厚生省「精神・神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法開発に関する研究

荒木班

平成２年度研究報告書

平成３年３月（1991年）

研究報告書の作成にあたって

厚生省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法開発に関する研究」班は，平成２年４月に発足し，平成３年３月を以て満１年を終え，ここに初年度の研究報告書を作成する運びとなりました。

平成２年９月，西ドイツで開催された，第７回国際神経筋学会と筋ジトロフィー協会世界会議に出席しましたが，分子生物学的研究の演題が増加し，今日，筋ジストロフィー研究には，分子遺伝学に最も大きな関心が払われていることを認識することができました。またわが国の筋ジストロフィーの研究は，国際的にも高い評価を得ていることに自信と喜びを感じました。

本研究班の初年度の目標は，筋ジストロフィーの各病型におけるジストロフィンの発現様式の検討，mdx マウスを用いた病態解明，ミトコンドリア脳筋症の分子遺伝学的解析および治療法の開発でありましたが，各班員の努力によって立派な成果をあげることが出来ました。班長として心から感謝を申し上げます。

筋ジストロフィー及び関連疾患の成因の解明と治療法の開発に向って今後とも，班員各位の一層の努力と研究の発展を期待したいと存じます。おわりに，本研究に対し終始懇切な御指導を賜りました国立精神・神経センターの里吉榮二郎総長，杉田秀夫研究所長，厚生省の関係各位と日本筋ジストロフィー協会の深い御理解と御支援に感謝申し上げます。

平成３年３月

〈班長〉荒　木　淑　郎

目　　次

平成２年度総括研究報告……7
平成２年度総合班会議研究報告抄録……13
分担研究報告……23
Ⅰ．筋ジストロフィー(1)……33
Ⅱ．筋ジストロフィー(2)……51
Ⅲ．筋ジストロフィー(3)……73
Ⅳ．遺伝子……101
Ⅴ．ミトコンドリア脳筋症(1)……123
Ⅵ．mdx マウスほか……165
Ⅶ．生　化　学……209
Ⅷ．ミトコンドリア脳筋症(2)……231
平成２年度研究班名簿……267

平成２年度

総括研究報告

総括研究報告

主任研究者　荒　木　淑　郎

研究目標

本研究班は，杉田班（昭和59年～平成元年に及ぶ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）の後をうけて，筋ジストロフィーおよび関連疾患（とくにミトコンドリア脳筋症）の成因の解明と治療法の開発を目標として分担研究者を再編成して，平成２年４月に発足した．平成２年度は，新しい班の初年度に当たるため，目標に向かって班員各自の研究を発展させた．班長は荒木淑郎，班員38名および顧問３名の計42名である．

１年度の研究目標は次の如くである．

１）各病型におけるジストロフィンの発現様式の検討

２）mdx マウスを用いた病態の解明

３）ミトコンドリア脳筋症の分子遺伝学的解析

４）治療法の開発

１．筋ジストロフィーと筋細胞膜のジストロフィン

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）はX染色体劣性遺伝を呈する進行性の筋萎縮症で，20歳台前半で死亡するが，Becker 型（BMD）は，予後良好である（良性型）．両者とも，同じX染色体短腕でコードされるジストロフィンの欠損によって生じることが明らかにされた．ジストロフィンは，筋細胞膜に局在する分子量427KDの巨大タンパク質で細胞骨格の一種である．ジストロフィン cDNA の全構造は解明され，現在まで，DMD/BMD の60％以上が遺伝子欠損によって生じることが解明されている．

本年度は，ジストロフィン抗体を用いて，DMD，BMD，肢帯型ジストロフィー，福山型先天性筋ジストロフィー，筋緊張型ジストロフィーなど各病型におけるジストロフィンの発現様式が検討された．またジストロフィンのヒト臓器分布が検討された．これらの成績は以下の如くである．

１）筋ジストロフィー各病型におけるジストロフィンの発現様式

(1) DMD：欠損

(2) BMD：減少

(3)肢帯型：正常（87%）

(4)福山型先天性筋ジストロフィー：正常（94%）

(5)先天性筋緊張性ジストロフィー：生後10ヵ月以下は染色不良，生後1歳6ヵ月以後は正常

2）ジストロフィンのヒト各臓器における発現

正常（+），DMD（−），BMD（多様性）

2．筋ジストロフィーマウス（mdx マウス）による病態の研究

1）筋小胞体からのCa漏出亢進がphenytoinで抑制されること，2）筋核のDNA量を経時的に測定し，DNA合成の面から筋細胞の変性，分裂，再生を検討し，これらの変化と密接な関係があることを認め，3）Immobilizationによる筋変性への影響をしらべ，DMDの運動制限は病気の進行遅延をおこす可能性があること，4）筋ジストロフィーハムスターの神経筋接合部の未熟性を電顕で明らかにし，5）筋再生と成長因子（fibroblast growth factor）との関係を検討し，mdxマウスとコントロール群の組織中のbasic FGF（bFGF）の量に差がないことなどを明らかにした．

以上の研究は，いずれもmdxマウスを用いての骨格筋の壊死と，再生機構，筋DNA合成と筋の機能などを検討した重要な所見である．

3．ミトコンドリア脳筋症

ミトコンドリア脳筋症とは，骨格筋内に異常形態を示すミトコンドリアが認められる疾患の総称で，筋生検にてragged-red fiber（崩壊赤色線維）を認める．狭義のミトコンドリアミオパチーは骨格筋のみの障害を呈するが，広義のミトコンドリア脳筋症は，骨格筋の症状だけでなく脳や心臓など多彩な症状を伴うものをいう．ミトコンドリア脳筋症の臨床的特徴は，Kearns-Sayre症候群，ミトコンドリア異常を伴うミオクローヌスてんかん（MERRF）および脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症（MELAS）に代表される．

近年，慢性進行性外眼筋麻痺（CPEO，KSS）において，ミトコンドリア（mt）DNAの欠失が見いだされ，さらに欠失様式（単一欠失あるいは多重欠失と正常mtDNAの混在），欠失機構（反復配列を含むslipped mispairingなど），および欠

失 mtDNA とその筋病変である ragged-red fiber さらに cytochrome c oxidase 欠損線維との関係などが明らかにされてきたが，今年度は，ひきつづき，これらの研究が進められ，また KSS 以外の疾患における欠失 mtDNA の検討なども報告された．

また，MERRF や MELAS においては，以前から mtDNA の異常が示唆されていたが，今回，MERRF においては $tRNA^{Lys}$，MELAS においては $tRNA^{Leu}$ の点突然変異が報告され，それぞれの変異は，患者群においてのみ特異であることから，病因であることが示唆された(図1)．また MELAS 多数例における臨床，病理，生化学的検討や mtDNA 以外の原因でおこるミトコンドリア異常症の遺伝子レベルでの解析などが報告された．

MERRF の $tRNA^{Lys}$ (8344) の発見，MELAS の $tRNA^{Leu}$ (3243) の発見は，わが国の研究者によって成功されたことは，本研究が世界的に最先端に位置することを示したものといえよう．

4．筋ジストロフィーの治療

今年度は治療に関する研究は，1）ジストロフィー筋への正常 myoblast の注射成績と，2）dantrolene sodium の投与効果を検討する研究がみられたにすぎない．dantrolene sodium は，筋細胞膜の安定作用をもつ抗痙縮薬で，血清 CK を減少させる作用を有している．ジストロフィー患者に対する影響は今後の研究テーマとなろう．

5．1年後の研究成果の要約

平成2年度の研究は，第1年目に当り，班員の協力によって，1）PMD におけるジストロフィンテストの応用と問題点を明らかにし，2）mdx マウスに筋ジストロフィーの病態の解明に当り，3）ミトコンドリア脳筋症の分子遺伝学的解析では，MERRF では $tRNA^{Lys}$ (8344)，MELAS では $tRNA^{Leu}$ (3243) の点突然変異の発見という世界的な業績をあげ，4）治療の開発では，移植の実験と，dantrolene sodium などの検討が行われた．

6．2年後の研究計画としては，次のテーマを考えている．

1）ジストロフィンテストの適用

(1) 普及化：どの抗体を用いれば充分か.

(例：N末端とC末端領域)

2） ジストロフィンの欠損部位と臨床との対比

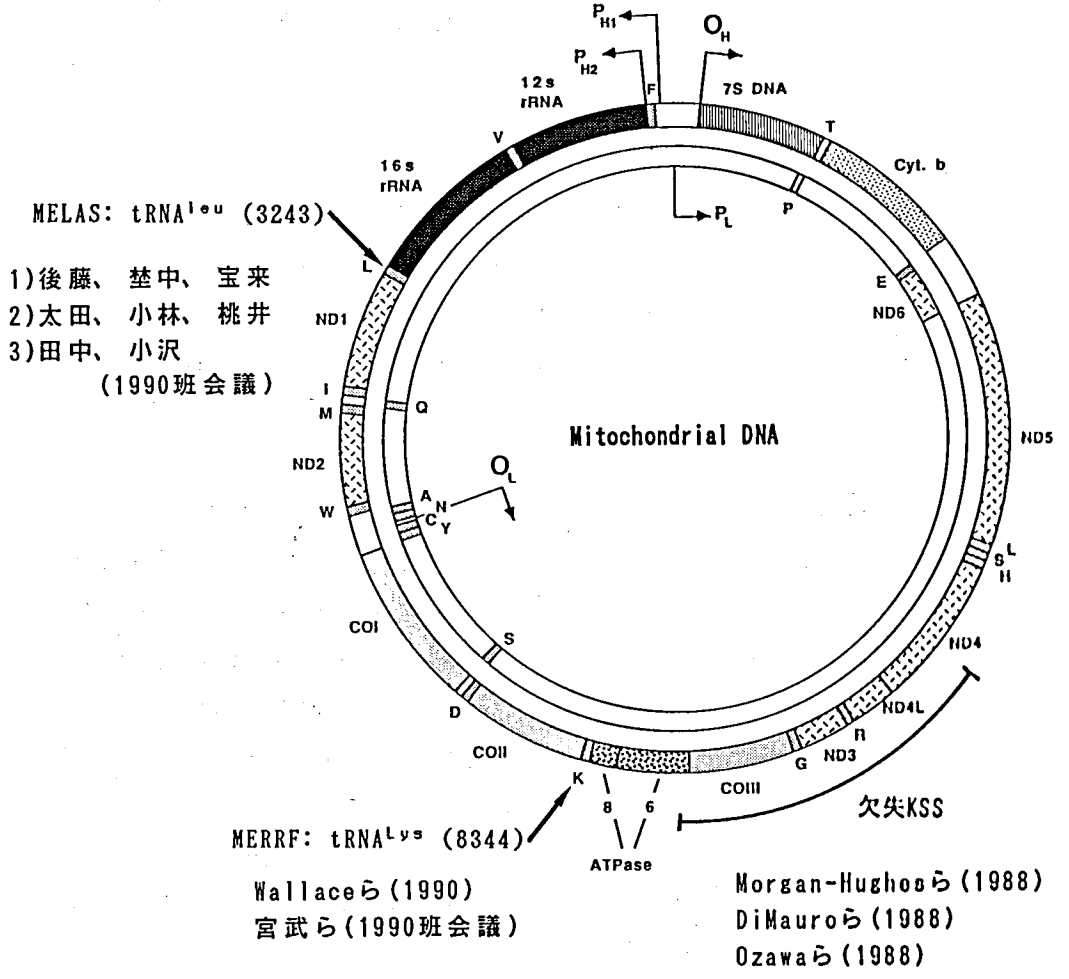
3）ジストロフィーの成因：mdx マウスの利用

4）ミトコンドリア脳筋症：分子遺伝学と臨床との対比

5）治療法の開発：dautrolene sodium など治療薬の検討

以上の他に，新しい薬があれば取り上げて前進したい.

ミトコンドリア脳筋症とミトコンドリアDNA異常



平成２年度厚生省精神・神経疾患研究委託費

「筋ジストロフィー」総合班会議

筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法に関する研究

研究報告抄録

PMDにおけるジストロフィンテストの応用と問題点

荒　畑　喜　一
（国立精神・神経センター神経研究所）

ジストロフィン遺伝子のクローニング（Monaco, Kunkel ら；1985），全 cDNA 塩基配列の決定とジストロフィン分子モデルの発表（Koenig, Kunkel ら；1987），さらにジストロフィンの発見（Hoffman, Kunkel ら；1987）とジストロフィンの筋組織における局在様式（Sugita, Arahata ら；1988）が相次いで報告されたのは我々の記憶に新しい．これらを筋ジストロフィー研究の新たな幕開けととらえるならば，今や我々はジストロフィン研究の第二段階に入ったといえる．今後ジストロフィンの全貌が明らかにされて行く過程の中で，筋ジストロフィー（PMD）の病因と病態機序がより具体的に解明されるであろうが，ここで PMD におけるジストロフィンテスト（①免疫組織化学，②イムノブロット，③ multiplex-PCR）の臨床応用と問題点を整理しておくことも有意義であろう．

1．抗ジストロフィン抗体

ジストロフィンの免疫組織化学イムノブロットテストには，特異抗体が必要である。抗体を使用する際に注意すべき事柄は，昨年度の総合班会議で述べてあるので詳細は省略する．大切なことは，① 特異的な抗体を用いることと，② ジストロフィン分子上の異なるドメインを認識する複数の抗体を用いて一つの生検筋を検索する事である．後者の理由は，仮に欠失遺伝子部分がコードするペプチドを抗原とした抗体を用いた時には，ジストロフィンの検出が不能となるからである（false negative）．具体的には，モノクローナル抗体2-5E2，3-4E5，4-4C5の 3 者を用いれば，ほぼ目的を達する．Nicholson らの Dy8（C 末）は有用であるが，Dy4（ロッド部分）は特異性に若干の問題を残す．また van Ommen らの P-20は DMD 筋の動静脈や筋細胞質をも染色するので，やはり特異性に疑問を残している．Kunkel らの30k と60k は有用であるが，ポリクローナル抗体のため結合組織のバックグラウンドが高く出るので注意深い観察が必要である．

2．ジストロフィンの免疫組織化学と臨床診断

臨床診断的側面で特筆すべきは，これまで必ずしも容易では無かった，① DMD と BMD の鑑別，② DMD と Fukuyama 型筋ジストロフィーの鑑別，③ DMD といわゆる肢帯型筋ジストロフィー（一般にジストロフィンは正常）の鑑別などが可能になった点であろう．また，④ DMD 保因者のうち，臨床症状を有する manifested carrier ではモザイクパターンが必ず出現しているので，これを肢帯型筋ジストロフィーとの鑑別のポイントとすることが可能である．さらに，⑤大腿四頭筋ミオパチーには BMD が相当数存在する可能性が報告されている．

3．イムノブロット法による DMD/BMD の診断

前述した免疫組織化学法はある意味では主観的な検査法であるので，これを補完する意味からも，並行してジストロフィンのイムノブロットテストを実施することが必須である．現在われわれの研

究室では，ルーチンの組織化学用凍結切片20枚からジストロフィンのウエスタン・ブロットを実施している．BMD の場合ジストロフィンは存在するが，分子量とタンパク量のいずれか或いは両者に異常が見いだされている．

4．multiplex-PCR 法による遺伝子診断

PCR 法（Polymerase Chain Reaction）によって微量のサンプルからでも遺伝子診断が出来るが，とくに Chamberlain と Beggs により調製された36個のプライマーを用いて multiplex-PCR 法を実施すれば，サザンブロットで見いだされる遺伝子欠失の98%が発見出来るので臨床診断的価値は高い．我々の研究室では現在，筋生検材料の一部から，または末梢血リンパ球から DNA を抽出して PCR 解析を実施している．前述の，免疫組織化学法，イムノブロット法と並び，極めて重要なテストである．

5．ジストロフィンの欠陥によって生ずる臨床像の多様性

おなじジストロフィン遺伝子に欠陥を持っていても，実際の臨床像は様々である．DMD と BMD の差異はよく知られているが，このほかにも高 CK 血症と筋の cramp を見る X-linked myalgia 家系の存在や，大腿四頭筋ミオパチー等の報告もある。また一方のみが臨床症状を呈した一卵性双生児の姉妹例（skewed inactivation の存在を示唆する）も知られている．さらにジストロフィンの46%が欠損していても臨床的には mild なミオパチーに止どまる家系も報告されているし，BMD 兄弟例で臨床的経過が大きく異なる症例等も存在する．

我々の最近の検索では，ジストロフィンテストを実施しない場合，いわゆる肢帯型筋ジストロフィーと臨床診断されている孤発症例の中には，男性の31%に BMD が，女性の12%に DMD 保因者が含まれていた．かかる症例については，適切な遺伝相談の資料としてジストロフィンテストが不可欠である．

mdxマウスによる筋ジストロフィー病態研究

高　木　昭　夫
（虎の門病院神経内科）

Dystrophin 遺伝子や蛋白の発見以来，Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）研究は大きく前進した．しかし，dystrophin 欠損と筋変性・壊死の関係については未だ充分解明されているとはいえない．荒木班においては mdx マウスを DMD のモデルとして使用したこの分野の研究が10編近く報告された．ここではその一部を紹介するとともに，焦点となる ion channel の問題につき言及したい．

川井らは筋核の DNA 量を分析して，cell cycle の時間経過を追求した．mdx では30日齢と60日齢では S 期と G_2M 期の筋核が増加しており，この時期の壊死・再生の亢進を示している．90日齢では S 期と G_2M 期の核は減少していた．mdx の筋障害が非進行性であるのは，加齢とともに筋壊死が発生しなくなるためと推論した．

田邊，水野らは mdx マウスを使用して，筋壊死の発生に影響する因子を分析した．前年までは tetanus toxin 使用による不動化により筋壊死が抑制されることを明らかにしている．本年は小さなケージ内で拘束飼育して，運動量を制限した．運動量制限により筋壊死が抑制されることを明らかにした．

栗原らは横隔膜標本を使用して微小電極による細胞内記録を行った．mdx では静止膜電位低下が観察され，33%の筋線維に electrical myotonia が出現した．この myotonia は phenytoin や mexiletine により回復した．薬理学的分析から，筋細胞には複数の ion channel の異常が推定された．すなわち，dystrophin 欠損のために膜構造の異常をきたし，多チャンネル異常が発生する可能性を指摘した．

寺尾は筋芽細胞移植による実験的治療を行っている．host マウスの全身X線照射後に移植を行うと，dystrophin 陽性細胞は0.4%から2.2%に増加した．しかしまだ陽性細胞の比率はかなり低く，治療応用への展望は開けない．この理由として，注射の技術的問題，拒絶反応，移植細胞の移動能などが考慮された．

Morandi らは DMD 保因者において dystrophin 欠損線維と筋変性の関連を分析している．細胞内に albumin や calcium（Ca）の侵入した変性線維は dystrophin を欠損する線維に多かった[1]．

Turner らによると mdx の静止時筋細胞内 Ca 濃度は92nM と対照の2.3倍に増量していた．また mdx myotube で Ca leak channel の open probability の増加が観察され，Ca 濃度増加の原因と推定している[2)3)]．

吉田らは 3 週齢と16週齢の mdx マウス長趾伸筋の Ca イオン濃度は35-80nM（50-130nM）であり，対照との間に差を認めなかった．後述のように筋小胞体(SR)の Ca 摂取能を分析すると，mdx と対照の両者において，100nMCa 附近で強力なポンプ作動を示した．したがって非変性筋線維において Ca 濃度が上昇してくるとは考えにくい．

高木らは 4 週齢の mdx において，SR の Ca 摂取能と Ca 誘発性 Ca 遊離(CICR)は正常であることを示した．しかし EGTA を含む溶液中での Ca 漏出は mdx で亢進していた．この異常は phenytoin により修復された．

これらの報告を総合すると，mdx マウスで dystrophin 欠損のため複数の ion channel に異常が生じており，細胞内環境の維持には余分のエネルギー消費が必要と推定される．

この homeostasis は種々の要因により破綻され，細胞壊死が発生する．運動負荷が誘因となる可能性も指摘され，本症の治療に関して重要な問題を提起している．

文　献

1）Morandi L et al: Ann Neurol **28**: 674, 1990

2）Turner PR et al: Nature **335**: 735, 1988

3）Fong P et al: Science **250**: 673, 1990

ミトコンドリア脳筋症分子遺伝学的解析 —MBRRF

宮　武　　正
(新潟大学脳研究所神経内科)

Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) は，ミオクロヌス，てんかん，小脳失調，ミオパチーを主徴とする疾患で，その他足変形を伴う．骨格筋生検で ragged-red fiber が認められ，血中乳酸及びピルビン酸が増加することから，ミトコンドリアの酸化的リン酸化酵素系の異常，さらに本症が母系遺伝を呈することからミトコンドリア DNA (mtDNA) の異常が病因と推定されていた．

しかし，これまで Southern blot では mtDNA の欠失はなく一塩基置換ないしは Southern 解析では検出できない程度の小さな欠失が病因である可能性が示唆されていた．

そこで我々は，本症の病因解明を目的に分子遺伝学的解析を行った．

〔対象及び方法〕

分析対象は，本症の疾患概念が最初に提唱された際に報告された 2 例，及び他の母子例の 4 例である．このうち 1 例の生検骨格筋より genomic DNA を抽出し，PCR で増幅した後，direct sequence 法あるいは，pUC19ないしは pBlue Script KS-plasmid vector に subcloning し，mDNA の全 sequence を検討した．

〔結果及び考察〕

患者骨格筋 mtDNA の98%の領域について塩基配列を解析した．これを Anderson らによって報告されている正常ヒト mtDNA の塩基配列と比較したところ，33箇所の単塩基置換が見いだされた．このうちの23箇所が蛋白質の coding region であった．この蛋白質 coding region のうち，12箇所がアミノ酸の置換をきたすものであり，3 箇所の塩基置換(塩基番号6,547のT→C，11,718のG→A，14,858のG→A)が human，bovine，mouse 間で保存されたアミノ酸を置換するものであった．さらに D-loop に 7 箇所，rRNA (12S) 領域に 2 箇所，tRNA 領域に 1 箇所の塩基置換が見いだされた．D-loop 領域の 3 箇所は，正常ヒト mtDNA の塩基置換として報告されており，また，rRNA 領域の塩基置換も MERRF 以外の疾患で認められていることから，これらの部位が本症の病因である可能性は低い．

一方，$tRNA^{Lys}$ 塩基番号8,344のA→Gの置換は，この塩基が human，bovine，mouse，rat，xenopus 及び cod で広く保存されているため，この部位での塩基置換は重要である．

以上より，本症の病因になり得る塩基置換として，蛋白質 coding region の 3 箇所と $tRNA^{Lys}$ 領域の 1 箇所の置換が考えられた．

そこで，これらの置換が MERRF 患者で共通に存在するかどうかを検討した．その結果，$tRNA^{Lys}$ 塩基番号8,344のA→Gの置換のみがすべての患者で存在し，正常コントロール15例では全く認められなかったので，この塩基置換を本症の病因と考えた．

この置換は $tRNA^{Lys}$ の TφC loop の stem の3' 側より 2 塩基下流に位置する．本症の病因とし

て，このTφC loopの塩基置換がtRNAの構造を変化させ，その結果mtDNAでcodeされる酵素蛋白サブユニットの合成が障害され，本症が発症する機序が考えられた．

MELASの分子遺伝学的解析

後藤雄一* 埜中征哉* 宝来聴**
小林葉子*** 桃井真里子*** 太田成男****
田中雅嗣***** 小澤高將*****
(*国立精神・神経センター神経研究所, **国立遺伝学研究所
***自治医科大学小児科, ****同生化学, *****名古屋大学生化学)

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) は，脳卒中様発作を特徴とするミトコンドリア脳筋症の一病型で，患者数も多く，重症度も高い．今年度，我が国の3グループがそれぞれのアプローチで独立にMELASの変異遺伝子の同定を試み，同一の結論に達した．さらに，遺伝様式，組織間分布，変異遺伝子の役割について明らかにされたので報告する．

(1) mtDNAの変位遺伝子の同定（1，2）

後藤らは，ミトコンドリアDNA (mtDNA) は母性遺伝することから，明らかに母性遺伝を示した患者骨格筋のmtDNAのtRNA領域の塩基配列を決定した．その結果，tRNA-Leu(UUR)の塩基番号3243のAがGに置換していることを見いだした．この置換によって，制限酵素切断部位Apalが生じ，容易に変異の有無を判断できた．患者31例の骨格筋DNAを調べると26例に変異塩基が認められた．いづれの例でも変異mtDNAと正常mtDNAは混在しており，その比率は，50から92%と患者によって異なっていた．

小林らは，同一MELAS患者骨格筋より筋芽細胞株を確立し，酵素活性染色と培養液依存性から呼吸鎖の変異株と正常株を選択した．この二つの培養細胞株の全mtDNAの塩基配列を比較することによって，変異塩基とミトコンドリア異常の因果関係を明らかにした．塩基配列を決定すると全mtDNAのなかで僅かに一塩基のみが異なっていた．この塩基置換は，前述の変異と同じで，9患者で変異mtDNAが認められた．

田中らは，二人のMELAS患者のmtDNA塩基配列を比較することで同じ結論に達した．

(2) 変異mtDNAの遺伝様式および分布

さらに，小林らは，7例中6例の患者のリンパ球細胞に変異mtDNAを検出し，血球細胞を用いて家系調査が行われた．例外なく母親には，患者より少量の変異mtDNAが検出され，発症していない兄弟姉妹の大部分にも変異mtDNAが認められた．その変異mtDNAの量は，母親と患者の中間であった．父親には，変異mtDNAはいづれも認められなかった．このことは，明瞭にキャリアの母親から患者へと変異mtDNAが遺伝したことを示している．剖検一例では，大脳に最も変異mtDNAが蓄積しており，脾臓は最も少なく，組織間で変異mtDNAの分布が異なっていた．

(3) 呼吸鎖欠損の分子機構

変異塩基はtRNA-Leu (UUR) 遺伝子上に位置しており，ミトコンドリア内でのタンパク質合成が阻害されることが想像された．前述の呼吸鎖欠損株と正常株のタンパク質合成を比較することによって変異tRNAの役割を分子レベルで調べると，変異tRNAもtRNAとしての機能は正常であ

った．ところが，特定のタンパク質の合成のみが低下しており，呼吸鎖の欠損の原因は全体のタンパク質合成低下ではなく，特定のタンパク質合成の低下に基づくと考えられた．この分子機構は現在検討中である．

ミトコンドリアのRNA合成の制御機構は特殊で，リボソームRNAとmRNAの比率は転写終結因子の結合によって調節される．変異のあった領域はこの終結因子の結合部位でもあり，tRNA-Leu(UUR)遺伝子は二重機能を持つ．RNA合成の調節に関しては，通常状態ではrRNAとmRNAの比率は変異株でも正常であったが，酸素濃度の低下による制御は変異株では正常に働かず，mtDNAの変異によってRNA合成の調節能が欠如することが明らかとなった．

(1) Goto Y, Nonaka I and Horai S : Nature 438 : 651, 1990.
(2) Kobayashi Y et al : Biochem Biophys Res Comm, 1990.

分 担 研 究 報 告

目　　次

I．筋ジストロフィー(1)

1）Duchenne 型筋ジストロフィーおよび筋緊張性ジストロフィーにおける部検内喉頭筋の組織学的ならびに免疫組織化学的検討……33
東京都立神経病院神経内科　田　邊　　等

2）筋ジストロフィー及び多発筋炎における筋 MRI ……37
九州大学医学部脳研神経内科　後　藤　幾　生

3）筋エコー法による中間広筋障害の検討……39
信州大学医学部第三内科　庄　司　進　一

4）筋ジストロフィー症における Dantrolene Sodium の血清 CPK 値に及ぼす影響 ……43
京都大学医学部神経内科　梶　　龍　児

5）骨格筋ライアノジンリセプターのオートラジオグラフィー（ARG）……45
虎の門病院神経内科　高　木　昭　夫

II．筋ジストロフィー(2)

6）ジストロフィン・テストによる肢帯型筋ジストロフィーの再検討……53
国立精神・神経センター神経研究所　荒　畑　喜　一

7）Dystrophin：ヒト臓器分布並びに Becker 型筋ジストロフィーにおける発現様式について……56
国立療養所再春荘病院神経内科　内　野　　誠

8）各種筋ジストロフィーにおける抗ジストロフィン抗体による免疫組織化学的検討……60
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

9）先天性筋緊張性ジストロフィーにおけるジストロフィン発現様式の免疫学的解析……64
東京大学医学部脳研神経内科　清　水　輝　夫

10）Becker 型筋ジストロフィーにおけるジストロフィンの動態 ……68
㈶東京都神経科学総合研究所分子研究系神経生化学　堀　　眞一郎

III. 筋ジストロフィー(3)

11) 福山型先天性筋ジストロフィーにおけるジストロフィンの研究……75
国立精神・神経センター神経研究所　荒　畑　喜　一

12) dystrophin およびその遺伝子の検討 ……78
国立療養所下志津病院神経内科　松　村　喜一郎

13) ジストロフィン cDNA に基づく cysteine-rich および C 末端領域
各種合成ペプチドの抗原性と抗体の反応性について……81
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

14) ラット脊髄付加ヒト培養筋細胞に於ける dystrophin の発現，局在に
関する免疫組織化学的，電顕的検討……85
東京医科歯科大学医学部神経内科　小　林　高　義

15) 急速凍結・ディープエッチング（QF-DE）法による培養筋管
細胞内 dystrophin の三次元的局在 ……90
東京医科歯科大学医学部神経内科　小　林　高　義

16) Deep etching replica 法によるマウス骨格筋細胞膜関連細胞骨格の研究
——化学固定と無化学固定標本の差異について——……96
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

IV. 遺伝子

17) 女性筋ジストロフィー患者細胞の X 染色体における脱メチル化と
DNA 複製パターンについて ……103
東京医科歯科大学医学部難治疾患研究所細胞遺伝　斎　藤　深美子

18) ミトコンドリア脳筋症の病因解明
——ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症における変異遺伝子解析—— 107
徳島大学医学部小児科　黒　田　泰　弘

19) 筋ジストロフィー組織ジストロフィンファミリーと生体膜機能 ……112
宮崎医科大学衛生学　濱　田　　稔

20) 筋ジストロフィー家系における分子遺伝学的検討 ……116
東京女子医科大学小児科　斎　藤　加代子

V. ミトコンドリア脳筋症(1)

21) ミトコンドリア DNA 配列からみたヒト上科の子進化 ……125
国立遺伝学研究所　宝　来　　聰

22) MELAS におけるミトコンドリア $tRNA^{Leu}$ (UUR) 変異 ……129
名古屋大学医学部第二生化学　小　澤　高　将

23) COX 部分欠損を伴った Leigh 症候群の生化学的分子遺伝学的検討 …134
東京大学医学部脳研神経内科　清　水　輝　夫

24) 筋緊張性ジストロフィーにおけるミトコンドリア DNA 異常 ……138
愛知医科大学第四内科　佐　橋　　功

25) 家族性労作性ミオグロビン尿症におけるミトコンドリア DNA 変異 …142
名古屋大学医学部神経内科　高　橋　　昭

26) ミトコンドリア・ミオパチーにおける末梢神経障害 ……148
筑波大学臨床医学系神経内科　水　澤　英　洋

27) 家族性進行性外眼筋麻痺症候群の 2 剖検例における
多重欠失ミトコンドリア DNA の臓器分布 ……153
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　　猛

28) Kearns-Sayre 症候群におけるミトコンドリア DNA の解析 ……157
大阪大学医学部第二内科・神経内科　垂　井　清一郎

29) 慢性進行性外眼麻痺症候群における欠失 mitochondrial (mt) DNA の
解析
——非 RI 標識 mtDNA probe を用いての検討—— ……161
熊本大学医学部第一内科　荒　木　淑　郎

VI. mdx マウスほか

30) mdx マウス骨格筋におけるカルシウム (Ca) 濃度調節 ……167
虎の門病院神経内科　高　木　昭　夫

31) MDX マウス骨格筋の強収縮状態に於ける細胞内 Ca^{2+} 濃度 ……170
国立精神・神経センター神経研究所　吉　田　瑞　子

32) mdx マウスの電気生理学的及び治療的研究 ……172
東邦大学医学部第四内科　栗　原　照　幸

33) 筋細胞膜モデルによるミオトニー発生機序の数理的解析 ……177
東邦大学医学部第四内科　栗　原　照　幸

34) Heterozygote mdx mouse の筋細胞における dystrophin の発現と筋核との関係 ……181
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

35) mdx mouse の骨格筋における DNA 合成 ……186
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

36) 「Immobilization」による mdx マウス筋変性への影響
——第 2 報—— ……191
東京都立神経病院神経内科　田　邊　　等

37) 筋ジストロフィーハムスターにおける神経筋接合部の電顕的研究 ……197
国立療養所犀潟病院　福　原　信　義

38) ジストロフィー筋への正常 myoblast の注射に関する研究
——X 線照射の効果—— ……200
帝京大学医学部第一内科　寺　尾　寿　夫

39) 骨格筋特異的蛋白発現に関する神経ペプチドの研究 ……204
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

40) 筋再生と成長因子 ……207
九州大学医学部脳研神経内科　後　藤　幾　生

VII. 生化学

41) 筋細胞死とリソゾームプロテアーゼ群 ……211
順天堂大学医学部生化学第一講座　木　南　英　紀

42) 骨格筋筋原繊維の構成成分である c-蛋白質を変換する因子について …215
㈶東京都神経科学総合研究所神経生化学　堀　　眞一郎

43) clofibrate の骨格筋の速筋と遅筋グルコース・アップテイクに対する影響 ……219
信州大学医学部第三内科　庄　司　進　一

44) 蛋白質のミトコンドリア移行とその異常 ……222
熊本大学医学部遺伝医学研究施設　森　　正　敬

45) 一次元ならびに二次元電気泳動による connectin の免疫化学的析：福山型先天性筋ジストロフィーにおける変性・分解の検討を中心に …226
国立療養所下志津病院神経内科　松　村　喜一郎

Ⅷ. ミトコンドリア脳筋症(2)

46) MERRF 様症状を呈した MELAS におけるミトコンドリア DNA の解析 ……233
筑波大学臨床医学系神経内科　水　澤　英　洋

47) Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers(MERRF)の病因に関する分子遺伝学的研究 ……238
新潟大学脳研究所神経内科　宮　武　　正

48) MELAS における遺伝子異常の発見 ……242
国立精神・神経センター神経研究所　埜　中　征　哉

49) Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels (SSV) の診断的意義 ……246
国立精神・神経センター神経研究所　埜　中　征　哉

50) MELAS におけるミトコンドリア DNA の点変異によるタンパク質, RNA 合成の変化 ……250
自治医科大学生化学　太　田　成　男

51) MELAS 症候群の臨床的検討とミトコンドリア DNA の解析 ……254
大阪大学医学部小児科　岡　田　伸太郎

52) MELAS 母娘例におけるミトコンドリア DNA の解析 ……258
自治医科大学神経内科　西　澤　正　豊

53) MELAS の遺伝子変異：骨格筋ミトコンドリアにおける点変異 ……261
自治医科大学小児科　桃　井　真里子

Ⅰ．筋ジストロフィー(1)

1）Duchenne 型筋ジストロフィーおよび筋緊張性ジストロフィーにおける剖検内喉頭筋の組織学的ならびに免疫組織化学的検討

田　邊　　等*

研究協力者　磯　崎　英　治*　高　元　喜代美*
宮　本　和　人*　小　田　雅　也**

緒　　言

我々は，これまで種々な神経筋疾患における内喉頭筋（声帯開大筋および声帯閉鎖筋）の組織学的変化を検討してきた．その結果，声帯麻痺を伴った多系統萎縮症では声帯開大筋のみの[1]，また筋萎縮性側索硬化症では全ての内喉頭筋において，神経原性変化を認めるなど，疾患や病態により特徴的な所見を呈することを報告してきた．今回は筋ジストロフィーを対象とし，組織学的所見とともに免疫組織化学的染色（ジストロフィン染色）も行ったので併せて報告する．

対象および方法

対象は，Ducehnne 型筋ジストロフィー(DMD) 1例（死亡時18歳），筋緊張性ジストロフィー(MD) 2例（死亡時46歳および52歳）で，何れも末期まで発声・嚥下機能は保たれていた．方法は，剖検時，内喉頭筋(前筋，横筋，後筋)，横隔膜および大腿四頭筋を採取し，生検材料に準じて凍結切片の作製および組織学的染色を行い，併せてジストロフィン染色も行った．ジストロフィン抗体は，味の素株式会社および富士レビオ株式会社から供与されたc末端に対する4－4c5モノクローナル抗体を使用した．

結　　果

図1は，DMD 例の横隔膜および内喉頭筋である．横隔膜では，明らかな大小不同，横断面の円形化，間質の増大，脂肪浸潤，opaque fiber を認め典型的な DMD の所見を認めた．それに対し，内喉頭筋ではいずれにおいても少数の opaque fiber の散在，筋鞘核の増加を認めるものの，横隔膜に比し全体として極めて変化は軽度であった．

図2は，MD 例である．横隔膜では脂肪浸潤を伴ったいわゆる myopathic change に加え，多数の中心核を認め，MD に特徴的な所見を呈する．同様な変化は内喉頭筋（後筋，前筋）においても認められる．他の MD 例についても基本的には同様の結果を示した（表）．

図3は疾患コントロールすなわち脳梗塞で死亡した例における各筋のジストロフィン染色を示す．大腿四頭筋では，各筋線維はいずれも全周性に染色され正常パターンを示した．しかし，内喉頭筋においてはほとんどの筋線維はジストロフィン陰性であり，横隔膜においても，ごく一部に不完全な陽性線維を認めるものの，基本的には内喉頭筋と同様，大部分が陰性線維だった．図4は MD 例の内喉頭筋および横隔膜である．いずれもコントロール例よりは陽性線維の数も多く，全体としてモザイク様に染色されたが，やはり陰性線維を認めた（表）．

＊東京都立神経病院神経内科
＊＊東京都立神経病院検査科病理

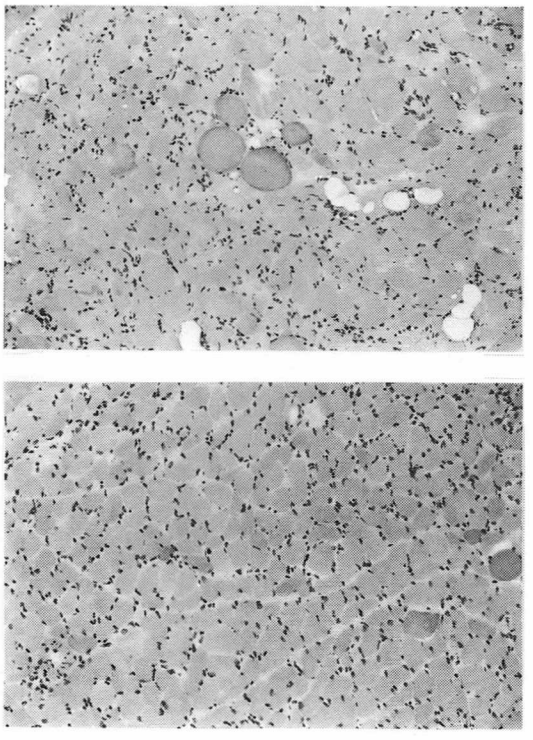


図 1 Duchenne 型筋ジストロフィー HE 染色　×40
横隔膜（上）に比し，内喉頭筋（下）の変化は極めて軽微である．

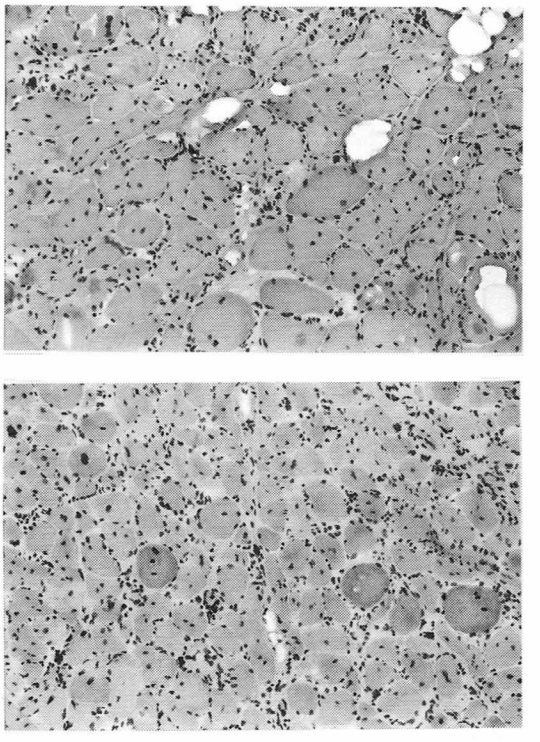


図 2　筋緊張性ジストロフィー HE 染色　×40
横隔膜（上），内喉頭筋（下）のいずれも多数の中心核を有した myopathic change を認める。

考　　察

一般に，DMD では末期まで発声・嚥下機能は保たれるとされるが，実際にそれらに関連した筋の組織学的検索を行った報告は少ない．今回の我々の検索は一例のみであるが，確かに DMD の内喉頭筋は，四肢の随意運動がほぼ消失した末期にもかかわらず，ジストロフィーとしての変化は極めて軽度であり，喉頭の前面に位置する外喉頭筋群と比べてもなお，その変化は軽微であった．DMD において，臨床的にあるいは画像ないし組織学的検索により比較的障害が軽度すなわち末期まで保たれるとされる筋は，外眼筋，後筋，側頭筋，胸鎖乳突筋，舌筋[2]，外肛門括約筋[3] などであるが，我々の結果から内喉頭筋もこれらの一つと考えてよいと思われる．発生学的に内喉頭筋は，咬筋とともに胎生期の鰓弓由来の筋であり，筋節由来の中軸筋とはかなり性質を異にする[4]．DMD ではこうした特殊な筋（鰓弓筋）が spare される可能性も考えられるが，臨床的には前述したように必ずしも鰓弓筋だけが軽度の障害にとどまるわけではなく（外眼筋や外肛門括約筋は中軸筋由来），単に発生学的母地の違いのみから障害部位を規定することは困難である．一方，MD 例においては 2 例とも四肢筋とほぼ同様の変化が内喉頭筋にも認められた．何れの例も臨床的には明らかな嚥下障害は認められなかったが，subclinical な誤嚥（喉頭ファイバー下での唾液の声門下流入所見）の可能性は否定できず，本例がさらに長期間生存していれば，いずれ明らかな嚥下障害をきたした可能性がある．従来，MD の嚥下障害については食道の平滑筋障害と関連して論ぜられてきたが[5]，上記の結果から，喉頭レベルにおける横紋筋障害とい

表　採取筋の組織学的所見およびジストロフィン染色の結果

採取筋の組織学的所見

	声帯閉鎖筋 前筋	声帯閉鎖筋 横筋	声帯開大筋 後筋	横隔膜
DMD	±	±	±	M
MD1	M	M	M	M
MD2	M	M	M	M

±：軽微な変化　　M：myopathic change

ジストロフィン染色

	大腿四頭筋	内喉頭筋	横隔膜
DMD	−	−	−
MD1	·	＋（ﾓｻﾞｲｸ様）	＋（ﾓｻﾞｲｸ様）
Control	＋（正常）	±（ごく一部）	±（ごく一部）

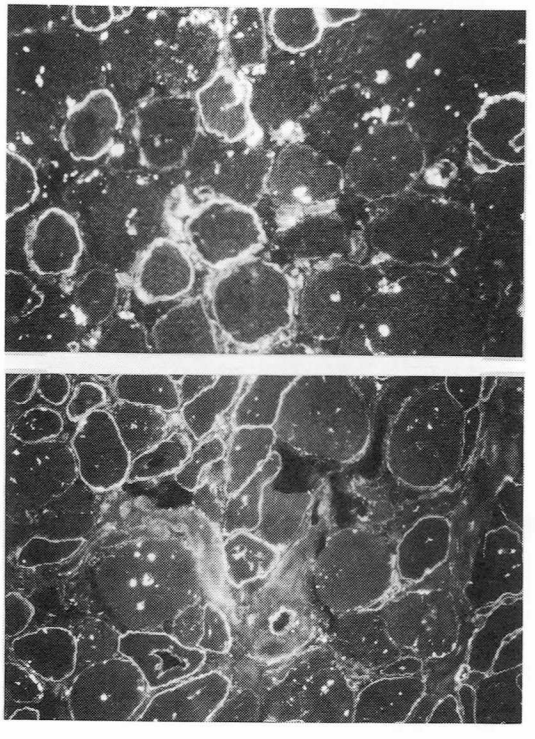


図4　筋緊張性ジストロフィーにおけるジストロフィン染色　×40
内喉頭筋（上）も横隔膜（下）も，ともにモザイク様の染色を示す．

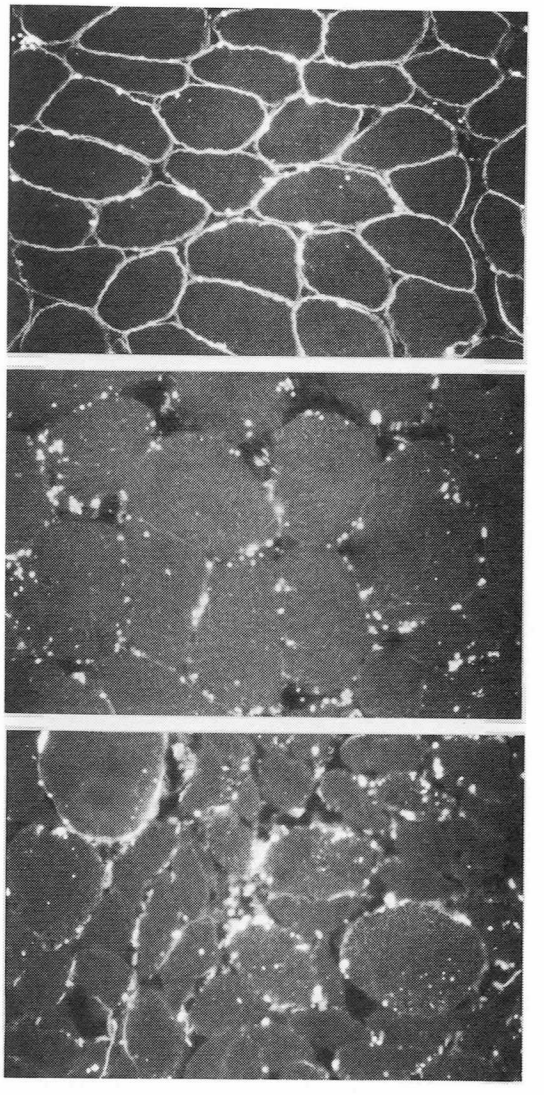


図3　正常例（脳梗塞例）におけるジストロフィン染色　×40
大腿四頭筋（上）は，全周性に染色されるが，内喉頭筋（中）および横隔膜（下）では，極めて染色性が低い．

う観点からも今後検討する必要があろう．

さて，DMDの内喉頭筋では前述したようにdystrophic changeが軽微であったこともあり，ジストロフィン染色を行ったところ結果的には表に示したように全ての採取筋で陰性であった．しかし，対照のために行ったcontrol例において，四肢筋では正常な陽性所見を認めたにもかかわらず，内喉頭筋や横隔膜においてはごく一部の線維しか染色されず，筋による染色性の違いを認めた．この理由を考えるにあたり，まず問題となるのが剖検検体では，果してどの程度ジストロフィンの免疫活性能が保たれているのかという点である．Matsumuraら[6]は，*in vitro*における経時的なジストロフィンの分解について検討しており，それによれば検体（兎の骨格筋）を室温にて2時間放置するとWestern blotting上ジストロフィンバンドは消失したという．我々の例では，死亡から解剖までの時間がcontrol例では5時間，MD例では1.5時間であり，MD例の方が染色性が良好な理由はこうした死後時間の違いによるのかも知れない．但し今回のジストロフィン染色の結果において興味あるのは同一剖検例，即ち死亡から検体採取までの時間はほぼ同じにもかかわらず，四肢筋では正常に染色されたにもかかわらず内喉頭筋や横隔膜では染色性が乏しかった点である．内喉頭筋や横隔膜は四肢筋と異なり，頻回に収縮，弛緩を繰り返すという生理的特徴を有し，筋細胞膜のturn overが早いことが考えられる．こうした筋では，ジストロフィンの合成遅延あるいは分解の促進状態が考えられ，結果的にジストロフィンの免疫活性能の低下を招くのかも知れない．筋による染色性の違いの原因は，この様に筋自体の特殊性の他，死後の自己融解の速さの違い—すなわち四肢筋に比し，より急速に進行するという可能性—も考えられる．この意味において内喉頭筋や横隔膜では四肢筋より筋細胞膜の易傷性がより強いとも考えられ，今後スペクトリン染色との比較やimmunoblot法による検討が必要と思われる．

結　論

1）Duchenne型筋ジストロフィーにおける内喉頭筋は，四肢の随意運動がほぼ消失した末期においてもなお，極めてよく保たれる筋の一つである．一方，筋緊張性ジストロフィーの内喉頭筋では四肢筋とほぼ同様の変化を認めた．

2）ジストロフィン染色上，疾患コントロール例の内喉頭筋および横隔膜でみられた染色不良の原因として，死後変化や筋の易傷性などの関与を考えた．

追記）脱稿後，布村らにより「DMDの内喉頭筋は一般骨格筋に比し，軽度であるが変性が認められる」との報告が，同時期（平成2年度）の筋ジス第3班から発表された．

文　献

1) 磯崎英治ら：多系統萎縮症における声帯麻痺の病理組織学的検討—特に内喉頭筋，反回神経について—．“厚生省特定疾患運動失調症調査研究班”昭和63年度研究報告書，1989，pp 64—69.
2) Kakukas BA and Adams RD : Muscular dystrophies. In “Diseases of Muscles.” (Fouth Edition, Harper & Row), Philadelphia, 1985, p397.
3) Ohtake T, et al : Sparing of the perineal muscles in muscular dystrophies. J Neurol 236 : 252, 1989.
4) ローマー&パーソンズ：脊椎動物のからだ〈その比較解剖学〉平光萬司訳，第5版，法政大学出版局，東京，1983，pp223—257.
5) 奥村利勝ら：筋緊張性ジストロフィーの内臓平滑筋障害について．神経内科29：582—588，1989.
6) Matsumura k, et al: In vitro degradation of the Duchenne muscular dystrophy gene product (dystrophin). Biomedical Research 10 : 325—328, 1989.

2）筋ジストロフィー及び多発筋炎における筋MRI

後藤幾生

研究協力者　藤野宏之*　山田　猛*　小林卓郎*

はじめに

筋ジストロフィー及びその他の筋肉疾患の診断には血清酵素，筋電図，筋生検などが重要な検査法であるが，最近CT，超音波などの非侵襲的な検査法が進歩してきている[1]．MRIも同様に非侵襲的な検査法であり，中枢神経疾患の臨床診断に多大な影響を与えている．筋肉疾患におけるMRI検査に関しては2，3の報告があるが，その有用性はまだ明確でない．今回，我々は筋ジストロフィー，多発筋炎及びその他の筋肉疾患でMRIを施行し，それらの鑑別にMRIが有用であることを見いだしたので報告する．

対象及び方法

対象は3例の筋ジストロフィー（肢帯型2，三好型遠位型1），12例の多発筋炎群（多発筋炎及び皮膚筋炎），3例のその他のミオパチー，及び3例の正常コントロールである．これら筋肉疾患の診断は臨床徴候，血清CK値，筋電図，筋生検像により確かめた．12例の多発筋炎群のうち8例は活動期で治療前にMRI検査を行った．そのうち4例は副腎皮質ホルモン治療後非活動期になりMRIの再検を行った．MRIは1.5テスラGE社製SignaMR装置にてT1はTR600ms，TE20ms，T2はTR2000ms，TE80msで軸位にて撮像した．

結果及び考察

正常コントロールではT1，T2強調画像ともに同様の所見であった．すなわち，皮下脂肪や結合織は高信号，骨皮質は低信号であり，筋肉はその中間であった．筋ジストロフィーでは筋肉は萎縮しており，一部の筋では，T1，T2ともに高信号を示した（図1）．この高信号は筋力の低下した筋肉に多くみられたが，患者により高信号の分布は異なっていた．この筋肉の高信号域は画像の性質より筋肉の脂肪変性を表わすと考えられた．

多発筋炎群の非活動期の症例では筋肉MRIは正常とほぼ同じであるか，一部T1，T2ともに高信号を示した．しかし，活動期の患者ではT1強調画像では正常のMRI像を示すのに対し，T2強調画像では高信号を示す筋肉が見られた（図2A）．この高信号は8例中7例に見られ，左右対称性のことが多かった．しかし，患者により高信号域の分布は異なっていた．筋力低下との相関は明らかでなかったが，筋の圧痛が見られる場所に高信号が見られる傾向であった．副腎皮質ホルモン治療により非活動期になった患者でMRIを再検すると4例で高信号域が消失し，ほぼ正常になっていた（図2B）．この治療による信号の変化及び高信号がT2強調画像のみで呈することより多発筋炎の高

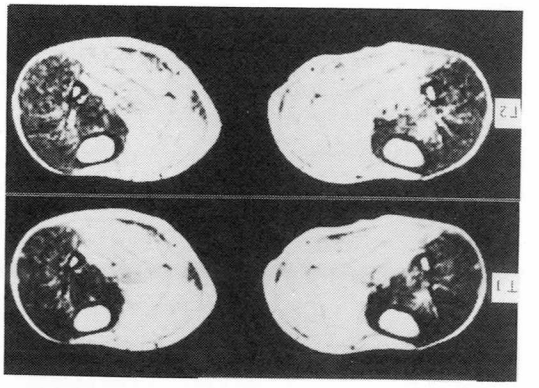


図1　肢帯型筋ジストロフィー39歳女性例の下腿部MRI．T1T2強調画像ともに高信号域が見られる．

＊九州大学医学部悩研神経内科

図2　多発筋炎65歳女性例の大腿部 MRI. (A)活動期(血清 CK3682　IU/1). T2強調画像において大腿四頭筋を中心に高信号域が見られるが, T1強調画像では正常である. (B)ステロイド治療後の非活動期（血清 CK　55 IU/1). 活動期に見られた T2強調画像の高信号域はほぼ正常化している.

信号は筋肉の炎症あるいは浮腫を表わすと考えられる. 同様な T2のみの高信号は熱帯性化膿性筋炎や横紋筋融解症などに見られるという報告がある[2)3)]. 非活動期の T1, T2両強調画像の高信号域は部分的な筋変性と考えられた. 2例のミトコンドリアミオパチー及び1例のネマリンミオパチーの筋肉 MRI は正常と差がなかった.

以上のごとく種々の筋肉疾患において筋肉 MRI を施行したが, その画像において筋ジストロフィー及び活動期多発筋炎は特徴的な所見を呈した. すなわち筋ジストロフィーでは T1, T2ともに高信号が見られ, 一方, 多発筋炎では T2のみに高信号が見られた. これらの結果は MRI にて筋ジストロフィーや多発筋炎とその他の筋肉疾患例えばミトコンドリアミオパチーやネマリンミオパチーなどと鑑別が可能であることを示唆した. さらに T1, T2強調画像両者をとることにより筋ジストロフィーと多発筋炎の鑑別も可能であった. MRI 検査のその他の利点として罹患した筋肉の分布がある程度把握できるとともに経時的な検査により, 疾患の進行や回復を知ることができることなどがあげられる. 一方, MRI の欠点は検査時間及び検査費用がかかることである. 現在のところ MRI のみで疾患の確定診断は困難であるが他の検査と組み合わせることにより, この非侵襲的な検査法は今後筋肉疾患の補助検査法として大きく寄与するものと考えられる。

文　　献

1) Bohan A, Peter JB, Bowman RL and Pearson CM : A computer-assisted analysis of 153 patients with polymyositis and dermatomyositis. Medicine **56** : 255—286, 1977.

2) Yuh TC, Schreiber AE, Montgomery WJ and Ehara S : Magnetic resonance imaging of pyomyositis. Skeletal Radiol **17** : 190—193, 1988.

3) Kitamura J, Maruyama H, Yamamura Y, Kurihara T and Matsukura S : Two cases of acute rhabdomyolysis. Pathogenesis, muscle biopsy, EMG, X-CT and MRI. Rinshou Shinkei **28** : 485—488, 1988.

3）筋エコー法による中間広筋障害の検討

庄 司 進 一*

研究協力者　朴 木 清 人*　武 田 伸 一*　吉 田 邦 広*
松 下 茂 樹*　柳 沢 信 夫*

はじめに

我々は，Heckmattら[1]および田代ら[2]の筋エコー法の神経筋疾患の診断に有効との報告以来，今まで約500例の神経筋疾患患者に筋エコー法を実施し検討してきたが，神経原性筋萎縮症では，筋エコー法上筋肉内エコーの増加は軽く筋束の減少が強いという特徴を認めた．さらに，神経原性筋萎縮症では，進行が遅い疾患群ほど中間広筋が大腿直筋に比べより強く障害される傾向がある印象があり，今回，筋萎縮性側索硬化症(ALS)，遺伝性運動感覚性ニューロパチー(HMSN)，脊髄性筋萎縮症（SMA）で，中間広筋の大腿直筋に対する障害の強さについて数値化し各疾患間の差を検討し，筋原性疾患では，Duchenne, Becker，筋緊張性，肢帯型の各ジストロフィー症，多発性筋炎・皮膚筋炎で同様の検討を行った．

対象および方法

対象は，ALS　21例，HMSN　11例，SMA　7例，筋原性疾患として，Duchenne Muscular Dystrophy（DMD）6例，Becker Muscular Dystrophy（BMD）5例，Myotonic Muscular Dystrophy（MMD）11例，Limb-Girdle Muscular Dystrophy（LG）8例，Polymyositis and Dermatomyositis（PM & DM）6例，健常対照8例である(表)．超音波断層装置は，日立EUB-40を用い，大腿中央部前面にて3.5MHzのプローブを用い，Gain 30dB，Near Gain-30dB，Far Gain 3.0dBの一定条件で横断像を記録した．得られたエコー像で，大腿中央部での大腿直筋の厚みを(a)，中間広筋の厚みを(b)とし，大腿直筋および中間広筋の幅2 cmおよび筋束の厚さ分の単位面積あたりのエコー輝度(echogenesity)をそれぞれ(A)および(B)とする（図1）と，b/aおよびB/Aをもとめ，これらの疾患で検討した．

表　Number of cases

	No. of Cases	Range of Age
ALS	21	29～74
HMSN	11	14～65
SMA	7	43～65
DMD	6	8～19
BMD	5	11～20
MMD	11	27～59
LG	8	19～54
PM and DM	6	31～66
Healthy Control	8	24～44

結　果

図2-1に，33歳の健常対照例の大腿中央部の筋エコー像を示す．筋肉内エコーはこの程度が正常であり，大腿直筋，中間広筋の筋束も保たれている．図2-2に，67歳ALS患者の大腿中央部の筋エコー像を示す．大腿直筋および中間広筋ともに著しい筋束の減少がみられ，両筋の軽度の筋肉内エコーの増加を認めた．図2-3に，47歳HMSN患者の大腿中央部の筋エコー像を示す．大腿直筋に比べ中間広筋の筋束の減少が目だち，両筋の軽度の筋肉内エコーの増加を認めた．図2-4に，58歳SMA患

＊信州大学医学部第三内科

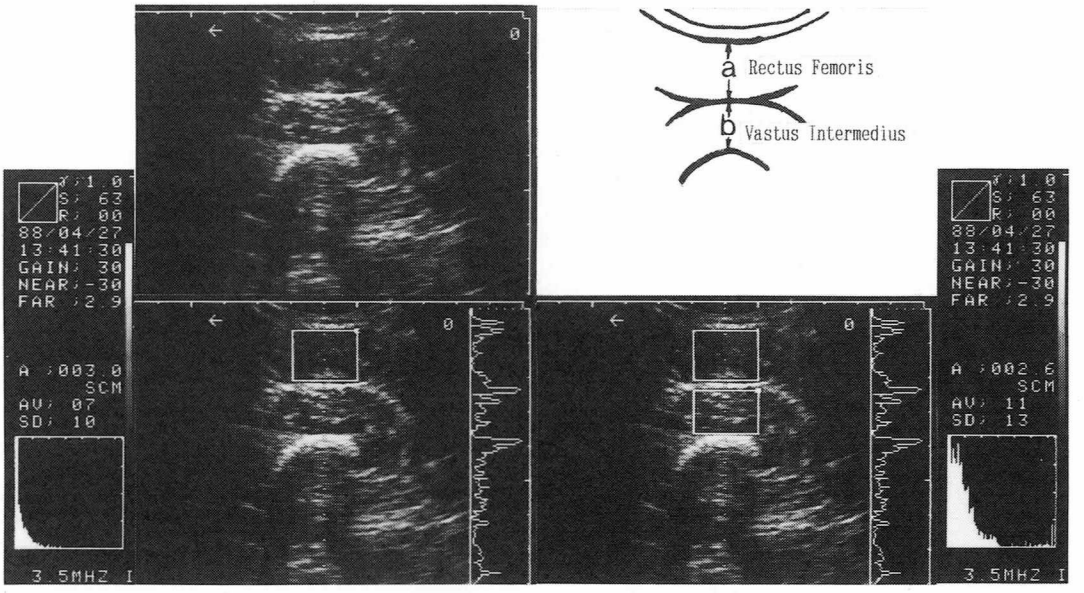


図1 Measuring of thickness and echogenesity of muscles on US

者の大腿中央部の筋エコー像を示す．大腿直筋の筋束は保たれているのに比べ，中間広筋の著しい筋束の減少があり，同筋の筋肉内エコーの著しい増加も伴っていた．

図3は，中間広筋の厚み(b)を大腿直筋の厚み(a)で割った値b/aを，各疾患毎に統計的に処理したものである．HMSNおよびSMAは，ALSおよび対照例に比べ有意（t検定で危険率1％以下）に低下を示した．HMSNとSMA間およびALSと対照例間では，有意差はなかった．筋原性疾患では，MMDでのみ対照例に比べ有意（t検定で危険率1％以下）に低下を示した．

図4は，中間広筋の単位面積あたりのechogenesity(B)を大腿直筋の単位面積あたりのechogenesity(A)で割った値B/Aを，各疾患毎に統計的に処理したものである．SMAは，ALSおよび対照例に比べ有意（t検定で危険率1％以下)に増加を示したが，SMAとHMSN間およびHMSNとALS間では，有意差はなかった．また，筋原性疾患では，MMDでのみ対照例に比べ有意（t検定で危険率1％以下）に増加を示した．LGでは増加を示すものと示さないものがあり，疾患の多様性を示唆していた．

各疾患の罹病期間とb/aあるいはB/Aとの関係を検討してみたが，今回明らかな関係は見られなかった．ただ，6年間に4回検索したHMSN例では，年数がたつにつれB/Aが増加する傾向を示した．進行の遅い（罹病期間10年）ALS例は，非定型的なので今回ALSグループから除いたが，同症例のb/aはALS群のRangeにはいるもののB/AはSMA群のRangeに入った．

考　　察

HMSNおよびSMAで，ALSおよび対照例に比べb/aが有意に低下を示したことは，神経原性筋萎縮症の中でも進行の遅いこれらの疾患では，大腿直筋に比べ中間広筋の筋束の減少が強いこと意味している．また，SMAで，ALSおよび対照例に比べA/Aが有意に増加を示したことは，SMAでは，筋束の減少と同時に筋肉内エコーの増加も大腿直筋に比べ中間広筋で強いことを意味している．HMSNでは，**図4**からも分かるように，中間広筋での筋肉内エコーの増加の仕方には症例によりかなりの幅がみられ，明らかにより強い増加を示すものもある．

疾患の罹病期間とb/aおよびB/Aには，今回

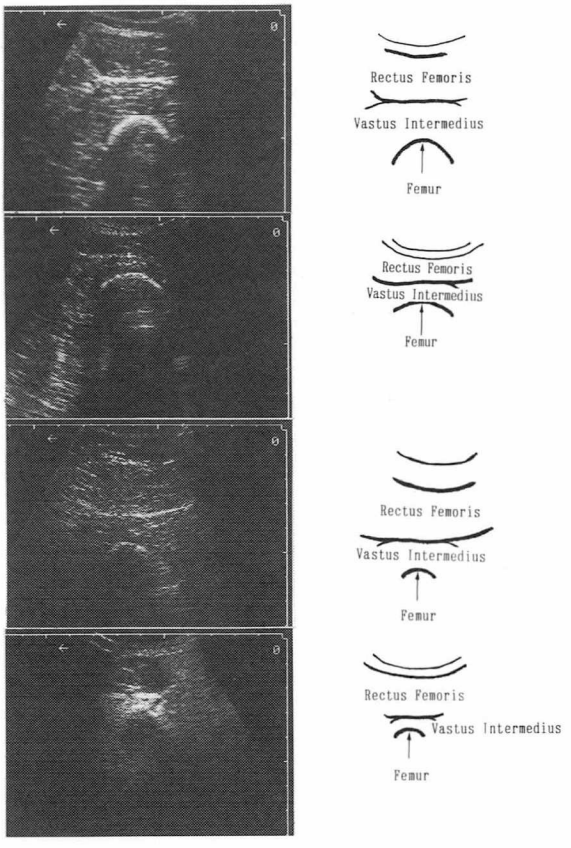


図2　Ultrasonogram of quadriceps in a healthy control and in patients with ALS, HMSN or SMA.

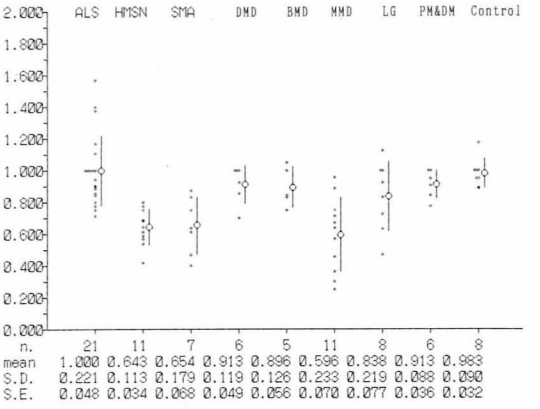


図3　The ratio of vastus intermedius and rectus femoris in thickness

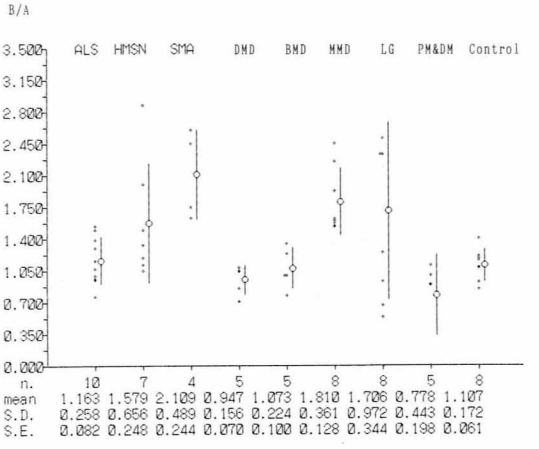


図4　The ratio vastus intermedius and rectus femoris in echogenesity

明らかな関係はみられなかったが，進行の遅いALS例および経過を追えたHMSN例では，B/Aが増加しており，症例を積み重ねてさらに検討する必要があると思われる．筋エコー法上，筋肉内エコーの増加は，結合織ないし脂肪織の筋組織内への浸潤と考えられている．また，筋束の減少は，筋萎縮そのものを示している．このことから判断すると，HMSNおよびSMA等の進行の遅い神経原性筋萎縮症では，中間広筋が大腿直筋より強く障害されていることになる．進行の遅い疾患群で中間広筋の障害がより強いということは，大腿直筋がType II線維優位[3]の速筋であるのに対し，中間広筋がTYPE I線維優位[4]の姿勢保持筋ないし抗重力筋であるということに関連している可能性がある．すなわち，姿勢保持筋の方が強く障害されるということを示唆している．筋原性筋萎縮症の中でType I線維萎縮が知られているMMDで選択的に中間広筋障害がみられたことについても，同様な要因が関与している可能性がある．臨床的には，ALSとSMA間でb/aおよびB/Aにおいて統計的に有意差がみられたことは，筋エコー法がこれら疾患の鑑別に役立つことを意味している．

結　論

神経原性筋萎縮症では，進行の遅いHMSNお

よびSMAで大腿直筋に比べ中間広筋がより強く障害される．筋原性筋萎縮症では，MMDでも同様の結果を示す．これらのことは，姿勢保持筋ないし抗重力筋が強く障害されることを示唆している．筋エコー法は，ALSとSMAの鑑別に役立つ．

文　献

1) Heckmatt JZ, Leeman S, et al : Ultrasound imaging in the diagnosis of muscle disease. J Pediatr **101**: 656, 1982.
2) 田代邦雄，松浦享ら：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」筋ジストロフィーの臨床，病態と成因に関する研究”（杉田班）昭和59年度報告書，1985，p90.
3) Johnson MA, Polgar A, et al : Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. J Neurol Sci **18**: 111, 1973.
4) Edgerton VR, Smith JL, et al : Muscle fibre type populations of human leg muscles. Histochem J **7** (3): 259, 1975.

4）筋ジストロフィー症における Dantrolene Sodium の血清 CPK 値に及ぼす影響

木村　淳*

研究協力者　梶　龍児*

要　約

筋ジストロフィー症の進行を遅延させる治療法を見出すため，FSH 型 2 例，Limb-girdle 型 3 例において，Dantrolene Sodium の経口投与の血清 CPK 値に及ぼす効果を検討した．5 例中 4 例において投薬量の増減は有意に CPK 値の変化と相関しており，投薬により CPK 値が低下することが示唆された．

はじめに

近年 Duchenne 型をはじめとする筋ジストロフィー症の病因が遺伝子レベルで解明されてきたが，未だ有効な治療法を確立するに到っていない．Duchenne 型では dystrophin の欠乏が示されているが，その正確な病因論的役割は明らかではない．しかし共通のメカニズムとしてカルシウムの細胞体内への異常な流入が関与していることが示唆されている[1]．細胞体内のカルシウム濃度の異常な上昇は永続的な筋収縮をひきおこし，組織学的に見られる Opaque Fiber などの所見を説明するものと考えられる．Dantrolene Sodium は sarcoplasmic membrane を安定化させる作用をもつ抗痙縮剤で，Duchenne 型筋ジストロフィー症やその動物モデルである mdx マウスで血清 CPK を有意に下げることが報告されている[2)3)]．

我々は，今回 FSH 型筋ジストロフィー症 2 例，Limb-girdle 型筋ジストロフィー症 3 例において，経口 Dantrolene Sodium の血清 CPK に与える影響を 4 ～18ヵ月にわたり調べた．

＊京都大学医学部神経内科

方　法

対象は，19～39歳の男性 2 名，女性 3 名で筋生検及び筋電図により確診のついた FSH 型 2 例及び Limb-girdle 型 3 例について，Informed Consent を得て行なった．

Dantrolene Sodium は経口にて25～50mg/日を 1 回～ 2 回にわけて投与した．

CPK は原則として月 1 回は採血をし，1 例を除き (Case 1)，外来通院時に調べた．同時に副作用のチェックのため肝機能も毎回検査を行なった．自宅から外来に受診するための行程は毎回同じで，ほぼ毎回同程度の筋肉に対する負荷が与えられる様にした．毎回，受診時には徒手筋力テストにて筋力評価を行なった．

得られた CPK 値は，Dantrolene Sodium の投与量（25又は50mg）との相関について simple regression analysis法（Statworks®による）を用いて検討した．

結　果

表に，各例の統計処理の結果（p-value）を示す．5 例中 4 例で，Dantrolene Sodium の投与量

表　Summary

case	type	duration(yrs)	p-value
1	L-G	4	0.019*
2	L-G	15	0.002*
3	FSH	3	0.045*
4	FSH	10	0.020*
5	L-G	8	0.208

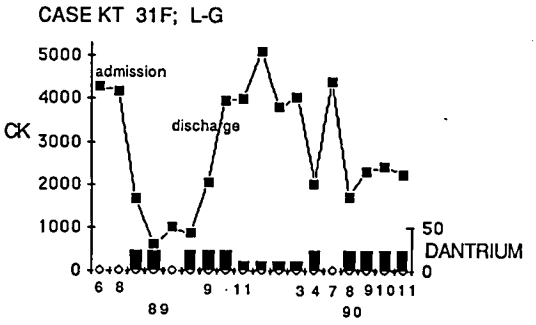


図1

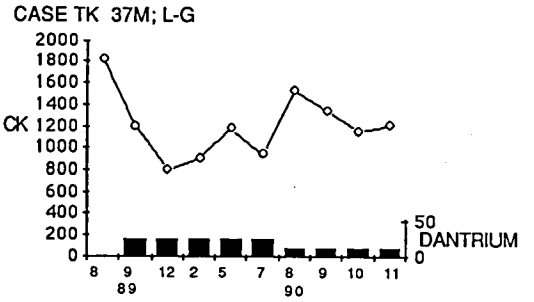


図2

はCPK値の変動に関与しない確率は0.05以下で，何らかの関与がある，即ち低下させることが示唆された．

図1は，入院中に投与を開始した例のCPK値の変動を示すもので，下段にDantrolene Sodiumの投与量を棒グラフで示している．入院時にCPK値は低下するが（admissionで示す）Dantrolene Sodium開始後さらに低下し，休薬すると上昇の傾向を示し，退院（dischargeで示す）と投与量減少により急激に高値になるが，また外来にて増量することにより低下し，CPK値の変動が投与量の増減でよく説明できた．

図2は外来にて投与を開始した例の同様のグラフであり，やはりCPK値は投与量に応じて増減を示した．

全例において徒手筋力テスト上で筋力に変化なく，2例において自覚的な一過性の易疲労性を投薬開始直後に認めた．

1例において（Case 5），投薬前より軽度の肝機能障害を認めたが，Dantrolene Sodiumの投与後肝機能の増悪を認めたため投薬を中止した．他の投薬による副作用は認めなかった．

考　　察

以上比較的短期間の観察で，本剤投与により見られたCPK値の減少が，筋ジストロフィー症の進行を遅延させるか否かは不明であるが，今後有効な治療法となり得る可能性が示唆された．将来より多施設の長期にわたる研究が必要と考えられた．

文　　献

1) Turner LFG, Westwood T, et al : Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mouse. Nature 335 : 735—738, 1988.
2) Quinlain JG, Johnson SR, et al : Dantrolene normalizes serum creatinine kinase in mdx mouse. Muscle & Nerve 13 : 268—269, 1990.
3) Bertorini TE, Palmieri GMA, et al : Effect of dantrolene in Duchenne muscular dystrophy. Muscle & Nerve, in press.

5）骨格筋ライアノジンリセプターのオートラジオグラフィー（ARG）

高木昭夫*

研究協力者　小島　進*　竹村玲子**　井田雅祥*
荒木　誠**　紫芝良昌**

はじめに

筋の興奮収縮連関（E. C coupling）における未解決の問題はT小管（T-tubule）から筋小胞体（SR）への興奮伝達機構にある．最近，植物アルカロイドであるryanodineが結合するryanodine receptorについての研究が進歩した[1]．1989年にTakeshimaらはryanodine receptor蛋白のcDNAをクローニングし，N端が"Foot"構造を，C端がCa^{2+}遊離チャンネルを形成していると推定した[2]．

一方この領域に於ける一つの話題は，常染色体性優性遺伝を示す悪性高熱の家系において，悪性高熱の責任遺伝子は第19染色体長腕にありryanodine receptorの遺伝子と同一であると推定された事である[3)4)]．すなわちryanodine receptor遺伝子の突然変異が悪性高熱の原因である可能性が指摘された[4]．悪性高熱の診断に有用とされているskinned fiber法によるCa^{2+}誘発性Ca^{2+}遊離（CICR）やカフェイン拘縮の亢進は[5)6)]，この筋小胞体のCa^{2+}チャンネルの異常に起因するとして矛盾しない．またヒト悪性高熱の実験モデルであるブタ悪性高熱においてryanodine receptorの生化学的特性の変化が報告されている[7]．

今回，我々はヒトryanodine receptor異常を検討する目的で，①筋生検cryostat標本に"*in vitro* labeling"法によるautoradiographyが可能か否か，②実際の生検筋に於けるryanodine receptor異常の有無につき検討したので報告する．

対象及び方法

対象はDuchenne型筋ジストロフィー1例，Becker型筋ジストロフィー1例，Duchenne型筋ジストロフィーの保因者1例，肢体型筋ジストロフィー1例，悪性高熱1例，悪性症候群1例，ヒト正常対照1例，およびmdxマウスとその対照のB10である．いずれの筋も−80°Cのdeep freezerに最長2年間保存されていた検体である．また悪性高熱と悪性症候群例はskinned fiber法により確定診断した例であり，詳細は別に報告した[8]．

方法は1979年にYoung & Kuharらが開発した"*in vitro* labeling"法を用いた[9]．

通常の方法で6 μmのクリオスタット切片をスライドグラス上にとり風乾後，0.1% formaldehyde in PBS（PH7.4）で10分間弱固定した．次に緩衝液A（20mM TrisHCl pH 7.0, 25μM $CaCl_2$, 4mM ATP, 0.1M KCl）で4°C，10分間preincubationした．その後各種濃度の〔^{3}H〕ryanodine（Du Pont-New England Nuclear）を緩衝液A中でincubateした．incubation時間，標本の厚さに関する基礎的検討も同時に行った．

オートラジオグラフィー（ARG）は，incubation後のスライドグラスを乳剤（Infold K5）中へdipした後，暗箱中で4°C，4週間及び8週間の露出後に現像定着した．後染色はHematoxylin & Eosin染色を用いた．

結合実験はincubateした切片をスライドグラ

＊虎の門病院神経内科
＊＊沖中記念成人病研究所

ス上より削り取りシンチレーションバイヤルにいれ，蛋白溶解剤（NCS：Amersham）で37°C，60分間溶解後シンチレーションカクテル（Ready Safe；Beckman）を加え液体シンチレーションカウンターで計測した．ヒト剖検筋より調整したheavy microsome分画を用いての結合実験も別に行った．

ARGにおいて銀粒子の密度を1標本上で無作為に10箇所選び計測し平均と標準偏差を求めた．統計学的手法はStudentのt検定を用いた．

結　　果

1）結合曲線：Incubationの時間に関する検討では，37°Cではほぼ30分後より結合量が一定となった．ARGは〔^{3}H〕ryanodine 100nMを37°C，90分で施行することとした(図1A)．標本の厚さは12μm以上の厚さとなると結合量は増加しなかった．Ligandの浸透度の問題と，切片が剥がれ易くなることが理由として考えられた（図1B）．

37°C，90分間のincubationでの結合曲線を得た．正常対照，B10マウスでは〔^{3}H〕ryanodine 80～100nMにおいて結合が飽和した．ヒトheavy microsome分画でも同様の結果を得た(図2)．すなわち本法におけるスライドグラス上のreceptorへのligandの結合を確認した．

2）Autoradiography（ARG）：筋線維に一致して銀粒子がみられた．赤筋と白筋，正常の筋線維と萎縮，肥大線維などの間に銀粒子の分布の差はなかった（図3）．

3）mdxとB10マウスの間には銀粒子の分布の差は認められなかった．しかし，銀粒子の密度はmdxで少ない傾向を認めた．

一方，saturation curveは両者の間に差を認めなかった．

4）ヒト筋ジストロフィーではDuchenne型，

表　Autoradiographにおけるsilver grainsの数．各標本で無作為に10箇所をcountした．Student's t test. * p<0.01，** p<0.001
MH：悪性高熱，NMS：悪性症候群，DMD：Duchenne型筋ジストロフィー，DMDc：DMDの保因者，BMD：Becker型，LG：肢体型

	grains/1000μm^2 (m±SD)
B10	104±13
mdx	84±10*
Normal	59± 9
MH	41± 9**
NMS	58± 6
DMD	76±11*
DMDc	69±11
BMD	68±11
LG	73±11*

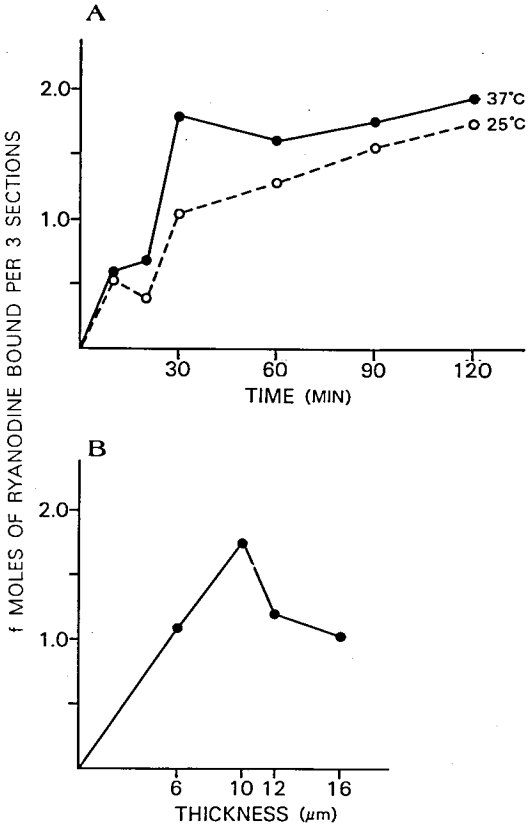


図1　A) Incubationの時間と結合量の関係．37°Cでは，ほぼ30分後より結合量が一定となった．B）標本の厚さと結合量の関係．12ミクロン以上の厚さとなると結合量は増加しなかった．

Becker 型，肢体型ともに銀粒子の分布の異常を認めなかった．しかし密度は Duchenne 型，肢体型で増加していた（図4，表）．

5）悪性高熱，悪性症候群では銀粒子の分布の差は認められなかった．しかし密度は悪性高熱で少ない傾向を認めた．悪性症候群では差はなかった（図5，表）．

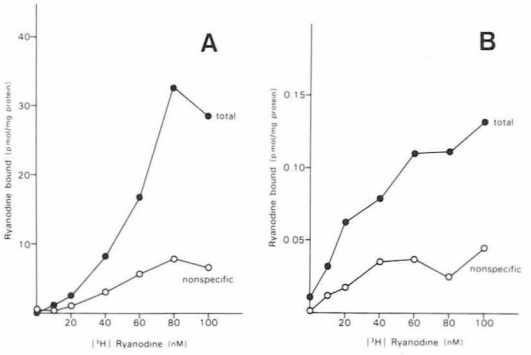


図2　〔^{3}H〕ryanodine による飽和曲線．A：ヒト heavy microsome 分画の〔^{3}H〕ryanodine の飽和曲線．B：*in vitro* labeling 法で得られた飽和曲線．両者ともに 80～100nM で飽和を示す．

考　　案

今回の検討により以下の事を明らかにした．

1）筋生検 cryostat 標本においても *in vitro* labeling 法による結合実験と ARG が応用可能である．2）mdx と B10マウスでは ARG 上 ryanodine receptor の分布異常は認めないが，mdx で密度が低い傾向がある．しかし，結合曲線はほぼ同一である．3）ヒト筋ジストロフィーでは Duchenne 型，Becker 型，肢体型ともに銀粒子の分布の異常を認めなかった．しかし密度は Duchenne 型，肢体型で増加していた．4）ヒト悪性高熱で ryanodine receptor の異常（銀粒子密度の減少）を指摘した．

今回の検討で－80°C の deep freezer で最長2年間保存した検体を用いて ARG が可能であるこ

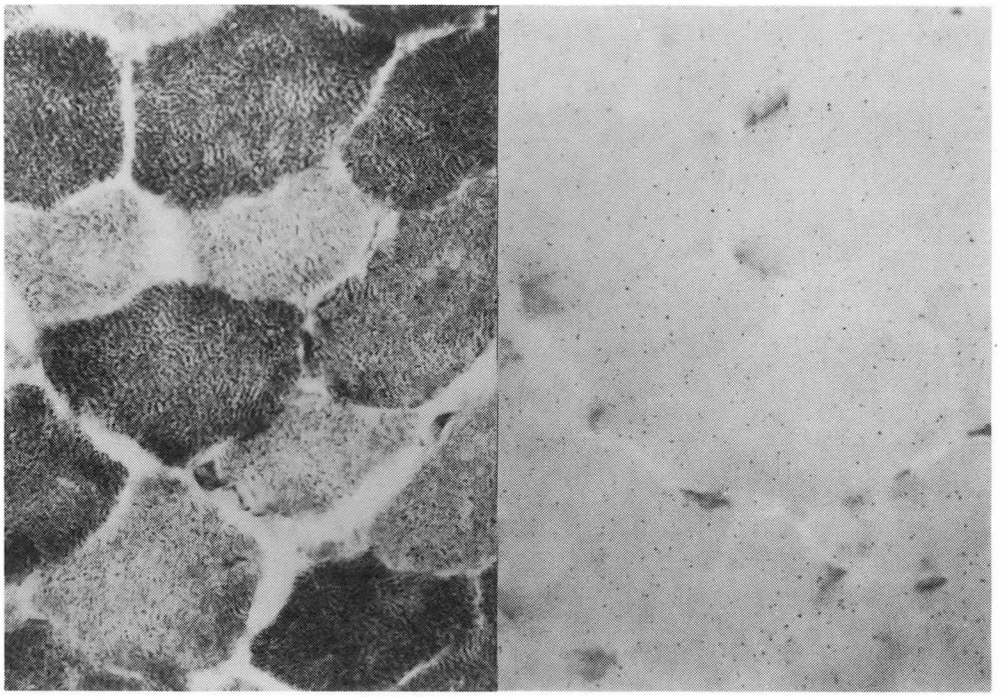


図3　〔^{3}H〕ryanodine の autoradiography.筋線維に一致して銀粒子がみられた．赤筋と白筋の間に銀粒子の分布の差はなかった．正常対照，A）NADH-TR，B）ARG，×800，Hematoxylin & Eosin（HE）染色で後染色．

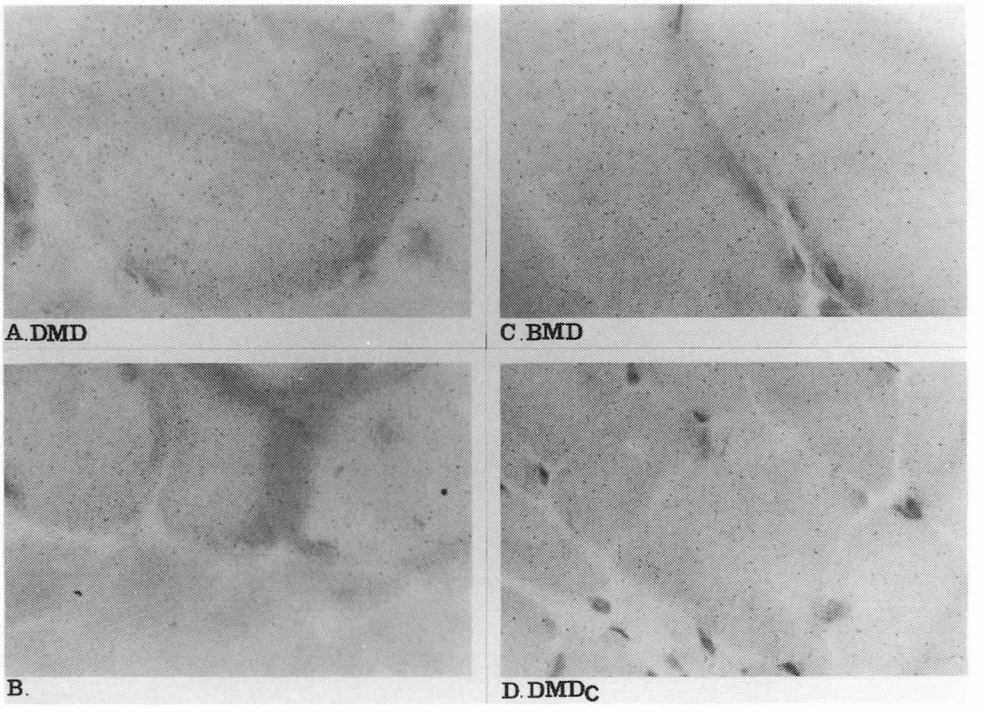


図4　〔^{3}H〕ryanodine の ARG．A，B）Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD），C）Becker 型筋ジストロフィー（BMD），D）DMD 保因者（DMDc）．×800，HE 染色で後染色．

とを確認した．すなわち，本法は過去の通常に施行した cryostat 検体が使えるという利点をもつ．また少量の標本量でも結合曲線が得られる．これらの事は筋疾患に於て適当な ligand が得られれば，その病態解析が通常の筋生検標本で可能であることを意味しておりその有用性がきわめて高いと考える．

Ryanodine receptor は Ca^{2+} 遊離チャンネルを形成し筋細胞内の Ca^{2+} 調節に重要な役割をなしている．Duchenne 型筋ジストロフィーにおいて skinned fiber 法でカフェイン拘縮が亢進している[6]，電顕的にT管と筋小胞体の間の junctional gap が拡大しているなどの異常が指摘されている[10]．今回の検討でも ryanodine receptor を示す銀粒子の密度が Duchenne 型筋ジストロフィーで増加の傾向を示したことは，筋細胞内の Ca^{2+} 調節異常を反映していると推定される．一方，mdx マウスでは銀粒子の密度が減少していたが結合曲線では B10とほぼ同様の結果を得た．これは mdx マウスでは Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離(CICR)が，B10と変わらないと言う結果を支持する所見と考える[11]．

今後，本症における Ca^{2+} 遊離チャンネルの病態と dystrophin 異常の関連を追求することが重要と考える．

同様の Ca^{2+} 調節異常が指摘されている悪性高熱で ARG 上 ryanodine receptor を示す銀粒子が少ないこと，結合曲線ではその結合度が正常と異なることは[8]，receptor 分子の減少とその機能の異常があることを示唆している．

今回は症例数が少なく各一例のみの結果であり，今後症例を追加して検討する必要がある．

結　　論

1）筋生検 cryostat 標本においても Young & Kuhar の *"in vitro* labelling" 法が可能である．

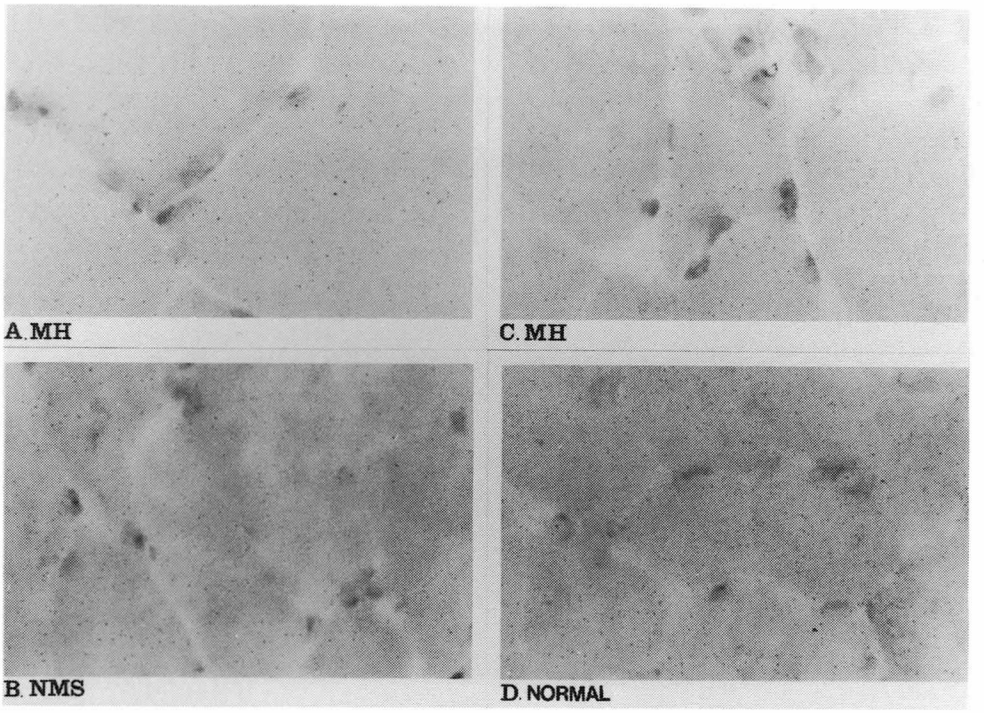


図5　〔^{3}H〕ryanodine の ARG．悪性高熱（MH：A，C.），悪性症候群（NMS：B），正常（Normal：D）silver grains の分布異常は認められないが MH では密度の低下がみられる．×800，HE 染色で後染色．

2）mdx と B10マウスでは ARG 上，mdx で銀粒子の密度が低い傾向があった．結合曲線はほぼ同一であった．

3）ヒト筋ジストロフィーでは Duchenne 型，肢体型で銀粒子の密度が増加の傾向を示した．

4）ヒト悪性高熱で ryanodine receptor の異常（銀粒子密度の減少）を指摘した．

文　献

1）高木昭夫，小島　進：悪性高熱研究の進歩．日本臨床**48**：197，1990.

2）Takeshima H, Nishimura S, et al: Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. Nature **339**: 439, 1989.

3）McCarthy TV, Healy JMS, et al: Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. Nature **343**: 562, 1990.

4）MacLennan DH, Duff C, et al: Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. Nature **343**: 559, 1990.

5）遠藤　実：筋生検における MH スクリーニングテスト．麻酔と蘇生**23**（別冊）：145，1987.

