

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61年度研究報告書

昭和62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臨床、病態と成因に関する研究」班が結成され、その研究活動が開始されてから本年（昭和61年）は3年目にあたり、今年をもって本研究班は一応の終止符を打つ事になります。その間不肖、私が班長として研究班のお世話をしてまいり workshop, 或いは班会議におきましてその成果がまとめられて参りました。本年度も研究報告書を完成し得ました事は、顧問の先生方、班員ならびに共同研究者各位の絶大な努力に負うものであり敬意を表したいと思えます。

本年度本報告書に集録された成果はいずれも水準の高いものであり過去3年間の成果の積み重ねにより筋ジストロフィー症の臨床、病態に関する幾つかの核心に迫る問題点が明らかにされつつあります。

本年度も筋ジストロフィー症の病因の解明、治療法の開発を待ちわびながら幾多の患児の尊い生命が失われた事に対し深い哀悼の意を表しますと共に本研究班が組織の上では終了致しますが班員個々の研究は中断する事なく続けられるべきものと思えます。

本研究班を活動の場として多くの若い研究者が本疾患研究にその情熱と意欲をかきたてて参りました事はまことに喜ばしい事であり、来年度も引続いて新しい班組織が実現される様に努力し、また関係各位の御援助を切に願うものであります。

本研究の推進に賜った厚生省、国立精神・神経センター、並びに日本筋ジストロフィー協会の深い御盡力、御支援と御理解に深く感謝致します。

昭和61年12月

〈班長〉 杉 田 秀 夫

# 目 次

昭和61年度総括研究報告	7
昭和61年度総合班会議研究報告抄録	11
分担研究報告	21
I. モデル動物・実験的ミオパチー	29
II. 臨床・臨床病理	57
III. 遺 伝	115
IV. 再生・移植・筋生理	165
V. 筋緊張症候群	189
VI. ミトコンドリアミオパチー	205
VII. 筋発育・赤血球	267
VIII. 生 化 学	281
昭和61年度研究班名簿	347

昭和 61 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61年（最終年度）の報告書である。当研究班の研究は特定のテーマを掲げて班員の英智を結集し研究の能率化と共に研究の飛躍を期待し3年間で幾つかの成果をあげる事が出来た。またこれと共に本研究班の伝統である班員各自の独創且つ自由発想を基盤とした従来の考えにとらわれない斬新な研究も推進して来た。筋ジストロフィー症の様な原因不明の疾患の解決には特にこの点は尊重されねばならない。

この報告書には昭和61年12月6日(土)、7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収録されている。

## 〔研究成果の要約〕

本年度の研究発表演題は62題であり次の7つに分類される。Iモデル動物・実験的ミオパチー5題、II臨床・臨床病理12題、III遺伝10題、IV再生・移植・筋生理4題、V筋緊張症候群3題、VIミトコンドリアミオパチー12題、VII筋発育・赤血球3題、VIII生化学13題である。

個々の研究は特に本年が研究班の最後の年でもあり何れも今後の研究を進めて行く上で重要な意義を持っているがこの中から2、3のトピックスについて述べる。

### A. 筋ジストロフィー症

欧米におけるこの方面の遺伝子工学、分子遺伝学の目ざましい進歩に伴い幾つかのDNAプローブが本邦に於ても使用出来る態勢となり数施設でデュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の遺伝子診断について発表された。DNAプローブのうち特にDr.Kunkilより恵与をうけたpERT87-1, 87-8, 87-15の3つのプローブについて日本人集団における実用性に関する検討がなされた。その結果適当な制限酵素を用いる事により日本人に於てもキャリアー同定、出生前診断が94%において可能である事がわかった。しかし一部にはcrossing overの症例もありかかるDNAプローブを用いる診断には血清CK、家系調査などを加味した総合判定が必要であると思われる。本邦における独自のDNAプローブの開発が望まれる。

## B. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症 (FSH) の病態

FSH においては筋生検所見の 1 つの特徴として壊死線維が殆んど認められないのに細胞浸潤が活発であり時に筋炎との異同が問題とされて来た。浸潤単核細胞 subset の解析の結果全例に於て血管周囲性に B リンパ球及び helper T 細胞の集積が認められた。この現象は DMD, 筋炎では認められず FSH に於ける液性免疫機序を推定させ、DMD とは本質的に異なった疾患である事を想定させる。本型の病態, 治療法開発への新しい足がかりと考えられる。

筋緊張性ジストロフィー症の生検筋に比較的高率に ragged red fiber が認められ, かかる症例では組織化学的, 並びに生化学的にミトコンドリア酵素活性が低下しており本症の病因を考える上で重要な所見と考えられる。

## C. 関連疾患

ミトコンドリアミオパチー, 乃至ミトコンドリア脳筋症は本研究班のプロジェクト研究である。

班員の協力を得てアンケート調査を行い100例の患者について臨床統計的検索が行われた。

ミトコンドリアミオパチー38例, ミトコンドリア脳筋症62例について本邦症例の臨床的特徴, 遺伝的背景, 酵素異常など系統的な検討がなされた。

ミトコンドリア脳筋症特に MELAS に関しては剖検材料を用い本型の特徴である stroke-like episode の発現に重要な意義を有すると思われる細・小動脈中臓平滑筋細胞の逆性壊死とミトコンドリアの異常集積が報告された。

昭和61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

## 多型性 DNA 断片 (RFLP) を用いる DMD の家系分析

鈴木 絃一, 秋田 朗子, 大野 茂 男

(東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部)

DNA の塩基配列の変異に基づく制限酵素断片の多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) を利用した疾病の診断がいくつかの疾患で試みられている。RFLP の検出に使うプローブは、疾患の遺伝子か、又は疾患の原因となる変異部位に出来るだけ近い位置にある DNA 断片でなければならない。L.M. Kunkel らは Xp21 領域の欠失による DMD 患者の DNA を使い、欠失部分に由来する DNA 断片 (pERT-87) を単離した<sup>1)</sup>。DMD の遺伝子はまだ同定されていないが、この DNA 断片は DMD の遺伝子領域に存在すると予想される<sup>2)</sup>。Kunkel らはこの断片から反復配列を持つ部分を除き、ユニークな配列だけを含む断片 (pERT87-1, pERT87-8, pERT87-15 など) を単離し、これをプローブにして検出した RFLP を DMD の家系分析に用い、キャリアーの検出などに極めて有効であるとの結果をえた<sup>3)</sup>。

