# 厚生省「精神・神経疾患研究委託費」 筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態と その病因に関する研究

# 杉田班

昭和62年度研究報告書

昭和63年3月

## 厚生省「精神•神経疾患研究委託費」

# 筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態と その病因に関する研究

# 杉田班

1

# 昭和62年度研究報告書

昭和63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」班は過去3年間に多くの研究成果を挙げ,昭和61年度をもって終了致しました. そして昭和62年度より新たに厚生省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー 症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究」班として発足し,不肖私が2期目 の班のお世話をする事になりました.

当研究班は従来より一貫して筋ジストロフィー症の病態及び発症機序解明を中心 課題として研究を行ってまいりました。昨今の欧米における分子遺伝学の進歩によ りデュシャンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子座,遺伝子そのものも明らかとなり, 筋ジストロフィー症の研究もようやくその方向づけが出来てくるものと思われます。

3年間の班研究の間に筋ジストロフィー症の病態を解明し,且つ治療法の開発を 目ざし,病床に横たわる患者さんの為に努力したいと考えております。その為に班 員各位の今後一層の努力と研究の発展を班長として期待しております。

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

#### 昭和62年12月

## 〈班長〉杉 田 秀 夫

目

1	
八	

昭利	D62年度総括研究報告·······7
昭利	<b>u62年度総合班会議研究報告抄録</b> 11
分担	且研究報告·······21
Ι.	臨床
II.	生化学
III.	ミトコンドリアミオパチー・・・・.93
IV.	変性と再生
v.	遺伝
VI.	生理学
VII.	培養
VIII.	形態
昭利	<b>162年度研究班名簿</b> 315

-

# 昭和62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及び関連疾患の病態とその病因に関する研究」班の昭和62年度(初年度)の報告書である。

本研究班の目的は筋ジストロフィー症及び関連疾患特にミトコンドリア脳筋症の病態を 分子遺伝学を含む基礎研究並びに臨床面から解明し,治療法の開発を最終目標としている。

#### 〔研究組織〕

本研究班はその目的遂行の為班長以下38名(監事1名,幹事6名,班員29名,公募班員 2名)より構成され、4つの柱となるべき研究課題を設立し、各々の課題に対し2名の担 当幹事を指名し、幹事の指導の基に総合的研究を行ないつつある。

- 1) 遺伝子診断と解析 (荒木淑郎, 鈴木紘一)
- 2) 筋変性と再生(寺尾寿夫,杉田秀夫)
- 3) 筋ジストロフィーの病態(宮武 正, 高木昭夫)
- 4) ミトコンドリア脳筋症(垂井清一郎,佐藤 猛)

()内は担当幹事

#### 〔研究成果の要約〕

本年度発表された報告の中から2,3のトピックについて述べる.

### A.筋ジストロフィー症

遺伝子診断と解析

デュシャンヌ型 (DMD), ベッカー型 (BMD) の遺伝子座, 惑いはその近傍の特 異的な数種類のDNAプローブを用い患者家族の家系分析を行ないつつありすでに約 10%に於いて欠失症例が見出されているが, 今後更にプローブをふやし, 多くの症例 について, 欠失部位と臨床症状との対比を行なう予定である.

3. 筋変性と再生

DMDにおける再生の研究は本疾患の対象療法としての骨格筋移植の問題に深い関 連を有している。骨格筋の移植が何故従来より成功しないのかその疑問を追究中であ る.

3) 筋ジストロフィーの病態

DMD, BMDの14kbのmRNAにコードされている蛋白質は分子量50万の未知の 蛋白質でありその同定が現在中心課題となっている。Woodらが報告したネビュリン は DMD では発現されているが早期にプロテアーゼにより分解する事が明らかとなり, DMD の病態の解明に重要な意味を持っている。

### B.関連疾患

ミトコンドリア脳筋症

ミトコンドリア脳筋症のうち特に MELAS は主として complex I, MERRF は complex IVの低下が重要な役割を持つと考えられ,現在母系遺伝をする症例について微量材料を用いミトコンドリア DNA の解析を行なう方法を検討中であり,近い将来遺伝子レベルでの病態が解明されるであろう.

昭和62年度厚生省「精神・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及び関連疾患の病態と その病因に関する研究

研究報告抄録

# Duchenne 型筋ジストロフィー症(DMD)における 巨大分子蛋白, connectin, nebulinの変化について

荒 木 淑 郎 (熊本大学医学部第一内科)

#### 〔目 的〕

DMD の遺伝子座は Xp<sub>21</sub>の約2,000kb にわたる DNA 鎖上にあり,この中に含まれる約60個の exon の一部あるいは大部分が欠失することにより DMD が発症することが次第に明らかになってきてい る. Wood らはこれをうけて、その mRNA size (14kb) から、単一の蛋白の遺伝情報がコードさ れているとすると、分子量約500kd の蛋白に相当するとの考えのもとに30例の DMD で SDS-PAGE による筋構造蛋白 (Mf) 分析を行い、DMD では全例 nebulin (分子量500~600kd) が消失している ことを報告した. 従来 DMD の Mf については myosin heavy chain (MHC) 以下の低分子蛋白に ついては詳細に検討されていたが、MHC より高分子領域の蛋白については最近漸く研究が開始され たばかりである。今回 DMD における巨大分子蛋白、connectin (C) (=titin) および nebulin (N) を中心とした mf の変化について検討を加えた我が国での研究結果について報告する。

I. 荒木, 内野ら

方法:対象は DMD 3例 (7, 9, 12歳), Becker 型 MD (BMD) 1例, myotonic dystrophy 2例, 多発性筋炎 5例, MG 1例, CMT 1例, HAM 1例, ALS 4例, control 4例で, 生検筋よ り約10数本の筋線維を分離し, homogenize 後, 50℃20分間の incubation を行って SDS-PAGE によ る Mf の分析を行った.

結果:DMDでは3例ともNと思われる band が消失していたが、これに加えてCも著減し、 *a*-actinin, troponin-T, tropomyosin の減少傾向もみられた。程度は軽いが類似の変化が BMD お よび急性多発性筋炎例で観察された。

考案と結論:今回の分析結果は Wood らの報告と異なり、DMD においては C の著減に加えて、  $\alpha$ -actinin も減少しており、内因性 protease の関与も否定できないように思われた。

#### II. 豊島ら

方法:対象は DMD 生検筋 3 個, 剖検筋 2 個から凍結乾燥切片を作成し, 4.5% slab gel を用い各 lane に 3 μg 乾燥重量を添加した.対照に正常ヒト骨格筋 2 個, 剖検ヒト腸管平滑筋, 鶏, 兎, 牛の 骨格筋を用いた.

結果:正常対照ヒト骨格筋および動物の骨格筋では、MHCより高分子量成分として10本ほどの band がみられ、主要なものは C, N, filamin 類似蛋白と考えられた。DMD 筋では MHC 含量に変動が みられ、高分子量成分も消長をともにした、MHC が保たれている例では N をはじめ他の band の変 動も明らかでなかったが、崩壊産物との鑑別が困難であった。

結論:Nに相当する band が DMD 筋でもみられたが、今後抗体による検討が必要と考えられた。

#### III. 杉田ら

方法:DMD 筋(preclinical = 1 歳 5 r 月, 2 歳 2 r 月, 臨床症状発現時期 = 2 歳 9 r 月, 6 歳,

8歳), 正常対照筋について SDS-PAGE による Mf の分析を行い, 同時に鶏砂嚢より抽出した C, N に対する polyclonal 抗体を作成し, immuno blot 法による検索を行った.

結果:発症初期の preclinical 段階の骨格筋では C, N は明らかに存在した. 臨床症状が発現し始 めた時期では band が薄くなっていたが, immuno blot でみる限り, C および N は発現していた. 実験的に鶏胸筋を 0 ℃に保存した場合にも N は24時間をすぎると減少分解が目立つようになり, N は protease 特に CANP に感受性が強いように思われた. 従って Wood らが DMD 生検筋の SDS-PAGE で N の band を検出できなかったのは, N が protease により分解したと考えれば充分説明で きるように思われた.

#### 〔参考文献〕

- 1) Wood DS, Zeviani M et al: Is nebulin the defective gene product in Duchenne muscular dystrophy? N Engl J Med 310: 107-108, 1987.
- 2) Sugita H, Nonaka I et al: Is nebulin the product of Duchenne muscular dystrophy? Proc Japan Acad 63 : 107-110, 1987.

	connectin	nebulin	МНС	a-Act
Wood B		absent $\sim \downarrow \downarrow \downarrow$	→	→
荒木,内野ら	111	absent $\sim \downarrow \downarrow \downarrow$	↓~→	Ļ
豊島ら	$\downarrow\downarrow \sim \rightarrow$	$\downarrow\downarrow\sim\rightarrow$	$\downarrow\downarrow \sim \rightarrow$	
杉田ら	$\{ \stackrel{\rightarrow}{\downarrow}$	$\rightarrow$	(preclinical) (clinical)	

表1 DMD における筋構造蛋白の変化

# 骨格筋の移植 ジストロフィー筋などの移植について

### 寺 尾 寿 夫 (帝京大学医学部第一内科)

### 〔目 的〕

骨格筋の移植は筋再生の研究や治療の目的で行なわれているが、ジストロフィー筋についてはあ まり報告されていない.ジストロフィー患者に対する筋移植が可能になるためには 1)移植された 筋がジストロフィーの host の中で正常に再生をするか、2)再生筋の収縮能力、3)大型の筋の移 植法などの問題が検討されなければならない.この研究はこれらを明らかにするために行なわれた ものである.

#### 〔方 法〕

1) 交換移植:mdx マウスとコントロールマウス C57BL/10sc との間に長指伸筋 (EDL) の交換 移植を行なった.移植後経時的に取り出し、組織標本を作製し、再生筋線維の直径, variability coefficient (V.C.),数を測定した.

2) 再生筋収縮力の測定: ラット EDL 自家移植後 2 ケ月目の再生筋を使用した. 電気刺激は *in vivo* で直接筋刺激で行ない, twitch および tetanic tension を測定した.

3) 比較的大型筋の移植: 2 g 以上の筋の移植では神経と血流の維持が大きな問題である。今回 はネコの EDL の autograft に前脛骨筋の一部を有茎の graft (inlay graft) として埋め込み, inlay を行なわなかった autograft と比較した.

#### 〔結果〕

1) 交換移植:移植後の再生筋線維の直径は表1にみる如く,  $C \rightarrow C > C \rightarrow D > D \rightarrow D > D \rightarrow C の 順であった. (C \rightarrow C はコントロールの EDL をコントロールマウスに移植, D → C は mdx の EDL をコントロールマウスに移植したことを示す. 以下同様)また V.C.は逆に D → D>D → C>C → D> C → C の順であった. (表1).$ 

2)再生筋の収縮特性:表2に示す如く、ラット EDL 自家移植後2ヶ月目の再生筋の tetanic contraction では単位断面積当りの収縮力は $0.28\pm0.07$ kg/cm<sup>2</sup>であり、移植前の収縮力の約25%であった.

3) inlay graft: ネコでは EDL の自家移植後 graft 中心部は壊死におちいり,空洞が形成される。inlay graft を行なうとその周辺にも再生筋線維が多数形成され,空洞形成が抑えられた.

#### 〔結論〕

ジストロフィーマウスとコントロールマウスの EDL の交換移植では、その再生筋は host よりも donor の筋の性質を受けついでいると思われる.したがって、ジストロフィーの個体に正常筋を移植 した場合には、正常の再生筋線維が再生すると考えられる。再生筋の収縮力は移植後2ヶ月目では 移植前の約25%であった. inlay graft では inlay された筋の周りにも筋線維が再生され、空洞形成 が防がれた.

#### 〔参考文献〕

- 1) Sola OM, Dillard DH et al.: Autotransplantation of skeletal muscle into myocardium. Circulation, 71:341-348, 1985.
- 2) Jasmin G and Bokdawala F: Muscle transplantation in normal and dystrophic hamster. Rev Can Biol, 29: 197-201, 1970.
- Hironaka T and Miyata Y: Transplantation of skeletal muscle in normal and dystrophic mice. Exp Neurol 47: 1-15,1975.
- 4) Wakayama Y, Schotland DL and Bonilla E: Transplantation of human skeletal muscle to nude mice: A sequential morphologic study. Neurology **30**:740, 1980.
  - 表 1 Diameter and Variability coefficient of regenerated muscle fibers; 2 months after cross-transplantation of EDL between normal and dystrophic mice (mdx)

$C \rightarrow C$ (n=3) $C \rightarrow D$	Diameter (µm) 21.64±0.87 T 21.19±3.56 * T T	Variability coefficient 258.75±40.89 286.75±58.71 * T T
(n=7) D + C (n=8) D + D	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	356.28±30.07 393.86±101.53 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
(n=5)		D=mdx * P<0.025

D=mdx \* P<0.025 C=C57BL/10SC \*\* P<0.01

表 2 Contractile properties of rat EDL (control and autograft) 2 months after transplantation

	Intact (n=6)	Autograft (n=6)
Twitch tension (g)	24.94±4.49	9.20±3.37
Tetanic tension (g)	178.67±57.53	29.37±11.33
Twitch tension/area of muscle section(kg/cm <sup>2</sup> )	0.21±0.07	0.10±0.04
Tetanic tension/area of muscle section(kg/cm <sup>2</sup> )	1.11±0.12	0.28±0.07
Contraction time (m sec)	31.44±5.52	16.78±2.88
Half-relaxation time (m sec)	52.48±16.02	27.68±4.17

# ヒト・ミトコンドリアDNAの多型解析と ミトコンドリア脳筋症への応用

宝 来 聰 (国立遺伝学研究所)

#### 〔目 的〕

ヒトのミトコンドリア DNA(mtDNA)は、約16,560塩基対の環状 DNA で、Anderson ら(1981) によって一個体の全塩基配列が決定されている.mtDNA は核 DNA に比べて、塩基置換速度がかな り速いことが知られており、ヒトにおいてもかなりの個体間変異(多型)が予想される。本研究で は、mtDNA の制限酵素切断型多型(RFLPs)による正常日本人集団での多様性の分析を行った。 さらに、これらの解析結果を踏まえて、ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリアゲノムの欠 陥、あるいは症患に特有の変異を明らかにするべく、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)法を応用した mtDNA のミスマッチ同定のための手法の確立を行った。

#### 〔材料及び方法〕

ヒトの mtDNA のソースとしては、血液・臓器等が考えられるが、多くの検体をより多くの種類 の制限酵素で解析するためには、胎盤が最も適当な材料と考えられる。 演者らの経験では、新鮮な 胎盤を用いれば、ミトコンドリア分画の分離・DNA 抽出・CsC 1・EtBr 密度勾配遠心法等の一連の 操作による環状 mtDNA の回収率は、胎盤あたり200~300µg であった。これは多種類の制限酵素に よる切断パターンを、サザンブロッティングあるいはエンドラベリング法を用いずに、EtBr 染色で 識別するのに充分な量である。日本国内、3地域(静岡・沖縄・青森)において約260検体の胎盤を 収集し、mtDNA を精製した。まず6塩基認識の制限酵素15種類による切断型分析を行い、各集団ご とに変異型(morph)の分布を明らかにした。さらに4塩基認識の制限酵素を用いた詳細な分析を 行い、各々の酵素による morph の頻度を明らかにし、全部の酵素の認識部位の比較により各個体の タイプ(restriction type)分類を行った。

#### 〔結果及び考察〕

(1)日本人集団での変異:日本人3地域集団は、各morphの頻度およびタイプの分布において は、かなり異なっていることが明らかとなった。しかし、タイプを基にした系統樹分析においては、 クラスタリングパターンは各集団で基本的にはよく類似していた。すなわち、本土2集団で観察さ れた2大クラスター(group IとII)は、沖縄集団でも観察され、各系統樹における最初の分岐時 間もほぼ同様であった。さらに本土および沖縄集団を合わせた系統樹分析の結果、両集団にかなり の遺伝子交流があったことが推測され、日本における founder population においてすでに mtDNA は多型的であったことが示唆された。

(2)他人種との比較分析:さらに日本人集団に見いだされた2大クラスターの分子進化的意義を 明らかにするため3大人種(日本人,白人および黒人)のmtDNA制限酵素地図のデータ解析を試 みた.我々の分析した日本人(静岡,n=116)とCann(1982)によって分析された白人(n=41) および黒人(n=19)のデータを併せて解析した.三大人種全体で117の異なったタイプが観察さ れ,個々のタイプはそれぞれの人種に特有のものであった.個々の人種集団内におけるDNAレベル の多様性, すなわち nucleotide diversity (d) を算出したところ, 日本人 (d=0.0026) と白人 (d= 0.0025)は、ほぼ同じ値であったが、黒人(d=0.0047)では約2倍近い値が得られた. さらに三大 人種集団からのタイプのすべての組み合わせ間でdを計算し、それに基づいて UPG 法により系統樹 を作成した(図2).得られた系統樹で、クラスタリングパターンによって便宜的に8つのクラスタ - (C1からC8)に分類したところ、3クラスターでは複数の人種からのタイプの混ざり合いが 観察されたが,他の5クラスターは同一人種からのみなる顕著なクラスターであった.mtDNAの塩 基置換速度を2×10<sup>-8</sup>/site/年と推定すると一番古いクラスター(C1とC2)の分岐は約17万年前 と計算された.ここでС1は黒人のみのクラスターであり、С2は日本人のみのクラスター(日本 人集団中の group I に相当) である. この値は、Nei のグループによって研究されたタンパク質の 遺伝子頻度データに基づいた3大人種の分岐年代に比べるとかなり古い.すなわち遺伝子頻度のデ ータからは、白人と東洋人の分岐を約5万年前、白人・東洋人のグループと黒人の分岐を約12万年 前とそれぞれ推定している。我々の分析は mtDNA 遺伝子の系統樹であり, 一方 Nei らの分析は人 類集団の分岐に関するものであるので、これらの推定値は、人種の分岐よりずっと以前に遺伝子の 分岐が起こっていたことを示唆している.また人種間での系統分析では gene migration の影響も当 然考慮しなければいけないが, mtDNA は人種の分岐以前にすでに多型的であったという説明が最も 妥当であろうと考えられる.

(3) DGGE 法によるミスマッチの同定:さて近年,ミトコンドリア・サイトパチー等の疾患にお いて、ミトコンドリアゲノムの欠陥、あるいは関与が問題にされている。患者試料は血液あるいは 微量の生検組織に限られるため、演者らが行って来たような分析は困難である. またサザンブロッ ト法では、分解能力に限界があり、ゲノム中に大きな欠失・挿入があった場合にしか変化が観察さ れない、このため、近年開発された Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法を用い た, mtDNAにおけるミスマッチの同定法への応用を試みた.まずこの方法の確立のため以下の実験 を行った. 正常人2個体より精製した mtDNA の2.1kb の Pst I 断片を pUC19にクローニングし た. この2個体のmtDNAのうち一方は制限酵素による分析でこのPst I断片中に9 bpの欠失があ ることがわかっている。クローニングされた2種類の DNA を等量ずつ混ぜた後, 熱変性, 再結合す るとホモデュプレックス2種類とヘテロデュプレックス2種類の混合物ができる.この混合物を, インサートをさらに切断するような制限酵素(この場合は Rsa I)で消化し, DGGE で分析した. この時、泳動方向と平行に変性剤の濃度匂配をつけたゲルで、60℃の温度を保ちながら泳動する. ヘテロデュプレックス中に塩基置換等によるミスマッチがあると低い変性剤濃度で二本鎖 DNA の部 分解離がおこり、その高次構造の変化によって易動度がおそくなるためホモデュプレックスと区別 できる.実際、上述の混合物を Rsa I で切断し、DGGE で分析すると、一方に欠失のある相同断片 同士のヘテロデュプレックスではかなりの易動度の遅帯がみられた. さらに別の断片 (411bp)のへ テロデュプレックスでも易動度の遅滞が観察され、シークエンスによる分析で、この2種類のmtDNA の断片の塩基配列には1塩基置換があることが明らかになった。この方法を用いると、ミトコンド リア・サイトパチーの患者試料を用いた場合でも正常人試料との比較によって、どの部位でも塩基 置換があるかをまず決め、その後シークエンスによる分析に発展できるという利点がある。

#### 〔参考文献〕

- 1) Horai S, Gojobori T and Matsunaga E :Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese : I. Analysis with restriction enzymes of six base pair recognition. Hum Genet 68 : 324-332,1984.
- 2) Horai S and Matsunaga E :Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese : II. Analysis

with restriction enzymes of four or five base pair recognition. Hum Genet 72: 105-117, 1986.

- 3) Horai S, Gojobori T and Matsunaga E: Distinct clustering of mitochondrial DNA types among Japanese, Caucasians and Negroes. Jpn J Genet 61: 271-275, 1986.
- 4) Horai S, Gojobori T and Matsunaga E: Evolutionary implications of mitochondrial DNA polymorphism in human populations. Human Genetics, Proc. 7th Int Cong Hum Genet Berlin (ed by Vogel F, Sperling K,) 1987, pp177-181.

# 分担研究報告

Ι	臨	床

1)	Rimmed	vacuole	を認めた rigid	spine synd	rome	の1	例	•••••	31
			新潟大学	学脑研究所神経	内科	宮	武	正	

- 2) 心伝導障害と rigid spine を合併した scapuloperoneal syndrome ……… 36 九州大学医学部脳研神経内科 後 藤 幾 生
- 3) 筋萎縮,皮疹,関節拘縮変形を伴う Lipodystrophy 症に類似する症例 … 40
   秋田大学医学部第一内科 豊 島 至

### II. 生化学

- 10) 骨格筋における受容体の誘導とその調節に関与する カルチトニン遺伝子関連ペプチドの研究(第1報) ………………………………………
   80 金沢大学医学部神経内科 高 守 正 治

信州大学医学部第三内科 庄 司 進 一

### Ⅲ. ミトコンドリアミオパチー

13) チトクローム c 酸化酵素欠損症における免疫組織化学的研究………… 95 鹿児島大学医学部第三内科 納 光弘 14) ミトコンドリアミオパチーの発症機序に関する臨床的並びに 自治医科大学神経内科 水 野 美 邦 15) MERRF(福原病) 剖検例の生化学的・免疫組織化学的研究 ……………………104 新潟大学脳研究所神経内科 宫 武 Æ 金沢大学医学部神経内科 福 原 信 義 17) チトクローム c 酸化酵素欠損・クローン化筋細胞の分子遺伝学的解析……116 自治医科大学小児科 桃 井 真里子 名古屋大学医学部第二生化学 小 澤 高 将 国立遺伝学研究所 宝 来 聰 20) ゴールド標識,免疫電子顕微鏡によるミトコンドリアミオパチーの研究…133 順天堂大学医学部脳神経内科 佐 藤 猛 21) 鉄欠乏食のラット骨格筋ミトコンドリアの 順天堂大学医学部脳神経内科 佐 藤 猛 22) 脱髄性神経炎をきたしたミトコンドリアミオパチーの一例…………141 名古屋大学医学部神経内科 杉 村 公 也 23) Scanning Organ Spectrophotometer による ミトコンドリア電子伝達系の検討(第2報) ……………… 北海道大学医学部神経内科 田 代 邦 雄

24) ミトコンドリア脳筋症における Coenzyme Q<sub>10</sub>療法の持続的効果の検討…153
 大阪大学医学部第二内科 垂 井 清一郎

26) 熱測定法による mdx マウス骨格筋のエネルギー論的研究 …………162 大分医科大学生理学 山 田 和 廣

### IV. 変性と再生

- 29) 脱神経後の筋萎縮におけるリソゾームカテプシン群の動態……………………179 徳島大学酵素科学研究センター 木 南 英 紀

## V. 遺伝

31)	<ol> <li>日本人筋緊張性ジストロフィー症と apolipoprotein CII 遺伝子の 連鎖解析</li></ol>							
	九州大学医学部脑研神経内科	後	藤	幾	生			
32)	女性筋ジストロフィーにおける細胞遺伝学的研究 リンパ芽球培养細胞株の樹立	並び	に					
	東京医科歯科大学難治研細胞遺伝	斉	藤	深美	<b></b> 長子	194		
33)	Duchenne 型筋ジストロフィー症の遺伝子診断…				· · · í · · ·	198		
	熊本大学医学部第一内科	荒	木	淑	郎			
34)	筋ジストロフィー症の DNA 診断		• • • • • •	•••••	•••••	202		
	国立精神・神経センター神経研究所	鈴	木	義	ナ			

35)	女性発症例を含む DMD	家系の遺伝子解析	•••••	• • • • • •	• • • • • •	208
•		筑波大学臨床医学系神経内科	中	西	孝	雄

 36) 欠損を伴う DMD 遺伝子の検出・・・・・・213

 東京都臨床医学総合研究所遺伝情報

 鈴
 木

 絋
 一

.

## VI. 生理学

の元素分析	素分析· 吉 岡	ジストロフィー筋の収縮特性と細胞内小器官の元 東海大学医学部生理学	37)
試み	, 于 田	fura-2による骨格筋細胞内の Ca <sup>2+</sup> 濃度測定の試み 国立精神・神経センター神経研究所	38)
田胞内記録227 9科 栗 原 照 幸	内記録· 栗 原	mdx マウスにみられる myotonic burst の筋細胞! 東邦大学医学部第四内科	39)
2報)232 內科 高 守 正 治	) ······· 高 守	骨格筋における Ca <sup>++</sup> paradox について(第2報) 金沢大学医学部神経内科	40)
······237 <sup>肉科</sup> 中野今治	中野	各種神経筋疾患における針筋電図上の spontaneous activity についての検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	41)
	一旦ルイ	佐田石はいっしっついったいとうことしっつ田角	(a)

42) 筋緊張性ジストロフィーにおけるミオトニア現象定量化の試み…………242 大阪大学医学部第二内科 垂 井 清一郎

### VII. 培養

東京医科歯科大学神経内科 塚 越 廣	
44) ヒト生検筋組織培養法による筋細胞及び神経筋接合部の	
先廷に民9 G (R) 東京医科歯科大学神経内科 塚 越 廣	200
45) 筋ジストロフィー症におけるクレアチン代謝異常:ラット筋芽細胞 レアチン代謝と甲状腺ホルモンの影響	包(L6)のク 262

冲中記念成人病研究所 高 木 昭 夫

· •

### Ⅷ. 形態

47)	横隔膜の多様性病変について	•••••	•••••		• • • • • • • •	
	東京都立神経病院神経内科	田	邊		等	210
48)	凍結損傷による筋病変の組織学的研究	•••••	•••••	•••••		
	東北大学医学部神経内科	高	瀬	貞	夫	210
49)	ラット骨格筋における雌雄差と性腺摘出の影響…	•••••	•••••	•••••	•••••	284
	国立療養所宇多野病院臨床研究部	斎	田	孝	彦	
50)	福山型先天性筋ジストロフィーの脳奇形					
	―小脳小多脳回の特徴とその成立機序	••••••	•••••	•••••	•••••	287
	鳥取大学医学部神経病理	中	村	晴	臣	
51)	ネマリンミオパチーの進行性	•••••	•••••	•••••	•••••	291
	国立精神・神経センター神経研究所	埜	中	征	哉	
52)	成熟 mdx マウス長趾伸筋細胞膜の caveolae 密度 freeze fracture による検討	まの				
	一ヒト筋ジストロフィー症との比較		•••••		•••••	296
	昭和大学藤が丘病院神経内科	若	山	吉	弘	200
53)	Core formation の免疫化学的研究					
	東京大学医学部脳研神経内科	清	水	輝	夫	500
54)	抗 Ca pump 蛋白(ヒトまたはラット)抗体によ	る免疫	<b></b>	截化学	学	
	冲中記念成人病研究所	高	木	昭	夫	
55)	細胞骨格蛋白(ネビュリン,コネクチンおよび α 見た DMD の病態	-アク	チニ	ン)	から	
	国立精神・神経センター神経研究所	杉	Ħ	秀	夫	

I.臨 床

.

## 1) Rimmed vacuole を認めた Rigid spine syndrome の一例

宮武 正\*

研究協力者 小野寺 理\* Ш 元 義\* 美 哲 崎 渥 至\* 塙 男\*\* 晴 和 泉 徹\*\*

#### はじめに

Rigid spine syndrome (以後 RSS と略す) は Dubowitz により幼少時期に発症し,脊椎特に頸椎 前屈制限を主症状とし,肘関節,足関節を初めと する多発性関節拘縮と,四肢体幹の筋萎縮と筋力 低下を有する症例にたいして命名されたものであ る<sup>1)2)</sup>.しかし,近年多くの報告者の指摘にあるよ うに,その組織所見の多様性や Emery-Dreifuss 型 筋ジストロフィー症との関連などから疾患として の単一性に疑問が持たれている<sup>3)4)</sup>.今回我々は, 心筋障害と呼吸障害を伴う RSS の1例を経験し, 筋生検上多数の rimmed vacuole を認めたので, それらの所見を報告する.

#### 症 例

**症例**:36歳,男性,(神内4220) **主訴**:頸部前屈制限。筋力低下。歩行障害。 **家族歴,既往歴**:特記すべき事無し。

現病歴:幼少時より,走ることが遅く,体格は 痩せ型であった。筋力は学童期より徐々に低下し たが,日常生活上困ることはなかった。

昭和62年6月4日右片麻痺と言語障害をきたし, CT上左基底核に低吸収域を認め,入院加療中,心 電図異常,全身の筋萎縮と筋力低下に気づかれ神 経内科に入院.

現症:身長162cm,体重34.5kg,脈拍81不整, 血圧100/54,高口蓋弓,扁平胸を認める。頸部に 著明な前屈制限と軽度側屈制限を認めるが,後屈 は比較的良好である。心,肺,腹部ともに異常な し、両側足関節に軽度の拘縮を認める。

神経学的には,意識清明で知能正常.視野,眼 球運動異常は認めない.軽度の構語障害,嚥下困 難を認めるが,他の脳神経は正常.運動系では, 身体幹近位部優位の筋萎縮,翼状肩甲が認められ る.徒手筋力テストでは,胸鎖乳突筋右4-,左 4,頸部前屈筋で2,頸部後屈筋で4-,三角筋で 3,右上腕筋,前腕筋,手根筋で4.下肢では, 腸腰筋右3左4,前脛骨筋で3,大腿四頭筋右 5<sup>-</sup>,他の諸筋は正常.Gowers'徵候陽性.Barre 徵 候は右上肢で陽性.筋線維束攣縮,筋痙攣,仮性 肥大,等認めない.

片足だち, 爪先だちは可能であるが, かかとだちは不能. 右足をやや引きずりぎみに歩く. 小脳症状, 錐体外路症状はみられない. 深部腱反射は上肢で消失, 下肢は正常. 病的反射は認めない. 膀胱直腸障害, 感覚障害も認められない.

検査所見:検血,生化学所見,CK 63 IU/L,ア ルドラーゼ 2.4 IU/L を含めて正常.心電図で右 軸変位,V1 aVfのP波陰転,V4 V5の ST 上昇, V5 V6のT波陰転,QT 延長を認める.ホルター 心電図で最高4連発の非持続性心室頻拍.心音図, 脈波検査でII音の亢進,固定性分裂,駆出性雑音 を認める.心エコーで左室の壁運動のび慢性の低 下と僧帽弁逸脱,TL<sup>201</sup>TC<sup>99M</sup>による心筋シンチで は,心臓の時計回りの回転,左室,右室の拡大, 左室駆出率の軽度低下,心カテーテル検査では, 駆出率の低下(46%)とびまん性の壁運動の低下 を認める.脅椎のX線検査ではStraight back index(胸郭前後径/胸郭横径)20%,第8胸椎前

<sup>\*</sup>新潟大学脳研究所神経内科

<sup>\*\*</sup>新潟大学医学部第一内科

縁より、第4胸椎と第12胸椎の前縁を結んだ線までの距離が12mm、と straight back を認めるが、 側彎や骨の変化は認めない<sup>5)</sup>.

筋電図では、上腕二頭筋、第一背側骨間筋、大腿四頭筋で short duration, low amplitude neuromuscular unit を認め、前脛骨筋、手根筋では少 数の short duration, low amplitude neuromuscular unit の出現をみる. 脛骨神経, 尺骨神経の運 動神経伝導速度はそれぞれ41.8m/s, 60.2m/s, 尺 骨神経, 腓腹神経の感覚神経伝導速度はそれぞれ 57.2m/s, 51m/s と, 共に正常である.

呼吸機能検査で%肺活量が34.6%と低下.血液



図1 a HE 染色(×400) 筋線維径の大小不同と中心核の増加が認められる.

- b Gomori-trichrome 染色 (×300) Rimmed vacuole を認める.
- c NADH 染色 (×300) ring fiber, moth-eaten 像, slit 状に濃染する部位を認める.
- d Acid-phosphatase 染色(×300)高活性を示す線維を多数認める.特に vacuole のあるものでは,高活性 を示す.



図2 myofilament 走行の乱れ、Z band streaming、少数の膜様構造物を含む空砲形成を 認める. ミトコンドリア、グリコーゲン顆粒の集積も認める. (×4300)

ガス分析で P CO<sub>2</sub> 49mmHg P O<sub>2</sub> 70mmHg と拘 束性換気障害を認める.

脳波では背景活動の徐波化と θ 波の混入を認める.

上腕二頭筋の筋生検では, HE 染色で, 著明な筋 線維径の大小不同,中心核増加を認める。僅かに 壊死線維を認めるが,間質には著明な線維化は認 めない.Gomori-トリクローム染色では多数のrimmed vacuole を有する線維を認めた. NADH 染色 では moth-eaten 像, 環状線維を認め, スリット状 に濃染する線維を認めた.酸フォスファターゼ染 色では高活性を示す線維を多数認め、特に rimmed vacuole を認める線維では高活性を示した(図 1). エボン切片トルイジンブルー染色では、横紋 構造の乱れとスリット状の微細顆粒の集積を認め た. 電顕では, myofilament 走行の乱れ、Z bandstreaming, 少数の膜様構造物を含む空砲形成を認 める. グリコーゲン顆粒, ミトコンドリアの集積 も認める (図2). ATP ase 染色では、タイプ1 筋線維優位,タイプ1筋線維萎縮,タイプ2B線 維欠損を認める. 又, rimmed vacuole はタイプ1

線維に多く認められた. 筋線維タイプ分布を検討 したところ、タイプ1筋線維は全体の71.0%を占 め、その径が平均35.4 $\mu$ m、タイプ2筋線維では2 Bがほぼ完全に欠損していた. タイプ2筋線維の 径は平均44.6 $\mu$ m であった(図3).





-33-

考案

本症例は著明な頸部の前屈制限,近位筋優位の 筋萎縮と筋力低下,両足関節の可動制限,などの 臨床像より Dubowitz らの唱えた RSS と診断し た. Emery-Drefuss 型筋ジストロフィー症は RSS ときわめて似通った臨床症状を示し鑑別が問題と なるが,伴性劣性遺伝形式を認めない,心伝導障 害を認めない,という点で鑑別される<sup>6</sup>.

又,本症例では, straight back syndrome によ る, 僧帽弁逸脱, V1 aVf の P 波陰転等の心異常 の他に, ST 低下や陰性 T 波を認めた. さらに,



前後一左右方向の内径短縮率

左室内径短縮率=FS

= (左室拡張末期径一左室収縮末期径) / (左室拡張末期径) ×100

本例の心エコーを左室拡張末期径と左室収縮末期 径より算出する短縮率という因子で検討すると(図 4),本例では straight back syndrome では,説 明し得ない,前後左右に及ぶ心壁運動の低下を認 めることから,心筋障害を伴っていると思われ る<sup>4)</sup>.又本例では高度の拘束性換気障害が見られ, 呼吸筋の障害も伴っていると考えられた.

一方,筋組織病理学的にはタイプ1筋線維優位, タイプ1筋線維萎縮,タイプ2B線維欠損を認め, 今まで報告されている本症の筋病理学的所見の特 徴を兼ね備えていた.

又本例では多数の rimmed vacuole を認める点 が特徴的である。今まで、本症で組織上 vacuole を 認めた症例は我々の例を含め6例ある(表 1)<sup>3)4)7)8)9)</sup>. これらの例を見ると, rimmed vacuole を伴う RSS は、若年死亡例や、呼吸障害を伴う例 が多い印象を受ける.しかし,我々の例のように 心筋障害を認めた例はない。一方 rimmed vacuole は種々の疾患で認められる非特異的な組織像であ るが、ライソゾームによる自己貪食を反映すると 考えられ、筋疾患の原因により迫りうる現象と考 えられる<sup>10)</sup>、また本例では vacuolation を認める線 維に NADH 活性,酸フォスファターゼ活性が高か ったことも注目され、同部にて活発なライソゾー ム由来酵素の活性化が起こっていることを示唆さ せた。今後,筋生検の部位や臨床経過を比較した 検討が必要であろう.

表1	Rimmed	vacuole	をる	とも	なっ	た	Rigid	Spine	Syndrome	の報告例
----	--------	---------	----	----	----	---	-------	-------	----------	------

	本症例	Goto <sup>(7)(9)</sup>	上原(8)	Bertini <sup>(3)</sup>	Munster <sup>(4)</sup>	Munster <sup>(4)</sup>
家族歴	_	_	_			_
発症年齢	学童期	6 歳	5 歳	4 歳	7 歳	生下時
性別	男性	男性	女性	女性	女性	女性
胸郭変形	+				. +	+
脊椎変形	+		+	++	+	+
換気障害	· · +			+	+	+
心電図	心筋障害	洞性頻脈		正常	右軸変位	正常
死亡年齢		18歳		16歳	20歳	
死因		突然死		肺気管支炎	肺性心	

図4 RSS, straight back syndrome, 正常人に於ける左室内径短縮率の比較

#### 結 語

- 1) 呼吸障害と心筋障害を伴う RSS の一例を報告 した.
- 2)筋組織化学ではタイプ1筋線維優位、タイプ 1筋線維萎縮、タイプ2B欠損を認めその組織所 見の特徴を検討した。
- rimmed vacuole を認める RSS には呼吸障害 を伴うものや若年死する例など予後のよくない ものがある。

#### 文 献

- Dubowitz V : Recent advances in neuromuscular disorder. Rheumatol Physic Med 11 : 126, 1971.
- Dubowitz V and Brooke MH : Rigid spine syndrome. in Muscle biopsy A modern approach, WB Saunders Co, London 1973, p368.
- Bertini E, Marini R et al : The spectrum of so-called rigid spine syndrome; nosological considerations and report of three female cases. J Neurol 233: 248, 1986.

- 4) Munster E, Joosten E et al : The rigid spine syndrome. J Neurol Neurosueg Psychiatry 49: 1292, 1986.
- Davies MK, Mackintosh P et al : The Straight Back Syndrome. Quarterly Journal of Medicine 196: 443, 1980.
- Rowland LP, Fetell M et al : Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Ann Neurol 5: 111, 1979.
- Goto I, Muraoka S et al : Rigid spine syndrome; clinical and histological problems. J Neurol 226: 143, 1981.
- と原真理子,原朋邦ら:強直性脊椎症候群(rigid spine syndrome)の1例.神経内科16:50, 1982.
- Goto I, Ishimoto S et al : The rigid spine syndrome and Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy. Clin Neurol Neurosurg 88: 293, 1986.
- Fukuhara N, Kumamoto T et al : Rimmed Vacuole. Acta Neuropathol (Berl) 51: 229, 1980.

# 2) 心伝導障害と rigid spine を合併した scapuloperoneal syndrome

#### 後藤幾生\*

研究協力者 田 中 薫\* 山 田 猛\*

#### はじめに

Rigid spine syndrome(RSS)<sup>1)</sup>と Emery-Dreifuss muscular dystrophy(EDMS)<sup>2)</sup>とは, と もに脊柱の屈曲制限と早期からの関節拘縮を特徴 とする比較的良性の筋疾患である.今回,いわゆ る rigid spine と心伝導障害を伴うミオパチーが家 族性にみられ,筋病理所見からはミトコンドリア 異常が考えられた 1 女性例を経験し, RSS や EDMS との異同について検討を加えた.

#### 症 例

症例:37歳女性 (NM870003)

現病歴:正常分娩にて出生し,乳幼児期の発達 は正常.4歳頃より同年齢の子供と比較して走る のが遅くなった.筋力低下は24歳頃まで緩徐に進 行し荷物の挙上や階段を昇ることが困難となった. 14歳頃より頸部の前屈制限と尖足を,17歳頃より 肘の伸展制限を自覚している.

家族歴:母,姉,兄<sup>3)</sup>に同症状がみられる.

身体所見:体格は身長141cm,体重27kgとやせ型.脈拍は50/分と徐脈で不整.頸部前屈および側屈制限,肘関節伸展制限,足関節背屈制限があり,両側尖足・胸腰椎の側彎がみとめられた(図1). 白内障・網膜色素変性症・難聴はない.神経学的には意識清明・知能正常.外眼筋・顔面筋の筋力低下はない.肩甲帯・上腕に最も強く次いで下腿,大腿に筋力低下と筋萎縮をみとめる.仮性肥大はない.深部反肘は全て消失している.感覚系には異常なく,ミオクローヌス・小脳失調・てんかん・自律神経症状はみとめない.

\*九州大学医学部脳研神経内科



図1 肩甲上腕の筋萎縮と脊柱の可動制限をみとめる.

検査所見:検血・検尿・検便には異常なく,血液生化学でCKは132mu/ml(正常値20-80)と軽度上昇していた。その他の肝機能・腎機能・脂質・ 電解質は正常、75g-OGTTでは,血糖値は空腹時 91mg/dl,糖負荷後60分で278mg/dl,糖負荷後120 分で205mg/dlと糖尿病型を呈した。下垂体ホルモン(GH,LH,FSH,ACTH,TSH)および甲状腺ホルモン(T<sub>3</sub>,T<sub>4</sub>)は正常。動脈血ガス分析は正常。髄液での細胞・蛋白・乳酸・ピルビン酸は 正常. 安静時血中乳酸・ピルビン酸は正常である が15Watt15分間の bicycle ergometer 運動負荷試 験では,乳酸27.4mg/dl,ピルビン酸1.59mg/dl と 軽度上昇した(正常値乳酸3.3-14.9mg/dl,ピルビ ン酸0.30-0.94mg/dl).

心電図ではII度からIII度の房室ブロックをみと めた. 心エコーには異常はない. 筋電図では, short duration, low amplitude MUP の筋原性変化をみ とめ三角筋では, fibrillation と positive sharp wave がみとめられた. 末梢神経伝導速度・脳波・



図2 左 Gomori Trichrome 染色 (132倍) と右 NADH-TR 染色 (132倍) ragged red fiber (矢印) をみとめる、同部位は NADH-TR 染色で濃染される。



**図3** 電子顕微鏡所見(7000倍)筋鞘膜のミトコンドリアの集積をみとめる. paracrystalline inclusion 様の封入体 (矢印) をみとめる.

視覚誘発脳波は正常. 染色体分析は46XX と正常. WAIS では IQ118と正常.

前脛骨筋でおこなった筋生検では、光顕的には、 筋線維径の軽度の大小不同をみとめたが、筋線維 の変性壊死像はなかった。Gomori Trichrome 染 色では ragged red fiber が少数みられ NADH-TR

表1 ミトコンドリア電子伝達系酵素活性

enzyme		control
NADH	71.2	27.3-52.3
dehydrogenase		
NADH cytochrome C	5.3	0.7-3.7
reductase		
(rotenone sensitive)		
NADH COQ	14.6	7.6-14.0
reductase		
Succinate	7.0	0.7-2.4
cytochrome C		
reductase		
Succinate CoQ	3.0	2.1-3.7
reductase		·
Succinate	1.2	0.7-1.9
dehydrogenase		
CoQ cytocrome C	22.1	18.3-29.6
reductase		
Cytochrome C	4.9	3.6-12.2
oxidase		
cytrate synthase	8.7	6.9-9.7
carnitine	8.5	1.6-4.7
acetyltransferase		
Glutamate	5.1	1.4-3.0
dehydrogenase		umol/min/g

染色では, ragged red fiber に一致して濃染した (図2). 電顕的には, 筋鞘膜下にミトコンドリア

の集積をみとめ、一部のミトコンドリア内には、 paracrystalline inclusion様の封入体をみとめた

(図3).生検筋を用いてミトコンドリア電子伝達 系酵素活性を測定したが、明らかな活性低下はみ とめられなかった(表1).

#### 考 案

本症例の臨床像は,脊柱の屈曲制限と早期から の関節拘縮を伴う緩徐進行性のミオパチーである ことから RSS や EDMD との異同が問題となる. 当科での RSS 3 例と EDMD 2 例との臨床病理 像<sup>40</sup>と比較してみても,高度の房室ブロックを本症 例が合併している点では,EDMD の臨床像に近 い.しかし EDMD は伴性劣性遺伝をすると考えら れており,本症例は家族歴からは常染色体優性遺 伝が疑われる女性例であることを考慮におくと EDMD とするには問題が残る.EDMD と似た臨床 症状があり,かつ遺伝形式は常染色体優性と考え られる症例<sup>5161</sup>も少数ながら報告はされているもの の,本症例の筋病理所見では ragged red fiber が みられる点まで加えて考えると,これらの報告と も本症例は異なっている.

本症例の筋病理所見でみられた ragged red fiber
 は比較的筋力低下や筋萎縮の軽い前脛骨筋で筋生
 検をしたためか, ragged red fiber の頻度は非常

表 2	Rigid spine syndrome,	Emery-Dreifuss	muscular o	lystrophy	・と本症例との	)比較
-----	-----------------------	----------------	------------	-----------	---------	-----

case	1	2	3	4	5	present case
age, sex	25 M	18 M	15 M	29 M	50 M	37 F
age of onset (yr)	6	6	6	6	12	4
family history	-	-	-	+		+
clinical progression	-	+	+	+	+	+
diagnosis	RSS	RSS	RSS	EDMD	EDMD	
muscle weakness	+	+++	+++	+++	+++	++
ECG(A-V block) muscle histology	-	-	-	+	+	+
fiber size variation	+	+++	+++	++	° <b>+</b> +	+
internal nuclei	±	+	+++	±	++	£
endomysial fibrosis	+	++	+++	++	+	-
necrosis	+	+++	+++	+	+	-
ragged red fiber	-	-		-	-	+

に少なく,また筋原性変化そのものも非常に軽か った.しかし、電顕所見で筋鞘膜下にミトコンド リアの集積があり、一部のミトコンドリア内には paracrystalline inclusion 様の封入体もみられるな どの所見もあわせると、本症例ではミトコンドリ アの異常が、病態の本質として考えられる。本症 例の兄<sup>3)</sup>も筋病理で ragged red fiber および筋鞘膜 下のミトコンドリアの集積があり, aerobic exercise test で乳酸・ピルビン酸の上昇がありミトコンドリ アの異常がみられた. Mitochondrial myopathy<sup>7)</sup> は, 臨床症状からは, Kearns-Sayre syndrome (KSS), myoclonus epilepsy with ragged red fibers (MERRF), mitochondrial encephalopathy, myopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes(MELAS)などに分類されるが、本症例のよ うな臨床症状をもつ mitochondrial myopathyの 報告は過去にはない。

Mitochondrial myopathy のなかには電子伝達 系酵素欠損がみられることがあり,生化学特徴か らの分類もされている。本症例の兄では,生検筋 での succinate cytochrome C reductase の活性低 下をみとめ Complex II の欠損が疑われている が<sup>3)</sup>,本症例では succinate cytochrome C reductase の活性の低下はみとめられず,今後の family study が必要であると考えられる。

本症例では, rigid spine, 心伝導障害を合併し, かつミトコンドリアの異常が疑われた家族性ミオ パチーであり過去の報告にはない貴重な一例と考 えられる.

謝辞:ミトコンドリア電子伝達系酵素活性を測 定していただいた鹿児島大学第3内科 中川正法 先生に深謝いたします。

#### 文 献

- Dubowitz V : Some unusual neuromuscular disorders. "Muscle diseases" (eds by Walton JN, Canal N, Scarlato G) Proceeding of an International Congress. Milan, 1969. Excerpta Medica Amsterdam, 1970, pp568-573.
- Rowland L P, Fetell M, Olarte M, Hays A, Singh N and Wanat FE: Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Ann Neurol 5: 111-117, 1979.
- 3) 姜 進,塚本美文,槇永剛一,佐藤史郎:ミト コンドリア異常,心伝導障害を伴った肩甲・上腕 型筋萎縮症,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61年度研究報告 書1987, pp28-32.
- 4) Goto I, Ishimoto S, Yamada T, Hara H and Kuroiwa Y : The rigid spine syndrome and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Clin Neurol Neurosurg 88 : 293-298, 1986.
- 5) Chakrabarti A and Pearce JMS : Scapuloperoneal syndrome with cardiopathy : report of a family with autosomal dominant inheritance and unusual features. J. Neurol Neurosurg Psychiathy 44 : 1146-1152, 1981.
- 6) Fenichel GM, Yi Chul Sul, Kilroy AW and Blovin R : An autosomal-dominant dystrophy with humeropelvic distribution and cardiomyopathy. Neurology 32 : 1399-1401, 1982.
- DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M and Deviro DC : Mitochondrial myopathies, Ann Neurol 17: 521-538, 1985.

# 3)筋萎縮、皮疹、関節拘縮変形を伴う lipodystrophy 症に類似する症例(山田ら) の筋病変の検討

豊島 至\*

 研究協力者
 小松真史\*
 正宗
 研\* 橋本啓子\*\*

 遠藤安行\*\*
 山田
 茂\*\*\*

#### はじめに

著者の2人(山田と豊島)が新潟大学神経内科 で経験した2症例(筋萎縮,皮疹,関節拘縮変形 を伴うlipodystrophy症に類似する姉弟例<sup>1)</sup>:以下 本症)のうち1例が1985年に47歳で死亡し,最近 Oyanagiらにより剖検報告がなされた<sup>2)</sup>.筋病変と してmultifocal fibrosis, rimmed vacuole, lobulated fiber,ミトコンドリア変化が見出され, とくに血管変化が特徴的で病態の本質をなすもの であろうとされた.

私達は今回, 遠藤らの症例<sup>3)</sup>を検索する機会を 得,本症であることを確認し,筋生検を施行した. その結果, 剖検例との共通筋病変は rimmed vacuole の多数の出現であることを観察したので報 告する.

症例:昭和25年生まれ34歳女性.

家族歴:両親がいとこ婚であるが類症なし。

現病歴:生後1ヶ月で両頬部に紅斑が出現し, 発熱,下痢を伴い疼瘡と診断され加療,10日間程 度で消褪した。その後も冬期に多く出没し,5-6 歳頃から四肢にも紅斑が出現するようになり,発 熱と関節痛を伴った。13歳頃から顔面のやせに気 付き,17歳頃から指関節の腫脹,変形と拘縮,手 のやせがはじまった。昭和48年(22歳),秋田大学 医学部第三内科受診,入院し,progressive partial lipodystrophy と診断され以後経過観察されてい る.この時,顔面の皮下脂肪組織と筋萎縮,慢性 唾液腺炎,リンパ節炎が指摘された.赤沈の著明 な亢進, γ-グロブリンの増加,CRP強陽性を伴っ ていた(表1).27歳第一子出産後,両上肢全体の 疼痛とともに皮下脂肪組織と筋萎縮が生じ再入院, 甲状腺腫も指摘された.その後30歳頃から下肢遠 位部に強い皮下脂肪減少と筋萎縮がはじまり,足 指の変形を生じた.34歳(昭和60年)に大腿部の 疼痛と萎縮を生じたため3回目の入院となった。 入院2ヶ月前にプレドニゾロンを中止したためと 考えられ,CK値も上昇していたが,再投与後,疼 痛は軽減しCK値は正常化した.

表1 検査所見

S48.5	(22歳)
	ESR 62/89 CRP $ $ + $ $ WBC4100
	TP 8.2g/dl γ-Gl 28.9%
	CK 31 (N<25)
S 53.6	(27歳)
	ESR 78/112 CRP   +   WBC6100
	TP 7.1 γ-Gl 28.4%
	CK 83 (N<40) ICG 44.5%
S 60.9	(34歳)
	ESR 25/52 CRP   +   WB4100
	lgG 1292 lgA 249 lgM 66
	CH <sub>50</sub> 44.2 C3 86 C4 42
	CK 1523(N<200)
	CT pallidal calcification (mild)

第3回目入院時所見:身長157cm 体重39.5kg, 血圧90/60. 顔面,頸部,上肢全体,大腿下半部以 下の遠位部に強い皮下脂肪,筋の著明な萎縮を認 め,四肢関節とくに手足指関節に著変な拘縮と変 形を伴っていた.腹部の脂肪組織はよく保たれて いた(図1).肘,膝伸側に紅色丘疹を認めた.甲 状腺腫あり,肝脾腫大なし.

<sup>\*</sup>秋田大学医学部第一内科

<sup>\*\*</sup>秋田大学医学部第三内科

<sup>\* \* \*</sup>秋田赤十字病院神経内科



5

図1 患者全身像 (34歳, 女性3))



図2 下腿X線CT 左側に著明な腓腹筋の低吸収を認める.

神経学的には知能正常,言語正常,眼球運動正 常,顔面筋,咳筋の萎縮と舌の軽度肥大があり, 運動系では,筋萎縮に伴い脱力が認められ,胸鎖 乳突筋:2,大胸筋:2,上腕三頭筋:3-の他は ほぼ4~4+で萎縮の割に筋力が保たれていた.運 動失調,不随意運動は認めず,感覚障害もない. 腱反射は膝蓋腱のみ正常で,他は低下~消失で, Babinski反射陽性であった.自律神経障害は認め なかった.

脳CTでは基底核石灰化の初期像を認めた.筋 電図では多相性筋原性変化を示し,筋CTでは下 腿で腓腹筋に著明な低吸収を認めた(図2)ほか は軽度の変化にとどまっていた.筋生検は右前脛 骨筋で施行され,Gomori trichrome 染色で多数の rimmed vacuole がみられた(図3). Rimmed vacuole は萎縮筋線維,通常径筋線維の両者にみら れ,また,錘内筋にも認められた.萎縮線維は groupingの傾向を示したが,神経原性所見は認め られなかった.軽度の間質の増生が認められたが, 束状線維化はなく,血管変化も明らかではなかっ た.電顕では空胞内に myeloid body と不規則な線 維の集塊が認められた(図4a). 血管は大小30本 余を検索したが異常所見は認められなかった(図 4b).

#### 考 察

山田らが本症の特徴として挙げたのは、1.常 染色体劣性遺伝、2.皮下脂肪の減少と筋萎縮、 3.四肢関節の拘縮、変形、4.発熱を伴って出 没する皮膚紅斑と高 γ-globulin 血症などの膠原病 様病変、5.大脳基底核石灰化と知能低下、6.肝 脾腫、7.心障害であった<sup>1)</sup>.今回検討した症例は 1~5があてはまるが知能低下はない、肝機能異 常はあるが腫大は腹部エコーでも認めない、手の 変形は軽度にとどまる。

筋病変についてはこれまで本症の3例<sup>114)</sup>で筋生 検が行われているが、十分な所見が得られていな かった.今回の遠藤らの症例<sup>3)</sup>でrimmed vacuole が多数認められたので、剖検例<sup>2)</sup>との異同を知るた め、この観点から再検討した.検索した筋は舌筋、 外眼筋、大腰筋、胸鎖乳突筋、肋間筋、腕橈骨筋、 前脛骨筋、半膜様筋、ひらめ筋、大腿四頭筋、腓



図3 右前脛骨筋の生検. rimmed vacuole を多数認める. Gomori trichrome.



図4 生検筋の電顕像 a:rimmed vacuole に相当する部位 b:aに近接した毛細血管 骨筋,大腿二頭筋,横隔膜,上腕二頭筋,大胸筋, 腹直筋,腓腹筋で,線維化と脂肪浸潤の強さの和 を変性の程度とすると,この順で高度にみられた. 変性の程度の差は顕著で,はじめの5筋には線維 化,脂肪浸潤はごく軽く,筋線維はよく保たれて いるのに対し,腹直筋,腓腹筋では筋線維は1本 も認められず,病変はきわめて高度であった.ひ らめ筋,前脛骨筋の病変は中程度で腓腹筋との差 は明らかであり,今回の症例の下腿CTとよく合 致していると思われた.Rimmed vacuole は舌筋 には認められず外眼筋にも少数であったが,他の 筋では筋変性の軽度なほど多数みられる傾向を示 し,胸鎖乳突筋で最多であった.上腕二頭筋,大 胸筋,大腿四頭筋では認められなかった.

Rimmed vacuole は種々の疾患でみられること が知られ<sup>59</sup>疾患特異性はないが、本症の2例で多 数、広範にみられたことから、偶発的なものと考 えるより、本態に深く関係するものと考えられる。 Oyanagi ら<sup>20</sup>の指摘した閉塞性血管病変は線維化 におちいった部に強くみられることから筋病変の 進行に与るものと考えられるが、筋病変の、より 初期の段階で線維化が軽度にとどまる時期では rimmed vacuole の役割が重要と考えられる。

本症に属する症例は、私達がこれまで直接診察 する機会があった4症例<sup>11314)</sup>のほか、皮膚科領域で "凍瘡を合併せる続発性肥大性骨膜症"として報 告されている症例(文献6参照)がある。とくに 喜多野の第1例は確実と思われるが、他の例は若 年であることもあって異同が明らかでない。これ らの症例での筋病変の検討が必要であろう。また、 本症においては皮下脂肪組織と筋萎縮が系統的で かつ選択性を示すことが特徴的であるが、その本 態について、また他の所見との相互の関係につい て未だ明確でない。免疫学的な検索もなされたが<sup>70</sup> 今後さらに検討が必要である。 謝辞:山田らの症例<sup>10</sup>の筋病変の検討に御協力を いただいた,新潟大学脳研究所神経病理 小柳清 光先生,同神経内科 渥美哲至先生,山崎元義先 生,宮武正先生に深謝致します.

#### 文 献

- 山田茂,豊島至,森茂,椿忠雄:筋萎縮,皮疹,関節拘縮変形を伴う lipodystrophy 症に類似する姉弟例.臨床神経24:703-710, 1984.
- Oyanagi K, Sasaki K, Ohama E, Ikuta F, Kawakami A, Miyatani N, Miyatake T and Yamada S : An autopsy case of a syndrome with muscular atrophy, decreased subcutaneous fat, skin eruption and hyper γ globulinemia : peculiar vascular changes and muscle fiber degeneration. Acta Neuropathol (Berl) 73 : 313-319, 1987.
- 3) 遠藤安行,三浦 亮: Progressive (partial) lipodystrophyの1例.日内会誌 69:554-560, 1980.
- 4) 堀越 昶, 岩淵 定, 飯塚芳一, 萩原照久, 天木 一太: Partial lipodystrophy に指趾の変形, 皮膚 筋炎様皮疹を認め, 広汎な基底核石灰化と免疫異 常, 知能指数の低下を伴った症例. 臨床神経 20: 173-178, 1980.
- 5) Fukuhara N, Kumamoto T and Tsubaki T: Rimmed vacuoles. Acta Neuropathol (Berl)
  51: 229-235, 1980.
- 6) 喜多野征夫:凍瘡を合併せる続発性肥大性骨骨膜症(仮称). 臨皮 29:867-873, 1975.
- 7) 佐久間かほり、田中正美、大野 司、宮武 正、 青柳愛孝:著明な NK 活性の減少が認められたり ポジストロフィーの姉弟例。神経内科 24:415-416, 1986.
### 4)筋US・筋CTによる筋緊張性 ジストロフィー症の検討

庄司進一\*

研究協力者	朴	木	清	人*	武	田	伸	*
	松	ጉ	茂	樹*	吉	田	邦	広*

はじめに

近年,神経筋疾患に,超音波断層法・CT・MRI 等の画像診断法が応用されるようになり,診断や 病態の解析に役立てられるようになってきた.

筋エコー法は、1983年 Dubowitz ら<sup>n</sup>により小児 の神経筋疾患、とりわけ進行性筋ジストロフィー 症の診断に有用であることが明らかにされた。わ が国では、1984年、北大の田代・松浦ら<sup>2</sup>が、成人 の神経筋疾患に応用をはかっている。また、筋 CT 法については、1977年 O'Doherty ら<sup>3</sup>が、DMD の 下腿筋に施行したことに始まり、様々な神経筋疾 患に応用されてきた。我々も、1984年末から、多 数の症例に対し筋エコー法並びに筋 CT 法を実施 し、神経筋疾患の診断及び病態の解析に利用して きた。

今回,我々は,筋緊張性ジストロフィー症(以下 MD) 6 例に,筋エコー法と筋 CT 法を実施し, 罹患筋分布及び進行様式に特徴的パターンを認め たので,その病態と合わせて報告する.

### 対象及び方法

対象は, 最近2年間に当科を受診した MD 6 例 (男3例・女3例, 27~59歳)で, いずれも DMD に対する進行期分類で2度(階段昇降にてすり不 要)以下と軽症であった(表1).

筋エコー法は、超音波断層装置日立 EUB-40を 用い、横走査像については、3.5MHz convex 型の probe を用い、gain 30dB, near gain -30dB, far gain 3.0dB (傍脊柱筋のみ gain 40dB) と

表1 対 象

CASE	性	年齡	経過年数	CK	進行期分類
1 H.T.	М	27	7年	839	G (1)
2 Y.O.	F	27	12年	564	G (1)
3 M. M.	F	29	17年	335	G (1)
4 F.F.	М	44	11年	392	G (2)
5 S.H.	М	56	4年	347	G (2)
6 S.F.	F	59	20年	263	G (2)

CKの正常値 M:43~272 F:30~165

し, 縦走査像については7.5MHz linear 型の probe を用い, gain 50dB, near gain-30dB, far gain 3.0dB と一定条件のもとで,三角筋・上腕二頭筋 中央・第3 腰椎棘突起外側・大腿中央前面・下腿 最大径部前-後面の6ヶ所で撮影した。

筋 CT 法は, CT 装置 siemens somatom 2を用 い level 25 window 256と一定条件で,三角筋中 央・上腕中央・第3 腰椎棘突起・恥骨結合中央・ 大腿中央・下腿最大径部の6スライスで横断像を得 た.

我々は、以前、筋原性疾患では筋エコー法上初 期に筋肉内エコー輝度の上昇がみられ、筋束の減 少はかなり進行した段階でないとみられないこと を報告している。MDは筋原性疾患であるので、 筋エコー法上、筋束の減少は目だたず筋肉内エコ ーの軽度増加がみられるものを mild と、筋束の軽 度減少と中等度の筋肉内エコーの増加を認めるも のを moderate と、筋肉内エコーの強い増加と筋束 の中等度以上の減少を認めるものを severe と区分 した.

また, 筋 CT 法上では, 筋肉内に線条の low density がみられるものを mild と, 筋肉内に散在 性に low density area がみられるものを moderate

<sup>\*</sup> 信州大学医学部第三内科

と, 筋全体が low density area に置き換わってい るものを severe と区分した。同一症例同一筋で, 筋エコー法と筋 CT 法上の障害度の分類で異なる 場合は, どちらか障害度の強い方をとった.

### 結 果

筋エコー法と筋 CT 法を共に施行した筋につい て、今回の結果を表2に示す.筋エコー法と筋 CT 法の障害度の分類は良く一致していた.この表か らわかるように、体幹四肢筋の中では、ヒラメ筋 がもっとも強く障害されていた.また、症例2(Y. O.) 27歳女性は、ヒラメ筋のみが強く障害されて いた.

表に示した筋を障害度順に示すと、ヒラメ筋> 前脛骨筋>中間広筋>腓腹筋内側頭>傍脊柱筋> 三角筋>大腿直筋だった.

図1は、中央に症例3 (M.M.) 29歳女性の下肢 の筋エコー図を示してある。左に対照、右に模式 図を示す。対照の大腿では、筋束は良く保たれ筋 肉内エコーの増加はなく、筋膜、骨エコーは良く 保たれている。一方、症例2 では、著明な、中間 広筋の筋束の減少と筋肉内エコーの増加および大 腿骨エコーの減弱を認める。下腿前面では、前脛 骨筋の著明な筋束の減少と筋肉内エコーの増加と 頸骨及び腓骨エコーの減弱を認める。下腿後面で は、ヒラメ筋で著しい筋束の減少と筋肉内エコー の増加を認める。中間広筋・前脛骨筋・ヒラメ筋 の強い障害が読み取れる。

図2は、同一症例の第3腰椎棘突起・大腿中央・ 下腿最大径部の筋CT図を示す。左に対照、右に 模式図を示す。中間広筋・前脛骨筋・ヒラメ筋が 強く障害されている.また,外側広筋・腓腹筋内 側頭が中等度障害されている.

図3は, 症例4 (F.F.)44歳男性の下肢の筋エコ ー図と傍脊柱筋・下肢の筋CT 図を示す。筋エコ ー図では,前脛骨筋・ヒラメ筋が強く障害され, 中間広筋が中等度障害されている。筋CT 図では, 前脛骨筋・ヒラメ筋が強く障害され,傍脊柱筋も 中等度障害されている。

### 考 察

MD では、胸鎖乳突筋 (以下 SCM) が臨床的に **最も早期に侵されるとされているが、今回、頸部** は3例のみしか CT を撮っていないので SCM は表 から省いた.表に示した筋群を type I 線維の多い 順に並べると、 ヒラメ筋>前脛骨筋>三角筋>傍 脊柱筋>腓腹筋内側頭>上腕二頭筋>腓腹筋外側 頭>中間広筋>大腿直筋の順である.type I%は すべて1973年のJohnson ら<sup>4</sup>の結果に基づいた.type I線維優位な筋が障害されやすい傾向を認めた。 しかし、Bulcke ら<sup>5</sup>が部位により大腿二頭筋(type I 66.9%) 大内転筋 (type I 63.3%) 等の type I 線維優位な筋が進行期に於て残ることを観察して いるが、我々の結果も同様であった。また、障害 度の軽い例から重い例を並べて筋の障害の進展を 推察すると、下腿では最初にヒラメ筋、次に前脛 骨筋、次に腓腹筋内側頭、最後に腓腹筋外側頭の 順が考えられ、大腿では、中間広筋がまず障害さ れ外側広筋へ及ぶと考えられた。

### 論

結

MD では体幹四股筋の中ではヒラメ筋が最も早

		三角筋	上腕二頭筋	傍脊柱筋	大腿直筋	中間広筋	前脛骨筋	腓肌	复筋	ヒラメ筋
								内側頭	外側頭	
TYPE I 1973) <sup>4</sup>	%(Johnson ら,	61.0	50.5	54.9	42.0	46.9	72.7	50.8	50.3	89.0
Case 1	Н. Т.					. 🗆				
Case 2	Y. O.									
Case 3	M. M.									
Case 4	F. F.									
Case 5	S. H.			0						
Case 6	S. F.									
		יח	NORMAL		MODEF	ATE	SEVERE			

表2 筋US・筋CTの骨格筋の障害度



図1 US of case 3(M.M.) RF: Rectus femoris VI: Vastus intermedius T A : Tibialis anterior G C : Gastrocnemius S : Soleus



図2 CT of case 3(M.M.). 略号は図1と同じ.



図3 US&CT of case 4(F.F.). 略号は図1と同じ

期に障害されるが、その病態として type I 線維萎 縮の関与が考えられた.下腿では、最初にヒラメ 筋、次に前脛骨筋、その次に腓腹筋内側頭、最後 に腓腹筋外側頭が障害され、大腿では、最初に中 間広筋、次に外側広筋が障害されると考えられた. しかし、罹患筋分布を全て type I 線維萎縮では説 明できなかった.

### 文 献

- Dubowitz V : Investigation of neuromuscular disorders. Journal of the Royal College of Physicions of London 17: 134, 1983.
- 2)田代邦雄,松浦享,長沼睦男,島功二:神経筋疾 患における ultrasound imaging—CT 所見及び筋 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, pp90-95.

- O'Doherty DS, Schellinger D and Raptopulos
   V : Conputed tomographic patterns of pseudohypertrophic muscular dystrophy : preliminary results. Journal of Computer Assisted Tomography 1: 482-486, 1977.
- 4) Johnson MA, Polgar J. Weightman D and Appleton D: Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. J Neurol Sci 18: 111-129, 1973.
- Bulcke JAL and Baert A : Clinical and radiological aspects of myopathies. Springer-Verlag, Berlin, 1982.

# 5)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の 定量化と画像シミュレーション

### 田代邦雄\*

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

#### はじめに

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-モード超音波画像が有用であ ることをすでに報告してきた<sup>1)-3)</sup>. B-モード画像上 の各疾患における所見の差異は隣接する組織の固 有音響インピーダンスの差と,その分布様式を反 映しているものと考えられ,昨年度著者らは生検 組織所見を用いて B-モード像をシミュレートする ための基礎データを得ることを目的として,生検 筋を構成する各成分について反射型超音波顕微鏡

(scanning acoustic microscope 以下 SAM)を 用いた固有音響インピーダンスの定量化を試み, その結果を報告したが,試料の厚みが薄かったこ となどいくつかの条件が不十分であったため,固 有音響インピーダンス値の相対的順位関係が知ら れたものの信頼に足る定量化までは至らなかっ た<sup>4</sup>.

今回の検討では試料の厚みを増し、より信頼性 のある定量化を行いその結果に基づいて構成要素 間の超音波信号反射損失を求めた.

### [実験1] 組織固有音響インピーダンスの定量化

### 方 法

イソペンタンを媒体とし液体窒素中で凍結固定 した生検筋の50ミクロン横断切片を検体とし、供 用周波数400MHzのSAMを用い、水をカプラー

\*北海道大学医学部神経内科

\*\*国立療養所札幌南病院神経内科

とした場合の基準となるガラス面と試料の超音波 の帰還レベルを電圧比として求め、さらに両者間 の反射損失を得る(式1).ガラス面と水の固有音 響インピーダンスを既知の値Z0,Z1とすると 試料の固有音響インピーダンスZ2は式2として 与えられる.ただし-GAPSは試料としてガラスを 用いた場合と検体を用いた場合の反射損失の差で ある<sup>4</sup>.

$$20 \log \left| \frac{\frac{Z2 - Z0}{Z2 + Z0}}{\frac{Z1 - Z0}{Z1 + Z0}} \right| = 20 \log \left| \frac{\mathbf{V}_{s^{\mathsf{R}}}}{\mathbf{V}_{r^{\mathsf{R}}}} \right| = \overset{-\text{GAPS}}{\text{(dB)}}$$

Z0 :カプラー (H<sub>2</sub>O) の固有音響インピーダンス

Z1:基準となる基板 (SiO₂)の固有音響インピー ダンス

- Z2 : 試料の固有音響インピーダンス
- Vr<sup>R</sup>:Z1のみの反射出力電圧
- Vs<sup>R</sup>: Z2 を挿入した場合の反射出力電圧 〔式 2〕

$$Z2 = \frac{Z0((Z1+Z0)^{2}+10^{w}(Z1-Z0)^{2}+2(Z1-Z0)(Z1+Z0)(10^{w})^{1/2})}{(Z1+Z0)^{2}-10^{w}(Z1-Z0)^{2}(kg/m^{2}s)}$$
$$W = \frac{-GAPS(dB)}{10}$$

### 結 果

図1Aは多発性筋炎の組織像である。筋細胞間 隙および筋膜に反射損失の大きな炎症性変化が黒 く示され、この変化は筋膜の近傍により強くかつ



図1A 多発性筋炎. 筋細胞間隙および筋膜に反射損失の大きな炎症性変化が黒く示され この変化は筋膜の近傍により強くかつ微細である.



図1B Duchenne 型進行性筋ジストロフィー.明るい肥厚した結合組織、100ミクロンから数mm単位で散在する反射損失が大きく黒く描出される脂肪組織、この間隙に小径の灰色を呈する筋線維群が示される.

微細である.図1Bに示すごとくDuchenne型進行 性筋ジストロフィー生検筋では明るい肥厚した結 合組織,100ミクロンから数mm単位で散在する反 射損失が大きく黒く描出される脂肪組織,この間 隙に小径の灰色を呈する筋線維群が示され分布パ ターンは前者のそれと大きく異なっている.

図2に結合組織、type 1 fiber、type 2 fiber、 再生線維、炎症性病変および脂肪組織のヒストグ ラムを反射損失を横軸として示す.これらの反射 損失をパラメーターとした組織分類は Kruskall-Wallis 多群間順位検定によれば10<sup>-28</sup>以下の危険率 で有意であった.ヒストグラム中に各群の中央値



図2 結合組織, type 1 fiber, type 2 fiber, 再生線維,炎症性病変および脂肪組織のヒ ストグラムを反射損失を横軸として示す.炎症性病変においてはその分散が多群に 比して大きい.

表1 算出された組織固有音響インピーダンス。結合組織, type 2 fiber, typer 1 fiber, 再生線維,炎症性病変および脂肪組織の順であり,炎症性変化ではその値の分散が 大きい。

< Acoustic Inpedance of Samples >

				*	median	, 8	nd (		confidence	interval
Fatty		tissue	1.544	(1. (+	.593 - 1 <b>31/-</b>	1.526	) E+( ) <b>E+(</b>	36 36		n = 15
Inflam	mation		1.586	(2. <b>(+</b>	.226 - 3 3.389/-(	1.544 <b>3.098</b>	) E+( ) E+(	<i>3</i> 6 <b>36</b>		, n ≠ 22
negene		110013	1.724	(+	<b>7.168/-</b>	8.004	) E+	<b>26</b>		
Panana	rativa	fibere	<b>2.052</b>	<b>(+(</b> (1)	9.111/-1 859 - 1	<b>1.083</b>	) E+(	<b>36</b> 26		n = 13
Туре	1	fibers	2.044	(2	.127 - 2	2.044	) E+(	26		n = 49
lype	2	fibers	2.653	(2) ( <b>+</b>	. 152 - 1 8.287/-1	2.483 <b>3.217</b>	) E+( ) E+(	26 266		n = 47
-			3.877	(+	8.713/-	3.445	È	<b>36</b>	(Kg/m•m•s)	
Connec	tive	tisène	! 3 123	(3	456 - 2	2 653	) F+(	76	(Ka/m*m*s)	! n = 25

表2 隣接する構成要素間に期待される超音波反射損失レベル.ひし形は中央値同士の組合せによって得られた値,左端および右端は99%信頼限界を考慮した場合とりうる最小および最大の反射損失.縦の破線は現在 B-モード像を得る際の著者らの条件における信号下限域.



