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います．

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年間の成果のつ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います．

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・小動脈中膜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

鈴木紘一，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[1]．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[2]．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，キャリヤーの検出などに極めて有効であるとの結果をえた[3]．

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（5-10μg）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^{32}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℃ 1晩），0.1X SSCで55℃，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のキャリヤ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***
(*国立精神神経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47OU/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，T8，B-1，Leu 7，Leu11，la，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±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，$T11^+$ 115.7±67.0(SE)，Mφs27.3±9.5，$B\text{-}1^+$ 2.8±1.5，$Leu7^+$ 14.4±5.4，$Lell^+$ 1.4±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⁺ 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 にのみ認められ，一方(1)深部感覚障害，(2) Friedreich 様足変形は MERRF にのみ認められた．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200μm 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，多田真瑳子，
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たし死に至る重症例，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，成人になって筋力低下を来た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．さらに肝臓の亜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ナージェティクス ……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ブアルブミンの
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
国立精神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
国立精神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_P 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
国立精神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　紘　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　眞　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
国立精神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_{10} 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
国立精神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_{ao} 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
——糖原病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
国立精神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ー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併う変化を検討し，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[1]．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[2),3)]．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㈶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[3]と同様，〔^{3}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-^{3}H〕-ロイシン（5 mci/ml）の添加量を300μl BGJb倍養液に対し，20μlに増やし，培養時間も20時間とし

＊㈶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}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い出された(図1)．家鶏の交感神経節での蛋白質合成能のこの様な差異は，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[3]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ケ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

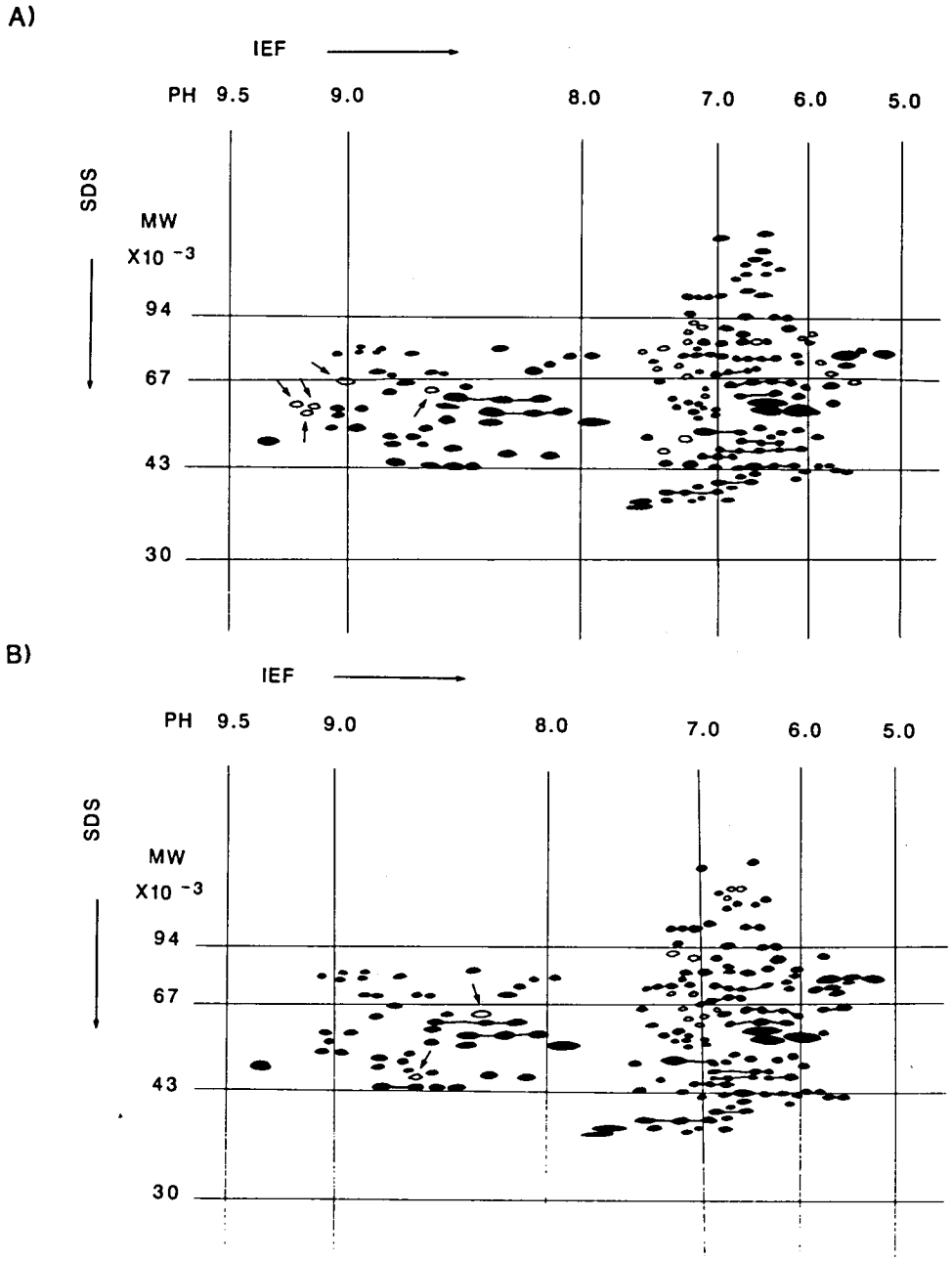


図1　孵化後の26日齢家鶏の交感神経節における蛋白質合成能．〔^{3}H〕-ロイシンで標識したペプチドを二次元電気泳動によって分離し，オートラジオグラフィーでX線フィルム上に検出した全体像の一部の領域のスポットについて，オートラジオグラフィーの時のX線フィルムへの露出時間を1日から30日の間で変え，それぞれの露出時間で検出されたスポットを同一画面上に写し取った．A）正常鶏（412系）の交感神経節での蛋白質合成能．B）筋ジストロフィー鶏（413系）の交感神経節での蛋白質合成能．白いスポットは正常と筋ジストロフィーの間で差異のあるもので，矢印のついたものは今回の検索で新たに発見されたものである．

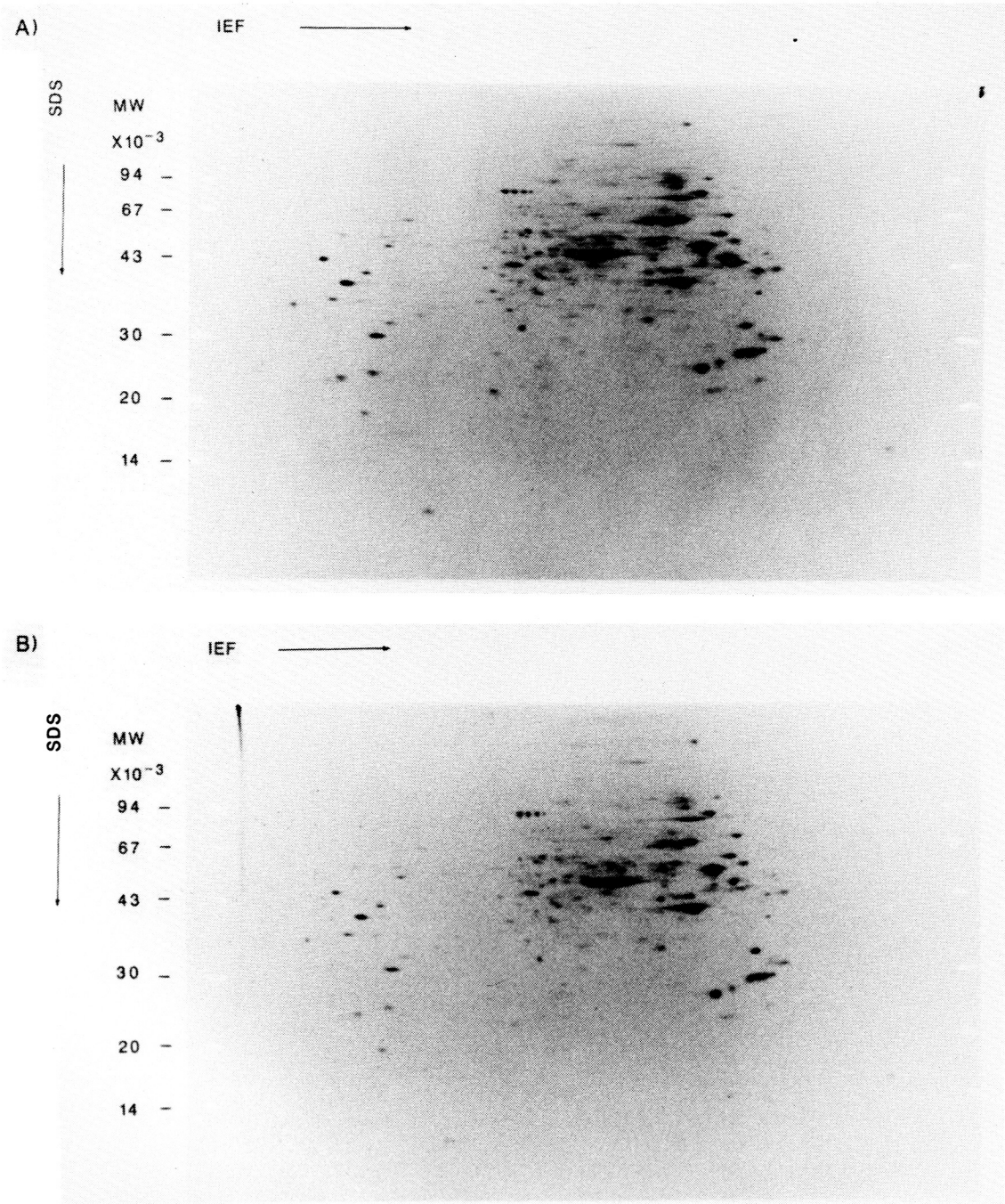
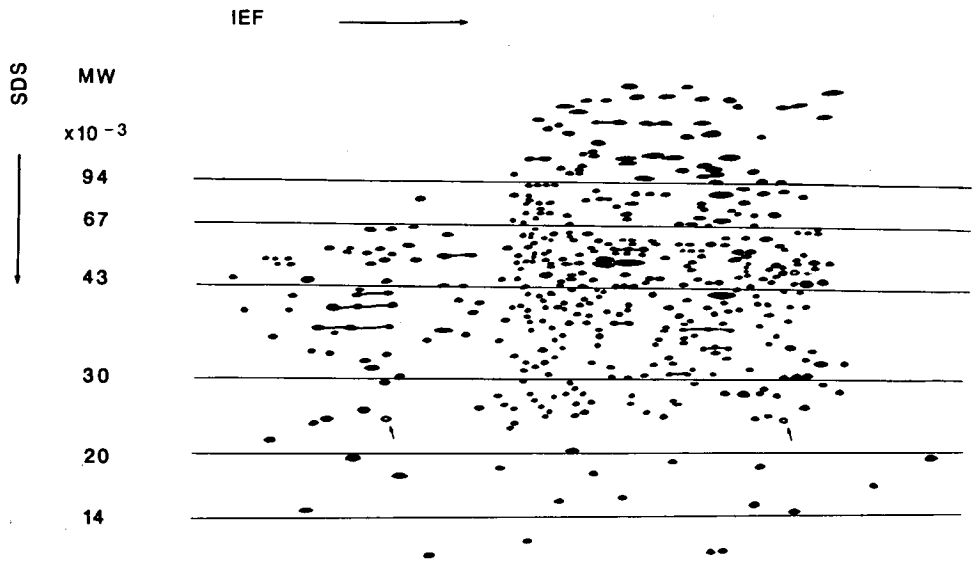


図2　マウスの交感神経節における蛋白質合成能．〔^{3}H〕-ロイシンで標識したペプチドを二次元電気泳動によって分離し，オートラジオグラフィーでX線フィルムに7日間露出して，検出されたスポットの全体像．図の左がアルカリ性側で，右が酸性側である．
A）正常マウス（C57BL/10ScSn）の交感神経節での蛋白質合成能．B）　筋ジストロフィーマウス（C57BL/10ScSn-MDX）の交感神経節での蛋白質合成能．

A)



B)

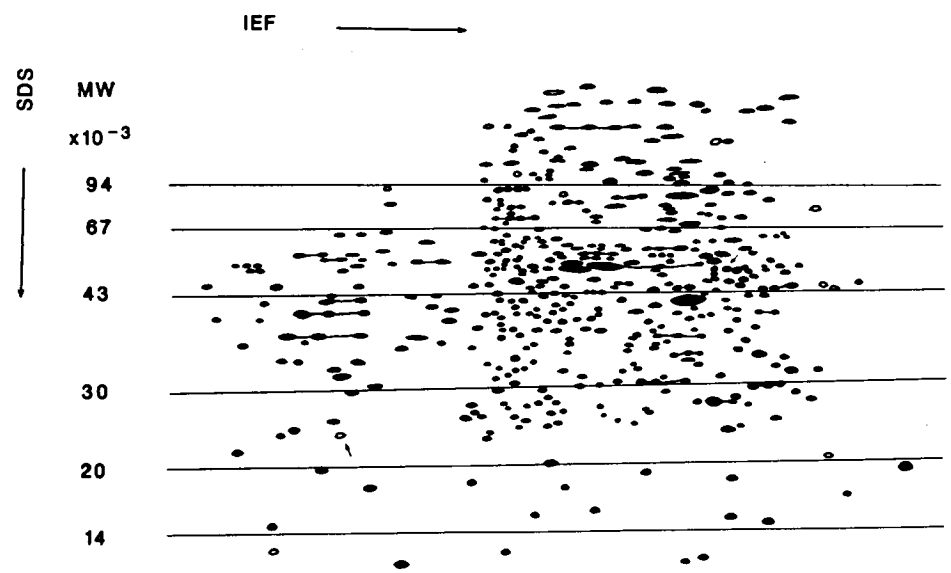


図3　マウスの交感神経節における蛋白質合成能．〔^{3}H〕-ロイシンで標識したペプチドを二次元電気泳動によって分離し，オートラジオグラフィーの時の露出時間を1日から30日の間で変え，それぞれの露出時間で検出されたスポットを同一画面上に写し取った．
A）　正常マウス（C57BL/10ScSn）の交感神経節での蛋白質合成能．B）　筋ジストロフィーマウス（C57BL/10ScSn-MDX）の交感神経節での蛋白質合成能．矢印のスポットは差異の確められたもの．無印の白いスポットは検討中のもの．

とが出来るかもしれない．

なお，先に報告した[3]様に，家鶏の場合，交感神経節における蛋白質合成能の異常が，個体発生の時期により変化することも明らかになっているので，MDX-マウスの場合にも，個体発生のいろいろな時期について検索することが必要である．

ま と め

1．交感神経節における蛋白質合成能を，筋ジストロフィー鶏とMDX-マウスについて検討した．

2．筋ジストロフィーと正常対照の動物の間に，交感神経節の蛋白質合成能に質的差異が，家鶏及びマウス共に認められたが，差異をもったペプチドは，家鶏に比べマウスの方が少数であった．

3．筋ジストロフィー鶏の交感神経節において，塩基性ペプチドの生合成異常がみつかった．

4．異種間の筋ジストロフィー動物における蛋白質合成能の質的差異の比較検討によって，筋ジストロフィーの発症に直接的に関与する遺伝子の異常が検出できる可能性を論じた．

文 献

1）椿忠雄，堀眞一郎，大谷幸子：筋ジストロフィー鶏及び正常鶏の後根神経節及び交感神経節の神経成長因子に対する反応性の加齢にともなう変化について，「筋ジストロフィー症の疫学，臨床および治療に関する研究」（祖父江班） 昭和58年度研究報告書，1984，p.558.

2）堀眞一郎，杉浦弘子，大谷幸子，椿忠雄：筋ジストロフィー鶏胚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（第一報）．「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，1985，p.267.

3）堀眞一郎，杉浦弘子，大谷幸子：筋ジストロフィー鶏胚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（第二報）．-加齢にともなう変化について-「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60年度研究報告書，1986，p.69.

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—

吉　岡　利　忠*

研究協力者　玉　木　哲　朗*　竹　倉　宏　明*　赤　塚　　明**

緒　　言

骨格筋筋細胞内の小器官および基質のイオン濃度分布を測定することは，正常筋線維の収縮弛緩機構の解明のみならず，病的状態の筋細胞の機能やその原因を極めるうえで強力な手段となる．電子プローブ微量元素分析法を用いると1個の細胞全体のイオン濃度分布のみならず，筋小胞体，ミトコンドリア，核などの小器官のイオン濃度分布を測定できる．

損傷された筋細胞では，高ナトリウム，高クロール，そして高カルシウムが測定されており[6]，カフェイン拘縮やキニーネ拘縮ではミトコンドリアにカルシウムが有意に取り込まれることを報告した[8),9]．筋蛋白が崩壊している筋ジストロフィー症の筋細胞では細胞全体に含まれるカルシウム量が議論されている．ここでは筋ジストロフィーマウスと対照マウスの骨格筋細胞について，各種イオン濃度分布を調べ，ジストロフィー筋とカルシウムイオンの関係を追求した．

実　験　方　法

実験動物中央研究所より供給された筋ジストロフィーマウス（mdxマウス）および対照マウスの長趾伸筋（EDL）およびヒラメ筋（SOL）を被検筋とした．両者の筋は腱を付けたまま摘出し，特別に工夫されたステンレス製メッシュのホルダーに固定した．液体窒素で−165±5℃に冷却した液体フレオンを用いて瞬間凍結標本を作成した．氷晶の少ない部位は，最初に液体フレオンと接触した表面から10μm以内であり[9]，凍結超薄切片は極力その部位から得るようにした（クライオトーム．LKB）．切片は銅のNo.200メッシュに載せ強制真空乾燥され，低温ホルダー，電子顕微鏡（1200 EX，日本電子），X線検出器（トレコアノーン，USA）を用い，各元素を測定した．測定された元素はNa，Mg，P，S，CI，KおよびCa(m mole/kg dry weight）であり，定量化および数値化には各種スタンダードの試薬を用い，2～4％のBSA（ウシ血清アルブミン）によって希釈されたサンプルを1種類の濃度において2ないし3個作り，X線検出器を用いてカウントした．バックグランドの比率からそれぞれの元素の濃度を定量した．これに関する詳細はSomlyo一派から詳しく報告されている[6]．

実　験　結　果

無染色の凍結超薄切片から得られた電子顕微鏡像を図1に示す．氷晶の少ない部位は液体フレオンと接触した付近であり，この写真では右上方で骨格筋の特徴である横紋構造が保たれている．左下方ではその構造が不明瞭となり，氷晶による損傷が示される．ミトコンドリアは電子密度の高いコントラストで示され，通常の電子顕微鏡写真によって得られる膜構造クリステは発見されない．A帯とI帯の接する部位に存在する筋小胞体などの膜系もこの像からは判断できない．一般に哺乳類の筋小胞体は，カエルなどの両生類に比較して小さいので，その発見は極めて困難である．

無染色切片から電子プローブを照射することによって得られる各元素のスペクトル像は，1個の

＊東海大学医学部生理学教室
＊＊東海大学医学部共利研電顕室

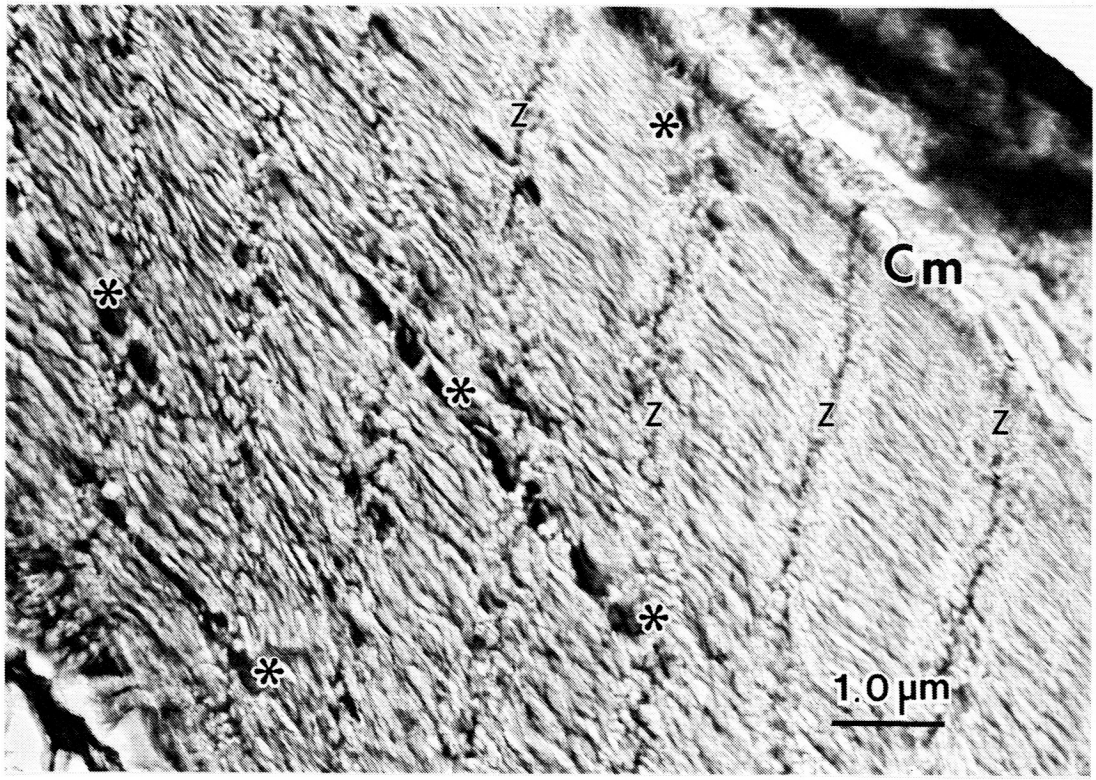


図1　無固定無染色超薄切片から得られた電子顕微鏡像.
星印：ミトコンドリア，Cm：筋鞘，Z：Z帯.

細胞全体（図2），ミトコンドリア，核（図3）などから得られた．細胞全体すなわち細胞内の各元素の濃度は，それぞれのスペクトルとして表現されるが，筋細胞では照射する電子プローブの直径によってそのスペクトルの内容が異なってくる．すなわち筋細胞の場合，筋節5～8個の大きさの直径とし，ミトコンドリアや核がそのプローブの範囲に含まれないようにしている．図2はmdxマウスの細胞内のスペクトル像であるが，低ナトリウム，低クロール，高イオウ，高カリウムのピークが示されている．カルシウムはカリウムのK_βと重複しているためにそのピークは表面に顕われてこない．すなわちカルシウム濃度は低値を示す．図の横軸（keV）の右端には銅（Cu）メッシュからのシグナルK_α，K_βのピークがみられる．

筋細胞のI帯あるいはA帯から得られるスペクトル(図3の1および2)，ミトコンドリアから得られる各元素（図3の3および4）は，1個の細胞全体から得られるものとほぼ類似している．しかし，それぞれのパターンはmdxおよびコントロール間で大きな差はない．特徴としては，前者

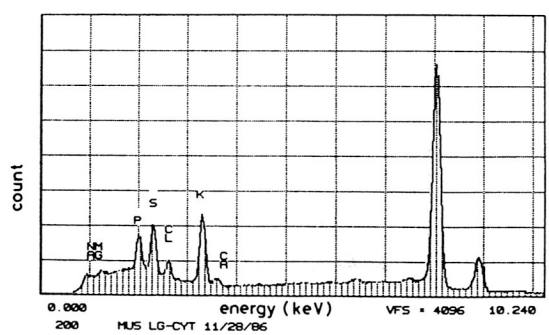


図2　mdxマウスヒラメ筋の筋細胞全体から得られた元素スペクトル像.

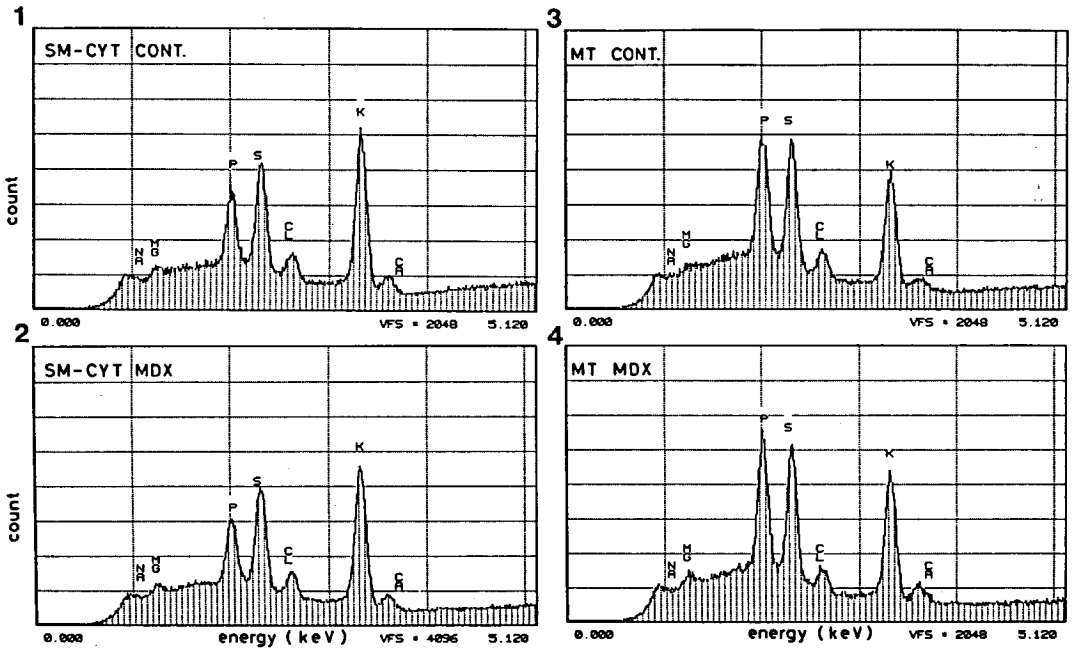


図3　mdx (MDX) および対照マウス (CONT) のヒラメ筋の筋細胞内小器官から得られたスペクトル像.
SM-CYT：収縮蛋白フィラメントの部位，MT：ミトコンドリア.

で高カリウム，低ナトリウム，低クロールが示され，ミトコンドリアでは低カリウム，高リン，高イオウである．静止している時の筋細胞のミトコンドリアではカルシウムの濃度はほとんどゼロである[6),9)].

表1には，コントロールと mdx マウス各2匹ずつの SOL から得られた分析結果である．イオウを除いた各元素の濃度が各小器官別に示されているが，コントロールおよび mdx マウス間に有意な差は認められなかった．分析された細胞は3個から8個であり，凍結状態の良いものを選ばなければならず，現時点で例数が限定された．従ってこの表には標準偏差を，カルシウムを除いて記入していない．mdx マウスでは細胞全体としてカルシウム濃度が高い傾向にあり，A帯，I帯の部位でも同様であった．ミトコンドリアにも軽度カルシウムが取り込まれている．コントロール，mdx マウスともミトコンドリアには高リンが認められたが，他のイオン濃度分布に有意な差は認められなかった．

考　　察

mdx マウスおよび対照マウスの骨格筋の瞬間凍結無染色像では，細胞内小器官の形態はこれまでの知見[9)]と同じである．例えばミトコンドリアは電子密度の高い円形あるいは楕円形として認められ，その内部にあるクリステは発見されない[6),9)]．横紋構造についても同様である．内部膜系である筋小胞体，横行小管系は発見されなかったことから，できるだけ氷晶の少ないサンプルを得て，その形態および各種イオン濃度から病的筋細胞を考察することが必要であり，今後の問題として残る．

本報告書には示されていないが，コンベンショナルな方法によって得られた電子顕微鏡像および光学顕微鏡レベルにおける酵素染色法による形態からも，mdx および対照マウスにおいて記載すべき特徴はなかった．mdx マウスでは中心核をもつ

表1　細胞内小器官から得られた元素の測定値

Elemental compositions of large-cytoplasm, small-cytoplasm, nucleus, and mitochondria in mouse skeletal muscle

	n	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca
LG-CYT								
control	3	42	55	305		75	643	5±3
mdx	5	53	45	289		81	701	8±2
SM-CYT								
control	4	55	43	354		85	653	6±2
mdx	6	65	56	325		83	689	9±5
Nu								
control	3	50	65	590		75	650	5±3
mdx	3	42	61	625		85	755	4±4
MT								
control	8	30	25	560		33	305	1±2
mdx	7	25	33	770		27	289	4±2

Mean SD mmole/kg dry weight; LG-CYT,large-cytoplasm; SM-CYT,small-cytoplasm; Nu,nucleus; MT,mitochondria; mdx,mdx mouse; control,control mouse.

多くの筋細胞と，Z帯のストリーミング，太・細フィラメントの配列のバラツキが認められたが，内部膜系はほとんど正常像が示された．今回用いたmdxマウスは生後2～3カ月でありその筋肉の構成は再生筋細胞が優位であることから，形態学的な異常所見は少ないものと考えられる．

カルシウムイオンは筋細胞の機能に種々な面から重要な役割を果しており，多くの総説も報告されている[1),4)]．筋ジストロフィー症の筋細胞内カルシウムは増加しているという報告から[4),5)]，筋蛋白の崩壊とともに各種の酵素の流出が生じている[2)]．静止時の筋細胞のカルシウム濃度は約0.1μMであるが，細胞全体では総計1 mM以上のカルシウムが含まれる[1)]．したがって，筋細胞内のカルシウム分布は一様でなく，筋小胞体にそのほとんどが蓄積されている．今回用いたジストロフィー筋では，その張力発生は対照のものと変わらないことから[3)]，大部分のカルシウムは筋小胞体に存在しているものと考える．これまでに筋ジストロフィー筋の筋小胞体の機能としてカフェインに対する感受性の違いなどが報告されているが[7)]，カルシウムイオンの総量についての知見はない．表1に示したように，細胞全体のカルシウム量はコントロールで5 mM/kg湿重量であり，ジストロフィー筋では8 mM/kg湿重量であった．細胞内には77%程度の水を含むことから算定すると，それぞれ1.1～1.2および1.8mM程度となる．フィラメント上の局所に存在するカルシウム濃度も，ミトコンドリア内の濃度もそれぞれ上昇しており，これらの傾向は1種の損傷された細胞の状態[6)]であるとも言える．例えば，物理的に損傷された細胞では，高ナトリウム，高クロールとともに多量のカルシウムがミトコンドリア内に取り込まれる[6)]．一般にミトコンドリアは静止状態でほとんどカルシウムを含まないと報告されている[6)]．

筋ジストロフィー症における筋収縮蛋白質の崩壊がカルシウム依存性プロテアーゼ（CANP）を1つのトリガーとするならば[4)]，その活性の発生には余分なカルシウムが必要となる．さらに，CANPはZ帯に局在することや，オペイク細胞にカルシウム濃度が高いという報告[4)]からも，筋ジストロフィー症細胞内のカルシウム濃度は上昇していることが考えられる．この余分なカルシウムは細胞外から流入するものかどうか不明である．

結論として2～3カ月のmdxマウス筋細胞内では高い濃度のカルシウムが測定され，静止状態の収縮蛋白系，ミトコンドリア内でも同様にカルシウム濃度が上昇していた．他の元素においては，対照に比較して大きな濃度差は無く，筋ジストロフィーの筋細胞におけるカルシウムイオンの動態解明が極めて重要な点と考えられる．

文　献

1）Blinks, J.R., Wier, W.G., Hess, P., and Predergast, F.G.: Measurement of Ca^{2+} concentration in living cells. Prog. Biophys. Molec.Biol., 40：1-114, 1982.

2）Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A.L., and Moore, K.J.: X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81：1189-1192, 1984.

3）Damgain, J., and Vrbova, G.: Muscle development in mdx mutant mice. Muscle

Nerv., 7：700-704, 1984.
4）今堀和友：Ca^{2+}依存性プロテアーゼ．代謝，17：1247-1254, 1980.
5）栗原照章，田中政幸，塩屋敬一，山村善教，松倉茂：mdx マウスの電気生理学的研究：膜電位及び筋細胞内 Ca の計測．昭和60年度「筋ジス」報告書，杉田班，44-50, 1985.
6）Somlyo, A.V., Gonzalez-Serratos, H., Shuman, H., McClellan, G., and Somlyo, A.P.: Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: An electron-probe study. J Cell Biol., 90, 577-594, 1981.
7）高木昭夫：筋小胞体機能．昭和59年度「筋ジス」報告書，杉田班，22-24, 1984.
8）吉岡利忠：骨格筋細胞内の elemental composition．特にカルシウムイオンの動きについて．昭和60年度「筋ジス」報告書，杉田班，289-294, 1985.
9）Yoshioka, T., and Somlyo, A.P.: Calcium and magnecium contents and volume of the terminal cisternae in caffeine-treated skeletal muscle. J.Cell Biol., 99：558-568, 1984.

3）mdxマウス骨格筋収縮のエナージェティクス

山　田　和　廣*

研究協力者　米　谷　快男児*　北　野　敬　明*　河　野　義　久*

筋肉の収縮に際して，張力の発生および仕事量などが収縮の指標として測定される．一方，収縮に際してエネルギーは熱としても遊離されるから，遊離されるエネルギーの総量を知るためには，熱量の変化も同時に測定することが必要である．

収縮に際して遊離されるエネルギーは，収縮のために供給される化学エネルギーに由来する．筋肉においては，フォスファーゲンとしてのクレアチン燐酸（PCr）が分解されることによって化学エネルギーが遊離される．また，このとき無機燐酸（Pi）の生成が見られる．収縮のための直接のエネルギー源はATPの加水分解により得られるのであるが，クレアチンキナーゼ反応により急速にPCrが分解されATPが再生される．収縮に伴う筋細胞内におけるこのような化学的変化は，最近燐核磁気共鳴法を用いて，非破壊的に測定することが可能となった．

本研究は，mdxマウス（C57BL/10Sc-mdx）とその対照マウス（C57BL/10Sc）の長指伸筋（EDL）を対象として，上に述べたようなエネルギー遊離と供給の研究を行ったものである．

1．等尺性収縮と熱産生

第8週齢のmdxマウスおよび対照正常マウスより摘出したEDLを95％ O_2／5％ CO_2飽和Krebs液中で20℃に保ち，湿チェンバー内で刺激し，等尺性張力を記録するのと同時に，熱産生を測定した．熱産生の記録には銀―コンスタンタン熱電対によって構成される熱電堆を用いた[1]．図1は短い単発刺激による単収縮張力の発生と，それによる筋肉の温度上昇（熱量の単位に換算してある）を記録したものである．正常対照EDLでは，mdxマウスのものに比べ発生張力が小さく，また経過が少し延長している．これと同時に熱の産生も低下している．正常マウスとmdxマウスはほぼ同じ週齢であるので，これらの結果を直接に比べても良いが，筋の単位断面積当りの張力および筋の単位重量当りの熱量変化に換算して比較した方がより正しい（図3，4参照）．とくに強縮刺激による結果をみるとき，mdxマウス骨格筋では発生張力が平均して34％低下し，かつ収縮の経過，特に発生した張力の弛緩の経過が延長している（half relaxation timeの38％の延長）ことは，定量的に，第3－4週齢マウス筋についてこのような変化を見出した，他の研究者による報告[2]と良く一致している（図2）．

図3および4は，単収縮および短い強縮（持続0.5秒）について，張力および熱量変化の筋の長さに対する依存性を，mdxマウス筋と正常対照筋で比較したものである．筋を引き伸ばすと発生張力が低下するから，これらの図では熱量変化を筋の単位断面積当りの発生張力に対してプロットしてある．このように熱量変化には張力の発生に直接に関連づけ得る成分と，張力発生には直接には関連しない成分とがある．これらの結果から示されることは，mdxマウス筋では，対照筋と比較すると，発生張力の低下に加えて上にのべた熱量変化の二つの成分がともに低下しているということである．

mdxマウス筋の単収縮および強縮に際して，発生する張力および遊離されるエネルギーについての上にのべた実験結果は，mdxマウス筋では，一つの筋肉に含まれる筋線維の一部，もしくは1本の筋線維に含まれる筋原線維の一部が正常に働い

＊大分医科大学生理学

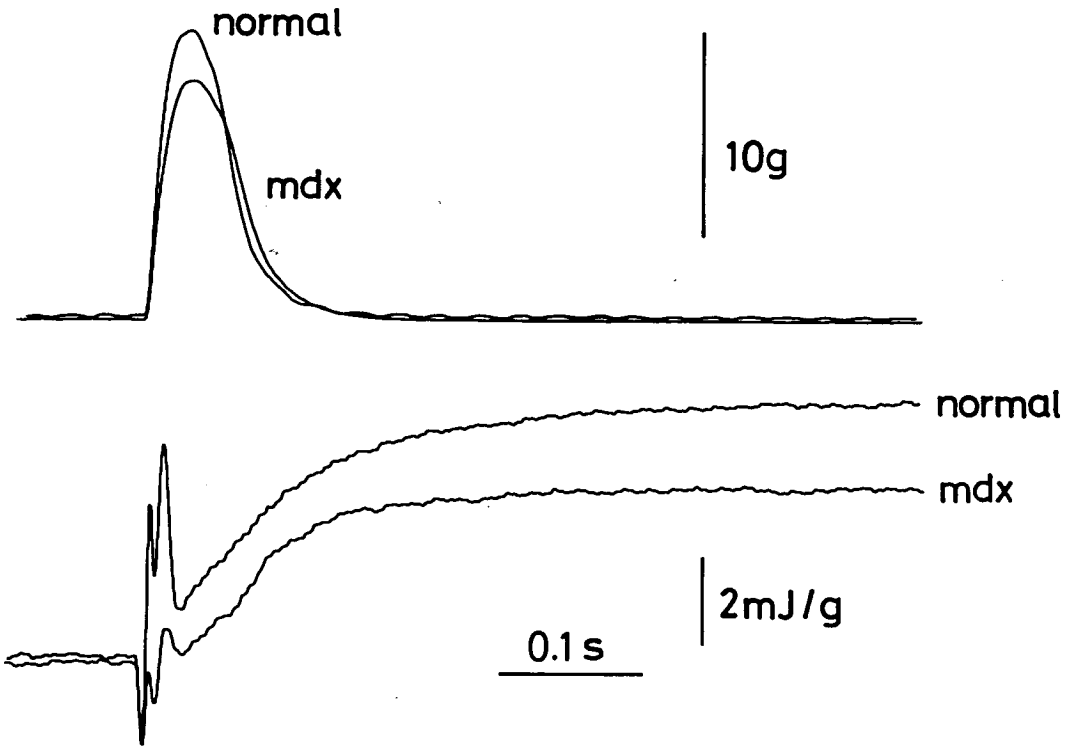


図1　正常対照およびmdxマウス長指伸筋（EDL）の等尺性単収縮張力発生（上の記録）と熱産生（下の記録），20℃．熱産生の記録にみられるスパイクは刺激電流によるアーティファクト．

ていないとすると，最も良く説明することが出来るように思われる．このような仮説についての組織学的研究結果との対比が必要と思われる．しかし一方では，収縮の経過，特に発生張力の弛緩の経過が延長していることは，筋小胞体の機能もしくは細胞内パルバルブミン量のいずれかに変化が生じていることも示している．

2．燐NMRスペクトル

マウス筋のEDLは小さく，重量も小さいので，燐NMR測定においてあまり良い感度が期待できない．本研究では第8週齢のマウス4匹から摘出した8本のEDL（湿重量合計約50mg）を対象として，主として静止筋について燐NMRスペクトルを調べた．図5は良い生理的状態にある静止筋の燐NMRスペクトルを示す．これらのスペクトルは，2秒間隔の燐NMR測定を3万回近く繰り返して加算して居り，従って測定時間はそれぞれおよそ16時間を要している．

このことは一方ではマウスのEDLがこのような実験条件下で長時間よい生理的状態にあったことを示している．ATPに由来するα-，β-，およびγ-ピークおよびPCrに由来するピークが良く分離されている．無機燐酸（Pi）に由来するピークが非常に大きいのは，灌流のために用いたKrebs液中に含まれている約1 mMのH_2PO_4に由来するものである．このスペクトルとは別にKrebs液だけ存在する場合のスペクトルを測定す

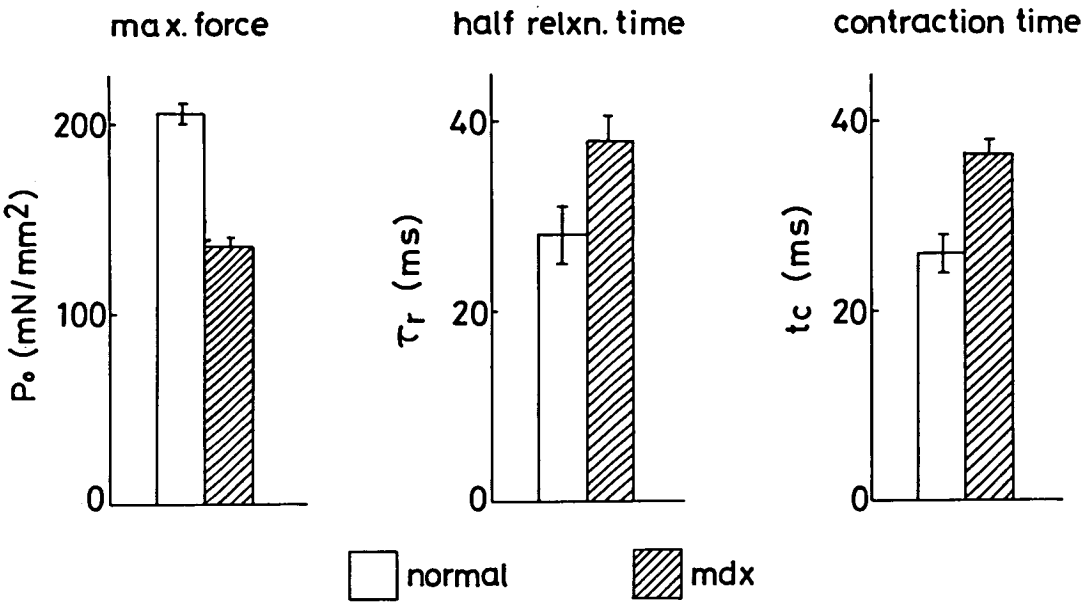


図2　正常対照およびmdxマウスEDLにおける，等尺性強縮による張力発生(左図)，張力弛緩の経過（中央）および単収縮張力における収縮時間（最大張力に至るまでの時間，右図）の比較．

ることにより，実際に細胞内に存在するPiは非常に小さいことが示されている．燐NMRスペクトル測定から結論されることは，mdxマウス筋と正常対照筋との間には，mdxマウス筋ではPCrおよびATPの量がともにやや少ない（この違いは，この実験では正常対照として用いた筋がやや大きかったことによって強調されている）ことの他には，PCr/ATP比も含め殆ど違いが認められない．ジストロフィー症ニワトリの胸筋に認められたような特異シグナル[3]も全く認められなかった．一方，収縮の定常状態における代謝産物などの濃度には，mdxマウス筋に異常が認められる可能性は残っている．マウス筋を対象とするときは，先にのべたように燐NMR測定上高い感度が期待できないことから，このような動的研究における良い時間分解能は期待できないのであるが，ある程度の時間分解能を持った研究は可能であると考えられるが，このような研究は今後に残された．

3．結　　論

1）mdxマウスから摘出したEDLの張力および熱産生の測定結果は，この筋肉ではその一部が障害を受けているが，それ以外の部分はほぼ正常に機能していることを示唆した．しかし一方では，筋の弛緩の機序には全体にある程度の障害が認められた．

2）上にのべたmdxマウスにおける変化は第8週齢において認められた．このことは，第3-4週齢mdxマウス筋のみに異常が認められるとする他の報告とくい違っている．

3）静止筋についての燐NMRスペクトル測定においては，mdxマウス筋では，全体的にシグナル強度が小さいこと以外には異常は認められなかった．この事実も，筋の健常部については大きな異常は生じていないとする考えを支持する．

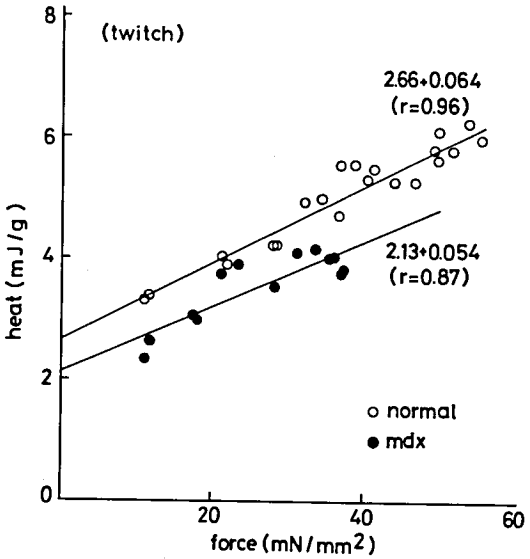


図3　正常対照およびmdxマウスEDLの等尺性単収縮における，筋の長さと張力および熱産生．筋単位断面積当りの張力に対して，筋単位重量当りの熱産生をプロット．

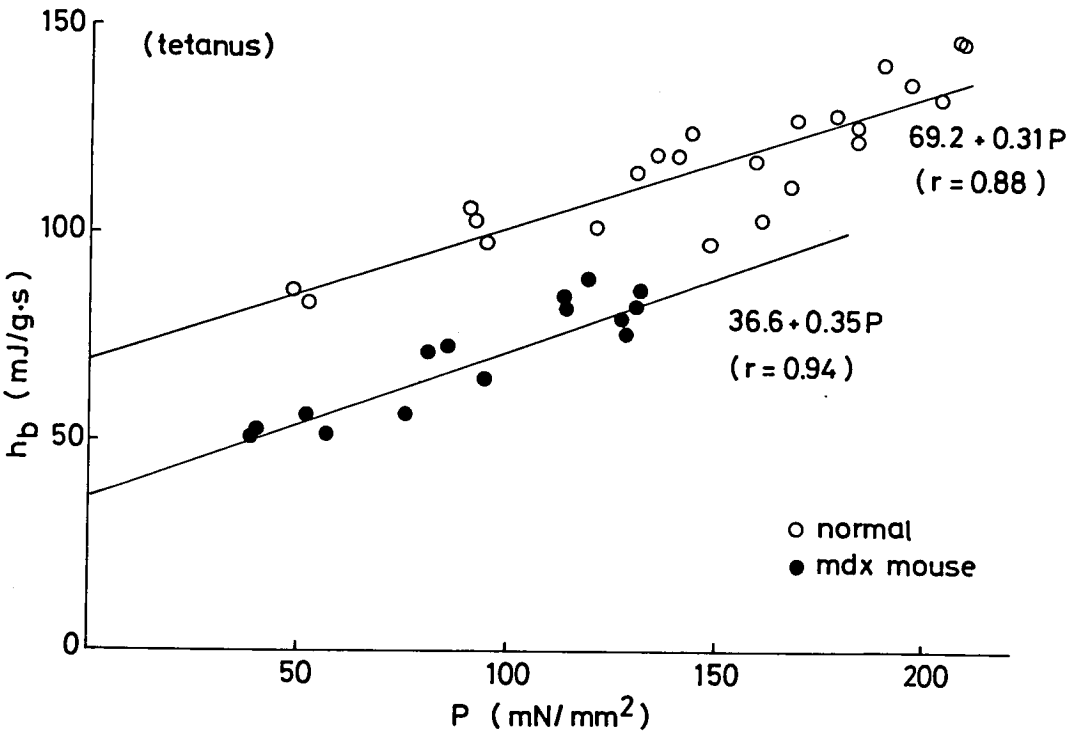


図4　正常対照およびmdxマウスEDLの等尺性単収縮における，筋の長さと張力および熱産性．筋単位断面積当りの張力に対して，筋単位重量当りの熱産生をプロット．

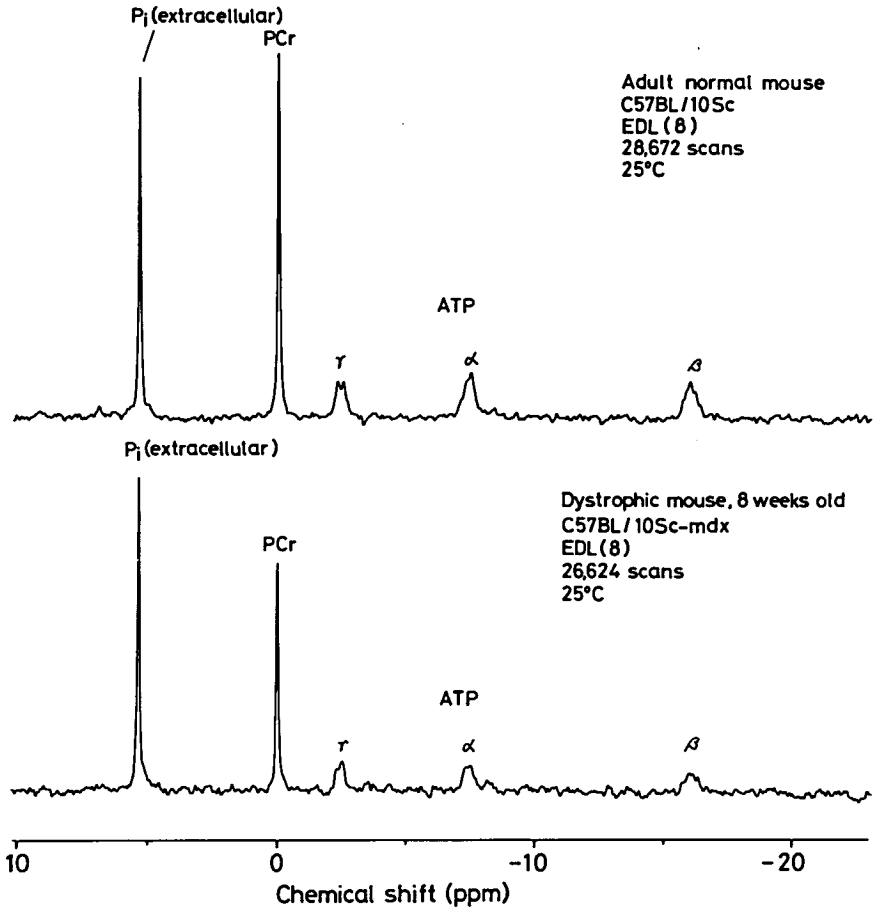


図5　正常対照およびmdxマウスEDLの静止時における燐NMRスペクトルの比較（説明本文）.

文　献

1）米谷快男児，山田和廣：熱産生測定．"運動生物学"（杉晴夫，平本幸男編）丸善，1984，実験生物学講座10巻，pp93—110.

2）Dangain, J. and Vrbova, G.: Muscle development in mdx mutant mice. Muscle Nerve, 7/9：700-704, 1984.

3）Burt, C.T., Glonek, T. and Barany, M.: Phosphorus-31 nuclear magentic resonance detection of unexpected pohsphodiesters in muscle. Biochemisty, 15：4850-4853b.

4）筋ジストロフィーモデル動物骨格筋における パルブアルブミンの量的変化について

塚越　廣*

研究協力者　佐野元規*　横田　司*　遠藤登代志**

はじめに

Parvalbuminは低分子量（M.W.12,000）で酸性（pI 4.0～5.0）のCa^{2+}結合蛋白であり，そのドメインにEF hand型のCa^{2+}イオン結合部位をもち[1]，calmodulinを含む一連の細胞内Ca^{2+}結合蛋白質と同じ祖先から由来する蛋白質である．Parvalbuminは筋細胞に大量に存在するが，筋細胞における生理的な役割については，troponin CよりCa^{2+}イオンを受け取り，筋小胞体へCa^{2+}イオンを送りこむとされている[2]．またいろいろな動物のparvalbuminの含量と筋弛緩速度が相関する[3]ことからも，筋弛緩に関与する筋弛緩因子の一つと考えられている．今回，我々はジストロフィーモデル動物骨格筋におけるparvalbuminの量的変化について検討したので報告する．

方法及び結果

Parvalbuminを以下の方法により簡単且つ迅速に精製することが可能であった．すなわちrat骨格筋（fast twitch muscle）を4倍量の50mMリン酸ナトリウム緩衝液でホモジナイズし，遠沈後上清を熱処理して，熱に安定な蛋白をDEAE-Sephadex A50のカラムを通して，50mM NaClで溶出することにより精製した．

DEAE-Sephadex A50 columnの結果，260nmの波長における吸光度の高いpeak IIの蛋白が存在し，ゲル濃度15%のSDSポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）で確認すると分子量約12,000の単一なbandであった（図1）．収量は約150gのfast twitch muscleから約120mgのpeak II蛋白が得られた．この蛋白のアミノ酸分析を

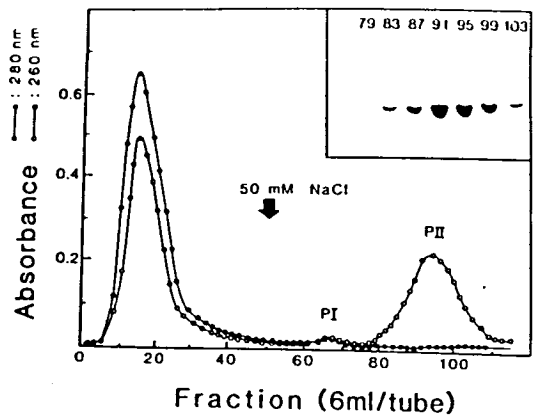


図1　DEAE Sephadex A-50 columnのelution profile.
右上は15% SDS-PAGEの泳動パターン．番号はfraction numberを示す．

Spackmanらの方法[4]により島津社のアミノ酸分析器LC-3Aを用いて施行したところ，Berchtoldらの報告[5]したrat骨格筋のparvalbuminのアミノ酸組成にほぼ同じであった．Peak II蛋白はTyrosine，Tryptophanをほとんど含まず，Phenylalanineの含有量が高かった．このような特徴的なアミノ酸組成のために，波長280nmにおいては吸光度が小さく，260nmで吸光度を示す理由と考えられる（表1）．さらにSchibechiらの方法[6]により，SDSを含まないポリアクリルアミド電気泳動ではpeak IIの蛋白はcalmodulinと同様に，Ca^{2+}イオンの存在下では，Ca^{2+}イオンの非存在下に比較して電気泳動の移動度が小さく，Ca^{2+}イオンの存在下では逆に移動度が大きくなるtroponin Cとは異なっていた（図2）．以上の結果よりpeak II蛋白はCa^{2+}結合蛋白の性質を持ち，アミノ酸組成の結果からもparvalbuminと同一のものであると考えられた．

＊東京医科歯科大学医学部神経内科
＊＊山梨医科大学第三内科

表1

Amino Acid	peak II	Rat skeletal muscle parvalbumin[b]
Lys	13.8[a]	14.9
His	1.6	2.1
Arg	0.8	0.9
Asp	14.0	14.0
Thr	4.2	5.0
Ser	10.0	10.1
Glu	9.2	9.1
Pro	N.D.	-
Gly	10.1	9.0
Ala	13.4	10.9
Cys	N.D.	-
Val	5.0	4.9
Met	2.9	3.1
Ile	5.4	5.7
Leu	9.1	9.0
Tyr	N.D.	-
Phe	8.1	8.2
Trp[c]	N.D.	-

a. The values are based on molar ratio.
b. Taken from Berchtold, et al. (17)
c. Determined spectrophotometrically (18)
N.D.; not detectable

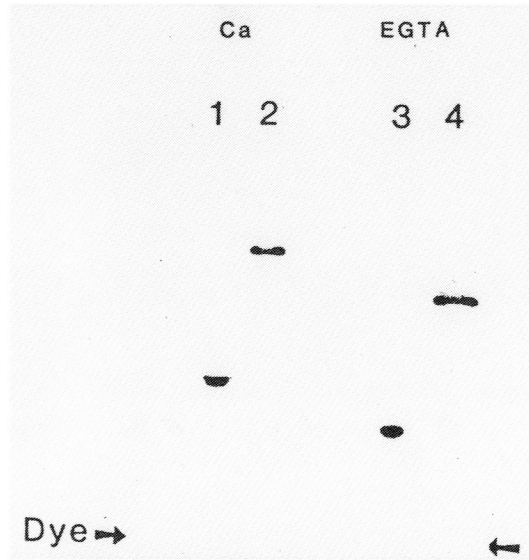


図2　SDSを含まないゲルでの電気泳動
1，3はcalmodulin，2，4はparvalbumin.（peak II protein）
1，2は10μM $CaCl_2$，3，4は1 mMのEDTAの存在下で電気泳動を行なった.

次に精製したparvalbuminを抗原として，ウサギに抗体を作成した．得られた抗体の特異性をWestern blottingで確認するためラット骨格筋の．whole homogenateをSDS-PAGEのゲルからニトロセルロース膜に転写した．転写された蛋白のうち，分子量約12,000のparvalbuminに一致する蛋白のbandのみが陽性にPAP法で染色され，特異的な抗体であることが確認された（図3）.

ウサギ血清から，IgGをprotein A speharose 413のアフィニティーカラムを用いて得て，さらに得られたIgGをpepsinで分解してウルトロゲルACA44でFab′を精製した．Fab′とhorseradish peroxidaseを石川らの方法[7]によりマレイミドでconjugateとして，Fab′-peroxidase conjugateを作製した.

Fab′-peroxidase conjugateを用いて，免疫組織学的にRat骨格筋を直接法で染色すると，type II fiberのみ陽性に染色され，さらにtype II fiberにも濃淡が存在していた．またFab′-peroxidase conjugateによりrat骨格筋のparvalbuminをELISA（Enzyme Linked Immunosorbent assay）法により定量すると，standardとして用いた精製したparvalbuminでは，20pg/tubeまで定量可能であった．S-100，calmodulinとはcrossしないことがELISA法でも確認できた（図4）．ELISA法によりラット骨格筋でparvalbuminを定量したところfast twitch muscle（tibialis anterior, gastrocnemius）では約70,000 ng/mg protein存在していた.

Parvalbuminは出生直後より次第にrat骨格筋において含有量が増大し（未発表データ），未熟な筋細胞では少ないことが確認された.

Rat骨格筋において，塩酸ブピバカインで壊死を起こすと，筋注後約24時間で，著明にParval-

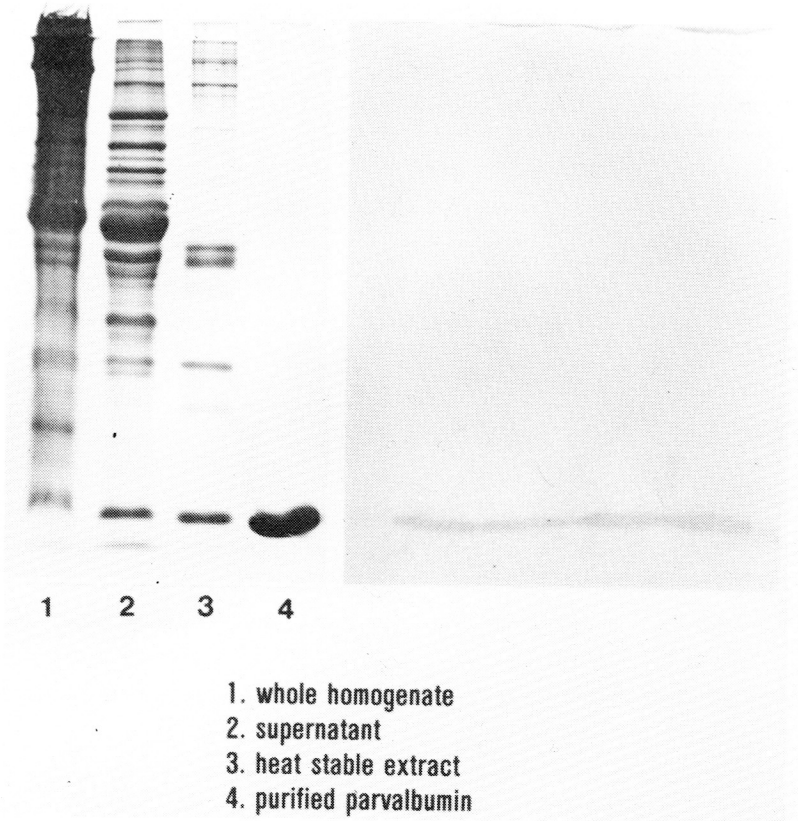


図3　ゲル濃度15%のSDS　PAGEを行ない，ニトロセルロース膜に転写し，PAP法でImmunoblottingを行なった．

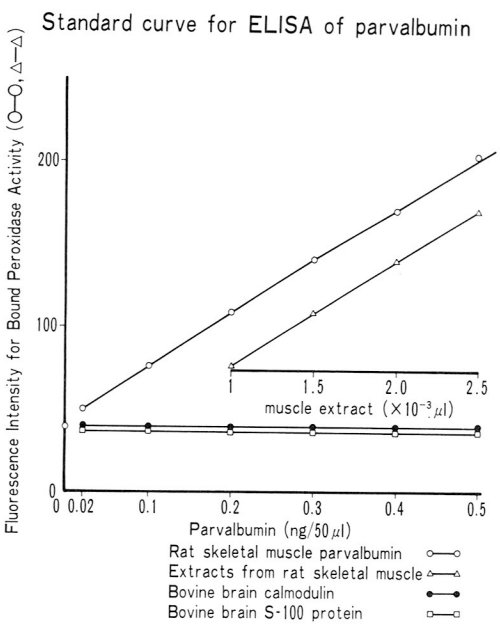


図4

表2

Levels of parvalbumin in skeletal muscles

Rat	Control	Marcaine
Tibialis anterior	77813±6249	25625±6120***
EDL	78047±13054	18807±13183**
Soleus	319.7±64.9	95.4±20.2**
Mouse	**Control**	**Mdx**
Tibialis anterior	18220±4296	10705±1917*
Gastrocnemius	11825±1291	7649±1499**
Soleus	115±4	103±14

n=5, ng/mg protein
* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

bumin が減少していた．Mdx マウス骨格筋においてもコントロール系の正常マウスに比較して parvalbumin が tibialis anterior, gastrocnemius で減少していた（表2）．

考　　察

今回我々の研究により parvalbumin の高感度の Enzyme Immunoassay が可能となり，rat の slow twitch muscle である soleus においても，fast twitch muscle の約 1/200の量の parvalbumin が存在することが明らかとなった．

Parvalbumin は実験的ミオパチー（塩酸ブピバカイン）及び筋ジストロフィーモデル動物骨格筋において減少していた．筋ジストロフィーモデル動物骨格筋では筋細胞の壊死・再生が盛んにあり，壊死した筋細胞，再生途上の未熟な筋細胞の割合が多いため parvalbumin の含量が少ないと考えられる．

Parvalbumin の減少は生理学的には筋弛緩速度の遅延とりわけ，tetanus 刺激後の筋弛緩速度の遅延に関与するものと思われる．

文　　献

1）Kretsinger RH, Nockolds CE: Carp muscle calcium-binding protein. J. Biol. Chem., 248：3313, 1973.

2）Haiech J, Derancourt J et al: Magnesium and calcium binding to parvalbumins, Evidence for differences between parvalbumins and an explanation of their relaxing function. Biochemistry, 18：2752, 1979.

3）Heizmann CW, Berchtold MW et al: Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79：7243, 1982.

4）Spackman DH, Stein WH et al: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Biochem., 30：1190, 1958.

5）Berchtold MW, Heinzmann CW et al: Primary structure of parvalbumin from rat skeletal muscle. Eur.J. Biochem., 127：381, 1982.

6）Schibechi A, Martonosi A: Detection of Ca^{2+}-binding proteins on polyacrylamide gels by ^{45}Ca autoradiography. Anal. Biochem., 104：335, 1980.

7）Ishikawa E, Imagawa M et al: Enzyme-labelling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. J. Immunoassay, 4：209, 1983.

5）Local tetanus 法の応用による実験的ミオパチーに関する研究

田　辺　　等*

研究協力者　水　野　美　彦**

はじめに

昨年の本班会議で我々は local tetanus (tetanus toxin の1回筋注による足関節の持続的底屈）に陥ったラットの足関節を背屈位に固定することにより，ヒラメ筋（SOL）に筋ジストロフィー（PMD）類似の病変を作成したことを報告し，その発生機序として筋線維が過伸展されることによる筋膜の障害によることを示唆した．今回は方法論を変えて，やはり筋線維に過伸展刺戟を加え，SOL の病理変化について検討したので報告する．

対象及び方法

34匹の SD 系 adult albino rat を用い，右腓腹筋に40ng の Tetanus toxin を1回筋注した．2日后に local tetanus が出現した時点で右足関節に他動的・反復的背屈運動を与えた．この際，ネズミを次の3群に分けた．A群：1度に50回の完全背屈位までの運動を1日に4回(10匹)，B群：1度に5回の足関節角度90度迄の背屈運動を1日に2回(12匹)，C群：1度に20回の90度迄の背屈運動を1日に2回（12匹)．運動開始后1，2，3，5，7，14日后にラットを殺し，両側 SOL を採取し，湿重量測定后組織学的並びに電子顕微鏡学的に検索した．又，血清 CK, GOT, GPT, LDH も測定した．

結　　果

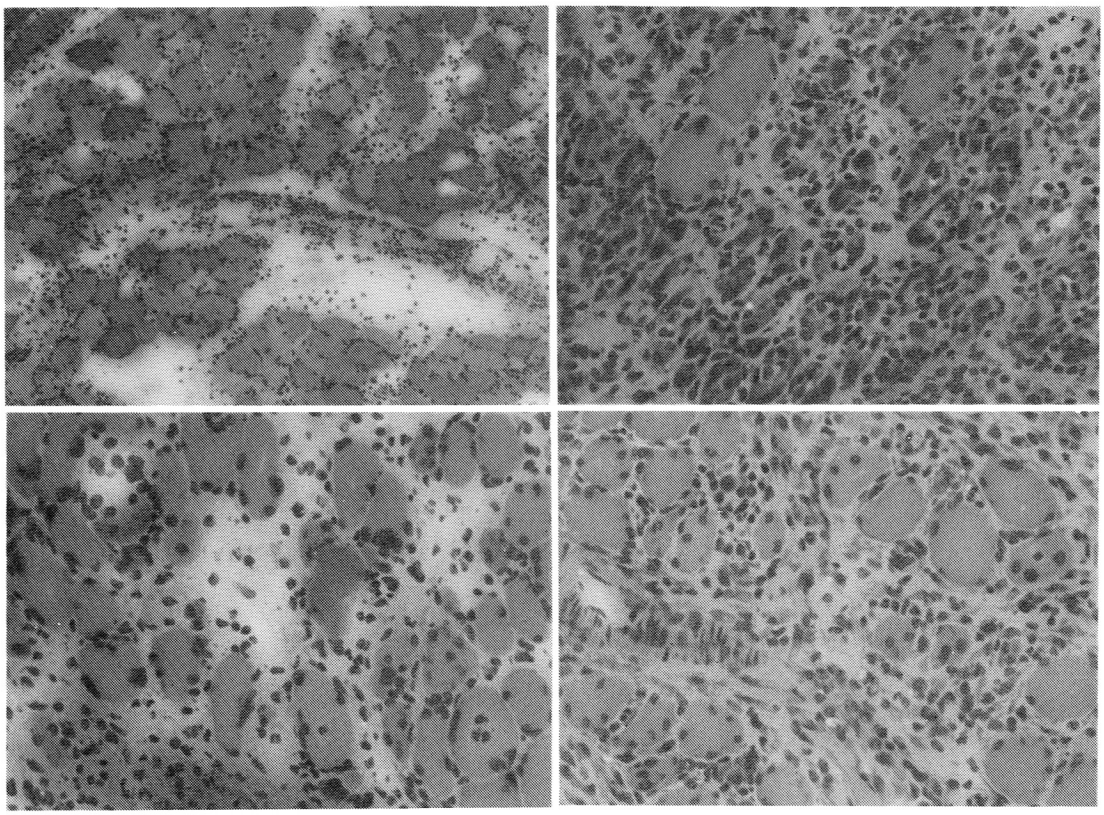
(1) SOL 組織所見

A群：1日目から多くの筋線維の hyaline degeneration, phagocytosis, 間質の浮腫が著明に認められた(図1a)．3日目には殆どの線維が変性消失し，一方 myoblast と思われる単核細胞が数箇集合し，再生が活発に開始されている（図1b)．5日目には再生が急速に進み，中心核を有する線維が多数認められた．間質には浮腫が軽度に認められた(図1c)．7日目には再生が更に進み成熟線維が増加する一方，phagocytosis を伴った変性線維も散在性に認められた．間質には fibrosis が出現している（図1d)．

B群：第1日目には筋線維束構築は全体としてよく保たれているが，phagocytosis を伴った壊死線維が特に周辺部に優位に散在性に認められた（図2a)．3日目になると筋線維の壊死は急速に増加し，間質の phagocytosis，浮腫が認められた（図2b)．7日目では再生現象が focal に活発に認められ，間質には phagocytosis, fibrosis が認められた．変性線維も若干併存している（図2c)．14日目になると，再生線維が成熟し筋束構築は改善されてくるが，perimysium，endomysium に fibrosis が出現し，筋線維の大小不同，変性線維の散在，再生線維の小グループ等の所見が認められた（図2d)．

C群：1日目ではB群同様，周辺部に強い変性壊死線維の散在が認められた(図3a)．3日目には変性は急速に進行し，間質には浮腫，phagocytosis が認められた．一部の変性線維で phagocytosis が筋線維の中央部分から始まり，次第に全汎化する過程が示された(図3b)．7日目には変性線維は余り認められず，再生が諸々に認められた．Endomysium，perimysium の fibrosis

＊東京都立神経病院神経内科
＊＊東京都立神経病院神経小児科



a	b
c	d

図1　a．A群第1日目のSOL組織像 H.E.390×
b．同3日目 H.E.780×
c．同5日目 H.E.780×
d．同7日目 H.E.390×

も出現し始めた(図3 c)．14日目には筋束構築が乱れ，筋線維の大小不同，変性線維，再生線維の散在，間質結合織の増加が認められた（図3 d)．

(2)電子顕微鏡所見

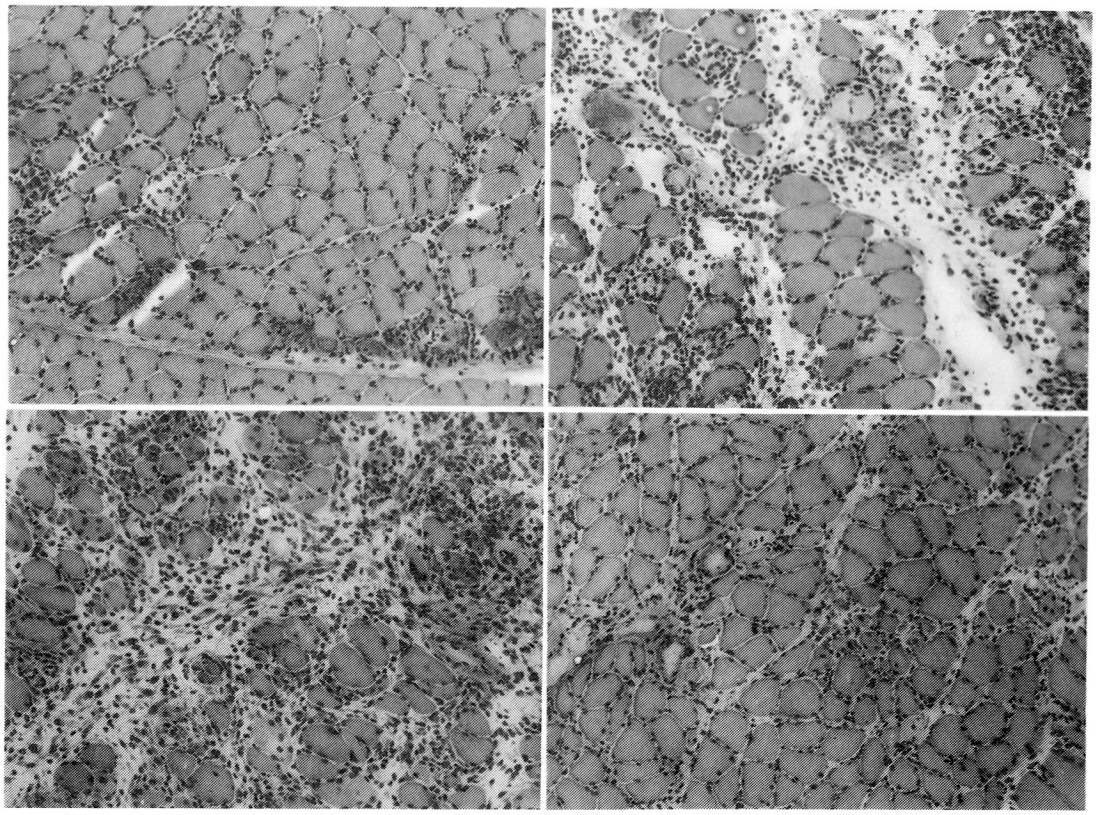
図4に示す如く，各群共対照と比較して1日目より筋鞘膜の構築が乱れ，連続性に障害を生じている．C群（図4 d）では2日目の像が示されているが，筋原線維構築も乱れてきた時点ではbasement membraneも構造が乱れており，筋鞘膜の構築の乱れは更に強い．図4 c，dではランタンをトレーサーとして使用しているが，特にdではランタンが筋鞘下に不規則に侵入している．横管系，T-systemへの入りが悪いが，これは技術的な点で問題があった可能性もあり，今后更に検討の予定である．又，いずれの群においても筋鞘下にミトコンドリアの集積が認められた．一方，これらの変化が認められている時点においても，筋原線維の構築は比較的よく保たれていた．

(3) SOL湿重量

病変側のSOLの湿重量を同一動物の対側対照SOLと比較すると，図5に示す如く，A群では初期より対照の2倍近く増加し，以后漸減を示したが，7日目に再びやや増加を示した．B群では1日目に極く僅か増加したが有意の増加はなく，経過と共に減少を示した．C群では3日目から5日目にかけて軽度の増加を示し，以后漸減を示した．

(4)血清酵素

表1に示す如く，GOT，LDH，CKの全体の平



a	b
c	d

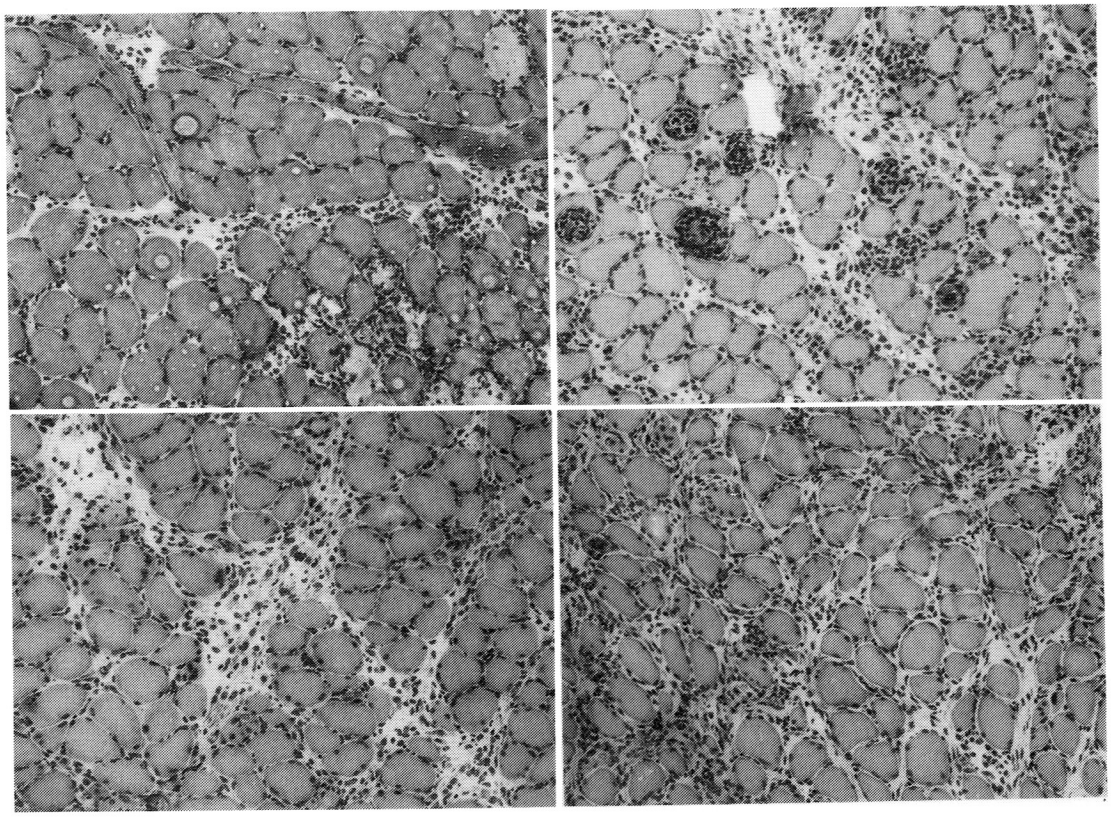
図2　a．B群第1日目のSOL組織像 H.E.390×
b．同3日目 H.E.390×
c．同7日目 H.E.390×
d．同14日目 H.E.390×

均値は各群共対照と比べて上昇を示しているが，GPTのみは上昇が認められなかった．各群間の差ではCKがB群，C群でA群に比べて高い傾向が認められた．CKについて経過による変動を図6に示す．A群では初期に1,000IU/l前后の増加を示し，以后漸減を示した．B群では1日目より3日目にかけて著増を示し，以后漸減を示した．C群では初期より増加を示し，5日目に更に著増を示し，以后漸減を示した．

考　　察

昨年度の本班会議で報告した方法では，local tetanusに陥った足関節を背屈位で固定することにより，SOLを過伸展位で固定するという外因が筋線維に加わっていた．その結果は処置后3日目には殆どの筋線維が変性壊死に陥るという強い変化が見られた点でPMDの病変モデルとしては問題点が残った．今回の方法はlocal tetanusに陥った足関節に反復的・他動的に背屈運動を加えるもので，背屈位固定法に比べて，伸展刺戟という点では共通であるが，間欠的であるということと，筋線維の不動化(immobilization)の要素が取除かれているという点で異なり，その意味では純粋に伸展刺戟の影響を観察することが出来た．又，背屈角度や運動回数を変えることにより，伸展刺戟強度の違いによる病変の違いも観察することが出来た．

結果的にはA群の強刺戟群では昨年の結果と同



a	b
c	d

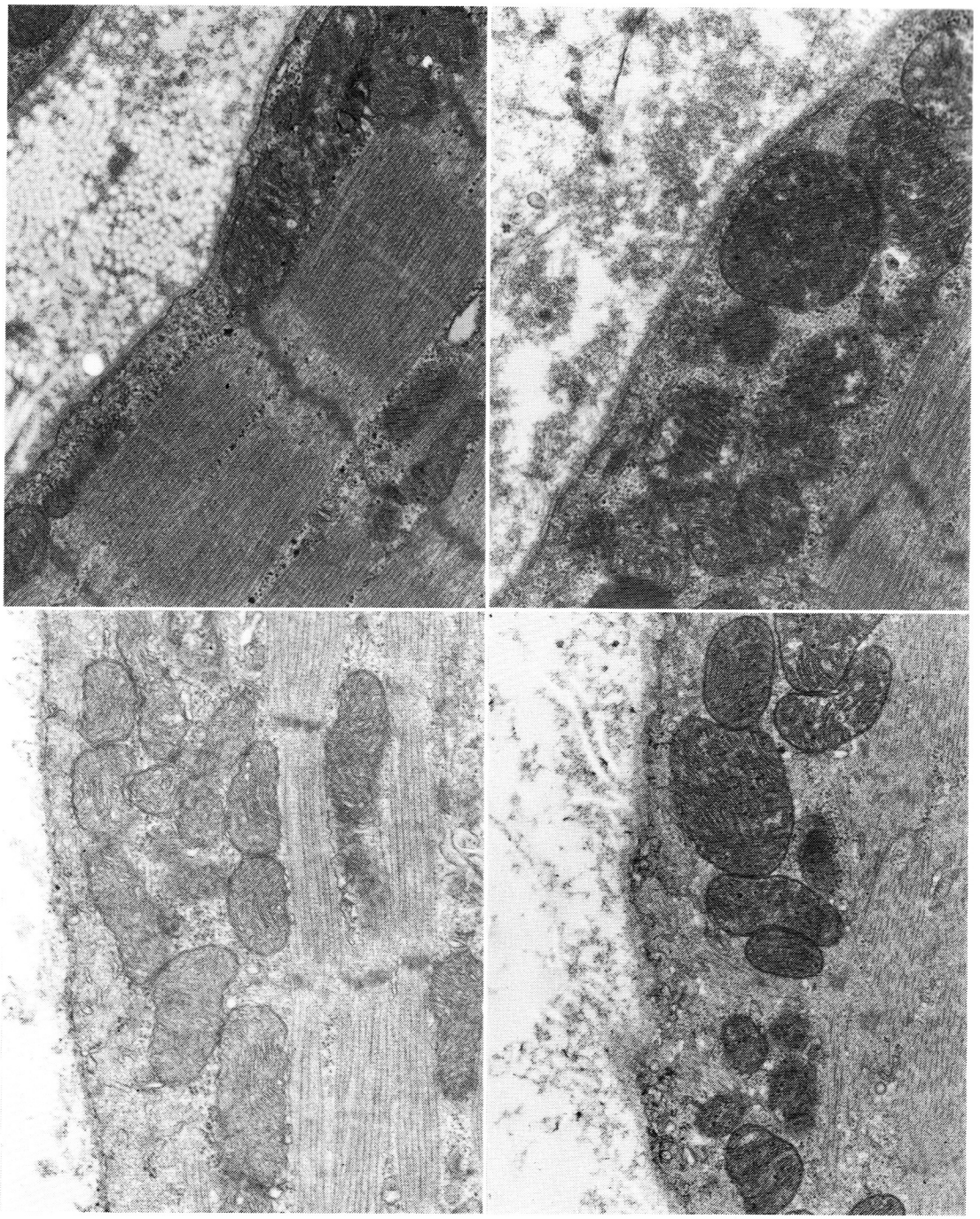
図3　a．C群第1日目のSOL組織像．H.E.390×．
b．同3日目 H.E.390×
c．同7日目 H.E.390×
d．同14日目 H.E.390×

様，3日目には殆どの線維が壊死に陥り，刺戟が強過ぎたことを示している．一方，B群とC群では徐々に変性が進む一方，再生も共存し，次第に筋線維の大小不同，間質結合織の増加等，PMD様の変化が認められた．B群とC群の間では変性速度に多少差があり，C群の方が早い傾向が見られたが，本質的には大差なく，弱い伸展刺戟が慢性的に加わることが必要であることが示された．

次に電顕所見について見ると，対照筋と比較して，いずれの群においても初期より基底膜は外縁が乱れ，筋鞘膜は連続性が乱れ，対照筋に見られるような明瞭性を欠いている．更に筋鞘下にはミトコンドリアが集積してきているが，ミトコンドリアにはカルシウムを吸収する作用があり，筋膜の障害によるカルシウムの流入に対して，反応性に集積し，細胞内カルシウム濃度の上昇を防いでいる可能性が推察された．この時期には筋原線維の構築は比較的保たれており，筋膜の変化が先ず生じ，ミトコンドリアによる防壁も破綻した時に筋原線維の破壊が起る病変過程が推察された．

SOLの湿重量はA群において初期に有意の増加を示したが，これは主に浮腫によることが組織所見より示唆された．C群においても少し遅れて若干増加が見られるが，これもやはり変性が或程度進行してきた段階での浮腫によるものと考えられる．B群では刺戟が最も弱く湿重量増加を来す程の浮腫は生じなかったものと考えられた．

血清CKについては群間での変動が可成見られ



a	b
c	d

図4　a．対照SOL，24,000×
b．A群1日目SOL，24,000×
c．B群1日目SOL，25,000×
d．C群2日目SOL，20,000×
（c，dはランタンをtracerとした）

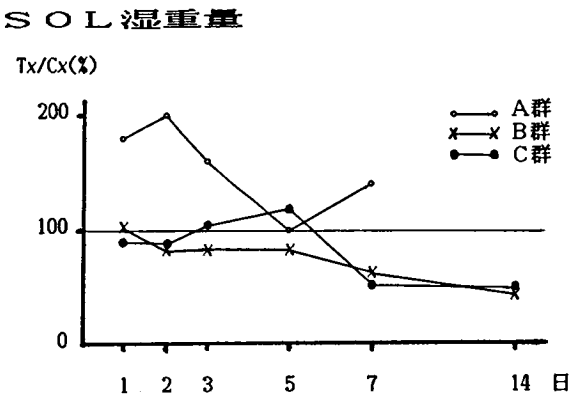


図5　SOL 湿重量

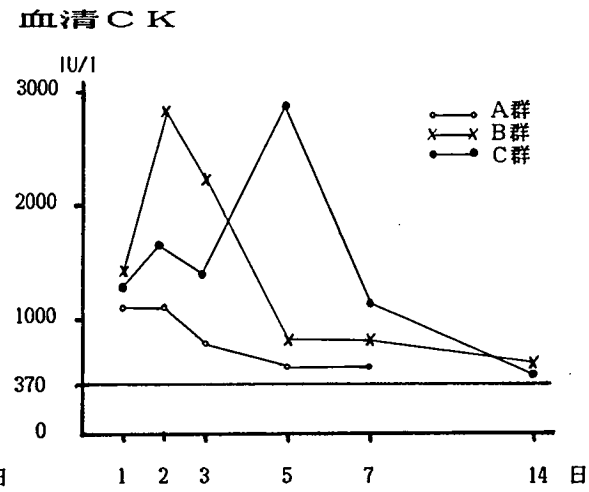


図6　血清 CK

表1　血清酵素値

	GOT	GPT	LDH	CK
対照(n＝4)	78± 7	38±5	363± 192	369± 96
A群(n＝10)	153±40	41±6	1921± 601	855± 243
B群(n＝12)	164±49	41±5	1720± 808	1428±1068
C群(n＝12)	173±71	42±8	2127±1240	1453±1137

るが，この原因としては麻酔の際の筋攣縮の程度の差も影響すると思われ，又同一実験日の検体数が少ない（各2匹）こともあり，結果の解釈に問題は残るが，何れにせよ初期に上昇して次第に漸減するという傾向は明らかに共通して見られる．電顕所見による初期の筋膜の障害と考え合わせると，血清酵素の上昇は障害された膜よりの leak が原因と考えられ，変性壊死に陥った筋線維が増えるにつれ血清酵素が減少してくることもこの考え方を裏づけている．

本モデルを PMD の病変モデルと考える時，組織学的には確かに類似しているが，生理学的状況という点で問題点が残る．即ち，local tetanus に見られるような持続的収縮状態は PMD 患者では生じていないという点である．しかしながら，この点に関しては次の様に考えることが出来る．つまり local tetanus においては収縮した筋線維を伸展するということで，筋膜には一定のポテンシャルを持った外力が加わることになる．一方，PMD 患者の場合，もし筋膜に本態的な障害が存在し「弱い」状態にあれば，それはマイナスの要因として働き，通常の筋活動に伴う伸展刺戟に対して，実験群の場合と近似したポテンシャルの外力が加わるのではなかろうか．そのような外力が慢性的に加わることにより少しずつ変性が進んでゆく可能性が考えられる．Duchenne 型 PMD 患者の仮性肥大が，活動が活発になる1～2歳頃から急速に進行するという事実は，そのような病態を示唆している可能性がある．その意味で本モデルは，生理的にも病理学的にも PMD の病変モデルの一つとして利用出来るのではないかと考えられた．

文　献

1）Brooks, V.B. et al.: The action of tetanus toxin on the inhibition of motoneurones. J. Physiol., 135：655-672, 1957.

2）水野美彦，Chou, S.M.: Local tetanus による実験的ミオパチーに関する研究筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究．“筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究 昭和60年度研究報告書”（班長・杉田秀夫）1986，pp57—62.

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

中　野　今　治*

研究協力者　松　村　喜一郎*　青　木　芳　朗**　福　田　信　男***
池　平　博　夫***　舘　野　之　男***

Proton nuclear magnetic resonance imaging (MRI) を用いて腰帯筋・下肢筋の proton spin-lattice relaxation time (T_1値) を *in vivo* において測定する事が可能であり，Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (DMD) 患者の筋肉 T_1 値は，病初期には正常より高値を，進行期には低値を示す事が知られている[1)~3)]．我々は今回 DMD 保因者 (carrier) に本法を適用し，測定した T_1 値に基づいて筋肉の生物水に関する検討を行なった．

目　的

DMD carrier における筋肉 T_1 値と結合水分画 (BWF＝bound water fraction) の検討．

対　象

DMD carrier 19例 (平均年齢42±6歳) と，正常対照として正常女性10例 (平均年齢39±12歳) を対象とした．DMD carrier は全例が DMD 患者の母親で，definite carrier 4例，probable carrier 4例，possible carrier 11例である．

方　法

(1)旭 Mark-JNMR-CT を使用し，次の条件で T_1 画像を作製した：静磁場強度0.1 Tesla (常伝導)，共鳴周波数4.5MHz，くり返し時間 (Tr) 1,000ms，回復時間 (Td) 300ms．

T_1 は saturation recovery (SR) と inversion recovery (IR) の組合わせにより次式より計算した：すなわち T_1 に対して充分大きい Tr を選択すると

T_1 (Td, Tr)＝Td/ln (2 SR (Tr)/ (SR (Tr)－IR (Td, Tr))).

なお測定 matrix は256×256，表示512×512，スライス厚は15mm である．

(2)撮影部位として臀部，大腿中央部，下腿部の3スライスを選択し，大臀筋内側部(glu)，大腿四頭筋の vastus lateralis (quad)，腓復筋 (gas) の T_1 値を ROI 処理にて測定した．

(3) T_1 値は生体組織内の proton の mobility に関する物理化学的な情報を提供するが，parameter として T_1 値を使用する場合，1）具体的イメージが湧きにくい，2）共鳴周波数の異なる NMR-CT 機種間で値が異なる，などの難点がある．

ところで一般に筋肉は水が70%を占め，triglyceride を主体とする mobile な中性脂肪は1～2%程度を占めるに過ぎないとされ，筋肉の T_1 値は，主に水 proton のそれを反映していると考えられる．そこで本法では，Fullerton らの fast proton diffusion (FPD) model に基づき，測定した T_1 値より BWF を算出し，parameter として使用した[3),4)]．すなわち FPD model では生物水を，生体内の macromolecule 表面に付着し mobility の低い結合水と，そうでない自由水に大別しているが，BWF はその両者の合計に占める前者の割合を%で表示したものである．BWF はあくまでも model 上の概念

＊国立療養所下志津病院神経内科
＊＊放射線医学総合研究所病院部
＊＊＊放射線医学総合研究所臨床研究部

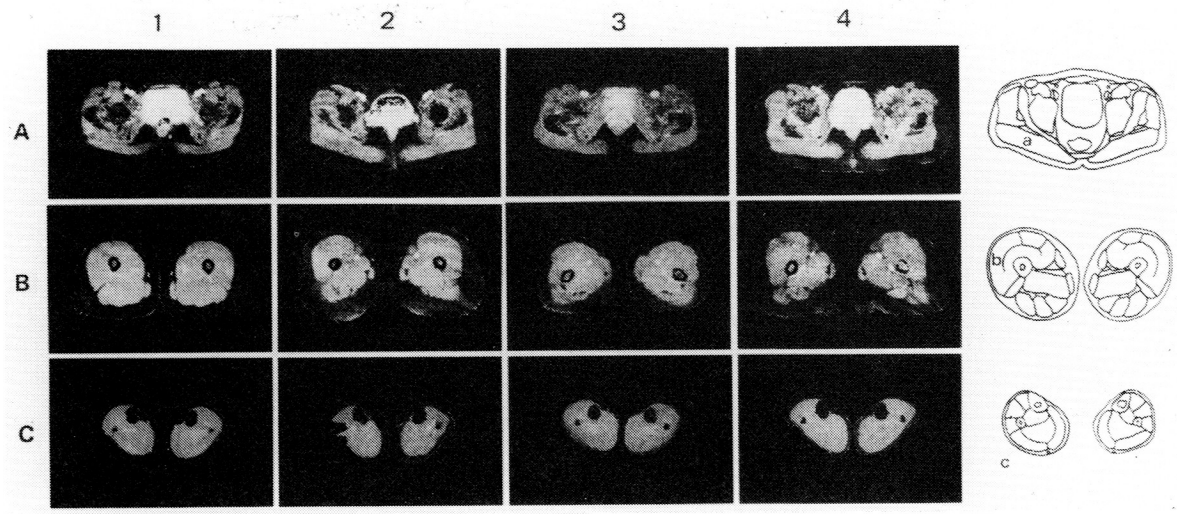


図1

MRI, T_1 images of the skeletal muscles of a 36-year-old normal female (1), a 39-year-old definite Duchenne muscular dystrophy carrier (2), a 43-year-old probable carrier (3), and a 30-year-old possible carrier (4). Diagrams of the muscles at each level are shown on the right. The levels of the buttock, mid-thigh and calf are shown in A, B and C respectively. The muscles of gluteus maximus (a), quadriceps femoris (b), and gastrocnemius (c) are clearly identifiable in these pictures.

ではあるが，これを知る事により，単に生物水の存在様式のみでなく，間接的に生体内の種々の macromolecule の *in vivo* での動態を検討する事が可能となる．

結　　果

図1は正常女性と DMD carrier の MRI, T_1 画像と，その模式図である．glu, quad, gas の各筋肉は明瞭に同定される．

(1)正常女性と DMD carrier の筋肉 T_1 値と BWF を**表1**に示した．本研究では正常者の数が少く，筋肉 T_1 値と BWF の正常値を規定し DMD carrier 各例について検討する事はできなかった．そこで DMD carrier を次の各群に分類し，各群につき各筋肉の T_1 値, BWF の平均値を求め正常者のそれと比較検討した：すなわち，definite or probable carrier 群8例，possible carrier 群11例；血清 CK 異常高値群8例，血清 CK 正常値群11例，である．

DMD carrier の glu の T_1 平均値は全 carrier 群において，正常者のそれより高値を，BWF 平均値は低値を示した．quad の T_1 平均値は possible carrier 群，血清 CK 異常高値群において正常者のそれより高値を，BWF 平均値は低値を示した．それに対して gas の T_1 平均値，BWF 平均値はいずれの DMD carrier 群においても正常者のそれと有意差を認めなかった．

(2) DMD carrier 各症例の筋肉 T_1 値と血清 CK 値との関係を検討した．両者の間の相関係数は glu は −0.110, quad は0.251, gas は0.070であり，いずれの筋肉においても両者の間には有意な相関関係を認めなかった．

考　　察

(1)本法の特徴について：

本法の特徴として，まず第一に常伝導による比較的低磁場の NMR-CT 機種を使用している点

表1　Muscle T_1 Values and BWFs[a]

Group	No. of Cases	Age (yr)	Glu		Quad		Gas	
			T_1(ms)	BWF(%)	T_1(ms)	BWF(%)	T_1(ms)	BWF(%)
Normal Controls	10	39±12	262±12	11.6±0.6	274±8	11.0±0.4	284±16	10.6±0.7
Definite or Probable Carriers	8	42± 7	273±12[c]	11.1±0.5[c]	280±9	10.8±0.4	283±13	10.7±0.6
Possible Carriers	11	42± 5	273±14[d]	11.1±0.6[d]	282±8[d]	10.7±0.3[d]	288±11	10.5±0.5
Carriers with high CK[b] Values	8	44± 7	274±10[d]	11.0±0.5[d]	284±8[e]	10.6±0.3[e]	290±14	10.4±0.6
Carriers with normal CK Values	11	41± 5	272±15[c]	11.1±0.6[c]	279±7	10.8±0.3	283±10	10.7±0.4

[a]All values are expressed as means ±SD.
[b]Upper limit of normal range is 170 U/l.
Statistical significance compared to the normal control values by Wilcoxon test: [c]$p<0.05$, [d]$p<0.025$ and [e]$p<0.01$.

が挙げられる．そのため水 proton と脂肪 proton の T_1 値は区別されない．上述のように，正常な筋肉組織においては，脂肪 proton の影響は無視し得るため，これは問題にはならないが，例えば DMD 進行期などには，逆に水よりも脂肪 proton の影響が重要となる[2),3)]．当然このような場合には FPD model より BWF を算出する事は不可能である．

低磁場で信頼性が高い事による最大の利点は，方法(1)に示したように SR と IR の組合わせにより，比較的短い Tr（本法では1,000ms）で T_1 値が計算される点である．つまり短い撮影時間で信頼性の高い T_1 値が得られる事になる．

本法の特徴の第二は，imaging に基づき各筋肉を同定して T_1 値を測定している点である．つまり本法により，*in vivo* に，各筋肉別に，物理化学的 parameter である T_1 値を得る事が可能となる．

(2) DMD carrier の筋肉 T_1 値と BWF について：

本研究において，DMD carrier の glu, quad の T_1 値，BWF 平均値は，正常者のそれよりも，各々高値，低値を示した．その原因との関連において以下の点が重要と考えられる．1）病初期の DMD 患者でも筋肉 T_1 値は正常より高値を，BWF は低値を示す事が知られており，これは本研究の結果と類似している[3)]．2）一部の DMD carrier では筋肉生検により DMD 病初期と類似の所見が見出されている[5)]．3）symptomatic carrier の筋力低下は腰帯筋主体である[6)]．4）asymptomatic carrier にも近位筋力低下を示すものがある[7)]．

以上より，DMD carrier の glu, quad の T_1 高値，BWF 低値は，DMD 病初期におけると同様の機序によってもたらされると考えられる．すなわち，一部の DMD carrier 症例において，1）筋肉変性に伴う浮腫性変化などにより筋肉組織の含水量が増加する事，2）変性筋線維内では，筋構造蛋白などの macromolecule の組成・高次構造が

変化し，またそれらが量的にも減少する結果，その表面の結合水の量が減少する事，などがその要因と推定される．

(3)本法の DMD carrier detection への応用について：

本法を carrier detection へ応用するためには，まず数多くの正常者に施行し，各筋肉の T_1 値 BWF の正常値を規定する事が必要である．

さて本研究では glu, quad, gas いずれの筋肉においても T_1 値と血清 CK 値との間に有意な相関関係を認めなかった．従来最も普及している carrier detection の方法は血清 CK 値の測定であるが，これによって probable と definite carrier の 60-70%が陽性とされている[8]．一般に DMD carrier における血清 CK 高値は，筋肉変性のみでなく，Lyon 仮説に基づく一部筋肉細胞の膜異常にも影響されると考えられるのに対して，筋肉の T_1 高値，BWF 低値は，筋肉変性を分子レベルにおいて直接反映していると考えられる．つまり両者は carrier state をやや異なった側面から捉えていると考えられ，この意味において本法は carrier detection の一助として応用可能と考えられる．

文　献

1）納光弘，岡田明彦ら：Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (DMD) 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．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，昭和59年度研究報告書，1985．p74．

2）中野今治，松村喜一郎ら：進行性筋ジストロフィー症における NMR-CT．——筋肉 T_1 時間について——．厚生省神経疾患研究委託費，筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究，昭和60年度研究報告書，1986．p43．

3）松村喜一郎，中野今治ら：筋肉疾患の NMR-CT…正常人ならびに Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における筋肉 T_1 時間について…．臨床神経26：733．1986．

4）Fullerton GD, Cameron IL et al : Frequency dependence of magnetic resonance spin-lattice relaxation of protons in biological materials. Radiology 151：135, 1984.

5）Roy S, Dubowitz V : Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy : a comparative study of electron microscopy, light microscopy and serum enzymes. J Neurol Sci 11：65, 1970.

6）Moser H, Emery AEH : The manifesting carrier in Duchenne muscular dystrophy. Clin Genet 5：271, 1974.

7）Roses MS, Nicholson MT et al : Evaluation and detection of Duchenne's and Becker's muscular dystrophy carriers by manual muscle testing. Neurology 27：20, 1977.

8）杉田秀夫：遺伝性ミオパチー，内科35：616, 1975.

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

埜 中 征 哉*

研究協力者　禹　　満*　古 賀 靖 敏*　斎 藤 陽 子*
石 井 弘 子*　桶 田 利 加*

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は通常3～4歳以降に起立，歩行異常などによって気付かれる．症状が出現した時に筋生検を行うとすでに強い病理的変化があり，結合織の増生もあって何が主病変で，どのような経過で病理像が完成するか不明である．本症の病理の初期変化をみることは病理発生を知る上で極めて重要なことと考えられる．そこで我々はまだ無症状期にある2歳以下の DMD 患者の生検筋に組織化学的，電顕的検索を行い検討した．

対象および方法

DMD 患者は5名（年齢11月-1歳11月，平均1歳3月）で，全例偶然にクレアチンキナーゼ(CK)値の上昇で気付かれ，筋生検の対象となった．全例筋生検後3年以上経過していて，現在典型的な DMD の臨床症状を呈している．対照としたのは生後10月-1歳5月，平均1歳1月）の乳幼児で，筋緊張低下などを主訴とし筋生検の対象となったが，病理学的には軽度タイプ2B 線維の萎縮をみる以外著変のないものを選んだ．

さらに DMD 筋で筋線維タイプ分布の比較をするため，症状が明らかな DMD 患者10名（5歳3月-8歳，平均6歳2月）を検索した．

生検筋は全例左上腕二頭筋の中腹より採取し，凍結切片を作成し，組織化学染色を行い，筋線維タイプ（タイプ1，2A，2B，2C）を決定し，そのヒストグラムを作成した．また生検筋の一部は電子顕微鏡用に固定し，その横断面につき最終倍率×3,000の写真を作成し，筋線維数，直径10μm以下の毛細血管数，直径1μm 以上の核をもつ有核内皮細胞面積を Kontron semiautomatic image analyzer にて測定した．また筋衛星細胞についても，筋線維数，筋核に対しての比で算定した．

＊国立精神神経センター神経研究所微細構造研究所

結　　果

1）一般組織像

生後11月の最若年者にも，すでに筋線維の壊死，再生がみられ，全例に筋線維の大小不同，散在する壊死線維（時に貪食細胞を伴う）が認められた．壊死線維は2本まで相接し存在したが，3本以上グループをなす例はなかった．再生線維は塩基好性の胞体，大型の核で特徴づけられ，それは多くは数本群をなして存在した．中心核線維も散在性に認められた．結合織の増生は軽度であったが全例に確認できた．

2）筋線維タイプの分布　（表1）

全例にタイプ1，2A，2B 線維はモザイク状に分布し，全ての線維に大小不同を認めた．さらに，未分化なタイプ2C 線維を13.9-28.5%と多く認め，平均18.4%であった．この筋線維のタイプの

表1　MUSCLE FIBER TYPE DISTRIBUTION

	Total No. Counted	Diameter (μm) 1	2A	2B	2C	Distribution(%) 1	2A	2B	2C
DMD									
Preclinical	(5) 2251	21.6	18.6	17.5	17.2	44.3	22.8	14.5	18.4
Symptomatic	(10) 3264	31.2	29.4	28.9	24.0	41.0	32.5	8.7	17.8
CONTROL	(5) 2064	20.7	17.7	15.8	17.4	44.0	28.1	26.3	1.6

分布を年長児と比較すると，タイプ2B線維がわずかに減少する以外ほとんど変わらなかった．筋線維の直径はDMDで大小不同はあるが，平均すると対照とあまり差はなかった．

3）筋衛生細胞の頻度（表2）

DMDでは胞体の大きな，小器官に富む筋衛星細胞を多く認めた．その頻度も高く，筋衛星細胞/筋線維内の全ての核×100＝14.5%と対照の8.8%に比較すると有意に増加していた．ただし，症状がすでに出現している年長者に比較すると，その頻度は低かった[1]．

4）血管の変化

DMD（preclinical stage）の患者では1本の血管に4.2本の筋線維があり，対照の5.9本に比べると有意に血管の分布が多いことが分かった（表3）．また，まれではあるが，内皮細胞が腫大した血管もみられた（図1）．さらに血管の周囲を何重にも基底膜がとり囲む異常血管も数多く存在した（図1）．有核内皮細胞面積はDMDで平均18.8±6.8μm^2で，対照の16.4±7.2μm^2と比較し，有意に大きかった．基底膜が何重にもとり囲む異常血管は対照では総血管数の1.5%にしかすぎないのにDMDでは25.6%と著増していた（表4）．この異常血管は結合織の増加した患者に多くみられる傾向にあった．内皮細胞の面積と年齢とには特に相関はないようであった．

表2　SATELLITE CELL POPULATION

		MF	MN	SC	SN	SN/MN+SN
DMD(preclinical)	(5)	2834	1278 (45.1%)	494 (17.4%)	222 (7.8%)	14.5%
(symptomatic)* 3-9y	(9)					25.2%
CONTROL	(5)	3113	972 (31.2%)	148 (4.8%)	92 (2.9%)	8.8%

MF: myofibers　MN: myonuclei　SC satellite cell　SN: satellite cell nuclei
* Wakayama et al. 1979

表3　POPULATION OF CAPILLARIES

	MF	BV	MF/BV	EC+N	EC+N/BV (%)	Area of EC+N (μm^2)
DMD preclinical (5)	2834	669	4.2[a]	318	47.5[b]	18.8±6.8[c] (S.D.)
CONTROL (5)	3113	528	5.9	206	39.0	16.4±7.2

MF: muscle fibers　BV: blood vessels
EC: endothelial cells　N: nucleus
a: $p < 0.01$
b: $p < 0.05$
c: $p < 0.005$

表4　MORPHOMETRIC ANALYSIS OF CAPILLARY DIMENSIONS

		Age at Biopsy (Month)	Endomys. Fibrosis	Replicated Basal Lamina (%)	Areas of Nucleated Endothels (μm^2)
DMD (preclinical)	1	11	+	9.4	17.7
	2	13	++	21.0	18.2
	3	14	++	32.3	21.3
	4	19	++	44.0	16.6
	5	23	++	28.2	20.5
	Total			25.6	18.8
CONTROL (5)		10 - 17 (13)	−	1.5	16.4

+ : minimal　++ : mild

考　　察

DMD骨格筋の初期変化を知るため，今回は無症状期の患者5名を組織化学的に検索した．その一般組織像をみると全例に筋線維の大小不同，壊死，再生，結合織の増生があり，組織学的には筋ジストロフィーの病理学的特徴をすでに備えていた．また筋線維のタイプの分布をみてもタイプ2B線維の減少傾向，2C線維の増加とすでに異常所見を示し，症状出現した6歳前後のDMD筋に近い分布を示していた．これらのことから考えるとDMD患者では1歳前後であって臨床的には症状がなくても，病理像は完成していて，多分もっと早い時期から壊死と再生が出発していることが考えられる．Hudgsonら[2]は生後8週の時期にすでに壊死，再生像を確認している．明らかな壊死，再生の確認はないが，胎児期にすでに筋線維の大小不同，opaque線維の出現，カルシウム染色で陽性に染色される線維の出現などが記されているので[3]，DMD患者では多分胎生期に病理変化が始まり，乳児期（少なくとも1歳までに）筋ジストロフィーとしての病理学的特徴を備えると考えられる．

1歳前後でも壊死後の再生が活発なことはタイプ2C線維の増加，筋衛星細胞の増加などからもうらづけられる．DMD患者の平均筋線維径が正常対照と1～2歳まではあまり変わらないことは，再生が活発で壊死を比較的よく代償していること

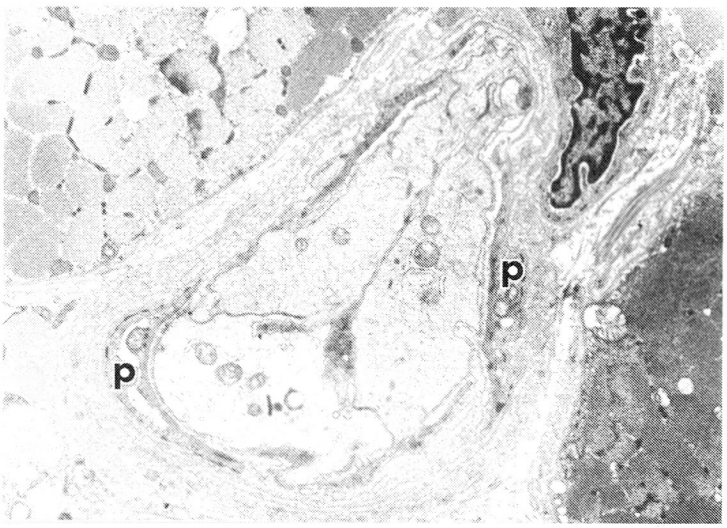


図1　腫大した内皮細胞，重複した基底膜でとり囲まれた異常血管．Pericyte (P) は増加している．1歳1月男児．×5,000.

の証拠であり，筋力低下が臨床的にまだ認められないこととよく相関する．

壊死線維や再生線維がしばしば群をなして存在することから，筋線維壊死は小血管の虚血ないし梗塞（microinfarction）の結果ではないかと血管説が登場した．三池ら[4]は1歳以下のDMDの生検筋を検索すると内皮細胞が腫大し，内腔が閉塞した血管を高頻度に認めるとし，血管病変を再検討する必要性を強調した．我々も今回無症状期の5例につき検討し内皮細胞はやや腫大傾向にあることを見出した．さらに有核内皮細胞の数，血管数もDMDで多いことを見出した．しかし，血管腔の血栓による閉塞などは見出し得ず，我々がみたようなわずかな変化を一次的なものとし，筋線維の壊死を説明するに足るものとみなすことはできなかった．

正常対照と明らかに異なるのは血管周囲のpericyteの増殖，基底膜が何重にも血管周囲をとりまく像（末梢神経のonion bulbと似る）であった[5,6]．このような血管の変化はDMDに限らず多くの神経疾患でみられる非特異的なものである[7]．DMDではやはり結合織の多い所に異常血管が多い傾向にあった．

血管内皮細胞の腫大や血管周囲の変化は結合織の増生により二次的に惹起されたものかもしれない．しかし，このような血管変化は二次的なものであるにしても，筋線維個々への血流量を減少させるであろうことは十分考えられる．そのために再生は遅延し不完全な再生，すなわち壊死を代償しえない再生が導かれると考えられる．また虚血状態により多分再生途上筋も壊死に陥り易くなり悪循環を繰り返すことになるのだろう．

血管の基底膜の変化は多分pericyteの増殖性変化に基づくと考えられる．そのような場所は図1に示したように，膠原線維が多い．線維芽細胞，pericyteの異常増生，それは血管系に悪影響を与え，病気の進行を速める大きな要因となっていると考えられる．

ま　と　め

無症状期（preclinical stage）にあるDMD患者5名につき，その生検筋（上腕二頭筋）を検索し次の結果を得た．

1）DMDでは1歳前後で筋ジストロフィーの病理学的特徴が完成していた．

2）筋線維タイプの分布では，タイプ2B線維はやや減少するが6歳頃まであまり大きな変動はなかった．

3）血管1本が支配する筋線維数はDMDで小であった.

4）血管内皮細胞はDMDでやや腫大傾向にあった.

5）重複基底膜をもつ異常血管の頻度はDMDで大であった.

文　献

1）Wakayama, Y. & Schotland, D.L.: Muscle satellite cell populations in Duchenne dystrophy. In Muscle Regeneration, ed. by Mauro, A., Raven Press, New York, 1979, pp. 121-129.

2）Hudgson, P., Pearce, G.W. & Walton, J. N.: Pre-clinical muscular dystrophy; histopathological changes observed on muscle biopsy. Brain, 90: 565-576, 1967.

3）Emery, A.E.H. & Burt, D.: Intracellular calcium and pathogenesis and antenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. Br. Med. J., 1: 355-357, 1980.

4）三池輝久，大谷宜伸，多久鑒一，吉岡毅：筋ジストロフィー症における血管説の再検討．第27回日本神経学会総会抄録集，1986，p. 44.

5）Koehler, J.: Blood vessel structure in Duchenne muscular dystrophy. I. Light and electron microscopic observations in resting muscle. Neurology, 27: 861-868, 1977.

6）Leinonen, H., Juntunen, J., Somer, H. & Rapola, J.: Capillary circulation and morphology in Duchenne muscular dystrophy. Eur. Neurol., 18: 249-255, 1979.

7）Jerusalem, F., Engel, A. G. and Gomez, M. R.: Duchenne dystrophy. I. Morphometric study of the muscle microvasculature. Brain, 97: 115-122, 1974.

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

杉田秀夫*

研究協力者　荒畑喜一*　石原傳幸**　埜中征哉*

目的

FSHはすでに，1862年Duchenneによりその存在が記載され，1884年Landouzy, Dejerineらにより疾患概念としてまとめられた．Waltonらはこれを Duchenne型筋ジストロフィー症(DMD)，肢帯型筋ジストロフィー症と並び代表的な筋ジストロフィー症の一型とした．本症は臨床的にきわめてheterogeneityが高いのみならず，病理組織学的にも特異的所見に乏しいものと考えられているが，生検筋にしばしば多数の細胞浸潤が出現することは古くより知られている[1]．ところがこれが本症の病因に関連した現象であるのか，単に筋壊死に随伴したものなのか，あるいは多発性筋炎の合併と見做すべきであるのか，未だ結論は得られていない．我々は今回，これらの疑問に対する解決の糸口を得ることを目的として，FSH15例に対してはじめて表面マーカーによる浸潤細胞サブセットの解析を試み検討を加えた．

対象

症例はFSH15例(男8，女7)．8例に遺伝歴を認めた．FSH型筋萎縮症を呈する他の疾患(ネマリン・ミオパチー，セントラル・コア病，筋強直性ジストロフィーおよびSPMA等）は除外した．年齢は5-62歳（平均26.5歳)．血清CK値511IU/L(50-8000)．発病から筋生検までの期間は4カ月～29年であった．なお随伴症状にはCoats' Syndrome,小脳のう胞，脳波異常が各1例ずつ存在した．

*国立精神神経センター神経研究所

**国立療養所東埼玉病院

方法

連続凍結切片を用い，一般組織化学的検索とともに，定量的免疫組織化学法[2]による浸潤リンパ球サブセットの解析を施行した．使用された単クローン抗体は，抗ヒト・T_{11}，T_4，T_8，B_1，Leu 7，Leu11，HLA-DR，HLA-A.B.C，IL-2R，γ-IFNおよびC_9などである．冷アセトン固定後，直接または間接蛍光抗体法，およびAvidin-Biotin-Peroxidase法による免疫染色を施し検鏡に供した．

結果

まず一般病現学的所見のまとめを表1に示す．程度の軽微なもの（Grade 1）まで含めると全例に単核細胞浸潤が認められた．壊死筋線維数は，細胞浸潤の著しい症例ほど多い傾向を見た．しかしこれは後述する如く，DMDや多発性筋炎にくらべれば，かなり少ないものであった．その他，筋線維の大小不同，中心核の増加，結合織の増生なども認められた．

次に代表的な血管周囲性の細胞浸潤を図1に示す．多数のT_4^+細胞（helper, inducer T-cell）とともにB_1^+ B細胞を認めることが特徴的であった．T_8^+細胞（supressor, cytotoxic T-cell）は散在性に認められたが，Leu 7^+細胞（K/NK cell）は少数であった．またLeu11^+細胞（mature K/NK cell）はほとんど見られなかった．このほかにはacid phosphatase強陽性のマクロファージが散見された．

定量的結果は表2に示すとおりである．単位筋線維（1000本）あたりに出現した各リンパ球サブ

表1　SUMMARY OF PATHOLOGICAL FINDINGS

F S H　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

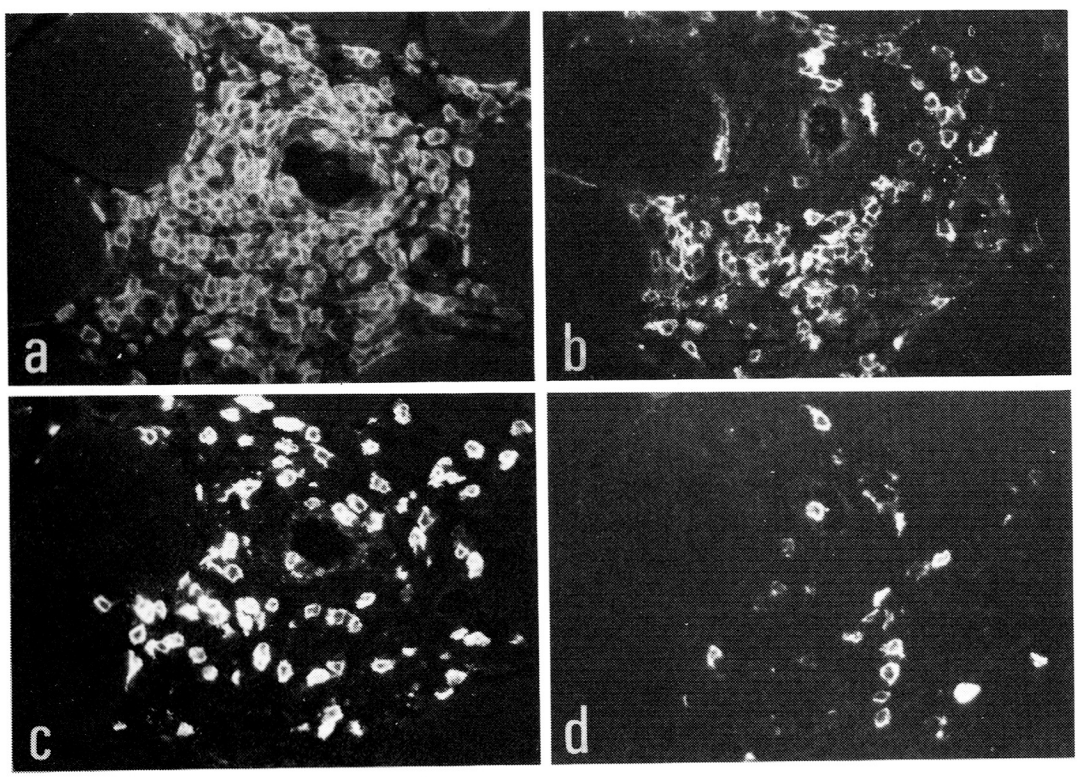


図1　FSH，16歳，男性：血管周囲性に多数の T_4^+ 細胞（a），中等量の B_1^+ 細胞（b）と T_8^+ 細胞（c）および少数の Leu 7^+ 細胞（d）の浸潤を認める．（×360）

表2　PERCENT DISTRIBUTION OF ENDOMYSIAL MONONUCLEAR CELLS IN FSH WITH PROMINENT CELLULAR EXUDATE

CELL TYPE	Perivascular	Perimysial	Endomysial
B cells(B-1$^+$) (%)	23.3±1.6	8.8±4.5	3.6±4.6
Macrophages (%)	27.0±17.7	37.7±13.2	22.8±8.8
T cells(T-11$^+$) (%)	49.7±17.2	53.6±15.1	73.7±12.1
T8$^+$/T cells (%)	63.9±36.5	67.8±23.1	64.8±21.1
T4$^+$/T cells (%)	58.8±13.9	47.1±21.1	50.0±22.6
T4$^+$/T8$^+$ ratio	1.12±0.57	0.81±0.45	1.04±0.61
B cell/T cell ratio	0.36±0.23	0.18±0.10	0.06±0.08
Leu 7$^+$ cells (%)	12.2±9.5	14.5±4.3	12.8±4.7

セット（%）を部位別に示した．B細胞は主として血管周囲性に存在し筋内膜には少なかったが，T細胞はより広く分布した．T_4/T_8 比はいずれの部位においても1.0内外であった．マクロファージ，Leu 7$^+$ 細胞も広く分布し，それぞれ23-38%，12-15%を数えた．HLA-Class I および Class II抗原の表出や IL-2R や γ-IFN は微弱で，正常筋と大差が無かった．筋線維1000本あたりの壊死筋線維数（C_9^+，MAC$^+$）は1.33±0.52（SE）であった．この値は DMD や多発性筋炎にくらべてかなり少ない値である．

考　　察

FSH における細胞浸潤の特徴の第1は，その分布様式が血管周囲性にかなり多いことである．これは DMD（血管周囲への出現頻度はきわめて低く，主として筋内膜の浸潤を見る）や，強皮症（筋周膜に浸潤を見る）の場合と大きく異なり，皮膚筋炎のそれに類似する[3]．第2の特徴は，これら血管周囲性の浸潤細胞に占める B_1^+ B細胞の頻度が23%と高いことである．DMD における B細胞の出現は FSH と異なり稀である[3]．FSH では多発性筋炎（16%）と皮膚筋炎（40%）の中間的なところに位置するといえよう．第3の特徴は**表3**から明らかなように，FSH では壊死筋線維数が DMD の10分の1程度と少数であるにもかかはらず，浸潤リンパ球数がむしろ多いことである．このように見てくると，FSH における細胞浸潤は DMD の場合と様相を異にし，筋壊死に随伴する epiphenomenon であると単純には考えにくいものと思われる．次に第4の特徴は，多発性筋炎との対比になるが，FSH では非壊死筋線維内への T細胞の invasion が全く認められなかったのに対して，多発性筋炎では高率に認められたことである（**表3**）．この事実は FSH のリンパ球浸潤が多発性筋炎のそれとは異なる機序によることを示唆する．ここで FSH の細胞浸潤の分布様式，サブセットのパターンに最も近似する疾患を強いて挙げるとすれば皮膚筋炎であろう．しかしながら，FSH では皮膚筋炎に特徴的とされる臨床症状を示さないのみならず，Perifascicular atrophy は全く認められないし，血管壊死なども存在しない．

以上の結果は，FSH における細胞浸潤が FSH の病因と密接にかかわり合っている可能性を示唆しているものとも考えられて興味深い．今後さらに臨床との対比も含めて掘り下げていく必要があろう．

結　　論

(1) FSH における骨格筋内細胞浸潤は単に筋線

表3 ENDOMYSIAL CELL COUNTS, FREQUENCY OF NECROTIC MUSCLE FIBERS, AND FREQUENCY OF NONNECROTIC FIBERS INVADED BY MONONUCLEAR CELLS PER 1000 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 Non-nec. Fibers		11.5±8.9	2.6±0.8	0	0

*,FSHD with prominent cellular exudate
#,values indicate mean±SE

維壊死に随伴したepiphenomenonとは考えにくい. (2) FSHにおける細胞浸潤は多発性筋炎の場合と異なる態度を示す. (3) T-B cellの存在様式はFSHにおいて局所液性免疫反応の存在する可能性を示唆する.

文　献

1) Dubowitz, V., Brooke, M.H., et al.: Muscle biopsy: A modern approach. W.C.Saunders Co. Ltd., London, 1973.

2) Engel, A.G. and Arahata, K.: Mononuclear cells in myopathies: Quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigenspecific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. Human Pathology 17: 704-721, 1986.

3) 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.