RFLP の出現頻度は人種によってかなり違うので、欧米人集団では有効なプローブが日本人集団では有効でない場合もある。我々は Kunkel 博士から供与を受けた 3 種のプローブ (pERT87-1, -8, -15) を使い、DMD の家系分析を行い日本人集団における 87 系プローブの有効性を検討した。

ヘパリン血 (約 10ml) から調製したリンパ球から、グアニジン塩酸-塩化セシウム法で DNA を単離した。DNA 試料 (5-10 $\mu$ g) を、XmnI, BstNI, TaqI, BstXI などの制限酵素で切断したのち、アガロース電気泳動 (0.7%ゲル) で分離した DNA 断片をニトロセルロース膜に転写した。ニックトランスレーションで<sup>32</sup>P-ラベルした“87”プローブをニトロセルロース膜上の DNA 断片とハイブリダイズさせ (65°C 1 晩), 0.1X SSC で 55°C, 50 分洗浄後、オートラジオグラムを作製して結果を検討した。

多型性 DNA の出現頻度を表 1 にまとめた。欧米人と日本人集団では allele の出現頻度が著しく違うもの (pERT87-8/BstXI, pERT87-8/TaqI など) も見られたが、ヘテロ接合体の頻度は、どのプローブでも著しい人種間の差は見られなかった。

“87”プローブを使って DMD の家系分析を行った結果、87-8/XmnI と 87-15XmnI 系を使って 84% の家系が、さらにこれに TaqI, BstXI で切断した DNA 断片の検索を行うと日本人の DMD 家系の 94% (16 家系中 15) で DNA 診断が可能であった。現在までに分析した DMD 8 家系、28 例の中には“87”プローブの領域で染色体の交叉がおこった例は見られず、欧米人集団と同様、日本人集団においても“87”プローブが DMD のキャリアーの検出等に非常に有効であった。また、このプローブで BMD の家系分析も可能で、BMD と DMD の遺伝子は互いに非常に近い位置にあることが示唆された。



表1 “87”プローブで検出できる allele の出現頻度とヘテロ接合体の比率

Probe	Restriction Enzyme	Allele Frequency		Heterozygosity, %	
		American & European*	Japanese	A & E	Japanese
				Expected	(Observed)
pERT 87-1	XmnI	A. 0.66 a. 0.34	0.53 0.47 (n=70)	45	55 (53)
	BstNI	C. 0.63 c. 0.37	0.48 0.52 (n=54)	47	50 (54)
pERT 87-8	BstXI	D. 0.60 d. 0.40	0.26 0.74 (n=58)	48	38 (39)
	TaqI	E. 0.71 e. 0.29	0.38 0.62 (n=52)	42	47 (40)
pERT 87-15	TaqI	F. 0.67 f. 0.33	0.85 0.15 (n=52)	44	26 (24)
	XmnI	B. 0.68 b. 0.32	0.59 0.41 (n=70)	44	48 (50)

\* by Kunkel et al. (1986)  
number of chromosomes (n) ≥ 75

- 1) Kunkel, LM et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4778, 1985.
- 2) Monaco, AP et al., Nature, 323: 646, 1986.
- 3) Monaco, AP et al., Nature, 316: 842, 1985, L.M. Kunkel et al., Nature, 322: 73, 1986.

# FSH 型筋ジストロフィー症の病因に関する一考察

杉田 秀夫\*, 荒畑 喜一\*, 埜中 征哉\*  
石原 傳幸\*\*, 福永 秀敏\*\*\*

( \*国立精神センター神経研究所  
\*\*国立療養所東埼玉病院, \*\*\*鹿児島大学医学部第三内科 )

## 〔目 的〕

FSH は代表的な筋ジストロフィーの一型と考えられているが, 筋病理学的特徴所見として細胞浸潤の存在が知られている。これが本症の病因と関連したものか, 単に骨格筋壊死による epiphenomenon なのか, または多発性筋炎の合併と見做すべきか, 未だ結論は得られていない。

われわれは今回, 各種リンパ球表面マーカーによりこれらの解析を試み, FSH の病態機序について若干の検討を加えたので報告する。

## 〔対象および方法〕

症例は FSH18例 (男10, 女8 ; 10例に遺伝歴を認める)。年齢は 5—62歳 (平均27)。血清 Ck 値 470U/L (50-8000)。発病から筋生検までの期間は 4 カ月~29年。随伴症状に Coats's syndrome, 小脳のう胞, 脳波異常を各々 1 例ずつ見た。

病理学的検索には, 生検筋の連続凍結切片を作製し, 一般組織化学とともに, 定量的免疫組織化学法を実施した。

使用した単クローン抗体は, 抗ヒト・T11, T4, T 8, B-1, Leu 7, Leu11, Ia, HLA-1, PCA-1, および C9 などである。

## 〔結 果〕

一般病理学的所見は, 表 1 にまとめて示す。いずれも FSH として compatible と考えられた。

リンパ球を中心とした単核細胞浸潤には症例間のバラツキがかなり存在したが, 全例にこれを認めた。とくに 11例で筋線維 1,000本あたり 100個以上を, 6 例で 300個以上を数えた。

他方壊死線維数は  $1.3 \pm 0.4$  (SE) と極めて小数であった。リンパ球サブセットの解析では, T11<sup>+</sup>  $115.7 \pm 67.0$  (SE), Mφs  $27.3 \pm 9.5$ , B-1<sup>+</sup>  $2.8 \pm 1.5$ , Leu7<sup>+</sup>  $14.4 \pm 5.4$ , Leu11<sup>+</sup>  $1.4 \pm 0.8$ , T4/T8比

