

厚生省「神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー症の臨床、病態と成因に関する研究

杉田班

昭和59年度研究報告書

昭和60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」班は、過去3年間多くの研究成果を挙げ、昭和58年度をもって終了しました。そして昭和59年度より新しく「筋ジストロフィー症の臨床、病態と成因に関する研究」班として発足致しました。当研究班は過去10数年間一貫して筋ジストロフィー症の病因、発症機序の解明を目指し、現象論、実態論的研究の蓄積を経てようやく本質論的アプローチの段階に入りつつあるように思います。

筋ジストロフィー症のように原因不明の疾患の研究にあたっては既成の概念にとらわれない独創的なアイデアが要求されると思います。この報告書の中にも自由な発想に基づいた示唆に富む学問的価値の高い成果が発表されており、今後の研究が大いに期待されます。班員各位の不断の御努力に心から敬意を表します。筋ジストロフィー症の研究の道は極めて険しいと思います。しかし病床に横たわる患者さんを思う時、私どもは一時といえども研究を中断することはできません。

本研究班に賜った厚生省当局、国立武蔵療養所神経センター、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、ひきつづき御支援をお願い致します。

昭和59年12月

〈班長〉 杉 田 秀 夫

目 次

昭和59年度総括研究報告	7
昭和59年度総合班会議研究報告抄録	13
分担研究報告	25
I. 臨床・臨床病理	33
II. 組織化学・微細形態	85
III. 膜, カルシウム, Creatine Kinase	127
IV. エネルギー代謝, 他	181
V. 遺伝子	241
VI. 筋再生	247
VII. 蛋白代謝	265
昭和59年度研究班名簿	289

昭和 59 年 度

総 括 研 究 報 告

総括研究報告

班長 杉 田 秀 夫

〔はじめに〕

本研究報告書は「筋ジストロフィー症の臨床、病態と成因に関する研究」班の昭和59年度（初年度）の報告書である。

本研究班の目的は筋ジストロフィー症の成因の解明を当面の目標としつつ、終局的には治療法の確立と本症の根絶を願っている。

この報告書には昭和59年12月1日(土)、2日(日)の両日に開催された班会議に於て報告された論文が集録されている。

〔研究成果の要約〕

本年度発表された報告の中から2、3のトピックについて述べる。

A. 筋ジストロフィー症

1) 新技術の開発

未知の分野の開拓に新しい方法論は必須である。最近注目されている画像解析法を用いた臨床研究が報告されている。即ちCT、超音波、NMR画像などでありこれらの機器を用いた本症の経時的変化が確立されるであろう。

組織化学的には carbonic anhydrase III (CA-III), muscle specific enolase (MSE) などによる新しい fiber type 識別法が発表された。又、本症罹患筋に浸潤するリンパ球の表面マーカーによる subpopulation の解析とその病因論的意義が論じられている。

その他放射性同位元素を用いたクレアチン代謝の研究、モノクロナール抗体を用いた核内 non-histone 蛋白の局在と染色体との関連などの研究が報告された。

2) 筋の変性と再生

この問題は本症の病態の中核をなすものである。変性を考える上で形質膜は重要な課題であるが、この方面の研究は極めて難しい。

形質膜特異的リガンドを用いた新しい形質膜画分分離法が報告され今後の発展が期待される。

3) 遺伝子工学的アプローチ

本年より開始された DMD 遺伝子単離の試みは当研究班の柱の一つであり本質論的研究といえる。

DMD 遺伝子の単離又はそれと密接に linkage している probe を見つける事により当面保因者発見及び胎児診断を目標としている。すでにヒト X 染色体よりいくつかの probe が単離されており近い将来 linkage 研究が行なわれるであろう。

4) モデル動物に関する研究

従来常染色体劣性遺伝形式を持つハムスター、マウス、ニワトリジストロフィーが研究対象となったが今回 DMD と同じ遺伝形式をとる mdx マウスが我国に導入され形態、生理、生化学的に検索されるであろう。

B. 関連疾患

1) Distal myopathy (rimmed vacuole 型)

Rimmed vacuole 型 distal myopathy は本研究班が過去精力的に行って来たプロジェクト研究の 1 つであり、lysosome 酵素の病因的意義が研究されてきた。今年度 rimmed vacuole の周辺にカテプシン B, H などの酵素が酵素坑体法により実際に存在する事が明らかとなり lysosome 酵素が筋蛋白分解に直接的に関与している事がより明白となった。実験的クロロキンミオパチーでも同様の所見が得られ両者は共通の筋蛋白分解機構を有するものと思われる。 (E-64-d)

又、クロロキンミオパチーはチオールプロテアーゼ阻害剤で発症が阻止される事がわかりこの事は rimmed vacuole 型 distal myopathy の治療に結びつく可能性を示している。

2) Mitochondrial myopathy

本症も当研究班の研究プロジェクトの 1 つである。

本邦に於ける mitochondrial myopathy の臨床像の特徴、診断法、Coenzyme Q₁₀ などによる治療など多方面の発表があり本年 8 月 1 日当研究班に於いて基礎専門家を交えて workshop を行なう予定である。

