

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58年度研究報告書

昭和59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58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一昨年、昨年につづいて第3年目であります。研究は各自の独創的で自由な発想に基づき、しかし、研究の共通目的を失わぬように心掛けて行っています。また、班研究の意義を活かすためにいくつかのプロジェクト研究を設定してきました。

本年度の研究成果はこの報告書に示されていますが、いずれも学問的価値の高いものであり、今後の研究に格段の進展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く寄与するものと思います。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。

筋ジストロフィー症は、人間の生命活動の象徴ともいべき全身の筋の萎縮をもたらす疾患であり、若い人々を原因の知れぬままに冒し、生命を失わせるものであること、そして、この病気の解決が近年の科学・技術の進歩によって漸く現実化しつつある段階にあることを思えば、私達は本症の研究を中断することはできません。

報告書の作成に当っては、本年度もその提出時期を58年の12月と致しました。本年度の研究はなおつづけられているところ、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援助に深く感謝し、引きつづいての御支援をお願い致します。

昭和58年12月

〈班長〉 三 好 和 夫

目 次

昭和58年度総括研究報告	7
昭和58年度総合班会議研究報告抄録	15
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・病態	59
a) 遺伝・臨床	61
b) 形態・培養	96
c) リンパ球・赤血球など	128
d) 生理	158
III. 遠位型ミオパチー	177
IV. ミトコンドリアミオパチー	199
V. 筋ジストロフィー症の生化学・代謝など	223
昭和58年度ワークショップ抄録	285
昭和58年度研究班名簿	305

昭和 58 年 度

総 括 研 究 報 告

総括研究報告

班長 三好和夫

〔はじめに〕

本研究報告書は、「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」研究班の第3年度の報告書である。前2回の報告書と併せて対をなしている。

この報告書には、本年（昭58年）12月3日(土)、4日(日)の両日に開催した当研究班の班会議席上で行われた報告をまとめた54編の論文が集録されている。またこれに加えて、本年8月3日(休)に行った当研究班のワークショップ「筋変性の自己崩壊機序：Rimmed vacuoleをめぐって」の抄録、並びに明年（昭59年）1月に開催予定の「筋ジストロフィー症」総合班会議における当研究班報告の抄録を掲載してある。

〔研究方針〕

当研究班での研究は、各班員のこの問題に関する独創的で、自由な発想によることを基調としている。しかし、当班の研究目的を見失うことのないように、常に各自の研究の性格を明確にしてゆくことに努め、また班としての研究の意義を活かすために、プロジェクト研究として特定のテーマを掲げて集中研究を行ってきた。

研究性格の3段階：

筋ジストロフィー症のように未だ原因不明の疾患の研究には、研究員各自の研究の性格が十分に意識されていることが必要である。すなわち、1) 症例の症状、所見の把握と解析からの新しい疾患、病型の発見と確立、2) 筋の変性、崩壊と再生の病態の確立、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、本症の病因究明に対して、それぞれ、1) 現象論的、2) 実態論的、3) 本質論的研究、といえるが、大切なことは、これら各段階の研究が別個に成立するのではなく、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。

プロジェクト研究：

プロジェクト研究は当班の研究発展の中からの芽生えと国際的研究レベルでいわゆる先端分野の所に焦点を合せてとりあげた。

今期においては、1) 筋の崩壊と再生 (初年度から)、2) いわゆる遠位型ミオパチー (2年度から)、3) 筋ジストロフィー症の分類学 (3年度から次期に向けて)、そして、4) いわゆるミトコンドリアミオパチー (同上) である。

〔本年度の研究報告〕

集録した論文54編の内訳は、用いられた研究資料や研究方法の面からは、本報告書での配列のごとく、I 実験動物 5、II 遺伝、臨床と病理、病態、a) 遺伝、臨床 7、b) 形態、培養 8、c) リンパ球、赤血球など 8、d) 生理 4、III 遠位型ミオパチー 4、IV ミトコンドリアミオパチー 5、V 生化学、代謝など 13、となっている。

また、内容的には大凡、I 新しい症例、特異な症例と分類学 8、II 筋の変性崩壊と再生、a) 筋の変性、崩壊 16、b) 筋の再生 6、III 本症における特異な異常、成因の探究 9、IV 新しい研究手技 10、V 遠位型とリソゾーム 4、VI ミトコンドリアミオパチー 6 (これに米国学者DiMauro教授の招待講演が加わる)、VII その他 4、である。

〔研究成果の要約〕

各個の研究はそれぞれ独自の意義をもっており、典型的な要約が困難であることがむしろ特徴であるが、項目別にのべる。

I 新しい症例、特異な症例、そして本症の分類学

本症の分類を「分類学」として推進する基本構想が示された。古い時代の病状分類に対して、病状に準拠しながら病態を織込み、病因を指向しての分類である。臨床から基本的研究への立場を明確にしたものである。

新しい症例、病型は、毎年加えられているが、本年度もいくつか報告された。当班員の発見したLDH-M欠損症の第2家系、特異な先天性ミオパチー、Myoadenylate deaminase欠損疑、Phosphorylase b kinase欠損とそのATP治療効果、などである。また、全身骨格筋のCT所見による本症の病期分類が示され、完成されれば実際臨床上に寄与するところが大きい。