表 1 Summary of pathological findings

FSH Cases	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Cell infiltrates	3	3	1	1	2	2	1	2	2	3	1	1	3	1	4
Necrotic fibers	3	2	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	3	0	3
Rege. fibers	1	1	0	0	1	1	1	0	1	2	0	0	3	0	2
Variation in size	2	4	0	1	1	4	4	2	1	1	1	0	4	1	4
Internal nuclei	1	2	1	1	1	4	4	2	1	1	0	0	2	1	2
Angulated fibers	2	1	0	1	1	1	2	1	0	1	1	0	2	1	3
Connective tissue	3	4	2	1	2	3	3	1	1	3	2	2	4	1	3

0, Not found; 4, Severe

1.00±0.19であった(以上 endomysium)。また、血管周囲性の B-1<sup>+</sup> B cell の出現率は高く 23.3±1.6%を数えた。

### 〔結 論〕

FSH における浸潤細胞の特徴の第 1 は、血管周囲性に B 細胞が多数出現し DMD(B 細胞は稀)と異なる点であろう。

第 2 の特徴は表 2 に明らかな如く、FSH では壊死筋線維数が DMD の 10分の 1 程度であるにもかかわらず、浸潤リンパ球数がむしろ多いことである。

第 3 点は、多発性筋炎と異なり、FSH では非壊死筋線維内へのリンパ球の invasion が全く認められなかったことである。

これらの事実は FSH の細胞浸潤が単に筋壊死に続発したものとか、筋炎の合併によるものでは無いことを示唆する。

さらに B 細胞とヘルパー T 細胞の血管周囲への集積は、局所液性免疫反応の関与を想起せしめ興味深い所見である。

表 2 Endomysial cell counts, Frequency of necrotic muscle fibers, and Frequency of nonnecrotic fibers invaded by mononuclear cells per 1,000 muscle fibers #

CELL TYPE	MARKER	PM	DMD	FSH	FSH*
Macrophages	Ac Phos	251±70	38±5	27±9	76±17
T cells	T-11	530±140	59±7	116±67	376±218
Nec. Fibers	C9, MAC	9.3±4.1	14.8±4.4	1.3±0.5	3.8±0.5
Invaded Nonnec. Fibers		11.5±8.9	2.6±0.8	0	0

\*. FSHD with prominent cellular exudate

#, values indicate mean ± SE

### 〔参考文献〕

- 1 Arahata, K. and Engel, A.G.: Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and site of accumulation and demonstration and counts of muscle fiber invaded by T cells. *Ann Neurol*, 16: 193-208, 1984.
- 2 Engel, A.G. and Arahata, K.: Mononuclear cells in myopathies: Quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the patho-genesis of the different inflammatory myopathies. *Human Pathology*, 17: 704-721, 1986.
- 3 Dubowitz, V., Broke, M.H., et al.: *Muscle biopsy: A modern approach*. W.C. Saunders Co. Ltd., London, 1973.

## ミトコンドリア脳筋症の臨床, 病理学的検討 —MELAS と MERRF の位置付け—

宮 武 正\*, 西 澤 正 豊\*, 田 中 恵 子\*  
渥 美 哲 至\*, 大 浜 栄 作\*\*, 武 田 茂 樹\*\*  
大 原 慎 司\*\*, 生 田 房 弘\*\*

( \*新潟大学脳研究所神経内科  
\*\*新潟大学脳研究所実験神経病理 )

ミトコンドリア脳筋症に分類される疾患群に対して生化学的分析が加えられるようになるとともに, 臨床症状と生化学的に同定される障害部位とは必ずしも一対一に対応しないことが明らかとなってきた。一方, 臨床的に独立した subtype として MELAS と MERRF が提唱されているが, 文献上は両者の特徴を合わせもつとされる症例の報告があり, 分類に混乱を生じている。

最近, 我々は MELAS 2 例, MERRF 1 例を剖検にて検索する機会を得たので, これらに文献上, 剖検所見の記載された MELAS 5 例, MERRF 4 例を加えて MELAS, MERRF の臨床的, 病理学的特徴を検討し, ミトコンドリア脳筋症における両者の位置付けについて考察を加えた。

### 【対 象】

末尾の文献に示した MELAS 7 例と MERRF 5 例。

### 【結 果】

MELAS と MERRF には進行性痴呆, 全身性けいれん, 難聴, 筋萎縮, 脳波異常, 乳酸・ピルビン酸の高値など, 両者に共通して認められる所見も多いが, (1)発作性の頭痛, 嘔吐, (2)何らかの脳卒中様発作ないし CT 上の低吸収減の出現, (3)大脳基底核の石灰化は MELAS にも認められ, 一方(1)深部感覚障害, (2)Friedreich 様足変形は MERRF にも認められた。MERRF は著明な action myoclonus と小脳失調を主徴として myoclonus epilepsy の病像を呈していたが, MELAS では各々 1 例にのみ記載されていた。myoclonus 発作の記載は MELAS の 4 例にも認められた。

病理学的には MELAS では大脳皮質を主とする多発性の軟化巣が共通して認められたが, 自験 2 例では直径 200 $\mu$ m までの, 特にクモ膜下腔の細小動脈中膜の平滑筋細胞(外層により著明), および内皮細胞におけるミトコンドリアの著増, および同部の平滑筋細胞の壊死からなる特徴的な血管病変, すなわちミトコンドリア・アンギオパチーを確認した。一方 MERRF では小脳歯状核・皮質, 赤核, 淡蒼球, 視床下核, 脊髄後索, 脊髄小脳路等に系統的な変性像を認め, これらは MERRF の剖検例に共通した所見であり, MELAS にみられた著明なミトコンドリア・アンギオパチーの所見は認められなかった。

### 【考 察】

今回剖検例に基づいて MELAS と MERRF の特徴をまとめてみると, 両者は各々ミトコンドリア脳筋症に属する疾患群の中で際だった特徴を有していた。文献上両者の中間型が存在すると報告されて分類上の混乱をきたした理由は, それらが剖検所見に基づいたものでなかったことに加えて

