.03±0.56	6.40±0.62	p<0.05

単位：mg／ml，mean ± SD（n＝4）

*自治医科大学神経内科

表2　ジストロフィー鶏におけるsuperoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductas,e活性(蛋白1mg当りの比活性で現わした場合, m±SD, n=4)

年　齢	Dystrophy	Control	t 検定
Cu−Zn　superoxide dismutase*			
第 1 週	1.112 ±0.240	0.747±0.037	p<0.05
第 2 週	0.927 ±0.199	0.568±0.089	p<0.05
第 4 週	1.350 ±0.384	0.536±0.076	p<0.02
第4ヶ月	0.993 ±0.355	0.412±0.062	p<0.05
Mn superoxide dismutase*			
第 1 週	0.815 ±0.076	0.419±0.024	p<0.01
第 2 週	0.706 ±0.078	0.388±0.021	p<0.01
第 4 週	0.738 ±0.126	0.372±0.045	p<0.01
第4ヶ月	0.556 ±0.060	0.344±0.014	p<0.01
Catalase**			
第 1 週	1.23 ±0.34	0.20 ±0.10	p<0.01
第 2 週	0.76 ±0.14	0.086±0.078	p<0.01
第 4 週	0.99 ±0.43	0.052±0.017	p<0.01
第4ヶ月	0.73 ±0.19	0.021±0.025	p<0.01
Glutathione peroxidase***			
第 1 週	18.71 ±1.60	10.81±2.24	p<0.01
第 2 週	17.76 ±2.65	8.91 ±0.90	p<0.01
第 4 週	16.94 ±4.25	7.74 ±0.93	p<0.02
第4ヶ月	20.27 ±2.70	6.53 ±1.52	p<0.01
Glutathione reductase***			
第 1 週	9.19 ±0.93	4.93 ±0.93	p<0.01
第 2 週	7.11 ±1.95	3.29 ±0.96	p<0.05
第 4 週	8.01 ±3.44	1.99 ±0.40	p<0.05
第4ヶ月	7.04 ±0.95	2.13 ±0.63	p<0.01

* 1 unit=epinephrineの酸化を50%抑制する酵素活性
** 1 unit= 1 μmole H_2O_2 catalyzed/min.
*** 1 unit= 1 n mole NADPH oxidized/min.

表3　ジストロフィー鶏におけるsuperoxide dismutase, catalase, glutathione, peroxidase, glutathione reductase活性（湿重量1g当りの総活性で現わした場合，m±SD, n=4）

年　齢	Dystrophy	Control	t 検定
Cu−Zn　superoxide dismutase*			
第 1 週	47.5±10.6	43.9 ±5.1	n.s.
第 2 週	45.6±7.9	37.5 ±7.3	n.s.
第 4 週	65.7±19.6	33.8 ±5.9	p<0.05
第4ヶ月	50.62±12.46	26.87±3.58	p<0.05
Mn superoxide dismutase*			
第 1 週	34.6±1.6	24.6 ±2.6	p<0.01
第 2 週	34.9±3.7	25.4 ±1.2	p<0.01
第 4 週	35.7±5.9	23.2 ±2.1	p<0.05
第4ヶ月	29.24±1.02	23.29±1.62	p<0.01
Catalase**			
第 1 週	71.4±14.8	15.1 ±7.7	p<0.01
第 2 週	53.8±9.8	6.14 ±2.07	p<0.01
第 4 週	65.1±25.8	4.44 ±1.39	p<0.01
第4ヶ月	42.1±9.6	1.82 ±2.16	p<0.01
Glutathione peroxidase***			
第 1 週	796±51.1	624±87.3	p<0.05
第 2 週	887±93	582±43	p<0.01
第 4 週	818±193	484±50	p<0.05
第4ヶ月	1007±82	415±73	p<0.01
Glutethione reductase***			
第 1 週	390±21	286±37	p<0.01
第 2 週	349±81	214±58	p<0.1
第 4 週	386±158	125±23	p<0.05
第4ヶ月	349±15	133±32	p<0.01

* 1 unit=epinephrineの酸化を50%抑制する酵素活性
** 1 unit= 1 μmole H_2O_2 catalyzed/min.
*** 1 unit= 1 n mole NADPH oxidized/min.

活性はやはりジストロフィー鶏で有意に高いが，成長に伴う変化は対照とほぼ平行した漸減パターンを示している．次にcatalase活性については，対照浅胸筋では活性がきわめて低く，更に成長に伴って活性は低下するが，ジストロフィー鶏では著明に上昇しており平均値では第1週目で既に6倍の活性増大を示していた．その後の経過も4週目に小さいピークがあり，Cu-Zn superoxide dismutaseとほぼ平行する経過をたどった．Glutathione peroxidase活性はやはりジストロフィー鶏で有意に上昇しており，対照では成長と共に漸減するのに対し，ジストロフィー鶏では，最初軽度に漸減コースをたどるが，再び増大して4ヶ月齢で活性が最大となり，対照との差は3倍以上となっている．Glutathione reductaseに関してもやはりジストロフィー鶏で有意に活性が上昇しており，成長に伴う活性の低下も，対照に比較すると軽度に見られるのみである．

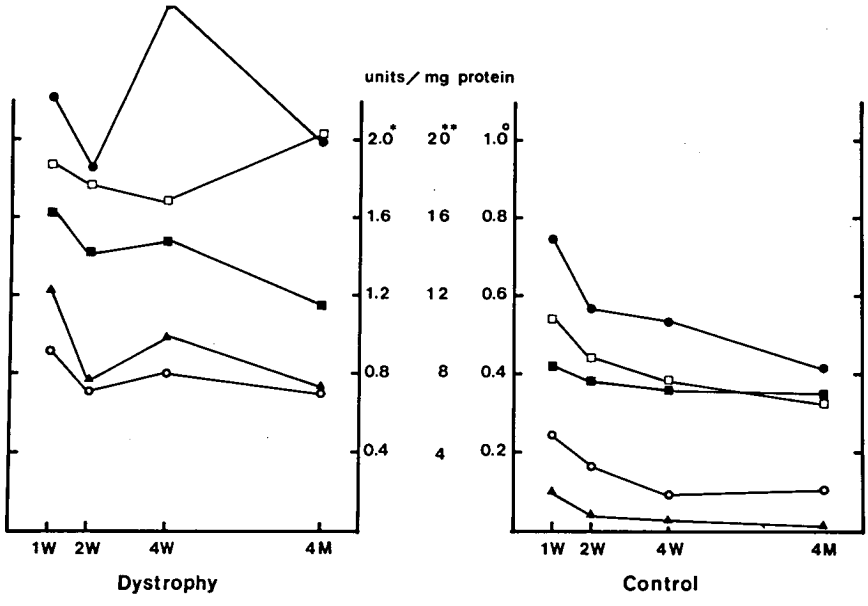


図1　Cu-Zn superoxide dismutase (●-●), Mn superoxide dismutase (■—■), catalase (▲—▲), glutathione peroxidase (□-□), glutathione reductase (○-○) 活性の成長に伴う変化. * catalase 用スケール, ** glutathione peroxidase および glutathione reductase 用スケール, ○ superoxide dismutase 用スケール. 左ジストロフィー鶏, 右対照. 説明本文並びに表2参照.

これら5つの測定した酵素の平均値を縦軸に年齢を横軸にとってプロットしてみると図1の如くなり, ジストロフィー鶏と対照との差異がはっきりする. 即ち, 対照では活性酸素の代謝に関連したこれらの酵素活性は何れも, 成長と共に, ほぼ平行して漸減してゆくが, ジストロフィー鶏では活性の絶対値の増加があるのみならず, 成長に伴う活性の時間経過が全く乱れて特異なパターンを示している事がよくわかる.

考　　察

活性酸素とは, 酸素分子が段階的に還元をうけてゆく過程で生ずる分子種の事で, 全ての酸素呼吸を行う細胞内で絶えず発生しており, その非特異的な酸化能力により細胞毒性が強い[8]. 生体内には, 活性酸素系から自己を守る酵素系が存在するが, その一部を模式的に示すと図2の如くになる. 即ち superoxide anion は superoxide dismutase により過酸化水素に代謝され, 過酸化水素は catalase, glutathione peroxidase により水に代謝されるが, 一方生体内では superoxide anion (O_2^-) と過酸化水素から, $O_2^- + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow HO\cdot + {}^1O_2 + H_2O$ (Harber-Weiss reaction と呼

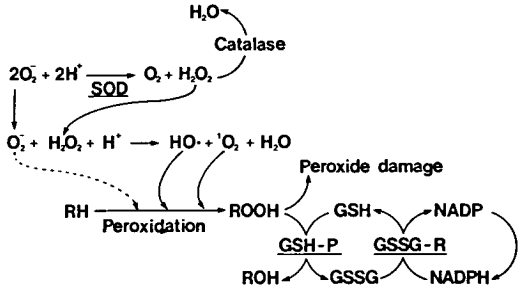


図2　活性酸素代謝過程模式図 SOD = superoxide dismutase, GSH-P=glutathione peroxidase, GSSG-R=glutathione reductase, 説明本文参照.

ばれる）の反応で，HO・（hydroxy radical）や $^1O_2$ (singlet oxygen) を生ずる反応が知られている．これらのラジカルは細胞毒性が強いが，そのひとつの機序として，細胞内小器官の膜を構成する脂質の過酸化があげられており，脂質の過酸化は，膜の機能障害をおこす事が知られている[9]．

今回これら活性酸素の代謝に関連する5つの酵素を，ジストロフィー鶏の発育早期に，成長を追って測定したわけであるが，対照鶏ではこれらの5つの酵素活性は何れも成長と共に漸減するが，ジストロフィー鶏では蛋白当りの比活性でも，湿重量当りの総活性でも有意の上昇を示しており，発育に伴う変化も対照とは著しく異なっている事がわかった．ジストロフィー鶏の測定値の標準偏差は可成大きいが，対照鶏では，これは大体平均値の10%前後に入っており，測定方法の問題とは考えにくく，実際ジストロフィー鶏においてはこれら酵素活性の変動に可成個体差があるものと思われる．

ジストロフィー鶏における superoxide dismutase 活性に関する報告では，Francis ら[3]，Park ら[4]が，4ヶ月齢の Connecticut 系ジストロフィー鶏において約3倍の活性上昇を報告しており，又 glutathione peroxidase に関しても Park ら[4]が上昇を報告し，又 Omaya and Tappel[2]も18ヶ月齢のジストロフィー鶏において活性の上昇を報告して，活性酸素による障害の可能性を述べているが，発症後日時を経てからの測定では，筋病変の進行と共に，筋組織以外の成分も増加してくる事があり，異常な測定値が筋病変を反映したものかどうかに関して疑念が残る．又，筋病変を反映したものだとしても，病変に対する二次的な変化の可能性も否定できない．もし活性酸素仮説が正しいならば，発症早期から異常が出現している筈で，我々はこの点にまとを絞って検討したが，まだ形態学的な変化は軽微である生後1週目より既に活性酸素の代謝に関連した酵素系の上昇が見られ，我々の検討したジストロフィー鶏においては発症早期に活性酸素系の代謝回転の亢進のある事が考えられた．Superoxide dismutase に関しては昨年一度検討を行ってあるが，今回その変化を再確認した事になる．Superoxide dismutase 活性上昇の原因をもう少し細く考察してみると，superoxide radical (O_2^-)の生成増加に対する反応性の活性上昇と考える事が最も妥当ではないかと考えられる．何故ならば，superoxide dismutase による生成物である過酸化水素の代謝に関係した catalase，glutathione peroxidase も活性が上昇しており，酸化された glutathione を還元型にもどす glutathione reductase も上昇している．もし superoxide radical の生成増加がないならば，superoxide dismutase 活性が上昇したとしても，過酸化水素の生成はまもなく底をつくであろうし，そうなれば catalase や glutathione peroxidase の活性が増加している事は理解し難い．次の課題は superoxide radical の生成増加の有無を直接的に確かめる事である．

次に catalase 活性の上昇にふれると，その time course が Cu-Zn superoxide dismutase 活性の time course とほぼ平行している事から，catalase の上昇は過酸化水素生成に対する反応と考えるのが最も理解しやすい．Glutathione peroxidase も過酸化水素の代謝に関係はしているが，time course が catalase や Cu-Zn superoxide dismutase とは異なり別の意味を持っているのではないかと考えられる．即ち，図2に示した superoxide radical，hydroxy radical，singlet oxygen 等は膜を構成する脂質の過酸化を通じて細胞の機能障害をおこす機序が考えられているが，glutathione peroxidase は過酸化脂質を普通の酸化脂質に還元する事により膜の機能を保護する方向に働くので，glutathione peroxidase の活性上昇は，活性酸素の生成上昇⟶膜の過酸化⟶膜の機能障害の仮説を示唆する．この点は今後組織中の malondialdehyde を定量する事により本当に脂質の過酸化を生じているかどうか検討できるので，次のステップとして予定している．

ま と め

1．New Humpshir 系ジストロフィー鶏浅胸筋 superoxide dismutase，catalase，glutathione peroxidase，glutathione reductase を生後1週，

2週，4週，4ヶ月目に測定し，対照正常鶏の値と比較した．

2．正常対照において，これら諸酵素活性は成長と共に比活性でも総活性でも漸減するのに対し，ジストロフィー鶏では活性が対照に比し有意の上昇を示すのみならず，成長による経時変化のパターンも異常であった．

3．上記所見は，活性酸素系の代謝回転の亢進を意味すると考えられ，活性酸素系が，ジストロフィー鶏の発症機序に関与している事を示唆する所見と考えられ，今後その機構を更に検討したいと考えている．

文　献

1) Kar, N.C. & Pearson, C.M.：Catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase and thiobarbituric acid-reactive products in normal and dystrophic human muscle. Clin. Chim. Acta, 94：277-280, 1979.

2) Omaya, S.T. & Tappel, A.L.：Glutathione peroxidase, glutathione reductase, and thiobarbituric acid-reactive products in muscles of chickens and mice with genetic muscular dystrophy. Life Sci., 15：137-145, 1974.

3) Francis, S.H., Brandon, S. & Park, J.H.：Superoxide dismutase levels in tissue of genetically dystrophic chickens. Fed. Proc., 35：1652, 1976.

4) Park, J.H., Hill, E.J., Chou, T.H., et al.：Mechanism of action of penicillamine in the treatment of avian muscular dystrophy. Ann. N.Y. Acad. Sci., 317：356-369, 1979.

5) Misra, H.P. & Fridovich, I.：The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 247：3170-3175, 1972.

6) Cohen, G., Dembiec, D. & Marcus, J.：Measurement of catalase activity in tissue extracts. Anal. Biochem., 34：30-38, 1970.

7) Paglia, D.E. & Valentine, W.N.：Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med., 70：158-169, 1967.

8) 浅田浩二：酸素毒性．生化学，48：226－257，1976.

9) Tappel, A.L.：Lipid peroxidation damage to cell components. Fed. Proc., 32：1870-1873, 1973.

10) 水野美邦，城下裕，金子仁：筋ジストロフィー症の発症機序に関する研究——ジストロフィー鶏の superoxide dismutase の検討——．脳と神経，34：667－672，1982.

11) Dystrophy mouse 及び dystrophy hamster 組織中の Enkephalin 様免疫活性

井 村 裕 夫*

研究協力者　中 尾 一 和*　坂 本　誠*　吉 政 孝 明*
須 田 光 明*　池 田 淑 夫*　古 川 昭 栄***
林　恭 三**

はじめに

神経成長因子（NGF）は，交感神経細胞と知覚神経細胞の成長と機能維持に必要な栄養因子であるが，我々は既に dystrophy mouse において顎下腺及び骨格筋中の NGF 含量の低下していることを報告してきた[1)2)]．一方，最近になり種々の内因性モルフィン様ペプチドが分離同定されてきたが，これらの中で Methionine-Enkephalin（Met-Enk）及び Leucine-Enkephalin（Leu-Enk）などの Preproenkephalin A(3)に由来するモルフィン様ペプチドは，副腎髄質交感神経系，中枢神経系，消化管等に広く分布している．中でも副腎髄質交感神経系はこれらの主要な産生臓器であることが明らかになり，副腎髄質交感神経系における生理的意義が注目されている．以上の成績に着目し，交感神経系の成長及び維持に必要な NGF の減少した動物モデルである dystrophy mouse における種々の組織中の Met-Enk 及び Leu-Enk 様免疫活性含量について検討した．また他の dystrophy モデル動物である dystrophy hamster の副腎，全脳中の含量についても検討した．

方　法

動物　Dystrophy mouse は6週齢の雄のC57 BL/6 J dy/dy を，対照群としては6週齢の dy/＋の heterozygous mouse を用いた．Dystrophy hamster は12週齢の雄の BIO14.6系を，対照群としては同週齢の F_1 B hybrid 系を用いた．

組織及び抽出　Mouse は断頭後直ちに全脳，副腎，心臓，後肢骨格筋，胃，小腸，盲腸，大腸を採取し湿重量を測定した．各組織は0.1N塩酸メタノール（1：1）中で homogenize し，70℃で10分間加温後50,000×g で超遠心し上清を抽出物とした[4)]．

Hamster は全脳，副腎を採取後凍結保存し，その後同じように抽出した．抽出物は－20℃で保存し，ラジオイムノアッセイ（RIA）の直前に0.1N NaOH を用いて中和した．

RIA　Met-Enk 及び Leu-Enk の RIA は既に報告した方法に従って行った[5)]．Met-Enk の RIA は Leu-Enk とモル比で10.3%の交叉反応を示すが Leu-Enk の RIA は Met-Enk とモル比で0.7%の交叉反応しか示さない．両 RIA 共に 5 pg/tube の最少検出量を有する．

結　果

Dystrophy mouse 及び対照 mouse の副腎，骨格筋，心筋抽出物中の Met-Enk 様免疫活性（Met-Enk-LI），Leu-Enk 様免疫活性（Leu-Enk-LI）は検出感度以下であった．Dystrophy mouse 及び対照 mouse における測定結果を表1と図1に示す．

Dystrophy mouse の消化管では，Met-Enk-LI 及び Leu-Enk-LI 含量が平行した増加傾向を示し，特に胃，小腸，大腸では有意の増加を示した．

＊京都大学医学部第二内科
＊＊岐阜薬科大学
＊＊＊国立武蔵療養所神経センター

表 1　Dystrophy　mouse 各組織中の Met-Enkephalin 及び Leu-Enkephalin 様免疫活性.

		Met-Enk-LI	Leu-Enk-LI
Brain			
dy/+	n=6	104.3 ± 4.6	20.2 ± 0.9
dy/dy	n=6	118.9 ± 4.1*	24.7 ± 2.3
Stomach			
dy/+	n=6	4.8 ± 0.7	2.0 ± 0.1
dy/dy	n=6	11.1 ± 1.6**	3.1 ± 0.2**
Small Intestine			
dy/+	n=6	6.2 ± 1.0	1.0 ± 0.2
dy/dy	n=6	24.9 ± 4.0**	4.1 ± 0.7**
Colon			
dy/+	n=6	106.0 ± 4.7	31.1 ± 2.8
dy/dy	n=5	220.0 ± 28.8**	59.6 ± 8.0**
Cecum			
dy/+	n=5	18.8 ± 4.1	2.5 ± 0.4
dy/dy	n=5	32.8 ± 9.0	5.4 ± 1.6
Adrenal Gland			
dy/+	n=10	ND	ND
dy/dy	n=10	ND	ND
Skeletal Muscle			
dy/+	n=10	ND	ND
dy/dy	n=10	ND	ND
Heart			
dy/+	n=10	ND	ND
dy/dy	n=10	ND	ND

*p<0.05　** p<0.01

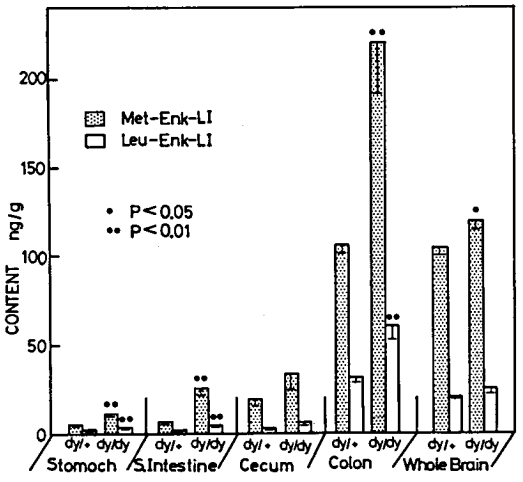


図 1　Dystrophy　mouse の消化管，全脳組織中の Met-Enkephalin 及び Leu-Enkephalin 様免疫活性.

Dystrophy　hamster 及び対照 hamster の測定結果を表 2 に示す．Dystrophy　hamster の副腎の Met-Enk-LI 及び Leu-Enk-LI 含量は有意差が認められなかった．しかし dystrophy hamster 全脳抽出物中の Met-Enk-LI 及び Leu-Enk-LI 含量は平行した有意の増加を示した．

表 2　Dystrophy　hamster 全脳，副腎抽出物中の Met-Enkephalin 及び Leu-Enkephalin 様免疫活性.

		Met-Enk-LI	Leu-Enk-LI
Brain			
control	n=6	94.5 ± 3.2	25.9 ± 0.9
dystrophy	n=6	109.4 ± 2.7**	31.9 ± 0.6**
Adrenal Gland			
control	n=6	253.6 ± 20.9	542.3 ± 57.4
dystrophy	n=6	259.6 ± 35.3	512.9 ± 68.9

* p<0.05　** p<0.01

考　察

Dystrophy　mouse における NGF 減少の及ぼす影響をさぐる目的で，副腎髄質交感神経系，脳，消化管等に広く分布している[5)6)7)] Met-Enk, Leu-Enk 含量の変化を検討したが，mouse の副腎では予想以上に含量が少なく検出感度以下であり，NGF 減少の副腎における Met-Enk, Leu-Enk 含量への影響についての評価は不可能であった．副腎髄質のモルフィン様ペプチド含量については種属差の著しいことが報告されており[8)]，我々の測定したヒト，ウシの副腎髄質の含量[5)] と mouse の副腎含量を比較すると mouse の含量は約10^3分の一以下であった．今回，同時に交感神経節の採取も試みたが動物が小さく技術上の問題点もあり採取出来なかった．Dystrophy mouse の NGF 減少の及ぼす副腎髄質交感神経系への影響については，カテコラミン含量及び関連酵素活性の測定等今後の検索を予定している．

一方 dystrophy　mouse の消化管の Met-Enk-LI 及び Leu-Enk-LI の著しい増加が認められた．この増加が dystrophy　mouse の病因に直接あるいは間接に関係した特異性の高い変化であるか，運動障害のもたらす結果であるか，合併症によるものかは現時点では不明であるが興味深い成績と思われる．消化管の Met-Enk, Leu-Enk は Auerbach's myenteric plexus に含まれていることが明らかにされており，myenteric　plexus が交感神経系及び副交感神経系の神経支配を受けているこ

とはよく知られている．

このような関係を考慮すると dystrophy mouse における NGF 減少が myenteric plexus の Met-Enk, Leu-Enk 含量の増加に関連している可能性は否定できない．Dystrophy mouse の消化管における Met-Enk-LI, Leu-Enk-LI の増加は顕著なものであり，増加の原因に関する今後の検討が期待される．

Dystrophy mouse の全脳抽出物中の Met-Enk-LI Leu-Enk-LI も増加傾向を示し，特に Met-Enk-LI の増加は有意であった．また後述する dystrophy hamster の全脳抽出物中でも Met-Enk-LI 及び Leu-Enk-LI が有意の増加を示しており，2種の動物モデル共通の変化と考えられ興味深い成績と思われる．Met-Enk, Leu-Enk は脳内に広範に分布していることが知られているので，今後脳内のどの部位で増加しているかについて検討が必要であろう．

Dystrophy hamster については dystrophy mouse 以外のモデル動物として，また hamster は Met-Enk, Leu-Enk 含量の高い動物であることを見出していたので合わせて検討した．しかし，hamster の NGF 活性は mouse NGF の bioassay 等の測定法では検出されない．そのため dystrophy hamster では dystrophy mouse と同じように NGF が減少しているかどうかは不明である．

Dystrophy hamster の測定結果は副腎含量については対照群と有意差は認められず，全脳含量では dystrophy mouse と同様に Met-Enk-LI, Leu-Enk-LI 含量の増加を示した．Dystrophy hamster については消化管交感神経節等も含めて今後の検討が必要であろう．

結　語

1．Dystrophy mouse では消化管及び全脳抽出物中の Met-Enk-LI 及び Leu-Enk-LI 含量が平行して増加していた．副腎抽出物中の含量は測定感度以下であった．

2．Dystrophy hamster では副腎抽出物中の Met-Enk-LI 及び Leu-Enk-LI 含量は変化を認めなかったが全脳抽出物中のそれは有意の増加を示した．

文　献

1) Furukawa, S., Nishitani, H. & Hayashi, K.：Level of the Nerve Growth Factor Activity in the Submaxillary Glands of Genetically Dystrophic Mouse (C57BL/63). Biochem. Biophys. Res. Commun., 76：1202, 1977.

2) Furukawa, S., Hayashi, K., Ohi, T. & Imura, H.：Level of Nerve Growth Factor-like Immunoreactivity in the Lower Limb Muscles of Muscular Dystrophic Mice. Biochem. Biophys. Res. Commun., 90：130, 1979.

3) Noda, M., Furutani, T., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S. & Numa, S.：Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. Nature, 295：202, 1982.

4) Nakao, K., Yoshimasa, T., Oki, S., Tanaka, I., Nakai, Y., Wakimasu, M., Fujino, M. & Imura, H.：Presence of dynorphin-like immunoreactivity in rat pituitary gland and hypothalamus. Regulatory peptides, 2：201, 1981.

5) Yoshimasa, T., Nakao, K., Ohtsuki, H., Li, S. & Imura, H.：Methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in human sympathoadrenal system and pheochromocytoma. J. Clin. Invest, 69：643, 1982.

6) Ikeda, Y., Nakao, K., Yoshimasa, T., Yanaihara, N., Numa, S. & Imura, H.：Existence of Met-enkepahlin-Arg^6-Gly^7-Leu^8 with Met-enkephalin, Leu-enkephalin and Met-enkephalin-Arg^6-Phe^7 in the brain of guinea pig, rat and golden hamster. Biochem. Biophys. Res. Commun., 107：656, 1982.

7) Sakamoto, M., Nakao, K., Yoshimasa, T., Ikeda, Y., Suda, M., Takasu, K., Shimbo, S., Yanaihara, N. & Imura, H.：Occurrence of

methionine - enkephalin - Arg^6 - Gly^7 - Leu^8 with methionine-enkephalin, leucine-enkephalin and methionine-enkephalin-Arg^6 - Phe^7 in human gastric antrum. J. Clin. Endocrinol. Metab., 56 : 202, 1983.

8) Yang, H. Y., Hexum, T. & Costa, E. : Opioid peptides in adrenal gland. Life Sci., 27 : 1119, 1980.

II．筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病理

a）遺　　伝

b）臨　　床

c）形　　態

d）培　　養

12）筋萎縮性疾患の遺伝分析
—Duchenne 型ジストロフィー症について—

古　庄　敏　行*

研究協力者　中　里　興　文**　中　島　洋　明***　金　久　禎　秀***
納　　光　弘***　井　形　昭　弘***　川　平　　稔****

1980年来，Duchenne 型ジストロフィー症（DMD）の遺伝機構の解明と DMD，X_g^a血液型，色盲のX-連関遺伝の解析を行うため，南九州地区を対象に，調査を行ったのでその結果を報告する．

資　　料

本年度（1982）は新たに DMD を発端者として19家系について，昨年同様検索した（図1参照）．いままでの調査資料を加えると54家系になる．

調査結果

A．X-連関遺伝調査について

DMD，X_g^a血液型，色盲については，図1に示した如く，19家系である．

なお，いままで3年間の調査成績を示すと**表1**の如く，父は72.2%，母は77.8%，その子供は80%である．

ここで，性別，DMD の有無別に X_g^a血液型および色盲の頻度をみると**表2**の如くである．

表1および**表2**からわかるように，調査例数が少ないので，X-連関遺伝の検定および X_g^a血液型および色盲の頻度の比較などは，現時点では不可能に近いので，これらの分析は来年度，すべての検査が完了した時に試みる予定である．

B．DMD の分離比の検定

表1に示した資料を用いて分離比（P）および

表1　DMDを発端者とした家系についての血液型（X_g^a），色盲検査結果（1980～1982）

DMD数 / 同胞数	1	2	3	同胞群数	同胞総数	DMD数	検査済 X_g^a血液型	検査済 色盲	父 X_g^a血液型	父 色盲	母 X_g^a血液型	母 色盲
1	5			5	5	5	4 (80.8)	4	4 (80.0)	4	4 (80.0)	4
2	17	5		22	44	27	40 (90.9)	40	18 (81.8)	18	19 (86.4)	19
3	10	3		13	39	16	32 (82.1)	32	10 (76.9)	10	11 (86.4)	11
4	6	1		7	28	8	23 (82.1)	23	5 (71.4)	5	5 (71.4)	5
5	3			3	15	3	10 (66.7)	10	2 (66.7)	2	1 (33.3)	1
6	3	1		4	24	6	15 (62.5)	15			2 (50.0)	2
合　計				54	155 男：104	65 65	124 (80.0)	124	39 (72.2)	39	42 (77.8)	

（　）：%

* 杏林大学保健学部疫学
** 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
**** 国立療養所沖縄病院神経内科

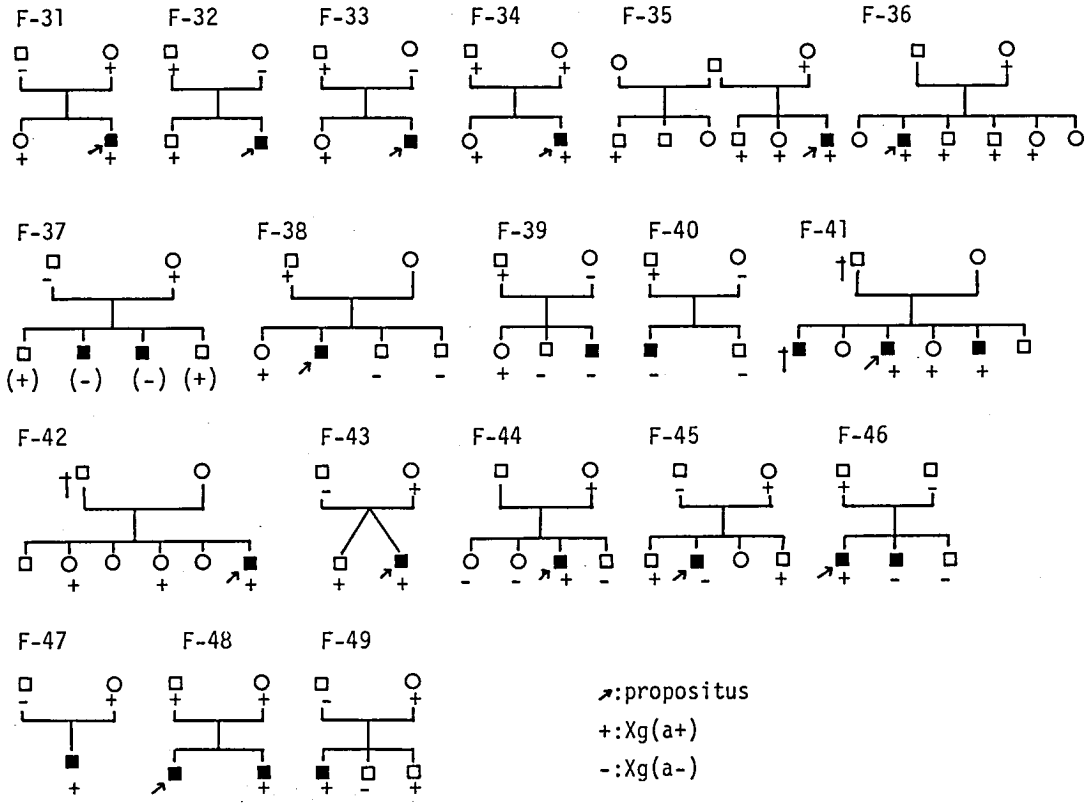


図1　1982年度におけるDMDの家系のX_g^a血液型および色盲検査

表2　DMDを発端者とした家系についての血液型（X_g^a）および色盲の頻度

		X_g^a血液型		色盲	
		+	−	+	−
親	父（非 DMD）	78.9	21.1	2.6	97.4
	母（非 DMD）	77.5	22.5	0	
同胞	男（非 DMD）	67.3	32.7	0	
	男（ DMD ）	56.3	43.7	0	
	女（非 DMD）	86.1	13.9	0	

（%）

その標準誤差（S. E. P）を推定したところ

$$P=\frac{65-54}{104-54}=\frac{11}{50}=0.22$$

$$S.E._P=\sqrt{\frac{P\ (1-P)}{N}}=\sqrt{\frac{0.22\times0.78}{50}}=0.0586$$

が得られた．

ここで得られた分離比の推定値（0.2200）とその期待値（0.5）との差は，S. E. P（0.0586）の4.8倍で0.3%水準で有意となる．したがってDMDが完全浸透であれば，伴性劣性遺伝の仮説に適合しない．

考　　察

昨年（1981）の報告書で，分離比の推定およびX-連関の分析に当って考慮すべき点について論じたが，なお1980～1982年の資料でも，分析にたえうる調査例数ではないので，分析は来年度試みることにし，ここでは，連関分析に当って若干検討を試みたい．

遺伝連関はMorgan(1926)らが，ショウジョウバエを用いて，遺伝子座位間の連関値は，その距

離に逆比例することを確かめ，あわせて，各遺伝子が染色体上に一列線状に配列することおよび各遺伝子の染色体上に占める位置，すなわち，遺伝子座位を決定することに成功した．周知の如くショウジョウバエのような実験生物では遺伝子型を同定したり，環境を制御することが可能であり，したがって得られた推定値も精度が高い．

人の場合は表現型を用いるので，この点十分考慮しないと，議論がややこしくなる．そこで本研究資料を用いて連関分析するに当りつぎのことを考慮する必要があろう．すなわち，(1) 対象とする形質の浸透度，(2) 干渉，(3) 連関変動：例えば，性，加齢および温度など．

以上のことを充分考慮して人のX-連関の分析法を開発し，その方法によってDMD，X^a_g血液型，色盲の遺伝子座位を決定する予定である．

ま と め

本研究は調査資料に限界があり，発端者の家系全員調査することが必要であるが，移住や非DMDの者の調査協力が得られにくいこと，したがって短期間にすべて，調査を完了することは不可能に近い．ここでは調査結果の報告と今後の資料分析に関する方法論などについて考察を試みた．

文 献

1) 古庄敏行，金久禎秀，中島洋明，ほか：筋萎縮性疾患の遺伝分析—Duchenne型ジストロフィー症について—．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55年度研究報告書，1981，pp.59-62.

2) 古庄敏行，中里興文，中島洋明，ほか：筋萎縮性疾患の遺伝分析—Duchenne型ジストロフィー症について—．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究 第二班（三好班），昭和56年度研究報告書，1982，pp.45—48.

13) Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝補遺
——突然変異率と親の年齢——

近藤　喜代太郎*

研究協力者　　安　田　徳　一**

ごくわずかの単劣性例を除けば，Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）では伴性劣性遺伝（XR）がよく確立されているが，突然変異率がきわめて高いことが注目されている．本研究の目的は，DMD 患児の尊属の年齢を用いて，突然変異の機構に関する仮設を検定し，できればなぜ突然変異率が高いかを知ることである．

なお，本研究は DMD の遺伝に関する広い研究の一部で，昨年度は，DMD の95%は XR で，突然変異率に性差はなく6.3×10^{-5}／世代・座位，新生男児での発生率は21.7×10^{-5}であることを報じた（56年度当班報告書，pp.41—44）．

材料と方法

分析に用いた資料は国立下志津病院，東大病院神経内科の234例と，国立八雲，西多賀，新潟，下志津，西別府病院（療養所）の433例から重複を除いた514例（うち女性16）を発端者とする家系資料である．診断は病歴に従い，家族情報はその記載を戸籍で確認した．患児誕生時の父母年齢，父誕生時の父方祖父母年齢，母誕生時の母方祖父母年齢を抽出した．

遺伝子突然変異には種々の分子機構があるが，それらを2大別すると；

1) 複製モデル．　配偶子（精子，卵子）を生成する細胞分裂に当って，DNA 塩基の複製障害を生ずる種々の機構をふくむ．幼児期に分裂を終る卵子と異なり，精子は生涯，分裂をつづけるため，その都度変異の可能性があり，それが累積してこのモデルでは精子の突然変異率が高い．

2) 非複製モデル．　突然変異が細胞分裂と無関係に生ずる種々の機構をふくむ．このモデルでは性差はないが，配偶子が接合しないまま，陳旧化する間が長いほど変異の確率が高く，従って，変異遺伝子を祖先から受けた保因者よりも，自身の配偶子に生じた変異遺伝子で子が発病した親の年齢が高くなる．

Barrai ら（1968）は，突然変異率 μ が年齢 x ともに線形増加するとして，

$$\mu_x=\mu_0+bx,$$

また，非変異個体の誕生時の親年齢が正規分布するとして，

$$\frac{b}{\mu_0}=\frac{\bar{x}_s-\bar{x}}{\sigma^2-\bar{x}\ (\bar{x}_s-\bar{x})} \qquad (1)$$

$$s\ \left(\frac{b}{\mu_0}\right)=\sigma\ \bar{x}_s\cdot\frac{\sigma^2}{[\sigma^2-\bar{x}\ (\bar{x}_s-\bar{x})]^2} \qquad (2)$$

という関係を導いた．ここに $\bar{x}$ は非変異個体（すなわち一般集団）の誕生時の親年齢の平均，$\bar{x}_s$ は変異個体の誕生時の親年齢の平均である．

今回の資料をすべて XR と見做しても，個々の発端者の遺伝機構，とくに非変異個体（母は保因者）と変異個体（母は非保因者）を100%確実に識別できないが，同胞群を，DMD 発端者だけの一人子 Uniplex，他に正常兄弟のある Simplex，発端者以外の兄弟にも DMD のいる Multiplex に分け，さらに，発端者の母方おじを中心として，同胞群の外での DMD の有無を調べ，Uniplex（±），Simplex（±），Multiplex（±）の6群に分類（( )内の±は同胞群以外の患者の有無を示す）

* 東京都神経科学総合研究所臨床神経学研究部
** 国立放射線医学総合研究所遺伝部

すると，変異個体は Uniplex(−)と Simplex(−)だけにふくまれ，他の4群は非変異個体のみをふくむことになる．非変異個体は前2群にも少々ふくまれるが，前2群と他の4群にみられる差は前2群が変異個体をふくむためと見做してよいことになる．

結　　果

尊属の年齢の平均と分散を表1に示す．

1)卵子の突然変異率と母年齢

昨年度報告および Yasuda と Kondo (1980) が示したように，突然変異率の性差がない点は非複製モデルを支持する．そこで，母年齢をみると，表1のように，Uniplex(−)，Simplex(−)で高いことはなく，表2の分散分析の結果をみると，同胞群外の患者の(+)，(−)と関係がない．表3に平均年齢が示されているが，この両種の母がむしろ若い．従って非複製モデルで期待される孤発例の母の高齢は観察されず，逆にむしろ若いが，その理由は，Multiplex の場合に比べて，これらの母の生殖が充分に終っていないためと思われる．

1950—75年，1977年の我国女性の出産時年齢の資料を用い，$\bar{x}$，b/μ_0，$s(b/\mu_0)$を求め，表4を得たが，μ_0単位で示した95%限界にみられるよ

表1　Means and standard errors ages of ascendants of probands

	Type of Family											
	Uniplex history of DMD				Simplex history of DMD				Multiplex history of DMD			
	−		+		−		+		−		+	
	Age at birth	n	Age at birth	n	Age at birth	n	Age at birth	n	Age at birth	n	Age at birth	n
Mother	26.41	41	26.00	7	27.92	308	27.54	37	28.59	175	29.15	61
	(0.77)[a]		(1.36)		(0.25)		(1.04)		(0.39)		(0.64)	
Father	31.22	36	30.00	7	31.65	307	30.30	37	32.07	175	32.46	61
	(1.32)		(2.19)		(0.30)		(1.21)		(0.45)		(0.81)	
Maternal grandfather	35.46	36	31.71	7	33.25	302	31.32	37	34.39	82	33.75	28
	(1.45)		(2.50)		(0.42)		(1.02)		(0.81)		(1.03)	
Maternal grandmother	29.32	41	27.00	7	28.90	307	29.08	37	30.33	82	29.18	28
	(1.19)		(1.50)		(0.37)		(1.04)		(0.78)		(1.31)	
Paternal grandfather	33.94	35	41.00	7	33.31	300	35.27	37	33.93	81	36.52	27
	(1.32)		(3.46)		(0.43)		(1.49)		(0.84)		(1.58)	
Paternal grandmother	28.72	36	36.43	7	29.45	303	28.65	37	29.02	82	31.74	27
	(1.14)		(3.38)		(0.37)		(0.99)		(0.67)		(1.24)	

[a]Standard error; n = Number of sibships.

表2　Analysis of variance*

Sources of variation in age of mother at birth of proband	SS	DF	MS	F	P
Type of sibship	197.31	2	98.65	4.17	<.025
Family history of DMD	0.06	1	0.06	0.003	ns
Interaction between family history and type of sibship	7.56	2	3.78	0.16	ns
Residual	14736.14	623	23.62		
Total	14941.07	628			

*SS. sum of square; DF, degree(s) of freedom; MS, mean square; F, F value; P, probability;

表3　Family history of DMD

Type of sibship	Present: Mean age of mother at birth of proband (yr)	Present: Number of sibships	Absent: Mean age of mother at birth of proband (yr)	Absent: Number of sibships
Uniplex	26.00	7	26.41	41
Simplex	27.64	39	27.91	306
Multiplex	29.15	61	28.59	175

表4　Effect of age on mutation rate in mother*

Year	$\bar{x}$	σ^2	b/μ_0	$S(b/\mu_0)$	95% confidence interval
1950	28.24	31.41	−0.0007	0.0036	$(-0.008\mu_0, 0.006\mu_0)$
1955	27.68	19.56	0.0028	0.0142	$(-0.03\mu_0, 0.03\mu_0)$
1960	27.05	17.89	−1.3492	16.9028	$(-34.0\mu_0, 31.0\mu_0)$
1965	26.95	16.09	−0.1582	0.1588	$(-0.47\mu_0, 0.15\mu_0)$
1970	26.99	15.67	−0.1720	0.2031	$(-0.57\mu_0, 0.23\mu_0)$
1975	26.90	13.68	−0.0937	0.0439	$(-0.18\mu_0, 0.008\mu_0)$
1977	27.15	12.92	−0.2052	0.3880	$(-0.97\mu_0, 0.56\mu_0)$

*$\bar{x}$, mean of distribution of ages of mothers at birth in Japan, with variance σ^2 (Vital Statistics, Ministry of Health and Welfare, Japan); $b/\mu_0 = (\bar{x}_s - \bar{x})/[\sigma^2 + \bar{x}(\bar{x} - \bar{x}_s)]$ with the standard error $s(b/\mu_0)$. $\bar{x}_s = 27.73$, mean of distribution of age of mothers at birth of DMD mutant progeny (either uniplex or simplex) with the standard error $\sigma_{\bar{x}_s} = 0.24$.

表5　Effect of age on mutation rate in men

Maternal grandfather's age	
Multiplex with family history	$\bar{x} = 33.75, \sigma^2 = 28.54, n = 28$
Multiplex without family history	$\bar{x}_s = 34.39, \sigma_{\bar{x}_s} = 0.81, n = 82$
The age of onset of gamete formation in men	15 yr
$\frac{b}{\mu_0} = \frac{(34.39-15) - (33.75-15)}{28.54 - (33.75-15)(19.39-18.75)}$	$= 0.039 \pm 0.085$
95% confidence interval	$(-0.13\mu_0, 0.20\mu_0)$

うに，bはゼロと異なるとはいえない．即ち，母年齢とともに，突然変異率が増すとはいえないが，本法では年間0.23μ_0以下の微弱な増加は検出し得ない．

2)精子の突然変異率と父年齢

担X精子の変異は娘を保因者にし，男孫を発病させる．そこで患児からみれば，母方祖父の年齢が問題になるが，発病は母の卵子での変異や，母方祖母の遺伝子で母が保因者となってもおきるので，これらを区別する必要がある．患児の母の兄弟に罹患者があれば，母方祖父の担X精子の変異ではあり得ないが，罹患者がなければ，あり得るので，この2群にみられた差は，後者における担X精子の変異によるものの混入に帰せられる．

表5に示すように，母が生まれたときの両群の母方祖父の年齢は，33.75，34.39歳であり，b/μ_0は0.039±0.085でゼロと有意差がない．表6，7に示したように母方祖父の年齢を2分して，家系の特徴との関係をみても相関していない．

表6　Effect of age on mutation rate in men*

	I+	M+	I−	M−	Sum
Maternal grandfather under 30 yr (A−)	22	20	304	54	400
Maternal grandfather 30 yr or older (A+)	22	8	138	28	196

* −, without family history; +, with family history; I, uniplex and simplex; M, multiplex.

表7　Partition of Chi-square

Association	χ^2	DF[a]	P[b]
(Type of sib) × (History)	22.7172	1	<.001
(History) × (Age)	2.8608	1	ns
(Type of sib) × (Age)	0.0015	1	ns
(Type of sib) × (History) × (Age)	2.6357	1	ns
Total	28.2152	4	<.001

[a]DF, degree(s) of freedom.
[b]P, probability.

考　　察

本研究はDMDの高い突然変異機構を知るために行われた．本報と前報を合せても，性比がない点では第2のモデルを支持するが，その場合，予期される孤発例の母の高齢化がみられないため，前記の両モデルを確実には鑑別できなかった．その理由のひとつは性・年齢効果が微小で，統計的方法の検出力の範囲内であったことが考えられる．

DNAはきわめて安定であるが，稀に分子構造の変異を生じ，点突然変異とよばれる．これは多くの場合有害であり，そのため病者は子がのこり難く(淘汰)，突然変異による新生との間に平衡が成立する．DMDでは淘汰は男子のもつXのみに及び，それは集団全体のXの⅓に当るので，この状態は精子，卵子の変異率を等しくμとし，DMDの集団内頻度をXとするとつぎのように表される．

$$\mu=\frac{1}{3}\mathrm{m}\ \mathrm{X}$$

DMDではm＝1なのでμ＝X/3となる．

本法による突然変異率の推定を間接法というが，これにはつぎのような問題点がある；1)診断，調査精度が低く，Xが不正確，2)淘汰値mの算定が不正確，3)淘汰と突然変異が真に平衡しているか不明，4)その座位のみが関与するか不明，5)その座位の変異はいつもその表現型を生ずるか不明．

近年，動植物で実験的に得た値に比べて，ヒトの疾患の突然変異率の推定値は一般に高すぎるとの批判がある．DMDでは特に高く，Stevenson & Kerr (1967) によれば，49種のX連鎖性疾患の突然変異率がほとんど$0.01\sim0.1\times10^{-5}$付近なのに対し，DMDは群を抜いて高く，文献の11の数値は，$5\sim9\times10^{-5}$で，それにつぐのは血友病A $2\sim4\times10^{-5}$，血友病B (Christmas病) 0.5～1があるにすぎない．

間接法と異なり，突然変異と淘汰の平衡を仮定しない，いわば“半直接法”がGardner-Medwin (1970) によって開発された．本法はJを孤発例の数，Rをその中で母が保因者でないものの割合，Tを同期間の新生男児数とし，μ＝JR/Tとして求めるもので，DMDで得られた結果は10.5×10^{-5}と，やはり高かった．なお，おなじ資料で間接法を用いると10.9×10^{-5}であった．

DMDの高い変異率の理由は不明である．ひとつの説明は上記のような推定法に伴う過誤で，たとえば本症は実は2疾患以上の混合体なら，各々のXの和がみせかけのXとなる．しかし，近年，

姉妹染色分体交換の分析で，Xp_{21}は傷害されやすいことが示されただけでなく，つぎのような興味深い例が知られ，新しい問題が提起された．

すなわち，X染色体と常染色体の間で，染色体物質を部分的に交換し合い，DMDを呈する孤発性女子の平衡転座例が少なくとも4例知られ，これらでは正常Xは大部分の細胞で不活化しており，従って転座Xの当該部分は半接合となっている．きわめて興味深いことに，4例ともXの転座部分はXp_{21}（短腕の末梢部の近位側）であるのに反し，転座した常染色体は1（Lindenbaumら，1979），3（Cankiら，1979），5（Jacobsら，1981），11（Greensteinら，1980）と不定であり，DMDの発現に関係があるのはXp_{21}であることが示された．このことは，長腕にある色盲，G6PDとDMDの無連鎖とも合致し，また，この部分が切断や突然変異を生じやすいことと，DMDの突然変異率が異常に高いこととも関連があるかもしれない．

文　献

1) Gardner-Medwin, D.：Mutation rate in Duchenne type of muscular dystrophy. J. Med. Genet., 7：334—337, 1970.

2) Stevenson, A. C. & Kerr, C. B.：On the distribution of frequencies of mutation to genes determining harmful traits in man. Mutation Res., 4：339—347, 1967.

3) Yasuda, N. & Kondo, K.：No sex difference in mutation rates of Duchenne muscular dystrophy. J. Med. Genet., 17：106—111, 1980.

4) Yasuda, N. & Kondo, K.：The effect of parental age on rate of mutation for Duchenne muscular dystrophy. Am. J. Med. Genet., 13：91—99, 1982.

14) Emery-Dreifuss muscular dystrophy の一例

荒　木　淑　郎*

研究協力者　池　川　眞　一*　内　野　　誠*　植　川　和　利*

神経筋疾患に心病変を伴う事は以前よりしばしば報告されている．しかし一般に心病変の程度は神経筋疾患の程度と比し軽いものが多い様である．今回我々は徐脈を主訴とした26歳の男性に，早期よりの頸，肘関節の拘縮，上腕二，三頭筋及び下肢遠位筋の萎縮，高 CPK 血症，部分的心房停止を認めた．本症は1966年 Emery と Dreifuss が報告した[1] Emery-Dreifuss muscular dystrophy と思われるので，若干の文献的考察を加え報告する．

症例：26歳，男性，薬剤師．

主訴：徐脈の精査．

既往歴：特記すべき事はない．

家族歴：家系内に神経筋疾患，不整脈，突然死はない．家系調査を行なったが，その範囲では同疾患はなかった．血族結婚はない．

現病歴：出生，成長には特に問題はなかった．10歳の頃，頸が前屈せず，左肘関節が伸び切らない事に気づいていた．又この頃心電図異常を指摘されているが，詳細は不明である．大学生の頃，徐脈を自覚していたが放置．昭和57年４月，健康診断にて徐脈と心電図異常を指摘され精査目的にて当科入院した．Adams-Stokes 様症状はなく，筋脱力は自覚していない．職業は薬剤師で，知能は正常と思われる．

入院時現症：身長172cm，体重52kg．脈拍は毎分40で不整．心音ではII音が亢進し，心尖部で Levine II度の収縮期駆出性雑音を聴取する．色覚は正常で外眼筋麻痺，網膜色素変性はない．神経学的には脳神経系には異常ないが，頸部の前屈は全く不能で，胸背部も前屈不良，左肘関節は伸ばし切る事ができない．上腕二，三頭筋，及び下肢遠位筋に軽度の萎縮を認めた（図１）．筋力はほぼ正常で，深部反射は消失していた．知覚系に異常を認めなかった．

検査所見：入院時一般検査は正常．血清 CPK は1473 U/L（正常：62-175 U/L）と高値をとり Aldorase 88 U/L（正常：2.2-5.9 U/L），LDH 312 U/L（正常：130-250 U/L）と上昇していた．CPK isozyme は MM 型98.5%，MB 型1.5%，マイクロゾーム test は1600倍と軽度上昇していた．筋電図では干渉波形成が悪く，放電数は減少し，高振

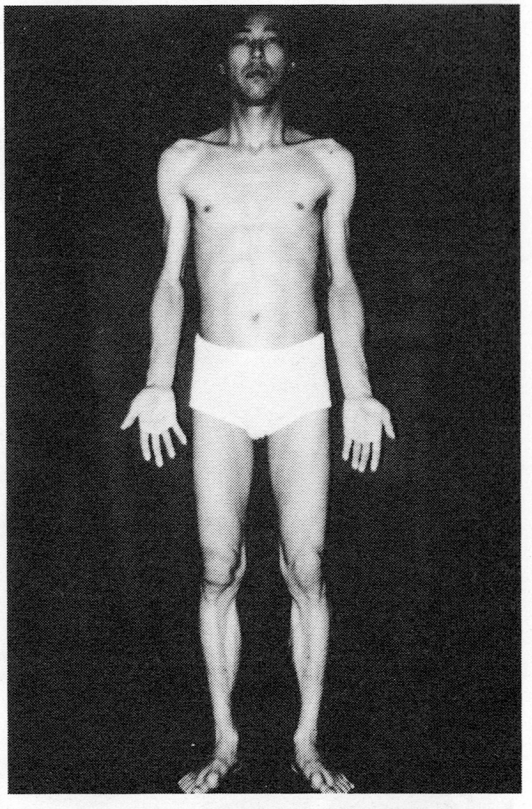


図１　患者全身像．上腕二，三頭筋と下肢遠位筋に軽度の筋萎縮を認める．

＊熊本大学医学部第一内科

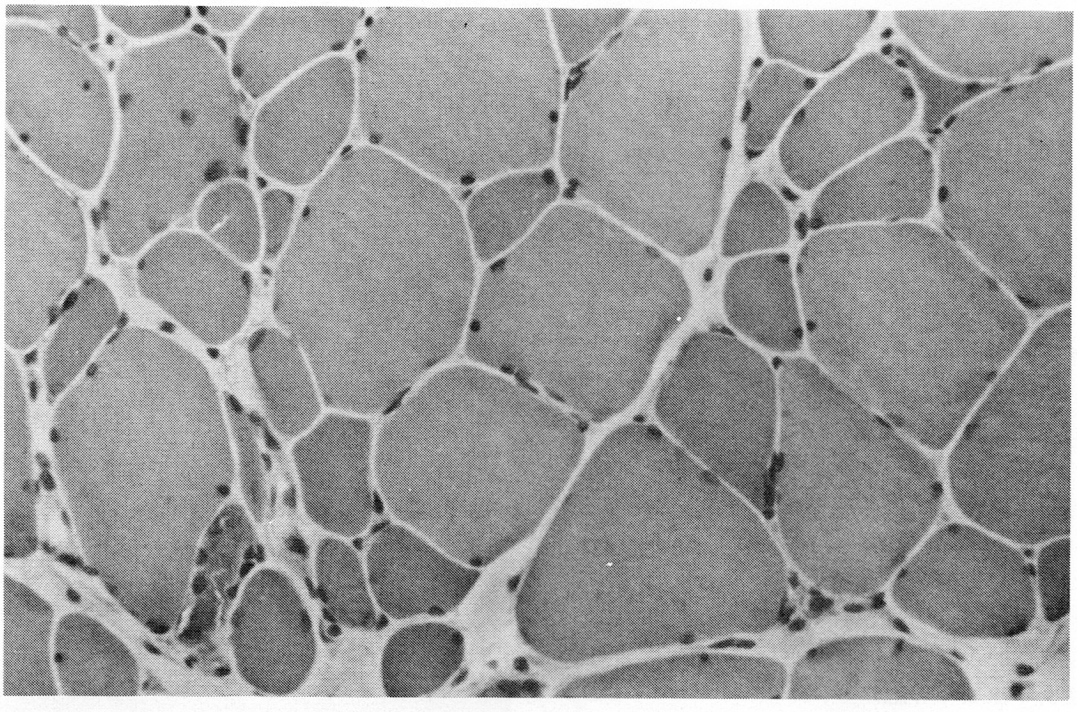


図2　左上腕二頭筋生検．ＨＥ染色．

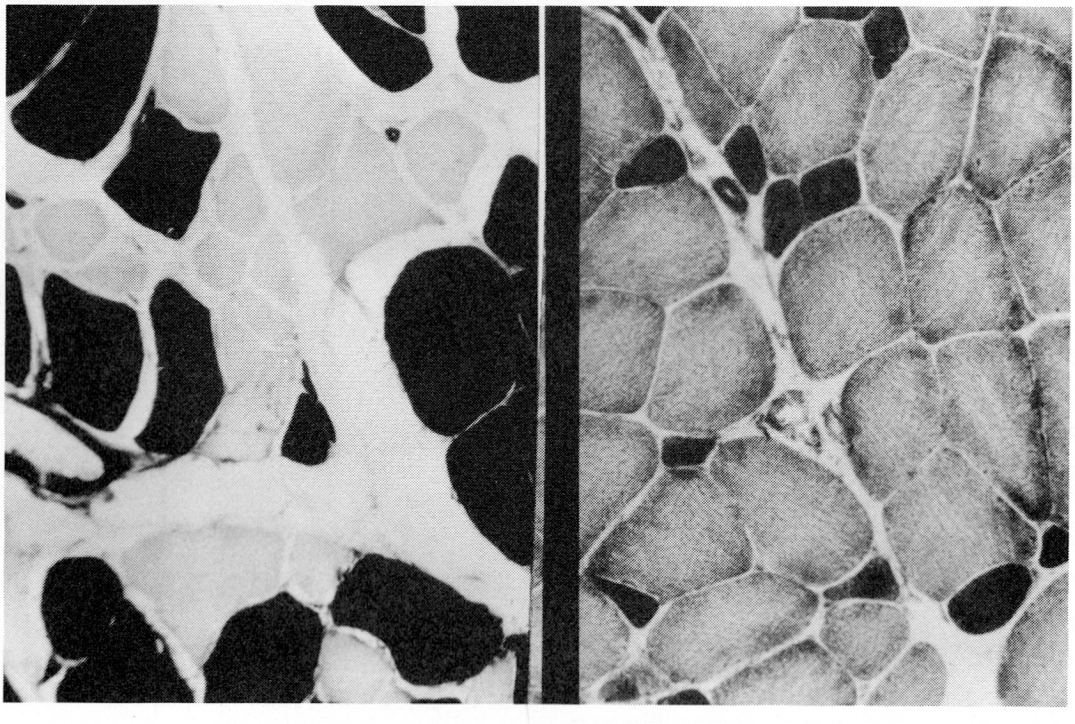


図3　右，ATPase 染色．左，ＮＡＤＨ染色．

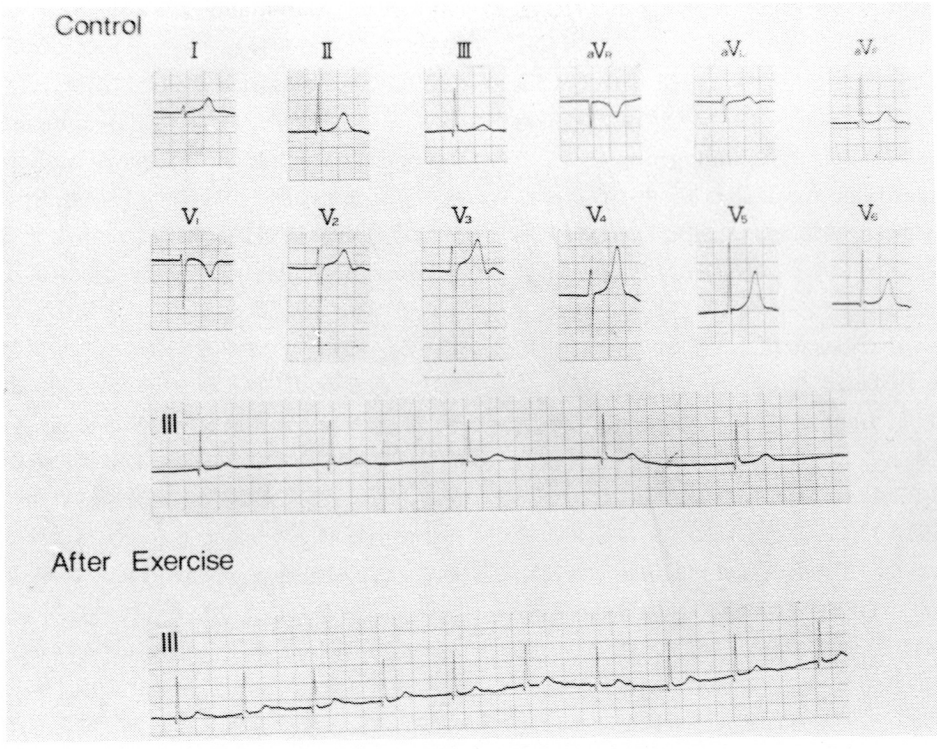


図4　心電図．明らかなP波を認めず，毎分40の結節性調律．運動負荷により結節性調律は増加する．

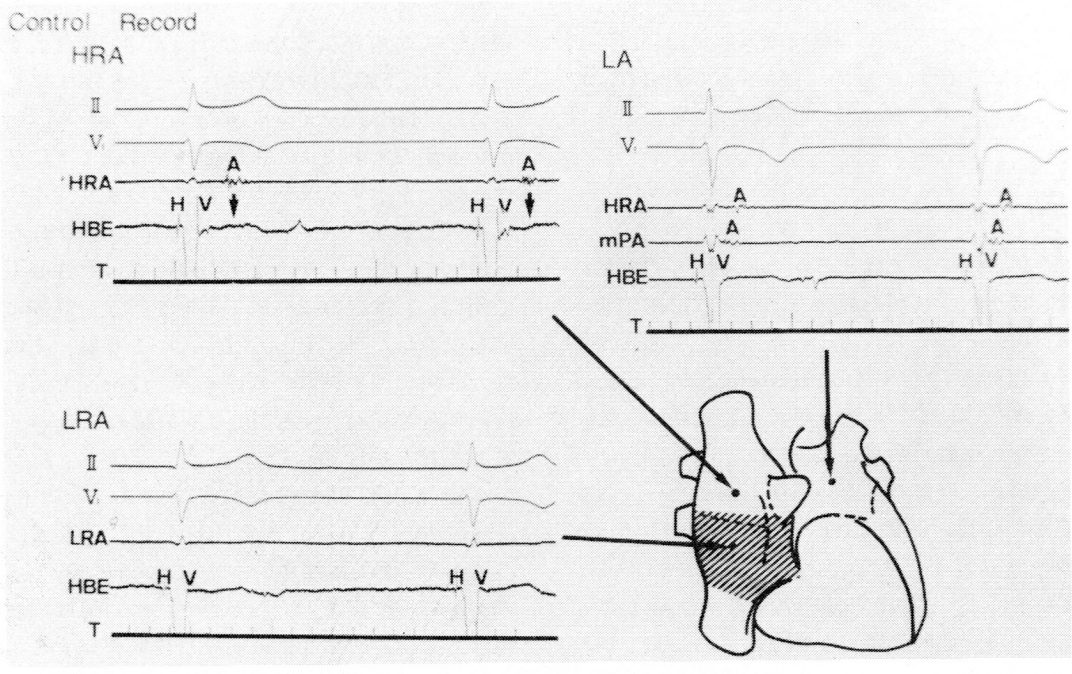


図5　心内心電図．

幅，多相性であり神経原性パターンを示した．しかし安静時放電は認めなかった．

左上腕二頭筋生検を行なった．HE染色では(図2）正常の大きさの細胞の内に小径の円形の筋線維が散在性にみられ，所々small groupをなしている．Angular fiberも少数認める．中心核は少なくendomysiumの増成はない．主として神経原性のパターンと考えられる．NADH染色，ルーチンATP染色(図3)でヒストグラムをとるとtype I fiber：type II fiberの比は3：5で各々の平均直径はtype I fiberが39μ，type II fiberが85μであり，type I fiberが主としてatrophicな事がわかる．電顕上ミトコンドリアの明らかな異常は切った範囲では認められなかった．

心電図（図4）ではP波を認めず，毎分40の結節性調律であり，運動負荷にて結節性調律は70にまで増加した．心内心電図（図5）では低位右心房(LRA，HBE)にてA波を認めず，低位右心房は電気的活動を失なっている事がわかる．又高位右心房及び左心房でみられるA波も幅広く多相性低電位で心房内伝導障害が示唆された．又完全房室blockも認める．10mAで右心房各部を刺激したが心房の活動は得られなかった．右心房内圧測定ではA波に一致する心房収縮波形を認めず，右心房は機械的活動を失なっていると考えられ，以上より本患者の心臓は部分的心房停止というまれな状態にあると考えられる．

考　　察

本症例は孤発例ではあるが，早期よりの関節の拘縮，特徴的な筋萎縮の分布，持続性心房停止への移行段階と考えられる[2]，部分的心房停止があり，本症例はEmery-Dreifuss muscular dystrophyと考えられる．本症と思われる記載はふるくはドイツの文献に散見される[3)4)5)]が心電図，心内心電図等詳しい記載がない為明らかでない．本症の最初の詳しい記載は1961年DreifussとHoganが良性の経過をとるDMPの一家系を報告し，1966年EmeryとDreifuss[1]が同家系に早期よりの関節拘縮，心伝導障害が存在するのに気づいた事にはじまる．その後Rotthauwe[7]，Thomass[8]，Cammann[9]，Water[10]らが家系を追加した．また心房停止というまれな心伝導障害に対して，Cardiologist達が独自に注目し，本症と思われる数例が検討され（Bloomfield[11]，Caponetto[12]，Baldwin[13]），pace maker植込み術の有効性が強調されて来た．1979年，Rowland[14]らはそれらの諸報告を検討し，本症をEmery-Dreifuss muscular dystrophyと呼ぶように提案し以下の5つの特徴をもってこの疾患を定義づけている．即ち，1)伴性劣性遺伝をとり孤発例では男性である事．2)肘と頸の拘縮が早期に出現する事．3)上腕二，三頭筋及び下肢遠位筋という特徴的な筋萎縮の分布をとる事．4)筋疾患の進行は緩徐である事．5)心伝導障害を普遍的に伴い，心房停止に至る事，の5点である．本邦に於ても本症と思われる報告が，Mawatari[15]，栗山[16]，早原[17]，工藤[18]らによりなされている．

また，Rowlandのクライテリアを満たしながら筋生検，筋電図で神経原性変化を示す事が報告されている．我々の症例も神経原性変化を示した．果してこの疾患は単一なものか，又その本態がmyopathyであるか否かについても問題となっている．Rowland[15]やHopkins[19]らは2つの剖検報告[20),21)]で脊髄に変化がなかった事，慢性的な筋疾患ではEMG上神経原性パターンを示す事もあること，large grouped atrophyのない事，明らかな本症の家系内に1人は神経原性，1人は筋原性の変化を示す兄弟例もある事などより，本疾患は単一な疾患でその本態はmyopathyであろうと述べている．一方1982年工藤[18]らは急性心不全で死亡した本症の孤発例の剖検を行ない詳細に脊髄を検索した所，5-7頸髄，4-5腰髄，1仙髄内の前角細胞の巣性の変性脱落，gliosisを認め髄内内側先端部にspheroidを多数認めたという興味ある報告をしている．

本症は比較的まれな疾患ではあるが，pace maker植込み等により突然死をさけうる点は重要である．また本疾患の本態がdystrophyであるのか，単一の疾患であるか否かについては依然問題はあるが，臨床的には明確な症候を呈する1症候群といえよう．

要　旨

徐脈を主訴とした26歳男性に早期よりの頸部，肘関節の拘縮，上腕二，三頭筋，下肢遠位筋の萎縮，毎分40の徐脈を認めた．筋酵素は上昇し，筋電図，筋生検では type I fiber の萎縮を呈する神経原性パターンを示した．心電図，心内心電図より心臓は部分的心房停止と判明した．以上より本症を Emery-Dreifuss muscular dystrophy と診断し本症の病因につき，若干の考察を加えた．

文　献

1) Emery AEH, Dreifuss FE：Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 29：338－342, 1966.

2) 小野忠弘，堀尾豊，ほか：洞機能不全症候群にみられた部分的心房停止の一例．心電図，2：2，216，1982.

3) Cestan R & Le Jonne：Une myopathie avec retractions familiales. Nouv. Iconogr. Salpêtriere, 15：38－52, 1902.

4) Schenk P & Mathias E：Zur Kasuistik der Dystrophia musculorum progressiva retrahens. Berl. Klin. Wschr., 57：557－558, 1920.

5) Trommer E：Dystrophia myosclerotica. Dtsch. Z. Nervenheilkd., 85：196－226, 1925.

6) Dreifuss FE, Hogan GR：Survival in X-chromosomal muscular dystrophy. Neurology (Minneap.), 11：734－737, 1961.

7) Rotthauwe HW, Mortier W, et al：Neuer Typ einer recessive X-chromosomal verebten Muskeldystrophie：Scapulo - humerodistale Muskeldystrophie mit frühzeitigen Kontrakturen und Herzrhythmusstörungen. Humangenetik, 16：181－200, 1972.

8) Thomas PK, Calne DB, et al：X-linked scapuloperoneal syndrome. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 35：208－215, 1972.

9) Cammann R, Vehreschild T, et al：Eine neue Sippe von X chromosomaler benigner Muskeldystrophie mit Fruhkontraktüren (Emery-Dreifuss). Psychiatr. Neurol. Med. Psychol.(Leipz), 26：431－438, 1974.

10) Waters DD, Nutter DO, et al：Cardiac features of an unusual X-linked humeroperoneal neuromuscular disease. N. Eng. J. Med., 293：1017－1022, 1975.

11) Bloomfield DA, Sinclair-Smith BC, et al：Persistent atrial paralysis. Am. J. Med., 39：335－340, 1965.

12) Capponetto S, Pastorin C, et al：Persistent atrial standstill in a patient affected with facioscapulohumeral muscular dystrophy. Cardiologia, 53：341－350, 1968.

13) Baldwin BJ, Talley RC, et al：Permanent paralysis of the atrium in a patient with facioscaplohumeral muscular dystrophy. Am. J. Cardiol., 31：649－653, 1973.

14) Rowland LP, Fetell M, et al：Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Ann. Neurol., 5：111－117, 1979.

15) Mawatari S, Katayama K, et al：Scapuloperoneal muscular atrophy with cardiopathy. An X-linked recessive trait, Arch Neurol., 28：55－59, 1973.

16) 栗山勝，ほか：関節拘縮と心障害を伴った肩甲下腿型筋萎縮症の1例．臨床神経，17：575－580，1977.

17) 早原敏之，岡本繁，ほか：脊椎可動性低下と心電図異常を伴なう神経原性肩甲下腿型筋萎縮症の1例．神経内科，1：545－551，1974.

18) 工藤英昭，谷野定之，ほか：Emery-Dreifuss 型筋萎縮症における脊髄病変．脳と発達，14：363－369，1982.

19) Hopkins LC, Jakson JA, et al：Emery-Dreifuss Humeroperoneal Muscular Dystrophy：An X-linked Myopathy with Unusual Contractures and Bradycardia. Ann. Neurol., 10：230－237, 1981.

20) Takahashi K, Nakamura H, et al：Scapuloperoneal dystrophy associated with neurogenil changes. J. Neurol. Sci., 23：575－583, 1974.

21) Dubowitz U, Brooke MH, et al : Muscle Biopsy : A modern approach. Philadelphia, Saunders, 1973, p.368-371.

15）筋緊張性ジストロフィー症における脳CT・脳波・WAISを中心とした臨床的研究

田　辺　　等*

研究協力者　小　島　　進*　松　井　孝　道*
内　潟　雅　信*　武　田　裕　子**

緒　　言

筋緊張性ジストロフィー症（以下MD）において，脳室拡大・脳波異常・知能低下等の中枢神経系の異常を示すことは良く知られているがその詳細は必ずしも明らかでない．今回脳CTを施行したMD例を中心に，脳波・WAISの所見を合わせて検討を加えた．

対象及び方法

対象は1970年以降，当院で入院精査したMD例47例で，年齢は11歳から61歳，男29例女18例である．

1）CTは，MD群16例（男11，女5；年齢37±12歳）に施行，対照群として主に神経学的所見のない頭痛例24例（男13，女11；年齢35±11歳）をage-matchedで抽出した．CTの機器は日立CT-Hと東芝TCT60Aとを用い，CM線に15°，スライス幅10mm，MATRIXは前者が256×256，後者が320×320で撮影した．計測部位として，最大前角間距離（A），同部での最大頭蓋骨内径（F），側脳室Cella media部最小幅（E），同部の頭蓋骨内径（H），最大第3脳室幅を各々透明なメジャーで測定した．これらからi）Frontal horn index（以下FHI）；A／F，ii）Cella media index（以下CMI）；E／H，を計算，iii）最大第3脳室幅（以下V_{3W}，単位mm）は測定値を換算し実際の値を求めた．

2）脳波はCT導入前例30例を含めた計45例（男28，女17）につき視認法で基本波周波数を決定し，1指標とした．

3）WAISはCT導入前例22例を含めた計34例（男24，女10）につき，主に1人の検者により施行，判定された．

結　　果

1）CT各計測値と年齢の関係；FHIと各年代の間には，図1に示す様に30歳台までは対照群と有意差を認めないが，40，50歳台では，有意差を認める（$p<0.025$）．又，年齢とFHIの間には$r=0.606$，$p<0.01$と相関を認めた．

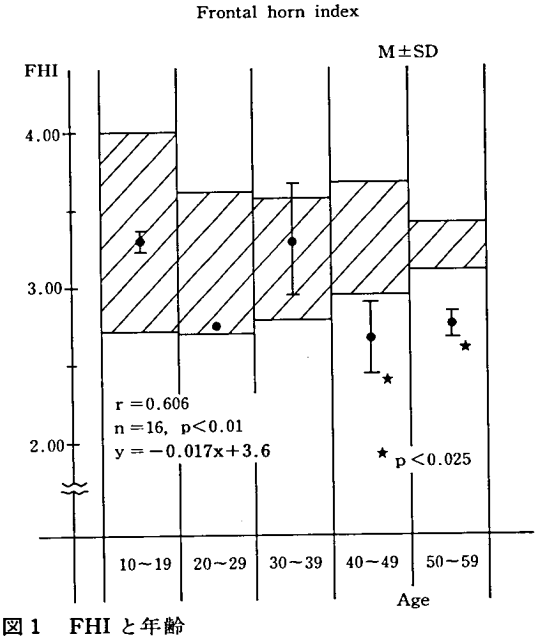


図1　FHIと年齢
斜線部の範囲は対照群を示す．
40歳台，50歳台で低下を示しFHIと年齢の間に相関を認める．

＊虎の門病院神経内科
＊＊虎の門病院心理社会部

CMI と各年代との間には，図 2 に示す如く FHI と同様に40歳台以降低下傾向を示すが有意でなく，CMI と年齢の間にも相関はなかった．

V_{3w} と各年代の間には，図 3 に示す様に40，50歳台では増加傾向を示し特に40歳台では対照群に比し有意であった($p<0.025$)．又，V_{3w} と年齢の間には $r=0.497$，$p<0.05$と有意の相関を認めた．

2) 脳波；基本波周波数が8.9c/s 以下と低下を示したものは，45例中27例（60%）であった．年齢と共に基本波周波数が低下する傾向を示したが，$r=0.269$と有意ではなかった．

3) WAIS（表 1）；Full-scale IQ が89以下と低下を示したものは34例中26例（76%）であった．90以上の正常例と89以下の低下例との間に，年齢が各々45± 9 歳，36± 8 歳と差を認め，低下例の方が有意に低年齢であった（$p<0.025$）．しかし，Full-scale IQ と年齢の間には $r=0.303$と相関は認められなかった．

言語性 IQ（以下 VIQ）と動作性 IQ（以下 PIQ）との間に15以上の差を示したものは 7 例（21%）であった．

VIQ＞PIQ 群が 4 例（12%）で，PIQ＞VIQ 群 3 例（9%）であった．この 2 群間で PIQ には差を認めなかったが，VIQ＞PIQ 群の方が高齢であり，かつ Full-scale IQ が高値であった（各々$p<0.025$，$p<0.05$）．

4) 各計測値間の相関について；FHI と基本

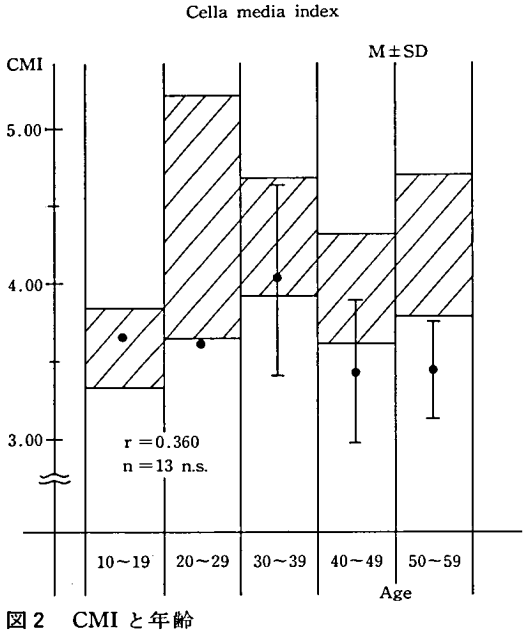


図 2　CMI と年齢
40歳台，50歳台で低下傾向を示すが有意でない．

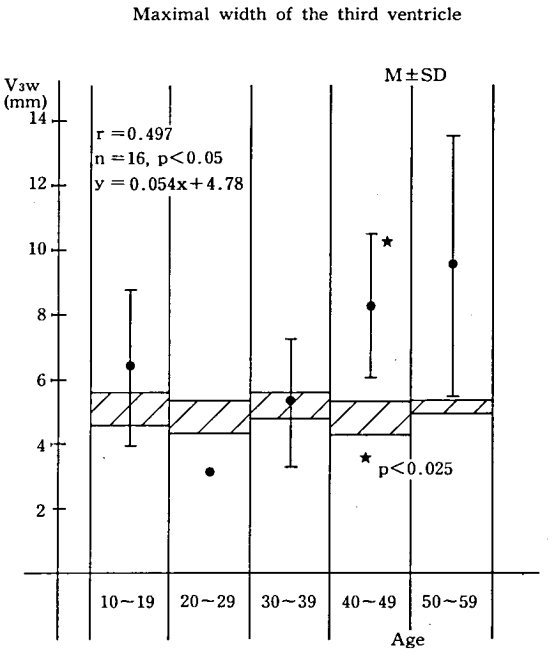


図 3　V_{3w} と年齢
40歳台では有意の増大を示す．V_{3w} と年齢の間に相関を認める．

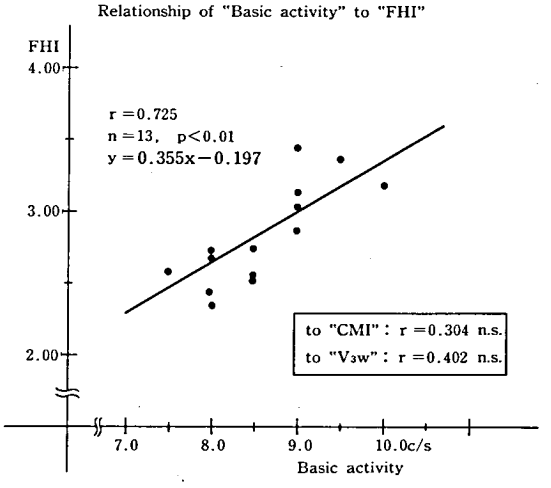


図 4　FHI と基本波周波数との間の相関を示す．

表1　(説明は本文参照)

WAIS (n=34)

Full-scale IQ	Number	Age (M±SD)	
120～	2 (5.9%)	44± 1	45± 9
110～119	0		
90～109	6 (17.6%)	45±11	★
80～ 89	15(44.1%)	40± 8	36± 8
70～ 79	6 (17.6%)	33± 9	
～ 69	5 (14.8%)	39± 8	

Relationship of "Full-scale IQ" to "Age" : r=0.303(n.s.)