6）高木昭夫，小島　進ほか：悪性高熱および Duchenne 型筋ジストロフィーにおけるカフェイン拘縮亢進の機序と診断的意義．臨床神経**29**：301，1989.

7）Mickelson JR, Gallant EM, et al: Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor in malignant hyperthermia. J Biol Chem **263**: 9310, 1988.

8）小島　進，高木昭夫ほか：悪性高熱，悪性症候群におけるライアノジンレセプター異常―生検骨格筋のオートラジオグラフィーによる検討．

麻酔と蘇生26（別冊）：1990，印刷中.
9) Young WS and Kuhar MJ: A new method for receptor autoradiography: 〔^{3}H〕 opioid receptors in rat brain. Brain Research 179: 255, 1979.
10) 吉岡利忠，田中みどりほか：mdx マウス下肢骨格筋の SR-T membrane system 及び dipeptides 含有量．“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）平成元年度研究報告書，1990，p136.
11) Takagi A, Kojima S, et al: Increased leakage of calcium (Ca) ion from sarcoplasmic reticulum (SR) of mdx mouse. J Neurol Sci 98 (Suppl): 408, 1990.

II. 筋ジストロフィー(2)

6）ジストロフィン・テストによる脂帯型筋ジストロフィーの再検討

荒　畑　喜　一*

研究協力者　有　川　恵　理*　階　堂　三砂子*
石　浦　章　一*　埜　中　征　哉*

緒　　言

ジストロフィン遺伝子のクローニング（Monaco, Kunkel ら；1985），全 cDNA 塩基配列の決定とジストロフィン分子モデルの発表（Koenig, Kunkel ら；1987），さらにジストロフィンの発見（Hoffman, Kunkel ら；1987）とジストロフィンの筋組織における局在様式（Sugita, Arahata ら；1988）が相次いで報告されたのは我々の記憶に新しい．これらを筋ジストロフィー研究の新たな幕開けととらえるならば，今や我々はジストロフィン研究の第二段階に入った．

ジストロフィンが正常筋でいかなる生理・解剖学的役割を担っているかなお不明の部分がおおく，これを解明して行くには様々な手だてが必要であろうが，大別すれば基礎医学的研究（分子遺伝学，細胞生物学，生化学等）と臨床医学的研究（臨床遺伝学，診断学，治療学等）に分けられよう．そして今回我々は，特にジストロフィン・テストの臨床医学的側面に的を絞り，①ジストロフィンの免疫組織化学，②ジストロフィンのイムノブロット，③ジストロフィン遺伝子の multiplex PCR 解析を通して，いわゆる肢帯型筋ジストロフィーの再検討を試みたので報告する（図1，2，3）．

目　　的

肢帯型筋ジストロフィー（LGD）は決して単一の疾患ではないが，一般に腰帯・肩甲帯・四肢近位筋部分に筋萎縮の分布を認める常染色体劣性遺

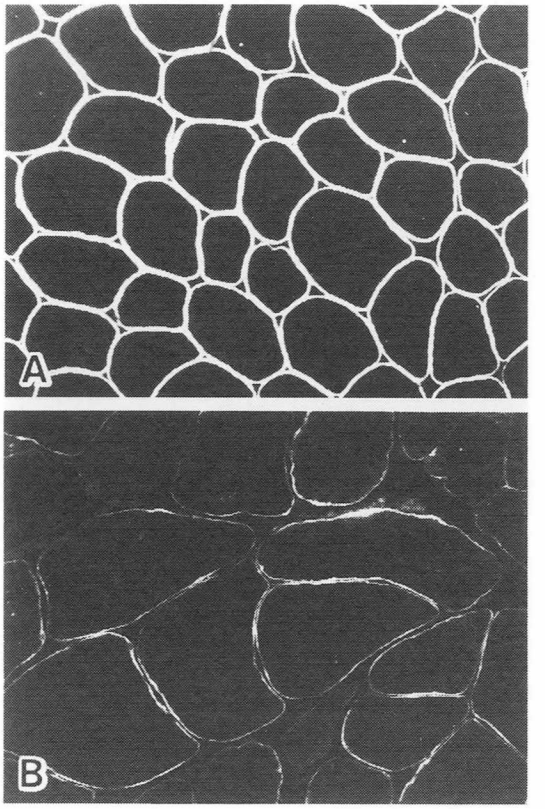


図1　ジストロフィンの免疫組織化学．
ジストロフィン遺伝子に異常の認められない肢帯型筋ジストロフィー（A；常染色体劣性）ではジストロフィンは筋形質膜部分に明瞭に染色されるが，一方ジストロフィン遺伝子の欠失と分子量に異常を認めた症例では不均一な染色が見られ，ベッカー型筋ジストロフィーである可能性が示された．抗ジストロフィン抗体はモノクローナル 4-4C5（C 未端）を使用．（×200）

＊国立精神・神経センター神経研究所

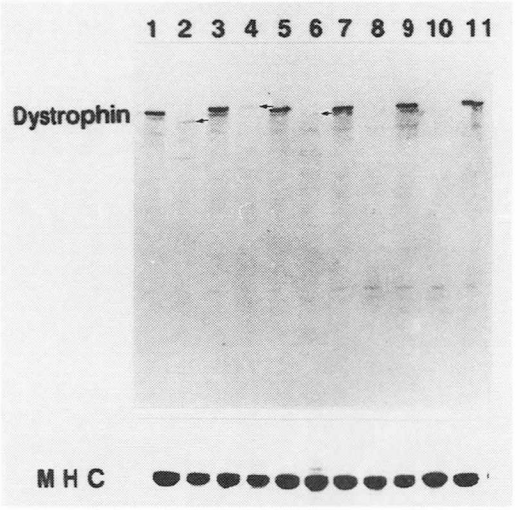


図2　イムノブロット法によるDMD/BMDのジストロフィン解析.
Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11は正常対照筋を示し，いづれも400kdのジストロフィン・バンドを認める．Lanes 2, 4, 6はBMDで，ジストロフィン（矢印）は分子量（<400 or>400kd），蛋白量（減少）とも異常を見る．
Lanes 8, 10はDMDで，ジストロフィンは検出されない．MHCは筋タンパクの指標として用いたミオシン重鎖を示す．骨格筋の試料はクリオスタット切片（10μ）を20枚使用した．

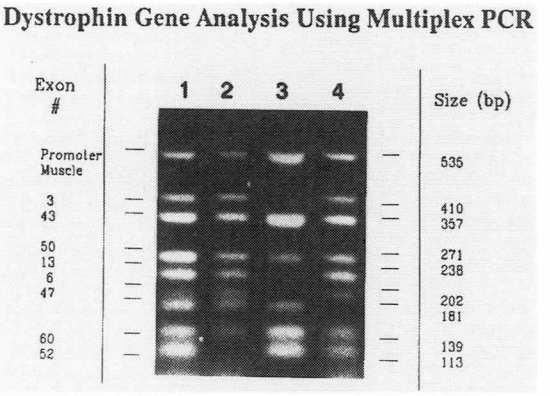


図3　Multiplex PCR法によるDMD/BMDのジストロフィン遺伝子解析.
Lane 1は正常コントロール；lane 2はDMD（エクソン52に欠失を見る），lanes 3, 4はBMD（それぞれエクソン3～13, 47に欠失を見る）．DNA試料は生検筋より直接フェノール/クロロフォルム抽出，エタノール沈澱法にて得た．Gene amp kitを用い，genomic DNA 250ng, Taq polymerase 5 units, 各プライマーを0.5μlずつ使用しDDWにて50μlとした．Thermal Cyclerは94°C, 7分(変性)，のあと25サイクルの94°C, 30秒；55°C, 30秒(プライマーの付加とアニーリング)；65°C, 4分(DNAポリメラーゼによる伸長）を実施した．PCR productsは1.4%アガロースゲルに20μlずつ乗せた．

伝もしくは孤発例の筋ジストロフィーを示す．このため，Becker型筋ジストロフィー（BMD），DMD保因者等との鑑別診断が困難な症例も存在するはずである．我々は，臨床的にLGDと診断された症例について上記した各種のジストロフィン・テストを実施してみた．

対象と方法

対象は過去12年間にLGDと臨床診断された41症例（3048例の生検筋リストより抽出）である．これらの生検骨格筋についてジストロフィン・テスト(免疫組織化学法，イムノブロット法，multiplex PCR法）を実施した．

結　　果

LGDと臨床診断されていた41例中34例ではジストロフィンは正常に発現していた．ところが5例（全体の12%，孤発例男性に限れば31%）においては，BMDの場合に報告されているようなジストロフィンの異常発現を確認した．即ちジストロフィン分子量とタンパク量の減少および筋形質膜の異常な免疫染色パターン（全体的な淡染性ないしは部分的欠損等によるheterogeneousな染色）とともにDMD遺伝子の欠失が認められた．従ってこれらの5症例は当面BMDと見なすことが妥当であるものと考えられた．また女性の2症例（孤発例女性の13%）において免疫組織化学的モザイシズムが確認され，これらはmanifested DMD carrierと見なされた．

考　　察

最近ジストロフィンの欠陥によって生ずる臨床像の多様性がいくつか報告されている．おなじジストロフィン遺伝子に欠陥を持っていても，実際の臨床像は様々であり（DMD と BMD の差異は既に述べたとおりであるが[1]）このほかにも高 CK 血症と筋の cramp を見る X-linked myalgia 家系の存在や，大腿四頭筋ミオパチー等の報告もある．また一方のみが臨床症状を呈した一卵性双生児の姉妹例（skewed inactivation の存在を示唆する）も知られている．あるいはジストロフィンに46%の巨大欠損が存在しても臨床的には mild な BMD に止どまる家系も報告されているし，BMD 兄弟例で臨床的経過が大きく異なる症例等も存在する．

現在われわれの研究室では，ルーチンの組織化学用凍結切片20枚からジストロフィンのイムノブロットを実施している．前述した免疫組織化学法はある意味では主観的な検査法であるので，これを補完する意味からも並行してジストロフィンのイムノブロット・テストを実施することは必要である．

さらにより信頼度の高い結果を得るために，我々の研究室では，筋生検材料の一部から直接 DNA を抽出して multiplex PCR 解析法による遺伝子診断を並行して実施している．とくに，Chamberlain と Beggs により調製された multiplex プライマーによる PCR 法を用いれば，サザンブロットで見いだされる遺伝子欠失の98%が発見出来るので臨床診断的価値は高い．いずれにしても DMD/BMD 患者の50～70%にジストロフィン遺伝子の欠失をみいだすことが出来る．

ジストロフィン・テストを実施しない場合，いわゆる LGD と臨床診断されている症例の中にはかなりの程度に BMD 孤発例，DMD 保因者孤発例が含まれているものと推察された．かかる症例については，適切な遺伝相談の資料としてジストロフィン・テストが不可欠である．また今後これらの症例については更にその臨床的側面についても掘り下げて検討を加えて行く必要があるものと思われた．臨床症状を何等示さない（asymptomatic）保因者でしかも血清 CK 値が正常の症例では，モザイクパターンをとらず正常の免疫染色をみるとの報告もあり，免疫組織化学法での保因者診断には限界がある．ジストロフィンの cDNA プローブと DNA 多形解析，さらには組織培養法による DMD の保因者診断は DMD の遺伝相談に重要な資料を提供するわけで，免疫組織化学的診断法，イムノブロット法と並んで重要であることは言うまでもない．

文　　献

1) Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, et al: Dystrophin diagnosis: Comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analyses. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7154—7158, 1989.

2) Arikawa E, Hoffman EP, Kaido M, et al: The frequency of patients having dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population. Neurology (In Press)

7）Dystrophin：ヒト臓器分布並びにBecker型筋ジストロフィーにおける発現様式について

内野　誠*

研究協力者　三池輝久**　荒木淑郎***

はじめに

骨格筋及び心筋におけるdystrophin（"d"）の発現状況については，疾病の場合を含め，詳細に検討されているが，筋以外のヒト臓器における"d"の発現状況は今日なお不明である．そこで今回ヒト臓器における"d"の分布，特に脳における発現様式を明らかにするため，健常者及びDuchenne型筋ジストロフィー（DMD）患者の剖検臓器を用いて，抗"d"抗体による検索を行った．また昨年にひき続きBecker型筋ジストロフィー（BMD）における"d"の発現様式についても検討したので，それらの結果について報告する．

対象と方法

対象は神経筋疾患以外で死亡した正常対照剖検例2例，筋緊張性ジストロフィー1例，並びにDMD 1例で，骨格筋，心筋，胃，膀胱，腎臓，肺，脳などの各臓器について，4種類の抗"d"抗体（ハーバード大学小児科のDr. E.P. Hoffmanより供与された60kd, 30kd抗体，及び神経センター杉田先生より供与されたペプチドII，ペプチドIV）を用いて，Western blotting及び免疫組織化学染色（ABC法，螢光抗体法）による検索を行った．

また，BMD 9例の生検筋についても同様の検索を行った．

＊国立療養所再春荘病院神経内科
＊＊熊本大学医学部発達小児科
＊＊＊熊本大学医学部第一内科

結　果

I　Dystrophinのヒト臓器分布

1）Western blotting

ペプチドIV（"d"のc末端抗体）を用いた正常対照剖検例のWestern blottingにおいて，骨格筋，心筋ではほぼ同じ程度の明瞭な"d"の発現がみられ，大脳（前頭葉皮質，頭頂葉皮質），胃においても，微量ながら明らかな"d"bandの発現がみられた．膀胱でも痕跡的な"d"bandの発現を認めたが，肺や腎臓では明らかではなかった（図1）．60kd抗体及び30kd抗体でもほぼ同様の結果であった．ペプチドIIは抗体価が低く，通常の1000倍稀釈による検索では検出困難であった．

筋緊張性ジストロフィー例は骨格筋，心筋，及び大脳において"d"の発現がみられ，正常対照とほぼ同様の結果が得られたが，胃・膀胱などの平滑筋臓器における"d"bandの発現は明らかではなかった．

DMDでは死後1時間前後で剖検が実施されたが，骨格筋，心筋，大脳，膀胱など検索した全臓器で"d"の発現はみられなかった（図2）．抗体による差もみられなかった．

2）免疫組織化学染色

正常対照剖検例の骨格筋では死後4時間程度経過して，一部の筋線維で融解像がみられたが，大半の筋線維では筋表面膜に全周性に抗"d"抗体の局在がみられた．心筋では筋線維の中心部にリポクスチンの沈着が目立ち，螢光抗体法では黄色に光ってみえたが，"d"は筋線維表面膜に全周性に局在していた．胃，膀胱，肺，腎臓などにおいても平滑筋線維の筋表面に抗"d"抗体の局在が

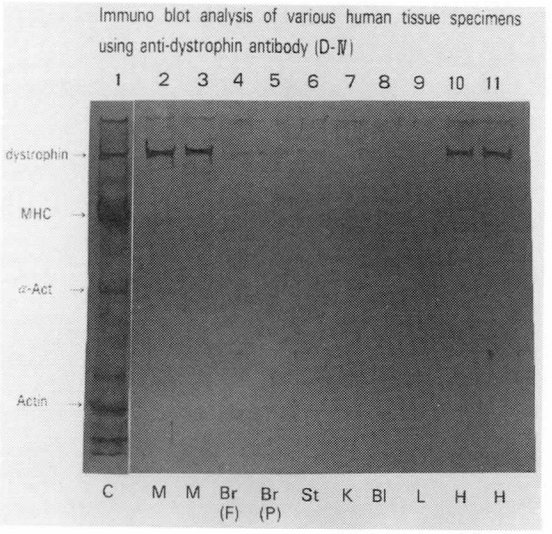


図1　正常対照剖検例（74歳）各臓器の Western blotting
1 (c)：正常対照の骨格筋を Western blotting 後アミドブラック染色したマーカー，2，3 (M)：骨格筋，4 (BrF)：大脳(前頭葉)，5 (Br P)：大脳（頭頂葉），6 (St)：胃，7 (K)：腎臓，8 (Bl)：膀胱，9 (L)：肺，10，11(H)：心筋

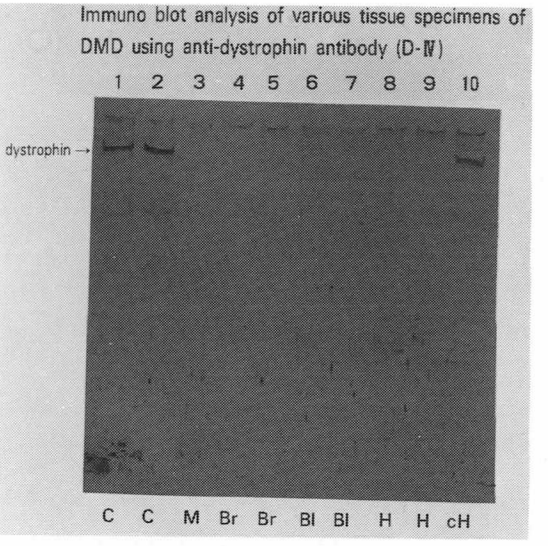


図2　DMD 剖検例（26歳）各臓器の Western blotting
1，2 (c)：正常対照骨格筋，3 (M)：DMD 骨格筋，4，5 (Br)：BMD 大脳，6，7 (Bl)：DMD 膀胱，8，9 (H)：DMD 心筋，10(cH)：正常対照心筋

認められた．大脳については螢光抗体法ではリポフスチンの沈着が著明で，正確な抗体の局在は不明瞭であった．そのため ABC 法による検索を行ったが，60kd 抗体による検索では neuron の胞体が褐色に染色され，C 末端抗体による染色では neuron は染色されず，glia 特に astroglia の胞体及び神経突起が染色された．

筋緊張性ジストロフィーにおいても正常対照例とほぼ同様の結果が得られた．

一方，DMD においては，骨格筋，心筋，膀胱などにおいて“d”の局在はみられず，大脳でも明らかな“d”の局在を認めなかった．

正常マウス脳における検索でも，60kd 抗体では neuron の胞体特に表面膜が濃染し，C 末端抗体では glia が染色された．小脳においても60kd 抗体及び30kd 抗体ではプルキンエ細胞の胞体が染色され，C 末端抗体では glia が染色された．

Preliminary study として，マウス骨格筋に対して，C 末端抗体を用いてゴールド標識免疫電顕による検索を行ったが，筋表面の caveola の中にはゴールドの沈着はみられず，主に形質膜の直上にゴールドの沈着がみられたが，凍結超薄切片のような鮮明な像は得られないため，形質膜との位置関係が不明瞭であった．

II　BMD における dystrophin の発現様式について

9 例の BMD 生検筋で検討したが，60kd 抗体及び30kd 抗体による Western blotting では，DMD と同様に“d”の発現がみられないもの，正常の427kd とは異なる分子量を有するもの，及び正常分子量で含量が減少したものの 3 つのタイプがみられた．

C 末端抗体による Western blotting では60kd 抗体では“d”band の発現を認めなかった BMD 例で，痕跡的ながら，正常分子量の位置に band の発現がみられた．また60kd 抗体では異常分子量を

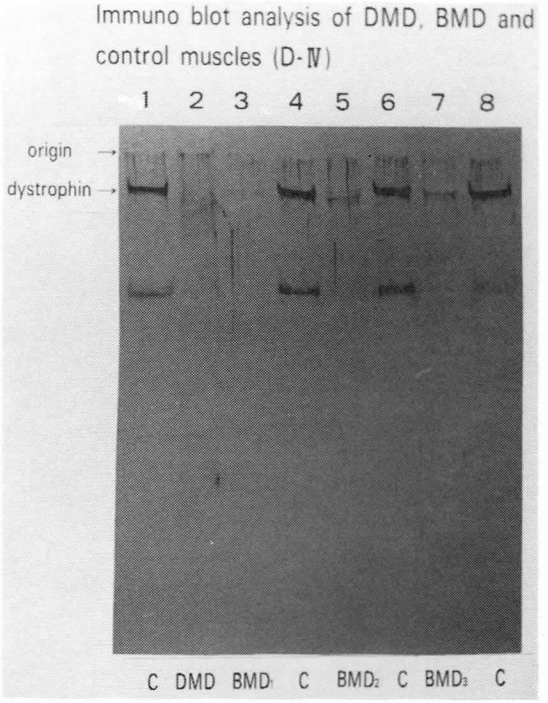


図 3　Duchenne 型（DMD），Becker 型（$BMD_{1,2,3}$）及び正常対照（C）の生検筋のC末端抗体による Western blotting

示した例では，異常分子量の main band の他に正常分子量の位置にもう一本の薄い band が認められた（図3）．DMD ではC末端抗体でも明らかな“d”band の発現は認めなかった．

免疫組織化学染色では大半の症例は筋表面膜が patchy に染色されたが，一部全周性に染色される症例もみられた．

考　　察

“d”の mRNA は骨格筋，心筋のみならず，微量ながら胃や腸などの平滑筋組織，さらに脳組織にも含まれることが知られている[1)2)]が，今回の4種の抗“d”抗体を用いた Western blotting では正常対照例及び筋緊張性ジストロフィー例において，骨格筋や心筋のみならず，痕跡的ながら平滑筋臓器（胃，膀胱），さらに脳においても“d”が発現しているのが認められた．一方 DMD では骨格筋，心筋のみならず，脳でも“d”を欠如しており，DMD で高率にみられる IQ 異常との関連も考えられた．

興味深いのは抗体による脳組織での認識細胞種の違いで，60kd 抗体では neuron が染色されるのに対して，C末端抗体では glia が染色された．このことは培養系で証明されている neuron と glia での“d”産生の違い[3)]や，約75個の“d”エクソンの alternative splicing により，C末端領域の一次構造が異なる複数の“d” isoform の存在が推定されている[4)]点とも関連し，neuron と glia では質的に異なった“d”を産生している可能性が示唆された．

BMD 生検筋を用いた Western blotting で60kd 抗体では“d”band の発現を認めず，C末端抗体では正常位置に痕跡的な band の発現がみられた点に関しては，抗体による検出感度の違いによるのか，“d”以外の蛋白との cross reaction なのか今後検討が必要と思われた．今回検索した9例の BMD 中5例は正常分子量で含量が減少した例であり，いわゆる frame-shift 仮説での説明が困難であるが，原因としては1）遺伝子の欠失が短かく，Western blotting ではとらえられない，2）point mutation，3）promoter 領域の異常，4）その他が考えられる．BMD の重症度と“d”の含量は密接に関連するので，今後“d”の産生機構についての検討を多面的に推進していくことが重要と考えられた．

要約と結論

1）ヒト臓器における“d”の発現様式を明らかにするため，抗“d”抗体を用いて，Western blotting 及び免疫組織化学染色による検索を行った．

2）Western blotting による分析で，“d”は正常対照及び筋緊張ジストロフィー例の骨格筋，心筋のみならず，胃，膀胱などの平滑筋臓器，さらに脳においても発現が認められた．DMD では全臓器で“d”の発現はみられなかった．

3）免疫組織化学染色では“d”は正常対照及び筋緊張性ジストロフィー例の骨格筋，心筋，平滑筋線維の表面膜に局在し，脳においては60kd 抗

体では neuron の胞体，C末端抗体では glia が染色され，抗体により認識細胞種に違いがみられた．DMD では全臓器で“d”の発現はみられず，IQ 異常との関連も考えられた．

4）BMD では正常の427kd より低分子化した“d”を有する例の他，“d”を欠如する例，及び正常分子量で含量が減少する例がみられた．免疫染色では筋表面膜が patchy に染色される例が大半を占めたが，一部に全周性に染色される例もみられた．

5）いわゆる frame-shift 仮説だけでは説明困難な BMD が少なからず存在する可能性があり，“d”の産生機構について，今後多面的検討が必要である．

文　献

1) Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S and Kahn A: Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. Nature 333: 858—860, 1988.

2) Nudel U, Robzyk K and Yaffe D: Expression of the putative Duchenne muscular dystrophy gene in differentiated myogenic cell cultures and in the brain. Nature 331: 635—638, 1988.

3) Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A and Berwald-Netter Y: Pystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. Nature 344: 64—65, 1990.

4) Feener CA, Koenig M and Kunkel LM: Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. Nature 338: 509—511, 1989.

8）各種筋ジストロフィーにおける抗ジストロフィン抗体による免疫組織化学的検討

納　光弘*

研究協力者　樋口逸郎*　中川正法*　臼杵扶佐子*
福永秀敏**　有村公良*　中原啓一*
末原雅人*　竹永智***

各種筋ジストロフィーを含む神経筋疾患におけるジストロフィン発現異常の有無を免疫組織化学的に検討し，臨床診断と，ジストロフィン染色を加味した最終診断を比較検討した．

対象及び方法

対象とした症例の臨床診断は，Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD) 14例，家族歴のある Becker 型筋ジストロフィー (BMD) 2例，肢帯型筋ジストロフィー(L-G)あるいは孤発例の BMD の可能性のあるもの49例，先天性筋ジストロフィー(CMD) 12例，女性保因者5例，その他の神経筋疾患68例の計150例である．

抗ジストロフィンモノクローナル抗体は，味の素株式会社及び富士レビオ株式会社から供与されたものを使用し ABC 法にて免疫組織化学的染色を行った．ジストロフィン染色との比較のため，抗スペクトリンポリクローナル抗体を用いて同様の染色を行った．各症例200本以上の筋線維について，ジストロフィンの染色性を Absent (A), Faint (F), Patchy (P) 及び Normal (N) に分類し各々の頻度を求めた．壊死線維など変性の強い筋線維は除外した．染色性の低下が軽度で正常との鑑別が難しい筋線維はすべてNに含めた．尚，今回の分類ではFかつPの場合はFに含め，正常に近い濃度で不連続に染まっているもののみをPに分類した．

＊鹿児島大学医学部第三内科
＊＊国立療養所南九州病院
＊＊＊国立療養所沖縄病院

結　果

表1にジストロフィン染色にて DMD と診断した症例を示した．年齢は筋生検施行時のものである．Aが高頻度で平均97%であった．すべての筋線維がまったく染色されない症例は3例のみで他の11例は一部の筋線維が多少とも染色された．正常の染色性を示した筋線維の頻度は症例8の5%が最高であった．症例13と14の2例が臨床的には CMD と診断されていた症例である．症例13を簡単に呈示する．症例；Y.N. 3ヵ月，男．主訴；四肢筋力低下．現病歴；出生時体重2500g．羊水混濁あり．泣き声は弱く，四肢筋緊張低下あり．生後の運動発達不良．現症；四肢筋緊張低下，筋萎縮あり．顔面筋力低下，眼瞼下垂あり．検査所見；血清 CK：540 (正常26—200)．筋生検所見；筋線維の大小不同があり変性線維が散在し結合織の軽

表1　ジストロフィン染色にて DMD と診断した症例

症例	年齢	臨床診断	最終診断	A	F	P	N
1	8	DMD	DMD	99.5	0.5	0	0
2	13	DMD	DMD	95	5	0	0
3	5	DMD	DMD	94	5	0.5	0.5
4	5	DMD	DMD	95	5	0	0
5	8	DMD	DMD	100	0	0	0
6	2	DMD	DMD	100	0	0	0
7	9	DMD	DMD	98	0	0	2
8	7	DMD	DMD	93	2	0	5
9	4	DMD	DMD	98	1	0	1
10	10	DMD	DMD	96	3	0	1
11	9	DMD	DMD	100	0	0	0
12	7	DMD	DMD	96	3	0	1
13	3 mon.	CMD	DMD	99.5	0.5	0	0
14	9 day	CMD	DMD	96	4	0	0

度増加がみられた．スペクトリン染色では正常に染色されたが，ジストロフィン染色では99%の筋線維が欠損を示した（**図1**）．

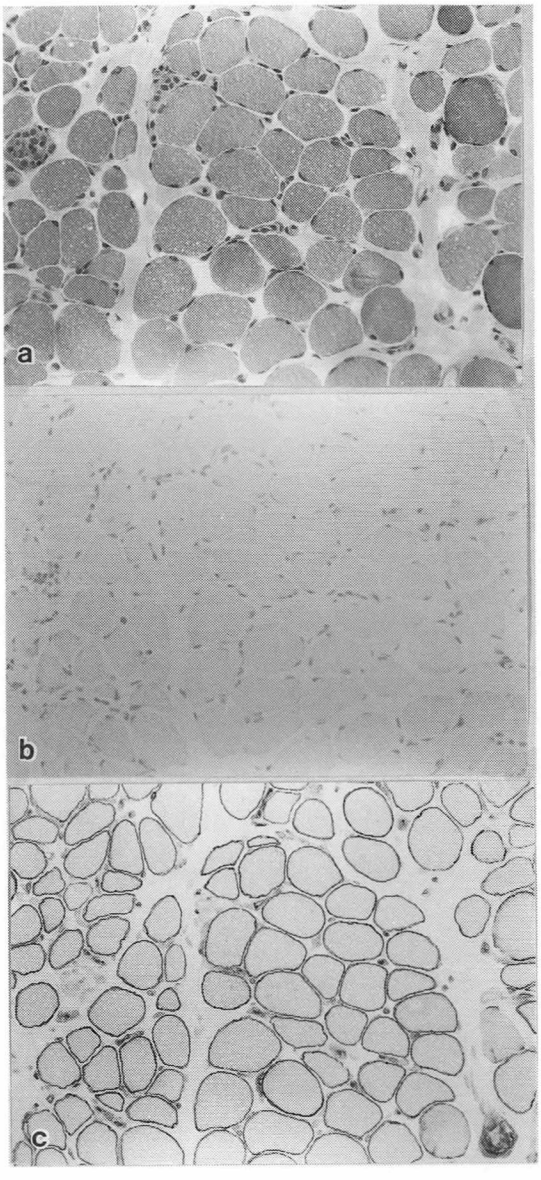


図1　臨床的にCMDと診断され，ジストロフィン染色にてDMDと診断された症例の生検筋
a：HE染色　×250
b：ジストロフィン染色　×250
c：スペクトリン染色　×250

表2　ジストロフィン染色にてBMDと診断した症例

症例	年齢	臨床診断	最終診断	A	F	P	N
1	24	BMD	BMD	60	39.5	0.5	0
2	50	BMD	BMD	6	35	0	59
3	4	DMD	BMD	2	41	17	40
4	4	DMD	BMD	0	22	0	78
5	42	L-G or BMD	BMD	28	72	0	0
6	30	L-G or BMD	BMD	0	62	0	38
7	15	L-G or BMD	BMD	0	34	3	63
8	62	L-G or BMD	BMD	0	10	0	90
9	22	L-G or BMD	BMD	81	15	2	2
10	20	L-G or BMD	BMD	1	10	5	84
11	24	L-G or BMD	BMD	12	85	0	3
12	29	L-G or BMD	BMD	0	98	2	0
13	29	Polymyositis	BMD	10	5	5	80

次に，ジストロフィン染色にてBMDと診断した症例を**表2**に示した．欠損線維の頻度は0～81%と症例により大きく異なり，Fの筋線維は平均42%と高頻度であった．症例3と4が臨床的にはDMDと診断されていた症例である．2例ともAは少く，FあるいはPが認められた．症例9は欠損線維が81%と最も高頻度にもかかわらず骨格筋障害は比較的軽度で，心不全を主症状とした症例である．また症例13は臨床的には多発性筋炎が疑われた症例である．症例3，9及び13を簡単に呈示する．症例3は，おじが16歳時にDMDで死亡しており本患児も10歳で歩行不能となっており，臨床的にはDMDと診断されている．しかし，ジストロフィン染色ではFとPの染色性を示す典型的なBMDのパターンを呈していた．症例9は22歳男性で主訴は呼吸困難である．血清CKの上昇もあり近医で一時心筋梗塞も疑われているが，当大学で拡張型心筋症と診断された．四肢近位筋の軽度筋力低下，筋萎縮があり下腿筋の軽度の仮性肥大が認められた．スペクトリンの染色は正常であったが，ジストロフィン染色ではAが81%，Fが15%と著明な低下を示した（**図2**）．症例13は臨床的に多発性筋炎が疑われた29歳男性で，主訴は大腿部痛である．家族歴は特記すべきことなく，今年の1月運動後に大腿部痛が出現するまで異常を自覚していなかった．四肢の軽度の筋力低下と大腿部の圧痛を認めたが，筋萎縮や仮性肥大は明らかではなかった．血清CKが1170（正常<55）と高度上昇しており，抗核抗体陽性で筋電図でも

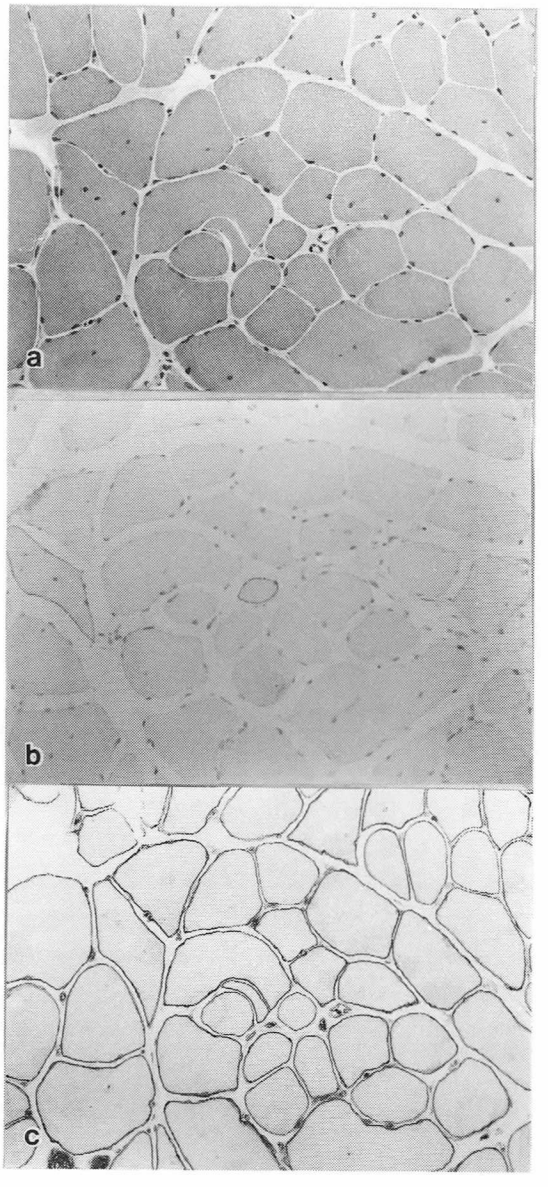


図2　臨床的に拡張型心筋症と診断され，骨格筋症状が軽度であったBMDの生検筋
a：HE染色　×250
b：ジストロフィン染色　×250
c：スペクトリン染色　×250

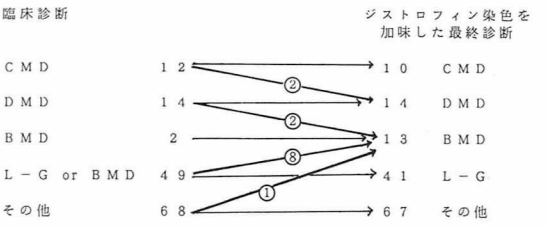


図3　臨床診断とジストロフィン染色を加味した最終診断の比較
○で囲んだ数字は診断が変更あるいは新たに確定された症例数である．

short duration, low amplitude MUP, fibrillationが認められ筋炎が疑われている．各種鎮痛剤は無効でステロイド投与にて筋痛が改善し，血清CKも低下しつつある．筋生検所見は，炎症細胞浸潤は軽度で変性線維が散在し，部位によっては神経原性変化が混在していた．ジストロフィン染色では，組織学的に正常に近い筋線維にも明らかな欠損線維が認められ，Fの筋線維も含めると20%の筋線維が異常を示した．これらのジストロフィン欠損線維は，スペクトリン染色では正常であった．

女性保因者5例のジストロフィン染色の結果は，欠損線維が存在したのは36歳の症例で軽度の四肢筋力低下を呈した1例のみであった．他の3例のsymptomatic carrierでは，Aの線維は認められずFの染色性を呈するものが2～5%の頻度で認められた．無症候性のdefinite carrierの1例においては，ほとんどの筋線維が正常に近い染色性を示した．また，欠損線維が存在した1例は4例のsymptomatic carrierの中では臨床的には最も軽症であった．

図3は臨床診断とジストロフィン染色を加味した最終診断を比較したものである．CMD12例中2例がDMDの染色性を示し，DMD14例中2例がBMDの染色性を示した．その他の1例は臨床的に多発性筋炎と診断されBMDの染色性を示した症例である．L-G型と臨床的に鑑別が困難であったBMD 8例の診断もジストロフィン染色により確定した．

考　　察

福山型先天性筋ジストロフィーの症例の中にDMDと同様のジストロフィン欠損を呈する症例が存在することは，既にArahataら[1]により報告

されているが，我々の検討でもCMD12例中2例においてジストロフィンを全く欠損することが明らかとなった．CMDとDMDの合併，あるいはDMDと他の疾患の合併と考えるには頻度が高すぎるものと思われる．生下時より発症するDMDが存在する可能性があるものと考えられる．

DMD14例の中でBMDの染色性を呈したものが2例存在したが，この2例はX染色体性劣性遺伝の家族歴があり，4歳時に筋生検を施行してからそれぞれ9歳及び12歳まで経過観察中であるが臨床的にはDMDに分類される症例である．BMDと診断を確定するには，より長期の経過観察と，ウエスタンブロット及び分子遺伝学的検討が必要であるが，この2症例はジストロフィンが比較的保たれているにもかかわらず重症であるという点で，これまで報告がなく極めて注目される症例である．

また，心不全症状を呈し拡張型心筋症と診断され，骨格筋の障害が軽度であったBMDの1例で欠損線維が81%に達したことも，臨床症状とジストロフィン量が必ずしも相関しないという点で注目される．

臨床的に非定型的なBMDとして報告されているものとして，myalgiaやcrampを主徴とする症例[2]やミオグロビン尿症を呈するが筋力低下のみられない症例[3]などが報告されている．我々の多発性筋炎様の症状を呈した1例も今後詳細に検討する必要があると思われる．BMDは，ジストロフィンの発現量においても臨床病型においても多型性があり，診断及び予後判定の際注意する必要がある．

今回の我々の検討は，ジストロフィンのC末端に対するモノクローナル抗体のみによる検討であるが，今後ジストロフィンの他の部位に対する抗体を用いた検討を行い，今回の結果と比較する必要があると思われる．また免疫組織化学的には正常との鑑別が困難な，BMDが存在する可能性もあり，現在ウエスタンブロットにて検索中である．さらに今後，分子遺伝学的検討も行い，より完全な診断を目指したいと思う．

結　語

1）ジストロフィン染色を行った150例中13例（9%）において最終診断が変更あるいは新たに確定された．

2）臨床的にDMDと診断された14例中2例がジストロフィン染色ではBMDに分類された．

3）臨床的にCMDと診断された12例中2例が，DMDと同様のジストロフィン欠損を示した．

4）BMDの中には，拡張型心筋症を主体とするものや多発性筋炎類似の症状で発症する非定型的なものが存在した．

5）BMDにおいては，ジストロフィン欠損線維の頻度と臨床的な骨格筋障害の重症度とは明らかな相関は認められなかった．

文　献

1) Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, et al: Dystrophin diagnosis: Comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analyses. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7154—7158, 1989.

2) Gospe Jr SM, Lazaro RP, Lava NS, et al: Familial X-linked myalgia and cramps: A nonprogressive myopathy associated with a deletion in the dystrophic gene. Neurology 39: 1277—1280, 1989.

3) Fischbeck KH, Kamholz J, Shi YJ, et al: X-linked myoglobinuria. (Abstract) Neurology 38 (Suppl 1): 174, 1988.

9）先天性筋緊張性ジストロフィーにおける ジストロフィン発現様式の免疫学的解析

清 水 輝 夫*

研究協力者　砂 田 芳 秀*　戸 田 達 史*
萬 年 徹*　埜 中 征 哉**

はじめに

先天性筋緊張性ジストロフィーは子宮内発症を特徴とする筋緊張性ジストロフィーで通常筋緊張性ジストロフィーの母親から生まれるこどもにみられる．臨床的には生下時より floppy infant で精神運動発達遅滞を呈し，病理学的には筋線維の未熟性を示すことから muscle maturation に異常があると考えられている．筋細胞の発生・分化過程におけるジストロフィンの発現調節機構を明らかにすることは，その生理機能を知る上でも重要であると考え先天性筋緊張性ジストロフィーにおけるジストロフィン発現様式を免疫組織化学とウエスタンブロットにより検討した．

対象と方法

8例の先天性筋緊張性ジストロフィー（年齢：生後40日～18歳，男5例，女3例，表）および疾患対照として16例の筋緊張性ジストロフィー（年齢：14歳～63歳，男7例，女9例）2例の多発筋炎（年齢：38歳，56歳，女）の生検筋について検討した．なお先天性筋緊張性ジストロフィーの診断根拠としては，(1)筋病理像が壊死・再生所見に乏しく，筋肉の未熟性（小円形線維・中心核線維・タイプ2C線維の増加，タイプ2B線維欠損などのタイプ分化不良）を呈すること(2)母親に筋緊張性ジストロフィーの病歴があることを重視した．

表　Clinical data of 8 patients with congenital MyD

#case	Age	Sex	Affected mother	Biopsied site
1	40d	F	+	lt.quad.femoris
2	3m	F	+	rt.quad.femoris
3	10m	M	+	lt.biceps brachii
4	18m	F	+	lt.biceps brachii
5	4y	M	+	lt.quad.femoris
6	5y	M	?	lt.abd.hallucis
7	11y	M	+	lt.ext.hal.brevis
8	18y	M	+	lt.biceps brachii

＊東京大学医学部脳研神経内科
＊＊国立精神・神経センター神経研究所

抗ジストロフィン抗体：本研究では3種類の抗ジストロフィン抗体を使用した．A1Cは我々の研究室で作成した単クローン抗体でN末側のアクチン結合ドメイン（アミノ酸215—264）を認識し，P04eは三重らせん構造部分（アミノ酸440—489）を認識する抗血清（国立神経センター小沢先生より提供），NCL-DYS2（New Castle Laboratory社）はC末端の17個のアミノ酸を認識する単クローン抗体である．

免疫組織化学：採取後−80°Cにて凍結保存した生検筋ブロックより8 μmの凍結切片を作製し，50%正常羊血清で30分間ブロッキングした後，A1C，NCL-DYS2は室温で1時間，P04eは37°Cでovernight反応させた．反応終了後PBSで洗浄し，FITC標識二次抗体を室温で30分反応させた．

電気泳動およびWestern Blot：−80°Cにて凍結保存された生検筋ブロックの一部を蛋白溶解液（0.24M Tris/HC1 pH6.7, 10%SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 3.4mM EDTA）でhomogenizeし，直ちに3分間煮沸した後13,000xgで20分間遠沈しその上清をRoss & Schatzの方法で蛋白定量した．蛋白量100μg相当の試料をDoucet

& Trifaro (1988) の方法により8％のゲルを用いて電気泳動した．電気泳動終了後，Kyhse-Andersen (1984) の方法により蛋白をPVDF膜に転写し，抗ジストロフィン抗体P04e, NCL-DYS2と反応させABC法を用いて発色させた．

結　　果

免疫組織化学：3種類の抗ジストロフィン抗体はいずれも疾患対照とした筋緊張性ジストロフィーおよび多発筋炎の患者の骨格筋細胞膜を全周にわたって均一に染色した．ところが先天性筋緊張性ジストロフィー8例中3症例 (case 1,2,3) では3種類全ての抗体についてジストロフィンの染色が不良であった(図1A,B,C)．すなわちジストロフィンが全周性に良好に発現している筋線維もみられるものの，細胞膜上のジストロフィンの発現が部分的・不連続であったり全くジストロフィンが発現していない筋線維が観察された．これらジストロフィンの発現が不良であった3症例は生後10ヶ月以下の症例であり生後18ヶ月以降の5症例 (case 4—8) では形質膜上に正常なジストロフィン染色パターンが観察された(図1D)．ジストロフィンの発現が不良であった3例について連続切片上でスペクトリンの免疫組織化学を行ったところ，ジストロフィンの染色が不良であった筋線維も含めて全ての骨格筋細胞膜上に全周性・均一にスペクトリンが染色された（図2）．

Western Blot：対照とした多発筋炎および筋緊

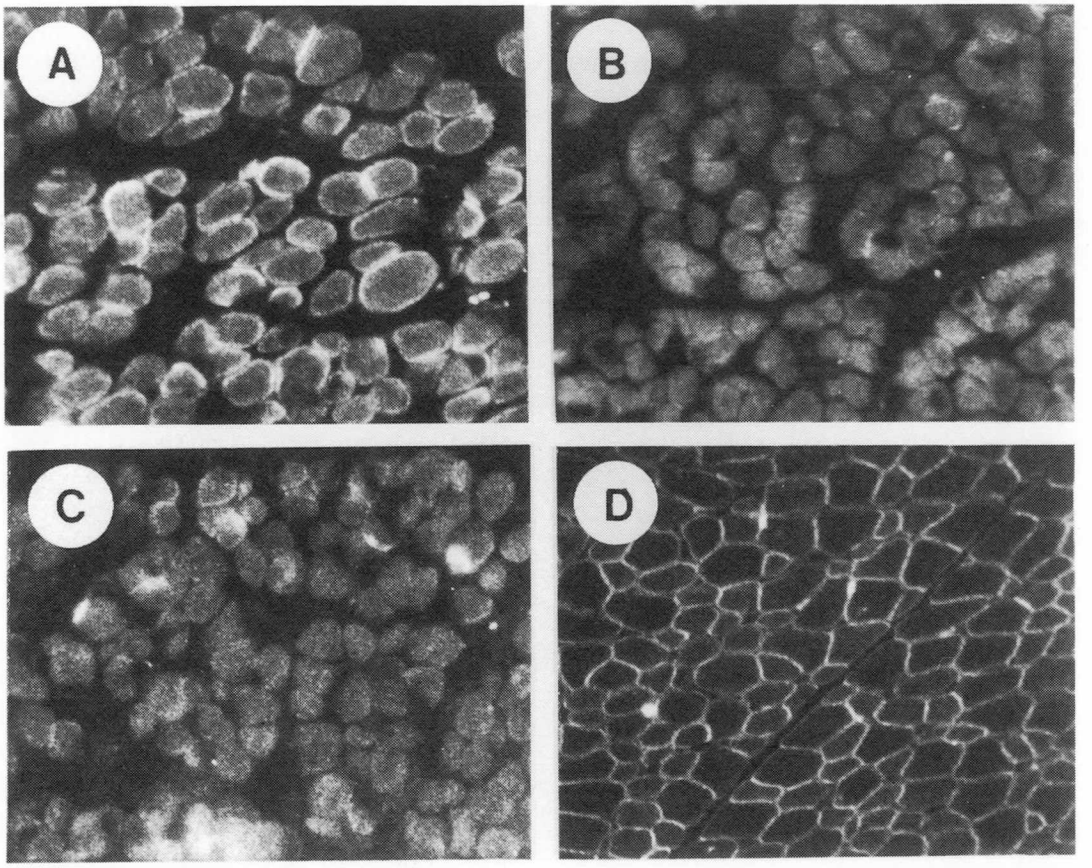


図1　抗ジストロフィン抗体P04eによる先天性筋緊張性ジストロフィー骨格筋の免疫組織化学
A：case 1（生後40日），B：case 2（生後3ヶ月），C：case 3（生後10ヶ月），D：case 4（生後18ヶ月）

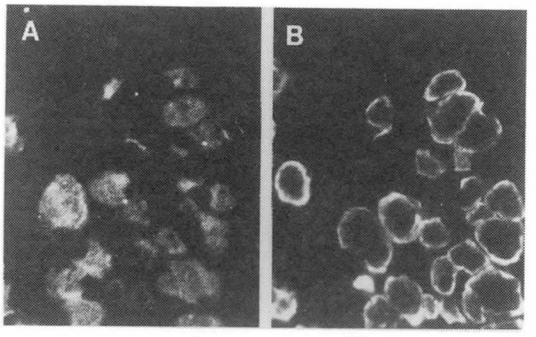


図2　先天性筋緊張性ジストロフィー骨格筋（case 3）のA：ジストロフィンの免疫組織化学　B：スペクトリンの免疫組織化学

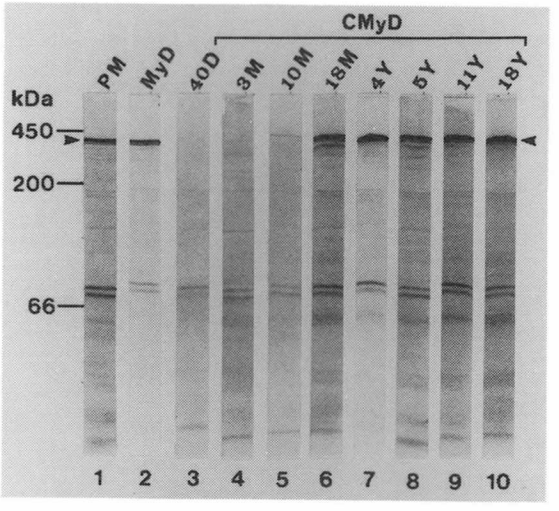


図3　P04eによるウエスタンブロット
lane 1, 2 : control, lane 3-5 : case 1-3,
lane 6-10 : case 4-8

張性ジストロフィーではP04e，NCL-DYS2の2種類の抗体により明瞭な400kDaのジストロフィンbandが検出される（図3 lane 1，2，図4 lane 1）．先天性筋緊張性ジストロフィーの生後40日のcase 1および生後3ヶ月のcase 2はP04eでほとんどbandは検出されず（図3 lane 3，4），NCL-DYS2で薄いbandが検出された（図4 lane 2，3）．生後10ヶ月のcase 3ではこれより若干明瞭なジストロフィン染色が不良であった生後10ヶ月以下のcase 1，2，3では対照に比べてジストロフィン発現量が明らかに低下していた．他方，

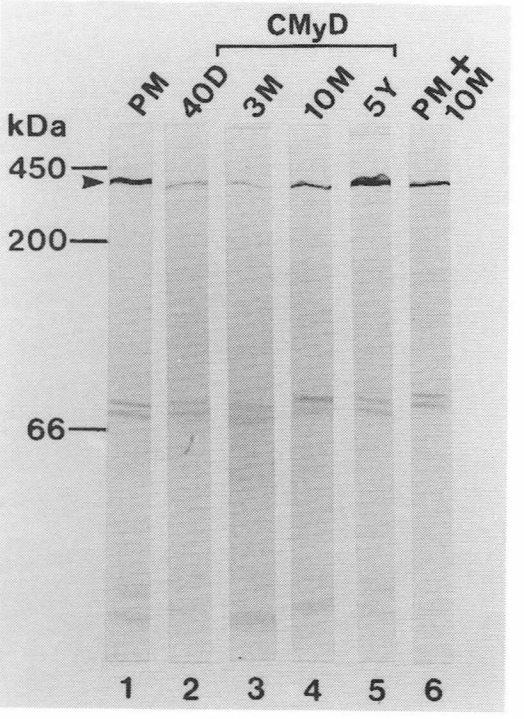


図4　NCL-DYS2によるウエスタンブロット
lane 1 : control, lane 2-4 : case 1-3,
lane 5 : case 6, lane 6 : control＋case 3

生後18ヶ月以降の5例では対照とほぼ同量のジストロフィンbandがみられ（図3 lane 6—10，図4 lane 5），正常量のジストロフィンが発現していることが示唆された．またジストロフィンの発現量が少なかったcase 3の試料を多発筋炎の試料と混和し同一レーンで電気泳動してブロッティングしたところ400kDaの単一bandだけが検出され，分子量の異なったジストロフィンisoformは検出されなかった（図4 lane 6）．

考　　察

最近骨格筋の発生過程におけるジストロフィン発現様式が経時的に検討されている．Hagiwaraら[1]はラット骨格筋細胞においてジストロフィンのdevelopmental expressionを免疫組織化学およびウエスタンブロットにより検討し，胎生15日よりprimary myotube上にジストロフィンの発現が始まり生後5日にはprimaryおよびsecon-

dary myotube の形質膜上へのジストロフィンの発現が完成することを報告している．またヒトの胎児筋におけるジストロフィン発現も検討されており Strong ら[2] は胎生 8 週ですでにジストロフィンが検出されると報告している．一方 Prelle ら[3] は免疫組織化学上は胎生 9 週ではジストロフィンが検出されず胎生11週頃から細胞質および形質膜上に発現し始め22週には成人と同程度に形質膜上に発現していると報告している．我々も17週と35週の胎児筋におけるジストロフィン発現を AlC による免疫組織化学で検討し，35週ではほとんどの筋線維の形質膜上にジストロフィンが均一に発現していることを確認している[4]．すなわちヒトでは生下時には既に筋形質膜上のジストロフィン発現を完成しているわけだが本研究で生後10ヶ月までの先天性筋緊張性ジストロフィーにおいてはジストロフィンの発現が不良であることが蛋白レベルで明らかにされた．連続切片上でのジストロフィンとスペクトリンの免疫染色で，ジストロフィンが negative な筋線維においてもスペクトリンは正常に発現していることからジストロフィンの発現が悪いのは壊死に伴う二次的な現象とは考えられない．また18ヵ月以降の症例ではジストロフィンが正常に発現してくることからもこれはジストロフィンの発現遅延によると考えられ，本症における muscle maturation の異常を支持する所見といえる．患児骨格筋になぜ成熟障害が生じるのかその理由は明らかにされていない．ジストロフィンの発現調節には神経系の関与は少ないと考えられる事例があり，今回の我々のデータは先天性筋緊張性ジストロフィーにおける筋発生遅延は神経系以外の要因によることを示唆している．先天性筋緊張性ジストロフィーは筋緊張性ジストロフィーが母親から遺伝した場合に発症することが知られているので筋緊張性ジストロフィーの母親の母胎環境の中に筋の maturation を阻害するような何等かの因子が存在する可能性が考えられる．

ジストロフィンの生理機能は十分解明されていないが形質膜の裏打ち構造を支える細胞骨格蛋白であると推定されている．このことから DMD においてはジストロフィン欠損により細胞膜が脆弱化し細胞膜の破壊や Ca イオンの透過性の増大がもたらされ，最終的に筋崩壊に至ると考えられている．ところが先天性筋緊張性ジストロフィーではジストロフィンの発現が不良であった症例においても筋線維の壊死所見を欠いており，臨床症状がまだみられない同時期の DMD では既に筋に dystrophic な変化がみられることと極めて対照的である．このことは膜におけるジストロフィンの欠損が直接細胞膜の破壊につながるわけではないことを示唆していると思われる．従って DMD 発症にはジストロフィン欠損以外にも何かの要因が関与していると思われる．

文　献

1) Hagiwara Y, Yoshida M, Nonaka I and Ozawa E: Developmental expression of dystrophin on the plasma membrane of rat muscle cells. Protoplasma 151: 11—18, 1989.
2) Strong PN, Clerk A, Sherratt TG and Sewry CA: Dystrophin expression in foetuses at risk for DMD and BMD. J Neurol Sci 98 (supple): 231a, 1990.
3) Prelle A, Chianese L, Gallanti A, Moggio M, Scarpini E, Bonilla E and Scarlato G: Appearance and localization of dystrophin in normal human fetal muscle. J Neurol Sci 98 (supple): 229a, 1990.
4) Shimizu T, Matsumura K, Hashimoto K, Mannen T, Ishiguro T, Eguchi C, Nonaka I, Yoshida M and Ozawa E: A monoclonal antibody against a synthetic polypeptide fragment of dystrophin (amino acid sequence from position 215 to 264). Proc Japan Acad 64B: 205—208, 1988.

10) Becker 型筋ジストロフィーにおけるジストロフィンの動態

堀　　眞一郎*

研究協力者　清 水 輝 夫** 埜 中 征 哉*** 田 邊　　等****

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィーにおける異常遺伝子が単離され，それにコードされている蛋白質（ジストロフィン）が明らかになった．Becker 型筋ジストロフィーは，Duchenne 型と類似の遺伝子異常をもつが，臨床症状は Duchenne 型に比し軽度である．ジストロフィンの免疫組織化学的検索では，Duchenne 型ではほとんどの例で完全欠損しているのに，Becker 型では部分欠損の像を示す．ジストロフィンの分子量に関して，Becker 型では正常に比べ，大小の多様性が指摘されている．

私達は，先に，ジストロフィンを二次元電気泳動で単離検出することに成功した[1]．そこで Becker 型筋ジストロフィー（以下，BMD と略す）のジストロフィンの多様性について，この二次元電気泳動法で検討した．

方　　法

既に報告した[1]ように，摘出した筋組織を8M 塩酸グアニジン含溶液で処理した後，0.15M KCl 溶液に対し透析し，ミオシンの大部分を沈澱として取り除き，上清を，5M 尿素溶解液に対して透析した後，二次元電気泳動法により分離した．分離した蛋白質は銀染色で発色した後に観察した．ジストロフィンはジストロフィンに対するモノクローン抗体 AIC を使って，Western Blotting により検出した．

＊(財)東京都神経科学総合研究所分子研究系神経生化学
＊＊東京大学医学部脳研究施設神経内科
＊＊＊国立精神・神経センター神経研究所
＊＊＊＊東京都立神経病院

結　　果

10例の BMD 患者について検索した．図1にその代表例を示した．銀染色した二次元電気泳動図に矢印で示すように，BMD 患者では，AIC 抗体に対して反応する複数のスポットが観察された．32歳男性の BMD 患者の上腕二頭筋では銀染色図に矢印で示した2つの位置に一致するスポットに AIC 陽性が認められた．一つは正常ジストロフィンよりやや分子量が小さくアルカリよりのもの，二つ目はミオシン重鎖よりやや分子量が大きく，正常ジストロフィンよりややアルカリよりのものであった．7歳男性の BMD 患者の上腕二頭筋では，銀染色図に矢印で示した3つの位置に一致するスポットに認められた．一つは正常ジストロフィンと同じ位置のもの，二つ目は正常ジストロフィンより分子量が大きく酸性よりのもの，三つ目は正常ジストロフィンとミオシン重鎖の中間の分子量で，やや酸性よりのものであった．23歳男性の BMD 患者の上腕二頭筋では，銀染色図に矢印で示した3つの位置に一致するスポットに認められた．正常ジストロフィンより分子量が大きく酸性よりのものについては先ほどの7歳男性の BMD 患者と同じ位置に検出されたが，他の二つについては異なっており，C－蛋白質に近い位置に分子量のやや大きいものと小さいものが検出された．更に，8歳男性の BMD 患者の上腕二頭筋では，銀染色図に矢印で示した5つの位置に一致するスポットに認められた．一つは正常ジストロフィンと同じ位置のもの，二つ目は正常ジストロフィンより分子量が大きく酸性よりのもの（7歳男性および23歳男性に認められた位置と同じ），三つ目は正常ジストロフィンとミオシン重鎖の中間

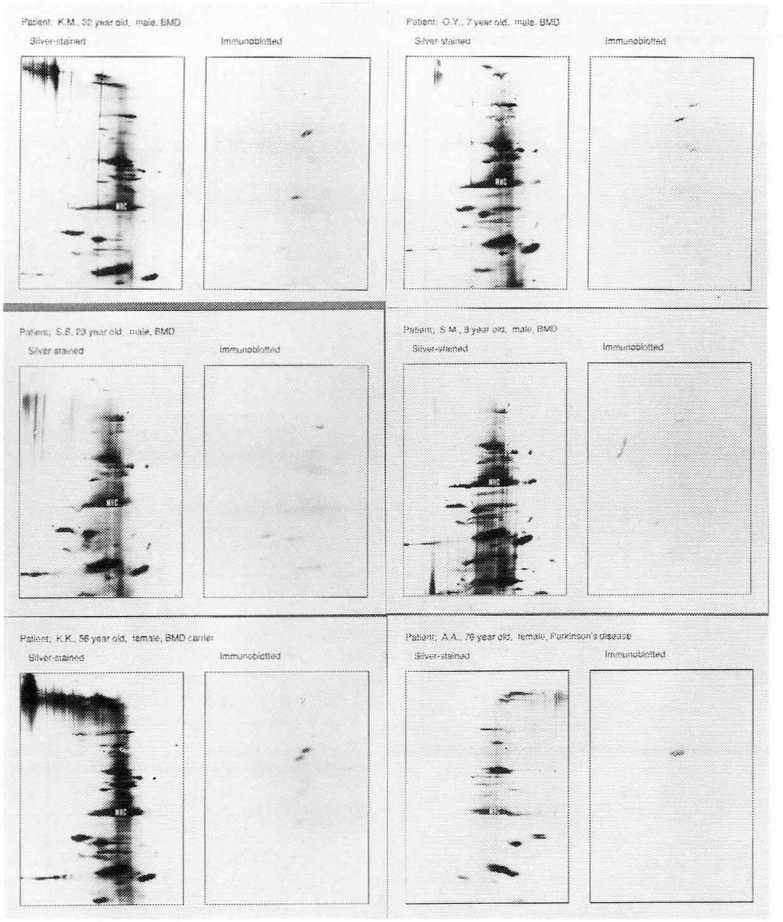


図1

の分子量で，やや酸性よりのもの（7歳男性に認められた位置と同じ），四つ目と五つ目はC—蛋白質に近い位置に分子量のやや大きいものと小さいもの（23歳男性に認められた位置と同じ）の5ヵ所に検出された．32歳男性の患者の弟もBMD患者であるが，この患者の大腿四頭筋を検索したところ，兄と同様な2つの位置にAIC陽性スポットが検出された．また，**図1**の56歳女性例は，これらBMD患者の兄弟の母親で，BMDキャリヤーである．このキャリヤーの上腕二頭筋では，正常ジストロフィンと同じ位置と正常ジストロフィンよりやや分子量が小さくアルカリよりの位置（このスポットはBMD兄弟に認められたのと同じ位置）の2カ所に認められた．しかし，BMD患者の兄弟に認められたミオシン重鎖よりやや分子量が大きく，正常ジストロフィンよりややアルカリよりのものは，キャリヤーには認められなかった．76歳女性のParkinson病患者の前頸骨筋では，既に報告[1]したように，銀染色図に矢印で示した位置に一致して抗ジストロフィン抗体AICに反応するスポットが，ただ一つ検出された．この位置は分子量約40万，等電点約5.5であった．以上10例のBMD患者と一例のBMDのキャリヤーについての検索では，**図2**に示すように，抗ジストロフィン・モノクローン抗体AICに反応するスポットとして，正常ジストロフィンと同じ位置のもの(No.1)，正常ジストロフィンより分子量が大きく酸性よりのもの(No.2)，正常ジストロフィンより

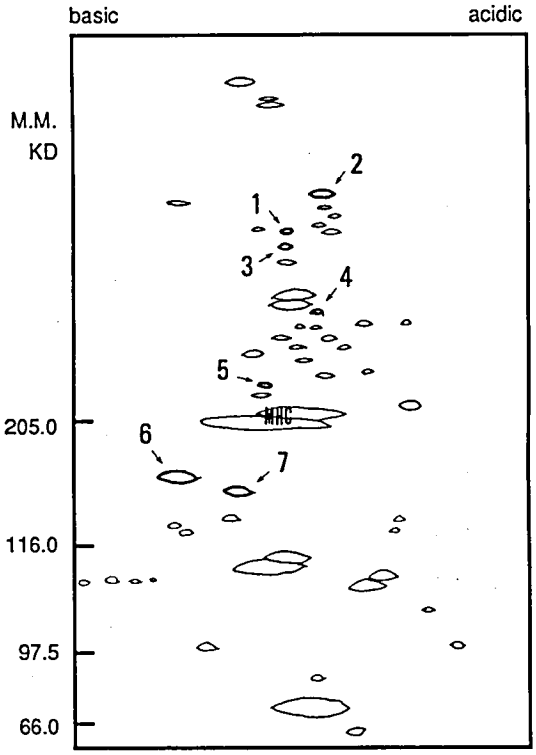


図2

やや分子量が小さくアルカリよりのもの（No. 3），正常ジストロフィンとミオシン重鎖の中間の分子量で，やや酸性よりのもの(No.4)，ミオシン重鎖よりやや分子量が大きく，正常ジストロフィンよりややアルカリよりのもの(No.5)，C—蛋白質に近い位置に分子量のやや大きいもの（No.6）と小さいもの（No.7）の7つの位置に検出された．どのBMD患者においてもAICに反応するスポットは単一ではなく，2つから5つの組合せとして，検出された．また，肢帯型筋ジストロフィー4例，顔面・肩甲・上腕型筋ジストロフィー1例，福山型筋ジストロフィー1例について検索したところ，表1に示すように，これらの筋ジストロフィー患者では正常ジストロフィンと同じ位置に単一スポットとして検出された．

BMD患者でのAIC陽性スポットの位置の出現頻度をまとめると(表2)，正常ジストロフィンに比べやや分子量が小さくアルカリよりの位置

表1

Patient			Diagnosis	A1C positive spot	Muscle
Name	Age (year)	Sex			
K.R.	31	male	BMD	1 2 ③ 4 ⑤ 6 7	M.quadriceps femoris
K.M.	32	male	BMD	1 2 ③ 4 ⑤ 6 7	M.biceps brachii
S.K.	13	male	BMD	1 2 ③ 4 ⑤ 6 7	M.biceps brachii
I.M.	14	male	BMD	1 2 ③ 4 ⑤ 6 7	M.biceps brachii
O.R.	26	male	BMD	1 2 ③ 4 ⑤ 6 7	M.quadriceps femoris
I.T.	22	male	BMD	1 2 ③ 4 ⑤ 6 7	M.quadriceps femoris
I.R.	7	male	BMD	1 2 ③ 4 ⑤ 6 7	M.quadriceps femoris
K.K.	56	female	BMD carrier	① 2 ③ 4 5 6 7	M.biceps brachii
S.S.	23	male	BMD	1 ② 3 4 5 ⑥ ⑦	M.biceps brachii
O.Y.	7	male	BMD	① ② 3 ④ 5 6 7	M.biceps brachii
S.M.	8	male	BMD	① ② 3 ④ 5 ⑥ ⑦	M.biceps brachii
T.S.	35	male	LGMD	① 2 3 4 5 6 7	M.quadriceps femoris
N.Y.	54	male	LGMD	① 2 3 4 5 6 7	M.biceps brachii
T.H.	26	female	LGMD	① 2 3 4 5 6 7	M.biceps brachii
O.M.	24	male	LGMD	① 2 3 4 5 6 7	M.quadriceps femoris
T.M.	18	male	FSHMD	① 2 3 4 5 6 7	M.gastrocnemius
E.K.	24	female	Fukuyama	① 2 3 4 5 6 7	M.quadriceps femoris
A.A.	76	female	Parkinson	① 2 3 4 5 6 7	M.tibialis anterior

表2

number of spots	position	number of cases
2	3,4	7
3	1,2,4	1
	2,6,7	1
5	1,2,4,6,7	1
		10

(No.3)，ミオシン重鎖よりやや分子量が大きく，正常ジストロフィンよりややアルカリよりの位置(No.5)の2カ所に検出されたのが，10例中7例で，No.2，6及び7の3カ所，No.1，2及び4の3カ所，No.1，2，4，6及び7の5カ所に検出された例が，それぞれ1例であった．

考　　察

最近，Angelini ら[2] は duplication によって，巨大なジストロフィンをもったBMD患者の例を報告している．ここで観察したBMD患者でのジストロフィンの多様性はジストロフィン遺伝子の terminal code に mutation が入って，蛋白質合成に際して，ペプチドの延長あるいは短縮が起こっ

たのか，frame shiftによるのか，またsplicing siteの崩壊によるexonの組合せの変化によるのか，またこの様な遺伝子そのものにおける多様性によるのではなく，筋ジストロフィーに際して亢進している蛋白分解酵素によるジストロフィンの分解[3]によっているのか今後の検討課題である．

まとめ

BMDのジストロフィンの多様性について，二次元電気泳動法で検討した．10例のBMD患者と一例のキャリヤーについて検索したところ，抗ジストロフィン・モノクローン抗体AICに反応するスポットとして，正常ジストロフィンと同じ位置のもの(No.1)，正常ジストロフィンより分子量が大きく酸性よりのもの(No.2)，正常ジストロフィンよりやや分子量が小さくアルカリよりのもの(No.3)，正常ジストロフィンとミオシン重鎖の中間の分子量で，やや酸性よりのもの(No.4)，ミオシン重鎖よりやや分子量が大きく，正常ジストロフィンよりややアルカリよりのもの(No.5)，C—蛋白質に近い位置に分子量のやや大きいもの(No.6)と小さいもの(No.7)の7つの位置に検出された．どの例も単一のスポットとしてではなく，2つから5つの組合せとして，検出され，No.3及び5の2カ所に検出されたのが，10例中7例で最も高い頻度であった．

文献

1) Hori S, et al : Detection of dystrophin on two-dimensional gel electrophoresis.Biochem Biophys Res Comm **161** : 726−731, 1989.
2) Angelini C, et al : Enormous dystrophin in a patient with Becker muscular dystrophy. Neurology **40** : 808−812, 1990.
3) Matsumura K, et al : In vitro degradation of the Duchenne muscular dystrophy gene product (dystrophin). Biomed Res **10** : 325−328, 1989.

Ⅲ．筋ジストロフィー(3)

11）福山型先天性筋ジストロフィーにおける ジストロフィンの研究

荒　畑　喜　一*

研究協力者　有　川　恵　理*　階　堂　三砂子*
石　浦　章　一*　埜　中　征　哉*

ジストロフィンの欠損がDuchenne型筋ジストロフィー（以下DMD）で明らかになり，その病因と病態機序の解明が近年急速に進んでいる。今回我々は一般筋病理像がきわめてDMDに類似する福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）におけるジストロフィンの発現様式を免疫組織化学的に検討したので報告する．

対象及び方法

先天性筋ジストロフィー51例，うちFCMD36例，非福山型先天性筋ジストロフィー（nonFCMD）15例，及びDMD 5例，Spinal muscular atrophy（SMA）17例，の計73例（表）について凍結切片のジストロフィン免疫染色を行った。また各ジストロフィン染色異常線維の特徴を知るため連続切片においてC^{5b-9} complement membrane atack complex（MAC）の免疫染色，アクリジンオレンジ染色，ATP ase染色を含む一般組織化学染色を行った。ジストロフィン免疫染色につき定量的検討を加えるためジストロフィンの免疫染色パターンを5型に分類し（ジストロフィンが完全に欠損しているnegative，筋形質が淡染するfluffy，一部が断裂しているpartially defective，正常の染色性を示すnormal，筋表面膜がnormalより一段強く染まるintense），その出現頻度をage-matchedのFCMD，nonFCMD，SMA各5例で各生検筋あたり約500本について比較検討した（図1）．

＊国立精神・神経センター神経研究所

またジストロフィンの欠損しているDMDについては筋形質膜のマーカーとしてスペクトリンを用い膜障害の程度をFCMDと比較してみた（図2）．以上の免疫組織化学染色はペルオキシダーゼ間接法を用いた．

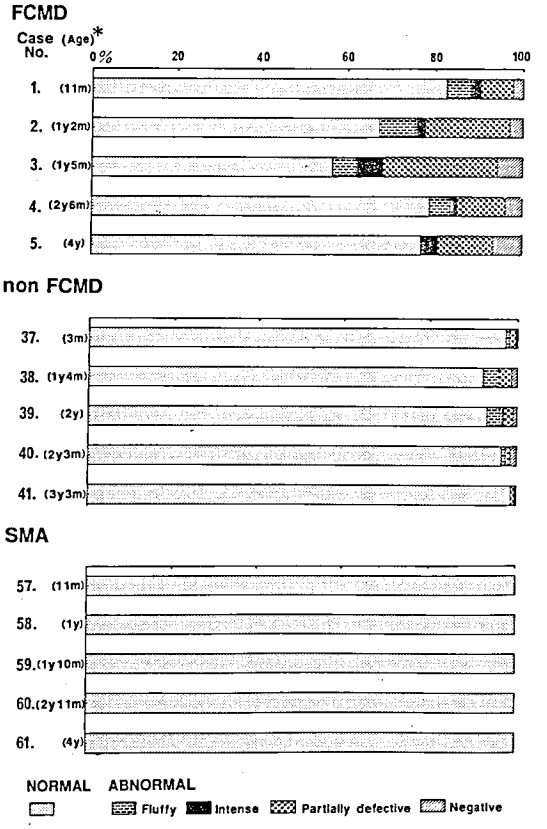


図1　FCMD, non FCMD, SMAにおける各ジストロフィン免疫染色パターンの出現頻度の比較

結　　果

ジストロフィンはDMDでは欠損していたがSMA, non FCMDでは筋形質膜に正常の発現を示していた．SMAとnon FCMDではImmunoblot法でも正常のジストロフィンが確認された．一方FCMDでは基本的にジストロフィンが存在したが，免疫染色のパターンではnormalの他にfluffy, partially defective, intense, negativeの4型の異常染色パターンを認め，それらの平均は約28%と高値であり特有のパターンを呈した（図3）．SMA（平均0%）やnon FCMD（平均4%）のパターンとは明らかに異なっていた．fluffyパターンを示した筋線維はアクリジンオレンジ染色陽性，type 2Cの再生初期の線維，negative, intense, 及びpartially defective, はopaque線維を含む壊死変性線維に大部分が一致し本質的には二次的，非特異的所見であった．しかしながら，これらに加えてFCMDでは一般組織化学的染色

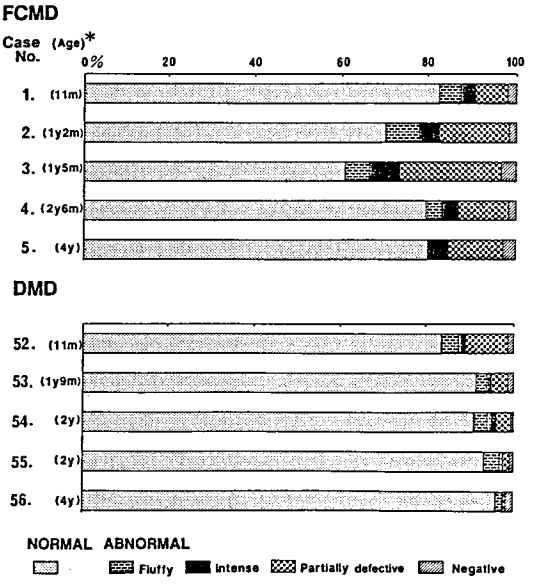


図2　FCMD, DMDにおける各スペクトリン免疫染色パターンの出現頻度の比較

表　対象73症例の年齢，性別，CK値

Clinical Diagnosis*1	Number of Patients	Sex M	Sex F	Age range	Age mean	CK (U/L)*2 range	CK (U/L)*2 mean
CMD							
FCMD	36	22	14	3m-14y	1y7m	27 - 13050	4326.5
non FCMD	15	5	10	2m-18y	5y8m	52 - 1955	386.7
DMD	5	5	0	11m- 4y	2y1m	4026 - 29100	12014.0
SMA	17	8	9	3m-12y	2y4m	20 - 179	101.1

*1 FCMD: Fukuyama congenital muscular dystrophy,
non FCMD: non Fukuyama congenital muscular dystrophy,
DMD: Duchenne muscular dystrophy, SMA: spinal muscular atrophy

*2 CK: creatine kinase　normal:12-75 U/L

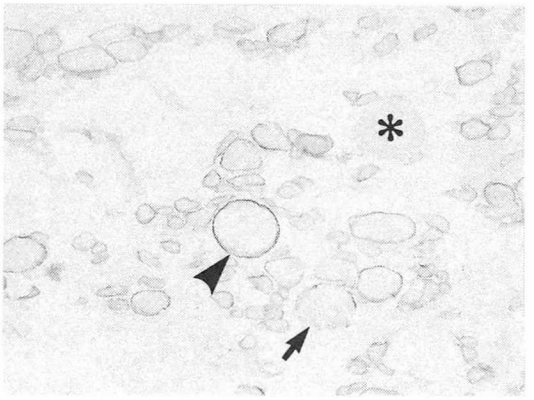


図3　福山型筋ジストロフィーのジストロフィン免疫染色像（×200）
筋形質膜部分が正常に染色される線維の間にしばしばより強く染色される線維（intense；arrow head），部分的に欠損の見られる線維（partially defective；arrow），及び染色性が完全に欠損している線維（negative；asterisk）等が認められ，特有のジストロフィン染色パターンを呈する．抗ジストロフィン抗体はモノクローナル4—4C5抗体（C末端）を用いた．

で一見正常と思われる筋線維の中に明らかにジストロフィンの異常染色を示す線維が散見されたことは興味深い．

連続切片においてスペクトリンとジストロフィンの免疫染色像を比較するとFCMD，non FCMD，SMAともほぼ同様の染色態度を呈していた．例えばジストロフィン染色でnegativeパターンの線維はスペクトリン染色でもnegativeパターンをとっていた．DMD筋についてスペクトリンを筋形質膜のマーカーとして用いて膜障害の程度をFCMDと比較した結果ではFCMDにおいてスペクトリン染色異常線維数は平均25％とage-matchedのDMDでのそれ（平均9％）よりも有意に高率であった．Immunoblot法ではFCMDではジストロフィンの分子量は2例を除き正常であった．

考　　察

CMD51例（FCMD36例，nonFCMD15例），SMA17例，DMD 5例においてジストロフィンの免疫組織化学的検討を行った．FCMDではジストロフィン染色異常を呈した線維がnon FCMDより有意に高率であり，これはFCMDにおける活発な壊死再生による筋形質膜の2次的変化を反映するものと思われた．FCMDでは一見正常と思われる線維の中にも明らかにジストロフィン染色の異常を示した線維が観察され，筋形質膜の脆弱性が存在する可能性も併せて示唆された．またジストロフィンの欠損による膜の異常が疑われているDMDとの比較においてスペクトリン免疫染色異常線維の出現頻度がFCMDでより高率であったこともFCMDにおける膜障害の程度が強いことを示唆するものと思われた．

結　　語

FCMDではジストロフィンの免疫染色パターンの異なる幼若な筋線維と変性線維とが正常筋線維の間に多数散在し，それによって特有なジストロフィンの免疫染色像を呈していることが注目された．これは臨床診断上，FCMDとnon FCMDを鑑別する一つの補助検査法としても有用であるものと思われる．また，FCMDの病態にも筋形質膜の障害が関与している可能性が示唆された．

文　　献

1) Arikawa E, Arahata K, Ishihara T, et al: Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy. J Neurol Sci, in press.

12) Duchenne 型筋ジストロフィーを合併した福山型先天性筋ジストロフィーの1家系：dystrophin およびその遺伝子の検討

松　村　喜一郎*

研究協力者　戸　田　達　史*　長谷川　　毅*　亀　井　真　樹*
伊　本　夏　樹**　清　水　輝　夫***

はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）の原因は未だ不明である．FCMD の大多数の症例において dystrophin は正常に発現していることが明らかにされている一方，部分的な異常を認める症例やごく希ではあるが dystrophin を完全に欠損する症例も報告されており，FCMD と Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）との病因論的関連は完全には確立されていない[1)~3)]．我々は DMD の表現型を呈する1症例と FCMD の表現型を呈する3症例を合併した特異な家系を経験したので，本家系について dystrophin の遺伝子学的ならびに蛋白生化学的検討を行い，上記の問題点につき検討した[4)]．

症　　例

図1に家系図を示した．症例はいずれも男児である．

症例1：妊娠，分娩歴に異常なし．乳児期母乳の吸引力が弱かった．定頸6カ月．1歳頃2回てんかん発作あり．2歳6カ月より歩行可能となるも不安定であった．12歳で起立・歩行不能となった後，四肢の関節拘縮，筋萎縮が進行した．生下時より知能低下著明でわずかに2－3語文を話すのみであった．いつも口を半開きに口唇を突出させ，流えん著明であった．17歳で呼吸器感染症にて死亡した．16歳時 CK 値は1,400—2,700IU/1（正常54—263）であり，同時期の前頸骨筋よりの筋生検所見は non-specific dystrophic change を示した．

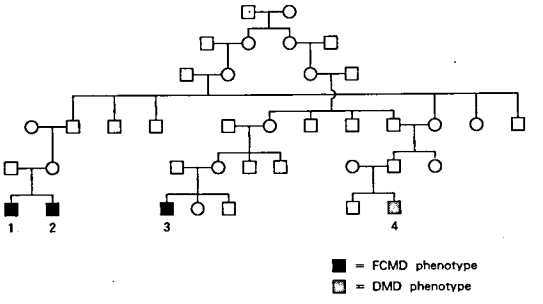


図1　The pedigree of the present family

症例2（図2A）：妊娠，分娩歴に異常なし．乳児期母乳の吸引力が弱かった．定頸1歳．1－2歳頃3回てんかん発作あり．四這い，起立・歩行は不能であった．5－6歳頃より四肢の関節拘縮，筋萎縮が進行した．生下時より知能低下著明でわずかに2－3語文を話すのみであった．いつも口を半開きに口唇を突出させ，流えん著明であった．15歳時 CK 値は1,000—2,000IU/1であった．

症例3：詳細は不明であるが知能低下，顔面筋障害を伴い歩行不能であったらしい．10代後半に死亡した．

症例4（図2B）：母方の家系に神経・筋疾患患者はいない．妊娠，分娩，発育歴に異常なし．3歳

＊国立療養所下志津病院神経内科
＊＊筑波大学臨床医学系小児科
＊＊＊東京大学医学部脳神経内科

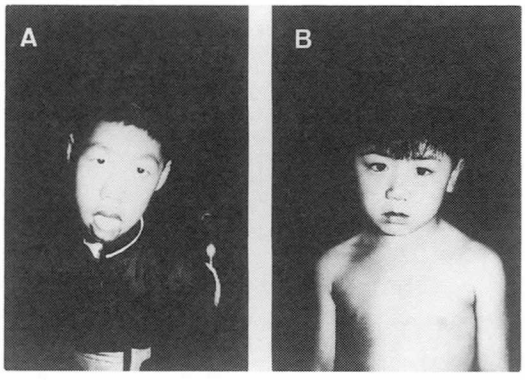


図2　Portraits of patients 2 (A) and 4 (B) (Informed consent was obtained from the parents). Note the marked difference of the facial expression between the 2 patients : Only patient 2 had severe facial weakness with open mouth and drooling which is characteristic of Fukuyama type congenital muscular dystrophy. Patient 1, the elder brother of patient 2, had remarkably similar facial features to patient 2.

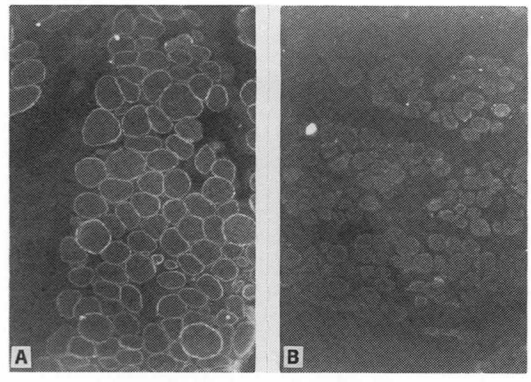


図3　Immunohistochemistry by indirect immunofluorescence of the biopsied skeletal muscles from patients 1 (A) and 4 (B) with an anti-dystrophin monoclonal antibody, A1C, ×180. The sarcoplasmic membrane was immunostained continuously wjth A1C in all of the muscle fibers in patient 1, while it was completely negative in patient 4.

頃より起立・歩行障害が始まり進行しており，5歳時腰帯筋・下肢近位筋の筋力低下，腓腹筋の仮性肥大，アキレス腱反射以外の深部腱反射低下を認めた．知能低下，てんかん発作，顔面筋障害はない．5歳時CK値は18,000U/1（正常24—195）であり，同時期の大腿四頭筋よりの筋生検所見はnon-specific dystrophic changeを示した．なお母親のCK値は正常範囲内であった．

Dystrophin遺伝子異常の検討

症例2と4および両人の母親を対象に，dystrophin cDNA 1—2a，2b—3，4—5a，5b—7，8，9—14を用いてSouthern blot解析（制限酵素としてHindlllとBglllを使用）を行ったが，いずれも異常を認めなかった[5]．

Dystrophinの免疫化学的検討

症例1と4の生検筋を用いて抗dystrophinモノクローン抗体（AlC）による間接蛍光抗体法による免疫組織化学を行った[6]．症例1ではほぼ全筋線維においてdystrophinが筋細胞膜に一致して存在したが，症例4では完全に欠損していた（図3）．同じくAlCを用いてWestern blot解析を行った[6)7)]．症例1では正常者と同じ～400kdのdystrophin bandを認めたが，症例4では完全に欠損していた（図4）．

考案ならびにまとめ

(1)前述のようにFCMDとDMDとの病因論的関連が完全には確立されていない現在，本家系内の筋疾患の解析は重要と考えられた．Dystrophinの遺伝子学的検討からは情報は得られなかったが，dystrophinの蛋白生化学的検討の結果より症例1（従って症例2そしておそらく3も）はFCMD，症例4はDMDと診断され，本家系中の筋疾患は単一ではなく2つの異なる疾患の合併と考えられた．この結果は，FCMDの原因はdystrophinの欠損ではないことを示唆している．

(2) DMDにおいて遺伝子レベルでの異常が検出される割合はせいぜい60—70%以下である．

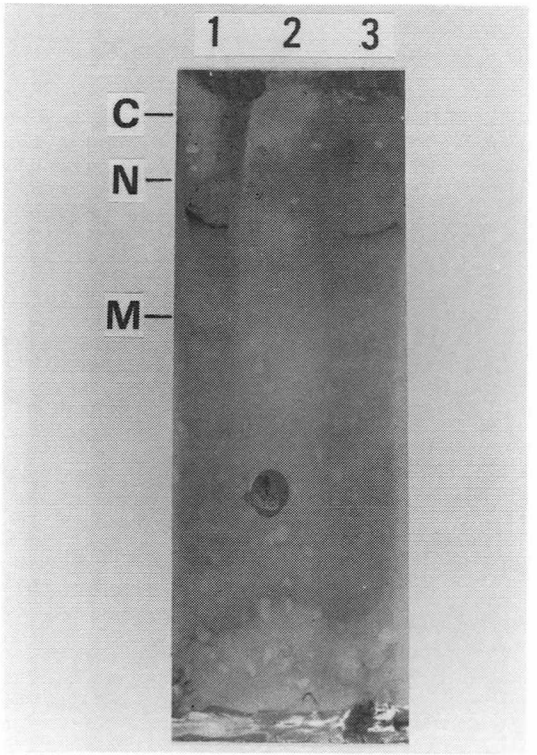


図4　Western blotting of the biopsied skeletal muscles from patients 1 and 4 with an anti-dystrophin monoclonal antibody, A1C. Lanes 1, 2, and 3 are normal dontrol (44-year-old polymyositis female), patient 4, and patient 1, respectively. C, N, and M shows the position of connectin (also called titin), nebulin, and myosin heavy chain, respectively. ~400 kd dystrophin band was immunostained in patient 1 as well as in normal control, while it was completely absent in patient 4.

Dystrophin の免疫化学的検討は，侵襲的検査である筋生検を必要とするが，dystrophin の遺伝子レベルでの異常が検出されない場合極めて有効である．

文　献

1) Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, et al: Dystrophin diagnosis: comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analyses. Proc Natl Acad Sci USA **86**: 7154—7158, 1989.

2) 有川恵理，荒畑喜一，埜中征哉ほか：福山型先天性筋ジストロフィーにおけるジストロフィンの研究．医学のあゆみ**150**：747—748, 1989.

3) Matsumura K, Shimizu T, Sunada Y, et al: Degradation of connectin (titin) in Fukuyama type congenital muscular dystrophy: immunochemical study with monoclonal antibodies. J Neurol Sci 1990, in press.

4) Matsumura K, Hasegawa T, Kamei M, et al: A Japanese family with both Fukuyama type congenital muscular dystrophy and Duchenne muscular dystrophy (DMD): DNA analysis of the DMD gene and immunochemical analysis of its protein product, dystrophin. J Child Neurol, submitted.

5) Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al: The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. Am J Hum Genet **45**: 498—506, 1989.

6) Shimizu T, Matsumura K, Hashimoto K, et al: A monoclonal antibody against synthetic polypeptide fragment of dystrophin (amino acid sequence from position 215 to 264). Proc Jap Acad **64B**: 205—208, 1988.

7) Matsumura K, Shimizu T and Mannen T: In vitro degradation of the Duchenne muscular dystrophy gene product (dystrophin). Biomed Res **10**: 325—328, 1989.