および99%信頼区間を上段に,平均値±SDを下段 に示す.炎症性病変においてはその分散が多群に 比して大きいことが知られる.得られた結果を組 織固有音響インピーダンスに変換し降順に配列し た結果を表1に示した.同値は結合組織,type 2 fiber,type 1 fiber,再生線維,炎症性病変および 脂肪組織の順であり,炎症性変化ではその値の分 散が大きい.

### [実験2]構成要素間における超音波信号反射損 失の算出

### 方 法

生検筋組織において各構成要素が理想的平面を 形成してあい接すると仮定した場合の隣接する構 成要素間に期待される超音波反射損失レベルをさ きにあげた式1によって求めた。

### 結 果

表2に,算出された結果のうち臨床的に意味の 大きいと考えられる組合せを反射損失レベルの小 さな,すなわち超音波反射信号の大きな順に配列 して示す.各段のひし形は中央値同士の組合せに よって得られた値,左端および右端は99%信頼限 界を考慮した場合,とりうる最小および最大の反 射損失である.縦の破線は現在 B-モード像を得る 際の著者らの条件における信号下限域でありこの 線より左側ほど信号が大きいことを示す.表から 結合組織と脂肪組織の組合せが echogenicity に最 も富み,ついで結合組織と炎症性病変が続く.筋 線維では信号に関与するのは主として type 2 fiber であることも知られる.また,炎症性病変のステ ージによりそのとりうる反射損失レベルは大きく 変動する可能性が示される.

### まとめ

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。 これらの値を用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,両者の境界面において生 ずると期待される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 echogenicity に最も富み、ついで結合組織と炎症性変化、type 2 fiber と脂肪組織などの組合せが続き, 逆に type 1 fiber と type 2 fiber では echogenicity はきわ めて小さいものと推定された、更に、炎症性変化 が関与すると、そのステージによって echogenicity が変動することも示された.また,各疾患により 明らかにこれら各成分の分布パターンが異なり。 B-モード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、生検標本から超音波画像の シミュレーションを行い対比することは、B-モー ドによる組織診断の妥当性を検討する上で有意義 であると考えられた.

### 文 献

- 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--.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, pp90-95.
- 2) 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.
- 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,土井静樹,森若文雄,島 功 二:神経筋疾患における ultrasound imaging一超 音波顕微鏡による組織固有音響インピーダンス定 量化の試み一.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61年度研究報告書,1987,pp100-105.

## II.生 化 学

.

### 6) Duchenne 型筋ジストロフィー症(DMD)における 超高分子蛋白, titin, nebulin の変化について

荒木淑郎\*

研究協力者 内野 誠\*

### はじめに

分子遺伝学の急速な進歩に伴ない, Duchenne 型 筋ジストロフィー症 (DMD) の原因遺伝子に関す る研究も近年著しい進展をみている<sup>1)~1</sup>. Kunkelら の最近の研究によると、DMD の遺伝子座は X 染 色体短腕 (Xp21) の約2,000 kilo bases (kb) に わたる DNA 鎖上にあり、この中に含まれる約60個 の exon (平均200 base pairs) の一部あるいは大 部分が欠失することにより DMD が発症すること が次第に明らかにされてきている。この60個の exon は mRNA の長さで16kb<sup>4</sup>さらに最新の研究では14 kb5)に相当することが明らかにされ、既に cDNA と してクローニングされている. Wood らはこれらの 研究成果に基づき, 16kbのmRNA が単一の蛋白 の遺伝情報をコードしていると仮定すると、分子 量約500 kilo daltons(kd)の蛋白に相当するとの 考えのもとに筋肉中の超高分子蛋白 nebulin(分子 量500~600kd)の変化に注目して DMD 患者生検 筋の SDS polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE)による筋構造蛋白の分析を行い, DMD で は全例 nebulin に相当する band が欠損ないし著し く減少していることを報告した<sup>9</sup>. 従来 DMD にお ける筋構造蛋白の変化については myosin heavy chain (MHC, 分子量200kd) 以下の比較的低分子 量の蛋白の変化については詳細に検討され、多く の研究報告が行なわれてきたが")~9, MHCより高 分子の蛋白の変化については殆んど報告がなく, 最近漸く研究が開始されたばかりである。 そこで 今回 DMD 並びにその他の各種神経筋疾患におけ る titin(分子量約1,000kd), nebulin, 及び filamin

(分子量250~270kd)などの超高分子蛋白を中心 に筋構造蛋白の変化について検討を加えたので報 告する。

### 対象並びに方法

対象は DMD 3 例(7歳, 9歳, 12歳), Becker 型ジストロフィー症 (BMD) 1例 (25歳), 筋緊 張性ジストロフィー症(MD)2例(20歳,30歳) のいずれも男性。多発性筋炎 (PM) 5 例 (19歳男 性, 33歳男性, 47歳男性, 50歳女性, 70歳女性), 重症筋無力症(MG)1例(32歳女性), Charcot-Marie-Tooth 病(CMT) 1 例(30歳男性), HTLV -1 associated myelopathy (HAM) 1例 (60歳 女性), 運動ニューロン疾患(MND) 4例(62歳 女性, 68歳女性, 70歳女性, 73歳男性), 及び正常 対照4例(10歳女性、13歳女性、18歳男性、26歳 男性).筋生検は上腕二頭筋、腓腹筋あるいは前脛 骨筋で行ない、生検筋の一部を氷冷の弛緩液(0.12 M KCl, 20mM tris, 20mM maleic acid, 4mM EGTA, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 4mM ATP, 50% glycerine, pH6.8) 中に浸し, 実体顕微鏡下で10~20本 の筋線維を single fiber の形で分離した. この10数 本の筋線維を集めて10~15µlの蛋白溶解液(2% SDS, 5 %  $\beta$ -mercaptoethanol, 40% glycerine, 40mM tris, 0.24M glycine, 0.03% bromphenol blue, pH8.5) 中に移し, Wheaton micro tissue grinder で homogenize 後, 50℃ 20分間の preincubation を行った. 電気泳動は slab 型の泳動装置 にて行ったが、分離用ゲルには5%の acrylamide を, 濃縮用ゲルには4%の acrylamide を用い,7 mA で約3時間の泳動を行なった。染色は三川ら10) の方法に従って銀染色を行なったが、一部は比較



I SDS gel pattern of human skeletal myofibrillar proteins by silver stain. Protein bands with lower mobilities than myosin heavy chain (MHC) are labeled numerically from the top: bands 2, 5, and 6 are identified as titin, nebulin, and filamin respectively from published patterns and molecular weight (approximately 1,000 kd, 550 kd, and 300 kd). Ph=phosphorylase. TM=tropomyosin.

のために Coomassie brilliant blue (CBB) 染色 を行った.

### 結 果

1) 正常対照者: rabbit の骨格筋で報告されて

いる SDS PAGE パターン<sup>11)~13)</sup>とは異なった泳動 パターンを示し、MHC より高分子領域に主要なも ので約6本の band が認められた. gel top に近い ものから順に band 1, 2, 3, 4, 5, 6と仮に 命名すると、移動率から求めた分子量はそれぞれ



 $\boxtimes 2$  SDS gel electrophoresis of myofibrils from Duchenne muscular dystrophy (DMD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and control (C) muscle. The band identified as nebulin is absent in the DMD patient. The band identified as titin is extremely faint with a decrease of the  $\alpha$ -actinin, troponin-T, and tropomyosin bands.

T=titin. N=nebulin. MHC=myosin heavy chain.  $\alpha$ -A= $\alpha$ -actinin. Act=actin. TM=tropomyosin.

1,100, 1,000, 800, 700, 550, 及び300kd となる (図1). 泳動パターン及び分子量から band 2は
titin, band 6は filamin<sup>14)15)</sup>と考えられる. その他
の band については泳動パターンからは band 3が
nebulin に概当するようにも思われるが, band 3は
分子量約800kd と従来の文献に報告されている分
子量よりも高分子域にあり,分子量も重視すると、
約550kd の band 5が nebulin に合致するので, band 5を nebulin と判断して以下の分析を行なった. band 1, 3, 4 の由来については不明である. な お CBB 染色では銀染色に比較して各 band の描出 は不鮮明で, band 1は染色されなかった.

2) DMD: nebulin の消失に加えて, titin も著 しく減少していた. filamin は不変であった. MHC 以下の band では actin には変化なく, α-actinin, troponin-T, tropomyosin の減少傾向がみられた



 $\boxtimes$  3 SDS gel electrophoresis of myofibrils from polymyositis  $(PM_1,\,PM_2)$ , myasthenia gravis (MG), and control (C) muscle. The titin band is extremely faint with a decrease of nebulin in  $PM_1$  (acute polymyositis case).

(図2).

3) BMD: titin, nebulin は著減し, filamin は 不変で, troponin-T も減少していた.

4) MD:特に変化を認めなかった.

5) PM:慢性型では特に変化を認めなかった が,急性型の一例でband 1が消失し,titin band の著減,低分子領域への移動,nebulin と思われる band の減少傾向がみられた(図3).なお本例では 壊死線維が孤立性,あるいは十数本の集団をなし て存在し,筋束内にも著しい炎症性細胞浸潤がみ られた.

6) MG:特に変化はみられなかった.

7) CMT:本例では形態学的に多数の whorled fiber を認めたが、MHCより高分子域で titin の減 少傾向がみられた。 8) HAM:特に変化はみられなかった.

9) **MND**: band 1の増加傾向がみられたが, そ の他には特に変化はみられなかった(図2).

### 考 察

DMDにおける筋構造蛋白の変化については、こ れまで MHC 以下の低分子蛋白について詳細に検 討され、 $\alpha$ -actinin、desmin、troponin-I、C の減 少など actin を除いて殆んど全ての筋構造蛋白に変 化がくることが報告されており<sup>77-91</sup>、このことは Ca -activated neutral protease (CANP)を始めと する内因性 protease の活性化に伴なう筋構造蛋白 分解の結果と考えられ、DMD の膜異常説を支持す る一つの大きな根拠となっていた。ところが最近 DMD の遺伝子座が cDNA としてクローニングさ

れ<sup>4)5)</sup>, これをうけて Wood ら<sup>6)</sup>はその DNA の size から単一の蛋白が合成されていると仮定すると. 分子量500kd以上の高分子蛋白に相当すると考え, 30例の DMD で筋構造蛋白を分析した結果, DMD では全例 nebulin (分子量500~600kd) が消失ない し著しく減少しているという注目すべき報告を行 なった. ただ Wood らの論文に提示された SDS-PAGE を見る限りでは control においても titin 及 び nebulin が constant に明瞭な band として認め られておらず, titin 及び nebulin の泳動距離もこ れまで文献に報告されている泳動パターンと比較 して、かなり接近しており、呈示されている band を nebulin と断定するにはなお慎重な検討が必要と 思われた。そこで今回我々も DMD 生検筋を用い て SDS-PAGE による筋構造蛋白の分析を試みた が,titin 及び nebulin は泳動条件によって分離度 に違いがでてくることがわかった。

titin 及び nebulin を constant に明瞭な band と して描出するための泳動・染色条件を種々検討し た結果、1) slab gel で泳動を行なう場合、disc gel 法で推奨されている6.5% ゲル<sup>16)</sup>よりも濃縮用ゲル 濃度は3~4% 分離用ゲルは5% ゲルを用いた 方が良好な結果が得られる。2) 泳動前の incubation は Wang<sup>11)</sup>の推奨する50°C-20分間が、一般に 行なわれる90~100°C、2~3分間の incubation よ り分離が良好である。3) 生検筋を mass として homogenize するよりも、弛緩液中で single fiber の形で分離し、10数本の筋線維を集めて homogenize する方が band の分離は良好である。4) 染色 も銀染色と CBB 染色のそれぞれに長所短所がある が、微量蛋白の検出は銀染色の方が優れている。

以上の条件下に SDS-PAGE を行ない DMD 及 びその他の各種神経筋疾患における筋構造蛋白の 変化を検索したが,正常対照者では MHC より高 分子領域に 6本の主要な band が認められた.前述 したように band 2 は約1,000kd の分子量, band 5 は約550kd の分子量を有し,文献上に報告されてい る分子量を参考に,それぞれ titin, nebulin と判定 した. band 6は泳動パターン及び分子量(約300kd) から filamin<sup>14)15)</sup>と判定した. band 1, 3 及び 4 の 由来は不明で, band 3, 4 は titin の分解産物の可 能性もあるが,正確な由来については今後の検討 が必要である.

DMDにおける筋構造蛋白の変化は Wood ら<sup>6</sup>が nebulin に相当する band のみが消失ないし著しい 減少をみたと報告しているのに対して,我々の分 析では nebulin の消失と共に titin も著減し, $\alpha$ actinin, troponin-T 及び tropomyosin の減少傾 向もみられた.DMD 以外の神経筋疾患では BMD でも程度は軽いが DMD と類似の所見がみられ, また急性多発筋炎例で band 1の消失, titin の低分 子領域への移行, nebulin の減少を認めた.その他 の神経筋疾患では筋構造蛋白に大きな変化はみら れなかった.

以上我々の分析結果は基本的には Wood らの報 告と類似した結果となったが、MHC や actin に比 較して、titin や $\alpha$  - actinin、troponin - T、 tropomyosin も減少しており、内因性 protease 作 用による蛋白分解の関与も完全には否定できない ように思われた。DMD における nebulin の消失が 遺伝子の欠失に基づく蛋白合生障害によるのか、 内因性 protease による消化の結果か DMD の成因 に直結する重要な問題であるが、既に DMD の遺 伝子座が cDNA としてクローニングされており<sup>5</sup>、 全塩基配列の決定にひきつづき、蛋白のアミノ酸 配列が判明するのも時間の問題となっており、DMD の発症機構の解明も真近いものと思われる。

謝辞:本研究に種々御協力いただいた宮崎県立 延岡病院神経内科 川崎渉一郎先生,国立再春荘 病院神経内科 寺本仁郎先生に深謝いたします.

### 要 約

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) 並び に各種神経筋疾患において,超高分子蛋白の titin 及び nebulin の変化を中心に筋構造蛋白の分析を 行った. DMD では nebulin の消失に加えて, titin も 著 減 し,  $\alpha$  - actinin, troponin - T,及び tropomyosin も減少傾向を示した.

Becker 型ジストロフィー症も類似の変化を示 し,また多発性筋炎の急性型で titin の低分子領域 への移行, nebulin の減少がみられた. DMD にみ られる nebulin の消失は遺伝子の欠失に起因してい る可能性もあるが, 泳動パターンの特徴から内因 性 protease の関与が示唆され, 更に多数例での検 討が必要と考えられた.

### 文 献

- Monaco AP, Bertelson CJ et al: Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. Nature 316: 842, 1985.
- Kunkel LM and co-authors: Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy.
- 3)金田安史:遺伝病遺伝子のクローニング.代謝 23:571,1986.
- Monaco AP, Neve RL et al : Isolation of candidate cDNA for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature 323: 646, 1986.
- 5) Koenig M, Hoffman EP et al : Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50: 509, 1987.
- Wood DS, Zeviani M et al : Is nebulin the defective gene product in Duchenne muscular dystrophy?. N Engl J Med 316: 107, 1987.
- Sugita H and Toyokura Y: Alteration of troponin subunits in progressive muscular dystrophy (DMD). I pattern of troponin subunits in DMP. Proc Japan Acad 52: 256, 1976.

- 8) Sugita H, Katagiri T et al: Studies on the structural proteins in various neuromuscular diseases. In Basic Research in Myology, ed by Kakulas BA, Excerpta Medica Amsterdam 1974, p291.
- 9) Uchino M, Araki S et al : Structural proteins of the opaque muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. Neurology 35: 1364, 1985.
- 三川隆:手軽なマイクロ2次元電気泳動法と高感 度蛋白染色法 微量蛋白分析のために,生体の 科学 32:74, 1981.
- Wang K: Purification of titin and nebulin. Methods Enzymol 85: 264, 1982.
- 12) Wang K: Sarcomere-associated cytoskeletal lattices in striated muscle. Cell Muscle Motil 6:315, 1985.
- Horowits R, Kempner ES et al : A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. Nature 323: 160, 1986.
- 14) Gomer RH and Lazarides E : Highly homologous filamin polypeptides have different distributions in avian slow and fast muscle fibers. J Cell Biol 97: 818, 1983.
- Koteliansky VE, Glukhova MA et al : Isolation and localization of filamin in heart muscle. Eur J Biochem 156: 619, 1986.
- 16) Locker RH and Wild DJC: A comparative study of high molecular weight proteins in various types of muscle across the animal kingdom. J Biochem 99: 1473, 1986.

### 7) 筋ジストロフィーマウス(MDX) における 筋蛋白質の高分子領域における異常について

堀 眞一郎\*
 研究協力者 杉 浦 弘 子\* 大 谷 幸 子\*
 平 林 民 雄\*\* 中 村 瑞 穂\*\*

遺伝性筋ジストロフィー症の異常遺伝子のクロ ーニングが急速に進み、今日、異常遺伝子のもつ 情報発現をとらえるこころみが、色々となされ数 多くの報告があるが、高分子領域での報告は少な い.私達は筋ジストロフィーマウス(C57BL/10ScSn -MDX)の筋組織について、平林の開発したミオ シン重鎖をも定量的に分離できる二次元電気泳動 を用いて検索したところ、比較的高分子領域(約 14.7kD)における蛋白質の異常を見いだしたので 報告する.

#### 実験方法

大部分の筋線維に中心核が出現する"生後120日 の雄の筋ジストロフィーマウス(C57BL/10ScSn-MDX,以下 MDX-マウスと略す)及び正常対照マ ウス(C57BL/10ScSn-+/+,以下正常対照マウス と略す)の長指伸筋,ヒラメ筋,及び心筋を使用 した.

蛋白質の可溶化および抽出 摘出した筋組織を 5M urea-1M thiourea-0.5%  $\beta$ -mercaptoethanol 液中に glass homogenizer で懸濁し,遠心 後,上清を可溶化された蛋白質標品として用いた。 筋蛋白質の可溶性の検索には,0.05M KCl-0.01M Tris-HCl, pH7.8に懸濁した筋組織を,16,000g× 20min 遠心し,上清分画と沈澱分画に分離し,そ れぞれを5M urea-1M thiourea-0.5%  $\beta$ -mercaptoethanol 液で先に記載した様に処理し,上清 分画から回収された蛋白質を可溶性蛋白質,沈澱 分画から回収された蛋白質を不溶性蛋白質とした. 二次元電気泳動 平林の開発した二次元電気泳 動法<sup>2</sup>により抽出された蛋白質を分離し、Coomassie Brilliant Blue R で染色の後、観察した.

#### 結 果

**蛋白質の異常** 正常対照マウスの長指伸筋では、 ミオシン重鎖より、分子量がやや小さく、等電点 がややアルカリ側にスポットが観察されるのに, MDX-マウスの長指伸筋ではこのスポットが消失 もしくは減少している(図1).一方、ミオシン重 鎖より分子量がやや小さく、等電点がやや酸性側 のスポットは逆に MDX-マウスの方が正常対照マ ウスより増加していた(図1). この二つの蛋白質 は蛋白質の荷電状態を示す等電点は著しく異なっ ているが分子量はあまり異っていなかった。しか L, 5M urea -1M thiourea -0.5%  $\beta$  - mercaptoethanol 液による蛋白質の可溶化抽出に先だ って、筋組織を8M塩酸グアニジン処理することに よって、後者のスポットはほとんど観察されなく なり、MDX-マウスおよび正常対照マウスのいず れの長指伸筋においても、 ミオシン重鎖よりやや アルカリ側のスポットのみが観察されるようにな った(図2).8M塩酸グアニジンは組織中の酵素 を速やかに失活させることが知られている。よっ て、これらの結果は MDX-マウスの筋組織には正 常対照マウスの筋組織にはないかあるいは弱い活 性しかない蛋白質を修飾する酵素が存在していて, 筋組織より蛋白質を抽出する際.8M 塩酸グアニジ ンで処理することにより、この蛋白質を修飾する 酵素が失活したことを示唆している。正常対照マ

<sup>\*</sup> 東京都神経科学総合研究所神経生化学研究室

<sup>\*\*</sup>筑波大学生物科学系



図1 長指伸筋の蛋白質の二次元電気泳動. A) 正常対照マウスの長指伸筋, B) MDX-マウスの長指伸筋. MH; ミオシン重鎖, A;酸性側のスポット, B; アルカリ側の スポット.



-67-



図3 ヒラメ筋の蛋白質の二次元電気泳動. A)正常対照マウスのヒラメ筋, B) MDX-マウスのヒラメ筋. MH;ミオシン重鎖.



図4 心筋の蛋白質の二次元電気泳動.A)正常対照マウスの心筋,B) MDX-マウスの 心筋.MH;ミオシン重鎖.



 図5 正常対照マウスの長指伸筋の蛋白質の可溶性. A) 0.05M KCl-0.01M Tris-HCl, pH7.8に懸濁した際,上清分画に回収された蛋白質の二次元電気泳動図, B) 0.05M KCl-0.01M Tris-HCl, pH7.8に懸濁した際, 沈澱分画に回収された蛋白質の二次 元電気泳動図. MH;ミオシン重鎖, A;酸性側のスポット.



 図6 MDX-マウスの長指伸筋の蛋白質の可溶性. A) 0.05M KCl-0.01M Tris-HCl, pH7.8に懸濁した際,上清分画に回収された蛋白質の二次元電気泳動図, B) 0.05M KCl-0.01M Tris-HCl, pH7.8に懸濁した際, 沈澱分画に回収された蛋白質の二次 元電気泳動図. MH;ミオシン重鎖, A;酸性側のスポット.

表1 アルカリ側の蛋白質と酸性側の蛋白質の画像解析による定量.

二次元電気泳動で分離された長指伸筋の蛋白質の内,ミオシン重鎖よりやや小さい 分子量で,アルカリ側にみられたスポット(スポット B, basic protein)と酸性側 にみられたスポット(スポット A, acidic protein)について,コンピュータによる 画像解析をして,それぞれのスポットの蛋白質の量を算出した。それぞれの値は筋 組織の湿重量 mg 当りの蛋白質の量を示す。

	Basic Protein (µg)	Acidic Protein (µg)	Basic/Acidic
Control	0.63±0.090 (26)	0.28±0.032 (26)	3.71±1.14 (26)
MDX	0.58=0.082 (24)	0.50±0.055 (24)	1.87±0.40 (24)

ウス筋と MDX-マウス筋の間のこの二つの蛋白質 の量の違いを数値化して比較するため正常対照マ ウスの長指伸筋26例, MDX-マウスの長指伸筋24 例について, アルカリ側の蛋白質と酸性側の蛋白 質の量を画像解析を用いて定量したところ(表 1),アルカリ側の蛋白質は正常対照マウスの長指 伸筋では0.63µg/mg湿重量, MDX-マウスでは 0.58µg/mg湿重量, 酸性側の蛋白質は正常対照マ ウスの長指伸筋では0.28µg/mg湿重量, MDX-マ ウスの長指伸筋では0.50µg/mg湿重量であった. アルカリ側の蛋白質と酸性側の蛋白質の量比は個 体差がかなりあったが, 正常対照マウスでは3.71 であったのに対し, MDX-マウスでは1.87であっ た.しかし,これらの異常な蛋白質はヒラメ筋(図 3)および心筋(図4) では認められなかった.

**蛋白質の可溶性** 長指伸筋において異常なスポ ットを示した蛋白質の可溶性を検索するため,筋 組織を0.05M KCI-0.01M Tris-HCl, pH7.8溶液 に懸濁したところ, MDX-マウスの長指伸筋のみ ならず,正常対照マウスの長指伸筋においてもア ルカリ側のスポットは消失し酸性側のスポットの みとなった。このことはアルカリ側の蛋白質と酸 性側の蛋白質とは同一の蛋白質であり,筋組織内 の酵素によりアルカリ側から酸性側に変化するこ とを示している.この蛋白質は0.05M KCl の塩濃 度では不溶性であり(図5,図6),筋組織の構造 蛋白質に由来することが示唆された.

### 考察

ミオシン重鎖よりやや低分子量で、アルカリ側 に出現するこの蛋白質はいわゆる C-protein であ ると思われる. この C-protein は筋細胞のミオシ ンフィラメントを束ねる作用を持っていると言わ れている、このことから、この異常が筋ジストロ フィーの発症と何等かの関連を持っていると思わ れる. 2ヶ所に出現した異常蛋白質は近似した分 子量であることから、蛋白質の荷電に関係する蛋 白質の修飾を触媒する様な酵素に異常があるのか もしれない。尚、この異常が個体発生のいかなる 時期から出現するのか、この蛋白質が C-protein と 同じものであるのか、さらに今回の検索では、ヒ ラメ筋、心筋にはこの種の異常を検出することは 出来なかったが、この異常が白筋に固有のもので あるのか否か、これらの点について、検討中であ る.

### まとめ

 筋ジストロフィーマウス (C57BL/10ScSn-MDX, MDX-マウス)の長指伸筋, ヒラメ筋およ び心筋の蛋白質を, 二次元電気泳動法を用いて分 析した.

2. 正常対照マウスの長指伸筋ではミオシン重鎖 より分子量が小さく,等電点がややアルカリ側に ある蛋白質が観察されるのに,MDX-マウスでは 消失もしくは減少していた.一方,ミオシン重鎖 より分子量が小さく,等電点がやや酸性側にある 蛋白質は MDX-マウスの方が増加していた.この 2つの蛋白質の量比は正常対照マウスで3.71, MDX-マウスで1.87であった.

3. ヒラメ筋, 心筋では正常対照マウスと MDX-マウス間に差は認められなかった.

4. 長指伸筋を8M 塩酸グアニジン処理後, 尿素抽 出を行うと正常対照マウスと MDX-マウスの間の 差はなくなり, 蛋白質はすべてアルカリ側にきた. 5. 0.05M KCI-0.01M Tris-HCl, pH7.8溶液中 では, この2種類の蛋白質は正常対照マウス, MDX -マウスともにすべて酸性側に移動し, 不溶性分画 に回収された.

**謝辞**:マウスの長指伸筋およびヒラメ筋の簡便な 調製法を御教授いただいた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部長に感謝いたします.

### 文 献

- 杉田秀夫:筋ジストロフィー症モデル動物の開発.mdxマウス骨格筋の病理学的研究.「厚生省神経疾患委託費筋ジストロフィー症動物の開発,供給に関する研究」野村班,昭和59年度研究報告書,1985,p13.
- 2) 堀真一郎,杉浦弘子,大谷幸子:筋ジストロフィ 一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、「厚生省神経疾患委託費筋ジストロフィ 一症の臨床,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, p69.

### 8) Duchenne 型筋ジストロフィー患者の生検筋及び 剖検筋の高分子量成分の検討(予報)

		豊	島	至	*		
研究協力者	山	本	彰	夫*	IE.	宗	研*
	小	林	良	<u>**</u>	宮	武	正***

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) では遺 伝子の解析がすすみ、ヒト胎児筋 mRNA で同定さ れた16kb<sup>1)</sup>あるいは14kb<sup>2)</sup>の遺伝子の産物が注目さ れている. Wood ら<sup>3)</sup>は30例の DMD の生検筋のす べてで分子量が約50万とされる nebulin の消失~著 減を報告した.

今回, 私達は, DMD 筋においてこれまであまり 注目されていなかった nebulin をはじめとする高分 子量蛋白質について検討を行ったので報告する.

### 対象と方法

DMD 生検筋 3 個(9歳,6歳,2歳男児,いず れも大腿四頭筋), 剖検筋 2 個(17歳,22歳男性, いずれも胸鎖乳突筋),正常対照生検筋 2 個(いず れも最終的に心因反応と診断された66歳男性の腓 腹筋と46歳女性の前脛骨筋)を用いた.また,鶏, 牛,兎の骨格筋,兎心筋と平滑筋,ヒト平滑筋を 用いた.

各筋肉を液体窒素あるいはドライアイス-イソペ ンタンで急速凍結し、凍結乾燥切片を作成し<sup>4</sup>,微 量電子天秤(Sartorius)で秤量したのち、SDS-ポ リアクリルアミド平板ゲル電気泳動を行った.1lane あたり3µg 乾燥重量を添加し、銀染色法で蛋白質 を検出した.

#### 結 果

各種動物の骨格筋高分子量蛋白質の構成
 鶏の浅胸筋,牛の臀筋,兎の背筋,正常ヒト腓

\*秋田大学医学部第一内科 \*\*秋田大学医学部第二生化学 \*\*\*新潟大学脳研究所神経内科 腹筋を4.5%アクリルアミドとして比較した(図 1).マーカー蛋白質としてはヒト赤血球 spectrin (分子量:24万,22万)と、牛の微小管関連蛋白 質(MAPs, MAP1:35万, MAP2:28万~30万ダ ブレット)を用いた.いずれの筋でもミオシン H



図1 各種動物の骨格筋高分子量蛋白質
 m:ミオシン H 鎖, C:C-protein,
 aa: α-アクチニン, 矢印: spectrin と
 MAPs (MAP1a, MAP1b, MAP2a,
 MAP2b) 4.5%アクリルアミド, 銀染色.

鎖がわずかの分子量のちがいを示しながら中央に 位置し、その下に C 蛋白質、α-アクチニンが認め られ、ミオシン H 鎖より高分子量には10本余りの バンドがみられた.

Nebulin を同定するため、兎の骨格筋と心筋を比較した(図2). アクリルアミドを3.3%として検討すると、骨格筋で MAP1a のすぐ上にあるバンドが心筋で失われているので、nebulin と同定された<sup>5)6)</sup>. 胃平滑筋でも明らかでない. Nebulin より上のバンドは connectin  $\alpha$ ,  $\beta$  と考えられるが<sup>6)77</sup>, 心筋では少なく、胃平滑筋では認められない. 心筋と平滑筋では nebulin と connectin の間に淡いバンドが認められるが骨格筋では明らかでない. 平滑筋でミオシン H 鎖の上に filamin が多量に認められる<sup>5)</sup>. 骨格筋でこれよりわずかに分子量の小さいバンドが淡く認められ、心筋では両者がほぼ等量で少量認められた.アクリルアミドが4.5%では nebulin と connectin の間に何本かのバンドが見ら

れるが、3.3%では明らかでなく、nebulinより下 方に移動しているように見える。何らかの原因に よるゴーストと考えられる。

正常ヒトで骨格筋と十二指腸,直腸の平滑筋を 検討したが,兎と同様の所見であった.

2) DMD 筋の高分子量成分の検討

5 個の DMD 筋と 2 個の対照筋を比乾検討した (図3). 高分子量成分は、ミオシン H 鎖の相対 量と平行する傾向を示し、減少例では不分明とな っているが、剖検 DMD 筋の 1 例では正常対照と 同程度の nebulin と、対照より明瞭な connectin( $\beta$ と思われる) がみられた.正常対照の 1 例でも nebulin は不明瞭であった.

### 考 察

Wood らは DMD 筋のすべてで nebulin の著減 ~ 消失を報告したが<sup>3)</sup>, その後, nebulin と DMD の 関係は否定的となっている<sup>9)</sup>.





 図2 兎骨格筋(a:背筋,b:胸筋)と心筋(C), 胃平滑筋(d)の比較
 3.3%アクリルアミド, 銀染色.黒丸:MAP1aの位置 今回の結果からも、剖検DMD筋の1例で nebulinは明らかに保存されており、反証例の存在 が示された。DMD遺伝子のmRNAは、骨格筋全 体のmRNAの0.01~0.001%にすぎないとされ<sup>8)</sup>、 nebulinの含量(3-5%<sup>7)</sup>)と一致しない.また、 心筋には nebulin が存在しないとされ<sup>5)6)</sup>、DMDで は心筋がおかされること、また、DMD遺伝子の mRNA が心筋にも存在すること<sup>8)</sup>から DMD遺伝 子と nebulinの直接的な関連は否定的である。

他の高分子量成分については、今回の検討から は、ゴーストバンドの存在など技術的な困難が一 部未解決であるが、観察できる範囲での差異は認 められなかった. DMD 遺伝子の mRNA の量から 考えて、少量成分の差異を検出する方法の検討が 重要であると思われる.

### 文 献

- Monaco AP, Neve RL, Colleti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM and Kunkel LM : Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature 323: 646-650, 1986.
- 2) Koenig M, Hoffmann EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C and Kunkel LM: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50: 509-517, 1987.

- 3) Wood DS, Zeviani M, Prelle A, Bonilla E, Salviati G, Miranda AF, DiMauro S and Rowland LP: Is nebulin the defective gene product in Duchenne muscular dystrophy? N Engl J Med 316: 107-108, 1987.
- 4) Toyoshima I, Tanaka K, Fukuhara N, Kumamoto T and Miyatake T: Dissection and electrophoretic protein analysis of single muscle fibers from histologically identified freezedried sections: Application to muscle fibers with rimmed vacuoles. Biomed Research 4: 459-466, 1983.
- 5) Locker RH and Wild DJC: A comparative study of high molecular weight proteins in various types of muscle across the animal kingdom. J Biochem 99: 1473-1484, 1986.
- 6) Hu DH, Kimura S and Maruyama K: Sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis studies of connectin-like high molecular weight proteins of various types of vertebrate and invertebrate muscles. J Biochem 99: 1485-1492, 1986.
- 7) Wang K: Purification of titin and nebulin. Methods Enzymol 85(B): 264-274, 1982.
- 8) Hoffman EP, Monaco AP, Feener CC and Kunkel LM: Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans. Science 238: 347-350, 1987.
- 9) 本報告書 55)参照

### 9) 筋ジストロフィーマウス(dy/dy)の交感神経節の 蛋白質合成能について

堀 眞一郎\*

研究協力者 杉 浦 弘 子\* 大 谷 幸 子\* 平 林 民 雄\*\*

遺伝性筋ジストロフィー症における発症の誘因 に,骨格筋の栄養神経としての自律神経,殊に交 感神経の異常があるのではないかとの仮定にたっ て筋ジストロフィー症の家鶏およびマウスの動物 モデルを使用して検討してきた.先に,私達は, ニューハンプシャー種家鶏413系の交感神経節では 神経成長因子に対する反応性の加齢に伴う変化が 正常対照鶏と異なること<sup>1)</sup>,神経節における蛋白質 合成能に質的な差異があること<sup>213)</sup>を見いだした.

この家鶏の神経節において、合成能に差のある 蛋白質の抽出同定は進行中であるが、今回はこの 種の蛋白質合成能の異常が筋ジストロフィーマウ ス (C57BL/6J-dy/dy)においても見られるのか否 か、検討したので報告する。

### 実験方法

ホモの筋ジストロフィーマウス(C57BL/6J-dy/ dy,以下 dy/dy-マウスと略す)の雌雄から取り出 した卵子と精子を体外授精したのち,授精卵を雌 マウスの胎内に移し出産させて得た仔を使用した. 蛋白質合成能の変化は生後10日および122日のマウ スの上頸神経節を用いて観察した.上頸神経節を L-[4,5-<sup>3</sup>H]-leucineを含む BGJb 培養液中で 20時間培養し,その間に[<sup>3</sup>H]-leucineで標識され たペプチドを二次元電気泳動法を用いて分離し, オートラジオグラフィーで個々のペプチドの位置 を X 線フィルム上に検出し,個々のペプチドの生 合成について,質的量的な差異を検討した.

#### 結果および考察

413系筋ジストロフィー鶏の交感神経節における蛋 白質合成能では、孵化後26日齢において中性領域 で7個,酸性領域で2個,アルカリ性領域で7個 の蛋白質に、正常対照鶏との間に差を見いだし た3).アルカリ性領域にある蛋白質の内2個は筋ジ ストロフィー鶏でのみ検出できた。この内1個は 鶏胚15日で既に観察され、孵化後日齢が進むにつ れより明瞭になってくることが解ってきた。図1 は生後10日目のマウスの上頸神経節を器官培養し, [<sup>3</sup>H]-leucine により標識されたペプチドを二次元 電気泳動で分離したものであるが、正常対照マウ スで749個の, dy/dy-マウスで750個のスポットが 検出された。個々のスポットについて、正常対照 マウスと dy/dy-マウスとの間での差異を検討した ところ、413系筋ジストロフィー鶏の交感神経節で 観察されたような明らかな差異を見いだすことは 出来なかった。生後120日目のマウスでも、生後10 日目と同様に有意な差異を見いだすことは出来な かった.先に,私達は筋ジストロフィーマウス(C57 BL/10ScSn-MDX) の上頸神経節でも、生後10日 齢においても120日齢においても、有意に差異のあ るスポットを見いだすことはできなかった3ことを 報告した.このことと合わせ考慮すると家鶏413系 における遺伝子上の異常と dv/dv-マウスおよび MDX-マウスの遺伝子の異常はその領域が異なっ ていることによることを意味するのかもしれない。 また、マウスの場合、交感神経の分化、発育の異 常はないことを意味しているのかもしれない。

### まとめ

1. 筋ジストロフィーマウス (C57BL/6J-dy/dy,

<sup>\*</sup> 财東京都神経科学総合研究所神経生化学研究室

<sup>\*\*</sup>筑波大学生物科学系



A) Control Mouse (C57BL/6J,+/+) ganglion, 10days old

B) Dystrophic Mouse (57BL/6J,dy/dy) ganglion, 10days old



図1 10日齢のマウスの交感神経節における蛋白質合成能.[<sup>3</sup>H]-leucine 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に際しての露出時 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)正常対照マウス(C57BL/6J-+/+)の交感神経節での蛋白 合成能。B)筋ジストロフィーマウス(C57BL/6J-dy/dy)の交感神経節での蛋白合 成能。黒く塗りつぶしたスポットは正常対照マウスと筋ジストロフィーマウスの両 方に認められたスポットである。 dy/dy-マウス)の交感神経節における蛋白質合成 能を検討した。

2. 生後10日齢および120日齢の dy/dy-マウスの 交感神経節の蛋白質合成能には,正常対照マウス との間に質的差異を見いだすことは出来なかった.

### 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、「厚生省神経疾患委託費筋ジストロフィー 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,1964, p558. ۰.

- 2) 堀眞一郎, 杉浦弘子, 大谷幸子:筋ジストロフィ 一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).「厚生省神経疾患委 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, p69.
- 3) 堀眞一郎,杉浦弘子,大谷幸子,平林民雄,椿忠 雄:筋ジストロフィー(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、「厚生 省神経疾患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,1987, p31.

### 10) 骨格筋における受容体の誘導とその調節に関与する カルシトニン遺伝子関連ペプチドの研究(第1報)

高守正治\*

研究協力者 吉川弘明\*永田美和子\*

### はじめに

筋疾患の成因,病態を考える上で trophic factor の関与を調べる事は重要と思われる. Drachman<sup>1)</sup> は骨格筋の trophic factor としてアセチルコリン (ACh)を重要視しているが,別に複数の trophic factors が骨格筋を栄養している可能性がある.近 年,同一ニューロンにおいて古典的神経伝達物質 とニューロペプチドの共存がみいだされているが, 運動神経終末部においても、カルシトニン遺伝子 関連ペプチド (CGRP) が ACh と共在することが 報告された<sup>2)</sup>. 我々は,骨格筋初代培養細胞を用い て CGRP が AChR の誘導に与える影響を調べると ともに,電気生理学的解析にて神経終未部からの ACh 遊離に及ぼす CGRP の影響を検討した.

### 材料ならびに方法

1) CGRP の AChR 誘導に与える影響の検討 骨格筋初代培養細胞は、胎生20日目のウィスタ ー系ラット胎児の下肢筋より得た。35mm プラス チック・ディシュ上で、Dulbecco's modified Eagle medium に10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin solution を加え、7日間、37℃、 5% CO<sub>2</sub>, 95% air 下で培養し実験に供した。新し く細胞膜に誘導された AChR だけをみるため、各 ディシュを2 $\mu$ M の非放射性  $\alpha$  - Bungarotoxin (BuTX)を加えた medium にて1時間培養し、 既に細胞表面にあった AChR を非放射性  $\alpha$ -Bu-TX で占拠させた。その後、CGRP (10<sup>-7</sup>)を加え た群と加えない群に分け培養した。数時間後 medium を除去し、4nM の [<sup>125</sup>I] -  $\alpha$ -BuTX を加 えた medium で1時間培養することにより,新し く細胞膜上に誘導された AChR を標識した.細胞 は rubber policeman にて集め, AChR に結合した  $[^{125}I]-\alpha$ -BuTX の放射活性を  $\gamma$  カウンターにて 測定した. CGRP の効果をさらに検討するため, dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP) (1mM), cholera toxin (100nM) を加えた場合についても 調べた.

2) CGRP の ACh 遊離に与える影響の検討

ウィスター系雄ラットの横隔膜神経筋標本につ いて, ガス(O<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub>=95:5)負荷 Ringer 液(122 mM NaCl, 4.7mM KCl, 15.5mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.6mM CaCl<sub>2</sub>, 11.5mM glucose) (37℃) 灌流下に微小電 極を用いて測定を行った.終板電位(EPP)(クラ ーレ d-TC 添加量1.6 $\gamma$ /ml) を指標として, ACh quantum content は1Hz 連続神経刺激による誘発 EPPs 振幅(11th~60th)の変異係数で表現, immediatery releasable ACh store 量は100Hz 連続 神経刺激による EPPs(1st~3rd)から算出する quantum content で表現, ACh mobilization rate は100Hz60発連続神経刺激による EPPs の最後の 12発の quantum content で表現した. これらを指 標として, CGRP (4.67×10-7M) 添加 Ringer 液 灌流下の変化を調べた.

### 果

1) CGRP の AChR 誘導に与える影響

結

CGRP を加えた群は培養開始後4時間では control 群と差は無かったが8時間後には有意に AChR の誘導が増加した(p<0.001)(図1). db-cAMP (1mM)を培養液に加えた群も4時間後では con-

<sup>\*</sup> 金沢大学医学部神経内科



図1 CGRP (10<sup>-7</sup>M) 添加, 無添加における AChR 誘導の時間経過



図2 CGRP (10<sup>-7</sup>M) とdb-cAMP (1mM)の AChR 誘導に対する影響



図3 CGRP (10<sup>-7</sup>M) と cholera toxin (100nM) の AChR 誘導に対する影響 cholera toxin (100nM) を加えた群は既に 4 時間で有意 (p<0.01) の AChR 誘導 増加を示す.

trol 群と差は無かったが8時間後には有意にAChR の誘導が増加した (p < 0.05). しかし, CGRP と db-cAMP の効果には相加性はなかった ( $\boxtimes 2$ ). cholera toxin は8時間後 (p < 0.001) のみなら ず,既に4時間後に control 群に比し有意にAChR の誘導を増加させた (p < 0.01). しかし, db-cAMP と同様に CGRP とは相加的な効果は無かった ( $\boxtimes 3$ ).

2) CGRP の ACh 遊離に与える影響

a) EPP, ACh quantum content b) immediately releasable ACh store c) ACh-mobilization rate について Ringer 液灌流下の control 群と CGRP (4.67×10M) を含む Ringer 液灌流群 との間に差はなかった (表1).

### 考 察

CGRPの生理作用<sup>214)5)6)</sup>については不明な点が多く,我々は神経筋の情報伝達,修飾に関する本ペ

### 表1 CGRP (4.67×10<sup>-7</sup>M)の神経終末部に対する 影響 対照群との間に有意差を認めない。

Presynaptic function determined by microelectrode study in rat phrenic-diaphragm

	Control	<u>CGRP (4.67×10-7M)</u>
	n:15	n:18
EPP, ACh quantum con- tent at l Hz	$233\pm59$	247±61
Immediately releasable ACh store (quanta)	$1340 \pm 445$	1418±399
ACh-mobilization rate at 100Hz(quanta/sec.)	5534±750	6672±342
		(Mean ± S.D.)

プチドの役割を明らかにする目的で AChR の誘導 に対する CGRP の影響を検討した.その結果, CGRP を加えた群で有意に AChR の誘導が増加し た(図1).しかし,これが AChR の synthesis を 反映するものか, clustering によるものかは不明で あった.更に,細胞内の cAMP を増加させる目的
で加えた db-cAMP は AChR の誘導を増加させた が、CGRP の効果とは相加性が無かった(図 2). cholera toxin は特異的に促進性 GTP 結合蛋 白質(Gs)を ADP リボシル化し adenyl cyclase を活性化させ細胞内 cAMPを増加することが知ら れている<sup>3)</sup>.本実験では cholera toxin は AChR の 誘導を有意に増加させたが、その効果は CGRP と は相加性が無かった(図3).以上の結果から、 CGRP, db-cAMP と cholera toxin の AChR 誘導 に与える作用が共通の機序を介する可能性が示唆 された.すなわち、CGRP 受容体が Gs を介し adenyl cyclase を活性化すると考えられる.なお、 cholera toxin は効果の発現が他の2者より早く、 この点は今後さらに検討を要するものと思われる.

CGRP は神経終末部に局在するとされている が、今回の微小電極による電気生理学的解析では、 終末部からの少なくとも Ca<sup>++</sup>依存性 ACh 量子性 遊離には影響を与えないことが示された(表1).

### 文 献

1) Postronk A, Drachman DB et al: Cholinergic transmission regurates extrajunctional acetyl-

choline receptors. Exp Neurol 70: 690, 1980.

- Takami K, Yoshida H et al:Effect of calcitonin gene-related peptide on contraction of striated muscle in the mouse. Neuroscience Letters 60: 227, 1985.
- Gill DM and Meren R: ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: Basis of the activation of adenylate cyclase. Proc Natl Acad Sci USA 75: 3050, 1978.
- 4) Takami K, Yoshida H et al:Effect of calcitonin gene-related peptide on the cyclic AMP level of isolated mouse diaphragm. Japan J Pharmacol 42: 345, 1986.
- 5) New HV and Mudge AW: Calcitonin generelated peptide regulates muscle acetylcholine receptor syntheses. Nature 323: 809, 1986.
- 6) Fontaine B, Changeux JB et al: Calcitonin gene-rerated peptide present in spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo myotubes. Neuroscience Letters 71: 59, 1986.

### 

高守正治\*

研究協力者 佐野正登\*井手芳彦\*

アセチルコリンは神経の骨格筋に対する trophic factor の1 つとされている.43-kDa ポリペプチド (43K) はその受容器としてのアセチルコリン・レ セプター(AChR)と深い関連を持つとされている が、その機能などについての詳細は未だ明らかで はない.我々は43K と AChR との後シナプス膜で の関係について検討を加え、骨格筋の構造・機能 のコントロールにかかわる本ペプチドの間接的な 役割について検討を加えた.

### 材料と方法

シビレエイ電気器官を用い,図1に示す手順で その membrane fragments を連続ショ糖密度勾配 遠心法にて分画した<sup>1)</sup>. 各 fraction の AChR 活性 は<sup>125</sup>I-α-Bungarotoxin を使ったメンブラン・フィ ルター法で測定した<sup>2)</sup>.

これらのうち高 AChR 活性を示した fraction を 集め AChR-rich membrane fragments として使 用した.

このAChR-rich membrane fragmentsを pH11でアルカリ処理を行ない、43Kを抽出し た<sup>3)</sup>. アルカリ処理後のAChR-rich membrane fragments は Buffer で2度洗浄し、pHをアルカ リ処理前の状態に戻した.なお蛋白成分は、ゲル 濃度10%の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 にて分析した.またAChR-rich membrane fragmentsを泳動後、アフィニティー精製したシビレ エイAChR で免疫したラット血清を用い、Western blotting 法で染色し、各AChR サブユニット  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ の泳動位置マーカーとした. 43K と AChR の後シナプス膜での関係について 検討するため、AChR の細胞膜からの可溶性をア ルカリ処理前後の fragments で対比した.即ち、 両 fragments を 0,0.05,0.2,0.5,1%の Triton X-100でぞれぞれ 0 ℃ で30分処理した.Triton X -100処理後、それぞれの fragments を  $10^5 \times g$  で沈 殿させ、その後 Buffer での再浮遊・沈殿の操作を 繰り返した.それぞれの fragments に可溶化され ずに遺残した AChR 活性をメンブラン・フィルタ ー法で測定、Triton X-100を加えないで処理した



図1 AChR-rich membrane fragments の分画法.

<sup>\*</sup> 金沢大学医学部神経内科



図2 各 fraction の AChR 活性および蛋白濃度.

fragnents の 遺残 AChR 活性 を100% として, AChR 遺残率をアルカリ処理前後の両 fragments で比較した.

### 結 果

シビレエイ電気器官 membrane fragments の連 続ショ糖密度勾配遠心法による分画では、高ショ 糖密度側に高 AChR 活性を示す fraction があり、 これらのうち fraction5がピーク(0.81pmol toxin binding sites/ $\mu$ g protein)を示した(図2).比 較的 AChR 活性の高い fraction 5から8を集め AChR-rich membrane fragments とした.

AChR-rich membrane fragments のアルカリ処理前後の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に よる分析では、アルカリ処理前に  $\alpha \ge \beta$  サブユニ ットの間に認められた分子量約43,000の蛋白(図 3, lane2,  $\Leftrightarrow$ )がアルカリ処理により膜成分から 消失した(図3, lane3). 一方上清中にはこれを主 とする蛋白成分が抽出され、この蛋白が43K と同 定された(図3, lane4). この結果よりアルカリ処 理前の AChR-rich membrane fragments を43K (+) fragments、処理後のものを43K(-) fragments とした.

Triton X-100による membrane fragments から の AChR 可溶性については、0.05%の Triton X-100処理で、43K(+) fragments では80%以上の AChR 遺残率を示すのに対し、43K(-) fragments では30%程度に過ぎなかった、より高濃度の Triton



 図3 アルカリ処理前後の AChR-rich membrane fragments の SDS-ポリアクリル アミド・ゲル電気泳動像。
1:各 AChR サブユニットの泳動位 置。
2:アルカリ処理前の fragments。
3:アルカリ処理後の fragments。
4:アルカリ処理による抽出成分。43
K が主である。
左端の数字は分子量マーカー。

X-100処理でもこの傾向は同様であり,43K(-) fragmentsでは43K(+) fragmentsに比較して, 遺残 AChR 活性は 3 分の 1 程度であった(図 4).

### 考 察

43K はシビレエイ電気器官,後シナプス膜の細胞質側に存在4)し,AChR と深い関連を持つ蛋白とされている.抗43K モノクローナル抗体を用い,



図 4 43K(+) fragments と43K(-) fragments での Triton X-100による AChR 可溶性の比較.

これに反応する成分が,哺乳類骨格筋の神経筋接 合部にも存在することが知られている<sup>5)</sup>.

43K は 3 種類の components から成り, そのう ち 2 つは Actin<sup>6)</sup>と Creatine kinase<sup>7)</sup>であることが 明らかとなっている.他の 1 つの本体は不明であ るが, AChR の clustering<sup>8)</sup>や安定性<sup>9)</sup>・運動性<sup>10)</sup>に 関与していると考えられている.今回,我々はシ ビレエイ電気器官より AChR-rich membrane fragments を得,アルカリ処理によりこの fragments より43K を主とする蛋白が抽出されること によって, AChR の後シナプス膜からの可溶性が 増大することを示した.この結果は,43K が後シ ナプス膜で AChR anchoring protein としての機 能を持つことを支持するものと考えられる.

一方, Walker らは43K に actin binding protein としての機能があり、後シナプス膜で、より深層 の細胞骨格蛋白と結合している可能性を示してい る<sup>11)</sup>.

これらのことより,43K は後シナプス膜の内側 から AChR を保持し,更に細胞骨格蛋白とも関係 を持つ蛋白であることが想定された.

### 結 語

シビレエイ電気器官より43K(+) AChR-rich membrane fragments と43K(-) fragments を 得,両者で AChR 可溶性を比較した. その結果, 43K は AChR anchoring protein として機能する ことが示唆された.

神経は骨格筋に対し trophic influence を持ち, アセチルコリンは trophic factor の1つとして重 要視されている.43K のようにその trophic factor の受容器である AChR を膜の内側から保持し,更 に深層の細胞骨格とも関連を持つと考えうる蛋白 が,種々の myopathy でなんらかの役割を果たし ているのか,興味ある問題と考えられた.

### 文 献

- Hayashi F and Amakawa T: Calcium-and calmodulin-dependent phosphorylation of diphosphoinositide in acetylcholine receptor-rich membranes from electroplax of *Narke japonica*. J Neurochem 45: 124-131, 1985.
- Weber M and Changeux JP: Binding of Naja nigricollis [<sup>3</sup>H] α-toxin to membrane fragments from *Electrophorus* and *Torpedo* electric organs. Mol pharmac 10: 1-14, 1973.
- 3) Neubig RR, Krodel EK, Boyd ND and Cohen JB: Acetylcholine and local anesthetic binding to *Torpedo* nicotinic postsynaptic memtranes after removal of nonreceptor peptides.Proc Natl Acad Sci USA 76: 690-694, 1979.
- 4) Froehner SC, Gulbrandsen V, Hyman C, Jeng AY, Neubig RR, and Cohen JB:

Immunofluorescence localization at the mammalian neuromuscular junction of the Mr43,000 protein of *Torpedo* postsynaptic membranes. Proc Natl Acad Sci USA 78: 5230-5234, 1981.

- 5) Froehner SC: Peripheral proteins of postsynaptic membranes from *Torpedo* electric organ identified with monoclonal antibodies. J Cell Biol 99: 88-96, 1984.
- 6) Porter S and Froehner SC: Characterization and localization of the Mr=43,000 proteins associated with acetylcholine receptor-rich membranes. J Biol Chem 258: 10034-10040, 1983.
- Barrantes FJ, Mieskes G and Wallimann T: Creatine kinase activity in the Torpedo electrocyte and in the nonreceptor, peripheral v proteins from acetylcholine receptor-rich membranes. Proc Natl Acad Sci USA 80: 5440-5444, 1983.

- Burden SJ: The subsynaptic 43-kDa protein is concentrated at developing nerve - muscle synapses *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 82: 8270-8273, 1985.
- 9) Saitoh T, Wennogle LP and Changeux JP: Factors regulating the susceptibility of the acetylcholine receptor protein to heat inactivation. FEBS Letters 108: 489-494, 1979.
- 10) Rousselet A, Cartaud J, Devaux PF and Changeux JP: The rotational diffusion of the acetyl-choline receptor in *Torpedo marmorata* membrane fragments studied with a spin-labelled α -toxin: importance of the 43,000 protein(s). EMBO J 1: 439-445, 1982.
- Walker JH, Boustead CM and Witzemann V: The 43K protein, ν<sub>1</sub>, associated with acetylcholine receptor containing membrane fragments is an actin-binding protein. EMBO J 3: 2287-2290, 1984.

### 12) 筋収縮及びmyosin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\*

### はじめに

骨格筋の諸性質は神経支配の制御を受けており, 筋疾患の成因を考える場合も、その影響を検討す ることは重要と思われる。除神経早期に筋の生理 的変化が生じ、やがて萎縮に至ることはよく知ら れているが、生化学的な機序は明らかにされてい ない.我々は<sup>1120</sup>昨年度本研究班において、rat 速筋 の myosin light chain2 (LC2) リン酸化型が除神 経後早期に減少・消失することを報告した。本年 度はその生理的意義を検討した。Manning ら<sup>31</sup>は速 筋の LC2リン酸化が、速筋に特有の生理現象であ る等尺性単収縮張力の強縮後増強(post-tetanic potentiation: PTP)と関係することを報告してい る.このことより、筋収縮パラメーター、特に PTP と LC2リン酸化の除神経後の変化を経時的に比較 検討した。

### 対象と方法

対象として,Wistar rat, 5週齡,80~100gを 用い,一側の坐骨神経を切離し対側を対照とした. 切離後1日,2日,3日及び7日で長趾伸筋(EDL) を取り出し,Ringer 液中で電場刺激により収縮さ せ,①単収縮張力,②収縮時間,③弛緩時間,④ 単収縮/強縮張力比,⑤PTP(強縮後10秒で測定) を記録した.一方,同様にEDLを用い,安静時及 び強縮後10秒で急速凍結させ,10%トリクロル酢 酸で homogenize した.遠沈後,残渣を Sobieszek ら<sup>0</sup>の方法を改変し処理し,電気泳動用サンプルと した.このサンプルより,urea-glycerol-acrylamide gel 電気泳動法にてLC2リン酸化型と非リン酸化型 を分離し、densitometry で定量化した.リン酸化 の程度は LC2全体に対するリン酸化型の割合を% で表した.

#### 結 果

### 1. 筋収縮に対する除神経の影響

単収縮張力は除神経後3日より増加し,7日で controlの約2倍に達した.収縮及び弛緩時間は除 神経後3日より延長しはじめ,7日で更に延長し た.単収縮/強縮張力比は除神経後2日で増加を認 め,3日で最大となり,7日でやや低下した.PTP は除神経後2日で低下しはじめ,7日では1.03と ほとんど増強を示さなくなった(表1).

2. LC2リン酸化に対する除神経の影響

 $\boxtimes 1$  is rat EDL  $\mathcal{O}$  urea-glycerol acrylamide gel 電気泳動像を示した.この方法では低分子酸性 タン白のみが preparation gel 内に入り, 6本の主 要な band が分離された. 個々の band はそれぞれ 抽出したタン白との比較により同定した。リン酸 化LC2は非リン酸化LC2より陰性側に泳動され, 両者を明瞭に分離することができた.LC リン酸化 は強縮後に亢進し、約10秒で最大に達することが 報告されている5が、除神経後はこの条件でもリン 酸化の程度の低下を示した. densitometry により 定量化した結果を表2に示した.筋安静時は, control では約17%リン酸化されているが, その程度は 除神経後経時的に低下し,7日で0に達した.こ の結果は、昨年度2次元電気泳動法を用いて解析 し報告した結果にほぼ一致している。強縮後10秒 では、controlでは50%以上がリン酸化を受ける が、除神経後に著明に低下し、3日では強縮に伴 うリン酸化がほとんど生じなくなった。しかし,

		Twitch				
		Tension (g/g)	Contraction time (ms)	Half-relaxation time (ms)	Twitch : tetanus ratio	Post-tetanic potentiation
Sham-operated						
Experimental	(4)	$332 \pm 20$	$15.3 \pm 0.8$	$12.4 \pm 0.8$	$0.16 \pm 0.02$	$1.51\pm 0.06$
Contralateral	(4)	$340 \pm 16$	$14.8 \pm 1.0$	$12.0 \pm 0.7$	$0.15\pm0.02$	$1.48\pm0.03$
1 Day					0110 = 0101	1.10±0.00
Denervated	(6)	$319\!\pm\!10$	$15.1 \pm 0.8$	$11.8 \pm 0.8$	$0.19 \pm 0.02$	$1 47 \pm 0.04$
Contralateral	(4)	$348 \pm 36$	$14.9 \pm 1.1$	$12.1\pm1.0$	$0.16 \pm 0.02$	$1.52\pm0.07$
2 Days					0.10 - 0.02	1.02±0.07
Denervated	(6)	$252\pm51$	$15.4 \pm 0.7$	$12.6 \pm 0.9$	$0.41 \pm 0.02^*$	$1.18\pm0.07*$
Contralateral	(4)	$311\pm26$	$15.2 \pm 0.8$	$12.5 \pm 0.9$	$0.14 \pm 0.01$	$1.54 \pm 0.03$
3 Days					0.111_0.01	1.04±0.00
Denervated	(6)	$407 \pm 26*$	$18.4 \pm 0.8*$	$14.5 \pm 1.2^+$	$0.60 \pm 0.03^*$	$1 07 \pm 0 04^*$
Contralateral	(4)	$318\!\pm\!18$	$15.3 \pm 0.8$	$11.9 \pm 0.8$	$0.15\pm0.02$	$1.49\pm0.06$
7 Davs						1.10 = 0.00

Contractile properties in rat extensor digitorum longus musclesª

<sup>a</sup>Contractile properties in normal and denervated muscles. Values are means  $\pm$  SD; number of muscles in parentheses; post-tetanic potentiation was recorded 10 sec after tetanus (200Hz for 1 sec). <sup>+</sup> p<0.01 vs contralateral

 $19.2 \pm 2.2^*$ 

 $11.7 {\pm} 0.5$ 

 $0.47 \pm 0.02*$ 

 $0.16 \pm 0.03$ 

 $1.03 \pm 0.03^*$ 

 $1.51 \pm 0.02$ 

 $22.6 \pm 0.8*$ 

 $15.6 \pm 0.5$ 

(5)

(4)

 $614 \pm 25^*$ 

 $352 \pm 22$ 

Denervated

Contralateral

\* p<0.001 vs contralateral



図1 強縮後10秒における control 及び除神経 EDL の urea-glycerol-acrylamide gel 電気 泳動像. P:リン酸化 myosin, D:脱リン酸化 myosin, C: control, 1d:除神経後 1日, 2d:除神経後2日, 3d:除神経後3日, 7d:除神経後7日;TM: tropomyosin, PA: parvalbumin, LC1: myosin light chain1, LC2: myosin light chain2, LC2・P:リン酸化 myosin light chain2, LC3: myosin light chain3.

### 7日では若干のリン酸化を認めた.

3. 除神経後の PTP と LC2リン酸化の関係 除神経後のPTP 及びLC2リン酸化の変化を

controlと比較して減少率で示し比較検討した (図2). PTP, LC2リン酸化ともに除神経後1 日~2日の減少が最大で,その後の変化は緩徐で

表 2 Extent of phosphorylation of myosin light chain 2ª

	%LC2	Phosphorylation
Muscles	at rest	10 sec after tetanus
Sham-operated		
Experimental	$16.6 \pm 2.3$	$51.3 \pm 2.9$
Contralateral	$18.0 \pm 2.1$	$51.3 \pm 3.2$
1 Day		
Denervated	7.4±1.9*	$32.1 \pm 4.5^{+}$
Contralateral	$16.7 \pm 2.2$	$49.9 \pm 3.1$
2 Days		
Denervated	$3.9 \pm 1.2^*$	$13.8 \pm 2.6^*$
Contralateral	$15.3 \pm 1.2$	$51.7 \pm 2.2$
3 Days		
Denervated	6.1±1.0*	6.0±1.9*
Contralateral	$17.6 \pm 2.2$	$50.0 \pm 4.2$
7 Days		
Denervated	$0.0 \pm 0.0^*$	10.6±2.6*
Contralateral	$17.3 \pm 2.3$	$56.7 \pm 4.2$

\*% Phosphorylation of LC2 in the resting state and at 10 sec following tetanus in control and denervated EDLs. Values are means  $\pm$  SD of 3-4 muscles.

\* p<0.01 vs contralateral</p>

\* p<0.001 vs contralateral



図2 除神経後7日間の、強縮後10秒におけ る PTP 及び LC2リン酸化減少率の比 較、値は対側に対する除神経側の比を 示し、それぞれ3~4検体からの平均 値士標準偏査、

あった。除神経後7日の範囲で両者に強い有意な 相関を認めた。

### 考 案

速筋と遅筋は生理学的に,①収縮・弛緩時間, ②強縮後の単収縮の変化,③収縮温度低下後の単 収縮の変化に相違を認める.強縮後の変化として, 速筋では単収縮の post-tetanic potentiation が, 遅筋では post-tetanic depression が認められる. PTP は交叉神経支配により速筋で認められなくな り,遅筋で認められるようになる<sup>6)</sup>.このことは, PTP が神経支配の制御を受けていることを示唆し ている.一方,LC2リン酸化の程度は速筋で大,遅 筋で小<sup>6)</sup>であり,また,速筋のLC2リン酸化は除神 経により減少する<sup>1)2)</sup>.これらのことは,LC2リン 酸化も神経支配の制御を受けていることを示して いる.Persechiniら<sup>7)</sup>は,LC2リン酸化に伴って actomyosin ATPase 活性が亢進し PTP が生ずる と考えているが,本研究では,PTP とLC2リン酸 化の関係を支配神経による制御の観点から検討し 以下のことが明らかにされた.

(1) PTP は除神経後経時的に低下を示し,7日 でほぼ消失した。

(2) 除神経に伴い, LC2リン酸化は, 筋安静時に 加え強縮後においても急速に減少した.

(3) 除神経後の PTP と LC2リン酸化の減少率に強い相関が認められた.

これらの結果は、速筋支配型運動神経が LC2リ ン酸化を制御し、それと関連して PTP に影響して いることを示している。除神経に伴う PTP の低下・ 消失は、速筋がその特異性を失う早期の生理的現 象であり、その生化学的背景として、LC2リン酸化 の変化が関与しているものと思われる。

除神経により LC2リン酸化の程度が減少する機構は不明だが、次のような可能性が考えられる.

 (1) 神経支配が myosin light chain kinase (MLCK)ないし myosin light chain phosphatase (MLCP)の遺伝子発現を直接制御しており,除 神経に伴い, MLCK 活性低下ないし MLCP 活性 亢進が生ずる.

(2) 除神経により細胞内 calcium 動態が変化 し, MLCK の活性化が生じにくくなっている。結 果的に, LC2リン酸化の低下が生じる。

MLCK の活性は速筋で高く, 遅筋で低い. 一 方, MLCP 活性はその逆であることが知られてい る<sup>®</sup>. Klug ら<sup>®</sup>は chronic electrical stimulation に より, ウサギ速筋の MLCK 活性が低下することを 報告し、その変化は fast から slow への fiber type の変換に伴うものと考えている。これらの知見は、 MLCK 及び MLCP 活性が神経支配の制御を受け ていることを示している。この事実は、除神経に 伴い MLCK 活性が低下ないし、MLCP 活性が亢 進し、LC2リン酸化の程度が低下する可能性を示唆 する。

一方, MLCK は calcium・calmodulin 依存性の キナーゼであるが, 生理的には, 強縮に伴い筋小 胞体から遊離される calcium によって活性化さ れ, LC2リン酸化を生ずる. 除神経により筋小胞体 からの calcium release の異常が起こることが報告 されている<sup>10)</sup>が, 強縮に伴う calcium release が不 十分になれば, 結果的に LC2リン酸化が低下する ことが予想される.

上記可能性のいずれか,あるいは両者が,除神 経による LC2リン酸化の低下に関与しているもの と思われる.

神経支配が筋に与える影響は多様で複雑である が、本研究はその1つの機構を示しているものと 考える.

### おわりに

除神経に伴う,速筋特有の生理現象である PTP の低下・消失に,LC2リン酸化の減少が関与してい ることが示された.

### 文 献

- 1) 庄司進一,松下茂樹,武田伸一,柳沢信夫: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.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,1987,pp287 -290.
- 2) Matsushita S, Takeda S, Shoji S and Yanagi-

sawa N : Effect of denervation on phosphorylation of the myosin light chain in rat extensor digitorum longus muscles. Biomed Res 8:211, 1987.

- 3) Manning DR and Stull JT: Myosin light chain phosphorylation and phosphorylase a activity in rat extensor digitorum longus muscle. Biochem Biophys Res Commun 90: 164, 1979.
- 4) Sobieszek A and Jertschin P: Urea-glycerolacrylamide gel electrophoresis of acidic low molecular weight muscle proteins: Rapid determination of myosin light chain phosphorylation in myosin, actomyosin and whole muscle samples. Electrophoresis 7: 417, 1986.
- 5) Manning DR and Stull JT: Myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation in mammalian skeletal muscle. Am J Physiol 242: C234, 1982.
- 6) Hoh JFY: Neural regulation of muscle activation. Exp Neurol 45: 241, 1974.
- Persechini A and Stull JT: Phosphorylation kinetics of skeletal muscle myosin and the effect of phosphorylation on actomyosin adenosinetriphosphatase activity. Biochemistry 23: 4144, 1984.
- 8) Moore RL and Stull JT: Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscles in situ, Am J physiol 247: C462, 1984.
- 9) Klug GA, Houston ME, Stull JT and Pette D: Decrease in myosin light chain kinase activity of rabbit fast muscle by chronic stimulation. FEBS Lett 200: 352, 1986.
- Gutmann E and Sandow A : Caffeine-inducwd contracture and potentiation in normal and denervated rat muscle. Life Sci 4: 1149, 1965.

# Ⅲ. ミトコンドリアミオパチー

.

## 13) チトクローム C 酸化酵素欠損症における 免疫組織化学的研究

約 光 弘\*

研究協力者 樋口逸郎\*中川正法\*山野 隆\* 福永秀敏\*\*伊佐敷 靖\*\*\*

### 目 的

チトクローム C 酸化酵素 (CCO) 欠損症におけ る免疫組織化学的検討は,ポリクローナル抗体を 用いたものがいくつか報告されているが<sup>1)-4)</sup>, CCO のサブユニット蛋白に対するモノクローナル抗体 を用いた研究はこれまでなされていない.我々は CCO の組織化学的欠損線維の成因を明らかにする ことを目的として CCO のサブユニットIVに対する モノクローナル抗体,及びサブユニットII+IIIに 対するポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学 的染色を行い比較検討した.

### 対象と方法

臨床的に MELAS, MERRF, および Leigh 脳 症類似の脳筋症と診断された 3 例のミトコンドリ アミオパチーの生検筋を対象とした. これらの 3 例は臨床病型は異なるが, 生化学的には CCO 活性 がそれぞれ正常対照の23%, 38%, 26%と同程度 低下していた(表1).

使用したモノクローナル抗体は骨格筋及び心筋 の CCO サブユニットIVに特異的に反応するもので

=	1	防止沙脏	That CC	<u>ስ መቶ /</u>	レッチャンチャ
₩.	1	臨床診断	なひしし	しの生1	七子的活件

Patient	Age, Sex	Clinical	CCO activity
No.		diagnosis	compared to normal
1	14, Male	MELAS	23%
2	44. Male	MERRF	38%
3	10, Male	Leigh	26%
		encephalor	athy

\* 鹿児島大学医学部第三内科

\*\*国立疗疗费所南九州病院

\* \* \* 鹿児島大学医学部眼科

あり<sup>9</sup>,またポリクローナル抗体はカラムで分離した CCO のサブユニット II + IIIに対する抗血清であ り,ウェスタンブロッティングで CCO のサブユニ ット II + IIIのみに反応することを確認した.

免疫組織化学的染色は10µの連続凍結切片においてABC法により行い,CCO染色を含む各種組織化学的染色と比較検討した。また各症例のragged red fiber (RRF),組織化学的CCO欠損線維及び免疫組織化学的CCO欠損線維の出現頻度を求めるため各切片の400本の筋線維を数えた。

#### 結 果

症例1では, RRF が13%の筋線維に認められ, 50%の筋線維において CCO 活性が欠損していた. 免疫組織化学的には,これらの組織化学的 CCO 欠 損線維においてもサブユニットIV及びサブユニッ トII+IIIの抗原性は保たれていた(図1).

症例2ではRRFは14%の筋線維に認められ45% の筋線維にCCO活性欠損が認められた.しかしこ れらの欠損線維においても,免疫組織化学的には サブユニットIV及びサブユニットII+IIIの抗原性 はよく保たれていた(図2).

症例3においてはRRFは7%と比較的少数で変 性も軽度だが、48%の筋線維において、CCO活性 が欠損していた。また、本症例においては免疫組 織化学的にサブユニットIVの抗原性が6%の筋線 維で欠損していた。一方、サブユニットII+IIIの 抗原性はすべての筋線維で保たれていた(図3). サブユニットIVの抗原性欠損線維はtype 1線維に もtype 2線維にも認められ、またこれらの筋線維 は例外なく組織化学的にもCCO活性が欠損していた。



図1 症例1の生検筋の連続凍結切片 ×300
a:CCOの組織化学的染色
b:サブユニットIVに対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色
c:サブユニットII+IIIに対するポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色



図2 症例2の生検筋の連続凍結切片 ×200 a, b, cは図1と同じ



図3 症例3の生検筋の連続凍結切片 ×300 a, b, cは図1と同じ

表 2	生検筋の ragged re	ed fiber,	組織化学的 CCO	欠損線維及び免疫組織化学的 CCO	欠損線維の頻度
-----	----------------	-----------	-----------	-------------------	---------

Patient No.	Ragged red fiber (%)	Histochemical CCO deficient fiber (%)	Immunohis deficie	stochemical CCO ent fiber (%)	
			Subunit IV	Subunit II or III	
1	13	50	0	0	
2	14	45	0	0	
3	7	48	6	0	

これらの結果を表2にまとめて示すが, RRF と 組織化学的 CCO 欠損線維の出現頻度は相関が認 められず, また RRF は CCO 活性が低下している ものでもサブユニットIV及びサブユニット II + III の抗原性は正常かむしろ亢進を示した.

### 考 按

臨床病型は異なるが、生検筋の CCO の生化学的 活性が同程度に低下し、かつ CCO の組織化学的染 色でほぼ同頻度の欠損線維を有する 3 例の CCO 欠 損症において、サブユニットIVの抗原性は同じで はないことが明らかになった.症例 3 において認 められた 6 %のサブユニットIVの抗原性欠損線維 においては例外なく CCO 活性が欠損しており、CCO のサブユニットIV蛋白の欠損が CCO の組織化学的 欠損線維の成因の1つである可能性が高いものと 考えられた.また、サブユニットIVの欠損線維に おいてもサブユニットII+IIIの抗原性は保たれて おり、CCOのすべてのサブユニットが同じように 障害されるのではなく、部分的なサブユニットの 異常が生ずることが明らかになった.

CCO は少なくとも7つのサブユニットから構成 されており、サブユニット I ~IIIはミトコンドリ アの DNA によりコードされ、ミトコンドリアのリ ボゾームで合成され、サブユニットIV~VIIは核の DNA によりコードされ、細胞質のリボゾームで合 成されることが知られている<sup>61</sup>. 今回の免疫組織化 学的検討では電子伝達において重要な働きをして いると考えられているサブユニット II + IIIの欠損 線維は認められなかったが、機能があまり明らか にされていないサブユニットIVの欠損線維が3例 中1例に認められた。サブユニットIVの抗原性欠 損線維でCCOの組織化学的活性が認められたもの は全く存在しなかった事は、サブユニットIV蛋白 も CCOの活性の発現に重要な部位であることを示 唆している。

しかし症例3においてもサブユニットIVの欠損 が証明された筋線維は、CCO活性欠損線維の約13 %であり、症例1、2においてはサブユニットIV、 及びサブユニットII+IIIの欠損線維は認められず、 組織化学的CCO欠損線維の成因は症例により、ま た筋線維により異なる可能性があり、今後CCOの 他のサブユニットに対する抗体を用いたより詳細 な検討が必要であると思われる.

