③

厚生省精神・神経疾患研究委託費

筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究

平成３年度研究報告書

班長　　高　橋　桂　一

平成４年３月

目　　次

（★：プロジェクト研究）

総括研究報告書　　班　長　高　橋　桂　一　1

分担研究報告

プロジェクトⅠ　遺伝・疫学

Ⅰ-A　疫学・データベース

★国立療養所八雲病院における Duchenne 型筋ジストロフィー患者の推移 …… 5
国立療養所八雲病院　南　　良　二

北海道における Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子欠失と
臨床症状の多様性…… 9
国立療養所八雲病院　南　　良　二

当院筋ジス病棟における入院患者動向……13
国立療養所西別府病院神経内科　三　宮　邦　裕

Duchenne 型筋ジストロフィーにおける若年心不全の検討……17
国立療養所鈴鹿病院神経内科　酒　井　素　子

★Duchenne 型筋ジストロフィー患者のデータベース……21
と DNA 分析に関するアンケート結果
国立療養所南九州病院神経内科　福　永　秀　敏

Ⅰ-B　遺伝相談・遺伝子診断

★Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝相談倫理についての検討……35
東京女子医科大学小児科　福　山　幸　夫

本院における遺伝相談の現況……39
国立療養所西別府病院神経内科　三　宮　邦　裕

進行性筋ジストロフィー患者の遺伝子解析において
ジャンクションフラグメントを高率に検出するための方法……42
慶応義塾大学医学部微生物学教室　加　藤　真　吾

PCR-RFLP 法による Duchenne 型筋ジストロフィー症の遺伝子診断……46
国立療養所川棚病院　金　沢　　一

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の保因者診断および
出生前診断における PCR-RFLP 法の有用性の検討 ……49
東邦大学医学部第1産婦人科　片　山　　進

PCR 法を用いた Duchenne 型及び Becker 型筋ジストロフィーの
保因者診断と出生前診断について……53
大阪大学小児科　乾　　幸　治

Duchenne /Becker 型筋ジストロフィーの遺伝子診断：
遺伝子増幅とイメージプロセシングによる患者及び保因者の同定……56
東京都臨床医学総合研究所　鈴　木　義　之

CA dinucleotide repeat polymorphism を用いた Duchenne 型
筋ジストロフィーの非保因者診断……59
国立療養所新潟病院神経内科　保　住　　功
Duchenne 型及び Becker 型筋ジストロフィーにおける
ジストロフィン遺伝子の解析—第2報—……62
国立療養所下志津病院　山　田　広　樹
PCR 法を用いた進行性筋ジストロフィー患者の遺伝子診断 ……65
国立療養所西別府病院神経内科　三　宮　邦　裕
病院検査室における PCR 法を利用した Duchenne 型進行性
筋ジストロフィーの遺伝子診断……70
国立療養所西多賀病院　鴻　巣　　武
Multiplex PCR によるジストロフィン遺伝子欠失の検出
Chamberlain 法と Beggs 法について……73
国立療養所兵庫中央病院　高　橋　桂　一
Multiplex PCR による Xp 21 筋ジストロフィーの遺伝子診断
Chamberlain 法と Beggs 法の比較……77
国立療養所兵庫中央病院　高　橋　桂　一
Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子重複例及び
欠失例における臨床所見……79
国立療養所原病院　亀　尾　　等
筋緊張性ジストロフィー症の原因遺伝子近傍における連鎖不平衡
及び PCR-RFLP 法による簡便遺伝子診断……83
大阪大学医学部第4内科　三　木　哲　郎
Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝相談倫理の検討
遺伝相談の定義にかかわる問題を中心として……87
国立精神・神経センター精神保健研究所　白　井　泰　子
DNA 技術と筋ジストロフィー対策……92
北海道大学医学部公衆衛生学講座　近藤　喜代太郎

プロジェクト II　臨床病態

II-A　画像診断

進行性筋ジストロフィーの心筋病変に対する心臓核医学的検討……95
国立療養所東埼玉病院　石　原　傳　幸
心エコー検査による心機能評価と治療の検討……99
国立療養所長良病院小児科　矢　嶋　茂　裕
神経筋疾患の病態についての骨格筋 MRI による研究 ……103
愛媛大学医学部小児科　松　田　　博
副腎皮質ステロイド反応性の再発性急性横紋筋壊死：
骨格筋 MRI 所見について ……107
弘前大学医学部脳研神経内科　松　永　宗　雄
筋ジストロフィー患者でのデュアルX線骨密度測定装置による
筋萎縮の定量的評価法 ……112
国立療養所兵庫中央病院　高　橋　桂　一

顔面肩甲上腕筋ジストロフィーの筋障害の CT による検討……116
国立療養所兵庫中央病院神経内科　堀　川　博　誠
Duchenne 型筋ジストロフィーの脊柱変形 ……121
国立療養所宮崎東病院　井　上　謙次郎

II-B　臨床・病態生理

★Duchenne 型筋ジストロフィー症における脊柱側彎発生のメカニズム
—傍脊柱筋X線 CT による検討—……123
奈良県立医科大学神経内科　高　柳　哲　也
筋ジストロフィーの運動機能に関する研究（第一報）
—床反力からみた小児の歩行の発達— ……129
国立療養所徳島病院　松　家　　豊
筋ジストロフィーの足の機能障害 ……135
国立療養所徳島病院　松　家　　豊
Duchenne 型筋ジストロフィー症の新しい歩行分析 ……139
国立療養所西奈良病院小児科　岩　垣　克　己
Becker 型筋ジストロフィーにおける多面的臨床解析 ……145
愛知医科大学第四内科　佐　橋　　功
顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの筋障害以外の臨床的特徴 ……150
奈良県立医科大学神経内科　高　柳　哲　也
筋ジストロフィー症患者の循環機能 ……154
国立療養所岩木病院　五十嵐　勝　朗
心不全合併筋ジストロフィー患者における心房性ナトリウム利尿ペプチド
の変動について ……159
国立療養所刀根山病院神経内科　姜　　進
筋交感神経活動が筋血流量に及ぼす影響 ……164
名古屋大環境医研高次神経統御部門　自律神経・行動科学　間　野　忠　明
定量的筋電図法の研究（第三報） —distal myopathy における
myopathy index— ……173
東京都立神経病院神経内科　廣　瀬　和　彦
筋ジストロフィーにおける jitter 現象の異常
—筋緊張性ジストロフィーと他の型の筋ジストロフィーの比較— ……177
国立療養所沖縄病院　大　城　盛　夫
事象関連電位を用いた筋強直性ジストロフィー患者の知的機能の検討 …… ……181
国立精神・神経センター武蔵病院神経内科　春　原　経　彦
筋緊張性ジストロフィーにおける睡眠ポリグラフィーの検討 ……186
国立療養所沖縄病院　大　城　盛　夫
筋緊張性ジストロフィーにおける脳核磁気共鳴スペクトロスコピーの検討 ……191
京都大学神経内科　秋　口　一　郎
Myotonic dystrophy における中枢神経障害の臨床的検討
—睡眠中動脈血酸素飽和度および安静時動脈血ガス分析と髄液中
神経組織特異蛋白の関連性について— ……194
名古屋大学神経内科　松　岡　幸　彦

筋緊張性ジストロフィーにおける血圧の日内変動—第二報— ……199
国立療養所道北病院　坂井英一

II-C　生化学・内分泌

★筋強直性ジストロフィー症に併発する糖尿病の実態調査 ……203
弘前大脳研神経内科　松永宗雄
シビレエイ電気器官からのジストロフィンタンパクの精製の試み ……206
岐阜薬科大学分子生物　林　恭三
血清 CA-III 測定の普及にむけて，多施設での臨床検討 ……209
国立療養所札幌南病院神経内科　島　功二
筋萎縮マウス（wobbler）脊髄蛋白の異常について……214
弘前大学脳研神経内科　松永宗雄
Myotonic dystrophy におけるホルモン負荷試験の検討
—Ellwnorth-Howard 試験，Arginine 負荷試験，Insulin 負荷試験— ……217
東京都立神経病院神経内科　廣瀬和彦
筋緊張性ジストロフィーに於ける free T3, 及び free T4 値の検討 ……222
国立療養所箱根病院神経内科　村上慶郎
進行性筋ジストロフィーにおける骨代謝についての検討 ……226
国立療養所宮崎東病院　井上謙次郎

II-D　先天性筋ジストロフィー

先天性筋ジストロフィー児に認められるけいれんに関する検討 ……229
東京女子医科大学小児科　福山幸夫
福山型先天性筋ジストロフィー症の遺伝学的・臨床的検討
—同胞罹患例を中心に— ……232
神戸市立中央市民病院小児科　吉岡三恵子

プロジェクト III　病　理

III-A　剖検例集積

★筋ジストロフィー剖検登録例の集計と解析 ……235
国立療養所中部病院臨床研究部　向山昌邦
Duchenne 型筋ジストロフィー症の心肥大について
—臨床ならびに剖検所見の検討— ……238
国立療養所徳島病院　松家　豊
Duchenne 型筋ジストロフィー患児に発生した横紋筋肉腫の免疫組織化学的検討 ……242
東京女子医科大学小児科　福山幸夫
筋萎縮性側索硬化症における呼吸筋の組織化学的検討 ……247
国立療養所東埼玉病院　石原傳幸
増殖細胞核抗原（PCNA）を指標とした骨格筋再生の動態 ……250
徳島大学医学部第1病理学教室　楢澤一夫
mdx マウスにおける筋再生能の検討……255
国立療養所宇多野病院神経内科　斎田恭子
Heterozygote mdx マウスの培養筋細胞におけるジストロフィン発現に関する研究 ……259

東邦大学医学部第4内科　木下眞男
先天性筋緊張性ジストロフィー症筋における細胞骨格蛋白
（ジストロフィン，ジスミン，スペクトリン）の免疫組織学的研究……263
札幌医科大学小児科　舘　延忠

III-B　ジストロフィン関連

★症例におけるジストロフィン反応の多様性 ……267
熊本大学医学部小児発達学　三池輝久
Mdx mouse 及び control mouse における dystrophin の局在及び
組織特異性について　—モノクローナル抗体による検討—（第4報）……272
国立療養所再春荘病院　寺本仁郎
先天性ミオパチーにおけるジストロフィン ……276
熊本大学医学部小児発達学　三池輝久
先天性筋ジストロフィーの筋組織におけるジストロフィンの研究 ……281
東京女子医科大学小児科　福山幸夫
ヒト正常筋と Duchenne 型筋ジストロフィー症罹患筋の筋肉培養
における各種細胞骨格蛋白発現に関した免疫組織学的検討 ……286
札幌医科大学小児科　舘　延忠
ベッカー型筋ジストロフィーにおけるジストロフィン分析 ……291
国立療養所筑後病院　岩下宏
ジストロフィン神戸にみられた mRNA 前駆体2次構造の異常 ……294
神戸大学小児科　松尾雅文
ジストロフィンC末端ドメインが保たれた筋ジストロフィーの重症例 ……298
国立療養所南九州病院神経内科　福永秀敏

プロジェクト IV　治　療

IV-A　評価法と治療法の開発

★デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するプレドニゾンの臨床効果 ……301
国立療養所刀根山病院神経内科　姜進
可動型等尺性筋力計の開発と治療評価への応用 ……303
国立療養所兵庫中央病院　高橋桂一
先天性筋ジストロフィーの脊柱変形 ……307
国立療養所岩木病院　五十嵐勝朗
Duchenne 型筋ジストロフィー患者の余命の予測 ……311
広島大学整形外科　畑野栄治
長期器械的人工呼吸療法における動脈性出血の検討 ……315
国立療養所松江病院小児科　笠木重人
Duchenne 型筋ジストロフィー呼吸不全期のレニン-アンギオテンシン-
アルドステロン系の動態と血圧上昇に対するカプトプリルの効果について ……319
国立療養所医王病院小児科　本家一也
Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の心不全に対する captopril の
治療効果 ……322
国立療養所川棚病院　金沢一

ワークショップ

＜第1部　遺伝相談・遺伝子診断＞

遺伝相談の問題点 ……327
東京女子医科大学小児科　大　澤　真木子
筋ジストロフィーの遺伝子診断の現状と問題点 ……331
東京都臨床医学総合研究所　鈴　木　義　之

＜第2部　ジストロフィンテスト＞

ジストロフィン総論
—ジストロフィンとその抗体について— ……334
熊本大学医学部発達小児科　三　池　輝　久
ジストロフィン染色 ABC 法の実際 ……338
徳島大学医学部第一病理　伊　井　邦　雄
ジストロフィン染色 ABC 法の症例 ……341
札幌医科大学小児科　舘　　延　忠
ジストロフィン染色 FITC 法……344
熊本大学発達小児科　吉　岡　　毅
Western blotting の基礎と臨床 ……348
国立療養所再春荘病院神経内科　内　野　　誠
PCR 基礎編……352
神戸大学医学部小児科　西　尾　久　英
PCR の臨床面……357
東京女子医科大学小児科　斎　藤　加代子

運営の経過 ……363

研究班組織図 ……365

班員名簿 ……367

総括研究報告書

主任研究者　高橋桂一
国立療養所兵庫中央病院

班の課題に遺伝相談をかかげ，新たな班員を加えて2年度が発足した。班の基本構成は4分野9系列で，データ・ベースが幹事会の検討を経て疫学部門に移行した。本研究班の目標は遺伝子診断の方法の確立と普及を図り，それを基盤として倫理に支えられた遺伝相談を行い，発生予防をはかり，また筋ジストロフィーの臨床病態を解明し，治療を充実させることである。

今年度は遺伝相談・遺伝子診断とジストロフィンテストについてワークショップを行い，現状の把握と技術の普及に大きな成果を挙げた。報告書の後半にその内容を掲載した。演者および司会の方々の労に深謝する。

以下各分野の研究成果をまとめ，今後の発展の方向について考察する。

1）遺伝・疫学

疫学に関しては，北海道および九州での20数年間の DMD 患者の推移の分析から，入院時年齢及び死亡年齢の上昇傾向が明らかにされ，体外式人工呼吸器の導入による延命効果と療養所の存在価値が認識された（南，三宮ら）。また若年心不全死の国立療養所25ヶ所のアンケート調査の結果が報告された（酒井）。

データベースは現在20の国立療養所筋ジス施設が参加している状況であり，登録患者数は570例に達した（福永ら）。より有効な利用が望まれる。今回，福永により DNA 分析に関する現状と意識調査が行われた。DNA 分析結果をデータベースに含めることについて13施設の賛同をえたが，秘密の保持や家族の了解については慎重に対処すべきであるとの意見が多かった。

遺伝相談倫理に関して全班員と関係者にアンケート調査がなされ，相談者の経験の有無と遺伝相談の目的，カウンセラーの任務や適切な行動，情報の開示などに関連した回答との連関が統計手法により解析され，倫理のコンセンサスのための基礎資料がえられた。班員のカウンセリングに関する研修と，各施設における倫理委員会の設置の必要性が指摘された（白井）。西別府病院では，三吉野らの努力により，近接する九州大学生体防御研究所付属病院とタイアップして出生前診断を含めた遺伝子診断と遺伝相談が開始された。今後，各地区で設置されるべき遺伝相談のキーステイションの一つのモデルとなるであろう。

遺伝子診断は Polymerase Chain Reaction（PCR）の応用により，方法の確立と普及が目ざましく，関連した13の演題が報告された。PCR-RFLP 法の有用性は確立され，保因者診断と出生前診断が進展した（金沢，片山，乾）。新しく CA 繰り返し領域の多形性による保因者に関する検索の有用性が確かめられ，報告された（保住，乾）。ジストロフィン遺伝子欠失の検出は Multiplex PCR 法の普及により著しく進展し，全国の症例で検索が可能となった。その手技と応用および有用性に関し，Chamberlain 法と Beggs 法の比較や DNA 定量法を含めて5題の報告がなされた（高橋，鈴木，三吉野，鴻巣，乾）。欠失および重複の有無と臨床症状との関連が検討されたが，有意差がみられなかった（亀尾）。本邦での欠失や重複の頻度は，欧米と比較して差がないことが cDNA プ

ローブを用いたサザンブロット法を用いて結論された（山田）。欠失や重複に伴って生じるジャンクションフラグメントを高率に検出する方法が開発された（加藤）。欠失部位およびreading frame 機構と臨床症状の関連は Koenig や Beggs らにより検討された結果が報告されているが，あとで述べる福永らの症例のような興味ある所見が報告され，また中間型とされていた患者の遺伝子解析が進み，点変異の解析とあいまって，各症例が分子レベルで分類されるようになるであろう。

筋緊張性ジストロフィー（MyD）の原因遺伝子座位はせばめられ，p37.1（DNA マーカー）で強い連鎖不均衡が見いだされ，遺伝子単離に重要な手がかりが得られた（三木）。

顧問の近藤は前向的遺伝相談の必要性を強調している。現状分析と予想される効果を述べているので，報告書に補遺として掲載する。今後の遺伝相談のあり方に一つの方向を示すと思われる。

2）臨床病態

画像診断に関しては，RI，エコー，MRI，CTなどによる病態解析が行われている（石原，矢嶋，松田，堀川）。デュアルX線による筋萎縮の定量法が新しく開発された（高橋）。さらにソフトウエアの開発により実用性の向上が期待される。

臨床病態に関して，側弯発生の機構は治療面からも関心が高く，CT やX線での解析がなされた（井上，高柳）。歩行分析は床反力や足圧測定による新しいアプローチがなされ，障害度との関連が示された（松家，岩垣）。MyD の病態に関し，事象関連電位の p300 の振幅低下（春原），睡眠ポリグラフィーによる異常（大城），MRI スペクトロによる N-acetyl aspartate の脳内低下（秋口），血圧の日内変動の減少（坂井）などが明らかになった。

内分泌・生化学からのアプローチでは，MyDにおける糖尿病の合併について全班員施設における調査が行われ11.4%に合併することが明らかになった（松永）。MyDにおける偽副甲状腺機能低下症Ⅱ型の存在は当班員において見いだされたが，アルギニンやインスリン負荷による成長ホルモンや ACTH の変動より系統的な adenylate cyclase-cAMP 系の異常が示唆された（広瀬）。先天性筋ジストロフィーについては痙攣に関する検討がなされた（福山）。また兄が福山型で弟が Walker-Warburg 症候群を合併した例の報告があった（吉岡）。今後，福山型の全国調査，医療の実態調査，家族例の遺伝子解析など，プロジェクトを活かした研究を行う必要がある。

3）病　理

剖検例は1991年11月末迄で327例で，DMD は249例に達した。平均寿命は18.96±4.11歳で最近の5年間でも延長傾向にあり，死亡前の呼吸器装着の状況も合わせ調査が行われた（向山）。人工呼吸器の装着は神経筋疾患の治療の一環となりつつあり，生存期間も呼吸器の着用状況を把握せずに解析できない状況になってきた。

mdx マウス の筋再生能は徐々に低下すること，heterozygote の場合培養細胞はジストロフィン陽性と陰性の筋管細胞が存在し，あと融合により陰性細胞にもジストロフィンが発現することが示された（木下）。mdx マウスは筋力低下が少なく，再生能が高いためとされているが，マーカインによる壊死を繰り返し起こすと，徐々に再生能力が低下する（斎田）。檜澤らは正常ラットで増殖細胞核抗原を用いて筋の再生過程を調べ，HE 染色よりも速く反応がみられ，また速く反応が消失するようである。ジストロフィー筋での検索が期待される。先天性筋ジストロフィーではジストロフィンはすべての型で存在し，その染色は重症 DMD との鑑別に重要である（福山）。BMD におけるジストロフィンの解析は臨床症状や経過との関連において興味がもたれる（佐橋）。福永らは DMD 類似の臨床経過を示し，ジストロフィン染色ではC末端及び rod 中央部に対する不連続な染色性を示し，N末端に対する染色性を欠き，PCR で Exon 3〜19 の欠失を示す重症 BMD と呼ぶべき症例を報告した。松尾らは mRNA の2次構造の異常より生ずるエクソンのスキッピング例を報告した。三池は種々のジストロフィン抗体

について検討し，班員への抗体の供給も行い，ワークショップのジストロフィンテスト部門のアレンジを行い，当班におけるジストロフィンの研究を大きく推進させた。

4）評価法と治療法の開発

DMD に対するプレドニソロンの投与の小数例での結果が報告された(姜，高橋)。客観的評価には筋力の測定が不可欠であり，簡便な等尺性筋力計の開発と実測例が報告された(高橋)。薬物療法としてカプトプリルの有効性が明らかとなった（本家，金沢)。

班会議では特別に，石原により1991年10月にソレントにおいて行われた第1回筋ジストロフィーおよび関連疾患の治療に関する国際会議の概要がスライド写真を用いて報告され，班員に益すること多大であった。

以上，各分野での研究を総括した。今後，遺伝相談がどこでも客観性を持って行われる体制の確立が必要である。全体を通じ研究の進め方は，よりプロジェクトの特徴を活かすことが望ましく，各部門のリーダーおよび全班員の一層の協力が期待される。

Ⅰ．遺伝・疫学

Ａ．疫学・データベース

プロジェクト研究Ⅰ　遺伝・疫学
Ⅰ-A 疫学・データベース

国立療養所八雲病院における Duchenne 型筋ジストロフィー患者の推移

班　員　南　良二
国立療養所八雲病院

共同研究者　永岡正人，岡部稔，石川幸辰
石川悠加，木林正弘，野呂浩史
国立療養所八雲病院

要　旨

国立療養所に筋ジス病棟が開設されて27年が経過している。そこで筋ジス病棟の運用およびその患者の動向を，国立療養所八雲病院の特にDMD 患者を中心に調査した。

その結果，神経筋疾患の患者はコンスタントにほぼ９割，DMD 患者は６割以上を占めていた。また，入院患者の平均年齢は，DMD を含めて確実に上昇していた。これは，DMD の気管切開等の呼吸管理による延命効果により，有意に生存期間が長くなっていたことによると思われる。このことは延命という意味では，これまでの国立療養所の価値と筋ジス研究班の成果は評価されるが，今後出生率の低下および保因者診断および出生前診断に基づく遺伝相談の効果から DMD 患者の発生数の極端な減少が予想され，高齢化した筋ジス患者の対応，および患者数の減少に対する療養所の在り方が問われることになると思われる。

目　的

国立療養所に進行性筋萎縮症（筋ジス）病棟が開設されたのが昭和39年であり，すでに27年が経過している。厚生省の整備計画によると，昭和39年に八雲病院を含む全国８つの療養所に100床，その後昭和54年までに2500床が整備された（図１）。

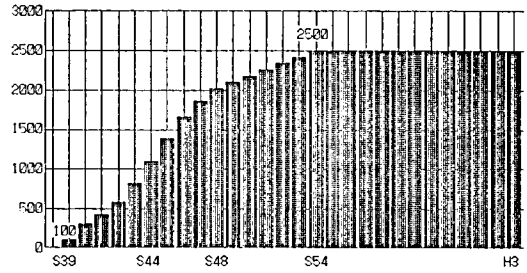


図１　全国27の国立療養所の筋ジスのベッド総数の推移（整備年度）

そこで，筋ジス病棟の運用およびその患者の動向を，国立療養所八雲病院の特に Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）患者を中心に調査し，筋ジス病棟の価値について考えてみた。

方　法

過去の入退院簿，死亡診断書，入院原簿から，２カ月以上入院した患者を抽出し，病名，生年月日，入院年月日，退院年月日もしくは死亡年月日を調べた。病名は DMD, BMD, CMD, MyD, LG や FSH などのその値の筋ジス，WH や CMT など筋ジス以外の神経疾患の６つの群に分類した。それらの疾患の毎年10月における人数，平均年齢を求め，年代の推移による疾患の構成比率，疾患の人数による構成比および延べ入院月数で見た構成比，疾患別の平均入院期間，各疾患の平均年齢の推移を調べた。

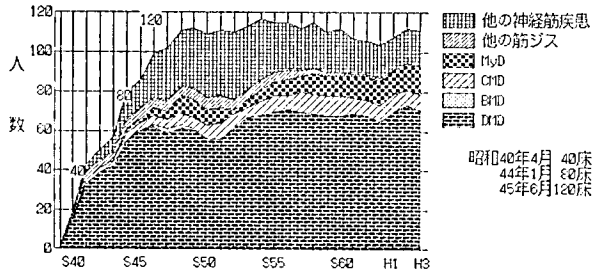


図2　国立療養所八雲病院筋ジス病棟入院患者の推移（昭和47年頃より120床満床）

またDMDに関しては名年度における新規入院数とその平均年齢，死亡数とその平均年齢を調べ，さらに気管切開などの呼吸管理の有無での死亡年齢の比較を行なった。

結　果

対象となった2カ月以上の筋ジス患者は総数で，308名であった。

筋ジス病棟の開設は昭和40年4月であるが，最初の患者はDMDで，昭和39年9月に入院しており，病棟開設時には14名（そのうちDMD患者が10名）が入院していた。開設は40床であるが，44年1月に80床となり，45年6月に現在と同じ120床となった。47年頃から満床となっているが，当院では一般病棟がないため，喘息，肺炎，癲癇などの患者が常に数名入院しており，筋ジス患者はほぼ9割を保っている。

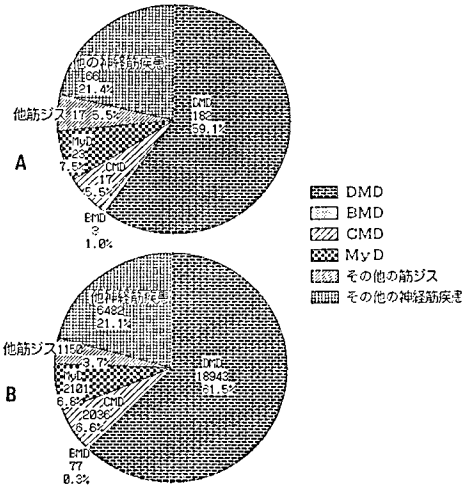


図3　A；国立療養所八雲病院における昭和40年から平成3年10月までの筋ジス病棟入院患者308名の疾患の内訳　B；同期間の疾患別在院月数

患者の内訳を見ると，53年頃までではDMD患者が筋ジスのうちの約5割を占め，それ以降現在までは6割以上を占めており，DMD患者の減少は見られない。

その他の疾患については，CMDが常に10%ほど入院しており，BMDは初期の一時期を除いて長期入院はない（図2）。

入院患者の疾患群別の構成を人数および在院月数で見ると，どちらも約6割がDMD患者で占められていた。またBMDに関しては，人数で1%ほど在院しているが，入院期間で見るとわずかに0.3%に過ぎなかった（図3）。

患者一人当たりの入院期間は，CMDが約10年で最も長く，DMD患者は9年弱であった（図4）。

入院患者の平均年齢を見ると，53年以降に限るとCMDとMyDはほぼ1年で1歳の自然上昇に近い推移を示したが，DMDはそれよりは緩やかではあるが，確実に上昇していた。昭和46年6月の120床になった時点では，DMD患者は62名で平均年齢は13.7歳であったが，平成3年10月の時点では，71名，平均19.2歳で20年間で5.5歳も平均年齢が上昇していた（図5）。

入院患者の平均年齢は新規入院患者の年齢と退院患者の年齢によって変動する。DMD患者の入院時年齢の推移を見ると，開設時よりほぼ10歳前後であり，入院時年齢の上昇は見られない（図6A）。一方DMD患者の退院はほとんどが死亡退院であるが，退院時の年齢の推移を見ると，全体として確実に上昇しているのが伺えた（図6B）。

次に，DMD患者の動向を見ると，入院患者

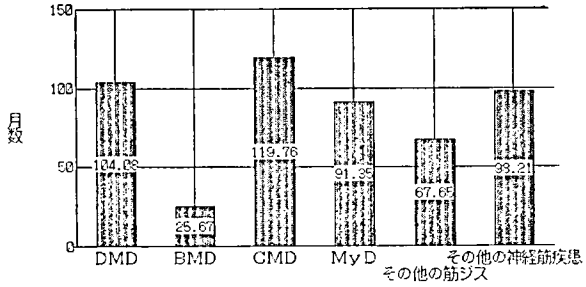


図4　患者1人あたりの平均入院月数

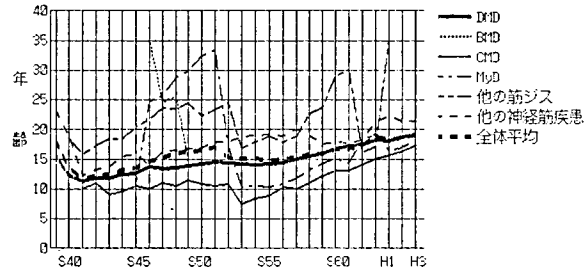


図5　疾患別平均年齢の推移

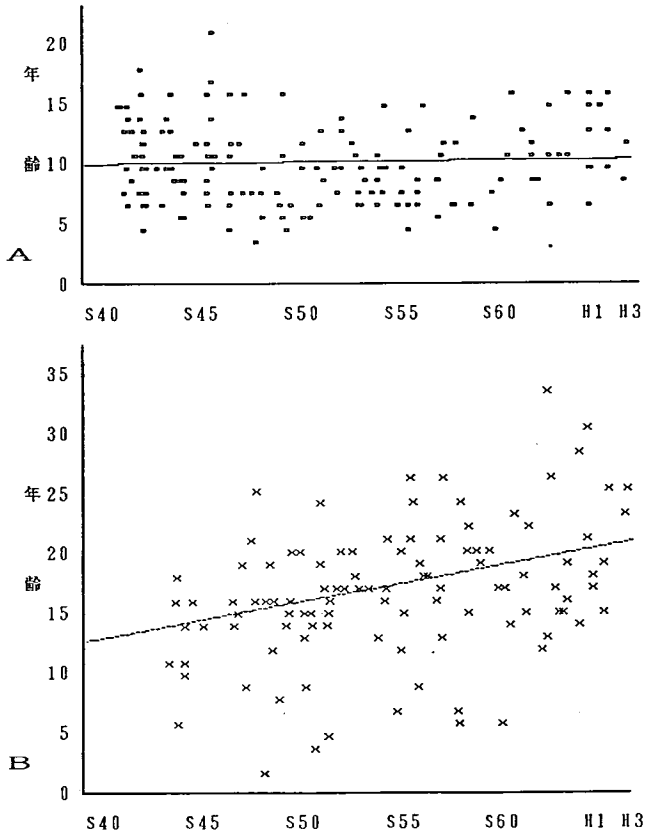


図6　A；新規 DMD 入院患者の年齢の分布　B；DMD 患者の退院（死亡）年齢の分布

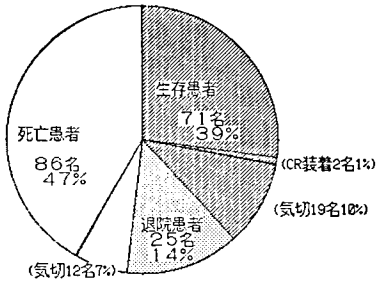


図7 DMD 患者182名の動向

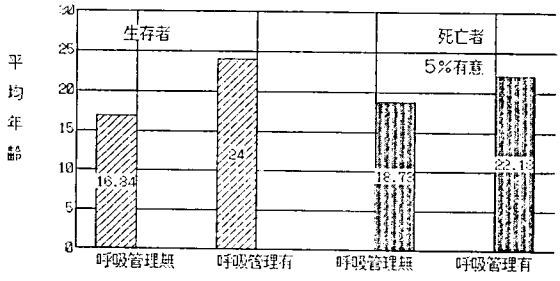


図8 DMD 生存者と死亡者の呼吸管理の有無による平均年齢の比較

の総数は 182 名で，そのうち86名（47%）が死亡し，現在の生存者は71名（39%）である。また，退院患者も25名（14%）見られた（図7）。

生存者と死亡者を気管切開等の呼吸管理の有無で見ると，死亡者で呼吸管理を行なわなかった者は74名で，平均 18.73 歳しか生存していないが，呼吸管理を行なった者では12名で，22.18 歳と有意に生存期間が長くなっていた（有意水準5%）。因みに，生存者で呼吸管理を現在行なっている者の平均年齢は24歳である。(図8)。

考　察

八雲病院に筋ジス患者が入院するようになって27年，現在と同じ 120 床になって19年になるが，筋ジス病棟としての稼動率はコンスタントにおよそ9割であり，DMD 患者の占める割合

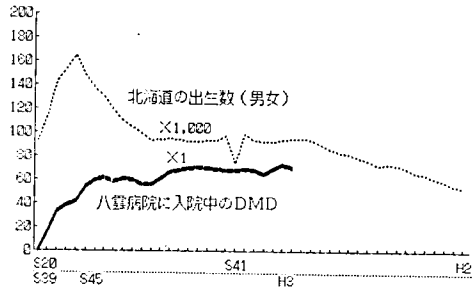


図9 北海道の出生数の推移と八雲病院の DMD 患者数の推移

は6割を超し，出生率の低下が言われているにもかかわらず，むしろ増加の傾向さえ伺える。しかし現在入院中の DMD 患者の平均年齢はすでに19歳を上回っている。そこで概略的に19年前の北海道における出生数との比較を行なってみると，19年前はまだそれほどの出生率の低下はなく，その後の低下が著しい。現在の出生数は19年前の約 1/2 である（図9）。さらに保因者診断および出生前診断に基づく遺伝相談が効を奏してきており[1]，今後 DMD 患者の発生数の極端な減少が予想される。

一方 DMD 患者の平均年齢は自然増加には及ばないものの，積極的な呼吸管理などによる死亡時の年齢の上昇の影響を受け，確実に増加しているのも事実であり，疾患の防止および延命という意味では，これまでの国立療養所の価値と筋ジス研究班の成果は評価されると思われる。しかし，今後高齢化した筋ジスの対応，および患者数の減少に対する療養所の在り方を迫られることになるのではないだろうか。

文　献

1) Takeshita K, Kasagi S et al : Decreased incidence of Duchenne muscular dystrophy in Western Japan 1956-1980. Neuroepidemiology 6 : 130, 1987.

北海道における Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子欠失と臨床症状の多様性

班　員　南　良二
国立療養所八雲病院
共同研究者　石川悠加，石川幸辰，野呂浩史*
岡部稔，永岡正人
国立療養所八雲病院　小児科　神経内科*

要　旨

今回我々は Beggs 等の報告した19対のプライマーを用いて PCR を行い，Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の遺伝子欠失と，その臨床症状との関係について検討した。対象は当院入所中の DMD 67家系77人とした。

DMD の38%に欠失を認め欠失率は本邦報告例と同等であった。欠失部位は Major hot spot に集中し，他報告例と同様であった。MR は exon 47～52 の欠失者に多いが，特定の exon と MR との関係は，今回みられなかった。

遺伝子欠失群と非欠失群で臨床症状を比較すると，歩行消失年齢，心不全出現率年齢および合併率，呼吸不全合併率に差はなかった。また，年齢，遺伝，脊柱側彎，呼吸不全出現年齢は欠失群で重篤な傾向があり，MR，痩せは非欠失群で重篤な傾向があったが，これらは統計学的に有意差を認めなかった。しかし，歩行開始遅延は非欠失群に高率で，統計学的に有意差を認めた（$p < 0.05$）。

目　的

近年 Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の臨床症状の多様性と，DMD 遺伝子異常の Heterogeneity との関係に興味がもたれている。今回私達は，北海道における DMD 遺伝子の欠失と，その臨床症状との関係を検討した。

方　法

対象は当院に入所している67家系77人の DMD 患者で，末梢血から DNA を抽出し，Beggs 等[1]の報告した19対のプライマーを用いて通常の方法で PCR を行い，遺伝子欠失を調べた。さらに臨床症状を，遺伝子欠失群と非欠失群で比較した。

結　果

DMD の38%に遺伝子欠失を認め欠失部位は Major hot spot に集中していた（図1）。MR は，Lindlöf 等[2]が報告した Probe 8 すなわち exon 47～52 の欠失者に多いという傾向と一致していた。しかし，Rapaport 等[3]が報告した exon 52 の欠失者の77%に MR を認めたり，Covone 等[4]が報告した MR の86%に exon 50の欠失を認めたというような特定の exon と MR との関係は，今回みられなかった。

各 exon の欠失率を本邦[5~7]及び欧米の報告[2~4]と比べると，exon 51 の欠失が他の全報告例に対して統計学的に有意に少ない以外は差を認めないものがほとんどであった（表1）。

遺伝子欠失群と非欠失群で臨床症状を比べると，年齢は欠失群が17.2歳で非欠失群の18.6歳より若いが統計学的に有意差はない（図2）。歩行開始月齢は欠失群の16カ月に比べ，非欠失群で18.4カ月と遅く，これは有意水準0.05で統

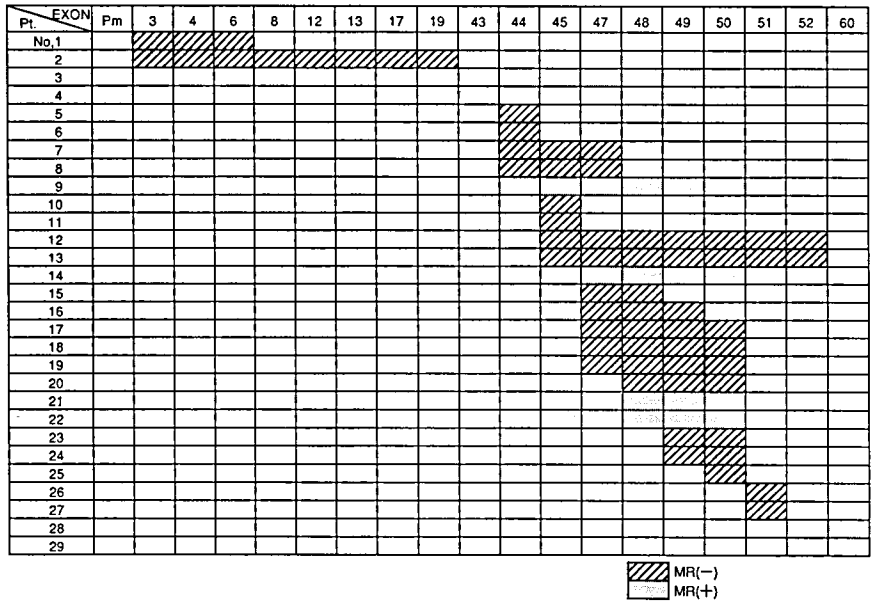


図1　PCR 法による欠失部位

表1　各 exon の欠失率の比較

(%)

DEL / EXON	当院 77人	Covoneら 127人	Lindlöfら 90人	松村ら 82人	鈴木ら 29人	西尾ら 47人
	38%	57.5%	50%	41.5%	38%	29%
Pm	0.0	—	—	—	—	—
3	2.6	5.5	5.6	3.7	6.9	—
4	2.6	6.3	5.6	3.7	—	—
6	2.6	7.1	5.6	2.4	6.9	—
8	1.3	5.5	8.9	4.9	3.4	6.3
12	1.3	5.5	10.0	4.9	—	—
13	1.3	5.5	10.0	3.7	3.4	—
17	1.3	3.9	8.9	2.4	6.9	4.3
19	1.3	3.9	10.0	3.7	—	6.3
43	1.3	3.9	4.5	1.2	3.4	—
44	9.1	4.7	1.1	0.0	—	4.3
45	11.7	13.4	4.5	6.1	—	19.1
47	15.6	26.0	10.0	12.2	20.7	—
48	16.9	26.8	12.2	15.9	—	19.1
49	18.2	23.6	15.6	18.3	—	—
50	18.2	24.4	17.8	19.5	24.1	—
51	9.1	18.9	24.5	18.3	—	—
52	6.5	15.7	10.0	17.0	—	—
60	1.3	0.8	1.1	0.0	—	—

当院と統計学的に有意差($P<0.05$)

計学的に差があるといえる。歩行消失年齢は両群ともに10.6歳であった。心不全出現年齢（心エコーで Ejection Fraction 0.5 以下でジギタリス製剤や利尿剤を開始した時期）は両群で20.5歳，20.6歳と差が無く，若年性心不全の1例では欠失は検出されなかった。呼吸不全出現年齢（$PaCo_2$ が 60 mmHg 以上になった時期）は欠失群で19.1歳と非欠失群の21.5歳より若いが，統計学的には有意差を認めなかった。肥痩度（DMD 患者の身長別肥痩判定の目安[8]による）は非欠失群でやせが目立つが，肥痩度の分布には両群で統計学的に有意差を認めなかった

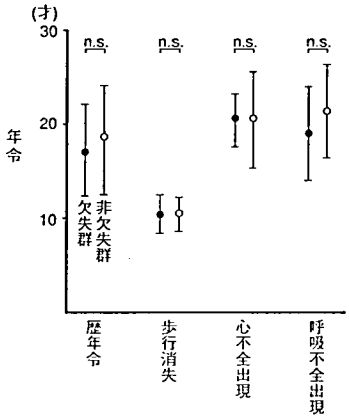


図2　DMD の遺伝子欠失群と非欠失群の臨床症状の比較

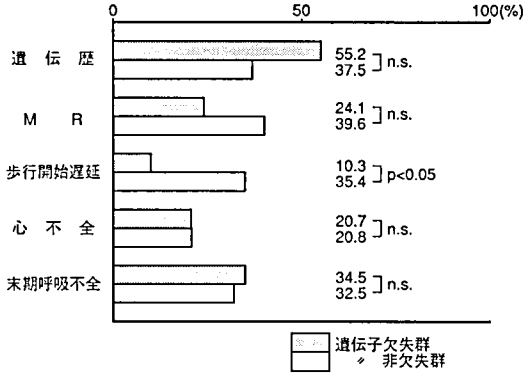


図4　DMD の遺伝子欠失群と非欠失群の臨床症状の比較

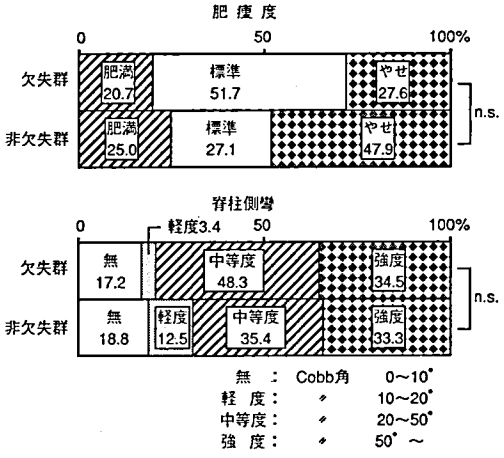


図3

(図3)。脊柱側彎（Cobb 角 10° 未満を側彎無し，10° から 20° を軽度，20° から 50° を中等度，50° 以上を強度）は側彎中等度以上が欠失群で高率であるが，統計学的に有意差を認めなかった。遺伝は欠失群で55.2%に認め，非欠失群の37.5%に比べ高率であるが統計学的に有意差はなかった（図4)。IQ 70 以下で MR と判定された者は欠失群の24.1%に対して非欠失群で39.6%と高率であるが統計学的に有意差を認めなかった。歩行開始時期が1歳7か月を過ぎて歩行開始遅延と判定された者は欠失群で10.3%

表2　臨床症状の多様性と遺伝子欠失

報告	欠失群で重篤な傾向	欠失群＝非欠失群	非欠失群で重篤な傾向
当院	歴年令 遺伝歴あり 脊柱側彎 呼吸不全出現年令	歩行消失年令 心不全出現年令 心不全合併率 呼吸不全合併率	歩行開始遅延* MR やせ
西尾ら	歩行消失年令 運動機能障害度 呼吸不全出現年令	IQ 歩行開始年令	
金沢ら	%VC* 12才時の ADL* 死亡年令* 心・呼吸不全症状出現率	身長・体重 14才時の ADL 脊柱側彎 心・呼吸不全症状出現年令 心機能・CTR 動脈血液ガス	
Baumbach ら		診断時年令 歩行消失年令 歴年令	
Medori ら			重症度 score* （歩行消失年令）

*統計学的に有意差あり（$p<0.05$）

に対し非欠失群で35.4%にのぼり，これは有意水準0.05で統計学的に差があるといえる。心不全合併率は両群とも約20%で，呼吸不全合併率はともに30%台前半で差がなかった。

考　察

遺伝子欠失と臨床症状の関係は，Koenig等[9]のフレームシフト仮説や，Beggs等[10]のCystein-rich domein と C-terminal domein の半分 がessential であるという説などが知られている。欧米では遺伝子欠失のみつからない例が30～50%だが，本邦ではそれが50～60%にも達し，Point Mutation や Splicing の異常が考えられている。

この非欠失群について，Medori等[11]は臨床症状が欠失群より重症であると報告している(表2)。Baumbach等[12]は両群で差がないとし，西尾等[5]も呼吸不全出現年齢などで欠失群が重篤な傾向があるが統計学的に有意差を認めないとしている。金沢等[6]は死亡年齢などで欠失群が重篤な傾向があるとした上で，非欠失群も含めた DMD の臨床症状の違いをもたらすのはジストロフィン欠損以外のファクターの可能性があると示唆している。今回の私達の結果は，歩行開始遅延が非欠失群で統計学的に有意に多い他は，西尾等[5]と同様に呼吸不全出現年齢等が欠失群で若い傾向がみられるが，両群間で統計学的に有意差を認めなかった。

今後さらに遺伝子の検索と臨床症状の経過観察を続ける必要があると思われた。

文　献

1) Beggs AH, Koenig M et al : Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet **86** : 45, 1990

2) Lindlöf M, Kiuru A et al : Gene deletions in X-linked muscular dystrophy. Am J Hum Genet **44** : 496, 1989

3) Rapaport D, Passos-Bueno MR et al : Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23a in Duchenne muscular dystrophy. Am J Med Genet **39** : 437, 1991

4) Covone AE, Lerone M et al : Genotype-phenotype correlation and germline mosaicism in DMD/BMD patients with deletions of the dystrophin gene. Hum Genet **87** : 353, 1991

5) 西尾久英，松尾　保ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症における遺伝子部分欠失と臨床症状との関係に関する検討．小児科臨床　**44** : 1235, 1991

6) Hajime Kanazawa, Hidetoshi Takashima et al : Correlation between clinical features and deletions of the dystrophin in Duchenne muscular dystrophy. Jpn J Med **30** : 1, 1991

7) 松村喜一郎，伊本夏樹ら：Duchenne 型及び Becker 型筋ジストロフィーにおけるジストロフィーにおけるジストロフィン遺伝子の解析．厚生省精神・神経疾患研究委託費　筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究　平成2年度研究報告書：37, 1991

8) 木村　恒：患者の体位　進行性筋ジストロフィー症　栄養所要量　体位・体力評価．厚生省神経疾患研究　筋ジストロフィー症の療護に関する臨床および心理学的研究班　栄養・体力研究プロジェクト編，1987, p. 97

9) 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, 1989

10) Beggs AH, Hoffman EP et al : Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy : Dystrophin gene and protein studies. Am J Hum Genet **49** : 54, 1991

11) Medori R, Brooke MH et al : Genetic abnormalities in Duchenne and Becker dystrophies : Clinical correlations. Neurology **39** : 461, 1989

12) Baumbach LL, Chamberlain JS et al : Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. Neurology **39** : 465, 1989

当院筋ジス病棟における入院患者動向

班　　員　三　宮　邦　裕
国立療養所西別府病院神経内科

共同研究者　三吉野　産　治[1)]，藤　本　　伸[2)]，木　下　裕　俊[3)]
[1)] 国立療養所西別府病院院長　[2)] 国立療養所西別府病院神経内科　[3)] 国立療養所西別府病院小児科

要　旨

過去26年間の当院入院患者を対象に，出身県，病名，生年月日，入院退院年月日，死亡年月日を調べ，患者構成，入院年齢等の変化を調査した。特に Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）については，CR 導入による死亡年齢の変化を調査した。

患者出身県は，大分県を中心とする傾向への変化がみられた。患者構成は，筋ジス以外の筋萎縮性疾患の割合の増加が認められた。DMD の死亡年齢は初期に比べ延長が認められたが，CR 導入前後では僅かな延長しか認められなかった。

患者出身県の変化は，他県に同様の施設が整備されてきたことによると思われた。入院年齢の上昇傾向には，疾患の多様化・重症化が影響しているものと考えられた。DMD の死亡年齢の延長は，診療体制の総合的効果によるものが大きいと考えられた。

目　的

当院が昭和39年に進行性筋ジストロフィー患者の受け入れ施設として指定され，昭和43年に現在の筋ジス病棟が開設されて以来，現在までに大分県を中心に九州名県から多くの筋ジス患者が入院している。

また，当院においても昭和60年から体外式人工呼吸器（以下 CR）が導入されたが，これまでに CR 導入による生存期間の延長の報告がなされている[1)]。

病院開設20周年にあたり，過去26年間の当院筋ジス病棟における筋ジス患者の動向と，CR 導入の効果について調査・検討した。

対象と方法

昭和40年から平成3年までの，当院筋ジス病棟における入院患者242名について，疾患の内訳，出身県，入院年齢を調査し，九州各県に筋ジス病棟がほぼ整ったと思われる昭和53年を境に2期に分けて比較した。

さらに，Duchenne 型筋ジストロフィー（以下 DMD）および先天性筋ジストロフィー（以下 CMD）については，CR 導入前後で平均死亡年齢を比較検討した。

結　果

患者出身県（図1）についてみると，昭和53年以前は大分県出身者が最も多かったものの，九州各県からの入院が多く認められたが，昭和54年以降は他県からの入院が減少し大分県出身者を中心とする傾向へ変化していた。

入院患者総数（表1）は，昭和53年以前が167名であったのに対して，昭和54年以降は75名と減少していた。これには他県からの入院の減少や遺伝相談による筋ジス患者の発生率の低下などが影響していると考えられた。

患者構成（表1）を見てみると，昭和53年以前は，DMD 及び CMD の占める割合が大きかったのに対して，昭和54年以降は，その他の筋

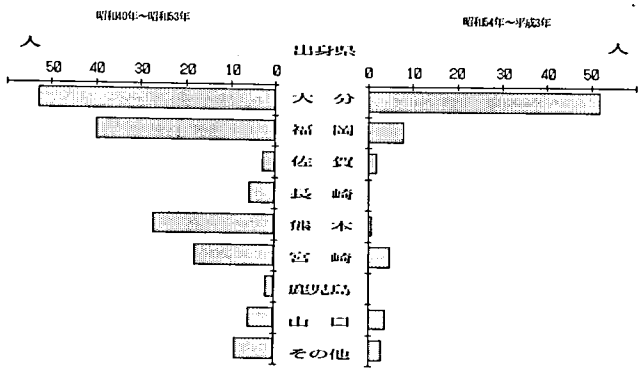


図1 当院筋ジス病棟入院患者の出身県の変化

表1 当院筋ジス病棟入院患者の内訳

疾患名	昭和40年～昭和53年（人）	昭和54年～平成3年（人）
Duchenne 型筋ジストロフィー	96	36
Becker 型筋ジストロフィー	1	3
先天型筋ジストロフィー	18	10
肢帯型筋ジストロフィー	9	0
顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー	0	1
筋緊張性ジストロフィー	0	2
先天性ミオパチー	4	5
遠位筋ミオパチー	0	1
多発性筋炎	0	1
進行性筋ジストロフィー(分類不明)	22	2
Werdnig-Hoffmann 病	6	4
Kugelberg-Welander 病	3	2
脊髄性進行性筋萎縮症	3	4
その他	5	4
合計	167	75

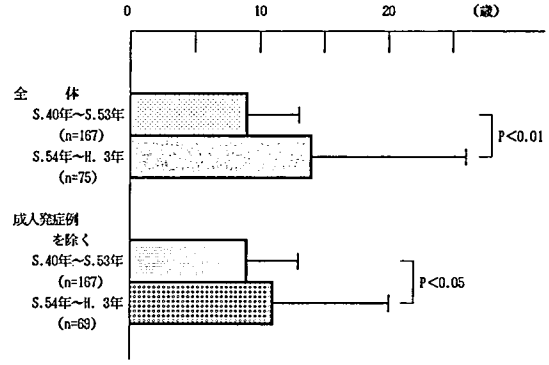


図2 入院年齢の変化

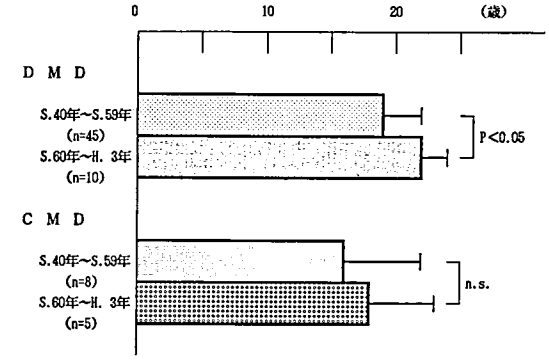


図3 死亡年齢の変化

萎縮性疾患患者の占める割合の増加する傾向が認められた。

次に入院年齢の変化（図2）を，まず入院患者全体で見てみると，上のグラフのごとく昭和53年以前が9.0±3.8歳であったのに対して，昭和54年以降は13.9±12.6歳と有意な平均入院年齢の上昇が見られた。さらに入院年齢の上昇に影響していると考えられる脊髄小脳変性症やALS 等の成人発症例を除いた場合についてみても，下のグラフのごとく昭和53年以前が 9.0±3.8歳，昭和54年以降が11.3±0.8 歳と平均入院年齢の上昇が認められた。これらのことより入院年齢の上昇傾向には，疾患の多様化・重症化，さらに在宅療養の普及が影響しているもの

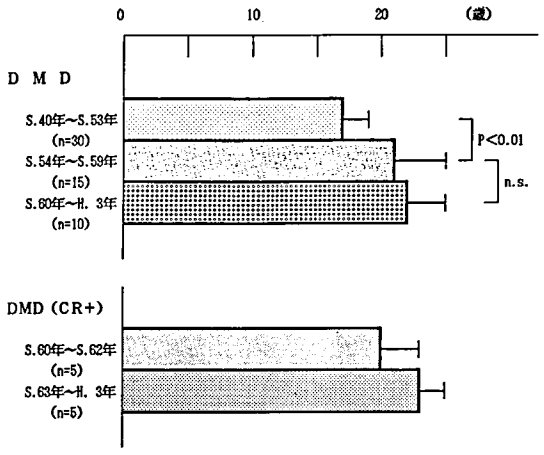


図4　死亡年齢の変化

と考えられた。

CR 導入による死亡年齢の変化（図3）を見るために，CR 導入前後で DMD 及び CMD の平均死亡年齢を比較した。DMD においては，昭和59年以前の CR 非装着者45例の平均死亡年齢は18.6±3.3歳，昭和60年以降の CR 装着者10例の平均死亡年齢は 21.2±2.4 歳と，有意な延長が認められた。

一方 CMD では，胸郭変形や Mental 等の問題から CR が使用困難であったために，全例 CR 非装着者であり，平均死亡年齢は16.0±6.5歳から 17.4±4.7 歳と約 1.8 歳の延長が認められたものの有意な差は認めなかった。

さらに DMD については，昭和59年以前の CR 非装着者を2期に分けて比較してみたところ，図4の上のグラフのごとく昭和53年以前30例の平均死亡年齢が 17.3±2.1 歳であったのに対して，昭和54年以降15例のそれは 21.0±3.9 歳であり，有意な延長が認められた。これには診療体制の改善，進歩に伴う総合的効果が影響[1)2)] しているものと思われた。

これに対して昭和54年から昭和59年の CR 非装着者と昭和60年から平成3年の CR 装着者との比較では，平均死亡年齢は 21.0±3.9 歳から 21.2±2.4歳と僅かな延長しか認めなかった。

そこで CR 装着者10例のみを，昭和60年から昭和62年に死亡した5例と昭和63年から平成3年に死亡した5例との2期に分けて平均死亡年齢を比較してみたところ，図4の下のグラフのごとく昭和60年から昭和62年の5例の平均死亡年齢は 19.8±2.5 歳，昭和63年から平成3年の5例のそれは 22.6±1.5 歳と，約 2.8 歳の延長が認められた。

CR 導入以前には DMD の死亡年齢の有意な延長が認められたのに対して，CR 装着者の死亡年齢には僅かな延長しか認めなかったのは，一つには昭和54年から昭和59年の平均死亡年齢が CR 非装着にもかかわらず，過去の報告と異なり，すでに 21.0 歳と大きく延長していたこと，さらには CR 導入初期における CR の使用の問題等が考えられた。

CR 装着開始時期に関する一定した基準がないこと，また，心不全を合併するものにおいては CR 装着後，早期に死亡するものがみられることなどがあり，患者の病態に応じた CR の装着開始時期及び使用方法の一定した基準の検討が，今後必要であると思われた。

ま と め

1．昭和40年から平成3年までの当院筋ジス病棟入院患者の動向を調査した。

2．患者出身県は，大分県を中心とする傾向への変化がみられ，これは他県に同様の施設が整備されてきた事によると思われた。

3．患者構成は，昭和53年以前は DMD および CMD が大半であったが，昭和54年以降はその他の筋萎縮性疾患患者の占める割合の増加が認められた。

入院年齢の上昇傾向には，疾患の多様化・重症化が影響しているものと考えられた。

4．DMD の死亡年齢は初期に比べ延長が認められたが，これは，診療体制の総合的効果によるものが大きいと考えられた。

CR 導入前後では死亡年齢に僅かな延長しか認められず，導入初期における使用の問題が考えられたが，今後 CR 装着時間の問題等を含め検討が必要であると思われた。

文　献

1）福永秀敏，園田至人ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症，その臨床像の変貌—平成元年度鹿児

島県における現況から一。日本医事新報，No. 3440：29 1990.
2）向山昌邦，椿　忠雄ら：Duchenne 型筋ジス患者の寿命の年代別推移。厚生省神経疾患研究委託・筋ジストロフィー症の疫学，臨床および治療に関する研究・昭和58年度研究報告書。1984，p. 242

Duchenne 型筋ジストロフィーにおける若年心不全の検討

班　員　酒　井　素　子
国立療養所鈴鹿病院神経内科

共同研究者　本　田　　仁[1)]，飯　田　光　男[2)]
[1)] 名古屋大学医学部神経内科　[2)] 国立療養所鈴鹿病院

要　旨

全国の筋ジストロフィー施設において，18歳以下で心不全により死亡した Duchenne 型筋ジストロフィー（以下 DMD）患者31症例についてアンケートならびに訪問調査を行ない，その臨床特徴について検討した。その結果，早期の所見として，6～8歳時において心胸郭比が50%以上の症例では，若年での心不全発現に留意する必要があると思われた。また，長く歩行していた症例ほど死亡年齢が低い傾向にあり，歩行不能時において体重が重いほど CTR が大きい傾向にあったことから，歩行などの日常活動による運動負荷が，心機能障害を助長する可能性がうかがわれた。また，死亡時の運動機能障害度は同年齢の呼吸不全死例より軽度であった。従って，若年心不全死例では，心筋障害の進展過程が骨格筋障害のそれより加速的であると推定され，その病態についてより一層の検討が必要であると考えられた。

はじめに

これ迄私共は，筋ジストロフィーにおける心不全について検討してきた。昨年の本会議では DMD の17.1%が心不全により死亡し，その最頻死亡年齢が16才にあり，呼吸不全死よりも4才若年に偏っていることを報告した。そこで本年は，DMD の若年心不全死例の臨床・検査経過の特徴を明らかにする事を目的として，アンケート調査ならびに訪問調査を行なったのでその結果を報告する。

表1　調査に御協力頂いた施設

国立療養所道北病院	国立療養所兵庫中央病院
国立療養所八雲病院	国立療養所西奈良病院
国立療養所岩木病院	国立療養所松江病院
国立療養所道川病院	国立療養所原病院
国立療養所東埼玉病院	国立療養所川棚病院
国立療養所医王病院	国立療養所再春荘病院
国立療養所長良病院	国立療養所南九州病院
国立療養所宇多野病院	国立療養所沖縄病院

対象および方法：

今回の調査にご協力頂いた施設は16施設で（表1），当院を含めた17施設において18歳以下で心不全死した症例を対象とした。各症例について，入院時年齢，歩行不能時年齢，死亡時の機能障害度および5歳（あるいは初検査時）・10歳時・歩行不能時・死亡直前の4期における身長・体重・心電図所見・胸部レ線所見・肺活量・動脈血ガス分析値・血清 CK 値・側彎と前彎の程度を調査した。

結　果

今回の調査では，対象症例は31例で（表2），

表2　SUBJECTS

DMD patients died of heart failure (under the age of 18 years)	
No. of cases	31
Age at admission (year)	10.2±2.8
Age at gt. unable to walk	10.7±1.3
Age of death	16.0±1.7
Disability score at death	6.8±1.0

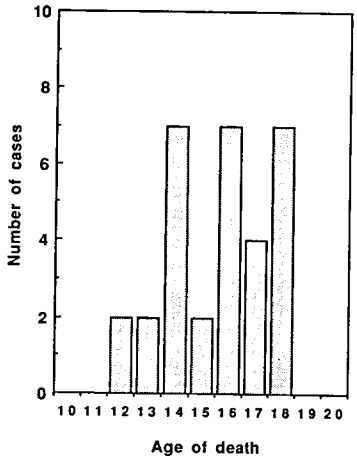


図1 Age distribution of dead cases in the present study (n=31)