VIQ＞PIQ (4例, 12%)

	1	2	3	4	M±SD
Age	45	50	61	49	51± 7
VIQ	131	104	100	112	112±14
PIQ	110	88	74	87	90±15
Full-scale IQ	121	98	91	101	103±13

PIQ＞VIQ (3例, 9%)

	1	2	3	M±SD
Age	28	37	31	32± 5 ★
VIQ	69	83	65	72± 9 ★
PIQ	93	99	73	88±14
Full-scale IQ	79	89	67	78±11 ★★

★p＜0.025　★★p＜0.05

波周波数との間には図4の様に r=0.725, p＜0.01と相関を認めたが, CMI, V_{3w} との間には相関は認められなかった.

Full-scale IQ, PIQ, VIQ と CT 各計測値間にはいずれも相関は認められなかった.

IQ と基本波周波数の間にも相関はなかった.

考　　案

CT 導入以来, 脳萎縮の判定は比較的容易に行なわれる様になり各種の測定法が考案されている. 今回, 我々は CT の計測値として cortical sulci の最大幅, Sylvian fissure の最大幅等の測定も同時に行なったが, 計測に用いるスライス面が得られないものが多かったこと, 計測値の再現性に問題のあること等の理由により本研究からは除外した. なお FHI, CMI は本来各々の測定部位の頭蓋骨外径を用いて計算する様に定義されているが, 最大前角間距離 (A) の測定部位延長線上の頭蓋骨の厚さが MD 群11.4±7.7mm, 対照群7.8±1.2mm と MD 群に明らかな hyperosteosis を認めることから内径を用いた.

対照群として主に神経学的所見のない頭痛例を用いたが, 従来の報告[1] にある正常値と較べて, 内径を用いたことを考慮するとほぼ同様の値であり対照群として用いるのは妥当と思われた.

MD の脳萎縮に関しては, 過去に気脳写を用いた報告が多いが, 1969年 Lundervold ら[2] は, MD 例の脳波基本波周波数, 気脳写を検討し, 両者は年齢と共に異常を示す率が高くなる事, 基本波の徐波化と脳室拡大はある程度の一致を示す事, 基本波周波数と IQ の間には関連がない事等今回の我々の結果とほぼ同様の報告をしている. 彼らは, 検査時年齢はほぼ罹病期間と平行するとし脳室拡大・脳波異常は, MD の進行と共に出現率が高くなると結論している.

我々も検査時年齢と推定罹病期間の関係を調べたが, 高齢者に罹病期間の長い傾向があるものの両者の相関はみられなかった.

MD の CT 所見に関しては, 井村ら[3] の報告があるが, 我々と同様の index を用い側脳室及び第3脳室の拡大は, 30もしくは40歳台以降大となることを示しているが, 本報告と同様に罹病期間と年齢の間には明確な関係を認めていない.

罹病期間と年齢の間に相関がみられない理由としては, MD において本人もしくは家族からは正確な発症時期を推定することが困難な事があげられる. このことは, むしろ MD の一徴候すなわち中枢神経系の異常を逆に表現している事になると思われる. ただし, 脳室拡大が真に年齢に依存すると仮定すると, MD を Werner 症候群の類似疾患と捉える議論があった様に, 脳室拡大は早期老化の一徴候ということになる. これらの点に関しては今後の検討を要すると思われる.

又, 井村らの報告では, 前頭部での半球間裂がやはり30歳台以降大となることをあわせ, MD では前頭葉萎縮が30歳台以降にみられると推論している. 今回の我々の検討でも, FHI は CMI, V_{3w} より明確に40歳台以降, 対照群と較べ有意差がでること, FHI と基本波周波数の間に有意の相関を

認める事より，やはりMDでは脳室拡大の中でも前角部拡大が特徴的所見と考えられた．

一方，病理学的には前頭葉萎縮の強い例の報告は散見されるが一定していない．

1967年，Rosmanら[4]は，知能低下を示したMD 3例に脳重量低下，皮質細胞の構築異常を示したが，知能低下を示さない1例では，これらの異常所見を認めていなかった．更に，1973年にはCulebraら[5]がRosmanらの2例を含むMD例6例に，thalamusのdorsomedial and anterior nucleiの10-30%にcytoplasmic eosinophilic bodyを認めMDの特徴的変化とし，thalamic neuronの消失が本症に認められる脳波異常（基本波周波数の徐波化）やdementiaの説明となりうるとしている．

しかし，今回の我々の検討では間脳部病変を示唆すると思われる第3脳室最大幅と基本波周波数，IQとの間に相関は認められず必ずしも彼らの説を支持するものではなかった．

結　論

1）MDに認められる脳室拡大は年齢と共に大となり，特に前角部，第3脳室幅と年齢は有意の相関を示し40歳台以降大となる．

2）基本波周波数低下は45例中27例（60%）に，IQ低下は34例中26例（76%）に認められたが，いずれも年齢とは相関を示さなかった．

3）基本波周波数と側脳室前角部拡大の間には相関を示すが他の部位とはなかった．

4）脳室拡大とIQの間には相関がなかった．

5）基本波周波数とIQの間には相関がなかった．

文　献

1) Meese, W., Kluge, W., Grumme, T., et al : CT evaluation of the CSF spaces of healthy persons. Neuroradiology,19 : 131-136, 1980.

2) Lundervold, A., Refsum, S. & Jacobsen,W. : The EEG in dystrophia myotonica. Europ. Neurol., 2 : 279-284, 1969.

3) 井村裕夫，大井長和，太田光，ほか：筋緊張性ジストロフィー症の脳のCT-scan所見の検討．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」三好班，昭和55年度研究報告書，1981，pp. 72-75.

4) Rosman, N.P. & Kakulas, B.A. : Mental deficiency associated with muscular dystrophy. A neuropathological study. Brain,89 : 769-787,1967.

5) Culebras, A., Feldman, R.G. & Merk, F.B. : Cytoplasmic inclusion bodies within neurons of the thalamus in myotonic dystrophy. A light and electron microscope study. J. Neurol.Sci.,19 : 319-329, 1973.

16) Rigid spine syndromeの臨床型について

黒岩 義五郎*

研究協力者　福井 律子*　石本 進士*　後藤 幾生*

Rigid spine syndromeは脊柱の屈曲制限と関節の可動制限を特徴とする比較的良性のまれな筋疾患とされている[1),2)]．我々は本症と考えられた3症例を経験し，臨床的に経過の異なるものの存在する可能性があるように思われたので報告する．

症　例

対象症例は3例．すべて男子．年齢は15歳から21歳．3例とも，生下時，幼年期には特に問題はなく，発症年齢は6歳前後であった．初発症状は首の前屈制限や軽度の四肢筋力低下などである．

症例1[6)]と症例3には血族結婚が認められたが，症例2[7)]には血族結婚はなく，3例とも同胞には神経筋疾患はみられない．

主要な神経学的所見は，3例とも知能正常で，首の前屈制限と脊柱側彎がみられたが，肘関節の拘縮は症例1ではみられなかった．

筋脱力と萎縮は，症例1では，胸鎖乳突筋で著明，上肢帯で軽度で，症例2と症例3では，全身に著明な筋脱力と萎縮があり，歩行がかろうじて可能で，Waddling gait, Gowers徴候陽性であった．

臨床経過は，症例1では16歳時からの5年間の経過観察では症状の進行は全くなかった．症例2では13歳時の初回入院後の2年間で，比較的急速に筋脱力と萎縮が進行した．症例3でも同様に13歳頃から歩行困難が著明となり，比較的増悪傾向をたどった．

検査所見で，血清CPKレベルは，症例1では軽度の上昇のみであったが，症例2及び症例3では中等度の上昇を示した（表1）．

その他，筋電図では3例とも筋原性変化を示し，心電図では伝導障害は認められなかった．

筋組織学的所見

症例1：上腕二頭筋の組織学的検索では，HE染色で軽度の筋線維の大小不同，中心核の軽度増加，間質結合織の軽度増生を認めたが，炎症所見は認めなかった．ATPase染色で，fiber typeの分布に異常はなかった．

表1　Clinical features of 3 cases

	Case 1	Case 2	Case3
Age(years),Sex	21,male	15,male	15,male
Age of Onset(years)	6	6	6
Consanguinity	+	−	+
Limitation of Neck Flexion	+	+	+
Contracture of Elbow joints	−	+	+
Scoliosis	+	+	+
Muscle Weakness and Atrophy	mild	marked	marked
Course	stationary	progressive	progressive
CPK(n:30-70mu/ml)	71-103	230-693	255-262

＊九州大学医学部脳研神経内科

症例2：上腕二頭筋の組織学的検索では，HE染色で，筋線維の著明な大小不同と中心核の増加を示し，壊死線維，fiber splitting, cytoplasmic body等の変性所見も著明であった．Trichrome染色ではrimmed vacuoleがみられ，電顕でmyelin figureが確認された．ATPase染色でfiber typeに著明な異常はなかった．

症例3：三角筋の組織学的検索では，HE染色で，筋線維の著明な大小不同を示し，中心核も増加し，fiber splitting, ring fiber, whorled fiber等の著しい変性所見がみられた．Trichrome染色で濃染物質がみられ，電顕でcytoplasmic body及びrod様構造物が確認された．

考　　按

Rigid spine syndromeは1970年のDubowitzの提唱以来[1]，脊柱の運動制限と肘関節の可動制限，側彎などの特徴的臨床症状を示し，筋脱力や萎縮は比較的軽度で，良性筋疾患の1つとされている[2)5)6)]．遺伝歴や心伝導障害のないことで，Emery-Dreifuss型ジストロフィー症とは一応区別されている[3)4)]．

我々の経験した3症例もRigid spine syndromeとしての臨床的特徴を有しているが，症例1はほとんど筋脱力や萎縮が停止性で良性筋疾患のタイプを示し，他の2例は比較的急速に増悪傾向を示した．

このようにRigid spine syndromeの中にも異なった経過をたどるものの存在する可能性が示唆された．またその2つのタイプにおいては，血中CPKレベルや，筋組織学的所見における筋線維の変化の程度に違いがあるように思われた．

文　　献

1) Dubowitz, V.：Some unusual neuromuscular disorders. in Walton JN, Canal N, Scarlato G. (eds) Muscle diseases. Proceeding of an International Congress (May 19-21, 1969, Milan). Excerpta Medica, Amsterdam, 1970, 568-573.

2) Dubowitz, V. & Brooke, M. H.：Rigid spine syndrome. in Muscle biopsy. A modern approach. WB Saunders Co, London, 1973, 368-371.

3) Emery, A. E. H. & Dreifuss, F. F.：Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 29：338-342, 1966.

4) Rowland, L. P., Fetell, M., Olarte, M., et al：Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Ann. Neurol., 5：111-117, 1979.

5) Goebel, H. H., Lenard, H. G., Görke, W. & Kunze, K.：Fiber type disproportion in the rigid spine syndrome. Neuropädiatrie, 8：467-477, 1977.

6) Seay, A. R., Ziten, F. A. & Petajan, J. H.：Rigid spine syndrome. A type 1 fiber myopathy. Arch. Neurol., 34：119-122, 1977.

7) Goto, I., Nagasaka, S., Nagara, H., et al：Rigid spine syndrome. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 42：276-279, 1979.

8) Goto, I., Muraoka, S., Fujii, N., et al：Rigid spine syndrome：Clinical and histological problems. J. Neurol., 226：143-148, 1981.

17）軽度かつ持続的な運動により筋硬直を呈する家族性ミオパチー

西　村　嘉　郎*

はじめに

随意運動によって誘発される有痛性筋拘縮は神経原性にも筋原性にも観察されるが，後者の場合は横紋筋の運動エネルギー産生機構の障害によるものが多いと思われる．骨格筋の運動量は，安静時のものも含めて，運動の最大酸素消費速度（VO_{max}）によって表現されると考えてよい．

VO_{max}90％以上の高度に激しい運動の開始後数分間は，筋組織への酸素供給が不充分な状態（“O_2 debt”）であり嫌気性解糖のみによって運動エネルギーは与えられる．Phosphorylase, Phosphofructokinase, LDH-M subunit 等の酵素欠損症ではこのような条件下に於てのみ発症する．

他方 VO_{max}50％以下の運動や安静時には筋はそのエネルギー供給源を主として脂質に求めており，Carnitine-palmitate transferase 欠損症や Carnitine 欠損症の筋症状は嫌気性解糖を必要とする条件下では通常みられない．

最近われわれは一見正常な筋力を有しながら軽度の運動を持続するとき，筋の疼痛と硬直を自覚し，運動継続困難となりかつ血清 CPK，LDH 値上昇を呈した家族性ミオパチーを経験したので報告する．

症　　例

32歳男性，工員．数年間血清 LDH 高値が持続するため肝疾患の精査を目的として来院した．小学生の頃より徒競争は不得意で，ゆっくり走っても1,000米程度で下腿に緊張を覚え，さらに筋痛を生じ走行不可能となっている．中学生の頃には30分程度歩いても肩，頸部および下腿に同様の症状がみられ歩行を継続できなかった．しかし日常生活には他に特に支障なく現在に至っている．入院時現症では一般理学的所見正常．筋萎縮は肩甲帯に極軽度認められるが，むしろ前腕・下腿筋の hypertrophy が顕著であった．腱反射は低下または消失．小脳失調・感覚障害はない（図1）．

家系に近親結婚はなく，患者の同胞4人のうち長兄，次兄に同様の筋症状が認められた．長兄は40歳．四肢近位筋萎縮，筋力低下は3人のうちで

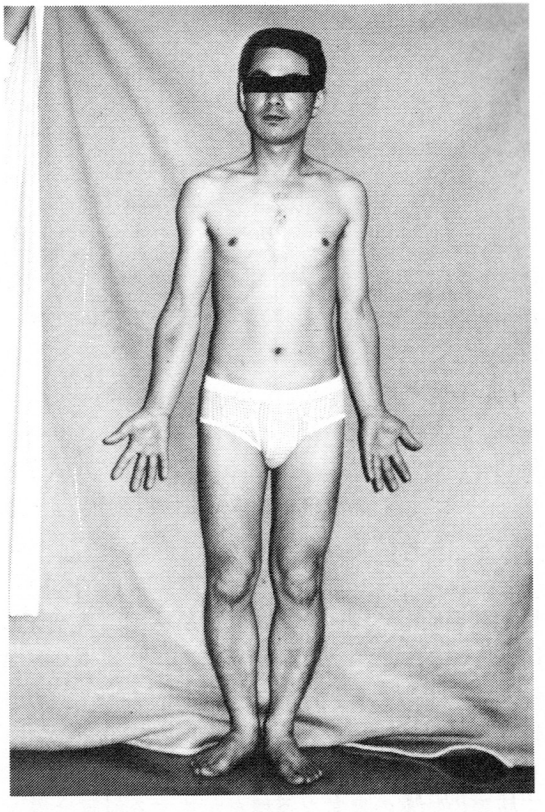


図1　患者全身像．四肢近位筋に極軽度の萎縮が認められるが，むしろ遠位筋の hypertrophy が特徴的である．これは同胞の2人にも認められた．

＊浜松医科大学第一内科

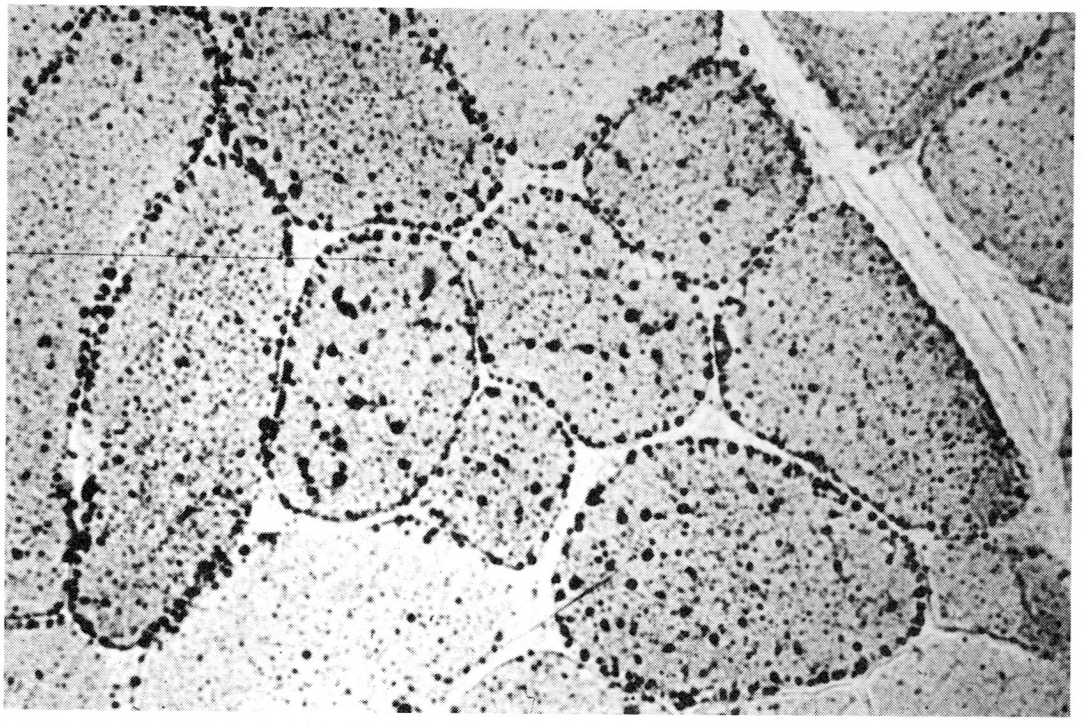


図2　大腿四頭筋生検組織．Sudan black B 染色．脂肪顆粒の軽度増加が認められる．

最も高度であるが，学童期から現在に至るまでこれらの症状の進行は否定している．次兄は38歳．筋萎縮，筋力低下は患者とほぼ同程度と考えられるが，下腿筋の hypertrophy は顕著である．現在筋症状は自覚しないが，小学生の頃は遠足の際目的地までは歩行したが，帰途は筋痛のため歩行困難となった．この軽度運動時の筋痛，硬直は休息によって更に増強した．

一般検査（生化学・免疫学）では異常はない．甲状腺機能，耐糖能等正常．髄液検査正常．筋電図は大腿四頭筋に一部神経原性変化を認めたが他の筋では正常所見が得られた．MCV は正常．筋生検は軽度の筋線維の大小不同と中心核の存在が明らかであった．組織化学及び電顕では筋線維内に空胞等の物質の異常な蓄積を示唆する所見は得られなかった．

Sudan black B 染色（図2），Oil red O 染色では type Ⅰ線維に軽度脂肪顆粒を認めたが，正常上限である．

負荷試験と CPK 値の変動

1．基礎値：入院後比較的安静時に血清CPK値は90～140 IU/L（正常値120以下）を示した（図3）．血清 LDH 値は225～261 WU/L（正常値170～340）．

2．外来（日常生活）および軽度運動時：CPK値は183～2617と上昇を示した．これは特に運動負荷の少ない生活を行っている時の早朝空腹時の値も含まれる（図3）．

3．前腕虚血試験：右前腕1分間阻血下における最大運動負荷では，前値は血清CPK が92，LDH236であるがCPKは10時間後の最大値でも119とわずかな上昇を示したにすぎず，10分後の値は90と低下していた．LDH は1分後に257と最大値をとった．血清 myoglobin 値は1時間後に最大値4000 ng/ml を呈した．血清 lactate は前値1046 IU/L，

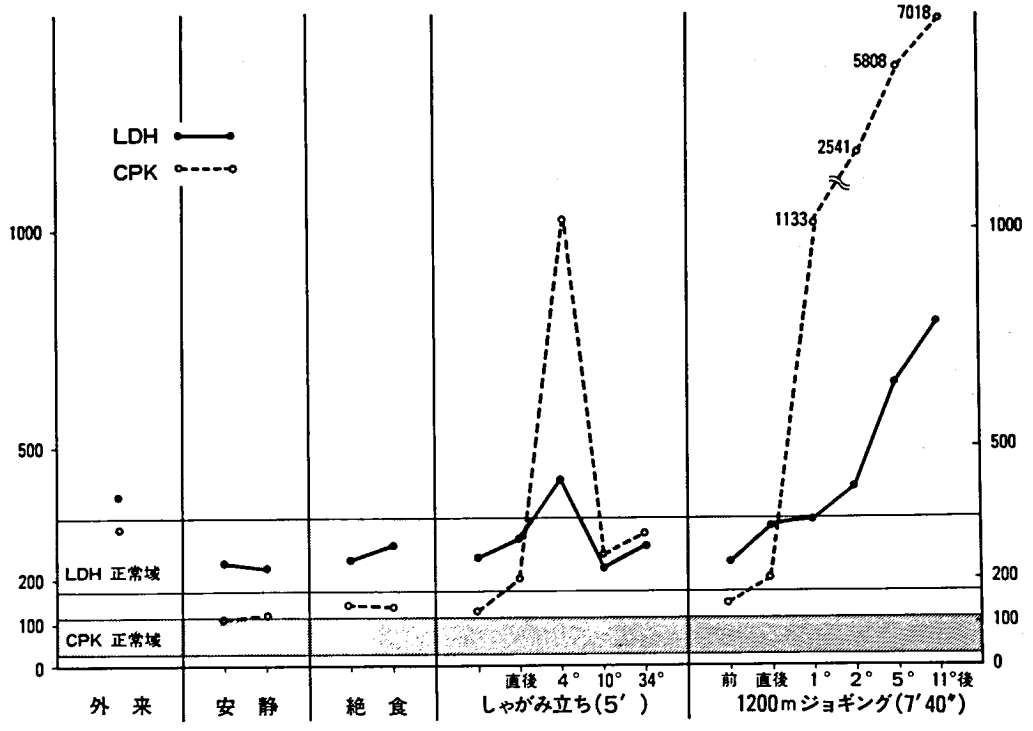


図3　負荷試験時の血清CPK値，LDH値．左端（「外来」）は日常生活を行っている時のもので，入院中，ほぼ同等の運動量を行っている時のものも含まれる．「絶食」は72時間絶食試験を示す．本試験中myoglobin値は軽度上昇を示した．「しゃがみ立ち」は絶食試験終了時の軽度運動負荷を示す（5分間，10秒に1回しゃがみ立ち）．
「Jogging」試験は筋痛と硬直のために走行不能となって終了した．

3分後最大値が5676を示した．患者は充分に運動を行ない筋痛を自覚しなかった．血清lactateの反応は本患者の前腕筋に於て嫌気性解糖によるエネルギー産生が正常に行われていることを意味する．しかしmyoglobin値の上昇はCPK値との解離とあわせて何らかの膜の変化を示唆すると考えられる（図4）．

4．絶食試験(72時間)：本試験は患者の脂肪代謝についての検索である．血清遊離脂肪酸をはじめ入院時血液生化学検査では異常を示さなかったが，本試験ではtriglycerideは前値が117ng/dlから6時間後に172と上昇したが，その後は下降し77迄低下を示した．尿中ketone体も出現した．これらの反応はほぼ正常と考えられる．終了時に10秒に1回のしゃがみ立ちを5分間行った結果が図3に示す血清CPK値の上昇である．この上昇は日常生

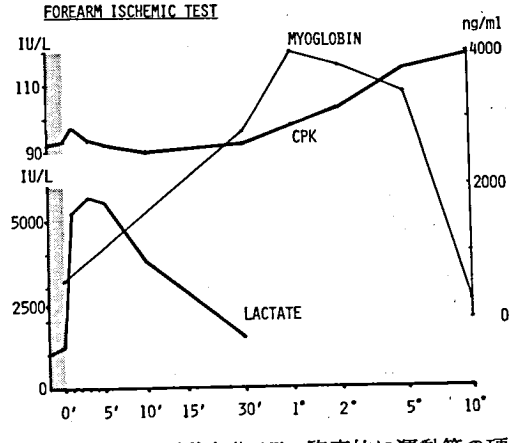


図4　前腕虚血運動負荷試験．臨床的に運動筋の硬直は誘発されず，血清中のlactate値も数分後に最大値をとる正常反応を示した．血清CPK値はわずかな上昇を示すのに対し，血清myoglobin値は著増し両者の解離を示した．

活における運動量とCPK値の変動量の関係と比較して有意の変化と考えられる．

5．Jogging試験：典型的な有痛性筋硬直を示す運動として患者があげた一つにマラソンがある．筋力テストで正常な筋力を有すると判断される本患者に於て，また工員として労働を職業としている人間で，この症状は理解しがたいものである．走行速度は1500米を完走を条件に患者に判断させた．第1回は秒速平均2.60米である．約1,000米より両側大腿前面の硬直を自覚し始め，1,200米で全く走行不能となって中止した．中止後も筋痛は増強し歩行も不能となり，筋硬直は高度となったが筋電図では不完全ながら干渉波形が認められた．血清CPK値は12時間後に最大値7018を示した．第2回はl-carnitine 600mg（1日量）を経口負荷後に行った．本剤投与数週間後より日常労働にも自覚的に改善をみているが，Jogging能力の改善は明らかで，1,600米走行後も独歩可能であり，筋硬直も大腿に軽度自覚するのみであった．血清CPK値は12時間迄しか検索できなかったが，最大値は1380に止まった．第3回はl-carnitineを1日量800mgに増量して行った．検査日は勤務上疲労のなるべく少ない日時を選んだが，実施日は数日間残業の続いた後となってしまった．血清CPK値は前値ですでに1400と高値を示した．Joggingも下肢のだるさを当初から訴え，速度も第1回，第2回よりは遅かったが，運動量は上回り，有痛性筋硬直の程度は前回より更に軽度であった．CPK値は運動の影響を示していない（図5）．

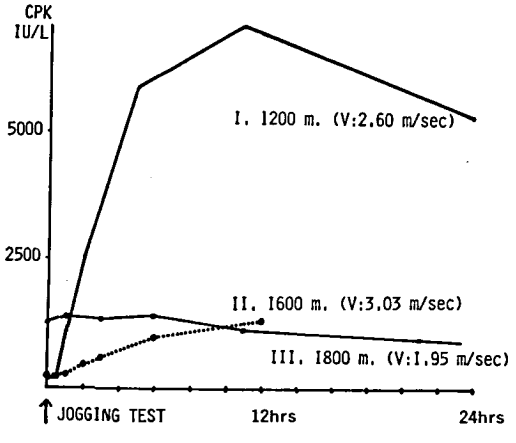


図5　Jogging試験時の血清CPK値の変動．Iは入院時l-carnitine投与前．IIは1日600mg経口投与後，IIIは1日800mg投与後のもの．II，IIIでは軽い筋硬直を自覚し走行困難となったが独歩は充分可能であった．

考　　案

筋細胞壊死の表現の一つであるmyoglobin尿症の原因については様々なものが知られているが，遺伝性疾患としては，解糖系代謝異常によるものでPhosphorylase欠損症に代表されるものがあり，他に脂質系のものとしてCPT欠損症，Carnitine欠損症がある．前者は過激な運動によって発症するが，後者はむしろ軽い運動や安静時に間欠的に発症する特徴があり，この差違は筋のエネルギー源としての糖質と脂質の差による決定的な問題である．また運動後の筋硬直を呈する例が多くみられるAdenylate deaminase欠損症もこの筋エネルギー代謝の面から考えて考慮されねばならない．

本症の発症条件，検査所見からみて，解糖系代謝異常は全く考えられないことは先に述べた通りである．本症は筋生検脂肪染色標本に脂肪沈着が軽度であることからCPT，Carnitine欠損症と即断できないが，一応両者について比較してみると，CPT欠損症はくり返すmyoglobin尿があり，空腹のみでCPK値の上昇をみる点で本症と異なるが，本症で絶食試験後の運動負荷で有意にCPK値が上昇することはやはりCPT欠損症でも特徴的である．検査でtriglycerideその他の脂肪酸等の高値は本症では認められなかった．CPT欠損症は最初絶食試験で血清ketone体の上昇がみられないと言われたがその後ketone体の遅延反応を示すもの，正常に近い上昇を示すものがあり，診断は筋組織中のCPTその他mitochondria膜における長鎖脂肪酸輸送に関係する酵素の測定によらねばならない．

Carnitine欠損症は，幼少時からの進行性あるいは非進行性筋萎縮を主症状とするもので本症患者の様に筋萎縮の強くないものを考えることは問題がある．勿論肝不全または心筋障害のないこと

等，全身性 Carnitine 欠損症は否定されるが，Carnitine 欠損症は様々な随伴する臨床症状の差異を示すものが報告されていることや，carnitine が膜における脂肪酸担当体であることが筋のエネルギー代謝に持つ意味は大きく，本症の原因精査には充分考慮されねばならない．症状の多様性は Deaminase 欠損症でも問題であるが，本症の報告例は臨床の記載の不充分なものが多く，運動後の筋硬直は記載が多いがその内容は不明である．

本症患者は安静時に CPK 値が正常であるにも関らず，軽度かつ持続的な運動（日常生活も含め）で CPK 値の上昇，運動継続困難がみられ，この CPK 値の変動が絶食によって増強されること，l-carnitine 投与によって改善をみること等の特徴がある．このことは本症の問題点が筋エネルギー代謝にある可能性が充分考えられる．また好気的条件下ということから mitochondria に於ける糖質・脂質の代謝，さらに ATP/AMP の調整をしていると考えられている deaminase も含めて，今後幅広い検索が必要であろうと考える．

ま と め

1．軽度かつ持続的な運動により有痛性筋硬直を示し，CPK 値上昇を呈する家族性ミオパチーを報告した．

2．本症患者について絶食試験，Jogging 試験，前腕虚血試験等を行い，その結果について病態を考察した．

3．走行能力について l-carnitine 経口投与によって症状の改善をみたことも併せて報告する．

18）骨格筋の組織病理学的研究

——特に肥大線維，中心核，Fiber splitting について——

茂 在 敏 司*

研究協力者　竹 中 正 純*　河 村　宏*　篠 田 恵 一*
増 井 義 一*　小 西 慎 吾*

はじめに

各種神経筋疾患における筋組織像を検討する際，多くの場合，興味は変性，萎縮した筋線維に対して集中される傾向があるように思われる．筋生検像を検討する時，このような崩壊過程にある線維をみることも重要であるが，一方健常に残存した線維および時に観察される，あたかも萎縮した線維の働きを補うかのごとく肥大化した線維についての観察を行うこともまた重要である．

運動ニューロン疾患（以下MNDと略す）のある種のものには，時に肥大化した筋線維を高頻度にみる例があり，またこれらの筋生検像では，中心核，Fiber splitting などの変化が同時に多く観察される．今回は，これらの変化，即ち，肥大線維，中心核，Fiber splitting などの所見を中心に，各種神経筋疾患の筋生検像を検討した．

対象および方法

対象は，MND および，筋原性疾患として，筋強直性ジストロフィー症，多発性筋炎について検討した（表1）．MND では，血清CPK値により，2つのグループに分類した．CPK値正常群は，ALS12例，SPMA 1例である．ALS12例のうち，case 12が家族内発症をみた例で，臨床経過は約20年と長期にわたっているが，他の11例は経過3年以内である．なおここに示した臨床経過は，初発症状より筋生検施行までの期間を示している．筋生検を行なった部位の筋力は，case 7を除いて，MMT 4程度の筋力が保たれている．血清CPK値は，入院安静時に採血されたもので，ほぼ正常範囲にある．SPMA 1例は，近位型筋萎縮をみた例である．

表1　症例総括

Case	Age	Sex	Clinical course (yr.)	Muscle power (*MMT)	CPK
ALS					
1	72	F	2	4	70
2	56	M	3	4	65
3	77	F	3	4-	76
4	37	F	1.1	4	63
5	59	F	1.5	4	37
6	67	F	1.5	4	86
7	68	F	2	3	40
8	69	M	1.5	4-	73
9	65	M	1.3	4-	44
10	28	M	0.2	4	70
11	57	F	1	4	33
12	30	M	20	4-	45
SPMA					
1	55	M	5	5	70
SPMA					
Distal form					
1	55	M	3	4	162
2	27	M	20	4	324
Proximal form					
3	41	M	2.5	4	588
4	49	M	0.5	4	384
Kennedy's disease					
5	40	M	8	4	741
6	50	M	9	4	923
CMT disease					
7	19	M	15	4-	229
Myotonic Dystrophy					
1	19	F	3	4-	183
2	37	F	3	4	266
3	21	M	2	4	319
4	40	F	7	4	172
Polymyositis					
1	33	F	0.5	3	393
2	25	F	0.5	3	37
3	48	F	5	4-	176
4	37	F	3	4-	393
5	63	M	0.8	4	1563

一方血清CPK値上昇を示したMND 7例の内訳は，SPMA 4例，Kennedy病2例に，CMT病1例について検討した．SPMA 4例のうち2例は遠位部に，他の2例は近位部につよく筋萎縮を認めている．経過は半年より20年の長期に及ぶものまであり，筋力は4程度に保たれている．血清CPK値は162より923の範囲にある．以上の7例は，全例男性である．

*大阪医科大学第一内科

筋強直性ジストロフィー症は，3例が女性，1例が男性．多発性筋炎は，4例が女性，1例が男性であり，男性例のみが癌に合併したものである．

以上の各症例の生検大腿四頭筋より凍結切片を作製し，H.E.染色を行った．さらに100×の写真撮影より，at randam に200個の筋線維を観察し，ヒストグラムを作製するとともに，個々の線維において，中心核，Fiber splitting の観察を行った．

結　　果

CPK 正常を示した MND13例の total のヒストグラム，中心核，Fiber splitting を図1左に示し，中心核，Fiber splitting は線維の何%にみられるかを示したものである．ヒストグラムでは，90μ 以上の肥大線維はごく少数であり，また中心核，Fiber splitting をみる頻度も極めて低い．

一方 CPK が上昇した，MND のグループでは（図1右）90μ 以上の肥大線維が多く認められた．中心核は，正常径の線維にも認められるが，肥大線維により高頻度に観察された．また，Fiber splitting も同様の傾向が認められる．40μ 以下の小径の線維には splitting はみられなかった．これらの観察を通して，一般に肥大線維，Fiber splitting，中心核などの諸変化は，群集萎縮などが強くみられる部位の近傍により多く観察される傾向があった．連続切片の観察では，中心核に連続して，splitting が出現する所見がみられる．他の多くの splitting についても同様の所見が得られた．図2は SPMA の Distal form のものであるが，中心核と関連して，splitting が出現している像が観察される．電顕的には Fiber splitting は，sarcolemma が筋原線維間に陥入し，陥入した先端部にほぼ連続するように中心核が筋形質内において観察される（図3）．

多発性筋炎では，90μ 以上の肥大線維は少数であり，中心核は肥大化傾向の線維に中等度観察される．一方，Fiber splitting はほとんどみられない（図4左）．

筋強直性ジストロフィー症においても，90μ 以上の肥大線維は少数で，中心核は正常径ならびに肥大線維に中等度観察されるのに反し，Fiber splitting をみる頻度は極めて低いものであった（図4右）．また縦断面切片の観察では中心核の連珠状配列が特徴的であった．

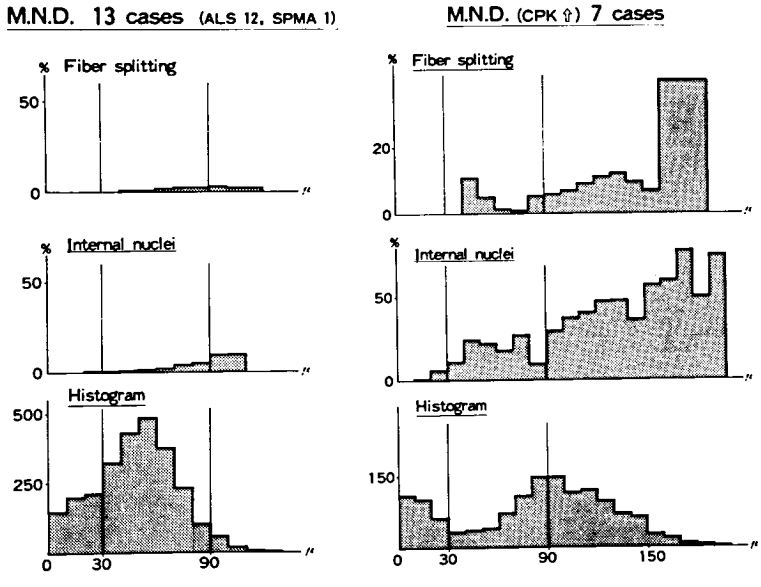


図1　運動ニューロン疾患における，ヒストグラム，中心核，Fiber splitting.

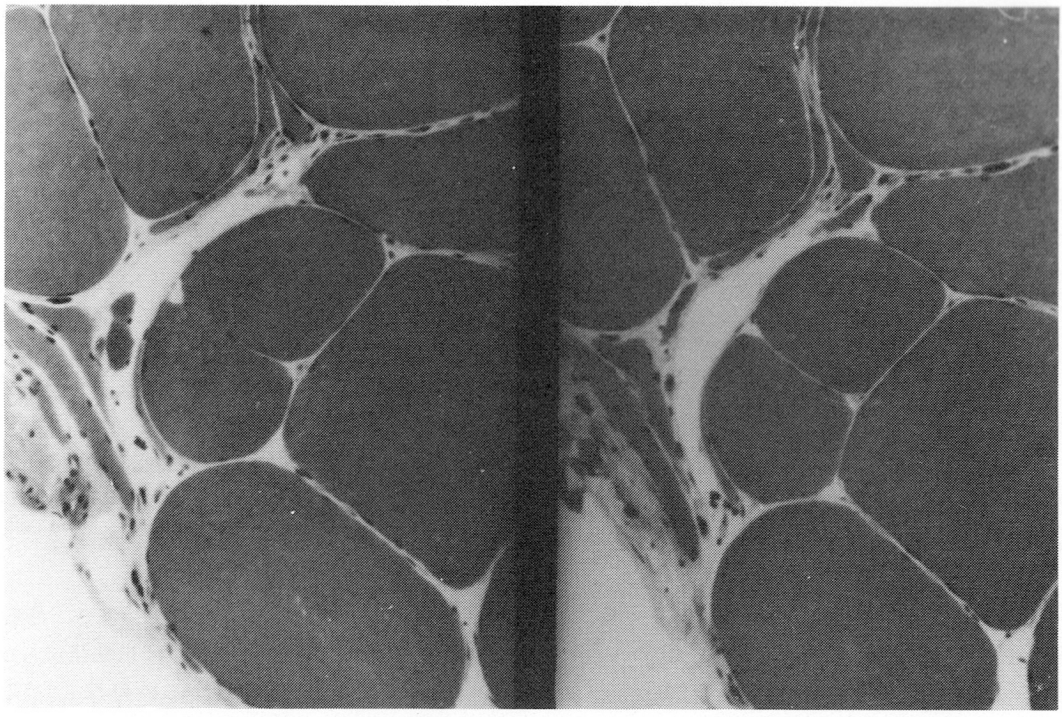


図2　中心核に向って，Fiber splittingが形成される．

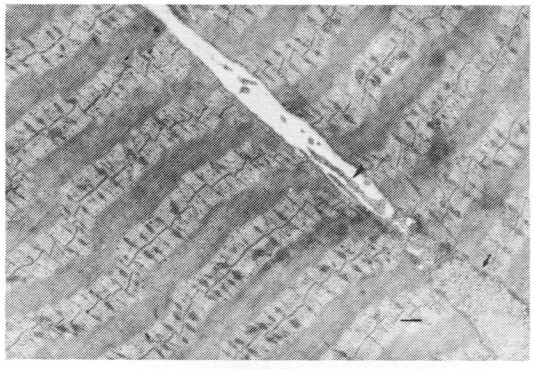


図3　Splitting部の電顕像

Splitting部はsarcolemmaが筋原線維間に陥入したかたちで観察され，さらにsplittingに連続するかたちで筋形質内に中心核(←)が認められる．

Splitting部の腔内にはfibroblastと思われる細胞の一部が観察される(◀)．

考　　案

脱神経にみられる筋の組織学的所見において，肥大線維の存在に注目した報告は少ない．Stålbergら[1]は，経過の速いMNDにおいて，筋線維の肥大化の起こり難い説明として，前角細胞の機能障害が急速に起こり，脱神経化により萎縮した筋線維へのcollateral sproutingによる神経再支配が十分に行なわれない，即ち運動単位の再構築が障害されるとするのに反し，一方Wohlfart-Kugelberg-Welander病のように経過のおそい疾患では，この再構築化が十分に行なわれる結果，筋の代償的肥大化がみられるとしている．

我々のMNDのうち高CPK値をとったグループも，疾患の経過は比較的緩徐であり，また経過も長く，これらの点を考慮すれば，筋の肥大化のためには，時間的な経過が重要な因子であることが考えられる．しかし代償的なreinnervationを受けた線維が，いかに肥大化してゆくかのメカ

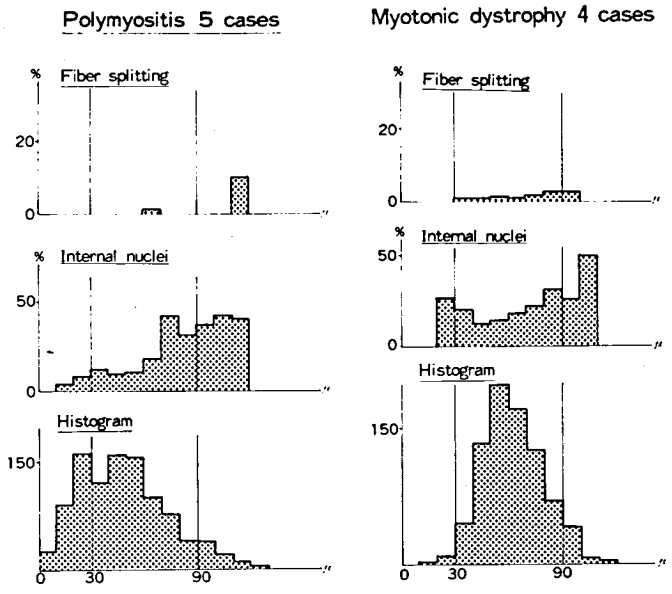


図4　多発性筋炎，筋強直性ジストロフィー症におけるヒストグラム，中心核，Fiber splitting.

ニズムについては，明らかではない．

また高CPK血症と肥大線維の関連には注目しなければならない．この線維の肥大といった現象が単に代償的なものかどうか，そのメカニズムについては，今後さらに検討が必要である．

我々の検討では，MNDにおける筋の肥大化は，中心核およびFiber splittingと相まって起こっているように思われる．Schwartzら[2]も，同様の報告をしており，Fiber splittingの成り立ちは，不十分な神経支配を受けた肥大線維へのoverloadによるものとしている．

脱神経による筋の筋原性変化に関しては，従来より議論の多いところである．Drachmanら[3]は，これらの筋原性変化は，脱神経とは異なった病的過程すなわち原発性の筋原性病変が加わったというよりも，むしろ偶発的あるいは，脱神経に付随してみられるといった立場をとっている．今回我々の検討した結果では，中心核，Fiber splittingなどの従来筋原性疾患にみられる変化は，筋の肥大化と関連してみられるものであり，一方筋疾患においては，中心核は観察されるものの，splittingは関連して観察されず，これの諸変化は，神経原性疾患と筋疾患との間に大きな違いとして，指摘される．

肥大線維，中心核，Fiber splittingの成り立ちについては，今後なお十分な検討が必要である．

文　献

1) Stålberg, E., Schwartz, M. S. & Trontelj, J. V. : Single fiber electromyography in various processes affecting the anterior horn cell. J. Neurol. Sci., 24 : 403-415, 1975.

2) Schwartz, M. S., Sargeant, M. & Swash, M. : Longitudinal fibre splitting in neurogenic muscular disorders——its relation to the pathogenesis of myopathic change. Brain, 99 : 617-636, 1976.

3) Drachman, D. B., Murphy, S. R., Nigam, M. P. & Hills, J. R. : Myopathic changes in chronically denervated muscle.Arch. Neurol., 16 : 14-24, 1967.

19) Duchenne ジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験
——再生筋直径の定量的検討——

若 山 吉 弘*

研究協力者　大 生 定 義*　熊 谷 俊 幸**

筋ジストロフィー症における筋再生が正常であるかどうかは本症の病因，治療，予後に関して重要な課題でありながらまだ一定の結論は得られていない．本年度も昨年度にひき続き，先天的に胸腺のないヌードマウスの皮下に本症生検筋を移植し，その再生筋を正常対照生検筋の移植片のそれと形態学的に比較し，とくにその直径について定量的に検討したので報告する．

材料と方法

ヌードマウスをネンブタールにて麻酔し，2つの小さな切開を左右の背部に加え，ここへ組織化学的に正常な整形外科手術患者9例，Duchenne 筋ジストロフィー症（以下 DMD）患者8例からの生検筋を小さく細切（約2×5㎝）したものを周囲の筋に直接触れない様に挿入し縫合した．

移植片は移植後1，2，3，4週目でそれぞれ正常対照筋と DMD 筋からの再生筋の形態学的比較をした．まずヌードマウスをエーテル麻酔後屠殺し背部の皮膚を切開した．移植片は通常血管新生により赤く，線維組織の被膜により覆われ周囲の組織からは容易に識別可能であった．

移植片のついた皮膚をピンで伸ばし，2.5%グルタールアルデヒドをここへ注ぎ，約10分間固定した．これは移植片における再生筋線維の contraction artifact を避けるためにおこなった．その後移植片をヌードマウスの皮膚から除去し，まわりに付着している結合織を除去し，小さな block に細切した．この標本を固定脱水後プラスチックに包埋した．½μの厚切り切片はトルイジンブルーにて染色後光顕にて検索した．また超薄切片をウラニールと鉛で2重染色後電顕にて観察した．

再生筋細胞直径の定量的検討はそれぞれの症例で20個以上のプラスチックに包埋した標本の½μの厚切り切片をトルイジンブルー染色し，その再生筋線維の横断標本を at random に最終倍率400倍で光顕写真にとり測定した．また整形外科手術患者の年齢を DMD 患者の年齢と match させるため，新たに整形外科手術例4例からの組織化学的に正常な生検筋を同様な方法でヌードマウスに移植後標本を作製し形態学的に検討した．

結　　果

裸眼的には正常筋および DMD 筋の移植組織片はヌードマウスの皮下組織のなかで，1週後には移植片のなかの血管新生のために赤くはっきりと周囲の結合織からは識別できた．そして移植片はその周囲の結合織の被膜により被包され，周囲の疎な結合織のなかに浮いている状態で移植片の採取は容易であった．そして移植片は時とともに小さくなってゆくように思われた．移植片の割面は周辺部がより赤く密で，中央部はやや白っぽく疎であった．光顕的には正常筋，DMD 筋の移植片にて1週後には移植片の周辺部で核小体と明るい核をもち繊細な細胞質のある myoblast，myotube を認めた．他方移植片の中央部には核が消失し硝子様筋原線維をもつ変性筋線維が存在し，その周辺部にはいくつかの紡錘形細胞が随伴していた．

* 昭和大学藤が丘病院神経内科
** 愛知県コロニー中央病院小児神経科

2，3週後にはmyotubeの生育があり，それらのいくらかには胞体内に空胞を有するものもみられた．また移植後2週以降には正常筋移植片にも間質結合織の著しい増加が認められ，DMD筋移植片の間質結合織の増加の程度と区別が困難なほどであった．このような状況のなかで最も興味ある所見としてDMD再生筋は移植2週以後には正常筋移植片の再生筋より直径が細い傾向がみられた．そして移植4週後までには周辺核と横紋をもつ筋線維や，横紋形成と中心核をもつもの，さらに横紋のみられないmyotubeなどが正常筋，DMD筋の移植片に認められた．

正常筋，DMD筋の移植片の電顕所見の詳細に関してはすでに昨年度までの報告書の記載[1),2)]を参照されたい．電顕的には移植後1～4週までの標本において形態的には対照筋移植片と明らかな差はなく，またDMD筋移植片からの再生筋細胞の細胞膜にはDMD生検筋線維にみられるような細胞膜の消失は認められなかった．

さてDMD筋移植片の再生筋細胞は正常対照筋移植片の再生筋細胞より細い傾向がみられた（文献2，図1A～1D）ので，再生筋細胞の直径を測定した結果をそれぞれの症例につきmean diameter±standard deviation(μm)で表示すると表1のようになる．大部分の症例で移植3週後までは再生筋細胞の直径は増加しその後減少する傾向がみられた．また再生筋細胞の直径の年齢による差異は表でみる限り明らかでなかった．

次に正常対照群とDMD群の移植後1，2，3，4週目の標本の再生筋細胞の直径分布のヒストグ

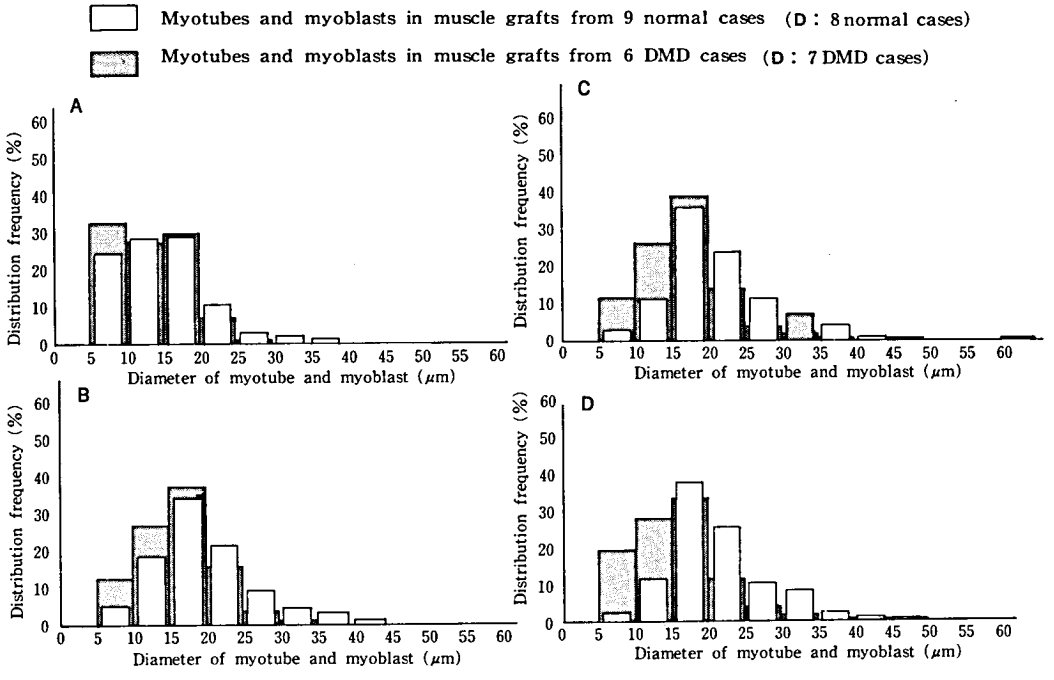


図1　A　Distribution frequency of myotube and myoblast diameter after 1 week of transplantation
B　Distribution frequency of myotube and myoblast diameter after 2 weeks of transplantation
C　Distribution frequency of myotube and myoblast diameter after 3 weeks of transplantation
D　Distribution frequency of myotube and myoblast diameter after 4 weeks of transplantation

表 1　Mean diameters (μm) of cross sectioned myotubes and myoblasts after 1~4 weeks of transplantation

Case	Age	Sex	Normal or DMD	1 Week	2 Weeks	3 Weeks	4 Weeks
1	15	M	Normal	18.3±7.6[a] (n = 101)b	22.6±8.6[a] (n = 60)b	24.3±9.5[a] (n = 122)b	22.5±7.0[a] (n = 83)b
2	18	M	Normal	14.0±7.4 (n = 119)	19.5±7.2 (n = 73)	23.0±7.8 (n = 50)	18.3±7.3 (n = 50)
3	16	F	Normal	13.4±4.9 (n = 87)	19.0±6.0 (n = 81)	21.6±7.9 (n = 115)	20.7±7.3 (n = 73)
4	21	F	Normal	16.7±6.1 (n = 63)	17.6±5.9 (n = 53)	22.2±6.4 (n = 77)	20.7±6.5 (n = 56)
5	14	F	Normal	12.5±5.4 (n = 71)	21.2±7.7 (n = 54)	18.8±5.9 (n = 103)	17.6±5.3 (n = 71)
6	16	M	Normal	16.2±6.1 (n = 87)	19.6±8.3 (n = 235)	22.6±7.5 (n = 150)	23.2±7.4 (n = 124)
7	12	F	Normal	13.6±4.4 (n = 70)	21.0±6.5 (n = 76)	20.5±6.4 (n = 109)	21.1±6.0 (n = 64)
8	16	F	Normal	15.6±6.0 (n = 103)	19.1±6.2 (n = 108)	20.8±7.3 (n = 124)	21.7±7.0 (n = 57)
9	8	M	Normal	14.0±3.9 (n = 207)	19.9±7.0 (n = 115)	17.5±4.2 (n = 53)	
10	6	M	DMD	14.4±4.2 (n = 112)	15.8±5.0 (n = 187)	17.0±6.1 (n = 96)	14.6±4.6 (n = 114)
11	3	M	DMD	11.9±4.6 (n = 46)	12.8±3.5 (n = 121)	14.7±4.0 (n = 226)	13.4±3.9 (n = 63)
12	7	M	DMD	13.1±4.7 (n = 64)	16.5±6.8 (n = 51)	20.8±7.5 (n = 54)	19.1±8.1 (n = 62)
13	4	M	DMD	11.6±4.6 (n = 55)	16.0±5.3 (n = 45)	14.7±5.4 (n = 50)	15.7±5.5 (n = 72)
14	5	M	DMD	16.8±5.2 (n = 50)	15.2±5.6 (n = 75)	18.0±6.0 (n = 77)	20.3±7.9 (n = 73)
15	2	M	DMD	12.6±4.0 (n = 345)	17.5±5.1 (n = 360)	17.1±6.3 (n = 115)	
16	7	M	DMD				15.5±6.1 (n = 144)
17	13	M	DMD				14.5±5.5 (n = 141)

M : Male　F : Female　DMD : Duchenne muscular dystrophy
a : Mean diameter (μm) ± standard deviation
b : Number of myotubes and myoblasts examined

表2 Group mean diameters(μm) of cross sectioned myotubes and myoblasts in both normal and DMD muscle grafts at different stages of transplantation

	1 Week	2 Weeks	3 Weeks	4 Weeks
Normal	14.9±0.6[a*] (n = 9)b	19.9±0.5[a**] (n = 9)b	21.3±0.7[a***] (n = 9)b	20.7±0.7[a****] (n = 8)b
DMD	13.4±0.8[a*] (n = 6)b	15.6±0.7[a**] (n = 6)b	17.1±0.9[a***] (n = 6)b	16.2±1.0[a****] (n = 7)b

DMD : Duchenne muscular dystrophy

a : Group mean diameter (μm) ± standard error of the mean　　b : Number of cases

* P>0.1　** P<0.001　*** P<0.005　**** P<0.005

ラムを作製すると図1A, 1B, 1C, 1Dのようになり，移植1週後では特に両者の差は明らかでないが，2週以降DMD再生筋細胞の直径分布は明らかに対照に比し太い側で低くなっている．

またDMD群と正常対照群につき再生筋細胞直径のgroup mean diameter ± standard error of the mean (μm) を求めると移植後1，2，3，4週目では対照筋移植片でそれぞれ14.9±0.6(μm), 19.9±0.5, 21.3±0.7, 20.7±0.7であり，DMD筋移植片ではそれぞれ13.4±0.8(μm), 15.6±0.7, 17.1±0.9, 16.2±1.0で移植後2，3，4週目ではそれぞれP<0.001, P<0.005, P<0.005で有意にDMD生検筋からの再生筋細胞の直径は細かった（表2）．以上の所見はすでに雑誌[3]などで発表した．この研究では対照として用いた整形外科手術患者の年齢をできるだけage matchとなるよう努めたが，若年者の生検筋を当院で得ることはむつかしく，結果的に10歳代がほとんどをしめた．従って年齢による再生筋細胞の直径の違いを調べることもかね，より若年者からの生検筋を用いて再生筋細胞直径の問題を現在再検討中であり，ここでは現在までに得られた結果を呈示したい．DMD 6例とほぼage matchした組織化学的に正常な整形外科手術例6例（2歳1人，7歳2人，8歳1人，10歳1人，12歳1人）のいずれも大腿四頭筋をヌードマウスの皮下に移植し，現在までに移植後1，2週の再生筋細胞の直径を測定した．それぞれの症例からの移植片の移植1，2週後の再生筋細胞直径のmean diameter ± standard deviation (μm) は表3に示す通りである．2歳の症例の再生筋細胞の直径は他の症例よりも直径が細い傾向がみられる．また正常対照群6例，DMD群6例の移植1，2週後のgroup mean diameter ± standard error of the mean (μm) は1週後で正常対照群13.7±1.4(μm), DMD群13.4±0.8, 2週後で正常対照群18.7±2.8, DMD群15.6±0.7で2週後にはP<0.05で統計的に有意にDMD群にて再生筋細胞の直径が細かった．

考　察

本症の病因として筋細胞膜異常が唱えられ[4]，本症生検筋線維の初期変化を示す部分では電顕的に筋細胞膜の部分的消失がみられているが，このような筋細胞膜の変化は昨年度までの我々のこのモデルを利用して得られた再生筋細胞には認められなかった．むしろ横管よりなるhoney comb構造などが再生早期より認められ，DMD再生筋で

表3 Mean diameters(μm) of cross sectioned myotubes and myoblasts after 1, 2 weeks of transplantation.

Case	Age (yr)	Sex	Normal or DMD	1 week	2 weeks
1	7	F	Normal	13.8 ± 4.6 (n=117)	21.4 ± 7.1 (n=224)
2	7	F	Normal	11.3 ± 3.3 (n=81)	16.1 ± 5.5 (n=244)
3	2	F	Normal	13.9 ± 4.1 (n=201)	14 5 ± 4.1 (n=233)
4	8	M	Normal	14.0 ± 3.9 (n=207)	19.9 ± 7.0 (n=115)
5	12	F	Normal	13.6 ± 4.4 (n=70)	21.0 ± 6.5 (n=76)
6	10	M	Normal	15.7 ± 5.3 (n=120)	19.7 ± 6.6 (n=172)
7	6	M	DMD	14.4 ± 4.2 (n=112)	15.8 ± 5.0 (n=187)
8	3	M	DMD	11.9 ± 4.6 (n=46)	12.8 ± 3.5 (n=121)
9	7	M	DMD	13.1 ± 4.7 (n=64)	16.5 ± 6.8 (n=51)
10	4	M	DMD	11.6 ± 4.6 (n=55)	16.0 ± 5.3 (n=45)
11	5	M	DMD	16.8 ± 5.2 (n=50)	15.2 ± 5.6 (n=75)
12	2	M	DMD	12.6 ± 4.0 (n=345)	17.5 ± 5.1 (n=360)

M=Male, F=Female, DMD=Duchenne muscular dystrophy.
[a] Mean diameter (μm) ± standard deviation.
[b] Number of myotubes and myoblasts examined.

も活発なmembrane biogenesisが存在することが確かめられた．

次に再生筋細胞の直径が統計的に有意にDMDで細いという事実は興味ある所見である．これは再生筋の周囲の結合織がDMD移植片に多いことによる二次的な変化によるとも考えられるが，正常対照筋の移植片も移植後2週以降にはDMD筋移植片と同程度の線維芽細胞などの結合織細胞の増生をみるので，この変化は再生筋細胞自体の特性による一次的な変化と考えたい．その原因については不明であるが，細胞の種々の代謝の中心的な場と考えられているGolgi装置の密度や機能が正常再生筋とDMD再生筋とでは異なる可能性や，Mastagliaら[5]が言うようにDMD再生筋ではmitochondriaが少なく，その産生エネルギーが少ないとか，杉田らにより提唱されているnon lysosomalな蛋白分解酵素（CANP）活性[6]やlysosomal enzyme，例えばacid phosphatase活性など細胞の代謝と密接な関係のある諸酵素の正常対照筋，DMD筋よりの再生筋細胞内における活性の異同を検討する必要があろう．また再生筋の直径も移植片を採取した整形外科手術患者の年齢が著しく若いと細い傾向がみられるので，この点も考慮して更に検討を進めてゆきたい．

文　献

1) 若山吉弘：Duchenneジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験．筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究(三好班)，昭和55年度研究報告書，1981，p.114.

2) 若山吉弘：ヌードマウスへ移植されたDuchenneジストロフィー症生検筋の形態学的検討．筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究（三好班），昭和56年度研究報告書，1982，p.87.

3) Wakayama, Y. & Ohbu, S.：Light-and electronmicroscopic studies of transplanted human dystrophic muscles to nude mice. J. Neurol. Sci., 55：59, 1982.

4) Mokri, B. & Engel, A. G.：Duchenne dystrophy——Electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. Neurology (Minneap.), 25：1111, 1975.

5) Mastaglia, F. L., Papadimitrion, J. M. & Kakulas, B. A.：Regeneration of muscle in Duchenne muscular dystrophy——An electron-microscopic study. J. Neurol. Sci., 11：425, 1970.

6) 杉田秀夫，中瀬浩史，石浦章一：Plasmocidによる実験的ミオパチーの筋蛋白分解機構—筋ジストロフィー症との関連—．筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究(三好班)，昭和57年度抄録集，1982，p.46.

20）各種神経筋疾患における satellite cell の検討

黒　岩　義五郎*

研究協力者　石　本　進　士*　後　藤　幾　生*

目　的

私達は前回，進行性筋ジストロフィー症，多発性筋炎において，筋再生の stem cell と考えられている satellite cell の数が正常対照群と比較して有意に増加しており，進行性筋ジストロフィー症でも，筋再生能は保たれている事を報告した．しかしこれら両疾患群に於て，その臨床経過は非常に異なっている．今回，これら増加した satellite cell 自体の機能の異常の有無について検討した．

対　象

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）5例，多発性筋炎（PM）5例，及び正常対照群（control）7例について検討した．

方　法

各症例毎に，10個以上の satellite cell の電顕写真を撮り，NEC-PC-8001画像解析装置にて，satellite cell の cytoplasm, nucleus, mitochondria 各々の面積，cytoplasm の全細胞体（cytoplasm＋nucleus）に対する面積比，mitochondria の cytoplasm に対する面積比，mitochondria 数について，morphometrical analysis を行なった．

結　果

別表の如く，多発性筋炎は対照群と比較して，cytoplasm, nucleus の面積，mitochondria の数及び核の短径に於て，有意の増加を認めたが，cytoplasm の全細胞体に対する面積比，mitochondria 合計の cytoplasm に対する面積比には有意差を認めなかった．一方，Duchenne 型筋ジストロフィー症では，各項目に於て，対照群との間に有意差を認めなかった．

考　察

前回，私達は多発性筋炎，Duchenne 型筋ジストロフィー症に於ては，satellite cell 数と共に，細胞の機能の活性化を示すと考えられる satellite cell 核内の euchromatin の割合は有意に増加している事を報告した[1]．さらに今回の検索より，多発性筋炎に於ては，satellite cell の細胞体の面積，核の面積，mitochondria 数も対照群と比較して有意に増加していた．

Watkins らは，nuclear size の増大は，細胞機能亢進の結果と考えられると論じている[2]．以上より，多発性筋炎に於て増加した satellite cell は，蛋白合成，代謝機能等に於ても非常に活発な状態と考えられた．

一方，Duchenne 型筋ジストロフィー症に於ては，対照群と比較して satellite cell の cytoplasm の面積，nucleus の面積，mitochondria 数に於て増加傾向を認めるものの有意の増加を得るには至らなかった．この事より，Duchenne 型筋ジストロフィー症では，これら増加した satellite cell 自体の機能は多発性筋炎と比較して，その活性化の程度が少ないものと推察される．若山らは，Duchenne 型筋ジストロフィー症の生検筋を nude mice に移植実験を試み，対照筋と比較して，その再生筋径は細い事を報告している[3]．今後，Duchenne 型筋ジストロフィー症の筋再生能を研究するにあたり，satellite cell から myoblast, myotube への発達過程を詳細に検討する必要がある．

＊九州大学医学部脳研神経内科

表 Summary of satellite cell morphometry

	cyto (μm2)	N (μm2)	cyto / N+cyto (%)	mito	mito (μm2)	mito / cyto (%)	N(L) (μm)	N(S) (μm)
Control (n=7)	5.78 ±1.44	6.82 ±1.27	46.34 ±5.30	2.57 ±0.85	0.188 ±0.101	3.28 ±1.59	4.67 ±0.85	1.77 ±0.28
DMD (n=5)	6.85 ±0.85	8.08 ±1.82	46.33 ±2.67	3.15 ±1.00	0.162 ±0.062	2.44 ±1.01	5.14 ±0.73	1.99 ±0.12
PM (n=5)	8.21** ±1.78	8.25* ±1.24	48.82 ±6.12	4.77* ±2.38	0.257 ±0.090	2.73 ±0.50	4.63 ±0.62	2.29*** ±0.33

t-Test
* $p < 0.05$
** $p < 0.02$
*** $p < 0.01$

cyto: cytoplasm
N : nucleus
mito: mitochondria
L : diameter of long axis
S : diameter of short axis

mean ± S.D.

結　論

Duchenne 型筋ジストロフィー症では，再生筋の stem cell と考えられる satellite cell の数は著明に増加しているにもかかわらず，これら satellite cell 自体の機能に関しては，多発性筋炎と比べると，その活性化の程度は少なく，何らかの機能の低下のある可能性が示唆された．

文　献

1) 黒岩義五郎，石本進士，後藤幾生：筋疾患における satellite cell の検討．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」(三好班)，昭和56年度研究報告書，1982，p.95.

2) Watkins, S. D. : The number, size and morphology of satellite cells in neuromuscular disorders. 5 th International Congress on Neuromuscular Disorders. Marseilles, France, Sep. 12-18, 1982. platform session n°40.

3) Wakayama, Y. & Ohbu, S. : Light and electron-microscopic studies of transplanted human dystrophic muscles to nude mice. J. Neurol. Sci., 55 : 59-77, 1982.

21) Carbonic anhydrase III (CAIII)の人骨格筋における局在について

田代邦雄*

研究協力者　島　功二*,**　日比　望**
塚田　裕**　平井秀松**

はじめに

最近，ヒト骨格筋よりcarbonic anhydraseアイソザイムの1つであるIII型（CA-III）が分離精製されたが[1]，本酵素は赤血球中のI型，II型アイソザイムとは酵素化学的および免疫化学的性状が異なり，種々の組織と比較し骨格筋に特に多く存在すると言われている．さらにその含量が1 mg/gm wet proteinと多量のため，筋疾患のマーカーエンザイムとしての可能性が示唆されている．骨格筋中のcarbonic anhydraseは既に生化学的手法により，白筋にくらべ赤筋に多く含まれると報告されているが[2]，我々の知る限り組織学的にそれを直接証明した報告はない．そこで，この点を明らかにすべく，CA-IIIに対する特異抗体を作製し，酵素抗体間接法にて[3]，さらに今回は，酵素抗体直接法にてCA-IIIの筋肉内分布について検討を加えたので報告する．

材料と方法

——CA-IIIの精製——剖検時に摘出した正常ヒト腸腰筋よりNishitaらの方法[4]を改変し以下の如くCA-IIIを分離精製した．正常ヒト腸腰筋100gmに2倍量の0.01Mリン酸カリ緩衝液（pH6.6）を加えpolytron homogenizerでホモジネートした．遠心上清（10,000g，15分）をあらかじめ同緩衝液で平衡化したCM-Sephadex，C-50カラム（2.5×50cm）にかけ，非結合蛋白を十分洗った後，NaClの0～0.2M linear gradientで溶出した．CA活性フラクションを集め濃縮後Sephadex G-75（2.5×80cm），ついでカラム等電点電気泳動法（pH 5～8）にて精製した．なおCA-IIIはそのS-S結合によりdimerを生成することが知られているので，各ステップの緩衝液中には0.5mM dithiothreitolを加えた．Carbonic anhydraseの酵素活性はWilbur-Andersonの原法[5]を一部改変して測定した．精製蛋白の純度検定は，SDS-PAGE（polyacrylamide gel electrophoresis）にて行った．**——CA-IIIに対する特異抗体の作製——**精製CA-III 1 mgをFreund's complete adjuvantとともに家兎背部に1週毎，計3回免疫し，最終免疫後7～10日に十分抗体価の上昇を確認してから耳静脈より採血した．また筋肉粗抽出液（crude muscle extract）に対する抗体も同様の方法で作製した．抗血清の特異性は，ゲル内沈降反応および免疫電気泳動法にて確認した．

——ペルオキシダーゼ（HRP）標識抗CA-III抗体の作製——CA-IIIに対する抗血清をCA-III結合Sepharose 4B免疫吸着カラムにかけ非結合蛋白を十分洗った後，3M KSCNで特異抗体を溶出した．このようにして得た抗CA-III抗体のHRP標識は，Wilson-Nakaneの方法[6]にて行い，また対照実験のため正常家兎IgGのHRP標識も同時に行った．**——酵素抗体直接法——**ヒト生検筋（上腕二頭筋，各種組織化学的染色による検討で正常範囲と診断されたもの）の未固定凍結切片（8 μ）を30分風乾後，冷アセトン，95%エタノール，periodate-lysine-paraformaldehyde固定液（PLP）の各々で別個に固定した標本を，以下同様に処理し結果を比較検討した（図1）．内因性ペ

＊北海道大学医学部脳神経外科
＊＊北海道大学医学部第一生化学

DIRECT IMMUNOPEROXIDASE METHOD

UNFIXED CRYOSTAT CUT FROZEN SECTION(8μ)
↓
AIR DRY, 30MIN
↓
FIX IN COLD ACETON(OR 95% ETOH, PLP SOLN.),15MIN
↓
WASH IN PBS, 20MIN
↓
0.3% H_2O_2-METOH, 5MIN
↓
WASH IN PBS, 15MIN
↓
10% NORMAL SWINE SERA, 30MIN
↓
WASH IN COLD PBS, 10MIN
↓
HRP-Rb ANTICA-III IgG OR HRP-Rb NORMAL IgG, 37°C, 2HR
↓
WASH IN COLD PBS, 20MIN
↓
DAB-H_2O_2 SOLN. 5MIN
↓
WASH IN COLD PBS, 10MIN
↓
DEHYDRATE, CLEAR AND MOUNT

図1 Flow chart of direct immuno-peroxidase method
ETOH; ethyl alcohol, PLP SOLN; periodate-lysine-paraformaldehyde solution, METOH; methyl alcohol, PBS; phosphate buffered saline, HRP; horseradish peroxidase, Rb; rabbit.

ルオキシダーゼは0.3% H_2O_2-メタノール溶液でブロックし，また Fc receptor は10%正常豚血清でブロック後，HRP 標識特異抗体と37℃，2時間インキュベートした．コントロールとしては HRP 標識正常家兎 IgG を使用した．また block test として組織標本を抗 CA-III抗体でインキュベート後に HRP 標識抗 CA-III抗体を上述の如く反応させた．ついで DAB (diaminobenzidine) -H_2O_2溶液で HRP 活性を染色し検鏡した．なお各ステップの洗滌には0.01M PBS (phosphate buffered saline) pH7.2を用いた．

結　　果

——CA-IIIの精製—— 各ステップの溶出パターンを図2に示した．CM-Sephadex カラムクロマトグラフィーにおける2つの活性ピークのうち前半のピークが抗 CA-I，CA-II抗体と反応しないことから CA-IIIと考えられ，以下 Sephadex G-75，カラム等電点電気泳動にて酵素蛋白の精製を進めた．なお後半の活性ピークは抗血清との反応性から CA-II と判明した．SDS-PAGE により，Sephadex G-75ゲル沪過の段階でかなり純化されていることがわかったが，さらに確実に精製するためカラム等電点電気泳動を行った．CA-IIIは pH7.4に単一ピークとして泳動され Carter らのデータと一致していた．SDS-PAGE で CA-IIIは1本のバンドとして認められ分子量は約28000であった(図3)．なお筋肉粗抽出液の泳動パターンから，CA-IIIは骨格筋中の major band として存在することがわかった．**——抗 CA-III抗体 (a-CA-III) の特異性の検定——** 図4にゲル内沈降反応および免疫電気泳動の結果を示した．図左上の如く a-CA-III と筋肉粗抽出液は1本の，しかも精製蛋白と完全に融合する沈降線を形成した．また図右上の如く CA-IIIは a-CA-III とのみ沈降線を形成し抗 CA-I，抗 CA-II抗体とは反応を認めなかった．また免疫電気泳動でも a-CA-III と筋肉粗抽出液は精製蛋白と同一の移動度をもつ1本の沈降線のみを示し，a-CA-IIIの特異性が確認された．**——HRP 標識抗 CA-III抗体の力価——** ゲル内沈降反応（オクタロニー法）で1 μg の CA-IIIに対して2倍希釈で最適比を示したので，この希釈倍数を以下の直接法の実験に使用した．**——酵素抗体直接法による染色結果——** 図5 a に CA-III の局在を示した．ペルオキシダーゼ反応産物は，主に筋線維内に存在し，しかも濃染する筋線維群と，コントロールに較べてごくわずかにしか染色されない筋線維群の2種で構成され弱拡にてモザイク状を示した．筋鞘膜も筋線維内と同様，一線維群のみが濃く染色された．筋線維内における反応産物は光顕でみるかぎり，均一な染色性の背景に点もしくは線状の，筋線維内に均等に分布する濃染部を認めたが，微細構造の判定は不可能であった．また筋鞘核は全筋線維にわたってほぼ均等に中等度に染色された．血管壁はごくわずかの染色を示したが，結合織は染まらなかった．なお筋線維内神経終末の軸索が濃染していることは興味深く思われた．図5 b は HRP 標識正常家兎 IgG を用いた対照実験であるが，非特異的染色は認めなかった．Block test にても同様の結果を示した．また，fiber type の同定のため連続切片を myosin

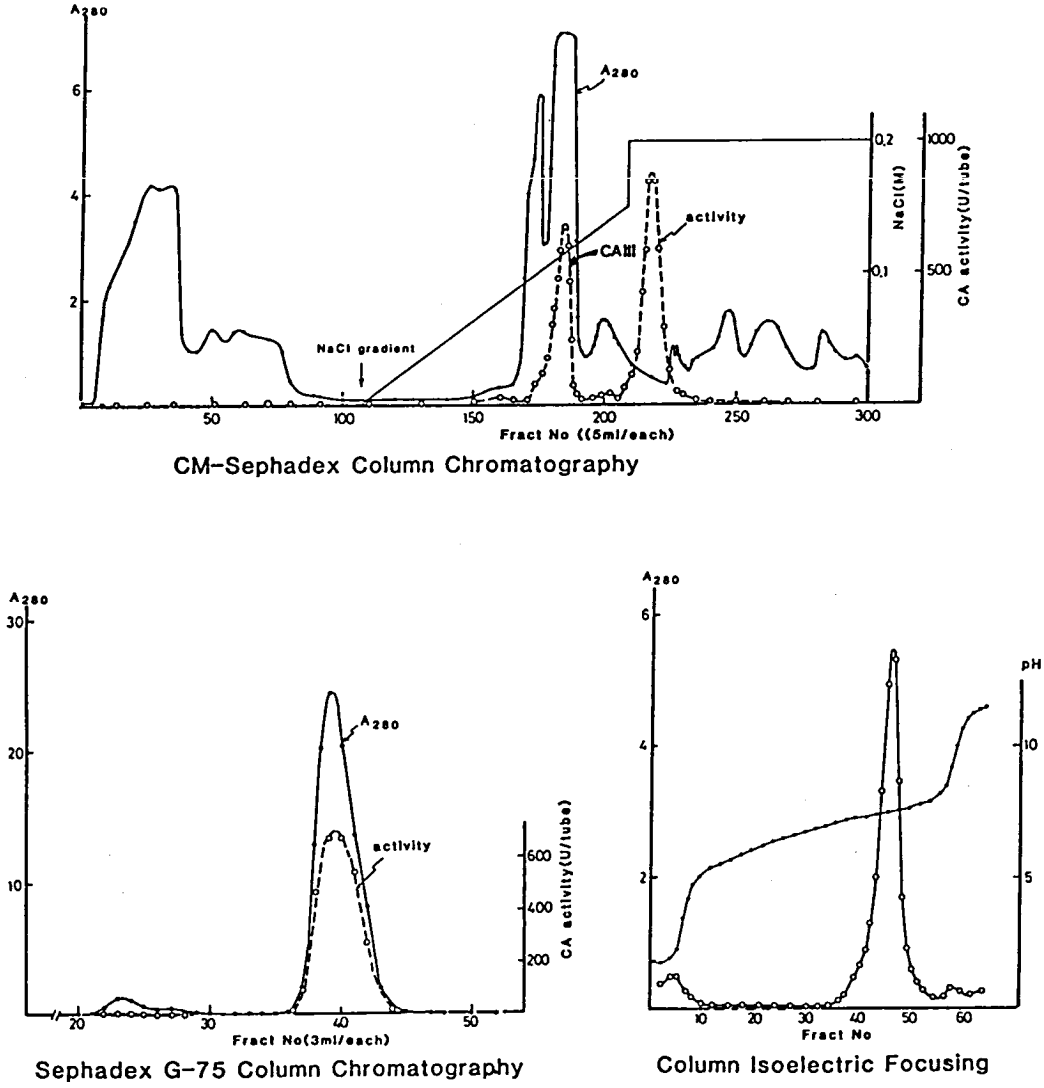


図 2　Elution patterns of each purification steps

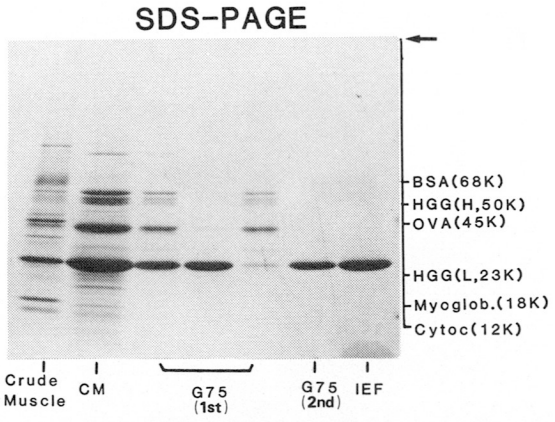
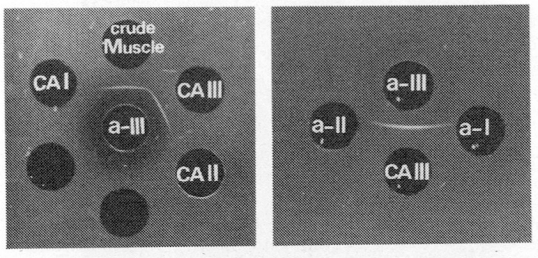
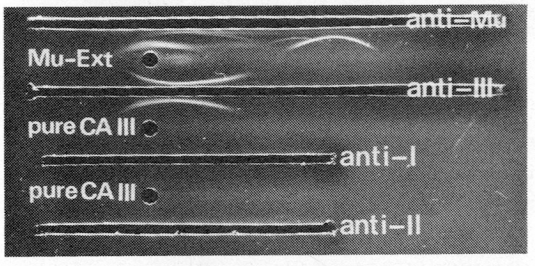


図3　SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, CM ; CM-Sephadex, G75 ; Sephadex G-75, IEF ; Column isoelectric focusing, BSA ; Bovine serum albumin, HGG ; Human gamma-globulin (H ; heavy chain, L ; light chain) , OVA ; ovalbumin, Myoglob.; Myoglobin, Cytoc ; Cytochromec



Ouchterlony Test



Immunoelectrophoresis

図4　Specificity of anti-human CA-III serum, CAI, CAII and CAIII stand for carbonic anhydrase-I, II and III, respectively, a-I, a-II and a-III stand for anti-CA-I, CA-II and CA-III antibodies, respectively. Mu-Ext; human muscle extract, anti-Mu; anti-muscle extract antibody.