なお, 最近我々は CCO のサブユニット Vのモノ クローナル抗体の作成に成功し, 現在詳細に検討 中である.

### まとめ

1)臨床病型は異なるが生化学的及び組織化学 的には類似した3例のチトクロームC酸化酵素欠 損症について免疫組織化学的に検討した。

2) チトクローム C 酸化酵素のサブユニットIV の抗原性は症例により異なり、1例では6%の筋 線維が欠損を示した。

3) CCO のサブユニット II + IIIの抗原性は全例 で保たれており、CCO の一部のサブユニットの欠 損により、組織化学的 CCO 欠損線維が出現する可 能性があることを明らかにした.

### 文 献

- (1) 安野みどり、佐藤 猛ほか:ミトコンドリア・ミ オパチーの診断一生化学的酵素活性・組織化学・ 免疫組織化学との対比一。神経内科:143-151, 1986.
- Bresolin N, Zeviani M et al: Fatal infantile cytochrome c oxidase deficiency. Decrease of immunologically detectable enzyme in muscle. Neurology 35: 802-812, 1985.
- Müller-Höcker J, Stünkel S et al: Focal deficiency of cytochrome c oxidase and of mitochondrial ATPase with histochemical evidence of loosely coupled oxidative phosphorylation in a mitochondrial myopathy of a patient with bilateral ptosis. J Neurol Sci 69: 27-36, 1985.
- Zeviani M, Nonaka I et al: Fatal infantile mitochondrial myopathy and renal dysfunction caused by cytochrome c oxidase deficiency. Immunological studies in a new patient. Ann Neurol 17: 414-417, 1985.
- 5) Nakagawa M and Miranda AF: A monoclonal antibody against cytochrome c oxidase distinguishes cardiac and skeletal muscle mitochondria. Exp cell Res 168: 44-52, 1987.
- 6) Hare JF, Ching E et al : Isolation, subunit composition, and site of synthesis of human cytochrome c oxidase. Biochemistry 19: 2023-2030, 1980.

## 14) ミトコンドリアミオパチーの発症機序に関する 臨床的並びに分子遺伝学的研究

水 野 美 邦\*

研究協力者 大塚 美恵子\*太田成男\*\*吉田充男\*

### はじめに

ミトコンドリア脳筋症の発症機序を解明するた めには異常ミトコンドリア DNA (mt. DNA)の 有無ならびにシークエンスを決めることが重要と 考えられるが、ヒト mt. DNA は多型性に富み、単 に患者と健常者の mt. DNA シークエンスを比較し ても、異常・正常の意味づけは困難と思われる。 母性遺伝が明らかで、しかも同一細胞内における 正常ミトコンドリアと異常ミトコンドリアが混在 している場合は mt. DNA をクローン化することに より異常 mt. DNA と正常 mt. DNA のシークエン スを比較し、異常の原因を決定できる可能性があ る。今回、私たちは、母性遺伝の強く疑われるミ トコンドリア脳筋症患者の大腿四頭筋において、 ragged-red fiber を確認し, 100mg の同筋から異 常 mt. DNA のクローン化を試みた。

### 方法及び結果

表は当科で最近経験したミトコンドリアミオパ チーの症例のまとめである。この中で母性遺伝の 強く疑われる症例2の,大腿四頭筋を研究に用い た.図1は同患者の生検大腿四頭筋 modified Gomori trichrome 染色で,ragged-red fiber が確 認された。図2は昭和61年度当班研究において, 当小児科桃井,及び第一解剖斉藤らの報告"の一部 である。同患者上腕二頭筋の培養より得られた, myoblast の cytochrome c oxidase 染色の電顕像 で同一細胞内に,モザイク状に染色されるミトコ

			·					
	年齡	性別	家族歷	初発症状	経過	筋生検	酵素欠損	梗塞様症状
1	30	м	_	視覚異常	4 у	ragged-red fiber +	Complex I	÷
2	21	F	+ 母性遗伝	Convulsion	5у	ragged-red fiber +	- *	+
3	54	F	+ AD	眼瞼下垂	14 y (54y.o.) 死亡)	ragged-red fiber +	-	- 呼吸不全
4	23	F	+	下肢筋力 低下	8 y	ragged-red fiber —	cytochrome c oxidase 部分欠損	-

表症例

★ 筋芽細胞にて同一細胞内でのcytochrome coxidase 部分欠損

\* 自治医科大学神経内科

\* \* 自治医科大学第一生化学



図1 筋生検組織像 modified Gomori trichrome 染色 左下が ragged-red fiber



図2 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 (▲) が見られる.(文献1より引用) ンドリアとされないミトコンドリアが混在してい る. 矢印は染色されないミトコンドリアである. このことは, この部分欠損が, 核ではなくミトコ ンドリア DNA の異常によるものであることを示し ていると思われ, クローン化による mt. DNA シー クエンスの比較に適した症例と思われる.

同患者の生検大腿四頭筋100mgを0.3M sucrose 溶液中で proteinase K を加え, 0℃中おだ やかに homogenate し、さらに10% SDS を加え homogenate し, 50℃ incubate 後, RNaseA を加 え,3時間55℃ incubate した.その後,フェノー ル処理,エタノール沈澱し, total DNA を抽出し た. さらにこれを EtBr を含む CsCl 平衡密度勾配 遠心<sup>2)</sup>, 5万回転24時間行った.この時 vertical rotor 使用したため, mt. DNA, 核 DNA (ncl, DNA)は明確に分離可能であった。遠心後、tube の底面に針で穴をあけ0.5ml ずつ下層から順に12分 画に分け dot blot hybridization<sup>3)</sup>により定量した. 図3は dot blot hybridization の結果である、矢印 はそれぞれ mt. DNA, ncl. DNA を示し前者は重 い方の分画に、後者は軽い方の分画に出現してい る. 図3の2段目は standard である. 図中の数字 はそれぞれの dotの DNA 量を示している.この 時,約~1ngのmt. DNA を回収した. 図4はサザ ンブロッティング4)を示している。生検筋からの myoblast より得られた total DNA を制限酵素 BamHI で切断し、アガロースゲル電気泳動を行

い,この DNA 断片をゲルからナイロン膜に移した. 一方, Hela cell mt. DNAの cytochrome c oxidase site をクローン化したものを<sup>32</sup>P で標識し て probe とした. この probe は、これと相補的な mt. DNA 塩基配列をもつナイロン膜上のmt. DNA 断片とハイブリッドを形成し, これが, ナイ ロン膜をX線フィルムに感光させることにより黒 いバンドとして現われる. 矢印が mt. DNA 断片 で, BamHI で一ヶ所切断され, 16.5Kb の位置に 黒いバンドとして現われている。前述の、CsCl分 画にて得られた mt. DNA を BamHI で一ヶ所切断 し, λ-phage DNAの BamHI site に組み込み, in vitro package して大腸菌に感染させクローン 化を試みた. しかしながら, mt. DNA 分画にはエ タノール不溶性物質が多量に混在しており、この 方法ではプラークが少量しか得られず、クローン 化は成功しなかった. また, 患部 total DNA を同 じ方法で, in vitro package してもプラークは通 常の1/100しか生じず, 前述の不純物が ligation, in vitro package のいずれかの過程を著しく阻害 したと考えられた.この不純物は、同じ方法でmt. DNA を精製した時, myoblast, Hela cell, 白血 球, 肝細胞からは認められないものであった.

そこで次に100mg の生検筋から常法<sup>5</sup>に従ってミ トコンドリアを分離し、ここから mt. DNA を抽出 し、EtBr を含む CsCl 平衡密度勾配遠心法にて mt. DNA を精製した. これを dot blot hybridization



🖾 3 Dot blot hybridization.



**図4** ショ糖密度勾配遠心にて分けた mt. DNA 画分(矢印)の dot blot hybridization.



🖾 5 Southern blot hybridization.

により定量したところ40ngのmt. DNA が回収され、前述のエタノール不溶性不純物は得られなかったが、その後のエタノール沈澱にて、回収が著しく悪く3ng以下となり、クローニングのための必要量が得られなかった。そこでさらに、CsCl 密度勾配遠心のかわりに、ショ糖密度勾配遠心法<sup>6</sup>によるmt. DNA の精製も試みた(図5). しかしながら、不純物は除去できたものの、回収率が1%以下と悪く、クローン化に必要なDNA が得られなかった.したがって、ミトコンドリア抽出後mt. DNA を精製する方法も、ショ糖密度勾配遠心法によるmt. DNA の精製も、微量生検材料には適用しにくいと思われた.

### 考 察

ミトコンドリア脳筋症発症の原因の1つとして, mt. DNA の異常が推定されているが,直接の証明 は未だ例がない.したがって微量の生検材料(特 に筋組織)から mt. DNA をクローン化し,シーク エンスを決定する方法を確立することは重要なこ とと思われる.

私たちは、母性遺伝が強く疑われ、ミトコンド リアモザイキズムを示すミトコンドリア脳筋症患 者の mt. DNA を抽出し、クローン化のための基礎 的検討を行った.mt. DNA を分離精製する方法と して、total DNA より mt. DNA を分離精製でき ることが dot blot hybridization によりわかった. この方法ではクローン化の過程を阻害するエタノ ール不溶性不純物の析出のあることが判明した. 生検筋からミトコンドリアを分離後, mt. DNA を 精製する方法及びショ糖密度勾配遠心法による mt. DNA 精製いずれも不純物の析出はなかったが回収 率が悪く、微量の生検材料には適用困難と思われた.しかし、mt. DNA のクローン化は異常 mt. DNA を直接明らかにし得る可能性をもっており、 今後さらに検討を加え、異常 mt. DNA クローニン グとその解析を行う予定である.

### 文 献

- 桃井真里子,下泉秀夫,斉藤多久馬はか: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.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61年度研究 報告書,1987, pp.258-261.
- 2) Radloff R, Baver W, and Vinograd J: A dyebuoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in Hela cells. Proc Nath Acad Sci USA 57: 1514-1521, 1967.
- 3) Davis LG, Dibner MD, and Battey JF: "Dot blot" hybridization of labeled probe to DNA or RNA samples. Molecular Biology, Science publishing Co, Inc, 1986, pp.147-149.
- Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-517, 1975.
- Chappell JB and Perry SV: Biochemical and osmotic properties of skeletal muscle mitochondria Nature 173: 1094, 1954.
- 6) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: Large scale preparation of partially digested DNA. Molecular cloning, cold spring Harbor Laboratory, 1982, pp.284-285.

## 15) MERRF(福原病) 剖検例の生化学的・ 免疫組織化学的研究

### 宮武 正\*

研究協力者 米 田 誠\*\* Ξ 中 雅 嗣\*\* 小 濹 高 将\*\* 子\* 大 浜 栄 作\*\*\* 渥 美 哲 至\* Ξ 中 恵 弘\*\*\* 武 Ξ 茂 樹\*\*\* 生 H 房

### はじめに

1980年 Fukuhara ら<sup>1</sup>により dyssynergia cerebellaris myoclonica, Friedreich 失調症, ミトコ ンドリア筋症の三徴をあわせもつ疾患群が, myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (以下 MERRF) として提唱され, その後の 症例の集積によりミトコンドリア筋症の中でも特 徴ある一疾患単位として認められている<sup>2</sup>. ミトコ ンドリア脳筋症の中には, 電子伝達系酵素の欠損 が明らかにされているものもあるが, MERRFの 病因に関してはいまだ不明である. 今回我々は MERRF の剖検例<sup>1131</sup>を得て, 大脳, 小脳, 心臓, 骨格筋, 肝臓, 腎臓の各臓器組織のミトコンドリ ア電子伝達系および酸化的リン酸化系に関して生 化学的, 免疫化学的, 免疫組織化学的検索を行な った.

### 対 象

今回分析の対象となったのは1980年の Fukuhara らの最初の報告中で症例1として呈示されたもの である.

症例:30歳の女性,母方の祖母,母,兄に軽症 ながら同様の症状がある。兄の子供にてんかんが 認められるが,他の症状は認めない。16歳頃より 四肢の不髄意運動,構音障害,時に全身性の痙攣 発作が出現し,21歳の時に新潟大学神経内科受診 し本症と診断された.以後徐々に症状進行し,30 歳で死亡した.現症としては,軽度の知能低下, 四肢の動作性ミオクローヌス,小脳症状,深部知 覚障害,足の変形,四肢筋の萎縮を認めた.検査 所見では,脳波異常,頭部CTで小脳萎縮,筋電 図で神経原性変化,血中および髄液中乳酸,ピル ビン酸の上昇を認めた.剖検は死後11時間目に施 行され,神経病理学的所見に関しては既に武田ら によって報告がなされている<sup>3)</sup>.

### 方 法

-70℃で凍結保存されていた剖検組織より,脳 のミトコンドリアは Lai らの方法で,他の臓器の ミトコンドリアは Bookelman らの方法に従い単離 した.電子伝達系酵素複合体 I ~ V とマトリック ス酵素の一つである citrate synthase の活性を測 定した.チトクロム含量を分光学的に測定した. ミトコンドリア蛋白を SDS-尿素・濃度勾配ポリア クリルアミド電気泳動により分離後, Western blot を行い,ウシ心筋ミトコンドリアから精製した複 合体 I, III, IV, Vに対する抗体と反応させ, PAP 法により免疫化学的に各サブユニットを検出した. さらに複合体IVのサブユニットに関しては免疫沈 澱法により詳細に分析した。各剖検組織のパラフ ィン包埋標本を複合体特異抗体を用いて免疫組織 化学的に検討した.

#### 果

結

図1は各臓器の複合体酵素活性を正常平均活性

<sup>\*</sup>新潟大学脳研究所神経内科

<sup>\* \*</sup> 名古屋大学医学部第二生化学

<sup>\*\*\*</sup>新潟大学脳研究所実験神経病理



図1 各臓器の酵素活性の正常平均に対するパーセント.I: 複合体 I (NADH-ubiquinone oxidoreductase), II: 複合体 II (succinate-ubiquinone oxidoreductase), III: 複合体III (ubiquinol-cytochrome <u>c</u> oxidoreductase), IV: 複合体IV (cytochrome <u>c</u> oxidase), V: 複合体V (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase) CS: citrate synthase.

に対するパーセントで表したものだが、いずれの 臓器でも複合体IVの活性が低下していた.活性の 低下の程度は臓器間で差があるものの複合体IVが 共通に障害されており、一部の臓器では複合体 I

や複合体IIIの障害を伴っていた。臓器間で比較す ると、中枢神経で複合体IV活性の低下が著しかっ た.さらに、臨床症状の認められなかった臓器に おいても活性の低下が認められ、電子伝達系酵素 欠損が広く全身性に存在することが示唆された. これは臓器特異性のサブユニットの異常では説明 が困難と考えられる.

骨格筋ミトコンドリアにおけるチトクロム含量 を求めると、複合体IVの補欠分子族であるチトク ロム <u>aa</u>3含量は正常の18%と低下していた、複合体 IIIの補欠分子族であるチトクロム<u>b</u>は52%に軽度 低下していたがチトクロム<u>c+\_c</u>1は正常であっ た.

次に本例のサブユニットの分析結果を示す.図 2 は複合体IVに対する抗体を用いて各臓器のミト コンドリア蛋白の Western blot を行ったものであ る. 複合体IVは少なくとも7つのサブユニットか らなり,ブロッティングではそのうち細胞質由来 のサブユニットであるサブユニット4と5が検出 されている. 肝臓,腎臓,大脳,小脳ではこれら のサブユットの低下が認められた.一方,骨格筋 では活性の低下が認められたにもかかわらずサブ ユニット含量の低下は認められなかった.そこで ミトコンドリア由来のサブユニットを含めた分析 をするため,骨格筋のミトコンドリアを複合体IV に対する抗体を用いて protein A sepharose によ り免疫沈澱を行い泳動後に銀染色により検出した

(図3).Western blotの結果と同様に細胞質由来 のサブユニットであるサブユニット4,5,6に は低下が認められなかったが,Western blotでは 検出できなかったミトコンドリア由来のサブユニ ットであるサブユニット1の含量は患者ミトコン ドリアでは著明に低下していた.他の臓器での Western blotの結果と考え合せると、ミトコンド リア由来のサブユニットの低下が最初に存在し、 障害が増すに従い細胞質由来のサブユニットおよ びチトクロムの低下を伴ってきている過程が推察 された.

複合体 I, IIIおよび V のサブユニットの分析結 果でも各臓器において活性の低下と平行したサブ ユニットの低下が認められた.

次に, 複合体特異抗体を用いた免疫染色の結果 を示す(図4). これは生前に施行された筋生検標 本である. Gomori's trichrome 変法染色をほどこ したもの(A)では, 中央部に赤くそまる ragged -red fiber が認められた. 同じ部位を cytochrome c\_oxidase 活性染色(B) すると non-ragged-red fiber は一部の fiber を除いて染色性が著明に低下し



図2 複合体IV特異抗体を用いた Immunoblot. BHM: ウシ心筋ミトコンドリア, P:本 例, C: コントロール.



図3 複合体IV特異抗体を用いた免疫沈澱.OX:ウシ心筋より精製した複合体IV, P:本 例骨格筋ミトコンドリア, C:コントロール骨格筋ミトコンドリア.

ており、ragged-red fiber は染色されなかった.こ の部位を複合体IVに対する特異抗体で免疫染色を おこなった.本例(C)ではコントロール(D) に比べて全般的に染色性が低下していたが、ragged -red fiber はむしろ濃染された.以上より, ragged -red fiber では複合体IVの免疫反応物質が存在して いるにもかかわらず複合体IV活性が低下している 所見が認められた.



図4 骨格筋の組織化学染色と免疫染色.A:本例のGomori trichrome 変法染色,B:本 例のCytochrome <u>c</u>活性染色,C:本例の複合体IV特異抗体を用いた免疫染色,D: 正常コントロールの複合体IV特異抗体を用いた免疫染色.

次に、小脳組織を複合体IV特異抗体を用いて免疫染色したものを示す(図5).本例(C)では、 コントロール(D)に比べて Purkinje 細胞の染色 性が著明に低下していた。

### 考 察

MERRF における電子伝達系の生化学的異常に ついては、Riggs ら<sup>4)</sup>が複合体 II -III活性の低下した 症例を、Holliday ら<sup>5)</sup>が複合体 I の活性の低下した 症例を報告しているがサブユニットの検討はなさ れていない. 我々が今回分析した症例では複合体 IVの酵素活性が低下し、Western blot 及び免疫沈 澱の結果より核 DNA で規定されたサブユニット含 量の低下に比して、ミトコンドリア DNA で規定さ れているサブユニット含量の低下が著しいという 所見が得られた.最近, Mendell ら<sup>6</sup>も複合体IV活 性の低下した MERRF の症例を報告しているが, ELISA 及び免疫染色からは骨格筋での複合体IVの 免疫反応物質の差を見出してはいない.ミトコン ドリア由来のサブユニットの減少が見過ごされて いる可能性が考えられる.

さらに、本例においては、複合体 I, IIIの欠損 を一部の臓器で合併しており、電子伝達系に広範 な障害が存在していた.しかしながらミトコンド リア DNA によって規定されない複合体 II および citrate synthase 活性は比較的良く保たれていた. 我々は MELAS や乳児型致死性筋症において複数 の電子伝達系複合体の障害を呈した例を経験して おり、複数の複合体にまたがる障害は MERRF の みならずミトコンドリア・ミオパチーにおいてし



図5 小脳皮質の複合体IV特異抗体を用いた免疫染色. A:コントロール, B:本例

ばしば観察される現象であると考えられた. 複数 の複合体の合併欠損は細胞質由来のサブユニット に対する核の構造遺伝子の異常では説明が困難で ある.一方,ミトコンドリア電子伝達系の複合体 は複合体IIを除いてミトコンドリア自身のもつ16 kbの環状二本鎖 DNA によって規定されたサブユ ニットを含んでおり,それらの mRNA は polycistronic な RNA として mtDNA から転写され,プ ロセシングを受けた後,エンドヌクレアーゼで切 断され mRNA となることが知られている. MERRF において複合体IVを中心とする電子伝達系複合体 の合併欠損が臓器ごとに異なった程度に観察され たことから,ミトコンドリア DNA 自身の変異ない しはその発現過程の異常が MERRF の病因として 推察された.

### 文 献

 Fukuhara N, Tokiguchi S Shirakawa S et al: Myoclonus epilepsy associated with raggedred fibers (mitochondrial abnormalities) : disease entity or syndrome? J Neurol Sci 47: 117-133, 1980.

- DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M et al: Mitochondrial myopathies. Ann Neurol 17: 521-538, 1985.
- 3) 武田茂樹,若林孝一,大浜栄作,ほか:Raggedred fiber を伴うミオクローヌスてんかん(福原病) の1 剖検例・脳神経(印刷中).
- 4) Riggs JE, Schochet SS, Fakadej AV et al: Mitochondrial encephalomyopathy with decreased succinate-cytochrome <u>c</u> reductase activity. Neurology (Cleveland) 34: 48-53, 1984.
- Holliday PL, Andrew RCW, Gilroy J et al: Mitochondrial myopathy and encephalopathy: Three cases-A deficiency of NADH-CoQ dehydrogenase. Neurology (Cleaveland) 33: 1619-1622, 1983.
- 6) Mendell JR, Barohn RJ, Yates AJ et al: Autopsy case of myoclonic epilepsy and ragged - red fibers with cytochrome <u>c</u> oxidase deficiency: Evidence for a maternally inherited biochemical defect. Ann Neurol 22 (Abstract) : 128, 1987.

### 16) ミトコンドリア脳筋症の電顕的研究

福原信義\*

研究協力者 本 間 義 章\*\* 栗 原 照 幸\*\*\* 岸 雅 彦\*\*\*

### はじめに

ミトコンドリア脳筋症における酵素異常につい ては、種々の報告があるが、未だ一致した結果は 得られていない.一方、病理学的には Kearns-Sayre 症候群, ragged-red fiber を伴うミオクローヌスて んかん (MERRF)<sup>1)</sup>, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis & strokelike episodes (MELAS)<sup>2)</sup>は異なっており<sup>3)</sup>, 特に MELAS では大浜ら<sup>4)</sup>により脳血管の中膜平滑筋細 胞と内皮細胞にミトコンドリアの異常集積、形態 異常があり脳卒中様発作の原因となっていること が報告されている。一方、MERRF ではそのよう な血管の異常は報告されていない。

我々は、先ず、MERRFの1例で剖検脳のミト コンドリアの形態的変化について検討した。次に、 MELAS では MERRF と異なり、脳 CT で大脳基 底核の石灰化が比較的多くみられる<sup>3)</sup>ことから、こ の部分に焦点をしぼり、石灰化構造物と血管との 関係を検討するとともに、その成分の X 線分析を 行った。

### 方 法

症例1 30歳女性<sup>1),5)</sup>, 14歳時発症. ミオクロー ヌス,小脳失調,四肢深部感覚障害など MERRF の定型的症状を示す.筋生検でミトコンドリアの 形態異常(+). 剖検で小脳歯状核,黒質,下オリ ーブ核,脊髄後索,脊髄小脳路などに変性がみら れた.

**症例2** 30歳女性<sup>6)</sup>. 23歳時発症. 両下肢筋力低下,頭痛,呕気発作,全身痙攣をくり返し,左片麻痺,左同名半盲などを生じた. 筋生検でミトコ

ンドリアの形態異常(+) MELAS と診断. 剖検 で大脳,小脳に大小,新旧さまざまの虚血性病変 がみられたが,淡蒼球,歯状核に,特に血管周囲 でカルシュウム沈着がみられ, von Kossa 染色で 黒色に染っていた.

方法 症例1は剖検時直ちに脳の一部をグルタ ールアルデヒド固定,オスミュウム酸後固定後, 通常のごとく電顕にて観察した.症例2はホルマ リン固定脳より淡蒼球を中心として切り出し,グ ルタールアルデヒド(カコジレートバッファー) で再固定,オスミュウム酸で後固定したものと, しないものの2種類についてアラルダイトに包理 し,透過型電顕(日立 H-600)で観察,エネルギ ー分散型X線マイクロ分析(Kevex)で血管周囲 組織の元素分析を行った.

### 結 果

1) MERRF 脳の電顕的観察: 症例1の脳では ミトコンドリアの一部が腫大し、基質が淡明化し たものもみられたが、形態がよく保持されている ものが多かった.小脳皮質、小脳歯状核のミトコ ンドリアに形の大きい、クリスタが vesicular にな っているもの(図1)があり、生前の筋生検によ るミトコンドリアの形態異常(図1,挿入部)に 極めて類似しているものがあった.また、基質に 0.2µm 径までの大きさの結晶様物質(図2)の沈 着したミトコンドリアが非常に多くみられたが、 みられる場所は、神経細胞の胞体、樹状突起、星 状グリアの突起などであった。

2) MELAS 脳の電顕的観察: 症例2の insular cortex のくも膜下腔の血管はミトコンドリアが空 胞状に腫脹していたが,内皮細胞,中膜細胞のミ トコンドリアが増加していた。淡蒼球の毛細血管 でも内皮細胞の胞体が腫大し,ミトコンドリアの

<sup>\*</sup> 金沢大学医学部神経内科

<sup>\*\*</sup>佐渡総合病院神経内科

<sup>\*\*\*</sup>東邦大学医学部第四内科



図1 MERRF,小脳皮質のミトコンドリア×50,000
挿入部:生検骨格筋のミトコンドリア×23,000



図2 MERRF,小脳歯状核の樹状突起のミトコンドリアにみられた基質の結晶様構造物 (矢印)×58,000



図3 MELAS, 淡蒼球の毛細血管, 内皮細胞は腫大, ミトコンドリアが増加, 基底膜に接 して石灰化構造物(矢印)がみられる.×9,200

増加しているものがみられた(図3). 淡蒼球の石 灰沈着は主に血管周囲にみられ,一部基底膜の外 側に接しているもの(図3)もあるが,小球状, 層状の構造物が癒合した像を示していた.大きな ものは中心部が粗で,小顆粒状のものを含み, dense な外殻は周囲に細かい線維状のものを出している (図4).このような石灰化構造物は血管の外側を

きっちりとすき間なくとり囲んでいるのがしばし ばみられたが、カルシュウム沈着の著明な部位の 血管でも内皮細胞や pericyte にはカルシュウムの 沈着はみられなかった.

血管周囲組織の X 線マイクロ分析では石灰化構 造物の外殻は図 5 A のごとく Ca, P のほか, S, Fe, Si が大量に含まれていた. 一方, その粗な基 質の部分では Ca はみられず, S が主体となってい た (図 5 B).

### 考 察

1) MERRF 脳の電顕的観察:ミトコンドリアは 虚血あるいは死後変化(自己融解)により腫大, 基質の淡明化,クリスタの断裂,クリスタ顆粒の 消失が生じる<sup>70</sup>.症例1の脳でみられたミトコンド リア内の結晶様構造物は,MELASを含め他疾患 の剖検脳ではみられることはなく,MERRFに伴 った病的所見と考えられ、vesicularなクリスタ像 が生前の骨格筋でみられたミトコンドリア変化<sup>10</sup>に 極めて類似していることもMERRFの脳ミトコン ドリアに病的変化が生じていることを示唆してい る.MERRFではMELASと異なり,神経細胞自 体のミトコンドリアに異常のあることが疑われる.

2) MELAS 脳の電顕的観察:大脳基底核の石 灰化 (striopallidodentate calcification)の原因に ついては Alajouanine & Contamin (1954), Norman & Urich (1960) 以来,血管の異常によると



**図4** MELAS, 淡蒼球の血管 (V), 周囲は石灰化構造物 (矢印) によってとり囲まれて いる.×4,400



図5 MELAS, 淡蒼球の石灰化構造物 (グルタール単独固定,未染色)のX線分析.
A (外殻部分): Ca, Pのほか, Fe, S, Si が多い(Cuのピークは銅メッシュの影響による)

B (基質部分): S が主体で P, Si もみられるが Ca は検出されない。

するものがある。すなわち、カルシュウムが血管 周囲に沈着することが多く、また、大脳基底核が 血管支配の境界域であり,低酸素血症の影響をう けやすいことによる。一方、カルシュウムの沈着 部位は血管外であることから、何らかの代謝異常 の結果、二次的にカルシュウムの沈着が生じると も考えられ、Liebaldt & Descalzo (1963) 以来、 カルシュウム代謝についてくり返し検討されてき た、しかし、ほとんどの症例では副甲状腺機能の 異常はみられない. このような大脳基底核の沈着 物質を分析した報告は非常に少ないが, Löwenthal & Bruyn (1968), Smeyers-Verbeke ら (1975) は脳の灰化による化学分析で Caのほか Cu, Fe, Zn, Al, Mn などを検出している。我々と同様の 電顕下の X 線分析によるものでは,Copeland ら (1977)<sup>8)</sup>は Ca, P のほか Fe, Mg, Si を, 小俣ら (1978)<sup>9</sup>は Ca, Fe, Ni の集積を報告している。 また, Duckett ら(1986)<sup>10)</sup>は, Cr, P, Ca を検出 し, Cr が生前に使用された造影剤に含まれていた ものとしている.いずれにしても,症例2でみら れる石灰化構造物の外殻部分における Ca, P, Fe の沈着は今までの報告と一致し、主に燐酸カルシ ュウムよりなるものと思われる。一方, 内部の基 質の部分には Ca はみられず、S が主体となってい る。このことは硫酸基をもつ酸性ムコ多糖体が増 加し, そこに二次的に Ca, P が沈着したことを示 しているように思われる。MELAS では脳血管の 変化による透過性の変化があり,酸性ムコ多糖体 のような物質が増加するとそこにカルシュウムが 沈着し,脳の二次的な変化を防ごうとしているの かもしれない。

### 結

1) MERRF では小脳の神経細胞にミトコンド リアの形態的異常がある。

論

2) MELAS でみられる大脳基底核石灰化は, 酸性ムコ多糖体の増加に対する二次的なカルシュ ウム沈着と思われ,脳血管の透過性異常を反映し たものかもしれない.

### 文 献

- Fukuhara N, Tokiguchi S et al: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): Disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literatures. J Neurol Sci 47: 117, 1980.
- Pavlakis SG, Phillips PC et al: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: A distinctive clinical syndrome. Ann Neurol 16: 481, 1984.
- 福原信義:ミトコンドリア脳筋症の臨床. 神経進歩 31:604, 1987.
- 4) Ohama E, Ohara S et al: Mitochondrial angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalopathy. Acta Neuropathol (Berl) 74: 226, 1987.
- 5) 武田茂樹, 若林孝一ほか: Ragged-red fiber を伴うミオクローヌスてんかん(福原病)の1 剖検例. 脳神経 39:1171, 1987.
- 6)栗原照幸,岸 雅彦ほか:ミトコンドリア脳筋症 の一剖検例.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60年度研究報告書1986,p221.
- 高木文一:細胞障害の超微形態学.日病会誌 53: 17, 1964.
- 8) Copeland DD, Lamb WA et al : Calcification of basal ganglia and cerebellar roof nuclei in mentally defective patient with hidrotic ectodermal dysplasia. Analysis of intracranial concentration by electron microprobe. Neurol 27: 1029, 1977.
- 小俣好作,赤井契一郎ほか:広範な皮質壊死を伴った striodentate calcification (所謂 Fahr 病) について――その組織化学,透過及び分析電顕所見を対比して,臨床神経 18:663, 1978.
- Duckett S: Abnormal deposits of chromium in the pathological human brain. J Neurol Neurosurg Psychiat 49: 296, 1986.

### 17) ミトコンドリア脳筋症クローン化筋細胞の検索

桃 井 真里子\*

秀 - 夫\* 中三川 利\* 小林 繁 研究協力者 下 泉 晃 沢 ЛЕ 靖 雄\*\* 枊 Æ 義\* 太田 成 男\*\* 香

ミトコンドリア脳筋症は、臨床的多様性は元よ り、組織多様性や欠損酵素の多様性を特徴とし、 また遺伝形式もミトコンドリア遺伝子に由来する 母性遺伝を示すものや、核遺伝子に由来する遺伝 形式を示すものがあり、各々の病態の解析には単 一の細胞系が必要である。本研究では、ミトコン ドリア脳筋症患者より得た培養骨格筋細胞に、発 癌遺伝子を導入し、永久増殖系とし、ミトコンド リア酵素欠損細胞株を樹立し、それらの解析を試 みた。

### 材料と方法

MELAS と診断された19歳男子大腿四頭筋より 得た生検筋を培養し、複製起始部欠損 SV40DNA<sup>1)</sup> を燐酸カルシウム法2)にて導入し,形質転換した細 胞をクローン化した3).クローン化細胞の内,合成 無血清培地にて多核細胞を形成するもの, 更に creatine kinase がセルロース・アセテート上電気 泳動にて MB または MM isomer を表現するクロ ーンを, myogenic clone とした. この二つの形質 を示さないクローンを non-myogenic clone とし た。生検筋の組織化学染色は通常の方法で行い、 培養細胞のチトクロームc酸化酵素活性染色は Seligman の変法によった、通常の培養は、 HamF12 (10% FCS) にて行い, myogenic clone の検出には合成無血清培地中にて培養した<sup>3)</sup>.細胞 の増殖曲線は、以下のようにした、各々の細胞を 1×10ずつ60mm ディッシュにまき, 2, 6, 8 日目に0.05%トリプシン, 0.02% EDTA にて浮遊 した細胞をカウントした. ミトコンドリア DNA 量

\* 自治医科大学小児科

\*\*自治医科大学第一生化学

の検討には, total DNA を BamHI で切断後, ミ トコンドリア DNA の CCO をコードする領域を含 む3.4kbの cDNA をプローブとして, southern blotting をおこなった.さらに CCO コード領域の 検討のために, total DNA を Hing III と Sacl にて 切断後, 上記のプローブをもちいて southern blotting をおこなった.

#### 結 果

**組織化学染色**:生検筋の gomori-trichrome 染 色では、少数の ragged-red fiber を認め、CCO 染 色にて、segmental な活性欠損の線維を認めた。

ミトコンドリア酵素活性:結果を表1に示す. Complex II + III, Complex IV共に正常コントロー ルより高い結果だが,電子伝達系酵素活性に低下 はみられないと判断した.

クローン化細胞: クローン化した細胞を CCO 染 色し, CCO 活性陰性のクローンを比較的選択的に 検討した為, 表 2 に示すクローン化細胞の CCO 陽 性クローン, 陰性クローンの比は, *in vitro* の陽性 細胞と陰性細胞の比を反映していない. myogenic clone の内, CCO 陽性クローンは 3 個, 陰性クロ ーンは 8 個であった. non-myogenic clone 多数の 内 2 個検討し, 共に CCO 陽性であった.

クローン化細胞の組織化学染色:図-1に示す様 に、陽性クローン核周辺に染色性があり、ミトコ ンドリアの染色を示した(図1-A).同一クロー ンを弱拡大で示す.視野内の全細胞が染色されて いる.更に、同じクローンを、0.2% NaN3存在下 で染色すると、核周辺の染色性が消失する(図1 -B). CCO 陰性クローンは図1-C, Fの様に NaN3存在下と同様に染色性を示さない.染色陽性 も陰性も全視野にわたり、CCO 活性に関してはモ

表1	Mitochondrial	enzymes in	mitochondrial	preparations
----	---------------	------------	---------------	--------------

	NADH- cytochrome c reductase ( Complex I )	Succinate- cytochrome c reductase ( Complex II + III )	Cytochrome c oxidase (Complex IV.)
Patient	226	1420	2785
Controls	161 ± 66 ( 88 -249 )	409 ± 200 ( 141 - 667 )	1435 ± 480 ( 1008 -2114 )

(nmol/min/mg mitochondrial protein)

表2 確立したクローンとその CCO 活性

Myog	enic clor	Non-myogenic	
clones	cco	DNA	clones CCO
2D4	+		1C1 +
2A4	+	√	1D4 +
1A3	+		
1A5	-		
1B2		V	
1D2	_		
2A3	-	v	
2C1	-	v	
2D2	_	V	
1B4	_		
1B6	-		

ノクローンであることを確認した。同時に検討した同一患者からの線維芽細胞は CCO 陽性であった (図1-D). クローン化細胞の増殖曲線:CCO 陽 性クローン,2D4、陰性クローン,1B4,1A5の増 殖曲線を図2に示す.2D4は,培養2日目に,doubling time31時間の log phase を示す.陰性クロー ンは何れも培養6日目に log phase に達し,log phase の doubling time はそれぞれ39時間,48時間 であった.培養2日目に陰性クローンの数が一時 的に減少しているのは,陰性クローンがよりトリ プシンに弱いことを示すのかも知れない.また, log phase に至る時間が長いのは,たんに最初の一 時的細胞数現象の反映の可能性が考えられる.log phase の増殖性がそれほど変わらないことは,CCO 欠損細胞も CCO 正常細胞と同じ様な細胞増殖を 示しうることを示唆している.8日目以降の増殖 を検討することにより,overgrowthした時の陰性 クローンの状態を知ることができ,検討中である.

ミトコンドリア DNA 解析: BamHI にて切断後 プローブとハイブリダイズした DNA 量に差は認め なかった. Hind IIIと SacI で切断後のハイブリダ イズの結果を図3に示す. 陽性クローン, 2A4と示 した4個の陰性クローンとのあいだにパターンの 差は認めなかった.



#### クローン化細胞の CCO 活性染色 図1

A, E: CCO 陽性クローン, 1A3. 矢印は核周辺のミトコンドリアが CCO 陽性に染 色されていることを示す. B: クローン1A3の NaN3存在下での染色. NaN3の為, 反応陰性である.C,F:陰性クローン,2B4を示す.E,Fは、弱拡大にて、全ての 細胞が CCO 陽性,または陰性であることを示す.D:患者皮膚線維芽細胞は,全て 陽性である.

#### 老 察

ミトコンドリア脳筋症の診断及び病態の解析に 生検骨格筋が用いられるが、特に筋症状を示さな い例においては、筋線維の一部が変異形質を表現 している場合が多い.このような場合は、病理学 的検索以外は,変異形質を表現する細胞を正常細 胞群から取り出し,解析する必要がある。本研究 で確立した CCO 活性欠損筋細胞は, 発ガン遺伝子 で形質転換したために無限増殖系であり,初代培 養細胞より高増殖性を示す。かつ、変異形質がモ ザイクの組織から, 唯一, 疾患の遺伝子, または, 1) Gluzman Y, Frisque RJ and Sambrook J:

形質のみを違いとする,正常細胞と,変異細胞が 得られる. ミトコンドリア DNA の検索にて, 今回 使用した制限酵素によっては,大きな deletion は 認められなかった。ミトコンドリア遺伝子に関し ては、今回のような検索を進め、また、核遺伝子 に関しては、CCO陽性クローンにのみ表現されて いる mRNA の検出を行うに最適の系であると考え られる.

#### 文 献



 図2 クローン化細胞の増殖曲線
CCO 陽性クローン(2D4), 陰性クローン (1B4, 1A5) を60mm ディッシュに 1×10まき, 培養2, 6, 8日目にトリプシン処理後の細胞数をカウントした。各々3ディッシュずつセットし, 2回のカウントの平均を取った。

Drigin-defective mutants of SV40. Cold Spring Harbor Snmp Qunt Biol 44 : 293, 1980.

2) Wigler M, Pellicer A, Silverstein S and Axel R: Biochemical transfer of single-copy eukaryotic genes using total cellular DNA as donor. Cell 14: 725, 1978.



### a bcdef

図3 筋細胞由来クローンのミトコンドリア CCO 遺伝子の制限酵素切断パターン

3) Nakamigawa T, Momoi MY, Momoi T and Yanagisawa M: The generation of human yogenic cell lines by the transformation of primary culture with origin-defective SV40 DNA. J Neurol Sci 83: 305-319, 1988.

### 18) ミトコンドリアサイトパチーの家系分析

小澤 高 将\*

嗣\* 研究協力者 Ξ 中 雅 田 中 智 子\* 錦 見 盛 光\* 鉿 木 實\* 細 Ш 好 孝\* 寿 原 綷 彦\*\* 埜 中 征 哉\*\* 古 敏\*\* 賀 靖

### はじめに

ミトコンドリア・サイトパチーにおける電子伝 達系酵素欠損の診断法および根本的治療法を開発 するためには、その異常を遺伝子レベルで解明す る必要がある.その前段階として、酵素活性測定 あるいはサブユニットの分析などにより分子レベ ルでの異常を確定し、その背後にある遺伝子異常 を絞り込んでいかなければならない、家系分析は 遺伝子異常を明らかにする上で重要な手掛かりを 提供する.本稿では、常染色体劣性遺伝によると 考えられる致死性乳児型ミトコンドリア・ミオパ チーの家系および母性遺伝の疑われるミトコンド リア脳筋症の家系における電子伝達系酵素のサブ ユニットの異常を報告する.

本研究における生化学的、免疫化学的、免疫組 織化学的分析は既報の方法に従って行った1)~5)

### 致死性乳児型ミトコンドリア・ミオパチーにおけ る電子伝達系酵素異常

家系 両親はいずれも臨床的には正常で、家系 内に血族結婚はない。第1子のは筋緊張低下、高乳 酸血症, 汎アミノ酸尿を認め, Fanconi 症候群を伴 った fatal infantile mitochondrial myopathy と 診断され、呼吸障害により生後8ヶ月で死亡した。 その生検骨格筋ミトコンドリアの分析では、電子 伝達系酵素活性の全般的低下,チトクロム aaaおよ びチトクロム b の欠損、複合体IVサブユニット含 量の低下およびミトコンドリアの蛋白質組成の異

常が見出だされたい。第2子は正常であった。第3 子は第1子と同様の臨床症状を呈し、現在、人工 呼吸管理下にある。

酵素活性測定 表1に両親および第3子の生検 骨格筋から単離したミトコンドリアの電子伝達系 酵素活性を示す。第3子の複合体 I-IIIおよび複合 体VIの活性はそれぞれ正常平均の44%および4% に低下していた.これに対し複合体II-IIIの活性は 正常域にあった。一方、両親では複合体 I-III活性 が正常下限域に, 複合体 II-III活性は正常, 複合体 IV活性は正常上限域にあり、他の複合体の活性に 比して複合体Ⅰの活性の低下が疑われた。

Western blotting 図1に第3子および父親のミ トコンドリア電子伝達系複合体のサブユニットの 分析結果を示す。これまで致死性乳児型ミトコン ドリア・ミオパチーは複合体IV欠損症の一型と考 えられてきた.しかし、第3子のミトコンドリア の分析の結果は、サブユニット量の減少が複合体 IVのみならず複合体Iおよび複合体IIIにも及んで いることを示している. これに対し複合体 Vのα およびβサブユニットの減少は見られなかった。 注目すべきことに、複合体Iに対する抗体を用い た分析で、正常では見られない異常なバンドが第 3子のみならず父親においても検出された。

想定しうる酵素欠損の原因 臨床的に正常な父 親に異常所見が見出だされたことから、母性遺伝 すると考えられるミトコンドリア DNA の異常は否 定しうるであろう、また第2子が正常であったこ とから、この家系での電子伝達系の異常は常染色 体劣性遺伝によるものであると推定される.

こうした常染色体劣性遺伝を考えた場合、早発

<sup>\*</sup>名古屋大学医学部生化学第二講座 \*\*国立精神センター神経研究所
	I-III	II-III	IV	I-III/ IV
Patient	100 (44)	222 (95)	12 (4)	2.33
Father	122 (54)	273 (117)	397 (146)	0.31
Mother	152 (67)	216 (93)	397 (146)	0.38
Control	227 + 120	233 <u>+</u> 97	271 <u>+</u> 133	0.83 <u>+</u> 0.35

表 1 Activities of electron-transfer complexes in mitochondria.

Activities were expressed in nmol/min/mg of mitochondrial protein.

\* Figures in parentheses are percentages of mean control values.

%\*Values are means + S.D.



 図1 致死性乳児型ミトコンドリア・ミオパチーの家系におけるミトコンドリア酵素サブユニットの分析.I:複合体I III:複合体III IV:複合体IV V:複合体V.C: 正常コントロール P:患者(第3子) F:患者の父.

性動脈硬化症の患者において見出だされた異常が 想起される(11).すなわち,アポリポ蛋白 AI の coding region に転位がおきたために,アポリポ蛋 白 AI 遺伝情報の一部のみが発現しアポリポ蛋白 AI よりも分子量の小さい異常蛋白が生成している と考えられる例が最近報告されている.このよう な染色体 DNA の転位などの異常がこの家系で最も 考えられる原因である.

## 母系遺伝の疑われるミトコンドリア脳筋症の家系 における電子伝達系酵素異常

**家**系 患者は25歳,女性.乳幼児期および小児 期には特に異常は無かった.12歳時に易疲労性を 訴え,15歳には長時間の歩行が困難になり,脱力 発作が出現した.その後,筋力,知能共に低下, 振戦に加えミオクロヌスてんかんも出現した.患 者の母(55歳)はこの数年間で徐々に筋力の低下 をきたし,易疲労性を訴えた.最近著しく痴呆が 進行した.妹(22歳)は臨床的症状は無く,知能 も正常である.

免疫組織化学 患者18歳時の筋組織において ragged-red fiber (RRF)をみとめ cytochrome c oxidase 活性染色において軽度の低下が見られた. 25歳時には、初回の筋生検組織像に比して、RRF の数が増加し cytochrome c oxidase 活性染色も 著明な低下を示した.また、複合体IVに対する抗 体を用いた免疫染色では多くの筋線維において染 色性の低下が認められたのに対し、RRF において はむしろ免疫反応性物質の蓄積が見られた(図 2).

母においても患者と類似した組織像が見られた. 妹の生検筋においては RRF は見られず, cytochrome *c* oxidase 活性染色も正常であったが, 筋 線維の大小不同が認められた.

酵素活性測定 図3にこの家系における電子伝 達系酵素活性の変動を示した。5年前における患 者の電子伝達系酵素の活性は全般的に低下が見ら れたが、特に複合体IVの活性の低下が著明であっ た。その時点における母の電子伝達系酵素の活性 は、複合体II-III活性がやや低下していた他は著し い異常を認めなかった。 現在,患者においては複合体IVの活性に加え複 合体 I -III活性も明らかに低下している。母におい ても同様に複合体IVの活性と複合体 I -IIIの活性の 低下が認められている。妹においては複合体IVの 活性の軽度低下が見られる。

Western blotting 図4に電子伝達系複合体の サブユニットの分析結果を示す。複合体IVのサブ ユニット4および7の含量は、患者(P)のミトコ ンドリアで著しい低下が見られ、母(M)におい ても軽度の減少が見られた。また妹 (S) において も明らかに低下が認められた。複合体Iのウエス タンブロットにおいてもバンド1,4,10の濃度 の低下が見られた、その低下の程度は母、妹より も患者において著しかった。またバンド3の濃度 に上昇が見られたが、このサブユニットの含量の 増加の程度は、患者よりむしろ母、妹において著 しかった。このように複合体Iのサブユニット間 の量比に不均衡が存在することが示唆された。一 方, 複合体III, 複合体Vに対する抗体を用いたウ エスタンブロットではサブユニットの欠損あるい は低下は患者においても母においても認められな かった.

想定される遺伝的異常 本家系において複合体 IVのサブユニットの著しい欠損に複合体 I の軽度 の欠損が合併していることが明らかになった.経 過を追って酵素活性を比較検討した結果,発病当 初,明確でなかった複合体活性の低下が次第に顕 著になっていく過程が明らかになった.従って, 複合体IVの欠損が一次的な原因となり,二次的に 複合体 I の欠損が生じるのではなく,むしろ複合 体IVと複合体 I の欠損は,共通の異常に起因する ものであるが,異なった時期に顕在化してくるも のと考えられる.

一方, MERRF の剖検例において, 臓器間での 電子伝達系複合体の活性およびサブユニット含量 を比較検討した結果, 複合体IV欠損に加えて複合 体 I, III, Vの部分的欠損が種々の臓器で合併し ていることが明らかになっている(Yoneda et al. 投稿中および宮武ら,本報告書,別項).本家系で MERRF の剖検例と同様に複合体IVを主としたミ トコンドリア電子伝達系全般の欠損が存在したこ



図 2 母系遺伝の疑われるミトコンドリア脳筋症の患者の生検骨格筋組織像

- A : Gomori's modified trichrome stain
- B: cytochrome c oxidase 活性染色
- C: 複合体IVに対する特異抗体を用いた免疫組織化学染色
- D:コントロールにおける複合体IVの免疫組織化学

とは、両者が病因において同一であることを示唆 討を進めている. している.

MERRF では母系遺伝が疑われ、大家系の報告 もある".本家系において見られた電子伝達系の複 合体IVおよび複会体 I の合併欠損が、ミトコンド リア DNA の変異によって発現することが最も考え られる.この詳細については本研究室において検

#### ŧ とめ

ミトコンドリア・サイトパチーの2家系におい て酵素学的ならびに免疫化学的な分析を行い,分 子的異常を明らかにすることができた。 一家系で は核の遺伝子の異常が疑われ,他の家系ではミト









図3 母性遺伝の疑われるミトコンドリア脳筋症の家系における電子伝達系酵素活性の変 動.

I-III: 複合体 I -III (NADH-cytochrome *c* reductase) 活性 II-III: 複合体 II-III (succinate-cytochrome *c* reductase) 活性 IV: 複合体 IV (cytochrome *c* oxidase) 活性 患者 (P) 母 (M) 妹 (S) の活性をコントロールの値に対するパ ーセントで表示した.



図4 母系遺伝の疑われるミトコンドリア脳筋症の家系におけるミトコンドリア酵素サブ ユニットの分析。

I: 複合体 I III: 複合体III IV: 複合体IV V: 複合体V C: 正常コントロール P: 患者 M: 母 S: 妹

コンドリア DNA 上の遺伝子の異常がその原因とし て推定された.一方,我々の研究室ではヒトのチ トクロム c<sub>1</sub>の cDNA のクローニングに成功し<sup>8</sup>, その presequence を含む全遺伝子構造を明らかに した<sup>9</sup>. さらに鉄-イオウ蛋白質ならびにユビキノ ン結合蛋白質の cDNA クローンの単離に成功し, 現在その塩基配列の決定を急いでいる.このよう に,遺伝子の構造を解明し,疾患における異常を 明確にしていくことは、ミトコンドリア・サイト パチーに対する明確な診断法の確立に寄与するば かりでなく,遺伝子治療への道を拓くものであり, 今後の重点課題とすべきものであろう<sup>10</sup>.

#### 文 献

 Tanaka M, Nishikimi M, Suzuki H, Ozawa T, Okino E and Takahashi H: Multiple cytochrome deficiency and deteriorated mitochondrial polypeptide composition in fatal infantile mitochondrial myopathy and renal dysfunction. Biochem Biophys Res Commun, **138**: 911-916, 1986.

- 2) Tanaka M, Nishikimi M, Suzuki H, Ozawa T, Nishizawa M, Tanaka K and Miyatake T: Deficiency of subunits in heart mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase of a patient with mitochondrial encephalopathy and cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun, 140:88-93, 1986.
- 3) Tanaka M, Nishikimi M, Suzuki H, Ozawa T, Koga Y and Nonaka I: Partial deficiency of subunits in Complex I or IV of patients with mitochondrial myopathies. Biochem Int 14:525

-530, 1987.

- 4) Tanaka M, Nishikimi M, Suzuki H, Ozawa T, Ichiki T, Kobayashi M and Wada Y: Variation in the levels of Complex I subunits among tissues in a patient with mitochondrial encephalomyopathy and renal dysfunction. Biochem Int 14: 735-739, 1987.
- 5) Ichiki T, Tanaka M, Nishikimi M, Suzuki H, Ozawa T, Kobayashi M and Wada Y: Deficiency of subunits of Complex I and mitochondrial encephalomyopathy. Ann Neurol (in press)
- 6) Zeviani M, Nonaka I, Bonila E, Okino E, Maggio M, Jones S and DiMauro S: Fatal infantile mitochondrial myopathy and renal dysfunction caused by cytochrome c oxidase deficiency: Immunological study in a new patient. Ann Neurol 17: 414-417, 1985.
- 7) Rosing HS, Hopkins LC, Wallace DC, Epstein

CM and Weidenheim K: Maternally inherited mitochondrial myopathy and myoclonic epilepsy. Ann Neurol 17: 228-237, 1985.

- 8) Nishikimi M, Suzuki H, Ohta S, Sakurai T, Shimomura Y, Tanaka M, Kagawa Y and Ozawa T: Isolation of a cDNA clone for human cytochrome c<sub>1</sub> from a λgt 11 expression library. Biochem Biophys Res Commun 145: 34 -33, 1987.
- 9) Nishikimi M, Ohta S, Suzuki H, Tomoko T, Kikkawa F, Tanaka M, Kagawa Y and Ozawa T: Isolation and sequencing of a cDNA encoding the precursor to human cytochrome c. Nucleic Acid Res (submitted).
- Ozawa T, Tanaka M, Suzuki H and Nishikimi M:Structure and function of mitochondria: Their organization and disorders. Brain Dev 9:76-81, 1987.

# 19) ヒト・ミトコンドリアDNAの多型解析

宝来 聰\*

研究協力者 五條堀 孝\* 早 坂 謙 二\* 松 永 英\*

ヒトのミトコンドリア DNA (mtDNA) は、約 16,560塩 基 対 の 環 状 DNA で、Anderson ら (1981) によって一個体の全塩基配列が決定され ている<sup>1)</sup>. mtDNA は核 DNA に比べて、塩基置換 速度がかなり速いことで知られており<sup>2)</sup>、ヒトにお いてもかなりの個体間変異(多型)が予想される。 本研究では、mtDNA の制限酵素切断型多型 (RFLPs) による正常日本人集団での多様性の分 析を行った. さらに、これらの解析結果を踏まえ て、ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリ アゲノムの欠陥、あるいは疾患に特有の変異を明 らかにするべく、Denaturing gradient gel electrephoresis (DGGE) 法<sup>3)</sup>を応用した mtDNA のミス マッチ同定のための手法の確立を行った.

#### 材料及び方法

ヒトの mtDNA のソースとしては、血液・臓器 等が考えられるが、多くの検体をより多くの種類 の制限酵素で解析するためには、胎盤が最も適当 な材料と考えられる。著者らの経験では、新鮮な 胎盤を用いれば、ミトコンドリア分画の分離・DNA 抽出・CsCI-EtBr 密度勾配遠心法等の一連の操作 による環状 mtDNA の回収率は、胎盤あたり 200~300µg であった。これは多種類の制限酵素に よる切断パターンを、サザンブロッティングある いはエンドラベリング法を用いずに、EtBr 染色で 識別するのに充分な量である。日本国内、3地域

(静岡・沖縄・青森)において約260検体の胎盤を 収集し,mtDNAを精製した。まず6塩基認識の制 限酵素15種類による切断型分析を行い,各集団ご とに変異型(morph)の分布を明らかにした<sup>9</sup>.さ らに4塩基認識の制限酵素を用いた詳細な分析を 行い、各々の酵孝による morph の頻度を明らかに し、全部の酵素の認識部位の比較により各個体の タイプ (restriction type) 分類を行った<sup>5)</sup>.

#### 結果及び考察

(1)日本人集団での変異

日本人3地域集団は、各morphの頻度およびタ イプの分布においては、かなり異なっていること が明らかとなった。しかし、タイプを基にした系 統樹分析においては、クラスタリングパターンは 各集団で基本的にはよく類似していた。すなわち、 本土2集団で観察された2大クラスター(group I とII)は、沖縄集団でも観察され、各系統樹にお ける最初の分岐時間もほぼ同様だった(図1).さ らに本土および沖縄集団を合わせた系統樹分析の 結果、両集団にかなりの遺伝子交流があったこと が推測され、日本における founder population に おいてすでに mtDNA は多型的であったことが示 唆された<sup>6</sup>.

(2)他人種との比較分析

さらに日本人集団に見いだされた2大クラスタ ーの分子進化的意義を明らかにするため、3大人 種(日本人、白人および黒人)のmtDNA 制限酵 素地図のデータ解析を試みた.我々の分析した日 本人(静岡, n=116)と Cann (1982)によって分 析された白人(n=41)および黒人(n=19)のデ ータを併せて解析した<sup>5)77</sup>.3大人種全体で117の異 なったタイプが観察され、個々のタイプはそれぞ れの人種に特有のものであった.個々の人種集団 内における DNA レベルの多様性、すなわち nucleotide diversity (d)を算出したところ、日本人

(d=0.0026) と白人 (d=0.0025) は, ほぼ同じ 値であったが, 黒人 (d=0.0047) では約2倍近い 値が得られた(表1). このことは黒人の mtDNA



図1 日本人(静岡)のmtDNA 多型解析で観察された62タイプの系統樹.

表 1	Number of mtDNA restriction types and
	estimates of nucleotide differences among
	three major racial groups

Race	No. of types	Individuals tested	Average no. of. nucleotide substitu- tions
Japanese <sup>1)</sup>	62	116	0.0026
Caucasians <sup>2)</sup>	36	41	0.0025
Negroes <sup>2)</sup>	19	19	0.0047
Total	117	176	0.0033
The data used	i are 1) H	lorai and Mat	sunaga (1986) and

2) Cann (1982)

は白人あるいは日本人のそれらより多様性が高い ことを示している. さらに3大人種集団からのタ イプのすべての組み合わせ間でdを計算し、それ に基づいて UPG 法により系統樹を作成した(図 2). 得られた系統樹で、 クラスタリング パター ンによって便宜的に8つのクラスター(C1からC8) に分類したところ、3クラスターでは複数の人種 からのタイプの混ざり合いが観察されたが、他の



図2 mtDNA からみた3大人種の系統樹.

5 クラスターは同一人種からのみなる顕著なクラ スターであった.mtDNA の塩基置換速度を2× 10<sup>-8</sup>/site/年と推定すると一番古いクラスター(C1 と C2)の分岐は約17万年前と計算された.ここで は C1 は黒人のみのクラスターであり、C2は日本人 のみのクラスター(日本人集団中の group I に相 当)である.この値は、Neiのグループによって研 究されたタンパク質の遺伝子頻度データに基づい

た3大人種の分岐年代に比べるとかなり古い.す なわち遺伝子頻度のデータからは、白人と東洋人 の分岐を約5万年前、白人・東洋人のグループと 黒人の分岐を約12万年前とそれぞれ推定している<sup>9)</sup>. 我々の分析は mtDNA 遺伝子の系統樹であり、一 方 Nei らの分析は人類集団の分岐に関するもので あるので、これらの想定値は、人種の分岐よりず っと以前に遺伝子の分岐が起こっていたことを示 唆している。また人種間での系統分析では gene migrationの影響も当然考慮しなければいけないが、 mtDNA は人種の分岐以前にすでに多型的であった という説明が最も妥当であろうと考えられる<sup>9</sup>.

(3) DGGE 法によるミスマッチの同定

さて近年, ミトコンドリア・サイトパチー等の 疾患において, ミトコンドリアゲノムの欠陥, あ るいは関与が問題にされている.患者試料は血液 あるいは微量の生検組織に限られるため, 著者ら が行って来たような分析は困難である.またサザ ンブロット法では, 分解能に限界があり, ゲノム 中に大きな欠失・挿入があった場合にしか変化が 観察されない.このため,近年開発された Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法を 用いた,mtDNAにおけるミスマッチの同定法への 応用を試みた.まずこの方法の確立のため以下の 実験を行った.正常人2個体(MS70とMS85)よ り精製したmtDNAの2.1kbのPst I 断片を pUC19にクローニングした.この2個体のmtDNA のうち一方(MS70)は制限酵素による分析でこの Pst I 断片中に9bpの欠失があることがわかってい る.クローニングされた2種類のDNAを等量ずつ 混ぜた後,熱変性,再結合するとホモデュブレッ クス2種類とヘテロデュプレックス2種類の混合 物ができる.この混合物を,インサートをさらに 切断するような制限酵素(この場合はRsa I)で 消化し,DGGEで分析した(図3).この時,泳動 方向と平行に変性剤の濃度勾配をつけたゲルで,



3 Denaturing gradient gel electrophoresis.

60℃の温度を保ちながら泳動する。 ヘテロデュプ レックス中に塩基置換等によるミスマッチがある と低い変性剤濃度で二本鎖 DNA の部分解離がお 。こり、その高次構造の変化によって易動度がおそ くなるためホモデュプレックスと区別できる.実 際,上述の混合物を Rsa I で切断し, DGGE で分 析すると,一方に欠失のある相同断片同士のヘテ ロデュプレックスではかなりの易動度の遅滞がみ られた. さらに別の断片 (411bp) のヘテロデュプ レックスでも易動度の遅滞が観察され、シークエ ンスによる分析で、この2種類のmtDNAの断片 の塩基配列には1塩基置換があることが明らかに なった(図4). この方法を用いると、ミトコンド リア・サイトパチーの患者試料を用いた場合でも 正常人試料との比較によって, どの部位で塩基置 換があるかをまず決め、その後シークエンスによ る分析に発展できるという利点がある.



図4 DGGE 法によるヘテロデュプレックスの同定.

#### 結 語

(1)正常日本人集団において,mtDNAの多型解析 を行い,その系統分析により日本人集団は異なる 2大グループより形成されることを明らかにした.

(2)白人,黒人との比較分析により,日本人にみられた2大グループの人種進化における位置づけを行い,mtDNAは人種の分岐以前にすでに多型的であったという示唆を得た.

(3)ミトコンドリア脳筋症において, mtDNAの変異の有無を明らかにする手段として, Denaturing gradient gel electrophoresis 法によるミスマッチを同定する手法を確立した.

#### 文 献

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R and Young IG: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457-465, 1981.
- Brown WM, George Jr M and Wilson AC: Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA 76: 1967-1971, 1979.
- Myers RM and Maniatis T : Recent advances in development of methods for detecting single -base substitutions associated with human genetic diseases. Cold Spring Harbor Sym. Quant Biol 51: 275-284, 1986.
- Horai S, Gojobori T and Matsunaga E : Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese : I. Analysis with restriction enzymes of six base pair recognition. Hum Genet 68: 324-332, 1984.
- 5) Horai S and Matsunaga E: Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese: II. Analysis with restriction enzymes of four or five base pair recognition. Hum Genet 72: 105-117, 1986.
- 6) Horai S, Gojobori T and Matsunaga E: Evolutionary implications of mitochondrial DNA polymorphism in human populations. Human Genetics, ed by Vogel F and Sperling K, Proc 7th Int Cong Hum Genet, Berlin, 1987, pp177-

181.

- Cann RL: The evolution of human mitochondrial DNA. Ph D thesis, University of California, Berkeley, California, 1982.
- Nei M and Roychoudhury AK : Genic variation within and between the three major races of

man, Caucasoids, Negroids, and Mongoloids. Am J Hum Genet 26: 421-443, 1974.

9) Horai S, Gojobori T and Mastunaga E: Distinct clustering of mitochondrial DNA types among Japanese, Caucasians and Negroes. Jpn J Genet 61: 271-275, 1986.

# 20) ゴールド標識免疫電子顕微鏡による ミトコンドリアミオパチーの研究

佐 藤 猛\*

研究協力者 関 尒 ......\* 中 村 眞 埜 中 征 哉\*\*\* 濹 高 将\*\*\*\* 小

ミトコンドリアミオパチーの形態学的特徴は異 常ミトコンドリアであり、結晶状封入体を有する もの,内膜が同心円状に増殖したものなどが出現 する、生化学的には電子伝達系酵素の複合体Ⅰ、 II, III, IVの欠損例が報告されている。異常ミト コンドリアにおける複合体酵素蛋白の異常を明ら かにするため、われわれはゴールド標識法による 免疫電子顕微鏡法を開発し、昨年度本研究班にお いて複合体IIIの抗体を用い、異常ミトコンドリア 内の結晶には複合体IIIの酵素蛋白はほとんど存在 しないことを報告したり

本年度はさらに複合体IおよびIVの抗血清を用 い結晶状封入体を有するミトコンドリアを検索す ると共に2例の複合体 I およびIV 欠損例を検索し、 生化学的酵素活性と免疫電顕的に検出されるゴー ルド粒子の密度との相関性を検討したので報告す る.

#### 方 法

症例:ミトコンドリア脳筋症4例の生検筋を用 いた. 症例1, 2ではミトコンドリアの各複合体 の酵素活性は正常,症例3は複合体1欠損症?,症 例4は複合体IV欠損症<sup>3)</sup>としてすでに報告されてい るものを検索した. 4例すべてに筋線維内の異常 ミトコンドリアを認めた.

免疫電顕:生検筋を2%グルタールアルデヒド 固定後, N, N-dimethylformamide にて脱水,

-20℃にて glycol methacrylate に置換後,紫外線 重合した. 重合後, 超薄切片を作成し、 ニッケル グリッドにのせた. これを5%ヤギ血清-PBS に て各複合体に対する抗血清(1000倍稀釈)にて反 応,洗浄後複合体IIIはプロティンA・コロイドゴ ールド(8nm), 複合体 IとIVはゴールド標識抗兎 IgG ヤギ血清にて反応した。PBS と蒸留水で洗浄 後,乾燥,2%酢酸ウランにて電子染色後,電顕 にて観察した.

#### 結 果

クリステ内に結晶状封入体を有する異常ミトコ ンドリアでは、辺縁部を取り囲んでいる内膜と結 晶を有しているクリステ膜では複合体IIIおよび I に対応するゴールド粒子の密度は正常と同程度で あった.しかし、結晶内のゴールド粒子密度は内 膜と比較すると明らかに減少していた(表1)。す なわち結晶内では免疫電子顕微鏡的に検出し得る 電子伝達系の酵素蛋白は極めて少なかった。

一方,同心円状に内膜が増殖しているミトコン ドリアではゴールド粒子の密度は正常対照と同程 度であった。巨大ミトコンドリアで膨大した基質 のみで、クリステがほとんど存在していないもの では、辺縁部の内膜にのみゴールド粒子が存在し

表1 Density of gold particles in mitochondria with paracrystaline inclusions

	Complex I	Complex III
Normal Mit.		127.8
Incluison	12.6	35.7
Mit. inner memb.	22.6	115.2
Background	2.5	24.1

(Number of gold particles/ $\mu$ m)

<sup>\*</sup> 順天堂大学医学部脳神経内科

<sup>\* \*</sup> 順天堂大学医学部共同病理 \* \* \* 国立精神センター微細構造 \* \* \*名古屋大学医学部第二生化学



図1 生検筋の複合体IV抗体を用いたゴールド標識法による免疫電子顕微鏡. ゴールド粒子は5nm. A:対照,×36,000, B:症例3(複合体I欠損症)<sup>2)</sup>,×36,000, C:症例4(複合体IV欠損症)<sup>3)</sup>,×45,000.

表 2	Activities	of	electron-transfer	enzymes
-----	------------	----	-------------------	---------

	Complex I -III	Complex II-III	Complex IV
Case 3	7	245	73
4	15	392	51
Control	$227 \pm 120$	$233\pm97$	$271 \pm 133$
	(n m	nol/min/mg. m	it. protein)

#### 表3 Density of gold particles

	Complex I	Complex III	Complex IV
Case 3	43.3	118.0	56.4
4	53.2	73.0	34.6
Control	71.0	122.0	105.2
	()		

(Number of gold particles/ $\mu$ m<sup>2</sup>)

ており、基質には認められなかった。すなわち、 巨大ミトコンドリア1個当りではゴールド粒子数 は著しく減少していた。

症例3と症例4はそれぞれ複合体 I 欠損症,複 合体III欠損症として報告されている<sup>213)</sup>.これらの 骨格筋内ミトコンドリアの複合体の酵素活性を文 献より引用し,表2にまとめた.2例とも複合体 I-III,およびIVの低下が著明であった.免疫電顕 による検索では各症例のミトコンドリア単位面積 当りの粒子密度は複合体 I はやや減少,複合体III は変りなく,複合体IVは症例3は対照の53%,症 例4は33%と減少していた.複合体IVの酵素活性 の減少率は症例3が30%,症例4が19%であるの で,複合体IVについては酵素活性の低下とゴール ド粒子の減少の程度は大体相関していた.

#### 考察と結論

ミトコンドリア内膜内の電子伝達系酵素の局在 をゴールド標識法により観察する方法をはじめて 確立し、結晶状封入体における結晶では、電子伝 達系酵素が周辺の内膜に比し極めて少ないことを 明らかにした.すなわち結晶はミトコンドリア内 膜の構造蛋白に由来するか,電子伝達系酵素蛋白 が含まれているとしても正常とは著しく異ったも のとして存在していることが示唆された.

複合体欠損例においては電子伝達系酵素の生化 学的活性低下と共に、免疫電顕において検出され る酵素蛋白も減少している例では、酵素蛋白の生 合成も阻害されていることが推定された.一方、 酵素活性の低下に比し、酵素蛋白はそれほど減少 していない例では、酵素の生合成は行われていて も、活性の発現段階で異常があるのではないかと 考えられた.

今後は症例を重ねて検索すると共に,酵素のサ ブユニットのみを認識する抗体を樹立し,異常ミ トコンドリアにおける電子伝達系酵素の局在異常 を明らかにする予定である.

#### 文 献

- 佐藤 猛,安野みどり、中村眞二、内田 隆、小澤高 将:ミトコンドリア・ミオパチーのゴールド標識 法による免疫電子顕微鏡的研究、神経進歩31:646 -652,1987.
- Tanaka M, Nishikimine M, Suzuki H, Ozawa T, Koga Y and Nonaka I: Partial deficiency of subunits in complex I or IV of patients with mitochondrial myopathies. Bioch International 14: 525-530, 1987.
- 3) 春原経彦,富英明,橘慈国,埜中征哉,里吉營二郎:ミトコンドリア異常を伴うミオパチーおよび 肢帯型筋ジストロフィーの Staircase phenomenon について,臨床神経22: 799-809, 1982.

## 21) 鉄欠乏のミトコンドリア電子伝達系に及ぼす影響

佐藤 猛\*

 研究協力者
 石
 垣
 泰
 則\*
 内
 田
 悦
 子\*

 宋
 東
 林\*
 小
 澤
 高
 将\*\*

#### はじめに

近年ミトコンドリア筋症の原因として,電子伝 達系酵素の欠損が指摘されている.電子伝達系酵 素は,複合体 I から V より成り, NADH, フマル 酸の2種類の基質から分子状酸素に電子の受渡し を行ない, ATP 産生のためのエネルギーの伝達を 行なっている。各複合体は,鉄イオウ中心・チト クローム・フラビン・銅などの補欠分子族を含む。 鉄はこのうち鉄イオウ中心・チトクロームに含ま れ,各複合体に分布し,電子伝達系としての機能 に重要な役割を演じているものと考えられる。

鉄欠乏は、重篤な鉄欠乏性貧血を引き起こすと ともに、骨格筋ミトコンドリアに巨大化、封入体 出現などの異常が認められることが知られてい る<sup>1)</sup>.そこで我々は鉄欠乏ラットモデルを作成し、 骨格筋ミトコンドリアの生化学的分析ならびにゴ ールド標識免疫電顕法による形態観察を行なった.

#### 方 法

1. 鉄欠乏ラット

動物は、生後4週齡、離乳直後の雄 Wister ラッ トを用いた。鉄欠乏群(n=10)には0.02mg%の 鉄を含んだ鉄欠乏食を与え、コントロール群(n= 5)には、32.7mg%の通常食を与えた。両群とも 飲料水として蒸留水を与え、プラスチックケージ 内にて飼育した。8週後、採血した血液の赤血球 数・ヘモグロビン値・ヘマトクリット値・血清鉄 を測定し、下肢筋を採取した。

2. ミトコンドリア酵素活性

ラット骨格筋から、ミトコンドリアの調製を行 なった、マトリックス内酵素である citrate synthase およびミトコンドリア電子伝達系酵素である NADH cytochrome c reductase, succinate cytochrome c reductase, complex II, cytochrome c oxidase の活性を分光学的に測定した.

蛋白定量は Lowry 法で行なった. 3. ゴールド標識免疫電子顕微鏡

抗体は牛心筋ミトコンドリアより精製された複 合体 I, III, IVを家兎に免疫して樹立されたもの である.なお複合体 I, III抗体は名古屋大学の小 澤高将より供与されたものを使用した.

2% グルタールアルデヒド固定した骨格筋を N, N - dimethylformamide に て 脱 水, -20°Cに て glycol methacrylate 置換後,紫外線重合した.重 合後超薄切片作成し,抗体と反応させた. これを プロテインA・コロイドゴールド溶液と反応させ, 2% 酢酸ウランにて電子染色後,電顕観察した.

#### 結 果

#### 1. 貧血

鉄欠乏ラットは発育不良で,眼の色も淡くコン トロール群との差は一目瞭然であった.両群の赤 血球数・ヘモグロビン値・ヘマトクリット値・血 清鉄を比較すると,いずれもコントロール群に比 較して鉄欠乏群では低値を示した(図1).赤血球 数・ヘモグロビン値は個によってばらつきが大き かったが,ヘマトクリット値・血清鉄の値は個体 差が小さい上に,鉄欠乏群では著しく低値を示し, 鉄欠乏の指標として適当であった.

2. 酵素活性

マトリックス内酵素である citrate synthase の 活性は、両群に有意差はなかった. 電子伝達系酵 素として NADH cytochrome c reductase, succinate cytochrome c reductase, complex II,

<sup>\*</sup> 順天堂大学医学部脳神経内科

<sup>\*\*</sup>名古屋大学医学部第二生化学

cytochrome c oxidase を測定したが, succinate cytochrome c reductase, complex IIの活性値は コントロール群と鉄欠乏群の間に有意差を認めた. 一方, NADH cytochrome c reductase, cytochrome c oxidase には有意差はなかった(図
2). すなわち succinate cytochrome c reductase,
complex IIについては、比較的個体差が少なく、
鉄欠乏群では全例で活性の低下が示された、NADH



図2 鉄穴之群(斜線) とコントロール群のミトコントリア酵素活性の比較. Succinate cytochrome c reductase と complex IIの活性が鉄欠乏群において有意に低下している.

cytochrome c reductase, cytochrome c oxidase では個体による活性値のばらつきが大きく, 平均 値としては両群に差は出なかったが, 個体によっ ては活性低下をきたしているものも認められた. 3. ゴールド標識免疫電顕

鉄欠乏群1例、コントロール群1例の骨格筋を 検索した.鉄欠乏群では、正常形態のミトコンド リアに混じてマトリックスの膨化したものを散在 性に認めた.ゴールド粒子はクリステおよびミト コンドリア内膜に一致して認められた(写真1). 電顕上で観察されたゴールド粒子数は酵素蛋白を 半定量的に示すことが報告されている<sup>2</sup>.今回の検 索では,ゴールド粒子の数は分光学的に測定した 酵素活性値ほどの極端な差は出なかったが,ある 程度ゴールド粒子数は酵素蛋白の量を反映してい るものと考えられた(図3).