2つ挙げられる。第1は MELAS の症例における myoclonus の記載である。この点は文献上の記載が必ずしも明確でなく、myoclonus の解釈にも問題が残るためと考えられ、今回の MELAS の7例でも4例に myoclonus 発作を認めており、単に myoclonus のみでは両者は鑑別できなかった。しかし、MELAS で MERRF の如き myoclonus epilepsy の病像を呈するものはなく、臨床症状の全体像の相違は明らかであった。第2は MERRF における脳卒中様発作の記載であるが、この点は今回の剖検例では確認されない。MERRF には上述の如く系統的な変性像を認めるが、MELAS にみられる多発性の軟化巣は認められない。一方 MELAS は自験2例にミトコンドリア・アンギオパチーを共通して認め、これが軟化巣に対応するものと考えられた。MELAS の症例では今後血管系の詳細な検索が重要である。

生化学的には MELAS では電子伝達系の complex I の異常によるものと complex IV の異常によるものが報告されており、我々の1例でも complex I の異常を確認した。一方 MERRF では母性遺伝を示唆する家系が多く、ミトコンドリア DNA の異常が示唆されているが、生化学的異常は未だ明らかにされていない。

#### 〔文 献〕

##### MELAS 剖検例

- 1) Shapira Y et al.: Neurology 25: 614, 1975.
- 2) Hart AH et al.: Arch neurol 34: 180, 1977.
- 3) Kuriyama M et al.: Neurology 34: 72, 1984.
- 4) Mukoyama M et al.: J Neurol 233: 228, 1986.
- 5) Nishizawa M et al.: J Neurol Sci in press.
- 6) 田中恵子ら：臨床神経26：1190，1986.

##### MERRF 剖検例

- 1) Fukuhara N et al.: J Neurol Sci 47: 117, 1980.
- 2) 中野隆雄ら：脳神経34：321，1982.
- 3) Fukuhara N: in Mitochondrial pathology in Muscle Diseases (Ed by G. Scarlato et al.) Piccin Medical Books, 1983, pp89.
- 4) Sasaki H et al.: Neurology 33: 1288, 1983.

# ミトコンドリア電子伝達系酵素欠損症におけるサブユニット異常

小澤 高将, 田中 雅嗣, 多田 真瑛子,  
鈴木 寛, 錦見 盛光

(名古屋大学医学部生化学第二講座)

ミトコンドリア・ミオパチーには、乳児期に著しい高乳酸血症や呼吸不全を来し死に至る重症例、幼児期に発育遅滞、知能低下、高乳酸血症、脳卒中様発作などを呈し次第に重篤となる症例、大人になって筋力低下を来し運動負荷によってのみ血中乳酸・ピルビン酸の上昇を認め症状の進行の遅い症例など、臨床的に幅広い疾患群が含まれる。我々はミトコンドリア・ミオパチーの分子的異常を解明するために、電子伝達系酵素の異常を検索する手法を開発し、多くの症例について分析を行ってきた。その結果、ミトコンドリア・ミオパチーにおける電子伝達系酵素のサブユニット欠損に特徴的な、いくつかの点が明らかになったので報告する。

## 〔結 果〕

### 1. 乳児致死型ミトコンドリアミオパチー

臨床的ならびに組織化学的にチトクロムcオキシダーゼ欠損症と診断された症例の骨格筋ミトコンドリアを分析したところ、全てのチトクロムの欠損、複合体IVのサブユニットの著しい減少に加え、ミトコンドリアのポリペプチド組成の異常が認められた。この症例ではミトコンドリア蛋白の異常が広範に存在することが示唆された。

### 2. 筋型チトクロムcオキシダーゼ欠損症

中枢神経系の異常を欠く複合体IV欠損症患者の骨格筋ミトコンドリアを分析した結果、複合体IVのサブユニットのうちミトコンドリアDNAで規定されたサブユニットIIに特に著しい低下が認められ、さらに複合体I、複合体IIIのサブユニットの減少を伴っていることが明らかになった。

### 3. MELASを呈した複合体I欠損症

心不全で死亡したMELAS患者の心筋ミトコンドリアでは、複合体Iのサブユニットの全般的減少と複合体IVのサブユニットの軽度減少が認められた。さらに、MELASを呈した別の4症例について生検骨格筋ミトコンドリアの分析を行った結果、複合体Iの活性低下がサブユニット欠損の程度に相関することが明らかになった。免疫組織学的検索により、欠損の著しい症例ほど複合体Iの免疫反応性サブユニットの異常集積した筋線維とその減少した筋線維の間の染色体の較差が大きくなる傾向が認められた。このうちの1例の剖検組織からミトコンドリアを単離し分析したところ、複合体I活性およびサブユニット量の減少程度が臓器ごとに異なっていることが明らかになった。さらに肝臓の垂ミトコンドリア粒子を用いた、複合体Iの鉄イオウ・クライスターのEPRスペクトル分析では、N-1とN-4クライスターの減少に比べN-2とN-3クライスターの減少がより著しいという結果が得られ、複合体I分子の統合性が失われていることが示唆された。

### 〔考 察〕

これらの結果から、ミトコンドリア・ミオパチーにおける電子伝達系酵素サブユニット欠損の特徴としては以下の点が指摘しうる。

a) 欠損程度の多様性：酵素欠損の著しいものほど発症が早い。従って成人発症型にもおそらく軽度の酵素欠損が存在すると推測される。

b) 臓器多様性：症例ごとに酵素サブユニット欠損の臓器分布とその程度が異なる。それぞれの臓器での酵素欠損の程度とエネルギー需要の両者がその臓器の機能に影響を与えると考えられ、これがミトコンドリア・ミオパチーにおける症状の多様性の基礎となっているであろう。

c) 酵素欠損の重複性：複合体IV欠損に複合体Iサブユニットの軽度減少が伴い、逆に複合体I欠損に複合体IVのサブユニットの軽度低下が伴う。また重症例では電子伝達系全般に欠損が及ぶ。

d) サブユニットの全般的減少：複合体Iおよび複合体IVの欠損症で、特定のサブユニットのみが単独で欠落している例はまだ見いだされていない。減少の程度に差はあるが、ほぼ全てのサブユニットの量の減少が見られる。これは、おそらく複合体の分子集合に必須な調節因子に欠陥がある結果と考えられる。