II 筋の変性、崩壊と再生

a) 筋の変性、崩壊：

Duchenne型筋ジストロフィー症(DMD)を代表とする筋ジストロフィー症における筋の変性、崩壊の実態が、当研究班今期で次のごとく具体的に組立てられた。

まず、何らかの転機により表面膜が障害され、細胞外Caの流入によりCANPが活性化

され限定分解が行われ、Z帯の消化、 α -アクチニンの遊離が起って筋原線維の disassembly が生じる。ついで、リソゾームカテプシン群による非限定分解が進行し、この際マクロファージ由来のカテプシン、肥満細胞由来のセリンプロテアーゼも関与する。この間、筋から血清中に遊離酵素や筋構成成分が逸脱する。

本年度もこの全過程に新しい知見が加えられた。例えば、筋膜の超微細構造の所見、薬剤使用によるモデル実験、変性筋線維の opaque fiber とそれに至る各段階の形態変化と蛋白成分解析、などである。また、蛋白分解酵素の内因性 inhibitor についての知見が進められ、別に、逸脱酵素 CK と Mb の流出が定量的に本症の崩壊筋量として比較して示された。

b) 筋の再生：

DMD 筋の再生筋には未分化ないし脱分化の特徴がみられることが当班のこれまでの詳細な研究で明らかにされている。今回も種々の知見が動物と症例において加えられた。すなわち、satellite cell の動員と活性化、再生線維の特徴が示された。中で、ハムステージストロフィー筋では、筋力低下の少ないことが再生筋における結合織の増生のないことで説明されたことなど興味深い。また、少しく意味が異なるが、各種のミオパチー筋にみられるリンパ球浸潤の T-cell, B-cell subpopulation の差が明らかにされたことは新知見である。

III 本症における特異な異常や成因の探求

本症の成因を直接にねらって、それぞれ独特の着想に基づいて、異常な蛋白質、酵素の探究が続けられている。今期でも、筋クレアチンの分解酵素と能動輸送の特性、麻酔剤に対する特殊反応の機序、筋膜の特殊抗原、過酸素関連酵素、その他各種の筋内酵素、各代謝系酵素の研究である。

本質的研究というべきものであり、容易ではないが、この種の研究が活発に行われることが望まれる。

IV 新技術の開発

当研究班では、研究遂行のための現在の国際レベルの研究技術を保持しており、また、常に自ら新しい技術の開発を行っている。このことは専門的研究班として大きな財産といえることができる。

それらは、組織、細胞の超微細観察、酵素構造蛋白質成分の分析、また、単離筋線維での研究、組織・細胞培養、細胞クローニング、ヌードマウスへの移植、モノクローン抗体の作製、それらを用いての RIA, EIA と染色技術、その他である。

また、臨床例や生体を対象とした、新しい筋の CT 解析、 ^{31}P -NMR 研究などがある。

V 遠位型と vacuole ないし lysosome (プロジェクト研究)

この領域において当班のあげた成果は、国外に例をみない極めて目覚ましいものである。まず、遺伝・臨床型として、古典的な Welander 型の他に、新しく、筋ジストロフィー症型と vacuole を有する各型の存在を確立した。後者には debrancher 酵素低下例も含まれる。そして、vacuole 形成を lysosome 変化を対象とした筋崩壊の一つのパターン「リソゾム型変性」としてとらえ、これを超微細形態と蛋白分解酵素の両面から裏付けた。

これに関しては、本年 8 月にワークショップを、基礎専門研究者を交えて開いた(本報告書並びに明春、専門誌「神経内科」に掲載予定の論文参照)。

本年度の研究班会議でも、神経系性筋萎縮にみられる vacuole、リソゾム諸酵素の系統的研究、また、クロロキンによって vacuole ミオパチーのモデル動物が作成されるなど成果を加えた。

VI ミトコンドリアミオパチー (プロジェクト研究)

リソゾムと同じく、エネルギー産生源としての organella、ミトコンドリアに焦点を合せた集中研究で、次年度へ向けて取り上げた。本症の中の Ocular, Oculopharyngeal 型と、いわゆるミトコンドリアミオパチーの各種の相互関係が、分類学的に、また成因的に明らかにされる要がある。

本年度もすぐに数題の研究が集まり、また米国からミトコンドリア関連酵素の異常症の一つ carnitine palmytyl transferase 欠損症の発見者である DiMauro 教授を招待して講演と討議への参加をえた。

本報告書にみるように、症例としては、各種のミトコンドリアミオパチー、Kearns-Sayre 症候群、ミトコンドリア脳脊髄症、高乳酸血症、運動時 CK 上昇例、それらにおけるミトコンドリア機能の酵素化学、また、皮膚線維芽細胞における研究、など、ミトコンドリアに関する症例、形態と機能に関する必要な研究項目が出揃ったといってもよい。