#### 考 察

ミトコンドリア筋症の原因検索についての研究 は、近年めざましく進展している。田中らはミト コンドリア脳筋症における複合体のサブユニット 形成の障害を種々の方法を用いて証明した<sup>3)</sup>.ミト コンドリアにおける蛋白合成に障害が生じた場合、 ミトコンドリア由来のサブユニットを多く含む複



写真1 抗複合体Ⅲ抗体を用いて、鉄欠乏ラット骨格筋をゴールド標識免疫電顕で観察した。ミトコンドリア(M)内膜およびクリステに一致してゴールド粒子が存在する。

	Control	Fe deficient
Gold Complex III *	208.3 <sup>±</sup> 97.8	149.2±68.0
particles IV *	26.1 <sup>±</sup> 14.8	24.3±17.7
Citrate synthase **	242	212
NADH cyt. c red. **	257	243
Succinate cyt. c red. **	212	58
Complex II **	97	12
Cyt. c oxidase ***	1.69	0.87
* /µm <sup>2</sup> of Mit, ** n	mol/min/mg, <sup>÷</sup>	*** sec <sup>-1</sup> /mg/m1

図3 ゴールド粒子数とミトコンドリア酵素活性の比較. 下段の酵素の酵素活性を有する ラットの骨格筋をゴールド標識免疫電顕で観察した. Complex IIIの抗体を用いた場 合,ゴールド粒子の減少を認めた.

合体 I ならびにIVに異常をきたし易いと思われる. 電子伝達系の異常の原因としては、ミトコンドリ ア遺伝子の異常・核遺伝子の異常・ミトコンドリ アにおける蛋白合成異常・サブユニット蛋白のア センブリーの異常、そして補欠分子族の異常など が考えられる.補欠分子族として鉄イオウ中心・ チトクロム・フラビン・銅が挙げられ、各複合体 に分布している.特に鉄は鉄イオウ中心・チトク ロムに含まれ、すべての複合体に広く存在する. 中でも複合体 I ならびに II における鉄の含有量が 多い.

ミトコンドリア脳筋症の臨床は多彩で、中枢神 経系及び骨格筋以外にも心、肝、腎、内分泌系に も障害を認める一方、その障害の程度は各臓器に おいても様々である。また、家族発症例の報告も 少なからず存在するが、同胞発症例であっても必 ずしも同じ臨床型をとらないこともある。そして ひとつの骨格筋だけをとってみても、各線維にお いて免疫組織化学染色での染色性がまちまちであ ったり、ragged-red fiber の現われ方と抗体染色 での欠損線維の現われ方が一致しなかったりと多 型性が認められる。我々の鉄欠乏ラットにおいて も、同一条件で飼育したにもかかわらず、NADH cytochrome c reductase および cytochrome c oxidase では個体差が非常に大きく認められ、個体 間の多型性が示された。

鉄欠乏の際のミトコンドリアの形態異常として

膨化, 巨大化, electron-lucent mitochondoria の 出現などが報告されている<sup>10</sup>.このような変化は主 に肝臓やリンパ球で観察され, その発生メカニズ ムとして蛋白合成障害によるミトコンドリアの分 裂の抑制が考えられている.鉄欠乏ラット骨格筋 ではマトリックスの膨化が散見され, 固定時のア ーチファクトの鑑別も必要であるが, コントロー ル群に比べて多いように思われた.このことは骨 格筋においても鉄欠乏が蛋白合成に障害をきたし, ミトコンドリア形態異常を招くことを示唆してい る.しかし骨格筋の場合には肝臓などに比べると 鉄欠乏の影響は受け難く, その形態異常も軽度で ある.

ゴールド標識免疫電顕を用いて佐藤らは生検筋 における複合体蛋白のミトコンドリア内膜におけ る局在を明らかにした<sup>2</sup>. ゴールド標識免疫電顕の 優れている点は,超薄切片上に直接抗体を反応さ せるために,抗体の組織内浸透性についての技術 的問題を除外でき,かつ低温で組織の包埋ができ るため抗原性が保持できることである.さらに超 微形態的に抗原の局在をきわめて正確に知ること ができ,ゴールド粒子を数えることにより酵素蛋 白の分布を半定量的に測定可能である.本研究で もミトコンドリア µm<sup>2</sup>当たりのゴールド粒子数を 分光学的に測定した酵素活性と比較した所,半定 量的ではあるが相関性が得られた.酵素活性値は 筋肉全体のミトコンドリアの機能を反映している に過ぎないが、ゴールド標識免疫電顕では個々の ミトコンドリアの酵素の存在を蛋白レベルで解析 できる点で非常に優れた方法である.

### まとめ

電子伝達系酵素の補欠分子族である鉄の欠乏が、 骨格筋ミトコンドリアの酵素活性を低下させるこ とを明らかにした. ゴールド標識免疫電顕を用い て骨格筋ミトコンドリアを観察したところ, ゴー ルド粒子の数はその個体の酵素活性と相関してい た.

### 献

文

- Dallman PR and Goodman JR : Enlargement of Mitochondrial Compartment in Iron and Copper Deficiency. Blood 35 : 496-505, 1970.
- 2) 佐藤 猛,安野みどり、中村眞二ほか:ミトコンドリア・ミオパチーのゴールド標識法による免疫 電子顕微鏡的研究、神経進歩 31:646-652,1987.
- 田中雅嗣,小澤高将:ミトコンドリア脳筋症の電子伝達系酵素欠損,神経進歩 31:653-665,1987.

# 22) 脱髄性神経炎をきたした mitochondrial myopathy の1例

杉村公也\*

研究協力者 丸 山 和佳子\*\* 久 米 人\*\* 明 馬 淵 千 之\*\*\* 渡 辺 英 夫\*\* 本 田 仁\* 村 Ш 知 行\*

#### はじめに

Mitochondrial myopathy は骨格筋障害のみな らず, 眼症状, 中枢神経症状など多彩な症状をき たす一連の疾患群として近年その研究が進められ ている.一方これに伴う末梢神経障害に関しては, その組織像, 病因など不明の点が多い.

今回我々は, mitochondrial myopathy に末梢神 経障害を合併した症例を経験し,その病理像を検 討した.その結果は,今まで報告のあった'非特異 的'末梢神経障害の所見に加え,炎症所見が明らか であった.今までの報告例の中に,本症例と同様 炎症性 neuropathy が含まれている可能性は否定で きないように思われるので,この点について若干 の考察を行った.

#### 症 例

24歳男性. 主訴は両下肢筋力低下および知覚障 害. 既往歴として左肘骨折(12歳),右鎖骨骨折(14 歳)など頻回の外傷があり,この頃より転倒傾向 があったものと思われる. 幼少時より痩せ型. 19 歳ごろより進行性の筋力低下に気付いた. 20歳, 23歳時と2回下肢ビリビリ感と脱力の episode があ ったが,各々2週間,1か月で軽快し,足趾のビ リビリ感のみ持続した. 1986年(24歳)上気道感 染症状にひき続き両下肢の脱力と知覚障害をきた し,当院神経内科入院となった.

家族歴としては、母親が同様の体型で ileus を繰 り返し、てんかん発作で34歳で死亡しているが、 詳細は不明である.

入院時現症は、身長162cm、体重40kg. 全身の 筋萎縮が著明であり、鉤足がみられた. 神経学的 所見では、眼瞼下垂を軽度認めた以外脳神経に異 常なく、遠位優位の筋力低下を上肢に軽度、下肢 に中等度認めた.深部反射は全て消失していた. 知覚については自覚的に両下肢全体のビリビリ感 を訴え、他覚的には glove and stoking type の全 知覚に軽度低下が認められた. 自律神経に異常無 く、小脳症状・不髄意運動は認められなかった. 入院時検査(表1参照)

GOT LDH CK Aldrase など血清中筋原性酵素 の軽度上昇と血清・髄液中の乳酸値の上昇がみら れた.針筋電図では myogenic および neurogenic pattern の混在がみられた.脳 CT, MRICT では 大脳皮質に非特異的な萎縮が存在した.

以上の結果より,我々は,今回受診の動機となった末梢神経障害と共に,筋肉,中枢神経などを 含む全身的な疾患を疑い,筋生検,神経生検を行った.

生検した前脛骨筋の Gomori-trichrome 染色で は, ragged-red fiber が認められ, 電顕では封入 体を含む異常ミトコンドリアが明らかであり, 本 症例は mitochondorial myopathy と診断された

(図1). そのため大腿四頭筋より単離した mitochondria の電子伝達系酵素活性を名古屋大学第 一生化学教室に依頼し,現在詳細な分析を行って いる.

一方神経病理に関して、腓腹神経の光顕上の一 般的な観察では大径、小径有髄神経線維密度の減 少、remyelinated fiber の出現、所々にごく軽微

<sup>\*</sup>名古屋大学医学部神経内科

<sup>\*\*</sup>名古屋第一赤十字病院神経内科

<sup>\* \* \*</sup> 名古屋掖済会病院神経内科

末梢血:正常、赤血球、リンパ球、形態正常、	
血液生化学:GOT 44 IU/dl, LDH 428 IU/dl, CK 390 IU/dl, ALD 5.9 IU/I/37°C, 乳酸23.5mg/dl(3.3~14.9), ピルビン酸 dl(0.30~0.95), アラニン619.3nmol/ml(218~553).	0.75mg/
髄 液:一般検査正常,髄中蛋白質36mg/dl. 乳酸22.1mg/dl(10~16),ピルビン酸1.09mg/dl(0.6~0.9).	
尿 :一般検査正常.クレアチニン0.56g/dy(1~1.5),クレアチン137mg./dy(15~50).	
甲状腺機能,下垂体一副腎系機能:正常。	
心 電 図:左室肥大,右軸偏位.	
心 エ コ ー:全体にやや hypokinetic. MR あり.	
知 能 検 査:WAIS IQ=94 (正常).	
視力・視野・眼底所見:正常。	
聴力・ABR:正常.	
針 筋 電 図:安静時,四肢筋 denervation potential 収縮時,軽~中等度の NMU の減少および低電位・短持続電位 混刀	
(neurogenic+myogenic pattern).	
神経伝達速度:MCV は正中神経,尺骨神経,後脛骨神経 正常範囲内. SCV は正中神経,尺骨神経 正常,腓骨神経 抽出不能.	
脳 波:前頭葉優位の sporadic ⊖ activity (7~8Hz, 30~50µV). 4Hz diffuse phantom spikes & wave burst.	
脳 CT:前頭葉に軽度萎縮. 脳室拡大なし.	
脳MRI-CT:皮質の軽度萎縮.	
筋 生 検:Gomori-Trichrome 染色にて ragged red fiber(+)電顕像 封入体を有する異常ミトコンドリアを認めた.	
神経生検:有髄神経線維の demyelination と remyelination.リンパ球, マクロファージ, 浸潤	



入院時検査所見

表1

図1 生検筋の Gomori-trichrome 染色 \*印の線維が ragged-red fiber. 矢印で示した線維はすでに変性している. な onion bulb の出現など、これまでの報告での mytochondrial myopathy の末梢神経病変となん ら変わるところがないように思われた. ヒストグ ラムでは、有髄神経線維は、小径から大径までの 全てが control の約1/2に減少していた. しかる に,全 fiber を慎重に検討すると、脱髄線維の cluster が出現していたり、脱髄線維を macrophage と 思われる細胞が取り囲んでいたり、リンパ球性の 炎症性細胞が明らかに出現していたり、空砲をも った巨大な macrophage と思われる細胞が出現し ていた(図2). 電顕ではこれまで mitochondorial myopathy で報告されているような比較的小さな onion bulb が認められ、またリンパ球や macrophage のような炎症性細胞の出現が電顕上も確認 された. 一部では macrophage と思われる細胞が

basement membrane 内側に深く侵入している像 も認められた. macrophage が onion bulb 内に侵 入している像も認められた(図3). ときほぐし法 では節性脱髄が9%に (control 0%) 軸索変性が 10%に (control 0.5%) 認められた.

入院後経過:自他覚症状は,発症後20日目ごろ に最大となり筋力低下の為歩行不能となったが, 4か月目にはほぼ以前の状態まで回復した. 髄液 中蛋白は経過中緩やかな上昇を示し,臨床症状よ り約2週間遅れて最高値50mg/dlとなった後徐々 に低下した. 髄液中細胞数の増加は見られなかっ た.

以上より,本症例は recurrent inflammatory demyelinating neuropathy を伴った mitochondorial myopathy であると考えられた.



図2 生検腓腹神経のエポン切片像 太い矢印は軽微な onion bulb 形成を示した線維. 矢印の先で示したのは炎症性の細 胞. 細い矢印は macrophages. 白抜き三角には脱髄線維が見える.



#### 図3 生検腓腹神経の電顕像

endoneurium 内に見られた macrophage 等の炎症性細胞. A では macrophage (星印) が basement membrane 内に侵入している. 矢印の部分に特有の偽足が見られる. D では onion bulb 内に炎症性細胞 (星印) が侵入している. 空胞化した fibroblast の内側に密着している.

#### 考 察

Mitochondrial myopathy に末梢神経障害を伴った症例については、古くは1968年に Drachman らの報告が見られる。その後1980年代にはいって 報告が相次いでいるが、それらのうち比較的記述 の詳しいものについて表2にまとめる. Drachman, Groothuis らの症例はいわゆる Kearns-Sayre の症 例で、それぞれの生検所見は hypertrphic neuropathy, nerve root の脱髄性変化である。 Peyronnard らの生検所見も脱髄性 neuropathy の所見で あり、彼らは慢性の Guillain-Barre 症候群が筋疾 患と無関係に生じた可能性があると述べている. Sasaki らは onion bulb と軸索変性を認めており, 古谷らも線維密度の減少と髄鞘の菲薄化を認めて いる.一方 Yiannikas らは脱髄性所見の他に 2 例 で mitochondoria 内 paracrystalline inclusion を 認めたと述べており, 脱髄の原因を Schwann 細胞 内の異常 mitochondoria と関係づけている.しか し彼らの示している paracrystalline inclusion は これまで筋肉で証明されたものとはかなり形状を 異にし、さらに paracrystalline をもったものが mitochondoria とは必ずしも断言できないように思 われる.中西らも従来の報告と類似した所見を認 めている.

年 	報告者	神経生検 施行例数	臨床診断	末梢神経病理所見
1968	Drachman DA	4	ophthalmoplegia plus	hypertrophic interstitial neuropathy(2例)
1980	Groothuis DR et al	. 1	Kearns-Sayre syndrome	demyelination of cranial & spinal nerve
1980	Peyronnard JM et al	1	progressive external ophthal- moplegia & a ragged-red fiber myopathy	roots marked loss of large myelinated fibers mito- chondrial paracrystalline inclusion (-)
1983	Sasaki H et al	1	MERRF	loss of myelinated fibers
1985	古谷 ほか	1	Kearns-Sayre 症候群	axons with thin myelin sheath 有髄線維の菲薄化 大径有髄線維の減少
1986	Yiannikas C et al	4	mitochondrial myopathy	reduced density of large myelinated fibers segmental de-& remyelination mitochondrial paracrystalline inclusion (+) (2071)
1987	中西 ほか	4	ミトコンドリア・ミオパチー (MERRF 1 例を含む)	有髄神経線維,特に大径有髄線維の高度脱落 onion-bulb 形成 輪勤の非薄化
1987	自験例	1	ミトコンドリア脳筋症	大径〜小径の全ての有髄神経線維の減少 demyelination と remyelination, onion bulb 形成軸索変性・炎症細胞の明らかな浸潤

表2 末梢神経障害を伴ったミトコンドリア・ミオパチーの既報告例

これらの報告は全て,脱髄性病変を主体として いる点で一致しているが,脱髄性変化をきたした 原因については必ずしも明確にされていない.

一方、われわれの症例の末梢神経病理は従来の 報告と殆ど同様の所見であったが、更に慎重、詳 細に検討することによって、炎症性細胞の active な浸潤像を認めることができた。このことから少 なくとも我々の症例での脱髄性病変は炎症性 neuropathyによるものであると結論した。我々の 症例の今回の episode はたまたま比較的亜急性であ ったため炎症性変化を確認できたと思われる。し かし、一般的に脱髄性 neuropathy の原因は炎症性 のものが多いことを考慮すれば従来の報告例にお いても炎症性機転が慢性緩徐におきている可能性 が充分考えられる。したがって従来の報告の case についても生検神経を慎重かつ詳細に検討すれば 炎症性機転が関与している証拠をつかみうる可能 性もあろうと思われる。

まとめ

- 1) 末梢神経障害を伴った mitochondorial myopathy の1 例を報告した.
- 2)臨床経過及び病理所見より recurrent imflammatory demyelinating neuropathy がその 病因と考えられた。

3)これまでミトコンドリア・ミオパチーに伴う "非特異的"末梢神経障害といわれてきたもののなかにも本症例と同様炎症性の機序で起こっているものが有るという可能性を指摘した。

#### 文 献

- Drachman D: Ophthalmoplegia plus: The neurodegenerative disorders associated with progressive external ophthalmoplegia. Arch Neurol 18: 634, 1968.
- Groothius DR, Schulman S et al: Demyelinating radiculopathy in the Kearns-Sayre syndrome: A clinicopathological study. Ann Neurol 8: 373, 1980.
- Peyronnard JM, Charron L et al: Neuropathy and mitochondorial myopathy. Ann Neurol 7: 262, 1980.
- 4) Sasaki H, Kuzuhara S et al: Myoclonus, cerebellar disorder, neuropathy, mitochondrial myopathy and ACTH defficiency. Neurology 33: 1288, 1983.
- 5) 古谷博和, 本村 晩ほか: Kearns-Sayre 症候 群:末梢神経障害と髄液乳酸上昇を伴った一例. 臨床神経 25:1176,1985.
- 6) Yiannikas C, Mcleod JG et al: Peripheral neu

ropathy associated with mitochondrial myopathy. Ann Neurol 20: 249, 1986.

7)中西孝雄、大越教夫ほか: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.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,1987, p219.

## 23) ミトコンドリア電子伝達系の検討(第2報)

田代邦雄\*

研究協力者 伊 藤 和 1月 斉 之\*\* 藤 敏 森 若 文 雄\* 島 \_\_\*\*\* 菅 野 富 夫\*\* 功

実験1:

#### はじめに

ミトコンドリア異常に基づく種々の疾患が報告 され、形態的、酵素学的、遺伝的検討が加えられ て、その病態解明への研究がなされつつある現状 であるが、われわれは scanning organ spectrophotometer (SOSP) を使用して筋肉内のミトコ ンドリア電子伝達系の検討を施行した.この SOSP は反射光を利用し, 試料に直接光を当てることで 容易に、また試料(筋肉片)を生体内に近い状態 で観察可能である。この場合、筋肉内のミオグロ ビン、また血管、組織内ヘモグロビンがそれぞれ 酸素の運搬、拡散、触媒作用等の機能を分担して おり, SOSP を使用した場合, これらの影響がどの 程度、試料(筋肉)の吸光度に干渉してくるか、 また SOSP が真にミトコンドリアの Redox state (酸化還元反応)を反映しているかはいまだ研究 されていない。

#### 目 的

Scanning organ spectrophotometer(SOSP) を使用して筋肉内ミトコンドリアの Redox state (酸化還元状態)に影響を与えるヘモグロビン, ミオグロビンの吸光度分析を検討し,またミトコ ンドリア・ミオパチーの患者生検筋を用いて,窒 素還元,antimycin A, NaCN 等の検討を行い,こ の SOSP が実際筋肉内のミトコンドリア電子伝達 系の Redox state を反映するか否かの実験を試み た.

#### 方 法

1. ウマ・ミオグロビン (MW17000) を用いてミ オグロビンの吸光度分析を施行した。人ミオグロ ビンの MW は17500であり,主に骨格筋,心筋に 存在し,種によっても多少の含有量の差は存在す る.正常成人の大腿四頭筋に含まれるミオグロビ ン量は日浅ら<sup>10</sup>の結果より(骨格筋の部位にてもそ の含有量の差は認められる)6.32mg/1g muscle と の研究報告があり,これを基にして採取される生 検筋を約10mg wet weight で換算し,2.478×10<sup>-4</sup> M として算出した。この濃度のウマ・ミオグロビ ン溶液を使用して吸光度を測定した。この実験で は反射光,透過光 (SOSP, Beckman) の吸光光度 計を使用した。

2.酸素を通気しながら灌流液を充分灌流した後, ミオグロビンの吸光度を測定した.

その後,窒素還元を施行して、5分後,10分後,30分後のミオグロビンの吸光度を測定した。
 実験2:

約200gのラットを使用して、ネンブタール(0.15 ml) で麻酔し、総腸骨動静脈にそれぞれカニュレ ーションを行い、動脈から灌流液を注入し、静脈 から脱血して灌流液と血液とを完全に置換した.

(灌流液は10mMの HEPES buffer, heparin, 5% dextran を使用し, 灌流速度は3 ml/minで, 灌流 液の酸素濃度は約580~605mmHg) 灌流を行いな がら大腿四頭筋の Redox state を経時的に SOSP で測定した.

更に血液を灌流液に置換後,筋肉を切り出し(7 mg wet weight),同様に Redox state 変化を測 定した.

<sup>\*</sup> 北海道大学医学部神経内科

<sup>\* \*</sup> 北海道大学獣医学部獣医生理学講座

<sup>\*\*\*</sup>国立療養所札幌南病院神経内科

実験3:

1. 生検筋(ミトコンドリア・ミオパチー患者) を使用して窒素還元, NaCN を添加してミトコン ドリアの Redox state を測定した. 基質は10mM の pyruvate を使用し,まず初めに15分間窒素還元 を行い, 10分間酸素を充分灌流し1 mM, 10mM の NaCN と順次添加した.最後に窒素還元を行い この実験は終了した. NaCN はミトコンドリアの 電子伝達系を阻害し,還元状態に移行して,組織 呼吸障害を起こす.このことから NaCN が直接ミ トコンドリアに影響する為,ミオグロビン,へモ グロビン等の干渉を除外することができる<sup>2)</sup>. 2.同じ生検筋を使用して,窒素還元を施行し, ミトコンドリア電子伝達系阻害剤である antimycin A を20分間添加し続けた.

#### 結 果

1. ウマ・ミオグロビンを吸光度分析した結果を 図1に示した. 上段は SOSP での反射光による酸



HORSE MYOGLOBIN

図1 上段は SOSP, 下段は Beckman 型の吸光光度計で測定し, ウマ・ミオグロビン溶液 の還元スペクトルを示す. 上段, 下段ともに cytochrome 各成分に干渉していない.

化還元スペクトル,下段は Beckman の吸光光度計

(透過光)のスペクトルである。共にミオグロビ ン濃度が2.478×10<sup>-4</sup>である。上段の0 time から窒 素還元を施行し、5分、10分、30分後に cytochrome c+cl, b, aa3 に影響を与えるスペクトルの出現は 認めていない。また透過光による結果では窒素還 元30分後で550、575nm 付近に peak が認められる が、基線のずれもあり、有意にこのスペクトルが cytochrome 各成分に影響を与えているとは考え難 い.

2. ラットの大腿四頭筋の灌流実験の結果を図2 に示す. 室温約17℃の状態でヘモグロビンが完全 に灌流液に置換された時点(灌流後約15分)の Redox state (酸化還元)スペクトルである. cytochrome c+cl, b, aa3が理想値よりもやや短波長 側に偏位しているが, ミトコンドリアの各成分が 分離可能であった.

3. 灌流実験後、ラットの大腿四頭筋(7mg wet

weight)を切り出して, 基質を10mM pyruvate と して, SOSP で窒素還元後のミトコンドリア Redox state を図3に示した. 灌流実験と同様に cytochrome 各成分が分離され, また理想値に近い状態 で出現している.

4. 生検筋(ミトコンドリア・ミオパチー患者) を使い、上段に protocol、下段に NaCN を投与し た場合の Redox state を1mM, 10mM, NaCN の それぞれのスペクトルを図4に示した。1mM の NaCN では比較的分離は悪いが cytochrome 各成 分のスペクトルが出現した。10mM の NaCN の場 合はより明確にそれぞれのスペクトルが分離され た.ともに cytochrome 各成分は理想値にほぼ一致 した。

5. 生検筋(ミトコンドリア・ミオパチー患者) の試料を使用し, 窒素還元後 antimycin A を添加 した時のスペクトルを図5に示した. 窒素還元で cytochrome 各成分が還元側に移動し, antimycin



PERFUSION

RAT

BW 200G

図2 ラット灌流実験でヘモグロビンが完全に灌流液に置換された時の大腿四頭筋の還元 スペクトルである.ミトコンドリアの cytochrome 各成分が理想値にほぼ近く出現した.



図 3 が分離された。



図4 上段は実験計画,下段は1mM, 10mM 濃度 NaCN 添加後, cytochrome 各成分は分 離され,理想値に近く出現した.



図5 上段は実験系を下段は各 cytochrome 還元型スペクトルを示した. antimycin A 添 加後の酸化側へ移動していた.

A 添加後, それぞれの成分が酸化側へ移動している.理論的には antimycin A は cytochrome b, c+ cl を阻害するが, この結果からはミトコンドリアの電子が流れていることを示している.

#### 考 察

ミトコンドリアの形態学的,酵素学的異常に基 づく疾患単位を光学計(反射光)を使用してその 生理的機能からこのミトコンドリア異常を研究す べく<sup>3)4)</sup>, Scanning organ spectrophtometer (SOSP)を用いた。今回このSOSPが生検筋の中 に含まれているヘモグロビン,ミオグロビンへの 干渉の程度を検討したが、ミオグロビンが筋肉の I帯に存在し<sup>5)</sup>,酸素の運搬等の役割を果たしてい ることは知られている。また種族,部位によりミ オグロビンの含有量の差があるが、今回のミオグ ロビン濃度程度ではミトコンドリアの Redox state に影響はないと考えられた. ヘモグロビンに関し ては,血管内に存在し,酸素運搬の主な役割をな しているが,生検筋を採取した場合,必ずその組 織内にヘモグロビンが存在し,この影響は無視で きず,どの程度,ミトコンドリア Redox state に 干渉するかは組織内のヘモグロビン濃度に依存し ているが,生検筋採取時に生食(ヘパリン2000単 位加)で充分洗浄した,NaCN 添加にてミトコン ドリア Redox state を観察したが,明らかにミト コンドリアのスペクトルが分離可能であった<sup>607</sup>. ここではヘモグロビンの影響はほとんどミオグロ ビン同様無視でき,この SOSP は生検筋を *in vivo* に近い状態で観察可能であった.

生検筋(ミトコンドリア・ミオパチー)に窒素 還元を施行後 antimycin A を投与したが、cytochrome 各成分が酸化側へ移動しているが、これは 単に加える濃度か、他の因子が関与しているかは

-151-

今後の問題と思われた。

#### まとめ

SOSP を使用して筋肉内のミトコンドリア Redox state に与えるミオグロビン, ヘモグロビンの影響 を検討した. 10mg 程度の生検筋に含まれる量(ミ オグロビン)では cytochrome 各成分に干渉しない と思われた. また人・生検筋 (ミトコンドリア・ ミオパチー)を用いて NaCN を添加するとミトコ ンドリアの Redox state が観察され, ヘモグロビ ンの干渉は考慮せずに検討可能であった. なおこ の患者は電子伝達系の異常はなく, antimycin A の Redox state は解釈ができなかった.

#### 文 献

- 日浅光春:人体各種筋におけるミオグロビン量ならびにそれと筋型クレアチン・キナーゼの相関. 四国医誌 31:193-204, 1975.
- Piantadosi CA and Sylvia AL: Cerebralcytochrome aa3 inhibition by cyanide in bloodless rats. Toxicology 33: 67-79, 1984.
- 3) Kobayashi S, Yoshimura M, Shibahara T,

Nakase Y and Yaono S: Scanning spectrophotometery for dynamic study for the organ oxidative metabolism. Biomed Res 2: 390-397, 1981.

- Kanno T and Saito A: Cytochrome reduction coincides with electrical activity in perfused bullfrog brain. Brain Res 338: 237-242, 1985.
- 5) 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.
- 6) Kimmek R, Roggewig C, Fladerer H, Krettek C and Weger N: Effects of 4-dimethylaminophenol, Co-2EDTA, or NaNO2 on cerebral blood flow and sinus blood homeostasis of dogs in connection with acute cyanide poisoning. Toxicology 26: 143-154, 1983.
- Jeissire BP, Vielledent CC, Teisseire LJ, Vallez M, Herigault RA and Laurent DN: Chronic sodium cyanate treatment induces "hyposialike" effects in rats. Am J Physiol 250: 1145-1149, 1986.

# 24) ミトコンドリア脳筋症におけるcoenzymeQ<sup>™</sup>療法の持続的効果の検討

垂 井 清一郎\*

研究協力者	西	Л	嘉	郎*	依	藤	史	郎*	中	村	雄	作'
	巽	-	F賀	夫*	曽	我	文	久*	高	橋	光	雄'

ミトコンドリア脳筋症である Kearns-Sayre 症 候群"(KSS)において血中,髄液中乳酸及びピル ビン酸濃度の上昇があり、ミトコンドリアのピル ビン酸代謝異常が存在すると考えられている? 私 共は本班会議にて,これまで,本症候群において 生検骨格筋ミトコンドリア内膜電子伝達系酵素活 性及び coenzymeQ10 (CoQ) 含量が、 ミトコンド リア蛋白量当たりで有意に低下していることを報 告してきた3). そして何らかの原因により、ミトコ ンドリアが機能障害をおこしていると考えている. 本症候群において不足した CoQ を補うことは低下 したミトコンドリア内膜電子伝達系活性を賦活し 有用であろうと考え、これまでCoQ1日120-150 mgの大量療法を試みてきた<sup>3)4)</sup>.そして、CoQ投 与後 KSS に存在するピルビン酸代謝異常の改善と 共に,心電図,髄液蛋白,大脳誘発電位,一部臨

床症状に改善の認められたことを報告してきた<sup>314)</sup>.今回,本療法の長期にわたる持続的効果を明らかにする目的で検討分析した.

### 対 象

対象は表に示す如く KSS 患者 6 例(男性 5 例女 性 1 例) で年齢は19歳より40歳, 罹病期間は 5 年 から25年である。進行性外眼筋麻痺, 網膜変性, 心伝導障害の3 主徴を伴う完全型 4 例, 心伝導障 害を欠く不全型 2 例である。運動時高乳酸血症, 髄液蛋白増加, ragged red fibers は全例に認め た。

#### 方 法

CoQ 療法は対象 6 例に 1 日120-150mg の CoQ を経口投与し、最長 3 年 6 カ月間投与した。好気

Case	1	2	3	4	5	6
Agc (years)/sex	19/M	23/M	28/F	40/M	40/M	33/M
Duration of symptoms(years)	5	13	14	16	25	16
Ophthalmoplegia	+	+	+	+	+	+
Retinal degenaration	+	+	+	+	• •	+
Hearing loss	+	•	+	+	+	-
Cerebellar ataxia	-	+	-	-	-	-
ECG abnormalities	AV-block(1st	WPW syndrome	APB	CRBBB	-	IRBBB
	degree) CRBBB					
Exercise induced lactacidemia	+	+	+	+	+	+
CSF protein concentration	85	253	61	130	44	63
(mg/dl,normal<40mg/dl)						
Ragged red fibers	+	+	+	+	+	+

表 Kearns-Sayre 症候群 6 例の臨床像

AV-block:atrioventricular block, CRBBB:complete right bundle branch block, APB:atrial premature beat, WPW syndrome: Wolff-Parkinson-White syndrome, IRBBB:incomplete right bundle branch block

\* 大阪大学医学部第二内科

的運動負荷と考えられる15watts15分間の自転車エ ルゴメーター運動負荷時の血中乳酸,ピルビン酸 濃度の上昇,心電図異常,大脳誘発電位の変化よ り CoQ 療法を評価した.なお,エルゴメーター運 動負荷テストにおいて縦軸に血中乳酸/ピルビン酸 濃度比,もしくは,乳酸+ピルビン酸濃度,横軸 に運動開始後の時間をとって作成した曲線の下の 面積を計算し,各々乳酸/ピルビン酸濃度比面積 (Lactate/Pyruvate area)もしくは乳酸+ピルビ ン酸濃度面積(Lactate+Pyruvate area)として

表わすこととした.

#### 結 果

1) CoQ 投与前, 上昇していた Lactate/Pyruvate area 及び Lactate+Pyruvate area は CoQ 投与 後1年以内に有意に減少したが, その後は有意に 低下したままある一定の平衡状態を維持する傾向 を認めた(図1).また, CoQ を一時中止した4例 中3例において, Lactate/pyruvate area, Lactate+Pyruvate area とも悪化する傾向を認め た(図2). 2) 心電図異常については、第1度房室ブロック と完全右脚ブロックを認めた症例1について心電 図 PQ 間隔及び QRS 間隔の経過を図3に示す.本 症例では延長した QRS間隔の一時的改善とともに延 長した PQ 間隔の減少が3年以上継続して認められ た.

3) 大脳誘発電位については,経過を追えた4症 例において後脛骨神経刺激体性感覚誘発電位

 (PTN-SEP)の身長補正をした P37潜時(P37/ height)の CoQ 投与後の推移を図4に示す.その うち3例において P37/height 延長を認めたが、CoQ 投与後この延長に改善傾向がみられ、1例では正 常化した.この傾向は2-3年にわたり認められ、 1例では CoQ の一時的中止により悪化した.

#### 考 察

血中乳酸/ピルビン酸濃度比は組織ミトコンドリ ア内NADH/NAD比に比例すると言われてお り<sup>5)</sup>, 自転車エルゴメーター運動負荷時の血中乳酸/ ピルビン酸濃度比の異常上昇は、ミトコンドリア NADH酸化障害を示すものと考えられる. CoQ 投



図1 運動負荷時の乳酸, ピルビン酸代謝に対する CoQ 療法の効果.数カ月の CoQ 投与 にて運動負荷時の血中乳酸/ピルビン酸濃度比面積(Lactate/Pyruvate area)及び 血中乳酸+ピルビン酸濃度面積(Lactate+Pyruvate area)は有意に減少し,その 後はある一定の平衡状態を持続する傾向を認めた.



図2 CoQ療法前後及び CoQ 一時中止時の乳酸, ビルビン酸代謝. 運動負荷後の血中乳 酸/ピルビン酸濃度比面積(Lactate/Pyruvate area), 血中乳酸+ピルビン酸濃度面 積(Lactate+Pyruvate area)は, CoQ を一時中止した4例中3例において悪化す る傾向を認めた.



図3 心電図異常に対する CoQ 療法の効果(症例1) 延長した QRS 間隔の一時的改善と 共に延長した PQ 間隔の減少が3年以上継続して認められた。



図4 後脛骨神経刺激体性感覚誘発電位 (PTN-SEP) に対する CoQ 療法の効果.身長補 正をした P37潜時 (P37/height) の延長の改善傾向が2-3年にわたり認められ、1 例では正常化した.

与後これが1年以上にわたって有意に低下し, さ らに CoQ の中止により悪化する傾向にあったこと より KSS に対する CoQ 療法は1年以上の長期に わたりミトコンドリア NADH 酸化障害を改善させ ているものと考えられた. さらにこの効果は投与 初期に顕著であるが, その後はある一定の平衡状 態を持続する傾向にあるものと推定された.

大脳誘発電位 PTN-SEP, P37潜時の延長は中 枢,末梢を含めた知覚の上行性伝導路の異常の存 在を示すものと考えられる.外因性 CoQ は一般に 中枢神経組織に到着し難いと言われているが,長 期にわたる CoQ 投与にて PTN-SEP P37潜時の延 長が次第に改善する傾向を示したこと,また一例 において CoQ の中止がそれを悪化させたことは, CoQ の何らかの中枢,末梢神経系への作用を示唆 するものとして興味深く今後の検討が必要と考え られる.また,1例ではあるが,心伝導ブロック の改善が年余にわたり持続的に認められたことは 本症候群の予後を考える上でも重要なことと考え られる.

以上 KSS 神経筋組織において CoQ 療法は一定

の持続的効果をもたらすことが示唆された.

#### まとめ

1) Kearns-Sayre 症候群 6 例につき, CoQ 大量 経口投与を行い,長期の治療効果を検討した. 2) 運動負荷時の血中乳酸/ピルビン酸濃度比,血 中乳酸+ピルビン酸濃度の異常上昇は CoQ 投与 1 年以内に有意に減少し,その後はある一定の平衡 状態を持続する傾向を認めた.また,両者は CoQ の中止にて悪化する傾向を認めた.

3) 3例に認められた後脛骨神経刺激体性感覚誘 発電位 P37潜時の延長は、CoQ 投与後改善傾向が みられた。

4)第1度房室ブロックを認めた1例のPQ間隔の 改善が3年以上継続して認められた.

#### 献

文

 Kearns TP and Sayre GP: Retinitis Pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block. Arch Ophthalmol 60: 280, 1958.

-156-
mentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block. Arch Ophthalmol 60: 280, 1958.

- Lou HC and Reske-Neilsen E: Progressive external ophthalmoplegia: evidence for a disorder in pyruvate-lactate metabolism. Arch Neurol 33: 455, 1976.
- 3) 垂井清一郎,小笠原三郎ら:Kearns-Sayre 症候 群における coenzyme Q<sub>10</sub>代謝と coenzyme Q<sub>10</sub>療

法の検討. 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・ 杉田班昭和59年度研究報告書. 1985, pp230-236.

- 4) Ogasahara S, Nishikawa Y et al : Treatment of Kearns-Sayre syndrome with coenzyme Q10. Neurology (Cleveland) 36: 45, 1986.
- 5) Kreisberg RA: Lactic homeostasis and lactic acidosis. Ann Intern Med 92: 227, 1980.

## 25) 副甲状腺機能低下性ミオパチーにおける 運動筋のプリン体異化亢進

垂 井 清一郎\*

研究協力者 原 尚 子\* 河 野 典 夫\* 嶺 尾 郁 夫\* 山 田 祐 也\* 川 知 雅 典\* 清 川 裕 朗\*

#### はじめに

副甲状腺機能低下症に伴うミオパチーは、後天 性におこるミオパチーであるが、運動時に筋硬直 など筋糖原病に似た症状がみられる。糖原病Ⅲ型 (脱分枝酵素欠損症)、V型(筋ホスホリラーゼ欠 損症)、VII型<sup>1)2)</sup>(筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症) 患者では、先天性に筋の解糖系が障害される結果、 運動に伴って ATP の分解が亢進し、筋からアンモ ニアと尿酸の前駆体であるイノシン、ヒポキサン チンが多量に血中に放出されることを私共は報告 してきた<sup>3)4)5)</sup>(図1).一方,副甲状腺機能低下症 に伴うミオパチーでは、患者骨格筋における病態 代謝はほとんど検討されていない.本研究では, 副甲状腺機能低下症に伴うミオパチーの骨格筋プ リン体異化代謝を分析し、ミオパチーを伴わない 副甲状腺機能低下症と比較した.さらに、活性型 ビタミンD<sub>3</sub>投与による治療効果を検討した.

#### **方 法** 6 例の副甲状腺機能低下症患者を対象とした(**表**



\* 大阪大学医学部第二内科

表1 患者の臨床症状および検査成績

Patient	1	2	3	4	5	6
Age	32	35	46	52	42	79
Sex	М	F	М	F	М	Μ
Diagnosis	IHP	IHP	IHP	OpHP	PHP	PHP
Ca	2.9	2.5	3.4	3.7	3.3	2.3
(4.2-5.1mEq/l)						
Pi	5.7	5.5	4.2	3.7	5.3	5.2
(3.0-4.5mg/dl)						
Uric Acid	2.8	6.0	6.4	4.2	7.5	6.5
(2.0-6.0mg/dl)						
СК	207	4255	84	18	66	114
(16-130U/l)						
Tetany	+	+	-	_	±	-

IHP, idiopathic hypoparathyroidism; OpHP, postoperative hypoparathyroidism; PHP, pseudohypoparathyroidism; CK, creatine kinase.

1). 症例1,2,3は特発性,4は術後性,5, 6は偽性副甲状腺機能低下症である.いずれの患 者も血清カルシウムの低値とリンの高値を示した. このうち症例1と2は,血清クレアチンキナーゼ が高値を呈し,テタニーなどの神経筋症状が著明 であった.症例3,4,5,6はミオパチーを伴わな い症例で、クレアチンキナーゼは正常、筋症状も 無いか、ごく軽度であった。

部分的阻血下前腕運動試験<sup>617</sup>:上記の6例の患 者を対象に,部分的阻血下前腕運動試験を行った. 本試験は,中間血圧で上腕を圧迫し,握力計を用 いて2分間で120回の掌握運動を行う.その後,2 分間完全阻血にした後,肘静脈より経時的に採血 し,血中の乳酸,アンモニア,ヒポキサンチンを 測定した.患者1,2では,活性型ビタミンD<sub>3</sub>治 療により,血清カルシウムが正常化した後にも同 試験を行い,その治療効果を検討した.

乳酸, アンモニアは酵素法により, ヒポキサン チンは HPLC 法"により測定した.

#### 結 果

図2にミオパチーを呈した症例1,2の部分的 阻血下前腕運動試験における成績を示す。症例1 では治療前(Ca 2.6mEq/l),治療開始後3か月 (Ca 4.0mEq/l)の2回,症例2では治療前(Ca



2.5mEq/l), 治療開始後9日(Ca 3.7mEq/l), お よび3か月(Ca 4.3mEq/l)の3回本試験を行っ た.

両者共に,前腕運動後の血中乳酸の増加反応は, 治療前も治療後もほぼ正常であった(図2左).と ころがアンモニアは,治療前には症例1,2共に, 正常対照群に比べ,著しい増加反応を示した(図 2中).症例2では,治療開始後9日ではアンモニ アの過剰反応はまだ持続していた.しかし,治療 開始後3か月では,症例1,2共に正常反応となった.同様に,ヒポキサンチンの反応も,治療前 は両者共に過剰反応,治療開始後3か月では正常 反応となった(図2右).ミオパチーを伴わない症 例3,4,5,6では,乳酸,アンモニア,ヒポ キサンチンの反応はいずれも正常範囲であった.

正常対照群では,部分的阻血下前腕運動試験に おける乳酸とアンモニアの増加量の間には強い正 相関が認められた(図3).ミオパチーを伴う症例 1,2では,治療前には乳酸に比べアンモニアが 過剰反応し,正常対照群の95%信頼限界より上方



図3 部分的阻血下前腕運動試験における乳酸とアンモニアの増分の関連症例1:治療前(○),治療開始後3か月(●).
 症例2:治療前(△),治療開始後9日(▲),および3か月(▲).
 症例3,4,5,6:(□).

に位置するが、治療後は正常化することが確認された。ミオパチーを伴わない症例3、4、5、6 はいずれも正常対照と同様の相関を示した。

#### 考 案

ミオパチー所見を呈した2例の副甲状腺機能低 下症患者では、阻血下前腕運動後にアンモニア、 ヒポキサンチンの過剰反応が認められた.これは, 運動による筋プリン体異化が亢進していることを 示す。<br />
アンモニアの産生量は筋運動の強度に影響 されると考えられたので、アンモニアの反応を乳 酸反応との比較で評価した。正常対照群では乳酸 の増分とアンモニアの増分は強い正相関を示し, AMP の deamination は解糖反応に比例して進む ことが示された。一方、症例1、2では、乳酸は 正常反応したにもかかわらず、アンモニアは過剰 反応を呈した、ヒポキサンチンと乳酸についても 正常対照ではよい正相関を示すが, 症例1, 2で はヒポキサンチンの過剰反応が認められた。した がって、 ミオパチーを伴う副甲状腺機能低下症の 運動筋におけるプリン体異化亢進は, AMP deamination の亢進の結果おこっていると考えられ た.

プリン体異化の亢進は、先天性に筋の ATP 産生 に障害のある疾患、例えば、糖原病III型、 V型、 VII型において私共や Brookeらが証明した が<sup>4151819110</sup>、後天性の疾患としては、本症が筋プリ ン体異化亢進を示した最初の疾患である。

一般に,筋の ATP が供給を上まわって消費され ると、アデニル酸キナーゼを介して2 ADP から ATP, AMP を産生する反応が促進する. 増加し た AMP は AMP デアミナーゼを活性化し、アン モニアと IMP が産生される. したがって, ATP を 減少させる要因があれば, ATP 消費の亢進であれ ATP 産生不全であれ, AMP を増加させ, AMP deamination が亢進する結果, アンモニアと IMP が増加し, さらにヒポキサンチンも増加する. 本 研究の結果,低カルシウム状態がこのような代謝 系のいずれかのステップに影響を及ぼしているこ とが示唆された.

Cape ら<sup>11</sup>, Piechowiak ら<sup>12</sup>は著しい低カルシ

ウム血症ではホスホリラーゼキナーゼによるホス ホリラーゼbの活性化が阻害されることを示唆し た.私共の症例でも,乳酸産生に伴う ATP 供給が 不十分なために AMPdeamination が亢進している 可能性がある.

ミオパチーを伴う症例の骨格筋にみられたプリ ン体異化亢進は、3か月の治療により正常化した ことより可逆的な病態であると考えられる.また、 短期間の治療では、プリン体異化が正常化してい なかったこと、ミオパチーを伴わない症例では著 しい低カルシウム血症があってもプリン体異化亢 進がないことより、低カルシウム状態あるいはビ タミン D の欠乏が相当長期にわたって継続した場 合にのみ、このようなプリン体異化代謝の異常が 生じると考えられる.

#### 結 語

以上, 副甲状腺機能低下性ミオパチーでは, 運動筋のプリン体異化が亢進している. このような 代謝異常は, 治療により是正され, プリン体代謝 異常は可逆的であることが示された.

本研究は昭和62年度厚生省精神・神経疾患研究 委託費(62-2)によって行われた。

#### 文 献

- Tarui S, Mineo I et al : Neuromuscular Disease (ed by G. Serratrice). Raven Press, New York, 1984, p71.
- Tarui S, Kono N et al: Type VII glycogenosis (muscle and erythrocyte phosphofructokinase deficiency). Monogr Hum Genet 9: 42, 1978.
- 3) 垂井清一郎:グリコーゲン病の臨床.筋,肝,血 球をめぐって、日本内科学会雑誌 76, 1347,

1987.

- 4) Mineo I, Kono N et al : Excess purine degradation in exercising muscles of glycogen storage disease types V and VII. J Clin Invest 76: 556, 1985.
- 5) 垂井清一郎:筋糖原病の病態分析一糖原病VII型に おける高尿酸血症の成因."筋ジストロフィー症の 発症機序に関する臨床的研究"昭和59年度研究報 告書(杉田班), 1984, 226.
- 6) Mineo I, Kono N et al : A comparative study on glucagon effect between McArdle disease and Tarui disease. Muscle Nerve 7: 552, 1984.
- Kono N, Mineo I et al: Metabolic basis of improved exercise tolerance: muscle phosphorylase deficiency after glucagon administration. Neurology 34: 1471, 1984.
- 8) Mineo I, Kono N et al: Myogenic hyperuricemia: a common pathophysiologic feature of glycogenosis types III, V, and VII. N Engl J Med 317: 75, 1987.
- 9) Kono N, Mineo I et al: Increased plasma uric acid after exercise in muscle phosphofructokinase deficiency. Neurology 36: 106, 1986.
- 10) Brooke MH, Patterson VH et al: Hypoxanthine and McArdle disease: a clue to metabolic stress in the working forearm. Muscle Nerve 6: 204, 1983.
- Cape CA: Phosphorylase a deficiency in pseudohypoparathyroidism. Neurology (Minneap) 19: 167, 1969.
- Piechowiak H, Groebner W et al: Pseudohypoparathyroidism and hypocalcemic "myopathy". Klin Wochenschr 59: 1195, 1981.

### 26) 熱測定法によるmdxマウス骨格筋の エネルギー論的研究

山田和廣\*

研究協力者 米谷快男児\*柘野浩史\*河野義久\*

#### はじめに

Dangain & Vrbova<sup>1</sup>は mdx マウス前脛骨筋の 収縮特性を調べ, mdx 筋においては正常筋に比べ て,発生張力が小さくまた収縮・弛緩の時間経過 が延長するとの報告をしている. Mdx 筋における このような収縮特性の異常のうち,発生張力の低 下の原因としては筋組織中に壊死線維が混在する こと,あるいはアクトミオシンの異常が考えられ る.また収縮・弛緩の時間経過の延長の原因とし ては,アクトミオシンの異常,筋小胞体による Ca 取り込み速度の低下あるいは筋肉パルブァルブミ ン量の減少を考えることができる. Mdx マウス前 脛骨筋においてはパルブァルブミン量が減少して いることが報告され,弛緩速度の遅延への関与が 示唆されている<sup>2</sup>.

本研究では、mdx マウスの長指伸筋とヒラメ筋 について Dangain & Vrbova と同様の実験を行な うと共に、mdx 筋における収縮異常の原因を調べ るため熱産生測定を行なったので報告する.

#### 材料と方法

4~6週齢のmdxマウスと正常マウス(C57BL/ 10Sc)から摘出した長趾伸筋(EDL)およびヒラ メ筋(soleus)を用いて実験を行なった.実験方法 の概略は次の通りである<sup>3)</sup>.摘出した筋標本を熱電 堆に装着し,一端の腱を筋支持器に,他端を張力 トランスデューサに接続した.筋を装着した熱電 堆を,Kreds液の入ったガラス容器に封入し,95 % O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>混合ガスを通気して酸素供給を行 なった.ガラス容器全体を恒温水槽中に没するこ とにより温度制御を行なった。測定温度は20℃で ある。

筋の刺激時には、Krebs 液の液面を下げ筋を空 気中に露出し、熱電堆の上下両端に位置する白金 電極から直接刺激を行なった。等尺性単収縮およ び0.5-1秒の等尺性強縮を行ない、発生張力と熱 産生の同時記録を行なった。正常および mdx マウ ス筋の間で比較検討を行なった諸量は、単収縮に おける収縮時間、最大張力、強縮状態からの弛緩 の速さ(half relaxation time) および収縮時の定 常熱産生率である。

測定に用いた筋の質重量 (mg)の平均値±SD は EDL 筋では正常筋11.5±0.6 (7.1±0.7×10<sup>-4</sup>, n=7), mdx 筋12.9±2.0 (9.2±1.8×10<sup>-4</sup>, n= 9) であり, soleus 筋では正常筋8.9±0.6 (6.9±  $0.9\times10^{-4}$ , n=3), mdx 筋5.8±1.1 (5.4±0.6×  $10^{-4}$ , n=5) であった.()内の数値は筋重量/ 体重の値を示す.

#### 結果と考察

図1はEDL筋とsoleus筋の等尺性単収縮および強縮の張力曲線を示す。図には正常筋とmdx筋の結果を重ね書きして示している。いずれの場合も張力の小さい記録がmdx筋から得られた記録である。張力の時間経過は、soleus筋ではmdxと正常筋との間で殆ど差異を認めないが、EDL筋においては、mdx筋の弛緩の時間経過における明瞭な遅延が認められる。筋を変えて同様の測定を繰り返し、得られた結果をまとめてグラフにして示したものが図2である。最大張力(Po)は筋の単位断面積当りに換算して示している。Soleus筋では最大張力、収縮時間およびhalf relaxation timeの



図1 EDL 筋と soleus 筋の単収縮および強縮における張力曲線. 正常筋と mdx 筋の結果 を重ね書きして示す.

いずれにおいても、正常筋と mdx 筋の間で有意差 は認められなかった.しかし、EDL 筋ではこれら の諸量のいずれにおいても、両者の間で有意差を 示した.すなわち mdx 筋においては、正常筋に比 べて最大張力が低下し、収縮・弛緩の時間経過が 有意に延長している.図2の EDL 筋における結果 は Dangain と Vrbova の結果<sup>11</sup>と定性的に一致し ている.

図3はEDL筋の強縮における張力および熱産生 の記録を示す.このような熱産生の記録から定常 熱産生率を求め,mdx筋と正常筋との間で比較検 討を行なった.定常熱産生率は,筋収縮時におい てアクトミオシン ATPase と筋小胞体 CaATPase により,単位時間当りに分解される ATP の加水分 解熱に相当する<sup>9</sup>.

EDL 筋と soleus 筋について得られた熱産生結果 を図4に示す。図には筋肉の単位重量当りの熱産 生率と発生張力当りに換算した熱産生率とを併せ て示している。熱産生率/発生張力の比は,一定の 張力を維持するために消費される ATP 量の目安を 与える量である。

Soleus 筋においては、いずれの諸量においても mdx 筋と正常筋の間に有意差は認められなかっ た.図2に示された結果と併せ考えると, mdx マ ウスの soleus 筋においては、力学的・エネルギー 論的な収縮特性は正常筋となんら差異がないと考 えることができる。すなわち、図1に示されたよ うに, mdx 筋における張力発生が小さいことの原 因は、単に筋が小さいためであると考えることが できる.しかし、この結論は、soleus 筋を構成す る個々の筋線維が, mdx において何ら変化を受け ないということを意味じない。mdx 筋においては 筋線維の壊死の後、筋再生が速やかに起こること が知られている<sup>1,5)</sup>、壊死・再生に伴い fiber type の population も変動し、4 週齢以後の mdx マウス の soleus 筋においては, type I 線維の population が有意に大きくなることが報告されている。本研 究における soleus 筋に関する結果は、そのような population の変動にもかかわらず、mdx 筋の筋組 織としての力学的・エネルギー論的収縮特性は, 正常筋との間に有意差がないことを示している。 Mdx マウス EDL 筋における筋肉の単位重量当



図2 最大張力,収縮時間および half relaxation time の mdx 筋と正常筋における比較.



図3 EDL 筋における0.5秒強縮における張力および熱産生曲線、熱産生曲線における動揺 は刺激によるアーティファクト.



図4 正常および mdx 筋における定常熱産生率(h<sub>b</sub>)の比較.

りの熱産生率は、正常筋に比べて有意に小さい. しかし、張力当りに換算した熱産生率で比較する と、mdx 筋と正常筋との間の差は小さく、有意差 は認められなかった.これらの結果から mdx 筋に おいて張力が小さいことの原因として次のような 解釈をすることができる。すなわち多くの報告に みられるように 4 週齢前後の mdx 筋においては正 常および再生筋線維と壊死線維とが混在するが、 正常および再生筋線維は ATP 利用ならびに張力発 生において、正常マウスの筋線維と殆ど差異を示 さないと考えることができる。しかし、mdx 筋に おける明らかな収縮・弛緩の時間経過の延長の原

因については、図4の結果だけでは考察すること ができない。この原因を調べる目的で種々の筋長 のもとで等尺性単収縮および強縮を行ない、張力 と熱産生の測定を行なった。

筋長を生体長以上に引き伸ばすと,発生張力は 低下し,これに伴い熱産生量も小さくなる.両者 の間には線形関係が成り立ち,張力を zero に外挿 したとき zero でない熱産生を与える<sup>n</sup>.この熱産 生は活動化熱と呼ばれる。単収縮における熱産生 と張力の関係により得られた活動化熱を単収縮活 動化熱と呼び,強縮におけるそれを強縮活動化熱 と呼ぶ.また,強縮時の定常熱産生率から強縮活



図5 EDL 筋における単収縮活動化熱,強縮活動化熱および張力依存性熱産生率の正常筋 とmdx 筋における比較(説明は本文参照).

動化熱を差し引いた量を張力依存性熱産生率と呼 ぶ.単収縮活動化熱は単収縮時に筋小胞体から放 出された Ca<sup>2+</sup>量に比例し,強縮活動化熱は筋小胞 体 CaATPase 活性に比例することおよび張力依存 性熱産生率はアクトミオシン ATPase 活性に比例 することが示されている<sup>4,8)</sup>.

図5はそれらの諸量のmdx 筋と正常筋における 比較を示す. Mdx 筋の単収縮活動化熱と張力依存 性熱産生率は正常筋と殆ど差異が認められなかっ た. この結果は,mdx 筋の収縮時における Ca 放 出量およびアクトミオシン ATPase 活性は正常筋 と殆ど差異はないことを示している.これに対し て,強縮活動化熱はmdx 筋と正常筋の間に差異が あるように見うけられる.実験例数が少ないこと もあり,有意差を認めるに至らないが,mdx 筋の 筋小胞体 CaATPase 活性は正常筋に比べて低いこ とを示唆しているように思われる.すなわち,mdx マウス EDL 筋における収縮・弛緩の時間経過の遅 延は筋小胞体による Ca 取り込み速度が遅いためで あることが示唆される.この点に関してはさらに 例数を重ねて実験を行い確認したいと考えている.

#### まとめ

- 4~6週齢のmdx マウス soleus 筋における力 学的エネルギー論的特性は正常筋と差異を認め なかった。
- 2. Mdx マウス EDL 筋の最大張力は正常筋に比 べて有意に小さく,また収縮・弛緩の時間経過 の明らかな延長が認められた.
- 3. Mdx 筋における最大張力の低下は壊死線維の 混在によるものであり、正常および再生筋線維 の張力は発生能力は正常筋の筋線維と同じであ ることが示唆された。
- 4. 収縮・弛緩の時間経過の延長は筋小胞体による Ca 取り込み速度の低下に起因していることが 示唆された.

#### 文 献

- Dangain J and Vrbova G: Muscle developement in mdx mutant mice. Muscle & Nerve 7: 700-704, 1985.
- 2)塚越廣,佐野元規ほか:筋ジストロフィーモデル 動物骨格筋におけるパルブァルブミンの量的変化 について、厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジス

トロフィー症の臨床,病体と成因に関する研究, 杉田班,昭和61年度研究報告書,1987, p47-50.

- 3)米谷快男児、山田和廣:熱産生測定,実験生物学 講座10巻(杉晴夫,平本幸男編),丸喜,東京, 1984, pp93-110.
- Woledge RC, Curtin NA and Homsher E: Energetic aspects of muscle contraction. Academic Press, London, 1985.
- 5) Bulfield G, Siller WG, Wight PAL and Moore KJ: X-linked chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1189-1192,1984.
- 6)後藤幾生、山田猛、石本進士、北口哲雄:mdx マ

ウス骨格筋の経時的変化. 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, pp35-38.

- 7)山田和廣,米谷快男児,北野敬明,河野義久: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,1987, pp42-46.
- 8) Homsher E, Mommaers WFHM, Ricchiuti NV and Wallner A: Activation heat, activation metabolism and tension-related heat in frog semitendinosus muscles. J Physiol 220: 601-325, 1972.

# Ⅳ. 変性と再生

### 27) 骨格筋の移植に関する研究

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\* 弘 中 哲 治\*\* 五 十 里 良 生\*\*

#### はじめに

骨格筋の移植については、近年多くの研究が行 なわれているが、ジストロフィー筋の移植につい ての研究はすくない、この研究の目的は次の3つ に要約できる。1)ジストロフィー動物(今回はマ ウス)とコントロール動物との骨格筋の交換移植 2)再生筋およびジストロフィー筋の収縮能力の電 気生理学的検討 3)ネコを用いたやや大型筋の移 植に関する研究。

#### 方 法

- **交換移植**:ジストロフィー動物と正常動物との間の交換移植は mdx マウスと C57BL/10sc との間で行ない,graft には長指伸筋(EDL)を用いた.移植法は神経,血管を切り離した donorのEDL を host の EDL を取り除いた後にはめ込み,近位端を固定し,遠位端は残っている hostのEDL の腱の断端と縫合した.移植後2ヶ月でgraftを取り出し,クリオスタットで cross-sectionを作り,H-E 染色後この標本につき再生筋線維の直径 variability coefficient(以下 V.C.)および数を測定した。
- 収縮特性:mdx マウスおよび C57BL/10scの EDL の電気刺激を行ない,両者を比較した.再 生筋についてはラットの EDL の自家移植後2ヶ 月目のものを用いた.筋の刺激は *in vivo* で行な い, twitch tensionの測定には0.2msecの supramaximal square pulse を使用し,筋を直接 白金電極にて刺激した.また tetanic tension に は100Hz, 31回の刺激を行なった.
- \* 帝京大学医学部第一内科

 ネコ EDL の inlay graft: ネコの EDL の free graft では血流の途絶により中心部は壊死に落ち 入る.これを防ぐ目的で,前脛骨筋の一部を有 茎の graft としてその先端を EDL の free graft の中心部に埋め込む inlay graft を行なった.

#### 結 果

1) 交換移植: EDL の交換移植は mdx とコント ロールマウス C57BL/10sc の間のみでなく, mdx 同士、コントロール同士でも行なった。図1は これら4組の移植の再生筋中の再生筋線維の直 径を示したものである. (この図で C → C はコン トロールの EDL をコントロールの host に移植 した場合を,  $C \rightarrow D$  はコントロールの EDL をジ ストロフィーの host に移植したということを示 している.以下同様)これにみるように再生筋 線維の直径が大きいのはコントロールマウス相 互間の交換移植の再生筋線維であり、またもっ とも小さいのは mdx 同士の交換移植筋の再生筋 線維である.そして一般にコントロールの EDL の移植後の再生筋線維は host が C57BL であ れ, mdx であれ, 直径が大きく, また EDL の donor が mdx の場合は host の如何に拘らずこれ より細いといえる。

次に筋線維の性質を示すもう一つの指標である V.C.を示したものが図2である。図の横の点線 に示すように、移植前の EDL の値をみると、mdx はコントロールよりかなり高い値を示している ことがわかる。再生筋の V.C.についてみると、 EDL の donor がジストロフィーの場合は正常筋 の場合に比べて大きいのが明らかである。V.C. の大きさの順序はD→D>D→C>C→D>C →C であった。

<sup>\*\*</sup>帝京大学医学部薬理



2 months after cross-transplantation of EDL between normal and dystrophic mice (mdx)



⊠ 1 Diameter of regenerated muscle fibers



2 Variability coefficient of regenerated muscle fibers

表1	Contractile	properties	of rat	EDL	(control	and	autograft)
----	-------------	------------	--------	-----	----------	-----	------------

· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Intact (n=6)	Autograft (n=6)
Twitch tension (g)	24.94±4.49	9.20±3.37**
Tetanic tension (g)	178.67±57.53	29.37±11.33**
Twitch tension	0.21±0.07	0.10±0.04**
Tetanic tension area of muscle section (kg/cm <sup>2</sup> )	1.11±0.12	0.28±0.07**
Contraction time (m sec)	31.44±5.52	16.78±2.88**
Half-relaxation time (m sec)	52.48±16.02	27.68±4.17*
		* P<0.05

2 months after transplantation

\*\* P<0.01

なお再生筋線維の数については動物の例数が充 分でなく一定の傾向がみられなかった.

- 2) 収縮特性: ラット EDL の自家移植後2ヶ月 目の再生筋の収縮特性を移植前の EDL のそれと 比較したのが表1である。再生筋の単位面積当 りの tetanic tension は移植前の25%前後であっ た.また contraction time および half relaxation time は移植前の筋より小さい値を示した。 mdx マウスの EDL の収縮特性を C57BL の EDL のそれと比較してみると,mdx では EDL の単位面積当りの tetanic tension はコントロー ルの約40%を示していた。またこの両者の間に は contraction time と half relaxation time に は有意の差はみられなかった。
- 3)ネコの EDL の inlay graft: 我々は従来マウ ス、ラット、ハムスターの骨格筋のような小さ な筋では移植後の再生がきわめて良いことを報 告してきた.しかし、これより大型で2g以上 の重量を有する骨格筋の移植に関しては神経と 血流の維持がとくに大切である。昨年はウサギ の EDL の移植で再生における神経支配の重要性 を指摘したが、このような大きさの graft では血 流の確保はさらに重要と考えられる。

ネコの EDL の移植についてみると, 再生はウ

サギの場合より遙かに良好である.しかしこの 場合も再生は graft 周囲から始まるが,再生帯で ある intermediate zone は graft 中心まで達せ ず,多くの場合移植後2ヶ月もすると中心部に cavity を残してしまう.これは血流が中心部で は保たれず,酸素不足に落ち入るのが原因と考 えられる.しかし,ネコの EDL の血管を移植時 に縫合するのは困難であるため,ネコの一側下 肢では前脛骨筋の一部を inlay graft として EDL の free graft の中央部に埋め込んでみた (図 3).一方他側下肢では通常の free graft を行な い,両者の再生を比較した.

図4は移植後2ヶ月目の inlay graft 周辺の組 織像を示すが, inlay graft を取り囲むように新 しく形成された筋線維の再生帯がみられる.こ の例では inlay を行なわなかった他側の free graft の中心部は大きな cavity を形成していた.

Sola<sup>1)</sup>らは心筋梗塞巣に胸領乳突筋の inlay graft を行なっている.我々の結果は現在迄のと ころ再生はやや良い程度であるが, cavity 形成 の抑制にはかなり有効であった.現在 inlay する 筋の種類や大きさを検討中である.



図3 ネコの EDL の free graft に前脛骨筋の一部を inlay した



図4 inlay graft 周囲の筋線維再生帯

#### 考 察

近年, ヒトの筋の自家移植に関しては顔面筋や 手の小さな筋での報告が見られる<sup>2)3)4</sup>.しかしヒト のジストロフィー患者に治療の目的で筋移植を行 なった報告は見当らない.この理由としては, 拒 絶反応の問題や大型筋の移植についての基礎的研 究が不充分なためと思われる.この研究の結果は 次のことを明らかにしている.

第1はジストロフィー筋を移植した場合は再生 筋もやはりジストロフィーの性質を有している. これに反し,正常筋を移植すれば,hostはジスト ロフィー患者であっても正常の筋が再生されると いうことであり,治療目的の移植に当っては極め て重要なことと思われる.これは以前我々がヌー ドマウスで行った実験結果とも一致する<sup>5)</sup>.

第2は再生筋の筋力は original の筋の1/5程度し かないことである。測定に当っては周囲との癒着 は注意深く剝離して測定しており、癒着があれば 収縮効果はさらに減少するものと思われる。もっ ともこれは移植後2ヶ月目の初期の再生筋であり、 さらに時間が経てば増加すると考えられるので、 現在経時的に研究中である。

第3は大型筋の移植では神経と血管の縫合が必要である。とくに動脈を縫合するためにはある太 さ以上の動脈が一定の位置になければならない。 この条件が満たされない場合は血管の縫合の代り に inlay graft がある程度の効果をあげ得るものと 思われる。

#### 結 語

今回の研究で得られた結果をまとめると次の如 くなる.

 ジストロフィーマウスとコントロールマウス のEDLの交換移植では、EDLのdonorがジス トロフィーの場合は、donorがコントロールの場 合に比較し、hostの如何に拘らず再生筋線維は 細く、V.C.が大きかった.これは再生筋線維も originalの筋の特性を受けつぐものと考えられ る.

- 2) ラット EDL 自家移植後2ヶ月目の再生筋の単 位断面積当りの tetanic tension は移植前のそれ の約25%であった。
- 3) mdx マウスの EDL の単位断 面積当りの tetanic tension はコントロールの C57BL/10sc それの約40%であった.
- ネコ EDL の auto graft に他筋よりの inlay graft を行なうと, EDL の中心部非再生帯の縮小 傾向がみられ,空洞形成が抑制される。

#### 文 献

- Sola OM, Dillard DH, Ivey TD, Haneda K, Itoh T and Thomas R: Autonomous plantation of skeletal muscle into myocardium. Circulation 71: 341-348, 1985.
- 2) Harii K, Ohmori K and Torii S: Free gracilis muscle transplantation, with microneurovascular anastomosis for the treatment of facial paresis. Plast Reconstr Surg 57: 133-143, 1976.
- Habelius L: Free autogenous transplantation in two cases of total anal incontinence. Acta Chir Scand 141: 69-75, 1974.
- 4) Schenck RR: Rectus femoris muscle and composite skin transplantation by neurovascular anastomosis for avulsion of forearm muscles: a case report. J Hand Surg 3: 66-69, 1978.
- 5) 寺尾寿夫,高津成美,平口峰子:ジストロフィー ハムスターと正常ハムスター間の交換移植につい ての研究(第3報)およびmdxマウスの骨格筋の ヌードマウスへの移植についての研究.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,1986, pp249-259.

### 28) Duchenne 型筋ジストロフィー症生検筋の ヌードマウスへの移植実験

―再生筋組織のリソゾームプロテアーゼ活性と含有量について―

#### 若山吉弘\*

研究協力者	武	田		篤**	Ξ	杉	信	子***
	Ξ	宅	捷	太****	石	原	傳	幸****

筋の再生が正常か否かは筋ジストロフィー症に おいて重要な課題であり多方面から検討され論じ られてきた<sup>11</sup>.本症の病因の一つが筋タンパク質の 異常分解亢進でありプロテアーゼとの関連が提唱 された<sup>213</sup>.以前我々は、ヌードマウスに移植した Duchenne型筋ジストロフィー症 (DMD) 生検筋 の移植後のリソゾームカテプシン B 活性が対照再 生筋の活性に比べ高く、それは再生筋細胞内リソ ゾーム系オルガネラの増加によることを示唆する 結果として報告した<sup>10</sup>.今回はその可能性を明らか にする目的で、DMD 生検筋の移植再生後のリソゾ ームカテプシン群の活性と含有量について対照再 生筋と比較検討した.

#### 材料と方法

ヌードマウスをネンブタールで麻酔後,背部皮 下の左右に小さな切開を加え,少年の DMD 患者 大腿四頭筋 8 例,組織化学的に正常な Age-mached 少年の整形外科手術患者大腿四頭筋10例を 周囲の筋に直接触れないように挿入し縫い合せた. そして,移植後 2 週目で取り出し形態学的な検索 と酵素活性及び含有量測定用標本とした.

再生筋からのホモジネート上清の調製は前報<sup>4</sup>に 従って行った。リソゾームシステインプロテアー ゼ活性は、カテプシン B&L には Z-Phe-Arg-

\*昭和大学藤が丘病院神経内科 \*\*昭和大学藤が丘病院臨床病理科 \*\*\*神奈川県立こども医療センター整形外科 \*\*\*\*神奈川県立こども医療センター神経内科 \*\*\*\* MCA、カテプシン Bには Z-Arg-Arg-MCA、カ テプシン Hには Arg-MCA の各蛍光基質を用いて Barrett & Kirschke の方法<sup>5)</sup>をわずかに修飾して 測定した.また、再生筋ホモジネート上清のカテ プシン 群 の 含 有 量 の 測 定 は、Mason ら<sup>6)</sup>及 び Schwartz ら<sup>7)</sup>の方法で精製したそれぞれのヒトカ テプシンに特異的なウサギ抗ヒトカテプシン抗体 を調製し、それらを用いて確立したミクロ ELISA 法で定量した (図 1).



I Micro enzyme-linked immunosorbent assay method for measurement of cathepsins.

#### 結 果

移植2週目のDMD及び対照再生筋と成熟骨格筋 のホモジネート上清のリソゾームシステインプロ テアーゼ活性を図2に示す.カテプシンB&Lとカ テプシンB活性は,他のリソゾーム酵素と共に DMD移植再生筋で対照再生筋に比べて増加の傾 向を示した(表1).また,両再生筋のそれらのプ ロテアーゼ活性は,成熟骨格筋の活性に比べて有 意に高かった.尚,Arg-MCAを水解する酵素活 性が前の二つの酵素と異なる傾向を示したのは, アミノペプチダーゼ活性の寄与によるものと考え られる。

ミクロ ELISA 法で定量した DMD 及び対照再生 筋ホモジネート上清中のカテプシン B の含有量 は、それぞれ632.8±167.6ng/mg protein(平均± SD)、201.6±67.5ng/mg protein であり、DMD 再生筋で約3倍と有意な増加を示した(図3).し かし、カテプシン H の含有量には両再生筋では有 意な差異はなかった.また、両再生筋のそれらカ テプシンの含有量も成熟骨格筋に比べて有意に高 かった.

移植2週目の DMD 及び対照再生筋を酸性フォ スファターゼ活性染色し、筋細胞の電顕的検索の 結果,両再生筋細胞内には autophagy による二次 リソゾームと考えられる myeloid body が存在し, また、ゴルジ装置が濃染され一次リソゾームの存 在も強く示唆された.これら一次及び二次リソゾ ームは両再生筋では成熟骨格筋細胞に比べ有意に



phic muscle grafts.

表1 Lysosomal enzyme activities in normal and dystrophic muscle grafts after two weeks of transplantation.

Enzyme	Control(n=10)	DMD (n=8)	DMD/Control
Cathepsin B&L (µmol/min/mg)	0.391 <u>+</u> 0.139	0.437 <u>+</u> 0.149	1.1
Cathepsin B (µmol/min/mg)	0.094 <u>+</u> 0.021	0.116 ± 0.041	1.2
Cathepsin H (µmol/min/mg)	0.060 <u>+</u> 0.003	0.039 ± 0.008	0.7
Cathepsin D (m unit/min/mg)	$0.021 \pm 0.004$	0.026 <u>+</u> 0.004	1.2
Acid phosphatase (m unit/min/mg)	0.420 ± 0.042	0.493 <u>+</u> 0.074	1.2

DMD: Duchenne musclar dystrophy. Mean±SD.

増加していた?.