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

若　山　吉　弘*

研究協力者　熊　谷　俊　幸**　自　見　隆　弘*

Duchenne 筋ジストロフィー症（DMD）ではその病因として筋細胞膜異常が重要であると考えられている．筋細胞膜内部の微細構造を凍結割断法を用い調べてみると DMD では orthogonal array とその subunit particle 密度の減少及び caveolae の増加傾向がみられる[1),2),3)]．従来 DMD 類似の筋病理組織像が虚血[4)]や各種薬剤[5),6)]による実験的筋障害で出現することが報告されており，このような場合，筋細胞膜も同様の変化を示す可能性があり，虚血[4)]やマーカイン[5)]，Ca-イオノフォア[6)]等で実験的に rat の EDL 筋に障害を与え，凍結割断法により観察されたが，同様な変化は見られなかった．従って DMD でみられる筋細胞膜の変化は筋細胞膜の破壊実験では作製が困難であるようであり，この変化が他の筋ジストロフィー症でみられるかどうか興味がもたれる．我々は一昨年より福山型先天性筋ジストロフィー症生検筋を用いて検討しており，今迄に orthogonal array やその他の膜内粒子の減少を報告[7)]してきたが，本年度は筋細胞膜内の orthogonal array subunit particle 密度に関して検討した．

材料と方法

福山型先天性筋ジストロフィー症（FCMD）6例の大腿四頭筋生検筋と整形外科手術例幼小児の大腿四頭筋のうち組織化学的に正常なもの6例及び軽度の筋緊張低下を有する幼児1例からの組織化学的に正常な大腿四頭筋を対照とした．7例の正常対照生検筋の pH9.4preincubation による myosin AT Pase 染色標本では type 1 fiber が44.3%，type 2 fiber が55.7%であり，6例の FCMD では type 1 fiber が49.6% type 2 fiber が50.4%であった．このうち5例の正常対照例と3例の FCMD では pH9.4，4.6，4.3preincubation による myosin AT Pase 染色をおこない正常対照筋では41.5%の type 1 fiber，31.1%の type 2 A fiber，27.4% type 2 B fiber が，また FCMD 筋では48.0%の type 1 fiber，23.6%の type 2 A fiber，9.8%の type 2 B fiber，19.2%の type 2 C fiber がみられた．

凍結割断法のために標本を U 型筋鉗子に at rest length で採取し，あるいはマッチ棒に at rest length で糸で固定し，ただちに冷却した2.5%グルタールアルデヒド溶液（0.1M リン酸緩衝液 pH7.4）で固定した．実体顕微鏡下で外層の筋線維束を細切し，10%，20%，30%グリセリン水溶液に室温でそれぞれ30分ずつ通し浸軟した．浸軟後標本は液体窒素にて凍結し，EikoFD II A 凍結割断装置に装着し，真空度2.5～4 $\times 10^{-7}$Torr，－120℃の条件下で割断し，ただちに膜圧計にて膜圧を一定にしてプラチナとカーボンを電子銃にて蒸着しレプリカ膜を作製した．レプリカ膜に付着した筋組織片は市販の塩素系漂白剤にて消化後，蒸留水にて水洗し，グリッドメッシュにすくい乾燥後電顕にて観察し写真を撮影した．

レプリカ膜は次の基準にあうもののみ写真撮影した．すなわち1）細胞外空間が smooth であるもの，2）細胞膜に存在する膜内粒子の直径が小さいものから大きいものまでまちまちであること，3）細胞膜の back ground がきめ細かく，また P

＊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

面E面とも pit が明確に存在するものである．また筋細胞膜の同定は1）orthogonal array の存在するもの，2）筋細胞の内部と連続した細胞表面膜，3）割面に sarcomere outline のあるものなどでおこない，このような筋細胞膜内面を at random に写真撮影した．

orthogonal array subunit particle 密度の算出は FCMD 群か正常対照群かがわからない状態で160,000倍に引き伸ばした6つ切りの写真の1～1.85μm^2 の領域でおこなった．orthogonal array は P 面では直径6 nm の粒子がまた E 面では直径6 nm の pit が4個以上結晶状に集合したものとして同定した．orthogonal array 密度は正常対照筋では FCMD 筋に比しずっと大きいことが以前の研究[7] でわかっているので，正常対照例では1例につき10個の筋細胞膜を FCMD では1例につき30個以上の筋細胞膜（正常対照70個，FCMD251個計321個）をすべて code し混ぜ合わせどちらかわからない状態とした．これらすべての print に存在するすべての orthogonal array 及びその pit につき subunit particle と subunit pit を算出し，decoding 後，各群のすべての症例につき1個の orthogonal array 当たりの subunit particle 密度を算出し，これらの値を両群間で統計的に比較検討した．尚 P 面では subunit particle 数の算出がしばしば難しいことがあるが，E 面では subunit pit 間距離が約6 nm なので pit の直径は約6 nm と考えられ P 面での subunit particle の直径も約6 nm と考え，6 nm 間隔の mark のついた定規で P 面の subunit particle 数の算出をした．

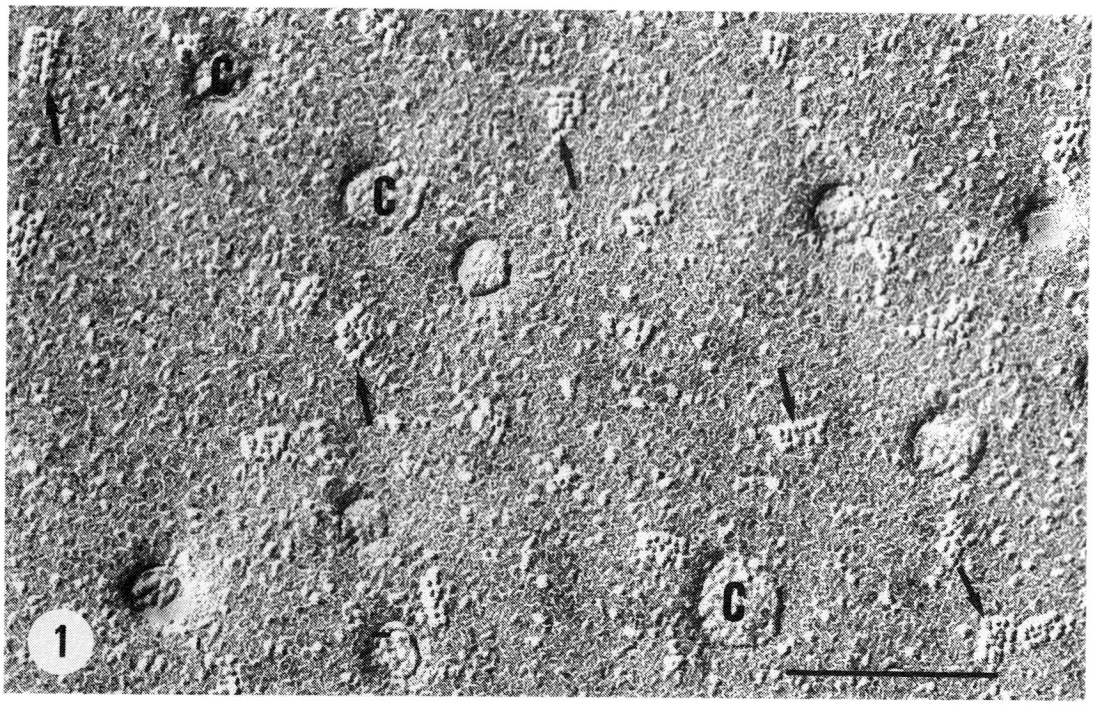
結　　果

正常対照生検筋細胞膜の高倍の電顕写真は P 面では辺縁が smooth な E 面では辺縁が隆起した caveolae の存在や，E 面より P 面に多い種々の直径の膜内粒子の存在，それに P 面には orthogonal array，E 面にはその pit の存在を示した．正常対照 P 面（図1）と FCMD の P 面（図2）はともに種々の直径の膜内粒子の存在がみられるが，これらと orthogonal array の密度はともに FCMD で減少していた[7]．

さて本年度検討した orthogonal array subunit particle 密度は図3のヒストグラムのように FCMD 群で減少しており，全体的に分布が左へ shift していた．6例の FCMD における1個の orthogonal array 当りの subunit particle 密度は group mean±standard error of the mean が 11.7±0.7，7例の正常対照ではそれが20.4±0.3 で FCMD で統計的に有意（$P<0.001$）に subunit particle の減少がみられた．

考　　察

orthogonal array は細胞膜の P 面のみに存在する装置で筋細胞膜のみならず，脳の astroglia，腎の renal tubular cell など多くの組織に分布している．現在その機能については不明であるが，1）細胞膜の透過性を調節，2）ion channel，3）浸透圧調節，4）上衣細胞の活動の伝播，5）cell-to-cell communication，6）細胞間接着などの機能が考えられている[1),2)]．また脳の astroglia では短時間の虚血で消失することが報告されているが，骨格筋では長時間の虚血でも尚保存されていること[4)] より，単一の機能をもつものとは限らないかもしれない．またこの構造物は筋線維タイプにより密度が異なるとされるが，本研究では両群間で type 1 fiber の割合に差は見られなかった．従って subunit particle 密度の減少は FCMD 筋に見られる多くの type 2C fiber による可能性もあるが，その場合 subunit particle 密度のヒストグラムによる分布が FCMD で2峰性ないし幅広い分布となり今回のように低密度へ shift したような形はとらないと考えられるので，orthogonal array subunit particle 密度の減少はほぼすべての FCMD 筋細胞膜で見られ，FCMD 筋の未熟性を反映しているのではないかと考えられる．DMD と FCMD の発症機序が同じかどうかは不明であるが，本研究の結果は1）FCMD の異常遺伝子により orthogonal array subunit particle の構成蛋白の産生が欠除ないし減少しているのか，筋細胞内でのこの構成蛋白の細胞膜への輸送機序が異常であるのか，2）FCMD の運動神経側に原



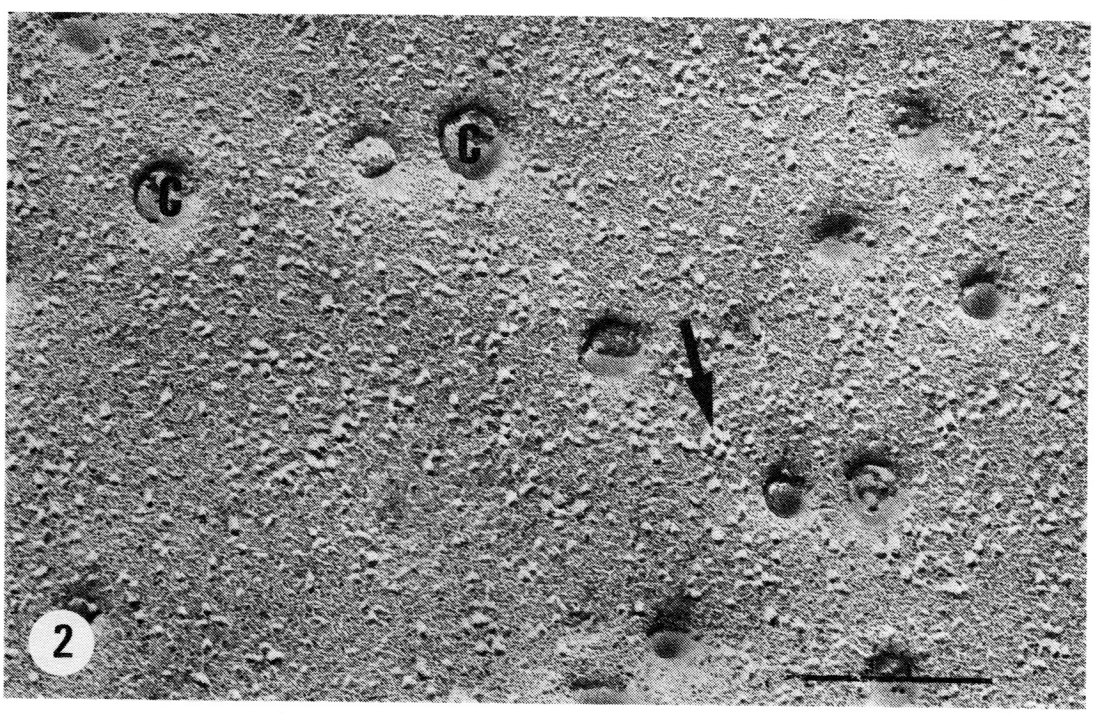


図1，2　正常対照骨格筋（図1）と FCMD 骨格筋（図2）の細胞膜 P 面の高倍の電顕像で，両者とも orthogonal array（矢印）はみられるが，FCMD でその頻度が少なく，かつ subunit particle 数の減少がみられる．（×160,000）

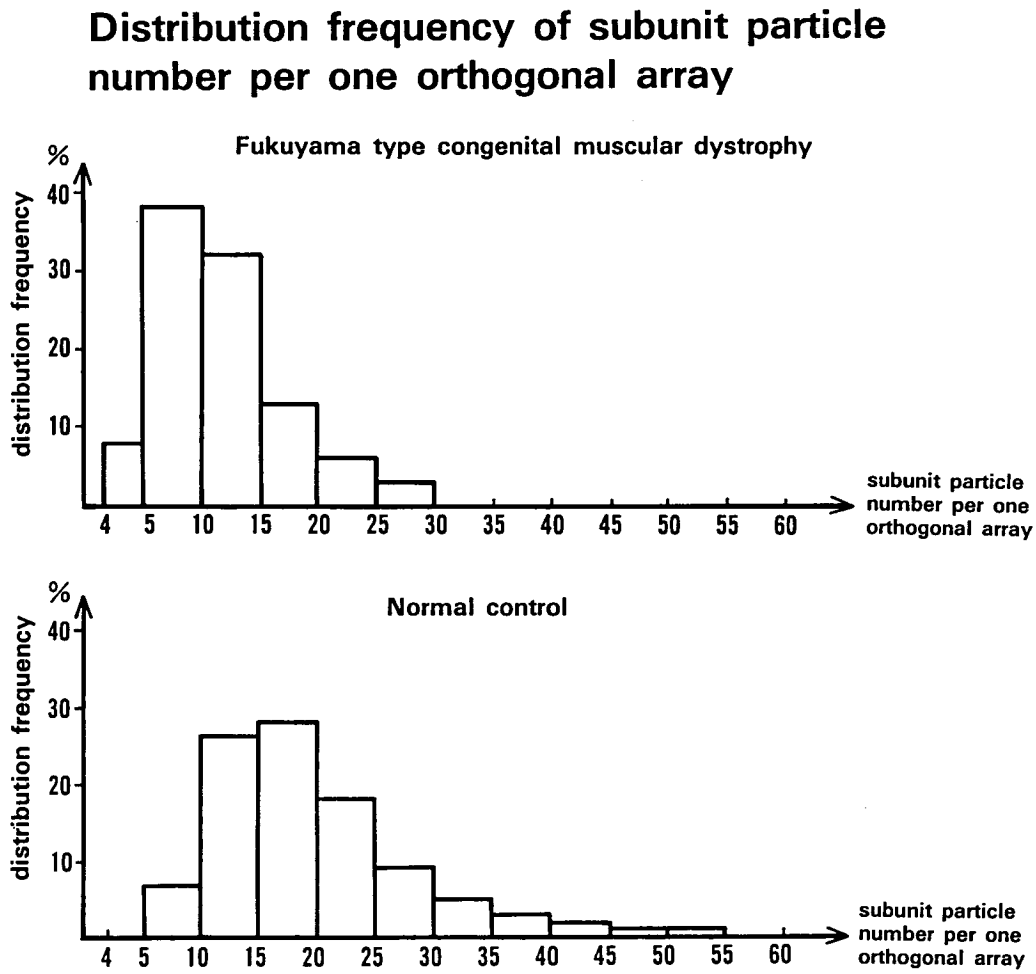


図3　正常対照骨格筋とFCMD骨格筋細胞膜にあるorthogonal array 1個当りのsubunit particle数の度数分布を示す.

因があるのか，3）筋細胞と運動神経末端とが本症でみられる厚い結合織の増殖により接触不良で筋細胞への神経支配が正常におこなわれないためなのか，種々の機序が考えられる．今後はsubunit particleの構成蛋白の同定とその機能の解明，及びその筋細胞内でのbiogenesisと筋細胞膜への輸送，膜への組込み並びにこれらの過程への神経支配の影響等を検討することがFCMDやDMDの発症機序を解明するうえで大切と考えられる．

文　献

1）Schotland , D.L., Bonilla, E. & Wakayama, Y.: Freeze fracture studies of muscle plasma membrane in human muscular dystrophy. Acta Neuropathol(Berl.), 54 : 189-197, 1981.

2）Wakayama, Y., Okayasu, H., Shibuya, S. & Kumagai, T.: Duchenne dystrophy: reduced density of orthogonal array subunit particles in muscle plasma membrane. Neurology, 34 : 1313-1317, 1984.

3) Bonilla, E., Fischbeck, K. & Schotland, D.L.: Freeze-fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. Am. J. Pathol., 104 : 167-173, 1981.

4) Wakayama, Y., Okayasu, H. & Kumagai, T.: Quantitative freeze fracture electron microscopic study of muscle plasma membrane of experimental anoxic myopathy. J. Neurol. Sci., 63 : 411-421, 1984.

5) Wakayama, Y. & Shibuya, S.: Quantitative freeze-fracture electron-microscopic analysis of muscle plasma membrane of bupivacaine-induced myopathy. J. Neurol. Sci., 72 : 31-42, 1986.

6) Yoshimura, T., Tsujihata, M., Satoh, A., Mori, M., Hazama, R., Kinoshita, N., Takashima, H. & Nagataki, S.: Ultrastructural study of the effect of calcium ionophore, A23187, on rat muscle. Acta Neuropathol. (Berl.) ,69 : 184-192, 1986.

7) Wakayama, Y., Kumagai, T. & Shibuya, S.: Freeze-fracture studies of muscle plasma membrane in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Neurology, 35 : 1587-1593, 1985.

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—

若山吉弘*

研究協力者　熊谷俊幸**自見隆弘*　渋谷誠二*

Duchenne筋ジストロフィー症（DMD）では，その病因として筋細胞膜異常が重要であると考えられている．この異常として凍結割断法でみられる筋細胞膜内のorthogonal array[1)2)]やそのsubunit particleの減少[2)]やcaveolae[3)]の増加傾向がみられている．膜の脂質構成はその機能と密接な関連があり，筋ジストロフィー症のような病的状態でのその変動には興味がもたれるが，DMD生検筋細胞膜ではそのcholesterol含量も増加[4)]していることが報告されている．現時点では骨格筋細胞膜を生化学的に純粋に抽出することは不可能に近い．しかし電顕的にはsterolと特異的に1：1で結合し，水に不溶性の複合体を形成するdigitoninを用い[5),6)]，筋細胞の細胞膜上で管状の構造物のpatchyな集合体として反応産物がみられるfreeze fracture法により反応領域の広さで膜のcholesterol含量を解析することは可能である．我々は一昨年より福山型先天性筋ジストロフィー症（FCMD）の筋細胞膜の微細構造をDMDのそれと比較検討しており，orthogonal array[7)]やそのsubunit particleの減少[8)]など類似所見を発見しているが，今回はFCMD生検筋細胞膜のcholesterol含量について検討した．

材料と方法

FCMD 6例の大腿四頭筋生検筋と組織化学的に正常な幼小児整形外科手術例6例の大腿四頭筋生検筋をU型筋鉗子にはさみat rest lengthで採取し，あるいはマッチ棒につけ両端を糸でat rest lengthでくくり，直ちに冷却した2.5% glutar aldehyde溶液（0.1M cacodylate buffer PH7.4）で2時間固定し電顕観察用標本とした．またこれら症例からの生検筋の一部は液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結し10μの厚さのcryosectionを組織化学的に染色した．myosin ATPase染色にて6例のFCMDと6例の正常対照とでtype 1 fiberの割合がそれぞれ49.6%，48.4%であった．digitonin染色はsigma社製crude digitoninを2 mg/mlの割合で2.5% glutar aldehyde溶液（0.1M cacodylate buffer pH7.4）に溶解した液のなかへ上記電顕観察用固定標本の1部を細切したものを入れ，室温で3時間反応させおこなった．

凍結割断法のためにdigitoninと反応させた筋組織を10%，20%，30%のグリセリン水溶液中でそれぞれ室温にて30分ずつ浸軟した．浸軟後標本を液体窒素で凍結し，EikoFDIIA凍結割断装置に装着し，真空度2.5～4×10^{-7} Torr，−120℃で割断し，直ちに膜圧計で膜圧を一定にし，プラチナとカーボンを蒸着しレプリカ膜を作製した．レプリカ膜に付着する筋組織を市販の塩素系漂白剤で消化後水洗し，グリッドメッシュにすくい乾燥後電顕にて観察し写真を撮影した．筋細胞膜の同定はorthogonal arrayの存在する細胞膜，筋細胞の内部と連続した細胞表面膜，それに割面にsarcomere outlineのあるものなどでおこなった．

レプリカ膜を電顕で観察し30μm^2より広い面積をもつ筋細胞膜をselection biasを避けるため出てくる順番に1症例につき20枚以上，original3,000倍で電顕写真をとり，最終倍率

＊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

図1 A, B：Aは正常対照筋，BはFCMD生検筋細胞膜のdigitonin-cholesterol複合体の低倍電顕写真で，rod状反応物質はFCMD生検筋細胞膜に多い（×40,000）

12,000倍で6つ切りの印画紙に焼付けた．FCMD 6例，正常対照6例からそれぞれ148個，143個の異なる筋細胞膜計291個のすべての写真をcodeし，それぞれの筋線維全表面積に占めるdigitonin-cholesterol複合体の面積の割合を画像解析装置を用い算出し，すべて算出し終えた段階でdecoding後，両群間で統計的に有意差を検討した．

結　　果

digitonin-cholesterol複合体は今回検索した12例のすべての生検筋細胞膜にみられ，低倍の電顕像ではrod状の反応産物が集合したpatchy area

（図1 A，B）として見られた．この反応部位を高倍に拡大してみると個々の反応産物は太さ約50nm，長さ200～300nmのrod状の形態をしており（図2），この構造物は筋細胞膜の微細構造，例えばcaveolaeやorthogonal arrayとは無関係に分布していた．

この反応産物は正常対照とFCMDとではFCMD生検筋細胞膜の多くでより大きな反応領域としてみられ，筋細胞全表面積に占める反応産物の割合のgroup mean±standard errorが6例の正常対照では31.9±2.9%であったのに対し，6例のFCMDでは51.2±4.7%であり統計的に有意（$P<0.01$）にFCMDで反応面積が大きかった．個々の筋線維におけるその割合の度数分布のヒストグラムを作製すると図3のようになり，正常対照ではかなり反応産物のみられない筋線維が存在するのに対して，FCMDでは露出筋細胞膜の全体が反応産物で覆われているものが，かなり観察された．尚前記したように，FCMD群と正常対照群とでは筋線維タイプに関してはtype 1 fiberの割合では差がみられなかった．

考　　察

digitonin-cholesterol複合体の含量はdigitoninが主として3-β-hydroxysterolと結合するので，sterol主にcholesterolの膜内の濃度に比例する．ちなみにsterolを含まない人工膜の場合にはこの複合体がみられない[6]．また生化学的にcholesterol含量の多いことがわかっている遅筋（type 1 fiber）において速筋（type 2 fiber）よりも筋細胞膜のcholesterol含量が増加していることが報告されている[9]．我々の今回のFCMD生検筋細胞膜の検索でFCMDでは正常対照に比し有意にその筋細胞膜のcholesterol含量が増加していることが判明したが，これはFCMD筋の筋線維タイプが対照と差がなかったことより，何らかの病的状態を反映しているものと考えられる．このような筋細胞膜のcholesterol含量の増加は

図2：正常対照筋細胞膜にみられる反応産物の高倍電顕像でrod状物質は巾約50nm長さ約300nmの大きさからなり，その下にはorthogonal array（矢印）も見られる．（×160,000）

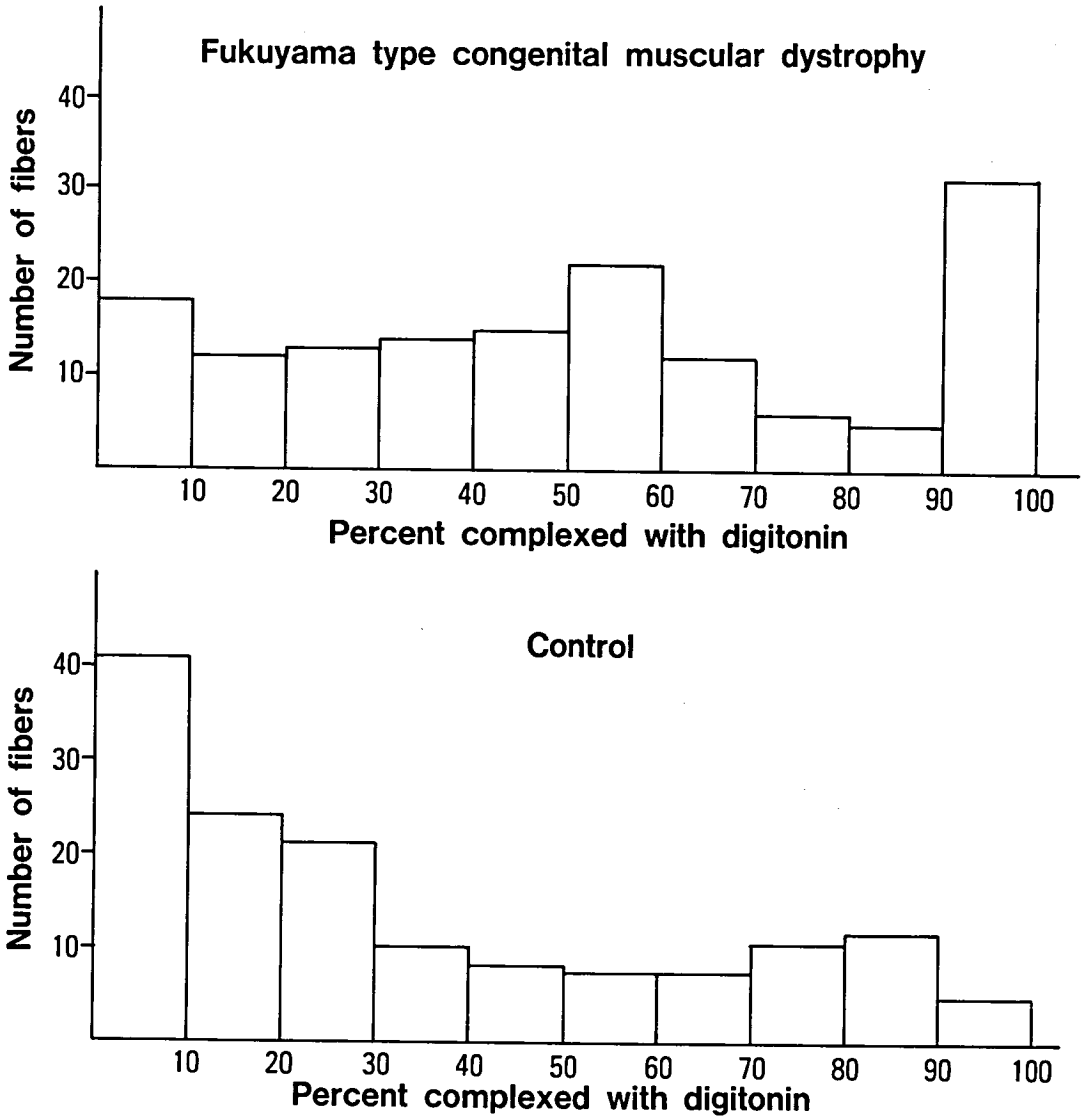


図3：個々の筋線維における反応産物の面積の筋表面積に対する割合の度数分布のヒストグラム.

DMDで報告されているが，例えば多発性筋炎のような他疾患では見られないことが報告されている[4]ので，筋ジストロフィー症筋の1つの特徴かもしれない．未熟な筋組織はcholesterol含量が多いので，FCMDやDMDで見られる再生筋細胞がこれらの結果に何らかの影響を与えている可能性も大きいが，同様に多くの変性・壊死線維の見られる多発性筋炎でdigitonin-cholesterol複合体の増加は見られなかったと報告されている[4]ことより，本研究の結果はFCMD筋の全体的な未熟性に関係しているのかもしれない．このようなFCMD筋細胞膜の異常は，本症生検筋細胞膜で我々が今迄に発見している膜内粒子やorthogonal array[7]やそのsubunit particle密度[8]の減少と密接に関連しているものと考えられる．このようなFCMD筋の筋細胞膜の脂質構成の異常

は本症骨格筋細胞膜の機能の低下，ひいては骨格筋細胞の変性，壊死の原因となっている可能性が考えられる．

文　献

1) Schotland, D.L., Bonilla, E. & Wakayama, Y.: Freeze fracture studies of muscle plasma membrane in human muscular dystrophy. Acta Neuropathol (Berl), 54 : 189-197, 1981.

2) Wakayama, Y., Okayasu, H., Shibuya, S.& Kumagai, T.: Duchenne dystrophy : Reduced density of orthogonal array subunit particles in muscle plasma membrane. Neurology, 34 : 1313-1317, 1984.

3) Bonilla, E., Fischbeck, K. & Schotland, D.L.: Freeze-fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. Am.J. Pathol., 104 : 167-173, 1981.

4) Fischbeck, K.H., Bonilla, E. & Schotland, D. L.: Freeze-fracture analysis of plasma membrane cholesterol in Duchenne muscle. Ann. Neurol., 13 : 532-535, 1983.

5) Windaus, A.: Uber die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. Ber. Chem. Ges., 42 : 238-247, 1909.

6) Elias, P.M., Goerke, J. & Friend, D.S.: Freeze-fracture identification of sterol-digitonin complexes in cell and liposome membranes. J. Cell Biol., 78 : 577-596, 1978.

7) Wakayama, Y., Kumagai, T.& Shibuya, S.: Freeze-fracture studies of muscle plasma membrane in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Neurology, 35 : 1587-1593, 1985.

8) Wakayama, Y., Kumagai, T.& Jimi, T.: Small seize of orthogonal array in muscle plasma membrane of Fukuyama type congenital muscular dystrophy. Acta Neuropathol (Berl), 72 : 130-133, 1986.

9) Fischbeck, K.H., Bonilla, E.& Schotland, D.L.: Freeze-fracture analysis of plasma membrane cholesterol in fast-and slow-twitch muscles. J. Ultrastruct. Res., 81 : 117-123, 1982.

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

中　村　晴　臣*

研究協力者　　高　田　邦　安*

福山型先天性筋ジストロフィー（以下FCMDと省略）の大脳奇形は胎生期の神経細胞の遊走異常によっておこるといわれ，また脳軟膜下のグリア増生の所見から胎内感染が原因である[1]とも言われているが，まだ不明の点が多い．今回，我々はゴルジ染色，血管鍍銀法，パラフィン連続切片の3次元再構築を用いて皮質構築の詳細を検討した．またFCMDの姉を持ち，23週で流産した胎児の脳奇形を検索する機会をえ，形態学的に検討した．それらの結果を踏まえ，本症の大脳奇形の発生機序について考察を加える．

方　　法

3例のFCMD剖検例（2歳女；6歳女；29歳男）について，ホルマリン固定後の大脳皮質にGolgi染色と血管鍍銀染色を施した．FCMDの大脳皮質は広範な細胞構築異常を示すが，その異常パターンは3段階に大別できる（**表1**）[2]．そこでGolgi染色については各異常パターンそれぞれの部位から小切片を切り出し，十分な水洗の後，3％重クロム酸カリ：10％ホルマリンの20：1混合液内で8～10日間固定，蒸留水で洗った後0.75％硝酸銀溶液に24～48時間浸漬，組織片を脱水，透徹，パラフィン包埋後，50～100μに薄切し，脱パラ後封入，個々の細胞形態をcamera lucidaで最終倍率270倍で描画した．隣接する各部位から同じく小組織片を切り出し，100～200μの凍結切片を作り，HasegawaとRavensの方法[3]により，Rio Hortegaのリチウム銀で血管鍍銀を加えた．また，一部組織片はパラフィン包埋後，連続切片を作り各種染色を施して，血管構築の3次元的構築の検討に供した．

胎児脳はホルマリン固定後，いくつかの冠状断を加え，パラフィン包埋後，切片に通常の組織染色と，PAP法によるグリア線維酸性蛋白(GFAP)染色を施行した．この症例の姉（3歳）はFCMD患者で，重度の精神発達遅滞を示し，筋生検でジストロフィー変化を認めている．両親に近親婚はない．

表1　FCMDにおける3段階の皮質形成異常[2]

皮質形成異常	細　胞　構　築
Type 1	6層構造を保つ verrucose dysplasia、 microsulcus を認める
Type 2	小多脳回（層形成無し） microsulcus　多数 verrucose dysplasia
Type 3	表面は平滑 1．接線線維を含む表層 2．厚い細胞層 3．ミエリン層 4．深部の細胞層

結　　果

Golgi法

1型では細胞は概ね皮質表面に垂直に配列し，個々の神経細胞の形態もおおむね正常と見なされ，

*鳥取大学医学部神経病理

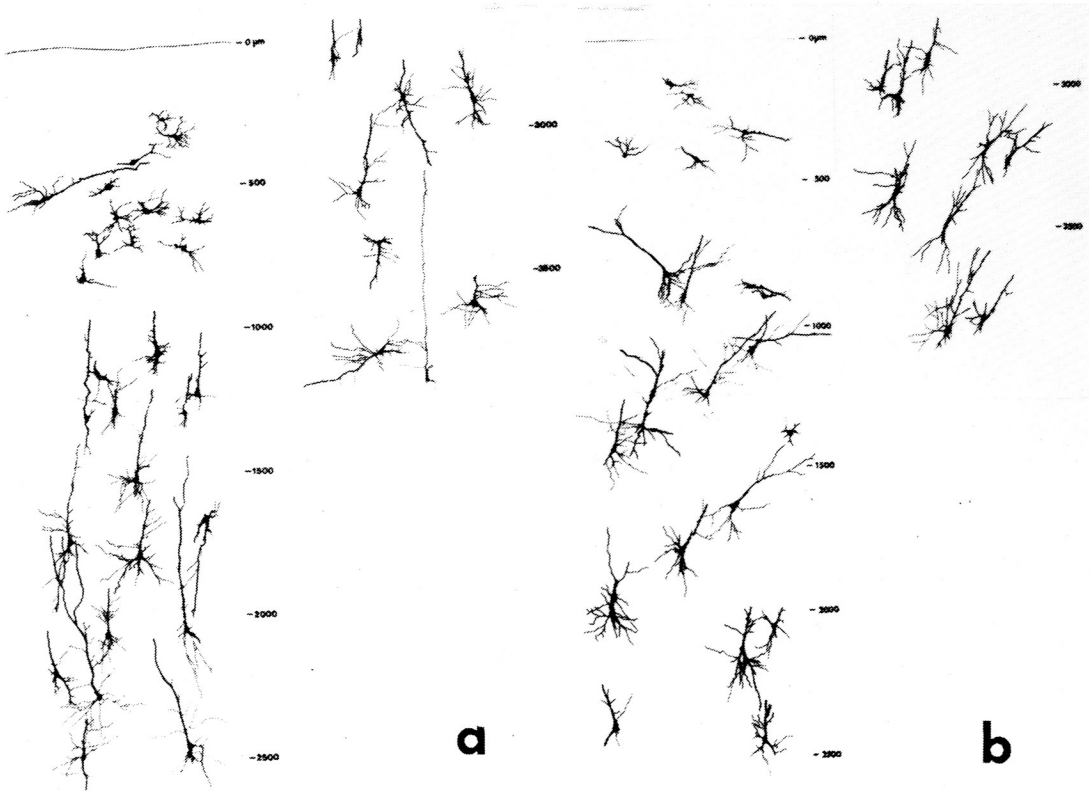


図1　Golgi 染色標本描画像；
　a　1型形成異常（verrucose dysplasia の部分）
　b　2型形成異常

錐体細胞が多数認められた（図1 a）．1型の verrucose dysplasia，2型の小多脳回の最上部ではそれぞれ突起の向きの不定な異常細胞が多い．2型の深部では神経細胞はおおむね互いに平行に並んでいたが，所によってさまざまの傾きがあり，細胞形態は樹状突起の側方への発達不良を示すものが多く，また層分化も1型に比べ未熟だった（図1 b）．3型では，配列の異常と神経細胞の未熟性が顕著で，殆どの神経細胞で樹状突起の発達不良・その向きの不規則性を示した．また細胞体も丸形・極端に細長いものなど，異常形態を示した．神経細胞の平行配列はほとんど認めないが，僅かに皮質深層の有髄線維束に沿って，樹状突起の発達の悪い神経細胞が平行に配列するのを認めた．

血管構築

1型では正常皮質と同様，穿通血管は脳表から直角に進入した．verrucose dysplasia の部分にはしばしばやや径の太い「中心血管」（そのほとんどは静脈と見なされた）が存在した．2型では血管構築は特に上層部でかなり乱れ，実質の分離しない脳溝と見なされる microsulcus に一致して，太い血管の集積が認められた（図2 a）．3型では，上2/3で大小の血管が不規則に走行・分岐・吻合する高度の異常パターンを示し，中層部に表面と平行して走る太い血管があり，そこからさらに深部では血管はむしろ垂直に進入していた（図2 b）．

胎児脳の所見

FCMD の胎児脳は対照脳とほぼ同じ大きさだ

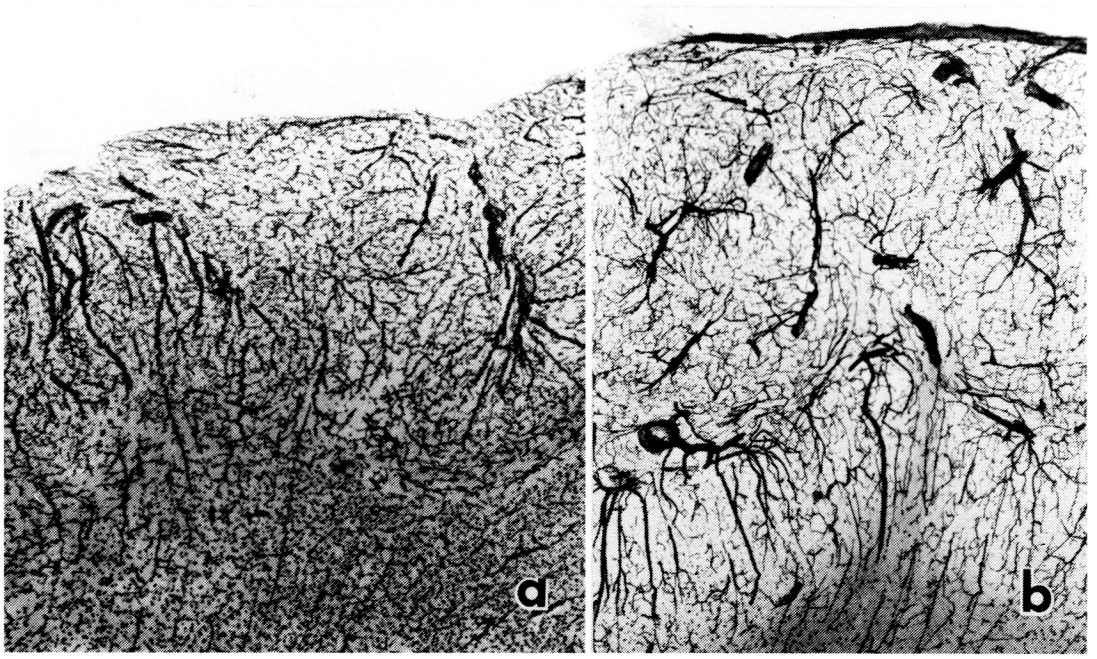


図2　血管鍍銀標本；
a　2型形成異常
b　3型形成異常

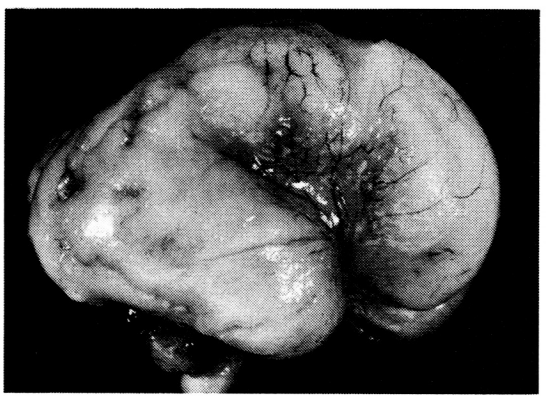


図3　FCMD 胎児脳；側面

が，側面特に側頭葉から島回，頭頂葉の一部で脳軟膜が肥厚し，表面の光沢が減少していた．また対照脳で見るような放射状の中大脳動脈の分枝が不明瞭だった（図3）．

組織学的には，大脳深部の基底核，視床，大脳白質などに著変はなかった．大脳皮質の cortical plate は穹隆部や内側面ではほぼ正常の厚さで，側頭葉では皮質細胞層は著しく厚かった．また大脳のほぼ全面で軟膜下グリア間葉性組織の増生があり，その厚さに比例して，一般の FCMD の脳と同じく3種類の皮質細胞構築の異常段階を示した．図4はその3段階の異常パターンをシェーマで示したものである．

先ず，鳥距溝の付近（type 1）では cortical plate は概ね正常に形成され，神経細胞はこの時期に顕著な垂直配列を明らかに示していた．皮質を覆うグリア組織は比較的薄く，この中に神経細胞の小集団が突出するのが見られ，ときには中に白質を含むやや大きい結節状隆起が，膜組織を押し上げていた．GFAP 染色では，胎生期に神経細胞の遊走をガイドするといわれる radial glia が一見正常な柱状配列を保つ神経細胞層内に明らかに染め出され，グリア膜の下まで延びていた．

前頭葉や頭頂葉（type 2）では表在グリア層は更に厚くなり，cortical plate からの神経細胞集団の突出の頻度が一層高くなっており，また時にはグリア層の中に孤立した細胞集団を作っていた．神

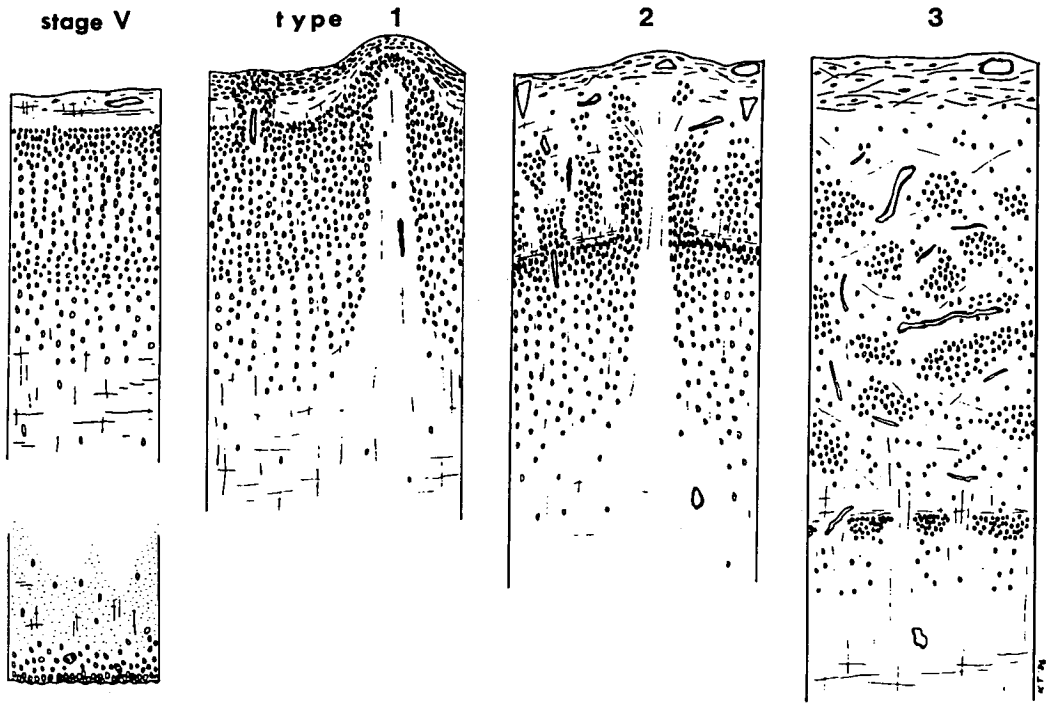


図4　FCMD 胎児脳における 3 段階の異常パターン，左端は stage V（胎齢16週以後）の正常大脳皮質

経細胞集団が外に向かって突出する結節の中心ではしばしば細い血管が垂直方向に貫いていた．GFAP 染色では，radial glia が 1 型同様，神経細胞層内に染め出され，グリア膜との境界部で突起の先端が水平に並び，そのほかこの境界面を越え，上方の神経細胞集団の内部にまで延びる radial glia も認めた．

側頭葉や後頭葉の外側部 (type 3) では皮質神経細胞層が厚く，内部は垂直配列のパターンを全く認めない不規則な細胞集団の集合で，血管やグリア間葉組織と入り交じっていた．ここでは radial glia は皮質の最深部に僅か認められるのみだが，突起を延ばしたアストログリアは多数存在した．

考　　察

大脳の正常発達においては，ventricular zone で分裂・増殖した神経細胞の precursor cell は，radial glia をガイドに遊走し，最外層の marginal zone の直下に，後続のものが先着のものより外側に順次到着して（'inside out' の原則）cortical plate, すなわち将来の大脳皮質をつくる[4]．このため生後しばらくまで皮質神経細胞は明らかな柱状配列をとるが，個々の神経細胞の分化・成熟にともない柱状配列は不明瞭となる．しかし，Golgi 染色では錐体細胞は apical dentrite を脳表に向かって垂直にのばし，互いに平行に並んでいるのが分かる．

Golgi 染色による検討の結果，FCMD の 1 型では，verrucose dysplasia の先端部を除いてこの垂直配列は保たれるが，2 型，3 型と細胞構築異常の程度が進むと，その配列の乱れが高度となり，個々の神経細胞の形態異常も細胞構築異常の段階に応じて高度となることが示された．この結果は，4 層型無脳回あるいは他の型の小多脳回の Golgi

解析の結果とは異なっている．すなわち，FCMDの奇形発生は，細胞遊走中期での遊走抑止（無脳回），細胞遊走終了後の皮質におこった層状のhypoxicな傷害(小多脳回)などとは，異なった発生機序によるものと推測される．

一方，皮質栄養血管はcortical plateの形成とともに発達し[5]，正常では神経細胞遊走終了の少し前にあたる胎齢15週以降成人に至るまで，皮質を垂直に貫くradial patternは保たれている．今回，FCMDでの血管構築異常は細胞構築の異常段階とパラレルな関係があることが証明され，本症の奇形発生のcritical periodは遅くとも細胞配列・血管構築の基本が完成する神経細胞遊走終了時期以前であることが示唆された．特に3型でradial patternが深部では保たれていたことは，ここでも細胞遊走のごく初期は正常に行われたことを示すものであろう．

また胎児脳の検討によりFCMDの大脳奇形は胎生23週には既に形成されていることが判明し，さらにその発生には，胎生期における皮質表層のグリア間葉組織増生が重要な働きをしていることが示唆された．すなわちこのグリア増生のため(たとえば分子層の境界をなすグリア限界膜の部分的欠損を経て)，細胞遊走期の神経細胞が正常の到達位置よりさらに表層に誘導され，異常細胞構築を来したという奇形発生メカニズムが推測できる．部位によって脳表への神経細胞蓄積の程度が異なる結果，先に示した3段階のパターンが区別されるのであろう．しかし，このグリア組織増生の一次的な原因は依然不明である．かつて指摘された胎内感染の可能性もなお否定できないが，いままでの剖検例で多少のバリエーションはあっても，皮質形成異常の各型の出現部位におおむね共通性があり，ほぼ対称性の分布を示すことなどから，我々自身はこのグリア増殖の原因は遺伝的に規定されたものである可能性が高いと考えている．

謝　辞

胎児例の検索の機会を与えて頂いた，名古屋市立大学分娩部鈴森薫助教授・小児科石川達也講師に深謝する．

文　献

1) Kamoshita S: Pathology of congenital muscular dystrophy: suggestive evidence of intrauterine infection. In S. Ebashi (ed): Muscular dystrophy, Tokyo, University of Tokyo Press, 1982; 425-439.

2) Takada K, Nakamura H, Tanaka J: Cortical dysplasia in congenital muscular dystrophy with central nervous system involvement (Fukuyama type). J Neuropathol Exp Neurol 1984; 43: 395-407.

3) Hasegawa T, Ravens JR: A metalic impregnation method for the demonstration of cerebral vascular patterns. Acta Neuropathol (Berl) 1968; 10: 183-188.

4) Rakic RL, Sidman P: Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. Brain Res 1973; 62: 1-35.

5) Pape KE, Wigglesworth JS: Haemorrhage, ischaemia and the perinatal brain. William Heinemann, London, 1979; 11-38.

12）ネマリンミオパチーの組織診断に関する知見補遺

福　原　信　義*

研究協力者　澤　弥　生*　高　守　正　治*　堀　川　楊**

はじめに

ネマリンミオパチーは骨格筋におけるnemaline rodの出現を特徴とする先天性筋疾患であるが，他の先天性ミオパチーと臨床症状の類似する点が多く，診断には筋生検でのrodの確認が重要であり，今までの報告例の80%の症例では20%以上の筋線維にrodがみられたと記載されている．また，ネマリンミオパチーの骨格筋は組織化学的にタイプI線維優位，タイプI線維萎縮，タイプII線維肥大を示すことが多い[1,2,3]が，これも先天性筋線維型不均衡症と共通する点である[3]．我々は，幼少期発症，非常に緩徐な進行性の顔面・四肢のび漫性筋萎縮，筋力低下を示し，臨床的にネマリンミオパチーとして非常に特徴的な症状があるにもかかわらず，生検筋でのGomori trichrome染色でrodが認められないか，1.4～2.4%と非常にわずかにしか認められなかった2症例の形態計測分析を行い，本症の組織診断に際し，注意すべき点をみいだしたので報告する．

症　例

症例1　24歳　女性

主訴：歩行障害

家族歴，既往歴：特別のことなし

現病歴：幼児期より運動能力が劣っており，年齢とともに顕著となっていた．20歳頃より疲労時に腰部の脱力感，腰部痛を生じるようになった．58年9月，第2子の出産後，歩行障害を自覚するようになったが，次第に腰部の脱力感，歩行障害が増悪してきた．

現症：身長164cm，体重44kg．胸腹部の理学的所見は正常．高口蓋弓と凹足がみられる．顔筋，頸筋を含め全身の筋トーヌスの低下と筋萎縮，筋力低下がみられるが，特に近位筋に著明である．深部反射は消失，病的反射⊖，感覚障害⊖，協調運動は正常．

検査所見：血清CK：49U/1，EMG：ミオパチーの所見でミオトニー現象⊖，末梢神経伝導速度：正常下限．筋生検：左大腿四頭筋（Q）で施行．

症例2　25歳　男性

主訴：歩行障害．

家族歴：兄と母方従兄に色盲(+)．

既往歴：11歳時，左下腿骨折．

現病歴：生来，やせ型であったが，11歳時に左下腿骨折をして以来，左足首のかえりが悪く，左第1趾の背面に知覚鈍麻があった．22歳頃より重い物をかついで長く歩くと左足の脱力感が生じ，歩けなくなることがあったが，次第にその傾向が強くなり，全身倦怠感，疲労感，微熱が生じ，52年7月30日新潟大学神経内科受診，肺結核とネマリンミオパチーの診断で8月17日信楽園病院入院．

入院時現症：高口蓋弓(+)，緑色盲(+)，胸腹部の理学的所見は正常，顔面を含め全身のび漫性筋萎縮がみられるが，筋力は顔面筋を除き比較的保たれている．左下腿が特に萎縮しており，左足関節に運動制限があるが，11歳時の骨折の影響と考えられた．深部反射正常，協調運動は正常で，感覚も左母趾背面の触覚低下以外は正常．

検査所見：胸部X線像：右肺上葉に活動性肺結核の所見．喀痰に結核菌(+)，Gaffky 5号，血清CK：25U/1，EMG：ミオパチーの所見．一部，右大腿四頭筋で5 mV以上の高振巾活動電位がみられた．ミオトニー現象⊖．末梢神経伝導速度：正常．筋生検：左上腕二頭筋（B），左大腿四頭筋（Q）で施行．

＊金沢大学医学部神経内科
＊＊信楽園病院神経内科

表1　Rodの出現率と筋線雑タイプ比率

	Rod	I	II A	II B	II C
症例1（Q）	1.4 %	4.7 %	92.3 %	2.6 %	0.4 %
症例2（B）	0	44.0	4.6	51.2	0.2
（Q）	2.4 (-79.2)	35.7	3.4	57.3	3.6

Q：quadriceps femoris,　　B：biceps brachii

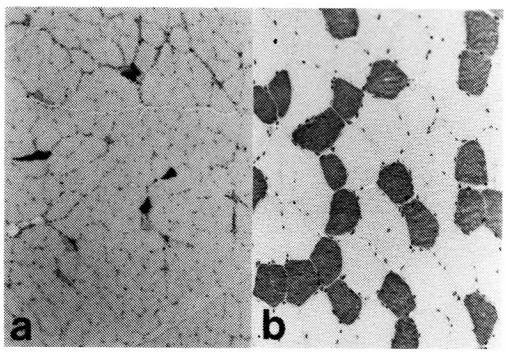


図1　pH4.3で前処置のATPase染色.
a　症例1×60；b　症例2（B）×75

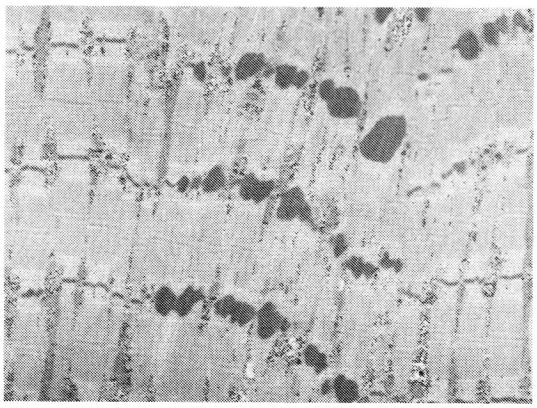


図2　症例2（B）の電顕像×7,300

筋生検所見

1．一般組織学的所見

症例1では筋線維径の大小不同がみられるが，筋線維の壊死や間質の線維化はみられない．1.4%の筋線維にごく少数のrodがみられた．症例2（B）では筋線維径はほぼ正常であり，筋線維の壊死などもなく，rodは全く認められなかった．一方，症例2（Q）では，1個の筋線維束でのみ，79.2%の筋線維にrodがみられたが，他の筋線維束ではほとんどrodはみられず，筋線維全体で2.4%のものがみられた．

2．タイプ線維の比率（**表1**）

症例1（**図1 a**）では著明なタイプII A線維優位がみられ，タイプI線維の比率はわずか4.7%であった．一方，症例2（**図1 b**）でのタイプIとIIの比率はほぼ正常であったが，サブタイプではII A線維が減少していた．

3．筋線維平均直径（**表2**）

症例ではタイプI線維とII B線維の萎縮が，症例2（B）では萎縮はなく，（Q）ではタイプI線維萎縮がみられた．

4．電顕所見

症例1のrodの数は少ないが，定型的なものであった．一方，症例2（B）のrod（**図2**）はZ帯の拡大という型で長径が1 μm以下の大きさであった．しかし，その構子状構造は定型的なものと変りはなかった．

考　　察

症例1でのrodを有する筋線維は1.4%と非常に少ないが，電顕所見からは定型的なものであり，臨床症状とも合わせ，先天性ネマリンミオパチーと診断するのに不都合はない．rodは一般にタイプI線維にみられることが多い[1),2)]が，本例の筋線維はタイプII線維がほとんどであり，これが本例でrodの少ない理由と考えられる．今までの文献

表2　筋線維平均直径（μm）

	I	IIA	IIB	IIC
症例1（Q）	21.69 ± 9.04	79.64 ±23.58	23.40 ± 9.36	28.25 ± 0.01
症例2（B）	53.41 ±10.67	57.71 ±11.80	63.84 ±13.64	57.00
（Q）	30.00 ± 1.19	66.60 ±23.85	71.23 ±12.85	33.88 ±14.95

Q：quadriceps femoris,　　B：biceps brachii

表3　Nemaline myopathy：筋線維タイプの比率異常

	症例数	筋肉数
タイプ I 線維優位	53※	61
タイプ II 線維優位	2※	2
正常	21	21
分類困難	3	3
記載なし	5	6
計	83例	92筋

※　1例で重複

例で，組織学的所見について比較的詳しく記載されている83例についてまとめてみると（表3），大部分はタイプI線維優位であり，タイプII線維優位を示したものはわずかに2例のみである．したがって，まれではあるが症例1のように，タイプI線維が極端に少ない症例では，rodが見逃されている危険性が大と思われる．

一方，症例2の上腕二頭筋では，タイプI線維の数は正常であるにもかかわらず，trichrome染色でrodは認められなかった．この症例がネマリンミオパチーであることは大腿四頭筋の一部の筋線維束でrodがみられたことより確かである．そして，電顕では非常に小さなrodがみられ，ネマリンミオパチーの診断には生検部位によってrodがみられないことがあること，また，rodが小さければ光顕では診断のできない場合のあることが判り，特に先天性筋線維型不均衡症の診断には慎重でなければならない．

結　論

ネマリンミオパチーでは，(1)まれにタイプII線維優位を示すことがあり，そのような症例では，光顕でのrodの出現率は低い．(2) rodの大きさが小さいと，Gomori trichrome染色では診断しにくく，電顕的観察が重要である．

文　献

1）Fukuhara,N., Yuasa,T., Tsubaki,T. et al.: Nemaline myopathy. Histological, histochemical and ultrastructural studies. Acta Neuropathol. (Berl.), 42：33-41, 1978.

2）福原信義，湯浅龍彦：ネマリンミオパチー，神経内科，8：305-312, 1978.

3）Miike,T., Ohtani,Y., Tamari,H. et al.：Muscle fiber type transformation in nemaline myopathy and congenital fiber type disproportion. Brain Develop., 8：526-532, 1986.

13) Acute rhabdomyolysis の2症例
—成因，筋生検像，筋電図，X線CT及びMRI—

栗原照幸*

研究協力者　北村純一*　丸山英晴*　山村喜教*
石川恵美*　鶴田和仁*　松倉　茂*
野崎藤子**　黒木竜郎**　森田紀子**

はじめに

早期診断と適切な輸液療法により腎不全に致らずに救命しえたacute rhabdomyolysis（ARMLと略）の2症例を経験した．その成因，診断，筋電図所見，筋生検像，X線CT及びMRIを含めて報告する．

症　例

症例1：S.K生．25歳．男性．主訴は意識障害と左下肢腫脹．既往歴は，20歳時に中垂切除以外特記すべき事はない．家族歴は特記すべき事はない．現病歴は，家業の借金と，幼少時の父母の離婚で悩んでいたところ，昭和61年7月6日に38.3℃台の発熱があり，近医では膵臓炎が疑われ，腹部CTをとったところ，本人は膵臓癌と信じこみ，不眠，不穏となり，多量の抗精神薬を投与され，昏睡となる．また左大腿腫脹が出現したため，本科に紹介入院となる．入院時現症は，身長160cm，体重45kgであり血圧は100／80 mmHg，脈拍120／分，整．呼吸は12回／分で浅呼吸である．皮膚及び舌は乾燥している．肺野，心音及び腹部に異常を認めない．四肢では，左大腿部に熱感を伴った腫脹を認め，左大腿周径は，膝関節上20cmで，左44.5cmで，右42.5cmであり，鼠径部で，左周径58.0cm，右周径52cmである．足背動脈はよく触知できた．神経学的には，髄膜刺激症状なく，昏睡以外に所見を認めない．検査所見では，白血球8700／mm³（リンパ球対好中球は59対29），Hct 41.3%，Hb 13.8g／dl，血小板33.1万／mm³．尿検査でpH 7.5，潜血（＋），赤血球7～10／HPFである．腎機能，電解質は正常であるが，筋肉酵素は血清CK 26,600IU／L（正常120以下），LDH 3,000IU／L（同365以下），GOT 598IU／L（同38以下），GPT 300IU／L（同30以下）と高値である．血清ミオクロビンは，196 ng／ml（同60以下）である．X線CTにて，左大腿内転筋中央部に低吸収域を認める（図1）．脳脊髄液では，血圧は正常，細胞数10／3（リンパ球対単球は7対3），蛋白 18mg／dl，糖 59mg／dlと正常であり，フェノバール，ヒダントイン，バルプロ酸の血中濃度は有効治療濃度以下であったが，ハロペリドール，ダイアゼパムなど他の6剤については，測定法が一般化していないため値を得る事はできなかった．単純ヘルペスの抗体価や日本脳炎抗体価はpair髄液にて共に陰性であった．脳波で，左前頭，側頭部に棘波を認めるが，頭部CTには異常を認めない．入院後，1日尿量を3,000 cc／日に保ち，腎不全なく，大腿の腫脹も消失し，血清CK，ミオグロビン値も正常化した．不穏時の脳波にもspike burstはなく，不穏状態については心因性に起ったことを強く示唆し，家族との話し合いにより，現在退院し，通常の生活を始めている．

症例2：A.K生．63才．男性で，元は大工であった．主訴は両下肢麻痺と右大腿腫脹である．既往歴は，39才時胆嚢切除．57才時に，飲酒後，階段より転落し，意識消失と左眼を失明している．

＊宮崎医科大学第三内科
＊＊野崎病院画像診断センター

図1　症例1の発症3日目の大腿部のX線CTである．左大腿内転筋中央部に低吸収域を認め，rhabdomyolysisである事を示している．

現病歴は，昭和61年9月30日，飲酒後排便しようと立ちあがると，両下肢の感覚喪失と脱力あり．痛みや膀胱，直腸障害はなく，上肢の運動障害はなかった．翌日，隣人が近医に受診させるが，右大腿腫脹があり，血清CK値が39,600IU／Lと高値の為，紹介入院となる．入院時現症は，身長163cm，体重72kg，血圧120／80mmHg，脈拍，呼吸は正常である．一般理学所見では，左眼の失明以外には，胸腹部には異常所見を認めない．四肢では膝上20cmにて，左大腿周径は50.0cm，右大腿周径は52.5cmと左右差を認め，右大腿は熱感を伴っている．両側足背動脈はよく触知する．神経学的には，脳神経系は，左眼失明以外正常．運動系では，上肢正常であるが，左下肢は屈伸がかろうじて可能である．右下肢の自発運動はできない．深部反射は正常だが，四肢の腱反射の亢進を認め，ワルテンベルグ反射は両側ともに陽性であるが，バビンスキー反射は認めない．感覚は両側とも$L_{4,5}$，S_1の領域に障害を認めた．検査所見では，尿検査にて，潜血を認め，赤血球を7—10／HPFに認めた．末梢血では，白血球8,500／mm³，Hct 40.5%，Hb 13.5g／dl，血小板34.1万／mm³と正常であり，腎機能，電解質の異常も認めない．筋肉酵素は，血清CK 137,900IU／L，LDH 1,729 IU／L，GOT 236 IU／L，GRT 189 IU／Lと異常高値を認めた．血清ミオグロビン値も406 ng／mlと高値であった．右前脛骨筋生検を発症14日目に行った．好酸性に染まる筋細胞の変性と，軽度の筋細胞の大小不同を認めるが，炎症細胞の浸潤は少ない（図2）．X線CTでは右大腿の腫脹を認めるのみであるが，MRIではlong SEにて鮮明に高輝度病変を認めた（図3）．入院後経過においては，ARMLと診断して1日尿量を3,000cc／日に保ち，尿中ミオグロビンは5 ng／dl以下で経過し

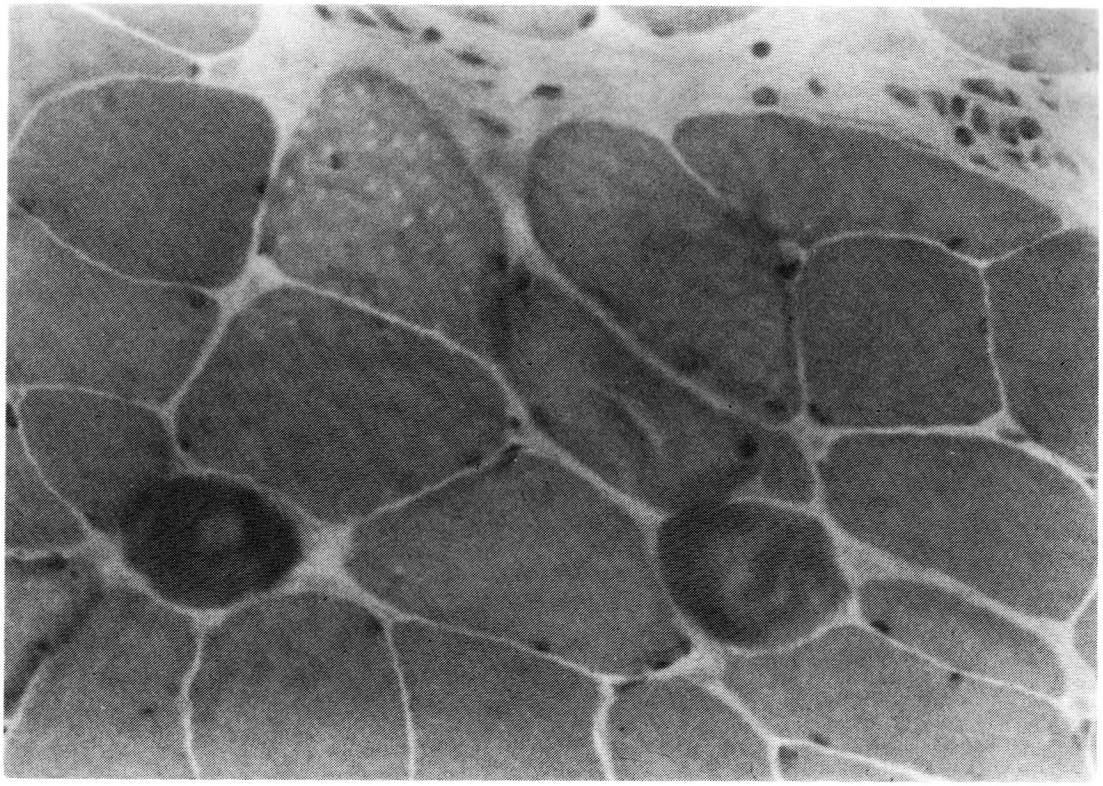


図2　発症14日目の右前脛骨筋生検像（ヘマトキシリン・エオシン染色×400）．好酸性に染まる変性した筋細胞，筋細胞の大小不同を認める．炎症細胞の浸潤は少ない．非特異的虚血性変化を示す筋生検像である．

た．血清CK，ミオグロビンも発症20日目に正常化した．左下肢は，筋力が5日目に，感覚が20日目に正常化したが，右下肢は，発症2ヶ月後も，膝の屈伸は可能だが，足の背屈，底屈は全くできず，発症20日目位より，灼熱痛を訴える様になり，鎮痛剤と睡眠剤を要求する様になった．Anterior compartment syndrome を疑い，経時的に神経伝導速度は低下し，針筋電図で，fibrillation potential や positive wave を認め，脱神経性変化を認めた（図4）．また，MRI で long SE にて高輝度病変を認めた（図5）．大腿内転筋の筋電図的所見は short duration と low amplitude の筋原性変化であった．現在，下肢の挙上と安静，ビタミン剤と Coenzyme Q_{10} などを投与後，下腿に短肢装具を装着して歩行可能となり，外来で経過を見ている．尚，病初期に起った両下肢の麻痺について脊髄動物の循環障害，頸椎症や脊髄炎を疑い，それぞれ DSA，ミエログラフィー，髄液中の oligoclonal band の検索をしたが，軽度の大動脈硬化，頸椎椎間腔の軽度の狭窄，oligoclonal band（－）であり，決定的な所見はなく，不明であった．

考　　按

ARML は，筋腫脹，血色素尿，また正常値より10倍以上の CK 高値の時に疑い，Gasbow ら[1]の報告では，87例中29例が急性腎不全となり，6例が死亡しており，早期診断と適切な輸液により救命しうる救急疾患である．

ARML の成因については，Gasbow ら[1]や Rowland ら[2]が報告している様に，アルコール，圧迫，ケイレンや抗精神薬がそれぞれ原因として多く，昏睡の患者に筋腫脹をみたら，疑うべきで

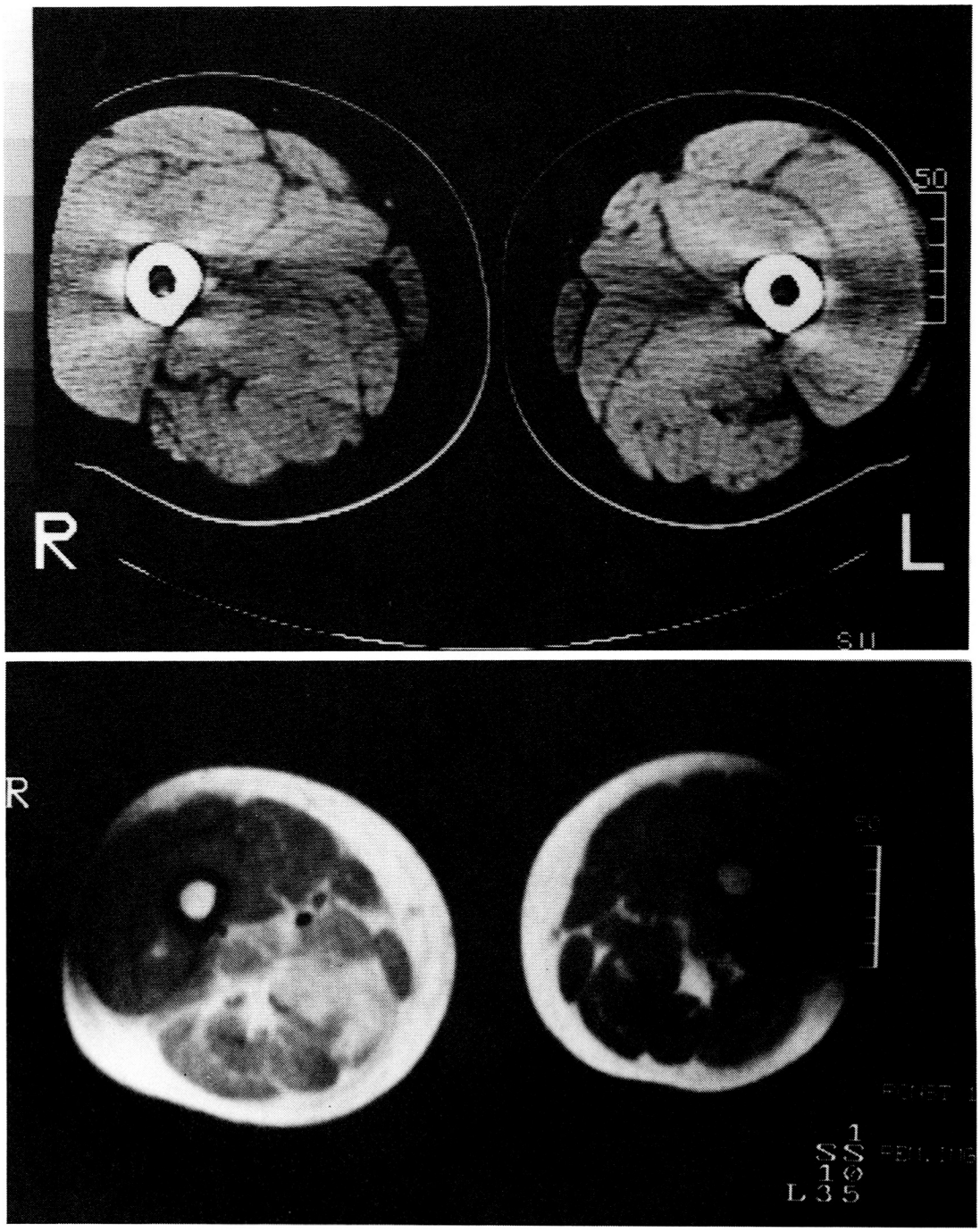


図 3　症例 2 の発症 2 日目の大腿部の X 線 CT（上段）と MRI の long SE 像（T_R／T_E＝1500／34）（下段）．X 線 CT では腫脹を認めるだけであるが，MRI では，病変を鮮明に高輝度として描出している．

Nerve conduction studies

after onset	10 days	30 days	50 days
Rt. Peroneal Nerve (normal>43 m/sec) (latency <7.0msec)	40.5 m/s (4.0 msec)	35.1 m/s (4.7 msec)	誘発不能
Rt. Post. Tib. Nerve (normal>41 m/sec) (latency <7.3msec)	32.5 m/s (4.6 msec)	29.2 m/s (6.6 msec)	33.5 m/s (6.0 msec)

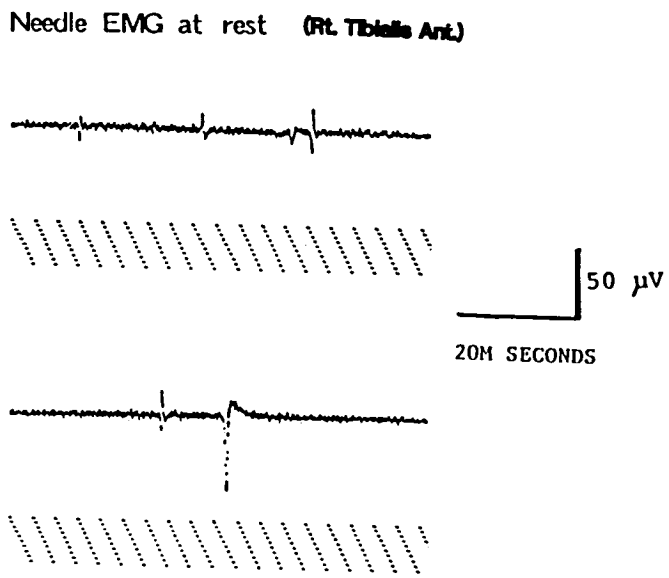


図4　経時的にみた右後脛骨神経と腓骨神経の運動神経描伝導速度（上段）と，発症40日目の前脛骨筋の安静時筋骨図(下段)であり，fibrillation potential や positive wave を認め，脱神経所見である．患肢は全く自動運動できない状態であった．

ある．Rowland ら[2] は局所の圧迫に他の要因の組み合せによって生ずると考えている．症例1は抗精神薬の多量投与が，症例2ではアルコールが，それぞれ局所の圧迫に加えて重要な成因であると考えられる．

ARML の筋病理像は，生検の時期によって異なるが，筋腺維は個々バラバラに侵され，食細胞を伴う壊死と筋の再生像および細胞浸潤の少ない事がその特色であり，我々の症例でも同様の所見であった[3]．

ARML の筋電図学的検索の報告は少ない．大腿内転筋の針筋電図は，筋原性変化を示した．下肢では Shields ら[4] が，昏睡後に筋腫脹と compartment syndrome を合併する事を指摘したが，我々

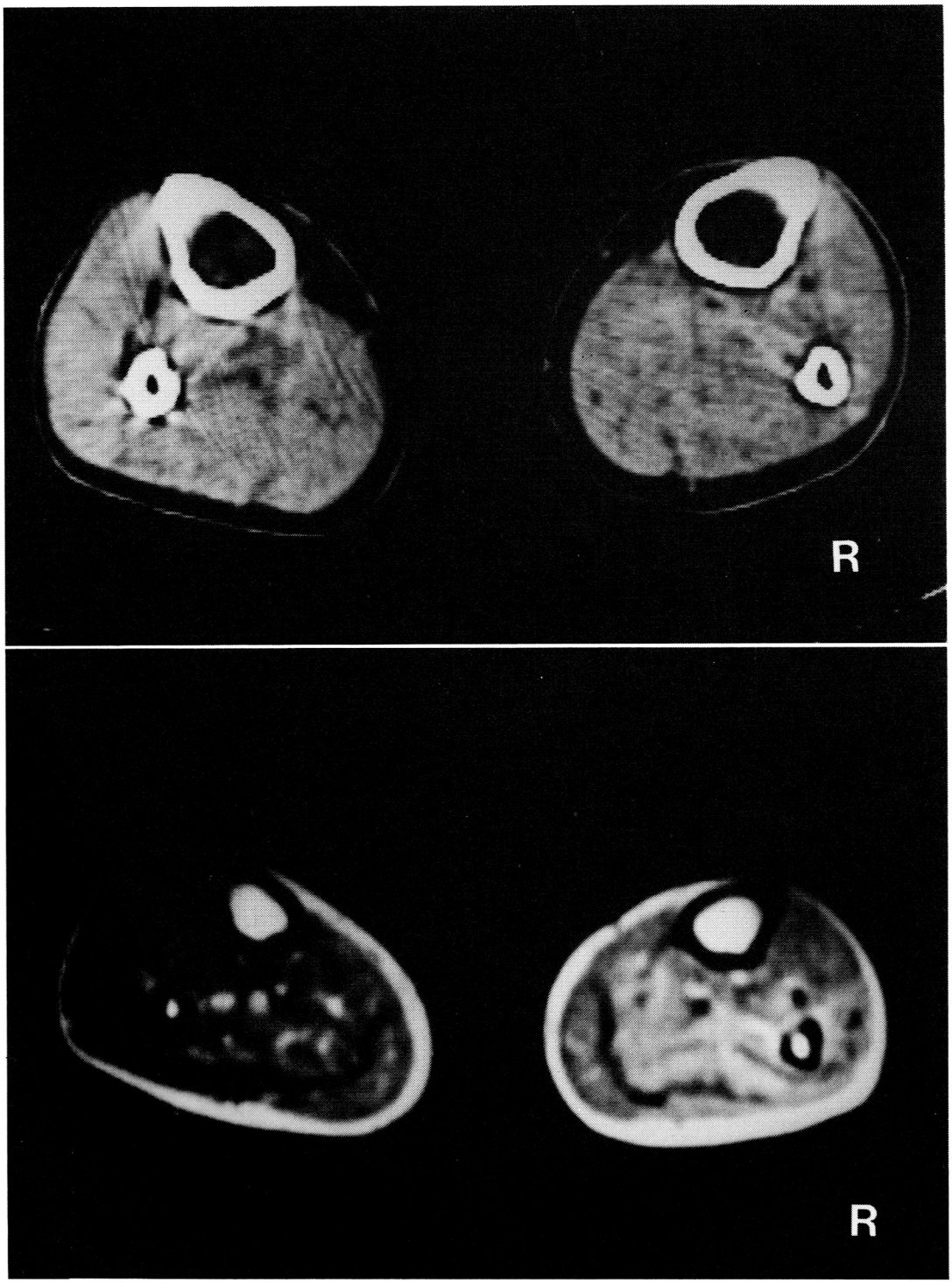


図5　発症2ヶ月目の下腿部のX線CT（上段）とMRI（T_R／T_E＝1500／34）（下段）で，X線CTでは何の異常も描出していないが，MRIでは浮腫性病変を高輝度として認める．

の症例でも合併し，患者の予後や管理上，留意すべき事と思われる．

ARML の MRI の報告例はまだ1例をみるのみであるが[5]，ARML の X 線 CT 及び MRI を同時にとり，MRI が，その病変をより鮮明にしめす事を明らかにした初めての報告である．これは，筋生検所見でみられた筋細胞の浮腫や腫脹，また間質の炎症，浮腫や硝子様変性という顕微鏡的所見を正確に反映しており，興味深い．また，発症2ヶ月目の下肢の MRI で，anterior compartment syndrome を示す高輝度病変を描出した初めての報告例である．

ARML の治療と予後に関しては，腎不全が予後を決定しており，Gasbow らは，血清クレアチニンが3.0mg／dl 以上の群に腎不全と死亡率の高い事を指摘した．彼らの考察によると，血清 K 値は，腎不全の結果上昇するとしており，心臓に対する影響よりも，腎臓に対する注意を喚起している[1]．血清ミオグロビン値と腎不全との関係については，まだ報告がないので，臨床の場では十分な輸液療法を行うことが大切である．

結　　語

ARML をきたした2症例を報告し，局所の圧迫以外に，抗精神薬やアルコールなどの関係を指摘した．筋生検像は，筋細胞の崩壊や浮腫を主変化とする筋原性変化である事を示した．筋電図学的変化は，末梢神経障害を合併しなければ short duration, low amplitude の筋原性変化であるが，ARML は anterior compartment syndrome を合併しやすく，合併した場合，運動神経伝導速度の経時的増悪と脱神経性変化を示す事を明らかにした．X 線 CT よりも，MRI の方が病変をより鮮明にし，それは，筋生検でみられた虚血性変化の所見と一致した．X 線 CT ではっきりとした低吸収域が出現する前に MRI で病変を示した最初の報告例であり，また，anterior compartment syndrome を MRI で示した報告例でもある．

ARML は腎不全の治療が第一であり，適切な輸液療法と，期を逸さない透析が救命と予後を決定する．早期診断と早期治療が要求される筋肉の救急疾患のひとつであることを強調する．

文　　献

1) Gasbow, PA. Kaehny, WD, et al: The spectrum of rhabdomyolysis. Medicine, 61: 141, 1982

2) Penn AS, Rowland LP, et al: Drugs, coma and myoglobinuria. Arch Neurol, 26: 336, 1972

3) 中野　智，宮本浩明ら：大量飲酒後に発生した一側下肢の rhabdomyolysis と急性腎不全．臨床神経，25：1010，1985

4) Shields, RW, Root KE, et al: Compartment syndromes and compression neuropathies in coma. Neurology, 36: 1370, 1986

5) Zogalia RJ, Karskedf N, et al: MR Imaging of rhabdomyolysis. J Comput Assist Tomogr, 10(2): 268, 1986

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

茂 在 敏 司*

研究協力者　河 村　宏*　佐 伯 彰 夫*　浅 野 彰 彦*
市 岡　修*　篠 田 恵 一*　増 井 義 一*
小松原千鶴子*　福 田 市 蔵*

はじめに

Multicore diseaseは1966年Engelら[1]により報告されて以来多くの報告がなされ，先天性ミオパチーとして位置づけられている．その診断は筋組織像でcentral coreに類似したmultiple coreの存在によりなされているが，coreの成因に関してはいまだ明確にされていない．我々は亜急性発症した末梢神経障害患者の筋組織にmulticore様変化を認めたので報告する。

症　例

患者：S. I. 18歳　女性

主訴：両下肢の筋力低下

家族歴：両親健康，近親婚なし．

既往歴：生後まもなく幽門狭窄にて手術．

現病歴：妊娠期間中異常なく満期安産，生下時体重1800g，処女歩行11ケ月，その後精神運動発達遅滞なし．昭和61年6月下旬より食欲不振，嘔気，嘔吐をきたし摂食不良となる．7月初旬，歩行中数度足関節を捻挫する．7月中旬両側腓腹筋部に疼痛出現，同時に下腿脱力を自覚．7月下旬には両手指の脱力出現．下腿の脱力は次第に進行し，8月初旬には起立不能となり入院する．

身体所見：身長140cm，体重34kg，意識清明，脈拍80／分整，血圧110/80mmHg．その他一般内科的所見異常なし．

神経学的所見：両下肢遠位部優位の筋力低下を認める．両側の垂足を認める。知覚障害なし．深部腱反射は上下肢とも低下，左右差なし．両足ATR消失．脳神経系異常なし．小脳症状なし．その他神経学的異常なし．

血液生化学的検査：検尿，検便異常なし．血沈（1時間値）14mm，CPK 21U／/L，その他血液一般，生化学的検査異常なし．

筋電図：両下肢にfibrillation voltageおよび一部low amplitude short duration NMUのmyogenic changeの混在を認める．

腓腹神経生検：大径有髄神経線維の脱落および軸索の変性を認める（図1）．teased fiberにて約半数の線維に軸索変性の所見を認める（図2）．

筋生検（左腓腹筋）：HE染色にてscattred angular atrophyおよび一部の筋線維内にエオジンに濃染する部位が存在する．しかし間質の増生，炎症細胞浸潤などを認めない（図3 a）．NADH-TR染色では一部の筋線維に直径5～30μのcoreを1～数ケ認める．coreは偏在するものが多く，Type I，Type II双方の線維に認める（図3 b）．

電顕的にはcoreのひろがりは比較的限定されており，横紋構造の消失，Z-lineの乱れを認めミトコンドリアや筋小胞体の消失や減少，Z-lineの変性したものとおもわれるdence materialを認める（図3 d）．またcoreと健常部位の境は明瞭ではない．

さらにoil red 0染色では散在性にlipid bodyが著明に増加した線維が存在し，これらの線維は全てType I線維であり（図4 a），電顕的にもlipid bodyの増加を認める（図4 b）．

臨床経過：入院後食欲も改善，リハビリテーションも積極的におこない，約1ケ月にて歩行可能となり11月末退院した．

＊大阪医科大学第一内科

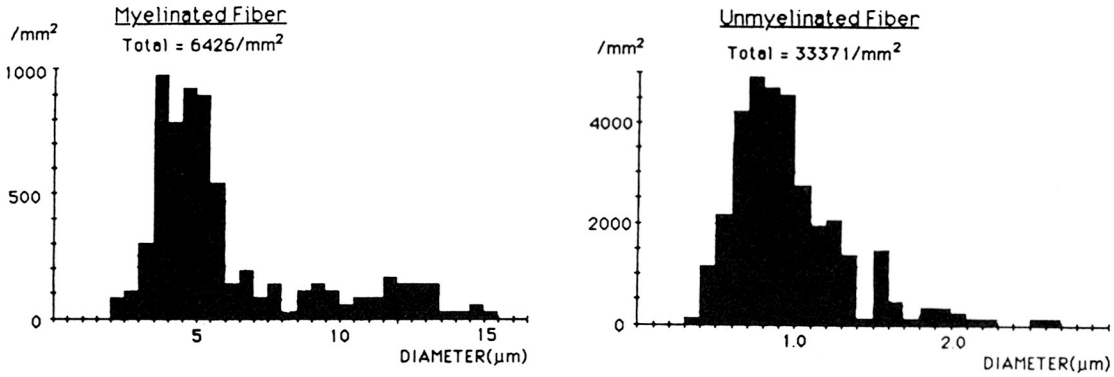


図1　腓腹神経のヒストグラム大径有髄神経の脱落を認める．

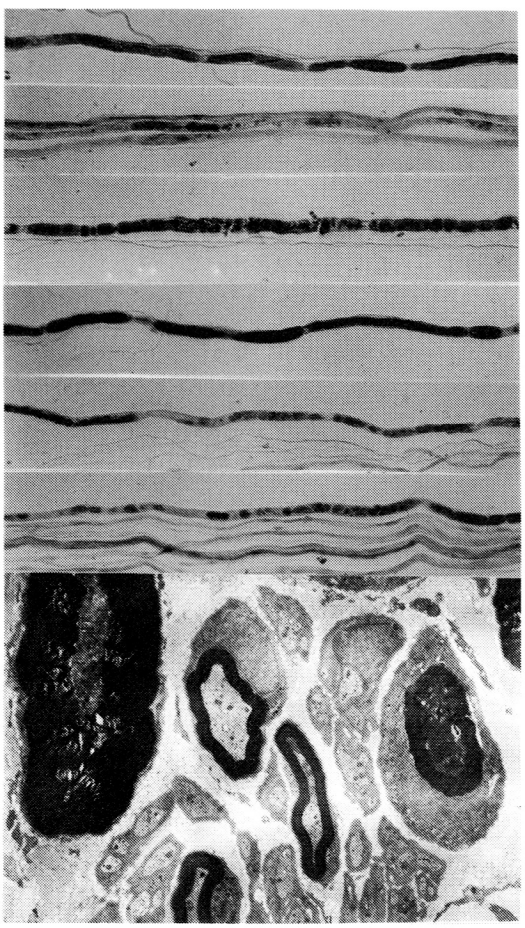


図2　teased fiber ではミエリンオボイドが認められ，電顕でも軸索変性を認める．

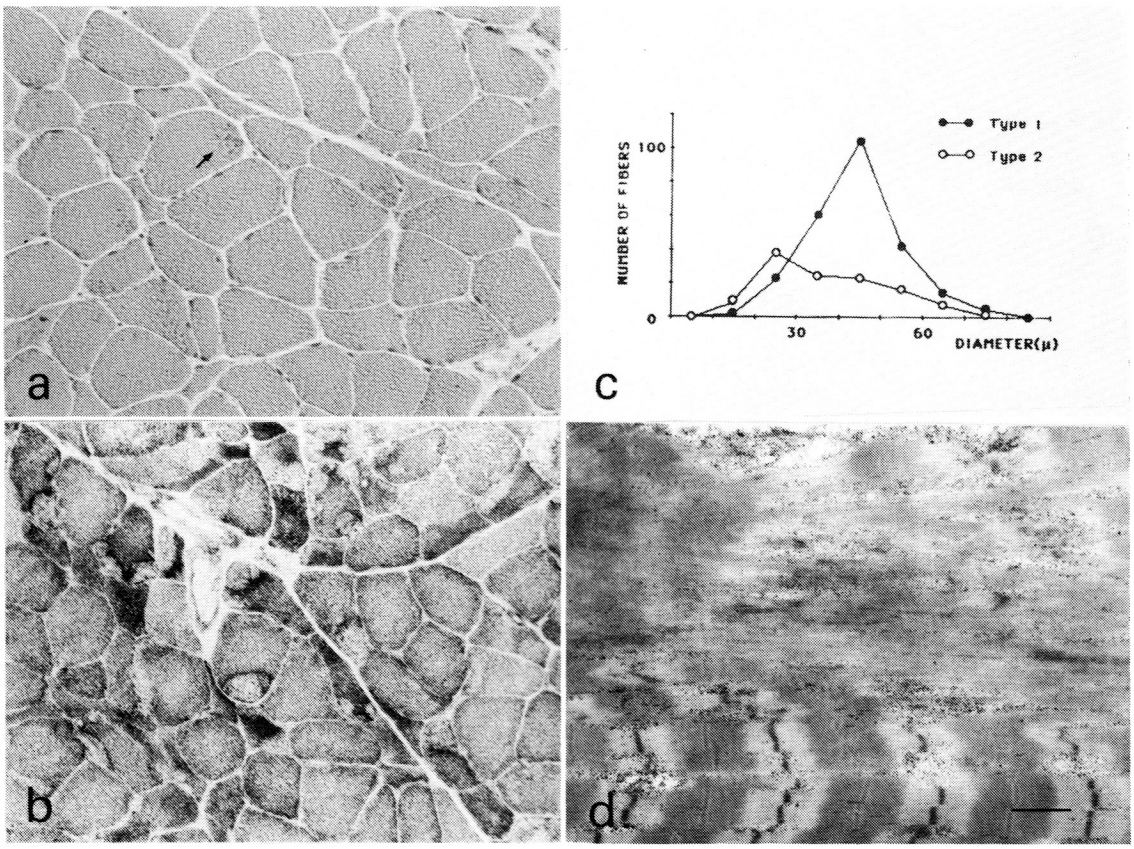


図3　左腓復筋生検

a：HE 染色（x100）

一部の筋線維にエオジンに濃染する部位（矢印）をみとめる．

b：NADH-TR 染色（x100）

c：ヒストグラム

d：core 部の電顕像，横紋構造の消失，ミトコンドリアの消失などを認める．

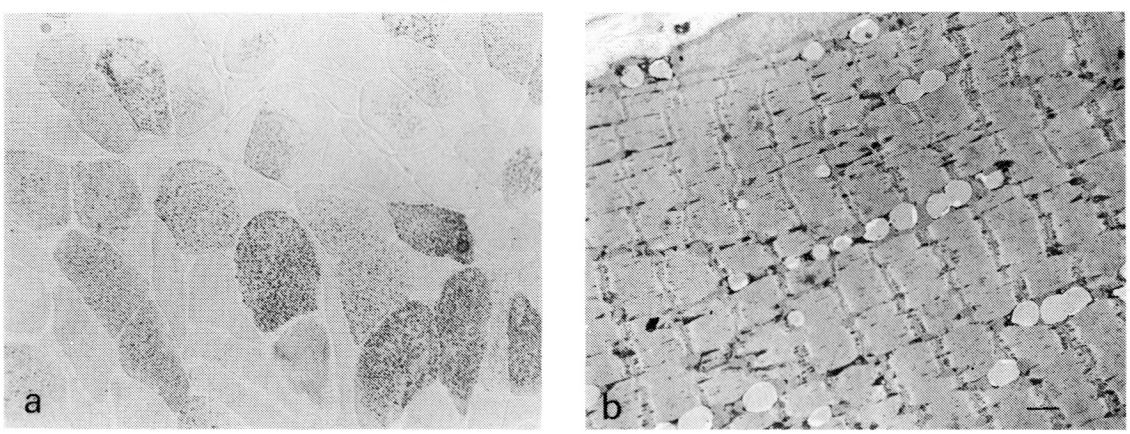


図4　左腓腹筋生検

a：Oil red O 染色　b：電顕像 Type 1 線維に著明な lipid body の出現をみる．

考　　察

本症例は亜急性発症の軸索変性を主とした末梢神経障害に筋生検 NADH-TR 染色で multicore 様変化を示し，かつ明かな筋力回復を認めたものである．軸索変性を主とする神経障害には種々の toxic neuropathy が考えられるが，本例では既往がないことより原因不明である．

一方，筋病変に関して Engel ら[2]は multicore 自体は non specific な変化ととらえ，筋ジストロフィー，筋炎，denervation atrophy の一時期などにも出現すると述べている．さらに一條ら[3]は悪性症候群の例に一過性に multicore 様変化を認めたと報告している．本例はその臨床像および経過から先天性ミオパチーとしての multicore disease は否定される．また，明かな軸索変性が確認されていることより，末梢神経障害を考える場合，NADH-TR 染色像が示す所見と target あるいは targetoid fiber との異同が問題となろう．target fiber はその名の示すごとく筋線維の中心に core を有する 3 zone fiber であり，targetoid fiber はその中間層の欠如したものとされている[4]．本例のcoreは多発および偏在することより multicore と表現されるのが妥当だと考えられる．

一方，電顕的には本例の core, multicore, targetoid fiber の core に本質的な差異は認められず，このような観点より本例の core を targetoid fiber とともに denervation, reinnervation に関連した一連の変化としてとらえることもできるであろう．しかし，日常一般によく遭遇する末梢神経疾患で multicore 様変化をみることは極めてまれであることおよび本症例の筋組織には multicore の他に Type Ⅰ fiber に著明な lipid body の増加が認められることより，単に末梢神経障害のみにこの筋病変の意味づけを求めて良いのかどうかは問題であり，神経筋の両者の根底に共通した未知の代謝障害が存在していることも考えねばならない．本症例の筋力低下が約 1 ケ月にて改善していることより，この multicore 様変化が一過性である可能性もあり，今後さらに筋生検を含めた検討が必要と考える．

本症例は，現時点では原因不明の特異な neuromyopathy と考えられ，筋における multicore の成因および病理学的意味づけを考えるうえでも興味ある症例と考え報告した．

文　　献

1) Engel AG, Gomez MR : Congenital myopathy associated with multifocal degeneration of muscle fibers. Trans Am Neurol Assoc 91 : 222-223, 1966

2) Engel AG, Gomez MR : Multicore disease. A recently recognized congenital myopathy associated with multifocal degeneration of muscle fibers. Mayo Clin Proc. 46 : 666-681, 1971

3) 一條真琴，石原傅幸，内田晃雄，森皎祐：一過性に multicore 様の病変を認めた悪性症候群（syndrome malin）の一例　臨床神経23：749-756, 1983

4) Carpenter S, Karpari G : Disease of skeletal muscle ; Denervation atrophy Adult, Pathology of skeletal muscle, Churchill Livingstone, New York, 1984, pp460-470

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—

田　代　邦　雄*

研究協力者　松　浦　　亨*　土　井　静　樹*
森　若　文　雄*　島　　功　二**

緒　　言

神経筋疾患の診断および経過観察のための非侵襲的検査法としてB-mode超音波画像（Ultrasound Imaging，以下UI）が有用であり，神経原性と筋原性の判断のみならず筋原性変化においては経験的に進行性筋ジストロフィー症と他の多発性筋炎をはじめとする炎症性ミオパチーとが容易に鑑別可能であること[1)2)3)]，生検筋組織連続切片の反射型超音波顕微鏡（Scanning Acoustic Microscope，以下SAM）をもちいて検討した超音波吸収度の分布と通常染色による組織分布の疾患特異性のあいだに相関を認めること[4)]，炎症性変化をともなった結合組織では正常のそれに比して超音波吸収度が著明に増大していること[4)5)]などから，隣接する組織の固有音響インピーダンスの差に情報を多く依存するUI上において各疾患のあいだに認められる所見の差異はそれらの組織変化の疾患特異性によるものであり，逆にUI所見から非侵襲的に組織変化の程度および性格を推測できる可能性が妥当なものであることについてすでに報告してきた．今回われわれは生検組織所見をもちいてUIをシミュレーションするための基礎データを得ることを目的とし，生検組織を構成する各成分につきSAMをもちいた固有音響インピーダンスの定量化を試み，さらに組織が各成分の理想的立方体の集積体であると仮定した場合の隣接する二種類の媒体の違いによる超音波反射率の差異について検討したので報告する．

＊北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門
＊＊国立療養所札幌南病院神経内科

方　　法

SAMの二次元画像はトランスデューサーから発信された超音波パルスの試料からの反射レベル（電位）を明度情報に変換しxおよびy軸方向にマッピングして得られるものである．すなわち試料検索時の一次情報は試料のある一点に規定のエネルギーを持った超音波パルスを照射した場合，これによって反射されたエコーパルスがトランスデューサーによってふたたび電気エネルギーに変換された電位レベルであるといえる．ところでいま二種類の均一な媒体A，Bが理想的な平面を構成して接していると仮定すると，この平面にAからBに向かって垂直方向に入射する超音波の媒体境界面における反射率τは媒体A，Bの固有音響インピーダンスをそれぞれZ_A，Z_B（単位kg/m²s）とすると式(1)のようにあらわされ，この場合の反射損失RL（単位dB）は対数をとることにより式(2)として示される．実際にはA，Bはカプラーとしてもちいる水と組織試料であるから水

式（1）　二媒体AB間の反射率

sample A　sample B

$Z_A=\rho_A C_A$　$Z_B=\rho_B C_B$　反射率　$\tau=\dfrac{Z_B-Z_A}{Z_B+Z_A}$

式（2）　二媒体AB間の反射損失

$$RL = -20\log\left|\frac{Z_B-Z_A}{Z_B+Z_A}\right| \quad (dB)$$

$$= \frac{-10\log_e\left|\dfrac{Z_B-Z_A}{Z_B+Z_A}\right|^2}{\log_e 10}$$

および試料の固有音響インピーダンスをそれぞれ Z_0, Z_1 とすると両者の境界面での反射率 τ およびこれにともなう反射損失 RL は式(3), (4)としてしめされる.

二媒体が理想的平面を構成して隣接する場合の境界面での反射率

式（3）

water　　sample

$Z_0=\rho_0 C_0$　　$Z_1=\rho_1 C_1$　　反射率　$\tau=\dfrac{Z_1-Z_0}{Z_1+Z_0}$

式（4）

反射損失 $RL=-20\log\left|\dfrac{Z_1-Z_0}{Z_1+Z_0}\right|$　(dB)

Z_0：カプラーの音響インピーダンス　(kg/m²s)
Z_1：試料の音響インピーダンス

ここで試料としてガラス SiO_2 をもちいた場合と組織標本をもちいた場合の反射損失の差は水, SiO_2 および検索対象である組織の固有音響インピーダンスをそれぞれ Z_0, Z_1, Z_2 とすると式(5)

式（5）SiO_2基準面と試料面でのdBの差　(−GAPS)

$$20\log\left|\frac{\dfrac{Z_2-Z_0}{Z_2+Z_0}}{\dfrac{Z_1-Z_0}{Z_1+Z_0}}\right| = 20\log\left|\frac{V_s^R}{V_r^R}\right| = -GAPS \quad (dB)$$

Z_0：カプラー（H_2O）の音響インピーダンス
Z_1：基準となる基板（SiO_2）の音響インピーダンス
Z_2：試料の音響インピーダンス
V_r^R：Z_1の時のみの反射出力電圧
V_s^R：Z_2を挿入した時の反射出力電圧

の−GAPS（単位 dB）として表現される. 式(5)を Z_2 について解くと式（6a), (6b）の解 Z_{21}, Z_{22}

試料の固有音響インピーダンス

式（6a）

$$Z_{21} = \frac{Z_0\left((Z_1+Z_0)^2+10^W(Z_1-Z_0)^2+2(Z_1-Z_0)(Z_1+Z_0)(10^W)^{1/2}\right)}{(Z_1+Z_0)^2-10^W(Z_1-Z_0)^2}$$

式（6b）

$$Z_{22} = \frac{Z_0\left((Z_1+Z_0)^2+10^W(Z_1-Z_0)^2-2(Z_1-Z_0)(Z_1+Z_0)(10^W)^{1/2}\right)}{(Z_1+Z_0)^2-10^W(Z_1-Z_0)^2}$$

(kg/m²s)

ただし

$$W = -\frac{GAPS\,(dB)}{10}$$

を得る. Z_0, Z_1 の値は既知であるから標本試料の固有音響インピーダンスは水をカプラーとして測定した SiO_2 基準面および標本試料面における反射損失の差（−GAPS）の関数であり, またこの値は SAM をもちいて測定可能である. 表1のプログラムにより−GAPS が0.0から99.9（単位 dB）までの−GAPS, Z_{21}, Z_{22} の対応表を作成した. 行番号90, 100でそれぞれ水およびガラスの固有音響インピーダンスを定数として与えている. 得られた対応表の一部を表2に示す. 第1行で SiO_2 基準面での反射損失と標本面でのそれとの差がない（0dB）場合の標本の固有音響インピーダンスが SiO_2 と同様 Z_{21}=1.314E+07であることが示されており, また最終行からはその差が99.9(実際には反射信号がほとんど認められない)であれば標本の固有音響インピーダンスは限りなく水(カプラー)のそれに近いこと, また Z_{22} は計算時の求根による虚解であることがわかる. つぎに上記の方法によって求めた各成分の固有音響インピーダンス（Z_{21}）をもちいて式（1, 2）からそれぞれことなった組織が理想的平面を構成して接する場合その境界面において生じると期待され

表1　水をカプラーとして, SiO_2 面および試料面からの反射レベルの差から試料の固有音響インピーダンスを求めるためのプログラム. 第90行, 第100行でそれぞれ水および SiO_2 の固有音響インピーダンスを与えている.

```
10 REM CALCURATION PROGRAM FOR SAM
20 CLS
30 PRINT "=================================================="
40 PRINT "    CALCURATION PROGRAM FOR SAM                   "
50 PRINT "=================================================="
60 FOR J=0 TO 99
70 FOR I=1 TO 9
80 GAPS=J+(I/10)
90 Z0=1.483E+06
100 Z1=13140000#
110 PRINT
120 PRINT
130 PRINT
140 W=-GAPS/10
150 Z2U1=Z0*(((Z1+Z0)^2)+((10^W)*((Z1-Z0)^2))+(2*(Z1-Z0)*(Z1+Z0)*(SQR(10
^W))))
160 Z2U2=Z0*(((Z1+Z0)^2)+((10^W)*((Z1-Z0)^2))-(2*(Z1-Z0)*(Z1+Z0)*(SQR(10
^W))))
170 Z2B=((Z1+Z0)^2)-((10^W)*((Z1-Z0)^2))
180 Z21=Z2U1/Z2B
190 Z22=Z2U2/Z2B
200 CLS
210 LPRINT "-------------------------------------------------------"
220 LPRINT GAPS,Z21,Z22
230 NEXT I
240 NEXT J
250 END
```

表2　-GAPS（SiO_2 および試料の，超音波反射レベルの差）と試料の固有音響インピーダンス（Z_{21}）対応表の一部．試料の固有音響インピーダンスが，-GAPS＝0（第1行）では SiO_2 と，-GAPS＝99.9（最終行）では水とそれぞれ同値であることを示す．Z_{22} は虚解．

-GAPS	Z21	Z22
0	1.314E+07	167369
.1	1.25105E+07	175791
.2	1.19393E+07	184203
.3	1.14186E+07	192602
.4	1.09422E+07	200989
.5	1.05045E+07	209363
.6	1.01012E+07	217722
[illegible]	[illegible]	[illegible]
4.8	3.99664E+06	550284
4.9	3.94399E+06	557630
5	3.89293E+06	564944
5.1	3.84339E+06	572226
5.2	3.79531E+06	579475
5.3	3.74862E+06	586692
5.4	3.70327E+06	593877
5.5	3.65921E+06	601028
5.6	3.61638E+06	608146
5.7	3.57474E+06	615230
5.8	3.53423E+06	622281
99.6	1.48302E+06	1.48298E+06
99.7	1.48302E+06	1.48298E+06
99.8	1.48302E+06	1.48298E+06
99.9	1.48302E+06	1.48298E+06

る反射率と反射損失の大きさを求め，比較した．今回の検討に使用した SAM は Nikon/HONDA AMS-3400，供用周波数は220MHz で，標本には凍結固定した生検筋の25μ 横断切片を用いた．

結　　果

図1a，b に脂肪組織および炎症性結合組織（多発性筋炎例）の反射損失測定の実際を示す．SiO_2 基準面における反射損失レベルはスケールの上限に設定してあり，提示した例では画像上は脂肪組織と炎症性変化をともなう結合組織はともに超音波吸収のおおきい黒い部分として描出されているが，基準面における反射損失と標本面での反射損失の差にはそれぞれ29dB，14dB と明らかな差異があった．得られた Type 1 fiber（n＝14），Type 2 fiber（n＝10），結合組織（n＝5），脂肪組織（n＝6），炎症をともなう結合組織（n＝6）の固有音響インピーダンスを**表3a** に，これらをもちいて算出した各組織間での反射率と反射損失を**表3b** にしめす．上記5者間の組合せを比較すると，①結合組織―脂肪組織，② Type 2 fiber―脂肪組織，③結合組織―炎症性結合組織，④ Type 1 fiber―脂肪組織，⑤ Type 1 fiber―結合組織，⑥ Type 2 fiber―炎症性結合組織，⑦脂肪組織―炎症性結合組織，⑧ Type 1 fiber―Type 2 fiber，⑨ Type 1 fiber―炎症性結合組織の組合せの順に超音波の反射レベルは減少する．

考察および結論

水およびガラスの固有音響インピーダンスを既知の値とし，SAM をもちいて生検筋を構成する各成分の固有音響インピーダンスの定量を試みた．得られた各値は予想されたものよりもそれぞれ高めであり，その原因はもちいた周波数帯域での超音波の波長に対して試料の厚みが過小であったため標本の支持体としたスライドガラスによる反射を完全に除去できなかったことによるものと考えられ，今後条件を変えてさらに検討しなければならないと思われる．従って今回算出した各成分の固有音響インピーダンスを絶対値として取り扱うことはできないが，相対的な値として取り扱うことは可能と思われたためこれらの値をもちいて各成分が理想的平面を構成して接すると仮定した場合の両者の境界面における反射率と反射損失の大きさを推定した結果，結合組織と脂肪組織の組合せがもっとも echogenicity にとみ，ついで Type 2 fiber と脂肪組織，結合組織とその炎症性変化などの組合せが続き逆に Type 1 fiber と Type 2 fiber の組合せにおいてはその echogenicity はきわめて小さいものと推定された．UI 上実際に描出される画像情報においては理想的反射のほか，組織内散乱や減衰の要素が無視できないため単純に今回の結果を援用することには問題があるが UI の常用周波数帯域である数 MHz における点分解能を勘案し生検標本から UI シミュレーションをおこない実際の画像と対比することは組織診断の妥当性を検討する上で有意義であると思われる．

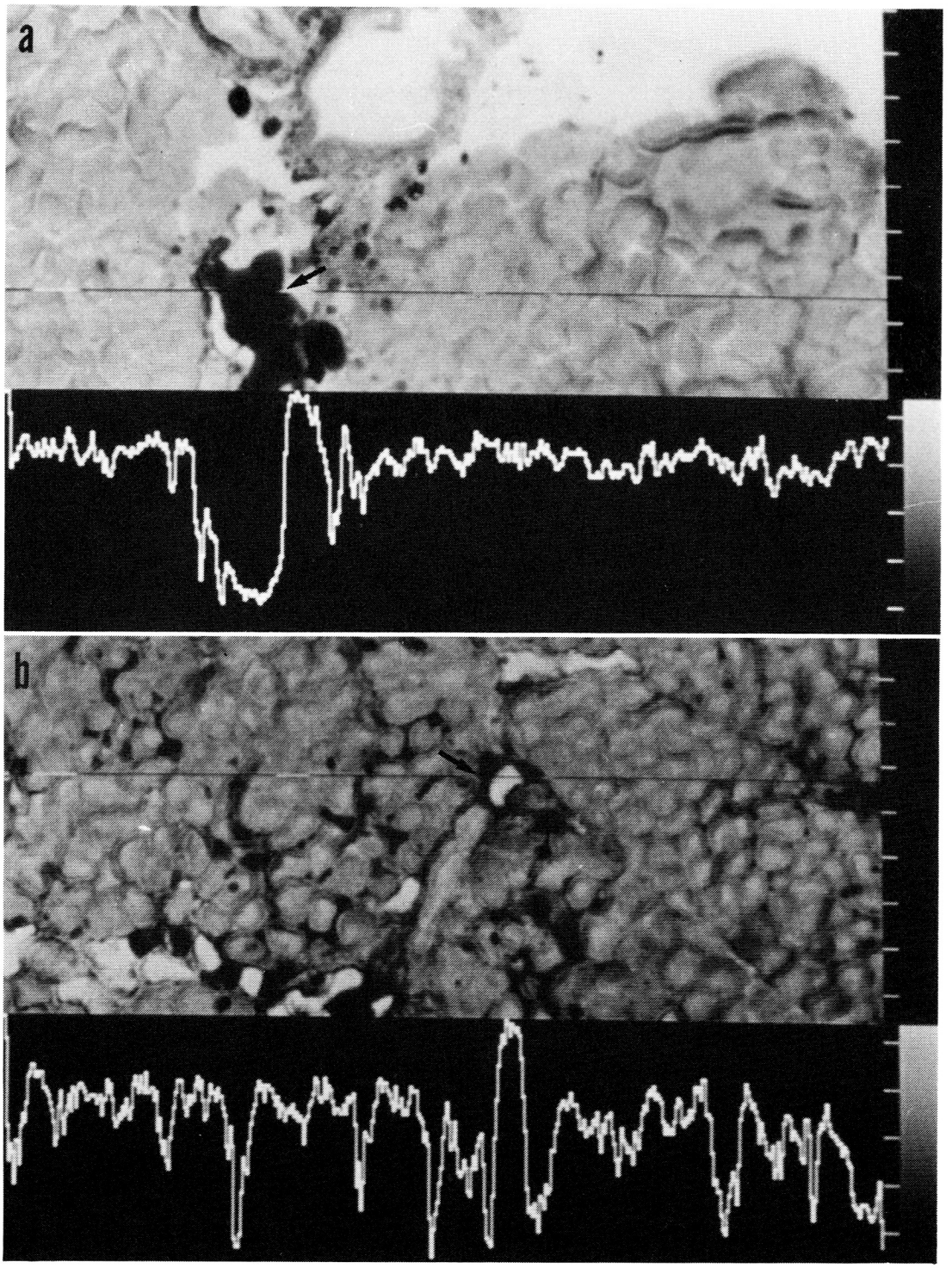


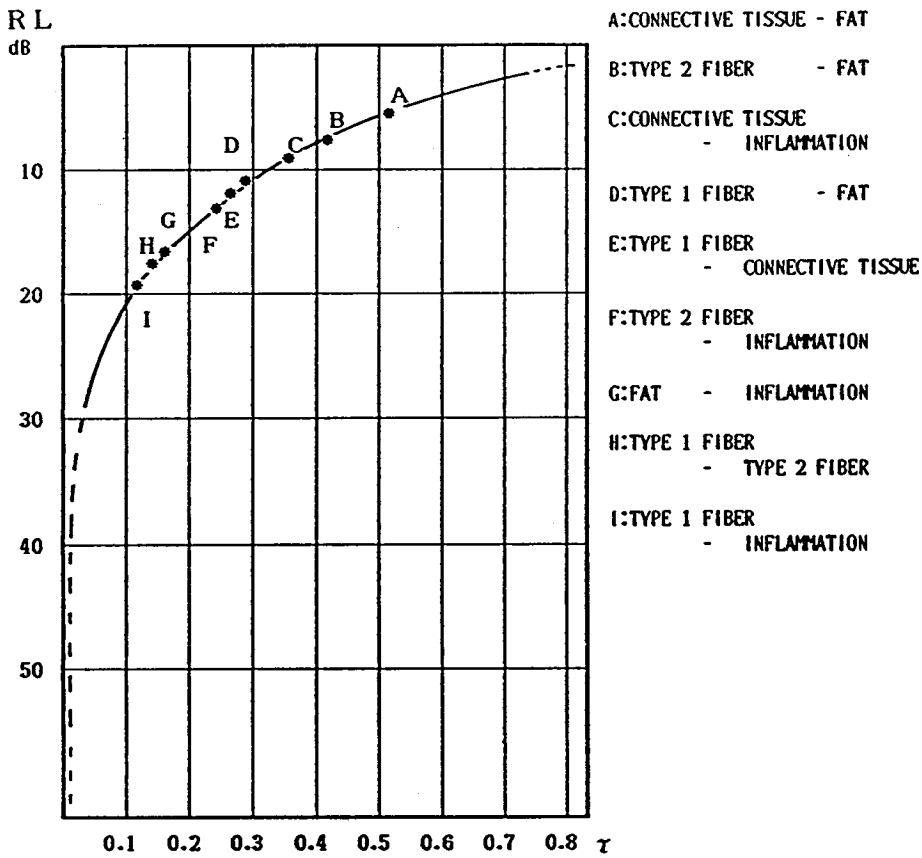
図1　脂肪組織（a）および炎症性変化をともなう結合組織（b）における－GAPSの測定．双方共に超音波吸収が大きく明度の低い部分として描出されるが－GAPSにはそれぞれ29dB，14dBと差を認めた（多発性筋炎）．

表3　(a)求められた各成分の固有音響インピーダンス．(b)各成分が理想的平面を構成して接する場合の，境界面での反射率（τ）および反射損失（RL）．

a.

	固有音響インピーダンス（kg/m² s）
Type 1 fiber	2.7987E+06
Type 2 fiber	3.8433E+06
結合組織	4.92436E+06
脂肪組織	1.57907E+06
炎症性結合組織	2.23858E+06

b.



今回の検討の結果は，進行性筋ジストロフィー症において早期から著明に認められる UI 所見上の snow storm pattern が組織所見上他の疾患に対してかなり特徴的に存在する散在性かつ混在性の脂肪変性と結合組織の増生に，また急性期の多発性筋炎に認められる foggy pattern が主として筋膜近傍の結合組織や筋細胞周囲に進展した炎症性変化に，神経原性筋萎縮において認められる層状構造が島状にあるいは群化して残存する筋線維と慢性に増生した結合組織とに由来する可能性を強く示唆するものである．先にあげた各成分の組合せのうち実際上は考慮する必要の乏しいものもあ

り，また神経筋疾患における筋病変の分布は筋束内ではほぼ平均化されていることなどを勘案するとUI所見からtissue characterizationを行うことはかなりの程度妥当性を持つに至ると考えられた．

文　献

1）田代邦雄，松浦　亨，長沼睦雄，島　功二：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一．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，1985，pp. 90-95.

2）田代邦雄，松浦　亨：骨格筋の超音波診断とその応用，厚生省［神経疾患研究委託費］筋ジストロフィー症の疫学，病態及び治療開発に関する研究．西谷班，昭和60年度研究報告書（ワークショップ），1986，pp. 386-394.

3）田代邦雄，松浦　亨，土井静樹：筋疾患と超音波診断法．内科，58：120-124，1986.

4）田代邦雄，松浦　亨，北川まゆみ，森若文雄，島　功二：神経筋疾患におけるUltrasound imaging一超音波顕微鏡およびEMG-guided biopsy needleの臨床応用一．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60年度研究報告書，1986，pp. 103-108.

5）松浦　亨，田代邦雄，土井静樹，佐藤松治：筋疾患の超音波画像診断と超音波顕微鏡による検討．神経内科，25：173-175，1986.