〔研究の将来の見通し〕

当研究班は筋ジストロフィー症の臨症、病態の解明に着実な成果をあげた。筋ジストロフィー症に関する今後解決すべき問題点として 2 つの事が挙げられよう。

①筋の再生

本症の罹患筋では活発な再生が行なわれているが再生に関しては未解決な点が多い。例

えば再生のポテンシーは正常であるが内部環境が悪い為に変性を上回るに十分な再生ができないのか、再生筋自身正常と異なると理解すべきであろうか、再生を促進するにはどうしたらよいかなど解明すべき多くの課題を有している。

②遺伝子工学的アプローチ

我国は欧米に比しこの問題はやや立遅れてはいるが今後発展すべき重要課題である。最近 ornithine transcarbamylase の遺伝子が DMD 遺伝子と隣接している事が明らかとなったので linkage 研究は急速に進歩するであろう。Linkage 研究を実施する際重要なのは DMD の正確な家系図である。臨床にたずさわっている班員各自がもう一度患者の家族歴を調査し正確な家系図を作成し保持しておくことが当面極めて重要であると思われる。

昭和59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臨床，病態と成因に関する研究

研究報告抄録

Rimmed Vacuole 型 Distal Myopathy とリソゾーム

木南英紀

(徳島大学医学部酵素研酵素化学)

【目的】

Rimmed vacuole 型 Distal myopathy は、常染色体劣性遺伝で、本邦において詳細に検討されてきた。近年、この特異なミオパチーにおけるリソゾームの異常が示唆され、筋線維の変性とリソゾームのプロテアーゼとの関連が着目されつつある。

リソゾームに含まれるプロテアーゼの中でも、いわゆるチオール性カテプシン群（カテプシン B, H 及び L）は強いタンパク分解活性（筋構造タンパクの分解も含め）を有し、細胞内タンパク質の分解において主要な役割を担っていることが明らかになっている。Muscular dystrophy と異なり Distal myopathy は phagocytes の浸潤を伴わないのが特徴であり、Rimmed vacuole そのものがチオール性カテプシン群を含むかどうかの検査は本症において、リソゾームの異常を伴うか否か、又、筋萎縮との関連を調べる上でも基本的な課題と思われる。

我々はこのような Distal myopathy の病態を明らかにするため、カテプシン B, H の筋組織における局在を免疫学的に検討した。合わせてチオール性カテプシン群に対する内在性阻害タンパクの局在についても調べた。

【材料と方法】

国立神経センターで保存されている Distal myopathy 1 例の筋生検標本について組織学的検査 (HE, Gomori-Trichrome 染色) 並びに免疫組織学的検査を行った。ヒトカテプシン B 及び H の精製は唐渡ら及び Kirschke らのラットカテプシン B 及び H の精製法を修飾して行った。凍結肝を用いるため、リソゾーム膜が破れ、細胞質に存在する内在性インヒビターと複合体を形成している。そこで肝ホモジネートを pH4.5 で 37°C、防腐剤の存在下で incubate し、インヒビターを破壊後、その遠心上清を出発材料として精製した。DEAE-cellulose でカテプシン B, H を分離し、その後カテプシン B は CM-セルローズ、アフィゲル 501 を、カテプシン H は ConA-セファローズ、ハイドロキシアパタイトを行い、それぞれ均一な標本を得た。一方、カテプシン B, H, L などのチオールプロテアーゼに対する細胞内チオールプロテアーゼインヒビター (TPI) 3 種の中、皮膚、消化管上皮などの上皮性起源の細胞に多量に存在する TPI- α をヒト皮膚上皮を出発材料としてラット TPI- α と全く同じ方法で精製し均一なタンパク標品を得た。100 μ g のプロテアーゼ及び TPI- α を家兔皮内に 2 週間毎に 3 回注射し、最終注射 3~4 週間後に採血した。いずれの抗体もそれぞれの抗原に特異的であることは免疫拡散二重法及び Western blotting で確認した。硫酸分画、DEAE-セルロースクロマトグラフィーのステップを経て得た IgG をペプシン消化し、F(ab') を得た。ペルオキシダーゼ標識 Fab' の調整は石川らの方法に従った。免疫組織化学方法は今川らの方法を若干修飾して行った。

ホルマリン固定凍結切片の内在性ペルオキシダーゼを H₂O₂ でブロックし、対照血清で処理後切片を先に調製したペルオキシダーゼ標識抗体と反応させ、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride で染色した。後染色はヘマトキシリンで行った。

【結果】

患者疾患筋片を Hematoxylin-Eosin 染色及び Gomori-Trichrome 法で染色したところ、筋線維の大小不同、間質の増加、中心核の増加などの筋病変と共に、内容に塩基好性物質をもついわゆる Rimmed vacuole が観察された。そこで抗カテプシン B-Fab'-ペルオキシダーゼ複合体を用いて、切片を直接法で免疫組織学染色を行った。筋肉にみられる Rimmed vacuole が強く濃染されており筋細胞そのものは background レベルの染色しかみられない。低倍率で見ると小さなものから大きな vacuole までほとんどすべての Rimmed vacuole はカテプシン B 陽性であった。抗カテプシン-Fab'-ペルオキシダーゼ複合体を用いた検査結果も同様であり Rimmed vacuole が強く染色されている。一方 TPI- α -Fab'-ペルオキシダーゼ複合体を用いての染色結果では筋細胞 Rimmed vacuole いずれも陰性であった。