〔研究の将来の見通し〕

当研究班は、「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」の目的に沿って、本症病者の病状、病態の解明に関して着実に成果をあげてきた。この成果は将来とも確実に積重ねられてゆくものと思う。そして、この中から今後、本症の成因の発見がなされることに大きな期待が抱かれる。

研究班として、各期ごとに掲げたプロジェクト研究は、いずれも現在の本症研究の最も活発な研究分野に焦点を合せたものであり、その成果が誤りなく実っていることが判る。

なお、今後について付言すれば、遺伝子性疾患である本症に関しては、本報告書の分類学の論文でのべたごとく、近年の遺伝子クローニングと遺伝子工学技術の発展から、染色体上における疾患遺伝子マップの作製が進められる段階に入った。当研究班としても、臨床研究者として、その必要な部分を担当すべきであると考えてる。

【おわりに】

当研究班は、筋ジストロフィー症の成因臨床研究班として、基礎班、動物飼育班、そして疫学・臨床班、養護班と相ともに活動を行い成果をあげてきた。

発足以来、若干の年月が経過したが、当初の研究レベルに較べて格段の進展をみせるに至った。当初はそれ程多数ではなかった本症の研究者についても、なお十分といえないまでも、すでにここで育ち巣立ったものは少なくない。

筋ジストロフィー症が人の生命活動の象徴ともいべき筋の萎縮であり、また若い人々を理由不明のまま冒して命を失わしめる疾患であること、そして、その解決の現実化が近年の分子生物学や遺伝子化学の進歩によって望まれる段階にあることを思えば、私達は本症の研究を中断することはできない。

本研究報告書は、当研究班の本年度のものであるが、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な影響を及ぼすものと思う。

(12-25, 1983)

昭和58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分類学；病状，病態そして成因的分类への進展

三好和夫

(冲中記念成人病研究所)

筋ジストロフィー症の分類は，はじめは病状，ついで病態に基づき，現在は窮極の成因追求のもとに行われている。このように成因の究明を目指して行われる分類を私は分類学と呼びたい。その中で刻々に提示される分類が本症の日常臨床の指針，基準となっている。

〔本症分類学の進展〕

最近の分類（表参照）では，病状に準拠しながら，すでに知られた疾患の病態が十分に組み込まれている。表では，神経原性のものを省き，筋原性のミオパチーをあげて筋ジストロフィー症としてある。さらに著者らの分類では，ミオパチーと筋ジストロフィー症を分ける試みがなされている。

〔筋ジストロフィー症の特徴〕

本症の特徴としての，遺伝性，進行性，筋力低下，筋変性は現象的なものといえよう。筋変性をとりあげ，組織所見で myogenic と dystrophic を識別し，血清で CK 活性値の上昇を重視することを提唱したい。

〔症状の幅と体細胞のモザイク性〕

ホモ型で発症する劣性型に対して，ヘテロ型の発病者（例えば FSH 型）では症状に幅がみられる。DMD 女性保因者に適用される Lyon 説に対して体細胞のモザイク性が考えられないか。著者らは前に骨髄細胞の成熟段階における還元分裂の事実を発表しているが，考慮に入れて考えてみたい。この場合には，体細胞の成熟，分化という別の問題が持ち込まれる。

〔合併症状に対しての isozyme 的理解〕

多彩な症状を呈する病型の理解として，例えば DMD に伴う知能障害では，筋にある本症の原因酵素の isozyme が脳にあり，両者に共通した subunit の異常がこれらを起すと説明したい。この考え方は，福山型の脳障害にも当てはまり，また，ミオパチーにおける筋原性と神経原性変化の混在にも有用と思う。

〔遺伝型を異にする類縁の病型〕

LDH の subunit H と M の遺伝子は別であり，11，12番の染色体に別れてある。もし DMD の原因酵素が subunit からなり X 染色体と体染色体に別れてあれば，X 染色体性遺伝型の DMD に対して，類似の症状を呈し体染色体性遺伝型の別の病型があってもよい。異なった遺伝型を示し，多種類の病型からなる筋ジストロフィー症の分類において考慮されてよい。

〔Organelle からみた分類〕

遠位型とリソゾーム変化，Ocular，Oculopharyngeal 型とミトコンドリアミオパチー，いずれ

も、Organelle 変化の有無、それぞれに含まれる原因解決ずみの疾患 (Storage disease, Carnitine palmytyl transferase 欠損など) から、実態そして原因的分類に期待がもたれる。

〔染色体上の疾患遺伝子の分類〕

DMD 遺伝子の座位は最近、X染色体短腕 Xp₂₁と知られた。近年の遺伝子クローニングと遺伝子工学技術により、DNA 構成から蛋白質、酵素の同定が可能になった。まず、染色体上の異常遺伝子のマップすなわち分類を問題にし、当研究班の役割についてふれたい。

〔動物筋ジストロフィー症〕

動物にも X染色体性の筋ジストロフィー症が見出された。これまでの各種を含めて、分類学的にそれぞれ動物の遺伝・臨床型とみる観点が必要と思う。

〔おわりに〕

分類学は成因解明を目指す総括的研究といえる。本症の分類学の現状と今後の展望をのべた。

表1 筋ジストロフィー症の分類
(Walton ら, 1981)