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）

田　邊　　等*

研究協力者　宮　本　和　人*　栗　田　啓　司*　小　田　雅　也**

はじめに

骨格筋 fiber type の組織化学的指標として，現在 myosin ATPase の Padykula の原法[1)2)]に，前処置 pH 依存性を応用した Brooke らの変法[3)4)]が広く用いられている．すなわち基準となる段階的変化別に pH10.2～10.5で濃染する筋線維を type 2，陰性のもの type 1；pH4.5～4.7で濃染するもの type 1，中間色のもの type 2b，陰性のもの type 2a；更に，pH4.2～4.3で濃染するもの type 1，中間色のもの type 2c，陰性のもの type 2a および2b の四種に分けられている．しかし，神経筋疾患の診断や病態評価目的で実施した筋生検においては，その段階的変化に合致しない場合，例えば pH10.3前後で前処置を施したもので中間色が出現したり，pH4.6前後で前処置したもので数段階の中間色の出現に遭遇する．私達は，ミオシン ATPase 活性像の段階的 pH 依存性に合わない筋線維が存在する点に着目し，それらの組織化学的特徴や原病態との関連などにつき広く検討している．今回は，特にそのうちから，アルカリ側の中間色の問題の検討結果を報告する．

対象と方法

対象　1982年２月より1983年12月までに，当院にて筋生検を施行した68例，69検体である．男39例，女29例，年齢分布は９歳以下が14例，10歳代７例 20歳代６例，30歳代６例，40歳代16例，50歳以上19例である．

方法　生検の部位については，各症例の臨床症状に合わせて適宜選択した．生検筋組織を液体窒素で冷やしたイソペンタン中にて瞬間凍結させ，クリオスタットにて10μ の連続切片を作成して，H & E 染色，trichrome 変法，NADH-Tr 活性，更に pH10.4，10.3，4.6および pH4.3にて前処置を加えたミオシン ATPase 活性（本反応 pH9.5）を実施した．尚，MAG（menadione linked α-glycerophosphate dehydrogenase）活性，PAS 反応は一部の例で実施した．連続切片が確認された標本を，25倍の写真にて観察した．

結　　果

69検体につき検討すると，中間色線維が一本もみられなかったもの22例，25倍の視野に１～５本みられたもの20例，６～10本みられたもの18例，11本以上のもの９例であり，出現率は68％にのぼった．ここで中間色線維の実例を示すと，図１は１歳の女児例で，軽度の大少不同と type 2 artrophy をしめす症例であるが，ミオシン ATPase10.4において１と＊で示した２個の中間色線維が認められ，pH4.6，4.3，NADH-Tr 活性で濃染し，MAG 活性，PAS 反応では中間色に染まる．図２は49歳男性で，臨床的に筋のこわばりとミオキミアを主徴[5)]とし，筋生検では小角化線維の散在と fiber type grouping を認める末梢神経障害型の neuropathic change と考えられる症例である．図の ATPase10.3に数字で示した中間色線維が pH4.6で濃染し4.3で中間色に染まり，MAG 活性では陰性ないし中間色に染まる．図３(1)は30歳男性で脊髄小脳変性症と筋萎縮を呈する例で，筋生検像では pyknotic nuclear clump を含む極度の萎縮線維からなる大群集性萎縮および小角化線維の散在，肥大線維の混入を示し，前根

＊東京都立神経病院神経内科
＊＊東京都立神経病院検査科病理

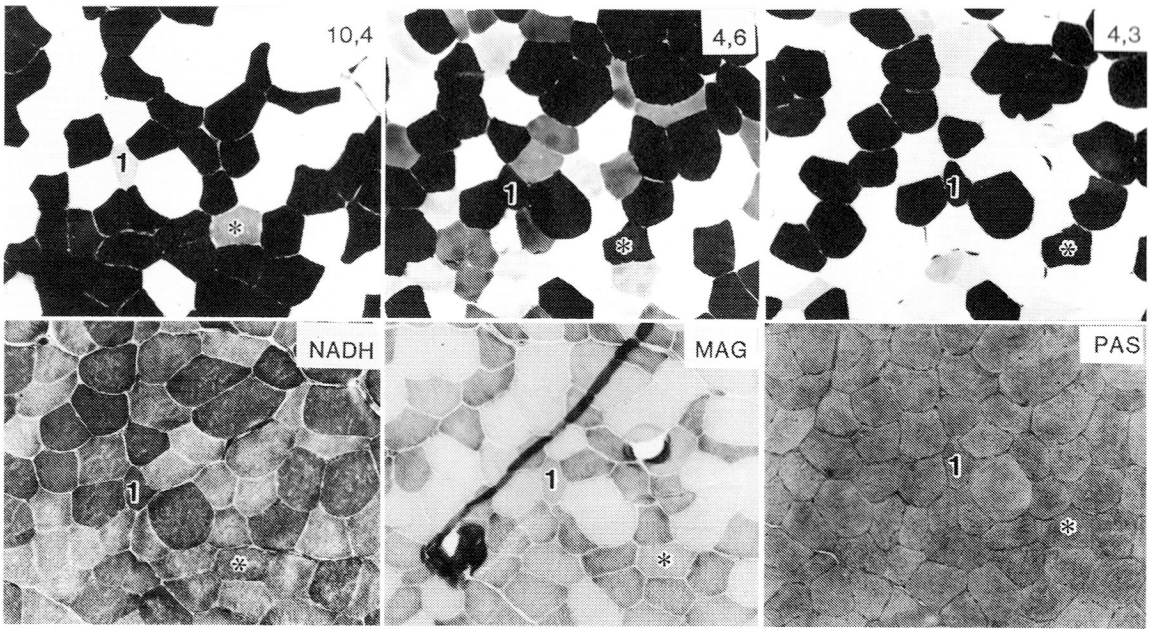


図1　ATP10.4　ATP4.6　ATP4.3　NADH-Tr　MAG 活性　PAS 反応

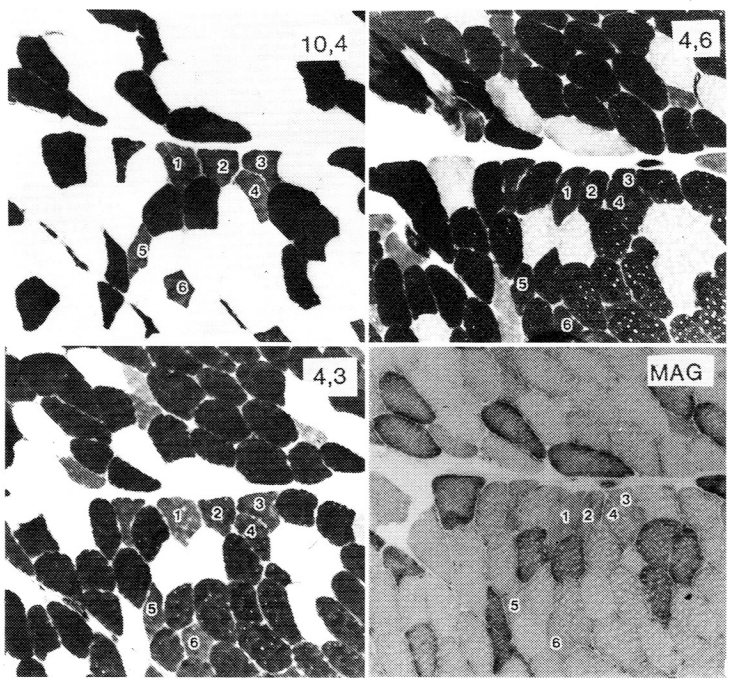


図2　ATP10.4　ATP4.6　ATP4.3　MAG 反応

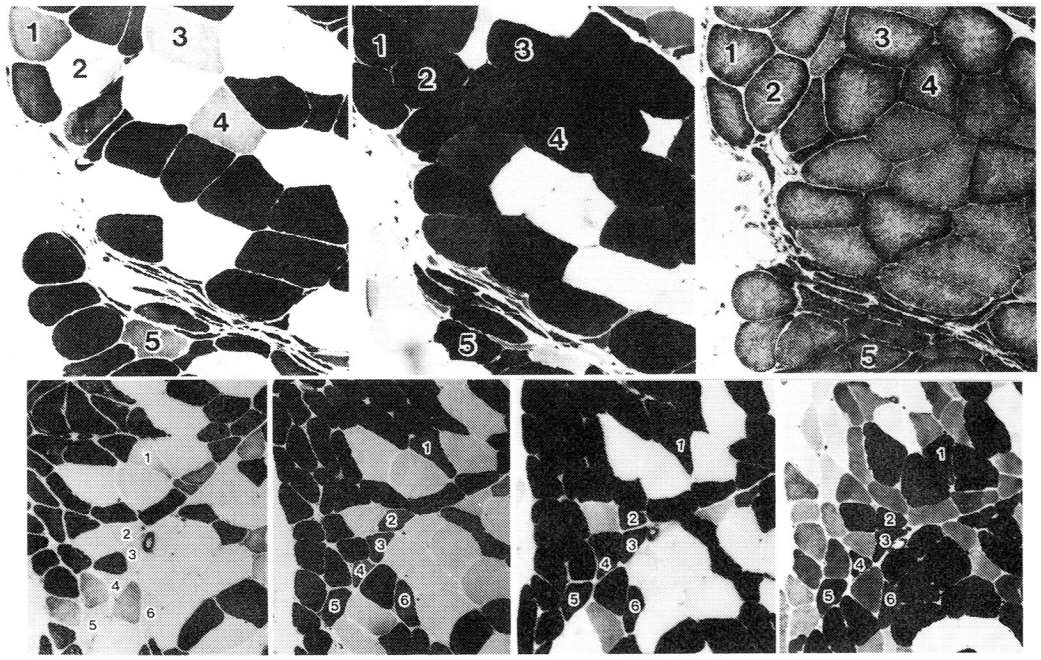


図3(1)　ATP10.3　ATP4.6
NADH-TR　(2)　ATP10.5　ATP10.4　ATP10.3　ATP4.6

末梢神経障害型のneuropathic changeと考えられる．図の如く，pH10.3にて数字で示すような中間色線維が認められる．pH4.6と4.3ではすべて濃染し，NADH-Tr活性ではsubsarcolemmal hyperactivityが著名のためfiber typeの判定は極めて困難である．図3(2)は別の症例であるが，アルカリ側で前処置pHを10.3より0.1ずつ10.5まで段階上昇させて反応させたもので，図のように10.3にて数字で示した一部の中間色線維が10.5では酵素活性がほとんど陰性になり，一方，10.3で濃染する他の一部の線維がpH10.5では中間色になる場合もある．表の上段はミオシンATPase活性像前処置pH10.3での中間色線維が，ミオシンATPase活性前処置pH4.6，4.3およびNADH-TR活性でどのような反応態度をとるかを示している．なお，「＋」は濃染，「±」は中間色，「－」は陰性を表わす．これらのうち3者とも濃染するものは35例，pH4.6，4.3で濃染しNADH-TR活性で中間色となるものは15例，4.6のみで濃染し，4.3とNADH-TRで中間色となる

表　中間色線維の各染色での反応態度

4,6	4,3	NADH	MAG*	例数**
＋	＋	＋		35
＋	＋	±		15
＋	±	±		8
＋	＋	＋	－	13
＋	＋	＋	±	17
＋	＋	±	±	12
＋	±	±	±	6

＊　MAG未施行例15例を含む
＊＊　重複例有り
出現率　47／69
（68％）

ものは8例であった．表下段はMAG活性を含めて検討したものである．前3者とも濃染し，MAG活性が陰性のもの13例，同じく前三者とも濃染するが，MAG活性が中間色となるもの17例，4.6，4.3で濃染し，NADH-TRとMAG活性が中間色となるもの12例，4.6のみで濃染し，他の3者で中間色となるものは6例であった．

考　　察

ミオシンATPase活性アルカリ側での中間色線維の出現はSchantzら[6]も指摘しているが，実験的に四肢筋に持続的に強力な負荷を加えた前後で筋生検を施行し比較して，前にはほとんど中間型はみられず，後で僅かに出現するとしている点，本研究とは状況を異にしている．調べえた限りそれ以外の報告でルーチンミオシンATPase活性像にて中間色が出現することを明確に述べたものはみあたらない．今回の検討で，通常の筋生検において，かなり高率に出現することを明らかにした．連続切片において組織化学的に検討すると，ミオシンATPase酸性側の所見でpH4.6では全例濃染し，pH4.3にて2種類，すなわち濃染するのものと中間色のものとに分けられる．酸性側の所見を重視するとpH4.3にて濃染する筋線維はtype 1の性格を，中間色に染まるものはtype 2cの性格を持っていると考えられる．NADH-TRとMAG活性で示されるミトコンドリア系および解糖系の酵素活性を考慮に入れると，中間色線維でNADH-TR活性陽性でかつMAG活性陰性のtype 1的性格を示すものが，かなりの頻度でみられた．また，これらの酵素活性も中間反応を示すものも多かった．ルーチンミオシンATPase活性像で中間色を呈する線維は筋組織の変性および再生の過程でミオシンATPase活性像のpH依存性になんらかの変異が生じたためと考えた．しかし，現在の定義からはこれらの筋線維はtype 2cと同一のものと言えないと考えた．

ま　と　め

ミオシンATPase pH10.3にて69検体中68%に中間色線維が出現した．これらを他の組織化学所見と対比し，ミオシンATPaseの酸性側の所見では少なくとも2型に分類できた．中間色線維は原病態解明の有力な手掛かりとなると考えた．

文　　献

1) Padykula, H.A. and Herman, E.(1955) Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical technique. J Histochem Cytochem., 3 : 161-169.

2) Padykula, H.A. and Herman, E.(1955) The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. J Histochem Cytochem., 3 : 170-195.

3) Brooke, M.H. and Kaiser, K.K.(1969) Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase. J Histochem Cytochem., 17 : 431-432.

4) Brooke, M.H. and Kaiser, K.K.(1970) Three myosin adenosine triphosphatase systems : the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. J Histochem Cytochem., 18 : 670-672.

5) Nahashima T. Kamegai M., Hirose K., Yamada K., Uono M., Tsubaki T., Nagashima K.(1985) Creatine Kinase (CK)-Linked Ig-A in Isaacs' Syndrome An Immune Complex Disease? J Neurol Sci., 67 : 269-276.

6) Schantz P., Billeter R., Henriksson J., Jansson E., Traning-induced increase in myofibrillar ATPase intermediate fibers in human skeletal muscle(1982) Muscle Nerves 5 : 628-636.

17) Cytoplasmic bodyの組織化学的，免疫組織化学的，並びに電顕的研究

福　原　信　義*

研究協力者　井　上　雄　吉**　吉　村　菜穂子**
杉　田　秀　夫***　伊　井　邦　雄****

はじめに

Cytoplasmic body（CB）はcytoplasmic body myopathy（CBM）で多数みられるほか，非特異的所見として種々の神経筋疾患でみられる．非特異的所見としてみられるCBと独立疾患としてのCBMとの関係は，非特異的に種々の疾患でみられるrodとnemaline myopathyとの関係になぞらえられている[1]ものの，CBの成因や生化学的構成などは未だ明らかではない．CBの報告の大部分はごく少数のCBが観察されるにすぎず，組織化学的な検討もほとんどなされていない．我々は既にCBMの2例について臨床病理学的観点より報告した[1]が，この症例とCBの多数みられた有機燐ニューロパチーの1例との筋生検材料で組織化学，免疫組織化学，超微形態の観点より検討を加えたので報告する．

症例と方法

症例1　42歳女性[1]

25歳頃より徐々に歩行障害が出現，四肢体幹の筋力，特に呼吸筋の筋力が低下していた．両側大腿直筋と肋間筋で生検．

症例2　56歳男性[1]

症例1の兄で，呼吸筋障害による肺胞換気不全のため死亡．剖検時に大胸筋，肋間筋，横隔膜を採取した．

症例3　52歳男性[2]

Dipterexの誤飲により，急性有機燐中毒を生じ，一時恢復した後，徐々に下肢の異常感覚，疼痛，筋力低下が増加してきた．誤飲後70日目に左腓腹筋にて筋生検を施行した．

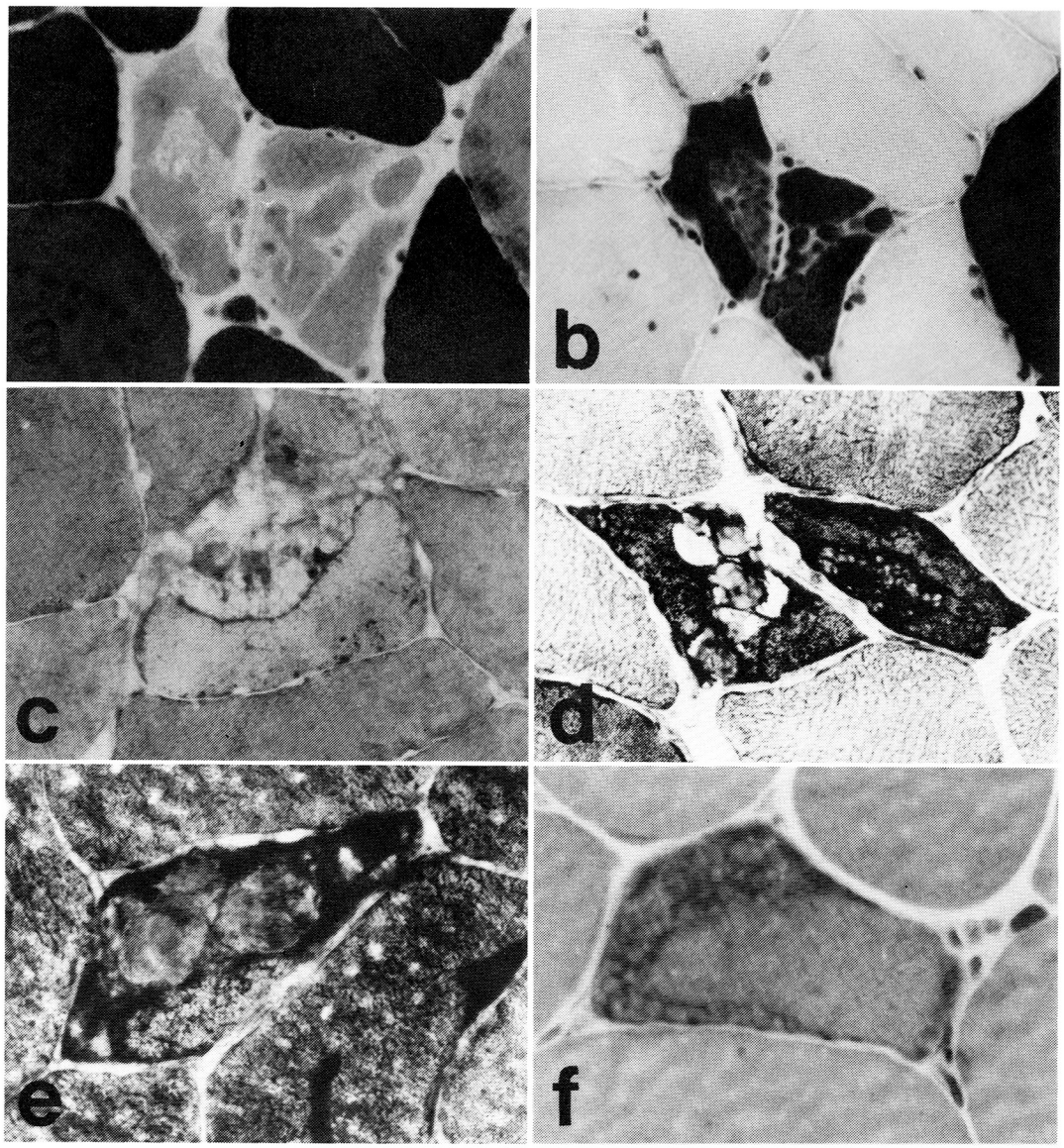
方法　凍結切片は通常の如く，各種組織化学的染色を行った．Acridine orange染色はPerlら[3]の方法によった．desminはウサギ抗ニワトリdesmin血清を用い，α-actininはウサギ抗ヒトα-actinin血清を用い，vinculinはウサギ抗ニワトリ血清を用いてavidin biotin peroxidase complex法で染色した．Cathepsin B,H,Lおよびcystatin α, βはヒトのcathepsin B,H,Lおよびcystatin α, βに対するウサギIgGを用い直接peroxidase法にて染色した．電顕標本は通常のごとく，グルタールアルデヒド，オスミュウム酸の二重固定を行い，アラルダイトに包埋した．

結　　果

1）組織化学的所見

今回用いた症例ではCBは1個の筋線維内に1個だけ出現することは少なく，大部分は数個のCBがかたまって出現していた．同一筋線維の正常部分に比し，H.E.染色ではエオジン好性に，Gomori trichrome染色では淡赤紫色，一部青緑色に染まった．Adenosine triphosphatase染色（図1 a, b）では，CBはタイプI線維にのみみられ，pH4.3前処置，pH10.4前処置，いずれの染色においても母筋線維より淡染した．Phosphorylase（図1 c），NADH-tetrazolium reductase（図1 d），Succinic dehydrogenase，PASなど

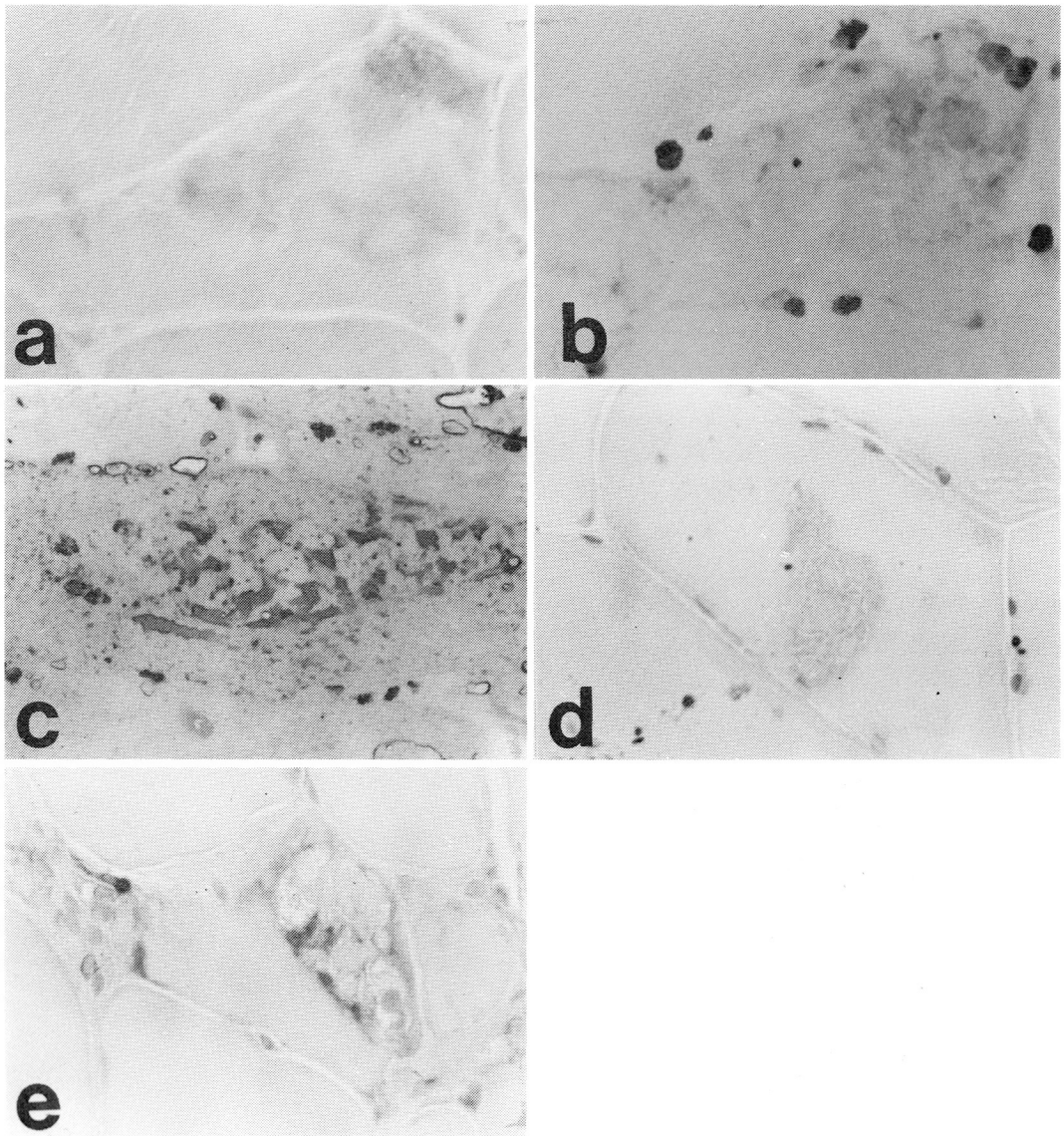
＊金沢大学医学部神経内科
＊＊富山医科薬科大学第二内科
＊＊＊国立精神神経センター神経研究所
＊＊＊＊徳島大学医学部第一病理



a	b
c	d
e	f

図1　組織化学的所見　×240
a. routine ATPase, b. 前処置 pH4.3の ATPase,
c. phosphorylase, d. NADH－TR,
e. AMP deaminase, f. non-specific esterase

の染色では CB は染らないが，CB の周辺部は濃染し，target fiber 様にみえるものもあった．AMP deaminase 染色（図1 e）では CB は染まらず，周辺部が濃染した．酸性 phosphatase 染色（図2 a）では主に CB の周辺部で染まるが，CB のない筋線維では染まらなかった．non-specific esterase 染色（図1 f）も同様であったが，CB のみられない小角化線維でも陽性に染っていた．acridine orange 染色では CB の周辺部で，わずかにオレンジ色を呈しているものもあるが，CB は RNA を



a	b
c	d
e	

図2　免疫組織化学的所見　×135
a（acid phosphatase）とb（desmin）は連続切片，
c. α-actinin, d. cathepsin B, e. Cathepsin H

有していなかった．

2）免疫組織化学的所見

CBは抗ヒトα-actininで濃染した（図2 c）．desminはCBにはなく，その周辺部で染まり，連続切片でみると酸性phosphatase陽性の部分と一致していた（図2 a, b）．抗ニワトリvinculinには染まらなかった．抗ヒトcathepsin B,H,Lでは，いずれもCBは染まらないが，CBの周辺部に陽性（図2 d, e）であった．一方，内因性のcysteine protease inhibitorのcystatin α，βは染まらな

かった.

3）電顕所見

有機燐ニューロパチーにおけるCBのcoreは一様に高電子密度のthin filamentよりなり，周囲にhaloがみられるが，CBMのCBのcoreは電子密度が不均一で，周囲のthin filamentの方向も不定であり，中には高電子密度の中心部に連続してthick filamentが方向不定性に配列し，あたかもZ帯の崩壊を生じた筋線維が丸められたもののようにみえるところもあった．CBのcoreと同様の構造物がほぼ正常に配列した筋線維のZ帯と連続してみられ（図3），CBがZ帯由来であることを示唆していた．CBの周辺部には小さなrod，著明に発達したtubuloreticularの構造物（図4），グリコーゲン顆粒（図4）やミトコンドリアの集積がみられ，また，膜につつまれたグリコーゲン顆粒の集積（図5）などlysosomeの異常を思わせる構造物もみられた．

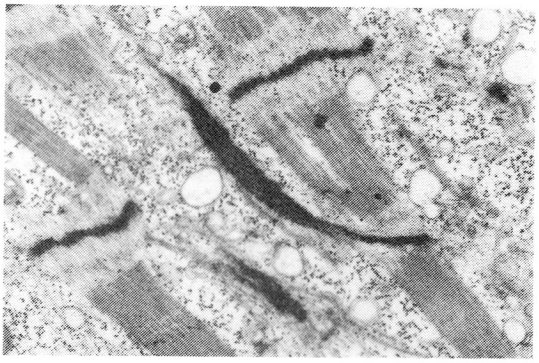


図3　Z帯に連続したcore構造　×12,600

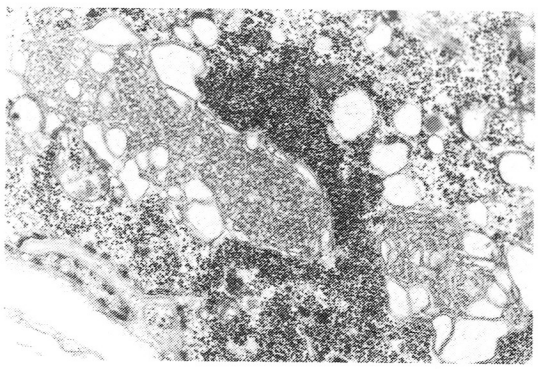


図4　著明に発達したtubulo-reticularな構造物とグリコーゲン顆粒　×12,600

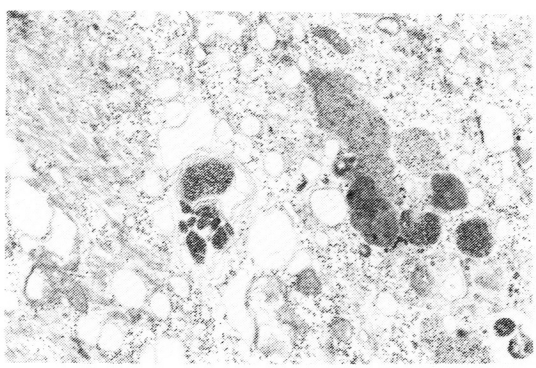


図5　ライソゾーム様構造物　×10,500

考　　察

CBはEngel[4]によって最初に報告された封入体でCBMのほか，種々の疾患で報告され，targetとの類似性から，筋の変性過程で生ずる構造物と考えられたが詳細は明らかではなかった．Edström ら[5]ま，sarcoplasmic bodies（彼らの電顕像からはCBと同じものと思われる）が抗desmin抗体で染まり，intermediate filamentが周囲で増加していることを報告し，Chou & Mizuno[6]はテタヌス毒素による局所的筋病変で実験的につくったCBは免疫組織化学的にactinとdesminを有するがmyosinやvimentinを有さないことをみいだしており，我々の結果と一致している．しかし，我々の観察では，CBは抗α-actinin抗体に強く染まり，Z帯由来と考えられるが，coreの部分はdesminはほとんどなく，その周囲に増加していた．正常ではdesminとvimentinは峰巣状に多数Z帯の周囲に分布し，最外側では筋形質膜につながる[7]といわれるが，Z帯の変性過程においてthin filamentによりcoreがつくられ，周囲に崩壊したdesminがたまってくるものと思われる．CBの周囲にはグリコーゲン，ミトコンドリアが増加し，lysosome酵素の活性が高まっていることが確認されたが，これはCBができる過程における崩壊組織の自己貪食機序をみているものと思われる．しかし，通常筋細胞壊死に伴ってみられる貪食細胞は出現しておらず，タイプII C線維で代

表される再生線維も極めて少なく，acridine orange でも RNA 螢光を有さないため，CB は通常と異なる筋線維の特殊な変性過程によって出現するものと思われる．lysosome 酵素の活性亢進[8]，AMP deaminase の高活性[9] などは rimmed vacuole 型遠位型ミオパチーにおける筋の変性過程と共通するものであり，この点からも興味がもたれる．

結　論

CBM と有機燐ニューロパチーでみられた CB について組織化学的，免疫組織化学的，電顕的に検討した．CB は Z 帯由来で，core の部分は α-actinin を，その周辺部は desmin を有し，CB のまわりにグリコーゲン，ミトコンドリア，tubulo-reticular の構造物などが増加し，lysosome 酵素の活性が亢進しており，筋の特殊な変性過程によるものと考えられた．

文　献

1）福原信義，井上雄吉，吉村菜穂子：cytoplasmic body myopathy の臨床的，病理学的研究．厚生省「神経疾患委託研究費」「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年度報告書，1985．p. 117-121.

2）Fukuhara, N., Hoshi, M. & Mori, S.: Core/targetoid fibers and multiple cytoplasmic bodies in organophosphate neuropathy. Acta Neuropathol.(Berl.), 40: 137-144, 1977.

3）Perl, D.P., Sher, J.H. & Aronson, S.M.: Acridine orange fluorescence staining of RNA in atrophic and regenerating skeletal muscle. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 27: 110-111, 1968.

4）Engel, W.K.: The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. Neurology (Minneap.), 12: 778-794, 1962.

5）Edström, L., Thornell, L. & Eriksson, A.: A new type of hereditary distal myopathy with characteristic sarcoplasmic bodies and intermediate (skeletin) filaments. J. Neurol. Sci., 47: 171-190, 1980.

6）Chou, S.M. & Mizuno, Y.: Induction of spheroid cytoplasmic bodies in a rat muscle by local tetanus. Muscle Nerve, 9: 455-464, 1986.

7）Granger, B.L. & Lazarides, E.: The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. Cell, 15: 1253-1268, 1978.

8）Ii, K., Hizawa, K., Nonaka, I. et al.: Abnormal increases of lysosomal cystatine proteinases in rimmed vacuoles in the skeletal muscle. Amer. J. Pathol., 122: 193-198, 1986.

9）Higuchi, I., Nonaka, I., Ishiura, S. et al.: High AMP deaminase activity in rimmed vacuoles of skeletal muscle. J. Neurol. Sci., 75: 329-342, 1986.

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

古　庄　敏　行*

研究協力者　田　村　高　志*　平　石　佳　之*　小　林　　優*
納　　光　弘**　福　永　秀　敏***　井　形　昭　弘**

はじめに

ドシャンヌ型筋ジストロフィー症（DMD）を支配する遺伝子解析を試みる上にDMDの遺伝的異質性を検討することは，極めて重要である．

周知の如くDMDのほとんどは伴性劣性遺伝に従うと考えられているが，Greensteinら（1977）[1]によって，X染色体一常染色体転座を伴った女性DMDの報告以来，染色体レベルで女性DMD（あるいはD-like MD）の研究が広く行われ，内外の文献で約15例，上記の転座型の女性DMDが報告されている．

他方，Kloepferら（1958）[2]，Somer（1985）[3]らによると，女性DMD（あるいはD-like MD）と診断された患者（同胞の男性DMDも含む）のうち，染色体核型は正常を示し，常染色体性劣性型のDMDの存在を報告している．

著者らも1984年以来，鹿児島大学医学部第三内科，および国立療養所南九州病院神経内科の外来，および入院中の女性DMDを発端者とした家系について調査を続行している．このうち女性DMDの3例についてはすでに昨年報告した．今回はこの3家系のうち姉弟にDMDをもつ例について染色体分析を試みDMDの遺伝的異質性および遺伝機構について検討を試みたので報告する．

方法と結果

本研究に用いた資料は，すでに1985年度の本研究班会議で報告した3家系のうち，同胞に男性・女性のDMDを有する1家系である．

方法　本症の家系調査は，発端者の全同胞および両親について問答および戸籍を用いて行った．

なお，DMDの判定についても家族全員について直接診断した．すなわち，血液生化学的検索としてN-tetra CK法による血清活性値，筋電図，心電図および臨床所見などを総合し，DMDを診断した．また，染色体分析は，Ikeuchiら（1979）[4]によって開発された高精度染色体分染法によった．

結果　本研究に用いた家系は図1に示す如く，両親はともに非DMDで他人婚である．発端者の全同胞は4人で，このうち姉と弟がDMDである．

発端者（M.M.）は，1953年8月23日出生，女性，1歳6ヶ月でやっとつかまり立つ．2歳で独歩，3歳頃転倒しやすい．競走は著しく遅い．9歳で登はん性起立，12歳で階段昇降不能，緩徐進行，現在歩行全く不可能で電動車イス使用．CK値244．筋電図：筋原性変化，心電図：異常なし，臨床所見：腓腹筋仮性肥大，染色体検査：図2に示

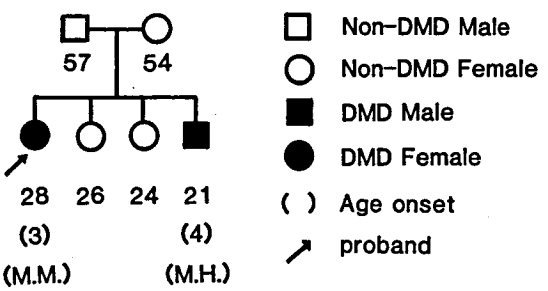


図1　DMDの姉弟の家系図

＊杏林大学保健学部臨床遺伝
＊＊鹿児島大学医学部第三内科
＊＊＊国立療養所南九州病院神経内科

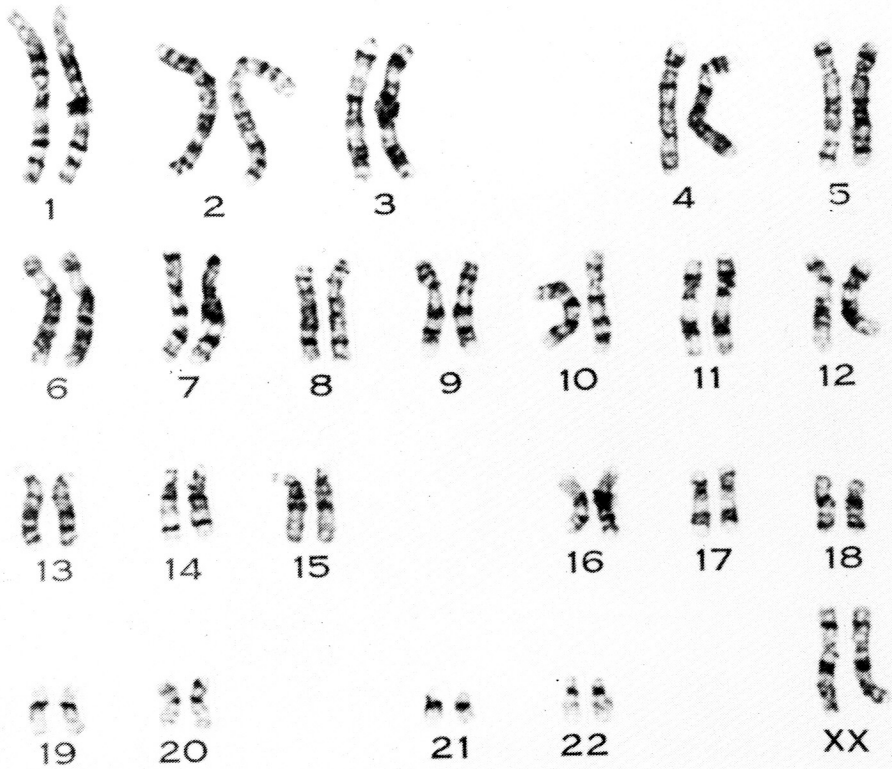


図2　発端者（M.M.）の染色体分染図

す如く正常核型であった．これはすでに昨年報告した．

発端者の弟（M.H.）は，1965年2月15日出生，1歳6ヶ月で処女歩行，3歳頃から倒れやすく，4歳頃から登はん性起立，6歳で階段を昇るとき手すり必要，14歳頃から歩行不能，CK値227，最近はCK値755となる．筋電図：筋原性変化，心電図：異常なし，臨床所見：腓腹筋仮性肥大．染色体検査：図3に示す如く正常核型であった．

考　　察

DMDのほとんどは伴性劣性遺伝型と思われるが，すでに述べた如く，この他に(1) X染色体―常染色体転座による女性DMD（あるいはD-like MD），(2)染色体核型は正常を示す，常染色体性劣性遺伝型などの報告からDMD（あるいはD-like MD）の遺伝的異質性の存在は疑いない事実と思われる．転座型の女性DMD（あるいはD-like MD），正常核型を示す常染色体性劣性遺伝型のDMDを遺伝学的に解明することは，遺伝子（あるいは分子）レベルでDMDの遺伝的異質性の解析に貢献するところ大と思われる．

著者らはこれらの点を考慮し，1984年来女性DMD（D-like MD）を発端者とした3家系について，現時点でこの成績をまとめてみると，(1)両親はいずれも正常（非DMD）．(2)両親のいとこ婚率は2/3＝0.67±0.27で高く，(3) 3家系におけるDMDの染色体検査結果は，いずれも正常核型で染色体異常はみられない．(4)図1に示した如く，同一同胞で男女ともにDMDが発現していること，などがあげられる．したがって女性DMD（あるいはD-like MD）を伴性劣性遺伝と仮定して説明するには，父がDMDであることが条件づけられるけれども，上述の如く，3家系ともいずれも

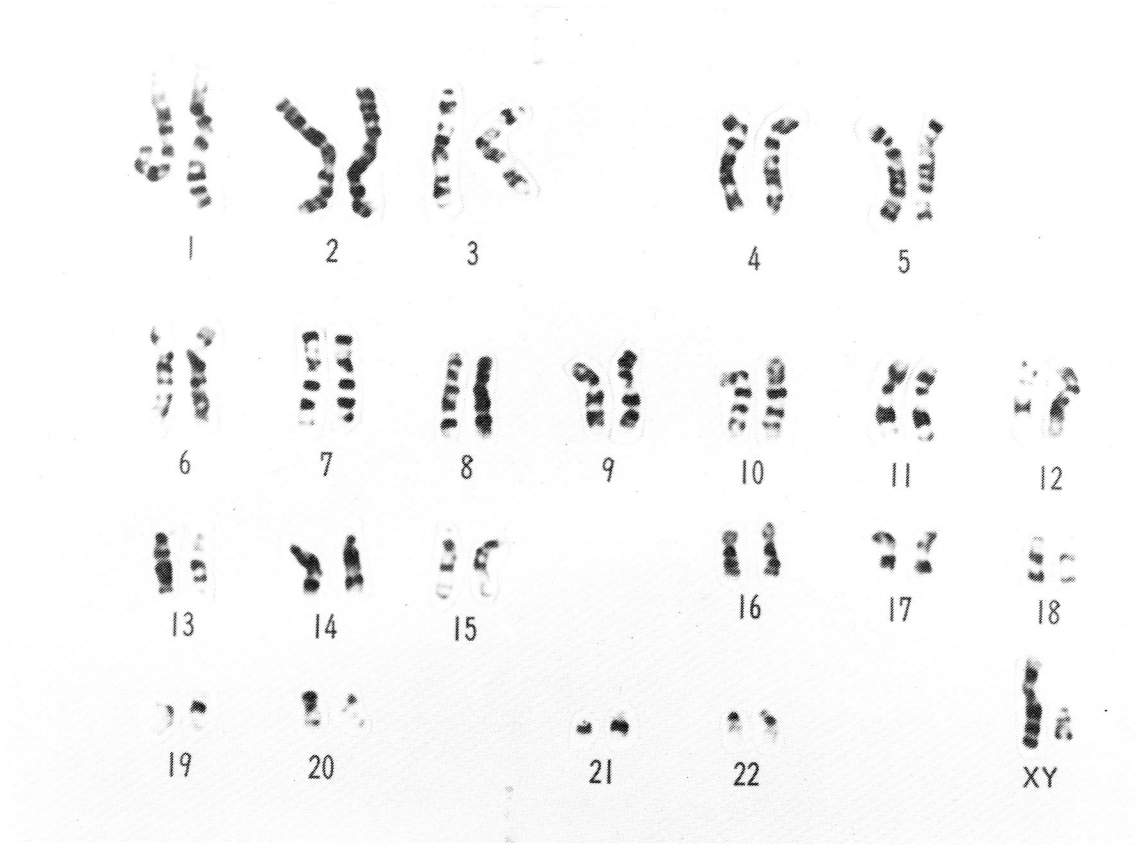


図3　発端者の弟（M.H.）の染色体分染図

両親は正常（非DMD）であり，本症例の女性DMD（あるいはD-like MD）は伴性劣性遺伝の仮説に適合しないが，吉丸ら（1984）[5]のDMDの浸透度が43%であることを考えれば，伴性劣性遺伝仮説も破棄できない．しかし，鹿児島集団における男性DMD頻度から推定した，女性DMDの頻度に比べ著しく過大である．このことは本研究の女性DMDをすべて伴性劣性遺伝型と判定することは困難であろう．

以上，一連の検討から，常染色体性劣性遺伝型の存在を示唆した例と考えられる．今後さらに調査例数を増して詳細にDMDの遺伝的異質性について検討する予定である．

なお，著者らの女性DMDを発端者とした3家系を対象に東京都立臨床医学総合研究所遺伝情報研究部の鈴木紘一先生の下で多型性DNAを用いた筋ジストロフィー症の遺伝子診断を行っている．

ま　と　め

両親とも非DMDで同胞に男性・女性DMDを有する患者について高精度分染法による核型分析を試みたが，いずれも染色体異常はみられなかった．本研究（1984年以来）からDMDの遺伝的異質性について検討し，常染色体性劣性遺伝型の存在を示唆した．なお，本家系については目下，遺伝子解析を試みている．

文　　献

1）Greenstein RM, Reardon MP and Chn TS: An X/autosome translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy (DMD):

Evidence for DMD gene localization. Ped Res 511 : 457, 1977.

2) Kloepfer HW and Talley C: Autosomal recessive inheritance of Duchenne - type muscular dystrophy. Ann Hum Genet 22 : 138 -143, 1958.

3) Somer H, Voutlainen A, Knuutila S, Kaitila I, Rapola J and Leinonen H : Duchenne-like muscular dystrophy in two sisters with normal karyotypes. Evidence for autosomal recessive inheritance. Clin Genet 28 : 151-156, 1985.

4) Ikeuchi T and Sasaki M : Accumulation of early mitotic cells in ethidium bromide-treated human lymphocyto cultures. Proc Jap Acad 55 : 15-18, 1979.

5) 吉丸博志，古庄敏行，中里興文，中島洋明，金久禎秀，納　光弘，井形昭弘，川平　稔，中嶋八良：筋萎縮性疾患の遺伝分析：Duchenne 型筋ジストロフィー症について．杏林医会誌15：181-188，1984.

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

塚越　廣*

研究協力者　佐野元規*　斉藤深美子**
山本興太郎**　外村　晶**

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー（以下DMD）は，伴性劣性遺伝を示す疾患であり，女性は異常X染色体の保因者（carrier）として，多くの場合は臨床症状を呈することは少ない．今回我々は女性発症例においてX染色体に数的モザイクを認め，DMDの発症に関与していると思われるので報告する．

症例

患者：23歳，女性，会社員

主訴：四肢近位筋の筋力低下

家族歴：母親の妹の子供（男児）にDMD発症者があり，母親とその妹はCPKが高値である（図1）．

家族歴：

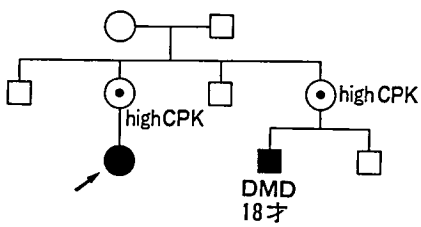


図1

既往歴：処女歩行は1歳6ヶ月で，精神運動発達にも異常なかった．初潮は13歳で月経周期は現在も規則的である．

現病歴：5～6歳頃より走るのが遅く，6歳頃より両下腿の腓腹筋の肥大が認められるようになった．学業成績は普通で知能低下はなかった．高校卒業時までは運動が不得意以外はとくに困ることはなかった．18歳，会社の健康診断でGOT，GPTが高値であると指摘されている．この頃より階段を昇るのに骨が折れるようになり，重い物を持ち上げるのが困難となってきた．今回，精査目的で昭和60年8月19日当科初診となる．

現症：身長151cm，体重55kg，体格中等度で軽度肥満あり．翼状頸，外反肘及びその他の外表奇形はない．心肥大・心雑音なし．骨格系正常．二次性性徴も正常で外性器，内性器ともに正常．

神経学的所見：知能正常，脳神経系正常．四肢近位筋に左右対称性に軽度の筋萎縮及び筋力低下を認める．両側下腿腓腹筋に仮性肥大を認め，深部反射は左右アキレス腱反射が正常以外はすべて低下していた．歩行は動揺性歩行でGowers徴候が陽性であった（図2）．

検査所見：血算，検尿正常．血液生化学ではGOT47 Iu/l，GPT128 Iu/l，LDH687 Iu/l，Aldolase27.3 Iu/l，CK4130（正常25-170）u/lと著明な高値を示していた．筋電図では筋原性変化を上下肢筋で認めた．右上腕二頭筋の筋生検所見では，筋線維の大小不同，肥大線維，opaque線維を認めた．また中心核の増加，結合織の増生が見られた．手根骨X-Pではcarpal angle正常（120度以上），metacarpal徴候陰性．

染色体検査：末梢血培養法により48時間培養したリンパ球標本の通常のギムザ染色法では観察した

＊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研細胞遺伝

図 2

77の細胞のうちほとんどは，46, XXの正常のkaryotypeであったが，1細胞に45, XX, -Cのkaryotypeを認めた．EB virusにより形質転換したリンパ球では，Q banding法で約20%の細胞にX染色体が一つ失なわれた45, Xのkaryotypeを認めた(図3)．また培養した皮膚線維芽細胞では約7%の細胞に45, Xのkaryotypeが見られた(表1)．

考　　察

本家系において，本症例の母親の妹の子供がDMDであり，母親及びその妹のCKが高値を示すことから，本症例は女性保因者からの発症例と考えられる．

本症例の染色体分析では，46, XXと45, Xのモザイクが認められたが，この現象は，正常X染色体とDMD遺伝子を有するX染色体の両方をもった受精卵が卵分割の過程で性染色体の不分離現象（nondisjunction）を起こして発生したものと考えられる．本症例では恐らく母親由来の異常X染色体が残ることにより，DMDとして発症したのであろう．

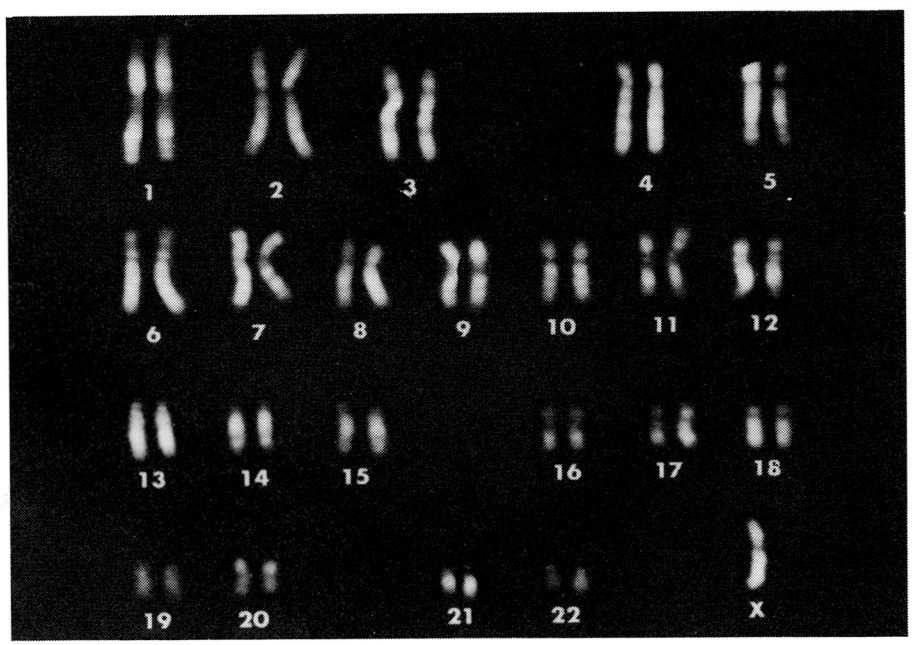


図 3

表1　Chromosomal findings in PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes, EBV-transformed lymphoblastoid cell line (LCL) and cultured skin fibroblasts.

	No. of cells observed	chromosome constitntion		% of 45, X
		45, X	46, XX	
Lymphocytes cultured with PHA	77	1	76	1
EBV-transforemed LCL	145	29	116	20
Fibroblast cultures	101	7	94	7

本例のような女性DMDにおいてX染色体に数的モザイクの認められた症例は文献では，Ferrier[1]，Jalbert[2]，Bortlini[3]の報告した3症例があり，Turner症候群とDMDの合併はWalton[4]が1例，報告している．またChellyら[5]はTurner症候群とDMDの合併症でKunkelら[6]のDNA probeである．PERT87.1，PERT87.8，PERT87.15をもちいて，残った母親由来のX染色体に欠失が存在することを証明した．

しかし，本症例ではTurner症候群の特徴を有していないのが，以上の症例と比較して特異的である．この理由として末梢リンパ球の通常の培養では45，Xの割合が少なく，ほとんどが正常の46，XXであることより理解可能であろう．一方EB virusにより形質転換したlymphoblastoid cell lineにおいては，約20%の細胞に45，Xが認められたことから，筋細胞においては45，XのKaryotypeをもつ筋細胞がかなりの割合で存在する可能性があり，母親由来のDMD遺伝子を有するX染色体が活性化されて筋症状を発現したものと推定される．

文　献

1）Ferrier P, Bamatter F et al: Muscular dystrophy (Duchenne) in a girl with Turner's syndrome. J. Med. Genet. 2: 38, 1965.

2）Jalbert P, Mouriquard C et al: Myopathie progrossive de type Duchenne et mosaique XO/XX/XXX: Considérations sur la genése de la fibre musculaire striée. Ann. Genet. (Paris) 9: 104, 1966.

3）Bortolini ER, Silva DM et al: Duchenne muscular dystrophy in a girl with a 45, X/46, XX/47, XXX chromosome constitution. Am. J. Med. Gen. 25: 239, 1986.

4）Walton JN: The inheritance of muscular dystrophy: Further observations. Ann. Hum. Genet. 21: 40, 1956.

5）Chelly J, Marlhens F et al: De novo DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. Hum. Genet. 74: 193, 1986.

6）Monaco AP, Bertelson CJ et al: Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA fragment. Nature 316: 842, 1985.

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

斎　藤　深美子*

研究協力者　外　村　　晶*

目　　的

伴性劣性の遺伝病であるDuchenne型筋ジストロフィー（以下DMDと略す）は，その遺伝様式上，主として男児にのみ発症するが，時として，女性発症者と考えられる患者が存在するのも確かである．女性DMDの発症に関して遺伝的に考えうるメカニズムとしては，表1にあげてある様に，(1)ホモ接合体の発症[1)2)]（現在のところ，まだ直接的証拠はない），(2)ターナー症候群での発症[3)~7)]，(3)ヘテロ接合体の発症[8)9)10)]，および，(4) X/A転座保有者での発症[11)~16)]が考えられている．臨床症状やその経過に関しては，(1)(2)の場合は男児DMDと同程度の重度な様相を呈するはずであり，またその様な報告もある．一方，(3)では，2本のX染色体は本来Lyonの仮説によりrandomに不活性化するはずであるが，DMDの病因遺伝子のない遺伝的に正常なXの方の不活性化の割合が大きい程，重度であると考えられており，このlyonizationの概念とヘテロ接合体での臨床症状の多様性との関連性が言われている．また，(4)については，常染色体との転座に関与していない構造的に正常なX染色体の方が選択的に不活性化することにより，転座による切断・再配列によって何らかの障害を受けたXp21上のDMD遺伝子

表1　POSSIBLE EXPLANATIONS OF OCCURENCE OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY (DMD) IN A FEMALE BY SEVERAL GENETIC MECHANISMS

1. HOMOZYGOUS FOR DMD GENE DUE TO THE MUTATION IN FATHER AND CARRIER MOTHER (X^dX^d)　$5X10^{-7}$　(Danieli et al. 1977)
   $(2.34-4)X10^{-8}$　(Furusho et al. 1985)
2. TURNER'S SYNDROME (X^dO AND MOSAICS); THIS MAKES THEM EFFECTIVELY MALE FOR DMD GENE　(Walton 1956, Ferrier et al. 1965, Jalbert et al. 1966, Chelly et al. 1986)
3. HETEROZYGOUS FOR DMD GENE (X^dX); RONDOM X INACTIVATION RESULTS IN MOSAICISM　(Emery 1963, Sugita et al. 1963, Pearson 1963)
4. X-AUTOSOME TRANSLOCATION AND PREFERENTIAL INACTIVATION OF NORMAL X (X/A)　(see review in Saito et al. 1986, Narasaki et al. 1985, Tomi et al. 1986)

*東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞遺伝部門

が発現したと考えられる．この様に，女性 DMD 発症原因の１つの要因として，染色体異常が関与している可能性が十分にある．

一般的に，女性 DMD と言っても，実際にはその臨床症状に heterogeneity が存在し，男児 DMD より軽度のものが多いため，類似疾患と区別することが困難な場合がほとんどである．そこで，今回は，対象を大きく広げて，女性筋ジストロフィーということにした．つまり，本研究においては，本邦における女性筋ジストロフィー患者に関して，家族性の有無にかかわらず，その細胞遺伝学的検索を通して各患者の染色体核型の同定と異常の有無，およびその結果から女性発症例における染色体異常の意義を検討することを目的とした．

対象と方法

対象　女性筋ジストロフィー患者

1．孤発例（特に10歳以前の若年発症例）

2．家系内発症例（男児 DMD のいる家系での保因者と思われる者（母，娘等）の発症例で年齢は問わない．）

方法　送られて来たヘパリン採血の静脈血を培養液と共に，PHA 添加後48時間（コルセミドは５～６時間処理）および72時間（コルセミドは２～３時間処理）培養した後細胞を回収し，0.075MKCl

表２　LIST OF FEMALE PATIENTS WITH MUSCULAR DYSTROPHY

Patient	Age at Exam.	Age at Onset	Family History	Still Walking	Cytogenet. Result
K.S.	$14^{y}\ 7^{m}$	2^{y}	-	-	N
I.I.	$19^{y}\ 9^{m}$	$3^{y}\ 6^{m}$	-		N
Y.M.	$24^{y}\ 6^{m}$	3^{y}	-	-	X/15
R.S.	$21^{y}11^{m}$	3^{y}	-	-	N
S.S.	$34^{y}\ 7^{m}$	$13\text{-}14^{y}$	-		N
N.F.	$5^{y}\ 5^{m}$	$3^{y}\ 3^{m}$	-	+	N
M.S.	$9^{y}\ 4^{m}$	3^{y}	-	-	N
K.I.	$31^{y}\ 7^{m}$	$30^{y}\ 9^{m}$	-	+	N
T.I.	16^{y}	2^{y}		-	X/3
N.M.	$2^{y}11^{m}$	2^{y}		+	N
Y.Y.	22^{y}	8^{y}	+	+	N*
H.S.	$16^{y}\ 3^{m}$	$4\text{-}5^{y}$	+	-	N
T.Y.	$30^{y}\ 8^{m}$	6^{y}	+	-	N
A.S.	$3^{y}\ 8^{m}$	$2^{y}\ 5^{m}$	+		N

* this case showed 45,X/46,XX mosaicism in the EBV transform lymphoid cells and fibroblasts.

にて低張処理を行ない，カルノア液（メタノール：酢酸＝3：1）で固定して染色体をスライドグラス上に展開し，標本を作製した．染色体分析は，通常のギムザ染色（リン酸 buffer，pH6.4），トリプシン前処理による G 分染法，および X 染色体の不活性化パターンを調べる目的で，後期 DNA 合成期での BrdU の取り込みパターンが観察できる R 分染法により行なった．

結　　果

得られた検体は14例で，その発症年齢，経過あるいは家族例の有無等様々である（**表 2** 参照）．明確に家系内発症例の判明しているものは 4 例（表 2 の下段の患者：YY, HS, TY および AS）であった．家族例のないもの（孤発例）および家族歴の不明なもの10例中 2 例に X 染色体と常染色体との相互転座染色体（X/15；**図 1**，および X/3；**図 2**）が発見された．共に X 染色体側の切断部位は p21であった．また，R 分染法により X 染色体の不活性化パターンを調べた結果，転座に関与していない正常な方の X が後期複製をしている割合が，X/15の例（YM）では96.4%，X/3の例（TI）では94.5%で，各々ほぼ100%近く不活性化していた．一方，家族例のある 4 人に関する染色体分析結果では，X 染色体に構造的異常は観察されなかったが，48時間培養の標本で，X 染色体を含む C 群の染色体が消失している45，XX，-C の核型を示す細胞が 0 ～1.3%観察された．尚，そのうちの 1 例（YY）については，EB ウイルス感染により樹立した細胞株および皮膚の線維芽細胞にて，18.7%および3.9%に45, X の核型を持つ細胞が見い出されている（本研究班員・塚越廣教授らの報告を参照のこと）．

考　　察

今回の 2 症例も含め，現在世界的に19例[11)~16)]の女性 DMD の相互転座が報告されており，いずれも共通して①転座に関与する常染色体は様々であるが，X 染色体の切断部位は一定で常に p21であり，②正常な X 染色体が選択的に不活性化している．これらの転座報告例においてもその臨床症状は一様ではなく，最近 Dubowitz (1986)[17)] はその点に関する見解を発表し，男児の DMD や BMD（Becker 型筋ジストロフィー）に関する分子生物学的な検索では注意深く診断しているのだから，女性転座例についてもすべて曖昧に

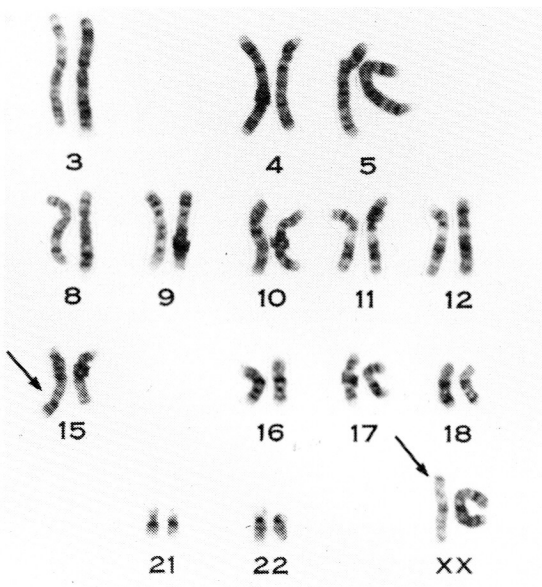


図 1

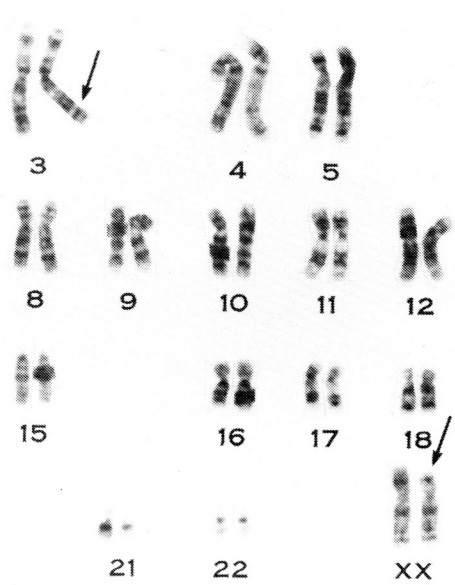


図 2

DMD とせずに同様の注意をむけるべきだとしており，今後，分子生物学的手法を用いた RFLPs の検索結果とその臨床症状について対応させた仕事の検討が期待される．

一方，X 染色体の構造異常に大方の注意が向けられ，数的異常の方は，Turner 症候群を合併した特殊な例でのみの報告しか注目されていなかったが，今回の調査結果から，Turner 症の特徴的症状を持たない一般には正常と考えられる女性の軽度の発症例で X 染色体の数的異常が発見されたことは，意義深いものと考えられる．このことから，ヘテロ接合の発症者と考えられる患者の中には，同様に体細胞レベルでの不分離によって生じた 45，X の細胞のモザイクを有する者が存在する可能性が生じてきた．一般に，女性の場合，年齢の経過と共に X 染色体が不分離を生じやすいため，この様な生物学的現象をふまえて，今回の様なモザイク例の存在を検討することは意味のあることと考えられる．

最後に，本研究は，検体を送って下さった次の先生方およびそのスタッフの方々との共同研究により行なったもので，深く感謝の意を表します．
（検体の順に）

国立療養所東埼玉病院内科	石原傳幸先生
東京医科歯科大学神経内科	塚越　廣先生
国立療養所下志津病院神経内科	中野今治先生
昭和大学藤が丘病院神経内科	若山吉弘先生
信州大学第三内科	武田伸一先生
国立精神・神経センター	杉田秀夫先生

文　　献

1）Danieli, G.A., Mostacciuolo, M.L., Bonfante, A., and Angelini, C.: Duchenne muscular dystrophy. A population study. Hum. Genet. 35: 225-232, 1977.

2）古庄敏行，岸邦和，納光弘，福永秀敏，井形昭弘：ドシャンヌ型筋ジストロフィー症の遺伝分析　I．女性ドシャンヌ型筋ジストロフィー症の染色体分析，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60年度研究報告書．79-83，1986.

3）Walton, J.N.: The inheritance of muscular dystrophy: Further observations. Ann. Hum. Genet. 21: 40-58, 1956.

4）Ferrier, P., Bamatter, F., Klein, D.: Muscular dystrophy (Duchenne) in a girl with Turner's syndrome. J. Med. Genet. 2: 38-46, 1965.

5）Jalbert, P., Mouriquand, C.L., Beandoing, A., Jaillard, M.: Myopathie progressive de type Duchenne et mosaique XO/XX/XXX: Considérations sur la genèse de la fibre musculaire striéi. Ann. Genet. (Paris) 9: 104-108, 1966.

6）Chelly, J., Marlhens, F., Le Marec, B., Jeanpierre, M., Lambert, M., Hamard, G., Dutrillaux, B., and Kaplan, J.-C.: De novo DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. Hum. Genet. 74: 193-196, 1986.

7）Bortolini, E.R., da Silva, D.M., Chequer, R.S., Vianna-Morgante, A.M., and Zatz, M.: Duchenne muscular dystrophy in a girl with a 45, X/46,XX/47,XXX chromosome constitution. Am. J. Med. Genet. 25: 239-243, 1986.

8）Emery, A.E.H.: Clinical manifestation in two carriers of Duchenne muscular dystrophy. Lancet, May 25: 1126-1128, 1963.

9）Sugita, H., and Tyler, F.M.: Pathogenesis of muscular dystrophy. Trans. Ass. Am. Physicians 76: 231-243, 1963.

10）Pearson, G.M., Fowler, W.M., and Wright, S.H.: X-chromosome mosaicism in females with muscular dystrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 50: 24-30, 1963.

11）Saito, F., Tonomura, A., Kimura, S., Misugi, N., and Sugita, H.: High resolution banding study of an X/4 translocation in a female with Duchenne muscular dystrophy. Hum.

Genet. 71 : 370-371, 1985.

12) Perez-Vidal, M.T., Gran, E.S., Vinas, J.P., Bayona, T.V., and Rustein, P. : Distrofia muscular tipo Duchenne en una hembra con una translocation equilibradfa X/6. Rev. Neurol., (Barcelona) XI, 51, 1983.

13) 楢崎修，花井敏男，植木洋子，満留昭久：X 染色体一常染色体転座を伴った Duchenne 型筋ジストロフィーの女児例．臨床神経25：432-436, 1985.

14) Nevin, N.C., Hughes, A.E., Calwell, M., and Lim, J.H.K. : Duchenne muscular dystrophy in a female with a balanced X/autosome translocation. Irish J. Med. Science 153 : 156, 1986.

15) Ribeiro, M.C.M., Melaragno, M.I., Schmidt, B., Brunoni, D., Gabbai, A.A., and Hackel, C. : Duchenne muscular dystrophy in a girl with an (X ; 15) translocation. Am. J. Med. Genet. 25 : 231-236, 1986.

16) 富英明，埜中征哉，杉田秀夫，里吉営二郎，斎藤深美子：X 染色体一常染色体間の相互転座を認めた進行性筋ジストロフィーの女児例．臨床神経26：965-969, 1986.

17) Dubowitz, V. : X ; autosome translocations in females with Duchenne or Becker muscular dystrophy. Nature 322 : 291-292, 1986.

21) Xp21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——

中　野　今　治*

研究協力者　後　藤　　順*　柿　沼　宏　明**
斎　藤　深美子***　村　山　繁　雄****

目　　的

副腎皮質機能不全，知能低下，筋ジストロフィー症，Xp21 partial deficiency を伴う，Complex glycerol kinase deficiency syndrome（以下GKD）の神経筋病変については，一般に Duchenne 型ジストロフィー症（以下DMD）と同じとされ，病理学的な検討はほとんどなされていない．ただ DNA probe を用いた遺伝子解析により，GKD では DMD の locus を含めた広範な locus deletion があることがわかる以前は，non specific myopathy[1] 等の記載も見られ，直ちに DMD と同じと断言していいかは疑問である．また Xp21には Becker の locus も存在しており，本例の筋病変については，臨床病理学的に慎重に検討を要すると思われる．今回我々は GKD 及び GKD carrier の神経筋所見につき，臨床病理学的に検討する機会を得たので報告する．

方　　法

症例は現在 9 歳の GKD 男児[2]．6 歳時施行した，左腓腹筋・左三角筋，左腓腹神経生検所見を，age matched DMD と比較した．また臨床症状，骨格筋 CTscan の経年性変化を合わせ検討した．

次に保因者である母[3] の，40歳時左大腿直筋筋生検所見を，DMDcarrier と比較検討した．

結　　果

臨床症状では，患児は出生時 floppy で，重度の精神運動発達遅滞を示し，痙攣発作を伴っていた．5 歳よりつかまり歩行と発語が可能となった．6 歳の筋生検時，津守・稲毛式発達検査で DQ20．咬合不全，facies myopathica，近位筋優位の筋力低下と筋萎縮，腓腹筋仮性肥大，登はん性起立を認め，全身腱反射はアキレス腱反射を除き低下していた．検査所見では，血清 CK 値は12345 IU/l(<195) と高値を示した．副腎皮質機能では，cortisol 11.7μg/dl，ACTH590pg/ml，rapid ACTH，ACTH loading で無反応，副腎シンチ，CTscan で副腎が描出されないことより，原発性副腎皮質機能不全と診断されていた[4]．

筋電図は被検全筋で筋原性を示し，脳波は epileptic であった．7 歳時の頭部 CT では軽度脳萎縮を認めた（図 1）．

その後運動機能の障害の進行ははっきりしなかったが，最近になり，徐々に進行が観察されるようになった．

骨格筋 CTscan では，7 歳時では，大臀筋の CTscore の低値が認められ，内側により著明であった．大腿断面では，各筋の境界が明瞭で，軽度の萎縮を示す所見と考えられた．下腿断面では腓腹筋にやや斑状の低吸収域を認めた（図 2 a）．9

＊国立療養所下志津病院神経内科
＊＊国立療養所下志津病院小児科
＊＊＊東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞遺伝
＊＊＊＊東京大学医学部脳研究施設神経内科

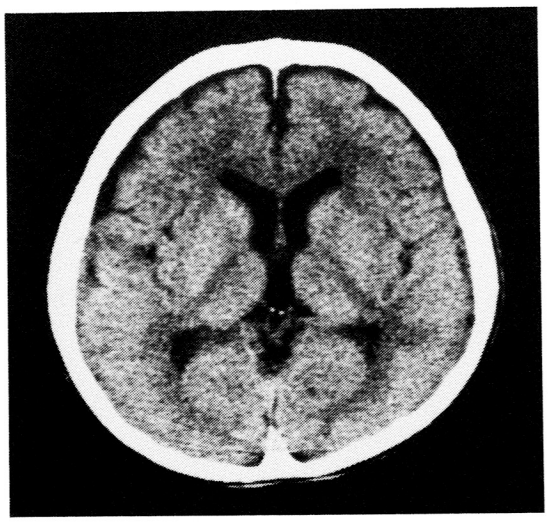


図 1　The cranial CT scan of the patient at the age of 9 years. Slight cortical atrophy for his age.

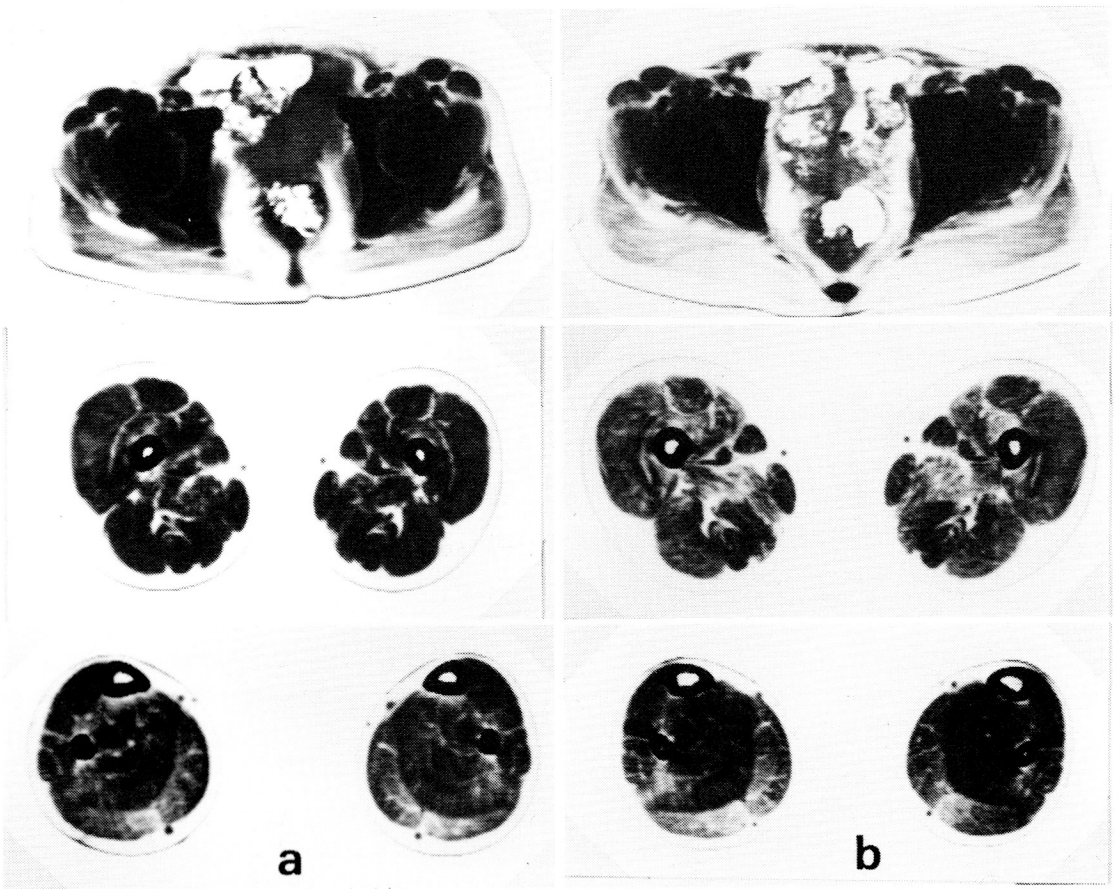
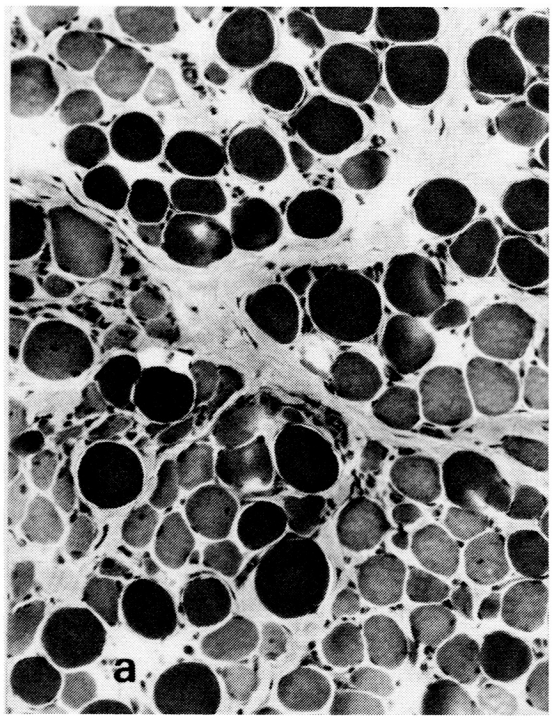
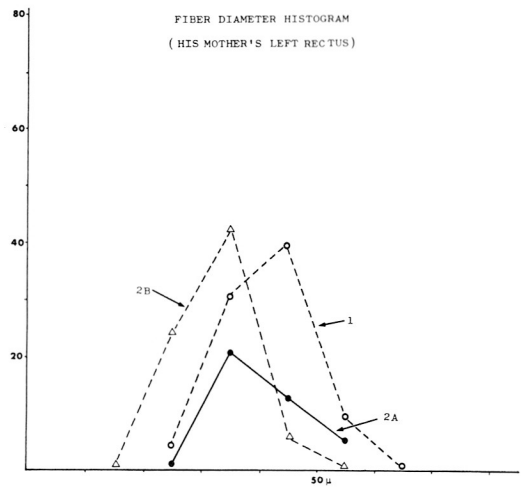


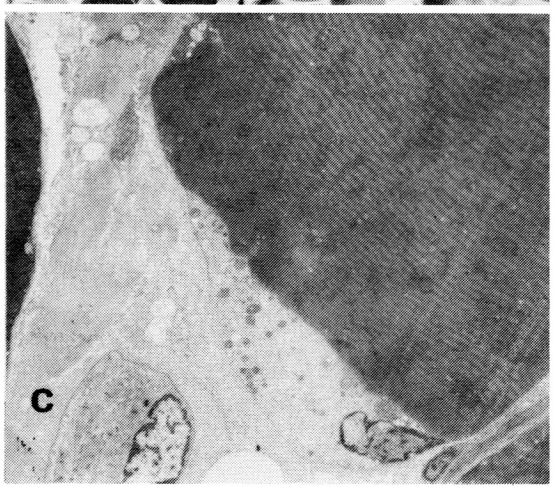
図 2　a) The patient's skeletal muscle CT scan at the age of 6 years. b) The patient's skeletal muscle CT scan at the age of 9 years. Progressive muscle degeneration was evident.





MUSCLE FIBER TYPE	I	IIA	IIB	IIC
MEAN DIAMETER	41.3	39.9	32.2	-
STANDARD DEVIATION	7.59	5.78	5.67	
ATROPHY FACTOR	57	65	360	
HYPERTROPHY FACTOR	0	0	0	
PERCENTAGE OF FIBERS	43.5	19	37.5	0

b



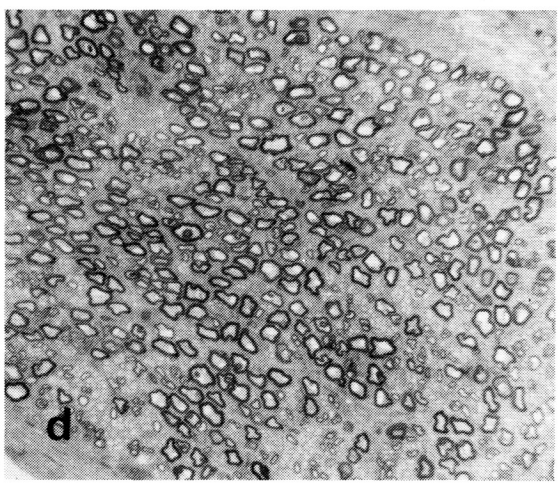


図 3　Neuromuscular pathological findings of the patient.

a) The muscle biopsy of the patient's left deltoid muscle at the age of 6 years (H.E. stain, 100X). A variation of fiber size, the increase of connective tissue and fatty infiltration, myophagia and numerous opaque fibers.

b) Fiber diameter histogram (ATP ase stain).

c) Ultrastructurally opaque fibers consisted of hypercontracted myofibrils with interrupted sarcolemmas. Increased collagen fibers in endomysium and the appearance of myoblast was observed (−5μm, double stain with uranium acetate and lead succinate).

d) The patient's sural nerve at the age of 6 years. The frequent appearance of thin myelinated fibers.

歳時，CTscoreの低下はさらに進行しており，大臀筋の低吸収域は外側を残し，全域に広がっていた．大腿断面では，低吸収域が斑状に拡大しており，m.adductor longus, m.adductor magnus, m.vastus medialisの障害が高度であった（図2 b）．

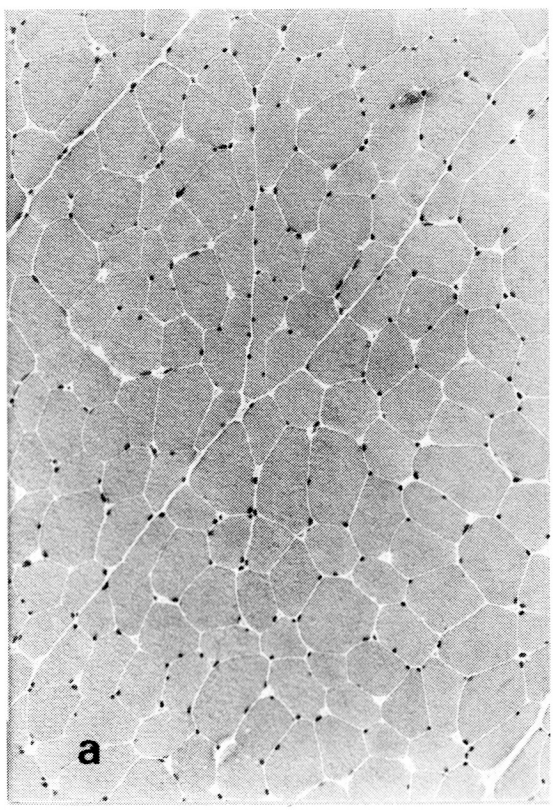
筋生検では，筋線維の大小不同，間質の増加と脂肪浸潤，中心核の増加とmyophagia，小径のhasophilic fiberの集族，多数のopaque fiberを認めた（図3 a）．組織化学上は，type I atrophy, type II b deficiencyを認めた（図3 b）．超微形態的にはopque fiberは筋線維が過収縮を示し，筋鞘膜の断裂を伴っていた（図3 c）．左腓腹神経生検では，神経線維密度はよく保たれていたが，thin myelinated fiberの増加を認めた（図3 d）．なお9歳時，GKD値は4.5pmol/10^6 WBC/h（119±5.6），血性glycerol値は29.1mg/dlであった．

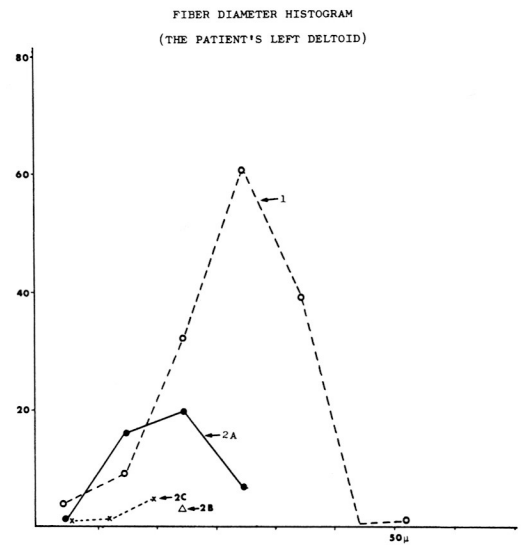
患児の母親は筋生検時40歳で，mental retardationを伴っていたが，神経筋症状ははっきりせず，血清のCK値も正常であった．染色体分析上Xp21 deletionのcarrierであることが判明しており[5]，GKD値は61.3pmol/10^6WBC/hで，正常の半分であった．本人及び本人の保護者の同意のもとに，40歳時筋生検を施行した．

筋生検所見では，筋線維の軽度の大小不同が認められるが，筋線維の壊死，再生の所見は認められず，間質の増加も認めなかった（図4a）．組織化学上はtype II b atrophyを認めた（図4 b）．

考　　察

患児の臨床像は，floppy infantであり，運動発達遅滞を伴っており，処女歩行も5歳で，またその後の臨床経過もDMDよりはゆるやかであり，





MUSCLE FIBER TYPE	I	IIA	IIB	IIC
MEAN DIAMETER	33.0	39.9	24	19
STANDARD DEVIATION	9.82	5.78	1.94	7.57
ATROPHY FACTOR	1,151	2,250	2,000	2,429
HYPERTROPHY FACTOR	0	0	0	0
PERCENTAGE OF FIBERS	73	22	1.5	3.5

b

図4　The muscle biopsy of the rectus femoris of the patient's mother. a) A slight variation of fiber size (HE100X). b) Fiber diameter histogram (ATP ase stain).

典型的なDMDの臨床経過とはほど遠い．ただし本例の場合，重度の精神発達遅滞と痙攣，またCTscanで軽度脳萎縮の認められる点で中枢神経系病変の合併を考える必要があり，病初期の臨床像を修飾していた可能性はあろう．ただしDMDでも，知能障害，痙攣，CT上軽度の脳萎縮を伴う症例は時に経験し，最近のprobe DNAの知見からは，deletionないしtranslocationの範囲との関連が推測されている．本例における初期精神発達の遅滞自体はそれらの症例に比べても明らかに強いが，これは本例におけるdeletionの範囲が広範囲であることと関係があるかどうか，さらに検討を有する．

次に筋生検時点での神経学的所見についてであるが，これは同年齢のDMDと矛盾するものではない．

その後の進行については，DMDよりは緩徐であるように一見見える．ただしDMDの臨床像の広いvariationの範囲内には十分おさまると思われるので，この点についてはさらに経過を追う必要があると思われる．

患児の骨格筋CTscan像であるが，7歳時のものは川井らの分類[6]でおおむねA2に属すると思われるが，大臀筋の障害がやや強い印象を受ける．9歳時のものはほぼA3に属すると思われ，明らかに進行が認められる．大腿諸筋は選択的障害パターンを示しているが，障害の強い筋が，典型的なDMDとは若干異なっている．

患児の筋生検所見はジストロフィー変化と考えられるが，多数のopaque fiberの存在が特徴的である．この所見の本態については，samplingに伴うcontraction band artifactとの説も根強いが，この患児と同日ないし同じ時期に行ったDMD患児の筋生検所見と比しても，本例では明らかに多数認められ，いずれにせよ筋鞘膜のfragilityを示す所見であろうと考えられる．

当時先天性筋ジストロフィー症を疑い，末梢神経の関与を想定して行った腓腹神経生検において，thin myelinated fiberの多発を認めた点について述べる．計測上有髄線維密度の減少は見られず，また電顕的にも無髄線維の障害やonion bulbを認めなかった点より，activeな神経障害が存在している可能性は乏しいと思われる．ただ何等かの意味でmyelin形成の障害を伴っている可能性は存在する．本例においては，GKDに伴い血清グリセリンは高値をとっている．グリセリンは細胞膜障害性を有していることを考えると，これらの所見は高グリセリン血症による病変の修飾と考えるのが妥当ではないかと思われる．

母の筋生検所見は，non-dystrophic myopathic changeと考えられるが，GK値が正常の半分であることと解離があった．これはX染色体の一方では両方とも欠損していると考えられる形質の発現に，一見解離が見られたことを意味している．

一般にDuchenneのcarrierの場合，年齢を経るにつれCK値が漸次下降することが知られている．これはLionization後発現した病的筋線維が，natural selectionの結果脱落し，正常筋線維におきかわっていくためであるとの説が出されている．本例の場合，筋肉についてはこの様なselectionが働き，一方GKを測定したリンパ球においてはGK活性が半分であることは機能にあまり影響を与えないため，selectionが働かなかった結果carrier stateが温存され，両者に解離が生じたと考えるのが最も妥当と思われる．ただし，この問題に関しては，生検で得られた筋肉のGK活性をはかることが直接的証明につながると考えられ，その点につき現在検討中である．

ま と め

1．GKD及びGKD carrierの神経筋所見につき臨床病理的に考察を加えた．

2．本例における筋病変は，中枢神経系病変，高グリセリン血症により修飾を受けている可能性を指摘した．

文　献

1）Guggenheim, M.A., McCabe, R.B., Roig, M. et al.: Glycerol kinase deficiency with neuromuscular, skeletal, and adrenal abnormalities. Ann. Neurol. 7: 441-449, 1980.

2）中野今治，後藤順，柿沼宏明ら：Glycerol kinase 欠損症：1．自験1例を含めての臨床像の検討．“厚生省神経疾患研究委託費筋ジストロフィー症の臨床・病態と成因に関する研究昭和60年度研究報告書”（班長・杉田秀夫）pp 170-174．

3）中野今治，斉藤深美子，柿沼宏明ら：Glycerol kinase 欠損症：2．家族性の Xp21欠失，及び X 染色体の不活性化について．“厚生省神経疾患研究委託費ジストロフィー症の臨床・病態と成因に関する研究昭和60年度研究報告書”（班長・杉田秀夫）pp 175-178．

4）中村文子，高柳直子，関根邦夫：筋ジストロフィー症を合併したアジソン病の一例．ホルモンと臨床32(sup)：206-208，1984．

5）F. Saito, J.Goto, H. Kakinuma et al. : Inherited Xp21 deletion in a boy with complex glycerol kinase deficiency syndrome. Clinical Genetics 29: 92-93, 1986.

6）川井充，國本雅也，本吉慶史ら：Duchenne 型筋ジストロフィーの骨格筋 CT 所見とこれにもとづく病期分類．臨床神経25：578-590，1985．

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

新　川　詔　夫*

研究協力者　松　本　　正*　亀　井　　勉*
吉　本　雅　昭**　近　藤　達　郎**

グリセロールキナーゼ（GK）遺伝子座はX染色体短腕に存在する．GK欠損症（GKD）には筋ジストロフィーを伴う臨床型が知られているので，DMD遺伝子を分子遺伝学的にアプローチする際の重要なモデルになると思われる．GKDの表現型には異質性が存在し，①乳幼児型GKD，②若年型GKD，③成人型GKDの3種に分けられる．このうち，乳児型GKDはGKD自体による高グリセロール血症の他に，先天性副腎低形成（AH），精神・発達遅滞，及び筋ジストロフィー（MD）が主症状である．乳児型GKDの筋ジストロフィーは血清CPK高値及びDMD様筋変化（或は非特異的ミオパチーともされるが）をみるとされる．乳児型GKDのこのような多彩な症状はGK遺伝子の単一な変異では説明が困難であった．最近乳児型GKD患者での染色体欠失が発見され[1]，欠失部位がDMD遺伝子座と近接あるいは包含する可能性が高いことから，GKDにおけるMDとDMDの異同が問題となってきた．さらに，両筋ジストロフィー遺伝子が一致するとすれば，他の遺伝子（GK, AHなど）との相互位置関係を決定することはDMD遺伝子の正確な座位を決定することになり，遺伝学的にも臨床的にも非常に重要と思われる．

著者らは乳児型GKDを分子遺伝学的に研究するため本邦に存在する5家族を集積した．今回はこのうち4家族の細胞遺伝学的研究及び1家族のDNA分析結果について報告する．

＊長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設遺伝部門
＊＊長崎大学医学部小児科

材料と方法

X染色体ライブラリー由来のクローン化DNA配列：C7（Dr. Mandelより供与），pERT87-8（Dr. Kunkelより供与），754（Dr. Pearsonより供与），及び21-水酸化酵素（21-OHase）遺伝子（6番染色体に座位がある）のcDNAであるpC21/3C（笹月教授を通じてDr. Whiteより供与）を^{32}Pでラベルしてプローブした．

患者を含むGKD 1家族（家族1）の構成員の白血球及びEBウイルス株化リンパ芽球様細胞より，フェノール法にて核DNAを抽出し，各種DNA制限酵素で切断後，0.8%アガロースゲル中で電気泳動し，Southernブロットを作成した．ブロットDNAと上記プローブとの間でハイブリダイゼーションを行い，オートラジオグラフィー法にて検出し，分析した．同様に，10名のコントロール（核型正常男性1人；女性9人）についても同様の方法で分析した．GKD 4家族（家族I，II，III，IV）構成員の末梢血リンパ球の核型を臭化エチジウム法を用いた高精度分染法にて分析した．

結　　果

(1) DNA配列754をプローブとしたとき：制限酵素Pst I消化では，コントロールは12キロ塩基対（kb）断片に相当するバンドが検出された．患児では12kb断片が消失し，代りに5.2kb断片が出現した（図1 a）．母では12kbと5.2kbの双方の断片がみられ，前者は正常染色体由来であり，後者はGKD連鎖X染色体由来であると考えた．

同様にTaq Iでは，コントロールは6.2kb，患児

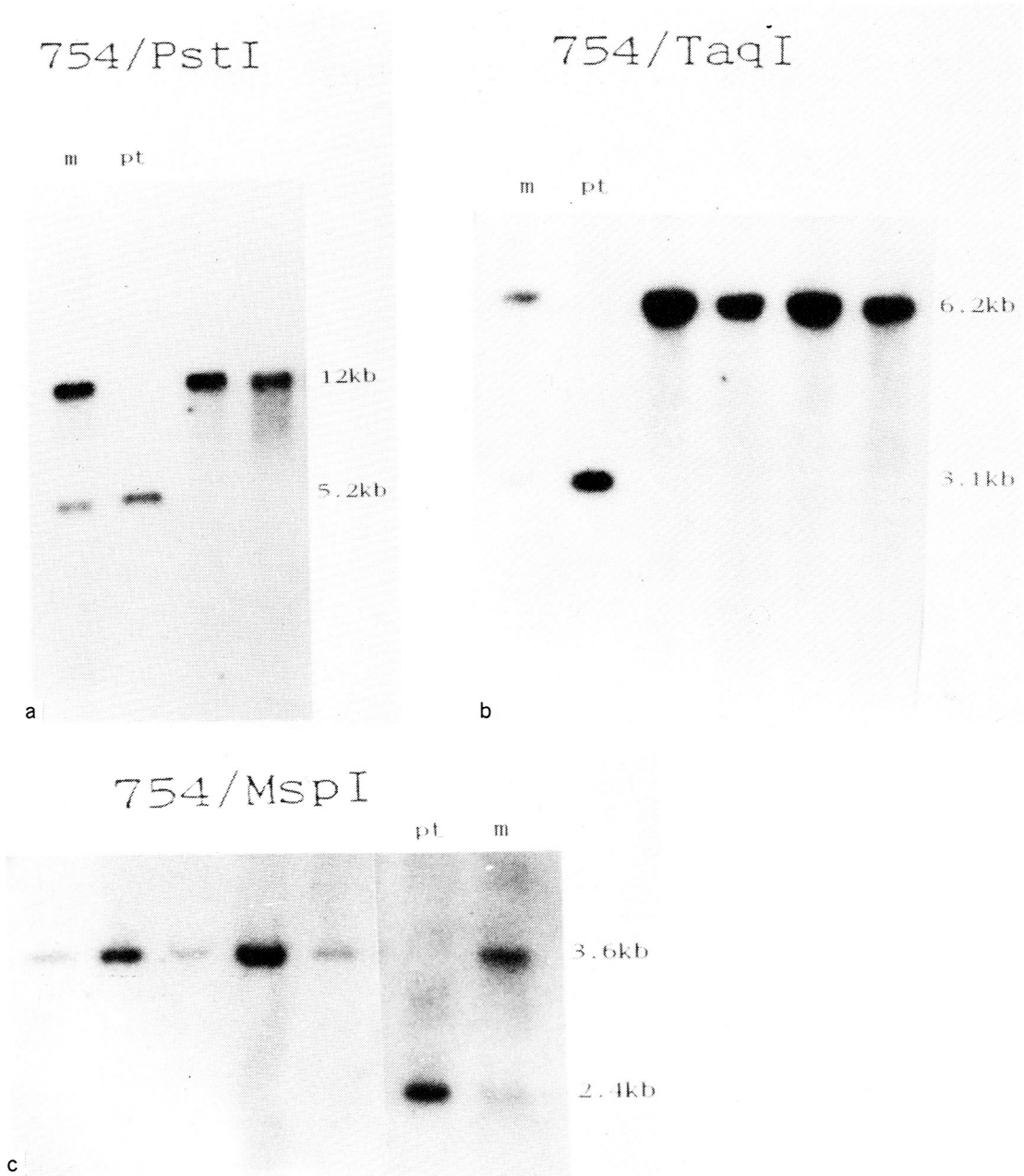


図1　GKDにおけるDNA欠失．GKD家族Ⅰの患児（pt），母（m）及びコントロールのDNAを制限酵素で切断し754をプローブとした場合のSouthern blot法により検出されるバンドを示す．
a：制限酵素Pst Ⅰでの切断片；b：Taq Ⅰ；c：Msp Ⅰでの切断片．

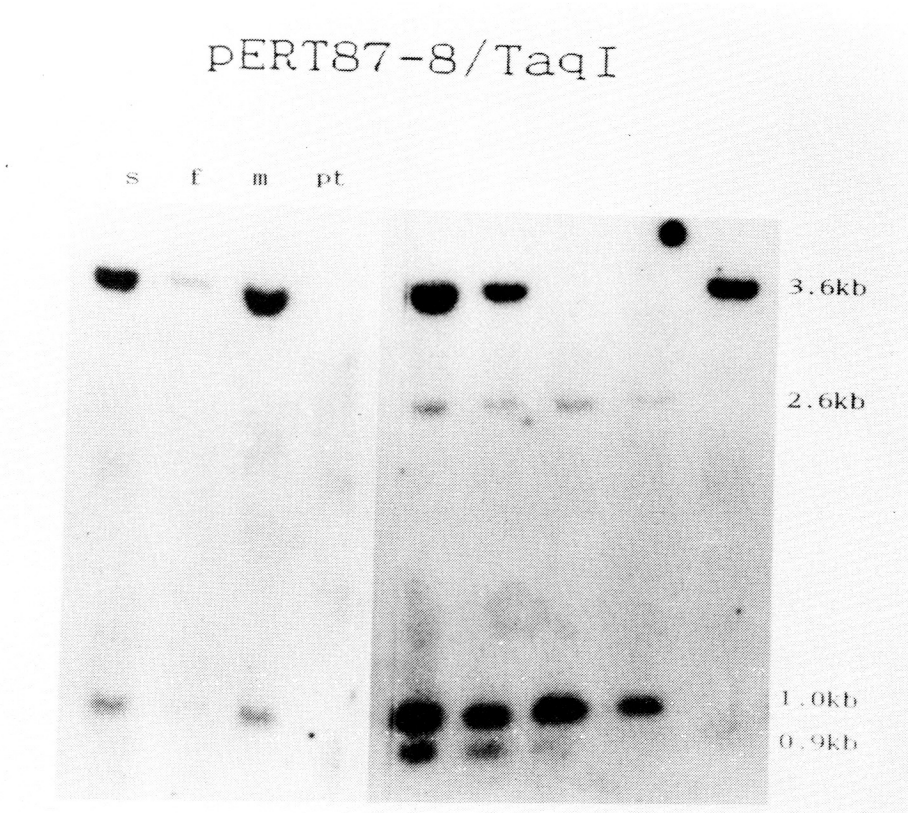


図2　pERT87-8をプローブとした場合のバンド．姉（s），父（f），母（m）では3.6kbと0.9kbのバンドが検出されるが，患児（pt）ではバンドが見られない

は3.1kb，母は6.2kb/3.1kb断片を有していた（図1 b）．MspIでは，コントロールは3.6kb，患児は2.4kb，母は3.6kb/2.4kbであった（図1 c）．

(2) pERT87-8をプローブとしたとき：TaqI 消化で，コントロールは3.6kb，2.6kb，1.0kb，0.9kb断片がみられた．このうち3.6kbと2.6kb＋1.0kbが多型になっていて，0.9kbは共通断片であった．母と姉では3.6kbと0.9kb各々の断片を検出し，父は3.6kbと0.9kbのヘミ接合体で，患児はいずれの断片に対するバンドシグナルも陰性（ナリ接合体）であった（図2）．患児では，コントロール・父・母・姉にみられるXbaI断片もみられなかった．

(3) C7をプローブとしたとき：MspI断片，PstI断片，EcoRI断片はすべてコントロール，患児，母において全く同じであった（図3）．

(4) pC21/3Cをプローブしたとき：コントロール核DNAのTaqI消化では，3.7kb，3.2kb，2.4kb，2.3kbの4断片を示した．患児では3.7kbと2.3kb断片が消失していた．これは21-OHase欠損症の1例と同じパターンであった（図4）．

(5)核型分析：家族Ⅰ～Ⅳの家族構成員の核型は以下の通りであった（図5）．

家族Ⅰ：母　：46, X, del(X) (p21.1p21.2)
　　父　：46, XY
　　患児：46, del(X) (p21.1p21.2) mat,Y
家族Ⅱ：母　：46, X, del(X) (p21.1p21.3)
　　父　：46, XY
　　患児：46, del(X) (p21.1p21.3) mat,Y
家族Ⅲ：母　：46, X, del(X) (p21.1p21.3)
　　父　：46, XY
　　患児：46, del(X) (p21.1p21.3) mat,Y

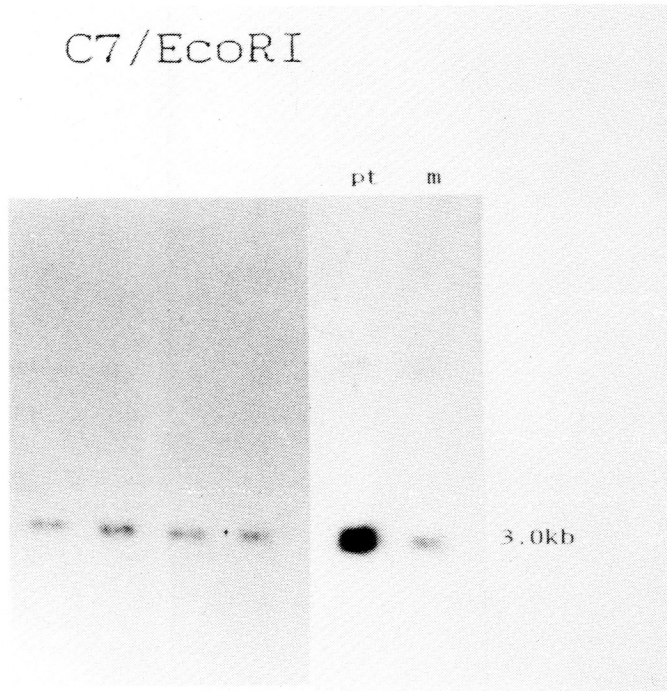


図3　C7/EcoR Ⅰの組合せでのバンド．患児，母共にコントロールと同じパターンを示す．

	兄	：47, X, del(X) (p21.1p21.3),Y
家族Ⅳ：	母	：46,X,del(X) (p21.1p21.3)
	父	：46, XY
	患児	：46, del(X) (p21.1p21.3) mat,Y

考　　察

GKDは前述したごとく3型に分類されている．この臨床症状の差をGinnsら(1984)[2]はGK残存活性の差によると考えた．しかし，乳児型GKDだけでも先天性副腎低形成・筋ジストロフィー・精神発達遅滞を合併し，また，これらにゴナドトロピン欠損症，オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症を伴うものなど多数の病型が知られていて，病型すべてをGKの残存活性の差で説明するのは困難である．

一方，最近GKDの染色体ないしDNAレベルでの欠失が報告されている．今回の家族Ⅰ～Ⅳでは高精度分染法による染色体分析でXp21.1-21.3の欠失をみいだした．患者4名および保因者5名（1名はXXYクラインフェルター症候群を合併）に共通の欠失部位はXp21.1の遠位からXp21.2のほぼ全域である．1家族ではあるが，患者・保因者の核DNAをXp21に由来する754, pERT87-8, C7をプローブとして分析した結果は染色体分析の結果と矛盾しない．

即ち，患者X染色体欠失部位は754に相当する部位の途中から，pERT87-8部位を含み，遠位側の断端は不明であるがC7部位の手前までに至る核DNA配列の欠失と推定できる（図6）．また，この欠失は母由来であることが染色体・DNA分析の双方で証明できた．なお遠位側の欠失幅を決定するために，この近傍のプローブを新たに入手中である．今回の分析で用いたプローブは従来の研究においてDMDと密接連鎖することが既に判明しているものである．従って，核型分析とDNA分析の結果を総合すると，この患者での欠失部位は

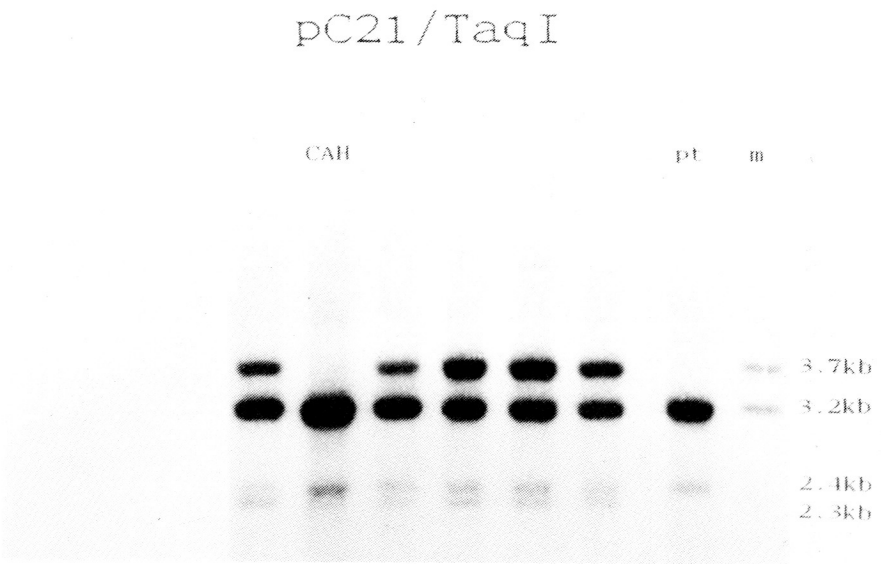


図4　pC21/3C をプローブとし，Taq I で切断した場合のバンド．GKD 患児（pt）は21-OHase 欠損症患者（CAH）と同じパターンを示す．

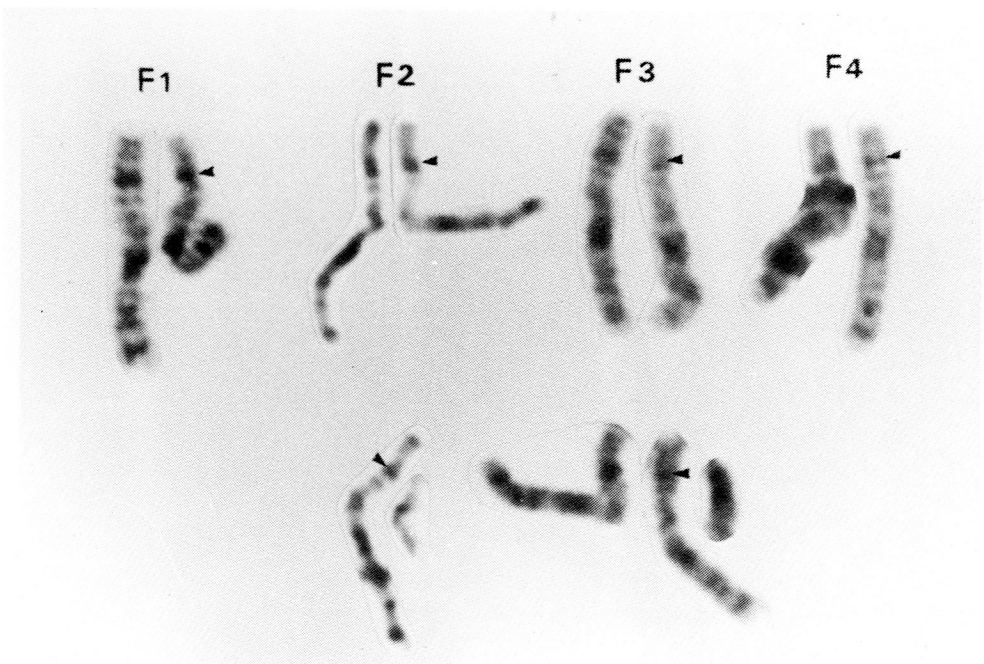


図5　GKD 家族 I ～IVの高精度分染法による染色体分析．上段は各家族の母，家族II（F2）の下段は GKD 患児，家族III（F3）の下段は兄（クラインフェルター症候群）．矢印は染色体欠失部位を示す

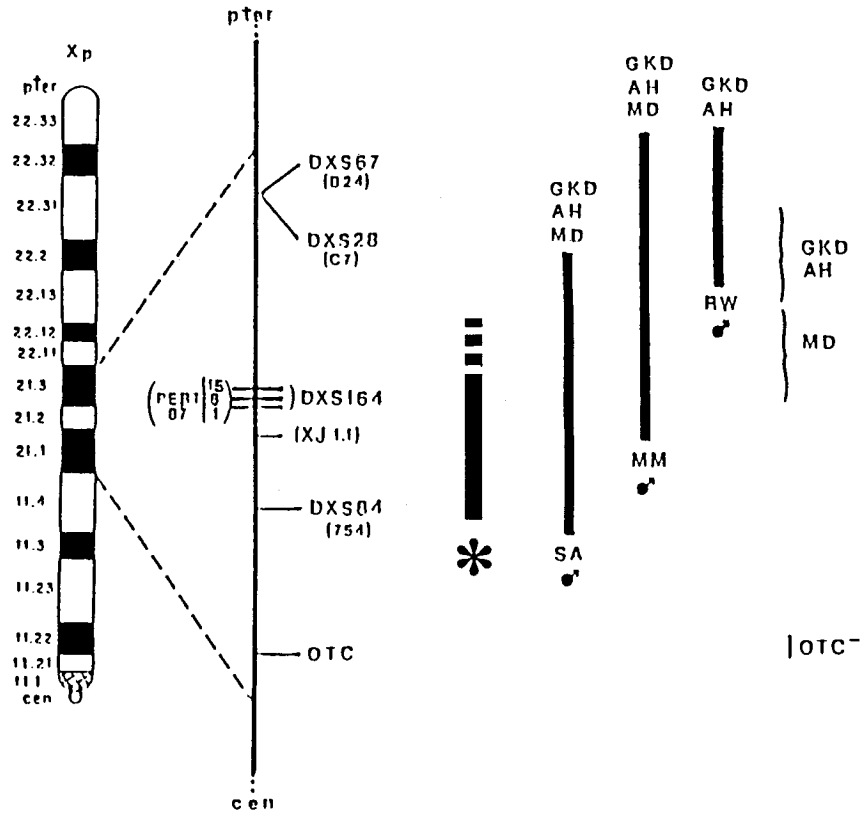


図6　GKD患者のDNA欠失の範囲（Francke[5]を改変）．＊印が我々の家族ⅠのGKD患児

Duchenne筋ジストロフィー（DMD）遺伝子座を含むか，あるいは非常に近接していると考えられる．換言すると，乳児型GKDの筋ジストロフィーはDMDと密接な関連があるといえる．

Dungerら（1985）[3]はOTC，754，C7をプローブにして2例の乳児型GKDを分析し，1例に754領域の欠失を認めた．Wieringaら（1985）[4]，Franckeら（1986）[5]も754あるいはXp21領域の欠失をもつ症例を示した（図6）．我々の症例及び報告例の欠失の範囲と合併病像を比較すると，GKD以外の各病像の原因となる遺伝子はGK遺伝子とは別に存在（近接連鎖）すると考えたほうが矛盾がない．各遺伝子の配列はcen-OTC-754-DMD-GKD/AH-C7-pterの順に並んでいると考えられる．乳児型GKDの異質性は，GK遺伝子変異に加えて，染色体レベルでの欠失幅の程度が異なるため，即ち種々の近傍の遺伝子変異の程度が異なるためと思われる．ちなみに，高精度分染染色体で観察できる1バンドは約2000kbのDNA配列に相当すると推定されている．

家族Ⅰの患児は21-OHase遺伝子が欠損していたが，この欠損により先天性副腎低形成が生じるとは考え難く，21-OHase遺伝子欠損は偶然合併したものと考えられる．

今後，GKに対するcDNAやこの近傍のX染色体特異的な新しいプローブが得られれば，各遺伝子の相互位置関係はより正確になり，各遺伝子病の出生前診断・保因者診断も容易になるであろう．

謝　　辞

患者及び家族の血液，臨床データを提供してい

ただきました旭川医大小児科　矢野公一，奥野晃正，香川医大小児科　豊田茂樹，山口大小児科　塚原正人の諸先生に深謝いたします．またDNA分析の実験補助を行った松原祐一，土井知己両君，核型分析を行った沖本声博士，山城修治，島田興人，川上かおるの諸君に深謝いたします．

文　献

1）Bartley, JA et al: J. Pediatr. 108: 189-192, 1986.
2）Ginns, EL et al: J. Pediatr. 104: 736-739, 1984.
3）Dunger, DB, et al: Lancet i: 585-587, 1986.
4）Wieringa, B et al: Clin. Genet. 27: 522-523, 1985.
5）Francke, U et al: In "DNA Probes" Spring Harbor, 1986, pp 49-55.

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

桃　井　真里子*

研究協力者　中三川　晃　利*　下　泉　秀　夫*
柳　沢　正　義*　桃　井　　隆**

近年，Duchenne型筋ジストロフィー症（以下DMDと略す）の遺伝子に関する研究が脚光を浴び，遺伝子座を決定することを目的とした研究が盛んであるが，DMDにおいてはその遺伝子産物が不明である事が，遺伝子の検出を一層困難にしてきている[1]．

遺伝子産物の検索には，二次的変化を含まないという点で培養筋細胞に利点があるが，ヒト培養筋細胞の増殖性の低さ，寿命の有限性，線維芽細胞の混在，継代中にmutationを生じ得る点，などが問題であった．これらの点を解決するには細胞のクローン化を必要とする．クローン化の方法として腫瘍ウィルスによる細胞の形質転換法があり，永久継代培養系を得ることを可能とするが，wild-typeのSV40はヒト細胞に対してsemipermissiveであるため，時にウィルスの増殖を来し，細胞を死滅させることがある[2]．我々はこれらを解決するべく自己複製開始起始部欠損変異株SV40（以下ori⁻ SV40と略す）DNA[3]をヒト筋細胞に導入し，多核細胞形成能を保持する筋細胞のクローン化に成功し，一部を既に報告した．本研究では，クローン化細胞の性質を更に検討し，又，同方法を用いてDMD筋より，分化能を有する細胞のクローン化に成功した．

方　　法

DMD筋初代培養：6歳DMD患児大腿薄筋からの生検筋を1～2mm立方小片に細切し，HamF12（10% FCS）中で37℃，5％CO_2，95% airで培養した．増殖した細胞をトリプシン処理で継代時に40分間でdishに付着した細胞を線維芽細胞として除去した．

トランスフェクション：上記の初代培養細胞をDNA導入の24時間前にトリプシン処理し，1×10^5 cells/60mm dishの濃度で培養した．ori⁻ SV40 DNAはplasmid pMK16中（東大医科研山口宜夫教授より供与された）よりDNA分離後定量し，1 dish当り10μgのDNAをリン酸カルシウム-DNA共沈殿法にて加え8時間インキュベートによりtransfectionした．培地交換後，細胞をトリプシン処理し，希釈後継代し，以後，形質転換により多層増殖するfocusをクローン化した．

ネマリンミオパチー筋クローン：既に報告したネマリン筋のクローンの内，myoblastic clone（1A5），fibroblastic clone（2C3）を用いた．

分化誘導：クローン化された細胞は通常はHamF12（10% FCS），37℃，5％CO_2，95% airで培養した．細胞密度がdish底面の60～70%に達した時点で，無血清培地に替え，10日以内に筋細胞特有の分化形態である多核細胞，又は，myotubeを形成するものを分化形質を保持したmyoblast由来のクローンと判定した．

増殖曲線：ネマリンミオパチー筋のクローンの内myotubeの形成性のmyoblastic clone（1A5）と非形成性のfibroblastic clone（2C3）における増殖性を検討した．1×10^5 cells/dishで細胞を撒き，HamF12（10% FCS）中の通常条件で培養を開始した（day 0）．2，4，6，8日目に各々の

＊自治医科大学小児科
＊＊国立精神神経センター神経研究所

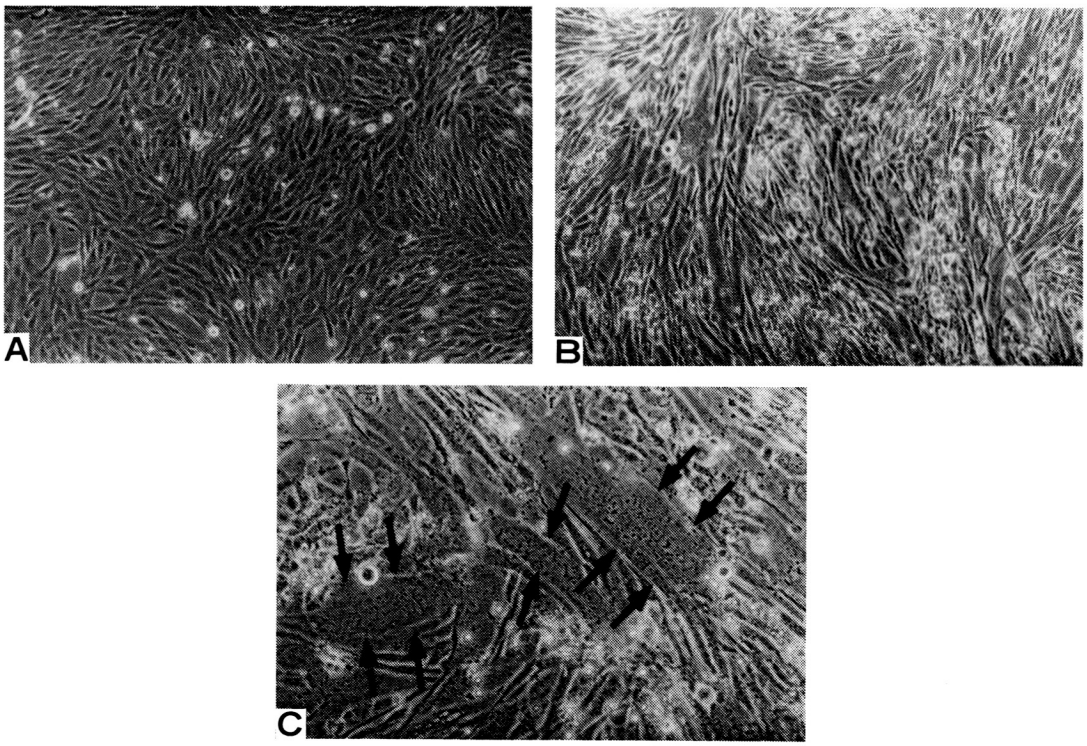


図1　DMD の myoblastic clone.
A．HamF12（10% FCS）中，高い増殖能を持った mononuclear cells.
B．無血清培地中，紡錘形の細胞が方向性を持って配列し，多核細胞形成を示す．（×100）
C．幅広の胞体に多数の核を含む多核細胞．（×400）

クローンにつき細胞数を数え増殖曲線を求めた．また，培養開始後4日目に無血清培地へと交換し，同様に6，8日目の細胞数を数えた．各々同一条件の3 dish の細胞数の平均をデータとした．

CPK アイソザイム：各細胞を HamF12（10% FCS）で5日間培養し，ポリスマンでえた細胞を凍結，融解で破壊後，1×10^5 cells/10μl 浮遊液とし，15,000rpm，30分遠心し，上清3μl をセルロースアセテート膜（TITAN III ISO-FLUR, Helena Lab.）上で150V，30分電気泳動した．CK は Sigma CK10により螢光にて検出し，各アイソザイムマーカーは Corning 社の Control 2 in 1を用いた．

結　　果

DMD 初代培養：初代培養は fibroblast の混入が多く，形態から myoblast と同定できる細胞の比率は極めて少なかった．又，myoblast の増殖は悪く，myotube 形成に乏しく，かつ myotube は不完全なものが目だった．

トランスフェクション：DMD 筋より得られたクローンの殆どが，多角，不定形の胞体を有する fibroblastic clone であり，形態上 myoblastic clone とみなされるものは，全クローンの10%程度であった．後者は小型で丸みを帯びた紡錘形をしており，HamF12（10% FCS）中では均等に広がる増殖様式を示し，多核細胞形成は認めなかった（図1 A）．

分化誘導：DMD の myoblastic clone は，無血清培地にかえて2日後には，各々の細胞形態は細長い紡錘形となり，migration により方向性のある配列を示した（図1 B）．5日後には多数の多核細胞が形成されたが，これらは幅の広い胞体の中に多数の核を充満した構造を呈し，定型的な

myotubeを形成するには至らなかった（図1C）．一方，ネマリンミオパチーのmyoblastic clone（1A5）は無血清培地中では，同様に多核細胞形成が認められたが，それらの多くは細長い細胞中に数個の核が編在したmyotube様構造を呈した（図2）．

増殖曲線：myoblastic clone（1A5）は，fibroblastic clone（2C3）に比較し，増殖のlag phaseが長く，また，無血清培地中での増殖性が明らかに異なっていた．即ち，myoblastic cloneは，培地をHamF12（10% FCS）から無血清培地に替えることにより増殖能が抑制され，doubling timeが20hrから90hrへと延長を示した．（形態学的には，増殖抑制に続いてmyotube様構造が出現している）一方，fibroblastic cloneでは，培地の違いにより増殖性に差異は認められなかった．

CPKアイソザイム：fibroblastic cloneは，無血清培地中で培養してもMサブユニットの活性を認めないが（図3 b），ネマリンミオパチーのmyoblastic cloneは，HamF12（10% FCS）中においてもMサブユニットの活性を認め，無血清培地中においてはその活性が著しく高くなることが示された（図3）．3種のDMD myoblastic cloneはいずれも無血清培地中で明らかなMサブユニット活性を認めるが，ネマリンミオパチーのものと比較すると，活性は弱いものであった．（図4）．

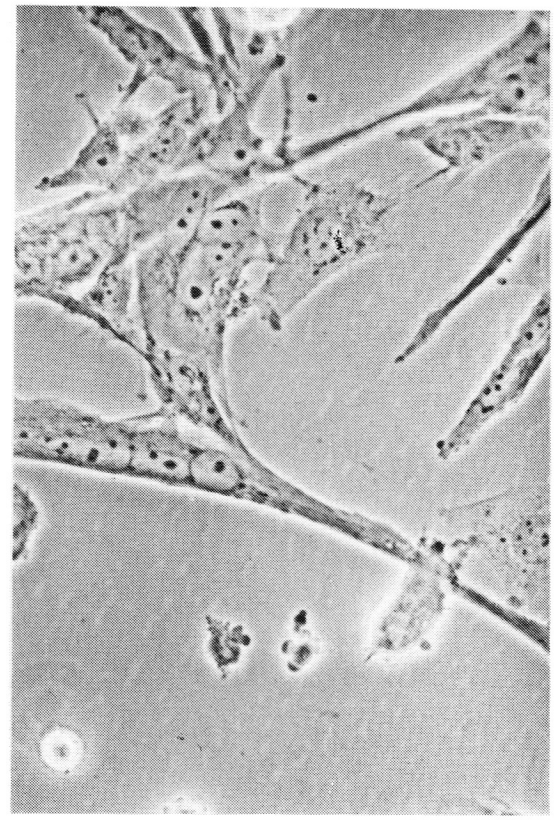


図2　myotube様構造ネマリンミオパチーのmyoblastic cloneが形成したmyotube様構造．

考　　察

ヒト骨格筋細胞の安定継代培養系を得るために，これまで様々な試みがなされてきた．我々は，ori⁻SV40・DNAを導入し，筋細胞をトランスフォームすることでこれをクローン化し，安定継代培養系を得る方法を先に報告した．トランスフォームに用いる初代培養はmyoblastとfibroblastの混在培養系であるため，得られた多種のクローンから，形態のみでmyoblastic cloneを同定することは困難である．我々が用いた無血清培地は，myoblastic cloneの分化を誘導するため，筋細胞特有の現象である多核細胞の出現，myotube様構造の形成，CPKアイソザイムにおけるMサブユニットの上昇などをindexとして，多種のクローンの中からmyoblastic cloneをスクリーニングすることを可能とした．

DMD患児より得た初代培養は，fibroblastの混入が多く，myoblastの増殖能，myotube形成能共に低いことは，他の報告でも確認されている[4)5)]．我々は，この様な培養条件の良くない系にもori⁻SV40DNAを導入し得ることを示した．

我々が得たDMDのmyoblastic cloneは定型的なmyotubeを形成せず，ネマリンミオパチーのものと比較すると，CPKのMサブユニット活性も低く，より低い分化レベルに留まっていた．一般にトランスフォームした細胞は，primaryの細胞とは異なる性格を有するため，今回得たネマリンミオパチーのクローンとDMDのクローンを単純に比較して，その差異を疾患由来のものと規定することは困難である．しかし，我々のDMD

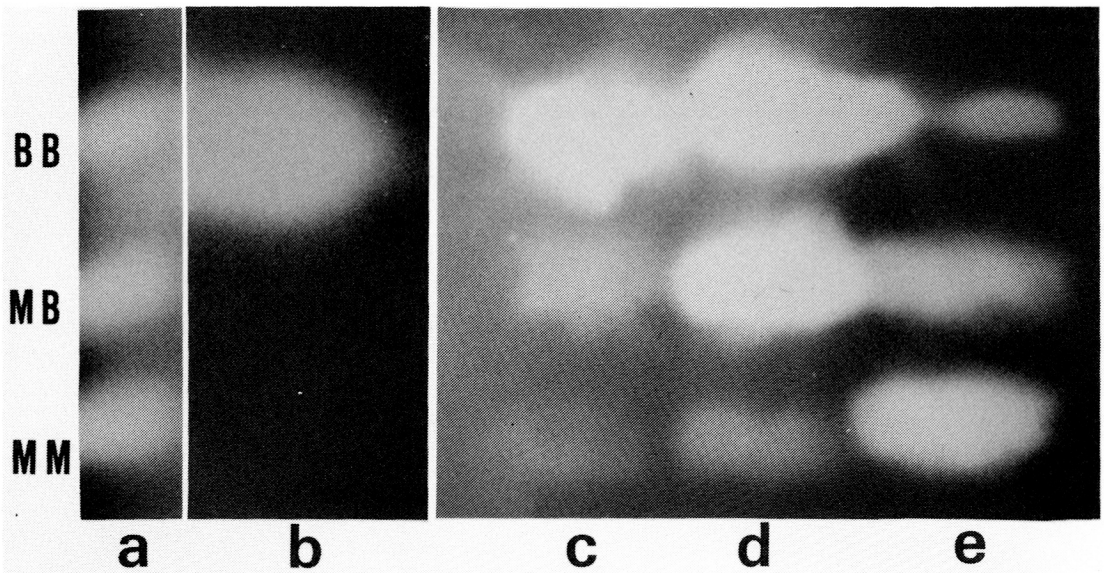


図3　ネマリンミオパチーから得た各種クローンのCKアイソザイムパターン．
a．reference isomers.
b．fibroblastic clone.
c．HamF12（10% FCS）中，myoblastic clone.
d．無血清培地中，myoblastic clone, MM, MB活性は高い．

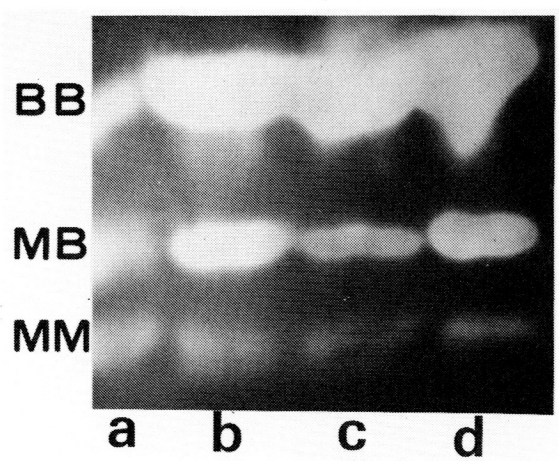


図4　a．reference isomers.
b, c, d. DMD myoblastic cloneの無血清培地におけるCKアイソザイムパターン，MM活性を認めるが弱い．

myoblastic cloneが，筋特有の分化形質である多核細胞形成能と，CPK-Mサブユニット活性発現能を保持していたことはprimary cellが保有する形質のかなりの部分が，トランスフォーム後も発現されうることを示している．

DMDの一次変異形質は，myoblastの段階で既に発現されているか[5]，あるいは分化のかなり初期の段階で発現される可能性があり[4]，核酸，プロテアーゼ活性，細胞膜の検索などを行う上で，我々のクローンは均一で安定したサンプルを供給する点に於て優れていると考えられる．

文　献

1）Louis M. Kunkel et al.: Nature **322**: 73-77, 1986.
2）Miranda A.F., Babiss L.B. and Fischer P.B.: Proc. Natl. Acad. Sci. **80**: 6581-6585, 1983.
3）Gulzman Y., Sambrook J. and Frisque R.J.: Proc. Natl. Acad. Sci. **77**: 3898-3920, 1980.
4）Jasmin G., TautuC., Vanasse M., Brochu P. and Simoneau R.: Laboratory Investigation **50**: 197-207, 1984.
5）Blau H.M., Webster C. and Palvlath G.K.: Proc. Natl. Acad. Sci. **80**: 4856-4860, 1983.