【考察】

ラットの各種組織におけるカテプシン B, H 及び TPI- α , β のレベルをペルオキシダーゼ標識抗体を用いてサンドイッチ法で測定した結果では、骨格筋におけるカテプシン B 及び H の含量は極めて弱く、腎臓の約10分の1及び27分の1であった。又、正常な骨格筋細胞は抗カテプシン B あるいは H 抗体で殆ど染色されず、わずかな浸潤細胞が染色されるのみであった。ヒトにおける本症例においてもカテプシン, TPI いずれも骨格筋のサイトプラズムは background レベルの染色であり、Rimmed vacuole のみが抗カテプシン B 抗体及び抗カテプシン H 抗体によって濃染された。この結果は Rimmed vacuole が、リソゾーム由来であることを強く示唆している。塚越らは、Distal myopathy でカテプシン B & L 活性を含む多くのリソゾーム酵素活性の上昇を認めており、Rimmed vacuole が active な lysosome であり、本症の筋変性が vacuole 内で進行している可能性も考えられる。しかし、活性なプロテアーゼをもつ非常に大きな Rimmed vacuole の成因は何であろうか。肝臓では、autophagic vacuole の形成と退縮は極めて速く、約10分の半減期で代謝回転しており、そのことは活発なタンパク分解を反映している。従ってリソゾームのチオール性カテプシンを阻害すると vacuoles 中のタンパク分解が抑制され、非常に多数の又、互いに癒合した大きな vacuoles が形成される。しかし、本症ではカテプシン活性が抑制されているという証拠はない。Rimmed vacuole の成因とチオール性カテプシンとの関係は興味ある今後の課題と思われる。今回の報告は一症例のみの検討であり、今後、多くの症例について検索を重ねると共に、Rimmed vacuole 中の内容物及びカテプシン群を電子顕微鏡及び免疫電子顕微鏡的に追求して、Rimmed vacuole と筋線維変性との関連を追求する必要があると思われる。

クロロキンミオパチーとリソゾーム酵素

杉田 秀夫, 佐野 元規, 石浦 章一

(国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部)

リソゾームには、細胞内蛋白質をアミノ酸にまで非限定分解するカテプシンと総称される一群の酸性プロテアーゼが存在し、その中でもチオールプロテアーゼが蛋白分解の主役とされている。リソゾームは細胞内蛋白質の主要な分解の場と考えられているが、筋細胞においては正常状態ではリソゾームの発達が乏しいとされている。

病的な場合、例えばデュシャンヌ型筋ジストロフィー及び塩酸ピピバカインによる実験的ミオパチーにおいては、筋細胞それ自身よりも浸潤してくるマクロファージのリソゾームが主役となり筋蛋白分解が完了することが想定されている。一方 Rimmed vacuole (RV) を伴う distal myopathy においてはマクロファージの浸潤は例外的で、筋細胞内に多数の autophagic vacuole (autophagosome と autolysosome の総称) の出現があり、autophagy の亢進状態が想定されている。

細胞質や細胞小器官が膜によって包み込まれ形成された autophagosome はリソゾームと融合して autolysosome に変換され、この中で取り込まれた物質の分解が行なわれている。これら一連の生物学的現象は autophagy と呼ばれている。autophagy の制御機構あるいは生理的意義については、従来不明な点が多く、最近になってようやく、細胞内蛋白分解に関する生化学的研究が活発になり autophagy の誘起に関する知見が集積されるようになった。アミノ酸欠乏やグルカゴンによって誘起される細胞内蛋白質の分解亢進は autophagy によることが明らかになってきた。RV を伴う distal myopathy は、筋細胞における autophagy の亢進状態と理解することが可能であろう。

我々は RV を伴う distal myopathy のモデルとして、クロロキンをラット腹腔内に連日長期間投与することにより RV を伴うミオパチーを作成し、autophagy の亢進状態をつくり出し生化学的に検討を加えたので報告する。

クロロキンを長期間投与すると筋細胞及び肝細胞に autophagosome の出現が多数観察され、筋肉のホモジェネートでは正常コントロールに比較してカテプシン B 及びカテプシン B & L が著明に上昇していた。肝細胞を subcellular fractionation して各分画のリソゾーム・チオールプロテアーゼ活性を測定するとリソゾーム-ミトコンドリア分画 (LMfr) で正常コントロールと比較して著明な上昇があり、中でもカテプシン B の上昇が著明であった。LMfr から Percoll による密度勾配法でリソゾームを分離すると正常のリソゾームよりも比重の軽いところにカテプシン B & L の活性の peak があり、しかも正常よりも上昇していた。この fraction は電顕的に autophagosome よりなる事が確認された。すなわち autophagosome は酸性加水分解酵素をもち autolysosome であると判定された。

次に大熊らの方法により fluorescein-isothiocyanate dextran (FITC-dextran) を用いてリソゾーム内の pH を測定した。FITC-dextran の蛍光強度が pH により大幅に変化することを利用してあらかじめ FITC-dextran を取り込ませたリソゾーム内の pH を測定した。