ミトコンドリアDNAの遺伝子産物は、複合体Iに7種、複合体IIIに1種、複合体IVに3種、複合体Vに2種、計13種のサブユニットとして、それぞれの酵素の中核をなしている。これまで複合体IV欠損症は多くの報告があり、複合体I欠損症も最近の診断法の進歩により報告が増加傾向にある。複合体Iと複合体IVの異常の頻度が高く、また両者の合併欠損も見られることから、ミトコンドリア・ミオパチーの原因として、ミトコンドリアDNA自身の異常ないしはその発現過程の異常が疑われる。今後、遺伝子レベルでの解明が必要であろう。

# 分 担 研 究 報 告



# 目 次

## I. モデル動物・実験的ミオパチー

- 1) 筋ジストロフィーマウス (MDX) の交感神経節における  
蛋白質合成能の特異性についての研究……………31  
東京都神経科学総合研究所神経生化学 堀 眞一郎
- 2) mdx マウス骨格筋細胞のイオン環境  
——電子線マイクロプローブ分析法による——……………37  
東海大学医学部生理学教室 吉岡 利忠
- 3) mdx マウス骨格筋収縮のエネルギーティクス ……………42  
大分医科大学生理学 山田 和広
- 4) 筋ジストロフィーモデル動物骨格筋におけるパルプアルブミンの  
量的変化について……………47  
東京医科歯科大学医学部神経内科 塚越 廣
- 5) Local tetanus 法の応用による実験的ミオパチーに関する研究……………51  
東京都立神経病院神経内科 田辺 等

## II. 臨床・臨床病理

- 6) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症保因者の MRI による  
骨格筋生物水の検討……………59  
国立療養所下志津病院神経内科 中野 今治
- 7) 無症状期 (preclinical stage) における Duchenne 型  
筋ジストロフィーの筋病理……………63  
国立<sup>精神</sup>神経センター神経研究所微細構造研究部 埜中 征哉
- 8) 顔面肩甲上腕型 (FSH) 筋ジストロフィー症に認められる  
細胞浸潤の表面マーカーによる解析……………67  
国立<sup>精神</sup>神経センター神経研究所 杉田 秀夫
- 9) 福山型先天性筋ジストロフィー症生検筋細胞膜の orthogonal  
array subunit particle density について……………71  
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山 吉弘

- 10) 福山型先天性筋ジストロフィー症生検筋細胞膜の  
cholesterol 含量について  
——Freeze fracture 法による検討—— .....76  
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山 吉弘
- 11) 福山型先天性筋ジストロフィーの大脳皮質形成異常の成立機序  
Golgi 法, 血管構築の検討及び胎児脳の形態学的検討 .....81  
鳥取大学医学部神経病理 中村 晴臣
- 12) ネマリンミオパチーの組織診断に関する知見補遺 .....86  
金沢大学医学部神経内科 福原 信義
- 13) Acute rhabdomyolysis の 2 症例  
——成因, 筋生検像, 筋電図, X 線 CT 及び MRI—— .....89  
宮崎医科大学第三内科 栗原 照幸
- 14) 遠位筋筋力低下を主症状とし筋生検にて multicore を呈した 1 例 .....96  
大阪医科大学第一内科 茂在 敏司
- 15) 神経筋疾患における Ultrasound Imaging  
——超音波顕微鏡による組織固有音響インピーダンス  
定量化の試み—— .....100  
北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門 田代 邦雄
- 16) 骨格筋 myosin ATPase 活性像の pH 依存性に関する  
臨床病理学的研究(1) .....106  
東京都立神経病院神経内科 田邊 等
- 17) Cytoplasmic body の組織化学的, 免疫組織化学的,  
並びに電顕的研究 .....110  
金沢大学医学部神経内科 福原 信義
- III. 遺伝
- 18) ドシャンヌ型筋ジストロフィー症の遺伝分析  
II. ドシャンヌ型筋ジストロフィー症の姉弟の染色体分析 .....117  
杏林大学保健学部臨床遺伝 古庄 敏行
- 19) X 染色体に数的モザイクの認められた女性 Duchenne 型  
筋ジストロフィーの 1 例 .....121  
東京医科歯科大学医学部神経内科 塚越 廣
- 20) 女性筋ジストロフィー患者における細胞遺伝学的研究 ..... 124  
東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞遺伝部門 斎藤 深美子

- 21) X<sub>P</sub> 21欠損を伴った複合グリセロールキナーゼ欠損症 (GKD) 患者及び保因者の, 神経筋病変の臨床病理学的検討  
—Clinico-pathological study of complex glycerol kinase deficiency syndrome— .....129  
国立療養所下志津病院神経内科 中野 今治
- 22) 筋ジストロフィー, 副腎低形成を伴う(乳児型)グリセロールキナーゼ欠損症の分子遺伝学的・細胞遺伝学的研究.....135  
長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設遺伝部門 新川 詔夫
- 23) 起始部欠損 SV40・DNA によるジストロフィー筋細胞のクローン化 ..142  
自治医科大学小児科 桃井 真里子
- 24) Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子診断 .....146  
国立<sup>精神</sup>神経センター神経研究所疾病研究第五部 鈴木 義之
- 25) DNA 多型を用いた Progressive Muscular Dystrophy (DMP) の linkage analysis .....150  
九州大学医学部脳研神経内科 後藤 幾生
- 26) 多型性 DNA を用いた筋ジストロフィー症の遺伝子診断.....154  
東京都臨床医学総合研究所 鈴木 絃一
- 27) 日本人 X 染色体ライブラリーよりの OTC プローブ作製の試み .....160  
金沢大学医学部神経内科 高守 正治