24）Duchenne型筋ジストロフィーの遺伝子診断

鈴　木　義　之*

研究協力者　　新　本　美智枝*　辻　　明　彦*

緒　　言

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) とは，DNA を制限酵素で切断後，電気泳動，サザンブロットを行い，ラベルした特定のDNA プローブとハイブリダイズさせて得られるDNA 断片の長さの個体間における多型性のことである．遺伝疾患の原因遺伝子に近接するDNA プローブによるRFLP の家系分析を行い，DNA マーカーと疾患との連鎖を調べる（linkage analysis）と，間接的に保因者診断，出生前診断が可能となる．近年，RFLP の解析によって種々の遺伝疾患の診断が行われるようになってきた．Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）についても，既に欧米では，DMD の遺伝子座（X 染色体，短腕Xp21）内もしくはその近傍に局在するDNA プローブを用いた遺伝子診断が行われている[1~4]．ところが人種の異なる黄色人種である日本人については，これらDNA プローブの有用性については不明な点が多く，RFLP による診断を行うにあたっては，これらの基礎的研究が必要である．今回，欧米でDMD のDNA 診断に使用されている11種類のDNA プローブを用いて，その有用性並びにDMD の家系分析への応用について検討を加えた．

方　　法

正常人並びに臨床的に診断の確立したDMD 患者及びその家族から得られた末梢血より，塩化アンモニウム法にてリンパ球を分離し，protease K 処理，phenol 処理，RNase A 処理によって，DNA を分離した．リンパ球DNA（10μg）を3倍過剰の各種制限酵素で37℃，3時間処理し，0.7%アガロース電気泳動にて各DNA 断片を分離し，ニトロセルロース膜へサザンブロットし，DNA プローブ（10^7cpm/0.1μg）とハイブリダイズさせた．フィルターの洗浄は，65℃にて2×ssc 15分間，2回，1×SSC 15分間，2回，0.3×SSC 15分間1回行った．風乾後−80℃にて，オートラジオグラフィーにかけ，バンドのパターンを比較した．

結　　果

1．日本人と白人のRFLP の比較

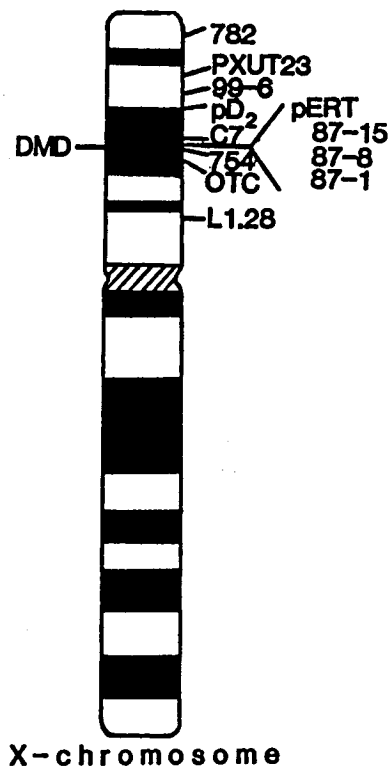


図1　Schematic distribution of RFLP probes

*国立精神神経センター神経研究所疾病研究第五部

表1　Comparison of X-chromosome specific RFLP between Japanese and Caucasians

probe	Japanese restriction enzyme	polymorphic band (Kb)	frequency	Caucasian polymorphic band (kb)	frequency (ref. 2) 3)
782	EcoR I	15.0 9.4	0.39 0.61	14.0 7.0	0.60 0.40
PXUT 23	Bgl II	22.0	1.0	17.5 12.5	0.84 0.16
99-6	Pst I	13.0	1.0	22.0 13.0	0.71 0.29
pD_2	Pvu II	6.4	1.0	6.6 6.0	0.71 0.29
C-7	EcoR V	8.0 7.5	0.94 0.06	8.0 7.5	0.15 0.85
DMD					
pERT 87-15	Xmn I	2.8 1.6,1.2	0.57 0.43	2.8 1.6,1.2	0.58 0.42
pERT 87-8	Bst XI	4.4 2.2	0.33 0.67	4.4 2.2	0.73 0.27
pERT 87-1	Xmn I	8.7 7.5	0.49 0.51	8.7 7.5	0.72 0.28
754	Pst I	12.0	1.0	12.0 9.0	0.62 0.38
754-11	EcoR I	4.2 2.4	0.56 0.44	4.2 2.4	0.16 0.84
L1.28	Taq I	12.0 9.0	0.29 0.71	12.0 9.0	0.68 0.32

2) Bakker, E., Hofker, M.H., Goor, N., Lncet, 1, 654 (1985)
3) Anthony, P.M., William, M., Nature, 316, 842 (1985)

実験に用いた各種DNAプローブのX染色体上での配置を図1に示した．DNAプローブ，pERT87-1，87-8，87-15は，現在DMDの遺伝子座位に最も近いと考えられている．まず，約20名の正常人DNAを用いて，既に報告のある白人のRFLPと日本人のそれを比較し，人種間の差について検討した．表1に示すように，プローブPXUT23，99-6，pD_2，C-7，754については，日本人の場合，白人と較べると，多型性の頻度が著しく低く，日本人DMDの，RFLPによる診断には不適当であると考えられた．また，これらのプローブについて，制限酵素をEcoRI，Pvu II，Pst I，Taq II，Bgl IIIにかえてみても，多型性の頻度が高くなることはなかった．PXUT23，782については，各バンドの大きさに差がみられた．

2．DMDの家系分析

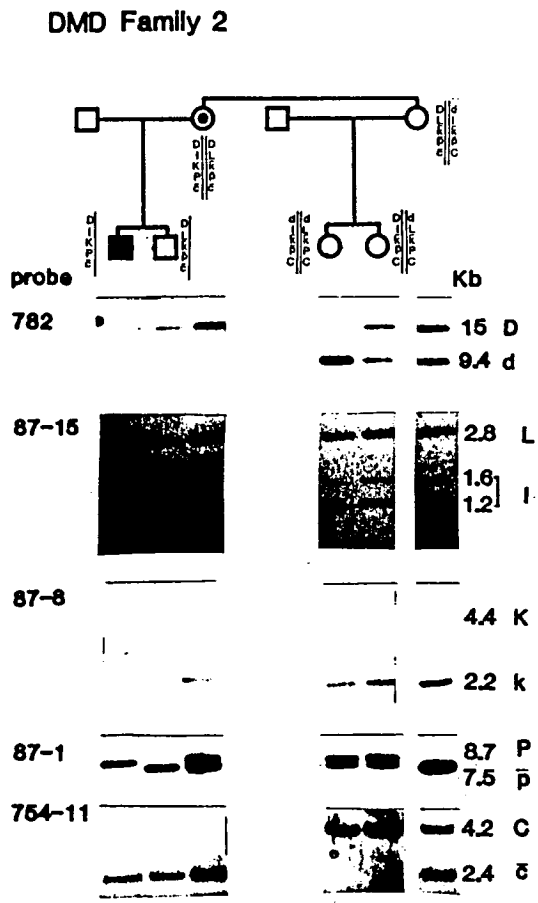


図2

表1に示した多型性の頻度が高かったプローブ782，pERT87-1，87-8，87-15，及び754-11，L1-28を用いて，実際にDMDの家系分析を行い，それぞれのプローブの有用性につき検討した．図2に示すように，各プローブとハイブリダイズして得られる2つの対立遺伝子型（DNAマーカー）をアルファベットの大文字と小文字で示し，各マーカーの染色体座位を調べた．

(1)家系2（図2）

母親と子供2人の比較により，DMDはDNAマーカーKPcと連鎖していると判断された．母親の妹，及び妹の女児については，KPcは持っていないので，保因者の可能性は否定された．

(2)家系3（図3）

母親がプローブ87-8，87-15による多型性を示さ

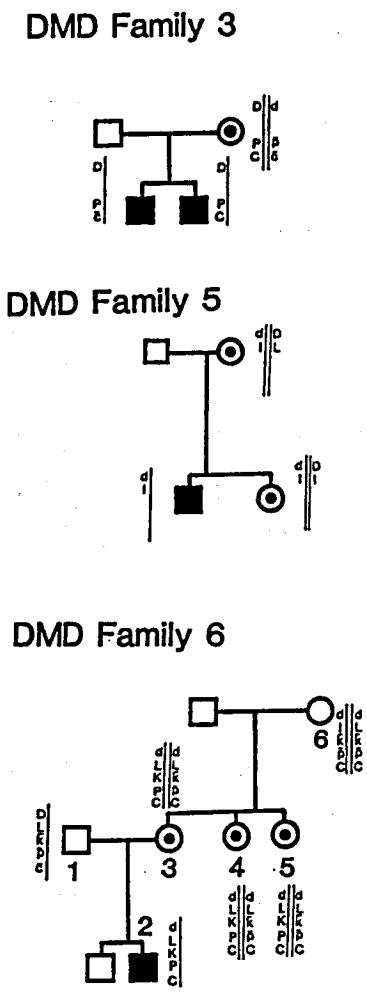


図3

なかったが，プローブ782，87-1の結果よりDMDはDPに連鎖していると思われた．またこの場合，兄弟のうち，いずれかでCとc̄の組換えが起きている．

(3)家系5（図3）

この場合，母親はプローブ87-1，87-8で多型性を示していないが，プローブ782，87-15によってDMDはdlに連鎖していると判断され，患者の妹もdlを保有しており，保因者である可能性が高い．

(4)家系6（図3）

DMDはKPに連鎖していた．母親の妹2人ともKPを保有しているので，保因者であると思われた．

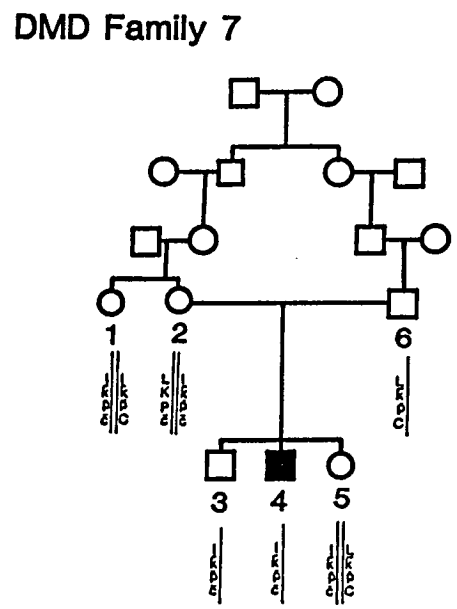


図4

(5)家系7（図4）

この家系においては，患者と兄で全く同じDNAマーカーの染色体座位を示し，使用した5種類のDNAプローブでは，DMDと連鎖しているDNAマーカーを同定できなかった．

結論，考察

既に白人のDMD診断に応用されている11種のDNAプローブの有用性につき検討したところ，pERT87-1，87-8，87-15が多型性並びに連鎖の点で最も有用であった．しかし家系6で示されたように，これらのプローブを併用しても診断できない例もあること，またpERT87の組換え率が5％あることを考えると，正確な診断のためには，pERT87以外のプローブも使用し，かつ血清CPK値等の臨床生化学的分析結果も考慮に入れ，総合的に判断される必要があると考えられた．

終りに，御協力いただいた瀬川小児神経学クリニック，瀬川昌也，太田総合病院小児科於保祐子，東京女子医大小児科，大沢真木子の諸先生に深謝いたします．

文　献

1) Monaco, A.P. et al: Nature, 322: 12, 1986.

2) Kunkel, L.M. et al.: Nature, 322: 73, 1986.

3) Bakker, E. et al.: Lancet, 1: 654, 1985.

4) Anthony, P.M. and William, M.: Nature, 316: 842, 1985.

25) DNA多型を用いたProgressive Muscular Dystrophy (DMP) のlinkage analysis

後藤幾生**

研究協力者　古谷博和*,**　小川知子*　佐々木裕之*
榊　佳之*　山田　猛**　田中　薫**

はじめに

進行性筋ジストロフィー症（Progressive Muscular Dystrophy）（以下DMPと略す.）のうち，Duchenne型筋ジストロフィー症（以下DMD）やBecker型筋ジストロフィー症（以下BMD）はX染色体上に連鎖した伴性劣性遺伝を呈する遺伝子疾患であり，そのうち特にDMDでは患児は小児期に発症して思春期までに死亡することが殆どである．現在までに有効な治療法はなく，保因者（キャリアー）の検出も血清中のcreatine kinase（以下CK）の測定程度しか方法がない状態であった．近年，遺伝子工学の進歩に伴い，病変遺伝子の近傍に位置するDNAプローブをクローニングする方法が確立し，これまでにOTC, 754, D-2などのDNAプローブを用いてDMD家系のrestriction fragment length polymorphism（以下RFLP）のハプロタイプを解析することでDMD保因者の同定を行おうとする試みがなされてきた（linkage analysis）[1]．しかし，DMDの異常に高い突然変異率や転座，欠損の頻度の高い事などのためにこれらのプローブを用いた場合には臨床とDNA診断との間に解離の見られる例が多くあり，単独で用いるには問題となっていた．

ところが，Monacoらは染色体検査にてプローブ754領域に欠損の認められるDMD患児のDNAと正常人のDNAとの間にsubtraction[2]を行うことによってこの欠損部位に相当する部位のクローニングを行うことに成功し[3]，これをDNAプローブとして用い，多数の患児家系のRFLPを解析することで，これまでのプローブよりも遙かに高い頻度でキャリアーの検出を行うことに成功した．また，家族性DMD患児の8.3%，孤発例DMD患児の5.8%，BMD患児の1.4%に欠損領域を検出することに成功した[4]．今回我々は，このプローブの供与を受け（pERT87-1, 8, 15），日本人DMP患者家系のRFLPの解析を行ったので以下に報告を行う．

対象・方法

臨床的，病理的にDMD，BMD患者と診断された患者のうちで孤発例の混入を避けるため，母親が以下の条件のいずれかを満たし，臨床的にキャリアーと診断された例について解析を行った．

1）患児，母親がCK高値を呈し，他のミオパチーが否定される場合．

2）患児の家系内に同じ疾患の発症が認められる場合．

この条件を満たすDMD 4家系とBMD 2家系の患児，両親，同胞と，比較のため正常人16名より10mlのヘパリン採血を行い，白血球より数十マイクログラムのゲノムDNAを抽出した[5]．5μgのゲノムDNAを制限酵素で切断，電気泳動後Southern blotting[6]を行いDNAをニトロセルロースフィルターに移行した．その後，DNAプローブpERT87-1, 8, 15をMultiprime DNA labelling system（Amersham）により^{32}Pでラベルして，hybridizationおよびautoradiographyを行い，出現するバンドのパターンからハプロタイ

＊九州大学遺伝情報実験施設
＊＊九州大学医学部脳研神経内科

プ解析を行った.

結　　果

正常人 RFLP の解析

正常日本人群に行った解析の結果は表1に示した. allele frequency は既に欧米人について調べられているが[4], 日本人ではその頻度が欧米人とは多少異なっていた. しかし, linkage analysis に用いられないほどの著明な差異はみられなかった.

DMP 患者家系の解析

DMD 4家系, BMD 2家系で表1に示した7種類の RFLP を解析することによって, 全ての家系でハプロタイプ解析は可能であった. これらの家系では Kunkel らの報告した欠損例は検出されなかった.

次に CK 値と linkage analysis との相関を調べた. 図1 a の BMD 家系では, genotype が p を示す染色体上に BMD の病変遺伝子が位置することになり, 同胞女子はそれと同じ genotype を示していることより, キャリアーと考えられ, CK 測定

表1　日本人正常者群(a), DMP 群(b)における DNA プローブ pERT87-1, 8, 15使用時の RFLP 出現頻度. バンドパターンの表記は Kunkel らの報告[4] に従った.

Subclone	Enzyme	Allele size (kb)		Allele frequency Japanese*		Kunkel et al.	
		p	q	p	q	p	q
pERT87-1	BstNI	3.1	2.5/0.6	0.47	0.53	0.63	0.37
	XmnI	8.7	7.5	0.47	0.53	0.66	0.34
pERT87-8	BstXI	4.4	2.2	0.44	0.56	0.60	0.40
	TaqI	2.7/1.1	3.8	0.32	0.68	0.71	0.29
pERT87-15	BamHI	7.1/2.3	9.4	0.72	0.28	0.62	0.38
	TaqI	3.1	3.3	0.90	0.10	0.67	0.33
	XmnI	1.6/1.2	2.8	0.56	0.44	0.68	0.32

* N=37

Subclone	Enzyme	Allele size (kb)		Genotype	
		p	q	BMD (p/q)	DMD (p/q)
pERT87-1	BstNI	3.1	2.5/0.6	2/0	2/2
	XmnI	8.7	7.5	2/0	2/2
pERT87-8	BstXI	4.4	2.2	2/0	1/3
	TaqI	2.7/1.1	3.8	2/0	1/3
pERT87-15	BamHI	7.1/2.3	9.4	1/1	3/1
	TaqI	3.1	3.3	2/0	4/0
	XmnI	1.6/1.2	2.8	0/2	3/1

値結果との間に矛盾は見られていない．

図1 bのDMD家系では，genotypeがqを示す染色体上にDMDの病変遺伝子が位置する事になる．同胞の弟では，これとは異なるpのパターンを呈しており，臨床所見及びCK値の結果より患児でない可能性が高いと考えられた．

さらに家系内に3名のBMD患者がいることより，家族性のBMDと診断されてはいるが，これら家族のCK値が正常であるために，同胞女子がキャリアーであるかどうかの判定に苦慮していた一家系について両者の相関を調べてみた（図1 c）．結果は3名のBMD患者及びその母親ではgenotypepを示していることにより，このタイプを呈する染色体上にBMDの病変遺伝子が位置していると考えられる．同胞女子にはgenotypepしか見られていない事により，母親由来の病変遺伝子を有するキャリアーの可能性が非常に高いと考えられた．

なお現在までの所，検索した全てのDMP例にKunkelらの報告した診断矛盾例[4]は検出されな

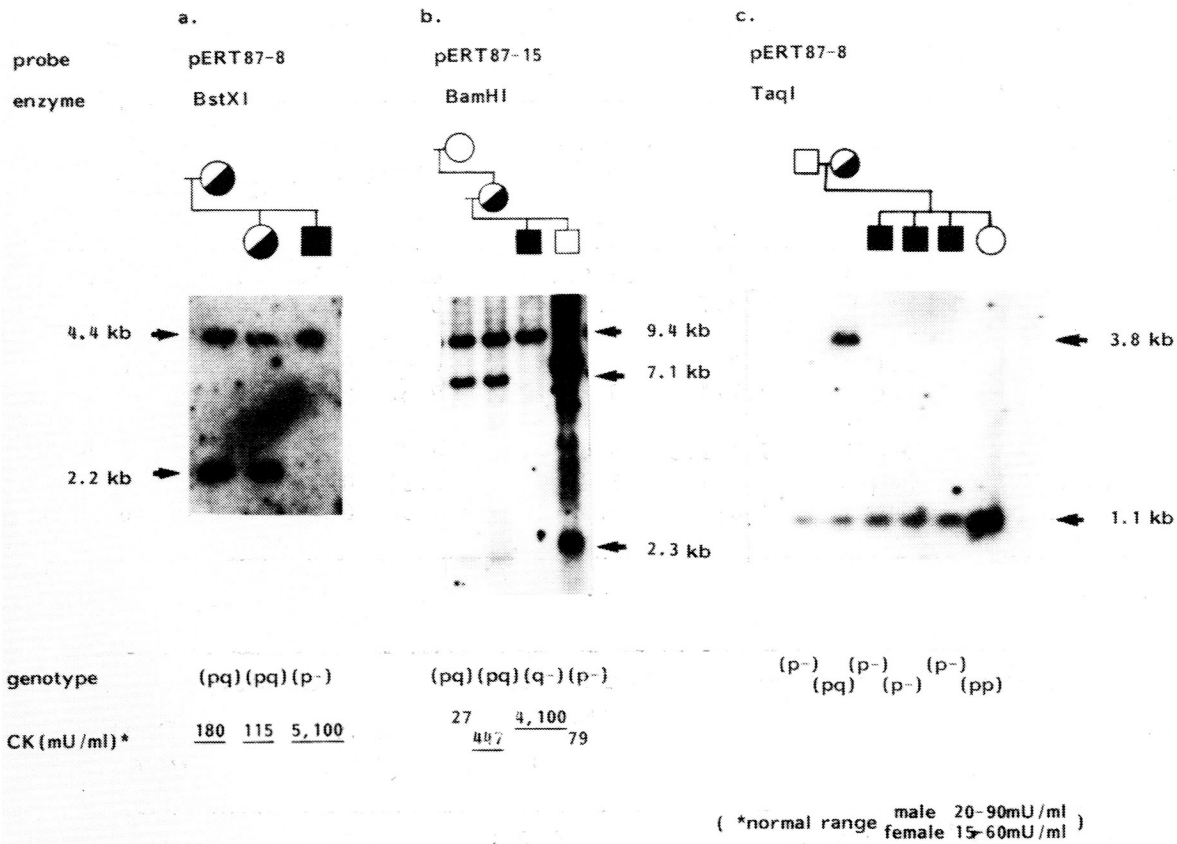


図1　家族性DMP linkage analysisの実例．上段より使用DNAプローブ名，制限酵素名，家系図，バンドのパターン，genotype，CK値を示す．

a．家族性BMD例．患児，母親，姉のいずれもが高CK値を呈しており，母親，姉がキャリアーと考えられていた．

b．家族性DMD例．患児，母親が高CK値を呈している事により母親がキャリアーと同定されていたが，弟は発症年齢前であり臨床診断は出来ていなかった．

c．家族性BMD例．同胞3名が患者であることにより，母親がキャリアーと考えられたが，CK値は全員正常範囲内であり，姉がキャリアーかどうかは不明であった．

かった.

考　　案

従来，筋ジストロフィー症のキャリアー同定には血清CKの測定が用いられてきたが，判定が必ずしも正確ではなく，出生前診断には適用出来ないことが欠点であった．この点RFLPを用いた診断では，出生前診断，発症前診断も可能な点が特徴的である．また，特にpERT87（DXS164）プローブを用いることで，これまでのDNAプローブより遙かに高い頻度で欠損例を検出できること[4]，今回我々が調査した範囲内で臨床所見（家族歴，CK値，病理所見）との間に矛盾例が見られなかった事よりこのプローブの有用性は高いと考えられる．

最近Monacoらは[7] pERT87（DXS164）プローブの中から欠損部分に位置するプローブを用いてDMP遺伝子に関与していると考えられるcDNAの一部をクローニングする事に成功した．これをプローブにしてDMD患者のDNAとhybridizationを行ってみたところ，確かにこの部分に相当するDNAが欠損していることを証明した．彼らはさらにこのDNAとhybridを形成するmRNAが16kb（キロ塩基対）もあることより，ゲノムDNAではこれが1,000から2,000kbにも及ぶであろうと予測し，DMPの突然変異率の高さ，欠損出現頻度の高さ，linkage analysisでの矛盾例の頻度の高さなどはこれに起因するのであろうと考えている[7]．pERT87プローブを用いたキャリアー検出は，間接的な遺伝子診断に相当するものであり，直接的な遺伝子診断（家族性アミロイドーシスなど[8]）に比べて，家系内検索の必要性のあること，診断と臨床との間に解離の見られる率の高いことなどの短所が見られる．しかしDMPの場合には欠損のパターンが必ずしも一定でない事より，患者の病変部位が何種類も存在する可能性のあること[4]や疾患に関与する遺伝子が巨大なものであろうと予想されること[7]より，一次スクリーニングとしての間接的診断法の有用性は存在すると予想される．今後この方法を用いてキャリアーと診断された例や未発症例について，さらに臨床的な追跡調査を行うと共に，多数の例の解析を行う必要があると考えられる．

最後に患者血液を送っていただいた，日本赤十字社医療センター，篠原多美子先生，国立療養所筑後病院，北口哲雄先生に深謝します．

文　　献

1）Bakker E, Hofker MH, Goor N: Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy with closely linked RFLPs. Lancet, i: 655-658, 1985.

2）Lamar EE, Palmer E: Y-encoded, species-specific DNA in mice: Evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains. Cell, 37: 171-177, 1984.

3）Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W et al: Detection of deletion spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. Nature, 316: 842-845, 1985.

4）Kunkel LM: Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. Nature, 322: 73-77, 1986.

5）Ryan J, Barker PE, Shimizu K et al: Chromosomal assignment of a family of human oncogenes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80: 4460-4463, 1983.

6）Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular cloning. "A laboratory manual" Cold Spring Harbor, N.Y. 1982, pp269-307.

7）Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C et al: Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature, 323: 646-650, 1986.

8）Sasaki H, Sakaki H, Matsuo I et al: Diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy by recombinant DNA techniques. Biochem. Biophys. Res. Commun., 125: 636-642, 1984.

26）多型性DNAを用いた筋ジストロフィー症の遺伝子診断

鈴木紘一*

研究協力者　秋田朗子*　大野茂男*　今野保彦**
後藤順***　中野今治***　高津成美****
杉田秀夫*****

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー症（DMD）の病因を究明する上で，DMD遺伝子の単離と遺伝子産物の同定は不可欠であるが，適当な治療法のない現在では，当面，DMD家系における女性保因者の検出と胎児診断が早急の課題となる．DMD遺伝子のマーカーとしてDNAの塩基配列上の多型性（RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism）を利用する遺伝子診断は，従来の血清creatin kinase試験によるDMD保因者の判定に代わるものとして，また，胎児診断に道を開く方法として有効である．

多型性DNAによる遺伝子診断を一般的に適用するには，（i）マーカーとする多型性DNAが調べたい遺伝子疾患と密に連鎖すること，（ii）高頻度に出現する多型性であること，（iii）併用する複数のDNA多型性部位は連鎖平衡の関係に近いこと，が挙げられる．pERT87-1, pERT87-8, pERT87-15の3種の多型性DNA断片は，DMD遺伝子座位に局在することが示唆されており[1]，（i）のDMDとの連鎖の点では現時点では最良のDMDマーカーである．（ii）の多型性の頻度については，種族が異なると多型性が全く認められないことが，insulin遺伝子[2]等いくつかの例で報告されている．また，（iii）に関しては，近接した位置にある多型性部位間でしばしば強い連鎖非平衡の関係が存在し，互いのマーカーの価値を相殺すること[3]が知られる．

今回，我々は日本に於て遺伝子診断を確立することを目的として，pERT87の3種のプローブをKunkel博士より恵与を受け，これらの実用性について（ii）と（iii）の点を検討した．

対象および方法

正常人およびDMD18家系，BMD 2家系の家族構成員から末梢血をヘパリン採取し，リンパ球DNAを検体として用いた．

リンパ球DNAは，Xmn I，BstN I，BstXI，Taq Iの各々の制限酵素で消化後，アガロース電気泳動でDNA断片を分離し，適当な^{32}P標識プローブを用いてSouthern分析を行なった．

結　果

1．pERT87の多型性の出現頻度

pERT87の3種類のプローブと4種類の制限酵素との組合せにより検出される6種類の多型性について，allele頻度とヘテロ接合体頻度（heterozygosity）の結果を**表1**に示した．日本集団に於てpERT87-8によって検出されるTaq I，BstXI両多型のcommon alleleは，欧米白人集団に於てrare alleleであり，また，pERT87-15のTaq I多型のrare alleleの頻度は0.2より低く，その結果ヘテロ接合体頻度が欧米よりかなり低い等，両種族間にいくつかの差違を認めた．しかし，ヘテロ接合体頻度は全体として40-50%であり，非常に高頻度の多型性が日本に於ても保持されていた．この結果は，pERT87の多型性の利用価値の高

＊東京都臨床医学総合研究所
＊＊杏林大学保健学部疫学
＊＊＊国立療養所下志津病院神経内科
＊＊＊＊帝京大学医学部神経内科
＊＊＊＊＊国立精神神経センター神経研究所

表1 Allele frequency and heterozygosity of DNA polymorphisms for pERT87

Probe	Restriction Enzyme	Allele Frequency			Heterozygosity, %	
			American & European*	Japanese	American & European	Japanese
					Expected	(Observed)
pERT87-1	XmnI	A:	0.66	0.53	45	50 (53)
		a:	0.34	0.47		
				(n=70)		
	BstNI	C:	0.63	0.48	47	50 (54)
		c:	0.37	0.52		
				(n=54)		
pERT87-8	BstXI	D:	0.60	0.26	48	38 (39)
		d:	0.40	0.74		
				(n=58)		
	TaqI	E:	0.71	0.38	41	47 (40)
		e:	0.29	0.62		
				(n=52)		
pERT87-15	TaqI	F:	0.67	0.85	44	26 (24)
		f:	0.33	0.15		
				(n=52)		
	XmnI	B:	0.68	0.59	44	48 (50)
		b:	0.32	0.41		
				(n=70)		

*, by Kunkel et al. (1986)
number of chromosomes (n)=75

いことを意味する.

2. pERT87多型性による遺伝子診断の適用範囲

遺伝子診断は, DMD保因者である母親が6種類の多型性のいずれかに於てヘテロ接合体であった家系に於て適用可能である. 表2は同一検体について複数の多型性で検索した時にヘテロ接合体が検出された頻度である.

pERT87-1のプローブでXmn IおよびBstNI切断DNAを検索したところ56%であり, 1種類の多型性で得られるヘテロ接合体頻度の値54%と変わらなかった. これは, Xmn I多型性のallele A, aとBstNI多型性のallele C, cが各々のal-

表2　Applicability of polymorphic sites for the pERT87 subclones in DMD Diagnosis

Probe	Restriction Site	Applicability, % Observed	Expected
pERT87-1	XmnI and BstNI	56(14/25)	75
pERT87-8	BstXI and TaqI	39(7/18)	67
pERT87-15	XmnI and TaqI	68(13/19)	62
pERT87-1, -15	XmnI	81(26/32)	74
All	XmnI, TaqI, BstXI, and/or BstNI	94(30/32)	-

lele 頻度に従ってランダムに組み合わさっているならば，4種類の haplotype (AC, ac, Ac, aC) が約25%ずつ存在するはずであるが，観察された遺伝子型の頻度から haplotype の頻度を推測したところ，日本集団では AC と ac の2種類の haplotype が各々50%近く存在し，Ac, aC は殆ど存在していないことに起因していた（データ省略）．すなわち，pERT87-1の2種の多型性部位の間に存在する AC，ac 間の密な連鎖非平衡の関係が，2種類の多型性で調べる価値を減じていた．pERT87-8の BstXI 多型と Taq I 多型に於ても同様の連鎖非平衡の関係が観察され，ヘテロ接合体頻度は39%であった．更に，pERT87-1と pERT87-8の4種の多型性を全て検索しても連鎖分析による診断可能な家系数は56%であり，1種類の多型性で検索した場合（39-54%）と本質的に変わらなかった．他方，pERT87-15は2種の多型性間に於ても，また，上記4種の多型性とも連鎖平衡の関係にあり（XmnI 切断 DNA を pERT87-1と pERT87-15で検索すると81%がヘテロ接合を示す），このプローブの利用価値の高いことが明らかである．結果として，6種（又は BstNI を除く5種）の多型性の検索により，日本の DMD 家系の94%に於て遺伝子診断が可能である．

3．DMD 家系分析

DMD16家系を調べた結果，全家系に於て pERT87多型性のいずれかにより遺伝子診断が可能であった．現在，8家系28例の分析を終え，全例に於て pERT87の多型性はメンデルの遺伝様式に従い，交叉を認めなかった．代表例を図1に示した．この家系は，Xmn I 切断 DNA を^{32}P 標識 pERT87-1で検索した時，保因者である母親がヘテロ接合体であった症例である．DMD 患者は8.8kb の allele A を持ち，他方，正常な男児は7.5 kb の allele a を持つことから，DMD 疾患遺伝子は母親の allele A で示される X 染色体上にあることが推定された．このことから，allele A の染色体を母親より受け継いでいる女児は DMD の保因者であると判定され，血清 CK 活性の上昇と一致していた．この女児が将来妊娠時に，男の胎児について出生前診断を希望するならば，DMD は pERT87-15で検出される1.6kb と1.2kb のバンド（allele B）を指標として判定可能である．

4．Xp21部分欠失による GK（グリセロールキナーゼ欠損症）—DMD 併発症例

血縁関係のない DMD18例，BMD 2例の内で pERT87座位の欠失に起因する疾患発症例は，1家系のみであった．この家系は，患者とその母親の X 染色体 p21に部分欠失の認められた症例である[4]．家族構成員の dosage analysis を図2に示した．患者は pERT87-1から pERT87-15の領域を全て欠失し，母親はこの領域のバンドの濃度が正常男性と等しい X 染色体1本分の濃度を示した．この結果は，母親が患者で明らかな欠失の保因者であるという先の染色体分析の結果と一致する．欠失の範囲は，少なくとも pERT87の3種の

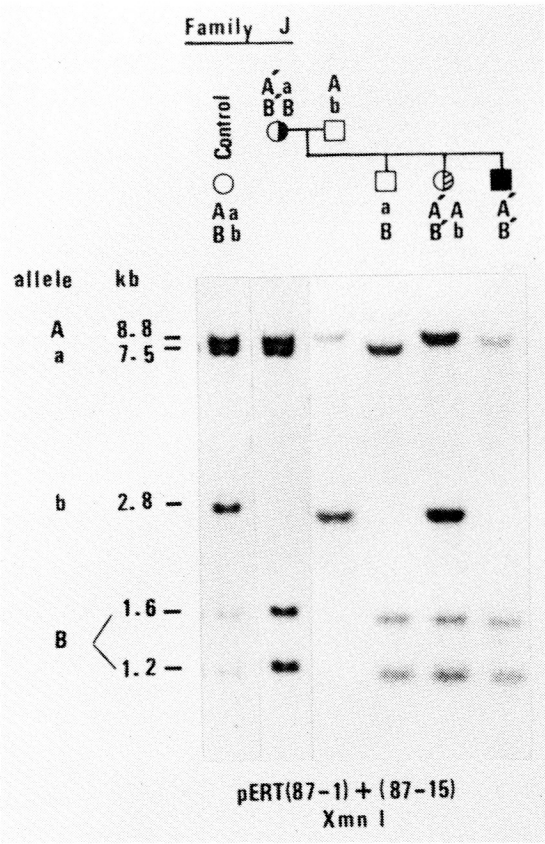


図1　pERT87-1およびpERT87-15で検出されるXmnI多型を用いて連鎖分析を行なったDMD家系.
▶印は疾患遺伝子が連鎖していることを表わす. ◑印は, 本実験で保因者と判定された症例を示す.

プローブが占める52kbに渡るが, DMDと同じXp21に局在するornithine transcarbamoylase遺伝子（OTC-d, e, f）および1-1, 1-4の他のX染色体の領域は正常であった.

5. Becker型筋ジストロフィー症（BMD）の家系分析

BMD 2家系中分析可能であった1例を図3に示した. この家系に於てBMDは, 姉妹関係にある2人の母親から由来する3.8kbのallele eに連鎖していることが明らかである. 左側の家系の娘は, 父親から2.7kbと1.1kbのallele Eを, 母親から疾患遺伝子と連鎖したsmalle eを受け継いでいることから, BMDの保因者であることが推定された. この女性は血清CK値が正常であったが, CK試験では保因者の30%は正常値を示すことから, CK試験で見落とす保因者の1例であると考えられる. 右側半分の家系の2人の娘は, 同一の遺伝子型を示しているが, 保因者であるか否かの判定は父親の遺伝子型を調べることにより可能である.

1家系ではあるが, BMD家系に於てpERT87とBMDが連鎖を示したことは, BMDとDMDが同一遺伝子座位にあって, 異なる部分での変異に基づく疾患であるという考え[1,5]を支持している.

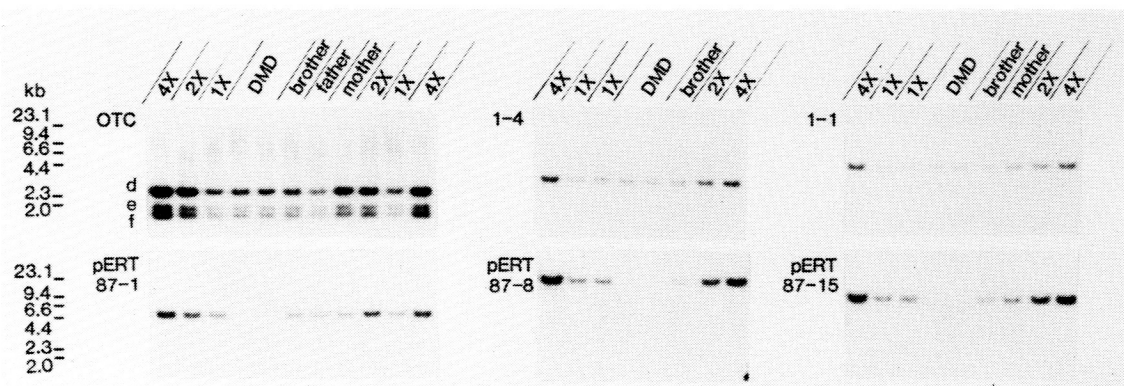


図2　Xp21欠失によるGK-DMD併発症例の家族におけるSouthern分析.
各laneに2μgのDNAを泳動した.

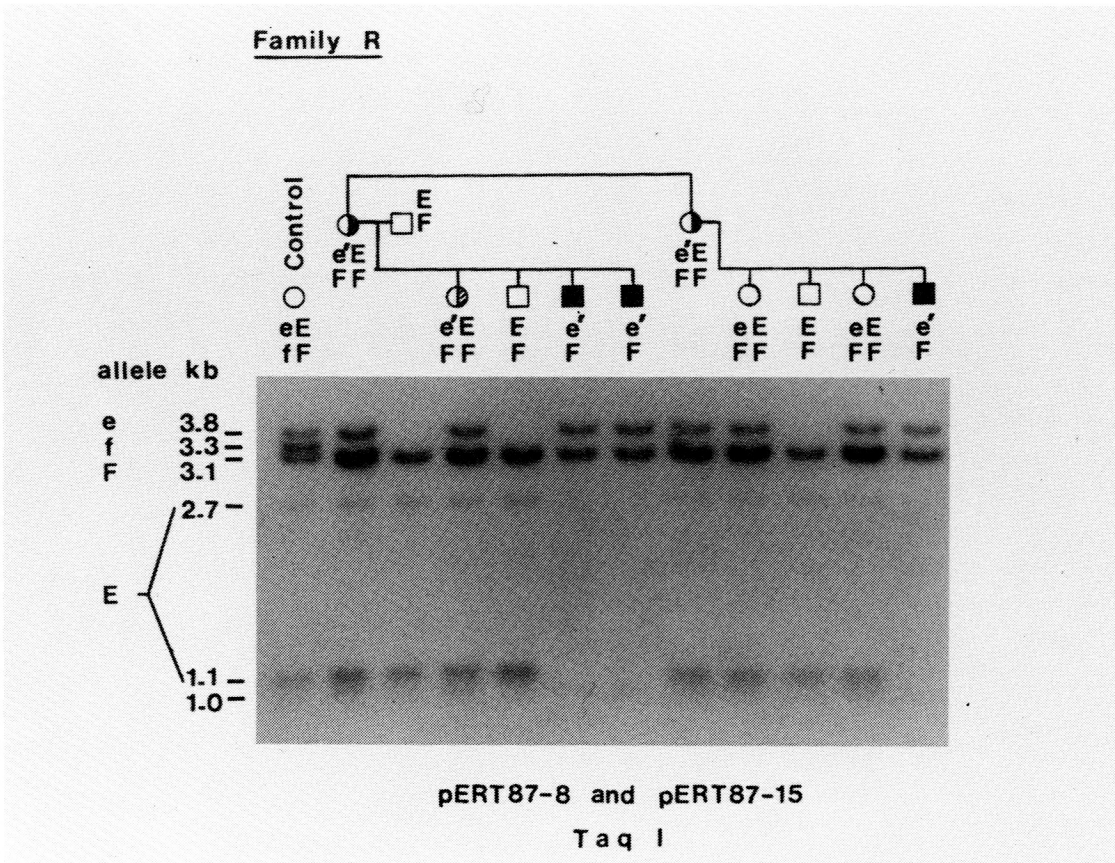


図3　Taq I 多型による BMD 家系の連鎖分析.
印は図1に同じ.

考　　察

pERT87の多型性による遺伝子診断の適用範囲について検討し，DMD 8家系，BMD 1家系の連鎖分析を行なった．結果は，pERT87の3種のプローブによる遺伝子診断が，日本の DMD 家系および BMD 家系の大半に於て疾患保因者の検出に極めて有効であることを示した．

保因者の検出にあたっては，経費と効率の面を考慮し，まず母親の Xmn I 切断DNAをpERT87-1と pERT87-15の2種のプローブで同時に検索する．ここで81%の母親がヘテロ接合体になる（**表2**）ので，これらの家系の構成員について連鎖分析を行なう．残り20%の家系については，母親の Taq I 切断 DNA を pERT87-8と pERT87-15で検索するか，あるいは同時に，BstXI 切断 DNA を pERT87-8で検索することが適当と考える．

診断の精度は，DMD 遺伝子と pERT87座位の間の遺伝的組み換え（交叉）に規定される．我々は未だ交叉例を認めていないが，欧米では5-6%の交叉率が報告されている[6]ことから，今後より正確な診断には，pERT87のプローブと共に DMD 遺伝子をはさむ位置関係のプローブを併用する必要がある．

Kunkel, Monaco らのグループは，極く最近，pERT87領域から転写されている mRNA の相補的 DNA 断片を，DMD 遺伝子転写産物の cDNA の候補として単離し，この遺伝子座位が1000-2000 kb に及ぶ長大なものであることを示唆した[7]．

DMD遺伝子及びその産物の構造が解明されれば，病因となるDNAの変異そのものによる直接的遺伝子診断も可能となろう．しかし，遺伝子が長大であり，かつ病因が極めて多様であることが示唆されることから，病因解明には種々の症例と遺伝子レベルの研究とを対応させることが今後重要であると考える．

文　献

1）Kunkel, L.M., and co-authors: Nature, 322: 73-77, 1986.

2）Chakravarti, A., Elbein, S.C., and Permutt, M.A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 1045-1049, 1986.

3）Antonarakis, S.E., Boehm, C.O., Giardina, P.J.V., and Kazazian, Jr. H.H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 137-141, 1982.

4）Saito, F., Goto, J., Kakinuma, H., Nakamura, F., Murayama, S., Nakano, I., and Tonomura, A.: Clin. Genet., 29: 92-93, 1986.

5）Brown, C.S., Thomas, N.S.T., Sarfarazi, M., Davies, K.E., Kunkel, L., Pearson, P.L., Kingston, H.M., and Shaw, D.J.: Hum. Genet., 71: 62-74, 1985.

6）Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M.: Nature, 323: 646-650, 1986.

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

高　守　正　治*

研究協力者　松　原　四　郎*　奥　村　誠　一*

近年分子生物学の進歩に伴って種々の遺伝病について染色体の分子レベルの解析が可能となった．特に過去3年間英米では筋ジストロフィー症の分子遺伝学的な研究がめざましい発展をみせたが，その背景には種々のプローブの分離の成功が重要な役割を果した．中でも英国のDaviesら（1985）はornithine transcarbamylase（OTC）遺伝子を含むプローブを得てDuchenne型筋ジストロフィー症の遺伝子座解明に大きな貢献をした．このOTCは肝で発見されたミトコンドリア酵素のひとつでカルバミロ硫酸とオルニチンを縮合してシトルリンを形成する働きをもつ．このOTC遺伝子はX染色体短腕上Xp11.4の部位に存在し，そのcDNAの塩基配列はラット（Horwich et al. 1983）およびヒト（Horwich et al. 1984）であきらかにされている．我が国においても今後分子遺伝学的な研究成果の臨床への応用がすすむと予想されるが，欧米で有用であったプローブも必ずしも日本人に有用でない場合があるのは，Restriction fragment length polymorphism（RELP）の発生部位や頻度に人種的な差があるためと思われる．実際遺伝病には民族や地域によって発生頻度や病型に大きな差を示すものが多数あり，分子遺伝学的な研究に際してもこの点を無視することはできない．今回我々は，日本人X染色体ライブラリーよりOTC部位を含むプローブの分離を試みているので，その中間報告をしたい．

*金沢大学医学部神経内科

材料と方法（図1）

日本人X染色体ライブラリーはがん研究振興財団を通じて九州大学遺伝情報実験施設，榊佳之先生のご好意で供与を受けた．ライブラリーを含むλファージ，λgt・WES・λBが大腸菌LE392の培養平板上で形成するプラークを各々2枚のニトロセルロース膜に転写した．これを強塩基液で変性，続いて68℃で12時間加熱固定した．一方Horwichら（1983，1984）によって明らかにされているラットおよびヒトのOTC遺伝子のcDNAの塩基配列からDaviesら（1985）が推定し彼らのプローブの分離のために使用したと同じ27塩基をBeckman社製DNA合成装置system 1 plusを用いて合成し，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で2回精製した．1回目の詳細は省略するが2回目では移動相はA・B 2液のグラジェントでA液は0.1N TEAA（pH6.5）＋5％CH_3CN，B液はCH_3CNを使用し，B液を3％で1分間流したあと13％に20分間で増加させた．この後，5′末端をpolynucleotid kinaseの存在下，γ-^{32}P・ATPと反応させ（forware phosphrylation）^{32}Pで標識した．これをエタノール沈殿法で粗精製後，Sephadex G-100でカラムクロマトグロフィーを行い^{32}P放射活性を各分画で測定し，第1のピークを分取した．この標識oligonucleotideと，前述のニトロセルロース膜に固定されたX染色体ライブラリーを含むファージDNAの間でハイブリダイゼーションの諸条件はDaviesら（1985）に準拠したが，ハイブリダイゼーション液に10％Dextran Sulfateを用いる点のみを変更した．洗浄後－80℃で24時間オートラジオグラフィーを行

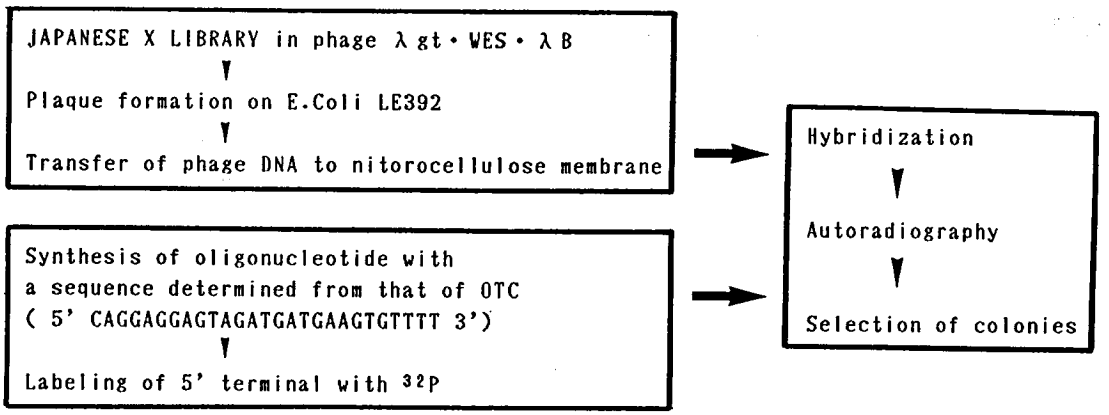


図1　Materials and methods

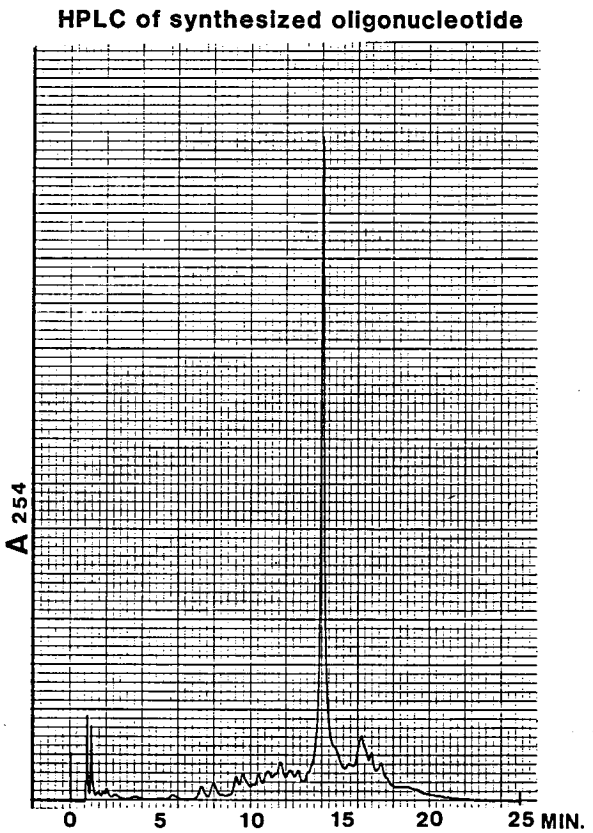


図2　HPLC of synthesized oligonucleotide

った．一枚の培養平板から転写した2枚のニトロセルロース膜から得られた放射活性像を比較し，2枚の同一部位で放射活性が得られた場合を陽性の所見と考えた．こうして陽性部位に相当する培養平板からプラークを分離し，更にこれを大腸菌に感染させる作業を行った．

結果：合成 oligonucleotide の HPLC での溶出パターン（図2）では，14分で単一のピークを認

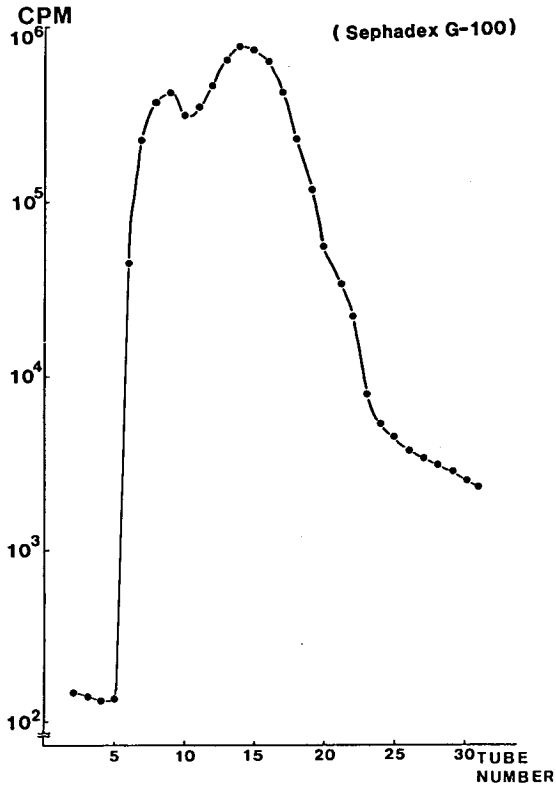


図3　Gel filtration after 5' end labeling

めこの部分を分取した．これを ^{32}P で5'ラベリングした後精製の目的で行った Sephadex G100によるゲル濾過の溶出液の ^{32}P 放射活性（図3）を測定し，最初のピークを分取し，ハイブリダイゼーションに使用した．oligonucleotide に比し γATP の比率が高く，2番目のピークが高い傾向があったが，1番目のピークより十分な量の標識 oligonucleotide を得た．

ハイブリダイゼーションは未だ実験の初期的段階であるが，現在迄行った約66万個のプラークのうち陽性の結果を得たものについて選択をすすめている．現在迄行ったものの1例を図4に示す．陽性率はいまだ低いが，今後選択をすすめて行く予定である．

考　　察

Duchenne 型筋ジストロフィーについて Monaco ら（1986）は DMD 遺伝子の一部と思われる cDNA 断片 pERT87-25を分離し，これが骨格筋の16kb の RNA とハイブリダイズすることを本年10月に報告しており，本疾患についての OTC

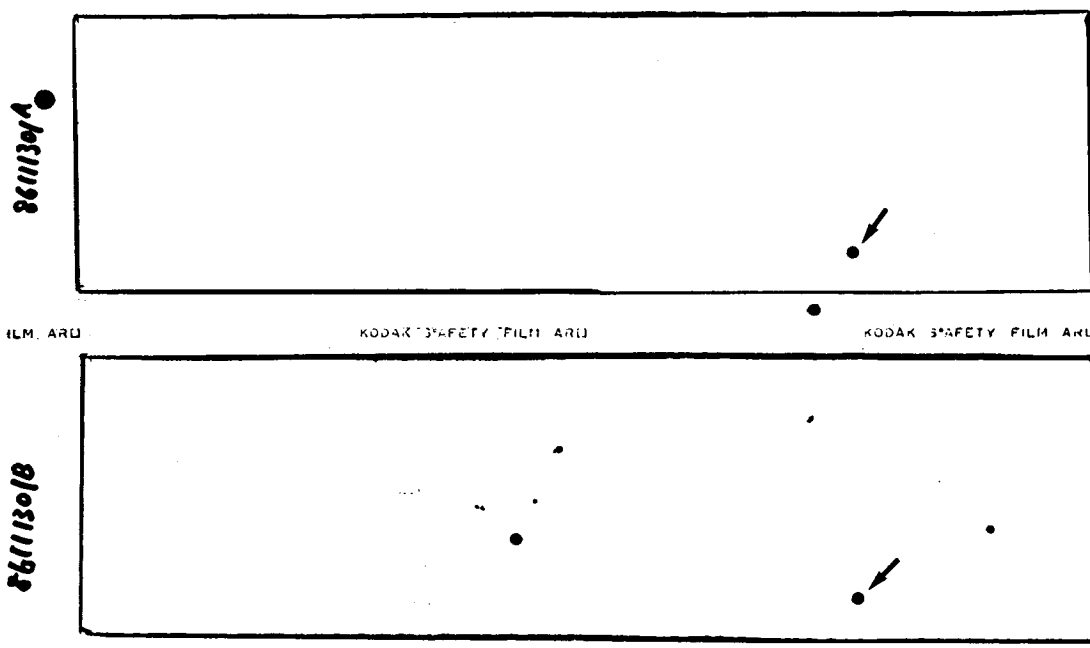


図4　同一平板より転写した2枚のニトロセルロース膜のオートラジオグラフ．ほぼ対応する部位での放射活性を認めるものがみられる（矢印）．

プローブの役割はすでに限定されたものとなった．しかし今後検索の対象となると思われる多数のX染色体性遺伝を示す疾患については染色体上の位置が確定しているOTC遺伝子を含むプローブは今後とも有力な道具として頻繁に利用されるものと思われる．またOTCは核DNA上にコードされるミトコンドリア酵素として重要な酵素で，OTCプローブはミトコンドリア脳筋症の分子レベルでの病態の研究にも利用価値を有するものと考えられる．

なおoligonucleotideの合成に関してBeckman Japan社のご協力を頂いた．

文　献

1）Davies KE, Briand P, Ionasescu V, Ionasescu G, Williamson R, Brown C, Cavard C, Cathelineau L: Gene for OTC. Characterisation and linkage to Duchenne muscular dystrophy. Nucleic Acids Research 13: 155-165, 1985.

2）Horwich AL, Kraus JP, Williams K, Kalousek F, Konigsberg W, Rosenberg L: Molecular cloning of the cDNA coding for rat ornithine transcarbamoylase. Proc Nat Acad Sci USA 80: 4258-4262, 1983.

3）Horwich AL, Fenton WA, Williams KR, Kalousek F, Kraus JP, Doolittle RF, Konings-berg W, Rosenberg LE: Structure and expression of a complementary DNA for the nuclear coded precursor of human mitochondrial ornithine transcarbamylase. Science 224: 1068-1074, 1984.

4）Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM: Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature 323: 646-650, 1986.

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

高　瀬　貞　夫*

研究協力者　小　林　和　夫*・鈴　木　博　義*　関　沢　　剛*

はじめに

筋損傷時にみられる筋再生は損傷筋筋線維より，衛星細胞へ何らかの情報が伝達され，衛星細胞の分裂増殖がおこると考えられている．しかしながら静止状態にあった衛星細胞を活性化させる因子については明らかにされていない．

そこで我々は損傷筋ホモジナイズ液を筋芽細胞培養液中に加え，筋芽細胞増殖促進因子（MPF）について検討してきた．昨年本班会議において筋損傷後早期（損傷12時間後に最大）の筋組織中にMPFの存在を確認し報告した[1]が，本年度は筋損傷早期の筋ホモジナイズ液を用いて，MPFの物理，化学的性質について検討を加えたので報告する．

材料と方法

(1)筋芽細胞の培養と増殖性の測定

ラット由来の筋芽細胞L6（Flow Laboratories Inc.）を15mm径シャーレに4～6×10^4個/dishの細胞密度で培養し（ダルベッコMEM99%，牛胎児血清1%，ペニシリン20単位/ml，ストレプトマイシン20μg/ml），24時間後筋ホモジナイズ液上清（SMH）を加えた培養液（ダルベッコMEM99.75%，牛胎児血清0.25%，ペニシリン5単位/ml，ストレプトマイシン5 μg/ml）と取り替え4日間培養する．トリプシンにて細胞浮遊液を作製し，血球計算盤にて細胞数（×10^4個/dish）を算出した．各値は3検体の平均をもって表わした．

(2)筋ホモジナイズ液上清（SMH）の作製

250gラット前脛骨筋に切断損傷（約5mmの横切開を5～6回行なう）を加え，12時間後に損傷筋を採取した．25W%になるようPBSを加えて筋をホモジナイズした．凍結融解を3回くり返した後に，18000×gにて30分間遠心し，上清を0.45μフィルターで沪過したものをSMHとして用いた．

(3)損傷筋ホモジナイズ液の熱処理

熱処理はSMH（1.6%及び3.1%）を100℃，10分間行ない，20000×g，30分間遠心した上清を培養液中に添加し筋芽細胞の増殖性を測定した．対照として37℃，10分間処理を行なった．

(4)筋損傷ラットにおける損傷筋，非損傷筋ホモジナイズ液の筋芽細胞増殖性の測定

筋損傷ラットにおける非損傷筋への影響を検討するため，ラットの一側肢に筋損傷を加え12時間後，①術側の損傷筋，②対側の非損傷筋を採取した．対照として一側肢の皮膚だけ切開した後，12時間後の③術側の非損傷筋，④対側の非損傷筋を採取した．①～④の採取筋のSMHを作り，3.1%濃度で培養液に添加し，筋芽細胞の増殖性を測定した．

(5)損傷筋ホモジナイズ液の塩析

2.5% SMH5mlを硫酸アンモニウムにて塩析した．飽和度20，50，80，90%にて析出したものを10000×gにて30分間遠心し，各沈澱に5ml PBSを加え，セルロースチューブにて12時間透析した後，0.45μフィルターにて滅菌後培養液に添加した．

(6) MPFの分離

損傷筋SMH（25% SMH2ml）の硫安分画（40～80%）をSephadex G100にてゲル濾過を行なった．ゲルベット容量は72ml，溶出速度は6ml/hr.で行ない，calibration proteinとしてalbumin，ovalbumin，chymotrypsinogen A，

*東北大学医学部脳研神経内科

ribonuclease A を用い，溶出物質の分子量を求めた．

結　　果

(1)損傷筋ホモジナイズ液の熱処理による筋芽細胞増殖性

熱処理しないSMHの筋芽細胞の増殖は著明で，SMHの濃度に比例した増殖をみとめた（3.1％SMH；34.3±5.7，1.6％SMH；29.1±1.8，図1）．一方熱処理したものの増殖は低く（3.1％SMH；8.9±1.4，1.6％SMH；10.9±2.8），SMHを添加しない群と同程度の増殖（8.9±1.9）であった．以上のことよりMPFは，100℃，10分間で完全に不活化され，蛋白質であると考えられた．

(2)筋損傷ラットにおける損傷筋，非損傷筋ホモジナイズ液の筋芽細胞増殖性

筋損傷ラットの損傷筋①における筋芽細胞の増殖は著明（30.8±3.1）であった．一方筋損傷ラットの対側非損傷筋②における増殖は低く（11.8±0.6），また皮膚切開のみのラットの術側③及び対側④の非損傷筋における増殖（③；13.8±1.5，④；11.9±1.1）と同程度であった（図2，表1）．しかし②～④の非損傷筋はSMH非添加群（6.7±0.6）に比し，軽度ながら有意に筋芽細胞増殖促進作用を認めた．これらの事よりMPFは非損傷筋においても軽度ながら存在するが，損傷筋に著明に増加，且つ局在している事がわかった．

(3)損傷筋ホモジナイズ液の塩析による各分画の筋芽細胞増殖性

0～20％及び80～90％の硫安分画における筋芽細胞の増殖は低いが（0～20％；5.2±1.8，80～90％；4.7±0.6），20～50％及び50～60％分画においては筋芽細胞の著明な増殖（20～50％；22.8±

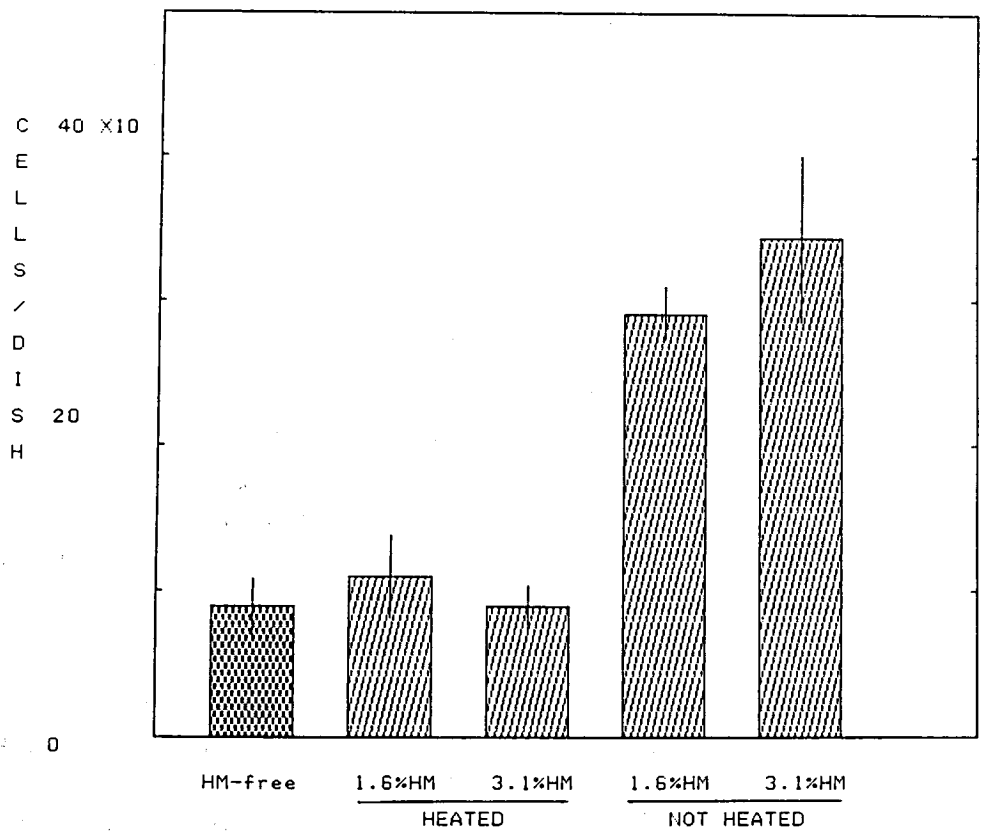


図1　損傷筋ホモジナイズ液の熱処理による筋芽細胞増殖性．HM；homogenized muscle

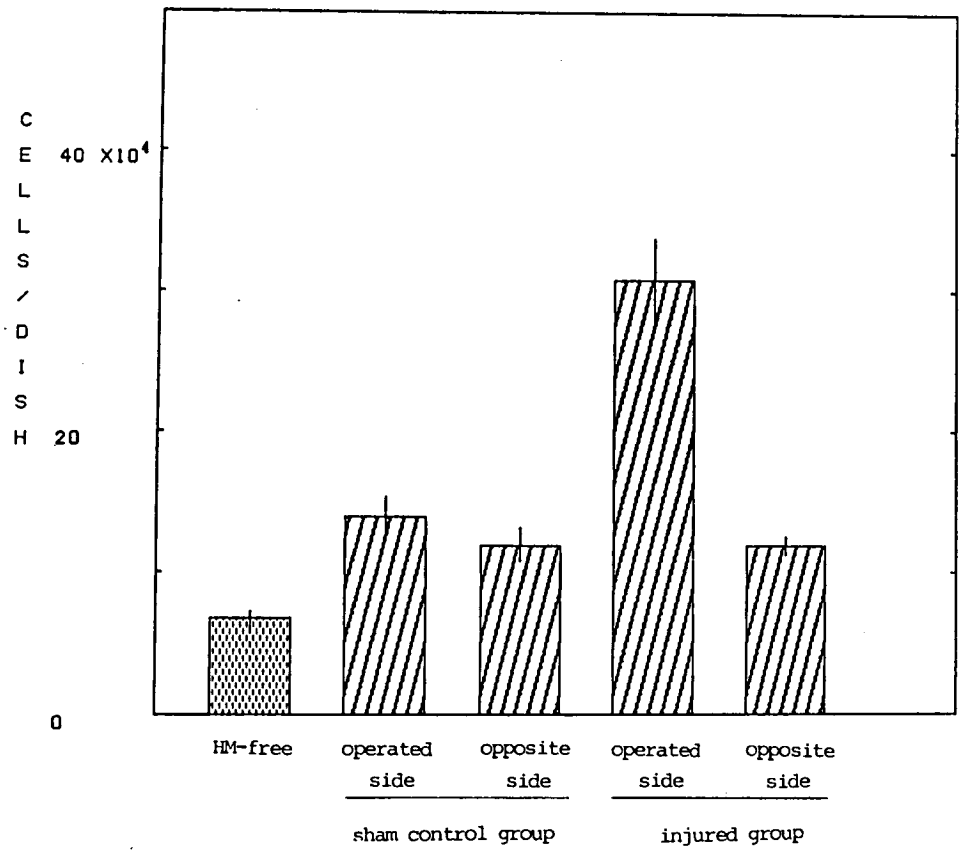


図2　筋損傷ラットにおける損傷筋，非損傷筋ホモジナイズ液の筋芽細胞増殖性．HM；homogenized muscle

表1　筋損傷ラットにおける損傷筋，非損傷筋ホモジナイズ液の筋芽細胞増殖性

	myoblast proliferation (cells x10 /dish)
injured group	
operated side	30.75+3.07
opposite side	11.83+0.63
sham control group	
operated side	13.83+1.53
opposite side	11.92+1.13
homogenized muscle-free	6.67+0.59

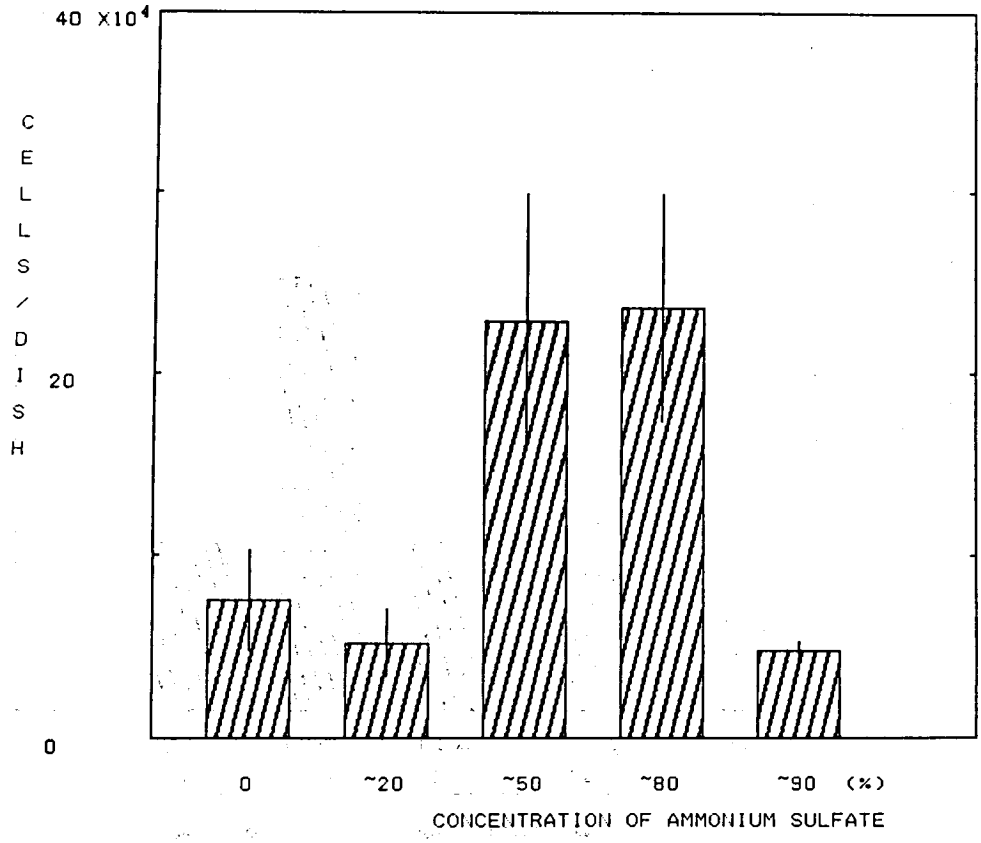


図3　損傷筋ホモジナイズ液の塩析による各分画の筋芽細胞増殖性

7.1, 50～80%；23.7±6.3）を認めた（図3）.

(4) MPF の分離

カラムクロマトグラフィーの溶出曲線（図4）では，分子量67000と2600の主に2つの物質が分離された.

考　察

Duchenne 型筋ジストロフィー症の筋病変は，筋細胞の壊死とさかんな再生所見で特徴づけられる．再生は活発であるが，再生が完了しないうちに変性壊死に至る．従って再生過程の異常が細胞の破綻を引き起すのであろうか？　しかし筋再生機構が明らかにされていない今日，不明といわざるを得ない.

筋再生は衛星細胞の活性化に始まり，分裂増殖，融合，筋管細胞，成熟筋細胞の形成という過程をとる．その始期過程である衛星細胞活性化因子の研究はきわめて少ない．一方衛星細胞の前駆細胞である筋芽細胞の増殖因子については，従来より somatomedin A, C,, multiplication-stimulating activity, fibroblast growth factor, transferrin, dexamethason, insulin like growth factor, 等が報告されている．しかしこれらはいずれも筋組織から抽出されたものではない．我々が損傷筋組織で明らかにし得たMPFは，その性質より somatomedins では熱に安定である事より異なり，分子量の点でその他の MPF とも異なっており，新たな MPF であろうと考えられる.

最近 Bischoff[2] は single muscle fiber の培養系より，ラットの圧迫損傷筋抽出物において，衛星細胞の活性化因子（satellite cell mitogen）を検討し，transferrin とは異なった分子量30000以上

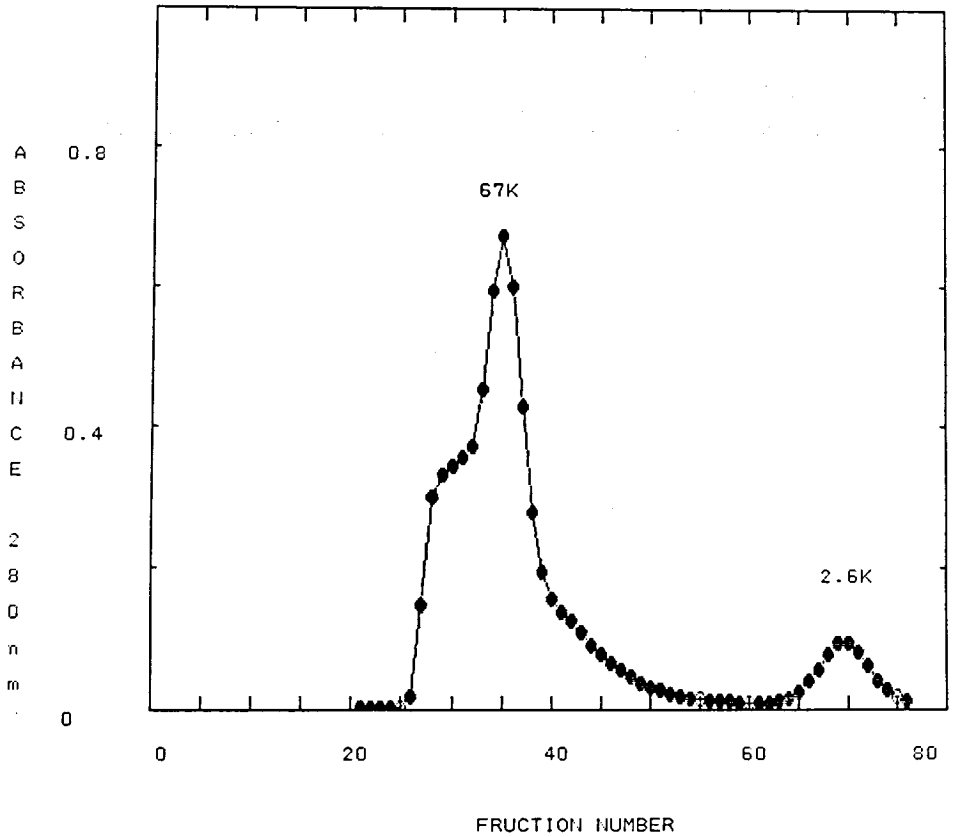


図4　Sephadex G100カラムによる損傷筋ホモジナイズ液の分画

の高分子蛋白質であろうと報告している．損傷筋にみられるMPFと，satellite cell mitogenはおそらく同一物質と考えられるが，いかなる蛋白質か，一種類の蛋白質か否か，今後の研究によらねばならない．

MPFの産生部位について，今回の結果ではMPFが損傷筋組織に著明に増加且つ局在していた事より，損傷筋組織にて産生されると考えられた．Maltinら[3]は再生筋の形態的研究より，活性化した近傍の衛星細胞は損傷部に移動する事を指摘しており，損傷筋において同時に遊走因子が産生されると考えられている．衛星細胞が遊走し，増殖した後，増殖の抑制，融合，筋管細胞の形成へとすすむが，その制御因子，誘導因子は何んであるのか，今後大いに研究されなければならない課題である．

ま と め

培養筋芽細胞の著明な増殖促進作用をしめす筋損傷早期（損傷後12時間後）の筋ホモジナイズ液を用い，筋芽細胞増殖促進因子（MPF）の物理，化学的性質について検討した．その結果MPFは，①蛋白質であり，②非損傷筋においても軽度ながら存在しているが，③損傷筋にて著明に増加し且つ局在することから，損傷筋組織で産生されると考えられた．④20～80%硫安にて塩析され，⑤ゲル濾過により分子量67000及び2600の物質が分離された．

文　献

1）高瀬貞夫，小林和夫，ほか：実験的再生筋における筋芽細胞増殖促進因子について，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60年度研究報告書, 1986, p151.
2) Bischoff, R.: A Satellite Cell Mitogen from Crushed Adult Muscle. Dev. Biol., 115: 140-147, 1986.
3) Maltin, C.A., Harris, J.B., et al.: Regeneration of mammalian skeletal muscle following the injection of the snake venom toxin, taipoxin. Cell Tissue Res., 232: 565-577, 1983.

29）骨格筋の移殖に関する研究

寺　尾　寿　夫*

研究協力者　高　津　成　美*　加　藤　洋　司*
岡　下　恭　子*　永　井　由紀子*

〔I〕　骨格筋の神経付グラフト

我々は動物の骨格筋の移植について研究を行なってきたが，従来使用してきた動物はマウス，ラット，ハムスターが主なものであり，これらの動物の筋肉は小さく，再生も良好であった．

今回はどの程度の大きさの筋まで移植が可能であるかを検討し，またその再生に神経支配がどの様に影響するかを研究した．

方　　法

実験動物は雄のウサギ（Japan white，体重3 kg 前後）を使用した．移植する筋は EDL を用いた．ウサギの EDL の重量は2.5g 以上あり，マウスの約1.5mg，ラットの統100mg に比し遙かに大きい．

EDL の移植は orthotopical autotransplantation を行なったが，左右の下肢に異った手技を用いた．

一側下肢では従来の移植法と同じ free graft 法であり，EDL に入る血管，神経をすべて切断して EDL を摘出し，これをその部分に移植した．この際近位端は起始部近くに固定したが，遠位端は残存する腱に縫合した．また，他側の下肢には神経付 graft を作製した．これは EDL に入る血管を結紮切断した後，EDL の両端を切り離したが，神経は切断せず，そのまま保存した．ウサギの EDL にはかなり proximal の部分に深腓骨神経の枝が後方から数本入っている．これらをすべて残し，並行して走る血管のみ切断した．

移植筋は種々の時間の後取り出し，クリオスタットにて薄切標本を作り，H-E，NADH，アクリジンオレンジなどの染色を行なった．これらの標本につき free graft と神経付 graft の再生を比較した．

結　　果

図1は移植後1ヵ月の1例を示したものである．これに示す様に神経付 graft の方が通常の free

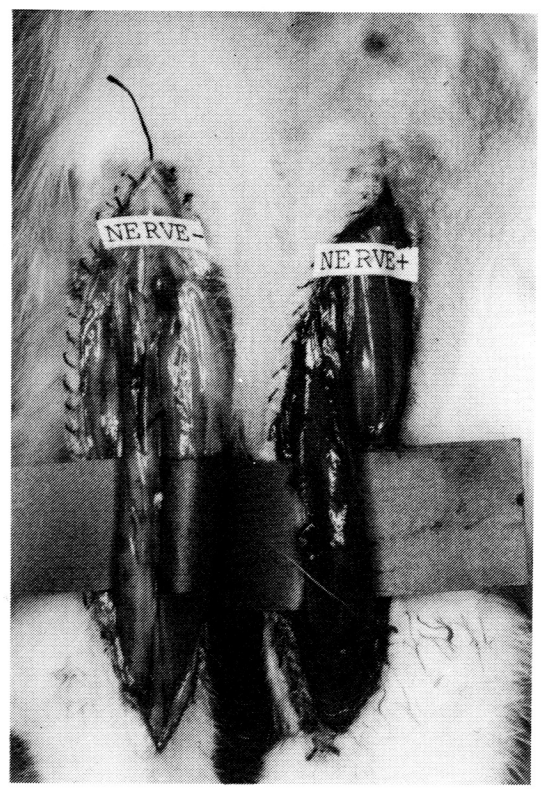


図1　移植後1ヶ月の再生筋の比較

＊帝京大学医学部第一内科

graft よりも太いものが多かった．移植後１ヶ月目の graft を取り出し，重量を測定したものが，図２である．

EDL の重量は移植前は約2.6g であるが，移植後１ヶ月目の graft では1g 前後となる．これらの重量はかなりバラツキがあるが，神経付 graft の方が重いものが多かった．組織標本でみると，free graft では，１ヶ月目には original の筋線維はほとんど消失し，すでに島状の再生が始まっている例が多いのに対し，神経付 graft では図３が示す様に，中央にまだ orjginal の筋線維が多数残存しているものが多かった．そして新しい筋線維の再生はこの残存する筋線維帯の外側に起こっていた．

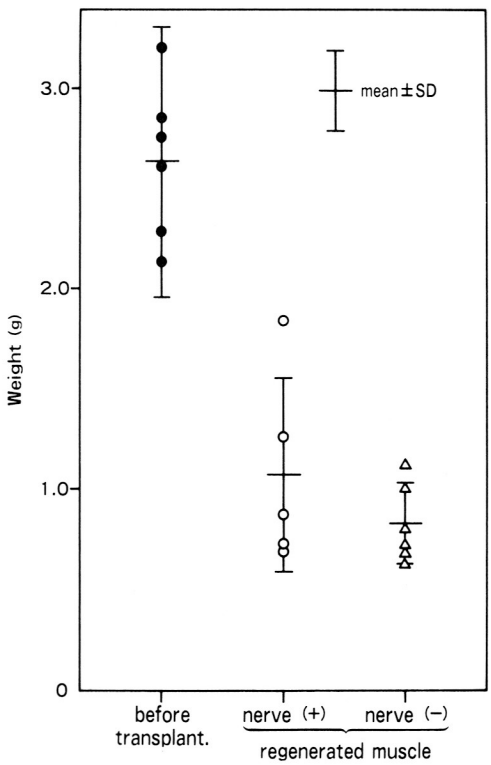


図２　Weight of regenerated muscle 1 month after autotransplantation of rabbit EDL

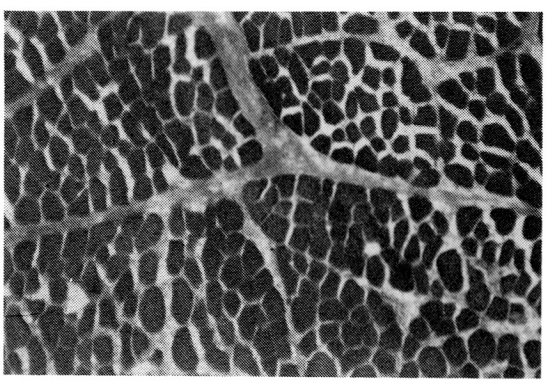


図３　神経付 graft 中心部の残存筋線維（移植後１ヶ月）

中央に残存する筋線維はすでに変性を示しており，NADH 染色では全く染色されず，アクリルオレンジでも染色性がなく，周囲の再生筋と明瞭な対比を示していた．またこの中央部には macrophage その他の細胞の増加は観察されなかった．

考　　察

移植筋が再生する場合，これに影響を及ぼす因子としては，移植初期における血流，神経の再支配，移植後の筋の物理的状態，筋そのものの性質などが挙げられる．

ウサギの EDL の自家移植後の再生がマウス，ラットなどに比し悪いのは，移植直後 diffusion により入る O_2 の供給が悪く，その後の血管の再生にも時間を要するためと思われる．

神経の再生に及ぼす影響については，さきに我々は[1] 坐骨神経切断により除神経された bed に移植した graft 内の筋線維の再生は，初期には正常と同様に起こるが，筋の成熟が起こらないことを報告した．今回の神経付 graft の結果は Maxwell[2] の報告と多少異なり，神経が残っている場合 graft 中の original の筋線維の崩壊の遅れることを示している．この遅れがその後の再生に及ぼす影響につき検討中である．

〔II〕　除神経筋中のアミノ酸の変化

骨格筋は独特のアミノ酸パターンを有している．我々は骨格筋中の遊離アミノ酸を測定しており，昨年は実験的ミオパチーや種々の動物のジストロフィー筋中のアミノ酸量の変化を報告した[3]．

今回は１）移植後８週までの再生筋中のアミノ

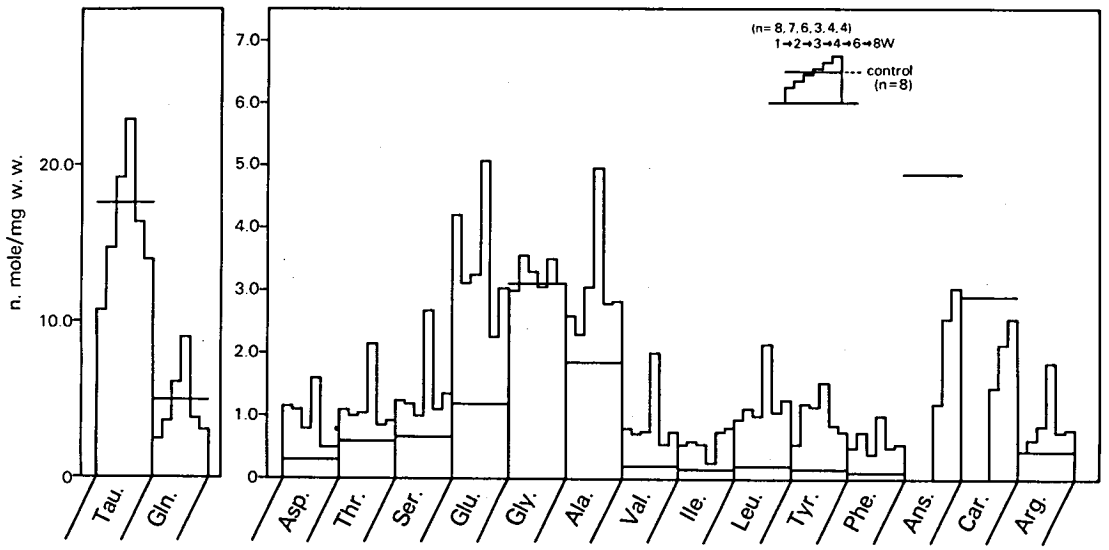


図4　Amino acid concentration in regenerated muscle after autotransplantation (rat EDL)

酸の変化と2）除神経による萎縮筋中のアミノ酸濃度の変化をmdxマウスで測定し，コントロールのそれと比較した．

方　　法

移植後の再生筋中のアミノ酸の測定には，ラット（生後2ヶ月，雄）のEDLを自家移植し，その再生筋中のアミノ酸の濃度を経時的に調べた．定量は過塩素酸で除蛋白後，日立のアミノ酸自動分析機で測定した．

除神経後のアミノ酸の変化には生後1.5～2ヶ月の雄のmdxマウスとC57BL/10SCを用い，坐骨神経切断後2週目の下肢筋のアミノ酸の変化を測定し，両者を比較した．

結　　果

1）再生筋中のアミノ酸の変化

図4はラットのEDLを自家移植後，その再生筋中の遊離アミノ酸の変化を移植後8週まで追ったものである．これに示す様に大部分のアミノ酸は移植後4週までは上昇し，それ以後は下降を示した．例外はcarnosineとanserineであり，これらは移植直後は極めて低く，その後は上昇を示すが，8週を経ても移植前の値には達しなかった．

2）除神経筋中アミノ酸の変化

C57BLの坐骨神経切断後2週目の下肢の筋肉中のアミノ酸の変化をN.C.P・当りで見ると除神経後には，carnosineを除く各アミノ酸は上昇を示したが，carnosineのみ逆に減少した．

我々はマウスの他にラットでも同様な測定を行なったが，この場合も同じ変化が認められた．

この様な除神経後の変化が，筋ジストロフィー動物では正常対照と如何に異なるかを見るためmdxマウスについて除神経を行い，C57BLと比較した．

図5は，各アミノ酸毎に，mdxマウスとC57BLの除神経後の変化を，その前後の比で示したものである．これに見る如く，大多数のアミノ酸でこの比（除神経後／除神経前）は1以上であり，除神経後各アミノ酸は増加することを示しているが，serine, glycine, alanine, anserine, arginineなどmdxの方がC57BLよりも増加が著しいものがみられた．

考　　察

移植後の再生筋中のアミノ酸の濃度は移植後4

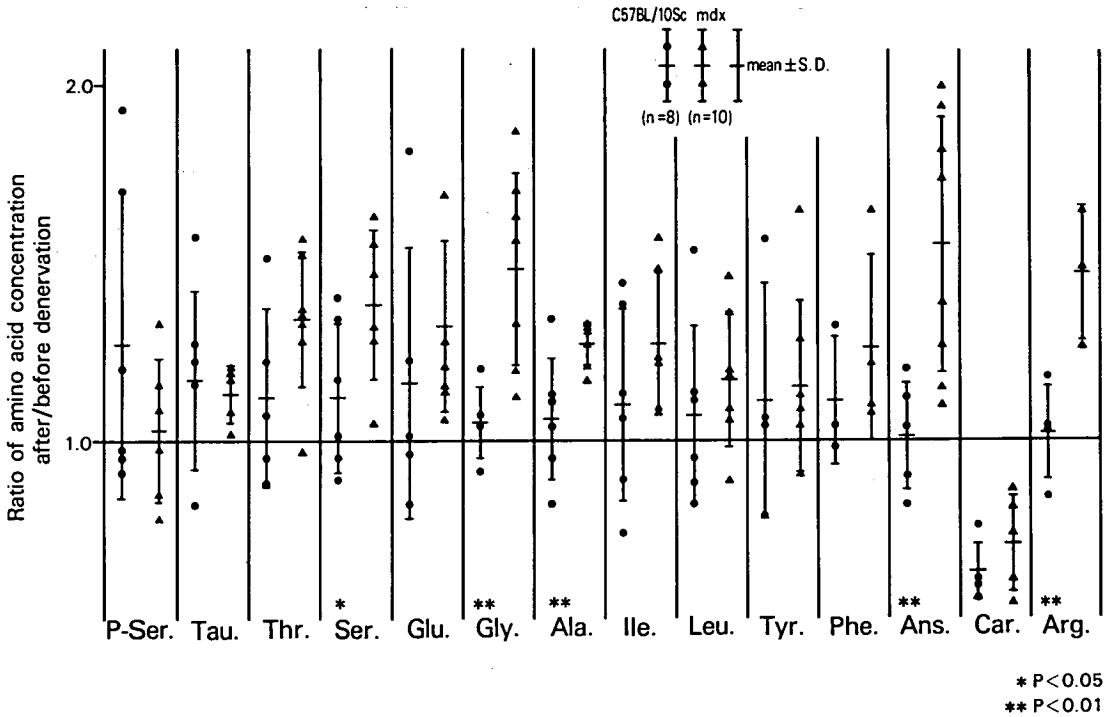


図5　Change of free amino acid concentration in denervated muscle (after/before)

週をピークとして，それ以後は減少した．carnosine と anserine は例外で，はじめ低いがその後は8週でも増加を続けた．

これと似たことは発育期の筋でもみられる．

先回報告した如く[2]，幼若な C57BL マウスの骨格筋では大部分のアミノ酸は生下時に高値を示すが週齢と共に減少する．しかし carnosine, anserine, taurine は最初は低いが，生後8週でもなお増加を続けていた．

以上のアミノ酸の変化は再生筋，発育筋に共通の部分が認められた．また anserine, carnosine は筋の神経支配や筋の運動機能と関係が深いとされている[4)5)]．

除神経後のアミノ酸の変化については，除神経により起るアミノ酸の筋への取りこみの増加，筋の代謝の変化，K 濃度との関係など多くの要因が考えられる．昨年の報告では各種筋ジストロフィー動物や実験的ミオパチーの際の筋中アミノ酸の変化を示したが，これらのミオパチー筋では，taurine, glutamic acid, glutamine は上昇することが多いのに対し，glycine を始め，多くのアミノ酸は減少していた．これらの特徴は上述の除神経筋のアミノ酸変化とは著しく異っていた．ジストロフィーマウスでは除神経後のアミノ酸の上昇がとくに多いアミノ酸があり，その意味は明らかでないが興味ある点と思われた．

結　　語

1）ウサギ EDL の移植後の再生は，マウス，ラット，ハムスターに比し不良であった．

2）神経付 graft の移植では，通常の free graft の移植に比し，graft 中心部の筋線維の変性が遅れ，残存するものが多かった．

3）移植筋中の各種アミノ酸濃度は大部分が移植後1ヶ月でピークに達し，その後は下降した．しかし carnosine と anserine は2ヶ月でも上昇を続けた．

4）除神経により筋中アミノ酸濃度は上昇した．mdx マウスではコントロールより上昇するものが多く，とくに serine, glycine, alanine, anserine,

arginineは有意の上昇を示した．carnosineは逆に減少した．

文　献

1）寺尾寿夫，増野和子，大沢仲昭：筋再生に及ぼす神経支配の影響，筋の発生と分化に関する基礎的研究，厚生省班会議江橋班，昭和56年度研究報告書，昭和57年，p. 33.

2）Maxwell, L.C.: Muscle fiber regeneration in nerve-intact and free skeletal muscle autografts in cats, Am. J. Physiol., C96, 1984.

3）寺尾寿夫，高津成美，平口峰子，加藤洋司，永井由紀子：ジストロフィー筋の再生と種々の萎縮筋中の遊離アミノ酸の変動，筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究，厚生省班会議杉田班，昭和60年度研究報告書，昭和61年，p. 162.

4）Tamaki, N., Nakamura, M., Harada, M. et al: Anserine and carnosine contents in muscular tissue of rat and rabbit, J. Nutr. Sci. Vitaminol., 23: 319, 1977.

5）Thomsen, W. and Marshall, F.D.: Effects of neuromuscular blockers on carnosine levels in rat skeletal muscle, Experimentia 41; 374, 1985.

30）神経筋シナプスにおけるATPの修飾について

高　守　正　治*

研究協力者　　橋　井　美奈子*

目　　的

一般にコリン作動性シナプスやアドレナリン作動性シナプスでは，類を他に求めればセロトニン作動ニウロンにおける5 HTとsubstance Pの同時放出のように，アセチルコリンやノルアドレナリンの放出に際してATPが同時に放出され[1]，1神経に1トランスミッターとする〝Daleの原則〟の再考を促す事実があり，また，このATPまたはその分解産物がneurotransmitterの役目を担っているか，neuromodulatorの役割を演ずるかも問題がある。ミオパチーの病因，病態論の観点からこれをとりあげれば，neurotrophic factorの修飾が考えられ，アセチルコリンがこのfactorの一つとしても重要視されていることを考えるとき，そのco-transmitter或いはmodulatorとしてプリン関連物質の役割も重要と思われる．1972年Ginsborg & Hirst[2]は哺乳動物骨格筋についてこの点に初めて注目し，以来いくつかの報告があり[3)~5)]，主にアデノシンによる神経終末からのアセチルコリン遊離抑制が証明されている．しかし，これらの報告では指標としての終板電位EPPの記録のためにクラーレ添加または高Mg液で神経終末機能を薬理的に修飾した状況下でデータがとられているきらいがある．クラーレはアセチルコリン自体による神経終末側受容体を介した作用で遊離制御機構を修飾するし[6]，高Mgはプリン関連物質の作用部位が"Mg site"であるかどうかを論ずるとき問題を不明確にする．本研究では，標本に人工的脱分極をかけて薬剤の修飾なくアセチルコリン遊離を評価できる方法を採った．

*金沢大学医学部神経内科

方　　法

ACh量子性遊離量（quantum content）は，ラット横隔膜神経筋標本をvoltage clampによって活動電位を終板電位EPPレベルまで低下せしめ（図1），1 Hz反復誘発EPPs（60～109th）を指標として$(\overline{EPP}/SD_{EPP})^2$から算出した．データは①EPPの立ち上りまでの時間1.1msec以下，②立ち上りはsharp negative，③二重刺激によるEPP確認，④non-linear summation補正，静止膜電位補正の計算に採用した平衡電位は－12mV，標準静止膜電位は－45mV，⑤測定はclamp操作45分以降，膜電位安定下で施行，などの条件[6]で算出した．しかし，これから得た数値は28を越すとPoisson分布の仮定に沿わなくなるので，あらかじめ正常ラット4匹の横隔膜標本から直接法$(\overline{EPP}/\overline{MEPP})$で得た数値と上述の方法で得た数値とで作製したグラフ（図2）に照合して，直接法による値として表現した．ACh自発性遊離は通常の細胞内電極法で記録する自発性微小終板電位MEPP放電頻度で表現した．

標本を潅流するプリン関連物質として，N^6-methyladenosine（0.25mM），2′-deoxyadenosine（0.2mM）を用い，潅流30～90分の間に電気生理学的指標の記録を行った．

結　　果

ACh量子性遊離量（EPP，quantum content at 1 Hz）はコントロール（正常リンゲル液潅流）64±14（n＝40）に対してN^6-methyladenosine処理で36±16（n＝15）と低下（P＜0.01），一方2′-deoxyadenosine処理ではむしろ86±20（n＝14）と増加した（P＜0.01）（図1，表）．また，自発性微小終板電位MEPP放電頻度は，コントロール

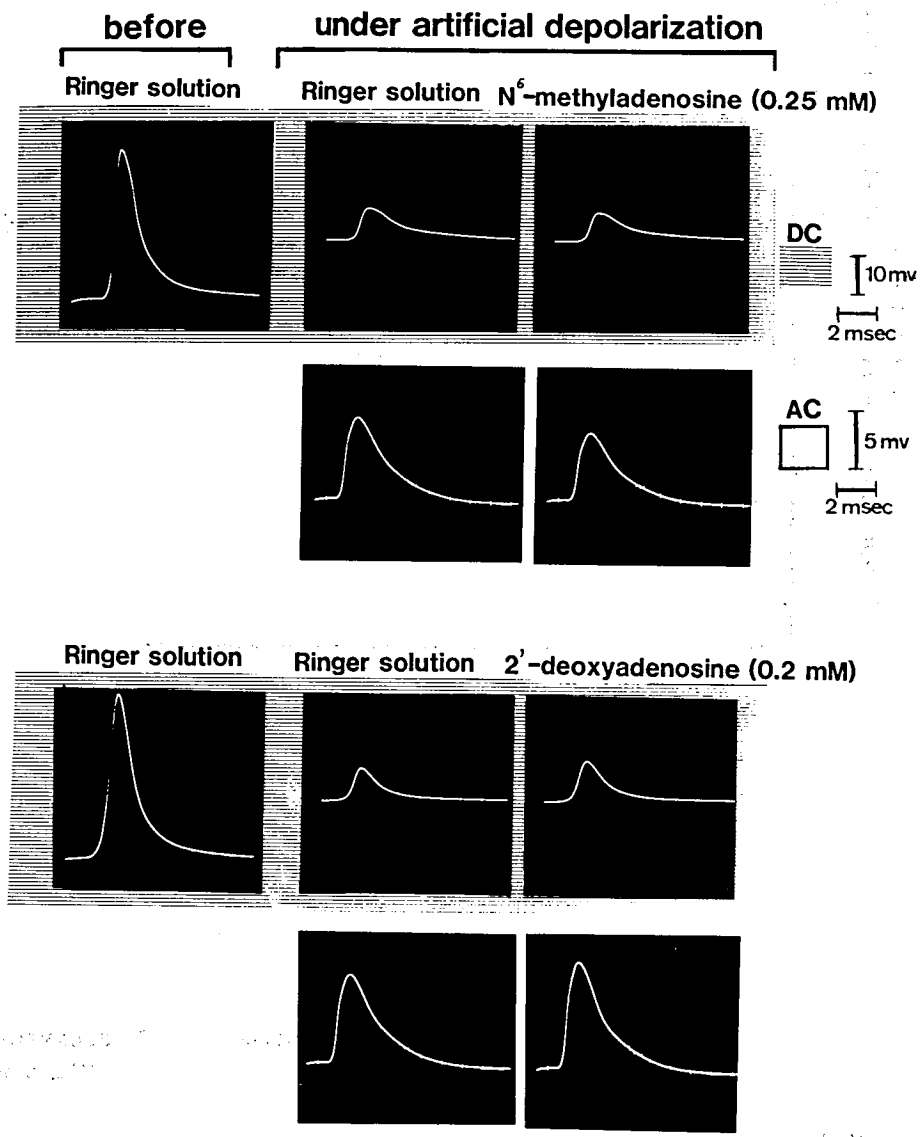


図1　ラット横隔膜神経筋標本で，voltage clamp により活動電位を終板電位 EPP レベルまで低下せしめ，得られる EPPs(1 Hz) を AC 記録，variance 法で ACh quantum content を算出．標本の Ringer 液潅流中（上，下）にコントロール値を得，つゞいて N^6-methyladenosine (0.25mM) 潅流中（上），および2'-deoxyadenosine (0.2 mM) 潅流中（下）の誘発 EPPs の AC 記録を計算に供した．

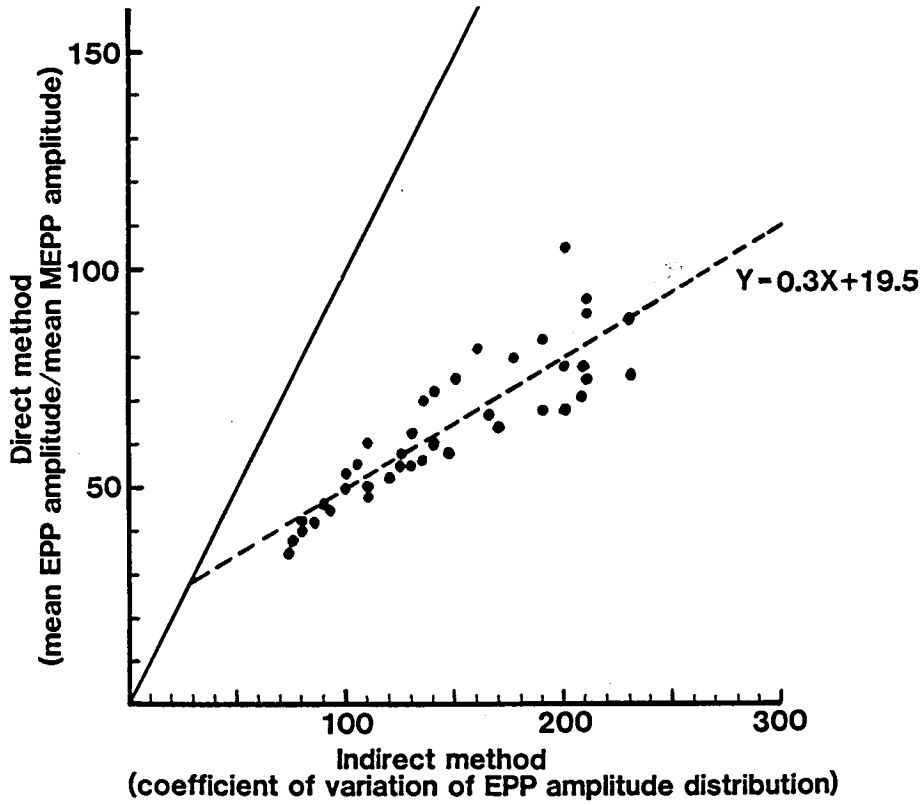


図2　アセチルコリン量子性遊離量（quantum content）の直接法（$\overline{EPP}/\overline{MEPP}$）（縦軸）と，variance 法（$\overline{EPP}/SD_{EPP})^2$（横軸）による値の関係．実線は直接法と variance 法の値が同一の場合を想定して引かれたもの，破線は4匹の正常ラット横隔膜筋から40運動終板について直接，variance 両法で測定した quantum content をもとに引いた回帰分析回線（correlation coefficient：0.88）．variance 法による quantum content は28を越すと Poisson 分布から偏位する．

表1

	Control (Ringer solution)	N^6-methyladenosine (0.25 mM)	2'-deoxyadenosine (0.2 mM)
EPP, ACh quantum content at 1 Hz	64 ± 16	36 ± 16	86 ± 20
EPP amplitude (mv)	8.5 ± 1.6 (n:40)	5.4 ± 1.2 (n:12)	8.7 ± 1.8 (n:14)
MEPP frequency (per second)	4.3 ± 1.7	1.8 ± 0.7	14.3 ± 2.7
Resting membrane potential (mv)	75 ± 3.7 (n:30)	75 ± 2.6 (n:15)	75 ± 4.7 (n:15)

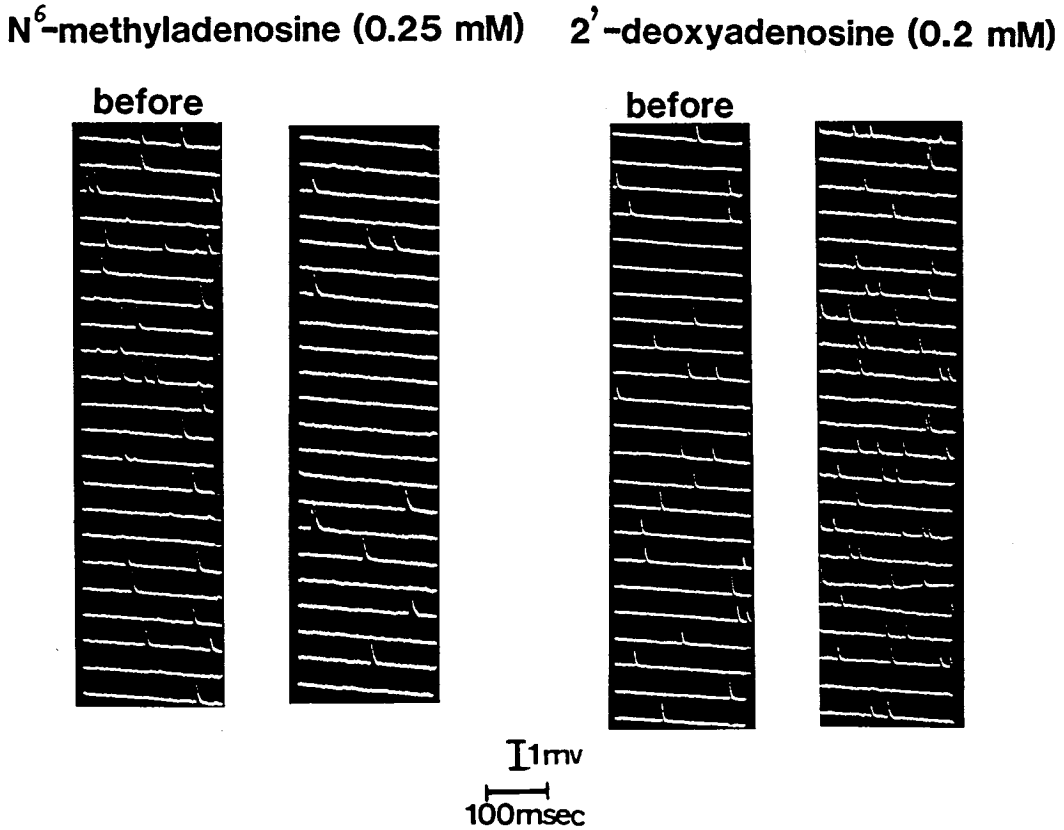


図3　ラット横隔膜標本をRinger液（before）およびN⁶-methyladenosine（左），2′-deoxyadenosine（右）で灌流中に，細胞内電極で記録した自発性微小終板電位MEPP.

4.3±1.7/秒（n=30）に対してN⁶-methyladenosine処理で1.8±0.7/秒（n=15）と低下（P<0.01），2′-deoxyadenosine処理で14.3±2.7/秒（n=15）と増大した（P<0.01）（図3，表）.

考按・結語

本研究では，プリン受容体の特性からアゴニストの選択を行い，2つの薬剤を選んだ．その1つは，Burnstock[7]の分類によるアデノシン感受性P_1受容体（cyclic AMP関連，methylxanthinesで抑制；一方P_2受容体は主に消化管に局在してATP感受性，キニジンで抑制を受けプロスタグランジン産生に関与）に属し，Londosら[8)9)]の定義によるR siteすなわちその活性化にはintact ribose moietyを必要とし，xanthinesでブロックされ細胞外面に局在，adenylate cyclase活性を修飾する部位のアゴニストであるN⁶-methyladenosine[8)]である．他の一つは，同じくアデノシン反応部位であるがLondosら[8)9)]の定義による細胞内局在のP siteのアゴニストである2′-deoxyadenosine[8)]である．

AChのevoked releaseの指標であるACh量子性遊離量（quantum content），spontaneous releaseの指標であるMEPP放電頻度とも，extracellular R site agonist処理で低下し，intracellular P site agonist処理で増大をみた．すなわち，骨格筋神経筋シナプスでは，AChとともに遊離をされたATP[10)]は，直ちに分解されて生ずるアデノシンによって，2種の異る受容器を

介して，ACh 遊離を一方で抑制し他方で促進，コリン作動性シナプスの前シナプス機能を修飾することが示唆された．抑制系に関しては，神経筋シナプスでは中枢神経シナプスの場合と異り必ずしも adenylate cyclase-cyclicAMP 系の関与を受けず，従って R site は A_1/A_2 system の概念[11]の外への位置付けが示唆され[12]，A_3 adenosine receptor とも假称される[13]．おそらく，基底膜外表面の Ca^{++} entry に関わる site，または膜内面の ACh 遊離への Ca^{++}効果に関わる site に link していると思われる[13]．しかし，R site の刺激は cyclic AMP 合成には直結しなくても，adenylate cyclase の regulatory subunit の comformational change により Ca^{++}-binding protein の Ca^{++} affinity を変えることもあり得よう．MEPP 放電頻度を指標とする ACh の spontaneous release との関係では，この指標は静止時の細胞内 Ca^{++}に関わるものであるから，アデノシン反応部位の刺激による ACh 遊離抑制（放電頻度低下）は，上述の Ca^{++} entry とは関係のないところがその舞台となっている可能性が示唆されよう．

いずれにしても，コリン作動性神経終末に ACh と共存する ATP は，遊離後その分解産物によって ACh 遊離に関与し，neurotrophic factor としての ACh の役割にも修飾を加える可能性を示唆する証左を得た．postsynaptic の ACh 受容体感受性も ATP により修飾を受ける事実[14]も併せ，骨格筋病態の解釈の中に，neurotrophic influence の機序が勘案されるときは，このプリン関連物質の関与も考慮に入れるべきであろう．

文　献

1) Burnstock, G.: Neurotransmitters and tropic factors in the autonomic nervous system. J. Physiol., 313: 1-35, 1981.

2) Ginsborg, B.L., Hirst, G.D.S.: The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. J. Physiol., 224: 629-645, 1972.

3) Ribeiro, J.A., Walker, J.: The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on transmission at the rat and frog neuromuscular junctions. Br.J. Pharmac., 54: 213-218, 1975.

4) Ribeiro, J.A., Dominguez, M.L.: Mechanisms of depression of neuromuscular transmission by ATP and adenosine. J. Physiol. Paris, 74: 491-496, 1978.

5) Buckle, P.J., Spence, I.: The actions of adenosine and some analogues on evoked and potassium stimulated release at skeletal and autonomic neuromuscular junctions. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac., 319: 130-135, 1982.

6) Takamori, M., Sakato, S., Okumura, S.: Presynaptic function modified by acetylcholine-receptor interaction in experimental autoimmune myasthenia gravis. J. Neurol. Sci., 66: 245-253, 1984.

7) Burnstock, G.: Purinergic receptors. ed. by Burnstock, G. In: Receptors and Recognition, Series B, vol. 12, Chapman & Hall, London/New York, 1981.

8) Londos, C., Wolff, J.: Two distinct adenosine sensitive sites on adenylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5482-5486, 1977.

9) Silinsky, E.M.: Evidence for specific adenosine receptors at cholinergic nerve endings. Br. J. Pharmac., 71: 191-194, 1980.

10) Silinsky, E.M., Hubbard, J.I.: Release of ATP from rat motor nerve terminals. Nature, 243: 404-405, 1973.

11) Van Calber, D., Müller, M., Hamprecht, B.: Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. J.Neurochem., 33: 999-1005, 1979.

12) Ribeiro, J.A., Sebastião, A.M.: On the type of receptor involved in the inhibitory action of adenosine at the neuromuscular junction. Br.J. Pharmac., 84: 911-918, 1985.

13) Ribeiro, J.A., Sebastião, A.M.: Adenosine

receptors and calcium: Basis for proposing a third (A_3) adenosine receptor. Progr. Neurobiol., 26 : 179-209, 1986.

14) Akasu, T., Hirai, K., Koketsu, K. : Increase of acetylcholine - receptor sensitivity by adenosine triphosphate: A novel action of ATP on ACh-sensitivity. Br.J. Pharmac., 74: 505-507, 1981.

31) 筋細胞内アルカリ化による筋拘縮の発生

高 木 昭 夫*

研究協力者　小 島　進*　相 沢 仁 志*
小宮山 伸 之*　荒 木　誠**

筋拘縮とは活動電位の先行なしに出現する筋張力発生である．McArdle 病や垂井病の阻血運動負荷により発生する筋拘縮の病態は従来より注目されたが，まだ未解決である．

McArdle 病では阻血運動負荷により，細胞内 pH が若干上昇することが知られる[1]．このアルカリ化が筋拘縮誘因となりうることを証明するため，in vitro でアルカリ化の収縮系や筋小胞体におよぼす影響を分析した．また Duchenne 型筋ジストロフィーにおいて類似の病態が存在するかどうかについて若干の検討を行った．

方　法

材料としてはラット長趾伸筋，ひらめ筋あるいはヒト生検筋を使用した．スキンドファイバーの作製や実験法は既報のとうりである[2]．収縮系に対する pH の影響は，pH6.8，pH7.0，pH7.2で Ca^{2+}濃度・張力曲線を作製して比較した．pH6.8，3×10^{-5} M Ca^{2+}により発生する張力（Po）を1.00として，その他の條件下の張力は相対張力（P/Po）として表現した．筋小胞体による Ca 摂取はスキンドファイバーを使用して測定した．筋小胞体に Ca^{2+}を負荷した後，30mM カフェインにより拘縮を誘発した．その頂点張力の大きさを Po と比較して Ca 摂取指数とした．Ca 負荷の條件は各種 pH の3×10^{-7} M Ca^{2+}または10^{-6} M Ca^{2+} を含む溶液中に 2 分間接触させた．Ca 誘発性 Ca 遊離（Ca-induced Ca release，CICR）は ATP と Mg^{2+} 濃度をともに 0 とした溶液中で分析した．筋小胞体に 3×10^{-7} M Ca^{2+}を含む溶液中で 2 分間 Ca^{2+} を負荷後，各種 pH の 3×10^{-7} M Ca^{2+}あるいは10^{-5} M Ca^{2+} の溶液により Ca 遊離を誘発させた．小胞体に残存する Ca^{2+} 量から Ca 遊離速度を計算した．1 分間に小胞体中の Ca 量が全量遊離される速度を1.0とした．実験に使用した薬剤と溶液組成は既述の通りである[2]．Ca EGTA のみかけの結合定数（Kapp）は各々 5×10^{5}（pH6.8）1.3×10^{6}（pH7.0），3.2×10^{6}（pH7.2）とした[3]．

結　果

(1) pH の収縮系への影響

ラットタイプ 2 筋線維では pH の上昇とともに収縮系の Ca 感受性が増加し，pCa-張力曲線は左方に移動した（図 1）．過量の Ca^{2+} による最大張力は pH6.8に比較して，pH7.0と pH7.2では約110%に増加した．最大張力は pH7.0と pH7.2の間では差はなかった．pCa6.5と pCa6.0の溶液中では，pH7,2の方が pH7.0より大きな張力を発生した．ヒトタイプ 2 筋線維において上記のラットと同一傾向の結果を得た．しかし pH の影響はヒトでより著明であった（図 2）．少数例の観察であったが，Ca^{2+} 濃度全域において pH7.2は pH7.0より大きな張力を発生した．pH7.2中の最大張力は pH7.0より約10%大きかった．ラットおよびヒトのタイプ 1 筋線維において，pH の収縮系におよぼす影響はタイプ 2 の場合と同様であった．

(2) 筋小胞体機能への pH の影響

pH の影響はラットタイプ 2 筋線維について検討した．3×10^{-7} M Ca^{2+} を含む溶液中の Ca 摂取指数は平均0.75（pH6.80），0.78（pH7.0），

＊虎ノ門病院神経内科
＊＊国立神経研究所

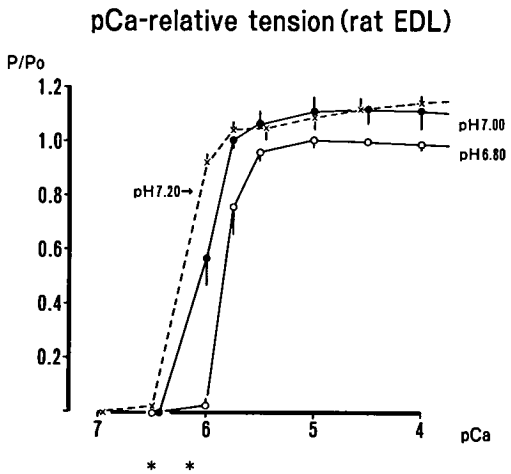


図1　pH6.80, pH7.00および pH7.20の溶液中における収縮系の Ca イオンによる活性化.
ラット長肢伸筋（タイプ2線維）スキンドファイバーで測定した．横軸は遊離 Ca 濃度（pCa＝－log [Ca^{2+}]），縦軸は相対張力（P/Po），pH6.80, 3×10^{-5} M Ca^{2+} を含む溶液中の張力（Po）を1.0とした．平均±S.D.（各々の pH に関して n＝4）.
＊ pH7.00と pH7.20間の比較にて，有意差（P<0.01）を認めた.

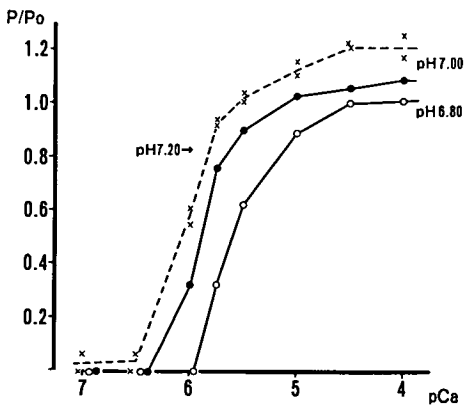


図2　ヒトタイプ2筋線維で図1と同様の測定を行った．pH6.80は n＝5 の平均値，pH7.00(n＝1)，pH7.20(n＝2)を図示した．pH7.20では pH7.00に比して，Ca^{2+} の全濃度域でより大きな張力を呈した.

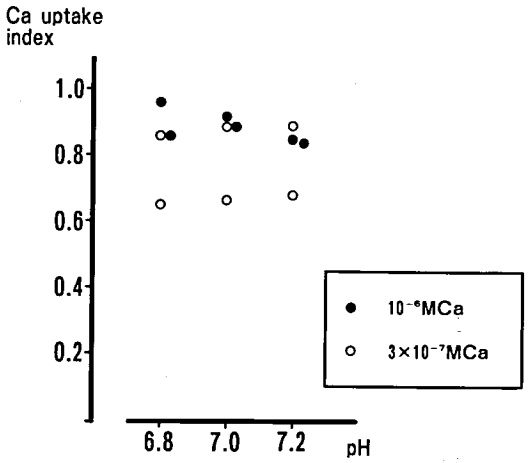


図3　pH6.80, pH7.00あるいは pH7.20の溶液における筋小胞体の Ca 摂取．Ca 摂取にはスキンドファイバー（ラット長趾伸筋）を使用した．10^{-6} M あるいは 3×10^{-7} M Ca^{2+} を含む各種 pH の溶液中で2分間筋小胞体に Ca^{2+} 負荷を行った後，カフェイン拘縮を誘発し，その頂点張力をその筋線維の最大張力（Po）と比較して，Ca uptake index を計算した．各々の pH の間において Ca uptake index に差はないと判断された.

0.78 (pH7.2) と差をみとめない（図3）．10^{-6} M Ca^{2+} の溶液中では0.91（pH6.8），0.90 (pH7.0)，0.85 (pH7.2) であり，著明な差はみとめられない．Ca 摂取の時間経過に関して pH の影響はみとめられなかった.

Ca 誘発性 Ca 遊離(CICR)は pH7.2溶液中で著明に増加した(図4)．Ca 遊離の誘発には，pCa6.5 と pCa5.0の2種の溶液を使用した．pCa5.0溶液中の Ca 遊離は pH7.20では pH7.0の1.6倍に増加した.

ラット骨格筋から分離小胞体を使用して，CaATPase を測定すると，0.118μmole/mg/min (pH7.0)から0.210(pH7.2)に増加した．pH7.20では CICR 亢進のため，Ca 摂取・遊離のサイクルが促進するためと推定した.

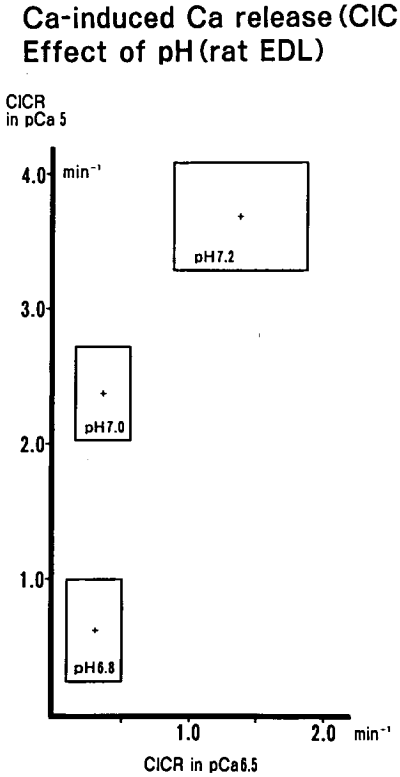


図4　pH6.80, pH7.00および pH7.20溶液中における Ca 誘発性 Ca 遊離(CICR)の比較．ラット長趾伸筋スキンドファイバーを使用した．横軸：3×10^{-7} M Ca^{2+} (pCa6.5) による Ca 遊離速度，縦軸：10^{-5} M Ca^{2+} (pCa 5) による Ca 遊離速度．平均値±S．D(n＝4)を呈示した．pH7.20中で Ca 遊離速度が著増した．

考　　案

筋拘縮が臨床的に問題となる疾病は多くはない．有名なのは McArdle 病や垂井病において阻血運動負荷による有痛性筋拘縮である．この筋拘縮の出現機序に関して１－２の仮説が検討されてきた．Rowland らは阻血運動負荷の前後で筋肉中の ATP, creatine phosphate, 無機燐，creatine 濃度を比較した．拘縮筋において，creatine phosphate は低下したが，ATP 濃度は不変であった[4]．筋拘縮に筋小胞体の関与が仮定され，Ca 摂取能が比較された[5]．筋拘縮出現の前後において Ca 摂取能に変化はみられなかった．

近年 P^{31}-NMR が代謝性ミオパチーに応用されるようになり，細胞内 pH や ATP 濃度の動態が明らかになりつつある．Ross らの報告によると，対照者では阻血運動により pH7.04 (安静時) から pH6.43へ低下した．これに反し McArdle 病では pH7.09 (安静時) から pH7.23へとアルカリ化を呈した[1]．また McArdle 病で inorganic P の増加と creatine phosphate の減少は対照に比して著明であったが，ATP 濃度の変化はなかった．Edwards らは垂井病の一例につき類似の結果を報告した[6]．McArdle 病における阻血運動によるアルカリ化の理由として，乳酸産生がない．creatine－P＋ADP＋H^+→ creatine＋ATP の系が促進し，H^+ が消費される．AMP deamination が亢進し，NH_3 の過剰生成などが考慮されている．phosphorylase kinase 欠損マウスの骨格筋は電気刺激によりアルカリ化したが，これも AMP deamination による NH_3 過剰のためと推定された[7]．

細胞内 pH の収縮力に与える影響は主として心筋で問題とされた[8]．あるいは骨格筋疲労と関連して検討された[9)16]．Nakamaru と Schwartz は犬骨格筋小胞体を pH6.46と pH7.56の溶液中で検討し，酸性域では Ca 結合が増加し，アルカリ域では Ca 遊離が増加するとした[10]．
Fabiato と Fabiato はカエル骨格筋とラット心筋で pH の影響を分析した[11]．pH6.60や pH6.20の中では収縮力は減少し，この効果は心筋でより著明であった[11]．Hultman はヒトに NH_4Cl を負荷し，酸性化の影響を in vivo で検討した[12]．NH_4cl 投与により収縮後の pH 低下がより著明となり，張力絶対値も低下した．本報告では安静時 pH7.0 から運動負荷により pH7.2へ上昇した時でも収縮系と筋小胞体機能が重大な影響を受ける事を明らかにした．pH7.2になるに伴い，収縮系は Ca 感受性が増加し，最大張力が増加する．筋小胞体 Ca 摂取能は変化しない．しかし Ca 誘発性 Ca 遊離 (CICR) は著増した．ただ CICR は生理的な興奮

収縮連関には関与しないとされている[13]．筋拘縮という病的過程への関与は充分推定されるがまだ証明はできていない．このように細胞内 pH が7.2と少しアルカリ化しただけでも，筋の持続的収縮，筋拘縮が生じやすくなると推定している．

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の患児にはしばしば有痛性の〝筋硬直〟がみられる．これが筋拘縮か否かはまだ明らかではない．ちなみに DMD 筋細胞 pH が１～２の論文で言及された．Edwards は静止時の筋 pH は DMD で7.26であり，対照より高値であるとした[6]．Newman らは６例の DMD では pH7.19±0.07であり，対照 pH7.04±0.05より高値であった[14]．Griffiths らは DMD で pH7.05±0.005（n＝５），対照 pH7.07±0.010（n=53）と差をみとめなかった[15]．このように DMD の細胞内 pH のアルカリ化の有無はまだ結着をみていない．アルカリ化→筋過収縮→筋破壊の図式が成立するかどうかは今後検討したい．

ま と め

１～２の代謝性ミオパチーでは阻血運動負荷により筋拘縮が発生する．この際筋細胞内 pH は対照とは逆にアルカリ化することが判明している．細胞内 pH は筋収縮系や小胞体機能に大きな影響を与える．筋 pH が7.0から7.2に増加すると，収縮系の Ca 感受性は増加し，最大張力も増大した．筋小胞体の Ca 誘発 Ca 遊離が著増した．このように細胞内の軽度アルカリ化が筋拘縮の原因となりうることを指摘した．

文　　献

1）Ross BD, Radda GK, Gadian DG et al: Examination of a case of suspected McArdle's syndrome by ^{31} Pnuclear magnetic resonance. New Eng J Med 304: 1338-1342, 1981.