13) ジストロフィンc DNAに基づくcysteine-richおよびC末端領域各種合成ペプチドの抗原性と抗体の反応性について

若山吉弘*

研究協力者　自見隆弘*　武田篤**　三杉信子***
三宅捷太***　熊谷俊幸****　埜中征哉*****

はじめに

ジストロフィンに関する知見の集積に伴い臨床病型と遺伝子欠失もしくは蛋白欠損部位との対応[1]が注目されている．我々は昨年度のmid portion[2]につづき，本年度はこれまで報告の少ないcysteine-rich（高システイン）およびC末端領域でジストロフィンcDNAよりペプチドを合成し，それらに対する抗体の反応性を検討したので報告する．

症例

以下の61症例生検骨格筋について検索した（表1）．すべてにジストロフィン免疫染色を，また一部の症例にイムノブロットを施行した．

方法

既報の方法[2]により高システイン領域より3種（IV，V，VI），C末端領域より3種（VII，VIII，IX）の計6種のペプチドをジストロフィンcDNAに基づき合成し家兎に免疫，ポリクローナル抗体を得た．各ペプチドのアミノ酸配列を図に示す（図1）．高システイン領域ではEFハンドの部分を除外しペプチドを合成した．免疫染色は約6μm凍結

表1　Materials

Duchenne muscular dystrophy	10
Becker muscular dystrophy	13
Limb girdle dystrophy	2
Facioscapulohumeral dystrophy	1
Myotonic dystrophy	3
Polymyositis	3
Mitochondrial myopathy	2
Nemaline myopathy	1
Amyotrophic lateral sclerosis	4
Normal human child	10
Normal human adult	12
Total	61

Amino Acid Sequence	ELISA Titer
(cysteine-rich portion)	
IV : ^{3121}L-D-L-L-S-L-S-A-A-C^{3130}	× 3,200
V : ^{3165}H-N-N-L-V-N-V-P-L-C-V-D-M-C^{3178}	× 6,400
VI : ^{3229}C-D-Q-R-R-L-G-L-L-L-H^{3239}	× 25,600
(C-terminal portion)	
VII : ^{3466}D-D-E-H-L-L-I-Q-H-Y-C^{3476}	× 1,600
VIII : ^{3538}P-L-P-S-P-P-E-M-M-P^{3547}——C	× 128,000
IX : ^{3676}P-G-K-P-M-R-E-D-T-M^{3685}——C	× 128,000

図1　Amino acid sequences of synthetic peptides and the ELISA titer of their antiboies

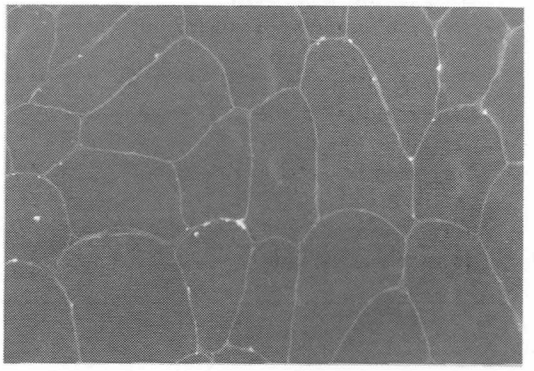
＊昭和大学藤が丘病院神経内科
＊＊昭和大学藤が丘病院臨床病理
＊＊＊神奈川県立こども医療センター
＊＊＊＊愛知県コロニー中央病院
＊＊＊＊＊国立精神・神経センター神経研究所

切片をアセトン固定，正常ブタ血清により非特異的染色をブロックした後，上記抗ジストロフィン抗体（希釈率100～400倍）に4°C 終夜，蛍光標識2次抗体に室温，1時間反応させ観察した．イムノブロットは生検筋を10倍量の0.1M Tris-HCl buffer（pH 8.0）（10% SDS，10mM EDTA，1% 2—mercaptoethanol，10% glycerol）を加えてhomogenize し，3分間煮沸後遠沈して得られた上清の蛋白濃度を3.2～5.8mg/ml となるように調整し4.7%ゲルを用いて SDS ポリアクリラミドゲル電気泳動を行った．ホライズブロット法で108mA，90分通電しクリアブロット・P膜（アトー社）に転写し，各抗体と反応後発色させた．

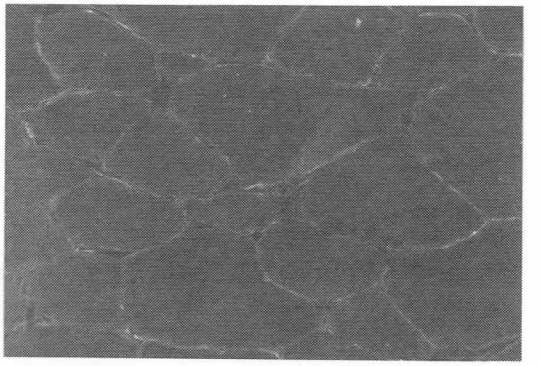
結　　果

各合成ペプチドに対する抗体価は，特にC末端領域ペプチドに対する抗体で128,000倍と良好な値を示した（図1）．免疫染色では抗体Ⅳを除く5種の抗体で正常対照骨格筋の表面膜を明瞭に染色した．特にC末端領域抗体（Ⅷ，Ⅸ）では強い免疫染色性を得た（図2A）．抗体Ⅴ，Ⅶは間質も僅かに認識する傾向が認められた．Duchenne muscular dystrophy（DMD）10例の高システイン，C末端領域抗体に対する反応は，一部の症例で散在性に陽性線維を極く少数認める場合がある以外，すべての抗体で反応を欠如していた（図2B）．

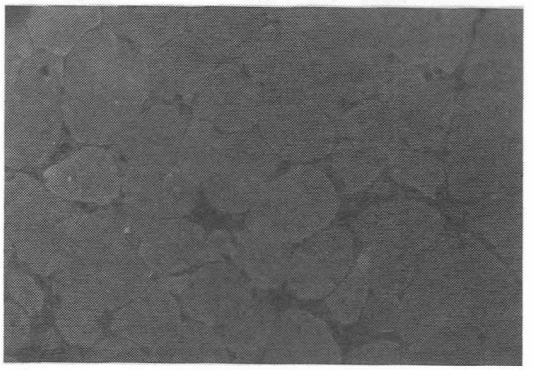
Becker muscular dystrophy（BMD）の高システイン領域抗体に対する反応は，13例中10例は patchy で faint ないわゆる BMD にしばしば認められる染色パターンを示した（図2C）．また1例では，正常より染色性が弱いものの continuous に表面膜が染色された．一方，筋表面膜の反応を欠



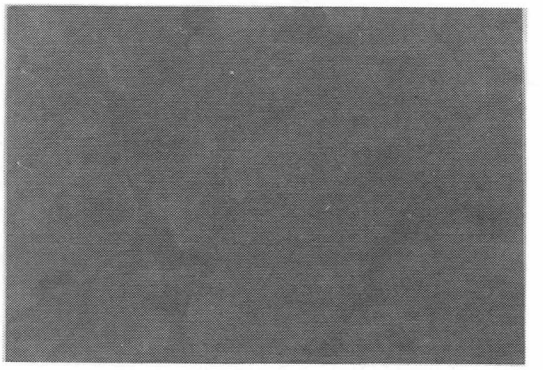
A



C



B



D

図 2

如し，DMD と染色パターン上は区別不可能な症例が13例中 2 例存在した．C 末端領域抗体に対する反応は，BMD13例中 7 例は patchy で faint な染色パターンを認めたが 5 例は反応を欠如（図2 D）していた．

イムノブロットでは，正常対照骨格筋ではいずれの抗体に対しても分子量約400kDa の位置に一本のバンドを認めた．これに加えて C 末端領域抗体（VII，VIII，IX）では分子量約320kDa の位置にバンドを認めた．DMD では全ての抗体と，反応するバンドは検出できなかった（図 3）．BMD 1 例では抗体VII，IXを用いたとき，分子量約380kDa の位置にうすいバンドを認めた．

考　　察

我々は昨年度，ジストロフィン mid portion の cDNA に基づく合成ペプチドに対する抗体の反応性を検討し報告した[2]．今回，我々はこれまで報告の殆どない高システイン領域および他の蛋白質と相同性がなく，細胞膜との関連で重要な部分と考えられる C 末端領域[3]に注目し，合成ペプチドに対する抗体の反応性を主として免疫組織学的に検討した．正常対照骨格筋に対するこれら抗体の免疫染色性は概して良好で筋表面膜を明瞭に染色した．一方，DMD ではこの反応を欠如しイムノブロットでも同様の結果を得たことから，これらの抗体は臨床的にも十分使用可能なものと思われた．今回の我々の検索のうち正常対照，DMD に対する免疫染色のパターンは，これまでの諸家の報告と一致[2)4)]するものであったが BMD については，若干異なる結果を得た．すなわち，いわゆる patchy で faint な染色パターンを示したものが高システイン，C 末端領域いずれの抗体においても過半数を占めたが，高システイン領域抗体で13例中 2 例，C 末端領域抗体で13例中 5 例では反応を欠如し DMD と染色パターン上区別できなかった（表 2）．一部の BMD 症例で反応を欠如したことについてはいくつかの可能性が考えられた．第一には実際にジストロフィンが著減している可能性，第二には BMD では特に C 末端でジストロフィン分子の分解が亢進している可能性，第三には，我々の抗体の感度の問題などである．これらについては，BMD 症例のジストロフィン遺伝子欠失部位や臨床的重症度との関連も含め，今後更に検討を加える必要がある．

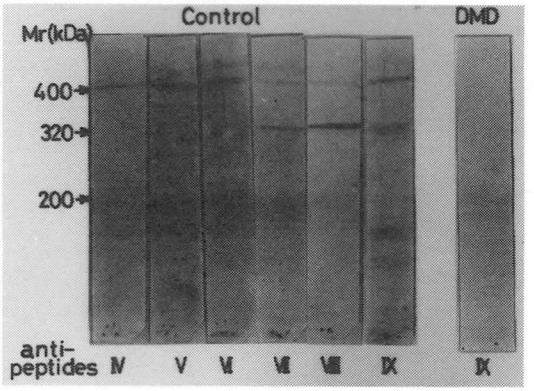


図 3　Western blot analysis

表 2　Dystrophin immunoreactivity of control muscles and muscles with DMD & BMD

	cysteine-rich portion		C-terminal portion	
DMD	n.d.		n.d.	
BMD	patchy, discontinuous	10/13	patchy, discontinuous	7/13
	weak, continuous	1/13	weak, continuous	1/13
	n.d.	2/13	n.d.	5/13
Control	+++		+++	

DMD：Duchenne muscular dystrophy
BMD：Becker muscular dystrophy
+++：continuous clear immunolabelling of the myofiber surface membrane
n.d.：not detected

文　　献

1) Koenig M, Beggs AH, et al: The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. Am J Hum Genet 45：498—506, 1989.

2) Wakayama Y, Jimi T, et al: Immunoreactivity of antibodies raised against synthetic peptide fragments predicted from mid portions of dystrophin cDNA. J Neurol Sci 97：241—250, 1990.

3) 杉田秀夫，荒畑喜一ら：ジストロフィン分子におけるC末端ドメインの臨床的意義．“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症および関連疾患の病態とその病因に関する研究”（杉田班）平成元年度研究報告書，1990，pp121—123.

4) Sugita H, Arahata K, et al: Negative immunostaining of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and mdx muscle surface membrane with antibody against synthetic peptide fragment predicted from DMD cDNA. Proc Japan Acad 64: 210—212, 1988.

14) ラット脊髄付加ヒト培養筋細胞に於ける dystrophin の発現，局在に関する 免疫組織化学的，電顕的検討

小 林 高 義*

研究協力者　松 本 容 秋*　亀 田 典 佳*
塚 越 廣*　清 水 輝 夫**

Dsytrophin (DP) は正常骨格筋細胞膜の直下に存在すると考えられているが[1)2)]，ヒトの胎生期の未熟な筋細胞では細胞膜と細胞質の一部に散在性に存在することが報告されている[3)]．従来，筋細胞の分化，発達に伴う DP の局在の変化に関して検討した報告は少なく，特に DP の細胞内の局在，構成に神経支配及び筋収縮活動が及ぼす影響に関して検討した報告はない．今回我々はそれらを明らかにするために，ヒト培養骨格筋―ラット胎児脊髄片併置培養系を用いて免疫細胞化学的に光顕及び電顕にて検討したので報告する．

材料及び方法

4例の内因性筋疾患を有しないと考えられるヒトの生検筋及び1例の Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) 患者の生検筋より，既に報告した方法により筋単層培養を行い，それに後根神経節を含んだ13日目ラット胎児脊髄片を併置培養した．併置培養後平均10日前後で筋細胞は自発収縮を始めるが，神経支配されていない筋細胞 (AM) と神経支配後の自発収縮している筋細胞 (ICM) につき，DP 蛋白 C 末端，N 末端に対するモノクローナル抗体を用いてペルオキシダーゼ間接法と蛍光抗体間接法にて DP の局在を光顕的，電顕的に検討した．DP の C 末端に対する抗体は4C―5抗体（味の素及び富士レビオ社），NCLDYS 2 (NOVOCASTRA 社) の抗体を使用し，N 末端に対する抗体は A1C (東大神経内科清水先生より供与) 抗体を使用した．

DP の細胞内局在，構成に及ぼす筋収縮活動の影響を明らかにするために，神経支配後最初の自発収縮が見られた時点で tetrodotoxin (TTX) 2 μM を投与し筋収縮活動を2週間停止させた．筋収縮活動を停止させた筋細胞 (IPM) につき，ペルオキシダーゼ間接法にて免疫染色した．対照として，正常筋由来の AM で一次抗体の代わりとして phosphate buffer saline (PBS) を使用し免疫染色した．又，DMD 由来の AM でもペルオキシダーゼ間接法にて免疫染色した．ペルオキシダーゼ間接法は以下のよう施行した．培養細胞を2%パラホルムアルデヒドで10分間固定し抗体の浸透性を良くするために0.05%サポニンで10分間処理した．その後一次抗体を37°C で2時間反応させ，二次抗体（家兎抗マウス二次血清）を1時間反応させた後 diaminobenzidine にて5分間反応させた．免疫染色後，電顕用に固定しエポンに包埋し，光顕用に2μm 厚切り切片を作成し免疫反応産物を確認後，超薄切片を作成した．超薄切片は無染色にて電顕で観察した．

結　　果

位相差顕微鏡による検討では，正常及び DMD 筋由来の筋細胞は，神経支配後共に良好に自発収

＊東京医科歯科大学医学部神経内科
＊＊東京大学医学部脳研神経内科

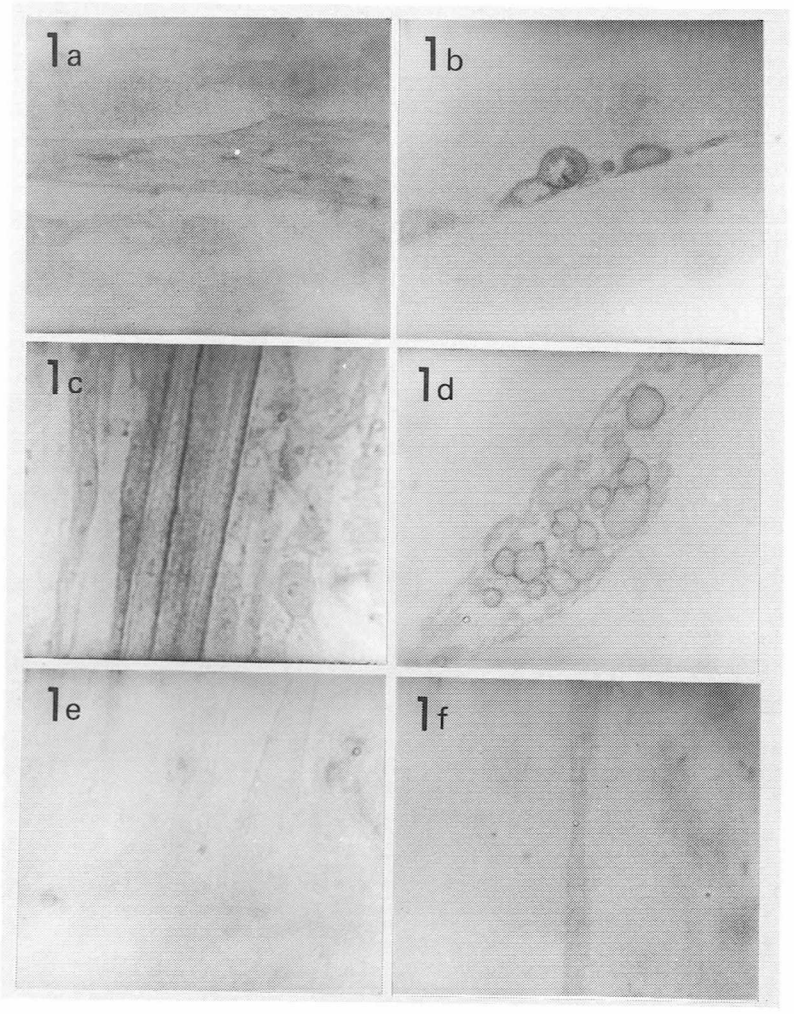


図1　ヒト培養筋細胞の光顕免疫染色像（2μM 厚切り切片）
a，b：培養5週目の神経支配のない筋細胞では，細胞膜と細胞質の一部に散在性に免疫反応が認められる．（×3000）c，d：ラット胎児脊随との併置培養により神経支配を受け，2週間自発収縮している筋細胞では細胞膜に沿ってび漫性に免疫反応が認められる．（×3000）e：神経支配していない DMD 由来培養筋細胞では免疫反応を認めない．（×3000）f：一次抗体の代わりに PBS を使用した筋細胞では免疫反応は認められない．（×3000）

縮し横紋形成も良好であった．筋芽細胞，筋管細胞及び神経支配後の筋細胞の分化，発達に関して，正常筋と DMD 筋由来筋細胞との間で明らかな差は認められなかった．

光顕免疫染色：正常筋及び DMD 筋由来筋芽細胞には，免疫反応は認められなかった．培養7日目の未熟な AM では，細胞全体に微かな免疫反応を認め一部に強く染まる免疫反応を細胞質内に認めた．培養5週目の比較的分化した AM では，細胞全体にほぼび漫性に免疫反応を認めると共に，一部細胞膜にも散在性に免疫反応を認めた．厚切り切片の観察では，培養5週目の AM で，筋細胞膜と細胞質に散在性に免疫反応を認めた（**図1a, b**）．神経支配後3週目の併置培養で2週間自発収縮を続けている正常筋由来 ICM では，DP は細胞全体にび漫性に免疫反応を認め，その縦断厚切り

切片での観察で筋細胞膜に沿ってび漫性に免疫反応を認めた(図1c)．また横断厚切り切片でも，同様にDPは筋細胞膜に沿って全周性に免疫反応を認め(図1d)，細胞質にDPの免疫反応は認めなかった．DMD筋由来AM及び一次抗体の代わりにPBSを用いて免疫染色したAMでは，DPの免疫反応を認めなかった．またDP蛋白のN末端を用いた蛍光免疫染色では，正常筋由来ICMの横断切片でC末端の抗体と同様に筋細胞膜に沿って全周性にDPの蛍光反応を認めた．

電顕免疫染色：正常筋由来培養5週目のAMで，細胞膜直下と細胞膜の近傍に散在性に免疫反応を認め(図2b)，一部の細胞質にも顆粒状の免疫反応を認めた（図2a）．正常筋由来のICMでは，細胞膜の直下にび漫性に免疫反応を認め，一部periodicityをもって染色される部分も観察された(図2c，d)．ICMでは，細胞質には，免疫反応を認めず，又免疫反応とT-tubuleとの明らかな相関も認めなかった．またDMD筋由来AMでは，免疫反応を認めなかった．

TTX experiment：TTXで2週間筋収縮活動を停止させた筋細胞（IPM）では，光顕で細胞全体にほぼび漫性に免疫反応が観察されると共に一部の筋細胞膜に散在性に免疫反応を認めた．光顕厚切り切片では，筋細胞膜に散在性に不連続性に免疫反応を認めた（図3a，b）．更に一部の筋細胞で，細胞質内にも免疫反応が観察されると共にDPの免疫反応が認められない筋細胞も一部に認められた(図3a，b)．電顕による観察では，DPは筋細胞膜直下に散在性不連続性に免疫反応が観察された（図3c，d）．

考　　察

従来DPの細胞内の局在に関してヒトの培養筋

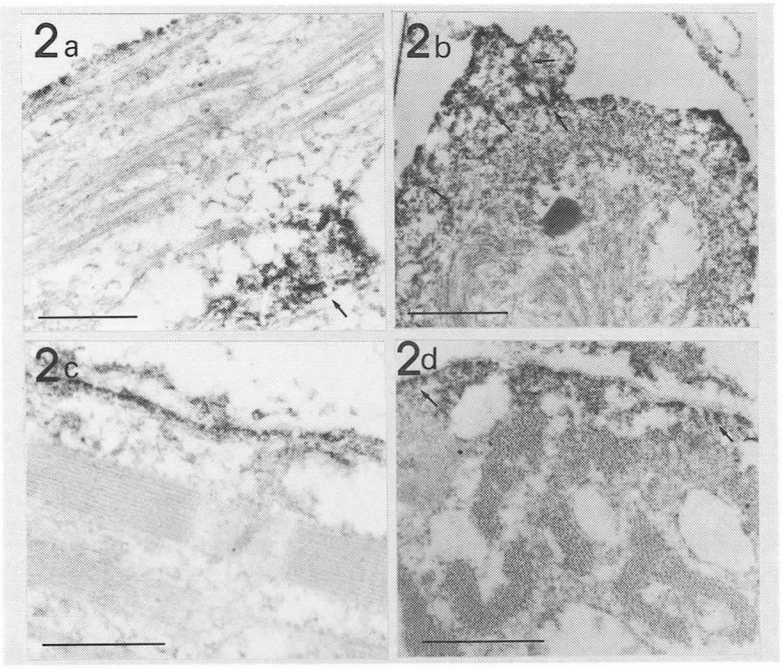


図2　ヒト培養筋細胞の電顕免疫染色像
a，b培養5週目の神経支配のない筋細胞では細胞膜の直下に散在性に免疫反応を認め，細胞質と細胞膜の近傍にも顆粒状の免疫反応を認める(矢印)．c，d：ラット胎児脊髄との併置培養により筋が成熟し2週間自発収縮している筋細胞では細胞膜の直下にび慢性に免疫反応を認め，一部にperiodicityをもって染色される部分を認める（矢印）．bar 1μm.

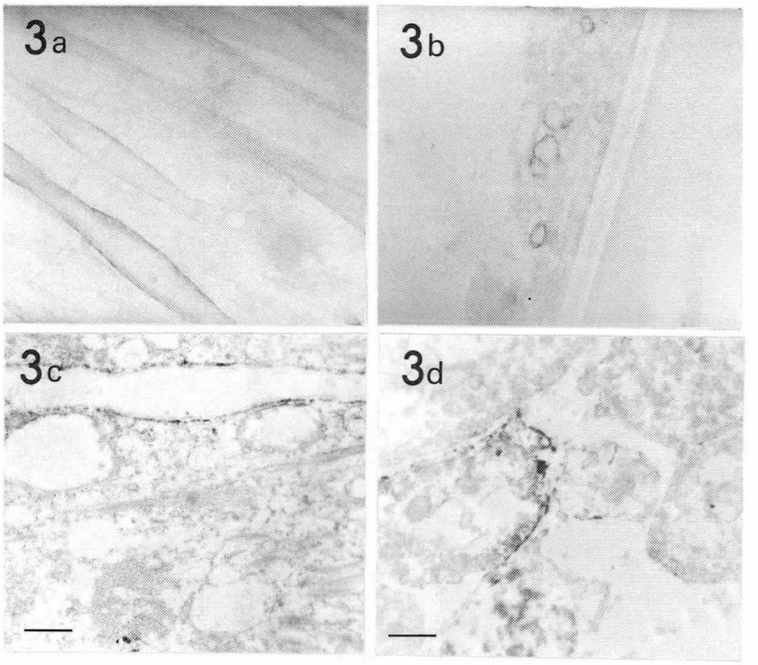


図3　ラット胎児脊髄との併置培養に2週間TTXを投与し筋収縮を停止させた培養筋細胞の免疫染色像
a，b：光顕免疫染色では細胞膜の一部に散在性に免疫反応を認める．(×3000)
d，e：電顕免疫染色では細胞膜の直下に不規則に散在性に免疫反応を認める．bar 1μm.

細胞では，神経支配されていないAMでは筋細胞膜と細胞質に散在性に存在すること[4]，マウス脊髄を使用したorganotypic cultureでは，再生ICM筋細胞膜に一様に存在することが既に報告されている[5]．一方ヒト胎児の研究では，神経支配が完全でない胎生11週で既にDPが細胞質に発現することが報告されている．今回の我々の検討においても，筋芽細胞ではDPは存在しないが，神経支配がなく自発収縮していない未熟な筋細胞においてはDPが発現し筋細胞膜と細胞質の一部に散在性に存在していることから考えて，DPの発現には神経支配も筋収縮活動も必要ないと考えられる．しかし，ICMではDPは筋細胞膜に沿ってび漫性に存在することから，神経支配後の膜の発達あるいは筋収縮活動によりDPは筋細胞膜直下に一様にび漫性に配列されるようになると考えられる．この培養系では筋細胞は神経支配後初めて自発収縮を開始するので，神経支配及び筋収縮活動のどちらがDPの細胞内の局在，配列に主な影響を及ぼしているのかが問題となる．この点を明らかにするために，TTXによって筋収縮を停止させる実験をおこなった．TTXはよく知られているように低濃度で筋細胞膜のTTX感受性sodium channelをブロックする事により筋収縮を停止させるが，活動電位をブロックしてもminiature endplate potentialはブロックしないことから，化学的神経筋伝達を残したまま筋収縮活動の影響を調べるのに適した薬物であると考えられる．TTXを投与したIPMではDPは筋細胞膜に散在性に存在し，ほぼAMと同じようなDPの分布を示し，ICMで観察された細胞膜への一様なび漫性の配列やDPの細胞膜におけるperiodicityを持った配列は認められなかった．このことからDPの筋細胞膜へのび漫性の分布，periodicityを有する配列には筋収縮活動が重要な役割を有している事が明らかとなった．我々はこの培養系で横

紋形成及び核の細胞膜直下への移動は，筋収縮活動により支配されるが，神経筋接合部の形成は筋収縮活動の影響を受けないことをすでに報告している[6]．一方マウス培養筋細胞で，TTXを投与した筋細胞では細胞骨格蛋白であるdesminの分布，配列に乱れを生じることが報告されている[7]．DPは膜関連細胞骨格蛋白として膜の裏打ち構造に重要な役割を果たし，actinをanchoringしていると考えられているが，spectrin，desminなどの他の細胞骨格蛋白との関係は依然として不明である．これらの細胞骨格蛋白が相互に結合しあい成熟した筋細胞に必要な最終的な筋細胞骨格系を完成させる上で，筋収縮活動がDPの細胞膜直下への局在，配列と同様に他の細胞骨格蛋白の配列，構成に重要な役割を果たしていることが考えられる．また最近DPは，神経筋接合部あるいは筋腱接合部に多いことが報告されており，筋の収縮弛緩のみならず膜を貫通しているacetylcholine receptorの保持にも何等かの役割を果たしている可能性があり，今後DPの局在と機能に関して，この培養系を利用して更に検討していく予定である．

文　献

1) Watkins SC, Hoffman EP, et al: Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibers. Nature 333：863—866, 1988.
2) Cullen MJ, Wash J, et al: Ultrastructural localization of dystrophin in human muscle by using gold immunolabelling. Proc R Soc Lond B240：197—210, 1990.
3) Prelle A, Chianese L, et al: Appearance and localization of dystrophin in normal human fetal muscle. J Neurol Sci 98 (Suppl)：229, 1990.
4) Miranda A, Bonilla E, et al: Immunocytochemical study of dystrophin in muscle culture from patients with Duchenne muscular dystrophy and unaffected control patients. Amer J Pathol 132：410—416, 1988.
5) Ecob-Prince MS, Hill MA, et al: Localization of dystrophin in cultures of human muscle. 12：594—597, 1989.
6) Park YC, Askanas V, et al: Paralysis of innervated cultured human muscle fibers affects their morphologic phenotype differentially. Neurology 40(Suppl 1)：122, 1990.
7) Tassin AM, Raymond M, et al: Unusual organization of desmin intermediate filaments in muscular dysgenesis and TTX-treated myotubes. Develop Biol 129：37—47, 198, 1988.

15) 急速凍結・ディープエッチング(QF-DE)法による培養筋管細胞内 dystrophin の三次元的局在

小 林 高 義*

研究協力者　大 野 伸 一** 松 本 容 秋*
馬 場 健*** 塚 越 廣*

1987—88年 Kunkel らの group によって，Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の gene が cloning され，その遺伝子産物である427kDa の蛋白質が dystrophin (DP) となづけられた．光顕免疫組織化学的には DP は細胞膜に存在し，二次元の透過電顕による観察では DP は細胞膜直下に存在し，成熟した筋細胞では periodicity をもっていることがいままで報告されている．一方 DP は，いままでに知られていなかった未知の蛋白質であるため，その正確な細胞内の局在及び他の細胞骨格蛋白との相互関係を明らかにすることが，その機能を知る上で重要である．我々は，DP の正確な三次元的局在を知るために高解像力で三次元的観察のできる QF-DE 法を用いマウス培養筋管細胞内の DP を免疫細胞学的に観察すると同時に他の細胞骨格蛋白（特に actin filaments[AF]）との相互関係を検討したので報告する．

材料及び方法

DMD の model 動物である mdx マウス及びその control マウスである scn マウスを使用した．新生マウス下肢筋より無菌的に筋組織を採取し，コラーゲン塗布カバースリップ上に explant culture した．培養液は Dulbecco's modified Eagle's MEM 67%, medium 199 23%, fetal bovine serum 10%の組成のものを使用した．培養は約1週間行い，充分な筋管細胞が得られた段階で以下の実験に使用した．QF-DE 用に，培養組織を2%パラホルムアルデヒドで5分間固定し，更に0.5%サポニンで15分間処理した．一部の試料は“細胞二分割法”で細胞内の可溶性蛋白質を除去した．免疫染色は DP 蛋白 C 末端に対するモノクローナル抗体（4C—5：味の素及び富士レビオ社）で30分染色後，peroxidase 標識抗マウス lgG 抗体で染色した．免疫染色対照群として scn マウス由来筋管細胞に，正常マウス血清と PBS を一次抗体として使用し，また mdx マウス由来筋管細胞に DP 抗体を使用した．0.25%グルタールアルデヒドで30分間再固定後 diaminobenzidine (DAB) 反応を5分間行った．AF 同定のために一部の試料は myosin subfragment 1 (S—1) で修飾した．電顕レプリカ膜作成のためには10%メタノール浸漬後，液体窒素で冷却し液体窒素中で凍結割断を加えた．Eiko 社製 FD-3S 装置内（−95°C, 2−6 ×10^{-7} Torr）で15—30分間 deep etching 後白金と炭素で回転蒸着した．型のごとくレプリカ膜を作成し，日立 HS-9, H-700電顕で観察した．

結　　果

I．位相差顕微鏡的観察：筋を explant 後24時間以内に単核細胞が遊走し，数日以内に多核の筋管細胞を形成し不規則な自発収縮を開始した．Scn 及び mdx 培養筋細胞間に特に差は認められなかった．

II．透過電顕的観察：Scn 及び mdx 培養筋管細胞とも，筋細胞の長軸方向に沿って Z-band を形成した未熟な myosin と actin 線維の束が認め

＊東京医科歯科大学医学部神経内科
＊＊信州大学医学部第一解剖学
＊＊＊信州大学医学部第二病理学

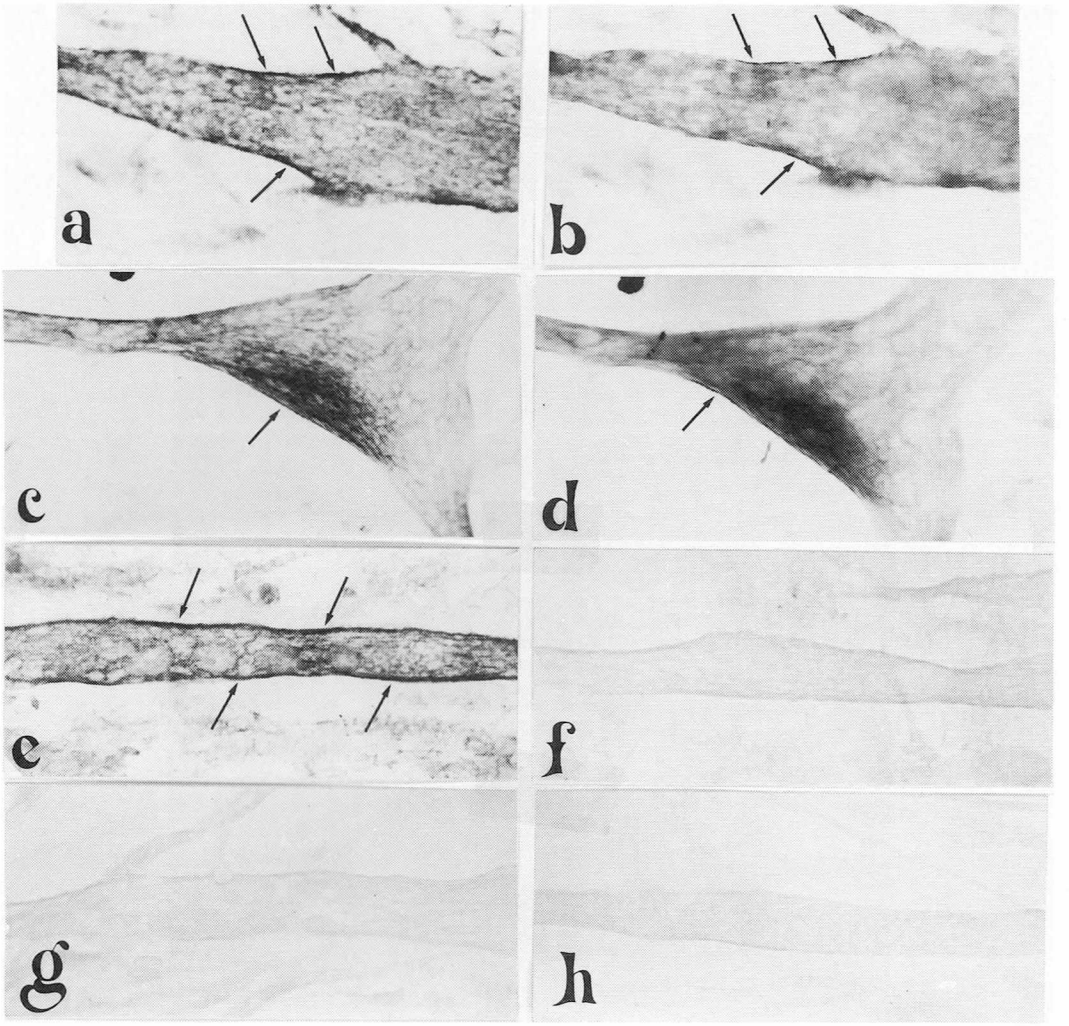


図1 Light micrographs for immunoperoxidase staining of cultured scn and mdx myotubes at 5-6 days of culture. (a)-(e) : Immunostaining of dystrophin. (a) The diaminobenzidine (DAB) reaction products are observed diffusely in the cytoplasm and some scattered immunostained spots (arrows) are noted under the plasma membrane in scn myotubes. (b) At another focus level near the horizontal cell surface, clear spotty DAB reaction products (arrows) are identified under the plasma membrane. (c) Immuno reaction products (arrow) are also localized in some parts of the cytoplasm of flat myotubes. (d) At another focus level, some are localized under the plasma membrane ((arrow). (e) The immunoreaction products with linear pattern (arrows) are localized along the plasma memebrane of well developed scn myotubes. (f)-(h) : Immunostaining controls. No DAB reaction product is observed in scn myotubes, which are immunostained with normal mouse serum (f) or phosphate buffered saline (g), instead of the primary anti -dystropin antibody. (h) Immunosatining with anti-dystrophin antibody is completely negative in mdx myotubes.

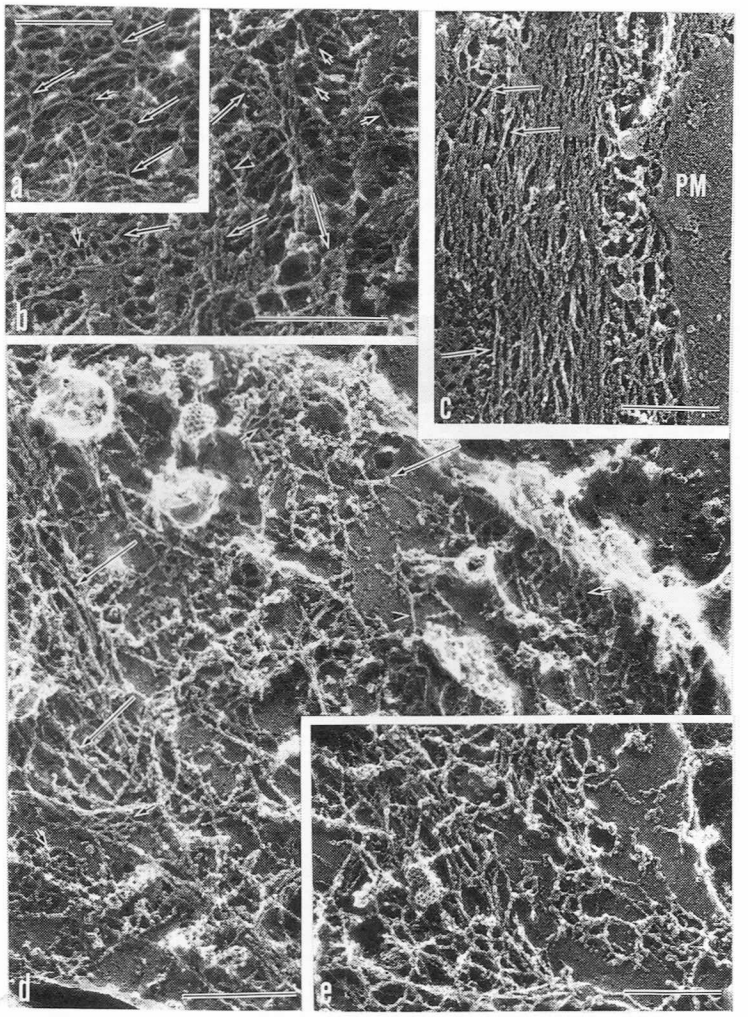


図 2　Replica electron micrographs for pure morphology (a) and S-1 decorated ultrastructures (b-e) in scn (a-d) and mdx (e) myotubes at 5-6 days of culture. Bar : 0.5 μm (a) Microfilaments (large arrows), thin filaments (small arrows) are associated with each other under the plasma membrane of scn myotubes. (b) Most of 8-10 nm microfilaments in subsarcolemmal networks are decorated with S-1 to identify actin filaments (large arrows). Some thin filaments are not decorated (small arrows). Arrowheads : Intermediate filaments. (c) Parallel running microfilaments under some parts of the plasma memebrane are decorated with S-1 to form typical rope-like structures, but intermediate filaments are not decorated (arrow). PM : Plasma membrane. (d) Lattice-like cytoskeletons (small arrows) are attached to the cytoplasmic sides of the plasma membrane and not decorated with S-1. Other microfilements are decorated with S-1 to identify actin filaments (large arrows). Arrowhead : Intermediate filament. (e) Most of cytoskeletons are decorated with S-1 in mdx myotubes. Lattice-like cytoskeletons, however, are rarely observed.

られ，またミトコドリアも細胞内に多数認められた．筋細胞膜も両者とも良好に保たれ差を認めなかった．

III. DP の光顕免疫細胞化学的観察：DP は筋芽細胞では scn, mdx とも陰性であった．しかし scn の培養細胞では，未熟な筋管細胞では，細胞膜の一部が部分的に強く染色されると共に細胞内にもび慢性の染色が確認された(図1a-d)．また，よく収縮している成熟した厚みのある筋管細胞では，細胞膜に一致して一様に染色された(図1-e)．一方，mdx マウス培養筋管細胞及び control の免疫染色は完全に陰性であった（図1f-h)．

IV. QF-DE 法による観察：

1）純形態像及び AF の観察：培養筋管細胞の細胞膜直下では所々相互に結合を有する線維状の network が密に存在した(図2a)．これらの細胞膜直下の network は，主として 8 —10nm の直径を有する線維から構成されており，またこの network の線維間同志と cross-link している 5 — 7 nm の直径を有する細線維も観察された（図2—a&b の短い矢印)．12—14nm の直径を有する中間大線維は細胞質内のより深い所に観察された(図2—b の矢印)．S—1による修飾によって AF を同定し観察すると，図2 b—e で示すごとく，細胞膜直下に存在する 8 —10nm の線維の大部分は S—1によってロープ状に修飾されて AF と考えられた．一方図2—d で短い矢印で示すごとく格子状の構造をもった S—1で修飾されない細胞骨格が scn 筋管細胞膜の細胞膜内面に密着して存在するのが観察されたが，mdx 筋管細胞では，このような細胞骨格は観察されなかった（図2—e)．

2）DP の免疫細胞学的観察：DAB 反応産物はレプリカ上で図3 a，b で長い矢印で示すごとく顆粒状の反応産物として観察された．この免疫反応産物は scn 培養筋管細胞の細胞膜の直下に部分的に不規則に散在性に存在した．この構造物は一部で AF 様線維と密接に結合していた（図3 a&b の短い矢印)．また一部の反応産物は，細胞膜内面に接着していた．DP は主として AF が豊富に存在する場所に存在し，AF の殆どない場所には存在しなかった．Mdx 培養筋管細胞の免疫染色では，DAB 反応産物は全く存在せず，また scn 培養筋管細胞を使用した control の染色でも DAB 反応産物は認められないことから scn 培養筋管細胞中の DAB 反応産物は DP に特異的と考えられた．

考　　察

いままでに伝統的透過電顕的手法による免疫細胞化学的観察によって，DP は細胞膜直下に存在することが明らかにされているが，他の細胞骨格蛋白との関係は明らかでなかった．今回我々は，マウス培養筋管細胞を使用して初めて三次元的に DP が細胞膜直下に散在性に存在し，局所的に AF 様線維と結合していることを明らかにした．AF が DP と結合を有する可能性は，その N 末端が α-actinin と同様な分子構造を有することから推測され[1)2)]，Levine ら[3)]は NMR を使用して N 末端と F-actin が強く結合することを報告しているが，今回の我々の実験によって，DP が AF 様線維と結合部分を有していることが初めて形態学的に明らかにされた．一方，scn 培養筋管細胞膜直下に存在する AF でない細胞骨格の格子様構造は，mdx 培養筋管細胞では観察されず，その一部が DP である可能性が高いと思われる．この格子様構造物は，Koenig & Kunkel[4)]らが最近明らかにした DP の新しい model に類似しており，更に他の DP の domain を認識するモノクローナル抗体を用いて検討していく予定である．

DP は細胞の裏打ち構造を形成し，骨格筋の特徴である長軸に伸び腱で固定されている長円形の細胞の収縮—弛緩に重要な役割を担っていると考えられる．一方，DP は神経筋接合部に密に存在すること，また電気ウナギではそのアセチルコリン受容体と密接な関係があることが最近明らかになり，膜を貫通している受容体の細胞膜上での固定にも重要な役割を担っている可能性があると思われる．このような DP の構造と機能を詳細に明らかにしていくことは，生体の中で最も可動性のある筋組織の維持機構を明らかにする上でも，また DMD を代表とする筋ジストロフィーの筋崩壊の機序，更に治療法を確立する上でも重要であると

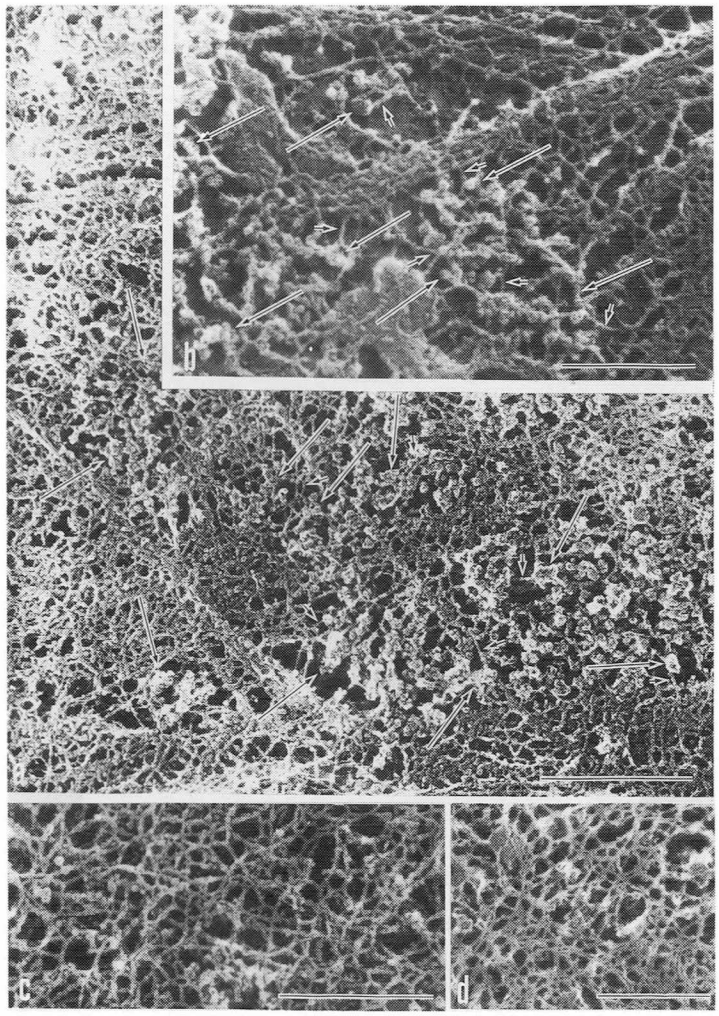


図3 Replica electron micrographs for immunoperoxidase staining of dystrophin in scn and mdx myotubes at 5-6 days of culture. Bar : 0.5 μm. (a) Granular DAB reaction products (large arrows) are mainly localized just under the plasma membrane. They are linked to actin-like filaments (small arrows, 8-10 nm in diameter) in scn myotubes. (b) Some granular reaction products are also observed to be localized on the cytoplasmic side of the plasma membrane (large arrows). Small arrows indicate actin-like filaments. (c) Immunostaining control of scn myotubes with normal mouse serum instead of the primary anti-dystrophin antibody. No reaction product is localized in microfilament networks. (d) Immunoreaction produc with anti-dystrophin antibody are completely negative in mdx myotubes.

考えられる.

結　論

我々は，マウス培養筋管細胞に QF-DE 法を応用し DP と細胞骨格蛋白の一つである AF との関係を三次元的に検討し，初めて形態学的に AF 様線維が DP と局所的に結合していることを明らかにした.

文　献

1) Hammonds RG: Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of α-actinin. Cell 51 : 1, 1987.
2) Koenig M, Monaco AP and Kunkel LM : The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell 53 : 219—228, 1988.
3) Levine BA, Moir AJG, Patchell VB and Perry SV : The interaction of actin with dystrophin. FEBS 263 : 159—162, 1990.
4) Koenig M and Kunkel LM : Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. J Bio Chem 265 : 4560—4566, 1990.

16) Deep etching replica 法によるマウス骨格筋細胞膜関連細胞骨格の研究
―化学固定と無化学固定標本の差異について

若 山 吉 弘*

研究協力者　渋 谷 誠 二*

緒　言

Heuser により開発された quick freeze, deep etching, rotary shadow 法による replica 膜の電顕的観察は細胞骨格の3次元的観察に適しており，membrane cytoskeletal interaction や cytoskeletal elements の微細構造の解明やその相互間の関連を研究するのに極めて有力な手段となりうる．特に細胞膜と細胞膜関連細胞骨格との相互関係を解析するには極めて有用である．近年 Duchenne 筋ジストロフィー症(DMD)の遺伝子産物である分子量427kDa の蛋白質 dystrophin は正常骨格筋細胞膜の細胞質側に存在することが明らかにされつつあり，DMD では dystrophin が筋細胞膜に欠損している．我々は DMD gene 相同部位の異常により同じく dystrophin が欠損していると報告されている mdx マウスと dystrophin が存在する mdx コントロールマウスを用い，deep etching replica 法による replica 膜の電顕的観察にて dystrophin の超微形態とその存在様式を研究してきている．昨年度は無化学固定の新鮮骨格筋標本の本法による研究結果を報告したが，本年度は抗 dystrophin 抗体標識骨格筋標本の本法による研究のためには化学固定が必要となるので，化学固定による影響につき検討した．

材料と方法

6匹の成熟 mdx コントロールマウスの後肢筋を2分し生の新鮮骨格筋の本法による研究用のため1.5mm 四方くらいの立方体に細切し，すばやく以下の方法で急速凍結する．もう一つの部分はまず冷却した4％パラフォルムアルデヒド溶液で1時間固定後洗浄し，クリオスタットで細切し，2.5％グルタールアルデヒド溶液で30分間再固定後洗浄し，以下のように急速凍結し replica 膜を作成した．方法は，

1）急速試料凍結装置 Eiko RF―23型に液体窒素と液体ヘリウムを入れ－269°C まで冷えた純銅 block に採取した筋の小片を圧着し急速凍結する．

2）上記標本を Eiko FD―5A 凍結割断装置に移し－150～－170°C に凍結面の表層を割断する．

3）割断後試料台の温度を－90°C まで上昇し真空度 1～2×10^{-7} Torr で約30分間 deep etching をおこなう．

4）Deep etching 後試料台に装着した標本の温度を－160°C 前後まで冷やす．

5）その後電子銃に装着した白金を膜圧計でその厚さを監視しながら，また試料台を回転しながら蒸着し，次に同じく電子銃に装着したカーボンを試料の上の白金膜に回転蒸着して replica 膜を作製する．

6）次に試料のついた replica 膜を凍結割断装置から取り出し，塩素系漂白剤で筋肉だけを消化し replica 膜を得る．

7）Replica 膜を蒸留水で3分ずつ3回洗浄する．

＊昭和大学藤が丘病院神経内科

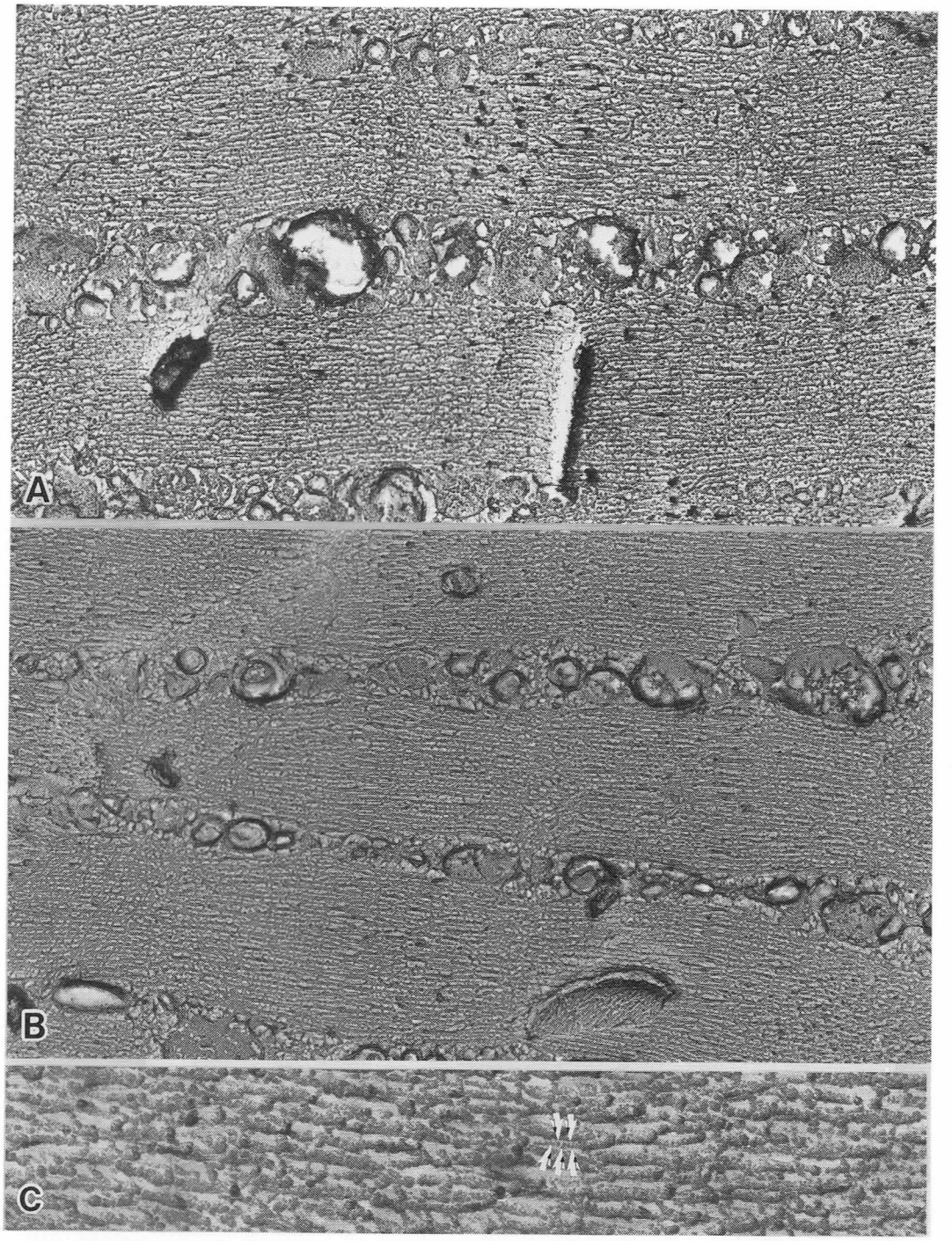
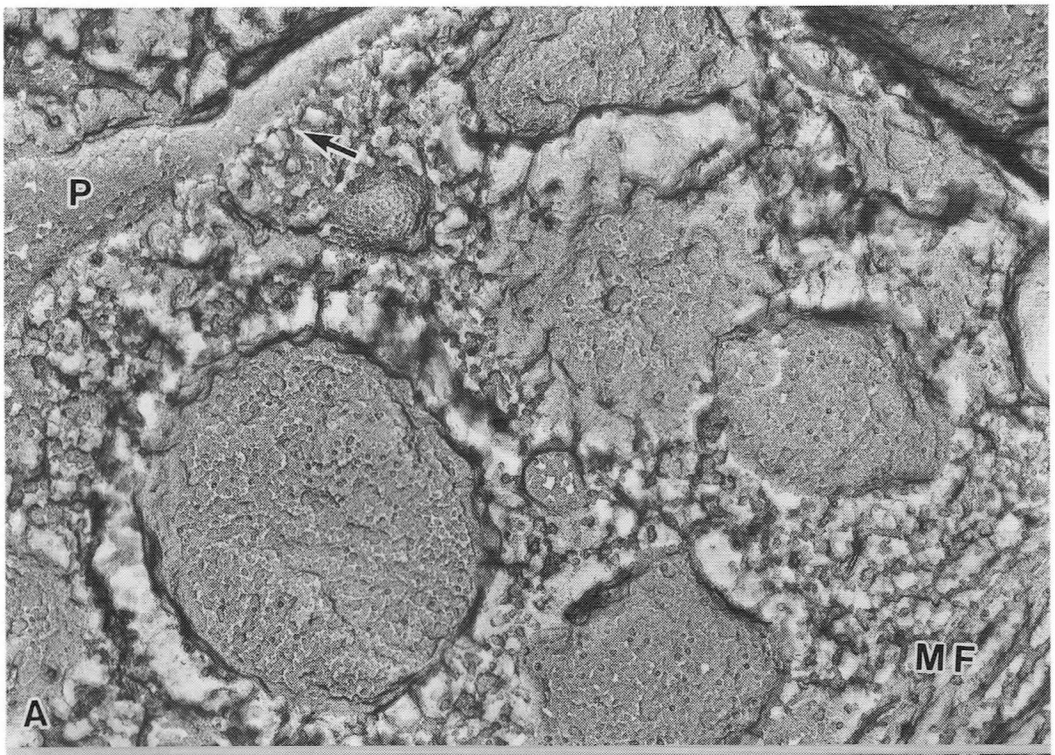
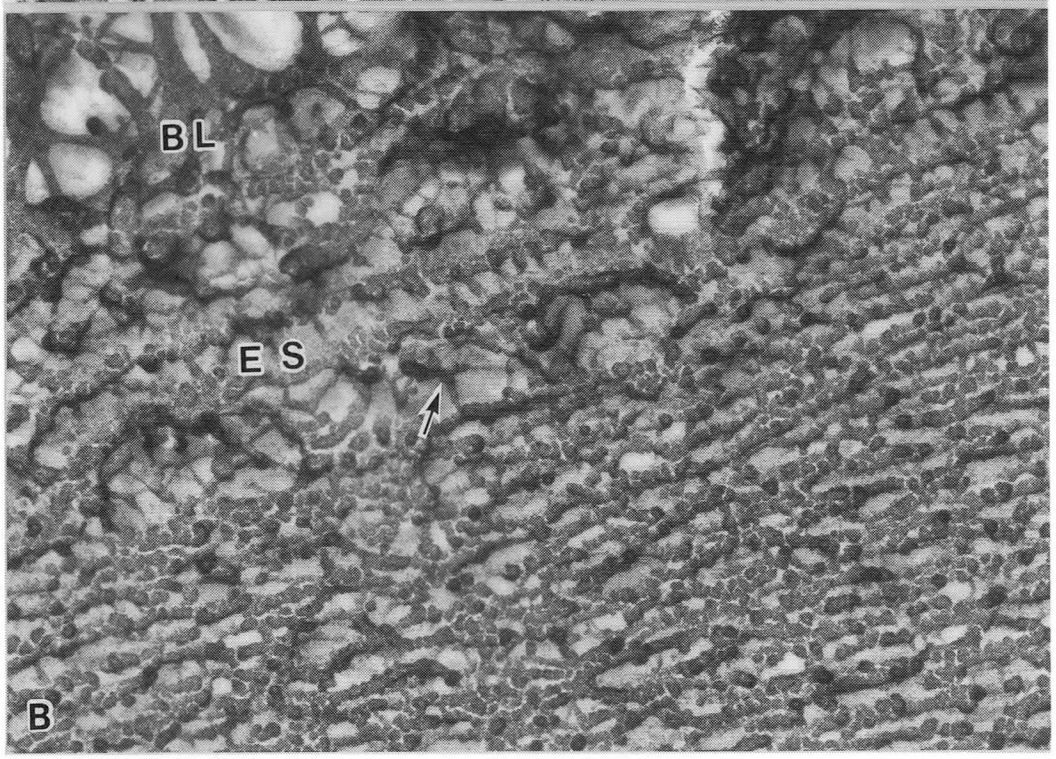


図1　A-C　Quick freeze, deep etch, rotary shadow replica　(QDR) 法による骨格筋筋原線維の電顕像．図A，Bは比較的低倍像でそれぞれ無化学固定，化学固定標本の同一倍率の所見で，両者にほとんど形態的差異は認められない．図Cは actin filament の高倍像で，矢印のような5nm の縞紋様が認められる．(図A，B×32,900　図C×131,800)


P
MF
A


BL
ES
B

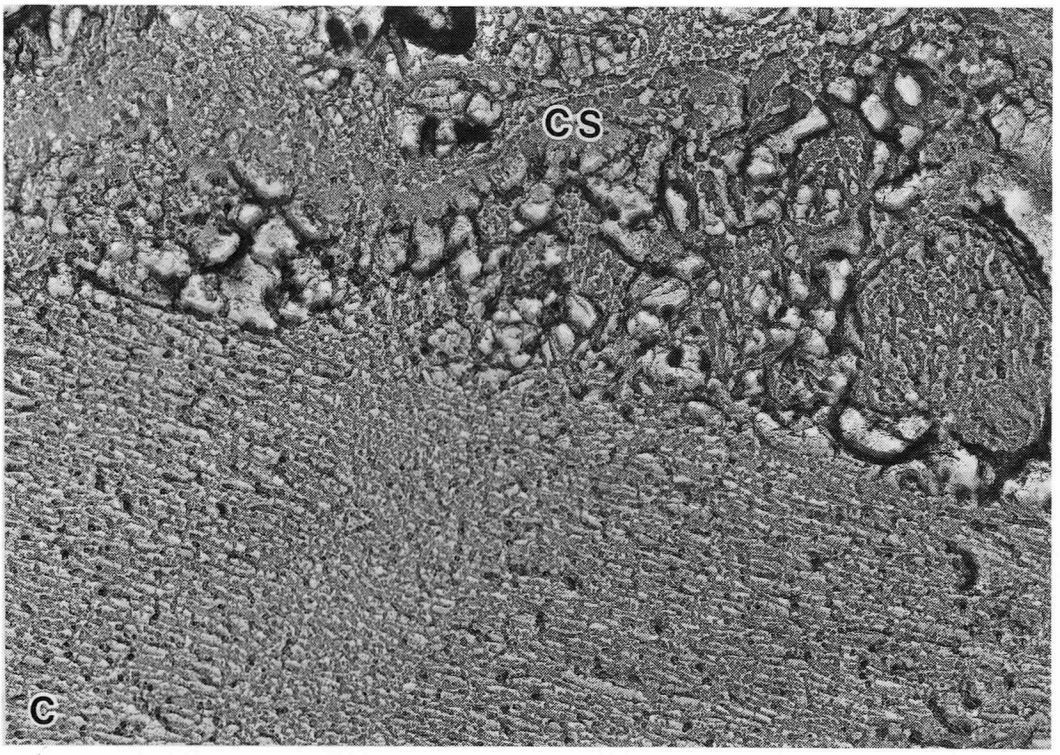


図2　A-C　QDR法による筋細胞膜周辺の微細構造．図Aは無化学固定，図B，Cは化学固定標本のreplica像である．また図A，Bは筋細胞の外腔よりその内部を観察したもので，図Aでは筋細胞膜P面に近接した部位に矢印のように筋細胞膜関連細胞骨格が見られる．図Bでも基底膜（BL），筋細胞膜真表面（ES）に接して矢印のようなY字形ないしV字形の筋細胞膜関連細胞骨格がみられる．尚BLとESの間にそれを結ぶ細線維構造が比較的規則的に存在しているのがみられる．図Cは筋細胞内部から筋細胞膜内面（CS）を観察したもので，多数の種々の形態の筋細胞膜関連細胞骨格がみられる．（図A×65,900　図B×131,800　図C×65, 900）

8）Replica膜を銅メッシュにすくい取る．

9）得られたreplica膜を乾燥後，電顕にて観察し，写真を撮影する．

なお，Heuserらはcytoskeletal elementの写真は反転して論文に発表している．こうするとcytoskeletal elementが黒のback groundから浮き出したように白く観察され，より良く見えるので多くの発表でこの方法が採用されている．しかしreplica膜の電顕写真はもともとcontrastが強く，そのうえこのように白黒反転させるため何度も写真を焼き直すと更にcontrastが増加するため，本論文では電顕ネガをそのまま印画紙に焼き付け，cytoskeletal elementは白のback groundに黒い構造物として観察されるようにした．

結　　果

Replica膜の良否は筋原線維の低倍及び高倍の写真で容易に判定可能である．氷晶などによる筋原線維のひずみが著しい場合は低倍像で一見してわかるが，構造物が良く保持されている場合には低倍像よりむしろ高倍像にしないと判定は困難である．我々の経験では人口産物の少ないreplica膜では無化学固定標本，化学固定標本とも筋原線維は整然と配列し，高倍像ではmyosinのcross

bridge や actin filament では約5nm の周期をもつ縞紋様構造が観察された（図1 A, B, C）が，このような良好な replica 膜は化学固定標本の方が，より作製し易かった．

ところで筋細胞への割断面の入り方で replica 膜で観察される部位が異なる．大別すると2種類あるが，その1つは割断面が細胞外腔，筋細胞の基底膜から細胞膜の真表面，細胞膜疎水性の内部を通り，細胞膜直下から細胞質内部へと走るものである．この場合筋細胞膜割断面のP面とそれに関連する細胞骨格がみられる（図2 A, B）．他の1つは割断面が筋細胞内部から細胞膜直下を通り筋細胞膜内表面，細胞膜の疎水性内部から基底膜，筋細胞外腔へと進むものである．この場合は筋細胞膜E面，筋細胞膜真内表面とこれに付着する細胞膜関連細胞骨格が網目構造を形成しているのが観察された（図2 C）．筋細胞膜関連細胞骨格の形態は種々であり，なかに5nm の周期性をもつ細胞骨格が組み込まれているのも観察された．尚，筋細胞膜関連細胞骨格の微細構造についても無化学固定標本と化学固定標本では大きな差異は認められなかった（図2 A, B）．

考察とまとめ

Dystrophin 異常が Duchenne/Becker 筋ジストロフィー症や幾種類かの動物の骨格筋異常の原因であることが判明したことはすばらしい医学の進歩であるが，dystrophin の形態，機能やその存在様式などについては不明な点が多い．我々はその機能の一端を解明するため，分子の超微形態やその存在様式を研究している．現在までに生の骨格筋標本の quick freeze, deep etching, rotary shadow replica (QDR) 法による dystrophin 分子観察を行ってきている[1]が，種々の形態の筋細胞膜関連細胞骨格から dystrophin 分子を同定することは困難であった．したがって抗 dystrophin 抗体でラベルした筋組織を用い QDR 法を用いて replica 膜を作製し dystrophin 分子を同定するためには筋組織をあらかじめパラフォルムアルデヒドで化学固定しなければならないので本年度は化学固定による影響を検討した．筋細胞膜関連細胞骨格には spectrin[2], fodrin[3], ankyrin[2], dystrophin[4] などが含まれているとされており，このうち幾つかはその特徴が記載されているが，化学固定標本でも，これらを識別することは困難であった．しかし本年度の研究で判明したことは筋細胞膜関連細胞骨格のなかに約5nm の周期性をもつ細胞骨格が含まれていることである．Heuser に[5]よるとこれは actin filament ではないかと考えられた．

以上より筋細胞骨格の微細構造には化学固定標本，無化学固定標本とも大きな差異はなくむしろ人口産物は化学固定標本に少ないこと，及び筋細胞膜関連細胞骨格には actin filament も含まれていることが判明した．

文　献

1) Wakayama Y and Shibuya S: Observations on the muscle plasma membrane-associated cytoskeletons of mdx mice by quick-freeze, deep etch, rotary-shadow replica method. Acta Neuropathol (Berl) 80: 618—623, 1990.
2) Shotton DM, Burke BE and Branton D: The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies. J Mol Biol 131: 303—329, 1979.
3) Miranda AF, Bonilla E, Martucci G, et al: Immunocytochemical study of dystrophin in muscle cultures from patients with Duchenne muscular dystrophy and unaffected control patients. Am J Pathol 132: 410—416, 1988.
4) Koenig M, Monaco AP and Kunkel LM: The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell 53: 219—228, 1988.
5) Heuser JE and Kirschner MW: Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. J Cell Biol 86: 212—234, 1980.

IV. 遺　伝　子

17) 女性筋ジストロフィー患者細胞のX染色体における脱メチル化とDNA複製パターンについて

斎　藤　深美子*

研究協力者　山　本　興太郎**　外　村　　晶*

はじめに

哺乳動物では，第2の，そしてすべての付加的なX染色体は発生初期に不活性化され，その後安定して子孫細胞に伝達されてゆく（M. Lyonの仮説）．保因者の女性（XX^d）の場合，原則的にはat randomにXが不活性化して，あまり発症に至らないはずであるが，稀に発症する場合は，正常なXが不活性化する割合が多いためと考えられている．また，Xp21を切断点とする転座染色体を有する女性では，正常のXが選択的に不活性化するため発症するとされている[1)2)]．この不活性化XはDNA合成（S）期の後期に複製されるので，この時期にTdRの類似体のBrd　Uを取り込ませる（B-pulse）と，後期複製パターンがReplication banding（又はRBG-banding）として観察することができる（表1）．現在では，このDNA複製パターンの経時的順序が遺伝子発現と関連しているか又は，部分的にこれをコントロールしていると考えられている[3)]．

一方，遺伝子発現とDNAメチル化に関する*in vivo*あるいは*in vitro*における研究により，不活性化されたX染色体上の遺伝子とDNAのメチル化とは深く関連していることが示されている．これらの研究結果は，メチル化されていない遺伝子は発現され，メチル化された遺伝子は抑制されたり，不活性化されたりすることを意味していた．さらに，DNAのメチル化パターンはDNA複製過程の一部として娘細胞へ伝達されてゆく．細胞内の保存メチラーゼ・システムが鋳型のDNA鎖でのメチル化部位を見付け，新しいDNA鎖のajacentな部位にメチル基を付加してゆくためである[3)4)]．この様なコピー・プロセスは通常安定ではあるが，5－azacytidine（5－azaCR）を含む培養液で細胞を増殖させた場合，回避される．

表1　Chromosome banding techniques

Banding technique	Basis of technique
Q-banding	AT-specific fluorochromes; quinacrine, DAPI and Hoechst 33258
G-banding	Giemsa staining after incubation in warm SSC or trypsin
R-banding	Giemsa satining after incubation in hot buffer
Replication banding	Incorporation of BrdU during either early(T-pulse) or late S phase(B-pulse) followed by Gimsa satining

5－azaCRはシトシン類似体で，複製中のDNAの中に取り込まれるが，メチル基を受け入れることはできない[5)]．そのためDNAの低メチル化状態が生ずる．最近，後期複製の不活性化したX染色体上のHPRT等の数種の遺伝子が，5－azaCR処理によって再活性化されたことにより[6)7)]，5－azaCR処理によって低メチル化状態を誘導すると，不活性化した遺伝子が再活性化される可能性のあることが示唆されている．

そこで本研究では，遺伝子発現と深く関連していると考えられるDNA複製パターンを指標に，後期複製の不活性Xに対する5－azaCRの効果を細胞遺伝学的に検索したのでその結果を報告する．

＊東京医科歯科大学医学部難治疾患研究所
細胞遺伝ウイルス／免疫疾患
＊＊東京医科歯科大学医学部

方　　法

今回の実験には，Duchenne 型筋ジストロフィー症患者で，X 染色体と常染色体間に相互転座を有する 2 名の女性から由来したリンパ芽球細胞（1：46, X, t(X；15)，2：46, X, t(X；19)）を用いた．これらの細胞では，転座に関与していない正常な X 染色体の方が不活性化して後期複製するため，この不活性化した X の DNA 後期複製パターンに対する 5 —azaCR の効果について，5 —azaCR 無処理の場合と比較検討した．

方法は，細胞数と増殖を調整した上記リンパ芽球細胞に各々，5 —azaCR（2 — 3 μm）を48時間処理した後（対照として，無処理のものも用意する），TdR（300μg/ml）で一昼夜処理し，その後 BrdU（10^{-4} M）を数時間添加して（B—pulse 法）細胞を回収した後，通常の方法で固定し，染色体標本を作製する．その後標本を，Hoechst 33258（2.5μg/ml）で15分間染色してから D.W.で洗浄し，2 ×SSC で封入した後，black light（15W, 360nm）を照射し，ギムザ液で染色する（FPG 法）．

結　　果

B—pulse 法による Replication banding では，後期に DNA 複製する部位は，淡染色される．そのため，不活性化された後期複製の X 染色体は，通常，全体的に淡染色されることになる．中には，濃染色される部位（early replication site）もあるので，観察結果を数値化するために，early replication band のクラス分けを行い，10のバンドに分けた（図 1）．

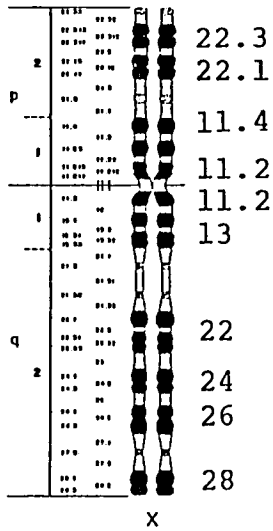


図 1

その結果を，表 2 に示す．ここで，例えば Total 10とは，不活性化 X 染色体上で，図 1 の10箇所のすべての部位で early replication band（濃染バンド）が観察されたことを示している．この結果より，症例 1（46, X, t（X；15））および症例 2（46, X, t(X；19)）において，共に，5 —azaCR 処理をした方（1 A—B および 2 A—B）が無処理（1 C—B および 2 C—B）の場合に比べて，濃染部位つまり early replication 部位が多くなっていることが判った．この結果をまとめてグラフにしたのが図 2 である．因みに Total count の平均値は，対照の無処理の場合の3.61（1 C—B）および4.44（2 C—B）に対して，5 —azaCR 処理の場合は，6.04（1 A—B）および6.28（2 A—B）と高い値を示していた．又，濃染部位は全体的に，対照に比べてより強く，より広範囲に染色されていることが観察された．

考　　察

DNA のメチル化は遺伝子の不活性化機構に関連があり，これは又，5 —azaCR の処理によって脱メチル化される．X の転座染色体を保有する女性筋ジストロフィー症患者のリンパ芽球細胞を用いた今回の細胞遺伝学的研究により，DNA 複製のバンドパターンに対する 5 —azaCR のある特別な効果のあることが判明した．

(1)培養リンパ芽球細胞の不活性化 X における DNA 複製の遅延は，5 —azaCR 処理によって短縮された．この知見は，Shafer と Priest の報告[8]や，低メチル化は不活性な X を再活性化させると同様にその DNA の早期複製化を誘導するという仮説を支持していると考えられる．

(2)不活性な X の複製パターンは，5 —azaCR 処理によって変化した．新しいバンド部位の出現は観察されなかったが，染色性が強まることによ

表2

	Total	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1A-B	23	0	1	4	3	0	2	2	0	4	3	4
	(100.0)	(0)	(4.3)	(17.4)	(13.0)	(0)	(8.7)	(8.7)	(0)	(17.4)	(13.0)	(17.4)
1C-B	28	3	4	3	5	2	5	2	2	1	1	0
	(100.0)	(10.7)	(14.3)	(10.7)	(17.9)	(7.1)	(17.9)	(7.1)	(7.1)	(3.6)	(3.6)	(0)
2A-B	56	0	2	4	5	4	6	5	8	8	9	5
	(100.0)	(0)	(3.6)	(7.1)	(8.9)	(7.1)	(10.7)	(8.9)	(14.3)	(14.3)	(16.1)	(8.9)
2C-B	32	5	3	4	3	0	3	3	3	5	2	1
	(100.0)	(15.6)	(9.4)	(12.5)	(9.4)	(0)	(9.4)	(9.4)	(9.4)	(15.6)	(6.3)	(3.1)

(%)

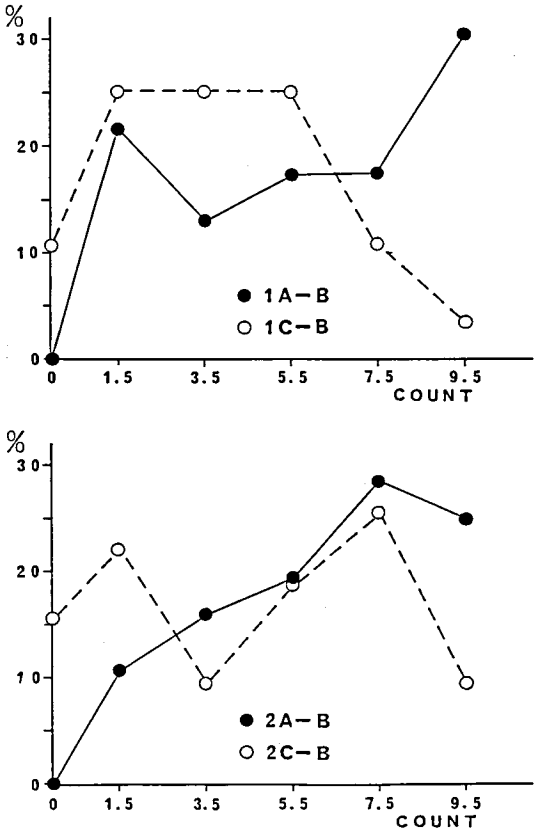


図2

り独特のパターンが観られた.

これらの結果やいままでの報告から，DNAのメチル化によって，染色体の複製と遺伝子発現は共に，部分的にあるいは領域的に制御されていることが示唆される．たぶん，これは，これら2つの現象を結びつける共通なメカニズムと思われる．DNA上の重要なメチル化部位は，DNAおよびRNAの両方のポリメラーゼの結合や伸展を阻害するのだろう．

今後さらに，(1)観察数や例数を増やし，また(2)より高精度なbanding法を導入して，同様の実験をすすめると共に，新しいreplication bandの出現やreplicationのtiming等について検討して行きたい．

文　献

1) 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.

2) 斎藤深美子，外村晶，山本興太郎：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．“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，1988，p 194.

3) Riggs AD: DNA methylation and late replication probably aid cell memory, and type I DNA reeling could aid chromosome folding and enhancer function. Phil Trans R Soc Lond B326 : 285, 1990.

4) Razin A and Riggs AD: DNA methylation and gene function. Science 210 : 604, 1980.

5) Jones PA and Taylor SM: Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA meth-

ylation. Cell 20 : 85—93, 1980.
6) Mohandas T, Sparkes RS and Shapiro LJ : Reactivation of an inactive human X chromosome : evidence for X inactivation by DNA methylation. Science 24 : 393, 1981.
7) Grant SG and Chapman VM : Mechanisms of X-chromosome regulation. Ann Rev Genet 22 : 199, 1988.
8) Shafer DA and Priest JH : Reversal of DNA methylation with 5 — azacytidine alters chromosome replication patterns in human lymphocyte and fibroblast cultures. Am J Hum Genet 36 : 534, 1984.

18）ミトコンドリア脳筋症の病因解明
——ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症における変異遺伝子解析——

黒田泰弘*

研究協力者　伊藤道徳*　内藤悦雄*
西條隆彦*　武田英二*

要約

ミトコンドリア脳筋症の病因としてピルビン酸脱水素酵素（PDH）複合体の異常が報告されている．今回我々は，PDH 複合体異常症の一次的な原因を明らかにするためにウエスタンブロット分析でPDHのα（E1α）とβサブユニット（E1β）がともに著明に減少していたPDH欠損症の1女児例においてE1αに対するcDNAの塩基配列を分析した．患児のcDNAでは分析した20クローン中19クローンにおいて4bpの挿入が認められ，1クローンは正常な塩基配列を示した．ゲノムDNAの分析では，患児は正常遺伝子と変異遺伝子のヘテロ接合体と考えられたが，RNAの分析ではほとんどの細胞で変異遺伝子のみが発現していると考えられた．E1αの遺伝子はX染色体上に存在することが知られており，患児においては何らかの原因により変異遺伝子を持つX染色体が優位に活性化されていると思われる．また，E1αの遺伝子において変異を認めたことからE1βはE1αの異常により二次的に減少しているものと考えられた．

緒言

ピルビン酸脱水素酵素（PDH）複合体は6つの成分，すなわちPDH（E1），リポ酸アセチルトランスフェラーゼ（E2），リポアミド脱水素酵素（E3），PDHホスファターゼ，PDHキナーゼおよびProtein-X（X）から構成されており，その活性はPDHホスファターゼおよびPDHキナーゼによる脱リン酸化—リン酸化機構によって調節されている．また，PDHはαおよびβの2種類のサブユニット（E1α，E1β）の4量体として存在している．ミトコンドリア脳筋症の病因としてピルビン酸脱水素酵素（PDH）複合体異常が報告されている．また，PDH複合体異常の中ではPDH活性低下やPDH複合体活性化障害が多い．PDH複合体異常症の一次的な原因を明らかにするためには，蛋白質レベルとともに遺伝子レベルでの検討が必要である．そこで今回我々は，PDH欠損症の1女児児例においてE1αに対するcDNAの塩基配列を分析した．

対象

ウエスタンブロット法でE1αとE1βがともに著明に減少していたPDH欠損症の1女児例（図1）から得られた培養皮膚線維芽細胞を対象とした．また，高乳酸血症の認められない患者から得られた培養皮膚線維芽細胞を対照とした．

方法

1）PCRおよび塩基配列の決定

培養皮膚線維芽細胞からChomczynskiらの方法[1]でtotal RNAを抽出した．このtotal RNAを鋳型にしてM-MLV transcriptase（BRL社）によりsingle strand cDNAを作製してこれを

*徳島大学医学部小児科

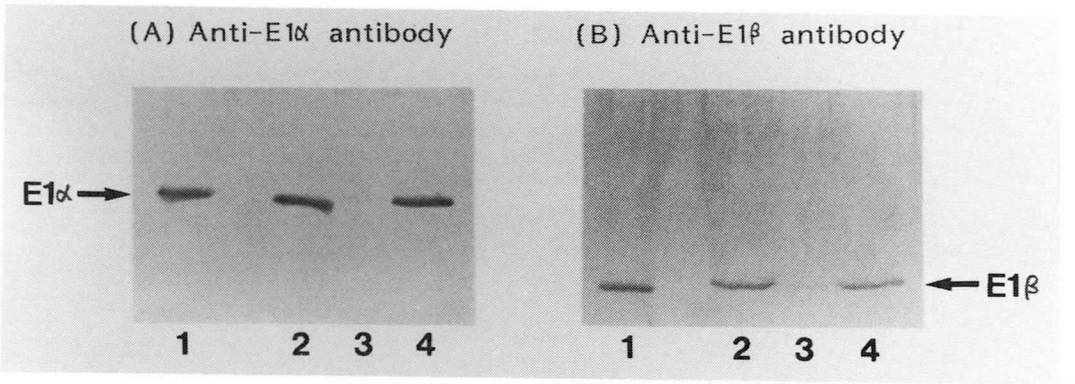


図1　培養皮膚線維芽細胞 PDH 酵素蛋白質の immunoblot 分析
(A)　抗 E1α 抗体による immunoblot 分析
(B)　抗 E1β 抗体による immunoblot 分析
レーン 1：牛心臓精製 PDH 複合体
レーン 2：対照
レーン 3：PDH 欠損症女児例
レーン 4：対照

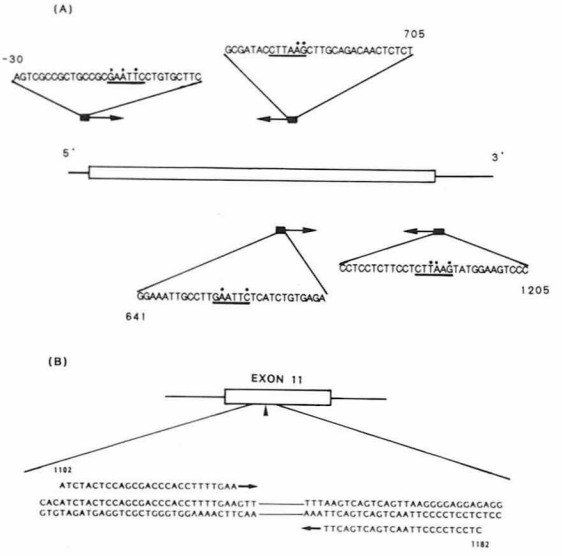


図2　PCR による cDNA および DNA フラグメントの増幅
(A)　total RNA から作製した single strand cDNA を鋳型とした E1α cDNA の増幅
＊：Eco RI 認識部位作製のための塩基置換部位を示す.
(B)　ゲノム DNA フラグメントの増幅
矢印は4bp の挿入部位を示す.

PCRの鋳型にした．ついですでに報告されている塩基配列を参考にして，4種類のプライマーを合成した．それぞれのプライマーには2または3塩基を置換してほぼ中央にEco RIの認識部位を作製した．これらのプライマーを用いたPCR法によりE1αのcDNAを−30から+705までと+641から+1205までの2つのフラグメントに分けて増幅した（図2 A）．PCR法はTaq DNA polymeraseを利用したGene Amp™キット（Perkin-Elmer Cetus社）を用い，変性94°C 1分間，アニーリング60°C 2分間，伸長反応72°C 3分間を1サイクルとして30回の増幅を行った．増幅したcDNAの両端をEco RIで切断後，低融点アガロースゲルで分離精製した．これをプラスミッドベクターBluescript IIのEco RI認識部位に組み込み，大腸菌XL1-Blueに移入して得られたクローンを単離して，dideoxy法によりcDNAの塩基配列を決定した．

2）ゲノムDNAおよび変異遺伝子発現の解析

患者cDNAの塩基配列決定により推定された4 bpの挿入がゲノムDNA上に存在することを確認するためにゲノムDNAを鋳型としてこの変異部分を含む第11エクソン部分のDNAフラグメントを増幅した．すなわち，図2 Bに示す特異的プライマーを用いて変性95°C 1分間，アニーリング62°C 1分間，伸長反応72°C 1分間を1サイクルとして30回の増幅を行った．得られたPCR産物は，6％NuSieveアガロースゲル電気泳動でそのサイズの決定を行った．また，total RNAから作製したsingle strand cDNAを鋳型として同様の条件でPCRを行い，PCR産物のサイズを決定した．

結　　果

E1αに対するcDNAの塩基配列を決定したところ，対照ではDahlらが報告[2)3)]している塩基配列と完全に一致していた．患者では5'側のフラグ

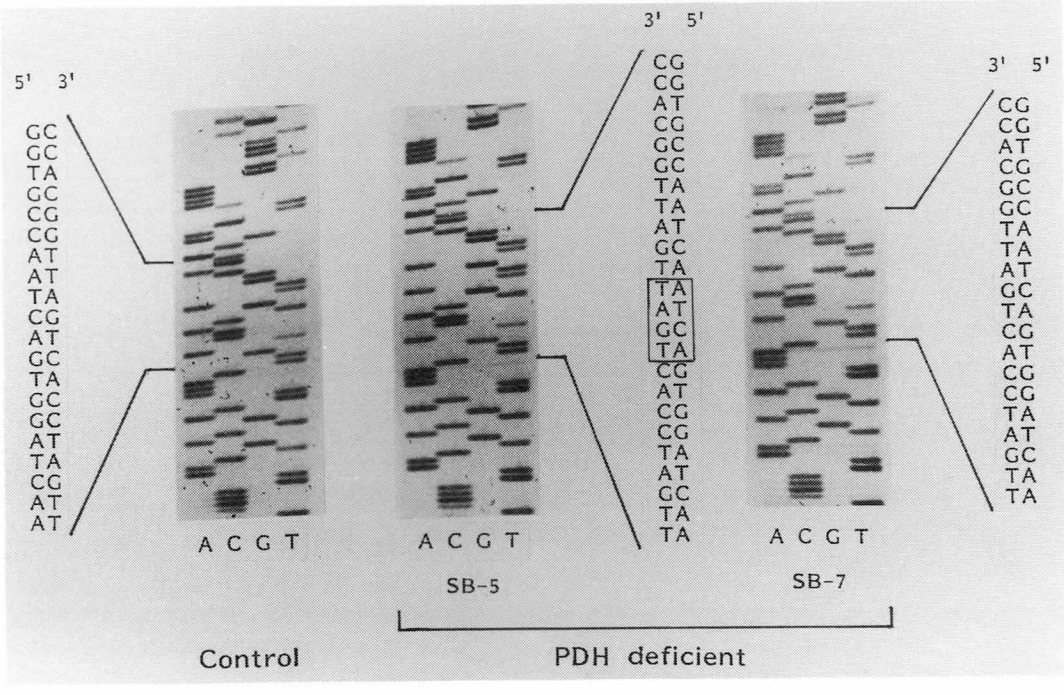


図3　PDH欠損症患者と対照のE1α cDNAの塩基配列の比較
PDH欠損症患者において塩基配列を決定した20クローン中19クローンがSB-5と同じ4bpの挿入を示した．

```
         ProPheGluValArgGlyAlaAsnGlnTyrIleLysPheLysSerValSer***
Control  CCTTTTGAAGTTCGTGGTGCCAATCAGTGGATCAAGTTTAAGTCAGTCAGTTAAGGGGAGGAG

Patient  CCTTTTGAAGTTCGTGGTGCCAATCAATCAGTGGATCAAGTTTAAGTCAGTCAGTTAAGGGGAGGAG
         ProPheGluValArgGlyAlaAsnGlnSerValAspGlnVal***
```

図4　PDH 欠損症患者における遺伝子変異とアミノ酸配列の変異

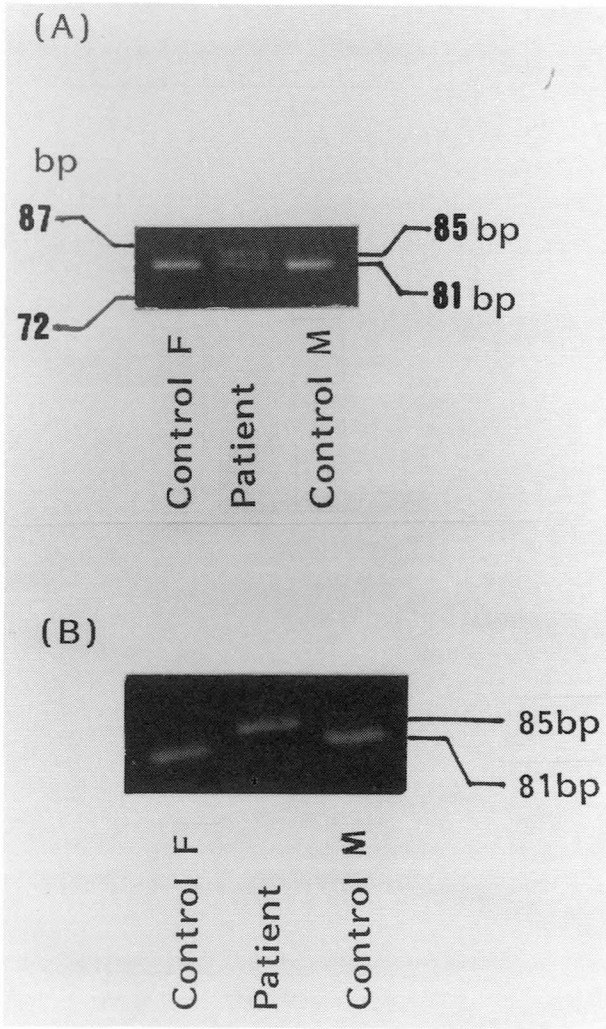


図5　遺伝子変異部位の DNA および cDNA フラグメントの電気泳動パターン
(A)　ゲノム DNA フラグメント
(B)　total RNA から作製した single strand cDNA を鋳型とした cDNA フラグメント

メントでは分析した10クローンの塩基配列はすべて正常であったが，3'側のフラグメントでは分析した20クローン中19クローンにおいて＋1146の位置にATCAの4塩基対の挿入が認められた（図3）．しかし，残る1クローンの塩基配列は正常であった(図3)．この4塩基対の挿入によりフレームシフトを生じ，正常の停止コドンより上流に新たな停止コドンが出現した（図4）．

ゲノムDNAを鋳型として変異部分を含むDNAフラグメントの増幅を行ったところ，患者では対照と同じ81bpのフラグメントに加えて，4bp長い85bpのフラグメントが認められた（図5 A)．また，この2つのフラグメントはほぼ同量であった（図5 A)．次に，total RNAから作製したsingle strand cDNAを鋳型として変異部分を含むcDNAフラグメントの増幅を行ったところ，患者では85bpのフラグメントのみが認められた(図5 B)．

考　　察

E1αの遺伝子はX染色体上に局在することが報告[4]されている．今回我々は，PDH欠損症の女児例においてE1αに対するcDNAの塩基配列を決定し，20クローン中19クローンにおいて4塩基対の挿入を認めた．しかし，1クローンは正常の塩基配列を示し患児がヘテロ接合体である可能性が示された．そこで，ゲノムDNA上での変異を検討したところ，患児においては対照と同じ81bpのDNAフラグメントに加えて変異遺伝子由来の85bpのDNAフラグメントを認めその量はほぼ同じであり，患児は正常遺伝子と変異遺伝子のヘテロ接合体であることが確認された．また，塩基配列を決定した20クローン中19クローンが変異配列を示したため，患児における変異遺伝子の発現を検討したところ，患児のmRNA由来のcDNAでは変異遺伝子由来の85bpのcDNAフラグメントしか認められず，患児の培養皮膚線維芽細胞ではほとんどの細胞で変異遺伝子が発現しているものと考えられた．女性においては2つのX染色体の1つは不活性化されていることが知られているが，一般にこの不活性化は任意に起こり一方のX染色体が発現される割合は50%と考えられている．しかし，本患児では何らかの原因によりほとんどの細胞で正常なX染色体が不活性化され変異遺伝子を含むX染色体が発現しているために，ヘテロ接合体であるにもかかわらず，高乳酸血症などの症状を示したものと思われた．

ウエスタンブロット法で本患児においてはE1αとE1βがともに著明に減少していたが，E1αの塩基配列に異常を認めたことからE1αに一次的な異常がありE1βはE1αと安定な4量体を形成できないため二次的に減少しているものと考えられた．

結　　論

PDH欠損症の1女児例において遺伝子増幅法を応用してE1αcDNAの塩基配列を決定し，4塩基対の挿入を同定した．また，患児は変異遺伝子と正常遺伝子のヘテロ接合体であったがほとんどの細胞で変異遺伝子が発現していた．

文　　献

1) Chomczynski P and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chioroform extraction. Anal Biochem 162: 156—159, 1987.
2) Dahl H-H M, Hunt S M, Hutchison W M, et al: The human pyruvate dehydrogenase complex: Isolation of cDNA clones for the E1α subunit, sequence analysis, and characterization of the mRNA. J Biol Chem 262: 7398—7403, 1987.
3) Maragan C, Hutchison W M, Hayasaka K, et al: Structural organization of the gene for the E1α subunit of the human pyruvate dehydrogenase complex. J Biol Chem 264: 12294—12298, 1989.
4) Brown R M, Dahl H-H M and Brown G K: X-chromosome localization of the functional gene for the E1α subunit of the human pyruvate dehydrogenase complex. Genomics 4: 174—181, 1989.