ATPase (pH9.4) および NADH-TR (nicotinamide-adenine-dinucleotide-tetrazolium-reductase) で染色し比較検討した．図5 c, d は，本直接法 (c) と NADH-TR (d) で染めた結果であるが，ペルオキシダーゼ反応で濃染する筋線維群は Type I fiber であることが示された．また図5 d にみられる intermediate fiber に対応する筋線維には，lightly stained fiber (Type II) と同様に染色の程度はわずかであった．なお凍結切片を風乾後の固定は PLP 固定液によるものが冷アセトン，95%エタノールによるものよりすぐれていた．また，本直接法と以前検討した間接法は[3]，ほぼ同じ CA-IIIの局在パターンを示したが，直接法の方が，多少非特異的染色は少なかった．

考　　察

Carbonic anhydrase は骨格筋には存在しないと考えられていたが[7]) Zborowska-Sluis[11] や Moynihan[2] らは extravascular carbonic anhydrase 活性の存在を犬やラットにおいて生化学的に証明した．また Moynihan はラットの red soleus muscle が white muscle (extensor digitorum longus) よりもかなり高い活性を示したと報告している．Ridderstråle[8] は，この点を組織化学的に直接証明するため Hansson の cobalt phosphate 法[9] を改良してラット骨格筋を染色したが，赤筋，白筋の間に有意な染色性の差を認めなかった．これに反し Lönnerholm[10] は，レジン包埋したウサギ骨格筋を用い，同じ方法で染色し筋線維間に明らかな染色性の差を認めたが，濃染される fiber がどの fiber type かは検索していない．ただ acetazolamide による抑制実験により，筋線維内の染色性が，血管壁のそれと比較し，1000倍も抑制抵抗を示したことを報告している．Carter[1] らによると，CA-IIIは CO_2 hydratase 活性が低く，他のアイソザイムと比較して acetazolamide の阻害に強い抵抗性を示すとしている．従って Lönnerholm の報告した濃染する筋線維は CA-IIIの存在にもとづくものであろうと考えられる．今回の報告で，我々は，この濃染する筋線維群は CA-IIIの存在によるものであり，これらが Type

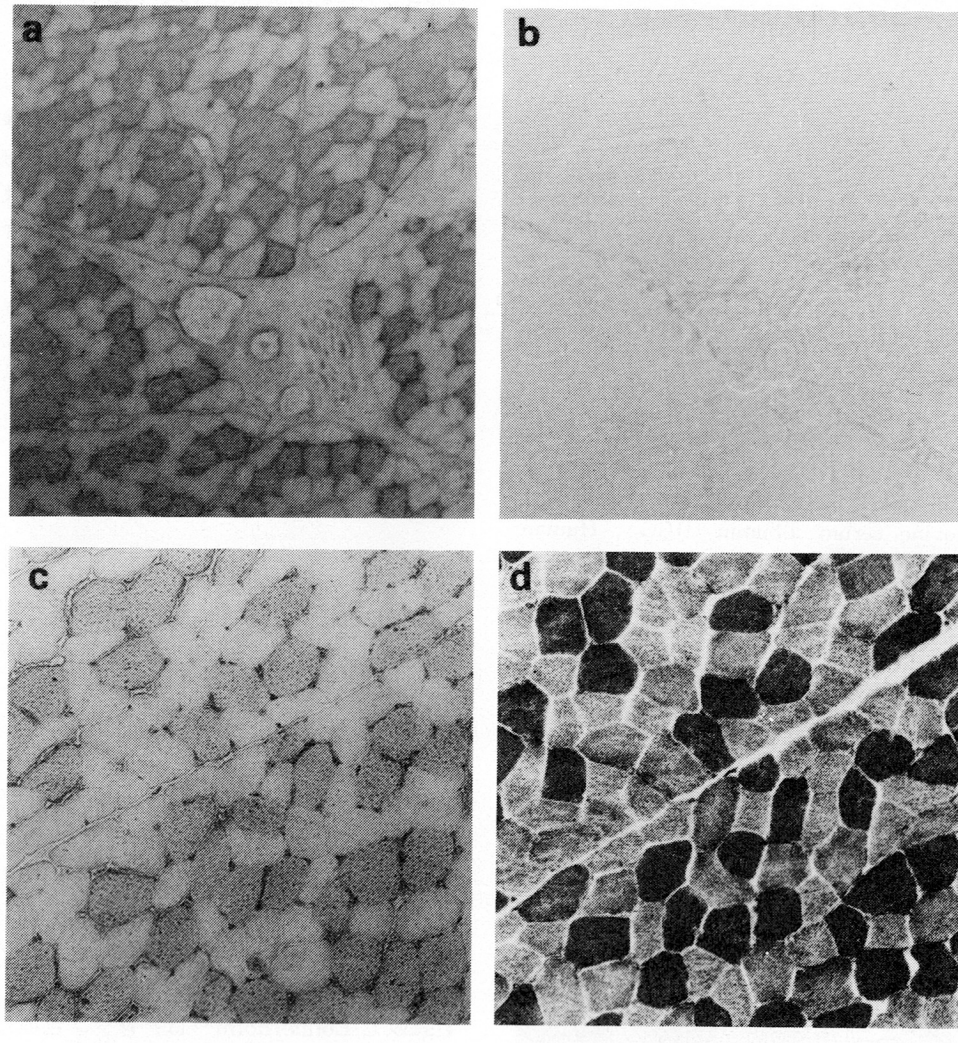


図 5　Pairs of serial frozen sections from human skeletal muscle without pathology (original magnification, a-b, ×40, c-d, ×100, respectively.)., a-c; immuno-peroxidase staining, b; control incubated with HRP-labelled anti-normal rabbit IgG, d; NADH-TR. Note that peroxidase reaction products seen in certain fibers only producing mosaic appearance (a). These fibers are corresponding well to type-I fibers when compared with the fibers in NADH -TR stain (c,d). Control showed no specific staining (b).

I fiber であることを明らかにした．しかし筋線維内の詳細な局在は，電顕レベルの検討が必要であり，目下検討中である．なお本酵素の生理学的役割として CO_2 transport を促進することが推論されているが，なぜ Type I fiber に特に多く存在するのかということは不明である．何れにしろ CA-IIIが Type I fiber に主として局在すること，ならびに筋ジストロフィー症にて CA-IIIが血中に増加するという報告[12]があることから，CA-IIIが神経筋疾患における Type I fiber 異常のマーカーになりうるのではという期待がもたれる．現在，臨床的に筋疾患の診断に重要な CPK は主に Type II fiber に存在するとされ[13]，それとの関連に於て，CA-IIIを今後検討していく意味が十分あると思われた．

結　論

1．正常ヒト骨格筋より CA-IIIを単一蛋白まで分離精製した．2．CA-IIIに対する特異抗体を家兎にて作製し，免疫組織化学的に CA-IIIの筋肉における分布を調べた．3．酵素抗体直接法にて CA-IIIはヒト正常筋において，主として Type I fiber に局在することが明らかとなった．これは，間接法における結果と一致した．4．CA-IIIが，各種神経筋疾患において，特に Type I fiber 異常のマーカーとなる可能性が示唆された．

謝　辞

CA-III精製の指導及び抗 CA-I，CA-II抗体を提供いただきました米国 Wisconsin 大学 Deutsch 教授に感謝致します．

文　献

1) Carter, N., et al.: Characterization of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle. Biochem. Genet., 17 : 837, 1979.

2) Moynihan, J. B. : Carbonic anhydrase activity in mammalian skeletal and cardiac muscle. Biochem. J., 168 : 567, 1977.

3) Shima, K., et al. : Carbonic anhydrase-III immunohistochemical localization in human skeletal muscle. Acta Neuropath. (Berl.), in press, 1983.

4) Nishita, T., et al. : Isolation of equine muscle carbonic anhydrase in crystalline form. Biochem. Biophys. Res. Commun., 103 : 573, 1981.

5) Wilbur, K. M., et al. : Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. J. Biol. Chem., 176 : 147, 1948.

6) Wilson, M. B., et al. : Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. Immunofluorescence and Related Staining Techniques, Knapp, W., et al., Ed., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1978, p.215.

7) Maren, T. H. : Carbonic anhydrase : Chemistry, Physiology, and Inhibition. Phys. Rev., 47 : 674, 1967.

8) Ridderstråle, Y. : Observations on the localization of carbonic anhydrase in muscle. Acta Physiol. Scand., 106 : 239, 1979.

9) Hansson, H. P. : Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity. Histochemie., 11 : 112, 1967.

10) Lönnerholm, G. : Carbonic anhydrase in rat liver and rabbit skeretal muscle ; Further evidence for the specificity of the histochemical Cobalt-Phosphate method of Hansson. J. Histochem. Cytochem., 28 : 427, 1980.

11) Zborowska-Sluis, D. T., et al. : Evidence of carbonic anhydrase activity in skeletal muscle : A role for facilitative carbon dioxide transport. Resp. Physiol., 21 : 341, 1974.

12) Heath, H., et al. : Radioimmunoassay of human muscle carbonic anhydrase III in dystrophic states. Clin. Chim. Acta, 119 : 299, 1982.

13) Sherwin, A. L., et al. : Immunohistochemical localization of creatine phosphokinase in skeletal muscle. Proc. Nat. Acad. Sci., 64 : 171, 1969.

22）生検筋の primary culture の確立とその応用について

吉　岡　三恵子*

緒　　言

人骨格筋を組織培養によって研究する場合，これまでは主として胎児の筋が使われてきた．この際，筋芽細胞の発育は良好であるが，胎児筋の利用にはおのずから限界がある．最近成人の骨格筋の培養が試みられているが，ラットやマウスの場合のように確立された cell line は人の場合にはまだ存在していない．

生後の人筋線維では増殖可能な筋芽細胞は基底膜と成熟した筋線維の細胞膜の間に位置する比較的少数の衛星細胞であり，培養に際してはこれらの衛星細胞が clone を生ずるといわれている[1]．この培養細胞の生存期間は胎児筋の培養に比較して短く，これまでの報告[2]でも胎生80日の胎児の筋が60～70の doubling を行うのに対して，生後の人培養細胞では約45に過ぎない．しかし，各々の衛星細胞は少なくとも 1×10^7個の細胞を生じ得るといわれており，これによると少量の生検組織片からでも，培養によって生化学的分析を行うに十分な蛋白量を得ることが可能である．又，生後の筋線維に存する衛星細胞は *in vitro* において証明されているような種々の筋線維の特質を *in vivo* においても示すに至り，筋肉として十分成熟するだろうと推測されている．我々は以上の根拠をもとに生検筋の primary culture の確立とその生化学的応用を目的に，まず本年度は筋芽細胞の培養条件の検討を行った．

実験方法

ラット新生児大腿筋を用いて，筋芽細胞の培養条件を検討した．

生検筋を細切後，①使用する蛋白分解酵素の種類，②培養皿の coating の必要性，③培養液の選定を目的に，以下の実験を行った．①については，筋細片を0.1% collagenase＋0.24% trypsin の混合液に入れ，25分間37℃で振とうする方法と，collagenase 200u／ml of medium の2つの方法を比較した．次に，②については，rat tail collagen で培養皿を coating した場合としない場合での筋芽細胞の発育状況を調べた．③については Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）に馬血清，胎児牛血清又は chick embryo extract を加えたものについて検討した．

今回，最も大きな問題であったのは，いかにして線維芽細胞の発育を抑え，純粋の筋芽細胞の培養を確立するかということであった．これには，(a) Yaffe 等[3] の serial passage（線維芽細胞と筋芽細胞の培養皿への付着に要する時間の差を利用して筋芽細胞を選り出す方法），(b) serum-free medium（J. R. Florini 等[4]，1979）の使用，(c) cloning ring を使って1つの colony を選び出す等の方法を検討した．

以上の方法をもとに dystrophy mouse (129 ReJ dy/dy) と control（129ReJ＋/＋）の筋芽細胞の培養を行い，筋の分化状況を比較した．更に，得られた数種の神経筋疾患の患者の生検筋の培養を試み，筋芽細胞の生育状況と発達について若干の検討を加えた．

結　　果

ラット新生児大腿筋を使って，筋芽細胞の培養条件を検討した所では，①使用する蛋白分解酵素として2種試してみたが，特に両者の間に差はなく，共に必要量の筋芽細胞を得ることができた．次に②培養皿の coating の必要性であるが，coating をした培養皿では確かに筋芽細胞の発育は良好であったが，coating なしでも発育は可能であ

＊神戸市立中央市民病院小児科

ったので以後は特に coating せずに培養している．③培養液については DMEM＋10％馬血清＋5 or 10％胎児牛血清を主体に，その組成については現在も尚，検討中である．

次に線維芽細胞を除去するためにとった3つの方法の内，(a) Yaffe 等の方法は，筋芽細胞の損失が大きく，採取量の少ない生検筋への応用はむづかしいと思われた．(b) serum-free medium を用いる方法では，初期の培養皿への付着が悪く，筋芽細胞自体の生育も良くなかった．現在(c) cloning ring を用いる方法での培養の確立を進めている．

次に培養したラット新生児の大腿筋筋芽細胞の動態を示す．**図1**は培養当日のもので，**図2**は培養14日目の筋収縮の著明になった時のものである．dystrophy mouse 129 ReJ dy/dy の培養では，**図3**に示すように myotube の形成がみられ，control との間に形態学的には大差を認めなかった．現在までに，数種の神経筋疾患の患者の生検筋の培養を上記の方法で行った．筋芽細胞の生育状況は良好であるが，線維芽細胞の混入を除くには，更に検討が必要である．**図4**は生後1カ月男児の Werdnig-Hoffmann 病の大腿四頭筋を培養したものである．単核の筋芽細胞が，**図5**に示すような多核の myotube へ発達していくことが確かめられた．

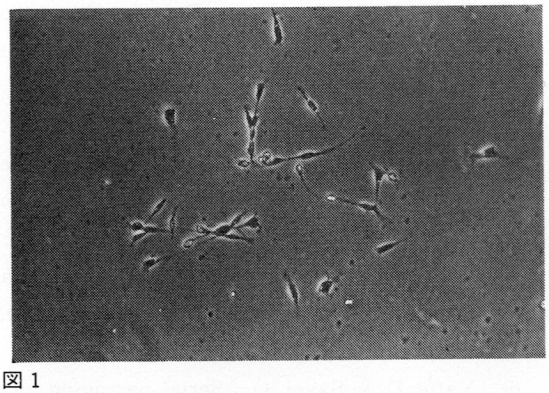


図1
ラット新生児大腿筋筋芽細胞．培養1日目．Rat tail collagen で coating した培養皿を用い，培養液は DMEM＋10％馬血清＋10％胎児牛血清．（撮影時倍率×100）

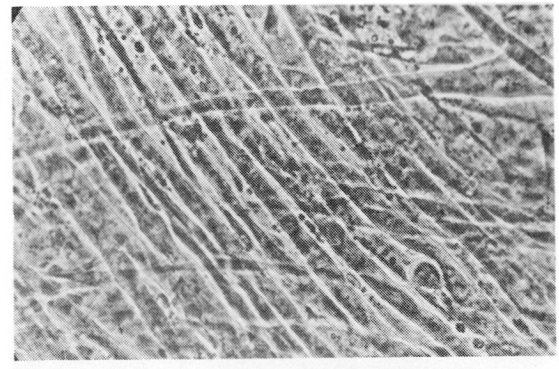


図2
図1の培養14日目．多核の myotube がみられ，筋収縮が著明である．（×100）

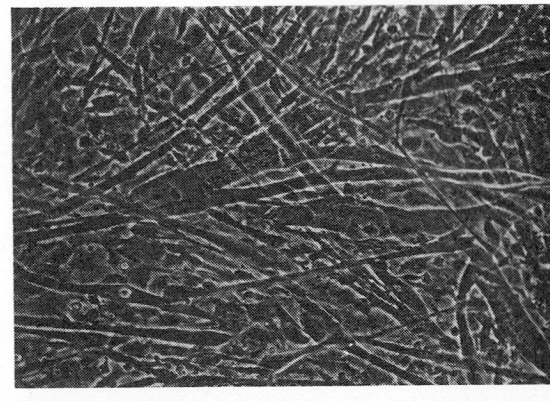


図3
生後9日目の dystrophy mouse 129 ReJ dy/dy の大腿筋の培養．培養10日目．多核の myotube がみられ，筋収縮も認められている．（×100）

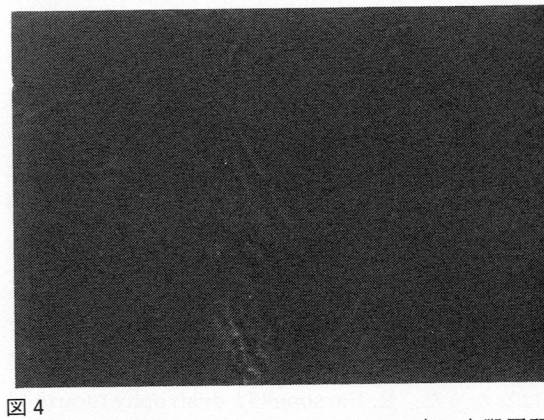


図4
生後1カ月男児の Werdnig-Hoffmann 病の大腿四頭筋の培養．培養8日目．培養液は DMEM＋10％馬血清＋5％胎児牛血清で，培養皿の coating は行っていない．（×100）

図5
図4の培養14日目．多核のmyotubeが認められる．(×100)

考　　察

筋肉の分化を種々の側面から研究するため組織培養の方法を用いることは，近年ますます盛んになってきている．これらの研究においては多くの場合，酵素による分解で十分量の筋芽細胞を得，primary surface cultureを確立するという方法がとられている．このような方法では，筋肉の分化に伴うあらゆる細胞学的状況を観察し，定量化しうるという長所がある．従って，生後の人骨格筋においてもこのようなprimary surface cultureが確立されると，今後，神経筋疾患の患者の筋肉をより細胞学的に又は定量的に研究できるようになると考えられる．いくつかの研究室においてすでに正常人及びジストロフィー症の患者の骨格筋の培養が行われているが，得られた所見は現在の所必ずしも一致しているとはいえない．

我々は今回，まずラット新生児の大腿筋で基本的な培養条件の選定を行い，得られた結果に基づいて，dystrophy mouse 129 ReJ dy/dyの生後9日目の骨格筋の培養を試みた．myotubeの形成に要する日数には多少の差異はあったが，得られたmyotubeには形態学的にcontrolとの間に大差はなかった．R. Parsons[5]はdystrophy mouseでは多核のmyotubeの形成がみられず，pseudo-straps と呼ばれる細胞の集合のみが認められたと述べている．一方，Yaffe等[6]はmyotubeの形成はみられるが，controlに比べると短いと報告している．dystrophy mouseについても今後は形態学的な問題だけでなく，更に詳細な検討が必要と考えられる．一方，生後の人骨格筋のprimary cultureについては種々の培養条件の検討により，生検筋の培養はできたが，線維芽細胞の混入という基本的な問題が解決されておらず，今後の大きな課題として残されている．Florini等は，彼等の開発したserum-free mediumでラットのprimary cultureを行うと，線維芽細胞よりも筋芽細胞が早く増殖すると述べているが，我々がこの培養液を用いた所では，初期の培養皿への付着がきわめて悪く，筋芽細胞自体の発育も良いとはいえなかった．最近はcloning ringを用いる方法を試みているが，低密度での筋芽細胞の培養を成功させるには，尚種々の条件の検討が必要であろう．今後，この問題を解決した上，培養生検筋について，生化学的分析を行っていきたいと考えている．

文　　献

1) Konigsberg, U. R., Lipton, B. H. & Konigsberg, I. R.：The regenerative response of single mature muscle fibers isolated in vitro. Dev. Biol., **45**：260-275, 1975.

2) Hayflick, L.：The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res., **37**：614-636, 1965.

3) Richler, C. & Yaffe, D.：The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. Dev. Biol., **23**：1-22, 1970.

4) Florini, J. R. & Roberts, S. B.：A serum-free medium for the growth of muscle cells in culture. In Vitro, **15**：983-992, 1979.

5) Parsons, R.：Expression of the dystrophia muscularis (dy) recessive gene in mice. Nature, **251**：621-622, 1974.

6) Yaffe, D. & Saxel, O.：Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. Nature, **270**：725-727, 1977.

23）糖脂質の神経筋培養に与える影響

斎　田　孝　彦*

研究協力者　大　石　京　子*　松　田　修　一*
松　田　享　子*　清　田　覚　子*

骨格筋の分化発育の様々な段階において，種々の筋外由来の物質が栄養物質として要求される．運動神経より放出され，筋に対し“trophic”な物質の存在は，除神経により生じる著明な筋萎縮が，筋肉の単なる運動の麻痺のみでは出現しないことが知られて以来想定されてきた．

Oh, Markelonis 等は中枢及び末梢神経より抽出した84,000の分子量を持つ酸性蛋白を“sciatin”と命名し，それが神経支配のない培養条件下の胎仔筋のアセチルコリン・エステラーゼ活性を高める事，また成熟した横紋を有する培養筋線維を，神経支配なしで数ケ月にわたり維持しうる事を報告している．彼等によれば，この sciatin はこれまで *in vitro* での筋の分化を促すのに不可欠であった鶏胚抽出液にも存在し，また sciatin に対する抗血清を鶏胚抽出液に添加する事により，筋の初期の分化が抑制される事が示されている[1]．一方 Ozawa, Hagiwara, Hasegawa, Kimura 等は sciatin と同様の分子量をもつ transferrin が鶏胚抽出液やニワトリ血清中に存在する“muscle trophic factor”と identical であると報告している[2]．

しかしながら神経の筋に及ぼす影響は，その発生・分化段階に応じ，また現象により，必ずしも単一の物質のみで規定されるものでなく，より複雑である事が想定される．例えば Kuromi 等[3]は脊髄由来の分子量10,000以下の塩基性ペプチドが，マウスの器官培養した除神経骨格筋の活動電位の tetrodotoxin 感受性が除神経により減弱するのを阻止すると報告している．一方 Obata, Oide 等は神経筋接合形成に対し globoside が促進的に作用する事を報告している．彼等は神経筋培養の自発性 e. p. p. s を発する筋管細胞の割合が globoside の培養液への添加により高まるのを観察した．

スフィンゴ糖脂質は，一般に細胞膜の表面に位置していると考えられ，細胞の認識や相互作用に重大な役割を果している事が想定されている．例えば globoside はヒト P 血液型抗原であり，いくつかの ganglioside は bacterial toxin に対する受容体である事が知られていたが，最近ではリンパ球サブセットのマーカーや melanoma, colon cancer その他の腫瘍特異抗原でもある等の新しい知見が報告されている．

本研究で我々は鶏胚の脊髄・筋培養を用い，筋細胞上のアセチルコリンエステラーゼ活性の分布が，神経筋接合の形成・分化成熟の進行に伴って限局化する事を指標として，*in vitro* における神経筋接合形成に対する糖脂質の与える影響を組織化学的に検索した．

材料と方法

11～12日目の White Leghorn 鶏胚大胸筋を0.2％ collagenase で処理して得た筋芽細胞を，予め自家抽出にて得たラット尾コラージェンを coat したプラスチック皿上に 5×10^4cell/cm^{2}撒布した．プラスチック皿は Aclar film を用い直径1.5 cm の円型のもので自家製作したものを用いた．このプラスチック皿を通常のファルコンプラスチック皿の中に入れ，37℃，95％加湿，CO_2 5％の条件下で培養した．2日後に7～8日目の鶏胚脊髄の横断切片を1個ずつ加え培養を続けた．培養液はヒト臍胎血清20％，鶏胚抽出液10％，Earle の MEM70％，glucose 6 mg/ml 組成のものを用いた．

＊国立療養所宇多野病院臨床研究部

糖脂質は galactocerebroside, glucocerebroside, sulfatide, ceramide, sphingomyelin を50μM および500μM となる様に脊髄切片培養開始時より培養液中に添加した. ganglioside は牛脳より抽出したものを 5, 50, 125, 500, 2000μM 濃度で用いた. その組成は図 1 のごとくで, G_{MI}, G_{D1a}, G_{D1b}, G_{T1b}で99%をしめるが, minor のものが0.9%加わっている.

ACh-E 染色は糖脂質添加後 5, 8, 10, 15, 20 日目に Karnovsky の変法により行なった. 脊髄培養開始後 5 日目より筋管細胞上に Karnovsky 染色陽性部分の拡がりがみられ, 次第にそれらは限局化していくが個々の筋管細胞により, また脊髄培養前角ないしは前根部分よりの距離により, また個々の培養により, 陽性染色の限局化はかなりのバラツキを示す. 今回の実験ではこうしたバラツキによる影響を少しでも減ずるために, 顕微鏡下の観察で脊髄前角に近く, 陽性染色限局化の進んでいるものより, 1 培養当り10ケずつ選んで, 陽性染色の最大径を測定した.

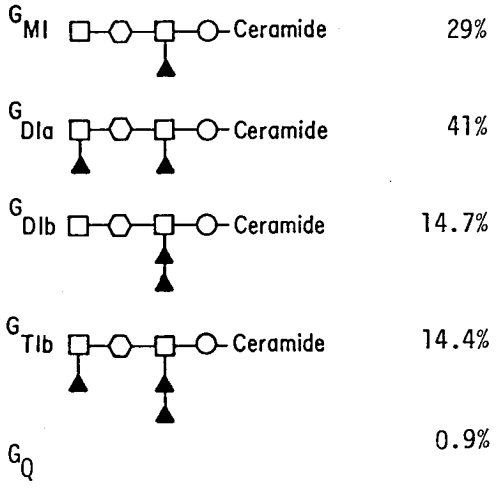


図 1 Composition of beef brain ganglioside

結　　果

先ず0.5mM 濃度で種々糖脂質を添加した場合の影響をみた. 表 1 のごとく, 無添加コントロール群では脊髄培養開始後 8 日目で, 筋細胞表面における ACh-E 陽性染色最大径が平均14.4μ の長さであったが, galactocerebroside, glucocerebroside, ceramide, sphingomyelin, 添加群での染色の長さの平均は有意の変化を示さなかった. 混合牛脳 ganglioside 添加群では陽性染色が18.6μ とかえって長く, より未分化であることを示した. 一方 sulfatide はこの濃度では非特異的な毒性を示した.

次に50μM 濃度での種々糖脂質添加の影響を, 同じく脊髄培養開始後 8 日目で見てみた. この濃度では sulfatide も毒性は示さず, galactocerebroside, glucocerebroside, ceramide, sphingomyelin と共に特に陽性染色の有意な変化は示さない. 一方混合牛脳 ganglioside 添加群では10.2μ と有意な短小化を示し, 神経筋接合形成の促進がうかがわれた (表 2).

混合 ganglioside の神経筋培養に対する影響を, さらに種々濃度によって見るための実験を次に行った (表 3). 5 μM の ganglioside では陽性染色短小化の傾向がみられるが有意の変化ではない. 50μM では有意の短小化が見られる. 125μM では再びあまり変化を示さず, 500μM では逆に陽性染色の延長化がみられる. 2000μM では神経細胞に

表 1 Effects of 0.5mM glycolipids in cord-muscle cultures**

Glycolipids	Length(μ) of ACh-E Activity
None (control)	14.4 ± 1.6
Galactocerebroside	14.7 ± 2.6
Glucocerebroside	15.1 ± 2.7
Sulfatide	toxic
Ceramide	15.2 ± 2.6
Sphingomyelin	14.5 ± 2.4
Gangliosides	18.6 ± 3.1*

(Mean ± SEM)

* $P < 0.05$
** Cultured for 8 days in the presence of glycolipids

も顆粒変性が出現し限局化した陽性染色は出現しない．

さらに培養日数によってどの様な変化をみせるのかを，50μM 混合 ganglioside を添加して検討した．脊髄培養を開始し，同時に ganglioside 50 μM を添加して5日，10日目では対照群に比し有意の差がみられたが，15日，20日目では有意の差はなかった（図2）．

表2　Effects of 50μM glycolipids in cord-muscle cultures**

Glycolipids	Length(μ) of ACh-E activity
None (control)	14.4 ± 1.6
Galactocerebroside	14.8 ± 2.8
Glucocerebroside	14.4 ± 2.6
Sulfatide	14.7 ± 2.5
Ceramide	15.1 ± 3.0
Sphingomyelin	14.9 ± 2.9
Gangliosides	10.2 ± 2.4*

(Mean ± SEM)

* P < 0.01
** Cultured for 8 days in the presence of glycolipids

表3　Effects of gangliosides on differentiation of cord-muscle cultures***

Concentration (μM)	Length(μ) of ACh-E Activity
0	14.4 ± 1.6
5	13.6 ± 2.7
50	10.2 ± 2.4*
125	14.9 ± 2.9
500	18.6 ± 3.1**
2000	toxic?

(Mean ± SEM)

* P < 0.01　　** P < 0.05
*** Cultured for 8 days in the presence of gangliosides

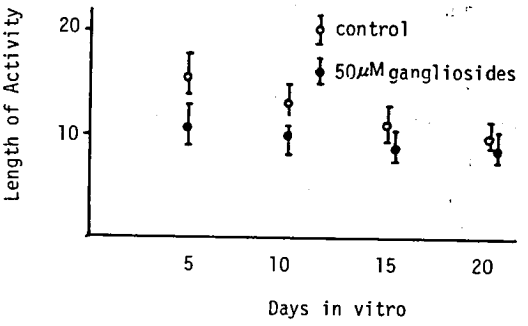


図2　Effects of gangliosides on the length of ACh-E activity

考　　察

種々の糖脂質のうち牛脳由来の混合 ganglioside は50μM の濃度で鶏胚脊髄筋培養において，その筋表面における ACh-E 活性分布の限局化を促進する事が明らかとなった．しかしより高濃度の ganglioside 添加は逆にその限局化に対し抑制的に働く事も示された．こうした結果は ACh-E 活性分布が神経筋接合の新形成とその成熟に伴って，接合部近くへと急速に限局されるというこれまでの知見と併せ考えると，ganglioside が50μM 濃度では神経筋接合の新形成に対し促進的に作用している事を示唆している．この結果はまた Obata 等が先に発表した生理学的実験結果とも，種々の濃度による促進・抑制効果の出現がかなり良く一致している．50μM ganglioside 添加5日，8日，10日目では有意の陽性染色限局作用を示したことは，この神経接合新形成に対する促進効果がかなり早い時期に働いている事を示唆しているといえる．今後さらに神経筋接合形成のどの時期に作用しているのかを調べる事が必要である．またどの ganglioside が有効であるのかを知るため，より純粋な標品を用いた研究が必要であり，また抗 ganglioside 抗血清等を用いての研究や，ganglioside の代謝や受容体の分布等の検討も必要であろう．

文　　献

1) Markelonis, G. & Oh, T.H. : A sciatic nerve

protein has a trophic effect on development and maintenance of skeletal muscle cell in culture. Proc. Natl. Acad. Sci., 76 : 2470-2474, 1979.

2) Ozawa, E. & Hagiwara, Y. : Degeneration of large myotubes following removal of transferrin from culture medium. Biomed. Res., 3 : 16-23, 1982.

3) Kuromi, H., Gonoi, T. & Hasegawa, S. : Partial purification and characterization of neurotrophic substance affecting tetrodotoxin sensitivity of organ-cultured mouse muscle. Brain Res., 175 : 109-118, 1979.

4) Obata, K. & Oide, M. : Effects of glycolipids on in vitro development of neuromuscular junction. Nature, 266 : 369-371, 1977.

III．筋ジストロフィー症の病態生理

a ）赤血球など

b ）生　　理

c ）生化・代謝など

24) Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球の polyphosphoinositide の同定

吉田瑞子*

研究協力者　林　文夫**　安藤一也*

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）の筋細胞には，カルシュウムが蓄積しているのがある．これは筋細胞膜が異常でカルシュウムが細胞外から細胞内に入り蓄積していると考えられている．私達はこの仮説に基づき，筋細胞膜のカルシュウム調節機構が異常になっているのではないかと考えている．この異常を究明するための試料として，患者の赤血球が使用出来るかどうか昨年まで調べて来た．その結果，DMD の赤血球にも異常が有り，特に外液にカルシュウムが存在した時に，その異常現象が現れ易いことが明らかとなった[1]．そのひとつに，カルシュウムを含む緩衝液中に浮遊した DMD 赤血球膜には，対照者のものより多くのカルシュウムが結合していることがあげられる．また DMD 赤血球の $Ca^{2+}-Mg^{2+}$ATPase 活性が高いことが報告されている[2]．

一方細胞の刺激，受容，応答そして機能発現に，イノシトール・リン脂質が関与していることが注目をあびている．またイノシトール・リン脂質の分解産物のホスファチジン酸（PA）は，Ca・チャンネルとして働いていることが認められつつある．1972年に，Buckley と Hawthorne は赤血球膜に poly-phosphoinositide（PPI）が増加すると膜のカルシュウム結合量が増加し，$Ca^{2+}-Mg^{2+}$ATPase 活性が高くなることを報告している[3]．

私達は今回 DMD 赤血球の 0℃と37℃での PPI（Diphosphoinositide：DPI，Triphosphoinositide：TPI）の含量を測定した．

* 国立武蔵療養所神経センター
** 神戸大学教養部生物学教室

方　法

試料：DMD 患者3名（20歳）と健康男子対照者4名（20歳）のヘパリン血液より，赤血球を分離した．その赤血球を0.9mM Ca^{2+} と 5 mM のブドウ糖を含むリン酸緩衝食塩溶液（pH 7.4，0℃）で3回洗滌した．その後42～45%ヘマトクリットに調整し，浮遊液の1ml（×2）を赤血球の0℃でのリン脂質抽出試料とした．残りの浮遊液は0℃で1ml（×2）ずつ容器に入れ，37℃で3時間 incubate した後，赤血球の37℃でのリン脂質抽出試料とした．

リン脂質抽出：1）1ml浮遊液を30mM $CaCl_2$ を含む2ml－MeOH に入れ，撹拌後2ml－$CHCl_3$ を加えて，室温に30分放置した．2）遠心分離で上清を取り，残査に20ml－$CHCl_3$：MeOH＝2：1 を加えて PPI 以外の脂質抽出を行なった．3）2）の残査に0.25%の濃塩酸を含むC：M＝2：1を25ml加えて PPI の抽出を行った．4）3)の抽出液を，その0.2容の1 N-塩酸で洗滌後，下層をその2/3容のC：M：1 N-HCl＝3：48：47で1回洗滌した．5）下層を NH_4OH で pH 8～8.5に調整した．6）5)の溶液を等容量の2 M-KCl で振とうし，さらに下層をその2/3容のC：M：1.5M-KCl＝3：48：47で2回洗滌した．7）下層を N_2 で乾燥した．

DPI，TPI の分離：試料――乾燥した PPI を50 μl のC：M：H_2O＝65：25：2で溶解した．方法――薄層クロマトグラフィー2次展開法を用いた．シリカゲル60薄層板（Merck-HPTLC）にしゅう酸カリウムを含ませ（1%－$K_2C_2O_4$水：メタノール（3：2）溶液中で），110℃で10分間乾燥した．

その薄層板に10μlの試料をplot（写真のSの位置）して，1次展開液（C：M：NH_4OH＝65：25：5）で展開した．展開後35℃で20分間，N_2気流中で乾燥後，DPI(0.3mg/ml)とTPI(0.6mg/ml)の標準物質（牛脳から抽出，精製した）を1μl，2μl，3μlと4μlの4点（写真の1，2，3と4の位置）をplotした．次に2次展開液（C：A：M：Ac：H_2O＝40：17：14：12：8）で展開した．その後30%硫酸水素アンモニュウムをスプレーし，160℃で17分間で発色させた．DPIとTPIの含量はツァイス-デンシトメーター（PMQ 3）で検出した．試料の含量は各薄層板の標準物質の検量線より得た．最終的にヘマトクリット値で補正し，赤血球1ml当りの含量とした．

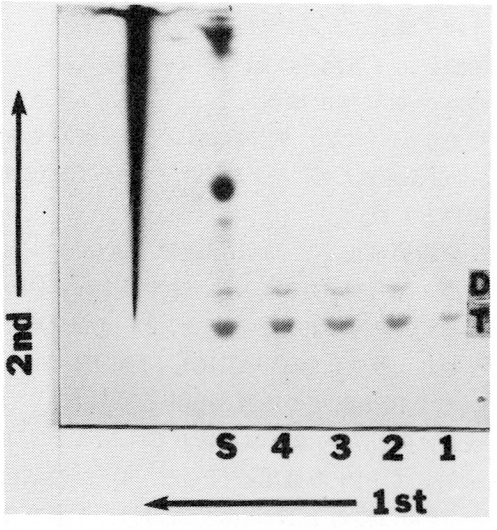


写真　DPI(D)とTPI(T)の2次展開薄層クロマトグラフィー
S：赤血球より抽出した試料
1，2，3と4：牛脳より抽出精製したPPI標準物質

結果と考察

DPIとTPIは1次展開で原点に止り，2次展開で写真のように展開される．この薄層クロマトグラフィーで得た結果を図に示す．0℃と37℃におけるDMD赤血球のDPIの含量は対照者のそれと比べて差は認められなかった．両者共，37℃に於けるDPI含量は，0℃の含量に比べ減少する傾向であった．

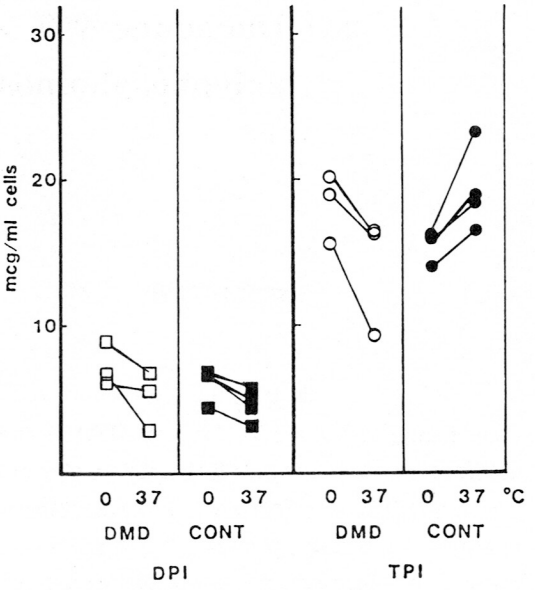


図　赤血球のPPI含量
DMD（3名，20歳）と健康対照者（4名，20歳）の赤血球（0℃と37℃）のDPIとTPI含量

0℃に於けるDMD赤血球のTPI含量も対照者のそれに比べて大きな差はなかった．しかし赤血球を0℃から37℃で3時間incubateした後の，DMD赤血球のTPI含量は減少し，対照者のそれは増加した．対照者のTPIが増加することは，すでに報告されている豚赤血球の結果と一致する[4]．

患者3名と対照者4名の結果からまだ結論出来ないが，DMD患者赤血球のイノシトール・リン脂質の代謝回転に異常が有る結果を得た．

結　論

0℃と37℃に於けるDMD（3名）赤血球のDPIとTPI含量は対照者（4名）のそれに比べて大きな差は認められなかった．しかし赤血球を0℃から37℃で3時間incubateした時のDMDのTPI含量は減少し，対照者のそれは増加した．

文　献

1) Yoshida, M., Ando, K. & Satoyoshi, E. : Abnormalities of Erythrocytes in Duchenne Muscular Dystrophy. Ann. Neurol., in press.

2) Dunn, M. J., Burghes, A. H. M. & Dubowitz, V. : Erythrocyte-ghost Ca^{2+}-stimulated Mg^{2+}-dependent adenosine triphosphatase in Duchenne muscular dystrophy. Biochem. J., 201 : 445—453, 1982.

3) Buckley, J. T. & Hawthorne, J. N. : Erythrocyte Membrane Polyphosphoinositide Metabolism and the Regulation of Calcium Binding. J. Biol. Chem., 247 : 7218—7223, 1972.

4) Peterson, S. C. & Kirschner, L. B. : Di-and Triphosphoinositide Metabolism in Intact Swine Erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta, 202 : 295—304, 1970.

25）Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の赤血球カルシウム含量

庄　司　進　一*

研究協力者　野　本　昭　三**

要　約

本研究の目的は赤血球カルシウム測定の最適条件を見出す事と Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の赤血球カルシウムを測定する事である．

赤血球カルシウム測定の最適条件としては，ピロコーティング・グラファイトを用い，原子化温度は1800℃である．

赤血球カルシウムを原子吸光法で測定した．これは Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症で *in vivo* の赤血球カルシウム含量の増加がないか？という疑問に答えるためであった．

25例の Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患児，24例の年齢・性対応対照児及び16例の健常対照者の赤血球カルシウム測定の結果は，それらの群の間に有意な差を認めなかった．

はじめに

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患者及び胎児の筋細胞で組織化学的にカルシウムの増加を示唆する報告や，本症保因者の筋核でX線ミクロ分析からカルシウムの増加が示唆されている．これは筋の変性の原因である可能性があり，直接筋細胞カルシウム含量を測定することが重要である．しかし現段階では数オーダー高いカルシウムを含む細胞外液を完全に除くことが困難で，筋細胞カルシウム測定は将来の課題である．

一方赤血球において報告されているいくつかの異常は，本症における赤血球でもカルシウムの異常増加を示唆しているものであり，この方は細胞外液の完全な除去が比較的容易である．この目的のため，我々は赤血球カルシウム測定の最適条件と Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患児での測定結果を本論文で報告する．

対象及び方法

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の患児及び年齢・性対応対照児は8歳から17歳までである．健常対照者は7歳から76歳までである．年齢・性対応対照児は血液疾患を含まぬ各種疾患患児である．

採血は早朝空腹時に静脈採血により行ない，ヘパリンと直ちに混和し室温で保存し，1時間以内に血漿と分離し，洗浄に移った．

赤血球層と洗浄上清のカルシウムの測定，及び前者のヘマトクリットの測定から赤血球カルシウム含量を算出した．

水は脱イオン後2回蒸留水を用いた．試薬は最も純度の高いものを用いた．特に NaCl は99.99%以上の純度のものを用いた．

ガラス器具からのカルシウム遊離によるコンタミを避けるため，ポリエチレン製のチューブやカップを用いた．これらは塩酸による洗浄を行なった．

Parkin-Elmer 原子吸光光度計4000，オートサンプラー AS-40，プログラマー HGA-500を用いた．

結　果

〔カルシウム測定条件の検討〕

最初に炎光原子吸光法による測定を試みたが，これでは感度が不充分であることが判明し，グラファイトを用いる原子吸光法を追求した．グラフ

＊信州大学医学部第三内科
＊＊信州大学医療技術短大部

ァイト法では従来の標準原子化温度2600℃で行なうと，しばしば吸光シグナルに第二のピークが現われた．このピークは一度グラファイトの分子層間に吸着したカルシウム原子が原子化段階で再び遊離してくるためと考えられる．キャリーオーバーや再現性が悪いことはこの現象によると考えられ，測定を困難にしている．

この現象を防ぐため，グラファイト分子層間をあらかじめストロンチウム原子で飽和しておくことを試みた．これにより第二のピークは消失した．

次にこのストロンチウム処理による効果をキャリーオーバーの程度，感度，直線性の範囲から検討した．方法はブランクを測定後カルシウムのスタンダード溶液系列を測定し再びブランクを測定した（図1）．

2500℃の原子化温度でストロンチウム処理前後で比較すると，キャリーオーバーが10%から3%に減少し，感度が上昇した（図2）．

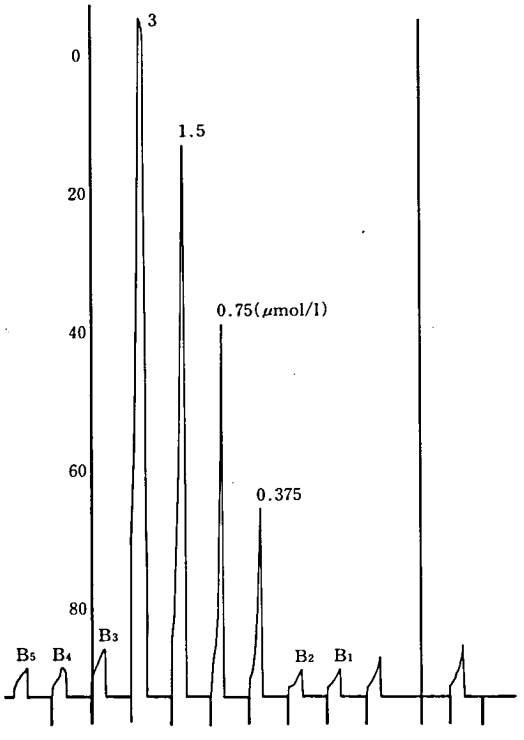


図1　Recorder tracing of a typical standard curve, showing a linearity and carryover phenomenon

ピロコーティングの無いグラファイトを用いると，感度が1オーダー低く，キャリーオーバーが高く，ストロンチウム処理によっても10%と高かった．

原子化温度を1800℃にするとストロンチウム未処理でも，第二のピークは消失し，キャリーオーバーは低かった(3.3%)（図3）．直線性の範囲を考え合せると，ストロンチウム未処理のグラファイトをこの温度で用いると良い事が判明した．

赤血球カルシウム測定の最適条件を表1にまとめた．炭素のチューブ内での沈着を防ぐため，500℃で空気を100ml/min流すと良い．この原子

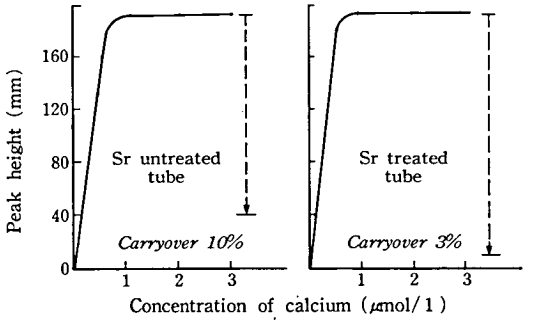


図2　Comparison of standard curve and carry-over rate between strontium-treated and-untreated tube
(pyro-coated tube, atomization temp. 2500℃)

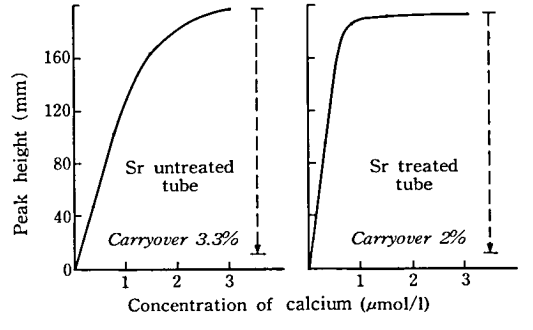


図3　Comparison of standard curve and carry-over rate between strontium-treated and-untreated tube
(pyro-coated tube, atomization temp. 1800℃)

化温度が比較的低い条件下では，サーモ・フォト・センサーの調整は重要である．

〔洗浄条件の検討〕

赤血球の洗浄は10容の等張リン酸緩衝食塩水（pH7.4）で混和1100g 3分の遠心を繰返えして行なった．これで1回から4回洗浄を行ない検討し，3回の洗浄で良いことが判明した．

〔Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症赤血球カルシウム含量の測定〕

表2に結果を示した．本症患児，対照患児，健常者の間に有意差は認められなかった．

考　　案

赤血球カルシウム測定には多くの困難があった．第一は感度で，グラファイト法のみで充分な感度があった．第二は周囲からのコンタミで，ガラス器具からのコンタミを防ぐためポリエチレン製器具に換えた．又水は脱イオン後の2回蒸留水を用いた．洗浄用の緩衝液には，赤血球からカルシウムを遊離させにくいものを選んだ．

原子吸光のシグナルに第二のピークが出現する現象は，ストロンチウム処理と原子化温度を低温化することで消失することから，グラファイト分子層間に吸着後遊離してくるカルシウム原子によると考えられる．感度，キャリーオーバーの程度，直線性の範囲から，ピロコーティング・グラファイトにストロンチウム処理を行なわずに，原子化温度を1800℃で用いる条件を選んだ．

表1　Recommended conditions for calcium analysis in erythrocytes

Diluent : Deionized redistilled water

Tube Type : Pyrocoated

Step	1	2	3	4	5	6
Temperature (°C)	80	130	500	1000	1800	2200
Ramp Time (sec)	3	25	2	15	0	1
Hold Time (sec)	0	5	5	15	4	3
Air (ml/min)			100			
Argon (ml/min)	300	300	0	300	50	300

表2　Calcium content in erythrocytes

Healthy Controls (16)	6.7 ± 1.8	μmoles/l cell
Age-matched Controls (24)	6.1 ± 3.6	
Duchenne Muscular Dystrophy (25)	6.1 ± 4.4	

mean ± s.d.

Number in parenthesis represents number of subjects

この条件下では，赤血球カルシウム含量は従来の報告[3),7)]より低いことが判明した．赤血球の洗浄は室温で行ない，カルシウム・ポンプを阻害しない条件であるので，この価は *in vivo* の赤血球カルシウム含量に近いと考えられる．

4グループ[2),4),5),8)]が本症に於て赤血球膜の Ca-ATPase の活性上昇を報告しており，1グループ[10)]が正常との報告をしている．この酵素は赤血球のカルシウム・ポンプであると考えられている．Mollman ら[6)]は inside-out vesicle を用いてカルシウムの transport を測定し，本症ではカルシウムの汲み出しで Vmax と Km が高いと報告した．一方 Shoji[9)]は right-side-out の赤血球を用い，radio-active カルシウムの流入と汲み出しで対照と差が無いことを報告した．これらの論争は，赤血球のカルシウム transport 系の異常の有無に関する *in vitro* の実験である．今回の研究は新鮮赤血球のカルシウム含量の異常の有無をみたもので，生体内で赤血球カルシウム含量(流入—汲み出し)に異常がないことを示している．

今回の測定はカルシウムの総量であるので，結合カルシウムと遊離カルシウムの合計で，それぞれの比率の異常の有無は言えない．

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症に於て赤血球カルシウムの異常蓄積はないようだ．

追　　記

前年度本症の赤血球含量が4℃72時間の incubation 後に有意に上昇するとのデータは，対照群でも同様に上昇することから有意差は無いと訂正する．これは洗浄時にわずかでも温度上昇があると，洗浄中にカルシウム・ポンプが働いてカルシウムを汲み出すためで，厳重な温度コントロールのもとでは差はなく同様に上昇した．又新鮮赤血球のカルシウム含量の測定は，測定方法の改良と症例数の増加で有意差無しになった．前年度の測定ではパイロ・コーティングの無いグラファイトを用い，経時的感度変化を頻回にモニターしなかったため，バイアスがかかったものと考えられる．

文　　献

1) Brown, S. S., S. Nomoto, M. Stoeppler & F. W. Suderman : IUPAC reference method for analysis of nickel in serum and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. Pure Appl. Chem., 53 : 773-781, 1981.

2) Dunn, M. J., A. H. M. Burghes & V. Dubowitz : Erythrocyte ghost Ca^{2+}-stimulated Mg^{2+}-dependent adenosine triphosphatase in Duchenne muscular dystrophy. J. Biochem., 201 : 445-453, 1982.

3) Harrison, D. G. & C. Long : The calcium content of human erythrocytes. J. Physiol., 199 : 367-381, 1968.

4) Hodson, A. & D. Pleasure : Erythrocyte cation-activated adenosine triphosphatase in Duchenne muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 32 : 361-369, 1977.

5) Luthra, M. G., L. Z. Stern & H. D. Kim : $(Ca^{++}+Mg^{++})$-ATPase of red cells in Duchenne and myotonic dystrophy : Effect of soluble cytoplasmic activator. Neurology (N. Y.), 29 : 835-841, 1979.

6) Mollman, J. E., J. C. Cardenas & D. E. Pleasure : Alteration of calcium transport in Duchenne erythrocytes. Neurology (N. Y.), 30 : 1236-1239, 1980.

7) O'Rear, Ed. A., M. M. Udden, L. V. Mcintire & E. C. Lynch : Problems in measurement of erythrocyte calcium. Am. J. Hematol., 11 : 283-292, 1981.

8) Ruitenbeek, W. : Membrane-bound enzymes of erythrocytes in human muscular dystrophy. $(Na^{+}+K^{+})$-ATPase, Ca^{2+}-ATPase, K^{+}-and Ca^{2+}-p-nitrophenyphosphatase. J. Neurol. Sci, 41 : 71-80, 1979.

9) Shoji, S. : Calcium flux of erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 51 : 427-435, 1981.

10) Tsuchiya, Y., H. Sugita, S. Ishiura & K. Imahori : Spectrin extractability from eryth-

rocyte in Duchenne muscular dystrophies and the effect of proteinases on erythrocyte ghosts. Clin. Chim. Acta, 109 : 285-293, 1981.

26) Myotonic dystrophyにおける赤血球膜脂質構成

馬　渡　志　郎*

研究協力者　安　徳　恭　演*

はじめに

Myotonic dystrophyでは種々の赤血球膜の異常が報告されているが，必ずしも確立されたものではないように思われる．昨年度[3]，私共はmyotonic dystrophy患者の赤血球膜では総脂肪酸構成に異常を認めたことを報告した．今回は赤血球膜リン脂質を4つの分画に分けて脂肪酸を分析し，対照群と比較した．

対象および方法

Myotonic dystrophy患者(13人，平均年齢41.7歳，16～60歳)，健康対照群(15人，平均年齢42.9歳，21～60歳）を対象とし，同時刻ごろヘパリン採血し，血漿分離後，buffy coatを除去し，赤血球は0.85%生食水で3回洗浄し，10mM Tris-HCl (pH7.4)で溶血後，同液で4回膜を洗い，白色の赤血球膜を得た．赤血球膜は分析まで－80℃に保存した．

赤血球膜からFolchらの方法により脂質を抽出し，クロロホルム層の脂質を分析した．薄層クロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール：28%アンモニア＝70：30：5，Merck Kieselgel 60）によりホスファチヂルエタノーラミン(PE)，ホスファチヂルコリン(PC)，ホスファチヂルセリン（PS)，スフィンゴミエリン（SM）を分画分取した．PE, PC, PSは5%KOH・50%メタノール溶液に溶解し，98℃，20分でけん化した．12N塩酸添加後クロロホルム塩酸・メタノール液で98℃，5時間加水分解後クロロホルムで抽出し，さらにアルカリ加水分解後，クロロホルムで脂肪酸を抽出した．クロロホルムを窒素ガスで乾固後，螢光ラベル剤9-アンスリルヂアゾメタンを溶解したメタノールを加え，室温にて1時間以上放置した．その後は高速液クロマトグラフィー（島津LC-4A，自動試料注入器装備，Zorbax C_8カラム，カラム温度60℃，移動相：アセトニトリル＋水，流量1.6ml/分，Ex. 365nm, Em. 412nm）により分析した．ピーク面積計算はクロマト用データ処理装置（島津C-RIA）によりおこなった．溶媒は液クロ用の有機溶媒と水を使用した．有機溶媒にはすべて酸化防止剤butylated hydroxytoluenoを入れた（5 mg/dl).

結　果

赤血球膜のPEの脂肪酸構成ではmyotonic dystrophyでは対照群にくらべ16：0 ($p<0.005$)が多く，18：0 ($p<0.005$)が少なかった（表1）．PCの脂肪酸構成では18：1 ($p<0.01$)が多く，18：0 ($p<0.05$)が少なかった（表2）．PSとSMの脂肪酸構成には対照群と有意の差を認めなかった（表3，4）．

考　案

私共は昨年赤血球膜の総グリセロリン脂質の脂肪酸構成を分析しmyotonic dystrophyでは肺結核患者を対照群とした場合，16：0と18：1の増加と18：0の減少を認め，対照群を変えた分析でも16：0の増加と18：0の減少を認めた[3]．今回の分析ではPEで16：0の増加と18：0の減少，PCでは18：1の増加と18：0の減少を認め，昨年の結果と矛盾はなかった．

Myotonic dystrophyの赤血球膜脂質分析はRuitenbeekの報告[1]では赤血球膜の中性脂肪の16：1の低下を認めているが，症例数が4例と少ない．McLaughlinら[2]の報告では総脂肪酸構成

＊国立赤坂療養所神経内科

表1 Fatty acid composition of phosphatidylethanolamine

	Myotonic dystrophy(n=13)	control(n=15)	significance*
22:6	14.90 ± 2.40	15.85 ± 1.68	
20:4	18.91 ± 2.00	19.10 ± 2.04	
18:2	9.68 ± 0.67	9.68 ± 1.14	
16:0	20.28 ± 1.13	18.79 ± 1.02	($p < 0.005$)
18:1	18.31 ± 1.29	17.38 ± 1.39	($p < 0.1$)
18:0	5.46 ± 0.66	6.28 ± 0.61	($p < 0.005$)

Values; area percentage (means ± SD). Minor peaks were omitted from this table.

* t-test

表2 Fatty acid composition of phosphatidylcholine

	Myotonic dystrophy(n=12)	control(n=15)	significance*
22:6	4.42 ± 1.25	3.99 ± 1.33	
20:4	4.56 ± 0.53	4.66 ± 0.90	
18:2	17.05 ± 2.04	18.31 ± 2.11	
16:0	41.78 ± 2.68	41.15 ± 2.43	($p < 0.5$)
18:1	18.77 ± 1.49	17.01 ± 1.59	($p < 0.01$)
18:0	10.33 ± 1.51	11.86 ± 1.90	($p < 0.05$)

Values; area percentage (means ± SD). Minor peaks were omitted from this table.

表3 Fatty acid composition of phosphatidylserine

	Myotonic dystrophy(n=10)	control(n=12)	
22:6	14.61 ± 4.17	13.23 ± 3.38	
20:4	15.80 ± 2.89	15.64 ± 2.75	
18:2	5.49 ± 1.74	4.89 ± 1.15	
16:0	7.58 ± 1.78	6.97 ± 1.07	ns
18:1	5.61 ± 1.11	4.96 ± 1.06	ns
18:0	43.28 ± 7.72	46.02 ± 6.00	ns

Values; area percentage (means ± SD). Minor peaks were omitted from this table.

ns; Difference was statistically not significant.

表4　Fatty acid composition of sphingomyelin

	Myotonic dystrophy(n=10)	control(n=12)	
16:0	37.20 ± 3.62	38.64 ± 3.45	ns
18:0	11.42 ± 2.56	11.28 ± 1.39	ns
20:0	2.03 ± 0.22	1.92 ± 0.21	
22:1	0.81 ± 0.35	0.79 ± 0.18	
22:0	5.60 ± 0.62	6.01 ± 0.88	
24:1	23.86 ± 4.45	23.64 ± 2.89	
24:0	13.26 ± 1.55	12.81 ± 2.96	

Values; area percentage (means ± SD). Minor peaks were omitted from this table.

ns; Difference was statistically not significant.

表5　Erythrocyte lipids in myotonic dystrophy

phospholipid / cholesterol			ns		
phospholipid classes			ns		
fatty acid composition		16:0	18:0	18:1	
	total	(↑	↓	↑	)*
	total	↑	↓	ns	
	PE	↑	↓	ns	
	PC	ns	↓	↑	
	PS	ns	ns	ns	
	SM	ns	ns	ns	

ns; Difference was statistically not significant.

↑; increased　↓; decreased

* compared to tuberculous control

で対照群と差を認めていない．Ruitenbeek も McLaughlin らも脂肪酸分析にはガスクロマトグラフィーを用いており，私共の方法とは異なる．ガスクロマトグラフィーの場合は脂肪酸のメチルエステル化が必要であり，私共の経験からすべての脂肪酸がエステル化されてはいないように思われ，螢光試薬9-アンスリルヂアゾメタンのラベルにくらべると脂肪酸の回収が不完全であるように思われる．

私共の myotonic dystrophy の赤血球膜脂質の分析ではコレステロールとリン脂質の比，各リン脂質の分画の構成比には異常を認めず，リン脂質分画中の PE と PC の主要な脂肪酸である16：0，18：1，18：0に相対的異常を認めた(表5)．これらの脂肪酸構成の異常と myotonic dystrophy における赤血球膜の種々の異常の報告との関連性については当面明らかでない．

結　語

Myotonic dystrophy の赤血球膜の4つのリン脂質（PE, PC, PS, SM）の脂肪酸構成を高速液クロマトグラフィーを用い分析した。

PE では16：0が多く，18：0が少なかった。PC では18：1が多く，18：0が少なかった。PS, SM の脂肪酸構成には対照群とくらべ有意の差は認めなかった。

文　献

1) Ruitenbeek, W.：The fatty acid composition of various lipid fractions isolated from erythrocytes and blood plasma of patients with Duchenne and congenital myotonic muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta, 89：99, 1978.

2) McLaughlin, J., et al：Lipid Composition of Erythrocytes：Findings in Duchenne's Muscular Dystrophy and Myotonic Atrophy. Arch. Neurol., 36：351, 1979.

3) 馬渡志郎，安徳恭演：筋緊張性ジストロフィー症における赤血球膜および血漿の脂質分析．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」（三好班）昭和56年度研究報告書，1982，p. 171.

27) Duchenne 型筋ジストロフィーの筋小胞体機能：スキンドファイバー法による再検討

高　木　昭　夫*

研究協力者　宮　沢　　寛*　安　部　和　子*

1967年 Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)からの分離筋小胞体においてカルシウム（Ca）摂取機能の低下が指摘された[1]．その後ヒト筋ジストロフィーやその動物モデルにおいて類似の報告が相次いでいる．これらの結果を総合すると，Ca 摂取能の低下，Ca, Mg-ATPase 活性の変化，Ca-ATPase 蛋白量の減少，あるいは膜燐脂質組成の変化などである[2]．しかしこれらの知見の DMD 病因上の意義に関してはまだ不明な点が多い．DMD の骨格筋よりの分離小胞体の純度の問題，筋線維タイプ分布の相違などが考慮されるべきであろう．また従来同年齢対照との比較がなされていない点にも留意すべきであろう．今回我々は DMD の生検筋から単一筋線維スキンドファイバーを作製し，筋小胞体機能につき再検討を行った．

方　　法

9名の DMD 患児（平均年齢4.9歳）および13名の神経筋症状を呈した小児（平均年齢5.0歳）を対照とした．なお結果の一部は成人対照とも比較した．DMD 以外の疾病の内訳は筋低緊張，非特異的先天性ミオパチー，脊柱側彎，尖足，神経原性筋萎縮，悪性高熱の同胞である．主として上腕二頭筋より筋肉を採取した．資料の処理，スキンドファイバー実験，筋線維タイプの識別は既報の通りである[3]．筋小胞体の Ca 摂取は以下の3つのパラメーターを使用して検討した．

Ca 摂取指数　スキンドファイバーを各種の Ca 濃度の溶液中に保持して，筋小胞体に Ca イオンを摂取させた．次いで0.1mM EGTA を含む弛緩溶液中でカフェイン拘縮を発生させ，その頂点張力（Pcaf）を測定した．またその筋線維の発生しうる最大張力（Po）を 3×10^{-5}M Ca イオンを含む溶液中で測定した．Pcaf/Po の比を Ca 摂取指数とした（図1）．

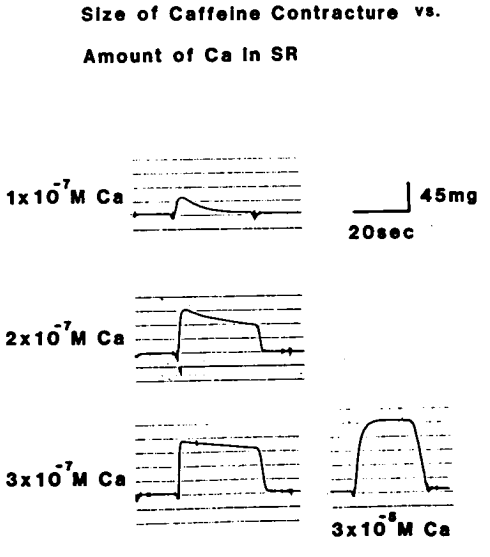


図1　3種の Ca 濃度（10^{-7}，2×10^{-7}，3×10^{-7}M）の溶液中でスキンドファイバーの筋小胞体に Ca 摂取させた後で，カフェイン拘縮を発生させた．外液の Ca 濃度が高くなるにしたがい，Ca 摂取量は増え，したがってカフェイン拘縮の大きさも増加する．カフェイン拘縮の最大張力をその筋線維の発生する最大張力(Po)と比較して Ca 摂取指数を計算した．Poは右下段のように 3×10^{-5}M により直接収縮系を活性化して発生する張力である．

＊国立武蔵療養所神経センター

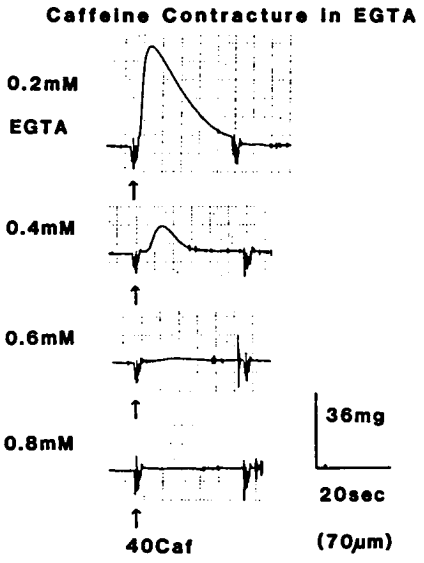


図2　スキンドファイバーに一定条件下でCaイオンを負荷した後で，各種のEGTA濃度の弛緩溶液中でカフェイン拘縮を誘発した．EGTA濃度が増加するにしたがって，発生する拘縮の大きさは減少し次いで消失する．明瞭な張力発生が観察される最大のEGTA濃度（図では0.4 mM）を決定した．

EGTA溶液中でのカフェイン拘縮　筋小胞体に一定条件下でCa負荷後に，各種のEGTA濃度下でカフェイン拘縮を発生させた(図2)．EGTA濃度の増加にともない，発生する張力は漸減し遂に消失する．カフェイン拘縮消失直前のEGTA濃度を筋小胞体中Ca量の指標とした．比較する両群で筋直径の分布が等しいならば，このEGTA濃度は小胞体Ca量を反映すると推定される．筋直径平均は38±1 μm (DMD) および28±1 μm (小児対照）であった．

カフェイン閾値　筋小胞体にpCa6.5の溶液中でCa摂取を行なわせた後で，筋拘縮を誘発するカフェイン閾濃度を決定した．モデル実験として筋小胞体に負荷するCa量とカフェイン閾値の関係を図3に呈示した．このカフェイン閾値は小胞体中のCa量あるいは小胞体膜の性質を反映するものである（未発表）．

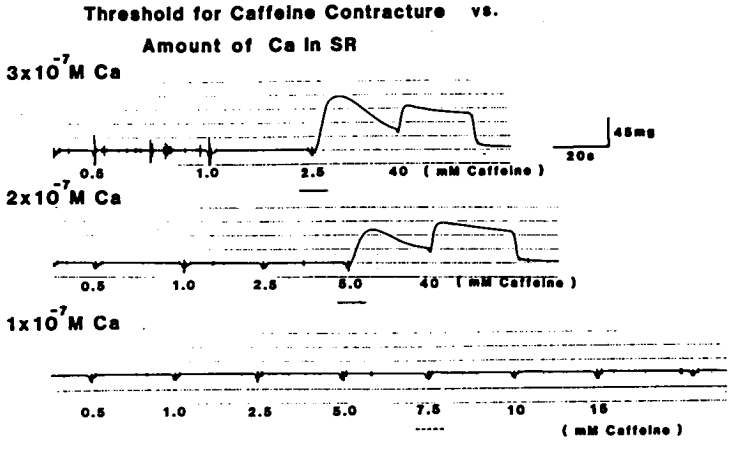


図3　筋小胞体にCaイオンを負荷後，拘縮を誘発するカフェイン閾濃度を測定した．筋小胞体中Ca量は負荷する際の溶液中のCa濃度（図では3×10^{-7}，2×10^{-7}，10^{-7}Mの3種）で調整した．3×10^{-7}Mの場合には2.5mMカフェインで拘縮が発生した．10^{-7}Mの場合には15mM以下では拘縮は発生しない．カフェイン閾値は1つには筋小胞体中のCa量を反映している．また筋小胞体膜の性質などの因子によっても影響をうける．

結　　果

1) DMDおよび対照のタイプ1線維において，Ca摂取はpCa7.5で開始し，pCa 6で最大となった(図4)．タイプ2線維ではCa摂取はpCa7.0で開始し，pCa 6で最大となった．いずれの筋線維タイプにおいても，DMDと小児対照例の間でCa摂取指数に有意差はみとめられなかった．しかし成人対照と比較する時，Ca摂取指数は有意に低値であった．

pCa6.5の溶液中で，Ca摂取速度をCa摂取指数の時間経過から比較した．DMDと小児対照の間に有意差はみとめなかった．

2) カフェイン拘縮が観察される外液のEGTA最大濃度は，0.51±0.33mM(DMD, n=22, 平均±標準偏差) および0.59±0.28mM (小児対照，n=22)である．両者間に有意差はみとめられない(図5)．

3) 拘縮を発生させるカフェイン閾濃度は6.9±4.3mM (DMD, 平均±標準偏差) および10.4±5.4 mM (小児対照) であった．DMDの閾値は有意に低下していた (p=0.005) (表1)．このような閾値の低下は悪性高熱，無症候性高CPK血症 (asymptomatic hyperCPKemia) や悪性症候群の症例で観察された．

表1　拘縮を誘発したカフェイン閾濃度 (mM) を比較した．DMDでは小児対照より有意に低下していた．しかし悪性高熱，無症候性高CPK血症，悪性症候群においても閾値の低下があった．

	Mean	S.D.	(N)+
Adult controls	12.0	4.4	(42)
Child controls	10.4	5.4	(49)
Malignant hyperthermia	5.8	3.5	(27)*
Duchenne dystrophy	6.9	4.3	(29)**
Asymptomatic hyperCPKemia	7.7	3.2	(47)*
Neuroleptic malignant syndrome	9.2	4.9	(39)***

+Number of skinned fibers analyzed

*P less than 0.001, **P=0.005, ***P=0.02

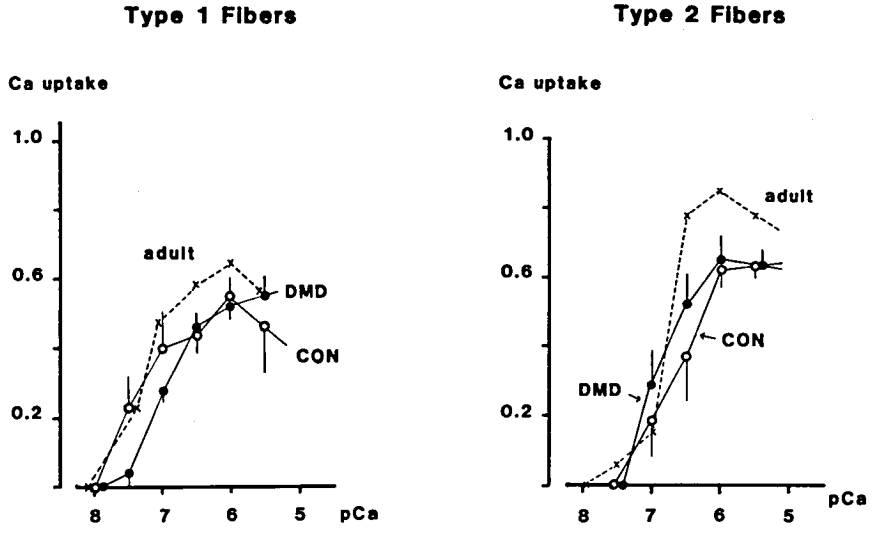


図4　DMDのタイプ1およびタイプ2線維におけるCa摂取指数を対照と比較した．縦軸：Ca摂取指数，横軸：Ca負荷を行った溶液のCa濃度 (pCa=−log〔Ca^{2+}〕)．各値は平均と標準偏差を呈示した．N=10(DMD)，6 (小児対照)，10 (成人対照)．各種のpCaにおいて，DMDと小児対照の間には有意差はない．成人対照との比較では，小児のCa摂取指数は有意に低値である．

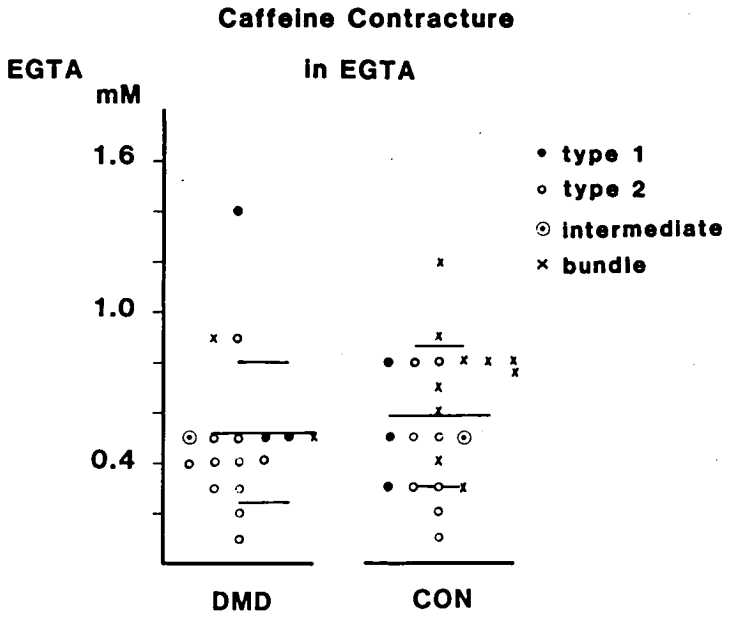


図5　図2にしたがって測定したEGTA濃度をDMDと小児対照で比較した．両群間に有意差はみとめられない．

考　　案

DMDの筋小胞体機能をスキンドファイバー法を応用して分析した．この場合最終的にはCaイオンに対する収縮系の反応（張力発生）を利用している．したがって比較する両群において(1)Ca濃度と張力発生の相互関係が同一である．(2)カフェインは収縮蛋白にも作用して張力発生を修飾するが，この作用が両者で同一である．などの前提が必要である．我々は(2)に関しては問題のないことを確認した．(1)に関してDMDはpCa 6より低濃度の範囲にて若干感受性が増加している可能性があり，厳密にはまだ問題が残っている．

今回の検討において，Ca摂取指数やEGTA濃度を指標とした場合のいずれにおいても，DMDと小児対照との間に有意差をみいだせなかった．この結果は従来の報告と相違している[4]．この理由として，同年齢を対照として使用している．筋線維タイプ別で比較していることなどが考えられる．しかし単一筋線維法では比較的正常なものだけをサンプリングしているとの議論もあろう．

拘縮を誘発するカフェイン閾値はDMDで低値を示した．この事実はDMDの筋小胞体にはある程度以上のCa摂取能が保持されていることを示している．また筋小胞体の性質としてCa-induced Ca-releaseの機序が作動しやすい可能性を示唆している．DMD症例に時として悪性高熱類似の麻酔副作用が発生する事実と矛盾しない結果である．このカフェイン閾値の低下は，悪性高熱の回復者，asymptomatic hyperCPKemia その他で観察されており非特異的な現象である．カフェイン閾値低下で表現されるカフェイン感受性亢進は筋細胞変性あるいは再生に伴って出現する現象と推定している．

筋小胞体機能に関してDMDに特異的異常は証明されなかった．遺伝病としてのDMDにおいて，異常遺伝子の発現が筋小胞体に関係する可能性は少ないと推定される．今回とり上げなかったが，筋小胞体のもう1つの重要な機能はCa遊離である．しかしCa遊離の生理的機序に関する知見はまだ不充分である．DMDの骨格筋におけるCa遊離の問題は今後に残されている．

結　論

スキンドファイバー法を応用してDMDの筋小胞体機能を再検討した．Ca摂取能はCa摂取指数やカフェイン拘縮の際の外液EGTA濃度を指標として評価した．DMDと小児対照の間に有意差はなかった．小児のCa摂取指数は成人対照より低値であった．DMDではカフェイン感受性が亢進していた．しかしこの現象は悪性高熱や高CPK血症の症例でも観察され非特異的と推定された．このようにDMDの筋小胞体に特異的異常はみとめられなかった．

文　献

1) Sugita, H., Okimoto, K. & Ebashi, S.: Biochemical alterations in progressive muscular dystrophy with special reference to the sarcoplasmic reticulum. In "Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders", (ed. by A. T. Milhorat), Exerpta Medica, Amsterdam, 1967, pp.321-326.