2）Takagi A, Yonemoto K, Sugita H: Single-skinned human muscle fibers. Neurology 28: 497-499, 1978.

3）Harafuji H, Ogawa Y: Re-examination of the apparent binding constant of EGTA with calcium around neutral pH. J Biochem 87: 1305-1312, 1980.

4）Rowland LP, Araki S, Carmel P: Contracture in McArdle's disease. Arch Neurol 13: 541-544, 1965.

5）Scarpa A, DiMauro S, Bonilla E et al: Studies of fragmented sarcoplasmic reticulum from human skeletal muscle, Ann Neurol 3: 194-201, 1978.

6）Edwards RHT, Dawson MJ, Wilkie DR et al: Clinical use of nuclear magnetic resonance in the investigation of myopathy. Lancet 1: 725-730, 1982.

7）Lutaya G, Rahim ZHA, Shuttlewood RJ et al: Alkalinization of phosphorylase kinase-deficient muscle during tetanic contraction. Bioscience Rep 1: 177-182, 1981.

8）Poole-Wilson PA: Measurement of myocardial intracellular pH in pathological states. J Mol Cell Cardiol 10: 511-526, 1978.

9）Sahlin K: Intracellular pH and energy metabolism in skeletal muscle of man, Acta Physiol Scand Suppl 455: 1-56, 1978.

10) Nakamaru Y, Schwartz A: The influence of hydrogen ion concentration on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J Gen Physiol 59: 22～32, 1972.

11) Fabiato A, Fabiato F: Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. J Physiol 276: 233-255, 1978.

12) Hultman E, Del Canale S, Sjöholm H: Effect of induced metabolic acidosis on intracellular pH, buffer capacity and contraction force of human skeletal muscle, Clin Sci 69: 505-510, 1985.

13) Endo M: Calcium release from the sarcoplasmic reticulum, Physiol Rev 57: 71-108, 1977.

14) Newman RJ, Bore PJ, Chan L et al: Nuclear

magnetic resonance studies of forearm muscle in Duchenne dystrophy. Brit Med J 284 : 1072 -1074, 1982.

15) Griffiths RD, Cady EB, Edwards RHT et al : Muscle energy metabolism in Duchenne dystrophy studied by ^{31}P-NMR : Muscle Nerve 8 : 760-767, 1985.

16) Roos A, Boron W : Intracellular pH. Physiol Rev 61 : 297-434, 1981

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

納　光弘*

研究協力者　中川正法*　樋口逸郎*　山野　隆*
上永吉達彦*　福永秀敏**

目　的

筋緊張性ジストロフィー（MyD）の原因は今だ明らかではないが，最近，われわれはMyDの生検筋に比較的高率にragged-red fibers（RRF）を認め，本症とミトコンドリア異常との関連を疑い，MyDにおけるミトコンドリア異常の有無を明らかにするために，臨床的，筋組織化学的および生化学的検討を行った．

対象および方法

対象は，MyD患者12例で男性10例，女性2例で，筋生検時の平均年齢は38才である．生検部位は，上腕二頭筋10例，大腿四頭筋1例，上腕三頭筋1例であり，女性1例では上腕二頭筋以外に下顎部腫瘍摘出時に顎二腹筋を得た．12症例中3例については，Ogasawaraら[1]の方法にて自転車エルゴメーター運動負荷試験を実施し，乳酸ピルビン酸代謝を検討した．全例について組織化学的検討を行い，RRFを認めた例については連続切片にて，Gomori-trichrome染色，cytochrome c oxidasei（CCO）染色およびCCOのsubunit IVに対するmonoclonal抗体[2]を用いた免疫染色を行い比較検討した．また，RRFを認めた例については電顕による検討も行った．11例の凍結生検筋を用いて，150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH7.5溶液にて10%ホモジネートを作製し600×gにて15分間遠心し，その上清を用いてミトコンドリア酵素活性[3]の測定を行った．2症例については，Bookelmanら[4]の方法にてミトコンドリアを分離し，酵素活性とcytochrome含量の測定を行い，また，同2症例の新鮮生検筋より，Ozawa[5]の方法にてミトコンドリアを分離し酸素電極を用いた酸化的リン酸化能の検討を行った．

結　果

表1に今回検討した12例の臨床所見を示す．全例に家族内発症，ミオトニア現象，白内障を認め，病状進行度合では症例11のみ車いすを必要とした．RRFを12例中5例（42%）に認めその出現頻度は筋線維の2－20%であり，いずれも上腕二頭筋であった．また，症例1では顎二腹筋でもRRFを認めた．特徴的な点は，RRFを認めた5例中4例に

表1　症例一覧

症例	性	年齢	家族歴	発病期間	知能障害	眼筋麻痺	眼瞼下垂	ミオトニア	白内障	握力	CK	生検部位	RRF
1	女	31	+	6	+	+	−	+	+	10	145	B 顎	+ +
2	男	52	+	40	+	+	+	+	+	2	98	B	+
3	女	46	+	10	−	+	+	+	+	2	86	B	+
4	男	28	+	10	−	+	+	+	+	6	74	B	+
5	男	43	+	5	−	−	−	+	+	7	134	B	+
6	男	22	+	8	−	−	−	+	+	17	23	B	−
7	男	37	+	17	+	−	−	+	+	7	10	B	−
8	男	32	+	6	−	−	−	+	+	8	67	T	−
9	男	42	+	?	−	−	+	+	+	7	100	B	−
10	男	36	+	26	−	+	−	+	+	7	139	B	−
11	男	52	+	40	+	+	+	+	+	0	133	B	−
12	男	38	+	26	+	−	−	+	+	6	53	Q	−
発現率(%)					42	50	42	100	100				42

B：biceps brachii
顎：顎二腹筋
T：triceps brachii
Q：quadriceps femoris

＊鹿児島大学医学部第三内科
＊＊国立療養所南九州病院

軽度から中等度の眼球運動制限を認め，眼瞼下垂も3例にありRRFを認めなかった群よりも高率であった．知能障害，握力，CK値にはRRFの有無による差は認められなかった．自転車エルゴメーター運動負荷試験は症例2，3，4にて実施し，3例中症状が最も軽度であった症例4は正常範囲内であったが，症例2，3において血中乳酸の優位な増加を示し(図1)，ピルビン酸も同様な増加を示した．筋組織化学的には光顕所見にて，筋線維の大小不同，中心核の増加，結合組織の増加等のMyDに特徴的な所見に加えて，先に述べたように典型的なRRFを12例中5例に認めた．電顕所見でも巨大化し膜様構造を示すものや異常構造物を含むミトコンドリアの集積を筋鞘膜下や筋線維間に認めた（図2）．CCO活性染色では上記のRRFは染色されず，RRFにおいてCCO活性が欠損している事が示された．しかし，抗CCO抗体を用いた免疫染色ではRRFは，monoclonal抗体に対して，ミトコンドリアの分布に一致するように強く染色された(図3)．以上の組織化学的所見はRRFを示した5症例すべてに認められた．ミトコンドリア酵素活性は，症例12を除く11例の凍結生検筋について図4に示す10酵素とcitrate synthaseの測定を行い，筋組織の変性による影響を補正する意味でミトコンドリアマトリクスに局

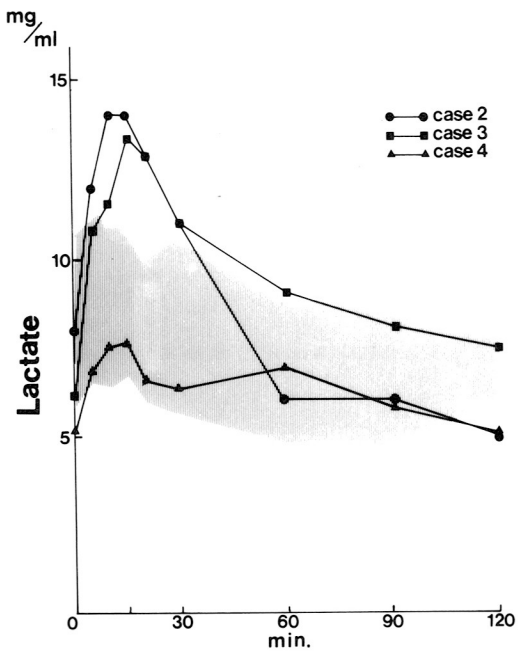


図1　自転車エルゴメーター運動負荷試験

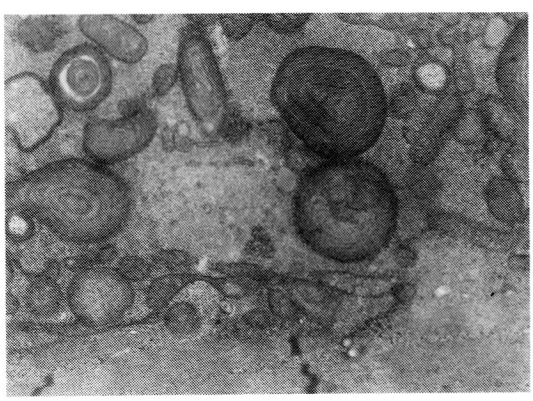


図2　電顕像（症例2）16,000倍

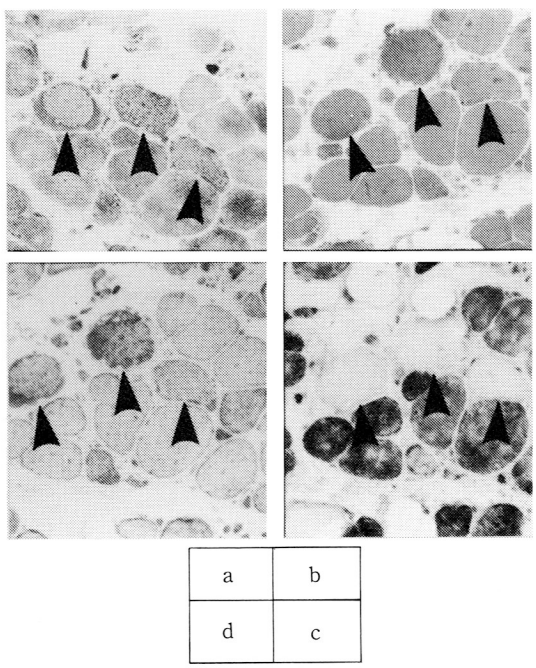


図3　CCO活性染色および抗CCO抗体を用いた免疫染色（症例2）　140倍
a：NADH-TR染色
b：Gomori-trichrome染色
c：CCO活性染色
d：抗CCO抗体を用いた免疫染色

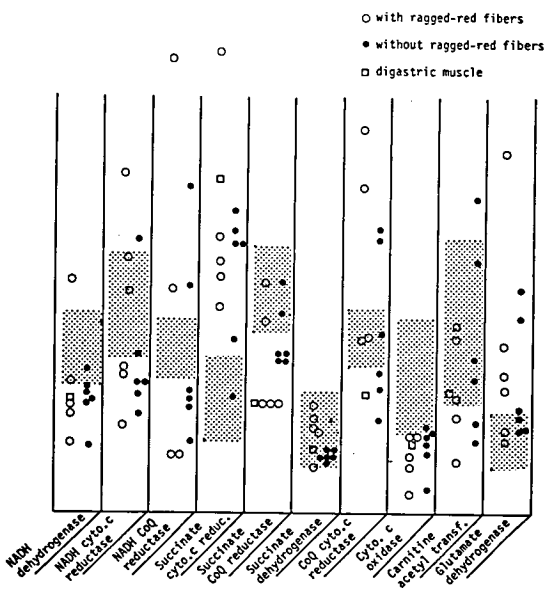


図4　Ratio of the enzyme activities compared with citrate synthase activity

在する citrate synthase 活性に対する比を求めた．CCO 活性は11例中 9 例において mean－1 S.D. 以下の低値を示し，症例 3 は対照平均値の11%（mean－2 S. D. 以下）であった．症例 1，3，5－8，10は，NADH dehydrogenase, NADH cytochrome c reductase, NADH CoQ reductase, Succinate CoQ reductase においても活性低下を示し，CCO のみならずミトコンドリア電子伝達系全体の機能低下を示した，また，活性低下の程度については，RRF の有無による差を認めなかった（図4）．症例3，4について，分離ミトコンドリアによる酵素活性と cytochrome 含量の測定を行った．症例3はいずれの酵素活性も低値を示したが，CCO 活性は対照平均値の23%に低下しており，症例4は CCO 活性のみが対照下限よりも低下していた．Cytochrome 含量は，症例3で cytochrome b が対照平均値の60%とやや低下し，症例4では succinate と KCN による還元状態ではいずれも軽度低下を示したが，dithionite による還元状態では cytochrome cc_1が64%と軽度低下を示したのみであった（表2）．これら2症例の生検筋ミトコンドリアの succinate を基質とした場合の酸化的リン酸化能は，respiration rate, respiratory control index, ADP/0 比のいずれも正常であった．

考　　案

MyD の生検筋に RRF を認めたという報告は少なく，われわれが検索した限りでは，2報告のみである．Ono ら[6]は，約50%の MyD 生検筋に RRF を認め，とくに上腕二頭筋に優位に出現したと報告し，また，Carpenter ら[7]は，ophthalmoplegia を示した MyD の例に RRF を認めている．われわれの検討でも眼球運動制限を示した例に高率に RRF を認め，上記2報告と一致していた．MyD の眼球運動制限についての報告は，比較的少なくわが国では郡司ら，北野ら，金久らの報告を見るのみであり，RRF の出現と眼球運動制限との間には何らかの関連があることが示唆された．また，1例だけではあるが顎二腹筋においても RRF を認めたことは，MyD が全身性の疾患であることを考えると興味ある所見であった．電顕レベルでのミトコンドリアの形態異常については，Klinkerfuss, 宮岸ら，Casanova らの報告がある．いずれも，ミトコンドリアは巨大化し，クリステの異常走行，dense body, paracrystalline inclusion bodies 等の異常構造を示し，われわれが得た所見と類似していた．しかし，RRF の出現や電顕レベルでのミトコンドリア異常は，ミトコンドリアミオパチーやその他の筋疾患においても見られる所見であり，その疾患特異性は比較的低くその意義は不明な点が多いといわざるを得ない．しかし，今回，報告したように MyD の生検筋に組織化学的にも生化学的にもミトコンドリア酵素に異常を認めたことは，これらの異常が一次的か二次的変化かは不明であるが，本症においてミトコンドリア異常が存在することを示唆していると言える．とくに，CCO 活性は組織化学的にも RRF において欠損し，生化学的にも RRF の有無にかかわらず低下傾向を示しており，本症との関連が特に示唆された．CCO 活性欠損を示した RRF は，抗 CCO 抗体による免疫組織化学にてその抗原性は示しており，活性としては発現していない

表2　Mitochondrial enzyme activities and cytochrome content in isolated mitochondria

enzyme(nmol/mg/min)		case 3	case 4	control (n=20)
NADH cytochrome c reductase	R(-)	244	279	404±132 (239-752)
	R(+)	214	254	324±141 (100-616)
Succinate cytochrome c reductase		203	380	351± 90 (222-542)
Cytochrome c oxidase		299	603	1320±454 (715-1990)
Citrate synthase		225	523	470±153 (273-774)
Cytochrome (p mol/mg protein)				
aa_3	S+K	450	313	540±130
	D	618	626	690±124
b	S+K	285	393	489±121
	D	337	1049	811±242
cc_1	S+K	537	383	693± 85
	D	561	593	927±159

R:rotenone, S:succinate, K:potassium cyanide
D:sodium dithionite

が，酵素蛋白の合成はなされている事が示唆された．この事は，MyDにおけるミトコンドリア異常の機序を考えるうえで興味ある結果であった．しかし，検討し得た2症例の酸化的リン酸化能はpolarographyで見る限り正常範囲であり，本症におけるミトコンドリア異常の病態については更に詳細な検討が必要であると考える．

ま と め

1）検討した筋緊張性ジストロフィー12例中の5例において，ragged-red fibersを生検筋に認め，電顕でも異常形態を示すミトコンドリアの集積を認めた．

2）組織化学的検討にて，RRFのCCO活性は欠損していたが，抗体を用いた免疫染色ではRRFは抗CCO monoclonal抗体に対して，強い抗原抗体反応を示した．

3）生化学的にも，RRFの有無にかかわらずCCO活性の低下傾向を示した．また，CCOを含む電子伝達系酵素活性全体が低下している症例も見

られた.

4）しかし，検討し得た2例のミトコンドリアの酸化的リン酸化能は正常であった.

5）以上より，本症において何らかのミトコンドリア異常が関与していることが示唆された．しかし，これらの異常が本症の病因とどのように関連しているかは不明であり，今後，更に詳細な検討が必要である.

文　献

1）Ogasawara, S., Yorifuji, S., Nishikawa, Y. et al.: Improvement of abnormal pyruvate metabolism and cardiac conduction defect with coenzyme Q in Kearns-Sayre syndrome. Neurology 35: 372-377, 1985

2）Nakagawa, M., Miranda, A.F., Moggio, M., et al.: Demonstration of tissue-specific cytochrome c oxidase with monoclonal antibodies. Neurology 35 (Suppl 1): 95, 1985

3）Bresolin, N., Zeviani M., Bonilla, E et al.: Fatal infantile cytochrome c oxidase deficiency: Decrease of immunologically detectable enzyme in muscle. Neurology 35: 802-812, 1985

4）Bookelman, H., Trijbels, JMF., Sengers, RCA. et al.: Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria isolated from fresh and frozen stored muscle specimens. Biochem. Med. 19: 366-373, 1978

5）Ozawa, T.: Adenosine monophosphate as the first phosphoryl acceptor in oxidative phoshorylation. Arch. Biochem. Biophys. 117: 201-223, 1966

6）Ono, S., Kurisaki, H., Inouye, K. et al.: "Ragged-red" fibers in myotonic dystrophy. J. Neurol. Sci. 74: 247-255, 1986

7）Carpenter, S. and Karpati, G.: Myotonic dystrophy-adult. "Pathology of Skeletal Muscle" (ed by Mastaglia, F.L., Walton, J.N.) Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, and Melbourne, 1984, pp612-628.

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

木下眞男*

研究協力者　大島久二*　斉藤栄造*　吉田ひとみ*

筋緊張性ジストロフィー症（以下MyDと略す）は遺伝性の多臓器疾患であり，種々の内分泌代謝異常を伴うことが知られている．しかし本症には多くの骨異常を合併することも報告されているが[1]，カルシウム（Ca）代謝異常の有無については明らかにされていない．一方近年Caは筋収縮や細胞内情報伝達機構に重要であることが注目されてきている．我々はこれまでに，本症では血清Ca値が正常であるにもかかわらず副甲状腺機能が亢進していることを明らかにした[2)3)]．そこで今回，このCa代謝・副甲状腺機能異常の機序を明らかにすることを目的とした．

対象と方法

対象　MyD 5例，対照群として正常人3例，筋萎縮性側索硬化症1例，オリーブ・橋・小脳変性症1例を対象とした．

方法　経静脈的Ca負荷試験：グルコン酸Ca溶液を用い，Caとして0～350mg/hを一定速度で1時間毎に濃度を変え経静脈的に負荷した．1時間毎に尿を採取し，尿採取5分前に採血した．EDTA-2 Na負荷試験：EDTA-2 Na40mg/kgを30分間で経静脈的に負荷し，負荷直後及び1時間毎に3回採血し，1時間尿を3回採取した．血清PTHは中間部RIA（ヤマサPTH測定キット）で測定した．

成　績

①Ca負荷量0の時（基礎値），血清Ca，リン（IP），％TRPにMyD群，対照群で差を認めなかった（表1）．しかしPTH値はMyD群で578±188（Mean±SD）pg/mlと対照群の308±83に比

表1　MyDにおける検査所見（基礎値）

	Myotonic Dystrophy	Control
s-Ca (non-corr.) (mg/dl)	9.26±0.32	8.95±0.43
s-Ca (corr.) (mg/dl)	9.84±0.31	9.62±0.21
s-IP (mg/dl)	3.10±0.42	2.97±0.46
%TRP (%)	85.8±3.7	89.6±4.0
PTH (pg/ml)	578.0±188.4*	307.5±82.9
n-cAMP (nmole/100ml GF)	1.85±0.68	2.06±0.82

★P＜0.02

＊東邦大学医学部第四内科

し有意に（P<0.02）高値であった．②図1にCa負荷，EDTA負荷試験における血清PTH値とCa値の関連を示した．Ca負荷後両群とも血清Ca値は同様に上昇しPTHは低下したが，MyD群ではPTHは高値にとどまっていた．EDTA負荷により両群とも血清Ca値は低下したが，PTHはMyD群で高値を示した．表2にこれらの成績をまとめて示した．Ca値が13mg/dl以上の時PTHは対照群では142±59に低下したのに対し，MyD群では415±107と有意に（P<0.02）高く，PTHの抑制が悪かった．EDTA負荷により両群とも血清Ca値は7～8 mg/dlに低下したが，PTH値はMyD群で1990±630，対照群では1219±185に上昇し，MyD群で有意に（P<0.05）高値を示した．又PTHの最大分泌の50%を分泌する血清Ca値は，MyD群では9.43±0.35mg/dlと，対照群の8.68±0.45に比べ有意に（P<0.05）高く，PTH分泌に対する血清Caのset pointが上昇していた．③次にPTHと血清IP値との関連を示した（図2）．PTHが650pg/ml以上の高値ではIP値はほぼ一定し，MyD群対照群に差を認めなかった．しかしPTHが400～650pg/mlの中等度の濃度ではMyDでIP値は高値であった．さらにPTHが400～650pg/mlの時，% TRPはMyD群で88%，対照群で82%とMyD群で有意に（P<0.05）高値であった．④対照群の中で，正常人と疾患を有する者では成績には差がなかった．

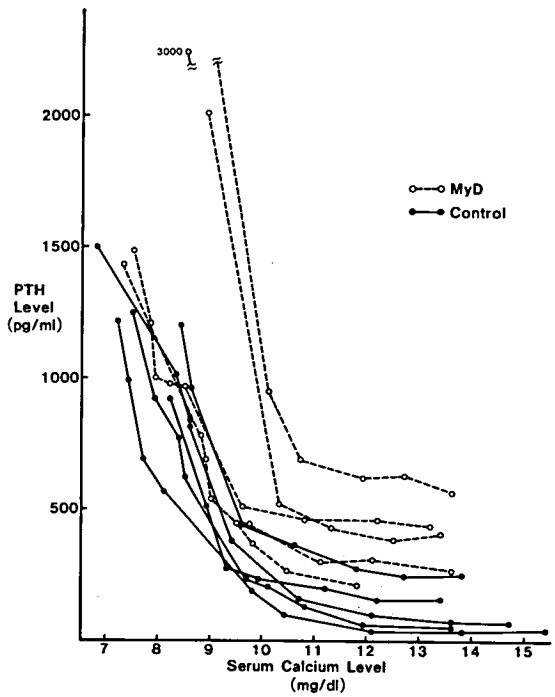


図1　経静脈的Ca及びEDTA負荷試験における血清Ca値と血清PTH値との関連

表2　経静脈的Ca並びにEDTA負荷試験の成績

	Myotonic Dystrophy	Control
Ca Infusion Test (sCa>13mg/dl)		
PTH (pg/ml)	415.0±106.7**	141.7±58.7
EDTA Test		
sCa (mg/dl)	8.05±0.67	7.62±0.60
PTH (pg/ml)	1990±630*	1219±185
sCa Level at Half Maximal Excretion of PTH (mg/dl)	9.43±0.35*	8.68±0.45

★P<0.05,　★★P<0.02

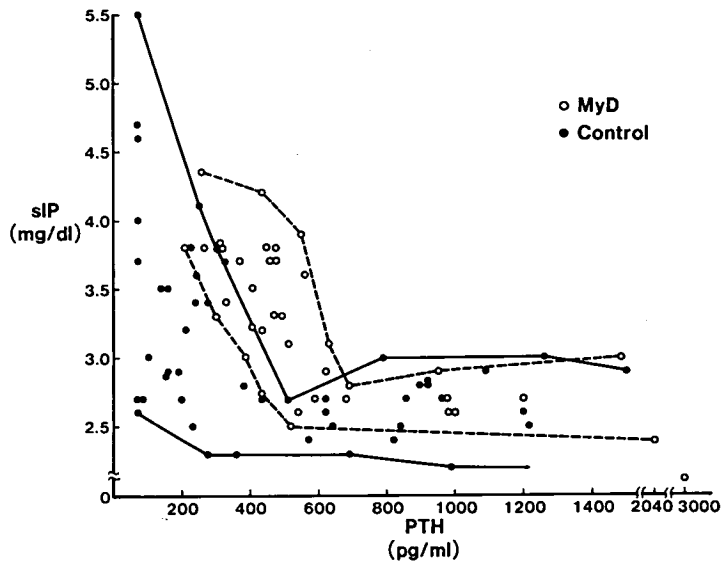


図2　血清 PTH 値と血清 IP 値との関連

考　　按

MyD における Ca 代謝・副甲状腺機能異常の有無に関してはほとんど知られていない．これまでに我々は本症に経口 Ca 負荷試験を行ない，血清 Ca 値が正常域にあるにもかかわらず PTH，1,25 $(OH)_2$ ビタミン D_3 が高値であることを明らかにし，本症には Ca 代謝・副甲状腺機能異常の存在することを示した[2)3)]．今回本症に経静脈的 Ca 及び EDTA 負荷試験を行ない血清 Ca 値を変化させることにより，この Ca 代謝・副甲状腺機能異常の機序を明らかにすることを試みた．

経静脈的に Ca を負荷すると，血清 Ca 値は MyD 群，対照群ともに上昇し差を認めなかった．しかし MyD 群では PTH の抑制が悪く，血清 Ca 値が上昇しても PTH は高値にとどまっていた．一方 EDTA 負荷では血清 Ca は両群共同様に低下したが MyD 群では PTH 分泌が多かった．さらに PTH 分泌に対する Ca の set point が MyD では上昇していた．以上の成績より，MyD では副甲状腺 PTH 分泌における Ca による調節機構の異常が存在するものと考えられた．

一方 PTH が中等度の濃度では，MyD では血清 IP 値，% TRP が高値を示した．このことより MyD では PTH の腎尿細管でのリン再吸収抑制作用が低下しているために血清 IP 値も高値を示したと考えられ，本症では PTH の作用機構に異常の存在するものと考えられた．Konagaya ら[4)]は，本症に PTH 負荷試験を行ない，腎尿細管に対する PTH 作用に異常の例があることを報告した．今回の成績より，PTH が高値の場合 MyD 群と対照群の間に差を認めず，本症の PTH 作用機構異常の解明には PTH 負荷量を考慮する必要があると考えられた．

結　　論

① MyD では PTH の基礎値が高値を示すとともに Ca 負荷後の PTH の抑制が悪く，EDTA 負荷後 PTH は高値を示した．又 PTH 分泌に対する Ca の set point が上昇していた．従って本症では Ca の PTH 分泌調節機構の異常の存在することが考えられた．

② MyD では PTH が中等度の濃度で血清 IP 値，% TRP が高値を示し，PTH の作用機構の異常が示唆された．

③以上の成績より，MyD の Ca 代謝・副甲状腺機能異常の一因として，Ca の PTH 分泌調節異常並

びにPTHの作用機構の異常が考えられた。

文　献

1）Rowland, L.P. and Layzer, R.B.: Muscular dystrophies, atrophies and related disease. chap. 53, 1-109, Ed. by Baker, A.B., Clinical Neurology, vol. 4, Harper & Row, Philadelphia, 1983

2）木下眞男，大島久二，斉藤栄造，勝島聡一郎：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．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年度報告書，p. 63, 1984

3）木下眞男，大島久二，斉藤栄造，吉田ひとみ：筋緊張性ジストロフィー症におけるカルシウム代謝異常に関する研究．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60年報告書，p. 145, 1985

4）Konagaya, Y., Konagaya, M., Mano, Y., Takayanagi, T., and Tomita, A.: Evaluation of renal parathyroid hormone receptor function in myotonic dystrophy. J.Neurol. Sci. 70: 339, 1985

34）先天性ミオトニアの筋線維タイプについて

後　藤　幾　生*

研究協力者　山　田　　猛*　田　中　　薫*

はじめに

先天性ミオトニアはミオトニアを主症状とする比較的稀な遺伝性疾患である．本症では筋組織化学検査において，タイプ2 B線維の欠損が報告されているが，私共はその欠損について，他疾患と比較検討し報告する．

症　例

患者：38歳，男．　（NM400427）

主訴：筋のこわ張り．

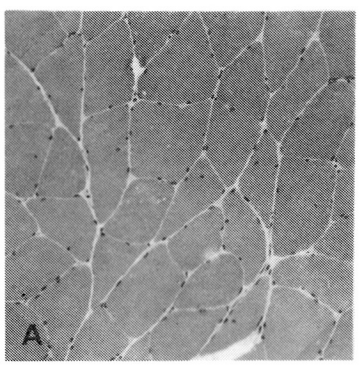
現病歴：乳児期の発育，発達は正常であったが，幼児期より急に動こうとすると筋が硬くなり動作開始が困難であった．症状は，7歳頃は下肢に強く，100m走はスタートが常に遅れたが，ゴールは中位であった．10歳頃には手を強く握ると開きにくくなった．また話したり，物をかんだりすることも最初は困難であったが，続けると容易にできた．これらの症状は年齢とともに徐々に強くなった．

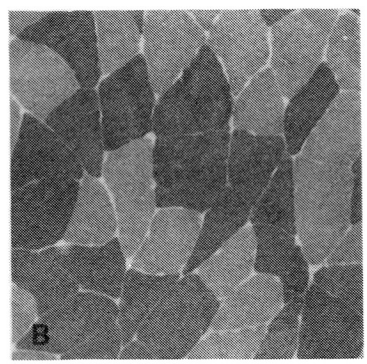
生活歴，既往歴：特記事項なし．

家族歴：両親がいとこ婚であったが，他に同症状を呈する者はいない．

入院時現症：一般身体所見は，筋肉質で，頭髪は正常，睾丸の萎縮はなかった．神経学的には，下方視の際lid lagがみられ，咬筋，顔面筋，四肢および軀幹筋全てに筋収縮性および叩打性ミオトニアが著明に認められた．筋力は最初は弱く，くり返すと正常となったが，頸部屈筋には持続的に軽度の筋力低下を認めた．

検査所見：血清CK 121mu/ml（正常値20～90）と軽度上昇がみられた．針筋電図検査でミオトニア放電を認め，正中神経の10Hzの反復電気刺激により拇指球筋に87％のwaningを認めた．拇指の反復屈伸運動後にはwaningは5％となった．





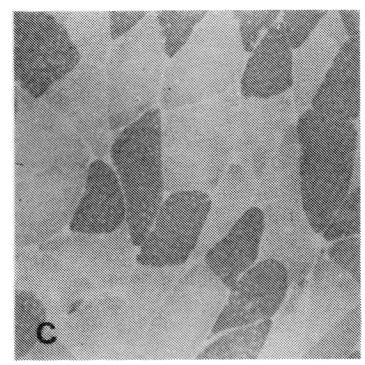


図1　先天性ミオトニア例の三角筋の組織所見．A：HE染色では筋変性や中心核の増加は認められない．B：ATPase染色（pH9.4），C：ATPase染色（pH4.6）ではタイプ1および2 A線維は認められるが，タイプ2 B線維は認められない．倍率はいずれも100倍．

＊九州大学医学部脳研神経内科

三角筋の組織学的検査では，HE染色では筋変性や中心核の増加は認められなかった（図1 A）.

以上より本症例は常染色体劣性遺伝型の先天性ミオトニアと判断された．ATPase染色ではタイプ1線維とタイプ2 A線維を認めたが，タイプ2 B線維は認められなかった（図1 B）.

方　　法

本症例（MyC）の他に，緊張性筋ジストロフィー症（MyD）7例（21～48歳，男），Duchenne型筋ジストロフィー症（DMD）5例（7～11歳，男），痙性斜頸（STC）1例（38歳，男）について調べた．STCの症例は，34歳頃より頭部の左への不随意回転がみられ，右胸鎖乳突筋の肥大が認められた．生検筋のHE染色およびATPase染色（pH4.3，4.6，9.4）横断標本を使い，筋線維タイプの割合，平均筋線維径を計測した.

結　　果

MyCではタイプ2 B線維は認められず，筋線維径はタイプ1線維がタイプ2 A線維より大きかった.

MyDでは3例でタイプ2 B線維の割合は23.5～30.0%であったが，4例で2.1～5.7%と減少していた．両群で，HE染色標本の筋病理像に明らかな差異は認められなかった．減少群でタイプ2 C線維は0.9～3.4%であった．筋線維径は5例でタイプ1線維がタイプ2線維より小さく，肥大線維はタイプ2 A，2 B線維に多かった.

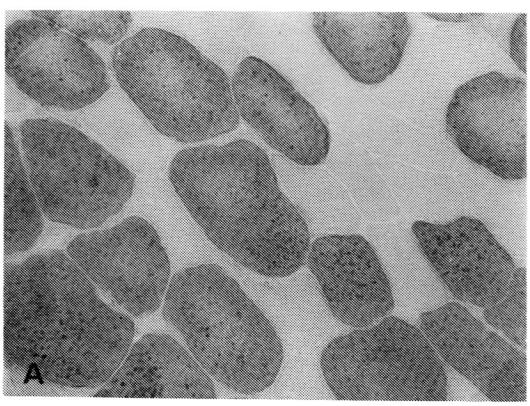
DMDでは5例ともタイプ2 B線維の割合が2.3～10.3%と減少していた．タイプ2 C線維は7.2～25.3%と増加が認められた．筋線維径は全体的に小さかったが，1例でタイプ2 A線維がより小径化していた他は，筋線維タイプによる選択的な萎縮は明らかではなかった.

STCでは患側（右）の胸鎖乳突筋でタイプ2 B線維は1%以下に減少し（図2 A），健側（左）に比してタイプ1線維の割合の増加と肥大がみられた．健側ではタイプ2 B線維は40.7%認められた（図2 B）.

考　　察

MyCの筋病理に関する報告は少ないが，組織化学検査によるタイプ2 B線維の欠損がCrewsら[1]やHeeneら[2]により報告されている．私共のMyCの症例でもタイプ2 B線維が完全に欠損していた．またMyD 7例中4例，DMD 5例全て，STCの症例では患側の胸鎖乳突筋で，タイプ2 B線維の減少が認められた.

各疾患におけるタイプ2 B線維欠損の機序としては，筋線維タイプの分化の障害および筋線維



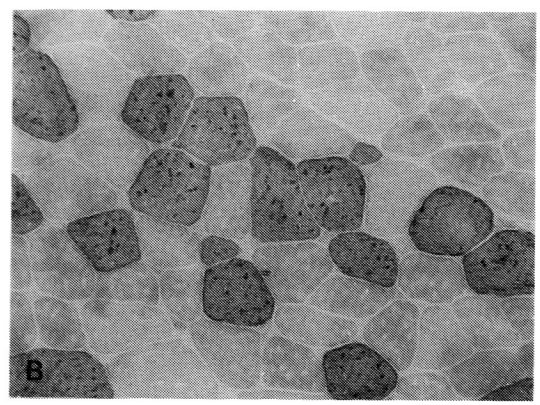


図2　痙性斜頸例の胸鎖乳突筋の組織所見，ATPase染色（pH4.6）．A：患側（右）ではタイプ2 B線維は認められず，タイプ1線維の肥大を認める．B：健側（左）ではタイプ2 B線維が認められる．倍率はいずれも200倍.

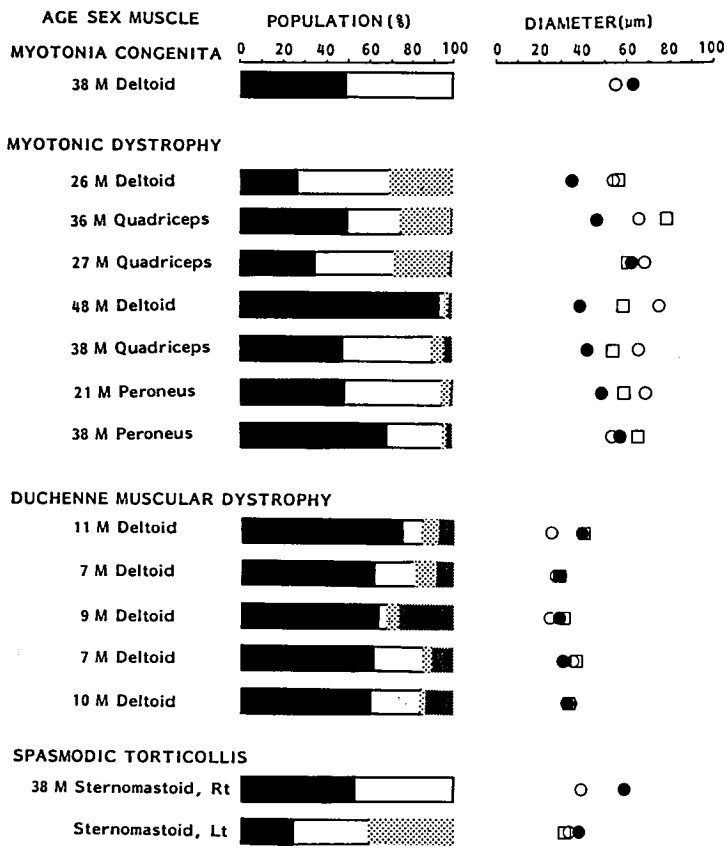


図3　先天性ミオトニア，緊張性筋ジストロフィー症，Duchenne 型筋ジストロフィー症，痙性斜頸例の筋線維タイプの割合および平均筋線維径．
■●タイプ1線維，□○タイプ2A線維，▨□タイプ2B線維，▨タイプ2C線維．

タイプの転換が考えられる．筋線維タイプの分化は，発生上タイプ2C，1，2A，2Bの順に進むとされている[3]．したがってDMDのように筋変性が盛んな場合，筋再生が行われてもタイプ2B線維に分化する前に筋変性が起こり，タイプ2B線維が減少するものと考えられる．

筋線維の収縮特性からみると，タイプ1線維は緩筋で，タイプ2Aおよび2B線維は速筋であり，タイプ2A線維はタイプ1と2B線維の中間的な特徴を有する．この筋線維タイプは必ずしも固定したものではなく，速筋に持続的に収縮刺激を加えると緩筋へ転換するという報告があり[4]，ヒトでも持久的な運動負荷によるタイプ2B線維から2A線維への変化が報告されている[5]．

MyCおよびSTC例では，筋変性は認められず，タイプ2C線維の増加もなく，タイプ2B線維の欠損の機序として筋線維タイプの転換が推定された．すなわちMyCでは，高度なミオトニアが筋に対するtonicな負荷となり，STCでは胸鎖乳突筋にtonicな収縮刺激が常に加わり，速筋であるタイプ2B線維が中間的なタイプ2A線維に変化したと考えられた．

MyDではミオトニアおよび筋変性の両者がみられ，本症のタイプ2B線維の減少には筋線維タイプの転換，分化の障害およびその他の因子が複雑に関与しているものと考えられる．

ま と め

MyCの一例を報告し，そのタイプ2 B線維の欠損を他疾患と比較検討し，機序として筋線維タイプの転換を推定した．

文　献

1) Crews J, Kaiser KK et al : Muscle pathology of myotonia congenita. J Neurol Sci 28 : 449, 1976.

2) Heene R, Gabriel RR et al : Type 2 B muscle fibre deficiency in myotonia and paramyotonia congenita. J Neurol Sci 73 : 23, 1986.

3) Colling-Saltin A : Enzyme histochemistry on skeletal muscle of the human foetus. J Neurol Sci 39 : 169, 1978.

4) Salmons S & Vrbová G : The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. J Physiol (London) 201 : 535, 1969.

5) Ingjer F : Effects of endurance training on muscle fibre ATP-ase activity, capillary supply and mitochondrial content in man. J Physiol (London) 294 : 419, 1979.

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）

杉田秀夫*

研究協力者　垂井清一郎**　佐藤　猛***　埜中征哉*
福原信義****　中川正法*****

はじめに

本研究班員及び関連の42施設（表1）より今回の調査で集積された成人症例100例について臨床的，臨床病理的検索を行いつつあるが今回はその中間報告を行う．

1　症例の内訳（表2）

今回集積された症例のうち中枢神経症状の有無により2群に大別した．後者は更に罹患部位により眼筋（O）型，四肢（E）型，眼筋十四肢（OE）型に分類した．

表2に示す如くミトコンドリアミオパチー（狭義）38例中O 2例，E 7例，OE 29例で圧倒的に眼筋十四肢型が多かった．またミトコンドリア脳筋症62例中Kearns-Sayre Syndrome（KSS）が26例で最も多く，ついでMELAS 23例，MERRF 7例，Leigh syndrom 2例の順であった．

2　発症年令，性比（表3）

発症年令では中枢神経症状を伴わないグループでは10才以下の発症が少くなく，脳筋症，OEでは何れも10～20才台の発症が最も多い．KSSは従来より20才以下の発症が多いとされており，今回の結果もほぼそれに一致するが，50才台，60才台にもわづかながら認められた．

性比に関しては従来おおよそ3：2の比率で男性に多いとされていたがOとMERRFを除くと今回の結果もほゞこれに一致した．

＊国立精神神経センター神経研究所
＊＊大阪大学医学部第二内科
＊＊＊順天堂大学医学部脳神経内科
＊＊＊＊金沢大学医学部神経内科
＊＊＊＊＊鹿児島大学医学部第三内科

家族内発症症例は表4に示す通り全体で27%に認められ，かなりの高率を示した．

ミトコンドリアミオパチーでは20～30%とこれまでの報告例に比較して多いと思われる．
脳筋症ではKSSは11.5%と従来の報告をやゝ上回っている．MERRFは従来言われていた様に家族内発症例が多く認められた（71.4%）．

MELASの家族内発症率についてはこれまであまり述べられていないが今回36.4%とかなり高い値を示した．

3　臨床症状（表5）

ミトコンドリアミオパチーの内眼筋障害を伴わないEにおいてその14.3%は四肢筋以外に球症状を呈していた．KSS（不全型を含む）は難聴及び脳波異常の高頻度出現が注目され，逆に小脳症状，発育異常の頻度が低く先の本邦文献例の場合と同様に本邦におけるKSSの特徴と言えよう[1]．

MELAS，MERRF共に外眼筋麻痺及び網膜色素変性が認められる点はDiMauroらの統計[2]と異っている．今回のアンケートに基いて両者を臨床症状の面から比較してみると，stroke-like episode，ミオクローヌスの有無以外の差異としてMELASでは難聴が多く，また，大部分のMERRFで小脳症状が出現する一方でMELASでは14%に留っている．比等の症状の出現頻度の違いについては今後更に症例の積み重ねが必要であろう．

検査データでは血清CK値はO<OE<E<KSS<MELAS<MERRFの順で高値を示し，MERRFでは2000IUを越える症例もあった．血

表1

(成人)

北海道大学医学部付属病院	脳外科(神経内科部門)
〃	神経内科
東北大学医学部付属病院	神経内科
秋田赤十字病院	神経内科
米沢市立病院	脳外科
新潟大学医学部付属病院	神経内科
総合病院長岡赤十字病院	内科
田宮病院	精神科
佐渡総合病院	神経内科
群馬大学医学部付属病院	神経内科
自治医科大学付属病院	神経内科
筑波大学医学部付属病院	神経内科
信州大学医学部付属病院	第三内科
国立長野病院	内科
東京大学医学部付属病院	神経内科
東京医科歯科大学医学部付属病院	神経内科
順天堂大学医学部付属病院	脳神経内科
帝京大学医学部付属病院	神経内科
東京都立神経病院	神経内科
狭山神経内科病院	脳神経内科
横浜市立大学医学部付属病院	第二内科
昭和大学藤が丘病院	神経内科
神奈川県立総合リハビリテーションセンター	精神科
名古屋大学医学部付属病院	神経内科
金沢大学医学部付属病院	神経内科
福井県立病院	神経内科
大阪大学医学部付属病院	第二内科
大阪医科大学付属病院	第一内科
岡山大学医学部付属病院	第二病理科
県立南岡山病院	神経内科
香川医科大学付属病院	精神科
徳島大学医学部付属病院	第一内科
九州大学医学部付属病院	神経内科
九州厚生年金病院	神経内科
北九州市立八幡病院	内科
熊本大学医学部付属病院	第一内科
大分県立三重病院	第二内科
国立別府病院	神経内科
宮崎医科大学付属病院	第三内科
鹿児島大学医学部付属病院	第三内科
鹿児島県立大島病院	神経内科
国立南九州中央病院	循環器科

表2　ミトコンドリアミオパチー，ミトコンドリア脳筋症の内訳
O：眼筋のみ，E：四肢筋のみ，OE：眼筋及び四肢筋 KSS：完全型及び不全型を含む

Mitochondrial myopathy	No.of cases
Ocular (O) type	2
Extremities (E) type	7
O E	29
Mitochondrial encephalomyopathy	
Kearns-Sayre Syndrome(KSS)	26
Leigh Syndrome	2
MELAS	23
MERRF	7
Others	4
Total	100

表3　Histogram illustrating range of age at onset of symptoms and sex ratio

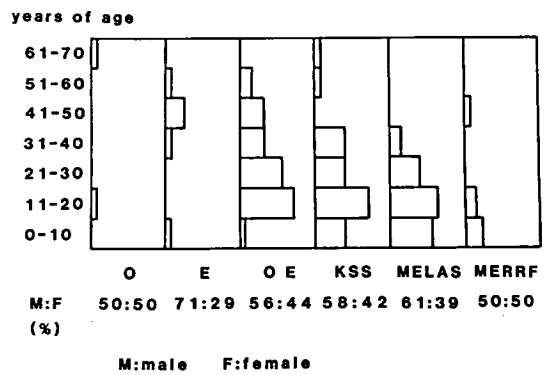


表4　Familial Occurrence

Mitochondrial myopathy	%
O	20.0
E	28.6
O E	26.9
Mitochondrial encephalomyopathy	
KSS	11.5
Leigh Syndrome	0
MELAS	36.4
MERRF	71.4
Others	0
Total	27.1

表5　Clinical Features (%)

Features	O	E	O E	KSS	MELAS	MERRF
Ophthalmoplegia	100	0	92.6	92.3	27.3	16.7
Retinal degeneration	0	0	11.1	34.6	4.8	14.3
Heart block	0	0	8.3	38.5	0	0
Deafness	0	14.3	29.2	76.9↑	61.9	33.3
Ataxia	0	0	3.7	32.0↓	14.3	85.7
Short stature	0	0	4.0	16.0↓	23.8	14.3
EEG abnormality	0	50	18.2	68.0↑	90.5	100
Mental retardation	0	0	15.4	34.6	68.2	85.7
Limb weakness	0	85.7*	96.3	76.9	90.0	100
Stroke-like episode	0	0	3.8	4.0	63.6	16.7
Myoclonus	0	0	0	0	27.8	100

*: with bulbar sign 14.3%

↑↓: Comparison with foreign cases

中及び髄液中の乳酸ピルビン酸値はMELAS以外ではKSS, MERRFで高値を示す症例があった．ミトコンドリアの電子伝達系の酵素では表6に示す如くNADH-cytochrome c reductase, 及びcytochrome c oxidaseの欠損例が量も多く，次いでsuccinate-cytochrome c reductase欠損例であった．

表6　Mitochondrial Encephalomyopathies due to Enzyme Defects

	O	E	O E	KSS	MELAS	MERRF	Total
NADH-Cyt.c reductase	-	1	2	3	3	2	11
Succinate-Cyt.c reductase	-	0	0	0	3	2	5
Cyt.b	-	-	-	0	2	0	2
Cyt.c oxidase	-	0	-	1	6	2	9

-:not examined

文　献

1）山本剛司，杉田秀夫：わが国におけるミトコンドリア・ミオパチーの臨床—成人例—：神経内科24：109-116，1986.

2）DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., et al: Mitochondrial myopathies. Ann. Neurol., 17: 521-538, 1985.

36）成人型 mitochondrial myopathy の臨床的研究

萬 年　　徹*

研究協力者　中 瀬 浩 史* 清 水 輝 夫*

我々の経験した8例の成人型 mitochondrial myopathy の臨床的特徴に関して検討を加えた．対象症例は**表1**に示したとうりで，MELA (S) が4例，atypical KSS をふくむ ocular myopathy が3例，MERRF が1例である．**表1**に示したように，生検筋を用いた呼吸酵素活性の測定を症例1，2，4については Veerkamp の方法[1]を用いて行い，症例6，8については Morgan-Hughes の方法[2]を用いて酸素消費量の測定を酸素電極を用いて行った．^{31}P-NMR は症例1，5，7について行った．方法は ergometor による運動負荷前後で大腿四頭筋における ^{31}P-spectrum の変化を Siemens 社全身用 MRI 装置を用いて測定した．組織化学では cytochrome c oxidase 染色を Novikoff らの方法を一部改変して行った．

表1　対象症例の概要

症例	臨床型	^{31}P-NMR	生化学	組織化学 (CCO)
22 M	MELA	Pi/CrP↑	CCO↓	diffuse↓
19 F	MELA	n. d.	CCO↓	diffuse↓
38 F	MELA	n. d.	n. d.	"mosaic"
35 F	MELA	n. d.	n. d.	"mosaic"
42 M	KSS	正常	正常	"mosaic"
48 F	ocular myopathy	正常	正常	"mosaic"
45 M	ocular myopathy	Pi/CrP↑	n. d.	"mosaic"
54 F	MERRF	n. d.	正常	"mosaic"

n. d. ; not done

*東京大学医学部脳研神経内科

結　　果

症例1，2は兄妹例である．臨床症状は妹の方が重症であり，著しい lactic acidosis や motor intorelance をともない，一方兄は外眼筋麻痺や高 bilirubin 血症は妹よりは明かであるが，lactic acidosis あるいは motor intolerance の程度は妹よりも相当軽く軽症例と考えられる．本例においては生検筋にて生化学的に呼吸酵素活性が正常下限（兄）と cytochrome c oxidase 活性の低下（妹）を認め，，cytochrome c oxidase 染色では正常対照と比較して著しい染色性の低下を認めた．

生検筋の mitochondria 分画における呼吸酵素活性は兄においては正常下眼であったが，臨床症状の強い妹において明らかな cytochrome c oxidase の活性低下を認めた．本例においては^{31}P-NMR の検索では運動負荷5分後において Pi/PCr 比が依然上昇していた．正常対照においては，この時間では運動負荷前の状態まで回復している．一方，症例3，4においては通常の組織化学的検索のみを行ったが，cytochrome c oxidase 染色において染色性の全くないあるいは明らかに低下した筋線維を認めた（focal deficiency）．これらの症例は従姉妹例であり，症例3の男児も本症と考えられた．

症例5，6，7は，ocular myopathy を主徴としている症例で，症例5は atypical Kearn s-Shy 症候群である．症例5，7において，呼吸酵素活性を測定したが，いずれも正常範囲内であったが，組織化学染色では，cytochrome c oxidase 染色において focal deficiency の所見を認めた．また，症例6は，神経原性の変化をともなっていた．

表2　症例1，2の呼吸酵素活性

	Case 1	Case 2	control values mean±SD(range)
Cytochrome c oxidase	738	336	1554±753(601-2837)
Succinate cytochrome-c-reductase	1567	1030	889±507(343-1767)
NADH cytochrome-c-reductase	104	149	249±174(82-637)

* nmol/min/mg mitochondrial protein

表3　症例8の oxidation rate

Substrate	State 3 rate*	CRC**
5mM L-Pyruvate (+malate)	91 (77~132)	2.9
10mM DL-Glutamate (+malate)	76 (70~126)	2.5
10mM DL-Succinate (+rotenone)	58 (64~109)	2.5
1mM L-Ascorbate (+50μM TMPD)	121 (90~154)	—

* State 3 rate in n atom O/min/mg mitochondria protein.
** Respiratory control ratio (Chance and Williams, 1956).
*** Yield 1.9mg/g tissue.

症例8は MERRF の症例で，27才失調性歩行で発症し，以後動作時に著しい myoclonus とついで痙攣発作を認め，その後45才ごろより，筋萎縮が進行し，軽度の知能低下も伴った．本例は福原らの報告した症例とほぼ同一の病状を呈していると考えられる．本例での筋生検の所見では ragged-red fiber の存在と cytochrome c oxidase 染色において focal deficiency の所見を認めた．しかし，生検筋の呼吸酵素活性は正常範囲内であった．また ATPase 染色と対比すると，正常では ATPase 染色と cytochrome c oxidase 染色とはほぼ対応するのに対し，症例8においては type I fiber においても中程度に染色性の低下している筋線維が多数認められた．また ATPase 染色上 type IIB fiber deficiency を認めた．

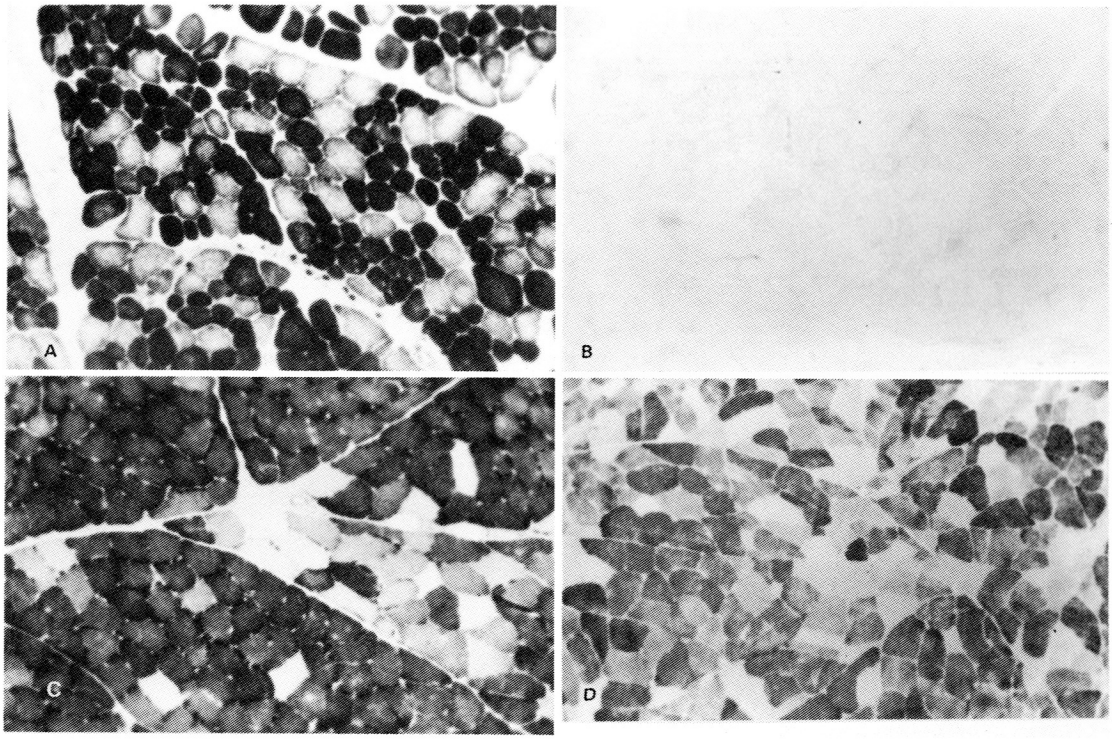
考　　察

検索した8症例を組織化学の所見で分けてみると，症例1，2は cytochrome c oxidase 染色において全筋線維に活性の低下を認めているが，他の6症例はすべていわゆる focal deficiency である．diffuse な欠損を示す例では生検筋の mito-

表4　症例8の cytochrome c oxidase 染色における染色性と fiber type の関係

activity of cytochrome c oxidase	case 8 (MERRF) I	IIA	IIB	IIC	control I	IIA	IIB	IIC
++	28.8	4.4	0	0.2	47.4	2.6	2.0	0
+	17.0	26.6	0	0.4	1.0	20.6	24.8	1.6
-	5.8	16.8	0	0	0	0	0	0
total	51.6	47.8	0	0.6	48.4	23.2	26.8	1.6(%)

++;darkly stained,　+;weakly stained,　-;negative
**500 fibers were counted in each case.



a	b
c	d

図1　生検筋の cytochrome c oxidase 染色像
（A：control B：症例1　C：症例6　D：症例8）
症例1ではすべての筋線維で染色性が低下．症例6は示された部分はすべて type I 線維であり，さまざまな程度に活性の低下した筋線維を認める．症例8も活性の低下した筋線維を認める

chondria 分画を用いた呼吸酵素活性の測定でも低下を認めることが可能であったが，他の症例では困難であった．また，31P-NMR においても我々の用いている装置においては計測時間が相当かかるため軽症例での異常の検出はかなり困難である．またこれらの症例においては生筋検上 ragged-red fiber の数が極めて少数である症例があり，本症の診断における cytochrome c oxidase 染色の有用性を強調したい．

症例8は MERRF の症例であるが，本例は福原らが報告している症例[3] とほぼ同一の臨床症状を認めている．その筋生検所見はやはり cytochrome c oxidase 染色における focal deficiency であり，また本症例においては type IIB fiber deficiency も認められた．Mitochondria の異常と構造蛋白の異常の合併については nemalin myopathy において合併が報告されているが，fiber type deficiency については報告がない．この異常が単純な合併症なのかそれとも本例の代謝異常となんらかの関係を有する症状かは不明である．しかし nemalin myopathy においても type IIB fiber の欠損が知られており，興味深い所見と考えられる．

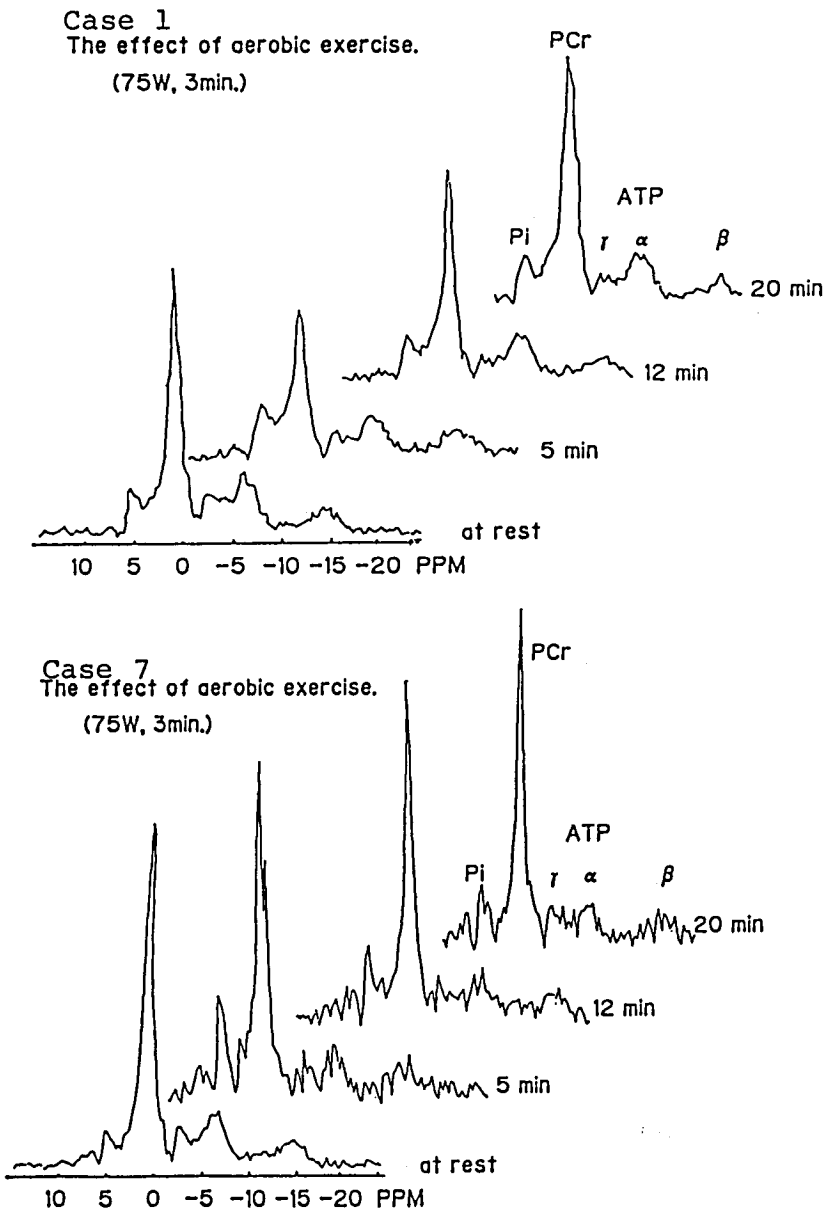


図2　^{31}P-NMR spectrum
症例1に比べて症例7の変化は極軽度である.
正常例では5分後には負荷前まで回復している.

文　献

1) Morgan-Hughes et. al. Brain, 100, 617, 1977.
2) Veerkamp et. al. In mitochondrial pathology in muscle diseases, Piccin medical books, Trento (Italy), 1983.
3) Fukuhara et. al. J.Neurol. Sci., 47, 117, 1980.

37) ミトコンドリア脳筋症における睡眠時無呼吸

垂　井　清一郎*

研究協力者　北　口　正　孝*　高　橋　光　雄*　依　藤　史　郎*
中　村　雄　作*　巽　千　賀　夫*　今　岡　弘　之*
階　堂　三砂子*

はじめに

ミトコンドリア脳筋症は神経症状をはじめ，種々の臨床症状を呈するが，その呼吸障害については，ほとんど検討されていない．我々は睡眠中に昏睡に陥ったミトコンドリア脳筋症2例を経験したため，これらを含む5例のミトコンドリア脳筋症患者に終夜睡眠ポリグラフ（以下ポリソムノグラフ）を施行し，また中枢神経障害との関連について検討を加えた．全例に睡眠時無呼吸を認め，病態，予後に関連し重要な徴候と思われるので報告する．

症　例

今回検索した症例の臨床像を表1に示す．全例に筋生検にてミトコンドリア形態異常を認め，また好気的運動負荷（エルゴメーター15w 15分）にてLactate/Pyruvate比が有意に上昇しており，NADH Oxydationの異常を認めた．症例1．2．3はKearns-Sayre症候群である．症例4は睡眠中，低換気もしくは無呼吸によると思われる昏睡に陥った例で，筋生検ではGomori-Trichrome染色にてネマリンロッドを認めた．症例5も低換気による意識障害を発症した例であるが，核上性眼球運動障害，網膜変性，感音性難聴，小脳失調，知能障害を呈した特異なミトコンドリア脳筋症である．球症状としては全例に発語障害，嚥下障害が軽度認められた．

表2に肺機能と動脈血ガスデータを示す．肺機能検査では，症例1．2．4は拘束性，症例3は混合性呼吸障害である．症例5は閉塞性障害を示したが気管切開後のデータであり1秒率の低下は気管カニューレの抵抗の影響も考えられた．動脈血ガスは覚醒時の値であるが，症例3を除きhypoxia, hypercapniaの傾向を示した．症例3は動脈血採取が困難な患者で，施行時hyperventilationをきたした可能性がある．

表1

症　例	1	2	3	4	5
年齢　性	42 M	51 M	32 F	44 F	46 M
外眼筋麻痺	+	+	+	−	+
網膜変性	+	+	+	−	+
感音性難聴	+	+	+	−	+
発語・嚥下障害	+	+	+	+	+
四肢筋力低下	+	+	+	+	+
小脳失調	−	−	−	−	+
知能障害	−	−	−	−	+
心電図異常	+	+	+	−	−

全例に
(1) ミトコンドリア形態異常
(2) 好気的運動負荷にてLactate/Pyruvate比の有意な上昇を認めた

方　法

ポリソムノグラフは10チャンネルで記録し，それぞれ眼球運動（EOG）×2，下顎の筋電図（EMG），脳波（EEG）×4（国際10-20法にてC_3

表2　肺機能，動脈血ガス

症　例	1	2	3	4	5
%VC	57	20	38	49	85
$\%FEV_{1.0}$	82	100	56	98	58
PaO_2(mmHg)	73	59	109	79	62
$PaCO_2$(mmHg)	60	49	33	52	60

＊大阪大学医学部第二内科

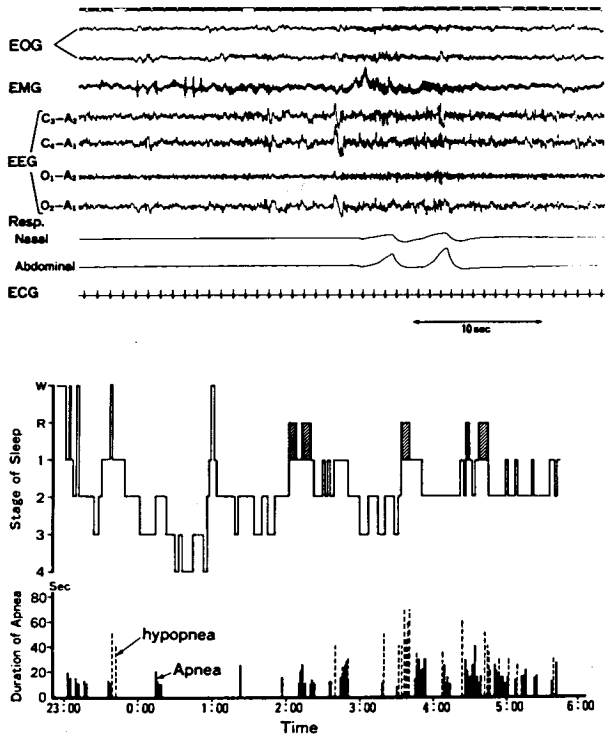


図1　症例1のポリソムノグラム（上段）と睡眠段階（中段），無呼吸の出現（下段）．点線の棒グラフは Hypoventilation を示す．

-A_2，C_4-A_1，O_1-A_2，O_2-A_1），心電図（ECG），呼吸（Resp）×2である．呼吸は鼻孔の気流をサーミスタの抵抗変化で，腹部の動きはストレインゲージで記録した．

結　　果

症例1　図1上段に症例1のポリソムノグラムの一部を，中段に睡眠段階（以下 stage），下段に無呼吸の出現状況を示す．上段は stage 1での記録で下顎の筋電図は比較的高電位である．呼吸曲線は2回の呼吸の前後に長時間の無呼吸が認められるが，鼻孔の気流（Nasal），腹部の動き（Abdominal）が共に停止しており中枢性無呼吸の Type である．しかし，時には鼻孔の気流，腹部の動きが認められるが，共に非常に僅かな Hypoventilation が出現する．下段の棒グラフは，それぞれひとつの無呼吸に対応し，その長さは無呼吸の持続時間である．実線は無呼吸を，点線は Hypoventilation を示す．無呼吸は上段に示した中枢性無呼吸の Type が大部分であり，持続時間は10-30秒で，入眠期，Stage 1．2に多発する．Hypoventilation は比較的長時間（20-70秒）持続し，StageREM に多発する傾向にある．

症例2　図2上段に症例2のポリソムノグラムの一部を，中段に睡眠段階，下段に無呼吸の出現状況を示す．呼吸曲線で無呼吸が見られるが，鼻孔の気流は停止しているにもかかわらず，僅かではあるが腹部の動きが認められ閉塞性無呼吸の Type である．しかし，時には中枢性無呼吸も認められた．本例では，全 Stage を通じて10～30秒持続する無呼吸の頻発が見られたが，特に StageREM での増加，StageNonREM での減少は認められなかった．

症例3　10～15秒持続する閉塞性無呼吸が

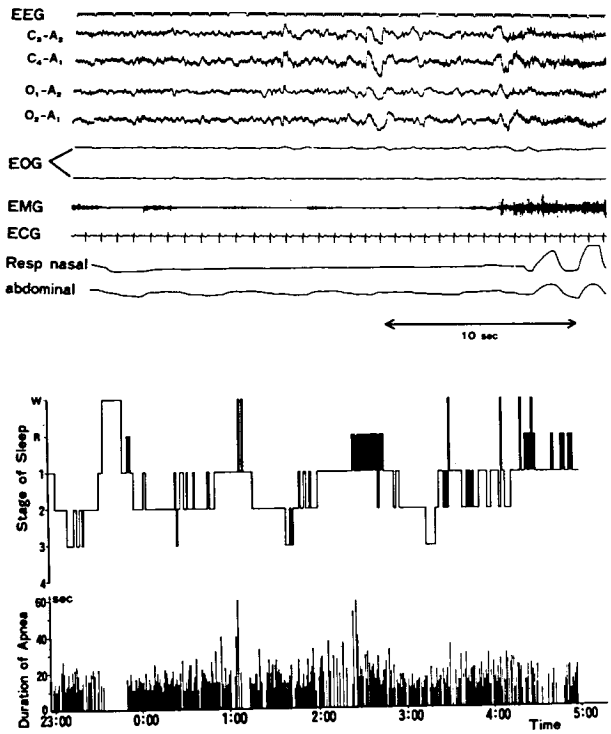


図2　症例2のポリソムノグラム（上段）と睡眠段階（中段），無呼吸の出現（下段）．

StageREM に集中して見られるが，出現頻度は35回/5時間と症例1．2に比較して低値であった．

症例4　低換気による意識障害を呈した例である．閉塞性無呼吸が47回/5時間，無呼吸の持続時間は10～15秒と軽度であったが，StageREM には時に30秒の無呼吸が見られた．

症例5　この例も低換気による意識障害を呈した例であるが，40～50/分の頻呼吸が全睡眠段階に常時出現し，時に10～20秒の中枢性無呼吸が見られた．

表3に各症例の無呼吸の Type と中枢神経系の電気生理学的検査および脳 CT 所見を示す．脳波異常は全例に認められ，主として広汎性徐波の混入であった．聴性脳幹反応（BAEP）においても I-V 波頂点間潜時の延長が全例に認められた．体性感覚誘発電位（右正中神経刺激）では症例3．4において中枢伝導時間（N_{13}-N_{18}）の延長が認められた．脳 CT では症例1．2で大脳皮質の萎縮を，症例5で脳幹の萎縮を認めた．

表3

症　例	1	2	3	4	5
無呼吸の型	中枢性	閉塞性 中枢性	閉塞性	閉塞性	中枢性*
EEG 異常	＋	＋	＋	＋	＋
BAEP 異常	＋	＋	＋	＋	＋
SEP 異常	－	－	＋	－	＋
脳CT異常	皮質萎縮	皮質萎縮	－	－	脳幹萎縮

*頻呼吸の著明な低換気を伴う

考　　案

睡眠時無呼吸は Pickwick 症候群，慢性不眠症など睡眠障害を呈する疾患のほか，慢性閉塞性肺疾患，Shy-Drager 症候群を始め種々の内科疾患においても出現することが近年注目されてきており，無呼吸時の血圧上昇，不整脈の出現等は，患

者の病態，予後に重要な影響を与えると思われる[1]．筋疾患においては，多くの例で，呼吸筋の筋力低下，換気障害が認められるが，睡眠時無呼吸についての報告は少なく，未だ充分注目されていない．特にミトコンドリア脳筋症における呼吸障害については，CO_2 に対する換気応答の低下について，いくつかの報告[2)3)]があるが，睡眠時無呼吸については Leigh 脳症での報告[4)]の他は，いわゆる福原病の病型を呈する1例の報告[5)]があるにすぎない．今回，我々は検索した5例のミトコンドリア脳筋症全例に睡眠時無呼吸を認めた．無呼吸の Type としては症例1が中枢性，症例2が閉塞性および中枢性，症例3．4が閉塞性，症例5が頻呼吸と中枢性無呼吸と多様であり，中枢障害，末梢障害両者の関与が考えられた．症例により無呼吸の程度に差が大きく中枢性無呼吸が認められた症例1．2は高度であったが，閉塞性無呼吸のみの症例3．4は比較的軽度であった．また症例5は無呼吸としては軽度であったが頻呼吸のため著明な換気障害を示した．肺機能では，症例4は症例1と同程度障害されており，症例3ではむしろ他に比べ拘束性障害が高度であった．一方，全例に中枢神経系における電気生理学的異常所見を認めたことより，睡眠時無呼吸に脳幹障害の関与の可能性が示唆された．なお，画像診断的にも脳CTでは症例1．2に脳皮質萎縮があり，症例5では明らかな脳幹萎縮が認められた．無呼吸の重症度と中枢神経障害の関連性については今後さらに症例を重ね，検討すべき問題であるが，症例1．2および5の睡眠時無呼吸発現には中枢障害の関与が大であると思われる．ミトコンドリア脳筋症における睡眠時無呼吸は，重要な臨床徴候であり，特に Kearns-Sayre 症候群等の心筋障害を有する患者においては重大な risk factor である．ポリソムノグラフによる充分な検討，経過観察が必要と思われる．

ま と め

1）5例のミトコンドリア脳筋症患者に終夜睡眠ポリグラフを施行，全例に睡眠時無呼吸を認めた．

2）全例に電気生理学的に脳幹障害を認め無呼吸出現に呼吸中枢の異常の関与の可能性が示唆された．

3）無呼吸の type は多様であり，閉塞性無呼吸のみを呈した2例の無呼吸は軽度であったが，中枢性無呼吸を認めた2例および著明な頻呼吸を呈した1例においては呼吸障害が高度で中枢障害の関与が大であると思われた．

4）睡眠時無呼吸の存在はミトコンドリア脳筋症患者の予後に重要な影響を与え，ポリソムノグラフによる充分な検討，経過観察が必要と思われる．

文　　献

1）Miller WP : Cardiac arrhythmias and conduction disturbances in the sleep apnea syndrome. Am J Med 73 : 317-321, 1982.

2）Carroll JE, Zwillich C, Weil JV et al. : Depressed ventilatory response in oculocraniosomatic neuromuscular disease. Neurology 26 : 140-146, 1976.

3）Bogard JM, Busch HFM, Arts WFM et al. : Metabolic and ventilatory responses to excercise in patients with a deficient O_2 utilization by a mitochondrial myopathy. Adv Exp Med Biol 191 : 409-417, 1985.

4）Pincus JH : Subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh's disease) : a consideration of clinical features and etiology. Develop Med Child Neurol 14 : 84-101, 1972.

5）Byrne E, Dennett X, Trounce I, Burdon J : Mitochondrial myoneuropathy with respiratory failure and myoclonic epilepsy. J Neurol Sci 71 : 273-281, 1985.

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

中　西　孝　雄*

研究協力者　大　越　教　夫*　渡　辺　雅　彦*
樋口八寿子*　水　澤　英　洋*

はじめに

ミトコンドリア・ミオパチーは，臨床的に骨格筋のほかに中枢神経系など種々の臓器の障害を伴うことが知られており，多系統疾患としての病像を呈することも少なくない．その中で，末梢神経障害の合併は，myoclolus epilepsy with ragged-red fibers (MERRF)，Kearns-Shy症候群(KSS)，opthalmoplegia plusおよびその他のミトコンドリア・ミオパチーでそれぞれ少数例の報告があるが，組織学的に証明した報告はまれである[1-6]．

我々は，MERRF 1例を含むミトコンドリア・ミオパチーの4例を経験し，末梢神経障害について臨床的，電気生理学的検索および腓腹神経の組織学的検索を行った．その結果，MERRFの1例を除き3例に感覚障害および神経伝導速度の遅延を認め，また神経生検では全例に末梢神経障害を組織学的に確認できたので報告する．

症　例

症例1：46歳男性．家族歴として，両親はいとこ婚で，長兄（症例2）に同様の症例を認める．18歳の時，視力低下を自覚し，40歳頃より四肢肢帯筋の筋力低下，44歳頃から，眼瞼下垂，頚部の筋萎縮および四肢末梢のしびれ感が出現し，これらの症状が徐々に進行するため，昭和60年6月，当科に入院した．入院時現症として，軽度の知能低下，両側の視力低下と視神経萎縮，眼瞼下垂，ごく軽度の眼球運動制限，軽度の構音障害を認めた．顔面・頚部・四肢筋，特に近位筋優位の筋力低下と筋萎縮があり，全般性に深部反射低下を認めた．手袋靴下型の異常感覚，両手指・足に軽度の温痛覚・触覚低下および下肢に振動覚・位置覚低下を認め，Romberg徴候は陽性であった．頚部・肘部に神経の肥厚を触知した．

症例2：48歳男性，症例1の兄．12歳頃，視力低下および眼瞼下垂を自覚し，33歳頃より下肢の筋力低下および筋萎縮が出現し，歩行が不安定となった．44歳の時，四肢末梢のしびれ感を自覚し，筋力低下も徐々に進行するため，昭和60年11月，当科に入院した．入院時現症は，ほぼ症例1と同様であったが，筋力低下および筋萎縮が四肢の遠位筋優位であること，感覚障害がより高度であること，Babinski徴候を認めること，などの点が症例1と異なっていた．

症例3：37歳女性．家族歴に特記すべきことなし．33歳の時，両側の眼瞼下垂に気づき，昭和60年7月，両足底のしびれ感を自覚し，11月，両手指にもしびれ感が出現したため，昭和61年4月，当科に入院した．入院時現症として，眼瞼下垂およびごく軽度の眼球上転制限，深部反射の低下，両手指・足底の異常感覚，両足の表在感覚の軽度低下，振動覚の低下などを認めたが，筋力低下はなかった．

症例4：49歳女性（Sasaki, et al.[1]最終診断MERRF）．家族歴は，第1子が同様の症状を呈し，13歳で死亡している．42歳頃から上肢にすばやい不随意運動がおこり，起立時や歩行時に急に膝が屈曲するような不随意運動が出現し，48歳の時，体重減少，四肢の筋萎縮，歩行障害などが起こり，昭和55年7月当科に入院した．入院時現症は，身長155cm，体重34.5kg，軽度の計算力低

＊筑波大学臨床医学系神経内科

表1　検査所見

	症例1	症例2	症例3	症例4	正常値
血液　CK	64	124	32	206	< 50 mU/ml
乳酸	17.1	14.9	10.5		4 - 16 mg/dl
ピルビン酸	0.84	0.86	0.50		0.3-0.9 mg/dl
髄液　蛋白	25	23	27	28	15 - 45 mg/dl
乳酸	16.5	15.2	16.5		10 - 16 mg/dl
ピルビン酸	1.00	1.15	0.79		0.6-0.9 mg/dl
心電図	正常		正常	左室肥大	
筋電図	四肢近位筋優位に筋原性 四肢遠位筋優位に神経原性		上肢に 神経原性変化	四肢に 神経原性変化	
MCV　尺骨神経	54	62	70	59	> 50 m/sec
腓骨神経	41	37	44	52	> 45 m/sec
SCV　正中神経	42	67	52		> 50 m/sec
腓腹神経	35	30	32		> 45 m/sec

下，四肢近位筋優位の筋萎縮・筋力低下，深部反射亢進，Babinski 徴候陽性，小脳失調，および四肢に姿勢保持や運動時に誘発されるミオクローヌスを認めたが，感覚障害はなかった．

検査所見

主要検査所見（表1参照）：血中 CK 値は症例1，2，4で軽度上昇しており，血中乳酸値は症例1で軽度増加，髄液乳酸値は症例1，3で軽度増加，髄液ピルビン酸値は症例1，2で軽度増加していた．臨床的に感覚障害を呈した症例1，2，3では，末梢神経伝導速度，特に下肢の MCV, SCV の遅延を認めた．

筋生検所見：全例とも ragged-red fiber を認め，電顕的には結晶様封入体や同心円状クリスタなどを含む異常ミトコンドリアが筋鞘膜下と筋原線維間に集簇し，ミトコンドリア・ミオパチーの診断に合致していた．症例1，2では，多数の ragged-red fiber や筋線維の大小不同などを認め，さらに small grouped atrophy や type grouping などの神経原性変化も呈した．症例3では，ragged-red fiber はごく少数点在し，筋線維の大小不同を認め，症例4は少数の ragged-red fiber および筋線維の大小不同を認めた．Cytochrome c oxidase 染色標本では，症例1，2にて全般性に染色性が低下しており，modefied Gomori trichrome 染色標本と対比すると，ragged-red fiber を呈する筋線維はほとんど染色されず，ragged-red fiber を呈さない線維でも染色性の低下を認めた（図1）．症例3では，ragged-red fiber を呈する筋線維はほとんど染色されず，他に染色性の低下を示す線維が散在し，部分的な染色性の低下を呈した．

腓腹神経生検所見：有髄神経線維密度および平均直径は，症例1（図2）で4840/mm², 2.8μm，症例2で2923/mm², 2.5μm，症例3（図3）で8089/mm², 3.1μm，症例4（図4）で5687/mm², 3.8μm で症例3を除き有髄線維の脱落を認め，特に大径有髄線維は全例とも高度に脱落していた．また，全例とも髄鞘の菲薄化，onion-bulb 形成，small nerve cluster，Schwann 細胞の増生，間質の線維化などを認めた．Onion-bulb 形成は，症例1，2では多数の線維に，症例3，4では電顕的に少数の線維にのみ認められた．ときほぐし法は症例4を除き施行し，症例1，2にて少数の有髄線維に節性脱髄を認めた．無髄線維は症例1，2にて小径化しており，Schwann 細胞の扁平層状化，多数の collagen pocket 形成，軸索をもたない Schwann 細胞突起などの像が見られた．しか

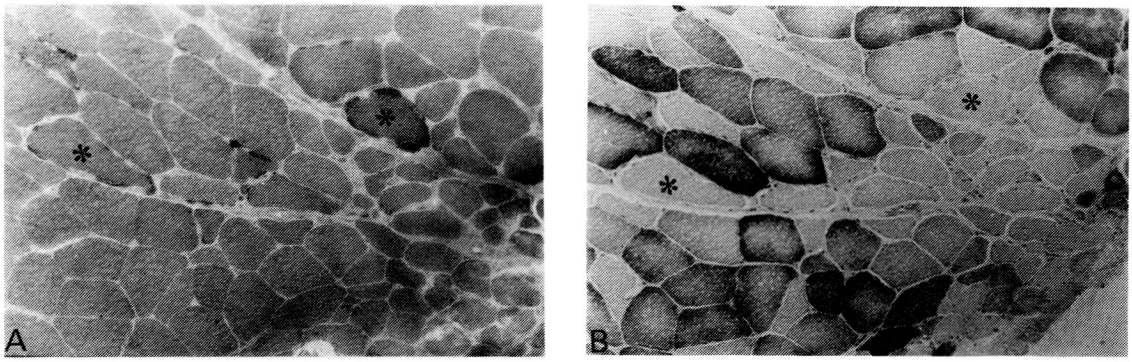


図1　症例2の大腿四頭筋生検標本の modefied Gomori trichrome 染色と cytochrome c oxidase 染色.

A．筋線維の大小不同と ragged-red fiber（星印）.
（Modefied Gomori trichrome 染色×50）

B．連続標本による cytochrome c oxidase 染色の活性部分欠損.
Ragged-red fiber を呈した筋線維は染色性の低下を示すが，その他にも染色性の低下した筋線維が多数認められる．（Cytochrome c oxidase 染色×50）

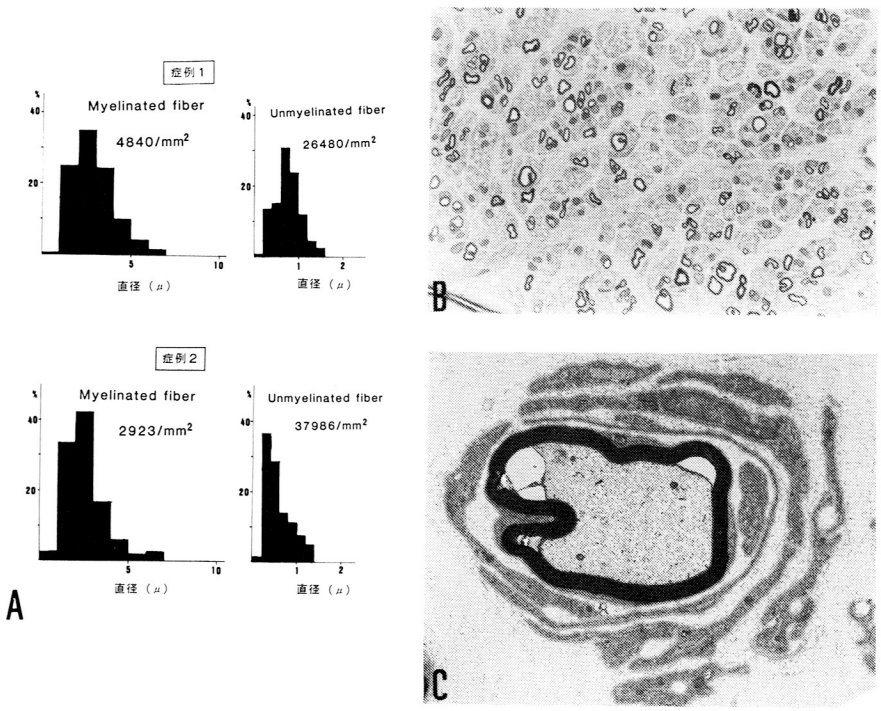


図2　症例1，2の腓腹神経生検所見

A．症例1，2の有髄神経線維および無髄神経線維の直径ヒストグラム

B．有髄神経線維，特に大径有髄神経線維の脱落が高度であり，Schwann 細胞の増生，間質の線維化，髄鞘の菲薄化，onion-bulb 形成などを認める.
（症例1．Toluidine blue 染色×200）

C．有髄神経線維の周囲を軸索をもたない Schwann 細胞突起が層状に取り囲んだ onion-bulb 形成を認める．（電顕×5000）

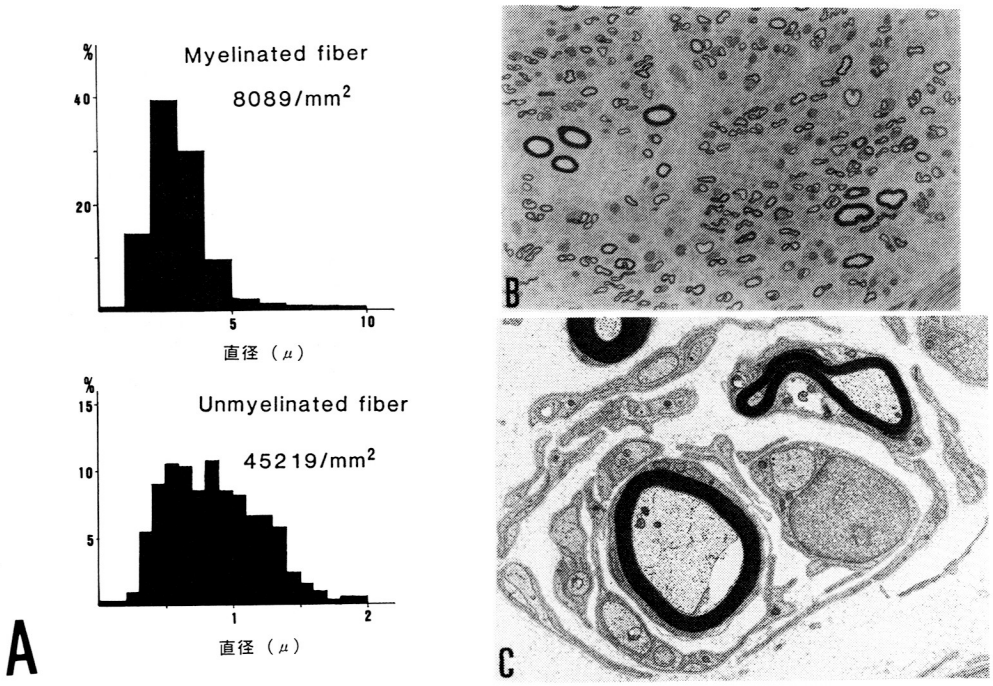


図3　症例3の腓腹神経生検所見
A. 有髄神経線維および無髄神経線維の直径ヒストグラム
B. 光顕像(Toluidine blue 染色×200)
C. 電顕では onion-bulb 形成を認める．(×5000)

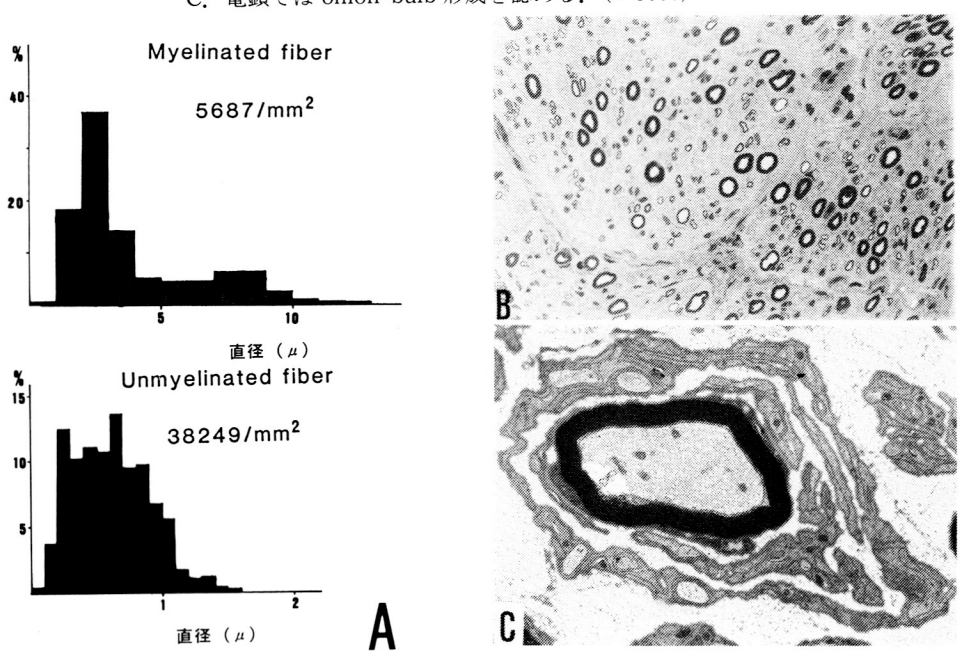


図4　症例4の腓腹神経生検所見
A. 有髄神経線維および無髄神経線維の直径ヒストグラム
B. 光顕像(Toluidine blue 染色×200)
C. 電顕では onion-bulb 形成を認める．(×5000)

し，Schwann 細胞および軸索のミトコンドリアには，筋にみられるような結晶様封入体，同心円状クリスタなどの形態異常は認められなかった．

考　　察

ミトコンドリア・ミオパチーの4症例の主に末梢神経障害について検索した．その結果，3例では臨床的に四肢遠位部のしびれ感，軽度の表在感覚障害および中等度の深部感覚障害を呈し，神経伝導速度の遅延がみられた．また，腓腹神経の組織学的検索では，臨床的に感覚障害を有さない症例も含め全例が末梢神経障害を呈し，主な変化は有髄神経線維，特に大径有髄線維の高度脱落，onion-bulb 形成，髄鞘の菲薄化，small nerve cluster，間質の線維化，Schwann 細胞増生などであった．

ミトコンドリア・ミオパチーの中で，MERRF，KSS，opthalmoplegia plus などでは末梢神経障害を合併した報告例は比較的多くみられるが，組織学的に証明された報告はまれである．Fukahara ら[2]は神経伝導速度の遅延と腓腹神経生検にて有髄神経線維，特に大径有髄線維の高度脱落を認めた MERRF の症例を報告している．また，古谷ら[3]は腓腹神経生検にて大径有髄線維の高度脱落と髄鞘の菲薄化を呈した KSS の症例を報告している．Peyronnard ら[4]は臨床的に明らかな末梢神経障害を伴い，腓腹神経生検で大径有髄線維の高度脱落と電顕的に onion-bulb 様変化を証明しており，我々の検索と類似した所見を報告している．また，Drachman[5]も ophthalmoplegia plus の症例に典型的な onion-bulb 形態を伴った報告をしており，我々の検索では全例で onion-bulb 形成を認めたことからミトコンドリア・ミオパチーの神経生検上，onion-bulb 形成は重要な所見と考えられる．一方，Yiannikas ら[6]はミトコンドリア・ミオパチー20例中5例に臨床的に末梢神経障害を伴い，その5例のうち腓腹神経生検を施行した4例すべてに大径有髄線維の高度脱落を認め，ときほぐし法では節性脱髄と軸索変性を呈し，さらに2例では Schwann 細胞の胞体内に結晶様封入体を含む異常ミトコンドリアを証明している．この異常ミトコンドリアの証明は，ミトコンドリア・ミオパチーの末梢神経障害を考察する上できわめて興味深いことであり，末梢神経障害に Schawnn 細胞のミトコンドリア異常が関与している可能性を示唆するものと思われる．その他，Gonatas ら[7]は末梢神経の Schwann 細胞および軸索内に "zebra" body を認めたという報告をしており，また Atsumi ら[8]は末梢神経の軸索内に Hirano body を証明しており，ミトコンドリア・ミオパチーにおける末梢神経障害のメカニズムとの関連について注目に値する所見である．

以上より，ミトコンドリア・ミオパチーにおける末梢神経障害は，組織学的には大径有髄線維の脱落と髄鞘の菲薄化が主要所見と考えられ，時に onion-bulb 形成，節性脱髄，再生性変化などが認められ，我々の結果とほぼ同様であった．したがって，末梢神経障害のメカニズムは，軸索および Schwann 細胞の両者の障害による慢性の軸索変性と脱髄によるものと考えられる．また，これらの変化はミトコンドリア・ミオパチーの臨床病型の違いによらず共通した所見を有し，末梢神経障害も骨格筋と同様にミトコンドリアの代謝異常によることを示唆するものと思われる．しかし，今回の検索からは末梢神経におけるミトコンドリアの形態異常を直接証明することができなかった．今後，電顕的による Schwann 細胞内や軸索内のミトコンドリアの定量的分析や剖検例による神経節細胞の検索などの詳細なる検討が必要と考えられる．

ま　と　め

1．ミトコンドリア・ミオパチーの4症例の末梢神経障害について，臨床的，電気生理学的および組織学的に検索した．

2．組織学的には，全例で末梢神経障害がみられ，大径有髄線維の脱落，髄鞘の菲薄化，onion-bulb 形成などの所見を認め，慢性の軸索変性と脱髄によるものと考えられた．

3．Myoclolus epilepsy with ragged-red fibers の1例では，臨床的には感覚障害がなかったが，組織学的には変化を認めた．

文　献

1) Sasaki H, Kuzuhara S, Kanazawa I, et al: Myoclonus, cerebellar disorder, neuropathy, mitochondrial myopathy, and ACTH deficiency. Neurology 33: 1288, 1983

2) Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, et al: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities) : Disease entity or a syndrome ? J Neurol Sci 47: 79, 1981

3) 古谷博和，本村　暁，北口哲雄ら：Kearns-Sayre-Shy 症候群：末梢神経障害と髄液乳酸上昇を伴った1例．臨床神経25：1176，1985

4) Peyronnard JM, Charron L, Bellavance A, et al: Neurophathy and mitochondrial myopathy. Ann Neurol 7 : 262, 1980

5) Drachman D: Ophthalmoplegia plus: The neurodegenerative disorders associated with progressive external ophthalmoplegia. Arch Neurol 18: 654, 1968

6) Yiannikas C, Mcleod JG, Pollard JD, et al: Peripheral neuropathy associated with mitochondrial myopathy. Ann Neurol 20 : 249, 1986

7) Gonatas NK, Evangelista I, Martin J: A generalized disorder of nervous system, skeletal muscle and heart resembling Refsum's disease and Hurler's syndrome: II. Ultrastructure. Am J Med 42: 169, 1967

8) Atsumi T, Yamamura Y, Sato T, et al: Hirano bodies in the axon of peripheral nerves in a cases with progressive external ophthalmoplegia with multisystem involvements. Acta Neuropathol (Berl) 49: 95, 1980

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

佐藤　猛*

研究協力者　石垣泰則*　安野みどり*
山内恵子*　宋　東林*

はじめに

Ocular Myopathyは，臨床像ならびに組織学的にOculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) とOculocraniosomatic syndrome (OCSS) の2つに大別されている[1]．後者は全身諸臓器に合併症を伴い，筋生検で特異的なragged-red fiber (RRF) を認め，Kearns Sayer症候群 (KSS) と呼ばれている，我々はKSSと異なり，全身症状を伴わず，四肢筋力低下もあったとしても極く僅かな8症例について筋生検を施行し，筋ミトコンドリア酵素活性測定並びに組織化学・電子顕微鏡的検索を行なったので，若干の考察を加えて報告する．

症　例

症例は眼瞼下垂を主訴とした男性2例，女性6例の25歳から58歳の成人で，小脳症状・四肢筋力低下等の随伴症状を全く伴わない5症例 (Group A) と，ごく僅かの四肢筋力低下はあるが他の合併症は認めない3症例 (Group B) の2群に分類した．なお全例テンシロンテスト陰性であった．

Group A

症例1．Y. M. 57歳　女性

55歳時より両側眼瞼下垂出現．白内障の手術を受けたが，それ以外一般理学的所見・神経学的所見に異常なし．

症例2．H. T. 25歳　女性

23歳時より複視を訴え，1か月後に眼瞼下垂が出現し，そのまま症状は一進一退で経過した．神経学的所見として外眼筋麻痺と四肢筋トーヌスの低下はあったが，筋力低下は認めなかった．

症例3．S. T. 58歳　女性

2か月前より夕方に強い両側眼瞼下垂が出現．その他神経学的に所見なし．

症例4．H. M. 36歳　男性

26歳時より両側眼瞼下垂出現，30歳時に複視を認めた，34歳時他院にて重症筋無力症と診断され治療を受けるが全く改善しなかった．症状は徐々に進行したが，当科受診時外眼筋麻痺と四肢深部腱反射の減弱以外症状なく，四肢筋力はよく保たれていた．

症例5．M. W. 31歳　女性

21歳時より右眼瞼下垂出現，日内変動はあったが複視はなかった．他の神経所見に異常なく，テンシロンテストも陰性であった．

Group B

症例6．M. S. 35歳　女性

幼少時より運動は不得意であったが，日常生活には全く問題はなかった．17歳時突然左眼瞼下垂出現，次いで33歳時右眼瞼下垂が出現，34歳時斜視を自覚した．神経学的所見として網膜色素変性症・難聴等認めず，項頸部，四肢に軽度の筋力低下を認めた．

症例7．S. Y. 38歳　男性

27歳頃より眼瞼下垂，階段昇降時の下肢脱力が出現，これらの症状は非常に緩徐に進行した．複視はないが，四肢筋力の軽度低下と深部腱反射の減弱を認めた．なおこの症例の兄弟に同症状を呈

*順天堂大学医学部脳神経内科

する家族歴がある．

症例8．I. O. 35歳　女性

30歳頃より両側眼瞼下垂出現，次いで臥位での頭部挙上困難を自覚した．受診時の神経学的所見として，眼瞼下垂と外眼筋麻痺，鼻声，項頸部筋力低下，四肢深部腱反射の低下を認めたが，四肢筋力はよく保たれていた．なお家族歴として，妹に眼瞼下垂を認めた．

軽度のCK上昇を2例に，筋電図上筋原性変化を4例に認めたが，乳酸・ピルビン酸値は安静時，負荷時いずれも上昇を認めず，脳波・CT・髄液その他一般検査所見も概ね正常範囲内であった．(表1)

方　　法

上記8症例に対し三角筋の生検を行なった．得られた筋は酵素活性用・組織学用と3～4つのブロックに分け，組織化学以外のものは液体窒素で凍結した．

1．組織学的検索

組織化学：生検筋はイソペンタン・液体窒素で凍結し，クライオスタットで8 μmの凍結切片を作製した．HE, modified Gomori-trichrome, routine ATPase, NADH, SDH, cytochrome oxidase染色を行なった．Cytochrome oxidase染色は，Seligmannら（1968）の方法を一部改変して行なった．

電子顕微鏡的検索：生検筋は2％グルタールアルデヒド固定後1％オスミウム酸で固定し，脱水後エポンアラルダイド包埋した．超薄切片は酢酸ウラン・クエン酸鉛で二重染色し，日立500型電子顕微鏡で観察した．

2．ミトコンドリア分画法

液体窒素で凍結保存した骨格筋を融解し，Makinenら(1968)の方法を一部改変した方法で行なった．骨格筋を細切し，Chappell-Perry medium（0.05M Tris-HCl pH7.4, 0.1M KCl, 0.2 mM ATP, 0.2mM EDTA, lmM $MgCl_2$）を用い，nagaseを作用させた後，遠心分離を繰り返してミトコンドリア分画を得た．

表1　臨床症状・検査データ

	Group A					Group B		
	1	2	3	4	5	6	7	8
Sex	F	F	F	M	F	F	M	F
Age at onset	55	23	58	26	21	17	31	30
Course	2y	2y	2m	10y	10y	18y	7y	5y
Ptosis	+	+	+	+	+	+	+	+
Ophthalmoplegia	-	+	-	+	-	+	+	+
Weakness of limbs	-	-	-	-	-	+	+	+
Cerebellar ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-
CK (IU)	ND	26	ND	69	ND	20-114	ND	ND
Lactate (mg/dl)	8.5	9.2	2.9	7.6	12.5	7.8	8.3	12.9
Pyruvate(mg/dl)	0.75	0.68	0.35	0.60	1.18	0.71	1.06	0.97
EMG	ND	WNL	WNL	Myo	WNL	Myo	Myo	Myo

3．ミトコンドリア酵素活性測定法

Cytochrome C oxidase：瀬屑ら（1965）の方法に準じた．Cytochrome C を hydrosulfate で還元し，Sepharose G 250カラムで精製した．この還元型 cytochrome C 15mM を用いてミトコンドリアに添加し，550nm，25°C における cytochrome C の酸化速度を日立557型分光光度計で測定した．

Succinate cytochrome C reductase：King（1967）の方法に準じた．基質として succinate を用い，ミトコンドリアを加えて550nm，25°C における cytochrome C の還元速度を分光光度計で測定した．

Complex II：Zielger（1967）の方法に準じた．succinate を基質として，Coenzyme Q の変化を600nm，25°C における idophenole の吸光度を介し分光光度計で測定した．

NADH cytochrome C reductase：King（1967）の方法に準じた．基質として NADH を用い，550 nm，25°C における cytochrome C の還元速度を分光光度計で測定した．

Citrate synthase：Morgan-Hughes（1977）らの方法に準じた．基質として Acetyl CoA とオキザロ酢酸を用い412nm，25°C において Mercaptide の変化を分光光度計で測定した．

蛋白定量：Lowry 法で行なった．

結　　果

1．組織学的検索

Group A において筋組織の萎縮・壊死等の非特異的な変化を症例1，2，4，5の4症例に認め，Gomori-trichrome 染色で ragged-red fiber を症例1，3の2例に認めた．又症例1，3，4に cytochrome oxidase 非染色線維をそれぞれ2-3％に認めた．Group B において，非特異的変化を症例7，8の2例に，Gomori trichrome 染色で

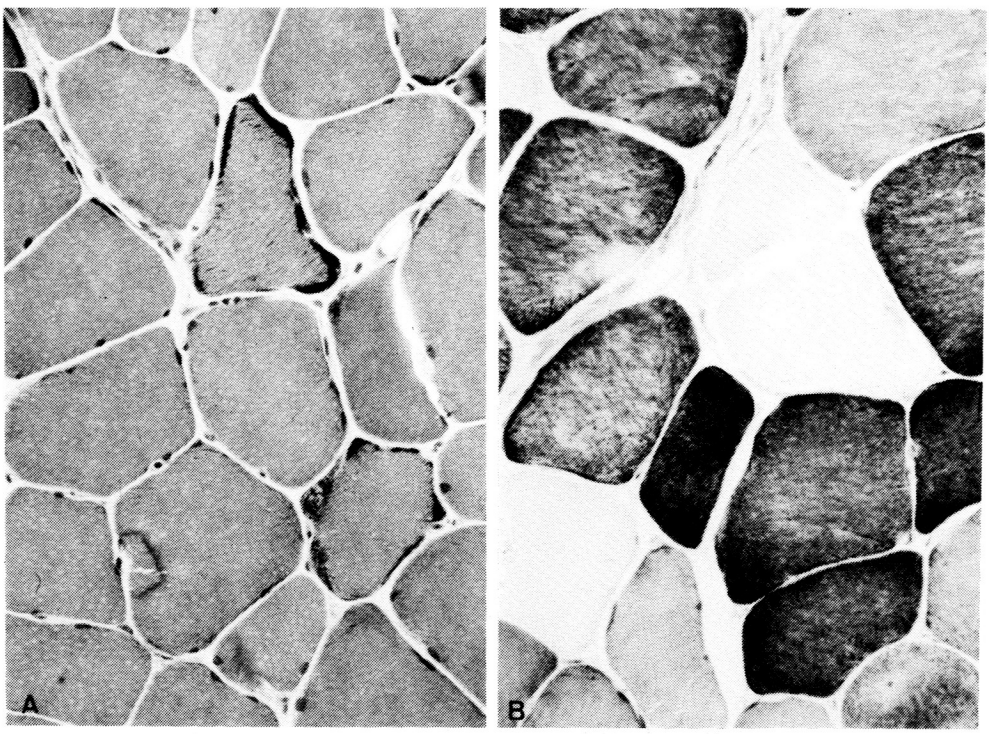


図1　症例6の生検筋，Ragged-red fiber（modified Gomori trichrome stain）（A）と cytochrome oxidase 染色における陰性線維（B）

ragged-red fiber を6，7の2例に認めた．又cytochrome oxidase 染色では症例6に10%，7に5%程度の非染色線維を認めた（図1）．

電顕では，Group A において症例3のみ正常であったが，症例1，2，4，5にグリコーゲン顆粒の集積が見られ，症例2では筋鞘下に管状構造物の集積を認めた．Group B では著しいミトコンドリアの異常を認め，症例8ではミトコンドリアの異常集積とグリコーゲン顆粒の蓄積を，症例6，7にはミトコンドリアの増殖と結晶状封入体を認めた（図2）．

2．ミトコンドリア酵素活性

対照群の酵素活性：各酵素活性値とミトコンドリア蛋白量との間には直線性が認められた．Cytochrome C oxidase（n＝11）：282±95nmol/min/mg Mit. protein, Succinate cytochrome C reductase（n＝11）：247±98nmol/min/mg protein, ComplexII（n＝11）：144±44nmol/min/mg protein, NADH cytochrome C reductase（n＝11）：251±93nmol/min/mg protein, Citrate synthase（n＝11）：419±135nmol/min/mg protein であった．

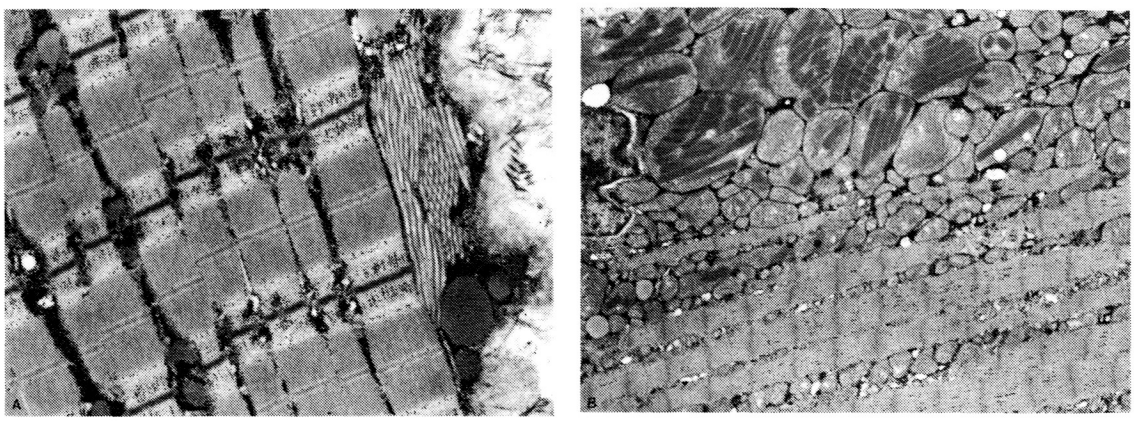


図2　生検筋の電子顕微鏡写真，（A）筋鞘下における管状構造の集積（症例2）（×16,000），（B）典型的結晶状封入体を伴う異常ミトコンドリアの集積（症例6）（×11,000）

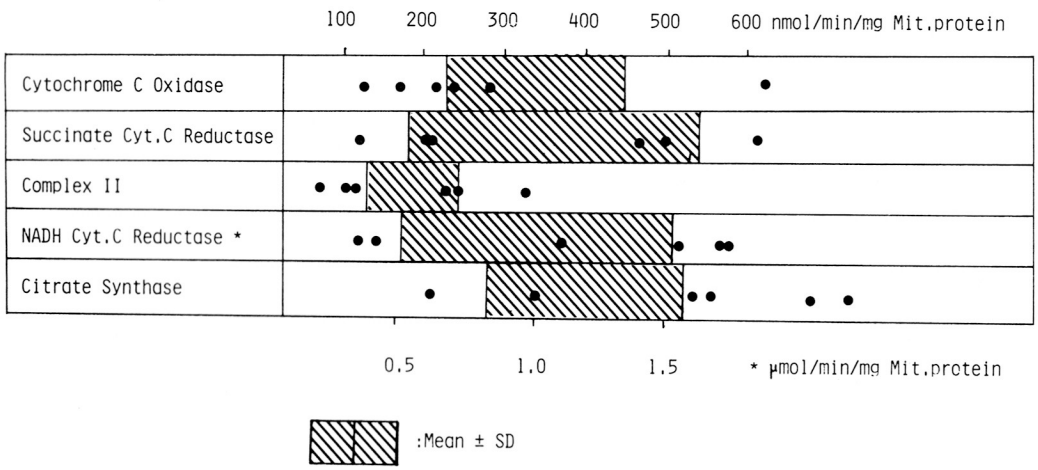


図3　生検筋ミトコンドリアの電子伝達系酵素活性値

Group Aでは症例5がcytochrome C oxidaseで110nmol/min/mg protein, Complex IIで72nmol/min/mg proteinと軽度低値を示した以外正常範囲内であった．一方Group Bでは，症例8がcytochrome C oxidaseで161nmol/min/mg proteinと軽度低値を示した他，いずれの酵素においても正常範囲内であった（図3）

考　　案

Morgan-Hughesらはミトコンドリア筋症を1）基質の移送障害，2）基質の利用障害，3）電子伝達系の障害，4）エネルギーの保存と転換障害に大別した[2]．従来電子伝達系の障害は多数報告されており，更に近年OCSSにcytochrome C oxidaseの部分欠損を有する症例が報告されているが，これらの大多数は四肢筋力低下を始めとして難聴・網膜色素変性症等の全身合併症を有している．M. A. Johnsonら（1983）はcytochrome C oxidase部分欠損を有するOCSSの症例の綿密な組織化学的検索を行なったが[3]，その症例15例中2例に我々のGroup Aに相当する症例を見いだすことができた．このようにOCSSの中には眼筋症状以外に随伴症状を持たず，血中乳酸・ピルビン酸の上昇もなく，しかも生検筋の酵素活性も正常である場合もかなり多いと思われる．一方，これらの症例における組織化学並びに電顕的検索を行なうと，今回のような様々なミトコンドリア異常を見いだすことができ，組織化学・電顕・酵素活性測定の3つのアプローチを併せて行なうことが重要であると思われる．

今回我々の検索した症例中緩徐な進行を見せているものもあるが，10年以上の病歴を持ちほとんど臨床症状に変化のない症例も存在し，日常生活にほとんど問題なく，改善傾向を認めた者さえいる．このような観点から見ると，今回提示した8症例はKearns-Sayer症候群の軽症例とするよりも，異なった疾患概念としたほうが良いかもしれない．この問題に関しては，今後更に症例の積み重ねが重要と考える．

文　　献

1）Fernando MST, Michel F: Ocular Myopathies. in Myology, ed. by Engel AG, Banker BQ, McGRAW-HILL Inc., New York, 1327, 1986

2）Morgan-Hughes JA: Mitochondrial myopathy. in Skeletal Muscle Pathology, ed by Mastaglia FL, Walton J, Churchill Livingstone, Edinburg 309, 1982

3）Johnson MA, Turnbell DM et al: A partial deficiency of cytochrome C oxidase in chronic progressive ophthalmoplegia. J Neurol Sci 60: 31, 1983

40) ミトコンドリア・ミオパチーの免疫電子顕微鏡的研究

佐藤　猛*

研究協力者　安野みどり*　中村真二**　村居達雄***
内田　隆****　小澤高将*****

ミトコンドリア・ミオパチーでは骨格筋内に異常ミトコンドリアが出現することが特徴である．最近，本症候群ではミトコンドリア電子伝達系酵素欠損を示す症例が続々と報告されている．電子伝達系の主要酵素は複合体I，II，III，IVであり，IVはチトクロームC酸化酵素で欠損例が最も多い．生検筋の組織化学的検索ではチトクロームC酸化酵素反応の陰性線維，すなわち部分欠損を示すことがしばしばある．

ミトコンドリア・ミオパチーに出現する異常ミトコンドリアにはクリステ内に結晶状封入体を有するもの，渦巻状クリステ，クリステを欠く巨大ミトコンドリア，大顆粒を有するものなどさまざまなものがみられる．コロイド・ゴールド標識抗体法による免疫電子顕微鏡により，複合体のミトコンドリア内膜内での局在をはじめて明らかにしたので報告する．

方　法

症例：ミトコンドリア脳筋症2例の生検筋を用いた．症例1に筋線維内にミトコンドリアの異常集積，症例2は多数の異常ミトコンドリアを有していた．生検筋の生化学的検索では電子伝達系の酵素活性は正常であった．

抗体：複合体IIIの抗体は名古屋大小澤高将，錦見盛光先生により樹立されたものを供与された．

プロティンA・コロイドゴールドの作製：クエン酸ナトリウムによる還元法[2]によりプロティンAにコロイドゴールド粒子（8 nm）を結合させた．

免疫電子顕微鏡：Kobayashiら[3]の方法によった．生検筋を2％グルタールアルデヒド固定後，N，N-dimethylformamide（DMF）にて脱水，−20°Cにてglycol methacrylate置換後，紫外線重合した．重合後，超薄切片を作成した．これを2％アルブミン−PBSにてブロッキングした後，抗複合体III兎血清（1000倍稀釈）にて4°C，一晩反応させ，洗滌後プロティンA・コロイドゴールド20倍液にて30分室温で反応させた．酢酸ウランにて染色後，電顕にて観察した．

結　果

正常形態を示すミトコンドリアでは，内膜およびクリステ膜に一致して特異的に抗体・プロティンAゴールド複合体（PAG）の沈着が認められた．一方，PAGの沈着は核では全くみられず，筋原線維で少数認められたに過ぎず，ミトコンドリア内膜に極めて強い特異性を有していた（図1）．

症例2では筋線維内に種々の形態を示す異常ミトコンドリアが多数出現していた．すなわち，クリステ内に結晶状封入体を有するもの，クリステが渦巻状に増生しているもの，巨大なミトコンドリアで，基質のみが増加しクリステが減じているもの，粗大な顆粒を有しているものなどである．

これらの異常ミトコンドリアを複合体IIIに対する抗体を用いて検索した．結晶状封入体を有する

＊順天堂大学医学部脳神経内科
＊＊順天堂大学医学部共同病理
＊＊＊順天堂大学医学部中央電子顕微鏡室
＊＊＊＊山梨医科大学解剖学教室
＊＊＊＊＊名古屋大学医学部第二生化学教室

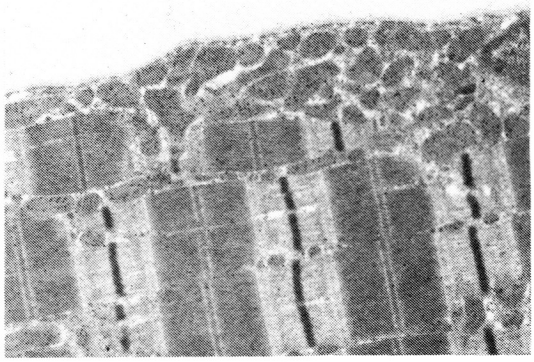


図1　ミトコンドリア　ミオパチー（症例1）生検筋における複合体IIIの免疫電顕．抗体・プロティンAゴールド複合体（PAG）はミトコンドリア内膜に一致して沈着している（×9,000）．

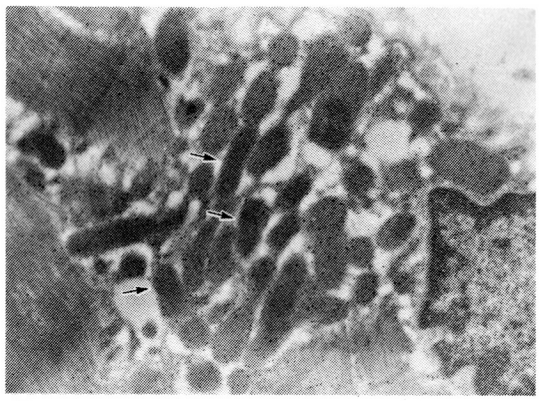


図2　ミトコンドリア　ミオパチー（症例2）生検筋における結晶状封入体を有するミトコンドリア．結晶内にはPAGは沈着しておらず，これを取り囲んでいる膜にのみ沈着している（矢印）（×13,000）．

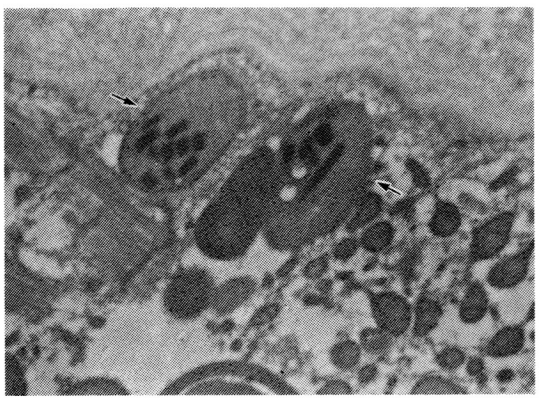


図3　症例2，巨大ミトコンドリアでは内膜のみにPAG陽性（矢印），渦巻状ミトコンドリアでは増生したクリステ膜に沿って陽性（×11,000）．

ミトコンドリアでは内膜，および結晶を取り囲んでいるクリステ膜にPAGの沈着が認められたが，結晶内にはPAGの沈着は少なかった．結晶構造は通常ではクリステ内に4層の膜が一単位となっている．この4層の膜のうち，最外層の膜だけにはPAGの沈着が認められることがあった（図2）．渦巻状ミトコンドリアでは増生したクリステに沿って多数のPAGの沈着が見出された．

巨大ミトコンドリアでは内膜のみにPAGの沈着が見出されたが，膨大した基質内には認められなかった．巨大ミトコンドリアと渦巻状のものとが連続しており，さらに内部に結晶状封入体をも含んでいる異常ミトコンドリアが観察されることもあるが，PAG沈着状態は前述のものと同一傾向にあった（図3）．

粗大顆粒を有するミトコンドリアでは，この顆粒を取り囲んでいる膜にはPAGが沈着していた．

考察と結論

電子伝達系酵素はミトコンドリアの内膜に局在することが知られている．この酵素群のひとつである複合体IIIに対する抗体を用い，プロティンA・ゴールド法による免疫電顕ではじめて複合体IIIの局在を明らかにした．さらに結晶状封入体を有するミトコンドリアにおける複合体IIIの局在も観察した．

正常では，ミトコンドリアの内膜とクリステにはPAG沈着が明瞭であった．結晶状封入体を有するミトコンドリアでは結晶構造内にはPAG沈着はほとんど見出せず，結晶を取り囲んでいるクリステ膜にのみPAGが沈着していた．結晶を構成している4層の膜のうち最外層にのみPAGが沈着していることがあるが，超薄切片の厚さを考慮すると，切片の厚さのためのずれによる可能性が考えられる．

結晶状封入体に電子伝達系酵素の活性が存在するか否かについては，電顕的組織化学による研究が報告されている[4]．この報告では結晶構造内にはチトクロムC酸化酵素，およびカルニチン，アセチル，トランスフェラーゼ活性は陰性であり，これを取り囲んでいるクリステ膜だけが陽性であった．われわれの研究でも結晶内には電子伝達系の酵素蛋白は存在していなかった．すなわち結晶構造では内膜の酵素蛋白は含まれておらず，酵素活性も発現していない．

一方，渦巻状に増殖したミトコンドリアのクリステ膜には電子伝達系の酵素蛋白は存在していた．

以上のように超薄切片上に直接抗体を反応させることが可能な免疫電顕の方法を紹介した．今後，ミトコンドリアの電子伝達系酵素欠損例における酵素の局在の検索などを続ける予定である．

文　献

1）安野みどり，佐藤　猛，山内恵子，福森義宏：ミトコンドリア・ミオパチーの診断——生化学的酵素活性・組織化学・免疫組織化学との対比——．神経内科24：142-151，1986．

2）Roth, J : The protein A-gold (pAg) technique ——A qualitative and quantitative approach for antigen localization on thin sections. Techniques in Immunocytochemistry. (ed. Bullock G.R. and Petrusz P.) Academic Press, London, Vol. 1, pp 107-113.

3）Kobayashi, S., Uchida, T., Ohashi, T., et al. : Met-Enkephalin-Arg-Gly-Leu-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and carotid body chief cells of the dog and monkey. Biomedical Research 4 : 201-210, 1983.

4）Bonilla, E., Schotland, D.L., and Aldover, B. : Electron cytochemistry of crystalline inclusions in human skeletal muscle mitochondria. J. Ultrastructure Research 51 : 404-408, 1975.