19）筋ジストロフィー組織ジストロフィンファミリーと生体膜機能

濱田　稔*

研究協力者　丸山英晴*　山下秀一*　澄田道博**
塩坂孝彦***　仲地　剛****　井上謙二郎****

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）遺伝子はX染色体短腕p21領域（Xp21）に遺伝子座位が存在する．その欠失や転座などの変異が同発症と関係することが明らかにされ，また，DMD遺伝子は2,000kbに近い巨大な遺伝子（群）で構成されることが判明した[1]．最近，Kunkel, Hoffmanらはジストロフィーマウス（mdx）のジストロフィンについて，cDNA及びencodeされた同ペプチドに対するポリクローナル抗体を用い，DMD遺伝子の65exonからなる14kbの長さのmRNAを確認し，またその産生タンパク質が427kDのヒトと相同のジストロフィンであることを見出した[2]．Arahata, SugitaらはDMD患者に欠失しているジストロフィンのDNAの一部に対応するペプチドを合成し，その抗体を用いて筋細胞形質膜でのジストロフィンでの局在と同病態との関連を明らかにした[3]．その後，ジストロフィンタンパク質の生理的役割や，病態との関係が究明された．ジストロフィンに特異的なドメインの構造も明かにされ，このうち，細胞骨格タンパク質の一つであるスペクトリンやアクチンとの相同性が認められ，いわゆるジストロフィンファミリーの存在が同病との関係でクローズアップされた．

＊宮崎医科大学衛生学
＊＊愛媛大学医学部生化学第二
＊＊＊愛媛県医療短期大学
＊＊＊＊国立療養所東宮崎病院

目　的

筆者らはこれまでにヒト本疾患にみられる赤血球膜性状の変異を，細胞に一定のhypoosmotic stress処理をし，赤血球からのアデニル酸キナーゼやヘモグロビンのleakage kineticsの異常を認めて報告した[4]．この結果を応用して本病態における骨格筋細胞膜や赤血球膜の細胞骨格タンパク質に変異とも関連する可能性を明らかにする事を目的とした．そのために，宮崎県内の在宅および国立療養所東宮崎病院在院中の患児ならびに患者（DMD：13例，L-G：11例，FCMD：5例）を対象に同病態の臨床診断に基づき，その成因を〔I〕ジストロフィンペプチドで作成した抗体に対する反応性及び〔II〕遺伝子増幅法を応用して検討した．〔I〕に対しては，赤血球膜構成タンパク質の性状変化をジストロフィン抗体（富士レビオより供与を受けた4-4C5抗体，及びHoffman博士より恵与された30K抗体を利用）をWestern blotting法に適用して，また，〔II〕についてはChamberlainら[5]の用いた5種のジストロフィンDNAをプライマーとして，正常例では増幅され，同DNA構造に異常があれば増幅されない性質を指標として検索を試みた．しかし，〔I〕の方法では赤血球膜構成タンパク質の可溶化をジギトニンなど界面活性剤や変性剤共存下の影響等の試料作成法や，同抗体による検出法について予備実験を行っている．そこで諸種の不明な点が生じたので，さらに検討する．今年度は患者から得られた各試料のジストロフィー遺伝子の変異について上記のプロー

ブを用い，遺伝子診断を行いその確定を試みたので報告する．

材料と方法

(1) DNAの抽出と分離： 筋ジストロフィーの各病型より得られたヘパリン加血液（5 ml）を採血後2時間以内にフィコールハイパーク混合溶液（フローラボラトリー社，3 ml）に重層し，25°Cで300Xg，30分間遠心分離した．リンパ球単球層，好中球層を分取後，各々，生理食塩水で遠心洗浄後0.05M K-PO_4（pH7.2 1 ml）に懸濁し，直ちに液体窒素で凍結保存した．DNAの抽出は，上記保存リンパ球を20mM EDTA-0.5% Sarcosyl溶液中に溶解（DNA濃度200μg/ml）し，Proteinase K（メルク社，100μg/ml）を加え，37°C，30分間温置した．フェノール/10mMトリス・HCl，pH8.0（1 mM EDTA含有）溶液で2回処理後，エタノール沈澱とし，次に50mM Tris-HCl (pH8.0)/10mM EDTA/10mM NaClに溶解しRNase A（ベーリンガー社，終濃度100μg/ml）を添加し，37°C，3時間温置した．続いて，フェノール/TEで2回処理し，エタノール沈澱とした．沈澱はTE buffer（pH8.0）に溶解してDNA標品とし，各プライマーを用いて遺伝子増幅をした．

(2) 遺伝子増幅法： 反応条件はInnisら[6]の方法に従い行った．10mM Tris-HCl（pH8.3），50 mM KCl，1.5mM $MgCl_2$，200μMの各dNTP（dTTP，dGTP，dCTP，dATP），0.01%ゲラチン，1 μMの各プライマー，0.2μgのtemplate DNAおよび1 unit Taqポリメラーゼ（宝酒造社）を加え，遺伝子増幅装置（アステック社）により行った．最初のDNA変性は93°C 7分間で行ない，次にアニーリングを55°C，2分間，合成反応を70°C，3分間，変性を93°C，2分間として30サイクル繰り返した．増幅後のDNAの検出は分子雑種法に従い5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動法を行い，エチジウムブロマイドで染めた．なお，primerはChamberlainらの報告[5]に従い，DNA合成装置（ミリジェン・バイオサーチ社）を用いて化学合成し，6つのprobe A～Fとした．各プローブA（Exon 8），B（Exon 17），C（Exon 19），D（4.1kb Hind III genomic断片），E（0.5 kb Hind III），F（1.2/3.8kb Hind III）は合成後，アンモニアクリベージ，55°Cで10時間の脱塩基保護基を行った後，減圧乾燥した．このprimerを核酸精製用カラムNACS-52（BRL社製）で精製し，上記反応に用いた．また，次年度の実験に備え，ジストロフィンC端17アミノ酸残基（SFGGSNIEPSVRSCFQF）をHoffmanら[2]のシーケンス成果に基づいてペプチドシンセサイザー（ミリジェン・バイオサーチ社，EXELL）にて合成し，減圧乾燥後，レンジに切り出し脱保護剤としてm-クレゾール0.6ml，チオアニソール3.6 ml，トリフルオロ錯酸（TFA）20mlを加え，25°Cで1時間のペプチドの切り出しを行なった．Argの脱保護剤（TMS-Br 4.0ml）を加え，0°C，1時間の脱保護操作後，TMS-BrをN_2ガスフラッシングで除去した．この反応液にエーテル100 mlを加え，沈澱したcrude peptideを得て減圧乾固した．精製はμBondasphere 5 μ C18 100A°（3.9×150mm）のウォーターズM600，U6K，M481，M740システムのHPLCを用いて2種の溶離液A：0.1% TFA，B：0.1% TFA（95%アセトニトリル）で，B液20～62%の30分間直線グラジェントにより220nm波長でモニタリングしながら流速1.0ml/minで試みた．なお，この合成ペプチドはserin，glycin含量が多い特異なCa結合部位とされ，骨格筋，心筋，脳に存在するジストロフィンを特徴づけているペプチド部分であるので，その特異性を利用し，この合成peptideに個有なモノクローナル抗体を作製して，Western blotting法により，中枢神経症状，心筋障害を早期に前景とする本症患者や保因者の診断や病態の解明に資する予定である．

(3) 結果と考察： Chamberlainら[5]のDMD遺伝子のE領域のprimer-1の構造はAAACATG-GAACATCCTTGTGGGGAC，primer-2のそれはCATTCCTATTAGATCTGTCGCCCTACで，増幅されるべきEのDNAのサイズは547bp（Aは360bp，Bは416bp，Dは268bp）である．このprimer[1)2)]を用いてDNA増幅を行ったところ，正常女子2例（図1のレーン1，2）男子4例（図

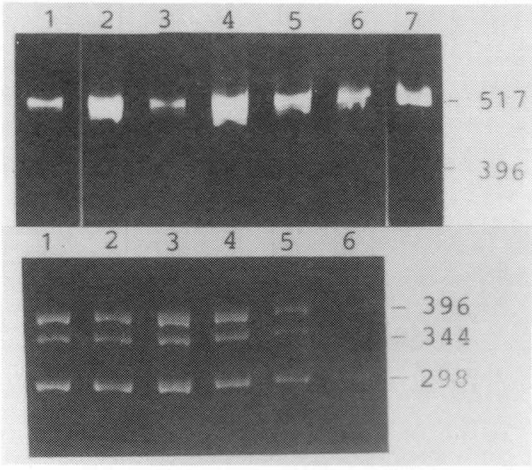


図1　DNA amplification of lymphocytes DNA from healthy males and females.

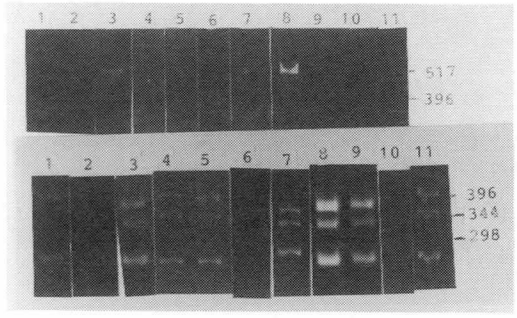


図3　DNA amplification of lymphocytes DNA from subjects of limb girdle type disease.

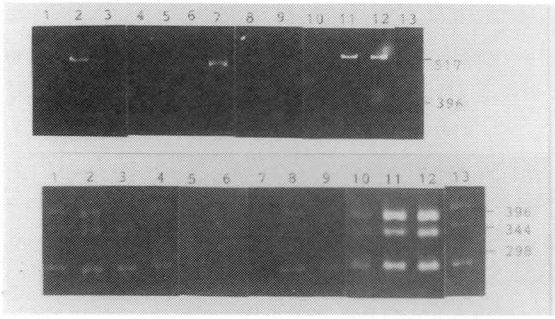


図2　DNA amplification of lymphocytes DNA from subjects of DMD.

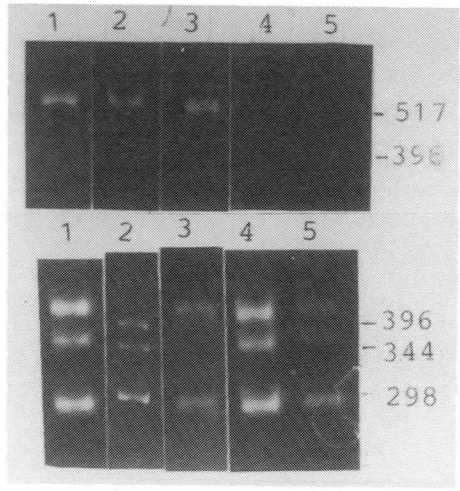


図4　DNA amplification of lymphocytes DNA from subjects of Fukuyama type disease.

1のレーン3～6）でE領域のDNA合成が確認された．また性差によるバンドの濃さには差は見られなかった．C，FのDNA領域については今回は正常に対しても増幅の至適条件が得られなかった．ついで，DMD13例について同条件下に遺伝子増幅を行い図2に示した．レーン3～6，8～10及び13の8例にEに相当する遺伝子領域が増幅されなかった．この結果，高率にその領域の欠失があると考えられた．また，L-G型11例についての検出結果（図3）ではprimer Eに関してはレーン2，4，6，9の4例に欠失が存在することになるがL-Gと筋ジス診断の基準に基づいて診断された例にBMDとの鑑別が困難なものが含まれるものと予想された．次に，福山型（FCMD）と診断された5例の場合（図4），E領域についてレーン4，5の2例の写真のバンドが不明であったが，ネガにはバンドの存在が認められ，欠失が観察されなかった．しかしFCMDにおいても生検筋ジストロフィンに陽性線維と欠損線維が混在するとの報告もあり，筋病理像がDMDに近似する症例があるので，その鑑別が臨床的に困難となる場合があろう．そこで，他のprimerによる異なる遺伝子領域での同様の確認も併せて慎重に検討する必要がある．

さらに，本研究の経過において，primerのアニーリング，55℃，45sec及び210sec（extension

times) 条件下では DNA は増幅されなかった．そこで，種々の検討の結果，primer A, B, D に関しては，反応条件を，変性95°C，45sec，アニーリング 65°C，1 min，合成 72°C，2 min＋45sec.とし，また，primer Eの場合はそれぞれ93°C，2 min；56°C，2 min；70°C，3 min として増幅に適した条件が得られた。

全般的考察としてはジストロフィンの遺伝子領域A，B，Dに関しては対照と DMD, L-G の間で差異は見られなかったが，領域Eに関して DMD, L-G の症例に欠失が確認され，領域Eは前者の診断に有用と判断された．しかし，L-G 例における領域Eの欠失については他の領域の primer や，酵素を併用した primer などを用いて検討し，その結果も診断の基準とすることが必要であると思われる．

ま と め

Kunkel ら[2] が分離したジストロフィン遺伝子の exon 部分の primer を用いて，遺伝子増幅法で本症患患児ならびに患者の病因遺伝子の欠損を調べたところ，DMD の61%にこの遺伝子の部分的な欠失が観察された．

文 献

1) Koenig M, et al: Cell **50**: 509, 1987.
2) Hoffman E P and Kunkel L M: Neuron **2**: 1019,1989.
3) Arahata K, et al: Nature **333**: 861, 1988.
4) Kuby SA, et al: Biochemistry of Metabolic Processes (ed by Lennon DLF, et al) Enzyme Catalysis, 1983, pp303—322.
5) Chamberlain JS, et al: Nucleic Acids Res. **16**: 11141, 1988.
6) Innis MA, et al: Proc Natl Acad Sci USA **85**: 9436, 1988.

20）筋ジストロフィー家系における分子遺伝学的検討

斎　藤　加代子*

研究協力者　池　谷　紀代子***　山　内　あけみ*　原　田　隆　代*
小　澤　鍈二郎**　福　山　幸　夫*

筋ジストロフィーの遺伝子異常と遺伝子産物の異常の関連を調べ，本症の病因・病態を解明することを目的として，本年度はDuchenne型(DMD)およびBecker型筋ジストロフィー（BMD）を対象として，遺伝子解析[1]と抗ジストロフィン抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った．さらに1例ではpolymerase chain reaction（PCR）法を用いて，欠失を有する遺伝子から転写された筋組織のmRNAの構造を解析した[2]．

対象と方法

遺伝子解析の対象はDMD26家系に属する患者28例と，BMD 4家系に属する患者4例である．患者リンパ球からの高分子DNAをDMDのcDNAプローブを用いて，Southern blotting-hybridizationにて解析した．

遺伝子解析により，遺伝子欠失を証明し得た例で，生検筋の免疫組織化学的検討をあわせて行った例はDMD 3例とBMD 2例である．抗ジストロフィン抗体は00；cDNAマップのアミノ酸11-60，02；215-264，04[3]；440-489，23[4]；2360—2409，34；3495—3544の合成ペプチドに対する抗体であり，これを用いて筋生検組織の蛍光抗体法を行った．またimmunoblottingも行った．用いたcDNAプローブ，抗体の位置関係を図1に示す．

exon10-37の遺伝子欠失を有する1例では，筋生検組織からRNAを調製した．exon 9とexon 38の一部のsequenceからそれぞれsence primer

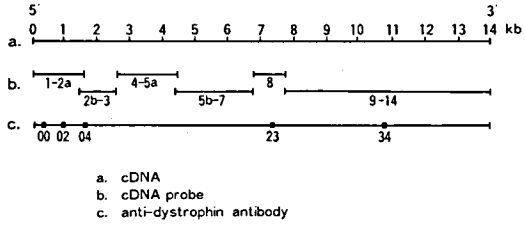


図1　使用したcDNAプローブと抗体の位置

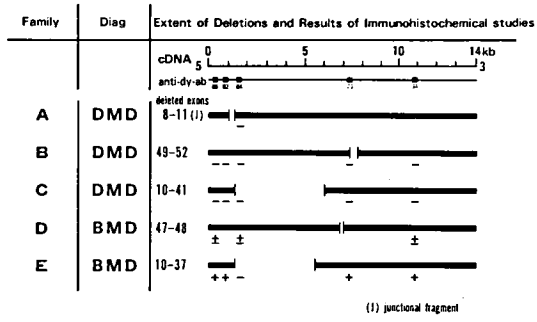


図2　DMDのcDNAプローブを用いて判定した遺伝子欠失領域．DMD，BMD，out-of-frame，in-frameに分けて図示した．A，B，C，D，Eは生検筋の免疫組織化学的検討もあわせて行い得た症例である．

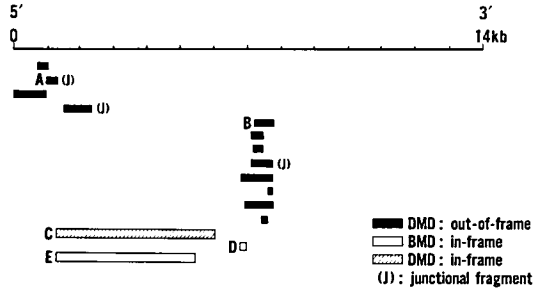


図3　遺伝子欠失を有する症例で生検筋の免疫組織化学的検討を行い得た5症例の結果

＊東京女子医科大学小児科
＊＊国立精神・神経センター神経研究所機能研究部

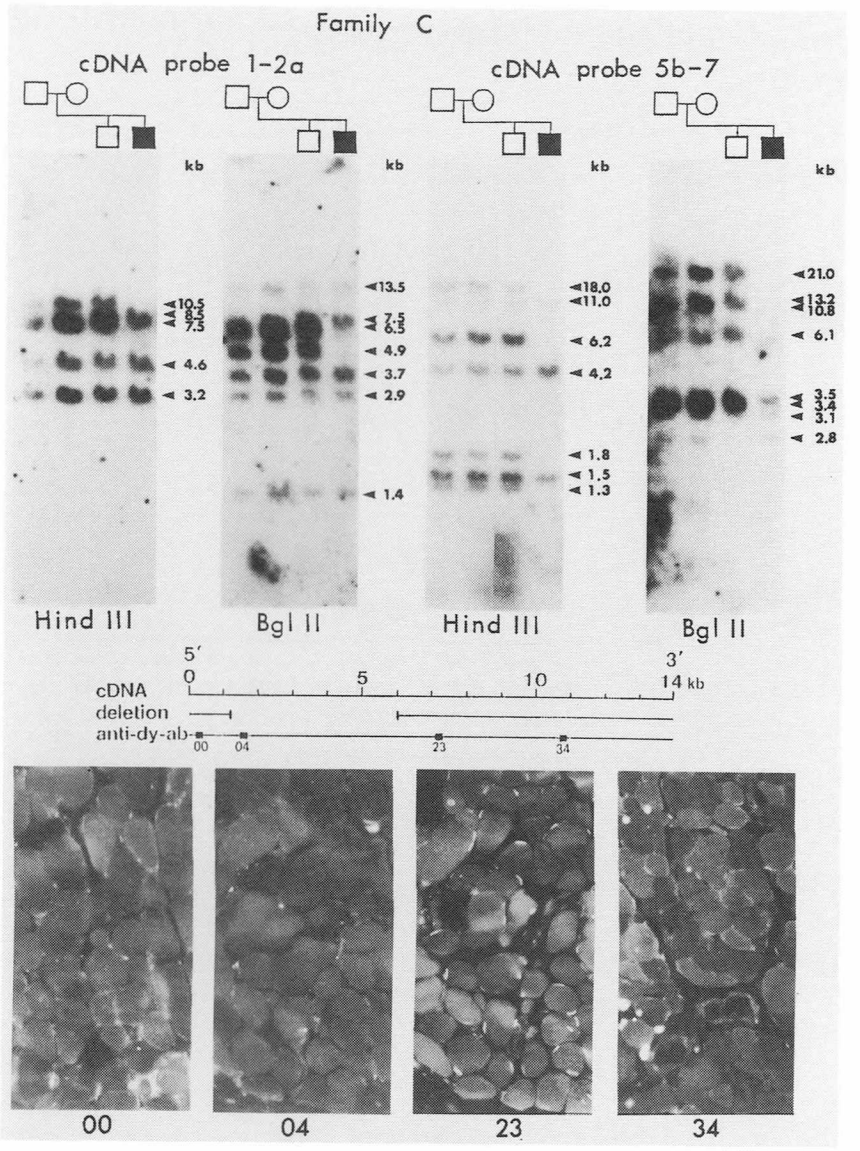


図4　家系Cの家族構成員のDNAの制限酵素切断断片のパターン（上段）とその遺伝子欠失領域（中段）および患児の生検筋の抗ジストロフィン抗体（00, 04, 23, 34）による免疫組織染色像（下段）．制限酵素はHind III, Bgl IIを用い，cDNAプローブ1—2aで遺伝子欠失の5′端を調べ，5b—7で3′端を調べた．それらの間に相当するプローブ2b—3, 4—5aでは患児で全くバンドが認められなかった．

(E9) と anti-sence primer (AE38) として合成 oligonucleotide primer を作製し，患者筋組織由来の RNA を PCR にて増幅し，PCR 産物を M13 mp19ベクターにてサブクローニングしてその塩基配列をしらべた[2]．

結　　果

(1) 患者における遺伝子欠失

患者の遺伝子欠失は，DMD 14家系16例と BMD 2家系2例で認めた．各々の欠失領域を図2に示す．Koenig ら[5]のエクソン—イントロン境界の検

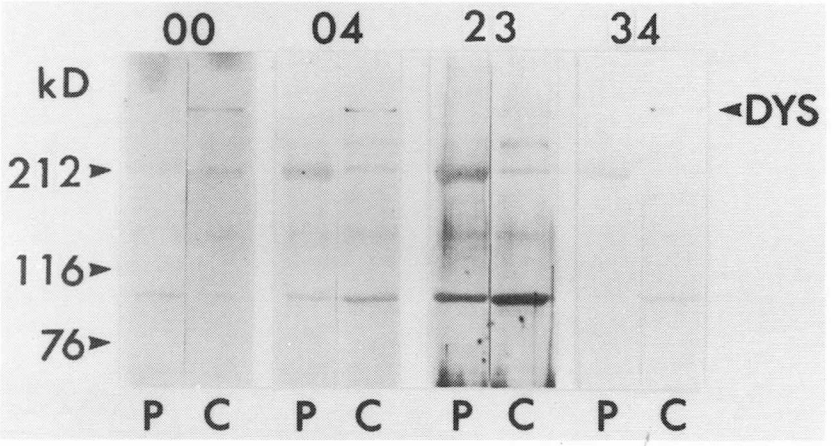


図5　家系Cの患児の生検筋の immunoblotting
C：正常
P：患児
抗体は00，04，23，34を用いた．DYS はジストロフィン（分子量400kD）を示す．左側の数値は分子量マーカー（単位 kD）

討に従ってこれらの症例をみると，DMD のうち1例で in-frame の欠失を示した以外は DMD 13家系が out-of-frame の欠失であり，BMD の2例が in-frame の欠失であり，reading frame theory に合致していた．

(2) 遺伝子欠失例における生検筋の免疫組織化学的検討

遺伝子欠失を有し，筋生検組織におけるジストロフィンの検討を行った例は DMD 3例と BMD 2例である．これらの症例の遺伝子欠失領域と，免疫組織化学の結果をあわせて**図3**に示した．各抗ジストロフィン抗体の位置の下にその反応を＋，－で示している．DMD と臨床診断した症例A，B，Cでは，いずれの抗体でも螢光抗体法の結果は陰性であり，immunoblotting でも400kD のジストロフィンの分子量に相当するバンドはみられなかった．BMD と臨床診断した2例では，症例Dでは抗ジストロフィン抗体に対する反応はうすく陽性であった．症例Eは，以下に述べるような特異な結果を示した．以上のうち，症例CとEについて示す．

症例C（**図4**）は，遺伝子欠失は exon 10-41である．欠失は in-frame であり，reading frame theory に合致していない症例である．生検筋の蛍光抗体では，欠失の上流，下流，欠失内のいずれの部位に対する抗体によっても筋細胞膜にジストロフィンは陰性であった．Immunoblotting の結果，コントロールにみられる400kD のジストロフィンのバンドは，いずれの抗体によっても，患者では証明されなかった（**図5**）．従って本症例は in-frame の欠失を示す DMD であり，reading frame theory の例外例であった．

症例E（**図6**）は，欠失は exon 10-37であった．exon 9-10の境界，exon 37-38の境界は triplet codon の境界となっており，in-frame の欠失であった．臨床的には本症例の年齢は6歳であり，DMD か BMD かの臨床診断の確定は困難であるが，同年齢の DMD より良性の経過をとっており，現時点では，BMD と診断している．蛍光抗体法では，抗体04以外の4種の抗体，すなわち欠失の上流と下流に対する抗体では筋細胞膜にジストロフィンの蛍光を示したが，欠失領域内（抗体04）では筋細胞膜に蛍光は全くみられなかった．Immunoblotting でも抗体00，23，34では，260kD のバンドが認められるが，抗体04では，260kD のバンドがみとめられず（**図7**），この領域の遺伝子欠

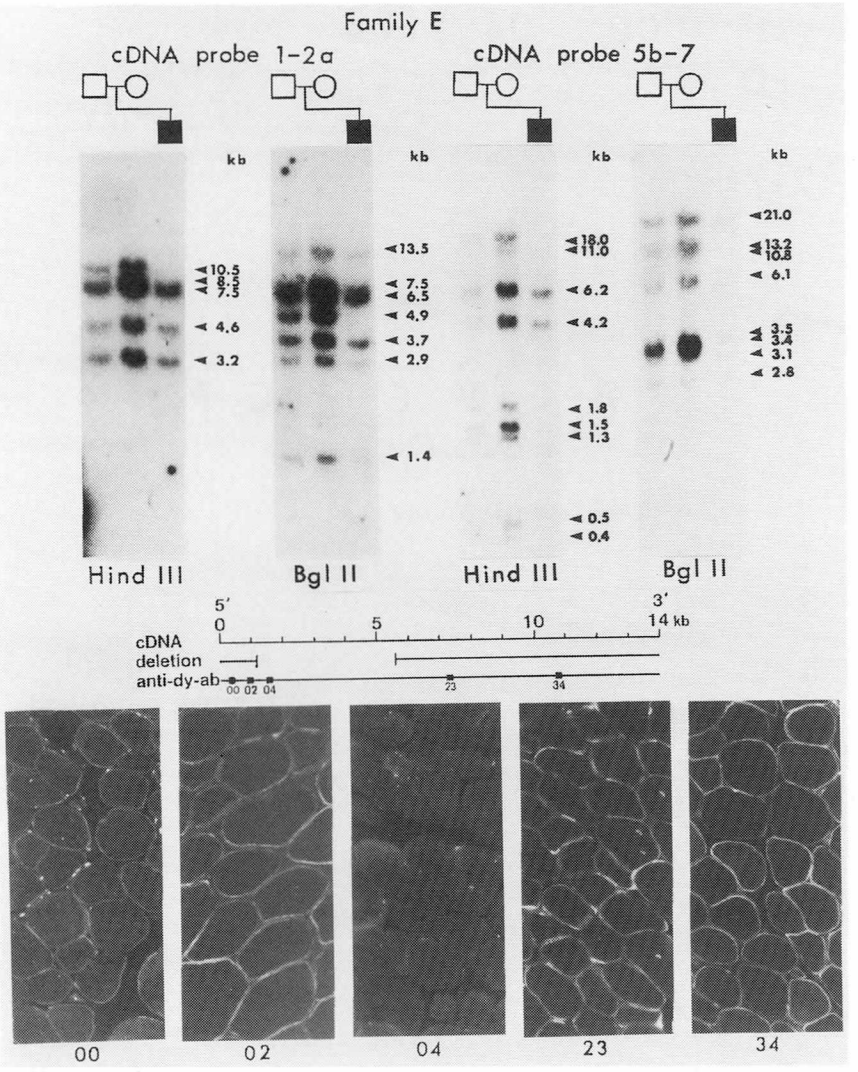


図6　家系Eの家族構成員のDNAの制限酵素切断断片のパターン（上段）とその遺伝子欠失領域（中段）および患児の生検筋の抗ジストロフィン抗体（00, 02, 04, 23, 34）による免疫組織染色像（下段）.

失のため，コードするジストロフィンの一部が合成されておらず，分子量260kDの変異ジストロフィンとなっていることが示唆された.

(3)　生検筋組織のmRNAの検討[2)]

症例Eに関して，欠失を有する遺伝子から転写されたmRNAの構造の解析を試みた．生検筋から調製したtotal RNAをexon 9およびexon 38の一部の配列から合成したE9, AE38をprimerとしてPCRで増幅し，約200bpのPCR産物を得た．このPCR産物をサブクローニングして，塩基配列を調べたところ，塩基番号1168番のGが5534番のGに直接つながっている，すなわち，exon 9のC末端とexon 38のN末端が本来のスプライシングをうける部位でつながっていることが証明できた(図8)．従ってこの遺伝子欠失により，exon 10-37に相当して転写されておらず，open reading

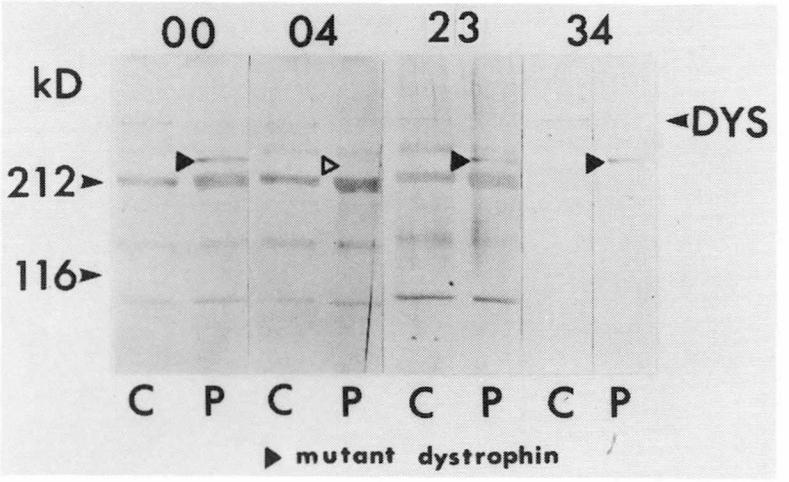


図7　家系Eの患児の生検筋の immunoblotting
C：正常，P：患児
抗体は00，04，23，34を用いた．DYS はジストロフィン（分子量400kD）を示す．
▶は分子量260kD の変異ジストロフィン
▷には260kD に相当するバンドが認められない．

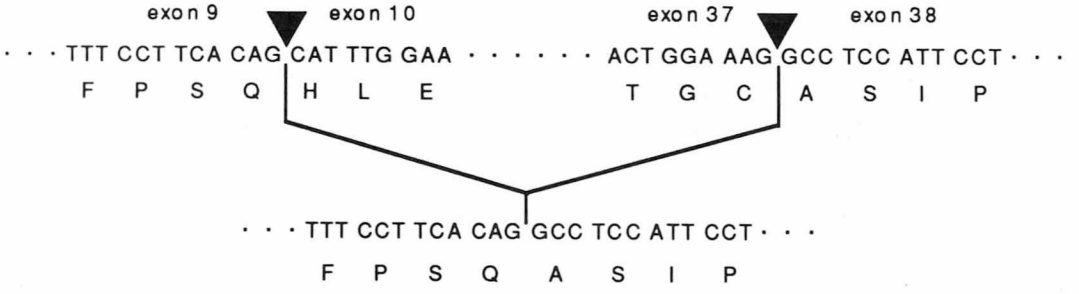


図8　症例Eの生検筋組織由来の PCR 産物の構造
上段は正常のジストロフィンの cDNA の構造（塩基配列とアミノ酸配列）．
▼ではさまれた領域（exon 10—37）が欠失し，下段のような構造になっている．

frame を保持していることを塩基レベルでも証明できた．

考　　察

DMD，BMD の臨床症状と遺伝子欠失の関係について Kunkel たちのグループ[5] は translation において open reading frame が保持されている場合(in-frame の欠失)，BMD として臨床的に軽症でありジストロフィンが不完全であるが合成されていることを，そして open reading frame が保たれていない場合（out-of-frame の欠失）は，DMD として重症な臨床症状を示し，ジストロフィンが合成されないことを述べている（reading frame 仮説）．我々の検討では，16例中 DMD の1例（症例C）で reading frame 仮説に合致していなかった以外は仮説を支持する結果であった．この例外である in-frame 欠失を示した DMD 例では筋組織の抗ジストロフィン抗体による蛍光抗体，immunoblotting の結果ではともにジストロフィンが証明されなかった．現在のところ，この理由

は不明である．

また，我々は症例Eにおいて，PCR法を用いて遺伝子欠失領域を転写レベルでも検討し得た．さらに，この症例は，Englandら[6]の述べた症例と同様に欠失領域に相当した抗体ではジストロフィン陰性，欠失以外の領域では陽性という特異な蛍光抗体，immunoblottingの結果を呈し，分子量260kDの変異ジストロフィンを有する症例であった．ジストロフィンの分子構造からみると，中央のスペクトリン様三重らせん構造ドメインがアミノ酸としては，1456個（ヌクレオタイドとして4366個）短くなっている構造をとっていることがわかった．本症例は同年齢のDMDよりは軽症であるが少なくともEnglandらの報告例より臨床的に症状は重い．この点からも，この変異ジストロフィンが本来のジストロフィンとしての機能をどの程度有しているか，今後の検討が必要である．

文　献

1) 斎藤加代子：ジストロフィン遺伝子解析とその応用．細胞．23：43—50，1991．
2) Ikeya K, Saito K, Hayashi K, et al: Molecular genetic and immunohistochemical analysis of dystrophin of a young patient with X-linked muscular dystrophy. 投稿中
3) Arahata K, Ishiura S, et al: Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. Nature 333: 861—863, 1988.
4) Shimizu T, Matsumura K, et al: A monoclonal antibody against a synthetic polypeptide fragment of dystrophin (amino acid sequence from position 215 to 264). Proc Jpn Acad 64B: 205—208, 1988.
5) Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al: The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. Am J Hum Genet 45: 498—506, 1989.
6) England SB, Nicholson LVB, Johnson MA, et al: Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. Nature 343: 180—182, 1990.

Ⅴ．ミトコンドリア脳筋症(1)

21）ミトコンドリアDNA配列からみたヒト上科の分子進化

宝来　聰*

研究協力者　早坂謙二*　颯田葉子*　近藤るみ*
林　誠司*　村山久美子*　服部優子*
石田貴文**　井上　正***

はじめに

種間で相同遺伝子の配列を比較することは，種の系統関係を明らかにするのみでなく，進化の過程で起こった変異を定量することにより，各遺伝子あるいは塩基配列上における機能的制約の程度を類推することができる．ミトコンドリアDNAは，核DNAに比べて塩基置換速度が5倍から10倍高いことにより[1]，近縁種間の比較や種内変異の分析に有効である．霊長類におけるミトコンドリアDNAの塩基配列の比較による分子進化の研究は，Brownら[2]およびHayasakaら[3]によるものがあるが，比較した配列は，約900塩基対であった．とくに，ヒト，チンパンジー，ゴリラの属するヒト上科においては，3種の分岐に関して決定的な系統関係は確立していない．我々はヒトに最も近縁な種は何か明らかにするため，ミトコンドリアDNAの4.9Kbの相同領域の塩基配列を，ヒト上科の4種・チンパンジー，ピグミーチンパンジー，ゴリラ，オランウータンにおいて決定した．この領域には，11個のtRNA遺伝子，6個のタンパク質遺伝子(ND1, D2, COI, COII, ATPase 8, ATPase 6）が含まれている（図1）．

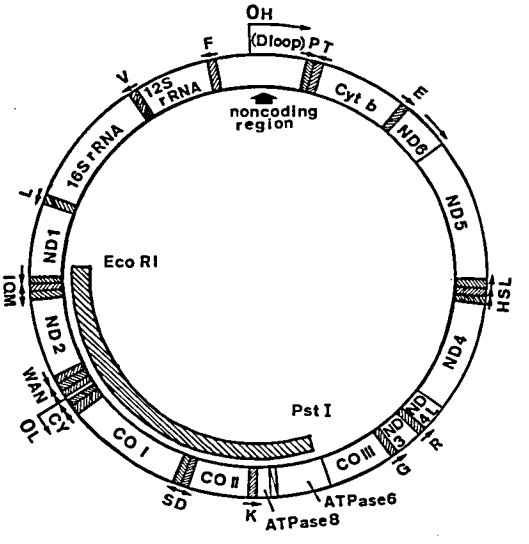


図1　ヒト・ミトコンドリアDNAの模式図とヒト上科4種で塩基配列を決定した領域（斜線のバー）を示す．

材料および方法

チンパンジーおよびオランウータンより確立したBセルラインを大量培養し，ミトコンドリア画分を分離し，ミトコンドリアDNAを抽出した．ピグミーチンパンジーおよびゴリラは全DNAよりPCR法によりミトコンドリアDNA断片を増幅した．塩基配列を決定した相同領域は，ヒトのEcoRIサイト（bp 4121）からPstIサイト（bp 9020）までで，ヒト上科の4種でもこれらのサイトが保存されていた．このEcoRI-PstI断片をさらに別の制限酵素で切断し，pBluescriptにクロ

＊国立遺伝学研究所
＊＊東京大学理学部
＊＊＊日本大学農獣医学部

ーニングし，4種で4.9Kbをカバーするクローンを得た．各クローンの挿入部位をさらにHaeIIIあるいはAluIで切断し，M13にサブクローニングし，ダイデオキシ法により各クローンの塩基配列を決定した．さらに，各クローンのオーバーラップする領域の配列を結合し，4種に関して4.9Kbの塩基配列を完成した．

結　　果

既に，全塩基配列が決定されているヒトの配列[4]と合わせて整列し，各種間において，塩基置換数を算出し，さらに塩基置換の特徴を検討した．表1に示すように各種間における塩基配列の相同性は，チンパンジー・ピグミーチンパンジー間で96%，ヒトと2種のチンパンジー間で91～92%，ヒトとゴリラ間で89%，ゴリラと2種のチンパンジー間で89～90%，オランウータンと他の4種間では約85%であった．また，全塩基置換に占めるトランジッション型置換の割合を種間で定量したところ，2種のチンパンジー間で，94%，ヒトと2種のチンパンジー間では95%，ゴリラとヒトおよび2種のチンパンジー間では88～89%，オランウータンと上記4種の間では約82%の値が得られた．このことは系統関係が遠くなるに従って，塩基置換においてトランスバージョン型置換の割合が増加することを示している．種間の塩基置換数に基づいて，2種類の系統樹作成法（UPGMAおよびNJ）を用いてミトコンドリアDNAの分子系統樹を構築した（図2）．両方法とも全く同じトポロジーが得られ，まず，チンパンジーとピグミーチンパンジーがクラスターし，ついで，ヒト，ゴリラ，オランウータンの順でクラスターする系統関係が得られた．また系統樹上の各分岐点における標準誤差は重なり合わないことより，ヒトに一番近縁な種は，チンパンジーであることが統計学的に有意の差をもって結論することができた．これは，比較する塩基配列の長さが，従来の研究の5倍以上であり，各分岐点における標準誤差は比較する塩基数が多いほど，減少するからである．

さらに，6個のミトコンドリアタンパク質のアミノ酸配列を5種間で比較した結果を表2に示し

表1　Percent similarity of nucleotide sequence (above the diagonal) and propotion of transition (below the diagonal) between species (whole positions)

	Species Compared				
Species Compared	C-chimp.	P-chimp.	Hum.	Gor.	Ora.
C-chimpanzee	—	96.7	91.6	89.8	85.0
P-chimpanzee	93.9	—	91.8	90.1	84.9
Human	95.4	95.3	—	88.9	84.8
Gorilla	88.2	87.9	89.3	—	84.6
Orangutan	81.8	82.2	82.1	81.3	—

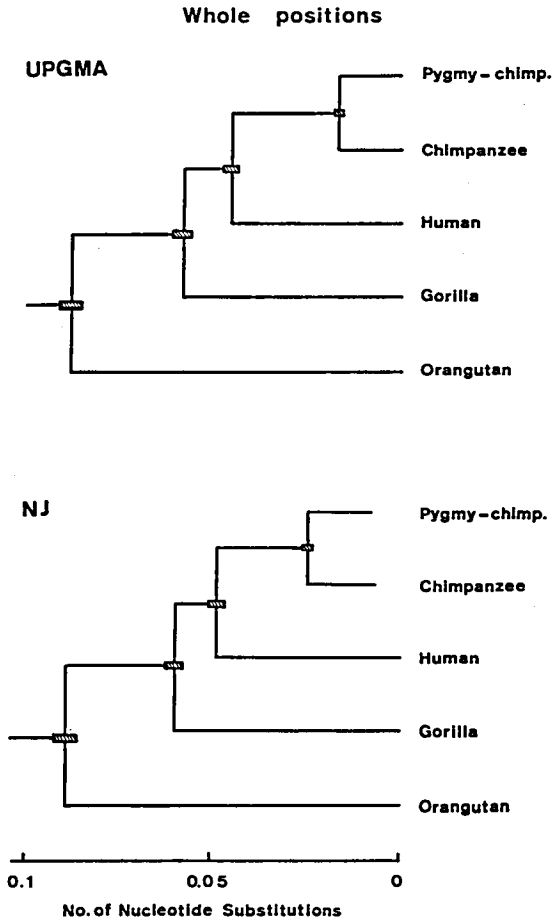


図2　各種間の塩基置換数に基づいて構築した遺伝子系統樹．UPGMA（平均距離法）およびNJ（近隣接合法）の2種類の系統樹作成法を用いた．各分岐点の標準誤差を斜線のバーで示した．

表 2　Percent homology of amino-acid sequences in 6 proteins

species compared	ND1	ND2	COI	COII	ATPase 8	ATPase 6
P-C	93.5	97.1	99.6	100.0	96.2	96.7
H-P	87.0	95.7	98.8	97.8	94.3	94.7
H-C	93.4	96.3	98.8	97.8	94.3	94.0
H-G	95.7	93.4	98.1	96.5	88.7	92.0
C-G	97.8	93.4	98.2	97.8	83.0	90.7
P-G	91.3	93.7	97.9	97.8	83.0	91.3
G-O	87.0	83.3	96.1	97.4	62.3	81.3
H-O	87.0	83.9	95.7	94.7	64.2	84.0
C-O	84.8	83.6	95.3	96.0	62.3	84.0
P-O	82.6	84.1	94.9	96.0	64.2	87.3

C: Chimpanzee, P: Pygmy-chimpanzee, H: Human, G: Gorilla, O: Orangutan

表 3　Synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions in protein genes (orangutan vs hominines)

Synonymous (percent)

	ND1	ND2	COI	COII	ATPase 8	ATPase 6
H-O	24.1	47.1	53.4	51.1	34.1	50.6
C-O	37.5	42.3	52.3	53.9	38.8	52.0
P-O	37.5	42.4	55.5	50.3	37.2	54.8
G-O	43.7	42.6	57.6	52.0	35.2	49.9

Nonsynonymous (percent)

	ND1	ND2	COI	COII	ATPase 8	ATPase 6
H-O	6.7	8.7	2.2	2.5	20.7	9.1
C-O	8.1	8.7	2.4	1.9	21.6	8.5
P-O	9.1	8.4	2.6	1.9	21.3	6.7
G-O	7.2	9.1	1.9	1.2	22.8	9.5

た．各タンパク質は種間のアミノ酸配列の相同性の程度によって3つのグループ分類された．第1のグループは種間でアミノ酸配列がよく保存されているもので，COI と COII がこれに含まれる．第2のグループはアミノ酸置換のよく起こっている ATPase 8である．第3のグループは前2グループの中間型となるもので，ND1，ND2および ATPase 6が含まれる．このことは，各々のミトコンドリアタンパク質において機能上の制約の程度がかなり異なることを示唆している．このような各タンパク質におけるアミノ酸配列の相同性の差異が，塩基配列ではどのように反映されているかを明らかにするため，各タンパク質遺伝子で同義塩基置換と非同義塩基置換の割合を比較した．ヒト，チンパンジー，ピグミーチンパンジーおよびゴリラを系統的に遠いオランウータンと比較したところ，表3に示すように COI および CO II では50%以上が同義置換であるのに対し，非同義置換は1～3%と低く抑えられていることが明かとなった．一方，ATPase 8では，同義置換の割合が34～39%であるのに対し，非同義置換は21～23%と高い割合を示した．また，NDI および ND2では，同義置換が24～47%であるのに対し，非同義置換は7～9%の間にあった．さらに，ATPase 6では同義置換の割合は50～55%であるのに対し，非同義置換は7～10%であった．このようにミトコンドリア DNA にコードされる各タンパク質遺伝子の間で塩基置換の様相をきわめて異にすることが明かとなった．これは，従来の分子進化学の研究における新しい知見であり，一見，全体の塩基置換の総数を一定化するような，同義置換および非同義置換の均衡機構が存在するかのようである．本研究で決定した4.9kb の配列の比較から，オランウータンと他の4種の分岐を1300万年と推定し，それぞれの種の分岐時間を求めたところ，ゴリラが約630万年前に分岐し，続いてヒトが約410万年前，最後にチンパンジーとピグミーチンパンジーが約180万年前に分岐したという結果が得られた．

文　献

1) Brown WM, George JrM and Wilson AC: Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA 76: 1967—1971, 1979.

2) Brown WM, Prager EM, Wang A and Wilson AC: Mitochondrial DNA sequences of primates: Temps and mode of Evolution. J Mol Evol 18: 225—239, 1982.

3) Hayasaka K, Gojobori T and Horai S: Molecular phylogeny and evolution of primate mitochondrial DNA. Mol Biol Evol 5(6): 626—644, 1988.

4) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruiji 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.

22) MELASにおけるミトコンドリアtRNA^{Leu}(UUR)変異

小 澤 高 将*

研究協力者　田 中 雅 嗣*　井 野 秀 一*
大 野 欽 司*　池 辺 紳一郎*

はじめに

ミトコンドリア脳筋症は多様な疾患単位から構成されている．Kearns-Sayre症候群およびMERRF症候群においては前者では大きな欠失[1)~3)]，後者ではtRNA^{Lys}の点変異[4)5)]，とそれぞれのミトコンドリア遺伝子変異が明らかにされているが，もう一つの代表的疾患単位であるMELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) 症候群ではその遺伝子変異は確定していない．MELAS症候群は低身長，嘔吐，半盲・皮質盲などの視覚異常を伴った脳卒中様発作を主症状とし，これらに加えて高乳酸血症，発作に伴ったCT上での低吸収域の出現，生検骨格筋の組織化学におけるミトコンドリアの異常所見により診断される[6)]．また本疾患は心筋症を伴うことが多く[7)]，心不全は代謝性アシドーシスとともにその死因として重要である．近年，MELAS症候群においてミトコンドリア電子伝達系酵素複合体I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) の欠損が報告された[8)9)]．ウエスタンブロット[10)]およびEPR (electron paramagnetic resonance) [11)]スペクトルによる分析から，複合体Iの分子構築が障害されていることが示された．今回我々は，放射性物質を使用せず螢光法による全自動DNA解析装置を用い，安全でかつ短期間にミトコンドリアDNA (mtDNA) 全塩基配列を決定する方法を確立し，MELAS症候群の病因を解明した．

*名古屋大学医学部第2生化学

症　例

患者1：18歳女性．頭痛，嘔吐を主訴とし入院．CTで頭頂後頭葉に低吸収域を認めた．低身長，知能低下，痙攣発作，筋力低下，繰り返す嘔吐，片麻痺，半盲，乳酸アシドーシスを呈し，糖尿病，および肥大型心筋症を伴っていた．20歳で心不全のため死亡した．

患者2：13歳男性．低身長，知能低下，痙攣発作，筋力低下，繰り返す嘔吐，片麻痺，皮質盲，乳酸アシドーシスを呈し，肥大型心筋症を伴っていた．15歳で突然死した．

両症例ともに筋生検でragged-red fibersを認めた．家族歴はともに認められなかった．また骨格筋より単離したミトコンドリアのNADH-ubiquinone oxidoreductase活性はともに低下していた．

方　法

プライマー作製　約300塩基対の間隔でmtDNAのL鎖，H鎖それぞれに特異的な配列をもつ20merのプライマー（Lプライマー，Hプライマー）を各60種ずつ作製した．プライマーはアプライドバイオシステムズ社の390B型BNA合成装置で作製し，同社のオリゴヌクレオチド精製カートリッジを用いて精製した．我々は次のようなプライマーの命名法を用いている．L(n)プライマーは塩基番号10n+1から10n+20までのL鎖の塩基配列をもつ20merのプライマーをさす．H(n)プライマーは塩基番号10n+20から10n+1までのH鎖の塩基配列をもつ20merのプライマーをさす．さらに各Lプライマーの5'端側にM13

mp18のユニバーサル配列（5'-TGTAAAAC-GACGGCCAGT-3'）をつけた38merのプライマーを60種作製し，FL(n)プライマーとした．

一次増幅　患者1の骨格筋，患者2の心筋組織からtotal DNAを抽出した．以下のプライマー対を用いmtDNA全長をカバーするように10のフラグメントに分けpolymerase chain reaction (PCR)法にて増幅した．L1641-H136, L61-H339, L231-H454, L372-H559, L488-H702, L680-H929, L853-H1338, L1250-H1534, L1482-H1619, L1594-H60.

二次増幅　FLプライマーおよびHプライマーを1：100の比で加え，asymmetric PCR法により60種の一本鎖DNAを増幅した(図1)．それぞれのプライマー対の間隔は約500ないし800塩基対とした．

螢光色素シークエンス反応　調製した一本鎖DNAを鋳型として，M13mp18のユニバーサル配列に螢光色素で標識した螢光プライマーを用いてシークエンス反応を行なった．90°C，2分間加熱変性後，6％のアクリルアミドゲルで10時間泳動し，アプライドバイオシステムズ社自動DNA解析装置によりmtDNAの全塩基配列を決定した．またコントロールとして正常ヒト組織より抽出したmtDNAを用いた．

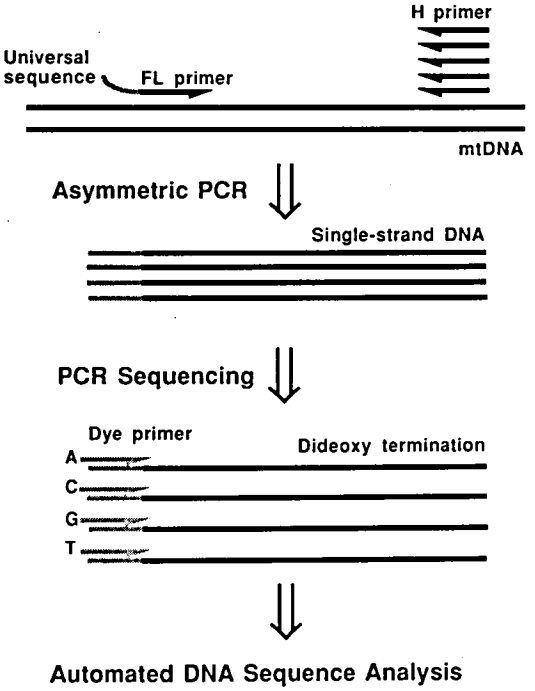


図1　Schema for fluorescence-based direct sequencing

結　　果

翻訳領域において患者1，2共通にアミノ酸置換をもたらさない10個の変異が見られたが，これらの変異はいずれもコントロールにも認められた．さらに患者1に4個，患者2に7個のそれぞれに特異的な変異が見られた．またアミノ酸残基の置換をもたらす変異として，10個の共通な変異が見られ，そのうちの一つはヒト[12]，ウシ[13]，ラット[14]，マウス[15]で保存されているものであったが，コントロールにも認められた．さらに患者1でNDI領域に，また患者2でND4領域に，上記哺乳類で保存されているアミノ酸残基の置換をもたらす変異を認めた．非翻訳領域では，2症例に共通してmtDNAの塩基番号3243番$tRNA^{Leu}$(UUR)遺伝子のdihydrouridine (DHU) ループにA→G塩基転位型突然変異が見いだされた（図2，3）．この変異は他の2例のMELAS患者においても検出されたが，7例の正常者およびMERRF 1例とCPEO 2例のmtDNAの塩基配

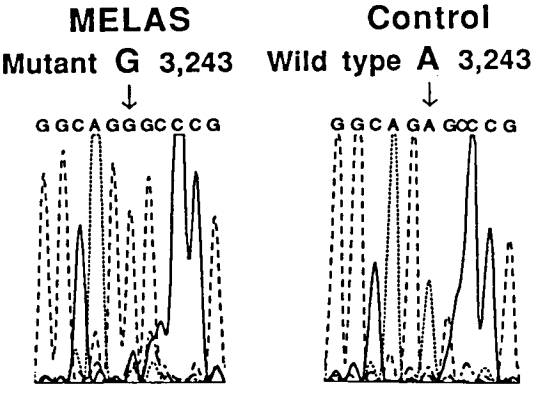


図2　Detection of A to G transition mutation at nucleotide 3243 in the $tRNA^{Leu}$(UUR) gene by fluorescent based direct sequencing

列の分析ではこの変異は認められなかった．

考　　察

我々は複合体Ⅰ欠損の原因としてND領域の変異を推定し，MELAS 2症例の全塩基配列を決定した[16]．しかしこの2症例に共通して認められ，かつコントロールに見られなかった変異はtRNA^{Leu} (UUR) のA→G塩基転位型変異のみであった．このA塩基はヒト，ウシ，マウス，ラットの他，ニワトリ，カエル，ウニ，およびショウジョウバエまで保存されており（表1），このA塩基のG塩基への転位がtRNA^{Leu} (UUR) の機能に大きく影響を及ぼすことが考えられた．

この変異により制限酵素 *Apal* の認識部位を形成し，この制限酵素での切断により変異tRNA^{Leu} (UUR) はヘテロプラスミーの状態で存在することがわかった．現在，組織間および家系における変異DNAの占める割合の違い，また変異DNAの占める割合と酵素活性との関連につき検討中である．

また，患者2のtRNA^{Ala}のTΨCループにA→G塩基転位があり，このA塩基は哺乳類で保存されていた．MELAS症候群にこの変異をもつサブグループがあるのか今後の検索が必要であろう．Tanakaらは小児発症の重症心筋症の1例でtRNA^{Ile}のTΨCループのA→G塩基転位を報告しており，この変異も哺乳類で保存されていた[17]．tRNA^{Leu}に変異のある[18] MELAS 2症例でも心筋症をともなっていたことから，tRNA遺伝子上の種間保存の高い塩基の置換による変異が心筋症の発症と関わっている可能性が示された．

一方，この2症例でそれぞれに特異的で，かつ種間保存の高いアミノ酸の置換をもたらす変異がND領域に認められた．しかし，今回我々のコントロール2例ではこのような変異は一つも認めなか

Mitochondrial tRNA^{Leu} (UUR)

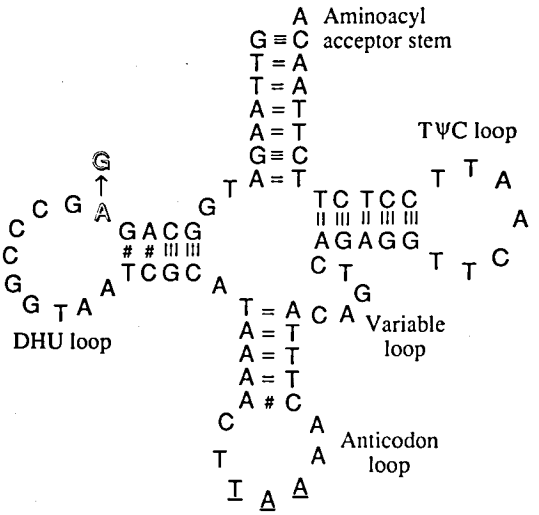


図3　Proposed tRNA^{Leu}(UUR) secondary structure showing the mutation at 3243 in the DHU loop. Bars indicate hydrogen bonds: # indicates non-standard base pairs found in tRNA. Nucleotide A (normal) and G (mutation) at position 3243 are highlighted

表1　Comparison of tRNA^{Leu}(UUR) gene DNA sequences of vaious species.
S. p. Strongylocentrotus purpuratus P.l. Paracentrotus lividus.

A to G Transition at the 5' End of DHU Loop of tRNA^{Leu} (UUR) in MELAS

MELAS	Aminoacyl stem		DHU stem	DHU loop	DHU stem		Anticodon stem	Anticodon loop	Anticodon stem	Variable loop	TΨC stem	TΨC loop	TΨC stem	Aminoacyl stem
				G										
Human	GTTAAGA	TG	GCAG	AGCCCGGTAA	TCGC	A	TAAAA	CTTAAAA	CTTTA	CAGTC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	TCTTAACA
Bovine	GTTAAGG	TG	GCAG	AGCCCGGTAA	TTGC	A	TAAAA	CTTAAAC	TTTTA	TATCC	AGAGA	TTCAAAT	CCTCT	CCTTAACA
Mouse	ATTAGGG	TG	GCAG	AGCCAGGAAA	TTGC	G	TAAGA	CTTAAAA	CCTTG	TTCCC	AAGGG	TTCAAAT	CCTCT	CCCTAATA
Rat	ATTAGGG	TG	GCAG	AGCCAAGTAA	TTGC	G	TAAGA	CTTAAAA	CCTTG	TTCCC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCCTAATA
Chicken	GCTAGCG	TG	GCAG	AGCTCGGCAA	ATGC	A	AAAGG	CTTAAGC	CCTTT	AT-CC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCCTAGCT
Xenopus	GCTAGCG	TG	GCAG	AGCCTGGCTA	ATGC	A	AAAGA	CCTAAGC	TCTTT	TTATC	AGGGG	TTCAAAT	CCCCT	CGCTAACT
Urchin (*S.p.*)	GCTAAAG	TA	GCAA	AG--TGGTTA	ATGC	A	GAAGG	CCTAAGA	CCTTC	CTATC	AAAGG	TTCAACT	CCCTT	CTTTAGCT
Urchin (*P.l.*)	ACTAAAA	TA	GCAA	AG--TGGTTA	ATGC	A	GAAGG	CCTAAGA	CCTTC	CTACA	AAGGT	TTCAACT	CCCTT	TTTTAGCT
Drosophila	TCTAATA	TG	GCAG	AT-TAGTGCA	ATGC	A	ATGGA	TATAAGC	TCCAT	-----	AAA-G	TATTATT	C-TTT	TATTAGAA

った．種間保存の高いアミノ酸の置換をもたらす変異は，MEALS 症候群の発症になんらかの関わりを持ち，置換されたアミノ酸残基の種類によっては機能的な変化をもたらす可能性があると考えられた．

本研究において，我々は適当なprimer pairを作製，調整することにより螢光法を用いた全ミトコンドリア遺伝子の塩基配列決定システムを確立した．このシステムを用いることにより一回の電気泳動の際に24種の試料を泳動でき，1試料あたり350-450塩基対を読むことができるため，3回の泳動で全長を読むことができ，数日で1症例のmtDNA の変異の解析を完了することが可能である．

ま と め

螢光色素による mtDNA 全長16,569塩基対シークエンス法を確立した．MELAS 症候群の2症例に共通してミトコンドリア $tRNA^{Leu}$ (UUR) 遺伝子に変異を認めた．さらに症例特異的に種間保存の高いアミノ酸残基の置換をともなう変異が ND 領域に見られた．

文 献

1) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S, et al: N Engl J Med **320**: 1293—1299, 1987.
2) Holt IJ, Harding AE and Morgan-Hughes JA: Nature **331**: 717—719, 1988.
3) Ozawa T, Yoneda M, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Suzuki H, Nishikimi M, Yamamoto M, Nonaka I and Horai S: Biochem Biophys Res Commum **154**: 1240—1247, 1988.
4) Shoffner JM, Lott MT Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW and Wallace DC: Cell **61** : 931—937, 1990.
5) Yoneda M, Tanno S, Horai S, Ozawa T, Miyatake T and Tsuji S: Biochem Int **27**: 789—796, 1990.
6) Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, DeVivo DC and Rowland LP: Ann Neurol **16**: 481—488, 1984.
7) Nishizawa M, Tanaka K, Shinozawa K, Kuwabara T, Atsumi T, Miyatake T and Ohama E: J Neurol Sci **78**: 189—201, 1987.
8) Tanaka M, Nishikimi M, Suzuki H, Ozawa T, Nishizawa M, Tanaka K and Miyatake T: Biochem Biophys Res Commun**140**: 88—93, 1986.
9) Ichiki T, Tanaka M, Nishikimi M, Suzuki H, Ozawa T, Kobayashi M and Wada Y: Ann Neurol **23**: 287—294, 1988.
10) Ichiki T, Tanaka M, Kobayashi M, Sugiyama N, Suzuki H, Nishikimi M, Ohnishi T, Nonaka I, Wada Y and Ozawa T: Pediatr Res **25**: 194—201, 1989.
11) Chomyn A, Mariottni P, Cleeter MWJ, Ragan CI, Doolittle RF, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y and Attardi G: "Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research, Volume II: Biogenesis" (ed by Quagliariello, Slater, Palmieri, Saccone and Kroon) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford, 1985, pp 259—275.
12) 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: Nature **290**: 457—465, 1981.
13) Anderson S, de Bruijn MHL, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F and Young IG: J Mol Biol **156**: 683—717, 1982.
14) Gadaleta G, Pepe G, De Candia G, Quagliariello C, Sbisa E and Saccone C: J Mol Evol **28**: 497—516, 1989.
15) Bibb MJ, Van Etten AV, Wright CT, Walberg MW and Clayton DA: Cell **26**: 167—180, 1981.
16) Tanaka M, Ino H, Ohno K, Ohbayashi T, Ikebe S, Sano T, Ichiki T, Kobayashi M, Wada Y and Ozawa T: Biochem Biophys Res

Commun (in press).
17) Tanaka M, Ino H, Ohno K, Hattori K, Sato W, Ozawa T, Tanaka T and Itoyama S: Lancet 336 : 1452, 1990.
18) Ino H, Tanaka M, Ohno K, Hattori K, Ikebe S, Sano T, Ozawa T, Ichiki T, Kobayashi M and Wada Y: hancet 337 : 234—235, 1991.

23）COX部分欠損を伴ったLeigh症候群の生化学的分子遺伝学的検討

清　水　輝　夫*

研究協力者　中　瀬　浩　史*　萬　年　　徹*

Leigh症候群は主に乳幼児期に見られる亜急性の脳症として知られ，病理学的に中枢神経系特に脳幹・基底核・小脳・視床・まれには脊髄などに血管増生を伴う壊死組織を認める点が病理学的な特徴とされてきた[1]．臨床的に高乳酸血症を認めることより，その病因として好気性糖代謝異常が存在すると考えられている．多くの代謝異常が報告されており，1）thiamine diphosphateからthiamine triphosphateへの転換の障害，2）pyruvate carboxylase deficiency, 3）pyruvate dehydrogenase deficiency，4）cytochrome oxidase（COX）deficiencyがあげられる[2)3)]．しかし，現在までに多数例の報告が認められるのは3）のpyruvate dehydrogenase deficiency及び4）のCOX deficiencyである．本研究では4）のCOX deficiencyに関して報告する．これらの症例の遺伝形式は通常は常染色体劣性遺伝であり，本研究のCOX deficiencyにおいても，常染色体劣性遺伝と考えられている．またArmond MirandaらはCOX deficiencyを伴うLeigh症候群のfibroblastとHela cellとのfusion cellを用いた実験に於てHela cell由来のmitochonderial DNA（mtDNA）が消失しLeigh患者由来のmtDNAのみになっているにもかかわらずCOX活性が保たれていることより，このcytochrome oxidase欠損はmtDNAの異常ではなく核DNAにコードされた因子の異常によることを示した[4]．今回Ann Lombesらとの共同研究により病理学的にLeigh症候群と確定診断されたcytochrome oxidase部分欠損症の剖検例3例について生化学的分子遺伝学的に検討しその結果を報告する．

＊東京大学医学部脳研神経内科

方　　法

症例は第一例は5歳，第二例は二歳，第三例は7ヶ月の剖検例であり，第二例・第三例では同胞に同一疾患を認める．正常対照としては神経疾患以外で死亡した7ヶ月及び3歳の剖検例を用いた．剖検組織は死後3時間以内に凍結保存したものを以下の検討には用いた．

酵素活性はcytochrome c oxidase, rotenone-sensitive NADH cytochrome c reductase, succinate cytochrome c reductase, citrate synthetase, NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase活性を既述の方法で測定した[5]．COXのMichelis定数測定のために，dithionateにより還元されたcytochrome cを2から80μM基質として用いることによりKm及びVmaxを測定した．

Western blottingには100μgのミトコンドリア蛋白を電気泳動しニトロセルロース膜に転写後COX subunit II及びVIに対する抗体で検出した．

免疫組織化学は各症例の骨格筋凍結切片を用いCOX subunit II, VI, Vab, VIbc, VIIIab, VIIIに対する抗体を用いて行った．

mtDNAの定量のために各臓器のDNAを抽出し0.8% agarose gelにおいて電気泳動後ニトロセルロース膜に転写後Southern hybridizationを行った[6]．プローブはauthentic mtDNAを抽出して用い，また核由来のDNAのマーカーとして

18S rDNA を用いて検出した．

Northern analysis には各臓器より guanidium-isothiocyanate 法により RNA を抽出後 formaldehyde をふくむ1％ agarose gel で電気泳動後 nylone membrane に転写し，hybridization を行なった．プローブは COX subunit Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅵ，Ⅴa，Ⅴb，Ⅵa，Ⅵb，Ⅵc，Ⅶa，Ⅶc，Ⅷすなわち Ⅶb を除くすべての subunit の cDNA を用いた．

結　　果

剖検された各臓器のミトコンドリア酵素活性は図1に示した succinate dehydrogenase・citrate synthetase を含め他の電子伝達系各酵素の活性が正常であるのに対し，cytochrome oxidase の活性は部分的に低下を示し，特に骨格筋・心筋において明らかな活性低下を示してた．このように本症の酵素活性の低下は中枢神経のみならず全身に及ぶものである．

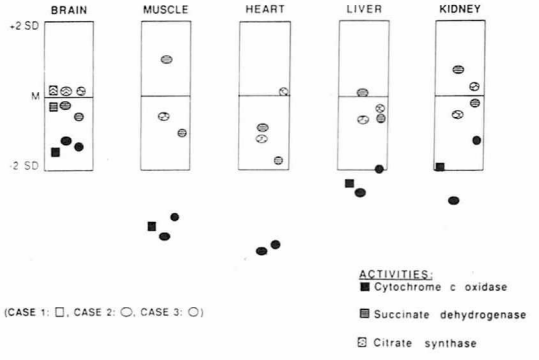


図1　各臓器のミトコンドリア酵素活性

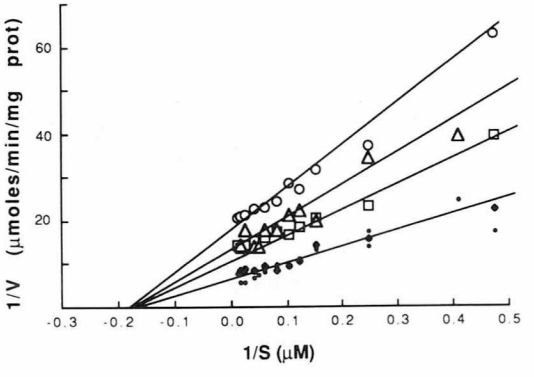


図2　各症例での COX の Michaelis 定数の測定（●は正常対照，他は各症例）Km は一定であることを示す．

次に還元型 cytochrome c を基質として Michaelis 定数を求めたが（図2），Km は約6 μM と各症例とも正常対照と同様の値を示した．Vmax は正常の30～40％の値を示した．したがって正常と同じ性格を持つ COX が存在しているが量的に減少していることが推定された．

COX subunit Ⅱ及びⅣに対する抗体を用いた Western blotting の結果では，正常対照に比較して subunit Ⅱ及びⅣは明らかな減少を示している（図3）．但し，subunit 間の量の比には変化は認められなかった．すなわち，COX は全体として蛋白量が減少していると考えられます．

このことは免疫組織化学的にも示されており（写真省略），subunit Ⅱ，Ⅳ，Ⅶab に対する抗体を用いた免疫組織染色では，正常対照に比較して第2例の骨格筋において各 subunit に対する染色性は明らかな低下を示してる．これは検索した

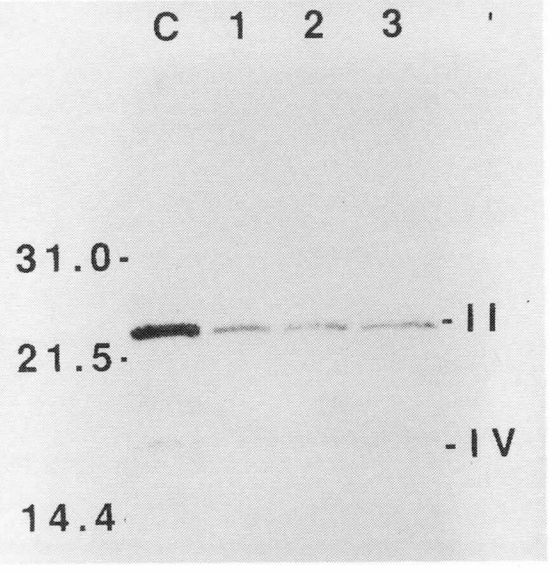


図3　COX subunit Ⅱ及びⅥに対する抗体を用いた Western blotting
同一量のミトコンドリア蛋白を電気泳動した．Ⅱは subunit Ⅱ，Ⅵは subunit Ⅵを示す．

subunit Vab, VIbc, VIIIにおいても同様の結果であった．すなわち，本症の酵素活性の低下はCOX蛋白量自体の低下による可能性が示されている．このことは前に示したMichaelis定数Kmが正常であったこととも一致する結果である．症例2でミトコンドリアDNAにコードされているcomplex Iのsubunit，NDlのc末端に対応する合成ペプチドを用いて作成した抗体で染色してみると，正常対照及び第2例の骨格筋の両者とも同様に染色され，ND1は正常量存在すると考えられる．すなわち染色性の低下はCOXに特異的なものであると示唆される．

次にmtDNAを脳・骨格筋・肝臓に於て定量においては図4の上のbandはmtDNA，下のbandは核にコードされたrDNAに対応するbandであり，下のbandに対する上のbandの濃さによって，mtDNAの相対的な量を見ることができる．脳においては明らかにmtDNAの増加を認め，このことはragged-red fiberが通常認められない骨格筋においても同様の増加を認める．肝臓を含めすべての臓器においてmtDNAの増加を認める．

最後にNorthern blottingにより，VIIbをのぞくすべてのsubunitのcDNAをプローブとして検討した．第一にすべてのsubunitのRNAは存在しsizeも正常であったことが言える．図5(B)に示されていないsubunit III及びVIIIに関しても同様の結果であった．次にmtDNAの増加に対応するmtRNAの増加の有無を見ると，β-actinをinternal controlとして，第3例では対照とほぼ同

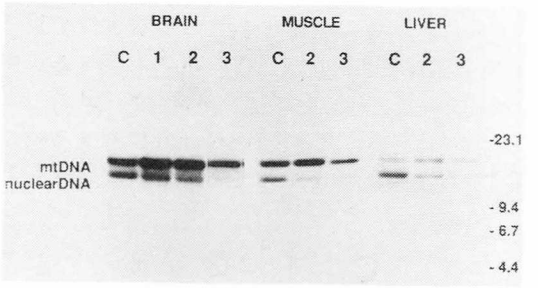
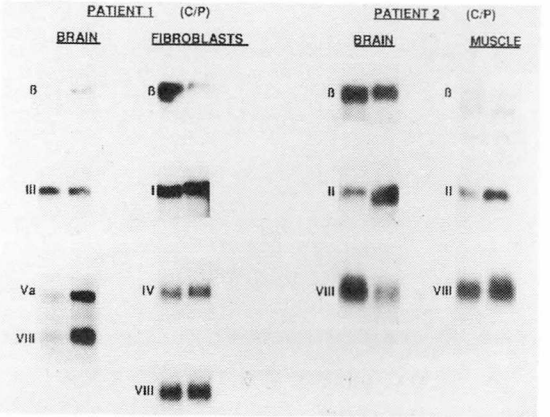


図4　mtDNAのSouthern blottingを用いた定量
核DNAのマーカーとして18S rDNAをプローブとして用いた．上下のbandの相対的な量比で判定する．



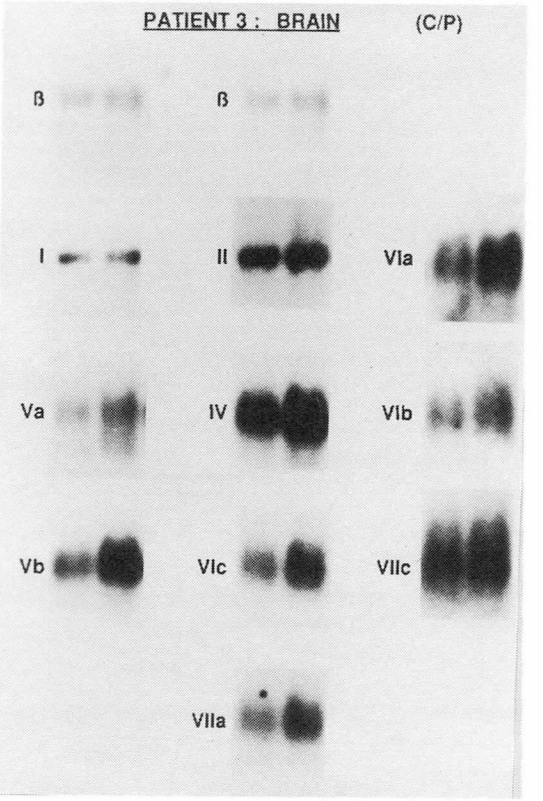


図5　COX各subunitに対するcDNAをプローブとするNorthern analysis
(A)は症例3，(B)は症例1及び2の結果を示す．各パネルの左側は正常対照，右側は各症例．
β-actinをinternal controlとして用いた．

量でありmtDNAの増加に対応するmtRNAの増量は認められません．つぎに図5(A)では*in vitro*である第1例のfibroblastを除いて，*in vivo*においては第1例の脳においてはむしろ減少しています．第2例の脳及び骨格筋に置いては多少の増加は認められるが，mtDNAのような著しい増加は見られていない．これはKSSやMERRFではmtDNAの増加にほぼ対応してmtRNAが増加していたことと対照的な一つの特徴点である．

考　察

本症はCOX活性が全身的に低下する病態を示しているが，その本態はいぜんとして不明のままである．本研究で示されたようにCOXは各subunitとも蛋白量として低下することが明らかになった．しかし各subunitのRNAは相当量存在し，sizeも正常であった．本症の本態として核にコードされたsubunitの異常である可能性は当然残されているが，すべてのsubunitの減少があることがはたして核にコードされたsubunitのpoint mutationで説明可能か問題が残る．またRNAの量的変化で蛋白量の減少を説明することは各subunitのRNAの絶対量は比較的保たれていることから言っても無理があると考えられる．mtRNAがmtDNAの増加に対応して増加していない点に関してもこれが本症の病態に一義的なものなのか，二次的な減少であるのかは不明である．したがってむしろ核にコードされた調節因子の異常によるtranslationレベルの異常も考慮の対照になると考える．本症の原因に関する検索はまだ始まったばかりであり，今後様々な検討が必要と考えるが，本症の異常がかなり複雑な機構である可能性があると考えられる．

文　献

1) Leigh D: Subacute necrotizing encephalopathyn in an infant. J Neurol Neurosurg Psychiatr 14: 216—221, 1951.
2) DiMauro S, Servidei S, Zeviani M, et al: Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. Ann Neurol 22: 498—506, 1987.
3) Robinson BH: Cell culture studies on patients with mitochondrial diseases: molecular defects in pyruvate dehydrogenase. J Biosnerg Biomembr 20: 313—323, 1988.
4) Miranda AF, Ishii S, DiMauro S and Shay JW: Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome: genetic evidence for a nuclar DNA-encoded mutation. Neurology 39: 697—702, 1989.
5) Lombes A, Mendell JR, Nakase H, et al: Myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) with cytochrome oxidase deficiency: neuropathology, biochemistry, and molecular genetics. Ann. Neurol 26: 20—33, 1989.
6) Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, et al: Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. Neurology 38: 1339—1346, 1988.

24）筋緊張性ジストロフィーにおけるミトコンドリアDNA異常

佐橋　功*

研究協力者　田代伯為*　衣斐　達*　周防　拡*
大野欽司**　田中雅嗣***　小澤高将***

はじめに

筋緊張性ジストロフィー（MyD）は常染色体優性遺伝を示し，異常遺伝子坐位はchromosome 19長腕上にあることが明らかにされている．主要な臨床症状として特徴的な骨格筋症状に加え，知能低下，白内障，禿頭，心伝導障害などを呈し，早老症としての所見を有している[1]．本症の筋病理の特徴は中心核の増加と，type 1線維萎縮である．またミトコンドリア・ミオパチーである慢性進行性外眼筋麻痺（CPEO）などに特徴的に認められるragged-red fiber（RRF），cytochrome *c* oxidase（CCO）活性陰性線維やミトコンドリア内封入体などのミトコンドリア異常の存在も示唆されている[2]．本研究はMyDにおける好気的エネルギー代謝を反映するミトコンドリア異常の病態への関与を明確化するために，生検骨格筋においてミトコンドリア異常に関する病理的および遺伝子学的解析を行なった．

対象および方法

方法は成人発症MyDにつき以下の検討を行なったがその詳細は割愛する．

まずミトコンドリア異常のスクリーニング法である自転車エルゴメータ負荷試験の血清中の乳酸，ピルビン酸値の推移を，検索可能であったMyD例と正常対照とミトコンドリア・ミオパチー患者の結果と比較し，その意義を検討した．

ついで生検筋の病理，分子遺伝学的検索を，全例歩行可能な成人MyD13例〔（男7，女6），年齢39.9±9.3（平均±標準偏差）歳，罹病期間12.2±6.8年，生検部位は上腕二頭筋7例，大腿四頭筋5例，腓腹筋1例〕につき実施した．

組織化学的検討は，新鮮凍結連続切片におけるGomori trichrome変法，コハク酸脱水素酵素（SDH）およびCCO活性染色標本につき，ランダム検鏡下にてRRFおよびCCO活性陰性線維頻度を算出した．

ミトコンドリアDNA（mtDNA）解析は，MyD生検筋および年齢対照の非悪性腫瘍・非神経筋疾患患者より得られた生検筋（男12，女8；20筋，平均年齢46.9±19.9歳，年齢分布7歳～76歳）より得た全DNAを用いた．mtDNA解析は*Southern blot*解析，PCR法を用い，さらに詳細な欠失確認を目的としてPCRサザン，primer shift PCR法，欠失部位周辺のmtDNAの直接塩基配列決定を自動シークエンサー法（アプライド・バイオシステムズ・ジャパン社製）により行なった．またPCR産物（0.5μl template DNA中の塩基番号8,531～13,400間を増幅した8 μl PCR産物）について欠失mtDNA量を定量化した．

そして以上の結果を加齢を含むMyDおよび対照例につき相関を検討した．

結　果

自転車運動負荷：血清中の乳酸・ピルビン酸値は，MyDでは負荷方法の問題例を除外したため症例数が少なかったが，有意な増加を示したミトコンドリア・サイトパチー比較してMyDでも負荷後に上昇し，また運動負荷前後値の差（デルタ

＊愛知医科大学第四内科
＊＊名古屋大学医学部神経内科
＊＊＊名古屋大学医学部第二生化学

値）またデルタ値と負荷前値との比（増加率；%）においてミトコンドリア・サイトパチーおよび対照例との間に有意差はなかったものの，高値傾向が示された．

病理解析：RRF は13例中 8 例，CCO 活性陰性線維は 9 例に認め，その頻度（平均±標準偏差）は夫々筋線維10,000本中で前者は50±116，後者は41±116であり，連続切片にて両者はほぼ対応して存在した．なお RRF は SDH 染色にて評価した．

30歳以下の対照例では RRF も CCO 活性陰性線維も認められず，また MyD の 2 男性例では約 1～4.5%と異常線維密度が高く，また全く RRF が観察されない症例は 4 例，CCO 活性陰性線維のそれは 3 例であった（**表**）．

分子遺伝学的解析：制限酵素 *Pvu* II消化による *Sourthern blot* 解析では16.6kb 正常 mtDNA バンドのみを認め，欠失 mtDNA は確認されなかった．

一方 PCR 解析は denature 94°C，15秒；annealing 55°C，15秒；extend，72°C，40秒の反応系で mtDNA 上の塩基番号8,531～13,4000（primer；L853—H1,338）間および13,101～16,450（L1,310—H1,643）間をオリゴヌクレオチド・プライマー（20mer）を用い30回増幅し，mtDNA 断片を検出した結果，全13症例に複数の異常バンドを証明したが（**図 1**），一定の欠失バンドは明らかではなかった．なお検索した30歳以下の対照例では正常 mtDNA のみを認めた．

表 MyD 患者での病理学的定量解析と欠失 mtDNA 量解析の結果
RRF：ragged-red fiber，CCO 活性（－）・F：cytochrome *c* oxidase 活性陰性線維，M：男，F：女，B：上腕二頭筋，VL：外側広筋，G：腓腹筋

Case #	Sex	Age (y. o.)	Biopsy Site	Duration (years)	RRF (/10^4)	CCO(-)・F (/10^4)	deleted mt DNA (ng/μl)
①	M	26	B	16	18	18	11.3
②	M	44	B	10	36	18	29.8
③	F	40	B	15	11	8	26.9
④	F	40	VL	4	19	19	31.0
⑤	M	44	B	10	109	77	86.7
⑥	F	37	B	2	3	3	8.9
⑦	M	49	B	20	12	8	48.0
⑧	F	27	G	5	0	0	16.0
⑨	F	53	VL	20	0	0	15.9
⑩	M	38	VL	8	0	2	14.7
⑪	F	34	VL	7	3	3	16.2
⑫	M	52	VL	22	440	365	19.7
⑬	M	35	B	10	0	11	1.4

図 1　MyD 患者生検筋 PCR 解析での多重欠失 mtDNA
mtDNA マップ上，塩基番号8,531～13,400間を示す．Lane 1～13：MyD，Lane C：24歳，男性，事故死例

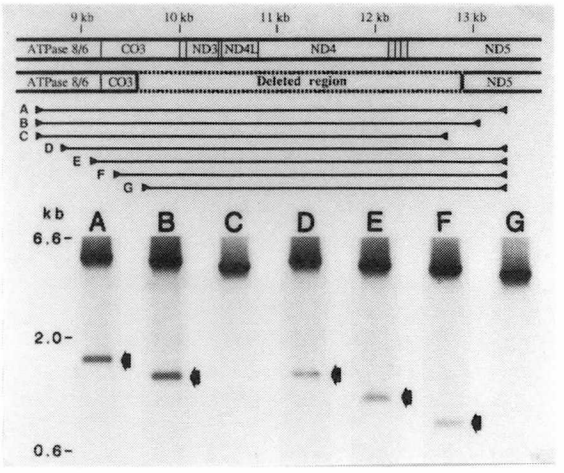


図2　MyD 患者1（表）における primer shift PCR 法の結果

1症例（**表**　Lane 1）における primer shift PCR 解析（primer L932, H1308間）では，塩基番号9,321—13,100間の約3.8kb の欠失が確認された(**図2**)．さらに同部位は，自動シークエンサー解析にて欠失部両端に 5′-TAGAAG-3′の6塩基の直接繰り返し塩基配列が証明され，欠失確認領域は wild type の mtDNA マップ上の CO3 gene 内の 5'側の position 9,593から ND5 gene 内の 3'側 position 13,052間の3,460bp の欠失が確認された．

mtDNA 解析結果と病理・加齢の比較検討：欠失 mtDNA 量と RRF および CCO 活性陰性線維の頻度は相関した(**図3**)．すなわち RRF と CCO 活性陰性線維密度と欠失 mtDNA 量との結果は一部を棄却し検定した結果，RRF は相関係数 0.80，CCO 活性陰性線維0.77と正の相関を示した．

また欠失 mtDNA 量は加齢（**図4**）とともに増加し，とくに30歳以降の症例にて対照と比較しても明らかに MyD 例に顕著で有意（$p<0.05$）な増加を示した．

考　　察

ミトコンドリア・サイトパチーとしての CPEO および Kearns-Sayre 症候群の生検骨格筋には

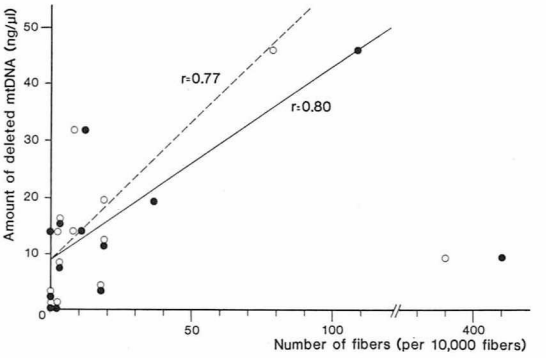


図3　RRF，CCO 活性陰性線維と，欠失 mtDNA の相関

RRF（黒丸）とは相関係数 $r=0.8$.，危険率 $p<0.01$(回帰直線：実線)，CCO 活性陰性線維（白丸）とは相関係数 $r=0.77$，危険率 $p<0.01$（回帰直線：破線）で有意の正の相関を認める．但し図右端の一例は棄却検定により棄却した．

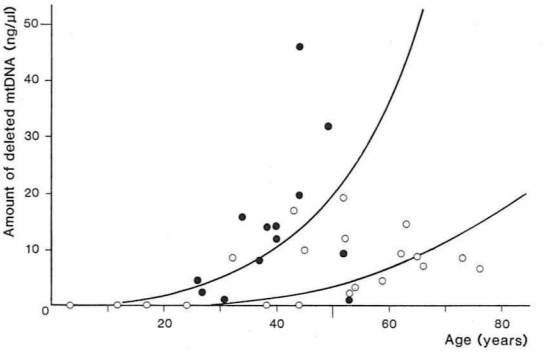


図4　MyD 患者と対照例における欠失 mtDNA 量と加齢との相関

MyD 患者（黒丸），対照例（白丸）とも加齢とともに欠失 mtDNA 量が増加し，MyD において増加が顕著である．

mtDNA 欠失に関連し RRF や CCO 活性陰性線維が多数観察されるが[3]，本研究において MyD 例の骨格筋においても低頻度ではあるが定量的に確認された．

そして mtDNA 解析では多重欠失 mtDNA が PCR 法にて示されたが，低密度の RRF，CCO 活性陰性線維におそらく対応し欠失 mtDNA 量は微量であった．さて欠失 mtDNA の蓄積が，変性

疾患や加齢現象と密接な関係を示すことが一部に報告されている．すなわち加齢によりミトコンドリア呼吸鎖活性は低下し，また心筋のCCO活性陰性線維は増加するとされ[4]，加齢者やパーキンソン病患者の線条体に欠失mtDNAが確認されている[5]．

本研究にてRRFおよびCCO活性陰性線維は欠失mtDNA量と相関し，かつ欠失mtDNA量はと加齢とともに増加することが確認された．とくに加齢に伴う欠失mtDNA増加がMyDにて促進され，故に本疾患における早老性所見としての骨格筋所見，知能障害，白内障，禿頭などはmtDNA欠失の加速と蓄積と何らかの関連を持つことが示唆された．そしてMyDにおける欠失mtDNAの蓄積は，核遺伝子との相互作用の結果あるいはmtDNA障害により発生した蛋白合成障害の結果である可能性も推察された．

最後に，MyDにおける欠失mtDNAとそれに伴うミトコンドリア機能異常はMyDにおける臨床病態と深く関連している事が明らかとなった．

文　献

1) Goldstein S: Human genetic disorders that feature premature onset and accelerated progression of biological aging. "The genetics of aging." (ed by Schneider EL) New York Plenum Press, 1978, pp 171—224.
2) Isashiki Y, Kawabata E, Ohba N, et al: Mitochondrial abnormalities in extraocular muscles in myotonic dystrophy. Neuro-ophthalmology 9: 115—122, 1989.
3) Holt IJ, Harding AE, Cooper JM, et al: Clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA. Ann Neurol 162: 664—672, 1989.
4) Müller-Höcker J: Cytochrome-*c*-oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart -An age-related phenomenon. Am J Pathol 134: 1167—1173, 1989.
5) Ikebe S, Tanaka M, Ohno K, et al: Increases of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence. Biochem Biophys Res Commun 170: 1044—1048, 1990.

25）家族性労作性ミオグロビン尿症における ミトコンドリアDNA変異

高橋　昭*

研究協力者　大野欽司*　田中雅嗣**　井野秀一**
田代伯為***　衣斐　達***　佐橋　功***
小澤高将**

はじめに

労作性ミオグロビン尿症は運動・過労・飲酒後に誘発される発作性の筋肉痛・脱力および褐色尿を特徴とし，腎不全の合併が時に問題となる．本症には家族性に発症する一群があり，先天代謝異常症に起因すると考えられている．原因となる先天代謝異常症はいずれも骨格筋エネルギー産生に重要な役割を担っている酵素の欠損症である[1]．一方，骨格筋における最も重要なエネルギー産生装置であるミトコンドリア電子伝達系の欠損による本症の報告は従来ない．我々は，骨格筋ミトコンドリアの形態異常を伴う家族性労作性ミオグロビン尿症の兄弟例を経験し，その骨格筋ミトコンドリアDNA（mtDNA）変異の検索を行なった[2]．

対象と方法

症例：症例は，3人兄弟の次男・三男で，両親は血族結婚ではない．患者1は，26歳男性で，18歳時，飲酒後・過労後の褐色尿を自覚し，22歳時よりしゃがみ立ち困難・労作時呼吸困難が発現し，入院精査をした．患者2は，21歳男性で，18歳時大量飲酒後の高CK血症の指摘を受け，登山時の褐色尿・大腿部筋痛にて入院精査をした．血清CK値は両者とも変動を示しながらも高値を示した．安静時の血清乳酸・ピルビン酸は両者とも正常範囲内であったが，15ワット15分間のエルゴメータ運動負荷にて血清乳酸・ピルビン酸は両者とも異常高値を示し，骨格筋におけるミトコンドリア電子伝達系の異常が示唆された．

生検骨格筋病理：生検は上腕二頭筋より行なった．Gomori染色変法・cytochrome *c* oxidase活性染色・succinate dehydrogenase活性染色を行ない，さらに電顕による検索を行なった．

酵素活性：ミトコンドリア電子伝達系複合体I，II-III, IVの活性を単離したミトコンドリアにつき既報に従い測定を行なった[3]．

Southern blot法：10mgの生検骨格筋より単離したtotal DNAを制限酵素Pvu IIにて切断後，0.6%アガロースにて電気泳動・アルカリブロットを行なった．全長mtDNAをプローブとしてhybridization後，ECL（Enhanced Chemiluminescence）法にて検出を行なった．

Primer shift PCR法：mtDNA欠失の好発部位を挟むプライマー対を用い，PCR法にて異常バンドを検出した．さらに左右のプライマーをそれぞれ約300塩基ずつずらすprimer shift PCR法にて異常バンドが欠失mtDNAに由来することを確認した．

Colony direct sequencing法：PCR法にて増幅された異常バンドを適当な制限酵素にて切断後，プラスミドpUC19にクローン化した．欠失領域を決定する目的で，トランスフォームされた大腸菌JM109のコロニーより直接にPCRを行ない，挿

＊名古屋大学医学部神経内科
＊＊名古屋大学医学部第二生化学
＊＊＊愛知医科大学第四内科

入DNAの塩基配列を決定した．

Direct sequencing 法：mtDNA 多重欠失の病因を検索するため，asymmetric PCR 法による mtDNA の major non-coding 領域の直接塩基配列決定を行なった．

結　　果

生検骨格筋病理：図1に患者1生検骨格筋の組織化学染色と電顕の結果を示す．中心核・硝子様変性に加え，ragged-red fiber, cytochrome *c* oxidase 活性陰性線維が認められた．患者1・2の ragged-red fiber の比率はそれぞれ4.7%，1.1%であった．さらに，cytochrome *c* oxidase 活性陰性線維の比率はそれぞれ8.7%，7.9%であった．電顕による検索では，結晶様封入体を含む異常ミトコンドリアが認められ，グリコーゲン顆粒の増加も認められた．

酵素活性：患者2の生検骨格筋より単離したミトコンドリアの電子伝達系酵素活性は，いずれも正常範囲内であった．

Southern blot 法：図2に生検骨格筋 mtDNA の Southern blot 分析の結果を示す．患者1・2（lane s 1, 2）では，コントロール（lane C）では認められない複数の異常バンドを検出した．異常バンドは両者に共通に検出されたが，患者1では7 kb のバンドが優位に，患者2では13kb のバンドが優位に認められた．

Primer shift PCR 法：図3に primer shift

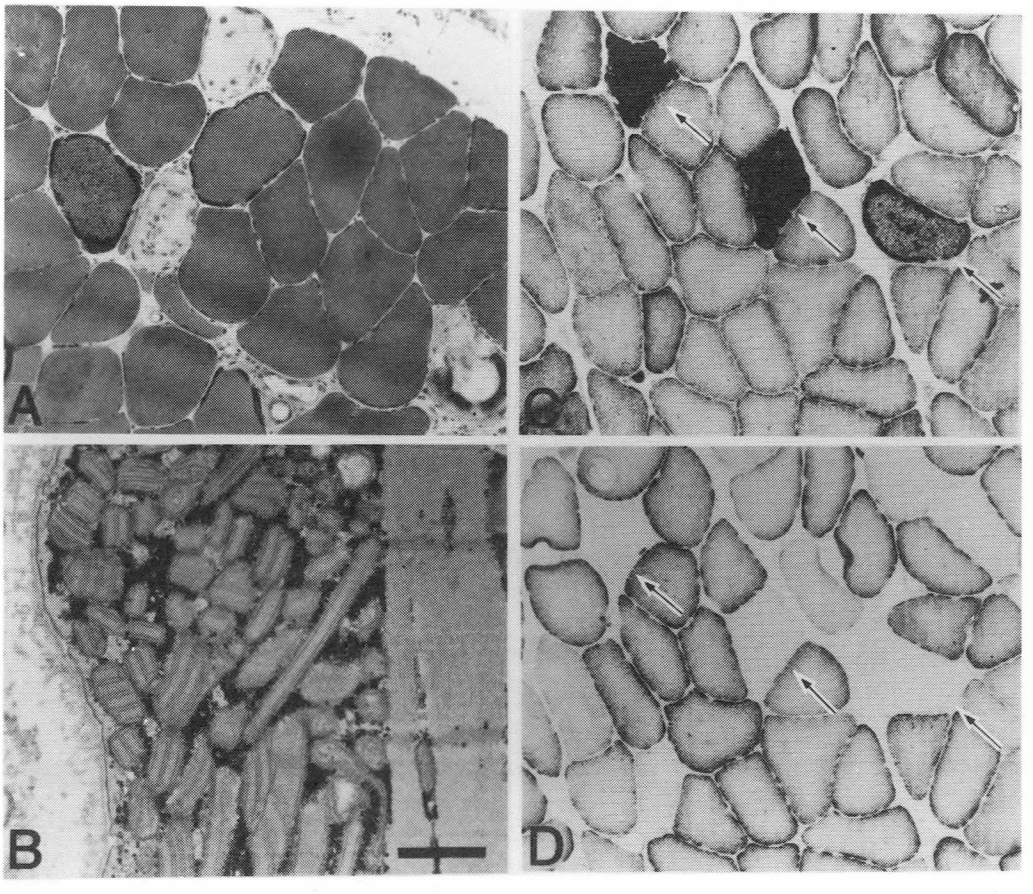


図1　患者1生検上腕二頭筋の組織化学染色・電顕 (A) Gomori 染色変法，(B)電顕（bar＝0.1μm），(C)コハク酸脱水素酵素活性染色，(D)チトクローム c 酸化酵素活性染色

PCR 分析の結果を示す．ATPase 8/6遺伝子からND5遺伝子の領域の増幅にて，患者 1 では3.7kbと4.1kb の mtDNA 欠失が primer shift PCR 法により確認された．患者 2 では3.5kb，3.9kb の mtDNA 欠失が確認された．

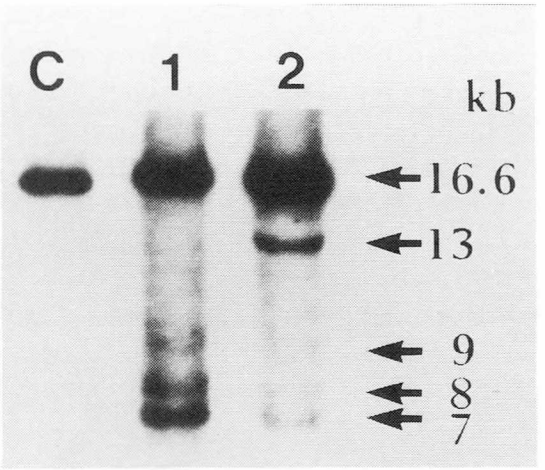


図 2　Southern blot 分析

Colony direct sequencing 法：上記 primer shift PCR 法にて検出された異常バンドを制限酵素切断後，shot-gun 法にて subcloning し，欠失領域の塩基配列決定を行なった（図 4）．3,915bp から5,550bp の欠失 mtDNA の欠失領域には，2 bp から12bp の直接繰り返し塩基配列が認められた．同様に CO1遺伝子から major non-coding 領域にわたる mtDNA 欠失の欠失領域塩基配列決定を行なった（図 5）．図 4 に示す mtDNA 欠失と同様に，欠失領域の両端に完全もしくは不完全な直接繰り返し配列が存在した．この多重欠失は，塩基番号16,052から16,075の約20bp の範囲に終止していた．

Direct sequencing 法：患者 1・2 の major non-coding 領域の直接塩基配列決定を行なったところ，Anderson ら[4]の報告したヒト mtDNA 塩基配列からの変異が16ヶ所に認められた．変異はいずれも insertion もしくは transition であり，tran-

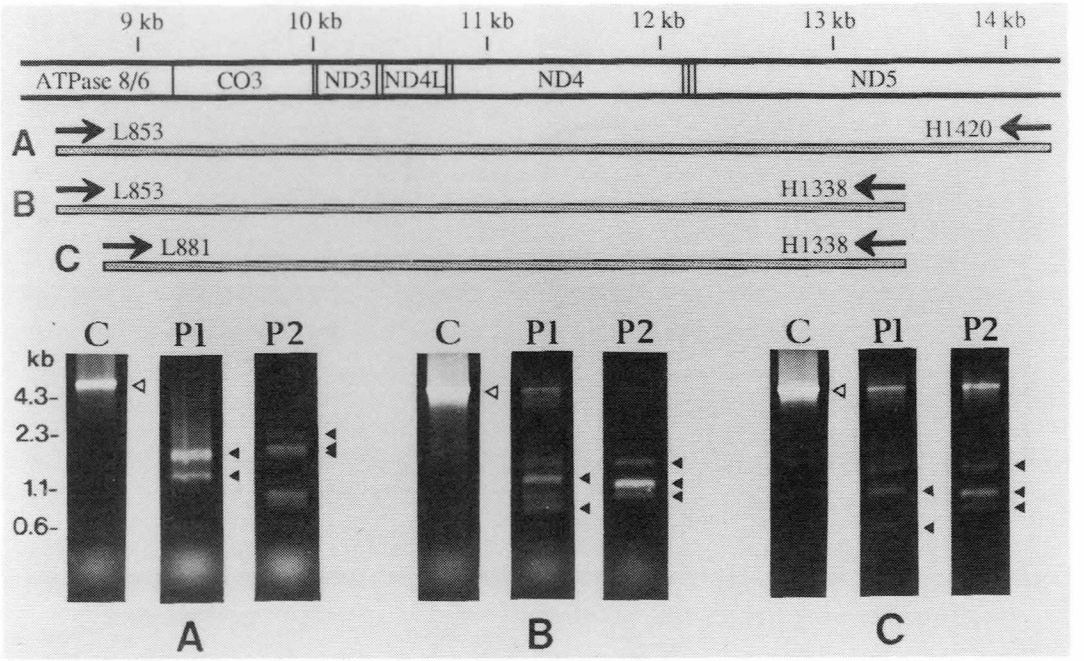


図 3　Primer shift PCR 分析　白矢印の先は正常 mtDNA 断片を示す．黒矢印の先はＬ鎖とＨ鎖の両方の primer shift にて確認された欠失 mtDNA 断片を示す．各レーンは，C：コントロール，P1：患者 1，P2：患者 2 を示す．

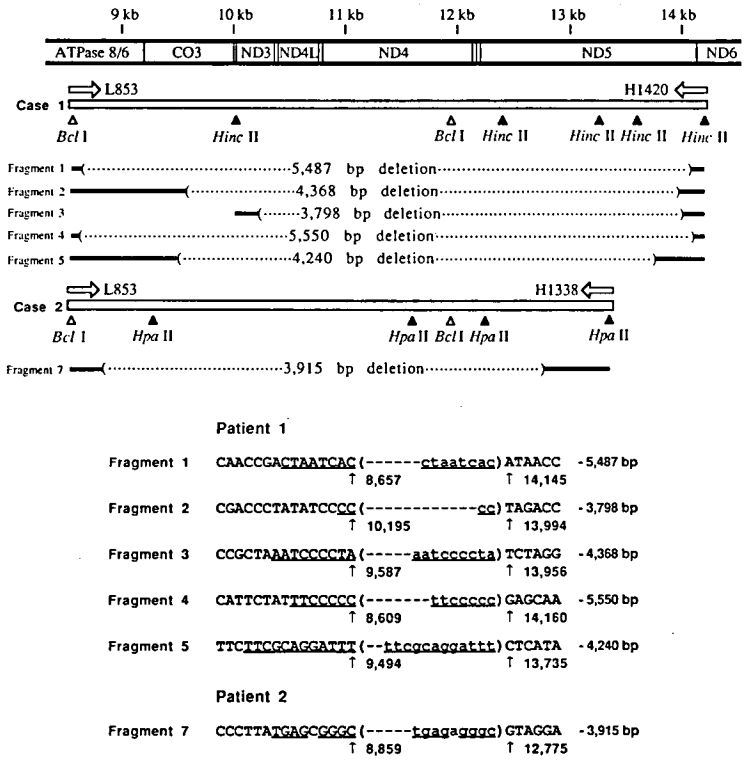
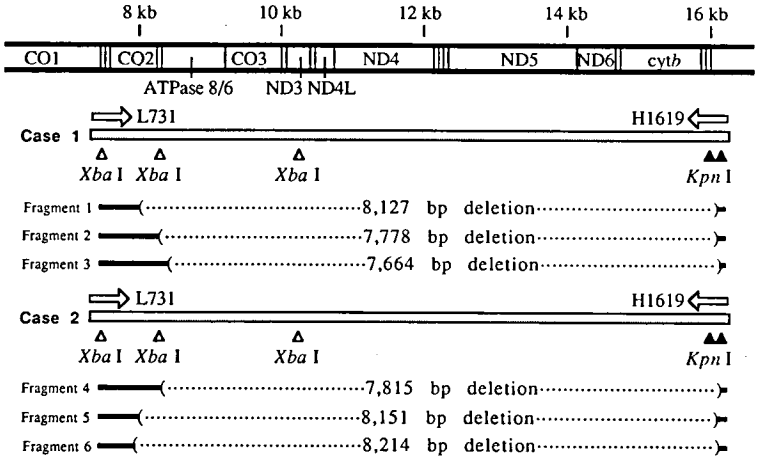


図4　Colony direct sequencing (coding 領域).
(A)PCR 増幅に用いたプライマー対を白矢印で示す.黒のバーはPCR増幅された領域を示している. subcloning に用いた制限酵素の認識部位の矢印の先で示す. 欠失領域は括弧内に示されている. (B)欠失点は括弧で示す. 小文字は欠失領域内の配列を示す. 直接繰り返し配列を下線で示している. 右のカラムには, 欠失mtDNAのサイズを示す.

sversion, deletion は認められなかった. 5ヶ所の変異は自験コントロール例にも既報告コントロール例[5]においても認められない変異であった. 16ヶ所の変異の内, 哺乳類で保存されている領域における変異は3ヶ所であった. コントロール例において認められず, 保存された領域に存在する変異は, 塩基番号217におけるTからCへの transition のみであった. この変異は, CSB-I(Conserved Sequence Block-I) に位置していた.