クロロキン長期投与により pH には上昇が見られず、正常コントロールと差がなかった。

クロロキンは細胞内での作用部位として、リソゾーム内で塩基 (base) として働き pH を上昇さ

せるといわれてきた。しかし長期投与の結果では pH には変化がなく、クロロキン長期投与により出現する autolysosome はクロロキンの pH 上昇効果に抵抗性であるといえよう。

従って筋細胞内でも、多数の autolysosome 内で活性が上昇したカテプシン B をはじめとするチオールプロテアーゼにより蛋白分解が充分行なわれているものと考えられる。Autolysosome がどのような機序で induction されてくるかは不明であるが、RV を伴う distal myopathy においても autophagic vacuole は筋萎縮に関与しているものと考えられる。

現在我々はチオールプロテアーゼインヒビターである E-64-d によりクロロキンミオパチーの発症及び進行が抑えられるか否かを検討中である。

1 表面膜

若山吉弘

(昭和大学藤が丘病院神経内科)

江橋・杉田ら (J Biochem 46:103, 1959) により発見された進行性筋ジストロフィー症患者血清 CK 値の高値, Sibley と Lehninger (J Natl Cancer Inst 9:303, 1949) により偶然発見され, Dreyfus ら (J Clin Invest 33:794, 1954) により確立された本症における血清 aldolase 値の上昇などより本症では何らかの leaky muscle plasma membrane が存在する可能性が示唆され, 馬渡・高木ら (Arch Neurol 30:96, 1974) により Duchenne muscular dystrophy (DMD) の筋細胞膜の adenyl cyclase 活性の epinephrine や sodium fluoride に対する反応も正常筋とは異なることが報告されていたが, 形態学的に筋表面膜の異常を証明したのは Mokri と Engel (Neurology 25:1111, 1975) の DMD 生検筋細胞膜についての報告が最初である。彼等は DMD 生検筋の glutar aldehyde, OsO₄ 2 重固定 epon 包埋標本の厚切り切片を位相差顕微鏡で観察すると筋線維の表面に底辺を置き多くは楔状をした筋原繊維の疎しょう化した部分がみられ, これを δ -lesion と呼んだ。この部の電顕的観察では筋線維の基底膜は保たれているものの筋細胞膜の部分的消失とその内部の微細構造の変化を見出しこのような変化は本症生検筋線維変性の初期変化であろうと考えた。彼等は同時に電顕細胞化学的研究にて筋細胞膜の欠損部分を通じて δ -lesion への peroxidase の流入を証明した。Bradley と Fulthorpe (Neurology 28:670, 1978) は peroxidase より拡散しやすい染色剤 Procion yellow が DMD 生検筋では対照筋に比し明らかに多くの筋線維に入ったことから DMD では sarcolemma に何らかの異常のあることを示唆した。DMD 生検筋細胞膜の部分的消失は Carpenter と Karpati (Brain 102:147, 1979) や 埜中・杉田 (神経進歩 24:718, 1980) も報告しており, またこのような変化は preclinical DMD 生検筋でも認められている (Wakayama Y et al, Neurology 33:1368, 1983)。次に DMD 生検筋細胞膜の残存部分ないし透過電顕的に正常と思われる部分の structural integrity が正常かどうか問題となる。Bonilla ら (Ann Neurol 4:117, 1978) は筋細胞膜表面に sugar residue として出ている concanavalin A の receptor の分布を電顕細胞化学的に検討し DMD では対照筋に比しこの分布が不規則であることを示した。これは Dubowitz 一派の Capaldi ら (J Neurol Sci 63:129, 1984) により確認された。さて Branton (Proc Natl Acad Sci USA 55:1048, 1966) により開発された freeze fracture 法は細胞膜内部の分子構築を観察するのに最適の手技である。細胞膜は -110°C , 真空度 $4 \sim 6 \times 10^{-7}$ Torr の条件で割るとその疎水性の内面で裂け細胞質側 (P 面) と細胞外腔側 (E 面) の 2 葉の断面が出来る。Schotland ら (Science 196:1005, 1977) は 8 例の DMD 生検筋で 6 例の対照筋に比し筋細胞膜内粒子の明らかな減少を報告したが, Ketelsen (Recent Advances in Myology, Excerpta Medica, 1975, pp446-454) は 1 例の筋ジストロフィー症で膜内粒子の増加を報告し, 吉岡ら (J Electron Microsc 26:103, 1977) も 1 例の DMD で対照より膜内粒子の増加を報告したので, Schotland ら (Acta Neuropathol 54:189, 1981) は更に詳しく DMD 7 例, myotonic dystrophy 5 例, facioscapulohumeral (FSH) dystrophy 5 例の生検筋細胞膜構築を研究した。DMD では P 面, E 面とも有意の膜内粒子及び orthogonal array の減少を認め, FSH では orthogonal array の減少のみ認め, myotonic

dystrophy では異常はみられなかった。Ketelsen (Muscular Dystrophy Research Advances and New Trends, Excerpta Medica, 1980, pp79-87) は 2 例の DMD で追試し Schotland らの所見を確認し加えて caveolae 密度の増加を報告した。