歩行不能年齢は10.3±1.3歳，平均死亡年齢は16.0±1.7歳，死亡時の運動機能障害度は6.8±1.0度であった。死亡時の年齢分布は図1のごとくで，14歳での死亡例もかなり多くみられた。

経過別の臨床検査所見の推移を表3に示した。調査しえた最低検査年齢は6歳であったため，今回は早期の所見として，8歳以下のもの11例の結果をまとめた。心胸郭比（以下CTR）は47.1±4.4%，心電図では異常Q波を8例中4例に認めた。歩行不能時の所見では，平均歩行不能年齢が10.6±1.5歳であり，10歳時の所見とほぼ等しかった。CTRは，歩行不能時で50.4±5.5%，10歳時で50.9±5.8%，心電図では，異常Q波・不完全右脚ブロックと，歩行不

表3 Clinical course-related features of DMD patients died of heart failure

	6-8 year-old	10 year-old	Age unable to walk	At death
No. of cases	11	23	21	30
Age : mean±SD	7.3±0.7	10	10.6±1.5	16.0±1.7
Height (cm)	118.4±7.8	127.9±6.5	134.0±9.7	153.8±10.0
Weight (kg)	23.0±6.6	29.1±6.8	32.3±10.0	35.1±8.5
FVC (ml)	1241.7±424.4	1379.2±437.8	1441.6±534.0	1080.5±416.0
%VC	73.6±11.0	61.1±17.6	56.5±19.5	31.7±14.7
Scoliosis	(+)1/7	(+)5/18	(+)4/16	(+)10/26, (++)8/26 (+++)3/26
Lordosis	(++)1/7	(+)5/15	(+)3/13, (++)2/13	(+)7/19, (++)5/19
CTR (%)	47.1±4.4	50.9±5.8	50.4±5.5	64.0±6.8
ECG findings	aQ*4/8	aQ5/13, IRBBB 2/13	aQ3/13, T**3/13 IRBBB 2/13	aQ14/25, Ps^11/25 IRBBB 9/25, VPC 7/25 T6/25

*abnormal Q, **T wave change, ^P sinistrocardiale

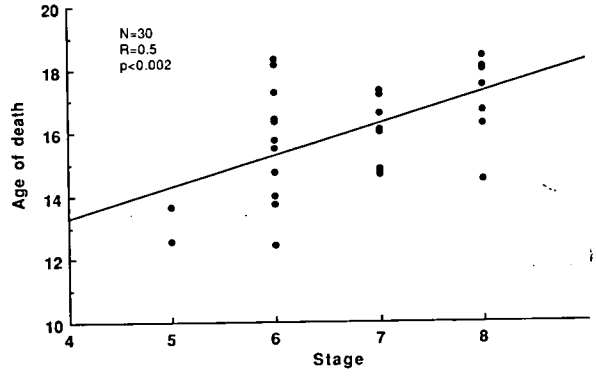


図2 Relationship between clinical stage and age of death

能時に陰性T波を認めた。死亡直前の所見で，CTR が 64.0±7.4％と増加し，胸水を41％に認め，心電図では異常Q波を56％に，左房負荷を44％に認め，その他，不完全右脚ブロック・房室ブロック・心室性期外収縮などを認めた。PaO_2 は軽度低下を示し $PaCO_2$ は正常範囲内であった。側彎・前彎は，経過と共に合併する症例が増加し，その程度も増強していた。

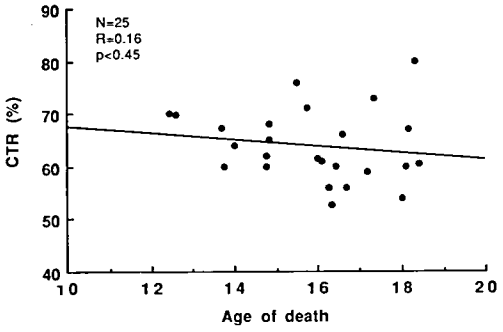


図3　Relationship between age of death and CTR

次に，若年心不全死例において心機能障害に関連する可能性のある因子として，①運動機能障害度②歩行年数③体重について検討した。まず，死亡時の運動機能障害度は，前述のごとくその平均は6.8±1.0度で，昨年調査した18歳以下の呼吸不全死例87例の平均7.9±0.3度に比して低く，機能は呼吸不全死例より保たれていた。運動機能障害度と死亡年齢との関連については（図2），障害度が高い程死亡年齢が高かったが，障害度6度での死亡例が多く，また，

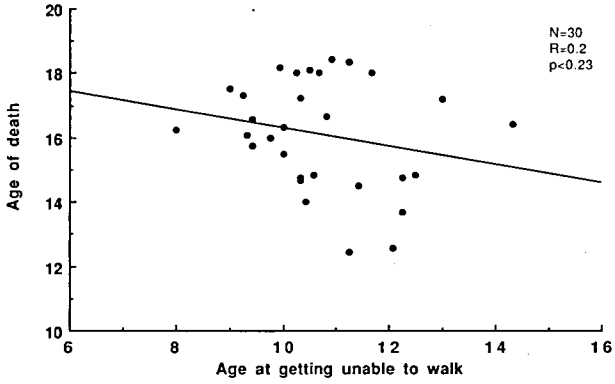


図4　Correlation between ages at getting unable to walk and death

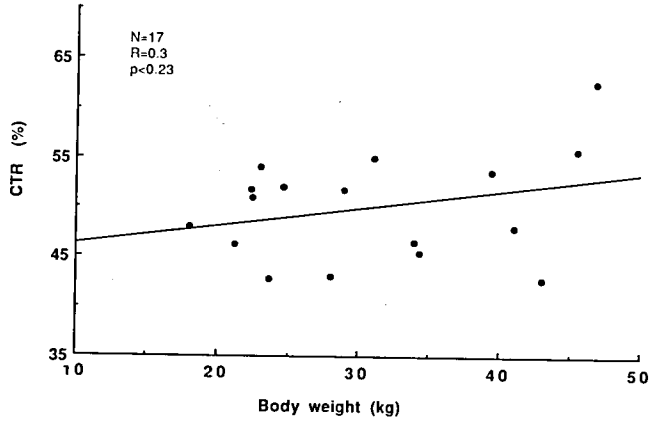


図5　Relationship between body weight and CTR at getting unable to walk

その中には18歳での死亡例も存在していた。死亡年齢とCTRとの関係では（図3），必ずしも死亡年齢の高いもの程CTRが増加しているとはいえなかった。歩行年数では，平均10.7±1.3歳で，当院のDMD入院患者56名の平均10.9±2.3歳とほぼ等しかった。図4の様に，歩行不能年齢と死亡年齢との間に明らかな相関は認められなかったが，歩行不能年齢が高いほど，死亡年齢が低い傾向にあった。12歳以上まで歩行していた6症例の平均死亡年齢は14.4±1.4歳と，より若年であった。体重に関しては，歩行不能時において，体重が重いほどCTRが大きい傾向にあった（図5）。

考　察

心不全死するDMDには，若年例が少なくない事が指摘されている。昨年私共は，心不全死例の死亡年齢分布は若年から高年齢にわたって広く分布するが，16歳をピークとして若年例が目立つことを報告した[1]。特に若年例では，早期での心筋障害の発見とその対策が重要であることは言うまでもない。今年度は，これらの若年死亡例の臨床所見の経時的な推移を調査し，その臨床像の特徴について検討した。特に，早期発見の指標を得るために，早期の所見として6歳から8歳のものを検討してみた。CTRでは，47.1±4.4%と，当院での呼吸不全死例のうち，8歳以下で検査を施行していた7症例の平均45.4±3.8%との差を認めなかった。しかし，呼吸不全死7例のうち8歳までにCTRが50%を越えていた例は1例であったが，今回調査した若年心不全死例では，10例中3例であった。心電図では，異常Q波を心不全死では8例中4例に，呼吸不全死例では7例中5例に認め，その存在範囲は心不全死例ほど広範とはいえなかった。従って，8歳以前では，CTRが50%以上の症例は心不全の早期発現の可能性に留意する必要があると思われた。死亡直前では，CTRは60%以上に増加し，胸水を高率に認め，多くが拡張型心筋症の様相を示すものと思われた。動脈血酸素分圧は軽度低下し炭酸ガス分圧は正常範囲内で，骨格筋障害による呼吸不全は認められなかった。

次に，歩行不能年齢とその時点での体重やCTR等を調査し，歩行などの運動や体重の，心臓への負荷の可能性について検討した。歩行不能時のCTRと体重の関係は，前述の様に体重の多い症例ほどCTRが大きい傾向にあった。また，歩行不能年齢が高いほど死亡年齢が低い傾向にあり，12歳以上まで歩行していた症例の平均死亡年齢はより若年であった。死亡時の機能障害度は6.8±1.0度で，昨年の調査での18歳以下の呼吸不全死例87例の平均7.9±0.3度より低く，運動機能は呼吸不全死例より保たれていた。従って，過度の肥満や長期にわたる歩行などの日常活動による心臓への運動負荷が，心機能障害を助長する可能性は否定できないと思われた。運動機能に関しては，若年心不全死例では10歳時において，呼吸不全死例よりも有意に障害度が高いとされており[2]，今回の結果はそれに反しているが，さらに症例を重ねて検討が必要と考えられる。今後はDMDでの心筋障害と骨格筋障害の進展過程における病態の異同の問題と共に，臨床的に，①若年心不全死を来たすDMD症例の臨床特徴をより明確にしていく事，②歩行可能な年齢において，早期での心機能評価をどのような指標に基づいて行なっていくか，③若年での心不全発症例に対し，その心筋障害の進展に対する早期治療の確立，などを中心に，さらに若年心不全に対する検討を重ねていく必要があると思われる。

謝辞：本調査にご協力頂きました諸先生方に深く感謝致します。また，国立療養所川棚病院の渋谷先生，田村先生には，資料収集にご援助頂きました。厚くお礼申しあげます。

文　献

1）酒井素子，本田　仁ら：Duchenne型筋ジストロフィーにおける心不全死の検討。筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究　平成2年度研究報告書，173，1991.

2）田村拓久，渋谷統寿：心不全診断マニュアル。進行性筋ジストロフィーの心不全マニュアル。厚生省神経疾患研究委託費　筋ジストロフィー研究第4班心不全プロジェクト研究マニュアル作成チーム編，1991，p. 9

Duchenne 型筋ジストロフィー患者のデータベースとDNA 分析に関するアンケート結果

班　　員　福　永　秀　敏
国立療養所南九州病院神経内科

共同研究者　鴻　巣　　武[1]，佐　藤　　恵[2]
[1] 国立療養所西多賀病院神経内科　[2] 医療情報システム開発センター

要　旨

“筋ジス第3班”の研究プロジェクトの一つとして，全国規模での統一入力フォーマットによるデータベースの構築が企画され，現在データの入力が行われ，有効に活用されつつある。本年度も例年と同様な年報出力による調査票の結果と，併せてDNA分析についてのアンケート調査の結果を報告したい。

年報出力について

現在20の国療筋ジス施設がこのプロジェクトに参加している。登録患者数は570例，経過調査票の総数は1525件である。

出力件数が少ないので今後各施設での有効利用が望まれる。

1．施設別年齢階層別患者数(表1)，2．施設別誕生月別基礎調査票登録件数（表2），3．施設別月別経過調査票登録件数（表3），4．生活様式別年齢階層別患者数（表4），5．機能獲得時年齢階層別患者数（表5），6．機能喪失時年齢階層別患者数(表6)，7．脊柱側彎・仮性肥大・症状別年齢階層別患者数（表7），8．外傷別患者数（表8），9．上肢機能別患者数(表9)，10．起立動作・這行動作別患者数(表10)，11．機能障害度別患者数（表11），12．ADL別年齢階級別患者数（表12），13．ADL別機能障害度別患者数（表13），14．機能障害度別筋力テスト平均スコア(表14)，15．機能障害度別関節拘縮変形平均スコア（表15），16．治療内容別年齢階級別患者数（表16）

問題点としては調査票の内容があげられた。簡略化や検査項目については今後検討して行きたい。

DNA 分析について

1．DNA 分析施行状況（1991年6月の調査）では Duchenne 型筋ジストロフィー，286例，保因者，53例，同胞，47例で施行されていた。

2．DNA 分析施設の調査では自施設は1施設のみで回答のあった残り12施設では他施設に依頼していた。

3．DNA 分析を今後どこで行うかという調査では自施設3施設，他施設（SRL など）に依頼11施設であった。

4．データーベースの中に DNA 分析を含めることについては13施設全てから賛成の回答を得た。ただ秘密の保持や家族の了解については慎重に対処すべきであるとの意見が多かった。

表1　施設別年齢階級別患者数

施設名	合　計	0　歳	1　歳	2　歳	3　歳	4　歳	5－9	10－14	15－19	20－24	25－29	30－34	35歳以上
総　計	570	0	0	1	5	5	39	174	172	101	31	8	34
国立療養所道北病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所八雲病院	80	0	0	0	0	0	4	17	27	18	3	1	10
国立療養所岩木病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所西多賀病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所道川病院	4	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0
国立療養所東埼玉病院	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
国立療養所下志津病院	51	0	0	0	0	0	0	11	13	13	2	4	8
国立療養所新潟病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立精神・神経センター	6	0	0	0	2	3	1	0	0	0	0	0	0
国立療養所箱根病院	4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0
国立療養所医王病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所長良病院	36	0	0	0	0	0	1	9	10	8	8	0	0
国立療養所鈴鹿病院	61	0	0	0	0	0	9	26	17	8	1	0	0
国立療養所宇多野病院	36	0	0	0	0	0	0	9	16	3	2	0	6
国立療養所刀根山病院	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
国立療養所兵庫中央病院	37	0	0	0	0	0	2	22	13	0	0	0	0
国立療養所西奈良病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所松江病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所原病院	20	0	0	0	0	0	0	3	6	9	2	0	0
国立療養所徳島病院	45	0	0	0	0	0	2	11	18	8	4	2	0
国立療養所築後病院	8	0	0	0	0	0	0	2	6	0	0	0	0
国立療養所川棚病院	36	0	0	0	0	0	6	13	7	5	2	0	3
国立療養所再春荘病院	20	0	0	0	0	0	1	6	6	5	2	0	0
国立療養所西別府病院	35	0	0	0	0	0	4	8	10	11	1	1	0
国立療養所宮崎東病院	9	0	0	0	0	0	1	4	4	0	0	0	0
国立療養所南九州病院	34	0	0	0	0	0	1	20	6	6	1	0	0
国立療養所沖縄病院	40	0	0	1	3	2	7	13	10	2	2	0	0

表2　施設別誕生月別基礎調査票登録件数

施設名	合　計	1　月	2　月	3　月	4　月	5　月	6　月	7　月	8　月	9　月	10月	11月	12月
総　　計	569	54	62	60	38	47	47	56	43	45	40	42	35
国立療養所道北病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所八雲病院	80	15	11	9	1	3	6	5	5	6	9	3	7
国立療養所岩木病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所西多賀病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所道川病院	4	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
国立療養所東埼玉病院	7	0	1	0	0	0	2	3	0	0	1	0	0
国立療養所下志津病院	51	4	7	5	2	4	7	2	3	4	3	5	5
国立療養所新潟病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立精神・神経センター	6	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
国立療養所箱根病院	4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
国立療養所医王病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所長良病院	36	3	7	2	0	6	3	5	3	1	1	2	3
国立療養所鈴鹿病院	61	3	4	7	6	6	2	10	3	1	4	7	8
国立療養所宇多野病院	36	3	4	1	1	3	6	2	3	2	6	3	2
国立療養所刀根山病院	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
国立療養所兵庫中央病院	37	1	3	6	3	3	2	5	6	3	1	4	0
国立療養所西奈良病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所松江病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所原病院	20	5	1	6	4	1	0	0	0	0	1	1	1
国立療養所徳島病院	44	0	3	5	3	2	8	4	4	5	4	6	0
国立療養所築後病院	8	1	0	3	1	3	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所川棚病院	36	3	3	1	5	3	2	3	3	6	3	2	2
国立療養所再春荘病院	20	4	2	1	1	1	0	1	1	5	3	1	0
国立療養所西別府病院	35	3	7	5	1	6	2	4	1	2	1	1	2
国立療養所宮崎東病院	9	1	0	2	1	1	1	0	0	2	0	0	1
国立療養所南九州病院	34	4	3	3	4	3	3	4	5	2	0	3	0
国立療養所沖縄病院	40	4	5	3	4	2	2	6	4	6	2	1	1

表3　施設別月別経過調査票登録件数

施設名	合　計	1　月	2　月	3　月	4　月	5　月	6　月	7　月	8　月	9　月	10月	11月	12月
総　　計	1525	126	164	142	117	126	120	171	118	112	118	121	90
国立療養所道北病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所八雲病院	255	36	34	35	6	6	24	19	15	29	27	7	17
国立療養所岩木病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所西多賀病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所道川病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所東埼玉病院	5	0	1	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0
国立療養所下志津病院	55	4	7	5	4	7	7	2	3	4	3	5	4
国立療養所新潟病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立精神・神経センター	10	0	2	2	0	0	0	2	2	0	0	1	1
国立療養所箱根病院	4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
国立療養所医王病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所長良病院	90	5	20	5	0	18	6	12	8	5	2	4	5
国立療養所鈴鹿病院	340	16	25	43	35	34	14	61	16	5	20	33	38
国立療養所宇多野病院	174	14	19	8	7	11	32	11	8	13	29	19	3
国立療養所刀根山病院	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
国立療養所兵庫中央病院	38	1	2	7	3	4	2	4	6	3	1	5	0
国立療養所西奈良病院	34	2	4	0	0	2	4	2	4	2	4	8	2
国立療養所松江病院	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所原病院	30	0	3	0	15	5	0	0	0	0	3	4	0
国立療養所徳島病院	13	0	3	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所築後病院	8	1	0	3	1	3	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所川棚病院	137	10	7	2	18	5	10	15	10	25	15	10	10
国立療養所再春荘病院	20	4	2	1	1	1	0	1	1	5	3	1	0
国立療養所西別府病院	35	3	7	5	1	6	2	4	1	2	1	1	2
国立療養所宮崎東病院	4	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
国立療養所南九州病院	214	20	22	18	15	18	15	27	36	12	5	20	6
国立療養所沖縄病院	55	10	5	2	6	3	2	8	7	7	3	2	0

表4　生活様式別年齢階級別患者数

生活様式区分	合計	0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5−9	10−14	15−19	20−24	25−29	30−34	35歳以上
1．たたみ	61	0	0	1	4	5	9	12	16	8	0	0	6
2．ベッド	478	0	0	0	1	1	27	148	150	92	31	8	20
3．ずり這い	59	0	0	0	0	0	0	36	17	3	0	0	3
4．四つ這い	45	0	0	0	0	0	4	33	4	4	0	0	0
5．手動車いす	232	0	0	0	0	0	5	129	64	17	1	0	16
6．電動車いす	213	0	0	0	0	0	0	13	95	67	22	5	11
7．装具歩行	19	0	0	0	0	0	1	14	3	1	0	0	0
8．介助歩行	8	0	0	0	0	0	3	5	0	0	0	0	0
9．歩　行	74	0	0	1	5	4	30	24	3	0	0	0	7

表5　機能獲得時年齢階級別患者数

機能獲得区分	合計	0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5−9	10−14	15−19	20−24	25−29	30−34	35歳以上
(1) 定頸	448	233	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
(2) 座位確保	276	134	12	3	2	0	1	0	0	0	0	0	0
(3) 四つ這い	194	77	24	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0
(4) 歩行開始	527	3	431	52	4	2	1	0	0	0	0	0	0

表6　機能喪失時年齢階級別患者数

機能喪失区分	合計	0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5−9	10−14	15−19	20−24	25−29	30−34	35歳以上
(1) 動揺性歩行	395	0	21	64	89	72	136	5	0	0	0	0	0
(2) 登はん性起立	349	0	23	26	55	55	176	8	0	0	0	1	1
(3) 階段昇降	341	0	0	5	5	6	193	105	7	0	0	0	1
(4) 歩行	449	0	1	0	0	0	153	270	17	2	0	0	0
(5) 這行	449	0	0	0	0	0	21	160	47	9	1	0	0
(6) 座位保持	449	0	0	0	0	0	0	49	69	25	3	1	0

表7　脊柱側彎・仮性肥大・症状別年齢階級別患者数

症状区分	合計	0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5−9	10−14	15−19	20−24	25−29	30−34	35歳以上
総計	805	0	1	0	0	0	28	225	213	117	44	11	166
脊柱側彎	555	0	1	0	0	0	1	137	171	84	29	11	121
背部より見て右	340	0	1	0	0	0	0	71	109	49	21	7	82
背部より見て左	215	0	0	0	0	0	1	66	62	35	8	4	39
高度	176	0	1	0	0	0	0	18	77	26	10	2	42
中程度	189	0	0	0	0	0	0	43	63	33	13	3	34
軽度	209	0	0	0	0	0	1	74	32	33	9	6	54
なし	198	0	0	0	0	0	27	82	29	20	10	0	30
仮性肥大	411	0	0	0	0	0	27	164	103	56	6	3	52
呼吸不全	124	0	0	0	0	0	0	2	26	32	14	5	45
心不全	48	0	0	0	0	0	0	2	13	11	3	0	19
食欲不振	41	0	0	0	0	0	0	6	9	8	6	0	12
肝腫大	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
嘔吐	11	0	0	0	0	0	0	2	5	2	0	0	2
便秘	196	0	0	0	0	0	2	24	60	26	13	7	64
下痢	5	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0	0	0
腹部膨満	29	0	0	0	0	0	0	4	7	3	3	0	12
発汗異常	11	0	0	0	0	0	0	2	4	1	1	0	3
しもやけ	29	0	0	0	0	0	0	14	7	2	0	1	5
嚥下障害	15	0	0	0	0	0	0	1	4	2	2	1	5
高口蓋	26	0	0	0	0	0	1	7	10	5	1	0	2
痙攣	8	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	1	1
皮膚症状	69	0	0	0	0	0	3	14	18	9	3	1	21
感染	28	0	0	0	0	0	1	13	3	5	1	0	5
奇形	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
その他	57	0	0	0	0	0	0	8	18	9	4	0	18

表8 外傷別患者数

外傷部位	合計	外傷の種類									
		骨折	関節脱臼	挫創	内部損傷	開放創	表在損傷	挫傷	圧挫損傷	熱傷	その他
総計	805	13	2	9	0	0	6	3	1	0	14
頭部	3	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
頸部	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
胸部	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腹部	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
背部	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腰部	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
上肢	8	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0
下肢	23	6	2	7	0	0	5	1	0	0	1
多部位	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表9 機能障害度別患者数

障害度区分	合計	0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35歳以上
総計	805	0	1	0	0	0	28	225	213	117	44	11	166
1 階段昇降可能	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0
1-a 手の介助なし	4	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0
1-b 手の膝おさえ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 階段昇降可能	28	0	0	0	0	0	11	12	1	1	0	0	3
2-a 片手手すり	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
2-b 片手手すり，ひざ手	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
2-c 両手手すり	19	0	0	0	0	0	7	8	0	1	0	0	3
3 椅子から起立可能	12	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	2
4 歩行可能	17	0	0	0	0	0	4	10	0	1	0	0	2
4-a 独歩で5m以上	8	0	0	0	0	0	3	4	0	0	0	0	1
4-b 物に捉まれば歩ける	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
4-b-1 歩行器	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-b-2 手すり	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4-b-3 手びき	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 歩行不能、四つ這い可能	33	0	0	0	0	0	2	26	2	0	0	0	3
6 四つ這い不能ずり這い可	183	0	1	0	0	0	1	81	51	11	2	0	36
7 座位保持可能	161	0	0	0	0	0	0	32	55	28	9	4	33
8 座位保持不能	218	0	0	0	0	0	0	21	62	48	26	6	55

表10　上肢機能別患者数

上肢機能区分	合計	0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5−9	10−14	15−19	20−24	25−29	30−34	35歳以上
総計	805	0	1	0	0	0	28	225	213	117	44	11	166
1　500g以上直上挙上	24	0	0	0	0	0	8	13	1	0	0	0	2
2　500g↑70～90°	20	0	0	0	0	0	6	9	0	0	0	0	5
3　重量0で直上挙上	38	0	0	0	0	0	10	19	6	0	0	0	3
4　重量0で70～90°	42	0	0	0	0	0	2	29	6	0	0	0	5
5　重量0で肘関節屈曲	102	0	1	0	0	0	1	56	24	2	0	0	18
6　肘伸展・手の水平移動	132	0	0	0	0	0	0	37	45	19	5	0	26
7　体幹反動肘伸展手の移動	33	0	0	0	0	0	0	10	9	7	2	0	5
8　体幹反動手の運動・移動	97	0	0	0	0	0	0	18	37	21	2	1	18
9　手の運動・手の前方移動	199	0	0	0	0	0	0	14	52	48	28	9	48

表11　起立動作・這行動作区分別患者数

動作区分	合計	0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5−9	10−14	15−19	20−24	25−29	30−34	35歳以上
起立動作	414	0	0	0	0	0	24	131	113	66	15	4	61
1　手をつかわずはずみ+−	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
2　手で膝を押えて片手両手	12	0	0	0	0	0	7	3	1	0	0	0	1
3　手を床で頭ではずみ+−	13	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	3
4　捉って立上れる	18	0	0	0	0	0	6	9	0	0	0	0	3
5　捉っても立上れない	231	0	0	0	0	0	4	68	74	51	7	2	25
6　その他	136	0	0	0	0	0	2	46	37	14	7	2	28
這行動作	112	0	0	0	0	0	21	50	6	2	1	1	31
1　指前方	46	0	0	0	0	0	16	21	2	1	1	0	5
2　指外方	30	0	0	0	0	0	2	18	2	0	0	0	8
3　指外方　90° 以上後方	36	0	0	0	0	0	3	11	2	1	0	1	18

表12　ADL 別年齢階級別患者数

ADL 区分		合計	0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5−9	10−14	15−19	20−24	25−29	30−34	35歳以上
総数		805	0	1	0	0	0	28	225	213	117	44	11	166
1 片足で立つ	可	24	0	0	0	0	0	9	6	6	2	0	0	1
	難	28	0	0	0	0	0	7	13	1	0	0	0	7
	不可	702	0	1	0	0	0	10	191	192	107	43	10	148
2 床からの立上り	可	33	0	0	0	0	0	15	6	6	2	0	0	4
	難	16	0	0	0	0	0	4	9	1	0	0	0	2
	不可	707	0	1	0	0	0	7	196	192	107	43	10	151
3 床からの起座	可	97	0	0	0	0	0	20	49	15	3	0	0	10
	難	47	0	0	0	0	0	2	25	6	2	0	0	12
	不可	617	0	1	0	0	0	3	139	182	104	43	10	135
4 ズボンの着脱	可	155	0	0	0	0	0	22	89	20	3	0	0	21
	難	94	0	1	0	0	0	1	46	25	7	0	0	14
	不可	525	0	0	0	0	0	4	86	159	101	43	10	122
5 シャツの着脱	可	160	0	0	0	0	0	22	92	19	4	0	0	23
	難	91	0	0	0	0	0	1	43	23	6	0	0	18
	不可	517	0	1	0	0	0	3	84	160	101	43	10	115
6 寝返り	可	188	0	0	0	0	0	24	97	31	6	0	0	30
	難	74	0	1	0	0	0	2	30	19	5	0	0	17
	不可	510	0	0	0	0	0	0	93	154	100	43	10	110
7 コップで水を飲む	可	388	0	0	0	0	0	25	178	83	26	6	1	69
	難	196	0	0	0	0	0	1	33	76	35	12	2	37
	不可	185	0	1	0	0	0	0	8	44	49	25	7	51
8 歯をみがく	可	409	0	0	0	0	0	25	180	87	34	8	2	73
	難	199	0	0	0	0	0	1	27	80	38	13	4	36
	不可	162	0	1	0	0	0	0	12	37	38	22	4	48
9 箸を使って食事する	可	444	0	0	0	0	0	25	185	99	40	12	2	81
	難	195	0	0	0	0	0	1	30	71	42	15	3	33
	不可	137	0	1	0	0	0	0	7	34	31	16	5	43
10 字を書く	可	507	0	0	0	0	0	26	194	129	52	18	3	85
	難	169	0	0	0	0	0	1	20	54	36	14	4	40
	不可	100	0	1	0	0	0	0	8	22	24	11	2	32
11 下肢装具歩行	使用	58	0	0	0	0	0	3	32	12	3	0	0	8
	否	688	0	1	0	0	0	21	174	191	109	43	10	139
12 手動車いす移動	使用	322	0	1	0	0	0	4	158	84	21	2	0	52
	否	397	0	0	0	0	0	20	44	106	88	39	10	90
13 電動車いす	使用	328	0	0	0	0	0	0	18	111	78	32	9	80
	否	373	0	1	0	0	0	24	178	74	32	8	2	54

表13-1　ADL 別機能障害度別患者数

ADL 区分		合計	機能障害度																
			1	1a	1b	2	2a	2b	2c	3	4	4a	4b	/1	/2	/3	5	6	7	8
総数		805	5	4	0	28	2	2	19	12	17	8	2	0	1	0	33	183	161	218
1 片足で立つ	可	24	4	3	0	8	1	1	5	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	難	28	1	1	0	12	1	0	9	5	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	不可	702	0	0	0	8	0	1	5	6	12	5	2	0	1	0	28	180	158	212
2 床からの立上り	可	33	5	4	0	12	2	1	8	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	難	16	0	0	0	8	0	1	4	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	不可	707	0	0	0	8	0	0	7	5	15	7	2	0	1	0	28	180	158	212
3 床からの起座	可	97	5	4	0	21	2	2	14	10	5	2	0	0	0	0	21	12	1	0
	難	47	0	0	0	5	0	0	3	2	6	2	1	0	1	0	6	20	1	0
	不可	617	0	0	0	1	0	0	1	0	5	4	1	0	0	0	3	149	157	213
4 ズボンの着脱	可	155	5	4	0	24	2	2	17	10	12	6	1	0	1	0	25	48	1	0
	難	94	0	0	0	3	0	0	2	2	4	1	1	0	0	0	5	53	7	0
	不可	525	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	82	152	215
5 シャツの着脱	可	160	5	4	0	25	2	2	17	9	11	5	1	0	1	0	25	53	1	0
	難	91	0	0	0	2	0	0	1	3	4	1	1	0	0	0	5	50	6	1
	不可	517	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2	78	152	214
6 寝返り	可	188	5	4	0	26	2	2	17	10	15	8	1	0	1	0	25	65	7	1
	難	74	0	0	0	1	0	0	1	2	2	0	1	0	0	0	5	40	8	3
	不可	510	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	78	145	211
7 コップで水を飲む	可	388	5	4	0	27	2	2	18	12	17	8	2	0	1	0	29	155	72	21
	難	196	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	24	69	64
	不可	185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	19	130
8 歯をみがく	可	409	5	4	0	27	2	2	18	11	17	8	2	0	1	0	29	157	82	34
	難	199	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	23	62	76
	不可	162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	16	105
9 箸を使って食事する	可	444	5	4	0	27	2	2	18	12	16	7	2	0	1	0	31	162	84	45
	難	195	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	19	61	76
	不可	137	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	15	95

表13-2　ADL 別機能障害度別患者数

ADL 区分		合計	機能障害度																	
			1	1a	1b	2	2a	2b	2c	3	4	4a	4b	/1	/2	/3	5	6	7	8
10 字を書く	可	507	5	4	0	28	2	2	19	12	17	8	2	0	1	0	32	173	98	69
	難	169	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	53	83
	不可	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	10	63
11 下肢装具歩行	使用	58	0	0	0	1	0	0	1	1	3	1	0	0	0	0	11	23	3	0
	否	688	5	4	0	25	2	2	17	9	10	5	2	0	1	0	20	154	155	208
12 手動車いす移動	使用	322	0	0	0	1	0	0	1	1	5	1	2	0	1	0	31	145	63	23
	不可	397	5	4	0	25	2	2	17	9	8	5	0	0	0	0	2	21	82	181
13 電動車いす	使用	328	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	44	95	140
	否	373	5	4	0	26	2	2	18	10	13	6	2	0	1	0	25	118	50	66

表14　機能障害度別筋力テスト平均スコア

障害度区分	合計	頸		肩				肘				手				股				膝				足			
		屈曲	伸展	外転 R	外転 L	伸展 R	伸展 L	屈曲 R	屈曲 L	伸展 R	伸展 L	背屈 R	背屈 L	掌屈 R	掌屈 L	屈曲 R	屈曲 L	伸展 R	伸展 L	屈曲 R	屈曲 L	伸展 R	伸展 L	背屈 R	背屈 L	底屈 R	底屈 L
総計	805	1.7	2.6	1.5	1.5	1.3	1.3	2.0	1.9	1.8	1.8	2.6	2.6	2.6	2.7	1.3	1.3	1.2	1.2	1.6	1.6	1.2	1.3	1.8	1.8	2.2	2.2
1 階段昇降可能	5	2.5	4.1	3.3	3.3	2.9	2.9	3.7	3.7	3.5	3.5	3.5	3.5	3.7	3.7	3.3	3.3	3.3	3.3	3.9	3.9	3.5	3.5	3.5	3.5	4.5	4.5
1－a 手の介助なし	4	2.7	3.9	3.2	3.2	2.7	2.7	3.7	3.7	3.4	3.4	3.4	3.4	3.7	3.7	3.2	3.2	3.2	3.2	3.9	3.9	3.4	3.4	3.4	3.4	4.4	4.4
1－b 手の膝おさえ	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2 階段昇降可能	28	2.3	3.4	2.6	2.6	2.1	2.0	3.0	3.0	3.0	2.9	3.2	3.2	3.4	3.4	2.2	2.2	2.0	2.0	3.0	3.0	2.1	2.1	2.8	2.8	3.8	3.8
2－a 片手手すり	2	2.5	3.5	3.0	3.0	2.5	2.5	3.5	3.5	3.0	3.0	3.5	3.5	4.0	4.0	2.5	2.5	2.0	2.0	3.0	3.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0
2－b 片手手すり，ひざ手	2	3.0	4.0	3.0	2.5	2.5	2.0	3.5	3.5	3.5	3.0	3.5	3.5	4.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	3.5	3.5	2.5	2.5	4.0	4.0	4.5	4.5
2－c 両手手すり	19	2.1	3.2	2.6	2.6	1.9	1.9	2.9	2.9	2.9	2.9	3.2	3.2	3.3	3.3	2.2	2.2	1.9	1.9	3.0	3.0	2.1	2.0	2.7	2.7	3.7	3.7
3 椅子から起立可能	12	2.3	3.1	2.7	2.6	2.2	2.2	2.8	2.9	2.7	2.7	3.4	3.4	3.5	3.5	1.9	1.9	1.4	1.3	2.8	2.8	1.9	2.0	2.6	2.6	3.3	3.3
4 歩行可能	17	1.9	2.9	2.2	2.1	1.6	1.5	2.8	2.8	2.5	2.5	3.0	2.9	3.0	3.0	1.8	1.7	1.2	1.2	2.5	2.5	1.9	1.9	2.2	2.3	2.9	3.0
4－a 独歩で5m以上	8	1.7	2.7	2.2	2.1	1.6	1.6	2.8	2.8	2.6	2.6	3.1	2.9	2.9	2.9	1.6	1.6	1.2	1.2	2.4	2.4	1.7	1.7	2.3	2.3	3.2	3.2
4－b 物に捉まれば歩ける	2	2.0	3.0	1.5	1.0	1.5	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	2.0	1.5	1.5	1.5	2.0	2.0	2.5	2.5	1.5	1.5	2.0	2.0
4－b－1 歩行器	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4－b－2 手すり	1	2.0	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0
4－b－3 手びき	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5 歩行不能、四つ這い可能	33	2.1	3.3	2.3	2.3	1.7	1.7	2.9	2.9	2.6	2.6	3.3	3.3	3.4	3.4	1.8	1.8	1.3	1.3	2.6	2.6	1.5	1.5	2.4	2.3	2.8	2.8
6 四つ這い不能ずり這い可	183	1.9	2.9	1.5	1.5	1.3	1.2	2.4	2.4	2.0	2.0	3.0	2.9	3.0	3.0	1.3	1.4	1.0	1.0	1.8	1.8	1.2	1.1	1.9	1.9	2.4	2.4
7 座位保持可能	161	1.6	2.5	1.1	1.1	1.0	1.0	1.7	1.6	1.6	1.5	2.6	2.6	2.7	2.6	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.3	1.0	1.0	1.5	1.5	2.0	2.0
8 座位保持不能	218	1.3	2.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.4	1.4	1.3	1.3	2.0	2.1	2.1	2.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0	1.3	1.3	1.7	1.7

表15-1　機能障害度別関節の拘縮変形平均スコア（1／2）

障害度区分	合計	頸		肩				肘				前腕				手			
		屈曲	伸展	屈曲R	屈曲L	伸展R	伸展L	屈曲R	屈曲L	伸展R	伸展L	回内R	回内L	回外R	回外L	背屈R	背屈L	掌屈R	掌屈L
総計	805	2.4	3.7	3.2	3.2	3.6	3.6	3.5	3.6	2.7	2.7	3.0	3.2	2.8	2.7	3.0	3.1	3.0	3.0
1 階段昇降可能	5	3.7	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
1－a 手の介助なし	4	3.7	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
1－b 手の膝おさえ	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2 階段昇降可能	28	3.5	3.9	3.8	3.8	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.7	3.8	3.8	3.7	3.9	3.9	3.9	3.8
2－a 片手手すり	2	3.0	3.5	3.5	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.5	4.0	3.5	3.5	4.0	4.0	4.0	4.0
2－b 片手手すり，ひざ手	2	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
2－c 両手手すり	19	3.4	3.9	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.9	3.9	3.7	3.8	3.8	3.8	3.9	3.9	3.8	3.8
3 椅子から起立可能	12	3.6	3.9	3.8	3.8	3.7	3.7	3.9	3.8	3.5	3.5	3.6	3.7	3.6	3.6	3.9	3.9	3.5	3.4
4 歩行可能	17	3.6	3.8	3.7	3.7	3.9	3.9	3.8	3.9	3.6	3.8	3.8	3.8	3.6	3.6	3.8	3.8	3.7	3.7
4－a 独歩で5m以上	8	3.8	3.9	3.7	3.8	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.6	3.6	3.9	3.9	3.8	3.8
4－b 物に捉まれば歩ける	2	2.5	4.0	3.5	3.5	4.0	4.0	3.5	3.5	2.5	4.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
4－b－1 歩行器	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4－b－2 手すり	1	2.0	4.0	3.0	3.0	4.0	4.0	3.0	3.0	1.0	4.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
4－b－3 手びき	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5 歩行不能、四つ這い可能	33	3.2	3.9	3.8	3.7	3.9	3.9	3.8	3.8	3.6	3.5	3.4	3.5	3.5	3.6	3.9	3.9	3.5	3.4
6 四つ這い不能ずり這い可	183	2.9	3.9	3.5	3.5	3.7	3.7	3.7	3.7	2.9	2.8	3.4	3.5	3.1	3.0	3.6	3.6	3.3	3.4
7 座位保持可能	161	2.1	3.7	3.3	3.2	3.7	3.6	3.5	3.5	2.5	2.6	3.0	3.2	2.4	2.3	2.9	3.0	2.9	2.8
8 座位保持不能	218	1.5	3.5	2.8	2.7	3.4	3.4	3.3	3.4	2.1	2.1	2.5	2.7	2.2	2.1	2.1	2.3	2.4	2.5

表15-2　機能障害度別関節の拘縮変形平均スコア（2／2）

障害度区分	合計	股				TFL短縮		膝				足背屈			
		屈曲R	屈曲L	伸展R	伸展L	R	L	屈曲R	屈曲L	伸展R	伸展L	膝屈R	膝屈L	膝伸R	膝伸L
総計	805	3.5	3.5	1.9	1.9	2.7	2.7	3.5	3.5	2.3	2.3	1.6	1.6	1.4	1.4
1 階段昇降可能	5	3.9	3.9	2.9	2.9	2.7	2.7	3.9	3.9	3.9	3.9	3.4	3.4	2.7	2.7
1－a 手の介助なし	4	3.9	3.9	2.9	2.9	2.7	2.7	3.9	3.9	3.9	3.9	3.2	3.2	2.4	2.4
1－b 手の膝おさえ	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2 階段昇降可能	28	3.9	3.9	3.0	2.9	2.5	2.5	3.9	3.9	3.3	3.4	2.5	2.6	2.3	2.4
2－a 片手手すり	2	4.0	4.0	4.0	2.5	3.0	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.5	4.0	3.0	3.5
2－b 片手手すり，ひざ手	2	4.0	4.0	2.5	2.5	2.5	2.5	4.0	4.0	4.0	4.0	2.5	2.0	2.0	2.0
2－c 両手手すり	19	3.8	3.8	2.8	2.8	2.4	2.4	3.8	3.8	3.2	3.3	2.4	2.5	2.1	2.2
3 椅子から起立可能	12	3.6	3.6	2.8	2.7	2.7	2.7	3.6	3.7	3.0	3.2	2.6	2.6	2.1	2.1
4 歩行可能	17	3.9	3.9	3.3	3.3	2.4	2.4	3.8	3.8	3.3	3.4	2.6	2.8	2.4	2.8
4－a 独歩で5m以上	8	3.9	3.9	3.6	3.6	2.5	2.5	3.7	3.7	3.4	3.4	2.7	2.9	2.8	2.9
4－b 物に捉まれば歩ける	2	4.0	4.0	2.5	2.5	2.0	2.0	4.0	4.0	2.5	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0
4－b－1 歩行器	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4－b－2 手すり	1	4.0	4.0	1.0	1.0	1.0	1.0	4.0	4.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
4－b－3 手びき	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5 歩行不能、四つ這い可能	33	3.7	3.7	2.2	2.3	2.7	2.7	3.9	3.9	2.4	2.4	2.1	2.1	1.9	1.9
6 四つ這い不能ずり這い可	183	3.6	3.6	1.8	1.8	2.8	2.1	3.5	3.6	2.4	2.4	1.7	1.7	1.4	1.4
7 座位保持可能	161	3.4	3.4	1.7	1.7	1.9	2.1	3.3	3.3	2.2	2.1	1.1	1.2	1.1	1.1
8 座位保持不能	218	3.3	3.3	1.4	1.4	2.2	2.2	3.5	3.5	1.8	1.8	1.0	1.0	1.1	1.0

表16　治療内容別年齢階級別患者数

治療内容	合計	0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5−9	10−14	15−19	20−24	25−29	30−34	35歳以上
総数	805	0	1	0	0	0	28	225	213	117	44	11	166
1000. 薬物療法	838	0	0	0	0	0	29	264	253	131	51	3	107
1010. ヌクレオタイド	43	0	0	0	0	0	1	12	8	13	3	0	6
1011. レバドシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1012. アデニン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1013. ATP	43	0	0	0	0	0	1	12	8	13	3	0	6
1014. イノシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1015. UTP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1020. ホルモン剤	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
1021. 蛋白同化ホルモン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1022. 成長ホルモン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1023. 副腎ホルモン	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
1030. アミノ酸製剤	9	0	0	0	0	0	0	0	1	5	2	1	0
1031. ロイシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1032. グリシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1040. プロテアーゼ抑制剤	36	0	0	0	0	0	9	22	5	0	0	0	0
1041. ロイペプシン	5	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0
1042. ベスタチン	28	0	0	0	0	0	7	19	2	0	0	0	0
1043. ホルフェニシノル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1050. カルシウム拮抗剤	45	0	0	0	0	0	1	22	15	5	0	0	2
1060. CoenzymeQ	176	0	0	0	0	0	2	41	55	37	21	1	19
1070. ビタミン剤	215	0	0	0	0	0	8	81	65	32	5	0	24
1071. B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1072. E	47	0	0	0	0	0	1	13	15	10	1	0	7
1073. 混合ビタミン剤	14	0	0	0	0	0	0	3	7	1	0	0	3
1080. 抗セロトニン剤	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1090. アロプリノール	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100. デスヘリオキサミン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1110. ジギタリス	58	0	0	0	0	0	0	2	18	16	6	0	16
1120. 利尿剤	46	0	0	0	0	0	0	3	15	5	8	1	14
1130. カテコールアミン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1140. 末梢血管拡張剤	141	0	0	0	0	0	8	72	44	3	1	0	13
1150. 抗生物質製剤	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1160. 化学療法剤	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1170. その他	45	0	0	0	0	0	0	4	20	6	4	0	11
1171. 鎮咳きょ去痰剤	10	0	0	0	0	0	0	0	5	1	1	0	3
1172. 消炎鎮痛剤	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

表16　治療内容別年齢階級別患者数(2)

治療内容	合計	0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5−9	10−14	15−19	20−24	25−29	30−34	35歳以上
総数	805	0	1	0	0	0	28	225	213	117	44	11	166
2000. 理学療法・作業療法	374	0	0	0	0	0	15	135	94	49	14	1	66
2010. 理学療法	309	0	0	0	0	0	14	127	76	28	9	1	54
2011. 運動療法	138	0	0	0	0	0	8	74	25	12	6	0	13
2012. 装具歩行	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
2013. 体幹装具	6	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	2
2020. 肺理学療法	33	0	0	0	0	0	1	3	10	7	2	0	10
2030. その他	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2040. 作業療法	25	0	0	0	0	0	0	2	5	13	3	0	2
3000. 整形外科療法	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3010. アキレス腱延長術	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3020. 腸脛靭帯切離術	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3030. その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4000. 人工臓器	67	0	0	0	0	0	0	0	17	13	14	4	19
4010. 人工呼吸器	77	0	0	0	0	0	0	0	18	18	14	5	22
4011. 体外式	49	0	0	0	0	0	0	0	14	11	7	3	14
4012. IPPB	6	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3
4013. 気管切開	22	0	0	0	0	0	0	0	1	7	7	2	5
4020. ペースメーカー	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4030. 人工透析	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4040. 血漿交換	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4050. その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5000. 吸入療法	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
5010. 酸素吸入	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
5020. 高圧酸素療法	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5030. 超音波ネブライザー	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5040. その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6000. 食事療法	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
6010. 高蛋白食	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6020. 栄養補給	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
6021. IVH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6022. 経腸栄養	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6030. その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7000. 遺伝相談	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8000. 心理療法	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Ⅰ. 遺伝・疫学

B. 遺伝相談・遺伝子診断

プロジェクト研究Ⅰ　遺伝・疫学
Ⅰ-B　遺伝相談・遺伝子診断

Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝相談倫理についての検討

班　　員　福　山　幸　夫
東京女子医科大学小児科

共同研究者　白　井　泰　子[1]，大　澤　真木子[2]，鈴　木　義　之[3]
金　沢　　一[4]，三　木　哲　郎[5]

[1] 国立精神・神経センター精神保健研究所　[2] 東京女子医科大学小児科　[3] 東京都臨床医学総合研究所
[4] 国立療養所川棚病院神経内科　[5] 大阪大学医学部第4内科

要　旨

より良い遺伝相談システムを確立してゆくための種々の倫理的問題点を明確化するために，本研究班班員及び顧問の所属する57施設（延べ171名）を対象にアンケート調査を実施し，40施設（延べ79名）から回答を得た（回収率は70.2％）。患者の遺伝子診断・保因者診断・出生前診断の実施にあたっての具体的配慮について尋ねたところ，全回答者の4割前後が『倫理委員会がない』と回答していた。こうした状況の中で，より良い遺伝相談システムを作り上げてゆくためには，日本人類遺伝学会の『臨床遺伝学認定医制度』に関する会告等を参考にしつつ，本研究班として遺伝相談カウンセラーのプロフェッショナル・コードについて検討し，後進の育成を図る必要があろう。

目　的

本プロジェクトは，平成元年度には患児家族への遺伝相談サービスのための教育材料として小冊子『筋ジストロフィー症のやさしい遺伝相談―患者・家族のために―』を作成した。また平成2年度には本研究班の目的の一つとしてかかげられている遺伝相談ネットワークの確立について検討すべく，遺伝相談の現状と今後解決すべき問題点の把握のためにアンケート調査を実施し，これに基づいていくつかの問題点の指摘を行った。そこで本年度は，より良い遺伝相談システムを確立してゆくための種々の倫理的問題点を明確化するために再びアンケート調査を実施した。

方　法

（1）調査の概要

本研究班班員及び顧問の所属する57施設（延べ171名）を対象に，表1に示す内容のアンケート調査を実施した。調査の実施に際しては，自己記入式の調査用紙に返信用封筒を添えて関係者に送付した。調査実施期間は，1991年10月。40施設（延べ79名）から回答を得た（回収率は70.2％）。

表1　アンケート調査の質問内容

Ⅰ．次項Q1-4は5段階尺度（eg.，5．極めて必要　4．どちらかと言えば必要，3．どちらとも言えない，2．どちらかといえば不必要，1．全く不必要）

Q1．患者の遺伝子診断，保因者診断，出生前診断の実施決定に際し，被相談者に下記項目を説明する必要性：検査の性質と精度，診断のメリット・デメリット，母体や胎児への影響，流産の危険性，検査結果判明時に本人及び家族が直面する意思決定の性質。

Q2．カウンセラーの任務として本人またはその家族

の次の行為を援助することの重要性：

a．診断・疾患の現れる過程，疾患の管理等の医学的事実を理解する

b．遺伝がその疾患に寄与する仕方や特定の親族に再発する可能性につき判断する

c．当該疾患の再発の可能性に対処のために，どの様な選択肢があるかを理解する

d．再発の可能性や家族目標を考慮し，適切と考える行動を選択する

e．自らの決定に即した行動をとる

f．患者の疾患を受容し，最善のかたちで対処する

g．当該疾患の再発の可能性に対し最も適切なかたちで対処する

Q3．遺伝相談の目標としての次項の重要性：

a．遺伝病あるいは異常の予防

b．患者や家族の不安や罪悪感の軽減

c．人口集団における遺伝病の保因者数を減少させる

d．遺伝的健康水準を高め，人口集団の活性化を図る

e．問題を抱えている個人や夫婦（婚約者）が当該の遺伝的問題を直視し，これに対処できるよう援助する

f．個人や夫婦が抱いている“自分達の子を持ちたいという願望”を到達するよう援助する

Q4．遺伝相談カウンセラーとして次項の行動を取ることの重要性：

a．種々の問題に関わる意思決定は当事者自身がすべきで，この点は力になれないと明言

b．当事者自身の決定に対しては可及的に援助する用意のあることを知らせる

c．同じ立場に立たされた他の人達の行動につき話す

d．カウンセラー自身が同じ立場だったらどうするかを話す

e．当事者のなすべき行為の具体的助言を与える

II．次項Q5～8は，適当と思うものを尋ねた。

Q5．Duchenne 型筋ジストロフィー児の母が，同じ病児をもつ可能性のある他の親族に，診断及び関連遺伝情報を開示する事の必要性を説得しても拒んだ場合のカウンセラーの対処法

1．被相談者の意向を尊重し，情報を伝えない

2．説得しても同意が得られない場合は，被相談者の意向を尊重し，情報を伝えない

3．やむをえず被相談者の意向に反しても，当該情報を関係者に知らせる

4．被相談者の意向に拘らず，関係者のリスクに直接関連する情報に限り被相談者の親族に知らせる

5．関係者（他の親族）が希望する場合のみ当該情報を知らせる

6．診療記録の一部として情報を被相談者の紹介医に送り，同氏に任せる

Q6．保因者の可能性のある女性に対する保因者検索の必要性の有無と方法：本人または家族に

a．特に理由は説明せず必要な検査として採血

b．説明し，積極的に検査を勧める

c．説明し，希望があれば検査

Q7．同法実施の可能性についての説明の必要性

Q8．出生前診断に関する説明の適当な時期：

a．患者の診断過程

b．患者の診断を説明した直後

c．患者本人の診断を説明した後，適応期に入り，次妊娠で病児出生の可能性を尋ねてきた時

e．母の次妊娠時

保因姉妹が

a．小児期，b．思春期頃，c．20歳過ぎ頃，

d．結婚話が出てくる頃，e．婚約時，

f．結婚後妊娠前，g．妊娠中

説明相手（母の場合：）

本人，夫，本人と夫，その他；

（姉妹の場合：）

母，父，本人，姉妹，兄弟，婚約者，夫

その他；

III．Q9．患者の遺伝子診断，保因者診断，出生前診断（絨毛，羊水）実施の際の具体的配慮の有無

IV．Q10．人工妊娠中絶の事由に（必ずしも法的に認められていない）関する賛否を5段階尺度（非常に賛成，どちらかといえば賛成，どちらともいえない，どちらかといえば反対，全く反対）で尋ねた。

a．母体の生命保護以外の人工妊娠中絶を禁止

b．経済的理由，c．胎児の重篤な異常，d．本人又は配偶者の遺伝性疾患，e．本人又は配偶者の四親等以内の血族関係者の遺伝的疾患を理由とする人工妊娠中絶を容認

V．Q11．遺伝相談の有無，年数，件数

結　果

(1)回答者の属性

79名の回答者の性別は，男性62名（78.5%），女性13名（16.5%），無答4名（5.1%）であった（男女の比率が著しく偏っているため，これ以降の調査結果の分析は男女を混みにして行うこととした)。

回答者の遺伝相談経験の有無，経験年数，相談内容等は表2に示す通りである。今回の調査の回答者のうち，遺伝相談の経験有りとする者は43%で，これらの回答者の経験年数は10年未満の者が最も多くなっている。また，相談内容別にみた相談件数では，神経筋疾患及びその他の疾患共に10件未満の者が最も多くなっている。

(2)患者の遺伝子診断・保因者診断・出生前診断を行うか否かを決める際に，クライエントに説明すべき事項

患者の遺伝子相談・保因者診断・出生前診断を行うか否かを決める際に，被相談者（クライエント）に対してどの様な事項を説明することが必要かを尋ねたところ，表3に示す結果を得た。表示した7項目に関しては，クライエントに説明する必要有とした者が，いずれの事項についても8～9割にのぼっている。さらにこの回答を遺伝相談の経験の有無で比較したところ，次のような結果を得た：<相談経験有り>群は，患者の遺伝子診断・保因者診断・出生前診断のいずれに関しても，『①検査の性質』をクライエントに説明する必要性について<相談経験無し>群よりも有意に（$p<0.05$）強く認識していることが示された。また<相談経験有り>群は，『患者の遺伝子診断　②検査の精

表2　回答者の遺伝相談経験

(a)　遺伝相談経験の有無

相談経験＼性別	男性	女性	無答	Total
経験有り	30 (48.4%)	4 (30.8%)	—	34 (43.0%)
経験無し	30 (48.4%)	9 (69.2%)	—	39 (49.4%)
無　答	2 (3.2%)	0	4 (100%)	6 (7.6%)
	62 (100%)	13 (100%)	4 (100%)	79 (100%)

(b)　遺伝相談の経験年数

～10年未満	17 (51.5%)
10年以上～20年未満	11 (33.3%)
20年以上	5 (15.2%)
	33 (100 %)

(c)　遺伝相談の件数

件数＼相談内容	神経筋疾患	その他の疾患	Total
～10件	18(58.1%)	8(53.3%)	26 (56.6%)
11件～20件	8(25.8%)	5(33.3%)	13 (28.3%)
30件以上	5(16.1%)	2(13.3%)	7 (15.2%)
	31(100 %)	15(100 %)	46 (100%)

表3　患者の遺伝子診断・保因者診断・出生前診断を行うか否かを決める際に，クライエントに説明すべき事項

	患者の遺伝子診断	保因者の遺伝子診断	出生前診断
①検査の性質	66 (88.0%)[ab]	71 (93.4%)	65 (87.8%)
②検査の精度	68 (90.7%)	73 (96.1%)	68 (94.6%)
③診断のメリット・ディメリット	60 (83.4%)	69 (93.3%)	65 (90.3%)
④母体への影響	——	——	71 (97.3%)
⑤胎児への影響	——	——	70 (95.9%)
⑥流産の危険性	——	——	69 (95.9%)
⑦検査結果が判明した時点に本人及び家族が直面する意志決定の性質	53 (80.3%)	60 (93.8%)	61 (92.4%)

[a] 各事項について，“クライエント”に説明する必要ありと回答した者の割合を表示。
[b] 各項目についての回答者数にばらつきがあるため，項目ごとに母数は異なっている。

表4　患者の遺伝子診断，保因者診断，出生前診断を実施するにあたっての配慮

診断 / 倫理委員会に	遺伝子診断		出生前診断	
	患者	保因者	繊毛	羊水
①申請し許可を得た	4（5.1%）	4（5.1%）	3（3.8%）	4（5.1%）
②申請中	3（3.8%）	1（1.3%）	0（—）	0（—）
③申請予定	3（3.8%）	4（5.1%）	3（3.8%）	3（3.8%）
④申請の対象外	13（16.5%）	12（15.2%）	8（10.1%）	7（8.9%）
⑤倫理委員会がない	34（43.0%）	34（43.0%）	30（38.0%）	30（38.0%）
⑥無答	25（31.8%）	24（30.4%）	35（44.3%）	35（44.3%）

度』に関しても，その説明の必要性を＜相談経験無し＞群よりも有意に（$p<0.05$）強く認識していることが明らかにされた。

（3）患者の遺伝子診断・保因者診断・出生前診断を実施するにあたっての配慮

各々の回答者の所属する施設において，患者の遺伝子診断・保因者診断・出生前診断の実施にあたっての具体的配慮について尋ねたところ表4に示す結果を得た。表からも明らかなように，これらの診断の実施にあたり『倫理委員会に申請し許可を得た』という者は，わずか5％にすぎない。これに『申請中・申請予定』を含めても，全体の1割をわずかに超えるに留まっている。さらに又，これらの診断の実施について倫理委員会の承認を得ることの必要性を論ずる以前の問題として，全回答者の4割前後が『倫理委員会がない』と回答している点に留意すべきであろう。

考　察

今回のアンケート調査では，全回答者の4割前後が『倫理委員会がない』と回答していた。こうした状況の中で，より良い遺伝相談システムを作り上げてゆくためには，日本人類遺伝学会の『臨床遺伝学認定医制度』に関する会告[3]等を参考にしつつ，本研究班として遺伝相談カウンセラーのプロフェッショナル・コードについて検討し，後進の育成を図る必要があろう。

文　献

1）福山幸夫：遺伝相談の現状把握と今後解決すべき課題の検討．筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究　平成2年度研究報告書，11-14，1991

2）大澤真木子，斉藤加代子ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症の遺伝相談．脳神経，43(5)，429-441，1991

3）日本人類遺伝学会・会告：臨床遺伝学認定医の到達目標について．人類遺伝学雑誌，36(1)，1-10，1991

本院における遺伝相談の現況

班　員　三　宮　邦　裕
国立療養所西別府病院神経内科

共同研究者　三吉野　産　治[1)]，平　松　良　二[2)]，安　部　真佐子[2)]
鈴　木　友　和[2)]，和　氣　徳　夫[3)]

[1)] 国立療養所西別府病院・院長　[2)] 九州大学生体防御医学研究所附属病院・体質代謝内科　[3)] 同上・産科婦人科

要　旨

最近，本院において経験した遺伝相談の2事例につき，近接する施設との連携に関することをも含め報告した。

事例1は，兄が筋ジス（D型）の診断で本院入院中であり，母親の第3子妊娠のため相談を受けたが，兄のPCRによる検索は正常であり，胎児は女児であることが確認され妊娠継続し，無事出産に至った。

事例2は，兄が筋ジス（D型）で外来通院治療中であり，母親が第2子を妊娠し相談を受けた。兄のPCR検索ではExon 51の欠失が認められたが，胎児では異常なく，母親のcarrierの可能性もなかったため，妊娠継続となった。

今回の2事例は幸いにも妊娠継続可能な例であったが，今後さらに詳細な遺伝相談につき，近接施設（九州大学生体防御医学研究所）との連携で，蓄積されたPCRのデータ等をもとに対処していきたいと考える。

目　的

Duchenne型筋ジストロフィー（以下DMD）は，ジストロフィン遺伝子の異常によることが明らかにされ，サザンブロット法・制限酵素断片長多型（Restriction Fragment Length Polymorphisms：RFLP）による連鎖解析，さらに，Polymerase chain reaction（PCR）法などにより遺伝子診断が行われるようになっている。また最近ではこれらの方法を用いて，出生前診断も行われるようになっており，本研究班でも全国的遺伝相談ネットワークの可能性の検討や遺伝相談の今後解決すべき課題の検討がなされているところである[1)2)]。

我々の西別府病院でも，最近になり近接する九州大学生体防御医学研究所附属病院，体質代謝内科および産科婦人科との連携が取れるようになり，遺伝子診断あるいは遺伝相談の実施が出来るようになった。

そこで，最近我々の施設にて経験した遺伝相談の2事例につき，報告する。

我々の施設と九州大学生体防御医学研究所（以下，生医研と略す）との位置関係についてであるが（図1），距離400-500 mと非常に近いところであり，密な連絡が取れるようになっている。

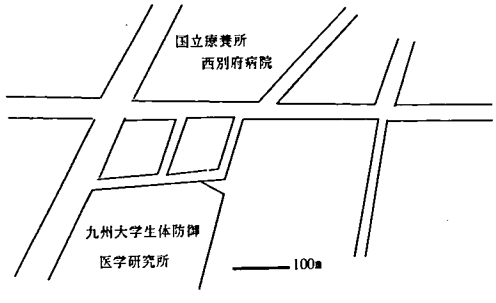


図1　国立療養所西別府病院と九州大学生体防御医学研究所との位置関係

事 例 1

最初の事例であるが，患児は８歳で，DMDの診断のもとに当院入院中であった。平成３年２月，母親が第３子を妊娠し相談を受けた（図２）。家族歴に問題なく，発端児の PCR でも，欠失の存在は認められていなかった。そこで生医研・産科婦人科に相談したが，羊水診断で女児であることが確認され，妊娠継続となった（なおその後，無事女児を出産した）。

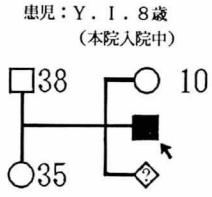


図２　事例１の家系図

事 例 2

第２番目の事例であるが，患児は２歳男児で，DMD の診断のもとに外来通院し経過観察中であった。平成３年５月，母親が第２子を妊娠し，相談を受けた。患児の家系図は図３の如くで，家族歴を詳細に取ってみると，父方祖母と母方祖父がいとこ同士であり，consanguinity が確認された。図４は患児の外来 follow 中に，東京女子医科大学小児科，大沢先生・斉藤先生に実施して戴いた家系分析の結果である。患児では，図４の如く，Exon 51 の欠失が認められたが，他の親族には異常は認められなかった。また，母に関して，患児で欠失していた Exon 51 は２コピーあると考えられ，さらに，母方祖母についても全てのバンドが２コピー存在しており，発端患児は germinal mosaic の可能性はあるものの，母親は保因者ではないことが推定されていた。

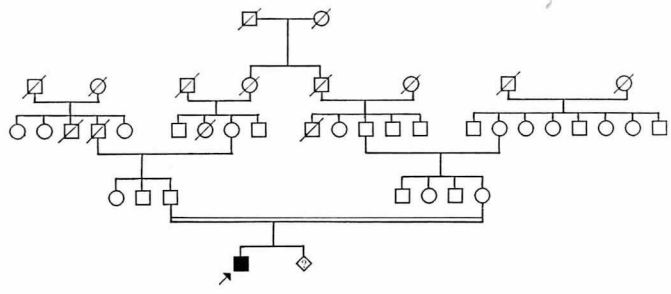


表３　事例２の家系図

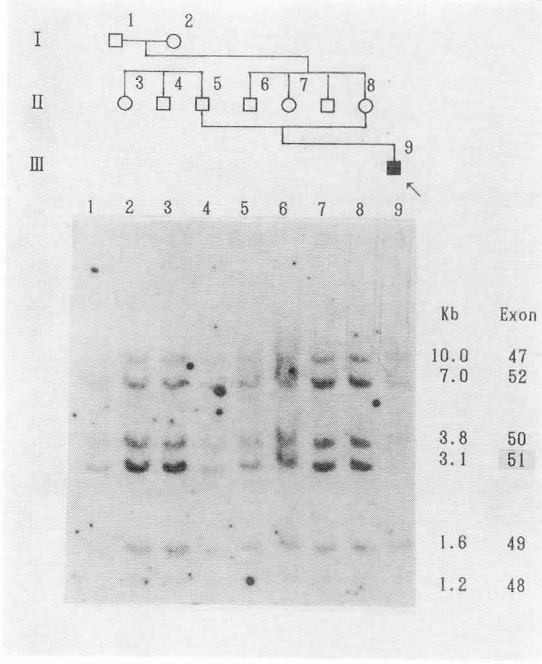


図４　事例２の家系分析結果

さて，今回の本事例での遺伝相談の検討であるが，まず，遺伝相談を受けた後，母親の強い希望で，事例１の時と同様，生医研・産科婦人科に相談した。本事例では，先述の如く，あらかじめ兄の Exon 51 の欠失が確認されており，妊娠18週と１日の時点で，羊水細胞を採取し，その細胞を培養した（表）。次に，培地に増殖

表：羊水細胞培養による PCR 実施方法

1．羊水細胞採取
2．細胞培養
3．付着細胞を buffer を加え溶解し，さらに熱処理を行い DNA サンプルとして調製
4．PCR 実施（条件）

examined Exon No.	4,17,19,45,48,51	3,13,43,50
≪mixture≫		
・DNA sample	Amniotic Fluid Cell	
・Taq DNA polymerase	5 U	5 U
・Total volume	50 μl	50 μl
≪condition≫		
・Temperature		
①denaturing	94° C, 30 sec	94° C, 30 sec
②annealing	53° C, 30 sec	65° C, 4 min
③elongation	65° C, 4 min	
・Cycle	33	35

5．agarose 電気泳動：2％ agarose gel
100 V/12 cm, 1 hr

した細胞に，界面活性剤の Tween 20, Proteinase K などを含む buffer を加え剝離溶解し，さらに熱処理し DNA サンプルとして調製した。実施した PCR 条件は表の如くで，検索した Exon にもとづき，Chamberlain 法[3]と Beggs 法[4]とで行った。

Exon 51 についての結果では，兄において確認されたと同じ欠失の存在は，培養羊水中細胞では認められず（図5），また同様に行った他の Exon 4,17,19,45,48 (Chamberlain), 3, 13, 43,50 (Beggs) においても欠失の存在は認められなかった。

以上の結果および先に東京女子医大にて実施していただいていた家系分析の結果などより，胎児の欠失はないものと判断し，そのまま妊娠継続となった。

考察・まとめ

以上，最近当院で経験した遺伝相談の2事例について報告した。今回は，幸いにも妊娠継続ができると考えられた事例であったが，出生後も経過観察が必要と思われる。

これまでなかなか実施できなかった詳細な遺伝相談について，近接する九州大学生体防御医学研究所の体質代謝内科および産科婦人科との連携により実施が可能となったが，今後は，これまで蓄積された患児の PCR 法によるデータ

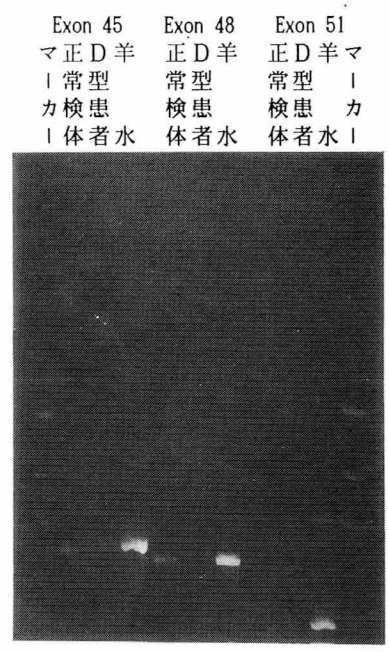


図5 培養した羊水中細胞の PCR 法による遺伝子診断（Exon 45,48,51）

などを参考にし，これからの遺伝相談に対処して行きたいと考えている。

謝辞：事例2の家系分析を実施していただいた東京女子医科大学小児科，大澤真木子先生・斉藤加代子先生に深謝いたします。

文　献

1）近藤喜代太郎，南　良二ら：筋ジストロフィーの遺伝相談ネットワークの可能性について．厚生省精神・神経疾患研究委託費，筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究，平成2年度研究報告書：5，1991.