41) MELASの臨床並びに生化学的所見

宮武　正*

研究協力者　西澤正豊*　田中恵子*　渥美哲至*
田中雅嗣**　小澤高将**

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になってきた．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の2症例を剖検にて病理学的に検索する機会を得，大脳皮質を中心として多発性の軟化巣を確認した．これらと共通する剖検所見の記載されたMELASの報告は文献上5例あり，これらに我々の2例を加えた7例についてMELAS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MELASの位置付けを考察した．我々の2症例に認められた特徴的な血管病変については共同研究者の大浜より報告する．また生化学的分析の結果についても合わせて報告する．

対象と方法

今回対象としたMELASの7剖検例を表1に示す．男性4例，女性3例で，発症は1～7歳であり，21歳までにすべて死亡している．全例に共通して大脳皮質を中心とした多発性の軟化巣が認められている．これらの症例を確実なMELASと考え，臨床，検査データ上MELASに特徴的と考えられる所見を抽出し，更に剖検所見が記載されたMERRF 3例[7),8),9)]と比較検討した．

生化学的分析にはまず諸臓器よりBookelmanらの方法によりミトコンドリアを単離し，電子伝達系の酵素活性を常法により測定した[5)]．ついで，Tanakaらの方法[10)]により電子伝達系のcomplex I，III，IV，Vについて各complexを構成するsubunitをimmunoblottingにより分析し，正常対照と比較検討した．

結　果

MELASの臨床上の特徴として7例のほぼ全例に認められたのは1)成長障害ないしは低身長，2)進行性の痴呆，3)発作性の意識障害ないしは頭痛，嘔吐，4)全身性けいれん，5)感音性難聴，6)筋萎縮ないしは筋力低下，7)片麻痺，半盲，一過性失明などの何らかの脳卒中様発作であった．遺伝性は6家系中3家系に認められた．また，視神経萎縮は3例，眼球運動制限は1例，眼振は2例，小脳失調は1例，深部腱反射の減弱は3例，Babinski徴候は1例に記載されていた．macular degenerationは2例に認められたが，網膜色素変性症はなく，深部感覚障害，足変形は認められなかった．MERRFとの鑑別上問題とされているミオクローヌスについてはミオクローヌス発作を4例に，“ミオクローヌス”の記載を1例に認めた．

検査所見上は1)脳波における基礎波の徐波化，および何らかの発作波の出現，2)静脈血中および髄液中の乳酸，ピルビン酸の上昇，3)大脳基底核の石灰化，はほぼ全例に認められた．血清CKの上昇は5例に，髄液蛋白の上昇は100mg/dlをこえないが2例にみられた．心電図ではST低下が2例に，WPW症候群が別の2例に記載されていた．肥大型心筋症の合併は我々の2症例にのみ認められた．神経伝導速度は全例正常であり，筋電

*新潟大学脳研究所神経内科
**名古屋大学医学部第二生化学

表1 AUTOPSY CASES OF MELAS

AUTOPSY CASES OF MELAS

	Reported by	Sex	Onset(y)	Death(y)	
1.	Shapira et al.[1]	F	4	16	
2.		M	3	10	
3.	Hart et al.[2]	F	7	18	
4.	Kuriyama et al.[3]	M	5	18	
5.	Mukoyama et al.[4]	M		21	
6.	Nishizawa et al.[5]	F	6	16	(Case 1)
7.	Tanaka et al.[6]	M	1-2	14	(Case 2)

表2 COMPARISON OF MELAS WITH MERRF

	MELAS	MERRF
heredity	3/6	+
growth failure/short stature	7/7	+
progressive dementia	7/7	+
episodic headache/vomiting	7/7	-
generalized convulsion	7/7	+
optic atrophy	3/7	-
nystagmus	2/7	+
sensorineural hearing loss	7/7	+
muscle wasting/weakness	7/7	+
myoclonus	1/7	+
myoclonic seizure	4/7	-
cerebellar ataxia	1/7	+
Babinski	1/7	+
disturbance of deep sensation	0/7	+
foot deformity (Friedreich)	0/7	+
strokelike episodes/ LDA in CT	6/7	-
basal ganglia calcification	6/7	-

図では3例は正常，2例は筋原性，1例は筋原性変化に一部神経原性変化を混じていた．CTは5例に施行され，全例に大脳皮質の萎縮が認められた．更に小脳萎縮は2例に，大脳の限局性の低吸収域の出現は3例に記載されていた．

以上のMELASの特徴的所見を，共通した剖検所見が記載されているMERRFの剖検例3例における臨床症状の特徴と対比して**表2**に示した．表から明らかなように両者を通じて認められる症状も多いが，MELASのみに認められる症状として1)発作性の頭痛ないし嘔吐，2)何らかの脳卒中様発作ないしはCT上の低吸収域の出現，3)大脳基底核の石灰化を挙げることができた．一方，1)深部感覚障害，2)Friedreich様の足変形はMERRFにのみ認められた．MERRFの中核症状は著明な動作性ミオクローヌスと小脳失調であり，ミオクローヌスてんかんの臨床像を前景として，これにBabinski徴候，深部感覚障害，足変形を伴っているのに対して，MELASでは“ミオクローヌス”，小脳失調，Babinski徴候はそれぞれ1例にのみ記載があり，MERRFとは極めて対照的であった．DiMauroら[11]はinterictalに認められるミオクローヌスの有無を重視したが，ミオクローヌス発作の記載はMELAS 4例に認められた．

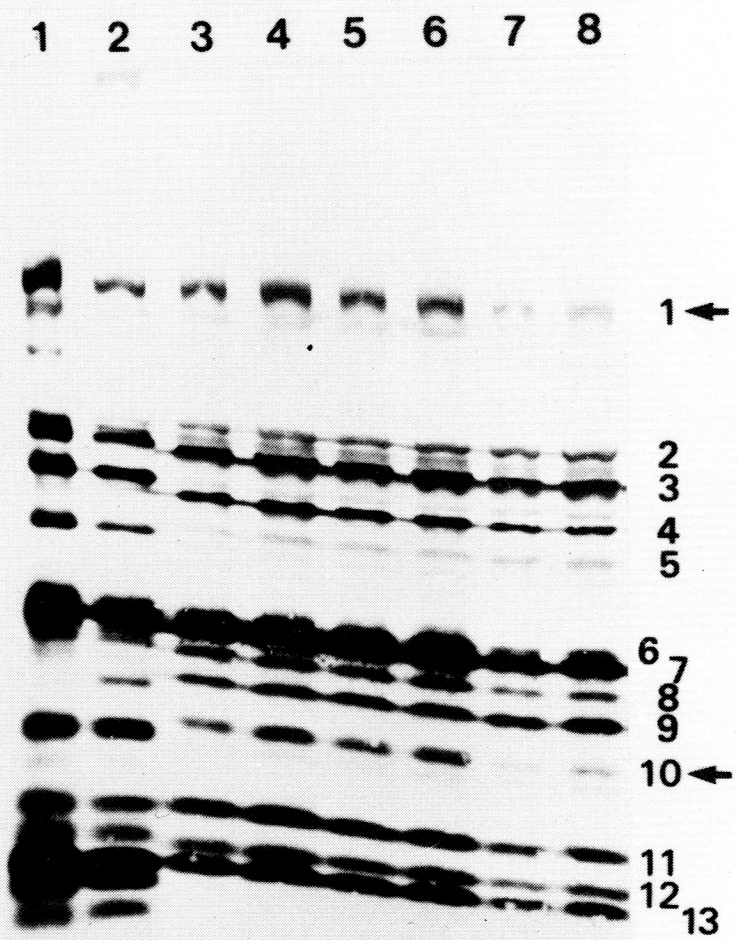
我々の症例1は昨年度の本班会議で報告した如く，心筋より単離したミトコンドリアについて酸素電極法による解析と電子伝達系酵素活性の測定を行ない，complex Iの異常が確認されている．加えているが，障害部位は未だ同定されていない．

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，両者はそれぞれミトコンドリア脳筋症に属する疾患群の中で際立った特徴をもった症候群と考えることができた．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2つ挙げられる．第1はMELASの症例でミオクローヌスの記載があることである．この点は文献上記載があいまいであり，また必ずしも誘発電位など詳細な電気生理学的解析が加えられていないため，ミオクローヌスの解釈に問題が残るためである．今回取りあげたMELASの7例でも“ミオクローヌス”の記載が今回はまず臓器特異性の有無を検討するため，骨格筋，肝においてもNADH-coenzyme Q reductase, succinate-cytochrome c reductase, cytochrome c oxidaseの活性を検討したところ，complex Iの活性は心，骨格筋，肝にてそれぞ正常対照の19，27，35%に低下していた．complex II＋IIIの活性は肝でのみ正常対照の60%に，complex IVは心でのみ正常対照の68%に低下していた．

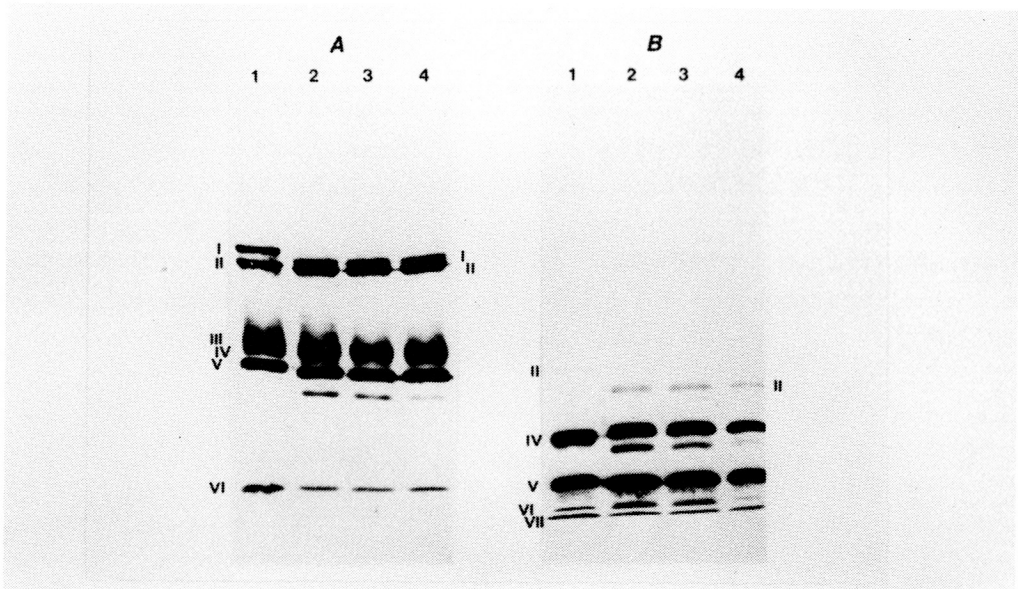
つぎに各complexのsubunit構成をimmunoblottingにより検討した結果を示す．心筋についてはcomplex Iの構成subunitの全般的な減少(**図1**)を認めたが，complex IIIの各subunitは正常対照と同程度に存在し(**図2，A**)，またcomplex IVについては対照に比して軽度の減少を認めた(**図2，B**)．この結果は酵素活性の測定結果に一致していた．検索した骨格筋，肝，腎についての結果をまとめて**表3**に模式的に示した．本症例における電子伝達系complex I subunitの減少は検索したいずれの臓器においても認められたが，その程度は一様ではなかった．また各subunitはいずれも全体的に減少しており，特定のsubunitの欠損は示さなかった．更に，心，肝ではcomplex IVのsubunitの軽度の減少を伴っていた．

我々の症例2についても同様な生化学的検討を1例に，またミオクローヌス発作の記載が4例にも認められており，単にミオクローヌスの有無のみでは両者は鑑別できなかった．MELASにミオクローヌスを合併する可能性は十分考えられるが，MERRFはミオクローヌスてんかんの病像を呈するものであり，両者の相違は明らかであった．第2はMERRFでの脳卒中様発作の記載である．しかし，この点は剖検例では確認されない．実際，剖検所見ではMERRFは小脳歯状核・皮質，赤核，淡蒼球，視床下核，後索，脊髄小脳路等に系統的な変性像があり，MELASにみられる多発性の軟化巣は認められない．また我々のMELASの2症例には大浜らがミトコンドリア・アンギオパ



Lane 1, purified complex I; lane 2, beef heart mitochondria; lane 3 and 4, normal human heart mitochondria; lane 5 and 6, another normal human heart mitochondria; lane 7 and 8, patient heart mitochondria. The amounts of protein applied are 2 μg in lane 1, 25 μg in lane 2, 37.5 μg in lane 3, 5, and 7, and 75 μg in lane 4, 6, and 8. The subunits are numbered tentatively on the right side of the figure.

図1 IMMUNOBLOTTING ANALYSIS OF SUBUNITS OF HUMAN HEART MITOCHONDRIAL NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE (COMPLEX I) USING ANTI-COMPLEX I ANTIBODY RAISED AGAINST PURIFIED BEEF HOLOENZYME



Lane 1, 25 μg of beef heart mitochondria; lane 2 and 3, 75 μg of normal human heart mitochondria; lane 4, 75 μg of patient heart mitochondria.
Roman numerals indicate the subunit numbers. In A, I and II, core proteins; III, cytochrome b; IV, cytochrome c_1; V, Rieske iron-sulfur protein; and VI, ubiquinone-binding protein.

図 2　IMMUNOCHEMICAL DETECTION OF SUBUNITS IN UBIQUINOL-CYTOCHROME C OXIDOREDUCTASE (COMPLEX III) (A) AND CYTOCHROME C OXIDASE (COMPLEX IV) (B) IN BEEF, NORMAL HUMAN, AND PATIENT HEART MITOCHONDRIA

表 3　IMMUNOBLOTTING ANALYSIS OF SUBUNITS OF EACH COMPLEX IN THE MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT CHAIN

IMMUNOBLOTTING ANALYSIS OF SUBUNITS OF EACH COMPLEX IN THE MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT CHAIN

Tissue	Complex			
	I	III	IV	V
heart	↓↓	→	↓	→
skeletal muscle	↓↓	→	→	→
liver	↓	→	↓	↓
kidney	↓↓	→	→	→

with the antibodies against each complex raised against the purified beef heart holoenzymes

チーと名付けた特徴的な血管病変が共通して認められており，この病変が多発性の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検討が重要と思われる．

MELASの症例で生化学的分析が加えられたものではcomplex Iの異常とcomplex IVの異常が報告されている．生化学的分析が進むにつれて生化学的に同定される障害部位と臨床症状が対応しなくなったことは既に述べたが，異なる障害により同一の病型を生ずる理由も未だ明らかでない．我々の1例ではcomplex Iの異常を確認したが，文献上complex Iの異常症は臨床的には筋症状のみの例，脳症を呈する例，MELASの例の3群に分けられ，同じ障害が異なる病型を呈する理由もまた明らかでない．更にcomplex IとIVにまたがる異常を認めた報告も散見され，また測定の時期により異なった異常を呈した例も報告されている．以上のように生化学的分類は混乱をきたしており，より詳細な検討が必要である．

結　語

1) ミトコンドリア脳筋症の中でMELASはMERRFとは異なる臨床・病理学的特徴を有する独立した疾患単位と考えられた．

2) MELASの中には生化学的にcomplex Iの異常によるものが存在した．自験例ではimmunoblottingによりcomplex I subunitの全般的な減少を認めたが，その程度は臓器により異なっていた．

文　献

1) Shapira Y, Cederbaum SD et al.: Familial poliodystrophy, mitochondrial myopathy, and lactate acidemia. Neurology 25: 614, 1975.

2) Hart AH, Chang C-H, et al.: Familial poliodystrophy, mitochondrial myopathy, and lactate acidemia. Arch. Neurol. 34: 180, 1977.

3) Kuriyama M, Umezaki H et al.: Mitochondrial encephalomyopathy with lactate-pyruvate elevation and brain infarctions. Neurology 34: 72, 1984.

4) Mukoyama M, Kazui H et al.: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes with acanthocytosis: a clinico-pathological study of a unique case. J. Neurol. 233: 228, 1986.

5) Nishizawa M, Tanaka K et al.: A mitochondrial encephalomyopathy with cardiomyopathy. A case revealing a defect of complex I in the respiratory chain. J. Neurol. Sci. in press.

6) 田中恵子，上野光博ら：ネフローゼ症候群を合併したミトコンドリア脳筋症の1例．臨床神経 26：1190，1986.

7) Fukuhara N, Tokiguchi S et al.: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? J. Neurol. Sci. 47: 117, 1980.

8) 中野隆雄，酒井晴忠ら：変性型ミオクローヌスてんかん，フリードライヒ失調症およびmitochondrial myopathyを合併した分類困難な1剖検例．脳神経 34：321，1982.

9) Fukuhara N: Myoclonus epilepsy and mitochondrial myopathy. in Mitochondrial Pathology in Muscle Diseases (ed. by Scarlato G & Cerri C) Piccin Medical Books, Padua, 1983, pp. 89.

10) Tanaka M, Nishikimi M et al.: Deficiency of subunits in heart mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase of a patient with mitochondrial encephalomyopathy and cardiomyopathy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 140: 88, 1986.

11) DiMauro S, Bonilla E et al.: Mitochondrial myopathies. Ann. Neurol. 17: 521, 1985.

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

宮　武　　正*

研究協力者　大浜栄作**　大原慎司**　生田房弘**

臨床的および剖検により確診された2例のmitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes（以下MELASと略）の脳血管系を，系統的に電顕的に検索し，特異な血管病変——mitochondrial angiopathyの存在することを見出した．この病変は，血管病変としても，これまで記載のない特徴的な所見を示すのみならず，従来剖検例で記載されながら，その発生機序については不明のままであったMELASの脳病変の原因をなすものと考えられる．

検索対象および方法

〔症例1〕死亡時16歳の女性[1,2]．

〔症例2〕死亡時14歳の男性[3]．

剖検時，各例から電顕用に採取した次の部位を検索対象とした．前，中，後各大脳動脈の主幹部，およびクモ膜下腔を走るそれらのより遠位側ならびに皮質表層部での細小血管．椎骨，脳底および後下小脳動脈．大脳各頭葉の皮質，白質，大脳基底核，視床，脳幹，小脳半球．

採取した組織は，ただちに3％グルタール，1％パラフォルムアルデヒド混合液，一部は4％パラフォルムアルデヒド液にて固定し，1％オスミウム液で後固定した．ethanol脱水，epon包埋の後，1μ厚の光顕標本，次いで超薄切片を作製し，光顕および電顕下で観察した．

結　　果

光学顕微鏡所見：中膜平滑筋細胞および内皮細胞の胞体内に小空胞が多数認められ（図1a，b），これらは後記のように著しく増加したミトコンドリアであることが確認された．特にクモ膜下腔の細動脈（50μ径まで）（図1a），および小動脈（200μ径まで）（図1b）で多く，時に，より大径の動脈にも認められた．平滑筋層が多層の動脈では，その外層部により多く認められた（図1b）．また，特にクモ膜下腔の細小動脈の中膜では，萎縮・濃染または淡染する平滑筋細胞が多数存在し，大小不同が認められた（図1a）．より大径の動脈では，内膜の線維性肥厚（図1b）や内弾性板の部分的消失，分裂・増生が見られた．

電子顕微鏡所見：中膜平滑筋細胞の胞体内に，異常に多数のミトコンドリアの集積が見られた（図2，3）．ミトコンドリアの形態は，大小不同，輪郭の不整，異常に長いもの，クリステの不規則な増加や層状構造を示すもの，電子密度の高い顆粒を有するものなど，骨格筋や心筋と比較すると軽度であるが，明らかな異常を示すものが認められた．結晶状封入体は認められなかった．ミトコンドリアの増加は，核の両端から胞体中央部にかけて最も著明であった（図2）．ミトコンドリアの増加した平滑筋細胞では，myofilamentが胞体の辺縁部に少量しか認められず，同時にグリコーゲン顆粒の増加を示すもの（図2）と，逆に胞体が萎縮し，myofilamentがdenseに濃縮され，細胞全体の電子密度が増して見えるもの（図3）とが認められた．また，周囲のbasal laminaを残したまま，変性，壊死に陥った平滑筋細胞が，散在性ま

＊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

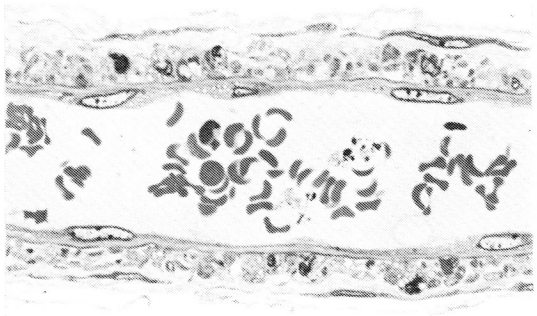
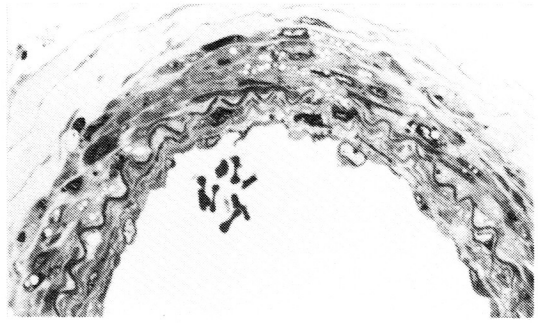


図1 a　Longitudinal section of a pial arteriole (50μ in diameter) of the motor cortex, showing numerous microvacuoles in endothelial and smooth muscle cells. Some smooth muscle cells are pyknotic, skrunken and varying in size and shape. Case 1. Toluidineblue-Safranine (TBS). × 690



1 b　Cross section of a pial small artery (125μ in diameter) in the Sylvian fissure, showing smooth muscle cells with microvacuoles, more frequent in the outer layer of the media. Fibrous intimal thickening is also noted. Case 1. TBS. × 690

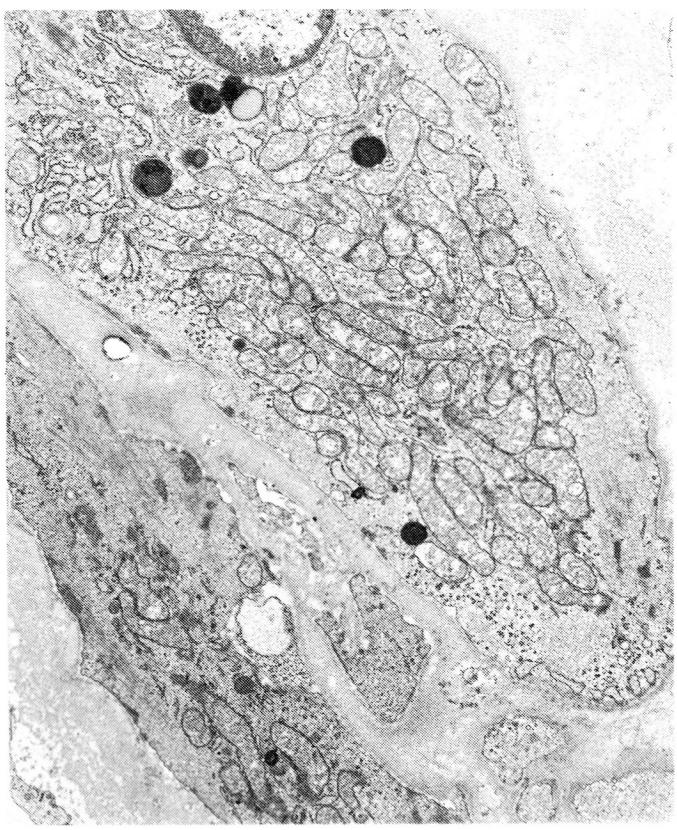


図2　A pial arteriole on the motor cortex. A smooth muscle cell shows accumulation of mitochondria of varied size and shape, and decreased amount of myofilaments. The lumen is at the lower left. Case 2. ×13,000

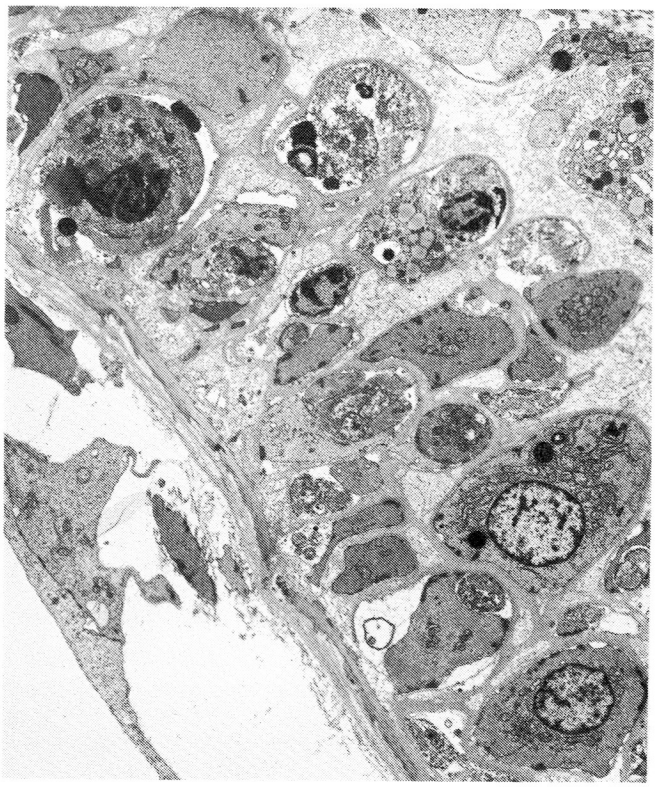


図3　A pial arteriole on the motor cortex, showing numerous degenerating and necrotic smooth muscle cells. The lumen is at the lower left. Case 2. ×5,500

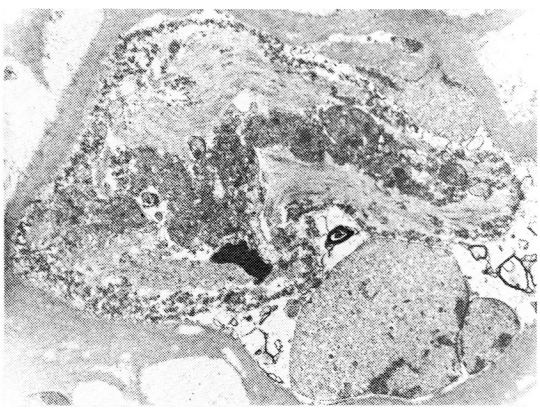


図4　A proximal portion of the middle cerebral artery. A necrotic smooth muscle cell showing loss of plasma membrane, subsarcolemmal accumulation of electron dense materials and degenerating mitochondria. Case 2. ×15,900

たは集簇性に認められた(図3，4)．このような変性・壊死を示す平滑筋細胞は，核膜および細胞膜の部分的または完全な消失とともに，核質，細胞質の崩壊を示し，細胞膜直下にそって高電子密度の物質が斑状，不規則に集積していた．また，胞体内に変性萎縮したミトコンドリアを伴うものも見られた(図4)．平滑筋細胞におけるミトコンドリアの集積や変性壊死像は，椎骨および脳底動脈をはじめ，前，中（図4）および後大脳動脈で，その主幹部およびクモ膜下腔で大脳皮質表層部や脳溝内を走る細小動脈のレベルまで，共通して認められた．しかしながら，それら病変の程度や頻度は，血管径が小さくなるほど強くなり，平滑筋層が1～3層までの細動脈（図2，3）および5～6層までの小動脈で著明であった．多層の平滑筋層から成る動脈では，中膜の外層部に多発し，内層部の平滑筋細胞の多くは，ほぼ健常に保たれ

ていた．クモ膜下腔の細小動脈と極めて対象的に，大脳および小脳皮質，白質，大脳基底核等の細小動脈では，このような中膜平滑筋細胞の変化をみることは稀で，その程度も軽かった．

ミトコンドリアの集積は，クモ膜下腔の細小動脈および脳実質内の細小動脈や毛細血管の内皮細胞にも認められた．しかし，その程度や頻度は，中膜平滑筋細胞に比較すると軽かった．

血管内腔に血栓や塞栓を示す所見は見られなかった．外膜には特に異常は認めなかった．

考　　察

今回我々は，臨床的および剖検によりMELASと診断された2例の脳血管系を，系統的に電顕的に検索し，2例に共通する特徴的な病変を見い出した．それらを要約すると，次のようになる．①中膜平滑筋細胞および内皮細胞体内のミトコンドリアの集積．これら増加したミトコンドリアの中には，軽度ながら明らかな形態異常を示すものも混在していた．②中膜平滑筋細胞層では，①と同時に，変性・壊死を示す平滑筋細胞が散在性または集簇して認められた．③上記の所見は，椎骨，脳底，前，中および後大脳動脈の主幹部およびそれらの分枝に認められたが，病変の程度と頻度は，クモ膜下腔の細動脈や小動脈で最も著明であった．

以上の所見より成る血管病変は，これまで脳血管を障害する種々の疾患や病態で記載されている血管病変のいずれとも異なっており，極めて特異な病変と言える．ただし，クモ膜下出血に続発した血管攣縮と悪性高血圧を有し高血圧性脳症を呈した患者の血管病変は，ともに中膜平滑筋細胞の壊死を示す点で，我々の2例に認められた血管病変に部分的に類似している．もちろん，これらの疾患や病態で，中膜平滑筋細胞や内皮細胞に，ミトコンドリアの集積が認められたという報告は見られない．

次に，この特徴的な血管病変の発生機序について考えてみたい．我々の2例はともに，臨床的にも肥大型心筋症と心機能低下が認められており，剖検では心筋にも著明なミトコンドリア心筋症が認められた．従って，この2例には，心機能低下による虚血状態が，かなりの期間にわたって持続していた可能性が考えられる．実験的にも，虚血によって，骨格筋にミトコンドリアの集積と形態の異常を惹起し得ることから，心機能低下による慢性の虚血状態が，この血管病変をひき起こした可能性を考慮する必要がある．しかしながら，我々の症例1では剖検心筋より単離したミトコンドリアの生化学的分析により，電子伝達系の複合体Iの欠乏が見出されている[1,2]ことから，この脳血管病変は，骨格筋や心筋で考えられているのと同様，中膜平滑筋および内皮細胞におけるミトコンドリアの一次的な機能異常に基づく病変——mitochondrial angiopathyと考えられる．

次に，MELASにおけるmitochondrial angiopathyと脳病変との関連について考察する．我々の2例およびこれまでの報告によると，MELASの頭部CTスキャンでは，脳梗塞を思わせる低吸収域が，単発性または多発性に出現し，臨床症状の推移によく一致して消長，移動，反復し，時間の経過によって全く消失したり，時に巣状の萎縮像として残存する．一方，MELASの脳病変については，これまで6例の剖検所見が報告されており[4~8]，我々の2例とよく類似している．すなわち，大小，新旧種々の孤立性または融合性の“梗塞”，あるいは軟化巣が主に大脳皮質に，多発性，両側性に出現し，その他，軽度ながら皮質下白質，大脳基底核，小脳，脳幹等にも認められる．Kuriyamaら[6]，Mukoyamaら[7]は，これらの病巣の分布が特定の血管支配領域に一致しないことを指摘し，従ってその発生機序は通常の血栓または塞栓とは異なるものと考えている．

このような，MELASの脳病変の局在・分布の特徴は，クモ膜下腔の細小動脈が最も強く障害されるmitochondrial angiopathyによって，極めてよく説明できる．

ところで，脳の細小動脈は，血流抵抗の大きい血管，すなわち抵抗血管であり，脳血流のautoregulationに最も重要な役割を演じている血管とされている．すなわち，その中膜平滑筋の収縮，弛緩によって，内径を能動的に変え，脳血流を一定に調節している血管である．従って，MELAS

では，mitochondrial angiopathy のために，脳血流の変化や血圧の変動に対する autoregulation 機能の低下が招来されることが考えられる．これらの異常は，さらに頭蓋内圧や脳灌流圧の変化をもたらし，局所的または広範な脳循環の異常を招来することも可能であろう．また，この点に関連して，心機能の低下を重要な因子として考慮する必要がある．MELAS では，我々の 2 例の他にも，ミトコンドリア心筋症を示した例や心電図，胸部 X 線写真等で異常を呈する例がしばしば記載されており，このような心機能低下が加われば，脳循環の異常はさらに増強されるだろう．

以上の所見と考察から，MELAS では，特徴的な mitochondrial angiopathy のため，あるいはこれに心機能障害が加わり，脳の血流動態の変化が招来され，これが大脳皮質に強調される MELAS 特有の脳病変を形成するものと考えられる．

文　献

1）Nishizawa M, Tanaka K, Shinozawa K, et al : A mitochondrial encephalomyopathy with cardiomyopathy. A case revealing a defect of complex I in the respiratory chain. J Neurol Sci : in press

2）篠澤一樹，西澤正豊，田中恵子，ほか：電子伝達系複合体 I の異常を認めた mitochondrial encephalomyopathy の一症例．臨床神経27：41，1987

3）田中恵子，上野光博，渥美哲至，ほか：ネフローゼ症候群を合併したミトコンドリア脳筋症の 1 例．臨床神経26：1190-1106，1986.

4）Shapira Y, Cederbaum SD, Cancilla PA, et al : Familial poliodystrophy, mitochondrial myopathy, and lactate acidemia. Neurology 25 : 614-621, 1975

5）Hart ZH, Chang C-H, Perrin EVD, et al : Familial poliodystrophy, mitochondrial myopathy, and lactate acidemia. Arch Neurol 34 : 180-185, 1977

6）Kuriyama M, Umezaki H, Fukuda Y, et al : Mitochondrial encephalomyopathy with lactate-pyruvate elevation and brain infarctions. Neurology 34 : 72-77, 1984

7）Mukoyama M, Kazui H, Sunohara N, et al : Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes with acanthocytosis : a clinicopathological study of a unique case. J Neurol 233 : 228-232, 1986

8）栗原照幸，岸雅彦，山村善政，ほか：ミトコンドリア脳筋症の一剖検例．厚生省「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60年度研究報告書，p. 221-226, 1986.

43) Scanning Organ Spectrophotometer による ミトコンドリア電子伝達系の検討

田 代 邦 雄*

研究協力者　伊 藤 和 則* 森 若 文 雄* 島 功 二**
斉 藤 敏 之*** 菅 野 富 夫***

はじめに

Mitochondrial Myopathy は1962年 Luft らが報告して以来，ミトコンドリア機能異常に伴う筋疾患として位置づけられてきた[1-4]．最近，生化学的検索の進歩に伴い酵素欠損が種々報告されている．今回われわれはミトコンドリアのエネルギー代謝，電子伝達系の検討を正常者の生検筋とミトコンドリアミオパチーの患者の生検筋を用いて検討したので報告する．

方法と対象

Scanning Organ Spectrophotometer（以下SOSP と略す）は立石ライフサイエンス社の spectrophotometer である[5]．これを用いることで，ミトコンドリアを単離することなく，in situ の状態で観察することができる利点がある．

生検筋は大腿四頭筋を試料とし，大きさは1辺3mm 立方体で重さは約20～30mg，生検後直ちに10mM HEPES buffer (pH7.35) に移し，酸素で incubation した．

測定は菅野，斉藤らの方式に準じ，試料を灌流装置にセットし，medium を灌流しながら，常温で生検筋試料を波長420nm～620nm までの可視光で高速 scan して得られるスペクトルとこれを reference として得られる差を経時的にモニターし，窒素還元に対する電子伝達系の反応と各種の電子伝達系阻害剤に対する反応の2つの実験系を観察した[6-8]．

実験1：基質を10mM pyruvate, 10mM succinate の2種類を用いて窒素還元法での差スペクトルを観察する．

実験2：電子伝達系阻害剤による反応の実験系は図1の如くに2種類実施した。

実験Aは10mM pyruvate の基質に窒素還元を行い，次に10μg/ml の antimycin A を添加して酸化還元反応を観察後，窒素，antimycin A を除去し，酸素を灌流してその反応を観察した．実験Bは10mM succinate を基質として rotenone 5×10^{-6}M 添加後，窒素還元と antimycin A を加えて酸化還元反応を観察した．

症例は62歳男性で，主訴が眼瞼が下がる，物が見づらい．現病歴で生来著患なく過ごしていたが，4年前から，両眼の下垂に気付くも放置していた．この頃から他人より話が聞き取りづらいことを指摘された．しかし本人は自覚せず，日常生活上でもまったく支障なかった（自動車の運転もおこなっていた）．症状は徐々ではあるが進行していた．またこの間複視，視力低下，四肢の脱力等の症状も自覚していない．既往歴は特記すべきことなし．家族歴では8人兄弟の中で76歳，64歳の2人の姉に同様な両眼瞼下垂を認めている．

体格小でロート胸を認める以外一般的現症で異常を認めなかった．入院時の神経学的陽性所見は構音障害，両側外眼筋麻痺，両側眼瞼下垂，両側顔面筋脱力（口輪筋，眼輪筋），両側胸鎖乳突筋の萎縮，脱力，全身の筋力低下，両上肢，両下肢の

＊北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門
＊＊国立療養所札幌南病院神経内科
＊＊＊北海道大学獣医学部生理学

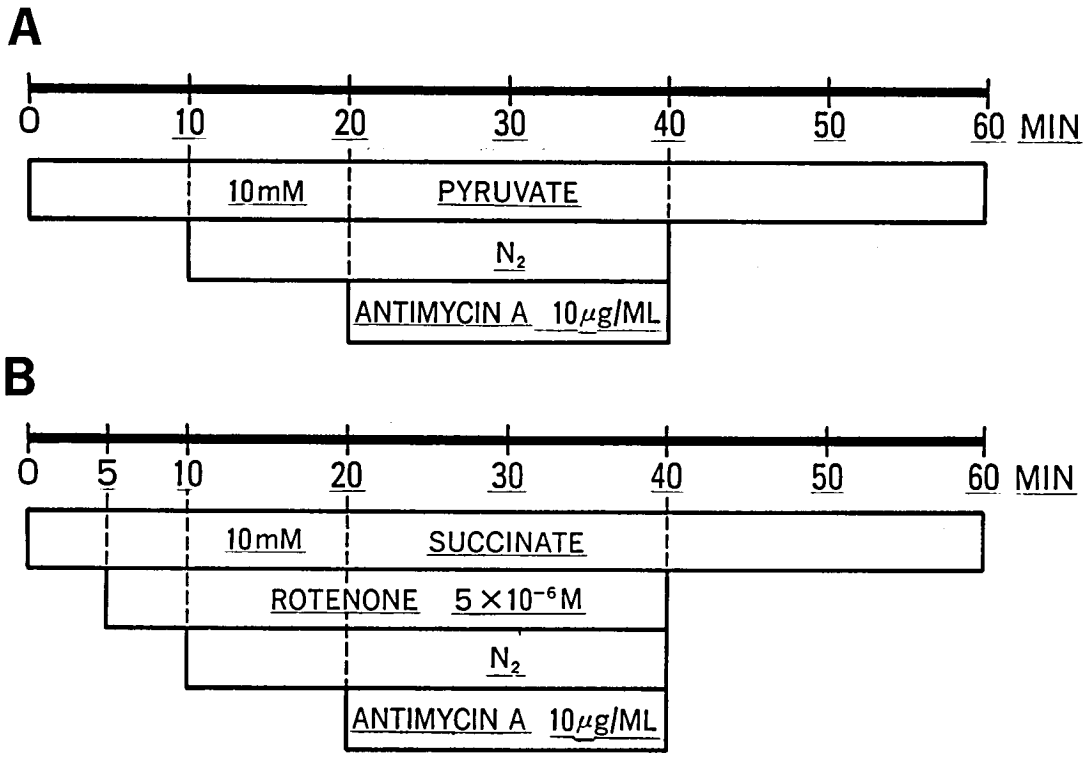


図1　電子伝達系阻害剤を使用した実験系．Aは窒素還元後，antimycin Aを添加し，Bはrotenone，窒素還元後にantimycin Aを添加した．

筋萎縮を認めた．

検査所見では検血，生化学，電解質，検尿に異常をみとめず，血中のピルビン酸，乳酸は正常であったが，髄液のピルビン酸，乳酸はそれぞれ高値を示した（1.07mg/dl，17.9mg/dl）また乏血性運動負荷試験でのピルビン酸，乳酸の値は正常であった．血液ガス分析，一般髄液検査，EEG，ECG異常なし．CT所見で左被殻部に円形の小さい低吸収域が認められた以外には異常を認めなかった．大腿四頭筋生検：筋線維横断面円形化，横径大小不同が認められ，trichrome変法でragged red fiberが見られ，電顕ではミトコンドリアの数の増加とその内部に結晶様封入体を伴っていた．

以上臨床症状，検査所見，光顕像，電顕像よりミトコンドリアミオパチーと診断し，この患者の生検筋と対照の生検筋を用いて上記の方法で実験を施行した．

結　　果

10mM pyruvateを基質として窒素還元法での差スペクトルを示す（図2）．上段は患者，下段は対照の生検筋である．γband，βband，還元型cytochrome $c+c_1$，cytochrome aa_3が認められる．しかしcytochrome bは$c+c_1$のpeakに重なり分離出来なかった．

上段，下段のpeakの差違は認められず，かつcytochrome $c+c_1$，cytochrome aa_3が理論値よりもやや短波長へ偏位していた．この原因は不明である．

10mM succinateを基質として上記と同様に差スペクトルを示す（図3）．この結果からも患者と対照との明確な違いは認められなかった．吸収率は相対値として表現されている為，その差違を比較することはできない．

以上の基質の違いによる窒素還元法での結果は患者，対照ともに差違は認められなかった．

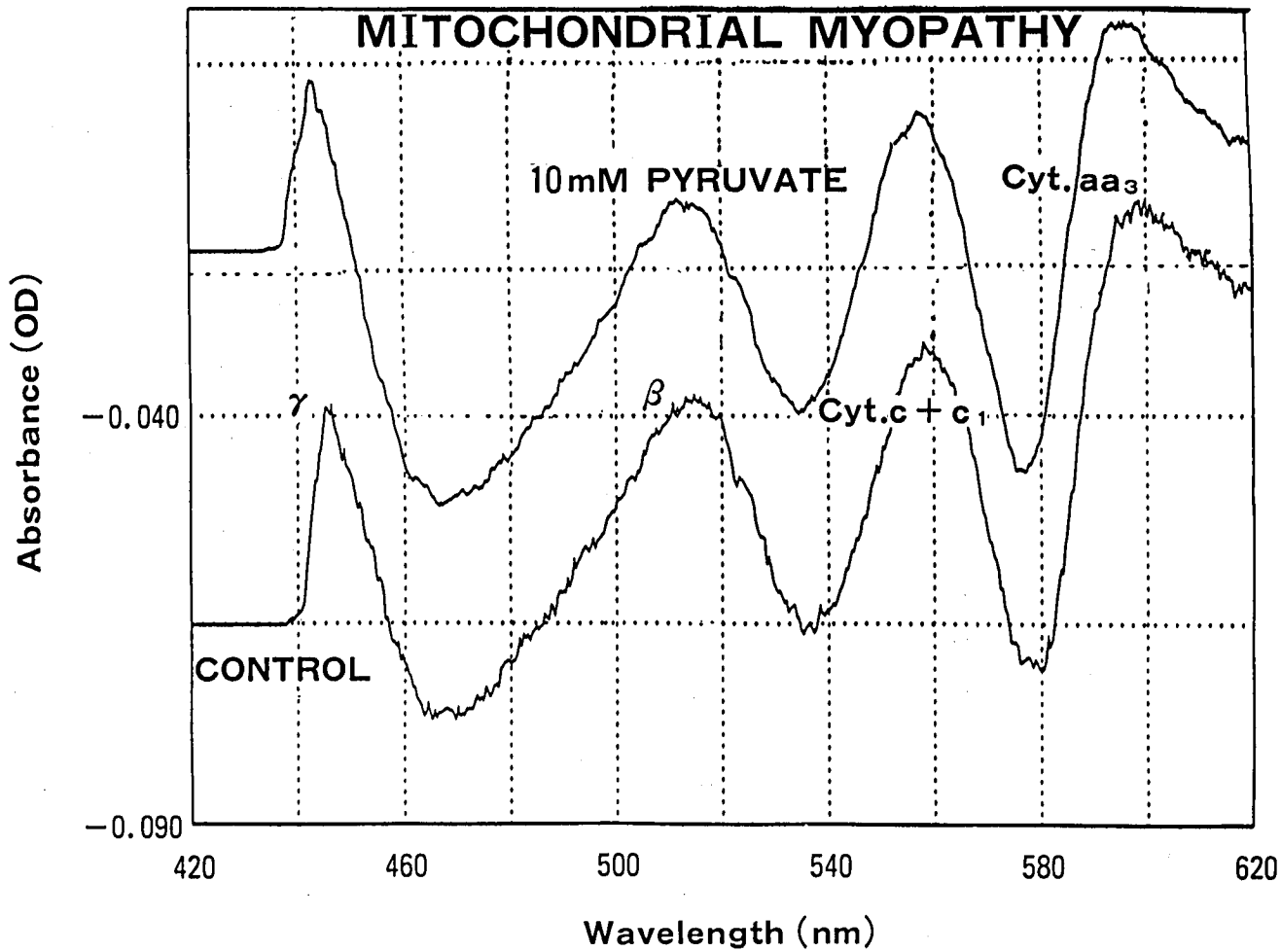


図2　10mM pyruvate を基質とした窒素還元法による差スペクトルを示す．上段は患者，下段は対照．差スペクトルの差違は認められない．

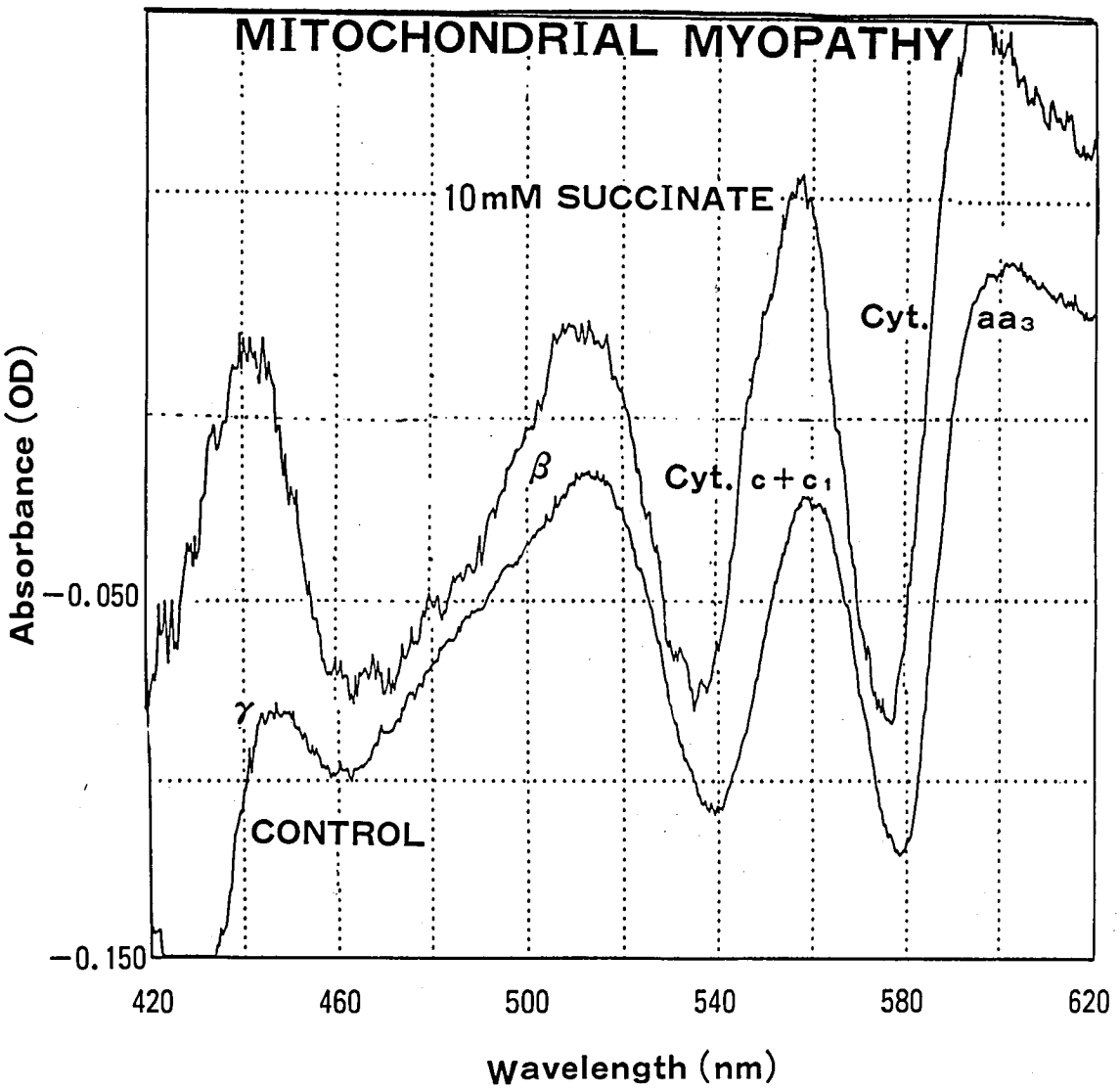


図3　10mM succinate を基質とした窒素還元法による差スペクトルを示す．上段は患者，下段は対照．図2同様 cytochrome b の peak が cytochrome $c+c_1$ に重なっている．差スペクトルのズレはない．

電子伝達系阻害剤を使用して実施した実験系で，10mM の pyruvate を使用した場合は，窒素還元で対照，患者ともに各 cytochrome 成分の差スペクトルが還元側へ移動している（図4）．しかし antimycin A を添加後，対照は還元側のままであるのに対して患者の差スペクトルは酸化方向に移動している．

antimycin A は cytochrome b と cytochrome c の間をブロックする．理論的には antimycin A で cytochrome b が還元化されるが，cytochrome c, a は酸化された差スペクトルとして認められる．しかしこの結果から cytochrome 各成分の差は認められず，しかし対照，患者との差違は確かに存在するがそれがどの因子にもとづくものかは今後

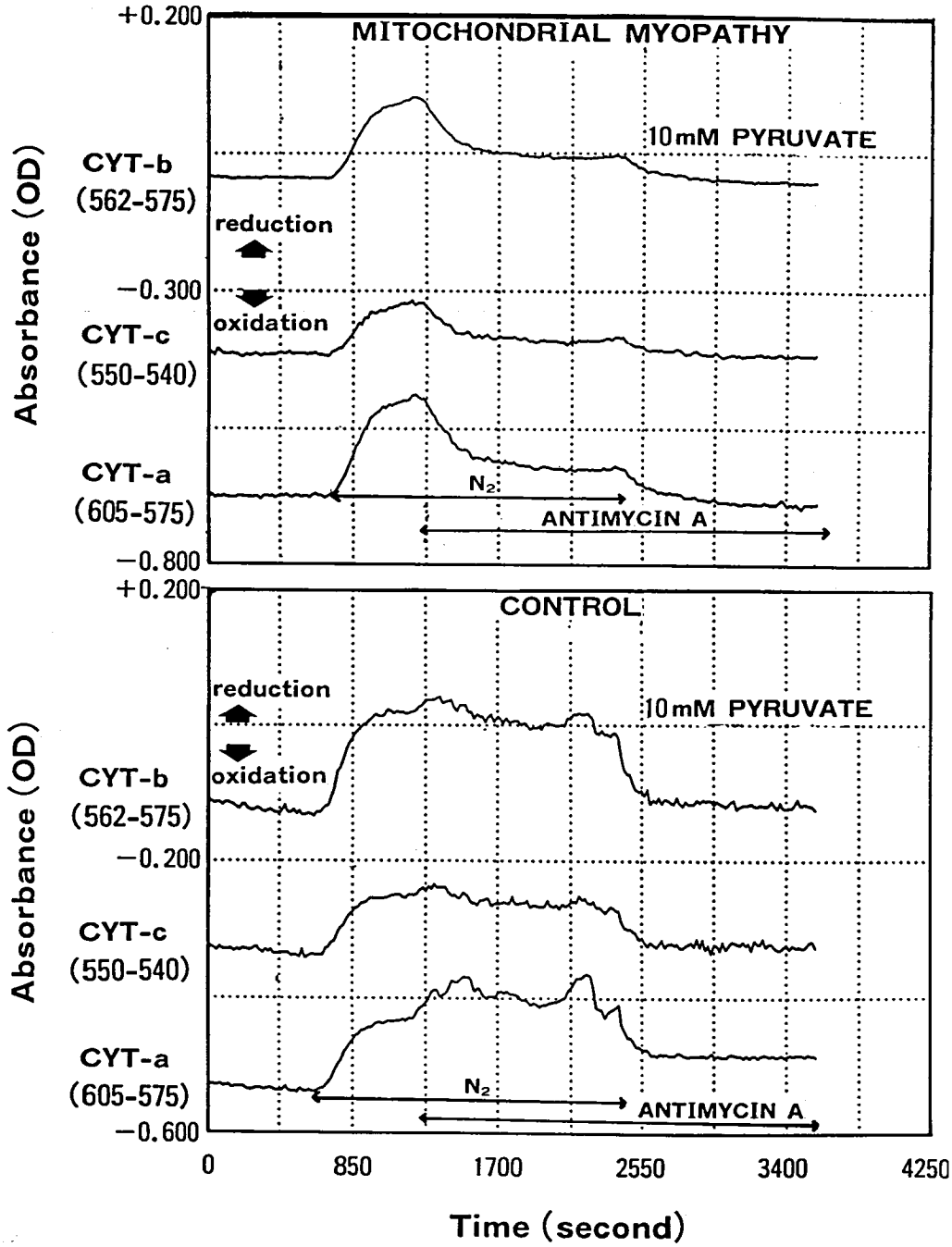


図4　10mM の pyruvate を基質として窒素還元，antimycin A を添加した場合の各 cytochrome 成分の差スペクトルを示す．上段が患者，下段は対照．antimycin A 添加後，患者の cytochrome 成分が酸化側へ移動している．

検討を要すると思われた．

10mM succinate を基質として用いた場合には，rotenone を添加して対照，患者共に cytochrome 各成分が還元側へ移動している（図5）．窒素還

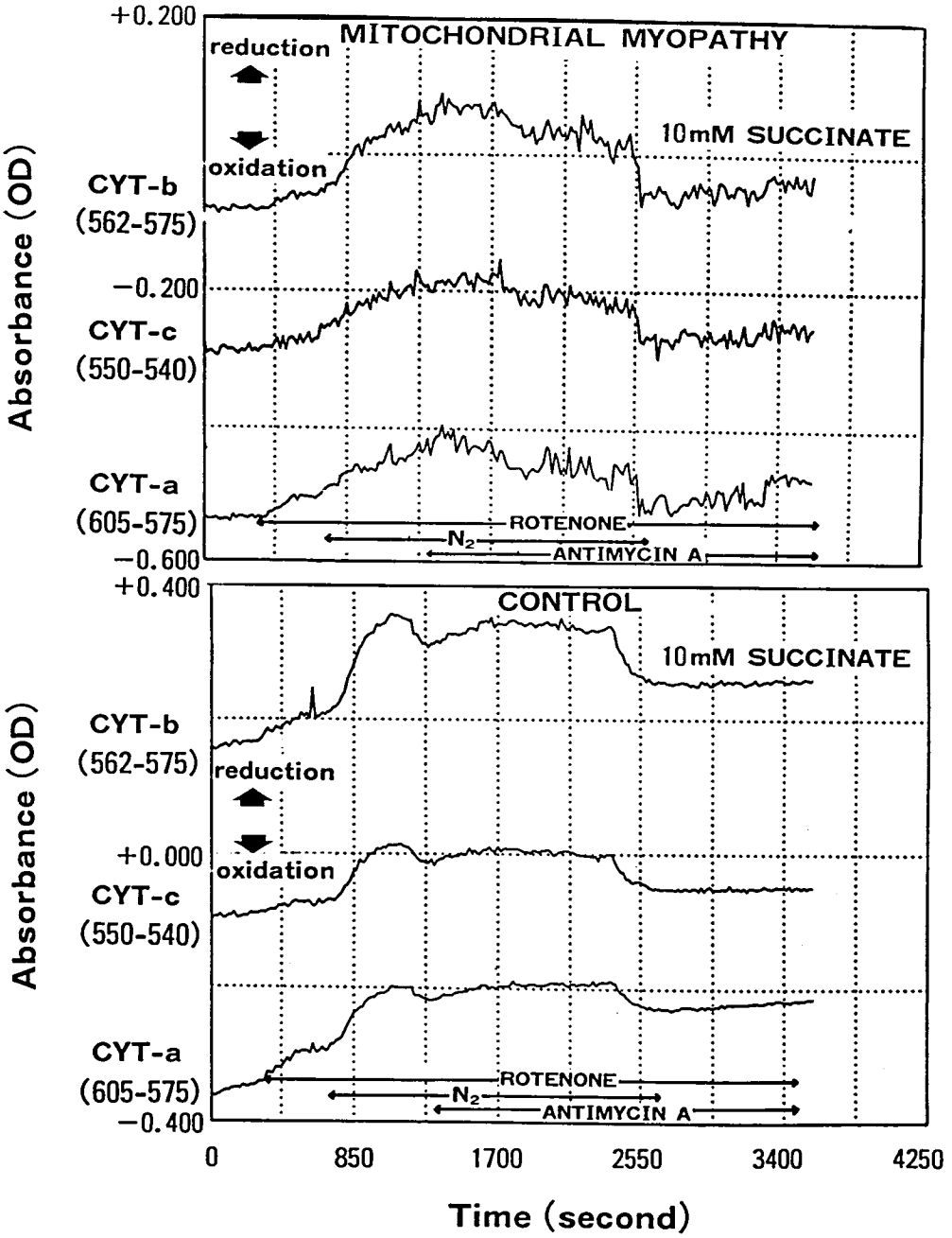


図5　10mM　succinate の基質に rotenone，窒素還元，antimycin　A を添加し各 cytochrome 成分の差スペクトルを示す．上段が患者，下段は対照であるが，この結果からは明確な差違は認められない．

元，antimycin A を添加しても差スペクトルの差違を認められなかった．

考　　察

ミトコンドリアの生体内代謝機構は in vitro の状態で種々の研究が行われているが，細胞内の構

造を破壊し，ミトコンドリアの細胞外環境の差が認められる実験でどの程度真のミトコンドリアの代謝，酸化還元状態を反映しているか疑問である．Mandel らは in vitro でミトコンドリアの酸化還元状態を観察して，それぞれの組織の差違でミトコンドリアの呼吸鎖の状態が変化することを指摘している[9]．ミトコンドリアのエネルギー代謝の動態を生体内の環境下で測定する必要性がここにあり，今回われわれが使用した SOSP は生体内のミトコンドリア酸化還元状態を経時的に観察でき，また試料も probe の種類で $1\times1\times1mm^3$，$3\times3\times3mm^3$，$5\times5\times5mm^3$の程度の大きさですみ，約20mg～50mg 程度の試料で検査可能である点がこの SOSP の利点である．また SOSP を使用した種々の実験では cytochrome $c+c_1$, b, aa_3 が分離されているが，今回われわれの結果で連続した scanning で cytochrome b が分離できなかったが，これは myoglobin や他の因子が関与していると思われたが，cytochrome b の波長で scanning すると分離可能である点が SOSP を今後使用していく上で注意を要すると思われた．

また myoglobin の cytochrome 各成分に与える影響を含めて今後検討が必要であると思われた．

ま と め

1．ミトコンドリアミオパチーの患者の生検筋より SOSP を使用して，ミトコンドリアを単離することなく，少量の試料でかつ，in situ の状態でミトコンドリア電子伝達系の各 cytochrome 成分の酸化還元状態を経時的に観察できたので報告した．

2．各種の電子伝達系阻害剤と呼吸基質とを組み合わせて試料を灌流することにより，これらに対する反応時間を追って観察した．

3．患者のミトコンドリア電子伝達系の障害が示唆されるが，明確な障害を推定出来なかった．今後基礎データを積み重ね，酵素活性を測定する為のスクリーニング法として SOSP の臨床応用を検討してきたい．

文 献

1）Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L and Afzelius B : A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control : A correlated clinical, biochemical and morphological study. J Clin Invest, 41 : 1776-1804, 1962.

2）DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nagasawa M : Mitochondrial Myopathies. Ann Neurol, 17 : 521-538, 1985.

3）Hayes DJ, Lecky RF, Landon DN : A New Mitochondrial Myopathy. Brain, 107 : 1165-1177, 1984.

4）山本剛司，杉田秀夫：わが国におけるミトコンドリアミオパチーの臨床．神経内科，24：109-116，1986.

5）Kobayashi S, Yoshimura M, Shibahara T, Nakase Y and Yaono S : Scanning spectrophotometry for dynamic study of the organ oxidative metabolism. Biomed Res, 2 : 390-397, 1981.

6）西澤正豊，斉藤敏之，菅野富夫，宮武 正：ミトコンドリアミオパチーの診断．神経内科，24：152-157，1986.

7）Kanno T, Saito T and Saito A : Cytochrome reduction coincides with electrical activity in perfused bullfrog brain. Brain Res, 338 : 237-242, 1985.

8）Kanno T, Saito T : Vasoactive intestinal polypeptide nullifies cytochrome reduction response to afferent activation of the perfused bullfrog brain. Brain Res, 369 : 275-284, 1986.

9）Mandel LJ, Riddle TG and LaManna JC : A rapid scanning spectrophotometer and fluorometer for monitoring of steady-state and kinetic optical properties of respiratory enzymes. "Oxygen and Physiological Function" (ed by Jobsis FF) Professional Library, Dallas, 1976, pp79-89.

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

小 澤 高 将*

研究協力者　田 中 雅 嗣*　多 田 真瑳子*　錦 見 盛 光*
鈴 木 寛*　一 木 貴**　小 林 正 紀**
和 田 義 郎**

はじめに

電子伝達系酵素の欠損がミトコンドリア・ミオパチーの原因として注目を集めている[1-6]. 我々は酵素欠損の分子的基礎を明らかにするために, ミトコンドリアのエネルギー産生に係わる複合体 I, III, IV, Vのサブユニットの異常を生化学的, 免疫化学的ならびに免疫組織化学的に検索する方法を開発してきた[7-10]. 今回, MELAS の剖検 1 例を含め 4 症例の分析結果を報告する.

対　象

症例 1：9 歳女児. 低身長, 筋力低下, 知能低下, 皮質盲, 交互性片麻痺および腎機能障害があった. 血中乳酸値の上昇を認め, CT スキャン上で後頭葉に低吸収域が見られた. 筋生検では ragged red fiber (RRF) は少数であった.

症例 2：9 歳男児. 反復する嘔吐, 片麻痺, 卒中発作および心筋障害を呈した. クレアチンキナーゼと乳酸値の上昇を認め, CT 上では左側頭葉, 頭頂葉および後頭葉に低吸収域があり, 組織像では RRF が多数見られた.

症例 3：13歳男児. 低身長, 知能低下, 筋力低下, 卒中発作, 皮質盲と腎機能障害があった. 血中乳酸値の上昇, CT 上で大脳・小脳の萎縮, 後頭葉の低吸収域および基低核の石灰化, 組織像で RRF を多数認めた. 14歳時, 突然死亡した.

症例 4：15歳男児. 低身長, 知能低下, 筋力低下, 交互性片麻痺と皮質盲を呈した. 乳酸値の上昇, CT でびまん性の萎縮と後頭葉の低吸収域, 組織像で RRF を多数認めた.

＊名古屋大学医学部第二生化学
＊＊名古屋市立大学医学部小児科

方　法

各組織のミトコンドリアは Bookelman らの方法に従い, 脳ミトコンドリアは Lai と Clark の方法に従い単離した. ロテノン感受性 NADH-cytochrome *c* reductase および succinate - cytochrome *c* reductase の活性は Sottocasa らの方法で, cytochrome *c* oxidase 活性は Cooperstein と Lazarow の方法で測定した. 肝ミトコンドリアからの亜ミトコンドリア粒子の調製およびその電子常磁性共鳴 (EPR) スペクトルの測定は既報に従い Pennsylvania 大学大西智子博士と協同で行った. 複合体 I, III, IV, Vのサブユニットは著者らの方法により免疫化学的に検出した. 免疫組織化学は国立精神・神経センター埜中征哉博士と協同で, 佐藤ら[2]の方法に準じて行った.

結　果

表 1 に 4 症例の生検骨格筋ミトコンドリアにおける電子伝達系酵素活性を示す. 複合体 I -IIIの活性は全例で低下しており, 正常の 0 ～27%であり, 年齢の高い患者ほどその低下が著しい傾向が見られた. 複合体II-IIIの活性は全例で正常かそれよりやや高い値が得られたのに対し, 複合体IVの活性は正常または正常の下限値を示した.

図 1 に 4 症例の骨格筋ミトコンドリア中の複合

表1　Enzymic activities of respiratory complexes in skeletal muscle mitochondria from patients with MELAS and from normal control.

Patient	I - III	II - III	IV
1	68	1364	1611
2	20	1862	634
3	14	1000	708
4	0	709	663
Control	249 ± 174*	889 ± 507	1554 ± 753

Values are expressed in nmol/min/ mg of mitochondrial protein.

*mean ± SD (n = 10)

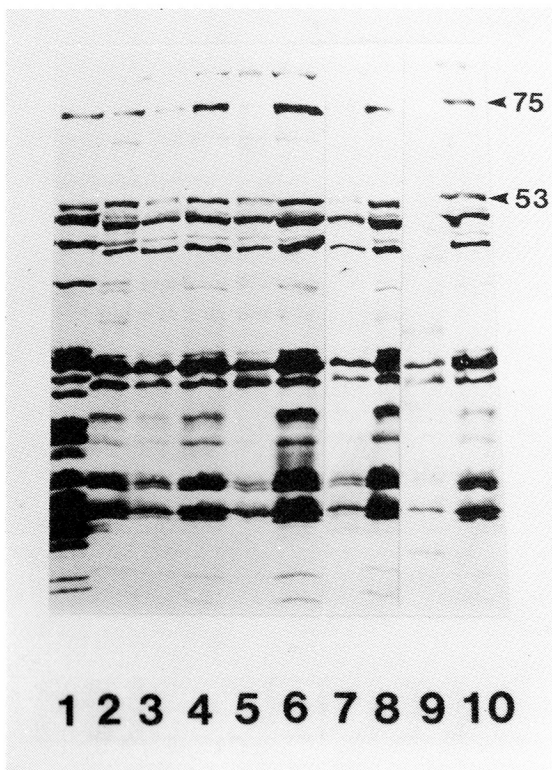


図1　MELAS 患者の骨格筋ミトコンドリアにおける複合体Ⅰのサブユニット分析．1：ウシ心筋ミトコンドリア．2，4，6，8，10：正常ヒト骨格筋ミトコンドリア．3，5，7，9：それぞれ症例1，2，3，4の骨格筋ミトコンドリア．

体Ⅰのサブユニットを Western blot 法により分析した結果を示す．正常では11本のサブユニットが検出しえたのに対し，患者ではサブユニットの量の全般的低下が見られ，活性の低下と同様に，年齢の増加とともに減少の程度が著しくなる傾向が見られた．サブユニットの内では75kDa と53 kDa のサブユニットの減少が顕著であった．

複合体Ⅰの欠損が骨格筋組織内でどのような分布を示しているかを明らかにするために免疫組織化学的検索を行った．図2 A は年齢が若く，酵素活性およびサブユニット量の減少が最も軽度であった症例1の骨格筋の免疫組織像である．少数見られる ragged red fiber（RRF）には免疫反応性物質の集積が見られ，非 RRF では免疫反応性物質の量がやや低下していた．一方，年齢が高く，酵素活性およびサブユニット量の減少が最も顕著

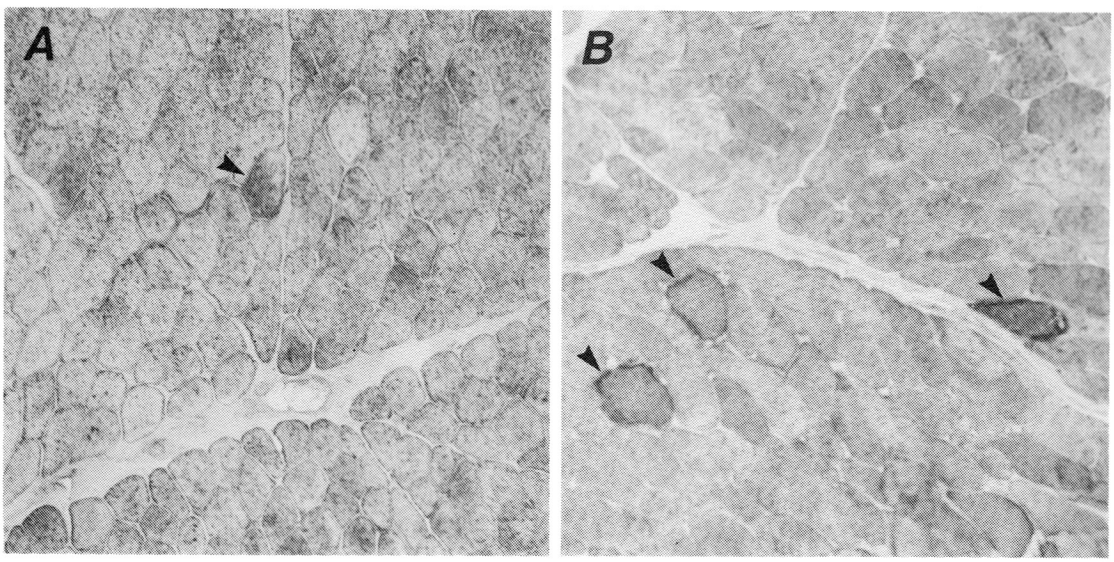


図2　複合体Ⅰに対する特異抗体を用いた骨格筋凍結切片の免疫組織化学染色．A：症例1．B：症例4．Ragged red fiber を矢印で示した．

表2　Rotenone-sensitive NADH-cytochrome *c* reductase activity in mitochondria from various tissues of the patient with MELAS (case 3) and controls.

Tissue	Patient (nmol/min/mg of protein)	Control (nmol/min/mg of protein)	Percentage of mean control value
Heart	87	209, 191	44
Skeletal muscle	39	487, 124	13
Liver	27	347, 150	11
Kidney	60	257, 148	30
Brain	1.6	—*, 55	3

*Not determined.

であった症例4（図2 B）ではRRFに免疫反応性物質が異常集積しているのに対し，非RRFではむしろその量の減少が見られた．

次いで複合体Ⅰの欠損の臓器分布を明らかにするために，症例3の剖検組織からミトコンドリアを単離し分析を行った[11]．表2に複合体Ⅰの各臓器における活性値を示す．いずれの臓器でも正常に比べ活性の低下を認めたが，その程度は臓器ごとに異なっていた．機能異常を認めなかった心臓では活性低下は軽度であり，臨床的に異常を認めた骨格筋・脳での活性低下は高度であった．肝での活性は正常の11%に低下していたにも拘らず肝機能障害を臨床的に認めなかった．また，腎での活性は正常の30%であったがクレアチン・クリアランスの中等度の低下を認めた．これらの結果から臨床症状の出現には，臓器における酵素欠損の程度とそこでのエネルギー需要の大きさの両者が関係していると考えられた．

図3に症例3の各臓器のミトコンドリアにおける複合体Ⅰのサブユニットの分析の結果を示した．酵素活性の減少度に比例して，心臓ではサブユニット欠損の程度は軽く，骨格筋・脳でのサブユニット欠損は高度であった．この症例では，特定のサブユニットが臓器特異的に欠損しているという所見は認められず，むしろ免疫学的に検出しうるサブユニットの量が全般的に低下し，しかもその程度が臓器ごとに異なっていることが注目された．

このようなサブユニットの異常が複合体Ⅰ分子の統合性にどのような影響を与えているかを検索するために，その補欠分子族である鉄イオウ・クラスターの含量をERRスペクトルにより測定した．正常者と症例3の肝ミトコンドリアから亜ミトコンドリア粒子を調製し，これをrotenone存在下にNADHにより還元し，各々の温度で検出

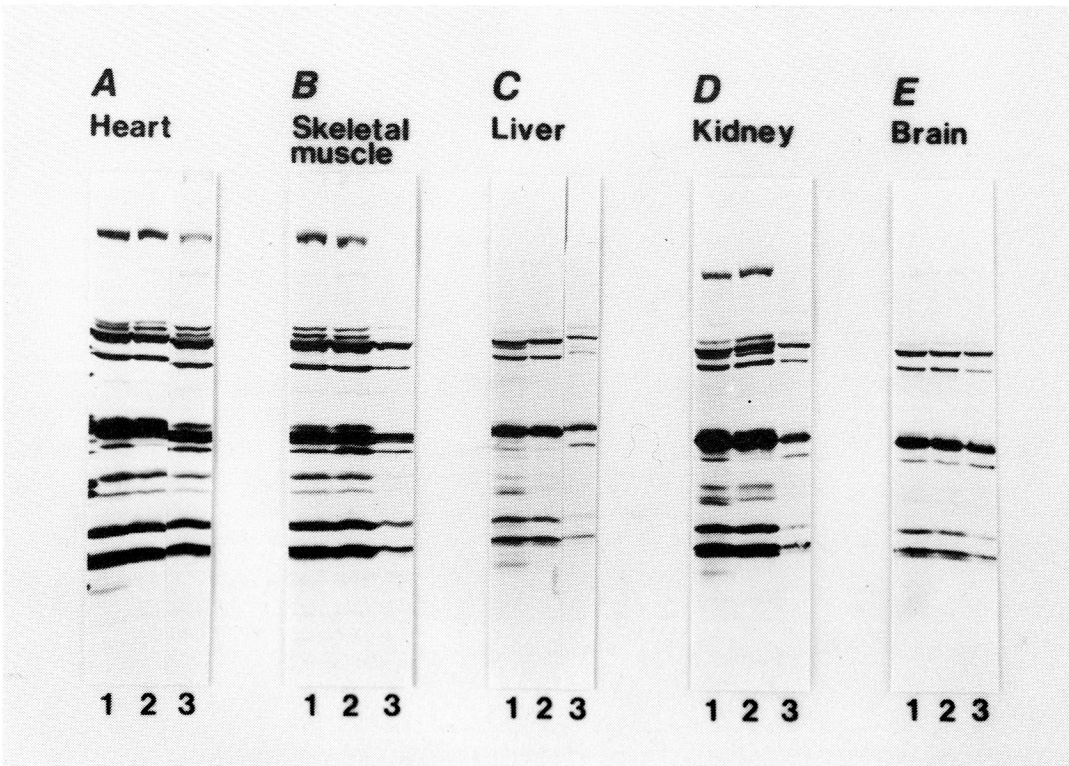


図3　MELAS患者における複合体Ⅰのサブユニット欠損の臓器分布．1，2：正常ミトコンドリア．3：症例3のミトコンドリア．

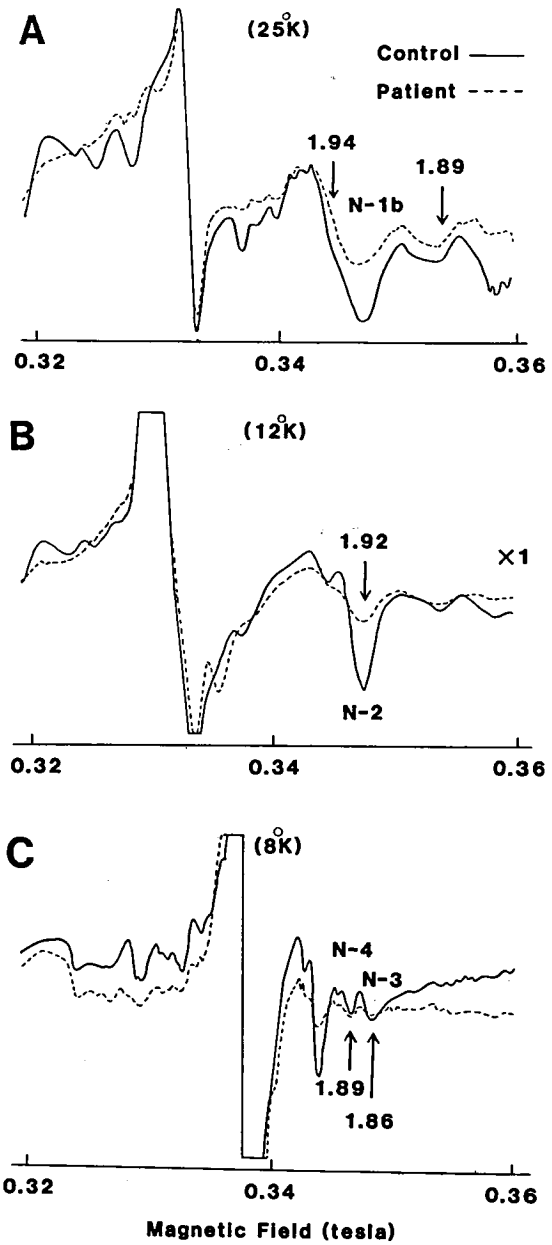


図4　MELAS患者の剖検肝から得た亜ミトコンドリア粒子のEPRスペクトル.
Rotenone存在下にNADHで還元し，それぞれの試料温度でスペクトルを記録した.
実線：正常ヒト肝亜ミトコンドリア粒子.
破線：症例3の肝亜ミトコンドリア粒子.

される複合体Ⅰの鉄イオウ・クラスターのEPRシグナルを記録した(図4). 25°KでN-1bクラスターのシグナル（g=1.94）と外膜の鉄イオウ・クラスターのシグナル（g_z=1.89）が検出された(図4A). 患者の標品の前者のシグナルの大きさは対照の64%であったが，後者のシグナルは正常のそれとの間に差を認めなかった. 12°Kではクラスターをg=1.92の位置の負のピークを用いて定量しうる. 患者のN-2クラスターのシグナルは正常の27%に低下していた(図4B). 8°KではN-3とN-4のクラスターのシグナルをそれぞれg_x=1.86とg=1.89の位置で正常対照と比較することができる(図4C). その結果，N-3クラスターの量は正常の31%に低下しているのに対し，N-4は正常の55%に保たれていた. このようにEPRスペクトルは患者ミトコンドリアの複合体Ⅰにおける鉄イオウ・クラスターの不均一な減少を明らかにした. このことは複合体Ⅰサブユニットの集合状態に異常の存在することを示唆している.

考察とまとめ

図5に複合体Ⅰの構造モデルを示した. NADHからの電子はフラビン蛋白画分に存在するFMN, N-3およびN-1bクラスターを経て，鉄イオウ蛋白画分に含まれる75kDaのサブユニット上のN-1bクラスターに至り，N-4クラスターおよびいくつかの未同定の鉄イオウ・クラスターを経由して，最終的にN-2クラスターおよびユビキノン結合蛋白(QP-N)を通り，ユビキノン(UQ_{10})に渡される. ミトコンドリアDNAによってコードされた6種のサブユニットを中心とした疎水性蛋白画分はフラビン蛋白画分と鉄イオウ蛋白画分を取り囲む殻を形成し，複合体Ⅰ分子を内膜に組み込む働きを担っている.

本研究によって我々はMELASの患者において複合体Ⅰの免疫学的に検出しうるサブユニットの減少と集合状態の異常を伴った活性低下が見られることを示した. 複合体Ⅰのサブユニット欠損の程度が患者ごとにまた臓器ごとに異なることは，核の遺伝子の異常によっては説明が困難であり，むしろミトコンドリアの遺伝子の発現過程の障害がその原因として想定される. ミトコンドリアDNAの遺伝子産物の異常により，複合体Ⅰのサ

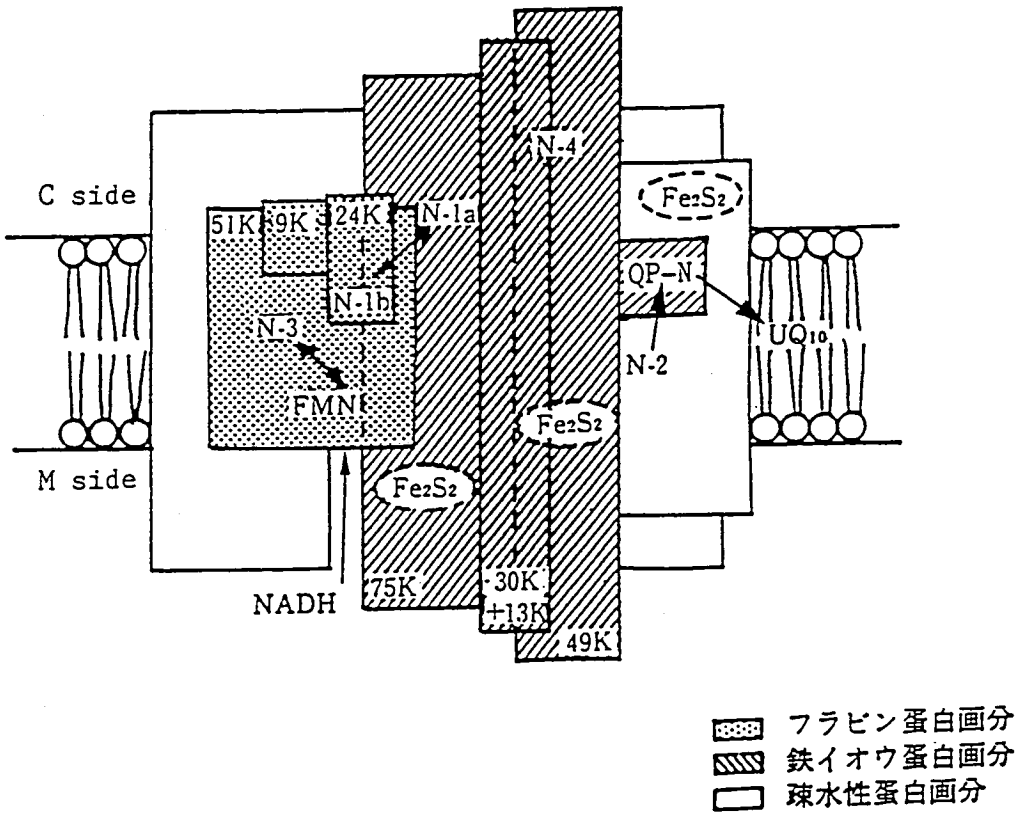


図5　複合体Ⅰのモデル

ブユニットのアッセンブリーが障害され，補欠分子族の組み込みの異常を来し，電子伝達ならびにエネルギー転換の機能低下に陥るものと考えられる．

複合体Ⅰの活性低下とサブユニット量の減少が，RRFへの免疫反応性物質の異常集積と非RRFにおけるその量の減少とに平行して観察されたことは，ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の間の発現の協調性が失われていることを示唆する．RRFの形成過程の第一段階は複合体Ⅰの欠損に反応してミトコンドリアの増殖が刺激されることであろう．一方，ミトコンドリアの遺伝子産物が異常であるためにミトコンドリア内へ輸送されてきた核の遺伝子産物とのアッセンブリーが障害され，結果としてサブユニットの異常な蓄積を生じるものと考えられる．非RRFではミトコンドリアの増殖は軽度で次第に酵素サブユニットの合成が低下していくのではなかろうか．

Horai and Matsunagaは日本人116名のミトコンドリアDNAの制限酵素切断片多型（RFLPs）を調べ，62もの型に分けうることを報告している．ミトコンドリア・サイトパチーの原因の一つとしてミトコンドリアDNA自身の異常が考えられるが，そこに見られる変異を正常から異常に至る連続したスペクトルとして捉えるべきである．今後，さらにミトコンドリア遺伝子の情報発現異常の原因を分子レベルで解明する必要があろう．

文　献

1）小澤高将，錦見盛光，田中雅嗣：ミトコンドリア電子伝達系とその異常．神経内科，24：215-225，1986.

2）佐藤　猛，安野みどり，中村真二，初鹿野　浩，

向山昌邦，小澤高将：ミトコンドリアにおけるチトクロム*c*酸化酵素と複合体IIIの局在に関する免疫組織化学的研究．神経内科，24：226-231，1986.

3）小澤高将，田中雅嗣：ミトコンドリア蛋白の変異と遺伝病．細胞工学，5：874-880，1986.

4）小澤高将，田中雅嗣：ミトコンドリア電子伝達系．臨床科学，22：1398-1406，1986.

5）小澤高将，田中雅嗣：ミトコンドリアの高エネルギー産生機構．病態生理，5：909-915，1986.

6）小澤高将，田中雅嗣，鈴木　寛，錦見盛光：代謝疾患：ミトコンドリア・サイトパチー．生体の科学（印刷中）.

7）Tanaka, M., Nishikimi, M., Suzuki, H., et al.: Multiple cytochrome deficiency and deteriorated mitochondrial polypeptide composition in fatal infantile mitochondrial myopathy and renal dysfunction. Biochem. Biophys. Res. Commun., 137: 911-916, 1986.

8）Tanaka, M., Nishikimi, M., Ozawa, T., et al.: Lack of subunit II of cytochrome *c* oxidase in a patient with mitochondrial myopathy. Ann. N.Y. Acad. Sci. (in press).

9）Tanaka, M., Nishikimi, M., Suzuki, H., et al.: Deficiency of subunits in heart mitochondrial NADH - ubiquinone oxidoreductase of a patient with mitochondrial encephalomyopathy and cardiomyopathy. Biochem. Biophys. Res. Commun., 140: 88-93, 1986.

10) Tanaka, M., Nishikimi, M., Suzuki, H., et al.: Partial deficiency of subunits in Complex I or IV of patients with mitochondrial myopathies. Biochem. Int. (in press).

11) Tanaka, M., Nishikimi, M., Suzuki, H., et al.: Variation in the levels of Complex I subunits among tissues in a patient with mitochondrial encephalomyopathy and renal dysfunction. Biochem. Int. (in press).

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

桃　井　真里子*

研究協力者　下　泉　秀　夫*　中三川　晃　利*　金　子　　仁**
斎　藤　多久馬***　柳　沢　正　義*

ミトコンドリア脳筋症はその臨床的，生化学的多様性が病態の本質を示唆するものとして注目されている疾患群である．病態の検索，診断には，生検筋の組織化学，生化学的検索により酵素欠損の証明が一般的である．しかし，生検筋は病態研究の材料としては，供給性に問題があり，十分な検索をし得ないことも少なくない．酵素診断に用いられる皮膚線維芽細胞は，組織特異性の強い本疾患群では必ずしも変異形質を表現しておらず，一方ミトコンドリアDNAの検索に使用されるリンパ球，血小板などは供給性に問題があり，かつ異常形質の検索には不適である．

筋細胞のクローン化法として既に我々が発表した[1]，複製起始部欠損変異株SV40 (ori⁻と略す) のDNAを培養細胞に導入し，形質転換細胞を作成する方法は，分化形質は100%表現しない場合が多いが，本来の細胞の基本形質は保持しており，ミトコンドリアなどの細胞の基本的形質の異常の検索には，十分に利点を利用し得ると考えられる．

我々はミトコンドリア脳筋症患者の生検筋における従来の方法による検索と共に，培養筋細胞のクローン化を試みた．

症　　例

症例1：19歳男性．

（家族歴）兄が患者とほぼ同様の経過で19歳で死亡している．

（経過）5歳で痙攣発作で発症．その後，知的退行が出現．9歳より構音障害，11歳より失調性歩行が出現し，15歳で会話不能，歩行不能となり，以後ベット上の生活となる．また，同時に麻痺性イレウスの症状を反復するようになった．周囲への反応は進行性に低下し，19歳現在知的反応は認めない．

（検査所見）血中乳酸；15.3～41.9mg/dl，血中ピルビン酸；1.00～2.14mg/dl，髄液中乳酸；38.6～45.8mg/dl，髄液中ピルビン酸；1.44～1.69mg/dl．髄液中蛋白；150mg/dl，ECG，MCV，EMG；正常．CTでは著明な灰白質，白質の萎縮，MRIでは両側の大脳皮質が広範囲にわたりlong SEで高信号域，1Rで低信号域として示された．

上腕二頭筋，及び大腿四頭筋より得た生検筋ではRagged-red fiberを認めた．Cytochrome c oxidase染色では，モザイク状に活性欠損線維を筋線維全体の約40%に認めた．

症例2：昭和60年度本研究班にて自治医科大学神経内科，金子らが報告したMELASの一例[2]．

方　　法

細胞培養，トランスフェクション（DNAの導入）：既に発表した[1]方法に従った．

分化誘導：無血清培地中で多核細胞，筋管細胞の出現を観察し，CK isozymeをセルロースアセテート膜上で分析した．

酵素組織化学：症例2の生検筋よりの初代培養細胞をSeligmanら[3]の方法に従いcytochrome c

＊自治医科大学小児科
＊＊自治医科大学神経内科
＊＊＊自治医科大学第一解剖学

oxidase 染色を行ない，光顕及び電顕にて検索した．

結　　果

初代培養筋細胞：HamF12（10% FCS）中，11日目頃には多数の myotube 形成が認められた（図1，図2）．以後，継代を重ねる毎に多核細胞，myotube の数は減少し，平担で多極的な形態の線維芽細胞が大半を占める様になった．

トランスフェクション：症例1の初代培養細胞からは18個のクローンが得られ，myoblast 由来と思われる紡錘形のクローン11個，比較的大型の fibroblast 由来と思われるクローン7個であった．

分化誘導：紡錘形の myoblast 由来と思われるクローンを無血清培地中で培養すると，多核細胞が多数観察され，myotube 形成も認めた（図3）．同様培養条件下では myoblast 由来と思われるクローンは CK の MB，更に僅かであるが，MM isomer 出現を認め（図4）るが，一方，同一クローンでも HamF12中では myotube，CK の MB，MM isomer 共に認めなかった．

酵素組織化学：症例2の初代培養細胞に対し Cytochrome c oxidase による染色を行なった．電顕的検索の結果，一視野中の全ミトコンドリアが活性陽性のもの，逆に活性陰性のもの，そして更に一視野内に活性陽性のミトコンドリアと陰性

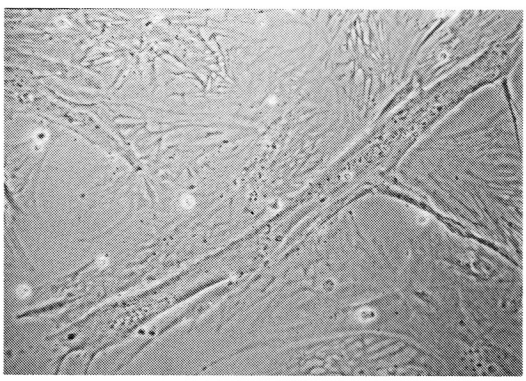


図1　症例1の初代培養筋細胞，多核の筋管細胞を認める．（×200）

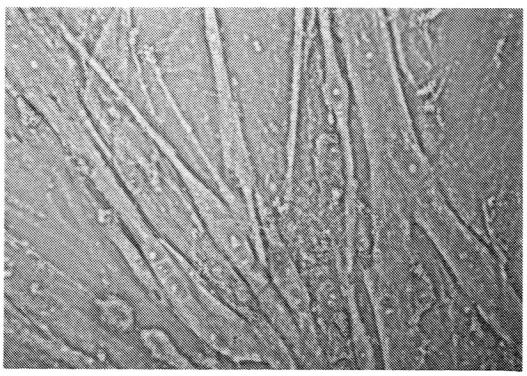


図2　症例2の初代培養筋細胞，多核細胞，筋管細胞形成を多数認める．（×400）

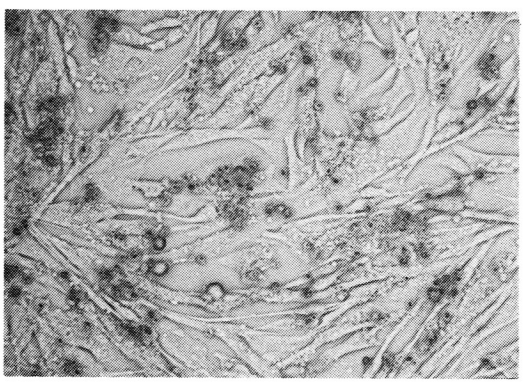


図3　症例1の transformed Myoblast，多数の多核細胞，筋管細胞形成を認める．（×200）

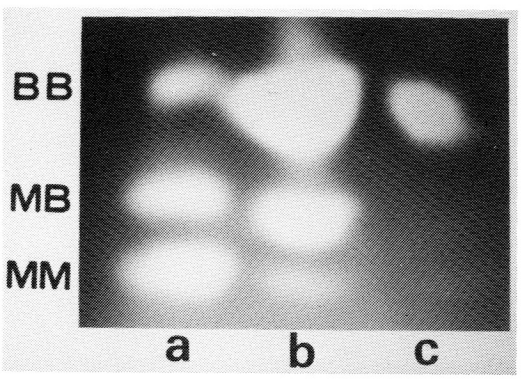


図4　図3の CK isozyme pattern
a：standard，b：無血清培地，c：10% FCS を含む HamF12培地

のミトコンドリアが混在している所見が得られた（図5）.

図5　症例1のCytochrome C oxidase酵素組織化学電顕．活性陽性のミトコンドリアと活性陰性のミトコンドリア（▲で示す）が見られる．

結論及び考察

家族内発症のある19歳男性のミトコンドリア脳筋症症例の骨格筋を培養し，ori⁻SV40・DNA導入法により筋由来細胞をクローン化することに成功した．ミトコンドリア脳筋症の骨格筋から得た初代培養系は一般に成育が悪く継代を重ねる毎にmyotube形成率が低下することから，安定な均一筋細胞を得るには，本方法によるクローン化が，材料提供法として優れていると思われる．

症例2はCytochrome c oxidase活性欠損が一視野内，即ち一細胞内で均一でなく活性が一細胞内でheterogeneietyを示していた．ヒトにおけるミトコンドリア遺伝子は一個体内での塩基配列の多様性は極めて低いと報告されており[4]，また，核DNA支配による活性の欠損であれば一細胞内では多様性を示し得ないことから，ここにみられる異常は，ミトコンドリアDNA支配の異常形質と考えられる．ミトコンドリア脳筋症は組織特異性，一組織内の細胞間モザイク，更に一細胞内のミトコンドリア形質の異常のモザイク，など多様性があり，これら多様性へのミトコンドリアDNAの関与の検索には我々の確立したクローン化細胞が果たし得る役割は大であると思われる．DNA導入し形質転換することによりミトコンドリア異常形質がどの様な確率で保持されるか，現在，クローン化myoblastにおいて検索を進めている．

文　献

1）桃井真里子，中三川晃利，桃井隆：SV40遺伝子導入によるヒト骨格筋細胞株樹立の試み．“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，昭和60年度研究報告書”（班長・杉田秀夫）1986，pp88-91.

2）水野美邦，金子仁：痙攣，乳酸上昇，反復性低吸収域を示しMELASを疑った一例.同上pp214-217.

3）Seligman, A.M. et al.: Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). J. Cell Biol. **38**: 1-14, 1968.

4）Monnat, R.J.Jr., Loeb, L.A.: Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**: 2895-2899, 1985.

46）低酸素症による筋障害に対するCoenzyme Q_{10}の効果

栗原照幸*

研究協力者　塩屋敬一*　松倉　茂*

はじめに

低酸素症又は虚血による心筋障害に関しては臨床的な必要性もあって現在まで多くの研究があるが[1]，骨格筋に関する低酸素症の報告は心筋に関するものより少く，特に筋細胞内記録や，筋細胞内Caの実測をした報告はみられない．筋の虚血や低酸素症は，薬物や昏睡状態に伴って一定の姿勢を長時間とることにより圧迫や虚血が原因でacute rhabdomyolysisという形で起ったり，近年トピックとなっているミトコンドリア脳筋症等でも組織における酸素の利用障害が問題となっている．後者ではCoenzyme Q_{10}（CoQ_{10}）を用いて効果がみられたという報告もなされている．低酸素症や虚血による心筋障害が起ると心筋線維内のCa濃度が高くなると報告されているが，骨格筋においてはどうであるか未だ実測されていない．また，正常な動物以外に筋ジストロフィー哺乳動物では低酸素症がいかなる影響を及ぼすかについても検索されていない．これらの疑問点を明らかにする目的で，正常の哺乳動物及びX-linked muscular dystrophic mutant mouse（mdx mouse）の骨格筋が低酸素症によって受ける影響を膜電位及び筋細胞内Caを指標として検討し，合わせてCoQ_{10}の効果をみたので報告する．

方　法

対象は生後91日目のddyマウス，59～73日目のウィスター系SPFラット，及び生後74～134日目の再生筋に変わった時期のmdxマウスを用いて横隔膜標本を作成して実験を行った．筋細胞内記録は3 M KClを満たしたガラス管微小電極を用いて膜電位（RMP）を経時的に計測した．酸素化する時は95% O_2と5% CO_2の混合ガスをTyrode溶液中に通じ，低酸素症にする時には，Tyrode溶液を交換した上で上記混合ガスを通じなかった．酸素化したときの細胞外液のガス分析ではPO_2 510mmHg，酸素化しない時の細胞外液はPO_2 161mmHg（7回の平均値）であった．これらは人の動脈血のように密閉された回路ではないため，大気と接しているので分圧は高い．文献上はN_2ガスを通じればPO_2を70mmHgに低下させることができる[2]．

筋細胞内CaはCaイオン電極を自作して，wpi社のエレクトロメーターFD-223を用いて計測した．Caイオン交換樹脂はFluka社のCa^{2+}-カクテルを用い[3,4]，シリコン化した微小管ガラス電極の先端に数百ミクロン満たしてその上方には0.1 M $CaCl_2$溶液を内部液として充填した．Caイオン電極は，一本ずつ10^{-8}～10^{-2}MのCa標準溶液を用いてtitrateした上で計測した．標準溶液の組成はできるだけ筋細胞内の組成と同一に近く作成する必要があるので，pHは7.00，147mMKCl，10 mM HEPES，10mM HEPES Na，1mM $MgCl_2$を含む．10^{-8}から10^{-5}Mの低濃度Ca標準溶液にはEGTAを加え，EGTAの純度は97%，イオン強度0.160，見かけ上の結合定数2.27×10^6，pH7.00を濃度へ変換し（活量係数0.76）計算上目的とするCa濃度になるようEGTAと$CaCl_2$とを混合して作成した．10^{-5}～10^{-2}Mの$CaCl_2$はCaに関しては10倍稀釈をし，KClやNaはイオン強度が一定となるように加えた．このようにして作成した標準溶液は計算上の値であるため，更に10^{-8}～10^{-2}Mの濃度にでき上っているか否かwpi社のCa membrane electrode CAL 1をFD-223 electrometerに接続して実測し，標準溶液が正し

*宮崎医科大学第三内科

い濃度になっていることを確認した．

CoQ_{10} は Tyrode 溶液に60μg/ml の濃度で加えて実験に用いた．その他 mdx マウスには尾静脈に12.5mg/kg の CoQ_{10} を静注した後30分経過した時点で，筋細胞内 Ca 高値が是正されるか否かの効果をみた．

結　　果

1)低酸素症と膜電位

ddy マウスは低酸素状態においても耐性が強く，RMP は前値の－86.9±2.5 (S.D.) mV（筋線維数 N＝51）に比し，低酸素状態10分後では－86.9±2.4mV(N＝20)，30分後－85.8±3.0mV(N＝21)，60分後－85.8±2.5mV(N＝21)，90分後－86.6±2.0mV（N＝22)，120分後－86.3±3.1mV（N＝22)，150分後－85.5±3.2mV（N＝20）と低下を認めなかった．

ラットでは RMP は前値－87.4±2.6mV（N＝70）に比し，**表 1** のように低酸素状態10分後には－77.1±2.9mV（N＝38）と低下し，150分後には－66.2±5.2mV（N＝49）と更に低下した．CoQ_{10} を Tyrodes 溶液中に加えておくと，低酸素状態にしても RMP の低下は抑えられ，10分後も－86.3±2.5mV（N＝46）に留まり，低酸素状態を60分間続けても平均で－80mV 以上に RMP を保つことができた．CoQ_{10} を用いない時と統計的にも有意差があった．

mdx マウスの筋標本では（生後日数平均90.5日)，RMP の前値は－83.9±3.5mV (N＝104) に比し，**表 2** の様に低酸素状態の30分後には－78.4±4.9mV(N＝51)，60分後には－72.3±5.6mV（N＝39)，90分後－63.5±8.1mV（N＝46)，120分後－49.7±20.1mV(N＝53)，150分後には－27.8±17.1mV (N＝70) と正常マウスやラットに比し著明な低下を認めた．mdx マウスでも CoQ_{10} を Tyrode 溶液に加えると，前値の RMP も－85.8±3.1mV（N＝102）と2mV ほどコントロールより過分極させ，30分以上の低酸素状態では統計的に有意な RMP の改善をみた．以上の膜電位の変化を図 1 にまとめた．

表 1　ラットでは低酸素状態にすると膜電位は10分後には－87から－77mV に低下し，150分後には－66mV まで低下する．CoQ_{10} を細胞外液中に加えておくと低酸素症にしても膜電位の低下は抑えられる

ラットと低酸素症及びCoenzyme Q_{10}の効果
RMPの経時的変化

	Coenzyme Q_{10}(－)	Coenzyme Q_{10}(＋)	有意差
前値	－87.4±2.6 mV (N＝70)	－87.6±2.1 mV (N＝64)	(－)
hypoxia 10分後	－77.1±2.9 (N＝38)	－86.3±2.5 (N＝46)	(＋) P＜0.01
30分後	－79.9±4.0 (N＝39)	－86.3±3.2 (N＝47)	(＋) P＜0.01
60分後	－77.4±3.8 (N＝46)	－80.8±3.7 (N＝46)	(＋) P＜0.01
90分後	－77.5±2.9 (N＝56)	－72.9±3.7 (N＝47)	(＋) P＜0.01
120分後	－72.7±5.9 (N＝54)	－76.6±6.7 (N＝46)	(＋) P＜0.01
150分後	－66.2±5.2 (N＝49)	－82.6±2.6 (N＝23)	(＋) P＜0.01

表2　mdx マウスでは，低酸素症によって正常マウスやラットに比し，著明な膜電位の低下が起ることを経時的に示した．CoQ_{10} を細胞外液中に加えておくと，低酸素症にしても膜電位の低下は統計的に有意に抑制された．

mdxマウスと低酸素症及びCoenzyme Q_{10}の効果
RMPの経時的変化

	Coenzyme Q_{10} (−)	Coenzyme Q_{10} (+)	有意差	
前値	−83.9±3.5 mV (N=104)	−85.8±3.1 mV (N=102)	t−test (+) P<0.01	u−test
hypoxia 10分後	−82.7±4.5 (N=49)	−82.8±3.7 (N=47)	(−)	
30分後	−78.4±4.9 (N=51)	−82.4±4.1 (N=44)	(+) P<0.01	
60分後	−72.3±5.6 (N=39)	−76.8±4.0 (N=43)		(+) P<0.01
90分後	−63.5±8.1 (N=46)	−69.0±6.0 (N=35)		(+) P<0.01
120分後	−49.7±20.1 (N=53)	−61.5±7.0 (N=33)		(+) P<0.05
150分後	−27.8±17.1 (N=70)	−44.8±19.5 (N=45)	(+) P<0.01	(+) P<0.01

2)筋細胞内 Ca

ラットの横隔膜-神経標本を用いて低酸素状態において30Hz，3分間の神経反復刺激を加えた後に，低酸素状態のまま経時的に筋細胞内 Ca と RMP を表3のように計測したところ RMP は前値−84.9±2.8mV（N=45）から30分後には−72.1±3.1mV（N=30），80分後には−72.3±3.1 mV（N=20）と約13mV の脱分極を認め，これは運動負荷を加えないで低酸素状態のみの際の脱分極（10mV）より大きい．筋細胞内 Ca をイオン電極を用いて測定すると，筋細胞外液が通常の Tyrode 溶液（〔Ca〕o=1.8×10^{-3}M）の際は〔Ca〕i =1.6×10^{-6}M（N=20）の前値より，低酸素状態運動負荷後30分では3.0×10^{-6}M（N=30），80分後では6.2×10^{-6}M（N=6）と約4倍の筋細胞内 Ca 上昇が認められた．

mdx マウスの筋細胞内 Ca は，細胞外液が Tyrode 溶液である場合は表4のように3.6×10^{-5}〜3.9×10^{-4}M と高値である．CoQ_{10} を尾静脈へ12.5mg/kg 静注して，mdx マウスの筋細胞内 Ca が是正されるか否かをみたが，投与後も7.1×10^{-5}〜3.1×10^{-4}M とやはり高値で，統計的にも有意な改善は認められなかった．

mdx マウスの筋細胞内 Ca は Ca イオン電極で計測するとこのように高値であるため，Tyrode 溶液中の Ca が10^{-3}M オーダーなので外から中へ電極刺入時に入る可能性が否定できないことから，0.2mM の EGTA を Tyrode 溶液（$CaCl_2$ を入れずに他の組成は同様）に加えて〔Ca〕o =4.3×10^{-6}M と低下させた溶液を作成した．この溶液中で SPF ラットの筋細胞内 Ca を計測すると8.6×10^{-7}M（N=12），7.7×10^{-7}M（N=12），8.2×10^{-7}M（N=10）となり，mdx マウスでは3.4×10^{-5}M（N=17）という結果を得た．これは通常の Tyrode 溶液中で計測した値よりは低いが，mdx マウスの筋細胞内 Ca は，正常哺乳動物の筋細胞内 Ca より依然として2桁高いことが示された．

考　　按

低酸素症による筋障害について，Harris ら[5]は犬の骨格筋を用いて，主に生化学的変化を研究しているが低酸素症になると筋の ATP の低下が起

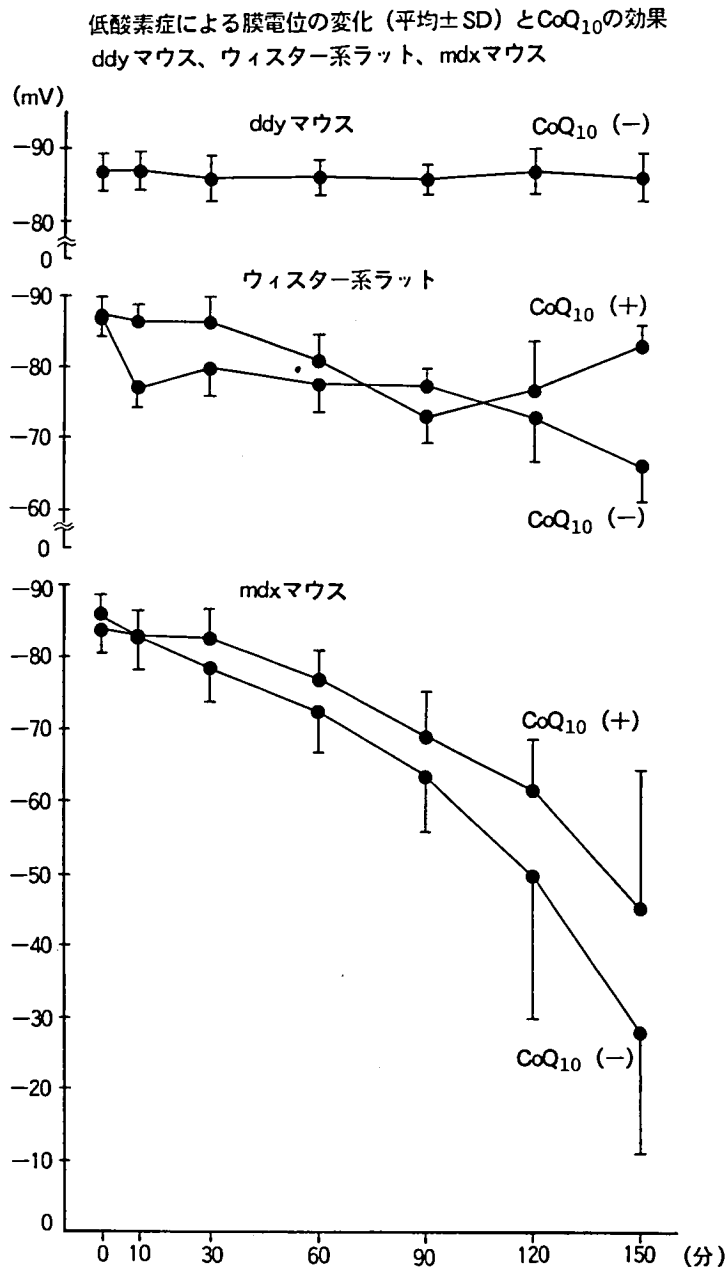


図1　ddy マウスでは低酸素症にしても150分間では膜電位の低下は起らない．ウィスター系ラットでは膜電位の低下が軽度に起り，mdx マウスでは著明に低下する．CoQ_{10} は低酸素症による膜電位の低下をある程度抑制する効果が認められた．

り，phosphocreatine と ADP から ATP を産生してこの不足を補うが，低酸素症が3時間も続くと phosphocreatine も消費しつくされ，ATP の急速な低下が起る．そのため脂肪の分解が起り，その分解産物が膜の透過性亢進を来し Ca も細胞外より中へ入ると考えられる．一方脂肪の酸化産物は

表3　低酸素状態で運動負荷を加えた際の筋細胞内Caと膜電位

ラットの横隔膜-神経標本で低酸素状態において30Hz，3分間の神経刺激を加えた後，経時的に筋細胞内Caと膜電位を計測した．膜電位の低下は運動負荷を加えた方がより顕著である．筋細胞Caの上昇はあるが，1.6×10^{-6}から6.2×10^{-6}Mと正常の4倍程度に留る．

SPFラットの筋細胞内Ca　　$[Ca]_o=1.8\times10^{-3}$ M (Tyrode溶液)

	$[Ca]_i$	RMP
前　値	1.6×10^{-6} M (N=20)	−84.9±2.8 mV (N=45)
hypoxia 運動負荷後 30分まで	3.0×10^{-6} M (N=30)	−72.1±3.1 mV (N=30)
80分後	6.2×10^{-6} M (N=6)	−72.3±3.1 mV (N=20)

hypoxiaで運動負荷をしても$[Ca]_i$の上昇は正常の4倍程度

表4　mdxマウスの筋細胞内Caは平均1.9×10^{-4}Mと高値である．CoQ_{10}を尾静脈投与をして30分後に筋細胞内Caを横隔膜標本においてCaイオン電極で測定した．平均1.5×10^{-4}Mと高値で，筋細胞内Ca高値を是正する効果は認められなかった．この測定はすべて酸素化した状態で行っている．

mdxマウスの筋細胞内Caに対するCoenzyme Q_{10}の効果

筋細胞内Ca					
Coenzyme Q_{10}(−)			Coenzyme Q_{10}(+) <尾静脈へ12.5 mg/kg BW i.v.>		
日齢	性別	$[Ca]_i$	日齢	性別	$[Ca]_i$
1. 80	F	2.1×10^{-4} M (N=23)	1. 100	M	1.1×10^{-4} M (N=10)
2. 81	F	3.6×10^{-5} M (N=10)	2. 107	F	3.1×10^{-4} M (N=11)
3. 89	F	3.9×10^{-4} M (N=7)	3. 107	F	1.1×10^{-4} M (N=10)
4. 110	M	2.6×10^{-4} M (N=26)	4. 110	M	7.1×10^{-5} M (N=27)
5. 134	M	4.2×10^{-5} M (N=20)			
平　均		1.9×10^{-4} M (SE=0.67×10^{-4})	平　均		1.5×10^{-4} M (SE=0.54×10^{-4})

t−testで有意差なし (t=0.41)

Na-K ATPaseの活性を低下させ，Na能動輸送の障害を来し，膜電位も下ると考えられる．CoQ_{10}はミトコンドリアに働き電子伝達体としてATP産生を増し，Na-pumpの働きを高め，膜電位を安定させる作用があると考えられる．正常な筋肉が低酸素症に陥った場合このような現象が起ると考えられるが，mdxマウスでは正常筋以上の著明な膜電位の低下が低酸素症によって起り，これはmdxマウスのATP，phosphocreatineが貯蔵量として少ない可能性があり，今後の計測を要する．筋細胞内Caは低酸素症下において運動負荷を加えても1.6×10^{-6}Mから6.2×10^{-6}Mと正常の4倍に増加する程度であり，mdxマウスの筋細胞内Caは低酸素症にしなくてもすでに正常の40〜100倍高く蛋白分解酵素が活性化され得るレベルにある．従ってmdxマウスでは膜構造の異常があって，これに低酸素症によるenergy failureが加わると更に膜電位の低下が顕著になると考えられる．

結　　語

(1)正常のマウスでは低酸素症による膜電位の低下は150分では起らない．(2)ラットでは低酸素症10分後には10mVの膜電位低下が起り，$Co\,Q_{10}$は30分以上の低酸素症状態を続けても膜電位低下を阻止する．(3) mdxマウスは低酸素症により，急速な膜電位低下を認め，CoQ_{10}を用いると有効である．(4) mdxマウスの筋細胞内Ca高値を是正する効果は，CoQ_{10}の尾静脈投与によっては得られない．(5)低酸素症と運動負荷による筋細胞内Caの上昇はラットでは正常の4倍程度に留る．(6)正常ラットの筋細胞内Caは外液のCa濃度を10^{-6}Mに低下させると$7.7\sim8.6\times10^{-7}$Mになり，mdxマウスの筋細胞内Caは外液のCa濃度を10^{-6}Mに低下させても3.4×10^{-5}Mとやはり高値である．

文　　献

1) Steenbergen, C., Hill, M.L. & Jennings, R.B.: Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on pasma membrane integrity. Circ. Res., 57: 864, 1985.

2) 今西愿，有田真，藤野正典ほか：頻拍性上室性不整脈に対するCoenzyme Q_{10}の臨床効果と微

小電極による実験的研究．臨床と研究，58：252，1981．

3）岡田泰伸，老木成稔：微小電極による細胞内カルシウム濃度測定法．生体の科学，37：404，1986．

4）Ueda, S., Oiki, S. & Okada, Y.: Oscillations of cytoplasmic concentrations of Ca^{2+} and K^{+} in fused L cells. J. Membrane. Biol., 91: 65, 1986.

5）Harris, K., Walker, P.M., Mickle, D.A.G. et al.: Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. Am. J. Physiol., 250 (Heart Circ. Physiol. 19): H 213, 1986.

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

斎　田　孝　彦*

研究協力者　岡　部　英　俊*　古　谷　泰　治*　山　田　正　明*
中　嶋　三智子*　西　口　悦　子*　岩　村　京　子*
斎　田　恭　子*

我々は先に部分的に精製したヒト白血球発熱物質とP388D1細胞株より分離した粗製Interleukin-1（IL-1）を用い，白血球発熱物質が筋蛋白分解を亢進せしめるとのBaracos等の報告[1]を確認した．

IL-1は活性化された単核食細胞（activated mononuclear phagocytes）によって作られるペプチドでかつてlymphocyte activating factor（LAF）と呼ばれていたものに一致する．1984年にはAuron等が31,000daltonのヒトIL-1のprecussor C-DNAのnucleotide sequenceを発表し，1985年にはMarchらがヒトIL-1のc-DNAクローニングにより，ヒトIL-1は17,000daltonではあるがPIが5.0のIL-1-αとPI7.0のIL-1-βの二つの異なる分子よりなる事を報告した[2]．

1986年に入って遺伝子工学的に作られたIL-1の生物活性の検討が始められたが，IL-1本来のthymocyte co-mitogenic activityの他，Bリンパ球の増殖促進活性，線維芽細胞の増殖促進活性actute phase proteinの誘発活性にもα，β型で差がない．またrecombinant IL-1の内因性発熱物質としての活性も確認されており，精製ヒト白血球発熱物質と蛋白量当りほぼ単位の発熱活性（pyrogenic activity）があることから，従来のいわゆる内因性発熱物質はIL-1と全く同一である可能性が一層強くなっている．

本研究ではrecombinantヒトα-IL-1のラット筋肉蛋白分解・促進作用の有無を調べ，その作用機序を検討した．

材料と方法

IL-1は古谷らの方法で作製されたヒトα-recombinant IL-1を用いた[3]．即ちHL-60株由来のpoly（A）mRNAより作製したcDNAライブラリーより，ウサギIL-1 cDNAをプローブとしてスクリーニング5個の陽性クローンを得，そのうち最も長いcDNAインサートをもつクローン（PHL4）の塩基配列（約2.1Kbp）を決定した．これによりヒトIL-1は271残基のアミノ酸よりなる前駆体分子として生合成されることが示唆された．ヒトIL-1のC端側159残基のアミノ酸をコードするcDNA断片を，大腸菌発現用ベクターにATG開始コドンを含むオリゴヌクレオチドアダプターを用いてTrpプロモーターの下流に連結し，大腸菌中で発現させた．菌体抽出液を硫安分画，イオン交換およびゲル濾過法により精製し，SDS-PAGE分析において18KDの単一バンドを示す実質的に不純物を含まないヒトIL-1精製品を得た．本標品の等電点は約5.3，エンドトキシン含量は検出限界以下（<0.08ng/mg）であり，α型IL-1に一致しlymphocyte activating factor比活性は2～3×10^7U/mgであった．

IL-1の筋組織に対する作用は，幼若ウィスターラットのヒラメ筋及び長母指伸筋をGoldbergらの方法によりインキュベートして調べた．Krebs-Ringer bicarbonate bufferに筋中への拡散を亢めるため5mMグルコース，0.1単位/mlのインスリン，血中レベルの5倍のbranchedアミノ酸を投与し，30分間プレインキュベートしたのち，緩

＊国立療養所宇多野病院臨床研究部神経内科

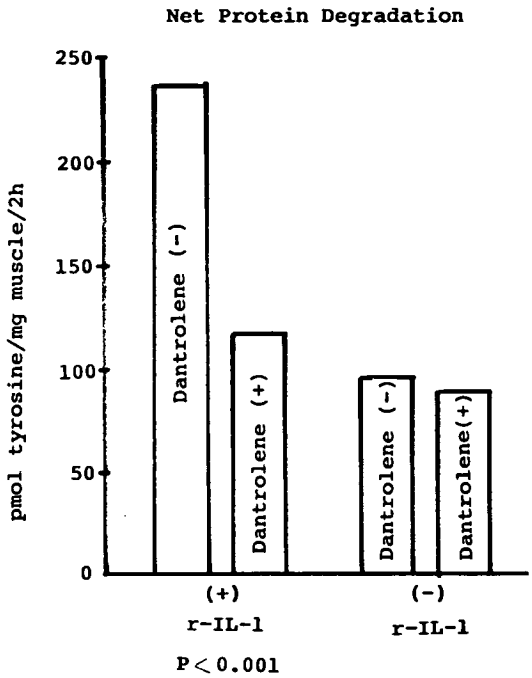


図1

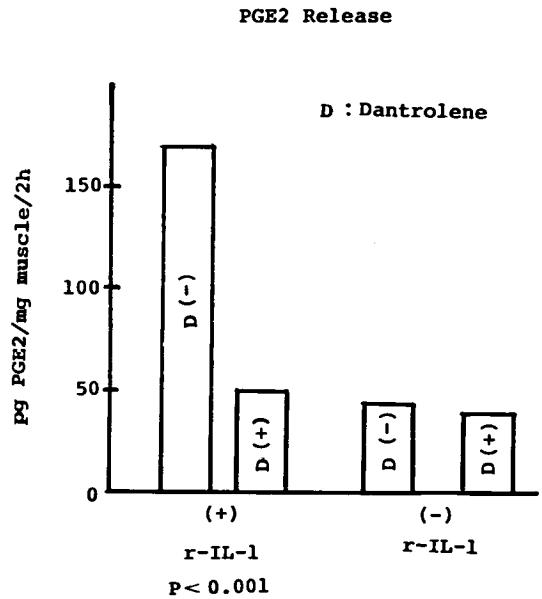


図2

衝液で充分透析したIL-1あるいは白血球発熱物質を多くの場合0.5rabbit pyrogen dose/mlとして投与し，さらに2～3時間インキュベートした．蛋白分解あるいは合成はインキュベーションの間に1mg湿重量当りの筋組織より取り込まれた，あるいは筋組織より放出された，nmole単位のチロシン量で表わした．

大多数の実験ではrecombinant α-IL-1 50ng protein/ml濃度で投与したが，これは1.0 rabbit pyrogen doseに相当する．PGE_2のラジオイムノアッセイは新技術開発事業団早石プロジェクトの裏出氏の御協力によってなされた．

結　　果

IL-1投与により蛋白合成は変化しないが，蛋白分解が亢進しこのためnetの蛋白分解の促進が見られる．IL-1投与後に〔C〕phenylalanineの取り込みで見た蛋白合成と筋中のtyrosine量に変化はなく，従ってmedium中でのtyrosine量の変化は細胞内アミノ酸プールの単純な漏出によるのではないと言える．tyrosineは骨格筋中で合成も分解もされないから，medium中での増加は細胞蛋白のnet degradationを反映しているといえる．

緩衝液にdantrolene 9μg/mlを加え，30分preincubateし，90分IL-1なしでincubateし，次いでIL-1を加えたmediumに3時間incubateすると，図1のようにほぼIL-1を加えない場合に近いレベルにまで蛋白分解は抑制される．この場合PGE2の産生もIL-1を添加しない場合と同レベルに抑制されている（図2）．

次に細胞外のCaイオンの影響をみるため，2.58mMCa^{++}を添加あるいは非添加のKrebs Ringer bicarbonate bufferで同様にpreincubate, incubateし，次いでIL-1添加meiumで3時間incubateした．この場合，図3の様にCaイオンを添加しなければ蛋白分解はIL-1非添加のレベルにとどまる．この条件ではPGE 2の産生はIL-1添加時にはCaイオンの有無にかかわらず，IL-1の非添加時に較べて高い．Bufferにprotease inhibiter Ep-475 25μm/mlを添加したものとしていないものとでpreincubateすることでIL-1による蛋白分解に与える影響をみると，図4の様に，

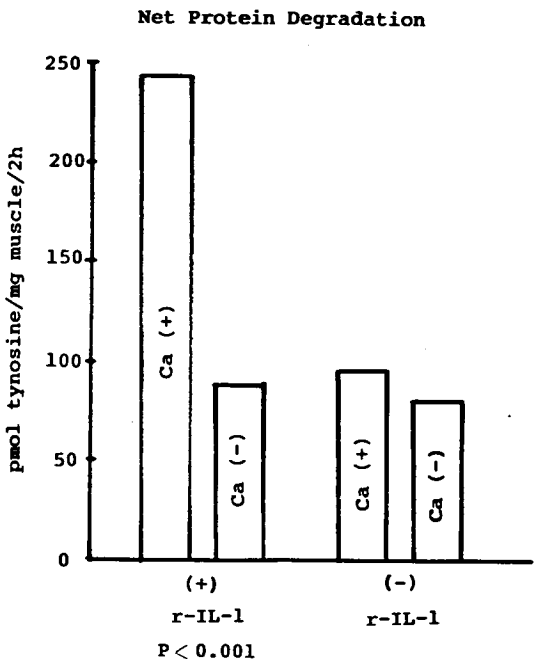


図3

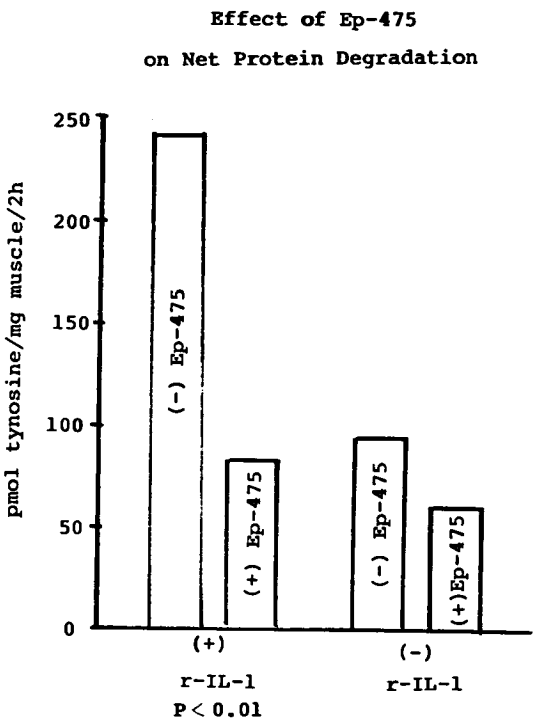


図4

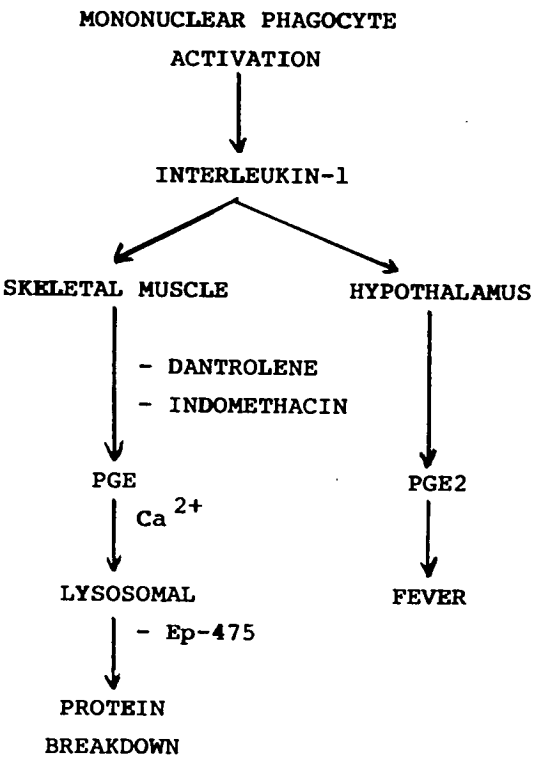


図5

Ep475の添加により，IL-1による蛋白分解促進に対する抑制がみられる．この場合にもEp475の添加はPGE 2産生の亢進に対しては抑制効果を示していない．

考　　察

本研究により，ヒトrecombinantα-IL-1がラット筋蛋白に対する分解促進効果を示すことが明らかとなった．我々の先の粗製IL-1を用いた研究でインドメサジンがIL-1の分解促進に対し抑制的に働くことが示されたが，本研究ではdantroleneも同様に抑制効果を示すことが明らかとなった．これらの薬物はいずれもPGE 2の産生を減ずることが知られており，ともにIL-1によるPGE 2産生亢進を抑えることにより蛋白分解亢進を抑制することであろうと考えられる．dantroleneは小胞体よりのCa放出のinhibitionであることから，小胞体よりのCa放出がIL-1によるPGE 2産生を促すと考えられる．Ca dependentの酵素である

phospholipase A2による遊離 arachidonic acid の産生に対し dantrolene が抑制的に働くことにより PGE 2の産生を抑制し，IL-1の筋蛋白分解を抑えるのかもしれない．

細胞外 Ca イオンを減ずることで，IL-1による蛋白分解が殆ど抑制されたことは，細胞外の Ca イオンが引続く IL-1による蛋白分解の進行にとって必須であることを示唆している．従って細胞内および細胞外の Ca イオンは，IL-1の筋蛋白に対する作用の異なるステップに対し，必要であると考えられる。

文　献

1）Baracos, V., Rodemann, H.P., Dinarello, C.A., and Goldberg, A.L.: Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E_2 release by leukocytic pyrogen: a mechanism for the increased degradation of muscle proteins during fever. New Engl. J. Med., 308: 553-558, 1983.