Bonilla ら (Am J Pathol 104 : 167, 1981) も 6 例の DMD と 5 例の対照で caveolae 密度の有意の増加を認め Fischbeck ら (Ann Neurol 13 : 532, 1983) は DMD 生検筋細胞膜の cholesterol 含量の増加を、また若山ら (Neurology 35 : 1313, 1984) は DMD 生検筋で orthogonal array 密度の減少とその subunit particle 密度の減少を報告した。納ら (Neurology 31 : 972, 1981) は DMD 培養再生筋で対照との間に膜内粒子の有意の差を認めておらず、今後は 1) DMD 生検筋のどの筋線維成熟段階で異常が出現するか 2) DMD 生検筋にみられる所見は DMD に特異的かどうか 3) 実験的に DMD 生検筋にみられる所見が作製可能かどうかなどを検討することにより、この筋細胞膜異常の本症の病態に及ぼす影響のより正確な把握が可能となるものと考えられる。

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) 生検筋における 膜異常の問題点—表面膜と NK 細胞

佐藤 猛*, 荒畑喜一*, A.G. Engel**

(順天堂大学脳神経内科*, Mayo Clinic**)

【目的】

Mokri B, Engel AG ら (1975, *Neurol*, 25:1111) は, DMD の初期病変として non-necrotic muscle fiber に筋形質膜欠損のあることを見出し, その重要性を報告した. その後 Carpenter S, Karpati G ら (1979, *Brain*, 102:147) は, 筋形質膜の微小欠損が修復されずに放置された場合, 当該筋は壊死に陥ることを指摘している. これら DMD における膜異常説の生化学的側面は, 杉田・石浦 (1980, *神経進歩*, 24:821) などにより明らかにされて来た.

一方, Natural Killer (NK) 細胞は, 何らかの異常細胞, たとえば腫瘍細胞, ウイルス感染細胞, 血液幹細胞や胎児線維芽細胞の一部に対して, これを早期に認識し破壊する能力を持つことで知られている. 最近この NK 細胞による標的細胞破壊機序として, Tubular complex による微小孔 (5~16nm) の形成が注目されている (Podack ER ら:1983, *Nature*, 302:442). Fidzianska A ら (1984, *Neurol*, 34:295) は, ヒト胎児 DMD と考えられた症例を電顕的に観察したところ, Killer cell の浸潤による筋障害過程の存在する可能性を示唆する, 興味深い所見を得て報告している. さらにジストロフィー・マウス (C57BL/6J) による動物実験では, ジストロフィー・マウスの各種リンパ組織 NK 活性が, 対照群に比較して明らかに高いことが報告されており (Semple JW ら:1984, *Clinical Immunol Immunopath*, 33:144), とくに生後 8~10週目で胸腺萎縮と強い筋崩壊のあらわれる時期に一致して, 最も高い NK 活性が見られたことは注目される.

われわれは, これまでヒト・リンパ球に対する各種のモノクローナル抗体を用いて, 各種のミオパチー骨格筋中に出現する浸潤単核細胞の解析を行なって来た (Arahata K, Engel AG:1984, *Ann Neurol*, 16:193). そして58年度の本研究班において, DMD 筋 (non-necrotic) 中に出現する浸潤単核細胞は主として T8⁺T 細胞 (cytotoxic/suppressor) 及びマクロファージからなること, さらに少数ながら NK 細胞マーカーとされる Leu 7 抗原陽性細胞の混在することを報告した. 実験的には, NK 細胞が一つの標的を破壊するには一個で十分であるし, NK 細胞はリサイクリングして, 次なる標的細胞破壊に関与することが知られているのでたとえ量的に少なくとも, その病因的な意義は看過し難いと考えられる. その意味からも, DMD における NK 細胞の役割を解明してゆくことは, 本疾患の発症機構の一端を知るうえで, きわめて重要であると思われる. 今回われわれは, その第一歩として, DMD 筋内に出現する NK 細胞の定量的解析を進めて来たのでここに報告する.

【対照】

DMD 8 例の生検骨格筋。

【方法】

各々の生検筋に含まれる筋線維総数、浸潤細胞総数と、そのサブセット別、部位別出現頻度を定量した。Leu 7, Leu 11 (NK 細胞マーカー) 及び Leu 4 (T 細胞マーカー) による免疫染色は、直接又は間接蛍光抗体法にて実施。壊死筋線維はトリクローム染色及び C5_b-9 complement membrane attack complex (MAC) にて同定。マクロファージは酸性フォスファターゼ強陽性、Mo-1抗原陽性細胞として同定した。いずれも2 μ 連続凍結切片を用いた。

【結果】

8 例の筋線維総数は34,151本 (1714~7357: \bar{x} =4269)。壊死筋線維比率は1.55% (0.25~3.46)。非壊死筋線維のうち直接細胞浸潤を受けているものは0.28% (0.05~0.80) であった。Endomysium に出現した Leu 4⁺, Leu 7⁺, Leu 7⁺4⁻, Leu 11⁺ 及び Leu 11⁺4⁻ 細胞数は、それぞれ筋線維1000本あたり73 \pm 25, 15 \pm 10, 2 \pm 1, 0.7 \pm 1.0, 1.0 \pm 1.0 (SD) であった。