2) 高木昭夫, 石浦章一：筋ジストロフィー．膜, 6：487-493, 1981.

3) Takagi, A. & Nonaka, I.: Duchenne muscular dystrophy: unusual activation of single fibers in vitro. Muscle Nerve, 4：10-15, 1981.

4) Wood, D. S., Sorenson, M. M., Eastwood, A. B., et al: Duchenne dystrophy: Abnormal generation of tension and Ca^{++} regulation in single skinned fibers. Neurology (Minneap.), 28：447-457, 1978.

28）筋ジストロフィー症及びその他の神経筋疾患におけるM波の研究

栗原照幸*

研究協力者　田中政幸*　年森啓隆**
山中信和*　井上謙次郎**

目　的

末梢神経に閾上刺激をして表面電極で導出される誘発筋電位（M波）は，多数の神経筋単位放電の合成波であり，M波発現には下位運動ニューロン，運動神経線維，神経筋接合部，筋肉の各要素が関与している[1),2)]．

昨年度はDuchenne型DMPについてM波を検討したが，今回は更に他のDMP及び，神経筋接合部，軸索，髄鞘に障害を来す種々の神経筋疾患についてM波の記録を行い，これらの疾患における診断，経過観察，及び治療効果判定についてM波の有用性を検討したので報告する．

対象と方法

正常者16名（平均年齢27.4歳），Duchenne型DMP12例（平均年齢11.9歳），Becker型DMP 2例（5歳と16歳），肢帯型DMP 2例（13歳と18歳），K-W病2例（9歳と19歳），重症筋無力症（MG）6例（平均年齢47.7歳），水俣病認定患者6例（平均年齢52.8歳），糖尿病患者32例（平均年齢52.8歳）の合計78例を対象とした．

M波の記録はMedelec MS 6-1型筋電計と表面電極E/RE-K 2個を用いて行い，電気刺激は0.2msの持続で，閾上となる電圧を用いて行った．M波はデーターレコーダーに記録した後，三栄7T08型シグナルプロセッサーを用いてM波を5回平均加算した後，M波の潜時，振幅，持続，面積の4項目をコンピューターにより計測しX-Yプロッターに記載するプログラムを著者らが開発して行った[3)]．

皮膚温はサーミスターで計測した．M波を導出した筋肉は上肢ではdeltoid, thenar muscle，下肢ではtibialis anterior muscle, ext. digitorum brevis (EDB) muscleであるが，MGではこの他orbicularis oculi muscleからもM波を記録した．

結　果

正常者16名のM波をdeltoid, thenar, tib. anterior, EDB, orbicularis oculi muscleより導出すると，M波の振幅（横軸）と面積（縦軸）はよく相関し，各々の筋肉で両者の関係は方程式で示され，筋肉が大きいほど図1の様に勾配も大である傾向を示した．各々の筋肉のM波の振幅と面積の正常値を図中四角形で示す．

表1はDuchenne型12例とBecker型DMP 2例，L-G型2例，K-W病2例の年齢，有病期間，CPK，皮膚温等を示す．Duchenne型DMPでは下腿の皮膚温が著明に低い例が12例中7例あり，平均でも正常値33.5℃に比してDuchenne型では28.0℃と約5℃も低い．これに対してBecker型では32.2℃と正常値より1℃低いのみで，L-G型では有病期間が15.4年と長い1例で26.4℃と低く，K-W病ではやはり有病期間が17.4年と長い1症例で26.0℃と低下を認めた．これは病気の進行と共に筋力低下，筋萎縮が進んで筋肉の熱産生が低下するためと考えられた．

M波の面積を有病期間を横軸にとって図2に示すと，Duchenne型では遠位筋の短指伸筋では有病期間との負の相関はみられないが，前脛骨筋や上肢近位筋の三角筋では有病期間が長くなると

＊宮崎医科大学第三内科
＊＊国立療養所宮崎東病院

表1　M波の記録を行ったDMP及びK-W病の症例（合計18名）
各症例の性，年齢，有病期間，血清CPK，M波記録時の皮膚温を示す．NR：no response の略

Duchenne 型筋ジストロフィー症（12例）

	性	年令	有病年数	足関節拘縮	歩行	CPK(IU/ml)	腓骨神経 MCV(m/s)	皮膚温 肩(°C)	皮膚温 下腿(°C)
1	M	18歳	15.0年	(+)	不可	865	39.9	34.2	23.8
2	M	17	15.5	(+)	不可	1005	37.1	29.0	24.3
3	M	17	14.0	(+)	不可	1196	49.1	32.5	23.8
4	M	14	8.0	(+)	不可	2334	50.2	32.9	27.2
5	M	13	11.5	(+)	不可	2358	59.5	34.3	31.4
6	M	12	10.0	(+)	不可	1961	49.4	29.5	26.3
7	M	11	9.0	(+)	不可	1976	52.7	30.1	26.9
8	M	11	8.0	(+)	不可	2328	50.2	30.8	26.2
9	M	10	3.0	(−)	可	3572	53.1	33.1	32.4
10	M	7	3.0	(−)	可	3872	56.5	32.9	30.6
11	M	7	2.0	(−)	可	17500	51.2	33.8	31.2
12	M	6	2.0	(−)	可	6127	53.2	33.1	31.9
平均 ±S.D.		11.9y ±4.1	8.4 ±5.0y			3758 IU/ml ±4373	50.2 m/s ±6.3	30.2°C ±1.8	28.0°C ±3.3
正常値						100IU/ml 以下	52.2 m/s ±3.8	34.0 ±0.7	33.5 ±0.6

Becker, L−G, K−W 病 の M 波

性 年令	有病年数	診断名	CPK (IU/ml)	皮膚温(°C) 肩	上肢	下肢	M波の面積 (ms・mV) EDB m.	Tib. ant. m.	Deltoid m.	Opp. pollicis m.
1. M 16y	10.3y	Becker	156	31.5	29.5	32.2	60.4	41.8	91.0	44.5
2. M 5	1.3	Becker	1525	33.8	32.6	32.2	6.2	60.4	149.9	15.0
3. F 13	9.4	Limb-Girdle	344	34.0	31.0	30.6	28.3	55.2	288.1	80.8
4. M 18	15.4	Limb-Girdle	116	32.8	29.4	26.4	60.5	40.1	15.2	66.1
5. M 19	17.4	K-W	455	33.7	31.6	26.0	NR	NR	NR	19.3
6. F 9	7.4	K-W	820	34.0	33.5	31.1	13.3	—	92.0	66.9
正常値				34.0 ±0.7	32.7 ±0.79	33.5 ±0.6	45.1 ±27.4	85.8 ±37.0	284.9 ±78.8	96.3 ±42.7

共にM波の面積が低下し，Becker，L-G，K-W病ではDuchenne型DMPと正常値の間の値をとりながら有病期間が長くなると低下して来るという経過をとっている．これは進行する疾患においては当然のことであり，M波の面積は検査した時点において残存するNMUの総和的指標となる．

MG 6例，Osserman Type II_A，II_B型の患者で胸腺摘除術をした前後で抗Ach receptor抗体，徒手筋力テスト，M波の振幅，面積を表2に示す．胸腺摘除術によって臨床症状が改善した症例2，4，5ではM波の振幅及び面積が平行して改善しており，M波の分析は治療効果をよく示す客観的指標として有用である．

胸腺摘除後も十分臨床症状が改善しなかった難治例の3症例にはTotal body irradiation (TBI)[4]，総量100Radを5週間に渡って行うと臨床症状としては，嚥下困難の改善，鼻声の消失，首垂り現象の改善，呼吸困難の改善，肺活量の増

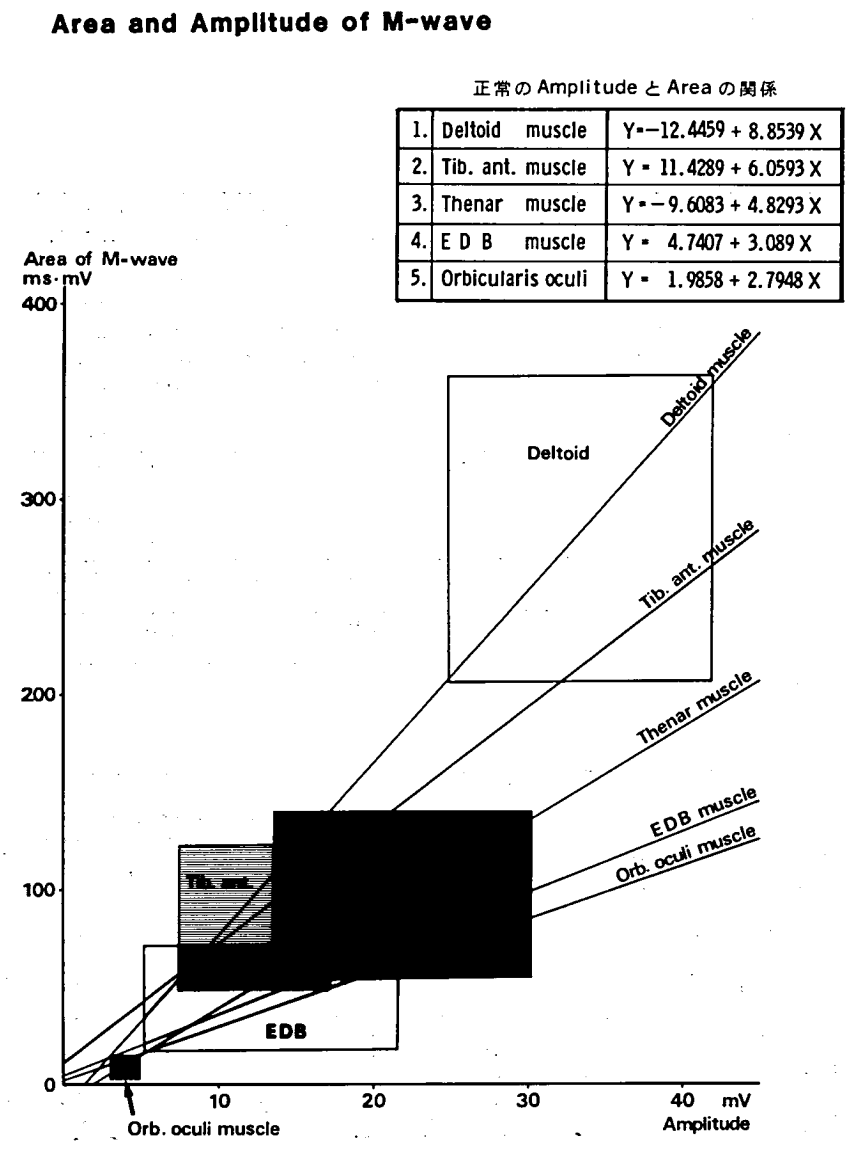


図1　正常者16名のM波の振幅（横軸）とM波の面積（縦軸）
三角筋，母指球筋，前脛骨筋，短指伸筋，眼輪筋よりM波を導出した．M波の振幅と面積はよく相関し，両者の関係は方程式で示される．各筋肉のM波の振幅と面積の正常値を四角形で示す．

加，臥床状態から独歩可能となる等，3症例とも退院できるようになったが，本療法前後でのM波の面積はやはり臨床症状の改善と平行して，眼輪筋，三角筋，母指球筋，前脛骨筋，短指伸筋の5筋で改善し，比較的新しい治療法の効果を判定する際には，客観的指標として有用であった．

末梢神経障害では，主に軸索変性を主体とするニューロパチーとして水俣病認定患者のM波をMCVと共に検索した．表3の様に左腓骨神経のMCVは6例中2例で夫々 no response と，41.1 m/s で異常であるのに比し，M波の振幅及び面積は6例中5例で異常を認め，M波の異常を認めな

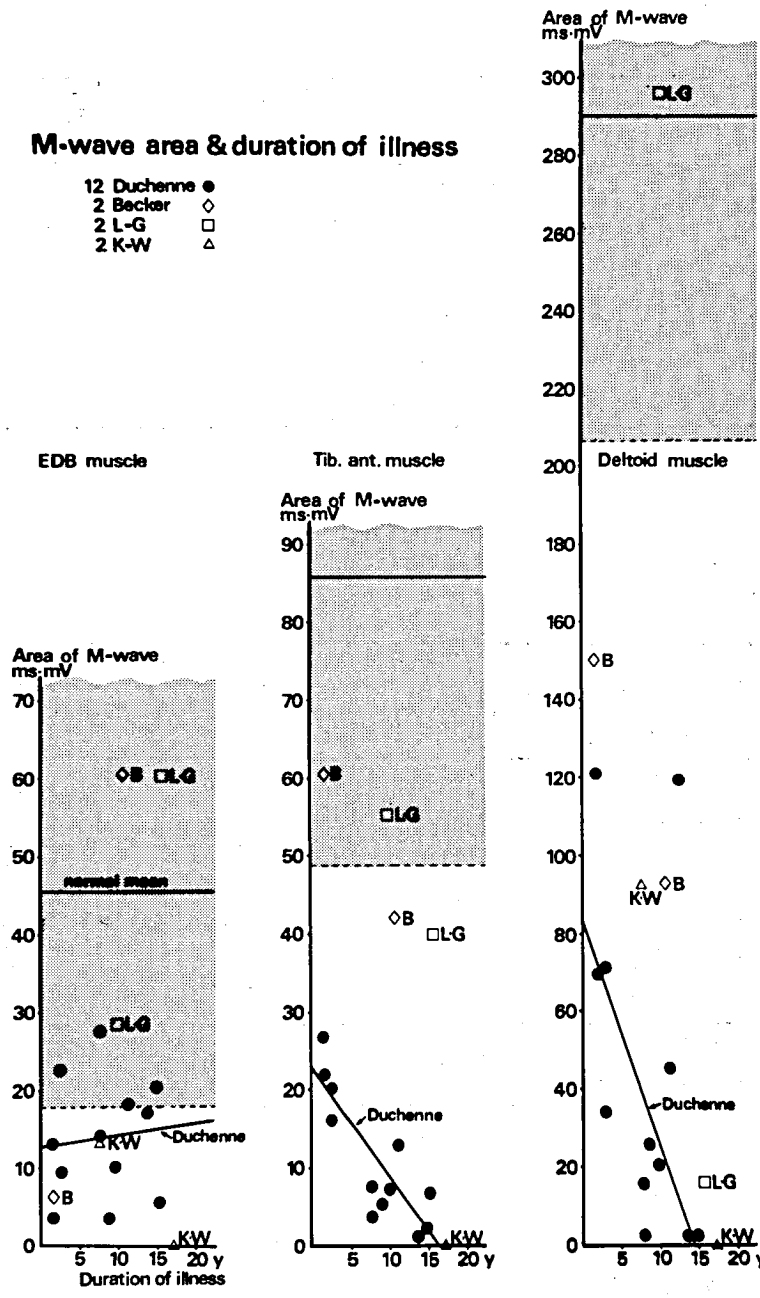


図2　DMPとK-W病におけるM波の面積と有病期間
左から短指伸筋，前脛骨筋，三角筋よりM波を導出した結果を正常値と共にグラフに示した．

表2　胸腺摘除術により臨床症状の改善をみた症例2，4，5では，下線のように徒手筋力テストの改善と平行してM波も改善している．抗 Ach receptor 抗体は必ずしも臨床症状の改善と平行しないが，M波は平行し，客観的指標として有用である．

	Age	Sex	Osserman classification	抗 Ach Receptor 抗体(正常<0.6) 術前2週 → 術後4週	Manual Muscle Test Deltoid M. 術前1ヶ月 → 術後2ヶ月	M波の変化(術前100%) Deltoid M. amplitude	area
1	31y	F	II_B	12.6 → 4.6	−2 → −3	41%	37%
2	69	M	II_B	5.4 → 7.3	−2 → −1	125%	133%
3	70	F	II_A	11.5 → 4.3	−1 → −3	38%	28%
4	27	F	II_B	6.9 → 5.8	−1 → 0	131%	133%
5	51	F	II_B	8.5 → 2.0	−1 → 0	450%	457%
6	38	F	II_A	39.5 → 26.5	−1 → −1.5	52.6%	91.2%

表3　軸索変性を主体とするニューロパチーではMCVは正常でもM波の振幅や面積の低下がみられることがある．水俣病認定患者6症例では，下線のようにMCVの遅延は2例，M波の異常は5例に認めた．症例6はMCVもM波も正常で，臨床的にも末梢神経障害は認めなかった．

検査項目 / 水俣病認定患者	左腓骨神経 MCV (正常:43-57 m/s)	下腿の皮膚温 (正常:33.5±0.6℃)	EDBより記録したM波の分析 振幅 正常平均値の%	面積 正常平均値の%
1　73才　女	44.3 m/s	32.5℃	8.6%	15.0%
2　69才　女	no response	30.3	no response	no response
3　34才　男	49.1	31.4	68.6%	70.0%
4　29才　男	44.4	31.5	11.4%	16.3%
5　49才　男	41.1	32.0	17.9%	18.8%
6　63才　男	43.5	31.2	141.0%	161.6%
平均52.8±16.9才	44.5±2.6 m/s (5例の平均)	31.5±0.7℃	49.5±50.7% (5例の平均)	56.3±56.5% (5例の平均)

(下線は異常に低値の場合)

かった1例は臨床的にも末梢神経障害を示す所見はなく，中枢神経系の異常を示す症例であった．

糖尿病患者32名では，腓骨神経MCVが正常範囲でも，M波の面積が低下している症例が32名中8名認められた．糖尿病性ニューロパチーでは節性脱髄が主体と言われているのでMCVがよい指標となるはずであるが，近年本疾患でも軸索変性が末梢では起こっていることが形態学的にも示されている[5]ことから，M波の面積低下は電気生理学的にも本疾患に軸索変性が伴っている可能性を示唆する所見と考えられる[6),7)]．

考　察

M波発現に関係する下位運動ニューロンから

筋肉に至る一連の経路の中で，今回は末梢神経，神経筋接合部，筋肉の各疾患について検討したところM波分析が有用な場合は以下の通りである．

1） DMP（Duchenne, Becker, L-G型），及びK-W病では，経過観察の客観的指標としてM波の分析は有用であり，検査した時点において残存するNMUの総和的指標を複合筋電位という形で表現する．治療法が開発されれば効果判定の指標として用い得る．

2） 重症筋無力症

胸腺摘除術や全身放射線照射療法（100Rad/5週）等の治療効果判定に客観的指標として役立つ．

3） ニューロパチー

臨床的にはニューロパチーがあると考えられる症例でも，末梢神経伝導速度は正常のこともあり，特に軸索変性を主体とするニューロパチーではこの傾向がある．M波の検索はニューロパチーの補助診断法として，特にaxonal neuropathyでは，MCVより鋭敏な指標となる．

筋疾患の主症状は筋力低下と筋萎縮であるが，特に筋力低下の検査法としては徒手筋力テスト，握力計等があるが，その他には数量的に表現する手段が乏しい．M波はNCVのように特異的な指標ではなく，運動ニューロン，末梢神経，神経筋接合部，筋肉のどこかに障害があればM波の振幅や面積の低下が起こり得るが，又反面臨床診断と共にM波を応用すれば，ニューロパチー以外にも種々の神経筋疾患に応用することが可能である．そしてM波の振幅や面積が表現するものは検査した時点において疾病により障害されながらも，運動機能として残存している能力を複合筋電位という形で数量的に示すことである．

結　　語

正常者，筋ジストロフィー症及びその他の神経筋疾患合計78例を対象にM波の検討を行った．M波は末梢神経障害におけるNCVの様に特異的な検査法ではないが，臨床所見及び診断と合わせてM波を記録すれば，筋疾患及び神経筋接合部，軸索，髄鞘に障害を来す種々の神経筋疾患の経過観察及び治療効果判定のために，定量的指標として有用である．

文　　献

1) 満留昭久：小児末梢運動神経伝導速度および誘発筋電位の発達に関する研究．福岡医誌，68：449-458，1977．

2) 栗原照幸，鶴田和仁，荒木淑郎：末梢神経伝導速度とM波の検討：家族性アミロイドポリニューロパチーと糖尿病性ニューロパチーへの適応．臨床神経，20：241-247，1980．

3) 栗原照幸，田中政幸：筋ジストロフィー症における誘発筋電位（M波）の研究．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究（三好班），昭和56年度研究報告書，1982，pp. 129-134．

4) Engel, W. K., Lichter, A. S., et al：Splenic and total body irradiation treatment of myasthenia gravis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 377：744-754，1981．

5) 八木橋操六：糖尿病患者および糖尿病ラットの末梢神経病変――病理組織学的変化およびその関連性について――．糖尿病性神経障害（後藤由夫，堀内光・編），文光堂，東京，1979，p. 51．

6) Hansen, S. & Ballantyne, J. P.：Axonal dysfunction in the neuropathy of diabetes mellitus：a quantitative electrophysiological study. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 40：555-564，1977．

7) Kuribayashi, T., Kurihara, T., Tanaka, M., et al：Diabetic neuropathy and electrophysiological studies：Evoked muscle action potentials, nerve conduction, and short latency SEP. In "Proceedings of the International Symposium on Diabetic Neuropathy and its Treatment"，（edited by Goto, Y., Horiuchi, A. & Kogure, K.），Excerpta Medica, Amsterdam, 1981，pp.120-124．

29) A23187-induced myopathyにおけるカルモデュリン・プロスタグランジンの役割に関する生理学的検討

高守正治*

研究協力者　新田永俊*　糸氏　薫*　駒井清暢*
坂戸俊一*　松原四郎*　奥村誠一*
安田厚子*

目　的

筋表面膜異常により細胞内へ流入したCa^{++}によって，Ca^{++}-sensitive proteases賦活[1]，ATP depletion[2]などを介し招来される筋細胞壊死の機序[3]が，筋ジストロフィー症病因の一つとして提唱されて久しく，カルシウム・イオノフォアA23187はその特徴的な薬理作用[4]から，本病実験モデル検討のための有用な因子として知られている．われわれは，本薬剤で処理したラット横隔膜筋について，膜特性の変化[5]，収縮弛緩機構異常[6]を解析し，ヒト・ジストロフィー筋との異同を論じて来た．近年，アラキドン酸からのプロスタグランジン（PG）$E_2, E_{2\alpha}$産生が骨格筋内でも起りうることが明らかにされ[7]，この間には，細胞内過剰Ca^{++}, calmodulin, phospholipase A_2, membrane phospholipidsの介在が示唆されている[8)-11)]ことから，本研究では，A23187による筋細胞内機構変化におけるこのPG系の役割の評価，検討を試みた．

方　法

ウイスター系雄ラット（220～280g）から横隔膜筋をとり出し，その切除片（乾燥重量19～28mg）をガス負荷（$O_2+CO_2=95:5$）中のリンゲル液（37℃）で灌流しつつ等尺性筋張力計にセット（最大単収縮張力が得られる静止時張力にセット），白金板電極によるmassive stimulation（0.5msec duration）にて筋直接刺激（D-Tubocurarine chloride 6 μg/ml添加で筋内神経刺激の可能性除去）し，単収縮張力，166Hz反復刺激による強縮張力を記録した．リンゲル液の構成は，122mM NaCl, 4.7mM KCl, 15.5mM $NaHCO_3$, 1.2mM $MgCl_2$, 1.2mM KH_2PO_4, 2.6mM $CaCl_2$, 11.5 mM glucoseである．A23187は1 mg/mlの割合でエタノールで溶解，リンゲル液で最終濃度を10 μg/mlとした．

薬理学的処理（図1）は，Aspirin（5×10^{-4}M），Indomethacin（2.8×10^{-6}M），Leupeptin（3×10^{-5}M）で15分間処理にひき続き，各薬剤それぞれとA23187（10μg/ml）との混合液で30分間処理後，単収縮，強縮張力を記録し，各処理前記録の張力（100%）からの変化を%で算出した．また同様の方法で，まずLeupeptin（3×10^{-5}M）で15分間処理後，これにPGE_2（2.8×10^{-6}M）を加えた液内で30分間処理して，張力曲線を記録し，処理前のそれとの変化を%で示した．次に，それぞれの変化の%を，A23187（10μg/ml），PGE_2（2.8×10^{-6}M）単独で30分間処理した前後の単収縮，強縮張力の変化の%と対比した．Arachidonic acid（5×10^{-6}M）単独およびAspirin（5×10^{-4}M）前処置（15分）にひきつづくこれとArachidonic acidとの混合液による処理（30分）についても同様である．Calmodulin inhibitor, Trifluoperazine（50μM）によるA23187（10μg/ml）処理変化に対する修飾の定量的評価についても同様の観察法を行った．

結　果

図2に示す通り，A23187単独処理後の単収縮

*金沢大学医学部神経内科

(Pt)，強縮張力（Po）は，処理前（100%）に比べて Pt，37±9.1%，Po，34±8.8%（n＝6）と著明な低下を示すのに対して，Aspirin による前および添加処理（n＝8）後 Pt，66±6.6%（$p<0.001$），Po，65±5.3%（$p<0.001$），Indomethacin による前および添加処理（n＝6）後 Pt，65±8.6%（$p<0.001$），Po，57±9.8%（$0.001<p<0.005$），Leupeptin による前および添加処理（n＝6）後 Pt，78±7.7%（$p<0.001$），Po，73±7.7%（$p<0.001$）と有意の差がみられた．PGE_2単独処理（n＝4）後の Pt，63±9.4%，Po，52±11.3%という著明低下も，Leupeptin による前および添加処理（n＝4）を行うと，Pt，85±6.4%（$0.005<p<0.01$），Po，85±8.9%（$0.001<p<0.005$）と有意の改善をみとめた．Inhibitors として用いた Aspirin, Indomethacin, Leupeptin 単独（前処理）では，Pt，Po に有意な変化は見出さなかった．図3に A23187単独処理および Aspirin, Indomethacin, Leupeptin それぞれの前・添加処理後の単収縮，強縮張力の変化の実例を示す．図4では PGE_2単独処理およびこれを Leupeptin で前・添加処理した場合の張力の変化の実例を示す．

図5には，Arachidonic acid 単独処理による単収縮，強縮張力の著明な低下が，Aspirin の前・添加処理で有意な阻止を受けることを示している．図6では，Calmodulin 阻害剤である Trifluoperazine（50μM）単独および A23187との相互作用を，単収縮，強縮張力を指標としてみたものである．両処置による著明な張力低下がみとめられた．

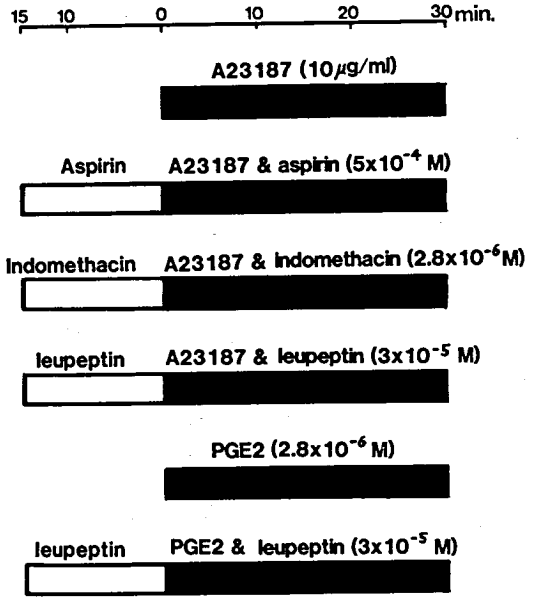


図1　薬理学的実験プログラム．

考　　察

カルシウム・イオノフォア A23187による外液からの Ca^{++}influx[4] によってもたらされた筋張力の著明な低下（図2，3）は，細胞内過剰 Ca^{++} による筋細胞崩壊[12),13)] を反映するものとして解釈される．既報[8)] のわれわれの A23187を用いた生理実験では，強縮力の著明低下に比べ単収縮力低下は軽度に止まったのに対して，本研究では両張力とも著明低下を示した．これは，本研究の場合，薬理学的処理期間中，被検筋はストレンゲージに掛け経過観察を行ったため tension が加わったのが原因の一つとして推定される[14)]．

A23187によるこの張力の低下は，lysosomal thiol proteases の inhibitor である Leupeptin[15)] で部分的ながら阻止されるとともに，Aspirin, Indomethacin など PG inhibitors によっても有意な阻止を受けた（図2，3）．また，PGE_2処理も筋張力の低下を惹起し，これが上述の lysosomal inhibitor で有意な阻止を受けうることも明らかにした（図2，4）．これらの事実は，A23187による張力低下から推察される筋細胞内過剰 Ca^{++}から筋細胞崩壊に至る機序の中に，PGE_2が介在することを示唆する．事実，PG precursor である Arachidonic acid にも骨格筋張力低下作用があり，これが PG inhibitor で阻止を受けることも証明した（図5）．近年，Arachidonic acid からの PGE_2，$F_{2\alpha}$ 産生が骨格筋内で起こりうることが明らかにされるとともに[7)]，membrane phospholipids から Arachidonic acid を含む脂肪酸の遊離には，Calmodulin を介し，細胞内過剰 Ca^{++} によって賦活された Phospholipase A_2が関与するといわれる[8)]．Phospholipase A_2[16)] および Arachidonic acid[17)] は一方で筋小胞体の Ca^{++}

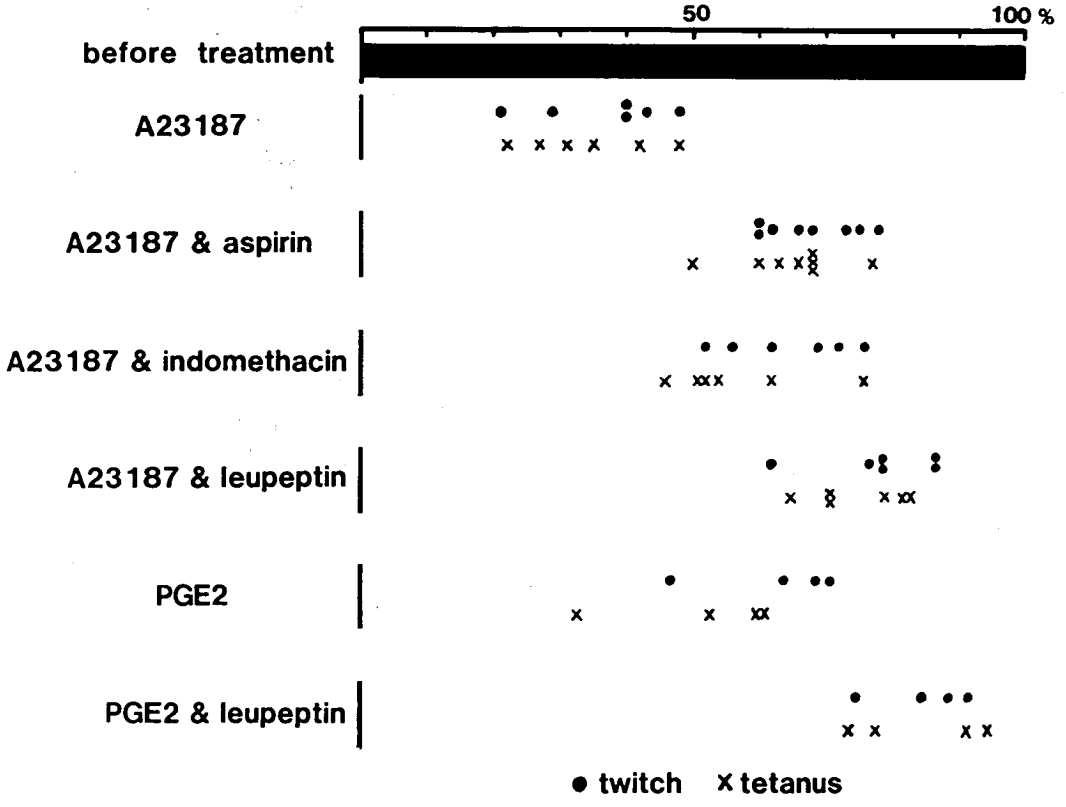


図2　A23187, PGE_2単独処理およびこれらとPG inhibitors, lysosomal inhibitorとの組み合せ処理による単収縮（●），強縮張力（×）の低下を，各処理前の張力を100として%で示す．

transportに対して抑制作用があり，細胞内free Ca^{++}濃度はこの機序によって一層高められることになる．かくてその合成が促進されたPGE_2, $F_{2\alpha}$はlysosomal enzyme release[18]に関与し筋細胞崩壊へ至ることが推察されており，PGE_2の筋張力低下作用がLeupeptinで部分的ながら阻止される事実（図2，4）からも，PGE_2の標的がlysosomal apparatusにあることが推定されるものの，細胞壊死に至る機序の詳細はなお明確ではない．

上述したCalmodulinのこの系における役割を，われわれの生理学的方法で確認するため行った結果は図6に示す通りで，Calmodulin inhibitorとして知られるTrifluoperazineは，それ単独処理でも筋張力を低下せしめ，A23187の添加はこれを一層悪化せしめた．これは，Trifluoperazineの諸薬理作用のうち，筋小胞体[19]，ミトコンドリア[20]のCa^{++}-uptake阻止作用，Ca^{++}-Mg^{++} ATPase活性阻害作用などで，細胞内free Ca^{++}濃度を高め，この点でA23187と共通の働きをなす結果と推察される．

近年，除神経筋のPGE_2含量の増加とその病態との関連に関する報告[21]もあるが，本研究は，ジストロフィー筋についても，その病因にかかわる膜異常・Ca^{++}論の一面が，少なくとも*in vitro*実験によってプロスタグランジン系からも示唆されうることを報告した．なお，Horrobinら[22]によって提唱されているDuchenne dystrophyのPGs

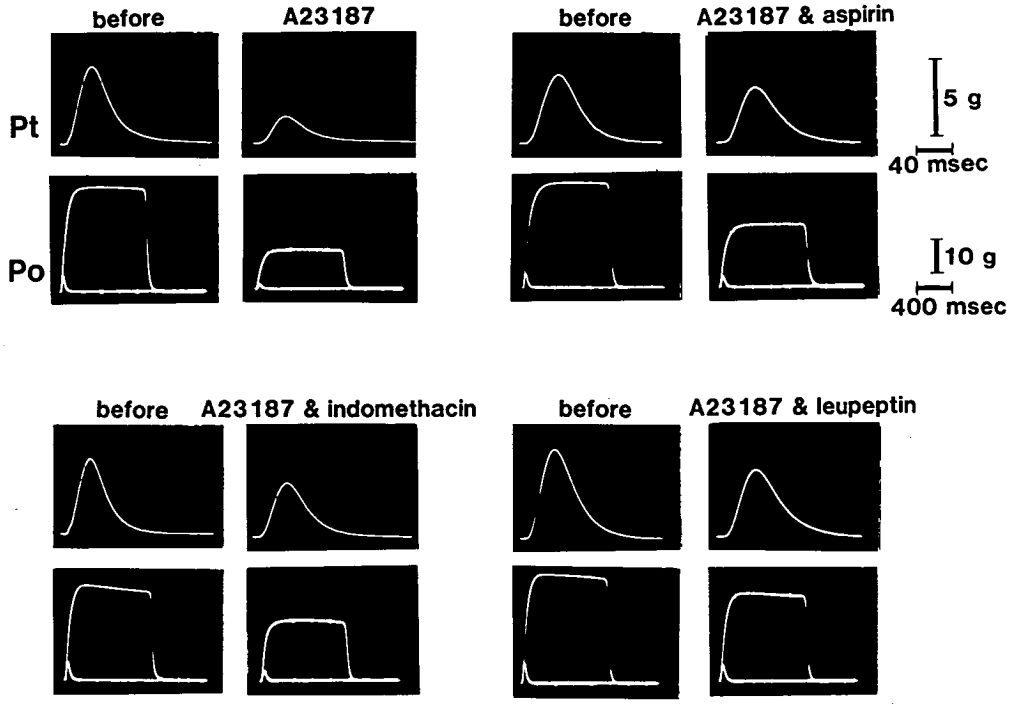


図3　A23187 (10μg/ml) 単独処理による単収縮 (Pt)，強縮張力 (Po) の著明な低下が，Aspirin (5 ×10⁻⁴M)，Inomethacin (2.8×10⁻⁶M)，Leupeptin (3 ×10⁻⁵M) による前・添加処理により，部分的ながら阻止されることを示す（ラット横隔膜筋，37℃）.

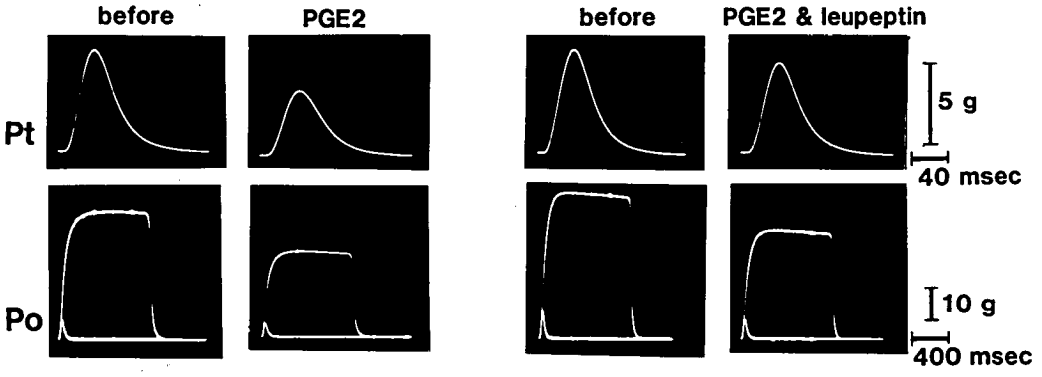


図4　PGE_2 (2.8×10⁻⁶M) 単独処理による単収縮 (Pt)，強縮張力 (Po) の低下が，Leupeptin (3 ×10⁻⁵M) による前・添加処理により部分的ながら阻止されることを示す（ラット横隔膜筋，37℃）.

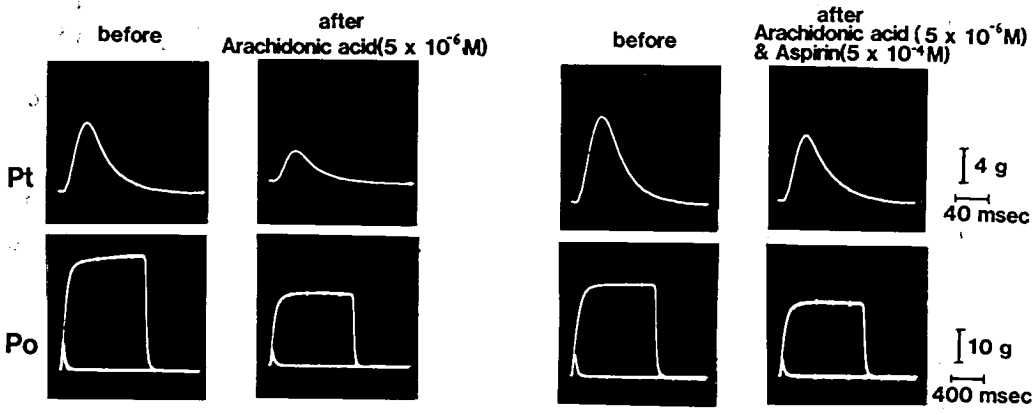


図5　Arachidonic acid30分間処理による単収縮(Pt)，強縮張力（Po）の著明な低下（左）は，これにAspirinによる前処理15分間，添加処理30分間を加えることにより部分的ながら阻止を受ける（ラット横隔膜筋，37℃）.

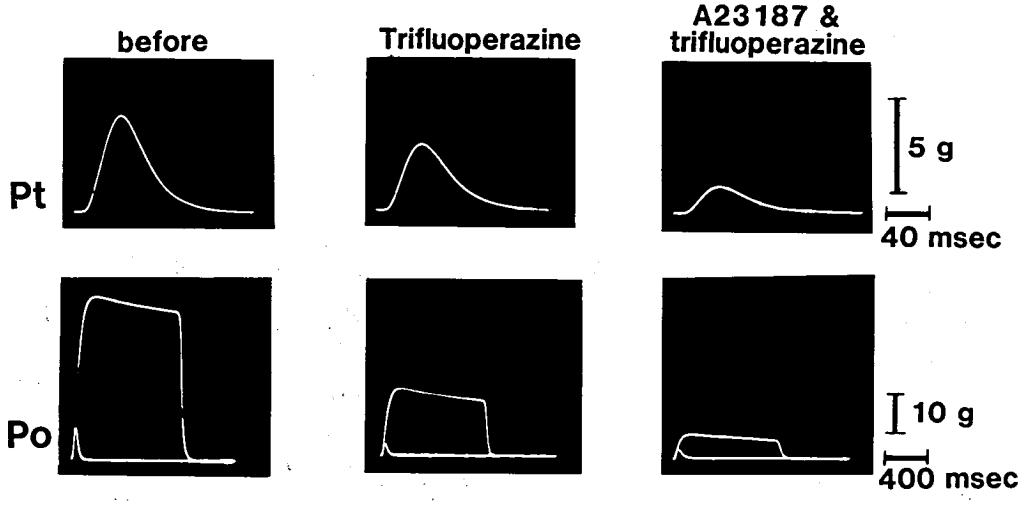


図6　ラット横隔膜筋の単収縮(Pt)，強縮張力(Po)は，Trifluoperazine（50μM）単独処理15分間にて低下し，さらに，これにA23187（10μg/ml）を加えて30分間処理すると一層の低下を示した（37℃）.

theory は，細胞内過剰 free Ca^{++}をつくる原因についての仮説であって，われわれがここで述べてきたものとは異なるものである．

結　語

カルシウム・イオノフォア A23187による骨格筋単収縮，強縮張力の低下は，lysosomal thiol proteases の inhibitor である Leupeptin 同様，PG inhibitor である Aspirin, Indomethacin によって阻止され，PGE_2による筋張力低下は，Leupeptin で阻止された．筋細胞内過剰 Ca^{++}から細胞壊死に至る機序に介在するプロスタグランジンの役割につき考察を加えた．

文　献

1) Kar, N. C. & Pearson, C. M. : Muscular dystrophy and activation of proteinases. Muscle Nerve, 1 : 308-313, 1978.

2) Wrogemann, K. & Pena, S. D. J. : Mitochondrial calcium overload—A general mechanism for cell necrosis in muscle diseases. Lancet, i : 672-673, 1976.

3) Schanne, F. A. X., Kane, A. B., Young, E. E. & Farber, J. L. : Calcium dependence of toxic cell death : A final common pathway. Science, 206 : 700-702, 1977.

4) Grinstein, S. & Erlij, D. : Action of insulin and cell death—Effect of ionophore A23187. J Membr. Biol., 29 : 313-328, 1976.

5) Takamori, M., Ide, Y. & Tsujihata, M. : Pharmacophysiological study on muscle treated with calcium ionophore A23187. J. Neurol. Sci., 50 : 89-94, 1981.

6) Takamori, M., Mori, K., Ide, Y. & Tsujihata, M. : Contractile and chemosensitive properties of muscle treated with calcium ionophore A23187. J. Neurol. Sci., 51 : 207-215, 1981.

7) Rodemann, H. P. & Goldberg, A. L. : Arachidonic acid, prostaglandin E_2 and F_2 influences rates of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. J. Biol. Chem., 257 : 1632-1638, 1982.

8) Wong, Y.-K. & Cheung, W. Y. : Calmodulin stimulates human platelet phospholipase A_2. Biochem. Biophys. Res. Comm., 90 : 473-480, 1979.

9) Lapetina, E. G. & Cuatrecasas, P. : Rapid inactivation of cyclooxygenese activity after stimulation of intact platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76 : 121-125, 1979.

10) Billah, M.M., Lapetina, E.G. & Cuatrecasas P. : Phospholipase A_2 and phospholipase C activities of platelets. Differential substrate specificity, C^{2+} requirement, pH dependence, and cellular localization. J. Biol. Chem., 255 : 10227-10231, 1980.

11) Kunze H. & Vogt M. : Significance of phospholipase A_2 for prostaglandin formation. Ann. N. Y. Acad. Sci., 180 : 123-125, 1970.

12) Uchino M. & Chou S. M. : Effects of calcium ionophore, A23187 on murine muscle. Proc. Jap. Acad., 56 (B) : 480-485, 1980.

13) Pestronk, A., Parhad, I.M., Drachman, D.B. & Price, D.L. : membrane myopathy : Morphological similarities to Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve, 5 : 209-214, 1982.

14) Kameyama, T. & Etlinger, J.D. : Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degradation in muscle. Nature (Lond.), 279 : 344-346, 1979.

15) Libby, P. & Goldberg A.L. : Leupeptin, a protease inhibitor, decreases protein degradation in normal and diseased muscles. Science, 199 : 534-536, 1978.

16) Howard, B. D. : Perodate increases the sensitivity of sarcoplasmic reticulum to phospholipase A_2. Biochem. Biophys. Res. Comm., 104 : 1175-1181, 1982.

17) Cheak, A.M. : Effect of long chain unsaturated fatty acids on the calcium transport of

sarcoplasmic reticulum. Biochem. Biophys. Acta., 648 : 113-119, 1981.

18) Nakanishi, M. & Goto, K. : Inhibitory effects by anti-inflammatory drugs on enzyme release from rabbit polymorphonuclear leukocyte lysosomes. Biochem. Pharmac., 24 : 421-424, 1975.

19) Chiesi, M. & Carafoli, E. : The regulation of Ca^{++} transport by fast skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Role of calmodulin and of the 53,000-dalton glycoprotein. Biol. Chem., 257 : 984-991, 1982.

20) Reinhart, P.H., Taylor, W.M. & Bygrave, F. L. : Trifluoperazine, an inhibitor of calcium action, antagonises phenylephrine-induced metabolic responses and mitochondrial calcium fluexes in liver. FEBS Lett., 120 : 71-74, 1980.

21) Larson, F.L., Katz, S. & Roufogalis, B.D. : Calmodulin regulation of Ca^{2+} transport in human erythrocytes. Biochem. J., 200 : 185-191, 1981.

22) Jaweed, M.M., Alam, I., Herbison, G.J. & Ditunno, Jr.J.F. : Prostaglandins in denervated skeletal muscle of the rat : Effect of direct electrical stimulation. Neuroscience, 6 : 2787-2792, 1981.

23) Horrobin, D.F., Morgan, R.D., Karmali, R.A., Ally, A.I., Manku, M.S., Karmyn, M. & Cunnane, S.C. : Thymic changes in muscular dystrophy and evidences of abnormality related to prostaglandin synthesis or action. Ann. N.Y. Acad. Sci., 317 : 534-547, 1979.

30) 筋病変とミオグロビンの局在
——酵素抗体法(PAP法)による観察——

出田　透*

研究協力者　植川和利**　上野　洋**
吉田　理**　内野　誠**

はじめに

これまで，各種神経筋疾患における血中ミオグロビン(Mb)の測定，家兎によるMbの代謝，排泄について検討してきた[1)2)]．今回は，酵素抗体法[3)]による筋線維内のMb染色を試み，筋線維内Mbの局在や筋病変に伴うMbの動態について，HE染色，Gomori trichrome染色変法，ATPase，NADH-TRなどの組織化学的観察と比較検討を加えた．

これまでの放射能活性による血清中Mb測定が漏出Mbの全体的な把握に供するのに対し，酵素抗体法[3)]による筋線維内のMb染色による観察は，筋肉の破壊壊死による高Mb血症の病態を肉眼的に観察できるものと考えられる．

方　法

1) 染色法について

酵素抗体法としては，DAKO社製のPAP kitとヘキスト社製の抗ヒトミオグロビン血清(家兎)を組み合せてMb染色を施行した．

生検筋より凍結切片標本を作製し，過酸化水素H_2O_2水で，組織中の内因性パーオキシダーゼを破壊するとともにメタノールで組織固定をおこなった．その後，図1に示す手順によりMb染色を施行した．施行に先がけて，まず，抗ヒトミオグロビン血清（家兎）とDAKO PAP kitとの至適な反応条件を得るために，抗ヒトミオグロビン抗体の½倍稀釈液を作製し，それぞれ濃度別の染色性についてチェックをおこなった．その結果（表1)，128倍稀釈液で最も鮮明な染色がおこなわれたので，以下，この稀釈液でMb染色を施行した．

2)組織化学的観察

連続凍結切片について，HE染色，Gomori trichrome染色変法，ATPase，NADH-TRを施行し比較検討を加えた．

結　果

1)Mb染色法について

抗ヒトミオグロビン抗体（ヘキスト社製）とDAKO PAP kitを組み合わせることにより，筋線維内のMb染色が可能となった．この染色の際の抗Mb血清濃度はback groundの染色性，3-

凍結切片
↓
固定(H_2O_2，メタノール)
↓
ブタ正常血清
↓
一次抗体(抗ヒトMb抗体)
↓
二次抗体(抗家兎免疫グロブリン抗体)
↓
peroxidase antihorseradish peroxidase (PAP) complex
↓
基質緩衝液(AEC，H_2O_2)
↓
Mayerヘマトキシリン染色
↓
包　埋

図1　酵素抗体法によるMb染色の手順

＊熊本大学保健管理センター
＊＊熊本大学医学部第一内科

表1　抗Mb抗体濃度と染色性の関係

抗Mb抗体稀釈度	back ground の染色性	AECの発色度
1/1	(+++)	(+)
1/2	(+++)	(+)
1/4	(+++)	(++)
1/8	(++)	(++)
1/16	(++)	(++)
1/32	(++)	(++)
1/64	(++)	(++)
1/128	(+)	(+++)
1/256	(+)	(++)

amino 9-ethylcarbazole（AEC）の発色度について検討した結果，128倍稀釈で最も鮮明に染色された．筋肉内の内因性パーオキシダーゼ活性の非活性化は，3％ H_2O_2 にて施行した．非活性化のcheckとして，正常家兎血清を抗Mb血清のかわりに使用し，以下PAP法と同じ過程でおこなった．その結果，筋線維内にはAECの発色は全くみられず，組織内パーオキシダーゼ活性の阻止は十分おこなわれているものと判断した．

2)正常筋線維内のMb局在について

正常人（3名）の骨格筋によるMb染色では，横断像で，筋線維内にびまん性に赤褐色に，赤褐色の細顆粒として染色され，縦断像でも，同様にびまん性に染色された．筋線維のtype別にMbの染色性を観察すると，type I fiberにおいて，Mb染色性が強い傾向にあった（図2．a）．

3)疾患別のMb染色について

筋ジストロフィー症（7名），多発性筋炎（5名），Motor neuron disease（3名）について比較検討した．

神経原性筋萎縮例として，筋萎縮性側索硬化症ALS（2名）では，Mb染色とATPase，NADH-TRとの比較の結果，筋線維内Mbは萎縮線維でも，type I fiberでは長期にわたりMbは染色されるのに対し，type II fiberの萎縮では，Mb染色性は低下していた．このように，Mbの筋線維内での保持能には，type別の差異が示唆された（図2．b）．

筋原性筋萎縮症の代表的なものとして，進行性筋ジストロフィー症Duchenne型（5名），肢帯型（L-G型）（1名），筋緊張性ジストロフィー症（2名）について観察した．8歳Duchenne型では，CPK 5950IU/l，HBD 1128U/l，Aldolase 61.5U/lと著明な血清酵素学的な異常が認められた．この例の筋生検像では，筋線維の大小不同，間質の増加に加えて，HE染色に濃染するいわゆるopaque fiberも散見され，典型的な筋病理所見がみられた．この症例のMb染色では，全般にMbの染色性が低下し，連続切片による検討でもMayerヘマトキシリンに濃染する筋線維でのMb染色性の低下がみられた．また，HE染色やGomori trichrome染色変法に濃染するopaque fiberでのMb染色性は低下していた．同様な傾向は，L-G型や筋緊張性ジストロフィー症でも認められた（図2．c）．

多発性筋炎（5名）では，発症時の状態，経過年数などの臨床所見に対応する筋生検像がみられたが，Mb染色でも，細胞浸潤が高度な部位でのMb染色性の低下がみられ，また，HE染色，Gomori trichrome染色変法に濃染する筋線維ではMbの染色性が乏しい傾向にあった．全般に，Mb染色の際のMayerヘマトキシリンに濃染する筋線維でのMb染色性低下がみられた．

考　　案

Mbは骨格筋に重要な酸素の貯蔵能を有し，筋肉の湿重量当り3～9 mg/dlとされている[4]．神経筋疾患の診断に際しては，CPK，LDHなどの血清酵素活性や筋電図，筋生検などが臨床的に用いられている．しかるに，最近，血中Mbの微量測定が可能となり，筋肉の破壊性疾患では，筋肉内のMbを指標として，その破壊壊死部の程度を算出する試みがなされている．我々も，筋肉からの漏出Mbの動態を知るため，家兎による実験結果より，腎臓の役割を強調してきた．しかし，血中Mb濃度と血清酵素との間には正の相関関係はあるものの，必ずしも平行したものではなく，また，Mbには日内変動や運動量の影響などが問題とされている[1),2)]．

筋線維内からのMbとCPKなどの筋漿酵素の漏出のメカニズムは不明であるが，今回施行した筋線維内のMb染色で，神経原性筋萎縮症の筋線維ではMbの染色性が保たれるのに反し，筋ジストロフィー症の筋線維では，全般にMb染色性の低下がみられた．また，特にMayerヘマトキシリンに濃染する筋線維でのMb染色性が低下していた．

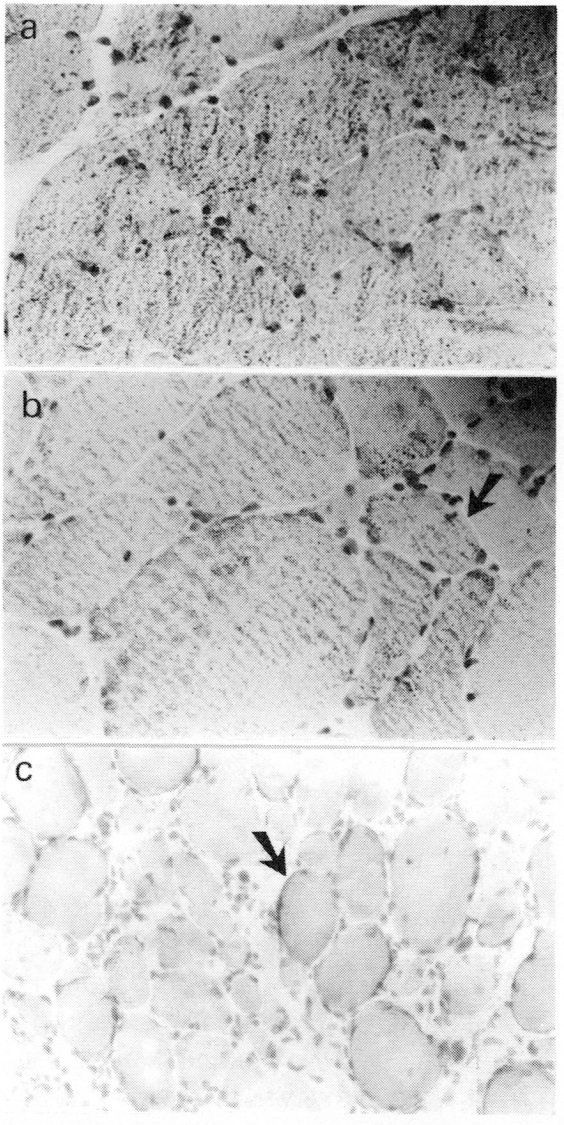


図2 a. b. c 酵素抗体法によるMb染色（Mayerヘマトキシリン核染色）

(a)健常人

筋線維内のMbはびまん性に細顆粒状に観察される．

(b) ALS

Small group atrophyがみられるが，Mb染色性が保たれている．（矢印）

(c) Duchenne型筋ジストロフィー症

Mb染色では全般に著しく染色性が低下し，とくにMayerヘマトキシリンに濃染する筋線維で低下している．（矢印）

神経原性萎縮線維では長期にわたり，Mbの染色性が保たれる点を考慮すると，筋鞘膜はほぼ正常な機能を有しながら，神経からのtrophic factorの欠如などのメカニズムが筋萎縮の進展に主な役割を演じていることも可能性として考えられる．

多発性筋炎では，細胞浸潤が高度で筋線維の破壊壊死が高度な部位で染色性が低下していた．染色性の低下の原因としては，筋線維に（細胞浸潤など）外的な因子の関与により，局所的な筋線維の破壊壊死が生じ，その部位のMb喪失がおこるためと考えられる．

酵素抗体法による筋線維のMb染色はこれを従来の組織学的あるいは組織化学的手法と組み合せ，対比検討することにより筋病変の多面的な観察を可能ならしめるものと期待される．我々は今後主として筋ジストロフィー症や多発性筋炎について筋線維の変性，再生過程におけるMbの動態をより詳細に観察していく予定である．

昭和57年度厚生省神経疾患研究委託費№82-04によって行なわれた．

文　献

1) 植川和利，ほか：Myoglobin（Mb）の代謝回転，尿中排泄の機序について．日本神経学会総会，1982年5月，東京．

2) 植川和利：神経筋疾患におけるミオグロビン測定の臨床的評価．熊本医会誌（印刷中）．

3) Sternberger, L. A.；Immunocytochemistry（2nd ed.）John Wiley and Sons, New York, 1979.

4) 三好和夫，ほか：ミオグロビンと筋疾患並びに心筋疾患．筋の構造と機能．酒井敏夫，遠藤実，杉田秀夫編集，医学書院，東京，1977，p.581－594.

31）血清ミオグロビンの変動パターンからみた筋・心筋疾患ならびに運動時の筋崩壊量の推定

川　井　尚　臣*

研究協力者　足　立　克　仁*　今　井　幸　三*　乾　　俊　夫*
増　田　健二郎*　藤　本　浩　史*　三　好　和　夫*,**

著者らの教室ではさきに人ミオグロビン（Mb）のラジオイムノアッセイ（RIA）を開発し，これを用いて各種の筋疾患，心筋疾患などにおける血中，および尿中Mbの上昇や変動パターンを明らかにしてきた[1)-5),7)]．

今回は，これらの成績を用いて各種の場合の血中への総流出Mb量を算出し，推定筋崩壊量を推定した．これによって各種疾患ないし病態の筋の崩壊機序を明らかにしたい．

対象と方法

対象は悪性高熱と亜悪性高熱5例（6歳～40歳），筋ジストロフィー症Duchenne型（DMD）18例（2歳～25歳），Becker型4例（20歳～45歳），肢帯型（LG）5例（24歳～41歳），顔面・肩甲・上腕型（FSH）4例（23歳～45歳），先天性筋ジストロフィー症（CMD）3例（5歳～8歳），筋緊張性ジストロフィー症5例（36歳～58歳），多発性筋炎4例（23歳～49歳）ならびに急性心筋梗塞6例（46歳～74歳），そして健常人の各種スポーツ21例（20歳～45歳）すなわち，長距離走（14km）5例，野球5例，サッカー4例，ゴルフ7例などである．

検索例のうち悪性高熱，急性心筋梗塞，運動負荷（各種スポーツなど）については，発症後あるいは運動後上昇する血清Mbの変動パターンを用いて総流出Mb量を算出し，この量より筋崩壊量を推定した．また筋ジストロフィー症各型，多発性筋炎などの安静時に血清Mbの上昇がみられるものについてはその値から推定筋崩壊量（1日（24時間））を同様の方法で推定した．

総流出Mb量ならびに筋崩壊量の算出法は，Robertsら[6)]の計算式を用いて行った．この方法は急性心筋梗塞時に増加する血清クレアチンキナーゼ（CK）の変動パターンより梗塞心筋量を算出するのに用いられた計算法である．

すなわち，急性心筋梗塞時の血清酵素の動態は，

$$\frac{dE(t)}{dt}=f(t)-kd\cdot E(t) \quad \cdots\cdots(1)$$

と表わされる．そして梗塞量（IS）は，

$$IS=(K)(BW)\left(\int_0^T f(t)dt\right) \quad \cdots\cdots(2)$$

と表わされる．ここで，

$$K=\frac{DV}{P_{CPK}\ (CPK_N-CPK_I)} \quad \cdots\cdots(3)$$

なお，E(t)：梗塞発症後の血清CPK（CK）値から発症前値を減じた値，f(t)：時間当たりの流出CPK量，$\int f(t)dt$：単位容積当たりの総流出CPK量，kd：CPKの血中減衰率，BW：体重（kg），DV：体重1kg当たりのCPKの拡散分布相（ml/kg），P_{CPK}：流出CPKが血中に出現する割合，CPK_N：正常心筋1g中の含有CPK量（I.U./g），CPK_I：梗塞心筋1g中の含有CPK量（I.U./g），T：血清CPK値が正常値に復するまでの時間．

今回私達は，これら式のCPKをMbに置き換え用いた．

心筋梗塞時の総流出Mb量（ΣMb）は，

$$\Sigma Mb=(IS)\ (Mb_N-Mb_I)$$

と表わすことができる．

＊徳島大学医学部第一内科
＊＊沖中記念成人病研究所

これに(2), (3)を代入して,

$$\Sigma Mb(mg) = \left(\frac{DV}{P_{Mb}}\right)(BW)\left(E(T) + kd \quad E_{(t)}\,dt\right) \int_0^T E(t)\,dt \quad \cdots\cdots(4)$$

となる．本論文ではこの計算式を心筋梗塞以外のものにも用いた．

$$筋崩壊量 = \frac{\Sigma Mb\ (mg)}{筋1g中の含有Mb量(mg/g)}$$

と表わすことができる．

ただし，筋1g中のMb量として心筋梗塞のときは2.25mgを，DMDで13歳までは5mg×1/3，14歳以後は5mg×1/5を用い，これら以外は5mgを用いた．

(4)の式で，ΣMb（mg）を算出するための定数kd, $\frac{DV}{P_{Mb}}$には，健常人における負荷Mbの血中消失曲線（既発表）[7]（図1）を用いた．すなわち，kdは，図の曲線の第2相の勾配として求められ，0.20 h^{-1}であった．また，$\frac{DV}{P_{Mb}}$はkdを(4)式に代入して0.46と計算された．

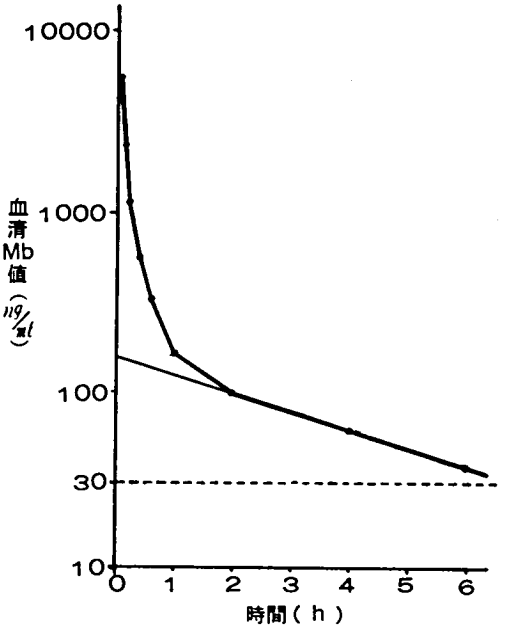


図1　健常人の負荷Mb消失曲線
（人Mb10mg/60kg静注）

結　　果

1．悪性高熱，急性心筋梗塞，ならびに各種スポーツなどにおける推定筋崩壊量

悪性高熱・亜悪性高熱：総流出Mb量は3241～485mgと算出され，これを筋量に換算すると，648～97gと極めて大量であった．また症例によってかなりの幅がみられた．

急性心筋梗塞：総流出Mb量221～56mg，これらが全て心筋から流出したとして計算すると98～25gとなり，相当の大量であった．

各種スポーツ：推定筋崩壊量は長距離走15～2g，野球12～1g，サッカー2～0.3g，ゴルフ1～0gであり，運動の激しいと思われるものほど大きかった．

図2に以上の成績をプロットで示した．

2．筋ジストロフィー症の安静時の推定筋崩壊量

筋ジストロフィー症では持続して筋の崩壊があり，Mbは持続的に血中へ流出しているので，安静時の血清Mbをもとにして，一日の筋崩壊量を推定した．

DMDでは26～2gであり，年齢によってかなり幅がみられた．Becker型では3～2g，LG型6～1g，FSH型2～0.5g，CMD 5～1g，筋緊張性ジストロフィー症4～1gであり，これらの病型では6gまでであった．多発性筋炎では70～4gと多かった．これらの成績を図3にプロットで示した．

DMDの年齢と筋崩壊量との関係：年齢の低いもの（幼児）では多く，10歳前後まで急速に減少し，それ以後は少なく，ほぼ横ばいであった（図4）．

3．DMDの運動負荷による推定筋崩壊量

独歩可能のDMD患者（9～11歳）に運動を負荷すると血清Mb値ははじめの93～190ng/mlから運動終了直後660～1200ng/mlと上昇し，その後安静によって，次第に減少し，12時間後にはほぼ前値近くまで下降した．

このときの増加Mb値から血中への増加Mb量を算出し，これを運動負荷によって増加した筋の崩壊量として計算した．結果は多いもので9g，少ないものでも4gであった．これらの値は健常

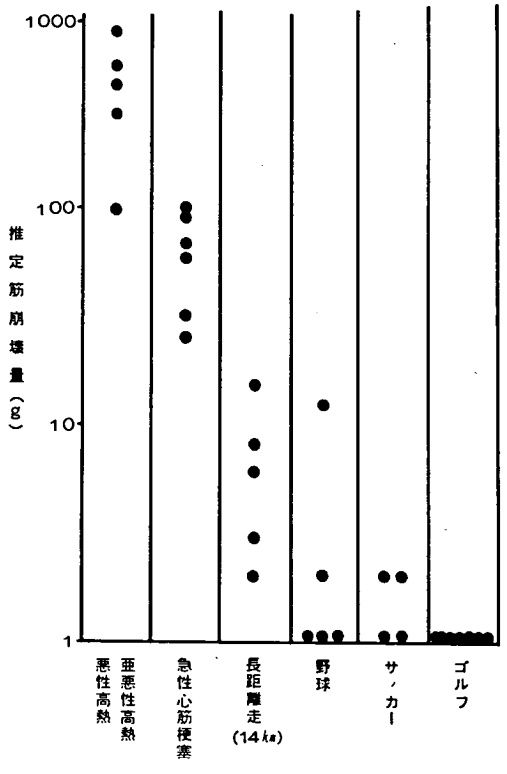


図2　筋・心筋疾患並びに運動時の推定筋崩壊量

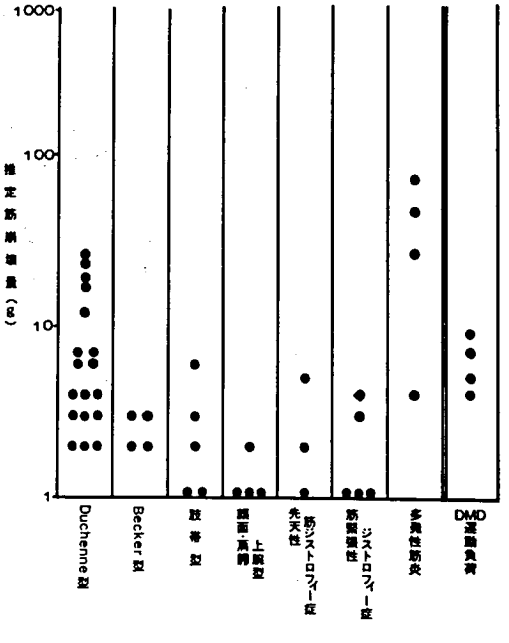


図3　筋ジストロフィー症の安静時推定筋崩壊量（1日）

人の激しいスポーツなみであった．成績はプロットで図3中に示した．

4．血清Mbの最高値と推定筋崩壊量との関係

血清Mbの上昇と変動を示した疾患のMb値の最高値と推定筋崩壊量との関係を図5に示した．縦に推定筋崩壊量（g）を，横に最高値（ng/ml）を対数目盛でとり，それぞれの症例の成績をプロットしてある．体重の少ない小児例を除いてほぼ直線関係がみられる．この直線によって，各種の筋崩壊時において，血清Mb値の最高値から崩壊筋量の大凡を知ることができる．

考　　察

本文では，当科ですでに血清Mb値，ないしその変動パターンを明らかにしている症例[1)-5)]および各種スポーツ[7)]などの運動負荷例（DMDの運動負荷については今回改めて検索した）について血清への流出Mb量をRobertsら[6)]の計算式を用いて計算し，筋崩壊量を推定した．

彼らの計算式のCKに関する定数をMbのそれに置き換え用いたのであるが，Mbの定数は，さきに著者らが得ている健常人の負荷Mbの消失曲線[7)]から求めた．

推定筋崩壊量は悪性高熱，亜悪性高熱例では648～97gと著しく大量であった．これら疾患には著明なMb尿が認められ，尿中総排泄Mb量からも筋の崩壊量を推定できる．試みに尿中Mb量からの成績（既発表[5)]）と今回血清Mbの総流出量より求めた推定筋崩壊量と比較すると，前者の4例の成績，それぞれ507g，158g，77g，29gに対して後者は648g，457g，268g，97gであった．これらの値は今後Mbの体内代謝や尿中Mb測定の精度を考慮に入れ検討する要があると思われる．

急性心筋梗塞例での98～25gは健常日本人の心の重さ約300gから考慮すると相当の大量である．ただし，この成績はMbが心筋のみから流出したとして算出したものである．著者らは，急性心筋梗塞時には随伴するショックによってMbは骨格筋からも流出すると考えており，このMb量を差し引くと心筋における実際の崩壊筋量ははるかに少ないことが推測される．

各種のスポーツでは，運動量の多いと思われるもので筋崩壊量の多いことが示された．

筋ジストロフィー症では安静時筋崩壊量（1日）

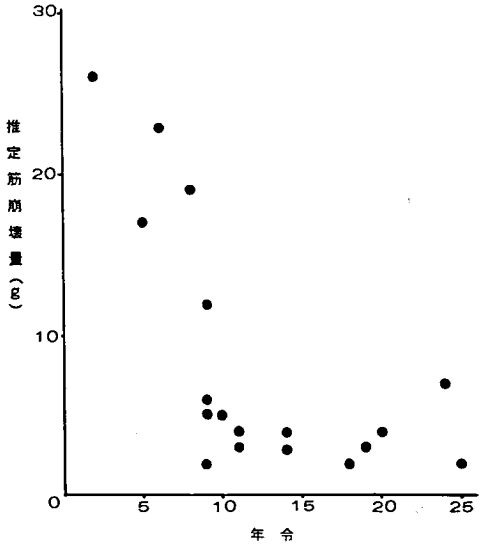


図4　Duchenne型の年齢と安静時推定筋崩壊量（1日）

はDMDで最も多いが，とくに若年者（幼児）で多く，年齢が高いものでは少なかった．若年者では，筋がなお多く残存しており，その後筋量が次第に減少して行く有様が示されていると考えられる．

多発性筋炎（急性期）では，DMDよりもむしろ多い．これは急激に筋力低下の発症する本症の病態をよく反映していると思われる．

DMD症例では運動負荷において血清Mbの上昇がみられるが，この際の増加Mb量より算出した1日筋崩壊量は9～4gであり，健常人の激しい運動（長距離走）なみに多く，本症では運動負荷によってMbが血中に流出し易いことが考えられる．

血清Mbの最高値と筋崩壊量の関係では，前者を横軸に，後者を縦軸にそれぞれ対数目盛でとり，各症例の成績をプロットしてほぼ直線の基準曲線を作った．

この直線上で各種疾患ないし病態の占める位置から，今後それぞれにおけるMbの生成，流出，

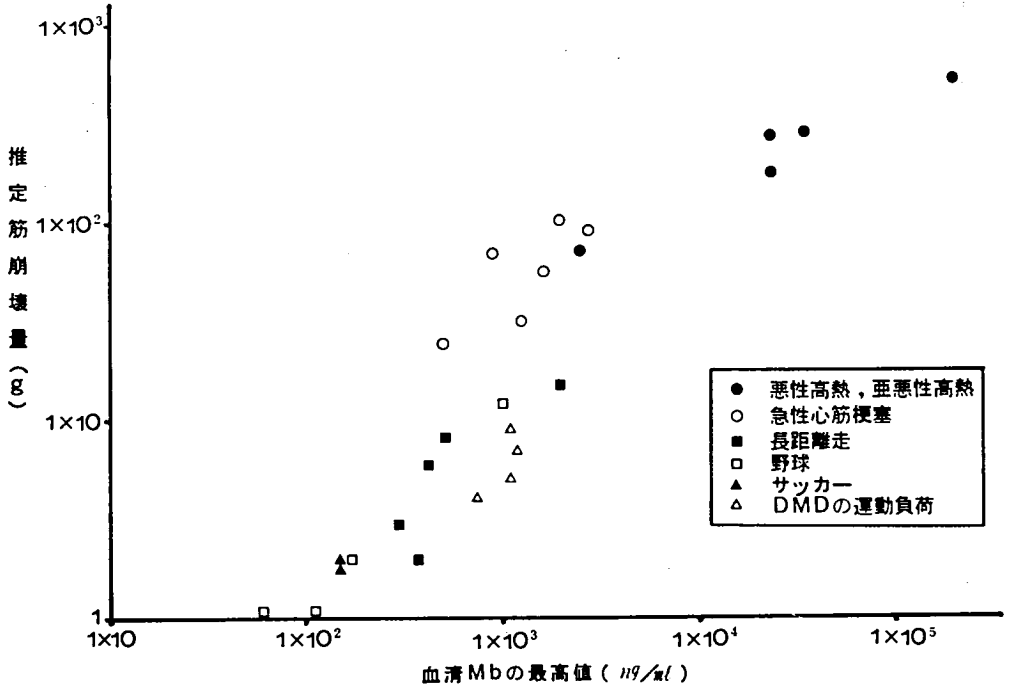


図5　血清Mbの最高値と推定筋崩壊量

分解など代謝過程の特徴を追究したい．また，この直線によって，各種の筋崩壊時における崩壊筋量の大凡を血清Mbの最高値から求めることができる．

結　　論

RIAで測定した血清Mbの変動パターンから，筋ジストロフィー症各型，悪性高熱，亜悪性高熱などの各種ミオパチー，心筋梗塞，ならびに健常人とDMD運動負荷時などにおける総流出Mb量と筋崩壊量をRobertsらの計算式を用いて算出した．また，血清Mbの最高値から筋崩壊量を求めるための直線を作製した．

各種の疾患，病態における推定筋崩壊量は，それぞれについてMbの産生，流出，処理機序の考察に有意義と思われる．

文　　献

1) 三好和夫，川井尚臣，岩朝　勝，ほか：血液化学検査——その数値をどう読むか．ミオグロビン（含・尿中）．日本臨牀，38：524，1980.

2) Miyoshi, K., Saito, S., Kawai, H., et al.：Radioimmunoassay for human myoglobin：methods and results in patients with skeletal muscle or myocardial disorders. J. Lab. Clin. Med., 92：341, 1978.

3) 林　正：急性心筋梗塞における血清ミオグロビンの経時的変動パターン．四国医誌，37：240，1981.

4) 今井幸三：筋ジストロフィー症を中心とする各種ミオパチーにおける血中ミオグロビン量．四国医誌，37：448，1981.

5) 末広　正：悪性高熱，亜悪性高熱の血清ならびに尿中ミオグロビンの変動パターンと血清ミオグロビンを指標とする事前チェックの試み．四国医誌，37：511，1981.

6) Roberts, R., Henry, P. D. & Sobel, B. E.：An improved basis for enzymatic estimation of infarct size. Circulation, 52：743, 1975.

7) 川井尚臣，岩朝　勝，三好和夫，ほか：ラジオイムノアッセイによる人ミオグロビンのturnover．厚生省・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55年度研究報告書，1981，p.220.