(a) <i>X-linked muscular dystrophies</i>
Severe (Duchenne)
Benign (Becker)
? Benign with early contractures (Dreifuss)
Scapuloperoneal
? Hereditary myopathy confined to females
(b) <i>Autosomal recessive muscular dystrophies</i>
Scapulohumeral ('Limb-girdle')
? 'Quadriceps myopathy'
Autosomal recessive muscular dystrophy in childhood
Congenital muscular dystrophies
(c) <i>Autosomal dominant muscular dystrophies</i>
Facioscapulohumeral
Scapuloperoneal
Late-onset proximal
Distal (adult-onset)
Distal (infantile-onset)
Ocular
Oculopharyngeal

表2 筋ジストロフィー症の分類
(著者ら, 1980)

1. Autosomal dominant muscular dystrophies
Facioscapulohumeral type
Distal myopathy (Welander type)
2. Autosomal recessive muscular dystrophies
Limb-girdle type
Malignant limb-girdle type
Autosomal recessive distal muscular dystrophy
Congenital muscular dystrophy
3. X-linked recessive muscular dystrophies
Duchenne type
Benign Duchenne type (Becker type)
4. Myopathies
Ocular myopathy
Oculopharyngeal myopathy
Oculopharyngodistal myopathy
Others

ミトコンドリア異常を伴う神経筋疾患

1) 臨床・形態

福原信義

(金沢大学医学部神経内科)

骨格筋ミトコンドリアの形態異常は、いわゆるミトコンドリア・ミオパチーといわれるもののほかに、種々の神経筋疾患でみられ、また、実験的にも虚血でも作れるので、特異性を欠き、一部、外眼筋麻痺を伴う筋疾患におけるほかは、骨格筋の病因を反映しているものとは必ずしも考えられない傾向があった。当三好班では、種々の臨床症状を示すミトコンドリア・ミオパチーの症例報告をつみ重ねるかわら、本年は DiMauro 教授を迎え、いわゆるミトコンドリア・ミオパチーについての特別講演をしていただいた。

ミトコンドリア・ミオパチーは狭義には眼筋・骨格筋の症状のみで、他の症状がなく、先天性ミオパチー、または進行性筋ジストロフィー症に似るものをさすが、広義には、眼筋・骨格筋の症状のほか、中枢神経症状など多彩な症状を示す神経筋疾患の部分症状(筋症状)をいう。

骨格筋のミトコンドリア異常は、組織化学的には、ragged-red fiber として、電顕的には、ミトコンドリアの数の増加、大きさの異常(巨大なもの、管状に長いもの)、形の異常(クリスタの増加、環状、峰窩状のもの、結晶様封入体、球状封入体)などがみられるが、ragged-red fiber の出現頻度とミトコンドリアの形態異常の程度には、疾患群の違いや臨床症状の強さとは必ずしも相関しない。DiMauro ら (1983) によって報告された cytochrome C oxidase 欠乏によるミトコンドリア・ミオパチーの症例は骨格筋の組織化学的・電顕的異常と酸素欠乏の程度が年齢とともに軽快しており、注目される。

狭義のミトコンドリア・ミオパチーの筋萎縮・筋力低下の分布としては、それぞれ、眼筋型・肢体型・遠位型・顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーに似た分布をしているものがあり、強い易疲労性の特徴としているものもあり、血中乳酸、ピルビン酸の上昇しているものが多い。

Cytochrome C oxidase 欠乏によるミトコンドリア・ミオパチーには、強い筋力低下、乳酸アシドーシスを生ずるが、De Toni-Fanconi-Debre 症候群を伴い4か月以内に死亡する悪性型 (van Biervliet ら, 1977) と De Toni-Fanconi-Debre 症候群を伴わず、次第に軽快する良性型 (DiMauro ら, 1983) のあることが報告されている。

筋症状以外に広範な症状を伴うもので単一疾患として確立されてきたものには、

1) Kearns-Sayre (-Shy) 症候群 (KSS) :

三主徴(外眼筋麻痺、網膜色素変性、心伝導障害)のうち3症状をもつ65症例と、2症状のみをもつ57症例とで分析すると、三主徴以外の症状頻度はほぼ同じであり、これらは単一の疾患と考えられる。

2) Hackett-Tarlow 症候群 (HTS) :

家族発症が多く、成長障害、難聴、痙攣を主症状としている。

3) Ragged-red fiber を伴うミオクローヌスてんかん (MERRF) :

ミオクローヌスてんかん、ミトコンドリア・ミオパチー、小脳失調を主症状とする。

	KSS(65定型例)	MERRF(15例)	HTS(10例)
家族歴	10.8%	46.7%	60%
発症年齢	小児期～49歳	小児期～42歳	2～8歳
外眼筋麻痺	100 %	6.7%	30%
網膜色素変性	100	13.3	20
心伝導障害	100	0	20
ミオクロームス	1.5	100	0
全身痙攣	10.8	73.3	60
知能異常	44.6	80	40
小脳失調	63.1	93.3	40
筋力低下	64.6	93.3	90
視神経萎縮	7.7	50	20
難聴	55.4	35.7	80
低身長	63.1	20	100