【考察】

われわれの結果からは、最も強力な NK 活性を有するとされる Leu 11⁺7⁻4⁻ phenotype は少なかったこと。逆に弱い NK 活性を示す Leu 7⁺11⁻4⁺ phenotype が、より優位であることが示された。このことは DMD 筋障害過程における NK 細胞の関与が、多発性筋炎における抗原特異的 T 細胞のそれとは異なることを示唆する。今後これらの preliminary なデータをさらに整理する必要性が残されているとともに、質的な解析の手段として、免疫電顕的検索を考えており、現在準備中である。

筋小胞体機能

高木 昭夫

(国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部, 虎の門病院神経内科)

筋小胞体 (SR) はミクロゾームに相当する筋細胞内部膜である。カルシウムイオン (Ca) を SR 内腔に摂取し、筋を弛緩状態にする。また表面膜興奮にともなって Ca を放出し筋収縮の引金となる。このように SR は興奮・収縮連関の中心的役割を担っている。デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の膜異常仮説あるいは Ca による筋障害説の立場から、1967年から本症の SR 機能が注目されだした。しかし DMD の SR 異常に関してまだ定説には到達していない。近年骨格筋 SR の Ca 遊離異常として、悪性高熱症 (MH) が注目されている。MH では Ca 誘発性 Ca 遊離が活性化されやすいといわれる。DMD にも悪性高熱の併発が報告された。この視点からも DMD の SR 機能を検討した。

1. 分離筋小胞体 (FSR)

筋ホモジェネートから超遠心法を応用して SR 分画が調製される。FSR 標本を使用して DMD における Ca 摂取能の低下が相次いで報告された。SR 膜組成の分析では、定性的異常はない。量的にはレシチン含量の低下や Ca-ATPase 蛋白の減少が指摘された。病的筋材料から得られる FSR の純度が問題となろう。上述の変化は SR 膜以外の膜成分の混入により説明可能であろう。事実筋ジスト動物モデルを使用して、比較的高純度の FSR で分析が行なわれた。この場合には SR 機能障害は少ないとされた。

2. スキンドファイバー法

DMD の生検筋より単一筋線維を分離してその機能が分析された。まず収縮系に関して Ca 濃度と発生張力の関係を調べた。低濃度の Ca による張力発生は DMD で有意に増加していた。SR の Ca 摂取能はカフェイン拘縮の大きさを指標にして比較した。この指標は同年齢対照との比較で差をみとめなかった。このように収縮力の保持された筋線維において SR の Ca 摂取能は正常と考えられた。

3. Ca 遊離の問題

正常筋の興奮・収縮連関において Ca 遊離がどのように調節されているかはまだ知られていない。実験的には Ca 遊離をきたす数種の機序が知られている。我々はカフェインによる Ca 遊離あるいは Ca 誘発性 Ca 遊離を DMD スキンドファイバーを使用して分析した。カフェインによる Ca 遊離は DMD で亢進していると推定された。しかし ATP を除去した条件下では Ca 誘発性 Ca 遊離の亢進は認められなかった。カフェイン拘縮の異常亢進は MH 回復者で観察される現象である。DMD 患者にときとして MH が併発する事実を支持している。DMD でも Ca 誘発性 Ca 遊離の異常を推定しているがまだ確実ではない。

1つの問題は Ca 遊離異常の DMD 病因上の意義であろう。30%の DMD 症例にはカフェイン拘

縮の異常は観察されない。疾患特異性の低いことを考慮すると、筋変性に伴う2次的現象と考えられる。ただ変性早期に出現する可能性が大きく、その発生機序は興味深い。筋変性の進展における役割も重要と思われる。

分 担 研 究 報 告

目 次

I. 臨床・臨床病理

- 1) 先天性多発性関節拘縮症の病因に関する病理学的研究…………… 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) mdx マウスの坐骨神経所見 …………… 39
鳥取大学医学部脳研神経病理 中 村 晴 臣
- 3) DMD の脊髄前角——ALS の最近の知見を踏まえての再検討 …………… 42
国立療養所下志津病院神経内科 中 野 今 治
- 4) (1) 諸種神経筋疾患における筋病変の各論的特性と
臨床的意義について…………… 47
——1340例の検討結果——
東京都立神経病院 田 辺 等
- 4) (2) Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーの 1 例…………… 55
東京都立神経病院 田 辺 等
- 5) (1) 特異な先天性ミオパチーの 1 例…………… 60
東邦大学医学部第四内科 木 下 真 男
- 5) (2) 筋緊張性ジストロフィー症のカルシウム代謝異常に関する研究…………… 63
東邦大学医学部第四内科 木 下 真 男
- 6) Oculopharyngeal muscular dystrophy の筋病変
——rimmed vacuole 型 distal myopathy との比較検討 …………… 67
筑波大学臨床医学系神経内科 中 西 孝 雄
- 7) (1) Duchenne 型筋ジストロフィー症の脳 NMR 画像の分析 …………… 71
鹿児島大学医学部第三内科 納 光 弘
- 7) (2) Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DM) の骨格筋の超音波,
X線-CT, NMR (MRI) 画像に関する研究, ならびに
その carrier detection への応用 …………… 74
鹿児島大学医学部第三内科 納 光 弘
- 7) (3) Duchenne 型筋ジストロフィー症の臨床細胞遺伝学的研究 …………… 79
鹿児島大学医学部第三内科 納 光 弘