2）福山幸夫，三吉野産治ら：遺伝相談の現状把握と今後解決すべき課題の検討．厚生省精神・神経疾患研究委託費，筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究，平成2年度研究報告書：11，1991.

3）Chamberlain JS, Gibbs RA, et al : Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res **16** : 1931, 1988.

4）Beggs AH, Koenig M, et al : Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum genet **86** : 45, 1990.

進行性筋ジストロフィー患者の遺伝子解析においてジャンクションフラグメントを高率に検出するための方法

班　　員　加　藤　真　吾
慶應義塾大学医学部微生物学教室

共同研究者　平　石　佳　之[1)]，高　野　利　也[1)]，石　原　博　幸[2)]
[1)] 慶應義塾大学医学部微生物学教室　[2)] 国立療養所東埼玉病院

要　旨

進行性筋ジストロフィー患者のジストロフィン遺伝子の重複の判定や，保因者診断をサザンブロット法で行なうためには，非常に定量性の高い技術が必要とされる。一方，遺伝子の重複や欠失に伴うジャンクションフラグメントが得られれば，これらの判定を容易に行なうことができる。しかしこのフラグメントが現われる例は多くない。そこでジャンクションフラグメントの出現率を高めるために，制限酵素で切断したDNAを一本鎖に変換した後に電気泳動を行なうことによって高分子量DNAの分離能を高める方法（一本鎖DNA電気泳動法）を開発し，これとrare cutter制限酵素を組み合わせたサザンブロット解析を行った。その結果，従来の方法ではジャンクションフラグメントが検出できなかった症例でそれを検出することができた。この方法は重複例の検出や保因者診断に有効であるだけでなく，イントロン内の異常やDNA反転の検出にも利用できると考えられる。

目　的

進行性筋ジストロフィー患者のDNAをジストロフィンcDNAを用いたサザンブロット法で解析すると，遺伝子の部分欠失や部分重複に伴って，ジャンクションフラグメントが現われることがある。この場合のジャンクションフラグメントとは，欠失あるいは重複領域の境界を跨ぐ制限酵素切断片の内部にエクソンを含むときに現われるバンドのことで，正常なバンドとは長さの異なる，新しいバンドとして観察できる。したがってジャンクションフラグメントは重複の判定や保因者診断に非常に有効であると考えられる。しかしジャンクションフラグメントが現われる例はむしろ稀である。そこで低頻度切断制限酵素（rare cutter）と新たに開発した一本鎖DNA電気泳動法を用い，ジャンクションフラグメントを高率に検出できるかを検討した。

方　法

昨年度の研究においてジャンクションフラグメントが検出されなかった2名のDMD患者を対象とし，末梢ヘパリン血から通常の方法でDNAを抽出した。DNAを制限酵素で切断し，グリオキサール処理[1)]によって一本鎖DNAにした後，0.4%アガロースゲル（FMC社製 Fast Lane Agarose）で電気泳動した。そしてジストロフィンcDNA8をプローブにしてサザンブロット分析を行なった。

結　果

サザンブロット解析においてジャンクションフラグメントをより高率に検出するためには，その成因から考えて，ヒトゲノムをより低頻度で切断する制限酵素を用いた方がよいと考えら

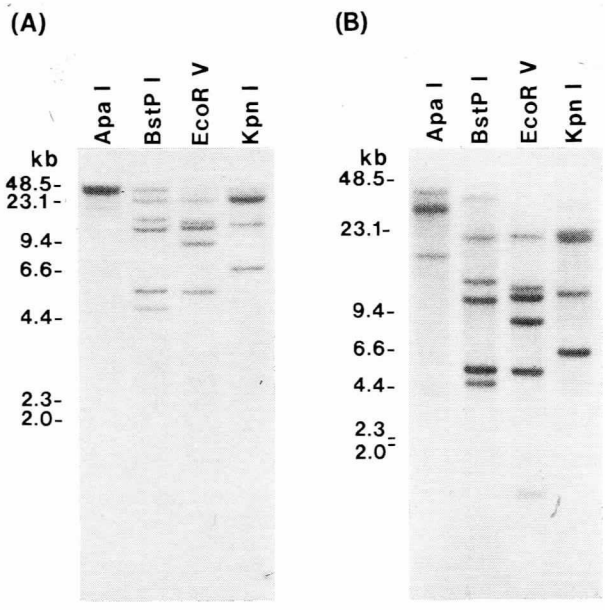


図1　従来の電気泳動法 (A) と一本鎖 DNA 電気泳動法 (B) を用いたサザンブロット解析の比較。正常人の抹消血 DNA を4種の rare culture 制限酵素で切断した。プローブはジストロフィン cDNA8 を用いた。

れる。そこで市販の制限酵素から，比較的安価で，部分切断の原因となる CG メチル化の影響を受けない rare cutter である Apa I, BstP I, EcoR V, Kpn I の4種を選び，ジストロフィン遺伝子のサザンブロット解析に用いることにした。しかし通常の電気泳動法は 20 kb 以上の DNA の分離が困難なので，これらの rare cutter による切断で生じる高分子の DNA の

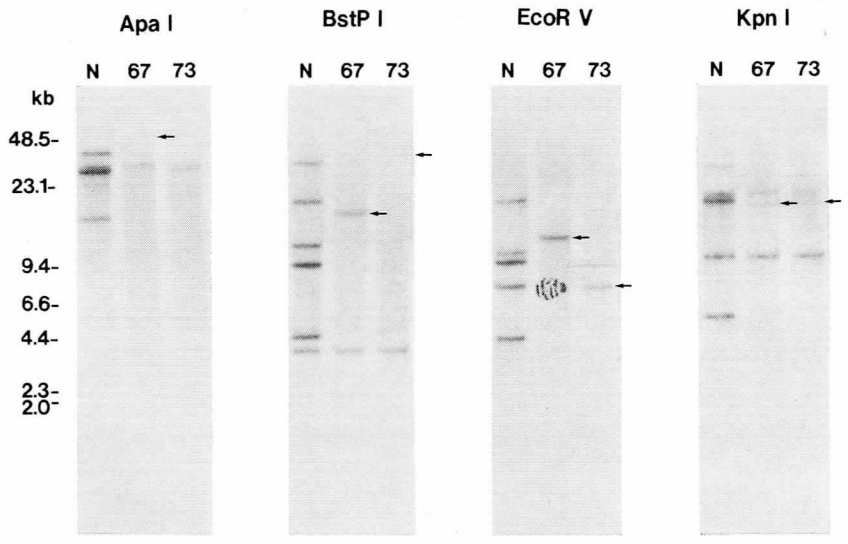


図2　Hind III 切断ではジャンクションフラグメントが出現しなかった2社の DMD 患者 DNA の一本鎖 DNA 電気泳動法と rare cutter 制限酵素を用いたサザンブロット解析。Nは正常人 DNA。プローブはジストロフィン cDNA8 を用いた。ジャンクションフラグメントと考えられるバンドを矢印で示した。

解析には適さないであろう。そこでより高分子DNAの分離能に優れていて，かつ簡便な新しい電気泳動法の開発を行なった。

一本鎖DNA電気泳動法と名付けるこの方法は，DNAを制限酵素で切断後，グリオキサール処理によって二次構造を形成しない一本鎖DNAに変性してから電気泳動を行なうことと，ゲル強度の高いFMC社製のFast Lane Agaroseを用いて作成した0.4%の低濃度ゲルを使用することからなる。これによって約100 kbまでのDNAの分離が可能となった。通常の電気泳動法と一本鎖DNA電気泳動法を用いて正常人のジストロフィン遺伝子を解析した結果を図1で比較する。一本鎖DNA電気泳動法の方が高分子量DNAの分離能が優れており，通常の方法では一本に見えるバンドも二本に分離しているのが分かる。

この一本鎖DNA電気泳動法を用いたサザンブロット法によって実際にジャンクションフラグメントの検出率が高まるかを調べるために，昨年度の研究においてHind IIIによる切断ではジャンクションフラグメントが生じなかった2名のDMD患者について，先に挙げた4種の制限酵素を用いてジャンクションフラグメントの検出を試みた。図2にその結果を示す。プローブに用いたcDNA8の領域内にこれらの2症例はジストロフィン遺伝子の部分欠失があるので，多くのバンドが欠落しているが，正常人にはなかった新しいバンドが症例67では4種の制限酵素のすべて，症例73では4種のうち3種で認められた。複数の制限酵素で同じ領域にRFLPsが観察される確率は低いので，これらのバンドはジャンクションフラグメントと考えられる。

考　察

進行性筋ジストロフィー患者のDNAのサザンブロット解析で稀に観察されるジャンクションフラグメントは保因者診断に非常に有効なマーカーである。これの出現率が低いのは，DNAの切断にヒトゲノムを比較的高頻度で切断するHind IIIが主に使用されているためであると考えられる。本研究では，rare cutter制限酵素と，新たに開発した，高分子量DNAの分解能に優れた一本鎖DNA電気泳動法を組み合わせることにより，2例のDMD患者においてジャンクションフラグメントがより検出され易いことを示した。今後さらに症例数を増やし，実際の保因者診断に応用することによって，この方法の有効性を検討していきたい。

最近，患者診断にmultiplex PCR[3)4)]が応用され始め，また保因者診断にもPCRを基本とした多型分析[5)6)]が利用されるようになり，筋ジストロフィーの遺伝子診断はすべて，サザンブロット解析よりも簡単なPCRで行えるのでないかと議論されている[2)]。しかしPCRは現在の段階では重複例を検出することができない。さらに50%近くにも及ぶ欠失を伴わない患者の近縁者の保因者診断を，ジストロフィン遺伝子付近の多型分析だけで行なうのは非常に危険である。今回報告した方法は，ジストロフィン遺伝子の欠失あるいは重複と一緒にジャンクションフラグメントが検出できるという点で，これらの方法より優れていると考えられる。

今回の方法はrare cutterを用いているため，イントロン部分をより広く含むDNAをバンドとして検出することができる。したがってこの方法はジャンクションフラグメントの検出だけでなく，ジストロフィン遺伝子の異常として従来予想されていながらまだ発見されていない，イントロン内における欠失や重複によるDNA異常や，DNAの反転の検出にも役立つと考えられる。

まとめ

高分子量DNAの分離能に優れた一本鎖DNA電気泳動法を開発し，これとrare cutter制限酵素を組み合わせることにより，ジストロフィン遺伝子の欠失や重複に伴って現われるジャンクションフラグメントの検出率を高めることができた。この方法は重複例の検出や保因者診断に有効であると考えられる。

文　献

1) McMaster GK, Carmichael GG : Analysis of single and double-stranded nucleic acids on poly-

acrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc Natl Acad Sci **74** : 4835, 1977.

2) Beggs AH, Koenig M et al. : Detection of 98% of DND/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet **86** : 45, 1990.

3) Chamberlain JS, Gibbs RA et al. : Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. in PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications, ed. by Innis MA, Gelfand DH et al., Academic Press, New York London, 1990, p. 272.

4) Roberts RG, Cole CG et al. : Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Nucleic acids Res **17** : 811, 1989.

5) Beggs AH, Kunkel LM : A polymorphic CACA repeat in the 3'untranslated region of dystrophin. Nucleic Acids Res **18** : 1931, 1990.

PCR-RFLP 法による Duchenne 型筋ジストロフィー症の遺伝子診断

班　員　金　沢　　一
国立療養所川棚病院
共同研究者　末　永　章　人[1)]，藤　下　　敏[1)]
渋　谷　統　寿[1)]，新　川　詔　夫[2)]
[1)] 国立療養所川棚病院　[2)] 長崎大学医学部原研遺伝

要　旨

我々は3種類の Primer を用いた PCR-RFLP 法が DMD または BMD 家系の74%で診断可能でありスクリーニング検査として有用であることを昨年報告した[1)]。今回は新たに2種類の Primer を加え5種類の Primer で解析することの有用性を検討した。Primer は pERT 87-15/XmnI[2)]，pERT 87-8/Taq I[2)]，3'CA[3)] に加え pERT87-15/BamHI[2)]，pERT 84/Mae III[4)] の5種類を使用した。それぞれの Primer のヘテロ率は pERT 87-15/XmnI (0.51)，pERT87-8/TaqI (0.35)，3'CA(0.36)，pERT87-15/BamHI (0.38)，pERT84/MaeIII (0.50) であった。5種類の Primer により88%の人が少なくとも1種類でヘテロ接合を示し，保因者診断を行った52人中43人（83%）で診断可能であった。PCR-RFLP 法は DMD または BMD の遺伝子診断のスクリーニングとして有用である。

目　的

DMD や BMD の遺伝子診断には，欠失の検索と遺伝子多型の検索の2つの方法がある。欠失は約60%の患者に認められるが，保因者診断を行うにはさらに遺伝子量解析を必要とする。遺伝子多型による遺伝子診断では有効な多型を増やすことで診断率を上げることが可能である。我々は PCR-RFLP 法により5種類の Primer を使用しその有用性を検討した。

対象・方法

対象はお互いに血縁関係のない DMD または BMD 家系の母親または保因者女性69人である。血液より抽出した DNA を pERT87-15/XmnI, pERT87-8/TaqI, 3'CA の3種類の Primer を用い PCR 法により増幅したのち制限酵素処理を行い（3'CA は除く），8%アクリルアミドゲルまたは2%アガロースゲルで電気泳動し得られたバンドを ethidium bromide で染色後観察した (Step I)。3種類すべての Primer でホモ接合した場合はさらに Step II として pERT87-15/BamHI, pERT84/MaeIII の2種類の Primer を用いて解析を行った。

結　果

PCR-RFLP 法で得られた Allele の頻度は，pERT87-15/XmnI で 730 bp を示すものが55%でありヘテロ接合率（PIC）は51%であった（表1）。pERT87-8/TaqI は65%と35%で PIC は35%，3'CA は18%と82%で PIC は36%，pERT87-15/BamHI は29%と71%で PIC は38%，pERT84/MaeIII は29%と71%で PIC は50%であった。遺伝子多型による遺伝子診断では母親あるいは保因者女性がヘテロ接合体を示すことが必要であるが，pERT87-15/XmnI,

表1　Allele frequency

Primer	Enzyme	Allele		PIC	Number of Chr.
		Size(bp)	Freq.		
pERT87-15	Xmn I	730	0.55	0.51	134
		520+210	0.45		
pERT87-8	Taq I	145	0.65	0.35	130
		74+ 71	0.35		
3'CA		137	0.18	0.36	112
		133	0.82		
pERT87-15	BamH I	216	0.29	0.38	84
		166+ 50	0.71		
pERT84	Mae III	236	0.29	0.50	52
		128+108	0.71		

表2　Results of PCR-RFLPs analysis

	Results	Step I	Step II
Carrer diagnosis (52 cases)	carrier	18	22
	non carrier	21	21
	impossible	13	9
	(recombination)	(2)	(2)
Prental diagnosis (5 cases)	male, affected	2	2
	male, healthy	1	1
	female, carrier	1	1
	female, non carrier	0	0
	impossible	1	1

Step I ; pERT87-15/Xmn I,
pERT87-8/Taq I, 3'CA.
Step II ; pERT87-15/BamH I, pERT84/Mae III.

pERT87-8/TaqI, 3'CA の3種類で検索した場合69人中53人（77%）が3種類のうちいずれかでヘテロ接合体を示した。3種類ともホモ接合体を示した16人については pERT87-15/BamHI と pERT84/MaeIII を用いて検討したところ9人が2種類のうちどちらかでヘテロ接合体を示し，Step I と Step II を合わせた結果では69人中61人（88%）が5種類のうち少なくとも1種類はヘテロ接合を示した。52例の保因者診断では Step I で52人中39人（75%）が診断可能であり Step II では43人（83%）が診断可能であった（表2）。診断不能であった9人のうち2人は組替えを示したものであった。出生前診断では5例中4例が診断可能であった（表2）。

考　察

DMD（BMD）の遺伝子診断は欠失があれば診断が可能である。しかし欠失は約60%の患者で証明されるにすぎず欠失のない家系では遺伝子多型による診断が必要である。しかも欠失を認めても保因者診断を行うためにはさらに遺伝子量解析を行わなければならず，時間・場所の点から考えても欠失による診断よりも PCR 法を用いた遺伝子多型による診断のほうがスクリーニング検査として適していると考えられる。我々は5種類の Primer を用いることで88%の母親または保因者女性が少なくとも1つの Primer でヘテロ接合であり診断に有用であることを示した。遺伝子多型による遺伝子診断の場合，患者のみならず両親の検索を必要とするほか常に遺伝子組替えの問題を考慮しておく必要がある[5]。遺伝子組替えの問題は5'側や3'側の多型を併用し検索することで誤診率をかなり低下させることが可能である。今後有用な Primer（ヘテロ率の高い Primer）の開発によりさらに診断率を向上させることが期待される。

まとめ

5種類の Primer を用いた PCR-RFLP 法は DMD（BMD）家系の88%で診断に有用であり実際に83%の保因者診断が可能であった。PCR-RFLP 法は遺伝子組替えを常に考慮しておく必要があるが，DMD および BMD の遺伝子診断のスクリーニング検査として有用である。

文　献

1）金沢　一，藤下　敏ら：PCR 法を用いた Duchenne 型筋ジストロフィー症での遺伝子診断。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2年度研究報告書：17，1991.

2）Roberts RG, Cole CG, et al : Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Nucleic Acids Res **17** : 811, 1989.

3）Beggs AH, Kunkel LM, et al : A polymorphic

CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin. Nucleic Acid Res **18** : 1931, 1990

4) Robert RG, Bowrow M, et al : A Mae III Polymorphism near the dystrophin gene promoter by restriction of amplified DNA. Nucleic Acids Res **18** : 1315, 1990

5) Abbs S, Roberts RG, et al : Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene. Genomics 7 : 602, 1990

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の保因者診断および出生前診断における PCR-RFLP 法の有用性の検討

班　　員　片　山　　進
東邦大学医学部第1産婦人科

共同研究者　祖母井　庸　之[1)]，竹　下　直　樹[2)]，矢　野　ともね[2)]
丘　　小　　瑾[2)]，久　保　春　海[2)]，百　瀬　和　夫[2)]
[1)] 東邦大学微生物学教室[2)]　東邦大学医学部第1産婦人科

要　旨

日本人 DMD の保因者診断や出生前診断を行う際の PCR-RFLP 法の有用性を検討した。14家系を対象として実際の家系分析を行った。このうち10例は出生前診断，4例は保因者診断であった。保因者診断は4例のうち3例で多型が検出され，1例が非保因者，2例が保因者と診断された。残り1例は多型の検出が不可能であった。出生前診断10例のうち4例は男児で，残り6例は女児であった。4例の男児のうち3例は正常で，残り1例の carrier status は不明であった。6例の女児のうち3例は非保因者2例は保因者と診断された。残り1例はクライエント（妊婦）の多型は検出されたが，父親の血液入手不能のため carrier status の決定は不可能であった。合計14例中12例86％で診断可能であり，diagnostic applicability の91％にほぼ一致した。日本人 DMD の保因者診断や出生前診断を行う際の PCR-RFLP 法の有用性が示唆された。

目　的

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の保因者診断や出生前診断は従来 genomic probe や cDNA probe を利用して行われてきた。一方近年，目的 DNA を短時間で増幅し，増幅産物を制限酵素で切断して DNA 多型を見る PCR-RFLP 法が開発された[1)]。しかしその多型出現率は人種により異なることが予想される。そこで日本人集団を対象に DMD の保因者診断や出生前診断を行う際 PCR-RFLP 法の有用性を検討した。

表1　PCR-RFLPS ANALYSIS FOR CARRIER AND PRENATAL DIAGNOSIS OF DMD

RFLPs detected	PCR product	products of digestion	
1. pERT 87-1/Bst NI	400 bp	400 bp	(−allele)
		250+150	(+allele)
2. pERT 87-8/Taq I	155	145+ 10	(−allele)
		74+ 71+10	(+allele)
3. pERT 87-15/Xmn I	740	730+ 10	(−allele)
		520+210+10	(+allele)
4. pERT 87-15/Bam HI	226	216+ 10	(−allele)
		166+50+10	(+allele)

方　法

多型の検索領域は 87-1/BstNI, 87-8/TaqI, 87-15/XmnI, 87-15/BamHI の 4 領域とした（表 1）。まず正常日本人男女を対象にこれら 4 領域の allele frequency を求め，これより Polymorphisms Information Content (PIC), observed PIC, diagnostic applicability を算出した。次に家系内に 1 名のみの DMD を有する孤発性家系10家系，2 名以上の DMD を有する遺伝性家系 4 家系の合計14家系を対象として実際の家系分析を行った。このうち10例は出生前診断，4 例は保因者診断であった。DNA（66 名）は末梢白血球より常法により抽出した。出生前診断ではクライエント（妊娠）の初診時期と希望により絨毛採取（3 例）か羊水採取（7 例）を行った。胎児組織は直接または培養後に DNA を抽出した。出生前診断例では診断にさきだち PCR 法により Y 染色体特異配列（149 bp）を増幅して胎児の性別を決定した。Template DNA 500 ng に，primer 15 μmol, Taq polymerase 2.5 単位をくわえ，合計 100 μl として，pre 94°C 6分，94°C 1分，60°C 2分，72°C 10分，post 72°C 10分 の条件で32回増幅した。増幅 DNA 15 μl を10単位の制限酵素で切断し，6％アクリラマイドゲルで電気泳動した（15 mA, 45分）。

表2　ALLELE FREQUENCIES AND POLYMORPHIC INFORMATION CONTENTS OF RFLPS DETECTED BY PCR-RFLPS ANALYSIS

Regions amplified	Restriction enzymes	Symbol	Allele size	Allele frequency	P. I. C.	Observed P. I. C.
1. pERT 87-1	BstNI	B1	400	0.45		
		B2	250/150 (N=33)	0.55	50	24
2. pERT 87-8	TaqI	E1	145	0.33		
		E2	74/ 71 (N=51)	0.67	44	45
3. pERT 87-15	XmnI	K1	730	0.54		
		K2	520/210 (N=46)	0.46	50	35
4. pERT 87-15	BamHI	G1	216	0.22		
		G2	166/ 50 (N=23)	0.78	34	20

表3　DIAGNOSTIC APPLICABILITY OF COMBINATIONS OF 4 TESTINGS BY PCR-RFLPS

Combinations of RFLPs	Diagnostic applicability (%)
1. Bst NI and/or TaqI	72
2. Bst NI and/or XmnI	75
3. Bst NI and/or Bam HI	67
4. TaqI and/or XmnI	72
5. TaqI and/or Bam HI	63
6. XmnI and/or BamHI	67
7. Bst NI, TaqI and/or XmnI	86
8. Bst NI, TaqI and/or BamHI	82
9. TaqI, XmnI and/or BamHI	82
10. All 4 testings BstNI, TaqI, XmnI and/or BstXI	91

結　果

各領域の allele frequency, PIC, observed PIC の結果を表 2 に示した。4 領域をすべて増幅した時の diagnostic applicability は 91％に達した。これを表 3 に示した。保因者診断は 4 例のうち 3 例で多型が検出され，1 例が非保因者，2 例が保因者と診断された。残り 1 例は多型の検出が不可能であった。

出生前診断10例のうち 4 例は男児で，残り 6 例は女児であった。4 例の男児のうち 3 例は正常で，残り 1 例の carrier status は不明であった（図 2）。6 例の女児のうち 3 例は非保因者 2 例は保因者と診断された。残り 1 例はクライ

表4 RESULTS OF CARRIER AND PRENATAL DIAGNOSIS OF DMD USING PCR-RFLPS ANNALYSIS

Diagnosis	No. of families studied	No. of informative families		No. of uninformative families
Carrier	4	3		1
		Noncarrier	1	
		Carrier	2	
Prenatal	10	9		1
		Male	3	Male*
		Normal	3	
		Affected	0	
		Female	6	
		Noncarrier	3	
		Carrier	2	
		Undetermined	1	
Total	14 (100%)	12 (86%)		2 (14%)

*: Affected X chromosome was grandpaternal origin of the client.

PRENATAL DIAGNOSIS OF A FAMILY WITH SPORADIC DMD USING PCR-RFLPS AND MULTIPLEX PCR ANALYSIS

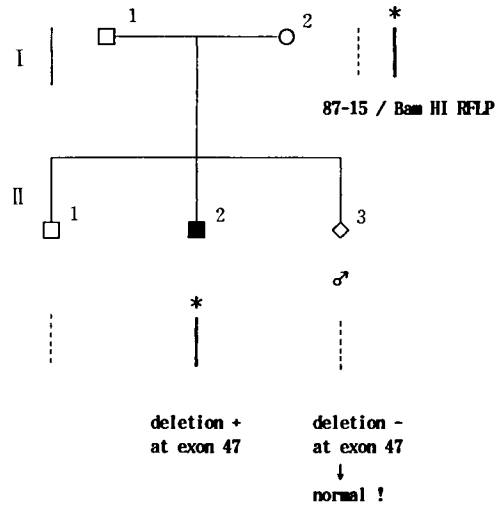
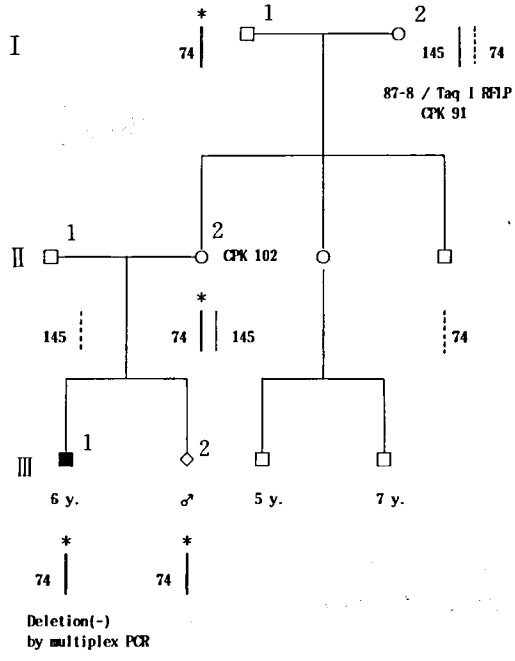


図1

PRENATAL DIAGNOSIS OF A FAMILY WITH SPORADIC DMD USING PCR-RFLPS AND MULTIPLEX PCR ANALYSIS CARRIER STATUS OF THE FETUS WAS UNDETERMINED



*:Affected X chromosome was grandpaternal origin of the client.

図2

エント（妊婦）の多型は検出されたが，父親の血液入手不能のため carrier status の決定は不可能であった。合計14例中12例86%で診断可能であり，diagnostic applicability の91%にほぼ一致した（表4）。

図1は2種類の PCR 法により診断された DMD の出生前診断である。PCR-RFLP 法により妊婦Ⅰ－2に DNA 多型が検出され，患児Ⅱ－2は *で標識されるアリールが，正常児Ⅱ－1は他のアリールが検出された。胎児Ⅱ－3は11週で CVS による絨毛検査で性別は男であり，正常児Ⅱ－1と同じアリールが検出され

たので正常男児と診断された。また multiplex PCR[2] による欠失の直接検出でも患児Ⅱ－2に検出された exon 47 の欠失は胎児にみられず正常と診断された。

図2も第1子Ⅲ－1が DMD の孤発例である。胎児Ⅲ－2は性別診断で男児と診断された。この例ではクライアントⅡ－2とクライアントの母親Ⅰ－2に多型が検出されて，患児Ⅲ－1のアリールは明らかにクライアントⅡ－2の父由来であることが判明した。この男児は患児Ⅲ－1がもつアリールと同じアリールを母親から受け継いだことが判明した。しかし new mutation がクライアントⅡ－2に発生したか，患児Ⅲ－1に発生したのか，不明のためこの胎児の carrier status は不明であった。また multiplex PCR による欠失の直接検出でも患児に欠失はみられなかった。

考　察

DMD の保因者診断や出生前診断に従来利用されていたサザン法は人体に有害なアイソトープが必要で，結果が出るまでに時間がかかる等の問題点が多かった。PCR 法の出現でこれらの問題を一挙に解決することができるようになった。

PCR 法には欠失を見る multiplex PCR 法と DNA 多型をみる PCR-RFLP 法がある。multiplex PCR 法は増幅領域を18領域まで増やすと cDNA probe により検出できる欠失（約60％）の98％を検出できるという。しかしこの方法では家系内の女性の保因者診断は不可能である。DMD の約3分の1が非保因者である母親から発症する new mutation である事実を考慮するとこのデメリットは小さくない。またこの方法の最大の欠点は DMD 患児の生存が前提となることである。当科で保因者診断や出生前診断を希望して来院したクライエントで家系内に DMD 患児が生存していた例は約70％であった。本邦における DMD 患児の欠失の検出率は30％から70％の報告があるが，仮に60％とするとこの70％のうち60％つまりクライエントの多くて42％のみに欠失が検出可能であり，この部分については出生前診断が可能となるが，残りは診断不能となる。この場合 RFLP 分析が有効となる。前回我々はサザン法による RFLP 分析の保因者診断率は本邦で約90％であり，Caucasian を対象とした場合の保因者診断率と同様であったと報告した[3]。今回 PCR-RFLP 法で14例中12例86％で診断可能であり，サザン法による RFLP 分析とほぼ同じ検出率がえられた。

PCR-RFLP 法のデメリットは約2％の recombination がおこりうることである。DMD gene の5' 側と3' 側の flanking marker の増幅もすでに可能となっているので今後この点の多型出現率の検討が必要となる。

ま と め

日本人 DMD の保因者診断や出生前診断を行う際の PCR-RFLP 法の有用性が示唆された。

文　献

1）Robert RG, Cole CG et al : Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Nucleic Acids Res **17** : 811, 1989

2）Chamberlain JS, Gibbs RA et al : Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res **16** : 11141, 1988.

3）片山　進，竹下直樹ら：Duchenne 型筋ジストロフィーの DNA 診断　多型分析，cDNA 法，PCR 法による比較検討．筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究　平成2年度研究報告書，p. 29

PCR 法を用いた Duchenne 型及び Becker 型筋ジストロフィーの保因者診断と出生前診断について

班　員　乾　　幸　治
大阪大学小児科
共同研究者　塚本浩子，福島久雄，田中順子
谷池雅子，柳原　格，岡田伸太郎
大阪大学小児科

要　旨

DMD または BMD 患者20例を含む17家系，男性27例とその血縁の女性23例の計50例を対象とし，PCR 法による pERT87座，ジストロフィン遺伝子両端の CA リピート部位の計7組のプライマーを用いた多型分析を行い，保因者診断・出生前診断を試みた。少なくとも1組でヘテロを示した女性は，pERT87 座の3組では74%，CA リピートの4組では91%，pERET87座と CA リピートの7組を組み合わせると96%に至った。保因者診断を行った12例では9例が保因者，3例が非保因者であった。出生前診断を行った2家系ではいずれもおのおの非患者，非保因者であった。X染色体上の組換えを考慮し，遺伝子内・両端での検索を行うことで，PCR 法を用いた pERT87座・CA リピートによる多型分析は保因者診断・出生前診断に有効な手段として活用すべきと思われた。

目　的

進行性筋ジストロフィーは，比較的頻度の高い疾患であり，近年遺伝子レベルでの解析が進んでいるが，現在なお有効な治療法もなく，症状も進行性であるため，その保因者診断がしばしば重要となる。今回私達は，PCR 法を用いたpERT87座の3種のプライマーと制限酵素の組み合わせによる RFLPs 分析と，最近報告のあった，ジストロフィン遺伝子両端の CACA の繰り返し構造（CA リピート）に基づく多型性に注目した RFLPs 分析を行い，保因者診断・出生前診断への応用を試みた。

方　法

対象は DMD または BMD 患者20例を含む17家系，男性27例とその血縁の女性23例の計50例である。対象者の末梢ヘパリン血より常法にて DNA を抽出した。

（pERT87 座の RFLPs 分析）

Roberts ら[1]の報告した3組のプライマーと制限酵素の組み合わせで，増幅した DNA を消化後（A；pERT87-15/BamHI，B；pERT87-8/TaqI，C；pERT87-15/XmnI），アガロースゲルに電気泳動し，バンドが切断されるものを allele（＋），切断されないものを allele（－）と判定した。

（CA リピートの RFLPs 分析）

Oudet ら[2]の報告した3'側プライマー（3'CA）と Feener ら[3]の報告した5'側プライマー（5'-DYSI，II，III）のアンチセンスプライマーの5'端を ^{32}P-dATP でラベルし，これを用いてDNA を増幅し，8%アクリルアマイドゲル（40%尿素）に泳動後，解析した。

結果と考察

（pERT87座の RFLPs 分析）（表1）

表1 Informativeness of pERT87 Locus

Allele	Allele Frequency		Heterozygous (%)	PIC
	total	(female)		
A : Allele (+)	0.66	0.64		
(−)	0.34	0.36	52	0.461
B : Allele (+)	0.32	0.33		
(−)	0.68	0.67	39	0.442
C : Allele (+)	0.57	0.59		
(−)	0.43	0.41	57	0.484

A : pERT87-15/BamHI B : pERT87-8/TaqI C : pERT87-15/XmnI

表2 Informativeness of 5' Dystrophin Markers

Marker and Allele	Our Cases		Heterozygous (%)	PIC	Reported Cases*		PIC
	Allele Frequency				Allele Frequency	Heterozygous (%)	
	total	(female)					
5' DYS-I	49	22					
A1 (185 bp)	0	(0)			0.048		
A2 (183 bp)	0	(0)			0.071		
A3 (181 bp)	0.296	(0.250)	40.9	0.375	0.310	78.6	0.608
A4 (179 bp)	0.704	(0.750)			0.536		
A5 (177 bp)	0	(0)			0.036		
5' DYS-II							
A1 (228 bp)	0.141	(0.114)			0.090		
A2 (226 bp)	0.155	(0.159)			0.077		
A3 (224 bp)	0	(0)			0.103		
A4 (222 bp)	0.070	(0.091)			0.026		
A5 (220 bp)	0	(0)	45.5	0.626	0.103	82.0	0.768
A6 (218 bp)	0.028	(0)			0.192		
A7 (216 bp)	0.070	(0.068)			0.013		
A8 (214 bp)	0.535	(0.568)			0.397		
5' DYS-III							
A1 (225 bp)	0.141	(0.136)			0.057		
A2 (223 bp)	0.532	(0.211)			0.529		
A3 (221 bp)	0.169	(0.205)	68.2	0.794	0.057	51.0	0.586
A4 (219 bp)	0.338	(0.318)			0.357		

* ; Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM (1991) Am J Hum Genet 48 : 621-627

表3 Informativeness of 3' Dystrophin Markers

Marker and Allele	Our Cases		Heterozygous (%)	PIC	Reported Cases*		PIC
	Allele Frequency				Allele Frequency	Heterozygous (%)	
	total	(female)					
3'CA	49	22					
A1 (137 bp)	0.155	0.182			0.22		
A2 (133 bp)	0.803	0.773	45.5	0.367	0.76	37.0	0.34
A3 (121 bp)	0.042	0.045			0.02		
A4 (119 bp)	0	(0)					

* ; Oudet C, Heilig R, Mandel JL (1990) Hum Genet 84 : 283-285

50例全体での多型頻度（allele（＋），allele（－））は，A（0.66，0.34）B（0.32，0.68）C(0.57, 0.43）であり，女性のみでの値と一致した。また，女性でのヘテロ率，PIC はA（52％，0.461），B（39％，0.442），C（57％，0.484）であった。

（CA リピートの RFLPs 分析）（表2，表3）5'端外側マーカーの5' DYS-I, II を用いると多型の種類は男女全体で2種類，6種類，女性のみでは2種類，5種類と欧米の報告5種類，8種類に比べて少なかった。同様に女性でのヘテロ率も各々40.9％，45.5％で欧米の報告76.8％，82％にくらべて PIC ともに低値であった。しかし5'端内側マーカーの 5' DYS-III では多型の種類も欧米と同じく4種類で，女性でのヘテロ率も68.2％と欧米の報告（51.0％）より高値であった。また3' CA では，多型の種類は3種類，ヘテロ率は45.5％（欧米37.0％）で PIC も0.367 であった。女性で5'端3'端の両端でヘテロを示したのは25％であった。

まとめ

pERT87 座の4組のプライマーを組み合わせると少なくとも1組でヘテロを示す女性は74％であり欧米での70％と一致した。また5'端マーカーの組合せでは82％，5'端3'端両端の組合せでは91％，pERt87 座と CA リピート計7組のマーカーを組み合わせると96％の女性が少なくとも1組でヘテロを示した。保因者診断を行った12例中，9例を保因者，3例を非保因者と判定した。いずれの症例も pERT87 座か CA リピートの少なくとも片方でヘテロを示した。

BMD 1家系（男性胎児）と DMD 1家系（女性胎児）について出生前診断を行い，それぞれ非患者，非保因者と診断した。また全体で3例の組換えの症例（5'端2例，3'端1例）が見いだされた。以上より PCR 法による pERT 87座と CA リピートの組合せによる RFLPs 分析は本邦でもヘテロ率が高く保因者診断の有効な方法と考えられた。X染色体上の組換えを考慮すればジストロフィン遺伝子内とその両端での確認が必要と考えられる。

参考文献

1）Roberts RG, Cole CG et al : Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Nucleic Acids Res **17** : 811, 1989.

2）Oudet C, Heilig R et al : An informative polymorphism detectable by polymerase chain reaction at the 3' end of the dystrophin gene. Hum Genet **84** : 283, 1990.

3）Feener CA, Boyce FM et al : Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA : Application to the 5' region of the Dystrophin Gene. Am J Hum Genet **48** : 621, 1991.

Duchenne / Becker 型筋ジストロフィーの遺伝子診断：遺伝子増幅とイメージプロセシングによる患者及び保因者の同定

班　員　鈴　木　義　之
東京都臨床医学総合研究所

共同研究者　桜　庭　　均，石　井　恵　子
新　本　美智技，立　野　玲　子
東京都臨床医学総合研究所

要　旨

ジストロフィン遺伝子欠失分析の定量化を試みた。筋ジストロフィー患者で欠失が確認されたエキソンを，その家族由来の試料からPCR増幅し，電気泳動後分離染色したバンドをイメージプロセッシングにより定量した。エキソン52の欠失例につき，その家系内保因者を診断することができた。この方法は，Duchenne/Becker 筋ジストロフィー患者家族の保因者診断に用いることができるであろう。

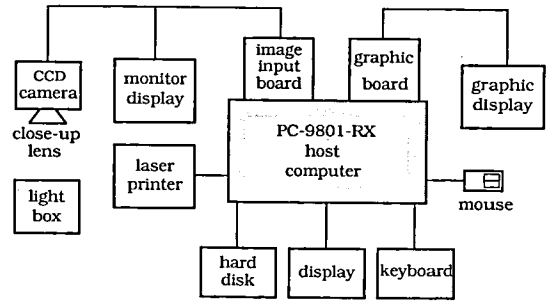


図1　分析の装置並びに手技の模式図

Duchenne 型並びに Becker 型筋ジストロフィー（DMD/BMD）の遺伝子診断は，これまで主に欠失の同定あるいは連鎖解析という方法で行なわれ，特に前者についてはその精度，信頼性の向上のために，いろいろな工夫がなされてきた。現在，患者自身の診断は，これらによりかなり正確に行なわれるようになった。しかし遺伝相談に重要な保因者診断は，必ずしも信頼度が高いとはいえず，新しい方法の開発が望まれている。そこで我々は，保因者において欠失部位の遺伝子の量が，正常人の半分になることを利用した分析法を開発し，診断に応用してみた。

材料と方法

DMD 患者の母親5名について検査を行なった。連鎖解析，家族歴，血清クレアチンキナーゼ値その他のデータより，3名はヘテロ接合体，2名は正常と診断された。患者のエキソン52欠失は，複合 PCR 増幅法（multiplex PCR amplification）[1] により確認した。比較のため，エキソン60を対照エキソンとして選んだ。DNA 抽出，精製，分析並びにポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は前著の方法で行なった[1]。

PCR 産物は，電気泳動後，臭化エチジウムで染色し，ポラロイド写真撮影により記録した DNA バンドを，イメージプロセッシングにより，定量した（図1）。その詳細は他の論文に印刷中である[2]。

結　果

1）PCR 増幅条件の検討

スポット強度（intensity）測定の最適条件を決定するため，増幅条件の検討を行なった。今

回の研究では，エキソン1,52,60の3つを選んだ。1μgのDNAからスタートした場合，エキソン52と60は21-24サイクルで対数指標の直線的増加を示したのに対し，エキソン1は22-23サイクルで既に飽和状態になっていた（図2）。そこで52/60比をとることにした。

鋳型DNA量とPCR産物の関係は24サイクルで観察した。エキソン52と60の両方に対して，1.5〜2μgまで直線的増加を示した（図3）。正常者ではこの2つのエキソン強度比は1に近く，患者ではエキソン52が増幅されなかったのに対し，保因者ではほぼその中間値が得られた。

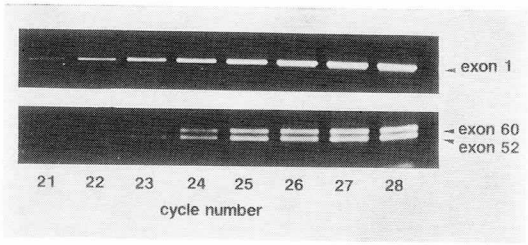


図2　PCR増幅回数とバンド強度

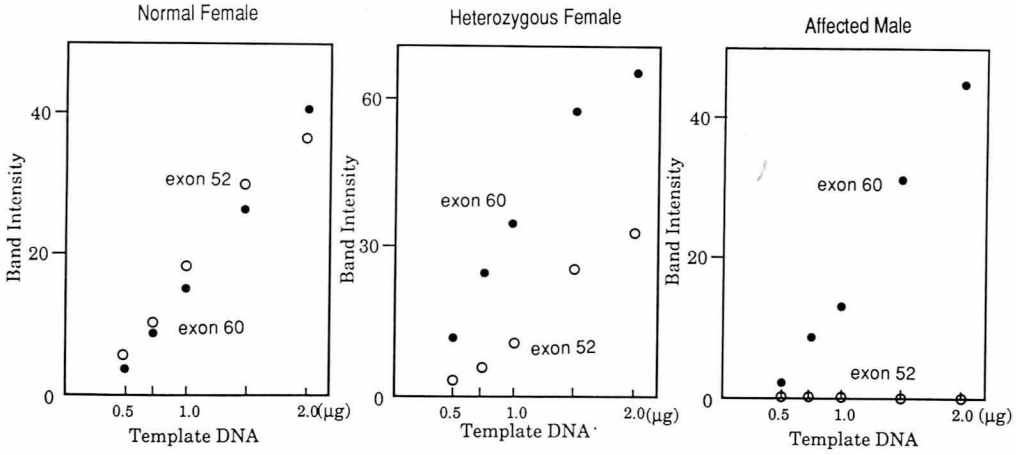


図3　鋳型DNA量とバンド強度

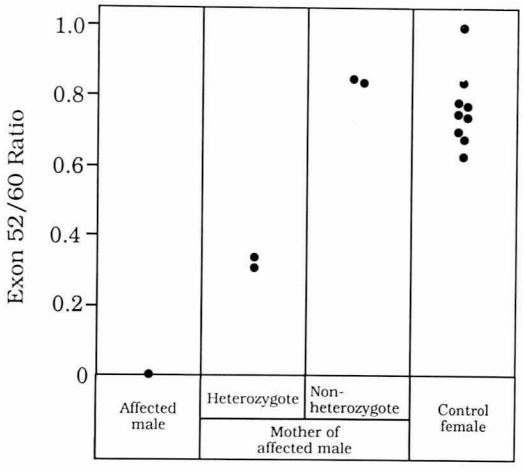


図4　エキソン増幅産物の量比（52/60）

2）定量的PCR分析による保因者診断

図4のように，エキソン52/60を計算してみると，保因者は0.30，0.32および0.41であったのに対し，正常と診断された母親は0.80と0.85であり，正常対照の値0.81±0.15（平均±標準偏差）のレベルであった。

考　察

DMD/BMDの診療，遺伝相談にあたっては，保因者診断が極めて重要である。家系調査，血清クレアチンキナーゼ値などの臨床的評価は必ずしも確定的な診断を与えるとは限らない。欠失の分析における定量性を考えるためには，かなりの条件設定をしなければならない。サザンブロットでの定量[3]には時間と労力が必要であるので，DNA増幅による分析法の報告もなされたが[4]，厳密な条件設定がなされていなかったためか，保因者を確実に診断するところまではいかなかったようである。

我々の今回の分析は，エキソン52だけを対象

としたものであったが，この条件でこのエキソンの欠失を持つ家系の診断は，確実に実施し得ることが確かめられた。勿論，欠失は多くの他のエキソンにもあり，順次それぞれに対する条件を設定することにより，少なくとも欠失例については（あるいはおそらく挿入，重複例も）広く実施することができるようになるものと期待される。

文　献

1）Sakuraba H, Ishii K, et al : A screening for dystrophin gene deletions in Japanese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy by the multiplex chain reaction. Brain Dev. 13 : 339, 1991.

2）Ishii K, Sakuraba H, et al : Carrier detection of Duchenne / Becker muscular dystrophy : computer-assisted direct quantitation of gene amplification products. Brain Dev, in press.

3）Prior TW, Freidman KJ, et al : Molecular probe protocol for determining carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies. Clin Chem **36** : 441, 1990.

4）Prior TW, Papp AC, et al : Determination of carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies by quantitative polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotides. Clin Genet **36** : 2113, 1990.

CA dinucleotide repeat polymorphism を用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの非保因者診断

班　　員　保　住　　功
国立療養所新潟病院神経内科

共同研究者　小野寺　　理[1]，近　藤　　類[2]，田　中　　一[1]
辻　　省　次[1]，宮　武　　正[3]
[1] 新潟大学脳研究所神経内科　[2] 国立療養所新潟病院神経内科　[3] 東京医科歯科大学神経内科

要　旨

近年，ヒト遺伝子中の CA 繰り返し配列の長さの多型性が高いことが知られている[1]。ジストロフィン遺伝子においても，その両端に，多型性を持つ CA 繰り返し配列が報告されている[2)~5)]。我々はこの CA 繰り返し配列の日本人での多型性を検討し，DMD 保因者診断への応用を試みた。

正常日本人女性の94%は4種類の多型性を持つ CA 繰り返し配列のうち少なくとも1種類にて多型性を示すことが確認された。一方，ジストロフィン遺伝子の両側で多型性を確認できた正常女性は24%であった。

保因者診断は，DMD 10家系のうち9家系において可能であり，3家系においては母親のジストロフィン遺伝子の 3', 5' の両側で多型性の存在を確認した。患児の姉妹が患児と同じ allele を持たず非保因者である確率が高いと診断されたのは6名であった。

本法は保因者診断に於いて極めて有用な方法であると考えられた。

目　的

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) の保因者診断には，ジストロフィン遺伝子の欠失をサザン法などにより定量する方法と[6]，連鎖解析を応用した方法[7] がある。DMD 患者の35%ではサザン法で欠失を認めないと報告されている[8]。個々の遺伝子変異が同定されていない家系においては，現在のところ，連鎖解析法が唯一の方法となる。連鎖解析法では遺伝子内の組換えが生じた場合，問題となる。ジストロフィン遺伝子内では約12%の割合で組換えが生じることが知られており[9]，この問題を解決するためには，より多くのマーカーでの多型性を検討する必要がある。近年，ヒト遺伝子中の CA 繰り返し配列の長さの多型性が高いことが知られ[1]，連鎖解析法に大きな貢献をしている。ジストロフィン遺伝子も，その両端に，多型性を持つ CA 繰り返し配列が4種類報告されている[2)~4)]。我々はこの CA 繰り返し配列の日本人での多型性を検討し，DMD 保因者診断への応用を試みた。

方　法

日本人における多型性の解析のため遺伝的に独立した31名の正常女性を対象とした。DMD の保因者診断には，今回の検査の内容を説明の上，家族より希望のあった DMD 10家系 (44名) を対象とした。

DNA は末梢血白血球より Johnらの方法により抽出した[10]。200ng の DNA を4種類の primer にて Taq DNA polymerase を用い ^{32}P-dCTP 存在下に30回増幅し，5%変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い解析した。

結　果

それぞれの primer におけるヘテロ接合率は白人より低値を示した（Table 1）。しかし，正常日本人女性の96.7%は4種類の primer のうち少なくとも1種類にて多型性を示すことが確認された。さらに，ジストロフィン遺伝子の両側で多型性を確認できた正常女性は24.1%であった。

保因者診断は，DMD 10家系のうち9家系において可能であった。3家系においては母親のジストロフィン遺伝子の 3', 5', 両側で多型性の存在を確認し得た。

Table 1 Informativeness of CA repeat polymorphisms in Japanese

	%Heterozygous	PIC*
5'DYS1	54.8 (78.6)	.460 (.608)
5'DYS2	60.7 (82.0)	.600 (.768)
5'DYS3	48.4 (51.0)	.530 (.586)
3'DYS	48.2 (50.0)	.450 (.460)

() informativeness in Coucasian people[11-12]

* PIC for these markers was calculated by the fomula $PIC=1-\sum_{i=1}^{n} Pi^2$, where Pi is the allele frequency.

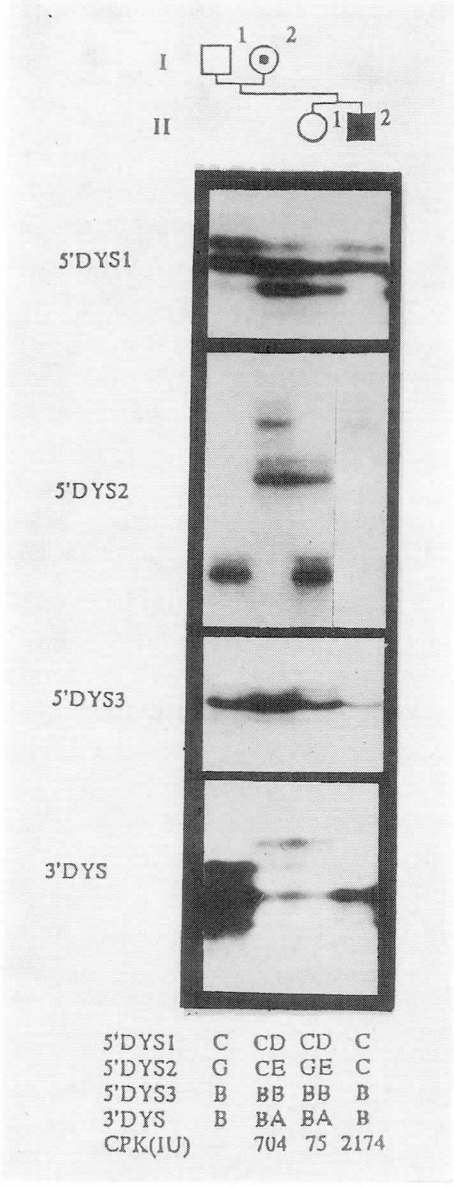


Fig. 1

症例 K.S.（11-2 Fig. I）の家族では母親の CPK は 704 IU（正常値 38-172 IU）と高値であり，母親が保因者であると考えられた。しかし CA 繰り返し配列の allele を検討すると，患

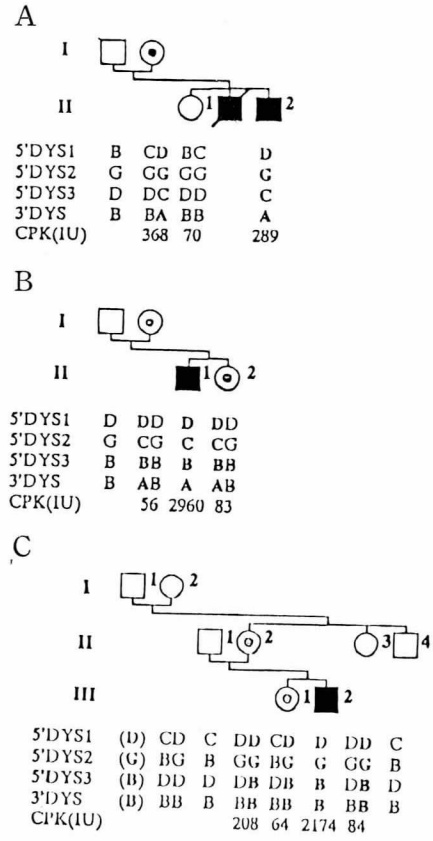


Fig. 2

児の CCBB の allele を患児の姉は持っていないことが判明した。この家系ではジストロフィン遺伝子の両側で多型性が得られたため，98%以上の確率で患児の姉は非保因者であると診断された。

症例 Y.I. (Fig. 2A) の家族では，患児の兄が DMD にて死亡しており，母親の CPK も368 IU と高値であるため，母親は保因者と考えられる。しかし，患児の姉は，患児と同じ DGCA の allele を持たず，98%以上の確率で非保因者であると診断された。

症例 M. T. (Fig. 2B) の家族では患児の妹は患児と同じ DCBA の allele を持っていた。しかし，この家系では，母親及び妹の CPK は正常であり，患児の代で初めて遺伝子異常が生じた可能性が充分に考えられた。

症例 K. T. (Fig. 2C) の家族では患児の叔母 (II-3) は患児と同じ DGBB の allele を有していた。しかし，患児の祖母 (I-2) はこの allele を持っておらず，既に亡くなられた，患児の祖父がこの allele を持っていたと推定された。患児の祖父はアナムネ上，DMD とは考えられない。このため，この家系では，患児の母，もしくは，患児の代で突然変異が生じたのではないかと推定され，患児の叔母が保因者である可能性は低いと考えられた。

考　察

日本人においても CA dinucleotide repeat polymorphism は高いヘテロ接合率を示し，連鎖解析が有効であることが判明した。本法は4種類の primer にて理論的に94%の家系の連鎖解析に応用でき，高い確率で非保因者であることが確認できる。さらにこの方法では極微量 (100-10 ng) の DNA からの解析が可能であるため，絨毛細胞を用いた出生前診断にも極めて有効な方法と考えられる[7]。

本法は母親が保因者であることが推定される家系に於いては有効な方法と考えられるが，M. T. (Fig. 2B) のような家系に対しては，慎重に対応する必要がある。このような家系に対しては，家系内でのジストロフィン遺伝子の異常を直接確認する必要がある。

さらにジストロフィン遺伝子内では約12%の確率で組換えが生じることが知られている[9]。今後ジストロフィン遺伝子の中央，3' 側の新たな CA dinucleotide repeat polymorphism が見いだされれば，本法はさらに有用性がますものと期待される。

文　献

1) Weber JL, May PE : Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet **44** : 388, 1989.