32) 筋におけるクレアチン代謝

筋ホモジュネートによる1-^{14}C標識クレアチンからの1-^{14}C標識サルコシンの産生

三 好 和 夫*

研究協力者　紫 芝 良 昌*　大 槻 なつ子*　門 脇 紀 子*
松 岡 明*　中 山 年 正*　北 村 元 仕*
田 村 克 也**　小 松 まち子**　三 橋 信 次**

はじめに

さきに私達（三好ら）[1)2)5)]は人骨格筋中にcreatine代謝経路としてcreatine-glycine pathwayのあることを提唱し，筋ジストロフィー症ではこの経路のcreatinaseのkineticsが異常であるとの成績を発表した．しかし，それらの成績は筋のcrude materialを用いて，基質や生成物の測定を呈色反応によってえたもので，改めて基質として1-^{14}C標識クレアチンを用いてこれまでの成績を確認する研究を進めている．

昨年度の本研究班においては，1-^{14}C標識クレアチンを基質として，これにpseudomonasからえた精製creatinase[3)]（pseudomonas creatinase）を反応させ，1-^{14}Cサルコシンの産生される成績を示した[4)]．今回は，酵素試料として人骨格筋ならびにラット骨格筋ホモジュネートを用いてえた成績を述べる．

試料と方法

人骨格筋とラット骨格筋を試料とした．人骨格筋は剖検時にえた筋を実験まで−50℃に凍結，保存して用い，また，外科的肢離断時にえられた筋を直ちに用いた．ラット筋は麻酔し，屠殺後の下肢筋を直ちに実験に供した．実験には筋から脂肪や結合織をできる限り除去し，ハサミで細切した後，3容の50mM燐酸緩衝液pH7.2を加え，polytron PT 10 homogenizerでホモジナイズし，600×gで10分間冷凍遠沈してえた上清（muscle extract）を用いた．

Muscle extractの0.2〜0.4mlに^{14}C-1-クレアチン（NEN社製）を加え，液量を前述の緩衝液で1.0mlとし，37℃60分インキュベートした．インキュベート終了後，65℃15分の加熱で反応を停止した．また，コントロール実験としてあらかじめ65℃15分加熱したmuscle extractを同様にインキュベートした．

インキュベート終了後，上清の20μlをシリカゲル薄層板につけ，フェノール：水，75：25の溶媒系で3時間展開した（薄層クロマトグラフィ）．さらに一部の検体は20μlを濾紙につけ，ブタノール：酢酸：水，120：30：50の展開系で濾紙上で24時間展開した（濾紙クロマトグラフィ）．

展開終了後の薄層板及び濾紙は乾燥した後，原点からフロントまで2.5〜5.0mm間隔で細切してそれぞれ試験管に移し，水を加えて^{14}C-放射活性を抽出し，ACS-IIシンチレーターを加え，^{14}C-放射活性をPackerd Liquid Scintilation counterで計測した．クロマトグラフィにおけるサルコシンの位置は非放射性サルコシンを加えて，ニンヒドリン反応で同定した．また，同様の実験をpseudomonas creatinaseを用いて行い，その成績をreference standardとした．

実験成績

人骨格筋（薄層クロマトグラフィ）：

図1に剖検筋ホモジュネート遠沈上清による成績を示した．縦軸に放射活性を，横軸に原点からの距離を示す．図の実線はmuscle extractをその

＊沖中記念成人病研究所
＊＊徳島大学医学部第一内科

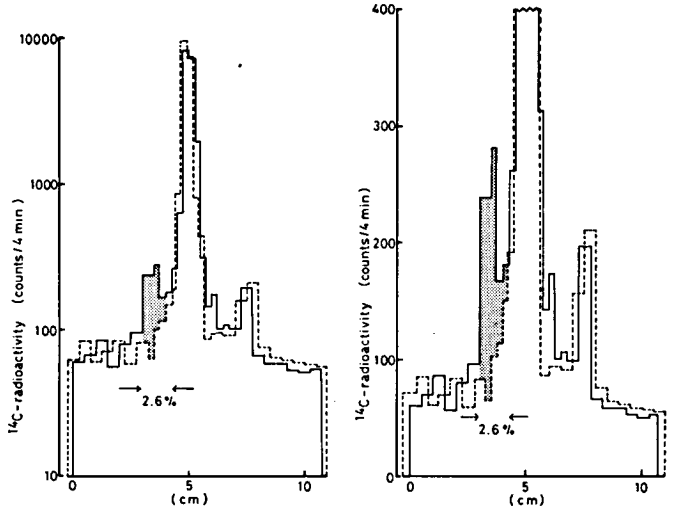


図1　人剖検筋ホモジュネートによる^{14}C-クレアチンからの^{14}C-サルコシンの産生.
矢印にかこまれた部分に，ニンヒドリン反応でサルコシンの呈色がみとめられる.

ま ま 用 い た 実 験 群，破 線 は heat inactivated muscle extract を用いたコントロール群である．^{14}C-放射活性の薄層板上の分布を^{14}C-クレアチンのピークで合わせて superimpose してある．図左は放射活性の全体の activity をみるために放射活性を log で表わし，図右は通常の linear scale で表わしたものである．

図にみるごとく^{14}C-クレアチンは Rf 0.50に主要なピークとしてみられ，Rf 0.38に相当して小さなピークが認められる．Rf 0.38のピークはサルコシンによるニンヒドリン反応の位置と同じであり，かつ pseudomonas creatinase とインキュベートした^{14}C-クレアチンにおいてもこの位置にピークを認めることからサルコシンであると考えられる．

放射活性としては，全体の92.6%が^{14}C-クレアチンであり，これに対して^{14}C-サルコシンは2.6%であった．なお，Rf 0.7付近に一つの^{14}C-放射活性のピークが認められるが，これはクレアチニンである可能性が強い．この部分の活性は実線と破線でほとんど差がないので，muscle homogenate の生物学的活性に依存するものではないと考えられる．

図2は外科的肢離断時にえられた新鮮な人下肢筋について行った実験の成績（表現は図1と同じ．以下の図も同様）である．

図2において，^{14}C-クレアチンは全体の87.1%，Rf 0.38付近でサルコシンと同定される部位に2.7%の放射活性が認められる．

新鮮な筋を用いた場合には原点付近に明らかな放射活性のピーク（約8.2%）が認められ，これは対照の heat inactivated muscle extract では認められない．この放射活性は Rf から考えるとフォスフォクレアチンであることが推定され，筋 muscle extract 中のクレアチンキナーゼによって生じたものと思われる．剖検筋の場合にはこのピークがみられないのは ATP その他の基質が減少してしまっているためであると思われる．^{14}C-クレアチニンと推定される活性については実験群とコントロール群で大きな差は認められず，前の実験と同様である．

ラット筋（薄層クロマトグラフィ）：

図3にラットの下肢筋を用いた実験の成績を示す．ラット筋で用いた homogenate の上清は0.2mlであり，人筋での0.4mlに対して少ない．

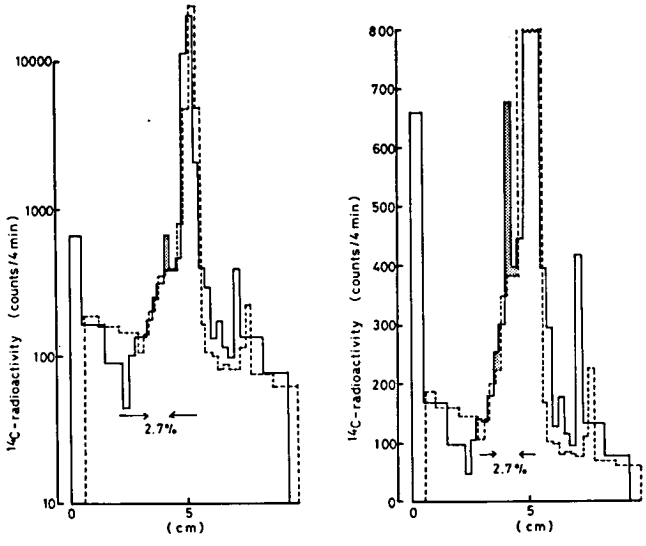


図2　外科的肢離断時にえられた人下肢筋ホモジュネートによる^{14}C-クレアチンからの^{14}C-サルコシンの産生.
矢印は前図説明参照.

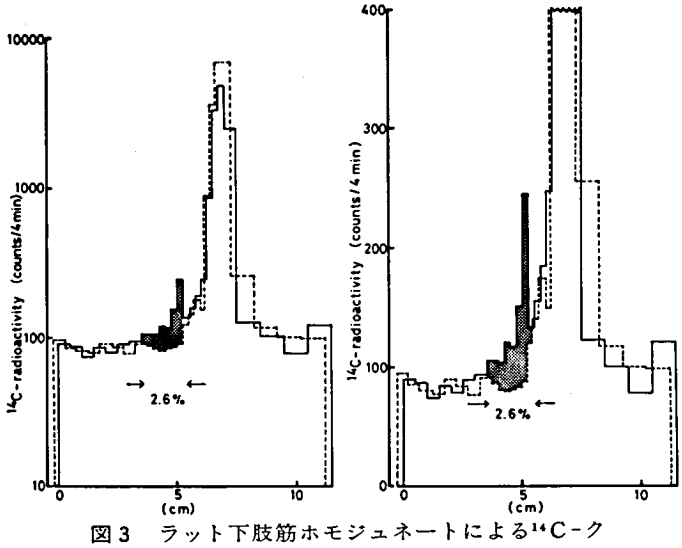


図3　ラット下肢筋ホモジュネートによる^{14}C-クレアチンからの^{14}C-サルコシンの産生.
矢印の説明は図1参照.

この実験においても^{14}C-クレアチン放射活性はRf0.55付近にあり（95.6%），サルコシンと思われる放射活性は0.38付近にあり，2.6%であった．Heat inactivatedのコントロール筋ではこの部分に特別なピークはみられない．なお，この実験においてはRf 0.5以上のアミノ酸に関する分離がよくなく，クレアチニンのピークはクレアチンのピークの中に含まれていることが考えられる．

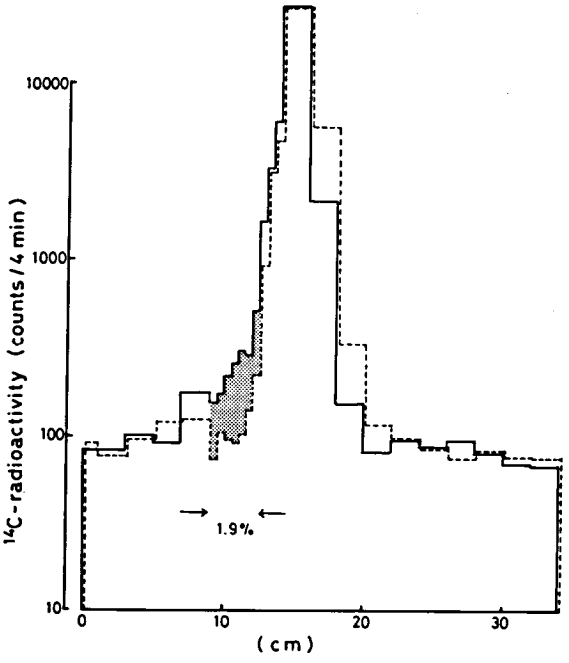


図4　人剖検筋ホモジュネートによる^{14}C-クレアチンからの^{14}C-サルコシンの産生(濾紙クロマトグラフィ（展開系 BAW）による).

また，ラットの筋は新鮮な筋でありながら，外科手術時にえた人下肢筋と異なり，^{14}C-フォスフォクレアチンと思われるピークがみられない．その理由は現在のところ明らかではない．

濾紙クロマトグラフィによる成績：

図4に人剖検筋のホモジュネートを用いたこの方法による成績を示した．

濾紙クロマトグラフィでは24時間に33cmまで泳動を行ったがクレアチンとサルコシンの分離は良好でない．しかし，^{14}C-クレアチンの肩の部分に相当してサルコシンと思われる^{14}C-放射活性のピークが認められた．放射活性は^{14}C-クレアチン96.1%，^{14}C-サルコシン1.9%であった．

考　　察

成績の項で示したように，人の muscle extract を^{14}C-クレアチンと60分間インキュベートすると，^{14}C-クレアチンからサルコシンの位置に放射活性が移行することをフェノール：水，シリカゲル薄層クロマトグラフィで確かめた．これがサルコシンであることは，非放射性サルコシンのニンヒドリン反応，pseudomonas creatinase とインキュベートした場合の^{14}C-クレアチンからの放射活性のこの部分への移行という2つのことで判断される．

クレアチンから生じるサルコシンの量は60分間のインキュベーションで最初の基質^{14}C-クレアチン放射活性の2～3%であった．この%は用いたホモジュネート量が人筋0.4ml，ラット筋0.2mlであるので，ラットでは活性がより高いことも推定される．

人筋を用いて同様に行った別の実験においてブタノール：酢酸：水溶媒系による濾紙クロマトグラフィ分析を行い，やはりサルコシンと思われる^{14}C-放射活性が^{14}C-クレアチンから移行することを認めた．

本実験でえた以上の成績は，人ならびにラット骨格筋中にクレアチンからサルコシンを生成する酵素が存在することを示す証左といえる．この酵素はおそらく creatinase であると思われるが，厳密には amidinotransferase を除外することはできず，現在行っている尿素測定法の工夫によって確認したい．

本実験における反応系の基質クレアチン量は muscle extract 中の本来のクレアチンのみであり，これにごく微量の^{14}C-クレアチンを加えたものである．生じた^{14}C-サルコシンの stoichiometry は pseudomonas creatinase を対照として計測中である．しかし，この条件での上述の成績は酵素活性の存在を十分に示すものであると思われる．

人など哺乳類の骨格筋中に creatinase 活性をみたとする文献は内外に見られない．

結　　論

剖検時ならびに肢離断時にえられた人骨格筋およびラット骨格筋についてホモジュネートの600 g，遠沈上清を作り，^{14}C-クレアチンとインキュ

ベートし，^{14}C-クレアチンから^{14}C-サルコシンが生ずることを確かめた．この成績は，私達が述べてきた骨格筋中にクレアチン分解代謝経路が存在することを示すものといえる．

文　献

1) Miyoshi, K., Taira, A., et al：Presence of creatinase and sarcosine dehydrogenase in human skeletal muscle. Proposal for creatine-urea pathway. Proc. Japan Acad., 56B：95, 1980. Abnormalities of creatinase in skeletal muscle of patients with Duchenne muscular dystrophy. Ibid, 56B：99, 1980.

2) 三好和夫，平良　章，ほか：筋ジストロフィー症骨格筋におけるクレアチン代謝の異常．厚生省「筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究」（三好班）昭和55年度研究報告書，1981，p. 207.

3) Tsuru, D., et al：Creatinine decomposing enzymes in pseudomonas putida. Agr. Biol. Chem., 40：1011, 1976.

4) 三好和夫，紫芝良昌，ほか：筋におけるクレアチン代謝——1-^{14}C 標識クレアチンを用いる方法の検討——．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」（三好班）昭和56年度研究報告書，1982，p.182.

5) Miyoshi, K., Taira, A., et al：Altered characteristics of creatinase-like activity in skeletal muscles of muscular dystrophies. Muscular Dystrophy,（edited by Ebashi, S.），Japan Medical Research Foundation Publication No.18, University of Tokyo Press, 1982, p.199.

33）筋肉酵素の漏出について

植　田　啓　嗣*

研究協力者　畑　中　良　夫*　宮　内　由美子*
阿　部　千　史*　久保田　道　子*

はじめに

血清CPK値は，筋肉疾患，心筋梗塞，粘液水腫，その他各種の神経疾患でも上昇がみられる．また平素は健康体である悪性過高熱症でも高値がみられる．

私共は，昨年，大学生のあいだに高率に高血清CPK値の保持者がみられること，そしてそれが女子よりも男子に，安静時よりも運動時に，またβ-blockerの投与によってもより顕著となることを報告し，合せてDuchenne型血清CPK値の動向に対しても検討を加えると共に，両者を対比しながら，筋肉組織からの酵素漏出の機構に考察を加えた[1]．

ここでは，引き続き，正常人の血清CPK値の動きを追跡し，高血清CPK値を示す“健康者”とDuchenne型との異同を検討してみることとした．

方　法

血清酵素値の測定であるが，CPK，LDH，GOT，GPTについてはモノテストを，aldolaseについてはUVテスト（いずれもベーリンガー・マンハイム社製）を用い，Chemtek式自動分析器を使用して測定した．

結　果

1．加齢と血清CPK値（表1）

学生・教職員を含めた233名についての安静時の血清CPK値を，年齢別に整理してみた．

200U以上を示した者の%は，男性では，学生群：11.8%，40～49歳群：4.4%，女性では，学生群：5.9%であった．

また，その平均値をみると，男性では，学生群：129U，～29歳：56U，30～39歳：68U，40～49歳：84U，50～59歳：74U，60歳～：59U，一方，女性においては，それぞれ97U，65U，55U，40U，62Uを示した．

表1　Serum CPK activities

Ages	Male Increase	Male Average	Female Increase	Female Average
Students	10/85(11.8%)	129±176	1/17(5.9%)	97±225
Staffs				
−29	0/ 2 (0 %)	56± 4	0/3 (0 %)	65± 9
30−39	0/16 (0 %)	68±21	0/1 (0 %)	55
40−49	2/45 (4.4%)	84±49	0/5 (0 %)	40± 9
50−59	0/45 (0 %)	74±36	0/6 (0 %)	62±30
60−	0/ 8 (0 %)	59±21		

したがって酵素値は，学生群に加えて，40～49歳の男性と50～59歳の女性に高値をとる傾向がみられた．

2．運動後の男子大学生の血清酵素値

駅伝マラソン参加を前提に健康診断書を求めに来た男子大学生70名について，まず600mを走らせ，その後10分して採血し，CPK，aldolase，LDH，GOT，そしてGPTの5種の酵素値を求めた（表2）．

血清CPKでは，最低値37U，最高値873U，平均191U，正常上限値94U以上を上回る者は46例，65.7%，また200U以上の値を示した者は26例，37.1%であった．

血清aldolaseでは，最低値2.3U，最高値14.3U，平均値6.3Uで，正常上限値7.6Uを上回る者は19例，27.1%であった．

血清LDHでは，最低値229U，最高値729U，平均値410Uで，正常上限値500Uを上回る者は11例，15.7%であった．

血清GOTでは，最低値13U，最高値56U，平均

*愛媛大学保健管理センター

値27Uで，正常上限値42Uを上回る者は1例，1.4%であった．

血清GPTでは，最低値10U，最高値68U，平均値18Uで，正常上限値36Uを上回る者は1例，1.4%であった．

3．運動直後の男子大学生高血清CPK値保持者の血清酵素パターン

(a) 運動直後の血清CPK値と他の血清酵素値

2.と同じ条件下の男子大学生70名で，その血清CPK値と他の血清酵素活性値との関係を求めてみた．

Aldolaseでは，本酵素のみが正常値の上限を上回っている者が2名，2.9%，CPKのみが上昇を来している者が29例，41.4%，両者が上昇している者が17例，24.3%であった（図1）．

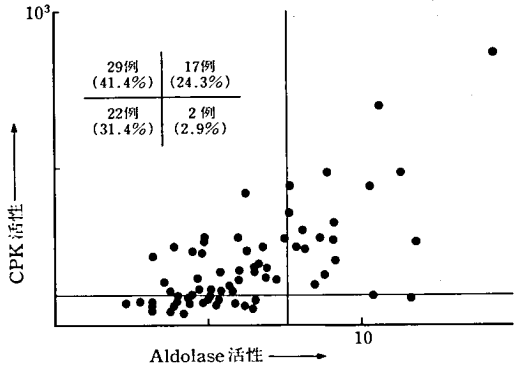


図1　CPK活性とAldolase活性 (male students)

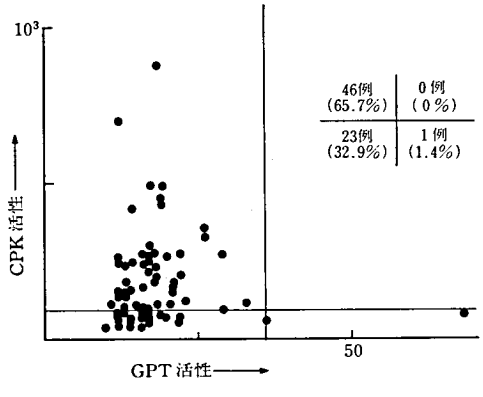


図2　CPK活性とGPT活性 (male students)

LDHでは，本酵素のみが正常値の上限を上回っている者が3例，4.3%，CPKのみが上昇を来している者が38例，54.3%，両者が上昇している者が8例，11.4%であった．

GOTでは，本酵素のみが正常値の上限を上回っている者が1例，1.4%，CPKのみが上昇を来している者は46例，65.7%，両者が上昇している者は1例も認められなかった．

GPTでは，本酵素のみが正常値の上限を上回っている者は1例，1.4%，CPKのみが上昇を来している者は46例，65.7%，両者が上昇を来している者は1例も認められなかった（図2）．

(b) 運動直後の高血清CPK値保持者の血清酵素パターン（表3）

2.と同じ条件下の男子大学生で，血清CPK値が200U以上示した者を15名無差別に抽出し，その同一試料について，aldolase，GOT，GPTの3酵素値を測定した．

その結果は，aldoleseで，正常上限値7.6Uを越えた者が12例，80%，GOTでは，正常上限値42Uを越えた者が2例，13%，GPTでは，正常上限値36Uを越えた者は1例も認められなかった．

考　　案

私共は，昨年度の報告[1]で，就職または駅伝マラソン参加を前提に健康診断書を求めに来た大学生の間に，高血清CPK値を示す者が相当数存在することを指摘した．その場合，正常上限値を94Uとおいた場合には，就職時男子学生で48.0%，600m疾走10分後の男子学生で77.9%の高率に昇ったので，一応200U以上を異常値ととり，就職時が8%，駅伝検診時が20.8%として，その成績をまとめた．

表2　Serum enzyme activities after exercise (male students)

Enzymes	Cases	Normal Values	Ranges	Average(S.D.)
CPK	70	94	37−873	191 (155)
Aldolase	70	7.6	2.3−14.3	6.3 (2.4)
LDH	70	250−500	229−729	410 (89)
GOT	70	42	13−56	27 (7)
GPT	70	36	10−68	18 (8)

しかしその後，岡山大の男子学生でも40.2%[2]，香川大の男子学生では75.6%[3]に異常者がみられたと報告された．

そのため，対象者の年齢層を拡げ，教職員を加えた233名について，安静時の血清CPK値を年齢別に区分けして整理してみたが，その結果は**表1**が示す通りで，10代ごとの平均値は，男性では129，56，68，84，74，59Uの値を示し，また，女性でも97，65，55，40，62Uとなって，男女両性とも学生群を除けば，いずれも正常上限値94U以下の値を示していた．

そしてこの場合，ホルモン環境が変動しているとみなされる学生群，40～49歳の男性群，50～59歳の女性群に高値をとる傾向があり，また男性値が女性値より高値となる点が注目された．なお，女子学生の1例に967Uの高値を示している者がいたが，家族歴からはDuchenne型のcarrierは否定された．

では何故，学生群で高値を示して来るかであるが，ホルモン環境が変動期にあることに加え，前回にも指摘している通り[1]，疾走後に異常者が増え，自律神経性因子もまた無視出来ない．

しかし，CPKを始めとしたsarcoplasmic enzymeの漏出の仕方はDuchenne型とはかなり異なっているように思われる．つまりDuchenne型ではpreclinical stageでも，CPK，aldolase，LDHの3酵素の活性値はほぼ平行して上昇がみられる[4]．また視床下部のb交感帯を電気刺激した家兎でもこの点は同様であった[5]．これに対し，600m疾走後の学生のうち，CPKが上昇を来した者65.7%に対して，aldolaseが上昇した者は27.2%（図1），LDHは15.7%，GOTは1.4%，GPTは1.4%と低く（図2），CPKと共に上昇を来した者の%としてみても，aldolaseが17%（図1），LDH 8%，GOT 0%，GPT 0%（図2）となっていた．更に，高血清CPK値を保持する学生を無差別に抽出し，その酵素値を調べたが，aldolaseは80%，GOT 13%，GPT 0%に上昇がみられたに過ぎなかった（**表3**）．

したがってこの結果からみると，学生にみられる高血清CPK値をもたらす機構は，Duchenne型とも，自律中枢刺激家兎ともかなり異なっているように思われる．しかし平素は健康体である悪性過高熱症では，血清CPK値のみに重点が置かれて報告されているので，その間の異同は明らかではない．加えてDuchenne発症の初期にもこのような酵素パターンを示す時期があるのかもしれない．

表3 Serum enzyme activities after exercise (male students)

	CPK	Aldolase	GOT	GPT
	(94)	(7.6)	(42)	(36)
T.K.	333	9.6	37	30
U.T.	660	12.6	43	21
Y.H.	230	6.0	20	12
K.U.	418	10.0	31	20
T.T.	349	9.8	38	21
U.M.	1580	18.3	60	21
M.K.	208	6.2	24	12
N.M.	237 (15/15)	8.3 (12/15)	28 (2/15)	15 (0/15)
W.K.	510 100%	8.5 80%	32 13%	16 0%
M.H.	251	3.9	29	12
K.H.	416	10.0	34	18
S.H.	270	9.1	27	17
H.T.	490	11.3	36	19
I.R.	701	10.6	33	12
K.Y.	873	14.3	32	18

おわりに

1．対象年齢層を拡げて，血清CPK値を測定してみると，学生層と更年期層に高値をとる傾向が窺えた．しかし学生層を除いた各年齢層の平均値は，いずれも正常上限値94Uを下回った．

2．その際，CPK，aldolase，LDH，GOT，GPTの5つの酵素の血清活性値を測定することによって得られる酵素パターンは，Duchenne型とも自律神経中枢刺激家兎とも異なっていた．

3．高血清CPK値を示す者を総べて“異常者”と見做すべきか否かは，その機構がなお不明であるだけに，現在の時点ではそこに“読み過ぎ者”の混入を想定しておくべきではなかろうか．

文　　献

1) 植田啓嗣，畑中良夫，野田温子，久保田道子，谷垣朋子：筋肉酵素の漏出機構について．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」（三好班）昭和56年度研究報告書，1982，p.191—195.

2) 辻孝夫，山吹隆寛：大学生の肝疾患集団検診と事後指導・管理のあり方—職員の検診成績と比較して—．日本医事新報，3024：45—50，1982.

3) 武田和久，市川えり子，友国寿美子，本田照代：学生にみられる血清クレアチン・キナーゼ活性の高値に関する検討．第12回中国・四国大学保健管理研究集会発表，昭和57年7月，高知.

4) 植田啓嗣，伊藤友昭，大原俊樹，岸野文一郎，中田俊士，松本謙二，西川光夫：筋ジストロフィー症にみられる筋 LDH Isozyme 組成異常の意味．医化学シンポジウム，7：161—166，1967.

5) 植田啓嗣，大原俊樹，畑中良夫，西川光夫，塩谷彌兵衛：視床下部の電気刺激後の血清酵素．臨床神経学，17：506—512，1977.

34) Duchenne 型ジストロフィー症の線維芽細胞および白血球の生化学的研究

馬 渡 志 郎*

研究協力者　竹 下 岩 男**

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）においては，血清の creatine kinase（CK）が増加していることが特徴的であるが，同一血清より CK と pyruvate kinase（PK）をともに測定すると相関して増加している[1)2)]．この両者の相関的な増加は DMD の保因者でも認められる[1)]．DMD 患者では病初期ほどこれらの酵素は血清で高い傾向があり，保因者では両酵素が血清で高いにもかかわらず臨床的に筋の異常を来す例は少ない．これらのことは DMD においては，両酵素の血清における増加は筋の変性や萎縮に先行して起こっていることを示唆するものとも考えられ，保因者のことを考えると，これらの酵素の血中増加は DMD における筋の変性や萎縮とは必ずしも直接的に関係した現象ではないとも考えられる．すなわち，筋の病変に先行した DMD の原発的異常に関連した現象であるかも知れない．

一方，遺伝性の疾患である DMD においては臨床的な標的ではない組織あるいは細胞にも潜在的な異常がある可能性は十分考えられる．事実，DMD の赤血球，白血球あるいは線維芽細胞においても異常の報告があるが，異論も少なくなく，当面確定された異常とは言えないように思われる．しかし，これらの細胞は，DMD の場合すでに病的変化のある骨格筋と比べて，材料の得やすさだけでなく，材料の純度の上でも対照との生化学的な比較検討には適している．

以上のことから，私共は DMD 患者の培養皮膚線維芽細胞，末梢血のリンパ球（単核球）および顆粒球の CK と PK および ATP＋AMP ⇄ 2 ADP の反応を媒介する adenylate kinase（AK）の活性を測定して対照群と比較した．

対象および方法

線維芽細胞は DMD 患者（5人）および対照群（胞腫瘍3人，てんかん1人，いずれも成人男子）より生検した皮膚より培養によって得た．分析に用いた線維芽細胞はすべて3回目の subculture で full sheets になったもので，培養液交換後4日目のものを用いた．生食水で3回洗浄後に剝離して遠沈によって採取した．リンパ球および顆粒球は DMD 患者（6人）および同一年齢層男子で同一施設に入院中の DMD 以外の神経筋疾患患者6人（表1）の末梢血より，リンパ球を Ficoll-Paque 法で採取した後，さらに3％ Dextran 法で顆粒球を採取した．末梢血は DMD 群および対照群よりすべて同日，同時刻に採血し，その後の操作や測定も同時に（交互に）行った．各細胞群は採取後酵素測定まで－80℃に保存した．測定時に25mM Tris-HCl（pH7.5）の中で10秒間3回超音波処理した．蛋白濃度は Lowry 法で測定した．測定した諸酵素は coupled enzyme 法により37℃で NADH あるいは NADP の変化を340nm で記録計で記録した．反応液の組成と最終濃度は下記の如くであった．PK；74mM Tris-HCl（pH7.4），7.4mM $MgCl_2$，0.74mM EGTA-Na，0.74mM phosphoenolpyruvate，1.56mM ADP，0.16mM NADH，LDH≧1.2U/ml，cell homogenate（30－60μg 蛋白）．AK の 2 ADP → ATP＋AMP の方向の測定は100mM Tris-HCl（pH7.5），10mM Mg-acetate，20mM glucose，2.5mM ADP，0.7

＊国立赤坂療養所神経内科
＊＊九州大学医学部脳研脳神経外科

表1 Patients used to leukocyte studies

	Age	Sex	Clinical diagnosis	Serum CK*
Contol				
1.	13	M	Dystonia	19 U
2.	7	M	Spinal muscular atrophy	19
3.	16	M	Congenital myopathy	39
4.	8	M	Spinal muscular atrophy	20
5.	5	M	Congenital myopathy	198
6.	11	M	Congenital myopathy	141
Duchenne dystrophy				
1.	10	M		550
2.	14	M		261
3.	9	M		352
4.	12	M		333
5.	13	M		231
6.	10	M		1176

* Normal range of serum creatine kinase; 0 - 25 U

mM NADP, hexokinase≧1.2U/ml, G-6 PDH≧2.5U/ml, AKのATP+AMP→2 ADPの方向の測定では，67mM Tris-HCl (pH7.4), 6.7mM $MgCl_2$, 0.67mM EGTA-Na, 0.7mM ATP, 0.7mM phosphoenolpyruvate, 0.15mM NADH, PK≧1.2U/ml, LDH≧1.2U/mlでの活性(Mg-ATPase)を記録し，この反応液に0.7mM AMPを加えて活性を記録し，これよりMg-ATPaseの活性を差引いた．CKの測定にはBoehringer社のCK-NAC法のキットを用いた．この測定キットには十分なAKの阻害剤が入っていて，本実験の資料におけるAKは完全にブロックされることを確かめた．

結　　果

上記方法で測定した諸酵素の活性値は表2，3および4に示した．線維芽細胞，リンパ球および顆粒球ともにPKの活性が最も高く，CKの活性はいずれの細胞群でもPKの2—4%に過ぎなかった．AKの活性はいずれの細胞群においてもPKの約15%程度であった．

DMDと対照群とを比較した場合，リンパ球と顆粒球におけるAKの活性は正，逆反応ともにDMDで高値を示した(いずれも$p<0.05$)．リンパ球と顆粒球のPKの活性もDMDで高い傾向を示した($p<0.1$)．線維芽細胞においてもAKおよびPKいずれもDMDで高い傾向を認めた($p<0.1$)．CKはいずれの細胞群においてもDMDと対照群との間で差はなかった．Mg-ATPaseの活性も線維芽細胞とリンパ球で測定したがDMDと対照群との間に差を認めなかった．

考　　察

既述したように，DMDおよびその保因者でも血清ではCKとPKは相関して増加している[1)2)]．AKはDMDの血清で高い例があったが，同一血清でCKとAKは相関していなかった[2)]．ところでCKはphosphocreatineとADP，PKはphosphoenolpyruvateとADPを基質とした酵素であり，両酵素ともにATPより高エネルギーのリン酸複合体を基質としていて，ともにATPの産生(あるいは供給)に直接関連した酵素である点はあらためて注目して良い点ではないかと思われる．この両酵素が相関してDMDの病初期より，あるいは保因者でも増加していることは，骨格筋におけるATPの産生(あるいは需要)に直接関係した

表2 Enzyme activities in fibroblasts from patients with Duchenne dystrophy and controls

	DMD(n=5)	Controls(n=4)	
Creatine kinase	21.5± 21.5	19.0± 9.3	
Pyruvate kinase	726.9±231.8	442.2± 220.9	(p< 0.1)*
Adenylate kinase			
2 ADP → ATP + AMP	92.8± 19.1	70.9± 13.3	(p< 0.1)*
ATP + AMP → 2 ADP	174.2± 24.1	146.3± 15.0	(p< 0.1)*
Mg-ATPase	33.9± 9.4	31.6± 6.0	

Enzyme activities; mμmoles/min/mg.protein at 37°C
* t-test

表3 Enzyme activities in lymphocytes from patients with Duchenne dystrophy and controls

	DMD(n=6)	Controls(n=6)	
Creatine kinase	24.4 ± 2.9	22.4 ± 4.9	
Pyruvate kinase	1206.4 ±123.5	1059.5 ±152.6	(p< 0.1)*
Adenylate kinase			
2 ADP→ATP + AMP	182.2 ± 11.7	164.5 ± 6.9	(p< 0.05)*
ATP + AMP→2 ADP	375.1 ± 18.2	349.0 ± 21.6	(p< 0.05)*
Mg-ATPase	52.2 ± 4.8	55.9 ± 10.4	

Enzyme activities; mμmoles/min/mg.protein at 37°C
*t-test

表4 Enzyme activities in granulocytes from patients with Duchenne dystrophy and controls

	DMD(n=6)	Controls(n=5)	
Creatine kinase	29.9 ± 3.1	29.6 ± 1.8	
Pyruvate kinase	1015.9 ± 228.9	644.9 ± 360.4	(p< 0.1)*
Adenylate kinase			
2 ADP → ATP + AMP	152.2 ± 14.7	127.8 ± 20.4	(p< 0.05)*

Enzyme activities;mμmoles/min/mg.protein at 37°C
*t-test

異常がDMDの原発的な異常と関係があることは否定は出来ないと思われる。　DMDで筋肉の酵素が血清に増加している機転や機構は良くわかっていないが，骨格筋だけでなく白血球でも細胞内の酵素の放出には細胞内のATPが関係があることは示唆されている[3)4)]．

私共の結果では，リンパ球，顆粒球および線維芽細胞のいずれにおいてもCKの活性はPKの活性の2－4％にすぎなかった．このことはこれらの細胞ではCKは生理的にも重要な働きはしていないことを示しているとも考えられる．CKはいずれの細胞群においてもDMDと対照との間に差を認めなかったが，活性値の高かったPKとAKの活性は，いずれの細胞群においてもDMDで高い傾向を示した．このことはDMDにおいては骨格筋以外のこれらの細胞においてもATPの産生（供給）あるいは需要に何んらかの異常があり，CKが少ないこれらの細胞ではPKとAKの活性に現われているとも考えられる．

しかし私共の今回の結果はリンパ球と顆粒球のAKの活性は統計学的に有意差であったが，これらの細胞群のPKおよび線維芽細胞のAKとPKについてはDMDで高い傾向（$P<0.1$）を示したにとどまるので，さらに症例を重ねて結論を出す必要があると思われる．

文　献

1) Percy, M. E., Chang, L. S., Murphy, E. G., et al.：Serum creatine kinase and pyruvate kinase in Duchenne muscular dystrophy carrier detection. Muscle & Nerve., 2：329, 1979.

2) 馬渡志郎，安徳恭演，ほか：筋緊張性ジストロフィー症およびDuchenne型ジストロフィー症の赤血球膜のATPase, adenylate kinaseなどについて．厚生省「筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究」（三好班），昭和55年度研究報告書，1980，p.183—186.

3) Thompson, W. H. S., Sweetin, J. C. & Hamilton, I. J. D.：ATP and muscle enzyme efflux after physical excertion. Clin. Chim. Acta., 59：241, 1975.

4) Wilkinson, J. H. & Robinson, J. M.：Effect of ATP on release of intracellular enzymes from damaged cells. Nature, 249：662, 1974.

35）神経筋疾患における白血球 proteolytic enzymes の検討

後　藤　幾　生*

研究協力者　小　林　卓　郎*　黒　岩　義五郎*

はじめに

白血球の中性および酸性プロテアーゼについての研究は多発性硬化症において行われているが，神経筋疾患においては殆んど行われていない[5),6),9),12)]．

対象および方法

対象は正常人20例，Duchenne 型筋ジストロフィー症７例，緊張性筋ジストロフィー症９例，多発筋炎５例，非炎症性ミオパチー７例，Guillain-Barré 症候群３例，ポリニューロパチー５例，重症筋無力症15例であった．

血液は EDTA を含んだチューブで行い，単核細胞および顆粒球の分離は Böyum[2),3)] の変法により行った．

EDTA を含んだ血液を0.85％食塩水（１：２ V/V）で稀釈し，その５ml を３ml の Ficoll-Conray 液に重層，400ｇ，30分間遠沈し，単核細胞を採取，0.85％食塩水で２回洗浄した．顆粒球は５％ dextran 液と混合し，400ｇ，10分間遠沈，0.85％食塩水で稀釈，遠沈，洗浄などを行い，顆粒球を採取した．これら単核細胞および顆粒球は 0.01％ Triton-X 0.5ml に浮遊させ，sonication を行い，酵素液を作製した．

中性および酸性プロテアーゼ活性測定は Serra ら[11)] の変法によって行った．

中性プロテアーゼ活性は0.1ml 酵素液，2.5mg の denatured hemoglobin，31μmoles の pH7.6の Tris-HCl 緩衝液で行い，酸性プロテアーゼ活性は 0.1ml 酵素液，５mg の denatured hemoglobin，40μmoles，pH3.2の NaCl-Citrate-HCl 緩衝液によって行った．Incubation は37℃，60分行い，５％トリクロル酢酸を２ml 加えることにより反応を停止させ，1,000g，20分遠沈後，その上清に 0.5M Carbonate-bicarbonate 緩衝液（pH：10.5）を２ml 加え，10分放置後，0.5ml Folin-Ciocalteau 液を加え，１時間後に L-tyrosine を標準とし，750nm の波長で測定した．蛋白量は Lowry 法[8)] により測定した．

結　　果（表１）

正常人の単核細胞および顆粒球の中性プロテアーゼ活性は0.226±0.055および2.118±0.379，酸性プロテアーゼ活性は，それぞれ1.556±0.293および1.447±0.349であった．

Duchenne 型筋ジストロフィー症では顆粒球の中性および酸性プロテアーゼ活性が1.323±0.179および0.863±0.151と低下がみられた．緊張性筋ジストロフィー症は単核細胞の酸性プロテアーゼ活性が1.254±0.348と低下していた．多発筋炎では単核細胞の中性プロテアーゼが0.475±0.204と上昇，単核細胞および顆粒球の酸性プロテアーゼ活性が1.246±0.160および1.094±0.167と低下を示していた．重症筋無力症では，ばらつきが多かった．ミオパチー，Guillain-Barré 症候群およびポリニューロパチーでは異常がみられなかった．

考　　察

一般に，中性および酸性プロテアーゼは antigen-antibody complexes が白血球によって貪食される時に分泌されるとか，組織の破壊のみならず，リンパ系の刺激において重要な役割を果すこ

＊九州大学医学部脳研神経内科

表1　Neutral and acid protease activities

	No	Neutral protease		Acid protease	
		Mononucl cell	Granulocytes	Mononucl cell	Granulocytes
Control	20	0.226 ± 0.055	2.118 ± 0.379	1.556 ± 0.293	1.447 ± 0.349
Duchenne type	7	0.188 ± 0.053	1.323 ± 0.179	1.333 ± 0.183	0.863 ± 0.151
Myotonic dystrophy	9	0.212 ± 0.072	2.019 ± 0.260	1.254 ± 0.348	1.256 ± 0.169
Polymyositis	5	0.475 ± 0.204	1.839 ± 0.294	1.246 ± 0.160	1.094 ± 0.167
Myopathy	7	0.224 ± 0.063	1.772 ± 0.317	1.423 ± 0.312	1.271 ± 0.390
Guillain-Barré	3	0.206 ± 0.083	2.440 ± 0.296	1.310 ± 0.181	1.795 ± 0.505
Polyneuropathy	5	0.235 ± 0.061	1.761 ± 0.456	1.613 ± 0.286	1.215 ± 0.215
Myasthenia gravis	15	0.247 ± 0.099	1.820 ± 0.400	1.421 ± 0.259	1.166 ± 0.264

μ moles of amino group released/mg of protein/h

とが推定されている．

単核細胞のプロテアーゼに関してはDuchenne型筋ジストロフィー症やミオパチーにおいては異常がみられず，緊張性筋ジストロフィー症および多発筋炎において異常がみられた．従来より，緊張性筋ジストロフィー症や多発筋炎における免疫学的異常について報告があり[7)10)14)]，これら疾患における単核細胞のプロテアーゼ活性の異常は免疫学的な問題との関連において興味があり，更に検討する必要があると考える．

他方，顆粒球のlysosomal enzymesに関しては細菌やimmune complexesの貪食と関係があるとの報告がある[1),4),13)]．

Duchenne型筋ジストロフィー症および多発筋炎の顆粒球プロテアーゼ活性の異常がみられたことは，これら疾患の感染に対する抵抗性の問題なども免疫学的な問題と共に検討する必要があると考える．

文　献

1) Baehner, R. L., M. J. Karnovsky & M. L. Karnovsky : Degranulation of leukocytes in chronic granulomatous disease. J. Clin. Invest., 48 : 187—192, 1969.

2) Böyum, A. : Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythocyte-aggregating agents. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21 (Suppl 97) : 31—50, 1968 a.

3) Böyum, A. : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21 (Suppl 97) : 77—89, 1968 b.

4) Cohn, Z. A. & J. G. Hirsch : The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med., 112 : 1015—1022, 1960.

5) Cuzner, M. L., A. N. Davison & P. Rudge : Proteolytic enzyme activity of blood leukocytes and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. Ann. Neurol., 4 : 337—344, 1978.

6) Cuzner, M. L., W. I. McDonald, P. Rudge, M. Smith, N. Borshell & A. N. Davison : Leucocyte proteinase activity and acute multiple sclerosis. J. Neurol. Sci.,26 : 107—111, 1975.

7) Grove, D. I., S. J. O'Callaghan, T. O. Burston & I. J. Forbes : Immunological function in dystrophia myotonica. Brit. Med. J., 3 : 81—83, 1973.

8) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.,193 : 265—275, 1951.

9) Riekkinen, P., J. Palo & I. Asikainen : Lysosomal enzymes in the lymphocytes and granulocytes of patients with multiple sclerosis. Acta Neurol. Scandinav., 56 : 83—86, 1977.

10) Roberts, D. F. & W. G. Bradley : Immunoglobulin levels in dystrophia myotonica. J. Med. Genet., 14 : 16—19, 1977.

11) Serra, S., A. Grynbaum, A. Lajtha & N. Marks : Peptide hydrolases in spinal cord and brain of the rabbit. Brain Res., 44 : 579—592, 1972.

12) Tchórzewski, H., J. Czernicki & Z. Maciejek : Polymorphonuclear leukocyte lysosome activities and lymphocyte transformation in multiple sclerosis and some other central nervous system chronic diseases. Eur. Neurol., 14 : 386—396, 1976.

13) Weissmann, G., R. B. Zurier, P. J. Spieler & I. M. Goldstein : Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes exposed to immune complexes and other particles. J. Exp. Med., 134 : 149 s —165 s , 1971.

14) Wochner, R. D., G. Drews, W. Strober & T. A. Waldmann : Accelerated breakdown of immunoglobulin G (IgG) in myotonic dystrophy : A hereditary error of immunoglobulin catabolism. J. Clin. Invest., 45 : 321—329, 1966.

36) 筋タンパクの崩壊とリソゾームチオール性プロテアーゼ

木 南 英 紀*

研究協力者　勝 沼 信 彦*

はじめに

筋ジストロフィー症における筋タンパクの崩壊には各種のプロテアーゼが協同的に働いていると考えられる[1]．本研究は細胞内タンパク質の分解で中心的な役割を果しているリソゾームのチオール性カテプシン群と，それらに対する内在性チオールプロテアーゼインヒビター(TPI)の筋タンパク崩壊への関与の仕方，程度を明らかにすることを目的としている．今回は，ジストロフィーハムスター骨格筋におけるリソゾーム酵素活性とTPIを測定した．さらに，カテプシンとTPI活性の上昇の機作をPlasmocid myopathyを用いて検索した．

方　法

筋ジストロフィーハムスター(BIO14.6)とその対照動物(F_1B)は18週齢のものを使用した．Plasmocidは国立神経センターの杉田先生より供して頂いた．0.5%生食液を直接ラットのひらめ筋に注射した．シクロヘキシミドは生食に溶解させ，100μg/100g体重を1日2回腹腔内投与した．TPIは筋ホモジネートの10000×g，20分遠心上清を用いて80°，1分の熱処理後，木南らの方法[2]で測定した．カテプシンB＆L，カテプシンC，β-グルクロニダーゼ，酸フォスファターゼ活性は筋ホモジネートを用い，Suc-Tyr-Met-β-naphtylamideを用いた勝沼らの方法[3]，Gly-Arg-β-naphthylamideを用いてBarrett方法[4]，Koldovsky[5]及びIgarashi[6]らの方法によってそれぞれ測定した．

*徳島大学医学部酵素研酵素化学

結　果

筋ジストロフィーハムスター18週齢の大腿2頭筋における各種リソゾームの酵素活性とTPI活性が表1に示されている．筋ジストロフィー動物では対照動物に比し，カテプシンB＆L，β-グルクロニダーゼの数倍の活性上昇が認められるが，同じリソゾームの酵素であるカテプシンC及び酸フォスファターゼの活性増加はない．内在性TPIはカテプシン活性の上昇と平行して増加していた．ジストロフィー筋におけるリソゾームの特定酵素の活性増加，TPIの増加がどのような機作に基づくかを調べるために，Plasmocidによる実験的ミオパチーを使用した．Plasmocid注射後，罹患筋の構造蛋白の速やかな崩壊とそれに続く筋再生がみられ，筋タンパクの崩壊とプロテアーゼとの関係を調べるのに良いモデルである[7]．Plasmocid投与後の罹患筋のリソゾームの各種の酵素活性とTPIの変動を追った結果が図1に示されている．カテプシンB＆L活性は約半日の潜伏期の後，急速に上昇し，3日目に約7倍の活性上昇が認められ，その後は減少していく．この時間経過は筋タンパクの崩壊の進行とよく一致している[7]．ジストロフィー症と同様，β-グルクロニダーゼは活性が強く増えるが，酸フォスファターゼ，カテプシンCの活性増加は著明でない．TPIは約2～3倍の活性増加が認められる．リソゾームの特定酵素の活性増加の機序には3つの可能性が考えられる．第1は，筋タンパク量の減少により，相対的に酵素活性が増加することである．表1，図1の活性の表現はU/g tissueであり，ジストロフィーハムスターでは筋タンパク量の減少は極めて少ない．従って第1の可能性は除去できる．第2は，リソ

表1　Activities of lysosomal hydrolases and TPI in biceps femolis muscle from normal and dystrophic hamsters

Enzymes	Normal(A)	Dystrophy(B)	(B)/(A)
		mU/g tissue	
Cathepsin B & L	34.0±6.8	97.6±30.2	2.9
β-Glucuronidase	9.1±4.2	49±9.9	5.4
Cathepsin C	274±34	304±37	1.1
Acid phosphatase	758±68	743±60	1.0
TPI	144±39	539±57	3.7

N=10

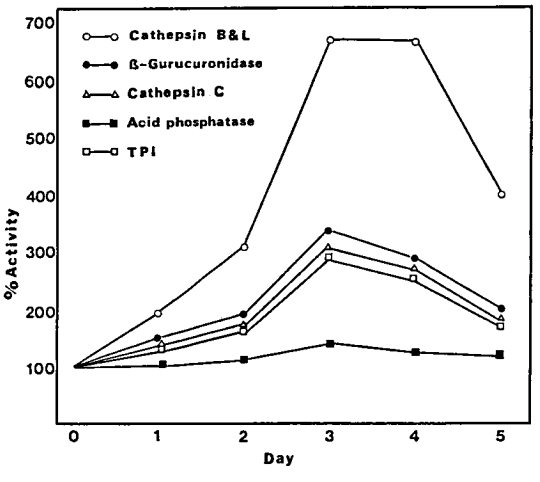


図1　Changes in activities of lysosomal hydrolases and TPI in soleus muscle after injection of plasmocid.

ゾーム酵素の合成の増加に基づく可能性であり，第3はマクロファージ(Mφ)の外からの浸潤の結果としてリソゾーム量が増える可能性である．それ以外に，リソゾームの酵素量の増加を伴わない活性上昇の可能性もあるが，TPIも平行して増えていること，活性増加に潜伏期があることはこの可能性が低いことを示唆している．さて，第3の可能性を検索する1つの方法として分離したMφ中の各種リソゾーム酵素活性，TPIを測定し，骨格筋中のそれと比較した(表2)．Mφは0.1%グリコーゲンを毎日1回3日間投与し，腹腔より集めたもので，約60%が顕微鏡的にはMφとみなせた．比活性の比較では，カテプシンB&L活性はMφの方が骨格筋より圧倒的に高い．β-グルクロニダーゼ，カテプシンCの順にMφ/骨格筋の活性比は減少し，酸フォスファターゼはMφと骨格筋で数倍の差しかない．Plasmocid myopathyでは，間質へのMφの浸潤は早期より認められるが，3日目にピークに達する．筋組織の酵素活性を測定する際，Mφの酵素の活性を含めて測定しており，Plasmocid罹患筋でリソゾームの酵素活性の変動が2群に分れるのは，浸潤してきたMφ中のリソゾーム酵素活性の差を反映しているとも考えられる．これらの結果は，勿論，Plasmocidによる骨格筋中のカテプシン活性の上昇を否定するものではない．次に，第2の可能性を調べるため，Plasmocidの注射と同時に，タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを投与して，リソゾームの酵素活性とTPIの増加が抑制されるかどうかを調べた．Plasmocid投与後2日目の罹患筋の活性が表3に示されている．Plasmocidの投与により著明に上昇したカテプシンB&L活性及びTPIはシクロヘキシミドの同時投与により，その上昇が完全に抑制されている．従って，Plasmocidによる筋リソゾームの酵素活性，TPIの上昇はタンパク合成を介する反応であることが示唆される．しかし，同時に行った組織学的検査では，罹患筋への細胞浸潤もシクロヘキシミドの投与より抑制されていた．シクロヘキシミドはカテプシン活性の上昇と筋タンパクの崩壊との関連を調べるのには好都合な手段であるので，実際にPlasmocidで誘起される筋タンパクの崩壊が，シクロヘキシミドの同時投与で抑制されるかどうかSDS-PAGEで検討した．Myosin HC, LC 1, LC 2及びTN-Tの分解の阻害が認められた（図2）．

考　　察

Plasmocid罹患筋におけるリソゾームチオール性カテプシンの活性上昇は蛋白合成を伴う遅い反応であり，カテプシン群の筋タンパク崩壊初期変化への関与は少ないと思われる．しかも，この活性増加は外からMφに由来する可能性が高いが，どの程度の活性がMφに依存しているのか今

表 2　Activities of lysosomal hydrolases and TPI in macrophages

Enzymes	Macrophages (A)	Muscle (B)	(A)/(B)
		mU/mg	
Cathepsin B & L	91	0.60	152
β-Glucuronidase	19.7	0.17	116
Cathepsin C	115	42	27
Acid phosphatase	79	8.6	9.2
TPI	31	1.6	19.3

表 3　Effect of cycloheximide on induction of cathepsin B & L and TPI in soleus muscle of plasmocid-induced rats

Treatment	Cathepsin B & L	TPI
Control (6)	47±6	120±11
Plasmocid (5)	295±76	240±62
Plasmocid + Cycloheximide (5)	46±14	103±7

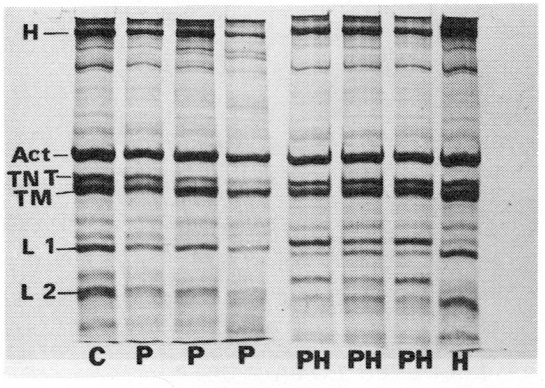


図 2　SDS gel electrophoretic pattern of myofibrillar proteins prepared from soleus muscle treated with plasmocid and/or cycloheximide for 36 h. C; non-treated control, P; plasmocid injected muscle, PH; plasmocid＋cycloheximide treated muscle, H; cycloheximide injected muscle.

回の結果では判然としない．浸潤細胞（とくにMφとマスト細胞）のプロテアーゼ群の筋線維崩壊の機序の解明と共に筋肉のタンパク質分解系即ち自己貪食-リソゾーム系が筋タンパクの崩壊とどのような関係があるか興味深い課題である．カテプシン活性と平行して上昇するTPIが筋タンパクの崩壊の場で重要な役割を演じているかどうかも今後の問題である．

文　献

1) Katunuma, N. & Noda, T.：Cathepsin B, H and L and intramuscular protein degradation in atrophic muscle of muscular dystrophy. In Muscular Dystrophy (edited by Ebashi, S.), University of Tokyo Press, Tokyo, 1982, p. 225.

2) Kominami, E., Wakamatsu, N. & Katunuma, N.：Purification and characterization of thiol proteinase inhibitor from rat liver. J. Biol. Chem., **257**：14648, 1982.

3) Katunuma, N., Towatari, T., Tamai, M. & Hanada, K.：Synthetic substrates for assays of cathepsin L and cathepsin B. J. Biochem., 1983, in press.

4) Barrett, A. J.：A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. Anal. Biochem., **47**：280, 1971.

5) Koldovsky, O. & Palmieri, M.：Cortisone-evoked decrease of acid β-galactosidase, β-glucuronidase, 11-acetyl-β-glucosamidase and arylsulphatase in the ileum of suckling rats. Biochem. J., **125**：697, 1971.

6) Igarashi, H. & Hollander, V. P.：Acid phosphatase from rat liver. J. Biol. Chem., **243**：6084, 1968.

7) 杉田秀夫，中瀬浩史：Plasmocidによる実験的ミオパチーの生化学的研究．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」(三好班)，昭和56年度研究報告書，1982，p.227.

37) Plasmocidによる実験的ミオパチーの筋蛋白分解機構
——筋ジストロフィー症との関連——

杉田秀夫*

研究協力者　中瀬浩史*　石浦章一*

はじめに

骨格筋，心筋には2種類のプロテアーゼが存在する．一つは非リソゾーム系プロテアーゼでありCa依存性中性プロテアーゼ(CANP)はこれに属し，もう一つはリソゾーム系プロテアーゼでありカテプシン群が含まれる．前者は蛋白質を限定分解し，後者は非限定分解を行う．本研究の目的はこの両プロテアーゼが筋蛋白の分解に際しどの様な関連を持って作用するのかを解明する事にある．

Wildenthalらによると心筋の筋蛋白の分解の場合，まず非リソゾーム系プロテアーゼにより限定分解をうけ，ついでリソゾーム系プロテアーゼにより蛋白分解が完成する系と，直接リソゾーム系プロテアーゼにより蛋白分解が完成する系が機構上想定されるが実証に乏しい．そこで我々は昨年同様plasmocidによる実験的筋壊死をモデルとしてこの問題を検討した．

方法

ウイスター系ラットの一側ヒラメ筋内に0.5% plasmocid生食溶解液0.4ml，即ち2 mgを直接注射し，その経時的変化を組織化学，電顕及び生化学的にしらべた．

プロテアーゼの測定には組織に10倍量のPBS-0.1% Triton X-100を加え，グラスホモゲナイザー中でホモゲナイズし，10,000×g，20分の上清を粗酵素液とし，カテプシンB＆LはSuc-Tyr-Met-Naphthylamide（徳島大勝沼教授の御好意による)を基質とし，1 mg蛋白あたり1時間で遊離する1 n Mol naphthylamineをもって1単位とした．カテプシンDはBarretの方法に従い，酸性フォスファターゼはp-nitrophenyl phosphateを基質として測定した．クレアチンキナーゼはBoehringerのキットを用いて測定した．

結果

1)形態学的所見

Plasmocidを直接ヒラメ筋内に投与すると2～3時間後には昨年観察されたと同様に所謂opaque線維の出現，またGBHAで陽性に染まるCa positive線維が認められた．電顕的にはほぼ選択的にZ帯が消失し，他の筋原線維の構造は比較的良く残存していた．

2)生化学的所見

a）筋構造蛋白の経時的変化

図1に示される様に筋構造蛋白の中でも特にα-アクチニンの低下は著明であり，注射2時間後にすでにコントロールの40%に低下し12時間で完全に消失した．他の構造蛋白例えばα-トロポミオシン，ミオシンH鎖は徐々に減少し12時間で1/2に低下し，注射72時間でほぼ完全に消失した[2]．

b）E-64-c及びEGTAの効果

図2はplasmocid単独及びplasmocidと共に1 mM E-64-c，又は5 mM EGTAを一緒に注射3時間後の筋構造蛋白のSDSゲル電気泳動パターンであるが，E-64-c及びEGTA存在下でα-アクチニンの罹患筋からの遊離は部分的に抑制された[3]．

c）罹患筋のクレアチンキナーゼ，リソゾーム酵素活性の経時変化

図3は罹患筋のクレアチンキナーゼ（CK)，カテプシンB＆L，D及び酸性フォスファターゼの

*国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

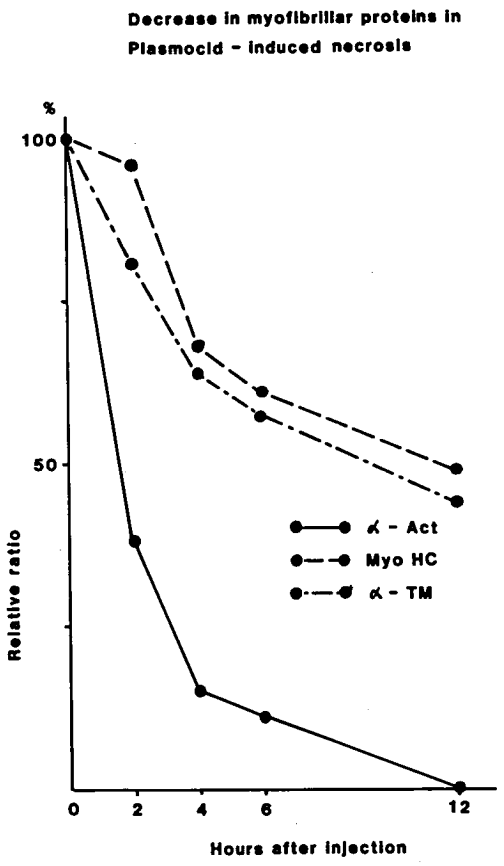


図1　筋構造蛋白の経時的変化
α-Act　；α-アクチニン
Myo HC　；ミオシンH鎖
α-TM　；α-トロポミオシン
各蛋白量はアクチンに対する比率で示している.

経時的変化である. CK は注射3時間後約1/4に低下し，48時間後には殆んど消失し，筋壊死が完成した事を示している.

カテプシンB＆L，及びDは注射3時間後はむしろ低下の傾向を示したが48時間後は著明に増加し，カテプシンDはコントロールの約3倍，カテプシンB＆Lは9倍に増加した. しかし同じリソゾーム酵素である酸フォスファターゼは増加しなかった[3].

考　　察

Plasmocid を直接ラットのヒラメ筋に注射する事により形態学的に昨年と同様の結果を再現する事が出来た.

即ち注射3時間後に opaque 線維の出現，且つ GBHA で染色される事，また電顕的に選択的にZ帯が消失する事等の所見は埜中らが塩酸ブピバカインをヒラメ筋に直接注射した時の所見によく似ており，plasmocid の作用点の一つは形質膜である事を示唆している[1].

さて注射3時間後のZ帯の消失及び α-アクチニンの遊離が非リソゾーム系酵素である CANP によるのか，リソゾームのカテプシンの作用によるかを検討した.

本来 CANP 及びカテプシンBは *in vitro* では速やかにZ帯を消失させ，α-アクチニンを遊離させる作用を持っている[4),5)]. Plasmocid と一緒にチオールプロテアーゼ阻害剤である E-64-c 1 mM を注射すると α-アクチニンの遊離は部分的に阻害された. つまりZ帯の消化はチオールプロテアーゼに由来すると思われる.

次に EGTA と plasmocid を一緒に注射し Ca イオンをキレートするとやはり α-アクチニンの遊離は部分的に阻害された. この事実は EGTA により Ca イオンがキレートされ CANP が作用

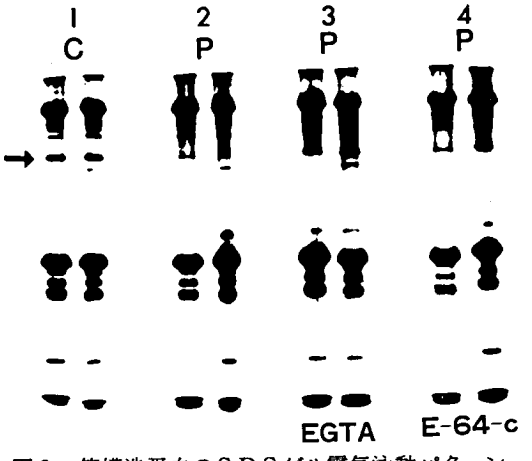


図2　筋構造蛋白のSDSゲル電気泳動パターン
C；未処置
P；plasmocid 投与
1；control，2；plasmocid 単独
3；plasmocid＋EGTA，
4；plasmocid＋E-64-c

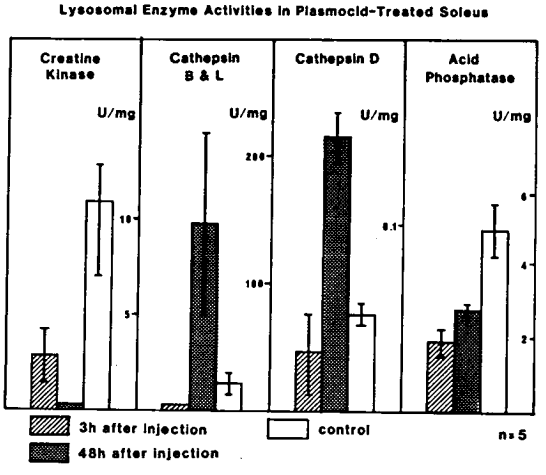


図3　罹患筋のカテプシン活性

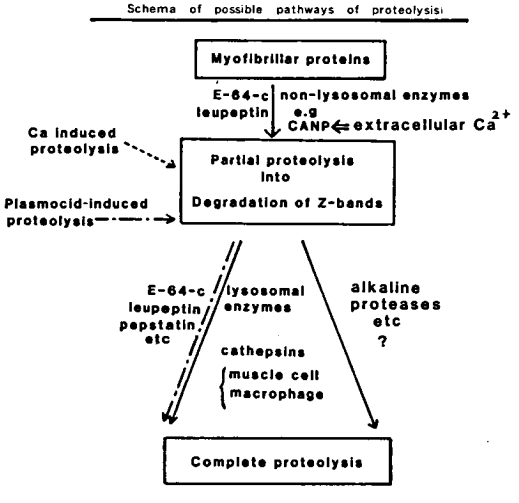


図4　筋蛋白分解機構図

出来なくなった為と想定され，plasmocid 注射初期に現われるZ帯の消失は非リソゾーム系CANPによる事が想定される．

リソゾーム系プロテアーゼ即ちカテプシンB&L，及びDは注射3時間は増加せず，むしろ低下した事はZ帯の消失がカテプシンによらない事を側面から支持するものであろう．しかし注射48時間後は著明に増加し筋壊死の進行とよく平行している様に思われる．

さてカテプシン群の増加は本来骨格筋に存在するリソゾーム自身なのか，筋細胞外の浸潤したマクロファージに由来するものかが問題となる．

我々は注射48時間後の筋肉について抗カテプシンB抗体（徳島大学勝沼教授，木南講師の御好意による）による螢光抗体法を用いてその局在を調べてみると，カテプシンBは殆んどマクロファージ内に局在する事が明らかになった．この事からplasmocid 注射による筋壊死の場合マクロファージ由来のカテプシンが筋蛋白分解にかなり関与しているものと想像される．

筋蛋白分解の二段階方式（two step mechanism）

Plasmocid の作用点はなお明らかではないが，塩酸ブピバカインの場合との類似性から考えると少なくても作用点の一つは筋形質膜と考えられる．

その結果，細胞外の Ca イオンの過剰の influx により CANP が活性化されZ帯は選択的に消失し（限定分解），筋原線維の disassembly が起る．これが第一段階である．

ついで disassembly した筋原線維はリソゾーム系プロテアーゼ即ち各種のカテプシンにより，非限定分解をうけ蛋白分解は完成する．これが第二段階である．この際浸潤するマクロファージ由来のカテプシン群が重要な役割をはたしていると思われる．

また浸潤するマクロファージと共に肥満細胞も induction をうけ，肥満細胞由来のセリン性プロテアーゼなどのアルカリ性プロテアーゼも第二段階に関与すると思われる（図4），デュシャンヌ型筋ジストロフィー症における筋蛋白の分解の場合にあてはめて考えてみると，形質膜の異常を起す機構は plasmocid の場合とは異なるが，膜異常による Ca イオンの過剰の influx とその結果生じる CANP の活性化は現象的に類似性があり，従ってこの場合も plasmocid の時と同様に二段階方式による筋蛋白分解機構が想定されよう．

ま　と　め

Plasmocid の直接注射による骨格筋の蛋白分解は第一段階は非リソゾーム系，第二段階はリソゾーム系の二段階方式に従っており，第一段階は細胞外からの過剰の Ca influx による CANP の

活性化とそれに伴うZ帯の選択的消失，及びα-アクチニンの遊出である．第二段階では第一段階によりdisassemblyした筋原線維がリソゾーム系カテプシンによる非限定分解によって蛋白分解は完成する．これと共通の機構がデュシャンヌ型筋ジストロフィー症の場合も想定される．

文　献

1) 埜中征哉，小林繁一，岡田理美：骨格筋の再生に関する組織学的研究．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する研究」(三好班)，昭和56年度研究報告書，1982，p.15.

2) 中瀬浩史，石浦章一，埜中征哉，杉田秀夫：未発表データ．

3) Ishiura, S. & Sugita, H.：Mechanism of muscle protein degradation in muscular dystrophy. Molecular Aspects of Neurological Disorders (Austin, L., edited), Academic Press, Australia, in press.

4) Busch, W. A., Stromer, M. H., Goll, D. E. & Suzuki, A.：Ca^{2+}-activated removal of Z-lines from rabbit skeletal muscle. J. Cell Biol., 52：367, 1972.

5) Noda, T., Isogai, K., Hayashi, H. & Katunuma, N.：Susceptibilities of various myofibrillar proteins to cathepsin B and morphological alteration of isolated myofibrils by this enzyme. J. Biochem., 90：371, 1981.

38）Duchenne 型筋ジストロフィー症にみられる opaque fiber の筋構造蛋白に関する研究

荒　木　淑　郎*

研究協力者　内　野　　誠*　吉　田　　理*　植　川　和　利*

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）の生検筋には変性・壊死筋線維に混じて，いわゆる“opaque fiber”と呼ばれる HE 染色，Gomori 染色，あるいは PAS 染色などで濃染する円形のやや肥大した筋線維が高率に認められ，DMD における組織所見の特徴の一つとなっている[1]．この opaque fiber の病的意義については種々論議されてきたが，DMD のみならず各種神経筋疾患，さらに健常人の生検筋にも稀にみられるところから，一つには筋生検過程や標本作製の過程で生じた人工産物とみなす意見[2]と，もう一つには単なる人工産物ではなく DMD の筋変性過程における初期変化像としてとらえる意見[3)~6)]が相対立しており，一定の結論がでるまでには至っていない．特に後者の考えは最近の DMD の成因に関する膜異常説[7)~10)]に結びつくものであり，膜異常に伴う細胞外 Ca^{++} の massive influx が筋原線維の hypercontraction 並びに CANP に代表される Ca^{++} dependent protease の活性化をきたすことにより，これに感受性を有する筋構造蛋白の分解を惹起し，筋線維が変性・壊死に陥る一連の過程で比較的早期に出現する変化として opaque fiber をとらえている[5),6)]．

今回我々は opaque fiber の病理発生的意義について生化学的に検討するために，DMD 生検筋から opaque fiber を単一筋線維として分離し，筋構造蛋白の分析を行ない興味ある結果を得たので報告する．

＊熊本大学医学部第一内科

対象と方法

4～25歳の DMD 患者12例について筋生検を行なった．生検部位は筋萎縮の高度な部位はさけて，上腕二頭筋，腓腹筋，あるいは前脛骨筋で実施した．生検筋の一部は組織化学的検索に用い，残りを opaque fiber の分離に用いた．すなわち検体は小さな筋束に分けて氷冷の relaxing solution（4 mM ATP, 4 mM EGTA, 4 mM $MgCl_2$, 0.12 M KCl, 20mM tris aminomethane, 20mM maleic acid, pH6.8）に浸したものを，暗視野実体顕微鏡及び偏光顕微鏡下に電顕用ピンセットを用いて opaque fiber 並びに正常横紋構造を有する対照筋線維を分離した（図1）．分離した単一筋線維は約 10μl の protein solution（1％ SDS, 10mM β-mercaptoethanol, 40% glycerine, 0.03% bromphenol blue, 40mM tris-0.24M glycin, pH8.5）中にて溶解し，ミニスラブ型電気泳動装置を用い Laemmli の方法[11)]に従って SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった．泳動したゲルは Coomassie brilliant blue で染色後，densitometer にて比色定量した．

結　　果

DMD12症例の生検筋より分離した opaque fiber 及び対照筋線維の中から type I fiber の泳動パターンを呈する opaque fiber 9 検体，対照筋線維19検体を選んで比較検討を行なった．偏光顕微鏡下で正常横紋構造を失ない，特有の光輝性を有する opaque fiber としてとらえられる筋線維の約70％は対照筋線維との間に筋構造蛋白の変化がみられなかった（opaque fiber a）が，約30％の opaque fiber（opaque fiber b）では myosin heavy

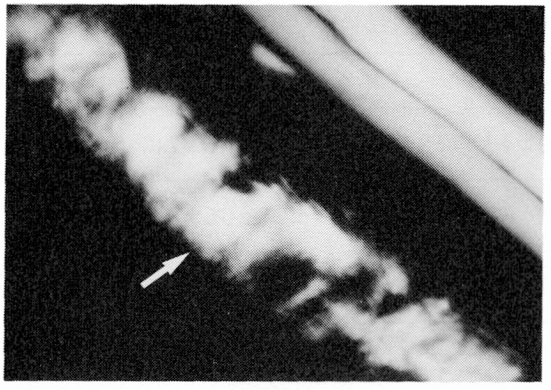


図1　A group of teased, unfixed fibers as seen through a polarized microscope. Notice the single opaque fiber (arrow), which lacks the normal banding pattern with peculiar brightness.

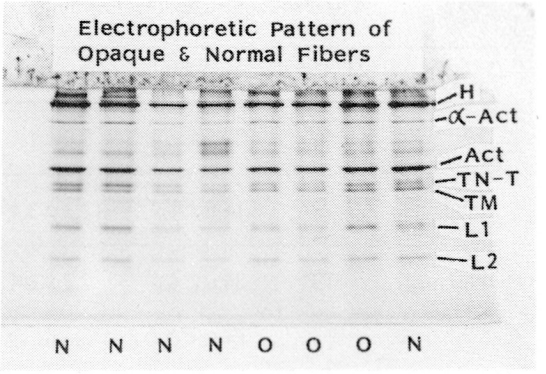


図2a　In this electrophoretogram, there is no obvious change in any component of the myofibrillar proteins of the opaque fibers as compared with the controls. O : opaque fiber, N : Normal control fiber.

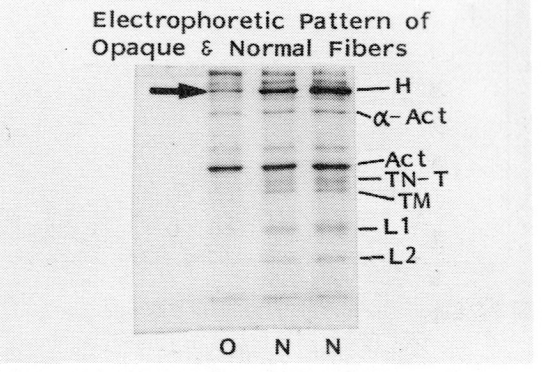


図2b　Another electrophoretogram of the opaque and control fibers. The myosin heavy chain and low molecular proteins of the opaque fiber is clearly reduced, but the actin band is well-preserved (arrow).

chainの減少を始め，actinを除く低分子蛋白の全般的な減少を示した(図2 a，b，図3，表1)．α-actininについてはopaque fiber a, b共有意の変化は認めなかった．Troponin I, Cについては対照筋でも含量が極めて微量であり，一次元の泳動のみではbandの同定並びに含有量の増減について言及することは困難であった．

考　　案

ヒト骨格筋線維は組織化学的にmyosin ATPase染色によりtype I fiber（赤筋）と，type II fiber（白筋）に分けられるが，生理学的な特性も，また筋構造蛋白の組成も異なっている[12]．DMD生検筋を用いた筋構造蛋白の変化の分析はSugitaら[13),14)]により行なわれてきたが，いずれもtype I，II fiberが混在し，また正常横紋構造を有する筋線維及び種々の変性段階にある筋線維が混在したmassとしての変化の分析であり，個々の病的筋線維についての検索はなされておらず，また文献的にも殆んど報告がない．Takagiら[15)~17)]はDMD生検筋から単一筋線維を分離し，ストロンチウムイオンに対する感受性の違いから電気生理学的にfiber typeを区別し，二次元の電気泳動による筋構造蛋白の分析を行ない，DMDにおいてはtype I，IIの中間的性質を有するtype Xと呼ぶ筋線維が高率にみられることを報告した．Type Xの由来については未分化の再生筋線維であろうと推定している．ただ高木らの用いた単一筋線維は無作為に選んだいずれも正常横紋構造を有する筋線維であり，横紋構造の変化を有する病的筋線維についての検索は行なわれていない．

一方opaque fiberの電顕的観察ではChouら[5)]は早期よりのZ-band及びthin filamentの消失を述べており，埜中ら[6)]もZ-bandの崩壊を報告している．従って電顕的観察と結びつけて考えるとopaque fiberの筋構造蛋白の分析ではZ-bandの構成蛋白であるα-actininが減少していること

表1　Percentage of myofibrillar proteins in opaque and normal fibers

	Number of samples	Myosin H chain	α-Actinin	Actin	Troponin-T	Tropo-myosin	Light chain 1	Light chain 2
Opaque (a)	6	32.2±2.4	8.6±1.4	28.9±4.3	7.9±0.9	8.9±1.1	7.5±2.0	6.1±1.6
Opaque (b)	3	16.6±1.2[a)] **	12.3±3.4	41.8±6.6	10.2±4.0	6.1±2.9	8.5±3.8	4.5±2.1
Normal	19	34.0±4.4[b)]	7.3±1.4	27.7±3.2	8.8±1.1	7.8±2.0	8.3±2.3	6.0±1.4

**P<0.01 (a) versus b))　　Mean±S.D.

The myosin heavy chain of opaque fiber "b" is significantly decreased.
On the contrary, the percentage of actin is relatively increased.

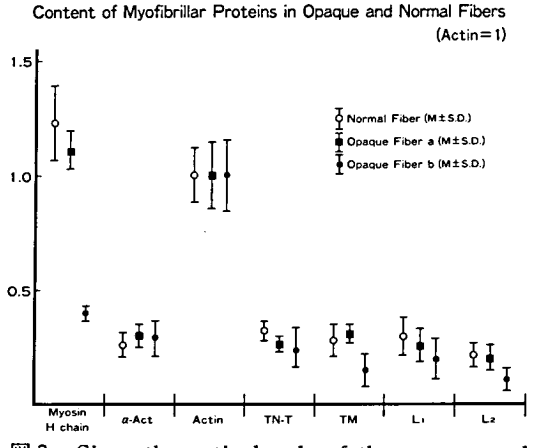


図3　Since the actin bands of the opaque and control fibers examined in this study were all well-preserved, we compared the contents of each myofibrillar proteins of the opaque fibers with those of the control fibers on the basis of the actin contents. The ordinate of this diagram represents the ratio of the content of each myofibrillar proteins to that of actin. Opaque fiber "a" displays the electrophoretogram of almost normal, and opaque fiber "b" shows the general reduction of myosin heavy chain and other low molecular proteins.

が予想されたが，我々の今回の研究結果では α-actinin に関しては明らかな変化がみられなかった．このことは今回我々が用いた方法では分離した筋線維を直接 SDS 溶液中に溶解するために，Z-band から筋形質中に遊離した状態で存在する α-actinin もそのまま泳動され，みかけ上は変化があらわれない可能性も考えられた．

ない線維と，明らかに差がある線維がみられたのは興味ある事実であり，opaque fiber の中には筋変性過程にある筋線維としてとらえられるものが

埜中らは詳細な組織化学的及び電顕的検索から opaque fiber には人工産物的に出現するものの他に，変性過程にある線維としてとらえられるものがあることを述べているが，我々の生化学的分析でも opaque fiber としてとらえられる筋線維には対照筋線維と比較して泳動パターン上特に差が含まれている可能性が示唆された．今後更に症例数を増し，二次元の電気泳動による微量成分の検索も含めて，詳細に検討していく必要があると思われる．

要　　約

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）における "opaque fiber" の病的意義について生化学的に検討するために，opaque fiber を生検筋から単一筋線維として分離し，筋構造蛋白の分析を行なった．4～25歳の DMD12症例から 9 検体の opaque fiber 並びに19検体の正常横紋構造を有する対照筋線維について比較検討を行なったが，形態学的に opaque fiber としてとらえられるものには対照筋との間に電気泳動パターン上特に変化がないもの（opaque fiber a）と，myosin heavy chain その他の成分の減少を示すもの（opaque fiber b）がみられた．今回の実験から opaque fiber としてとらえられる筋線維の一部は実際に筋構造蛋白の変化を有する変性過程にある筋線維が含まれている可能性が示唆された．

文　献

1) Boxler, K. & Jerusalem, F. : Hyperreactive (hyaline, opaque, dark) muscle fibers in Duchenne dystrophy. A biopsy study of 16 dystrophy and 205 other neuromuscular disease cases and controls. J. Neurol., 219 : 63-72, 1978.