#### 考察

DMDにおける筋の再生が正常であるかどうかは 本症の病因,治療,予後に関して重要な課題であ りながらまだ一定の結論が得られていない。Wakayama ら<sup>9</sup>は,ヌードマウスに移植した DMD 及 び対照再生筋の細胞直径を比較し,DMD 筋も経時 的に再生していることを明らかにした。しかし, DMD 再生筋の細胞直径が対照再生筋のものと比 較して有意に細かったことは,DMD 再生筋の筋タ ンパク質の分解亢進を強く示唆した。

DMD 再生筋のカテプシン B&L とカテプシン B 活性は、対照再生筋のそれに比べて増加の傾向を 示したが有意ではなかった(図2,表1).これ は、ホモジネート中に存在するカテプシン群に特 異的な内在性インヒビターの影響により活性値に はプロテアーゼの動態を正しく反映されないと考 えられる.そこで、ミクロ ELISA 法を用いて測定 した DMD 再生筋ホモジネート中の、特に、カテ プシン B の含有量が対照再生筋に比べて有意に増 加しており(図3)、DMD 筋は再生されると共に リソゾームカテプシン群量の増加亢進を伴ってい ることが明らかになった.

最近, Katunuma & Kominami によって DMD 筋におけるタンパク質の異常分解亢進機構の仮説 が提唱され3)、病態発現には筋繊維の崩れた筋細胞 内 autophagy 亢進と壊死細胞処理として浸潤した マクロファージ由来のリソゾームカテプシン群の 増加が強く関連していることが示された.本研究 でも成熟骨格筋に比べて両再生筋組織のカテプシ ン活性と含有量は有意に高かったが、筋の再生と の関連は不明である。形態学的検索では、両再生 筋に存在するマクロファージ性細胞は,移植2週間 後にはかなり少なくなっておりその存在量には大 差はなかった. さらに, 両再生筋細胞内には autophagy による二次リソゾームである myloid body が存在すると共に,酸性フォスファターゼ活性染 色で濃染されるゴルジ装置近傍に一次リソゾーム の存在も確認できた. この事実は, DMD 及び対照 生検筋の移植再生に伴うリソゾームカテプシンの 増加は,再生筋細胞内リソゾーム系オルガネラの 増加によると考えられる.そして,DMD 再生筋で 対照再生筋に比べてカテプシン活性と含有量が高 値を示したことは,それらプロテアーゼの増加亢 進が DMD の筋再生を不完全にしている可能性を 強く示唆した.

今後,カテプシンLの定量を行うと共に,それ ぞれの抗カテプシン抗体を用いて免疫組織化学的 に再生筋細胞内のカテプシンの存在を明らかにす る必要がある.

#### 文 献

- 1) 若山吉弘:筋ジストロフィー症における筋の再生 について、神経進歩 24:729, 1980.
- 2)杉田秀夫,石浦章一:筋ジストロフィー症とプロテ アーゼ.神経進歩 24:821, 1980.
- 3) Katsunuma N, Kominami E: Abnormal expressionof lysosomal cysteine proteinases in muscle wasting diseases. Rev Physil Biochem Pharmacol 108: 1, 1987.
- 若山吉弘,武田篤ら:Duchenne 筋ジストロフィー 症生検筋のヌードマウスへの移植実験――再生筋 組織の cathepsin B 活性について――.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, 1985, pp166-169.
- Barrett AJ and Kirschke H: Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. Methods in Enzymology 80: 535, 1981.
- Mason RW, Green GDJ et al: Human liver cathepsin L. Biochem J 226: 233, 1985.
- 7) Schwartz WN and Barrett AJ: Human cathepsin H. Biochem J 191: 487, 1980.
- 8) Wakayama Y, Matsuzaki H et al : Golgi apparatus : Distinct structure of acid phosphatase localization in regenerating human skeletal muscle fiber. Dev Neurosci 6 : 152, 1984.
- 9) Wakayama Y and Ohbu S: Light-and electronmicroscopic studies of transplanted human dystrophic muscle to nude mice. J Neurol Sci 55: 59, 1982.

### 29) 脱神経後の筋萎縮過程におけるリソゾームの動態

木 南 英 紀\*

研究協力者 勝 沼 信 彦\* 伊 井 邦 雄\*\*

#### はじめに

正常の筋細胞内のリソゾームはリソゾームの発 達した細胞と比べるとその数は極めて少ないが、 筋細胞に障害が加われば、生じた異常蛋白や崩壊 産物を除去すべく,オートリソゾームが多数形成 され、これらを処理する。 さらに障害が持続的に 作用すれば、この自己消化の機転は細胞保存的と いうよりも、細胞破壊的に変換していくように思 われる。この一連のプロセスにはリソゾームのプ ロテアーゼ群の中でもシステインプロテアーゼ群 (カテプシン B, H, L)がとくに重要な役割を果 していると考えられる。筋細胞障害に対するオー トリソゾームの形成(カテプシン群の筋細胞内の 上昇としてとらえることができる)は極めて早期 の細胞反応であることを筋ジストロフィー症(DMD) とその動物モデル (mdx マウス) および急性筋壊 死のモデルを用いて追求してきた"。しかし、圧倒 的に強いカテプシン活性をもつマクロファージの 筋細胞内への浸潤のないモデルを用いての解析が 望ましく、今回脱神経後の萎縮筋におけるリソゾ ームの動態を調べた。従来より脱神経後の萎縮筋 では細胞浸潤はなく、リソゾーム酵素活性が上昇 していると報告されている?

#### 材料と方法

4週齢のウィスター系ラットの右坐骨神経を起 始部に近いところから切断し,時間経過を追って ひらめ筋を分離し,リソゾーム酵素活性を調べる と共に,一部はホルマリン固定後,抗カテプシン B,H,およびL抗体を用いた直接法による免疫組 織学的検査でカテプシン群の展在を調べた<sup>3)</sup>.な

\*徳島大学酵素科学研究センター

\* \* 徳島大学医学部第一病理

お、左の非脱神経側のひらめ筋を対照として用いた。総蛋白量は筋ホジネートを0.1N NaOH に充 分溶解させ、遠心上清の蛋白質を Lowry 法<sup>0</sup>で測 定し、総蛋白量とした、カテプシン B および B& L 活性は Z-Arg-Arg-MCA と Z-Phe-Arg-MCA をそれぞれ基質に用いて測定した<sup>5)</sup>.  $\beta$ -ガラクトシ ダーゼ、 $\beta$ -ヘキソサミダーゼおよび $\beta$ -グルクロニ ダーゼは、4-メチルウンベリフェロン螢光基質を 用いて測定した<sup>9)</sup>. 酸フォスファターゼは Igarashi と Hollander の方法に従った<sup>7)</sup>.

#### 結 果

脱神経側のひらめ筋の総蛋白質の推移を調べた 結果を図1に示す.脱神経後のひらめ筋の総蛋白



図1 脱神経後のひらめ筋の総蛋白量の推移 (……)脱神経側,(一・一)非脱神経 側,4匹のラットの平均値,標準偏差 として表現されている。

量は切断後2日目で一過性に増加しているが、萎縮の進行につれて漸次低下し、1週間後および2 週間後には対照側のそれぞれ84%および74%となっている。

脱神経後のひらめ筋のカテプシン B 活性は2日間の潜伏期の後,4日目に最高値(対照の3倍) に達し、その後は漸減するが、非神経切断側のレ ベルには戻らず2週間後でも、1.5~2倍の活性を 有していた(図2-a).カテプシン B&L 活性もカ テプシン B 活性と同様の動態を示すが, 脱神経後 4 日目のレベルが対照側の2.5倍であった(図2b).

他のリソゾーム酵素の活性変動を図3に示す。 3種類の糖酵素と酸フォスファターゼも同様に2



図 2 脱神経後のひらめ筋におけるカテプシン B(a), およびカテプシン B+L(b)の活性変 動. (……) 脱神経側, (-・ー) 非脱神経側

日間の潜伏期の後4日目から活性上昇がみられる が、カテプシン活性のようにその後は減少せず一 定かむしろ上昇するもの (β-ガラクトシダーゼと β-ヘキソサミダーゼ)もある.比活性として表現 しており、筋組織の蛋白量が脱神経後減少してい るので、全活性は4日目以後有意には上昇してい ない.

脱神経後に上昇したカテプシン B, H および L の筋組織内局在を調べるため, 抗カテプシン B,

H および L-Fab'-ペルオキシダーゼ複合体を用い て直接法で免疫組織学的染色を行った。脱神経後 4日目の筋線維内にははっきりしたカテプシン群 の増加像が見い出せなかった。間質には細胞浸潤 はなく、陽性細胞はみられない。しかし萎縮変性 神経線維内のマクロファージ様細胞がカテプシン B, H, L いずれの抗体にも強陽性を示した(図4)。 脱神経後数週間を経ても変性神経末端のマクロフ ァージ様細胞のカテプシンは陽性であり、一部の



図3 脱神経後のひらめ筋における β-ガラクトンターゼ(a), β-ヘキソサミダーゼ(b), β-グ ルクロニダーゼ(c)および酸フォスファターゼ(d)の活性変動. (……)脱神経側, (-・-) 非脱神経側



 図4 脱神経後4日目のひらめ筋におけるカテプシンHの局在.カテプシンHは、Waller 変性をおこした筋内神経線維に出現した多数のマクロファージ様細胞に強く陽性で ある(←).筋細胞内には明らかな陽性所見はみられない. 抗ラットカテプシンHFab'-ベルオキシダーゼによる免疫組織染色 ×400(5×10×5)

萎縮筋線維を除いてほとんどの筋線維にカテプシンの増加は今回の実験では得られなかった.

#### 考 察

脱神経後にみられるリソゾームの酵素活性は以 前の報告のように2日の潜伏期の後,数倍の活性 上昇がみられた。マクロファージの浸潤を伴う筋 変性・壊死では、それらを含む筋組織ホモジネー トを用いてカテプシン活性を測定すると、マクロ ファージ浸潤の程度に比例して、カテプシン活性 は上昇する。今回は筋細胞内や間質内にはマクロ ファージの浸潤はみられなかったが、変性萎縮神 経線維内のマクロファージに限局してカテプシン の増加像が見い出された. 脱神経後のひらめ筋内 のカテプシン活性の増加は主として,この神経線 維内マクロファージに由来すると思われる、しか じ,筋細胞内のカテプシンが全く増してないかど うかは今回の実験ではわからない.より感度の高 い免疫染色法によっては筋細胞内のカテプシンも 増えていることを示し得るかもしれない.

脱神経のひらめ筋のリソゾーム酵素の変動をみ ると、カテプシン群が4日目をピークとしてかな り急速に活性が低下するのに対し、他のリソゾー ム酵素の活性は減少しない(図2,図3).この理 由としては次の2つが考えられる。1つは、シス テインプロテアーゼに対する内在性インヒビター が4日目以後、筋組織に(筋細胞内だけとは限ら ない) 増加してくる可能性で、インヒビターが増 えれば,筋ホモジネートを用いて活性測定する以 上、見かけ上カテプシン活性は低下してくる。も う一つの可能性は、4日目以後リソゾームの酵素 の合成と分解のバランスが変ってきたと仮定する と、カテプシン群が他のリソゾーム酵素より半減 期が短かい8)ため、より早く活性低下することも考 えられる. さらにはカテプシン群と他のリソゾー ム酵素活性の上昇の由来細胞が異なる可能性も無 視できない.たとえば、酸フォスファターゼ等の 活性増加は筋細胞に由来する可能性もある。しか し、本研究の初期の目的である筋に障害的要因が 加わった場合、早期(数時間内)にオートファジ

ーが亢進する(カテプシン活性が増加する)こと を調べる系として、脱神経後の筋萎縮は良いモデ ルとはいえないことが明らかになった。

最近培養筋細胞を用いて筋細胞障害とオートファジーの亢進(自己消化の亢進)との関連を調べ、 Preliminary ではあるが、良いモデルになる感触を 得た。

#### 文 献

- Kominami E, Ii K and Katunuma N: Activation of the intramyofibral autophagic lysosomal system in muscular dystrophy. Amer J Pathol 127, 461, 1987.
- 2) Weinstock IM and Iodice AA: Acid hydrolase activity in muscular dystrophy and denervation atrophy. "Lysosomes in Biology and Pathology" (eds by Dingle JT and Fell FB) New York, American Elsevier, 1969, p450.
- II K, Hizawa K, Nonaka I, Sugita H, Kominami E and Katunuma N: Abnormal

increases of lysosomal cysteine proteinases in rimmed vacuoles in the skeletal muscle. Amer J Pathol 122, 193, 1986.

- 4) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193, 265, 1951.
- Barrett AJ and Kirschke H: Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. Methods Enzymol 80, 553, 1981.
- Hindman J and Cotlier E: Glycosidases in normal cuman leucocytes and abnormalities in GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. Clin Chem 18, 1971.
- Igarashi H and Hollander VP: Acid phosphatase from rat liver. J Biol Chem 243, 6084, 1968.
- Kominami E, Tsukahara T, Bando Y and Katunuma N: Autodegradation of lysosomal cysteine proteinases. Biochem Biophys Res commun 144, 749, 1987.

## 30) Local tetanus法の応用による実験的ミオパチーに 関する研究-第3報-E-64-Cの効果の検討

#### 田邊 等\*

研究協力者 水 野 美 彦\*\*

#### 目 的

一昨年及び昨年の本班会議に於て,我々は local tetanus 法の応用により,ラットのヒラメ筋(SOL) に筋ジストロフィー様病変を作成したことを報告 してきた<sup>112)</sup>.この様な病変が生ずる機序としては local tetanus によって強収縮状態にある筋を伸展 することにより筋膜も過伸展刺戟を受け,膜の透 過性が亢進し,Caイオンの細胞内流入を招き,そ の結果 CANP が活性化され筋蛋白の崩壊を招くこ とが考えられた.そこで今回の研究では cystein protease inhibitor である E-64を投与し,筋の変 性に対する抑制効果を検討したので報告する.

#### 対象及び方法

48匹の SD 系 adult albino rat (体重150~180g) を用い、4×10<sup>-4</sup>LFの Tetanus toxin を右腓腹筋 に1回筋注した。2日後に右足関節の持続的底屈 (local tetanus) が出現した時点でラットを16匹 ずつの三群に分け、E-64-C(注射可能な剤型)を 連日、1日1回腹腔内投与した。この際、A 群は 無投与群、B 群は50mg/kg、C 群は100mg/kg とし た。E-64-C は飽和 NaHCO<sub>3</sub>溶液にて中和した 後、1/60MPBS にて希釈した、E-64-C はラット腹 腔内投与した場合、10分後に血中濃度がピークに 達するので、注射10分後に全ラットの右足関節を 反復的に20回、足関節角度90°迄背屈した。背屈刺 戟は1日1回とした。背屈開始後、2、3、4、 7、14、21及び28日後にラットを Nenbutal 麻酔下 に殺し、両働 SOL を採取し湿重量測定後組織学的

\*都立神経病院神経内科

\* \* 都立神経病院神経小児科

に検索した.又、心臓より採血し血清 GOT, GPT, LDH, CK の測定を行なった.筋変性の評 価は SOL 全横断面 HE 染色標本に於て、変性に陥 入った筋線維の比率を測定し、次の 6 段階に分類 した.Stage 0 : 0%, I : < 1%, II : <10%, III : <25%, IV : <50%, V : >50%. 実験は必 らず double で行ない、2 匹間で stage に差がある 時は、変性度の強い方を採用した.効果の判定は 障害 stage の比較、血清酵素、SOL 萎縮度の比較 によって行なった.

#### 1. 組織所見

各検査日における各群の SOL の組織変性の強い 方の変性度をグラフにすると図1の如くなった.

結

果







B群 125×



C群 50×

C 群 125× 図2 14日目の各群の SOL 組織像 H&E

まず A 群では 4 日目迄は stage IIに留まり, その 後急速に変性が進み, 7 日目に stage III, 14日目に stage IVとなり, その後は再生が進み stage II~I に戻った. 次に B 群では21日目迄 stage I~IIに 留まり, 21日目以降は stage I となった. C 群では 4 日目に一時 stage IIIになったが 7 日目は stage IIに戻り, 14日目以降は stage IIIから I と辿った.

14日目における各群の SOL の組織所見を図2に 示す. B, C 群では変性は筋の中心部に局在する傾 向が認められた. 又, 再生現象は図2の高倍率の 写真に見られる如く, 各群共同様にしっかりと認 められた.

2. SOL 湿重量比

病側 SOL の萎縮度の指標として健側 SOL に対 する重量比を測定した。結果は表1に示す如く, 各群共80%前後の萎縮を示し,各群間には有意差 を認めなかった。

表1 SOL 湿重量比 (Sample/Control)

Group	Weight (%)	n
Α	81±14	14
В	82±12	14
С	78±11	14
A : E-64-C	()	
B: E-64-C	50mg/kg	
C: E-64-C	100mg/kg	

#### 3. 血清酵素

各群の全経過の血清酵素価を平均したものを表 2に示す。対照と比べ各群共上昇を示しているが、 各群間には有意な差は認めなかった。図2に示し た各群のラットに相当する CK 値の経過による変 動を図3に示すが、図2に照合してみると変性が 強くなる以前に CK は上昇する傾向が認められた。

表2 血清酵素

Group	GOT	GPT	LDH	СК	n
A	130±52	39± 9	1299±594	788±361	14
• В	134±30	44±11	1322±575	709±298	14
С	143±31	43± 8	1486±589	849±331	15
Control	78±7	38± 5	$363 \pm 192$	369± 96	4

A: E-64-C (-), B: E-64-C 50mg/kg, C: E-64-C 100mg/kg



図3 血清 CK 値の推移

#### 4. ラット体重増加率

E-64-Cの副作用の有無を調べる一つとして体重 の増加率を各群間で比較した. 表3にその結果を 示すが, B群はA群よりやや増加率が悪く,一 方, C群はA群より若干良好であったが,有意と は言えなかった.

表3 体重增加率\*

Date Group	2	3	4	7	14	21	28
A	10	27	24	32	66	70	226
В	9	26	22	40	63	72	213
С	14	30	32	46	57	91	234

\* 検査時体重-初期体重 ×100(%)

初期体重 A:E-64-C(-),B:E-64-C 50mg/kg,C:E-64-C 100mg/kg

#### 考 察

過去2年間の実績を踏まえて、今回の実験では local tetanus rat に対し、足関節を1度に20回、 1日1回という背屈刺戟を与えたが、結果として は筋の変性は強過ぎず、弱過ぎず、薬剤効果を判 定する上で至適の強度が得られた。それに対する E-64-C の効果は筋変性を全く抑えることは予想通 り不可能であったが、少なくとも50mg/kg 群、100 mg/kg 群いずれにおいても maximum な変性の程 度を軽減する作用は認められたと言える.50mg/kg 群に比べて100mg/kg 群の方が効果が悪いように見 えるが,これは double で実験して変性の強い方を 採っていることと、ラットの個体差の為、たまた ま100mg/kg 群の一部に変性の強いもの、言いかえ れば local tetanus の強く出たものがあったと考え られる.

電顕的な観察で筋膜の focal な障害は各群間に 差は認められず、この E-64-C の効果は本薬剤の有 する蛋白分解抑制によることが推察された。今回 の実験系はそれでも人間の筋ジストロフィー症に 比べて変性の速度は圧倒的に速く、且つ重篤であ り、人間の疾患の緩徐な変性を考慮すると、E-64 の効果は更に良好なことが期待される。一方、再 生現象について見ると、E-64-C 使用群はいずれの 群も充分な再生が起っており、E-64-C は再生に悪 影響を与えないことが示された。

一方,筋萎縮度を示す SOL の湿重量の対側正常 SOL に対する比率には各群間に有意差を認めなか ったが、これはこの程度の組織学的差異から判断 しても,妥当な結果と考えられた.

又,血清 CK 値を含む血清酵素値についても全体の平均をとると各群間に有意な差は認められなかった.CK は極めて鋭敏な酵素で運動をした後では上昇を示すことも知られており,やはり上記した程度の組織学的差では有意な差が出ないものと考えられた.

ラットの体重増加率にも対照群と比較して E-64 -C 投与群に有意な差はなく,少なく共体重増加率 に見る限り E-64-C の影響は認められないことが示 された.

#### 結 論

- E-64-Cは local tetanus 法の応用により生じた筋ジストロフィー様病変に対して、その変化を軽減する作用が認められた。
- 2. 投与量は100mg/kgは50mg/kgと比較して良好とは言えず、50mg/kgで充分と考えられた。
- 3. 血清酵素値については E-64-C の投与による影響は認められなかった.
- 4. 副作用は認められなかった。

# Ⅴ.遺 伝

## 31) 日本人筋緊張性ジストロフィー症と apolipoprotein C2 遺伝子の連鎖解析

後藤幾生\*

研究協力者 山田 猛\*古谷博和\*\*\*\* 榊 佳之\*\*

はじめに

筋緊張性ジストロフィー症(以下 MyD と略す) は、常染色体優性遺伝性疾患であり、新たな突然 変異による発生は少ないとされている。MyDの発 症年齢は比較的遅く、子供をもうけてからの発症 もしばしばみられる. MyDの予後は比較的良いと はいえ、治療法の開発されていない現在、早期診 断により遺伝相談を行うことは、新たな患者の発 生を予防するうえで重要と考えられる。現在 MyD の病因遺伝子は不明であり、遺伝子レベルでの直 接診断はできないが,病因遺伝子の近傍に位置す る遺伝子あるいは遺伝子産物との連鎖に基づいた 間接診断はある程度可能である。MyDの連鎖解析 については従来 Lutheran 血液型, ABH 分泌型, Lewis 血液型, 補体 C3 や peptidase D との連鎖 が報告されてきたが、いずれも MyD との連鎖は弱 く MyD 診断のマーカーとしては不十分であった. 補体 C3 の遺伝子は19番目の染色体の短腕に存在 することが明らかにされており, MyDの病因遺伝 子も19番目の染色体上に存在すると推定されてい る<sup>1)</sup>. 最近 apolipoprotein C2(以下 ApoC2 と略す) の遺伝子が単離され、19番目の染色体の長腕上に 存在することが明らかにされた2)(図1). 欧米で はMyDとApoC2との強い連鎖が報告され, ApoC2 遺伝子をプローブに用いた DNA 診断の有 用性が示されている<sup>3)4)5)</sup>. そこで日本人 MyD と ApoC2 遺伝子の連鎖解析を行い、日本人 MyD に ついて DNA 診断の可能性を検討した.

\* 九州大学医学部脳研神経内科

\* \* 九州大学遺伝情報実験施設



図1 第19染色体上のC3, ApoC2 および推 定される MyD 病因遺伝子の位置を示す。

#### 方 法

MyD 7 家系34人(患者16人,健常者18人)より 採血を行い,白血球よりDNAを抽出し,サザンブ ロット解析を行った. Restriction fragment length polymorphism(以下 RFLP と略す)の報告されて いる制限酵素 Taq I または Ban I により5~7 µgのDNA を切断し,アガロースゲル電気泳動を 行い, ニトロセルロースフィルターにブロッティ ングした.ハイブリダイゼーションは ApoC2 cDNA を プ ロ ー ブ と し て 使 用 し, 6XSSC, 5XDenhard's, 0.5% SDS,  $100\mu g/ml$ の変性 herring bone sperm DNA, Amersham of Multiprime labelling system により<sup>32</sup>P 標識したプロー ブを加えて65°C, 16時間行った。洗いは0.1 XSSC, 0.1% SDS, 65°C, 1時間行い, autoradiography を行った。

#### 結 果

RFLP は Taq I では allelic size 3.8kb/3.5kb, allelic ratio 0.33/0.67 であり, Ban I ではそれぞ れ 2.7kb/1.3kb, 0.7/0.3 で他の報告と大きな差は認 められなかった.

図2に ApoC2 遺伝子の RFLP を用いた連鎖解 析の結果を示す.3世代について解析が行えた家 系1では、患者は全て父方由来の haplotype bd を 有し、MyD の病因遺伝子と ApoC2 遺伝子に連鎖 があると考えて矛盾しない. 家系2 では父親は死 亡しており genotype の解析は直接行えなかった が、母親と子供の結果より父親の genotype は ac, ac と推定され、MyD 患者は haplotype ac を有 し、MyD 遺伝子と ApoC2 遺伝子が連鎖している と考えても矛盾しない.

家系3~7については両親が健常者であり,連 鎖解析は行えなかった。MyDの発症年齢にはかな り幅があり<sup>9</sup>,優性遺伝性疾患であることを考える と、両親のどちらか一方が発症前の患者と考えら れる。家系3では MyD 遺伝子と allele b, d が同 一染色体上に存在する可能性がある。家系4では 父親が発症前の患者であると仮定した場合,MyD 患者は全て haplotype bd を有することになり MyD 遺伝子と ApoC2 遺伝子が連鎖すると考えて矛盾し



図2 家系図および ApoC2 genotype を示す. ■は患者を示し、□は健常者を示す. 左上の数字は年齢を示す. 斜線は死亡例を示し、年齢は死亡時の年齢である. a, bは Taq I RFLPの allele を, c, dは Ban I RFLPの allele を示す. 白抜き文字は MyDの病因遺伝子と同一の染色体上に存在すると考えられる allele を示す.

ない。一方母親が発症前の患者と仮定した場合は、 姉は MyD 遺伝子と allele a, cが、弟は MyD 遺 伝子と allele b, cが同一染色体上に存在すること になり、母親において MyD 遺伝子と ApoC2 遺伝 子の間で組み換えが起きたことになる。家系5, 6, 7 からは情報は得られなかった。

#### 考 察

今回の研究では,解析の行い得た家系数が少な くまた家系も小さく,MyDとApoC2の連鎖につ いて正確に評価することはできなかったが,連鎖 解析の可能であった家系1と2では連鎖があると 考えて矛盾はなかった.欧米の報告ではMyDと ApoC2の連鎖は強く認められ,lod score 3.32か ら16.29と報告されている<sup>31415</sup>.日本人についても 解析する家系数を増すことにより,強い連鎖を見 いだすことのできる可能性があり,ApoC2遺伝子 をマーカーに用いたMyDの早期診断の有用性はあ ると考えられる.

MyD 遺伝子領域の欠失例は ApoC2 をプローブ に用いたサザンブロット解析では見いだされなか ったが、パルスフィールドゲル電気泳動を併用す ることで欠失例を見いだすことができる可能性が あり、今後の検討が必要である. MyD と ApoC2 の 間の組み換え率は 2 ~ 4 %と報告されている<sup>5</sup>. 哺 乳動物では組み換え率 1 %は遺伝子上の距離では 約2000kb に相当するので、MyD の病因遺伝子と ApoC2 遺伝子の距離は少なくとも4000~8000kb にもなり、ApoC2 遺伝子から直接 MyD の遺伝子 に到達することは困難と考えられる.より病因遺 伝子に近いプローブの開発が望まれるが、第19染 色体の遺伝子から jumping library を作成し、プロ ーブを捜すことも一つの方法である.

#### 文 献

- Davies KE, Jackson J et al: Linkage analysis of myotonic dystrophy and sequences on chromosome 19 using a cloned complement 3 gene probe. J Med Genet 20: 259-263, 1983.
- 2) Jackson CL, Bruns GAP et al: Isolation and sequence of a human apolipoprotein CII cDNA clone and its use to isolate and map to human chromosome 19 the gene for apolipoprotein CII. Proc Natl Acad Sci USA 81: 2945-2949, 1984.
- Shaw DJ, Meredith AL et al: The apolipoprotein CII gene: Subchromosomal localisation and linkage to the myotonic dystrophy locus. Hum Genet 70: 271-273, 1985.
- Pericak-Vance MA, Yamaoka LH et al : Tight linkage of apolipoprotein C2 to myotonic dystrophy on chromosome 19. Neurology 36: 1418 -1423, 1986.
- 5) Bird TD, Boehnke M et al : The use of apolipoprotein CII as a genetic marker for myotonic dystrophy. Arch Neurol 44 : 273-275, 1987.
- 6) Bundey S and Carter CO: Genetic heterogeneity for dystrophia myotonica. J Med Genet
  9: 311-315, 1972.
- 7)本庶 佑ほか:筋緊張性ジストロフィー症のDNA レベルでの病因解析.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61年 度研究報告書, 1987, pp87-92.

### 32)女性筋ジストロフィー患者における細胞遺伝学的 研究並びにリンパ芽球細胞株の樹立

#### 斎 藤 深美子\*

研究協力者 外村

· 晶\* 山 本

#### 目 的

X 連鎖性劣性の遺伝様式を示す Duchenne 型筋 ジストロフィー症(以下 DMD と略す)は、主に 男児に発症するが、日本におけるその頻度は、約 5,000人に1人 (Yasuda et al, 1980) <sup>1)</sup>あるいは 6,531人に1人(吉丸ら, 1984)<sup>2)</sup>と推定されてい る.一方,女性発症例と考えられる患者も多数で はないが存在する. その発症メカニズムは, 以下 の遺伝学的考察から、(1)ホモ接合体の発症(X<sup>d</sup> X<sup>d</sup>) <sup>3)4)</sup>, (2) ターナー症候群での発症 (X<sup>d</sup>O および そのモザイク) 5/~9)、(3) ヘテロ接合体(保因者)の 発症(X<sup>d</sup>X)<sup>10)11)12)</sup>および(4) X 染色体を含む転座 保有者での発症(X/A)<sup>13)~18)</sup>が考えられており, (2)や(4)で示されている様に、数的あるいは構造的 な染色体異常と深い関わりのあることが推測され る. 我々は, これら女性の DMD 発症に関して以 上の様な染色体異常のもつ意義を検討するため. 調査を行なってきた。

一方, Epstein-Bar virus (以下 EB ウイルスと 略す)を感染させた末梢血 B リンパ球由来のリン パ芽球細胞株 (Lymphoblastoid Cell Line: LCL) は, *in vitro* での永代増殖可能な浮遊細胞系であ る.細胞の大量培養が可能なため、今後、分子生 物学的手法を用いた研究を行う場合,研究材料と して大変に有用である.そこで我々は、上記の女 性発症者での細胞遺伝学的検索と並行して、LCL の樹立および細胞の凍結保存も行ってきたので、 その結果をあわせて報告する.

\* 東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞遺伝部門

#### 対象と方法

興太郎\*

一般に,女性 DMD 症と思われる患者の臨床症 状は,男児 DMD 患者の症状程重度ではなく,ま た heterogeneity が存在するため,類似疾患と区別 することが困難なことが多い.そこで対象は以下 の様にした.

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)

方

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

#### 法

#### 1. 細胞遺伝学的検索

対象者からへパリン採血した末梢血約10mlのう ち7~8 mlを,培養液と共に,PHA 添加後48時 間および72時間培養した後に細胞を回収し,0.075 M KCl にて低張処理する.通常どおりに細胞を固 定した後,標本を作製する.染色体分析は,通常 のギムザ染色,トリプシン前処理によるG分染 法,高精度分染法<sup>20</sup>,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 合成期におけ る BrdU 処理による R 分染法により行なった.

2. リンパ芽球細胞株(LCL)の樹立

へパリン採血した末梢血の残りの2~3 mlに等 量の生理食塩水(0.9% NaCl)を加えてよく混合 し、Lymphoprep(比重1.077)の上に静かに重層 した後、2,000rpmで10~15分間遠沈する。分離さ れたリンパ球層をピペットで静かに吸いとり、生 理食塩水、次に FCS 入りの培養液で洗う。最後に 遠沈して集めた細胞を,調製しておいた EBV 液に 浮遊させて、37℃の恒温槽中で約1時間振盪す る. 培養液で洗った後,遠沈して集めた細胞を20 % FCS 入り培養液中に懸濁し,小さなプラスチッ ク培養チューブに入れて,5% CO<sub>2</sub>,37℃の条件 下で培養する. 時々,細胞の状態をチェックしな がら,週2回,培養液を交換する.細胞が増殖し てきたら、24穴のマルチディッシュに移して,さ らに増殖させる.週2回,同様に培養液を交換し ながら細胞の状態を観察し,十分に増殖したら, プラスチック製培養フラスコに移す. さらに安定 して増殖するのを確かめた段階で,細胞の一部を 凍結保存する.

#### 結 果

得られた検体は全部で22例で、(1)孤発例および (2)家系内発症例に分けて表に示した(表1および 表2参照).

1. 孤発例(表1);13名

細胞遺伝学的検索を行った年齢は2歳たっ34歳

までと様々ではあるが、7 (ShSh)および12(KiIs) を除けばすべて発症年齢が7歳以下で、特に2~3 歳のものが多かった、すでに歩行不能の患者もあ り、カッコ内にその時期を示した。また、精神発 達遅延(MR)を示す例も約半数存在した。細胞遺 伝学的検査結果より、13例のうち4例にX染色体 を含む転座染色体が発見された。これらのうち3 例については、X 染色体の不活性化パターンが観 察でき,正常な X が不活性化している割合が,ほ ぼ100%近い(94.5~100%)ことが判明した。X/ 19の転座をもつ1例においては、転座に関与する 染色体セグメントの長さ及びバンドのパターンが 互いによく似ているため, R 分染法を行ったが, 正常な X と転座型 X のどちらが不活性化している かの識別は不可能であった.13例のうち,残りの9 例に関しては、特に染色体異常はみられなかった. 一方,リンパ芽球細胞株の樹立については,全 例に関して試みた結果11例(84.6%)で成功した

Patient	Age at Exam.	Age at Onset	Still Walking	M R	Cytogenet. Results (X <sup>n</sup> inact)
1-Masu	11y	2-3y	+	_	46. X. t (X : 5) (100%)
2-KiSa	14y 7m	2y	-(11y)	-	46. XX
3-TeIn*	16y	2y	-(12y)	+	46, X, t (X : 3) (94.5%)
# 4-ItIt	19y 9m	2-3y	+	+	46. XX
5-YoMo	24y 6m	2-3y	- (14y)	+	46, X, t (X : 15) (96,4%)
6-ReSa	21y 11m	3-y	- (9y)	+	46. XX
7-ShSh	34y 7m	12-13y		+	46. XX
8-Eiso	4y 1m	2-3y	+		46, X, t (X : 19)
9-NaFu	5y 5m	3y 3m	+	()	46. XX
10-NaMo*	2y 11m	2y	+	(-)	46. XX
11-MaSh	9y 4m	3y	- (8y)	`+́	46. XX
#12·KiIs	31y 7m	30y 9	+		46. XX
13-KuSh	13y 5m	6-7y	+	-	46, XX

表1 Female patients with muscular dystrophy I. sporadic cases

表 2 Female patients with muscular dystrophy II. familial cases

_	Patient	Ag Ez	ge at cam.	Age at Onset	Still Walking	M R	Cytogenetic Results (%)
	1-YoYa	22у	1m	5-6y	+	_	46, XX 45, X/46, XX (L20%, F7%)
	2-MoMi	40y		7у	+	-	45, X/46, XX/47, XXX (8,3/90.0/1.7%)
#	3-HaSh*	16y	3m	4y	-(7-8y)	+	46. XX
#	4-ToYa*	30y	7m	6y	- (10y)	+	46. XX
	5-AsTs	3Y	8m	2y 5m	+	_	46. XX
#	6-RyYo	9y	5m	8y	+	_	46. XX
	7-MeKo	14y	2m	10y	+	_	46. XX
	KaKo	11y	lm	10y	+	_	46. XX
@	8-MoYa**	38y		34-36y	+	-	46, XX

(表の#印は樹立できなかった例).

2. 家系内発症例(表2);9名

発症年齢は、2歳~36歳と非常に幅が広く、10 歳を過ぎても歩行可能な人が多い.一方、精神発 達遅延(MR)を示したのは、10歳までにすでに歩 行困難となっている2例のみ(3-HaSh,4-ToYa) で、大半は正常であった。細胞遺伝学的検査結果 については、2例にX染色体の数的異常が発見さ れた.1例(1-YoYa)では、PHA 添加による末 梢血培養法では46、XX の核型を示したが、樹立し たリンパ芽球細胞株では約20%の割合で、45、Xの 細胞が観察された。また、もう1例(2-MoMi) では、末梢血で、45、X/46、XX/47、XXXの核 型が観察され、各々の割合は順に、8.3%、90.0% および1.7%であった。

一方、リンパ芽球細胞株の樹立については8 MoYa以外の症例、計8例について試みた結果、5例(62.5%)で成功した(表の#印は樹立しなかった症例を示す).

#### 考 察

今回、孤発例および家系内発症例に分けて細胞 遺伝学的調査結果をまとめてみたところ以下の2 点が明確になってきた。第1の点は、孤発例にお いては X 染色体を含む相互転座の関与する意義が 大きいということである。またこれらの転座染色 体は、現在までに報告されている約20例13)~18)も含 めて、皆共通して①転座に関与する常染色体側の 方はどれも様々であるが、X 染色体側の切断部位 は皆一様で常に P21である。そして、②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 遺伝子が発現したと考えら れる、次に第2の点は、家系内発症例、つまり保 因者の発症と考えられる症例の中で, Turner 症候 群の特徴的症状を持たず, 妊性も正常にあるか, **`**あると考えられる女性の軽度の発症例に,X 染色 体の数的異常が存在する可能性のあることであ る19). この場合, 消失した方の X が正常で, 残存 した X に DMD 遺伝子が存在すると推定される.

Kunkel らのグループが、DMD 遺伝子座位にお

ける,14kbにもわたる cDNA の完全なクローニン グを行なったと,最近発表した<sup>20)</sup>.彼らの論文によ れば,104人の男児 DMD のうち53人(51.0%)に 欠失が認められ,その切断点は,全体のほぼ中間 に位置する約2 kbのセグメントに集中しているこ とが判明した.今後より詳細に解析が行なわれれ ば,男児 DMD における欠失型突然変異の占める 割合は,さらに大きくなると予想される.

一方,女性 DMD に関する分子生物学的解析に 関しては、ターナー症候群での発症者における de novoの欠失型突然変異の存在<sup>8)</sup>および X/A 転座 例における切断点の検討に関する報告<sup>21)22)</sup>があり、 今後さらに詳細な解析が進むことになろう.今回 我々が樹立したリンパ芽球細胞株は、1-YoYaの 例の様に、モザイクの発見にもつながり得るし、 また、一度樹立してしまえば、培養操作も簡単で、 しかも高い増殖能を有するため、多くの細胞を必 要とする分子遺伝学的解析を行う際に、有用な研 究材料となると思われる。

最後に、本研究は、検体を提供して下さった次 の先生方およびそのスタッフの方々との共同研究 により行ったもので、深く感謝の意を表します. 国立療養所東埼玉病院内科 石原傅幸先生 東京医科歯科大学神経内科 塚越 廣先生 中野今治先生 国立療養所下志津病院神経内科 昭和大学藤が丘病院神経内科 若山吉弘先生 福岡大学医学部小児科 满留昭久先生 佐橋 功先生 爱知医科大学内科 武田伸一先生 信州大学医学部内科 杉田秀夫先生 国立精神・神経センター

#### 文 献

- Yasuda N and Kondo K: No sex difference in mutation rates of Duchenne muscular dystrophy. J Med Genet 17: 106, 1980.
- 吉丸博志、古庄敏行: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ー.杏林 医誌 15:181, 1984.
- 3) Danieli GA, Mostacciuolo ML, Bonfante A and Angelini C: Duchenne muscular dystrophy. A
population study. Hum Genet 35: 225, 1977.

- 4)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 J.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,1986, p79.
- Walton JN: The inheritence of muscular dystrophy: Further observations. Ann Hum Genet 21: 40, 1956.
- Ferrier P, Bamatter F and Klein D: Muscular dystrophy (Duchenne) in a girl with Turner's syndrome. J Med Genet 2 : 38, 1965.
- Jalbert P, Mouriquand CL, Beandoing A and Jaillard M: Myopathie progressive de type Duchenne et mosaique XO/XX/XXX: Considèrations sur la genèse de la fibre musculaire striéi. Ann Genet (Paris) 9: 104, 1966.
- 8) 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, 1986.
- 9) Bortolini ER, da Silva DM, Chequer RS, Vianna-Morgante AM and Zats M : Duchenne muscular dystrophy in a girl with a 45,X/46,XX/47, XXX chromosome constitution. Am J Med Genet 25 : 239, 1986.
- Emery AEH: Clinical manifestation in two carriers of Duchenne muscular dystrophy. Lancet May 25: 1126, 1963.
- Sugita H and Tyler FM: Pathogenesis of muscular dystrophy. Trans Ass Am Physicians 76: 231, 1963.
- 12) Pearson GM, Fowler WM and Wright SH : Xchromosome mosaicism in females with muscular dystrophy. Proc Natl Acad Sci USA 50 : 24, 1963.
- 13) 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, 1985.

- 14) Perez-Vidal MT, Gran ES, Vinas JP, Bayona TV and Rustein P: Distrofia muscular tipo Duchenne en una hembra con una translocation equilibradfa X/6. Rev Neurol (Barcelona) XI: 51, 1983.
- 15) 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 25:432,1985.
- 16) Nevin NC, Hughes AE, Calwell M and Lim JHK: Duchenne muscular dystrophy in a female with balanced X/autosome translocation. Irish J Med Sci 153: 156, 1986.
- 17) Ribeiro MCM, Melaragno MI, Schmidt B, Brunoni D, Gabbai AA and Hackel C : Duchenne muscular dystrophy in a girl with an (X ; 15) translocation. Am J Med Genet 25 : 231, 1986.
- 18) 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, 1986.
- 19) Sano M, Saito F, Yamamoto K, Tonomura A and Tsukagoshi H : Duchenne muscular dystrophy in a female with 45,X/46,XX chromosome constitution. Jpn J Hum Genet : in press.
- 20) Kœnig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C and Kunkel LM: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50: 509, 1987.
- 21) Boyd Y, Munro E, Ray P, Worton R, Monaco T, Kunkel L and Craig I: Molecular heterogeneity of translocations associated with muscular dystrophy. Clin Genet 31: 265, 1987.
- 22) Bodrug SE, Ray PN, Gonzalez IL, Schmickel RD, Sylvester JE and Worton RG: Molecular analysis of a constitutional X-autosome translacation in a female with muscular dystrophy. Science 237: 1620, 1987.

# 33) Duchenne型筋ジストロフィー症の遺伝子診断

荒木淑郎\*

誠\* 研究協力者 聖 治\* 村 上龍 文\* 内 野 西 前田秀一郎\*\* 典\*\* 寺 郎\*\*\* 島 田 和 本 仁

#### はじめに

近年, Duchenne 型筋ジストロフィー症(DMD) の病因遺伝子近傍に局在する DNA 断片がクロー ン化され, RFLP(制限酵素切断で生じる DNA 断 片の多型性)を利用した DMD の保因者診断が可 能となった<sup>11</sup>. 日本人 DMD においても,これら DNA 断片を用いた RFLP 解析が有用であること が,既に本班において報告されている.そこで, 今回我々は,CK 値の測定など従来の方法では判定 が困難であった保因者の同定及び DMD 発症機序 の解明に重要と考えられる欠失症例の検索を目的 として, Kunkel らより供与を受けた DNA プロー ブを用い,熊本県の症例で, DNA 診断を試みた.

#### 方 法

DNA プローブは, Kunkel らより供与を受けた pERT87-1, -8, -15を 用 い た<sup>11</sup>. こ れ ら は, DMD, Becker 型筋ジストロフィー症 (BMD)の 数%において欠失を検出し<sup>21</sup>, DMD 病因遺伝子の 近傍もしくは病因遺伝子内に存在すると考えられ ている<sup>31</sup>. これらのプローブは, **表1**に示すような RFLP を検出する<sup>21</sup>. 患者およびその家族の末梢血

表 1	2)	RFLP-detecting	subclones	of	pERT87
-----	----	----------------	-----------	----	--------

Subclone	Insert size	Enzyme	Allele	size	
	(Kb)		р	q	(Kb)
pERT87-1	1.3	BstNI XmnI	3.1 8.7	2.5	/0.6 .5
pERT87-8	1.3	BstNI TaqI	$4.4 \\ 2.7/1.1$	2 3	.2 .8
pERT87-15	1.5	BamHI TaqI XmnI	7.1/2.3 3.1 1.6/1.2	9 3 2	.4 .3 .8

\* 熊本大学医学部第一内科

\*\*熊本大学医学部第一生化学

\* \* \* 国立療養所再春荘病院

白血球より抽出した DNA を制限酵素で切断し, 電気泳動後,上記プローブを用いてサザンブロッ トハイブリダイゼーションを行ない,バンドを検 出した.プローブは,マルチプライムラベリング システムにより<sup>32</sup>PdCTP で標識した.

#### 結果および考察

図1に pERT87-8 による解析例を示す. 14歳男 児は DMD 患者で, 13歳と7歳の妹があり, 13歳 の妹は CK が高値を呈している. Bst XI による RFLP 解析で, 父親は2.2kb のへミ接合体, 母親 は4.4kb, 2.2kb のヘテロ接合体, DMD 男児は4.4 kb の band を示し, 13歳と7歳の女児は4.4kb, 2.2kb のヘテロ接合体であった.このことから DMD は4.4kb の band と連鎖していると考えられる. 従 って上の13歳の女児と同様, 下の7歳の妹も保因 者の可能性が高い.

図2の家系は、DMD 狐発例である。母親の血 清 CK 値は正常であり、pERT87-8 TaqIRFLPに おいて、3.8kb  $\geq$ 2.7/1.1kb のヘテロ接合体である。 18歳の DMD 男児は、2.7/1.1kb の band を有して いる。このため、2.7/1.1kb の band  $\geq$  DMD が連 鎖していることが考えられた。しかしこの弟も、 DMD の兄と同様に、2.7/1.1kb の band をもつ。 従って、この家系においては、新しい突然変異に よる DMD 発症例か、あるいは交叉が生じた例と 考えられるが、さらに他のプローブによって検討 中である。

以上2家系について RFLP 解析例を示した. 現 在さらに多数の家系において,保因者診断,欠失 例の検索を行なっている.また,今回の RFLP 解 析には、<sup>32</sup>P 標識プローブを用いたが,今後,一般 の検査室レベルで DNA 診断を行なうためには,放





kЬ



pERT87-8 BstXI

図1

-199-



pERT87-8 Taql

図 2

-200-



32 P 標識

ピオチン標識

図3 FAPのDNA診断

射性同位元素 (RI) を用いないサザンブロットハ イブリダイゼーションが有用と考えられる. 我々 は、ビオチン標識プローブによる、家族性アミロ イドポリニューロパシー (FAP)のDNA 診断を 試み,良好な結果を得た.図3は,正常(N),FAP 患者(F)について、サザンブロット解析を行なっ たものである.<sup>32</sup>P 標識プローブほど鮮やかではな いが、ビオチン標識プローブによっても診断でき ることが明らかとなった. ビオチン標識プローブ は,<sup>32</sup>P標識プローブに比較すると、一回の標識で 長期保存が可能であり,汚染の恐れもなく,今後 臨床検査レベルで DNA 診断を行なう上に有用であ ると考えられる. 今後は、多数の DMD, BMD 症 例について DNA 解析をすすめるとともに、非 RI 標識による遺伝子診断についても検討していく予 定である.

文 献

- Monaco AP, Bertelson CJ et al: Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. Nature 316: 842, 1985.
- 2) Kunkel LM & co-authors: Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. Nature 322:73, 1986.
- 3) Koenig M, Hoffman EP et al : Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50: 509, 1987.

### 34) Duchenne型筋ジストロフィーのDNA診断

#### 鈴木義之\*

研究協力者 新本美智枝\* 辻 明彦\* 楊 瑞成\*

#### はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 及び Becker 型筋ジストロフィー (BMD) は,近年 Kunkel ら<sup>1~3)</sup>や Worton ら<sup>4,5)</sup>により遺伝子座が解 明された. その遺伝子座内に制限酵素断片長多型 (restriction frogment length polymorphism: RFLP)を示すいくつかのプローベを用いて,連鎖 解析による保因者診断,出生前診断が行われるよ うになった. 我々は DMD 遺伝子座内,もしくは その近傍に座位を有する数種のプローベを用いて, DMD 及び BMD 患者家系の家系分析,保因者診 断を行ってきた. これらの家系の中には DMD 遺 伝子座内で交叉が生じている家系が見出された. また, DMD 遺伝子座内に欠失が生じている例もあった。今回我々はこれらの交叉,欠失を中心に DMD, BMD の遺伝子診断の結果について報告する。

#### 対象及び方法

#### 1) プローベ

図1に現在我々が連鎖解析に用いているプロー べのX染色体上でのおおよその位置を示す。プロ ーベpERT87シリーズは, Kunkelら<sup>1,2)</sup>により, XJ シリーズは Worton ら<sup>4</sup>により, 現在 DMD 遺伝子



<sup>\*</sup>国立精神 #国立抽経センター神経研究所疾病研究第五部

座の一部として同定されている.これらのプロー べの日本人における多型頻度は,すでに報告した<sup>6)</sup>.

\* 2) DNA の抽出

臨床的に診断の確立した DMD, BMD 患者及び その家族から得られた末梢血より Blin ら<sup>n</sup>の方法に 従い, プロテアーゼ K 処理, フェノール抽出, リ ボヌクレアーゼ A 処理で DNA を抽出した. その DNA 5  $\mu$ g を 3 倍過剰の各種制限酵素で切断し た.

3) サザンブロット

0.7%アガロースゲル電気泳動後,サザンブロット法により DNA 断片をニトロセルロース膜へ転写した.

4) ハイブリッド形成

ニックトランスレーションにより<sup>32</sup>P ラベルした DNA プローベを用いてハイブリダイゼーション 後, -80°C でオートラジオグラフィーを行った.





図2 DMD 遺伝子内交叉例

#### 結 果

1) DMD 遺伝子座内での交叉

我々はこれまでに DMD38家系, BMD 5 家系, 合計43家系について連鎖解析を行ってきた. これ らの家系のうち 2 家系において DMD 遺伝子座に 交叉が認められた.

図2に交叉が生じていた家系の例を示す.各々 のプローベに対する多型バンドは図中に示すよう に、便宜上分子サイズの大小に対してアルファベ ットの大文字と小文字をあてて示している.

この家系 (DMD-17) では4人の DMD 患者の うちII-2, II-3の患者と母親(I-2)の多型バ ンドのパターンから,母親の dFLtkp を示す側の X 染色体に DMD は連鎖していると考えられる. 従って患者の妹(II-1)は患者と同じ X 染色体を 母親から受け継いでおり,保因者であると診断さ れた.この家系の患者 II-4 において,DMD 遺伝 子座内に交叉が生じていた.患者 II-4 は dFLt と 先の二人の患者(II-2, II-3)と同じ X 染色体 を母親から受け継いでいるが、プローベ pERT87 -15と pERT87-8の間で交叉が生じ、続いて KPC ともう一方の側の X 染色体を母親から受け継いで いた.以上の結果より、この家系の DMD の病因 となった突然変異は pERT87-15側に生じたという 結論が得られた.

もう一つの家系の交叉はプローベ pERT87-1と XJ5.1の間で生じており,この家系の病因となった 突然変異は pERT87-1 側に生じていた(図は省 略).

2) DMD 遺伝子座内での欠失

これまでに分析した家系のうち5家系のDMD 患者にDMD 遺伝子座内で欠失が認められた. 図3 にこれらの家系のうち一つの家系の例を示す.

この家系 (DMD-37) においては発端者 (III-1) の pERT87-15に対する多型バンドが欠失してい た.この患者の他のプローベに対する多型バンド は正常であった.通常ホモ接合型の女性の場合, 多型バンドの濃さは男性のそれの2倍になる.と

> J-Bir:S 5 87-30:T t 87-15:L l 87-8:K k 87-1:P p XJ-1.1:Q q





図3 DMD 遺伝子内欠失例

ころが母親(II-2)と妹(III-2)のpERT87-15 のバンドは父親と同じ濃さであり,両者において も一方のX染色体のpERT87-15に対する多型バ ンドは欠失していると考えられる.また発端者の 妹(III-2)は他のプローベの多型バンドからも, 患者と同じST欠失 kPqを示す側のX染色体を受 け継いでいると考えられ,保因者であると診断さ れた.妹(III-2)のCPK 値は高値であり,この ことからも先の結果は裏付けられた.

図4にまとめてこれらの DMD 患者の欠失の範 囲を示す. DMD-19の家系の二人の患者の臨床症 状は比較的軽く,現在9歳と7歳であるが,通常 の歩行が可能である.他の家系の患者は典型的な DMD の臨床経過を示している.

3) プローベ754に欠失を示す患者

図5にプローベ754に対する多型バンドが欠失し ている患者家系を示す.この家系の患者は、生後 8ヶ月時に筋力低下、筋萎縮が認められた.症状 は軽く、4歳の現在、仮性筋肥大も少なく、歩行は ー応可能である. 典型的な DMD とは異なり精神 遅滞を伴っている. この患者において, プローベ 754とそのサブクローン754-11に欠失が認められ た. DMD 遺伝子座内にあるプローベ pERT87シリ ーズや XJ シリーズに対する多型バンドは正常であ った.

#### 考 察

Kunkel らは pERT87シリーズのプローベを用い てヒト胎児筋肉からの cDNA ライブラリーより14 kb に及ぶ DMD の cDNA をクローンした<sup>3</sup>. この cDNA の genomic DNA での分布から,現在 DMD 遺伝子座は2000kb にも及ぶ大きなものであろうと 予想されている.従って,その中の一部のプロー べを診断に用いても病気との間に交叉が生じる可 能性がある.多くの欧米人における DMD 患者家 系の連鎖解析の結果から,プローベ pERT87シリ ーズ,XJ シリーズと DMD との間に 6 %の割合で 交叉が生じることが報告されている<sup>9</sup>. 我々が分析



図4 欠失例の欠失部位



図5 プローベ754の欠失例

した日本人の DMD 患者家系においても,43家系 中2家系に,DMD 遺伝子座内のプローベ間で交叉 が認められた.このような高率で遺伝子座内に交 叉が生じることを考慮に入れ,DMD の保因者診断 を行う場合,DMD 遺伝子座をはさむ形で複数のプ ローベを用いることが,診断の精度を上げるため に有効であると考えられる.

DMD 患者における欠失については、欧米人において広く調査され<sup>9)</sup>,現在プローベ pERT87シリー

ズ、XJシリーズを用いた場合、11%の割合で欠失 が見出されると報告されている<sup>5)</sup>.日本人において も同様に43家系中5家系で欠失が認められた.欠 失の範囲は家系により様々であった.欠失例はま だ少なく、DMDの臨床症状とDMD遺伝子座にお ける欠失の位置、または大きさとの相関について は、現在不明である.

DMD の cDNA を診断に用いた場合,患者の50%に欠失が見出されると報告されている<sup>3)</sup>.患者に

おいて欠失が認められる場合,保因者診断は容易 になる.現在我々は DMD の cDNA を用いた診断 を検討中である.

プローベ pERT87シリーズ、XJ シリーズの多型 バンドは正常であるが、754、754-11に対する多型 バンドが欠失している筋ジストロフィーの患者を 認めた、プローベ754は DMD 遺伝子座の動原体側 にある.この患者の欠失部分は、DMD 遺伝子座の 調節部位を含んでいる可能性があり、重要な症例 と考えられる.この患者の欠失が DMD 遺伝子座 のどのあたりまでかかっているかをさらに詳細に 調べ、臨床症状との相関について、今後検討して いく予定である.

これらの欠失が認められた家系については、リ ンパ球を EB ウイルスにより株化して詳しい欠失部 位の解析に用いる計画である。

終りに,御協力いただいた瀬川小児神経学クリ ニック,瀬川昌也先生,野村芳子先生に深謝致し ます.

#### 文 献

 Monaco AP, Neve PL, Colleti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM and Kunkel LM : Nature 323 : 646-650, 1986.

- 2) Monaco AP and Kunkel LM: Trends Genet 3: 33-37, 1987.
- Koenig AP, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C and Kunkel LM: Cell 50: 509-517, 1987.
- Thompson MW, Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Oss I and Worton RG: J Med Genet 23: 548-555, 1986.
- 5) Burghes AHM, Logan C, Hu X, Belfall B, Worton RG and Ray PN : Nature 328 : 434-437, 1987.
- 6) 鈴木義之,新本美智枝,辻明彦: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,1987,pp146-149.
- 7) Blin N and Stafford DE : Nucleic Acids Res 3 : 2303-2308, 1976.
- Fischbeck KH, Ritter AW, Tirschwell DL, Kunkel LM, Bertelson CJ, Monaco AP, Hejtmancik JF, Boehm C, Ionasescu V, Ionasescu R, Pericak-Vance M, Kandt R and Roses AD: Lancet 2: 104, 1986.
- Kunkel LM, and co-authors. Nature 322: 73-77, 1986.

# 35) 女性発症例を含むDMD家系の 遺伝子解析について

中西孝雄\*

研究協力者 小松義 成\*金澤 一郎\* 近藤 郁子\*\*杉田 秀夫\*\*\*

はじめに

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー(以下 DMD)は伴性劣性遺伝型式をとり、男子にのみ発 症し、女性における発症は稀な病態であるとされ ているが、我々はこれまでに本班会議でその2家 系を報告してきた<sup>1)29</sup>.

Turner 症候群を除いた女性発症例出現のメカニ ズムとしては、

1) Lyonization 仮説<sup>3)</sup>, すなわち X 染色体のラ ンダムな不活性化が起こらずに正常 X 染色体が偏 位をもって不活性化されることにより異常染色体 保有の症状が発現する, という説がある. 実際, 母親がヘテロでない女児における Lesch-Nyhan 症 候群の発症機構を検討したところ, 母親由来の X 染色体上で HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) 遺伝子の完全欠損がお き, 父親由来の X 染色体が特異的に不活化されて いることを明らかにした報告がある<sup>4)</sup>. しかし, DMD の場合は, 筋疾患であり, 筋は融合した細胞なの で, このことは証明しえない.

2) つぎに, Lyonization の特殊型ともいうべき もので、X 染色体と常染色体の相互転座による正 常 X 染色体の不活性化によるとする説. すなわ ち、血友病、ornithine carbamyl transferase 欠 損症、 $\alpha$ -galactosidase 欠損症、外胚葉形成不全症 などで、正常 X 染色体が不活性化した上で常染色 体の転座に際して欠損した遺伝子座が発現したと 考えられるものである. しかし、この症例はすべ て突然変異によるものであり、X との連鎖が証明 されている家系での女性発症例を説明することは できない.また、この患者に子供ができた場合に は、DMD だけではなくこれに X 染色体の部分欠 損にもとずく症状も伴うものとなる.従来はこの 2つの考えが挙げられてきた.

3)これに対して、最近 DMD 家系の遺伝子解 析については、Kunnkel らにより pERT87クロー ンをマーカーとした RFLP 検定により、遺伝子連 鎖の検討が可能となってきた<sup>5)</sup>ことに鑑み、第3の 考え方の可能性を検討する必要がでてきた.すな わち、女性発症例の遺伝子型の2つの遺伝子のう ち、1つは保因者である母由来の異常遺伝子、そ してもう一方は父のX染色体のX p21付近に減数分 裂に際して突然変異を起こした異常遺伝子である と考えれば、女性にも発症しうるものであり、し かもこの仮説は DNA 分析によりその証明が可能で あるとする考え方である.すなわち、DMD 遺伝子 にたいしての、allele は異なるが compound homozygote であることによって発症したのではないか とする仮説である.

そこで本研究では、1) pERT87のサブクローン をマーカーとした RFLP により、我々の DMD で 遺伝子連鎖が証明できるか否か、2) 女性発症例 の発症メカニズムに、第3番目にあげた仮説であ る、父由来の X 染色体の遺伝子レベルでの変異が 関与することがあるか否かを調べることを目的と して、DMD 4 家系について遺伝子解析を行なっ た.

<sup>\*</sup> 筑波大学臨床医学系神経内科

<sup>\*\*</sup>筑波大学基礎医学系人類遺伝

<sup>\*\*\*</sup>国立精神センター神経研究所疾病研究第一部

#### 対 象

対象は、女性発症例を含まない2家系(H, J家 系)と女性発症例を含む2家系(N, S家系),計 4家系である(図1, 2, 3, 4). 保因者の同定 は家系図および CPK 値によって行なった.N家系 とそのなかの女性発症者については既に本班会議 において報告してある<sup>1)</sup>のでここでは触れないが、 S家系(図4)について簡単に述べておく、女性発 症者III-1については、その母の弟II-4は幼時期 に発症した近位筋の筋力低下があり、Gowers 徴候 が認められ、小学校高学年で歩行不能となり、20 歳で死亡したが、知能は非常に良かったというこ とから、病歴で判断するかぎり典型的な DMD で あったと考えられる。また母II-3は CPK が高値 を呈し、筋電図ならびに筋生検で筋原性変化の所 見が得られている。さてIII-1は小学校までは正常

H family









S family



であったが、中学校入学後、頸部と下肢近位部に 筋力低下が、腓腹筋に仮性肥大が認められ、CPK が高値を呈し、筋電図で筋原性変化の所見が得ら れたことより女性発症者であると診断した.

#### 方 法

遺伝子解析の方法は、患者および家族より8ml

Xpter.		
pERT87-15	(TaqI XmnI	(F: 3.1, f:3.3) (B: 1.6/1.2, b:2.8)
l pERT87-8	(TaqI BstXI	(E:2.7/1.1, e:3.8) (D:4.4, d:2.2)
 pERT87-1 ↓	(BstNI XmnI	(C:3.1, c:2.45/0.65) (A:8.8, a:7.5)
X cent.		図 5

ヘパリン採血し, EB ウイルスとサイクロスポリン にてリンパ球の芽化を行なったのち, DNA を抽出 した. この DNA をサザンブロティングハイブリダ イゼーション法によって分析したが,その際用い た probe は Kunkel らから提供された pERT87サ ブクローンである, pERT87-1,-8 および-15の 3種である.図5に示したように,pERT87-15に よっては制限酵素 Taq I では3.1kb(F)および3.3 kb (f) を,さらに Xmn1では1.6/1.2kb (B) お よび2.8kb (b) を識別した.同様に,pERT87-8 によっては Taq I では2.7/1.1kb (E) および3.8 kb (e) を, さらに Bst Xl では4.4kb (D) および 2.2kb (e) を識別した. そして pERT87-1によっ ては Bst Nl では3.1kb(C)および2.45/0.65kb(c) を, Xmn l では8.8kb (A) および7.5kb (a) を 識別した.

#### 結果および考察

女性発症例を含まない2家系では,まずH家系 (図6)での保因者の母と発症の男児が共通の haplotypeをもち,J家系(図7)での保因者の祖 母,母および発症者の男児が共通の haplotypeを もつことがわかり,これらの probe にて遺伝子連 鎖を確認することができた。従ってこの方法は高 い確度をもって診断可能なものであるといえる。

一方,女性発症例を含むN家系(図8)では, 女性発症者と,発症の男児が共通のhaplotypeを





有し、非発症の男児はそれとは異なる haplotype を もつことがわかった。女性発症者である母の1つ の遺伝子が病的なものと考えることによって、男 子の発症は説明でき、もう1つの遺伝子が正常な 男児に伝わりその男児が正常であるので、発症女 性の一方の遺伝子は正常であるといわざるをえな いことから、我々の仮説を支持する結果ではなか ったといえる。

つぎに、S家系(図9)では、女性発症者の他、 保因者である祖母、母、妹のすべてが共通のhaplotypeを有し、女性発症者のもう1つのhaplotypeは父のそれと一致していた.ここで女性発 症者S4は、父親から同じhaplotypeをうけつい でいることから、母親S2からうけとった異常遺 伝子のみで発症していると考えられる。このこと は、S4の姉妹であるS6が遺伝子型としては発 症者と同一であるにもかかわらず、非発症保因者



S family



N family

にとどまっていることからも支持される. すなわち, この家系においても, 女性発症のメカニズムに父親の遺伝子レベルでの突然変異が関与する証拠を得ることはできなかった.

N 家系とS 家系を併せて考えて、われわれの仮 説は証明できなかったものの、仮説そのものが否 定されたわけではなく、今後症例を重ねることに よって、この仮説で証明しうる女性発症者を見い だす努力を続ける必要があると考える.

謝辞:最後に,サザンを御担当下さいました都 立神経研究所の小泉先生,ならびに御指導を頂き ました都立臨床研究所の鈴木紘一先生に深謝いた します.



- 中西孝雄ら: Duchenne 型筋ジストロフィー症の母子発症例. 厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究・三好班昭和53年度研究報告書, 1979, pp76-79.
- 2)中西孝雄ら:Duchenne型筋ジストロフィー症が疑われる女性例.厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究・三好班,昭和58年度研究報告書,1984,pp76-79.
- Lyon MF: Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.). Nature 190: 372, 1961.
- 4) 小笠原信明,後藤治子:女児における Lesch-Nyhan 症候群の発症機構.細胞工学 5:916,1986.
- 5) Kunkel LM et al : Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. Nature 322 : 73, 1986.

-212-

# 36) 欠損を伴うDMD遺伝子の検出

鈴木紘一\*

 研究協力者
 大野茂男\*
 秋田朗子\*
 今野保彦\*

 斎藤深美子\*\*
 山本興太郎\*\*

#### 目 的

DMD 遺伝子の解析は Kunkel ら<sup>1)</sup>の研究により 最近飛躍的に進み, cDNA の全長約14kb がクロー ニングされ,約2000kb にわたる遺伝子の構造も明 らかにされつつある.このような状況の下で当面 の課題は DMD 遺伝子によってコードされる遺伝 子産物の同定と,DMD 患者における変異と病因の 解析である.Kunkel らはこれまでに解析した104 例の DMD 患者のうち53例が欠失を伴う変異であ ることを報告している<sup>1)</sup>.欠失を伴う変異であ ることを報告している<sup>1)</sup>.欠失を伴う変異による DMD は比較的まれであると考えられていたにもか かわらず,実際には DMD 患者の半数以上に欠失 がみられ,DNA の欠失が DMD の主因と予想され るようになった.我々は DNA の欠失に焦点を絞 り,DNA の変異部位と DMD の発症の相関を解析 することを目標に研究を進めている.

DMD 遺伝子部位の DNA の欠失は RFLP を分 析する場合と同じく,通常次のようにして行う. 即ち,リンパ球の DNA を制限酵素で切断し,電気 泳動で分離した DNA 断片をニトロセルロース膜に 転写し,適当な DNA プローブでバンドを検出し, 生じる DNA 断片のパターンから DNA の欠失の有 無を判定している.この方法では,患者と共にそ の家系を分析する必要があり,使用できる酵素も 多型性が出現するものに限られるなどの制限があ る.また,分析に多くの時間,労力,経費が必要 なためマススクリーニングに適した方法とは言え ない.そこで,我々はまず欠失を伴った DMD 患 者を手軽に検出する方法の開発を試みた.本年度 は,既に欠失が明らかにされている DMD 患者の DNA を使ったモデル実験を行い, DNA スロット ブロット法が DNA の欠失を検出する手軽な方法と なるか否かを検討した.

#### 方 法

斎藤ら<sup>2</sup>によって見出されたグリセロールキナー ゼ(GK) 欠損症を併発した DMD で pERT87-1 から15領域の DNA を欠失している症例<sup>39</sup>を材料と した. EB ウイルスでトランスフォームした患者と その母親のリンパ球,コントロールとして正常女 性及び46XXXX (4M1416) のリンパ球を用いた. 単離したリンパ球から Applied Biosystems 社の核 酸抽出機 (340A 型)を使って DNA を精製した. アガロースゲル電気泳動で検定した限りでは,え られた DNA は分子量的にも純度的にも従来法で精 製した DNA とほぼ同等であった.

DNA を超音波処理 (300W, 30秒×2回) で約 0.5~1 kb に細断し,S & S 社の Minifiltration manifold を使い Hybond N 膜に帯状 (スロット) に0.5~2  $\mu$ g の DNA を添付した.上記膜上の DNA をアルカリ変性後 UV 照射で固定し,サケ精 子 DNA と prehybridization を行った.次に同じ 条件 (65°C) で<sup>32</sup>P-ラベルのプローブ pERT87-1 と hybridize させ,最終的に膜を0.1×SSC-0.1% SDS 中で65°C, 20分,2回洗浄し,ラジオオート グラムを取った.pERT87-1の他にプローブとし てオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC),カ ルシウム依存性プロテアーゼ (CANP) の cDNA を用いた.

#### 結 果

DMD 患者の DNA 試料が, OTC プローブでは 欠損していないが, pERT87-1 では欠損している

<sup>\*</sup>東京都臨床医学総合研究所

<sup>\*\*</sup>東京医科歯科大学難治疾患研究所

ことを図1(上部)に示す. 母親では2本のX染 色体のうち,1本は正常だが他の1本には欠損が ある.これらを模式的に図1の下半分に示した. これらの試料を使ってスロットブロットを行った

結果が図2である。各写真の右側の数字は用いた プローブと反応すると思われるハプロイド当りの DNA のコピー数である。

CANP 遺伝子は X 染色体上にはないので, サケ の DNA 以外はすべて 2 コピー, OTC 遺伝子は X 染色体にあり,患者でもこの部位は欠失していな いのでコピー数は試料中の X 染色体の数に等し い.pERT87-1をプローブにすると,X 染色体の うち X'には欠損しているので,患者と母親では OTC よりコピー数が1少なく,患者では明らかなバン ドの消失が見られる.図2のバンドをデンシトメ ーターでトレースしたのが図3である.ブロット する DNA の量を正確に合せることは難しいが, CANP と OTC プローブによるバンドの濃度から 各々添加した全 DNA 量と X 染色体量が標準化で きる. このトレースの結果からも X'が CANP と OTC に関しては正常であるが, pERT87-1の領域 が明らかに欠損している.

以上の結果は DNA の欠損が確定している DMD 患者に対し, pERT87-1 プローブを用いて行った モデル実験ではあるが, スロットブロット法で DNA の欠失を検出でき, バンドの濃度を定量すれば, 患者の母親のような部分欠失でも検出できること が判明した.

#### 討 論

pERT87のように DMD 遺伝子そのものをプロー ブに使った RFLP 分析では, 解析の結果見出され た DNA の欠失は, 交叉の可能性を除けば疑問をは さむ余地は少ない.しかし, RELP 法は多数の試



図1 RFLP 法による pERT87-1 領域の欠損の検出と欠損部位の模式図







料を検討する方法としては現実的でない. ここで 用いたスロットブロット法はこれに対し次の利点 がある. ①家系分析によらず,患者だけの分析で よい. ②結果が欠損と出た場合には問題がない. ③ DNA をブロットした膜は何回か繰返し使用でき るので幾つかのプローブの結果が直接比較できる. ④プローブを組合せて使えば欠損の位置,大きさ 等の概略がわかる. ⑤労力,時間,経費の点で RFLP 法に比べ非常に優れているので多数の試料が処理 できる.

しかし、一方では、検定可能な症例が限定され るおそれがあり、幾つかのプローブをあらかじめ 用意し、使用するプローブが cross hybridization しないことをチェックする必要がある等の問題点 が考えられる.

スロットブロット法における最大の利点は時間, 労力,経費の節減である。スロットブロットのみ を行う時には,DNAの精製はずっと簡単になり, 抽出精製からDNA-フィルターの作製までを3時 間で終え,直ちに hybridization,オートラジオグ ラム(3~5日必要)に進むことができる。RFLP 法ではDNAの抽出精製に3~5日(今回使用した 機械を使えば1日),電気泳動,サザンブロットを 行ってDNA-フィルターを作るのに2日,さらに その後 hybridization,オートラジオグラム(3~5 日)を行うので,全部で約2週間かかる。スロッ トブロット法の最大の問題点はプローブの選択で ある。現在入手可能なものは pERT87など数種の 染色体 DNA 断片と,DMD の全長をカバーする cDNA 断片である。欠失は染色体 DNA の問題 で,検出が可能な限り出来るだけ小さな染色体 DNA 断片を DMD 遺伝子の全長にわたってとりそ ろえておけば、これらをプローブにして欠失が確 実に検出できる.しかし,現在簡単に入手できる のは cDNA 断片で、染色体 DNA ではない、 cDNA の大きさは DMD 遺伝子の約1/150で, cDNA の 1 kb は染色体 DNA の平均約150kb に相当する。 スロットブロット法では用いるプローブの全長が 完全に欠失していないと検出できないので、1 kb の cDNA をプローブにすると, 150kb 以上の欠損 しか検出できない. しかし, Kunkel ら"は2種類 の cDNA プローブを使って約80%の欠失を実際に 検出しているので、うまいものを選択すれば cDNA をプローブにしても事実上は検出できる可能性が ある。今後はさらに細かい条件を確立し、使用可 能な cDNA プローブを選別し, 実際の分析に応用 したい。

#### 文 献

- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C and Kunkel LM: Cell 50: 509-517, 1987.
- Saito F, Goto J, Kakinuma H, Nakamura F, Murayama S, Nakano I and Tonomura A : Clin Genet 29: 92-93, 1986.
- Akita Y, Ohno S, Goto J, Nakano I, Takaku M, Sugita H and Suzuki K : Jpn J Human Genet 32 : 71-82, 1987.

Ⅵ.生 理 学

# 37)ジストロフィー筋の収縮特性と 細胞内小器官の元素分析

#### 吉 岡 利 忠\*

研究協力者 玉木哲朗\*竹倉宏明\*

#### はじめに

筋細胞内における蛋白同化活性より異化の高進 は筋変性をもたらす大きな要因の1つとなる。筋 ジストロフィー症における筋収縮蛋白系の崩壊に は、カルシウム依存性プロテアーゼ (CANP) が 強く関連していると考えられ、実際 Duchenne 型筋 ジストロフィー症 (DMD) ではかなり高い濃度の カルシウムイオンが検出されている<sup>2</sup>. また、筋ジ ストロフィー症モデル動物である mdx マウスの筋 細胞のカルシウム濃度を電子線プローブ微量元素 分析法 (EPMA)を用いて測定してみると高い分 析値が得られた<sup>7)</sup>. 本報告では、実験動物の数を増 やして他の元素を含めて分析するとともに緩筋及 び速筋における収縮特性について検討を加えてみ 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) およびその対照マウスから 緩筋であるひらめ筋 (SOL) および速筋である長 趾伸筋(EDL)を摘出し,左側を元素分析用に液 体窒素で冷却したフレオン液(-165°C)を用い瞬 間凍結し,超薄切片を作り,真空乾燥後,特殊冷 却ホルダー(-100°Cに調節)を用い電子顕微鏡と X線検出器から各元素(Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca)を分析,定量した<sup>3)7)</sup>.