ミトコンドリア局在酵素の異常に関する研究の進歩

垂井清一郎

(大阪大学医学部第二内科)

ミトコンドリアには TCA サイクル、酸化的リン酸化、脂肪酸の β 酸化などに関係した諸酵素が局在しており、エネルギー代謝において重要な役割を担っている。なかでもマトリックスを中心に存在する TCA サイクル関連諸酵素と、内膜に局在する電子伝達系は生体エネルギーの重要な供給源である。

近年ミトコンドリア局在酵素の異常による代謝障害が多数報告されているが、生検標本を用いたミトコンドリア機能の生化学的解析には色々な技術的問題があり、ミトコンドリア機能障害が想定されているながら未だ生化学的に異常部位の決定されていない症例が多数存在している。

本講演では、ミトコンドリアのエネルギー代謝（特に酸化的リン酸化）に関連した諸酵素の異常の解析を中心とした研究の現状を紹介し、私共が行っている Kearns-Sayre 症候群の骨格筋ミトコンドリア内膜電子伝達系の解析結果につき報告する。

ミトコンドリアにおける ATP 産生は次のようにして行われる。解糖系によりブドウ糖から生成したピルビン酸はミトコンドリアに取り込まれアセチル C_0A となり TCA サイクルに入る。TCA サイクルでは脱水素反応や脱炭酸反応により NADH や還元型フラビンが作られ、これがミトコンドリア内膜電子伝達系を介して最終的に酸素を還元し、水を形成する。この過程でミトコンドリア内膜内外に水素イオンの濃度勾配が作られ、これが ATP 合成のエネルギー源となる（酸化的リン酸化の化学浸透説）。

ミトコンドリア内膜の電子伝達系は、フラビン蛋白、チトクロム、鉄・イオウ中心、ユビキノン (coenzyme Q) などで構成されており、酵素複合体 I ~ IV に分割、精製されている（図参照）。図の複合体 V はオリゴマイシン感受性 ATPase である。

ミトコンドリア内膜電子伝達系は組織より単離したミトコンドリア分画の酸素消費能とチトクロム含量を測定することにより解析されてきた。酵素消費能の解析により、ミトコンドリアの呼吸調節能の欠如 (Luft 病)、NADH-coenzyme Q reductase 欠損症などが発見された。

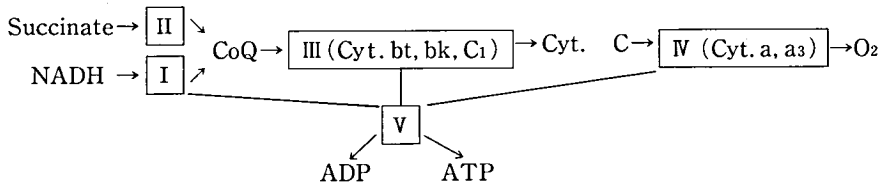
ミトコンドリア内膜のチトクロムは、a, a_3 , b_K , b_T , c, c_1 の少なくとも 6 種類存在することが知られている。チトクロムの分析は差スペクトル法によって行われ、 $a + a_3$, $b_K + b_T$, $c + c_1$ の 3 群に分割して測定することが可能である。

Morgan-Hughes 等、DiMauro 等はこれらの方法を駆使して、チトクロム aa_3 (Cytochrome Oxidase) 欠損症、チトクロム b 欠損症、チトクロム c 欠損症など、種々の疾患単位を報告して来た。しかし、これらの分析を行うには多量（数グラム）の生検組織が必要であり、容易に行い得るものではなかった。

最近私共は、ミトコンドリアの呼吸機能の解析にかわるものとして、ミトコンドリア内膜電子伝達系複合体活性の測定を行っている。

この方法では100mg程度の生検標本で充分であり、電子伝達系異常の発見、欠損部位の決定に有用である。又、ユビキノンは重要な電子伝達系構成成分であるが、これまでミトコンドリア異常症における解析の報告が見られなかった。私共は高速液体クロマトグラフィーによりユビキノンを測定し、ミトコンドリア異常症の病態解析を行っている。その結果、Kearns-Sayre症候群の骨格筋ミトコンドリアでは、内膜の電子伝達系活性、ユビキノンの含量ともに低下していることを見出した。

(附図) ミトコンドリア内膜電子伝達系複合体



I ; NADH-CoQ reductase, II ; Succinate-Co Q reductase,
 III ; CoQH₂-cytochrome C reductase, IV ; Cytochrome oxidase,
 V ; Oligomycine sensitive ATPase, CoQ ; Ubiquinone,
 Cyt.; cytochrome.