2) Karpati, G. : A review of the morphologic features and consequences of muscle cell necrosis in Duchenne disease : Clues to the pathogenesis. In International Congress Series 434, Neurology, ed. by Jarger W.A.H., Bruyn G.W., Heijstee A.P.J., Excerpta Medica, Amsterdam, 1978, p.117-131.

3) Schmalbruch, H. : Segmental fiber breakdown and defects of the plasmalemma in diseased human muscles. Acta Neuropathol. (Berl.), 33 : 129-141, 1975.

4) Cullen, M.J. & Fulthorpe, J. J. : Stages in fiber breakdown in Duchenne muscular dystrophy. An electron-microscopic study. J. Neurol. Sci., 24 : 179-200, 1975.

5) Chou, S.M., Miike, T., Crosby, T. W. & Amato, S. : Ultrastructure of "opaque fibers" (OFs) in Duchenne muscular dystrophy (DMD). Neurology (Minneap.), 29 : 594, 1979.

6) 埜中征哉，杉田秀夫：進行性筋ジストロフィー症の筋病理ーOpaque 線維を中心としてー．神経進歩，24：718-728，1980.

7) Mokri, B. & Engel, A. G. : Duchenne dystrophy : Electron microscopic findings to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. Neurology (Minneap.), 25 : 1111-1120, 1975.

8) Sugita, H. & Toyokura, Y. : Alteration of troponin subunits in progressive muscular dystrophy (DMD). II. Mechanism of the alteration of troponin subunits in DMD. Proc. Japan. Acad., 52 : 260-263, 1976.

9) Schotland, D.L., Bonilla, E. & Van Meter, M. : Duchenne dystrophy : Alteration in plasma membrane structure. Science, 196 : 1005-1007, 1977.

10) Carpenter, S. & Karpati, G. : Duchenne muscular dystrophy. Plasma membrane loss initiates muscle cell necrosis unless it is repaired. Brain, 102 : 147-161, 1979.

11) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature, 227 : 680-685, 1970.

12) 杉田秀夫，米本恭三：神経支配と筋蛋白．神経進歩，19：805-815，1975.

13) 杉田秀夫：ミオパチーと収縮蛋白．第18回日本医学会総会会誌：1411-1415，1971.

14) Sugita, H., Katagiri, T., Shimizu, T. & Toyokura, Y. : Studies on the structural proteins in various neuromuscular diseases. In "Basic research in myology", (ed. by Kakulas B. A.), Excerpta Medica, Amsterdam, 1973, pp.291-297.

15) Takagi, A., Yonemoto, K. & Sugita, H. : Single human muscle fibers : Activation by calcium and strontium. Neurology (Minneap.), 28 : 497-499, 1978.

16) Takagi, A. & Nonaka, I. : Duchenne muscular dystrophy : Unusual activation of single fibers in vitro. Muscle Nerve, 4 : 10-15, 1981.

17) 高木昭夫：シンポジウムII：進行性筋ジストロフィー症の成因をめぐって(2)再生現象よりのアプローチ一生理生化学的立場より一．臨床神経，21：1088-1091，1981.

39）筋糖原病の病態分析——新しいスクリーニング指標物質について

垂　井　清一郎*

研究協力者　嶺　尾　郁　夫*　清　水　孝　郎*
鷲　見　誠　一*　河　野　典　夫*

目　的

骨格筋において糖原分解から解糖系を経て乳酸にまで代謝される過程は，筋運動時のエネルギー産生系として極めて重要である．本代謝過程が障害される疾患として，糖原病Ｖ型（筋ホスホリラーゼ欠損症）とVII型（ホスホフルクトキナーゼ欠損症）が，既によく知られている．

Ｖ型は，1951年 McArdle によって報告[1]されて以来，約30年を経た今日，世界で少なくとも60例を越える症例が見出されている．我国においては，1975年に初めて報告されて以来，７例が診断されている．

VII型は，1965年私共の報告[2]以来，アメリカ・フランス・イギリス・カナダ・イタリア・スペインからの報告が相つぎ，現在20症例（16家系）を数える．これには，最近私共が確定診断した本邦第２家系目に相当する横須賀共済病院の２症例（兄妹）[3]が含まれる．

一方，Ｖ型やVII型の他に，類似した筋症状を呈するミオパチーとして筋解糖系の２～３の酵素欠損症も最近新たに見出されている[4),5)]．したがって，これらの酵素欠損症をミオパチー群の中から適切にスクリーニングしていく必要性が，従来にも増して高くなっている．

そのスクリーニング方法として，今日まで前腕運動による乳酸産生の有無が専ら検索されてきた．本研究では，迅速に且つ簡便に測定し得る新しい血中指標物質を見出すことを目的に，筋糖原病における運動筋の病態代謝の分析を試みた．

方　法

対象：糖原病Ｖ型２症例（２家系），VII型２症例（２家系），II型１症例及びその他のミオパチー症例（対照群）について検索した．糖原病各型は，全て生検筋について，当科で酵素学的に診断確定している．

部分的阻血下前腕運動試験（Semi-ischemic Forearm Exercise Test）；　前腕運動を完全阻血下で行わせる従来の方法では，運動継続の可能な時間が，特に筋糖原病患者で短く，激烈な筋症状を呈することさえある．そこで，私共は平均動脈圧 $\left(\frac{最高血圧＋最低血圧}{2}\right)$ で上腕部を緊縛する部分的阻血下 Semi-ischemic で，２分間で120回

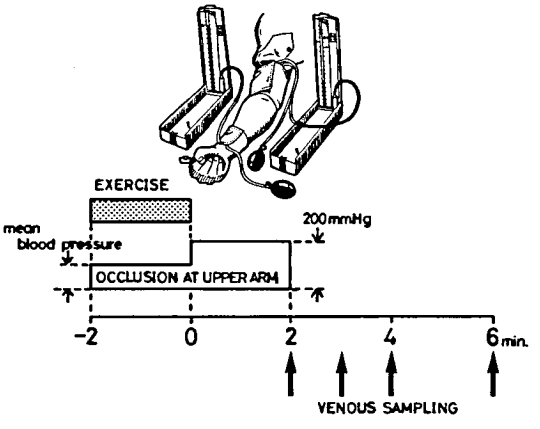


図１　部分的阻血下前腕運動試験
Semi-ischemic forearm exercise test

＊大阪大学医学部第二内科

ゴム球を握る運動を行わせる方法を考案した（図1）．これにより筋症状は軽減し，且つ運動量も増加できた．そこで，以下の検索に本法を採用し，得られた運動筋の還流静脈血中の代謝物質を分析した．

乳酸・ピルビン酸の測定は，6％過塩素酸で抽出した全血について，酵素法で行った．静脈血pHは，自動血液ガス分析装置を用いて測定した．アンモニアの測定は，EDTA加血漿について，酵素法（glutamate dehydrogenase）で行った．

成　　績

(1)乳酸（図2）

対照群では，頂値2810±1230μM（mean±SD）の上昇反応を認める．V型・VII型では，いずれの症例においても，乳酸上昇を認めない．なお，糖原病であっても，運動エネルギー源としてのグリコゲン代謝に障害のないII型では，対照群に匹敵する上昇反応を認める．

(2)ピルビン酸（図3）

対照群では，乳酸と同様にピルビン酸の上昇反応を認める（頂値34±21μM，mean±SD）．一方，V型・VII型群では上昇を認めず，運動負荷2分後に得られるピルビン酸値は，むしろ前値より低下する（−19±7μM）．

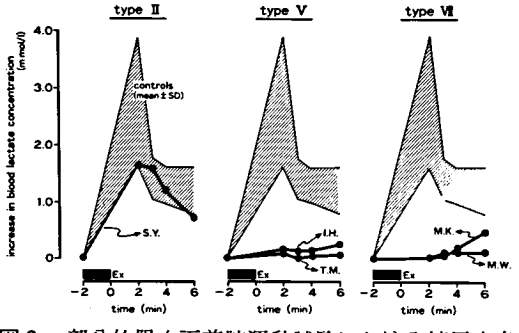


図2　部分的阻血下前腕運動試験における糖原病各型の乳酸の変化

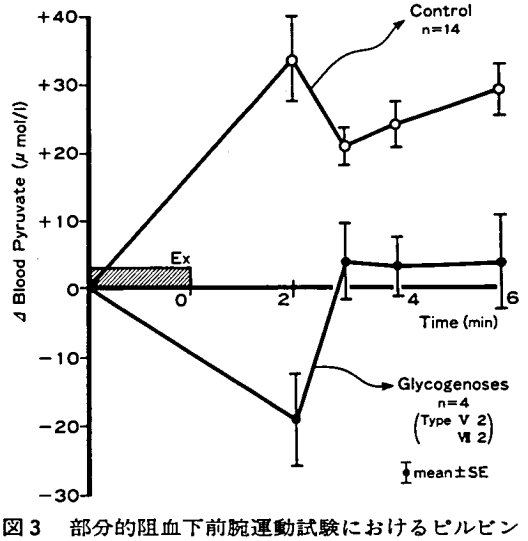


図3　部分的阻血下前腕運動試験におけるピルビン酸の変化

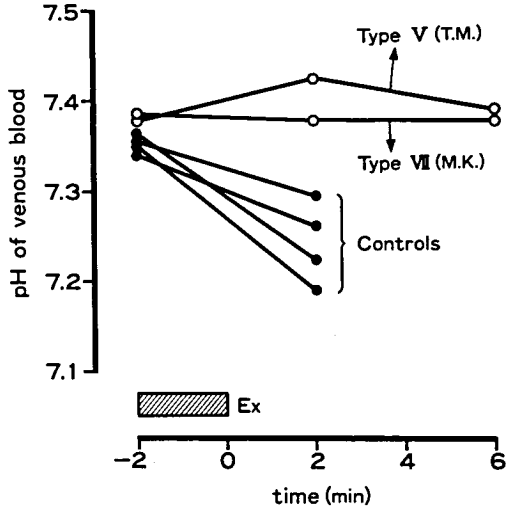


図4　部分的阻血下前腕運動試験における静脈血pHの変化

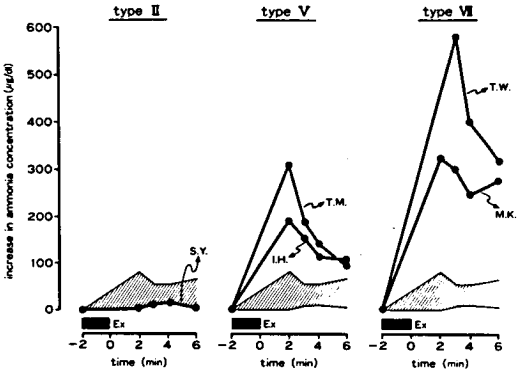


図5　部分的阻血下前腕運動試験におけるアンモニアの変化

(3)静脈血 pH（図4）

対照群では，静脈血 pH は低下する（0.14±0.05 低下）．V型・VII型では，pH の減少を認めない．

(4)アンモニア（図5）

対照群では，頂値56±38μg/dl の上昇反応を認めた．II型でも，対照と同程度の上昇を認めた．ところが，V型・VII型では，いずれの症例においても対照に比し著しく過剰な上昇（352±142μg/dl）を認めた．

考　　案

私共は改良した部分的阻血下前腕運動試験 Semi-ischemic Forearm Exercise Test によって，被験者の負担が軽減され，且つ対照者では採血初期に頂値の現れる明瞭な乳酸上昇反応が得られるので，上昇反応が欠如するV型・VII型を選別するのは容易である．

一方，ピルビン酸の増加度は少なく，本物質の測定上の問題も考慮すると，結果判定は乳酸ほど容易でない．但し，ピルビン酸の低下反応が観られたなら，V型やVII型が強く疑われる．それは，阻血による低酸素状態のため，ピルビン酸＋NADH $\overset{LDH}{\rightleftharpoons}$ 乳酸＋NAD の平衡が右方へ傾く時，解糖系からの供給がないV型やVII型ではピルビン酸の低下反応として観察されるからである．

対照群では，乳酸やピルビン酸産生を反映して明らかな静脈血 pH の低下（酸性化）が認められる．乳酸・ピルビン酸産生のないV型・VII型では，pH の低下は認められない．ベッドサイドで結果を迅速に知り得る簡易法として，pH の測定が有用である．

V型・VII型の両型において，アンモニアの過剰上昇反応が認められることは注目すべき点である．運動筋では

$$\mathrm{AMP} \xrightarrow{\text{Adenylate Deaminase}} \mathrm{IMP} + \mathrm{NH_3}$$

の反応によって，アンモニアが産生されることが明らかにされている[6]．但し，本代謝系の生理的意義については依然不明な点が多い．Chapman と Atkinson らは，肝において本代謝系が ATP：ADP 比を保持することにより，細胞の energy charge の安定化を図ると説明している[7]．一方，高い Adenylate Deaminase 活性が認められる骨格筋においても，本代謝系は同様に筋運動のエネルギー代謝に関与していることが示唆される．運動筋での本代謝系の重要性は，近年見出された骨格筋 Adenylate Deaminase 欠損症における知見[8]からも明らかである．

さて，V型・VII型におけるアンモニアの過剰反応の1つの機作として，解糖代謝障害に基づき ATP 産生が欠如している筋内で，ADP・AMP が過剰に増加する結果，Adenylate Deaminase が強く活性化されることがあげられる．つまり，運動筋の Adenine Nucleotide の変化にひきつづいておこる energy charge を保持する反応機構が，ATP（エネルギー）産生の欠如する筋糖原病においてより誇張した形をとって発現したと考えられる．また Adenylate Deaminase によって AMP が除去される結果，

$$2\ \mathrm{ADP} \xrightarrow{\text{Myokinase}} \mathrm{ATP} + \mathrm{AMP}$$

の反応が促され，ATP 欠乏を補うと考えられる．

機作については，さらに検討を要する問題であるが，本所見は筋糖原病に共通する特徴的所見として，スクリーニングへの応用が期待される．

前腕運動試験における結果の判定は慎重に行う必要がある．たとえば，正常者であっても，運動量が少ないために乳酸上昇が少ない場合や，筋糖原病患者であっても，運動筋による乳酸産生以外の要因（肝・赤血球における乳酸産生など）によって軽度ではあるが乳酸増加反応を認める場合がある．したがって，前腕運動負荷試験において，乳酸の他，pH あるいはアンモニアといった複数の物質を測定することによって，いっそう確実なスクリーニングが可能になると思われる．

結　　語

糖原病V型・VII型のスクリーニングには部分的阻血下前腕運動試験において，乳酸・ピルビン酸の測定以外に，静脈血 pH やアンモニアの測定が有用である．

文　献

1) McArdle, B. : Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. Clin. Sci., 10 : 13, 1951.

2) Tarui, S., et al. : Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. A new type of glycogenosis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 19 : 517, 1965.

3) Koyama, H., et al. : in preparation.

4) Kanno, T., et al. : Hereditary deficiency of lactate dehydrogenase M-subunit. Clin. Chim. Acta, 108 : 267, 1980.

5) DiMauro, S., et al. : Human muscle phosphoglycerate mutase deficiency : newly discovered metabolic myopathy. Science, 212 : 1277, 1981.

6) Lowerstein, J. M., et al. : The purine nucleotide cycle in skeletal muscle. Federation Proceedings, 37 (9) 2308, 1978.

7) Chapman, A. G., et al. : Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. J. Biol. Chem., 248 : 8309, 1973.

8) Sabina, R. L., et al. : Disruption of the purine nucleotide cycle : a potential explanation for muscle dysfunction in myoadenylate deaminase deficiency. J. Clin. Invest., 66 : 1419, 1980.

40）多発性筋炎における抗ミオシン抗体の診断的意義について

垂　井　清一郎*

研究協力者　和　田　圭　司*　上　野　　聡*　狭　間　敬　憲*
小笠原　三　郎*　姜　　進*　高　橋　光　雄*

多発性筋炎の診断検査法としては血清酵素活性の測定，筋電図，筋生検が最も頻繁に用いられているが，これらの検査法はいずれも多発性筋炎に特異的でなく，ために多発性筋炎と他の筋神経疾患，特に筋ジストロフィー症との鑑別が困難な場合も必ずしも少なくない．一方，多発性筋炎は自己免疫疾患の範疇に属すると考えられているが，自己免疫疾患においては特定の自己抗体の測定がその診断に役立つことが多い．今回我々は筋の主要成分たるミオシンに対する血中自己抗体のラジオイムノアッセイ法を開発し，同法で測定した血中抗体価が多発性筋炎を含む各種筋神経疾患においてどの様な分布をとり得るかを検索した．

対象および方法

患　者

多発性筋炎20名，筋ジストロフィー症15名（Duchenne 型 2 名，Becker 型 3 名，肢帯型 1 名，遠位型 2 名，眼筋・咽頭筋型 2 名，筋緊張性ジストロフィー 5 名），重症筋無力症10名，運動ニューロン疾患 8 名（Kugelberg-Welander 病 2 名，ALS 6 名），末梢神経疾患 6 名（中毒性多発神経炎 3 名，Charcot-Marie-Tooth 病 2 名，急性間歇性ポルフィリン症 1 名），自己免疫疾患 7 名（SLE 4 名，PSS 3 名），その他神経疾患30名（脊髄小脳変性症 6 名，Shy-Drager 症候群 3 名，Parkinson 病 4 名，Huntington 病 1 名，脳性麻痺 2 名，てんかん 1 名，神経ベーチェット病 3 名，多発性硬化症 3 名，脳血管障害 2 名，脊髄症 5 名）．

＊大阪大学医学部第二内科

抗　原

ミオシンは死後 4 時間以内の正常ヒト骨格筋より Perry ら[1]，Richards ら[2]，Samaha ら[3] の方法に従って精製した．精製されたミオシンをクロラミン T 法[4] により ^{125}I で標識し抗原とした．^{125}I-ミオシンの specific activity は1.0×10^{18}cpm/mole であった．

抗体価測定

抗体価測定は二抗体法によった．抗原 2×10^{-10} M と各濃度の血清を incubate 後第二抗体を追加，上清を遠沈除去した後沈殿の radioactivity を γ カウンターにて計測した．

患者血清値より正常血清値を差し引いた値をプロットし，titration curve の直線部分より抗体価を計算した．抗体価は moles of myosin precipitated per liter of serum (M) として表わした．患者血清値が正常血清値の mean＋2 SD 以内の時は抗体陰性とした．

抗体特異性の検討

抗ミオシン抗体のミオシン特異性の検討は McDonald ら[5] の方法に従った．血清と非標識ミオシンを incubate 後 precipitate を遠沈除去，上清における抗体の有無を先に述べた二抗体法により検索した．

結　　果

ミオシン

図 1 は精製したミオシンの SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動図を示す．1 本の heavy chain（分子量20万）と 2 本の light chain（分子量2.5万，2 万）が認められた．

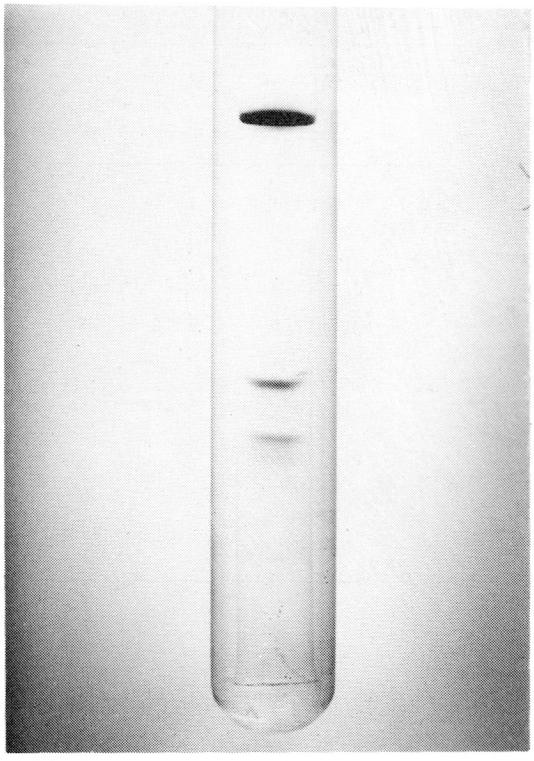


図 1

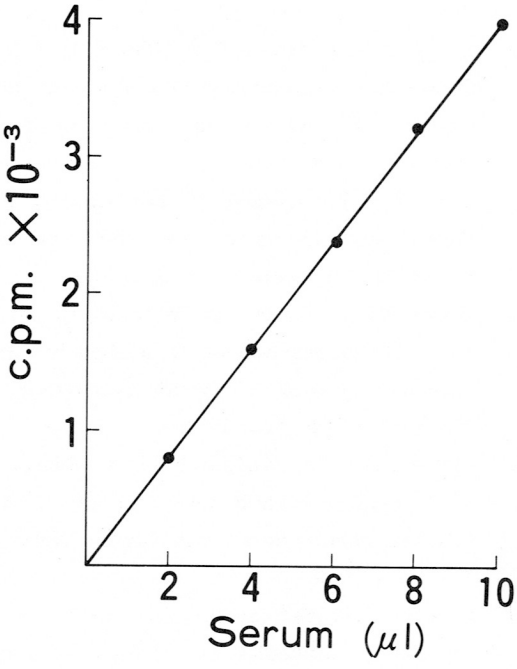


図 2

表 1 Absorption of autoantibodies to skeletal muscle myosin with purified human skeletal muscle myosin.

	Radioactivity* precipitated by serum absorbed with	
	Myosin	Buffer**
Patient	943±29	2856±62
Normal	914±34	907±58
	NS***	p<0.001

* All values are mean ± SD and expressed as c.p.m.
** 0.05M phosphate buffer (pH 7.0)
*** not significant

抗体価測定

図 2 は抗ミオシン抗体陽性例の titration curve を示す．図より抗体価は4.00×10^{-10}Mと計算される．

抗体特異性

表 1 に抗ミオシン抗体のミオシン特異性を検討した結果の 1 例を示した．非標識ミオシンとあらかじめ incubate した患者血清では対照に比べ有意な抗体価が得られなかった．

抗ミオシン抗体

表 2 に各種筋神経疾患における抗ミオシン抗体の出現率と抗体価の平均値を示した．多発性筋炎における抗ミオシン抗体の出現率は90%で筋ジストロフィー症（20%），重症筋無力症（20%），運動ニューロン疾患（12.5%）等における出現率に比べ有意に高率であった($p<0.001$)．また平均抗体価も多発性筋炎においては4.24×10^{-10}M で筋ジストロフィー症(0.37×10^{-10}M)，重症筋無力症（0.20×10^{-10}M)，運動ニューロン疾患（0.12×10^{-10}M）等における平均抗体価に比べ有意に高値であった（$p<0.04$)．

考　　案

抗ヒト筋ミオシン抗体が他疾患に比べ多発性筋炎において有意に高率，高値に出現したことより抗ヒト筋ミオシン抗体測定は多発性筋炎の鑑別診断上有用な検査であると考えられる．しかし筋ジストロフィー症，重症筋無力症，運動ニューロン

表2　Anti-myosin antibody in patients with and without polymyositis

Diagnosis	No.tested	No.positive	Percent positive	Mean titre* ($x10^{-10}$M)
Polymyositis	20	18	90.0	4.24±1.13
Muscular dystrophy	15	3	20.0	0.37±0.21
Myasthenia gravis	10	2	20.0	0.20±0.14
Motor neuron disease	8	1	12.5	0.12±0.12
Peripheral neuropathy	6	0	0	0
Miscellaneous neurological diseases	30	0	0	0
Presumed autoimmune diseases without polymyositis	7	0	0	0

*Mean ±　　*Mean±SD

疾患においても低率ながら出現することより，抗ヒト筋ミオシン抗体は多発性筋炎に特異的なものでなく，従ってその病態においては一次的な役割を果している可能性は少ないと考えられる．これまで多発性筋炎患者における抗ミオシン抗体については Caspary ら[6]の報告があるだけだが，出現率については正常群と患者群とで有意差が見出されなかった．しかし用いた方法が粗ミオシン分画を用いた赤血球凝集反応である等の問題があり，このために我々の結果と差異を生じた可能性がある．最近，多発性筋炎の鑑別診断上有用な検査として抗ミオグロビン抗体[7]，抗ウシ胸腺抗体[8),9),10]測定が提唱されているが，本法と合わせ用いることにより多発性筋炎は今後より的確に診断されるものと思われる．また多発性筋炎の再分類も将来可能になると思われる．

ま と め

多発性筋炎の患者血清において抗ヒト筋ミオシン抗体が他の疾患に比し高率，高値に検出された．したがって抗ヒト筋ミオシン抗体測定は多発性筋炎鑑別診断上有用であると考えられる．

文　献

1) Perry,S.V.：Myosin adenosinetriphosphatase. In Methods in Enzymology 2. (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., Eds.) Academic Press, New York, 1955, pp.582-588.

2) Richards, E. G., Chung, C. S., Menzel, D. B. & Olcott, H. S.：Chromatography of myosin on diethylaminoethyl-Sephadex A-50. Biochemistry, 6：528, 1967.

3) Samaha, F. J. & Gergely, J.：Biochemistry of normal and myotonic dystrophic human myosin. Arch. Neurol., 21：200, 1969.

4) Greenwood, F. C., Hunter, W. M. & Glover, J. S.：The preparation of ^{131}I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J., 89：114, 1963.

5) McDonald, B. L., Dawkins, R. L. & Robinson, J.：Myosin autoantibodies reacting with selective muscle fiber types. Muscle Nerve, 2：37, 1979.

6) Caspary, E. A., Gubbay, S. S. & Stern, G. M.：Circulating antibodies in polymyositis and other muscle-wasting disorders. Lancet, ii：

941, 1964.

7) Nishikai, M. & Homma, M. : Circulating autoantibody against human myoglobin in polymyositis. J. Am. Med. Ass., 237 : 1842, 1977.

8) Reichlin, M. & Mattioli, M. : Description of a serological reaction characteristic of polymyositis. Clin. Immunol. Immunopathol., 5 : 12, 1976.

9) Wolfe, J. F., Adelstein, E. & Sharp, G. C. : Antinuclear antibody with distinct specificity for polymyositis. J. Clin. Invest., 59 : 176, 1977.

10) Nishikai, M. & Reichlin, M. : Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis. Characterization of the Jo - 1 antibody system. Arthritis & Rheum., 23 : 881, 1980.

41）核磁気共鳴による筋ジストロフィー症の研究
(1)筋の発育に伴うproton緩和時間ならびにナトリウム量の変化

宮　武　　正*

研究協力者　桑原武夫*　湯浅龍彦**　大野享男***

はじめに

核磁気共鳴〔Nuclear Magnetic Resonance (NMR)〕を利用して物質の分子構造を決定する方法は化学の分野では確立された方法であるが，近年，本法の医学・生物系への応用が進展しつつある．

NMRの医学への応用は現在2つの方向で検討されている．一つはX線CTにかわる人体映像法としてであり，もう一つはchemical shiftによる化学的情報を含んだスペクトルを得ることを目的としたもので，主に，*in vivo*でのエネルギー代謝・生体計測法としてである．

後者，すなわちNMRの生体計測法への応用は1971年Damadianら[4]による腫瘍組織でのproton T_1時間の研究，Singer[13]らによる血流計への応用等が行なわれ，以来，水素のみならず燐や炭素を対象核種とした*in vivo*での代謝の研究[1)5)6)7)10)11)12)14)]といった新たな局面をむかえつつある．

NMRを生物試料に応用するということは，その試料をある原子の集団としてとらえることであり，例えば水素原子ならば組織中のprotonの存在様式，すなわち，protonの結合状態あるいは動きやすさ等を反映するものである．

また，骨格筋の発育，筋疾患の病理過程に伴って当然protonあるいはNaの存在様式はそれぞれ変化し，その変化を捕えることはその病変の診断，治療の指標となり得るものと思われ，また，現在NMRはprotonの映像法が発達し更に^{23}Naも同様に有望な核種の一つである．

そこで我々は^{1}H-NMRおよび^{23}Na-NMRを利用し骨格筋の発育に伴って水のproton緩和時間（以下proton T_1時間），およびNa含量（以下^{23}Na-NMR）がどのように変化するかを観察したので，その意義について若干の考察を加え報告する．

目　的

今回の目的は筋の発育に伴うproton T_1時間ならびに^{23}Na-NMRの変化を観察することである．

対象と方法

対象はWhite Leghorn系鶏の胸筋で胎生12日および19日，孵化後6日および20日のもので，proton T_1時間では更に孵化後15日のものも測定した．

Dystrophic hamsterとしてはBIO14.6系で体重100～140g，生後100日のもののM. Quadriceps femorisを使用し，controlとしてBIO FIB系のものを使用した．

使用機種は磁場強度90MHzのJEOL FX90Q FT-NMR spectrometerである．

生検筋は直ちに測定するか，あるいは，一旦湿潤箱内で密封容器におさめ0℃で保存したのち測定を行なった．

試料管はprotonの測定では5mmφのもの，^{23}Naの測定では10mmφのものを使用し，これら

＊新潟大学脳研究所神経内科
＊＊国立小千谷療養所
＊＊＊新潟大学分析センター

の試料管はそれぞれ密栓し，NMR spectrometer の計測筒に静置し，無回転で測定を行なった．

計測時の温度は proton では29℃，^{23}Na は室温であった．

Proton T_1時間の測定は共鳴周波数として89.6 MHz を用い180°～τ～90°パルス系列による inversion recovery method[2] を用いた．180°パルスの幅は試料毎にシグナル強度を見て決めたが約60 μ秒であった．時間を0.1秒，0.2秒，0.3秒，0.6秒，1秒，2秒，3秒，20秒と変化させた8本のエコーを検出し，得られた縦緩和曲線より非線型最小2乗法により T_1時間を算定した（図1）．

Proton T_1時間の測定に用いた生検筋は更に80℃ 6時間の乾燥を行ない前後の重量から含水量を算定した．

^{23}Na-NMR の測定は共鳴周波数として15.8 MHz を用い，定量は1200回加算による吸収スペクトルの面積を基準の希釈生理食塩水の吸収スペクトルの面積と比較して行なった．

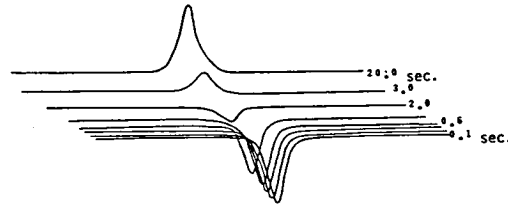


図1　Inversion recovery method
Eight signals were obtained by changing the intervals of the two pulses (τ) as 0.1, 0.2 0.3,0.6,1.0,2.0,3.0, and 20sec. .

^{23}Na-NMR に用いた生検筋は更に80℃ 6時間の乾燥後30%硝酸による抽出を行ない，炎光比色法により再度 Na 量の測定を行なった．

結　　果

(1) 筋の発育に伴う proton T_1時間の変化（図2）．Proton T_1時間は筋の発育に伴って短縮し

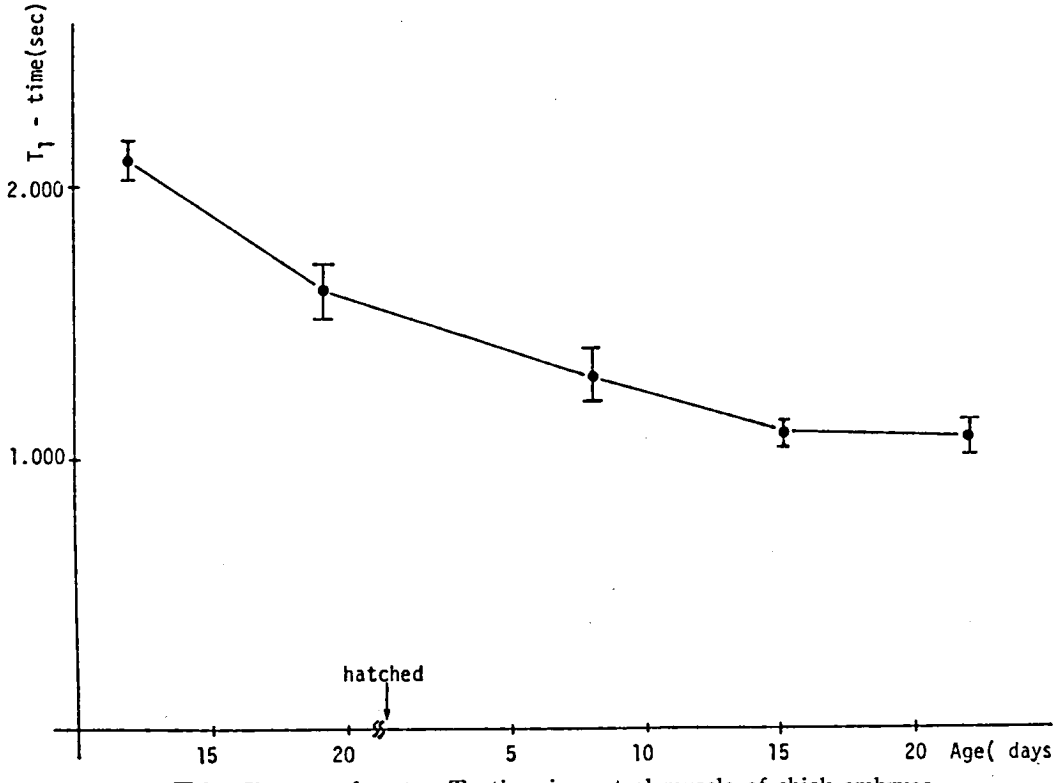


図2　Changes of proton T_1 time in pectral muscle of chick embryos and chicks.

た．すなわち12日鶏胚では2.082±0.091，19日鶏胚で1.605±0.106，6日雛で1.320±0.107，15日雛で1.108±0.038，20日雛で1.087±0.053（mean±SD秒）であった．

(2) 筋の発育の各stageにおける含水量とproton T_1時間を対比させたのが図3であるが，含水量が発育に伴い93%，86%，83%，78%，76%と減少するにしたがってproton T_1時間もexponentialに短縮して来た．

(3) 筋の発育に伴う^{23}Na-NMRの変化（図4 closed circle）．^{23}Naは発育に伴って低下が認められた．すなわち，12日鶏胚では59.5±3.51，19日鶏胚で49.0±4.95，6日雛で47.5±3.87，20日雛で18.8±1.61（mean±SDμEq/g）であった．

(4) 炎光比色法によるNa測定値の変化（図4 open circle）．12日鶏胚では72.6±1.26，19日鶏胚で68.3±4.22，6日雛で71.0±3.63，20日雛で18.8±1.61（mean±SDμEq/g）でNMRによるNaの検出率は73%から55%と成熟の各stageで

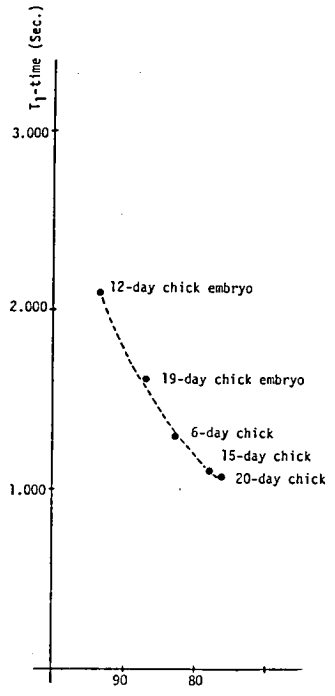


図3 Exponential curve representing the relations between proton T_1 time and humidity in pectral muscles.

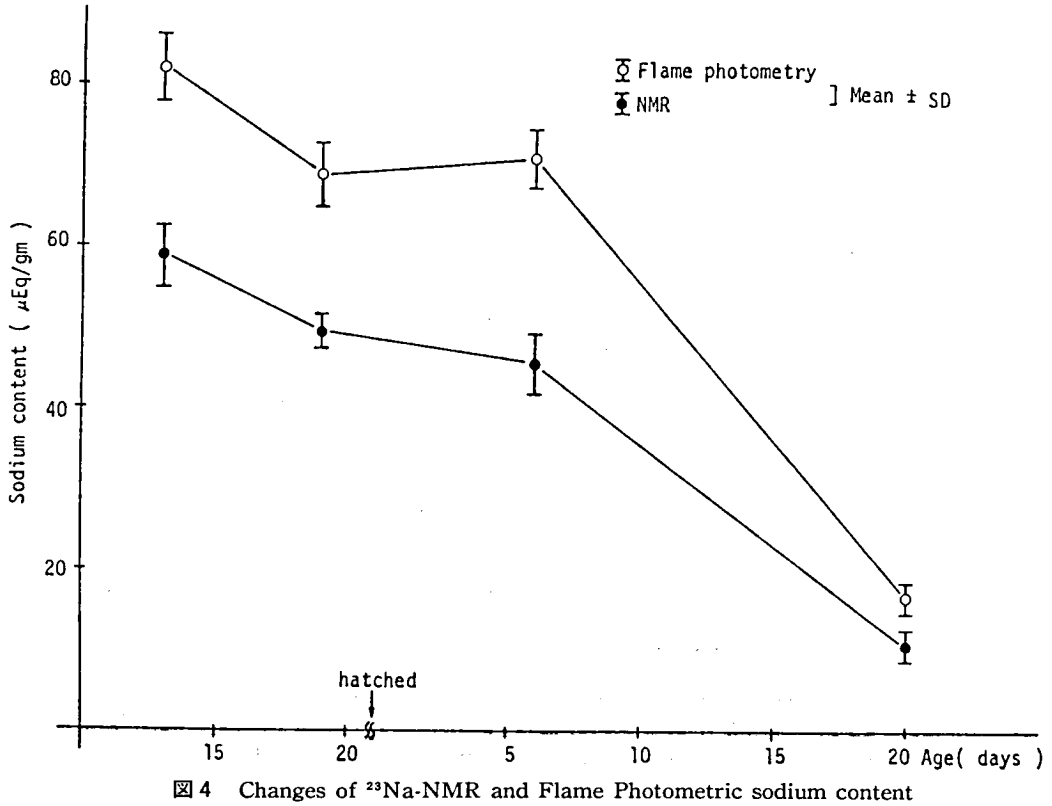


図4 Changes of ^{23}Na-NMR and Flame Photometric sodium content in pectral muscles of chick embryo and chicks.

差が見られた.

(5) Dystrophic hamster の proton T_1時間は control 1.004±0.015秒に対し1.049±0.018秒と延長していた（図5）.

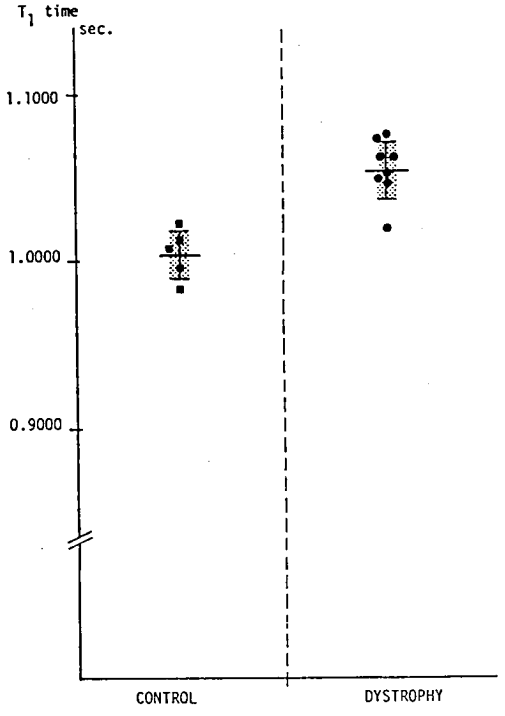


図5 Values of the proton T_1 time of quadriceps muscle from normal and dystrophic hamsters.

考　　察

骨格筋の発育には形態的・機能的そして生化学的な諸相が包括されている．既に述べた如く，NMR を生物試料に応用するということはその試料をある核種（本報告では ^{1}H および ^{23}Na であるが）の集団としてとらえることを意味しており，今回，筋の発育に伴って proton T_1時間が変化した事実も発育の各 stage 毎に proton の存在様式（すなわち水の存在様式）が異なることを意味するものと理解される[8]．Proton T_1時間に変化をもたらす要因としてはまず180°パルスの幅や，用いられた共鳴周波数，そして，測定温度などを考慮する必要があるが，更に重要なものとして，試料の水分含量，cellular protein の conformational change, cellular protein composition が考えられ，中でも water-protein interaction が主なものであるとされ[3]，我々の case でも水分含量との関係が深いものと考えられた．また，この分野では Chang ら[3]が生後1年の dystrophic chicken で proton T_1時間が延長していることを報告しているが，我々も生後100日の dystrophic hamster で同様の結果を得ている．今後こういった変化が何時から起って来るのかを調べることが重要であると思われる．

今回我々は proton T_1時間の他に組織内水分動態に関連深い Na の測定も行ない，筋発育に伴って組織の Na 量が変化することを NMR および炎光比色法で認めた．このことの理由については今回の実験からは未だ不明であるが，proton T_1時間の変化とともに ^{23}Na-NMR での観察が筋組織の発育段階の指標になると思われた．

NMR で観測できない Na の存在は，細胞内の種々な高分子に結合した Na イオンの吸収強度が free な状態の Na イオンよりも小さくなるためであるとされている[9]．^{23}Na-NMR において今回示した事実は，Na が筋細胞内の高分子と結合しているためと考えれば理解でき，これにより ^{23}Na-NMR もまた骨格筋の成熟を示す1指標として重要であると思われた．

以上骨格筋の発育に伴って proton T_1時間ならびに ^{23}Na-NMR が変化することを報告し，さらに生後100日の dystrophic hamster において proton T_1時間が延長することを示した．

文　　献

1) Ackerman, J., et al.：Mapping of metabolites in whole animals by ^{31}P NMR using surface coils. Nature, 283：167, 1980.

2) Boden, N.：Detection of organic structures by physical methods Chapter 2. Pulsed NMR methods, 4：51, 1971. Academic press, New York and London.

3) Chang, D., et al.：Nuclear magnetic resonance study of muscle water protons in muscular

dystrophy of chickens. J. Cell. Physiol., 107 : 139, 1981.

4) Damadian, R. : Tumor detection by nuclear magnetic resonance. Science, 171 : 1151, 1971.

5) Edwards, R., et al. : Clinical use of nuclear magnetic resonance in the investigation of myopathy. Lancet, 8274 : 725, 1982.

6) Gadian, D., et al. : Examination of a myopathy by phosphorus nuclear magnetic resonance. Lancet, 8250 : 774, 1981.

7) Gordon, R., et al. : Localization of metabolites in animals using ^{31}P topical magnetic resonance. Nature, 287 : 736, 1980.

8) Hazlewood, C., et al. : Nuclear magnetic resonance transverse relaxation times of water protons in skeletal muscle. Biophys. J., 14 : 583, 1974.

9) Monoi, H. : Nuclear magnetic resonance of tissue ^{23}Na. I) ^{23}Na signal and Na^+ activity in homogenate. Biophys. J., 14 : 645, 1971.

10) Newman, R., et al. : Nuclear magnetic resonance studies of forearm muscle in Duchenne dystrophy. Brit. Med. J., 284 (6322) : 1072, 1982.

11) Ross, B., et al. : Examination of a case suspected McArdle's syndrome by ^{31}P nuclear magnetic resonance. New. Engl. J. Med., 304 : 1338, 1981.

12) Shulman, R., et al. : Cellular applications of ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance. Science, 205 : 160, 1979.

13) Singer, J. : Biological flow and process tracing using nuclear and electron paramagnetic resonance. IRE Trans. Med. Electron., ME-7 : 23, 1960.

14) Ugrubil, K., et al. : ^{31}P NMR studies of intact anchourage-dependent mouse embryo fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78 : 4843, 1981.

42) 組織対応法による nemaline myopathy の生化学的研究

福 原 信 義*

研究協力者　田 中 恵 子*　豊 島　至*

はじめに

Nemaline myopathy は，乳幼児期に発症し，良性経過をとり，運動発達遅延，四肢近位筋優位の全身筋力低下，骨格変形などを伴う先天性ミオパチーで，筋線維内に桿状構造物 (rod) を認めることが特徴である．この rod は，電顕形態学的に Z 帯と類似しており，螢光抗体法の成績では，α-actinin, desmin などの Z 帯に関係した蛋白を含むとされている[1]．また，本症では，type I 線維の分布比率が著しく高い例が多く，type I 線維の萎縮傾向，rod の集積など，異常な type I 線維が過剰に形成されている可能性が推測されている[2]．

我々は，染色標本との対応が可能で，随時検索ができ，蛋白崩壊の危険性が少ない，生検筋凍結乾燥切片を用いる筋蛋白分析法を開発したので，本症の type I・type II線維それぞれにつき，構造蛋白上の特異性の有無を明らかにする目的で以下の検討を行なった．

対象と方法

1) **主要筋蛋白の精製**　正常筋蛋白の電気泳動パターンを得るため，剖検時に得られたヒト腸腰筋を用いて，myosin, actin, troponin (TN), tropomyosin (TM) の 4 主要構造蛋白を精製した[3]．また，phosphorylase, enolase, creatin kinase, aldolase, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase, phosphoglycerate mutase, triose-P isomerase の 7 肉漿蛋白を分離した[4]．

2) **凍結乾燥切片の作製**　Nemaline myopathy 4 例，正常筋 2 例の新鮮凍結生検筋を20μm の厚さに切り，−20℃，真空吸引下で凍結乾燥切片を作製した[5]．連続する 6 μm 厚の切片は，Gomori's Trichrome, NADH-TR, ATPase 染色を行なった．次いで，染色標本と対応させながら，実体顕微鏡下で，正常筋の凍結乾燥切片から type I・type II線維を，nemaline 筋から rod に富む type I 線維，光顕上 rod を認めない type II線維それぞれを切離した．

3) **電気泳動法**

i) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS)　Laemmli らの方法[6]に従ったが，ポリアクリルアミドは8.75～17.5%の linear gradient とし，泳動ゲルの高さを 3 cm とした．

ii) 二次元電気泳動 (2-D)　O'Farrell らの方法[7]を modify して行なった．SDS, 2-D とも，ゲルは銀染色を施した．

結　果

正常筋の 2-D を図 1 に示す．図 1 a は切片全体，図 1 b, c は type I 線維，type II線維各60個をそれぞれ泳動したものである．type I・II線維の主要構造蛋白の差違は次の点である．1) TM-α 鎖は分子量3.4万の slow form が type I 線維に，3.3万の fast form が type II線維に認められる．2) Myosin light chain (LC) は，type I 線維で LC_1，slow form LC_2の main spot に加えて，少量の fast form LC_2・LC_3が混じる hybrid pattern を呈した．Type II線維では，LC_1，fast form LC_2・LC_3が主体で，少量の slow form LC_2 を混じていた．3) TN-C に slow・fast form が区別される．

Nemaline myopathy の生検筋では，type I 線維に萎縮，rod の集積が認められた (図 2)．正常

*新潟大学脳研究所神経内科

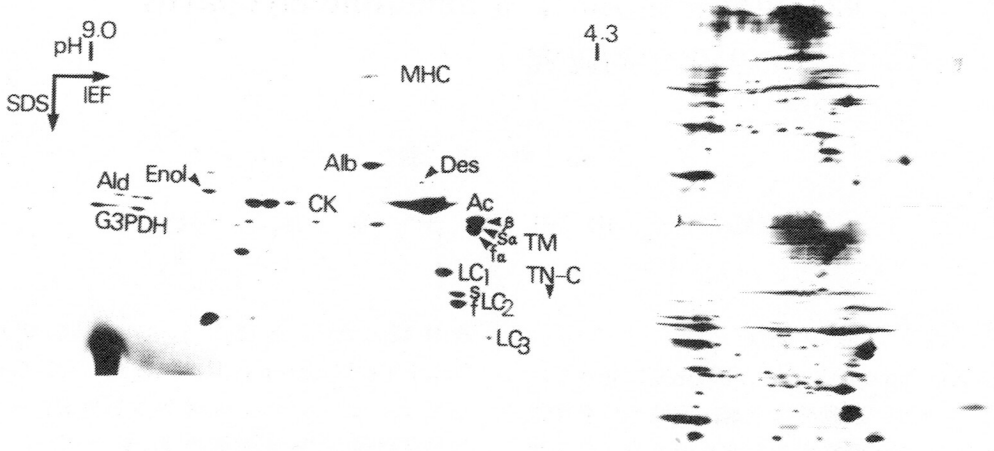
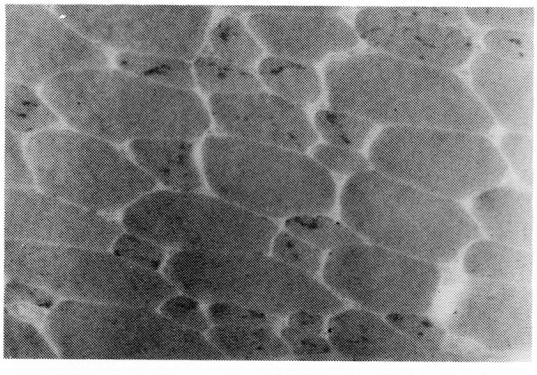


図1　正常筋の二次元電気泳動像.
左(a)：組織切片全体, CBB 染色. 右上(b)：type Ⅰ線維. 右下(c)：type Ⅱ線維, 銀染色. MHC：Myosin heavy chain, Alb.：Albumin, Des.：Desmin, Ac：Actin, TM：Tropomyosin (s：slow from, f：fast form, α-chain, β-chain), LC：Myosin light chain (s：slow form, f：fast form), TN-C：Troponin C, CK：Creatine kinase, Enol：Enolase, Ald：Aldolase, G3PDH：Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



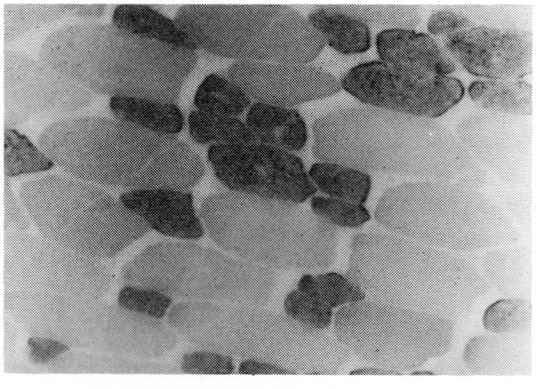


図2　Nemaline myopathy 生検筋.
左：Gomori Trichrome (×200)　右：ATPase (pH4.6) (×200). Nemaline rod は萎縮した type Ⅰ線維に集積していた.

筋と nemaline 筋それぞれの type Ⅰ線維 2-D を図3に示すが, 主要構造蛋白上, 両者に差違は認めなかった. Type Ⅱ線維を同様に比較すると (図4), 正常では minor spot である slow form LC_2 が, nemaline 筋では fast form より大きな spot として認められ, LC_2のみ量比が逆転していた. この所見は nemaline 筋4例中2例で認められた.

4主要構造蛋白以外についてみると, nemaline 筋では分子量5.5万の band が増量しており (図5), 特に type Ⅰ線維で顕著であった. この band は分子量から desmin である可能性が高い.

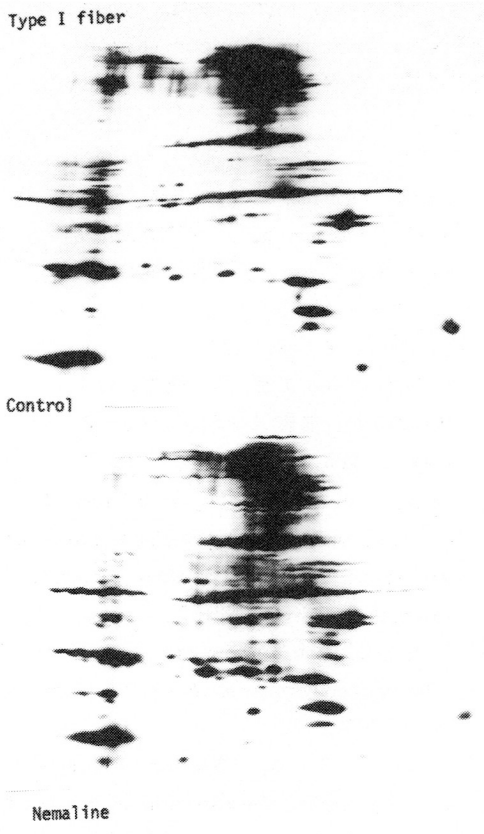


図3
Type I 線維の二次元電気泳動像.
上：正常筋，下：nemaline 筋．正常筋と nemaline 筋の間で Ac, TM, LC, TN-C に明らかな差違は認めない.

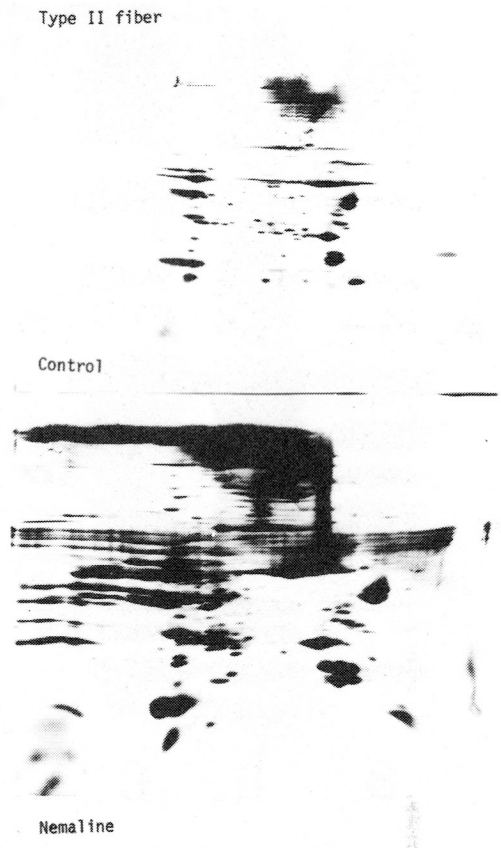


図4
Type II線維の二次元電気泳動像.
上：正常筋，下：nemaline 筋．正常では minor spot である slow form LC_2が増量している.

考　　察

Nemaline myopathy では，type I 線維に分布比率増加，萎縮，rod の集積などの所見が認められることが多い．我々は type I 線維の蛋白異常を想定して，本症の type I・type II線維それぞれを正常筋のそれと比較検討した．その結果 type I 線維では，分子量5.5万の desmin と思われる band が増強している以外，構造蛋白上の異常は認めなかった．Type II線維では 4 例中 2 例で slow form LC_2の増量が認められた．これは Billeter ら[8] が報告した type II C 線維の泳動パターンと同様である．我々の nemaline 筋 ATPase 染色の検討では，4 例とも type II線維200個中II C 線維は全く認められず，本症でのII C 線維増加はないと考えられる．Billeter らは ATPase の染色性は myosin heavy chain に規定されると述べており，本症の type II線維が，light chain にII C 線維の特徴を残したまま不完全な transform をとげたとの推測も可能である．しかしながら，Billeter らの報告は，1 本のみのII C 線維での成績であり，II C 線維の電気泳動パターンについては，さらに検討の必要がある．また，近年単一筋線維の電気泳動パターンに各種の heterogenity が報告されている．

今回の我々の検討は type I・II線維それぞれの筋線維片60個を平均したパターンであり，これでは正常の type I・type II線維は一定のパターンをとる．すなわち，正常の type I 線維に混じ

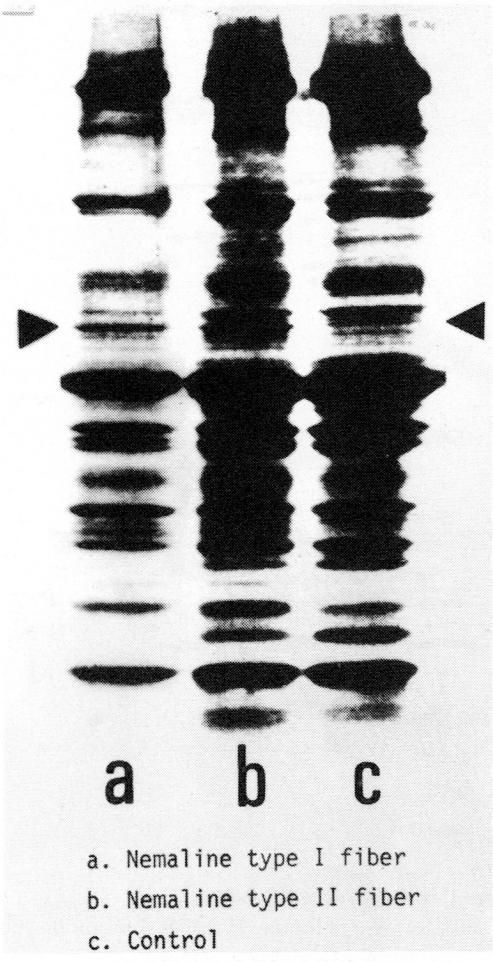


図5
SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像．Nemaline 筋で，分子量5.5万の band が増量しており，特に type I 線維に顕著である．

る $LC_{2,3}$ などの fast form，また，type II線維に混じる slow form は minor component であり，本症での LC_2 のパターンは特異である．

文　献

1) Sugita, H., Ishiura, S., Nonaka, I., et al.：Gel electrophoretic study of nemaline muscle. Proc. Jap. Acad., **57**, Ser. B：86, 1981.

2) 福原信義，湯浅龍彦：ネマリン・ミオパチー．神経内科，**8**：305, 1978.

3) 八木康一，丸山工作，平林民雄，ほか：生化学実験講座15．筋肉（日本生化学会・編），東京化学同人，東京，1975.

4) Petell, J. K., Sardo, M. J. & Lebherz, H. G.：A simple procedure for the isolation of seven abundant muscle enzymes. Preparative Biochem., **11**：69, 1981.

5) Lowry, O. H. & Passonneau, J. V.：A flexible system of enzymatic analysis. Academic, New York, 1972.

6) Laemmli, U. K.：Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature, **227**：680, 1970.

7) O'Farrell, P. H.：High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., **250**：4007, 1975.

8) Billeter, R., Heizmann, C. W., Howald, H., et al.：Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibers. Eur. J. Biochem., **116**：389, 1981.

Ⅳ．いわゆる distal myopathy

43）筋線維束からみたrimmed vacuoleを伴うdistal myopathyの筋病変

豊倉康夫*

研究協力者　井上聖啓*　水沢英洋*　栗崎博司**

筋線維束（fasciculus）は筋周膜（perimysium）で囲まれた筋線維集団であり，筋構築上の解剖学的単位をなしている．しかし，筋病変を筋線維束から観察し筋疾患の特異性を論じた報告は皮膚筋炎におけるperifascicular atrophyぐらいにすぎない[1]．

本報告の目的は，rimmed vacuoleを伴うdistal myopathyの生検筋において筋線維束に注目してその病変の特徴を他の筋疾患との比較の中で指摘することにある．

生検筋における観察

生検筋は多発性筋炎例を除いてすべて腓腹筋であり，susa液で固定後のparaffin切片についてH＆E染色またはMasson's trichrome染色をほどこして観察した．

まずrimmed vacuole型distal myopathyの1症例について記載する．

症例　K. S. 26歳男（012-9394-3）

主訴：下肢筋力低下　歩行障害

既往歴・家族歴：特記すべき事なし

現病歴：1981年11月走り方がおかしいと指摘された．階段の昇降も不自由となった．1982年2月坐位からの立ちあがりが困難となり，7月まで家業である農業を手伝っていたが以後在宅生活となった．下肢筋力低下は徐々に進行し，ゆっくりとした歩行しか出来なくなったため1982年10月7日入院した．

入院時現症：心肺腹部に異常なし

神経学的には脳神経領域異常なし

頸部・体幹の筋力は正常，四肢の脱力は遠位部に強く筋萎縮を伴う．屈筋群伸筋群間の筋力の差ははっきりしない．深部腱反射は下顎反射・膝蓋腱反射は正常であるが，その他はすべて著しい低下をみる．知覚は異常なし．前彎傾向を示しwaddling gaitである．

検査所見：尿および血液一般生化学は正常．CKは418（正常値～150）と軽度上昇をみた．

筋電図では上下肢遠位筋について持続の短い低振幅の筋原性変化を認めた．大腿四頭筋では持続の長い，高振幅，多相性の神経原性所見が筋原性変化に混在していた．また前脛骨筋，腓腹筋では主体は持続時間の短い低振幅であるが，その中に2 mV程度の振幅の持続のやや長い多相性電位を観察した（図1）．

腓骨神経のMCVは37.9 m/secであった．

筋生検所見（#1003）：右腓腹筋で行った．凍結切片でみると筋線維径の大小不同は著しく，その30%以上にrimmed vacuoleを認める．NADH-TRでangulated fiberの小群集を示す箇所もみられる．Rimmed vacuoleは小径化した線維の殆んどにみられ，小径化した線維は全体にbasophilicに染まる．一部にphagocytosisがみられる．

Paraffin切片でみるとperimysium, endomysiumは増生し筋線維束ははっきりと区画される傾向がある．各々の筋線維束は筋線維径の比較的良く保たれているもの，vacuoleを多数もつ萎縮した線維集団，さらに結合織にほぼ置換されている筋線維束とさまざまなstageが1枚の標本の中で観察された．炎症所見はないものと判断した（図2）．

＊東京大学医学部脳研神経内科
＊＊国立療養所東京病院

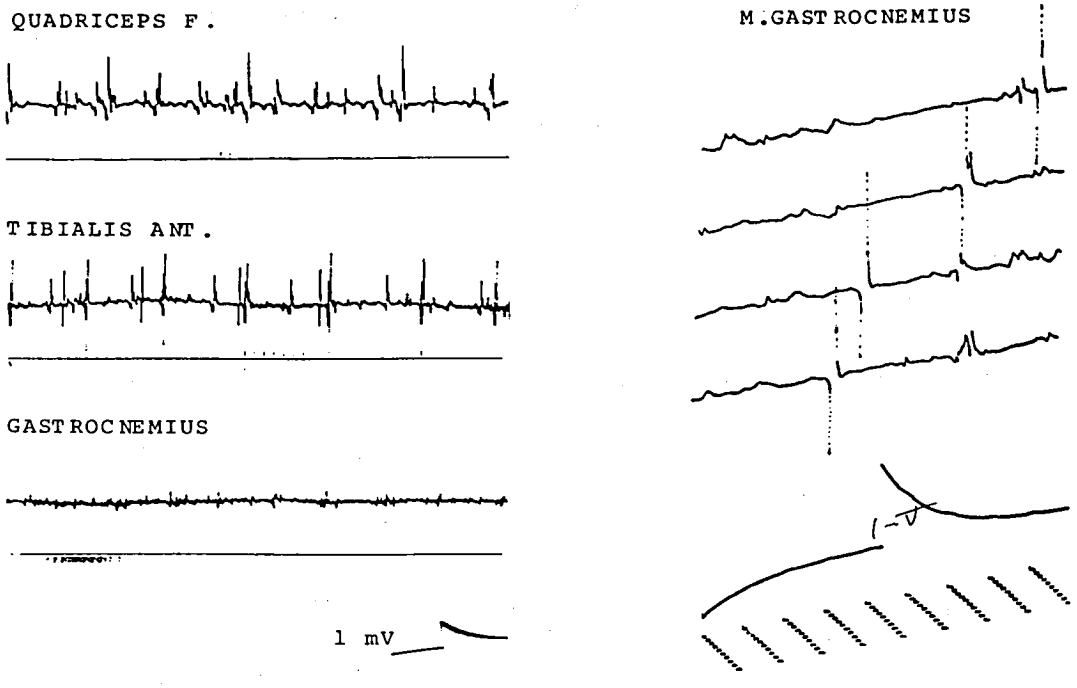


図1　症例の筋電図．腓腹筋では持続時間の短い低振幅電位が主体であるが，針電極の位置を変えることにより比較的容易に持続のやや長い高振幅波形を得ることが出来る．

電顕では光顕上の rimmed vacuole に対応して多数の myelin figure, dense body, tubular aggregate が変性した筋原線維に接して混在しており，これまでの報告に一致する所見である．筋核内の filamentous inclusion はみられなかった．

さて，ここにみたごとく，筋線維束に注目して，他の rimmed vacuole を伴う distal myopathy の自験例3例について（このうち2例はすでに水沢ら[2]により報告されている）筋病変を観察したが，すべてに同様の所見すなわち筋病変が筋線維束の単位で変性している所見が得られた．図3は27歳女性の症例（A23128）であるが，筋線維束性に変性がみられることがわかる．

次に，他のいくつかの筋疾患について同様の立場から観察してみる．

図4は Charcot-Marie-Tooth 病の例であるが，筋線維萎縮がいくつかの線維束にまたがりみられいわゆる大群集萎縮と呼ばれる状態を示している．一方よく残存している線維束の中に小群集萎縮が散在しているのがわかる．

図5は Duchenne 型の筋ジストロフィーであるが，高度の脂肪浸潤があり，その中に島状に筋線維集団がみられるが，各々の線維束は，それぞれほぼ同様の変性過程にあり distal myopathy でみたような各線維束間の変性像の差は明確でない．

図6は34歳女性の多発性筋炎の大腿四頭筋での筋生検の所見である．Perifascicular に萎縮が強いが，よくみると各々の線維束の変性過程が決して一様でない傾向にある．

考　　察

Rimmed vacuole を伴う distal myopathy において一見，神経原性萎縮を示唆するような小群集萎縮線維がみられることはこれまでいくつかの報告がある[2)-4)]．しかしより弱拡大で筋線維束に注目した報告はない．ここにみてきたように rimmed vacuole 型 distal myopathy では筋線維束がひとつの単位となったさまざまな過程の変性像が

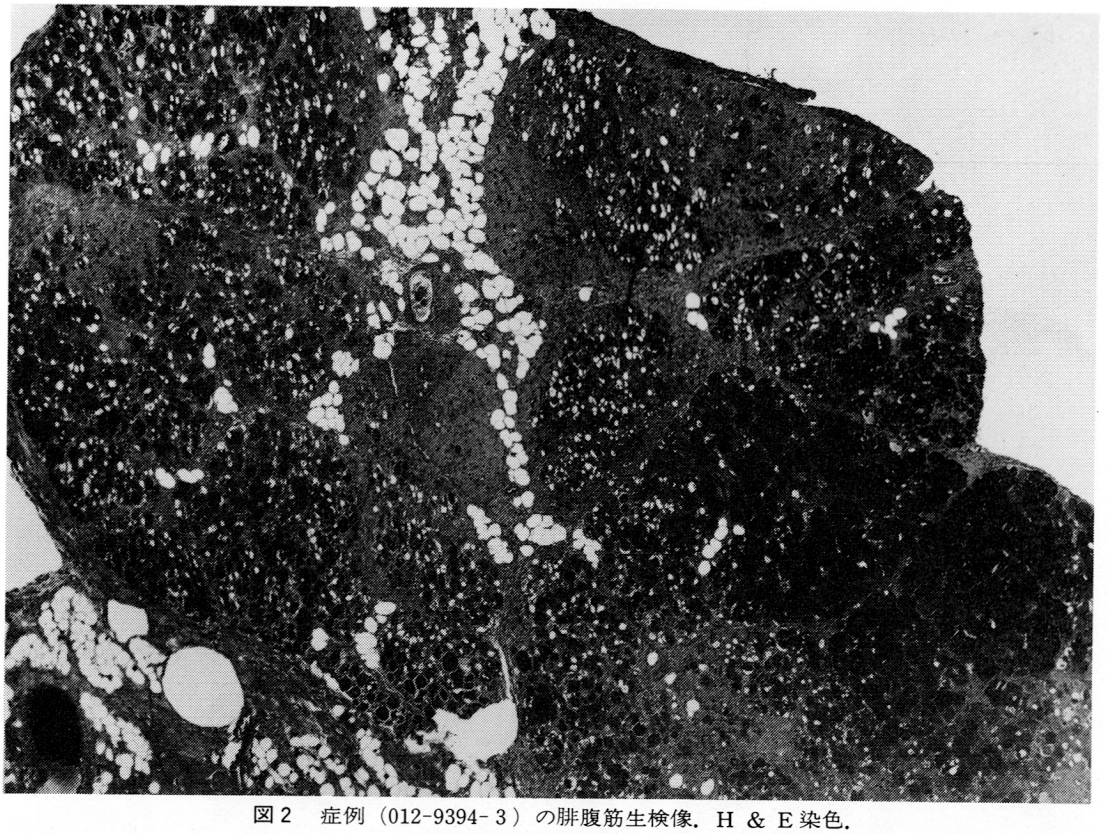


図2　症例（012-9394-3）の腓腹筋生検像．H & E染色．

1枚の標本の中に観察され，このような筋病変は他のいくつかの筋疾患との比較の中でみると本疾患の特徴とも云えよう．

神経原性萎縮はこのような筋線維集団の把握の中でつけられる診断であるが，いくつかの筋線維束が集団となって萎縮したり，一般に間質の増生はそれ程目立たなかったり，またよく線維径が保たれている筋線維束内にも小群集萎縮が必ずみられるのが常であり，これらの点はここで論じたdistal myopathyの所見とは一致しない．

多発性筋炎はperifascicular atrophyあるいは巣状の変化といった表現で筋線維束・筋線維集団の単位で病変が指摘されているものであるが[1]，よく観察すると各々の筋線維束の病的状態が多様である点がdistal myopathyの所見と似ており興味がある．

次に筋電図所見についてrimmed vacuole型distal myopathyでは，報告の殆んどに罹患筋で低振幅，持続時間の短い筋原性所見に加えて高振幅，多相性の記録が混入することが知られている．ここに報告した症例でも同様の所見を得ている．針筋電図の記録は針電極周辺2 mm前後の活動電位をとらえていると云われているが，このような筋電図所見は筋病理所見の不均一性に由来するものと考えられる．このことは多発性筋炎の筋電図所見でも同様であり，上に述べたような多発性筋炎における筋病変の多様性の電気生理学的表現とは云えないであろうか．

まとめ

1　Rimmed vacuoleを伴うdistal myopathyでは筋線維束単位に病変がみられ，さまざまな程度の障害が1枚の標本の中に観察される．

2　種々の筋疾患について筋線維束に注目して筋病変を観察したところ，多発性筋炎の例に同様の所見を示す傾向がみられた．

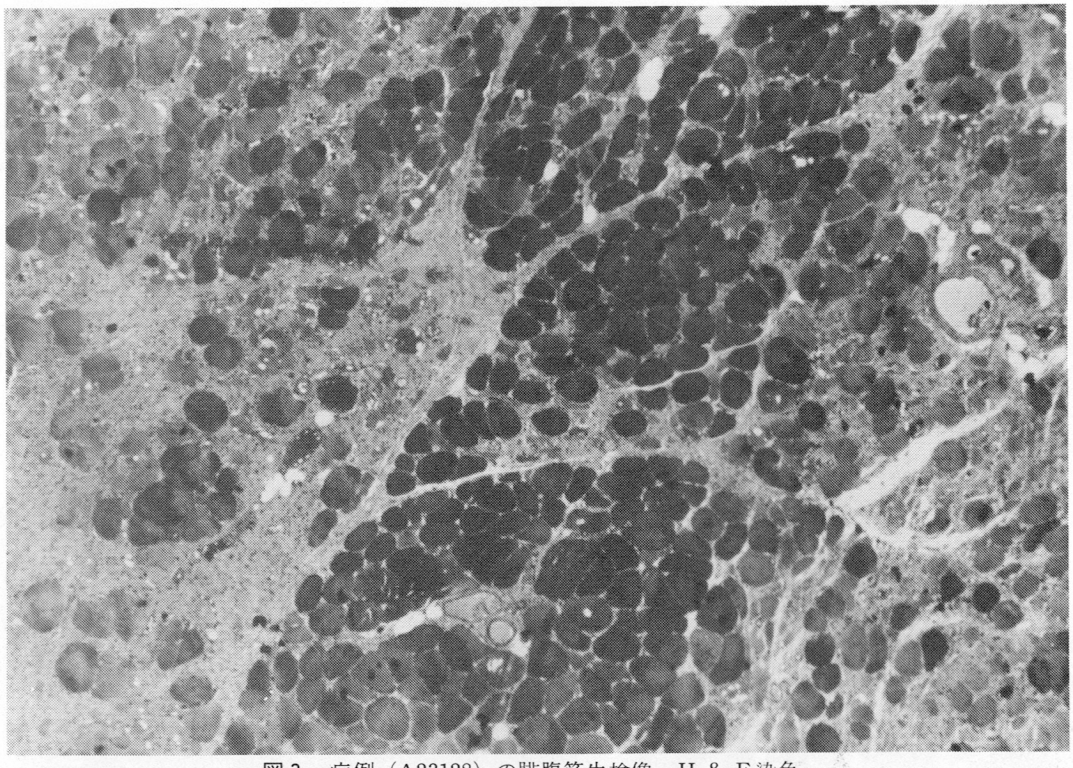


図3　症例（A23128）の腓腹筋生検像．H & E染色．

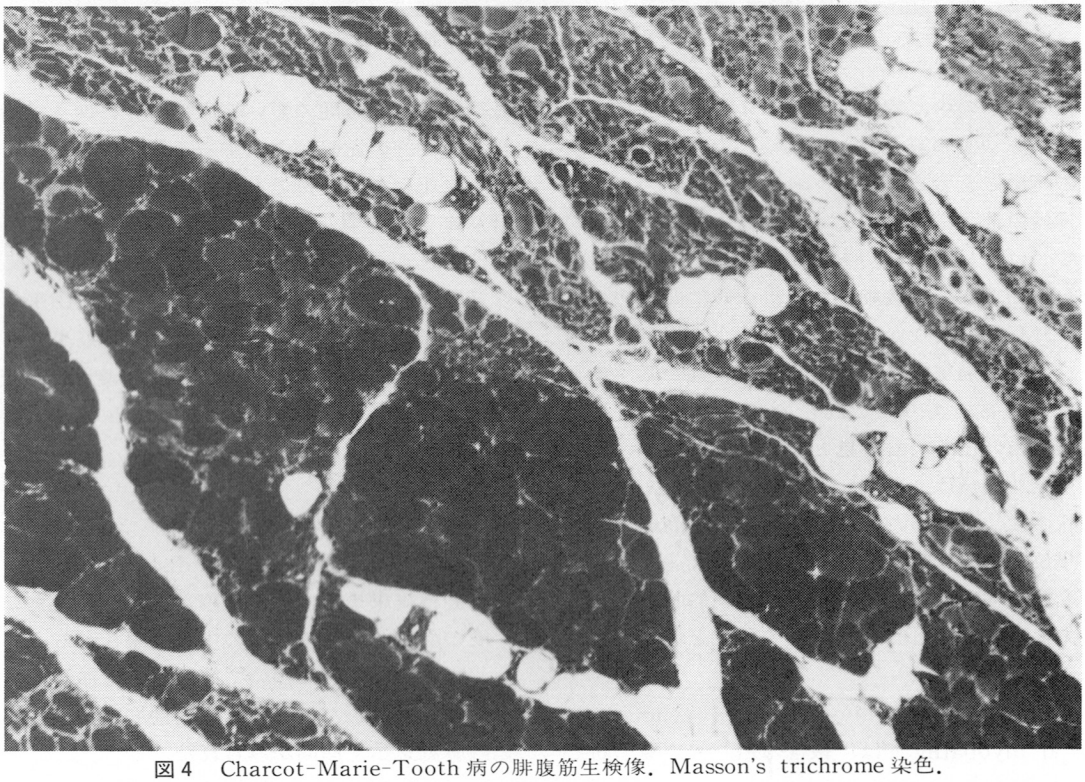


図4　Charcot-Marie-Tooth 病の腓腹筋生検像．Masson's trichrome 染色．

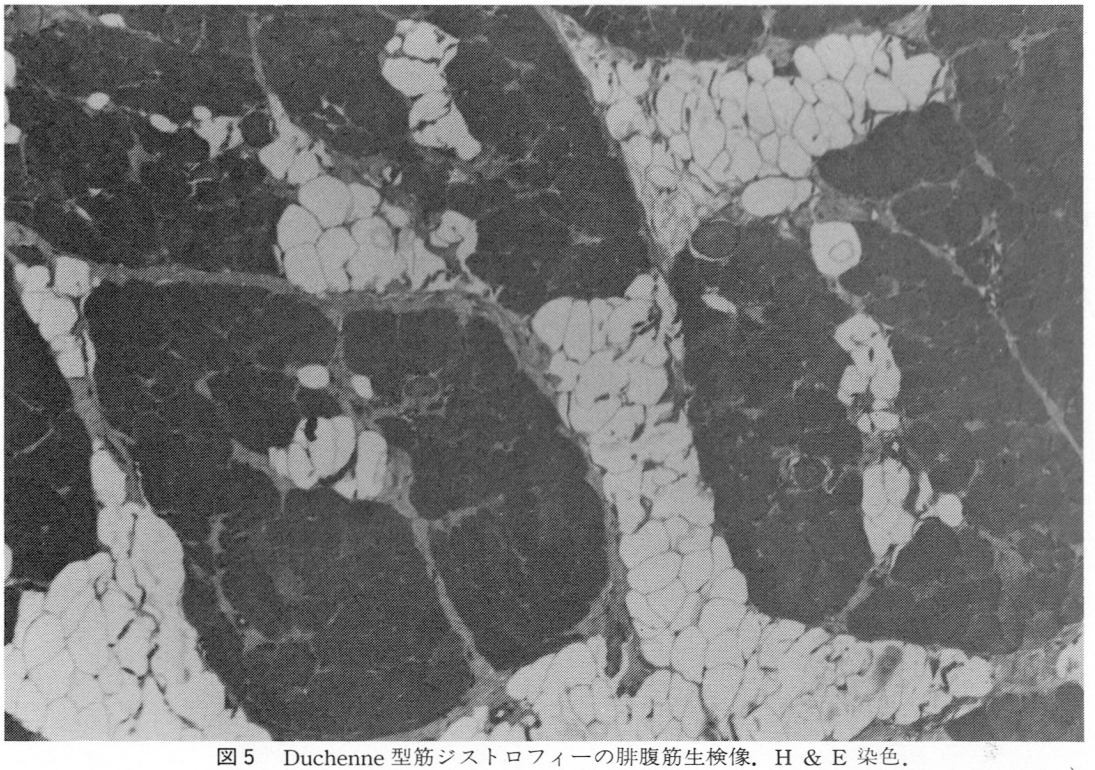


図5　Duchenne 型筋ジストロフィーの腓腹筋生検像．H & E 染色．

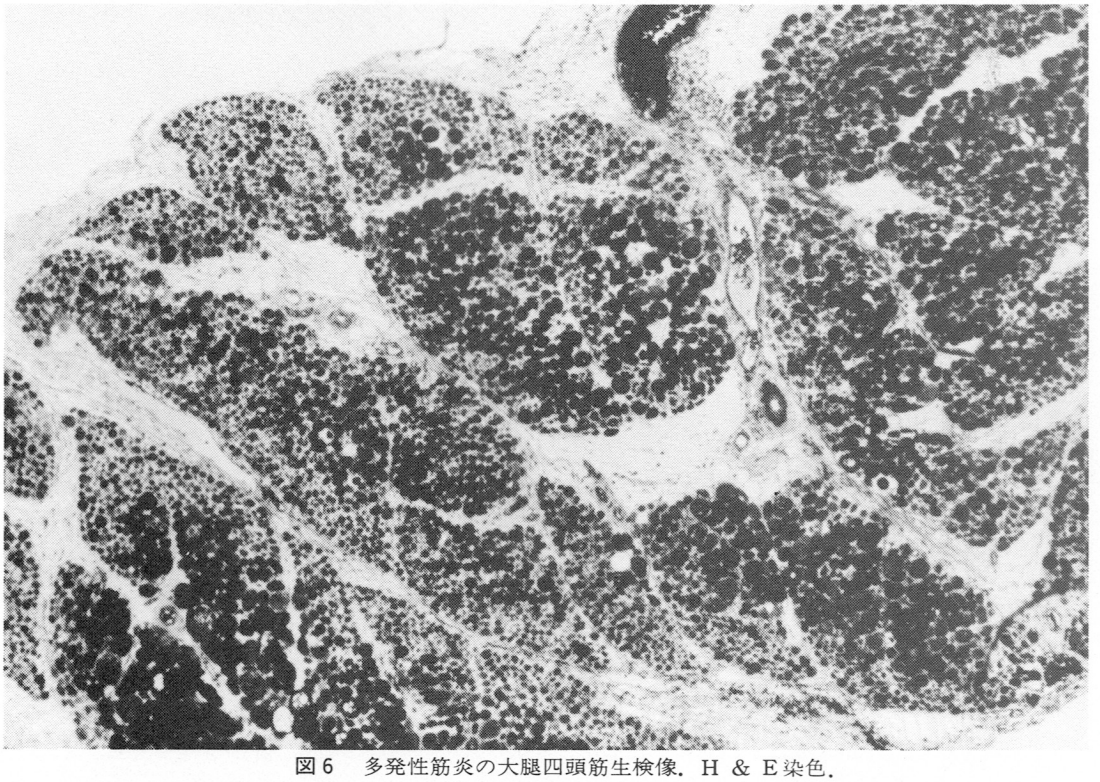


図6　多発性筋炎の大腿四頭筋生検像．H & E 染色．

3 Rimmed vacuole 型 distal myopathy における筋線維束性の病変を強調し，筋電図所見に関して若干の考察を加えた．

文　献

1) Banker, B. Q.：Dermatomyositis in childhood. Trans. Am. Neurol. Assoc., 87；11, 1962.