2）Dower, S.K., Kronheim, S.R., Hopp, T.R., Cantrell, M., Deeley, M., Gillis, S., Henney, C.S., and Urdal, D.L.: The cell surface receptors for interleukin-1α and interleukin-1β are identical, Nature, 324: 266-268, 1986.

3）Furutani, Y., Nomura, H., Notake, M., Yamayoshi, M., Ōue, M., Yamagishi, J., Furuta, R., Fukui, T., Yamada, M., and Nakamura, S.: Production of human recombinant interleukin-1, Proc. Jap. Soc. Immunol, 15: 380.

4）Goldberg, A.L., Martal, S.B., and Kushmerick, M.J.: In vitro preparations of the diaphragm and other skeletal muscles, Meth Enzymol, 39: 82-94, 1975.

48）骨格筋の発達と脂質の変化

木　下　眞　男*

研究協力者　河　村　裕　子*　小　林　雅　子*　若　田　宣　雄*

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー症やWerdnig-Hoffman病など幼児期にみられる神経筋疾患では成人骨格筋にはみられない幼若なタイプII C線維が多いことが知られている．発育過程にある骨格筋に対して生化学的，組織化学的検討を加えることは，これらの疾患の病因を考えるうえで有用と思われる．我々は，生後3週，4週齢及び成熟ラットについて発育に伴ないトリグリセライド（以下TGと略す）の減少とタイプII C線維の減少がみられたことを報告した．そこで今回，さらにTGとタイプII C線維の関連を明らかにするため出生直後のラットを除神経し比較検討し若干の知見を得たので報告する．

対象及び方法

出生直後のウィスター系ラットを冷凍麻酔し，坐骨神経を切断，10日目に断血屠殺し，ヒラメ筋（以下Soleusと略す），腓腹筋（以下Gastroと略す），長趾伸筋（以下EDLと略す）の除神経側及び対側対照側を採取した．生化学的検討としては，総脂質，総燐脂質，TG及びTGの脂酸構成を測定し，組織化学として，各筋の筋線維分布を測定した．これらの結果を3週，4週齢，成熟ラットの各筋と比較検討した．なお各脂質は，Folchらの方法にて抽出し，総脂質は乾燥重量として微量直示天秤にて測定，総燐脂質はBartlett法にて測定した．TGとその脂酸構成はKiselgel Hで作製した薄層クロマトグラフィーにスポット後，n.ヘキサン：エチルエーテル：酢酸＝170：28：2の展開液で展開し，TGを分離した．さらにガスクロマトグラフィーにより定量しその脂酸構成を測定した．カラムは充填剤として固定相担体はgaschrom Q，液相として10% etylene succinate methyl silicone copolymer（EGSS-X）を使用し，分析条件はカラム温度190°C，デテクター温度250°C，キャリアーガスは窒素を使用し，流速は50ml/minでおこなった．組織化学的検索は，Gomori-Trichrome，PAS，NADH，myosin ATPase（pH9.4，4.6，4.3）の染色でおこなった．

結　果

総脂質は，各時期でSoleusが最も多いが，各筋においては成熟による一定の傾向はなかった．総燐脂質は各時期，各筋において一定の傾向はみられなかった．TGは，Soleusで除神経側8.29±1.86（n＝4）から成熟ラット2.57±0.29mg/g wt（n＝4）と有意に減少し（$p<0.01$，表1），Gastroで除神経側5.47±0.60（n＝4）から成熟ラット1.23±0.33mg/g wt（n＝11）と有意に減少し（$P<0.001$，表2），EDLで除神経側2.50±0.22（n＝4）から成熟ラット1.32±0.18mg/g wt（n＝4），と有意に減少した（$P<0.001$，表3）．各時期においてSoleusが最も多く，また各筋共に成熟に伴ない有意に減少した．TGの脂酸構成では，Soleusで成熟に伴ないC14，C16の減少，C18：1，C18：2，C18：3の増加を認めた．Gastroでは成熟に伴ないC14，C16の減少，C22：2，C26：2の増加を認めた．EDLでは成熟に伴ないC14，C16の減少を認めた．全経過では，あまり大きな変動は認められなかったが，詳細に各時期を検討すると除神経側と3週，4週齢間で，3週，4週齢と成熟ラット間でかなり有意な変動が認められた．組織化学では，除神経による筋線維の変化は，萎

＊東邦大学医学部第四内科

表1　ヒラメ筋の脂質含有量および筋線維分布

Soleus

	Denervation	10 days	3 W	4 W	Adults
Total lipid(mg/gwt)	29.23±4.91	27.57±5.37	30.94±12.90	34.26±5.88	27.42±6.49
Total phospholipid(mg/gwt)	0.60±0.01	0.45±0.11	0.60± 0.09	0.52±0.04	0.51±0.64
Triglyceride(mg/gwt)	8.29±1.86	5.53±1.08	5.23± 0.84	5.04±1.12	2.57±0.29
Fiber type distribution(%)					
Type I fiber	2.5±0.7	39.5±4.5	55.1±4.8	69.4±5.2	79.3±11.1
Type II A fiber	0	0	20.6±3.6	19.8±2.4	18.0± 1.1
Type II B fiber	3.2±0.12	0	6.3±2.0	3.4±1.2	2.6± 1.8
Type II C fiber	94.3±0.8	60.5±3.8	18.0±4.8	7.4±1.3	1.4± 0.7

Denervation: 10 days after neonatal denervation

表2　腓腹筋の脂質含有量および筋線維分布

Gastrocnemius

	Denervation	10 days	3W	4W	Adults
Total lipid(mg/gwt)	25.64±6.64	22.62±5.06	27.96±6.21	22.10±2.59	24.13±5.15
Total phospholipid(mg/gwt)	0.52±0.09	0.55±0.05	0.48±0.05	0.46±0.05	0.32±0.03
Triglyceride(mg/gwt)	5.47±0.60	4.16±0.97	2.77±0.69	1.55±0.51	1.23±0.33
Fiber type distribution(%)					
Type I fiber	1.3±0.0	4.2±1.0	16.7±2.0	16.1±2.9	15.3±3.2
Type II A fiber	3.2±0.7	1.3±1.0	21.4±4.0	24.5±2.9	15.1±2.1
Type II B fiber	52.8±1.2	63.4±1.9	48.2±8.1	56.5±3.0	69.5±4.2
Type II C fiber	42.1±0.3	31.2±3.3	13.8±5.1	2.6±1.4	

Denervation: 10 days after neonatal denervation

表3　長趾伸筋の脂質含有量および筋線維分布

Extensor digitorum longs

	Denervation	10 days	3 W	4 W	Adults
Total lipid(mg/gwt)	20.15±1.05	22.52±5.98	28.85±7.52	31.20±5.18	22.78±6.83
Total phospholipid(mg/gwt)	0.57±0.03	0.45±0.07	0.61±0.06	0.62±0.05	0.41±0.05
Triglyceride(mg/gwt)	2.50±0.22	1.91±0.47	1.44±0.23	1.53±0.33	1.32±0.18
Fiber type distribution(%)					
Type I fiber	4.5±1.7	8.6±2.0	6.0±1.1	4.6±0.4	6.0±1.2
Type II A fiber	0.4±0.3	0	22.9±5.0	14.4±5.9	19.9±2.3
Type II B fiber	38.1±2.2	35.6±1.6	70.9±5.2	80.7±5.8	74.1±2.2
Type II C fiber	57.1±3.5	55.8±0.3			

Denervation:10 days after neonatal denervation

縮以外には特別なものはみられず，脂肪細胞の浸潤や結合織の増加もみとめられなかった．さらにSoleusでは除神経側でタイプII C線維は94.3%みられ，60.5，18.0，7.4，1.4%と成熟に伴ない減少した．タイプI線維は除神経側で2.5%みられ，39.5，55.1，69.4，79.3%と，タイプII C線維とは対称的に成熟に伴ない増加した（表1）．Gastroでは，除神経側でタイプII C線維は42.1%みられ，31.2，13.8，2.6%と減少し，消失した．またタイプI線維は，1.3%から15.3%と増加した（表2）．EDLにおいては，除神経側でタイプII線維は57.1%みられ，55.8%に減少，その後消失した．タイプI線維は除神経側で4.5%みられ，8.6，6.0，4.6，6.0%と若干の変動がみられた（表3）．

考　　案

我々は，本年度神経学会において成熟に伴ない

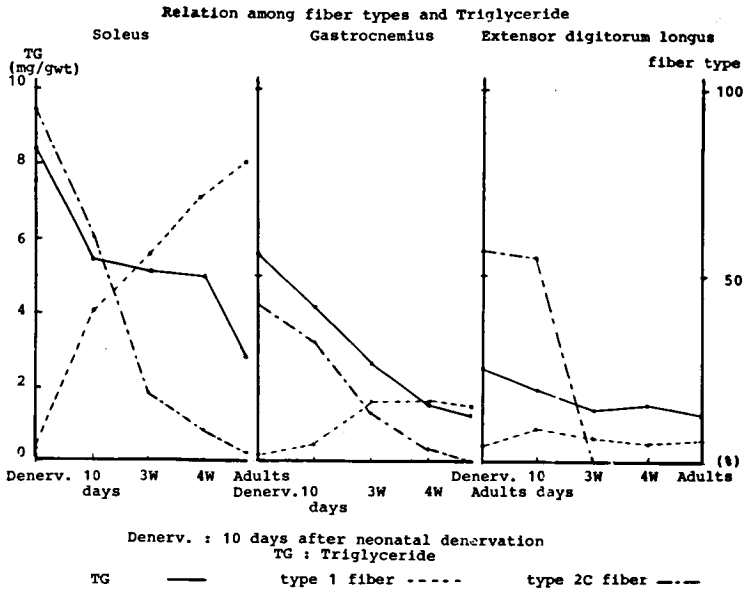


図1　タイプI，II C線維とトリグリセライドの関連

TG含有量の減少と，タイプII C線維の減少が認められる事を報告した．そこで各筋線維，特にタイプI及びII C線維とTGの関連を明らかにするため除神経をおこない脂質を検討した．総脂質，総燐脂質には成熟による大きな変動はなかった．TGは以前我々が家兎におこなった実験結果と同様にSoleusで最も多く含有され，成熟に伴ない有意な減少を認めた．我々は以前家兎においてTG含有量が，タイプI線維に最も多く，II A，II Bと減少していることを報告した．また今回の結果よりTGの変動とタイプII C線維の変動が平行関係にあることから，TG含有量はタイプI及びII C線維数に深く関係があるものと思われた．そこで各筋のTG含有量とタイプI及びII C線維数を図1に示した．この図より生下時から幼若期は，TGの変動はタイプII C線維数により，また幼若期から成熟期のTGの変動はタイプI線維数によるものと推察された．TGの脂酸構成について個々の脂肪酸変動の理由は不明であったが，各筋共に除神経側と3週，4週齢間または3週，4週齢と成熟ラット間においては，かなり有意な差が認められ，3週，4週齢における脂肪酸の活発な変動が認められた．

発育過程における骨格筋線維タイプの変動は動物により大きく異なる．多くの哺乳類では生下時すでに筋線維分化が完了しているが，ラットでは生下時に未熟なタイプII C線維がみられ除々にタイプI，II A，II Bと分化していく．それ由に発育過程の骨格筋の検索にはラットが適していると思われる．しかし生下時から幼若期の筋線維分化は連続的な現象であり各時点での生化学的，組織化学的検索に，かなり幅があり困難な点が多く，生化学的報告は，ほとんどない．また生下時除神経による組織化学的報告も様々であり，一定したものはなく，Engelらは，タイプII線維の増加，赤筋の白筋化と，白筋のより白筋化を報告した．岡田らは，タイプII C線維残存を報告した．我々は，生化学的には，発育過程でTGの変動が大きく成熟により減少することを，組織化学的には，岡田らと同様にタイプII C線維の残存を認めた．TGの変動は幼若期程大きく，タイプI線維が増加するにもかかわらず，TGが減少することにより，タイプII C線維は，タイプI線維より多くのTGを含有していることが明らかとなった．

結　　論

発育過程の骨格筋の変化を検討するために，出生直後のラットを除神経し，タイプII C線維の分化を抑制し，生化学的，組織化学的検討をおこなった．その結果，TGは成熟と共に減少し，これはタイプII C線維数の減少と関連があり，タイプII C線維は，タイプI線維より多くのTGを含有していると考えられた．

文　　献

1）Engel, W.K., Karpati, G.: Impaired Skeletal Muscle Maturation fallowing Neonatal Neurectomy. Dev. Biol., 17: 713, 1968.

2）岡田理美，ほか：ラット筋線維の発育・分化に関する組織化学的研究．神内，15：363，1981.

3）Ho, K.W., Heusner, W.W., et al: Postnatal muscle fibre histochemistry in the rat J. Embryol. exp. Morph. 76: 37, 1983.

4）Okada, S., Nonaka, I., et al: Muscle Fiber Type Differentiation and Satellite Cell Populations in Normally Grown and Neonatally Denevated Muscles in the Rat. Acta. Neuropathol., 65: 90, 1984.

5）若田宣雄，ほか：持続的運動負荷によるラット骨格筋の変化．臨床神経，25：202，1985.

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

吉 田 瑞 子*

研究協力者　安 藤 一 也*

はじめに

筋ジストロフィー症は，“細胞膜が異常のため，筋細胞外から細胞内に多量の Ca^{2+} が流入し，筋細胞が壊死に陥る”といわれている．私達はこの仮説に基づき，筋ジストロフィー症の細胞膜では，Ca^{2+} の制御機構が異常で細胞内の Ca^{2+} 濃度が正常に制御されていないと考えた．

一方細胞内の Ca^{2+} 制御を担っているひとつに，イノシトールリン脂質代謝機構がある．この代謝系は化学的情報伝達機構ではかなり検索されているが，電気的情報伝達機構ではほとんど検索されていない．最近 T 管からポリホスホイノシタイド（PPI）が抽出され[1]，さらに蛙骨格筋を用いて，電気刺激がイノシトールリン脂質代謝機構を介し，細胞内に伝達される[2]ことが報告されはじめた．私達はこれ等の報告により筋細胞においても，情報伝達や，Ca^{2+} 制御の一端をイノシトールリン脂質代謝機構が担っていると予測し，以下に述べる検索を行なった．

目　的

筋細胞膜を用いてイノシトールリン脂質代謝系を検索することはむずかしい．そこで赤血球を筋細胞のモデルとして用い，イノシトールリン脂質代謝系のリン脂質，特に PPI〔ジホスホイノシタイド（DPI），トリホスホイノシタイド（TPI）〕とホスファチジン酸（PA）の 2 °C および37°C における含量について検索した。

＊国立精神神経センター神経研究所

対象と方法

赤血球は Duchenne 型筋ジストロフィー症患者（DMD，18～23才）および対照者とした健康男子（同年齢層）の新鮮ヘパリン血より得た．血漿分離後，赤血球を Ca^{2+} とグルコースを含むリン酸緩衝食塩水（PBSD(+)）で 3 回洗滌し，43～45% ヘマトクリット値の赤血球浮遊液とした．その浮遊液を1.5ml ずつ分注し，duplicate で 2 °C および37°C で 3 時間浮置し，PA および PPI の抽出試料とした．

リン脂質抽出および分離

PA：赤血球浮遊液にその4.7倍量のメタノールを加え撹拌し，20分放置後クロロホルムを加えた．最終的に浮遊液の22倍量のクロロホルム（C）：メタノール(M)＝2：1でリン脂質を抽出した．抽出液をその 1/5 量の0.9% NaCl で洗滌後，その下層をさらに theoretical upper phase で洗滌し乾固した．乾固した全リン脂質を一定量の C：M＝9：1に溶解し，全リン脂質測定用に 1/20量を採取し，残る全量を PA 測定用とした．

PA の分離は二次元展開薄層クロマトグラフ法で行った．薄層板はメルク社のプレコーティング-シリカゲル60（厚さ0.25mm）を用いた．一次元展開はクロロホルム：メタノール：28%アンモニア水＝65：35：5.5の展開液で行い，二次元展開はクロロホルム：アセトン：メタノール：酢酸：水＝100：40：30：20：12の展開液で行った．

PPI：赤血球浮遊液にその4.7倍量のメタノール（60μmolCa/g·cells を含む）を加え，PA 抽出と同様にして，PPI以外の全リン脂質を抽出した．この抽出液は総リン脂質含量測定用とし，残査を

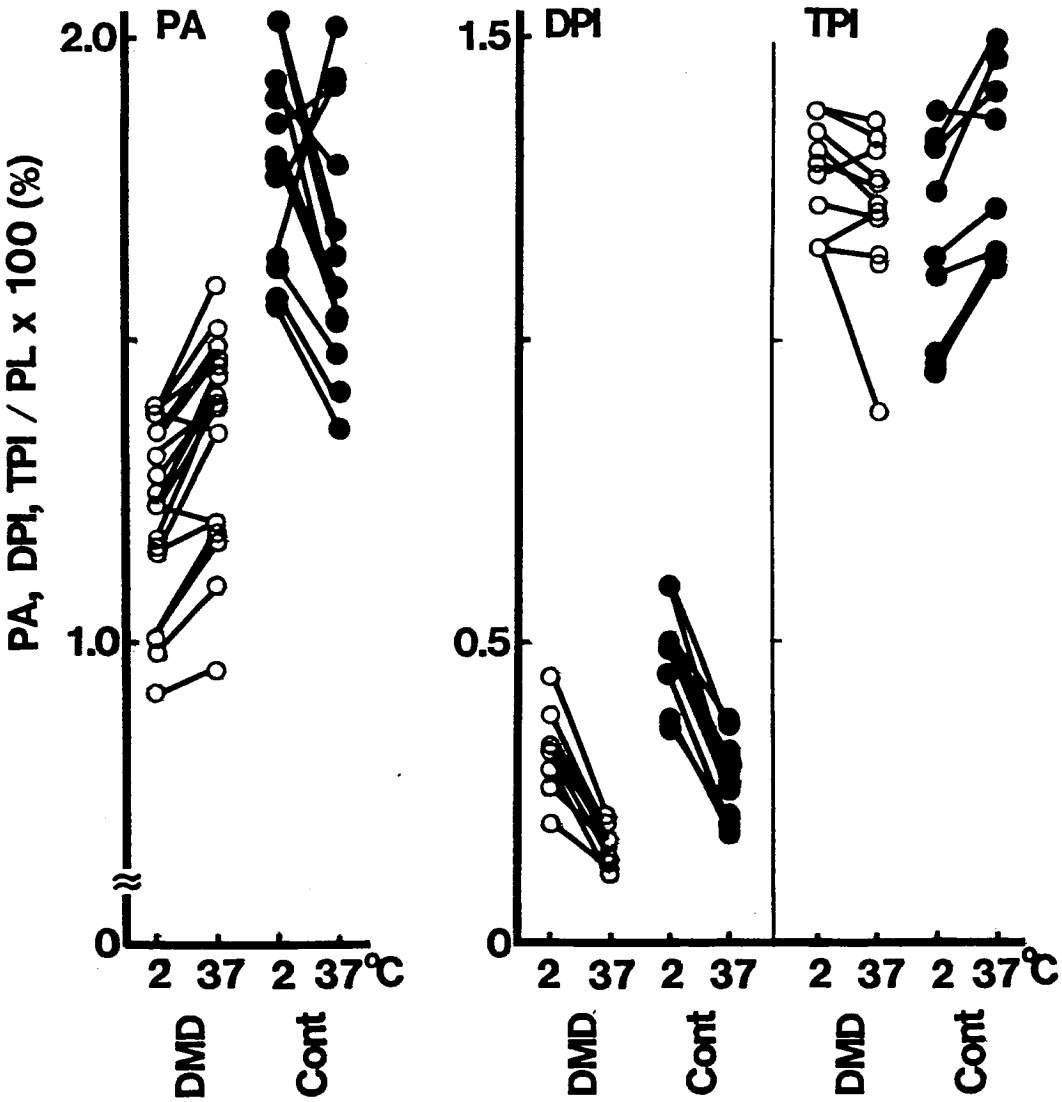


図　赤血球を2℃および37℃で，3時間浮遊した時のPA，DPIおよびTPIの含量変化.
DMD　：Duchenne型筋ジストロフィー症患者（18～23才）
cont　：健康男子対照者（18～23才）.
PL　：全リン脂質

PPI抽出用とした.

残査に赤血球浮遊液の17倍量の酸性C：M＝2：1（0.25% cHClを含む）を加えPPIを抽出した．抽出液をその1/5量の1 M-HClで洗滌し，さらに下層をその2/3量のtheoretical upper phaseで2回洗滌した．洗滌した下層に，その組成がC：M＝2：1になるようにメタノールを加え，28%アンモニア水でpH9.5（0℃）に調整した．アルカリ性PPI抽出液を，それの1/5量の0.05M KClで洗滌し下層を得た．下層はN_2気流中で蒸発乾固後，C：M：H_2O＝75：25：2の溶液で溶解し，薄層クロマトグラフ用の試料とした.

DPI と TPI の分離は二次元展開薄層クロマトグラフ法で行った．薄層板はメルク社のシリカゲル60（HPTLC）に1％しゅう酸カリウムを含ませ，110°C で1時間乾燥したものを用いた．一次元展開はクロロホルム：メタノール：28％アンモニア水＝65：35：5の展開液で行い，二次元展開はクロロホルム：アセトン：メタノール：酢酸：水＝40：17：15：12：8の展開液を用いた．

PA と PPI の検出はヨード蒸気中で行い，スポットを掻取った．

定量は Bartlett 法を改良した方法でリン定量を行った．シリカゲルごと70％過塩素酸で灰化した後に，水，Fiske-Subbarow 還元試薬，5％モリブデン酸アンモニウムを加え，7分間沸騰水浴中で加熱発色させた．冷却後シリカゲルを遠沈し，上清を820nm で比色した．

結　　果

PA の含量については，20名の DMD と14名の健康対照者，DPI と TPI の含量については，10名の DMD と健康対照者の赤血球で，それぞれ検索した．その結果を図に示し，2°C の含量に対して，37°C の含量を比較すると次のようになる。

PA：DMD では増加傾向を示し，健康対照者は減少傾向を示した。

DPI：DMD と健康対照者共に減少し，両者間に差異は認められなかった．

TPI：DMD の場合変化がないか，わずか減少する傾向を示し，健康対照者は増加する傾向を示した．

また DMD の PA 含量は健康対照者の PA 含量に比較して少なかった．特に2°C における含量の差は大きかった．

考　　察

最近“生体膜の膜状態を維持するのに，PA 含量が重要な役割を果たしている”と考えられる報告がある．すなわち PA 含量が減少すると膜が崩壊したり，細胞が変性[3]する報告がある．この結果より“DMD 赤血球の PA 含量が健康対照者の PA 含量に比べ少ない”ということは，DMD の膜が脆弱で，細胞が崩壊し易いことを示唆し，膜異常説を裏付ける．

私達は DMD と健康対照者の赤血球を，Ca^{2+} を含むリン酸緩衝食塩水に浮遊し4°C で保存した時，DMD の赤血球が対照者の赤血球に比較して異常形態（echinocyte）になり易く，その出現率が高かったことを報告した[4]．この現象は赤血球の PA 含量が少ないため，膜が脆弱で外液の Ca^{2+} が流入し易く，過剰の Ca^{2+} によって異常形態になったと考える．膜が脆弱であるという考えは，浸透圧破壊による検索の結果[5]と一致する．

今後 DMD の PA 含量が少ない原因を検索する．TPI 含量の温度変化では，DMD と対照者間にわずかな差がみられ，PA 含量では DMD と健康対照者間で，逆の変動を示したことから，DMD の膜では TPI → Diacylglycerol ⇄ PA に関与する酵素の異常が考えられる。

ま　と　め

DMD と健康対照者の赤血球の2°C における PA，DPI および TPI 含量に対する37°C における それぞれの含量を比較すると次の結果であった．

	DMD	control
PA：	増加傾向	減少傾向
DPI：	減少	減少
TPI：	減少傾向	増加傾向

DMD の PA 含量は，対照者の PA 含量に比べて少なかった．

文　　献

1）Hidalgo, C. et al: Phosphorylation of phosphatidylinositol by transverse tubule vesicles and its possible role in excitation-contraction coupling. FEBS 202: 69, 1986.

2）Vergara, J. et al: Inositol 1, 4, 5-trisphosphate: A possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6352, 1986.

3）吉岡　亨他：ショウジョウバエを用いた視細胞

変性の遺伝生化学的解析．第9回　生体膜と薬物の相互作用シンポジウムプログラム講演要旨集　p165, 1986　東京
4）Yoshida, M. et al: Abnormalities of Erythrocytes in Duchenne Muscular Dystrophy. Ann. Neurol. 13: 649, 1983.
5）荒木　淑郎他：Coil Planet Centrifuge による Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患者赤血球の浸透圧性脆弱性．神経進歩，24：786, 1980.

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——

庄　司　進　一*

研究協力者　　柳　沢　信　夫*

Glucocorticoid は広く臨床で用いられている治療薬で，これによる副作用の一つとして steroid myopathy がある．本症の発症機序は steroid (glucocorticoid) が細胞内に入り細胞質 receptor に結合後，核内 acceptor に結合しある蛋白の合成が起こり，その作用で最終的に一般の筋蛋白合成抑制がくることから説明されている (図1)．骨格筋ではこの最初に合成される蛋白が何であるのか，その作用が何であるのかが解明されていない．飢餓・糖尿病等の insulin 欠乏状態の筋障害が本症と速筋優位な障害という類似点を有つ事，steroid で萎縮がくる胸腺では glucose uptake の抑制が ATP 産生減少をきたし一般の蛋白合成抑制がくる事（図2）[1] 等から，骨格筋に於ても glucose uptake の抑制が発症機序に介在するかを検討した．

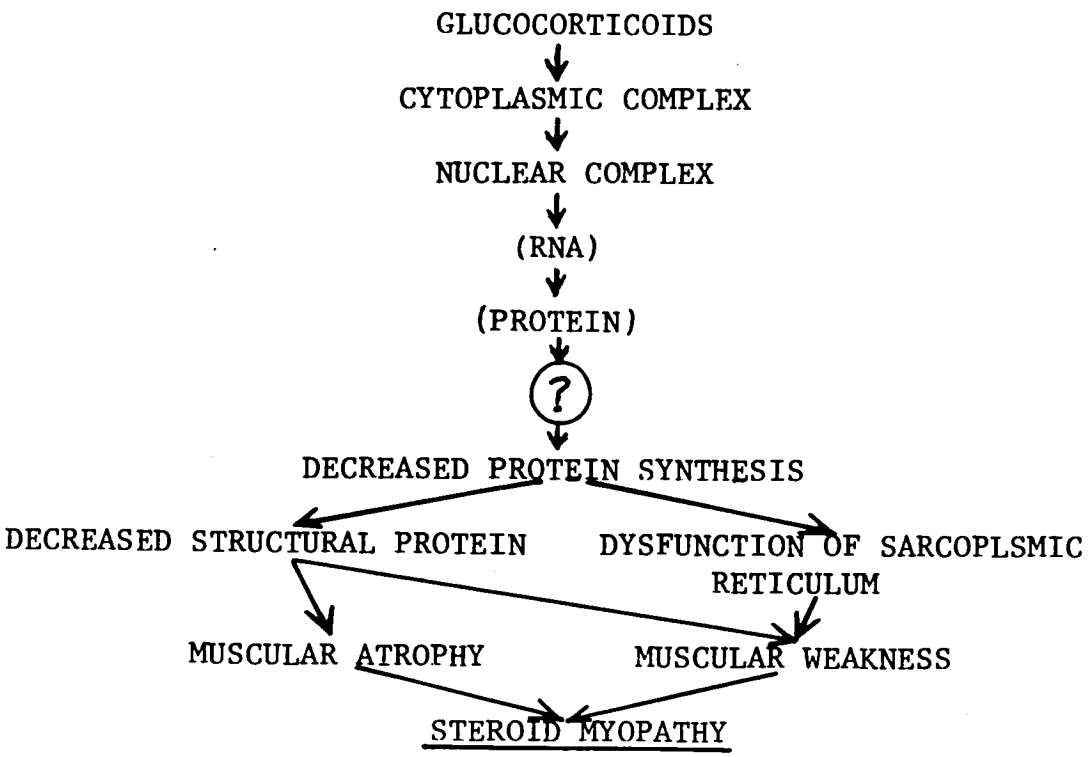


図1　ステロイド・ミオパチーの発症機序

*信州大学医学部第三内科

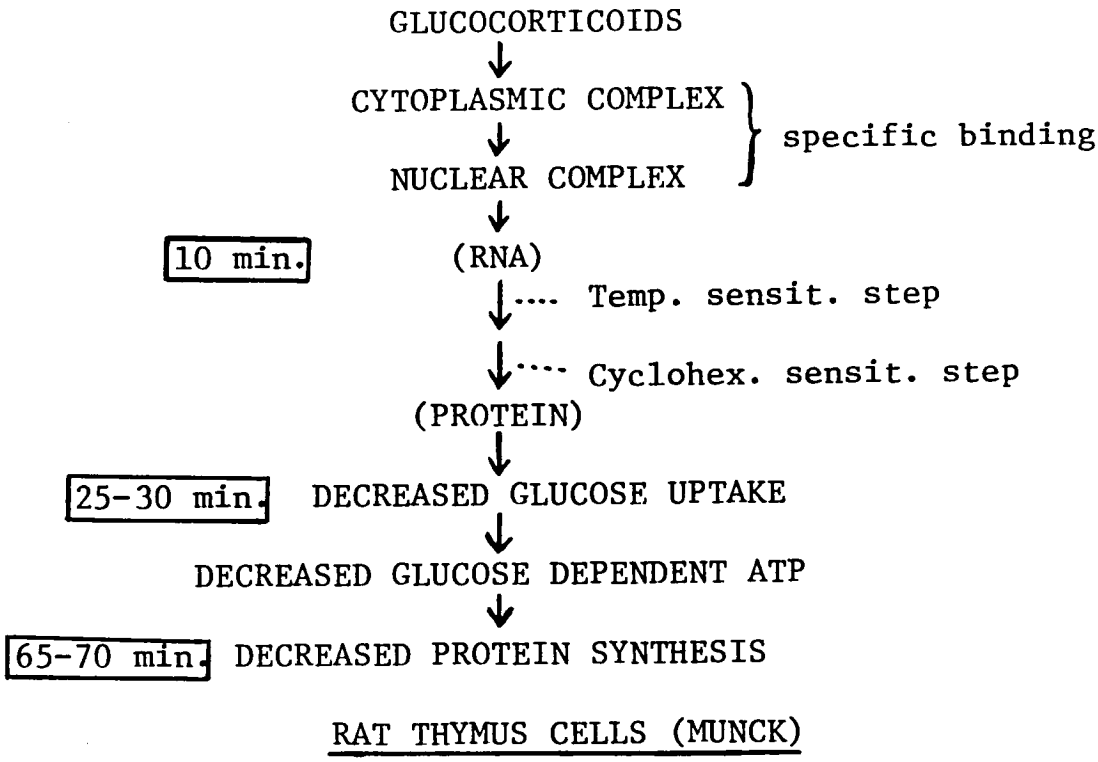


図2　胸腺細胞に対するステロイドの効果

方　　法

Wistar rat の hemidiaphragm, extensor digitorum longus (EDL)及び soleus を用いた.

Glucose uptake 測定

Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (pH7.4), 5 mM sodium pyruvate, ^{14}C-3-0-methylglucose (0.1mM, 1.0μCi/ml), ^{3}H-sucrose (1 mM, 0.2μCi/ml) で37°C, gentle shaking, continuous 95% O_2・5% CO_2 gassing 下で incubation を30分行ない, washing, blotting, weighing 後 digestion (Soluene350), neutralizing して, scintillation fluid (POP-POPOP-tritonX100-toluene) 中で double-label scintillation counting を external standard channels ratio method with correction for quenching を用い行なった[2]. EDL と soleus を用いる場合には, holder で tendon を固定し *in vivo* における最大伸展位に筋を伸展固定して incubation を行なった[3].

Glucose uptake 算出

3-0-methylglucose の distribution ratio より sucrose のそれを差引いて算出した.

有意義検定

Student's t test を用いた.

結　　果

1. Preincubation 又は incubation medium に cortisone acetate (2.5mg/ml) が含まれた場合の hemidiaphragm の 3-0-methylglucose uptake (表1)

a) Preincubation medium に2.5mg/ml の cortisone acetate を含む場合

Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (pH7.4), 5 mM sodium pyruvate, 2.5mg/ml cortisone acetate で30分 preincubation した hemidiaphragm と同一 rat の他方の hemidiaphragm を cortisone acetate の含まれない medium で

表1　コルチゾンの有無による横隔膜への3-0-メチルグルコース・アップテイクの差

COMPARISON OF 3-o-METHYLGLUCOSE UPTAKE INTO HEMIDIAPHRAGM BETWEEN PRESENCE AND ABSENCE OF CORTISONE ACETATE IN MEDIUM

PREINCUBATION MEDIUM CONTAINED CORTISONE (2.5 mg/ml)	PRESENT - ABSENT	0 ± 8 nmol/g/hr
INCUBATION MEDIUM CONTAINED CORTISONE (2.5mg/ml)	PRESENT - ABSENT	-20 ± 28 nmol/g/hr

N = 5, PAIRED ANALYSIS

preincubationをし，それぞれ3-0-methylglucose uptakeを続いて測定し，その有無でのuptakeの差を表示してある．5回の実験でその差は0±8 n mole/g/hr (mean ± standard error of mean)であった．

b) Incubation medium に2.5mg/ml の cortisone acetate を含む場合

Incubation medium に cortisone acetate の有無での3-0-methylglucose uptake の差を同一 rat の hemidiaphragms を用い5回行なった．4回で uptake が cortisone の有る方で減っており，5回の合計では，−20±28n mol/g/hr で有意差なかった．

2．Incubation medium に cortisone acetate が2.5×10^{-n} mg/ml (n=0～3) 含まれた場合の EDL と soleus の 3-0-methylglucose uptake (図3)

fast twitch muscle の EDL で変化が大きいとか，cortisone の濃度により uptake の変化が変わる等は認められず，cortisone の有無や濃度差で EDL 及び soleus で uptake に有意な差を認めなかった．

3．*in vivo* に cortisone acetate (10mg/100 gbw s.c.)投与した後の hemidiaphragm の 3-0-methylglucose uptake (図4)

cortisone 投与後10分から72時間後に hemidiaphragm を得て uptake を測定した．非投与例と比較して有意差を認めなかった．

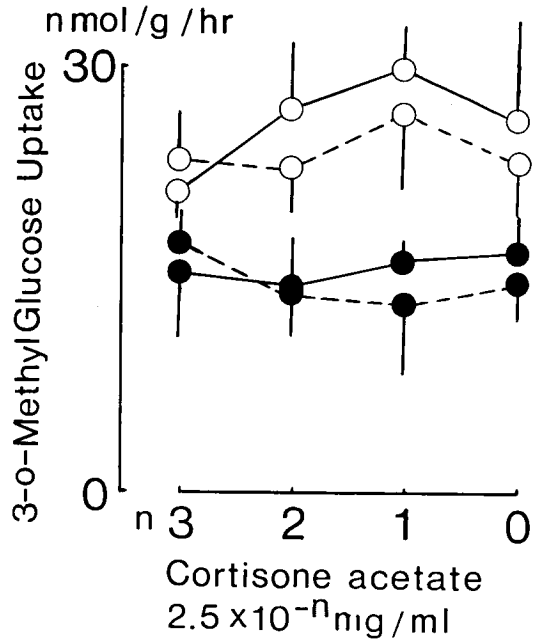


図3　インキュベーション・メディウム中にコルチゾン・アセテートを含む際のEDL及びsoleusの3-0-メチルグルコース・アップテイク
○ soleus
● EDL
—— コルチゾン・アセテート無し
------ コルチゾン・アセテート含む
mean±standard error of the mean

考　案

今回の結果は cortisone が骨格筋の glucose uptake に *in vitro* でも *in vivo* でも変化を与えないことを示唆している．従って胸腺細胞とは異なった機序で蛋白合成抑制がくることが考えられる．可能性としてはエネルギー産生系の他の部位の障害か蛋白合成系の直接的障害であろう．後者は fast muscle と slow muscle での障害の差を説明しにくいので，前者の方が考え易いと思われる．エネルギー産生系の他の部位としては，解糖系・TCA サイクル・酸化的リン酸化系等が考えられ

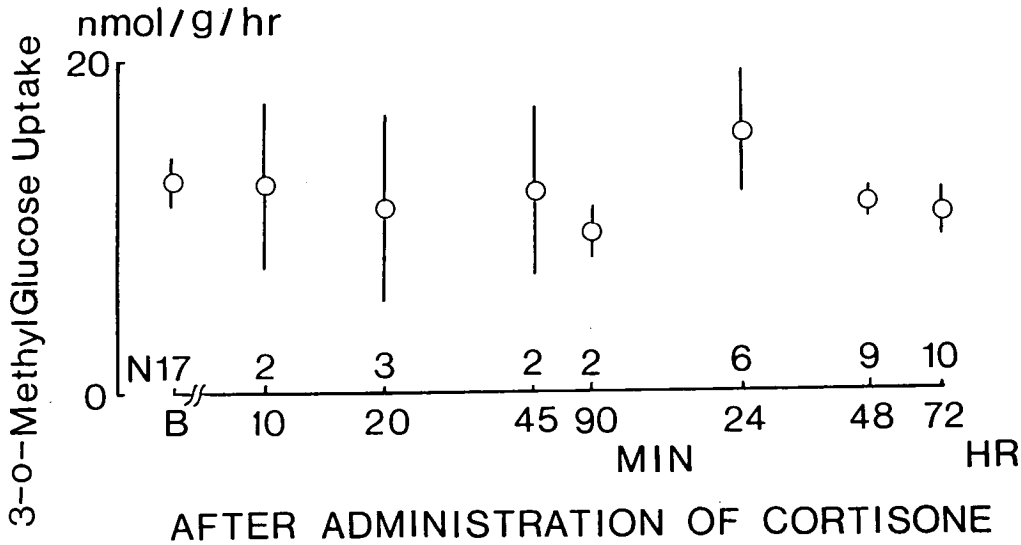


図4　コルチゾン・アセテートを10mg/100gbw 皮下注で投下した後の hemidiaphragm の 3-0-methylglucose uptake
B　コルチゾン・アセテート注射無し
N　用いた hemidiaphragm の数　　mean±standard error of the mean

るが，解糖系に関しては大きな障害が無いとの報告がある[4]．従って残るのは TCA サイクル・酸化的リン酸化系等のミトコンドリアの系で，これらのチェックが必要であろう。

結　論

cortisone acetate を in vitro に投与しても，*in vivo* に投与しても，rat hemidiaphragm, EDL, soleus で glucose uptake に影響は無かった．

文　献

1) Munch: Glucocorticoid inhibition of glucose uptate by peripheral tissues: old and new evidence, molecular mechanisms, and physiological significance. Persp. Biol. Med., 14: 265, 1971.

2) Elbrink: Defect in regulation of membrane transport of monosaccharides in dystrophic muscle. Can. J. Physiol. Pharmacol., 57: 695, 1978.

3) Shoji: Effects of stretch and starvation on glucose uptake of rat soleus and extensor digitorum longus muscles. Muscle Nerve, 9: 144, 1986.

4) Shoji et al.: Muscle glycogen metabolism in steroid-induced myopathy of rabbits. Exp. Neurol., 45: 1, 1974.

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

庄司進一*

研究協力者　松下茂樹*　武田伸一*　柳沢信夫*

はじめに

蛋白のリン酸化は，細胞の遺伝子発現や代謝調節に重要な役割を果たしていると考えられているが，近年，Duchenne型筋ジストロフィー症，筋緊張性ジストロフィー症を中心とした種々の筋症患で，筋蛋白のリン酸化の異常が注目されている．一方，筋蛋白の遺伝子発現を考えた場合，その制御に関わる最も主要な因子は神経支配である．この事実より，神経支配がリン酸化に与える影響を検討することは，症患の成因を遺伝子発現という観点から考える場合に極めて重要なことと考えられる．

myosin light chainのリン酸化は，Perrieら[1]によりウサギ骨格筋で最初に記載された．このリン酸化は，その後，平滑筋及び非筋細胞でも見出され，その収縮制御に極めて重要な役割を果たしていることが明らかにされたが，骨格筋における生理的役割は現在にいたるまで解明されていない．Manningら[2]はラット速筋で，単収縮による発生張力が強縮後増強する程度と，myosin light chain 2のリン酸化の程度が相関することを示した．この強縮後増強現象はラット速筋でほとんど認められない．Manningら[3]はまた，myosin light chain 2のリン酸化の程度は，速筋で大，遅筋で小であることを報告した．これらの事実より，骨格筋myosin light chain 2のリン酸化は，神経支配の影響を受けていることが示唆される．我々は，myosin light chainリン酸化に対する神経支配の影響を検討するため，除神経筋を用いて解析を試みた．

*信州大学医学部第三内科

対象と方法

対象として，Wistar rat，雌，5週齢，重量100～120gを選び，一側坐骨神経を大転子部で切離した．除神経後1，2，3日と継時的に，除神経された速筋EDL及びcontrolとした対側EDLをtendonsと共に取り出し，stretchしてholderで固定した．myosin light chain 2リン酸化の程度は筋の収縮状態により異なるため，Mooreら[4]に従い，固定した筋肉を95% O_2- 5 % CO_2飽和Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (pH7.4)で，35°C，30分間incubateし，これを安静時の状態とした．この状態の筋肉を液体窒素で急速凍結し，Bárányら[5]に従いperchloric acid及びtrichloroacetic acidを用いhomogenizeした．遠沈後残渣をSDSで可溶化した後透析し，これを凍結乾燥し電気泳動用サンプルとした．この処理で，myosin light chain kinaseの活性はおさえられ，in vitroでのリン酸化は抑制された．このサンプルより，Mikawaら[6]に従いマイクロ二次元電気泳動法を用い筋構造蛋白を分離・比較した．myosin light chain 2リン酸化型は，Hagerら[7]に従い〔^{32}P〕orthophosphateを用いたautoradiographyにより同定した（図1）．

結　果

成熟ラットEDLの二次元電気泳動像では，actin，α-及びβ-tropomyosin, parvalbumin, fast formのmyosin light chain 1，2，3が分離・同定できた．light chain 2リン酸化型は非リン酸

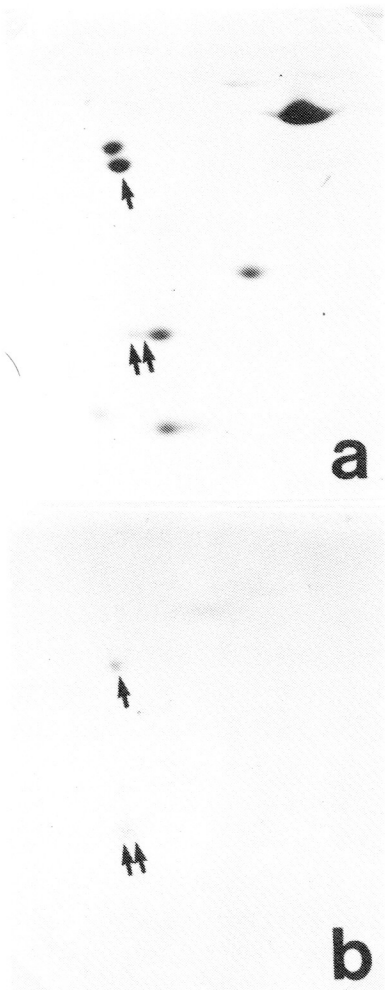


図1　ラットEDLの二次元電気泳動像及び〔^{32}P〕orthophosphateを用いたautoradiographyとの対比.
a. Coomassie brilliant blue染色
b. autoradiography
1本矢はα-tropomyosin, 2本矢はmyosin light chain 2のリン酸化型を示す.

化型よりやや酸性側に位置し，このspotの大きさを除神経後継時的に，除神経及びcontrolとした対側EDLで比較したところ，除神経後1日では両者の間に著明な差は認められなかったが（図2 a, b），除神経後2日では，除神経EDLのlight chain 2リン酸化型の大きさはcontrolに比し半減し（図2 c, d），除神経後3日ではリン酸化型は同定できなくなった（図2 e, f）．除神経後4週まで継時的に調べたが，この変化は持続して認められ，この間，他の筋構造蛋白には著変を認めなかった．

考　　察

骨格筋myosin light chain 2は，calcium-calmodulin系により活性化されたmyosin light chain kinaseによりリン酸化され，myosin light chain phosphataseにより脱リン酸化される．このリン酸化は，生理的には筋収縮に伴って生じ，筋弛緩にやや遅れて脱リン酸化されるが，安静状態においては，筋の種類に応じてリン酸化の程度は一定に保たれている．

最近Klug[8]らはウサギ速筋において，chronic electrical stimulationによってmyosin light chain kinase活性が低下することを報告した．myosin light chain kinase活性は速筋で高く遅筋で低いことより，彼らはこの結果を，速筋から遅筋へのfiber typeの変換に伴うものと説明している．今回，我々は，除神経後3日でラット速筋のmyosin light chain 2リン酸化型が消失することを示した．この短期間の変化は，fiber typeの変換として理解することは困難であり，速筋におけるmyosin light chainリン酸化は，その支配神経である速筋支配運動神経の制御を強く受けていることを示唆するものである．除神経モデルは，今後，骨格筋myosin light chainリン酸化の生理的意義を検討する上で有効なモデルと考えられる．

一方，筋構造蛋白遺伝子発現の制御という観点からは，slow formのmyosinは除神経によりfast formへ変換されることが知られているが，fast formのmyosinは除神経により質的な変化を受けないとされている．fast myosin light chain 2リン酸化型の除神経による減少・消失は純粋な筋構造蛋白の変化とは言えないが，これまでに報告されていないものであり，速筋において，除神経を示す早期の指標となりうると考えられる．

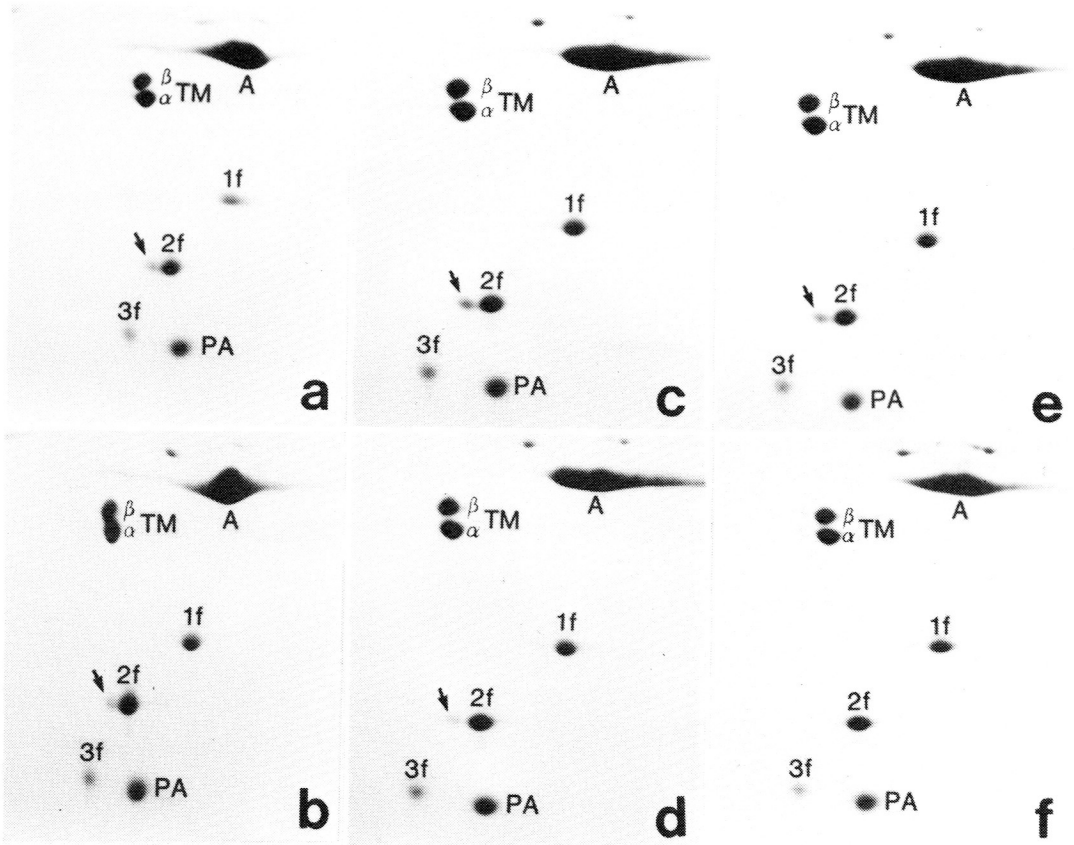


図2　control 及び除神経 EDL の二次元電気泳動像.
a, b：除神経後1日, c, d：除神経後2日, e, f：除神経後3日.
a, c, e：control, b, d, f：除神経側.
A：actin, αTM：α-tropomyosin, βTM：β-tropomyosin, If：fast myosin light chain 1, 2 f：fast myosin light chain 2, 3 f：fast myosin light chain 3, PA：parvalbumin.
矢印は myosin light chain 2 リン酸化型を示す.

おわりに

(1)ラット速筋における myosin light chain リン酸化は，速筋支配運動神経の制御を受けており，除神経によりリン酸化の程度は減少する.

(2)この変化は，筋構造蛋白の変化として，除神経の早期の指標となりうる.

(3)除神経筋を用いて，骨格筋 myosin light chain リン酸化の生理的役割を検討することができ，病的状態におけるリン酸化異常の意義を検索することが可能である.

文　献

1) Perrie, W.T. & Perry, S.V.: An electrophoretic study of the low molecular weight components of myosin. Biochem. J.,119: 31, 1970.

2) Manning, D.R. & stull, J.T.: Myosin light chain phosphorylation and phosphorylase a activity in rat extensor digitorum longus muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun., 90: 164, 1979.

3) Manning, D.R. & Stull, J.T.: Myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation in mammalian skeletal muscle. Am. J. Physiol., 242: C234, 1982.

4) Moore, R.L. & Stull, J.T.: Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscle in situ.
Am. J. Physiol., 247: C462, 1984.

5) Bárány, K., Ledvora, R.F., Vander Meulen, D.L. & Bárány, M.: Myosin light chain phosphorylation during contraction of chicken fast and slow skeletal muscles. Arch. Biochem. Biophys., 225 : 692, 1983.

6) 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, 1981.

7) Hager, S. R., Bárány, M., Bárány, K., & Homa, F.L.: Protein phosphorylation during contraction of chicken slow and fast skeletal muscles. Mol. Physiol., 2 : 121, 1982.

8) Klug, G.A., Houston, M.E., Stull, J.T., & Pette, D.: Decrease in myosin light chain kinase activity of rabbit fast muscle by chronic stimulation. FEBS Lett.,200: 352, 1986.

52) 肥大筋線維の筋蛋白特性
—実験的 compensatory work hypertrophy との対比—

茂 在 敏 司*

研究協力者　木 村 文 治*　上 野　豊*　小 西 慎 吾*
河 村　宏*　杉 野 正 一*　竹 中 正 純*
増 井 義 一*

筋原性疾患，神経原性疾患における病的筋線維の筋蛋白特性を明らかにする事はそれらの病態解明の上で重要であり過去多くの筋原性疾患で研究がなされている[1)2)3)]．しかし，神経原性疾患における筋蛋白特性についてはほとんど明らかにされていない[4)5)]．

さて，神経原性筋萎縮をきたす代表的疾患として，筋萎縮性側索硬化症（以下 ALS），脊髄性筋萎縮症（以下 SMA）があげられるが，それぞれの筋組織に差があることを以前報告した[6)7)]．特に，肥大線維の出現頻度は比較的経過の緩徐な SMA では多く，ALS では稀である．

これらにおける肥大線維がいかなる意味を持つものか検討すべく実験的に代償性 work hypertrophy を作成し，それぞれの筋蛋白構成について検討すると共に，ヒト ALS，SMA の肥大線維との比較検討を行った．いずれも，筋蛋白分析には SDS ポリアクリルアマイド電気泳動法を用いた．

対象および方法

Wister 系ラット生後 4 週（50gr～70gr）10匹を用い，8 匹の右肢腓腹筋腱切断を行ない，2 匹を無処理で対照とした．処置後，4 週間の期間を置き，切断肢，非切断肢および対照の腓腹筋の協同筋であるヒラメ筋（M. Soleus）を摘出し，イソペンタン・液体窒素で迅速凍結後，−80°C で冷凍保存，その後，組織所見，単一筋横径ヒストグラムおよび筋蛋白分析を行ない，比較検討した．蛋白分析には切断肢，非切断肢側ヒラメ筋それぞれの最大横径を示す部分の厚みを30μ にしたクリオスタット横断切片を用い，組織試料用尿素液（8.5 M urea, 1 M thiol-urea, 5% mercaptoethanol, 1% SDS, 1% EDTA, 1% CHAPS）50μl 中に一晩溶解したのち，O'Farrel の方法[8)] にて等電点・SDS 二次元電気泳動を行なった．

結　　果

ラット腓腹筋腱切断肢におけるヒラメ筋の平均筋湿重量は195mg で非腱切断肢94mg，対照105 mg より大であった．組織学的には切断側ヒラメ筋において，脂肪織，結合織などの増加はなく，平均単一筋最小横径は49.7μ と非腱切断側37.5μ，対照39.4μ より大きく，各200本の筋線維計測による10μ 毎のヒストグラムを図 1 に示すと，全線維の右方への扁位，即ち work hypertrophy を形成していた．なお，腱切断肢，非切断肢ともに type I 線維が約90%を占め，線維型には差を認めず，組織化学染色（NADH 染色，trichrom-Gomori 染色，ATPase 染色）上，その構築には何ら異常を認めなかった．

二次元電気泳動法により，Myosin heavy chain（MHC），C-protein，α-actinin, Desmin, Actin, Tropomyosin（$\alpha+\beta$），Myosin light chain が分離可能であった（図 2）．

これらの構造蛋白分析の結果，腱切断肢のヒラメ筋，即ち肥大筋におけるそれぞれの蛋白の構成成分は全体に増加を示すものの，Actin に対する

＊大阪医科大学第一内科

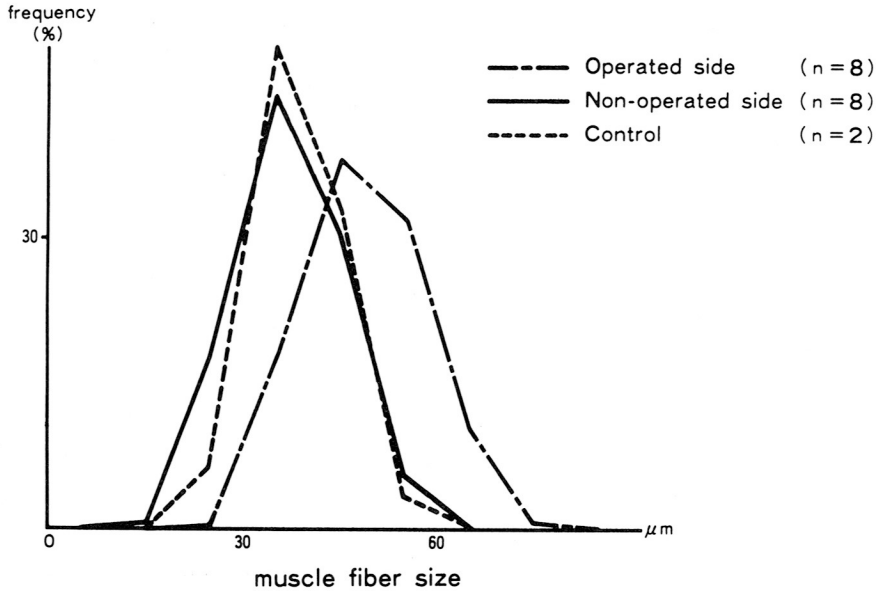


図1　ラット腱切断肢(operated side)，非腱切断肢(Non-operated side)，対照(control)のヒラメ筋における平均筋最小横径ヒストグラム．腱切断肢ヒラメ筋において，筋線維全体の右方への扁位，即ち，肥大化を認める．

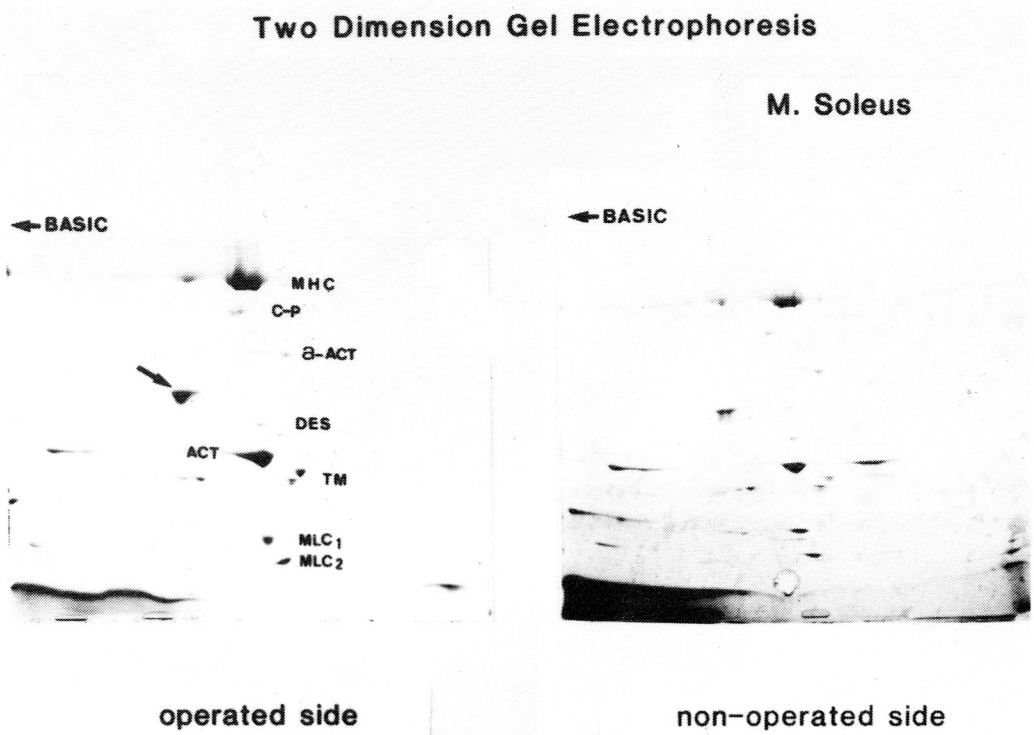


図2　ラット腱切断肢（operated side），非切断肢（non-operated side）のヒラメ筋蛋白二次元電気泳動パターン（矢印は64k dalt 蛋白を示す）．

それぞれの構造蛋白の比率には対照と差を認めなかった．

構造蛋白以外では肥大筋において64k dalt 蛋白の増加を認めた（図2の矢印）．

考　　案

ラット腓腹筋腱切断肢におけるヒラメ筋湿重量の増加は組織上，脂肪織や結合織などの増加を認めない点より筋の肥大化に基因するものである事が確認された．筋構造蛋白を比較すると，肥大化したヒラメ筋においてActinをはじめとする全ての筋構造蛋白は増加を示すものの，Actinに対する比率には対照と差を認めなかった．このことより，実験的代償性work hypertrophyにおける筋の肥大化に伴ない，その蛋白合成は等量的に増加するものと考えられる。

さて，このような代償性work hypertrophyの筋構造蛋白の結果をもとに，SMA, ALSの肥大線維について対比検討を加えてみた（昭和61年27回神経学会総会において発表済）．ALS12例，SMA 7例の筋線維径のtotal histogram（昭和57年本研究報告書“骨格筋の組織病理学的研究”内に各症例要約記載[9]）を模式化すると図3に示すごとく，比較的経過の緩徐な進行を示すSMAでは90μ以上を示す肥大線維が著しく多く，ALSとの大きな差異として指摘される．そればかりでなく，最も注目すべき点として，SMAでは萎縮線維の存在により非萎縮線維全体が右方へ，即ち残存した線維があたかも萎縮線維を補うかのごとく肥大化した線維群を形成しているようにみられ，SMAにおいては何らかの代償性機序が働いているのではないかと考えられた．

一方，ALSでは非萎縮線維が肥大化していない点が注目される．ただ，稀ではあるが，ALSの筋組織上，肥大線維を認め，いずれも群集萎縮の中に散在性に存在し，通常の組織化学染色において構築上異常を示さなかった（図4）．

そこで，萎縮線維や正常径線維が混在するため，豊島らのfreeze dried dissection法を用い[10]，肥大線維のみを単離し，single muscle fiberにて筋蛋白分析を行なうと，図5に示すごとくALSの

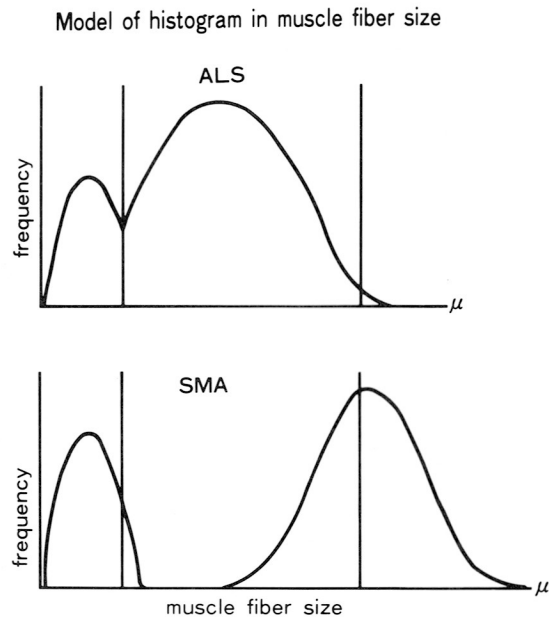


図3　ALS 12例，SMA 7例の筋線維径 total histogram.

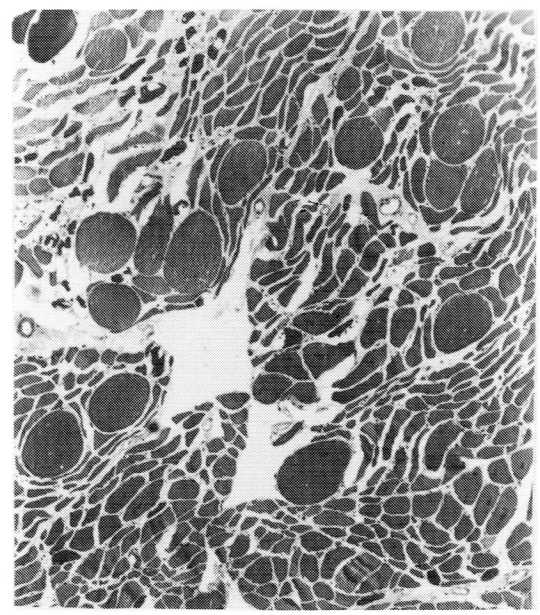


図4　ALSで見られた肥大線維（HE染色）群集萎縮の中に散在性に存在し，他の組織化学染色上，異常を認めない．

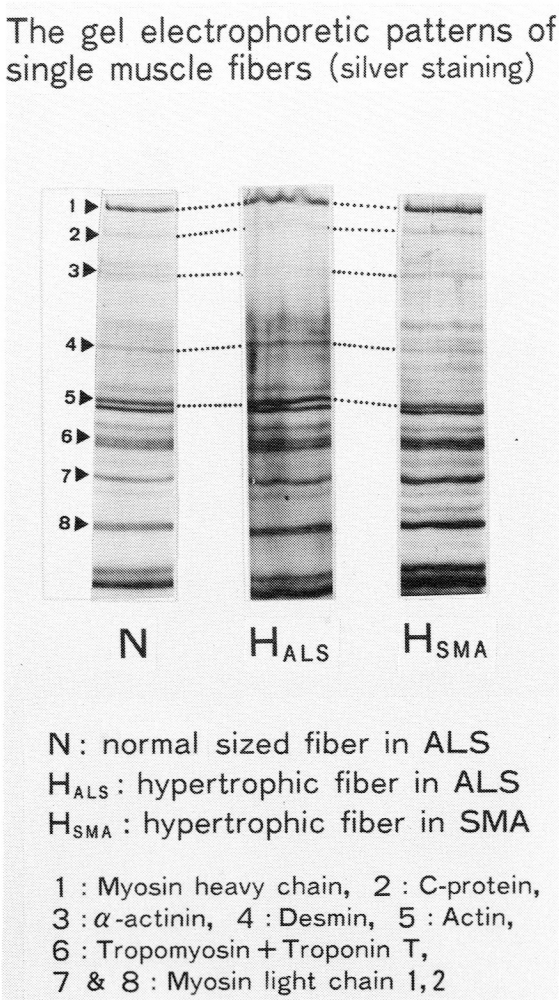


図5　単一筋線維分離法による SDS-電気泳動パターン，ALS に見られる肥大線維では C-protein, α-actinin の低下および Desmin の増加傾向を認める．SMA の肥大線維は正常径線維と同様のパターンを示した．

肥大筋線維では，MHC の低下は軽度にとどまるものの，C-protein, α-actinin の減少および Desmin の増加傾向を認めた（いずれも Actin に対する比として）．一方，SMA に認められる肥大線維では，正常径線維と同様の構造蛋白パターンを示した（ALS に見られる正常径線維は筋力低下や筋萎縮が見られない部位で，しかも正常構築を示した筋組織の正常径線維より採取したものである）．

今回のラット代償性 work hypertrophy 実験結果，およびヒト ALS，SMA の筋線維径ヒストグラムと筋構造蛋白分析結果を合わせ考えると，ラットにおいて肥大化した線維群や SMA の肥大線維では少なくとも肥大化に伴った構造蛋白の合成は等量的であり，このことはラットにおける肥大化現象が生体の生理的代償機構によるものである点を考慮すると，SMA においても同様の生体の代償機序により肥大化が形成されているのではないかと推測される．

しかし，ALS においては肥大線維の出現頻度はきわめて少なく，しかも筋構造蛋白で異常を示しており，肥大化に伴なう蛋白合成が等量的ではなく，その機序に何らかの欠陥が存在するのではないかと考えられた．ALS において，この肥大線維の異常構造蛋白パターンをひき起こす原因として，SMA に比べて ALS ではより急性進行性経過のため充分な collateral sprouting を形成しえないなどの支配運動ニューロンの異常を示すものなのか，筋肉そのものに何らかの問題があるのか，今後検討すべき点と考えられる．

最後に，work hypertrophy において筋構造蛋白以外の変化として，肥大筋において64k dalt 蛋白の増加を認め，肥大化現象に何らかの関連のある物質（Carrier protein を含めて）であるか，興味深い点と考えられる．しかし，考慮すべき点として，albumin 分画に近似しており，肥大化に伴なう筋肉周囲の血管の発達が予測され，血管内血清成分の contamination の可能性もあげられる．しかし，山田ら[11]は実験的 work hypertrophy で同様の蛋白増加を認め，しかも，組織培養法により筋肉内からの64k dalt 蛋白産生が亢進していることを報告しており，最近注目されている筋組織より上向する神経成長因子の存在を考える上で，興味ある問題であり，今後検討していくべき点と思われる．

ま と め

ラット腓腹筋腱切断によりヒラメ筋の compensatory work hypertrophy を作成し，筋

蛋白分析を行なうと，肥大化に伴ない筋構造蛋白は全体に増加するが，それぞれの蛋白合成は等量的に行われていることが確認された．このことはSMAにみられる肥大線維の筋蛋白分析結果と一致し，生体の生理的代償機構によるものと推測された．しかし，ALSでみられた肥大線維は，SMAの肥大線維と蛋白構造上明らかに異なり，肥大化過程における蛋白合成に何らかの欠陥が存在するものと考えられた．

ラット肥大筋において64k dalt蛋白の増加を認め，肥大に関連した物質であるか検討が必要である．

文　献

1) H, Sugita, K, Okimoto, et al : Some observations on the microsome fraction of biopsied muscle from patients with progressive muscle dystrophy. Proc. Jap. Acad. 42 : 295, 1966.

2) K, Tanaka, I, Toyoshima, et al : An electrophoretic study of the muscle proteins in Nemaline myopathy. A new method using type-defined freeze-dried sections. Brain & Nerve (Tokyo) 36 : 57, 1984.

3) M, Uchida, S, Araki, et al : Structural proteins of the opaque muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. Neurology 35 : 1364, 1985.

4) H, Sugita, T, Takagi, et al : Studies on the structural protein in various neuromuscular disease. Basic research in myology. Proceedings of the 2nd international Congress on Muscle disease, ed by Kakulas BA. Excerpta Medica Internat Cong Ser No. 294, p291－297, 1973.

5) Giometti, C.S., M, Barany, et al : Muscle protein analysis II. Two dimensional electrophoresis of normal and diseased human skeletal muscle. Clin. Chem. 26 : 1152, 1980.

6) T, mozai : Studies on the pathogenesis of ALS with review of literature. Clin Neurol (Tokyo) 23 : 1035, 1983.

7) M, Takenaka, S, Konishi, et al : Studies on the muscle pathology in motor neuron disease. Bulletin of the Osaka Medical School 30-1 : 56, 1984.

8) PH, O'Farrell : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250 : 4007, 1974.

9) 竹中正純，茂在敏司，他．骨格筋の組織病理学研究．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57年度研究報告書，1982年，p114.

10) I, Toyoshima, K, Tanaka, et al : Dissection and electrophoretic protein analysis of single muscle fibers from histologically identified freezed-dried sections : Application to muscle fibers with rimmed vacuoles. Biomedical Research 4 : 459, 1983.

11) Yamada, S, Tomino, S., et al : Purification, molecular properties and biosynthesis of a specific protein component induced under compensatory hypertrophy in the rat skeletal muscle. Biochemica et Biophysica Acta 798 : 260, 1984.

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——

水　野　美　邦*

研究協力者.　金　子　　仁*

筋疾患の進行には，筋線維の変性・壊死と共に再生過程が重要であると考えられる．Duchenne型筋ジストロフィー症では病態の進行に従い再生線維の減少してくる事が知られているが，その原因は明らかではない．今回我々は，細胞の発生・分化に密接な関係を有する糖蛋白の一つであるフィブロネクチン（以下FN）に注目し，筋変性壊死・再生過程における変化を多発性筋炎生検筋について組織学的に検討した．FNは血液中及びほとんどの組織に存在する分子量約44万の巨大な糖蛋白質で，血液中には約0.3mg/dl存在する．コラーゲンと強い親和性を有し，組織中では間質及び基底膜に存在している．FNの機能は多岐に渡るが[1]，培養細胞での検討では細胞の分化・増殖・進展・形態の保持に関係するとされている．又，生体内では，発生・分化，組織修復，血液凝固，オプソニン効果，などに関係している．神経系に関しては，神経系細胞の増殖，神経突起の成長，シナプス形成，発生段階での神経冠細胞の移動の促進，筋肉に関しては，培養下でmyoblastからmyotubeへの分化に関係するとされている．以上のことから，FNは生体内においても，筋線維の変性・壊死から再生に至る過程において何等かの役割を果たしていると考えられる。

方　　法

人新鮮凍結血漿よりMatti Uventoらの方法[2]に従いaffinity chromatographyを用いてFNを分離・精製した．すなわち，セファローズ4Bカラムに血漿を通し，通過液をゼラチン・セファローズカラムに通し吸着させた．次に1M Arginineを含む0.05M Tris/HCl, pH7.5で溶出した．得られたFN分画をArginine Sepharose columnに吸着させ，1M NaClを含む0.05M-Tris/HCl pH7.5で溶出しFNを得た．SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で，得られた分画が純粋であることを確認した．FNは，Freundの完全アジュバンドと共に乳化し，日本白兎に皮下注に抗人FN兎抗体を得た．抗体はオクタロニー法にて1本の沈降線を8倍希釈まで認めた．検討対象として当科にて多発性筋炎と診断された6例の生検筋を用いた．6例中，女性4例男性2例，平均年齢は56歳．コントロールとして，組織学的に正常であった生検筋3例を用いました．酵素抗体法は，Biotin-strepto avidine system (BioGenex Laboratories) を使用した．まず，内因性ペルオキシダーゼブロックを0.3% H_2O_2 メタノールにて30分行ったのち，160倍希釈した一次抗体を30分反応させた．次にビオチン結合二次抗体を反応させ，更にペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを結合させた．発色は，DAB基質を用いた．

結　　果

コントロールの標本では，FNはperimysium, endomysiume, 筋線維の表面，血管壁に染色された(図1)．更にperineurium, endoneuriumにも染色を見たが，筋線維細胞質，末梢神経軸索は染色されなかった(図2)．多発性筋炎標本では，コ

＊自治医科大学神経内科

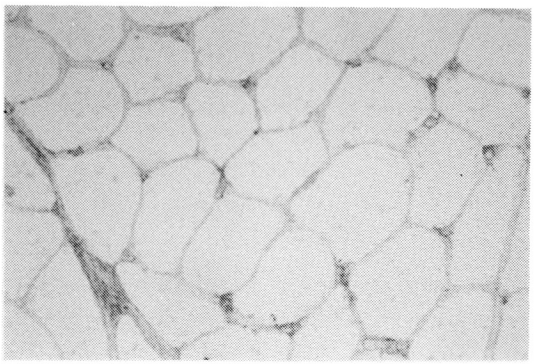


図1　正常筋組織　×350倍

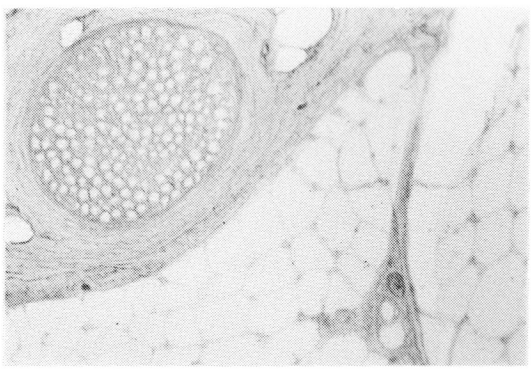


図2　正常筋組織　×180倍

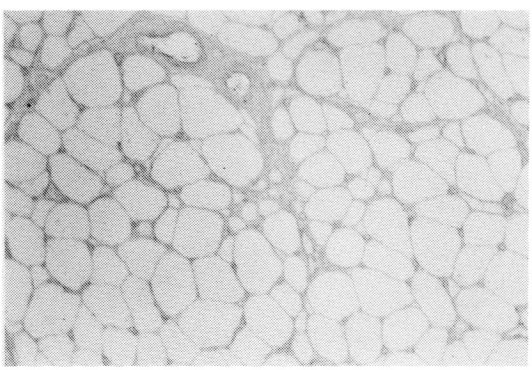


図3　多発性筋炎　×180倍

ントロール同様 perimysium, endomysium に染色され，筋線維細胞質内は染色されなかった（図3）．線維化の強い部分では増生した間質部に FN の染色を見た．H-E 染色で見られる壊死線維は，同部位の FN の染色では，表面の染色が不明瞭になり細胞質内がまだらに染色された（図4）．

図4　多発性筋炎　×350倍
矢印は壊死線維を示す

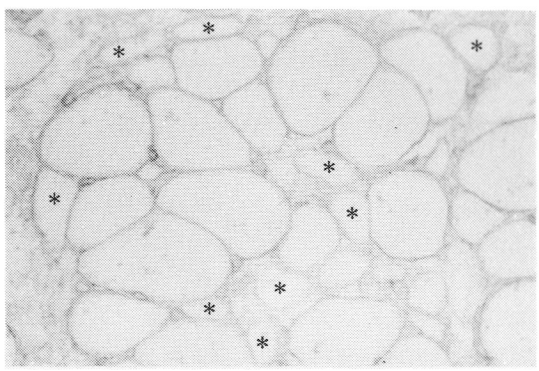


図5　多発性筋炎　×350倍
＊印は再生線維を示す

Acridine-Orange 染色でオレンジ色に染まる再生線維は，その表面に染色を見たが細胞質は染色されず，正常筋線維と同様な染色性を示した（図5）．

考　　案

筋肉組織と FN の関係について，これまでの報告では正常節組織中では，perimysium, endomysium, 血管壁などに存在するとされている．Foidart ら[3] は FN 及びコラーゲン I，III型の分布を正常筋組織と Duchenne 型筋ジストロフィー症，多発性筋炎で検討し，三者の間に差は見られなかったとしている．又，Bertolotto ら[4] は，FN とラミニンについて様々な神経筋疾患で検討し，一部の萎縮線維でラミニンが基底膜にやや厚く染色されること以外に，正常組織と差を見いだせな

かったと報告している．しかし，変性・壊死・再生の過程に注目した検討はこれまでされていない．培養細胞での検討では，Chen[5]，Furcht[6]，らはmyoblastが癒合しmyotubeを形成する時期には細胞表面のFNが消失すること，更にPodleski[7]は外から与えたFNがmyoblastの癒合を阻害することから細胞表面FNの消失がmyogenesisに必要な条件であるとしている．動物実験では，Adarsh[8]らは，ratのextensor digitorum longusのautoplantation modelにて，変性した筋細胞は表面のFNが減少し細胞質内にFNが出現すること，myoblastからmyotubeに分化すると細胞表面にFNが出現することを見いだし，myogenesisの初期には，FNは必要ではないと考えた．今回我々は，酵素抗体法を用いてFNの分布を正常筋と多発性筋炎について比較検討した．その分布はこれまでの報告と同様に差を認めなかったが，変性した筋細胞では細胞表面のFNが不明瞭となり細胞内部にFNが出現すること，更に再生線維においては細胞質内にFNは認めず，正常筋線維と同様な染色性を示すことを人の筋組織において明らかにした．このような結果が筋疾患の進行とどのような関係を有するかは今後更に対象を広げて検討する必要があると考えられる．

文　献

1）林正男：フィブロネクチンと細胞・発生・神経，蛋白質核酸酵素，29(14)：1964.

2）Matti Vuento, Antti Vaheri：Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions. Biochem. J. (1979) 183, 331－337.

3）Marguerite Foidart, Jean-Michel Foidart, W. King Engel：Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. Arch. Neurol.(1981) 38, 152－157.

4）Antonio Bertolotto, Laura Palmucci, Carlo Doriguzzi, et al：Laminine and fibronectin distribution in normal and pathological human muscle. J. Neurol. Sci. (1983), 60：377－382.

5）Chen, L. B. Alteration in cell surface LET protein during myogenesis. Cell. (1977), 10：393－400.

6）Furcht, L. T., D. F. Mosher, G. Wendelschafer-Crabb.：Immunocytochemical localization of fibronectin (LETS protein) on the surface of L6 myoblasts：Light and microscope studies. Cell. (1978), 13：263－271.

7）Podleski, T. R.：Fibronectin delays the fusion of L6 myoblast. Exp. Cell Res. (1979), 122：317－326.

8）Adarash K. Gulati, A. H. Reddi, Andrew A. Zalewski：Distribution of fibronectin in normal and regenerating skeletal muscle. The Anatomical Record. (1982), 204：175－183.

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

木 南 英 紀*

研究協力者　勝 沼 信 彦*　塚 原 俊 文*　伊 井 邦 雄**

はじめに

筋ジストロフィー症における筋細胞の障害と壊死は複雑な連鎖反応の結果であり，その機序はまだ明らかでない．壊死筋細胞の処理機構として浸潤マクロファージ中の強力なリソゾームプロテアーゼ群が大きな役割をもつことは以前に明らかにした[1]．続いて障害筋細胞中のリソゾームの動態に着目し，Rimmed Vacuole を伴う Distal myopathy においてカテプシンB，H，Lといったリソゾームのシステインプロテアーゼ群が Vacuole 自体及び筋線維内にも局在することを免疫組織学的に証明した[2]．同じ手法で，最近 DMD のある変性筋線維にカテプシンが増加していることを見い出している．今回は，筋細胞障害から壊死に至るプロセスの時間経過を追求するために，グルコースオキシダーゼによる実験的筋障害モデルを作成した．活性酸素の変動と筋細胞内カテプシンの異常増加の時間経過を追求した．

材料と方法

ウィスター系雄ラット（150－200g）のひらめ筋に1単位のグルコースオキシダーゼ(Sigma, 以下GO)を含む生食0.2ml を直接注射した．対照には生食のみを注射した．カテプシンB＆L活性は Barret らの方法[3]，β-グルクロニダーゼは Hindman と Cortier らの方法[4]の変法，酸フォスファターゼは Igarashi らの方法[5]によってそれぞれ測定した．筋組織中の全グルタチオンと GSSG の測定は Akerboon と Sies の方法[6]によって測定した．EDTA を含む過沃素酸による蛋白沈澱後，その酸抽出物から全グルタチオンを測定する．残りの酸出物に N-エチルマレイミドを加え GSH をトラップし，人工的な酸化を抑制した後，N-エチルマレイミドを完全に除き，GSSG を定量した．カテプシンB，H及びLの免疫組織学的染色法は抗カテプシン Fab′-ペルオキダーゼ複合体を用いる直接法で以前の報告[2]に準じた．

＊徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門
＊＊徳島大学医学部第一病理

結　果

①GO の筋内注射による急性筋壊死

GO は D-Glucose＋O_2→ D-Glucono－δ－lactone＋H_2O_2を触媒する酵素で，グルコースの存在下で，細胞毒作用をもつ H_2O_2 を産生する．本実験ではグルコースは組織内のものを利用し，GO のみを投与した．組織学的にみると投与後2－4時間で opaque 線維が出現し，6時間後にはマクロファージの浸潤を伴った筋細胞の壊死がところどころに見られる．GO 注射後，羅患筋の構造蛋白の速やかな崩壊（48－72時間でピーク）とそれに続いて筋の再生がみられる．この組織学的，生化学的変化は塩酸ブピバカイン[7]やプラスモシド[8]によるミオパチーと極めて類似している．図1にリソゾームの酵素，カテプシンB＆L，β-グルクロニダーゼ，酸フォスファダーゼの活性変動を追った結果を示す．カテプシンB＆Lは12時間の lag の後，急速に上昇し48時間後には7－10倍に達する．β－グルクロニダーゼは6時間目にすでに上昇しており，48時間後には数倍になるが，酸フォスファダーゼの活性上昇はほとんどない．このリソゾーム酵素の活性変動もプラスモシドミオ

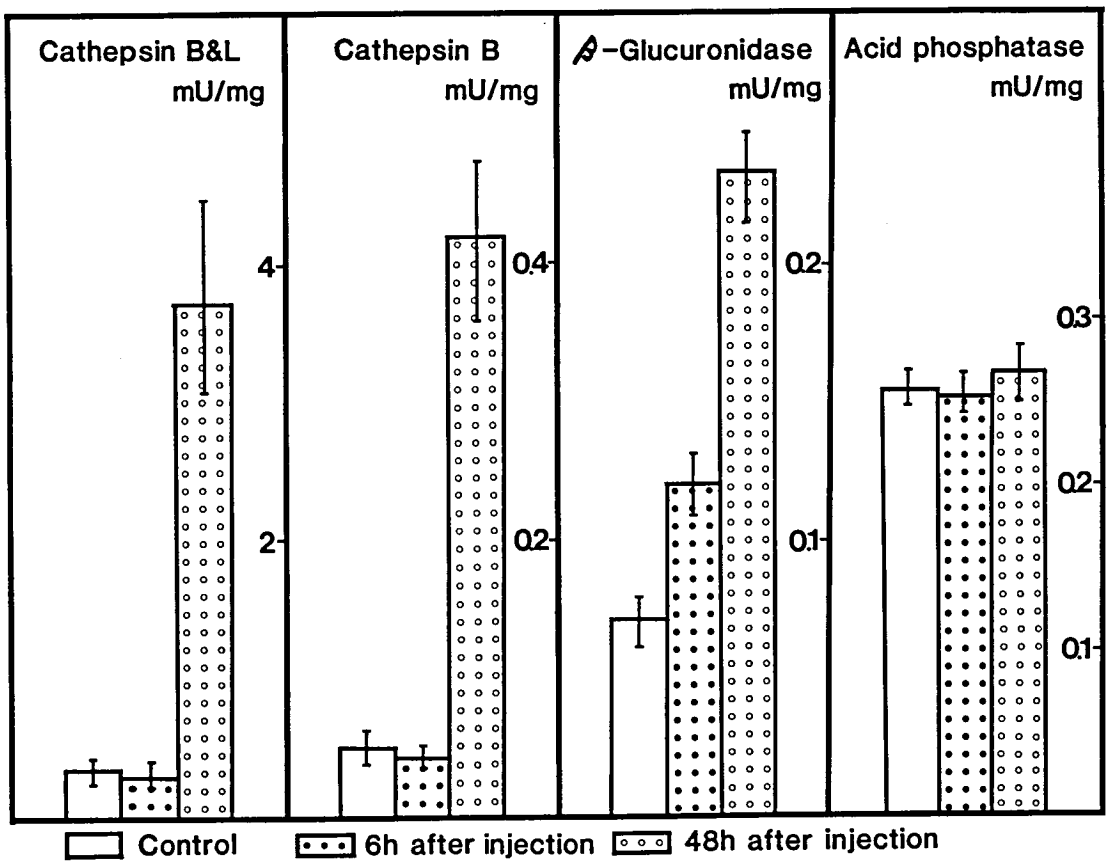


図1　グルコースオキシダーゼ（GO）投与後のひらめ筋のリソゾーム酵素の活性変化

パチーに類似しており，活性上昇は主として浸潤マクロファージに由来すると考えられる．

②筋線維内カテプシンの異常増加

次に，GO 注射後2，6，48及び144時間後にひらめ筋を取り出し，固定後カテプシンB，H及びLの免疫組織学的検査を行った．投与2時間後では局所の浮腫が強く，筋細胞は膨潤しており，カテプシンの局在がはっきりしない．6時間目になると，注射の中心部よりやや離れた周辺部に opaque 線維が多数出現するが，その線維の筋原線維間や筋鞘下に顆粒状の染色が認められる（図2a）．調べた限り，ほとんどすべての opaque 線維にカテプシンの異常増加が観察できる．48時間後になると筋細胞内へのマクロファージの浸潤が極めて著明であり，筋細胞内のカテプシンの増加を見い出すことは難しい．144時間には中心核をもった再生細胞が多数出現するが，この細胞にはカテプシンの増加はみられず，散在する変性筋細胞の一部に筋線維内カテプシンの増加した所見がある（図2b）．

③障害筋におけるグルタチオンの代謝

GO による細胞障害は H_2O_2 が主体で，一部は H_2O_2 から派生した O_2^-，OH^- などの活性酵素によるものと思われる．障害筋組織中の H_2O_2 や O_2^- を直接測定することはできないので，H_2O_2 の代謝産生である GSSG を測定することにした．即ち，H_2O_2 はグルタチオンペルオキシダーゼ（GPO）の作用で GSH と反応して H_2O と GSSG を作る．即ち，グルタチオンの酸化を伴う反応である．細胞内の GSSG の定量法はできるだけ人工的な酸化による GSSG の産生を防ぐ工夫がなされている[6]．全グルタチオンは GO 投与後2時間

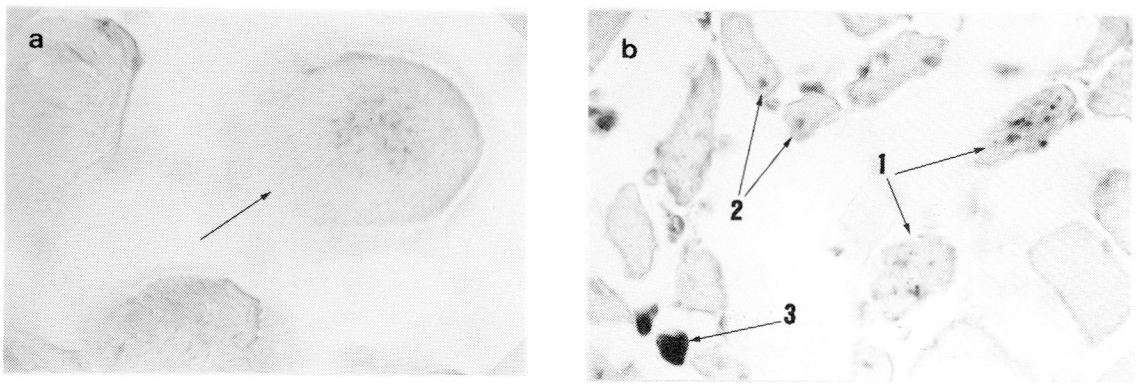


図2　GO 投与後6時間(a)と144時間(b)のひらめ筋におけるカテプシンの局在．(a)腫大した opaque 線維（矢印）内にカテプシンLの増加がみられる．間質は強い浮腫状．（5×40×4）(b)強い萎縮筋細胞(1)におけるカテプシンBの増加，再生筋細胞(2)およびマクロファージの浸潤(3)（5×40×4）

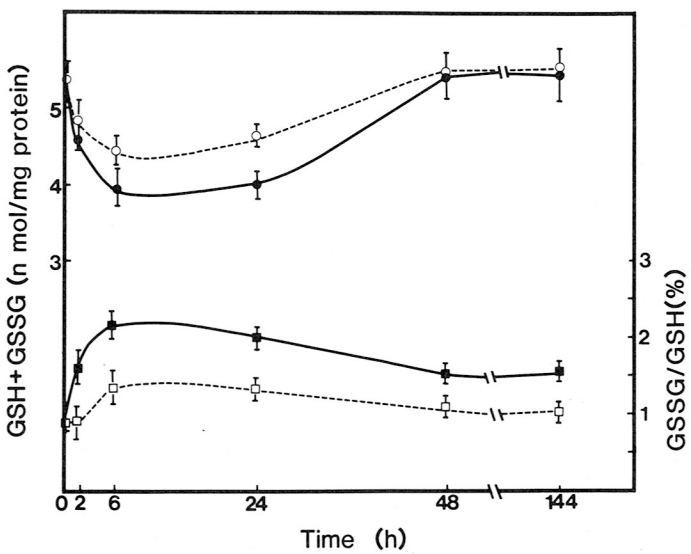


図3　GO 投与後のひらめ筋の全グルタチオン含量及び GSSG/GSH 比．
〔GSH〕＝全グルタチオン－2〔GSSG〕

で減少しており，6時間後には73%と最も低くなり，筋タンパクの崩壊が最大となる48時間後には元に戻っている．筋組織の GSSG/GSH 比は0.9－1.0%であり（図3），肝とさほど差はない．この比は GO 投与後2時間で1.7%，6時間で2.3%と上昇し，最大となりその後は漸減している．この値は正常な筋細胞をも含めたひらめ筋全体のホモジネートを用いて測定した結果であり，障害部位ではもっと高い比を示すものと考えている．生食注射群でも6時間目には GSSG/GSH 比は1.4%とやや上昇しているが，これは生食注射によっても弱い急性筋壊死がみられるからである．このグルタチオンの酸化の亢進は細胞障害の1つの指標であり，大きな代謝の変化の反映とみることができよう．

その他細胞膜の過酸化の指標としてマロンアルデヒドを定量すべく，TBA 反応産物を測定したが，GO 投与による増加は認められなかった．筋ジ

ストロフィー症で活性上昇していることが知られているGPOとグルタチオン還元酵素の活性を図4に示す．両活性共GO投与後48時間で約30%上昇しているが，この時期にはマクロファージの浸潤が強く，活性上昇はマクロファージに由来している可能性は否定できない．

考　　察

筋ジストロフィー症における細胞障害の機序の1つとしてフリーラジカルの役割が着目されている．最近，水野は幼若ジストロフィーチキン（1－2週令）を用いて活性酸素，グルタチオン関連酵素系の活性がジストロフィー症で上昇していることを報告している[9]．我々は，筋細胞障害から壊死に至るプロセスを究明する目的で，主としてH_2O_2産生による筋細胞障害を起こし，そのプロセスにおけるグルタチオンの酸化と筋内カテプシンの増加を調べた．GOを投与するとおそらく細胞外でグルコースと反応してH_2O_2を生じさしめ，細胞内に移行して細胞毒作用を発揮すると考えられる．H_2O_2はカタラーゼとGPOによって無毒化されるが，骨格筋のカタラーゼ活性は極めて弱いので，GPOが主要な役割を演じていると思われる．GPOの作用により筋組織のGSHは酸化されGSSGは増加し，GO投与6時間でピークに達する（図3）．GOによるH_2O_2の産生はこれ以後は減少しているのであろう．H_2O_2による細胞障害の機構の1つとしてはグルタチオンの酸化によって筋構造蛋白や酵素の一部がS-thiolation（複合ジスルフィド形成）化され，その結果代謝機能が変化することが考えられる．もう一つはフリーラジカルによって脂肪の過酸化が促進し，細胞膜の機能が変化するという考えである．しかしGOによる細胞障害はH_2O_2が主体であると思われるので，この第2の可能性は低いと考えられる．事実，脂肪過酸化のマーカーTBA反応物質の上昇はない．GO投与後6時間目にはすでに注射周辺部に見い出されるopaque線維や一部変性筋線維にカテプシンの著明に増加した像が見い出された．この時期は細胞内グルタチオンの酸化がピークになる時期である．細胞内カテプシンの増加はおそらく，オートファジーの亢進と解釈できようが，これは細胞障害に対する細胞応答であり，細胞のrepair processと我々は考えている．筋ジストロフィー症における筋細胞の障害，壊死とフリーラジカルとの関連を調べるためには，細胞障害の機構と共にオートファジーの亢進など細胞の防禦反応についても留意する必要があることを今回の結果は示唆している．

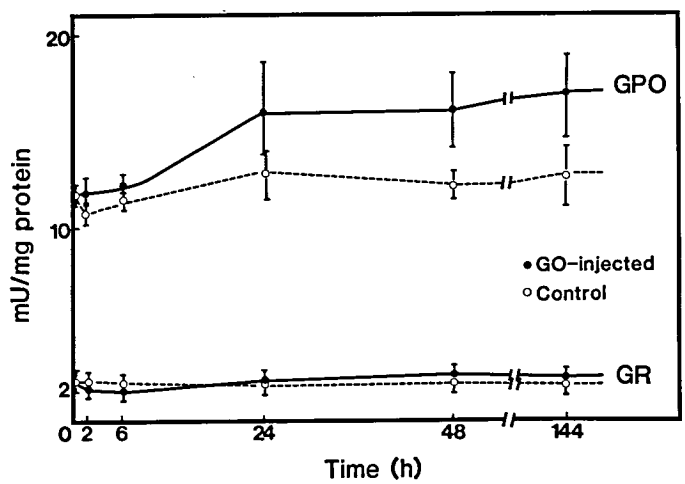


図4　GO投与後のひらめ筋のグルタチオンペルオキシダーゼ(GPO)及びグルタチオン還元酵素（GR）の活性変化

文　献

1) Kominami, E., Bando, Y., Ii, K., Hizawa, K., & Katunuma, N. : Increases in cathepsin B and L and thiol proteinase inhibitors in muscle of dystrophic hamsters. Their localization in invading phagocytes. J. Biochem. 96 : 1941, 1984.

2) Ii, K., Hizawa, K., Nonaka, I., Sugita, H., Kominami, E., & Katunuma, N. : Abnormal increases of lysosomal cysteine proteinases in rimmed vacuoles in the skeletal muscle. Amer. J. Pathol. 122 : 193, 1986.

3) Barrett, A. J., & Kirschke, H. : Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. Methods Enzymol. 80 : 535, 1981.

4) Hindman, J., & Cotlier, E. : Glycosidases in normal human leukocytes and abnormalities in GM_1-gangliosidosis. Clin. Chem. 18 : 971, 1972.

5) Igarashi, H., & Hollander, V.P. : Acid phosphatase from rat liver. J. Biol. Chem. 243 : 6084, 1968.

6) Akerboom, T.P.M., & Sies, H. : Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. Methods Enzymol. 77 : 373, 1981.

7) Nonaka, I., Takagi, A., Ishima, S., Nakase, H., & Sugita, H., : Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupiracaine hydrochloride (marcaine). Acta Neuropathol. 60 : 157, 1983.

8) Ishiura, S., Nonaka, I., Nakase, H., Tada, A., & Sugita, H. : Two step mechanism of myofibrillar protein degradation in acute plasmocid-induced muscle necrosis. Biochim. Biophys. Acta 798 : 333, 1984.

9) Mizuno, Y. : Changes in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activities and thiobarbituric acid-reactive products levels in early stages of development in dystrophic chickens. Experimental Neurol. 84 : 58, 1984.

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——

川　井　尚　臣*

研究協力者　瀬　部　俊　彦*　西　野　洋*　西　田　善　彦*
竹　田　勝　則*　米　田　賢　治*　増　田　健二郎*
佐　藤　幸　一*

は　じ　め　に

私達は，さきに免疫電顕法を用い，人の正常骨格筋細胞内のミオグロビンの局在部位を検索し，ミオグロビンは主としてＩ帯，Ｚ線およびミトコンドリア外膜に局在することを明らかにした[1]．さらにDuchenne型筋ジストロフィー症(DMD)筋についても検索し，本症筋におけるミオグロビン局在の変化を明らかにした[2]．本研究では，筋緊張性ジストロフィー症（MyD）筋ならびに筋萎縮性側索硬化症（ALS）筋を同様の方法で検索したので，その成績について述べる．

対象と方法

対象は生検によって得たMyDならびにALSの患者の骨格筋である．

方法の詳細はすでに発表した[1)3)]のでここではその概略を述べる．生検筋を冷却Zamboni液中で18時間固定し，液体窒素中で新鮮凍結後，クリオスタットで8 nmの組織切片を作成し，アルブミン塗布スライドグラス上に回収する．一方，抗人ミオグロビン家兎血清よりFab′を作成し，これにhorseradish peroxidase（HRP）をマレイミド結合させてFab'-HRP結合物を作製し，これとさきに用意した組織切片を4°C，20時間反応させ，さらに0.05%ジアミノベンチヂン（DAB）溶液と5分間反応させ，2%オスミウム処理を行いアセトン系列で脱水した後エポン包埋した．そして，この試料より85nmの超薄切片を作成し無染色で電顕観察した．光顕用の切片の作製は上記操作のように行ない，0.05% DAB溶液と反応後，アセトン系列で脱水し，キシレンに封入して作製した．

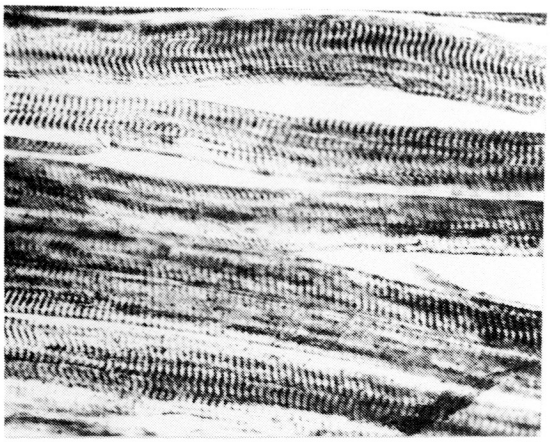
結　　果

1．筋緊張性ジストロフィー症（MyD）

光顕的にみて筋細胞の比較的変化の少ないものを選んで検索した．光顕的にはミオグロビンは横紋状に染色された(図１Ａ)．筋核は染色されなかった．この所見は正常筋のものとほぼ同じである．

電顕的には(図２Ｂ)，主としてＩ帯が染色されており，Ｚ線も染色された．Ｉ帯中に白く抜けてみえるのは膜系，とくにＴ管系が膨化したものと考えられた．図２に同じ組織切片の別の部位Ａ，Ｂ，Ｃを示した．Ａの部位では，左上方のＩ帯からＡ帯に縦走する線状の染色部分があり，その部位のＩ帯は他のＩ帯に比べ染色性が低下していた．Ｂの部位には，Ｉ帯からＡ帯にかけて管状の構造がみられ，これはsarcoplasmic reticulum（Ｌ管）と思われたが，この管内はＡ帯よりやや濃く染色されており，また，その管状構造物の外側の膜と思われる部分は内部よりさらに濃く染色されていた．Ｃの部位では，１本のmyofibrilがその横にある他のものとずれている部位を示したが，そのmyofibrilではＩ帯の染色性が極端に低下しており，これに代って隣接したmyofibrilとの間のintermyofibrillar spaceが染色されていた．

＊徳島大学医学部第一内科



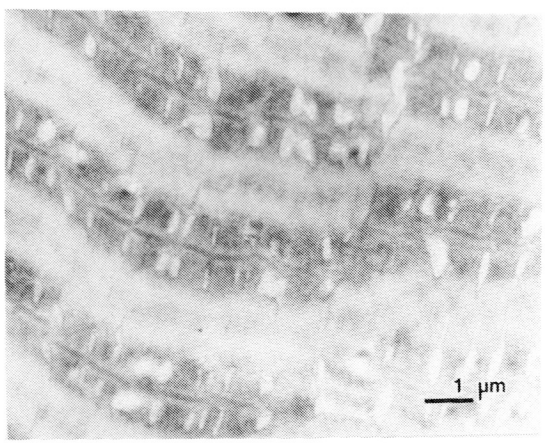
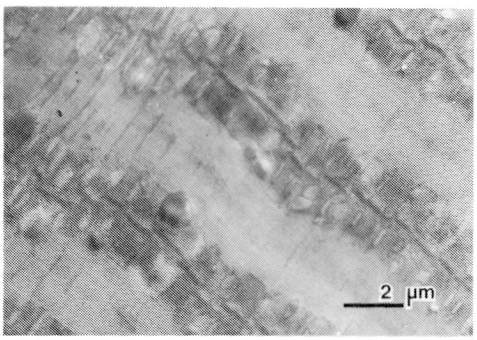


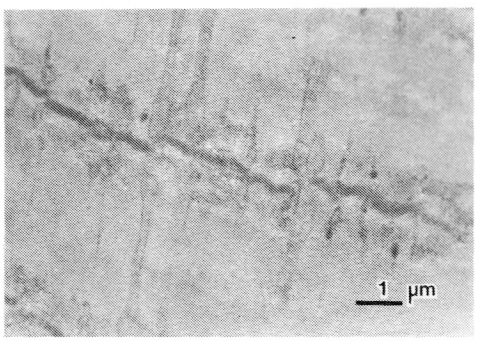
図1　免疫組織化学によるMyD筋のミオグロビン染色像．A：MyD筋の光顕写真（450倍）　B：電顕写真

筋細胞内のミトコンドリアにおける局在については，図3A，Bに矢印で示したごとく外膜と思われる部分が染色された．Cristaeの部分も多少染色されているように見えた．

2．筋萎縮性側索硬化症（ALS）筋

光顕的には，横断面では，線維によってミオグロビンの染色性がかなり異なっていた．とくにsmall angulated fiberには濃く染色されるものから殆ど染色されないものまでみられた．電顕的には，変化の少ない線維では，主としてI帯が染色されており，正常筋と基本的には同じ所見を示した（図4A）．図4Bにはsmall angulated fiberの染色されたものと，されなかったものを示した．





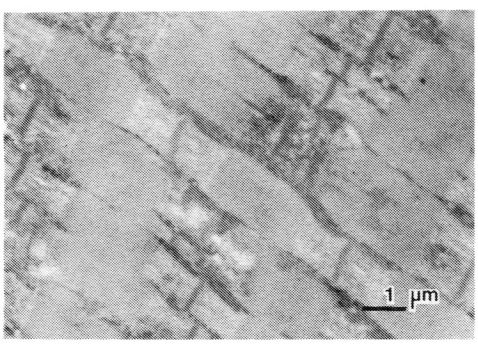


図2　免疫組織化学によるMyD筋のミオグロビン染色．A，B，C，は同一筋の異なった部位の像（電顕写真）．

また，標的線維を図4Cに示したが，中心部（central zone）は染色されず，辺縁部（peripheral zone）はI帯が染色されていたが，中間帯（intermediate zone）では染色性に一定の局在がみられなかった．

表1にさきに著者らが発表した正常骨格筋，DMD筋の成績と本研究の成績をまとめて示した．正常筋のmyofilamentではI帯とZ線，ミトコンドリアの外膜が染色されて，一部のtubular sys-

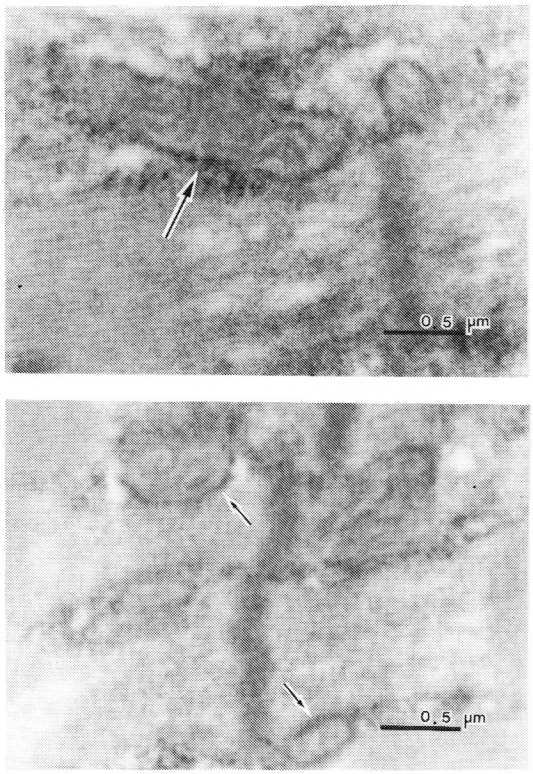


図3　免疫組織化学による MyD 筋のミトコンドリアのミオグロビン染色像（A，B）．外膜（矢印）の部分が染色されている（電顕写真）．

tem の膜部分も染色性を有していた．これに対して DMD 筋と MyD 筋では，I 帯の染色性が正常の部位から殆んど染色されない部位まであり，さらに，tubular system の膜部分やその内部，そして intermyofibrillar space が染色されているのが特徴である．また，ALS 筋では萎縮の軽い筋細胞では，正常筋と似た染色性を示した．

考　　察

ミオグロビンは水溶性の比較的分子量の小さい（MW 17,500）蛋白質であり，筋障害時には早期に血中に増加する．このような蛋白が筋細胞内で I 帯その他に限局して局在するためには，そのための何らかの機構の存在が考えられる．さきに著者らは DMD 筋におけるミオグロビンの局在の変化について報告したが 2），筋細胞に軽度にしろ障害が起きるとこの機構も同時に障害され，その結果ミオグロビンの細胞内局在の変化が生じると思われる．すなわちミオグロビンの局在の異常は筋の病態を鋭敏に反映したものと考えられるが，本研究ではこの点をさらに明らかにするため筋原性

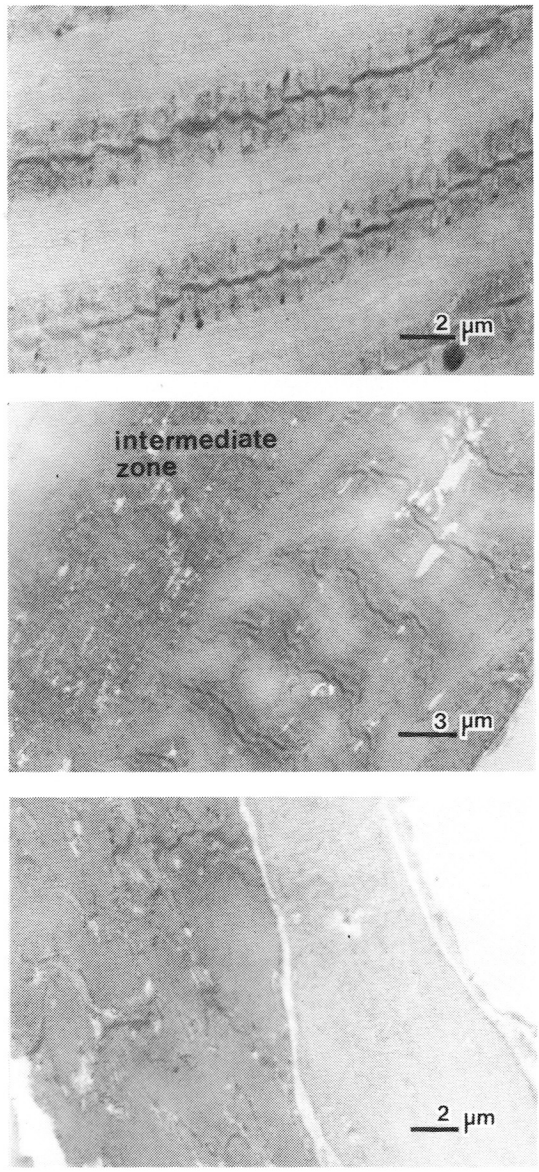


図4　免疫組織化学による ALS 筋のミオグロビン染色．電顕写真（A，B，C）
A．萎縮の軽い筋，B．small angulated fiber，C．target fiber

表1　正常者および各種神経・筋疾患患者の骨格筋細胞内各部位におけるミオグロビンの染色性.

	正常筋	DMD筋	MyD筋	ALS筋
Myofilaments				
I band	+	+〜−	+〜±	+
A band	−	−	−	−
Z line	+	+	+	+
Mitochondria				
outer membrane	++	+	++	++
inner membrane	±	±〜−	±〜−	±
Tubular system				
membrane	+	+	+	+
luminal space	−	−〜+	−〜+	−
Nuclei	−	−	−	−
Intermyofibrillar space	−	+	−〜+	−

Mbの染色性：高度++，中等度+，軽度±，なし−

疾患としてMyDを，また神経原性の疾患としてALSを選んで，両者の骨格筋のミオグロビンの局在を検索した.

MyDでは，光顕的には比較的変化の少ない筋細胞を用いたこともあり，正常筋と同様に横紋状に染色された．電顕的には，やはり主としてI帯が染色されたが，部分的にはintermyofibrillar spaseやA帯のL管なども染色された．そしてintermyofibrillar spaseの染色された部分ではI帯の染色性が低下していた．これらの所見はI帯に局在していたミオグロビンがそれらの部位を通って筋細胞外に流出していることを示すものと考えられるが，同時に筋細胞内のミオグロビン局在機構に異常が生じていることを示すものである．なお，DMD筋などでL管とT管の間に交通のあることは小口ら[4]によってもランタンを用いて明らかにされており，L管内の移行したミオグロビンはT管を通って細胞外へ流出することができると思われる.

また，ミトコンドリアの外膜は他のI帯の部分よりも濃く染色されており，この部位にはミオグロビンが多いことを示している．内膜については染色性が弱く，今後なお検討を要する．ミトコンドリアとミオグロビンの関係については，最近外膜にミオグロビンと結合する蛋白があるとの報告[5]やcytochrome b_5がミオグロビンのreductase活性を有するとの報告[6]もあり，次第に両者の関係が明らかにされつつある．本論文の成績も両者の密接な関係を示すものである.

ALS筋では光顕的には筋細胞によってミオグロビンの染色性に多様性が認められた．電顕的にはミオグロビンはI帯に局在しており，基本的には正常筋と似た染色性を示した．しかし，small angulated fiberには染色性に多様性が認められ，細胞によってミオグロビンの合成，分解の程度が異なっていることが示唆された．また，target fiberのごとく内部構造の乱れのある細胞では染色性の局在にも乱れが認められたが，このことはミオグロビンの局在は筋細胞の内部構造，すなわち，これを構成する構造蛋白に極めて深い関係のあることを示す成績で興味深い．正常筋，DMD筋と今回のMyD筋，ALS筋の成績の比較検討では，それぞれの疾患の異常筋において局在の変化がみられ，その変化は疾患により異なっており，ミオグロビンの局在の変化は，やはり筋の病態を鋭敏に反映しているものと考えられる.

おわりに

人ミオグロビンの免疫電顕法を用いてMyD筋およびALS筋におけるミオグロビン局在を検索

し，両者の筋細胞内局在の変化を明らかにした．さきに検索したDMD筋の成績と合わせ，筋細胞内ミオグロビン局在の変化はそれぞれの筋疾患の筋の病態を反映していると考えられる．

文　献

1）西野洋，川井尚臣：人ミオグロビンの筋細胞内局在―免疫電顕による研究，四国医誌，41：363－369，1985.

2）川井尚臣，西野洋，西田善彦，筒井芳彦，乾俊夫，増田健二郎，斎藤史郎，三好和夫：DMD筋におけるミオグロビン局在の変化―免疫電顕による検討，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，昭和60年度研究報告書，130－133，1985

3）Nishida, Y., Kawai, H., Nishino, H.：A sensitive sandwich enzyme immunoassay for human myoglobin using Fab'horseradish peroxidase conjugate：methods and results in normal subjects and patients with various diseases：Clin. Chim. Acta. 153：93－104, 1985.

4）小口喜三夫：Duchenne型進行性筋ジストロフィー症（DMD）における横細管系（T-system）の研究―高圧電子顕微鏡による観察，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，昭和53年度研究報告書，111－114，1979.

5）Edwards, D.L. and Criddle, R.S.：The interaction of myoglobin with mitochondrial structural protein：Biochem. 5：588－591, 1966.

6）Livingston D.J., McLachan S.J., La Mar G.N. and Brown W.D.：Myoglobin：cytochrome b5 interactions and the kinetic mechanism of metmyoglobin reductase：J.Biol. Chem. 260：15699－15707, 1985.

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）

荒　木　淑　郎*

研究協力者　内　野　誠*

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）の生検筋中には壊死筋線維（NFs）や再生筋線維（RFs）に混じて，いわゆる"opaque 線維"（OFs）が高率に認められ，DMD 筋組織所見の特徴の一つとなっている[1)~4)]．我々は DMD の筋変性壊死機構における OFs の病的意義を明らかにするため，single OFs を用いた筋構造蛋白の分析を行い，OFs の一部は α-actinin や desmin の減少など特徴ある筋構造蛋白の変化を示す"壊死前段階"の病的筋線維である可能性が高いことを報告してきた[5)~7)]．またこれらの研究の一環として，前報にて DMD の臨床経過に伴う OFs，NFs および RFs の出現頻度の推移について4～24歳の DMD についての分析結果を報告した[8)9)]．今回は更に4歳以下の preclinical stage の DMD 例を加えて，OFs，NFs，RFs の出現頻度と DMD 患者年齢との相関，並びに各症例における OFs と NFs 出現頻度の相関について検討を加えたので報告する．

対象と方法

対象は8ヶ月～24歳の DMD 患者21例で，筋生検は大半は腓腹筋及び上腕二頭筋より行った．生検筋は前報に従って，組織化学染色（HE, Gomori, ATPase 染色など）及び acridine orange（AO）染色にて，各生検筋中に含まれる全筋線維数に対する OFs，NFs，並びに RFs 数を数えて，各出現頻度を百分率で算出した．なお RFs の算定は myosin ATPase 染色（pH10.6，4.6，4.3）による type2C 線維[10)]，並びに AO 染色で筋線維全体がオレンジ色に染色される線維[11)]を指標とした．OFs，NFs，RFs 各出現頻度と DMD 患者年齢との相関，並びに各症例における OFs と NFs 頻度の相関の有無について相関図を作成し，統計学的に検討した．

結　果

DMD 21例で検索した筋線維総数は18,771本（200～1,886，$\bar{x}$＝894）で，OFs 頻度は症例により変動するが，平均8.3%に認められた（表1，図1）．NFs は平均0.7%に認められ，若年で高率で，年齢が長ずるに従って減少した（表1，図2）．RFs は type2C 線維頻度で平均16.9%，AO 陽性線維頻度で平均5.7%に認められ，type2C 線維頻度が AO 陽性線維頻度より全般に高値を示したが，いずれも17～18歳以降は著減し，極めて類似した経時変化を示した（表2，図3）．

OFs・NFs・RFs 頻度と年齢との相関係数はそれぞれ－0.38，－0.91，－0.86（type2C）で，OFs を除いて有意な負の相関を示した（$P<0.001$）．

また各症例における OFs 頻度と NFs 頻度の相関については，一部の症例で両者がほぼ直線的相関を示す傾向がみられたが，約半数の症例では OFs 頻度に比較して，NFs 頻度が低値を示し，全体についての統計処理では，OFs と NFs 頻度間に有意な相関はみられなかった（図4）．

考　案

前回[9)]報告した4～24歳の17例の DMD 症例に，今回8ヶ月，10ヶ月，1歳2ヶ月，並びに4歳の

＊熊本大学医学部第一内科

表 1　Percentage of opaque and necrotic muscle fibers in 21 biopsies of Duchenne muscular dystrophy.

Case No.	Age (years)	Biopsied muscle	No. of fibers identified	No. of opaque fibers (%)	No. of necrotic fibers (%)
1	8mo.	Biceps	1,818	107(5.9)	20(1.1)
2	10mo.	Biceps	984	143(14.5)	25(2.5)
3	1 2/12	Biceps	1,057	58(5.5)	19(1.8)
4	4	Biceps	974	85(8.7)	17(1.8)
5	4	Biceps	439	45(10.3)	12(2.7)
6	7	Gastrocnemius	1,306	129(9.9)	12(0.9)
7	12	Gastrocnemius	1,856	284(15.3)	3(0.2)
8	13	Tibialis ant	1,309	37(2.8)	6(0.5)
9	15	Gastrocnemius	1,051	107(10.2)	6(0.6)
10	15	Gastrocnemius	1,199	153(12.8)	4(0.3)
11	16	Gastrocnemius	666	26(3.9)	5(0.7)
12	16	Gastrocnemius	454	6(1.3)	1(0.2)
13	17	Gastrocnemius	603	42(7.0)	0(0)
14	17	Gastrocnemius	1,198	81(6.8)	0(0)
15	17	Gastrocnemius	957	25(2.6)	3(0.3)
16	18	Gastrocnemius	650	86(13.2)	0(0)
17	20	Gastrocnemius	1,025	91(8.9)	3(0.3)
18	20	Gastrocnemius	212	18(8.5)	0(0)
19	24	Gastrocnemius	593	19(3.2)	0(0)
20	24	Gastrocnemius	220	8(3.6)	0(0)
21	24	Gastrocnemius	200	6(3.0)	0(0)
		Total	18,771	1,556(8.3%)	136(0.7%)

early stage の症例を加えて OFs, NFs, RFs 頻度と患者年齢との相関について再検討したが，NFs・RFs は preclinical stage から高頻度に認められ，NFs・RFs 頻度は年齢と負の相関を示すという前回の結論が，4 歳未満の DMD 症例にもあてはまることが明らかになった．OFs については前報と同様に症例による変動が大きく，年齢との間に有意な相関はみられなかった．また今回新たに各症例における OFs 頻度と NFs 頻度の相関の有無について検討したが，一部の症例については

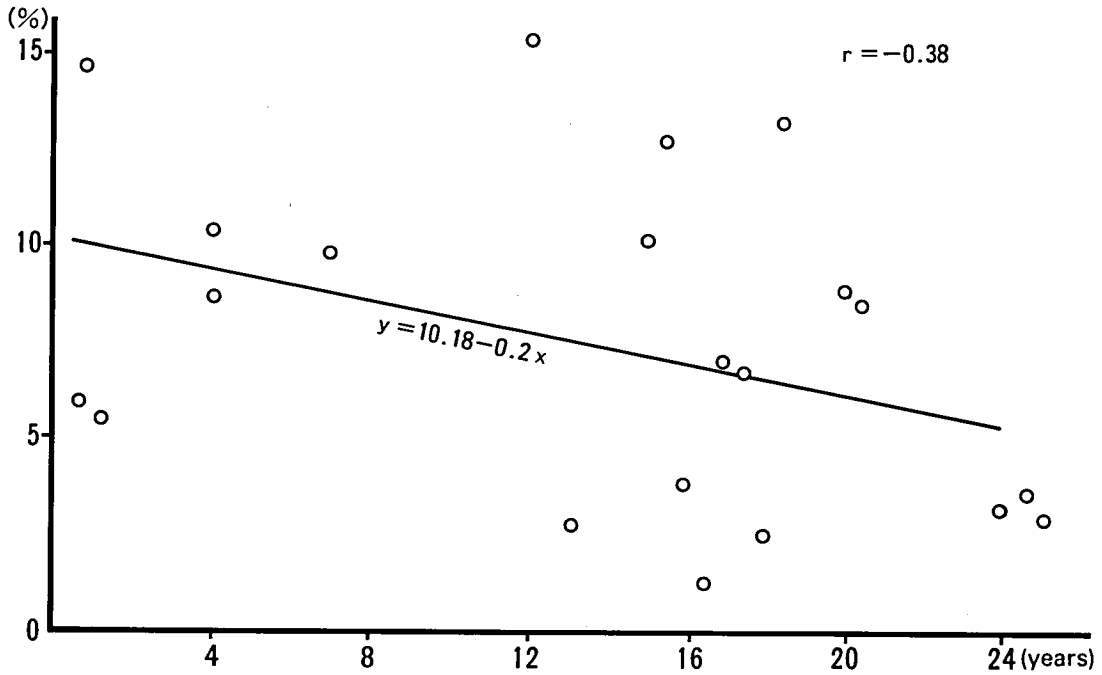


図 1　Change over time in the proportion of opaque muscle fibers in DMD muscles.