#### IV. 再生・移植・筋生理

- 28) 実験的再生筋における筋芽細胞増殖促進因子の検討.....167  
東北大学医学部脳研神経内科 高瀬 貞夫
- 29) 骨格筋の移植に関する研究.....173  
帝京大学医学部第一内科 寺尾 寿夫
- 30) 神経筋シナプスにおける ATP の修飾について .....178  
金沢大学医学部神経内科 高守 正治
- 31) 筋細胞内アルカリ化による筋拘縮の発生.....184  
虎の門病院神経内科 高木 昭夫

#### V. 筋緊張症候群

- 32) 筋緊張性ジストロフィーとミトコンドリア異常.....191  
鹿児島大学医学部第三内科 納 光弘

- 33) 筋緊張性ジストロフィー症のカルシウム代謝・  
副甲状腺機能異常に関する研究……………196  
東邦大学医学部第四内科 木下真男
- 34) 先天性ミオトニアの筋線維タイプについて……………200  
九州大学医学部脳研神経内科 後藤幾生
- VI. ミトコンドリアミオパチー
- 35) 本邦におけるミトコンドリアミオパチーの臨床統計(中間報告)……………207  
国立<sup>精神</sup>神経センター神経研究所 杉田秀夫
- 36) 成人型 mitochondrial myopathy の臨床的研究……………211  
東京大学医学部脳研神経内科 萬年 徹
- 37) ミトコンドリア脳筋症における睡眠時無呼吸……………215  
大阪大学医学部第二内科 垂井清一郎
- 38) ミトコンドリアミオパチー 4 症例における末梢神経の形態学的検討……………219  
筑波大学臨床医学系神経内科 中西孝雄
- 39) Ocular myopathy の四肢筋における  
ミトコンドリア異常に関する研究……………225  
順天堂大学医学部脳神経内科 佐藤 猛
- 40) ミトコンドリア・ミオパチーの免疫電子顕微鏡的研究……………230  
順天堂大学医学部脳神経内科 佐藤 猛
- 41) MELAS の臨床並びに生化学的所見……………233  
新潟大学脳研究所神経内科 宮武 正
- 42) MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis,  
and strokelike episodes) の脳血管病変：  
ミトコンドリア・アンギオパチー……………239  
新潟大学脳研究所神経内科 宮武 正
- 43) Scanning Organ Spectrophotometer による  
ミトコンドリア電子伝達系の検討……………244  
北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門 田代邦雄
- 44) MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy,  
lactic acidosis, and strokelike episodes) における  
電子伝達系複合体のサブユニット欠損……………251  
名古屋大学医学部第二生化学 小澤高将

45) ミトコンドリア脳筋症の培養骨格筋細胞のクローン化の試み……………258  
自治医科大学小児科 桃井 真里子

46) 低酸素症による筋障害に対する Coenzyme Q<sub>10</sub> の効果 ……………261  
宮崎医科大学第三内科 栗原 照幸

## VII. 筋発育・赤血球

47) インターロイキン-1 の筋細胞に対する作用 ……………269  
国立療養所宇多野病院臨床研究所神経内科 斎田 孝彦

48) 骨格筋の発達と脂質の変化……………273  
東邦大学医学部第四内科 木下 眞男

49) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球の PA  
および PPI 含量の温度変化 ……………277  
国立<sup>精神</sup>神経センター神経研究所 吉田 瑞子

## VIII. 生化学

50) Cortisone acetate の骨格筋 glucose uptake に対する影響  
——steroid myopathy の発症機序に対する検討—— ……………283  
信州大学医学部第三内科 庄司 進一

51) ラット速筋の myosin light chain リン酸化に対する  
除神経効果の検討……………287  
信州大学医学部第三内科 庄司 進一

52) 肥大筋繊維の筋蛋白特性  
——実験的 compensatory work hypertrophy との対比—— ……………291  
大阪医科大学第一内科 茂在 敏司

53) 各種筋疾患におけるフィブロネクチンの組織学的検討  
——多発性筋炎について——……………296  
自治医科大学神経内科 水野 美邦

54) グルコースオキシダーゼによる筋障害とグルタチン代謝……………299  
徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門 木南 英紀

55) 神経・筋疾患における骨格筋ミオグロビン局在の変化  
——免疫電顕による検討——……………304  
徳島大学医学部第一内科 川井 尚臣

56) Duchenne 型筋ジストロフィー症の筋変性壊死機構  
——opaque 線維の役割を中心に—— (第3報) ……………309

熊本大学医学部第一内科 荒木 淑郎

- 57) 筋ジストロフィー患者における血清 S-100<sub>α</sub> 蛋白について  
——Carbonic anhydrase III, Creatine kinase,  
Musclespecific enolase との比較検討—— .....315  
名古屋大学医学部神経内科 杉村 公也
- 58) 筋ジストロフィー症におけるクレアチン代謝異常：  
rat 培養筋細胞におけるクレアチン代謝 .....321  
冲中記念成人病研究所 紫 芝 良 昌
- 59) 筋原性高尿酸血症に関する研究  
——糠原病Ⅲ型（脱分枝酵素欠損症）における検討—— .....326  
大阪大学医学部第二内科 垂 井 清一郎
- 60) デュシャンヌ型筋ジストロフィー血清中のアミノペプチターゼ活性 .....331  
国立<sup>精神</sup>神経センター神経研究所 杉 田 秀 夫
- 61) 先天性ミオパチーの筋構造蛋白  
——Central core 病と Myotubulay (Centronuclear)  
myopathy を中心に—— .....336  
国立長野病院 小 口 喜三夫
- 62) ネマリン・ミオパチーの筋構造蛋白のモノクロナル抗体による解析 .....342  
東京大学医学部脳研神経内科 萬 年 徹