2) 水沢英洋，中野今治，井上聖啓，高木昭夫，萬年徹，豊倉康夫：筋線維に高度の空胞変性を伴った distal myopathy の一病型．神経内科，12：40, 1980.

3) 中西孝雄，葛原茂樹：遠位型ミオパチーの5例，筋萎縮の分布とその筋病変について．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」（三好班），昭和56年度研究報告書，1982, pp. 97-103.

4) Kumamoto, T., Fukuhara, N., Nagashima, M., Kanda, T. & Wakabayashi, M.：Distal myopathy. Histochemical and ultrastructural studies. Arch. Neurol., 39：367, 1982.

44）筋病変における rimmed vacuole ないしはその類似所見について

田　辺　　等*

研究協力者　内　潟　雅　信*　小　島　　進*　松　井　孝　道*
野　沢　胤　美*　松　原　四　郎*,†

目　　的

"Rimmed vacuole"（RV）という筋病変所見の表現は，1973年 Dubowitz & Brooke の oculopharyngeal dystrophy についての記載[1] 以来，広く用いられている．然しそれ以前にもこの病変は，我々の諸報告中の記載を含め，「myelin 様物質集積と空胞を伴う限局性変性像」など，色々な表現で数種の疾患について記載されている[2]．最近，いわゆる "distal myopathy" ないしは oculopharyngodistal myopathy (Satoyoshi) と呼称されている症例の中で，RV が多数含まれる筋病変を認めたものが相次いで報告され，その症例蓄積とともに臨床症候や遺伝形式をもふまえた病型特異性についても活発に論議されるに至っている．また RV 実体にせまる検討も進められ，本邦でも福原らの報告をはじめ多くの症例報告がみられる[2),3)]

今回の報告の目的の１つは，広く神経筋疾患全体における RV の出現状況とその位置づけ，他の１つはいわゆる distal myopathy ないしその近縁疾患における病型特異性および RV との関連についての考察である．

対象および方法

諸種神経筋疾患自験例（虎の門病院，1970～）のうち，適応を吟味して筋生検をおこなった1200例（1524検体）の筋病変を検討し，確実な RV を認めた42例（46検体）を抽出した．筋病理学的検索方法としては，paraffin 切片による一般組織学的染色，cryostat 切片による組織学的・組織化学的方法を全例に，またグルタールアルデヒド・オスミウム酸二重固定法による電顕的検索を32例に施行した．組織化学的方法は筋病理 regular battery によった．また，これらの所見を臨床診断，病型・症候・経過・他検査所見と対比考察した．

結　　果

RV を認めた症例の内訳

42例の疾患別内訳は表のごとくで，疾患別例数およびそれぞれの群の母集団総症例数を示す（最初の distal myopathy の１例の内容は後述）．また特記すべき点は，RV が，Kugelberg-Welander 病（KW）や，遠位型・肩甲下腿型などを含む "緩徐進行性神経原性筋萎縮症" に特に高率に認められたことである[4]．以下筋緊張性ジストロフィー４，筋ジストロフィー肢帯型・顔面肩甲上腕型各１，多発性筋炎５，諸種ニューロパチー４，その他11であった．

表　Rimmed vacuole を認めた症例の内訳

疾　患　群	例数(母集団例数)
Distal myopathy	1 (　1)
Kugelberg-Welander 病及び遠位型・肩甲下腿型などを含む "緩徐進行性神経原性筋萎縮症"	15 (40)
筋緊張性ジストロフィー	4 (39)
筋ジストロフィー　肢帯型	1 (17)
筋ジストロフィー　顔面肩甲上腕型	1 (　6)
多発性筋炎	5 (180)
諸種ニューロパチー	4 (46)
その他	11 (871)
計	42(1200)

検体数：46(1524)

*虎の門病院神経内科
†現・金沢大学医学部神経内科

Distal myopathy 例の要約

上記 distal myopathy の症例[5] は25歳男（図１）で同胞発症の姉と共に他院で加療中，主治医の紹介で弟のみ当院で入院精査を行った．家族歴では父方曾祖父と母方祖母がいとこであるが，父母は健常，他の家族にも同症を認めない．初発は弟22歳，姉24歳で，共に緩徐進行性．筋萎縮・筋力低下は下腿遠位から次第に上肢遠位に及んでいるが，屈筋・伸筋群の差は明らかでない．血清 CK 値（Rosalki 変法：100未満正常，100～150境界域，150以上異常）は弟690U/ml（MB29%），姉447U/ml（MB 0%）と正常上界の４倍前後に上昇，筋電図所見は共に筋原性変化を示した．弟のみに施行した筋生検では，腓骨筋において，横断面円形化を含む大小不同像・中心核など筋原性変化を示したが endomysium の線維化や脂肪浸潤は極めて軽微であった．RV は筋線維全体の約10%に認められるが，部分的に密集している（図２・a～c）．電顕像ではこれに一致して myelin figure, mitochondria・glycogen の集積，筋原線維の変性像を認め，さらにその間に filamentous inclusion（太さ15～20nm）も観察された（図２・d）．一方上腕三頭筋の変化は軽微であるが，やはり RV が小数ながら認められた．

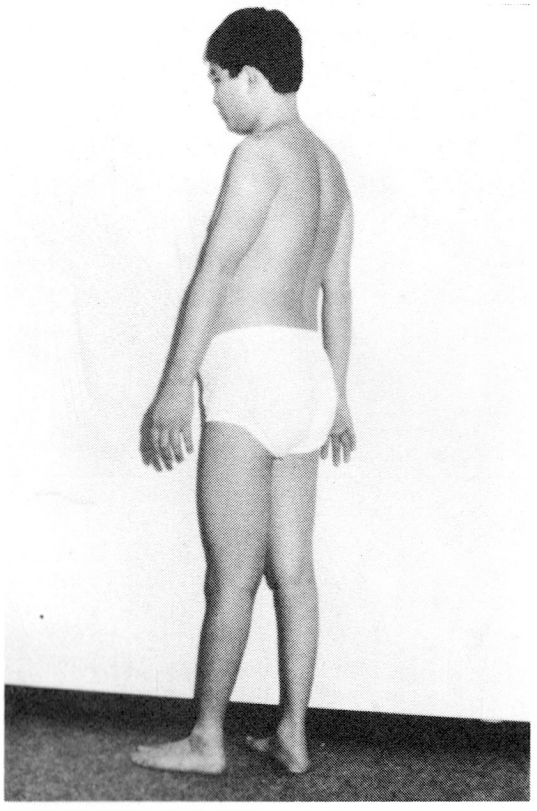


図１　Distal myopathy 同胞例の弟（25歳），全身像〔本文参照〕

本例は常染色体性劣性遺伝と考えられ，若年（20歳代前半）発症，下肢遠位部初発などの点で，distal myopathy のうち，三好らの報告した病型に類似しているが，一方屈筋群の障害の優位性がさほど顕著でなく，血清 CPK 上昇も特に高度でなく，また腓骨筋病変の程度も含め全体として筋ジストロフィーとは断定できない点などより，その診断基準に厳密には合致し得ない病態と考えた．したがって“RV を認めた常染色体性劣性遺伝型 distal myopathy”と表現しておくのが適当であろう．

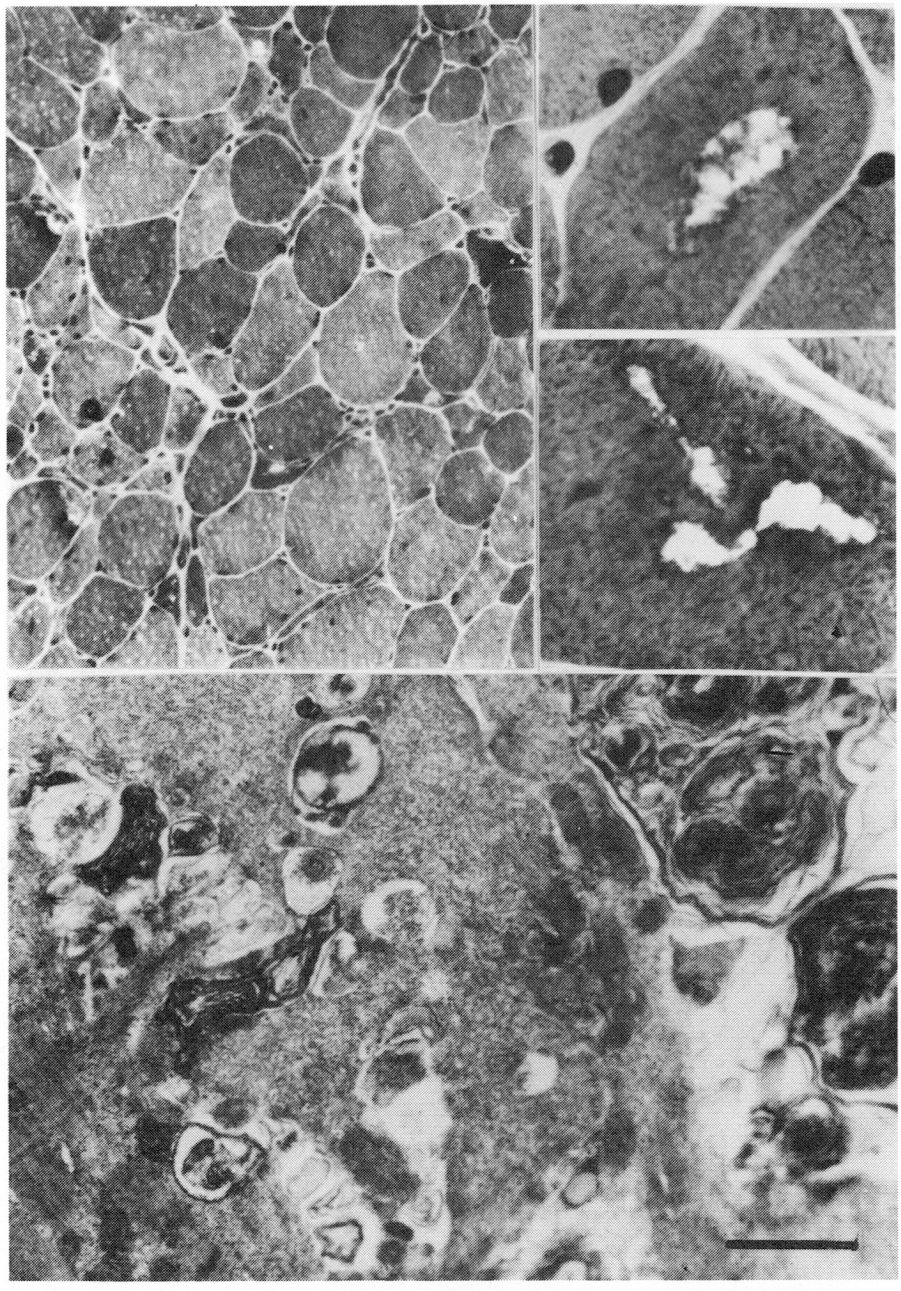
RV の一般的特徴

次に RV を認めた42例全体を通じて，いくつかの特徴を要約する．

a）その出現は，46検体中下肢遠位部とくに腓骨筋に32検体と高率であった（腓腹筋７，その他７）．尚，総検体母集団1524筋の近位・遠位比，上肢・下肢比は，いずれもほぼ１：１であった．

b）空胞にはかなりの variation が認められ，周辺部の mass 構造にも光顕レベルで種々相が認められた．典型的な所見では，中央部に比較的大型の空胞を有し，空胞部から放射状に周辺部に広がる filament 構造を認め，多くは周辺に dens な mitochondria 酵素活性，PAS 陽性物質を認める．しかし一部には空胞構造より，むしろ mass 構造の目立つ場合，また“多数の空胞”，“染色体の欠如”などの所見と共存する場合もある（図３・a～d）．

c）RV は中等度の萎縮線維に目立ち，type I 線維に出現し易い．また筋束毎に（境界はあまり明瞭でなく）RV の分布に相違をみることがあり，とくに大群集萎縮を示す神経原性変化の際にこの傾向は著明である（図３・e～f）．



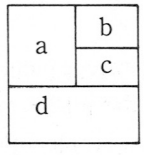
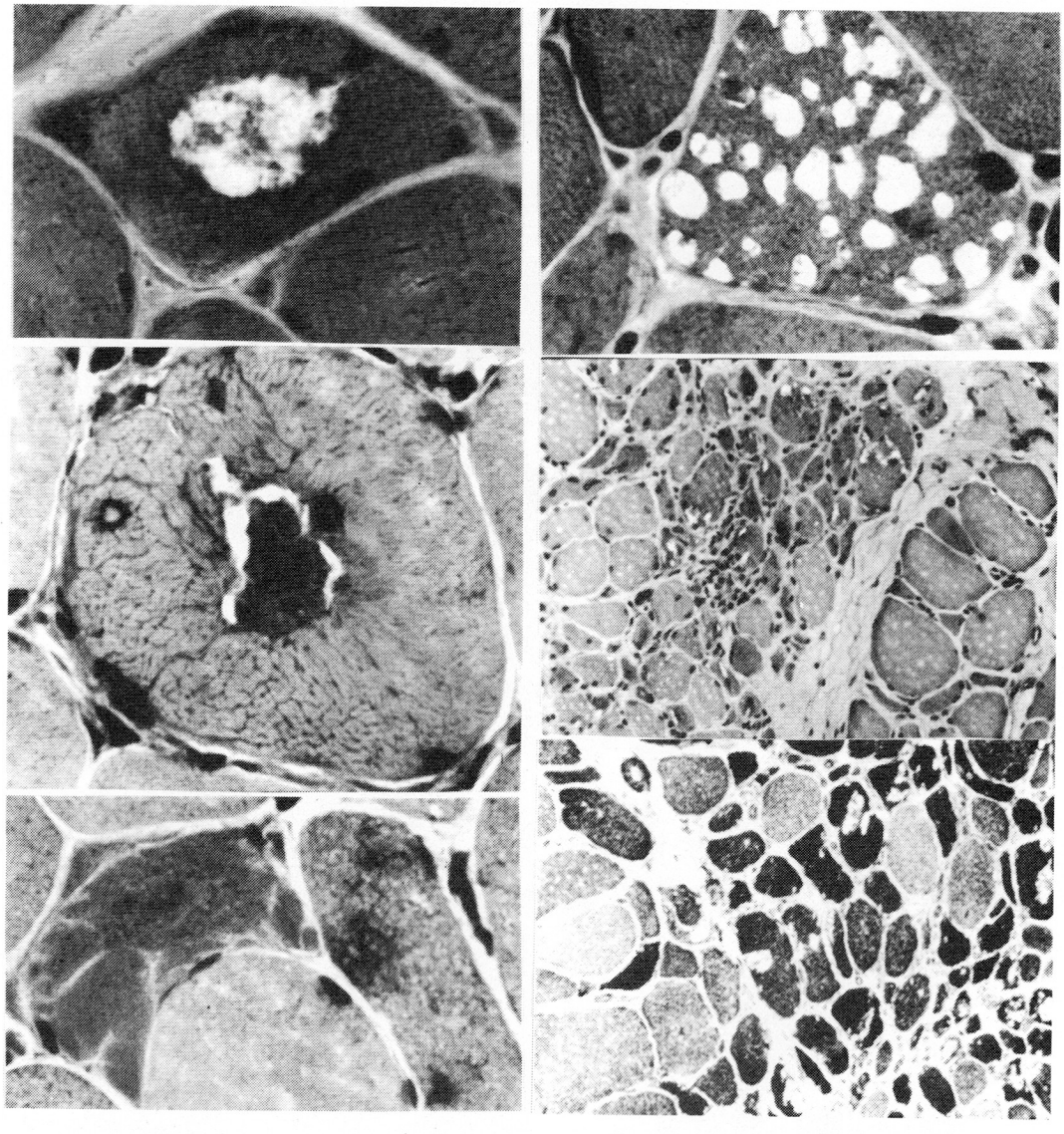


図2　図1に示した distal myopathy 例の筋生検（腓骨筋）所見．(a) trichrome 変法，100×，(b) HE 染色，400×，(c) trichrome 変法，400×．(a)(b)(c)いずれも myopathy 性変化中に認められた rimmed vacuole を示す．(d)電顕像での myelin figure と filamentous inclusion（太さ15～20 nm），bar＝1 μm．〔本文参照〕



a	d
b	e
	f
c	

図3　Rimmed vacuole の光顕所見種々相．(a)典型的な所見，trichrome 変法，400×，(b)(c)空胞構造より mass 構造の目立つ場合，HE 染色，400×，(d)多数の境界鮮明な空胞を有し mass 構造に乏しい場合，HE 染色，400×，(e)(f)群集萎縮を示す神経原性筋萎縮症（遠位型）腓骨筋にみられた多数の rimmed vacuole，(e)は HE 染色，(f)は DPNH-TR, type I 線維に高率に出現．〔本文参照〕

d)　RV の出現している筋病変にはこれと類似した mitochondria-lipid-glycogen (MLG) complex としての諸病変が共存することが多い．

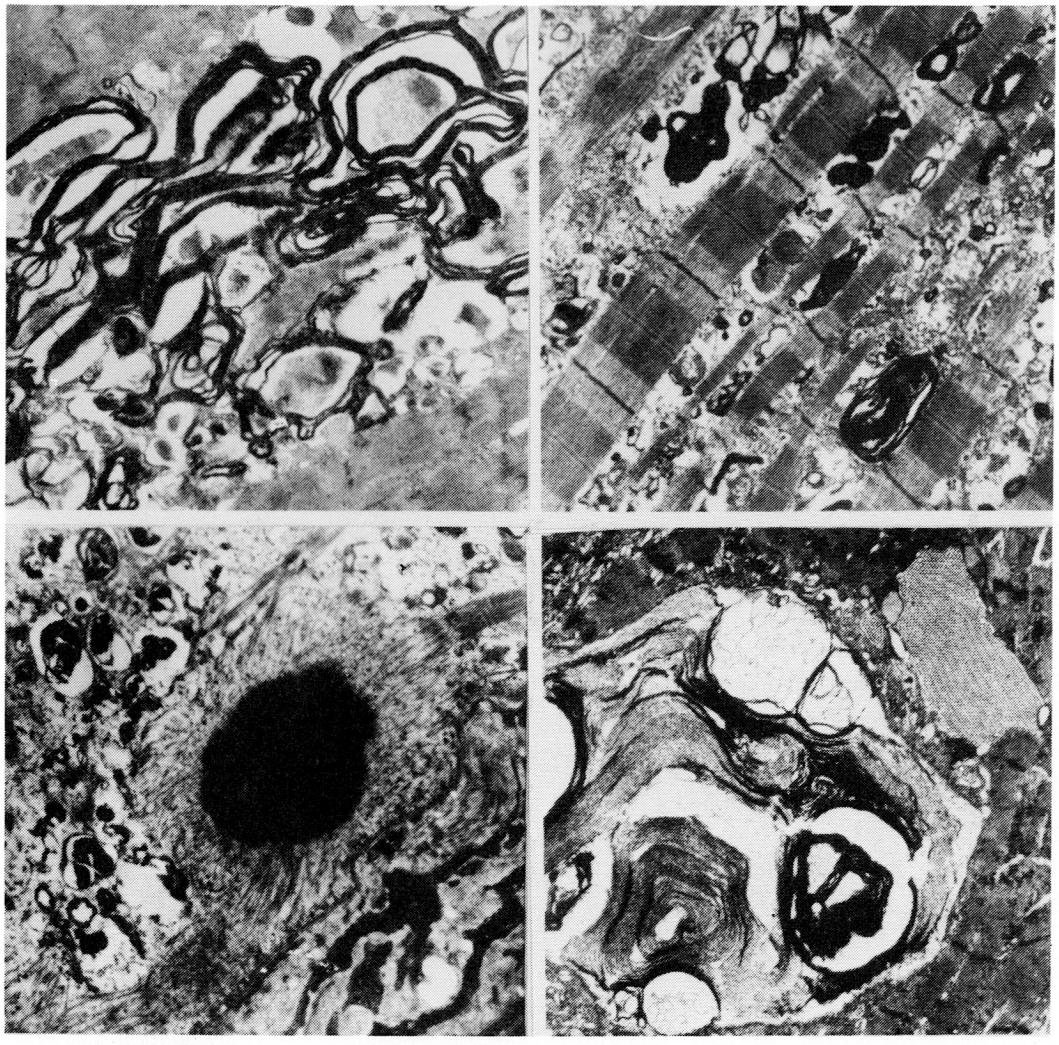
e)　電顕的には，典型的な myelin figure が集塊をなし，また filamentous inclusion が共存する場合，粗鬆化した筋原線維間に myelin figure が配列されている場合，cytoplasmic body と共存する場合，蜂巣構造と共存する場合などの種々相を

認めた（図4・a～d）.

考　　察

1）RVは，多数の文献報告症例[2]や本報告例[5]を含め，distal myopathyの一部および近縁疾患に特徴的な所見となっている場合がある．したがって，distal myopathyを一つの疾患群と考えた場合に，その一部に，臨床病態を含めて“RV型distal myopathyと表現するのが適当な病型も存在すると思われる．

2）しかし，いわゆるdistal myopathyに含まれる臨床遺伝学的あるいは臨床症候上の病型提示として，たとえば，“Welander型”，“三好型”，“oculopharyngodistal myopathy”（里吉）などとも表現されるいくつかの種類があり[2]，これらとRVとの関係は従来特に指摘されてはいない．



a	b
c	d

図4　電顕像種々相．(a)典型的myelin figure集塊，(b)粗鬆化した筋原線維間に配列されたmyelin figure，(c) cytoplasmic bodyとの共存，(d)蜂巣構造との共存，いずれも4000×．〔本文参照〕

一方，上述の“RV 型 distal myopathy”としての報告例も遺伝性・単発性両者の場合があり，oculopharyngodistal type を示す場合もあることが知られている．いずれにしても，RV という筋病理組織学的所見と，遺伝・臨床型とがその分類上の基盤を異にしているため，その組合せの上での特異性の抽出は必ずしも容易ではないと思われる．然し筋ジストロフィーとしての distal myopathy（“三好型”など）の場合には RV が出現しにくく，非ジストロフィー性（遺伝性・単発性を問わず）の distal myopathy の症例に出現し易い可能性も想定される[2]．

3) むしろ RV は，これら distal myopathy 及び近縁疾患以外にも KW ないし遠位型緩徐進行性神経原性筋萎縮症などにも高率且つ著明に認められること（本報告内容の一部）[4] からも，必ずしも distal myopathy のみに特有な所見ではなく，これら他の一部の疾患群にも共通する病態を示唆していると考えられる．さらに RV の出現は，原疾患の種類を問わず下肢遠位筋に高率である点も特記される．

4) RV は autophagic vacuole の一種であると考えられるが，その成因と好発疾患の本態との関連づけについても，今後とも総合的な比較検討が重要と考えられる．

結　論

RV はいわゆる distal myopathy の一部の症例に著明に認められるが，他疾患とくに緩徐進行性神経原性筋萎縮症（KW および遠位型，肩甲下腿型など）にも同様に高率・著明に検出され，且つ下肢遠位筋に優位であった．さらに RV の特性に関する他の知見補遺および RV と類縁の他所見について報告し，考察を加えた．

文　献

1) Dubowitz, V. & Brooke, M. H.：Muscle biopsy：A modern approach. Saunders, London, 1973, p. 231-241.

2) 豊倉康夫，三好和夫(編)：Distal myopathy. 外国における文献（1902—1981.12），日本における症例報告，その他(1951—1981. 12)．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究，三好班，昭和56年度研究報告書，1982，p. 243-249.

3) Fukuhara. N., Kumamoto, T. & Tsubaki, T.：Rimmed vacuoles. Acta Neuropathol. (Berl.)，51：229-235，1980.

4) a) 田辺等(班員)，松原四郎，内潟雅信，野沢胤美：知覚障害を伴わない緩徐進行性遠位型筋萎縮症について——神経原性病態を主とする 5 症例の検討を中心として．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，三好班，昭和54年度研究報告書，1980，p. 81－84.

b) 松原四郎，金坂明美，内潟雅信，野沢胤美，田辺等，原満：知覚障害を伴わない緩徐進行性遠位型神経原性筋萎縮症について，——5 症例の検討を中心として——．神経内科，13：222－227，1980.

c) 松原四郎：慢性脊髄性筋萎縮症の臨床病理学的研究．金沢大十全医学会雑誌，90：676－695，1981.

5) Matsubara, S. & Tanabe, H.：Hereditary distal myopathy with filamentous inclusions. Acta Neurol. Scandinav., 65：363-368，1982.

45) Filamentous inclusion, Tubulomembranous inclusion と Rimmed vacuolar degeneration について

中　西　孝　雄*

研究協力者　葛　原　茂　樹*

生検筋の筋核内および細胞質内封入体である filamentous inclusion (FI) と細胞質内封入体である tubulomembranous inclusion (TMI) は，それぞれ非定型的慢性多発性筋炎（いわゆる封入体筋炎）[1)8)]，福原ら[3)]により tubulomembranous myopathy (TMM) と命名された特異な先天性ミオパチーに疾患特異的と考えられてきたものである．昨年度の本研究班の研究報告において，われわれは，いわゆる「Rimmed vacuole (RV) を伴う遠位型ミオパチー」の症例の中にも，これらの封入体が認められるものがあることに言及した[6)]．本年度は，これらの封入体は，RV が出現するような筋の変性過程で，かなり非特異的に出現するのではないかという仮定のもとに，RV が認められた生検筋の電顕材料を多数検索した．

検索対象と方法

対象とした5症例の臨床所見と生検筋については，表に要約した通りである．このうち，症例5のみは肢帯型 DMP に類似した近位部優位の筋萎縮を示し，他の4症例は全て遠位部優位の筋萎縮を示した遠位型ミオパチー症例である．生検筋は，1症例で複数回実施したものを含めて8検体であり，1検体について5個以上の電顕材料を電顕的に検索した．

結　　果

1．光顕所見

全例に共通した所見として，RV と種々の変性像が認められた．RV を有する筋線維は一般に萎縮していて集合像を示し，一見神経原性萎縮のように見える部分があった．筋線維壊死や貪食像は CPK の高い症例のみに著明で，一般に RV を有さない筋線維はよく保たれていた．炎症像は凍結切片標本，パラフィン切片標本ともに認められなかった．

2．電顕所見

光顕的に見られた RV に対応して，多数の myeloid body, dense body, free and membrane-bound glycogen を内包する autophagic vacuoles が多数認められた．この他に，直径15～25nm 径の FI が全例の核内（図1）か細胞質内（図2），あるいはその両方に認められた（表1）．これらの大部分の症例では，断面が管状構造を示していた．細胞質内 FI は autophagic vacuole の周囲に高頻度に見られ，この中には変性した thick myofilament 由来であることを示唆するような，空胞周囲の変性初期の myofibril との連続性を示唆するような所見も認められた（図2）．TMI は，症例5を除く全例（全て遠位型ミオパチー）に認められた．症例3では極めて多数，様々の大きさのものが見られたが(図3)，他の症例は数が少なく形も小さかった．この封入体は，福原ら[3)]が詳細に記載しているように，8～9 nm の周期のやや彎曲した層状構造をなしており，切片の方向により管状構造を示す部分がある．この構造物は電子密度が一様でなく，非常に濃い部分と薄い部分があるだけでなく，注目すべきことには，電子密度の濃い部分の一部が，脂肪滴様あるいはリポフスチンに類似した構造に移行する像が見られた（図4）．

＊筑波大学臨床医学系神経内科

表　5症例のまとめ

症　　例	1	2	3	4	5
性	女	男	女	女	女
年齢(初発)	44(34)	38(33)	21(18)	47(41)	42(38)
筋萎縮	遠位優位	遠位優位	遠位優位	遠位優位	近位優位
家族歴	常・劣性	なし	従兄妹婚	なし	なし
CPK(<50)	70	530	90	60	160
生検部位	上腕二頭筋 大腿四頭筋 腓　腹　筋	腓腹筋	大腿四頭筋	前頸骨筋 上腕二頭筋	上腕二頭筋
炎症所見	−	−	−	−	−
RV	+	+	+	+	+
FI：細胞質内	+	+	+	−	+
核　内	−	+	−	+	−
TMI	+	+	+	+	−

考　　察

1967年，Chou[2]は慢性筋炎の患者の生検筋の電顕的検索で，筋核内と細胞質内に管状構造を有するfilament様構造物を見出し，形態学的にmyxovirusとの類似性を指摘した．類似の報告はその後，Satoら[7]，Carpenterら[1]によって追加され，1971年Yunisら[8]はこのような筋疾患を封入体筋炎inclusion body myositisと命名した．1978年，Carpenterら[1]は彼らの6症例と従来の報告例の所見に基づいて，封入体筋炎を皮膚筋炎，多発性筋炎から区別される筋炎の疾患単位とすることを提唱した．彼らによれば，その臨床的特徴は他の筋炎とは非常に異なっており，膠原病としての一般特徴や血清学的炎症所見を欠き，しばしば遠位筋優位の筋萎縮の分布を示し，CPKは軽度上昇にとどまり，ステロイドに反応せず，慢性経過をとるとされている．筋生検では炎症所見のあるものとないものがあり，筋原性変化に加えて凍結切片標本でRVが認められるのがその特徴であるとしている．

このような臨床的，筋病理学的特徴は，古典的な意味での多発性筋炎の病像とは非常に異なっているだけでなく，多くの点で，近年わが国で注目されている「RVを伴う遠位型ミオパチー」と共通していることが指摘されてきた[4)6)]．事実，「RVを伴う遠位型ミオパチー」の孤発例，家族例の生検筋の電顕的検索でFIが認められた症例の報告が増加している[5)6)]．本研究では，RVが認められた遠位型および近位型ミオパチー5例全例にFIが認められたので，これは疾患特異的というよりもむしろ，RVを伴う筋変性過程に高頻度に出現する封入体であろうと考えられる．細胞質内FIに

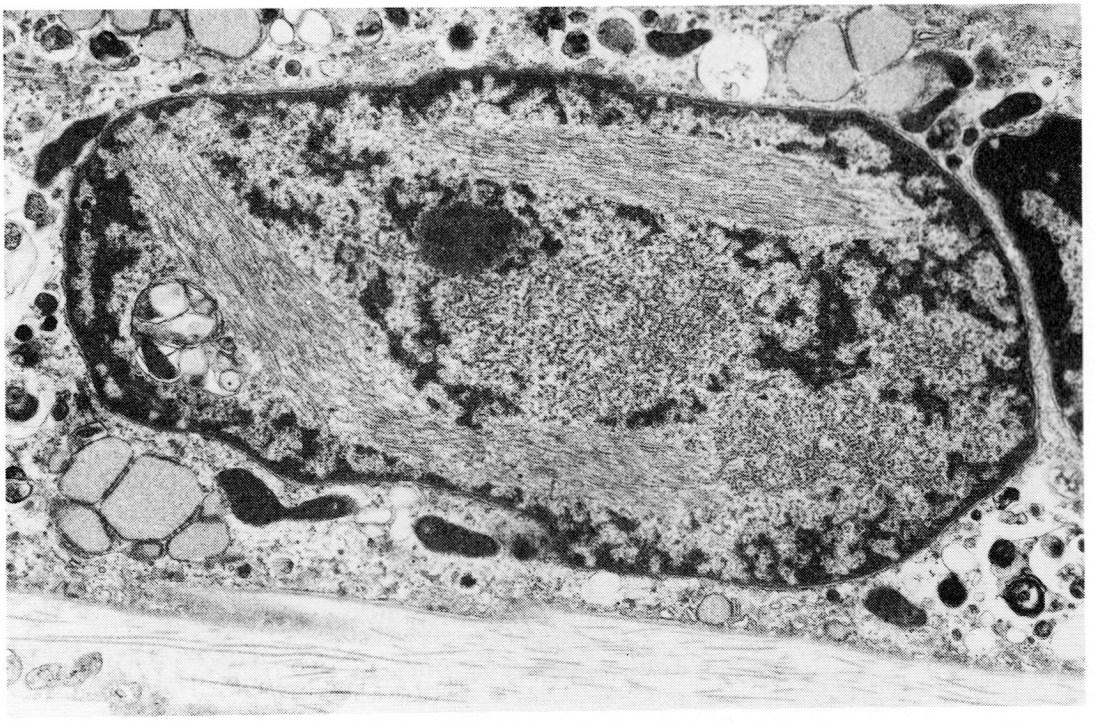


図1　萎縮筋の核内に認められた filamentous inclusion.
横断面では管状構造が認められる．症例4．原図，×14,000.

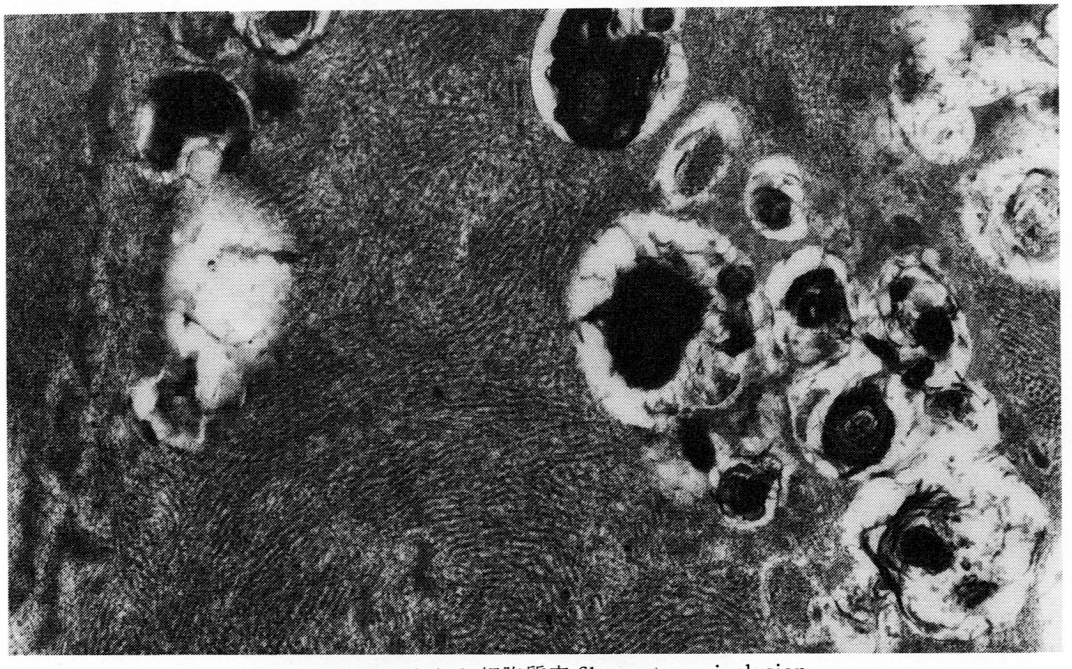


図2　空胞近傍に認められた細胞質内 filamentous inclusion.
横断面では管状構造を認める．所々に，より細い filament（thin myofilament？）や dense area（Z帯由来？）が散見される．症例5．原図，×34,000.

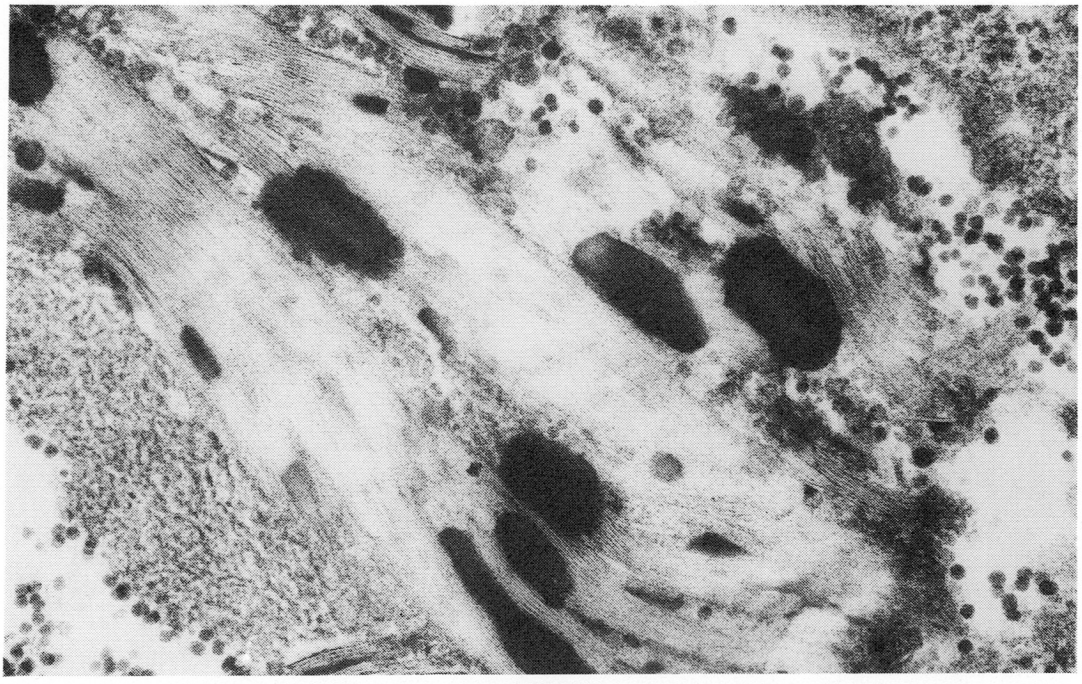


図 3　Tubulomembranous inclusion. 症例 1．原図, ×85,000.

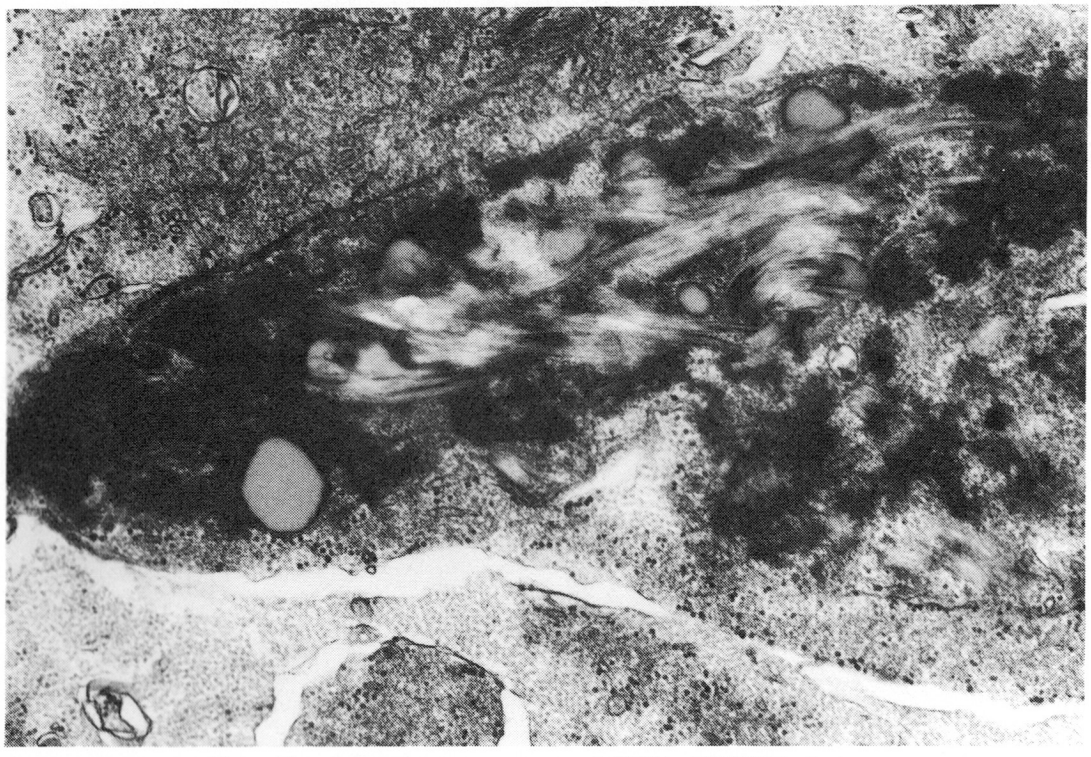


図 4　Tubulomembranous structure に連続して脂肪滴とリポフスチン類似構造が認められる．症例 2．原図, ×34,000.

ついては，Yunis ら[8] も指摘している所であるが，変性した thick myofilament が含まれている可能性が高い．このような点から，封入体筋炎という疾患概念について再検討すべきではないかと思われる．

次に，TMI は，顔面筋と四肢筋が障害された先天性ミオパチーの症例において初めて記載された封入体であり，福原ら[3] はこれが疾患特異的なものである可能性を示唆した．しかし，本研究で明らかになったように，類似の構造物は遠位型ミオパチー 4 例全例に見出されたので，少なくともそれ自体は疾患特異的とは言い難い．しかし，1 例（症例 1）で非常に多数認められたほかは，他の症例では量は少なく，ミトコンドリア異常症における「ミトコンドリアミオパチー」と「種々の筋疾患に認められる異常ミトコンドリア」のような関係にある可能性は否定できない．福原ら[3] の記載した症例の生検筋にも，光顕的に多数の RV が認められているので，TMI も RV を伴う筋変性と密接な関連がある封入体と思われる．また，自験例で TMI の一部にリポフスチン類似構造への移行が認められたことは，TMI が autophagia に関連した lysosome 由来のものである可能性を示唆する．

結　　語

RV が認められた遠位型ミオパチー 4 例，近位型ミオパチー 1 例の生検筋の電顕的検索で，高頻度に FI と TMI を認めた．いわゆる封入体筋炎や TMM の生検筋の光顕所見の特徴は RV の出現であることを考慮すると，FI や TMI は疾患特異的というよりも RV を伴う筋の変性過程に出現する独特の封入体であると考えられ，これらの疾患には共通の変性過程が存在している可能性を示唆する．

文　　献

1) Carpenter, S., Karpati, G., et al：Inclusion body myositis：a distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy. Neurology (Minneap.), 28：8, 1978.

2) Chou, S. M.：Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis. Science, 158：1453, 1967.

3) Fukuhara, N., Kumamoto, T., et al：A new myopathy with tubulomembranous inclusions. J. Neurol. Sci., 50：95, 1981.

4) 福原信義，熊本俊秀，ほか：Oculopharyngeal muscular dystrophy と distal myopathy をつなぐもの．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究，三好班，昭和56年度研究報告書，1982，p.104.

5) Nonaka, I. , Sunohara, N., et al：Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation. J. Neurol. Sci., 51：141, 1981.

6) 中西孝雄，葛原茂樹：遠位型ミオパチーの 5 例．筋萎縮の分布とその筋病変について．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究，三好班，昭和56年度研究報告書，1982，p.97.

7) Sato, T., Walker, D. L., et al：Chornic polymyositis and myxovirus-like inclusions. Electron microscopic and viral studies. Arch. Neurol., 24：409, 1971.

8) Yunis, E. J. & Samaha, F. J.：Inclusion body myositis. Lab. Invest., 25：240, 1971.

46) Autosomal recessive distal muscular dystrophy（常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症）の特徴と文献的考察（附）1部検例

三 好 和 夫*,**

研究協力者　岩 朝　勝*　日 下 香 苗*　吉 田 恭 典*
西 野　洋*　川 井 尚 臣*

はじめに

Autosomal recessive distal muscular dystrophy (ARDMD)（常染色体劣性末梢型ジストロフィー症）は，著者らがさき（1974年[1]）に7家系14症例を示して，新しい末梢型筋ジストロフィー症として発表したもので，その後家系例を追加してきた[2)3)4)]．いわゆる distal myopathy としては，Welander (1951) の Myopathia distalis tarda hereditaria が代表的にあり，その後いくつかの家系例や症例が報告されている．近年は，筋の組織で多数の rimmed vacuole のみられるものが注目され，報告例はとくにわが国において多い．

本文では，著者らの ARDMD の特徴を示し，さきの Welander 型，その他，そして，近年の vacuolar distal myopathy ともいうべき症例との関係を明らかにしておきたい．

なお，著者ら観察中の ARDMD 家系例の1例が昨年死亡し，剖検することができたので，臨床経過の要点を剖検組織所見の要約を附してのべる．

方　法

ARDMD を中心として，その他のいわゆる distal myopathy について，1)まず，遺伝・臨床型の観点からのべ，また2)臨床的には筋萎縮の強さの伸筋，屈筋における差異，3)血清 CK（クレアチンキナーゼ）活性値上昇の差異，そして，4)筋組織所見として，とくに rimmed vacuole の有無についてのべる．

＊徳島大学医学部第一内科
＊＊沖中記念成人病研究所

成　績

ARDMD の特徴の要約：

本病型の特徴は次のごとく要約することができる．1)遺伝型は autosomal recessive，男，女両性にほぼ同様に発病，2)筋萎縮は筋原性．筋電図は筋原性，筋組織所見はジストロフィー性で，空胞変性などを認めない．3)筋萎縮は下肢末梢にはじまり，下腿にもっとも強く，とくに屈筋がおかされる．ために早期に爪先立ちができなくなる．4)多くは10歳台後半から20歳台で発病．5)症状は進行性であり，筋萎縮は下腿筋から，次いで大腿筋にもおよび，発病後数年で起坐，歩行に支障をきたす．しかし，それらが不能になって bed patient となることは少い．上肢の手，前腕の筋萎縮も加わるが程度は軽い．6)血清 CK 活性値が中等度～高度に上昇する．7)血清 CK 活性値に関し，著しい上昇を示すホモ因子型 preclinical stage のものと，軽度の上昇を示すヘテロ因子型の2種類の生化学的保因者がある．

遺伝・臨床型としての ARDMD：

図1に本症の8家系17症例（男8，女9）を示した．これらの家系の中には，病者の他に，血清 CK に関する生化学的保因者，ホモ型2例（女2，16歳，19歳），ヘテロ型4例(男2，女2，14～19歳)がみられる．なお，Ak.家IV-2（男性22歳，病者）は，14歳から18歳発症時までホモ型保因者であった．

ホモ型保因者は家系図，年齢，CK 活性値，そして臨床経過から preclinical stage にあるものと判断されるし，ヘテロ型保因者は発症していない．

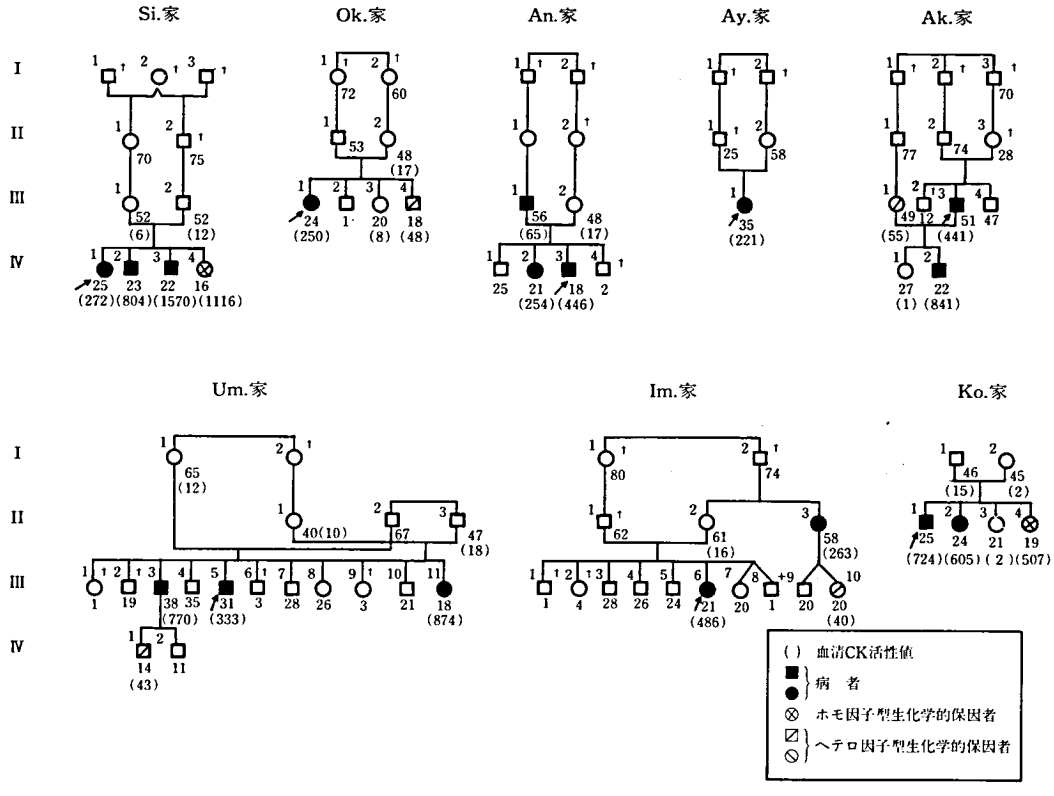


図1　常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症の家系

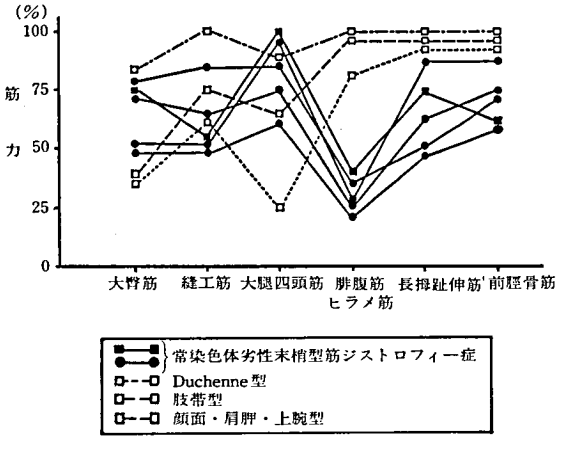


図2　筋ジストロフィー症各型の下肢筋力（徒手筋力テストによる）

これらの家系例は常染色体劣性の遺伝型を示し，症状，所見（前項，また，詳細は著者らの論文参照）からして疾患単位としての一遺伝・臨床型であることがわかる．

なお，図1中のAn.家（中村家）のIII-1（男性56歳）は昨年68歳で死亡し，剖検を行なった（後章参照）．

ARDMDにおける下腿屈筋の障害：

ARDMDでは下腿筋の萎縮で屈筋が強く侵されることが特徴である．そのため早期に爪先立ちが不能になる．図2にその筋力低下の有様を筋ジストロフィー症各型のそれと比較して示した．

本症では下腿の腓腹筋，ヒラメ筋の筋力低下が顕著であることが特徴であり，同じ下腿筋でも前脛骨筋，長拇趾伸筋は比較的よく保たれている．屈筋がより強く侵されるということは大腿筋にもその傾向がみとめられる．

下腿屈筋の萎縮が強いことは，視診，触診，ま

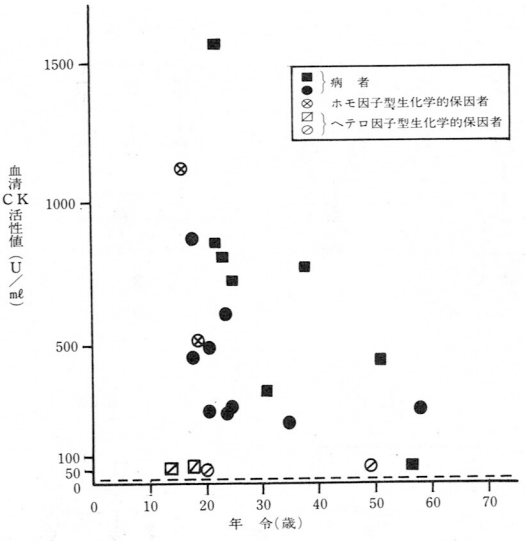


図3　常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症の病者および生化学的保因者の血清CK活性値

た筋電図，筋組織所見でもみとめられる．

ARDMDにおける血清CK活性値の上昇：

図3に，本病型の病者および生化学的保因者の血清CK活性値と年齢による経過を示した．

本病型の血清CK活性値は高齢者の1例（65U/ml）を除いて，221～1,570U/mlと中等度ないし高度に上昇している．血清CK活性値の著しい上昇は年齢の若い発症後まもない症例にみられ，年齢の増加とともに低値となっている．ホモ因子型の2例の血清CK活性値は1,116，507 U/mlの著しい上昇であり，ヘテロ因子型保因者の4例の値は40～55U/mlの軽度上昇である（健常値25 U/ml以下）．

生検筋組織所見：

本病型の6家系9症例における生検筋の組織所見では各症例ともよく似た所見がみられた．

著しい変化のみられた腓腹筋では，筋線維の大小不同，筋線維の減少，変性，壊死，中心核の増加，そして，脂肪織と結合織の増加があり，著しい筋原性の変化がみられた．しかし，空胞変性はみられない．そして同一症例でも大臀筋では散在性に変性壊死線維をみとめる程度の軽い変化であった（図4）．なお，筋束中の末梢神経に異常はみられていない．

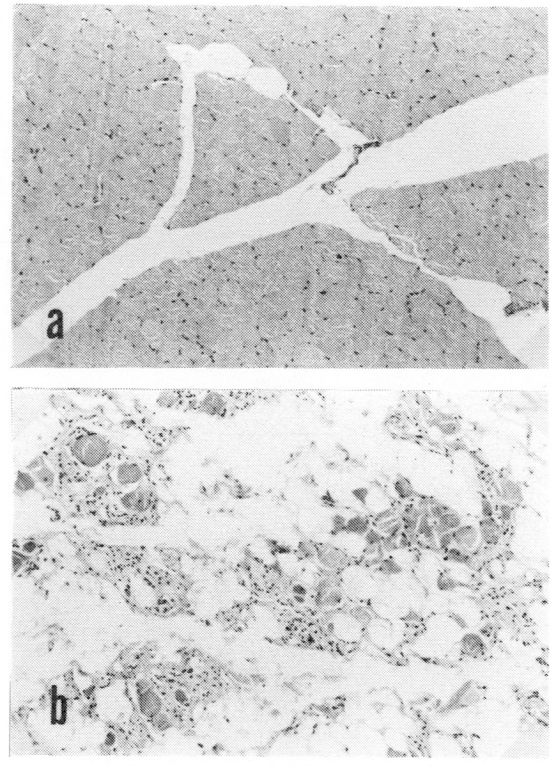


図4　筋生検組織像（Si.家 IV-1例）
a：大臀筋　b：腓腹筋　HE染色（×100）

組織化学染色では，全体的にtype predominanceの所見はみられず，また，nemaline rodなどもみられなかった．また，電顕では，Z-bandのstreaming，筋線維の粗鬆化，断裂などの変性所見であり，特異的なものはみられなかった（日下ら[7]）．

本病型の筋組織所見は，ジストロフィー性といってよく，空胞変性など特殊な所見のないところに特徴があるといえる．

剖検例．An.家III-1．男性．56～68歳：

家系図を図1（An.家）に示した．娘2人に本症病者がある（剖検所見は猪沢ら[5]の報告参照）．

20歳歩行障害ではじまり，下腿筋萎縮，その後上腕の筋萎縮が徐々に進行．56歳初診時には，爪先立ち不能，登はん性起立，動揺性歩行．筋萎縮が下腿に著明に，下肢の大腿部および前腕に軽度にみられた．握力は軽度に低下．血清CK活性値

は，56歳65U/ml，66歳35U/ml．68歳死亡，剖検．

66歳の筋生検で，本症の他の症例と同様所見をえた．すなわち，HE染色，組織化学，電顕で，腓腹筋に前述の強い筋原性変化をみとめ，しかし，筋線維型優位の明らかなものをみとめず，また，rod, vacuoleなどもみられなかった．

本例は本病型の1例で家族発症例である．ただ本例では，血清CK活性値の上昇が，高年期のためと考えられるが軽度であり，また，娘2人の発病期がやや早く（12歳），病状の進行も少し速い．

本例の剖検所見の要約（檜沢ら[5]による）：本例の特徴は，下肢遠位筋の強い萎縮，筋核の増加，集塊化，少数の壊死，再生筋の存在，一部筋にみられる変性に伴うネマリン小体の形成などである．部分的に神経原性の変化を思わせる像も混在するが，全体としては筋原性変性と考える．

娘2人（本家系の発端者およびその姉）の筋生検所見は父親と同様，下腿筋の高度な脂肪織浸潤，残存筋線維の散在性壊死を伴う筋原性変性であった．

考　　察

著者らのARDMDと文献例でこの型に属すると思われるものに対比して，Welander型，そして，組織所見でvacuoleを伴うdistal myopathyとされている報告例[7]の中から2～3を取りあげて**表1**に示した．Distal myopathyの文献に関しては豊倉ら[7]の文献集がある．**表1**に従って，以下，次の論点に絞って述べる．

遺伝・臨床型：

Welander型とARDMDはそれぞれ異なった遺伝・臨床型としてみられる．

高橋ら[7]の2家系とKuhnら[6]の1家系は明らかにARDMDといえる．とくに，これらの家系の中では，著者らが本病型の特徴として述べてきたCK活性値上昇による保因者の内，前者でヘテロ因子型，後者でホモ因子型のものがとらえられている．ARDMDに属すると思われる文献例としては，表中のものの他に，いずれも本邦例であるが，家系例が1，2家系あり，また，単発例が数例みられる．

Markesberyらの論文[7]は，症例が同種類でない例として取り上げた．3症例がvacuoleの存在を特徴とするものとして発表されているが，単発の2例（血清CK活性値が高度に上昇，vacuoleは少ない）はむしろ著者らのARDMDに近いことを思わせ，1例の家族発症例はvacuoleが多く，特殊の家系例といえる．

表1　ARDMDとdistal myopathy報告例の若干

発表者	Welander	三好ら	高橋ら	Kuhnら	Markesberyら		水沢，豊倉ら	熊本，福原ら
病名	Myopathia distalis tarda hereditaria	ARDMD	ARDMD	New type of distal myopathy	Distal myopathy		Distal myopathy vacuolar variety	Distal myopathy
発表年	(1951)	(1967～74)	(1979)	(1981)	(1977)		(1980)	(1982)
家系(例)数	72 (249)	8 (17)	2 (4)	1 (2)	2 (2)	1 (7)	2 (2)	1 (3)
遺伝型	AD	AR	AR	AR	単発	AD	単発	AR
発症年齢	40～60	10台後半～20台	18～27	17, 19	20, 19	44	26, 26	23～26
初発筋	手指	下肢末梢	下肢末梢	下肢末梢	下肢末梢	下肢末梢	下肢末梢	下肢末梢
経過	slow progressive	progressive	progressive	progressive	progressive	slow progressive	slow progressive	slow progressive
機能障害	踵立ち	爪先立ち	爪先立ち	爪先立ち	爪先立ち	踵立ち	踵立ち	踵立ち
筋萎縮	屈筋＜伸筋	屈筋＞伸筋	屈筋＞伸筋	屈筋＞伸筋	屈筋≧≒伸筋	屈筋＜伸筋	屈筋≒伸筋	屈筋＜伸筋
筋電図	myogenic	myogenic	〃	〃	〃	〃	〃	〃
血清CK値上昇		中～高度	〃	〃	中～高度	軽度	軽度	軽度
CK上昇保因者 (homo), (hetero)		(+), (+)	(−), (+)	(+), (−)				
組織像	myopathic	myopathic (dystrophic)	〃	〃	myopathic	myopathic	myopathic	myopathic
	vacuoles sometimes	(−)	(−)	(−)	(+)small single	(⧺)large multiple	(⧺)	(⧺)

水沢，豊倉ら[7]の例は類似の単発例を集めてvacuoleの顕著な新しい遺伝・臨床型として報じている．熊本・福原らの例はvacuoleを認める3例の同胞発症の例としてかかげた．これら，いわゆるvacuoleを伴うdistal myopathyは，文献上，単発例，家系例としてこれまでにすでにいくつかの発表[7]があるが，今後，各々の特徴によって整理されて，遺伝・臨床型として確立されてゆくものと思われる．

筋萎縮の伸筋，屈筋優位：

ARDMDでは下腿筋萎縮は明らかに屈筋優位（屈筋＞伸筋）である．このため病者は爪先立ちができなくなる．これに対して，Welander型では（下腿の萎縮はホモ因子型であるatypical caseで著明）伸筋優位（屈筋＜伸筋）で，踵立ちが不能となり，爪先立ちは可能としるされている．

Markesberyらの例では，単発の2例では下腿筋萎縮は，屈筋＞伸筋であり，家族発症の1例は屈筋＜伸筋である．また，内外のいわゆるvacuoleを伴うdistal myopathyでは，屈筋＜伸筋ないし屈筋≒伸筋で，やはり踵立ちができなくなっている．

血清CK活性値の上昇：

ARDMDの血清CK活性値の上昇は，著者らは中等度～高度としてきたが，健常値の10倍～20倍あるいはそれ以上であり，Welander型では記載はないが明らかな上昇はないと思われる．血清CK活性値についてもMarkesberyの例は2つに分かれており，単発の2例で高く，家族発症の1例では上昇していない．いわゆるvacuoleのあるdistal myopathyでは上昇は軽度ないし，殆どみられていない．血清CK活性値上昇による保因者はARDMD以外にはない．

筋組織所見，とくにvacuoleの存在：

筋組織所見は，表にみるようにすべてmyopathicと表現されている．ARDMDに著者らはdystrophicの表現を用いたが，それは，DMDの組織像を頭に描いて，myopathicの所見に，特別にvacuole，異常mitochondria，また筋線維型の異常などが顕著でないということを特徴とする，ことを指している．

Vacuoleないしrimmed vacuoleの存在について，ARDMDではみられていない．Welander型ではsometimes observedとされている．いわゆるvacuoleを伴うものでは，それが高度ないし顕著にみられている．

おわりに

著者らのいうARDMDの特徴を遺伝・臨床型としての観点から述べ，また，とくに下腿筋萎縮の屈筋，伸筋の優位性，血清CK活性値上昇，そして筋組織におけるvacuoleの存在をとりあげて明らかにした．

本病型は他のdistal myopathyに対して，いわゆるpure muscular dystrophyのカテゴリーに入るとの著者らの考えから，autosomal recessive distal muscular dystrophy，すなわちmyopathyとせずにmuscular dystrophyとしてある．

本文ではまた，最近死亡して剖検をすることができた本病型の1例（68歳男性，家族発症例，著者ら12年間観察）の臨床の要点を，剖検所見の要約を附して示した．

文　献

1) 三好和夫，岩朝　勝，川井尚臣，ほか：Distal myopathyの遺伝・臨床型，自験7家系14症例とわが国文献例についての成績．臨床神経，14：963—963，1974.

2) Miyoshi, K., Iwasa, M., Kawai, H., et al.：Autosomal recessive distal myopathy observed characteristically in Japan. Jap. J. Human Genet., 20：62—63, 1975.

3) 三好和夫，岩朝　勝，川井尚臣，ほか：常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症 Autosomal recessive distal muscular dystrophy——わが国にとくにみられる新しい末梢型筋ジストロフィー症——．日本臨牀，41：3922—3928，1977.

4) Miyoshi, K., Iwasa, M. & Kawai, H.,：Autosomal recessive distal muscular dystrophy：A new genetico-clinical entity of progressive muscular dystrophy. In "Muscular Dystrophy", Proceedings of the International Symposium on Muscular Dystrophy, Nov., 25

—27, 1980, Tokyo. (ed. Setsuro Ebashi), 1982, Univ. Tokyo Press. pp.471—483.

5) 檜沢一夫，布村進作，森住　啓：常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症（三好）の1剖検例．厚生省「神経疾患研究委託費」「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」（三好班），昭和57年度研究報告書．1983, pp.248—254.

6) Kuhn, E. & Schröder, J. M.：A new type of distal myopathy in two brothers. Neurology (N. Y.), 226：181—185, 1981.

7) 豊倉康夫，三好和夫：Distal Myopathy 文献集．厚生省「神経疾患研究委託費」「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」（三好班）昭和56年度研究報告書，1982, pp. 241—249.