ミトコンドリア異常を伴う神経・筋疾患線維芽細胞を用いた 酵素学的診断法

佐藤 猛, 安野 みどり, 山本 剛司
(順天堂大学医学部脳神経内科)

【目的】

高乳酸, 高ピルビン酸血症を呈する Leigh 脳症や, ミトコンドリア (Mit.) 脳・筋症では, 骨格筋内に異常 Mit. の集積が認められる。ピルビン酸の蓄積は①ピルビン酸の酸化障害, ②糖新生系の障害, ③その他, Mit. 障害などで起る。近年, pyruvate dehydrogenase complex (PDH) や, Mit. 内酸化還元酵素の異常が報告されている。これら多種にわたる諸酵素活性を測定する際, 生検筋では量的な制約, あるいは対照材料と同時に測定することが困難なことから, 皮膚線維芽細胞を用い, これらの酵素活性の測定法を検討した。

【症例】

症例 1 : 11 歳女児・身体発達遅延, 脳神経麻痺, 視神経萎縮, 小脳症状, 病的反射, 呼吸麻痺, けいれんを認めた。血中乳酸, ピルビン酸, アラニンが高値を示した。高脂肪食により改善した。
症例 2・3 : Mit. 脳・筋症の患者と母親 (山本, 別府, 椿 : 第 85 回神経学会関東地方会, 1983, 5 月発表)。

【方法】

(1) 生検皮膚線維芽細胞を Eagle MEM + 8% FCS にて培養, 5~7 継代培養したものを用いた。Trypsin + EDTA で剥離後 Heps buffer (+ mannitol, ATP, EDTA, ME) にて浮遊, protease を作用させた後, ホモジネートし, 遠心後 Mit. 分画を得た (Stumpf, 1981)。培養瓶 (175cm²) 当たり 0.05~0.15mg Mit. 蛋白が得られた。なお Mit. 分画法は Vero 細胞を用いて確立した。

(2) 線維芽細胞のホモジネートを凍結・融解したものを用いた。PDH complex : Blass ら (1970) の方法を一部改変した。反応系に 1-¹⁴C-pyruvate を加え, 発生した ¹⁴CO₂ を液シンにて測定した。PDH phosphatase 活性 : Robinson (1975) の方法にて行った。ATP にて PDH を不活性化した後, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ による再活性値を測定した。Lipoamide dehydrogenase (LAD, E3) : Koike (1970) の方法によった。

(3) Mit. 分画を凍結・融解後, 二波長分光光度計にて, 25°C, 550nm で次の Mit. 酵素を測定した。cytochrome-c-oxidase (Sekuzu, 1965), succinate cytochrome-c-reductase (SCR) (King, 1967), NADH-cytochrome-c-reductase (Gian Luigi Sottocasa, 1967) の活性を測定した。さらに Vero 細胞の Mit. 分画について, 液体窒素温度における酸化還元の違いスペクトラムより cytochrome spectra を測定した。なお Mit. 分画の一部は電顕にて観察した。

【結果】

(1) 症例 1 の線維芽細胞の PDH complex 活性が低値を示したが, 血小板と生検筋の活性値は正常範囲にあった。PDH phosphatase, および LAD は正常であった。

(2) Vero 細胞より得た Mit.分画は電顕にて Mit.の集積を確認した。cytochrome spectra では c は546nm, bは560nm, aは602nm で吸収極大を得た。さらに Mit.酸化還元酵素活性値と蛋白量との相関性を確かめた。

cytochrome-c-oxidase 活性値は正常であった。SCR は正常対照 10.9 ± 2.6 n mol/min/mg に比し、症例2では 4.9 ± 0.3 と低下が認められた。

【考察・結論】

まだ対照例数が少ないため、上記の測定結果の意義については現段階では保留する。症例1については他の PDH complex 構成酵素や糖新生系酵素も測定しなければならない。症例2についてはさらに他の Mit.酸化還元酵素活性の検討も問題となる。今回は皮膚線維芽細胞により、これらの酵素活性の測定法を主に報告し、日常診断に応用し得ることを示した。

分 担 研 究 報 告

目 次

I. 実験動物

- 1) 筋ジストロフィーハムスター骨格筋の再生……………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(続報) ……39
鳥取大学医学部脳研神経病理 中 村 晴 臣
- 3) 培養下における正常及び筋ジストロフィーチキンの
T-system の微細構造 ……44
東京医科歯科大学医学部神経内科 塚 越 廣
- 4) モノクローナル抗体を用いた筋ジストロフィー症
発症機序の研究……………50
国立静岡病院 宇尾野 公 義
- 5) ジストロフィー鶏発症早期における活性酸素関連諸酵素の
異常について(第3報) ……53
自治医科大学神経内科 水 野 美 邦

II. 筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病理・病態

- 6) 筋ジストロフィー症の分類学：病状，病態，
そして成因的分類への進展……………61
冲中記念成人病研究所 三 好 和 夫
- 7) 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—— ……66
杏林大学保健学部疫学 古 庄 敏 行
- 8) 骨格筋CTスキャンによる進行性筋ジストロフィー症の
下腿部仮性肥大の検討……………71
東京大学医学部脳研神経内科 豊 倉 康 夫
- 9) Duchenne 型筋ジストロフィー症が疑われる女性例 ……76
筑波大学臨床医学系神経内科 中 西 孝 雄