考　　察

家族性労作性ミオグロビン尿症において報告されている酵素欠損は以下の6種類である[1]: 1) phosphorylase deficiency (McArdle), 2) phosphofructokinase deficiency (Tarui), 3) phosphoglycerate kinase deficiency (DiMauro), 4) phosphoglyceromutase deficiency (Kanno), 5) Lactate dehydrogenase deficiency, 6) Carnitine palmitoyl transferase deficiency (DiMauro). 1)から5)は糖代謝に重要な役割を果たし, 6)は脂肪利用に重要な役割を果たしている. 本例では前腕虚血運動負荷試験が正常反応を示したことにより1)から5)の酵素欠損は否定される. 6)は電顕にて脂肪滴のみの増加を特徴とし[6], 本例の電顕像とは異なる. 本例において認められた ragged-red fibers と cytochrome *c* oxidase 活性陰性線維, さらに電顕でのグリコーゲン顆粒の増加は, ミトコンドリアにおける電子



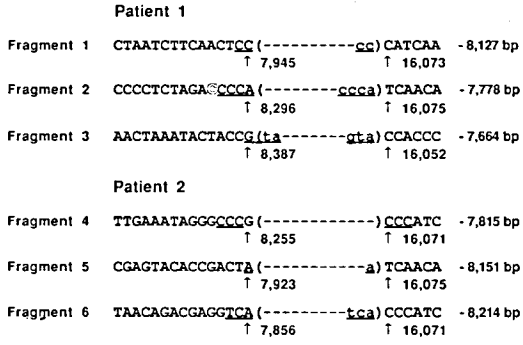


図5　Colony direct sequencing　(non-coding 領域).
(A), (B) ともに図中のマーカーは図4に準ずる.

伝達の障害を特徴的に示している[7].

骨格筋ミトコンドリア電子伝達系の障害は，好気的運動負荷試験による乳酸・ピルビン酸の異常上昇によっても示され，ミトコンドリアミオパチーと診断され得る．しかし，本例はミトコンドリアミオパチーに特徴的な外眼筋麻痺などの症状を欠き，ミトコンドリアミオパチーの非典型例と考えられた．

外眼筋麻痺を伴うミトコンドリアミオパチーにおける mtDNA 変異の多くは正常 mtDNA と欠失 mtDNA の2種類が混在するヘテロプラスミー型である[8)~10)]．一方，正常 mtDNA と多重欠失 mtDNA が混在するプレイオプラスミー型変異も報告されている[11~13)]．本例はプレイオプラスミー型 mtDNA 変異であったが，前述のごとく外眼筋麻痺を伴っていない点が特異である．欠失領域両端における直接繰り返し配列の存在は，既報告と同様に，本例における mtDNA 欠失に recombination 類似の機構が働いている可能性が示された[14)15)]．

MtDNA では，D-loop 領域を中心とする major non-coding 領域に，mtDNA の複製・転写に重要な各種因子の認識部位が存在している．図5に示すように，多重欠失の終止点が major non-coding 領域の約20bp の範囲に存在したことより，この領域における mtDNA 点変異が多重欠失を惹起する可能性が考えられた．

Major non-coding 領域の直接塩基配列決定では，H鎖複製開始点 (D-loop 開始点) の上流に位置する CSB-I 領域にコントロール例では認めら

れない変異が患者に存在した．CSB-I 領域は D-loop strand の RNA primer を合成する上で重要な役割を果たしており，また二次構造予測でもステム構造を取る部位に一致しており，機能的に重要な部位と考えられた．この点変異の他に15ヶ所の insertion, deletion が本例で同定されており，これらの変異のいずれか一つかあるいはその集合が，mtDNA 多重欠失を惹起する機序が想定された．

今回の検討により，mtDNA 多重欠失によるミトコンドリア電子伝達系の欠損が，家族性労作性ミオグロビン尿症の病因となることが判明した．さらに，本症における mtDNA 多重欠失の原因に，major non-coding 領域における変異が関与している可能性が示された．

文　献

1) Penn AS: Myoglobinuria. "Myology" (ed by Engel AG and Banker BQ) McGraw-Hill, New York, 1986, pp1785—1805.
2) Ohno K, Tanaka M, Sahashi K, et al: Mitochondrial DNA deletions in inherited recurrent myoglobinuria. Ann Neurol (in press)
3) Yoneda M, Tanaka M, Nishikimi M, et al: Pleiotropic molecular defects in energy-transducing complexes in mitochondrial encephalomyopathy (MELAS). J Neurol Sci 92: 143—158, 1989.
4) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457—465, 1981.
5) Horai S and Hayasaka K: Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. Am J Hum Genet 46: 828—842, 1990.
6) Bank WJ, DiMauro S, Bonilla E, et al: A disorder of muscle lipid metabolism and myoglobinuria. N Engl J Med 292: 443—449, 1975.
7) DiMauro S, Schotland DL, Bonilla E, et al: Progressive ophthalmoplegia, glycogen storage, and abnomral mitochondria. Arch Neurol 29: 170—179, 1973.
8) Holt IJ, Harding AE and Morgan-Hughes JA: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331: 717—719, 1988.
9) Ozawa T, Yoneda M, Tanaka M, et al: Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family with mitochondrial myopathy. Biochem Biophys Res Commun 154: 1240—1247, 1988.
10) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Med 320: 1293—1299, 1989.
11) Zeviani M, Servidei S, Gellera C, et al: An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. Nature 339: 309—311, 1989.
12) Yuzaki M, Ohkoshi N, Kanazawa I, et al: Multiple deletions in mitochondrial DNA at direct repeats of non-D-loop regions in cases of familial mitochondrial myopathy. Biochem Biophys Res Commun 164: 1352—1357, 1989.
13) Sato W, Tanaka M, Ohno K, et al: Multiple populations of deleted mitochondrial DNA detected by a novel gene amplification method. Biochem Biophys Res Commun 162: 664—672, 1989.
14) Tanaka M, Sato W, Ohno K, et al: Direct sequencing of deleted mitochondrial DNA in myopathic patients. Biochem Biophys Res Commun 164: 156—163, 1989.
15) Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, et al: A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. Science 244: 346—349, 1989.

26）ミトコンドリア・ミオパチーにおける末梢神経障害

水　澤　英　洋*

研究協力者　大　越　教　夫**　金　澤　一　郎*

ミトコンドリア脳筋症は，臨床的に多種多様であり骨格筋以外にも末梢神経を含むさまざまな臓器・組織が障害され得る[1]．しかしながら，末梢神経障害はこれまであまり注目されていない[2)3)]．本研究の目的は，ミトコンドリア脳筋症における末梢神経障害の特徴とその意義を明らかにすることにある．

方　法

末梢神経障害をともなうミトコンドリア脳筋症6例（**表1**）について，その臨床症状および神経伝導速度，筋電図，神経・筋生検などの検査所見の分析を行った．さらに，文献上報告された末梢神経障害をともなうミトコンドリア脳筋症の症例についても同様な分析を行い，自験例の分析結果とあわせて検討した[4]．

結　果

自験6例の臨床症状，検査所見のまとめを**表1**に示す．症例1－3は，主に骨格筋と末梢神経が障害されているのに対して，症例4－6は，骨格筋，末梢神経，中枢神経などが広範囲に障害されておりmyoclonus epilepsy with ragged-red fibers（MERRF）あるいはmitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes（MELAS）と診断された．

まず，症例1－3に注目すると，これらでは障害が骨格筋と末梢神経にほぼ限局していることから，例えばmitochondrial myopathy and peripheral neuropathy（MMPN）と呼ぶことができる．臨床的に明らかな感覚障害を呈し，感覚・運動神経伝導速度の低下，筋電図・筋生検での神経原性変化の混在（図1，2）を認めた．腓腹神経生検では有髄神経線維の減少，小神経の集族，髄鞘の非薄化に加えてonion-bulb形成（図3）や節性脱髄が認められた．文献上，このような症例は多くはないが確実に存在しており（**表2**），その認識は重要である[5]．とくに症例3のように筋障害が軽く末梢神経障害が前景に立ってくることがあり，このことはミトコンドリア異常によりほぼ純粋な末梢神経障害が生じ得ることを示唆している．

Kearns-Sayre症候群（KSS）については，自験例のなかに典型的症例はないが，症例1－3には軽度の眼症状があり症例1，2ではKSSに見られるようなミトコンドリアDNAの大きな欠失が認められた[6]．おそらく，近縁の病態と思われる．文献上，KSSでは**表3**のように多数の報告があり，その臨床・検査所見はMMPNとよく似ていた．

症例4はMERRFで，臨床的には感覚障害はなかったが，検査上明らかな末梢神経障害が認められた．文献的にも非常に高頻度に認められ，むしろ末梢神経障害はMERRFの特徴の一つと言える（**表4**）．剖検例の検索でも脊髄に加えて，末梢神経，後根神経節，脊髄神経根の病変が確認されている．

症例6はMELASで，臨床的に感覚障害は見られず，神経生検でも一見正常と思われるほどであったが，よく観察すると軽度ながら明らかな軸索

＊筑波大学臨床医学系神経内科
＊＊日立総合病院神経内科

表1　Peripheral neuropathy in 6 cases of mitochondrial myopathies

Diagnosis	Case 1 MMPN	Case 2 MMPN	Case 3 MMPN	Case 4 MERRF	Case 5 MELAS	Case 6 MELAS
Age, sex	46,M	48,M	37,F	49,F	19,M	37,M
Onset age	18	12	33	42	3	19
Family history	+	+	+	+	−	−
Optic atrophy	+	+	+	−	+	−
Ptosis	+	+	+	−	−	−
Muscle weakness	+	+	+	+	+	+
Myodonus/cbl. ataxia	−/−	−/−	−/−	+/+	−/+	+/−
Seizure	−	−	−	+	+	+
Stroke-like episode	−	−	−	−	+	+
Lactic acidosis	+	+	−		+	+
Sensory loss	+	+	+	−	−	−
SCV, sural (m/sec)	35	30	32		41	
MCV, peroneal (m/sec)	41	37	44	52	31	
EMG	M+N	M+N	M+N	N	N	
Sural nerve biopsy:						
myelinated fiber loss	++	++	++	+	++	±
axonal degeneration	−	−	−	+	−	+
small nerve cluster	+	+	+	+	+	+
thin myelin	+	+	+	+	+	+
segmental demyelination	+	+	−		−	−
onin-bulb formation	+	+	−	+	−	+

(Cases 1 and 2; Mizusawa et al 1988, Case 4; Sasaki et al 1983, Case 6; Suzuki et al 1988)

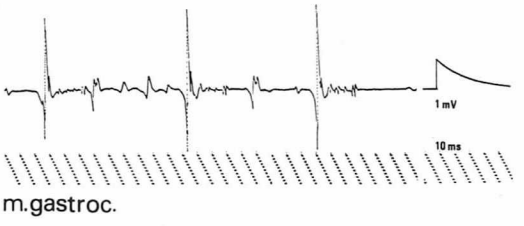


図1　筋電図で高電位，多相性で持続の長いユニットが見られる（症例1）

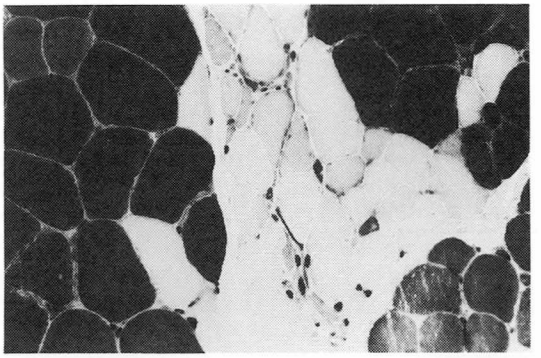


図2　筋生検でタイプ・グルーピング，小角化線維とその集族など神経原性変化が見られる（症例2，大腿四頭筋，ATPase, pH4.6, ×170）

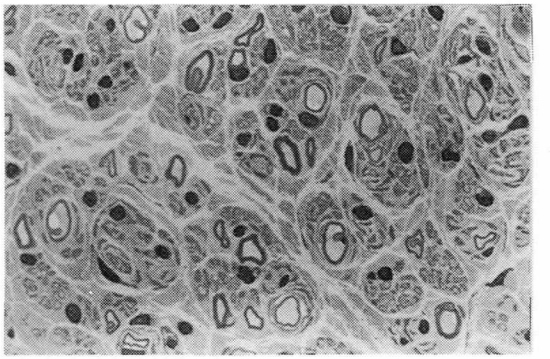


図3　有髄神経線維の脱落，髄鞘の菲薄化，onion-bulb 形成が明らかである（症例1，腓腹神経生検，toluidine blue 染色，×1000）

変性，小神経の集族，onion-bulb 形成が認められた（図4）．文献的には，頻度は多くないがかなりの報告例が見られた（表5）．症例5は，末梢神経障害が高度でMERRF様症状をともなうMELASと考えられたが，MERRFあるいはMELASに報告されているミトコンドリアDNAの点変異は認められなかった．

そのほか，Leigh 脳症などでも末梢神経障害が知られている[4]．また，膀胱・直腸障害を呈する症例が報告されており，そのほとんどが末梢神経障害も伴っていた[4]．

表2 Mitochondrial myopathy and peripheral neuropathy

1980	Fitzsimons Case 5 (1986 Yiannikas Case 3)
1986	Yiannikas Case 1
1988	Mizusawa Case 1, 2 (this presentation Case 1, 2)
1988	Onishi
1989	Yamanaka
1990	Mizusawa (this presentation Case 3)

表3 KSS or ophthalmoplegia plus with peripheral neuropathy

1967	Shy/Gonatas
1968	Drachman Case 3, 4
1969	Walsh Patients 4
1975	Yamamura (1980 Atsumi+)
1975	Kawasaki Case 2
1977	Croft Case 10+, 11, 12, 13
1978	Bastiaensen Patient 2
1979	Saito
1980	Peyronnard
1981	Okamoto Case 1, 2
1982	Genignami
1985	Furuya
1986	Yiannikas Case 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9
1987	Tsuchiya
1987	Pezeshkpour Patient ML
1989	Rivner
cf. 1980	Groothuis: demyelinating polyradiculopathy
1989	Konishi: recurrent polyradiculoneuropathy

表4 NERRF with peripheral neuropathy

1980	Fukuhara Case 1, 2 (1988 Takeda Case 1+, 2+)
1980	Nakano Case 1 (1982 Nakano)+, 2
1981	Kitamura
1981	Fitzsimons (1986 Yiannikas Case 10)
1982	Morgan-Hughes Case 2
1983	Sasaki+ (this presentation Case 4)
1983	Fukuhara Case 3
1983	Feit
1985	Byrne
1988	Federico

表5 MELAS with peripheral neuropathy

(1979	Markesbery)
(1982	Yoshida)
1982	Bogousslavsky+
1985	Goda
1986	Mukoyama+
1987	Yamamoto
1987	Oldfors+
1987	Pezeshkpour Patient DC
1987	Ihara
1988	Ihara
1988	Ohara+ (1988 Nishizawa, 1983 Fukuhara Case 9)

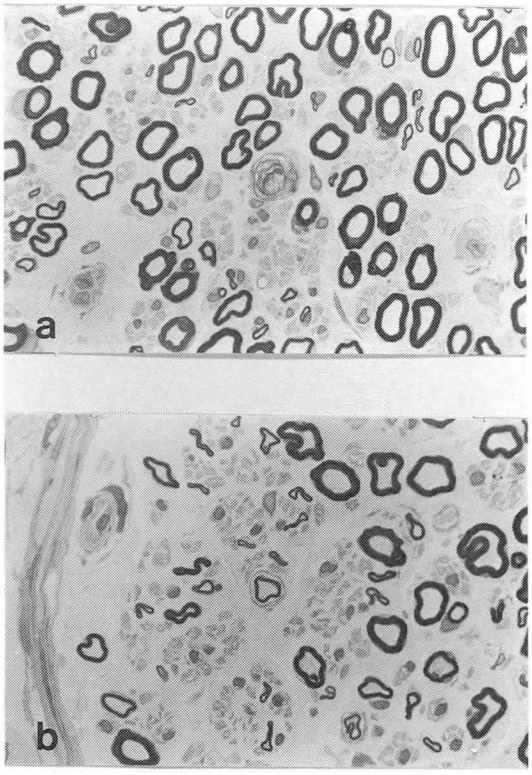


図 4a, b　有髄神経の減少は明らかではないが，軸索変性(a)や onion-bulb 形成(b)が見られる（症例 6，腓腹神経生検，toluidine blue 染色，×850）

考察・結論

以上の検討から，末梢神経障害はミトコンドリア脳筋症の広汎なスペクトラムの中でまれならず認められ，しかも他の症状がさまざまであるにもかかわらず類似の臨床・検査所見を呈することが明らかとなった[4]．このことは，末梢神経障害が二次的なものでなくミトコンドリア異常にもとづく一次的なものであることを示唆している．すなわちミトコンドリア・ニューロパチー mitochondrial neuropathy とも言うことができる．もちろん，個々の症例の検索に際しては，ミトコンドリア脳筋症に伴い易い内分泌障害や治療薬剤などの影響も考慮する必要がある．ミトコンドリア・ニューロパチーは，感覚運動ニューロパチーの形をとり，ふつう感覚障害が運動障害より強い．感覚障害は，通常手袋靴下型で深部感覚のほうが表在感覚より障害が高度である．一般的に障害は軽度であり，しばしば潜在性である．すなわち，臨床的には明らかでなく検査により初めて末梢神経障害が判明することも少なくない．検査所見では，神経伝導速度の軽度～中等度の低下，筋電図・筋生検での神経原性変化の混在，神経生検での大径優位の有髄神経線維脱落，髄鞘の菲薄化，onion-bulb 形成，節性脱髄などがよく見られる．まれには，多発単神経炎の形や小径線維優位の障害が報告されている．また，症例数は少ないが自律神経障害も生じ得るものと思われる．末梢神経障害の機序としては，軸索（神経細胞）障害のほかシュワン細胞や髄鞘の障害も加わっているものと考えられる．そして，症例によってどちらの機序がより大きく寄与するか，その比率が変化し得るものと思われる．

今後，ミトコンドリア脳筋症については末梢神経障害を念頭において検索する必要があり，逆に末梢神経障害についてはミトコンドリア異常がかかわっている可能性を考慮する必要があると思われる．

文　献

1) DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, et al: Mitochondrial myopathies. Ann Neurol **17**: 521—538, 1985.
2) Peyronnard JM, Charron L, Bellavance A, et al: Neuropathy and mitochondrial myopathy. Ann Neurol **7**: 262—268, 1980.
3) Yiannikas C, McLeod JG, Pollard JD, et al: Peripheral neuropathy associated with mitochondrial myopathy. Ann Neurol **20**: 249—257, 1986.
4) Mizusawa H, Ohkoshi N, Watanabe M, et al: Peripheral neuropathy of mitochondrial myopathies. Rev Neurol 1990, in press.
5) Mizusawa H, Watanabe M, Kanazawa I, et al: Familial mitochondrial myopathy associated with peripheral neuropathy: partial deficiencies of complex I and complex IV. J

Neurol Sci 86: 171—184, 1988.
6) Ohkoshi H, Harihara S, Nakanishi T, et al: A familial mitochondrial myopathy with possible multiple deletions of mitochondrial DNA. Biomed Res 10: 453—457, 1989.

27）家庭性進行性外眼筋麻痺症候群の2剖検例における多重欠失ミトコンドリアDNAの臓器分布

佐藤　猛*

研究協力者　平訳浩子*　石垣泰則*　中村眞二**
福田芳郎*　北　潔***　宝来　聰****

はじめに

慢性進行性外眼筋麻痺症候群（CPEO）には，Kearns-Sayre症候群（KSS），眼筋ミオパチーなどが含まれ，その大多数においてミトコンドリアDNA（mtDNA）の大欠失が認められ，かつ多重欠失mtDNAの存在も示されている．その多くの症例は孤発例であるが，家族例も少数報告されている．その中で重要な報告は本邦の兄弟例の骨格筋において全く同一パターンを示す多重欠失mtDNAが検出されたことで，本症の遺伝形式をうかがう上で重要である[1]．別に常染色体性優性遺伝を示す家系に筋mtDNAのD-Loop領域における多重欠失が認められており，mtDNAの欠失に核DNAが関与しているのではないかとの推定がなされている[2]．一方，前述の本邦の兄弟例ではnon D-Loop領域の多重欠失であり，かつ塩基配列の解析から4-12bpのdirect repentが存在することが明らかにされている．

われわれは昨年度の本研究班の報告においてCPEOの兄妹例の筋mtDNAにおいてSouthern blottingとPCRにおいて同一パターンを示す多重欠失mtDNAの存在を報告した[3]．その後，兄と同様に妹も死亡した．この兄妹の剖検例の多臓器におけるmtDNAをPCR法にて分析し，臓器ごとに同一パターンを呈する多重欠失mtDNAを見出した．さらに骨格筋と脳の欠失mtDNAの欠失部の塩基配列を決定したので報告する．

症　例

症例1　47歳長男，3歳まで正常に発育していたが，その頃から難聴を生じた．34歳頃から眼瞼下垂，外眼筋麻痺，四肢筋萎縮，易疲労性など漸次進行した．昭和59年，入院，眼底に異常なし，小脳症状，知覚障害なども認めなかった．検査にて性腺機能低下，腎機能障害，末梢神経伝導速度遅延を認めた．脳CTにて大脳白質のびまん性低吸収がみられた．47歳時恐らく急性心不全にて死亡した．

神経病理学所見：大脳白質のびまん性淡明化，被殻の神経細胞の高度脱落とグリア細胞の著明な増加を認めた．他に前頭葉皮質，プルキンエ細胞，下オリーブ核，脊髄前角に軽度変性を認めた．

症例2　46歳女性（症例1の妹）．15歳時難聴，27歳から外眼筋麻痺と全身筋萎縮，46歳，嚥下障害にて急死．神経病理学的所見は兄の所見と極めて類似していた．

次女も同じ経過を示し，27歳くも膜下出血にて死亡した．母（75歳）は健在，血族結婚なし．骨格筋のミトコンドリア酵素活性は症例1，2ともに複合体IおよびIVが著明に低下していた．

方　法

材料：剖検後，各臓器を−70°Cに保存，DNAを抽出した．

＊順天堂大学医学部脳神経内科
＊＊順天堂大学医学部共同病理
＊＊＊順天堂大学医学部寄生虫学
＊＊＊＊国立遺伝学研究所

Southern blotting による mtDNA 分析：抽出したDNAを制限酵素Pvu IIにより消化した．Probeはヒト胎盤から精製したtotal mtDNA，およびtotal mtDNAを適当な制限分解酵素で切断した16種の断片を用いSouthern blottingを施行した．

Oligonucleotides：自動DNA合成装置によりOligonucleotidesを合成後，PCR法にて増幅してprobeとして用いた．DNA塩基配列の決定用には次のものを用いた．Probe 1：5'－TCCACC-CTCCTCTCCCT-3'（nucleotide number 5,205—5,222）およびprobe 2：5'-GTCGTGGTT-GTAGTCCGTGC-3'（14,681R—14,701）である．

PCR法によるmtDNA分析：Southern blottingで得られた2例のmtDNAの欠失部位を参考に上述のoligonucleotide primerを用い，患者の各臓器のmtDNAを増幅し，電気泳動を行った．

DNA塩基配列：症例1，2の脳および骨格筋から得たmtDNA断片を制限酵素EcoRIおよびBamHIにて消化後subclone化し，欠失mtDNAの塩基配列をdideoxy nucleotide法により決定した．

結　　果

Southern blottingによるmtDNA分析：Total mtDNA，および断片mtDNA probeを用いてSouthern blottingを施行した結果，症例1および2共に，骨格筋と脳に8.1～7.6Kbの欠失を有する数本のextra bandを認めた．これらの欠失mtDNAの占める比率は症例1では2.4～4.4%，症例2では約1.0%であった．断片mtDNAプローブにより，欠失mtDNAの遺伝子上の部位は骨格筋では約5,780～13,922（－8.1Kb）のものと約6,340～14,000（－7.7Kb）のものとが同定でき，2症例とも同一の部位であった[3]．

PCR法を用いたmtDNA分析：各臓器から抽出したDNAを欠失領域近傍をPCR法にて増幅し，電気泳動にて分離した結果，**図1**に示すように骨格筋と大脳において，それぞれの組織ごとに全く同一のパターンを示す多重欠失mtDNAの多数のbandが検出された（**図1**）．各症例において骨格筋と大脳とではこれらのbandのパターンは異なっていた．次に症例2において大腿四頭筋，腸腰筋，横隔膜，外眼筋の多重欠失mtDNAのパターンを比較したがほぼ同一であった（**図2**）．

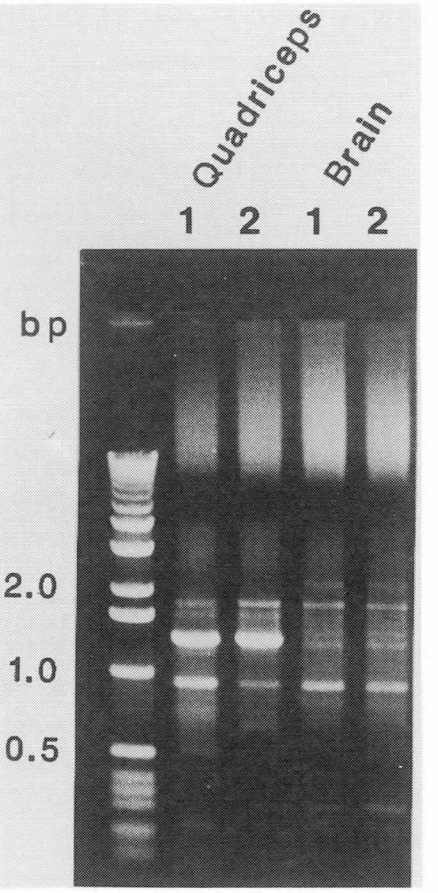


図1　Electrophoretic pattern of mtDNA fragments of quadriceps muscle and brain amplified by PCR. No.1-patient 1, No.2-patient 2.

骨格筋，大脳に加え，肝，腎，肺，小腸，脾臓のmtDNAにも多重欠失がPCR法にて検出されたが，肝，肺，小腸，脾臓は症例1，2において同一の多重欠失mtDNAパターンを示した．しかし，腎臓だけは症例2の方が症例1よりはるかに多数のbandが認められた（**図3**）．

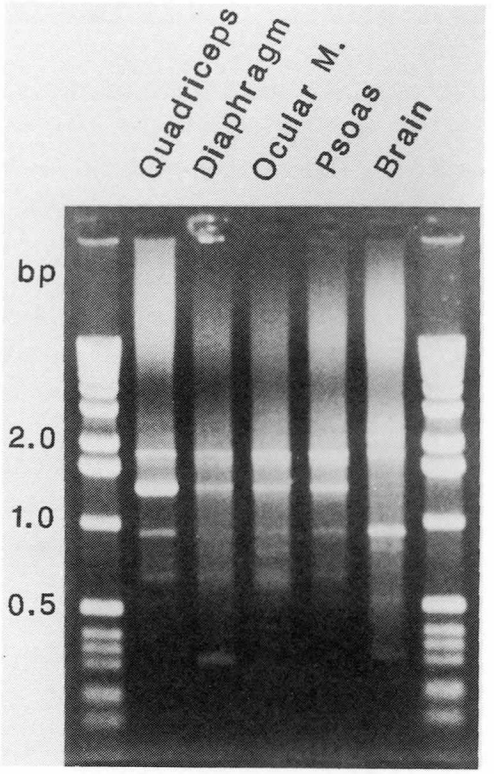


図2　Electrophoretic pattern of mtDNA fragments of quadriceps, diaphragm, ocular, psoas muscles and brain amplified by PCR in patient 2.

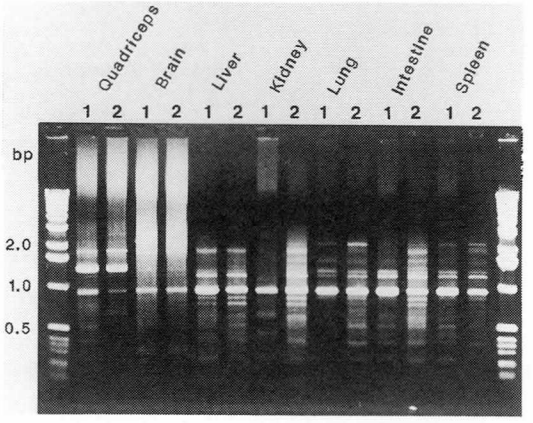


図3　Electrophoretic pattern of mtDNA fragments of various tissues amplified by PCR. No.1-patient 1, No. 2-patient 2.

DNA sequences at the breakpoint regions in mtDNA

Case	Muscles 1	Muscles 2	Brain 1	Brain 2
6330 6340 14010 GATCCTCCGTAGACCTAACC(---tagacctaacc)TGACTAGAA 11 bp repeat　6342-14004 (-7663)	+	+	+	+
5770 5780 13930 13940 GGCAGGTTTGAAGCTGCTTC---CCCTGACATCACACACCGCA 5788-13922 (-8135)	+	+		
6120 6130 14250 TACCCATCATAATCGGAGGC(---gc)CCCCGCACCAATA 6135-14244 (-8110)			+	
6160 6170 14250 CCTAATAATCGGTGCCCCCG(---g)CCCCCGCACCAATA 6175-14243 (-8069)				+

EcoRI - BamHI

図4　Nucleotides sequences of the breakpoint region of 4 different deletions in mtDNA fragments of muscle and brain from patient 1 and 2.

DNA 塩基配列：PCR 法にて増幅した各 band を EcoRI, BamHI にて消化して subclone 後，塩基配列を決定した．1個の異常 mtDNA の欠失領域は症例1，2において骨格筋，大脳共に全く同一の部位であった．しかも11塩基対の repeat を示していた（図4）．

他の1個の欠失 mtDNA は骨格筋において症例1と2に同一の欠失領域を示すものが同定された．

考　　察

ミトコンドリア脳筋症の中の代表的疾患には CPEO, MERRF, MELAS が知られている．CPEO では mtDNA の大欠失が認められるが，最近 MERRF および MELAS では tRNA の1塩基置換が見出され[4)5)]，病型ごとに mtDNA の変異形式が異なるという極めて重要な報告がなされている．CPEO における mtDNA の部分欠失については Holt 以来，多くの報告がみられる．その多くは孤発例であるが，家族例については小沢ら[6)]の母娘例での筋 mtDNA の部分欠失の報告があり，母系遺伝が示唆されている．しかし，母娘における欠失領域は異なっている．

Zeviani ら[2)]は常染色体性優性遺伝を示す家系において mtDNA の D-Loop 領域を起始部とする多重欠失を報告している．Yuzaki ら[1)]は兄弟例

の筋 mtDNA の多重欠失を認めており，全く同一パターンを示し，D-Loop 領域を含まないことを報告している．

われわれの検索した兄妹例でも筋 mtDNA に全く同様のパターンを示す多重欠失を認めた．数種の骨格筋や外眼筋でも同一のパターンであったが，脳 mtDNA では骨格筋とは異なったパターンの多重欠失が認められた．また，Southern blotting では検出できなかったが，PCR 法では肝，肺，小腸，脾臓においても兄妹同一パターンの多重欠失を認めた．これらの諸臓器の欠失 mtDNA のパターンは骨格筋と大脳のものとは異なっていた．

CPEO の剖検例において多臓器にわたって mtDNA の欠失が認められることは報告されているが[7]，兄妹例についての検索はわれわれの報告がはじめてである．各臓器にわたり欠失 mtDNA の多重欠失が存在することは，卵子の段階ですでに欠失 mtDNA が存在し，卵分割と共に randam な分配で各臓器の原基に配分されることが示唆されている．しかし，兄妹例において全く同一の比率で多重欠失を示す変異 mtDNA が各臓器ごとに存在していることは，臓器特有の遺伝的に兄妹共通の因子がなければ説明できない．欠失 mtDNA の塩基配列の分析では欠失領域が共通したものが骨格筋と脳に存在していたことから，卵子のレベルでは母親から遺伝した共通の欠失 mtDNA が存在しており，卵分割後に臓器特有の何らかの遺伝的因子の影響をうけ，兄妹同一の多重欠失 mtDNA が生じたものと推定される．本報告は臓器特有の多重欠失 mtDNA の遺伝的解析が必要なことを示唆している．

結　論

1　CPEO の兄妹例の剖検例において Southern blotting および PCR 法により各臓器のミトコンドリア DNA の解析を施行した．

2　兄妹共に骨格筋，大脳，一般臓器（肝，肺，小腸，脾）に mtDNA の多重欠失を認めた．

3　各臓器ごとに欠失 mtDNA の欠失領域のパターンは異なっていた．しかし，各臓器の多重欠失パターンは兄妹では同一であった．

4　欠失 mtDNA の塩基解析では兄妹の骨格筋，大脳に共通の欠失領域を示す変異 mtDNA が存在しており，11塩基対の repeat を示していた．

文　献

1) Yuzaki M, Ohkoshi N, Kanazawa I, et al: Multiple deletions in mitochondrial DNA at direct repeats of non-loop regions in cases of familial mitochondrial myopathy. Biochem Biophys Res Commun **164**: 1352, 1989.
2) Zeviani M, Servidei S, Gellera C, et al: An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. Nature **339**: 309, 1989.
3) 佐藤　猛，平訳浩子，関　公一　他：ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア DNA の欠失．“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）平成元年度研究報告書，1990, p259.
4) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, et al: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA $tRNA^{LYS}$ mutation. Cell **61**: 931, 1990.
5) Goto Y, Nonaka I and Horai S: A mutation in the transfer $RNA^{Leu(UUR)}$ gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. Nature **348**: 651, 1990.
6) Ozawa T, Yoneda M, Tanaka M, et al: Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family with mitochondrial myopathy. Biochem Biophys Res Commun **154**: 1240, 1988.
7) Zeviani M, Gellera C, Pannacci M, et al: Tissue Distribution and transmission of mitochondrial DNA deletions in mitochondrial myopathies. Ann Neurol **28**: 94, 1990.

28) Kearns-Sayre 症候群におけるミトコンドリア DNA の解析

垂 井 清一郎*

研究協力者　曽 我 文 久*　上 野 聡*　西 川 嘉 郎*
高 橋 信 行*　上 道 知 之*　依 藤 史 郎*
宝 来 聰**

はじめに

Kearns-Sayre 症候群(KSS)では骨格筋のミトコンドリアDNA (mtDNA) に大欠失が高率に見いだされることからmtDNAの異常が電子伝達系酵素蛋白の合成異常にむすびつき，ミトコンドリア内のエネルギー産生障害をきたしていると考えられる[1]．我々は，これまで7例のKSS骨格筋mtDNAのSouthern blot解析を行い，5症例においてmtDNAに3.4～9.2kbの欠失が存在すること，この欠失とミトコンドリア内膜電子伝達系酵素活性，筋力低下との関連を報告してきた[2]．本研究では，5例のmtDNA欠失断端の塩基配列を決定，さらに欠失がSouthern blot法で検出できなかった2例においてPCR法を用いて欠失を見いだし，これらの結果をもとにKSSにおけるmtDNA欠失の意義を検討した．さらにMERRF, MELAS, 分類困難なミトコンドリア脳筋症症例のtRNA(Lys)の一塩基置換[3]，mtDNAサイズの異常の有無について検索した．

方法と対象

対象としたKSS 7例の臨床特徴はすでに報告した[2]．5例(症例1，4，5，6，7)は筋力低下を有していた．

＊大阪大学医学部第二内科・神経内科
＊＊国立遺伝学研究所

骨格筋mtDNAのSouthern blot解析

KSS 7例の生検骨格筋から総DNAを抽出し，制限酵素 (BamHl, EcoRl, Pstl) 消化後，ヒト胎盤組織から分離精製した正常mtDNAをプローブとしてSouthern blot解析を行った．この結果から各症例におけるmtDNA部分欠失の同定，欠失mtDNA/総mtDNA比率を算出した．

部分欠失mtDNA断片のPCR法による増幅

Southern blot解析により同定された欠失領域の約200bp外側に5'側ではL鎖配列，3'側ではH鎖配列をもつオリゴヌクレオチドプライマー(20～23塩基)を合成した．総DNA100ngにプライマー100pmol，および基質を加え，Taq polymeraseを用いたPCR法により欠失断端を含む領域を選択的に増幅した．

mtDNA欠失断端塩基配列の決定

増幅DNA断片を制限酵素消化によって約200bpの断片とし，M13ファージベクターに組み込み，一本鎖DNAを精製してジデオキシ酵素法で塩基配列を決定した．増幅および塩基配列決定の際のアーチファクトを除外するために，6個以上の独立クローンの塩基配列を決定した．

mtDNA欠失のPCR解析

Southern blot解析ではmtDNAの欠失を検出できなかったKSS 2例を対象とし，mtDNA欠失の有無をPCR法を用いて検索した．mtDNAを複製開始点を境界にして2つの領域に分け，種々のプライマーの組合せでPCR増幅を行った．

プライマー配列から計算されるTmより5～8°C低い温度でアニーリングし，30サイクル増幅したDNA断片のサイズを正常対照と比較した．

tRNA（Lys）一塩基置換の検出

MERRF症例において報告されているtRNA（Lys）遺伝子における一塩基置換[3]が我々のKSS, MERRF, MELAS, その他のミトコンドリア脳筋症症例に存在するか否かをPCR法を用いたRFLP解析で検索した．まずこの一塩基置換に加えて新たに一塩基置換を導入して制限酵素HincII認識部位が生ずるようにミスマッチプライマー（5'-ATTTCACTGTAAAGAGGTGTT-GA'）を合成する．これを用いてtRNA（Lys）遺伝子を含む領域（8169—8367）を増幅した．この増幅DNA断片をHinc IIで消化後，電気泳動し，DNA断片のサイズから塩基置換の有無を検索した．

結　　果

mtDNA欠失領域および欠失mtDNA比率

Southern blot解析によりKSS 7例中5例でmtDNA部分欠失を見いだした（図1）．欠失の大きさは，症例1：3.4kb，症例4：5.6kb，症例5：5.5kb，症例6：9.2kb，症例7：5.0kbであった．3例（症例4，5，7）では欠失領域はmtDNAのH鎖，L鎖の複製開始点間の中央部に位置しており，2例（症例1，6）では複製開始点に近接していた．デンシトメーターによる解析の結果，欠失mtDNAが骨格筋mtDNA総数に占める割合は37～80%であった（症例1：53%，4：57%，5：80%，6：37%，7：47%）．

欠失断端塩基配列

5例の断端塩基配列を決定した結果，3例にそれぞれ5，10，13bpの反復配列（direct repeat）が見いだされた（図2）．症例4では断端に10bpのdirect repeat "5'-ACCGCTAACA-3'"（mtDNA配列[4] 9007-9016, 14566-14575），症例5では5 bpの"5'-CCCAC-3'"（8560-8564, 14115-14119），症例7では13bpの"5'-ACCTCCCTCACCA-3'"（8470-8482, 13447-13459）が存在した．他の2例では断端に反復配列はなく，症例1の欠失断端は

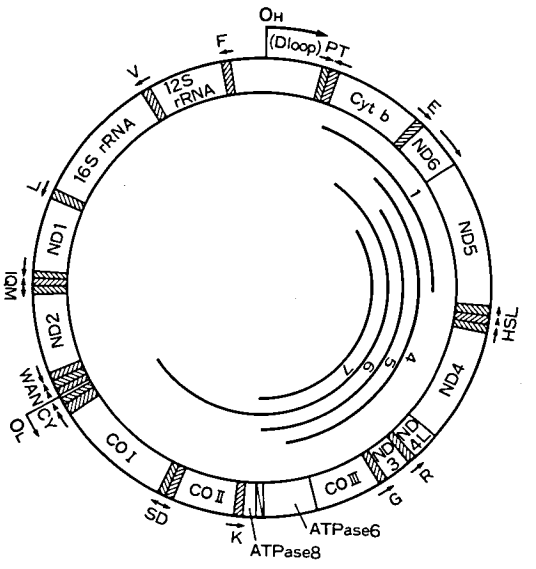


図1　Kearns-Sayre症候群7例の骨格筋ミトコンドリアDNA欠失領域
Southern blot解析により欠失を検出し，断端位置はシークエンスで決定した．

Patient 1　CTTCCCCACAACAATAT(----------)ATGGGCCTGTCCTTGTAGTA***TAA
ND5　12496　15880　Cyt b　tRNA(Pro)

Patient 4　ACGCCTAACCGCTAACA(------ACCGCTAACA)ATCAATACT***AAACCCCCATAAAT
ATPase6　9016　14576　ND6

Patient 5　TCATTCATTGCCCCCAC(----------CCCAC)TCATCCTAACCCTACTCCT***AATC
ATPase6/8　8564　14120　ND5

Patient 6　CCTCGGAGCTGGTAAAA(----------)CTCAGAAACCTGAAACATCGGCA
tRNA(Cys)　5833　15073　Cyt b
tRNA(Tyr)

Patient 7　ACCTACCTCCCTCACCA(---ACCTCCCTCACCA)TTGGCAGCCT***AGCATTAGCAGGA
ATPase8　8482　13460　ND5

図2　ミトコンドリアDNA欠失断端の塩基配列
（　）は欠失領域を，＊＊＊は終止コドンを示す．

mtDNA配列12497と15879，症例6では5834と15072に位置していた．

4例（症例1，4，5，7）では欠失により二つの蛋白遺伝子が融合しているが，断端部でフレームシフトが生じ，断端から11～23bp下流に終止コドンが出現していた．他の1例（症例6）ではtRNA（Tyr）とcytochrome b遺伝子が融合しており，開始コドンが失われていた．

mtDNA 欠失の PCR 解析結果

Southern blot 解析では mtDNA の欠失を検出できなかった 2 例（症例 2，3）について PCR 法を用いて mtDNA 欠失の有無を検討した．症例 2 では，PCR 増幅で多重欠失が検出され，症例 3 では断端に direct repeat を伴う 3 例の欠失とほぼ同じ領域の単一の欠失 mtDNA が検出された．

症例 2 では mtDNA の rRNA 遺伝子が存在する領域を PCR 増幅し，電気泳動すると5830bp を標的として増幅しているにもかかわらず0.5～2.0 kb の数本のバンドが検出された（図 3：Lane 1）．プライマーの位置をシフトし増幅してもそれに対応した増幅断片サイズの変化が認められ，多重欠失が存在していると考えられた．

症例 3 では PCR 増幅により一本の DNA 断片が検出された．（図 4）．この DNA 断片を抽出精製し塩基配列を決定した結果，10bp の direct repeat（5'-ACCGCTAACA-3'）を断端に有する欠失 mtDNA を同定した．16クローンの塩基配列を決定したがすべて同一配列であった．

tRNA（Lys）遺伝子一塩基置換検出結果

KSS 7 例，MELAS 2 例，分類困難例 5 例にはこの変異遺伝子（8344A→G）は検出できなかった．MERRF 症例では199bp の PCR 増幅断片の90％以上が Hinc II で切断され約20bp 短い断片となっており，報告されている変異が我々の症例にも存在していた（図 5 左）．

一方，tRNA（Lys）遺伝子から cytochrome c oxidase subunit 2 遺伝子にかけての199bp を標的に PCR 増幅したにもかかわらず，PCR 増幅断片のサイズがわずかながら大きい一症例が見いだされた（図 5 右）．この断片サイズの差を確認するために，先ほどの MERRF 症例，およびコントロールの PCR 増幅断片と混合して泳動した．この

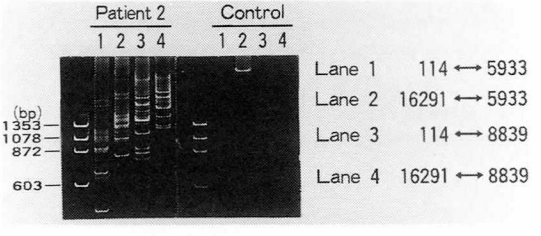


図 3　KSS 症例 2 におけるミトコンドリア DNA 欠失の PCR 解析
図右に PCR 増幅したミトコンドリア DNA 領域を示す．

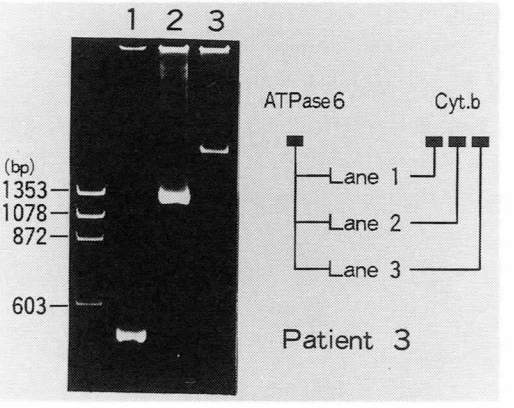


図 4　KSS 症例 3 におけるミトコンドリア DNA 欠失の PCR 解析
PCR増幅したミトコンドリアDNA領域は Lane 1：8817—14847，Lane 2：8817—15582，Lane 3：8817—16310
シークエンスにより欠失領域は9017—14575であることが決定された．

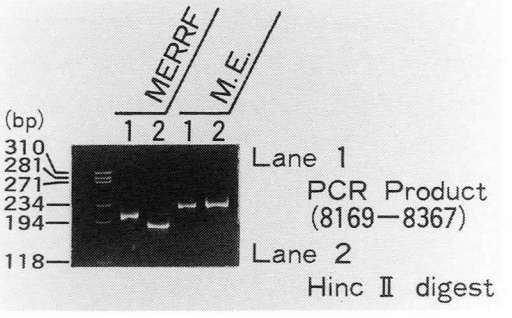


図 5　ミトコンドリア脳筋症症例における tRNA（Lys）一塩基置換の検出
ミスマッチプライマー（5'-ATTTCACT-GTAAAGAGGTGTTGA-3'），正常プライマー（5'-ATGCTCTGAAATCTGTG-GAGC-3'）を用いて cytochrome c oxidase subunit 2 遺伝子から tRNA（Lys）遺伝子にかけての199bp（8169—8367）の領域を PCR 増幅した．一塩基置換（8344A → G）が存在すると HincII 消化により180bp と 19bp の断片となる．M.E.は分類困難であったミトコンドリア脳筋症症例を示す．

結果，断片サイズが約30bp大きいことがわかった．この症例はミオクローヌス，重度精神運動発達遅延，完全房室ブロック，CT上大脳基底核の低吸収域の存在を特徴とするミトコンドリア脳筋症症例であり，骨格筋ミトコンドリア内膜電子伝達系酵素活性測定ではcytochrome c oxidase活性の低下が認められている．

考　　察

Southern blot法により骨格筋mtDNA欠失が同定されたKSS 5例のうち断端にdirect repeatが存在する3例の欠失領域はすべてmtDNAのH鎖，L鎖の複製開始点間の中央部に位置していた．複製開始点間の中央部はmtDNAの非対称な複製過程において数kbにおよぶ一本鎖DNA領域になることが知られており[5]，そのためdirect repeatが関与する欠失の好発領域になると考えられた．一方，欠失断端が複製開始点に近接していた2例の断端にdirect repeatは存在していない．核DNAにコードされるいくつかのmtDNA複製に関連する蛋白はmtDNAのH鎖複製開始点を含むDループ領域およびL鎖複製開始点近傍に結合して作用することが知られている[5]．これら2症例の欠失断端はこれらの領域から100bp以内にあり，核由来のmtDNA複製関連蛋白の機能異常が欠失生成に関与している可能性も考えられた．Southern blot法で欠失を検出できなかった2例においてPCR法で欠失の有無を検索した結果，1例で10bp direct repeatを伴う単一の欠失を見いだした．もう1例ではサイズの異なる複数の欠失の存在が検出された．KSS症候群においては普遍的に欠失mtDNAが存在すると考えられるが，その欠失機序，および異常mtDNA比率は症例により異なる．mtDNA欠失がKSSの直接の病因であるかどうかは不明であるが，欠失mtDNA比率が37%以上の症例でのみ筋症状を有していたことから，ある閾値以上の欠失mtDNAの存在はKSSにおける筋症状の発現に関与していると考えられた．

また，我々のMERRF症例でも既報の変異が見いだされ，特異な臨床症状を呈するミトコンドリア脳筋症症例においては挿入が疑われるmtDNA変異が検出された．ミトコンドリア脳筋症では臨床病型によりミトコンドリアDNA異常の様式が異なると考えられた．

文　　献

1) Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, et al: Deletions of mitochondrial DNA in Kearn-Sayre syndrome. Neurology 38: 1339—1346, 1988.
2) 垂井清一郎，曽我文久ほか：Kearns-Sayre症候群における異常ミトコンドリアDNAの解析．“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）平成元年度研究報告書，1990，pp218—221.
3) Schoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, et al: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial $tRNA_{Lys}$ mutation. Cell 61: 931—937, 1990.
4) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457—465, 1981.
5) Clayton DA: Replication of animal mitochondrial DNA. Cell 28: 693—705, 1982.

29）慢性進行性外眼筋麻痺症候群における欠失 mitochondril (mt) DNA の解析
——非 RI 標識 mtDNA probe を用いての検討——

荒　木　淑　郎*

研究協力者　　箕　田　修　治*

要　　旨

慢性進行性外眼筋麻痺（CPEO）患者筋において，非 RI 標識 mtDNA probe を用いて Southern blot 法と光顕レベルでの *in situ* hybridization（ISH）法による欠失 mtDNA の検出を行った．制限酵素で切断された mtDNA は，Southern blot 法にて特異的に，かつ容易に検出された．ISH では，Cytochrome c oxidase（CCO）活性が欠損した Ragged-red fiber（RRF）において欠失 mtDNA が著明に増加しており，CCO 活性が正常な線維において正常 mtDNA がより多く存在していた．この結果は，先に報告した RI 標識 probe を用いて得た結果と同様であり[1]，この方法が CPEO において，光顕レベルでの欠失 mtDNA 検出に有効であることを明らかにした．今後，電顕レベルへの応用を検討する．

はじめに

近年，Kearn-Sayre 症候群を含む CPEO 患者において，大きな欠失を有する mtDNA と正常 mtDNA が混在する heteroplasmy であることが明らかになった[2)3)]．先に我々は mtDNA の欠失機構を明らかにするため，28例の欠失部位を polymerase chain reaction 法及び direct sequencing 法を用いて検討した．約70%（20/28）の患者に5-13bp の direct repeat（DR）が存在しており，その欠失機構に slipped mispairing の関与が示唆された．このうち，60%（12/20）は同一欠失部位に13bp の DR を有し，hotspot と考えられた[4)5)]．また，全ての欠失は少なくとも 1 つの tRNA を含んでいた．更に，CPEO の筋病理学的特徴である RRF 及び CCO 欠損線維と欠失 mtDNA との関係を ISH 及び Immunocytochemistry 法を用いて検討した[1]．そして，正常 mtDNA の分布は CCO 活性の分布にほぼ一致しており，CCO 活性のない RRF において欠失 mtDNA が著明に増加していることを明らかにした．また，単一筋線維において，正常 mtDNA 及び CCO 活性は segmental に障害されていた．さらに，CCO 活性のない RRF において，欠失 mtDNA は mRNA へ転写されていたが，蛋白へは翻訳されていなかった．

これらの結果は，欠失 mtDNA を含む mt において，tRNA 欠如に伴う翻訳レベルでの蛋白合成障害を示唆した．また，光顕レベルにおいて正常と欠失 mtDNA が細胞間及び細胞内 heteroplasmy，mt 内 homoplasmy であることを示唆した．しかしながら，これまでの解析が光顕レベルであり，その感度が十分でない可能性や，実際は mt 内 heteroplasmy であるが，なんらかの原因により欠失 mtDNA が正常 mtDNA によって complementation されていない可能性がある．さらに，形態的に正常及び異常な mt と正常及び欠失 mtDNA との関係は明らかでない．これらの点を明らかにすることは欠失 mtDNA の発生・増殖のメカニズム及び臨床病態を考える上で非常に重要と思われる．このため，ISH と電子顕微鏡（ISH

＊熊本大学医学部第一内科

電顕）を用いてmtDNAの観察を試みようと考えた．このためには，従来のRI標識を用いたDNA probeではISH電顕への応用は不可能であり，非RI標識probeの使用が不可欠となる．今回，その第一段階として非RI標識mtDNA probeを用いてSouthern blot法と光顕レベルでのISH法によりmtDNAの検出を検討した．

対象と方法

対象はmtDNAの欠失が4977bpで断端に13bpのDRを有するCPEO患者（common deletion）[1)4)5)]の生検筋である．CCO欠損線維は約50%，RRFは約8%で全てCCO欠損線維であった．probeとして欠失部に含まれ正常mtDNAのみを検出するmt12DNAと非欠失部で正常と欠失mtDNAを検出するmt9DNAを用いた（図1）[1)]．方法として，Boehringer Mannheim社の非RI標識キットであるDigoxigenin（DIG）標識dUTPを用いてrandom primer法によりmtDNAを標識した，患者及び対照筋より抽出した染色体DNAを制限酵素Pvu II，Pst Iにて切断後，Southern blot hybridizationを行い，洗浄後，アルカリフォスファターゼ付加の抗DIG抗体及び基質（X-phosphatase+NBT）を用いて発色・検出した．ISHでは，対照及び患者筋の凍結切片をpoly-1-lysineでコートしたスライドガラス上にのせ，4%paraformaldehydeで固定したのち，proteinase K，RNaseAにて処理し，70% formamide, 2XSSCの溶液中，70℃にて組織片のmtDNAを変性（denaturation）させ，エタノールを用いて脱水した．これに，変性させたmtDNA probeを用いて，42℃で12—16時間hybridizationを行った．洗浄後，同様の方法を用いて発色・検出し，グリセリンジェリーにて封入後鏡検した．

結　　果

制限酵素Pvu II，Pst Iで切断されたmtDNAは，DIG標識mtDNA probeを用いたSouthern blot法により，特異的に，しかも容易（検出操作終了後数分以内）に検出された（図2）．また，検出感度の検討では，single copyの遺伝子の検出も容易であった．これらのmtDNA probeを用いて対照及び患者筋のISHを行ったが，対照筋ではtype II線維に比べtype I線維でやや濃染した．患者筋では，CCO活性が欠損したRRFにおいて欠失mtDNAが増加していた（図3）．一方，CCO活性正常線維において正常mtDNAがより多く存在していた．

考　　察

今回，非RI標識を用いたSouthern blot法及び光顕レベルでのISH法によりmtDNAの解析が可能であることを明らかにした．従来，遺伝子レベルでの研究においてDNAをRIで標識する方

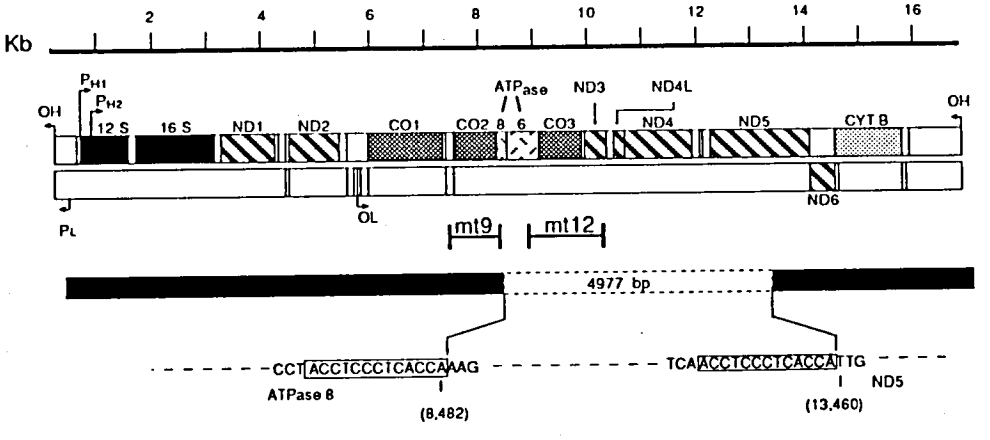


図1　CPEO患者のmtDNA欠失部位と用いたmtDNA probe

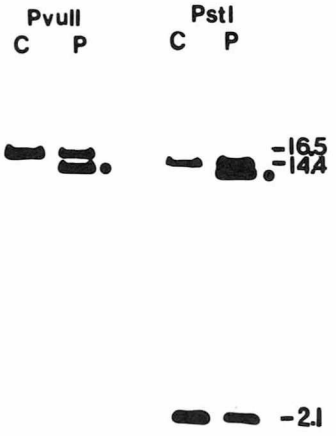


図2　DIG 標識 mtDNA probe を用いた Southern blot 解析
CPEO 患者筋（P）において対照筋（C）に認められない欠失 mtDNA 由来のバンド（・）が Pvu II，Pst I 切断により1つずつ認められる．

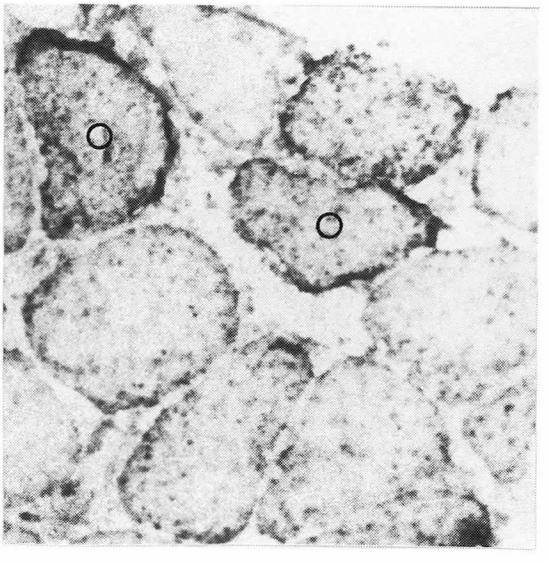


図3　CPEO 患者筋における DIG 標識 mtDNA probe を用いた ISH
mt9DNA probe を用いて欠失及び正常 mtDNA の検出を行ったものであるが，連続切片における CCO 染色，SDH 染色，正常 mtDNA 検出より，CCO 活性のない RRF において欠失 mtDNA が著明に増加している（○）．

法が広く用いられてきた．先の我々の研究においても ^{32}P や ^{35}S を付加したヌクレオチドを使って DNA や RNA を標識して解析に用いた．この方法は，感度がよく，検出が容易であるという長所がある一方，RI は高価で長期保存ができず，その取り扱いには特別な RI 専用施設での使用が必要で，手続きも煩雑であるという欠点をもっている．近年，このような制限を受けずに使用できる非 RI 標識法が開発され，感度や特異性等においてやや問題があるものの次第に使用されるようになってきた．さらに，非 RI 標識 probe は RI 標識では不可能な電顕レベルでの解析に応用できる可能性をもっている．

今回用いた DIG 標識システム及びアルカリフォスファターゼ付加した抗 DIG 抗体を用いた検出システムは，感度も良好で single copy の遺伝子でも容易に検出可能であった．mtDNA は1細胞当り数千存在しており，そのうち1－2個でも欠失があれば理論的には，Southern blot hybridization で欠失 mtDNA の検出は可能である．今回解析した患者筋には50％以上の欠失 mtDNA が含まれており，数分以内に欠失 mtDNA が検出されたのは当然のことと思われる．また，mtDNA 以外のバンドは認めておらず，用いた probe は mtDNA とのみ特異的に反応すると考えられた．今回示さなかったが，biotin 標識でストレプトアビジン・アルカリフォスファターゼによる検出システムにおいても同様の感度を得ている．次に，これらの mtDNA probe を用いて行った対照及び患者筋での ISH では，対照筋において type I，type II 線維間で染色性に差異を認め，type I 線維でやや濃染した．また，患者筋では，CCO 活性が欠損した RRF において欠失 mtDNA が増加しており，CCO 活性が正常な線維において正常 mtDNA がより多く存在していた．これらの結果は先に報告した RI 標識 mtDNA probe を用いて得た結果とほぼ同様であった．しかしながら，CCO 活性が部分欠損を示す線維の横断面において，RI 標識 probe では活性を示す部位と示さない部位で，正常 mtDNA を示す silver grain の数の差異は明らかであったが，DIG 標識 probe ではこ

の差異を検出することはできなかった．このように光顕レベルでは，半定量性や細胞内でのおおまかな局在は，RI 標識 probe が少し優れているように思われた．

現時点では，ここで示したように光顕レベルの ISH で mtDNA は特異的に検出することができた．この方法を電顕に応用するためには，例えばいかにミトコンドリアの形態を保持していくか等，いくつかの問題を解決しなければならない．ISH 電顕に関してはすでに報告があり[6]，これらを参考にしながら，今後このシステムが mtDNA の ISH 電顕へ応用可能かどうかを検討していく予定である．

文　献

1) Mita S, et al: Detection of deleted mitochondrial genomes in cytochrome c oxidase deficient muscle ficers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. Proc Natl Acad Sci USA **86**: 9505—9513, 1989.
2) Holt IJ, et al: Deletions of mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature **331**: 717—719, 1988.
3) Moreas CT, et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. New Engl J Med **320**: 1293—1299, 1989.
4) Schon EA, et al: A direct repeat is a hot spot for large scale deletion of human mitochondrial DNA. Science **244**: 346—349, 1989.
5) Mita S, et al: Recombination via flanking direct repeat is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. Nucl Acids Res **18**: 561—567, 1990.
6) Wolber RA, et al: Ultrastructural localization of herpes simplex virus RNA by in situ hybridization. J Histochem Cytochem **37**: 97—104, 1989.

VI. mdxマウスほか

30）mdxマウス骨格筋におけるカルシウム(Ca)濃度調節

高　木　昭　夫*, **

研究協力者　小　島　　進*　井　田　雅　祥*
黒　岩　義　之*　荒　木　　誠**

昨年度は3－4週齢のmdxマウスにおいて，caffeine拘縮の亢進を証明した[1]．この原因として，筋小胞体（SR）からのCa漏出の増加が関係している可能性を推定した．本年は引続き，SRにおけるCa出納の問題を分析した．ことにCa漏出とCa誘発性Ca遊離（CICR）の関係，adenine nucleotideやphenytoinの影響に注目した．

方　　法

4－6週齢のmdxマウスと対照マウスは実中研より供給された．筋小胞体（SR）によるCa摂取，Ca遊離やCa漏出はskinned fiber法により測定した[1]．Ca摂取量は各種Caイオン濃度を含む溶液（pH7.00）中でskinned fiberをincubate後，caffeine拘縮の大きさ（収縮曲線の積分値）から推定した．Ca誘発性Ca遊離（CICR）はATPおよび$MgSO_4$を除去した溶液中，あるいはAMP・PCP（adenylylmethylene-diphosphonate）および1mM $MgSO_4$を含む溶液中で測定した[2]．CICR測定中に生ずるSRからのCa喪失（Ca-inducedでない部分）はbasal leakageとして記載した．Ca遊離ないし漏出速度は1分間に基準量のCaイオンがSRから全て遊離した時を$1min^{-1}$とした．およそ0.5mmoleCa/g/minに相当する．Ca漏出を測定したのは弛緩溶液中であり，その組成は4mM ATP，4mM $MgSO_4$，20mM Tris-maleate（pH7.00），120mMK-methansulfonateである．また弛緩溶液からATPと$MgSO_4$除去した溶液，あるいはATPと$MgSO_4$を1mM AMP・PCPと1mM $MgSO_4$で置換した溶液でも測定した．

Phenytoin投与は腹腔内注射群（0.2mg/日）と飲水によるad lib経口投与（0.2mg/ml）の2群で行った．腹腔内注射は3週齢から5週齢まで行った．経口投与は母親マウスの妊娠中より開始した．深麻酔下で心臓穿刺を行い得られた血清につき，phenytoin濃度とCK活性を測定した．5週齢で瀉血屠殺後，前脛骨筋，腓腹筋，大腿四頭筋を採取した．組織学的評価は著者の1人が盲検で行った（表4参照）．

結　　果

1）Ca摂取（図1）

各種Caイオン濃度の溶液中でのCa摂取の時間経過をmdxと対照の間で比較した．両者ともにpCa7よりCa摂取が開始した．pCa6.5からpCa6.0でCa摂取量は飽和する．pCa6.0やpCa5.5では時間経過とともにCa貯留量は逆に減少した．mdxと対照の間に有意差をみとめなかった．

2）Ca誘発性Ca遊離（CICR）（表1）

ATPと$MgSO_4$を除去した溶液中でのCICRはmdxと対照の間で差を認めなかった．測定操作中に生ずるbasal leakageはこの条件下では両者間に差がなかった．ATPの代りにAMP・PCP（分解されないadenine nucleotide）を使用した溶液中では，やはりmdxと対照の間にCICRに関して差を認めていない（表1）．しかし，AMP・PCPを含む条件下では，basal leakageはmdxで

＊虎の門病院神経内科
＊＊沖中記念成人病研究所

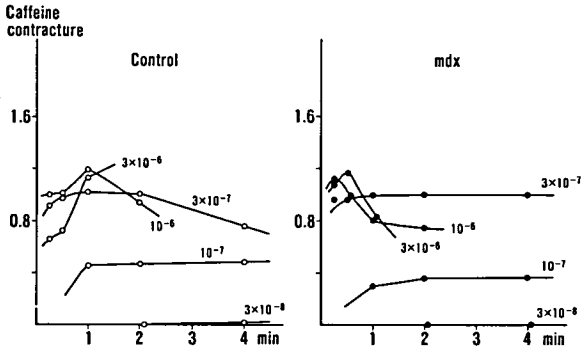


図1　各種 Ca イオン濃度溶液中における Ca 摂取の時間経過
横軸：Ca イオン溶液中での incubation 時間.
縦軸：Caffeine 拘縮の大きさ（SR 中の Ca 量を反映するとされる）. 図中の数字は Ca イオン濃度（pH7.00）. mdx と対照の間に有意差はない.

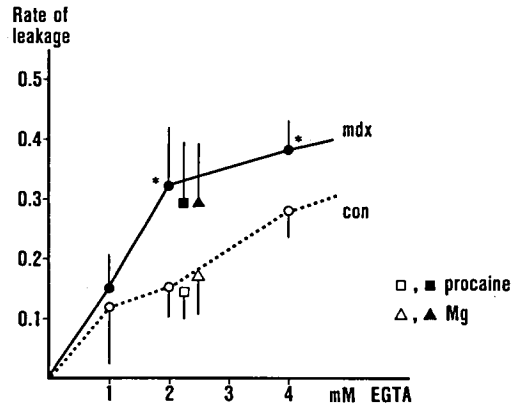


図2　弛緩溶液中での SR からの Ca 漏出速度
横軸：溶液（pH7.00）中の EGTA 濃度.
縦軸：Ca 漏出速度. procaine（5mM）あるいは, Mg（10mM）は漏出速度に影響を与えない. 2mM および4mM EGTA 中の Ca 漏出は mdx で有意に増加していた（*P=0.01）. n=5 for control and n=4 for mdx.

表1　Ca 誘発性 Ca 遊離速度(min^{-1})の比較

A　ATP, $MgSO_4$を除去した溶液		
刺激Ca濃度	mdx	control
basal leakage	0.34±0.04(7)	0.28±0.09(7)n.s.
pCa 7.0	0.43±0.47(7)	0.31±0.52(7)n.s.
pCa 6.5	1.58±1.29(7)	0.86±0.70(7)n.s
pCa 6.0	3.66±0.51(7)	3.47±0.80(7)n.s.
pCa 5.0	3.99±0.02(7)	4.00±0.06(7)n.s.
B.　1mM AMP・PCP－1mM $MgSO_4$の溶液		
刺激Ca濃度	mdx	control
basal leakage	0.43±0.03(4)	0.33±0.02(4)p=0.01
pCa 6.5	0.16±0.22(4)	0.94±0.95(4)n.s.
pCa 5.5	3.56±0.42(4)	3.70±0.60(4)n.s.

mean ± S.D.(number of experiment)
n.s. : not significant

表2　Ca イオン漏出に対する phenytoin の影響

mdx		rate(1/min)
phenytoin	0mg/L	0.31±0.11(7)
phenytoin	30mg/L	0.22±0.13(7)
		(p=0.05)
control		
phenytoin	0mg/L	0.23±0.08(8)
phenytoin	30mg/L	0.22±0.10(8)
		(n.s.)

有意に亢進していた.

3）Ca 漏出（図2，表3）

2mM EGTA を含む弛緩溶液中での Ca 漏出速度（min^{-1}）は mdx　0.31±0.11(7), control 0.23±0.13(7) (p=0.05) であり, mdx で有意に増加していた. この Ca 漏出増加は, ATP あるいは AMP・PCP の adenine nucleotide を含む溶液中でのみ観察された（表1）. Ca 漏出亢進は2mM ないし4mM EGTA を含む溶液中で認められた（図2）. Ca 漏出速度は5mM procaine や10mM Mg により影響をうけない. 一方, phenytoin により mdx の Ca 漏出亢進は完全に抑制された（表2）. control の Ca 漏出速度は phenytoin により影響をうけなかった.

4）Phenytoin による実験的治療（表3）

屠殺時の phenytoin 血中濃度は腹腔内投与群 1.5±0.2mg/L(n=4), 経口投与群6.1±1.0mg/L (n=4) であった. 血清 CK 値は投薬群と非投薬

表3　mdx マウス骨格筋組織に対する phenytoin の影響

	指数*
A.　中心核線維	
非投薬	2.8± 0.5(12)
血中濃度 1.5mg/L**	2.8± 0.4(12)(n.s.)
血中濃度 6.1mg/L***	2.1± 0.5(12)(p=0.01)
B.　壊死線維	
非投薬	1.6± 0.8(12)
血中濃度 1.5mg/L	1.8± 0.6(12)(n.s.)
血中濃　6.1mg/L	1.0± 0　(12)(p=0.05)

*　病的筋線維の占める割合を1：0-33%，2：34-66%，3：67-100% の3段階に分類して表示した。

**　腹腔内投与した4匹の平均

***経口投与した4匹の平均

群の間に差はなく，phenytoin 投与が CK 値に影響を与えることはなかった．

筋組織標本につき，壊死筋線維と中心核筋線維の頻度を定量した．経口投与群においてのみ，壊死線維と中心核線維は減少していた（表3）．

考　察

mdx マウスの SR における Ca 漏出亢進は ATP や AMP・PCP のような adenine nucleotide の存在下でのみ観察された．一方，CICR は ATP (−) あるいは AMP・PCP の存在下においても mdx と対照の間で差をみとめなかった．Ca 漏出は procaine や Mg イオンの影響をうけないことと併せ考えて，CICR とは別の機序によるものと推定している．phenytoin は mdx SR においてのみ Ca 漏出亢進を抑制した．骨格筋に対する phenytoin の作用は，主として表面膜に関してのみ記載されている[3]．他の興奮性膜と同様に Na influx を抑制して，膜安定化をきたすとされている．Na と同様に Ca influx も減少すると推定されている．SR 膜に表面膜と同様な Na channel や Ca channel が存在するか否かは不明である．Ca 漏出に対する phenytoin の効果は，mdx においてのみ観察され，対照筋では影響がないのが注目される．その理由は不明である．phenytoin の SR 機能に対する情報は調べた範囲では見出せず，この点の検討も必要であろう．今回の phenytoin による実験的治療では，血中濃度はまだ充分に治療域に達していないと思われる．血清 CK 値には影響を与えなかった．形態学的には筋壊死の抑制を示唆する結果を得た．今後投与法を検討して再実験の予定である．

結　論

1）mdx マウス SR の Ca 摂取と CICR は対照のそれらと同一であった．

2）ATP や AMP・PCP を含む溶液中においてのみ，mdx SR からの Ca 漏出亢進を観察した．この異常は phenytoin により修復された．

3）Phenytoin の *in vivo* 投与により，筋線維壊死が抑制される可能性を指摘した．

文　献

1) 高木昭夫，小島進，井田雅祥他：mdx マウスの筋小胞体機能（続報）．“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）平成元年度研究報告書，1990，pp 141—144.

2) Ohta T, Endo M, Nakano T, et al: Ca-induced Ca release in malignant hyperthermia-susceptible pig skeletal muscle. Am J Physiol 256 (Cell physiol 25): C358—C367, 1989.

3) Jones GL, Wimbish GH: Hydantoins in “Handbook of Experimental Pharmacology vol 74” pp 351—419, 1985.

31）MDXマウス骨格筋の強収縮状態に於ける細胞内Ca^{2+}濃度

吉田瑞子*

研究協力者　宮川厚夫**　菊池建機*

目的

Duchenne型筋ジストロフィー症（DMD）は，ジストロフィン欠損の膜異常であることが明らかになった．しかしジストロフィンが欠損しているだけでは，筋細胞は崩壊しないようである．従って未だに筋細胞崩壊への引き金は明らかになっていない．

私達はこの引き金を見いだす為にモデルマウスMDXの骨格筋の強収縮状態における細胞内カルシウムイオン（Ca^{2+}）濃度を蛍光プローブfura-2で測定した．

方法

DMDのモデルマウスMDX（3－6週齢，16匹）とその対照マウスB10（3－6週齢，11匹）の長指伸筋を腱から腱まで採取し，1匹につき1本から3本の単一筋細胞（セルに固定した時，長指伸筋の両端にある単一細胞）を用いた．細胞内への蛍光プローブfura-2の負荷は，fura-2-AM（10μM）とpluronic F-127（0.08%）を含むHanks-HEPES緩衝液に長指伸筋を入れ，酸素と炭酸ガス（=95：5）の混合ガスを充満させながら，10℃で，2-2.5時間浮置し，その後Hanks-HEPES緩衝液に移し，25℃で約10分間浮置した．fura-2を負荷した長指伸筋を培養用カバーグラス（厚さ0.1mm）とシリコン製フレキシムパームで作成したセルに固定した．固定方法は腱の一方をアロンアルファーで固定し，他方の腱を持ち長指伸筋が*in situ*の長さになるまで伸ばし，その腱をアロンアルファーで固定した．セルをHanks-HEPES緩衝液で満たし，落射型蛍光顕微鏡（オリンパスIMT-2）下に置いた．細胞内Ca^{2+}濃度の測定は顕微鏡に，細胞内カルシウム測定装置（オリンパスOSP-3）を接続し，340nmと380nmの励起光による蛍光強度比で検量線より算出した．検量線は80mg/ml γ-globulinと筋細胞内に負荷したのと同濃度のfura-2を加えたCa^{2+}緩衝液（pH 7.00，I＝0.20，25°C）[1]を，キャピラリー（筋細胞の太さ）に封入し，筋細胞と同様に測定して作成した．

長指伸筋の強収縮状態は，筋に平行に白金電極を置き，interval 50msec，duration 1 msecの電気刺激を与えた．

測定は25℃で行った．

結果

筋細胞の静止状態と強収縮状態の細胞内Ca^{2+}濃度を図に示す．矢印(a)で長指伸筋に電気刺激を与え強収縮状態を起こし，矢印(b)で電気刺激を切り静止状態に戻している．MDXマウスの場合，強収縮状態では約700nMを示している．他のMDXマウスの筋細胞内Ca^{2+}濃度は，この濃度以上にはならず，550nM前後を示す細胞が多かった（範囲330-700nM）．対照のB10マウスの細胞内Ca^{2+}濃度は約1100nMで，他のB10マウスはこの濃度以上にはならず，800nM前後を示す細胞が多かった（範囲550-1100nM）．MDXマウス骨格筋の強収縮状態に於ける細胞内Ca^{2+}濃度は，対照マウスB10のそれよりも僅かに低いが大差ない結果

＊国立精神・神経センター神経研究所
＊＊オリンパス研究所
バイオメヂカルリサーチセンター

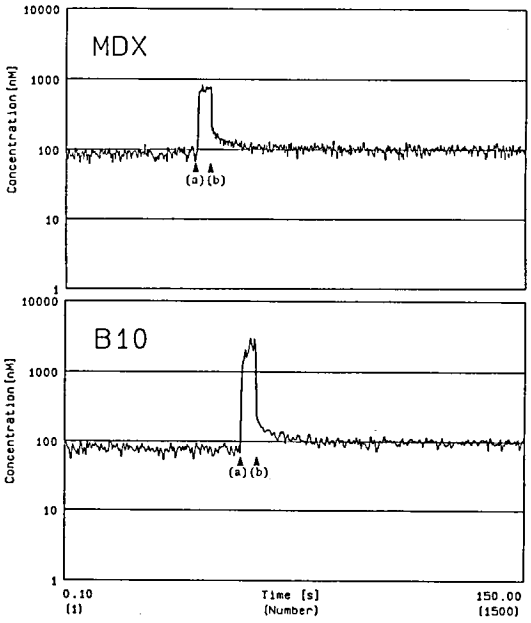


図　MDX マウスとその対照マウス B10の骨格筋の静止状態と強収縮状態の細胞内 Ca^{2+} 濃度.
矢印 (a) で筋細胞に電気刺激を与え，強収縮状態を起こし，(b) で刺激を切り静止状態に戻した．縦軸は Ca^{2+} 濃度，横軸は測定時間，括弧内は測定回数.

である．この結果は Turner PR[2] 等の結果とほぼ一致するが，測定した筋細胞の数が少ないので報告では結論は避ける．

ま と め

MDX マウス骨格筋内 Ca^{2+} 濃度は，対照の B10 マウスのそれに比べ大差ないが，細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した筋細胞の数が少ないので結論を避ける．

文　献

1) Horiuti, K : Some properties of the contractile system and sarcoplasmic reticulum of skinned slow fibres from *Xenopus muscle*. J Physiol **373** : 1-23, 1986.
2) Turner PR, Westwood T, Regen CM and Steinhardt RA : Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from *mdx* mice. Nature **335** : 735—738, 1988.

32）mdx マウスの電気生理学的及び治療的研究

栗　原　照　幸*

研究協力者　日　高　隆　信*　岸　　雅　彦*
根　本　　博*　木　下　真　男*

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症と mdx マウスでは，免疫組織染色上ほとんどの筋線維でその細胞膜に dystrophin の欠損があることが知られているが，その dystrophin の生理学的機能は依然不明である．

我々は，これまでの mdx マウスの筋細胞において電気生理学的に検討し，次のような事実を見出している[1)2)]．

①静止膜電位（RMP）の低下した筋線維があること．

②微小電極刺入時に electrical myotonia を認めること．

今回，これらの機能的異常を更に検討するとともに，膜安定化作用のある薬物を用いてこれらの機能異常を改善する効果があるか否かを検討した．

方　　法

mdx マウス（C_{57}BL/10ScSn-mdx）及びその対照の C_{57}BL/10ScSn（B_{10}）マウスの横隔膜標本を作成し，95% O_2 と 5 % CO_2 の混合ガスで酸素化した Tyrode 溶液中で3M KCl を満たしたガラス管微小電極を用いて筋細胞内記録を行なった．

RMP, electrical myotonia については，各筋標本で100本前後の筋線維にて測定を行った．

筋活動電位については，ラット，B_{10}マウスについて横隔膜・神経標本を作成し，神経刺激した際の波形をメモリースコープにとり，写真撮影して記録した．

1）Tyrode 溶液の温度を13, 18, 23, 26, 37℃に設定して RMP, 及び electrical myotonia の記録を行った．

2）Na 電流の不活化阻害剤であるサソリ毒（Leiurus quinquestriatus hebraeus, α-サソリ毒）の粗毒を用いてラット，B_{10}マウスにおいてその筋活動電位を記録，観察した．この際にみられた repetitive burst について，mdx マウスの electrical myotonia, 低 Cl 溶液中で観察される myotonic burst と比較した．

3）diphenylhydantoin 20mg/l, mexiletine 20mg/l, bestatin 40mg/l をそれぞれ Tyrode 溶液中に混入し，RMP, electrical myotonia を記録した．

結　　果

(1) 温度変化がもたらす mdx マウスの RMP と electrical myotonia の変化

Tyrode 溶液の温度を変化させて得た mdx マウスの RMP ではその変化による有為な差は認められなかった．しかし，electrical myotonia の頻度は，低温で高く，高温にては減少していた（表1）．また electrical myotonia を起こす筋線維の膜電位は低下していた[1)]．この現象は先天性パラミオトニアに類似している．

パラミオトニアでは，Na チャンネルの異常（一度開いたチャンネルが閉じなくなる）が指摘されている[3)]．

(2) サソリ毒投与時の筋活動電位

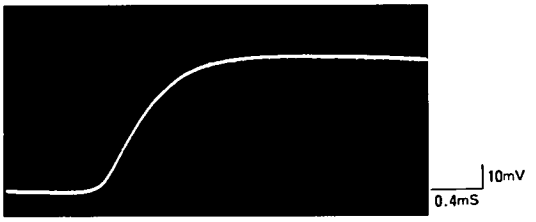
また，今回用いたサソリ毒は α-サソリ毒であり，精製毒においては Na 電流の不活性化を抑制

＊東邦大学医学部第四内科

表 1　mdx マウスの PMP と electrical myotonia の頻度
Tyrode 溶液の温度を変化させて観察すると electrical myotonia は明らかに低温で出現しやすい.

温度変化	RMP±S.D.(mV)	電気的ミオトニーの頻度(%)
13±1°C	−72.5±13.6	24.8%
18±1°C	−75.3±13.1	39.1%
23±1°C	−77.5±11.5	26.7%
26±1°C	−70.3±16.9	16.9%
37±1°C	−70.2±11.5	6.6%

Rat hemidiaphragm
サソリ毒 0.8mg/ℓ 投与後



サソリ毒 0.4mg/ℓ 投与後

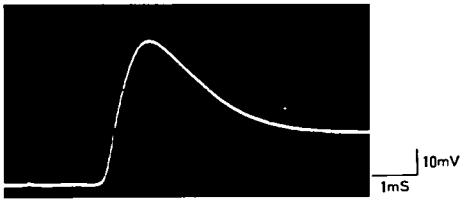


図 1　Rat の横隔膜標本
サソリ毒を0.8mg/l(上図), 0.4mg/l(下図)の濃度で投与し, 神経刺激を 1 回行って誘発した筋活動電位.

する作用があり, 他のイオンチャンネルには全く作用を及ぼさないが, 粗毒では Na 電流の不活性化の抑制のほかに, K チャンネルのイオン透過性も抑える.

この粗毒をラット, B_{10}マウスに投与し, 電気刺

B_{10} mouse
サソリ毒 0.2mg/ℓ 投与後

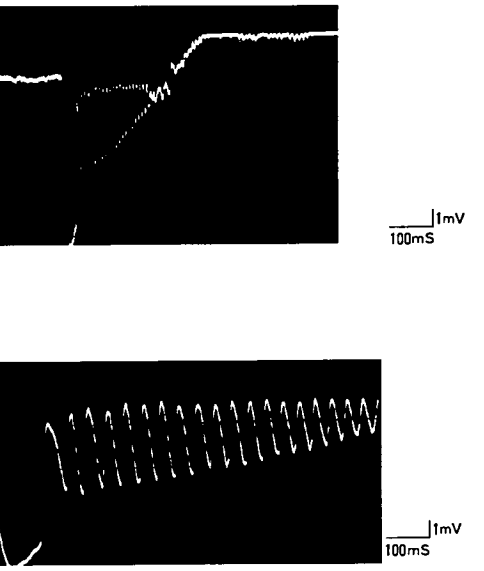


図 2　B_{10}マウスの横隔膜標本
サソリ毒を0.2mg/l と低濃度に投与し, 微小電極を刺入した際の機械的刺激で起こった burst.

激によって生じた筋活動電位は, 0.8mg/l の濃度では筋活動電位は発火後の再分極が粗害されているのが明らかである (図 1).

0.4mg/l の濃度でも発火後, 元の RMP まで戻っていない.

さらに, 0.2mg/l では低振幅の repetitive burst が認められた(図 2). この反復発火を記録し, 検討すると振幅も小さく, mdx マウスの electrical myotonia や低 Cl 溶液中で観察される electrical myotonia とは明らかに異なる.

(3) mdx マウスにおける RMP と electrical myotonia に対する薬物の効果 (図 3, 表 2)

Diphenylhydantoin では RMP の改善は認められないが, electrical myotonia は減少した. Mexiletine と bestatin では RMP の低い線維群において RMP を改善し, 更に mexiletine においては著明に electrical myotonia を抑制している. Diphenylhydantoin は Na チャンネルを選択的に抑

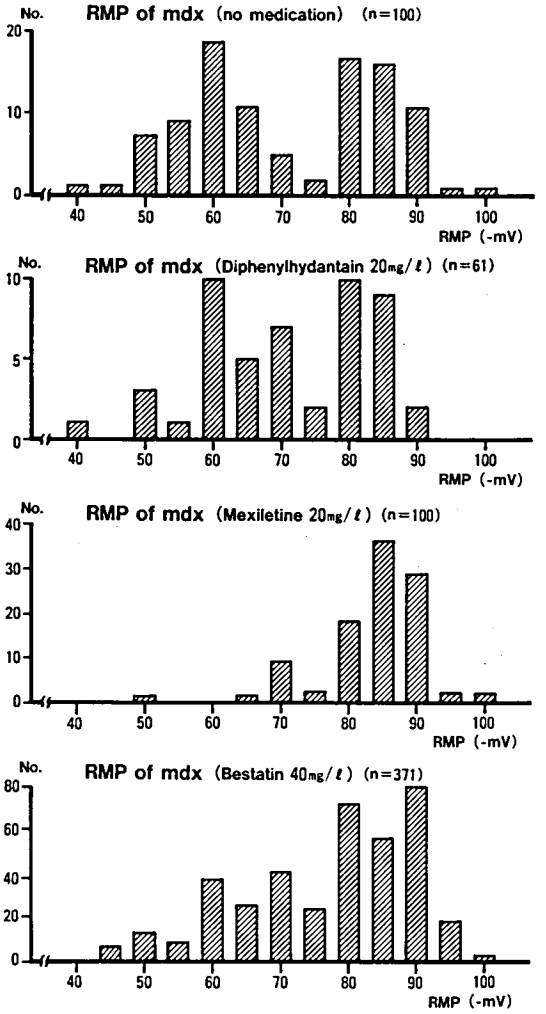


図3　mdx マウスの RMP
各種薬剤投与後の RMP のヒストグラムを示す.
Diphenylhydantoin では RMP の改善は認められないが, mexiletine, bestatin では改善がみられた.

制することが知られており, また mexiletine はクラスＩｂに属する抗不整脈剤として用いられるが, その作用は Na チャンネルの reopening に対する作用とともに K conductance に対する抑制作用があり, 我々の結果もこれを支持するものと考えられる. Bestatin[2] はプロテアーゼ阻害剤であるが, その電気生理学的作用はほとんど知られていない. 今回の結果では bestatin の筋細胞膜への直接作用としては mexiletine に近い作用, つまり Na チャンネル及び K チャンネルの両方を抑制する作用があると考えられる.