# I. モデル動物・実験的ミオパチー

# 1) 筋ジストロフィーマウス (MDX) の交感神経節 における蛋白質合成能の特異性についての研究

堀 眞一郎\*

研究協力者 杉 浦 弘 子\* 大 谷 幸 子\*  
平 林 民 雄\*\* 椿 忠 雄\*\*\*

## はじめに

筋ジストロフィーの発症の本態として、筋肉自体の異常、骨格筋の栄養神経としての自律神経の異常、筋肉組織における血管系の異常、あるいはそれらの異常の併存が考慮されている。近年、筋肉細胞自体に異常があるとの視点から、筋細胞膜、筋収縮に関与する蛋白質、及び、筋細胞の細胞成長(増殖)因子の異常について、勢力的に研究されているが、未だ決定的異常をみいだすにいたっていない。血管系の異常も不明である。自律神経の異常の関与についても検討がされているが、研究対象の生化学的解析の困難なこともあって、研究の進展は遅々としている。自律神経の骨格筋への直接支配について、長い間、論議の行なわれたところであるが、最近、証明された。しかし、筋ジストロフィーの発症における自律神経の関与は不明である。そこで、私達は、遺伝的筋ジストロフィーにおける発症の誘因が骨格筋の栄養神経としての自律神経、殊に、交感神経の異常にあるのではないかとの仮定にたって、筋ジストロフィーの実験動物モデルを使って検討してきた。研究の視点としては、1. 交感神経の興奮伝達の異常、2. 支配筋とのシナプス形成の異常、3. 交感神経細胞自身の異常の3つがあるが、私達は第3の交感神経細胞の分化、成熟及び機能維持の過程に視点をおき、これらの過程に関与する神経成長因子(nerve growth factor, NGF)との関連において検討してきた。先に、私達はニューハンプシャ

一種の家鶏の交感神経節及び脊髄神経節のNGFに対する反応性の加齢に伴う変化を検討し、脊髄神経節の反応性は正常鶏と筋ジストロフィー鶏の間に差は認めなかったのに対し、交感神経節の反応性は正常鶏に比べ、より早期に反応性が消失した<sup>1)</sup>。更に、交感神経節における蛋白質の合成能に質的差異があることがわかった<sup>2,3)</sup>。交感神経節における蛋白質の合成能における質的差異と筋ジストロフィーの発症との関連は、現在検討中であるが、発症機序の全く不明な疾患の病因の本体をつきとめるのに、類似した臨床像を呈する異種の動物モデルの間での異常の共通点をさぐることも一つの方策であると考え、今回は、筋ジストロフィーの実験動物モデルの内、最近、開発されたX染色体異常劣性遺伝の遺伝様式をもつ筋ジストロフィーマウス(MDX)の交感神経節における蛋白質合成能について、家鶏の交感神経節における蛋白質合成能との間で比較検討してみた。

## 実験方法

筋ジストロフィーマウス(C57BL/10ScSn-MDX)、及び正常対照マウス(C57BL/10ScSn)は(財)実験動物中央研究所より、雌雄それぞれ2対ずつ提供されたものを交配し使用した。生後10日の幼若マウスの上頸神経節を摘出し、交感神経節における蛋白質合成能の検索に用いた。蛋白質の合成能は昨年度の報告<sup>3)</sup>と同様、<sup>3</sup>H-ロイシンでペプチドを標識し検出したが、マウスの神経節は家鶏に比し、小さいことから、[4, 5-<sup>3</sup>H]-ロイシン(5 mci/ml)の添加量を300 $\mu$ l BGJb 培養液に対し、20 $\mu$ lに増やし、培養時間も20時間とし

\* 財東京都神経科学総合研究所神経生化学

\*\* 筑波大学生物科学系

\*\*\* 都立神経病院



た。他の条件は家鶏の場合と同様である。 $[^3\text{H}]$ -ロイシンで標識されたペプチドの分離及び検出は昨年報告したと同様に、 $5_M$ 尿素含溶解液で可溶化し、二次元電気泳動法によって分離した後、オートラジオグラフィーによって生合成された個々のペプチドの位置をX線フィルム上に検出し、差異について検討した。今回はオートラジオグラフィーを行うときのX線フィルムへの露出時間を選ぶことにより、個々のスポットの位置を詳細に検討した。即ち、標識が強いためスポット同士が重合し見分けられないものについては、露出時間を短縮することにより、個々のスポットとして検出出来る。又、標識が弱いため、検出されにくいスポットは露出時間を長くすることにより検出することが出来る。このようにオートラジオグラフィーの時の露出時間を1日から30日間の間で、変えて得た数枚のX線フィルム上のスポットを同一画面に写し取ることにより、個々のスポットの等電点と分子量の差異がより詳細に検討することが可能となった。なお、近似した位置のスポットの差異については、比較したい試料の混和物を、二次元電気泳動し、その上で、同一の位置にくるのか、あるいは分離するのかを観察することによって判定した。

### 結果及び考察

#### 家鶏（孵化後26日齢）の交感神経節の蛋白質合成能

孵化後26日齢の家鶏の交感神経節における蛋白質の合成能について、個々のスポットを写し取り、詳細に検討したところ、正常鶏で出現し、筋ジストロフィー鶏で出現しないスポットが少なくとも5個、筋ジストロフィー鶏で出現し、正常鶏で出現しないスポットが2個、アルカリ性領域で新たに見出された(図1)。家鶏の交感神経節での蛋白質合成能のこのような差異は、核蛋白の多くが塩基性蛋白であることと考え合わせるならば、遺伝子情報発現の段階での異常を考える上で興味ある変化と思われる。