2) Oudet C, Heiling R et al : An informative polymorphism detectable by polymerase chain reaction at the 3' end of the dystrophin gene. Hum Genet **84** : 283, 1990.

3) Feener CA, Boyce FM et al : Rapid detection of CA repeat polymorphisms in cloned DNA : application to the 5' region of the dystrophin gene. Am J Hum Genet **48** : 621, 1991.

4) Beggs AH, Kunkle LM : A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin. Nucleic Acids Res **18** : 1931, 1990

5) Clemens PR, Mackenzie E et al : Carrier Detection and Prenatal Diagnosis in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Families, Using Dinucleotide Repeat Polymorphisms. Am J Hum Genet **49** : 951, 1991.

6) Mao Y, Cremer M et al : Detection of Duchenne muscular dystrophy carriers by dosage analysis using the DMD cDNA clone 8. Hum Genet **81** 193, 1989

7) Bakker E, Hofker MH et al : Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy with closely linked RFLPs. Lancet **1** : 655, 1985

8) Den Dunnen JT, Grootscholten PM et al : Topography of the Duchenne and Becker muscular dystrophy gene. Am J Hum Genet **45** : 835, 1980

9) Abbes S, Roberts RG et al : Accurate assemnet of intragenic recombination frecuency within the Duchenne muscular dystrophy gene. Genomics **7** : 602, 1990

10) John SWM, Weitzner G et al : A rapid procedure foe extracting genomic DNA from Leukocytes. Nucleic Acids Res **19** : 408, 1991

Duchenne 型及び Becker 型筋ジストロフィーにおけるジストロフィン遺伝子の解析（第2報）

班　員　山　田　広　樹
国立療養所下志津病院神経内科

共同研究者　伊　本　夏　樹[1)]，松　村　喜一郎[3)]，有　波　忠　雄[2)]
浜　野　建　三[1)]，藤　原　順　子[1)]，浜　口　秀　夫[2)]
滝　田　　齊[1)]

[1)] 筑波大学臨床医学系小児科　[2)] 筑波大学基礎医学系遺伝医学　[3)] 国立療養所下志津病院神経内科

要　旨

Duchenne 型（DMD）及び Becker 型（BMD）筋ジストロフィーの発端者95例を対象にジストロフィン遺伝子を Southern 分析し，遺伝子再構成の頻度とその特徴について検討した。

95例中56例（58.9%）に欠失が認められ，7例（7.4%）に重複が認められた。欠失と重複を合わせた遺伝子再構成の頻度は66.3%であった。この頻度は欧米の報告[1)2)3)4)5)]と近似しており，人種間でジストロフィン遺伝子の再構成頻度に差異はないものと考えられた。ジストロフィン遺伝子のホットスポットは cDMD 1-2a, 7-8 の部位にみられ，またそのなかでも欠失切断点は欧米の報告と同様にイントロン44に集中する傾向がみられた。頻度だけでなく再構成の特徴についても人種間で差異のみられないことが示唆された。

目　的

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は人種を問わず高い発生頻度を示す。その原因としてジストロフィン遺伝子の巨大な構造による高い突然変異率やホットスポットの存在が考えられている。この考えが正しければ，ジストロフィン遺伝子の突然変異の特徴に人種間で類似性がみられるはずである。本研究はこの点を明らかにすることを目的として，日本人 DMD 及び BMD 症例のジストロフィン遺伝子をSouthern 分析し，欠失及び重複の頻度ならびに突然変異の特徴を欧米の報告と比較した。

対象及び方法

筑波大学附属病院，及び国立療養所下志津病院に受診中の DMD/BMD 症例のうち，発端者95例（DMD：BMD＝90：5）を対象とした。遺伝子解析には，ジストロフィン cDNA の中 cDMD 5b-7 を 5b-6, 7 に，cDMD 9-14 を 9, 10, 11-14のサブフラグメントに分けてプローブした以外，昨年度の報告と同様の方法を用いた。

結果及び考察

表1に Southern 分析の結果を示した。発端

表1　結　　果

部分欠失	55例／95例 (57.9%)
部分重複	7例／95例 (7.4%)
全領域の欠失	1例／95例 (1.1%)
合　　計	63例／95例 (66.3%)

表2　欧米の報告における遺伝子再構成頻度

報告者	報告年	対象数(例)	欠失(例)	重複(例)	合計(例)
Darras et al. (USA)	1988	32	21 65.6%	0 0	21 65.6%
Dunnen et al. (Holland)	1989	194	115 59.3%	15 7.7%	128 66.0%
Baumbach et al. (USA)	1989	160	90 56.3%		90 56.3%
Gillard et al. (Canada)	1989	181	109 60.2%		109 60.2%
Hu et al. (Canada)	1990	181		10 5.5%	10 5.5%
自験例　(Japan)		95	56 58.9%	7 7.4%	63 66.3%

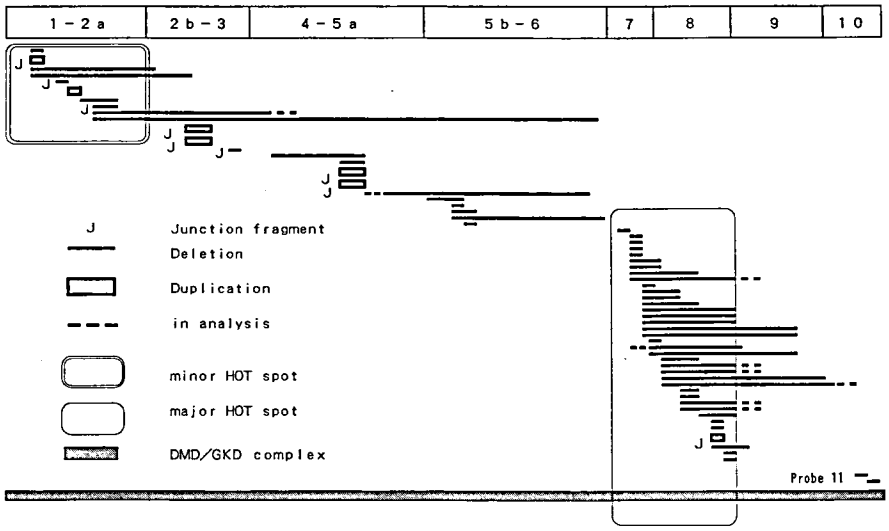


図1　遺伝子再構成の領域分布

者95例中，55例（57.9%）にジストロフィン遺伝子の部分欠失が認れられ，7例（7.4%）に重複が認められた。上記以外に，グリセロキナーゼ欠損症と副腎形成不全症を合併した1症例で遺伝子全領域が欠失していた。全症例を通じて欠失と重複の合併例はみられなかった。

BMD の発端者5例のうち遺伝子再構成の検出されたのは，部分欠失の認められた1例のみであり，それ以外の欠失及び重複症例は全てDMD 症例だった。部分重複の認められた7例は，デンシトメトリーで検出された1例を除きjunction fragment の存在によって検出された。

表2に主要な欧米での報告[1)2)3)4)5)]と自験例の結果とを整理した。ジストロフィン cDNA をプローブに用いた Southern 分析では，DMD 症例の60%前後に部分欠失が，また6%前後に重複が検出されている。本邦の DMD/BMD 症例におけるジストロフィン遺伝子の遺伝子再構成頻度は，95例中63例（66.3%）であり，また欠失と重複の比は約8対1と欧米の報告との差異はみられなかった。対象数が95例と少ないものの，Southern 分析で認められる主要な突然変異は遺伝子再構成であり，その頻度は欧米の患者群と同様であることが強く示唆された。

図1に自験例の遺伝子再構成を cDNA 上の領域分布として示した。欠失の領域分布は均一

表3　イントロン44内の欠失切断点

	全体 (例)	DMD (例)
Koenig et al.	83/273 30.4%	40/230 17.4%
自験例	9/55 16.4%	8/ 54 14.8%

(P>0.5) NS

ではなく，56例中37例（66.1%）が cDMD 7-8 の領域に，また8例（14.3%）は cDMD 1-2a の領域に分布した。これらはそれぞれ，いわゆるメジャーホットスポット，マイナーホットスポットに一致し，従来の報告と同様であった。一方重複は5'側により多い傾向が認められた。

メジャーホットスポットの中でもイントロン44には最も高頻度に欠失切断点が集中するとされている。Koenig らの報告[6]では273例中83例（30.4%）においてイントロン44に欠失の一方の断端が存在し，一方自験例では56例中8例（14.3%）であった（表3）。Koenig らの報告と自験例とでは対象中の BMD の症例数に大きな違いがあり，約2倍の頻度差はここに起因すると考えられた。そこで DMD 症例に限定すると，表3に示すように頻度に差はみられなかった。遺伝子再構成の分布についても頻度と同様，欧米の報告と差はみられず，突然変異の特徴に人種間での類似性が認められた。

ジストロフィン遺伝子は約 2400 kb に及ぶ巨大な構造を持ち，現在知られている最大のヒット遺伝子である。ゲノムの 0.6%に満たない 14 kb のコーティング領域は79以上のエクソンに分割され，イントロンの平均長は 30 kb におよぶ。この特異な構造が高い突然変異率，ひいては高い遺伝子再構成頻度の原因の一つと推測されている。またホットスポットの存在はジストロフィン遺伝子特有の欠失メカニズムの存在を推測させ，今後塩基配列レベルでの検討を進める必要があると思われた。人種間で突然変異の特徴が類似していたことは，これらの推測を支持するものと考えられた。

まとめ

1．日本人 DMD/BMD 症例の発端者95例のジストロフィン遺伝子を Southern 分析し55例（57.9%）に部分欠失が，7例（7.4%）に部分重複が認められた。

2．ジストロフィン遺伝子の主要な突然変異は遺伝子再構成であった。その頻度，分布とも欧米の報告と同様の特徴を有し，突然変異の特徴に人種間で類似性が認められた。

文　献

1）Basil T. Darras, Peggy Blattner et al : Intragenic Deletions in 21 Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) / Becker Muscular Dystrophy (BMD) Families Studied with the Dystrophin cDNA : Location of Breakpoints on Hind III and BgI II Exon-containing Fragment Maps, Meiotic and Mitotic Origin of the Mutations. Am J Hum Genet **43** : 620-629, 1988

2）J. T. Den Dunnen, P. M. Grootscholten et al : Topography of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Gene : FIGE and cDNA Analysis of 194 Cases Reveals 115 Deletions and 13 Duplications. Am J Hum Genet **45** : 835-847, 1989

3）L. L. Baumbach, J. S. Chamberlain et al : Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. Neurology **39** : 465-474, 1989

4）E. F. Gillard, J. S. Chamberlain et al : Molecular and Phenotypic Analysis of Patients with Deletions within the Deletion-rich Region of the Duchenne Muscular Dystrophy (DND) Gene. Am J Hum Genet **45** : 507-520, 1989

5）Xiuyuan Hu, Peter N. Ray et al : Duplicational Mutation at the Duchenne Muscular Dystrophy Locus : Its Frequency, distribution, Origin, and Phenotype Genotype Correlation. Am J Hum Genet **46** : 682-695 1990

6）M. Koenig, A. H. Beggs 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

PCR 法を用いた進行性筋ジストロフィー患者の遺伝子診断

班　　員　三　宮　邦　裕
国立療養所西別府病院神経内科

共同研究者　三吉野　産　治[1)]，藤　本　　伸[2)]，平　松　良　二[3)]
安　部　真佐子[3)]，鈴　木　友　和[3)]
[1)] 国立療養所西別府病院・院長　[2)] 国立療養所西別府病院神経内科
[3)] 九州大学生体防御医学研究所附属病院・体質代謝内科

要　旨

本院入院中または外来通院中の Duchenne 型および Becker 型進行性筋ジストロフィー患者39家系40名（1歳～37歳，平均15.3±7.7歳），さらにその家族25名（父7名，母10名，兄弟6名，姉妹2名）を対象とし，PCR 法（Chamberlain 法および Beggs 法）を用い遺伝子診断を実施した。その結果，患者においては Chamberlain 法による multiplex PCR で39家系40例中，21家系22例（53.8%）で欠失が確認され，また Chamberlain 法で normal であった18家系18例中，17家系17例について Beggs 法を実施し，4家系4例（23.5%）に欠失の存在が確認された。両方法によるジストロフィン遺伝子欠失の検出率は64.1%であった。患者家族における検索では，母親の保因者診断は今回の検討ではできなかったが，1家系において発端者の弟1例に兄と同様の欠失が確認され，早期の確定診断が可能であった。

目　的

国立療養所西別府病院において，現在入院中および外来受診中の患者で臨床的に Duchenne Muscular Dystrophy（以下 DMD）と診断した36家系37例，Becker type Muscular Dystrophy（以下 BMD）3家系3例について polymerase chain reaction（以下 PCR 法）による遺伝子診断を施行し64.1%において Dystrophin 遺伝子の欠失が確認されたので報告する。

対　象

表1のごとく臨床的に DMD と診断した36家系37名，年齢1～28歳，平均14.5歳±7.1歳であった。BMD は3家系3名で18～37歳，平均24.7歳±10.7歳であった。患者家族10家系25名は，父7名，母10名，兄弟6名，姉妹2名であった。

表1　対　　象

・Duchenne 型（DMD）	患者：36家系　37名
（1歳～28歳　平均 14.5±7.1歳）	
・Becker 型（BMD）	患者：3家系　3名
（18歳～37歳　平均24.7±10.7歳）	
・患　者　家　族	：10家系　25名
（父7名，母10名，兄弟6名，姉妹2名）	

方　法

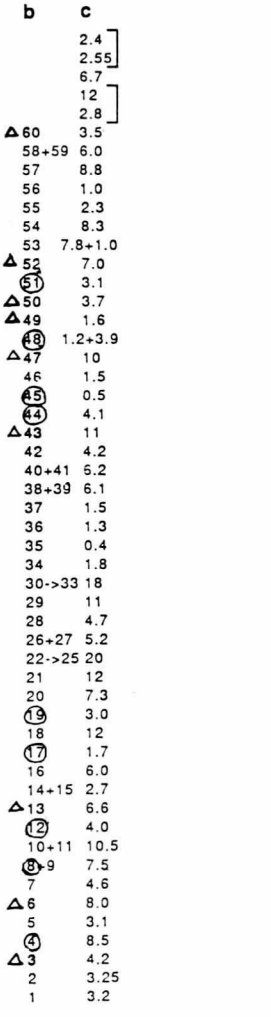
型の如く，末梢血の白血球より DNA を抽出し multiplex PCR 法を実施した。その条件，方法は表2に示す。

結　果

図1に Dystrophin Exon Map を示す。○で囲んだのは Chamberlain 法，△印は Beggs 法でそれぞれ増幅される Exon である。

表2　方　　法

	Chamberlain[1]	Beggs[2]
1．末梢血の白血球より DNA を抽出		
2．PCR 実施（条件）		
≪mixture≫		
・DNA sample	250 ng	250 ng
・Taq DNA polymerase	5 U	5 U
・Primer	31.2 pmol	25 pmol
Exon No.	4,8,12,17,19, 44,45,48,51	Pm,3,6,13,43,47, 49,50,52,60
・Total volume	50 μl	50 μl
≪condition≫		
・Temperature		
①denaturing	94° C, 30 sec	94° C, 30 sec
②annealing	53° C, 30 sec	
③elongation	65° C, 4 min	65° C, 4 min
・Cycle	23	25
3．agarose 電気泳動：2％ agarose gel 100 V/12 cm, 1 hr		



a: cDNA probes
b: Exon No.
c: exon-containing HindIII genomic fragments

図1　Dystrophin Exon Map

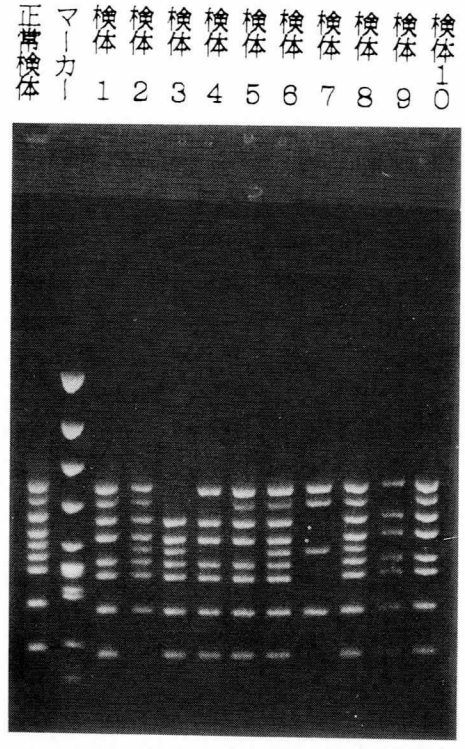


図2　PCR 法による Duchenne 型および Becker 型進行性筋ジストロフィーの診断

図2に PCR 法による DMD および BMD の遺伝子診断（Chamberlain 法[1]）の結果を示す。正常検体と比較すると，検体 1，2，3，4，5，7，9，10にバンドの消失が認められた。

表3に Chamberlain 法による結果の一覧を示す。Exon No. 4，8，12，17，19，44，45，

表3　Chamberlain の方法による multiplex PCR 結果

Family	Exon No. Pt No.	Type	4	8	12	17	19	44	45	48	51
1	1	DMD	+	+	+	+	+	+	−	−	−
2	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	−	−
3	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	−	−
4	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	−	−
5	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	−
6	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	−
7	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	−
8	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	−
9	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	−
10	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	−
11	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	−
12	1	〃	+	+	+	+	+	+	−	−	+
13	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	−	+
14	2	〃	+	+	+	+	+	+	+	−	+
15	1	〃	+	+	+	+	+	+	−	+	+
16	1	〃	+	−	−	−	−	−	+	+	+
17	1	〃	+	+	+	+	+	−	+	+	+
18	1	〃	−	−	−	−	−	+	+	+	+
19	1	〃	+	+	−	−	−	+	+	+	+
20	1	〃	−	+	+	+	+	+	+	+	+
21	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	1	BMD	−	−	+	+	+	+	+	+	+
38	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39	1	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+

48, 51について DMD 患者37名（家系 No. 14 は1卵性双生児），BMD 3名で Exon 51 の欠損11例，Exon 48 は7例，Exon 45, 19, 17, 12 はそれぞれ3例，Exon 44, 8, 4 は各名2例であった。家系21以下家系36までは全て normal PCR であった。BMD 3家系中37の1家系に Exon 4, 8 の欠損がみられた。但しこの BMD 患者では筋組織の Dystrophin 染色を行っていないので，DMD との鑑別は臨床所見によった。

この Chamberlain 法では39家系（40例）中，21家系（22例）に欠失があり，検出率は53.8%であった。

表4は Chamberlain 法で normal pattern であった家系21〜36および38の17家系について，Beggs の方法[2]を実施した結果を示している。家系21，22に Exon 49 および50，家系23に Exon 52，家系24に Exon 60 の計4家系において，更に Exon の欠失が証明された。

即ち Beggs の方法では Chamberlain の方法

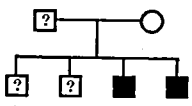
表4　Beggs の 方法による multiplex PCR 結果

Exon No. / Family No.	Type	Pm	3	6	13	43	47	49	50	52	60
21	DMD	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+
22	〃	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+
23	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
24	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
25	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38	BMD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表5　患者家族の PCR 結果（Chamberlain の方法）

Exon No. / Family No.	relation	4	8	12	17	19	44	45	48	51
20	mother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	y. brother	−	+	+	+	+	+	+	+	+
1	mother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	father	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	y. brother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	father	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	father	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	e. brother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	mother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	father	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	y. sister	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	father	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	y. brother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	father	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	e. brother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	e. sister	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	father	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mother	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	y. brother	+	+	+	+	+	+	+	+	+

家系２０



？：未検

家系２１

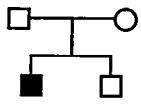


図３　PCR 法を実施した家系例

で normal pattern を示した18家系（18例）中17家系（17例）のうち４家系（４例）23.5％の検出率であった。

表３および表４をまとめると，ジストロフィン遺伝子の欠失率は，両方法で39家系（40例）中25家系（26例）で64.1％であった。

表５に患者家族の背景を示す。患者の母親10家系10例中，異常を証明し得た者は１例もなかった。このうち４家系には各々４例の息子があったので母親が保因者である可能性が考えられたが，今回我々が行った検索方法の範囲内では保因者診断はできなかった。兄弟６家系中１家系の兄が発病，その弟１歳に兄と同じ Exon 4 の欠失が証明され，早期確定診断が可能であった。姉妹２家系２例はいずれも normal pattern であった。

図３に家系20における１歳男児（第４子）の早期診断例を示す。家系21は孤発例で，その弟に異常を認めなかった例を示す。

ま と め

１．発端者

① Chamberlain 法による multiplex PCR では，39家系（40例）中21家系（22例）に欠失が証明され，検出率は53.8％であった。

② Chamberlain 法で normal pattern を示した18家系（18例）中17家系（17例）について Beggs 法を実施し，４家系（４例）に23.5％の欠失が証明された。

③ PCR の二つの方法により 39家系（40例）中25家系（26例）64.1％に欠失が証明された。

２．患者家族

① Chamberlain 法による multiplex PCR では発端者の弟（１歳）１例に欠失を認め，早期の確定診断となった。

② 母親（definite or possible carrier を含む）10家系の保因者診断は出来なかった。

文　献

1）Chamberlain JS, Gibbs RA, et al : Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res **16** : 1931, 1988

2）Beggs AH, Koenig M, et al : Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum genet **86** : 45, 1990

病院検査室における PCR 法を利用した Duchenne 型進行性筋ジストロフィーの遺伝子診断

班　　員　鴻　巣　　武
国立療養所西多賀病院

共同研究者　長　沢　治　夫
国立療養所西多賀病院

要　旨

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いた遺伝子診断を当院の検査室に導入し，これによる Duchenne 型 (DMD) および Becker 型 (BMD) 筋ジストロフィー遺伝子診断の有用性と可能性を検討した。その結果，DMD, BMD 患者24名のうち，11例 (45.8%) に少なくとも1断片の部分欠失を認めた。本邦における欠失頻度は37.5～52%であり，今回得た欠失の頻度はこれとほぼ同様であった。欠失の検出率からみると，本法は DMD, BMD 遺伝子診断のスクリーニング検査として有効な手段であると考える。また本法では市販のキットを用い，さらに処理手順をルーチン化した結果，採血から遺伝子欠失の判定まで要した時間は4～5時間であった。従って，本法は比較的簡便かつ短時間に検査の結果を得ることが出来ることから，一般病院の検査室でも PCR 法を用いた遺伝子診断のスクリーニング検査は十分可能であると考える。

目　的

Duchenne 型 (DMD) および Becker 型 (BMD) 進行性筋ジストロフィーにおけるジストロフィン遺伝子欠失の存在を利用して，現在，種々の遺伝子診断が行なわれている。なかでも有力な遺伝子診断法としてサザンブロット法があるが，この方法は手技が煩雑で時間を要すること，また放射性物質を使用する，などの問題があり一般病院の検査室レベルでは実施が困難である。しかし，臨床の場ではスクリーニング検査として，簡便かつ短時間に診断が可能な遺伝子診断を実施したいという期待は少なくない。そこで，Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による遺伝子欠失の同定法が普及しつつあることから，PCR 法を用いたスクリーニング検査を当院の検査室に導入し，病院検査室における遺伝子診断の有用性と可能性を検討した。

対象・方法

対象は当院入院中の DMD, BMD 患者24家系 (24名) とし，末梢血 1 ml から DNA を抽出した。DNA の抽出には簡便な操作で抽出が可能な STRATAGENE 社の DNA EXTRACTION KIT を用いた。PCR 法には Chamberlain[1] らが報告した9組の exon (4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51) に加えて，Beggs[2] らが用いた2組の exon (47, 52) に対するプライマーを用いた。遺伝子増幅に用いた反応液は Perkin Elmer Cetus 社の Gene Amp Kit にて調製した。増幅反応は，11組のプライマーの各セットごとに，全量 20 μl の反応液中で個別に行なった。反応の温度条件は Chamberlain[1] らの方法に準じ，サーマルサイクラーは Astec 社製の PC-700 を用いた。増幅の後，11組の反応液各 2 μl を2系例に分けて混合し，それぞれ

3% NuSieve-Agarose gel で電気泳動を行なった。電気泳動の後，増幅された DNA を ethidium bromide で染色・検出した。

PCR 法の実施にあたっては臨床検査室の担当者は1名とし，採血の後短時間で検査結果が得られるよう処理手順をルーチン化させて，スクリーニング検査の可能性を検討した。

結　果

図に DMD 患者6例における電気泳動の結果を示した。A系列は exon 4, 12, 19, 45, 51, 52, B系列は exon 8, 17, 44, 47, 48, の DNA 断片である。症例 D2 で exon 51，症例 D4 で exon 48, 51と52，症例 D5 で exon 8 と12，症例 D6 で exon 45 に相当する DNA 断片が欠失していた。表に欠失 exon の部位とその症例数を示した。24名の患者のうち11例（45.8%）に少なくとも1断片の部分欠失を認めた。

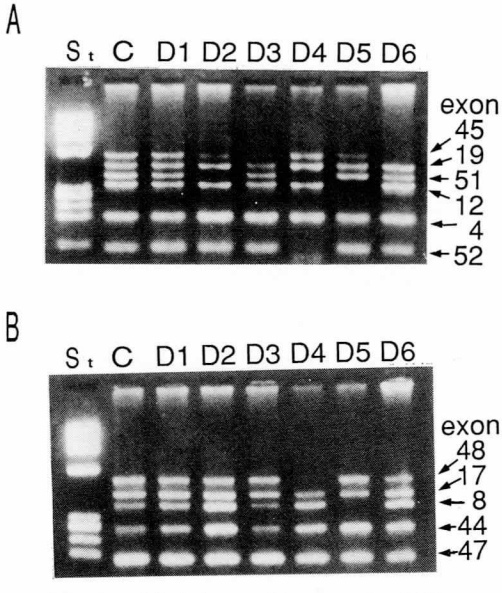


図　Amplified dystrophin gene by PCR

表　Detection of deleted exons in DMD/BMD

deleted exons	cases
4, 8, 12	1
8	2
8, 12	1
45	2
47, 48, 51	1
48, 51, 52	1
51	2
51, 52	1
total	11/24 (45.8%)

1名の検査実施者にて採血から遺伝子欠失の判定まで要した時間は4～5時間，このうち実働の時間は2時間以内であった。

考　察

PCR 法により認めた部分欠失のうち，半数がジストロフィン遺伝子の中央部分（exon 45～52），また 1/3 が5' 側の hot spot に存在した。これらは，従来報告されているサザンブロット法での hot spot の領域とほぼ一致していた。さらに，本邦における欠失頻度は37.5～52%であり，今回得た欠失の頻度はこれとほぼ同様であった。プライマーのセット数を増やすなど今後吟味を要する余地はあるが，欠失の検出率からみると本法は病院の検査室で行ない得る DMD, BMD の遺伝子診断のスクリーニング検査として十分有効な手段であると考える。

PCR 法の実施にあたっては DNA 抽出や反応液の調製に市販のキットを用いた。また反応液はあらかじめ調製した後 −70°C に保存しておくなど，処理手順をルーチン化させた。この結果，比較的簡便かつ短時間に検査の結果を得ることが出来た。従って，一般病院の検査室レベルにても PCR 法を用いた遺伝子診断法のスクリーニング検査は十分可能であることがわかった。

まとめ

PCR 法を当院の検査室に導入し，DMD, BMD 患者における遺伝子診断のスクリーニングを試みた。その結果，遺伝子欠失の検出率からみると本法は DMD, BMD 遺伝子診断のスクリーニング検査として有効な手段であると考えられた。また本法は比較的簡便かつ短時間に検査の結果を得ることができることから，一般病院の検査室でも PCR 法を用いた遺伝子診断のスクリーニング検査は十分可能であることがわかった。

文　献

1) Chamberlain JS, et al : Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucl Acids Res **16** : 1141-1156, 1988

2) Alan H. Beggs et al : Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet **86** : 45-48, 1990

Multiplex PCR によるジストロフィン遺伝子欠失の検出

Chamberlain 法と Beggs 法について

班　員　高　橋　桂　一
国立療養所兵庫中央病院

共同研究者　竹　村　一　男，小　林　万佐子
堤　　正　好，引　地　一　昌
㈱エスアールエル遺伝子部

要　旨

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）および Becker 型筋ジストロフィー（BMD）の簡便，迅速な遺伝子診断方法として，multiplex PCR による遺伝子欠失の検索が知られている。Chamberlain らの提唱した9領域に，Beggs らの提唱した10領域を加え，19領域についての検索が可能となった。これにより，遺伝子欠失の検出率はサザン法の98%まで高まるといわれている。両方法を比較し，これらの方法を併用した場合の有用性について検討した。これら19領域の検索でジストロフィン遺伝子の欠失が見い出された検体118例中，Chamberlain ら，および Beggs らの両方のプライマーセットによって遺伝子欠失が検出された検体は87例であった。また，Chamberlain らのプライマーのみで欠失が認められたのは22例，Beggs らのプライマーのみで欠失が認められたのは9例であった。欠失部位と欠失サイズは，すでに知られているように多様であった。両方法の併用により検索部位はほぼ倍になるが，遺伝子欠失の検出率を飛躍的に向上させるものではなく，これは欠失が複数のエクソンにまたがる場合が多いためと考えられた。しかし検索部位を増やすことは，比較的小さな欠失を見い出せる点，および欠失の endpoint についての情報が大幅に向上する点で非常に有用であると考えられた。

目　的

DMD, BMD の遺伝子診断方法のひとつとして，ジストロフィン遺伝子の複数の欠失好発部位を PCR で同時増幅し，欠失の有無を検索する方法が知られている。Multiplex PCR では用いるプライマーの数や種類によって遺伝子欠失の検出率が異なるが，従来の Chamberlain ら[1] の9領域（Exon 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51）のプライマーに加え，これを補足する形でデザインされた Beggs ら[2] の10領域（Muscle-specific promoter, Exon 3, 6, 13, 43, 47, 49, 50, 52, 60）のプライマーを用い，両方法の比較と，両方法を併用した場合の有用性について検討した。

方　法

1991年9月末日までに SRL に検査依頼のあった検体（男性検体269例，同一家系の検体を含む）のうち，PCR による19領域の検索の結果，ジストロフィン遺伝子の欠失が認められた118例についてデータをまとめた。EDTA 採血した末梢血 10 ml よりバフィーコートを分離し，RNase 処理，プロテアーゼ処理後，フェノール・クロロホルム抽出を行い，エタノール沈澱法により DNA を得た。250 ng の DNA を鋳型として，Chamberlain ら，または Beggs らのプライマーセットを用いて multiplex PCR

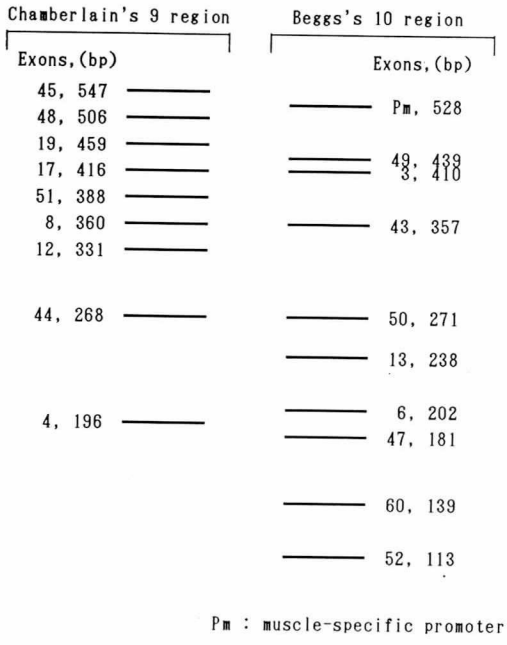


図1 Multiplex PCR によるジストロフィン遺伝子欠失好発部位の検出．増幅 DNA 断片の大きさと位置関係を示す。

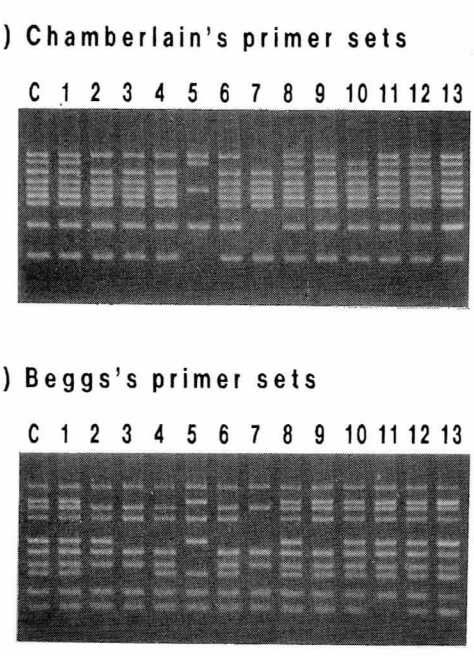


図2 Multiplex PCR によるジストロフィン遺伝子欠失の検索例　　Cは正常男子。

を行った。反応液 10 μl を 3％アガロースゲルにて電気泳動し，エチジウムブロマイド染色後，UV トランスイルミネーターにより増幅 DNA のバンドパターンを検出した。Multiplex PCR では，次の点に注意を払った。(1)ヘパリン血より抽出した DNA は増幅不良を起こす場合があるため，EDTA 採血とした。(2)反応液，反応条件は Chamberlain ら[1] の方法に準じたが，DMSO を使用しない方が良好な増幅パターンが得られたため，DMSO は除いた。(3)反応バッファーの凍結融解の繰り返しを避けた。

結果及び考察

図1に正常例のバンドパターンと，対応するエクソンナンバーを示す。DMD 患者検体について，Chamberlain ら，Beggs らのプライマーを用いて multiplex PCR を行った例を図2に示す。遺伝子欠失は図に見られるように明瞭に検出された。19領域の検索によってジストロフィン遺伝子の欠失が認められた118例の欠失パターンを図3に示す。欠失部位，欠失サイズは，すでに知られているように多様であった。

このうち Chamberlain らのプライマーによってのみ欠失が認められた検体は22例（18.7％）あり，その内訳は exon 8-12(2)，8(1)，17(2)，44(6)，45(7)，48(1)，51(3)であった（括孤内は例数）。また，Beggs らのプライマーによってのみ欠失が認められた検体は9例（7.6％）で，内訳は exon 3(1)，47(1)，49-50(3)，50(1)，52(3)であった。残る87例（73.7％）はいずれのプライマーセットを用いた場合にも遺伝子欠失が認められた（図4）。Chamberlain らの方法に加えて Beggs らの方法を実施することで，検出例は109例から118例に増加した。検索部位がほぼ倍になっても検出率の向上はわずかであったが，これは欠失が複数のエクソンにまたがる場合が多いことと，比較的欠失頻度の高い exon 44，45，が Chamberlain らのプライマーセットに含まれるためと考えられる。しかし小さな部分欠失は低頻度ながら様々な部位で起きており，こうした欠失を見い出せる点で両方法の併用は有用であると考えられる。さらに，図3に見られるように両方法の併用によって欠失の大きさと endpoint についての情

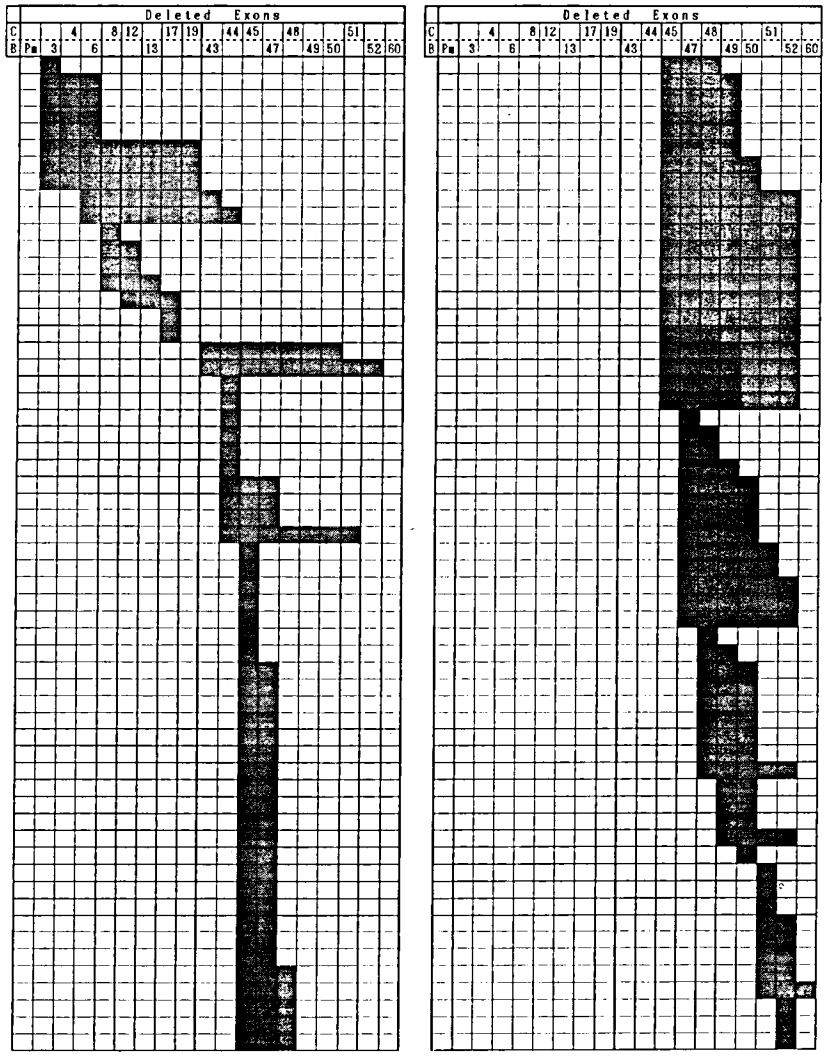


図3　Multiplex PCR によりジストロフィン遺伝子の欠失が検出された検体 118 例の欠失パターン

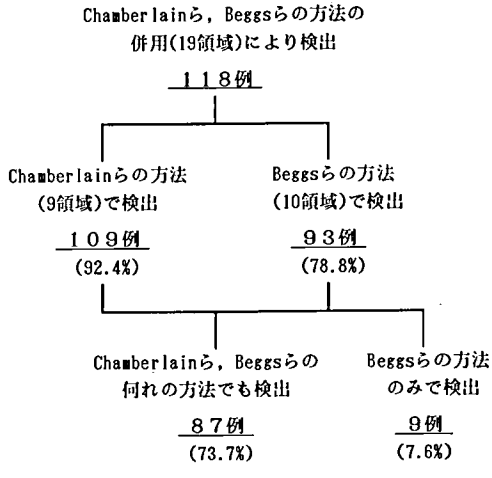


図4　Chamberlain ら，Beggs らの方法による検出例数の比較

報が大幅に向上する点も，有用性が大きいと考えられる。また，multiplex PCR で遺伝子重複を同定することは不可能もしくは困難と考えられているが，増幅したバンドパターンの相対的強度から遺伝子重複が示唆される検体が見い出されており，サザン法による解析の際の指標になり得るかどうか，今後の検討課題と考えている。

文　献

1) Chamberlain, J. S., et al : Multiplex PCR for diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In PCR protocols. A guide to methods and applications. (Eds Innis, M. A., et al) : Academic Press, pp. 272-281, 1990.

2) Beggs A. H., et al : Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction., Hum. Genet., **86**, 45-48, 1990.

Multiplex PCR による Xp21 筋ジストロフィーの遺伝子診断

Chamberlain 法と Beggs 法の比較

班　員　高　橋　桂　一
国立療養所兵庫中央病院

共同研究者　竹　村　一　男[1]，苅　田　典　生[2]，堀　川　博　誠[2]
[1] SRL 遺伝子部　[2] 国立療養所兵庫中央病院神経内科

要　旨

兵庫中央病院の症例のうち代表的な14例について，ジストロフィン遺伝子を multiplex PCR をもちいた Chamberlain 法(9領域)と Beggs 法（追加10領域）により検索し，検討した。Beggs 法により DMD の1例で新たに欠失が見いだされ，BMD 3例と Quadriceps myopathy の2例および高 CK 血症1例で新たに欠失範囲が追加された。診断の確定および欠失範囲の確認に両法の併用は有用である。

目　的

Multiplex PCR による Xp21 筋ジストロフィーの遺伝子欠失の検出法の有用性は確立され，必須の検査法として普及し，定着しようとしている。PCR 法では用いるプライマーの数と種類により検出率が変わる。ここでは従来の Chamberlain らの方法（サザンブロットの80～90%を検出）[1]と，最近 Beggs らにより報告された更に10領域を加え検出率を98%まで高めた方法[2]を用い，個々の臨床症例について比較検討した結果を報告する。

表1　Multiplex PCR によるジストロフィン遺伝子欠失の検出

No.	症例	年齢	臨床診断	Chamberlain 法	Beggs 法
1	IK	10	DMD	nd	52
2	KM	12	DMD	8　12	nd
3	SH	22	DMD — siblings	nd	nd
4	SY	25	DMD — siblings	nd	nd
5	ST	27	DMD — siblings	nd	nd
6	SA	10	Cardiomegaly DMD?	nd	nd
7	KH	21	Cardiomegaly DMD?	nd	nd
8	TN	16	BMD	45　48　51	47　49　50　52
9	AS	38	BMD	45	47
10	KK	48	BMD	45　48	47
11	NA	12	BMD	nd	nd
12	KH	12	high CK	45　48　51	47　49　50　52
13	NY	37	Quadriceps myopathy	45	47
14	KS	45	Quadriceps myopathy	45	47

nd：検出されず。⌒：予測された欠失　＿：新たに検出された欠失

方　法

Multiplex PCR は Chamberlain らの方法（C法と略）と Beggs らの方法（B法と略）により，SRL 遺伝子部との共同で行った。C法は Exon 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51 の9領域のプライマーを，B法では，C法を補足する muscle-specific promotor, Exon 3, 6, 13, 43, 47, 49, 50, 52, 60 の10領域のプライマーを用いて反応させた。DNA は10m*l* の EDTA 採血よりフェノール・クロロホルム抽出法で抽出し，エタノール沈澱法にて調製した。

対象は兵庫中央病院を受診し，DMD あるいは BMD と診断された患者である。

結　果

兵庫中央病院の症例のうち代表的な14例を表1に示す。症例1はC法で欠失が見つからず，B法で Exon 52 の欠失が見いだされた。症例2はB法で行っても新たな欠失は見いだされなかった。症例3，4，5は兄弟例であるが両法で欠失は検出されなかった。症例6，7は心肥大を主訴として来院した DMD 疑いの症例であるが，両法で欠失は検出されなかった。症例8から11は BMD で症例8で Exon 52, 症例9で Exon 47 がB法で新たに検出された。症例12は検診を機会に高 CK 血症の精査のため来院した症例で，顔面筋，四肢近位筋の軽度の弱力を示し，病型診断に手間取った例であるが，C法で Exon 45, 48, 51 の欠失が見つかり，B法で 47, 49, 50, 52 の欠失が検出され BMD と診断された。症例13, 14はいとこ同志で Quadriceps myopathy の典型例であるがC法で Exon 45 の欠失が，B法で47の欠失が新たに見いだされ，BMD の forme fruste であることが裏付けられた。

考　察

症例1のようにB法のみで欠失が見つかる場合は竹村らの報告（今年度Ⅰ－B－12参照）にみられるように，118例中9例で7.6%にすぎないが，欠失が見つかることにより診断が確定する意義は大きい。症例3，4，5は臨床症状も類似し，比較的良好な経過をとっている兄弟例であるが，これらの方法では欠失は見つからず重複その他に関して検索が必要である。症例6，7は心肥大が全面に立つ症例で，症例7の母親と妹に血清 CK の高値が見いだされているのでサザンブロット法にて検索中である。症例8から14の臨床診断で BMD に属する例では圧倒的に45エクソン以上の欠失が多かった。当班の山田，伊本らのサザンブロットによる検索では DMD と BMD の95例中56例（58.9%）に欠失がみられ，欧米との頻度の差はない。欠失の有無と臨床症状の対比がなされ，一部の症状に差があるとする報告もあるが，検出率が低い段階の論文もあり決定的な結論に至っていない。欠失部位および reading frame 機構と臨床症状の対比は詳細に検討され，関連が示されている[3]。transcription の異常やジストロフィン分子量や量の解析が各症例で詳細に検討されるようになり，臨床症状で DMD, 中間型, BMD などに分類されている症例が分子レベルで再分類されることになるであろう。

文　献

1）Chamberlain, J. S., et al : Multiplex PCR for diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In PCR protocols. A guide to methods and applications. (Eds Innis, M. A., et al) : Academic Press, pp. 272-281, 1990

2）Beggs A. H., et al : Detectoion of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum. Genet., **86**, 45-48, 1990

3）Koenig, 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

Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子重複例及び欠失例における臨床所見

班　員　亀　尾　　等
国立療養所原病院

共同研究者　福　田　清　貴[1)]，伊　藤　明　子[1)]，椙　山　桂　子[1)]
[1)] 国立療養所原病院　[2)] 放射線影響研究所

要　旨

Duchenne 型筋ジストロフィー症のうちサザンブロット解析により診断した原因遺伝子欠失例及び重複例について以下の4項目について臨床所見を比較検討した。

①知能指数

重複例では平均70.3，欠失例では平均72.7で両者間に有意差を認めなかった。

②歩行不能となった年令

重複例では10才9カ月，欠失例では10才0カ月で両者間に有意差を認めなかった。

③CK 値が下降し始めた年令

重複例では8歳1カ月，欠失例では6歳8カ月で両者間に有意差を認めなかった。

④心電図所見

異常Q波，右室肥大パターン，不完全右脚ブロック所見，ST-T 変化について重複例と欠失例で比較したが，重複例で前2者の所見を呈した症例を認めなかった以外は差を認めなかった。

目　的

Duchenne 型と診断された筋ジストロフィー症患者の中にも，進行の早い症例や遅い症例，知能レベルの高い例や低い例，心筋障害の強い症例や軽い症例など，臨床的に様々である。そこで，この多様さの原因が遺伝子レベルにあると考えて，遺伝子欠失例及び重複例について臨床所見を比較検討した。

表1　重複症例

症例	年令	重複部位
1	15	38-39
2	14	38-39
3	22	41
4	14	42-48
5	20	53-54
6	16	53-54

※症例5・6は兄弟

表2　欠失症例

症例	年令	欠失部位	症例	年令	欠失部位
1	13	3	17	21	34-35
2	11	3	18	(15)	34-37
3	19	3-15	19	15	34-36
4	19	6- 7	20	18	36-39
5	18	6- 7	21	17	36-39
6	20	6- 9	22	19	36-39
7	17	8	23	17	36-39
8	(18)	8-31	24	6	38-44
9	23	9-11	25	6	38-44
10	21	10-15	26	9	40
11	17	10-23	27	17	41
12	8	12-31	28	19	41
13	16	33	29	15	41
14	10	33	30	12	42-44
15	20	33-35	31	12	53
16	17	33-39	32	20	56-57

（ ）死亡時の年令
※症例1・2，13・14，18・19，20・21，22・23，24・25，28・29は兄弟

対　象

国立療養所原病院に入院又は，外来通院中のDuchenne 型筋ジストロフィー症のうち，サザンブロット解析により遺伝子重複例と診断された6症例（表1）と遺伝子欠失例と診断された32症例（表2）を対象とした[1)2)]。

方　法

以下の4項目の臨床所見に関して，重複例群と欠失例群の間で有意な差が認められるかどうか比較検討した。有意差判定にはt検定を用いた。また，重複部位及び欠失部位との相函関係にも言及した。

①知能指数

1989年尺度修正版[3)]による WISC-R 知能検査法で測定し比較した。

②歩行不能時期

歩行不能となった年令を月数で表し比較した。

③CK 値下降時期

CK 値が下降し始めた年令を月数で表し比較した。

④心電図所見

心電図を評価する目的で，異常Q波，右室肥大パターン，不完全右脚ブロッグ所見，ST-Tの変化のあった症例数を比較した。

結　果

表3は知能指数の検査結果です。重複例では51から95で平均70.3，欠失例では40から102で平均72.7だった。重複例群と欠失例群の間で有意の差を認めなかった。

表4は歩行不能となった年令を示したもので

表3　知能指数（WISC-R）

重複例		欠失例	
1	70	3	71
2	95	5	66
3	51	6	54
4	82	7	90
5	65	8	60
6	59	9	96
		11	57
		12	93
		13	85
		14	82
		15	79
		16	94
		17	80
		18	65
		19	82
		20	55
		21	40
		22	63
		23	102
		24	90
		25	88
		26	61
		27	45
		28	56
		30	64
平均	70.3±16.0	平均	72.7±17.2

表4　歩行不能になった年令

重複例	ヶ月	欠失例	ヶ月
2	156	1	104
3	125	2	103
4	96	3	135
5	137	5	137
6	132	7	120
		8	129
		9	167
		10	108
		11	122
		12	103
		13	155
		15	135
		16	104
		18	105
		19	96
		20	150
		21	137
		22	149
		23	120
		26	105
		27	108
		28	109
		29	97
		30	103
		31	101
平均	129.2±21.8	平均	120.4±20.4

表5　CK 値下降開始年令

重複例	ヶ月	欠失例	ヶ月
1	109	1	36
2	110	2	67
3	130	3	107
4	100	5	102
5	90	7	80
6	41	9	100
		11	124
		12	78
		14	87
		16	83
		17	127
		18	41
		19	73
		20	82
		21	76
		22	95
		23	76
		24	46
		25	42
		26	70
		27	50
		28	92
		30	79
		31	90
平均	96.7±30.3	平均	79.7±24.4

表6　心電図異常

	症例数	異常Q波	RVH パターン	IRBBB パターン	ST-T の異常
重複例	6	0	0	1	5
欠失例	29	5	3	6	21

す。重複例では96カ月から 156 カ月にわたり平均 129 カ月，つまり10才 9 カ月，欠失例では96カ月から 167 カ月にわたり平均 120 カ月，つまり10才 0 カ月で，重複例，欠失例間に差を認めなかった。

表5に示すように CK 値が下降し始めた年令は重複例では41カ月から 130 カ月にわたり平均97カ月，つまり 8 才 1 カ月，欠失例では36カ月から 127 カ月にわたり平均80カ月，つまり 6 才 8 カ月だった。重複例と欠失例の間には 5 % の危険率でも有意差を認めなかった。

表6に示すように，重複例には異常Q波や右室肥大パターンを示した症例を認めなかった。

考　察

Duchenne 型筋ジストロフィー症に知的障害を伴う例をしばしば認めるが，今回の検討では重複例・欠失例間では差を認めず，重複部位・欠失部位との相函関係も確認できず，知能レベルの多様性の原因は見つけることができなかった。

歩行できなくなる時期も重複例・欠失例間で差がなく，重複部位・欠失部位との相函も認めなかった。この検討では進行の程度に差があるかどうかをみるのに歩行不能となった年令を取り上げたが，もっと先の，たとえばベッド臥床となる時期とか，呼吸不全になる年令を検討すれば，両者間で有意な差が認められるかもしれない。

機能障害の進展とほぼ並行した推移をみせるといわれている CK 値[4] も検討したが，重複例と欠失例の間で有意の差は認められなかった。かつ，重複部位・欠失部位との相函関係も認められなかった。担し，筋疾患の CK 値は短期間内でも大きな変動をきたすことがあるため[4]，検査間隔の長い症例では真の“変曲点”をとらえられたかどうかは疑問が残る。

心筋障害の評価手段として，この検討では心電図に着目した。重複例で異常Q波や右室肥大パターンを示した症例を認めなかったが，症例数が少ないためこれが重複例の特徴かどうかは断定できない。また，その他の所見も重複例・欠失例間で差があることは思われなかった。かつ，重複部位・欠失部位と心電図所見にも一定の傾向を認めなかった。しかし，筋ジストロフィー患者の心電図は年令と共に変化し，所見も多くなりかつ悪化していくため，検討する症例数をもっと多くして年令の要素を加味できる検討法が必要と思われた。

以上検討した 4 項目の臨床所見では，重複例と欠失例の間に明らかな差は認められず，重複や欠失の認められた部位との相函関係も明らかではなかったが，症例数を増やし，検討する臨床所見項目を考慮すれば，何らかの有意な差，

または重複・欠失部位との相函関係，ひいては臨床上の多様性の原因が見つけることができるかもしれない。今後の課題として検討していく必要がある。

参考文献

1）Gallati SL, Koenig M. et al : Molecular deletion patterns in Duchenne and Becker type muscular dystrophy. Hum Genet 81 : 343-348, 1989

2）亀尾　等，唐川武典ら：日本人の Duchenne 型及び Becker 型筋ジストロフィー症患者における原因遺伝子の欠失及び重複の検出，筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究，高橋班，平成2年度研究報告書，1991，p. 34.

3）児玉　省，品川不二郎，茂木茂八共訳編著：日本版 WISC-R 知能検査法1989年尺度修正版，日本文化科学社，東京，1989，p. 1.

4）祖父江逸郎，西谷　裕：筋ジストロフィー症の臨床，医歯薬出版，東京，1985，p. 143.