表 2　mdx マウスの PMP と 3 つの薬剤投与前後の electrical myotonia の頻度
Diphenylhydantoin では RMP の改善は認められないが, mexiletine, 及び bestatin では RMP の改善がみられた.
3 剤ともに electrical myotonia の頻度を減少させる効果がみられた.

	RMP (mean±S.D.)	投薬前後の電気的ミオトニーの頻度
未治療群	−72.6±10.9mV (n=823)	33.3%
diphenylhydantoin (20mg/ℓ)	1. −69.5±12.0mV (n=50)	前 36.7% → 後 6.0%
	2. −72.0±10.8mV (n=61)	26.7% → 3.3%
mexiletine (20mg/ℓ)	1. −82.5±7.1mV * (n=100)	前 38.4% → 後 1.0%
	2. −84.7±7.0mV * (n=86)	21.7% → 1.2%
bestatin (40mg/ℓ)	1. −83.9±8.0mV * (n=50)	前 46.0% → 後 12.0%
	2. −81.9±9.0mV * (n=120)	51.0% → 31.4%

* Wilcoxon test 有意差あり ($p<0.05$)

考　　案

mdx マウスの electrical myotonia は低温で多く起こり, 又 myotonia が起こった mdx マウスの筋線維においては膜電位が低いことが観察された. このことは先天性パラミオトニアと似た変化である. パラミオトニアでは Na チャンネルの機能的異常が存在することが仮説として提唱されている. しかし, mdx マウスでみられる electrical myotonia は, Na 電流の不活化阻害作用のあるサソリ毒を用いた際に認められた repetive burst とは異なったものであり, むしろ Cl チャンネルをブロックした際にみられる myotonic burst に酷似していた.

mdx マウスでは RMP の低下と electrical myotonia があり, 一つのチャンネル異常では説明のつかない現象があることから, 機能的には多チャンネルの異常が, 程度としては軽度に起こっていると考えられる.

ミオトニアの発生機序に関して, 先天性筋緊張

症とヤギの先天性ミオトニアについてはCl conductanceの低下がLipickyらにより証明され，myotonia dystrophyについてはKチャンネルの異常がMerickelらにより提唱され，adynamia episodicaではNa電流の不活性化が抑制されているとのLeh mann-Hornらの報告がある[4]．又，パラミオトニアの赤血球膜での検討で，Naチャンネルの異常がMarxらにより報告されている[5]．

mdxマウスのelectrical myotoniaについては，我々の記録では活動電位のburstの形が低Cl溶液によるmyotonic burstやアントラセン-9-カルボン酸によって，Clチャンネルをブロックすることにより生じるmyotonic burstと酷似する．Na電流の不活化阻害剤によっては低振幅の反復発火があるもののfull sizeの活動電位がburstを来すことはなかった．mdxマウスにおけるelectrical myotoniaは，Na-channel blockerでは阻止することができるが，膜電位の低下はK-channel blockerとしての作用もある薬剤でないと改善することはない．このことは，mdxマウスの筋細胞膜異常が，一つのチャンネルの異常ではなく，多チャンネルの異常があると推測される．Dystrophinの欠損が，筋細胞膜の蛋白及び脂質の異常を来して多チャンネルに変化をもたらすと考える方が，一つのチャンネルにだけ異常を来すと考えるより自然であり，その可能性が大きいと考えられる．

また，現在イオンチャンネル構造は全てについて明らかになっている訳ではないが，Naチャンネルについていえば，その構造は細胞膜貫通部においては組織間でのホモロジーが高いが，その構造全体の半分を占める細胞質側ではホモロジーは低いことが知られている．Dystrophinは種々の組織で欠損が知られているにもかかわらず筋での変化が大きい．つまり，これらのイオンチャンネルの組織特異性とdystrophin欠損による膜構造変化が関与して筋細胞膜での多チャンネルの異常をもたらす可能性があると考えられる．

結　　語

1）mdxマウスのelectrical myotoniaは低温で起こりやすい．Electrical myotoniaの波形を観察するとmdxマウスのelectrical myotoniaは低Cl溶液中でのelectrical myotoniaと酷似する．

B_{10}を用いたNaチャンネル再分極阻害剤であるサソリ毒投与による観察では低濃度投与では短いburstが見られたが，これはmdxマウスや低Clによるelectrical myotoniaとは異なり，Na電流不活化阻害剤によってはrepetitive small burstは起こるが，mdxマウスのelectrical myotoniaとは明らかに異なることを示した．

2）薬物の効果

今回用いた3剤のうちbestatinとmexiletineはmdxマウスの低下したRMPを改善する作用が認められた．

mdxマウスのelectrical myotoniaについてはNaチャンネルを阻止する作用のある薬剤であるdiphenylhydantoin, bestatin, 及びmexiletineの3剤で阻止効果が認められた．

3）これらの結果よりmdxマウスでは，機能的には多チャンネルの異常が，程度としては軽度に起こっていると考えられる．

文　　献

1) Kurihara T, Kishi M, Saito N, Komoto M, Hidaka T and Kinosita M: Electrical myotonia and cataract in X-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. J Neurol Sci 99: 83—92, 1990.

2) Kishi M, Kurihara T, Hidaka T and Kinoshita M: The stabilizing effect of bestatin on the resting membrane potentials of X-linked muscular dystrophy mice. Jpn J Psychiatr Neurol 44: 595—600, 1990.

3) Lehmann-Horn F, Rüdel R and Ricker K: Membrane defects in paramyotonia congenita (Eulenburg). Muscle Nerve 10: 633—641, 1987.

4) Lehmann-Horn F, Küther G, Ricker K, Grafe P, Ballanyi K and Rüdel R: Adynamia episodica hereditaria with myotonia: a noninactivating sodium current and the effect

of extracellular pH. Muscle Nerve 10 : 363—374, 1987.

5) Marx A, Szymanska G, Melzner I and Rüdel R : The membrane lipid and fatty acid composition of erythrocyte ghosts from three patients with paramyotonia congenita. Muscle Nerve 11 :471—477. 1988.

33）筋細胞膜モデルによるミオトニー発生機序の数理的解析

栗　原　照　幸*

研究協力者　寺　田　和　子**　西　村　千　秋**　吉　沢　修　治***
岸　　雅　彦*　木　下　真　男*

はじめに

ミオトニーは，筋細胞膜のイオン透過性の異常により生じるといわれている．この異常は，膜の数理モデル上では生理定数の変化として表現される．そこで，数理モデル上でミオトニーの発生機序を解析できると考えられる．実際この方向の試みとして，Barchiが先天性ミオトニーの主因といわれるCl コンダクタンス低下時に，膜の微分方程式モデルが周期発射を示すことを数値的に示している[1]．

今回，Barchiが取り扱ったと同一のモデルにおいて，Clコンダクタンスと Na 再分極時間（その延長がパラミオトニーの主因という説が近年出されている）をそれぞれ変化させた場合について，数値解を求めるのみならず，解空間の構造を解析し，その結果を生理的知見と対照した．

以下，その内容を報告する．

方　　法

1）筋細胞膜モデル

解析の対象とした筋細胞膜モデルを表1に示した．これは，カエルの縫工筋について実験的に導出された式[2]で space-clamp（総電流＝0）を仮定したものである．この式の形はヤリイカ神経軸索の Hodgkin-Huxley 方程式と同一で，膜電位Vとチャンネル関連因子 m, h, n の時間微分に関する連立方程式であり，Vの変化は Na 項・K 項・leak 項の和で定まる．m, h, n の流入速度 α，流出速度 β が，電位Vの関数として与えられている．生理定数は，温度22℃の値を標準値として用いた．

上の定数のうち，リークコンダクタンス g_l は，その7－8割がClによると言われている．また，$\overline{V_h}$ は，Na 不活性化因子 h の移動速度の電位依存性を規定する定数であり，これが脱分極側に変化

表1　数理解析の対象とした筋細胞膜モデル

Adrian's equations (frog's sartorius muscle) : space clamp

$$\begin{cases} dV/dt = -\{ \overline{g_{Na}}\, m^3 h (V - V_{Na}) + \overline{g_K}\, n^4 (V - V_K) + g_l (V - V_l) \} / C_M \\ dm/dt = \alpha_m[V] \cdot (1-m) + \beta_m[V] \cdot m \\ dh/dt = \alpha_h[V] \cdot (1-h) + \beta_h[V] \cdot h \\ dn/dt = \alpha_n[V] \cdot (1-n) + \beta_n[V] \cdot n \end{cases}$$

$$\alpha_m[V] = \frac{\overline{\alpha_m}(V - \overline{V_m})}{1 - \exp\{-(V - \overline{V_m})/10\}} \qquad \beta_m[V] = \overline{\beta_m} \exp\{-(V - \overline{V_m})/18\}$$

$$\alpha_h[V] = \overline{\alpha_h} \exp\{-(V - \overline{V_h})/14.7\} \qquad \beta_h[V] = \frac{\overline{\beta_h}}{1 + \exp\{-(V - \overline{V_h})/7.6\}}$$

$$\alpha_n[V] = \frac{\overline{\alpha_n}(V - \overline{V_n})}{1 - \exp\{-(V - \overline{V_n})/7\}} \qquad \beta_n[V] = \overline{\beta_n} \exp\{-(V - \overline{V_n})/40\}$$

Constants of Adrian's equations at 22℃

$\overline{g_{Na}}$ = 110.0	mmho / cm^2	$\overline{\alpha_m}$ = 0.250	ms^{-1}
V_{Na} = 50	mV	$\overline{\beta_m}$ = 2.50	ms^{-1}
$\overline{g_K}$ = 45	mmho / cm^2	$\overline{V_m}$ = -42	mV
V_K = -70	mV	$\overline{\alpha_h}$ = 0.0187	ms^{-1}
g_l = 0.3	mmho / cm^2	$\overline{\beta_h}$ = 4.06	ms^{-1}
V_l = -95	mV	$\overline{V_h}$ = -41	mV
C_M = 1	μF/ cm^2	$\overline{\alpha_n}$ = 0.0275	ms^{-1}
		$\overline{\beta_n}$ = 0.1156	ms^{-1}
		$\overline{V_n}$ = -40	mV

＊東邦大学医学部第四内科
＊＊東邦大学医学部医学情報学研究室
＊＊＊東京大学工学部計数工学科

することは，Na の再分極時間が延長することに相当する．

2）解析方法

上記の膜モデルの微分方程式において，生理定数のうち g_l と $\overline{V_h}$ をそれぞれパラメータとして変化させ，他は normal な値として，解空間の構造を解析した．

解のうち，平衡点（dV/dt=dm/dt=dh/dt=dn/dt=0 なる点）は，Newton 法を用いて求め，その安定性を平衡点での固有値の実部の符号を調べて判定した．（その点から少しずれた値が時間経過とともにその点に近づくとき安定，離れて行くとき不安定という：不安定な点は定点として観測されることはない．）その他の解は，Runge-Kutta 法を用いて数値的に求めた．特に，ミオトニーの反復発射に関連する周期解または振動解の存在する生理定数の値の範囲と，その解が生じる初期値の範囲を調べた．

解析結果

1）g_l（Clコンダクタンス）変化の場合

(1) 平衡点

図1に，g_l をパラメータとした時のモデル方程式の平衡点の電位とその安定性を示した．g_l が normal の値0.3の時は，膜の静止状態（電位-95 mV）に対応する点が唯一の平衡点である．この点は，g_l を変化させてもほぼ一定の値で，常に安定である．$g_l<0.11$で，新たに2個の不安定な平衡点が脱分極側に現れる．これらの新平衡点は，他の生理定数を以下の方向に変化させると消失する．

Na 項減少：V_{Na} 低下・$\overline{g_{Na}}$ 減少・$\overline{V_m}$ 低下・$\overline{V_h}$ 上昇

K 項増大：V_K 上昇・$\overline{g_K}$ 増大・$\overline{V_n}$ 上昇

leak 項増大：g_l 大・静止電位（≒V_l）上昇

(2) 周期解

$g_l<0.014$で，方程式には安定な周期解が存在する．この安定周期解に収束していく電位波形の一例として，$g_l=0.001$の場合を図2に示した．この周期解の電位の振幅は g_l によらずほぼ一定で，最大値は20mV 付近であり，最低値は−70mV 付近即ち二つの不安定平衡点の間にある．また，周期

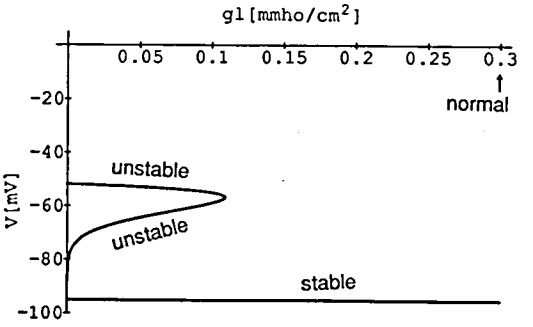


図1　g_l（リーク（主に Cl）コンダクタンスをパラメータとしたときのモデル方程式の平衡点の電位と安定性

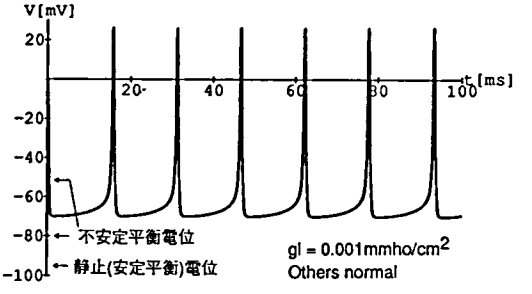


図2　g_l 低下時に出現する周期発射を示す数値解の一例

も g_l によらずほぼ一定で，16ms 程度である．

一度発火閾値をこえた場合は，静止状態には戻らず，この周期解に巻き付いていく．

この周期解が安定に存在する時に，生理定数を新平衡点を消失させる方向に変化させるか膜容量を増大させると，この解は消失する．

2）$\overline{V_h}$（Na 再分極時間）変化の場合

(1) 平衡点

図3に，$\overline{V_h}$ をパラメータとした時のモデル方程式の平衡点の電位とその安定性を示した．膜の静止状態に対応する平衡点は，$\overline{V_h}$ によらずほぼ一定で常に安定である．$\overline{V_h}>-36.1$mV で，新たに2個の不安定平衡点が静止点より脱分極側に現れる．さらに，$\overline{V_h}>-6.6$mV で，最も脱分極側の平衡点は安定になる．

これらの新平衡点は消失させる定数変化の方向

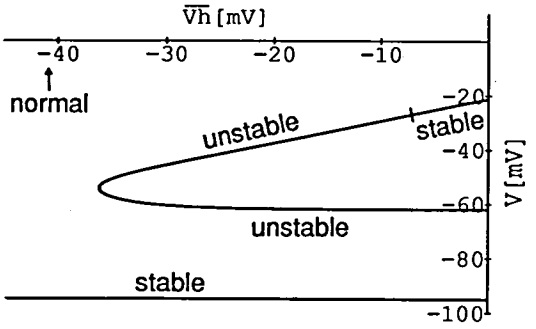


図3　$\overline{V_h}$（Na 不活性化因子移動速度の電位依存性定数）をパラメータとしたときのモデル方程式の平衡点の電位と安定性

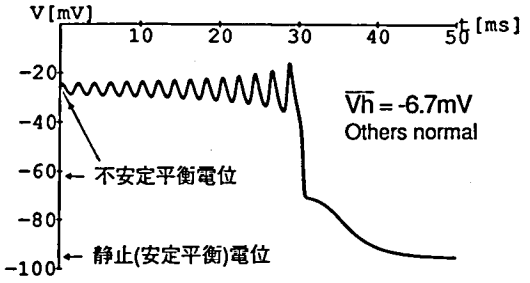


図4　$\overline{V_h}$ をパラメータとしたとき，脱分極側の平衡点が安定になる直前に出現する振動を示す数値解の一例

は，g_l の場合と同一である．

(2)　反復発射解

$\overline{V_h}$ が新平衡点のひとつが安定化する直前の値の−6.4から−6.6mV 付近で，この平衡点のまわりで小さな振幅で振動したのち静止状態に到達する数値解がえられる．その一例を図4に示した．図4は，脱分極側の平衡点のごく近くに初期値をとって得られた波形である．$\overline{V_h}$ が同じ値のときも，初期値の取りかたにより，通常の発射と同じ波形も得られた．

考　　察

前項で述べた解析結果と，薬物を用いて当該定数を変化させた生理実験の結果およびミオトニーの病態との対応を考察する．

1）g_l（Cl コンダクタンス）変化の場合

モデル方程式において低 Cl コンダクタンスで存在する安定周期解およびそれに巻き付いていく解の示す電位波形は，Barchi も指摘しているとおり，Cl チャンネル阻害剤を用いた電気生理実験[3)4)]やミオトニーにみられる反復発射と対応している．

また，一度発射がおきるとそのまま周期解に引き込まれていくという解空間の構造は，電気生理実験で針をいれるだけで連続発射が生じるという burst の生じ易さに関連している．

モデル上，低 Cl コンダクタンスで安定周期解が存在するときも静止状態に対応する平衡点が安定であるという構造は，無刺激では筋緊張が生じないという病態と対応している．

この新平衡解および周期解を消失させる定数の変化方向は，モデル方程式の上で統一的に理解できるが，治療的薬物による定数変化の方向と一致している．また，静止膜電位が低下した場合にミオトニー様 burst が生じ易いという知見とも一致している．このことから，ヒトのモデル方程式が確立できれば，治療に定量的指針を与えうると考えられる．

2）$\overline{V_h}$（Na 再分極時間）変化の場合

Na 再分極時間を延長する作用のある薬物は，サソリ毒から精製してえられるものが唯一知られているものであるが，筋にこれを用いた実験の報告例はない，今回の班研究の中で，栗原・日高らがサソリの粗毒を用いた実験を行っているので，その結果と数理解析の結果を対照する．実験の詳細は，栗原・日高らの報告書を参照されたい．

まず，ラットの横隔膜筋にサソリ粗毒を多量に（0.4〜0.8mg/l 程度）用いた場合，静止膜電位とそこから数10mV 脱分極側との二つの安定電位を示すデータが得られている．また，マウスにより少量（0.2mg/l）の毒を用いた場合，数値解と振幅の変化が逆だが，よく似通った波形が得られている．以上から，数値解と実験結果は，定性的にはよく対応しているといえる．

ここにみられた電位振動とミオトニーの関連を考察すると，振動の振幅は10mV 程度と小さく，静止電位からの変位幅も通常の発火に比してはるかに小さく，また持続時間も長くて数100ms 程度

と短い一過性の振動であるので，この電位振動は，ミオトニーとは異なると考えられる．

結　　語

今回検討したカエルの筋細胞膜モデルは，その解の挙動が定性的には生理的知見とよく対応していて，ミオトニー様 burst の発生機序を解析するモデルとして信頼に足るといえる．個別にみると，Cl コンダクタンス低下時の周期解が存在する解空間の構造は，先天性ミオトニーの発火とよく対応している．一方，Na 再分極時間の延長では，延長の程度が大きいときには膜がふたつの安定点をもち，2 安定状態になる直前で振動解が生じたが，これは myotonic burst とは異なるものである．

今後は，哺乳類のモデルを用いて定量的な解析をすすめたい．

文　　献

1) Barchi RI: Myotonia, an evaluation of the chloride hypothesis. Arch Neurol 32: 175—180, 1975.
2) Adrian R, Chardler W and Hodgikin A: Voltage clamp experiments in striated muscle fibers. J Physiol 208: 607—644, 1970.
3) 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—383, 1971.
4) Kurihara T, Tanaka M, Toshimori K, Tomita M and Shibata K: Experimental myotonia in human external intercostal muscles. Current Research in Muscular Dystorophy, Japan. The Proceedings of the Annual Meeting of Muscular Dystrophy Research Group 66—67, 1980.

34）Heterozygote mdx mouseの筋細胞における dystrophinの発現と筋核との関係

川　井　尚　臣*

研究協力者　玉　木　康　民*　三ツ井　貴　夫*　鳴　尾　隆　子*
土　橋　孝　之*　斎　藤　史　郎*

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー症（DMD）ではジストロフィン遺伝子に欠失があり，その結果ジストロフィンが産生されず，従って骨格筋の細胞膜にジストロフィンが証明されない．そして，ジストロフィン遺伝子に関してヘテロ接合体の同女性保因者の骨格筋ではジストロフィンが染色される細胞と染色されない細胞がモザイク状に存在すると報告されている[1]．私たちはDMDの女性保因者の骨格筋細胞におけるジストロフィンの発現様式は2個のX染色体の一方の不活性化と密接に関連していると考え，DMDのモデル動物であるmdxマウス[2]のヘテロ接合体の筋細胞膜におけるジストロフィンの局在部位と筋核との位置的関係を検討した．

対象及び方法

対象はC57BL/10-mdx雄マウスとC57BL/10-ScN雌マウス，およびC57BL/10ScN雄マウスとC57BL/10-mdx雌マウスを交配して得たヘテロ接合体の雌マウスである．正常対照として，C57BL/10ScNの雌マウスを用いた．親マウスは実験動物中央研究所の斎藤宗雄先生より供与を受けたものであり，当教室で飼育，増殖して用いた．

得られたヘテロ接合体及び正常マウスを生後5日目，10日目，15日目，20日目，30日目に頸椎脱臼法により殺処分し，腓腹筋を採取して6μの凍結切片を作製，この組織切片をDr. Hoffmanより供与を受けた60Kdの抗ジストロフィン抗体を用いABC法にて染色し，さらにmethyl greenあるいはhematoxylinにより核染色を行った．なお，抗ジストロフィン抗体は1000倍に希釈して用い，組織切片と37℃，60分間反応させた．そして，ABC法により染色した筋組織標本中の筋核に接した部分の細胞膜にジストロフィンが強く染色される核を（+），僅かに染色されるものを（±），染色されないものを（−）と分類し（図1），各時期の標本について筋核300個を無作意に調べ，（+），（±），（−）の核の比率を算出した．

成　　績

1．成熟マウス骨格筋のジストロフィン染色像

図2に左より正常雌マウス(N)，mdxヘテロ接合体（H），mdxヘミ接合体（D）の筋組織のジストロフィン染色像を示した．正常マウスでは全ての筋細胞の細胞膜に一様に全周性に染色性がみられ，ヘミ接合体では全く染色性がみられなかった．ヘテロ接合体では生後60日の成熟期には殆ど全ての筋細胞にジストロフィンの染色性が全周性にみられた．

2．mdxマウスヘテロ接合体の骨格筋細胞のジストロフィン染色部位と筋核との位置的な関係

1）各日齢における（+），（±），（−）の核の比率

mdxヘテロ接合体では生後5日目は（+）の核は33%，（±）の核は40%，（−）の核は27%，10

*徳島大学医学部第一内科

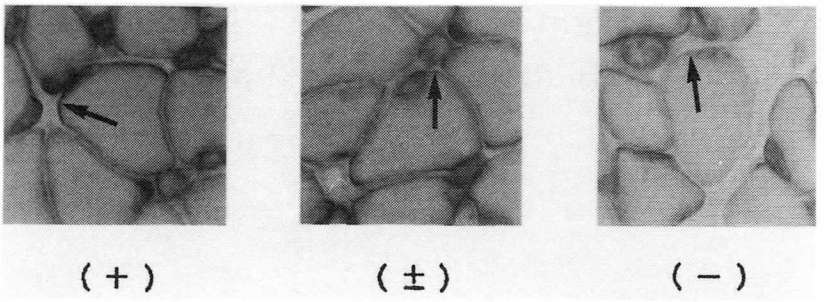


図1　周辺の筋細胞膜のジストロフィンの染色性による筋核の分類．筋核に接した細胞膜に染色性が強く認められる核を（＋），僅かに認められる核を（±），認められない核を（－）とした．

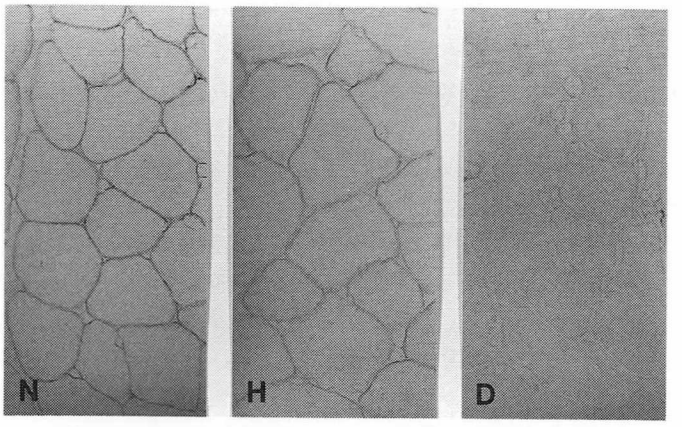


図2　左から正常雌マウス(N)，mdx マウスのヘテロ接合体(H)，mdx マウスのヘミ接合体(D)の生後60日目の骨格筋のジストロフィン染色像(×150)．ヘテロ接合体で殆ど全ての筋細胞の細胞膜にジストロフィンの染色性が全周性に認められる．

日目では（＋）の核は60%，（±）は26%，（－）は14%，15日目では（＋）の核は78%，（±）は15%，（－）は7%，20日目では（＋）の核は69%，（±）は20%，（－）は11%であり，30日目では（＋）の核は77%，（±）は18%，（－）は5%であった．

正常マウスでは生後5日目では（＋）の核が89%，（±）の核は9%，（－）は2%であった．10日目では（＋）の核が86%，（±）の核は13%，（－）は1%であった．15日では（＋）の核は98%，（±）は2%，（－）は0%であり，20日目は（＋）の核は94%，（±）の核は6%，（－）は0%，30日目では（＋）の核は94%，（±）の核は6%，（－）は0%であった．

2）生後10日目の正常マウスならびにヘテロ接合体の骨格筋のジストロフィン染色像

生後10日目のジストロフィン染色像を図3に示した．正常マウス(N)では殆ど全ての筋細胞が全周性に染色されるのに対し，ヘテロ接合体(H)では筋細胞膜が全周性に染色されるもの，部分的に染色されるもの，染色されないものなどが認められた．

3）生後30日目のジストロフィン染色像

生後30日目のジストロフィン染色像を図4に示した．左が正常マウス(N)，右がヘテロ接合体(H)の成績である．30日目にはヘテロ接合体において殆ど全ての筋細胞の細胞膜部分にジストロフィンの染色性がみられたが，染色性は必ずしも一様ではなく，染色性のみられない細胞も小数ながら認

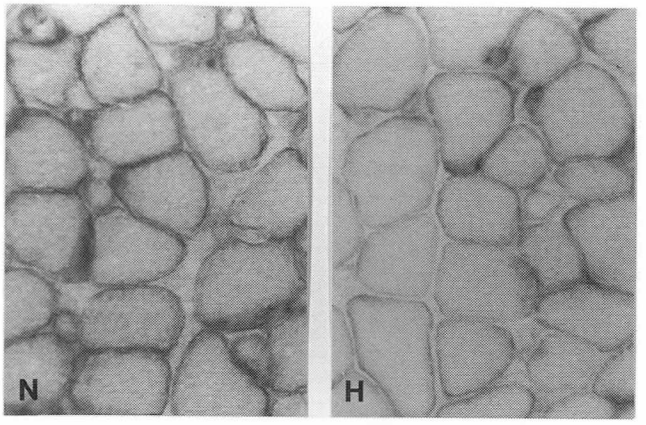


図3　生後10日目の骨格筋のジストロフィン染色像（×580）.
左が正常マウス（N）
右がヘテロ接合体（H）.

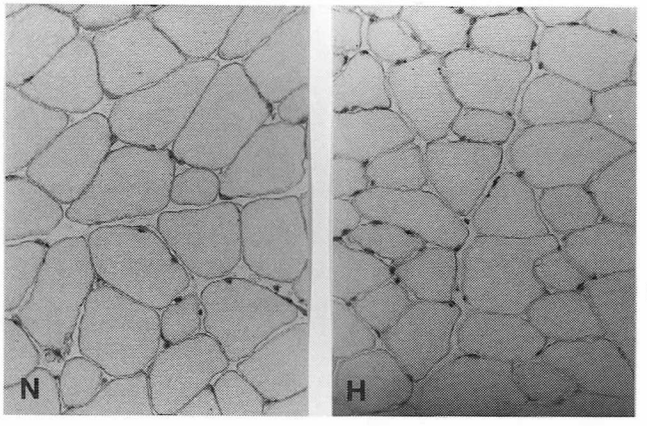


図4　生後30日目の骨格筋のジストロフィン染色像（×150）.
左が正常マウス（N）
右がヘテロ接合体（H）.

められた.

3．筋核近辺の細胞膜のジストロフィンの染色性により分類した筋核と出生後の経過日数との関係

図5に示した如くmdxマウスのヘテロ接合体では，明らかに筋核の近辺が染色される核（＋）(closed column）の数は生後5日目では全体の約3分の1を占めるが，日齢と共に増加して15日目には約80％となり，その後30日目までは明かな増加がみられなかった．これに対して核近辺の細胞膜が染色されない筋核（－）（open column）の数は生後5日目では全体の27％と正常筋に比べ多く，その後この比率は成長に伴い減少し，30日目で5％になった．正常マウスでは，生後5日目に始まり30日目まで殆ど全ての筋細胞で筋核に近接した細胞膜にジストロフィンの染色性が認められた．

また，（＋）の核と（－）の核の和に対する（－）の核の比率は，mdxのヘテロ接合体では生後5日目では45％とほぼ半数を占めたが，この比率は20日目では14％，30日目では6％と成長に伴って減少した．

考　　察

骨格筋細胞にLyon仮説[3]が当てはまるとすれば，女性保因者ではジストロフィン遺伝子に関し一個の筋核中の2個のX染色体のうち一方のみが活性化され，もう一方は不活性化されている筈である．従ってジストロフィン遺伝子に関してはジストロフィンを産生できる核と産生できない核の2種類の核が存在することが考えられる．一方，一個の筋核の遺伝子で産生されるタンパク質はそ

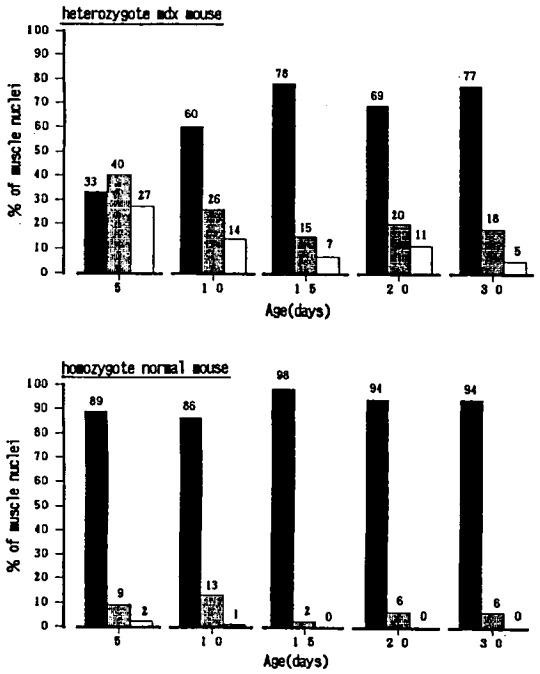


図5　筋核に近接した細胞膜のジストロフィンの染色性により分類した筋核と生後の経過日数との関係．■：(+)の核，▒：(±)の核，□：(−)の核．

の核の近辺に局在するとの報告があり[4]，ジストロフィンに関しても同様と推定される．従ってmdxのヘテロ接合体の骨格筋の筋核には，近辺の細胞膜にジストロフィンを有する核と有しない核の2種類の核が存在することが考えられる．我々の成績では，mdxマウスのヘテロ接合体の骨格筋細胞において生後5日〜10日目の幼若期には近接した細胞膜にジストロフィンが強く染色される核((+)の核)，僅かに染色される核((±)の核)，および染色されない核((−)の核)などが存在した．このことは，筋細胞においてLyon仮説が作動していることを示唆する成績である．10日目以後ジストロフィン(−)の核は，経過とともに減少し，30日目ではジストロフィン(−)の核は殆ど認められなくなった．また，我々は(±)の核は本来はジストロフィン非産生核であり近接したジストロフィン産生核のジストロフィンが移動してきたものと考えている．

ジストロフィン(−)の核の経時的な減少の機序については，やはりLyon仮説が作動しているとすれば，ジストロフィン産生核による代償的な産生の増加あるいは細胞内におけるジストロフィン産生核から非産生核の近辺へのジストロフィンの拡散分布が推定される．多数の(±)の核の存在はこれを支持する成績である．

文献的には，Watkinsら[5]はmdxマウスヘテロ接合体の骨格筋でジストロフィンが染色される細胞(陽性細胞)とされない細胞(陰性細胞)がモザイク状に存在し，また幼若期には細胞膜に染色されない部分とされる部分のある細胞，すなわちpatchyに染色される細胞が存在し，マウスが成長するに従ってジストロフィン陽性筋細胞が増加すると報告している．そしてこの機序についてはやはりジストロフィンの産生の代償的な増加あるいはジストロフィン産生核を有するsatellite cellが増殖，融合することによると考えられている．一方，筋細胞内の蛋白の流動，拡散についてはRalstonら[6]が多核筋管細胞において一つの筋核でコードされた蛋白は隣接する核にまで及ぶと報告している．これらの報告は我々のジストロフィンが筋細胞内で移動し，隣のジストロフィン非産生核にまで及び，(−)の核が(±)あるいは(+)に変わるとの考えを支持するものである．

以上のことにより，mdxマウスのヘテロ接合体ではLyon仮説が作動しており，また，1つのジストロフィン産生筋核にて産生されたジストロフィンは近接の筋核の近辺にまで及ぶと考えられる．

ま と め

mdxマウスのヘテロ接合体の骨格筋組織のジストロフィン染色を行い，近接した筋細胞膜に染色性を有する筋核と有しない筋核があり，mdxマウスのジストロフィン遺伝子に関してLyon仮説が作動しているとの考えを述べた．また，ヘテロ接合体mdxマウスの筋細胞ではジストロフィン産生核によって生成されたジストロフィンは非産生核の近辺にまで移動するため成熟ヘテロ接合体mdxマウスでは殆ど全ての筋細胞の細胞膜にジストロフィンが全周性に一様に証明されるものと

考えられる.

文　献

1) Arahata K, Ishihara T, et al: Mosaic expression of dystrophin in symptomatic carriers of Duchenne's muscular dystrophy. N Engl J Med 320: 138—142, 1989.
2) Bulfield G, Siller WG, et al: X chromosome -linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1189—1192, 1984.
3) Lyon MF: Sex chromatin and gene action in mammalian X-chromosome. Am J Hum Genet 14: 135—148, 1962.
4) Pavlath GK, Rich K, et al: Localization of muscle gene products in nuclear domains. Nature 337: 570—573, 1989.
5) Watkins SC, Hoffman EP, et al: Dystrophin distribution in heterozygote mdx mouse. Musle Nerve 12: 861—868, 1989.
6) Ralston E and Hall ZW: Localization of muscle gene products in nuclear domains. Nature 337: 570—573, 1989.

35) mdx mouseの骨格筋におけるDNA合成

川　井　尚　臣*

研究協力者　玉　木　康　民*　有　井　敬　治*　赤　池　雅　史*
増　田　健二郎*　横　井　健　治*

はじめに

mdxマウスは人のDuchenne型筋ジストロフィー症と異なり非進行性である．筋病理組織学的[1]にも生後4週～8週では筋細胞の変性・壊死が強く，その後これらの変化は少なくなり次第に再生筋に置き換えられ，90日目では変性・壊死細胞は殆どみられなくなる．本研究では，このようなmdxマウスの骨格筋の変化を筋細胞のcell cycleの面より究明するため，mdxマウスの骨格筋の筋核のDNA量を生後日を追って測定し，そのDNA合成曲線より筋細胞のcell cycleを調べ，mdxマウスにおける筋細胞の変性，再生と症状との関係について検討を加えた．

試料と方法

実験に用いたのは雄のmdxマウスである．正常対照としてはC57BL/10ScNマウスを用いた．親マウスは実験動物中央研究所の斎藤宗雄先生より供与をうけたもので，その後当教室で飼育，増殖し実験に用いた．これらのmdxマウスを生後15日目，30日目，60日目，ならびに90日目に頸椎脱臼法により殺処分し，腓腹筋を採取，厚さ30μの凍結切片を作成した．それぞれの時期の組織切片にFeulgen染色を行い，万能顕微分光測光装置(UMSP)（Karl Zeiss社）にて波長560μmを用い，測定面積314μm^2で筋核の吸光度を測定し，これをDNA量としarbitrary unit（A.U.）で表した．一枚の筋組織切片当たり無作意的に200個の筋核を測定し，各時期(15～90日目)の筋核DNAの分布を調べると共に三好ら[2]の考案した方法に従ってDNA合成曲線を作成し，各時期における筋細胞のcell cycleを検討した．

三好ら[2)3)]によると縦に筋核のDNA量をとり，横に等間隔にDNA量の少ない順に筋核を左から右へ並べると曲線を示し，diploid cellのDNA量2Cを中心としたpresynthetic gap（G_1期），直線状のsynthetic period（S期），4Cの横線を横切るpost synthetic gap（G_2M）期，4Cより大きい核（>4C）などのcell cycleが区別できるとされている．

成　　績

1．mdxマウスの筋病理組織像

図1に生後15日，30日，90日の筋病理組織像を示した．15日では異常所見は殆どみられないが，30日では，多数の壊死・変性筋細胞や再生筋細胞が見られる．90日目ではそれらの所見はきわめて少なくなり，大部分が中心核を有する再生後の筋細胞と思われる細胞で占められていた．

2．筋組織のFeulgen染色像

図2にmdxの生後90日目の骨格筋組織のFeulgen染色像を示した．Feulgen染色では核は濃い赤紫色に染色される．肉眼的にも核によって多少の濃淡の差がみられる．核部分の吸光度をUMSPにて測定したが，筋線維からはみ出た核や部分的に重なり合っている核は測定から除外した．

3．正常マウスとmdxマウスの筋核DNA量の分布

図3の左に正常マウス，右にmdxマウスの成績を示した．上から順に生後15日，30日，60日，

＊徳島大学医学部第一内科

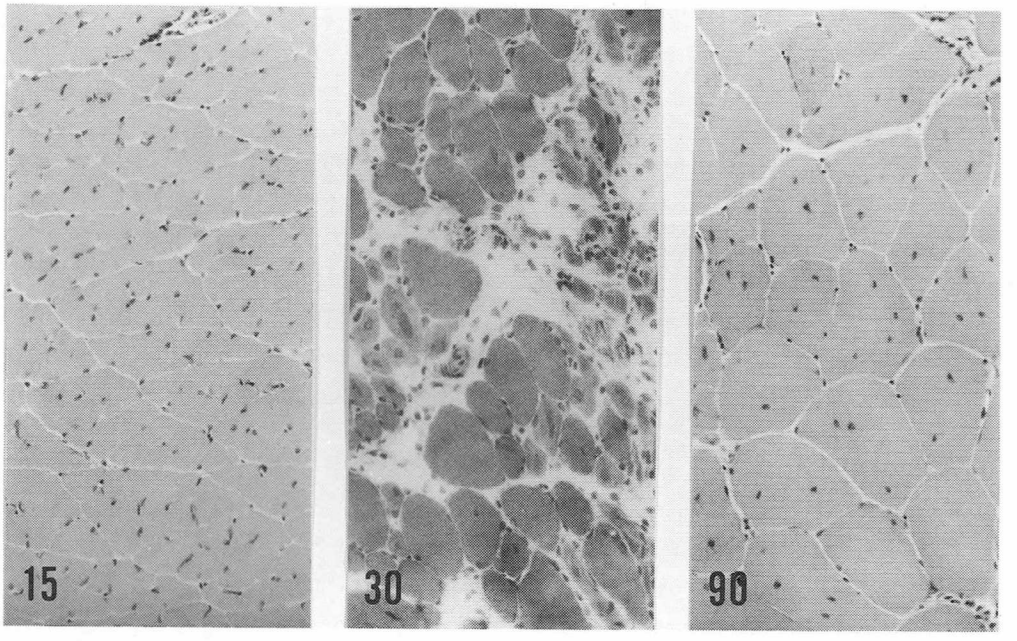


図1　右からmdxマウスの生後15日目，30日目，90日目の筋病理組織像を示した．HE染色，×120．15日目では殆ど変化はみられないが，30日目では筋細胞の壊死，変性，萎縮，再生が著明である．

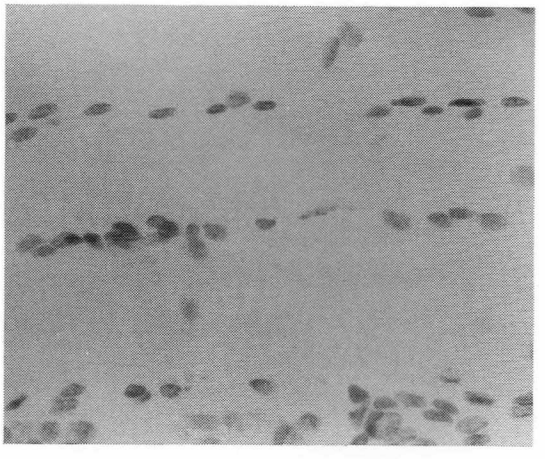


図2　mdxマウス90日目の筋組織のFeulgen染色像，×250．細胞核が濃染してみられる．

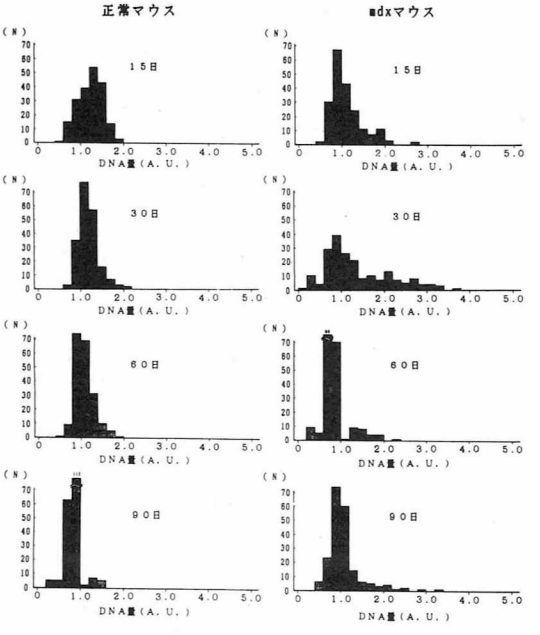


図3　正常マウスとmdxマウスの各時期(15日～90日）における筋核のDNA量の分布．

90日の成績を示し，横軸にDNA量，縦軸に筋核の数を示した．生後15日目では正常マウス，mdxマウスにDNA量が1.0A.U.を中心とした筋核が多くみられたが，30日目ではmdxはDNA量が3.0A.U.近辺のDNA量の多い核が増加しているのが認められた．

正常筋では，その後の60日目，90日目でも1.0A.U.附近の核が多く，DNA量の分布に経時的変化は殆どみられなかった．mdxマウス筋ではその後DNA量の多い核が減少し，90日目では再び核の多くがDNA量1.0A.U.近辺のものになった．

4．正常マウスとmdxマウスの骨格筋細胞のDNA合成曲線とcell cycle

図4に正常マウスとmdxマウスの30日目のDNA量の分布をもとに作成したDNA合成曲線を示した．なお，リンパ球の核のDNAの平均値A.U.値を2Cとした．

正常マウスの筋では2Cを中心としてpresynthetic gap（G_1期）の核が多く，S期の核はわずか3.5%みられるのみであり，postsynthetic gap（G_2期）のものは認められなかった．これに対し，mdxでは2Cを中心としたG_1期の核が61.5%，S期が12.5%，G_2M期は10.5%とS期，G_2M期の核が多く，4Cより大きい核も15.5%と多数認められた．この成績は，mdxマウス筋ではこの時期に正常期に比べDNAの合成期と分裂期の核が著しく多いことを示す．

図5は同様の方法で調べた15日目～90日目の各時期の筋組織の筋核のcell cycleを比較して示したものである．正常筋では，各時期を通じS期の核は3.0～3.5%とほぼ一定していたが，下段のmdxマウスでは15日目はS期はまだ5%と増加はわずかで，その他の時期の核も少ないが，30日では前述のごとくS期の核は12.6%と多くなり，G_2Mも多く，60日目でもS期の核はやはり12.0%と多数見られた．しかし，90日ではS期の核は再び著明に減少し，5.5%とほぼ15日目の値に近い数値を示した．

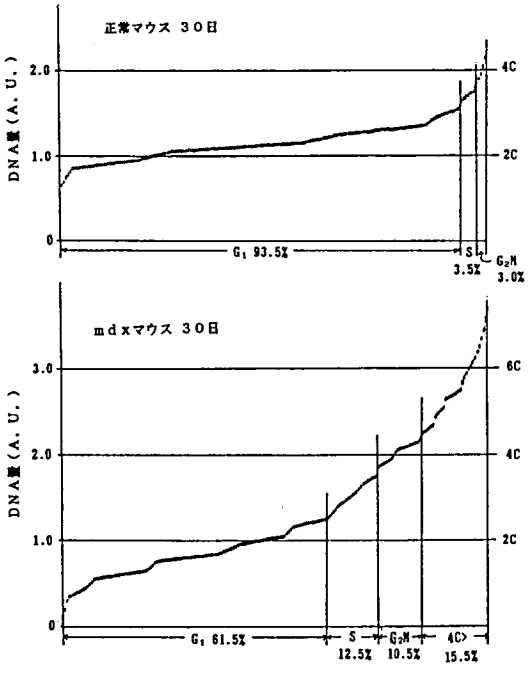


図4　正常ならびにmdxマウスの筋細胞のDNA合成曲線とcell cycle——筋組織の成績．

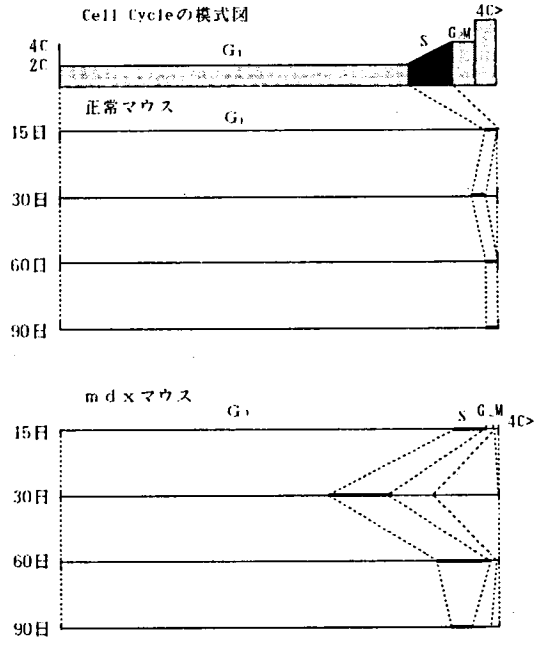


図5　正常ならびにmdxマウスの各時期における筋細胞のcell cycleの比較．

考　　察

mdx マウスには人の筋ジストロフィー症の Duchenne 型と同じく，ジストロフィン遺伝子に異常があり骨格筋細胞にジストロフィンは証明されないが筋力低下などの症状は非進行性であることが Duchenne 型とは異なっている．この病態についてはまだ十分研究が進んでおらず，mdx マウスの非進行性の機序は解明されていない．これを解明することは人の筋ジストロフィー症の治療法の開発にも結びつく重要な事柄である．

人の病的骨格筋の筋細胞の cell cycle に関しては同じ方法を用いて八木[4]がすでに Duchenne 型筋ジストロフィー症，その他の筋萎縮症の骨格筋における cell cycle の成績を発表しており，対照の成人骨格筋では cell cycle は G_1 期93.3%，S 期1.3%，G_2M 期4.7%，>4C　0.7%であるに対して，Duchenne 型では G_1 期83.4%，S 期10.7%，G_2M 期4.6%，>4C　1.3%で，対照に比べ S 期の核が増加しており筋細胞の cell cycle の面からも Duchenne 型では再生筋細胞が多いことが示唆されている．DMD の S 期核の率は我々の生後30日目，60日目の mdx マウスの成績，30日目12.6%，60日目12.0%ときわめてよく似た値であり，cell cycle の面から mdx マウスのこの時期の筋組織の筋細胞の DNA 合成の状態，すなわち細胞の変性，壊死，再生の状態は人の Duchenne 型に似たものであることが示唆される．そして，Duchenne 型では筋組織が著しく崩壊するまで S 期が多い状態が持続[4]し病状は進行性であるのに対して，mdx では生後90日目で S 期の核が減少し，すなわち再生筋細胞が減少し，病状が非進行性になることは Duchenne 型とは極めて大きい違いである．

本文では mdx マウスの筋核は生後15日では正常マウスとほぼ同じ cell cycle を示し，30～60日では S 期の細胞が増え，90日目には S 期のものが再び減少し元に戻るとの成績を示した．一方，筋の病理組織像は15日までは正常所見を示し，30日目，60日目では筋細胞の変性・壊死，そして再生が多く，90日目は中心核を有する細胞に置き変わっており，それまでにみられた変性・壊死細胞や再生筋細胞は極めて少ない．

筋核の cell cycle と筋病理組織像を経時的に比較検討すると，生後15日目では cell cycle では S 期が少なく，再生筋細胞も多くないことを示しており，この時期には筋細胞の変性壊死が少なく，従って筋の再生も起こらないと考えられる．30～60日では S 期，G_2M 期の核が増加しており，cell cycle の面からは再生筋細胞の著しい増加が示唆される．筋組織所見でもこの時期には変性・壊死細胞，再生細胞が多い．すなわち，この時期には筋細胞の脱落が多いためその補充のため筋核 DNA 合成の増加，すなわち筋細胞の再生が増加するものと考えられる．その後は筋細胞の変性・壊死が少なくなり，その結果 DNA 合成も減少(S 期の核の減少)，すなわち再生筋細胞が減少するものと思われる．

以上の成績から直ちに mdx マウスの病状が進行性でないことに対する解答は得られないが，mdx マウスで症状が進行しないのははじめ壊死・変性により脱落した筋細胞を再生筋細胞によって補充しているが，その後は S 期や G_2M 期の核を有する再生筋を増やし持続的に脱落細胞を補っているからではなく，再生筋の変性・壊死が何らかの原因によって抑制されていることによると考えられる．

本研究に示した成績はマウスの一個体を連続的に追って得たものではないので，今後実験の数を重ねて成績をさらに信頼度の高いものにしたい．

ま と め

mdx マウスの骨格筋細胞の cell cycle を経過を追って調べ，mdx マウスの病状が進行しないのは再生筋細胞が増加し，脱落した細胞を持続的に補っているのではなく，再生した筋細胞の変性，壊死が抑制されるためと考えられる．

文　　献

1) Dangain J and Vrbova G: Muscle development in mdx mutant mice. Muscle Nerve 7: 700—704, 1984.
2) 三好和夫，高野尚之：血球の DNA 合成に及ぼす放射線の影響—DNA 合成曲線の解析による

成績．日血会誌28：319—328，1960.
3) 岡　耕一：DNA 合成曲線より見た cell cycle. とくに正常人骨髄細胞について．四国医誌24：603—612，1960.
4) 矢木文和：筋ジストロフィー症及び各種筋疾患における骨格筋核の DNA 合成と cell cycle. 四国医誌37：130—142，1981.

36)「Immobilization」によるmdxマウス筋変性への影響
——第2報——

田邊　　等*

研究協力者　水野美彦**

昨年の本会議で我々はlocal tetanus法を用い，mdxマウスにおいて筋の不動化により筋変性が抑制されることを報告した[1]．今回は昨年の実験を更に拡大すると共に，運動制限のみを与えることによる筋変性への影響をも調べたので併せて報告する．

対象・方法

生後3wのmdxマウス24匹を使用した．8匹は昨年と同様右腓腹筋にtetanus toxinを1回筋注しlocal tetanusを作成した．別の8匹は身体の大きさより若干広い程度の狭い部屋で1匹づつ飼育した(**図1**)．残りの8匹は何も処置を施さず，通常の飼育とし対照とした．1，2，4，8週後（Rx群のみ4，8週後）に各4匹づつを殺し，toxin注射群は両側，それ以外は右SOL，EDLを採取し，HE染色標本における横断面での全線維数に対する中心核線維の頻度を測定し変性の指標とし，一方，湿重量，中心核を有しない線維の平均直径を測定し筋萎縮の指標とした．中心核を有する線維は再生途上にあり，従って線維直径は増加途中にあるので計測からは除外した．

各筋の同定は次の如くである．

Tx：Toxin注射群の注射側（右）

Cx：Toxin注射群の非注射側（左）

Rx：運動制限群

Ux：無処置対象群

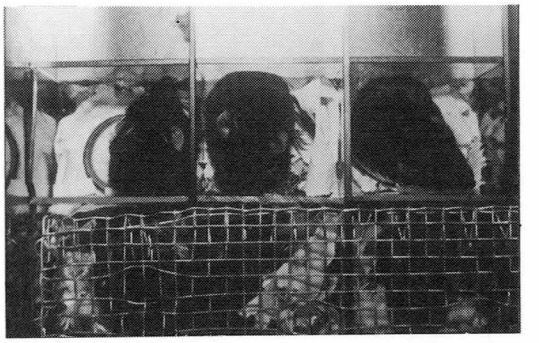


図1　運動制限用の飼育室

結　　果

1．中心核線維頻度

図2Aに示すごとく，SOLではTX群はUX群に比べ常に少なく，4，8週では有意差が認められた．Rx群でも4週でUx群との間に有意差をもって減少が見られた．一方，Cx群では1，2週ではむしろUx群より多く，かつTx群との間に有意差をもって増加を示した．

一方，EDLでは**図2B**に示すごとくTx群は1，8週後にUx群と比べて有意に減少し，8週後ではCx群，Rx群もUx群に比べて有意に減少を示した．**図3，4**に組織像の一部を示す．

2．湿重量

図5Aに示すごとく，SOLにおいては全体的にUx群に比べ湿重量は小さい傾向があり，4，8週で有意差が認められた．Cx群は1，8週でTx群との間に，2週でUx群との間にそれぞれ有意差が認められた．一方，Rx群ではUx群との間には有意差はなく8週ではむしろ増加が認められた．

＊東京都立神経病院神経内科
＊＊東京都立神経病院神経小児科

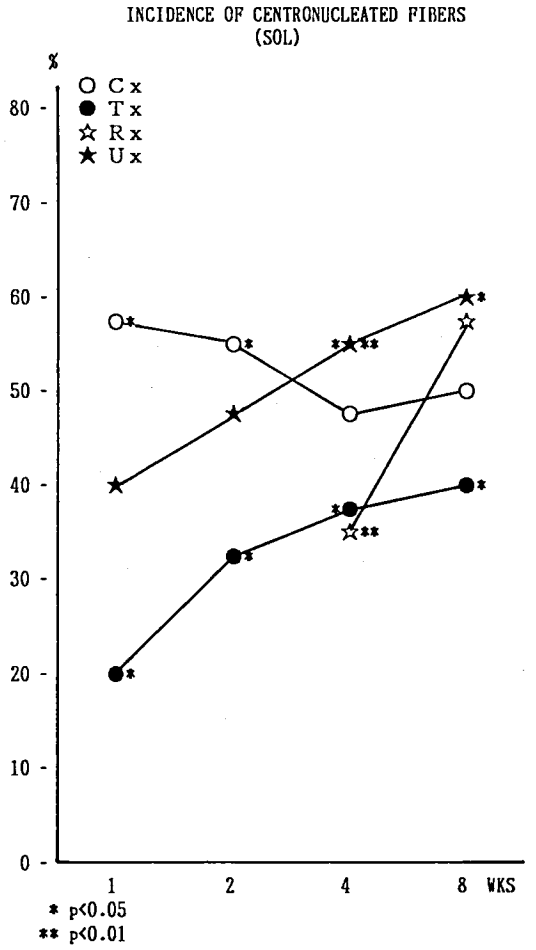


図2A　4週，Ux-SOL．HE×150

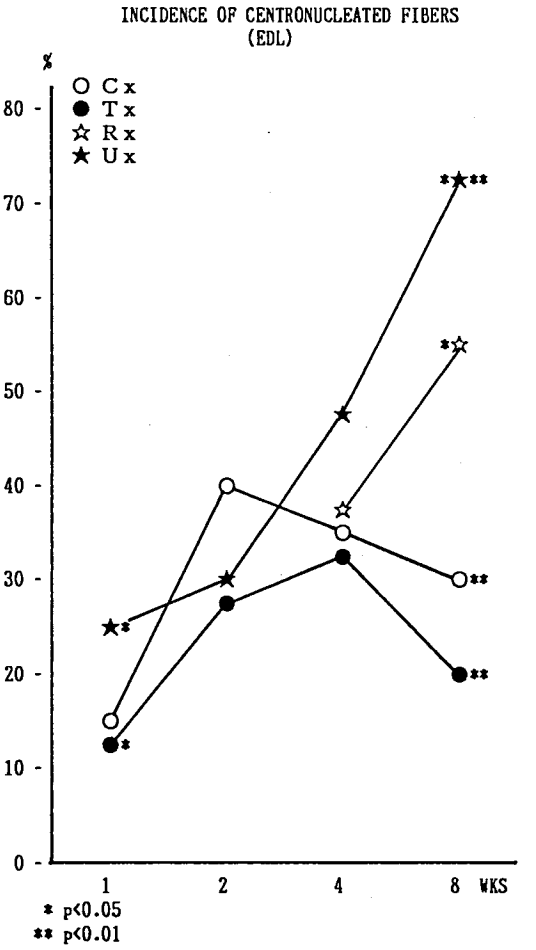


図2B　4週，Tx-SOL．HE×190

EDLでは図5Bに示すごとくCx群，Tx群ともUx群と比べて少ない傾向にあり，2週で有意差が認められた．Rx群はUx群との間には有意差はなく，8週でTx群との間に有意差が認められた．

3．平均直径

中心核を有しない線維の平均直径の測定では，SOLでは図6Aに示すごとくTx群，Cx群ではUx群に比べ小さく4，8週で有意差が認められた．Rx群ではUx群との間には差は認められなかった．EDLでは2週でCx群，Tx群がUx群に比べて有意に小さかったほかは有意差は認められなかった（図6B）．

4．変性抑制と筋萎縮の関係

表は中心核線維の減少，すなわち変性抑制が有意に認められた組合せと，平均直径，湿重量が有意差を示した組合せを表にして比較したものである．表から分かるように，平均直径，湿重量の間にはかなり良い相関がみられたが，変性抑制と平均直径，湿重量との間には数カ所を除いて相関はほとんど認められなかった．

考　　察

今回の実験ではlocal tetanus，運動制限の何れの方法でも対照と比較して筋変性は抑制されており，筋のimmobilizationが変性を抑制することが

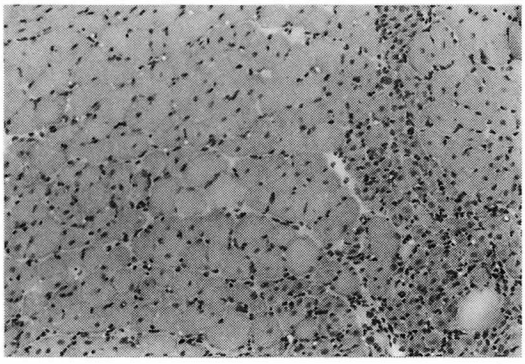


図3A　8週，Ux－EDL．HE× 60

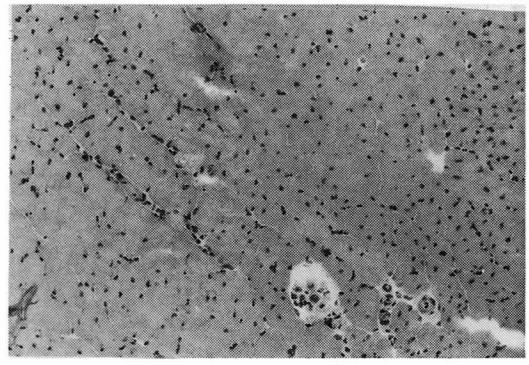


図4A

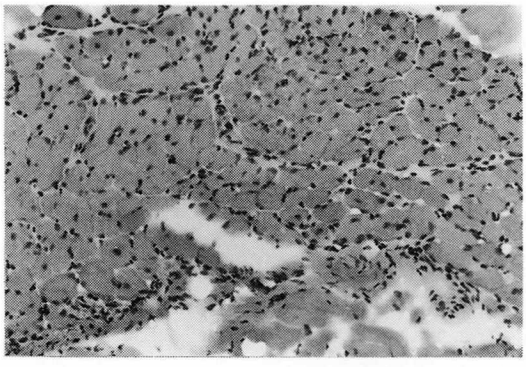


図3B　8週，Tx－EDL．HE×150

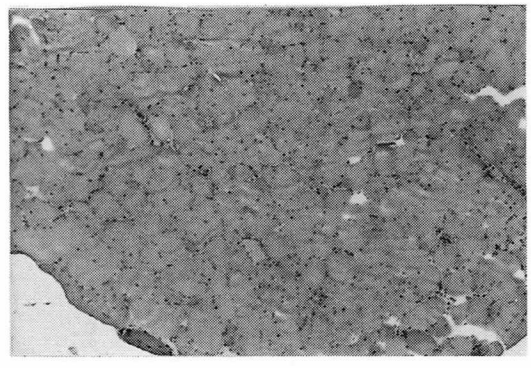


図4B

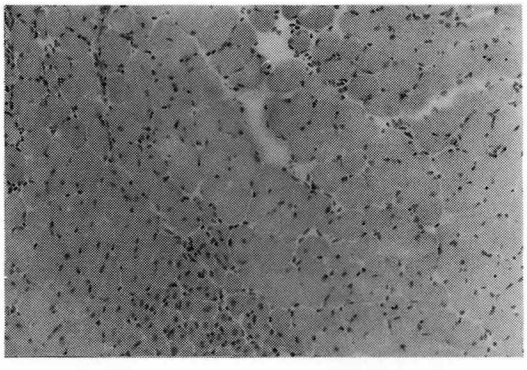


図3C　8週，Rx-EDM．HE ×75

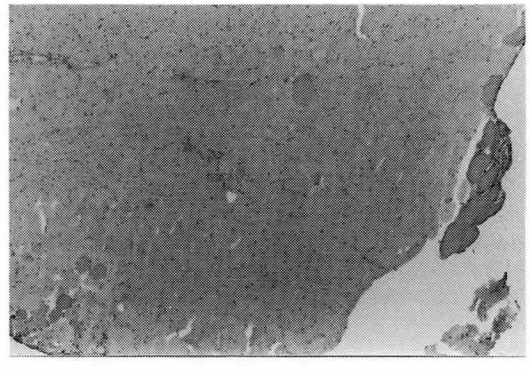


図4C

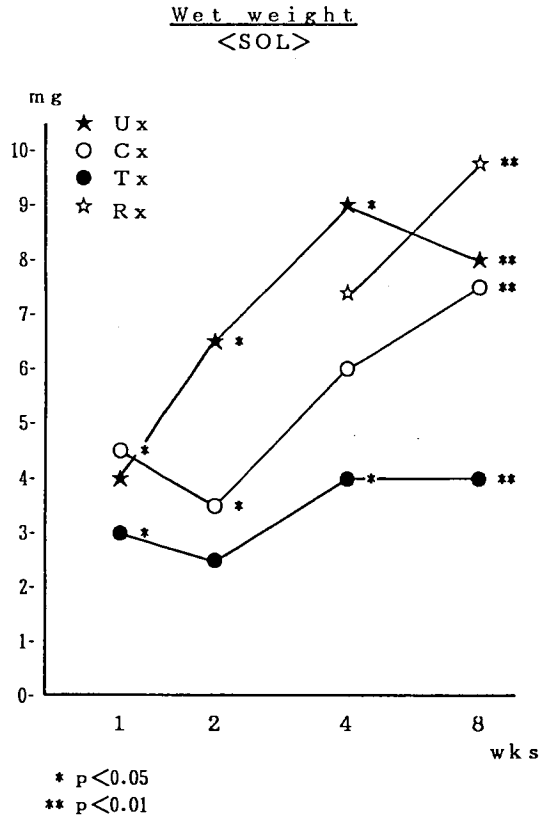


図5A

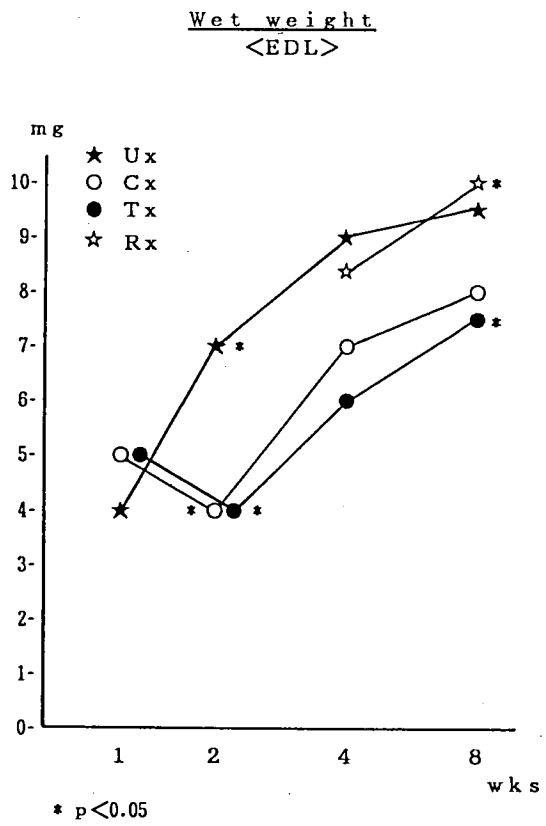


図5B

示された．また，SOLにおいて1，2週後にCx群がTx群に比べ有意に変性が強かったことは，Cx群が片足で歩くため過重労働になっていたことを考えると，筋運動自身が変性を促進することを示しているものと思われた．ジストロフィンは筋膜の内面を裏打ちするようにnetworkを作っていると考えられているが[2]，MDXマウスではジストロフィン欠損のためこの裏打ち構造が粗となり，膜の透過性が亢進し，カルシウムの流入が増加し筋変性をもたらすと考えられる．筋に対する運動負荷はこの透過性を一層亢進させる可能性が考えられた．Karpatiら[3)4)]はdystrophic hamsterにおける脱神経・再支配実験において，脱神経時に変性が抑制され，再支配時に変性が現われることより，筋の発達障害が筋変性抑制に影響していると推察している．今回の実験では平均直径と変性抑制の間には相関はなく彼等の結論は支持できなかった．筋運動自身が変性を促すとすれば，彼等の実験結果はこの観点から容易に解釈できるわけであり，筋萎縮は単なる廃用性萎縮に過ぎないと考えられた．

ところで，今回の結論を臨床に適用できるか否かについて考察してみたい．Duchenneの患者(DMD)の場合，2歳前後では元気に走り回っており，臨床症状だけからは疾患に気がつかないことが普通である．しかしながら，筋組織では立派に変性が見られている．この状態はMDXマウスの場合も同様で，臨床的に筋力低下は分からないにも拘らず，変性は進んでいる．かつ，両者ともジストロフィン欠損を示している．ジストロフィン欠損が筋変性に関係していることはほぼ間違いないと思われ，従って，今回の結論をDMDに適

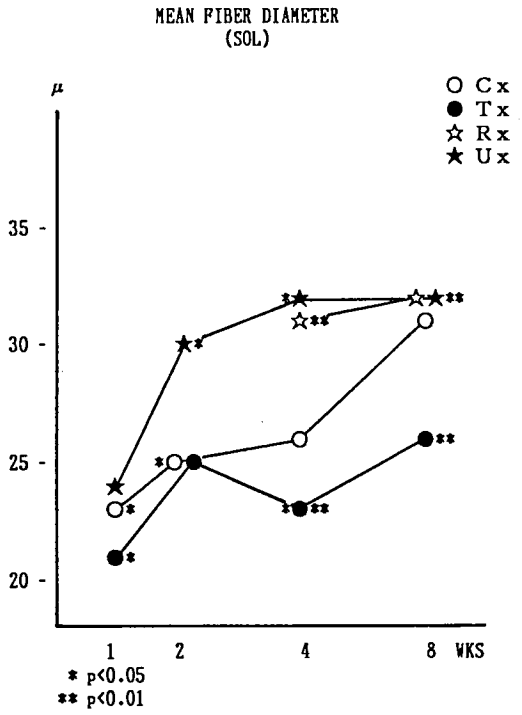


図6A

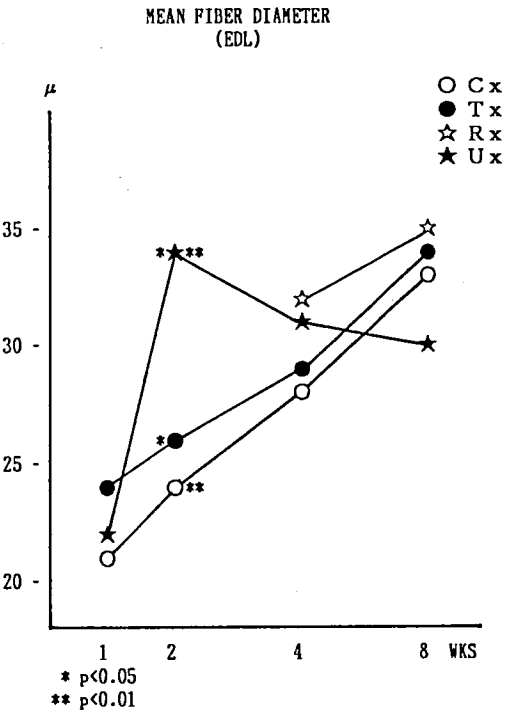


図6B

用して考えることは妥当と考えられる．実際，DMD 患者が合併症の治療のため臥床生活を送っていると，CPK が低下してくることはよく観察される所である．これは運動制限により筋変性が抑制されたことに他ならないと考えられる．一方，学童が夏休みなど長期休暇中に自宅であまり動かずに生活していると，新学期になって筋力が低下することも，また，観察されるところである．しかし，この場合は病気がかなり進行した症例であることが多く，この場合は廃用性萎縮の影響の方が強く出るのではないかと考えられる．従って，幼児期のまだ元気な内から運動を制限することで筋変性を抑制し，病気の進行を遅らせることが出来るのではないかと考えられた．

表　筋変性抑制と平均直径，湿重量の関係

週	筋	実験群	変性抑制	平均直径	湿重量
1	SOL	Cx - Tx	0.05*	0.05	0.05
	EDL	Ux - Tx	0.05	NS	NS
2	SOL	Cx - Tx	0.05	NS	NS
		Cx - Ux	NS	0.05	0.05
	EDL	Tx - Ux	NS	0.05	0.05
		Cx - Ux	NS	0.01	0.05
4	SOL	Tx - Ux	0.05	0.05	0.05
		Rx - Ux	0.01	NS	NS
		Rx - TX	NS	0.01	NS
8	SOL	Tx - Cx	NS	0.05	0.01
		Tx - Ux	0.05	0.01	0.01
		Tx - Rx	NS	NS	0.05
	EDL	Cx - Ux	0.01	NS	NS
		Tx - Ux	0.01	NS	NS
		Rx - Ux	0.05	NS	NS
		Rx - Tx	NS	NS	0.05

* 数値は有意差P値
NS: Not significant

結　　論

1．Local tetanus，運動制限何れの方法でも mdx マウスにおける筋変性を抑制出来た．この場合 tetanus 群の方が抑制が強い傾向が見られた．

2．筋萎縮と筋変性抑制との間には有意な相関は認められず，筋線維の発育障害が変性抑制の原因とは考えられなかった．

3．運動負荷の強い筋では変性の増強が見られ，MDX マウスにおける筋変性は筋運動自身によって促進されることが示唆された．

4．DMD 患児においても，幼児期より運動を制限することによって，病気の進行を遅らせる可能性が示唆された．

文　献

1) 田邊　等，水野美彦：Immobilization による mdx マウス筋変性への影響—Local tetanus 法による検討—．“厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究”（杉田班）平成元年度研究報告書，1990，pp 151—155.

2) Koenig M and Kunkel LM : Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility.

3) Karpati G, Armani M, Carpenter S and Prescott S: Reinnervation is followed by necrosis in previously denervated skeletal muscles of dystrophic hamsters. Exp Neurol 82: 358—365, 1983.

4) Karpati G, Carpenter S and Prescott S: Prevention of skeletal muscle fiber necrosis in hamster dystrophy. Muscle Nerve 5: 369—372, 1982.

37）筋ジストロフィーハムスターにおける神経筋接合部の電顕的研究

福　原　信　義*

はじめに

進行性筋ジストロフィーのモデル動物としては，種々のものが用いられているが，その中でジストロフィーハムスターは臨床症状が軽く，非進行性であり，組織学的には中心核線維を特徴とするため，myotubular myopathy との類似性がうかがわれる．myotubular myopathy は近年になり染色体の異常（Xq28など）[1]がいわれているものの，その病理学的発症機序は不明である．しかし，他の先天性ミオパチーと同様にタイプⅠ線維の萎縮，タイプⅡ線維の肥大，群集萎縮などの組織学的所見が見られ，神経原性の要素があることが疑われている．そこで myotubular myopathy のモデル動物としてのジストロフィーハムスターの神経筋接合部の形態的異常の有無を検討した．

対象・方法

生後130日目の雄性ジストロフィーハムスター（BIO 14.6）と対象ハムスター（BIO F1B）の各3匹を使用した．それぞれ長趾伸筋（EDL）とヒラメ筋（SOL）を取り出し，2.5%グルタールアルデヒドで固定後，神経筋接合部を切り出し，電子顕微鏡により観察するとともに，presynaptic area (PreA), presynaptic length (PreL), post-synaptic area (PoA), secondary synaptic clefts の数（SC）について形態計測を行った．synaptic clefts の数としては primary synaptic cleft と連続して観察される secondary synaptic clefts の数をもって SC とした．また，EDL, SOL の他，イソペンタンで凍結した多数の筋肉について各種の染色を行い，組織学的，組織化学的検討を行った．ジストロフィン染色にはホフマン博士より供与された60K の抗ジストロフィン抗体を用い，間接蛍光法により染色した．

結　　果

1）光顕的観察

筋ジス群では筋線維の大小不同，fiber splitting が目立ち，ほとんど全ての筋線維に中心核が見られた（図1）が，筋線維の平均直径は35—38μm で対照群とは有意差が見られなかった．一部の筋線維でわずかに再生線維の出現が見られたが，壊死や細胞浸潤はほとんど見られなかった．また，一部の筋では NADH-TR 染色でタイプⅠ線維の萎縮の認められるところがあった．間質の線維化はみられなかった．ジストロフィン染色では筋ジス群，対照群とも染色性には差はなく，筋鞘膜，筋鞘核が良く染まっていた．

骨格筋内の有髄神経線維には異常は見られなかったが，運動終板は幅が30～40μm にも拡大しているものが多く（図1），terminal collateral ramification が複雑化していることがうかがえた．

2）電顕的形態計測

表　神経筋接合部の形態計測データ

	Pre A(μm^2)	Pre L(μm)	Po A (μm^2)	S C
SOL				
対照ハムスター	5.01±0.82 (n = 29)	4.06±0.37 (n = 29)	4.98±0.56 (n = 29)	7.00± 0.70 (n = 29)
ジストロフィー	4.54±0.50 (n = 73)	3.75±0.26 (n = 73)	4.98±0.29 (n = 74)	5.73± 0.42 ** (n = 73)
EDL				
対照ハムスター	3.03±0.31 (n = 62)	3.79±0.22 (n = 64)	3.67±0.24 (n = 65)	6.10± 0.41 (n = 65)
ジストロフィー	3.28±0.55 (n = 21)	2.92±0.36 * (n = 22)	3.23±0.51 (n = 23)	4.70± 0.61 ** (n = 23)

n: number　　(* P <0.05; ** P<0.005)

*国立療養所犀潟病院

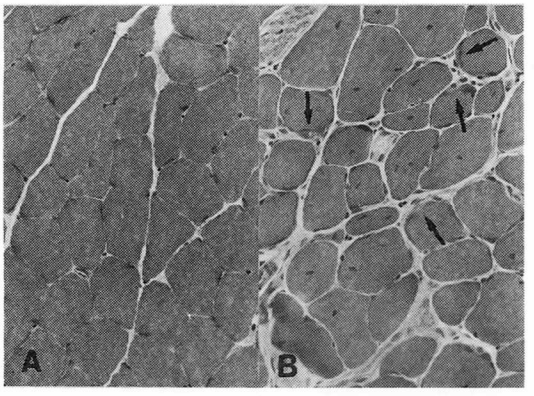


図1　ヒラメ筋　×136
A：対照群，B：筋ジス群．直径の大小不同があり，拡大した運動終板（矢印）が多数見られる．

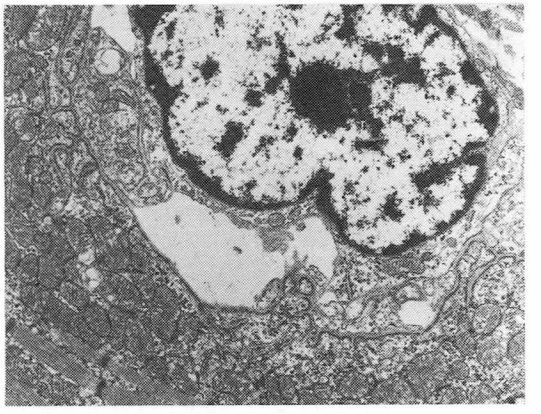


図3　筋ジス群：EDL の神経筋接合部
×6,800
神経終末が小さく，secondary synaptic cleft の数も少ない．

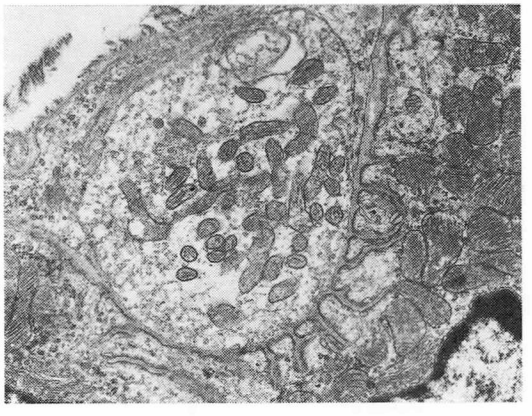


図2　対照群：EDL の神経筋接合部
×10,500

図4　筋ジス群：SOL の神経筋接合部
Secondary synaptic cleft の数が非常に少ない．　×10,500

詳細は**表**に示したが，観察した神経筋接合部の数は対照群が SOL29個，EDL65個，筋ジス群が SOL74個，EDL23個であった．Pre　A は SOL，EDL ともに筋ジス群と対照群とでは有意差は認められなかったが，PreL は EDL で対照群が3.79 μm±0.22（S.E.）に対して筋ジス群は2.92μm±0.36と筋ジス群が有意に（$P<0.05$）短縮していた．PoA は SOL，EDL とも筋ジス群と対照群では有意差は認められなかった．SC は SOL で対照群が7.00±0.70，筋ジス群が5.73±0.42，EDL で対照群が6.10±0.41，筋ジス群が4.70±0.61であり，何れも筋ジス群の方が synaptic cleft の数が有意に（$P<0.005$）少なかった．代表的な電顕写真を**図2，3，4**に示した．

考　　察

筋ジストロフィーハムスターは1962年に Homburger ら[2]により発見されたもので，臨床的には心筋障害があるが，骨格筋の症状は軽く非進行性なのが特徴とされている．病理学的にも，生後2週以後に壊死，再生が強く，4月までに中心核線維が大部分となってくるのに結合織の増加や脂肪

織の浸潤はみられないのを特徴としている．

中心核は筋線維の再生や，fiber splitting の一時期に出現するものであり，慢性のミオパチー，ニューロパチーで見られる．しかし，このジストロフィーハムスターでみられるほどに著明に多い中心核線維は人の疾患では緊張性筋ジストロフィー，myotubular myopathy で見られるぐらいである．緊張性筋ジストロフィーで中心核線維の多い理由はこの病気における fiber splitting と関係して生じているものと考えられているが，myotubular myopathy での理由は不明である．

緊張性筋ジストロフィーでは神経筋接合部の secondary synaptic cleft の数はむしろ増加している[3]．myotubular myopathy での神経筋接合部の変化についての報告はないが，筋生検でタイプⅠ線維萎縮，群集萎縮が見られることより神経原性の要素のあることが推定されている．ジストロフィーハムスターはこの myotubular myopathy のモデル動物とみなされるが，この動物での神経筋接合部の変化についての報告は見られない．しかし，Eu ら[4]は我々の用いたハムスターとは種類が異なるが，UM-X7.1で骨格筋の終末神経支配の異常について報告しているが，彼らは神経支配の異常を筋病変の原因というよりは筋変性の結果であると推定している．Becker 型筋ジストロフィーやネマリンミオパチーの神経筋接合部は筋ジストロフィーハムスターと同様に，secondary synaptic cleft の数が非常に少ないのが特徴であり[5)6)]，神経筋接合部の未熟性のためと考えられている．今回の筋ジストロフィーハムスターでみられた secondary synaptic clefts の数の減少も同様に考えられる．

ま と め

筋ジストロフィーハムスターの神経筋接合部の形態について検討した．光顕では運動終板が拡大し，terminal collateral ramification が複雑化していることがうかがえた．電顕的形態計測では presynaptic length が EDL で短縮し，secondary synaptic clefts の数が SOL，EDL ともに減少しており，神経筋接合部の未熟性のためと考えられた．

文 献

1) Lehesjoki AE, Sankila EM, Miao J, Somer M, Salonen R, Rapola J and Delac hapelle A : X-linked neonatal myotubular myopathy. One recombination detected with 4 polymorphic DNA markers from Xq28. J Med Genet **27** : 288—291, 1990.

2) Homburger F : Myopathy of hamster dystrophy : History and morphologic aspects. Ann NY Acad Sci **317** : 2, 1979.

3) 福原信義，熊本俊秀，湯浅龍彦，椿 忠雄：筋強直症の組織化学的，電顕的研究．臨床神経**19** : 909—909, 1979.

4) Eu H, Coërs C, Jasmin G and Telerman-Toppet N : Terminal motor innervation in myopathic hamsters. J Neurol Sci **47** : 329, 1980.

5) Fukuhara N, Yuasa T, Tsubaki T, Kushiro S and Takasawa N : Nemaline myopathy. Histological, histochemical and ultrastructural studies. Acta Neuropathol (Berl) **42** : 33—41, 1978.

6) Fukuhara N, Suzuki M, Tsubaki T, Kushiro S and Takasawa N : Ultrastructural stuides on the neuromuscular junctions of Becker's muscular dystrophy. Acta Neuropathol (Berl) **66** : 283—291, 1985.

38）ジストロフィー筋への正常 myoblast の注射に関する研究——X線照射の効果

寺　尾　寿　夫*

研究協力者　加　藤　洋　司*　岡　下　恭　子*
永　井　由紀子*　石　岡　邦　明**

はじめに

最近多くの研究グループより，正常の myoblast をジストロフィー筋に注射し，ジストロフィー筋の性質を正常化しようとする試みが行なわれている[1)~4)]．

我々も，ジストロフィー動物を用い，正常 myoblast をジストロフィー筋に注射して，その変化につき研究を行なっており，昨年の報告に続き，現在までの研究結果を報告する．

方　法

(1) Precursor cell の取り方

これは昨年報告した方法と同じである[5)]．まず C57 BL/10Sc の生後1～3日目の幼若マウスの下肢筋をとり出し，結合組織，血管などを取り除いた後に trypsin で処理し，沪過後 collagen coating dish に移し，incubatc を行なった．この際使用した medium は Dulbecco's modified Eagle medium である．

培養終了後に，増殖した muscle precursor cell を trypsin を用いて再び集め，遠心後適量の medium を加えて 5×10^7ml になるように suspend し，これをジストロフィー筋に注射した．

(2) 注射法

Host は生後2ケ月の雄の mdx マウスを用い，注射する筋は主として長指伸筋（EDL）を使用した．注射は筋の数ケ所に分割して行ない，注射量は1本の EDL につき約0.05ml，細胞数としては約 3×10^6 個である．

なお注射は皮膚を切開し，直視下に行ない，注射後皮膚を縫合した．その後種々の時間後取り出し，一般組織学的に観察し，また抗ジストロフィン抗体を用いて免疫組織学的に検討した．

(3) 拒絶反応の抑制

先回報告した如く，mdx の筋に B-10の myoblast を注射すると，拒絶反応が起ってくる．これを防ぐために，昨年は cyclosporin A を50mg/kg オリーブ油に溶解し，30日間連日経口投与した．しかしこれでは十分に抑制できなかった．そのため今回は host の全身的な X 線照射を行なった．方法は mdx マウスを特殊なケージに入れ，一匹当り全身に450rad の X 線を照射した．そして照射24時間後に EDL に 3×10^6 程度の precursor cell を注射した．注射後1ケ月目に EDL をとり出し，immunostaining を行なって再生筋線維を調べた．

結　果

Myoblast transfer を行なって1ケ月後，EDL をとり出し，H-E 染色を施して観察すると，myoblast を注射した場所に一致して，新たに再生した筋線維が集まってみられた．これらは周囲の筋線維より直径が小さい線維群である．無処置の mdx に myoblast を注射した場合は，拒絶反応による細胞浸潤がみられる．しかし450rad の X 線

＊帝京大学医学部第一内科
＊＊帝京大学医学部放射線科

図1　正常myoblast注射後1か月のmdxのEDLの抗ジストロフィン抗体によるimmunostaining（hostに450radのX線照射）

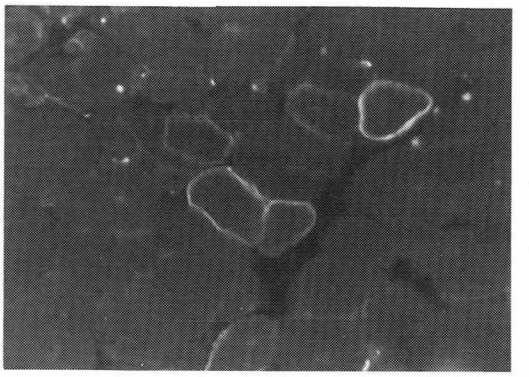


図2　正常myoblast注射後1か月のmdxのEDLの抗ジストロフィン抗体によるimmunostaining（hostに450radのX線照射）

照射を行なったものには，拒絶反応はほとんどみられなかった．

Myoblastを注射した場所に再生した筋線維を抗ジストロフィン抗体で免疫染色を行ってみると，数本～十数本のジストロフィン陽性の線維群がところどころに集まっているのがみられる．

図1，図2はこれを示したものである．ときには陽性線維は群をなさず，孤立して存在するものもあった．

10匹のmdxマウスのmyoblast注射後のEDLを取り出し，各々のEDLにつき2～3ケ所のcross-sectionのimmunostainingを行い，1本のEDLの各sectionから合計約1000本の線維を観察し，ジストロフィン陽性線維の数を数えた．これを表にしたのが**表1**である．

この表に示された通り，radiationを行った例ではジストロフィン陽性線維の出現率はかなりバラツキがあり，0.7～5.1%にみられる．平均値は2.2%となる．一方myoblastを注射しなかったコントロール側にも陽性線維は少数みられ，平均0.4%存在していた．これら両者の間には有意な差がみられ，radiation後，myoblastをtransferした側では有意に増加していた．

これをcyclosporin Aを使用した場合に比べると，この場合には或程度拒絶反応が起こるためか，陽性線維の出現率は0.8%位にとどまり，コントロールより僅かな増加があるのみで，有意な上昇はみられなかった．これに比較すると，radiationの方が効果があったことになる．

さて，上記の実験ではhostのmdxマウスは，生後2ケ月のものを使用しており，EDL中の筋線維はほとんど再生を経ている．したがって再生後安定した筋線維中のsatelite cellは休止状態にある．もしmdx側のsatelite cellが活性化されている時に，正常myoblastを注射すれば，ジストロフィン陽性線維の出現率を上げることができると考えられる．

一般に筋を移植した場合には，移植された筋線維はほとんどすべて壊死におちいる．しかし移植後のanoniaの状態で筋線維が崩壊してもsatelite cellは生き残り，これも残存する基底膜の下でdonorのmyoblastが活性化され，筋再生は進行していく．この時graftがジストロフィー筋でこれに正常myoblastが注射で与えられた場合，ジストロフィン陽性線維の出現率がどのようになるかをみるため次の実験を行った．

まずmdxマウスに450radのwhole body irradiationを行い，24時間後にEDLを取り出し，体外でこれに培養して得たmyoblastを3×10^6個注射した．注射後直ちにそのEDLを取り出したmdxマウスのもとの場所にautotransplantationを行った．2ケ月後，これをとり出し，同様にim-

表1　Dystrophin positive fibers in mdx EDL, 1 month after normal myoblast transfer (whole body X-ray irradiation)

Host No.	Number of positive fibers / Total fibers		%	
	myoblast transfer	control	myoblast transfer	control
1	30 / 917	10 / 1398	3.3	0.7
2	18 / 673	2 / 630	2.7	0.3
3	12 / 995	0 / 602	1.2	0.0
4	10 / 1124	10 / 1278	0.9	0.8
5	53 / 1045	0 / 541	5.1	0.0
6	20 / 705	2 / 872	2.8	0.2
7	15 / 796	10 / 862	1.9	1.2
8	25 / 1235	2 / 1041	2.0	0.2
9	10 / 697	6 / 857	1.4	0.7
10	10 / 1377	3 / 1477	0.7	0.2
Average			2.2±1.3	0.4±0.4

$p<0.01$

表2　Dystrophin positive fibers in autografted mdx EDL, 2 months after normal myoblast transfer

Host No.	Number of positive fibers / Total fibers		%	
	myoblast transfer	control	myoblast transfer	control
1	15 / 898	3 / 714	1.7	0.4
2	20 / 1058	11 / 1089	1.9	1.0
3	3 / 857	3 / 1071	0.4	0.3
4	10 / 1163	0 / 1011	0.9	0.0
5	7 / 842	3 / 638	2.0	0.5
6	23 / 700	8 / 1026	3.3	0.8
7	3 / 500	10 / 800	0.6	1.3
8	10 / 654	0 / 750	1.5	0.0
9	28 / 1013	15 / 1364	2.8	1.1
Average			1.7±0.9	0.6±0.4

$p<0.01$

munostaining を行い観察した．

表2は9匹の mdx マウスにつき行った結果を示している．やはり一本の EDL につき1000本前後の筋線維を調べたものである．

これでもかなりバラツキがみられる．平均は1.7%であり，コントロールよりも有意に増加していた．しかしこれは *in situ* で注射した場合に比し，有意な差は見られなかった．この理由は明らかでないが，一つには移植後の筋再生は残存する基底膜の下で行われ，これが注射された正常の myoblast との fusion を妨げるためと考えられる．

考　　察

正常の myoblast をジストロフィー筋に注射し細胞移植を行なおうとする試みは Law ら[1]により始められ，この後多くの報告がみられるようになった．

Host の mdx マウスをヌード化し，拒絶反応を防いで行った Partridge ら[2]の報告によれば，陽性化率は10～40%であるという．

Law ら[1]は myoblast を soleus に注射し，筋重量の増加と tetanic tension の増加を報告している．また竹光ら[4]は塩酸ブピバカインと共に myoblast の注射を行い，ジストロフィン陽性筋線維は3.86%となり，コントロールに比し増加したと報告している．

Myoblast を注射後，もっとも問題になるもののひとつは拒絶反応である．これを抑制するため，昨年我々は cyclosporin A を使用したが，抑制は充分でなく，ジストロフィン陽性線維の出現も0.8%（コントロール0.6%）であった．今回行った X 線照射では拒絶反応は良く抑えられたが，ジストロフィン陽性線維の割合は2.2%（コントロール0.6%）にとどまっていた．

陽性線維の比率が十分上昇しない理由としては次の要因が考えられる．

1）注射時に precursor cell が筋組織内にとどまらず，筋肉外に流出してしまう可能性

2）注射された myoblast が僅かしか migrate しないこと

3）Myoblast の注射後起こる拒絶反応

4）Myoblast を注射しても，host 側の satelite cell が activate されず，dormant の状態にとどまり，注射された myoblast と fusion を起さないこと

などであろう．4）に関しては satelite cell を activate させるため，移植筋に注射したが，陽性化率を上昇させることはできなかった．これは筋移植後の筋線維の崩壊時にも移植筋線維の基底膜はしばらく残存し，注射された myoblast との fusion を妨げるのも原因と考えられる．

さて，この程度のジストロフィン陽性線維の増加が果して筋力の増強に効果があるだろうか．これは直接治療効果に関連する重要な問題である．

mdx マウスの筋力低下に関しては諸説があるが，最近の Carlson ら[6]の報告によれば，mdx マ

ウスでは whole body tension の低下があり，また *iv vivo* での筋直接刺激で twitch および tetanic tension の低下があるという．我々も昨年の本会議で mdx マウスの *in vivo* での筋直接刺激で twitch および tetanic tension の低下を報告した[7]．

しかし，cyclosporin A で拒絶反応を抑制しながら行った昨年の報告では，ジストロフィン陽性線維の増加が僅かであり，myoblast 注射後の EDL の直接刺激で twitch および tetanic tension の増加はみられなかった．現在 X 線照射マウスの myoblast 注射後の EDL につき筋力を検討中である．

さらにジストロフィン陽性化率を増加させるため如何に多くの myoblast を注射し，これを筋内にとどめるか，また拒絶反応を有効に抑制する方法の研究が今後の課題であろう．

文　献

1) Law PK, Goodwin TG and Wang MG: Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. Muscle and Nerve 11: 525—533, 1988.
2) Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP and Kunkel LM: Conversion of mdx myofibers from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. Nature 337: 176—179, 1989.
3) Karpati G, Pouliot Y, Zubrzycka-Gaarn E, et al: Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. Am J Path 135: 27—32, 1989.
4) 竹光正和，荒畑喜一，埜中征哉：mdx マウスの筋再生能と，その過程における正常筋芽細胞の移植．臨床神経学 30：1066—1071，1990.
5) 寺尾寿夫他：ジストロフィー筋への正常マイオブラストの注射に関する研究．“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) 平成元年度研究報告書，1990，pp 177—182.
6) Carlson, CG and Makiejus RU: A noninvasive procedure to detect muscle weakness in the mdx mouse. Muscle and Nerve 13: 480—484, 1990.
7) 寺尾寿夫他：骨格筋の移植に関する研究．1）ヌードマウスに移植後の再生筋の収縮特性，2）再生筋の由来．“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成因に関する研究”(杉田班)昭和63年度研究報告書，1989，pp 99—104.