右側の筋束は,95%酸素をバブリングしている クレブスリンゲル液(37°C)に浸漬し,白金プレー ト電極を介したフィールド刺激を与え,単収縮, 強縮,連続刺激による疲労曲線などが記録された.

#### 結 果

生後2カ月半のmdx マウスおよびコントロール のSOLおよびEDLの単収縮,強縮および10Hz刺 激によって得られた連続単収縮とその張力減衰過 程,それに続く電気刺激に対する反応が無くなる までの経過から、それぞれの筋の収縮特性を知る ことができる(図1,2).疲労曲線の疲労に至る までの時間は、mdxマウスにおいて延長する傾向 にあり、特にEDLで著明であった(表1の





図2 長趾伸筋の収縮様式

"CFT"). その他の特徴では,やはり EDL におい て認められ,筋重量当りの発生張力は対照に比較 して減少し (表1の "F/MW"),完全強縮を生ず る刺激頻度は,mdx マウスで125 $H_z$ (対照で156 $H_z$ ) と減少している(表1の "FQ"). SOL のそれぞれ の項目においては大きな変動はなく(表1),この 年齢における mdx マウスで EDL に対する影響が 強く認められた.

EPMA で求められる元素分析は、1 個の細胞全体 (large-cytoplasm),太・細フィラメントの部位 (small-cytoplasm),およびミトコンドリアから得られた.Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>などは筋の摘出,凍結処理,あるいは薄切時に受けた損傷 (すなわちdamaged-fiber)によって高い濃度を示し,また K<sup>+</sup>は激減するので,これらの細胞は分析結果から除いた.SOL および EDL の Na, Mg, P, S, Cl および K の濃度については、例数が少ないこともあるが、有意な差は認められなかった.**表2**には濃

度に変動があったカルシウムについてのみ示して ある.全般的に mdx マウスの両筋において高いカ ルシウム濃度が得られた. 核を除くようにして筋 形質に照射された8~10µm 直径のプローブから得 られる1個の細胞のカルシウム濃度は, mdx マウ スで5 (SOL) および6mmole/kg dry weight (EDL) であり対照と比較して上昇していた. ま たミトコンドリアのカルシウム濃度にも高い測定 値が得られた.

#### 考 察

骨格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、正常筋収縮機構の解明の みならず、病的状態の機能やその原因を極める上 で強力な手段となる<sup>677</sup>.筋ジストロフィー症骨格 筋細胞や mdx マウスの筋細胞では細胞内カルシウ ム濃度の上昇が報告されており<sup>277</sup>、今回の結果と 一致する.正常筋細胞の静止状態下では、筋小胞

muscle (n=3)	•	BW (g)	MW (mg)	MW/BW (×10)	F (g)	F/MW (g)	TW/TE (%)	FQ (Hz)	HFT (sec)	CFT (sec)
SOL	cont	29.7	10.1	3.38	5.35	528.2	14.9	100	250	1230
	mdx	31.0	11.8	3.82	4.83	410.3	14.7	100	300	1800
	cont	29.7	14.0	4.73	5.62	402.3	20.7	156	66	690
EDL	mdx	31.0	15.9	5.10	4.88	305.7	22.8	125	90	1920

表 1 The characteristics of SOL and EDL in control and mdx mice

BW:body weight, MW:muscle weight, F:tension force, TW/TE:twitch and tetanus ratio, FQ:frequency of complete tetanus, HFT: half time during complete fatigue, CFT: time of complete fatigue, Numbers are expressed as mean.

-220-

	SOL		EDL	
	cont	mdx	cont	mdx
Large-cytoplasm	4	5	4±3	6±3
	(n=2)	(n=2)	(n=5)	(n=6)
Small-cytoplasm	4	6	7±2	8±3
	(n=2)	(n=2)	(n=5)	(n=6)
Mitochondria	1	8	2±2	9±5
	(n=2)	(n=2)	(n=5)	(n=6)

# 表 2 The calcium concentration of whole muscle cell of SOL and EDL in control and mdx mice

Numbers are expressed as mean±S.D.(m mole/kg dry weight) numbers with parenthesis is animal No.

体にカルシウムのほとんどの量が貯蔵されており, 収縮,拘縮時にその6割以上が放出され,troponin や parvalbumin に結合するが,細胞全体としての カルシウム量には変動はない<sup>4</sup>.

カルシウム濃度はジストロフィー筋で対照群よ り高値が示されたことから、外からのカルシウム イオンの流入を考えなければならない。静止時の 細胞内カルシウムイオン濃度は通常0.1µ11(10-7 M)以下と極めて低く、その調節にはカルシウム ポンプやナトリウム-カルシウム交換機構を介して 行われている。ジストロフィー筋ではその細胞膜 にカルシウムイオンを積極的に細胞外へ排出しよ うとする機構に何等かの異常を示しているのであ ろう。細胞膜に限らず内部膜系を持つミトコンド リアについても高い濃度のカルシウムが検出され、 同様に考察できると考えられる(表2). 筋原線維 に局在するカルシウム濃度が高いことは(表2の "small cytoplasm"), CANP の活性上昇をさらに 助長することになり筋蛋白の崩壊を進行させるも のであろう<sup>2</sup>. さらに CANP は Z 帯に極在するこ とからその構造変化,たとえば streaming などの 幅の広くなった Z 帯には高い濃度が予想されるこ

とやオペイク細胞のカルシウム濃度が高いという 報告<sup>2)</sup>からも,全体としてみた筋内カルシウム濃度 を増加させる要因にもなる.

収縮様式からみると mdx マウスの EDL は、SOL の性質を帯びるようになったが5)、筋細胞膜の性 質, 収縮蛋白系, 筋小胞体の機能, 筋線維のステ ッフネスなどに関して,いわゆる除神経的効果が 生じているものと考えられる。カルシウム結合蛋 白である parvalbumin 量が疾患筋で減少している ことは、筋弛緩速度の遅延を生じ、10Hzで刺激を 与えた場合疲労に至るまでの時間が延長されたも のと考えられる.また,mdx マウスの EDL 筋に対 して刺激頻度を増した場合には、筋小胞体へのカ ルシウム取り込みに早い phase (troponin より) と遅い phase (parvalbumin より) があること<sup>4</sup>か ら、疲労に至るまでの時間は逆に短縮される可能 性がある。筋湿重量当りの発生張力の減少は収縮 蛋白の減少、間質の増加などの形態的変化と筋束 の偽肥大"によるものと考えられる.

今回用いた筋束には,再生された筋線維が多数 を占めるが,たとえ再生筋であっても遺伝的には 発症時の細胞膜の性質が残存している可能性も考 えられる. ミトコンドリアのカルシウム濃度上昇 に関しては, 正常, 静止時にはいかなる細胞のミ トコンドリアにもほとんどカルシウムを含まない ことから<sup>4</sup>, カルシウムの異常なる蓄積はミトコン ドリア膜のイオンの透過性変化, あるいは筋ジス トロフィー筋においてはミトコンドリアの積極的 なカルシウム取り込みの結果であると考えられる が今後の問題である.

#### 文 献

- Damgain J and Vrbova G : Muscle development in mdx mutant mice. Muscle and Nerve 7 : 700 -704, 1984.
- 2) 今堀和友: Ca 依存性プロテアーゼ. 代謝 17:1247 -1254, 1980.
- 3) Somlyo AV, McClellan G, Gonzalez-Serratos H and Somlyo AP: Electron prob X-ray microanalysis of post tetanic Ca and Mg movements across the sarcoplasmic reticulum in situ. J Biol Chem 260: 6801-6807, 1985.
- Somlyo AP, Somlyo AV, Bond M, Broderick R, Goldman YE, Shuman H, Walken JW and

Trentham DR : Calcium and magnesium movements in cells and the role of inositol trisphosphate in muscle. "Cell calcium and the control of membrane transport" (ed by Eaton DC, Mandel LJ). Rockfeller University Press 42 : 77–92, 1987.

- 5) 高木昭夫,小島進,藤田武久,荒木誠,杉田秀夫: ジストロフィー筋(in vitro)よりの creatine kinase の遊離。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.279-282.
- 6) Yoshioka T and Somlyo AP: Calcium and magnesium contents and volume of the terminal cisternae in caffeine-treated skeletal muscle. J Cell Biol 99: 558-568, 1984.
- 7)吉岡利忠,玉木哲朗,竹倉宏明,赤塚明:mdxマウス骨格筋細胞のイオン環境一電子線マイクロプローブ分析法による一.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61年度研究報告書,1987, pp.37-41.

# 38) fura-2 による骨格筋細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度測定の試み

田瑞子\* 吉

研究協力者 工藤佳久\*\* 菊 池 硉 機\*\*

骨格筋細胞内のカルシウムイオン濃度は、未だ に正確に測定されていない、そこで1985年 Tsien に よって、細胞内のカルシウムイオン濃度を測定す るために発表された蛍光プローブ, fura-2<sup>1)</sup>を用 いて骨格筋細胞内のカルシウムイオン濃度測定を 試みた.

fura-2は水溶性で解離するため、細胞膜を通過 しない。細胞膜を通過出来るように、アセトキシ メチルエステル化し、疎水性にした fura-2-AM がある。これが細胞内に取り込まれると、細胞内 にあるエステラーゼによって分解され、fura-2と なりカルシウムイオンと結合する。従って細胞が fura-2-AM を取り込むことが出来、細胞内に fura -2-AM を分解するエステラーゼが存在するなら ば、インジェクションが不可能な細胞内のカルシ ウムイオン濃度を測定出来る。現在まで平滑筋, 神経細胞、リンパ球等種々の細胞内カルシウムイ オン濃度が、fura-2-AM 負荷によって測定され ている.しかし骨格筋では fura-2-AM が細胞内 に取り込まれないのか、細胞内に分解酵素がない のか、fura-2-AM 負荷によるカルシウムイオン 濃度測定の報告がない.

#### 試料と方法

試料:骨格筋は ICR マウスの長趾伸筋(図1A) を用いた. 腱から腱までを採取し, 緩衝溶液2)中で 4本の束にさいた。裂き方は腱が1本の方をピン で止め,他方腱が4本に別れているうち3本を, ピンで止めてある方へ、1本ずつひっぱりあげた。 ひっぱりあげた筋束は収縮したままとなった(図 1 Bの右3本)ので除去した。残った筋束はスム

ースで、ほとんどの筋細胞は腱に結合していた。 この筋束に fura-2-AM を負荷し,細胞内カルシ ウムイオン濃度測定を行なった。

fura-2-AM 負荷:7.5µM fura-2-AM および 0.08% pluronic F-127が入った緩衝溶液に筋束を 入れ,標準酸素を加えながら,37°C で40分間浮置 した.その後筋束を緩衝液で洗滌し、さらに10分 間,37℃で標準酸素を供給しながら緩衝溶液中で 浮置した.

測定用セルと蛍光強度測定:fura-2-AM を負 荷した筋束は次のようなセルに固定した。0.1mm の厚さの培養用カバーグラス(55×70)にフレキ シパームの仕切りを取りはずしたものをはりつけ た。その枠内に、両面テープ(3×5)を筋束の 長さの間隔をあけて2ヶ所にはり、その上にシリ コンシート(3×5×1)をはった. このセルの 中に緩衝液を入れ、fura-2-AM を負荷した筋束 の腱をシリコンシートにステンレス製ピンで止め、 筋束を固定した.

蛍光強度測定は、キセノン光源の落射型蛍光顕 微鏡を用いた。ステージ上に筋束を固定したセル を設置した。筋束が動かないように、リング状の ステンレスワイヤーで軽く押え、標準酸素を飽和 した37℃の緩衝溶液をセル内に灌流した。

蛍光強度は超高感度 SIT テレビカメラを顕微鏡 に接続して受光した、その蛍光強度を画像解析装 置を用いて処理し、カルシウムイオン濃度を算出 した。測定部位の検索は測光回路にモニターテレ ビを接続して、テレビ画面上で行なった。

カルシウムイオンと結合した fura-2は、340nM の励起光でカルシウムイオン濃度に依存した蛍光 強度(F<sub>340</sub>)を示し、360nM でカルシウムイオン 濃度に依存しない蛍光強度(F360)を示す。二波長 の蛍光強度比 (F<sub>340</sub>/F<sub>360</sub>) は, fura-2の濃度, 試

<sup>\*</sup>国立<sup>精神</sup> \*国立<sup>神経</sup>センター神経研究所疾病研究第四部 \*三菱化成生命研究所



図1 ICR マウス長趾伸筋
 A: 聴から聴まで採取した長趾伸筋
 B: 四本の筋束に裂いた長趾伸筋
 C: Bの左下のスムースな筋束
 D: Cの筋束の側面

料の形態、測定装置の係数に関係なく、カルシウムイオン濃度を与える<sup>3)</sup>. 画像解析装置を用いて、 $F_{340}/F_{360}$ の比より、細胞内カルシウムイオン濃度を算出した.

fura-2-AM の細胞内取込みと分解の検索: fura-2-AM 負荷の細胞に, 10<sup>-5</sup>M のイオノマイ シン処理を行ない, 細胞外から Ca<sup>2+</sup>を流入させる ことによって調べた.

標準溶液による蛍光強度測定: Harafuji-Ogawaの方法に従って作成したカルシウムイオン 標準溶液に、fura-2を加え、 $10\mu$ M-fura-2 -Ca<sup>2+</sup>標準溶液を作成した.この溶液をカバーグラ スで挟み、顕微鏡下で37℃に保ち、蛍光強度を測 定した.

#### 結果と考察

標準溶液の画像処理像の色彩を図2Aに示す. カルシウムイオン濃度が50nMでは桃色,100nMで は桃色にわずか緑色が加わった.200nMでは桃緑 色,500nMでは薄青色,1.0µMでは薄青色に黄色 が加わった.

ICR マウス長趾伸筋のモニターテレビ画面上の 像と画像処理によるカルシウムイオン濃度を図2 Bに示す.aは腱からはずれた細胞である.細胞内 のカルシウムが異常に高いのか,細胞がスムーズ でない.画像処理による色彩は,白色に黄色が入



図2A 画像処理による標準カルシウム溶液の色彩



 図2B 骨格筋細胞のモニターテレビの映像と画像処理による筋細胞内カルシウム濃度
 a: 腱からはずれた骨格筋(白一黄色, 10<sup>-6</sup>M以上), b: 腱からはずれた筋(白 一黄色, 10<sup>-6</sup>M以上)と腱に結合している筋(桃一緑色, 100~200nM), c: 無 傷の筋(桃色, 50nM), d: cの骨格筋細胞に10<sup>-5</sup>Mのイオノマイシンを負荷した (薄青一緑色, 500nM). り10<sup>-6</sup>M 以上のカルシウムイオン濃度を示した.b は腱からはずれた細胞とその下の腱に結合してい る細胞を示す.腱に結合している細胞は桃色に緑 色が加わり,カルシウムイオン濃度として,100~200 nM を示した.cの細胞は,非常に滑らかな形態を 示している.桃色を示し,50nM のカルシウムイオ ン濃度を示した.この細胞に10<sup>-5</sup>M のイオノマイ シンを負荷した.その結果dに示すように,細胞 の形態が変り,外液のカルシウムイオンが流入し 収縮を起していることがわかった.画像解析では 桃色から薄青色に緑色がわずかに加わっており, 約500nM のカルシウムイオン濃度を示した.モニ ターテレビ画像と,画像解析像と形態が異なるの は,撮影時間がわずかずれたためである.

以上の結果より次のことが明らかになった.1) 骨格筋細胞は fura-2-AM を取り込み, fura-2に 分解する能力を持っている.2)細胞内の fura-2に よって,正常一無傷骨格筋の静止状態のカルシウ ムイオン濃度は100nM 以下である.

#### 文 献

- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY: A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260: 3440-3450, 1985.
- Kerr LM and Sperelakis N: Ca<sup>2+</sup>-dependent slow action potentials in normal and dystrophic mouse skeletal muscle. Am J Physiol 245: C415 -C422, 1983.
- 3) Kruskal BA, Keith CH and Maxfield FR: Thyrotropin - releasing hormone - induced changes in intracellular (Ca<sup>2+</sup>) measured by microspectrofluorometry on individual quin 2loaded cells. J Cell Biol 99: 1167-1172, 1984.
- 4) Harafuji H and Ogawa Y: Re-examination of the apparent binding constant of ethylene glycol bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic acid with calcium around neutral pH. J Biochem 87: 1305-1312, 1980.

# 39) mdxマウスにみられるmyotonic burstの筋細胞内記録

栗原照幸\*

研究協力者	内	田	東	彦*	根	本		博*
	岸		雅	彦*	木	下	真	男*

はじめに

mdx マウスは1984年イギリスの Bulfield ら<sup>10</sup>が C<sub>57</sub>BL/10マウスの中からスクリーニングして creatine kinase と pyruvate kinase の活性が高い マウスを発見し,X 染色体劣性の遺伝形式をとる 筋ジストロフィー症モデル動物ということになっ ているが筋変性が起る他活発な再生がみられるこ と等ヒトの筋ジストロフィー症とは異なる点もあ る。今回著者らは mdx マウスの横隔膜標本を用い て筋細胞内記録を行ったところ,筋変性の始まる 以前の生後4日目の標本でも myotonic burst が起 ることを見出し, myotonic burst の活動電位が反 復して起る機序について Na<sup>+</sup>依存性であるか否か Na channel blocker を用いて検討したので報告す る.

#### 方 法

mdx マウス生後4日目(筋変性の始まる前の時期),生後9日目(筋変性が始まる時期)及びそれ 以後の時期(再生筋の時期)の横隔膜標本をつく り,95% O<sub>2</sub>と5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを通じて酸素化 しながら3 MKClを満したガラス管微小電極を用 いて筋細胞内記録をした.

mdx マウスの対照として  $C_{s7}BL/10マウスを用い$ て膜電位を計測し、微小管ガラス電極刺入時にミオトニーが起らないことを確認した。その他哺乳動物のミオトニーモデルとして、Wister 系ラットの横隔膜一神経標本を用いて低 Cl 溶液でミオトニーを実験的につくり、筋細胞内記録を行った。低

\* 東邦大学医学部第四内科

Cl 溶液は Tyrode 溶液の組成の中で NaCl を59.6 mM の Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>に変え, KCl を5mM の KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> に変えて作成した.

Myotonic burst の活動電位を生じるイオン機序 について Na<sup>+</sup>依存性であるか否かを検討するため Na channel blocker として tetrodotoxin  $\varepsilon$ 1.2  $\mu$ M/L の濃度で muscle chamber に加えることで 筋細胞内へ微小電極が刺入される時や、細胞から 電極が出る瞬間に myotonic burst が阻止されるか 否か検索した。

#### 結 果

静止膜電位は Wister 系ラットでは $-85.1\pm3.1$ mV (I.S.D.) (N=107), C<sub>57</sub>BL/10マウスでは-85.7±3.1mV (N=60) であったが, mdx マウス では生後4日目では,  $-66.9\pm10.0$ mV(N=33); 生後9日目では,  $-84.2\pm3.5$ mV(N=31); 生後23日目では,  $-84.2\pm3.5$ mV(N=80); 生後102日目では,  $-71.9\pm6.4$ mV(N=50); 生後102日目では,  $-69.1\pm7.8$ mV(N=50); 生後125日目では,  $-69.1\pm7.8$ mV(N=52); 生後229日目では,  $-71.6\pm8.7$ mV(N=100); 生後255日目では,  $-69.7\pm10.1$ mV(N=62)であ った.mdx マウスでは生後9日目と23日目の標本 で, 膜電位は正常であったが, 他の時期では60日 目以後の再生筋の時期を含めてみな低下を認めた.

生後4日目の mdx マウスの横隔膜標本を作成 し、Tyrode 溶液中に95%  $O_2 \ge 5\% CO_2$ の混合が スを通じて酸素化しながら微小管ガラス電極を筋 細胞内へ刺入すると、刺入時の機械的刺激によっ て図1のような myotonic burst が認められた.こ の図では微小電極が筋細胞膜に触れて完全に細胞



- 図1 生後4日目のmdxマウスの横隔膜標本で、微小電極刺入時にみられたミオトニー.下図はオシロスコープの掃引速度を上図の5倍に速めて記録したもの.
- 表1 生後4日目のmdxマウスの横隔膜標本で10個の筋細胞より微小電極刺入時に起るmyotonic burstを記録し、各burst中の活動電位の数、発火頻度、持続時間を計測した。

#### mdx マウスの myotonic burst (生後4日目)

筋細胞	活動電位の数	発火頻度	持続時間
1	13 個	62.5 Hz	220 msec
2	21	96.2	240
3	19	64.1	370
4	34	45.5	900
5	15	55.6	480
6	13	83.3	180
7	7	50.0	120
8	33	59.5	610
9	13	62.5	200
10	10	54.3	200
平均±S.D.	17.8±9.2	$63.4 \pm 15.4$	352.0±245.7

内へ入り切る前から小さい活動電位が起り始め、 細胞内へ入り切った時にも通常の大きさの活動電 位が反復して起っている.**表**1は、生後4日目の mdxマウスで10個の筋細胞から myotonic burst を 記録して、1回の burst で起った活動電位の数、発 火頻度、発火持続時間を計測してまとめたもので ある.一回の myotonic burst でみられる活動電位 の数は7~34個みられ、平均すると17.8個であっ た.発火頻度は45.5~96.2Hzで平均63.4Hz であ った.発火持続時間は120~900msecで、平均 352.0msec と短い burst が多かった. 図2は生後 9日目の mdxマウスの myotonic burst を筋細胞 内記録したものであるが、他のミオトニーにみら れるように微小電極が筋細胞内へ入ると、脱分極 相のあと活動電位が生じている。

図3には低Cl溶液にラットの横隔膜標本を浸した時に生じたmyotonic burstの記録であるが、やはり微小電極を筋細胞内へ刺入した機械的刺激で反復する活動電位の発火が起っている。活動電位の形はmdxマウスのミオトニー発火とよく似ている。

mdx マウスのコントロールである C<sub>57</sub>BL/10マウ スでは微小電極刺入時に myotonic burst を認めな

#### mdx mouse (9 days old)



図2 生後9日目のmdx マウスの横隔膜標本 で、微小電極刺入時に起った myotonic burst. 比較的緩徐な脱分極 相の後に閾値に達した時点で活動電位 が生じ、これを反復している. burstを くり返すと膜電位も次第に低下し、活 動電位も次第に小さくなっている. かった.

Myotonic burst の各活動電位の発生に先行して 比較的緩徐な脱分極相が存在するが、このような を復発火を生じるものに心臓の洞房結節がある. 洞房結節が自発性に活動電位をくり返して生じて いるイオン機序については Ca++依存性であること が知られている. ミオトニーについて活動電位を 生じるイオン機序について検索する目的で Na channel blocker である tetrodotoxin を muscle chamber 中に $1.2\mu$ M/L の濃度で加えると, mdx マウス にみられる myotonic burst は微小電極の刺入時に おいても,又電極を細胞外へ引き抜く時にも反復 発火が起らなくなった.図4の上図は、生後4日 目のmdx マウスでtetrodotoxin 投与前には、微小 電極を筋細胞内から引き抜く時に burst がみられ る.図4の下図2つは、2つの異なる筋細胞で細 胞内電極が入っている時には陰性の膜電位を示す が、電極が細胞外へ出る時には0mVにもどり、 この間の機械的刺激によっても tetrodotoxin が投



図3 ラットの横隔膜標本を低Cl溶液に浸して実験的につくったミオトニー. 下図はオシロスコープの掃引速度を上図の5倍に速めて記録したもの. 与された時には burst が起らないことを示す.

低 Cl 溶液によってつくったラットのミオトニー 標本でも同様な実験を行い, tetrodotoxin によっ て myotonic burst が阻止された.

#### 考 察

mdx マウスは形態学的には Bulfield らにより生後4日目の骨格筋では変性像は未だ見られず,杉田らの報告でも5日目の標本で筋変性が起っていないことが報告されている.



**図4** 生後4日目の mdx マウスの横隔膜標本.

上図は微小電極を會印の時点で筋細胞 内から外へ引き抜く時に生じた burst (↓).

下図 2 つは tetrodotoxin  $\varepsilon 1.2\mu M/L$ の濃度で Tyrode 溶液に加えると、微小 電極を筋細胞内から外へ引き抜く時 ( $\blacklozenge$ )にも burst が起らないことを 2 つの 異なる筋細胞で示した. 最初の変性は10日目のヒラメ筋で認められ貧食 反応を伴った壊死線維が集塊を成して認められる ことが杉田らの報告にある。著者らも9日目の横 隔膜標本で変性像を認めている。変性の後には, 中心核線維が増して60日目~120日目では大部分の 筋線維が再生筋線維となる。mdx マウスではヒト の筋ジストロフィー症と異なり完全な再生が起っ ていることが特徴である。

今回の実験から生後4日目のmdx マウスの横隔 膜標本でも myotonic burst が細胞内記録されたこ とは、筋変性に先立って筋細胞膜の機能的異常が 起っていることを示唆する。又再生筋の時期でも mdx マウスは膜電位が低く、形態学的には再生し ても、筋細胞膜の異常は存在すると考えられる。 又ミオトニーが生後4日目でもそれ以後でも、再 生筋の時期においても認められることは膜異常が 常に存在していることを示す。

ミオトニーの発生機序については先天性筋緊張 症()及び先天性にヤギにみられるミオトニー5),実 験的にはアントラセン-9-カルボン酸によって誘 発される実験的ミオトニー<sup>6)</sup>において筋細胞膜の Cl イオンに対する透過性が減少していることが示さ れている。Cl イオンの透過性が減少すると異常整 流が起り、筋活動電位の再分極相でKイオンの conductance が増加する時間が延長し、 膜電位は 過分極をする傾向が生じる. Kイオンの conductance が増加する相はそのまま長続きはせず、次 に Na イオンの conductance の増加を引き起す. そして過分極状態から比較的緩徐な脱分極相に移 行し、ミオトニーでは発火閾値も下っていること から、次の発火を起し、次々に反復する発火がみ られる.mdx マウスにおいてもミオトニーが記録 されたということは、筋細胞膜の機能的異常があ り、おそらくは上述と同様なイオン機序が反復発 火を引起していると考えられる. そして膜の異常 としては、Cl channel を構成する蛋白質の異常が ある可能性が示唆される. それによって異常整流 が起り、過分極から脱分極相を経て、反復発火を 起すと考えられる。活動電位のイオン機序につい ては Na channel を介していることが今回の実験で 示された.

mdx マウスの膜の異常は, 膜電位の低下という ことでも示され, 膜異常は一方でミオトニーを引 起すと共に, 筋変性については異常な膜を通して 筋細胞内 Ca<sup>++</sup>の上昇が起り, カルシウム依存性中 性プロテアーゼが活性化され筋崩壊を起す第一段 階になっていると推測される.

#### 結 論

- mdx マウスでは生後4日目の横隔膜標本で筋 細胞内記録によりミオトニーを認めた。筋変性 が形態学的に認められる以前の時期から筋細胞 膜の異常が機能的には起っていることを示唆す る。
- 2) mdx マウスの筋細胞では再生の時期でも膜電 位は低下していて、ミオトニーも認められる。 このことから膜異常は再生筋にも存在すること が示される。
- 3) mdx マウスの myotonic burst は Na channel blocker である tetrodotoxin によって阻止され る.
- 4)低Cl溶液によるラットの実験的ミオトニーも Na channel blocker によって阻止される.

#### 文 献

- Bulfield G, Siller WG et al: X chromosomelinked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci 81: 1189, 1984.
- 2) 杉田秀夫,田辺雄三ら:筋ジストロフィー症モデ ル動物の開発,mdxマウス骨格筋の病理学的研 究.「厚生省神経疾患研究委託費」筋ジストロフィ 一症動物の開発・供給に関する研究」(野村班)昭 和59年度研究報告書,1985,p13.
- Kurihara T, Tanaka M et al: Myotonia induced by low chloride solution: Intracellular studies by Cl liquid ion exchanger microelectrode. Folia Psychiat Neurol Jpn 38: 481, 1984.
- 4) Lipicky RJ, Bryant SH et al: Cable parameters, sodium, potassium, chloride, and water content, and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and

patients with myotonia congenita. J Clin Invest 50: 2091, 1971.

5) Lipicky RJ and Bryant SH: Sodium, potassium, and chloride fluxes in intercostal muscle from normal goats and goats with hereditary myotonia. J General Physiol 50: 89, 1966.

6) Bryant SH and Morales-Aguilera A: Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. J Physiol 219: 367, 1971.

# 40) 骨格筋におけるCa<sup>++</sup> paradoxについて(第2報)

#### 高守正治\*

研究協力者 橋 井 美奈子\*

#### 目 的

筋ジストロフィー症病態と $Ca^{++}$ 関係検討の一環 として、骨格筋にも $Ca^{++}$ paradox、すなわち灌流 溶液の $Ca^{++}$ 濃度をfreeから正常に戻すと、 $Ca^{++}$ が細胞内へ過剰流入し筋細胞障害に至る現象がみ られることを、第1報で報告した。本報では、 $Ca^{++}$ paradoxの膜イオン透過機構を解析し、筋ジスト ロフィー症類似の $Ca^{++-}$ induced myopathy の引き 金となる細胞膜の病態につき検討を加えた。

#### 材料および方法

雄ウイスターラット(250~300g)より横隔膜筋 標本を得,下記溶液にて灌流した。

 I. 灌流溶液:リンゲル液組成は、122mM NaCl, 4.7mM KCl, 15.5mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.6mM CaCl<sub>2</sub>, 11.5 mM glucose, pH7.4とした. Ca<sup>++</sup>-free 溶液は, 上記リンゲル液から CaCl<sub>2</sub>を除き(OCPC 法で0.0 mg/dl を確認), 0.1mM EGTA を添加した. さら に、灌流溶液に種々の処理を加え、表1に示す順 序で筋標本を灌流した.なお各灌流液は、ガス(O<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub>=95:5)負荷, 37℃の一定温下においた.

**II. 電気生理学的検討**:筋標本をリンゲル液で 灌流しつつ,等尺性筋張力計にセット,白金板電 極により刺激(クラーレ10γ/ml添加で筋内神経刺 激の可能性除去)し,単収縮張力(Pt),強縮張力

(Po)を記録した.続いて,表1の2~8の灌流 を行い,経過中単収縮張力を記録,強縮張力につ いては再灌流15分後のみ記録した.諸処理による 張力変化は,処理前張力(100%)の%で表現し た.

III. 筋細胞内イオン濃度測定:Ca++-free 溶液

表	1	Summary	of	experimental	groups	and
		sequence of	of pe	rfusions.		

Group	Perfusion	1 Perfusion 2	Perfusion 3
1	DC	DC	DC
1.	KS	кз —	— K5
2.	RS —	Ca <sup>++</sup> -free solution+-	-RS
		EGTA	
3.	RS	Ca <sup>++</sup> -free solution+-	RS
		EGTA+nifedipine	+nifedipine
		(4µM)	(4µM)
4.	RS —	Ca*-free, high Mg*(12-	—RS
		mM) solution+EGTA	
5.	RS —	Ca <sup>++</sup> -free solution+-	RS
		EGTA+ouabain (1.7 $\times$	
		10 <sup>-4</sup> M)	
6.	RS —	Ca <sup>++</sup> -free solution+	-normal Ca*
		EGTA	low Na <sup>+</sup>
			(72.5mM)
7.	RS	Ca+-free solution+-	-RS
		EGTA+FCCP $(0.5\mu M)$	
8.	RS	Ca <sup>++</sup> free solution +	@
		EGTA	
9.	RS	Ca*-free, low Na*(22.5	@
		mM) solution+EGTA	
10.	RS	Ca <sup>++</sup> ·free solution+	@
		EGTA+ouabain (1.7 $\times$	
		10 <sup>-4</sup> M)	

RS, Ringer solution; @, Perfusion 3 was not done.

灌流後リンゲル液で再灌流した群 (表 1-2), ouabain 添加 Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流後リンゲル液で 再灌流した群 (表 1-5)の筋細胞内 Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>濃度を, リンゲル液で30分間灌流 した対照筋 (表 1-1)のそれと対比した. さら に, Ca<sup>++</sup>-free 溶液15分間灌流直後の筋細胞内イオ ン変化につき, Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流群 (表 1-8),低 Na<sup>+</sup>処理を加えた Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流群 (表 1-9), ouabain 添加 Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流群 (表 1-10)を対照群 (表 1-1)と比較した. イ オン濃度測定については,灌流後の筋標本をただ ちに0.4M サッカロース・1 mM EGTA・10mM トリス緩衝液 (pH7.4, 0~2°C)で洗浄し, 沪紙

<sup>\*</sup>金沢大学医学部神経内科

でブロットした.次に筋肉片を140°Cにて60時間乾燥,硝酸を加え加熱分解後,誘導結合プラズマ発 光装置にて測定,筋肉単位重量当りのCa<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>濃度を算出した.

#### 成績

I. Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流による筋収縮力変化: リンゲル液再灌流15分後(表1-2)における単収 縮張力は,処理前の60±11%に低下,また強縮張 力も処理前の60±10%に低下した.再灌流後の時 間経過と共に,張力低下の程度が変化するかを調 べるため,単収縮張力の経時的変化を追った(図 1). その結果,再灌流後いずれの時期を比較して も有意の変化はなく,骨格筋における paradox 現 象は,再灌流後1分目までに完成すると予想され た.

II. 灌流条件を変えた場合の筋収縮力変化:

1. nifedipine 添加による処理(表2-3)

Ca<sup>++</sup>拮抗剤の nifedipine (4µM) を, Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流~再灌流にかけて添加した結果, 再灌流 15分後の張力は, Ca<sup>++</sup>-free 溶液のみの処理群との

表 2 Changes of contractile properties after various perfusions of muscle.

Experimental	Pt %	Po %	· · ·	Pv. Gr	oup 2.
Group	k.			Pt	Po
1.	$100\pm 0$	$100\pm0$	(n:5)		
2.	$60 \pm 11$	$60 \pm 10$	(n :15)	<b></b>	·
3.	$65 \pm 13$	$58\pm 6$	(n:5)	N.S.	N.S.
4.	$65 \pm 12$	$67\pm 6$	(n:5)	N.S.	N.S.
5.	$21\pm 8$	$27\pm2$	(n:5)	0.01	0.01
6.	$33 \pm 12$	$34 \pm 13$	(n:7)	0.01	0.01
7.	3± 3	7± 5	(n:3)	0.01	0.01

Numbers of experimental groups correspond to those in Table 1. Po, maximum tetanic force; Pt, maximum twitch force: Pv. Group 2., statistical comparison of the means with Group 2. achieved by Duncan's multiple comparison test.

Each value represents mean ±S.D..



 $\boxtimes$  1 Changes of twitch during the Ca<sup>++</sup>-free period and the reperfusion period. Forces were expressed as percent of those recorded prior to the Ca<sup>++</sup>-free perfusion.
間に有意差を認めなかった.また,再灌流直後より経時的に単収縮張力について測定した結果も, Ca<sup>++</sup>-free 溶液群に比し有意な阻止効果は見られ なかった(図1).

2. 高 Mg<sup>++</sup>·Ca<sup>++</sup>-free 溶液での灌流(表 2-4)

Ca<sup>++</sup>-free 溶液に, slow Ca<sup>++</sup> channel blocker として働く Mg<sup>++1)</sup>の濃度を増加 (12mM) する処 理を加えたが, 再灌流15分後の張力は, Ca<sup>++</sup>-free 溶液群に比し有意差を認めなかった.

3. ouabain 添加による処理(表2-5)

Ca<sup>++</sup>-free 溶液中に, (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATP ase 阻害 剤である ouabain (1.7×10<sup>-4</sup>M) を添加した結 果, 再灌流15分後の筋張力低下は, Ca<sup>++</sup>-free 溶液 群に比し, 一層著明となった.

4. 低 Na<sup>+</sup>・正常 Ca<sup>++</sup>溶液での再灌流(表 2-6)

再灌流溶液に低 Na<sup>+</sup>処理(72.5mM)を加えた 結果,再灌流15分後の筋張力低下は, Ca<sup>++</sup>-free 溶 液群に比し,一層著明化した.

5. FCCP 添加による処理(表 2-7)

ミトコンドリア脱共役剤, carbonylcyanide-ptrifluolomethoxyphenylhydrazone (FCCP) を Ca<sup>++</sup>-free 溶液中へ添加した結果, 筋張力はほぼ消 失し, Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流~再灌流にかけて持続的 拘縮を認めた.

Ⅲ.筋細胞内イオン濃度測定:

1. 再灌流15分後の変化(表3)

対照群, Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流後, リンゲル液で再 灌流した群 (paradox 筋), ouabain 添加 Ca<sup>++-</sup> free 溶液灌流後, リンゲル液で再灌流した群

(ouabain 添加 paradox 筋) 間で細胞内イオン濃 度を比較した.結果は, paradox 筋は対照筋に比 し, いずれのイオン濃度にも差を認めなかったが, ouabain 添加 paradox 筋では, 対照筋に比し, 細 胞内 Ca<sup>++</sup>の増加, Na<sup>+</sup>の増加, K<sup>+</sup>の減少を認め た.

2. Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流直後の変化(表4)

対照群, Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流群(Ca<sup>++</sup>-free 溶液 群), 低 Na<sup>+</sup> (22.5mM) · Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流群 (低 Na<sup>+</sup>処理群), ouabain 添加 Ca<sup>++</sup>-free 溶液 灌流群 (ouabain 添加群)の間で細胞内イオン濃度 を比較した(表1-1,8,9,10). Ca<sup>++</sup>-free 溶 液群では対照群に比し,細胞内 Ca<sup>++</sup>減少を認め た.一方,低 Na<sup>+</sup>処理群では,細胞内 Ca<sup>++</sup>は対照 群に比し軽度の減少が見られたが,Ca<sup>++</sup>-free 溶液 群に比べると有意に減少が抑えられていた.Ouabain 添加群では,対照群および Ca<sup>++</sup>-free 溶液群に比 し,細胞内 Na<sup>+</sup>増加を認めた.

## 考 察

Ca<sup>++</sup> paradox における Ca<sup>++</sup>過剰流入機序とし て、心筋では次の仮説があげられている。第1は、 再灌流後初期に重視される, slow Ca++ channel を 介しての Ca++流入説<sup>2)</sup>である。第2は、Ca++-free 溶液灌流中に細胞内 Na+は増加, Ca++は減少し, ついで再灌流時, [Na+],-[Ca++]。交換系を介して Ca++流入がおこるという説<sup>3)</sup>である. Ca++-free 溶 液灌流中の細胞内 Na<sup>+</sup>増加は、心筋では paradox 発現の前段階として重視され、この機序として Na+ の slow Ca++ channel を介しての流入()等が想定さ れている。第3は、再灌流後期、膜が機能・形態 的に障害されるため、passive diffusion により Ca++ が流入するという仮説5°である.その他, Ca++-free 溶液灌流中に膜結合 Ca++の減少により,基底膜内 での剝離がおこり,ここから Ca++が流入するとい う説等も想定されている.

本報では、これら心筋での解釈をふまえ、骨格 筋について検討した。本現象は ouabain を添加し て、Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流中に細胞内 Na<sup>+</sup>濃度を高 めたり(表4)、再灌流溶液に低 Na<sup>+</sup>処理を加えた 場合、再灌流後の張力低下は一層著明化し、再灌 流中 [Na<sup>+</sup>]<sub>1</sub>-[Ca<sup>++</sup>]。交換系による細胞外 Na<sup>+</sup>流 出、細胞内 Ca<sup>++</sup>流入機序が示唆された。筋イオン 濃度も、ouabain 添加で強調した筋では Ca<sup>++</sup>増加 を伴っていた。さらに Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流直後の 筋イオン測定において、細胞内 Ca<sup>++</sup>は減少を認 め、Ca<sup>++</sup>-free 溶液の Na<sup>+</sup>が低ければ、この Ca<sup>++</sup> 減少は有意に抑えられた。これは、Ca<sup>++</sup>-free 溶液 灌流中、[Na<sup>+</sup>]<sub>0</sub>-[Ca<sup>++</sup>]<sub>1</sub>交換系が活性化されてお )、同時に細胞外液 Na<sup>+</sup>濃度が低い場合には、こ の交換系が抑制され、Ca<sup>++</sup>の細胞外への流出が抑

表 3 Total tissue contents of Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> (μmol/g dry wt), after reperfusion with Ringer solution (15min).

control (n: 6)	Experimental Group			Py. Control
Ca# 8.3±0.4	2. Ca*-free perfusion	9 3+1 4	(2.5)	N.C.
Ma# 38+1 5	5. Ca+.free+ouabain	$12.4\pm0.9$	(n :8)	N.S. 0.01
Mg 30_1.3	2. Ca <sup>#</sup> -free perfusion 5. Ca <sup>#</sup> -free+ouabain	$\begin{array}{c} 37 \pm 1.8 \\ 38 \pm 2.1 \end{array}$	(n :5) (n :8)	N.S. N.S.
Na+ 100±7	2. Ca*-free perfusion 5. Ca*-free+ouabain	$90 \pm 13$ 142 ± 8	(n:5)	N.S.
K+ 254±17	2. Ca <sup>+</sup> ·free perfusion 5. Ca <sup>+</sup> ·free+ouabain	$243 \pm 35$ 209 ±11	(n :5) (n :8)	N.S. 0 01

Numbers of experimental groups correspond to those in Table 1.

Pv. control, statistical comparison of the means with control achieved by Duncan's multiple comparison test. Each value represents mean  $\pm$  S.D.

表 4 Total tissue contents of Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> (μmol/g dry wt), immediately after Ca<sup>++</sup>-free perfusion (15min).

Control (n: 6)	Experimental Group			Pv. Control	Pv. Group8.
Ca+8.3±0.4	8.Ca <sup>+</sup> -free perfusion	5.9±0.6	(n:7)	0.01	
	9.Ca <sup>+</sup> -free+low Na <sup>+</sup>	$7.3 \pm 1.0$	(n:7)	0.05	0.01
	10.Ca*-free+ouabain	$5.6 \pm 1.0$	(n:7)	0.01	N.S.
Mg*38±1.5	8.Ca <sup>+</sup> -free perfusion	37±1.7	(n:7)	N.S.	_
	9.Ca*-free+low Na <sup>+</sup>	$38 \pm 1.6$	(n:7)	N.S.	N.S.
	10.Ca*-free+ouabain	$37 \pm 1.4$	(n:7)	N.S.	N.S.
Na+100±7	8.Ca <sup>+</sup> -free perfusion	$118 \pm 18$	(n:7)	N.S.	
	9.Ca <sup>+</sup> -free+low Na <sup>+</sup>	$43 \pm 16$	(n:7)	0.01	0.01
	10.Ca*.free+ouabain	$166 \pm 23$	(n:7)	0.01	0.01
K+254±17	8.Ca <sup>+</sup> -free perfusion	$239 \pm 35$	(n:7)	N.S.	
	9.Ca <sup>+</sup> -free+low Na <sup>+</sup>	$227 \pm 24$	(n:7)	N.S.	N.S.
	10.Ca*-free+ouabain	$188 \pm 21$	(n:7)	0.01	0.01

Numbers of experimental groups correspond to those in Table 1.

Pv., statistical comparison of the means achieved by Duncan's multiple comparison test. Each value represents mean±S.D..

えられるためと推察された.次に、Ca<sup>++</sup>-free 溶液 灌流時、および再灌流時における slow Ca<sup>++</sup> channel の役割検討のため、Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流~再灌 流時にかけ nifedipine 添加処理を加えたり、Ca<sup>++</sup> -free 溶液灌流時に Mg<sup>++</sup>増加処理を加えた.しか し、いずれの操作によっても本現象を阻止するこ とはできず、Ca<sup>++</sup>-free 溶液灌流中、slow Ca<sup>++</sup> channel を介した Na<sup>+</sup>流入機序は証明されなかっ た. さらに、再灌流中、slow Ca<sup>++</sup> channel を介 した Ca<sup>++</sup>流入機序の有無を検討するため、Ca<sup>++-</sup> free 溶液灌流期~再灌流期の単収縮張力変化をプ ロットした(図1). その結果, nifedipine は再灌 流後初期を含むいずれの時期にも張力低下の阻止 をもたらさず, slow Ca<sup>++</sup> channel の関与を示唆 する証左はえられなかった. なお図1は, 再灌流 後期に作動する, passive diffusion の存否の検討 を含んでいる. 再灌流後経時的に誘発した単収縮 張力が,後期で低下する所見はなく, 本機序の役 割は否定的と考えられた.次に, Ca<sup>++</sup>-free 溶液に FCCP を添加して, ミトコンドリアへの Ca<sup>++</sup>取込 み阻止<sup>0</sup>による張力低下阻止を期待したが, 逆に張 力消失を認め, FCCP により ATP 過剰消費から細 胞崩壊が促される機序が考えられた.

筋ジストロフィー症の病態として細胞内 Na+異 常の関与も報告されており、Fong ら<sup>n</sup>は、ジスト ロフィーマウスに見られる細胞内 Na+増加は、Na+ -K+ pump の障害によるのではないことを示すと 共に、細胞内 Na+設定濃度自体の変化を予想して いる.本研究での ouabain 修飾の結果は、筋ジス トロフィー症の一次的成因に細胞内過剰 Ca++の存 在が重要とした場合、その前段階の機序として細 胞内 Na+異常が重要であることを示唆している. なお、筋ジストロフィー症成因の一部には、細胞 内器官自体の機能的異常も注目されており、ミト コンドリアでは、酸化的リン酸化障害<sup>8)</sup>、Ca++濃度 上昇等が報告されている.本研究での FCCP 修飾 結果も、本病病態成立に、細胞内器官機能異常も 関与することを示唆している.

#### 結 語

- 骨格筋の Ca<sup>++</sup> paradox では、Na<sup>+-</sup>Ca<sup>++</sup>交換 系が主役を演じ、slow Ca<sup>++</sup> channel および、 passive diffusion の役割は少ない。
- 骨格筋の paradox 現象は,前段階として細胞 内 Na+濃度の上昇があれば著明化する.
- 3. ミトコンドリア脱共役剤は、ミトコンドリア への Ca<sup>++</sup>取込み阻害から細胞壊死を抑えるよ り,むしろ ATP 消費から細胞崩壊への機序を促 す.

# 文 献

- Ruff RL: Ionic channels: II. Voltage-and agonist-gated and agonist modified channel properties and structure. Muscle & Nerve 9: 767, 1986.
- Nayler WG and Grinwald PM: The effect of verapamil on calcium accumulation during the calcium paradox. J Mol Cell Cardiol 13: 435, 1981.
- 3) Dhalla NS, Alto LE et al: Role of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup> exchange in the development of cardiac abnormalities due to calcium paradox. Eur Heart J
  4 (Suppl. H) : 51, 1983.
- 4) Chapman RA, Rodrigo GC et al : Calcium paradox of the heart: A role for intracellular sodium ions. Am J Physiol 247 : H874, 1984.
- Nayler WG, Perry SE et al : Calcium, sodium, and the calcium paradox. Circ Res 55: 227, 1984.
- 6) Deth R and Casteels R: A study of releasable Ca<sup>++</sup> fractions in smooth muscle cells of the rabbit aorta. J Gen Physiol 69: 401, 1977.
- 7) Fong CN, Atwood HL et al: Intracellular sodium activity at rest and after tetanic stimulation in muscles of normal and dystrophic (dy<sup>21</sup>/dy<sup>21</sup>) C57BL/6J mice. Experimental Neurology 93: 359, 1986.
- 8) Scolte HR, Luyt-Houwen IEM et al: Muscle mitochondria from patients with Duchenne muscular dystrophy have a normal beta oxidation, but an impaired oxidative phosphorylation. Neurology 35: 1396, 1985.

# 41) 各種神経筋疾患における, 針筋電図上のspontaneous activityについての検討

# 中野今治\*

研究協力者 園 生 雅 弘\* 下 平 雅 之\* 野 原 勉\* 神 宝 知 行\*\* 萬 年 御\*\*

# はじめに

針筋電図検査における fibrillation などの spontaneous activity の存在はよく知られているが,高 周波数のものまで含めた種々の用語の指す概念に は、まだ若干の混乱が残っているように思われる。 また様々な疾患での出現状況を、包括的に調べた 報告は多くない、fibrillation については、発射間 隔の不規則なものに病的意義があるかという点も 一つの問題となっている。

今回我々は、筋ジストロフィー症を始めとする 種々の神経筋疾患における spontaneous activity を記録し、これらの点について検討したので報告 する。

## 対象 方法

対象は、表1に示した69例で、Duchenne 型を始 めとする筋ジストロフィー症各型、多発筋炎など の筋原性疾患46例と、筋萎縮性側索硬化症、 demyelinating polyradiculoneuropathy などの神 経原性疾患23例とから成る。被検筋には、三角筋、 上腕二頭筋、橈側手根伸筋、大腿四頭筋、腓腹筋 などを主に選んだが、病変の分布によっては他筋 も対象とした。

方法としては, Medelec 社 MS-6筋電計を用い, 通常の同芯針電極を刺入して,随意活動を記録し た後,筋を完全に弛緩させて,安静時活動の記録 を行った.筋腹内での針先の移動を繰り返して, 一筋あたりおよそ数十個の地点を検索した.通常

\*国立療養所下志津病院神経内科

\*\*東京大学医学部脳研神経内科

表1 対象

筋ジストロフィー		
Duchenne 型(DMD)		16例
Becker 型(BMD)		6
肢帯型(LG)		6
顔面肩甲上腕型(FSH)		4
遠位型 (三好)(Miyoshi)		3
rimmed vacuole を伴う遠位型ミオバ	ペチー(RV)	1
多発筋炎		4
その他のミオパチー		6
筋原性疾患		46
筋萎縮性側索硬化症(ALS)		4
Demylinating polradiculoneuropath	ny (DPN)	3
その他の神経原性疾患		16
神経原性疾患		23
	総計	69例

の insertional activity より長く続く活動が見られ た時には、直ちにこれを全て記録紙上に記録した. 記録は、 $100\mu$ V/cm、20msec/cm の RASTER モ ードで行った.なお、検査室内の温度は25℃前後 に保つように心がけた.総計、234筋より、1496個 の安静時活動が得られた。

#### 活動の分析方法

得られた個々の活動について以下のような分析 を行った.まず, fibrillation, positive sharp wave, あるいは complex repetitive discharge な どの用語を無条件に使うことを控え,純粋に発射 の一単位の形態のみを見て,これを, fibrillation type, positive sharp wave type と,複数のスパ イク成分から成るように見える complexed type の 三つに分類してみた.

次いで,発射間隔の規則性を regular, semir-

egular (voluntary discharge の規則性にほぼ相当 する程度), irregular (end-plate spike 程度に不 規則なもの)の三つに分類した. 特に regular の場 合には, 経過中の最大周波数も測定し, 15Hz を一 応の基準として, 高周波数, 低周波数に分けた.

また、end-plate noise そのものは、今回の分析 対象とはしなかったが、基線の揺れとしての endplate noise が背景に見られた場所を、end-plate zone 内と判定した.end-plate zone 内で見られる irregular な fibrillation type のスパイク、特に 初期陰性の二相性のものは、通常 end-plate spike とされるものだが、これも一応 分析対象に含めた. その他、発射の一単位の振幅、持続時間、位相数、 活動全体の継続時間なども判定した.

# 結 果

1) fibrillation の規則性について

図1に一単位の形態別に regular, semiregular, irregular 各々の出現数の割合を円グラフ に示した. fibrillation type では irregular のもの がかなり見られるが,他の二型はほとんど regular のものばかりであることがわかる.

表2に fibrillation type のものについて,規則性 と, end-plate との関係を示した. end-plate zone 内では irregular のものがほとんどであるのに対 し, end-plate zone 外では regular のものの方が 多くみられている. irregular のもので, end-plate zone 内外の振幅を比較すると, end-plate zone 外 の方が有意に低振幅であった. regular なもので は, end-plate zone 内外の振幅に有意差は見られ





表 2 End plate zone と規則性との関係 (fibrillation type)

なかった。

2) 疾患と安静時活動のタイプとの関係
 ここでは,発射間隔の regular なものだけを対象
 とし、またある程度永続性のある活動をというこ
 とで、fibrillation、positive sharp wave type に

ついては、活動の継続時間10秒以上、complex type については1秒以上のものを集計した。

図2に,代表的な疾患いくつかについて,一単 位の年態別に,最大周波数のヒストグラムを作成 したものを示す.前述のごとく,15Hzを基準とし



図2 代表的疾患についての形態別最大周波数ヒストグラム ヒストグラム横軸は活動の経過中の最大周波数を,縦軸は記録活動数を示す。

て、高、低周波数を色分けで区別した。

まず,低周波数の fibrillation,もしくは positive sharp wave type のものは,神経原性疾患はもちろんだが,筋ジストロフィー症各型,及び,筋炎の筋原性疾患でもかなりの量の出現があり,疾患間での差はそれほど見られない.

一方, 高周波数の fibrillation, positive sharp wave type のものは, 各種筋原性疾患では, いず れもかなりの量の出現が見られるのに対し, ALS, demyelinating polyradiculoneuropathy で は, 極めて少量である.

また,高周波数の complexed type のもの(い わゆる complex repetitive discharge)は,主と して, Duchenne 型, Becker 型の筋ジストロフィ 一症, ALS などの限られた疾患においてのみ出現 を見た.

# 考 察

1) fibrillation の規則性について

従来 fibrillation には, regular なものと irregular なものがあるとされることが多かった<sup>1)</sup>. しか し, end-plate spike の存在がよく認識されてくる につれて, irregular fibrillation とは end-plate spike と同じものに他ならず, 従って病的意義はな いという意見が支配的となりつつある<sup>2)</sup>. しかしな がら, 病的な irregular fibrillation もやはり存在 するのだとする研究者もみられる<sup>3)</sup>.

今回我々も、安静時活動の分析を始めるにあた り、何を病的な活動と判断するかを明らかにする 必要を感じたので、この点についての検討をまず 試みた.その結果、fibrillation typeの活動のう ち, end-plate zone 内でみられるのは irregular の ものが圧倒的に多く、これらは end-plate spike に 相当すると考えられた.

irregular fibrillation は病的ではないとする立場 からは、end-plate zone 外で記録された irregular fibrillation は、end-plate spike がたまたま endplate からやや離れたところで記録されたものであ ると考えられている。この考えからすれば、endplate zone 外で記録されるものは、end-plate zone 内のものより、振幅が低い確率が大きいと推定さ れる. 今回の結果で, end-plate 内外の振幅を比べ ると, regular なものでは差がないのに対し, irregular のものでは end-plate 外のものが有意に低振幅 であった. このことから, 病的な irregular fibrillation の存在を全て否定することはできないが, end -plate spike との鑑別が難しいことは確かのよう に思われる.

 2) 安静時活動の用語について(high frequency のものを中心に)

従来 myotonia 以外の疾患でみられる高周波数 の安静時活動に対して, pseudomyotonia, bizarre high frequency potential など様々な用語が用いら れていた. しかし最近では, complex repetitive discharge を一つの概念として独立させる他は,高 周波数のものまですべて fibrillation, positive sharp wave などの範疇に入れてしまう場合が多い ようである。しかし Buchthal ら<sup>1)</sup>, Conrad ら<sup>4)</sup> は, traumatic を含む neuropathy, radiculopathy などを主な対象とした、多数の安静時活動の分析 にて、それぞれ11Hz、15Hzを越えるものはない との結果を得ている。我々の結果でも、一部の神 経原性疾患では、15Hz 以下のものがほとんどであ り,15Hzを越えるものは筋原性疾患に特徴的であ った. 以上のようなことから, この15Hz あたりを 境に高低周波数を分けて扱うことは、何らかの意 味があることのように思われる.

3)疾患との関係について

高周波数の fibrillation, positive sharp wave と 疾患との関係については,既に述べた. 過去の報 告では, Hausmanowa-Petrusewicz ら<sup>5)</sup>が,周波 数などの定義は必ずしも明らかではないが,同様 の結果を得ている.

いわゆる complex repetitive discharge につい ては、多くの疾患で出現が報告されているが、種々 の疾患で系統的に検討した報告は少ない. Emeryk ら<sup>60</sup>の多数例の検討では、complexed typeの bizarre high frequency discharge は、primary muscular group と spinal group に多くみられた とされている. 我々の結果では、高周波数 complexed type のものは、Duchenne 型、Becker 型筋ジ ストロフィー症、及び ALS で多くみられた. このように種々の疾患間で出現する安静時活動 のタイプに差がみられたことは、これらの診断の 一助としての意義をもっと評価できる可能性を示 唆すると思われ、また、これらの安静時活動の機 序を考えていく上でも重要と考えられるので、今 後更に検討を加えていく予定である。

## 結 論

- ①各種神経筋疾患における安静時活動について検討した。
- ② irregular fibrillation は end-plate spike との 区別が難しいことを論じた.
- ③高周波数の fibrillation, positive sharp wave type は筋原性疾患ではよく見られたが、ALS、 demyelinating polyradiculoneuropathy では稀 であった。
- ④ Duchenne 型, Becker 型筋ジストロフィー症, 及び, ALS では, 高周波数の complexed type のものが多く見られた。

文 献

1) Buchtal F and Rosenfalck P: Spontanetous electrical activity of human muscle. Electroen-

cephalogr Clin Neurophysiol 20: 321, 1966.

- Stohr M: Benign fibrillation potentials in normal muscle and their correlation with endplate and denervation potentials. J Neurol Neurosurg Psychiat 40: 765, 1977.
- Partanen JV and Danner R: Fibrillation potentials after muscle injury in humans. Muscle Nerve 5: S70, 1982.
- Conrad B, sindermann F et al : Interval analysis of repetitive denervation potentials of human skeletal muscle. J Neurol Neurosurg Psychiat 35: 834, 1972.
- Hausmanowa-Petrusewicz I, Emeryk B et al: Electromyography in neuromuscular diagnostics. Electromyography 7: 203, 1967.
- 6) Emeryk B, Hausmanowa-Petrusewicz I et al: Spontaneous volleys of bizarre high-frequency potentials (b.h.f.p.) in neuro-muscular diseases; part 2 an analysis of the morphology of spontaneous volleys of bizarre high-frequency potentials in neuro-muscular diseases. Electromyogr Clin Neurophysion 14: 339, 1974.

# 42) 筋緊張性ジストロフィーにおける ミオトニア現象定量化の試み

垂 井 清一郎\*

研究協力者	北		IE	孝*	中	村	雄	作
	今	岡	弘	之*	高	橋	光	婎

#### はじめに

筋緊張性ジストロフィー患者の病態生理につい ては、膜電位、イオン透過性および膜の脂質分析 を中心に研究が進められ、多くの知見が得られて いるが、ミオトニア現象そのものの臨床生理学的 研究の進展は乏しい、それは一つにはミオトニア 現象の定量化の困難さによると思われる。これま で各種刺激後の筋弛緩の遅延の解析を中心に、電 気生理学的手法、機械的手法を用いてミオトニア 現象の定量化が試みられているが、未だ満足な結 果は得られていない。我々は今回、叩打ミオトニ アの定量化を目的とし、叩打後の myotonic discharge の解析法を開発、その時定数をもとめた。

#### 対 象

筋緊張性ジストロフィー患者6名,年齢は29~53 歳,すべて男性(表1).室温約26℃の恒温室で30 分以上経過後測定した.

## 方 法

図1に示すように脳波用の針電極2本を約3 cm 間隔で母指球筋に刺入し,記録電極とした.ハン マーにて電極間を叩打,発生した myotonic discharge をメデレク社製筋電計 MS6にて増幅したあ と,日本電気三栄社製シグナルプロセッサー7T17 にて整流, smoothing, artifact 除去を行った.得 られたデータを対数表示し,その一次回帰曲線の 傾きより時定数をもとめた.検査中,手掌におい たサーミスタにて皮膚温をモニターした.冷水負 荷時にも測定を行い,時定数の温度依存性を検討 した.

# 果

結

図2aに症例5のmyotonic discharge と、その 解析結果を示す。上段は筋電計よりの波形である が、low cut filter で低周波成分を除くと、電極が 正、負極とも同じ形態のため、ほぼ正負対称の筋

表1 症例の臨床的 profile と時定数 (time constant)

Case	Age	Sex	GF	ТМ	GS	Time Constant
1	38	M	. 3	20	6	1.69±0.27
2	29	м	2.5	40	17	2.85±0.43
3	31	м	4	20	7	$3.23 \pm 0.48$
4	42	м	3	10	6	4.76±0.29
5	53	м	9	10	2	$5.47 \pm 0.72$
6	40	м	14	10	14	$6.52 \pm 0.47$

GF: Grip Frequency (times/ 10 sec)

TM: Time for Maximum GF (sec)

GS: Grip Strength (kg)



電図が得られる。これを整流し、artifactを除去, smoothing 処理を行い、対数表示したのが下段で ある、下段の曲線はほぼ直線的に減衰しており、 上段の myotonic discharge は, exponential に減 衰していると考えられた. 下段のグラフの一次回 帰曲線より時定数をもとめると5.06秒であった。 図2bは症例6のデータであるが、図2aに比べ 明らかに、減衰が緩徐であり、得られた時定数は 6.72秒と図2aに比べ1.66秒の延長である。図2 cは症例1のデータであるが、図2a、2bと異 なり、下段の減衰曲線は、叩打直後の急速な減衰 相(第1相),それにつづく、やや緩徐な渉衰相(第 2相),非常に緩徐な減衰相(第3相)と,おおむ ね3相に分割される。第1相は、図2a、2bに おいても非常に短いが、わずかに認められており、 経験的には、ほぼ叩打の強さに相関し、各叩打毎 にその傾きにかなりの差異がみられる。第2相は 後に述べるように、叩打の強さに相関せず、ほぼ 一定の傾きをもつ。第3相は、非常に長く持続す る低電位の筋電図によって形成されるもので図2 a, 2bに示した症例5, 6においても見られる が第2相が長いため、これらの図の表示範囲外で ある. 第3相の傾きは一定せず, 持続時間の計測

も困難であるため、本症における何らかの異常放 電を反映していると思われるが、今回は評価の対 象としなかった.これに対し第2相の傾きは再現 性がよく、myotonic dischargeの減衰相の主要部 分を占め、その時定数を叩打ミオトニアの定量的 指標とした.図2 c の第2相の時定数は1.53秒と 図2a、2bに比べ非常に低値である。

図3に症例3,6について myotonic discharge の出現初期の電圧 (initial voltage)と第2相の時 定数(以下,時定数)の相関を示す. initial voltage



図3 Myotonic discharge 発生初期の電圧 (initial voltage)と時定数 (time constant)



図2 Myotonic discharge とその解析 a)症例5 b)症例6 c)症例1 は叩打の強さにより,叩打毎に大きく異なるが, 時定数は,それとは相関せず,狭い範囲内に分布 する.

図4は、各症例の叩打毎の時定数を示すが、その分散は、平均値に対して6~16%と、再現性は 良好であった。

症例6において、冷水負荷により手掌温度を 24.8℃まで下げて、室温での値と比較したが、図 5に示すように室温(34.8℃)での時定数6.52± 0.47秒に比べ、10.54±0.84秒と著明に延長した.



#### 考 案

叩打ミオトニアは、叩打による物理的刺激が膜 の興奮を誘発するために生じるが、その興奮の発 生は他の刺激、たとえば、電気刺激や、随意的筋 収縮による刺激によるものに比べ安定している。 電気的刺激では、100Hzのテタヌス刺激を10数秒 間加えても安定した myotonic discharge は得られ ない<sup>1)-3)</sup>.随意収縮後の myotonic discharge の発 生も不安定で、その定量的評価は困難である<sup>4)</sup>.叩 打ミオトニアは、叩打の強さにより、得られるデ ータが大きく変化するとの報告<sup>5)</sup>があり、これまで ほとんど定量化の対象にはさまれていないが、我々 の方法では、先に示したように叩打の強さによら ず安定した結果を得た。

各施行毎の再現性の検討においても、我々の方 法による myotonic discharge 減衰の時定数の分散 (各症例についての約10回測定)は、平均値に対 して 6~16%であった。従来の方法でのそれが 50~100%であったことを考えると非常に低値であ る。本法による時定数は叩打ミオトニアの定量的 指標として、有用であると思われる。

冷水負荷にて時定数を測定すると、室温での値 に比べ著明に延長した.筋緊張性ジストロフィー における細胞膜の易興奮性は、細胞膜のイオン透 過性異常によるとされているが、時定数の著明な 温度依存性は、この膜異常による易興奮性が低温 で非常に増大することを示すもので、イオンチャ ンネルを構成する蛋白の構造的な変化であること を示唆する.

臨床症状と時定数を表1に示すが、手の開閉回 数、手の開閉が最大頻度に達するまでの時間は時 定数とは比例せず、むしろ手の開閉回数について は、回数の多い症例の方が時定数が長い傾向がみ られる.これは一見予想に反するようであるが、 筋緊張性ジストロフィーでは病態が進行するにつ れて、手の開閉の遅延など、いわゆるミオトニア 症状が軽くなる、あるいは消失することが知られ ている.我々の症例5も罹病期間が長く、筋萎縮 が著明で握力2kgであるが、手の開閉回数、最大 回数に至るまでの時間などのいわゆるミオトニア 症状は他の例に比べて軽度であった。しかし時定 数は症例1~4に比べ有意に長い.これは臨床的 にいわゆるミオトニア症状が改善しても,筋膜の 興奮性など筋線維そのもののミオトニア現象が必 ずしも改善しないか,むしろ進行することを示唆 しており,ミオトニア現象を評価するには,臨床 症状のみではなく,本法のような電気生理学的方 法が必要であると思われる.

## まとめ

- Myotonic discharge を解析して、その減衰曲 線より時定数をもとめた。
- 2. 時定数は再現性に優れ、叩打ミオトニアの定 量的指標となる.
- 3. 時定数には、著明な温度依存性が見られた.
- 4. 筋緊張性ジストロフィーにおいてミオトニア 現象を評価するには、臨床的なミオトニア症状 のみならず、本法のような電気生理学的手法が 必要であると思われる。

# 文 献

- 1) 真野行生,本田 仁,高柳哲也:筋緊張性ジスト ロフィー症の電気刺激による after discharge の分 析.臨床神経 26:358-362, 1987.
- Liversedge LA and Newmann MJD: The treatment of myotonia: Acontrolled clinical trial, Brain 79: 395, 1956.
- Griggs RC, Moxley RT, Riggs JE et al: Effect of acetazolamide on myotonia, Ann Neurol 3: 531-537, 1978.
- 4) Torres C, Moxley RT and Griggs RC: Quantitative testing of handgrip strength, myotonia, and fatigue in myotonia dystrophy, J Neurol Sci 60: 157-168, 1983.
- Durelli L, Mutani R, Piredda S et al: The quntification of myotonia, J Neurol Sci 59:167 -173, 1983.

Ⅶ. 培

養

# 43)筋緊張性ジストロフィー,先天性パラミオトニア 培養筋細胞の電気生理学的検討

塚 越 廣\*

研究協力者 小林高義\* 斉藤公司\*\* V. Askanas\*\*\* W. K. Engel\*\*\* K. Ishikawa\*\*\*

ミオトニアを呈する筋疾患で、先天性ミオトニ アでは Cl-conductance の低下が指摘され、先天性 パラミオトニアでは Na channel の異常が指摘され ているが、筋緊張性ジストロフィー (MD)を含め その病態生理の詳細はなお不明である。今回、我々 は MD 及び先天性パラシオトニア (PC)の生検筋 を使用し、培養筋の電気生理学的、形態学的検討 を行ったので報告する<sup>122</sup>.

# 方

法

7 例の MD. 2 例の PC 及び17例の内因性筋疾患 を有しないと考えられる生検筋を使用し, explant -reexplantation culture を行い, control 及び MD では、筋単層培養に未熟な筋管細胞が出現し始め て1週間後に妊娠13日目 Sprague-Dawley ratの 後根神経節を含んだ脊髄片を付加した<sup>3)</sup>. 筋単独培 養には、10% fetal bovine serum (FBS), fibroblast growth factor (FGF) 50ng/ml, epidermal growth factor (EGF) 10ng/ml, insulin $10\mu g/ml$ を加えた F14 medium を使用し", 脊髄片との coculture には、10% FBS 及び insulin10µg/ml を加 えた Fumedium を使用した。電気生理学的検討 は、3MKClを充テンした15~40MQのガラス管微 小電極を使用し、脊髄を付加しない筋細胞 (AM),脊髄付加後,持続的に収縮し横紋形成を している筋細胞 (CM) の電気生理学的 parameter に関して検討を行った、かん流液の組成は、Na150 mM/l, K4mM/l, Ca2.2mM/l, Mg1.1 mM/l, Cl 160.6mM/l, glucose5.6mM/l, Hepes 10mM/l (pH7.2) 0.1% bovine serum albumin であり, 液は通常の場合27~31℃に保ち実験を行 った.また, MD では長期培養 (co-culture 後5 ~17週)で, 神経筋接合部を検討するため, Acetylcholinesterase (AChE) 染色と<sup>125</sup>Iα-Bungarotoxin による autoradiography (ARG) の double labeling<sup>3)</sup>を行い, AChE 活性部位と AChR cluster の相互関係を観察し, 定量的検討を行った.

#### 結 果

#### I. ヒト MD 培養筋の検討

MD 生検筋より神経を付加しない筋単独培養で も、良好な多くの筋管細胞が得られ、control 筋と その出現率,形に差異を認めなかった。しかし, MD では,脊髄付加後,持続的に収縮し,横紋形 成を有する筋線維束の出現率は,正常に比し低下 していた。

 電気生理学的検討(表 1) 静止膜電位 (Er): MDのAMまた, co-culture 初期のCM のErは各々-52mV, -63mVで, control筋の それに対し(各々-59, -69mV), 有意に低下し ていた(p<0.0001).</li>

活動電位 (Ap) の振幅 (AmAp) 及びその最大 立ち上り速度 (Ap dv/dt) : MD の AM 及び CM の ApAm は, 80mV, 85mV と, 正常に比し(各々 89, 92mV) 有意に低下していた (p<0.03, p< 0.01). MD の AM の Am dv/dt は, 症例によ リバラツキがあるが, 全体として, control 筋と 有意差を認めなかったが, CM では MD で127V/ sec と control 筋 (147V/sec) に比し, 有意の低

<sup>\*</sup> 東京医科歯科大学医学部神経内科

<sup>\*\*</sup>国立精神神経センター神経研究所

<sup>\* \* \*</sup> Neuromuscular Center, Dept. of Neurol, USC

_	Aneurally	cultured	muscle		Innervate	d contracting muse	le
Patients				RMP (	mV)	AP Amp (mV)	AP dV/dt (V/sec)
	RMP (mV)	AP Amp (mV)	AP dV/dt ( V/sec )	early lo co- c culture cu	ong-term o- lture		
Control	59 ± 6	89 ± 10	112 ± 26	69 ± 7 <sup>###</sup> 5	7 ± 9	92 ± 11 <sup>#</sup>	147 <u>+</u> 35 <sup>##</sup>
mean ± SD	(68)	(17)	( 17 )	(92) (	52)	(15)	( 29 )
м р <sup>1</sup>	45 ± 6	81 ± 8	97 <u>+</u> 21	62 ± 8 5	2 ± 8	78 ± 5	112 ± 22
	( 10 )	( 8 )	8 )	(15) (	21)	(9)	( 9 )
2	47 <u>+</u> 7	88 ± 13	141 ± 22	63 ±10 4	7 ± 7	78 ± 13	$126 \pm 12$
	( 13 )	( 10 )	( 10 )	(5) (	21)	(3)	(3)
3	51 ±13	77 ± 8	86 ± 15	49 ± 3 5	1 ± 5	84 ± 14	142 <u>+</u> 3
	( 12 )	( 9 )	( 9 )	( 2 ) (	8)	(4)	( 4 )
4	54 ± 6	69 ± 11	114 ± 19	61 ± 10 7	2 ± 13	101 <u>+</u> 21	$143 \pm 32$
	( 43 )	( 4 )	( 4 )	(5) (	10 )	(5)	(5)
5	50 ± 10 ( 10 )	81 ± 11 ( 10 )	108 ± 29 ( 10 )	- S	4 ± 8 20)	82 ± 9 (6)	123 ± 21 (9)
6	57 <u>+</u> 5 ( 21 )	89 ± 7 ( 9 )	136 ± 21 ( 9 )	66 ± 7 (21)	-	-	-
7	55 ± 6 (10)	71 ± 9 (10)	78 ± 29 ( 10 )	-	-	-	-
mean <u>+</u> SD	52 ± 8 <sup>***</sup>	*80 ± 12*	109 ± 32	63±8∦∦∦5	4 ± 11	85 <u>+</u> 14 <mark>*</mark>	127 <u>+</u> 27
	(119 )	(60)	(60)	(48) (	82)	(27)	(36)

Electric membrane properties of aneurally cultured and innervated contracting 表1 muscle cells from seven patients with MD and from controls.

Values are mean + SD. Numbers of cells tested are in the parentheses.
\*: P<0.01, \*\*: P<0.03, \*\*: P<0.001, compared with control.</li>
#: P<0.01, #: P<0.001, ##: P<0.0001, compared with aneural culture.</li>
RMP:resting membrane potential, AP Ampraction potential amplitude
AP dV/dt:maximum rate of rise of action potential
1) Aneural culture days are 13-19 days. Early co-culture means less than 28 days of co-culture (10-27 days of co-culture), and long-term co-culture means more than 27 days of co-culture (28-78 days of co-culture).
2) AP Amp was measured from resting membrane potential to the peak of off-response after hyperpolarization of membrane to -80 - -100 mV.
3) AP dV/dt was measured using a differenciating circuit with time constant of 150 usec.

Percentage of muscle cells with spontaneous firing (SpF), and repetitive dis-表 2 charge (RD) on the insertion of a microelectrode, and elicited by anodal-break excitation or deporalizing current pulse in cultured MD and control muscles.