- 8) Duchenne 型筋ジストロフィー症における交感神経機能異常について
 ——心電図所見から——82
 国立療養所筑後病院 馬 渡 志 郎

II. 組織化学・微細形態

- 9) (1)凍結乾燥切片を用いた微量定量組織化学
 —— CA-IIIの筋線維レベルでの定量化の試み——87
 北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門 田 代 邦 雄
- 9) (2)神経筋疾患における Ultrasound imaging
 —— CT 所見および筋生検所見との関連について——90
 北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門 田 代 邦 雄
- 10) 骨格筋パラフィン包埋切片での muscle specific enolase および
 carbonic anhydrase III 染色による fiber type 識別の試み96
 名古屋大学医学部第一内科 杉 村 公 也
- 11) (1)筋ジストロフィーチキンの形態学的初期変化：
 酵素組織化学的検討99
 九州大学医学部脳研神経内科 後 藤 幾 生
- 11) (2) Kearns-Sayre-Shy 症候群の検討
 ——末梢神経障害を伴った症例——104
 九州大学医学部脳研神経内科 後 藤 幾 生
- 12) 培養下における正常及び筋ジストロフィー鶏の T-system の
 微細構造
 ——タンニン酸染色による検討——109
 東京医科歯科大学医学部神経内科 塚 越 廣
- 13) (1) Becker 型筋ジストロフィーにおける神経筋接合部の電顕的観察113
 金沢大学医学部神経内科 福 原 信 義
- 13) (2) Cytoplasmic body myopathy の臨床的, 病理学的研究117
 金沢大学医学部神経内科 福 原 信 義
- 14) 福山型先天性筋ジストロフィー症の筋細胞膜の変化について
 ——I. Freeze fracture 法による caveolae 密度の検討——122
 昭和大学藤が丘病院神経内科 若 山 吉 弘

III. 膜, カルシウム, Creatine Kinase

- 15) Toxin-アフィニティーによる骨格筋形質膜の分離法129
自治医科大学小児科 桃井真里子
- 16) インタクト赤血球からの PPI 抽出分離法と
筋ジストロフィー症赤血球への応用.....133
国立武蔵療養所神経センター 吉田瑞子
- 17) Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の筋小胞体機能
(続報)137
国立武蔵療養所神経センター 高木昭夫
- 18) (1) Kearns-Shy 症候群と類似した臨床症状を呈した
神経原性筋萎縮症の 1 例.....142
宮崎医科大学第三内科 栗原照幸
- 18) (2) Ca イオン電極による筋細胞内外の Ca 濃度の測定:
マーカイン急性筋融解への応用.....147
宮崎医科大学第三内科 栗原照幸
- 19) 筋肉酵素の漏出機構 (白鼠を用いて)152
愛媛大学保健管理センター 植田啓嗣
- 20) 各種ミオパチー, 心筋梗塞および健常人の運動負荷における
ミオグロビン (Mb) とクレアチンキナーゼ (CK) の血中への
流出パターン.....157
徳島大学医学部第一内科 川井尚臣
- 21) (1)カルモデュリン免疫ラットの神経筋に関する研究.....164
金沢大学医学部神経内科 高守正治
- 21) (2)組織培養法による受容体蛋白代謝回転とプロテアーゼ,
プロスタグランジンに関する研究.....170
金沢大学医学部神経内科 高守正治
- 21) (3)筋ミトコンドリア異常を伴う 2 種の特異な
筋病態について.....174
金沢大学医学部神経内科 高守正治

IV. エネルギー代謝他

- 22) (1)ジストロフィー鶏発育早期における活性酸素関連諸酵素
および解糖系酵素の異常について……………183
自治医科大学神経内科 水野美邦
- 22) (2)ワゴスチグミンによる agonist induced myopathy の
形態的研究……………189
自治医科大学神経内科 水野美邦
- 23) (1)固定・筋ジストロフィーの筋の glucose uptake ……192
信州大学医学部第三内科 庄司進一
- 23) (2) Nemaline myopathy の筋構造蛋白 ……197
信州大学医学部第三内科 庄司進一
- 24) 筋収縮のエナージェティクス
——³¹P NMR 法による筋ジストロフィー症病態の研究—— ……203
大分医科大学生理 山田和廣
- 25) ミトコンドリアミオパチーの生化学的研究：scanning organ
spectrophotometer による白血球電子伝達系の検討……………208
新潟大学脳研究所神経内科 宮武正
- 26) 生体内におけるクレアチンの代謝経路：¹⁴C-クレアチン腹腔内
注射（ラット）にみられる尿中への¹⁴C-尿素の排出……………213
冲中記念成人病研究所 紫芝良昌
- 27) (1)ミトコンドリア・ミオパチー：酵素学的診断法の確立……………218
順天堂大学医学部脳神経内科 佐藤猛
- 27) (2) Duchenne 型筋ジストロフィー症 (D.D.) 生検筋における
KINK 細胞の定量的解析 ……222
順天堂大学医学部脳神経内科 佐藤猛
- 28) (1)筋糖原病の病態分析
——糖原病VII型における高尿酸血症の成因——……………226
大阪大学医学部第二内科 垂井清一郎
- 28) (2) Kearns-Sayre 症候群における coenzyme Q₁₀ 代謝と
coenzyme Q₁₀ 療法の検討……………230
大阪大学医学部第二内科 垂井清一郎