筋緊張性ジストロフィー症の原因遺伝子近傍における連鎖不平衡及び PCR-RFLP 法による簡便遺伝子診断

班　員　三　木　哲　郎
大阪大学医学部老年病医学講座

共同研究者　山　縣　英　久，武　本　優　次
名　倉　　潤，荻　原　俊　夫
大阪大学医学部老年病医学講座

要　旨

筋緊張性ジストロフィー症（DM）の原因遺伝子は，第19染色体長腕にある。最近の分子遺伝学的解析では，DM 座位は約 200 kb の範囲に狭められている。その遺伝子座位の順序は，動原体—D19S19—APOC2—D19S63—p37.1—p36.1—D19S62—末端である。今回，我々は，DM 座位の遺伝子マーカーである D19S19, APOC2 D19S63, p37.1，p36.1 を用いて連鎖不平衡の有無を検討し，DM に最も近いマーカーを検索した。その結果，p37.1 において強い連鎖不平衡を見出した。この事から，DM において，p37.1 が最も近いマーカーの1つと考えられた。

また，DM の遺伝子診断について，APOC2 遺伝子の PCR-RFLP 法を用いた簡便法を開発したので併せて報告する。

目　的

連鎖分析によると筋緊張性ジストロフィー症（DM）の原因遺伝子座位は，第19染色体の長腕（19q13.2-q13.3）にある。最近の分子遺伝学的解析では，DM 座位は，約 200 kb の範囲に狭められている。その遺伝子座位の順序は，動原体—D19S19—APOC2—D19S63—p37.1—p36.1—D19S62—末端である。

これら DNA マーカーは，DM 座位にあまりに近接しているため，従来の家系の連鎖分析により遺伝子組み換え部位を決定して，遺伝子間の相互位置関係を同定する事は困難である。

我々は，各マーカー RFLP のハプロタイプ分析を行い，連鎖不平衡を計算することにより，DM 座位に最も近いマーカーを検索した。

また，原因遺伝子が単離されていない現在，遺伝子診断は，近傍のマーカーを用いた連鎖分析になるが，これまで有用な簡便法は報告されていない。今回我々は，近傍の APOC2 遺伝子の多型を利用した PCR-RFLP 法を診断に応用できるか検討した。

方　法

（1）連鎖不平衡の解析

日本人の DM 家系（40家系約 200 名）の高分子量 DNA を PstI, TaqI, PvuII, BamHI, BglII の5種類の制限酵素により消化した後，順に D19S19, APOC2, D19S63, p37.1, p36.1 の DNA プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。得られたデータは，血縁関係のない健常者，DM 患者群に分け，各々正常遺伝子，原因遺伝子に連鎖している対立遺伝子を集計して，連鎖不平衡を計算し，χ^2 検定を行った。

（2）簡便遺伝子診断

DM座位に強く連鎖している APOC2 遺伝子の多型に富む領域（874 bp）を5' 側プライマー（GCAAGATGAGATGCCTAGCCCGA）及び3' 側プライマー（GCCGGACTTCAATAA-

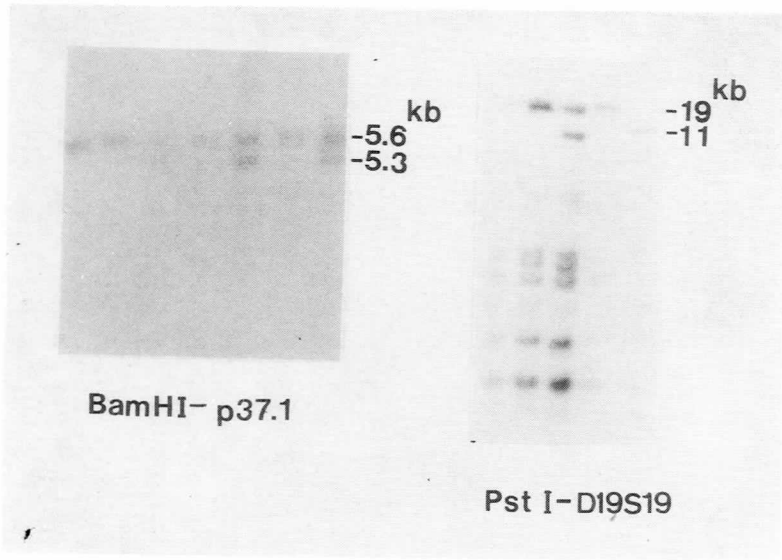


図1　DM座位近傍の プローブ p37.1 と D19S19 の RFLP。

表1　連鎖不平衡の解析

DNA マーカー	制限酵素	対立遺伝子	DM	健常	D	χ^2
D19S19	PstI	A_1=19 kb	8	16		
		A_2=11 kb	4	12	0.09	0.32
APOC2	TaqI	B_1=3.8	8	24		
		B_2=3.5	6	16	−0.03	0.04
D19S63	PvuII	C_1=7.1	6	9		
		C_2=6.8	2	11	−0.23	2.30
		C_3=6.5	6	10	0.09	0.37
p37.1	BamHI	D_1=5.6	23	28		
		D_2=5.3	1	20	0.39*	10.89*

* significant ($p<0.001$)　(standardized linkage disequilibrium constant)

$$D=\frac{n_1\cdot n_4-n_2\cdot n_3}{[(n_1+n_2)\cdot(n_3+n_4)\cdot(n_1+n_3)\cdot(n_2+n_4)]^{1/2}}$$

(Hill and Robertson, 1968)

AGATTAGTC) を使って PCR 法にて増幅 (94°C 1分, 55°C 2分, 72°C 3分を40サイクル, $[Mg^{2+}]$=2mM, ゲノム DNA 約 1 μg, 他は, 従来法と同様) し, AvaII, BanI, MboII の3種類の制限酵素により消化した後, そのままアガロース電気泳動を行い, 切断パターンを DM 家系毎に解析した。

結果及び考察

(1)連鎖不平衡の解析

サザンハイブリタイゼーションで出現した多型性 DNA バンドを図1に示した。p36.1-BglII の RFLP は, 白人にて E_1=9kb, E_2=6kb の2つ報告されているが, 日本人の健常者, 患者ともほとんど 9kb のバンドしか認めず, informative なデータとならなかった。

表1に示したように, χ^2 検定の結果, p37.1 において強い連鎖不平衡を見出した。この結果は, 今後の DM 遺伝子単離に向けて重要な手掛かりを与えるものと思われる。

(2)簡便遺伝子診断

DM 家系の DNA を APOC2 の多型領域に

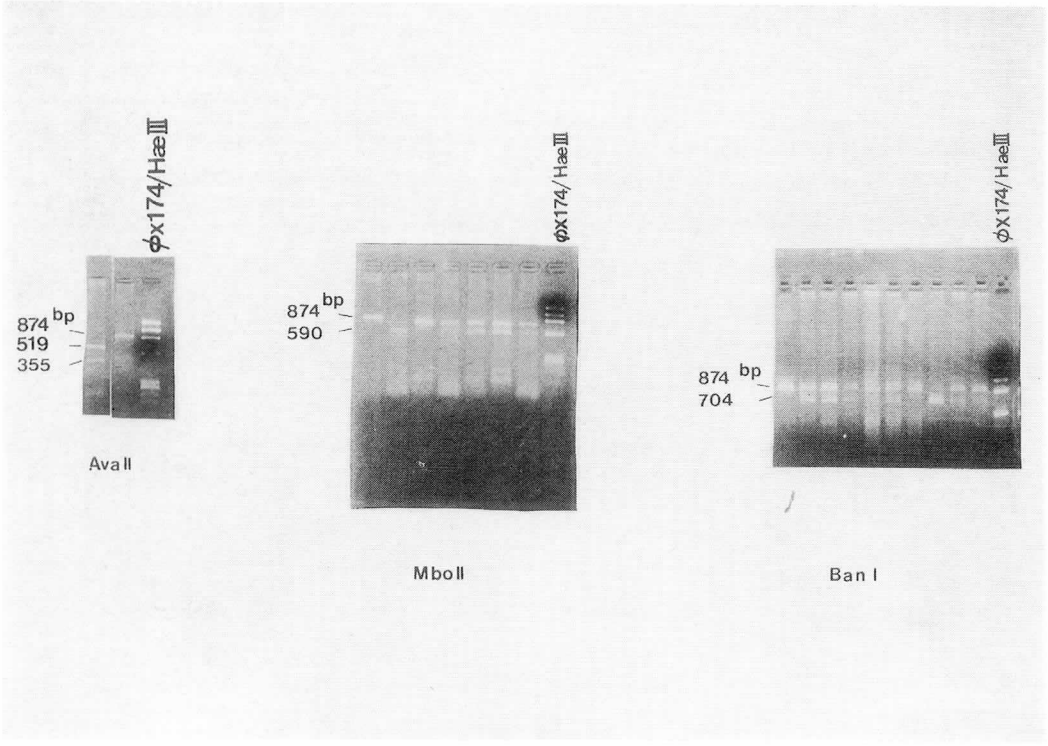


図2 APOC2 遺伝子多型領域の PCR-RFLP。874bp の切断パターンにより多型が出現する。
AvaII（1：874bp，2：519＋355bp）　BanI（1：874bp，2：704＋170bp）
MboII（1：874bp，2：590＋284bp）

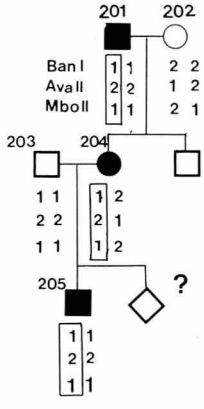


図3 DM 家系に対する APOC2 PCR-RFLP 法によるリンケージ解析。
201，204，205が DM 患者。
202，203が健常者。

ついて PCR にて増幅した後，AvaII，BanI，MboII によって消化した。切断パターンは，AvaII（1：874bp，2：519＋355bp），BanI(1：874bp，2：704＋170bp），MboII(1：874bp，2：590＋284bp）となった。典型例を図2に示す。

DM 家系—(39）において PCR-RFLP を施行したところ，図3のような結果となった。図3において［121］と疾患が連鎖しており，今後，203と204の第2子について［121］のホモなら患者と診断可能である。

この方法は，DM 遺伝子が単離されていない現在，直接診断ではないが，非 RI を使った迅速な簡便法として有用と思われる。

ま と め

1．DM 座位近傍の遺伝子マーカーの内，p37.1 が日本人 DM において強い連鎖不平衡を示した。

2．非 RI の DM の簡易遺伝子診断法として

APOC2 遺伝子多型領域の PCR-RFLP 法が，有用と思われた。

文　献

1) Helen G. Harley, J. David Brook et al : Detection of Linkage Disequilibrium between the Myotonic Dystrophy Locus and a New polymorphic DNA Marker. Am. J. Hum. Genet. **49** : 68, 1991

2) L. C. Surch, S. C. Leblond et al : A highly informative PCR marker linked to Myotonic Dystrophy illustrating some of the hazards of PCR-based molecular analysis. Am. J. Hum. Genet. Supplement, Vol. 49 No. 4, p. 195, 1991

Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝相談倫理の検討

遺伝相談の定義にかかわる問題を中心として

班　員 白　井　泰　子
国立精神・神経センター精神保健研究所

共同研究者 大　澤　真木子，福　山　幸　夫
東京女子医科大学小児科

要　旨

遺伝相談倫理についての合意形成に向けての基礎資料の作成のために今年度のプロジェクト研究として行った『遺伝相談倫理に関するアンケート調査』の中から，遺伝相談の定義にかかわる諸問題―遺伝相談の目的，遺伝相談カウンセラーの任務と行動，遺伝相談における第三者への情報の開示―を取り上げて検討した。遺伝相談の主たる目的を“与えられた情報をクライエントがどう扱うかを援助するためのコミュニケーション（過程）”と考えるならば，クライエントのかかえる問題の心理的側面に対する配慮を踏まえた上での医学情報の提示の仕方について再検討する必要が示唆された。また，本人の同意が得られなかった場合の親族に対する情報の開示の是非についても，今後更に検討を要する。

目　的

分子遺伝学の進歩にひきかえ，遺伝相談の現状には解決すべき問題が数多く残されている[1)2)3)]。『臨床遺伝学認定医制度』に関する日本人類遺伝学会の会告[4)]にも示されているように，臨床遺伝医としての責務を全うするためには遺伝性疾患に関する一般的診療能力の修得に加えて，遺伝相談のクライエント（被相談者）の自律性を尊重し，クライエントの自己決定を勇気づける方向での遺伝相談のあり方についての認識およびカウンセラーとしての適切な行動様式の獲得が不可欠であろう。

本報告では，遺伝相談倫理についての合意形成に向けての基礎資料の作成のために今年度のプロジェクト研究として行った『遺伝相談倫理に関するアンケート調査』の中から，遺伝相談の定義にかかわる諸問題――遺伝相談の目的，遺伝相談カウンセラーの任務と行動，遺伝相談における第三者への情報の開示――を取り上げて報告する。

方　法

本研究班班員及び顧問の所属する57施設（延べ171名）に対して自己記入式の調査用紙に返信用封筒を添えて郵送し，40施設（延べ79名）から回答を得た（回収率70.2%）。調査実施期間は1991年10月である。

結　果

（1）遺伝相談の目的

6つの事項を示し，遺伝相談の目標という点からみた各事項の重要性を5段階尺度を用いて評価させたところ，図1に示す結果を得た。

遺伝相談の目的としては，「(5)当事者の対処行動の援助」や「(2)患者・家族の不安や罪悪感の軽減」を重視する者が多かった。また，「(1)遺伝性疾患の予防」（81.3%）だけでなく「(3)保因者数の減少」や「(4)遺伝的健康水準の向上」を重視する者も半数近くあった。特に「(4)

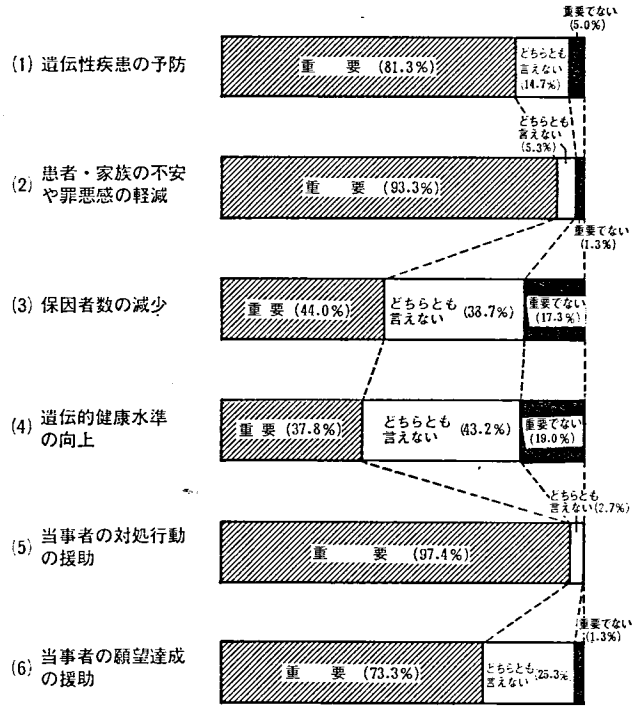


図1　遺伝相談の目的

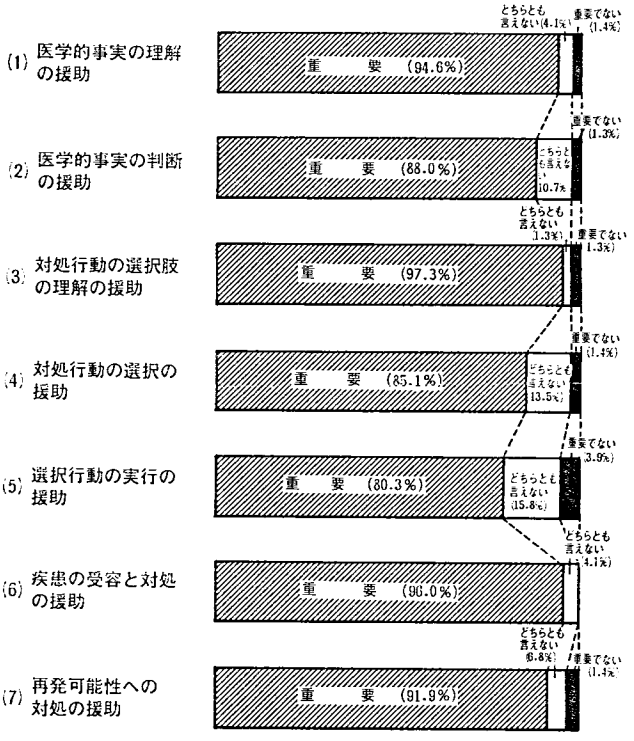


図2　遺伝相談カウンセラーの任務

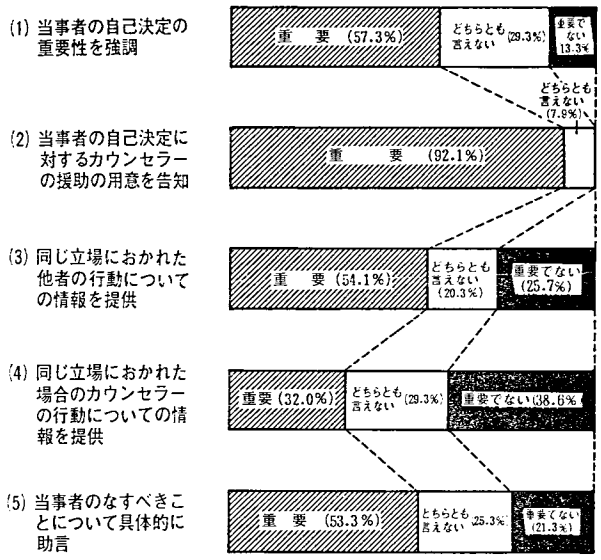


図3　遺伝相談カウンセラーの適切な行動

遺伝的健康水準の向上」に関しては，遺伝相談の経験＜なし＞群に比べ＜あり＞群の方がこれを重視する傾向の強いことが示された（$\chi^2=10.693$　$df=4$　$p=0.030$）。

（2）遺伝相談カウンセラーの任務

7つの事項を示し，遺伝相談カウンセラーの任務という点からみた各事項の重要性について5段階尺度を用いて評価させたところ，図2に示す結果を得た。

回答者の過半数以上は，ここに挙げた7項目すべてを遺伝相談カウンセラーの任務として重要だと考えていることが明らかにされた。その中でも特に，「(1)医学的事実の理解の援助」「(3)対処行動の選択肢の理解の援助」「(6)疾患の受容と対処の援助」「(7)再発可能性への対処の援助」の4項目については，回答者の9割以上が遺伝相談カウンセラーの任務として重視していることが解った。また，「(6)疾患の受容と対処の援助」を重視する傾向は，遺伝相談の経験＜あり＞とする回答者に強く示されていた（$\chi^2=6.187$　$df=2$　$p=0.045$）。

（3）遺伝相談カウンセラーとしての適切な行動

5つの事項を示し，遺伝相談カウンセラーとして遺伝相談の中で各々の事項を行うことの重要性について5段階尺度を用いて評定させたところ，図3に示す結果を得た。

遺伝相談カウンセラーとしての適切な行動として9割以上の回答者が選んだ項目は，「(2)当事者が下した決定に対しては，できるだけの援助をする用意のあることを知らせる」のみであった。また，「(1)当事者の自己決定の重要性の強調」の重要性を指摘した者は，遺伝相談経験の有無に拘らず，過半数をわずかに超えるに留った。「(5)当事者のなすべきことについての具体的助言」という指示的行動様式をカウンセラーとしての適切な行動とした者も過半数にのぼっていた。さらにまた，遺伝相談の経験＜あり＞とする回答者は，「(4)同じ立場におかれた場合のカウンセラー自身の行動についての情報の提供」という，いわゆる“比較情報”（comparative information）の提供を重視する傾向のあることも示唆された（$\chi^2=7.476$　$df=4$　$p=0.113$）。

（4）Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の遺伝相談における情報の開示

DMD と診断された児の母が，診断及び関連する遺伝情報を，同じ疾患の患児をもつ可能性のある自分の姉妹など他の親族に伝えることを拒んだ場合，遺伝相談カウンセラーとしてどう対処するかを尋ねたところ，図4に示す結果を得た。

遺伝相談の経験＜あり＞群では，診断及び関

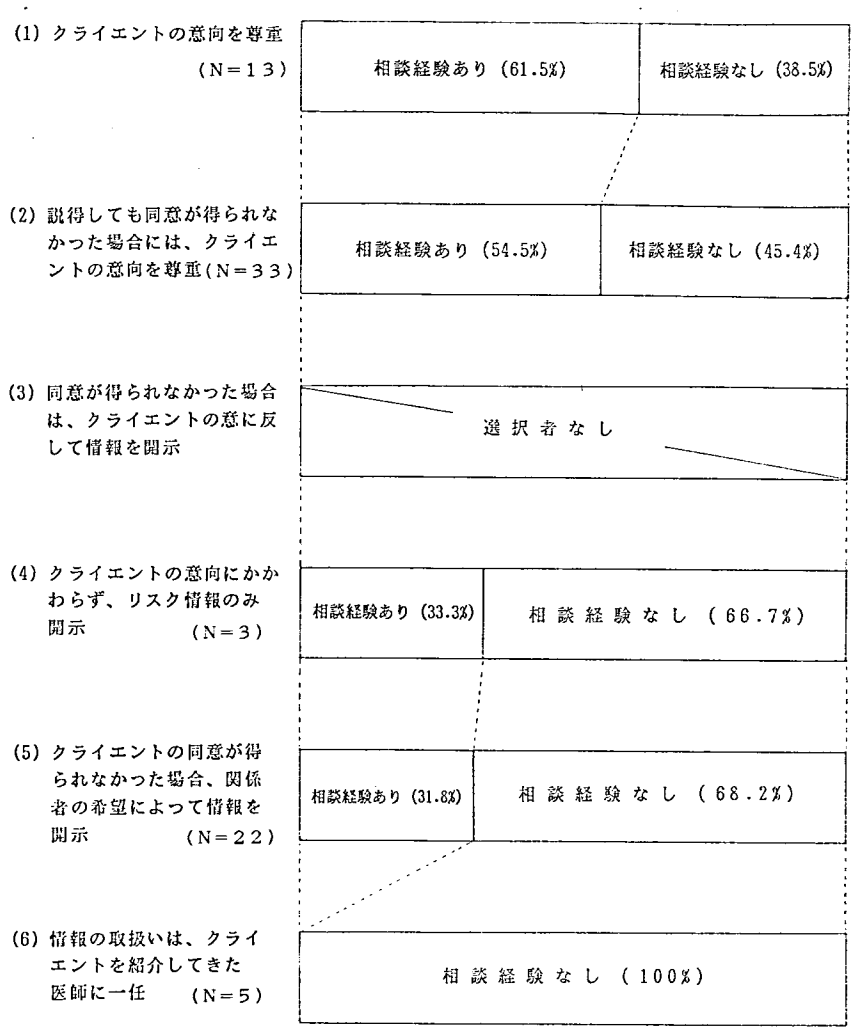


図4 Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝相談における情報の開示

連する遺伝情報の開示についての承諾を得るために患児の母に働きかける努力はするとしても，最終的には“クライエントの意向を尊重して，情報の開示を差し控える”（図4(1)，(2)）という立場をとるとする者が8割弱である。これに対して経験＜なし＞群では，情報の開示に対してクライエントの同意が得られなかった場合であっても，“リスクに直接関連する情報に限り，何等かの形で関係者に開示する”（図4(4)(5)）と回答した者が4割あった。このように，DMD の遺伝相談における親族への情報の開示については，遺伝相談経験の有無によって考え方に差異のあることが示唆された（$\chi^2=8.459$ $df=4$ $p=0.076$）。

考　察

遺伝相談の目的をどう考えるかについては種々の立場がある[5)6)]。しかし今日では，WHO の定義（1972）やアメリカ人類遺伝学会遺伝相談特別委員会の定義[7)]に明示されているように，遺伝相談の主たる目的は，“遺伝医学情報の提供及び遺伝性疾患の予防”から“与えられた情報をクライエントがどう扱うかを援助するためのコミュニケーション（過程）”へとその力点がシフトされている。こうした立場から遺伝相談カウンセラーの役割と行動とを考えれば，ク

ライエントのかかえる問題の心理的側面に対する配慮を踏まえた上での医学情報の提示の仕方について再検討する必要があろう。また，本人の同意が得られなかった場合の親族に対する情報の開示の是非に関しては，アメリカ合衆国大統領委員会報告書[8]の指摘などを参考にしながら，わが国においてどの様に考えるべきかを改めて検討する必要がある。

最後に，アンケート調査に御協力を賜わった諸先生方に対し，感謝の意を表する。

文　献

1）福山幸夫：遺伝相談の現状把握と今後の解決すべき問題の検討，筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究　平成2年度研究報告書，11-14，1991

2）S．ケスラー(編)：遺伝相談―心理的次元―。大倉興司，佐治守夫，高柳信子訳，新曜社，1984

3）Sorenson, J. R.: Some social and psychological issues in genetic screening: Public and professional adaptation to biomedical inovation. In Bergsma, D. *et al.* (Eds.), Birth Defects: Original Article Series. 10(6), 165-184, 1974. National Foundation, March of Dimes

4）日本人類遺伝学会：会告「日本人類遺伝学会・臨床遺伝学認定医の到達目標について」，人類遺伝学雑誌，**36**(1)，1-10，1991

5）Epstein, C. J.: Who should do genetic counseling under what circumstances? In Bergsma, D. *et al.* (Eds.), Birth Defects: Original Article Series, 9(4), 39-48, 1973. National Foundation, March of Dimes

6）坂元正一(編)：遺伝相談ガイドブック，厚生省心身障害研究昭和57年度報告書，1982

7）Ad Hoc Committee on Genetic Counseling: Genetic Counseling, Am J Hum Genet, **240**, 240-242, 1975

8）President's Commission for the Study of Ethical Problem in Medicine and Biomedical and Behavioral Research: Screening and counseling for genetic conditions. Superintendent of Documents, US Government Printing Office, 1983

DNA 技術と筋ジストロフィー対策

顧　問　近　藤　喜代太郎
北海道大学医学部公衆衛生学講座

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の研究が飛躍的に進展し，その遺伝子と，対立遺伝子の産物であるジストロフィンが分析され，その生理的役割と DMD の発症機序がかなり明らかにされ，また診断への応用が進みつつある。一方，現在，日本の各地方に DNA 技術をもつ施設が増し，それぞれの地域の DMD 対策への協力が得やすい状況も生まれ，また遺伝の問題に対する日本人の考え方にも変化がみられる。

本稿では DNA 技術の応用を前提として，日本の筋ジス対策とそれに対する患者サイドの考え方に配慮しながら，DMD を中心とする筋疾患の予防対策の望ましいあり方を考察する。

I　筋ジストロフィーと予防

狭義の治療をふくめて，Leavell と Clark (1958) は疾患に対する対策をその自然史に応じてつぎのように分けた[1]。

1次予防とは，疾患の発生を阻止することで，その対象は公衆または発病の危険性の高い「ハイリスク群」であり，予防の方法は一般に公衆衛生的である。

2次予防とは，なんらかの方法で発見できる程度に進んだ疾患に対する早期発見・早期治療であり，発見の枠組みは一般に公衆衛生的であるが，治療の方法は臨床的である。

3次予防には，疾患のもたらす結果を軽減するすべての対策がふくまれる。リハビリテーションはその代表的な方法である。

DMD をこのような立場からみると，現行の対策は，3次予防に著しい重点がある。これは遺憾なことであるが，その最大の理由は有効な治療がないため，2次予防に実効性がなく，また，発生阻止を主として後向的遺伝相談に依存していたためである。しかも，「遺伝」を正視しない日本人の国民性によって，これまで遺伝相談の有効性が発揮できる場面が限られていたのが実情であった。しかし DNA 技術は従来の遺伝相談の制約を破り，また近年，我国でも「遺伝」に対する態度が大きく変わりつつある。こうした状況に対応して DMD の遺伝相談システムを再検討することは有意義なことである。

II　当班のプロジェクト 1A の成果

1984年以来，著者は当班のプロジェクト1A「疫学」のリーダーとして筋ジストロフィーの疫学的研究を進展させ，狭義の研究に加えて，筋ジス対策にかかわる様々の問題点を疫学的方法で評価する共同研究を進め，つぎのような成果を得た。

1）筋ジストロフィーの施設ケアの便益性に関する肯定的評価（1987年度研究報告書 pp. 5-8）

2）DMD の遺伝対策の基礎的研究（1984年以前の研究をふくめて，1987年度研究報告書 pp. 13-15 に要約）

(i)集団遺伝学(Genet Epidem 4：425-432, 1987)

(ii)遺伝相談に対する医師の意見

(iii)同上に対する患家の意見

(iv)臨床的解析，とくに発病年齢・受診年齢・診断確定年齢の分布

(v)国療筋ジス施設における CPK 検査の現状

(vi)電算機による家系登録に関する技術的問

題

(viii)新生児スクリーニング

3）小冊子「進行性筋ジストロフィー症の遺伝相談」の発行（1980）

これらの知見と著者らの個人的経験から，DMD の予防は日本では国療筋ジス施設において診療担当者が診療と並行して遺伝相談を行なうことがもっとも適切であると思われた。しかしながら，つぎにのべる理由から遺伝相談は「前向的」であることが絶対に必要であることが明らかになった（1990年度研究報告書 pp. 5-9)。

前向的遺伝相談が必要となった状況は，

(i)患者・家族が養育施設における遺伝対策の充実を望んでいる。

(ii)産児数の著しい減少・出産間隔の短縮のため，兄の診断確定を動機とする後向的遺伝相談がほとんど無意味になった。

(iii)DNA 技術の進歩のため，家系図に基づく確率計算によらず，yes/no 型の保因者診断ができる場合が増した。

(iv)胎児診断の進歩で，罹患する胎児を特定できる場合が増した。

(v)(ii)の現状のため患児の大半が第1子となるため，保因者を事前に検出し，前向的遺伝相談を行なう仕組みが必要となった。

このような変化のため DMD の遺伝相談は，個々の事例の主治医が個別的に対応するだけでは不充分となり，全国の関連施設・専門家が協力して体制をつくり，あらかじめ保因女子を検出し，継続的に進めなければならない状況となった。

III 前向的遺伝相談ネットワークの技術的問題

「前向的遺伝相談」とは近親者の発病を動機とせず，検出した保因者の第1子出産以前に行なうもので，第1子から予防の対象となる点が後向的遺伝相談と異なる。しかし，その実施には少なくともつぎの各点を解決する必要がある。

1）家系登録

遺伝性疾患に関して，患者・近親者の個人情報を登録し，診療・予防・福祉対策に活用するデータバンクである。DMD の場合，すべての国療筋ジス施設がこれに参加することが望ましく，当面，つぎのような仕組みが考えられる。

(i)ある施設に親コンピュータを置き，登録に参加する施設と「パソコン通信」ができるようにする。

(ii)DMD を診断したとき，その女子近親，とくに姉妹の保因者検査など，必要な検査を行なう。

(iii)患者の保護者などに遺伝相談の意義，DNA，ジストロフィンによる診断，絨毛穿刺による出生前診断と選択的妊娠中絶などについての基礎知識を提供し，希望があれば家系登録ができることを説明する。

(iv)希望があった場合，パソコン通信によって，親コンピュータに家系登録を行なう。

(v)データバンクの運用，とくに守秘義務についての規定を設ける。

2）遺伝相談ネットワーク

DNA 技術を利用でき，遺伝相談に経験・意欲のある施設が共同して，パソコン通信で相互に情報利用できるネットワークをつくる。このシステムによって，1）の仕組みであらかじめ登録されている保因者が必要としたとき，将来の任意の時期に，国内の任意の地域で，最初の診療担当医とは別の医師が遺伝相談の求めに応ずることができる。

3）選択的妊娠中絶

保因妊婦の希望があった場合，あらかじめ協力関係のできている産科を紹介する。

IV 社会的受容と倫理的問題

遺伝相談システムは，その内容を理解した上での求めに応ずる社会サービスのひとつであり，「劣悪者」の排除を目的としないことは勿論，国民の遺伝的資質の向上を図る優生的意図をもつものではない。DMD 場合でも，発病の悲劇を熟知し，その再発を避けようと希望する近親者，とくに保因女子の希望に応ずるひとつの技術であるにすぎない。

1）患者サイドの希望

プロジェクト1Aが行なった調査のなかで，「発病後の対策だけでなく，予防，とくに遺伝対策を筋ジス専門施設で充実させて欲しい」という選択肢を肯定したものは，患者が入院中の保護者は45/96，入院外の保護者は17/35で，ともに約50%であった（1989年度研究報告書 pp. 5-8)。

このようなアンケート調査には制約もあるが，社会サービスはその需要者に受け容れられなければならない。よいシステムはそれに対する賛意，需要をも増すものであり，最近のように産児数が激減した現状における家族計画では，児の健康への懸念がきわめて大きいことを考えれば，このような遺伝相談システムの意義は大きい。

遺伝相談はクライアントに求められてはじめて，行なうべきもので，説明を受けた上で，それを欲しないとのべた人に決して強制すべきではない。その意味で，筋ジストロフィーの診断の中に，この点についての「説明と同意」が適切なかたちでふくまれ，現状でどんなサービスができるかについて情報を提供することがすべての前提となる。

2）倫理的問題

遺伝相談には多くの倫理的問題があるが，近年のDNA技術の進歩によって，新しい問題点も生じている。DNA 情報は病名，予後など，医療関係者に守秘義務が課される個人情報に準ずると考えられており，この技術を活用したシステムはこの点を充分に配慮する必要がある。

一般に，診療上得られた個人情報は医療の進歩，将来の患者の利益になる場合でも，その個人に直接の利益が生じない場合は「説明と同意」なくして診療機関の外に出して収集，貯蔵できないとされている。ただ，この点に関する具体的な問題は国際学会などで，検討されている段階で，個々の場合に適応できる，ひろく承認された基準はまだないのが実情である[2]。

V 予測される効果

当面，前向的遺伝相談はつぎのような効果が予想される。

1）保因女子の家族計画への支援

このシステムは DMD の保因女子に対し，夫との間の実（女）子を安心して産める道を開くもので，この点こそが，このシステムの最大の存在意義である。

2）1次予防

選択的妊娠中絶はそれが実施された数に応じて将来の DMD 患者を減ずる。DMD の突然変異率は高く，新生男児約2,000人に1人の割合で発生し，その2/3は保因女子から遺伝し，1/3は新生突然変異によると推定される[3]。後者は現状ではまったく，予知できず，従って，1次予防の効果の上限は現在の発生率の1/3への減少である。

文 献

1）Leavell HR, Clark EG : Preventive Medicine for the Doctors in his Community, McGraw-Hill, New York, 1958.

2）Inoue E, Bankowski Z : On ethics in medical genetics, I Fujiki N, Bulyzhenkov, Z Bankowski (eds) Medical Genetics and Society, Kugler, Amsterdam, 1991, pp.47-93.

3）近藤喜代太郎：Duchenne 型筋ジストロフィー症の遺伝と日本における実態，神経研究の進歩 24：693-701，1980.

Ⅱ. 臨床病態

A. 画像診断

プロジェクト研究Ⅱ　臨床病態
Ⅱ-A　画像診断

進行性筋ジストロフィーの心筋病変に対する心臓核医学的検討

班　　員　石　原　傳　幸
国立療養所東埼玉病院

共同研究者　佐々木　　明[1]，川　村　　潤[1]，青　柳　昭　雄[1]
小　野　彰　史[2]，平　田　俊　吉[2]，石　川　恭　三[2]
[1] 国立療養所東埼玉病院　[2] 杏林大学第2内科

要　旨

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー（DMD）患者34例について心臓核医学検査（^{201}TI —心筋 SPECT，^{99m}Tc 心プールスキャン）を施行した DMD の心筋病変について半定量的に評価し検討した。SPECT 像より左室心筋を9領域に区分し2人の医師により各領域の uptake を4段階に半定量的に診断し Defect score（DS）とし，その総和を Total defect score（TDS）とした。心筋低灌流領域の分布は心尖部が最も高く（1.18）以下，下位後壁（1.03），下位前壁（1.00）の順に高値を示したが，年令および骨格筋の障害度とは明らかな相関は認められなかった。心機能（LVEF）と TDS の関係では，r＝−0.53で有意な負の相関を示した。（P＜0.01）。

今回の結果から心筋病変の進行が心機能低下に関与していると考えられた。心臓核医学検査は，本症の心筋障害の評価に適した検査法であると考えられた。

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）では骨格筋ばかりでなく心筋にも病変を認め[1)2)]，二次性心筋症を呈することが知られており[3)4)]，その心筋病変および心機能の評価は，日常臨床上重要な課題となってきている。今回，我々は心臓核医学検査（^{201}TI- 心筋 SPECT および，^{99m}Tc 心プールスキャン）を施行し DMD の心筋病変について半定量的に評価し検討したので報告する。

対　象

国立療養所東埼玉病院に入院中の男性 DMD 患者34例で，年令は12〜26歳（平均17歳7カ月）であり，四肢機能障害度は4度〜8度（平均6.7度）であった。

方　法

心プールスキャンにおいては ^{99m}Tc-HSA 740MBq（20 mCi）を静注し，約15分後に心電図同期下に 1 flame 30 msec 300 beats でデータ収集し variable RO1 法にて LVEF を算出した。

心筋 SPECT に関しては，安静時に ^{201}TI 111 MBq（約 3 mCi）を静注し約10分後より島津社製回転型ガンマカメラ（SNC, 51OR,）を用いて RAO 45°-LPO 45° の 180°（20秒×32方向）でデータを収集し，同社製シンチパック7000を用いて短軸断層像，長軸水平断層像及び長軸矢状断層像を再構成した。得られた SPECT 像より Fig. 1 に示すように左室心筋を高位前壁，下位前壁，高位中隔，下位中隔，高位側壁，下位側壁，高位後壁，下位後壁，および心尖部の9領域に区分した。

高位，下位の判断は短軸像より心基部より4スライスを高位心室とし，心尖部より4スライ

【方　法】

1．心プールイメージング

^{99m}Tc-HSA 740 MBq (20mCi)

multi gate 法：1 flame 30 msec, 300 beats

2．TI 心筋 SPECT

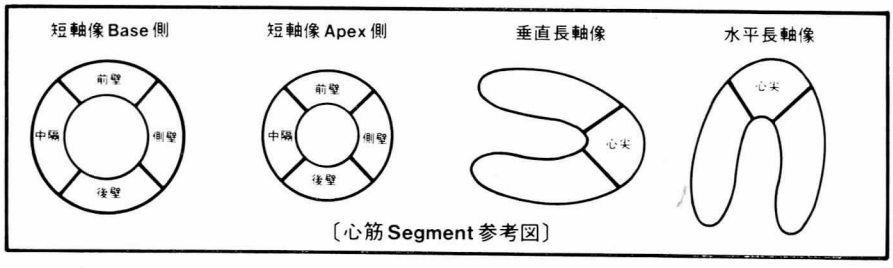
^{201}TI 111MBq (3mCi)

RAO 45°-LPO 45° 180°（20秒×32方向）

Matrix size：64×64（1 slice 6 mm）

島津社製回転型ガンマカメラ SNC 510R

島津製シンチパック 7000



Defect score (DS)

0点：正常灌流域

1点：軽度低灌流域

2点：高度低灌流域

3点：灌流欠損

Fig. 1

スを下位心室とした。

2人の医師により各領域の uptake を正常灌流域：0点，軽度低灌流域：1点高度低灌流域：灌流欠損：3点の4段階に半定量的に診断 Defect score (DS) とし，その総和を Total defect score (TDS) とした。

結　果

Fig. 2 に典型的な症例の心筋 SPECT を示す。症例は19歳男性で障害度は8度，LVEF は30%。上部2段に短軸像を下法に長軸及び水平断層像を示す。短軸像において左側面が中隔，上部が前壁，右側面が側壁，そして下方が後壁を示す。低灌流域は，後側壁から心尖部にかけて明らかに認められる。

(2)　低灌流領域の分布を示す。Fig 3

TDS の平均で得られた心筋低灌流領域の分布は心尖部が 1.18 と最も高く以下，下位後壁 (1.03)，下位前壁 (1.00)，高位後壁 (0.86) と高く，心尖部から後壁にかけて高値を示した。中隔および側壁では低値であった。

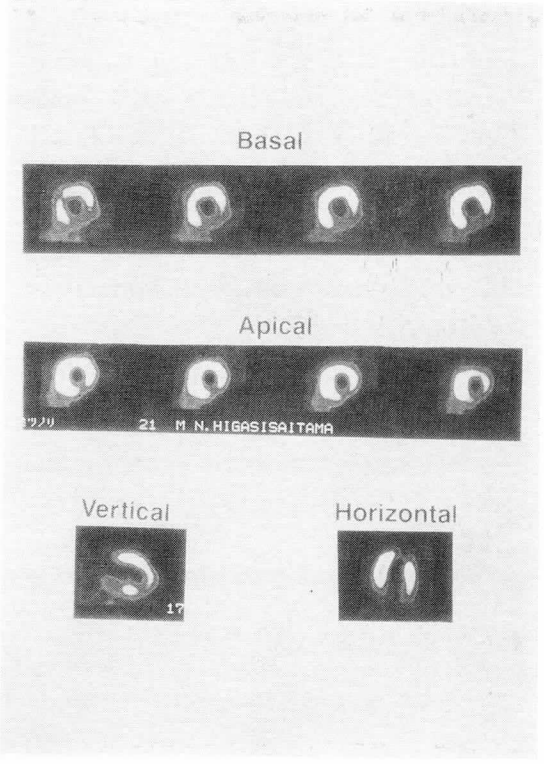


Fig. 2

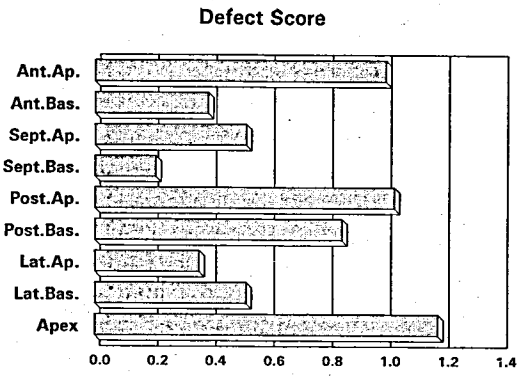


Fig. 3

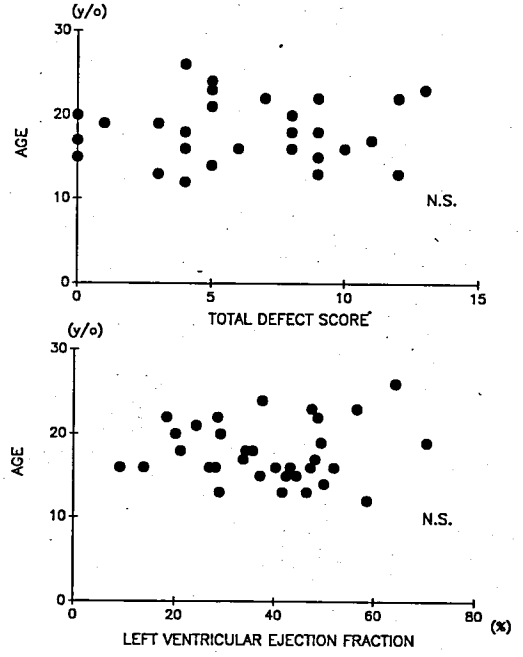


Fig. 4

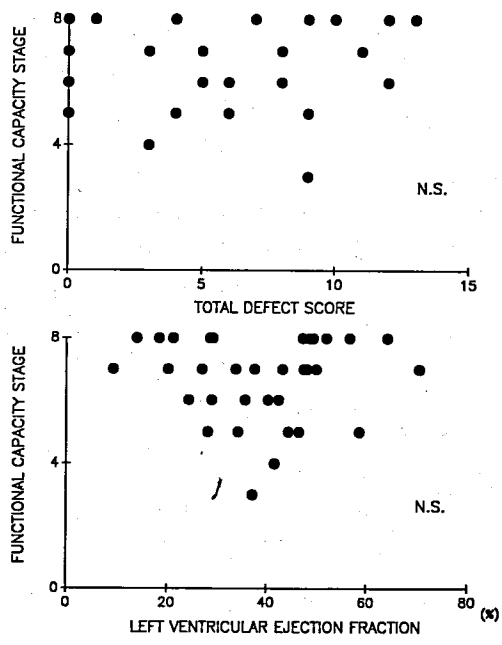


Fig. 5

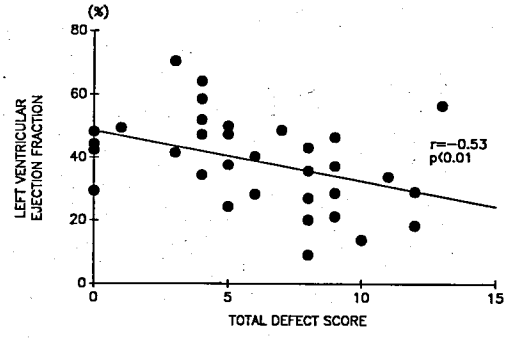


Fig. 6

(3) 年令と TDS および LVEF との関係。Fig. 4

全症例中最少年令である12歳で低灌流領域を認めたが，20歳で正常を示す症例もあり，グラフからも解るように TDS と LVEF ともに明らかな相関は認められなかった。

(4) 障害度と TDS, LVEF との関係。Fig. 5

年齢と同様に障害度においても明らかな関係が認められなかったが，心筋 SPECT にて DCM 様所見を示したものは障害度4度以下には認めず，5度に1例，8度に3例認められた。

(5) LVEF と TDS の関係。Fig. 6

グラフより明らかなように TDS と LVEF では，$r=-0.53$ で有意な負の相関を示した ($p<0.01$)。

考察およびまとめ

DMD における心筋病変は病理学的には左室後側壁の綿維化が特徴であり，更に進行した際は左室全体に及ぶことが知られている[1)2)]。

今回我々の結果では低灌流領域は心尖部から後壁を中心に多く認められ，病理学的報告[1)2)]

と同様と考えられた。しかし心筋病変は，各症例毎に相違があり障害度及び年齢とは関係が認められず，この点でも他の報告と同様の結果が得られた[5)6)]。また，TDS と LVEF に負の相関が認められたことより心筋病変の進行が心機能低下に関与しているものと考えられた。

心臓核医学検査は，他の検査法に比べより直接的に心筋病変を評価し得，かつ胸部変形の影響も受けにくく本症の心筋障害の評価に適した検査法であると考えられ今後更に，経年的かつ詳細な検討をしていく予定である。

文　献

1）Fowler NO : Classification and diagnosis of myocardial disease, ed by Fowler NO, Grune & Stratton, New York, p. 25, 1973

2）発知紀之：進行性筋ジストロフィーの心の病理学的研究 Duchenne 型 DMP 60剖検例の検討，四国医誌，**31**，295-310，1975

3）杉浦　浩：筋ジストロフィーの心筋所見，病理と臨床，580-310，1975

4）Perloff JK, et al, The cardiomyopathy of progressive muscular dystrophy, Circulation **33** : 625-649, 1966

5）安武敏明，富口静二ら：^{201}TI 心筋シンチによる Duchenne 型筋ジストロフィーの心筋障害の評価，筋ジストロフィーの疫学，病態および治療開発に関する研究，昭和61年度研究報告書，p. 145-149，1987

6）陣之内正史，井上謙次郎ら：Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における心筋症の ^{201}TI 心筋 SPECT，核医学，**22**，1353-1359，1985

心エコー検査による心機能評価と治療の検討

班　員　矢　嶋　茂　裕
国立療養所長良病院小児科

共同研究者　山　田　重　昭
国立療養所長良病院副院長

要　旨

断層心エコー検査により筋ジストロフィー症患者の心機能の変化を経年的に測定し，さらに左室壁応力と左室平均円周短縮速度との関係をみた。左室短縮率は3年間で有意に低下していた。左室壁応力と左室平均円周短縮速度の関係は，前負荷，後負荷に影響されない良好な心機能の指標と言われているが，DMD では正常群に比して高い壁応力と低下した短縮速度が特徴的であり，拡張型心筋症の状態に類似していた。心不全症状を呈した症例が3例あったが，いずれもきわめて高い壁応力と低い短縮速度の状態にあった。これらの症例に血管拡張剤のエナラプリルを投与したところ，両者の関係は正常領域へと近づき，臨床的にも有効と思われた。

左室壁応力と左室円周短縮速度の関係はDMD の心機能を把握する上で有用である。また血管拡張剤は心不全に対して積極的に使用すべきと思われた。

緒　言

Duchenne 型筋ジストロフィー症患者の一部は心不全が呼吸不全に先行し致命的となる。心不全の評価法として断層心エコー検査は簡便で有用であるが，近年，左室壁応力と左室平均円周短縮率の関係は前負荷，後負荷に影響されない良好な心機能の指標として注目されている[1)2)]。本年度の研究では，3年間における左室収縮能の変化をみた上で，筋ジストロフィー症患者における左室壁応力と左室短縮率の関係を求め，さらに心不全症状を呈した3例に対し，血管拡張剤エナラプリルを使用し有効性を検討した。

対　象

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) 32

表1　対象及び計測結果

	DMD (n=32)	CMD (n=3)	K-W (n=4)	健常者 (n=6)
年　齢 (Y)	21.6±6.1	18.6±1.6	25.2±3.5	22.1±6.5
左室短縮率 (%)	18.9±5.7	24.8±4.6	22.9±5.6	33.4±3.3
駆出時間 (msec)	277±23	296±12	332±16	335±16
RR時間 (msec)	716±118	666±18	890±64	954±89
収縮末期圧 (mmHg)	83.9±10.9	85.6±12.1	84.0±11.4	83.9±4.3
左室短縮速度 (circ/s)	0.57±0.18	0.68±0.12	0.64±0.12	0.97±0.10
左室壁応力 (g/cm²)	123.0±47.3	82.4±8.8	101.6±33.8	56.0±3.8

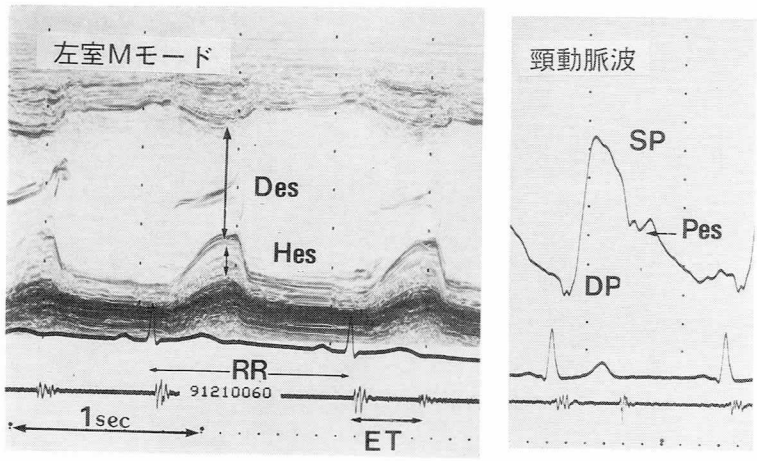


図1　収縮末期左室壁応力の計測方法

左室壁応力（end-systolic wall stress：ESWS）

$$=\frac{1.35(Pes)(Des)}{4(Hes)\{1+(Hes/Des)\}}$$

Pes：収縮末期圧　Des：収縮末期左室径

Hes：収縮末期左室後壁厚

心拍補性左室平均円周短縮速度（mean velocity of circumferential fiber shortening：mVcfc）

$$=\frac{SF\sqrt{RR}}{ET}$$

SF：左室短縮率　ET：駆出時間

図2　左室壁応力と短縮速度の計算方法

例，先天性筋ジストロフィー症（CMD）3例，Kugelberg-Welander 病（KW）4例，正常対照として6例について検討した（表1）。

方　法

Mモード心エコー図より収縮末期左室径（Des），左室短縮率（SF），左室後壁厚（Hes），RR時間（RR）を計測し，心音図，頸動脈波から左室駆出時間（ET），左室収縮末期圧（Pes）を求めて Grossman らの式[3]に基づいて左室壁応力（ESWS）を計算した。左室平均円周短縮速度（mVcf）は左室短縮率を左室駆出時間で除したもの，心拍で補正した短縮速度（mVcfc）は mVcf に $\sqrt{RR}$ を乗じたものである（図1，2）。

結　果

まず3年間の左室機能の変化を示した（図3）。経年的に計測した DMD 25症例について SF をみると，1例はきわめて左室機能が低下した状態で経過しており，心不全の進行後に呼吸不全が増悪して，体外式呼吸器に依存して現在に至っている。この症例は心室中隔が奇異性運動をしており SF としては計測の意味があまり無い。これを除外した24例では SF が 0.226±0.054 から 0.196±0.058 へと有意に低下し

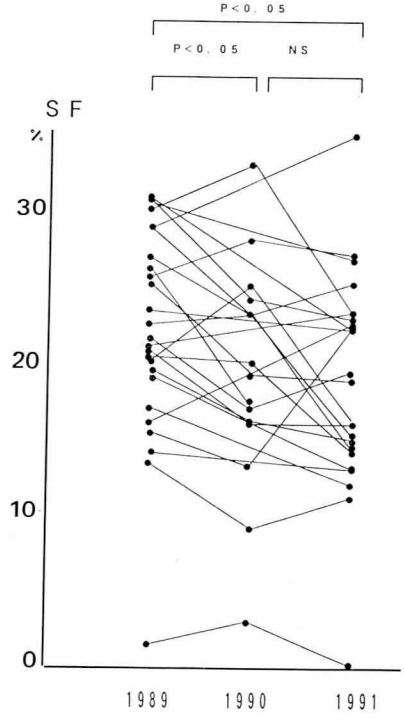


図3　左室短縮率の変化

ていた。しかし昨年度と本年のみ計測した15例についてみると，この2年間ではSFは低下していたが有意ではなかった。

次に左室壁応力（ESWS）と左室収縮速度（mVcfc）の関係を検討した。これらの計測値に関係する左室短縮率（SF），駆出時間（ET），RR時間（RR），左室収縮末期圧（Pes）をあわせて表1に示した。DMDは正常対照に比してRRが短く（心拍数が多い），ETもそれに比例して短かった。PesはDMDと正常対照で差がなかった。mVcfcはSFを反映してDMDでは0.57±0.18と低く，CMDは0.68±0.12，KWは0.64±0.12であり，正常対照の0.97±0.10に比していずれも低下していた。一方ESWSはDMD 123.0±47.3と正常対照56.0±3.8の約2倍の高値を示し，CMD, KWでは正常対照とDMDの中間の値を示した（図4）。従ってDMDでは壁応力が高く左室収縮速度が低下した関係であり，これは拡張型心筋症におけるパターンと類似していた。

次に個々の症例におけるESWSとmVcfcの関係を図5に示した。Colanらの報告した正常値±2SDの幅を実線で表わしてある。正常対照群はほぼこの正常範囲内に入り，KW, CMD群はやや収縮低下領域に入っていた。DMD群はColanらの示した正常領域より下方でESWS

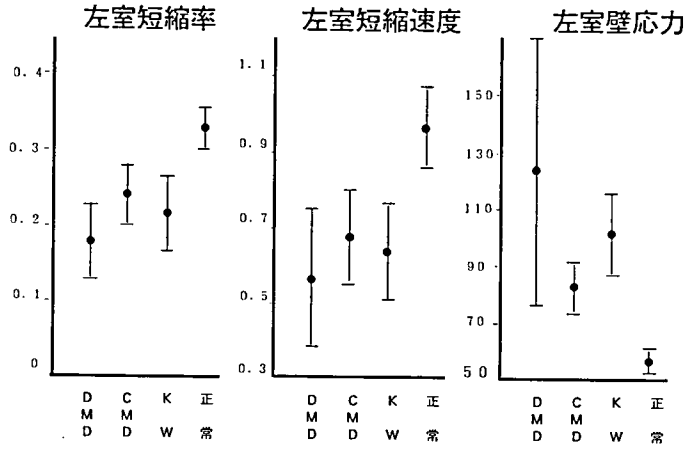


図4　疾患別計測値の比較
平均±標準偏差を示す

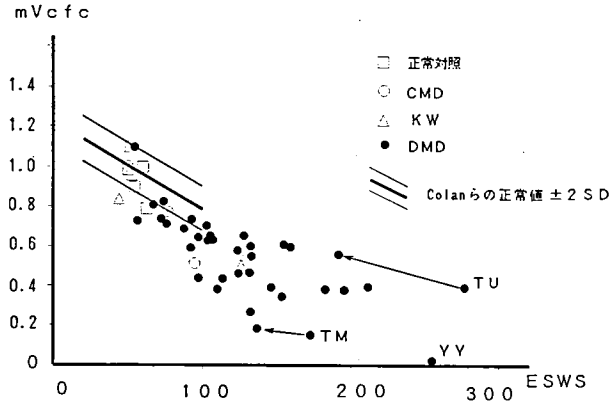


図5　左室壁応力と短縮速度の関係
矢印はエナラプリルによる治療前後の変化を示す

表2　エナラプリルによる計測値の変化

症例	左室短縮率		収縮末期圧		左室円周短縮速度		左室壁応力	
	前	後	前	後	前	後	前	後
T M	54	51	78	75	0.15	0.17	172	137
T U	13	17	103	73	0.39	0.55	274	193

が広く分散していた。

最後に血管拡張剤エナラプリルの効果を検討した。心不全症状を呈した3例にエナラプリル5mgを分2で内服させた。1例は心不全，呼吸不全が強く2年間内服を継続しているが，投与前は体外式呼吸器（CR）の装着を終日必要としていたが，投与後にはCRを1～2時間はずすことができるようになり，心機能が悪いながらも臨床的には安定している。他の2例は投与前と投与後1カ月での測定値を比較した（表2）。症例TMは呼吸不全を伴わず，動悸，頭痛などの愁訴がしばしばみられるものの心不全症状がそれほど強くない。投与後に軽度のmVcfcの上昇とESWSの低下がみられた。症例TUは外来通院中呼吸不全が徐々に進行し，心不全を合併したと思われる症例である。投与前には最も高いESWSを示していた。この計測からまもなく，呼吸・心不全が悪化し，胸水の貯留などで入院した。CRを使用し，エナラプリル，利尿剤などを使用した結果，軽快し退院した。計測上は治療開始後，血圧が低下し左室の後負荷が減少して，ESWSは正常領域へと近づいている（図5，矢印で変化を示す）。

考　按

DMDにおける心機能の評価について昨年までMモード心エコー図とドプラを用いた検討を行なってきた。今回報告した左室壁応力と左室短縮速度の関係は，後負荷があらかじめ組み込まれており，心機能を評価する上で鋭敏な指標といわれている。正常対照群についてはいくつかの報告においていずれもColanらの結果と殆ど差異がなく，その正常幅を参考にして検討した。その結果DMDでは拡張型心筋症と類似したパターンを示し，低い左室短縮速度と高い左室壁応力が特徴であった。片山ら[3]が指摘しているように，Colanらの示した正常群の相関は直線的であるが，ESWSが100以上の状態でも直線関係が成立するのかは疑問であり，ESWSが高いこと自体がすでに異常であると考えるべきとすると，DMDの約半数は正常群とは異なった心機能にあることになる。特に心不全症状を呈して治療を行なった3例はmVcfcが最も低いかESWSが最も高い値を示しており，DMDの中でも特に異常な状態であった事を反映していると考えられる。

血管拡張剤の効果については症例数が少なく十分な評価は困難であるが，従来の強心剤，利尿剤を中心とした治療では改善が乏しかった症例においても有効な印象を受けた。血管拡張剤を用いるとESWSが低下し，mVcfcとの関係が多少なりとも正常域に近づくことは理にかなっているといえよう[4]。今後，症例数を増やして検討を加えたい。

結　語

左室短縮速度と左室壁応力の関係は心機能を評価する上で有用な指標であった。DMDの多くは正常域からはずれており，その程度が強い症例において心不全症状がみられた。血管拡張剤エナラプリルはそうした症例において，検査上も臨床的にも有効と思われた。

文　献

1）Colan SD, Borow KM et al : Left ventricular end-systolic wall stress-velocity of fiber shortening relation : a load-independent index of myocardial contractility. J Am Coll Cardiol **4** : 715, 1984

2）Grossman W, Jones D et al : Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. J Clin Invest **56** : 56, 1975

3）片山博視：End-systolic wall stress から見た先天性心疾患の非侵襲的心機能評価の検討。東京医大誌 **60** : 69, 1990

4）Cohn JN, Franciosa JA : Vasodilator therapy of cardiac failure. N Engl J Med **297** : 27, 1977

神経筋疾患の病態についての骨格筋 MRI による研究

班　員　松　田　　博
愛媛大学医学部小児科

共同研究者　長尾秀夫[1]，赤松　満[2]，野島元雄[3]
仁井田　明[4]，三木　均[4]，貞本和彦[5]
[1] 愛媛大学医学部障害児病理　[2] 愛媛大学医学部理学療法部
[3] 愛媛県医療技術短期大学　[4] 鷹の子病院放射線科
[5] 鷹の子病院脳神経外科

要　旨

神経筋疾患の中で Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の MRI に特徴的な所見があることを昨年報告したが，本研究ではこれらの所見が他の型の筋ジストロフィーや神経筋疾患と異なるものであるか否かを検討した。

対象症例は福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）及び他の筋ジストロフィーとWerdnig-Hoffmann 病（WH）及び Kugelberg-Welander 病（KW）などの神経原性疾患をもった1歳10カ月から20歳までの10例である。MRI 検査は右下腿の軸断面と矢状断面を記録した。

その結果，歩行不能の FCMD や WH では腓腹筋よりヒラメ筋の病変が高度で，DMD と逆の傾向を示した。また WH と KW においては，MRI で遠位部により高度なシワ状の高信号域が認められ，DMD とは異なる所見が得られた。MRI 検査は神経筋疾患の補助診断として有用である。

目　的

神経筋疾患の病態を明らかにするために骨格筋の CT，ECHO などの画像診断法が有用であることはすでに多くの報告がある。また最近行われるようになった MRI 検査も骨格筋の病変を解明するのに役立つとの報告が散見される。著者らも本研究班において Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の骨格筋 MRI 所見を報告してきたが，今回は DMD 以外の神経筋疾患患者に骨格筋 MRI 検査を施行し，DMD と比較検討した。

方　法

DMD は昨年報告した患者21例で年齢は3歳5カ月から18歳まで，運動機能障害度は厚生省筋ジス班の8段階分類で stage 1 から stage 8 までであった。正常対象も昨年と同様で7歳から14歳までの6例であった。なお DMD と比較するため，本研究の神経筋疾患の運動機能障害度は DMD と同じ分類を用いた。

筋ジストロフィーでは福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）が stage 7 の1歳10カ月男児，stage 6 の6歳女児の2例，Becker 型筋ジストロフィー（BMD）が stage 1 の17歳4カ月男児，小児型常染色体性劣性遺伝の筋ジストロフィー（小児型筋ジス—AR-MD）が stage 2 の16歳9カ月男児，stage 3 の18歳3カ月男児の兄弟例であった。脊髄性進行性筋萎縮症では若年型 Werdnig-Hoffmann 病（WH）が stage 7 の8歳4カ月男児と stage 6 の12歳1カ月女児の2例，Kugelberg-Welander 病（KW）が stage 1 の6歳6カ月男児，stage 2 の9歳男児，stage 4 の20歳男児の3例であった。

MRI 装置は日立 G-50, 磁場 0.5 tesla で SE 法と IR 法を行った。検査部位は右下腿の最大径部を中心にして，軸断面と矢状断面をそれぞれ 6 から 8 連続断面記録した。

結　果

図 1 に DMD で運動機能障害度 stage 2 の症例の MRI 所見を示した（図 1）。矢状断面では腓腹筋にヒラメ筋より高度の高信号域が認められた。軸断面でも同様の傾向があった。図 2 は FCMD で運動機能障害度 stage 7 の MRI である（図 2）。矢状断面でヒラメ筋は萎縮し，高信号域が他の筋に比べて明らかであった。軸断面でも腓腹筋よりヒラメ筋の高信号域が顕著であった。図 3 は小児型筋ジスで運動機能障害度 stage 2 の MRI である。腓腹筋やヒラメ筋の高信号域が明らかに認められた（図 3）。なかでも両者の筋が接する部分が高度であった。軸断面でもこの所見は明らかで，それに加えて腓骨筋に著しい高信号域が認められた。図 4 は WH で運動機能障害度が stage 6 の MRI である（図 4）。筋萎縮が著しく，判読に困難があったが，ヒラメ筋の高信号域が腓腹筋より強い傾向にあった。左側の下腿最大径部の軸断面でもヒラメ筋がシワ状の高信号域を示し，腓腹筋より高度であった。同症例のさらに遠位部の MRI では，ヒラメ筋にシワ状の高信号域がより顕著に認められた。図 5 は KW