10) 運動によって誘発される高CK血症 ——3症例の検討——	80
浜松医科大学第一内科 西村嘉郎	
11) 筋線維の発育分化遅延を主病変とする先天性ミオパチー (congenital myopathy without specific features) の重症例	85
宮崎医科大学第三内科 栗原照幸	
12) Myoadenylate deaminase 欠損症を疑われた1例 ——筋痙攣を主徴とする診断困難な症例の提示および問題点——	90
虎の門病院神経内科 田辺等	
13) Duchenne 筋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(続報)——	96
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山吉弘	
14) 神経筋疾患における筋衛星細胞および筋核の定量的検討	101
九州大学医学部脳研神経内科 黒岩義五郎	
15) 筋再生に関する研究 ——衛星細胞活性化因子の検討——	103
信州大学医学部第三内科 小口喜三夫	
16) 筋緊張性ジストロフィーにおける Satellite cell の電顕的研究	106
大阪医科大学第一内科 茂在敏司	
17) 筋ジストロフィー骨格筋における delta lesion の検討	111
東北大学医学部脳研神経内科 高瀬貞夫	
18) Duchenne 筋ジストロフィー症生検筋細胞膜の Orthogonal array subunit particle について ——Freeze fracture 法による検討——	116
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山吉弘	
19) 筋疾患における fiber type disproportion の 発現機序に関する研究	121
東邦大学医学部第四内科 木下真男	
20) 培養神経筋組織成長に対する ganglioside および 抗 ganglioside 抗体の作用	124
国立療養所宇多野病院臨床研究部 齋田孝彦	
21) 緊張性筋ジストロフィー症の末梢血リンパ球 subsets ——monoclonal 抗体と fluorocytometer による解析——	128
九州大学医学部脳研神経内科 後藤幾生	

- 22) モノクローナル抗体による生検筋内浸潤リンパ球の解析…………… 131
 順天堂大学医学部脳神経内科 佐藤 猛
- 23) 糖原病II型にみられる空胞化リンパ球の超微形態…………… 137
 大阪大学医学部第二内科 垂井 清一郎
- 24) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜の研究…………… 141
 九州大学医学部脳研神経内科 黒岩 義五郎
- 25) Duchenne 型筋ジストロフィー症患者の赤血球膜
 主要ポリペプチドの電気泳動による分析…………… 144
 神戸市立中央市民病院小児科 吉岡 三恵子
- 26) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜のリン脂質構成…………… 147
 国立療養所筑後病院 馬渡 志郎
- 27) 筋強直性ジストロフィー症の赤血球膜と血漿の脂質の比較検討…………… 151
 東邦大学医学部第四内科 木下 真男
- 28) Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球の
 ホスファチジン酸について…………… 155
 国立武蔵療養所神経センター 吉田 瑞子
- 29) マーカインによる急性筋融解の機序…………… 158
 国立武蔵療養所神経センター 高木 昭夫
- 30) Duchenne 型筋ジストロフィーの筋小胞体機能,
 とくに Ca 遊離について…………… 162
 国立武蔵療養所神経センター 高木 昭夫
- 31) 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 第2報…………… 166
 金沢大学医学部神経内科 高守 正治
- 32) ミオトニーの発生機序に関する研究：
 低Cl溶液とミオトニー…………… 172
 宮崎医科大学第三内科 栗原 照幸
- III. 遠位型ミオパチー
- 33) “Rimmed vacuole 型 distal myopathy” と “rimmed vacuole を
 伴う緩徐進行性神経原性筋萎縮症群” との比較検討…………… 179
 虎の門病院神経内科 田辺 等
- 34) 筋生検所見よりみた遠位型ミオパチーと遠位型筋ジストロフィーの
 比較検討…………… 186
 金沢大学医学部神経内科 福原 信義

35) Distal myopathy の臨床的, 形態学的検討と lysosome 酵素活性	190
東京医科歯科大学医学部神経内科 塚 越 廣	
36) 実験的クロロキンミオパチー ——Rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーとの関連——	195
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部 杉 田 秀 夫	
IV. ミトコンドリアミオパチー	
37) パラコートによる筋ミトコンドリアの障害.....	201
順天堂大学医学部脳神経内科 佐 藤 猛	
38) Kearns-Sayre 症候群の骨格筋ミトコンドリア 電子伝達系の解析.....	206
大阪大学医学部第二内科 垂 井 清一郎	
39) ミトコンドリア異常を伴う進行性外眼筋麻痺の 2 例 ——病像の多様性を中心に——.....	210
金沢大学医学部神経内科 高 守 正 治	
40) 高乳酸血症を伴った mitochondrial encephalomyopathy の一例.....	215
九州大学医学部脳研神経内科 後 藤 幾 生	
41) ミトコンドリア・ミオパチーにおける皮膚線維芽細胞の ① Pyruvate dehydrogenase complex ② Cytochrome c oxidase, Succinate-cytochrome c reductase 活性	219
順天堂大学医学部脳神経内科 佐 藤 猛	
V. 筋ジストロフィー症の生化学・代謝など	
42) 筋病変とミオグロビンの局在 ——ミオグロビン染色法の検討——.....	225
熊本大学保健管理センター 出 田 透	
43) ヒト骨格筋における enolase isozyme の局在について ——免疫組織化学的検討——.....	228
名古屋大学医学部第一内科 杉 村 公 也	
44) ヒト筋型 Carbonic anhydrase III (CA-III) ——ELISA 系の確立と神経筋疾患への臨床応用について——	232
北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門 田 代 邦 雄	