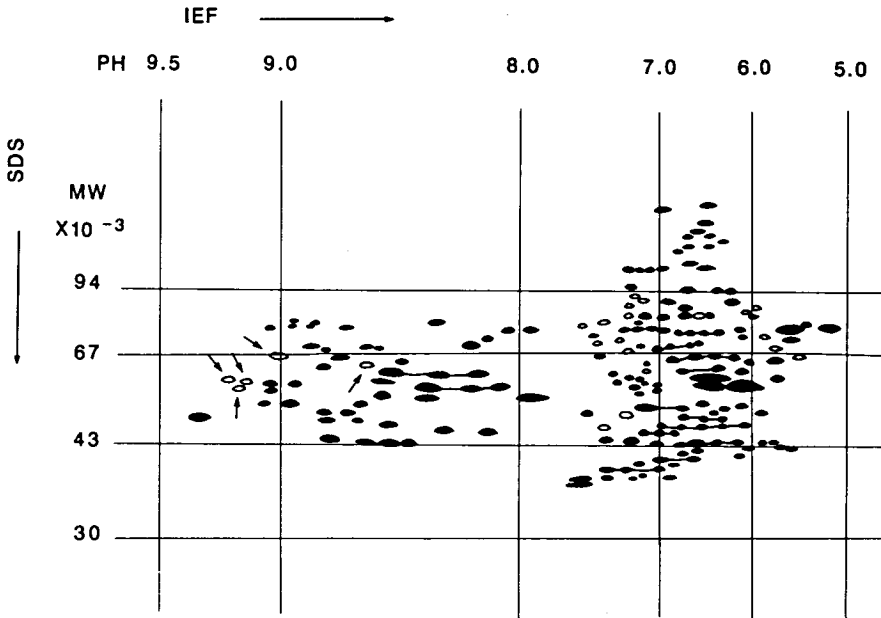
#### マウス（生後10日齢）の交感神経節の蛋白質合成能

図2は生後10日齢マウスの交感神経節で生合成された蛋白質をオートラジオグラフィーで観察した際の全体像である。正常マウスの交感神経節における蛋白質合成能(図2A)と、MDX-マウスの交感神経節における蛋白質合成能(図2B)とは、質的によく似ている。更に、その類似性を詳細に検討するため、個々のスポットの位置を写し取ったところ、正常マウスの交感神経節では448個のスポット(図3A)が、MDX-マウスの交感神経節では461個のスポット(図3B)が確認された。その内、正常マウスに出現し、MDX-マウスには出現しなかったスポットが3個、MDX-マウスに出現し、正常マウスには出現しなかったスポットが16個認められたが、これらの内、差異の確認されているのは図3の中に矢印で示したスポットで、アルカリ性領域で2個、中性領域で3個のみであった。他の14個のスポットについては極めて弱く標識されたペプチドであるため、差異の有無の判定が困難であった。MDX-マウスの場合、生後10日前後に発症するが、この時期の交感神経節における遺伝子情報の出現には、正常マウスとの間に、顕著な差異のないことを示唆している。

家鶏の交感神経節では発症前の孵化直後で既に蛋白質合成能の差異が出現し、日齢を経るにつれ、差異のあるペプチドの数が増えていった<sup>3)</sup>が、MDX-マウスの場合では、筋ジストロフィーを発症する前後の生後10日においても、差異のあるペプチドは存在したものの、家鶏の場合に比べ著しく少数であった。つまり、交感神経節での遺伝子情報発現の差異は、家鶏の場合に比べ、MDX-マウスの場合は少ないことを示唆している。このことは1つの可能性として筋ジストロフィー鶏と、MDX-マウスとの間の遺伝子の異常の違いを反映しているのであろう。

蛋白質合成能は遺伝子情報発現の結果を示している。合成能の差異をもったペプチドの内に、生理的役割の類似したペプチドを、類似の臨床像を呈する異種の動物の間で検出することにより、筋ジストロフィーを発症する動物の遺伝子上の異常が1ヶ所とは限らないとしても、筋ジストロフィーの発症に直接的に関与する異常を見つけ出すこ

A)



B)

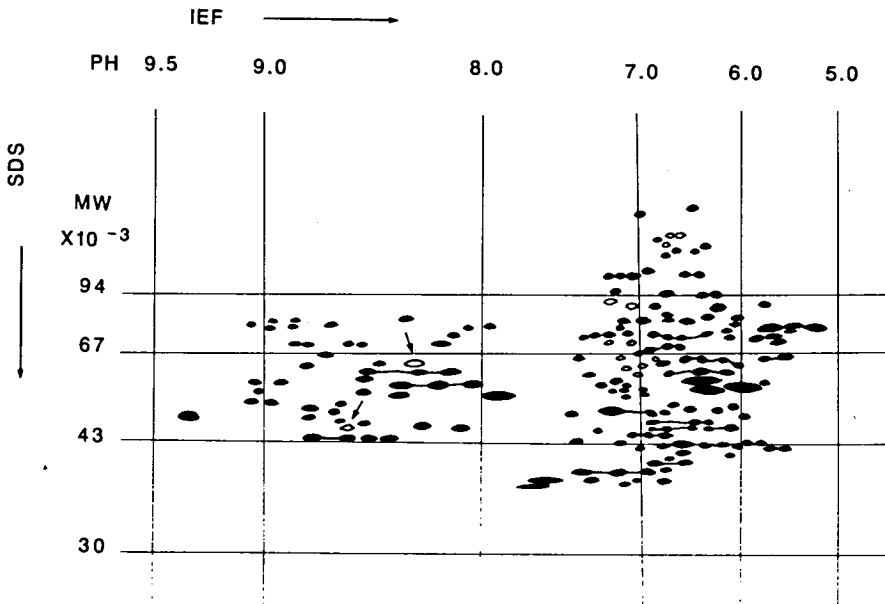


図1 孵化後の26日齢家鶏の交感神経節における蛋白質合成能。 $^{3}\text{H}$ -ロイシンで標識したペプチドを二次元電気泳動によって分離し、オートラジオグラフィーでX線フィルム上に検出した全体像の一部の領域のスポットについて、オートラジオグラフィーの時のX線フィルムへの露出時間を1日から30日の間で変え、それぞれの露出時間で検出されたスポットを同一画面上に写し取った。A) 正常鶏(412系)の交感神経節での蛋白質合成能。B) 筋ジストロフィー鶏(413系)の交感神経節での蛋白質合成能。白いスポットは正常と筋ジストロフィーの間で差異のあるもので、矢印のついたものは今回の検索で新たに発見されたものである。