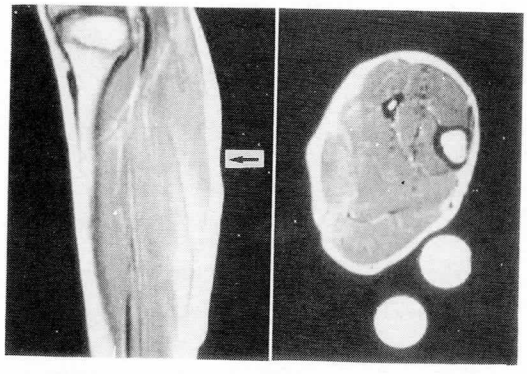


図 1　DMD（stage 2）

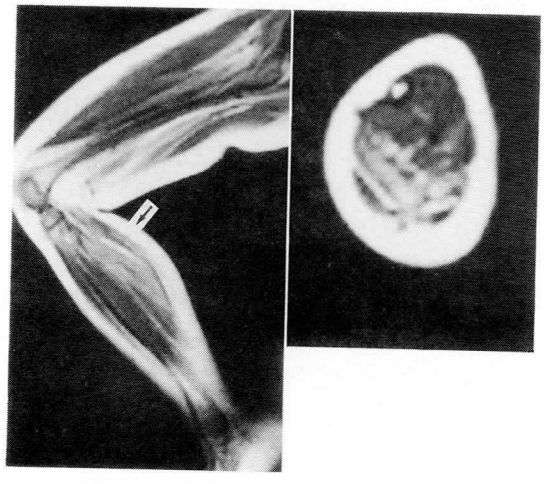


図 2　FCMD（stage 7）

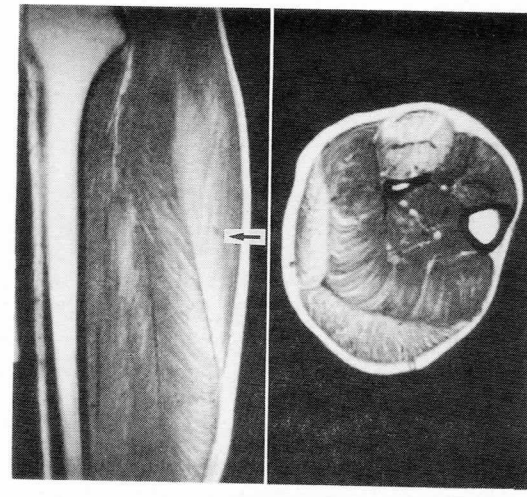


図 3　AR-MD（stage 2）

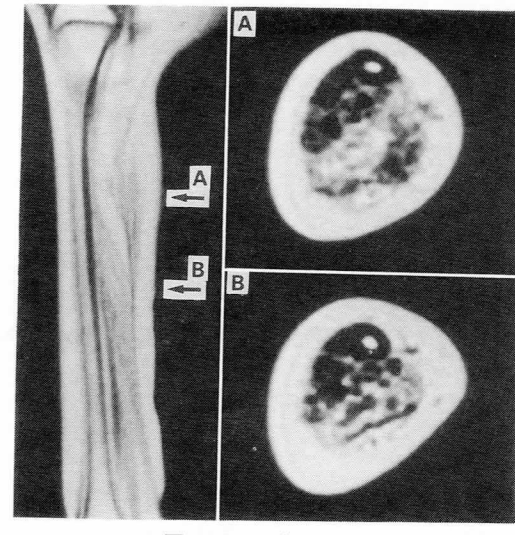


図 4　WH（stage 6）

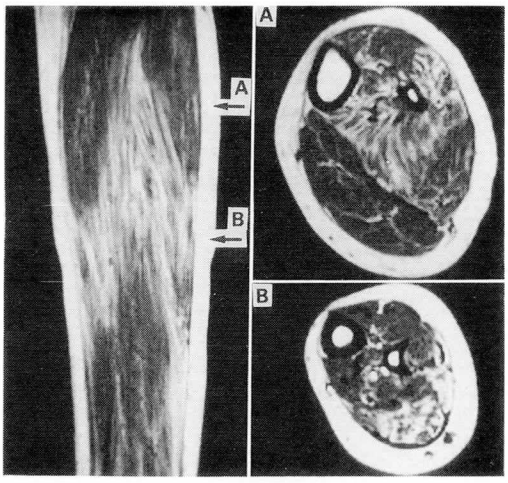


図5　KW（stage 4）

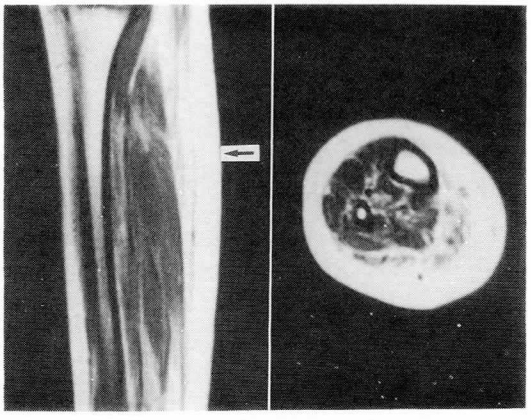


図6　KW（stage 1）

で運動機能障害度 stage 4 の MRI である（図5）。この図は撮影条件が異なり，ほぼ前額断面になっている。ヒラメ筋に高信号域がみられたが，腓腹筋では明らかではなかった。同症例の軸断面では，ヒラメ筋には粗いシマ状の高信号域がみられたが，腓腹筋の変化は軽度であった。さらに遠位部の MRI では，ヒラメ筋にシワ状に見える高信号域が明らかに認められた。図6は KW で運動機能障害度 stage 1 の MRI である（図6）。腓腹筋はヒラメ筋より著しい高信号域がみられた。なかでも腓腹筋とヒラメ筋の境界部が帯状に高信号域になっていた。同症例の軸断面では，腓腹筋にシワ状の強い高信号域がみられたが，ヒラメ筋の変化は軽度であった。以上の MRI 所見をまとめて表に示した（表1）。

考　察

骨格筋 MRI 所見を DMD とそれ以外の神経筋疾患で比較検討した。その結果，歩行不能の FCMD や WH では腓腹筋よりヒラメ筋の病変が高度で，DMD と逆の傾向を示した。DMD 以外の筋ジストロフィーも基本的には DMD と同じ筋に高信号域がみられたが，運動機能障害度が同じ DMD に比べてより顕著な高信号域が出現する傾向があった。また WH と KW の神経原性疾患においては，MRI で網目状，シワ状の高信号域が認められ，DMD とは異なる

表1　MRI 所見のまとめ

症例	年齢	診断名	運動機能障害度	腓腹筋		ヒラメ筋	前脛骨筋	後脛骨筋
1	1 y 10 m	FCMD	7	−	<	+	−	−
2	6 y 0 m	FCMD	6	++	<	++	−	−
3	17 y 4 m	BMD	1	+	>	+	−	−
4	16 y 9 m	AR-MD	2	+	>	+	−	+
5	18 y 3 m	AR-MD	3	+	>	+	−	+
6	7 y 8 m	WH	7	++	<	++	+	++
7	12 y 1 m	WH	6	+	<	++	+	−
8	6 y 5 m	KW	1	+	>	+	−	−
9	9 y 0 m	KW	2	+	>	+	−	+
10	20 y 0 m	KW	4	+	<	++	+	+

所見が得られた。従って，MRI 検査は神経筋疾患の補助診断や病態解明に有用と思われた。本研究においては症例数が少なく，なかでも早期発症例が少なかったため，DMD で興味ある所見が得られた筋内病変の進展方向については一定の傾向が得られなかったが，今後とも検討を重ねることが必要である。

文　献

長尾秀夫，松田　博，他：Duchenne 型筋ジストロフィーの骨格筋 MRI——とくに軸断面，矢状断面の連続記録による検討——脳と発達，**23**：39-43，1991

副腎皮質ステロイド反応性の再発性急性横紋筋壊死

骨格筋 MRI 所見について

班　員　松　永　宗　雄
弘前大学医学部脳研神経内科

共同研究者　石　丸　浩　平，奥　島　敏　美，玉　沢　直　樹
小　川　雅　也，沼　山　貴　也
弘前大学医学部第三内科，脳研神経内科

要　旨

1年に2回，明らかな誘因なく急性横紋筋壊死を再発し，その都度プレドニン（PSL）の治療効果を認めた28歳の女性例を報告した。再発時，把握痛を伴う軽度四肢筋力低下を認めた。血液検査では筋逸脱酵素の上昇以外に異常はなかった。筋電図では小振幅の多相性電位が散見された。筋生検では一部の線維に変性を認めたのみで，細胞浸潤はなかった。PSL の投与で CK は正常化し筋肉痛や筋力低下も消失したが，急速な漸減時には再燃傾向があり，PSL 依存性を認めた。よって，原疾患として多発筋炎を考えたが，多発筋炎が急性横紋筋壊死で発症することは稀であり，特異な症例と考えられた。今回骨格筋 MRI を経時的に観察した。当初広範な斑紋状の T2 高信号域を認めたが，治療に伴い8週間以内に消失した。横紋筋壊死ないしは浮腫に起因する所見とするのが妥当と思われ，PSL の効果は炎症機転に対するよりも筋細胞膜の安定化や浮腫の軽減が主体であったと考えられた。

緒　言

我々は今回，1年間に都合3回再発性急性横紋筋壊死を発症した28歳の女性例を経験した。ステロイドに明らかな治療効果が認められ，基礎疾患として多発筋炎類似の疾患を考えたが，経過観察上繰り返し撮影した骨格筋 MRI に興味ある知見を得たので報告する。

症　例

患者：28歳女性，看護婦。

[既往歴・家族歴]　特記事項なし。

[現病歴]　平成2年10月，初めてゴルフをした翌日に筋肉痛と近位筋筋力低下を発症した。勤務先で CK 4324 U/l を指摘され，プレドニン（PSL）50 mg/日 を処方された。約1週間で CK 値は正常化し，3週以内に脱力も消失した。PSL を3カ月間で漸減中止したがその後も CK は正常であった。平成3年7月看護婦に復職。7月20日朝より筋肉痛，四肢筋力低下と全身倦怠感を訴え，25日 CK が 17240 U/l であったため，弘前大学第3内科に緊急入院した。

[入院時現症]　発熱，皮膚症状，関節炎などはなかった。神経学的には脳神経系，感覚系，小脳系正常。上肢近位筋，下肢で大腿屈筋，腓腹筋に把握痛があり，同部位で徒手筋力試験にて 5^-〜4^+程度の筋力低下と運動時筋痛を認めた。握力は右 25 kg 左 20 kg，Gowers 徴候は陰性だった。筋萎縮はなかった。深部反射は正常で病的反射はなかった。

[検査成績]　血液検査では CK，myoglobin，GOT，LDH といった筋逸脱酵素の上昇を認め

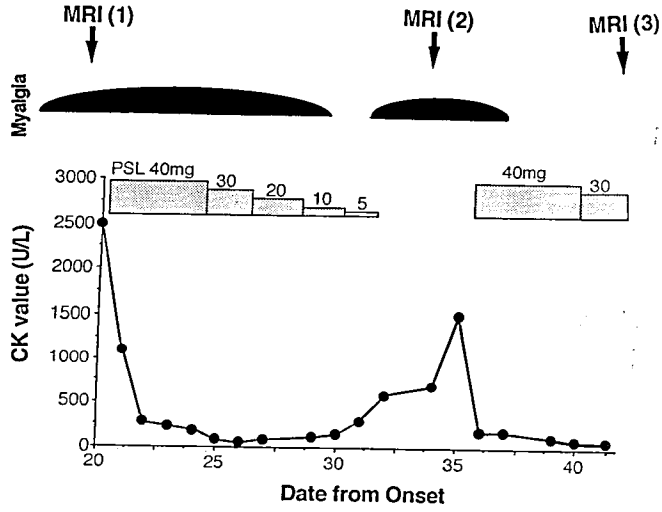


図1　臨床経過

た。電解質は正常で，全身炎症所見はなく，膠原病検査，内分泌学的検査はいずれも正常だった。ミオグロビン尿は認めなかった。血清，髄液の乳酸値は正常。阻血下前腕運動負荷試験で乳酸とアンモニアの上昇は正常範囲。左大腿四頭筋より生検を実施したが，炎症性細胞浸潤は認められず，一部の線維に変性所見を認めたのみで，筋線維内に特異構造はなく，また ragged-red fiber はなかった。筋電図では小振幅の多相性電位が散見された。骨格筋 CT には異常はなかった。

[経過]　PSL を 40 mg/日 から約3週間で急速に漸減した。初め徐々に CK は低下し筋肉痛も消失したが，10 mg/日 の時点で CK が再上昇し，筋肉痛が再燃した。PSL を 40 mg/日 に再増量したところ，数日内で CK は正常化し筋肉痛も消失した（図1）。現在1日 15 mg で維持しているが CK は正常値を保っており，筋肉痛や筋力低下，筋萎縮は認めない。

[骨格筋 MRI]　大腿中央部と下腿最大径部で，図1に示した3回にわたってプロトン像と T_2 強調像を検討した。治療前（写真 1-a 大腿，b 下腿），筋腹内に数 mm 径のプロトン低信号，T_2 高信号の斑紋状の異常像が散在していた。筋肉痛と CK の再上昇を認めた時点，すなわち再燃期においても（写真 2-a, b）この異常所見は順調に改善しており，3回目（写真 3-a, b）にはほぼ消失していた。

考　按

本症例は20歳代発症の再発性横紋筋壊死である。急性横紋筋壊死を起こし得る過激な運動，アルコール濫用，薬物摂取，種々のウイルス感染症は病歴から否定された。また電解質異常，ミトコンドリア脳筋症，筋糖原病，carnitine 欠乏症，CPT 欠損症，AMP deaminase 欠損症は諸検査から否定された。家系内に類症者はなく筋ジストロフィー症の保因者も否定的である。筋組織上炎症性細胞浸潤を認めなかったため厚生省診断基準における多発筋炎（以下 PM）の確定診断は満たさないが，ステロイドの治療効果から PM 類似の炎症性ミオパチーと考えた。ただし，PM が急性横紋筋壊死で発症することは極めて稀とされており[1]，さらに，臨床的に無症状の間欠期を経て急性横紋筋壊死を繰り返した PM 例は文献上確認できない。すなわち本症例は PM としては非常に特異な例であると考えられる。ないしは，本例において PM のごく初期の臨床像を捉えることができたのかも知れない。

PM の骨格筋 MRI による検討では，疾患活動性に応じて出現する T_2 高信号領域が知られている[2)3)]。Lamminen らは平均罹病期間5.4年の PM 8例の検討で，その信号強度から脂肪組織への置換を主因と考えた[2)]。一方 Fujino らはステロイド治療にて病勢を抑えた後に T_2

a．大腿中央



b．下腿最大径部

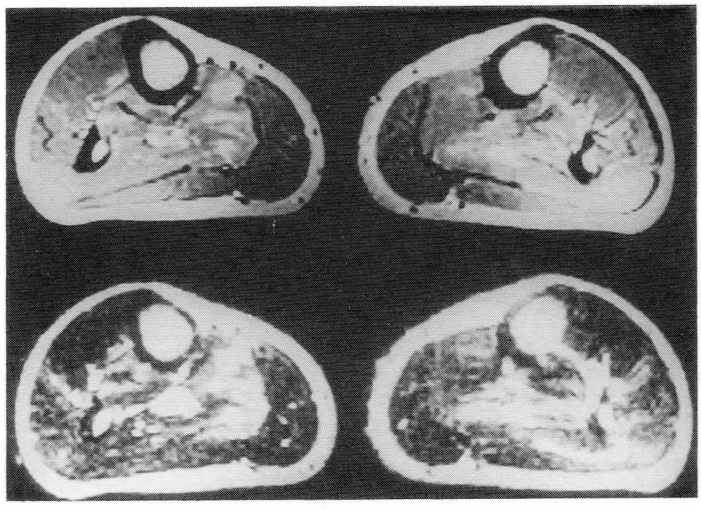
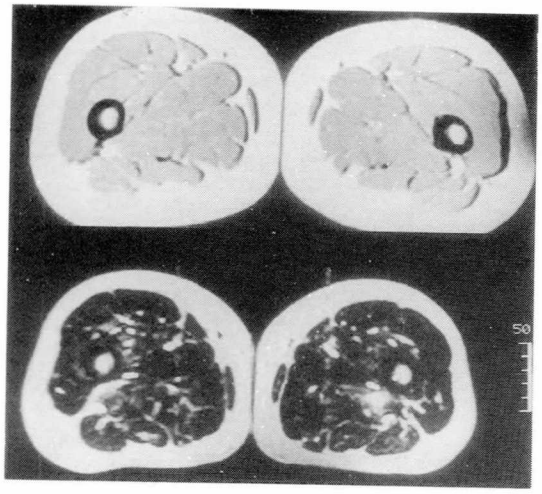


写真1　骨格筋　MRI。
上段がプロトン像，下段が T2 強調像。写真左側が右下肢。

強調像の異常が減弱消失する例があることを示し，炎症機転ないし浮腫を捉えたものと考えた[3]。本例の MRI 所見は，経過中に筋肉痛と CK の再上昇を認めたにもかかわらず，短期間で順調に正常化した（図および写真1～3）。よって PM における炎症性細胞浸潤像を捉えたものとは考えにくく横紋筋壊死に陥った部位[4]と解釈するか，浮腫や筋細胞の代謝低下などに起因する所見[5]とするのが妥当と思われた。よって，ステロイドについても，炎症機転に対する効果よりも，筋細胞膜の安定化や浮腫の軽減による血流代謝の改善によって治癒機転を促進したものと解釈された。

Mills らは筋肉痛や筋痙攣を主訴とした 109 例の検討で，確定診断に至ったものが37例（うち炎症性ミオパチーは8例）であったとしている[6]。7割は鑑別不能の疾患か，また病的とは考えられず放置されていることになる。こうした例は確定診断が不明なため文献報告されないのが現実と思われるが，本症例はステロイドの治療効果や MRI 異常所見など注目すべき点が多く，あえて報告した。

a．大腿中央



b．下腿最大径部

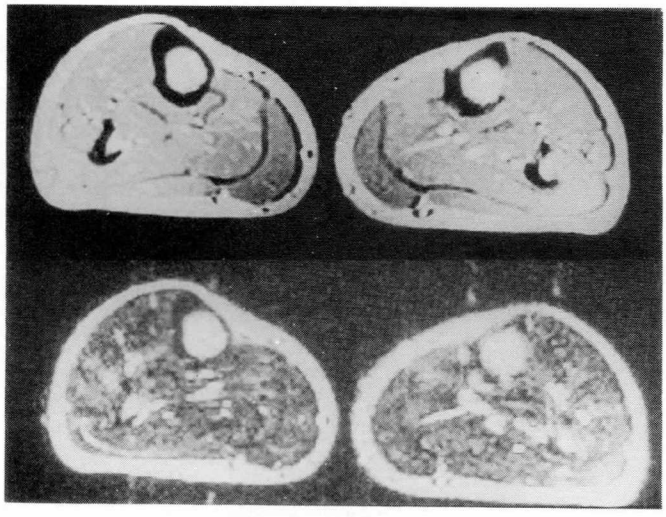


写真2　骨格筋 MRI。
条件は写真1と同様。

文　献

1）Gabow PA, Kaehny WD and Kellerher SP : The spectrum of rhabdomyolysis. Medicine **61**, 141-152, 1982

2）Lamminen AE : Magnetic resonance imaging of primary skeletal muscle diseases : patterns of distribution and severity of involvement. Brit J Radiol **63**, 946-950, 1990

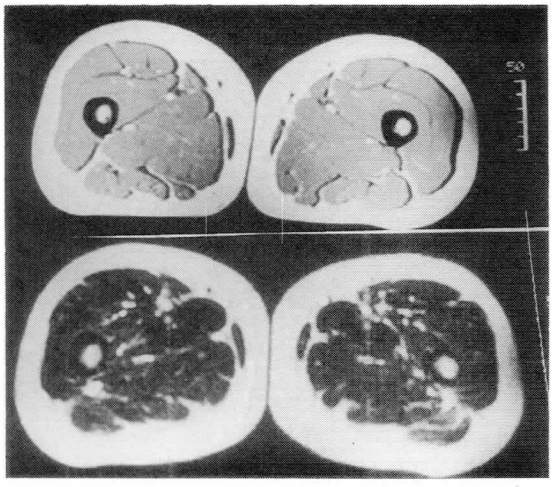
3）Fujino H, Kobayashi T et al : Magnetic resonance imaging of the muscles in patients with polymyositis and dermatomyositis. Muscle Nerve **14**, 716-720, 1991

4）Zagoria RJ, Karstaedt N and Koubek TD : MRI imaging of rhabdomyolysis. J Comput Assist Tomogr **10**, 268-270, 1986

5）Shellock FG, Fukunaga T et al : Exertional muscle injury : Evaluation of concentric versus eccentric actions with serial MR imaging. Radiology **179**, 659-664, 1991

6）Mills KR and Edwards RHT : Investigation strategies for muscle pain. J Neurol Sci 58, 73-88, 1983.

a．大腿中央



b．下腿最大径部

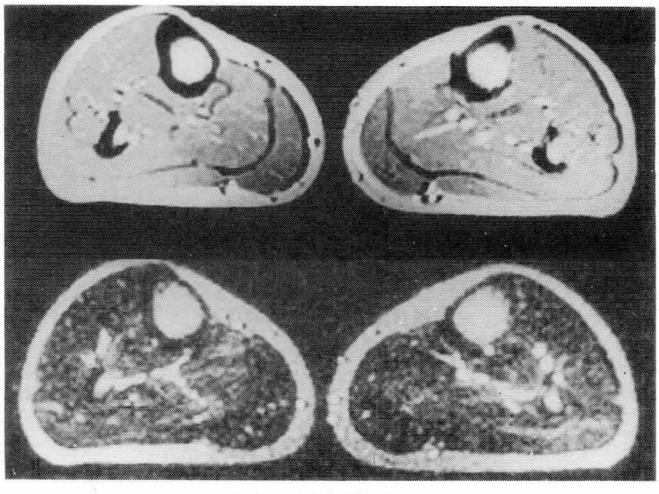


写真 3　骨格筋　MRI。
条件は写真 1 と同様。

筋ジストロフィー患者でのデュアルX線骨密度測定装置による筋萎縮の定量的評価法

班　員　高　橋　桂　一
国立療養所兵庫中央病院

共同研究者　苅　田　典　生[1]，藤　井　芳　夫[2]
八　若　博　司[3]，藤　田　拓　男[4]

[1] 国立療養所兵庫中央病院神経内科　[2] 国立療養所兵庫中央病院内科
[3] 国立療養所兵庫中央病院小児科　[4] 国立療養所兵庫中央病院院長

要　旨

筋ジストロフィーの臨床病期を定量的に把握する目的で，デュアルX線骨密度測定装置を用いて，全身の組織の重量を骨量，脂肪量，筋肉量に分けて測定した。男女とも筋ジストロフィー群では，正常対照群に比べて有意に，筋肉量が減少，脂肪量が増加し，脂肪／筋肉比は上昇していた。この脂肪／筋肉比は，筋ジストロフィーのステージの進行と共に，増大する傾向を示した。同程度のADL障害を有する神経疾患では，脂肪／筋肉比に正常群との差を認めなかったことから，筋ジストロフィー群で見られた変化は，筋ジストロフィーで筋肉が脂肪織に置換されていく過程を反映したものと思われた。この方法による脂肪・筋肉量の定量は，筋ジストロフィーの進行度を客観的に評価することができ，今後，治療効果の判定などにも有用であると思われた。

目　的

筋ジストロフィーの治療法の開発において問題となるのは，この疾患が極めて慢性に経過するために，治療の効果を客観的・定量的に判断することが非常に困難であるということである。これに対して，現在行われている臨床症状の定量化には，大きく分けて二通りの方法がある。一つは，筋力の定量であり，もう一つは筋肉の質や量の測定である。前者について我々は，等尺性筋力測定器を開発，臨床に応用している[1]。後者の筋肉量を測定する方法として，今回我々は，本来は骨量を測定するために開発されたデュアルX線骨密度測定装置を用いて，患者の全身の組織を骨，脂肪，筋肉の3つの構成要素，すなわち「composition」に分け，筋肉重量を測定する試みを行った。

方　法

使用機器は米国ノーランド社製デュアルX線骨密度測定装置XR 26で，これに米国IBM社製パーソナルコンピューターを接続し，データーの解析と記録の管理を行った。使用X線を可変式フィルターによりピーク値46.8 KeVと80 KeVの二種類のX線として，全身をスキャン，各組織のX線吸収度の差から，骨，脂肪，そしてその他の軟部組織（大半は筋肉），の3つの構成成分（composition）に分けて，重量で表現した。特に，筋ジストロフィーの患者では，筋肉組織が変性し脂肪織に置換されていくので，筋肉重量当たりの脂肪重量（脂肪／筋肉比）を算出し，疾患の進行過程を，定量的に表現することが可能であるかどうかも検討した。

対象としたのは当院入院中の患者と外来患者で，表1に示したように，筋ジストロフィー

表1　対　　象

男　性	対照群	筋ジス群	神経群
	22名	31名*	10名**
年　齢	27.1±15.8	27.3±15.7	54.5±11.4
ステージ		5.0±1.3	4.9±1.6
身　長	165±8.4	159±13.3	161±18.3
体　重	56.0±11.1	44.8±12.3	43.1±5.1
女　性	対照群	筋ジス群	神経群
	13名	9名***	6名****
年　齢	39.8±14.6	42.8±16.1	45.3±21.9
ステージ		4.3±1.7	4.0±1.7
身長 (cm)	153±5.4	153±8.3	155±7.7
体重 (kg)	48.6±8.5	43.8±9.5	39.1±5.9

*：D型・B型19名，L-G 型3名，FSH 型3名，筋緊張型5名，遠位型1名
**：ALS3名，SCD 5名，CMT 1名，MS 1名
***：FSH 型3名，筋緊張型5名，遠位型1名
****：ALS 2名，SCD 3名，MS 1名

(筋ジス) 群は，デュシャン型を中心に男性 31名，また，筋緊張型を中心に女性9名である。重症度はステージ分類で3度から7度であった。対照群としては，健康正常人男子22名，女子13名。またこれと別に，ADL がほぼ同程度の神経疾患，例えば脊髄小脳変性症や運動ニューロン病患者（神経群）についても同様の検査を行い比較検討した。

結果および考察

対照群に比べて，筋ジス群，神経群ともに体重は低下していたが，この両群間では body composition に明らかな違いが認められた。筋ジス群では，筋肉量が減少し，脂肪量が増加していたが，神経群では筋肉量と共に，脂肪量も減少していた（図1上段)。これを筋肉重量で脂肪重量を除した値，すなわち「脂肪／筋肉比」で表すと，図1下段で示したように，筋ジス群では対照群に比して有意に脂肪／筋肉比の上昇がみられた。これに対し，神経群では脂肪／筋肉比に対照群との間で有意な相違はなく，筋ジス群と神経群の間で，同じ筋萎縮でも脂肪への変性の程度が異なることが示された。すなわち，筋ジストロフィーでは筋肉は萎縮すると

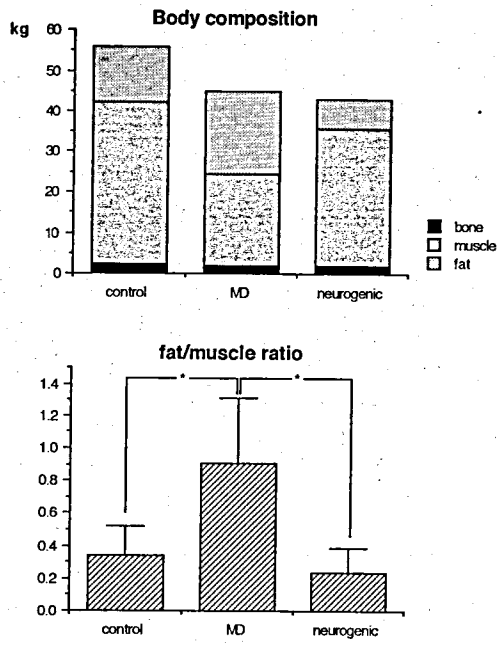


図1　男性患者の body composition（上段）と脂肪/筋肉比（下段）

同時に脂肪織へ置換されていくが，神経原性筋萎縮では脂肪織への置換は原則として行われないという組織所見を示したものと思われた。従って，今回デュアルX線骨密度測定装置で示さ

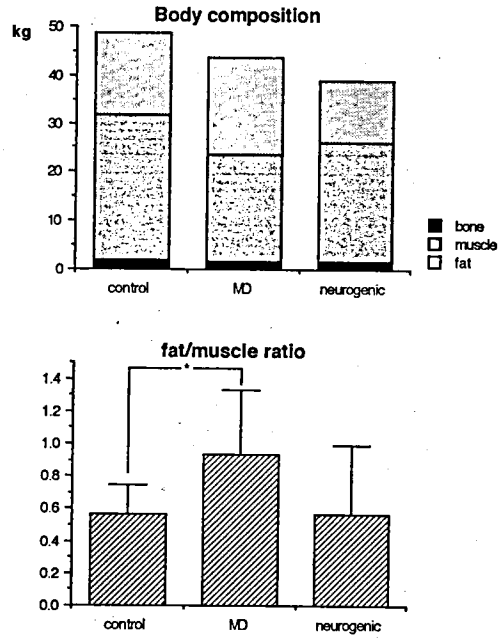


図2　女性患者の body composition（上段）と脂肪/筋肉比（下段）

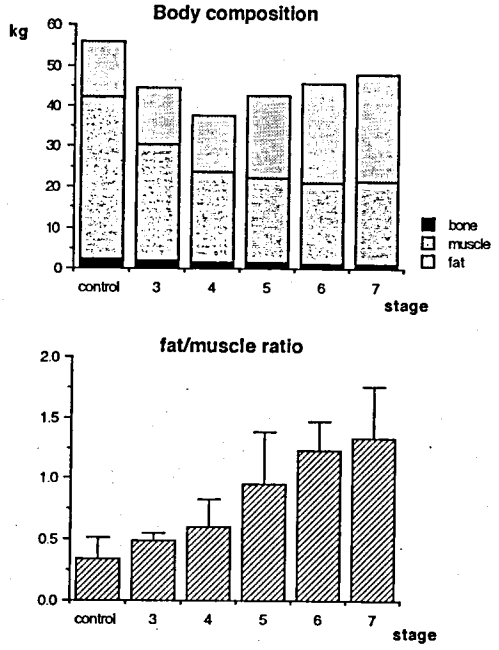


図3　筋ジストロフィー患者のステージ毎の body composition（上段）と脂肪/筋肉比（下段）

れた，筋ジス群の body composition における変化は，単に筋肉の廃用性萎縮を示すだけではなく，「筋肉が変性し脂肪織に置換される」という，筋ジストロフィーの特徴的な病理組織像も，ある程度表現しているものと思われた。

図2は女性患者の結果であり，上段に示したように全群で男性に比べて脂肪量が増加していた。その中で，筋ジス群，神経群ともに筋肉量は減少しているが，脂肪量に差があり，筋ジス群での脂肪の増加が明らかである。図2下段に示したように女性患者においても，脂肪／筋肉比では筋ジス群で明らかな増加があったが，神経群ではその変化は顕著ではなかった。

図3では男性のデュシャン型およびベッカー型でステージ毎に分けて body composition を検討した。ステージが進行するに連れ，筋肉量は減少し，脂肪量が増加しているのが明らかであった。これを脂肪／筋肉比で表しても，ステージの進行に伴って明らかに増加していることから（図3下段），脂肪／筋肉比は，筋ジストロフィーの病期の進行を定量化するのに，優れた方法であると考えられた。

従って，この方法で，個々の症例について経時的に body composition を測定すれば，病期の進行を客観的，定量的に捉えることができることになる。また，筋ジストロフィーの治療法の開発過程においても，その治療効果を「筋肉量」の見地から客観的に評価することができ，筋力測定など他の方法と共に用いれば，一層正確に判定できるものと思われた。

ま と め

1．デュアルX線骨密度測定装置を用いて，筋ジストロフィー患者の全身の組織を骨，脂肪，筋肉に分けて重量を測定した。

2．筋ジストロフィーでは病期の進行にしたがって，筋肉量が減少し脂肪量が増加，脂肪／筋肉比は上昇した。

3．これらの結果は，筋ジストロフィーにおいて，筋肉が脂肪織へ置換される過程を定量的に表現しているものと考えられた。

4．この方法は，今後，治療効果の客観的な判定にも有用であると思われた。

参考文献

1）高橋桂一，堀川博誠ら：可動型等尺性筋力計の開発と治療評価への応用。筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究　厚生省精神・神経疾患研究委託費平成3年度研究報告書 1992, in press

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの筋障害の CT による検討

班　　員　堀　川　博　誠
国立療養所兵庫中央病院神経内科

共同研究者　高　橋　桂　一[1)]，苅　田　典　生[1)]，吉　仲　弘　充[2)]
真　野　行　生[2)]，高　柳　哲　也[2)]
[1)] 国立療養所兵庫中央病院神経内科　[2)] 奈良県立医科大学神経内科

要　旨

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの下肢及び体幹の筋障害をX線 CT により検討した。対象は10家系14例で，のべ23回撮影した。筋障害は CT 上，筋断面積の減少と低吸収域の増加が特徴的で，左右差のみられる場合があった。下肢では近位部優位の筋障害が認められた。大腿ではハムストリングスから障害され，進行に伴い大腿四頭筋にも障害がおよんだ。下腿では屈筋群に比べ前脛骨筋で障害の強い例が多かった。腰帯では腹筋群の障害が早くから現れ，次いで臀筋群，腰部背筋群の順に障害され，大腰筋は比較的保たれていた。頸部では腹筋群や臀筋群に比べ障害は軽く，また頸部背筋群と胸鎖乳突筋では障害度にあまり差のない例が多かった。

はじめに

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSH）は常染色体優性遺伝を呈し，顔面，肩甲帯，上腕の筋障害が病名の如く臨床的特徴である。しかし進行すれば体幹や下肢の筋もしばしば障害される。筋障害の把握には従手筋力測定，CK などの血液生化学検査，筋病理検査，筋電図，画像診断などが用いられている[1)]。我々は既に Duchenne 型筋ジストロフィー[2)]，緩徐な経過をとる Werdnig-Hoffmann 病[3)]や rigid-spine 症候群[4)]で X線 CT が筋障害の把握に有用であることを報告した。今回は FSH の下肢や体幹の筋障害の進展過程を検討した。

方　法

対象は表1に示すように10家系14例の FSH である。全例とも臨床的に顔面，肩甲帯および上腕に著しい筋萎縮を呈していた。進行例では下肢や体幹の筋障害がみられ，腰椎の前弯が強くなり，歩行は不能になった。筋生検や筋電図で筋原性変化がみられることを確認した。全例，国立療養所兵庫中央病院あるいは西奈良病院に入院あるいは通院中で，兵庫県，大阪府あるいは奈良県の出生でそれぞれの家系は互いに関係ない。X線 CT の撮影は第7頸椎部，第3あるいは第4腰椎部，大臀筋中央部，大腿中央部及び下腿中央部の軸位で行った。8例で経時的に撮影し，のべ23回行った。

結　果

筋障害は CT 上，Duchenne 型筋ジストロフィーと同様に筋断面積の減少と低吸収域の増加が特徴的であり，左右差のみられる場合があった（図1，2，3，4）。そのため表2の下段に示すように筋障害を6段階に評価した。下肢では近位部優位の筋障害が認められた（表2）。大腿ではハムストリングスから障害され（図1），進行に伴い大腿四頭筋にも障害がおよび，車椅子使用例では CT 上ほとんどの筋が低吸収域として表された（図2，表2）。歩行例で1

表1　症　　例

Pt	Age	Sex	Onset	Family history	ADL
1	14	F	1st decade	Sister of Pt2	Walking
2	11	F	1st decade	Sister of Pt1	Walking
3	40	F	2nd decade	Mother of Pt 1 & 2	Walking
4	35	F	1st decade	Sister of Pt5	Wheelchair
5	33	M	1st decade	Brother of Pt4	Wheelchair
6	54	F	3rd decade	Mother of Pt7	Wheelchair
7	26	M	2nd decade	Son of Pt6	Walking
8	45	M	1st decade	Sporadic?	Wheelchair
9	28	M	1st decade	Sporadic?	Wheelchair
10	29	M	1st decade	Sporadic?	Wheelchair
11	45	M	3rd decade	A brother has myopathy	Wheelchair
12	22	F	2nd decade	Two sisters have scoliosis	Walking
13	16	M	1st decade	Sporadic?	Walking
14	47	M	2nd decade	Sporadic?	Wheelchair

表2　下肢の筋障害の評価

Pt	Age	Quadriceps femoris		Hamstrings		Tibialis anterior		Gastrocnemius		Soleus	
		rt	lt	rt	lt	rt	lt	rt	lt	rt	lt
1	14	0	1	3	4	0	0	0	0	0	0
1	15	1	1	4	4	1	1	0	1	0	1
2	11	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
2	13	1	1	2	2	1	0	0	0	0	0
2	15	1	1	4	4	2	1	1	1	1	1
3	40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	35	5	5	5	5	4	5	3	3	5	5
4	39	5	5	5	5	4	5	3	3	5	5
5	33	4	5	5	5	1	1	1	1	1	1
5	37	5	5	5	5	1	1	1	1	1	1
5	37	5	5	5	5	1	1	1	1	1	1
6	54	5	4	5	5	1	1	1	1	1	1
7	26	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0
7	28	1	1	2	3	0	0	0	0	0	0
8	45	5	5	5	5	4	4	4	2	3	2
8	46	5	5	5	5	4	4	4	2	4	2
9	28	4	4	5	5	5	4	1	1	1	1
10	29	5	5	5	5	5	5	3	1	3	1
11	45	5	5	4	4	5	5	1	1	1	1
11	48	4	5	5	5	4	4	5	5	1	1
12	22	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
13	16	4	4	4	4	3	1	0	1	0	1
14	47	5	5	5	5	1	1	1	3	1	2

0：正常，　1：筋量の減少あるいは0≦低吸収域＜25%，　2：25≦低吸収域＜50%，
3：50%≦低吸収域＜75%，　4：75≦低吸収域＜100%，　5：100%低吸収域

表3　体幹の筋障害の評価

Pt	Age	Gluteus mus.		Psoas maj.		Ext. of back		Abdominal mus.		Ext. of neck		Sternocleid.	
		rt	lt	rt	lt	rt	lt	rt	lt	rt	lt	rt	lt
1	14	Not examined		0	0	1	1	2	2	1	1	2	2
1	15	5	2	1	1	1	1	4	4	1	1	2	2
2	11	Not examined		0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
2	13	3	3	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
2	15	5	3	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
3	40	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2
3	43	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2
4	35	5	5	3	3	5	4	5	5	3	3	3	3
4	39	5	5	3	4	5	4	5	5	3	3	3	3
5	33	4	4	1	1	3	3	5	5	2	2	3	3
3	37	5	5	1	1	3	3	5	5	2	2	3	3
6	54	4	5	2	2	5	5	4	4	1	1	2	1
7	26	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
7	28	0	1	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0
8	45	5	5	4	4	5	5	5	5	4	4	4	4
8	46	5	5	4	4	5	5	5	5	4	4	4	4
9	28	5	5	3	2	4	4	5	5	3	2	3	3
10	29	3	4	5	2	5	5	5	5	5	5	3	3
11	45	2	3	0	0	1	1	4	4	1	1	2	2
11	48	2	3	0	0	1	1	4	4	1	1	2	2
12	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	16	1	1	0	0	2	2	2	2	1	1	1	1
14	47	5	5	1	2	4	4	Not examined		4	4	3	3

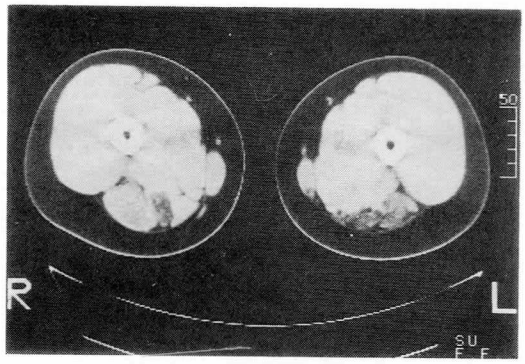


図1　患者12（22歳）の大腿像。ハムストリングスに左優位の障害がみられる。左の薄筋に点状の低吸収が認められる。

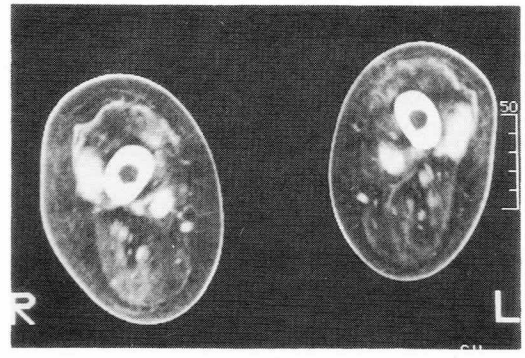


図2　患者9（28歳）の大腿像。両側大腿四頭筋の外側の一部を除いて全て低吸収域になっている。

例のみに片側の薄筋の把大がみられた。下腿では腓腹筋やヒラメ筋に比べ前頸骨筋で障害の強い例が多かった（表2）。腰帯では腹筋群の障害が早くから強く（図3），次いで臀筋群，腰部背筋群の順に障害され，大腰筋は比較的保たれていた（図4，表3）。頸部では腹筋群や臀筋群に比べ障害が軽く，頸部背筋群と胸鎖乳突筋では障害度にあまり差のない例が多かった（表3）。

考　察

今回の検討では顔面，肩甲帯および上腕に筋障害のみられる典型的な FSH を対象とした。2病院とも神経筋疾患病棟を有するため ADL

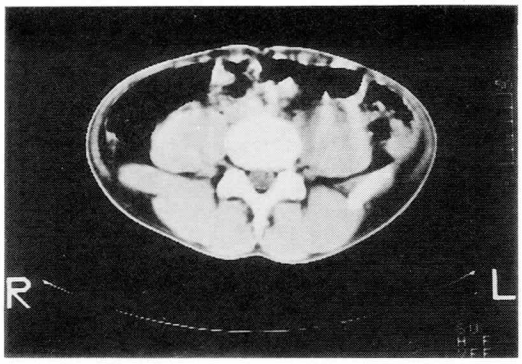


図3 患者7（28歳）の腰部像。腹筋群の障害が強い。腰部背筋群と大腰筋は正常範囲内である。

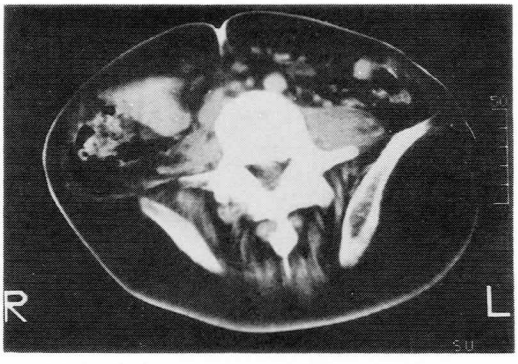


図4 患者9（28歳）の腰部像。腹筋群は全て低吸収に置き代っている。腰部背筋群にも強い障害がみられる。大腰筋の障害が右優位に認められる。

の低い例が多く，腰帯や下肢筋障害のため14例中8例が車椅子を使用していた。今回の筋CTの特徴を以下にまとめたごとく一定の傾向がみられ，家族内や家族間での障害パターンの相違は認められなかった。(1) Duchenne型筋ジストロフィーと同様に筋障害は筋断面積の減少と低吸収域の増加が特徴的であった。即ち病理学的検討から筋組織内での脂肪織の増加が疑われる[5]。(2)左右差のみられる場合があった。(3)下肢では近位部優位の障害が認められた。(4)大腿ではハムストリングスから障害された。(5)下腿では屈筋群に比べ前頸骨筋で障害が強い例が多かった。(6)腰帯では腹筋群の障害が早くから現れ，次いで臀筋群，腰部背筋群の順に障害され，大腰筋は比較的保たれていた。(7)頸部では臀筋群に比べ障害が軽度であった。

今までにFSHに関する筋CTの報告は乏しい。Hawleyらは[6] FSHを含め種々の神経筋疾患で筋CT像を検討し，我々と同様に上記の(1)と(2)の所見を認めている。しかし対象症例が少ないので一定の傾向は見いだせなく，家系により違った筋障害パターンを認めたと報告している。

一般にFSHの腰帯および下肢の筋障害には臨床的に二つのパターンがみられ，腰帯や大腿の筋障害の強い型と下腿特に前頸骨筋の障害の強い型がある[7),8)]。欧米では後者の型が多いが[9)]，本邦ではFSHに関する疫学調査はなく不明である。今回検討した症例は全例ともCT像より前者と考えられる。このことは偶然の一致なのか，我々の病院の特殊性のためなのか，本邦では前者の型が多いためなのか，などが考えられるが言及することはできない。

進行例では腰椎の前彎が著しくなったが，CTの検討より腹筋群や臀筋群が腰部背筋群や大腰筋に比べ障害が強いためと考えられる。またハムストリングスの障害が強くても歩行は可能であったが，車椅子使用例では大腿四頭筋の障害が強く，FSHの歩行に関し大腿四頭筋は重要な役割を果している。

文　献

1）Bulcke JAL and Baert AL : Clinical and radiological aspects of myopathies. Springer-Verlag, Berlin, 1982, p. 3

2）堀川博誠，小長谷正明ら：Duchenne型筋ジストロフィー下肢筋CT像の定量的解析　筋力および血清CK値との対比．臨床神経　**25**：1227, 1985

3）堀川博誠，小長谷正明ら：緩徐な経過をとるWerdnig-Hoffmann病の大腿筋CT像．臨床神経　**26**：490, 1986

4）高橋桂一，妻鹿治行ら：Rigid spine syndromeの一症例．厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究」昭和60年度研究報告書　1986, p. 5

5）堀川博誠，高橋桂一ら：神経疾患の下肢筋CT像と組織像との対比(会)．リハビリテーション医学　**27**：635, 1990

6）Howley RJ Jr, Schellinger D et al : Computed tomographic patterns of muscles in neuromus-

cular Disease. Arch Neurol **41** : 383, 1984
7) Kazakov VM, Bogorodinsky ZV et al : The facio-scapulo-limb (or the facioscapulohumeral) type of muscular dystrophy. Europ Neurol **11** : 236, 1974
8) 古川哲雄：顔面肩甲上腕型筋萎縮症. 星和書店, 東京, 1985, p. 33
9) Munsat TL : Facioscapulohumeral dystrophy and the scapuloperoneal syndrome. In Myology, ed by Engel AG and Banker BQ. Mc Grow-Hill, New York, 1986, p. 1251

Duchenne 型筋ジストロフィーの脊柱変形

班　　員　井　上　謙次郎
国立療養所宮崎東病院

共同研究者　仲　地　　剛，吉　原　明　子
宮　内　恵　子，諸　冨　康　行
国立療養所宮崎東病院

要　旨

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）における脊柱変形の合併は，この疾患の予後に重大な影響をおよぼす。そこで DMD 患者7名の脊柱変形と腰椎骨塩量の関係について，2年間ないし3年間の追跡調査を行い経年的変化について検討した。

DMD 患者全体でみれば加齢とともに第3腰椎骨塩量は減少した。また歩行不能になる時期に急激な低下をしめすこともわかった。歩行不能な患者を Gibson の分類による stable pathway と unstable pathway の2群に分けて比較したが両群間に差はみられなかった。

脊柱変形の進行を予測するためには症例数を増やし，歩行可能な早期から長期間の観察を要すると思われた。

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィーに対する各分野の研究が進み，死亡年令も次第に延長してきた。そのうち比較的長命の患者には脊柱変形が少なく，反対に若年で死亡する患者は脊柱変形が強度であることが多いということはよく知られている。そこで，予後に重大な影響をおよぼす脊柱変形について第3腰椎骨塩量の経年的変化から検討した。今回この結果に若干の文献的考察を加えて報告する。

対象および方法

対象は，当院筋ジス病棟に入院中の DMD 患者7名。全例男性。年令は9歳から20歳。機能的には全員歩行不能。カルシウム・骨代謝に影響するような薬物は投与されていない。

全脊柱2方向のX線撮影をおこない，Gibson の分類[1]をもちいて患者の脊柱変形を3群に分けた。それはまず，5つの group に分けるもので，Group Ⅰは後彎が軽度で，側彎は20度以内。Group Ⅱは後彎が主になり，側彎は35度以内。Group Ⅲは著名な後彎と35度以上の側彎。Group Ⅳは，側彎がしばしば100度以上にもおよぶグロテスクな変形。Group Ⅴは側彎は35度以内，側面撮影で脊柱は直立もしくは過伸展をしめす。Gibson は Group ⅠからⅡ，Ⅲ，Ⅳと脊柱変形がすすむ unstable pathway と，Group Ⅰから直接 Group Ⅴにすすむ stable pathway の2つの pathway に分類した。我々は Group Ⅰをどちらの pathway にすすむかは不明なので別のグループとした。

第3腰椎骨塩量の推定には，第3腰椎中央部の CT 値と，骨量ファントム B-MAS 中の既知 $CaCO_3$ 濃度の CT 値を比較し，炭酸カルシウム相当量で推定する Quantitative CT（QCT）法[2]を採用した。

検査は1988年から1991年の9月から10月にかけて行ない比較した。

結　果

年令と第3腰椎骨塩量の関係をみると危険率は1％未満で有意の負の相関があり，加齢とともに第3腰椎骨塩量が減っていくことが分かる。

しかし患者を歩行可能時と歩行不能時にわけ年令と第3腰椎骨塩量の関係をみると相関はなく，どちらかというと歩行可能時には炭酸カルシウム相当量で 200 mg/cm³ 以上，歩行不能時は年齢に関係なく90から 160 mg/cm³ の間にある（図1）。

Stable Pathway は平均16.1歳，Unstable Pathway は平均13.5歳，Group Ⅰは平均9.5歳で各群間には1％未満の危険率で有意の差がある。

1988年から1991年にかけての第3腰椎骨塩量を経年的にプロットした。Stable Pathway の患者と Unstable Pathway の患者を比較すると差はない。また両 Pathway ともに Group Ⅰとは変化のパターンに差がみられた。（図2）。

Group Ⅰの折れ線中，矢印は歩行不能になった時点を示す。

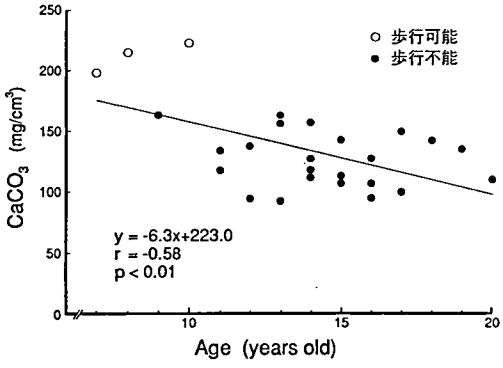


図　1

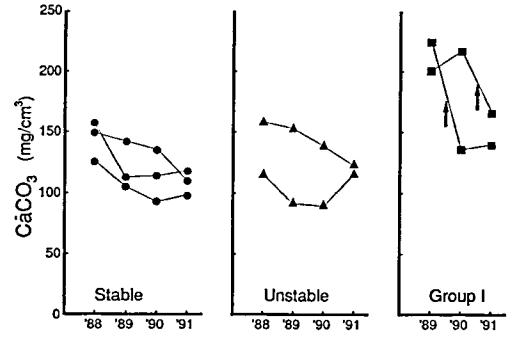


図　2

考　察

DMD 患者の脊柱変形と第3腰椎骨塩量の関係について調査した。

加齢とともに骨塩量の減少がみられるという結果は福永らの報告[3]と一致するが，歩行可能時と歩行不能時に分けて骨塩量をみると年令とは相関の無い変化をしていることがわかった。

Gibson の分類をもちいて患者を3群にわけ年令をみると Group Ⅰは平均9.5歳，Stable Pathway は16.2歳，Unstable Pathway は13.5歳で，この結果は Gibson の報告とほぼ一致する[1]。また DMD 患者で高齢に達する者は Stable Pathway が多いということがわかる。

Group Ⅰと Stable, Unstable, 両 Pathway との間には有意の差がみられ，脊柱変形が軽度であれば骨塩量が多いということがわかる。

Stable Pathway と Unstable Pathway の間に骨塩量の有意差は無いものの，年令では Stable Pathway が有意に高いことを考慮すると Stable Pathway で骨塩量は比較的高年齢まで維持されるのではないかと予想される。

私たちは Group Ⅰから Stable Pathway もしくは Unstable Pathway への過程を確認した症例が無く，この過程がどのような変化を示すか確認することが今後の課題である。

文　献

1）Gibson DA, Wilkins KE : The management of Spinal Deformities in Duchenne muscular Dystrophy, Clin orthop Rel Res 108 : 41, 1975

2）Firooznia H, Golimbu C et al : Quantitative computed tomography assessment of spinal trabecular bone. 1. Age related regression in normal men and women. J Compu Tomog 8 : 91, 1984

3）福永秀敏，北島　勲ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症における骨代謝の研究一括性型ビタミンD投与による骨代謝改善作用について一．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（班長，西谷　裕），昭和63年度研究報告書，180，1989

Ⅱ. 臨床病態

B. 臨床・病態生理

プロジェクト研究Ⅱ　臨床病態
Ⅱ-B　臨床・病態生理

Duchenne 型筋ジストロフィー症における脊柱側弯発生のメカニズム

——傍脊柱筋 X 線 CT による検討——

班　　員　高　柳　哲　也
奈良県立医科大学神経内科

共同研究者　安　東　範　明[1)]，藤　本　泰　代[1)]
山　田　隆　敏[2)]，真　野　行　生[3)]
[1)] 国立療養所西奈良病院神経内科　[2)] 国立療養所西奈良病院放射線科
[3)] 奈良県立医科大学神経内科

要　旨

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) 15例について①上部胸椎レベル②中部胸椎レベル③下部胸椎レベル④上部腰椎レベル⑤中部腰椎レベル⑥下部腰椎レベル，の6つのレベルで傍脊柱筋 CT を撮影し，CT 値を計測し検討することになり，DMD における脊柱側彎発生のメカニズムを検討した。上部胸椎から中部腰椎のレベルで外側傍脊柱筋の変性が内側に比べて強かった。また，中部腰椎レベルの筋変性が最も強く，レベルが上がるにつれて筋は保たれる傾向があった。変性が早期から強い中部腰椎レベルの筋変性に左右差があると，比較的保たれた側を凸とする脊柱側彎が生じるが，その機序として代償的な姿勢保持の関与が考えられた。

はじめに

以前我々は，新しい圧計測センサシステムを応用して DMD の坐位保持能力を評価する試みを行い左右両方向の坐位保持能力に差のある症例の多いことを発見した。そしてその原因として，左右の傍脊柱筋の変性の程度の差による筋力の imbalance を考え，この imbalance こそが脊柱側彎の原因であるという仮説を立てた[1)]。

一方，近年骨格筋 CT を DMD の病態解明に役立てる試みが始められている[2)~9)]。そこで，今回我々は，傍脊柱筋の CT 値を，脊柱の各レベルで測定することにより，傍脊柱筋の変性と側彎との関係を検討した。

対象および方法

対象は国立療養所西奈良病院に入院中の10歳から20歳の DMD 15例である。これらの患者を①Cobb 法で10度以上の腰椎左側彎を有する群②Cobb 法で10度以上の腰椎右側彎を有する群③Cobb 法で10度以上の腰椎側彎を有しない群，の3群に分類し，それぞれ①左側彎群②右側彎群③伸立位群，とした。症例数は①が8例，②が2例，③が5例であった。

各群について，①上部胸椎として Th 3 レベル②中部胸椎として Th 6 レベル③下部胸椎として Th 10 レベル④上部腰椎として L1 レベル⑤中部腰椎として L3 レベル⑥下部腰椎として L5 レベル，の合計6つのレベルで骨格筋 CT 撮影を行った。

CT は東芝製全身用 CT スキャナー，TCT-300S を用い，スライス幅10 mm，スキャン時間4.5秒，X線 120 kvp，110 mA の条件で撮影し

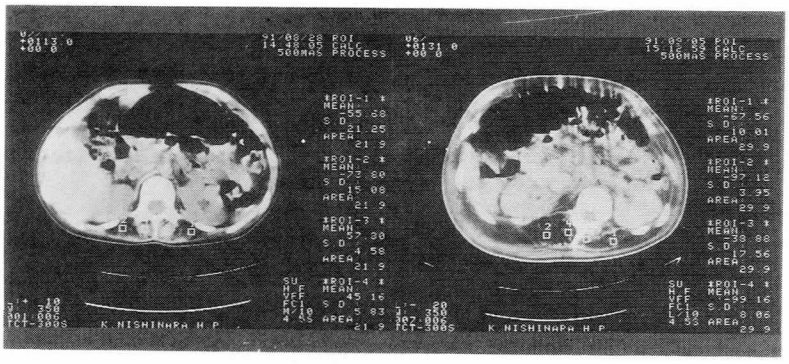


図1　傍脊柱筋 CT 値の計測
各スライスで，傍脊柱筋を外側（Lateral）と内側（Median）の左右合わせて4カ所で CT 内臓のコンピューターで CT 値の計測を行った。CT 計測範囲は全部 30 mm² で統一した。図で左は伸立位群，右は左側彎群での計測例。

た。各スライスで，傍脊柱筋を，腸肋筋を主とした外側の筋と多裂筋を主とした内側の筋に分け，それぞれ Lateral, Median と名付けた。この Lateral と Median の，左右合わして4カ所で，CT 内臓のコンピュータで CT 値の計測を行った。CT 値計測範囲は全計測部とも 30mm² で統一した（図1）。尚，撮影にあたっては，可能な限り椎体に垂直なスライスを得るように努めた。

結　果

全症例の，各脊柱レベルでの傍脊柱筋 CT 値をみると，TH 3, すなわち上部胸椎レベルから L3, すなわち中部腰椎レベルまでで，0.1% 水準で有意に Lateral の CT 値が低く（表1），

表1　全症例の各脊柱レベルでの傍脊柱筋 CT 値
(mean±S. D.)（H. U.)

level	n	Lateral	Median
Th3	28	−45.36±42.98	21.45±31.86*
Th6	30	−36.61±54.26	11.58±33.94*
Th10	30	−43.39±48.54	2.09±38.29*
L1	30	−74.37±30.14	−9.49±40.91*
L3	30	−76.34±34.85	−15.60±35.69*
L5	28	−35.60±24.89	−27.22±22.69

* P<0.001

L5 を除く各レベルで Lateral が Median に比べ有意に低い CT 値をとり，筋変性が高度であると考えられる。

傍脊柱筋の変性は外側が内側に比べて強いことを示していた。

また，各レベル間での CT 値を比較すると，Median では L5 が最低で，Th 3 に向いレベルが高いほど CT 値も高い傾向があった。また

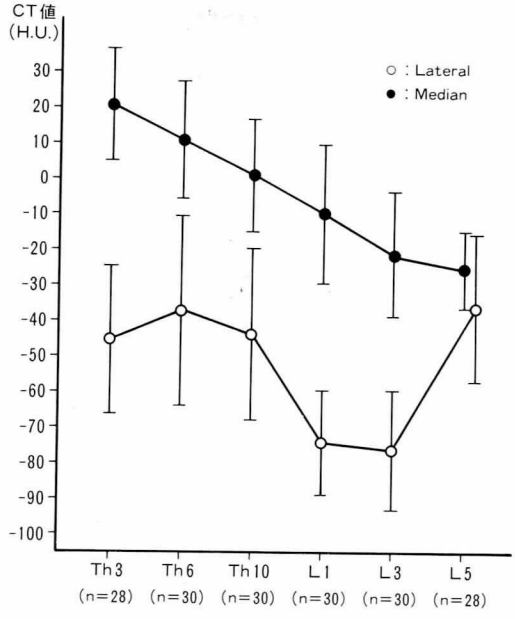


図2　全症例の各脊柱レベルでの傍脊柱筋 CT 値
L5 を除く各レベルで Lateral が Median に比べて有意に低い CT 値をとることに加えて，Median では L5 が最低で Th3 に向かってレベルが高いほど CT 値が高く，Lateral においても L3 から Th6 の範囲でレベルが高いほど CT 値が高い傾向がみられた。

表2　各群における各脊柱レベルでの左右の傍脊柱筋 CT 値

(mean±S. D.) (H. U.)