39）骨格筋特異的蛋白発現に関する神経ペプチドの研究

高　守　正　治*

研究協力者　吉　川　弘　明*　安　川　善　博*　沖　野　惣　一*

はじめに

最近，筋細胞決定因子としてLassarらによるMyoD1[1]やWrightらによるmyogenin[2]が発見され，骨格筋細胞分化調節機構の遺伝子レベルの解析という新たな展開が始まった．また分化過程のみならず，筋細胞がそれ自身を維持し，収縮・弛緩といった特殊な生理機能を果たすには，数多くの遺伝子の発現が何らかの因子により的確に制御される必要があるものと考えられる．

これまで，筋の機能を制御する因子として支配神経の役割が重要視されてきた．脱神経された筋は萎縮するとともに，アセチルコリン受容体（AChR）の分布も変化をきたす．Drachmanら[3]は，この神経性の因子としてアセチルコリン（ACh）自体の重要性を指摘した．一方Takamiら[4]により，運動神経終末部にはカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）が，AChと共存することが示された．CGRPの生理作用として筋細胞のAChRの増加をmRNA転写のレベルで促進することや，筋の張力を増強することが明らかとなった．

本報では，CGRPが細胞の生理機能に重要な役割を持つプロトオンコジーン発現に及ぼす影響を調べるとともに，我々の用いているラット骨格筋初代培養細胞に筋決定因子であるMyoD1とmyogenin発現があるかを調べ，筋タンパク質の発現調節機構を理解していくことを目的とした．

方　法

培養筋細胞はウィスター系ラット胎仔下肢筋をトリプシン処理して得られた初代培養細胞を使った．60mmのゼラチンコートしたプラスチックディッシュに細胞を入れ，Dulbecco改変Eagle培地に10%胎仔牛血清，1%ペニシリン－ストレプトマイシン液を加えた培地で5日間培養した．培養3日め以降は繊維芽細胞の混入を防ぐため10^{-5} Mのcytosine arabinosideを加えた．10^{-7}MのCGRP添加群と無添加群に分け，2時間培養後，guanidine/thiocianate液を加え細胞を回収し，CsClのクッションを置き超遠心によりtotal RNAを集めた．このtotal RNAをサンプルに使い，ノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った．

プローブはオンコジーンの中からerbA, src, raf, sis, fos, myc, Ha-ras, Ki-ras, erbB, mybを，筋構成タンパク質としてDr. Lindstromより供与されたhuman AChR α-subunit[5], Dr. Davisより供与されたMyoD1, Dr. Wrightより供与されたmyogeninをランダムプライムDNAラベリングキットにより^{32}Pラベルして使った．

結　果

ラット筋初代培養細胞ではプロトオンコジーンの中でerbBとmybは発現が認められなかったが，erbA, src, raf, sis, fos, myc, Ha-ras, Ki-rasが発現していた．発現がみられたプロトオンコジーンのなかでCGRP添加により変化があったのはKi-rasで，約2倍に発現が増強した．AChR α-subunitの発現も約2倍に増強した（表，図1）．

MyoD1とmyogeninについては，今回はラット初代培養筋細胞における発現の有無を検討するた

*金沢大学医学部神経内科

表 Summary of proto-oncogene expression

ONCOGENES	control	CGRP
erbA	+	+
erbB	−	−
myb	−	−
src	+	+
raf	+	+
sis	+	+
fos	+	+
myc	+	+
Ha-ras	+	+
Ki-ras	+	++

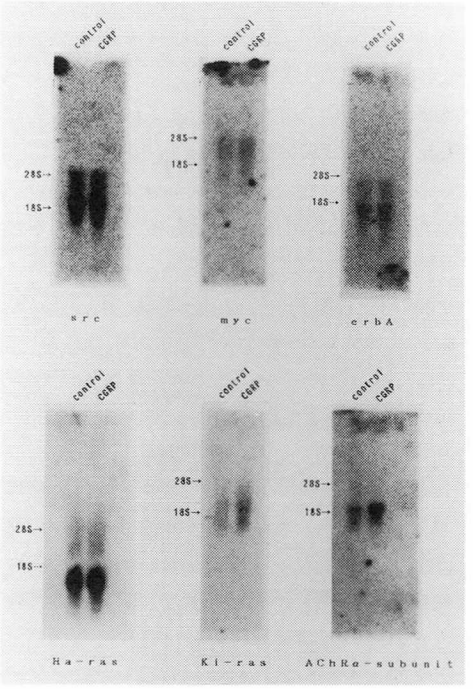


図1 Northern blot analysis of rat myotube total RNA probed with oncogenes and human AChR α-subunit

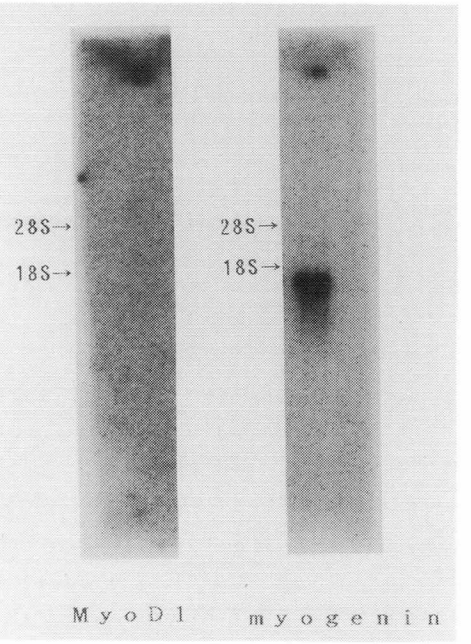
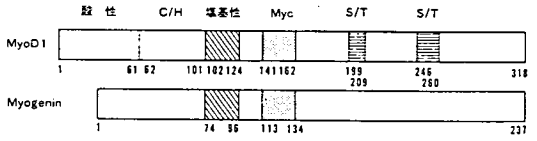


図2 Northern blot analysis of rat myotube total RNA probed with MyoD1 and myogenin

めCGRP無添加群について調べた．その結果，MyoD1の発現は見られなかったがmyogeninの発現が認められた（図2）．

考　　察

運動神経は単に興奮を筋に伝えるだけではなく，筋細胞の栄養因子の供給という重要な働きもしていると考えられている．これまで栄養因子の候補としてAChが調べられてきたが，神経終末に神経ペプチドであるCGRPが見いだされたことにより，その作用が注目を集めた．我々は，CGRPが筋膜上に存在する高親和性受容体・GTP結合タンパク質・アデニレートシクラーゼからなる情報転換ユニットを介し，cAMPをセカンドメッセンジャーとしてAChRの増加作用，筋収縮力の増強作用などをもたらすことを明かとしてきた[6)7)]．しかし，アデニレートシクラーゼ活性化によるcAMPの増加とAChRの増加の間にはどの様な過程が介在しているのかは明らかではなかった．今回は，この点を明らかにすることを目的とした．CGRP



（遠藤より引用）

図3　Structure of MyoD1 and myogenin

により発現が変化する遺伝子の候補として，まずプロトオンコジーンを考えた．

プロトオンコジーンはウィルス癌遺伝子と同じ配列を持った細胞内に存在する遺伝子で，それぞれEGFレセプター，GTP結合タンパク質，甲状腺ホルモン受容体といった細胞の活動に必須の機能を持ったタンパク質をコードしている．今回の結果では，プロトオンコジーンの中でGTP結合タンパク質をコードするKi-rasの発現がCGRPにより増加することがわかった．AChRの発現増加がKi-ras産物によるというように単純に両者を結び付けることはできないが，Ki-ras産物がさらに多くの遺伝子の発現を制御する可能性があり，重要な変化として注目できると思われる．

筋特異的蛋白として今回新たに，MyoD1とmyogeninの発現を調べた．両者とも筋の決定因子もしくは分化因子として，MyoD1はマウス繊維芽細胞株（10T1/2）から，myogeninはラット筋細胞株（L6）より得られた．ともに高塩基性の領域とmyc相同性の領域を持つアミノ酸配列を持っており，DNA結合性タンパク質として機能すると考えられている(図3)．我々が使用しているラットの初代培養細胞ではmyogeninの発現は認められたが，MyoD1の発現は見られなかった．これはL6細胞にMyoD1の発現が見られないのと同様に，ラットとマウスという種の違いによるものと考えられるが，系代培養株と初代培養細胞による性質の違い，培養日数の影響も否定できないと思われる．また神経性栄養因子であるCGRPが筋決定因子であるMyoD1, myogeninの発現に影響を与えるかという点も興味ある問題であり，今後の課題として現在検討している．

文　献

1) Davis RL, Weintraub H and Lassar AB: Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell **51**: 987—1000, 1987.
2) Wright WE, Sassoon DA and Lin VK: Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. Cell **56**: 607—617, 1989.
3) Pestronk A, Drachman DB, Stanley EF, Price DL and Griffin JW: Cholinergic transmission regulates extrajunctional acetylcholine receptors. Exp Neurol **70**: 690—696, 1980.
4) Takami K, Kawai Y, Uchida S, Tohyama M, Shiotani Y, Yoshida H, Emson PC, Girgis S, Hillyard CJ and MacIntyre I: Effect of calcitonin gene-related peptide on contraction of striated muscle in the mouse. Neurosci Lett **60**: 227—230, 1985.
5) Schoepfer R, Luther M and Lindstrom J: The human medulloblastoma cell line TE671 expresses a muscle-like acetylcholine receptor. Cloning of the α-subunit cDNA. FEBS letters **226**: 235—240, 1988.
6) Takamori M and Yoshikawa H: Effect of calcitonin gene-related peptide on skeletal muscme via specific binding site and G protein, J Neurol Sci **90**: 99—109, 1989.
7) 高守正治，吉川弘明，安川善博：ジストロフィンおよびアセチルコリン受容体mRNA発現に対するカルシトニン遺伝子関連ペプチドの修飾に関する研究．“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）平成元年度研究報告書，1990，p 88.

40）筋再生と成長因子

後　藤　幾　生*

研究協力者　笹ケ迫　直　一*　宮　田　清　典*
山　田　　猛*　小　林　卓　郎*

はじめに

成長因子の一つであるfibroblast growth factor（FGF）は，中胚葉・外胚葉由来のさまざまな細胞に対して増殖を促進させる作用がある事が知られ，筋芽細胞に対してもその増殖を促進させる事が知られている[1]（表1）．また，筋ジストロフィー症の動物モデルであるMDXマウスは活発な筋再生を示しそのため致死的な脱力を呈さない事が知られているが，このMDXマウスの骨格筋の細胞外基質には正常マウスと比べて多くのbasic FGF（bFGF）が発現されている事が報告された[2]．そこで我々はこのbFGFが筋再生の過程において重要な役割を果たしているのではないかと考え，実験的損傷筋を作成し，筋再生が行われている組織中のbFGF量を経時的に測定した．また，MDXマウス筋肉におけるbFGFの量も測定した．

表1　Pleiotropic activities of FGFs on normal cells

Tissue target	In Vitro Mitogenic Activity	In Vitro Non-Mitogenic Activity	In Vivo[1] Mitogenic Activity	In Vivo[1] Non-Mitogenic Activity
fibroblasts	+	+	+	
endothelial	+	+	+	
smooth muscle	+	+	+	
pericytes	+			
myocytes				
chondrocytes	+	+	+	+
keratinocytes	+	+		
myoblasts	+			
osteoblasts	+			
neuroblasts	+			
blastema	+			
adrenocortical	+	+		
granulosa	+	+		
thyroid	+			
lactotrophs				
thyrotrophs				
melanocytes	+			
neurons	−	+		+
astrocytes	+	+		
oligodendrocytes	+	+		
Schwann	+	+	+	+
adrenomedullar				
hepatocytes	+			
epithelial lens	+	+		
epithelial cornea	+	+	+	
epithelial prostatic	+			
hair bulb papillary	+			
tumour cells[2]	±	±		

対照・方法

実験的損傷筋作成は8週齢の雄のC57BLマウスを用いた．エーテルおよびネンブタール麻酔下に後脚を切開，ヒラメ筋を露出．右ヒラメ筋に0.5％bupivacaine hydrochloride 0.1mlを，左ヒラメ筋には生食0.1mlをそれぞれ26G針を用いて直視下に注入し，皮膚を縫合した．1，3，5，7，9日後にそれぞれ3匹ずつよりヒラメ筋を摘出した．そのうち1匹分を組織学的検索のためHE染色を行い，2匹分をbFGF測定に用いた．MDXマウスは雄の16週齢のものを用い，正常対照として雄の16週齢のC57BL/10ScSnマウスを用いた．

bFGFの抽出[3)4)]は，ヒラメ筋を1.0M NaCl，10mM Tris，pH7.0溶液1.0mlでホモジェナイズ後，20,000×g，4℃で20分間遠沈．上清を10mM Tris，pH7.0，4℃で透析し，heparin-Sepharose（Pharmacia）カラムに吸着．0.5M NaCl溶液で洗浄後，2.0M NaCl溶液で溶出した．bFGFの測定は，^{125}I-basic FGFアッセイキット（Amersham Japan）を用いて，radioimmunoassay法にて行った．

結　　果

Bupivacaine注入1日後では既に筋壊死が認め

*九州大学医学部脳研神経内科

表2　bFGF in soleus muscles after myonecrosis

	before	days after inj. 1	3	5	7	9
bupivacaine	39.4	39.4	28.4	36.7	45.0	37.2
saline		32.6	40.6	34.9	44.5	50.7

fmol/mg tissue (wet weight)

表3　bFGF in soleus muscles

MDX mouse.	16w.old	72.1
Control.	16w.old	70.1

fmol/mg tissue(wet weight)

られたが，部分的なものに止まり広範囲なものではなかった．5日後では中心核を持つ再生線維が認められた．9日後では殆んどが再生線維に置き換わった．一方，生理的食塩水注入筋では針の刺入経路にそって筋壊死・再生が認められたが，bupivacaine注入筋に比べると軽度であった．

実験的筋損傷後のbFGF量の経時的変化を表2に示す．値は2ヒラメ筋のbFGF量の平均を示す．何も処置しないヒラメ筋では39.4fmol/mg tissue (wet weight) であった．実験的損傷筋ではbupivacaineおよび生理的食塩水注入筋ともbFGF量は経時的に一定した変化は示さず，壊死・再生との関係は判断できなかった．

MDXおよび正常対照マウスのヒラメ筋中のbFGF量を表3に示す．値は何も処置しない2ヒラメ筋中のbFGF量の平均であるが，16週齢のマウスでは両者の間に差は認められなかった．

考　　察

今回のbupivacaine注入筋では筋壊死が部分的で広範囲なものではなく，また，筋毎に壊死の範囲が異なっていたであろうと想像される．そのためにbFGFの量に一定した変化の生じなかった可能性が考えられた．筋壊死・再生と成長因子との関係を探るためには，確実に広範囲に壊死を起こしうる方法を採用し検索筋数を増やした上で今後とも検討したいと考える．

また，今回用いた16週齢のMDXおよび正常対照マウスではbFGF量に差が認められなかった．MDXマウスでは10～12週以降筋壊死・再生が鎮静化することが知られている．16週ではその壊死・再生の過程が活発でないためにbFGF量に差が認められなかった可能性が考えられた．より若年マウスでの検討が必要であると思われた．

文　　献

1) Baird A and Walicke AP: Fibroblast growth factors. Brit Med Bull 45(2): 438—452, 1989.
2) Dimario J, Buffinger N, Yamada S, et al: Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. Science 244: 688—690, 1990.
3) Gospodarowicz D: Isolation and characterization of acidic and basic fibroblast growth factor. Methods in Enzymol 147: 106—119, 1987.
4) Klagsbrun M, Smith S, Sullivan R, et al: Multiple forms of basic fibroblast growth factor: Amino-terminal cleavages by tumor cell-and brain cell-derived acid proteinases. Proc Natl Acad Sci 84: 1839—1843, 1987.

Ⅶ. 生 化 学

41）筋細胞死とリソゾームプロテアーゼ群

木　南　英　紀*

研究協力者　上　野　　隆*　武　野　大　策*
　　埜　中　征　哉**　内　山　安　男***

はじめに

Kunkel, Hoffmanらによるジストロフィーの発見[1]以来，筋ジストロフィー症の分子遺伝学的，診断学的研究は著しく進んだ．しかし，筋崩壊に至る過程特にタンパク分解の亢進のトリガー・初発機構については全くわかっていない．我々は変性死細胞の処理のために浸潤マクロファージのリソゾームプロテアーゼ群が関与すること[2]，それ以前に障害を受けた筋細胞内に自己貪食-リソゾーム系が活性化していることを示唆した[3]．この筋細胞内の自己貪食の誘起はジストロフィー症ばかりでなく，自己貪食の異常が病像の前面にでているRimmed vacuoleを伴う遠位性ミオパチーの例[4]もあり，筋細胞死の初発段階に関与する重要なプロセスと思われる．しかし，古くから自己貪食の機構の形態学的研究はあるが，細胞生物学的研究は最近始まったばかりである．今回は，自己貪食の開始機構に関するデータとその結果を踏まえvacuolar myopthiesにおける自己貪食の異常について考察する．

材料と方法

1）オートリソゾームおよびリソゾームの分離：ロイペプチン投与ラット肝よりオートリソゾーム[5]を，デキストラン投与肝よりリソゾームを単離した．分離した小胞から膜分画を庶糖密度勾配遠心で得，さらに炭酸ナトリウムで洗浄して膜標品とした．

2）免疫学的手法：リソゾーム膜の主要タンパクの一つLGP120に対する抗体はラットLGP120の細胞質に出ているドメインに対するペプチド抗体である．ユビキチン抗体はヒトユビキチン-ウシIgGに対する抗体で，ユビキチン-タンパク複合体を認識する．

3）対象：Rimmed vacuoleを伴う遠位性ミオパチー（DMRV）は27歳女性の生検筋[6]，封入体筋炎は72歳の男性からの材料である．

結　　果

1）自己貪食の機構

自己貪食胞の隔離膜の由来を明らかにすべく，まずロイペプチン投与肝より自己貪食胞（AP）とリソゾームの融合したオートリソゾーム（AL）に富む分画を単離した．一方，純粋なリソゾームをデキストラン投与肝より得て，両者の膜の性状から隔離膜の由来を調べるアプローチを行った．ALとリソゾームの膜をアルカリ処理後，膜構成タンパクをSDS-電気泳動で分析した．絶食後の動物から得たAL-S膜も自由摂食させた動物のAL-F膜もリソゾーム膜の構成タンパクと非常に類似しており，明らかに小胞体膜あるいはゴルジ装置の膜構成とは異なる（図1-A）．AL-SとAL-Fの間の差は53Kポリペプチドが AL-Fのみに存在することである．このポリペプチドは小胞体膜上の主要タンパクチトクロームP450（図1-A，レーン1）と一致している．イムノブロット分析によると，AL膜，リソゾーム膜全てがリソゾーム膜の主要糖タンパクの一つLGP120を持っている

＊順天堂大学医学部生化学第一講座
＊＊国立精神・神経センター神経研究所
＊＊＊筑波大学医学専門群解剖学

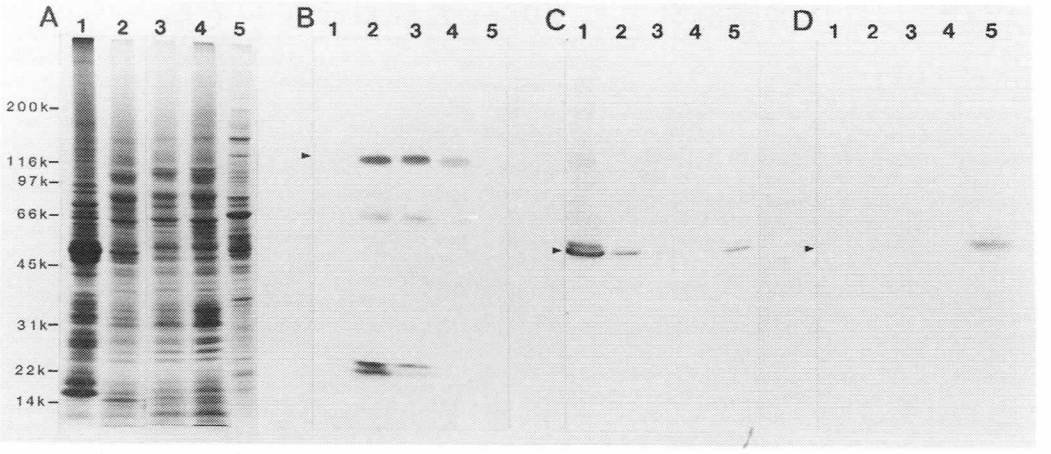


図1　各種小器官膜標品の蛋白染色（A）とイムノブロッティング．抗LGP120（B），抗チトクロームP450（C），抗シアリルトランスフェラーゼ（D）．膜：小胞体（レーン1），オートリソゾームF（レーン2），オートリソゾームS（レーン3），リソゾーム（レーン4），ゴルジ装置（レーン5）．

が，AL-Fのみが抗-チトクローム抗体と反応した．これら何れのリソゾーム膜もゴルジ膜のマーカー・シアリルトランスフェラーゼ抗体とは反応しなかった．AL-S膜にチトクロームP450が欠損していることはこのマーカーの出現に栄養条件が重要な役割を持っていることを示す．摂食状態から絶食状態に移すと，自己貪食の亢進にともない，AL上のチトクロームP450は，増加してくる（図なし）．このことは小胞体，マーカーが自己貪食胞膜形成の指標となることを示す．しかし，絶食を続けると小胞体マーカーは漸減していき，この結果は図1での観察とよく一致している．

2）Vacuolar myopathiesにおける自己貪食像

DMRVおよび封入体筋炎一例についてリソゾームの可溶性酵素（ジペプチジルアミノペプチダーゼI，カテプシンC），リソゾーム膜タンパク（LGP-120）及びユビキチン-タンパク複合体の局在を免疫組織学的に調べた（図2）．カテプシンCは以前報告したと同様，Rimmed vacuolesに一致した染色像が得られた（図2-a，d）．LGP-120はRimmed vacuolesにも存在する（図2-e）が，細胞膜直下の自己貪食胞あるいはエンドゾーム様の様々なサイズの小胞に染色が集積しているのが観察できる（図2-b，d）．ユビキチン-タンパク質複合体はRimmed vacuole内に，一部は自己貪食胞様小胞に局在していることが示された（図2-c，f）．

考　　察

リソゾームの細胞質成分の取り込み機構の最も重要なものはMacroautophagyであり，細胞障害に応答して誘起されるのもこの反応である．今回の実験は従来いろいろ議論の多かった自己貪食胞の隔離膜がゴルジ膜というより，小胞体膜由来であることを強く示唆している．刺激に応答して形成された二重膜を持つ自己貪食胞（おそらく膜は小胞体膜の性質を持つ）は成熟過程で，酸性化，リソゾーム膜の性質を持つ一重膜への変化，リソゾーム可溶性酵素の獲得を行い，オートリソゾームへと変化していく．このプロセスは複雑であり，自己貪食胞とリソゾームの融合のステップ一つを取ってみても，関与する役者がまだ全然わかっていない．*in vitro*の再構成実験できるようになれば，一気に進むことが期待される．単離オートリソゾーム膜に小胞体マーカーが見い出されたことは*in vitro*実験への一つのステップであると考え

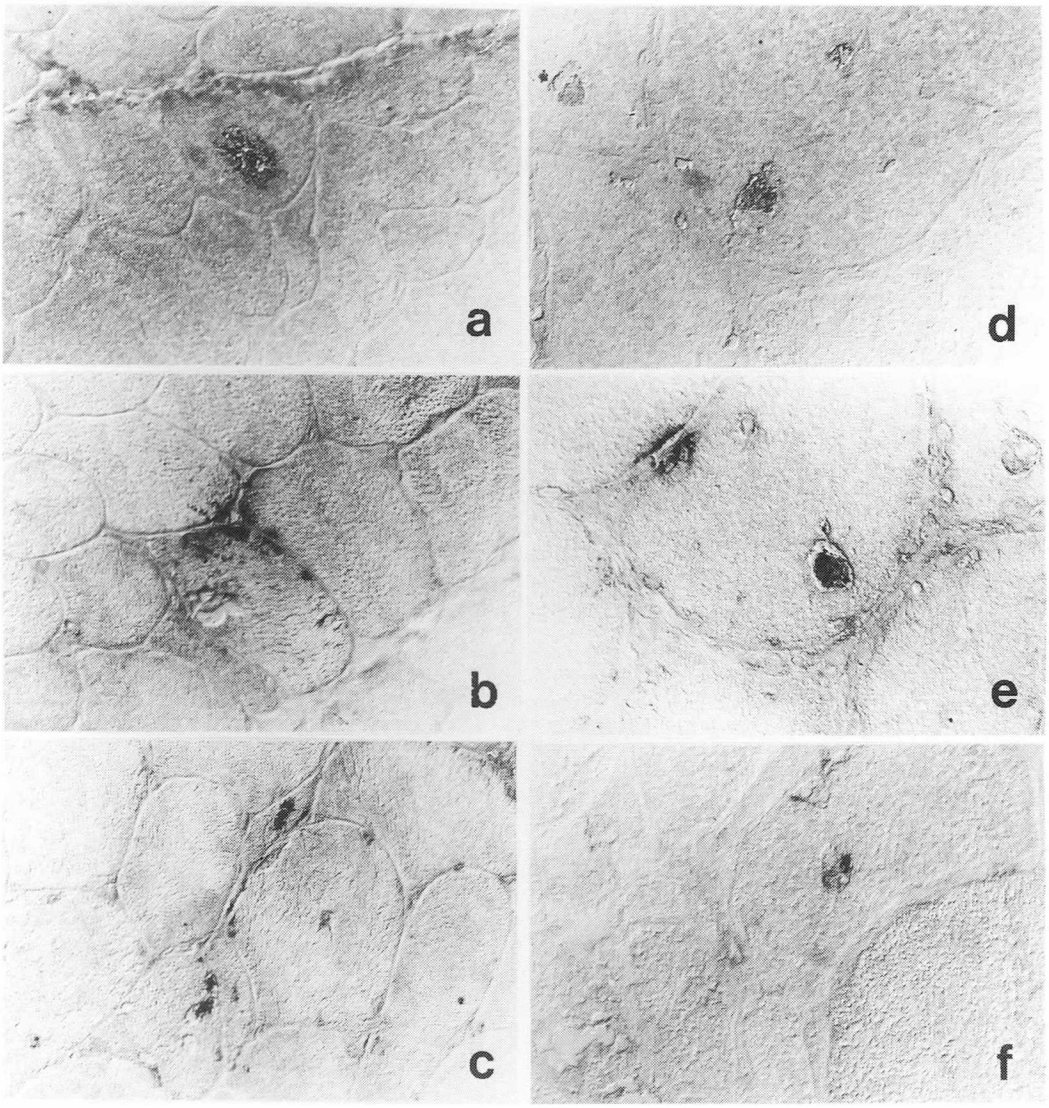


図2　抗カテプシンC（a, d），抗LGP120（b, e）および抗ユビキチン-タンパク質複合体（c, f）抗体による骨格筋の免疫組織学的染色．DMRV（a, b, c），封入体筋炎（d, e, f）を示す（×650）．

られよう．

自己貪食胞は正常筋線維にはみられないが，炎症性ミオパチー，リソゾーム蓄積症，遠位性ミオパチー，実験的クロロキンミオパチーなどでは著明である．しかし，自己貪食胞の蓄積の機序は同じではない．α-グルコシダーゼ欠損症ではグリコーゲンのリソゾーム内蓄積が，クロロキンミオパチーではリソゾーム内pHの上昇がリソゾーム内タンパク分解を阻害しているからである．DMRVや封入体ミオパチーでは自己貪食胞とRimmed vacuoleにリソゾーム可溶性酵素，膜タンパク及びリソゾーム外より取り込まれたタンパク（ユビキチン結合タンパク）すべてが陽性であり，少なくとも融合のステップが障害されているとは考え

られない．リソゾーム内タンパク分解か，酸性化の障害もしくは自己貪食の著しい誘起が想定される．これらの疾患では細胞質に分解物が非常に多く蓄積しているという観察がある[6)7)]．これに基づくと，異常産物を処理するために自己貪食胞が多数形成され，元来少ないリソゾームと融合できず，細胞内に蓄積すると考えることが出来る．この考えによると，Rimmed vacuole にカテプシンや酸性フォスファターゼ陽性のものと陰性のものがあることは説明できる．自己貪食の異常亢進のみられるミオパチーは遺伝性であれ，非遺伝性であれ，多くは細胞膜ではなく，細胞質成分の何かに異常があると考えた方がよいかもしれない．そうすればリソゾームの反応は二次的変化ということになる．DMD のように細胞膜に異常がある場合，おそらく細胞内 Ca^{2+} の上昇を介して自己貪食は亢進するが，大きな自己貪食胞を形成・蓄積する前にマクロファージが浸潤して処理してしまうと思われる．

異常タンパクはユビキチン化され，細胞質の ATP 依存性プロテアーゼで分解されるという機序がある[8)]．一方ユビキチン化されたタンパク質のプールは多くの細胞に常にあり，リソゾームへ絶えず取り込まれている．ロイペプチンでリソゾーム内タンパク分解を止めるとリソゾーム内に多量のユビキチン化されたタンパク質の蓄積がみられる[9)]．筋細胞の自己貪食や Rimmed vacuole にこれらが証明できることは，小胞が自己貪食胞-リソゾームの性質を持つことをさらに支持するものと解釈できる．

文　献

1) Hoffman EP, Brown RH and Kunkel LM: Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell **51**: 919—928, 1987.
2) Kominami E, Bando T, Ii K and Katunuma N: Increase in cathepsin B and L and thiol proteinase inhibitor in muscle of dystophic hamsters. Their localization in invading phagocytes. J Biochem **96**: 1841—1848, 1984.
3) Kominami E, Ii K and Katunuma N: Activation of the intramyofibral autophagic lysosomal system in muscular dystrophy. Amer J Pathol **127**: 21—26, 1987.
4) 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—198, 1986.
5) Kominami E, Hashida S, Khairallah EA and Katunuma N: Sequestration of cytoplasmic enzymes in an autophagic vacuole-lysosomal system induced by injection of leupeptin. J Biol Chem **258**: 6093—6100, 1983.
6) Nonaka I, Sunohara S, Ishiura S and Satoyoshi E: Familial distal myopathy rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation. J Neurol Sci **51**: 141—155, 1981.
7) Fukuhara N, Kumamoto T and Tsubaki T: Rimmed vacuoles. Acta Neuropathol (Berl) **51**: 229—235, 1980.
8) Hershko A and Ciehanover A: Mechanisms of intracellular protein breakdown. Ann Rev Biochem **51**: 335—364, 1982.
9) Ueno T and Kominami E: Mechanism and regulation of lysosomal sequestration and proteolysis. Biomed Biochim Acta, in press, 1991.

42）骨格筋筋原線維の構成成分であるC-蛋白質を変換する因子について

堀　眞一郎*

研究協力者　小島　崇*　田中知仁*　大谷幸子*

はじめに

筋ジストロフィーマウス（C57BL/10ScSn-MDX，MDXマウス）はヒトのDuchenne型筋ジストロフィーと類似した遺伝子異常を持った動物モデルである．我々は，このマウスを用いて，筋蛋白質における遺伝子の情報発現の異常を二次元電気泳動で検討している過程で，MDXマウスの速筋型C-蛋白質のスポットが消失あるいは正常対照マウスに比べ量的に減少することを見いだした[1]．さらに，このC-蛋白質の変化はヒラメ筋や心筋では見られず，速筋型C-蛋白質に特異的であることが分かった．また，このC-蛋白質の変化は8M塩酸グアニジン処理によって見られなくなった．この事から8M塩酸グアニジンによって失活する因子が筋組織中に存在する事が分かった．この因子は0.6MKCl溶液に対して不溶性画分に存在した[2]．ここでは，このC-蛋白質を変換する因子の活性は，C-蛋白質を修飾するのではなく分解する事，また，活性は生体内に一様に存在するのではなく，組織特異的に存在している事が分かったので報告する．

実験方法

速筋型C-蛋白質の精製：速筋型C-蛋白質は，ウサギ（New Zealand white）の背筋から，Offerら[3]の方法に従って精製した．

C-蛋白質変換因子の調整：マウス（C57BL/10ScSn及びC57BL/10ScSn-MDX）の長指伸筋，大腿直筋，ヒラメ筋，心筋，脳及び肝臓を0.6MKCl-10mMEDTA-10mMトリス・塩酸緩衝溶液（pH7.8）に懸濁し，不溶性画分をさらに同溶液で3回洗ったものをこの因子の標品にした．

C-蛋白質変換因子の活性検定：精製した速筋型C-蛋白質に変換因子の標品を加えたものを，5M尿素-1Mチオ尿素-10mMピロ燐酸ナトリウム-0.17%メルカプトエタノール溶液に一晩透析し，SDS-PAGEとイムノブロット法を組合せ，C-蛋白質の変化を検出した．SDS-PAGE終了後，48mMトリス-39mMグリシン-1.3mMSDS-20%メタノール溶液（pH8.8）中で電気的にニトロセルロース膜に転写した．このニトロセルロース膜を1.5%ゼラチン-TBS（Tris buffered saline：0.5MNaCl-20mMトリス・塩酸緩衝溶液pH7.5）溶液に一晩浸しブロッキングした後，一次抗体で1時間インキュベイトし，TBSで洗浄後，二次抗体で1時間インキュベイトし，TBSで洗浄してからNi^{++}-Co^{++}-DAB法で発色させた．一次抗体には，千葉大学理学部の大日方教授より供与された，速筋型C-蛋白質に対するモノクローナル抗体FC-18を，二次抗体にはTBSで3000倍希釈したBio-Rad社のHRP-GAM IgGを用いた．

結　果

C-蛋白質変換における濃度依存性：

MDXマウスの長指伸筋を8M塩酸グアニジン溶液中に懸濁してから，5M尿素溶液に透析すると，速筋型C-蛋白質のスポットの消失は見られなくなる[1]．8M塩酸グアニジンは強力な蛋白変性剤であることから，この因子は酵素であると考えられるが，酵素であるとすれば，基質であるC-蛋白

*（財）東京都神経科学総合研究所神経生化学

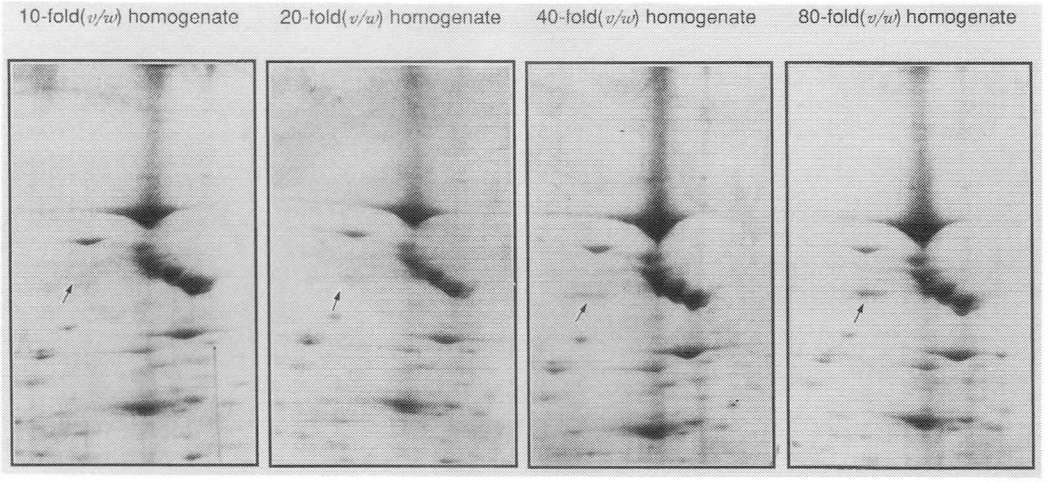


図1　C-蛋白質変換因子の活性に対する希釈効果
MDX マウスの長指伸筋を，それぞれ10倍量，20倍量，40倍量，80倍量の 5 M 尿素溶液に懸濁し，二次元電気泳動にかけた．

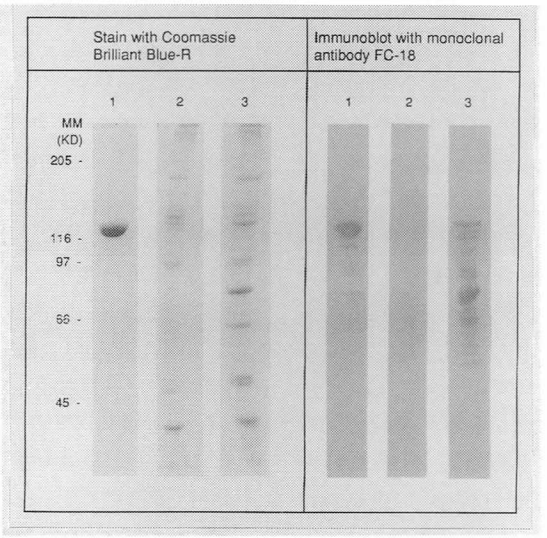


図2　精製 C-蛋白質に対する C-蛋白質変換因子の作用
左：クマジーブリリアントブルーRによる染色像．右：モノクローナル抗体 FC-18によるイムノブロット像．1：精製したウサギの速筋型 C-蛋白質．2：MDX マウスの長指伸筋の0.6MKCl 溶液に対する不溶性画分．3：精製したウサギの速筋型 C-蛋白質と MDX マウス長指伸筋の0.6MKCl 溶液不溶性画分を渇ぜたもの．

質の濃度に依存して活性が変化するはずである．そこで，MDX マウスの長指伸筋を，10倍量，20倍量，40倍量及び80倍量の 5 M 尿素溶液で懸濁し，それぞれについて二次元電気泳動にかけてみたところ，希釈度が大きいほど C-蛋白質のスポットの減少度が小さくなっていた(**図1**)．即ち，この因子の活性は C-蛋白質の濃度に依存していた．また，この事は，従来，筋組織を懸濁するに際して，筋組織の希釈倍率によって C-蛋白質の消失が見られたり，見られなかったりした事を説明している．

C-蛋白質変換因子による C-蛋白質の分解：

C-蛋白質変換因子の C-蛋白質に対する作用が蛋白質の修飾であるのか，あるいは分解であるのかを調べるため，精製したウサギの速筋型 C-蛋白質に MDX マウス長指伸筋から調整した変換因子を加えて検討した(**図2**)．C-蛋白質変換因子の標品中には C-蛋白質に対する特異的モノクローナル抗体 FC-18に反応するものは存在していないが(**図2－2**)，C-蛋白質とこの因子とを混ぜてインキュベートすると，C-蛋白質の位置に相当するバンドが減少し，新たに FC-18に反応する低分子量のバンドが出現した（**図2－3**）．このことは，この因子が精製したウサギの速筋型 C-蛋白質

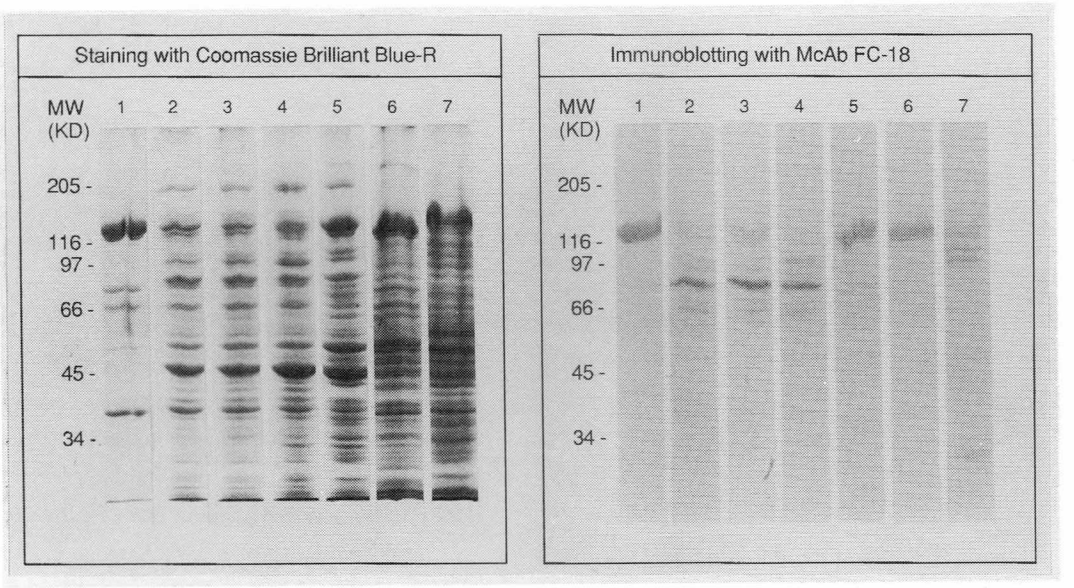


図3　C-蛋白質変換因子活性の組織特異的存在
左：クマジーブリリアントブルーRによる染色像．右：モノクローナル抗体FC-18によるイムノブロット像．1：精製したウサギ速筋型C-蛋白質．2－7：MDXマウスの様々な組織の0.6MKCl溶液に対する不溶性画分に精製したC-蛋白質を加えたもの；2：長指伸筋，3：大腿直筋，4：ひらめ筋，5：心筋，6：脳，7：肝臓

に作用し，C-蛋白質を分解，消失させることを示している．

C-蛋白質変換因子活性の組織特異的局在：

C-蛋白質変換因子の存在の組織特異性について検討するため，長指伸筋に加えて大腿直筋，ヒラメ筋，心筋，脳及び肝臓について検討してみた（**図3**）．長指伸筋，大腿直筋，及びヒラメ筋ではC-蛋白質の分解がみられた（**図3－2，3，4**）が，心筋と脳ではC-蛋白質の分解は見られなかった（**図3－6**）．また，肝臓では，C-蛋白質の分解は見られた（**図3－7**）が，分解産物のペプチドが長指伸筋，大腿直筋及びヒラメ筋で見られるものより分子量が大きかった．これは肝臓にはC-蛋白質変換因子が存在するが活性が弱いためか，あるいは別種のプロテアーゼによる分解であると考えられる．

考　　察

C-蛋白質を変換する因子は，8Mグアニジン塩酸で失活する事，その活性は基質であるC-蛋白質の濃度に依存すること，変換されたC-蛋白質は低分子量のペプチドに分解される事などから，プロテアーゼであると考えられる．

この因子は長指伸筋，大腿直筋，ヒラメ筋で活性が見られ，心筋や脳で活性が見られないことから，骨格筋に特異的に存在する可能性が高い．肝臓でもC-蛋白質の分解が観察されたが，分解産物が長指伸筋，大腿直筋及びヒラメ筋で観察されたものと異なっていた．しかし，肝臓に存在する因子と骨格筋に存在する因子が異なるものであるか否かはさらに検討を要する．

この因子は0.6MKClに不溶性であることから膜に存在していると思われる．もし，この因子が膜に存在するのなら，この因子が生体内でどの様にして筋原線維内のC-蛋白質に作用しているのか，興味深い問題である．

また，この因子の基質であるC-蛋白質は，免疫グロブリンスーパーファミリーに属する事が明らかになっており[4]，この因子が免疫グロブリンスーパーファミリーに対しても作用するプロテアー

ゼである可能性も考え得る．この因子の生理的役割を考える上で検討すべき問題である．

今後は，まずこの因子のプロテアーゼとしての性質を明らかにし，この因子の精製と組織化学的局在の検討によって生理的役割及び筋ジストロフィーの発症との関連を解明する．

ま と め

1）マウス骨格筋中に存在するC-蛋白質変換因子はC-蛋白質を低分子ペプチドに分解した．

2）C-蛋白質変換因子の活性は長指伸筋，大腿直筋，及びヒラメ筋において見られ，心筋や脳では見られなかった．

文　献

1) 堀　眞一郎，杉浦弘子，大谷幸子，平林民雄，中村瑞穂：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．“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，1988，pp69—73.

2) 堀　眞一郎，杉浦弘子，大谷幸子，平林民雄：筋ジストロフィーマウス（MDX）筋のC-プロティンの動態について．“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63年度研究報告書，1989，pp243—246.

3) Starr R and Offer G: Preparation of C-protein, H-protein, X-protein, and phosphofructokinase. Meth Enzymol 85：130—138, 1982.

4) Einheber S and Fischman D A: Isolation and characterization of a cDNA clone encoding avian skeletal muscle C-protein: An intracellular member of the immunoglobulin superfamily. Proc Natl Acad Sci USA 87：2157—2161, 1990.

43) Clofidrateの骨格筋の速筋と遅筋グルコース・アップテイクに対する影響

庄 司 進 一*

研究協力者　朴 木 清 人*　柳 沢 信 夫*

目　的

動脈硬化用剤で，血中総脂肪や総コレステロールを降下させる作用のあるclofibrateは，耐糖能を改善する[1]. clofibrateはまた末梢組織でのインスリン感受性を増加させると報告されている[2]. このclofibrateによる耐糖能改善の機序を追及するため，グルコース・アップテイクをラットの骨格筋の速筋と遅筋でclofibrate投与とインスリンの有無で測定比較した.

方　法

約40gのオスのWistarラット6匹にclofibrate, 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid ethylester, を腹腔に(30mg/100g体重/日)8日間投与した. 対照ラット6匹には使薬の1%ゲラチン溶液を同量投与した. 最終注射24時間後，頸椎脱臼で殺し，速筋のextensor digitolum longus (EDL) と遅筋のsoleus (Sol) を *in vivo* の最大伸展位で近位と遠位の腱でホルダーに固定し取り出した.

ホルダーに固定された筋はホルダーごと，95% O_2—5% CO_2 を連続的に通気し，緩やかに震盪し，37℃のフラスコ内のインキュベーション溶液中でインキュベートした. この溶液は，Krebs-Henseleit緩衝液 (pH7.4) に5 mM sodium pyruvate, ^{3}H-3-0-methylglucose (1μCi/ml), 5mM glucose, ^{14}C-sucrose (0.2μCi/ml), 1mM sucroseを含む. インスリンを用いる場合は100 mU/mlを含めた.

30分のインキュベート後0℃の生理的食塩水で洗浄し，腱を除いた. 筋の表面の水分を除き，湿重量を測定し，0.4mlのSoluene350 (Packard) 中で溶解した. 完全に溶解後，酢酸で中和し，この溶解液とインキュベーション溶液の一部をScintisol EX-H(和光純薬)中で，そのradioactivityをシンチレーションカウンターで測定した.

グルコース・アップテイクは3-0-methylglucose spaceとsucrose space(細胞外スペース)の差から算出した. 統計処理はStudent-t検定を用いた.

結　果

対照とclofibrate投与ラットの体重は，試験開始直前は，それぞれ38.2±2.3と38.0±1.8gで有意差無く，8日後にはそれぞれ72.2±4.1と71.2±6.2gとこれも有意差無かった.

EDLとSolの湿重量を**表1**に示した. 対照とclofibrate投与ラットで有意差は無かった.

グルコース・アップテイクの測定結果は**表2**に示した. Clofibrate投与ラットのEDLのbasalグルコース・アップテイクは有意に増加した. Clofi-

表1　Clofibrateの筋湿重量への影響

	対照群	clofibrate投与群
EDL	27.3±2.1	26.1±2.7
Sol	22.9±2.8a	22.7±2.1b

筋湿重量 (mg)：平均±sd (12筋)
a：p<0.001 vs EDL, b：p<0.01 vs EDL

*信州大学医学部第三内科

表2　Clofibrate 筋グルコース・アップテイクへの髪響

	A	B
EDL 対照群		
Basal	0.77±0.14	21.1±3.7
Insulin	1.54±0.23a	41.8±6.2a
Insulin -Basal	0.77±0.09	20.7±2.4
EDL Clofibrate 投与群		
Basal	1.01±0.18d	26.4±4.8
Insulin	1.48±0,22b	38.5±5.7b
Insulin -Basal	0.47±0.11c	12.1±2.9c
Sol 対照群		
Basal	1.20±0.21f	27.4±4.8g
Insulin	1.67±0.22b	38.5±5.7b
Insulin -Basal	0.47±0.07e	11.0±1.7e
Sol Clofibrate 投与群		
Basal	1.11±0.20	25.1±4.5
Insulin	2.05±0.28adf	46.8±6.4adg
Insulin -Basal	0.94±0.06ce	21.7±1.3ce

Basal：インスリンの無い状態でのグルコース・アップテイク
Insulin：インスリン100mU/ml の存在する状態でのグルコース・アップテイク
平均±sd（6筋ないし6対の筋）
A：μmol/gww/h, B：nmol/whole muscle/h,
a：p <0.001 vs Basal,
b：p <0.01 vs Basal,
c：p <0.001 vs Control,
d：p <0.05 vs Control,
e：p <0.001 vs EDL,
f：p <0.01 vs EDL,
g：p <0.05 vs EDL

brate 投与ラットの Sol では insulin-activated グルコース・アップテイクが有意に増加した．インスリンによるグルコース・アップテイクの増加量は clofibrate 投与により，Sol で有意に増加し，EDL で有意に減少した．

考　　案

本研究では clofibrate は遅筋のインスリン感受性と速筋の basal グルコース・アップテイクを増加させることが判明した．前者は clofibrate の耐糖能の改善の主要な原因であろう．

この遅筋に於けるインスリン感受性の増加の原因としては，clofibrate による，1）インスリン受容体のインスリンとの結合率の増加，2）インスリン受容体数の増加，3）受容体後の step での変化などの可能性がある．Clofibrate 投与による遊離脂酸構成の変化が形質膜の物理化学的性状を変化させ，インスリンのインスリン受容体への結合率に変化が来るとの報告があった[3]．Clofibrate に近縁の metformin がインスリン受容体数やインスリンの結合率を変化させずに，血糖値を低下させるとの報告があった[4]．従って，1）と3）の可能性が示唆される．

速筋における basal グルコース・アップデイクの増加とインスリンによる増加率の減少は，clofibrate がインスリン様作用があり，glucose transporter の細胞内から形質膜への動員が clofibrate で起こる可能性が示唆される．

結論として，clofibrate はラットの遅筋と速筋でグルコース・アップテイクに関し異なる作用を示す．

文　　献

1) Herriot SC, Percy-Robb IW, Strong JA and Thomson CG,: The effect of atromid on serum cholesterol and glucose tolerance in diabetes mellitus. J Atherosclero Res 3：679—688, 1963.
2) Yashiro H, Irie T and Takebe K: Enhancing effect of clofibrate on insulin sensitivity in

the peripheral tissues. Igakuno Ayumi 130 : 739—741, 1984.

3) Ginsberg BH, Brown TJ, Simon I and Spector AA : Effect of the membrane lipid environment on the properties of insulin receptors. Diabetes 30 : 773—780, 1981.

4) Prager R and Schernthaner G : Insulin receptor binding to monocytes, insulin secretion, and glucose tolerance following metformin treatment. Results of a doubleblind crossover study in type II diabetes. Diabete 32 : 1083—1086, 1983.

44）蛋白質のミトコンドリア移行とその異常

森　　正　敬*

研究協力者　村　上　　薫*

はじめに

ミトコンドリアは細胞のエネルギー産生，アミノ酸代謝，糖代謝（TCAサイクル），脂肪酸β酸化，尿素合成前半などを担う重要な細胞小器官（オルガネラ）の一つである．ミトコンドリアはそれ自身が複雑な構造を持っており，サイトソルに面している方から外膜，膜間分画，内膜およびマトリックスの4つの区画より成っている．ミトコンドリアの大きな特徴の一つは，固有の遺伝子DNAと蛋白質合成系を持ち，部分的な自律性を備えていることである．しかしミトコンドリアDNAはきわめて小さく，2種のリボソームRNA，22種のtRNAおよび呼吸鎖に関与する13種のポリペプチドのみがコードされていることが分っている．最近ミトコンドリアDNAの異常によるミトコンドリア病（ミトコンドリア脳筋症）が発見され，その研究が急速に進んでいる．一方，外膜，膜間分画，マトリックスに存在する全ての蛋白質および内膜の大部分の蛋白質は核染色体DNAにコードされており，ミトコンドリア外部で合成されたのち，1枚または2枚のミトコンドリア膜を通過して内部へ移行し，または膜に組み込まれる．すなわち，ミトコンドリアの形成はミトコンドリア遺伝子と核染色体遺伝子の2重支配を受けている．したがって核支配ミトコンドリア蛋白質のミトコンドリア移行の障害はミトコンドリア病を来たす．蛋白質のミトコンドリア移行の異常は①個々のミトコンドリア蛋白質の異常と②蛋白質のミトコンドリア移行のシステムを構成する因子の異常に分けて考えることが出来る．①については症例が報告されはじめているが，②については先ず蛋白質のミトコンドリア局在化の分子機構を明らかにすることが重要である．我々は肝臓のミトコンドリアマトリックスに局在する2つの尿素サイクル酵素―カルバミルリン酸合成酵素Ⅰ（CPSI）とオルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）―を実験系として蛋白質のミトコンドリア局在化とその異常の研究を進めている[1]．

我々はまずラットCPSIとOTCの*in vitro*合成を行い，両酵素が分子量の大きい前駆体の形で合成されることを明らかにした．引き続いて多くの研究室で種々のミトコンドリア蛋白質について同様の実験が行われ，ミトコンドリア蛋白質の大部分が前駆体として合成されることが明らかとなった．さらにミトコンドリア蛋白質の合成部位が遊離リボソームであること，前駆体がサイトソルのプールより数分以内にミトコンドリアに移行し，ミトコンドリアに存在するプロセシングプロテアーゼによって成熟蛋白質に転換されることを明らかにした．図1にCPSIとOTCのミトコンドリア移行の概略を示す．

さらに*in vitro*で合成した蛋白質前駆体を単離ミトコンドリアに取り込ませて成熟酵素に転換する*in vitro*のトランスポート再構成系を開発し，このトランスポートとプロセシングの系が①組織特異性がなく，どの組織のミトコンドリアでも使用出来る，②種特異性が低く，ラットやマウスのミトコンドリアが使用出来る，③複数の前駆体に共通である，④トランスポートのステップにエネルギーが必要であることなどを明らかにした．ついでOTC前駆体cDNAをクローン化し，成熟酵素のN末端に32アミノ酸残基の“延長ペプチド

＊熊本大学医学部遺伝医学研究施設

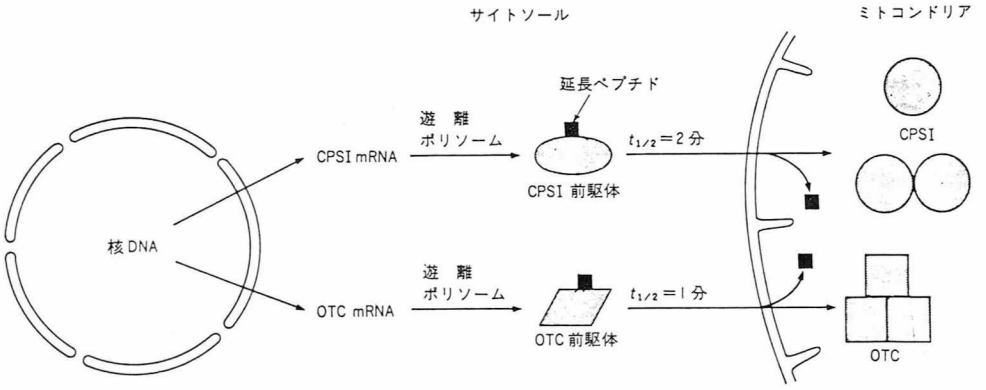


図1 カルバミルリン酸合成酵素Ⅰ（CPSI）とオルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）のミトコンドリア移行．CPSIは単量体または2量体，OTCは3量体である．

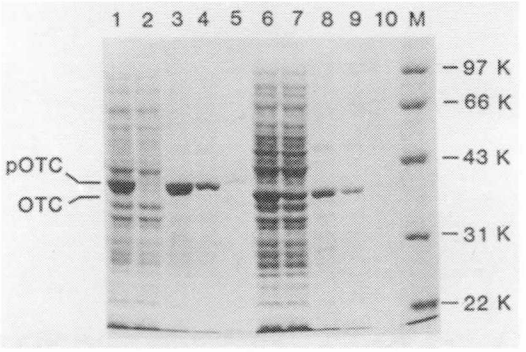


図2 OTC前駆体（pOTC）および成熟型OTCの大腸菌内での発現と精製．レーン1，pOTCを発現させた大腸菌抽出液；レーン2，抽出液上清；レーン3，抽出液沈殿；レーン4，沈殿からの尿素抽出液；レーン5，尿素抽出後の沈殿；レーン6～10，成熟型OTCを発現させた場合でレーン1～5に相当．M，分子量マーカー．

(presequence)”が付着していることを明らかにした[2]．この前駆体の性状およびミトコンドリアへの移行の仕組みを明らかにするためには前駆体を大量調製する必要がある．そこで遺伝子工学の手法を用いて大腸菌でOTC前駆体の大量発現を試みた．

方法と結果

OTC前駆体cDNAを入ファージのP_Lプロモーターを持つ発現ベクターに組み込んで大腸菌に発現させたところ，全菌体蛋白の10%におよぶ発現が得られた（**図2**）．発現したOTC前駆体は封入体を形成しているため，8M尿素または6Mグアニジン塩酸で可溶化し均一に精製した．この精製OTC前駆体はミトコンドリアマトリックスに存在するプロセシングプロテアーゼの基質になること，また*in vitro*トランスポート系でミトコンドリアに取り込まれることを確認した．この際，ウサギ網状赤血球中に含まれる蛋白質因子（サイトソル因子）の存在が必要であることを明らかにした[3]．

精製前駆体を蔗糖密度勾配遠心にかけると不溶化して沈殿してしまうが，ライセート存在下では沈降係数6～11Sの可溶性複合体を形成した（**図3**），一方，OTC前駆体と同様に発現させ精製した成熟型OTCはこのような複合体を形成しなかった．これらの結果は，ライセートの中にOTC前駆体に特異的に結合する因子が存在することを示す，この因子は前駆体のpresequence部分に特異的に結合することが分ったのでpresequence binding factor（PBF）と名付けた．

表はウサギ網状赤血球からのPBFの精製を示す．OTC前駆体をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー，DEAE-5PW液体クロマトグラフィーおよび蔗糖密度勾配遠心法により91,000倍に精製し均一標品を得た．30gのライセート蛋白質より0.21mgの精製標品が得られた．PBFは分子量50,000のサブユニットのオリゴマ

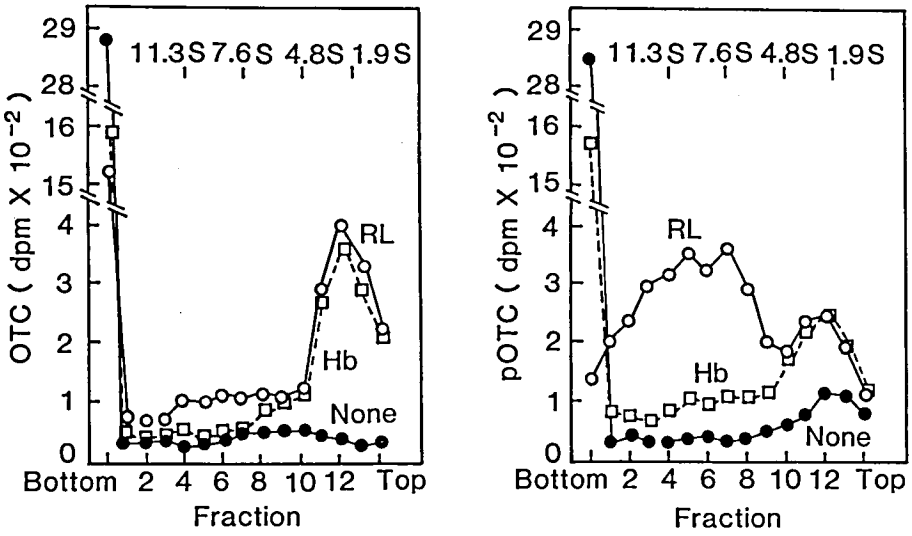


図3　OTC前駆体とサイトソール因子の複合体形成．精製リコンビナントOTC前駆体（左）または成熟型OTC（右）を単独で（None）またはウサギ網状赤血球溶血液ライセート（RL）またはヘモグロビン（Hb）と混合後，蔗糖密度勾配遠心法で解析した．

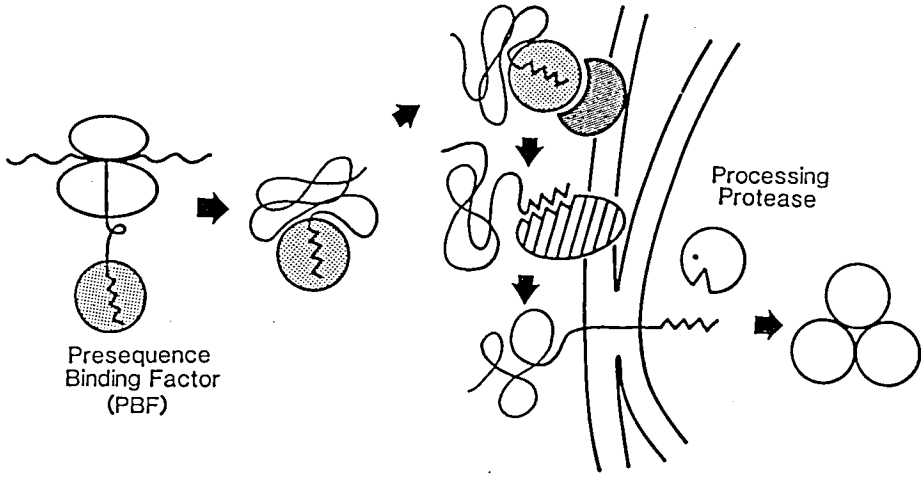


図4　前駆体蛋白質のミトコンドリア移行の初期ステップのモデル

ーであることが分った[4]．精製PBFは精製OTC前駆体のミトコンドリア移行を強く促進した．

考　　察

図4にミトコンドリア蛋白質前駆体のミトコンドリア移行の初期ステップのモデルを示す．前駆体蛋白質がリボソームで合成されてpresequence部分がリボソームより出てくるとPBFが結合し，可溶性の複合体を形成して前駆体の凝集を防ぎ，前駆体を膜透過可能な状態に保つものと思われる[5]．この複合体は恐らくミトコンドリア表層に存在すると思われる“PBFレセプター”に結合し，presequence部分が次いでPBFからpresequenceに対する別のレセプターに移された後，外

表　網状赤血球ライセートからPBFの精製

精能ステップ	蛋白質 (mg)	全活性 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	精製倍率
ライセート	30,000	3,300	0.1	1
アフィニティークロマト	21.6	2,400	110	1,000
DEAE-5PW HPLC	0.81	2,250	2,800	25,000
蔗糖密度勾配遠心	0.21	2,100	10,000	91,000

膜と内膜のコンタクトサイトを通ってマトリックスに移行すると考えている．今後PBFの性質を更に明らかにすると共に，遺伝子を単離し，"PBFレセプター"の検索を行う予定である．これらの基礎に基いて蛋白質のミトコンドリア局在化の障害を解析したい．

文　献

1) 森　正敬：蛋白質のミトコンドリア膜識別とミトコンドリア内移行．現代化学　増刊10「タンパク質の細胞内輸送と膜透過」1987，pp174—185.

2) Murakami K, Amaya Y, Takiguchi M, Ebina Y and Mori M: Reconstitution of mitochondrial protein transport with purified ornithine ranscarbamylase precursor expressed in *Escherichia coli*. J Biol Chem 263：18437—18442，1988.

3) Murakami K and Mori M：Purified presequence binding factor (PBF) forms an import-competent complex with a purified mitochondrial precursor protein. EMBO J 9：3201—3208，1990.

4) Murakami K, Tokunaga F, Iwanaga S and Mori M：Presequence does not prevent folding of a purified mitochondrial precursor protein and is essential for association with a reticulocyte cytosolic factor(s). J Biochem 108：207—214，1990.

5) Mori M and Murakami K：Transport of mitochondrial precursor proteins: Their conformational competence and related factors (Minireview). Cell Struct Funct 14：643—647，1989.

45）一次元ならびに二次元電気泳動による connectin の免疫化学的分析：福山型先天性筋ジストロフィーにおける変性・分解の検討を中心に

松　村　喜一郎*

研究協力者　萬　年　　徹**　萬　年　　徹*　埜　中　征　哉***
丸　山　工　作***　木　村　澄　子***　堀　　員一郎****
杉　浦　弘　子****

(I)　一次元電気泳動

はじめに

Connectin は myosin 線維を Z 帯に連結する弾性線維であり，サルコメアの保持に重要な役割を果たす[1]．3,000kd の巨大蛋白質である connectin は脆弱で，種々の要因により容易に変性・分解をおこす[1]．従って何らかの病的状態においては *in vivo* で connectin が変性・分解する可能性があり，またその場合 connectin が分解した結果として筋構築の崩壊がさらにいっそう助長されるという悪循環が成立することも考えられる[2]．我々は抗 connectin モノクローン抗体 (SM1-36-2) を用いた Western blot 解析により各種神経・筋疾患における connectin の変化を検討してきたが，その結果 connectin は，(1) Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) では 5 — 6 歳以降で高度に分解していること，(2) Becker 型筋ジストロフィー，筋緊張性ジストロフィー，肢帯型筋ジストロフィー，筋萎縮性側索硬化症，Charcot-Marie-Tooth 病などでは分解はいたって軽度であることを報告した[2]．今回は同様の方法で典型的な福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) における connectin の変化を検討した[3]．

＊国立療養所下志津病院神経内科
＊＊国立精神神経センター神経研究所
＊＊＊東京大学医学部脳研神経内科
＊＊＊＊千葉大学理学部
＊＊＊＊＊東京都神経科学総合研究所神経生化学

方　　法

生検筋を用いた connectin の一次元電気泳動後の Western blot 法についてはすでに報告した[2]．今回使用した 2 種の抗 connectin モノクローン抗体 (SM1-36-2と3B9) はともに connectin の分解産物を鋭敏に検出する．対象とした11例は表に示した．

結　　果

結果を図 1 と表に示した．Connectin は，2 — 3 歳以下の FCMD でも著明な変性・分解を認めたが，一方10歳以上でも変化のいたって軽い症例（もしくは筋肉）も存在した．

考察ならびにまとめ

前述のように connectin の分解は 5 — 6 歳以降の DMD における筋変性に重要な役割を果している可能性が考えられた[2]．このことは，DMD における骨格筋 CT 上の変化が 5 —10歳の間に最も急速に進行することと良く一致していた[4]．さて本研究により connectin は 2 — 3 歳以下の早期の FCMD でも分解していることが示された．このことは，FCMD における骨格筋 CT 上の変化は極めて早期に生じるとの報告と矛盾しない[5]．しかし一方10歳以上でも変化のいたって軽い症例（もしくは筋肉）も存在し，FCMD における connectin の変化は DMD よりもはるかに症例（もしくは筋

表 Degradation state of connectin in Fukuyama type congenital muscular dystrophy

Case No.	Age	Sex	Site of Biopsy	Degradation of Connectin[a]
1	5mo	M	Biceps brachii	2
2	8mo	M	Biceps brachii	4
3	1yr	M	Biceps brachii	3-4
4	1yr 11mo	F	Biceps brachii	4-5
5	2yr	F	Biceps brachii	2
6	3yr	F	Biceps brachii	2
7	3yr	F	Biceps brachii	4-5
8	4yr 1mo	F	Biceps brachii	1-2
9	5yr	F	Biceps brachii	3
10	14yr	F	Intercostal	1-2[b]
11	16yr	M	Tibialis anterior	1

[a]Degradation state of connectin revealed by immunostaining with SM1-36-2 and 3B9: 0 = no remarkable change compared with normal control (Figure legend), 1 = very mild degradation, 2 = mild degradation, 3 = moderate degradation, 4 = severe degradation, 5 = severe degradation with no identifiable α- or β-connectin.

[b]Muscle specimen was obtained at autopsy. Connectin degradation pattern of this case was significantly different from those of the others.

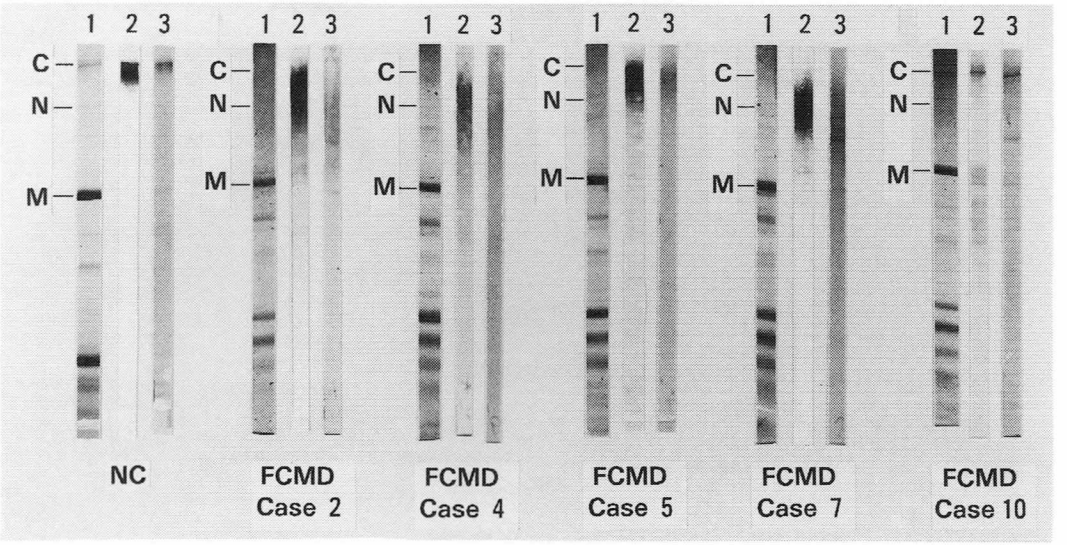


図1 Western blotting of the myofibrillar proteins of normal control (NC) and Fukuyama type congenital muscular dystrophy (FCMD). Lane 1 shows the polyacrylamide gel stained with Coomassie brilliant blue. Lanes 2 and 3 show nitrocellulose membrane immunostained with SM1-36-2 and 3B9, respectively. SM1-36-2 was more strongly reactive than 3B9. C, N and M denote connectin, nebulin and myosin heavy chain, respectively. NC is a case whose biopsied quadriceps femoris muscle turned out to be within normal limits by the conventional muscle histology. In cases 2, 4 and 7 of FCMD, both connectin and nebulin were hardly identified on the polyacrylamide gels. When immunostained with SM1-36-2 and 3B9, connectin was shown to be degraded extensively, with low-molecular-weight degradation fragments being stained as broad smears. In case 5, both connectin and nebulin were less distinct than in NC on the polyacrylamide gel. When immunostained with SM1-36-2 and 3B9, connectin was shown to be degraded mildly, with degradation fragments being stained as smears. In case 10 whose muscle specimen was obtained at autopsy, connectin and nebulin were reduced on the polyacrylamide gel. When immunostained with SM1-36-2 and 3B9, however, connectin remained definitely, and degradation fragments were stained out as multiple sharp bands in a remarkably different way from the other cases.

肉）間でのばらつきが大きかった．すなわちconnectinの分解は，FCMDでもDMDと同様に発症機序における重要な一過程をなす可能性が考えられるものの，その程度は症例／筋肉により異なることが示唆された．

(II) 二次元電気泳動[6)]

一次元目ゲルに0.5% agarose gel，二次元目ゲルに2—12% SDS polyacrylamide gelを用い，平林法によりconnectinの等電点電気泳動を試みた[7)~9)]．Connectinのスポットは，ゲルのCoomassie blue染色では同定されなかったが，SM1-36-2を用いたWestern blot法により明瞭に同定され，そのplは～5.7であった（図2）．今後本法はconnectinの正常発生過程における変化，病的状態における変性・分解状態などを検討する際に有用と考えられた．

文　献

1) Maruyama K: Connectin, an elastic filamentous protein of striated muscle. Int Rev Cytol **104**: 81—114, 1986.

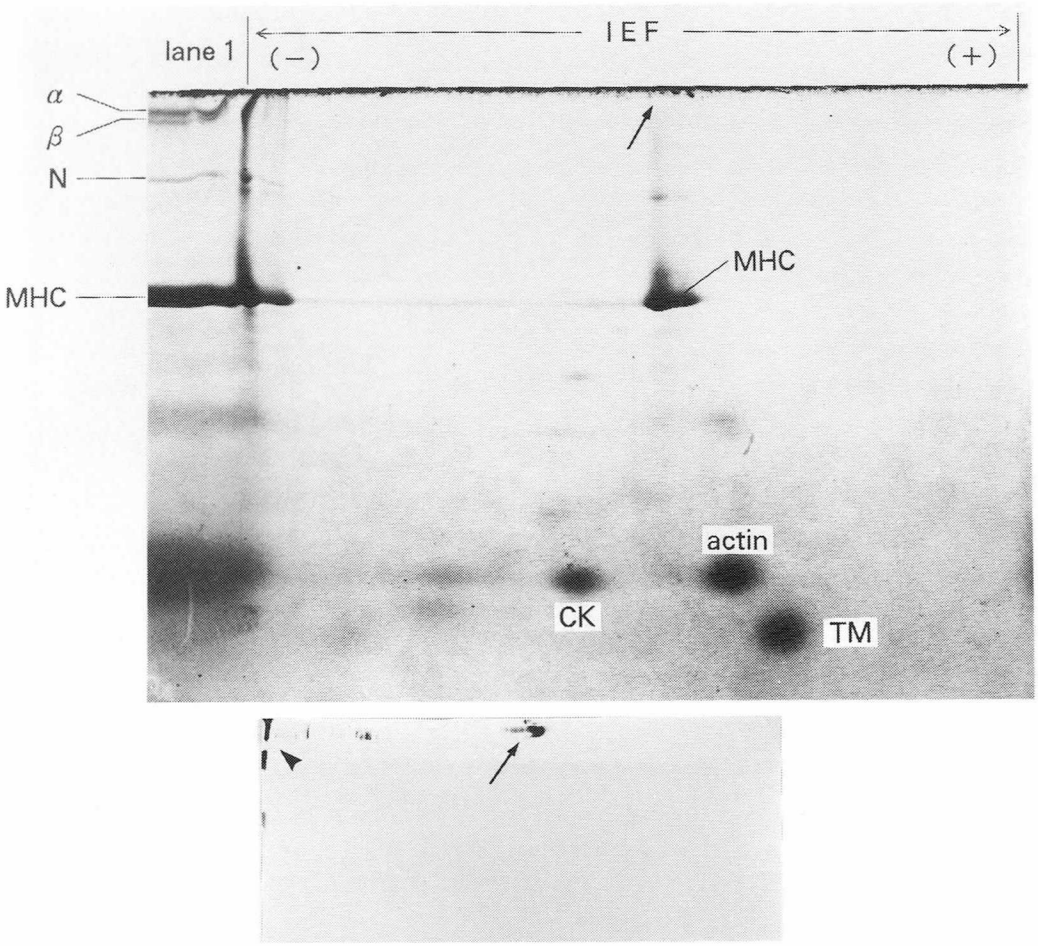


図2 (A) Coomassie brilliant blue (CBB) staining of the polyacrylamide gel following 2-dimensional gel electrophoresis of rat skeletal muscle proteins (area marked IEF). 0.5% Agarose gel was used at the 1st dimension and sample was applied from the basic side (−). 2—12% Gradient SDS polyacrylamide gel without stacking gel was used at the 2nd dimension; this was necessary for the high resolution analysis of high-molecular-weight proteins like connectin. SDS-extract of rat skeletal muscle proteins was run in lane 1 as molecular weight markers. α, β, N, MHC, CK and TM denote α-connectin, β-connectin, nebulin, myosin heavy chain, creatine kinase and tropomyosin, respectively (12, 13). Arrow points to the area where connectin spot is revealed by immunoblotting with an anti-connectin monoclonal antibody, SM1-36-2, as shown in Fig. 2B. Connectin spot was not visualized definitely by CBB staining; this was partly due to the trail of myosin heavy chain which exists abundantly in the sample (12, 13).
(B) Immunoblotting of the transferred nitrocellulose membrane with an anti-connectin monoclonal antibody, SM1-36-2. Connectin spot was detected definitely at an isoelectric point of ~5.7 (arrow). On close inspection, the spot seemed composed of 2 closely-located spots, in which case the upper and larger part and the lower and smaller part were presumed to represent α- and β-connectin, respectively. A substantial amount of connectin was not focused presumably due to aggregation of this extremely huge and filamentous protein (arrowhead).

2) Matsumura K, Shimizu T, Nonaka I, et al: Immunochemical study of connectin (titin) in neuromuscular diseases using a monoclonal antibody: connectin is degraded extensively in Duchenne muscular dystrophy. J Neurol Sci 93: 147—156, 1989.
3) Matsumura K, Shimizu T, Sunada Y, et al: Degradation of connectin in Fukuyama type congenital muscular dystrophy: immunochemical study with monoclonal antibodies. J Neurol Sci, 1990, in press.
4) 松村喜一郎, 清水 潤, 国本雅也ほか：デュシャンヌ型筋ジストロフィー症 (DMD) における骨格筋 CT 所見の経時的変化の検討. 筋ジストロフィー症の遺伝, 疫学, 臨床および治療開発に関する研究. 平成元年度研究報告書, 1990, pp114—118.
5) 福山幸夫, 新井ゆみ, 炭田沢子ほか：福山型先天性筋ジストロフィー症の骨格筋 CT について. 筋ジストロフィー症の遺伝, 疫学, 臨床および治療開発に関する研究. 昭和63年度研究報告書, 1989, pp127—133.
6) Matsumura K, Hori S, Sugiura H, et al: Isoelectrical focusing of connectin by agarose gel electrophoresis. J Biochem, in press.
7) Hirabayashi T: Two-dimensional gel electrophoresis of chicken skeletal muscle proteins with agarose gels in the first dimension. Anal Biol 117: 443—451, 1981.
8) Hirabayashi T, Tamura R, Mitsui I, et al: Investigation of actin in Tetrahymena cells: a comparison with skeletal muscle actin by a devised 2-dimensional gel electrophoresis method. J Biochem 93: 461—468, 1983.
9) Hori S, Sugiura H, Shimizu T, et al: Detection of dystrophin on 2-dimensional gel electrophoresis. Biochem Biophys Res Com 161: 726—731, 1989.

Ⅷ．ミトコンドリア脳筋症(2)

46）MERRF様症状を呈したMELASにおけるミトコンドリアDNAの解析

水　澤　英　洋*

研究協力者　太　田　成　男**　金　澤　一　郎*

Myoclonus epilepsy with ragged-red fibers (MERRF)[1] および mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS)[2]は，それぞれ特徴的な臨床症状を有するミトコンドリア脳筋症の中の独立した疾患単位である[3]．最近，それぞれ異なるミトコンドリアDNAの点変異が見い出されたことは，このことを裏付けるものである[4)~6)]．しかし，まれに両者の特徴を合わせ持つような症例も存在しており，単にどちらかの表現型の違いであるのか，あるいは全く異なる（遺伝子）異常によるのか不明のままである．私たちは，この点を明らかにする目的でMERRF様の症状を合わせ持つ非典型的MELASの一例で，ミトコンドリアDNAの解析を行った．

症　例

症例は，19歳の男性で，嚥下・構音障害，歩行障害を主訴に来院した．既往歴・家族歴には特記すべきことはなかった．現病歴としては，妊娠・分娩に異常なく満期産で出生時体重3200gであったが，3ヶ月の時に数秒間続く全身硬直発作が数回見られ，4歳からは両側の難聴を指摘されていた．10歳から大発作が出現するようになり，某大学病院で"Leigh脳症の疑い"と診断され，抗痙攣剤などの治療が始められた．しかし，その後構音障害，ふらつき，知能低下などが徐々に進行し，痙攣発作（時にミオクローヌス様）も時々見られた．17歳の時，左半盲のエピソードがあり，19歳で嚥下・構音障害，歩行障害が進行したため入院となった．

入院時現症では，身長170cm，体重51kgと軽度のるいそうを認めた．神経学的には，意識は清明であったが，知能は低下しており，両側難聴，構音・嚥下障害が見られた．下肢近位筋を中心に筋力低下，筋トーヌス低下があり，腱反射は全般性に低下し，Babinski徴候は両側で陽性であった．下肢で振動覚が低下していた．動作は緩慢で四肢・体幹の失調，開脚歩行があり，左側弯，便秘なども認められた．

検査所見では，尿，便，血液，髄液の一般検査には異常なかったが，乳酸は血液18mg/dl，髄液23mg/dl，ピルビン酸は血液0.9mg/dl，髄液1 mg/dlと乳酸の高値を認めた．神経伝導速度は，右脛骨神経MCV22m/s，右腓腹神経SCV41m/sと下肢で低下し，筋電図では一部の被検筋に神経原性NMUが見られた．脳波は，4－7 Hzθ波が主体であった．左上腕二頭筋筋生検では，多数のragged-red fiberを認めたが，組織化学的にcytochrome C oxidase活性は低下しておらず（図1），生化学的に測定したミトコンドリア電子伝達系呼吸酵素活性は正常範囲内であった．腓腹神経生検では，有髄神経線維の高度の減少が見られた（図2）．MRIでは脳幹・小脳・大脳の萎縮を認めた（図3）．入院後，構音・嚥下障害は一時改善したが，その後頭痛，右半盲が出現，大発作，焦点発作，ミオクローヌス様発作を含む痙攣発作を頻

＊筑波大学臨床医学部系神経内科
＊＊自治医科大学第一生化学

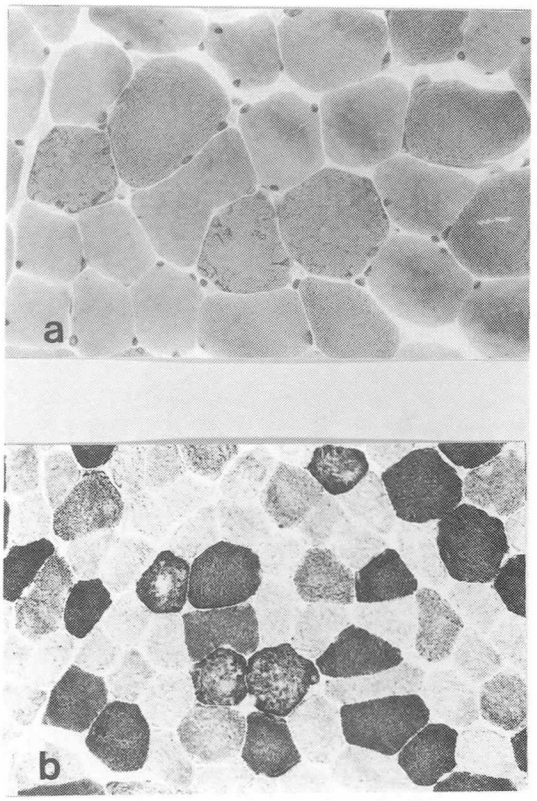


図1a，b　生検筋に軽度だが多数のragged-red fiberを認めるが(a)，cytochrome *C* oxidase活性は欠損していない(b).（a；Gomoritrichrome染色　×340，b；cytochrome *C* oxidase　染色，230）

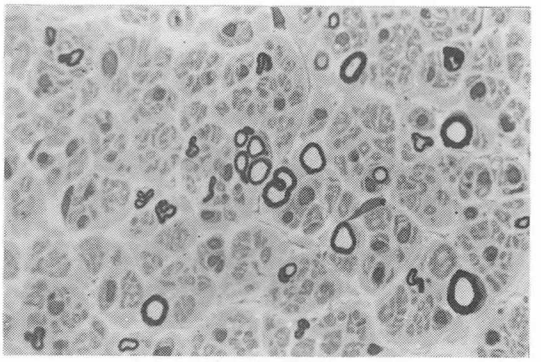


図2　生検腓腹神経では，有髄神経線維の高度の減少と小線維の集族を認める.（toluidine blue染色，×850）

発するようになった．さらに右三叉神経痛，右one and a half徴候，中枢性右顔面神経麻痺も加わった（図4）．MRIでは，T2およびPD強調画像でhigh intensityの病巣を，脳幹背側部から視床にかけてと左後頭葉を中心とする大脳皮質に多発性に認めた（図3）．

本症例は，その経過中明らかに“stroke-like”の症状を認めており，診断基準に照らしてみても低身長でない点を除けばMELASとして問題はないと思われた．一方，MERRFでも“stroke-like”の症状は知られており，ミオクローヌス様の痙攣発作や高度の末梢神経障害などMERRFによく見られる症状も伴っていた（図5）．なお，Leigh脳症は完全には否定できないが，MRI所見からはその可能性は少ないと思われた．以上のことから，本例はMERRF様症状を伴ったMELASの可能性が高いと考えて，ミトコンドリア遺伝子の解析を行った．

ミトコンドリア遺伝子の解析

まず，生検筋からDNAを精製し，PCRにて関心領域すなわちMELASの変異点である第8344塩基対およびMERRFの変異点である第3243塩基対を含む領域を増幅した．次いで，MELASについてはAからGへの変換が新しいGGGCCCという配列を形成することを利用して，制限酵素ApaIにて増幅DNAを切断し1.5%アガロース・ゲル電気泳動にかけエチウム・ブロマイド染色で異常DNA断片の有無を検索した．本症例では，tRNA-LeuのAからGへの変換は認められなかった（図6）．MERRFについては，非対称PCRにて一本鎖DNAを調整し，蛍光プライマー法を用いABIの自動塩基配列解析装置により全塩基配列を決定した．それによると，tRNA-LysのAからGへの変換も見られなかった（図7）．

考察・結論

本例においては，MELASおよびMERRFにおいて既に報告されている点変異はいずれも認められなかった．したがって，単に表現型の違いではなく異なる原因によると考えられる．しかし，そ

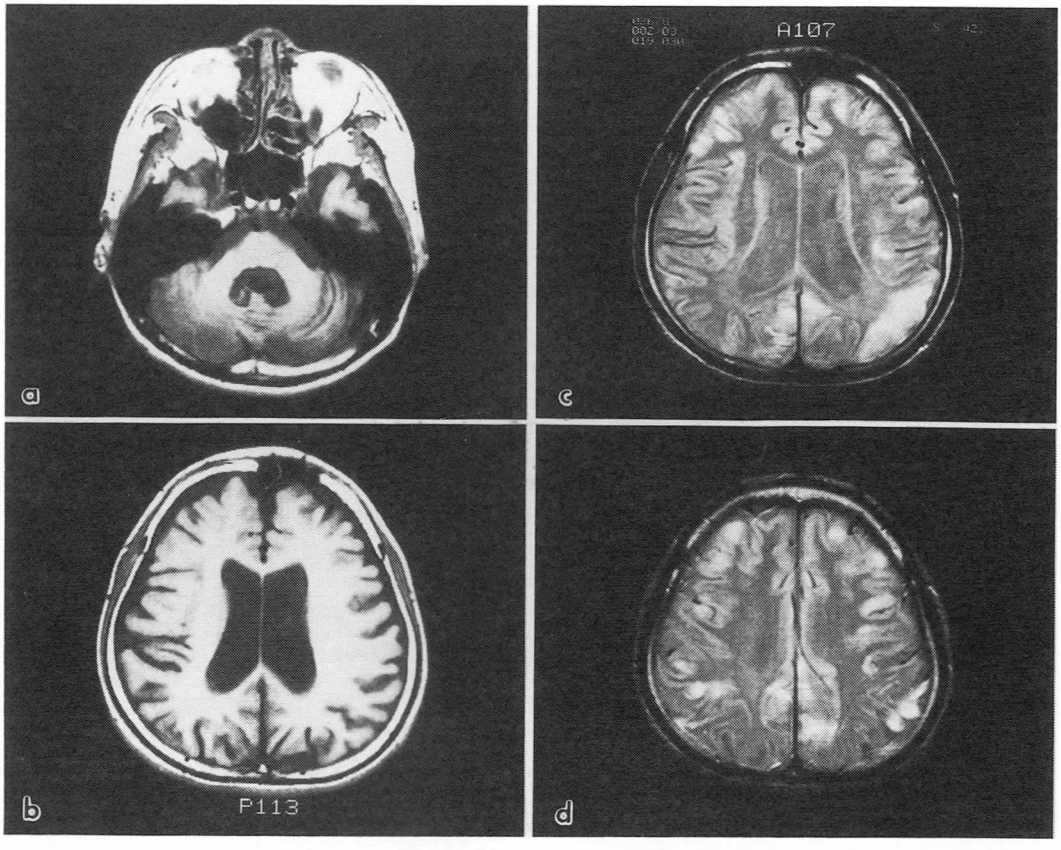


図3 a, b, c, d　MRI所見．a，bは入院時のT1強調像で脳幹・小脳・大脳の萎縮と小脳半球の低信号化を認める．c，dは半盲や痙攣発作出現後のPD強調像で左後頭葉を中心に大脳皮質に多発性の高信号域を認める．

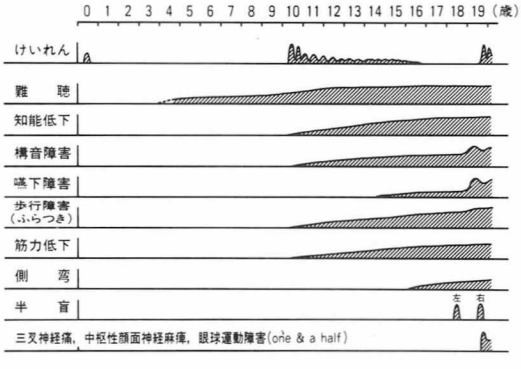


図4　本症例の臨床経過

	KSS	MERRF	MELAS	Leigh's E	This case
外眼筋麻痺	+	−	−	+	(+)
網膜変性症	+	−	−	−	−
心臓伝導障害	+	−	−	−	−
CSF蛋白>100 mg/dℓ	+	−	−	+	−
ミオクローヌス	−	+	−	(+)	(+)
小脳失調	+	+	−	+	+
筋力低下	+	+	+	+	+
痙攣	−	+	+	+	+
痴呆	+	+	+	+	+
低身長	+	+	+	(+)	−
発作性嘔吐	−	−	+	+	−
皮質盲	−	−	+	−	−
片麻痺，半盲	−	−	+	−	+
神経性難聴	+	+	+	+	+
乳酸アシドーシス	+	+	+	+	+
家族歴	−	+	+	+	−
Ragged-red fibers	+	+	+	+	+
海綿状変性	+	+	+	+	?
末梢神経障害	+	+	−	(+)	+

図5　本症例と主なミトコンドリア脳筋症との臨床・検査所見の比較

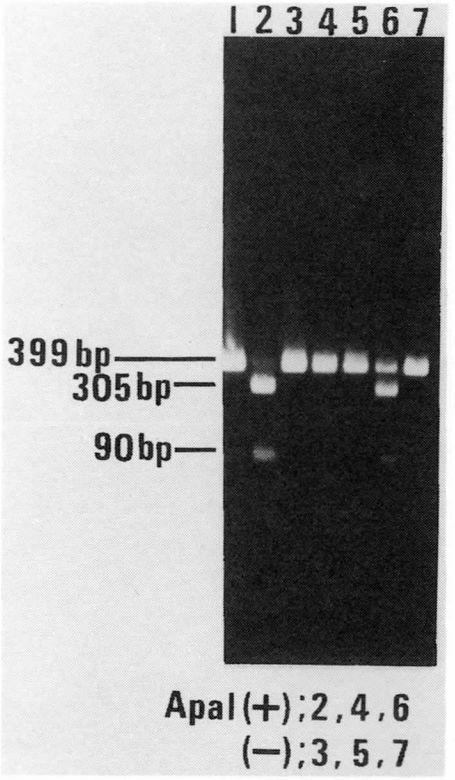


図6　PCRで増幅したミトコンドリアDNA断片のアガロース・ゲル電気泳動．Lane 1は正常対照，lane 2，3とlane 6，7がそれぞれ典型的MELAS症例の培養細胞および生検筋からの試料，lane 4，5が本症例の試料である．MELASでは，399bpのものがApaIで305bpと90bpに切断されるのに対して，本症例ではそれが見られない．

の原因は臨床症状の類似性からMELASやMERRFの点変異とよく似ている可能性がある．Gotoらによれば，報告された点変異を持たないMELASが20%もあり，変異を持つMELASと臨床症状では区別できないとされている[6]．このことは，典型的MELASにおいてもそれを引き起こす遺伝子異常はひとつではないことを示唆している．今後，本例を含めこのような症例の遺伝子解析が，新しい遺伝子異常あるいは遺伝子異常と臨床症状との関係の解明に役立つものと思われる．

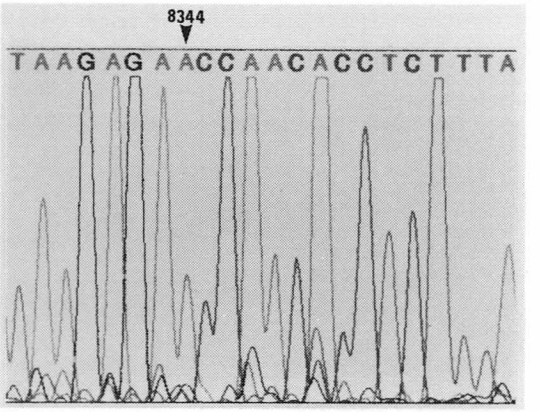


図7　ABIの自動塩基配列解析装置によるミトコンドリアDNAの塩基配列．第8344塩基対のAからGへの変換は認められない．

文　献

1) Fukuhara N, Takiguchi S, Shirakawa K, 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 literature. J Neurol Sci 47: 117—133, 1980.

2) Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, et al: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: A distinctive clinical syndrome. Ann Neurol 16: 481—488, 1984.

3) 福原信義：わが国におけるミトコンドリア・ミオパチーの臨床—病型分類—．神経内科 24: 125—132, 1986.

4) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, et al: Myoclonus epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA-Lys mutation. Cell 61: 931—937, 1990.

5) Kobayashi Y, Momoi M, Ohta S, et al: A point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. Biochem Biophys

Res Comm, in press
6) Goto Y, Hourai S, Nonaka I: A mutation in the $tRNA^{Leu(UUR)}$ gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. Nature, 348 :651—653, 1990

47) Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) の病因に関する分子遺伝学的研究

宮武　正*

研究協力者　米田　誠*　辻　省次*　丹野芳範*
田中恵子*　宝来　聰**　小澤髙将***

はじめに

Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) は，ミオクローヌス，てんかん，小脳失調，ミオパチーを主徴とする疾患であり，時に痴呆，足変形，感音性難聴，視神経萎縮などを伴う．骨格筋生検で ragged-red fiber (RRF) が認められ，母系遺伝を呈することからミトコンドリア DNA (mtDNA) の異常が病因と推察されてきた．

しかしながら，従来 Southern blot では mtDNA の欠失は認められておらず，一塩基置換ないしは Southern 解析では判別できない程度の小さな欠失が病因である可能性が示唆されてきた．

そこで，我々は本症の病因を明らかにすることを目的に分子遺伝学的解析をおこなった．

対　象

我々が，分析した症例の臨床症状の概略を表に示す (表1)．症例1及び2は福原ら[1]により本症の疾患概念が提唱された際に報告された症例である．症例3は67歳の女性で，55歳頃より小脳失調，動作性ミオクローヌス，てんかん，ミオパチーを呈し，筋生検で RRF が認められている．症例3，4は母子例である．

いずれの症例も母系遺伝として矛盾しない家族歴を有し，MERRF の中核症状であるてんかん，小脳失調，ミオクローヌス，ミオパチーを有し，血中乳酸・ピルビン酸値の上昇と骨格筋生検で RRF を認めている．他のミトコンドリア脳筋症との鑑別上問題となる脳卒中様発作，網膜色素変性，心伝導障害はいずれの症例でも認められていない．

表1　本研究で分析した MERRF 患者の臨床所見の概略[8] 症例3，4は，母子例である．(C；childfood)

Patient	P1	P2	P3	P4
Family	1	2	3	
Age(y/o)/Sex	20/M	30/F	67/F	25/M
Onset(y/o)	14	C	55	C
Familial incidence	(+)	(+)	(+)	(+)
Myoclonus	(+)	(+)	(+)	(+)
Epilepsy	(+)	(+)	(+)	(+)
Ataxia	(+)	(+)	(+)	(+)
Myopathy	(+)	(+)	(+)	(+)
Dementia	(+)	(+)	(+)	(+)
Foot deformity	(+)	(+)	(−)	(−)
Hearingloss	(−)	(+)	(+)	(−)
Optic atrophy	(+)	(−)	(−)	(−)
Retinal pigmentation	(−)	(−)	(−)	(−)
Heart block	(−)	(−)	(−)	(−)
Stroke-like episodes	(−)	(−)	(−)	(−)
Elevation of L/P	(+)	(+)	(+)	(+)
Ragged-red fibers	(+)	(+)	(+)	(+)

＊新潟大学脳研究所神経内科
＊＊国立遺伝学研究所
＊＊＊名古屋大学医学部第二生化学

以上のように対象とした症例は臨床的に典型的なMERRFの症例と考えられる.

方　法

患者の生検骨格筋よりgenomic DNAを抽出後, PCRによって増幅したDNA断片をdirect sequence法あるいはpUC19ないしはpBlue Script KS⁻ plasmid vectorにsubcloningし, mtDNAの全sequenceを決定した.

しかし, mtDNAには正常人でも多くの多型性が認められる事から, 本症の分析においても多数の塩基変異が認められる可能性がある.

そのため, 認められた多数の塩基置換のうちどれが本症の病因となる塩基置換であるのかを鑑別することが必要となる. このためLeber遺伝性視神経萎縮症[2)3)]と同様に, 種間での保存性の高いアミノ酸の変化を伴う塩基置換が病因となる可能性が高いというstrategyに基づいて, 詳細な検討をおこない, 本症の病因と考えられる塩基置換を決定した.

結果及び考察

症例1の骨格筋mtDNAの98%の領域(塩基番号4,532—4,557, 8,617—8,746, 12,544—12,653を除く)を分析し, Andersonらによって報告されている正常ヒトmtDNAの塩基配列[4)]と比較して, 33箇所の塩基置換が見いだされた. このうちの23箇所の塩基置換がタンパク質を規定している領域で, 10箇所がそれ以外のD-loop, rRNA, tRNA領域に含まれていた.

タンパク質のcoding regionの塩基置換のうち, 14箇所がNADH-dehydrogenaseのsubunit領域に, 5箇所がcytochrome *c* oxidase, 2箇所がATPase, 2箇所がcytochrome b領域に位置していた. このうち, 12箇所がアミノ酸の置換をきたすものであり, 3箇所の塩基置換(塩基番号6,547のTからC, 11,718のGからA, 14,858のGからA)がヒト, bovine, mouseの間で保存されたアミノ酸を置換するものであった(**表2**).

タンパク質のcoding region以外では, プロモーター領域を含むD-loop領域中に7箇所, r-RNA (12S) 領域中に2箇所, tRNA^{Lys}領域中に1箇所の塩基置換が見いだされた(**表3**).

このうち, D-loop領域の3箇所(塩基番号16,261, 16,311, 16,519)については正常ヒトmtDNAの塩基置換として報告[5)]されており, 本症の病因としては考えにくい. また, 塩基番号1,437 (rRNA-12S) の塩基置換については, Wallaceらにより, Leber遺伝性視神経萎縮症の解析の際に報告[2)]されており, いずれも本症の病因の可能性は低いと考えられる.

以上より, MERRFの病因となりうる塩基置換として, アミノ酸の種間での保存性を考慮し3箇所のタンパク質のcoding regionの塩基置換(塩

表2　症例1の骨格筋mtDNA分析で認められたアミノ酸の置換をきたす12箇所の塩基置換及び他種におけるアミノ酸配列[8)] (＊種間での保存性の高いアミノ酸の置換を伴う塩基置換)

nt position		Codon		Amino acid			
		Human	Patient	Human	Patient	Bovain	Mouse
＊1. 6547	COI	T	C	L	P	L	L
2. 6898	COI	T	C	M	T	I	I
3. 8860	ATP6	A	G	T	A	A	A
4. 10330	ND3	C	T	S	F	S	T
＊5. 11718	ND4	G	A	G	E	G	G
6. 12092	ND4	C	T	L	F	L	I
7. 13702	ND5	G	C	G	R	R	R
8. 14199	ND6	C	A	P	T	S	S
9. 14858	ND6	C	G	F	L	F	V
10. 14368	ND6	C	G	F	L	M	F
＊11. 14858	cytb	G	A	G	S	G	G
12. 15326	cytb	A	G	T	A	M	I

表3　症例1の骨格筋mtDNAのタンパク質をコードしていない領域における一塩基置換[8)]

nt position		Human,Camb	Patient 1
1. 73	D-loop	A	G
2. 263	D-loop	A	G
3. 750	12S	A	G
4. 1438	12S	A	G
5. 8344	tRNA(Lys)	A	G
6. 16261	D-loop	C	T
7. 16268	D-loop	C	T
8. 16288	D-loop	T	C
9. 16311	D-loop	T	C
10. 16519	D-loop	T	C

表 4　正常のヒトmtDNAの塩基配列[4]とMERRF患者のmtDNAの塩基配列[8]の比較

nt position	Normal	Patient 1	Patient 2	Patient 3
6457 COI	T	C	T	T
8344 tRNA(Lys)	A	G	G	G
11718 ND4	G	A	G	G
14858 cytb	G	A	G	A

基番号6,457, 11,718, 14,858)と$tRNA^{Lys}$領域の1箇所の塩基置換が考えられた．さらにこれらの塩基置換の中で，真にMERRFの病因となるものを見いだすため，他のMERRF患者がこれらと同様の塩基置換を持つか否かを比較検討した．その結果，塩基番号8,344の塩基置換は，3例全てに認められたが，塩基番号6,457及び11,718の塩基置換については他の2家系のMERRF患者においては見いだされなかった．また，塩基番号14,858の置換も他の2家系のMERRF患者中1人に見いだされたのみであり，本症の病因の可能性は低いと考えられた（表4）．

以上より，我々は$tRNA^{Lys}$塩基番号8,344の位置のAからGへの置換が本症の病因として最も可能性が高いと考えた．この塩基置換は$tRNA^{Lys}$のTΨC loopのTΨC stemの3'側より2塩基下流に位置する．S. Cerevisiaeにおいては，従来より多くの変異株が知られており，t-RNA^{Asp}のTΨC loopの塩基置換によってtRNAの高次元構造や機能に障害をきたし，酸化的リン酸化系の機能に障害をもたらすことが知られている[6]．本症における$tRNA^{Lys}$の塩基変異も同様に，mtDNAで規定されたサブユニットのタンパク合成に影響する可能性がある．また，TΨC loopは一般に種間での変異の多い部位であるが，このA残基は多くの種間で保存されており，$tRNA^{Lys}$の高次構造上重要と考えられる．

最近，我々とは独立にShoffnerらによってMERRF患者に同一の塩基変異が見いだされ，2～27%の割合で正常の塩基配列に由来するクローンが存在すると報告された[7]．

さらに，彼らは発症年齢とheteroplasmyの程度に相関がみられると報告している．今後，我々の分析した症例についてheteroplasmyの程度と臨床症状との関連性について，さらに詳しい検索をおこなう必要があると考えられる．

まとめ

1．MERRF患者の骨格筋mtDNAの解析から，$tRNA^{Lys}$塩基番号8344のAからGへの塩基変異が認められた．

2．この塩基変異は独立した3家系4症例のMERRF患者全てに認められた．

今後は，この塩基変異が$tRNA^{Lys}$の高次構造や機能にどのような影響を及ぼし，ミトコンドリアの蛋白発現にどう影響しているのかを解明し，各臓器での発現，臨床徴候を説明していくことが必要であると考えられる．

文　献

1) Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa S and Tsubaki T: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities) : disease entity or syndrome? Light and electronmicroscopic studies of two cases and review of the literature. J Neurol Sci 47 : 117～133, 1980.

2) Wallace DC, Singh G, Lott MT, HogdeJA, Schurr TG, Lezza AMS, Elsas II LJ and Nikoslelainen EK: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science 242 : 1427—1430, 1988.

3) Yoneda M, Tsuji S, Yamauchi T, InuzukaT, Miyatake T, Horai S and Ozawa T: Mitochondrial DNA mutation in family with Leber's hereditary optic neuropathy. Lancet i : 1076—1077, 1989.

4) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijin MHL, Coulson AR, et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290 : 457—465, 1981.

5) Zennaro E, Francisci S, Rangnini A, Frontalis L and Fukuhara B: A point mutation in a

mitochondrial tRNA gene abolishes its 3' end and processing. Nucl Acid Res 17 : 5751—5764, 1989.

6) Horai S: Molecular phylogeny andevolution of human mitochondrial DNA: New aspects of the genetics of molecularevolution, Springer-Verlag (in press)

7) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW and Wallace DC: Myoclonus epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA $tRNA^{Lys}$ mutation. Cell 61 : 931—937, 1990.

8) Yoneda M, Tanno Y, Horai S, Ozawa T, Miyatake T and Tsuji S: A common mitochondrial DNA mutation in $tRNA^{Lys}$ of patient with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. Biochem Int 21 : 789—796, 1990.

48）MELASにおける遺伝子異常の発見

埜中征哉**

研究協力者　後藤雄一*　松岡太郎*　竹光正和*

はじめに

ミトコンドリア脳筋症は，臨床的に3型に分類されている．すなわち，①眼瞼下垂と外眼筋運動制限を主徴とする慢性進行性外眼筋麻痺症候群(CPEO)，②ミオクローヌスを特徴とするmyoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF)，③卒中様症状を特徴とするmitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes (MELAS) である[2]．

これらミトコンドリア脳筋症に関する最近の分子生物学的研究，特にミトコンドリアDNA (mtDNA) 研究の進歩はめざましい．まず，約65%のCPEO患者生検筋に，大きな欠失をもつ異常mtDNAの存在することが明らかにされた[3)4)]．しかも，臨床症状と欠失の大きさや部位などと相関関係がないこと[4)]や，異常mtDNAの発現の研究[5)6)]などから，転移RNA(tRNA)の何らかの異常が，病因と関わっていることが示唆された．また，MERRFについては，mtDNA上のLys-tRNA内の塩基番号8,344のAがGに変異していることが明らかにされ，この疾患でも異常tRNAの病因への関与が示された[7)8)]．

そこで我々は，残るMELASにおいても，ミトコンドリアtRNA異常が存在する可能性が高いと考えた．その理由は，①MELASにも母系遺伝と考えられる家系があること，②三型とも，筋組織学的所見が類似していること，③臨床症候群と酵素学的異常が一対一に対応しないこと，などである．

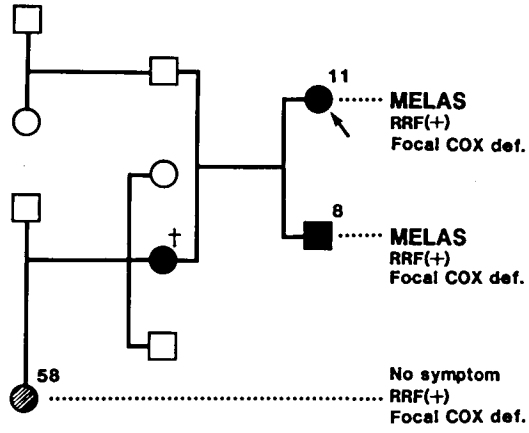


図1　母系遺伝と考えられるMELASの一家系．矢印は，塩基配列を決定した患者を示す．
RRF：ragged-red fiber
COX：cytochrome c oxidase

対　象

母系遺伝と考えられるMELAS家系の一患者の生検筋からDNAを分離した(図1)．全tRNAを含む領域をpolymerase chain reaction (PCR)法を用いて増幅し，サンガー法で塩基配列を決定した[1)]．

結果と考察

アンダーソンの塩基配列[9)]と比較検討したところ，tRNAに関する限り，塩基番号3,243のみが変異していた(図2)．この部位は，tRNA-ロイシン(UUR)のdihydrouridineループの最初の塩基にあたり，ヒトの他のミトコンドリアtRNAや核

*国立精神・神経センター神経研究所
**国立遺伝学研究所

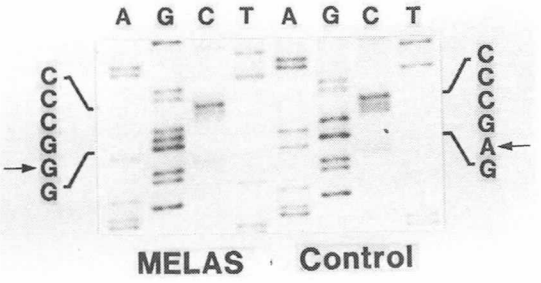


図2　PCRを用いたDirect sequencingの結果を示す．このMELAS患者では，Andersonの塩基配列[9] 3,243番のアデニン（A）がグアニン（G）に変わっていた．

tRNAでもアデニンのことが多い．さらに，この部位は，ヒトからウニに至るまで，厳密に保存されていることを考えると，この部位の変異は，tRNAの機能に重大な影響を与えることが予想された[1]（図3）．この変異により，GAGCCCがGGGCCCとなり，新たに制限酵素ApaIの切断部位を生じていた．したがって，変異部位を含む領域をPCR法で増幅し，ApaIで切断することで，容易に変異の有無を検出できる[1]（図4 a，b）．そこで，我々は他のMELAS患者39例とコントロール50例をはじめ，CPEO患者40例（単一欠失例29例，多発欠失例2例，無欠失例9例），MERRF患者6例についても検討した（表）．その結果，MELASでは，32例（80%）でこの変異が存在したが，コントロールでは一例も認められなかった．また，CPEOの例外的な一例以外，他のミトコンドリア脳筋症でもこの変異は存在しなかった．変異の存在したCPEO例は，サザン法で大きな欠失は見つかっておらず，また，その母と姉もCPEO患者であったが，姉にはMELASを思わせる脳卒中様症状が存在していた[10]．以上から，我々は，この塩基番号3,243のA→G変異が，MELASの最も主要な遺伝子異常と結論した．

また，変異を持つ全ての症例で，図4 bで示すように，ApaIでは切断されない断片を必ず認めることから，mtDNA全部が変異mtDNAではなく，正常と異常とが混在している（ヘテロプラスミー）ことが明らかである．その割合は，mtDNA

表　ミトコンドリア脳筋症3型及びコントロールの塩基番号3,243の塩基を示す．Aはwild-type，Gはmutantを表す．

	Total	A	G
MELAS	40	8	32
MERRF	6	6	0
CPEO	40	39	1
Control	50	50	0

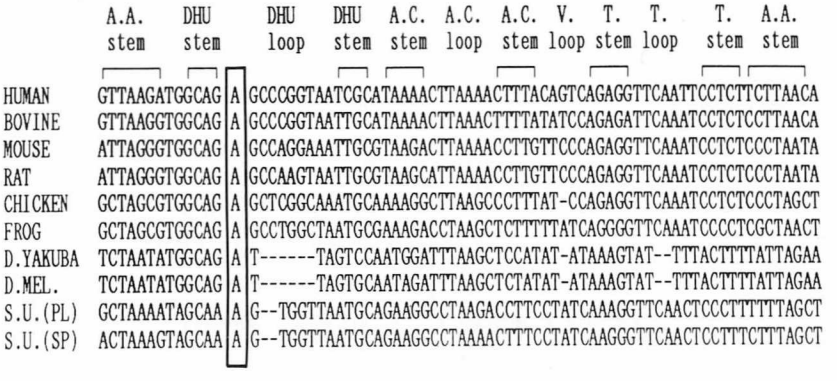
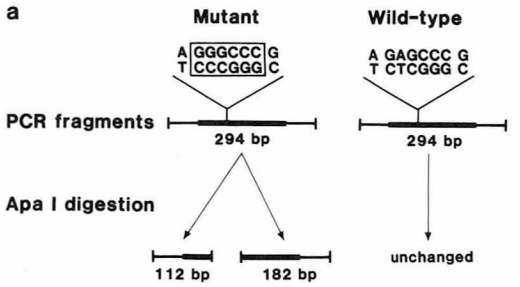


図3　ミトコンドリアtRNA$^{Leu(UUR)}$の塩基配列dihydrouridine（DHU）ループの最初の塩基は，厳密に保存されている．
A.A.：amino acid，A.C.：anticodon，V.：variable，T.：T C，D.：Drosophila，S.U.：sea urtin.



b

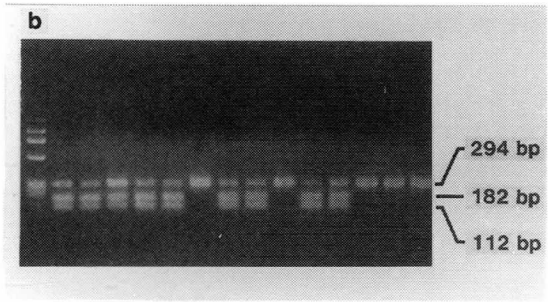


図4 a　塩基番号3,243を含む領域をPCRで増幅し，制限酵素ApaIで切断する．mutantは2つに切断されるが，wild-typeは切断されない．
b　電気泳動を行うと，容易に変異の有無を確認できる．マーカーは，HaeIII-digested φ×174．

全体のサザンブロティング法から計測でき，変異DNAの割合は50%から92%であった[1]．

おわりに

MELASの主要な遺伝子異常が明らかになった．今後は，この遺伝子異常が，具体的にどのような生化学異常を引き起こし，ひいてはどのように臨床症状と結び付くのかを検討しなくてはならない．また，MERRFのtRNA異常とMELASのtRNA異常は，どの点で似ているのか，どの点で違っているのかも，重要な研究テーマになるであろう．研究の発展により，ミトコンドリア脳筋症の病態がさらに明らかにされ，新しい治療法が開発されることが期待される．

文　献

1) Goto Y, Nonaka I and Horai S: A mutation in the transfer RNA$^{Leu(UUR)}$ gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. Nature **348**: 651—653, 1990.

2) DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, et al: Mitochondrial myopathies. Ann Neurol **17**: 521—538, 1985.

3) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive

external ophthalmoplegia and Kerans-Sayre syndrome. N Engl J Med 320 : 1293—1299, 1989.

4) Goto Y, Koga Y, Horai S and Nonaka I: Chronic progressive external ophthalmoplegia : a correlative study of mitochondrial DNA deletions and their phenotypic expression in muscle biopsies. J Neuro Sci 100 : 63—69, 1990.

5) Mita S, Schmidt B, Schon EA, et al: Detection of "deleted" mitochondrial genomes in cytochrome-c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 9509—9513, 1989.

6) Nakase H, Moraes CT, Rizzuto R, et al: Transcription and translation of deleted mitochondrial Genomes in Kearns-Sayre syndrome : implications for pathogenesis. Am J Hum Genet 46 : 418—427, 1990.

7) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, et al: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) ia associated with a mitochondrial DNA $tRNA^{Lys}$ mutation. Cell 61 : 931—937, 1990.

8) Yoneda M, Tanno Y, Horai S, et al: A common mitochondrial DNA mutation in the $t\text{-}RNA^{Lys}$ of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. Biochem Int 21 : 789—796, 1990.

9) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290 : 457—465, 1981.

10) 西尾健資，春原経彦，埜中征哉他：多毛，両側線条体壊死を伴なう家族性進行性外眼筋麻痺症候群．臨床神経学 28 : 1266—1273, 1988.

49) Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels (SSV) の診断的意義

埜 中 征 哉*

研究協力者　長谷川 ひとみ*　松 岡 太 郎*　後 藤 雄 一*

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) は卒中様症状をくりかえすミトコンドリア脳筋症である．Ohama ら[1] は MELAS の患者の剖検例を検索し，中枢神経系内の中・小動脈平滑筋内のミトコンドリアの異常増加，壊死性の変化を認めた．このことより，卒中をおこす病因として，血管病変 (angiopathy) が主なるものとし，mitochondrial angiopathy の概念を示した．

MELAS の患者は低身長，心障害，時に腎障害を認めるなどその病変は全身に及ぶ．ゆえに血管系の異常は中枢神経系内に限らず全身に存在することが考えられる．Sakuta ら (1989)[2] は MELAS 患者の生検筋の血管壁に Ohama らが認めたものと同じ変化を高頻度に認めている．

血管壁内のミトコンドリアの増加は SDH (succinate dehydrogenase) 染色で簡単に証明できる．なぜならば SDH はミトコンドリア固有の酵素だからである．Hasegawa らは血管壁にミトコンドリアが蓄積し，SDH 活性の上昇したものを SSV (strongly SDH-reactive blood vessels) とし，MELAS の診断に重要な所見であるとした[3]．

今回この SSV の診断的意義について検討したので報告する．

対象と方法

MELAS の患者 (①発作性反復性の頭痛，嘔吐に代表される卒中様症状，②血中，特に髄液の乳酸値の上昇，③筋生検で筋原性変化を認め，ミトコンドリア病が疑われているもの) 40名，MERRF (myoclonic epilepsy with ragged-red fibers) 6名，CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia) 40名，ミトコンドリア病以外の神経筋疾患患者100名を対象とした．生検筋には各種組織化学的染色を施した．Gomori トリクローム変法染色で小動脈を確認し，連続切片でその SDH 活性をみた．同じ検索をさらに300, 600μm 離れた連続切片でも検索した．

SSV がはたして異常なミトコンドリアを含む異常血管であるかどうか確認のため，連続凍結切片を作成した．連続切片の1枚目を SDH 染色に，次の1枚をグルタール液に固定し，さらに OsO_4 で後固定，エポン包埋し，電顕的に検索した[4]．SSV を持つ MELAS の患者6名，対象5名につき，この連続切片での検討を行った．

結　果

MELAS の患者生検筋はすべて筋線維の大小不同 (タイプ1，2線維とも) があり，いわゆる筋原性変化を示した．典型的な ragged-red fibers (RRF) は40例中36例に認められ，4例には RRF は存在しなかった．組織化学的には cytochrome c oxidase (CCO) の部分欠損を14例にみとめた．

生化学的には複合体 I 欠損を16名に，複合体 IV 欠損を5名に，I +IV 欠損を5名に認めた．14名では生化学的に異常を認めなかった．また RRF を欠く5名では生化学的にも異常を認めなかった．

同一生検筋で3枚の SDH 染色切片 (300μm ずつ離れている) をみると，MELAS40名中35生検筋内 (87.5%) に SSV が認められた (図1)．SSV

＊国立精神・神経センター神経研究所

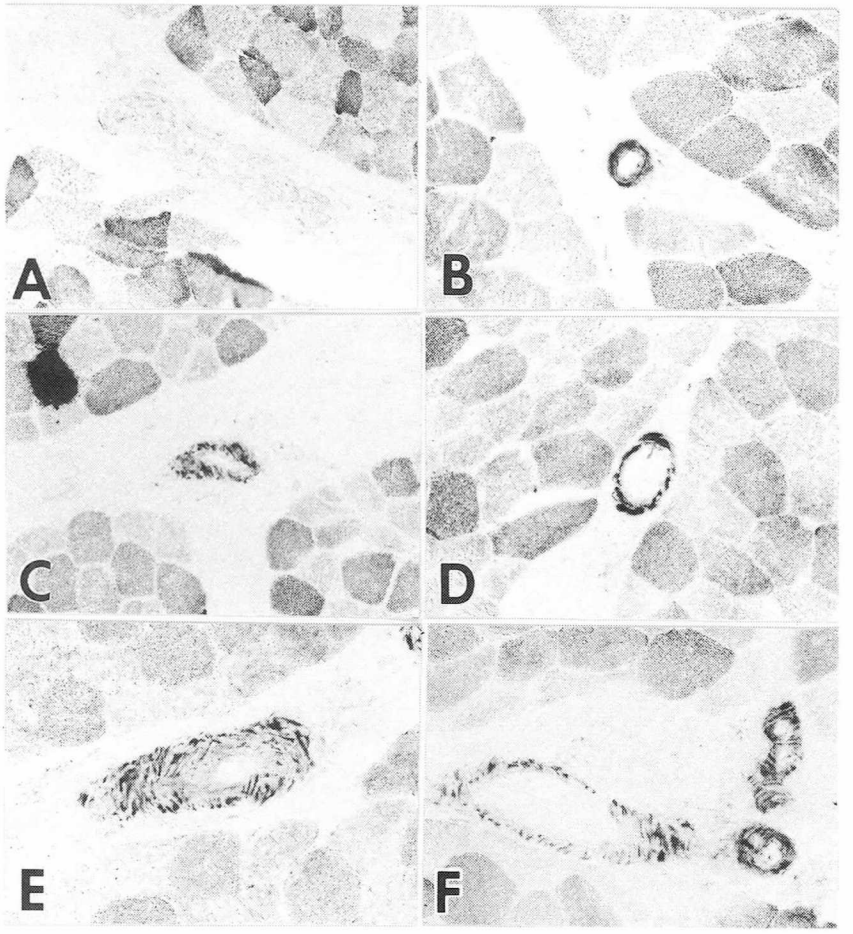


図1　正常対照の生検筋内では小動脈壁にはミトコンドリアは少数しか存在しないのでSDH染色でほとんど染色されない(A). MELASの生検筋内にはSDHで高活性を示すSSVが高頻度認められる（B—F). SDH染色, ×190.

は血管壁に顆粒状ないし斑点状の高活性物質を入れているので，容易に判断できた．その頻度は多くの例で半数以上の血管に異常を認めた．もっとも多いものでは38本中28本（75%）にSSVを認めた．全生検では830本中353本（42.5%）がSSVであった．

SSVはミトコンドリアDNA (mtDNA) 8344に点変異があるMERRFの患者6例中5例，CPEOでは40例中2例にも認められた．ミトコンドリア病以外の生検筋にはSSVは存在しなかった．

SSVが果して異常ミトコンドリアの集積を反映しているかどうか電顕的に確認したところ，SSVではその平滑筋細胞内に多くのミトコンドリアを認めた（図2）．ミトコンドリアは大型化し，複雑に増殖したクリステを入れていた．ただ類格子状封入体（paracrystalline inclusion）は存在しなかった．

考　　察

MELASの患者では中枢神経系だけでなく，全身の血管系の異常が推定される．その異常は平滑筋内のミトコンドリア異常で，その結果筋線維内のRRF内にみられるようなミトコンドリアの形態異常，数の増加が出現すると考えられる．この

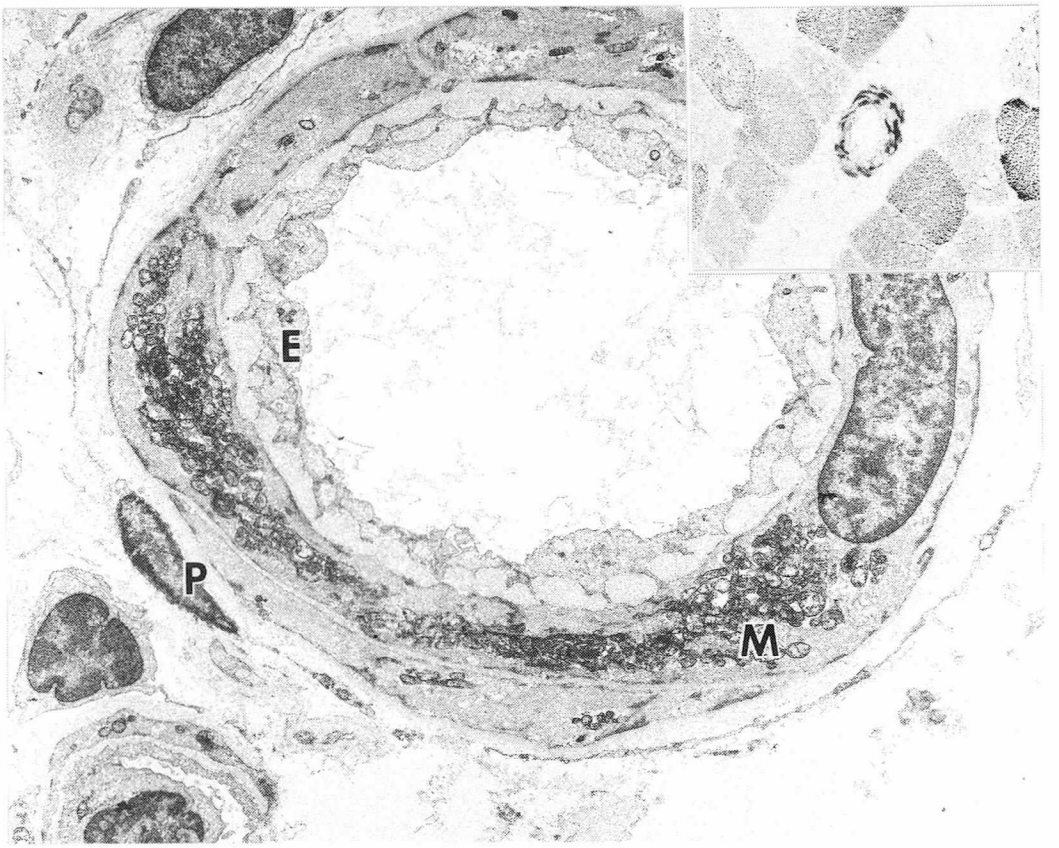


図2　光学顕微鏡で認められたSSV（右上挿入部）は，電子顕微鏡でみると大型化したミトコンドリアが平滑筋細胞内（M）に集積していることが分かる．内皮細胞（E）やpericyte（P）には異常を認めない．連続切片．ウラニール，鉛二重染色，×4800．SDH染色，×200（右上挿入写真）．

ような形態異常は電顕的にのみ確認されていたが，SDH染色により簡単にその異常が確認されることが分かった．筋生検の切片が十分に大きく（直径最低5 mm以上），1個体から3切片（300μmずつ離れて）を検索すれば，MELAS患者ではその異常（SSV）を容易に検出でき，診断的にも極めて有用であることが明らかにされた．

今回検索したMELAS患者40名中4名は，典型的な症状を備えているのにもかかわらず，その生検筋内にRRFも，生化学的異常もなく，ミトコンドリア病であるという決定打を欠いていた．さらにこの4名ではMELASにかなり特異的とされているmtDNAの点変異（mtDNA3243でのA→G変異[5]）は認められなかった．しかし明らかなSSVを認め，さらに電顕的にも異常ミトコンドリアの集積を血管平滑筋細胞内に確認したため，最終診断にいたった．

血管平滑筋が侵されるため，血管の収縮力は低下し，諸臓器の末端組織細胞への血流は減少する．筋線維内ミトコンドリア異常と共に，それは筋力低下，易疲労性をきたす大きな要因と考えられる．中枢神経系細胞には血流が減少していても，通常は大した症状はきたさない．過剰な運動，ストレス，感染などで代償がうまくいかなくなると，局所的な虚血状態となり，乳酸値の上昇をきたし，それがさらに血管の機能不全をきたす．この悪循

環がCTでみる局所的低吸収域，臨床的な卒中様症状となって出現するのだろう．ただ血管の内腔は閉塞していないので安静，輸液などの治療で回復する．このようにして卒中様症状を繰り返すのがMELASの主な病態であると考えられる．MELASの全ての症状が血管異常で説明されるものでは当然ない．個々の組織細胞のミトコンドリアも侵されている．ただ，血管がより選択的に侵されているがために，卒中様症状という特異な臨床像を示すのであろう．

ま と め

MELASでは全身の小動脈系の異常が推定されている．卒中様症状は中枢神経系の血管異常によるものと考えられている．この血管の異常は，生検筋の凍結切片をSDH染色するという簡単な方法で確認できる（NADH染色では代用できない！）．この血管では平滑筋細胞内にミトコンドリアが蓄積するためSDHで高活性となる（strongly SDH-reactive blood vessels：SSV）．RRFを筋生検内に認めない例でもSSVの存在がMELASの診断を確実にすることもある．MELASの病因，病態を考えるうえで，また補助診断としてもSSVの確認は重要である．

文　献

1) Ohama E, Ohara S, Tanaka K, et al: Mitochondrial angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalomyopathy. Acta Neuropathol (Berl) 74：226—233, 1987.
2) Sakuta R and Nonaka I: Vascular involvement in mitochondrial myopathy. Ann Neurol 25：594—601, 1989.
3) Hasegawa H, Matsuoka T, Goto Y, et al: Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles. from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes Ann Neurol (in press).
4) Nonaka I, Koga Y, Ohtaki E, et al: Tissue specificity in cytochrome c oxidase deficient myopathy. J Neurol Sci 92：193—203, 1989.
5) Goto Y, Nonaka I and Horai S: A mutation in the transfer $RNA^{Leu(UUR)}$ gene associated with MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. Nature 348：651—653, 1990.

50）MELASにおけるミトコンドリアDNAの点変異によるタンパク質，RNA合成の変化

太田成男*

研究協力者　小林葉子**　桃井真里子**　富永　薫*

はじめに

最近の飛躍的な進歩によってミトコンドリア脳筋症における変異ミトコンドリアDNA (mtDNA) が次々に同定された．慢性進行性外眼筋麻痺は，ミトコンドリアDNAの欠失と密接に関連していること[1]，MERRF患者には，tRNA-Lysの点変異が共通に認められる[2]ことが最近明らかにされた．MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) は脳卒中様発作を特徴としたミトコンドリア脳筋症の一病型であり，重症度も高く患者数も多い．私たちは，MELASの同一患者からミトコンドリア呼吸鎖欠損筋芽細胞株(以下，変異株)と正常株を分離し，そのmtDNAの塩基配列を比較した結果，tRNA-Leu遺伝子の点変異がミトコンドリアの呼吸鎖の異常を引き起こすことが明らかとなった．さらに変異培養細胞と正常細胞を用いて，その点変異がタンパク質合成だけでなく，RNA合成の調節能を欠如させていることを分子レベルで明らかにしたので報告する．

実験方法

呼吸鎖欠損株の分離

MELAS患者骨格筋より分離した筋芽細胞に，複製開始点欠如SV40DNAを導入して形質転換し，細胞をクローン化した[3]．シトクロム酸化酵素活性染色の有無によって，同酵素の欠損株と正常株を選択し，さらにグルコース欠損培地での増殖の有無によって変異株と正常株を選択した．

DNA塩基配列決定法

MELASの同一患者から分離した変異株と正常筋芽培養細胞株から全DNAを精製した．ミトコンドリアDNA断片をPCR法で増幅し，アガロース電気泳動にて精製後，非対称PCR法で一本鎖DNAを合成し，塩基配列決定の鋳型とした．塩基配列の読み取りは，蛍光標識terminatorを用いてApplied Biosystem Inc. (ABI) 自動DNAシークエンサーでおこなった．塩基配列は，シトクロム酸化酵素欠損株と正常株のミトコンドリアDNAの塩基配列を同時に電気泳動し，自動シークエンサーで読み取ることができない塩基についても，二つのmtDNA塩基の違いは判断できるようにした．

タンパク質合成

ミトコンドリアのタンパク質合成は，ロイシン欠損培地中で，細胞質タンパク質合成阻害剤エメチン0.2mg/ml存在下，14-Cロイシンを取り込ませてミトコンドリアタンパク質合成の指標とした．さらに，ミトコンドリアを分画しSDS電気泳動によって各サブユニットを分離した．

RNA合成

全RNA画分は，イソチオシアネート中で分画しNorthern blotに用いた．オリゴヌクレオチドをアイソトープラベルし，各々のプローブとして用いた．

＊自治医科大学生化学
＊＊自治医科大学小児科

RNA 合成の制御

変異株と正常株を2％酸素，5％二酸化炭素下で培養し，指示された時間培養しRNAを抽出しNothern blotによってRNAの変動を調べた．ミトコンドリアRNAに対応するオリゴヌクレオチドをプローブに用いた．核支配遺伝子としてアクチンをプローブとした．

結果と考察

(1) MELASの変異遺伝子の同定[4]

MELASの同一患者から分離した呼吸鎖変異株と正常株のmtDNAの塩基配列を比較するとわずかに一塩基のみが明瞭に置換していた．この塩基は塩基番号3243のAのGへの塩基置換であった(図1)．このひとつの塩基置換によってミトコンドリア呼吸鎖の機能が損ねられることが明らかとなった．

さらに，MELAS患者10人中9人に変異mtDNAは認められたので，この点変異はMELASに特有の変異であると結論した．

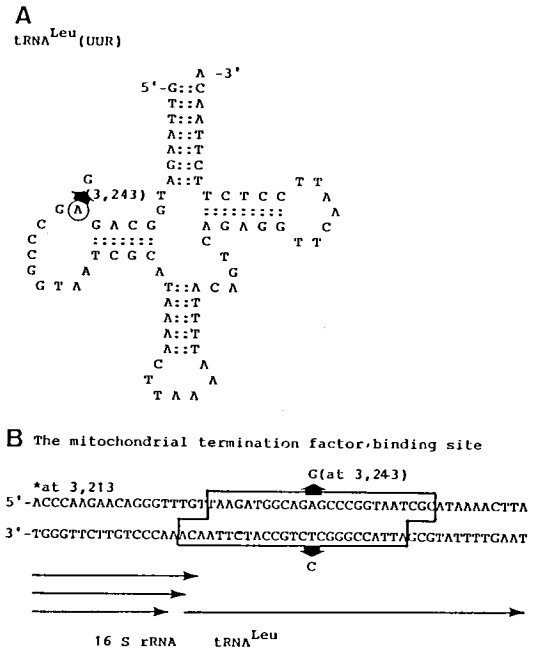


図1　MELASにおけるmtDNAの点変異．tRNA-Leu(UUR)の二次構造と転写終結因子結合部を示した．RNAではTの代わりにU．MELAS患者はG（3,243）のmtDNAを持つ．

(2) ミトコンドリア内タンパク質合成

この変異塩基は，tRNA-Leu（UUR）の14番の塩基であり，種を越えて保存されていたのでtRNAの機能を低下させると想像された．そこで，細胞質阻害剤エメチン存在下でタンパク質を合成させ，タンパク質に取り込まれたアイソトープ量を測定することによって，ミトコンドリア内のタンパク質合成速度を測定した．すると変異株と正常株では有意の差は認められなかった（図2）．オートラジオガラフィーの結果は，シトクロム酸化酵素サブユニット2が，40％に低下し，NADH脱水素酵素サブユニット4のバンドが消失していた．この原因は現在詳細に検討中であるが，少なくとも，変異tRNAがタンパク質合成全体を低下させるのではなく，特定のタンパク質の合成を阻害していることが明らかとなった．

(3) 変異mtDNAがRNA合成に与える影響

ミトコンドリア内では，H-鎖のリボソームRNA（rRNA）とmRNAの量比は環境により変動する．それは転写終結因子がrRNAの3'下流に結合してRNA合成を停止させることによって行われる．その結合部位はすでに同定されており，

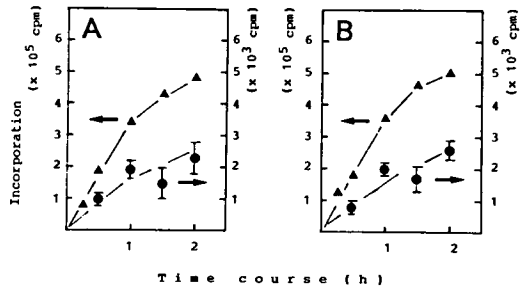


図2　呼吸鎖変異株と正常株のタンパク質合成．エメチン存在下での〔14-C〕ロイシンの取り込みをミトコンドリア内でのタンパク質合成の指標とした．エメチンとクロランフェニコール存在下での取り込みをバックグラウンドとして，差し引いた値を示した．A，Bはそれぞれ正常株と変異株を示す．▲●はそれぞれ全細胞とミトコンドリアでのタンパク合成を示す．

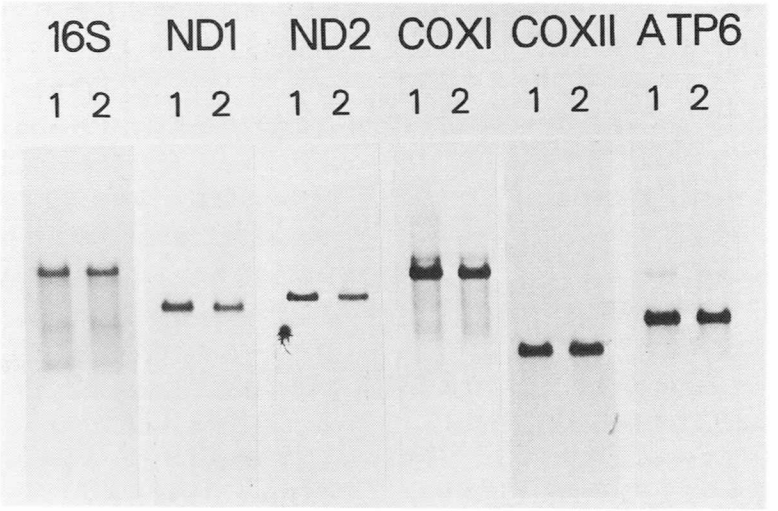


図3　Northern blotting
変異株と正常株から全RNAを抽出し，Northern blotによりRNA量を比較した．変異株と正常株での差は認められない．1は正常株，2は変異株のRNAを示す．

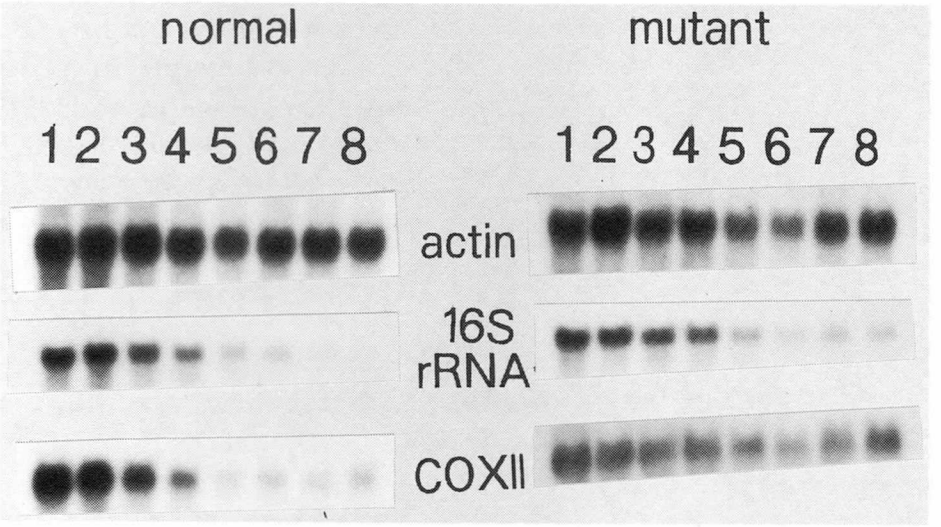


図4　酸素分圧変動後のRNA量の変動
酸素分圧2％下で細胞を培養し，各々の時間にRNAを分離し，Northern blotにより，RNA量を測定した．1～8レーンは0，6，12，24，48，72，96，120時間酸素分圧2％で処理した細胞のRNAを示す．

MELASのtRNA-Leu（UUR）遺伝子の変異部位に対応する[5]．すなわち，終結因子がtRNA-Leu（UUR）遺伝子部に結合するとrRNAの合成量は相対的に多くなる．そこで，rRNAとH-鎖mRNAの比をNorthern blot法により比較すると変異株と正常株では，有意の差は認められず，少なくとも通常の培養条件下では，終結因子は正常に作用していると考えられた（図3）．

次に，環境を変化させた時のRNA合成の調節能の変化を調べる目的で，酸素分圧を2％に低下

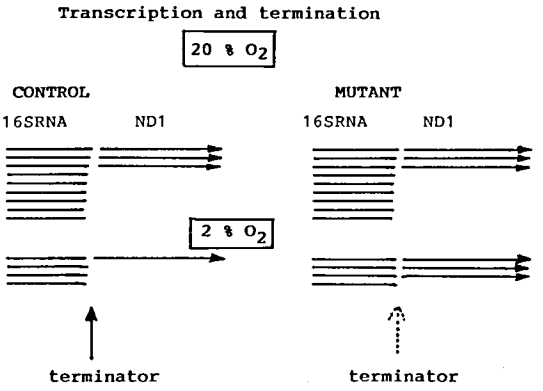


図5　酸素分圧の変動によるRNA合成制御機構のモデル
2％酸素分圧下では終結因子が結合できないため転写が終結せず，相対的にmRNA量（NDI）の変化が少ない．rRNA（16 sRNA）の量はmRNAに比べ多い．

させ，その時のRNA合成の変動を調べた．rRNA量は，酸素濃度を低くすると変異株と正常株で同しように低下し，何らかの作用によって転写開始の頻度が低下することが示唆された（図4，5）．核支配遺伝子であるアクチンのmRNAは，ほとんど変動しなかったので，ミトコンドリア特有の制御機構と考えられる．ところが，mRNA（図の例はシトクロム酸化酵素サブユニット2のmRNA）は，正常株では時間をおって低下したのに比べ，変異株では，ほとんど変動しなかった．これは，変異株では，環境変化による制御が正常に機能していないことを示唆する．分子機構については，さらに検討中であるが，mtDNA上の変異によって転写終結因子が結合できなくなりmRNAの合成量を制御できなくなったと考えると合理的である．

MELAS患者に見いだされた点変異によるミトコンドリア異常を引き起こす分子機構を明らかにすることで，発症の分子機構の解明ならびに治療法の確立が期待される．

文　献

1) Moraes CT, et al: Mitochondrial DNA deletion in progressive external opht halmoplegia and Kearns-Sayre syndrome N Engl J Med 320：1293—1299, 1988.
2) Yoneda M, et al: A common mitochondrial DNA mutation in the tRNA-Lys of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers Biochem Int 21：789—796, 1990.
3) Shimoizumi H, et al: Cytochromr c oxidase -deficient myogenic cell line in mitochondrial myopathy. Ann Neurol 25：615—621, 1989.
4) Kabayashi Y, et al: A point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) Biochem Biophys Res Commun, 173：816—822, 1990.
5) Kruse B, et al: Termination of tran scription in human mitochondrial: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. Cell 58：391—397, 1989.

51）MELAS症候群の臨床的検討とミトコンドリアDNAの解析

岡　田　伸太郎*

研究協力者　乾　幸治*　福島久雄*　塚本浩子*
田中順子*　谷池雅子*　緑川光雄*

はじめに

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke likeepisode)は小児期に比較的多い疾患であり，その原因，治療法も確立されていない．我々は3家系4症例（6歳から22歳）を経験し，その臨床症状を比較検討するとともに，筋生検を行い生化学的，組織化学的に検討した．また示唆されているミトコンドリアDNAの異常がないかを調べるため，生検筋よりDNAを抽出し，KSSでは比較的欠失が認められていない領域（ND I，ND II，CO I，CO II，CO III）を含むプライマーを作成し，polymerase chain reaction (PCR) 法にて増幅し，その大きさを検討するとともに，一部サブクローニングし，シーケネースを用い塩基配列を決定し，Andersonの報告と比較検討し，興味ある知見を得たので報告する．

症　例

症例1：HK　21歳　男

7歳時学校健診にて心雑音指摘，WPW症候群と診断．低身長のため10歳時入院，GH治療開始するも効果無く18歳で中止．13歳，14歳時卒中様発作あり，以後抗痙攣剤の投与を受ける．15歳より蛋白尿，17歳時，ネフローゼ症候群となり，腎生検を受け，巣状糸球体硬化症の診断．この頃，僧帽弁逆流による心不全が進行，また難聴に気づかれる．20歳時，心不全の治療のため僧帽弁置換術，三尖弁縫縮術を受ける．

家族歴は特記すべき事なし．身体所見としては，低身長（－4 SD），心雑音，2次性徴の発育不良あり．感音性難聴，中等度の知能障害．その他脳神経の異常は認めない．

血中，髄液中の乳酸，ピルビン酸の高値，L/P比の上昇を認める．CT, MRIにて後頭部優位の低吸収域と脳萎縮を認める．

症例2：KK　11歳　女

6歳時，頭痛，嘔吐に続き，痙攣，一過性の左半身麻痺．以後抗痙攣剤の投与をうけるも年2－3回の痙攣発作があった．9歳時卒中様発作あり以後言語障害出現．家族歴では，姉（症例3）がミトコンドリア脳筋症．母親も低身長，痩せ，知能障害，精神障害がある．身体所見では，低身長，眼瞼下垂，右外斜視，筋弱力，中等度の知能障害．その他異常は認めない．

血中，髄液中の乳酸，ピルビン酸の高値，L/P比の上昇を認める．心電図にてPQの短縮を認める．CT, MRIにて両側後頭葉，側頭葉に低吸収域と脳萎縮を認める．

症例3：KKの姉　22歳　女

6歳頃より低身長，MRに気づかれる．18歳より糖尿病，22歳よりインシュリン療法開始，いままでに卒中様発作は認めない．身体所見では，低身長，知能障害，感音性難聴，筋弱力．その他異常なし．

血中，髄液中の乳酸，ピルビン酸の高値，L/P比の上昇を認める．CT, MRIにて脳の著明な萎縮を認めるが，低吸収域は認めない．

症例4：TT　6歳　男

2歳過ぎから歩行が遅く，ころびやすい．3歳

＊大阪大学医学部小児科

表1　Kearns-Sayre-Shy (KSS) 症候群，福原病 (MERRF)，脳卒中発作を伴うミトコンドリア脳筋症 (MELAS) の鑑別診断

	KSS	MERRF	MELAS	T(4Y)	K(22Y)	K(11Y)	H(21Y)
外眼筋麻痺	+	−	−	−	−	+	−
網膜色素変性	+	−	−	−	−	−	−
心伝導障害	+	−	−	−	±	−	+
CSF蛋白＞100mg/dℓ	+	−	−	−	−	−	−
ミオクローヌス	−	+	−	−	−	−	−
小脳失調	+	+	−	−	−	±	−
筋力低下	+	+	+	+	+	+	+
痙　攣	−	+	+	+	−	+	+
知能低下	+	+	+	−	+	+	+
低身長	+	+	+	−	+	+	+
周期性嘔吐	−	−	+	+	−	+	+
皮質盲	−	−	+	+	−	?	?
片麻痺，半側盲	−	−	+	+	−	+	+
感音性難聴	+	+	+	+	+	−	+
高乳酸血症	+	+	+	+	+	+	+
家族歴	−	+	+	+	+	+	−
ragged-red fibers	+	+	+	+	?	+	+
中枢神経系の海綿状変性	+	+	+	+	±	+	−

KSS=Kearns-Sayre syndrome, MERRF=myoclonus epilepsy with ragged-red fibers, MELAS=mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes, CSF=cerebrospinal fluid. □は重要な鑑別点

より易疲労感，3歳11カ月時発熱し，以後歩行困難となる．5歳時嘔吐後痙攣，抗痙攣剤の投与を開始，3歳6カ月以降嘔吐，痙攣を伴う四肢の麻痺出現し，6歳時，痙攣が頻回におこり以後寝たきりとなる．家族歴では，母が28歳時卒中様発作あり，以後3回同様な発作あり，現在知能障害を残す．身体所見では，軽度知能障害以外異常認めない．

血中，髄液中の乳酸，ピルビン酸の高値，L/P比の上昇を認める．CT，MRIにて前頭葉，側頭葉，後頭葉，淡蒼球に多発性の低吸収域を認める．

表1に症例のまとめを示す．症例3以外，MELASの診断によく一致する．

【組織化学的検討】

4症例に筋生検を行ない，Gomori trichrome染色(GT)，SDH染色，CCO染色をおこない，比較検討した．GTでは，Ragged red fiber (RRF)は，症例1，2，3，4でそれぞれ5％以下，約20%，0％，5％以下であった．SDH染色でのstrongly positive vessels (SSV)は，症例1，2，3，4で，それぞれ陽性陰性血管の混在，陰性が主，陽性が主，陽性陰性の混在であり，CCO染色では特に異常を認めなかった．以上をまとめると，RRFの程度は臨床的重症度とは相関せず，SSVの有無が必ずしもMELASの病型と一致しない事が判明した．

生化学的検討

筋生検材料における電子伝達系酵素活性値を表2に示す．いずれの症例においても酵素活性の異常は認めなかった．

分子生物学的検討

筋よりDNAを抽出し，ミトコンドリアDNAの3130—3423 (tRNALeu)，3305—4262 (ND I)，4116—5283 (tRNAIle, Gln, Met)，4469—5511 (ND II)，5904—7444 (CO I)，7586—8294 (CO II)，9207—9990 (CO III) 領域のプライマーを作成し，PCR法にて増幅し，その大きさをアガロース電気泳動法にて検討した．いずれの症例においても増幅され，その大きさは，異常なかった．またミトコンドリアDNAの増幅は，核の

表2　Enzyme activities in muscle homogenates

	T	K	H	Control (mean±SD)
NADH-cytochrome c reductase (complex I+III)	2.3	2.2	2.2	1.4±0.6
Succinate-cytochrome c reductase (complex II+III)	1.8	1.0	1.5	0.9±0.3
Cytochrome c oxidase (complex IV)	2.4	1.5	1.9	1.3±0.5

(U/g tissue, U= mole of substrate reduced or oxidized/min at 30℃)

DNAの増幅と異なり，ミトコンドリアDNAのコピー数が多いためか，DNA量が1 ngでも増幅量に差がない事が判明した．

電気泳動法では大きな欠失が認められなかったため，症例1，2のEcoR1切断部位を含む4116—5283のPCR増幅産物をM13ファージにサブクローニングし，シクエネース(Ver. 2)を用い塩基配列を決定した．症例1では，14のクローンを検索し，4クローンにおいて図1に示す様に，ND I領域に多塩基の塩基置換と，3カ所の欠失が認められ，4165，4166の2塩基の欠失によりframe shiftが生じその下流にstop codonがくる事が判明した．症例2では，6クローン中3クローンに1カ所塩基置換を認めたが，アミノ酸置換の伴わないものであった．

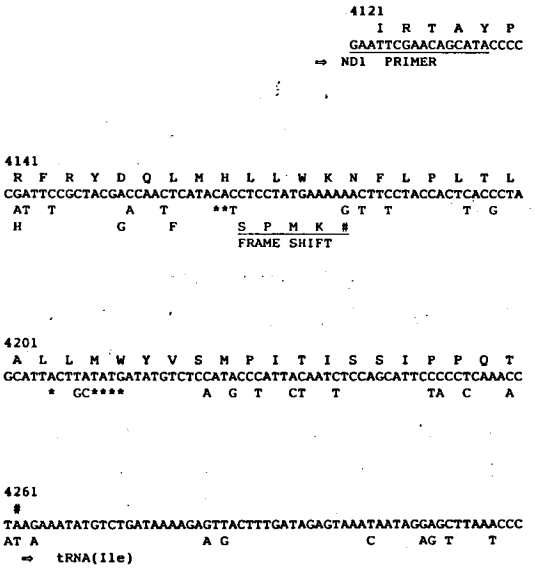


図1　Mt DNA sequence 5－1

MELASにtRNA (Leu) の変異があるとの情報を得[1]，この領域を含む3130—3423のPCRをおこなった．3243にA→G変異があるため，この部位での変異があると制限酵素Apa1の新しい切断部位が生じ，PCR産物294bpが112bpと182bpに切断される事が判明した(図2)．症例1—4の筋由来DNAを用い，PCRをおこない，Apa1にて切断後電気泳動をおこなった(図3)．症例1 (H)，症例2 (K)，症例3 (KS)，ではこの変異が認められたが，切断されないバンドも存在するためこの変異に関しheteroplasmyである事が判明した．典型的なMELASと考えられた症例4 (T)ではこの変異は存在しなかった．またCCO欠損症(1)，Leigh脳症(3，4)でもこの変異は存在しなかった．しかし，卒中様発作のないミトコンドリア脳筋症(2)においてもこの変異が存在した．

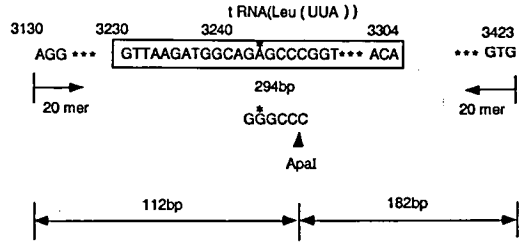


図2　tRNA (Leu) 領域の塩基配列とMELASにおける点突然変異(3243)

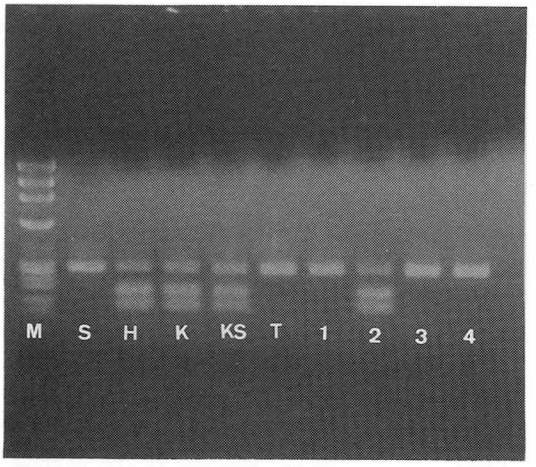


図3　PCR 産物のアガロース電気泳動
M：マーカー，S：コントロール，H：症例1，K：症例2，KS：症例3，T：症例4，1：CCO 欠損症，2：ミトコンドリア脳筋症，3, 4：Leigh 脳症

考　　察

ミトコンドリア DNA の異常が証明されている疾患は，慢性進行性外眼筋麻痺 (chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO)，Kearns-Sayre-Shy (KSS) 症候群，myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF)，Leber 遺伝性視神経萎縮症がある．前記2者では，ミトコンドリア DNA の欠失が証明され，異常ミトコンドリアの量と症状が相関すると考えられている[2]．Leber 病では，ND IVの点突然変異が証明されていたが，最近その異常の無い症例が報告され変異の多様性が示唆されている[3]．

MELAS と臨床的につながりのある MERRF においては，tRNA (Lys) 領域の点突然変異が証明され[4]，本疾患においても tRNA 領域の変異が示唆されていた．今回 MELAS においても tRNA (Leu) の変異が判明した事は，ミトコンドリア機能異常が tRNA 異常と重要な関連を持っているのではないかと考えられる．また MERRF と同様，異常 DNA が heteroplasmy の状態で存在するため，その程度が各組織内でどのように分布するのか，今後サザンブロット法にて検索する必要がある．この結果は，卒中様発作のない症例にも存在しており，MELAS がこの変異のみで起こらないことは明白であり，また MELAS の病態がこの変異のみで説明できるのか，今後ミトコンドリア DNA の他の領域も含め異常の検索が必要と考えられる．

文　　献

1) Nonaka I, et al: personal communucation.
2) Mita S, et al: Proc Natl Acad Sci USA **86**: 9509, 1989.
3) Howell N, et al: Am J Hum Genet **47**: 629, 1990.
4) Schffner JM, et al: Cell **61**: 931, 1990.

52) MELAS 母娘例におけるミトコンドリア DNA の解析

西 澤 正 豊*

研究協力者　大 塚 美恵子*　吉 田 充 男*

ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア DNA (mtDNA) の異常については，Kearns-Sayre 症候群と進行性外眼筋マヒの一部の症例で deletion が認められ，また MERRF においては $tRNA^{Lys}$ の Tψ ループに point mutation が存在することが明らかになっている．一方，MELAS においては異常 mt が heteroplasmy を示し，また大きな deletion はないことが確認されてきたが，明らかに母系遺伝と考えられる家族例が少ないため，mtDNA に異常があるか否か明確でなかった．最近我々は MELAS の母娘例を経験したので，その生検筋 mtDNA の塩基配列を解析することにより，MELAS における mtDNA 異常の有無を検討した．

症　例

症例 1：24歳女性．13歳より難治性のけいれん発作あり．19歳の時，意識障害をきたし，高乳酸血症と頭部 CT にて多発性の低吸収域を認められた．生検筋にて ragged-red fiber (RRF) が確認され，MELAS と診断された．

症例 2：51歳女性．症例 1 の母．36歳より糖尿病にて加療．41歳より感音性難聴あり．46歳時，娘が MELAS と診断された際，高乳酸血症を認められた．50歳頃から軽度の痴呆があり，頭部 CT 上低吸収域が出現した．生検筋にて約 5 %の RRF を認めた．電子伝達系の酵素活性では complex I，II，IIIのいずれもやや低値であったが，complex IVの活性が対照の14%と特に著しく低下していた．

方　法

生検筋より常法により DNA を抽出し，mtDNA の subcloning を行なうことなく，direct sequencing により，CCO, ND および tRNA 領域の塩基配列を決定した．まず，Anderson ら[1]の報告した mtDNA の塩基配列 (Cambridge sequence) に基づき，0.5～1.5kb の mtDNA フラグメントが生成するように primer pair を選び，生検筋 DNA を template として polymerase chain reaction (PCR) を行なった．合成された mtDNA 断片をアガロースゲル電気泳動により分離し，ついでこれを template として非対称 PCR を行ない，一本鎖 DNA を得た．精製した一本鎖 DNA 1 pmole を template としてさらに第三の primer をアニールさせた後，Taq polymerase により fluorescent dye terminator を取りこませ，ABI 社製の自動 sequencer にかけて塩基配列を決定した．常に H 鎖，L 鎖双方の塩基配列を決め，変異が見いだされた場合には一回目の PCR primer の位置を変えて同様の方法により確認した．

結　果

上記の方法により決定された患者生検筋 mtDNA の塩基配列を Cambridge sequence と比較すると，多数の変異が認められた．変異が homoplasmy である場合には sequencer の記録上のシグナルは単一のピークを示したが，heteroplasmy の場合にはシグナルは wild type と mutant type のピークの重なりとして示された．

coding 領域には図 1 に示すごとく，アミノ酸の変異を伴わない，主に third letter の homoplasmic な塩基置換が認められた．また，図 2 に示すご

＊自治医科大学神経内科

nt position		Cambridge	patient
6731	CCO I	ATA	ATG
7028	CCO I	GCC	GCT
7600	CCO II	GCC	GCT
8560	URF A6L	CCC	CCA
9165	ATPase 6	GTT	GTC
9377	CCO III	TGA	TGG
9540	CCO III	TTA	CTA
9575	CCO III	CCG	CCA
10400	URF 3	ACC	ACT

図1　Synonymous base substitutions in coding regions

nt position		codon		amino acid			
		Camb	patient	Camb	patient	bovine	mouse
6451	CCO I	T	G	L	R	L	L
9559	CCO III	G	C	R	P	P	P
8034	CCO II	T	T / G	I	I / S	I	I
9067	ATPase 6	A	A / G	M	M / V	L	L
9448	CCO III	A	A / G	Y	Y / C	Y	Y
9800	CCO III	T	T / A	F	F / L	F	F

図2　Nucleotide substitutions resulting in amino acid changes in coding regions

nt position	tRNA	Camb	patient	bovine	mouse
1654	Val Tψ	T	C	G	T
5570	Trp Tψ	T	A	T	T
5601	Ala Tψ	G	A	G	G
3243	Leu DHU (UUR)	A	G / A	A	A

図3　Nucleotide substitutions in tRNA regions

とく，6451と9559の変異はアミノ酸置換を伴うもので，前者は他種間では保存された塩基の変異であり，後者は対照とした配列のみが異なっている変異であった．さらに，heteroplasmic な変異がいくつか見いだされ，これらはいずれも他種間で保存されている部位の変異であった．

tRNA 領域では図3に示すごとく，Val(1654)，Trp(5570)，Ala(5601)の tRNA のいずれも Tψ loop に homoplasmic な変異が認められた．Val の変異は他種間でも変異のみられる部位であったが，Trp と Ala の変異は他種間では保存された部位にあり，患者においてのみ認められる変異であった．また，Leu(UUR)の DHU loop には heteroplasmic な変異が認められた．sequencer 記録上の wild type(A) と mutant type(G) とのピーク比は約4：6で，mutant type がやや優位を占めていた．Glu と Pro の tRNA の一部に決定できない塩基が数個残ったが，その他の tRNA には変異は認められなかった．

考　　案

mtDNA の塩基配列のなかで，種を越えて保存されている塩基が患者においてのみ変異している場合にはその変異は単なる polymorphism でなく，疾患に関連したものである可能性がある．実際，Leber 病[2]や MERRF[3] における mtDNA の point mutation はこのようにして推定され，この中で数例の患者に共通に同一の変異があれば，その変異を病的変異と同定している．このような観点からは Trp，Ala，Leu(UUR)の tRNA に認められた point mutation，および coding 領域のいくつかの変異はいずれも MELAS における mtDNA 変異の候補となりうるものである．Trp，Ala の tRNA 変異は記録上 mutant type のみが認められることから，より病的意義をもった変異である可能性が想定された．この点を明らかにするためには多数の MELAS および正常対照においてこれらの変異が認められるか否かの検討が必要条件として不可欠であった．

今年度の本研究班会議において，後藤らは MELAS 40例中8割の症例に Leu(UUR) のA→G 変異 (3243) を認め，他の tRNA 領域には MELAS に共通して認められる変異がなかったことから，これを MELAS における mtDNA 変異であると結論した．田中らも2例の MELAS 患者の全 mtDNA 塩基配列を決定し，共通に認められたのは同じく Leu(UUR) の3243番目のA→G 変異のみであったと報告した．かれらの1例には $tRNA^{Ala}$ にわれわれの症例と同一の変異が認められている．一方，小林らは MELAS 患者より筋細胞株を樹立し，これより CCO 活性陽性と陰性の株を分離した．ついで両者の mtDNA の全塩基配列を決定し，唯一 $tRNA^{Leu(UUR)}$ の3243位にA→G変異を認めた．さらに，7例の MELAS に共通

にこの変異を認め，剖検例の各臓器および家系例の白血球における変異mtDNAの分布まで明らかにした．

以上より，大部分のMELAS症例には$tRNA^{Leu(UUR)}$にA→G変異が存在することが明らかにされた．MELASにおいてはmtDNAに変異がおきやすいという可能性は残されているが，われわれの症例に認められた他の変異はpolymorphismである可能性が高い．今後はtRNAの変異がミトコンドリアの機能にいかなる影響を与えるか，さらに細胞レベル，組織レベル，個体レベルではどうか，遺伝様式はどうか，加齢変化はないか，などの基礎的研究がMELASの病態を解明する上で不可欠である．

謝辞：PCRのためのprimerを提供して下さった自治医大生化学香川，太田両先生，自動sequencerの使用に御援助下さった同香川，浜本，太田各先生に深謝致します．

文　献

1) Anderson S, et al: Nature 290: 457—465, 1981.
2) Wallace DC, et al: Science 242: 1427—1430, 1988.
3) Schoffner JM, et al: Cell 61: 931—937, 1990.

53）MELASの遺伝子変異：骨格筋ミトコンドリアにおける点変異

桃　井　真里子*

研究協力者　小林葉子*　市橋　光*　小黒範子*
下泉秀夫*　柳沢正義*　太田成男**
香川靖雄**　二瓶健次***

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes) の遺伝子変異を解明する目的で，MELAS骨格筋よりクローン化した筋細胞のミトコンドリアDNAの塩基配列を解析した．ミトコンドリアDNA（mtDNA）は多型性を特徴とし，個体差があり，患者と正常人のmtDNAの比較から疾患関連遺伝子変異を確定するのは困難である．われわれは，MELAS病態解析を目的として，MELAS患者骨格筋の初代培養系を癌遺伝子導入によりクローン化し，同一個体よりの正常細胞と電子伝達系酵素欠損細胞のmtDNA塩基配列解析を同時に行うことにより，その両者の差が，MELASにおける疾患関連遺伝子変異であるという方法論を取った．これにより，MELASにおける遺伝子変異を確定し，変異遺伝子が母系遺伝を示すことも明らかにした．

方　法

1．細胞のクローン化：MELAS患者より診断目的で得た生検筋より初代培養系を作成し，培養筋細胞に複製起始部欠損SV40・DNAを導入し形質転換細胞をdilution method法にてクローン化した[1]．クローン化細胞はSeligmanらの方法でチトクロームc酸化酵素（COX）の活性染色をし，酵素活性正常クローンと酵素活性欠損クローンを確立した[2]．各々のクローンの細胞内ミトコンドリアのCOX活性は，電顕にて確認した．

2．COX活性正常クローン（TNK205），活性欠損クローン（TNK203）から全DNAを分離し，直接塩基配列決定法にて塩基配列を決定した．Sequencing strategyを図1に示す．PCR増幅DNAフラグメントを鋳型とし，蛍光ラベルしたdideoxy nucleotide terminatorを用い，ABI社のmodel373Aで解析し，97%の塩基配列を決定した．

結　果

1．TNK203内のミトコンドリアは電顕上は全てCOX活性陰性であり，TNK205のミトコンドリアはCOX陽性であった．従って，この2クローンは，同一個体の同一筋組織から得た筋細胞であるため，COX活性という表現型と，この表現型と直接関連する遺伝子のみを異にするクローンであることを確認した．

2．TNK203もmtDNAの塩基配列は，Andersonらの報告したmtDNA塩基配列と30箇所異なっていたが，このうち，29箇所はTNK205でも同様の塩基配列の異なりであり，TNK203とTNK205の差は，1箇所，TNK203における塩基番号3243のtRNA-Leu(UUR) 遺伝子上のA→G置換であった(表)．従って，この塩基置換がCOX活性欠損という表現型，すなわち，MELASの病

＊自治医科大学小児科
＊＊自治医科大学第一生化学
＊＊＊国立小児病院神経科

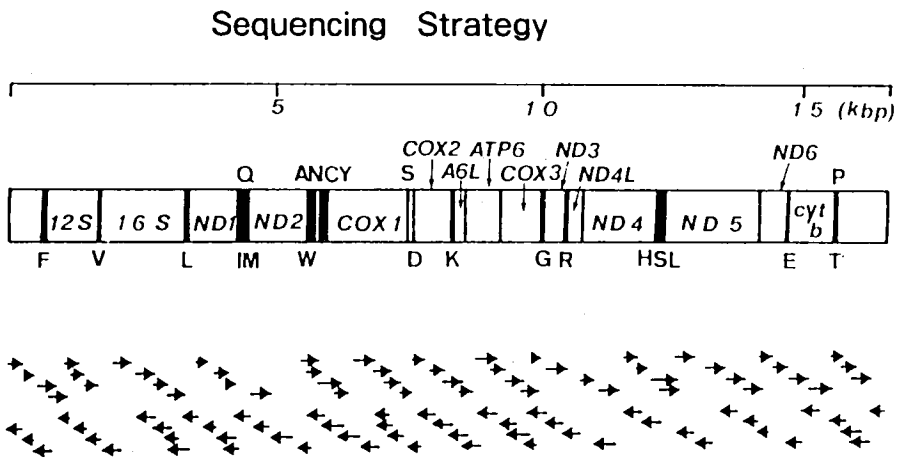


図1　クローン化細胞のミトコンドリア DNA の sequencing strategy.
矢印は，用いた primer の位置を示す.

表　Differences in nucleotides in clones TNK203 and TNK205

number	region	nucleotide				amino acid			
		TNK203	TNK205	Anderson et al.[a]	Yoneda et al.[b]	TNK203	Human[c]	Mouse[d]	Bovine[e]
73	D-loop	G	G	A	G				
222	D-loop	G	G	C					
263	D-loop	G	G	A	G				
273	D-loop	G	G	A	G				
475	D-loop	G	G	A					
750	12SrRNA	G	G	A	G				
1438	12SrRNA	G	G	A	G				
2706	16SrRNA	G	G	A					
3243	tRNA-Leu	G	A	A					
3423	ND1	T	T	G	T	Val	Val		
4769	ND2	G	G	A	G	Met	Met		
4985	ND2	A	A	G		Gln	Gln		
5147	ND2	A	A	G		Ser	Ser		
5172	ND2	G	G	A		Asp	Asn	Asn	Asn
7028	COXI	T	T	C	T	Ala	Ala		
8179	COXII	T	T	A		Asp	Glu	Glu	Glu
8860	ATP6	G	G	A	G	Ala	Thr	Ala	Ala
9027	ATP6	G	G	C		Gly	Gly		
9559	COXIII	C	C	G		Pro	Arg	Pro	Pro
10607	ND4L	T	T	C		Leu	Leu		
10832	ND4	G	G	A		Val	Ile	Thr	Val
11335	ND4	C	C	T	C	Asn	Asn		
11447	ND4	G	G	C		Val	Leu	Ile	Val
11719	ND4	A	A	G		Gly	Gly		
13702	ND5	C	C	G	C	Arg	Gly	Arg	Arg
14199	ND6	A	A	C	A	Thr	Pro	Ser	Ser
14272	ND6	C	C	G	C	Gly	Gly		
14893	cytb	G	G	A		Leu	Leu		
15326	cytb	G	G	A	G	Ala	Thr	Ile	Met
16519	D-loop	C	C	T	C				

a: Anderson et al. (1981). b: Yoneda et al., (1990). c: Anderson. et al. (1981).
d: Bibb et al. (1981) and e: Anderson et al., (1982).

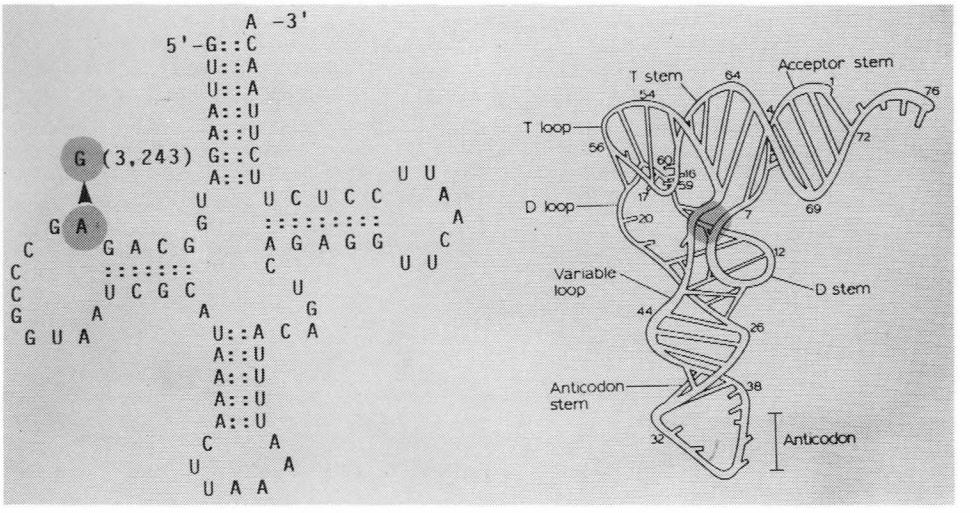


図2　ミトコンドリアtRNA-Leu(UUR) 遺伝子上の点変異を示す．TNK203クローンでは塩基番号3,243はGであり，TNK205ではAであった．

態と直接関連する遺伝子異常であると確定した[3]（図2）．

3．このGAGCCCからGGGACCCの変異により，制限酵素ApaIの切断部位を新たに獲得したことになり，このMELAS関連mtDNA上の点変異の存在と正常遺伝子に対する比率を，PCR増幅DNAフラグメントをApaI処理することにより，検出することが可能となった．患者筋組織，リンパ球，クローン化細胞，患者剖検組織などから，DNAを抽出し，PCR増幅し（Primer 1: dTTCACAAAGCGCCTTCCCCC 塩基番号3153～3172, Primer 2：dGCCATGGTGAGAGCTAAGGTC 塩基番号3551～3531）ApaI処理後，1.5%アガロースゲル上で解析した．定量実験には，Primer 1の5'端を［γ ^{32}P］ATP，T4-polynucleotide kinaseでラベル後，DNAフラグメントをPCR増幅し，ApaI処理後，6％polyacrylamideゲル上で解析し，各バンドを切り出し，カウントした．

(1) 図3に示すように，患者クローン化細胞TNK203はほとんど変異遺伝子を持ち，TNK205は正常遺伝子のみであった．この方法により，8症例のMELAS患者の骨格筋が正常mtDNAと変異mtDNAのヘテロプラスミーであることが明らかにされた．

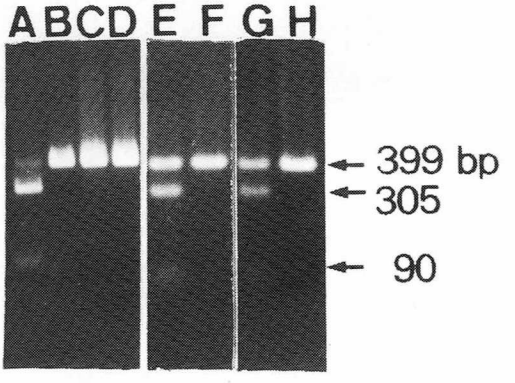


図3　ApaI処理後のアガロースゲル電気泳動．TNK203 with ApaI (A)，without ApaI (B)，TNK205 with ApaI (C)，without ApaI (D)，MELAS患者リンパ球 (E, G)，正常人リンパ球 (F, H)

(2) 図4に示すように，患者リンパ球は5人中4人が先に示した点変異を50―60%の割合で持ち1例のみがこの点変異を持たなかった．両親，同胞のリンパ球では，点変異を持つ患者の母親はこの点変異を患者より低い比率であるが（1.5%―8.5%）持ち，父親は全例正常遺伝子のみであった．2家系の同胞が患者と母親の中間の比率の変

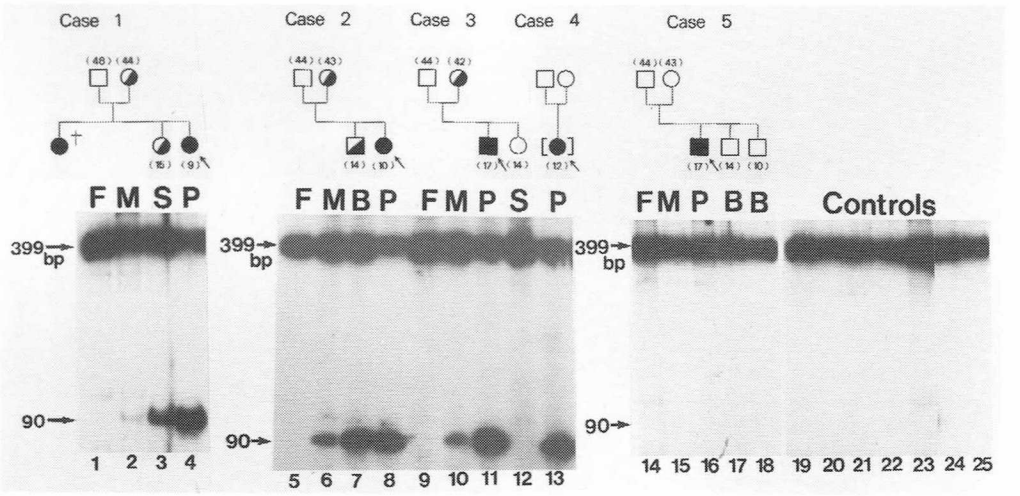


図4　患者，およびその家族におけるリンパ球ミトコンドリア DNA の解析．
定量実験のため，5' 端をラベルしてあり，オートラジオグラム上では305bp フラグメントは検出できない．90bp フラグメントが変異 mtDNA 由来である．症例 4 は，非血縁者からの養女のため家系解析は施行していない．

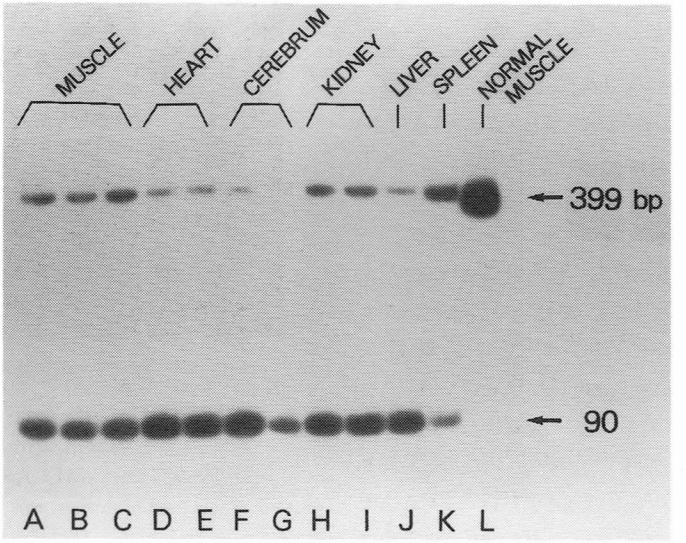


図5　MELAS 患者剖検組織内の変異ミトコンドリア遺伝子の解析．
図 4 と同様ラベル実験であり，90bp が変異ミトコンドリア遺伝子由来である．

異遺伝子を持っていた（7.1%，28%）．これにより，MELAS の変異遺伝子は母系遺伝を示すことが確認された．

(3)　図 5 に，MELAS 症例の剖検組織の変異 mtDNA の局在と割合を示す．検索した組織全てに変異 mtDNA は存在した．大脳前頭葉に最も変異遺伝子の割合が多く，灰白質，白質ともに，90%を占めた．心筋が，87%と変異遺伝子の比率が高く，ついで，肝，腎，骨格筋，脾，の順であった．骨格筋は，部位により大差なく，63%—69%

であった．同一組織内で約4 cm離れた部位から分離したDNAの解析では，変異遺伝子の割合はほぼ同一であった．

考　　察

MELASをきたす遺伝子変異は，ミトコンドリアDNA上のtRNA-Leu(UUR) 遺伝子内のA—G点変異であることを確定した．この点変異がMELASの病因であることは，1個体の同一組織から単離したクローン化筋細胞を遺伝子解析に用い，正常形質のクローンと，COX欠損クローンのmtDNAの全塩基配列を比較することで確定が可能であった．すなわち，上記2クローンは，MELASの表現形質であるCOX欠損という形質，およびそれと直結する遺伝子変異のみを異にするクローンであるためである．8例のMELAS骨格筋でこの変異を確認し，更に，この変異が母系遺伝を示すことを明らかにした．

今後の問題は，このmtDNA変異の増幅，分配機構であり，クローン化細胞内の変異mtDNAの増幅分配機構を検討することにより，患者という正常，異常mtDNAのヘテロプラスミーの構築機構を解明する点である．更に，治療の *in vitro* 検索，この変異を持たないMELAS患者の検索を進めている．

文　　献

1) Nakamigawa T, Momoi MY, Momoi T and Yanagisawa M: Generation of human myogenic cell lines by the transformation of primary culture with origin-defective SV40 DNA. J Neurol Sci 83：305—319, 1988.
2) Shimoizumi H, Momoi MY, Ohta S, Kagawa Y, Momoi T and Yanagisawa M: Cytochrome c oxidase-deficient myogenic cell-lines in mitochondrial yopathy. Ann Neurol 25：615—621, 1989.
3) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y and Ohta S: A point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopath, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes). Biochem Biophys Res Commun, 173: 816—822, 1990.

平成２年度研究班名簿

平成2年度　荒木班　名簿

区分	氏名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
主任	荒木淑郎	熊本大学医学部第一内科 〒860　熊本市本庄1－1－1	教授	096－344－2111 (内5611)
監事	垂井清一郎	大阪大学医学部第二内科 〒553　大阪市福島区福島1－1－50	教授	06－451－0051 (内2221)
幹事	寺尾寿夫	帝京大学医学部第一内科 〒173　板橋区加賀2－11－1	教授	03－3964－1211 (内1562)
〃	佐藤猛	順天堂大学医学部脳神経内科 〒113　文京区本郷2－1－1	助教授	03－3813－3111 (内3322)
〃	小澤高将	名古屋大学医学部第二生化学 〒466　名古屋市昭和区鶴舞町65	教授	052－741－2111 (内2031)
〃	後藤幾生	九州大学医学部神経内科 〒812　福岡市東区馬出3－1－1	教授	092－641－1151 (内2281)
運営幹事	高木昭夫	虎の門病院神経内科 〒105　港区虎の門2－2－2	部長	03－3588－1111 (内2016)
班員	荒畑喜一	国立精神・神経センター神経研究所 〒187　小平市小川東町4－1－1	室長	0423－41－2711 (内5114)
〃	内野誠	国立療養所再春荘病院神経内科 〒861-11　熊本県菊池郡西合志町須屋2659	医長	096－242－1000 (内536)
〃	太田成男	自治医科大学生化学 〒329-04　栃木県河内郡南河内町 薬師寺3311－1	講師	0285－44－2111 (内3151)
〃	栗原照幸	東邦大学医学部第四内科 〒153　目黒区大橋2－17－6	教授	03－3468－1251 (内3324)
〃	木南英紀	順天堂大学医学部生化学 〒113　文京区本郷2－1－1	教授	03－3813－3111 (内3514)
〃	斎藤加代子	東京女子医科大学小児科 〒162　新宿区河田町8－1	講師	03－3353－8111 (内31230)
〃	佐橋功	愛知医科大学神経内科 〒480-11　愛知県愛知郡長久手町大字 岩作字雁ヌ21	助教授	0561－62－3311 (内2176)
〃	田邊等	東京都立神経病院神経内科 〒183　府中市武蔵台2－6－1	院長	0423－23－5111 (内3201)
〃	西澤正豊	自治医科大学神経内科 〒329-04　栃木県河内郡南河内町 薬師寺3311－1	助教授	0285－44－2111 (内3522)
〃	埜中征哉	国立精神・神経センター神経研究所 〒187　小平市小川東町4－1－1	部長	0423－41－2711 (内5211)

区　分	氏　　名	所属施設名 所　在　地	所属における地位	連絡の際の電話
〃	福原信義	国立療養所犀潟病院神経内科 〒949-31　新潟県中頸城郡大潟町 犀潟468－1	医　長	0255－34－3131 (内553)
〃	堀　眞一郎	東京都神経科学総合研究所生化学 〒183　府中市武蔵台2－6	副参事 研究員	0423－25－3881 (内4020)
〃	松村喜一郎	国立療養所下志津病院神経内科 〒284　千葉県四街道市鹿渡943－5	医　長	0434－22－2511
〃	桃井真里子	自治医科大学小児科 〒329-04　栃木県河内郡河内町 薬師寺3311－1	助教授	0285－44－2111 (内3445)
〃	吉田瑞子	国立精神・神経センター神経研究所 〒187　小平市小川東町4－1－1	室　長	0423－41－2711 (内5143)
〃	若山吉弘	昭和大学藤が丘病院神経内科 〒227　横浜市緑区藤が丘1－30	教　授	045－971－1151 (内269)
〃	岡田伸太郎	大阪大学医学部小児科 〒553　大阪市福島区福島1－1－50	教　授	06－451－0051 (内2336)
〃	納　光弘	鹿児島大学医学部第三内科 〒890　鹿児島市宇宿町1208－1	教　授	0992－64－2211 (内2146)
〃	川井尚臣	徳島大学医学部第一内科 〒770　徳島市蔵本町3丁目	助教授	0886－31－3111 (内3204)
〃	木村　淳	京都大学医学部付属病院神経内科 〒606　京都市左京区聖護院川原町54	教　授	075－751－3770
〃	黒田泰弘	徳島大学医学部小児科 〒770　徳島市蔵本町3－18－15	教　授	0886－31－3111 (内2320)
〃	小林高義	東京医科歯科大学医学部神経内科 〒113　文京区湯島1－5－45	講　師	03－3813－6111 (内3385)
〃	斉藤深美子	東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞遺伝学 〒113　文京区湯島1－5－45	助　手	03－3813－6111 (内6132)
〃	清水輝夫	東京大学医学部脳研神経内科 〒113　文京区本郷7－3－1	講　師	03－3815－5411 (内8763)
〃	庄司進一	信州大学医学部第三内科 〒390　松本市旭3－1－1	助教授	0263－35－4600 (内5321)
〃	高橋　昭	名古屋大学医学部付属病院神経内科 〒466　名古屋市昭和区鶴舞町65	教　授	052－741－2111 (内2297)
〃	高守正治	金沢大学医学部神経内科 〒920　金沢市宝町13－1	教　授	0762－62－8151 (内3950)
〃	濱田　稔	宮崎医科大学医学部衛生学 〒889-16　宮崎市宮崎郡清武町木原5200	教　授	0985－85－0873
〃	宝来　聡	国立遺伝学研究所人類遺伝学研究 〒411　三島市谷田1111	助　手	0559－75－0771 (内568)
〃	水澤英洋	筑波大学臨床医学系神経内科 〒305　茨城県つくば市天王台1－1－1	講　師	0298－53－3224

区　分	氏　　名	所属施設名 所　在　地	所属における地位	連絡の際の電話
〃	宮　武　　正	新潟大学脳研究所神経内科 〒951　新潟市旭町通1番町757	教　授	025－223－6161 (内5180)
〃	森　　正　敬	熊本大学医学部遺伝学 〒862　熊本市九品寺4－24－1	教　授	096－344－2111 (内6771)
顧　　問	三　好　和　夫	徳島大学医学部第一内科 〒770　徳島市蔵本町3丁目	名誉教授	0886－31－3111
〃	宇尾野　公　義	国立静岡病院 〒420　静岡市城東町24－1	院　長	0542－45－0101
〃	豊　倉　康　夫	東京都老人医療センター 〒173　板橋区栄町35－2	院　長	03－3964－1131
事務担当者	安　部　和　子	沖中記念成人病研究所 〒105　港区虎の門2－2－2		03－3588－1111 (内2168)