- 29) 核内 non-histone 蛋白の局在と染色体との関連
 1) アクチン様蛋白の検討.....237
 東京大学医学部脳研神経内科 萬 年 徹

V. 遺伝子

- 30) 筋ジストロフィー症遺伝子の単離の試み.....243
 東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部 鈴木 紘 一

VI. 筋再生

- 31) ジストロフィーハムスターと正常ハムスター間の筋の交換移植
 についての研究 (第3報) および mdx マウスの骨格筋のヌード
 マウスへの移植についての研究.....249
 帝京大学医学部第一内科 寺 尾 寿 夫

- 32) 筋疾患における myosatellite cell の研究253
 大阪医科大学第一内科 茂 在 敏 司

- 33) 実験的再生筋における筋芽細胞増殖因子の研究.....258
 東北大学医学部脳研神経内科 高 瀬 貞 夫

- 34) 筋衛星細胞活性因子の検討.....262
 国立長野病院 小 口 喜三夫

VII. 蛋白代謝

- 35) 筋ジストロフィー鶏胚の交感神経筋における蛋白質合成能の
 特異性についての研究 (第一報)267
 東京都神経科学総合研究所神経生化学 堀 眞一郎

- 36) Rimmed Vacuole を伴う Distal Myopathy における
 カテプシン B 及び H の局在.....271
 徳島大学医学部酵素研酵素化学 木 南 英 紀

- 37) 白血球放出因子による筋崩壊機構の研究.....275
 国立療養所宇多野病院臨床研究部 斎 田 孝 彦

- 38) 実験的クロロキンミオパチー
 ——autolysosome の形態学的・生化学的検討——278
 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部 杉 田 秀 夫

39) Duchenne 型筋ジストロフィー症の筋変性壊死機構
に関する形態並びに生化学的検討.....283

熊本大学医学部第一内科 荒 木 淑 郎

I . 臨床・臨床病理

1) 先天性多発性関節拘縮症の病因に関する 病理学的研究

埜 中 征 哉*

研究協力者 内 田 智 子* 岡 田 理 美*

先天性多発性関節拘縮症 (arthrogryposis multiplex congenita) (以下 AMC と略す) は数多くの原因により惹起される症候群である。関節拘縮といっても関節そのものには異常なく、その周囲の筋に何らかの原因があると考えられている。筋あるいは中枢神経系の病理所見より AMC は神経原性と筋原性に二大別されている。神経原性では Werdnig-Hoffmann 病との、筋原性では先天性筋ジストロフィーとの異同が問題となることがある。

我々は既知の神経筋疾患を除く12例の特発性 AMC の骨格筋を組織化学的に検索し、病因がどこにあるか推察した。さらに総腓骨神経が先天性に欠損し、ためにその支配筋が萎縮し、内反足をみる peroneal muscular atrophy (pma) マウスの病理学的検討も行い、ヒト AMC との対比を試みた。

対象・方法

1) ヒト AMC

生後3月から15歳までの12例で、平均5.7歳、男性4、女性8名であった。何れの症例も3個以上に関節拘縮があり、左右対称性であった。検索した筋は主に手術の時得られたものであるが、一部は診断のために生検した。大腿四頭筋4、上腕二頭筋4、腓腹筋3、その他1の筋に各種組織化学的染色を行い、ATPase 染色により、タイプ1、2A、2B、2C 線維を分け、その直径を計測した。

2) pma マウス

pma マウスは常染色体劣性遺伝をとり、ホモとホモからホモが得られる。内反足を示す生後2月の pma マウス5匹にネンプタールで麻酔した後、左心室より1.5%グルタール液で灌流固定し、腰髄3~5のレベルで脊髄、脊髄前根をとり出し、さらに大腿骨頭よりやや中枢の部で坐骨神経をとり出した。O₃O₄ で後固定後エボンに包埋し、1 μ 切片にトルイジンブルー染色を行い、最終倍率1000倍の写真を作成し、有髄神経数とその直径分布をみて病因がどこにあるか追求した。対照としては生後2月の同種 (CAS) マウス5匹を使用し同様の方法で検索した。

結 果

1) ヒト AMC

今回使用した筋はいずれもタイプ1、2A、2B線維が約1/3ずつモザイク状に分布することで知られている。今回の組織化学的検索で1例(非特異的なタイプ2B線維萎縮のみ)を除き全ての症例に異常を認めた。最も重症の7月女児例では Werdnig-Hoffmann 病にみられるような群萎縮を認めた(図1)。この例以外では異常の大半は筋線維タイプの分布異常であった。

タイプ2線維の完全欠損が15歳男性の大腿四頭筋で認められた(図2)。この例では同筋の筋力低下が中等度に認められたが筋線維そのものはむしろ肥大気味(80.6 \pm 8.1 μ)であった。タイプ1線維が55%以上とタイプ1線維優位(多くはタイプ1線維の群化を伴っていた)が4例、タイプ2線維優位1例であった(図3)。未分化なタイプ2C線維の増加は4例に認められた。

以上12例の組織学的、組織化学的所見をまとめ

*国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部