45) 血清酵素と creatine kinase	237
愛媛大学保健管理センター 植田 啓嗣	
46) Duchenne 型筋ジストロフィー症におけるミオグロビンと クレアチンキナーゼの流出の特徴.....	242
徳島大学医学部第一内科 川井 尚臣	
47) 各種萎縮筋モデルにおける glucose uptake	247
信州大学医学部第三内科 庄司 進一	
48) Myotonic dystrophy にみられる糖代謝異常の 発生機序に関して.....	253
京都大学医学部第二内科 井村 裕夫	
49) 筋におけるクレアチン代謝：骨格筋のクレアチン輸送の特性.....	257
冲中記念成人病研究所 三好 和夫	
50) Duchenne 型筋ジストロフィー症における opaque fiber の 筋構造蛋白に関する研究（第2報）.....	261
熊本大学医学部第一内科 荒木 淑郎	
51) Nemaline myopathy の筋構成蛋白について.....	266
信州大学医学部第三内科 小口 喜三夫	
52) 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.....	271
徳島大学医学部酵素研酵素化学 木南 英紀	
53) ³¹ P-NMR による実験的糖原病の研究.....	275
新潟大学脳研究所神経内科 宮武 正	
54) Phosphorylase b kinase deficiency myopathy の ATP による治療.....	281
鹿児島大学医学部第三内科 納 光弘	

I. 実 験 動 物

1) 筋ジストロフィーハムスター骨格筋の再生

埜 中 征 哉*

研究協力者 寺 澤 健二郎* 岡 田 理 美*

進行性筋ジストロフィーの骨格筋の主病変は筋線維の変性、壊死である。筋線維は壊死に続いて再生するが、それは進行性筋ジストロフィーでも例外ではない。筋ジストロフィーでは活発な再生があるのに臨床症状は名の如く“進行性”であり止ることを知らない。もし筋の再生が壊死を代償しているならば症状の進行はないはずである。進行性筋ジストロフィーには再生があっても症状が進行するのは再生が十分でなくまた不完全だからと考えられている。

多くの筋ジストロフィー動物モデルの中で筋ジストロフィーハムスターは骨格筋の筋力低下がほとんどなく、非進行性である。しかし病理学的にはヒト筋ジストロフィー、特に Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) と較べても決して少なくない壊死線維を認める。多数の壊死線維が同じように存在しても、ヒトでは常に進行するのにハムスターではなぜ進行しないのか、その答えの鍵は再生にあると考えられる。筋ジストロフィーハムスターの再生を知ることはきわめて重要であり、ヒト筋ジストロフィー筋の再生と比較することにより、筋ジストロフィー筋がどのようにして進行していくかその病態生理を知ることになる。

筋ジストロフィーハムスター骨格筋の再生を研究していくにはまず健常のハムスター骨格筋が壊死した後どのように再生していくか、その組織学的、組織化学的変化を経時的にみていく必要がある。再生をみるためにはまず筋線維を壊死させねばならないが、従来使用されていた加熱、冷却、挫滅など物理的な方法は筋線維のみでなく、血管、神経など支持組織まで破壊する。そのために再生

線維は均等でなく再現性がない。今回は筋線維のみを選択的に壊す塩酸プロピバカイン (マーカイン)¹⁾を使用した。

対象・方法

1) 正常対照ハムスターにおける骨格筋の再生

対照ハムスターとして生後4月の BIO F1B (雄) を使用した。

筋を壊死させるため生食に融解した0.25%塩酸プロピバカインを右前脛骨筋 (白筋) と右ヒラメ筋 (赤筋) 内に直接0.5ml ずつ注射し、反対側の筋は対照とした。注射後24時間、4、7、10、15、30日目に同筋をとり出し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で固定し、連続凍結切片を作製した。切片には hematoxylin and eosin (HE), Gomori trichrome 変法, NADH-TR, PAS, oil red O, 酸フォスファターゼ, ATPase (routine, pH4.5, 4.3), acridine orange (AO), acetylcholinesterase (AChE), nonspecific esterase (NSE) 染色を行なった。

上記各時期に5匹ずつ (計30匹) の筋の中にみられた再生筋線維の組織化学的特徴を明らかにし、次に各筋中の再生線維100~200本の直径を計測した。対照筋 (非処理筋) の直径は無差別に10匹選び、各筋で200本の筋線維の直径を計測した。

2) 筋ジストロフィーハムスター骨格筋の再生

筋ジストロフィーハムスター (BIO 14.6) は実研動物中央研究所の御厚意で入手した。生後2週 (3匹), 4週 (3匹), 2月, 4月, 6月, 12月 (各5匹ずつ) の長指伸筋, 前脛骨筋 (白筋), ヒラメ筋 (赤筋) について前述した1)と同様の方法で切片を作製し、同じ染色を行なった。壊死、再生線維の頻度は個体差が大きく今回は統計的処理するまでの匹数が不足したので直径計測は行なわなか

* 国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部