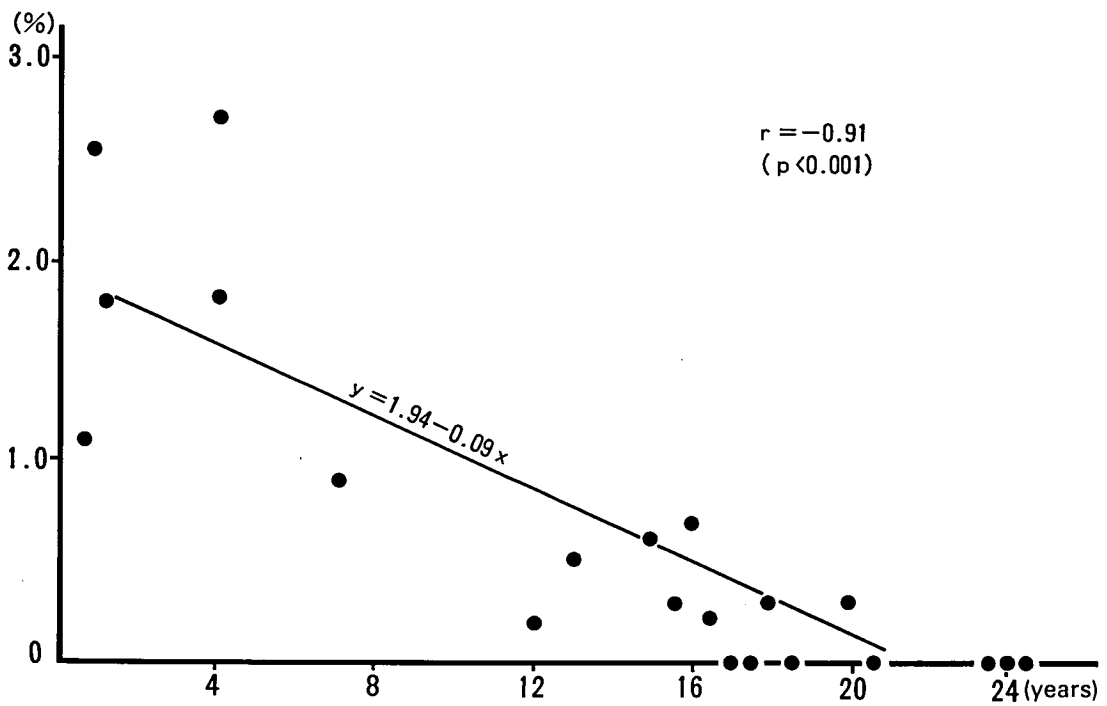


図 2　Change over time in the proportion of necrotic muscle fibers in DMD muscles.

表2　*small fibers with strong bright orange fluorescence. AO : acridine orange.

Case No.	Age (years)	ATPase stain		Acridine Orange stain	
		No. of fibers identified	No. of type 2C (%)	No. of fibers identified	No. of AO positive fibers *(%)
1	8mo.	1,131	223(19.7)	—	—
2	10mo.	1,166	373(32.0)	—	—
3	1 2/12	597	73(12.2)	—	—
4	4	988	308(31.2)	—	—
6	7	1,789	133(7.4)	1,715	120(7.0)
7	12	1,706	279(16.4)	416	36(8.7)
9	15	281	37(13.2)	605	33(5.5)
10	15	416	36(8.7)	362	25(6.9)
13	17	—	—	603	22(3.6)
14	17	470	54(11.5)	397	27(6.8)
15	17	355	40(11.3)	213	7(3.3)
16	18	147	7(4.8)	330	3(0.9)
18	20	60	0(0)	48	0(0)
20	24	83	1(1.2)	64	0(0)
21	24	63	0(0)	46	0(0)
Total		9,252	1,564(16.9%)	4,799	273(5.7%)

両者がほぼ直接的相関を示す傾向がみられたものの，全体についての統計処理では有意な相関は認めなかった．このことは全てのOFsがNFsにつながる病的筋線維であるとする考えに疑問をなげかけるものであり，我々が先に報告したsingle OFsの筋構造蛋白の分析結果[6)7)]ともあわせ，OFsにはNFsにつながる“壊死前段階”の筋線維の他に，筋生検過程などで生じる人工産物的筋線維が含まれている可能性が示唆された．従来の組織学的検索では人工産物か壊死前段階の筋線維かを区別することは実際上困難であるので，今後生化学的検査で明らかにしたα-actininやdesminの減少を指標に，抗α-actinin抗体や抗desmin抗体を用いて，螢光抗体法や酵素抗体法（PAP法，ABC法など）により，免疫組織化学的に両者の識別を試みることが必要と思われた．

要約並びに結論

1) 8ヶ月～24歳のDMD 21例について，opaque線維，壊死線維，再生線維頻度を検索したが，壊死線維，再生線維は若年で高率で，年齢が長ずるに従って減少し，患者年齢と負の相関を示した（$P<0.001$）．

2) opaque線維は年齢とともに減少する傾向がみられたが，症例による変動が大きく，患者と年齢との有意な相関はみられなかった．各症例のopaque線維と壊死線維頻度間にも相関はみられなかった．

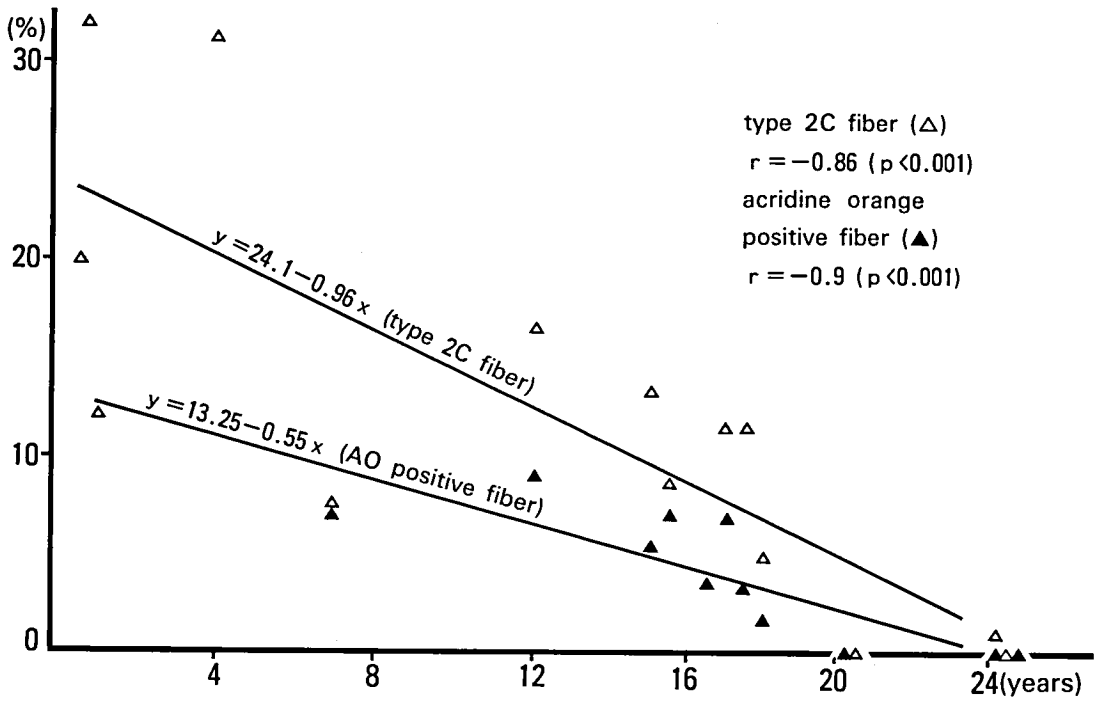


図3 Change over time in the proportion of regenerating muscle fibers in DMD muscles.

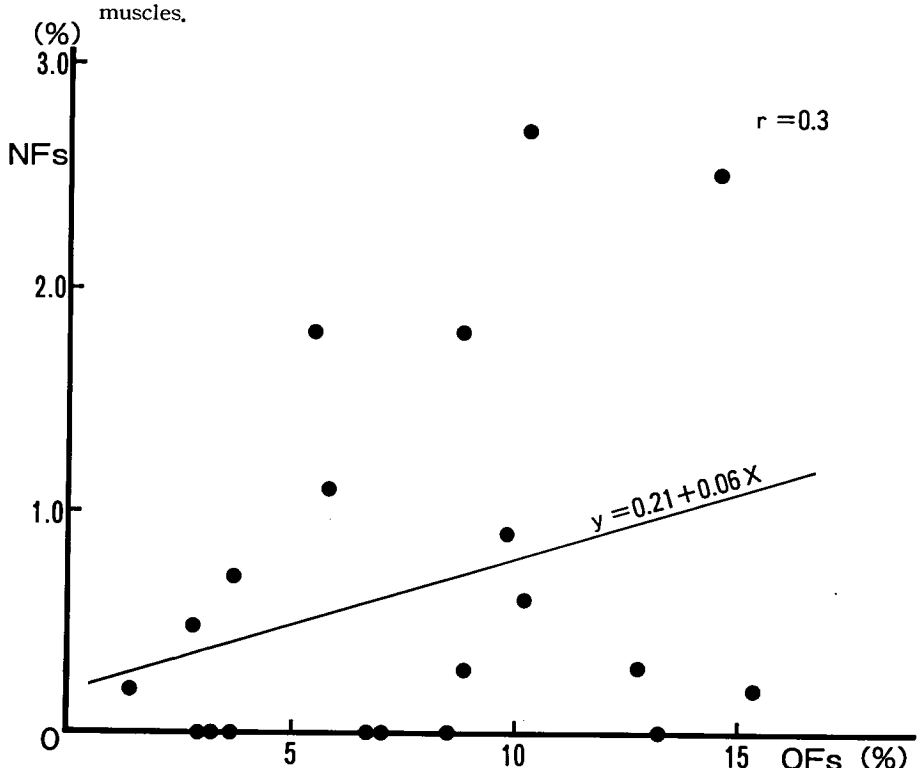


図4 Relationship between the proportion of opaque and necrotic fibers in each case of DMD.

3) これまで明らかにした opaque 線維の生化学的分析結果ともあわせ，opaque 線維には“壊死前段階”の病的筋線維と人工産物的筋線維が含まれている可能性が示唆された．

謝辞：本研究に種々御協力いただいた熊本大学医学部発達小児科三池輝久教授に深謝いたします．

文　献

1) Schmalbruch H：Contracture knots in normal and diseased muscle fibers. Brain 96：637, 1973.

2) Boxler K, Jerusalem F：Hyperreactive (hyaline, opaque, dark) muscle fibers in Duchenne dystrophy. J Neurol 219：63, 1978.

3) Chou SM, miike T et al：Ultrastructures of “opaque fibers” (OFs) in Duchenne muscle dystrophy (DMD). Neurology (Minneap) 29：594, 1979.

4) 埜中征哉，杉田秀夫：進行性筋ジストロフィー症の病理—opaque 線維を中心として—神経進歩24：718, 1980

5) 内野誠，荒木淑郎ら：Duchenne 型筋ジストロフィーにおける opaque fiber の筋構造蛋白に関する研究．臨床神経23：706, 1983

6) 内野誠，荒木淑郎ら：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)．臨床神経25：166, 1985

7) Uchino M, Araki S et al：Structural proteins of the opaque muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. Neurology 35：1364, 1985

8) 内野誠，荒木淑郎ら：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—．臨床神経25：944, 1985

9) 内野誠，荒木淑郎：Duchenne 型筋ジストロフィーの筋変性壊死機構—opaque 線維の役割を中心に—（第2報）．臨床神経26：841, 1986

10) Nonaka I, Takagi A et al：The significance of type 2C muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve 4：326, 1981.

11) Miike T, Tamari H et al：A fluorescent microscopy study of biopsied muscle from infantile neuromuscular disorders. Acta Neuropath (Berl) 59：48, 1983

57）筋ジストロフィー患者における血清S－100ao蛋白について
——Carbonic anhydrase III, Creatine kinase, Muscle-specific enolaseとの比較検討——

杉村公也*

研究協力者　村山知行*　杢野謙次**　加藤兼房***

1965年Mooreによってウシ脳で発見されたS-100蛋白は，最近まで神経組織特異蛋白と思われてきた．しかしS-100蛋白は単一成分ではなくα鎖とβ鎖からなる2量体で少なくともαα（S-100_{ao}），αβ（S-100_a），ββ（S-100_b）の3種類が存在することが明らかになった[1)2)]．その内，S-100_{ao}は神経組織には極めて少なく主に骨格筋心筋に高濃度に存在することが知られてきた[3)]．今回我々は高感度Enzyme immunoassay（EIA）法により，筋ジストロフィー患者におけるS-100_{ao}を測定し，筋疾患の他の指標であるCarbonic anhydrase III（CA III），Creatine kinase（CK），Muscle-specific enolase（MSE）との比較検討を行った．

対象と方法

対象：1．進行性筋ジストロフィー症（PMD）77例（Duchenne型筋ジストロフィー症〈DMD〉58例，肢帯型筋ジストロフィー症〈LG〉9例，顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症〈FSH〉10例）（男70例，女7例），年齢は5歳～56歳，平均29.3歳

2．筋緊張性ジストロフィー症53例，（男37例，女16例）年齢は18～57歳，平均39.3歳

3．Control群は10歳～50歳台のそれぞれ20人（男10人，女10人）の健康人あるいは非神経筋疾患で非心疾患の患者からなる計100例である．

方法：CA III，MSEは前回報告したβ-galactosidaseを標識酵素とするサンドイッチ型EIA法によった．正常値は，それぞれ前回測定のmean＋2SDである20.6ng/ml，15.0ng/mlを上限とし，これらの値を越す例を異常とした．S-100_{ao}もβ-galactosidaseを標識酵素とするサンドイッチ型EIA法で行った．この測定系は，ヒト大胸筋から精製したS-100_{ao}蛋白をもとに，S-100蛋白α-subunitに対する測定系である[3)16)]．標準蛋白として，この精製したヒトS-100_{ao}蛋白を使用した．この系では，S-100_aとも交叉反応を示すが，血清中のS-100蛋白は，大部分がS-100_{ao}で，便宜的に測定値はS-100_{ao}等価として表した．担し，S-100_{ao}の測定限界は0.06ng/mlで，これ以下の測定値は便宜的に0.06ng/mlとした．control群におけるS-100_{ao}値は，男女差，年齢差なく平均±標準偏差は0.132±0.112で，mean＋2SD＝0.356を越える例を上昇例とした．CK値は市販キット（シノテスト，正常15～125IU/l）により行った．なお血清は，測定まで－20°Cで保存し，溶血血清は検索から除外した．

結　果

1．各疾患群の血清S-100_{ao}値（表1）

PMD群では，DMD型3.94±4.19ng/ml（mean±SD）（range0.34～24.3ng/ml），LG型0.82±1.04ng/ml（0.06～3.40），FSH型0.28±0.45ng/ml（0.06～1.45）と，DMD型，LG型では有意（DMD：$p<0.005$，LG：$p<0.05$）に高値を示した．MyDでも，0.74±0.64ng/ml（range0.06～3.39）と有意（$p<0.005$）に高値を

＊名古屋大学医学部神経内科
＊＊Department of Neurology University of Pennsylvania
＊＊＊愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所生化学部門

表1　各測定値の平均±標準偏差

	S-100a₀ ≦0.356 (ng/ml)	CAⅢ ≦20.6 (ng/ml)	CK 15～125 (IU/l)	MSE ≦15.0 (ng/ml)
DMD	3.94±4.19**	379±288	2331±2645	117±169
LG	0.82±1.04*	104±186	633±950	22.7±26.9
FSH	0.28±0.45	17.9±10.1	96.8±62.4	7.04±2.65
MyD	0.74±0.64**	56.0±33.4	119.8±79.8	15.8±16.5

* $P < 0.05$

** $P < 0.005$

表2　筋ジストロフィー患者における各測定値の異常率

	S-100a₀	CAⅢ	CK	MSE
DMD 58例	98%（57例）	100%（58例）	98%（57例）	95%（55例）
LG 9例	56%（5例）	78%（7例）	78%（7例）	44%（4例）
FSH 10例	10%（1例）	30%（3例）	20%（2例）	0%（0例）
MyD 53例	66%（35例）	89%（47例）	38%（20例）	26%（14例）

表3　S-100$_{ao}$ 値と CA III, CK, MSE 値との相関係数

	CA III	CK	MSE
DMD　58例	0.812 **	0.560 **	0.718 **
LG　9例	0.900 **	0.984 **	0.977 **
FSH　10例	0.892 **	0.181	0.308
MyD　53例	0.538 **	−0.020	0.379 *

* P < 0.01
** P < 0.001

示した.

2. S-100$_{ao}$ 値と CA III, CK, MSE 値との相関関係（表2）

DMD 型では CA III 0.812, CK 0.560, MSE 0.718と，いずれも有意（p<0.001）な相関を示し，特に CA III との相関が最も高かった. LG 型では，CA III 0.900, CK 0.984, MSE 0.974といずれも有意（p<0.001）な相関を示した. FSH 型では，CA III 0.892, CK 0.181, MSE 0.308と，CA III とのみ有意（p<0.001）な相関を示した. MyD では，CA III0.538, MSE 0.379と有意（CA III：p<0.001, MSE：p<0.01）な相関を示したが，CK とは相関を認めなかった.

3. 各疾患群での S-100$_{ao}$, CA III, CK, MSE 値の異常率の比較（表3）

DMD では，S-100$_{ao}$, CA III, CK, MSE それぞれ，98%, 100%, 98%, 95%といずれも高い異常率を示した. LG では，CA III, CK が78%で，S-100$_{ao}$ 56%や MSE44%よりも高かったが，症例が少なく有意差は認めなかった. FSH 型では，S-100$_{ao}$ 10%, CA III30%, CK20%, MSE0%といずれも低い異常率を示した. MyD では，CA III89%と最も高く，次ぎに S-100$_{ao}$ 66%で，CK や MSE の38%, 26%に比べ，両者とも有意（p<0.05）に高い異常率を示した.

4. DMD 型における年齢と S-100$_{ao}$ との関係（図1）

S-100$_{ao}$ 値は年齢と共に減少する傾向を示し，その相関係数は，−0.511と有意（p<0.001）な逆相関を示した.

考　察

S-100蛋白は，分子量約2万のカルシュウム結合蛋白のひとつで，従来神経組織特異蛋白と考えられてきた. しかし最近になって，神経組織以外にも多量の S-100蛋白が存在することが見いだされた. この S-100蛋白のうち α-subunit だけからなる S-100$_{ao}$ は，木村・加藤らによって横紋筋及び心筋に高濃度に存在することが明らかにされた.[3]. 我々は，多数例の進行性筋ジストロフィー

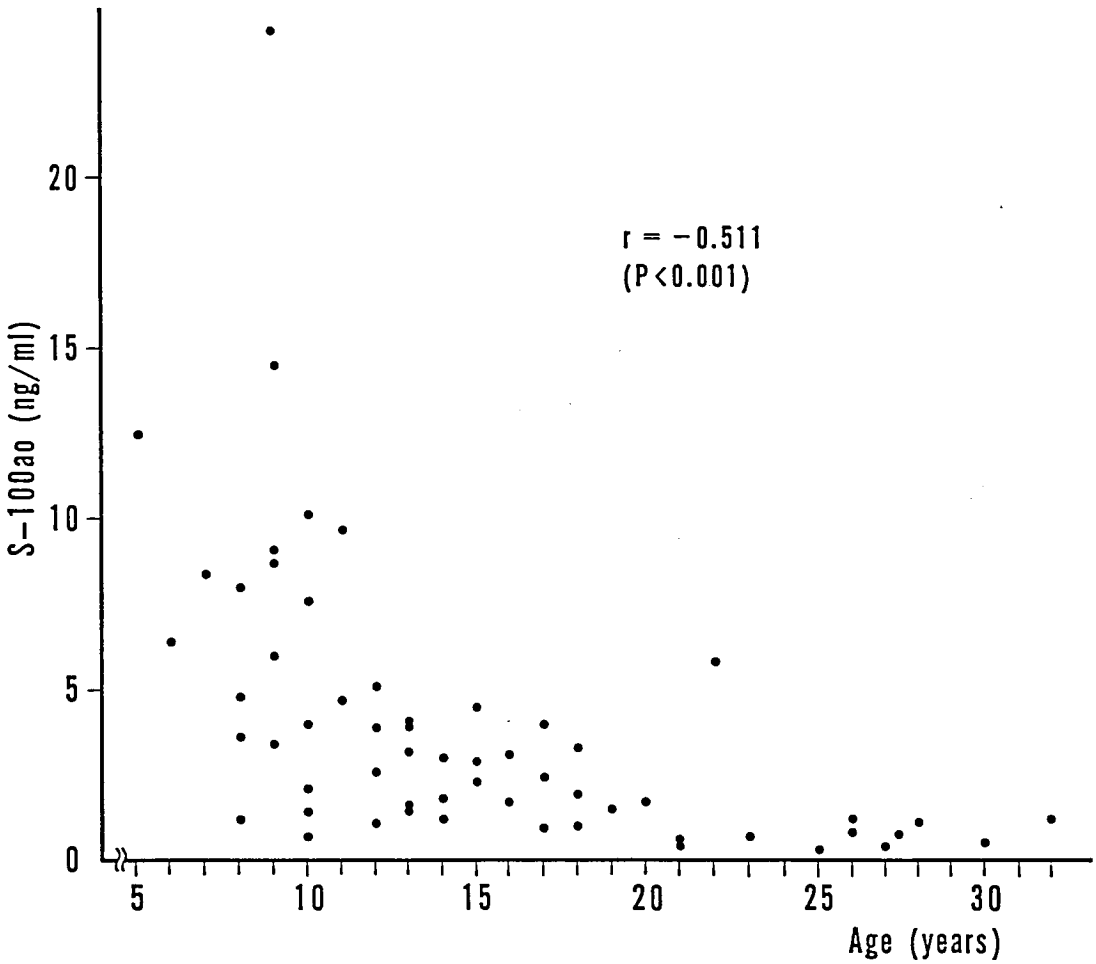


図1　DMDにおける血清S-100_{ao}値と年齢との関係

症と筋緊張性ジストロフィー症について血清S-100_{ao}値を測定し，従来から筋疾患の指標であるCA III, CK, MSE値との比較検討を行った．PMD群では血清S-100_{ao}はCA III，CK，MSEと同様な異常率を示し，いずれとも良い相関を認めた．その内，特にCA IIIとの相関が最も高かった．また，DMDでは，CA III，CK，MSEで，従来から報告されているものと同様に年齢との逆相関を認めた[4)6)7)8)]．一方，MyDでは，S-100_{ao}はCA IIIに次いで高い異常率を示し，CK，MSEに比べ有意差を認めた．また相関係数においてもCA IIIと最もよい相関を認めた．MSEともそれよりは低いが相関を認めたが，CKとは相関を認めなかった．これらの結果からS-100_{ao}は，PMDとMyDでは異なった態度を示すと考えられた．Haimotoらは免疫組織化学的にα抗原の筋組織内局在を調べ，骨格筋ではslow twitching fiberであるtype I fiberの細胞質に多く存在するとしており[5)]，主としてtype I fiberが障害されるMyDで高い異常率を示した結果と一致すると考えられた[12)13)14)]．同様に島らにより，type I fiberにより多く，type I fiberの異常を反映すると報告されている[9)10)11)]CA IIIとの相関が，PMDでもMyDでも最も高かったことも，これを支持するものと考えられた．しかし，type II fiberにより多く存在するとされているMSEとの相関が[15)]，PMD・MyDいずれに

おいても，CK とのそれより高かったことは不明である．今後は臨床症状の重症度・病期との関連や，疾患筋における免疫組織化学的検討を考えていく必要があると思われた．また，S-100_{ao} は筋疾患の指標として有用であり，MyD では CK や MSE よりもより良い指標となることが考えられた．今後これらを組み合わせることにより，筋障害のタイプ分けをすることができる可能性が示唆された．

ま と め

1．筋ジストロフィー症における血清 S-100_{ao} 値を測定し，CA III, CK, MSE 値との比較検討をおこなった．

2．S-100_{ao} 値は，control 群に比し，PMD・MyD で有意な上昇を認めた．

3．S-100_{ao} 値は，CA III と最もよい相関を認めた．

4．MyD での異常率は，S-100_{ao} で，CA III と同様に CK や MSE よりも有意に高かった．

5．DMD では S-100_{ao} 値と年齢は逆相関を示した．

6．S-100_{ao} 値は筋疾患の指標として有用であり，MyD では CK や MSE よりも良い指標となる可能性が示唆された．

最後に，貴重な検体を提供していただいた国立療養所鈴鹿病院院長飯田光男先生に深謝いたします．

文　献

1）Isobe T., Ishioka N., et al：A rapid separation of S-100 subunit by high performance liquid chromatography：the subunit composition of S-100 proteins. Biochem. Int 6：758, 1983.

2）Isobe T. and Okuyama T.：The amino acid sequence of the α subunit in bovine brain S-100 protein. Eur. J. Biochem 116：79, 1981.

3）Kato K. and Kimura S.：S-100_{ao} ($\alpha\alpha$) protein is mainly located in the heart and skeletal muscle. Biochem. Biophys. Acta 842：146, 1985.

4）杢野謙次，陸　重雄ら：神経筋疾患における血清 muscle-specific enolase 値の分析―新しい筋障害の指標としての可能性について．臨床神経23：852, 1983.

5）Haimoto H., et al：in press.

6）Mokuno K., Riku S., et al：Serum muscle-specific enolase in progressive muscular dystrophy and other neuromuscular disease. J. Neurol Sci 63：345, 1984.

7）Pearce JMs, Pennington RJ et al：Serum enzyme studies in muscle disease. Part II. Serum creatine kinase activity in muscular dystrophy and in other myopathic and neuropathic disorder. J Neurol Nurosurg Psychiatry 27：96, 1964.

8）杢野謙次，陸　重雄ら：筋ジストロフィー患者における血清 Carbonic anhydrase III (CA III) について――creatine kinase, muscle-specific enolase との比較検討．臨床神経25：1070, 1985.

9）島　功二，田代邦雄ら：ヒト筋型 Carbonic anhydrase アイソザイム (CA III) radioimmunoassay――特に神経筋疾患への臨床応用の可能性について．臨床神経23：892, 1983.

10）Shima K.：Human muscle carbonic anhydrase III (CA III) purification, immnohistochemical localization in the human skeletal muscle and its clinical application to the neuromuscular disease. Hokkaido J Med Sci 59：98, 1984.

11）Shima K., Tashiro K., et al：Carbonic anhydrase III immunohistochemical localization in human skeletal muscle. Acta Neuropathol (Berl) 59：237, 1983.

12）木下真男，里吉営二郎ら：筋緊張性ジストロフィー症の筋病理学的研究．臨床神経14：653, 1974

13）Brooke MH., Engel WK.：The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber type myotonia, myasthenia gravis and

hypokalemic periodic paralysis. Neurology (Minneap) 19 : 469, 1969.

14) Engel WK : Selective and nonselective susceptibility of muscle fiber types——A new approach of muscle fiber types. Arch Neurol 22 : 97, 1970.

15) Ibi T., Sahashi K., et al : Immunohistochemical demonstration of β-enolase in human skeletal muscle. Muscle Nerve 6 : 661, 1983.

16) Kato K., Shigeki K., : S-100_{ao} protein : Distribution in muscle tissue of various animals and purification from human pectral muscle. J Neurochem 46 : 1555, 1986.

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

紫　芝　良　昌*

研究協力者　三　好　和　夫*　門　脇　紀　子*　清　水　多恵子*
佐　藤　幸　一**

目　的

私達は従来筋ジストロフィー症の成因をクレアチン代謝の面から研究を行っている．これまでの筋ホモジュネートのin vitro及びラットのin vivoの実験で得たクレアチンの水解（尿素とサルコシンの産生）の成績[1)2)]を確認し，本症での異常を探る目的で本年度手掛けたラット骨格筋培養細胞系で行った基礎実験の成績について述べる．

方　法

American Type Culture Collection（ATCC）より入手したラット筋芽細胞株（L6）を10%牛胎児血清(FCS)を含むDME培養液を用いて培養した．細胞はCoster製6 well plate（直径24mm）に10^4個播種した．Doubling timeは約2日である．この条件では筋芽細胞は線維芽細胞様に増殖（図1）し，培養後7～10日目には多核の細胞が出現し，一部にmyotubeの形成をみる（図2）．この状態で培養液中の血清成分を10% FCSから2%馬血清（HS）に加えるとmyotube以外の細胞は脱落して培養中のmyotubeの占める率が高くなる[3)]．今回の実験では，この二つの状態においてクレアチン代謝を人皮膚より得た線維芽細胞を対照として比較した．クレアチン代謝産物の追跡のためには^{14}C-（amidine）-creatine（NEM社製，20μCi/mg）2 μCiを1 wellあたりに加え，同時にcold creatineを0，100，200，500，1000，10000μg/ml加えて，72時間37°C　5% CO_2の条件下で培養した．培養終了後，mediumを細胞層から分離し，細胞層をisotopeを含まない培養液で2回洗浄し，2N NaOHを加えて細胞層を溶解した．この抽出後にTCAを最終濃度6%になるように加え，蛋白を沈澱させて遠心し，上清を集めた．この上清の一部のradioactivityを液体シンチレーションカウンターで計測すると共に，一部は

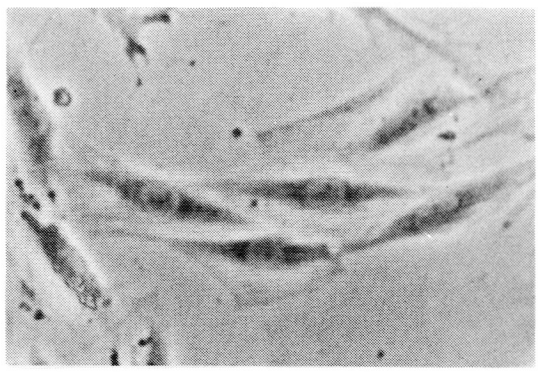


図1　10%牛胎児血清添加DME培養3日目のMyoblast細胞

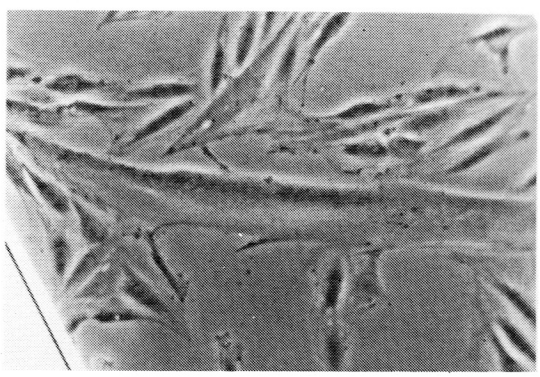


図2　2%馬血清添加培養5日目のMyotube

＊沖中記念成人病研究所
＊＊徳島大学第一内科

HPLCにかけてクレアチン代謝産物の同定を行った．HPLCのカラムにはSumipax 10Naを用い，移動層には10mM phosphate buffer (pH3.7)を用いた[2]．

成　　績

筋細胞内への放射性クレアチンのuptake

図3にこれを示す．非放射性クレアチンを添加しない条件で^{14}C-クレアチン2 μCi/wellを添加すると，比放射能から計算して培養液中のクレアチン量は，100μg/2mlとなる．図3にみるようにこの条件において，myotubeでは添加した^{14}C-クレアチンの5.4%が細胞内に見られる．この%はクレアチン添加によって次第に減少する．Myoblastでは培養3日目，5日目と2つの時期における観察で，クレアチン添加量0（培養液中のクレアチン濃度は上記のように100μg/2 ml)の時，放射性クレアチンの3.7%，2.3%が細胞内にみられる．この%はクレアチン添加によって減少する．これに対して人線維芽細胞では放射性クレアチンはクレアチンを添加しない条件でも1%以下である．各条件において，細胞層における約1%の放射性クレアチンの集積は非特異的な吸着とみなすことができる．

細胞内にとりこまれたクレアチンの総量

図4にこれを示す．図中の数値は図2に示した細胞内の放射性クレアチン量から非特異的吸着量をさしひき，培養液中のクレアチン濃度との積をとってえたものである．myotubeにとりこまれるクレアチン量は培養液中のクレアチン量に依存して増加し，培養液中のクレアチン濃度600μg/2 ml以上でプラトーに達する．この時myotube中に含まれるクレアチン量は5.5μg/200μg protein（1 well中にある蛋白量は200μgに近いので蛋白200μgあたりを表すことにした．）であった．myoblastも同様に，培養液中のクレアチン濃度に依存してクレアチンをとりこみ，やはりクレアチン濃度600μg/2 mlで頂点に達し，myoblastにとりこまれるクレアチン量は約3 μg/200μg proteinであった．これらに対し，人線維芽細胞では培養液中のクレアチン濃度が600μgの条件下でも1 μg以下のクレアチンしか存在しないことになり，クレアチンを細胞内に集積する能力は低いか，存在しないと考えられる．

細胞内におけるphosphocreatineの産生

細胞内外の^{14}C－クレアチンをHPLCで分析

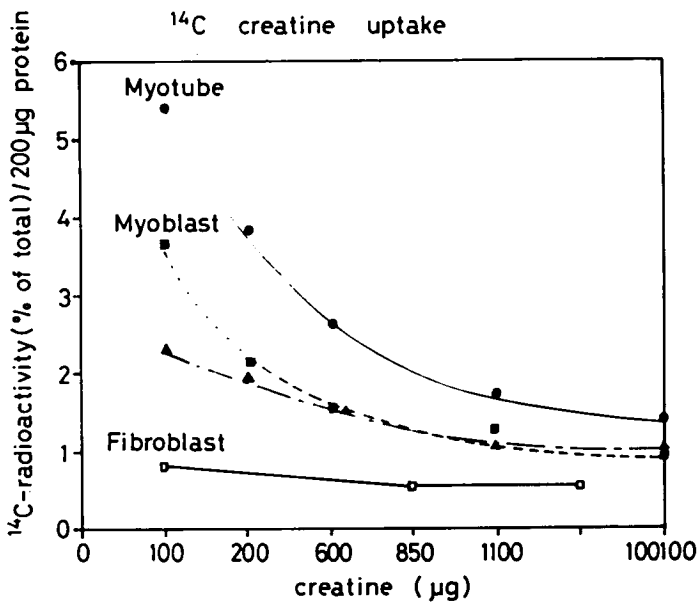


図3　クレアチンの各種濃度下における^{14}C－クレアチンの細胞層へのとりこみ

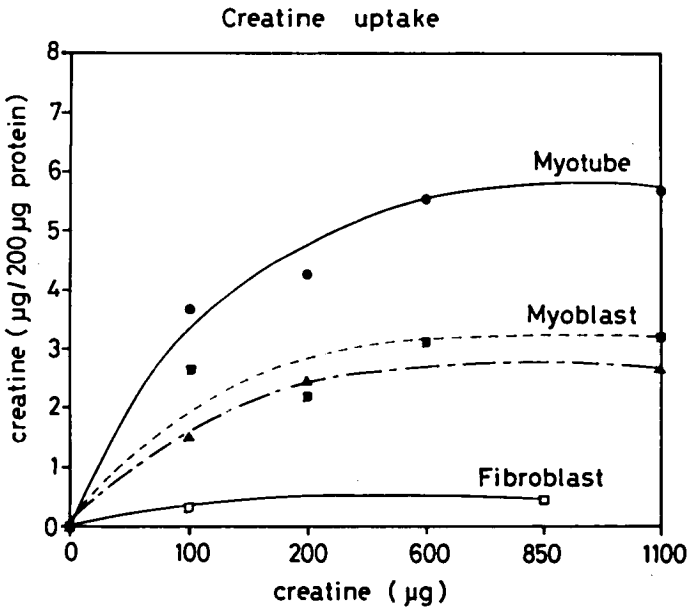


図4　クレアチンの各種濃度下において培養液から細胞層へ移行したクレアチンの総量

すると，培養液中では，myotube, myoblast，線維芽細胞，いずれの培養でも，放射活性の95%以上がクレアチンであった．これに対し，細胞内の^{14}C－radioactivity についてはmyotube培養ではその48.3%はクレアチンとして存在するが，42.1%はphosphocreatineとなっていた（図5）．繰り返し実験でも同様の成績がえられた．しかし，myoblastでは，細胞内^{14}C-活性の92%がcreatineとして存在し，phosphocreatineとして存在するのは2.8%に過ぎなかった（図6）．繰り返し実験でも同様であった．人線維芽細胞中の^{14}C－活性に関しては細胞内に取り込まれた量が少なく，解析することができなかった．

筋細胞内へのクレアチンの取り込みと集積能

筋細胞内へとりこまれた^{14}C－クレアチンの相当部分はphosphocreatineとなっているから，クレアチン自体の集積能をみるためには，phosphocreatineとなった部分を差し引いてクレアチンのみの量を示したものが図7である．このことからmyotubeでもmyoblastでもクレアチンの集積能はほとんど同一であり，myotubeではcreatine kinase (CK) 活性が高いために集積したクレアチンをphosphocreatineとしてpoolから除去して集積するために，細胞外から移行するクレアチンの量としてはmyoblastの約2倍に増加していることが推察された．

考察と結語

筋ジストロフィー症の病因究明のためのクレアチン代謝研究の一環として，筋細胞培養系についての基礎実験の成績を述べた．筋細胞培養系は培養条件によって，細胞分化の段階を調節することができる[4]利点がある．人骨格筋はクレアチンを血清濃度の1000－1500倍に高濃度に保有している．しかしこれまで，この特異なクレアチンの筋細胞内取り込みと集積の様相を，筋細胞の分化段階で明らかにした成績はみられなかった．

今回の我々の実験では，クレアチンのとりこみはmyoblastにおいて明らかに認められ，myotubeでは約2倍に増加している．しかし，とりこまれた^{14}C－活性を調べると，myotubeでは^{14}C－活性の約半分はphosphocreatineになっており，クレアチンの集積能自体はmyotubeとの差が認められない．すなわち，クレアチン集積能

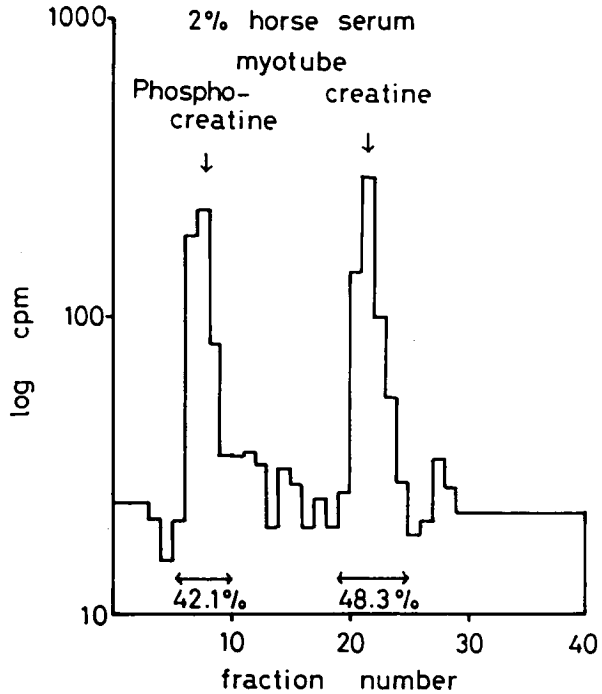


図5　Myotule 細胞層に移行した ^{14}C-活性の HPLC による解析．42% が phospho-creative となっている．

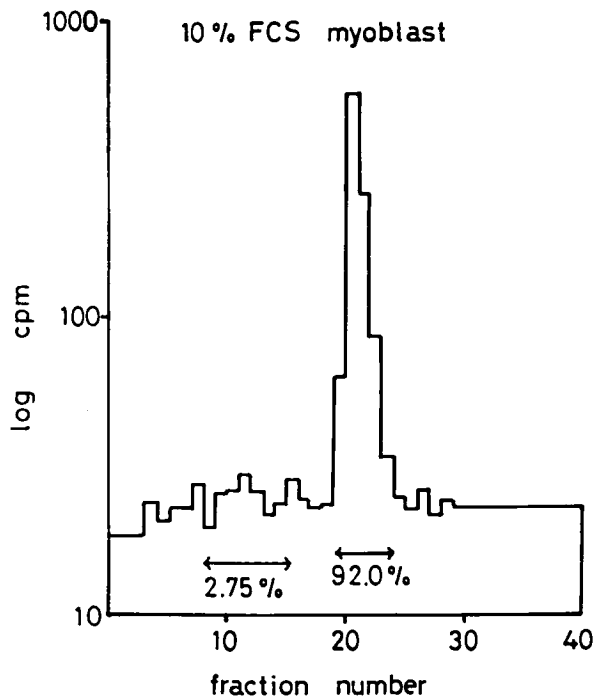


図6　Myoblast 細胞層に移行した ^{14}C－活性の HPLC による解析．2.8% が phospho-creatine となっているにすぎない．

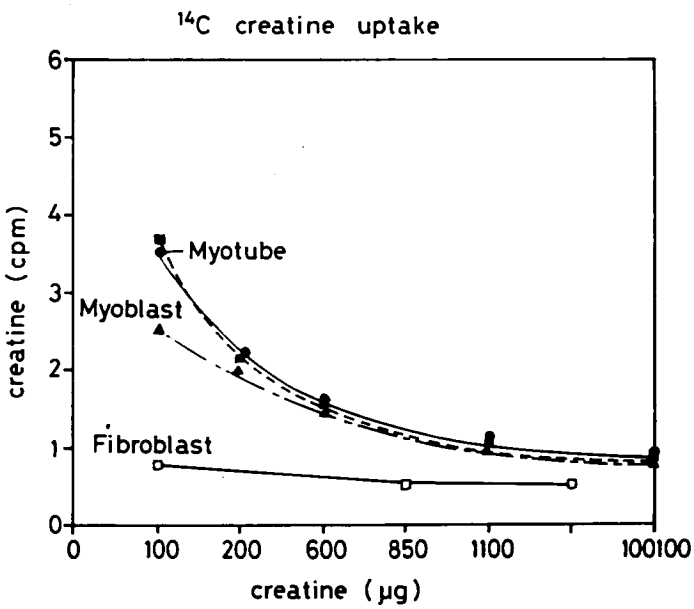


図7　phosphocreatine 量を補正した細胞へのクレアチンのとりこみ．mytube と myoblast でクレアチンのとりこみ能には差が認められない．

は myoblast の段階で既に完成しており，myotube の段階では CK 活性の増加と CK isozyme の変化によって，とりこまれたクレアチンの一部は phosphocreatine として sequestrate されるものと理解される．

この基礎的成績は筋細胞培養の条件の変化（例えば高濃度クレアチン培養）などによって詳細にしたいが，それらをふまえて，今後，ジストロフィー筋細胞について同様の実験を行いたい．さらにまた，ラット筋細胞と人の筋症の各種の非筋細胞との細胞融合（heterokaryon）実験によって研究を進めたい．

文　献

1）Miyoshi K., Taira A., et al. (1982) Altered characteristics of creatine-like activity in skeletal muscle of muscular dystrophies. in Muscular Dystrophy (ed. Ebashi S.), Japan Medical Res Found Pub No.18, Univ. of Tokyo Press, 1982, p199.

2）紫芝良昌，三好和夫，清水多恵子，門脇紀子，小島進，田村克也．
生体内におけるクレアチンの代謝経路：^{14}C－クレアチン腹腔内注射（ラット）にみられる尿中への^{14}C－尿素の排出．筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究．昭和59年度研究報告書，1985，p.213

3）Turner, D.C. et al.：Differentiation in cultures derived from embronic chicken muscle. I. Muscle specific enzyme changes before fusion in EGTA synchronized cultures. Develop. Biol. 48：284－307, 1976.

4）Blau, H.M. et al.：Plasticity of the differentiated state. Science 230：758－766, 1985.

59）筋原性高尿酸血症に関する研究——糖原病III型（脱分枝酵素欠損症）における検討

垂井清一郎*

研究協力者　嶺尾郁夫*　河野典夫*　原尚子*
山田祐也*　川知雅典*　清川裕朗*

はじめに

私共は，糖原病VII型（筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症）において，筋運動時に骨格筋プリン体の異化が著しく亢進し，これに基づいて高尿酸血症が発現することを明らかにしてきた（筋原性高尿酸血症）[1~5]．本病態が，どの程度の広がりをもって代謝性ミオパチーのなかに認められるかを明らかにする目的で，糖原病III型（脱分枝酵素欠損症）について，運動時の筋プリン体の異化代謝と尿酸代謝の変動を検討した．

方法

糖原病III型の同胞例（兄24歳，弟22歳）を対象とした．両症例ともに，乳児期に肝腫を指摘されたが，低血糖や成長障害は認められていない．小児期より比較的激しい運動時に筋の易疲労や脱力を自覚し，筋運動能の障害を訴えている．着色尿（ミオグロビン尿）の既往はない．筋萎縮や筋力低下は認めない．血清クレアチンキナーゼは，兄が6370U/l，弟が3115U/l（正常60－300）と高値を示した．外来における血清尿酸値は，兄は正常であったが（6.0mg/dl），弟は9.5mg/dl（正常3.1－8.3）と高尿酸血症を合併していた．兄について筋生検を行い，グリコゲンの蓄積（69.3mg/g muscle，正常11.4±4.2，mean±SD）と amylo-1,6-glucosidase 活性の欠損（0.6mU/g muscle，正常11.8±0.9）を認め，確定診断を得ている．

既に報告した方法に従い[6]，部分的阻血下前腕運動試験を行い，肘静脈血中のメタボライトの変動を検討した．次に，自転車エルゴメーター運動を実施し，経時的に前腕部よりの採血および採尿を行った．患者の筋症状に応じた適当なインターバルを設けながら，60分間でのべ40分のエルゴメーター運動を行った．運動負荷量は，図1に示すように，軽いものから漸次増強した．

乳酸，尿酸，アンモニアは酵素法で，イノシン，ヒポキサンチンは HPLC 法で分析した[2]．

結果

部分的阻血下前腕運動試験：両症例ともに，肘静脈血中の乳酸はほとんど増加しないが，逆にアンモニアは健常者に比し過大な増加反応を示した（図2）．イノシンやヒポキサンチンも，アンモニアと同様に過大に増加し（図3），糖原病III型患者の骨格筋では運動時にプリン体の異化が著しく亢進することが示された．

自転車エルゴメーター運動：前腕運動試験と同様に，全身の循環系においても，血漿アンモニア（データー示さず）やイノシン，ヒポキカンチンが運動後に速やかに著増した（図4）．しかも，これらのメタボライトの増加に引き続き血漿尿酸値も次第に上昇し，運動終了後2時間には著しい高尿酸血症が認められた（図4）．健常者では，各メタボライトは，ほとんど変動しなかった．エルゴメーター運動における，尿中への尿酸排泄量を表1に示した．両症例ともに，運動中に尿酸排泄は低下することなく，運動後に増加した．このことより，運動に伴う血漿尿酸値の上昇は，腎での尿酸排泄の低下によるものではなく，運動筋由来の

＊大阪大学医学部第二内科

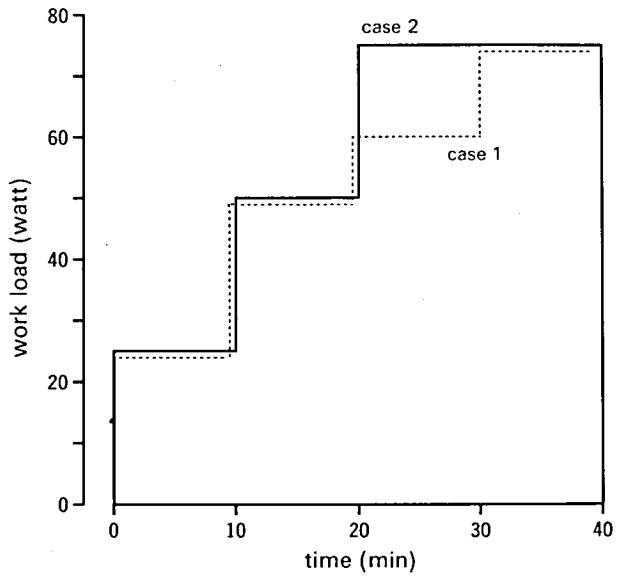


図1　自転車エルゴメーター運動における，糖原病III型患者の運動負荷量（Case 1：兄，Case 2：弟）．

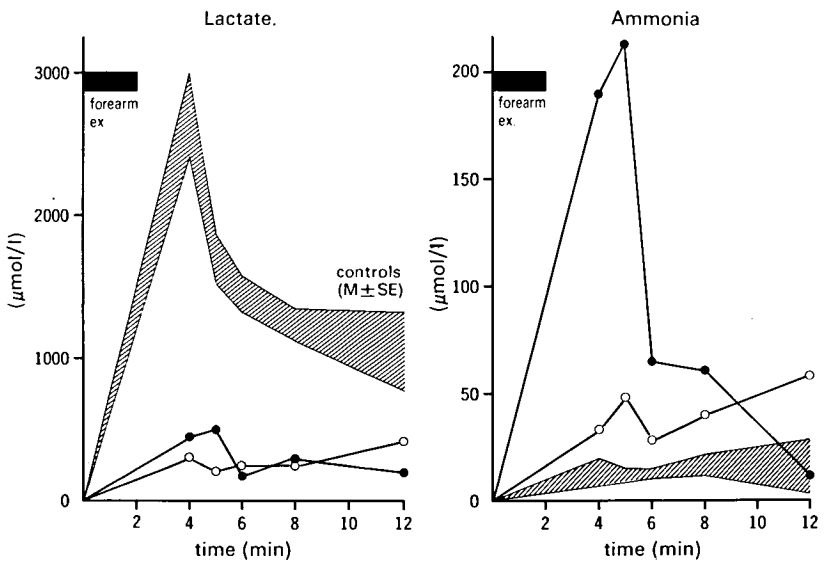


図2　部分的阻血下前腕運動試験における，糖原病III型患者の乳酸とアンモニアの反応（○——○：兄，●——●：弟）．

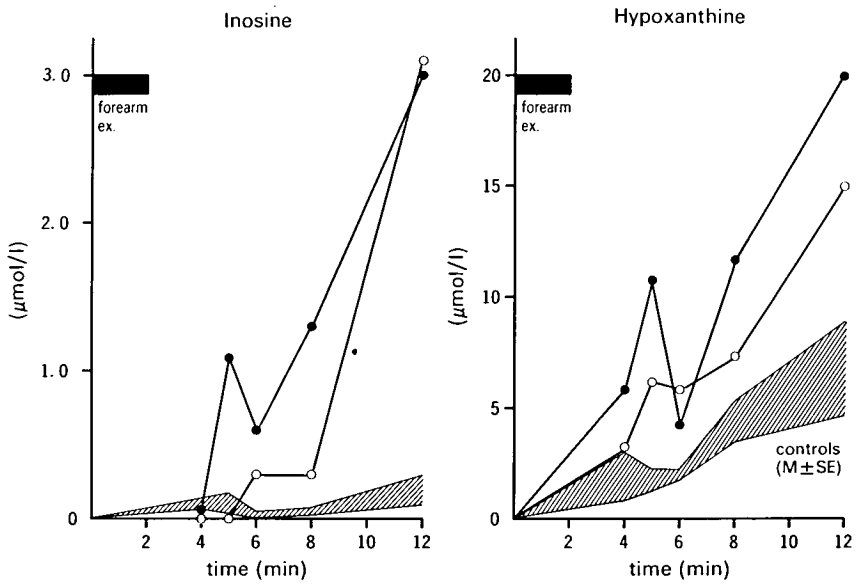


図3　部分的阻血下前腕運動試験における，糖原病III型患者のイノシンとヒポキサンチンの反応（○——○：兄，●——●：弟）．

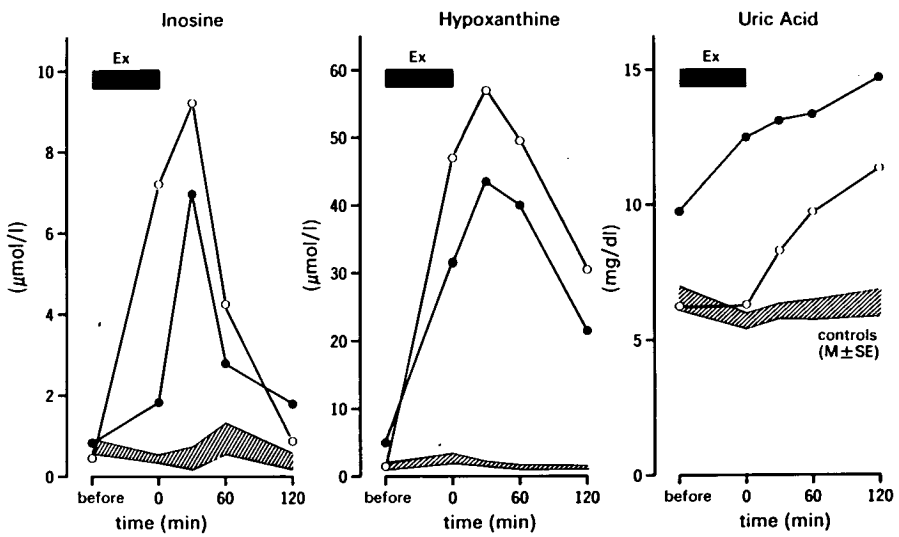


図4　自転車エルゴメーター運動における，糖原病III型患者の血漿イノシン，ヒポキサンチン，尿酸値の変動（○——○：兄，●——●：弟）．

表1　自転車エルゴメーター運動における，糖原病III型患者の尿中への尿酸排泄量（Case 1：兄，Case 2：弟）．

	uric acid/creatinine (mg/mg)		
	Case 1	Case 2	Controls (n=4)
before ex.	0.48	0.62	0.48 ± 0.15
during ex.	0.46	0.70	0.50 ± 0.05
after ex. (0-1 h)	0.45	0.68	0.50 ± 0.10
after ex. (1-2 h)	1.02	1.01	0.48 ± 0.14

イノシンやヒポキサンチンからの尿酸産生が亢進した結果と考えられる．

考　　察

本研究では，糖原病III型患者において，筋運動時に骨格筋プリン体の異化が著しく亢進する結果，高尿酸血症が発現することを明らかにした．糖原病V型（筋ホスホリラーゼ欠損症）においても，同様のプリン代謝異常を認めている[7]．したがって，糖原病VII型をはじめIII型やV型など骨格筋の解糖が障害される病態では，汎く筋原性高尿酸血症が成立するものと考えられる．

糖原病III型は，肝糖原病と筋糖原病の両病態を示し得るが，臨床症状は症例により多様であり，酵素学的にも数種の亜型が存在し複雑である[8]．肝グリコゲンの代謝異常に基づく低血糖や肝腫は，本症の代表的な臨床症状の一つであり，糖原病I型（グルコース6-ホスファターゼ欠損症）に似る．しかし，肝における病態代謝は，I型とIII型とで本質的な違いがみられる．すなわち，低血糖に対するグリコゲン分解は，III型では障害されるが，I型では障害されずに解糖が促進される．また，ペントースサイクルの基質となるグルコース6-リン酸は，I型では著増するが，III型では増加しない．したがって，I型に合併する高尿酸血症の有力な成因とみなされる肝性機序（ATPの分解亢進，ペントースサイクルの促進）を[9]，そのままIII型にあてはめることは無理である．

糖原病III型では，骨格筋にもグリコゲンが蓄積し，本研究で対象とした症例の如く，運動時に筋の易疲労や脱力を示す例がある．この場合，阻血下前腕運動試験において乳酸の増加反応は欠如し，III型の運動筋はVII型と基本的に同じ病態にあるとみなすことができる．実際，本研究で，VII型と同様にIII型患者の運動筋においても，プリン体異化の亢進することが明らかとなった．糖原病III型の報告例のうち高尿酸血症や痛風を合併した症例では，いずれもが筋症状を主徴としており[10][11]，高尿酸血症が筋原性機序に基づいて発現した可能性がつよく示唆される．

本研究では，自転車エルゴメーターを用いた定量的な筋運動によって，III型患者の血漿イノシン，ヒポキサンチン，尿酸が著増することを示した．これらのメタボライトの増分は，VII型患者とほぼ同じであるが，III型患者の行った運動量はVII型患者の約二倍に相当する[12]．すなわち，同一運動量の下では筋プリン体の異化は，VII型に比しIII型では相対的に軽度であると考えられる．これは，VII型ではホスホフルクトキナーゼの欠損によって解糖がほぼ完全に障害されるのに対して，III型では不十分であるがホスホリラーゼによるグリコゲン分解や血中グルコースの利用が可能であるため，解糖障害の程度が比較的軽症であることに基づくと考えられる．また，III型ではVII型に比べて一般に運動時の筋症状が軽く，ミオグロビン尿も伴わないのは，同様の理由によるとされている．今後，筋糖原病各型における高尿酸血症の合併率や重症度について，多数の症例で検討を重ねれば，これらの点も明らかになると考えられる．

結　　語

筋症状を示す糖原病III型の兄弟例を対象に，筋運動時の骨格筋プリン体の異化代謝と尿酸代謝について検討した．外来時の血清尿酸値は，兄は正常であったが，弟に高尿酸血症（9.5mg/dl）の合併が認められた．

部分的阻血下前腕運動試験において，両症例とも肘静脈血中の乳酸はほとんど増加しないが，アンモニア，イノシン，ヒポキサンチンは著増した．軽い負荷量の自転車エルゴメーター運動後にも，全身循環系の血漿アンモニア，イノシン，ヒポキサンチンが著増し，これに引き続き血漿尿酸が増加した（兄11.4mg/dl，弟14.8mg/dl）．尿中への尿酸排泄は，エルゴメーター運動中に低下することなく，運動後に増加した．

糖原病VII型・V型と同様に，III型においても筋原性高尿酸血症が認められた．

文　献

1）Mineo I. Kono N, Shimizu T, Hara N, Yamada Y, Nonaka K and Tarui S：Excess purine degradation in exercising muscles of patients with glycogen storage disease types V and VII. J. Clin. Invest., 76：556－560, 1985.

2）Mineo I, Kono N, Shimizu T, Sumi S, Hara N, Yamada Y, Takahashi M, Nonaka K and Tarui S：Accelerated muscle purine degradation in muscle glycogenoses. A pathogenesis of hyperuricemia in muscle phosphofructokinase deficiency. J. Neurol., 232(supple)：44, 1985.

3）Kono N, Mineo I, Shimizu T, Hara N, Yamada Y, Nonaka K, and Tarui S：Increased plasma uric acid after exercise in muscle phosphofructokinase deficiency. Neurology, 36：106－108, 1986.

4）嶺尾郁夫，河野典夫，原　尚子，清水孝郎，山田祐也，川知雅典，垂井清一郎：筋原性高尿酸血症．糖原病VII型に見い出された新しい病態．尿酸　9：134－138，1985.

5）河野典夫：筋原性高尿酸血症．新内科学体系（年刊版 '86-B），中山書店，p255－271，1986.

6）Mineo I, Kono N, Shimizu T, Sumi S, Nonaka K and Tarui S：A comparative study on glucagon effect between McArdle disease and Tarui disease. Muscle Nerve, 7：552－559, 1984.

7）Kono N, Mineo I and Tarui S：Hyperuricemia in type V glycogenosis. Neurology (in press).

8）Wyngaarden JB, Kelley WN：Gout. In；The Metabolic Basis of Inherited Disease, McGraw-Hill, p 1043－1114, 1983.

9）Howell RR, Williams JC：The glycogen storage disease. In；The Metabolic Basis of Inherited Disease, McGraw-Hill, p 141－166, 1983.

10）Brunberg JB, McCormic WF, Schochet SS：Type III glycogenosis. An adult with diffuse weakness and muscle wasting. Arch. Neurol., 25：171－178, 1971.

11）Murase T, Ikeda H, Muro T, Nakao K, Sugita H：Myopathy associated with type III glycogenosis. J. Neurol. Sci., 20：287－295, 1973.

12）垂井清一郎：糖原病VII型における高尿酸血症の成因――筋運動による尿酸産生の亢進．筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究（杉田班）．昭和60年度研究報告書，p311－314，1986.

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

杉田秀夫*

研究協力者　石浦章一*　山本真理*

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）患者血清中の各種アミノペプチダーゼ活性は，臨床症状の進行に伴って増減することが報告され，診断および病期の指標となり得ることが知られている[1]．

今回，我々は数種のアミノアシルMCAを切断するアミノペプチダーゼ活性が患者血清中で亢進しており，これが単一の酵素によるものであることを認めたので報告する．

対象および方法

対象は健常人およびDMD患者各3名とした．

方法は，健常人およびDMD患者血清各4 ccを高速液体クロマトグラフィー（TSK3000SWGカラム，以下HPLCと略す）によって画分し，各フラクション毎にGlu-MCA（アミノペプチダーゼAの基質），Arg-MCA（アミノペプチダーゼBの基質），Leu-MCA（ロイシンアミノペプチダーゼの基質）の水解活性を測定した．次に，これらの活性が最大となるフラクションを，さらにDEAE-セルロースカラムおよびハイドロキシアパタイトカラムを用いて部分精製した．

なお，血清中の酵素活性と比較する目的でヒト骨格筋中のアミノペプチダーゼ活性も測定した．すなわち，ヒト骨格筋に5mMリン酸緩衝液（pH7.0）を加えWaring blenderでhomogenizeした後，8,000gで10分間遠心した．上清4 ccを血清同様にHPLCによって画分し，フラクション毎に活性を測定した．

結果

健常人血清をHPLCによって画分したところ，分子量96,000に相当する画分（矢印）にArg-MCAとLeu-MCAを水解するピークをひとつ得た（図1 a）．DMD血清でも同様の画分（矢印）にArg-MCAとLeu-MCAを水解するピークを得たが，これは健常人のものと比較して明らかに増高していた（図1 b）．

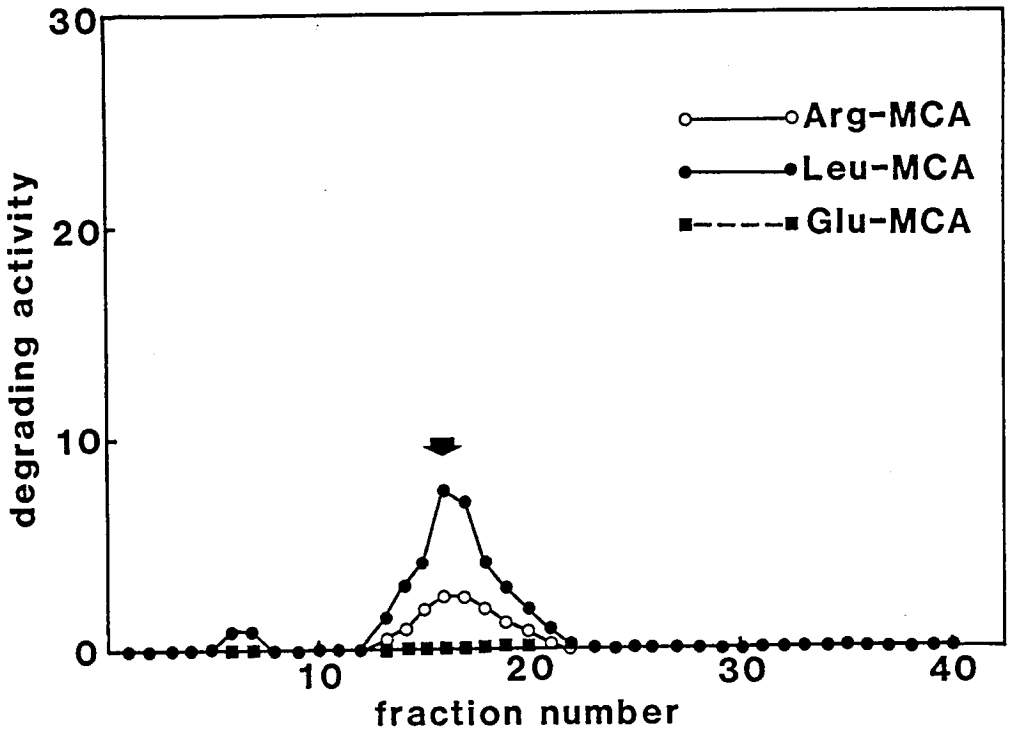
本ピークを中心に各基質を水解する活性の総和を健常人血清とDMD患者血清で比較すると，Arg-MCAとLeu-MCAを基質とする活性はDMD患者で有意（$p<0.005$）に増加していた（図2）．

HPLCで得られたピークはDEAE-セルロースカラム（図3：健常人血清），ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにおいても単一に溶出され，Arg-MCA水解活性とLeu-MCA水解活性を分離できなかった．

なお，ヒト血清中にはArg-MCAだけを特異的に水解するアミノペプチダーゼBやGlu-MCAを水解するアミノペプチダーゼA活性はほとんど検出されなかった．

一方，ヒト骨格筋ではHPLCによって，アミノペプチダーゼBが認められた他に，血清同様Arg-MCAとLeu-MCAの両方を水解するアミノペプチダーゼが存在した（図4，矢印）．後者は，DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーでもやはり単一に溶出された（図5）．

*国立精神神経センター神経研究所



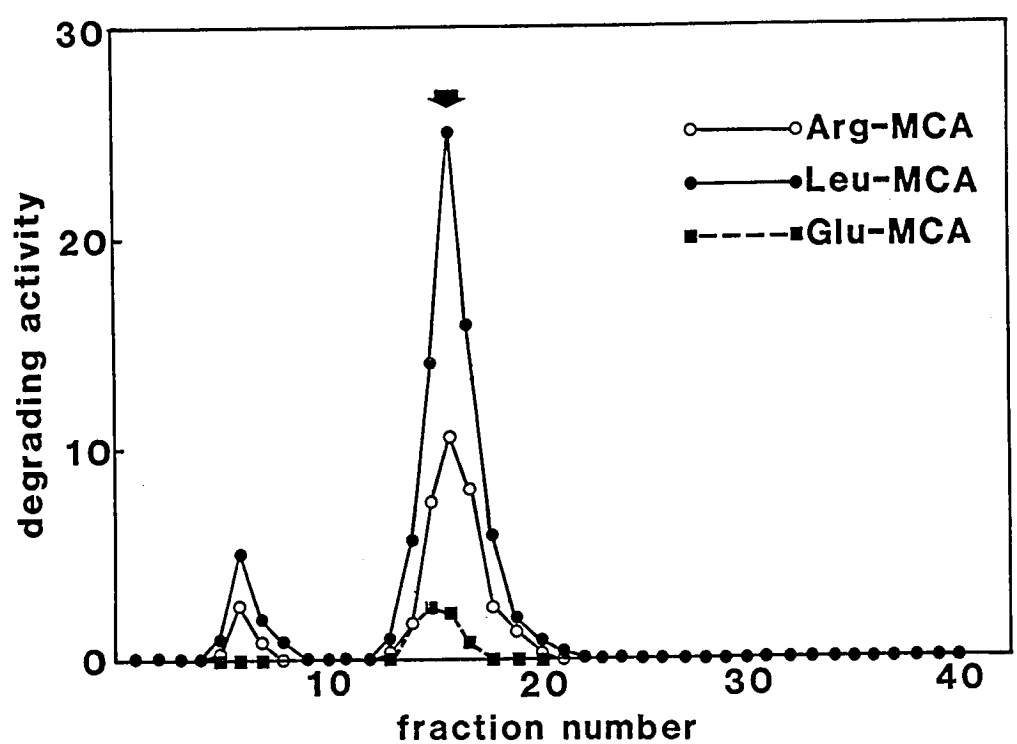


図1　HPLCによる健常人血清(a)，DMD血清(b)画分におけるアミノペプチダーゼ活性

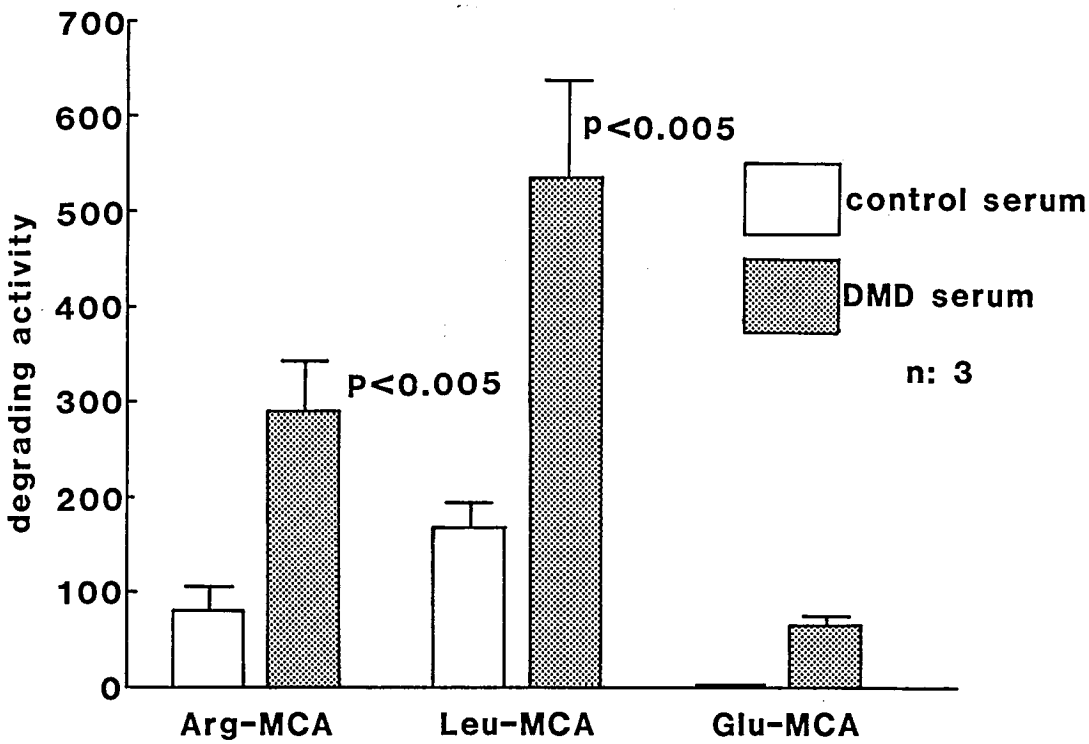


図2　健常人と DMD 患者との活性の比較

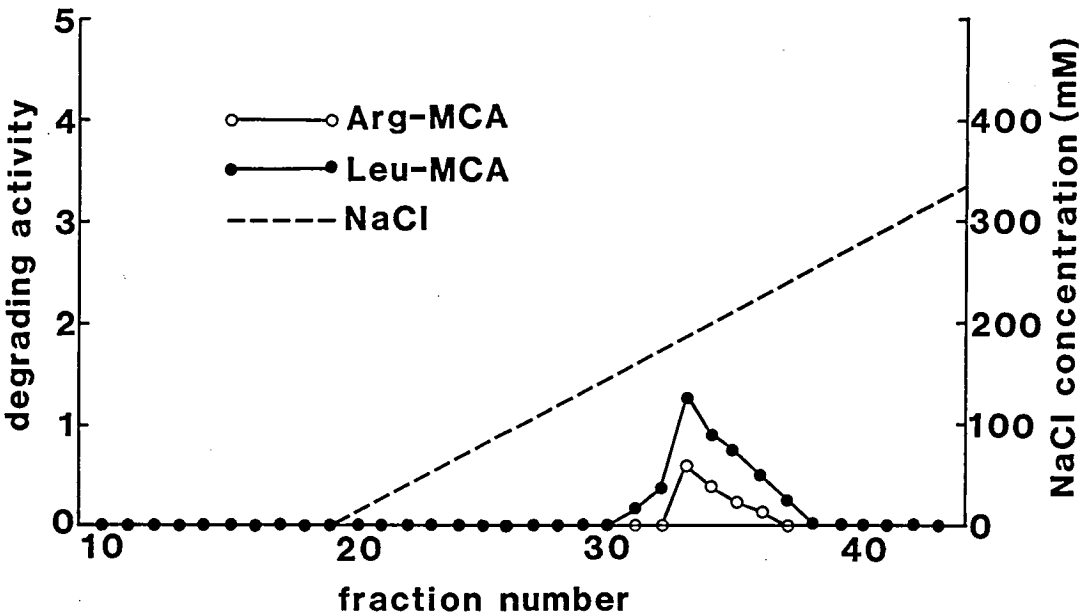


図3　健常人血清の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

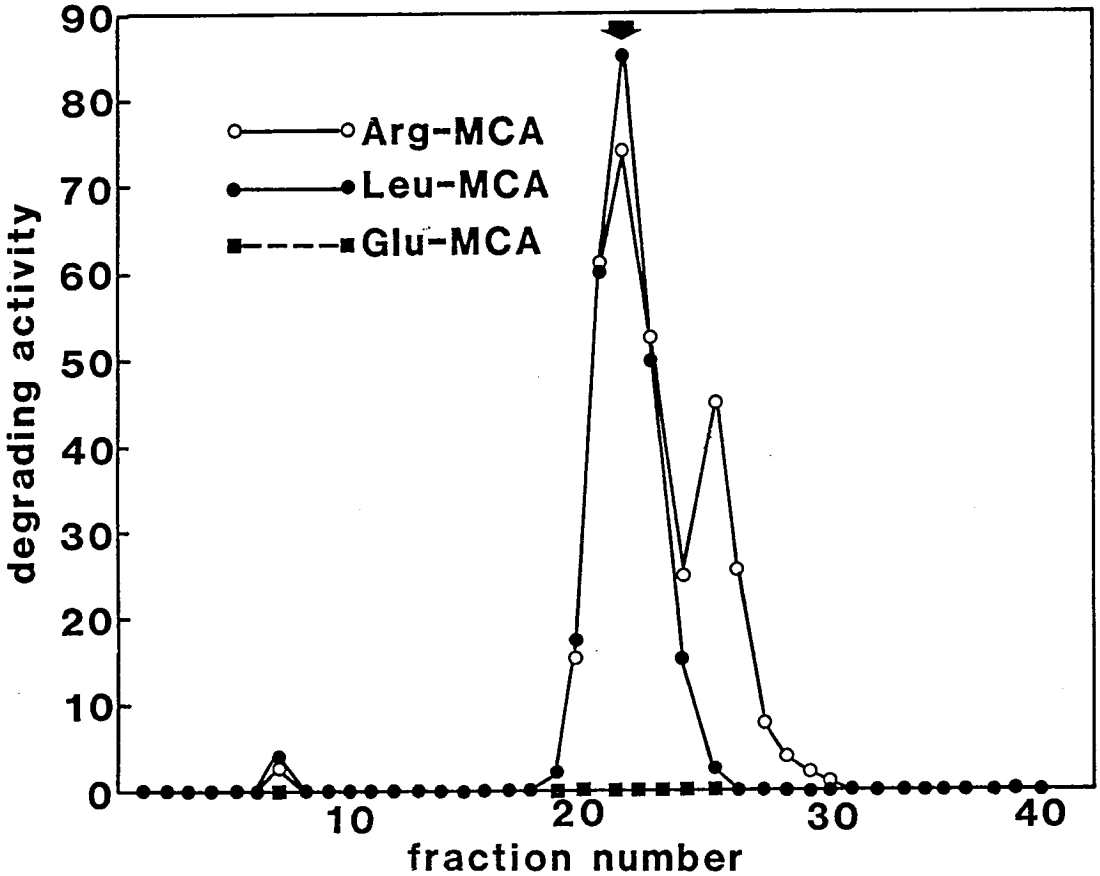


図4　HPLCによるヒト骨格筋画分におけるアミノペプチダーゼ活性

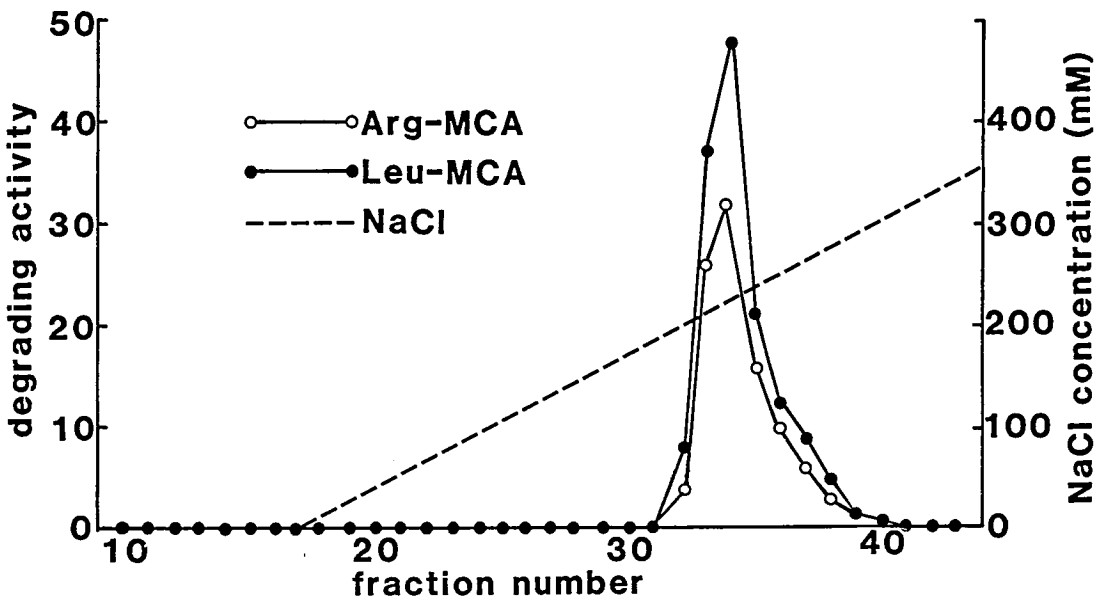


図5　ヒト骨格筋のDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

考　　察

ヒト血清中では，アミノペプチダーゼAとBはほとんど検出されず，Arg-血清，Leu-血清の両方を水解する単一の酵素が存在していた．これは，アミノペプチダーゼM様酵素と考えられ，骨格筋中にも多く存在することが明らかとなった．

このアミノペプチダーゼM様酵素活性は，DMD患者において健常人と比較して有意（$p<0.005$）に高く，新たな診断指標として使用可能であることが示唆された．

今後，例数を積み重ね臨床経過との関連等を検討する予定である．

文　　献

1）Aoyagi T, Wada T, Kojima F, Nagai M, Miyoshino S, and Umezawa H.
Two different modes of enzymatic changes in serum with progression of Duchenne muscular dystrophy. Clinica Chimica Acta 1983, 129 : 165-173.

61) 先天性ミオパチーの筋構造蛋白
——Central core 病と Myotubular (Centronuclear) myopathy を中心に——

小口　喜三夫*

研究協力者　武田伸一**　庄司進一**
柳沢信夫**　埜中征哉***

はじめに

新生児期あるいは乳児期早期より筋緊張と筋力低下をみる神経筋疾患のうち，明らかな神経原性の要因が加味されず，しかも筋の変性所見に欠ける一連の疾患が存在し，先天性ミオパチーと呼ばれてきた．この先天性ミオパチーには，Nemaline myopathy, Central core 病，Myotubular (Centronuclear) myopathy, 先天性筋線維タイプ不均等症などが含まれるが，何れも遺伝学的には常染色体優性遺伝の形式をとる事が多く，臨床的にはいわゆる floppy infant の像を示し，乳児期の運動発達の遅れがあり，日常生活に多少の障害はあるが，症状は非進行性である例が多い．このように遺伝学的にも臨床像からも鑑別が不可能な先天性ミオパチーは，その形態学的特徴により分類されてきた．筋線維内に各病型特有の異常構造物を認める事が顕著な所見であるが，組織化学的には，ファイバータイプの分化の異常を共通して認める事が知られている．従って，組織学的には異なるが，臨床症状の類似性，組織学的所見の共通性から，先天性ミオパチーの各病型は，病因的には近い位置にあると考えられている．

我々は，先天性ミオパチーのなかでも，頻度が高く良く研究されてきた Nemaline myopathy について，生検筋の二次元電気泳動による分析を行なってきた．type 1 fiber のみを呈した症例の分析で，fast form の L 鎖 2 のみを欠如した特異な構成を認め[1]，単一筋線維のレベルでも同一の構成を確認し[2]，家族例の複数筋の検索から，slow form 優位の筋への変換を示唆する所見を明らかにしている[3]．

今回は，Nemaline myopathy と共通してファイバータイプの分化の異常を呈する Central core 病及び Myotubular (Centronuclear) myopathy について，生検筋の筋構造蛋白の二次元電気泳動法を用いた分析を行なったので報告する．

対象と方法

Central core 病 5 例及び Myotubular myopathy 4 例の生検筋を対象とした（表 1 及び 2）．

(1)組織学的・組織化学的検索：生検筋の凍結切片について，hematoxylin-eosin 染色，Gomori-trichrome 染色，NADH-TR 染色，ATPase 染色などを施行した．

(2)筋構造蛋白の分析：生検筋凍結標本の厚切り切片 1 ～数枚を材料として，O'Farrell の lysis buffer 下で充分に homogenize した後，等電点電気泳動から SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動への二次電気泳動[2] を行ない，銀染色法（Oakley 変法）により検出した．記録はポラロイドシステムを用いた．

結　果

(1) Central core 病

A. 組織学的・組織化学的所見：全例で，myopathic change と共に多くの筋線維で core

＊国立長野病院
＊＊信州大学第三内科
＊＊＊国立精神神経センター神経研究所

表1　Central core 病5症例のまとめ

Case	Age	Sex	Histology	Histochemistry
1	3	F	myopathic change core formation	type 2 fiber deficiency
2	3	M	myopathic change core formation	type 2 fiber deficiency
3	8	F	myopathic change core formation	type 2 fiber deficiency
4	10	F	myopathic change core formation	type 1 fiber predominance (90 %)
5	12	F	myopathic change core formation	type 2 fiber deficiency

Case 1-4　National Institute for Nervous, Mental & Muscular Disorders (Dr. Nonaka)

Case 5　Sapporo Medical College (Dr. Tachi)

表2　Myotubular myopathy 4症例のまとめ

Case	Age	Sex	Histology	Histochemistry
1	2	M	myopathic change increased number of internal nuclei	type 1 fiber predominance (88 %)
2	18	F	myopathic change increased number of internal nuclei	type 1 fiber predominance (90 %)
3	32	F	myopathic change increased number of internal nuclei	type 1 fiber predominance (70 %)
4	40	M	myopathic change increased number of internal nuclei	type 1 fiber predominance (70 %)

Case 1-3　National Institute for Nervous, Mental & Muscular Disorders (Dr. Nonaka)

Case 4　Shinshu University School of Medicine

formation を認め，組織化学的には，症例4で高度の type 1 fiber predominance を認めた以外は type 2 fiber の deficiency を認めた（表1）．

B．筋構造蛋白の構成：Myosin L 鎖について2通りの構成を認めた．type 2 fiber deficiency を呈した症例3の二次元電気泳動像を図1に示した．Myosin L 鎖については，slow form の L 鎖1と2を主体とし，fast form の L 鎖1と3を混ずるが，fast form の L 鎖2のみを欠如する hybrid 構成を認めた．Troponin C については，slow form のみが存在し，Nemaline myopathy で増加していた Desmin を始め，Actin, Tropomyosin には変化がなかった．高度の type 1 fiber predominance を認めた症例4及び，症例5でも，Myosin L 鎖と Troponin C について，同じ構成を認めた．

一方，同じ type 2 fiber の deficiency を認めた症例1の二次元電気泳動像（図2）を示した．Myosin L 鎖については，slow form の L 鎖1と2のみが存在し，pure slow な構成を示した．ヒト骨格筋は，fast form と slow form の mixed 構

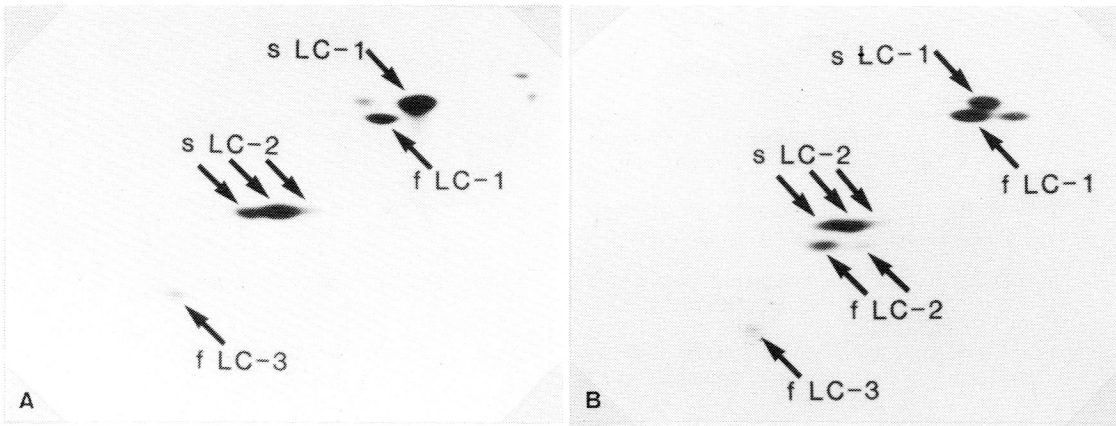


図3　Myotubular myopathy 生検筋の二次元電気泳動像.
A：症例2，B：症例1．二次元電気泳動の Myosin L 鎖の部分を示す．症例2では，slow form 優位の hybrid 構成，症例1では全 isoform が存在する mixed 構成を示した．

成を呈する事が特徴であり，pure slow 構成は，正常筋でも他の疾患筋でも報告されていない．Troponin C も slow form のみが存在し，他の筋構造蛋白には著変なかった．症例2でも，Myosin L 鎖と Troponin C について同じ構成を認めた．

(2) Myotubular（Centronuclear）myopathy

A．組織学的，組織化学的検索：全例で，myopathic change に加えて internal nuclei の増加と，70～90%の type 1 fiber predominance を認めた．

B．筋構造蛋白の構成：生検筋の二次元電気泳動による分析では，ミオシン L 鎖について，2種類の構成を認めた．type 1 fiber が90%を占めた症例2では，slow form の L 鎖1，2が主体で，fast form の L 鎖1，3を混じ，fast form の L 鎖2を欠如する hybrid 構成であった．この構成は，Nemaline myopathy や Central core 病で認めた構成であるが，相違点は，Sample の量をふやしたり，銀染色の程度を強くすると，わずかではあるが，fast form の L 鎖2に相当する spot が認められた事である．Troponin C については slow form のみが存在していた（図3）．

一方，type 1 fiber predominance が70～88%であった症例1，3，4では，Myosin L 鎖について，fast form の L 鎖1，2，3と slow form の L 鎖1，2が全て存在し，mixed の L 鎖構成を示した．Troponin C についても，fast，slow 両 form を認め，他の構造蛋白については，Desmin を含めて著変なかった．

(3)先天性ミオパチー各病型の比較

Central core 病，Myotubular myopathy 及び，Nemaline myopathy の Myosin L 鎖構成を比較したのが，図4である．Central core 病では，slow form の L 鎖1，2のみから成る pure slow 構成あるいは，fast form の L 鎖2のみを欠如した hybrid 構成の何れかを呈した．Nemaline myopathy では hybrid 構成を主体として，一部の生検筋で，fast と slow の全 isoform を備えた mixed 構成を示した．一方，Myotubular myopathy では，mixed の構成を取る事が多いが，一部の生検筋では fast form の L 鎖2が存在したとしても非常に少ない hybrid 構成をとる事が明らかにされた．

考　　察

Central core 病と Myotubular myopathy を中心とした先天性ミオパチー生検筋の筋構造蛋白の分析から次のような諸点が明らかにされた．

(1)先天性ミオパチー生検筋では，組織化学的な検索と Myosin L 鎖の構成に凡の対応がある．

(2)先天性ミオパチー骨格筋では，ヒト骨格筋の特

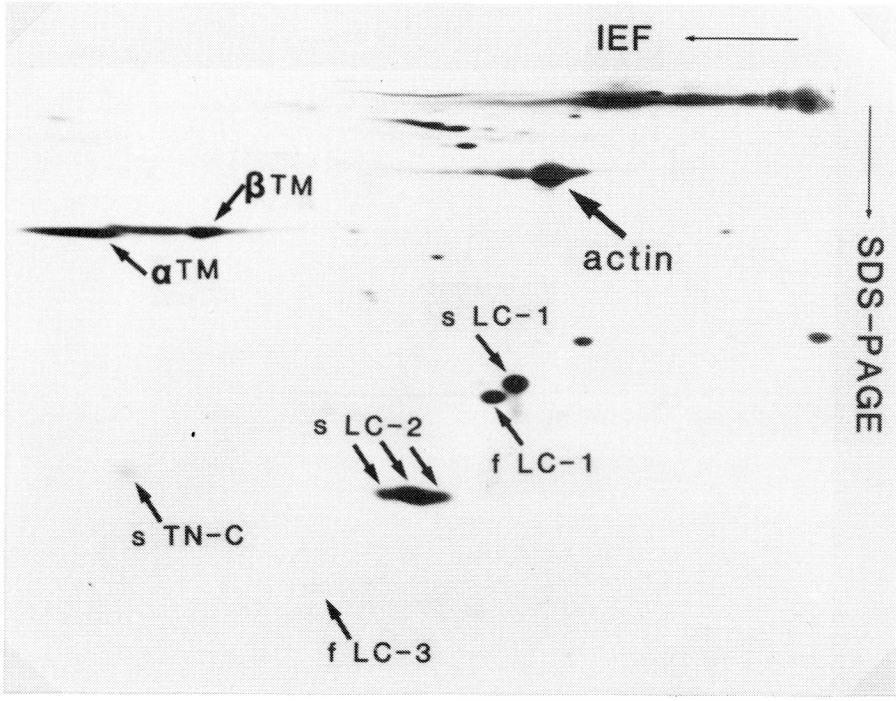


図1　Central core 病生検筋の二次元電気泳動像（症例3）.
　等電点電気泳動（IEF）から SDS-PAGE への二次元像を示す．Myosin の L 鎖（LC）1，2，3，Actin, Tropomyosin（TM), Troponin C（TN-C）の各 spot が示されている．slow form（s）優位で fast form（f）を混ずる hybrid 構成を認める．

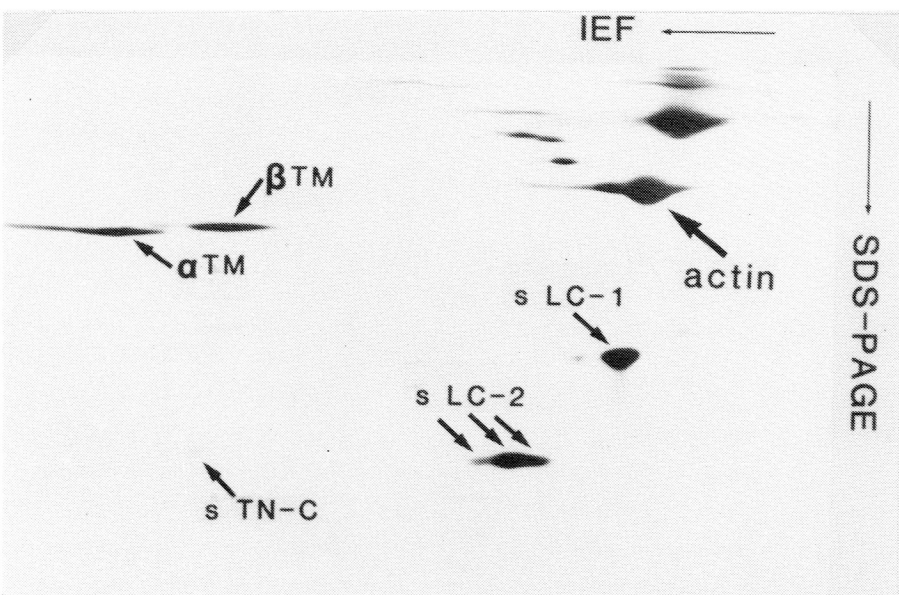


図2　Central core 病生検筋の二次元電気泳動像（症例1）.
　Myosin L 鎖について slow form のみから成る pure slow 構成を認める．

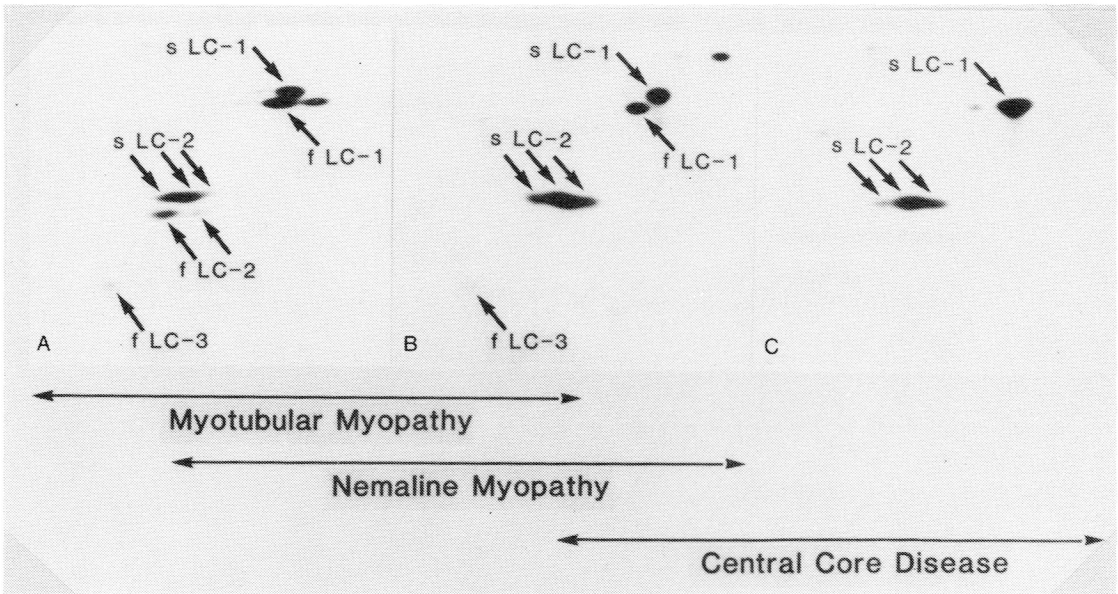


図4　先天性ミオパチー各病型の Myosin L 鎖構成の比較.
図の上半に Myosin L 鎖の構成を，下半に各病型との対応を模式的に示した．A は，fast form と slow form の混在する mixed 構成，B は slow form 優位の hybrid 構成，C は slow form のみの pure slow 構成を示す．

徴である fast と slow の mixed 構成から，slow form 優位の slow myscle への変換が示唆される．
(3)先天性ミオパチーの各病型に注目すると，純粋な slow muscle に近い側から，Central core 病，Nemaline myopathy, Myotubular myopathy の順に並べる事ができる．
(4) slow muscle への変換について，最も重要な鍵を握るのは，Nemaline myopathy の分析結果から注目してきた Myosin の fast form の L 鎖 2 であると考えられる．

slow muscle への変換という考え方は，Nemaline myopathy の報告[4]でも注目され，Myosin H 鎖の分析でも指摘されてきた[5),6)]．疾患筋や実験動物を問わず，slow muscle への変換が明らかにされている系としては，① development ② denervation ③ cross reinnervation ④ chronic electrical stimulation ⑤ hypothyroidism を挙げる事ができる[7)]．このうち，ニワトリ ALD の development に伴なう Myosin L 鎖の変化をみると[8)]，成鶏ではほぼ pure な slow muscle となって，slow form の L 鎖 1，2 から成る構成を示すが，鶏胚初期には，fast form の L 鎖 1，2 が共存し，L 鎖 2 は比較的早期に消失するが，L 鎖 1 は孵化後もかなり長期間残存する．Rat の chronic electrical stimulation の実験系[9)]でも，骨格筋が slow muscle に変換する過程で，最初に fast form の L 鎖 2 が消失し，続いて L 鎖 1 の消失が起こるとされる．こうした実験系との対照及び従来から行なわれてきた組織化学的な検討から，先天性ミオパチー骨格筋 Myosin L 鎖の構成も slow muscle への変換として説明可能なように思われる．しかも，先天性ミオパチーの各病型は，Myosin の分化という点からみて，ごく近接した疾患である可能性が高く，病因としても，共通して神経系の要因を考える必要がある．具体的には，type 2 fiber 支配神経の denervation と type 1 fiber 支配運動ニューロンの異常発火の可能性が考えられる．前者については，fast form の維持には必ずしも神経系の関与が必要でないため，fast form の消失を説明できにくい．後者の可能

性は残るが，少なくとも神経生理学的に運動ニューロンの異常発火を示唆する所見は得られておらず，今後の検索が注目される．特に slow form への変換では神経の役割が重視されてきたが，最近，培養系を用いた検索により，Myosin H 鎖の胚型から成人型への変換には，神経と筋の contact ではなく，培地上に脊髄が存在する事が重要である事が明らかにされてきた[10]．今後は，神経系の持つ trophic factor としての意義にも注目しながら研究を進める必要があると考えられる．

要約並びに結論

1．Central core 病5例，Myotubular (Centronuclear) myopathy 4例の生検筋について，筋構造蛋白の二次元電気泳動法による分析を行なった．

2．Central core 病では，Myosin L 鎖について，slow form のみから成る pure slow 構成の場合と，slow form を主体とし，fast form が混在するが，fast form の L 鎖2のみを欠如する hybrid 構成の場合とを認めた．

3．Myotubular myopathy では，fast, slow の全 isoform が存在する mixed 構成の場合と，hybrid 構成の場合とを認めた．

4．先天性ミオパチー骨格筋では，少なくとも Myosin L 鎖について slow muscle への変換が予想され，共通した病因として神経系の関与が注目された．

文　献

1）武田伸一，堀米啓一，中台　昭，小口喜三夫，柳沢信夫：タイプ I 線維のみを呈し特異なミオシン L 鎖構成を認めたネマリンミオパチーの1例．臨床神経，26：119，1986．

2）庄司進一，武田伸一：Nemaline myopathy の筋構造蛋白．“筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究，昭和59年度研究報告書”（班長・杉田秀夫）1985，pp197-202．

3）Takeda, S., Shoji, S. and Yanagisawa, N.: Abnormal hybrid pattern of myosin light chains was maintained in type 1 fiber of skeletal muscle from nemaline myopathy——Single fiber analysis of biopsied materials by two-dimensional electrophoretic analysis, (abst) 6th International congress of neuromuscular diseases, Los Angeles, USA, July, 1986.

4）Volpe, P., Damiani, E., Margreth, A., Pellegrini, G. and Scarlato, G.: Fast to slow change of myosin in nemaline myopathy: Electrophoretic and immunologic evidence. Neurology (NY), 32: 37, 1982.

5）Biral, D., Daimiani, E., Margreth, A., Scarpini, E. and Scarlato, G.: Slow myosin heavy chain isozyme in nemaline myopathy. Neurology, 35: 1360, 1985.

6）萬年　徹，清水輝夫，中瀬浩史：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．“筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究，昭和60年度研究報告書”（班長・杉田秀夫）1986，pp330-333．

7）Bandman, E.: Myosin isoenzyme transitions in muscle development, maturation and disease. Int. Rev. Cytolo., 97: 97, 1985.

8）江橋節郎，三川　隆，大日方　昂，真崎知生，大室弘美：ミオシン H 鎖及び L 鎖 isoform の発生過程における発現様式．“筋の発生と分化に関する基礎的研究，昭和56年度研究報告書”（班長・江橋節郎）1982，p113．

9）Brown, W. E., Salmons, S., and Whalen, R. G.: The sequential replacement of myosin subunit isoforms during muscle type transformation induced by long term electrical stimulation. J. Biol. Chem., 258: 14686, 1983.

10）Ecob, M. and Whalen, R.: The expression of myosin heavy chain isoforms in a nerve-muscle culture system. “Molecular Biology of Muscle Development” Alan R. Liss, Inc., 1986, p273.

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

萬 年 徹*

研究協力者 清 水 輝 夫* 中 瀬 浩 史*

はじめに

ネマリンミオパチーでは特異な桿状体の出現・Dipeptidyl Peptidase I 欠損[1]に加えミオシン分子の発生異常[2)3)]が示唆されている．ネマリン桿状体にはアクチンフィラメントとZ帯構成蛋白であるα-アクチニンが含まれ，アクチンやZ帯構成蛋白の形態形成又はその崩壊過程の異常が考えられている．しかしながらそれのみではなくミオシン分子の発生・発現にも変化が見られ，組織化学的ATPアーゼ活性でみてタイプ1線維が優位であって免疫化学的に遅筋型ミオシンから成っていると，電気泳動法でも遅筋型ミオシン軽鎖MLCが優位であることが示されてきた．近年武田らは二次元電気泳動法を用いタイプ1型線維群のMLCを分析した所，pure slow form（MLC $C_{1(S)}$ と $MLC_{2(S)}$）の場所のみでなく，mixed form（$MLC_{1(s+f)}$, $MLC_{2(s+f)}$, MLC_3）やhybrid form（$MLC_{1(s+f)}$, MLC_{2S}, MLC_3）が存在することを示し，タイプ1線維でもslow formだけではなく，色々な割合でfast formが混じるような発現をしていることを示した．

私共は特異性の高い単クローン抗体をミオシン重鎖MHCに対して作成し，MHCの免疫組織学的検討をタイプ2C，1線維を中心に行なった．

方 法

ヒト剖検材料大腿四頭筋，ヒラメ筋，12日目トリ胸筋の粗ミオシン分画をBalb/cマウスに免疫後，脾臓細胞をとり出しP3U-1細胞株とPEG-4000により細胞融合しハイブリドーマ細胞株を確立した．その中よりQM355，E35-3，SM 1-11-2を選び実験に供した．これらの抗体はいずれもイリノブロット法でMHCに特異的に反応することを確認した上でコントロールおよびネマリンミオパチー生検材料（上腕＝頭筋）を間接螢光抗体法にて検討した．

結 果

QM355は成人骨格筋のタイプ1，2A，2B線維のすべてを均等に認識した．他に心室・心房・外眼筋をも強く染めたが，平滑筋・神経系は全く認識しなかった．E35-3はタイプ2A，2B線維を等しく認識するがタイプ1線維を認識しなかった（図1）．また，外眼筋を染めたが，心房・心室・平滑筋・神経系は染めなかった．SM 1-11-2はタイプ1線維を認識し，2A・2B線維を認識しなかった（図2）．また，心房・心室・一部の外眼筋線維を染めたが神経系は染めなかった．以上の結果からQM355は横紋筋をすべて認識すると考えられ，E35-3は速筋型（2型）MHCを，SM 1-11-2は遅筋型（1型，slow-twitch）MHCをそれぞれ認識すると考えられる．

幼若期の骨格筋を検討した所，胎生15週ではすべての線維が2C線維でありQM355とE35-3はすべての線維を認識していた．SM 1-11-2はすべてではなく一部の線維を認識しており，すでにこの時期において分化が始まっていることが判明した．胎生35週では多くのタイプ2C線維と一部のタイプ1線維とに分別され，QM355とE35-3はすべての線維を認識，SM 1-11-2はタイプ

＊東京大学医学部脳研神経内科

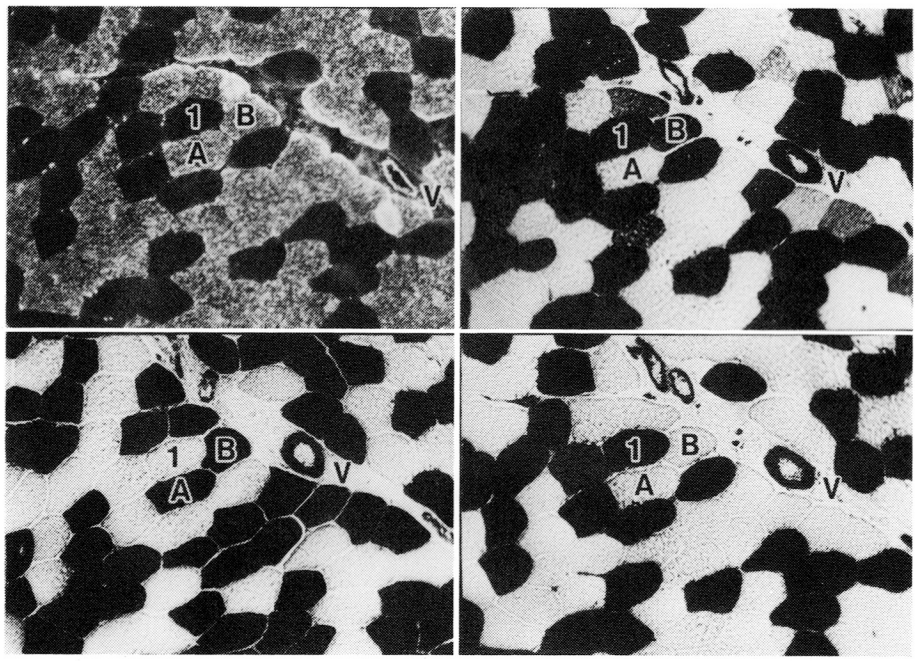


図1　E35-3の特異性．左上；コントロール上腕二頭筋10μmの間接螢光抗体法．左下；routine　ATPase染色．右上；ATPase染色（pH4.6）．右下；ATPase染色（pH4.3）．1；タイプ1線維．A；タイプ2A線維．B；タイプ2B線維．V；血管（小動脈）．Vでひかっているのは内皮層で色調の遠いから非特異的反応である．

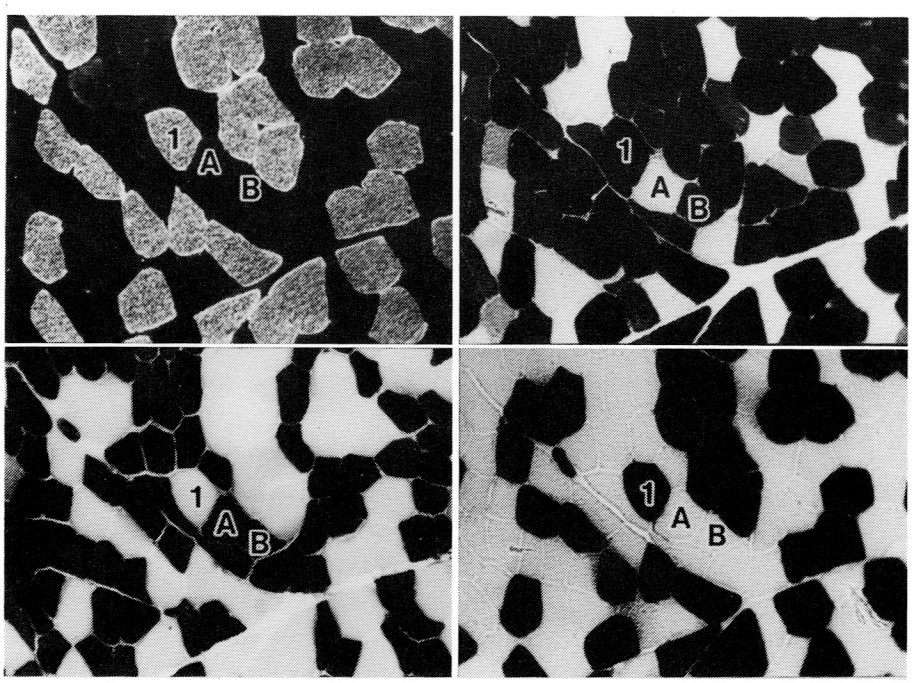


図2　SM 1-11-2の特異性．図1と同じ構図である．

表1　単クローン抗体3種類のSpecificity.
＊印はtransitional type 1 fiberである.

	17　週	35　週	成　人	心　房	心　室	血　管
QM355	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)
E35−3	2C(+)	2C(+) 1(+)*	2A, 2B(+) 1(−)	(−)	(−)	(−)
SM1−11−2	2C(−, +)	2C(−) 1(+)*	2A, 2B(−) 1(+)	(+)	(+)	(−)

表2　ネマリン・ミオパチー患者2例の上腕二頭筋の分析

タイプ分類	E35−3	SM1−11−2	8月男	36才女
1	+	−	5	0
	+	+	18	0
	−	+	537	297
2C	+	−	54	2
	+	+	20	2
	−	+	0	1
2A	+	−	359	5
	+	+	0	1
2B	+	−	2	0
総　数			995	308

1線維のみを認識していた．従って15週・35週からみるかぎり免疫学的には2種類の線維があって，(1) QM355陽性，E35-3陽性，SM 1-11-2陰性の線維と(2) QM355陽性，E35-3陽性，SM 1-11-2陽性の線維である．(1)は組織化学的に2Cであり幼若型と考えられる．(2)は組織化学的に2Cまたは1であり成人型の遅筋線維とのtransitional stageで幼若型MHCと遅筋型MHCとの両者を同時に発現していると考えられる．従って基本的にSM 1-11-2は遅筋型MHCを認識しE35-3は速筋型と幼若型とを認識すると考えてよい．QM355はそのすべてを認識している．これらの結果を**表1**にまとめる．

これらの抗体をつかいネマリンミオパチー2症例の上腕二頭筋を検討してみた(**表2**)．第一例は生後8ヶ月男児で995本の筋線維を検討した．タイプ2C線維74本，タイプ1線維560本，タイプ2A線維359本，タイプ2B線維2本であった．検索した多くの2C線維はE35-3陽性でSM 1-11-2陰性で純幼若型MHCのみを発現していた（図3➡印）．しかし74本中20本はE35-3陽性であると同時にSM 1-11-2も陽性でありtransitional fiberであった(図3▶印)．タイプ1線維をみるとE35-3陰性でSM 1-11-2陽性を示し成人型遅筋MHCと思われる線維が圧倒的に多い（537／560，図3▲印）が，560本中18本はE35-3陽性・SM 1-11-2陽性でありtransitional fiberであった(図3↑印)．さらに極めて稀であったがE35-3のみ陽性のタイプ1線維もあり非常に特殊な遅筋型ミオシンの発現があるのかもしれないが，あまりにも少なくその意味づけは今後の検討課題としている．

以上の結果から組織化学的ATPアーゼ活性から分類されるタイプ2C・1線維は免疫学的に分類されるMHCの類型分類と必ずしも一致していない．従ってMHCの分類からみなおすと，(1)組織化学的にタイプ2Cまたは1線維と分類される634本中で，E35-3のみ陽性の線維（純幼若型）が59本（9%），(2) E35-3とSM 1-11-2とが陽性の線維（transitional fiber）が38本（6%），(3) SM 1-11-2のみ陽性の線維(成人の遅筋型と同一線維）が537本（85%）であった．従って遅筋型MHCの発現は非常によく保たれていることがわかる．これは従来のデータとよく一致す

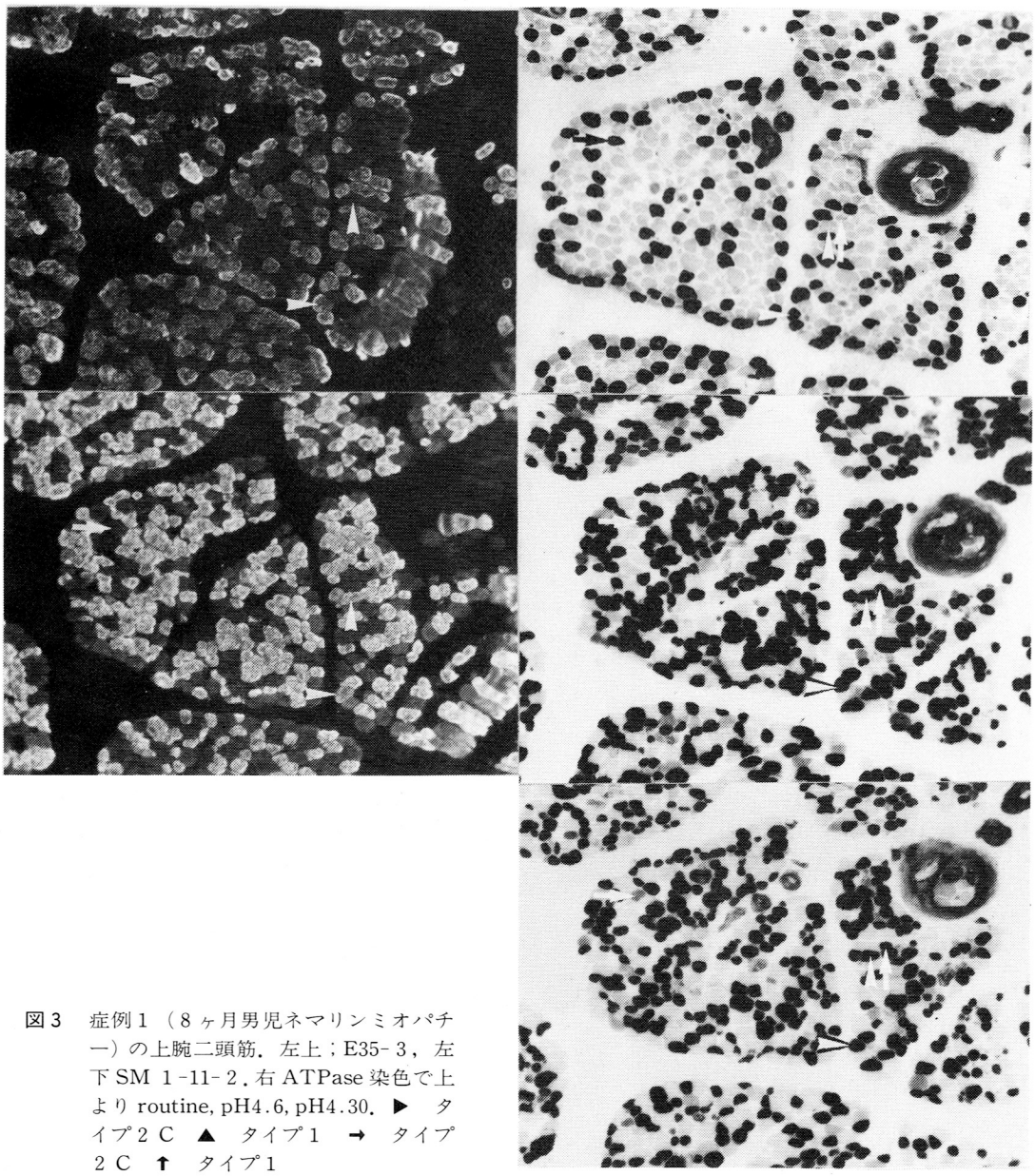


図3　症例1（8ヶ月男児ネマリンミオパチー）の上腕二頭筋．左上；E35-3，左下SM 1-11-2．右ATPase染色で上よりroutine, pH4.6, pH4.30．▶ タイプ2C　▲ タイプ1　➡ タイプ2C　⬆ タイプ1

る．しかしpure slow formではなくて幼若型または2A・2B型MHCとの混合したタイプ1線維（mixed form）も存在しており武田らのMLCのデータと一致すると考える．

症例2は36才女性で，基本的に症例1と同様であるが，純幼若型やtransitional fiberが非常に少なくなっており各々1%以下であった．従ってほとんどの線維が成人型遅筋MHC発現線維（SM 1-11-2のみ陽性）であった．

これに対し速筋線維（2A，2B線維）の発現をみると，症例1では検討した955本中359本（36%）が2A線維，2本（0.2%）が2B線維で2B線維が極端に少ない組成であった．いずれもSM 1-11-2陰性でE35-3のみ陽性であった．症

例2においては2A線維は308本中6本（約2％）と極端に少なく2B線維はみとめられなかった．やはりE35-3陽性でSM 1-11-2は陰性であった．いずれの場合も2B線維の発現がわるいまたは欠損しており，2A線維もわるい場合があると考えられる．この速筋型MHCの発現がわるいのを確認しうる単クローン抗体の開発が急務となっており，幼若型，速筋型（2A，2B）に特異的抗体を調製中である．

文　献

1）Stauber, W. T., Riggs, J. E., Schochet, S. S., Gutmann, L., and Crosby, T. W. Nemaline Myopathy Evidence of Dipeptidyl Peptidase I Deficiency. Arch Neurol 43, 39-41, 1986.

2）Biral, D., Daimiani, E. Margreth, A., Scarpini, E. and Scarlata, G. : Slow myosin heavy chain isozyme in nemaline myopathy. Neurology 35 : 1360-1363, 1985.

3）武田伸一他　Nemaline myopathyの筋構造蛋白．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60年度研究報告書　昭和61年3月　325～329頁

昭和61年度研究班名簿

昭和61年度　杉田班　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	杉田秀夫	国立精神神経センター神経研究所 疾病研究第一部 〒187　小平市小川東町4-1-1	部長	0423-41-2711
監事	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	096-344-2111
幹事	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
	寺尾寿夫	帝京大学医学部第一内科 〒173　板橋区加賀2-11-1	教授	03-964-1211
	佐藤猛	順天堂大学医学部脳神経内科 〒113　文京区本郷2-1-1	助教授	03-813-3111
運営幹事	高木昭夫	虎の門病院神経内科 〒105　港区虎の門2-2-2	部長	03-588-1111
班員	小口喜三夫	国立長野病院 〒389-08　長野県更級郡上山田町	副院長	0262-75-1581
	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
	川井尚臣	徳島大学医学部第一内科 〒770　徳島市蔵本町2-50	助教授	0886-31-3111
	木下眞男	東邦大学医学部第四内科 〒153　目黒区大橋2-17-6	教授	03-468-1251
	栗原照幸	宮崎医科大学第三内科 〒889　宮崎県宮崎郡清武町木原5200	助教授	0985-85-1510
	後藤幾生	九州大学医学部脳研神経内科 〒812　福岡市東区馬出3-1-1	教授	092-641-1151
	木南英紀	徳島大学医学部酵素研酵素化学 〒770　徳島市蔵本町3-18-15	講師	0886-31-3111
	斎田孝彦	国立療養所宇多野病院臨床研究部神経内科 〒616　京都市右京区鳴滝音戸山	部長	075-461-5121
	紫芝良昌	冲中記念成人病研究所 〒105　港区虎の門2-2-2	主任研究員	03-583-5528
	庄司進一	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
	杉村公也	名古屋大学医学部神経内科 〒466　名古屋市昭和区鶴舞町65	助手	052-741-2111
	鈴木紘一	東京都臨床医学総合研究所遺伝情報 〒113　文京区本駒込3-18-22	部長	03-823-2101

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	高瀬貞夫	東北大学医学部脳研神経内科 〒980　仙台市星陵町1-1	助教授	0222-74-1111
	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
	田代邦雄	北海道大学医学部脳神経外科 〒060　札幌市北区北15条西7丁目	助教授	011-716-1161
	田邊等	東京都立神経病院 〒182　府中市武蔵台2-6-1	副院長	0423-23-5111
	塚越廣	東京医科歯科大学医学部神経内科 〒113　文京区湯島1-5-45	教授	03-813-6111
	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	教授	0298-53-3196
	中村晴臣	鳥取大学医学部脳研神経病理 〒683　米子市西町86	教授	0859-33-1111
	埜中征哉	国立精神神経センター神経研究所微細構造 〒187　小平市小川東町4-1-1	部長	0423-41-2711
	福原信義	金沢大学医学部神経内科 〒920　金沢市宝町13-1	助教授	0762-62-8151
	萬年徹	東京大学医学部脳研神経内科 〒113　文京区本郷7-3-1	教授	03-815-5411
	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	0285-44-2111
	宮武正	新潟大学脳研神経内科 〒951　新潟市旭町通一番町757	教授	0252-23-6161
	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
	吉田瑞子	国立精神神経センター神経研究所疾病研究第四部 〒187　小平市小川東町4-1-1	研究員	0423-41-2711
	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
	中野今治	国立療養所下志津病院神経内科 〒284　四街道市鹿渡934-5	医長	0434-22-2511
	堀眞一郎	東京都神経科学総合研究所神経生化学 〒183　府中市武蔵台2-6	副参事研究員	0423-25-3881
	桃井真里子	自治医科大学小児科 〒329-04　栃木県河内郡南河内町 大字薬師寺3311-1	講師	0285-45-2111
	山田和廣	大分医科大学生理学 〒879-56　大分県大分郡挾間町 医大ヶ丘1-1506	教授	0975-49-4411

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	小沢高将	名古屋大学医学部第二生化学 〒466　名古屋市昭和区鶴舞町65	教　授	052-741-2111
	古庄敏行	杏林大学保健学部疫学 〒192　八王子市宮下町476	教　授	0426-91-0011
	吉岡利忠	東海大学医学部生理学 〒259-11　伊勢原市望星台	助教授	0463-93-1121
公募班員	斎藤深美子	東京医科歯科大学難治研細胞遺伝 〒113　文京区湯島1-5-45	助　手	03-813-6111
	鈴木義之	国立精神神経センター神経研究所疾病研究第五部 〒187　小平市小川東町4-1-1	部　長	0423-41-2711
	新川詔夫	長崎大学医学部原爆後障害医療研先天異常 〒852　長崎市坂本町12-4	教　授	0958-47-2111
顧　問	三好和夫	冲中記念成人病研究所 〒105　港区虎の門2-2-2	所　長	03-588-1111
	黒岩義五郎	九州大学医学部 〒185　国分寺市西町5-2-19	名誉教授	0425-74-1810
	豊倉康夫	東京都老人医療センター 〒173　板橋区栄町35-2	院　長	03-964-1131
	宇尾野公義	国立静岡病院 〒420　静岡市城東町24-1	院　長	0542-45-0101
事務担当者	光村征子	国立精神神経センター神経研究所疾病研究第一部 〒187　小平市小川東町4-1-1		0423-41-2711 (5111, 5112)