1）左側彎群

		Lateral		Median	
level	n	R	L	R	L
Th3	7	−58.54±39.72	−52.56±46.37	13.51±32.65	6.75±37.52
Th6	8	−45.66±43.13	−42.32±39.14	2.00±32.69	−4.64±30.92
Th10	8	−51.01±25.03	−41.04±32.32	−14.15±34.89	−3.39±35.30
L1	8	−84.94±24.67	−50.81±27.88*	−35.07±44.12	2.27±34.28
L3	8	−90.42±19.67	−35.67±31.81**	−48.89±26.53	0.69±22.17**
L5	8	−43.23±45.21	−45.98±36.05	−38.35±22.29	−36.69±17.39

2）右側彎群

Th3	2	−45.76	−35.42	28.34	47.36
Th6	2	−73.72	−51.84	24.62	45.06
Th10	2	−45.48	−69.46	9.26	−9.24
L1	2	−72.00	−102.32	−31.62	−37.22
L3	2	−75.52	−94.60	−32.00	−57.74
L5	1	−36.08	−64.08	−25.40	−1.72

3）伸立位群

Th3	5	−37.22±52.90	−28.78±39.07	27.79±27.43	33.73±18.88
Th6	5	−19.90±64.87	−8.78±68.36	24.36±31.88	21.47±32.75
Th10	5	−29.69±75.25	−37.39±63.41	20.28±46.68	20.28±38.23
L1	5	−77.67±30.24	−81.65±28.43	8.49±34.52	14.23±34.09
L3	5	−93.55±21.53	−94.70±24.03	10.06±21.20	19.21±22.73
L5	5	−13.14±50.07	−23.47±36.96	−6.06±15.96	−20.90±19.70

*：$P<0.05$　**：$P<0.01$

左側彎群において，Lateral の L1 と L3，及び Median の L3 で左傍脊柱筋の CT 値が有意に高いことがわかる。

変性の強い Lateral でも，L3 から Th 6 の間でレベルが高いほど CT 値が高い傾向がみられた（図2）。このことより，DMD では中部から下部腰椎レベルで傍脊柱筋の変性が強く，上部胸椎レベルに向かって，レベルが上がるにつれて筋は保たれる傾向があることがわかった。

①左側彎群②右側彎群③伸立位群の各群における各脊柱レベルでの左右の傍脊柱筋 CT 値を検討すると（表2），左側彎群では，L1 レベルの Lateral で全症例で左側の CT 値が右側より高く，5％水準で有意差がみられた。また L3 レベルでは Lateral, Median ともに全例で左側の CT 値が右側より高く，1％水準で有意差がみられた。すなわち腰椎左側彎群では，上部から中部，特に中部腰椎レベル傍脊柱筋の変性の強さに左右差があり，右側の変性が強く左側は比較的保たれることがわかった（図3）。

右側彎群は症例数が2例と少なかったため統計学的検討はできなかったが，左側彎群で有意な左右差がみられた L3 レベル，すなわち中部腰椎レベルに注目すると，2例とも右側が左側に比べて CT 値が高く，左側彎群と逆の傾向が認められた（図4）。

伸立位群では全レベルとも有意な左右差はなかった。L3 レベルをみても全体の傾向として左右の CT 値の差の少ないことがわかる（図5）。

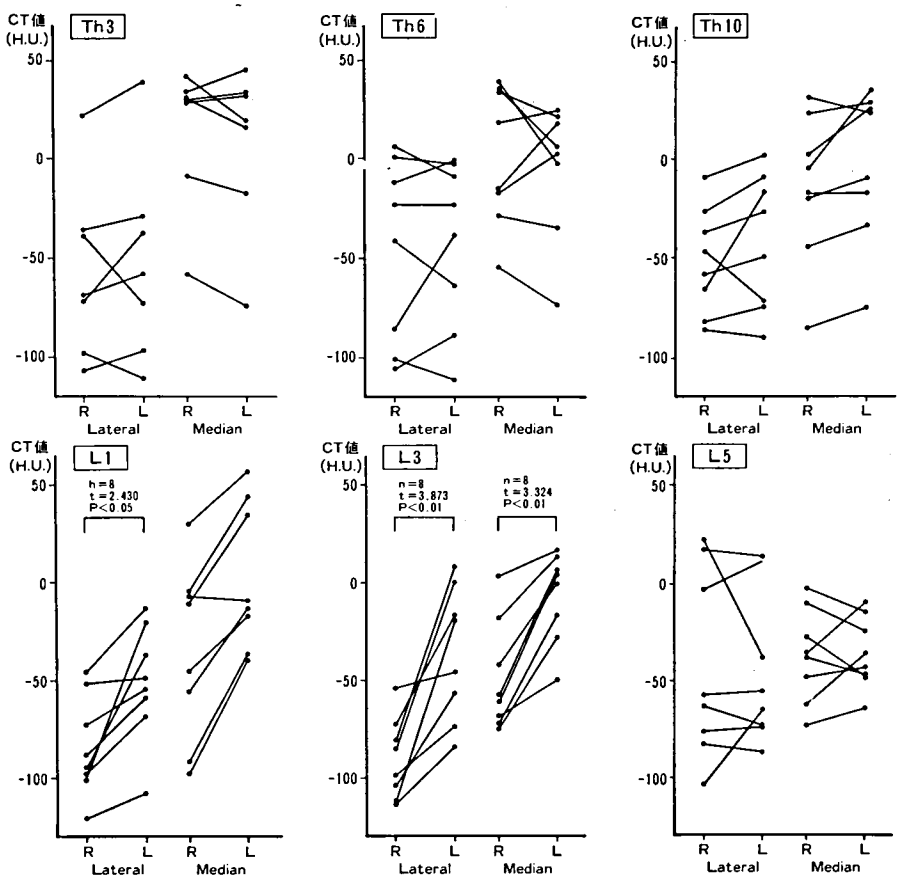


図3　左側彎群における各脊柱レベルでの左右の傍脊柱筋 CT 値
L1 レベルの Lateral で全例とも左側の CT 値が高く 5％水準の有意差がある。また L3 レベルの Lateral と Median で全例で左側の CT 値が高く 1％水準の有意差がある。

考　察

DMD の脊柱変形は，体幹を支持する筋群の筋力低下による脊柱の瓦解により生じ，歩行不能となる頃より急速に増悪するとされているが[10]，そのメカニズムについてはまだ明らかにされていない。今回我々は，骨格筋 CT を用いて，脊柱を支持しかつ脊柱の運動を司る傍脊柱筋の変性を定量することにより脊柱側彎のメカニズムを検討した。

我々の検討では，DMD では中部腰椎レベルの傍脊柱筋の変性が最も強く早期より現れ，上部胸椎レベルに向かってレベルが高いほど筋は保たれる傾向があることがわかった。また，全例で外側の傍脊柱筋の変性が内側に比べて強く，その差も大きかった。

各群に分けて検討した，傍脊柱筋の左右差と側彎の方向の検討では，変性の強い中部傍脊柱筋の変性に左右差があると，変性の弱い，比較的筋が保たれている側に凸の側彎が生じることがわかった。このメカニズムについて，我々は以下のように考えた。

傍脊柱筋は両側が同時に働くと脊柱を反らし，片側が働くと脊柱はその側に曲がる。腰椎レベルの傍脊柱筋に左右差が生じ，筋力の imbalance を生じると，保たれている側の傍脊柱筋の筋力を利用してその反対側へ上体を傾けた状態での姿勢保持や，傾いた状態から上体を立て直す運動はある程度可能だが，その逆方向は困難となる。そのため患者は，立位及び坐位保

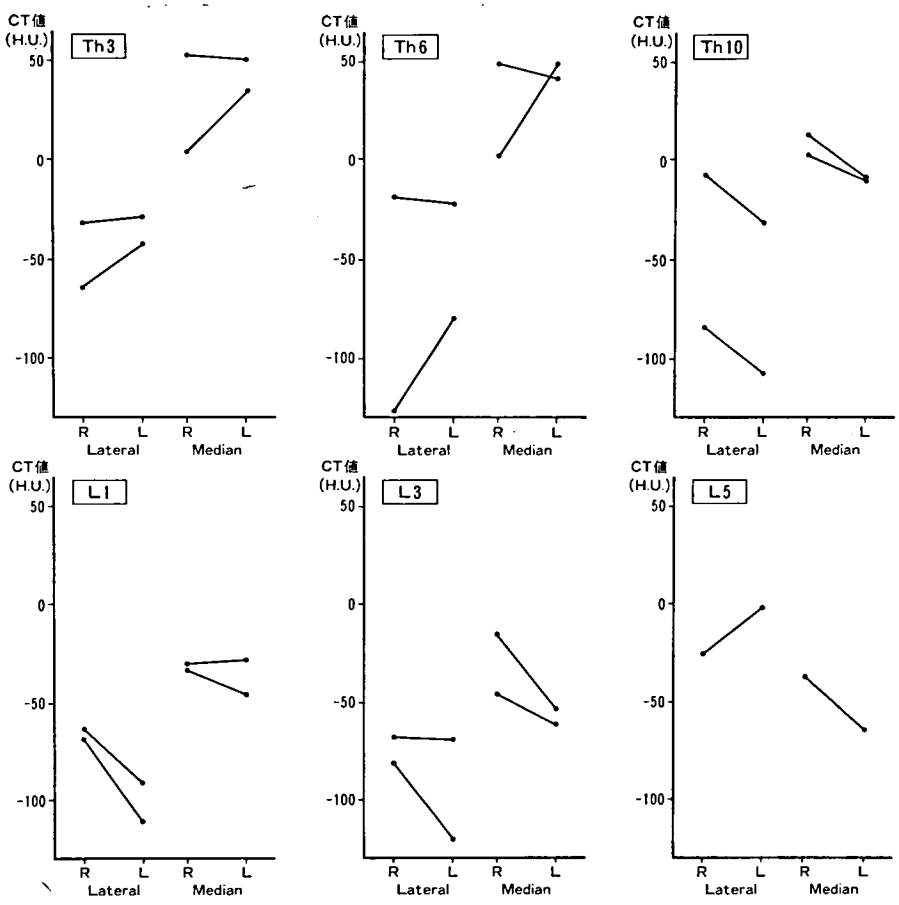


図4　右側彎群における各脊柱レベルにおける左右の傍脊柱筋 CT 値
2例と症例数が少なく，検定はできなかったが，左側彎群で有意な左右差の認められた L3 レベルをみると，2例とも右側が左側に比べて CT 値が高く，左側彎群と逆の傾向がみられた。

持に際し，自然と一方向へ上体を傾けた姿勢をとるようになる。このような，いわば筋力低下の imbalance を代償するような姿勢保持を行うことにより脊柱側彎が始まると考えた（図6）。

また，症例によっては，腰椎レベルの筋変性が進行している時期にまだ保たれている胸椎レベルの傍脊柱筋の筋力を利用して，腰椎部で一方向へ傾いた上体を立て直して視線を水平に保とうとすることにより，胸椎部と腰椎部が反対のカーブを描くダブルカーブが発生するのではないかと考えられた。

文　献

1）高柳哲也，安東範明ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症における坐位保持能力の検討．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遺伝及び疫学に関する研究　平成2年度研究報告書：83，1991

2）O' Doherty DS, Scheller D et al: Computed tomographic patterns of pseudohypertrophic muscular dystrophy: Preliminary result. J Comput Assist Tomography **1**：482，1977

3）大岩　昇，加藤友義ら：進行性筋ジストロフィー症における骨格筋 CT 所見．脳と発達 **13**：157，1981

4）立野勝彦，西村　敦ら：進行性筋ジストロフィー症の下肢筋群の CT パターンについて，総合リハ **10**：525，1982

5）Hawley RJ Jr, Schellinger D et al: Computed

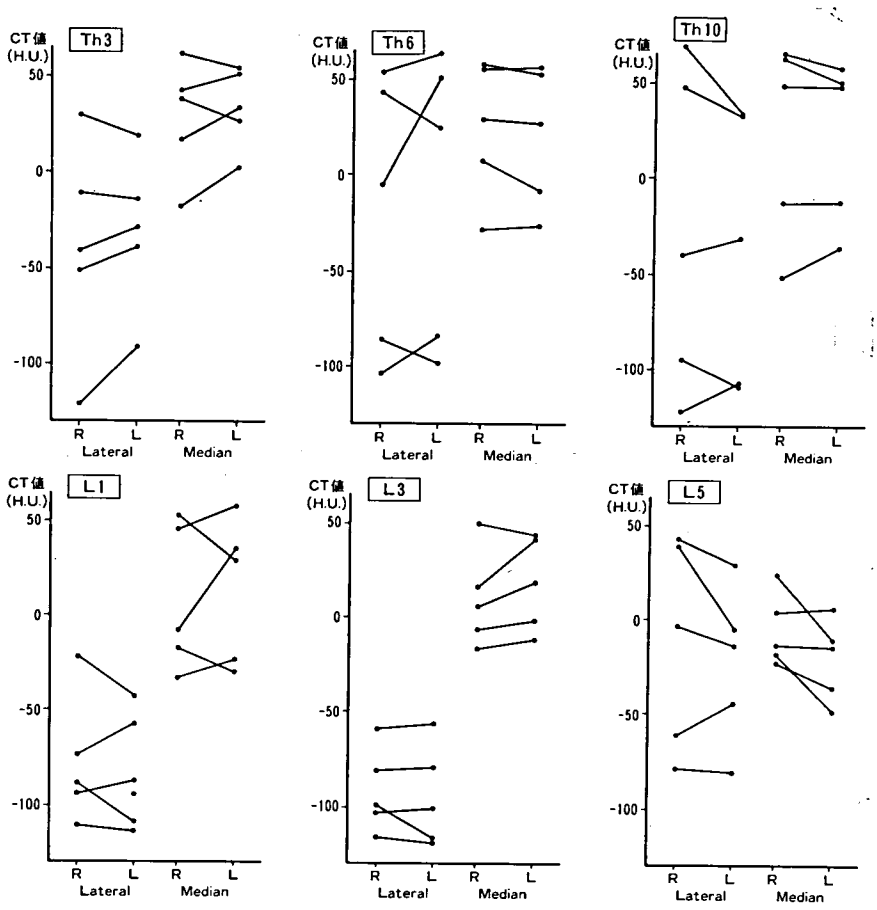


図5　伸立位群における各脊柱レベルでの左右の傍脊柱筋 CT 値
全レベルで CT 値の有意な左右差はなかった。L3 レベルをみても，全体的に左右の CT 値の差が少ないことがわかる。

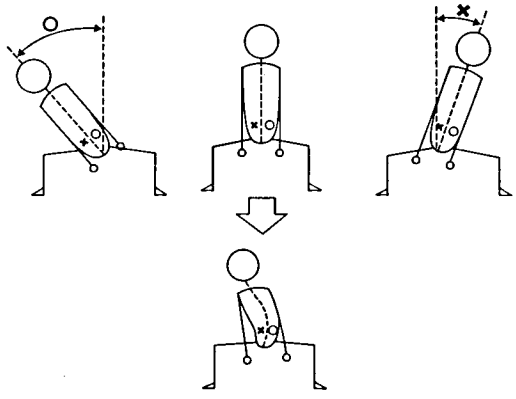


図6　DMD における脊柱側彎発生のメカニズム
腰椎レベルの傍脊柱筋の変性に左右差が生じると，比較的保たれている側の筋力を利用して，その反対側へ上体を傾ける運動や，その状態での姿勢保持は可能だが，その逆は困難となる。このような，いわば筋変性の imbalance を代償した姿勢保持を行うことにより脊柱側彎が始まる。

tomographic patterns of muscles in neuromuscular diseases. Arch Neurol **41**：383, 1984

6）川井　充，国本雅也ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症の骨格筋 CT 所見とこれにもとづく病期分類．臨床神経　**25**：578, 1985

7）堀川博誠，小長谷正明ら：Duchenne 型筋ジストロフィー下肢筋 CT 像の定量的解析．臨床神経 **25**：1277, 1985

8）川井　充，国本雅也ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症の manifesting carrier —2 症例の骨格筋 CT と筋生検所見—．臨床神経　**29**：23, 1989

9）清水　潤，松村喜一郎ら：デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおける骨格筋 CT 所見の経時的変化．臨床神経　**31**：953, 1991

10）坪井　純，森山明夫ら：進行性筋ジストロフィー症の脊柱変形について．整・災外 **28**：439, 1985

筋ジストロフィーの運動機能に関する研究（第一報）

——床反力からみた小児の歩行の発達——

班　　員　松　家　　豊
国立療養所徳島病院

共同研究者　村　川　和　義[1]，米　津　　浩[2]
水　谷　　滋[2]，橋　本　俊　顕[3]

[1] 国立療養所徳島病院・小児科　[2] 国立療養所徳島病院整形外科　[3] 徳島大学・小児科

要　旨

小児期の神経および筋疾患に歩行の異常を伴うことは多い。この異常の判定には正常歩行の発達に熟知することが大切である。そこで，今回，我々は大型床反力計を用いて正常小児の歩行分析を行った。

2～15歳の正常小児142名に大型床反力計（アニマ社製）を用い自由歩行させた。その数値をストライド毎に正規化し以下の結果が得られた。

歩行時間のうち両脚支持期，制動期の時間が年少児ほど長く，5～6歳で成人のパターンに近づいた。床反力では垂直分力の極大値は6歳頃に成人のパターンに近づいた。前後分力は5歳頃と思春期に発達の加速がみられた。側方分力は年少児ほど大きく，成人のパターンになるのは10歳前後であった。

今後，今回の結果に基づいて，進行性筋ジストロフィー患者の下肢運動機能を特に歩行解析の面から検討していく。

目　的

ヒトは一般に1歳頃に歩行を開始し，その歩容は加齢と共に変化し次第に成人のパターンに近づいていく。従って，小児期の神経および筋疾患に伴う歩行の異常を判定するには小児では，その患児の年齢層における正常小児の歩行と比較することが重要である。

そこで，今回，正常小児の歩行を大型床反力計を用いて分析し検討した。

今後，進行性筋ジストロフィー患者の歩行分析を行い，下肢運動機能について，特に歩行解析の点から自然経過を明らかにする。

対象と方法

表1　年齢分布

年齢（歳）		人数（人）	利き足 右足（人）	左足（人）	不明（人）
2		3	0	2	1
3		10	4	4	2
4		10	6	2	2
5		7	2	4	1
6		13	9	2	2
7		14	6	5	3
8		13	6	6	1
9		13	9	2	2
10		12	7	3	2
11		3	3	0	0
12		13	6	5	2
13		16	6	10	0
14		10	2	7	1
15		5	1	4	0
合　計		142	67	56	19
成人	男	20	13	6	1
	女	24	17	7	0
	全体	44	30	13	1

対象は2歳から15歳までの正常小児142名（男子70名，女子72名）と正常成人44名（男子20名，女子24名，平均年齢25.0±2.2歳）である。（表1）

方法は0.8×2.5mの大型床反力計（アニマ社製）を用い，その上を複数回自由歩行させサンプルを採取，その結果をコンピューター処理した。床反力波形はストライド毎に正規し，それを3分力（垂直，前後および側方分力）に分け，それぞれについて加算平均処理した。

得られた数値は歩行時間では両脚支持期と単脚支持期の比（T1/T2, T3/T4）について，垂直分力では制動期と駆動期の極大値の比（Z1/Z2）について，前後分力では制動期と駆動期の極大値の比（X1/X2）と時間の比（fx(t)/fx(t')）について，側方分力では最大値（Y1）と制動初期の側方分力（Y0）についてそれぞれに検討を加えた。（図1）

なお，これらの数値については左右差，利き足との関係についても検討した。利き足は連続片足跳び，走り幅跳びや走り高跳びの踏み切り足などから決めた。成績は2歳からの数値をだしたが，利き足がはっきりしてくるのは5歳頃からと言われているので[1] それ以後の年齢について検討をした。（表1）

結　果（図2～13）

〔1〕歩行周期での各期の時間比

1．両脚期・単脚期の時間比（図2，3）

歩行時間の両脚支持期と単脚支持期の比は年

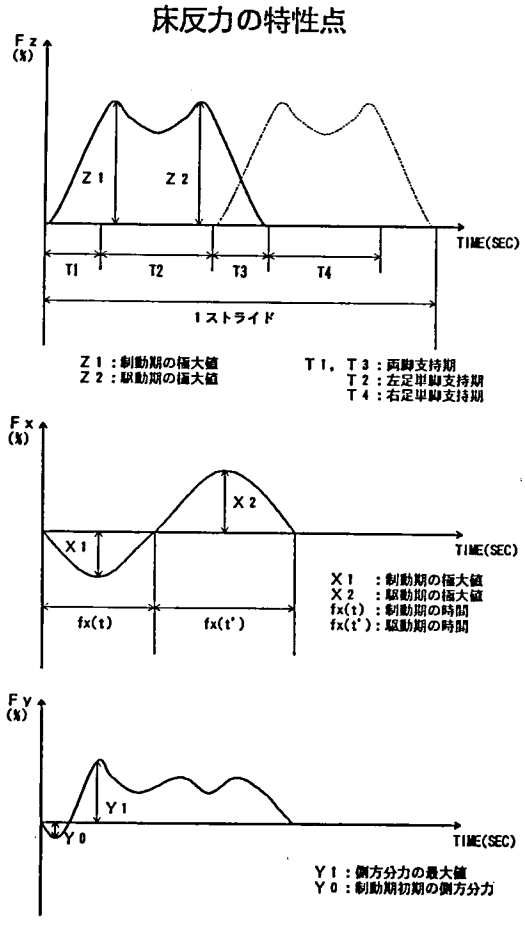


図　1

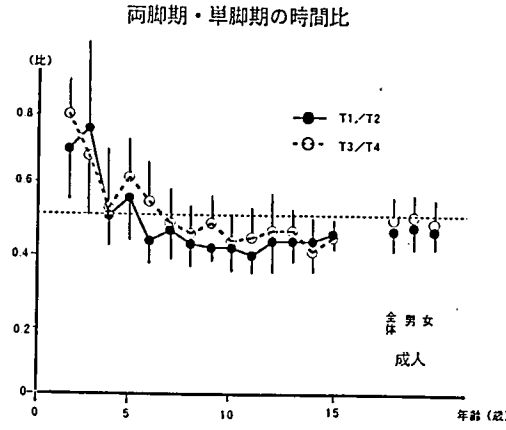


図　2

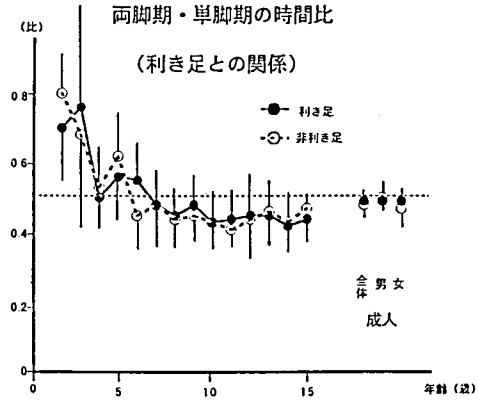


図　3

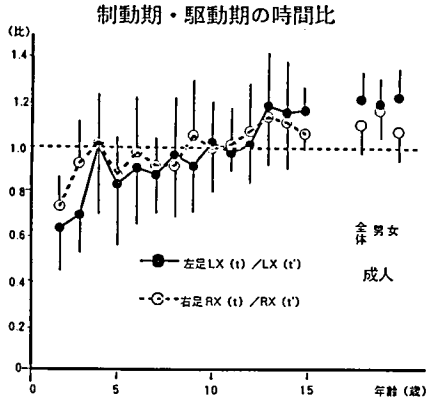


図　4

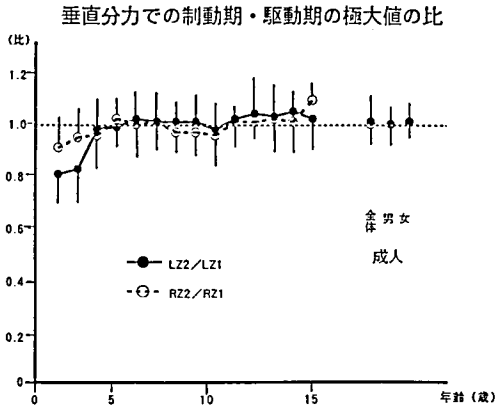


図　6

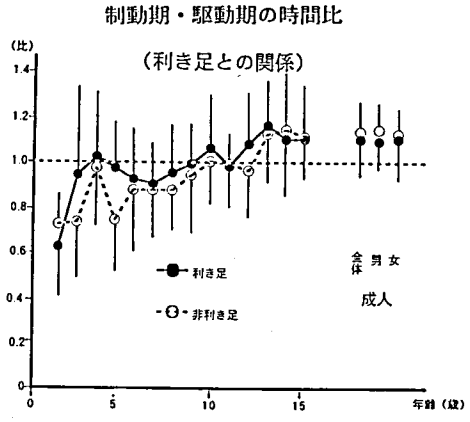


図　5

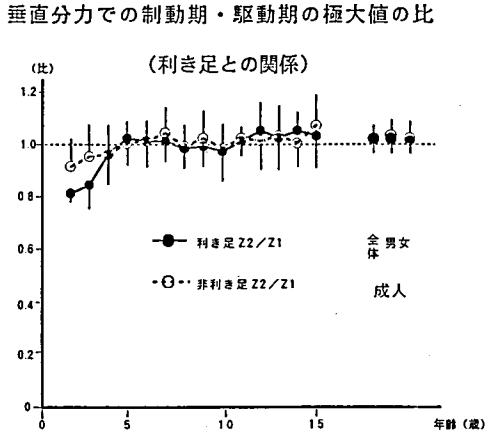


図　7

少児ほど両脚支持期が長く，6歳頃に成人の値に近づいた。左右差や利き足での差はみられなかった。

2．制動期・駆動期の時間比（図4，5）

年少児では制動期の時間の方が長く，加齢と共に駆動期の時間の方が長くなり10歳頃から駆動期の時間が制動期の時間より長くなった。その発達は5～6歳頃と思春期頃に加速の時期がみられた。左右差や利き足での差はみられなかった。

〔2〕床反力の各分力について

1．垂直分力（図6，7）

垂直分力での制動期と駆動期の極大値が5～6歳頃までは制動期の方が大きく，それ以後では駆動期で大きかった。また，その5～6歳頃の値がその後成人までほとんど変化しなかった。

2．前後分力（図8，9）

前後分力の制動期と駆動期の極大値も5歳頃までは制動期の方が大きく，以後は逆転して駆動期の方が大きくなり，思春期頃にはさらに著明になる傾向がみられた。

3．側方分力（図10，11）

側方分力の最大値は年少児ほど大きく，また，その個人差も大きかった。そのパターンが成人に近づくのは10歳頃であった。また，思春期頃の値は成人の値より小さかった。

4．制動初期の側方分力（図12，13）

制動初期の内側への側方分力は年少児ではみられないことも多かったが，思春期以降はほぼ

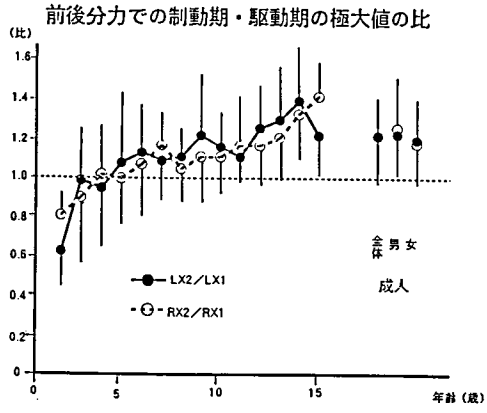


図 8

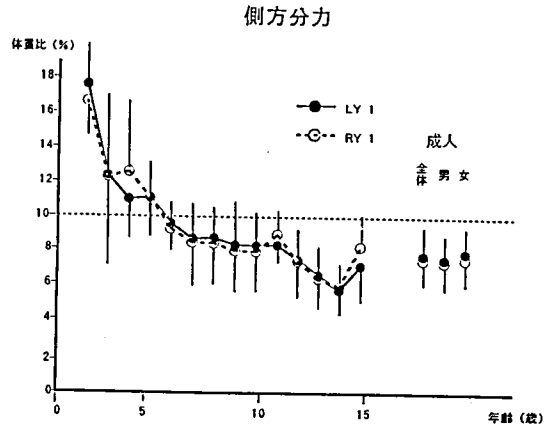


図 10

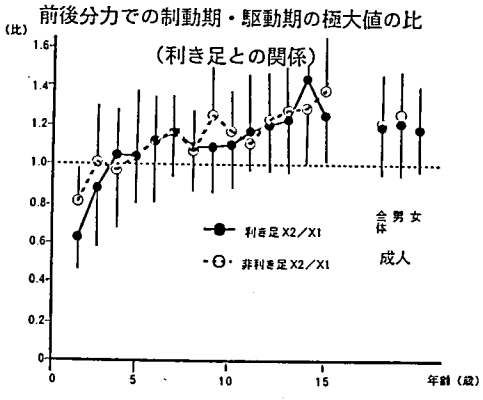


図 9

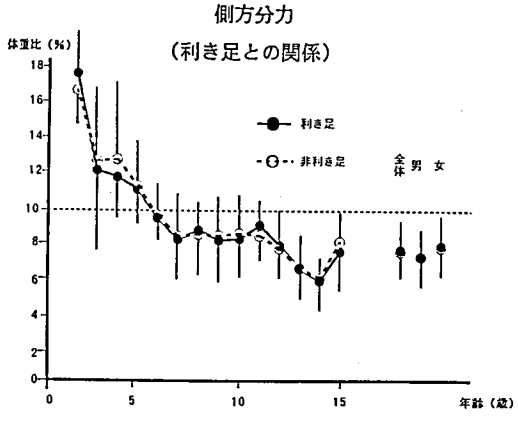


図 11

全例にみられ，その値も加齢と共に大きくなり，10歳前後で成人のパターンに近づいた。また，利き足との関係では2～4歳の利き足のはっきり決まらない時期を除いて，利き足側でよくみられ，また，その値も利き足の方で大きい傾向がみられた。

考　察

筋ジストロフィーのように歩行障害を伴う神経・筋疾患では，患者のそれぞれの障害の時点での歩行を正確に分析し把握しておくことは，以後の臨床経過を，また，治療効果をみていくうえで重要である。そのためには正常者の歩行分析を知っておく必要がある。特に，小児の場合は脳や筋肉などの発達と共に歩行のパターンが変化してくることを考慮しなければならない。

今回の床反力の測定結果からみて，垂直分力，前後分力は5～6歳頃に成人のパターンになった。このことは，鶴見の筋電図での前脛骨筋や腓腹筋の発達段階の時期[2]と一致していた。しかし，側方分力が成人のパターンに近づくのは10歳前後までかかり，長腓骨筋の発達の時期[2]よりも遅れていた。この側方分力の発達の遅れには筋肉だけではなく，平衡機能などの関与も考えられる。今回の我々の歩行分析の成果は従来の種々の歩行分析の報告[3)4)5)]とほぼ同じであり，大型床反力計での再現性は高いと思われた。

また，歩行障害には偏則性の場合もあるので正常歩行においても歩行の左右差や利き足との関係について検討しておく必要がある。今の結

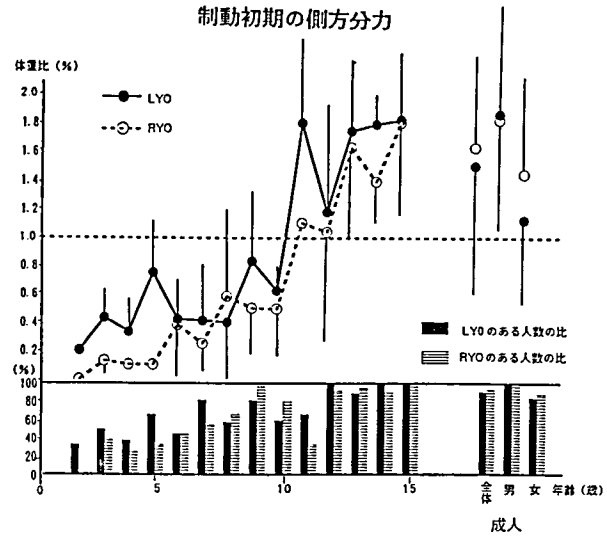


図　12

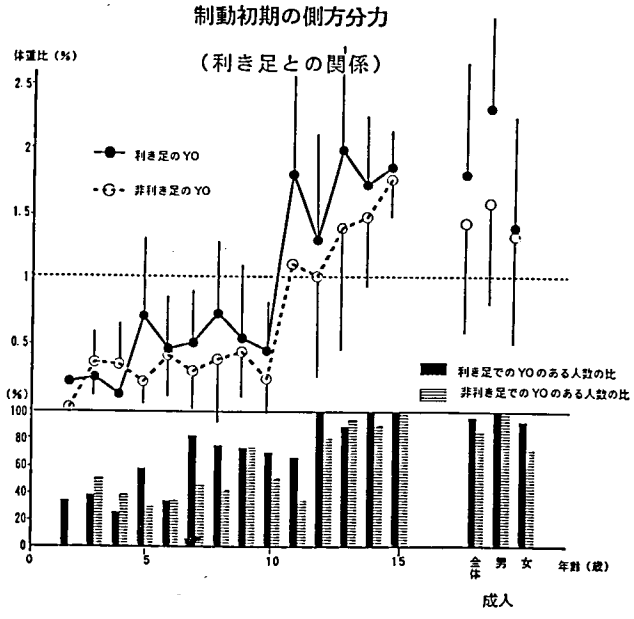


図　13

果では制動初期の側方分力において利き足側に大きい傾向がみられた。さらに検索を要するが，偏側性の歩行障害に対しても大型床反力計は有用である。

今後，今回の結果をもとに進行性筋ジストロフィーの歩行の自然経過および治療効果をみていくと共に他の歩行障害を有する神経・筋疾患についても検討していきたい。

ま と め

1）正常小児2～15歳の142名について自然歩行での歩行分析を行った。

2）小児の歩行では歩行周期では年少児ほど両脚支持期，制動期の時間の比が長かった。

3）床反力の各分力では垂直分力は5～6歳で成人の値に近づいた。前後分力は5歳頃と思春期に発達の加速がみられた。側方分力は10歳頃に成人のパターンとなった。

4）左右差，利き足での差はほとんどみられなかった。

文　献

1）前川喜平，副田敦裕ら：利き手，利き足と軸足の発達に関する研究．小児科診療 **51**：1841-1848, 1988

2）鶴見信之：小児歩行の筋電図学的研究．日整会誌，**31**：665-681, 1957

3）野口雅夫：小児期における歩行の発達—床反力から見た小児歩行の特徴．日整会誌：**60**：787-799, 1986

4）鈴木良平，乗松敏晴ら：床反力とアーチからみた歩容の加齢変化 —小児の歩行発達— J. SPORTS SCIENCE 8-3：121-127

5）Sharon R. Menkveld, Edwin A. Knip-stein et al: Analysis of Gait Patterns in Normal School-Aged Children. J. Pediatr. Orthop. **8**：263-267

筋ジストロフィーの足の機能障害

班　　員　松　家　　豊
国立療養所徳島病院

共同研究者　米　津　　浩[1)]，水　谷　　滋[1)]，斎　藤　博　史[2)]
[1)] 国立療養所徳島病院整形外科　[2)] 徳島大学医学部放射線科

要　旨

DMD における足変形について下腿から足にいたる骨格筋 CT 値および MMT, ROM などを測定し，その障害進行過程，装具との関連性について検討を行った。

足の変形として初期には扁平足をみるが障害が進行すると尖足，内反，凹足，外反母趾，かぎ爪などの特有な変形を生じる。

筋 CT 値では各筋に固有の障害進行パターンがみられ，前脛骨筋の低下は尖足に対し，腓骨筋の低下，後脛骨筋の優位は内反尖足に対し，母趾外転筋の優位は凹足に対し，短母趾屈筋の優位は外反母趾に対しそれぞれ変形の主な要因となっている。

長下肢装具は足変形の進行防止に対して有効な手段である。装具療法を適応したものは非適応のものより足変形は軽い。なお，装具療法中であっても足変形の増悪はみられる。

目　的

DMD で最も早く出現する運動機能障害は，起立・歩行の異常である。この場合，下肢の筋力低下に伴って関節拘縮が必発する。関節拘縮は非可逆的で運動機能障害を増悪する要因となり，将来強い変形となってくる。したがって治療を担当する立場から関節拘縮，変形に関しての病態を十分把握し機能維持をはかる必要がある。そこで，診療上関節拘縮で最も問題となる足の機能障害について検索した。

対象および方法

対象は当院入院中の DMD 患者45例で，年齢は12才～34才，平均17.8才である。厚生省研究班による機能障害度分類は stage 2 が 2 例，stage 5 が 1 例，stage 6 が20例 stage 7 が 5 例，stage 8 が17例である。

方法として，足の直接検診，MMT および ROM 測定，X線検査および CT 検査を行った。CT スキャナーは HITACHI CTW400-20A を用い，WL＋20HU，WW400 の条件で画像化した。

結　果

1．下肢の筋力低下は中枢側から始まり，MMT では大腿部の屈筋群は伸筋群より優位である。足関節では背屈筋力に対して底屈筋力が強い。また，足趾屈筋群は伸筋群より強い。

2．筋力低下について足関節では尖足位の不安定な姿勢となり背屈制限をきたすようになる。MMT と ROM の関係を示した（図1）。MMT の低下につれて ROM も制限が加わってきている。

3．足の変形は初期の歩行時期では立位荷重によって扁平足をみる。障害が進行すると尖足，内反変形（写真1）さらには，凹足，前足部内転などの共通した変形が特徴的となってくる。また，足趾では足内在筋のアンバランスのために外反母趾（写真2）あるいはかぎ爪(写真3）を伴ってくる。

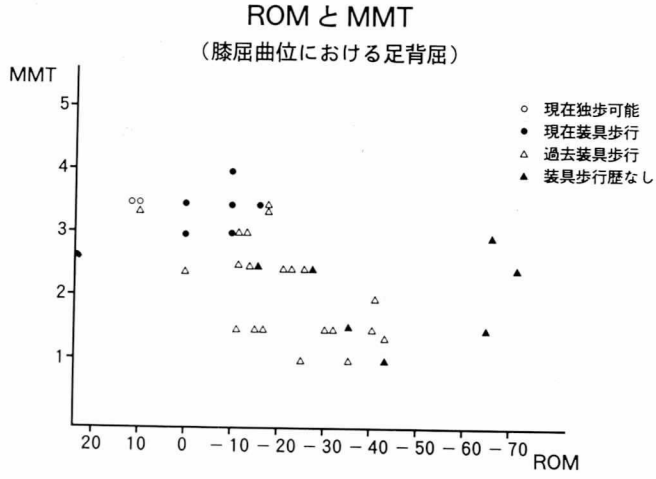
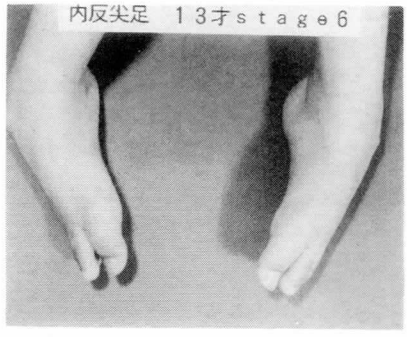
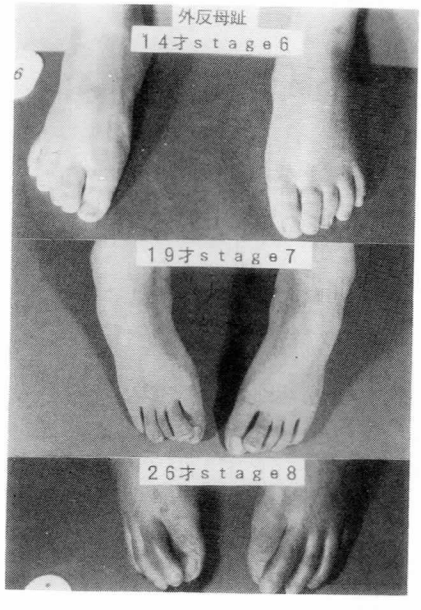


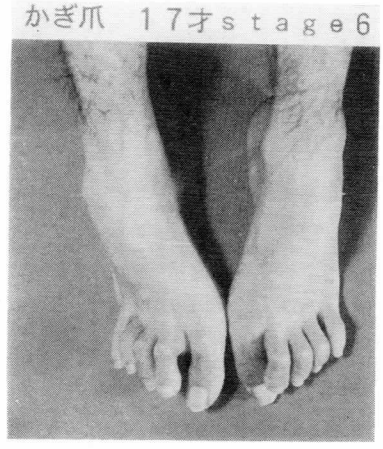
図　1



写 真 1



写 真 2



写 真 3

4．これら足の変形は，筋のアンバランスによる病態のほかに荷重関節として生体力学的な姿勢の異常による下肢アライメントの不安定性が関与する。

筋 CT 像は下腿筋の選択的障害，足内在筋の優位性を示すものである。（写真４）下腿以下の各筋の CT 値を示した。（図２）前脛骨筋の低下は尖足に対し，腓骨筋の低下，後脛骨筋の優位は内反尖足に対し，母趾外転筋の優位は凹足に対し，短母趾屈筋の優位は外反母趾に対しそれぞれ変形の要因となっている。

5．足の変形に対する治療として，予防・増悪防止のため徒手・器具によるストレッチは早期

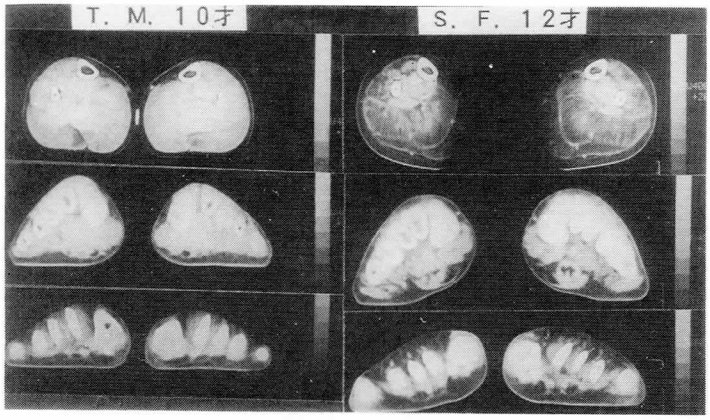
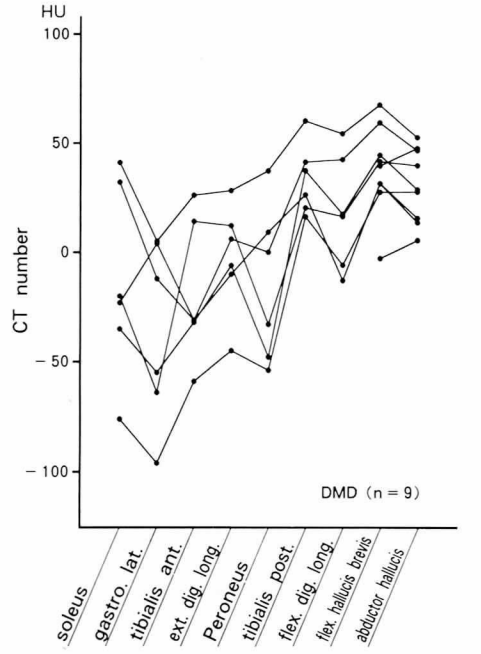


写真 4



CT number of each lower leg muscle

図 2

に始めるべきである。歩行不能になっての長下肢装具は廃用性筋萎縮の防止，変形防止のために有用である。装具装着に先だってアキレス腱延長，腸脛靭帯切離などの矯正手術も行われる。

長下肢装具装着中のもの，あるいはかって装着適用したものでは，装具を全くつけなかったものよりも変形は軽度であった（図3）。ベット臥床になると下肢外転・外旋位となり変形は増悪する。したがって，可能なかぎり長期にわたっての装具起立をすすめている。

6．長下肢装具から車椅子になったものでは短下肢装具を適応している。足変形防止のほかに，車椅子での姿勢の安定，介護のしやすさ，cosmetic にも有用である。

考　察

CT スキャンは DMD における骨格筋の障害を評価する方法として広く利用されている。自験の筋 CT 値は多少のばらつきがあるものの，ほぼ同様のパターンを示した。

DMD の足変形の発生機構について後脛骨筋は足底内側アーチの頂点付近でアーチの一部に広がっており舟状骨を距骨頭の下で下後方に引っ張っている。この筋の優位は舟状骨の向きを変化させ，アーチの前方支柱を低下させ彎曲を強める。また，母趾外転筋は内側アーチ全体に及んでおり，アーチの両端を近づけることで彎曲を強めている。前脛骨筋は内側楔状骨，第1中足骨に付着しこれらを舟状骨にむけて引き上げる作用をもつが，この筋の障害は中足骨頭の低下で彎曲を強め，長趾伸筋がこれを代償しようとして働くが基節骨の過伸展を生ることになる。CT で認められたこれらの筋の障害のアンバランスは，DMD 特有の内反凹尖足，外反母趾，かぎ爪の変形発生機構に関与するものである。さらに DMD では，これらの筋障害が成長期に生じるため，骨の成長軟骨帯の足底部が圧迫され足底面の骨の成長が抑制されて短くな

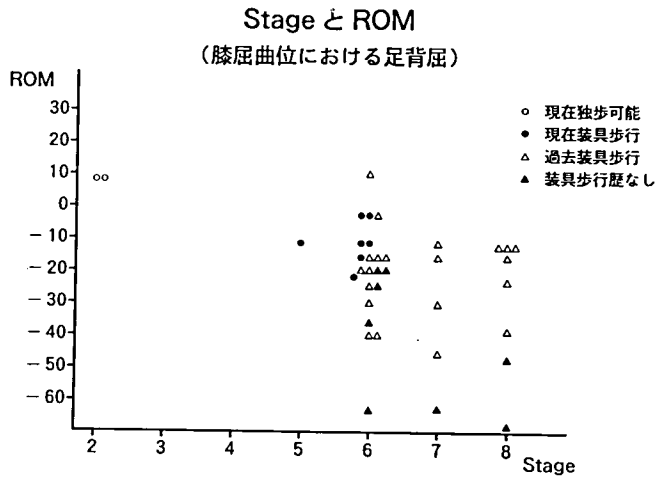


図 3

る。一方，足背部は肥大し，そのために関節面にねじれが生じる。この結果，筋・骨・関節のすべてに病理学的変化が生じ変形は不可逆的なものになってくると思われる。この変化に対し，ストレッチ，装具療法が有用な手段となっている。

ま と め

DMD の足の形態，機能と変形の発生機構に関して検討した。

1．CT および MMT より足部の筋はそれぞれ固有の障害進行をしており，その結果 DMD 特有の変形をきたしているものと思われた。

2．下肢装具は足変形進展に対して有効な手段であり，適用したものは非適用のものより足変形は軽度であった。

文　献

1）I. A. Kapandji：関節の生理学 vol. 2.（萩島秀男 監訳）医歯薬出版. 1980, p. 150

2）Bernard Regnauld：足（廣島和夫 監訳）シュプリンガー・フェアラーク東京. 1985, P123

Duchenne 型筋ジストロフィー症の新しい歩行分析

班　　員　岩　垣　克　己
国立療養所西奈良病院小児科

共同研究者　安　東　範　明[1)]，藤　本　泰　代[1)]，安　東　美波留[2)]
真　野　行　生[2)]，高　柳　哲　也[2)]
[1)] 国立療養所西奈良病院神経内科　[2)] 奈良県立医科大学神経内科

要　旨

圧計測センサシートを応用した新しい歩行分析装置を用いて，Duchenne 型筋ジストロフィー症の歩行を，足底圧の動きの面から解析した。DMD では機能障害度に応じて特徴的な足底圧パターンを呈した。stage Ⅰ では健常者とほぼ同じパターンだったが，stage Ⅱ では足底圧の中心が前足部に存在する時間が延長し始め，stage Ⅲ ではその変化はより顕著になっていた。stage Ⅳでは足底圧の中心は第１中足頭部から始まり，一旦後外側方向へ移動した後，足の外側に沿って再び前方に移動していた。これらの変化は足関節の尖足変形や動揺性歩行などを反映したものと考えられた。本法は各種の治療法の評価や，装具の開発などに有用であると考えられた。

はじめに

今回我々は，新しく開発された圧計測センサシステムを用いて，DMD の歩行を，主として立脚期の足底圧の動きを計測し，健常者との差異や各 stage における特徴，及び歩行機能の低下にともない足底圧のパターンにどのような変化が生じるかなどについて検討を行った。

対象と方法

対象は８歳から10歳，厚生省筋ジス班の機能障害度Ⅰ～Ⅳ度の DMD ７例で，その内訳は stage Ⅰ が１例，stage Ⅱ が２例，stage Ⅲ が１例，stage Ⅳが３例である。対照として７歳から13歳の健常男子10例も計測した。

計測に用いた圧計測センサシートは Teksscan 社製の F-SCAN である（図１）。このシ

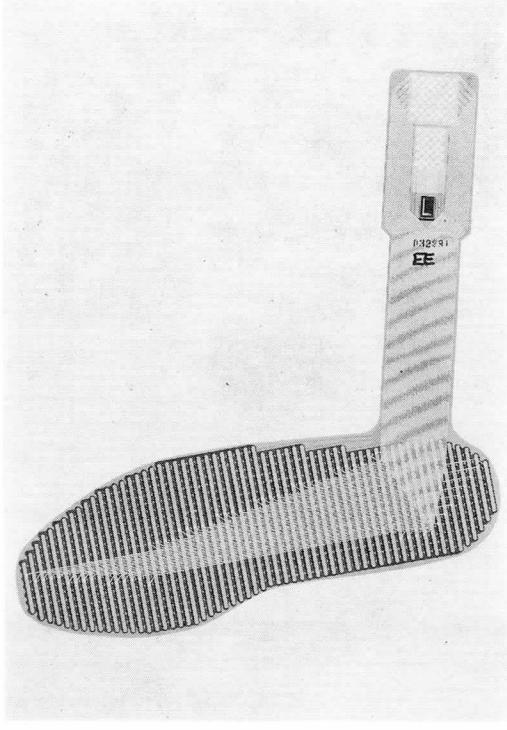


図１　F-SCAN センサシート
足型の圧計測センサシートで 0.1 mm と紙のように薄く，被検者の足の大きさに合わせてハサミなどで整形可能である。

ートは加える力の大きさに応じて電気抵抗値が変化する物質を薄膜形成し，その上下に行電極と列電極を一定の間隔でマトリックス状に配置したもので，それぞれの交点が力検出点となるよう構成されている。0.1 mm と紙のように薄く軽いこのシートを各被検者の足の形に合わせてハサミで整形し，両面テープで右足底に貼付け自由歩行させた。歩行時にセンサの行電極と列電極を周知的にスキャンし，その時点のそれぞれの交点における電気抵抗値をコンピューターに連続的に取り込み，4秒間の歩行時の電気的情報を力情報に変換表示した。

結　果

健常者10例では，全例同一の足底圧パターンをとった。足底圧の中心の軌跡は，圧の中心が踵の中心より始まり，Heel contact に相当する時間が長く，その後スムーズに前方に向かって直線的に，一部やや外側凸の孤を描きながら移動し，Toe off 期に再びやや長い時間を経過した後，第1趾方向に抜けるのが観察された（図2）。

垂直方向の圧分布をみると，立脚期において足の後部1/3と前部1/3の圧の大きさはほぼ同等で中間1/3の圧は少なく全体として双峰性のピークを有するパターンを示した。後部1/3の圧のピークの時点，すなわち Heel contact 期のピークに相当する時点での圧パターンを2次元

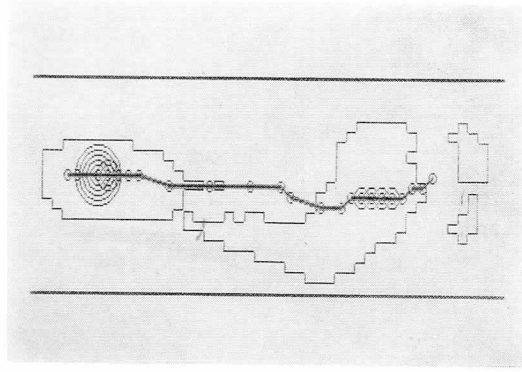


図2　健常者の足底圧の中心の軌跡（13歳男子）
フットプリントの上の太い実線は足底圧の中心の軌跡を示す。実線上の同心円は時間の経過を示すもので，円1個が0.02秒，2重円が0.04秒と，円の数が多いほど，同じ場所に長時間足底圧の中心が存在していたことを示す。

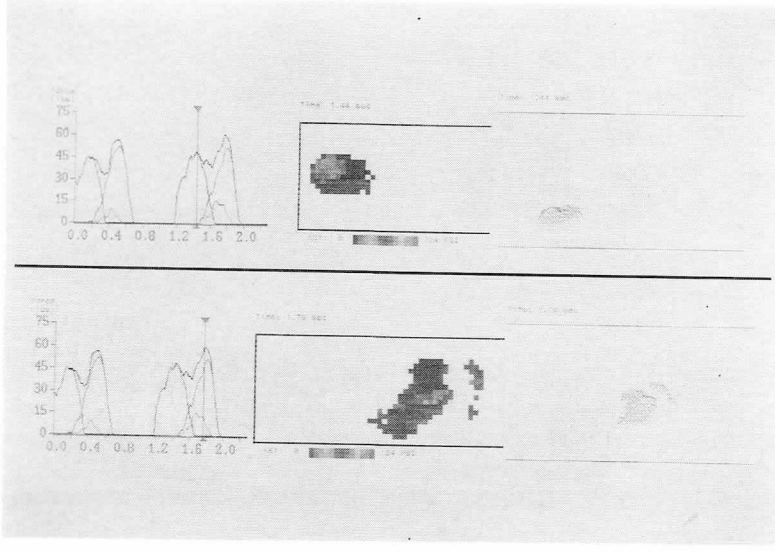


図3　健常者の Heel contact 期と Toe off 期の足底圧（13歳男子）
上段左は，足底圧分布の後部1/3，中間1/3，前部1/3に分けて表示したもの（合成された圧も表示されている）。横軸は時間（sec）縦軸は圧（PSI）。上段中は左の図の矢印で示した時点，すなわち Heel contact 期の圧のピークの時点での圧分布を2次元表示したもの。上段右はその3次元表示。
下段も同様の表示で，Toe off 期の圧のピークの時点での表示。

及び3次元表示でみると，踵部に圧分布が集中しているのがわかる。前部1/3の圧のピークの時点，すなわちToe off期のピークに相当する時点での圧パターンは2次元及び3次元表示共に，前足部に圧分布が着実に移動しているのが証明された。(図3)。

DMDでは障害度が進むにつれて次のパターン1からパターン4に進行することがわかった。まずstage Ⅰの1例は，健常者のパターンとほぼ同様のパターンを呈していた。すなわちHeel contact期とToe off期に時間がかかるパターンで，これを＜パターン1＞とした。

次にstage Ⅱの2例は，足底圧の中心は踵部から始まるものの，その時間は短く，かつ＜パターン1＞よりも外側凸の孤を大きく描きながら前方に移動し，前足部すなわちToe off期に相当する時間が延長していた。これをグラフでみても，やはり後部1/3の圧分布は小さく時間は減少し，前部1/3の圧分布と時間が増大したことがわかる。これを＜パターン2＞とした。

この変化はstage Ⅲに入るとさらに著明となっていた。圧の中心は中足部から始まり，すぐに第1趾部に向かって移動し，前足部での時間は著明に延長していた。グラフでも後部1/3の圧分布と時間はさらに減少し，前部1/3の圧分布と時間がさらに増大したことがわかる。これを＜パターン3＞とした（図4)。

stage Ⅳの3例はさらに特徴的なパターンを示した（図5)。①をみると，圧の中心は，まず第1趾部付近から始まり，一旦後外側方向に向かって移動した後，再び前方に向かって移動し，第3趾部付近に至るのがみられた。②の症例も同じパターンを示した。これらのパターンのグラフ表示をみると中部と前部の2つの山は存在するが後部からの圧分布はみられず，全体として双峰性のパターンをとることがわかる。③は歩行不能直前の患者のもので，圧分布はほ

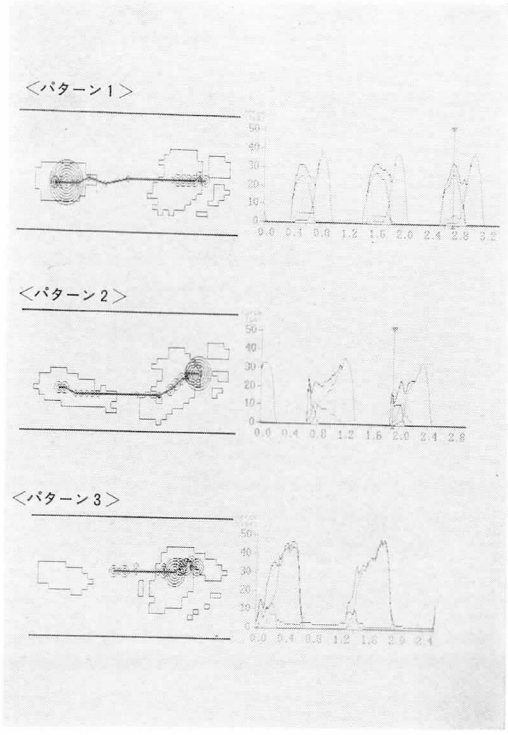


図4　DMDの足底圧パターン①
＜パターン1＞は厚生省筋ジス班機能障害度stage Ⅰの症例，＜パターンⅡ＞は同stage Ⅱ，＜パターン3＞は同stage Ⅲの症例のもの。

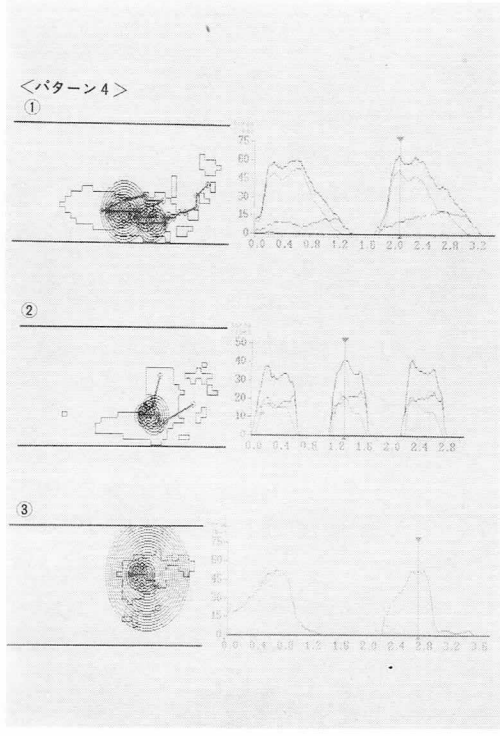


図5　DMDの足底圧パターン②
厚生省筋ジス班機能障害度　stage Ⅳの3症例のもので，①より②が，②より③が下肢の障害は強かった。③は歩行不能直前の症例。

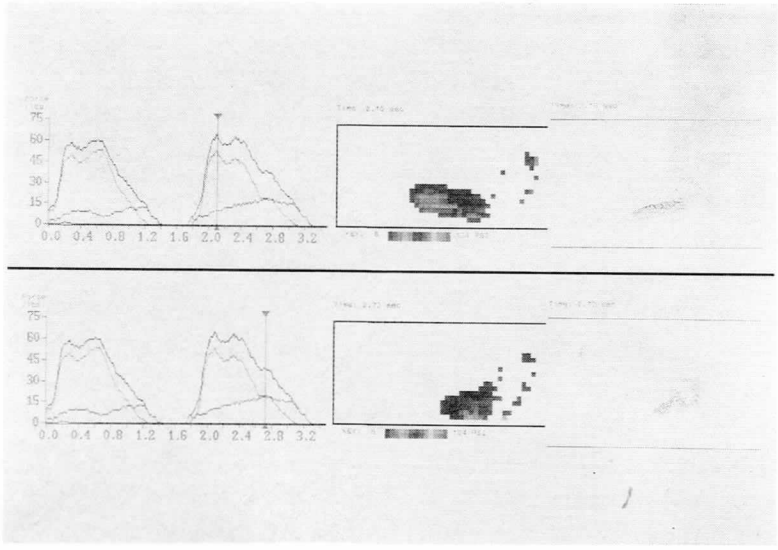


図6　DMD stage Ⅳ の Heel contact 期と Toe off 期に相当すると考えられる時点での足底圧（10歳男子）
上段は中部1/3の圧のピークの時点，すなわち健常者での Heel contact 期に相当すると考えられる時点での足底圧分布だが，圧は中足部から前足部に存在し，後部からの圧はみられない。下段は前部1/3の圧のピークの時点，すなわち健常人の Toe off 期に相当すると考えられる時点での足底圧分布だが，圧は前部かつ外側に存在している。

とんど全て前足部に局在していた。

図6は①の症例を表示を変えてみたものである。上段は中部1/3の圧のピークの時点のもので，健常者の Heel contact 期に相当すると考えられ，2次元表示及び3次元表示をみると中足部から前足部に圧が分布していた。

下段は前部1/3の圧のピークの時点のもので，健常者の Toe off 期に相当すると考えられ，2次元及び3次元表示では，圧分布が前足部の外側寄りに存在するのがわかる。

初回計測の9カ月後，＜パターン1＞の1例と＜パターン2＞の2例の計3例は独歩可能であったから第2回計測を行った。（＜パターン3＞の1例と＜パターン4＞の3例は独歩不能となったため第2回計測はできなかった。）

＜パターン1＞だった症例は＜パターン2＞に変わっていた（図7上段）。＜パターン2＞だった2症例のうち1例は足底圧の中心が中足部に存在する時間が延長し＜パターン2＞から＜パターン3＞の移行期と考えられた（図7中段）。＜パターン2＞だった症例のうち他の1例は＜パターン3＞に変化していた（図7下段）。

考　察

今回の検討により，足底圧からみた健常者の歩行パターンと，DMD の機能障害の進行に伴う歩行パターンの健常者との相違点が明らかにされた。

体幹から下肢の機能障害に起因する足底圧パターンのうち最も早期に出現したのは stage Ⅱ における＜パターン2＞の変化，すなわち足底圧が踵部に置かれている時間の短縮と前足部に置かれている時間の延長であった。DMD の多くは，立位時に腰椎前彎，尖足位姿勢をとることは知られており，この姿勢をとる患者の重心は健常者よりも前方に位置している[1]。このことが足底圧に反映されたと考えられ，腰椎前彎，尖足の発生に伴う体重心の前方移動は stage Ⅱ の時期よりすでに始まっていることを示していた。この変化は stage Ⅲ，すなわち＜パターン3＞においてより顕著となるが，Heel cord

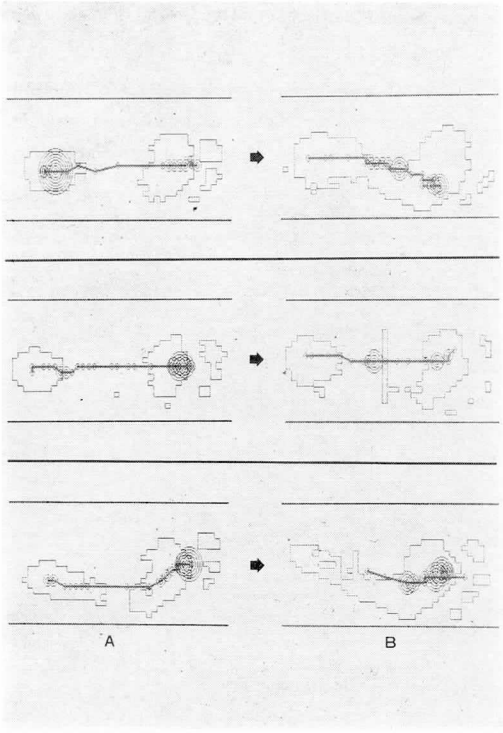


図7　足底圧パターンの経過（BはAの約9カ月後に測定）
上段は＜パターン1＞だった症例だが約9カ月後に＜パターン2＞に変わっている。中段は＜パターン2＞だった症例で，＜パターン2＞から＜パターン3＞の移行期と考えられる足底圧パターンに変わっている。下段も＜パターン2＞だった症例で，＜パターン3＞に変化したことがわかる。