47）常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症（三好）の1剖検例

特別発言　檜澤一夫* 布村進作* 森住　啓*

遠位筋障害を主徴とする筋原性疾患distal Myopathyは，Welander[1]の常染色体優性型（Myopathia distalis tarda hereditaria），Mageeら[2]，Bautistaら[3]の乳幼児型，Biemondの若年型[11]，三好ら[4]の常染色体劣性型，rimmed vacuoleを組織学的特徴とするもの[5),6),7)]など，遺伝，臨床的にも病理組織像の上からも多種類の疾患を含んでいる．三好らが報告したdistal myopathyは本邦の8家系の綿密な遺伝・臨床的検索に基づき，筋生検による組織像も併せて，進行性筋ジストロフィー症に属する一病型として分類されたものである．本病型の剖検検索はまだなされていなかったが，今回初めて1患者（An家）を剖検し得た．その所見は本病型の性格を明らかにし，他の病型との異同を論ずる上にも甚だ貴重であるので，筋病変を中心に報告する．

症　例

68歳，男．漁師．

主訴：下肢の脱力．下腿の筋萎縮．

既往および現病歴：小児，青年期には異常なし．20歳頃歩き方がおかしいといわれたことがあるが，仕事に支障はなかった．31歳腸チフス，45歳頃肺結核，48歳頃から胃潰瘍の治療を受けている．下肢の筋力低下は徐々に自覚されるようになり，37歳頃階段昇降に困難を覚え，下腿の筋萎縮に気付いた．45歳頃には手にも脱力感を覚えるようになった．56歳，初診時，下腿が細く，爪先立ち不能，登はん性起立，動揺性歩行が認められた．握力は軽度低下していた．血清CK活性値は65単位と軽度上昇を示した．昭和54年11月（66歳）徳島療養所に入院．この時は立ち上り極めて困難，歩行は平地のみ可の状態であった．知覚障害，病的反射はなく，血清CK活性値は48単位．昭和56年11月（68歳）より咳，喀痰，発熱が現われ，肺野陰影が拡大，昭和57年3月死亡した．

家族歴：患者は近親結婚をしており，娘2人が同病患者である．

剖検所見：るい痩著明．全身筋肉の萎縮がみられるが，とくに下腿に強く腓腹筋のふくらみは消失している．腓腹筋，ひらめ筋は脂肪織にほぼ完全に置換され黄色である．前，後脛骨筋は萎縮し少量の脂肪織浸潤，線維化を示す．大腿，上肢，肢帯，軀幹の諸筋にも萎縮はあるが，脂肪，線維化はほとんどなく，正常の色調硬度であった．剖検時に切り出したこれらの骨格筋について，組織化学，電子顕微鏡観察も併せ行った．

脳（1240 g），脊髄，心筋には異常を認めなかった．肺には陳旧な結核病巣，気管支拡張症と，死因となった気管支肺炎が見出された．

組織学的所見：腓腹筋は剖検時ほぼ脂肪織のみと化していたので，死亡2年前の生検標本を示す（図1 a,b）．すでに筋実質の脱落と大量の脂肪織がみられる．残存筋線維は核集塊を持つ強度の萎縮から200μmをこえる腫大が混在し，硝子様変性（opaque fiber）（図1 a），分節状壊死（segmental necrosis），食細胞侵入，再生（図1 b）が散見された．前後脛骨筋（図2 a），大腿二頭筋，拇指球筋（図2 b）には軽度の筋線維の脱落とperi-, endomysiumの線維化を認めたが，筋束構造はよく保たれていた．筋線維は大小不同を示し，円形の太い線維間に小径線維が混在し，所々に小径線維の小さな集団が認められた．筋線維のsplittingも多く観察された．筋核は増加し，中心核が多い．稀に孤在性の融解壊死筋線維が見出された（図2

*徳島大学医学部第一病理

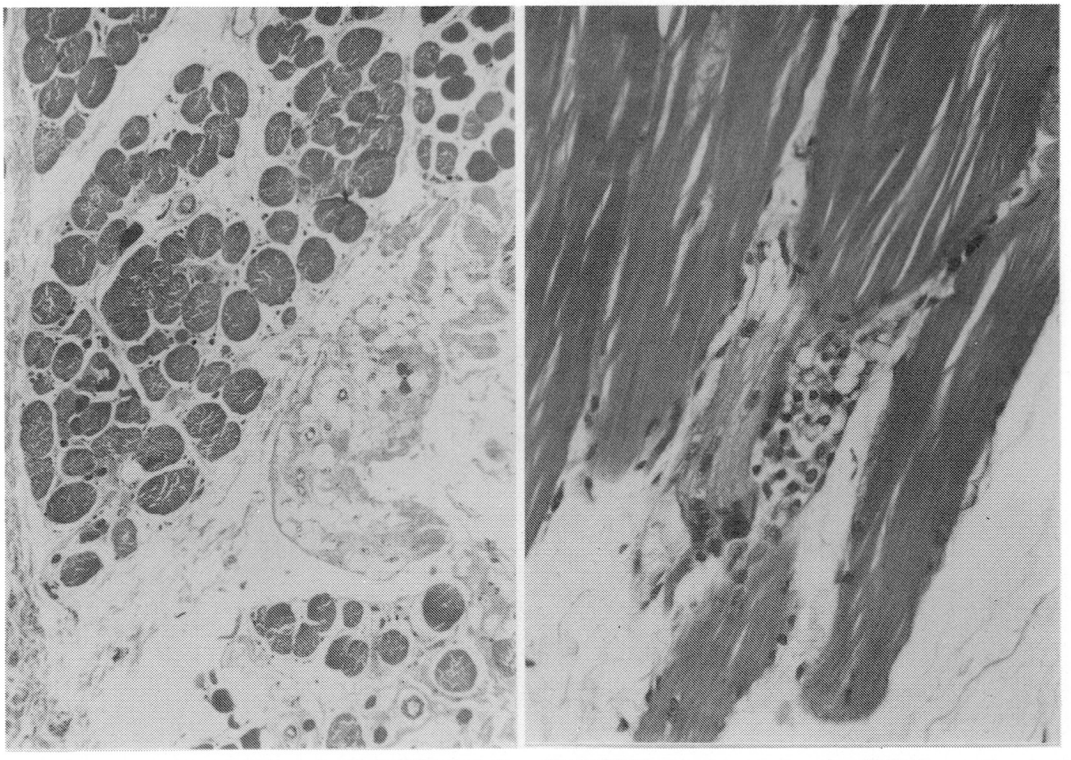


図１ａ，ｂ　生検腓腹筋

ａ　線維径の不同，横断面の円形化がみられる．濃染性の硝子様変性が散在．右中央部から下は，実質脱落の著しい筋束で，脂肪，線維化を伴っている．
ＨＥ　×80

ｂ　中央に食細胞浸潤を伴う分節状融解壊死と，それに平行して再生筋線維が並んでいる．
ＨＥ　×320

ｂ）．軀幹，四肢帯，上腕の諸筋には筋線維脱落や間質増生はほとんどなかったが，横径の不同，中心核，核増加があり，壊死が散見された（図３ａ）．再生現象は少なく稀にしか遭遇されなかった．

本例の筋肉には以上の変性，壊死に加えて，ネマリン桿状体が主に近位四肢筋，軀幹筋，横隔膜などに観察された．ネマリン桿状体は細胞膜下の小集塊あるいは細胞質の変性部に多量の集塊をなしており（図３ｂ），10μm をこえる針状構造も認められた．ネマリン桿状体集塊に接してリポフスチン顆粒がしばしば共存していた．横隔膜には中心コア変性もみられた．空胞変性は少数認められたが rimmed vacuole はなく，炎症性細胞浸潤も見出されなかった．

組織化学的所見：各筋肉とも同型線維の大小の集団，type predominance など線維型の分布異常が部分的に観察された（図４ａ）．各筋のヒストグラムは一様ではないが type 1 優位，type 1，2 萎縮（拇指球筋，三角筋，腸腰筋）の傾向がみられた（図4ｂ）．後脛骨筋では type 1 線維の萎縮と減少があり，type 2 線維は萎縮がなく 2 峰性パターンを示した（図４ｂ）．

電子顕微鏡所見：横隔膜筋をみると，中心コアに相当する中心部の筋原線維変性（サルコメア配列の乱れ，Ｚ線 streaming）と，これに連続してネマリン桿状体形成が（図５），また種々の大きさの電子密なリゾソーム（リポフスチン顆粒）もしばしば観察された．異常なフィラメント，封入体などは見出されない．

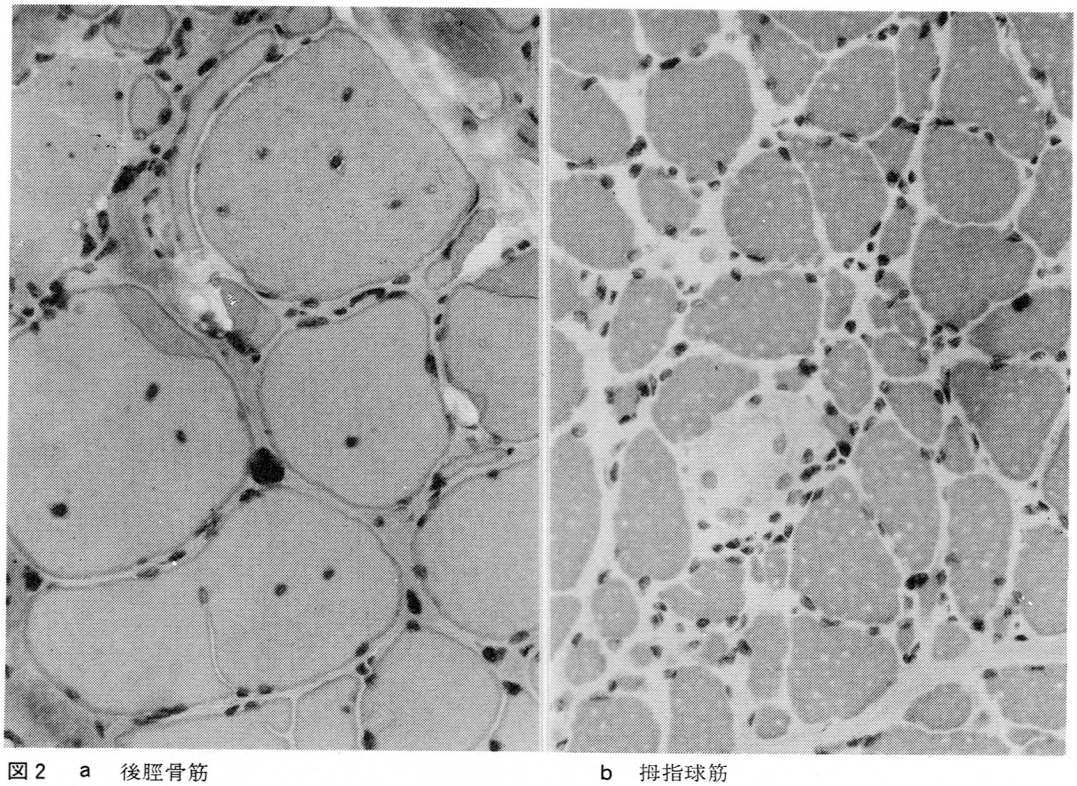


図2　a　後脛骨筋
腫大円形化した筋線維．中央に核集塊化した萎縮筋，上に小径線維群，下に splitting がみられる．ＨＥ　×320

b　拇指球筋
筋核の増加，線維横径の不同，小径線維群および中央やや左寄りに融解壊死筋を示す．
ＨＥ　×160

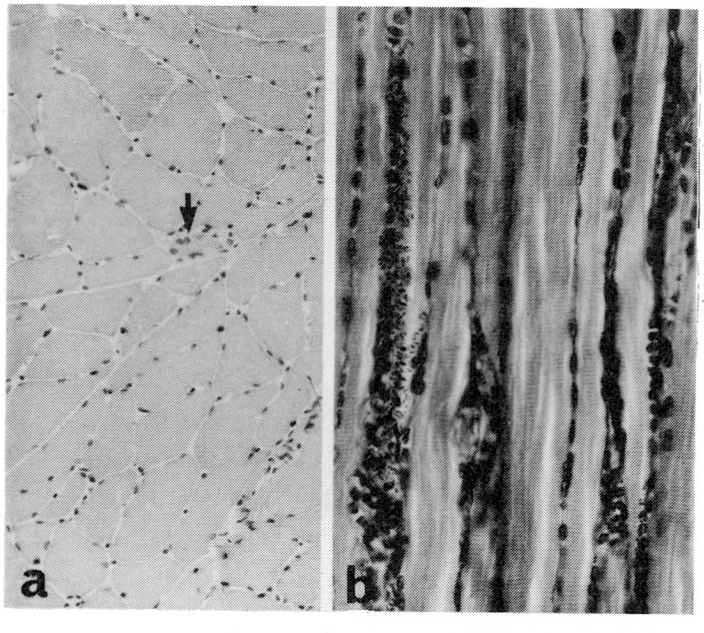


図3　三角筋

a

横断：線維径の不同，核増加，孤在性壊死筋（↓）を示す．間質の増加はない．
ＨＥ　×80

b

パラフィン切片，縦断：左側に多量のネマリン桿状体をいれた筋線維がみられる．
ＰＴＡＨ　×160

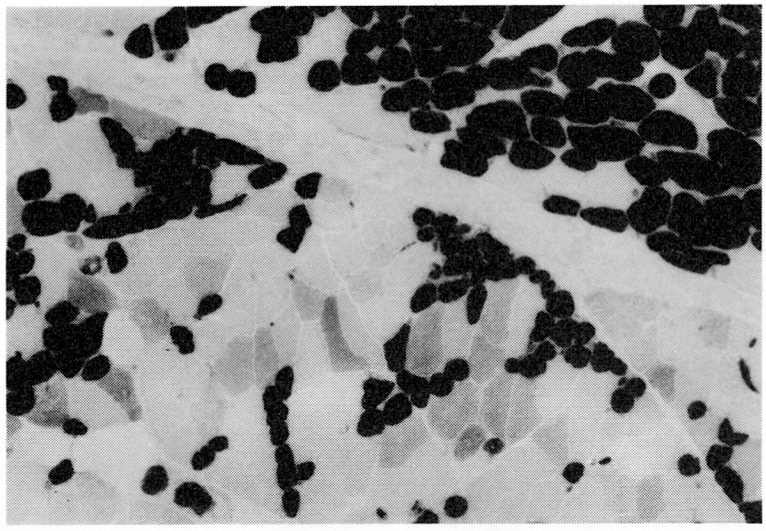
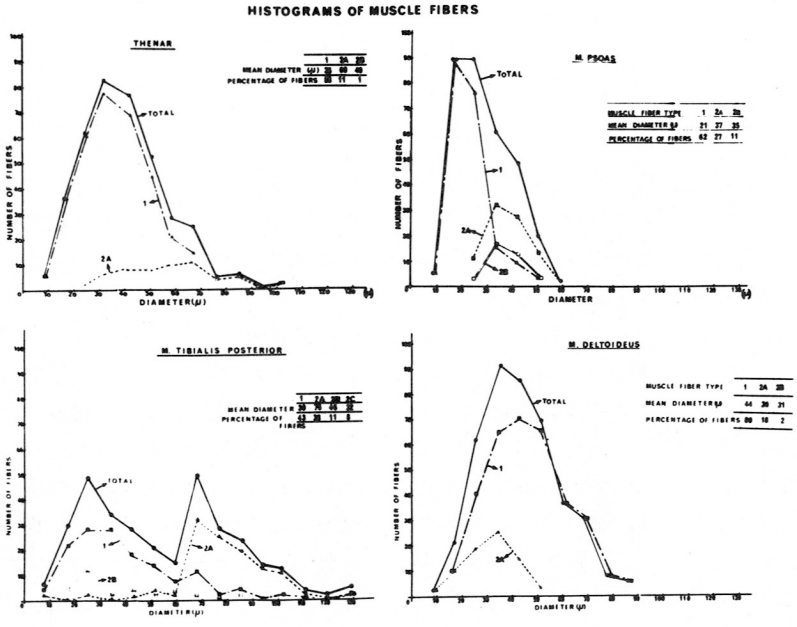


図4　組織化学所見のまとめ

a　腸腰筋，myosin ATPase 反応（pH 4.55）上の筋束は type 1，下は type 2 が優位を占める．さらに下の筋束では type 1 萎縮もある．



b　拇指球筋（左上），腸腰筋（右上），後脛骨筋（左下），三角筋（右下）のヒストグラム

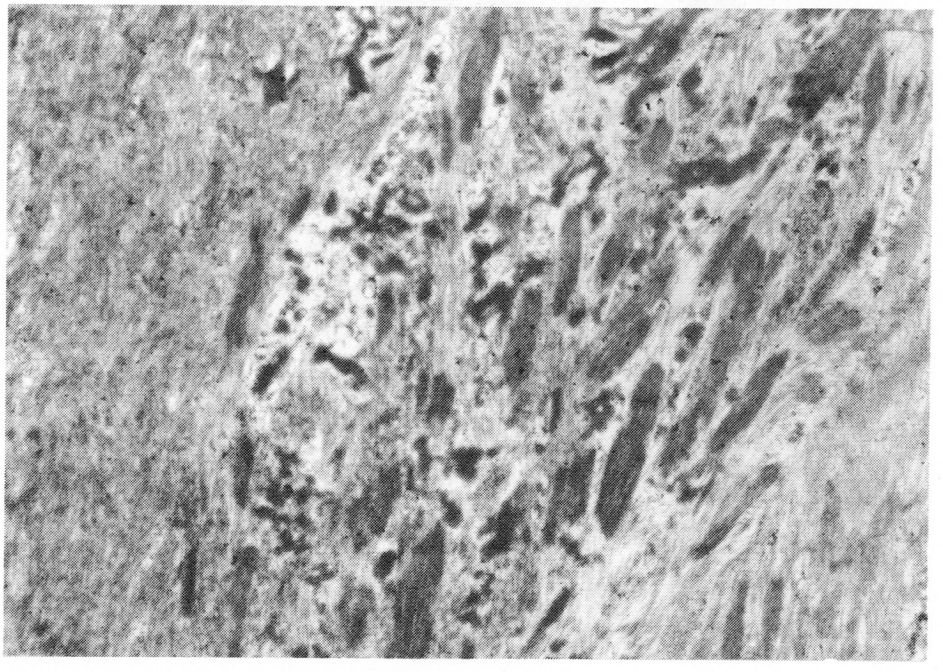


図5　横隔膜筋．サルコメア配列は不明瞭となり，筋原線維に連続してネマリン桿状体が多数みられる．

脳・脊髄の組織学的所見：脳，脊髄各部とも萎縮，運動ニューロンの変性，消失は認められず，前後根神経の髄鞘にも変化は見出されない．ただし頸髄後根に1コの神経腫小結節を認めた．

考　　察

本例の筋肉の病変は全身にわたってみられるが，高度な荒廃は下腿とくに屈側の筋に限局していた．病変の性状は壊死（piecemeal necrosis）を混じた非特異的変性が基本であり，進行性筋ジストロフィー症に共通な変化である[8]．本例ではこのような基本的変化に加えて，筋ジストロフィー症としては異例な筋線維型分布の異常，ネマリン桿状体がみられた．また筋ジストロフィー症では再生によって若い筋線維の比率が高いので，リポフスチン顆粒が多量に出現することは少ないと思われるが，本例ではむしろしばしばみられる変化であったので，これらについて考察を加える．

ネマリン桿状体は，ネマリンミオパチーのみならず，種々の筋疾患に際して筋原線維とくにZ線構成蛋白質（α-アクチニン）の変性に附随して生じることが知られており，進行性筋ジストロフィー症にも稀ながら出現し得る．Distal myopathyではMarkesberyら[9]（第3例），内野ら[7]の報告にみられる．本例にみられたネマリン変性は筋原線維の変性に随伴して起った非特異的変化と考えられる．なおEdströmら[10]が最近Welander型と考えられるdistal myopathyに見出した中間型フィラメント（skeletin）は本例には認められなかった．

一方最近になって筋線維のrimmed vacuole変性を組織学上の特徴とするdistal myopathyが多

数報告，注目されている．空胞変性は Welander 型の distal myopathy にも時々みられるという．Rimmed vacuole はミエリン様構造を有し，酸フォスファターゼ活性陽性といわれているが，このことは rimmed vacuole が小器官とくに膜要素の崩壊に由来する autophagic vacuole であり，細胞質崩壊過程の一様式を反映する非特異的構造であることを示している．事実本空胞は封入体筋炎や糖原病など本態の異なる疾患にも出現することが指摘された．われわれの報告例では空胞変性は少数観察されただけであり，とくに rimmed vacuole は見出されなかったが，autophagic vacuole ないしリゾソームの集塊であるリポフスチン顆粒がみられたことは，本例においてもリゾソームが関与する変性ないし修復過程が起っていることを示唆するものと思われる．とくにこれがネマリン桿状体と共存し，変化の軽い軀幹，近位四肢筋に多く認められたことは興味がある．

本例のような末梢型の筋萎縮の分布を示す疾患では神経原性筋疾患を鑑別しなければならないが，脳，脊髄には神経原性筋萎縮の基礎となる病変はなく，筋肉の病変も上述のごとく筋原性変化であった．筋線維型の分布異常，不均衡，同型線維集団がなんらかの神経原性因子の関与を意味するのかは今後の検索にまたなければならないが，これは長期の経過中にくり返された fiber splitting や再生に起因する myogenic type grouping としても理解し得る像である．

む す び

常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症(三好)の1例の剖検所見を報告した．筋肉の萎縮は下腿とくに屈側の腓腹筋，ひらめ筋に最も強かったが，筋線維の変性は全身の骨格筋にひろくおよんでいた．病変の性状は非特異的な変性・壊死 (piecemeal necrosis)が基本であり，筋ジストロフィー症の病変と同様である．本例ではしかし，これ以外にネマリン桿状体形成，リポフスチン集積をきたすような修飾が変性過程に加わっている可能性が示唆された．

文　献

1) Welander, L.：Myopathia distalis tarda hereditaria, 249 examined cases in 72 pedigrees. Acta Med. Scand., 141 (Suppl. 265)：1，1951.

2) Magee, K. R. & DeJong, R. N.：Hereditary distal myopathy with onset in infancy. Arch. Neurol., 13：387, 1965.

3) Bautista, J., Rafel, E., Castilla, J. M. & Alberca, R.：Hereditary distal myopathy with onset in early infancy. J. Neurol. Sci., 37：149, 1978.

4) 三好和夫，岩朝　勝，川井尚臣，佐々木尚子，日下香苗，八木田正聖，日浅光春，多田嘉明：常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症．わが国にとくにみられる新しい末梢型筋ジストロフィー症．日本臨牀，35：3922，1977.

5) 水沢英洋，中野今治，井上聖啓，高木昭夫，萬年　徹，豊倉康夫：筋線維に高度の空胞変性を伴った distal myopathy の一病型．神経内科，12：40，1980.

6) Fukuhara, N., Kumamoto, T. & Tsubaki, T.：Rimmed vacuoles. Acta Neuropath., 51：229, 1980.

7) 内野　誠，山村善教，川崎渉一郎，植川和利，徳臣晴比古：筋線維に著明な空胞変性とミエリン様構造物 (myelin figure) の増加を認めた oculo-pharyngo-distal type myopathy の1例．臨床神経，19：602，1979.

8) Cullen, M. J. & Mastaglia, F. L.：Morphological changes in dystrophic muscle. Brit. Med.. Bull. 36：145, 1980.

9) Markesbery, W. R., Griggs, R. C. & Herr, B.：Distal myopathy. Electron microscopic and histochemical studies. Neurology (Minneap.), 27：727, 1977.

10) Edström, L., Thornell, L.-E. & Eriksson, A.：A new type of hereditary distal myopathy with characteristic sarcoplasmic bodies and intermediate (skeletin) filaments. J. Neur. Sci., 47：171, 1980.

11) Biemond, A. : Myopathia distalis juvenilis hereditaria. Acta Psychiat. Neurol. Scand., 30 : 25, 1955.

48) Debrancher Deficiency Myopathy—inclusion body myositis あるいは rimmed vacuole を伴った distal myopathy との関連—

納　光弘*

研究協力者　岩政輝男**　中川正法*　中里興文*
福永秀敏*　法化図陽一*　山野隆*
中島洋明*　井形昭弘*

目的

最近，本研究班で“rimmed vacuole を伴った distal myopathy”が話題となり，その病理像から“inclusion body myositis”との関連が注目されている．しかし，これまでその生化学的側面（欠損酵素）に関しては明らかにされていなかった．今回，rimmed vacuole を有する myopathy 患者5症例に関し，グリコーゲン代謝の側面からの検討を行なった．

症例

症例1（39歳女性）と症例2（32歳男性　図1）は同胞で，詳細は文献1)と4)に報告．症例3（32歳女性）は孤発例で，その概要は文献2)と3)に報告．いずれも20歳頃の発症で，四肢末梢優位の萎縮（大腿内転筋と胸鎖乳突筋も萎縮）が緩徐に進行．血清 CK 値は軽度～中等度上昇．24時間絶食後の前腕阻血負荷試験で乳酸は正常の上昇反応を示さず（症例2）．症例4（34歳男性，概要は文献2）～3））は幼少期より筋脱力あり，一過性の肝腫大も認めている．臨床像は，近位筋優位の筋脱力並びに筋萎縮と手袋くつ下状感覚低下を認めた．肝機能障害あり，肝生検では肝細胞にグリコーゲンの貯留著明．CK 値は中等度上昇．血糖は著明に低下（空腹時42mg/dl）．前腕阻血負荷試験で乳酸上昇せず．症例5（56歳男性）は幼少時より近位筋優位の脱力存在．血清 CK 値は中等度上昇．

*鹿児島大学医学部第三内科
**熊本大学附属病院臨床検査部

生検筋病理所見

症例1～3は共通の所見を呈し，光顕病変の主体は空胞変性で，H.E.染色ではこれらの空胞は basophilic な顆粒で縁どられていて，いわゆる rimmed vacuole の像を呈している．PAS 染色では空胞部，空胞周辺部，あるいはそれと無関係の部位に PAS 陽性物質の異常な蓄積を随所に認めた．電顕像では rimmed vacuole は，glycogenosome の集積よりなり，所々にグリコーゲンの異常な集積を認めた．また筋線維の核内，或いは核外に20nm のフィラメント様構造物の集積を認めた．これらのフィラメント様構造物は管状構造を呈していた．症例4に於ては，ほとんど全ての筋線維に PAS 陽性物質で満たされた直径約数 μ～40μ の大小種々の空胞を認めた．一部の線維は rimmed vacuole を伴っていた．電顕像では PAS 陽性物質はグリコーゲン顆粒であることが確認された．Rimmed vacuole に相当する部分は，glycogenosome の集積より成っていた．本例では，フィラメント様構造物の集積像は認められなかった．症例5の病変の主体は空胞変性で，それら空胞は rimmed vacuole の特徴を有していた．電顕で核内，核外に直径20nm のフィラメント様構造物を認めた．

グリコーゲン代謝

生検筋のグリコーゲン代謝分析の結果，**表1**の様に症例1，2，4でグリコーゲン含量が増加していた．症例1，2では β-amylolysis の結果，%

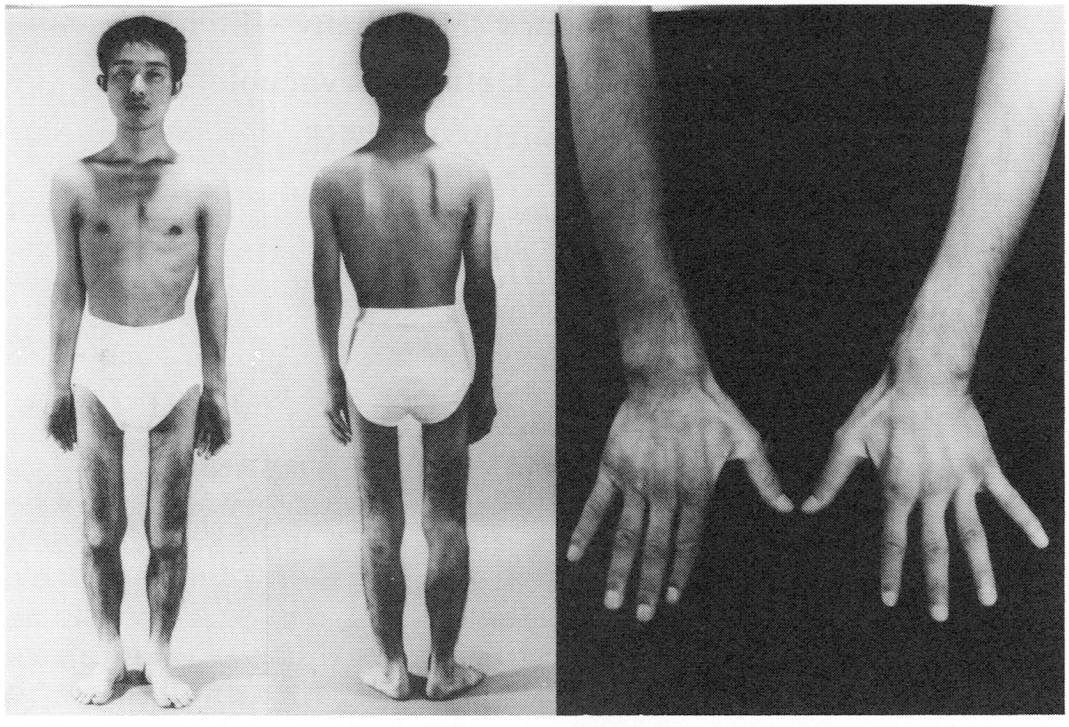


図1　症例2の全身像

表1　Glycogen and glycogenolytic enzymes in muscle

Subject	Glycogen Concentration[1]	Glycogen β-amylolysis[2]	Phosphorylase[3] Total	Phosphorylase[3] A	Acid Maltase[4]	Neutral Maltase[4]
Controls[5]	8.09 ± 3.48	31.2 ± 2.5	78.0 ± 21.1	47.7 ± 13.2	2.61 ± 1.78	2.91 ± 1.51
Case 1	24.0	17.0	70.1	30.0	3.70	2.75
Case 2	23.9	11.0	60.8	16.2	2.13	3.76
Case 3	14.7	ND	92.2	32.1	1.86	3.55
Case 4	66.2	ND	68.0	19.8	5.03	4.26
Case 5	12.7	ND	134.9	120.1	2.77	2.66

1) Glycogen concentration = mg/g.w.w. of muscle.
2) β-amylolysis = % digestion
3) Phosphorylase activities = μ moles/min/g protein
4) Acid and neutral maltase activities = n moles umbelliferone liberated/h/mg protein
5) Control values ± SD (N = 6).

ND = not determined.

digestionが減少し，グリコーゲンの外側枝が短いという構造異常が確認された．Phosphorylase, acid maltase, neutral maltaseは5例ともに特に異常を認めなかった．生検筋のdebrancher activityに関しては**表2**に示すように，radioactive assayではglycogenへの^{14}C-glucoseのincorporationは症例4で0であり，症例1，2で著明な減少を示した．Limit dextrinの消化能は症例1～3で著明に低下していた．症例5はいずれの方法でもdebrancher activityは正常であった．症例2では肝生検を行なったが，debrancher activityは対照の1/2～1/3であった（**表3**）．赤血球のdebrancher activityは症例4で0，症例2で著減，症例3では正常であった（**表4**）．

表2 Debrancher activity in muscle

Subject	Radioactive Assay[1] (units/g protein)	Limit dextrin as substrate (μmoles glucose/min/mg protein)
Controls[2]	143.6 ± 31.5	1.82 ± 0.46
Case 1	7.6	0.13
Case 2	13.1	0.08
Case 3	ND	0.05
Case 4	0	ND
Case 5	228.8	1.71

1) Incorporation of ^{14}C-glucose into glycogen.
2) Control values ± SD (N = 6).

表3 Glycogen concentration and debrancher activity in the liver

Subject	Glycogen (mg/g protein)	Radioactive Assay[1] (units/g protein)	Limit dextrin as substrate (nmoles glucose/min/mg protein)
Control 1	30.6	3.56	9.26
Control 2	31.7	7.88	5.37
Case 2	33.5	1.56	2.60

1) Incorporation of ^{14}C-glucose into glycogen.

表4 Glycogen concentration and debrancher activity in erythrocytes

Subject	Glycogen (μg/ml packed RBC)	Debrancher (units[1]/g Hgb)
Controls[2]	4.3	133 ± 26
Case 2	ND	22
Case 3	ND	137
Case 4	36	0

1) Units of debrancher activity caliculated as described by Van Hoof.
2) Control values ± SD (N = 1 for glycogen, 6 for debrancher).

考案並びにまとめ

筋病理像からみると，症例1，2，3並びに5は"inclusion body myositis"の条件を満足する．症例4は，部分的には"rimmed vacuole"を有するが，これを主体とせずかつ，フィラメント様構造物も認めないことから"inclusion body myositis"とは呼べないが，幾つかの類似点は有している．臨床像からみると，症例1，2，3はdistal myopathyであり，症例4，5はproximal dominantである．グリコーゲン代謝の面からは，症例1，2，3はdebrancher activityが特に筋で著明に低下している．症例3は赤血球でdebrancher activityが正常であったが，これは症例1，2がamylo-1, 6-glucosidase欠損であるのに対し，症例3はoligo-1, 4-glucan transferase欠損であることが想定される．以上のことより，症例1，2，3は臨床的にはdistal myopathyであり，病理学的には"inclusion body myositis"で，両者を合わせるといわゆる"rimmed vacuoleを伴うdistal myopathy"であり，生化学的にはdebranching enzyme活性の著明な低下をみる．このdebrancher deficiencyがprimaryなものであるか

どうかに関しては，症例2の肝と赤血球でdebrancher activityの低下をみていること，並びに前腕阻血負荷試験で乳酸の上昇をみないことよりprimaryなものと考える．症例4は臨床的には近位優位の萎縮を呈し，生化学的には筋と肝の両者を障害する全身型debrancher deficiency myopathyと診断された．症例5は"inclusion body myositis"の病理像を呈したが，debrancher活性は正常であった．

以上のことより"rimmed vacuoleを伴ったdistal myopathy"或いは"inclusion body myositis"の少なくとも一部の症例はdebrancher活性の著明な減少を認めること，そして，これが病因にprimaryな役割をになっている可能性が強いことを指摘した．

文　献

1) Osame, M. et al.：Familiar muscle type amylo-1, 6-glucosidase deficiency. 4 th International Congress on Neuromuscular Diseases, Sept. 1978, in Montreal, Abstract 207.

2) 納　光弘，ほか：Debrancher Deficiency Myopathy——Inclusion Body Myositisとの関連——．第23回日本神経学会総会抄録 IIIC-14(258)

3) Osame, M. et al.：Is"Inclusion Body Myositis" "Debrancher Deficiency Myopathy"?——The relationship between "Debrancher Dificiency Myopathy" and "Inclusion Body Myositis"—— 5th International Congress on Neuromuscular Diseases, Sept. 1982, in Marseilles, Abstract WE 63.

4) 納　光弘，ほか：Inclusion Body Myositisの筋病理を呈したDebrancher Deficiency Myopathyの同胞例．代謝，19：1321，1982.

49) Distal および Quadriceps myopathy における筋電図ならびに末梢神経の電子顕微鏡所見

佐藤　猛*

研究協力者　長岡正範*　安野みどり*

封入体筋炎は，慢性進行性で副腎皮質ステロイド剤は無効，組織学的には炎症所見に乏しく，rimmed vacuoles，筋鞘核内封入体を有し典型的多発性筋炎とは異なる特徴を持つ疾患群である．本疾患群の一部では fiber type predominancy が認められ，又，筋電図上，神経原性変化や，分類困難な多相性波が目立つなどの指摘[1]があり，その病因が筋線維自体にあるのか，あるいは，末梢神経にも障害が存在するのかなど，なお不明な部分が多い．

今回，筋電図により神経原性変化混入の頻度，その機序について考察を加え，1例では末梢神経の電顕による検索もあわせて施行し検討した．

対　象

筋生検により rimmed vacuoles，核内封入体を認めた症例計5例（表1）．内訳は Distal myopathy 3例（症例1，2，3），Quadriceps myopathy 2例（症例4，5）．他に，今回の筋電図検査の対象からは外れるが，Distal myopathy の1例．

方　法

筋電図は MCV 測定ならびに一芯同心電極による通常針筋電図を施行．第1・2例については，Desmedt ら[2]の方法に従って coherent EMG を施行した．これは NMU の波形の一部を trigger としてその前後の波形を記録分析するものである．

針筋電図評価のため，図1の様な規準を設けた．Short duration, low amplitude の筋原性変化（Myogenic：My），NMU の減少，高振幅電位（4 mV 以上），自発放電（fibrillation, positive sharp

表1　対象症例

Case	Clinical course	Distribution of amyotrophy	Serum CPK	Clin. Improve. by steroids	Biopsy
1. G.N. 46y. M.	5 yrs	Distal	87-293	—	Flex.Carp.Ul.
2. S.M. 34y. F.	9 yrs	Distal	157-207 (Prd.10mg)	—	Deltoid
3. K.N. 25y. F.	6 yrs	General, distal dominant	92 - 40 (Prd.60mg)	—	Biceps
4. T.N. 32y. M.	26 yrs	Quadriceps, Blt.	745 - 92 (Prd.40mg)	—	Quadriceps
5. K.U. 39y. M.	3 yrs	Quadriceps, Blt.	228 - 75 (Prd.50mg)	—	Quadriceps

*順天堂大学医学部脳神経内科

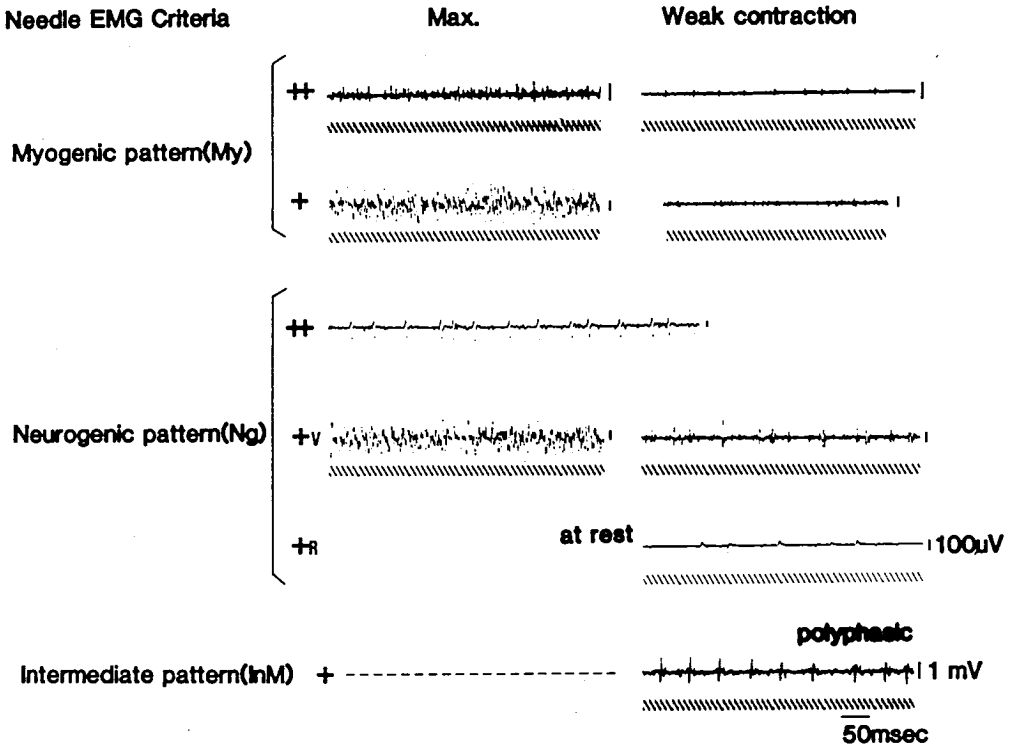


図1　筋電図所見評価のための規準

wave）などの神経原性変化（Neurogenic：Ng），さらに，1 mV・10msec 前後で分離の容易な多相性波（5相以上）を中間型（Intermediate：InM）と分類した．

結　　果

1．MCV（運動神経伝導速度）

上肢は正中・尺骨神経，下肢は深腓骨神経について肘・膝以下の MCV を測定し，検査を行った4例（第1・2・4・5例）で正常であった．

2．針筋電図所見

表2に針筋電図所見のまとめを示した．封入体筋炎では short duration, low amplitude の筋原性変化を被験筋の84%に認めた．4 mV を越す高振幅電位を25%に，denervation を示す fibrillation, positive sharp wave を19%にそれぞれ認めた．高振幅電位・自発放電は神経原性変化と考えられているが，典型的多発性筋炎でも報告されている．封入体筋炎にみられるこれらの出現頻度は，祖父江[3]らが多発性筋炎で報告した頻度より高い傾向を示した．

3．Coherent EMG 所見

中間型の多相性波は26%に認められ，この頻度も多発性筋炎より高頻度であった．これら多相性波を coherent EMG により分析した．図2は第1例の記録である．上段は10個の重ね記録，下段は個々のトレースを示す．A・Bそれぞれ最下段の下線で示す範囲が1つの NMU に属する電位である．その結果，約2 msec の jitter，構成 components の splitting，25msec に達する late component, blocking を認めた．Desmedt ら[2]は，これらの所見を reinnervation を反映すると説明したが，本法で検索した2例（第1・2例）とも同様の所見を示した．

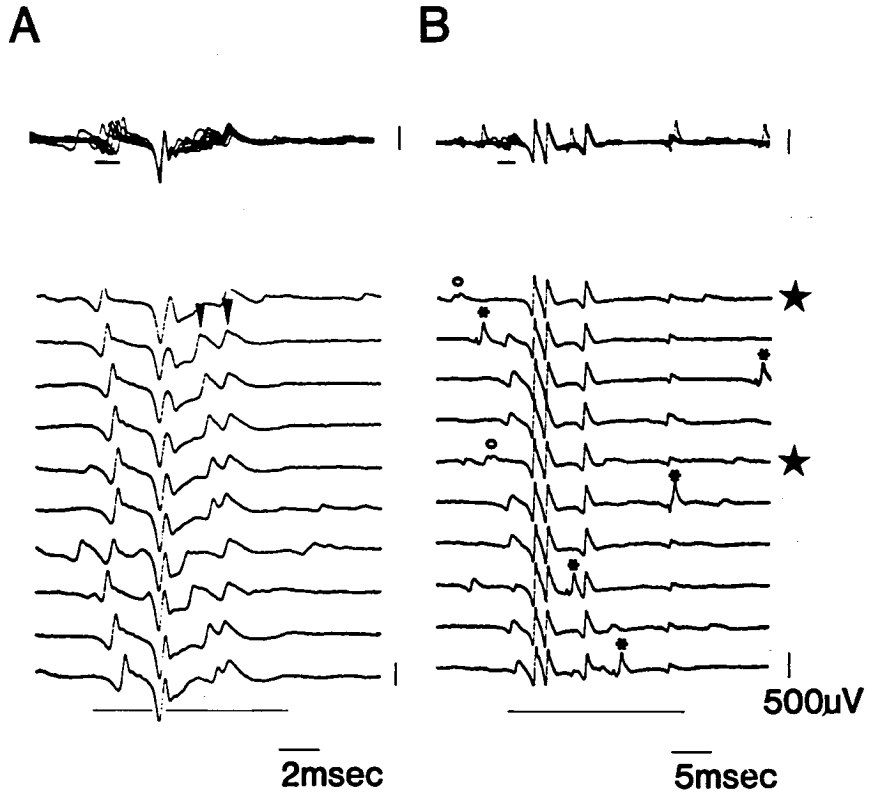


図2　Coherent EMG 所見
A・Bはそれぞれ症例1の上腕二頭筋から得られた多相性波．上段は10個の重ね記録．下段は個々の波形を示す．最下段の下線が1つのNMUの活動電位の幅を示す．
▼▼は splitting，★は blocking，＊・○は別の unit の混入を示す．
上段の下線は jitter の範囲を示す．

考　　察

筋生検により封入体筋炎と診断された Distal myopathy 3例・Quadriceps myopathy 2例の筋電図検査により，いわゆる筋原性変化の他に，神経原性変化を比較的高頻度に認めた．それは，従来から多発性筋炎で指摘される神経原性変化より若干高い頻度であった．この結果は，Lacy ら[1]の報告を支持するものである．さらに筋原性，神経原性のいずれとも分類の困難である多相性波（中間型）を26%に認め，coherent EMG の結果から，これらが reinnervation の結果であることが予想された．この点は，今回我々が初めて明らかにした所であり，封入体筋炎における神経要因の関与は，従来考えられていたより強いことが示唆された．

次に，本疾患群で指摘されている神経原性変化の起源について検討した．いわゆる筋疾患でみられる筋電図上の神経原性変化について，多発性筋炎では筋肉内末梢神経への炎症の波及が一因と考えられている．しかし，封入体筋炎では，初期は別として筋電図・筋生検が実施される時点では炎症所見は乏しく，従って，炎症波及の可能性は考えにくい．次に，筋 dystrophy でも除神経・神経再支配の所見が筋電図上指摘されている．Desmedt ら[4]は，筋線維上に focal necrosis が生じ，end plate を含まない distal 部分が除神経に陥り，

表 2　針筋電図所見
左端は，針筋電図所見を，右端はそれに対応する今回我々が設けた規準を示した．各数字は全被験筋の中で各所見を呈した筋の割合を示す．

EMG findings	Polymyositis		Inclusion myositis	
Low amplitude potential	80%	58%	84%	(My+,++)
Short duration	47			
Fibrillation potential	16	15	19	($Ng+_R$)
Reduced NMU	12	0	0	(Ng++,My++)
Complex action potential	4	54	26	(InM+)
High amplitude potential	3	0	25	($Ng+_V$,++)
Fasciculation potential	3	0	0	($Ng+_R$)
	(Sobue)	(Our Lab.)	(5 cases)	

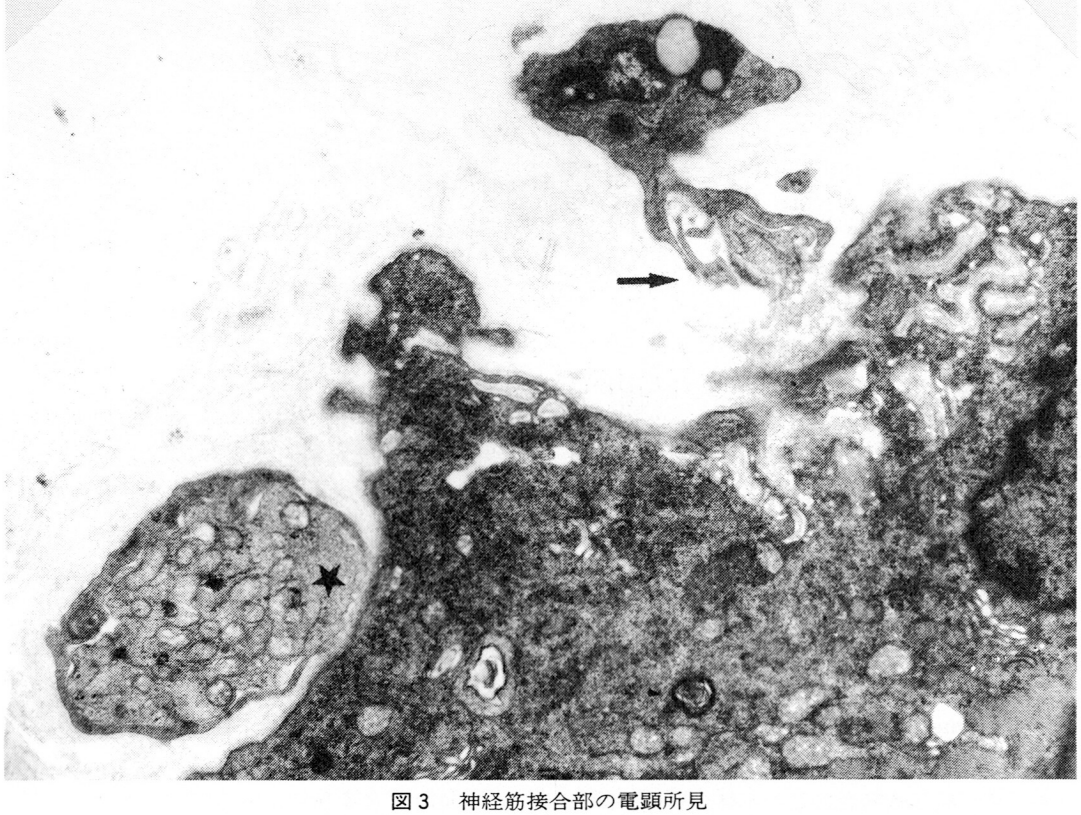


図 3　神経筋接合部の電顕所見

fibrillation, positive sharp wave などの自発放電を生じ，その後，隣接する神経終末からの側枝がのび distal 部分が再神経支配を受けると，jitter・blocking を示す late components を有する多相性波が出現することを実験的に示した．このことから，封入体筋炎では rimmed vacuoles としてみられる部分的な筋の変性像が，筋 dystrophy での focal necrosis と同様な機序として働らき，本報告で認めた様な denervation potential, reinnervation potential を生じさせる可能性が考え得る．

次に，Distal myopathy の他の1例について末梢神経を電顕により検索した．図3は，筋肉内末梢神経終末を示す．Presynaptic terminal の変性（矢印），synaptic cleft の離開，神経終末が secondary synaptic cleft のない部分に再接合する reinnervation とみられる所見が認められた．他に，筋紡錘内末梢神経では，ミトコンドリアや neurofilament が蓄積し軽度の axonal swelling や Schwann 細胞体内に空胞を有する変性像も認められた．これらは，末梢神経終末の変性と再生を示唆するものと考えられ，上述の筋電図上の reinnervation を裏付ける所見と思われる．所で，これらの神経原性要素が本疾患群にとって本質的なものか否かの疑問が残る．上記の電顕所見が軽度であること，筋電図上 MCV は正常であること，神経再支配もある程度正常な再生機能の存在を前提としていることなどを考え合わせると，現時点では，長い経過を反映した二次的変化であると思われる．

本疾患群で強調される核内封入体は，いわゆる封入体筋炎，Distal myopathy, Quadriceps myopathy, Oculopharyngeal dystrophy や，さらに多発性筋炎などでも報告され，疾患特異性に関して疑問が投じられている．しかし，最近，安野ら[5]は封入体の電顕形態上の検討から，多発性筋炎とは異なる特異性を指摘している．今後，本疾患群の臨床的・組織学的特徴に加え，電顕による微細構造上，及び，今回報告した筋電図による病態生理学的特徴をふまえて，本疾患群を考えていく必要があろう．

結　論

1．封入体筋炎5例の筋電図において，筋原性電位のほか，比較的高頻度に神経原性電位の混入を認めた．

2．筋生検で，従来からの rimmed vacuoles，筋鞘核内微小細管状封入体の他，軽度ながら筋肉内末梢神経の軸索および神経筋接合部の神経終末の変性像と再生を示唆する像を認めた．

3．本症の病態には，筋原性変化に加えて神経原性要素も関与している．その機序について考察を行なった．

文　献

1) Lacy, J. R., Simon, D. B., Neville, H. E. & Ringel, S. P.：Inclusion body myositis：Electrodiagnostic and nerve biopsy findings. Neurology (N. Y.), 32：A202, 1982.

2) Borenstein, S. & Desmedt, J. E.：Electromyographical signs of collateral reinnervation. New Developments in Electromyography and Clinical Neurophysiology, ed. by J. E. Desmedt. Vol. 1, Karger, Basel, 1973, pp.130—140.

3) 祖父江逸郎：多発性筋炎．筋肉病学（里吉栄二郎・豊倉康夫編），南江堂，1973，p.455.

4) Desmedt, J. E. & Borenstein, S.：Relationship of spontaneous fibrillation potentials to muscle fiber segmentation in human musclar dystrophy. Nature, 258：531—534, 1975.

5) 安野みどり，佐藤　猛：いわゆる「封入体筋炎」における筋鞘核内封入体の特異性．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究，三好班班会議，昭和57年度抄録集，1982，p.37.

50）いわゆる「封入体筋炎」における筋鞘核内封入体の特異性

佐藤　猛*

研究協力者　安野　みどり*

Distal myopathyの中には筋線維内に多数のrimmed vacuoleがみられる症例があり，その疾患概念が最近問題となっている．かかる症例では同時に微小細管状の筋鞘核内封入体が見出されている．筋鞘核内封入体はChou (1967)[1]，およびわれわれ[2),3)]が慢性多発性筋炎で報告して以来，現在までに50例以上の種々の筋疾患で報告されている．封入体を有する筋炎は炎症所見が乏しく，慢性進行性であることから封入体筋炎（Yunis & Samaha）[4)]との名称も提唱されている．しかし，封入体筋炎の報告例を再検討すると，上記のDistal myopathyと類似の症例が多い．一方Quadriceps myopathyやOculopharyngeal dystrophy[5)]にも封入体が認められることから，封入体筋炎の概念を再検討する必要がある．一方，封入体の形態にも微小細管状あるいはフィラメント状などさまざまなものが存在する．本研究では，封入体を有する自験例13例を記し，封入体の形態的特徴と，それを有する疾患の特徴を整理し，文献例とあわせ封入体の特異性につき検討した．

症　例

（表1・症例1～13の注として）

〈症例1〉1971年に封入体を有するChronic polymyositisとして報告した症例だが，その後の検索でDistal myopathyと診断を改めた．

〈症例2〉他院にて筋生検施行され，polymyositisの診断でステロイドを長期間投与されていた．

〈症例3〉1969年に封入体を有するChronic polymyositisとして報告した症例だが，その後13年経過しても筋萎縮，筋力低下は両側大腿部に限局し，症状は緩徐進行性ないし停止性と考えられ，Quadriceps myopathyと診断を改めた．

〈症例4〉他院にて筋生検施行され，筋ジストロフィー症の診断を受けていたが，筋萎縮，筋力低下は大腿部に限局し症状は緩徐進行性．

〈症例6・7・8・9〉Acuteないしsubacuteの典型的なpolymyositisで，筋肉痛，近位筋優位の筋力低下があり，CPKの著明な亢進，血沈亢進，CRP陽性の炎症所見を伴っていた．

〈症例10〉皮膚硬化は2年前より出現．

〈症例11〉全身倦怠感，関節腫脹は8ヵ月前より，皮膚硬化は筋症状とほぼ同じく1ヵ月前より出現．

〈症例12〉15年前よりレイノー現象，関節痛があったが，皮膚症状，筋症状は6ヵ月前より出現．

〈症例13〉1年前に皮膚症状ありステロイドで改善，ステロイド中止した6ヵ月前頃より筋症状出現．

治療に対する反応：症例1～5はステロイドでCPKの正常化はみられたが，臨床症状の改善はみられなかった．症例6～13（除く症例9）はステロイド，あるいは免疫抑制剤の併用によりCPK臨床症状の改善がみられた．症例9はステロイド，免疫抑制剤の投与でCPKの改善はみられたが，臨床症状は増悪し，感染症，糖尿病を併発して死亡した．

―筋電図所見―：症例2・3・4・5はshort duration, low amplitudeの筋原性変化とあわせ，high amplitude, fibrillation, polyphasic wave等神経原性変化がみられた．

症例6～13ではshort duration, low amplitudeの筋原性変化が主体で，少数にfibrillationがみられた．

*順天堂大学医学部脳神経内科

表1　Myopathy with intranuclear inclusion body

Case	Age at onset	Duration (Y)	Serum CPK	EMG Fibl.	EMG High amp.	Muscle Historogy Cell infil.	Muscle Historogy Rimmed Vacuole	Inclusion Microt. (130-180A)	Inclusion Fillam. (60A)	Response to Steroid	Clinical Diagnosis
1, R.F.	27 F	10	+			++→±	++	+++		±	Distal myopathy
2, S.M.	25 F	10	+	+	+	-	++	+++		±	〃
3, E.J.	41 M	15	+			+	+++	+++		±	Quadriceps myopathy
4, T.N.	17 M	17	+	+	+	-	+	+		±	〃
5, T.U.	37 M	2	+	+	+	-	++	+++		±	〃
6, M.N.	39 F	0.2	+++	-	-	+	+		+++	++	Polymyositis
7, T.T.	52 F	0.1	+++			-	+		++	++	〃
8, M.A.	41 F	0.2	+++	-	-	+	+		++	++	〃
9, T.T.	42 F	0.5	+++	-	-	+	+		+++	+	〃
10, R.H.	33 F	0.3	+	-	-	+	-		+	++	Scleroderma
11, K.Y.	39 F	0.1	+++	+	-	+	+		+	++	〃
12, C.K.	54 F	0.5	+++	-	-	-	+		+++	++	Dermatomyositis
13, S.T.	41 M	0.5	±			+	-	+		++	〃

—組織化学所見—：症例1は発症4ヵ月での第1回筋生検では間質に細胞浸潤と萎縮線維がみられたが，2年後の第2回目では細胞浸潤はみられず，萎縮線維，間質の膠原線維の増加とともに，rimmed vacuole がみられた．

症例2は発症後約10年目の筋生検で，筋線維の大小不同，萎縮線維，rimmed vacuole がみられ，更に group atrophy, type grouping, angulated fibers 等神経原性を思わせる所見も混在していた．細胞浸潤はみられなかった．

症例3・4・5では，著明に萎縮，変性した筋線維群と，比較的正常に近い筋線維群が混在し，萎縮線維の多い部位では rimmed vacuole や，type predominancy，間質の膠原線維の増加が目立った．

症例6～13例では全例に壊死線維，phagocytosis，時に hypercontraction に陥った線維がみられ，症例7・12以外では間質または血管周囲に細胞浸潤をみとめ，典型的なpolymyositis の所見であった．また，軽度ではあるが rimmed vacuole がみられた症例もあった．

症例1～13の全例に，Toluidine blue 染色で，筋鞘下の核に明るい均質無構造で，円形または楕円形に近い形をした封入体がみられた．

—電顕所見—：光顕でみられた封入体を電顕で観察すると，微小細管状のものと，フィラメント状のものとに大別することができた．

微小細管状封入体（図1）・症例1～5，13では，太い線維状のものがひとつの核内で一定方向に束状をなして配列したり，あるいは at randam な方向に散在性にみられた．これらを拡大してみると，横断面では中央部に halo を有するものがあり，直径130～180Åの管状構造からなると考えた．また縦断面で周期的な紋理がみられ，double helix からなる可能性も考えられた．この微小細管状封入体を有する核は腫大し，クロマチンは不明瞭となり，核膜の一部が重複したり，断裂し封入体が筋形質内に流出している像のみられるものもあった．封入体を有する筋線維は，軽度の変性を示すものから，強度の変性に陥ったもの membranous body, cytoplasmic body を有するものもあった．封入体と同一の構造を有するものが membranous body 周辺の筋形質内にみられ，その一部は変性した筋フィラメントや cytoplasmic body の構成成分と連続しているようにみえる部分もあった．

症例13で微小細管状封入体がみられているが，ひとつの核にのみみられており，他の5症例に比

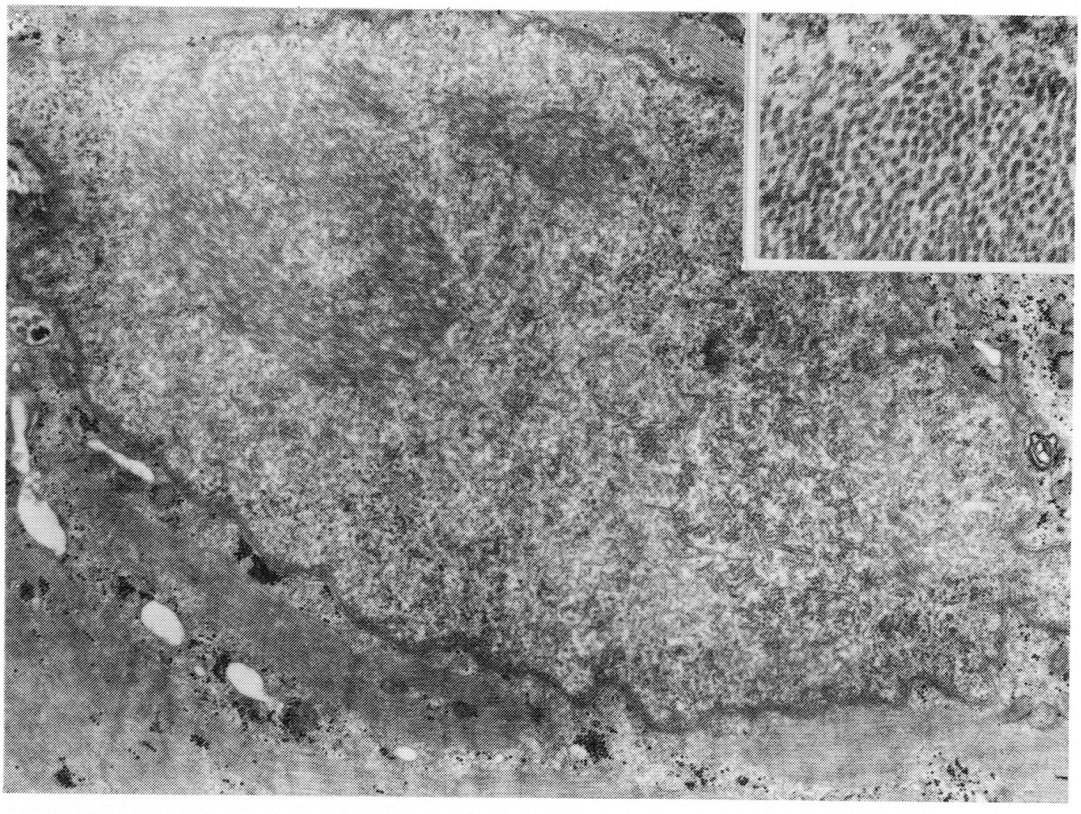


図1　Microtubular inclusion body.　症例2・Distal myopathy（×16,200）（挿入図は強拡大　×57,000）

べて程度は軽度の変化であった．

フィラメント状封入体（図2）・症例6～12では，細い線維状のものが束状に軽く波状を呈しながら一定方向に整然と配列していた．拡大像をみると，60Å前後の細いフィラメント状の集合からなっていた．封入体は核内の一部にみられるものから，核内全体を占めるものまでみられたが，核の腫大・変形は目立たず，クロマチンも核膜周辺に圧迫されてはいるが，構造上の異常はみられなかった．フィラメント状封入体を有する筋線維の変性は比較的軽度で，Z-streaming，筋線維の配列の乱れ等がみられる程度であった．

考　　察

微小細管状とフィラメント状封入体を有する症例13例を報告した．微小細管状封入体は，Distal myopathy 2例，Quadriceps myopathy 3例，Dermatomyositis 1例で，フィラメント状封入体は，acute または subacute polymyositis 4例，PSS に伴う polymyositis 2例，Dermatomyositis 1例である．Dermatomyositis の1例で微小細管状封入体がみつかっているが，封入体は1個のみであり，臨床像・筋電図・組織化学的にみて例外的な症例と考えた．

筋鞘核内封入体は，1967年 Chou[1] が Chronic polymyositis で報告して以来，現在までに50例を超す症例が知られている．1971年 Yunis & Samaha[3] らが筋鞘核内に封入体を有し，慢性進行性の症例を封入体筋炎とよぶことを提唱して以降，この診断名でよばれている症例が多い．その他にも Neuromyopathy, Distal myopathy, Quadriceps myopathy, Oculopharyngeal dystrophy Duchenne の carrier, Debranching enzyme deficiency の症例等の報告もみられている（表2）．

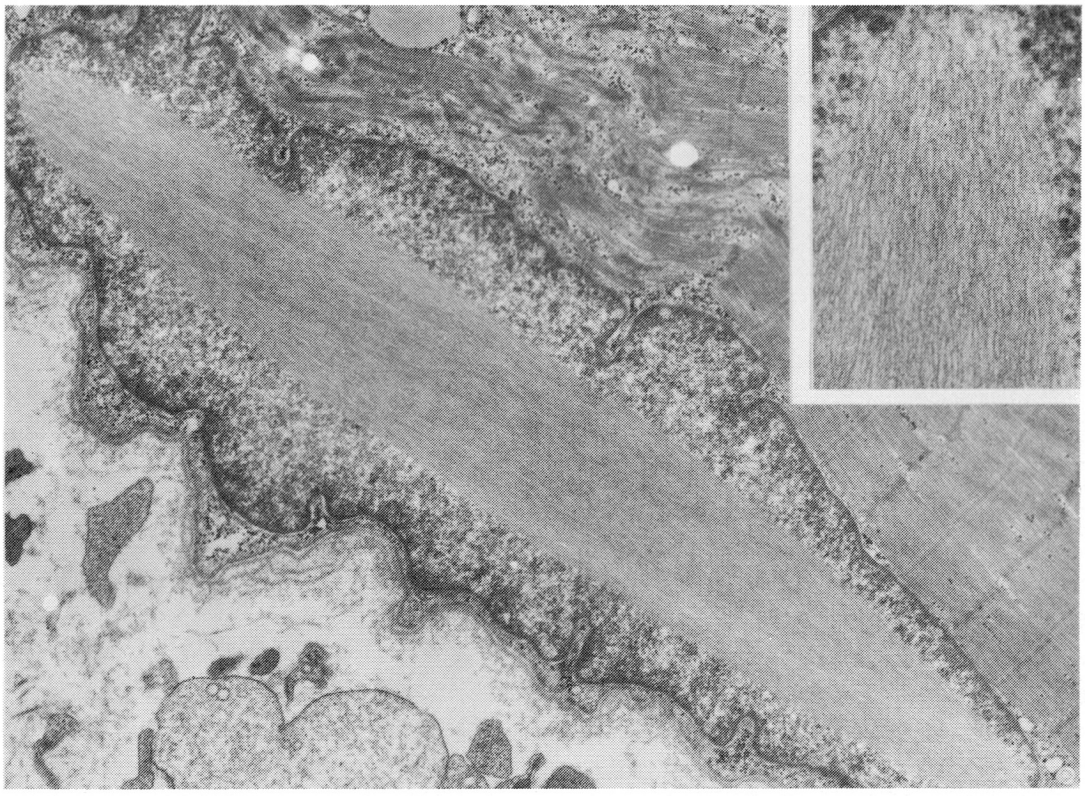


図2　Filamentous inclusion body. 症例6・Polymyositis（×12,600）（挿入図は強拡大　×45,000）

文献的に封入体筋炎11例，Chronic polymyositis 6例の報告があるが，症例を再検討すると，封入体筋炎の名で報告されたCarpenter[6]の6症例のうち，Distal myopathy，Quadriceps myopathyの臨床像を呈しているものがあった．細胞浸潤は6例中3例に著明，2例に軽度，1例は認めなかった．他の報告でも細胞浸潤はあるものもないものもある．一方Chronic polymyositisで報告されている症例でも細胞浸潤のあるものもないものもあり，報告者の中には，clinicopathologicalにはChronic polymyositisだが，封入体を認めたので，封入体筋炎と呼んでよいであろうとするものもあり，両者の明瞭な区別が困難と思われ，封入体筋炎の疾患概念の再検討が必要と考えた．

微小細管状封入体を有する報告例の中で，Jerusalem[7]や中野らは，神経原性の要素を強調している．他の症例でも記載では筋電図でhigh amplitudeや，polyphasic wave，組織化学でsmall group atrophy, type predominancy等神経原性変化の関与を記したものが多い．Carpenterは，封入体筋炎の名で報告した症例の筋肉内末梢神経は，正常または非特異的な変化を認めたのみであるとしている．

われわれの症例3のQuadriceps myopathyの神経筋接合部，筋紡錘の電顕で，末梢神経末端部の変性を示す像がみられている．これが一次的か二次的変性かは断定できないが，別報のごとく変性した筋線維の神経筋接合部における再生像の可能性もある．

微小細管状封入体を有する症例の臨床像・細胞浸潤の有無・神経原性の関与に関しては必ずしも一定の傾向がみられないが，共通した所見としてはrimmed vacuoleがあげられる．Rimmed

表2　Intranuclear inclusions in neuromyopathy

	Microtubular (130-180A)	Filamentous (60A)	
	No. of cases		
Inclusion myositis	11		11
Neuromyopathy	4		4
Distal myopathy	4		4
Quadriceps myopathy	3		3
Oculopharyngeal dystrophy	8		8
Polymyositis: chronic	6		6
acute, subacute		9	9
Dermatomyositis: chronic	2		2
acute, subacute		2	2
Others			
Carrier of Duchenne	1		1
Debrancher deficiency	1		1
	40	11	51

vacuole は近年 Distal myopathy で強調されているが，Oculopharyngeal dystrophy, Quadriceps myopathy でも認められ，疾患特異性はないと考える．しかし membranous body を多数伴った変性像を示し，筋ジストロフィー症や polymyositis の炎症性変化に伴う筋の変性過程とは異なった変性を反映するものと考えた．

結　論

微小細管状封入体は，rimmed vacuole を多数有する慢性進行性の症例にみられた．これらの症例ではステロイド療法で臨床症状の改善がみられなかった．

一方，フィラメント状封入体は典型的な acute ないし subacute の polymyositis にみられ，これらの症例の多くはステロイドあるいは免疫抑制剤により臨床症状の改善がみられた．

以上のことから，微小細管状封入体と，フィラメント状封入体は異なった成因により生じてきたものと考えた．

文　献

1) Chou, S. M. : Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis. Science, 158 : 1453, 1967.

2) Sato, T., Walker, D. L., et al. : Myxovirus-like inclusion bodies in chronic polymyositis : Electron microscopic and viral studies. Trans. Amer. Neurol. Assoc., 94 : 339, 1969.

3) Sato, T., Walker, D. L., et al. : Chronic polymyositis and myxovirus-like inclusions. Arch. Neurol., 24 : 409, 1971.

4) Yunis, E. J. & Samaha, F. J. : Inclusion body myositis. Lab. Invest., 25 : 240, 1971.

5) Tomé, F. M. S. & Fardeau, M. : Nuclear inclusions in Oculopharyngeal dystrophy. Acta Neuropathol. (Berl.), 49 : 85, 1980.

6) Carpenter, S., Karpati, G., et al. : Inclusion body myositis : A distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy. Neurology (Minneap.), 28 : 8, 1978.

7) Jerusalem, F., Baumgartner, G., et al. : Virus-ähnliche einschlüsse bei chronischen neuromuskulären Prozessen. Arch. Psychiat. Nervenkr., 215 : 148, 1972.

51) Rimmed vacuole を有する筋線維の電気泳動的研究

福 原 信 義*

研究協力者　豊 島　至*　熊 本 俊 秀*
田 中 恵 子*　宮 武　正*

Rimmed vacuole は種々の病態で観察されることが知られているが[1]，今回は，その生成機序を探ることを目的として，rimmed vacuole を有する筋線維のみを取り出して，その蛋白質について分析を試みた．また，この研究で生検筋より目的とする筋線維を同定して取り出し，分析する方法を開発し用いたので，紹介したい．

対象と方法

対象は，rimmed vacuole のみられる distal myopathy の患者3名（32歳男，26歳男，25歳男）と，rimmed vacuole を伴う Kearns-Sayre 症候群類似疾患として既に田中らが報告した1名（22歳男）[2]，正常対照の2名（45歳男，25歳女）の生検筋で，イソペンタン・ドライアイスで迅速凍結後，−80℃で密栓保存した．

方法の概略を図1に示す．

1)連続凍結乾燥切片の作製：主として，Lowry & Passonneau[3] に準じた．クライオスタットで厚さ20〜30μm の連続切片を10〜20枚程度切り，適当な容器内に順番に入れた．通常の太さの線維を扱う場合は30μm，萎縮線維を主にとりあつかう場合は20μm の厚さとした．Lowry の考案した真空壜に入れ，クライオスタット内，あるいはドライアイスジャーにうつし，一晩吸引したのち，さらに3時間室温で吸引乾燥した．使用までの間真空のままで−20℃に保存した．

2)染色標本の作製：通常，連続凍結乾燥切片の中間で厚さ8〜10μm の5〜10枚の連続切片をとり，必要な染色を行った．Gomori trichrome, NADH-TR, ATPase 染色などの標本を得た．

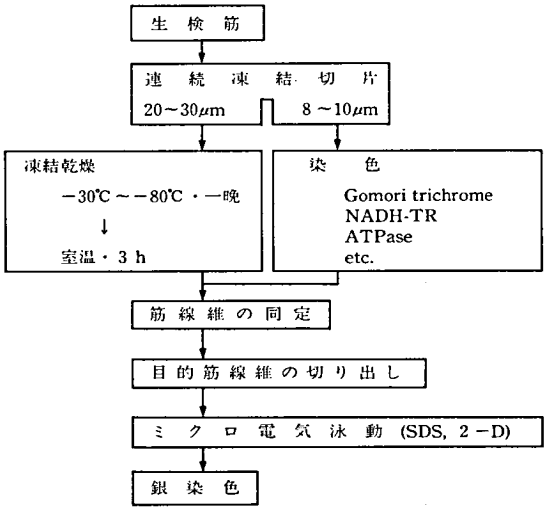


図1　方法概略

3)目的線維の同定と切り出し：凍結乾燥切片を容器とともに室温と平衡にし，乾燥した室内にとり出して実体顕微鏡下で観察した．染色標本を並べて目的とする線維を選択し，乾燥切片で同定した．手製のミクロナイフを用いて endomysium と筋線維の間を剥離して，筋線維のみを取り出した．

4)電気泳動：SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下 SDS）と，等電点・SDS 二次元電気泳動（以下2-D）を行った．SDS では lower gel を7.5%〜15%あるいは8.75%〜17.5%の linear gradient ポリアクリルアミドとした．2-D では4×3cmあるいは4×6cmの大きさとした．

5)銀染色法は既報[4]の如くとした．

*新潟大学脳研究所神経内科

結　　果

1)凍結乾燥切片での所見：Rimmed vacuole をもっている筋線維は，凍結乾燥切片でⅰ)暗色にみえるもの，ⅱ)中心が明るいもの，ⅲ)周囲とほとんどかわらないものの3種としてみられた（**図2** b，d）．萎縮筋線維は暗色にみえる傾向を示し

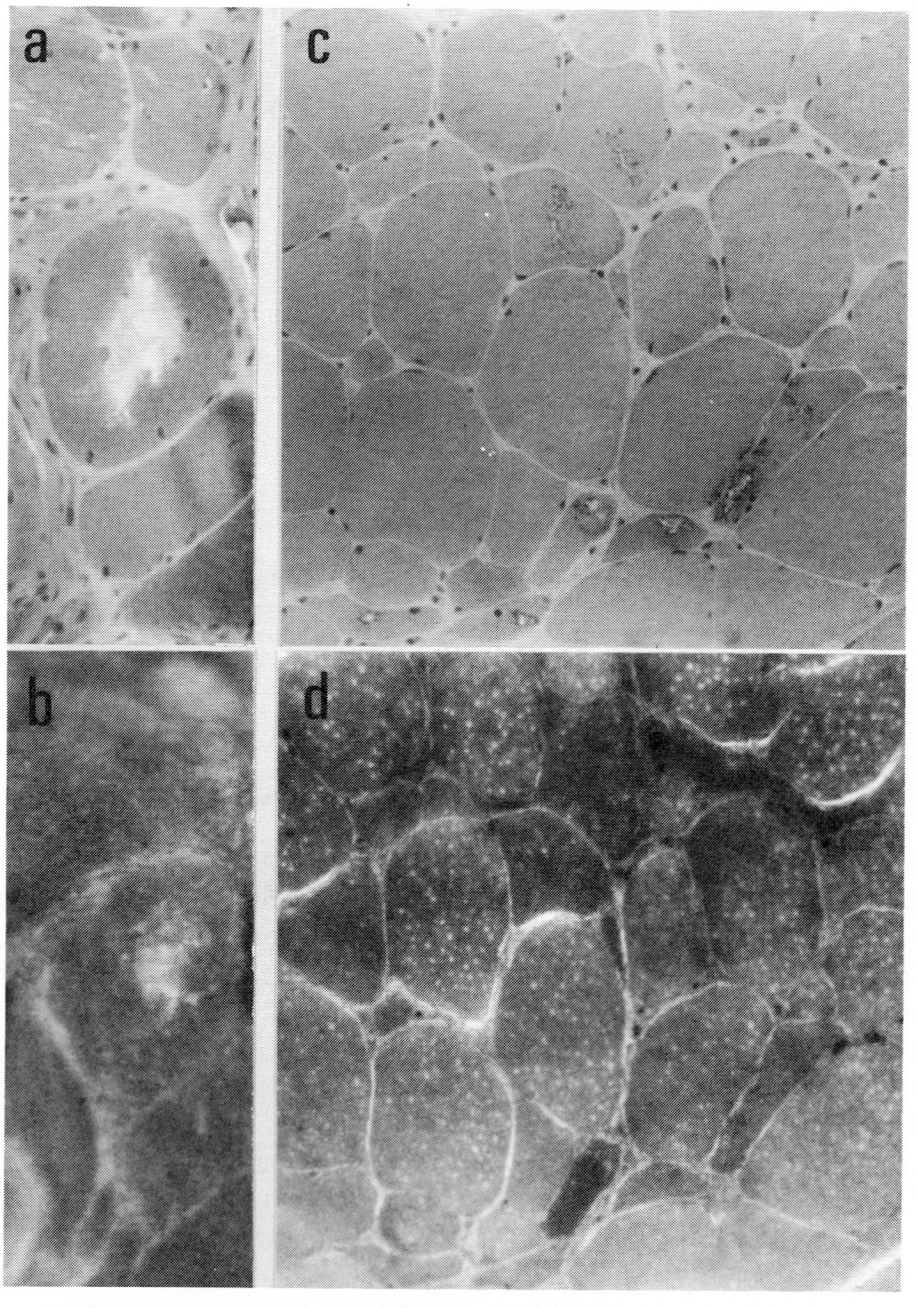


図2　Rimmed vacuole の凍結乾燥切片での所見．a，c：Gomori trichrome 染色，b，d：凍結乾燥切片．a と b，c と d は対応している．×100倍．

た．Gomori trichrome 染色で vacuole としてみられるところは，乾燥切片では抜けていないことの方が多かった．

2)単一筋線維の SDS 像（図3）：4症例の rimmed vacuole をもっている線維を，30μm 厚の切片より単一筋線維として取り出し対照と比較した．両者で myosin heavy chain, c protein, α-actinin, phosphorylase, pyruvate kinase, enolase, actin, creatine kinase, aldolase, G-3-P dehydrogenase, tropomyosin, phosphoglycerate mutase, myosin light chains に相当する band を分別することが可能であった．Rimmed vacuole を有する筋線維では，図中矢印で示す分子量 55,000（55K）の band が濃くなっていた．この所見は検索した4症例の rimmed vacuole を有するすべての筋線維に共通してみられたが，相対比は異なっており，萎縮線維でより増加する傾向を示した．また，rimmed vacuole をもっていない筋線維でも同様の傾向が認められた．

3)55K 蛋白質の同定（図4）：症例ではどの筋線維でも55K蛋白質が増加していることから，症例と対照の切片全体を2-D で比較することにより，55K蛋白質の同定を試みた．二次元目を6㎝長とし，分子量での分離をよくした．また，二次元目を同一 gel 上で行い，さらに同一サンプルの SDS を同時に流すことによって，正確な同定を行うことができた．分子量が55Kに相当する spot はいくつかみられるが，α-actin よりやや basic な2個とやや acidic な1個が並んで増加しており，等電点から考えて desmin と思われた．また，切片全体を添加したためかなりの量の albumin の混入が

図3　単一筋線維のＳＤＳ像．M_r：分子量マーカー．上から200K，94K，67K，60K，45K，30K，21K，12K．

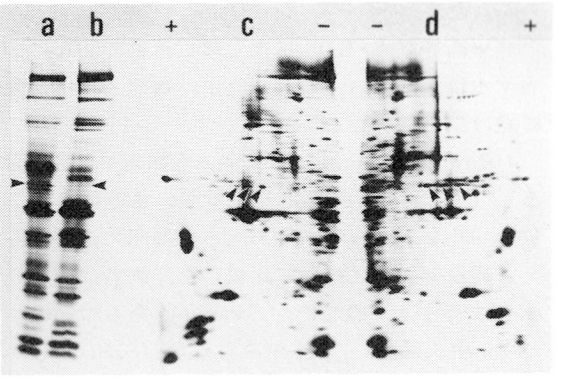


図4　55K蛋白質の同定．a，d：症例，b，c：正常対照．矢印：55K蛋白．

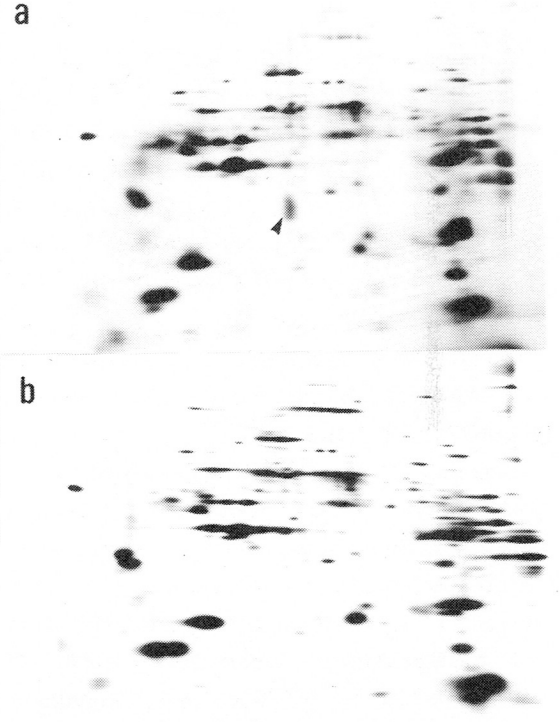


図5　Rimmed vacuole を有する筋線維の2-D(a)，vacuole をもたない筋線維の2-D(b)．矢印：説明，本文．

みられた.

非平衡等電点・SDS 二次元電気泳動で55Kに相当する塩基性蛋白を検討したが，対照と症例の間に差は認められなかった.

4)Rimmed vacuole を有する筋線維の2-D（図5）：Rimmed vacuole をもっている筋線維を2枚の切片全体から50本集め，その周囲の正常にみえる筋線維40本と2-D で比較した．両者は細かい spot までよく一致したが，vacuole をもつ筋線維で gel 中央に淡い spot がみられた（矢印）．しかし，他の症例で同様に行ってみたが，この spot は確認されなかった.

考　　按

Rimmed vacuole を有する筋線維の蛋白質を分析し，分子量55K の desmin と考えられる蛋白質の増加を見出したが，vacuole をもたない筋線維でもこの増加は見られ，vacuole を構成する蛋白質とは思われなかった．しかし，vacuole をもつ線維で desmin の増加傾向の強いことは，vacuole 生成に関与している可能性を示唆するように思われる.

これらの症例の電顕的観察の一部は既に報告されているが[1)2)5)]，desmin がどの構造に対応しているか再度検索中である.

Desmin の増加は，優性遺伝型の distal myopathy でみられることが Edström ら[6)]により，劣性遺伝型の rimmed vacuole を伴う distal myopathy でみられることが Nonaka ら[7)]によって報告されている．Edström らの desmin の証明は抗体による組織染色のみで，desmin のみが増加しているとする根拠はやや不確実である．Nonaka らの電気泳動の結果の図では albumin の混入が疑われる.

また，desmin は筋ジストロフィー鶏の single fiber で vimentin とともに増加していること[8)]，nemaline myopathy で α-actinin とともに増加していること[9)]が報告されている．これらのことは desmin の増加が非特異的な現象であるということを示すことになるが，それぞれの病態における desmin の増加機序の異同についても今後の検索が必要であろう.

文　　献

1) Fukuhara, N., Kumamoto, T. & Tsubaki, T.：Rimmed vacuoles. Acta Neuropath., 51：229－235, 1980.

2) 田中恵子，湯浅龍彦，熊本俊秀，福原信義，近藤喜代太郎：Kearns-Sayre 症候群に類似し骨格筋に多数の rimmed vacuole を認めた1例．臨床神経，22：1015－1020，1982.

3) Lowry, O. H. & Passonneau, J. V.：A flexible system of enzyme analysis. Academic Press, New York, 1972.

4) 豊島至：髄液蛋白質の二次元電気泳動――髄液特異蛋白質について．脳神経，34：973－979，1982.

5) Kumamoto, T., Fukuhara, N., Nagashima, M., Kanda, T. & Wakabayashi, M.：Distal myopathy-histochemical and ultrastructural studies. Arch. Neurol., 39：367－371, 1981.

6) Edström, L., Thornell, L. -E. & Eriksson, A.：A new type of hereditary distal myopathy with characteristic sarcoplasmic bodies and intermediate (skeletin) filaments. J. Neurol. Sci., 47：171－190, 1980.

7) Nonaka, I., Sunohara, N., Ishiura, S. & Satoyoshi, E.：Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation. J. Neurol. Sci., 51：141－155, 1981.

8) Mikawa, T., Takeda, S., Shimizu, T. & Kitaura, T.：Gene expression of myofibrillar proteins in single muscle fibers of adult chicken：Micro two dimensional gel electrophoretic analysis. J. Biochem., 89：1951－1962, 1981.

9) Sugita, H., Ishiura, S., Nonaka, I., Ohashi, K. & Maruyama, K.：Gel electrophoretic study of nemaline muscle. Proc. Jap. Acad., 57, Ser B：86－90, 1981.

昭和57年度研究班名簿

昭和57年度　三好班　名簿

区分	氏名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
班長	三好和夫	虎の門病院冲中記念成人病研究所 〒105　東京都港区赤坂虎の門2-2-2	所長	03—583—6871
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
	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
	荒木淑郎	熊本大学医学部第一内科 〒860　熊本市本荘 1-1-1	教授	0963—63—1111
運営幹事	杉田秀夫	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	部長	0423—41—2711
監事	宇尾野公義	東京都立神経病院神経内科 〒182　東京都府中市武蔵台 2-6-2	副院長	0423—23—5111
班員	塚越廣	東京医科歯科大学医学部神経内科 〒113東京都文京区湯島 1-5-45	教授	03—813—6111
	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
	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微細構造研究部 〒187　東京都小平市小川東町 2620	部長	0423—41—2711
	高守正治	金沢大学医学部神経内科 〒920　金沢市宝町 13-1	教授	0762—62—8151
	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 〒305　茨城県新治郡桜村天王台 1-1-1	教授	0298—53—3196
	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
	馬渡志郎	国立赤坂療養所神経内科 〒833　福岡県筑後市大字蔵数 515	副院長	09425—2—2195
	宮武正	新潟大学脳研究所神経内科 〒951 新潟市旭町通一番町 754	教授	0252－23－6161
	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

区　分	氏　名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
班　員	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
	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
	近藤　喜代太郎	東京都神経科学総合研究所臨床神経学研究部 〒182　東京都府中市武蔵台 2-6	部長	0423—25—3881
	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
	吉田瑞子	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
	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	助教授	0992—64—2211
	若山吉弘	昭和大学藤が丘病院神経内科 〒227　横浜市緑区藤が丘 1-30	助教授	045—971—1151
	小口喜三夫	信州大学医学部第三内科 〒390　松本市旭 3-1-1	助教授	0263—35—4600
	斎田孝彦	国立療養所宇多野病院臨床研究部 〒616　京都市右京区鳴滝音戸山町 8	医長	075—461—5121
	古庄敏行	杏林大学保健学部疫学 〒192　東京都八王子市宮下町 476	教授	0426—91—0011
	木南英紀	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	講師	0886—31—3111
	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	講師	0252—23—6161
	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	助教授	09858—5—1510
	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
	田代邦雄	北海道大学医学部脳神経外科 〒060　札幌市北区北14条西5丁目	講師	011—711—1161
	水野美邦	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 3311—1	助教授	02854—4—2111
	西村嘉郎	浜松医科大学第一内科 〒431-31　浜松市半田町 3600	講師	0534—35—2261
	後藤幾生	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	助教授	092—641—1151

区　分	氏　名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
班　員	出田　透	熊本大学保健管理センター 〒860　熊本市黒髪 2-40-1	教　授	0963—44—2111
	高瀬貞夫	東北大学医学部脳疾患研究施設脳神経内科 〒980　仙台市星陵町 1-1	助教授	0222—74—1111
	吉岡三恵子	神戸市立中央病院小児科 〒650　神戸市中央区港島中町 4-6	医　長	078—302—4321
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