	Aneurally	cultured muscle	Innervated contracting muscle		
Patient	SpF	insertion RD	RD by electric stimulation	SpF	RD by electric stimulation
control	1.6 <u>+</u> 3.7	1.1 <u>+</u> 3.3	10.7 + 22.9	100	58.3
mean <u>+</u> SD	( 205 )	( 205 )	(111)	(144)	(12)
MD 1	0	0	10	100	65
	( 10 )	(10)	(10)	(20)	(20)
2	15.4	0	7.7	100	18.2
	(13)	(13)	(13)	(22)	(22)
3	0	0	0	100	40
	(12)	(12)	(12)	(10)	( 10 )
4	18.6	0	0	100	90.9
	(43)	(43)	(11)	(11)	(11)
5	0	0	0	100	70.6
	(10)	(10)	(10)	(17)	(17)
6	52.3	9.5	70.0	100	19.5
	(21)	(21)	(21)	(19)	(19)
7	0 ( 10 )	0 (10)	0 (10)		
mean <u>+</u> SD	12.3 ± 9.4	1.4 <u>+</u> 3.6	12.5 <u>+</u> 25.7	100	49.2 ± 31.5

Numbers of cells tested are in the parentheses.

1) Ancurally cultured cells from 10 controls & 7 MD patients were examined in 13-59,

Anourally cultured cells from 10 controls \* , patients were construct in 12-57,
 16-22 days of culture, respectively. Innervated contracting cells from 14 controls
 6 Mo patients were examined in 13-78 days of co-culture.
 2) RD clicited by electric stimulation was examined in innervated muscle in the presence of 1\*5M d-tubocurarine in one control muscle and MD muscles except case 4 & 5.

下 (p<0.03) を認めた、また MD の CM の Ap dv/dt は AM に比べ有意に増加し, control 筋と 同様の傾向を示した。

Repetitive discharge(RD:表2): 筋単独培養 では spontaneous firing (SpF) は症例によって 0-52%とバラツキがあり、control 筋では平均 1.6%で, MD 症例間のバラツキが大きいため, 有意差を認めなかった. AM では, MD, control とも微小電極刺入時には RD はほとんど観察さ れず、電気刺激(脱分極あるいは過分極刺激) 後11~13%の筋細胞に RD を認めた。脊髄付加 後生じる SpF は、MD では control と同様10-4 ~10<sup>-5</sup>Md-tubocurarine (d-TC) で,一部を除 いて可逆的に阻害された.dTC 添加後の電気刺 激によって生じる RD もその出現頻度は control と差を認めなかった。

2) AChE, AChRのdouble labeling: MD 3例 から、5回の double labeling を行い control と 比較検討した. Control の長期培養の CM では、 37%の AChE 活性部位が複雑な pretzel 様構造 を呈するのに対し, MDのCMでは、96.4%の AChE 活性部位が線状の単純な構造を呈してい

> 51 (1 + 4)

59 + 5#

68 +

( 26 )

(19)

10###

MD

PC

mean ± SD

1

2

た. また AChE 活性部位あるいは AChR cluster は600µmの筋の segment あたり2.3±0.2個と control に比し増加していた (control では1.7± 0.2以下). ControlのCM上では, 98%のAChE 活性部位が AChR cluster 部位を共有し, 64%の AChR cluster 上に AChE 活性部位が存在する のに対し, MD では, 84%の AChE 活性部位が AChR cluster 部を共有し、68%の'AChR cluster 上に AChE 活性部位が存在し, control 筋に 比し, AChE 活性部位と AChR cluster の共存の 比率は低下していた。

II. ヒト PC 培養筋の検討

PCのAMは,正常に比し,長く,幅広くかつ厚 みのある筋が形成され、時にこれらの筋細胞に不 規則な自発収縮が認められた。脊髄付加により、 持続的に収縮し横紋形成を呈する筋線維束の出現 頻度は極めて低く、電気生理学的検討は AM にお いてのみ行った.

電気生理学的結果を表3に示す。

Er: 症状の強かった症例2では, AM の Er は-68mV と control に比し(-59mv)有意に高く(p< 0.0001), また症例1, 2とも MDの Er に比し有

0 - a few

(119)

25.0

(16)

55.6

(18)

with 1				
Patient	RМР (mV)	AP Amp. ( mV )	AP dV/dt ( V/sec )	appearing rate of Ca channcl ( % )
control mean <u>+</u> SD	59 ± 6 (68)	89 + 10 (17)	112 ± 26 (17)	0 - a few (68)

(60)

(12)

<u>+</u>

10##

109 + 24

110 + 21

152

( -)

( 60)

( 12)

5<sup>±</sup>

14#

表 3	Electric membrane properties of aneurally cultured muscle cells from 2 patients
	with PC, compared with those from MD and controls.

Values are mean  $\pm$  SD. Numbers of cells tested are in the parentheses. \*: P< 0.05, \*\*: P< 0.005, \*\*\*: P< 0.0001, compared with control.

84

100

( 5 )

#: P< 0.01 ##: P< 0.001 ###: P< 0.0001, compared with MD. RMP:resting membrane potential, AP Amp:action potential amplitude,

AP dV/dt:maximum rate of rise of action potential

1) AP Amp was measured from resting membrane potential to the peak of off-response after hyperpolarization of membrane to -80 - -100 mV.

2) AP dV/dt was measured using a differentiating circuit with time constant of 150 usec. 3) Ca channel means slow repolarization component of action potential which is abolished by 2 X 10-5 M nitrendipine.

表 4 Percentage of muscle cells with spontaneous firing, repetitive discharge (RD) on the insertion of a microelectrode and elicited by hyperpolarizing or depolarizing current pulse in aneurally cultured PC, MD, and control muscle cells at 32°C and 22°C.

Patient	Spontaneous firing ( % )		RD on the in microelectro	sersion of a de ( % )	RD elicited by electric stimulation ( % )	
	at 32°c	at 22°c	at 32°c	at 22°c	at 32°c	at 22°c
control	1.6 + 3.7	0	1.1 <u>+</u> 3.3	0	10.7 + 22.9	0
mean <u>+</u> SD	( 205 )	(20)	( 205 )	(20)	( 111 )	(20)
M D	12.3 + 9.4	0	1.4 + 3.6	0	$12.5 \pm 25.7$ ( $\frac{1}{87}$ )	0
mean <u>+</u> SD	(139)	(10)	(139)	(10)		(10)
PC 1	4.3	0	4.3	0	91.3	8.7
	(23)	(23)	(23)	(23)	(23)	(23)
2	81.3	18.8	68.8	0	100	18.8
	( 16 )	(16)	( 16 )	(16)	(16)	(16)

Values are mean  $\pm$  SD. The number of cells tested are in the parentheses.

1) The mean values were figured out from 10 controls and 7 MD patients at 32°C.

2) PC muscle was examined at 12°C in addition to 22°C.

意に高かった. Lemann-Horn  $6^{50}$ は, PC 患者の 外肋間筋を使用し, PC 筋の Er は温度依存性であ ることを示しているが,同様の現象が培養下で出 現するか否か,bath の温度を32℃から22℃に変え る (あるいは逆にする)ことによって検討した. 症例 2 では22℃で32℃の Er に比し78.4%と低下 し,また症例 1 では90.6%と低下した.一方,MD では96.6%, control では92.6%の低下しか示さ ず,症例 2 は MD, control に比し有意の低下を認 めた (p<0.0001).

ApAm 及び Ap dv/dt: control 筋の ApAm は 87mV, Ap dv/dt は112V/sec で, MD 筋の ApAm は80mV, Ap dv/dt は109V/sec であったが, 症例 2 の ApAm は100mV, Ap dv/dt は152V/sec と control, MD 筋に比し有意に高かった. 一方症例 1 では ApAm, Ap dv/dt とも, control, MD と 有意差を認めなかった.

Ap の slow component: 早い Ap に続くゆるや かな reporarization component が症例 2 で55.6 %, 症例 1 で25%と高頻度に認められた.この component は, Ca channel の阻害剤である nitrendipine 2×10<sup>-5</sup>M で消失し, 10mMBa 存在下で調 べた PC 筋全例で出現し, 同様に nitrendipine 添加 により消失することから Ca channel と考えられた (図 1).

RD: MDのAMでは, 12.5%, controlでは10.7 %に、電気刺激後の RD が認められたにすぎなか ったが、PCの症例2では100%、症例1では91% に RD を認めた. このような RD は PC では容易に 出現し,時に2分以上,10<sup>3</sup>以上のApを持つburst が認められた。特に、症例2では、81%の筋に長 く続く SpF を認め, 68.8%の筋細胞でガラス電極 刺入時の RD を認めた. 症例1 では4.3%の筋細胞 に SpF, そして電極刺入時の RD を認めたが, MD あるいは control 筋では電極刺入時の RD はほとん ど認めず, SpF は control で1.6%, MA で12.3% 認めたのみであった。Bath 内の温度を下げると(12℃ あるいは22℃)SpF, あるいは電気刺激または機械 的刺激による RD は著明に減少するが, spike discharge が消失したあと長く続く著名な oscillatory potential を認めた. このような oscillatory potential は control. MD では認めず PC で特有な現象 であった. 低温度下で, control 及び MD 筋におい て SpF は出現しなかったが, 症例1で9%, 症例 2 で19%の SpF あるいは RD を認めた.

# 察

考

MD 培養筋の筋単独培養での電気生理学的検討 は Tamoush ら<sup>6)</sup>, Merickel ら<sup>7)</sup>により行われてい るが, 前者では MD の Er は control と差はなく,



☑ 1 Slow repolarizing component of action potential in aneurally cultured PC muscle cells.

I. Slow component of action potential of PC muscle cells in a regular perfusion medium.

- A) Spontaneous action potential with slow component.
- B) Absence of this component in a medium containing 20 uM nitrendipine.
- II. Slow component of action potential without slow component.
- A) Spontaneous repetitive action potential without slow component.
- B) After adding 10 mM Ba ion to regular medium in the absence of Ca ion, spontaneous firing ceased, and slow component appeared following fast action potential elicited by anodal-break excitation.
- C) This component disappeared after adding 20 uM nitrendipine.
- D) Reappearance of the component after washing out of the drug.
- E) Disappearance of the component again in the regular medium.

Hyperpolarizing current pulses (500 msec) of 0.2, 0.7, 1.4, and 1.8 nA were applied in B.C.D, and E, respectively.

後者は control に比し低下していると報告してい る. 我々とほぼ同じ培養法を使用した Tamoush ら の control の Er の値 (-50mv) に比し今回の ER の値 (-59mv) が高いのは、我々の場合、いくつ かの peptide (EGF, EGF, insulin) を含んだ培養 液を使用しているためと考えられる。今回, MDの 筋単独培養でも co-culture 後の CM においても MDのErは control に比し有意に低下していた が、その原因として MD の細胞は insulin 抵抗性が あり, insulin に対する receptor affinity の低下が 最近報告されていることから筋細胞膜の insulin に 対する反応性の低下が1つの可能性として考えら れる. Co-culture において CM の Er, Ap dv/dt とも MD では control に対し低下を示しているこ と,また co-culture の長期培養においても, AChE 活性部位が単純な構造にとどまっていることは、 MD 培養筋では、control に比し、神経からのいわ ゆる "trophic" な影響を受けにくい状態に筋細胞 (膜) がおかれていることが推察された.

一方, PC 培養筋は, MD と逆に Er, AmAp, Ap dv/dt とも高く, Na channel はよく発達して いた.また症状の強い症例2では、Lehmann-Horn らの外肋間筋と同様に温度の低下と共に Er の有意 な低下を認めた、更に、PC 培養筋では、高頻度に SpF を認め, 電気的, 機械的刺激により repetitive discharge が認められ, control 及び MD 培養筋に 比し極めて興奮性が高かった. これは、MD では 筋単独培養, co-culture した CM でも control と 差を認めないのと対照的な結果であった。PC 培養 筋のもう一つの大きな特徴は, Er が深いにもかか わらず速い Ap に続く slow repolarization component (Ca channel) が頻繁に出現していることで ある.PC 筋のミオトニアの原因は依然として不明 であるが、ミオトニアをひきおこす機序として、 1) 遷延化する repetitive discharge, 2) 細胞外液か らの Ca influx の増加, 3) sarcoplasmic reticulum からの Ca の遊離または再吸収の異常などが考えら れるが、PC 培養筋の今回の結果は、1)2)の現象が in vivo でも PC のミオトニアの発症に関与してい る可能性を示唆しているものと考えられる。

## 文 献

- Kobayashi T, Saito K, Askands V, Engel WK and Ishikawa K: Electrophysiologic abnormalities of myotonic atrophy (MA) muscle fibers cultured aneurally and ones cultured and innervated by rat spinal cord. Neurology (suppl) 37: 184, 1987.
- 2) Kobayashi T, Askanas V and Engel WK: Electrophysiological abnormalities of aneurally cultured muscle fibers (ACMFs) from 2 patients with paramyotonia congenita (PC). Neurology (suppl) 37: 184, 1987.
- 3) Kobayashi T, Askanas V and Engel WK: Human muscle cultured in monolayer and cocultured with fetal rat spinal cord: Importance of dorsal root ganglia for achieving successful innerration. J Neurosci 7: 3131-3141, 1987.
- 4) Askanas V and G Gallez-Hawkins: Synergistic

influence of polypeptide growth factors on cultured human muscle. Arch Neurol 18: 716-719, 1987.

- 5) Lehmann-Horn F, Rüdel R, Dengler R, Lorkovic H, Haass A and Ricker K: Membrane defects in paramyotonia congenita with and without myotonia in a warm environment. Muscle Nerve 4: 396-406, 1981.
- 6) Tamoush AJ, Askanas V, Nelson PG and Engel WK: Electrophysiologic properties of aneurally cultured muscle from patients with myotonic muscular atrophy. Neurology (Cleveland) 33: 311-316, 1983.
- 7) Merickel M, Gray R, Chauvin P and Appel S: Cultured muscle from myotonic muscular dystrophy patients: Altered membrane electrical properties. Froc Natl Acad Sci USA 78: 648-652,1981.

# 44) ヒト生検筋組織培養法による筋細胞及び 神経筋接合部の発達に関する検討

**塚 越 廣\*** 

研究協力者 小林 高 義\* 斉 藤 公 司\*\* V. Askanas\*\*\* W. K. Engel\*\*\* K. Ishikawa\*\*\*

ヒト神経筋疾患の病因,病態を研究する上で, ヒト生検筋よりの培養法は有力な道具となり得る. しかしながら一般に,ヒト生検筋からの培養筋細 胞は未熟な段階にとどまり,自発収縮はなく横紋 形成をせず,そのために筋緊張性ジストロフィー, Duchenne型筋ジストロフィー,Mc Ardle病など では培養下で病的形質が出現しないのではないか と考えられていた.最近,我々はヒト生検筋より の筋単層培養に後根神経節を含んだ脊髄片との co - culture により機能的神経筋接合部を形成し,自 発収縮,横紋形成を有する培養法を確立したので 報告する<sup>1)</sup>.

# 方 法

内因性筋疾患を有しないと考えられる57例の生 検筋を使用し, explant-reexplantation culture を 行い,筋単層培養に未熟な筋管細胞が出現し始め て1週間後に妊娠13日目 Sprague-Dawley rat の 後根神経節を含んだ脊髄片を付加した.筋単独培 養には、10% fetal bovine serum (FBS), fibroblast growth factor (FGF) 50ng/ml, epidermal growth factor (EGF) 10ng/ml, insulin10 $\mu$ g/ml を加えた F<sub>14</sub>medium<sup>2)</sup>を使用し,脊髄片との coculture には、10% FBS 及び insulin10 $\mu$ g/ml を 加えた F<sub>14</sub>medium を使用した.継時的に位相差顕 微鏡で観察を行うと同時に co-culture 後1, 2, 3 W及びそれ以上の長期培養で, acetylcholinesterase (AChE)染色及び, <sup>125</sup>I $\alpha$ -Bungaro-

\* 東京医科歯科大学医学部神経内科

\*\*国立精神神経センター神経研究所

toxin (α - BT) を使用した autoradiography (ARG) を行い AChE 活性部位と acetylcholine 受容体 (AChR) cluster の動態を定量的に分析し た. また, AChE 活性部位と AChR cluster の相互 関係をみるため AChE 染色と<sup>125</sup>IαBT の ARG に よる double labeling を行い定量的検討を行った.

電気生理は、3MKClを充填した15~40M $\Omega$ のガ ラス管微小電極を使用し、神経を付加する前の筋 芽細胞、筋管細胞更に脊髄付加後の筋細胞につい て継時的に電気生理学的 parameter に関し検討を 行った.かん流液の組成は、Na 150mM/l, K 4 mM/l, Ca 2.2mM/l, Mg 1.1mM/l, Cl 160.6 mM/l, glucose 5.6mM/l, Hepes 10mM/l (pH7.2), 0.1% bovine serum albumin であり、 液は27~31℃に保ち実験を行った<sup>3)</sup>.

#### 結 果

#### I. 位相差顕微鏡下培養筋の観察

脊髄片付加後,24時間以内に脊髄及び後根神経 筋より神経線維が伸び始め,筋細胞と接触し,更 に、多くの神経線維は筋細胞に沿って伸び続ける が一部はボタン状の終末を形成する.co-culture 後、平均10日で筋細胞は収縮を開始し、数日後横 紋形成がみられるようになる.長期培養では、脊 髄片の一側(腹側)に、接続的に収縮し、横紋形 成をした筋線維束が形成され(図1-a)、筋に侵 入する神経線維は韃鞘を形成し(図1-c)、後根 神経節細胞も成熟し、長期に維持される(図1b).収縮し横紋形成をした筋細胞(CM)の長さ は19.0×10<sup>2</sup>±18.0μm(SEM),co-culture 内の収 縮していない筋細胞(NM)の長さは5.3×10<sup>2</sup>±7.9

<sup>\* \* \*</sup> Neuromuscular Center, Dept. of Neurol. USC



☑ 1 Phase-contrast microscopy of long-term co-cultures of human muscle and fetal rat spinal cord with dorsal root ganglia attached.

a. Low-power photomicrograph of 9-week-old co-culture. Abundant muscle fibers in close proximity to the presumably ventral part of the spinal cord explant are densely packed, parallel to each other, and are continuously contracting. Muscle fibers in proximity to the other (presumably dorsal) part of the spinal cord explant have degenerated. Bar, 1 mm.

b. Well-maintained DRG neurons in 4-week-old co-culture. Bar, 50 µm.

c. Myelinated nerve fibers branching over muscle fibers (from left to right) in 5 -week-old co-culture. Bar, 50 µm.

d,e. Contracting(d) and noncontracting(e) muscle fibers in 3-week-old co-culture. Contracting muscle fibers are thinner, longer, and more uniform in their individual diameters than noncontracting sister muscle fibers. Bar, 10  $\mu$ m. (from ref.1)

 $\mu$ m と CM の方が有意に長く、一方平均横断径 は、CM で8.9±0.07 $\mu$ m、NM で、21.4±0.41 $\mu$ m と径は有意に細くなった。また、CM では NM に 比べ平均横断径は均一であり、各々の筋細胞の幅 も均一であった。

# II. AChR cluster, AChE 活性部位の定量的検 討

神経線維と接触している筋細胞でのAChR cluster を有している筋細胞は、co-culture後5日で 35.3±1.5%であるが、co-ulture2、3週間には 46~47%となり有意に増加し(p<0.05)、更に筋 が収縮している部位では80.3%と増加した(p<0.025).一方、各々の筋細胞上のAChR clusterの 数は co-culture1、2、3週のNM では平均3個 であるが、培養3週後のCM では、 $1.7\pm0.15$ (同 ー皿の NM では、 $3.21\pm0.21$ )と有意に減少し た. 同様に、AChE 活性部位を有する筋細胞は、 co-culture 1、2週では14.1±1.7、 $15.3\pm2.4\%$ であるが、3週には $25.1\pm1.7\%$ と有意に増加(p< 0.025)し、更に筋が収縮している部位では $50.3\pm$ 6.9%となり急速に増加した。一方、各々の筋細胞 上の AChE 活性部位の数は co-culture 1、2、3 週の NM で平均2.1~2.6個であるが、長期培養で の CM では $1.5\pm0.2$ 、同一皿上の NM では、 $2.5\pm$ 0.1と、CM 上の AChE 活性部位の数が有意に低下 した (p<0.005). AChE 活性部位を AChR cluster の関係を double labeling で検討すると、NM で は、AChR cluster の44%の部位に AChE 活性部が 存在し、一方 AChE 活性部位の93.4%に AChR cluster が存在した。CM では、AChR cluster の



⊠ 2 Double-labeling of AChE and AChR on muscle fibers innervated and contracting in 5 weeks of co-culture. a. Histochemistry of AChE. b. Autoradiography of <sup>125</sup>I alpha-BT of a simple unorganized nerve-muscle contact. Note that the AChR cluster is much larger than the AChE patch. Bar, 10 µm. c. Histochemistry of AChE. d. Autoradiography of <sup>125</sup>I alpha-BT of a wellorganized neuromuscular junction. The size of the AChE patch is virtually the same as that of the AChR cluster. Bar, 10 µm. (from ref.1).

64%の部位に AChE 活性部位が存在し,一方 AChE 活性部位の98%に AChR cluster が存在し た. CM における単純な構造を持つ AChE 活性部 位の長さは AChR cluster の長さに対し65%である が,複雑な AChE 活性部位の長さは AChR cluster と同一となった (図2).

Ⅲ. 電気生理学的検討

- 静止膜電位(Er):紡鐘形をした筋芽細胞の Er は-40~-69mV(平均-50mV)で、核を5 ~10個有する筋管細胞では-53±8 mV であっ た. Co-culture 後の Er を継時的に検討すると (図3),筋収縮開始後, CM は NM に比して有 意に深くなり、逆に NM では Er がやや浅くな る傾向になった. CM の平均 Er は初期の coculture で-69mV であり、NM は-51mV,ま た神経を付加しない筋細胞(AM)では、-59mV で、CM の Er は有意に増加した。
- 活動電位(Ap):筋芽細胞においても, anodal -break excitationにより, 10%の筋芽細胞に Ap を認めた. Overshooting Ap は 3 核以上の筋細 胞で認め, 10核以上の筋細胞ではほぼ全例で電

気刺激後 Ap を認めた. Ap の振幅 (ApAm) は, AM, CM, NM とも有意差はなく平均89~92 mV であったが, ApAm の最大立ち上り速度(Ap dv/dt) は, CM, NM で147V/sec と AM (112 V/sec)に比べ有意に増加した. 自発放電は, CM の全例にみられ, NM の6%の筋細胞に認めら れたが AM では認めなかった. Anodal-break excitation により出現する Ap は 2×10<sup>-6</sup>M TTX で, 消失せず, Na free の溶液で消失する ことから, TTX 抵抗性 Na channel と考えられ た (図 4).

 Neural transmission (図 5): Miniature end -plate potential (mepp) は, co-culture 後 3 日 に認められたが, その振幅, 出現頻度は不規則 であった. 自発性 end-plate potential (epp) 及 び Ap は co-culture 6 日目には認められ, epp, Ap は 2 ×10<sup>-6</sup>Md-tubocurarine (d-TC) によ り可逆的に阻害された. Co-culture 後平均10日 で筋は自発収縮を始めるが, その収縮に一致し て,持続的な Ap を認めた. これらの Ap も10<sup>-4</sup> ~10<sup>-5</sup>M dTC で阻害されるが, 一部の筋では収



☑ 3 Resting membrane potential of the muscle cells after co-culture, Abscissa: days after co-culture with spinal cord. Ordinate: resting membrane potential. ⊙: aneural flat muscle cells at 0-day co-culture. ○: neural non-contracting flat muscle cells. ●: neural contracting cylindrical muscle cells. Each symbol and vertical bar shows mean±SD and number of cells tested is shown near each symbol. \*: significantly different (p<0.001) from non-contracting flat cells of the same co-culture days.</p>

縮が残存し、高濃度のdTC でも阻害されない Ap が認められた.これらのことから、多くの自発 収縮は neural transmission によるが、一部の筋 には筋細胞膜自身の自発性電気活動が存在して いると考えられた.

#### 考 察

我々の今回の研究で、ヒト生検筋よりの筋単層 培養に、後根神経節を含んだ脊髄片との co-culture により、筋は自発収縮を開始し、横紋を形成する 成熟した筋線維束が形成され、また電気生理学的 に chemical transmission がおこり、成熟した神 経筋接合部が形成されると共に、multifocal innervation から unifocal innervation に転換すること が示された。

Crain らは、ヒト筋の string と、後根神経筋を 含んだ脊髄片との organotypic culture で、筋が収 縮し、横紋形成をすることを報告している<sup>4</sup>. しか しこの系は筋の string を残すため、長期に渡って extracellular matrix (ECM) が残存し、その中 で筋の再生がおこり、更に新しい神経接合部も以 前に存在した部位に形成される可能性が高いこと、 また、筋の成長分化を筋芽細胞から継時的に観察 を行えないこと、organotypic culture のため細胞 内微小電極法に適しないなどの問題があり、筋の 筋芽細胞からの発達、神経筋接合部の発生を継時 的に観察するのには、我々の系のような筋単層培 養に、脊髄片を付加する系がより適していると考



☑ 4 Effects on action potentials of tetrodotoxin (TTX) and absence of Ca or Na ions from a perfusing medium. Action potentials in column (a) and (c) were recorded in normal perfusing medium before and after test medium, respectively. The trace in (Ab) was in the presence of TTX (10<sup>-6</sup>M), (Bb) in a Ca-free medium and (Cb) in a Na-free medium with tris-Cl (pH7.2). Records were taken from the same muscle cells co-cultured for 37 days.



Synaptic potentials, spontaneous action potentials and acetylcholine (ACh)-図 5 induced depolarization of neurally cultured muscle cells. Miniature end-plate potentials in (Aa) and (Ac) were recorded in normal medium before and after the addition of d-tubocurarine  $(2 \times 10^{-6} M, Ab)$  to the perfusing solution, respectively. Resting membrane potential: -64 mV. Records were taken from a 3-day cocultured non-contracting flat cell. Spontaneous end-plate potential were recorded from a 6-day co-cultured non-contracting flat cell(B). Resting membrane potential: -60mV. Amplitude of the action potential indicated by arrowheads are overscaled. Spontaneous action potentials in (Ca) and (Cc) were recorded in normal solution before and after the addtion of d-tubocurarine (10-4M,Cb) to the perfusing solution. Records were taken from 50-day co-cultured contracting cylindrical cells. Depolarization induced by ACh in (Da) and (Dc) were recorded in normal medium before and after the addition of d-tubocurarine (5×10-6M, Db), respectively. ACh( $10^{-5}$  M) was applied by a pressure pulse for 100 ( $\nabla$ ) and 500 ( $\mathbf{\nabla}$ ) msec. Records were taken from 62-day co-cultured flat cells.

えられる.

この系では、生化学的にも、co-culture 後、持 続収縮し、横紋形成をした部位では、creatine kinase の MM 型の比率が高まること、筋特異的な phosphorylase isozyme<sup>5</sup>)及び、phosphoglycerate mutase<sup>6</sup>)が出現することが明らかにされている。ま た、組織化学的には、脊髄を付加しない筋細胞に 比し co-culture により、持続収縮し横紋形成をし ている筋線維束では、NADH-TR、SDH 染色など によって、よく発達した intermyofibrillar network が認められ、phosphorylase 活性も強くなり、ま た、ATPase 染色では、いわゆる type II c に属す ると考えられる筋線維が大部分であったが一部 type II線維と考えられる染色性を示す細胞も認められ た<sup>9</sup>.

今回,我々の確立した脊髄片との co-culture に よるヒト生検筋の培養法は,ヒト筋細胞の発達, 神経筋接合部の発達に関する研究,更に各種神経 筋疾患の病態生理,病因解明に有効な道具となり 得ると考えられる.

# 文 献

- Kobayashi T, Askanas V and Engel WK: Human muscle cultured in monolayer and cocultured with fetal rat spinal cord: Importance of dorsal root ganglia for achieving successful innervation. J Neurosci 7: 3131-3141, 1987.
- 2) Askanas V and Gallez-Hawkins G: Synergistic influence of polypeptide growth factors on

cultured human muscle. Arch Neurol 18: 716-719, 1985.

- 3) Saito K, Kobayashi T, Askanas V, Engel WK and Ishikawa K: Electrical parameters of human muscle cultured in monolayer aneurally and innervated by rat spinal cord. Muscle Nerve (Suppl) 9: 162.
- 4) Grain SM, Alfei L and Peterson ER: Neuromuscular transmission in cultures of adult human and rodent skeletal muscle after innervation in vitro by fetal rodent spinal cord. J Neurobiol 1: 471-489, 1970.
- 5) Martinuzzi A, Askands V, Kobayashi T, Engel WK and DiMauro S: Expression of musclegene specific isoenzyme of phosphorylase and creatine kinase in innervated cultured human muscle. J Cell Biol 103: 1423-1429, 1986.
- 6) Martinuzzi A, Askanas V, Kobayashi T, Engel WK and Gorsky JE: Developmental expression of the muscle-specific isoenzyme of phosphoglycerate mutase in human muscle cultured in monolayer and innervated by fetal rat spinal cord. Exp Neurol 96: 365-375, 1987.
- 7) Vita G, Askanas V, Martinuzzi A and Engel WK: Histoenzymatic profile of human muscle cultured in monolayer and innervated *de novo* by fetal rat spinnal cord. Muscle Nerve (in press).

# 45) 培養ラット筋芽細胞(L6)のクレアチン代謝 並びにプロテオグリカン合成

高木昭夫\*

研究協力者 紫芝良昌\*清水多恵子\*横井紀子\*

## 目 的

クレアチン代謝は筋細胞の分化,発育に伴って 変化する代謝パラメーターで,昨年までに私達は 多核に fusion する前の prefusion stage において はクレアチンの集積 (線維芽細胞の 7-10倍)のみ が起こること,多核細胞に fusion した後 phosphocreatine が形成されるが,細胞内のクレアチンの みを考えると集積能はほとんど prefusion stage と 変わらないことを報告した<sup>10</sup>.これら筋細胞の発育 や分化は基質との関連においても最近問題にされ るところである.種々の細胞は基質として proteoglycan を合成し,この proteoglycan が細胞の分化 や成長を誘導する可能性も数多く示唆されている.

筋ジストロフィー症では proteoglycan 合成に異 常があることを示唆する所見を Hutchinson らは報 告している<sup>21</sup>. クレアチン代謝は筋の実質細胞とし ての面から重要であるが,同時に proteoglycan 代 謝を調べることも間質機能を知る上で重要である と考えた. L6細胞については proteoglycan に関す る研究はまだ報告されておらず,今後の研究のた めに基礎的なデーターを得ておく必要性も大きい. 筋細胞の分化や発育に作用する外的要因として, 甲状腺ホルモンがこの両面にどう作用するかを調 べることを当面の目標とした.

# 材料・方法

ラット筋芽細胞(L6)は10%牛胎児血清を含む DME 培地に培養した.培養6,12日目に血清中の T<sub>3</sub>濃度が0,120,1200ng/dlになるように調整し た牛血清を10%含む DME 培地に変え,更に3日間

\*冲中記念成人病研究所

培養し、最後の24時間<sup>14</sup>C - creatine, または <sup>35</sup>SO<sub>4</sub>, <sup>3</sup>H-glucosamine とインキュベートした. インキュベート終了後, <sup>14</sup>C-creatine とインキュベ ートした well から培養液を取り除き,細胞層を0.2 N NaOH で溶解し, TCA で蛋白を沈澱させ, 得 られた上清を中和した後 HPLC で分析した.分析 にはカラムとして smipax nucreosil 10 SA, 移動 相には0.01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with N-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH3.7を 用いた.また, この TCA 沈澱の蛋白量を Lowry 法で測定した.

<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>, <sup>3</sup>H-glucosamine とインキュベートした well は, 培養液を分離しこれに4M になるようにグ アニジン塩酸と蛋白分解酵素阻止剤を加えた. 細 胞層は洗浄した後, 2% triton x-100を含む4M グ アニジン塩酸で抽出した. これら抽出液は sephadex G50カラムにより利用されなかったアイソトープを 除去した後, Q-sepharose ミニカラムに吸着さ せ, 0.15M から1.5M の NaCl gradient で 溶出 し, sepharose CL-6B カラムで分子サイズを調べ た. Chondroitinase ABC 処理, 亜硝酸処理, OH<sup>-/</sup> BH<sub>4</sub>処理は既報のごとく行い<sup>3</sup>, sepharose CL-6 B カラムでこれら処理による分子サイズの変化か ら構造を調べた.

#### 成 績

(1) L6細胞 prefusion stage におけるクレアチン代 謝:図1にL6細胞の培養6,12日目に72時間,甲 状腺ホルモン0,12,120ng/dlとインキュベート した際のクレアチン代謝について示す。6日から 12日目にかけて細胞数,蛋白量,クレアチンとり こみ量ともに増加するが、クレアチン取り込み量 を蛋白当り表現すると、6日目と12日目ではほと

んど差が認められない(この取り込み量は線維芽 細胞の7~10倍である).また,T<sub>3</sub>の濃度によって も影響されない. クレアチンを HPLC で分画した 成績を図1Bに示すが、<sup>14</sup>C-creatine(amidine-<sup>14</sup> C label)の溶出位置に放射活性のピークがある が、phosphocreatine やその他クレアチン代謝産物 の溶出位置には放射活性のピークは認められない。 (2) L6細胞 prefusion stage における proteoglycan 合成:図2にL6細胞の培養液・細胞層のQ-sepharose salt gradient chromatography の結果を 示す.<sup>3</sup>Hの第一のピークと第二の小さなピークは 糖蛋白, 第三のピークは hyaluron 酸である. Medium では次の第四のピークは単一で<sup>35</sup>S と同時 にピークを形成しており、これは chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) である。この脚部に heparan sulfate proteoglycan (HSPG) に相当す る部分がある. Cell layer では hyaluron 酸のピー クのあとに<sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S 両者のピークが二つに分かれて 存在し、早く溶出してくる方が HSPG, あとから

Creatine accumulation in myoblast in culture (Effect of thyroid hormone)



溶出してくる方が CSPG である (chondroitinase ABC で水解されることから確認した).次に CSPG を OH<sup>-</sup>/BH<sub>4</sub>で処理してその前後で sepharose CL -6B カラムで比較すると, medium に存在する proteoglycan の glycosaminoglycan (GAG) chain の大きさは50K で, OH<sup>-</sup>/BH<sub>4</sub>処理前と大き さは変わらない.従って, proteoglycan は GAG chain が 1本, glycoprotein よりなるごく小さな core-peptide に結合している形のものであると推 定された.ところが cell layer には全く構造と大き さの異なる proteoglycan があり, GAG chain の 大きさは約20K, これが複数個, おそらくは4~5 個, core-peptide に結合して分子量100K 以上の巨 大分子を形成しているものである.今回, HSPG の characterization は行わなかった.

(3) L6細胞の proteoglycan 合成に対する甲状腺ホ ルモンの影響:図3に示すごとく,培養液のT<sub>3</sub>濃 度を12ng/dl から120ng/dl とすると, medium にお



-263-



いても cell layer においても CSPG は有意に増加 する. HSPG の増加は CSPG ほど著明ではない が, 推計学的に有意に増加する.

# 考 察

L6細胞の prefusion stage ではクレアチン代謝は 甲状腺ホルモンに影響されないが、CSPG の合成 は増加することが認められた.そもそも L6細胞が どのような proteoglycan を合成するのか知られて おらず、今回の成績から考えて、postfusion stage では prefusion stage と異なる proteoglycan を合成している可能性があり,現在,鋭意検討中である.

L6細胞の CSPG 合成が甲状腺ホルモンで刺激されることについても従来は知られることのなかった知見である。私達は人皮膚線維芽細胞での proteoglycan 合成が T<sub>3</sub>で刺激される所見を得ており、これは間質系細胞に共通する所見である可能 性が考えられる。筋ジストロフィー細胞の primary culture で Hutchinson らは、硫酸基の数が少ない CSPG が合成されると報告しているがその意義は 明らかでない。私達は proteoglycan を中心とした 細胞間質の代謝を様々な立場から探って、筋ジス トロフィー症に取り組んでみたいと考えている。

## 文 献

- \*芝良昌,三好和夫,門脇紀子,清水多恵子,佐藤幸一:筋ジストロフィー症におけるクレアチン 代謝異常,ラット培養筋細胞におけるクレアチン 代謝."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61年度研究報 告書1987, p.321.
- 2) Hutchinson CJ and Yasin K: Altered secretion of chondroitin sulfate proteoglycan in Duchenne muscular dystrophy cultures. J Neurol Science 79: 77, 1987.
- 3) Shishiba Y, Yanagishita M, Hascall VC, Takeuchi Y and Yokoi N: Characterization of proteoglycans synthesized by rat thyroid cells in culture and their response to thyroid stimulating hormone. J Biol Chem 1988 (in press).

# 46) 筋芽細胞(L6)の増殖,分化とCaイオノフォア およびサイトカラシンBの影響

川井尚臣\*

研究協力者 佐 藤 幸 --\* 鳴 尾 隆 子\* 西 Ξ 薯 彦\* 竹 Ħ 勝 則\* 増 Ħ 健二郎\* Ш 久 雄\*\*

はじめに

筋ジストロフィー症などの変性性筋疾患の病因 や病態を明らかにするためには、筋細胞の増殖や 分化そして変性の機序を知ることが必要である。 本研究ではラット筋芽細胞について、その形態の 変化および筋固有蛋白の出現や増加を指標として、 増殖と分化のあり方を調べるとともに、培養細胞 に膜系あるいは細胞骨格の障害物質を作用させ、 それら物質の培養筋細胞に及ぼす影響を検討した。

# 対象と方法

本研究には american type culture collection (ATCC)のラット筋芽細胞(L6)を用いた.こ の筋芽細胞を培養し,培養筋細胞の増殖と分化, ならびに培養細胞に対する細胞膜障害物質(Ca イ オノフォア,A23187)と細胞骨格障害物質(サイ トカラシン B)の影響を調べた。増殖や分化の指 標としては、細胞の形態の変化、細胞中のクレア チンキナーゼ(CK)活性値の上昇、ミオグロビン 量(Mb)の増加、単位 DNA 当たりの CK 活性値 (CK/DNA)の上昇などを用いた。

 筋芽細胞増殖の実験は、初め60mm 径のシャ ーレに1×10<sup>5</sup>/dishの細胞を播種し、これを10%牛 胎児血清を含む DME 液(増殖用培養液)で増殖さ せた。

2. 筋芽細胞分化の実験には、2%馬血清、6 µg/ ml インスリンを含む DME 液(分化誘導用培養液) にて細胞培養を行った。細胞増殖の実験は3日毎 に,そして細胞分化実験は2日毎に培養液の交換 を行い,細胞播種後6hr,3日,6日,8日,10 日,12日後にそれぞれ細胞を採取し,1 dish 当た りの細胞数,DNA量,CK活性値,Mb量を測定 した.

3. Ca イオノフォアとサイトカラシン B の影響を みる実験では,まず細胞増殖用の培養液に Ca イオ ノフォ ア100~300ng/ml,あるいはサイトカラシン B100~500ng/ml になるように加え増殖に対する影 響をみた.また,分化に対する影響をみる実験に は,はじめ60mm 径のシャーレに1×10<sup>5</sup>個/dish の 筋芽細胞を播種し,2%馬血清と6 $\mu$ g/ml インス リンを含む DME 液に Ca イオノフォ ア200ng/ml あるいはサイトカラシン B300ng/ml を加えた培養 液で培養を行い,播種後は増殖の実験と同様の日 程で培養細胞を採取し,同じく DNA 量,CK 活性 値,Mb 量を測定した.

上記実験では、いずれも経過を追って細胞の形 態を観察した.また、細胞数の算定には、0.25% トリプシン溶液を用い培養細胞の浮游液を作製し、 自動血球計算装置で測定した.そして、培養細胞 の DNA 量の測定は Erwin らの方法<sup>11</sup>によった.CK 活性値の測定には、採取した細胞を、凍結・解凍 後に遠沈し、上清を Oliver 変法<sup>21</sup>にて測定した.細 胞中の CK アイソザイムパターンは、テトラゾリ ウム塩法<sup>31</sup>で検索した.細胞内の Mb 量は RIA 法<sup>41</sup> で測定した.

#### 結 果

1. 筋芽細胞の増殖

ラット筋芽細胞(L6)を増殖用の培養液で培養

<sup>\*</sup>徳島大学医学部第一内科

<sup>\*\*</sup>徳島大学医学部第一生理

を行うと、細胞数は初め $1 \times 10^5$ であるが3日目よ り急速に増加し、6日目では $81 \times 10^4$ 、12日目では  $326 \times 10^4$ に増殖し、細胞数の増加と共に DNA 量も 増加した(図1-A). しかし、細胞内に CK 活性 値は殆ど増加せず、従って DNA 当たりの CK 活性 値 (CK/DNA) も不変であった.また、細胞内に Mb は検出されなかった.また、形態的にも紡錘状 の筋芽細胞のみがみられた(図2-A).

2. 筋芽細胞の分化

筋芽細胞(L6)を分化誘導用の培養液で培養す ると、図1-Bに示したごとく、DNA量は3日目 以後増加した.CK活性値は6日目より急速に増加 し、従ってCK/DNA値も急激に増加した.また12 日目には Mbが5ng/dishの量出現した.形態的に も6日目頃より筋管細胞が出現し、12日目には殆 どの細胞が筋管細胞に変化した(図2-B).また 細胞中のCKのアイソザイムパターンでも、筋芽



図1 A: 増殖用培養液で培養したラット筋 芽細胞. 細胞数, DNA 量は増加した が, CK 活性値, CK/DNA 値は増加し なかった.

> B:分化用培養液で培養したラットの筋 芽細胞.CK,Mb等の筋固有蛋白が増 加しCK/DNA値も上昇した.

細胞の段階では MB 型を示したが,分化した筋管 細胞では MM 型が主成分となった(図3).

3. 筋芽細胞の増殖と分化に及ぼす Ca イオノフォ アとサイトカラシン B の影響

1) Ca イオノフォアの影響

細胞増殖用の培養液にそれぞれ Ca イオノフォア 100, 300ng/ml を加え培養を行なった。100ng/ml では増殖に殆ど影響を及ぼさなかったが, 300ng/ ml では70%の増殖抑制がみられた。

次の培養細胞の分化に対する Ca イオノフォアの 影響の研究には、100と300の中間の200ng/mlの濃 度で培養を行った.その成績を図4-Aに示した



 図2 A: 増殖用培養液で培養した筋芽細胞の培養11日目の細胞を示す。細胞数は 増加しているが形態は紡錘型で筋芽細胞でとどまっている(×350)。
 B:分化用培養液で培養した筋芽細胞の培養12日目の細胞を示す。殆どが多核の筋管細胞に分化している(×700)



図3 CK アイソザイムパターン.筋芽細胞では MB型のみであったが筋管細胞では 主として MM型に変化した.



 図4 A:分化用培養液にCaイオノフォアを200ng/mlの濃度に加え培養した場合. DNA量,CK活性値,CK/DNA値,Mb量は殆ど増加しなかった.
 B:分化用培養液にサイトカラシンBを300ng/mlの濃度に加えた場合,DNA量,CK活性値の増加は少なく,Mbは検出できなかった. が、細胞は殆ど増殖せず、また DNA 量, CK 活性 値, CK/DNA 値のいずれも殆ど増加しなかった. 形態的にも筋芽細胞はさらに細長い紡錘状になっ た(図5-A)が、筋管細胞は認められなかった. ただし、変性したと思われる変形細胞は少なかっ た.

# 2) サイトカラシン B の影響

細胞増殖用の培養液にそれぞれサイトカラシン B100ng/ml, 500ng/mlを加え培養を行なった.100 ng/mlでは増殖には殆ど影響を及ぼさなかった



 図5 A: Ca イオノフォア200ng/ml 添加培 養液における培養11日目. 紡錘状の筋 芽細胞のみがみられた. 形態的に変性 細胞と思われる細胞は少ない (×700).

> B:サイトカラシン B300ng/ml 添加培 養における培養11日目. 筋管細胞がみ られ,その一部に膨化して変性に陥っ たと思われる細胞(矢印)がみられる (×700).

が, 500ng/ml では50%の抑制が認められた.

細胞分化に対するサイトカラシンBの影響に関 する研究には100と500の中間の300ng/mlの濃度で 培養を行った.その成績を図4-Bに示した.DNA 量とCK活性値は増加したが,サイトカラシンB を加えないものに比べ共に少なく,Mb量も増加が みられなかった.CK/DNA値は遅れて8日目以降 に増加した.また形態的には筋管細胞が一部で膨 化して変性に陥っていると思われるものが数は少 ないが認められた(図5-B).

## 考 察

筋ジストロフィー症の病因としては, Duchenne型 (DMD) については最近の遺伝子分析の研究<sup>5)6)</sup> により, dystrophin と称する (Hoffman ら) 著し く大きな蛋白質が欠損していることが明らかにさ れた.

本蛋白質は膜系に存在するとの成績も報告され ているが、これはまだ確定的とは言えない.我々 は、DMDの欠損蛋白質が筋細胞の膜系あるいは筋 細胞骨格に関係のある蛋白質と考え,本症におけ る筋障害のあり方を究明するため,本研究では細 胞膜障害物質として Ca イオノフォアを,また細胞 骨格の障害物質としてサイトカラシン Bをとりあ げ,これらの物質の筋細胞の増殖と分化に及ぼす 影響,および,これらによる筋細胞の変性につい て検討した.

我々の用いた ATCC の筋芽細胞は増殖用培養液 では細胞数は増加したが,形態の変化や筋固有の 蛋白(CK, Mb)の増加はみられなかった.ま た,分化用の培養液では培養6日目以降では CK, 12日目には Mbと筋固有蛋白の出現がみられ分化 していることが窺われた.形態的には紡錘状の筋 芽細胞から管状の多核の筋管細胞へと分化した. そして,CK に比べ Mb は遅れて出現したことよ り,筋固有蛋白は分化途上で,それぞれ出現する 時期が異なることが示唆された.

Ca イオノフォアあるいはサイトカラシン Bの分 化ならびに細胞に対する影響については、細胞増 殖を20~30%抑制する濃度のものを用いて研究を 行なったが、両者共、明らかに細胞の増殖を抑制 し,また分化も抑制あるいは遅らせた.その程度 は Ca イオノフォアの方が強いと考えられたが,な お両物質を用いる濃度を検討する必要がある.

両物質による増殖,分化,細胞の変性について は、Caイオノフォアでは用いた200ng/mlの濃度 では形態的な変化が少なかった。この濃度では細 胞は増殖分化できなかったので,このことが逆に 変性をおこさせない要因になったのかも知れない.

サイトカラシン B では筋管細胞の一部が膨化し て見える細胞が少数ではあるが、見出され、これ は一種の変性所見とも見える所見である。このこ とは、細胞骨格の障害により、筋芽細胞の増殖や 分化抑制のほかに分化した筋管細胞に変性が生じ ることが示唆される成績で興味深い。

今後はひき続き培養筋芽細胞を用いて細胞骨格 障害による培養細胞の変性と細胞膜障害による変 性とを対比しながら,さらに詳細に筋細胞の分化 の異常と変性の起こり方を調べたい.

# おわりに

筋芽細胞の培養系を用いて筋細胞の増殖と分化 ならびに細胞膜障害物質と細胞骨格障害物質によ る筋芽細胞,筋管細胞の変化を明らかにした。今 後さらに,これら物質による培養筋細胞の変化を 詳細に研究し筋ジストロフィー症をはじめとする 変性性筋疾患の病因・病態の究明に役立てたい.

#### 献

文

- Erwin BG, Stoscheck CM et al : A rapid fluorometric method for the estimation of DNA in cultured cells. Anal Biochem 110: 291, 1981.
- Hess JW, Murdock KJ et al: Creatine phosphokinase. A spectrophotometric method with improved sensitivity. Amer J Clin Path 50: 89, 1968.
- Oliver IT: A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. Biochem J 61: 116, 1955.
- 4) Miyoshi K, Saito S et al: Radioimmunoassay for human myoglobin.: method and result in patients with skeletal muscle or myocardial

disorders. J Lab Clin Med 92: 341, 1978.

5) Koenig M, Hoffman EP et al: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy(DMD) cDNA and prelimiary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50: 509, 1987.

6) Hoffman EP, Brown Jr RH and Kunkei LM: Dystrophin; The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51:919, 1987 Ⅷ.形

態

.

# 47) 横隔膜の多様性病変について

田邊 等\*

研究協力者 磯 崎 英 治\* 宮 本 和 人\* 小 田 雅 也\*\*

#### はじめに

横隔膜は、四肢の骨格筋と異なりたえず呼吸運 動即ち収縮、弛緩を繰り返している筋であり、ま た不随意筋であると同時に随意筋の要素もあわせ もつ横紋筋である。我々は、そうした特殊な性質 を有する筋が、形態学的にはどの様な特徴を持つ のかを検討してきた。その結果、肺気腫など慢性 閉塞性肺疾患における横隔膜では、ほとんど常に ragged red fiber (RRF)、core/targetoid fiber

(C/T fiber)が認められるほか,呼吸不全の期間 が長い例ほど type 1 fiber predominance が著明 となることもわかった<sup>1)</sup>.そこで今回は,脱神経を きたす疾患を中心とした神経筋疾患を対象とし, 横隔膜の筋病変を明らかにするとともに,あわせ て正常と思われる生検横隔膜についても検討した.

# 対象及び方法

対象は表1に示した剖検例20例,生検例4例で あり、これらの中には疾患コントロールという意 味から非神経筋疾患も含まれている。検体採取部 位は、全例下位肋骨に起始部を持つ肋骨部横隔膜 であり、剖検例20例のうち15例については全身の 筋病理所見との対応を行うため、非呼吸筋である

赛1 対象

	/ J 201	
4例	Neuromyositis	1例
3例	結核性髄膜炎	1例
3例	ヘルペス脳炎	1例
2例	脳原発性悪性リンパ腫	1例
1例	多発神経炎	1例
1例	hanging death	1例
1例		
3例		
	4332 (例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例例	4例     Neuromyositis       3例     結核性髄膜炎       3例     ヘルペス脳炎       2例     脳原発性悪性リンパ腫       1例     多発神経炎       1例     hanging death

\*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

大腿四頭筋も採取した. 生検例4例は, いずれも 肺癌のため開胸術施行時に横隔膜の一部を生検し た例であり,特に肺癌のみを有した3例はスパイ ログラムおよび血液ガス分析ともに正常域にある ため,便宜上これらを臨床的正常例として扱った. また他の一例は肺癌のほか肺気腫を合併した慢性 閉塞性肺疾患例である. これらの検体は採取後直 ちに,液体窒素で冷却したイソペンタンにて瞬間 凍結し,10μの切片を作製,ルーチンバッテリーに もとずく各染色を施したほか,生検例4例および 剖検例2例については cytochrome c oxidase (CCO) 染色も行った.

#### 結 果

横隔膜においても基本的には四肢筋と同様、原 疾患にもとずく変化が認められたが、この他に、 RRF, C/T fiber, cytoplasmic body(CB), ring fiber などの特有な変化が認められたため、これら の所見を中心に各疾患毎にその結果を示した(表 なお、NADH-TR 活性像ではしばしば著明 な moth-eaten fiber が認められ、必ずしも C/T fiber との鑑別が容易ではなく、事実 C/T fiber と 同時に出現することもあった。従って、両者はむ しろ移行しうるように思えたが、今回は便宜上 moth -eaten fiber の有無に関わりなく、明らかな C/T fiber が認められた場合のみを記載した。RRFは, 一般に原疾患と関係なく高率に出現したが、逆に ALSでは4例中1例にしか認められなかった点が 注目された. RRF が認められた生検例 4 例, 剖検 例2例に対し CCO 染色を行うと横隔膜では全例 CCOの部分欠損(図1)を示したが、 剖検例2例 の大腿四頭筋では認められなかった. CCO 不染線 維は通常 RRF に一致して認められたが、時には TC 染色で異常を認めない筋線維にも明らかな CCO 不
							大眼四百餘				
					DDF	CCO		CD	DE		
17.0 (1)	KKF	CLU	0/1	CB	ĸr	KKF	110	C/ I	CB	KF	
ALS (1)	•		0	Õ	•	•		•	0	•	
ALS (2)	•		•	0	•	•		•	•	•	
ALS (3)	•		0	0	•	•		0	•	•	
ALS (4)	0	0	0	0	•	•	•	•	•	•	
パーキンソン病(1)	$\bigcirc$		0		0			•	•	•	
パーキンソン病(2)	$\bigcirc$		0	•	$\bigcirc$				•	•	
パーキンソン病(3)	$\bigcirc$	0	$\bigcirc$	$\bigcirc$	0	•	•	•	•	•	
OPCA (1)	0		0	0							
OPCA (2)	- 0		•	•	•	•		•	•	•	
脳血管障害(1)	0		0	•	•				•	•	
脳血管障害(2)	0				•						
脳血管障害(3)	0		0		•			•		•	
急性心筋梗塞	0				0				5.55		
肺癌	$\bigcirc$		0	0			1				
Neuromyositis	0		0		•	•			•		
結核性髄膜炎	0		0	0	0				$\bigcirc$	•	
ヘルペス脳炎	0			0					0		
脳原発性悪性リンパ腫	0		0			•				•	
多発神経炎	0										
Hanging death	•		•	•	•						
生検例								1.15			
慢性肺気腫 肺癌	0	0	•	•	0						
肺癌(1)	0	0									
肺癌(2)	0	0		0							
肺癌(3)	Õ	Õ		•							

表2 筋病理所見

RRF; ragged red fiber CCO; partial cytochrome c oxidase deficiency C/T; core/targetoid fiber CB; cytoplasmic body RF; ring fiber



図1 臨床的正常例における横隔膜 A:ragged red fiber(\*). TC 変法×250 B: cytochrome c oxidase の部分欠損像(\*). CCO 染色×250 染性を認め、いわゆるモザイク状を呈した.なお、 これらの CCO 部分欠損を示した筋線維は myosin ATPase 染色にて、type 1 fiber であることが確 ◦認された.

C/T fiber も高率に認められたが、生検例ではい

ずれにもはっきりとしたものは認められなかった. その他,出現頻度は以上の所見に比べれば低下す るものの,CBや ring fiber が比較的多くの例で認 められ(図2),前者は ALSで,後者はパーキン ソン病で高率に認められる傾向にあった.横隔膜



図2 横隔膜 A: cytoplasmic body (ヘルペス脳炎例). TC 変法×125 B: ring fiber (慢性肺気腫例). NADH-TR 活性像×300 B': 同拡大像 ×800 では以上のような多彩な変化が認められたが,大 腿四頭筋ではこれらの変化はごく少数例にしか認 められず,その変化も軽微であった. 図3は、脳原発性の悪性リンパ腫で、頸髄転移 の結果、左横隔神経麻痺をきたした例における左 右の横隔膜である.健側に比し、麻痺側では RRF



図3 左横隔神経麻痺例A: 左横隔膜の挙上

- B: ragged red fiber の散在(右横隔膜). TC 変法×125
- C: ragged red fiber は認められない(左横隔膜). TC 変法×125

が明らかに少ないことが示された.

### 考 察

すでに我々は慢性閉塞性肺疾患における横隔膜 では, RRF, C/T fiber, type 1 fiber predominance が認められることを報告してきたり、そしてこれら の出現機序として、同疾患における横隔膜では気 道抵抗の上昇に打ち勝つため呼吸仕事量が増大し た結果、横隔膜全体の血液量を陵駕する状態、即 ち相対的な虚血が生じるためではないかと考えた。 Heffner ら<sup>2</sup>は、ラットの大腿部を阻血することに より, RRF, C/T fiber 等我々が横隔膜で認めた のと同様な変化を報告している。ところで、呼吸 不全状態にあり、更に一側の横隔神経麻痺を来す と、その側では健側に比し RRF は非常に少なかっ たが(図2), これは脱神経により横隔膜の動きが 減少した結果、酸素需要量が減り健側のような相 対的虚血を免れたためと考えられる. ALS の場合 も末期には呼吸筋麻痺にもとずく慢性呼吸不全の 状態を呈するが、慢性閉塞性肺疾患患者に比し RRF の出現が少なかったのは上記と同様, 脱神経 による筋の immobilization が関与しているのかも しれない. Karpati<sup>3)</sup>は、神経切断、腱切断、筋の 固定などを受けた筋はその活動性低下のためエネ ルギー及び酸素需要量が減少し、その結果 ischemic change を予防すると述べているが、同様な機序が 横隔膜に起こった可能性がある。 真木ら"は, 正常 対照例7例およびALS2例における剖検外眼筋に ついて検討しており,正常対照群では全例に RRF, ring fiber を認めている。特に興味深いの は、ALS 2 例のうち、より神経原性変化のはっき りした例では正常対照例に比しむしろ RRF が少な いという結果である.我々は、ALSの横隔膜では RRFの出現が少なく、それは脱神経による immobilization が関与すると考えたが、同様なことが subclinical な意味で外眼筋においても生じているのか もしれない。ただし、当然のことながらこれらの ALS 2 例はいずれも眼球運動制限がなく、また外 眼筋はもともと四肢筋ほどその組織化学的性質を 明らかにしえない複雑な fiber からなるなど, 簡単 には両者を同一視することはできず、今後の検討

が必要である.ただ、少なくとも横隔膜の場合に は、臨床的にはほぼ正常と考えられるような僅か な負荷で極めて容易に RRF が生じやすい筋である ことは確かであり、それは単に外的条件の変化だ けでなく, 筋そのものが oxidative reaction を起 こしやすいという,いわば筋側の因子も存在する と思われる. RRF の出現と脱神経との関係につい ては、西ら5の、ラットの大腿部を駆血した実験が ある。彼らは、予め支配神経を切断しておくこと により異常ミトコンドリアが増加し, RRF の形成 がむしろ加速化されて出現するという現象を見い 出しており、一見我々の結果と相反するように思 われる。しかし、我々の場合には、脱神経即ち横 隔神経麻痺によりその支配筋(横隔膜)の活動が 低下することにより、すでに相対的乏血状態から は免れていると考えている点で大きな相違がある. さて、こうした RRF の認められた生検例 4 例、 剖 検例2例について CCO 染色を行うと, 全例組織化 学的に CCO の部分欠損を認めた.近年, CCO の 部分欠損は必ずしもミトコンドリアミオパチーに 特異的ではなく、二次的な変化としても生じうる ことが示唆されており
<sup>6</sup>,我々が認めた横隔膜にお ける CCO の部分欠損もおそらくそうした non-specific なものであろうと思われるが、単に相対的乏 血によるものかどうかは今の所不明である。今後、 生化学的にも CCO の活性低下が認められるか否か 検討していく予定である.

横隔膜におけるその他の組織化学的変化として CB 及び ring fiber の出現がある.一般に,これら は何れも non-specific な変化とされている.しか し,CBにおいては少なくとも、ある場合において は、神経原性変化と関連して出現する<sup>n</sup>とされ、事 実我々も ALS では 4 例中全例に認められた.一般 に CB は type 2 fiber にみられるとされるが、我々 のヘルペス脳炎例では大部分が type 1 fiber に認 められ、福原ら<sup>8)</sup>の有機燐ニューロパチーと同様で あった.ただし、我々のヘルペス脳炎例では、ヘ ルペスウィルスそのものによる影響も無視できず、 今後 CB の出現する筋線維のタイプ別のみならず、 ウィルス疾患と CB という観点からも検討する必要 があろう.CB の出現機序については、いまだ明ら かではないが、横隔膜に CB の認められた ALS 4 例の大腿四頭筋について検討すると、明らかな神 経原性変化を呈しているにもかかわらず、1例に しか CB は見いだせなかった.このことから CB の 形成には単に脱神経ばかりでなく、前述したよう な虚血(相対的)あるいは筋活動の亢進等が直接 的、間接的に関与することが考えられる.

Ring fiber については、一端が遊離した筋、例 えば横隔膜や外眼筋等では,正常でも出現するこ とがすでに報告されている"が,我々が検討した臨 床的正常例3例ではいずれにも認められず、むし ろ慢性肺気腫を合併した例で多くの ring fiber が 認められた。我々の結果で特に興味深く思われた のは、パーキンソン病で高率に ring fiber が認め られた点である。朝長ら100もパーキンソン病の腓骨 筋で、やはり ring fiber を認めており、いまだ検 索例数が少ないため確定的なことは言えないが、 パーキンソン病では呼吸筋,非呼吸筋を問わず ring fiber が出現しやすいのかもしれない. 実験的に は、Ciesielskiら<sup>11)</sup>は横隔神経を電気刺激すること により、 横隔膜に C/T fiber のほか ring fiber の 出現を見ている. また, 一般に, ring fiber が多発 する疾患として筋緊張性ジストロフィーが有名で あるが、これらはいずれも筋の活動ないしは緊張 が亢進した状態にあり、さらに肺気腫例でring fiber の多発を認めた点からも、筋の活動あるいは仕事 量が増大した状態で ring fiber が出現しやすいの かもしれない.

以上,横隔膜では多彩な筋病変を呈するが同様 な変化は筋ジストロフィーを含む種々な神経筋疾 患で認められ,これらの筋病態を考える上で示唆 に富む所見と考えられる.

## まとめ

主として脱神経を来す神経筋疾患を対象とした 剖検横隔膜及び大腿四頭筋,臨床的に正常と考え られる生検横隔膜について組織化学的検討を行っ た.その結果,横隔膜では RRF, CCO の部分欠 損,C/T fiber を認めたほか,さらに CB や ring fiber など多彩な所見が認められ,特に前者の出現 については横隔膜における相対的虚血の関与を類 推した.また,RRFの出現が脱神経にもとずく immobilizationにより抑制される可能性や,CB, ring fiberなどの所見についても若干の考察を加えた.

# 文 献

- 1)磯崎英治,蝶名林直彦,田邊 等ほか:横隔膜病 変の組織化学的検討一特に呼吸不全を伴った非神 経筋疾患の剖検例について一(会)第28回日本神 経学会総会,1987.
- Heffner RR and Barron SA: The early effect of ischemia upon skeletal muscle mitochondria.
   J Neurol Sci 38: 295, 1978.
- Karpati G, Carpenter S et al: Experimental ishemic myopathy. J Neurol Sci 23: 129, 1974.
- 4) 真木寿之,杉田幸二郎ほか:筋萎縮性側索硬化症における外眼筋の組織学的検討.神経内科 11: 76,1979.
- 5) 西 克典, 佐藤 猛: 虚血による実験的ミトコン ドリアミオパチー;神経切断の影響. 臨床神経 21:773, 1981.
- 6) 埜中征哉,古賀靖敏ほか:ミトコンドリア脳筋症の病理,神経進歩 31:624,1987.
- Patel H, Berry K et al: Cytoplasmic body myopathy. Report on a family and review of the literature. J Neurol Sci 60: 281, 1983.
- 福原信義ほか: Cytoplasmic body の組織化学的, 免疫組織化学的,並びに電顕学的研究.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61年度研 究報告書, 1987, p110.
- 9) Bethlem J and Van Wijngaarden GK: The incidence of ringed fibers and sarcoplasmic masses in normal and diseased muscle. J Neurol Neurosurg Psychiat 26: 326, 1963.
- 10) 朝長正徳,田辺 等:パーキンソン病における骨 格筋の変化-とくに電顕像について-,臨床神経 13:111,1973.
- 11) Ciesielski TE, Fukuda Y et al : Response of the diaphragm muscle to electrical stimulation of the phrenic nerve. A histochemical and ultrastructural study. J Neurosurg 58: 92, 1983.

# 48) 凍結損傷による筋病変の組織学的研究

高瀬貞夫\*

研究協力者 小林和夫\*小暮久也\*

# はじめに

筋損傷後の再生過程は,静止状態にあった筋衛 星細胞が賦活化されひきおこされると考えられて いる.我々はこれまで本班会議において賦活化す る因子について研究を行なってきた結果,筋損傷 6~48時間後(12時間後に最大)の筋組織中に筋 芽細胞増殖促進因子(分子量96Kの蛋白質)の存 在する事がわかった<sup>10</sup>.今回は筋芽細胞増殖促進因 子の出現時期と筋芽細胞の出現時期との関連性を 検討する目的で,実験的再生筋における筋芽細胞 の出現時期を中心に組織学的検討を行なったので 報告する.

# 対象・方法

250gのウイスター系雄ラットの前脛骨筋を無菌 的に露出し,液体窒素で20秒間冷却した7gの鉄 棒(径7mm)を15秒間押し当てて凍結損傷を作製 した.経時的に損傷筋を採取し(3,15分,1, 2,3,6,12時間,1,2,3,5,7,10 日),採取筋の凍結切片,パラフィン切片,エポン 包埋による semi-thin 切片を作製し,光顕的に観察 した.又超薄切片を作製し,ウラン・鉛染色後, 電顕的にも観察した.

# 結 果

損傷3分後では損傷筋線維の径が増大し、細胞 質は eosinophilic となり、特に損傷部と非損傷部の 境界域(B域)で著明である(図1A). B域に限 局して氷の結晶によると思われる多数の小空胞が みられ、損傷部の筋細胞核は変形、萎縮し、クロ マチンが濃縮してくる。電顕的には細胞膜は断続 的に破壊消失し、細胞膜下のミトコンドリアの腫

\* 東北大学医学部脳研神経内科

大を認める.縦断標本では筋原線維の軽度の過収 縮,過伸展を認める.損傷15分後で過収縮,過伸 展は高度になり,核の周囲にわずかの細胞質をも つ筋衛星細胞が,基底膜をこえ間質に一部あるい は完全に遊離している所見もみとめられる(図1 B).

損傷1~2時間では損傷部の浮腫が著明となり, 多核白血球の浸潤をみとめる(図1C).損傷3時 間後ではB域に壊死線維がみられ(図1D),損傷 6時間後には壊死線維の細胞質内に多核白血球が 侵入してくる.損傷12時間後には損傷部に壊死線 維が広範に出現し,筋細胞核はほとんど消失して しまう.B域の壊死線維には macrophage の侵入 もみられるようになる.

損傷1日後のB域では多核白血球はみられず。 壊死線維内には単核状の侵入のみとなり(図2 A), RNA 染色 (methylgreen pyronine 染色) で は pyronine に強く染色される筋芽細胞が確認され た(図3A)、損傷2日後では B域は二層に分か れ,損傷側は①壊死線維の phagocytosis がみら れ、非損傷側は②増殖した筋芽細胞と macrophage で占められる (図2B). 筋芽細胞の増殖層では RNA 染色で陽性となるため、損傷部をとりかこん で帯状にみとめられる。損傷3日後では筋芽細胞 の増殖層はさらに拡大し、3~4日後に最大とな る (図3C). 損傷5日後では myotube が形成さ れ、B域は損傷側より① phagocytosis 層、②筋芽 細胞増殖層,③myotube層に分かれる(図2 C). RNA 染色では筋芽細胞増殖層は強陽性. myotube 層は陽性となる。筋芽細胞増殖層では多 くの線維は基底膜下に筋芽細胞が輪状に配列して, 中央部に macrophage を認める (図4A). 成長し た筋芽細胞には myofilament が形成され, 隣接す る筋芽細胞(多くは myofilament を形成していな



図1 凍結損傷による筋病変 A;損傷後3分(HE染色,×20) C;損傷後2時間(HE染色,×160) B;損傷後15分(電顕像,×3000) D;損傷後3時間(HE染色,×40)



図2 凍結損傷による筋病変 A:損傷後1日(HE染色,×20) C:損傷後5日(HE染色,×16) B:損傷後2日(HE染色,×40) D:損傷後7日(トルイジンブルー染色,×80)

い若い筋芽細胞)との融合がみられる.

損傷7日後では筋芽細胞増殖層とmyotube層 との間に、基底膜下に5~6コの筋芽細胞が配列 し、中央部は膠原線維で占められた輪状の細胞が 出現する(図2D, 4B).筋芽細胞の融合,成長



図3 凍結損傷による筋病変(RNA染色)
 A:損傷後1日.ピロニンに濃染する筋芽細胞(矢印)が出現する.(×100)
 B:損傷後2日.多数の筋芽細胞をみとめる.(×100)
 C:損傷後3日.筋芽細胞の増殖が最大となり,B域に帯状に分布する.(×20)

とともに基底膜が全周を囲むようになると、中心 部の膠原線維は間質の結合織となる.損傷10日後 では壊死組織,筋芽細胞の増殖はほとんど消失す る.一方 myotube の線維径はしだいに増大して、 RNA の染色性も弱くなってゆく.

# 考 察

筋細胞が損傷をうけると静止期(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期)にあった筋衛星細胞が賦活化因子により,合成期(S 期) へとすすむ.すなわち分裂能を有する筋芽細胞へ 変化して筋の再生が始まる.賦活化因子が衛星細 胞に作用してから筋芽細胞が出現するまでの期間 は,賦活化因子の作用機構を考えるうえで重要な 期間である.賦活化因子の作用している時期は我々 の研究より,損傷後6~48時間である事がわかっ



A;損傷後5日.基底膜(矢印)に接 して筋芽細胞(m)が輪状に配列し,中 央には macrophage(星印)を認める. (×2000) B;損傷後7日.図2Dの電顕像.

**B**,損傷後7日.凶2Dの電顕隊 (×2000) た"しかし筋芽細胞の出現時期の正確な決定は難 しい、筋芽細胞と同時に混在している macrophage を区別しなければならないが、初期の筋芽細胞は alkaline phosphatase 等のライソゾーム酵素の組 織化学的染色, 電顕的検査にても macrophage と の区別が判然としない.

今回我々は RNA 染色(methylgreen pyronine) を行なったところ,筋芽細胞は強陽性,macrophage は陰性~弱陽性となり,両者の区別は可能であっ た.筋損傷より24時間後に筋芽細胞が出現,損傷 3~4日後に最大となり,myotubeの形成ととも にしだいに減少する事が明らかにされた(図5). DNA は RNA と同時に S 期に合成されるので、<sup>3</sup>H -thymidin の取り込みからみた筋芽細胞の動態は RNA 染色によるものとほぼ同様の動態を示すと考 えられる,損傷筋における<sup>3</sup>H-thymidin の筋芽細 胞への取り込みは,損傷後12時間では取り込まれ ず,損傷後30~36時間に始めて取り込まれると報 告されている<sup>2)3)</sup>.

培養筋芽細胞の増殖促進因子(MPF)における 我々の研究より,筋損傷後 MPF は6時間後に出現 し,12時間後に最大となり、3日後にはほとんど 認められなくなる事を報告してきた<sup>11</sup>.つまり MPF が出現した後、筋芽細胞が出現するまでは6~18 時間かかる事になる(図6).この時間はおそらく MPF が $G_0/G_1$ 期にある衛星細胞の MPF 受容体と 結合し、新たな2次シグナルが形成され、シグナ ル量が $G_1$ 期後半にある限界点(R)をこえ、

hyaline fiber necrotic fiber interstitial edema phagocytoals cell infituration neutrocyte mecrophage myotalest myotalest 1 2 3 4 5 7 10

ATHOLOGICAL CHANGES AFTER COLD INJURY



DNA, RNA の合成を開始するまでの時間を意味 するものであろう。上皮成長因子においては休止 期の細胞に作用し, DNA 合成が行なわれるまで最 低12時間が必要であるとされている<sup>4</sup>. MPF にお いてもほぼ同様の時間を要すると考えられた。

MPF が損傷筋組織のどこで産生されるか興味の ある課題である。本実験でも明らかなように凍結 損傷では決して一様な再生組織像を呈するわけで はない. B域において最も早期に筋芽細胞の増殖 が始まり、しだいに損傷中心部へとすすんでゆく、 筋再生の場は B 域であり、おそらくは MPF も B 域に存在するのであろう. B 域に筋芽細胞が出現 する以前に壊死線維が帯状にみられ, MPF は筋原 線維の崩壊過程において壊死線維内で産生される のであろうか、壊死線維出現後まもなく(3時間 後)、macrophage が出現するが、損傷部位の macrophage に線維芽細胞,血管内皮細胞,平滑筋細 胞の増殖を促す因子(macro-phage-derived growth factor) が含まれている事が近年指摘され ておりり,筋芽細胞の増殖因子も macrophage でつ くられている可能性も否定できない.

どうして始めに B 域に再生がおこるかという事 については、①損傷中心部では衛星細胞も死に至 り、B 域での衛星細胞の損傷は軽度である事、② B 域は正常組織に接するため、血管、神経からの 栄養供給を受けやすい事、③ B 域は非損傷部より 遊走してきた衛星細胞に最も近い位置にある事な どが考えられよう.



図 6 筋芽細胞増殖促進因子(A) と筋芽細胞(B)の経時的変化

衛星細胞の遊走性については従来筋線維内での 移動は確認されていたが、基底膜をこえて遊走す る事はないとされていた。しかし最近標識された 培養衛星細胞を正常筋組織へ移殖すると、衛星細 胞は細胞外より基底膜の内側に入り込む事が確か められた<sup>6)</sup>.又 whole muscle の移植実験からも衛 星細胞が基底膜をこえて遊走しうる事が指摘され ている<sup>7)</sup>.衛星細胞をB域に遊走させる因子は MPF の濃度勾配によるものなのか、あるいは新たな因 子が作用するのか今後の研究によらねばならない.

まとめ

凍結による実験的損傷筋を作製し,経時的に形 態的検討を行なった.その結果,

①筋再生は損傷部と非損傷部の境界域より始ま り,

②筋芽細胞は筋芽細胞増殖促進因子の出現時期 より6~18時間遅れて,損傷24時間後より出現した.

③筋芽細胞は3~4日後で最も増加し、その後 myotubeの形成と反比例して漸減する事がわかった。

# 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・杉田班昭和61年度研究報告 書,1987, pp167-172.

- Bintriff S, Walker BE et al: Radioautographic study of skeletal muscle regeneration. Am J Anat 106: 233-245, 1960.
- 3) Mc Geachie JK and Grounds MD: Initiation and duration of muscle precursor replication after mild and severe injury to skeletal muscle of mice. Cell Tissue Res 248: 125-130, 1987.
- Carpenter G and Cohen S: Human Epidermal Growth Factor and the proliferation of human Fibroblasts. J Cell Physiol 88: 227-238, 1976.
- Wall RT, Harker LA et al : Factors influencing endothelial cell proliferation in vitro. J Cell Physiol 96: 203-214, 1978.
- 6) Lipton BH and Schultz E: Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. Science 205: 1292-1294, 1979.
- 7) Watt DJ, Morgan JE et al: The movement of muscle precursor cells between adjacent regenerating muscle in the mouse. Anat Embryol 175: 527-536, 1987.

# 49) ラット骨格筋における雌雄差と性腺摘出の影響

# 斎田孝彦\*

研究協力者 小 堀 真\* 西 谷 裕\* 山 室 隆 夫\*\*

骨格筋には,著明な性差が認められ,その性差 の発現に性ホルモンが関与していることは確かと 考えられる.男女性ホルモンが,骨格筋の成長分 化維持に及ぼす作用を調べ,どのタイプにどのよ うに働いているのかを知る目的で,ラット骨格筋 の雌雄差を検討し,性腺摘出の影響を各タイプ別 の筋線維径,数,構成比率について検討した.

# 方 法

ラットの骨格筋は酵素組織化学的にタイプ1, 2A, 2Bの3種に大別される. ヒトと異なり, タイ プ1は NADH-TR 染色でタイプ2A と2B の中間 の染色性を有する. タイプ1が slow oxidative, タイプ2A が fast oxidative glycolytic, タイプ2 Bが fast glycolytic である。骨格筋は、これら3 種の筋線維が、さまざまな比率でモザイク状に混 在しており、筋により、そのパターンが異なり、 同一筋肉内においても、そのパターンがいちじる しく異なる。筋線維径も、中心部と周辺部では差 があり、筋の形状、採取高位によっても異なる。 従って, 筋を比較する際には, 比較的細い紡錘状 の筋腹をもつ筋を選び、全筋横断切片を作製し、 それを構成するすべての筋線維の計測を行うこと が、誤差を少なくする為に必要である。筋線維型 の識別は、NADH-TR 染色等により、単一染色で 三種の識別は可能だが、実際には、筋線維型はさ まざまな中間型が存在している為, NADH-TR 染 色でも、識別に困難を感じることが多く、判定者 の主観で結果が異なる.

連続切片を用いて多種染色を組み合わせること により、同定は可能だが、手技が繁雑となる.こ

\*\*京都大学医学部整形外科

れに対しては、3種の筋線維型のうち2種のみか ら成る筋を求め、採取条件、高位を一定にするこ とにより、誤差を少なくすることができる。こう した条件を満たすものとして、soleusと caudofomoralisの2種の筋を選定し、使用した.

Soleus は代表的な slow muscle であり, 総線維 数は約3,000本.約80%がタイプ1, すなわち slow oxidative で, 残りがタイプ2A で, 2B は含まれな い. Caudofemoralise は, foot muscle で, 総線維 数約3,500本. タイプ1を含まず, タイプ2A すな わち fast oxidative glycolytic が約30%, タイプ 2B すなわち fast glycolytic が約70%で構成されて いる. Soleus を用いてタイプ1, caudofemoralis を用いてタイプ2A と2B の計測を行い, ヒストグ ラムを作製, 平均値, 標準偏差, 中間値を求め, 比較検討した.

同一家系のSD ラット40匹を用い、性腺摘出群 (雄10匹, 雌10匹)と無処置群(雄10匹, 雌10匹) に分けた、性腺摘出は生後3週で行い、以後、ゴ マ油0.1mlを週2回皮下投与した.無処置群に対し ては、性腺摘出操作、薬剤投与共に行っていない。 生後20週で、両側の soleus と caudofemoralis を同 条件下に、筋腹のほぼ中央部で筋クランプを用い て採取し, dt コンパウンドを用いて液体窒素によ り凍結、クリオスタットにより8µ厚の全筋横断連 続切片を作製した。染色は NADH-TR 染色及び ATPase pH9.4, 4.5, 4.2で行い, タイプ1, 2 A, 2B に識別, 同定した, 計測は, NADH-TR 柴 色標本を用いて行い、最終倍率100倍の全筋横断合 成写真を作製した。Kontron MOPAMO3画像解 析装置を用いて、筋を構成するすべての筋線維の lessor fibre diameter を直接計測し,数,平均値, 標準偏差、中間値及び5µ 平値のヒストグラムを求 め, 比較検討した. Lessor fibre diameter を用い

<sup>\*</sup>国立療養所宇多野病院臨床研究部

# RAT NO.27 FEMALE



図1 雌ラット soleus でのヒストグラム. い ずれの fibre タイプも分散の小さい正規 分布を示す.







# 表1 Average diameter of fibres

	S		Body Weight	Muscle	Fibre Diame	eter (µ)		
	X	b ;	(g)	Type 1	Type 2 A	Type 2 B		
0	8	10	403 ± 16	54.1 ± 1.0	42.0 ± 1.0	57.5 ± 1.4		
Control	Ŷ	10	274 ± 9	50.5 ± 0.9	35.3 ± 0.9	50.4 ± 1.4		
	ð	10	394 ± 11	54.6 ± 0.6	42.4 ± 1.0	52.9 ± 1.2		
GX-oil	Ŷ	10	315 ± 8	53.3 <sup>*</sup> ± 0.7	40.6 ± 0.9	53.2 ± 1.1		

(a) Muscle fibre diameter (る)



(b) Muscle fibre diameter (9)



**図3** 性腺摘出群 (GX oil 群) での筋線維径 の変化。

(a) 筋線維径(含)

(b) 筋線維径(♀)



ることにより,キンキングによる誤差も最少とす ることができ,かつ,計測者を同一とすることに より,主観による差を少なくするようにつとめた. 筋線維径のヒストグラムは,分散の少ない正規分 布を示す.各筋線維型の平均値をその個体の平均 値とみなし,t検定により有意水準5%で有意差を 求め比較検討した.

### 結 果

性成熟期に達した20週齢での雌雄差は、筋線維 径において、無処置群では、すべてのタイプで雄 が有意に大きく、特にタイプ2Aと2Bで著明であ る.雌の性腺摘出により、すべてのタイプで筋線 維径の増大が認められ、特にタイプ2Aで著明であ る. 雄の性腺摘出により、タイプ1と2Aは共に変 化しないが、タイプ2Bの径は著明に減少する.そ の結果、性腺摘出により、筋線維径の雌雄差が消 失する.

体重と筋線維径との関連をみると, 雄では性腺 摘出により体重には有意差がなく, 一方筋線維径 ではタイプ2Bの著明な径の減少が認められる.ま た, 性腺摘出を行った雌雄を比較すると, 体重に 約20%の差があるにもかかわらず, 筋線維径に有 意差が認められない。従って、筋線維径と体重と は、本実験では直接の相関はないと思われる. Soleus を構成する総線維数及びタイプ1と2Aの構 成比は、性腺摘出により2A が増える傾向がある が、有意差はない. また, caudofemoralis を構成 するタイプ2Aと2Bの構成比は、同様に有意差が ない. 従って、骨格筋における雌雄差は、その構 成パターン, すなわち性格の変化でなく, 筋線維 径, すなわち筋力に差があると考えられる. 卵巣 摘出は、女性ホルモン、すなわちエストロゲン、 プロゲステロンの除去と考えられるが、それによ り、すべての筋線維径が増大し、特にタイプ2A で 著明である. このことは、これら女性ホルモンの 筋線維径に対する抑制的作用をうかがわせる. 睾 丸摘出により、テストステロンが除去されると考 えられるが、これにより、タイプ1と2A は変化せ ず、タイプ2Bの径が著明に減少する。従って、テ ストステロンはタイプ2B との関連があるように思 われる。性腺摘出により雌雄差が消失することは, 性ホルモンの骨格筋に対する強い影響をうかがわ せる.

### 考 察

ラットの雌雄差に関しては、筋線維径において みられ, 雄が, タイプ1, 2A, 2B のすべてのタイ プにおいて大きいことが認められる。雌の卵巣摘 出、すなわち女性ホルモンの除去により、タイプ 1, 2A, 2Bのすべての径が増大し,特に2Aで著 明である。雄の睾丸摘出、すなわちテストステロ ンの除去により、タイプ1,2Aは変化せず、タイ プ2Bの径が減少する。その結果、性腺摘出によ り, 筋線維径においてみられた雌雄差が消失した. 筋線維総数及びタイプ別構成比率は、雌雄差を認 めず,また,性腺摘出により影響されない.従っ て、性ホルモンは、筋線維径すなわち筋力により 関与し、各タイプの構成比すなわち筋の性格には 関与していないものと思われる. 今後, 各種性ホ ルモンの授与実験を行い、性ホルモンが骨格筋に 与える影響を検討していきたいと考えている.

# 50)福山型先天性筋ジストロフィーの脳奇形 一小脳小多脳回の特徴とその成立機序

# 中村晴臣\*

研究協力者 高田邦 安\*

我々は昨年の本班会議で,福山型先天性筋ジス トロフィー (FCMD)の23週胎児の神経病理学的 検討の結果を報告し,本症では胎児期のかなり早 期から大脳皮質の全表面でグリア間葉組織が増生 し,これと関連して軟膜-グリア境界 (pial-glial barrier)の局所性ないしび漫性の欠損がおこり, その欠損部を通じて多数の神経細胞が皮質上部の グリア間葉組織内に進入し,種々の程度に神経細 胞へテロトピアを形成することによって,大脳皮 質形成異常が成り立つものと推測した<sup>9</sup>.

ところで、FCMD では大脳のみならず小脳皮質 にも広範な細胞構築異常が見られる.従来知られ ているその特徴は、①分子層と顆粒層が島状に不 規則に入り交じるいわゆる小脳小多脳回をなすこ と、②小多脳回は小脳上面とくに上半月小葉に限 局する傾向があること、③小脳の表面をしばしば 異所性の有髄線維束が走行していることなどであ る<sup>2</sup>.小脳皮質では、最初に表面を覆う外顆粒細胞 の遊走は大脳とは逆に外から中に向かって行われ、 満期出生後数カ月にわたってなお持続する<sup>3</sup>.従っ て、小脳小多脳回の発生機序は多少とも大脳のそ れとは異なることが想像できる.今回は、2歳例 および胎児例を用いて FCMD の小脳奇形を検討 し、その発生機序を考察した.

### 研究対象および方法

対象は死亡時年齢2歳のFCMD 患者の脳,およ び胎児例(胎齢23週)の脳である。

小脳は脳幹を含めて水平断とした.パラフィン 包理切片を作成しヘマトキシリン・エオジン (H&

\*鳥取大学医学部神経病理

E) 染色, ニッスル染色, 髄鞘 (ルクソールファー スト青) 染色を施し, 一部の切片ではグリア線維 蛋白 (GFAP) に対する抗体を用い免疫組織化学染 色を行った.また, 標本の一部から厚さ7 ないし  $10\mu m$ の連続切片を作り,連続的に観察し立体的構 造を把握した.また連続切片の一部を描画装置 (camera lucida)を用いてトレースし, さらにパ ーソナル・コンピューター画像解析装置 (Nikon Cosmozone98) によって三次元再構築を試みた.

#### 結 果

# 1)小脳小多脳回の特徴

連続切片の観察の結果,不規則に顆粒層と入り 交じる分子層は互いに樹枝状に連続し,脳表とも 連続していた.プルキンエ細胞も大多数は顆粒層・ 分子量の境界に分布していた.稀には皮質が局所 的に欠損し,白質が表面に露出する部分もあった. 樹枝状につながる分子層の中心部には血管が含ま れ,それらは最終的に脳表血管とつながっていた. コンピューター解析による三次元再構築ではその 特徴がよく示された(図1).大脳と異なり脳表の グリア結合織増生は顕著でないが,一部くも膜内 にGFAP 染色に染まる異所性グリア組織を認め た.

## 2)23週胎児における小脳奇形

肉眼所見として、小脳半球には偶発性と思われ る両側性くも膜下出血があり、その付近では小脳 回の形成を欠いていた。組織学的には、小脳虫部 の皮質がほぼ胎齢相当の正常細胞構築を示したの に対し、両側半球外側部の皮質は比較的疎な間葉 組織で覆われ、皮質成分は不規則な凹凸をなし、 外顆粒細胞層・ブルキンエ細胞層の配列が断裂し ていた.そこでは皮質表面に多数の小陥凹が存在 し,半球深部の白質にも多数の小空洞があった(図 2 a).小陥凹の内部には外顆粒細胞の小集団が少 量の間葉組織とともに取り込まれ(図 2 b),また 外顆粒細胞の小集団は時には間葉組織内に島状に, あるいは細い血管に沿って突出するようにも見え た.半球深部の小空洞は,やや疎な間葉組織を取 り込んでいた(図 2 c).白質内の小空洞の周囲に は神経細胞と見なしうる成分は見あたらず,また しばしば空洞内に出血を伴っていた.

連続切片標本で観察すると、単一切片で白質内 に多数認められた小空洞は、その中心に小血管を 含むかたちで小脳表面と交通していた。すなわち 小空洞内の間葉組織とくも膜下のそれは連続・一 体のもので、両者の出血も連続していることが分 かった。

# 考 察

発生学上,小脳は菱脳翼板と蓋板の移行部につ くられ,菱脳基板からできる橋との関連が深い. ヒトでは,胎齢6週頃に左右の菱脳唇 (rhombic lip)が厚くなって中央でつながり,やがて蓋板全 体が肥厚する<sup>3)</sup>.3カ月頃には中央部(将来の虫部) と外側葉(半球および片葉)が区別可能となるが, 小脳溝の出現や皮質神経細胞の成熟は,虫部や片 葉では半球に比べ,数週早く進む.

小脳原基と第四脳室蓋板の境界部では, 脳室壁



図1 小脳小多脳回と血管との関係. Nikon Cosmozone98で描いた三次元再構築像 をトレースしたもの. 黒丸の領域は顆 粒層.



 図2 23週胎児例の小脳(本文参照). ヘマト キシリン・エオジン染色: a 7 倍; b 60倍; c 150倍.

のgerminal layer から小脳の表面に沿って神経細胞が遊走しはじめ、やがて表面を覆って外顆粒層をつくる。Germinal layer の細胞の一部は直接放射状に皮質に向かい将来 Purkinje 細胞となり、一部は脳室付近に留まって小脳核をつくる。皮質表面の顆粒細胞はここでさらに増殖して数を増し、やがて順次分子層内に平行線維を出し、さらに皮質深部に降りて Purkinje 細胞層よりも深部に到達し、内顆粒層をつくる。この顆粒細胞の遊走は胎齢15週頃から生後数カ月にわたって行われ、また大脳皮質の radial glia に相当する細胞遊走のガイドは、Bergmann glia であるといわれる<sup>3</sup>.

以上に述べた小脳皮質細胞の遊走の特徴を大脳 との比較で要約すると、①神経細胞の大多数を占 める顆粒細胞の遊走は、大脳とは逆に表面から皮 質深部に向かって行われること、②大脳皮質でほ ぼ遊走が終了した生後20週以後も、小脳外顆粒層 の細胞は皮質表面でさらに増殖し続けていること、 ③細胞遊走は生後数カ月にわたって行われること、 ④発生的に橋との関係が深いこと、などである。

今回,生後の小脳小多脳回を連続切片で検討す ると,分子層が血管を中心にして,不規則に枝分 れしながら,深部に陥入していくのが確認できた. 脳表-髄膜(血管)と,分子層,顆粒層さらに Purkinje細胞の相互の位置関係は正常皮質と基本 的に同一であり,文字どおり小脳脳回のminiature (小多脳回)というべきものであった.言い替え れば小脳小多脳回において,皮質細胞は分子層内 で複雑に分岐する血管を中心に異常な配列を来た したと想像され,おそらく顆粒細胞やPurkinje 細

胞自身の遊走能力やそれらの相互作用に異常の原

因があるのではない.

また、FCMD 胎児脳の神経病理学的検索の結 果,小脳皮質の表面でも大脳同様,間葉系の増殖 がみられ,直下の小脳皮質も既に異常を示したが, 生後の小脳皮質奇形とは程遠く,いわばまだ発達 途上にある.これは,大脳皮質が二次溝はまだ形 成されないものの,生後とほとんど基本的に同一 の異常細胞構築を示すのと対照的で,おそらく, 胎齢23週という時点で,大脳では細胞遊走が既に ほぼ終了しているのに対し,小脳皮質ではまだ外 顆粒細胞が皮質表面で活発に増殖し、その細胞遊 走も始まったばかりの時期であることに対応する。 その異常所見は、第一に皮質表層部における顆粒 細胞を取り込んだ多数の小陥凹の形成であり、第 二に深部における比較的疎な結合組織を含む小空 洞の形成である。連続切片の観察で深部の小空洞 は小脳表面との交通が確認され、その中心に小血 管が含まれていた。

これらの所見から FCMD における小脳小多脳回 の形成機序を推測すると(図3),小脳でもやはり 大脳同様胎生期の皮質表層におけるグリア間葉組 織増生が重要で、とくに小脳実質の内部に及ぶ結 合組織の増生が奇形発生の鍵を握るように思われ た.小脳では胎児後期以後もなお外顆粒細胞には 増殖能力があるので、その数の増加にしたがって 表面の小陥凹は複雑化し、最後に顆粒細胞が、正 常の小脳皮質と同様の機序で、血管(髄膜組織の 一部)から遠ざかる方向に遊走して島状の顆粒層 を形成するものと推測された。

FCMD の胎児小脳皮質ではなぜこの様な結合組 織あるいは顆粒細胞を取り込んだ小空洞ないし小 陥凹が作られるのであろうか.大脳では軟膜-グリ ア境界の局所的な欠損により、神経細胞が、くも 膜下、すなわち正常位置よりも外側に集積するこ



- 図3 FCMDにおける小脳少多脳回の成立ち 1. 髄膜間葉組織の増生と共に,血管 に沿って結合組織が増加,小陥凹な いし小空洞を作る。
  - 2. 外顆粒層の増加と共に空洞が複雑 化し、さらに空洞表面を顆粒細胞が 覆うようになる.
  - 顆粒細胞は髄膜(血管)から遠ざ かる方向に遊走し、島状の顆粒層を 作り、小多脳回が完成する。

とが奇形発生の鍵と考えられた"ところが小脳で は結合組織の増生は大脳とは逆に外から内に向か うように見える. また結合組織内のグリア増生も 大脳ほど顕著ではない、その理由は今のところ明 らかでないが、大脳における細胞遊走が内から外 に向かうのに反し、小脳では顆粒細胞は表面でま だ活発に増殖し、やがて深部に向かって遊走して いくので、グリア細胞や神経細胞は、仮に大脳と 同様の軟膜-グリア境界の局所的な欠損があっても 外部に能動的に飛び出しにくく、逆に結合組織だ けが内部に進入するのかも知れない. すなわち, FCMD では、本来混じり合わないはずの髄膜間葉 組織と神経グリア組織が限界板の欠損により互い に入り交じり合って皮質奇形を作るが、大脳と小 脳では細胞遊走の方向が正反対のため、奇形発生 のプロセスが一見逆方向に見えるのであろう.

今後, FCMDの脳奇形の発生メカニズムの解明 のためには, 髄膜間葉組織の異常な増生と軟膜-グ リア境界の破壊がどの種な生化学的異常に基づく ものか,さらにそれが骨格筋の変性といかなる関 連があるかを追究することが必要と思われる.

# 献

文

- Takada K, Nakamura H et al: Cortical dysplasia in a 23-week fetus with Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD): a case analysis. Acta Neuropathol (Berl) 74: 300, 1987.
- 2) Takada K, Nakamura H et al: Cortical dysplasia in congenital muscular dystrophy with central nervous system involvement (Fukuyama type). J Neuropathol Exp Neurol 43: 395, 1984.
- 3) Rakic RL and Sidman P: Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. Brain Res 62: 1, 1973.

# 51) ネマリンミオパチーの進行性

# 埜中征哉\*

研究協力者 石浦章 一\* 荒畑 喜 一\* 植田初 江\*\* 丸山 哲 弘\*\*\*

ネマリンミオパチーは先天性非進行性ミオパチ - (congenital nonprogressive myopathy) に分 類され、乳児期から筋力、筋緊張低下はあるもの の、非進行性で予後はよいとされてきた。しかし 中には急速に進行し、呼吸不全をみたり<sup>11</sup>, 死に到 る例のあることも知られていて、けっして予後良 好でないことが分かってきた。ネマリンミオパチ ーではなぜ、どのようにして筋力低下が進行する のか、それを知るために本研究を行った。 例6は剖検筋)を使用した(表1). 症例1~5は 乳児期に発症し,現在まであまり明らかな進行が みられない典型例であった.症例6は乳児期より 症状があり,急速な進行を示し,3歳9月で死亡 した.この患者には拡張性心不全があり,心筋も 侵されていることが臨床的に疑われていた.症例 7は41歳まで全く正常で,2年間で急速な進行を みた成人発症例で,筋生検で本症であることが分 かった.

### 対象・方法

ネマリンミオパチー7例,対照7例の生検筋(症

生(剖)検筋は採取後直ちに液体窒素で冷却した イソペンタン内にて固定,連続切片を作成し,へ マトキシリン・エオジン (H&E), Gomoriトリク

表1 ネマリンミオパチー症例の臨床像のまとめ、ネマリン小体量、酸フォスファターゼ 活性。

Patient	Ace/Sex	Onset	Walked	Bragranoian	Muscle Biopsy		
			Alone		Nemaline	Acid P.	
1	8m/M	2M	_	?	-+++	+	
2	17m/M	Neon.	-	?	+	++	
3	4y/F	Neon.	18M	_	+	+	
4	6y/F	Neon.	4 ý		+	_	
5	24y/F	ЗМ	-	slow	+	+	
6*	3y9m/M	ом	-	rapid	<del>-111</del>	+++	
7 **	43y/M	41Y	Norm.	rapid	+++	+++	

\* Patient 6 : died at 3y9m from cardiac failure

Patient 7 : adult onset

<sup>\*</sup>国立精神センター神経研究所

<sup>\*\*</sup>国立循環器病センター病理

<sup>\* \* \*</sup> 長野赤十字病院神経内科

ローム変法,それに各種組織化学的検索を行った. さらに蛍光基質を使ってカテプシンBの活性をみた. 症例2,6,7にはカテプシンB,L,Hの抗 体を使用しその抗原性を免疫組織化学的に検索した. 生検筋には全て電子顕微鏡的検索を型のごと く行った.

生(剖)検筋の一部は採取後凍結し-70℃保存し、 生化学的分析(カテプシン B&L、カテプシン H、 酸フォスファターゼ、アミノペプチダーゼ B、M、 ディペプチディール、ペプチダーゼ I ~IV)を行 った.

# 結 果

### 1) 一般組織化学的所見

全例に筋線維の大小不同,ネマリン小体の存在 を確認した.ネマリン小体の数と重症度,経過の 速さはある程度相関しても必ずしも一致しなかった. 症例7を除いて全例に,タイプ1線維小径化

(type 1 fiber atrophy) と数の優位 (type 1 fiber predominance) を認めた. 症例 7 ではタイプ1, 2 線維とも大小不同を示し,小径線維が群をなす 傾向にあった.しかしそれは神経原性のものとは 考えられず,また筋線維タイプ群化 (fiber type grouping) はみられなかった.

# 2)酸フォスファターゼ染色

特記すべきことは全例に、特に小径の線維に酸 フォスファターゼ (AcP) 活性の上昇をみたこと である。正常筋でもわずかに点状に活性の高い所 が線維内にみられたが、ネマリンミオパチー筋で は非進行例でもその活性が高かった。急速増悪例 ほど高く、症例6、7の小径筋に強く、特に小例 6の心筋では強い活性を示した(図1). 心筋線維



図1 ネマリンミオパチーで心筋障害で死亡例は心筋線維も細くなり(A),また酸フォス ターゼの活性も著しく上昇している(B)(写真では黒い点として表現されてい る).正常対照骨格筋(C)では活性はほとんどない.A:H&E, B, C:酸フォス ファターゼ.A-C:×200.

は細く間質の結合織も増加していた.この例では 心筋にもネマリン小体を認めた.

# 3)筋内カテプシン活性

筋線維の崩壊に関与するといわれるカテプシン Bの活性を蛍光基質を用いて染色すると,AcP活 性の高い症例6,7の小径線維に活性の上昇をみ た.しかし筋ジストロフィーの壊死線維にみられ る貪食細胞の活性に比較すると,はるかに弱い活 性であった.

カテプシン B, H, L の抗体を用いて染色した結 果は全て陰性であった.

# 4) 生化学的分析

生(剖) 検筋の生化学的分析ではカテプシン B& Lの値がネマリンミオパチー筋で有意に高値を示し た(図2).特に急性増悪を示した2例(症例6, 7)で高く,酸フォスファターゼの活性とよく平 行した.心筋は患者で高値を示したが,対照でも 高値のものがあり,有意にはとれなかった.AcP 活性は生化学的にはやや高値を示すのみであった.

# CATHEPSIN B&L







図3 ネマリンミオパチーの急性増悪例では筋原線維が崩壊している像をしばしば認める. 症例2,×12,000



図4 筋原線維の乱れの著しいところでは、多くの自己貧食空胞(矢印)を認める。 症例7.×10,000.

また, dipeptidyl peptidase I (DPI) は正常範囲 であった.

# 5) 電子顕微鏡所見

全例にネマリン小体を認めた. さらに急性増悪 例では筋原線維の崩壊像がみられ(図3),特に急 性増悪例では多くの自己貪食空胞(autophagic vacuoles)を認めた(図4).この空胞は膜をも ち,しばしばグリコーゲン顆粒を入れていた.時 に rimmed vacuoleにみられるようなミエリン小 体を認めた.

### 考 察

ネマリンミオパチーは乳児期から筋緊張低下, 筋力低下があり発育発達の遅れを特徴とする.中 には乳児期や小児期に死亡する例もあるが,多く は歩行を獲得し,その後の経過は良好で非進行性 であると教科書的には記載されている.しかし, 急性増悪し呼吸不全や歩行不能となる例もある. このように急性増悪するのはどのような病理学的 変化に起因するかは全く知られていなかった. 急性増悪する例に限らずネマリンミオパチーの 生検筋では AcP の活性が高いこと,特に急性増悪 例にその傾向が強いことに気付いた. AcP はリソ ゾーム酵素であるので,本酵素活性が高いのは壊 死線維に侵入する貪食細胞であり,それに続く再 生線維である.また自己貪食機転が亢進した rimmed vacuole,糖原病 II型,軽度ではあるが脱神経 筋でも高活性がみられる.また筋緊張性ジストロ フィーの小径線維も高活性を示す.

ネマリンミオパチーでは壊死,再生がみられないので、生検筋でAcPが高いのは自己貪食機転が 亢進していることが考えられる.それはリソゾー ム酵素の一つで、筋原線維の崩壊に大きな役割を 果たすというカテプシン B&Lの活性上昇があった ことからもうらづけられた.また電子顕微鏡で autophagic vacuoles を多く認めたことからも疑い のない事実と考えられる.

ネマリンミオパチーでは筋線維のタイプの分布 の異常があること、筋線維の未熟性があることよ り、何らかの神経因子の欠如が推定される<sup>2</sup>. その

-294-

ために筋構造蛋白の構成 (assembly) の異常を来 しネマリン小体を見るのであろう.このような筋 では筋原線維の局所的な崩壊を来し易く,その結 果崩壊産物の自己貪食が起こると考えられる.急 性増悪を来す筋では崩壊は著しく亢進し,ために 自己貪食機転が顕著となり,組織化学的,生化学 的にリソゾーム酵素の活性上昇として表現される と想像される<sup>3,4)</sup>.成人発症例のネマリンミオパチ ーは先天性のものと発症機序は異なるかもしれな いが急性増悪する機序は同じと考えられる.

症例6 でみられたような心筋罹患は極めてまれ である<sup>5</sup>.しかし心筋罹患による死亡例の報告も散 見されるので、本症では心筋障害にも注目する必 要がある.なぜ心筋が侵されるかその機序は不明 であるが、心筋にも AcP の活性が上昇していたこ とは、やはり骨格筋と同様の変性機序が働いてい たと考えるべきであろう.

ネマリンミオパチーの発生機序は不明である. しかし急性増悪例では何らかのプロテアーゼの酵 素活性が上昇し,筋原線維の崩壊が緩徐に進行し ていることはリソゾームの酵素活性の上昇からみ て疑いない. E64のようなチオプロテアーゼインヒ ビターの使用が急性増悪に効果をもたらす可能性 もある.

#### まとめ

①ネマリンミオパチーの7例の生(剖)検筋を

検討し,急性増悪例ほど AcP,カテプシンなどリ ソゾーム酵素活性の上昇を組織化学的,生化学的 に認めた.

②電子顕微鏡的には急性増悪例ほど,筋原線維の崩壊像,自己食食空胞の増加を認めた.

③本症の急性増悪は何らかのプロテアーゼの活 性上昇,筋原線維の崩壊,自己貪食機転の亢進が あり,再生が乏しいためと思われた.

#### 文 献

- 石橋俊秀,宮尾益知ほか:重篤な呼吸不全を呈し たネマリン・ミオパチーの1幼児例。脳と発達 17: 565, 1985.
- Nonaka I, Tojo M et al: Fetal muscle characteristics in nemaline myopathy. Neuropediatrics 14: 47, 1983.
- 3) Nonaka I, Sunohara N et al : Autosomal recessive distal muscular dystrophy : a comparative study with distal myopathy with rimmed vacuole formation. Ann Neurol 17 : 51, 1985.
- Takeuchi Y, Iwami H et al : Rimmed vacuoles in biopsied muscle of nemaline myopathy. Acta Neuropathol (Berl) 68 : 253, 1985.
- 5) Stoessl JA, Hahn AF et al: Nemaline myopathy with associated cardiomyopathy. Report of clinical and detailed autopsy findings. Arch Neurol 42: 1084, 1985.

# 52) 成熟mdxマウス長趾伸筋細胞膜のCaveolae密度の Freeze-Fracture法による検討

ーヒト筋ジストロフィー症との比較-

若山 吉弘\*

研究協力者 澁谷誠 二\*

# 目 的

X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse は、その異常遺伝子部位が Duchenne 筋ジストロフィー症 (DMD) と近似しており<sup>10</sup>, 光顕, 電顕的病理所見においても類似性が認めら れている<sup>233)</sup>. また最近ではヒト筋ジストロフィー 症の筋表面膜形態異常も明らかにされており<sup>40-77</sup>, 本年度は、Freeze-Fracture 法により、mdx マウ ス筋表面膜の Caveolae 密度と DMD および福山 型先天性筋ジストロフィー症 (FCMD) の筋表面 膜 Caveolae (CA) 密度とを比較検討した.

# 方 法

生後 8 週, 16週および24週における雄 mdx マウ スおよび正常雄コントロールマウスの各々 6 匹ず つの長趾伸筋 (EDL) を使用した. 各々マウスの 右 EDL についてはイソペンタン・液体窒素下で冷 凍後, 光顕組織化学標本作製に利用し, myosin ATPase (pH10.0, 9.4, 4.6, 4.3, 4.0) 染色で fiber type の分析を行った. 一方, 左 EDL 筋は2.5 % glutaraldehyde の0.1M リン 酸 緩 衝 溶 液

(pH7.4) で固定後,若山ら<sup>8)</sup>の方法でFreeze-Fracture(F-F)標本を作製し,CA 密度算定は各々 のマウス1匹につき,1本の筋線維で少なくとも 10~29.6µm<sup>2</sup>の細胞膜面積をもつ筋線維10本(5P 面および5E 面)を観察の対象とした。各々の stage で最終倍率4万倍の mdx 群60枚と対照群60枚,計 120枚の写真をすべて code 後混ぜ合せ,mdx 群,

\*昭和大学藤が丘病院神経内科

対照群がわからない状態でCA 密度を算出し, decoding 後両群間で統計的に比較検討した.

# 結 果

光顕所見:H-E, Gomori-trichrome, PAS お よび oil red O 染色による観察において, mdx マ ウスのどの stage も,中心核線維よりなる筋線維で 占られ,その中に壊死線維および貧食細胞の浸潤 がみられたり,比較的大きな核を持ち,好塩基性 に染まる胞体よりなる再生筋線維の集塊が認めら れた.中心核線維は,生後8週では3分の2以上 を占め,生後16週および24週ではそのほとんどす べての筋線維が中心核線維であった.結合組織お よび脂肪組織の増加は認められなかった.

Myosin ATPase 染色による fiber type の分析 (表1): どの stage も、そのほとんどが type 2線 維よりなり、 type 1線維は 2%以下であった.ま た再生筋線維とみなされる type 2C線維は、生後 8週 mdx マウスで7%,生後16週では 6%,生後 24週では 3%と同じ成熟 mdx マウスの中でも加齢

表1 Fiber type percentage in EDL muscles from control and MDX mice at different stages after birth

		type 1	type 2A	type 2B	type 2C
	MDX	1 %	69 %	23 %	7 %
8 4	Control	1 %	66 %	33 %	0 %
	MDX	1 %	70 %	23 %	6%
10 W	Control	2 %	64 %	34 %	0%
	MDX	1 %	83 %	13 %	3 %
24 W	Control	1 %	67 %	32 %	0 %

-296-

に伴い減少してみられた.

Freeze-Fracture 法による CA 密度: 低倍の倍率 における P 面および E 面の観察において、コント ロールマウスの CA の分布は、A 帯よりも I 帯によ り多く認められたが、mdx マウスでは sarcomere band とは無関係に分布していた。

生後 8 週, 16週および24週における各々の筋表 面膜 CA 密度は, コントロール群において12.47± 1.21/µm<sup>2</sup> (Group mean±SE), 12.28±0.55およ び10.12±1.44であり, mdx 群 では15.61± 0.77 (p>0.1, two-tailedt test), 18.48±0.51 (p< 0.001) および15.45±1.11 (p<0.02) であった (図 1,2および表 2).

# 考 察

筋表面膜内部構造の構成成分である CA は, pinocytotic vesicle や T 管の開口部と関連を持つ という考えや, membrane reservoir としての働き などが考えられているが,その詳細な機能につい ては不明である.しかしながら,様々な筋病態に 伴い,その数の減少や増加がみられることが知ら れており,重要な機能を担っていることには違い ない.例えば,塩酸 bupivacaine 処理により作製 したラット EDL 筋の変性過程の強い時期では CA 密度の減少が<sup>8)</sup>,再生過程では逆に増加がみられる ことが報告されている<sup>9</sup>.

ところで DMD では CA 密度は増加傾向を示す ことが報告されており<sup>5)6)</sup>,本研究での生後16週お よび24週の mdx マウスは同様の傾向を認めた.こ れは DMD における数多い再生筋線維の存在と関

表 2 Caveolar density/µm<sup>2</sup> in EDL muscle plasma membranes from control and MDX mice at different stages (Group mean±standard error of the mean)

_ /	Age	Control	MDX
8	weeks	12.47 ± 1.21*	15.61 ± 0.77≎
16 weeks		12.28 ± 0.55* *	18.48 ± 0.51 ° °
24	weeks	10.12 ± 1.44***	15.45 ± 1.11° ° °
*	P > 0.1	(2 tailed t test)	
* *	P < 0.001	(2 tailed t test)	
* * :	* P < 0.02	(2 tailed t test)	



%



連をもつ可能性も考えられているが、生後16週お よび24週の mdx マウスの type 2C 線維は、それぞ れ6%および3%と DMD と比較して少なく、こ の再生筋細胞膜の CA 密度を観察しているとは考 えにくく、むしろ mdx マウスの massive な筋線維 変性後の未熟再生筋から成熟した type 2C の性格 を示さない筋細胞膜の Caveolae 密度を示している と考えたい. 一方、FCMD における CA 密度は正 常であり<sup>7</sup>、より若い生後 8 週の mdx マウスの筋 細胞膜と同様の所見であった. このことは、mdx マウス筋線維の massive な変性後の再生筋でも、 成熟途上の筋細胞膜の CA 密度を示していると考 えられ、FCMD 筋細胞膜は DMD のそれより、よ り未熟(未分化)であることが示唆された.

# 結 語

- 生後8週 mdx マウスのEDL 筋表面膜CA 密度は正常であり、FCMDと同様であったが、生後16週および24週のCA 密度は増加しており DMDと同様の傾向を有していた。
- 2. 本研究では,再生筋でも未熟なものは CA 密 度は正常であり,このことより FCMD の筋細胞



 ☑ 1 Freeze fracture images of control (CONT) and mdx (MDX) EDL muscle plasma membrane P faces at 16 weeks after birth are shown. Caveolae in mdx are more numerous than those in control. Arrows show caveolae. Bar=1µm, ×40000.

膜は DMD のそれより,より未熟(未分化)あ ることが示唆された.

# 文 献

- Heilig R, Lemaire C et al: Localization of the region homologous to the Duchenne muscular dystrophy locus on the mouse X chromosome. Nature 328: 168, 1987.
- Bulfield G, Siller WG et al: X chromosomelinked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1189, 1984.
- Mora M and Engel AG : Morphologic studies of the mdx mouse. Muscle Nerve (supple) 9 : 208a, 1986.
- 4) Schotland DL, Bonilla E et al: Freeze fracture studies of muscle plasma membrane in human muscular dystrophy. Acta Neuropathol (Berl) 54: 189, 1981.
- 5) Bonilla E, Fischbech K et al: Freeze fracture

studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. Am J Pathol 104: 167, 1981.

- 6) Wakayama Y, Kumagai T et al: Caveolar density of muscle plasma membrane in Duchenne Dystrophy. J Clin Electron Microscopy 18: 5, 1985.
- Wakayama Y, Kumagai T et al: Freeze-fracture studies of muscle plasma membrane in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Neurology 35: 1587, 1985.
- 8) Wakayama Y and Shibuya S: Quantitative freeze fracture electron-microscopic analysis of muscle plasma membrane of bupivacaineinduced myopathy. J Neurol Sci 72: 31, 1986.
- 9) Yoshimura T and Schotland DL: Freeze fracture analysis of muscle plasma membrane in bupivacaine HCL-induced degeneration and regeneration. J Neuropathol Exp Neurol 46: 522, 1987.

# 53) Core formation の免疫学的研究

清水輝夫\*

研究協力者 萬 年

先天性ミオパチーの一型であるセントラル・コ ア病は、1)ほとんどの筋線維がタイプ1型であり タイプ2型線維の発現がない、2)筋線維中心部に コア形成がみられる、の2点に特徴がある.この うちコア形成は組織化学的にミトコンドリア系酵 素活性がないことによって最も明らかにみい出さ れ、電顕上ミトコンドリア・グリコーゲン顆粒が なく、筋原線維構造が残されている(structured core).これに類似する構造物として慢性神経原性 筋萎縮症等にみられるターゲット線維、呼吸困難 患者の横隔膜に観察されるコア形成(横隔膜コア) が知られている.

今回この3種類の core formation を筋蛋白に対 する様々な抗体をもちいて免疫組織学的に検討し, セントラル・コア病の特異性を見い出そうとして 以下の実験を行なった.

### 方法および材料

セントラル・コア病9歳3ヶ月女子と進行性脊 髄性筋萎縮症70歳男子の上腕二頭筋の生検材料お よびデュシャンヌ型筋ジストロフィー・慢性気管 支拡張症の横隔膜(死後3時間以内の剖検材料) の凍結横断切片10µmをアセトン固定し,間接螢光 抗体法にて染色・観察した。

使用した抗体はミオシン重鎖(QM355)・コネク チン (SM1・36・2)・アクチン (Actin 3)・トロ ポミオシン (G17-1)・α-アクチニン (Sα5-17) に 対するモノクローン抗体とウサギ抗ネブリン抗血 清・ウサギ抗 Z-プロテイン抗血清の7種類であ る.後者の2つの抗血清は千葉大学理学部丸山工 作教授の提供による. 徹\* 石 原 傳 幸\*

### 結 果

最初にセントラル・コアについてしるす. 抗ミ オシン重鎖モノクローン抗体 QM355はタイプ2a・ 2b・2c・1型線維のすべてを共通して染める抗体 である、これでセントラル・コア病を染色する` コア部分は、他の細胞質部分同様によく染まって おり、一部のコアで抗原性が低下しているのみで あった、セントラル・コア病ではタイプ1型線維 しか発現していないので、タイプ1型ミオシン重 鎖特異モノクローン抗体 SM1・11・2 をつかって みたが結果は同じであった. 抗コネクチン抗体 SM1・36・2による染色では観察したすべてのコ アでその抗原性がよく保たれていた. この結果は ミオシン・フィラメントやコネクチンフィラメン トがよく保たれることを示唆している。これに対 し, 抗アクチン抗体 Actin 3 および抗トロポミオ シン抗体 G17・1 ではそれらの抗原性がよく保た れているコアと低下しているコアとがあった. Z帯 構成蛋白である α-アクチニンに対するモノクロー ン抗体 Sα5-17では抗原性が低下しているコアもみ られるが多くはよく保たれていた。これに対し同 じ Z 帯構成蛋白である Z-プロテインに対する抗血 清では、観察したすべてのコアでその抗原性が低 下していた.2帯のすぐ両脇にアクチン・フィラメ ントと直角方向に走る N-line を形成するネブリン に対する抗血清でみると、その抗原性がコア部分 で強く低下しており Z-プロテインと同様の染色パ ターンを示した。以上からセントラル・コアでは 特に Z 帯構成蛋白に変化がみられ, Z-プロテイン の抗原性が低下していたこと、それにネブリンの 抗原性の低下にはっきりとした異常がみつかった.

次に70歳男性にみられたターゲット線維につい て示す。このコアの特徴は、調べた7種の抗体で、 ほぼすべてのコアで類似の染色性を示したことに

<sup>\*</sup> 東京大学医学部脳研神経内科

<sup>\*\*</sup>国立療養所東埼玉病院

ある.特定の抗原性がコア部分で失なわれている というのではなく、すべての抗原性は保たれてい た.ただコアが一様に染まるのではなく、位相差 顕微鏡で濃くみえるコア最中央部が非常につよく 染色されていた.コアの辺縁部はかえって抗原性 が低下しており、コアの周囲は一様に再び抗原性 が保たれていた.従って筋線維横断面でみて同心 円太に三層に区別でき、最中央部が最も強い抗原 性で、次いで最外層に抗原性がみられ中間層は低 下内至消失していた.このような染色パターンが 検討したすべての抗体で共通してみられた点にこ のコアの特徴があった.少数例ではあるが一部の コアではミオシン重鎖の抗原性が低下しているも のがあり、次に述べる横隔膜コアとやや類似する 面もあった.

最後に横隔膜に疾患非特異的にみられる横隔膜 コアについて示す.抗ミオシン重鎖抗体および抗 コネクチン抗体で染色するとコア部分全体が免疫 性をほぼ完全に失なっていた.これはセントラル・ コアやターゲットでは見られなかった変化である. 抗アクチン抗体では一部のコアで抗原性が残って いるものもあり低下してしまっているものもあっ た.抗トロポミオシン抗体,抗ネブリン抗体では 抗原性が低下していた.これに対し,抗  $\alpha$ -アクチ ニン抗体・抗 Z-プロテイン抗体はその抗原性の低 下しているコアはなく非常によく保たれていた. 但し,その染色性は必ずしも一様でなく spotty な ものが多かった.この点でもセントラル・コアの 染色性とは異なると考えられる.

### 考 察

以上の結果の概略を表1に示す.セントラル・ コアで最もはっきりみられたのはネブリン・Z-プ ロテインの抗原性が低下し,α-アクチニンや細フ ィラメント蛋白の抗原性が軽い低下傾向を示して いたのに対し、ミオシン・コネクチンが非常によ く保たれていたことである.これに対し横隔膜コ アはミオシン・コネクチンの抗原性がほぼ完全に 失なわれてしまっており一部細フィラメント蛋白 の抗原性が残っていたものの主としてZ帯構成蛋 白がよく保存されていた.このことからセントラ

#### 表1 Core formation の免疫性

	セントラル ・コア	ターゲット	横隔膜コア
抗ミオシン重鎖	->	D	(-)
抗コネクチン	→	D	(-)
抗アクチン	→ or ↓	D	→ or ↓
抗トロポミオシン	→ or ↓	<b>D</b> .	Ļ
抗ネプリン	ļ ↓	D	Ļ
抗 α アクチニン	→or↓	D	
抗 Z プロテイン	Ļ	D	→

(-);免疫性の消失, ↓;低下, →;保存

D: disstorted の略。抗原性が保たれているがコア以外の部分と は異なった免疫性を示す。

ル・コアと横隔膜コアは、非常に異質のものであ ることを示唆しており病態上異なったメカニズム の存在が示唆される。両コアともミトコンドリア を含んでいない点、又ネブリンの抗原性が失なわ れている点には類似点をみるものの筋蛋白の障害 され方の点で相違点が多いからである。

この2種のコアに対し、ターゲット線維での抗 原性はこれら2種のコアとも異なる様子を示した. 一部のターゲットでミオシンの抗原性の低下して いるものがあって横隔膜コアと類似する面を示唆 された。しかし大部分のコアは、検討したすべて の抗体の抗原性がほぼ中央によせられた様にゆが んだものであった。さらにネブリンの抗原性は横 隔膜コアで低下していたのに対し、ターゲットで は低下していなかった。従ってターゲットと横隔 膜コアが単に病態ステージの相違とは考えにくい。 セントラル・コアでは電顕上いわゆる Z-streaming がみられる. 今回の実験で Z 帯構成蛋白 α-ア クチニンと Z-プロテインをみるとセントラル・コ ア部分で α-アクチニンの抗原性が比較的よく保た れているのに対し、Z-プロテインの抗原性が低下 している点に着目される。先天性ミオパチーの中 で過去比較的よく研究されてきたネマリン・ミオ パチーのネマリン桿状体およびその Z帯は両蛋白 がよく保存されていたい、今回の実験でコア部分の Z帯にはZ-プロテインが少ないことが示唆され、 セントラル・コア病とネマリン・ミオパチーの相 違が明らかになった。ネマリン・ミオパチーでは 桿状体という形で全2帯構成成分が "沈着" する のに対し、セントラル・コア病では Z 帯構成成分

が低下してきていると考えられ、両者での Z 帯蛋 白の動向が逆であると考えられる.

今後さらに別の先天性ミオパチーについて検討 を加えたい.

# 文 献

 Sugita H, Ohashi K, Maruyama K, Nonaka I, and Ishura S: staining of the nemaline rods by fluorescent antibody against Z-protein. Proceedings of the Japan Academy 59 (B): 190-193, 1983.

# 54) 抗Ca pump 蛋白抗体による免疫組織化学

高木昭夫\*,\*\*

研究協力者	小	島		進*•**	井	田	雅	祥*,**	後	藤		順*
	Ħ	中	達	朗*	荒	木		誠**	柴	芝	良	昌**

#### はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) や悪性 高熱など1~2の筋疾患では、筋小胞体 (SR)の 機能が問題となっている. SR の Ca 輸送の生理学 的解析には、スキンドファイバー法が応用されて きた.しかしその分子レベルでの異常について、 知見はきわめて乏しい.今回 Ca pump 蛋白に対す る抗体を作成し、免疫組織化学を行い、これらの 疾病の病態を検討したので報告する.

# 対象・方法

対象は Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 1例,原発性低K性周期性四肢麻痺1例,悪性症 候群1例,筋緊張性ジストロフィー2例,多発性 筋炎6例,神経原性筋萎縮10例など計25例30検体 である.

方法は人剖検大腿四頭筋およびラット白筋より Harigaya と Schwartz<sup>10</sup>の方法で筋小胞体分画

(FSR)を調整し、Meissnerら<sup>2</sup>に従い deoxycholate で処理して Ca pump 蛋白を精製した.こ れを抗原とし、抗原 (1mg 蛋白、1ml)と等量の完 全アジュバンドと共に家兎背部皮内に 2 週間間隔 で 3 回注射して抗体を得た.抗体は免疫拡散法 (ouchterlony) および western immunoblot によ り確認した.免疫拡散法に際して、抗原溶液に0.1 % TritonX 100を加えた.FSR 及び Ca pump 蛋 白分析は SDS-PAGE(10%)を使用し laemmli 法 で行った<sup>3)</sup>. immunoblot はメンブランフィルター (S&S 社、BA85)を使用し、vecstain ABC キッ トを用いた. 免疫組織化学は上記疾患の筋凍結切片を使用し て施行した。8~10µmの凍結切片を作成乾燥後, 冷アセトンで固定した.0.1%過酸化水素水加メタ ノールで内因性ペルオキシダーゼ活性を,正常山 羊血清で非特異的な抗体の結合を,各々阻止した. 一次抗体に対する対照試験としては,1)吸収試験 (抗血清を8倍量の抗原で吸収後の上清を使用), 2)正常家兎血清,3)PBSの3種を同時に施行して その特異性を確認した.二次抗体は,Vecstain ABC キットを使用した。染色は3.3'-DAB (Graham-Karnovsky)で施行し,核染は methylgreen を使 用した.一部はルーチン組織化学と比較対比した.

### 結 果

# 1) Ca pump 蛋白および抗血清

Deoxycholate で処理した精製 Ca pump 蛋白は SDS-PAGE 上, 100KD の主バンドと少量の51 KD, 30KD のバンドより構成されていた(図 1). 免疫拡散法 (ouchter lony 法) では Ca pump 蛋白および FSR に共通する沈降線が各々1本認め られた.cholic acid で処理した FSR では沈降線は ほぼ消失した(図2). Immunoblot では, 100KD に主バンドが幅広く濃染した.他に70KD, 53 KD, 27KD に淡いバンドを認めた(図3A). グリ セリン筋を SDS-PAGE にて分画して immunoblot を行った.100KD の主バンドが濃染され, 61KD の 淡いバンドが染色された(図3B).

### 2) 免疫組織化学

a) 筋線維タイプとの関連(図4). myfibrillar ATPase との対比から以下の結果を得た. タイプ 2線維は1に比し濃染したがこの差は抗ラット抗 体でより著明であった. タイプ2A, 2B では差がな く, 2C はよりタイプ1に近いものから2 に近いも

<sup>\*</sup> 虎の門病院神経内科

<sup>\* \*</sup> 冲中記念成人病研究所



図1 ヒト FSR および Ca pump 蛋白の SDS-PAGE による分析. St:標準蛋白. B:Ca pump 蛋白. C:FSR の蛋白組成. Coomassie 染色による.



図2 抗ヒト Ca pump 蛋白血清の二重免疫拡散法による検討. (中央)抗ヒト Ca pump 蛋白血清. A:ヒト Ca pump 蛋白. B:ヒト FSR. C:cholate で抽出した FSR. A と Bには共通する一本の沈降線をみとめた.



図3 抗ヒト Ca pump 蛋白抗体を使用した免疫ブロット A: (左).St:標準蛋白 B: ヒト Ca pump 蛋白, Bw: Bの immunoblot. St と B は coomassie 染色による蛋白 染色. Bw では100KD 付近が幅広く染色され,他に70KD, 53KD, 27KD に免疫染 色がみとめられた.B(右).グリセリン筋の蛋白染色(Mf)と免疫染色(Mfw).抗ヒト Ca pump 蛋白抗体では100KD の主バンドと61KD の副バンドが染色さ れた.

のまで種々の染色性がみられた.

b) 原発性周期性四肢麻痺にみられた tubular aggregates は濃染された (図5). tubular aggregates を認めない線維の Ca pump 蛋白の染色性に も不均一性があり, SR 系の形態異常が示唆され た.

c) DMD では他の疾患に比し全般的に染色性の低下がみられた. opaque fiber では,分節性に濃染する部位がみられた. その一部は筋表面膜にも染色性を認めた. 貪食されている線維はすべて染色

されなかった. (図6).

d) 神経原性の検体では、小角化線維における Ca pump 蛋白の濃染が見られた.タイプ grouping を 呈する検体の染色性はあまり低下がない.grouping を形成する筋線維では、タイプ1の線維の中にも、 Ca pump 蛋白が濃染するものがみられた.grouping を呈さない検体では全般的な染色性の低下が見ら れた.

e) 筋線維以外の組織では、血管内皮、神経軸索、 結合組織の一部に染色性がみとめられた。



図4 抗ヒト Ca pump 蛋白抗体による免疫組織化学. ATPase(pH10.6, pH4.6, pH4.3) 染色と対比した.(上)タイプ1はタイプ2A, 2B, 2Cに比して染色が弱い.しかし タイプ1間には免疫染色に差がみとめられる(1と1°).(下)タイプ2C線維の染色 性は線維により異なり,弱いもの(2C<sup>▲</sup>)から強いもの(2C<sup>■</sup>)まで分布した.



図5 原発性低K 血性周期性四肢麻痺にみられた tubular aggregates. (右) NADH-TR 染色により tubular aggregates は濃染した. (左) 抗 Ca pump 蛋白抗体による免疫 染色. tubular aggregates は濃染した.

# 考 察

今回抗原として使用した Ca pump 蛋白は FSR に比しかなり純度が高いとはいえ,まだ若干の extraband を有していた.しかし calsequestrin (66 KD)に相当するものは含まれていない.100KD 相 当の main band は Ca pump 蛋白,すなわち Ca ATP ase でありそれに対する抗体が得られたと考 えられる. Ca pump 蛋白はトリプシン分解で55 KD,45KD のフラグメントになる.55KD のフラ グメントはトリプシン分解を続けることにより30 KD,20KD のサブフラグメントになるといわれて いる.今回の抗原の extraband に関してはこの分 解産物をみている可能性がある.グリセリン筋の 電気泳動で得られた61KD のバンドに関しては未同 定である.

今回の抗体は、血管内皮、神経軸索などを標識 することが免疫組織化学の結果より判明している。 最近 Damiani ら<sup>4)</sup>は SR の Ca ATPase と T 管の Mg ATPase とが共通のドメインを持つ事を報告 している.同様に神経細胞膜とSRのCaATPase は共通のドメインを持つ可能性もある.すなわち, 今回の抗体は polyclonal であり種々の組織に分布 する cation ATPase の一部をも標識する可能性は 否定できない.今後検討を続ける予定である.

Ca pump 蛋白の免疫組織化学については,いく つかの報告がある.しかし人の Ca pump 蛋白を抗 原として抗体を作製し,ヒト骨格筋を染色したと いう報告はまだない.Karpatiらは鶏の大胸筋の SR に対する抗体で,ヒト筋を染めタイプ1と2とで 染色性に差を認めていない<sup>50</sup>. Jorgensen ら<sup>60</sup>, Salviatiら<sup>71</sup>は家兎,ラットの SR を用いている が,今回我々の結果と同じくタイプ2が1より濃 染するとの結果を得ている.タイプ2の方が1よ り Ca pump 蛋白の量が多い事はよく知られている が,タイプ1と2の Ca pump 蛋白の抗原性が異な るか否かについては以前より議論がある<sup>110</sup>.この点 に関して今回の検討からは結論はだせない.将来 の検討課題と考えている.



図6 DMDと対照(c)の抗ヒト Ca pump 蛋白抗体による免疫染色.(上)DMD は対照 より染色性が低下している.中央には軽度に染色されたタイプ2線維がある.対照の タイプ2よりは染色性は弱い.(下)左側では H.E.染色にて濃染する opaque fiber (硝子化線維)がみられる.右側の免疫染色では opaque fiber は濃染されている.

タイプ2C がタイプ1に近いものからタイプ2に 近いものまで種々の variation を示したことは筋線 維タイプの転換において, Ca pump 蛋白は myosin ATPase 系より速く変化するという生化学的な報 告と一致する所見であり興味深い<sup>8)</sup>

Tubular aggregates は古くより電顕所見より SR 起源が示唆された. Salviati ら<sup>n</sup>もラット白筋 からの抗体を用いて我々と同様の結果を得ている. しかし,先に述べたように,T管の Mg ATPase と SR の Ca-ATPase の間に共通の抗原性がある とすれば<sup>0</sup>, tubular aggregates の SR 起源を即断 することはできない.

DMD に関しては、Nagy と Samaha が Ca pump 蛋白の減少を報告している<sup>9</sup>. 彼らは SR 蛋白の SDS-PAGE で100KD のバンドの減少および55 KD, 45KD のバンドの増加, protease inhibitor の 効果などより、CANPによる Ca pump 蛋白の分 解を推定した。今回の我々の検討はあくまでも定 性的なものであるが、免疫組織化学的にも Ca pump 蛋白の減少が観察された。タイプ1線維の増加, 未分化な線維の増加などが原因の一つと思われる。 しかし, 組織学的に変性の所見を示さない線維に も染色性の低下がみられること、タイプ2線維で も低下がみられることなど病因的に意義ある変化 と思われる. opaque fiber では分節性に Ca pump 蛋白が濃染された. Ca pump 蛋白合成の調節には 細胞内 Ca 濃度が関与するといわれる<sup>10</sup>.変性の過 程における細胞内 Ca 上昇に対する一つの反応の可 能性が推定された. DMD 筋はある条件下では過剰 に Ca pump 蛋白を合成しうることを示している. DMD 筋の Ca pump 蛋白の減少の機序として, 蛋 白合成の調節異常を示唆する所見と考えた.

### まとめ

- 1) ヒト剖検大腿四頭筋およびラット白筋より Ca pump 蛋白を精製し,家兎を免疫して各々の抗血 清を得た.
- 2) 抗体は免疫拡散法および Immunoblot 法によ り確認した。
- 3)この抗血清を用いて、種々の筋生検凍結切片の免疫組織化学を行った。

a) タイプ2線維は1に比し濃染した. 抗ラット抗体でこの差はより著明であった. タイプ2A と2Bの差はなかった. タイプ2Cはタイプ1に近いものから2A, 2Bに近いものまであり均一では なかった.

b) tubular aggregates は濃染し, SR 起源が示 咬された.

 c) DMD 筋は他の疾患筋に比しタイプ1および タイプ2の両者で染色性の低下を認めた. Opaque fiber の一部は筋鞘および細胞質がともに濃染した.

d) 神経原性筋萎縮では,小角化線維は濃染した.

またタイプ1線維でありながら, Ca pump 蛋 白を多量に含むものがみられた。タイプ変換中 の筋線維と推定された。

# 文 献

- Harigaya S, and Schwartz A: Rate of calcium binding and uptake in normal animal and failing human cardiac muscle. Circ Res 25: 781, 1969.
- Meissner G, Conner GE et al: Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca<sup>2+</sup>-pump and Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. Biochem Biophys Acta 298: 246, 1973.
- Laemmli U K : Cleavage of structual proteins during the assembly of the head of the bacteriophage. Nature 227 : 680, 1970.
- 4) Damiani E, Margreth A et al: Common structural domains in the sarcoplasmic reticulum Ca -ATPase and the transverse tubule Mg-ATPase. J Cell Biol 104: 461, 1987.
- 5) Karpati G, Charuk J et al : Myopathy caused by a deficiency of Ca<sup>2+</sup> adenosine triphosphatase in sarcoplasmic reticulum (Brody's disease). Ann Neurol 20: 38, 1986.
- 6) Jorgensen AO, Kalmins V et al: Localization of sarcoplasmic reticulum proteins in rat skeletal muscle by immunofluorescence. J Cell
Biol 80: 372, 1979.

- 7) Schiaffino S, Severin E et al: Tubular aggregates: Sarcoplasmic reticulum origin, calcium storage ability, and functional implications. Muscle Nerve 8: 299, 1985.
- Heilmann C and Pette D: Molecular transformations in sarcoplasmic reticulum of fasttwitch muscle by electrostimulation. Eur J Biochem 93: 437, 1979.
- 9) Nagy B and Samaha FJ: Membrane defects in

Duchenne dystrophy : protease affecting sarcoplasmic reticulum. Ann Neurol 20: 50, 1986.

- Martonosi A, Roufa D et al: The biosynthesis of sarcoplasmic reticulum. Fed Proc 39: 2415, 1980.
- Damiani E, Betto R et al: Polymorphism of sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase of rabbit skeletal muscle. Biochem J 197: 245, 1981.

## 55) 細胞骨格蛋白(ネビュリン,コネクチン及び α-アクチニン)から見たDMDの病体

杉田秀夫\*

研究協力者 荒烟喜一\*石浦章一\*丸山工作\*\*

目 的

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の欠失 蛋白 (DMDP) 同定に関連したこの一年間の研究 には,目ざましい進展がみられた(表1). Monaco, Kunkel らにより DMD 遺伝子の mRNA の大きさ から DMDP が500kDa 以上であることが推定さ れ<sup>1</sup>, Wood らはこれが既知蛋白の中から nebulin である可能性を推定した<sup>2)</sup>. しかし Sugita, Maruyama ら<sup>3)</sup>, および Fürst, Weber ら<sup>4)</sup>の追試により DMDP が nebulin であることは否定され, Wood らの結果は proteolytic degradation による二次的 な nebulin の消失であったことが明らかになった. 更にごく最近 Hoffman, Kunkel らにより400kDa の "Dystrophin" が報告され, これが DMD 患者

表1 Recent advances in DMD researches

- 1986, Oct.(Nature): Monaco AP, Neve RL, Kunkel LM, et al.: The gene responsible for DMD encodes mRNA of about 16 kb. This suggests that the gene product would be over 500 kDa.
- 1987, Jan.(N Engl J Med): Wood DS, Zwviani M, Rowland LP, et al.: Nebulin has been proposed as a candidate for the DMD gene product because of its large size (--700 kDa) and its absence in DMD muscle.
- 1987, Mar.(Proc Jap Acad): Sugita H, Nonaka I, Maruyama K, et al.: Nebulin and connectin are evidently expressed in DMD muscle, but both proteins are more or less degraded in DMD muscle.
- 1987, Oct.(Cell): Hammonds RG,Jr.: Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin.
- 1987, Oct.(Science): Hoffman EP, Monaco AP, Kunkel LM, et al.: DMD gene is expressed in skeletal and cardiac muscle in both human and mice. Nebulin is probably not the primary product of DMD gene, however, the disturbed patterns of nebulin in DMD implicate nebulin as an important component in the etiology of this disease.
- 1987, Nov.(FEB): Furst D, Nave R, Weber K, et al.: Nebulin and titin expression in DMD muscle appears normal.
- 1987, Dec.(Nature): Hoffman EP, Knudson CM, Kunkel LM, et al.: "Dystrophin" (--400 kDa) is absent in two DMD-affected individuals and in mdx mice. This protein is associated with the triadic junction in skeletal muscle.

\*\*千葉大学理学部

<sup>\*</sup>国立精神 \*国立神経センター神経研究所疾病研究第一部

2例とmdxマウスにおいて欠失していることか ら, DMDPの有力な候補になっていることは特筆 される<sup>50</sup>.しかしながら,DMD筋の崩壊過程はな おほとんどが未知である.我々は,骨格筋の elastic components であり生理学的にも重要な nebulin お よび connectin が DMD 筋において早期から蛋白分 解を受けていることに注目し,これらの DMD 筋 における存在様式を検討したので報告する.

### 対象と方法

DMD 患者5 症例(2~7歳)と, 生検筋に特別 な異常所見を認めなかった5症例を検索した.抗 nebulin, 抗 connectin, 抗 *a*-actinin 抗体は, ニワ トリより抽出した各抗原をウサギに免疫して得ら れ,抗体の特異性は immunoblot 法とグリセリン 筋を用いた局在により検定した.免疫組織化学的 方法は、螢光抗体間接法を用いた. アセトン固定 された凍結切片をあらかじめ2% BSA・5%ヤギ 血清加 PBS (solution G) にてブロックした後, 一次抗体を1/1000稀釈 (in solution G) で反応さ せた.対照は免疫前のウサギ正常血清を用いた. 二次免疫試薬は FITC ラベル・ヤギ F(ab')<sup>2</sup>・抗ウ サギ IgG (Tago 社) を使用した (10µg/ml). 螢 光試料の観察は Zeiss, Axiophot Fluorescence 顕 微鏡を使用, BP485/20, BP520-560フィルターに て特異螢光を得た. なお一般組織像の観察には隣 接切片を供し, H+E染色, gomori trichrom 染 色,酸性フォスファターゼ染色等を施した。壊死 筋線維の同定は、これらに加えて C<sub>9</sub>, MAC(C<sub>5b-9</sub>) の局在も参考とした.

#### 結 果

各一次抗体の特異性は既に丸山らにより報告さ れている.また今回はラット・グリセリン筋にて もこれを確認した(図1).対照5例の筋では,各 細胞骨格蛋白とも微細な網目状構造(横断切片) を示した.DMD 症例での結果は症例間の差異がほ とんど認められなかったので,以下まとめて述べ る.Opaque 線維(OP)では nebulin の著しい減 少が認められた(図2).Connectin の減少は, nebulin に比較して軽度に止まったが,  $\alpha$ -actinin



 図1 ネビュリン(A)、コネクチン(B)、α-ア クチニン(C)、コントロール血清(D)
 の、螢光抗体法による局在(各上段は 明視野位相差像).ラット・グリセリン
 筋による、矢印はZ線の位置を示す.

はむしろ濃染する傾向を示した(図3).しかし壊 死筋線維には、いづれの細胞骨格蛋白とも、ほと んど消失していた(図3).なお再生筋では nebulin, connectinとも逆に強く染色されたが、  $\alpha$ -actininは再生初期に微弱であった.その他の筋 線維はおおむね対照筋と同様の染色性を示した.

#### 考 察

Nebulin, connectinは、これをまとめて elastic filaments とも呼称しており、これらはA帯

(myosin)を Z 線に結合させている. 生理学的に は筋線維に一定の resting tension を与えている重 要な細胞骨格蛋白である<sup>60</sup>. 今回の検索から先ず特 筆すべきことは DMD の op には nebulin が著しく 減少していたことと, connectin の中等度減少,  $\alpha$ -actinin の比較的残存ということであろう. これら



図2 DMD 筋におけるネビュリンの局在. ヘマトキシリン・エオジン染色(A)の中央に並 ぶ opaque fibers (星印) ではネビュリンの著しい消失が認められる(B). しかしそ の他の筋線維にはネビュリンが存在し,これが DMD の欠失蛋白では無いことが示 された. (×210)



図3 DMD 筋におけるコネクチン、 $\alpha$ -アクチニンの局在. ヘマトキシリン・エオジン染色(A)に見る opaque fiber (星印)のコネクチン (B) はやや減少しているが、 $\alpha$ -アクチニン(C)はむしろ強く染色されている. しかし壊死線維 (nec) ではいづれも 消失する. (×210)

の存在様式は、nebulin がとくに CANP による proteolysis を受けやすいことと考え併せると、DMD の op 形成過程に CANP が関与していることを示 唆する.いづれにしても DMD の筋構築異常が生 じる初期の段階に、nebulin、 connectin も何らかの

形で関与しているものと考えられる.次に明らか になったことは、免疫組織化学的にも DMD 筋に nebulin, connectin の欠失は認められなかったとい うことである.これは我々の immunoblot 法によ る検索結果<sup>3)</sup>と一致するものであった.

## 文 献

- Monaco AP, Neve RL et al : Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature 323: 646, 1986.
- Wood DS, Zeviani M et al: Is nebulin the defective gene product in Duchenne muscular dystrophy? N Engl J Med 316: 107, 1987.
- 3) Sugita H, Nonaka I et al: Is nebulin the product of Duchenne muscular dystrophy gene?

Proc Japan Acad 63, Ser B: 107, 1987.

- 4) Fürst D, Nave R et al: Nebulin and titin expression in Duchenne muscular dystrophy appears normal. FEB 224: 49, 1987.
- 5) Hoffman EP, Knudson CM et al: Subcellular fraction of dystrophin to the triad of skeletal muscle. Nature 330; 754, 1987.
- 6) Horowits R, Kempnet ES et al : A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. Nature 323 : 160, 1986.

昭和62年度研究班名簿

# 昭和 62 年度 杉田班 名簿

X	分	E	£		名	所属施設名	所属にお		
						所 在 地		る地位	連絡の際の電話
斑	長	杉	E	秀	夫	国立精神・神経センクー神経研究所疾病研究	部	3 長	6 0423-41-2711
						第一部			(内5111)
1						〒187 小平市小川東町4-1-1			
幹	事	●	井	清·	一郎	大阪大学医学部第二内科	教	t 授	06-451-0051
						〒553 大阪市福島区福島1-1-50			(内2221)
[		寺	尾	寿	夫	帝京大学医学部第一内科	教	红 授	03-964-1211
						〒173 板橋区加賀2-11-1			
		佐	藤		猛	順天堂大学医学部脳神経内科	助	教授	03-813-3111
]						〒113 文京区本郷2-1-1	1		(内3322)
		鈴	木	絋	-	東京都臨床医学総合研究所遺伝情報	部	長	03-823-2101
		.				〒113 文京区本駒込 3-18-22			(内5416)
		宮	武		Æ	新潟大学脳研神経内科	教	授	0252-23-6161
						〒951 新潟市旭町通1番町757			(内5180)
		高	木	昭	夫	沖中記念成人病研究所	主1	任研究員	03-588-1111
						〒105港区虎ノ門2-2-2			(内2016)
P-	事	荒	木	淑	郎	熊本大学医学部第一内科	教	授	096-344-2111
						〒860 熊本市本荘1-1-1			(内5611)
班	員	栗	原	照	幸	東邦大学医学部大橋病院第四内科	教	授	03-468-1251
						〒153 目黒区大橋 2 — 17— 6			(内2315)
		斉	H	孝	彦	国立療養所宇多野病院臨床研究部神経内科	部	長	075-461-5121
		_			ĺ	〒616 京都市右京区鳴滝音戸山			(内275)
		斉	藤	深美	子	東京医科歯科大学難治研細胞遺伝	助	手	03-813-6111
	ĺ					〒113 文京区湯島1-5-45			(内6132)
		鉿	木	義	之	国立精神・神経センター神経研究所疾病研究	部	長	0423-41-2711
						第五部			(内5151)
						〒187 小平市小川東町4-1-1			
		田	邊		等	東京都立神経病院	院	長	0423-23-5111
						〒183 府中市武蔵台2-6-1			(内3202)
		埜	中	征	哉	国立精神・神経センター神経研究所微細構造	部	長	0423-41-2711
						〒187 小平市小川東町4-1-1			(内5211)
		堀		真一	·郎	東京都神経科学総合研究所神経生化学	副	参 事	0423-25-3881
						〒183 府中市武蔵台2-6	研	究 員	
		水	野	美	邦	自治医科大学神経内科	助	教 授	0285-44-2111
						〒329-04 栃木県河内郡南河内町大字			(内3524)
		• •				薬師寺3311-1		ĺ	
		桃	井	真里	子	自治医科大学小児科	助	教 授	0285-44-2111
						〒329-04 栃木県河内郡南河内町大字			(内3448)
			_			薬師寺3311—1	_		

区	分	氏		名		所属施設名 所在地	所属 ける	にお 地位	連絡の際の電話
	 E			利	史	<b>東海</b> 大学医学部生理学	助参	5 授	0463-93-1121
-12L	я		p-g	13	,U,	〒259-11 伊勢原市望星台		~	(内2542)
		吉	H	瑞	子	国立精神・神経センター神経研究所疾病研究	研罗	と員	0423-41-2711
					•	第四部			(内5143)
						〒187 小平市小川東町4-1-1			
		若	ய	吉	弘	昭和大学藤が丘病院神経内科	助者	女授	045-971-1151
						〒227 横浜市緑区藤が丘1-30			(内269)
		納		光	弘	鹿児島大学医学部第三内科	助考	女授	0992-64-2211
						〒890 鹿児島市宇宿町1208-1			
		小	沢	高	将	名古屋大学医学部第二生化学	教	授	052-741-2111
						〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65			(内2031)
		щ	井	尚	臣	徳島大学医学部第一内科	助孝	<b>女授</b>	0886-31-3111
						〒770 徳島市蔵本町2-50-1			(内3204)
		木	南	英	紀	徳島大学酵素科学研究センター	講	師	0886-31-3111
						〒770 徳島市蔵本町3-18-15			(内2551)
		後	藤	幾	生	九州大学医学部脳研神経内科	教	授	. 092-641-1151
						〒812 福岡市東区馬出3-1-1			. (内2281)
		清	水	輝	夫	東京大学医学部脳研神経内科	講	師	03-815-5411
						〒113 文京区本郷7-3-1			(内8763)
		庄	司	進		信州大学医学部第三内科	助す	负授	0263-35-4600
						〒390 松本市旭3-1-1			(内5321)
1		杉	村	公	也	名古屋大学医学部神経内科	助	手	052-741-2111
						〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65			(内2297)
		高	瀬	貞	夫	東北大学医学部脳研神経内科	助	改 授	022-274-1111
						〒980 仙台市星陵町1-1			(内2323)
		高	守	Æ	治	金沢大学医学部神経内科	教	授	0762-62-8151
						〒920 金沢市宝町13-1			(内3950)
		H	代	邦	雄	北海道大学医学部神経内科	教	授	011-716-1161
						〒060 札幌市北区北14条西5丁目			
		塚	越		廣	東京医科歯科大学医学部神経内科	教	授	03-813-6111
						〒113 文京区湯島1-5-45			(内3380)
		中	西	孝	雄	筑波大学臨床医学系神経内科	教	授	0298-53-3196
						〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1			
		中	野	今	治	国立療養所下志津病院神経内科	医	長	0434-22-2511
						〒284 四街道市鹿渡934-5			(内294)
		中	村	晴	臣	鳥取大学脳研神経病理	教	授	0859-33-1111
		ļ				〒683 米子市西町86			(内2371)
		福	原	信	義	金沢大学医学部神経内科	助	教 授	0762-62-8151
						〒920 金沢市宝町13-1			(内3949)
		宝	来		聦	国立遺伝学研究所	助	手	0559-75-0771
1						〒411 三島市谷田111			(内568)

•

x	分	氏		名	所 属 施 設 名 所 在 地	所属 ける	にお 地位	連絡の際の電話	
公	募	ш	田	和	廣	大分医科大学生理学	教	授	0975-49-4411
班	員					〒879−50 大分県大分郡挟間町   医大が丘1−1506			(内2640)
		豊	島		至	秋田大学医学部神経内科	講	師	0188-34-1111
ĺ						〒010 秋田市本道1-1-1			(内2563)
顧	問	Ξ	好	和	夫	德島大学医学部第一内科	名誉	教授	0886-31-3111
						〒770 徳島市蔵本町3			
		豊	倉	康	夫	東京都老人医療センター	院	長	03—964—1131
						〒173 板橋区栄町35-2		ļ	
		宇尾	野	ድ	義	国立静岡病院	院	長	0542-45-0101
						〒420 静岡市城東町24-1			
事務担	当者	安	部	和	子	冲中記念成人病研究所		ľ	03-588-1111
						〒105 港区虎の門2-2-2			(内2168, 4418)

.