短縮による足関節拘縮の進行により尖足位がより増強したものと考えられた。

今回最も特徴的だったのは，stage Ⅳの症例での＜パターン4＞の変化であった。まず足底圧の中心の始まる点は＜パターン3＞よりさらに前方となり，第1中足頭部付近であった。これは尖足位がより進行することと関係すると考えられた。しかしその後＜パターン3＞のようにそのまま前方に動くのではなく，一旦後外側方向に移動した後，足の外側に沿って前方に動くのがみられた。

DMD では体幹から下肢の筋力低下が高度となると立位にて高度の腰椎前彎位をとり，肩は後方に移動し腹部は前方に突出し，両腕は体の後方で下垂した姿勢をとる。そして，片脚の接地時には腰椎の前彎はまだ強くないが，反対側の踵離れが出現してくると前彎が増強してくる。この反対側遊脚期において，大殿筋の高度の筋力低下により立脚肢の股関節が屈曲してしまう（ジャックナイフ現象）ことを防ぐため，上体を後方に倒すことにより重心線が股関節中心より後方を通るようになる[2]。すなわち，重心を後方移動させることにより弱体化した大殿筋の代償としての伸展力を与えているのである。これが足底圧の中心が後方に移動する理由だと考えられた。

また，支持脚に体重を移し Trendelenburg 跛行を防ごうとする代償動作を反映して，足底圧の中心は後方移動に加え，外側方向へ移動し，支持脚へ上体を傾けた状態で遊脚を前方に振り出して反対脚接地に至るため，その後足底圧の中心は，足の外側に沿って前方へ移動したものと考えられた。

同一症例により観察した歩行パターンでは，＜パターン1＞から＜パターン2＞，＜パターン2＞から＜パターン3＞と，一定の順序で変化していくことが判明したことから，本法は歩行障害の経過を知る上で，非常に優れた方法であると考える。DMD においては，過去に様々な理学療法[3)4)]や起立及び歩行用の装具[5)~8)]が開発され試みられてきたが，それらの評価や薬物療法の効果判定などにも本法は利用価値が高いと考えられる。

文　献

1）真野行生，豊島英徳ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症の立位・歩行障害．神経進歩 **35**：300-307，1990
2）豊島明義：正常人および進行性筋ジストロフィー症の歩行に関する研究．弘前医学 **39**：355-368，1987
3）野島元雄：進行性筋ジストロフィー症（上田敏編）．リハビリテーション医学全書 **20**：195-196，医歯薬出版，1975
4）野島元雄：筋ジストロフィーに対するリハビリテーション：111-112，愛媛大学医学部整形外科学教室，1987
5）Spencer G. E., Vignos P. J.: Bracing for ambulation in childhood progressive muscular dys-

trophy. J Bone Joint Surg **44A** : 234-242, 1962
6) Siegel I. M.: Plastic-molded knee-ankle-foot orthosis in the management of Duchenne muscular dystrophy. Arch Phys Med Rehabil **56** : 322, 1975
7) Zeiter F. A., Allsop K. G.: The value of orthoses for patients with Duchenne muscular dystrophy. Physical Therapy **59** : 1361-1365, 1979
8) Hyde S. A., Scott O. M. et al: Prolongation of ambulation in Duchenne muscular dystrophy by appropriate orthoses. Physiotherapy **68** : 105-108, 1982

Becker 型筋ジストロフィーにおける多面的臨床解析

班　　員　佐　橋　　功
愛知医科大学第4内科

共同研究者　衣　斐　　達[1]，周　防　　拡[1]，堀　　眞一郎[2]
[1] 愛知医科大学第4内科　[2] 東京都立神経科学総合研究所神経化学

要　旨

Becker 型筋ジストロフィー7例につき多面的解析（臨床・分子遺伝学・生化学・病理・組織化学的解析）を行なった。自験例の臨床所見は軽症であり，下腿筋の仮性肥大が特徴的であった。Multiplex PCR 法にて4例にジストロフィン遺伝子欠失を hot spot 領域に認めた。二次元電気泳動法でのジストロフィン蛋白分析では欠失4例に既報告と同様の低分子ジストロフィン蛋白パターンを認めたが，欠失未確認例ではそれと異なるパターンを示した。生検筋の病理特徴として肥大・断裂線維，中心核の増加，散在性 opaque fiber があり，lobulated fiber は見られなかった。ジストロフィン染色では各抗体に対し faint/patchy pattern を示し，exon12-17 欠失例では欠失部位に対応する抗体の反応性が欠如し，欠失を確認できなかった兄弟例でC末端部の抗体への反応性が欠如していた。

目　的

近年ジストロフィンの発見により，Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）や Becker 型筋ジストロフィー（BMD）の臨床診断が，遺伝学，生化学，免疫組織学分析にてより的確になった。とくに BMD の孤発例では limb girdle (LG) syndromes の中で鑑別すべき疾患が多い。自験例 LG syndromes の24例のうちジストロフィン遺伝子解析で4例，ジストロフィン染色で7例が BMD と診断された。本研究は計7症例の BMD につき多面的な解析を行なった。

対象および方法

対象　BMD 7症例の生検時年齢は8歳～38歳，発症年齢は4～26歳。症例5，6が兄弟例であり，症例2の兄に筋力低下がある。

方法　1）臨床像の解析。2）ジストロフィン DNA 解析（患者血液または生検骨格筋から抽出した DNA より multiplex PCR 法にて，Chamberlain と Beggs の primer を用い欠失 exon を確認）。3）ジストロフィン蛋白解析〔生検骨格筋より二次元電気泳動法を用い，Dys1, Dys3 抗体（Novocastra 社）にて Western blot 分析〕。4）一般組織学的検討（生検骨格筋凍結切片にて HE, Gomori trichrome 変法染色，NADH-TR 染色，コハク酸脱水素酵素，ATPase, cytochrome *c* oxidase 染色）。5）ジストロフィン染色〔ABC 法にて，30kd, 60kd（熊本大学三池教授），A1C（帝京大学清水先生），2-5E2（神経センター荒畑先生），4-4C5（味の素・富士レビオ），Dys1, Dys2, Dys3（Novocastra 社）の8抗体を用い染色〕。

結　果

1）臨床解析　筋力低下は下肢優位，近位筋優位に認め，症例2を除き筋力低下は軽く，就業，通学可能である。下腿筋の仮性肥大は症例2を除き見られ，血清 CK 値は中等度以上に増加し，心筋障害を2例，知能低下を2例に認

表1　BMD 7症例の臨床所見

Case #	1	2	3	4	5	6	7
年　齢	32	38	24	31	11	8	36
発症年齢	26	14	20	18	4	8	10
初発症状〔所見〕	階段昇降困難	歩行障害	労作時Mb尿症	走行障害	大腿痛	高CK血症	歩行障害
家族発症	−	+	−	−	+	+	−
筋力低下〔下肢>上肢 近位>遠位〕	++	+++	+	++	+	−	++
ADL	歩行可 就業	臥床	走行可 就業	歩行可 就業	走行可 就学	走行可 就学	歩行可 就業
Gowers' sign	+	／	+	+	+	−	+
仮性肥大	+	−	+	+	+	+	+
血清 CK 値	851	762	4505	480	1589	5255	2250
心筋障害	−	+	+	−	−	−	−
知能低下	−	−	−	−	+	+	−
そ の 他		分裂病				IDDM	
欠失 Exon	12-17	45	45-48	45-49	—	—	—

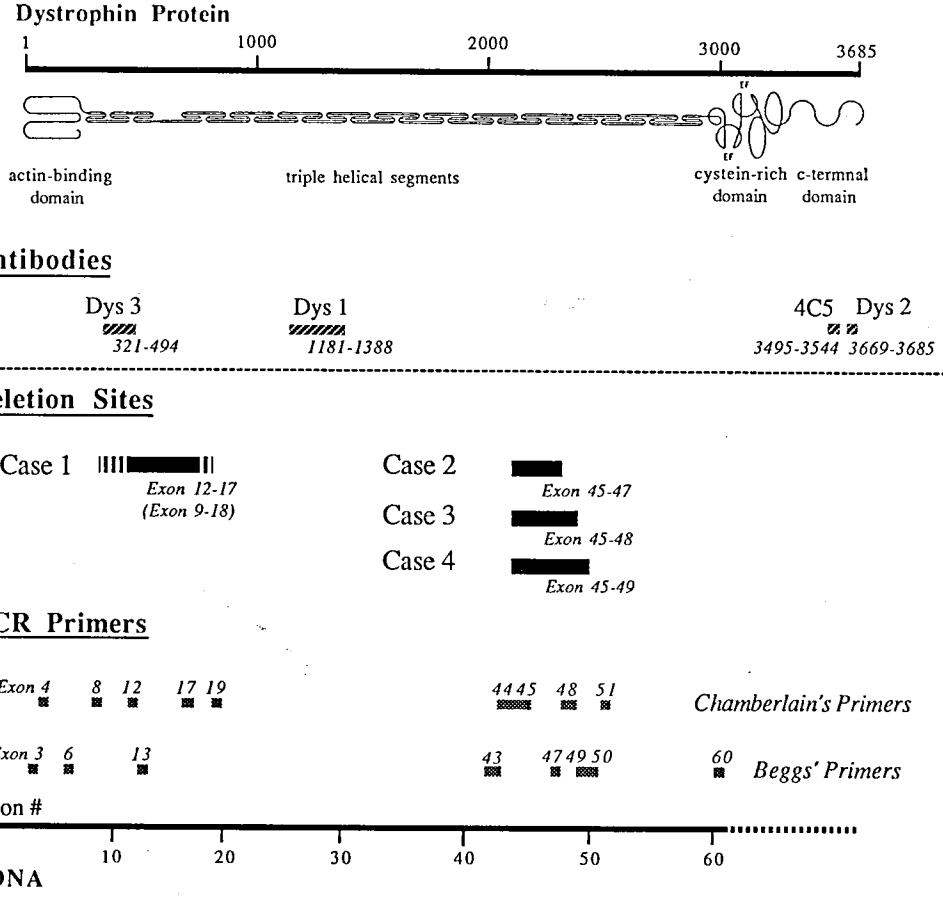


図1　BMD 7症例のジストロフィン遺伝子欠失部位と，免疫組織化学染色で使用した各抗体の特異性部位。

めた。（表1）

2）ジストロフィン遺伝子解析　Multiplex PCR 法にて4例（症例1-4）にジストロフィン遺伝子の欠失が確認され，その部位は major および minor hot spot 領域〔exon 12-17 (9-18), 45-47, 45-48, 45-49〕であった（図1）。

3）ジストロフィン蛋白解析　遺伝子欠失を確認した4例では正常ジストロフィンより分子量がやや小さいアルカリ側の位置と，ミオシン重鎖よりやや分子量が大きくアルカリ側の位置の2か所に反応スポットが検出された。症例1では免疫組織化学染色と同様に Dys 3 ではスポットは検出されなかった。欠失確認できなかった症例5, 6, 7は従来の報告[1]にない多型パターンを示す異常ジストロフィンが検出された（図2）。

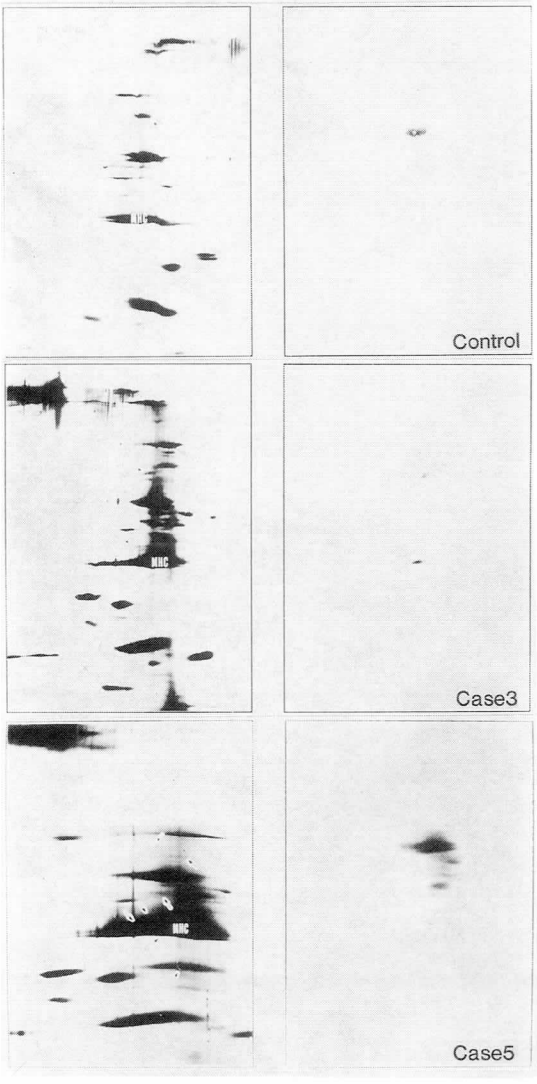


図2　二次元電気法による immuno blot（Dys 3 抗体による。図右側）と銀染色（図左側）。左図の矢印は右図抗 ジストロフィン抗体に反応したスポットに対応する。

4）一般病理組織所見　小児例では変性・再生線維が限局性に群をなして観察されたが，成人例では 100-150 μm 程度の肥大線維，中心核の 10-20% の中等度増加，断裂線維が観察された。生検時の人工産物の可能性を除外しても全例に低頻度の opaque fiber の出現をみた。LG syndromes の一部に見られる lobulated fiber は観察されず，いわゆる神経原性変化は軽微であった（図3）。

5）ジストロフィン染色　各抗体のうち Dys 1, 2, 3 と 4-4C5 の4抗体でより良好な染色性を得た。症例1は triple helical segment の N端側の Dys 3 に対する反応が欠如し，症例5,6ではC末端ドメインの Dys 2 と4-4C5に対する反応性が欠如していた。なお他症例の標本では各抗体に対し faint/patchy pattern を示した（図4）。

考　察

ジストロフィンの発見に伴う診断技術の発展にて BMD は LG syndromes より分離され，DMD とともに dystrophinopathy として扱われるようになってきている。自験例では LG syndromes の中で鑑別困難であった7例が BMD と診断された。その臨床像については6例が軽症であり，ADL 自立が可能であり，下腿筋の仮性肥大は BMD により特徴的な所見であった。

既報告では，ジストロフィン遺伝子解析では DMD/BMD 症例の 65% に Southern blot 法にて欠失が確認され，Chamberlain および Beggs の primer を用いた multiplex PCR 法にて欠失例の 98% が証明されるとされているが[2]，自験 BMD 7例中4例の欠失が確認された。なおこれらの方法ではC端側の解析が不十分であり，欠失が確認できなかった症例5，6でC端側抗体の反応性が欠如しており，今後注

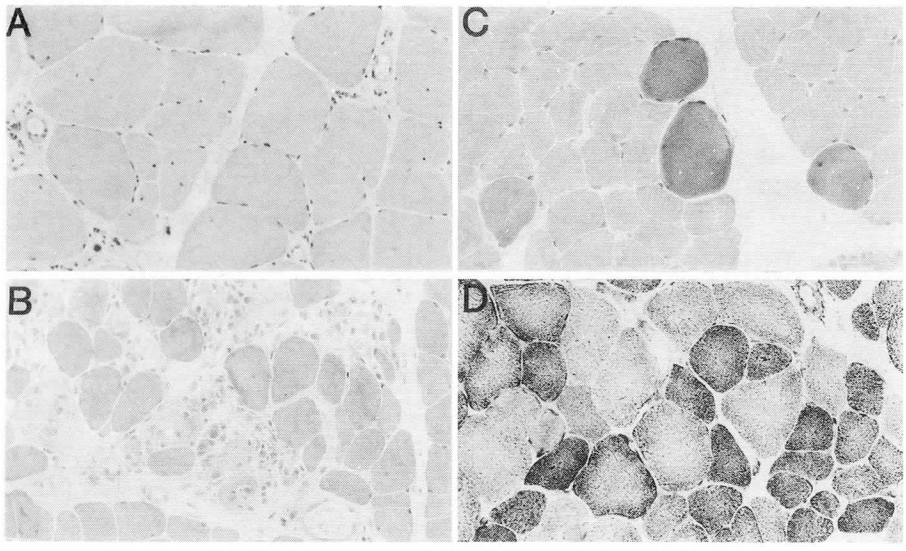


図3　生検筋凍結切片の病理像
A：肥大筋線維，中心核の増加，断裂筋線維を認める。（HE 染色，症例2 ×200）
B：小児例では集合して変性・再生線維を認める。（HE 染色，症例6 ×320）
C：Opaque fiber を認める。（Gomori trichrome 変法，症例5 ×320）
D：Lobulated fiber は見られない。（NADH-TR 染色，症例4 ×200）

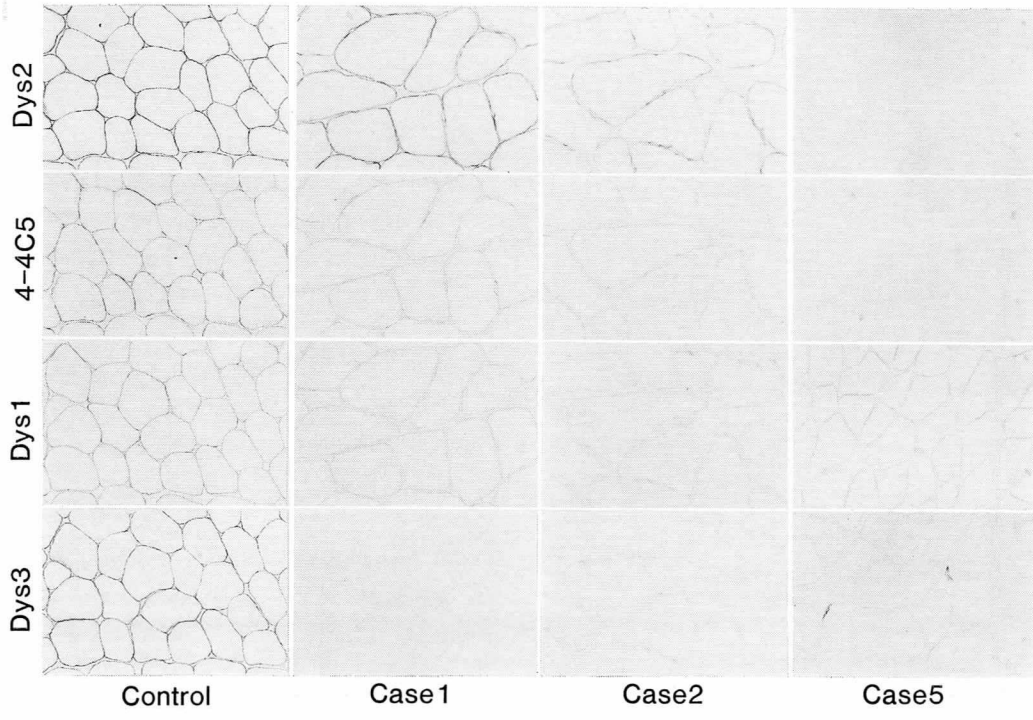


図4　各ジストロフィン抗体による免疫組織化学染色
全般的に faint/patchy pattern を示すが，症例1では Dys 3 に症例5では 4-4C5，Dys 2 に対する反応が欠如している。

目したい。

蛋白分析では従来の一次元法に比し二次元法にて異常蛋白の分離がより明瞭であった。欠失確認例では既報告[1]と一致した泳動パターンが見られた。欠失未確認例ではそれと全く異なるパターンが出現し，今後の検討が必要である。

一般筋病理では全例に opaque fiber を観察し，小児例ではより限局性の変性・再生線維の集合，成人例では肥大・断裂筋線維，中心核の増加が特徴的であり，lobulated fiber は見られなかった。

免疫組織化学的検討では各抗体に対し faint/patchy pattern を呈したが。minor hot spot 領域欠失の症例1では Dys 3 の反応性が欠如し，同部位の遺伝子欠失による蛋白欠失をジストロフィン染色にて確認した。症例5，6の兄弟例では欠失は確認されなかったがC端側の抗体への反応性が欠如し，その部位の蛋白の欠損あるいは異常が指摘された。なおC端部位はジストロフィン蛋白の臓器特異性を示す部位とされ，症例5，6の知能障害と脳ジストロフィン蛋白との関連性が推察された。

謝辞：症例の一部を紹介いただいた国療中部病院神経内科加知輝彦先生，県立多治見病院神経内科水野恵介先生に深謝する。

文　献

1）堀　眞一郎，清水輝夫ら：Becker 型筋ジストロフィーにおける ジストロフィンの動態。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 p. 68-71, 1991

2）Beggs AH, Koenig M et al: Detection of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet 86：45-48, 1990

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの筋障害以外の臨床的特徴

班　員　高　柳　哲　也
奈良県立医科大学神経内科

共同研究者　堀　川　博　誠[1)]，高　橋　桂　一[1)]，苅　田　典　生[1)]
吉　仲　弘　充[2)]，真　野　行　生[2)]
[1)] 国立療養所兵庫中央病院神経内科　[2)] 奈良県立医科大学神経内科

要　旨

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSH）8家系12例で筋障害以外の随伴症状を検討した。11例は発症後10年以上経過し，9例がなんらかの介助を必要とし，7例が車椅子を使用していた。オージオグラムを10例に行ない7例に感音性難聴を認めた。眼底検査で2例に Coats 症候群を合併していた。2例に舌萎縮がみられた。呼吸機能検査では％VC が 45％以下の4例で $PaCO_2$ が 45 mmHg を越え肺胞低換気を認めた。2例に自然気胸の既往があった。6例に軟便，下痢，腹痛などの下部消化管症状がみられた。難聴，Coats 症候群，舌萎縮は FSH の遺伝的素因に基ずく1次的症状と，肺胞低換気，自然気胸，下部消化管症状は骨格筋障害による筋力低下や変形のための2次的症状と考えた。

はじめに

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSH）は常染色体優性遺伝を呈し，顔面，肩甲帯，上腕の筋障害が臨床的な特徴であり，病名の由来でもある。進行すれば腰帯や下肢の筋障害も出現し，歩行困難となり車椅子生活を余儀なくされることがある。最近，難聴や Coats 症候群を伴う FSH が少なからず報告され，FSH の病因との関連性が注目されている。今回はこれらを含め主に進行列で骨格筋以外の症状について検討した。

方法と結果

対象は8家系12例の FSH で，年齢は17～58歳，男6例女6例である（表1）。症例12を除く11例は発症後10年以上経過しており，7例が車椅子を使用していた。症例3，7，12は社会生活に自立しているが，他の9例は何等かの介助が必要であった。全例とも筋 CT により近位部優位の下肢筋障害がみられ，進行例では腹筋や臀筋の障害が腰部背筋群の障害に先行し，腰椎の前彎が強くなり，胸廓は生理的後彎を失い偏平となった。

オージオグラムを10例に行い7例に感音性難聴を認めた（表2）。中等度以上の難聴のみられた6例はいずれも10歳未満の発症で，顔面筋罹患のための構音障害と難聴のために日常会話に何等かの障害がみられた。眼底検査では症例1で左眼底に血管の蛇行と拡張を伴った著明な浸出性網膜炎（そのため視力は指数弁），右眼底に軽度の血管の蛇行と拡張がみられ，Coats 症候群と診断された（図1）。症例10で右眼底は正常範囲内であったが，左眼底に血管の蛇行と拡張がみられ Coats 症候群の初期と考えられた。舌の萎縮が12例中2例に認められたが，明かな嚥下障害はみられなかった（表2，図2）。8例にスパイロメトリと動脈血ガス分析を行ったところ，％VC が 45％以下の4例で $PaCO_2$ が 45 mmHg を越え肺胞低換気を認めた（図

表1　患者リスト

Pt	Age	Sex	Onset	Family history	ADL
1	18	F	1st decade	Sister of Pt2	Walking
2	16	F	1st decade	Sister of Pt1	Walking
3	44	F	2nd decade	Mother of Pt1 & 2	Walking
4	40	F	1st decade	Sister of Pt5	Wheelchair
5	38	M	1st decade	Brother of Pt4	Wheelchair
6	58	F	3rd decade	Mother of Pt7	Wheelchair
7	30	M	2nd decade	Son of Pt6	Walking
8	47	M	1st decade	Sporadic?	Wheelchair
9	29	M	1st decade	Sporadic?	Wheelchair
10	31	M	1st decade	Sporadic?	Wheelchair
11	48	M	3rd decade	A brother has myopathy.	Wheelchair
12	23	F	2nd decade	Two sisters have scoliosis.	Walking

表2　脳神経系の随伴症状

Pt	Lagophthalmos	Hearing loss	Coats syndrome	Atrophy of tongue
1	+	moderate	+	−
2	+	moderate	−	−
3	−	mild	−	−
4	+	moderate	−	−
5	+	moderate	−	−
6	+	Not examined	−	−
7	−	Not examined	−	−
8	+	severe	−	mild
9	+	moderate	−	moderate
10	+	−	+	−
11	−	−	−	−
12	−	−	−	−

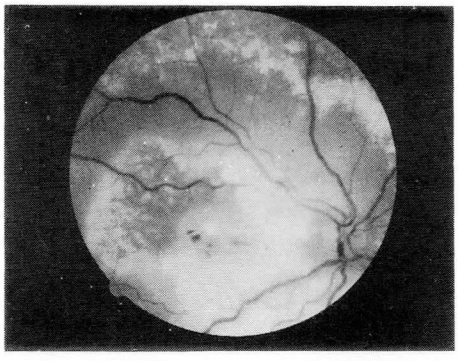


図1　症例1の左眼底。浸出性網膜炎と血管の蛇行と拡張がみられる。

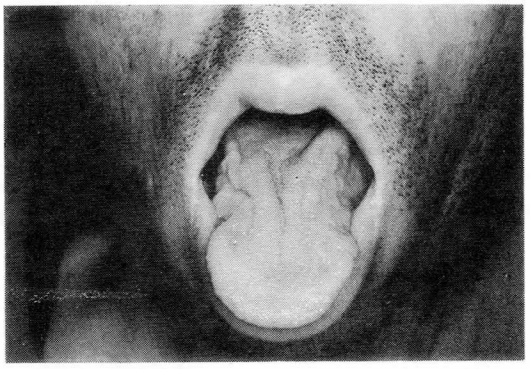


図2　症例9の舌萎縮

表3　消化管症状と既往歴

Pt	Gastrointestinal symptoms	Past history and complication
1	Occasional diarrhea and abdominal pain	A history of pneumothorax
2	Occasional diarthea and abdominal pain	
3	None	
4	Occasional diarrhea and abdominal pain	
5	Occasional diarrhea and abdominal pain	
6	None	
7	None	
8	None	
9	Caddy stool every day	A history of pneumothorax
10	Caddy stool every day	
11	None	NIDDM, Cervical disk hernia
12	None	

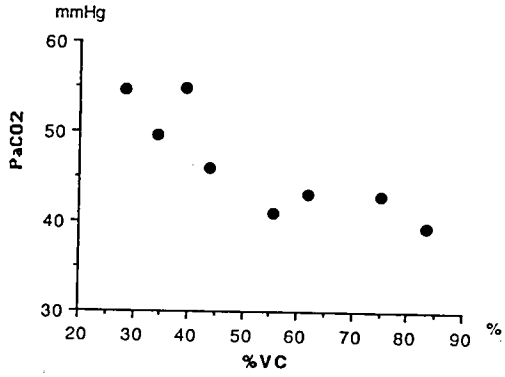


図3　%VC と $PaCO_2$

3）。12例中2例に自然気胸の既往があった（表3）。12例中6例に軟便，下痢，腹痛などの下部消化管症状が月に複数回みられ，この様な時は腸音の亢進が認められた（表3）。

考　察

1）Coats 症候群，感音性難聴，舌萎縮について。

Small が FSH に Coats 病と難聴を合併した4例を最初に記載している。本邦でも何例か報告がある。今回の検討では12例中2例で Coats 症候群を伴っていた。Fitzsimons らは FSH やその家族に蛍光眼底検査を行ない75例中56例に網膜血管異常を認めたと報告し，筋障害の病因に同様な筋内血管異常の関与もあり得ると考えた。また彼らは筋症状のない家族にも網膜血管異常を認めた。

Carroll らの報告以来，感音性難聴の合併も注目されている。今回オージオグラムを行なった10例中7例に感音性難聴を認め，その内6例は骨格筋症状が10歳までに出現していた。既に Voit らは早期発症例の FSH で感音性難聴をしばしば合併することを報告しており，外有毛細胞の障害による内耳性難聴を示唆した。

Korf らは1歳までに顔面筋障害の生じた FSH 5例を報告し，全例に感音性難聴を，3例に舌萎縮や運動障害を認めた。我々も12例中2例に舌萎縮を認めており，2例とも10歳までに既に骨格筋症状が生じてた。即ち難聴と同様，早期発症例で舌萎縮を合併しやすい。

2）呼吸器，消化管について。

Duchenne 型筋ジストロフィーでは呼吸筋障害による呼吸不全が予後を左右する。一般には FSH は予後良好で呼吸筋の検討はない。今回，全例に呼吸症状の訴えはなかったが，%VC が45%以下では $PaCO_2$ が負の相関をしめし，肺胞低換気を認めた。即ち進行例では呼吸筋も障害されるが，これがどのように進展するかは今後の追跡調査が必要である。

12例中2例に自然気胸の既往があり，1例では外科的処理は必要であった。これは Duchenne 型筋ジストロフィーや肢帯型筋ジストロフィーなど他の型の筋ジストロフィーにも時々合併す

る。一般に自然気胸は blebs の穿孔が原因で若年者に多いことが知られている。FSH を含め他の筋ジストロフィーは小児期発症が多く，徐々に骨格筋症状が増悪し胸郭が変形し，自然気胸の好発年齢に至る。特に自然気胸の既往のある2例で胸椎の生理的後彎の減少と胸郭の偏平化を呈したことが blebs 発生を即した可能性もある。

12例中6例に軟便，下痢，腹痛などの下部消化管症状がみられ，腸蠕動の亢進が疑われる。Duchenne 型筋ジストロフィーや他の型の筋ジストロフィーでは ADL の低下につれ便秘傾向になるのと対照的である。6例とも早期発症例で体幹および下肢の筋障害のため腰椎前彎が著明であった。第一にこの変形が腸蠕動に影響を及ぼしていると考えたいが，一次的な腸管の障害も否定はできない。

文　献

1) Small RE: Coats' disease and muscular dystrophy. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol **72**: 225, 1968

2) Fitzsimons RB, Gurwin EB et al: Retinal vascular abnormalities in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Brain **110**: 631, 1987

3) Carroll JE, Brooke MH: Infantile facioscapulohumeral dystrophy. In Peroneal Atrophies and related disorders, ed by Serratice G and Roux H, Masson, New York, 1976, p. 305

4) Voit T, Lamprecht A et al: Hearing loss in facioscapulohumeral dystrophy. Eur J Pediatr **145**: 280, 1986

5) Korf BR, Bresnan MJ et al: Facioscapulohumeral dystrophy presenting in infancy with facial diplegia and sensorineural deafness. Ann Neurol **17**: 513, 1985

筋ジストロフィー患者の循環機能

班　　員　五十嵐　勝　朗
国立療養所岩木病院

共同研究者　五十嵐　勝　朗，黒　沼　忠由樹，小　出　信　雄
大　竹　　進，工　藤　正　育，高　瀬　　洋
秋　元　義　巳
国立療養所岩木病院

要　旨

筋ジストロフィー（筋ジス）患者の最少心拍数の変化と動脈血酸素飽和度との関係を検討した。対象：当院に入院中の17-22歳の男子患者11名で，全例が車椅子生活である。
方法：1985年から患者の誕生日とその6カ月遅れの年2回を目安に24時間心電図，パルスオキシメータで検査した。結果：mean±SD では総心拍数は85年と91年は危険率5％で有意差があり，経年的に総心拍数が増加した。分時最大心拍数は経年的変化はなかった。一方，分時最少心拍数は85年と91年とでは危険率5％で有意差があり，分時最少心拍数は経年的に増加していた。考察と結論：深夜帯の分時最少心拍数の年毎の変化では85年と91年との間で危険率5％で有意差があり，一日の中での分時最少心拍数と深夜帯の分時最少心拍数とを比較すると深夜帯の方が1日中の分時最少心拍数より多かった。このことから筋ジス患者の総心拍数の増加には深夜帯の分時最少心拍数の増加が大いに関与することが示唆された。

はじめに

筋ジストロフィー（筋ジス）患者の循環機能，とくに分時最少心拍数の変化について，動脈血の酸素飽和度との関係の面から検討した。

対　象

対象は国立療養所岩木病院に入院中の筋ジス患者11名で，全員が男性で年齢は17-22歳である。全例が車椅子生活で歩行は全く不可能である。

方　法

方法は1985年から1991年まで患者の誕生日前後とその6カ月遅れの年2回を目安に，24時間心電図，それに血液ガス分析やパルスオキシメータによる動脈血の酸素飽和度を随時検査し観察した。

結　果

① 対象症例のデータ一覧（表1）

11名の患者について85年から3年毎の24時間心電図からの総心拍数（／日），分時最大心拍数，分時最少心拍数のまとめである。総心拍数で一番少ないときでも約11万9千拍と健康人に比較すると多く，また分時最少心拍数は51が最少であった。総心拍数の多少と分時最大心拍数との間には相関はなかった。

② 平均総心拍数（／日）（図1）

データから mean±SD を調べ検討したものである。総心拍数は85年が約13万3千，88年が13万8千，91年が14万5千拍で，85年と91年とでは危険率 5％で有意に差があった。すなわ

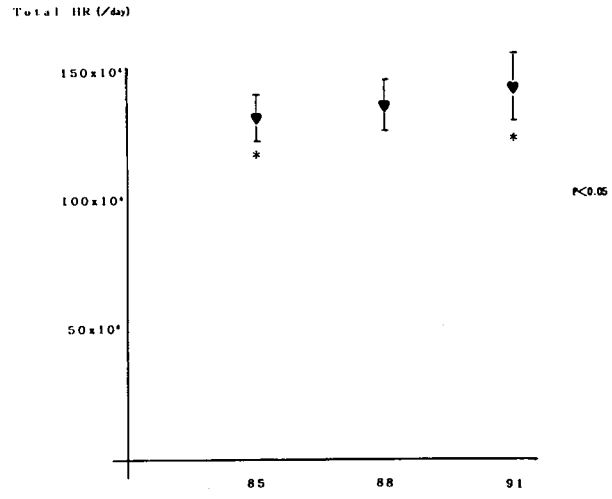


図　1

表　1

	記録年	総心拍 (/日)	最大拍 (/分)	最小 (/分)
阿　部	85	132628	144	72
	88	135236	147	72
	91	138644	118	78
永　沢	85	125765	135	60
	88	125849	138	51
	91	138908	129	58
佐　藤	85	131257	143	61
	88	139905	154	65
	91	141683	141	73
山　崎	85	120796	117	64
	88	126514	120	67
	91	119157	112	66
山　道	85	121396	127	64
	88	125072	129	63
	91	136241	119	69
山　内	85	125192	125	75
	88	137409	132	68
	91	169541	131	84
小　沼	85	144622	133	79
	88	156619	144	80
	91	155232	136	81
沼　畑	85	128333	127	62
	88	139879	124	68
	91	143695	135	62
石　田	85	135952	134	66
	88	136216	147	68
	91	156248	140	85
中　村	85	145591	141	72
	88	154104	137	84
	91	153789	145	85
片　山	85	146013	140	74
	88	148066	136	78
	91	146894	134	82

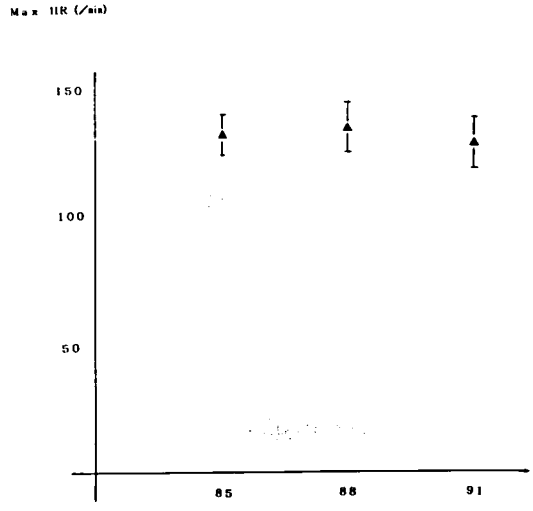


図　2

ち経年的に総心拍数が増加していた。

③平均分時最大心拍数（図２）

分時最大心拍数では85年が 133，88年が 136，91年が 130 拍で，ほとんど経年的変化はなかった。

④　平均分時最少心拍数（図３）

分時最少心拍数では85年が68，88年が69，91年が74拍と総心拍数と同様に85年と91年とでは危険率 5 % で有意に差があった。すなわち分時最少心拍数は経年的に増加していた。

⑤　深夜帯の平均分時最少心拍数（図４）

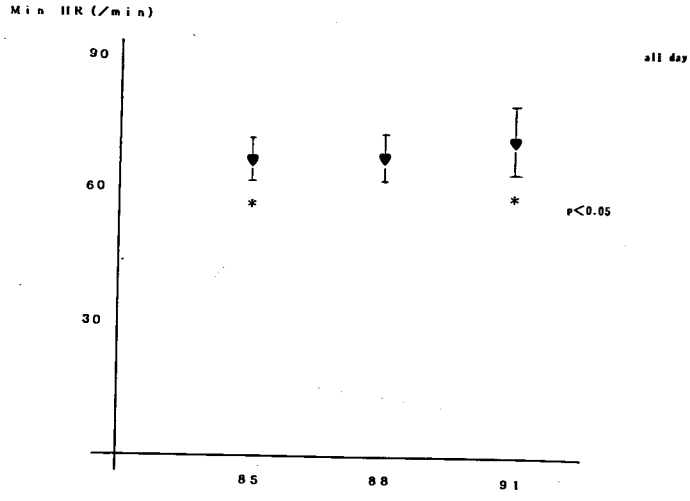


図 3

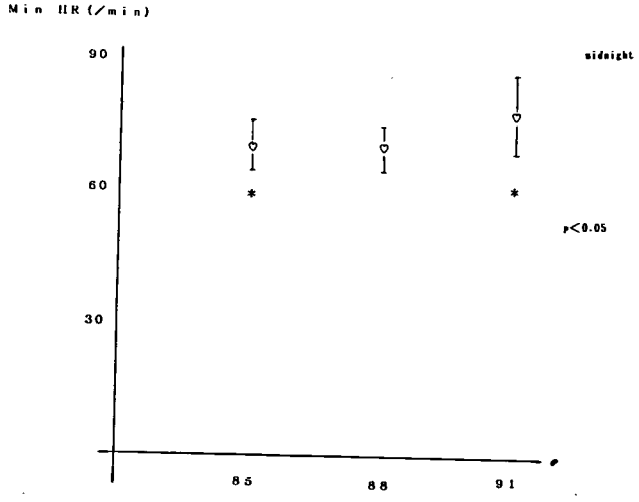


図 4

3時から5時までのいわゆる深夜帯の分時最少心拍数の年毎の変化である。85年が71，88年が70，91年が79であり，85年と91年との間で危険率 5 % で有意に差があった。すなわち経年的に増加していた。

考　察

対象となった筋ジス患者の日常生活は車椅子生活であり，午前中に機能訓練を行っている。ADL はそれでも年々低下の一途をたどっている。このような環境下での分時最大心拍数を増加させる因子としては肉体的なものより，むしろ精神的興奮などを考えた方が妥当である。しかし分時最大心拍数の増加がないことから精神的興奮も考えにくい。

一方，筋ジス患者では経年的に総心拍数が増加することを私たちは報告してきた。その原因として潜在性心不全の進行によるものであろうと推察してきた。この総心拍数の増加には，これまでは分時最大心拍数の増加の関与を考えてきた。しかし今回のデータから，経年的に総心拍数の増加はあるが，分時最大心拍数の増加が

ないため，両者間には相関がないことがわかった。それでは総心拍数の増加にはどの因子が関与するのであろうか。そこで私たちは分時最少心拍数に着目した。その理由として分時最少心拍数の増加には動脈血の酸素飽和度の低下が関与することを推察したためである。

私たちは臨床的に重症化した筋ジス患者は夜間に体位交換が一人でできないために呼吸によるガス交換が不十分になり，それらのことが低酸素状態を引き起こし，さらに循環機能に変化をもたらすという仮説を立ててきた。

筋ジス患者で実際に夜の9時から翌朝6時まで動脈の酸素飽和度をパルスオキシメータを用い，連続モニターしたデータの一例が図5である。深夜の3時から5時がどの症例でも動脈血の酸素飽和度が下がっていた。

図6は1日の中での分時最少心拍数と深夜3時から5時までの間の分時最少心拍数とを比較したものである。両者は全く同じ傾向であった。しかも深夜帯の方が，1日中の分時最少心拍数より多いということがわかった。このことから総心拍数の増加には深夜帯の分時最少心拍数が大いに関与することが示唆された。

この考えから類推すると，分時最大心拍数がほとんど変化しない筋ジス患者の総心拍数を増加させないためには，深夜帯の分時最少心拍数の増加を抑えればよいことになる。そのためには夜間の動脈血の酸素飽和度が下がらないように対応することである。大竹らは夜間に NIPPV (nasal intermittent positive pressure ventilation) を施行しているのは，理にかなっている方法である。潜在性心不全の一つの指標として，総心拍数の増加が用いられつつあるが，

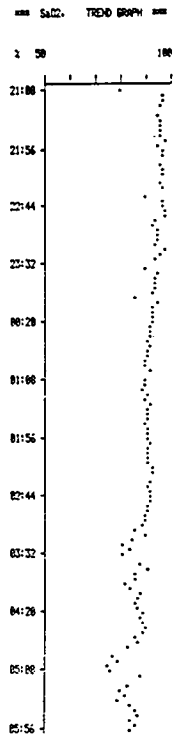


図 5

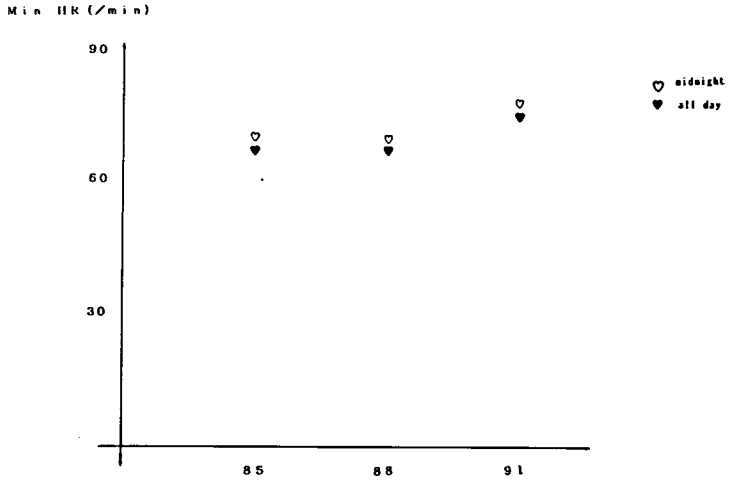


図 6

NIPPV 施行患者ではこれ以上の分時最少心拍数の増大がなく，そのうえ総心拍数の増加もなければ臨床的にはどうなのか，更に他のパラメータを用い確認したい。

結　論

1．筋ジス患者11名を24時間心電図で心拍数の変化を記録した。
2．1日の総心拍数，分時最少心拍数は経年的に増加した。
3．深夜3－5時に動脈血酸素飽和度が低下した。
4．分時最少心拍数は日中より深夜帯の方がより多いことがわかった。
5．総心拍数の増加は分時最少心拍数の増加に左右されることが示唆された。

文　献

1）五十嵐勝朗他：心疾患患児の入院療養中の心拍数の変化　小児科診療　54 p. 1963 1991
2）大竹進他：投稿中
3）五十嵐勝朗：心拍数からみた筋ジストロフィー患者の心機能
104回日本循環器学会東北地方会　1991.

心不全合併筋ジストロフィー患者における心房性ナトリウム利尿ペプチドの変動について

班　　員　姜　　進
国立療養所刀根山病院神経内科
共同研究者　宮井一郎，野崎園子，松村　剛
国立療養所刀根山病院神経内科

要　旨

心不全合併 Duchenne 型筋ジストロフィーおよび Becker 型筋ジストロフィーにおいて心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）の血漿濃度を経時的に測定し，治療効果や予後の判定に対する有用性を検討した。ジギタリスやカテコーラミンの投与例では，臨床症状の軽減や心拡大の改善とともに ANP が低下し，ANP が筋ジストロフィーの心不全治療の有用な指標であることが示唆された。また，心不全治療後も ANP が 200 pg/m*l* 以上を示した症例の生命予後は不良であった。

目　的

最近，心房筋細胞から分泌されるホルモンである心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）の血漿濃度が心不全において高値を示し，治療により低下すること，ANP レベルと肺動脈楔入圧，左室拡張末期圧，右房圧が正の相関を示すこと，ANP レベルと左室駆出率が負の相関を示すことが明らかになった[1)2)3)]。

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）においても ANP の血漿濃度が進行例ほど高値であること，ANP 値と心胸郭比（以下 CTR）が正の相関を示すこと，心筋細胞変性にもかかわらず ANP 分泌能が温存されることが示されている[4)5)]。そこで本研究では心不全合併 DMD ならびに Becker 型筋ジストロフィー（BMD）において血漿 α-ANP 値を経時的に測定し治療効果や予後の判定に有用かどうかを検討した。

対象と方法

対象は臨床症状，胸部レ線，心電図，心エコー所見より心不全と診断した DMD 9例（年齢13-25才，平均18.6才，気管切開2例），BMD 3例（年齢32-67才，平均46.0才）である。これらの症例で血漿 α-ANP を経時的に測定し，臨床症状，胸部レ線，心エコー所見，ジギタリス濃度などの変動と比較解析した。α-ANP は二抗体法で測定した[6)]。

結　果

心不全合併 DMD ではいずれも血漿 α-ANP 値の上昇を認めた（表1）。すなわち ANP は平均 365.8 pg/m*l* で，age-match した心不全非合併 DMD 48例の平均 39.3 pg/m*l* に比し，有意に高値を示した（表2，$p<0.01$，Wilcoxon test）。心不全合併 BMD でも同様に平均 369.9 pg/m*l* と高値であった（表3）。次に心不全治療による ANP の変動を検討した。ジギタリスを投与した DMD 5例，BMD 2例，ならびにカテコーラミンを投与した DMD 3例，BMD 1例では治療後，有意に ANP が低下した（図1，$p<0.05$，Wilcoxon test）。

DMD 4例は経過観察中，4ないし5カ月で

表1　心不全合併筋ジストロフィーにおける血漿 α-ANP 値

症例	病型	年齢(才)	病期	気管切開	CTR(%)	駆出率(%)	ANP(pg/ml)	予後
1	DMD	13	7	−	61	18	435.9	死亡(4カ月)
2	DMD	14	7	−	68	20	730.3	死亡(4カ月)
3	DMD	16	7	−	65	20	291.3	死亡(5カ月)
4	DMD	17	7	−	64	29	288.7	
5	DMD	19	7	−	55	20	376.4	
6	DMD	19	8	−	58	25	693.9	
7	DMD	22	8	+	65	26	78.3	
8	DMD	22	8	−	65	25	294.2	死亡(5カ月)
9	DMD	25	8	+	62	28	103.4	
10	BMD	32	4	−	55	35	70.1	
11	BMD	39	4	−	65	25	544.0	
12	BMD	67	6	−	65	24	495.8	

表2　DMD における血漿 α-ANP 値

	心不全合併(n=8)	心不全非合併(n=48)
ANP (pg/ml)	365.8±227.3*	39.3±13.0
年齢(才)	18.6±4.02	0.5±4.8

* $p<0.01$ (Wilcoxon test)

表3　BMD における血漿 α-ANP 値

	心不全合併(n=3)	心不全非合併(n=2)
ANP (pg/ml)	369.9	45.6
年齢(才)	49.6	40.0

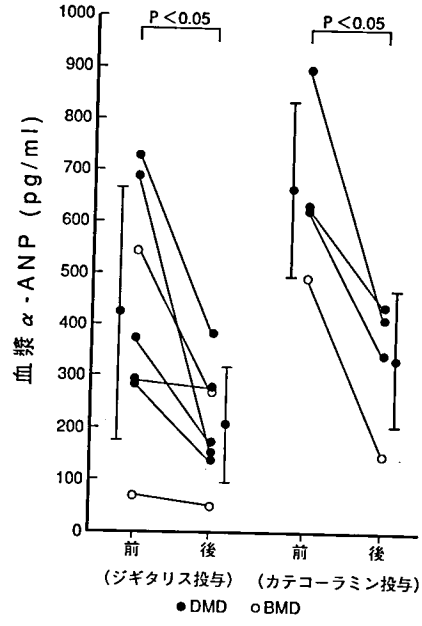


図1　心不全治療による血漿 α-ANP 値の変動

心不全により死亡した。そこで死亡例と生存例の心不全治療経過中の ANP の最低値と最高値を比較すると，いずれも有意に死亡例の方が高値を示した(図2，Wilcoxon test)。特に治療にもかかわらず ANP が 200 pg/ml 以上を示したの予後は不良であった。

以下，主な症例の経過を示す。

症例2は14才 DMD (図3) で1991年2月頃より呼吸困難が増強し1991年3月，当院に入院。CTR は 66%，心エコー上，左室駆出率 (EF) は 20% であった。ジギタリス投与後，自覚症状は軽減し，ANP も低下したが，ジギタリス増量 (メチルジゴキシン 0.05 mg から 0.1 mg) 後，心窩部不快，悪心嘔吐などの消化器症状が出現したため，再び減量したところ同症状は消失した。ジギタリスの血中濃度は増量前 0.86 ng/ml，増量後 1.18 ng/ml，減量後 0.88 ng/ml と有効濃度域内の変動であったが，症状の消長からジギタリス中毒と考えられた。それに一致して ANP は上昇しており，治療域の狭い DMD のジギタリス投与量の決定にも

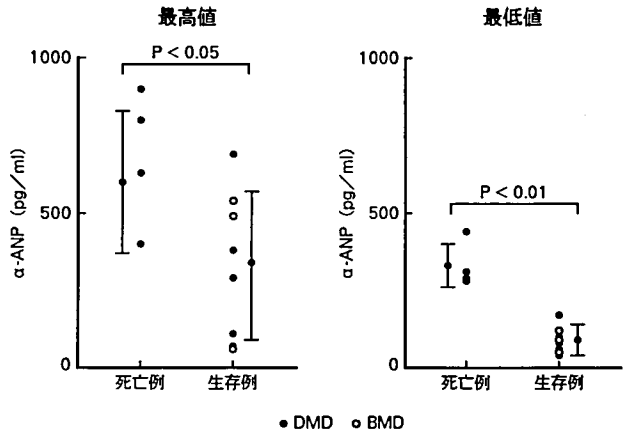


図2　心不全治療中の血漿 α-ANP 値

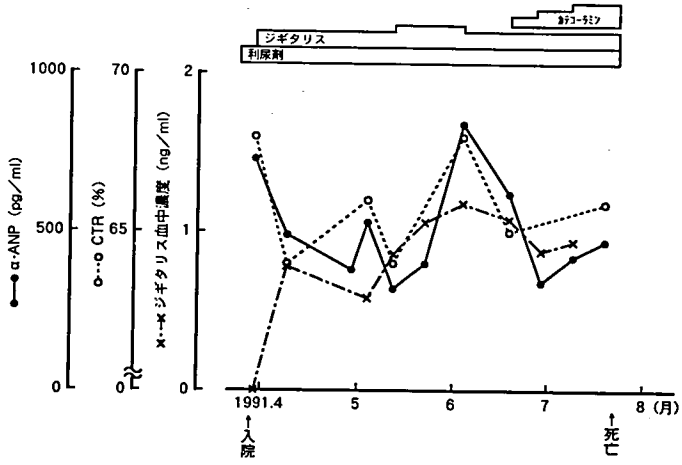


図3　症例2（14才 DMD）の臨床経過

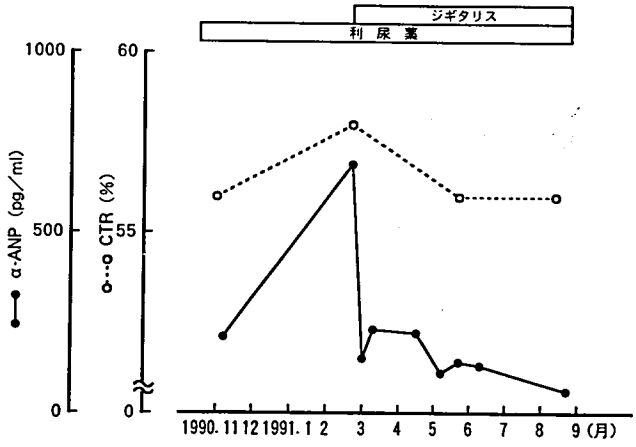


図4　症例6（19才 DMD）の臨床経過

ANP は有用と思われた。6月下旬より全身倦怠感や呼吸困難が増強しカテコーラミン投与により一旦 ANP は低下したが，その後次第に上昇し7月下旬に死亡した。CTR は ANP と並行して変動する傾向を示したが EF は変化しなかった。

症例6は19才 DMD（図4）で1991年2月に体動時の呼吸困難が出現，胸部レ線上 CTR は58％と心拡大を認め，ANP も 693.9 pg/m*l* と高値。EF は 28％。ジギタリス投与開始したところ自覚症状が軽減し，CTR は 56％，ANP も 59.3 pg/m*l* と低下し治療が奏功した。ただし，EF は治療後も変化しなかった。

症例11は39才 BMD（図5）で EF は 25％。EF や CTR は大きく変動しなかったため，退院後 ANP の変動を見ながら徐々に安静を解除したところ，最終的に職場復帰が可能になった。本例を除く全例で ANP と CTR は並行して変動する傾向にあったが，CTR が変動しないような症例でも ANP が治療効果や安静度決定の指標になりうることが示唆された。

症例12は67才 BMD（図6）で心不全のため

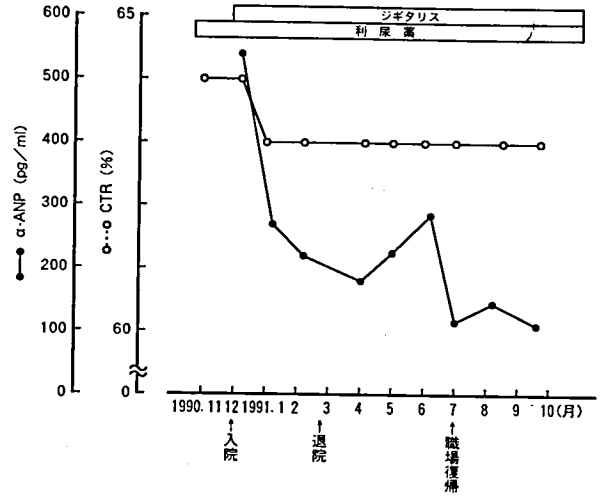


図5　症例11（39才 BMD）の臨床経過

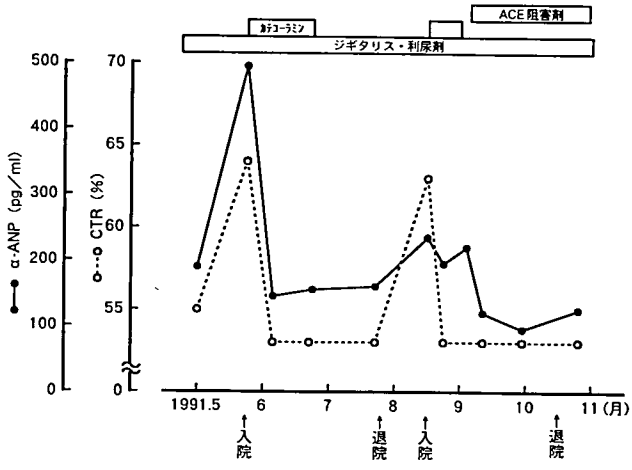


図6　症例12（67才 BMD）の臨床経過

入退院を繰り返している。EF は 24％。CTR と ANP が並行して変動したが EF は経過中，変化しなかった。本例ではアンギオテンシン変換酵素阻害剤（エラナプリル 1.25 mg/日）投与後，自覚症状の軽減ならびに ANP の下降がみられた。

考　察

筋ジストロフィー，特に DMD では，胸部レ線や心エコー上，心拡大や心機能低下が検出されるにも関わらず，臨床症状が明らかになるのは，心不全が進行してからであることが多い。これは運動機能の低下によるところが大きいと考えられるが，的確な心不全治療のためには早期に心不全を検出できる鋭敏な指標が必要である。ANP は心臓から分泌される降圧利尿ホルモンで，心不全でその血中濃度が上昇し，治療により低下することが知られている[1)2)3)]。筋ジストロフィーにおいても心筋細胞変性にもかかわらず ANP 分泌が免疫組織学的に証明されることから，心不全の指標となりうる[5)]。

本研究では心不全合併筋ジストロフィー患者において，ANP を経時的に測定した結果，ANP は治療に反応して変動し，治療効果の評価のみならず，安静度の決定やジギタリス中毒の判定にも有用であることが示唆された。生命予後との関連においては死亡例と非死亡例では ANP 値に有意な差を認め，とくに経過中に 200 pg/m*l* に低下しない症例は 5 カ月以内に死亡した。いずれの症例でも死亡前に ANP は著増したことから，臨床的にも筋ジストロフィーでは心不全末期まで ANP 分泌能が保たれていると考えられる。また，筋ジストロフィー以外の心不全においては，ANP と EF が負の相関を示す傾向がみられる[1)2)3)]が，筋ジストロフィーに対する今回の検討では，治療により臨床症状の改善や ANP の低下がみられたにもかかわらず EF はほとんど変化しなかった。その理由として心筋変性の進行した重症心不全例が多かったことも考えられるが，逆にそのような症例においても ANP は鋭敏に心不全の病態を反映することが示唆された。今後，様々な心不全治療薬の効果をみる上でも ANP は有用であろう。

文　献

1）Burnett JC, Kao PC et al: Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. Science **231**, 1145, 1986

2）Hara H, Ogihara M et al: Changes in the levels of plasma atrial natriuretic peptide, hemodynamic measurements, and the levels of vasoactive hormones during the clinical course of con gestive heart failure. Clin Cardiol **11**: 743, 1988

3）Ando K, Hirata Y et al: Circulating forms of human atrial natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. J Clin Endocrinol Metab **70**: 1603, 1990

4）Yanagisawa A, Yokota N. et al: Plasma levels of atrial natriuretic peptide in patients with Duchenne's progressive muscular dystrophy. Am Heart J **120**: 1154, 1990

5）Kawai H, Adachi K et al: Secretion and clinical significance of atrial natriuretic peptide in patients with muscular dystrophy. Arch Neurol **47**: 900, 1990

6）藤尾信昭，大橋昌夫ら：hANP 測定用 RIA キット（栄研）の臨床的検討．ホルモンと臨床**35**：509, 1987

筋交感神経活動が筋血流量に及ぼす影響

班　員　間　野　忠　明
名古屋大学環境医学研究所高次神経統御部門　自律神経・行動科学

共同研究者　岩　瀬　　敏，齋　藤　　満，渡　辺　丈　眞
岡　本　哲　也，杉　山　由　樹，竹　内　茂　雄
山　本　浩　二，美　和　千　尋
名古屋大学環境医学研究所高次神経統御部門　自律神経・行動科学

要　旨

針型レーザードップラー血流量計を用いて，ヒト骨格筋の血流量（MBF）を筋支配の交感神経活動（MSNA）とともに測定した。MBF は動脈血圧（ABP）と相同的な脈波を呈し，MSNA の発射後，ABP が上昇し，それとともに MBF の増加が観察されたが，その直後 MBF は僅かに低下した。ABP と MBF は，相同性変化を示す時と，相反性変化を示す時があった。被験者に Valsalva 法，静的掌握試験（最大収縮時の30% 2分，10% 5分），寒冷昇圧負荷（4℃ の氷水に2分），head-up tilting（静的・受動的・段階的な head-up tilting）を負荷し，MSNA，MBF，灌流量，灌流抵抗を経時的に測定したところ，MSNA の賦活化があまり強くなく，血圧上昇に MSNA の寄与があまり高くない状態では，MBF は ABP と相同的に変化し，逆に MSNA の賦活化が強い状態では，MBF は ABP と相反的に変化した。MBF，ABP，MSNA の連続測定は筋における血行動態解明の有力な手段となると考えられた。

目　的

筋労作能力の減退は，筋ジストロフィー症の特徴であるが，この原因の1つに筋血流量の減少の関与が考えられる。昨年度にわれわれは筋血流量をレーザードップラー血流計を利用して連続的に測定し，その有用性について報告した[1]。本年度は，同様の方法を用いて筋血流量を測定するとともに筋血管支配の交感神経活動（筋交感神経活動）と血圧波を連続的に測定し，三者の関係を解析した。

対象と方法

22歳の健康男子1名を対象とした。被験者を tilting bed 上に仰臥位にさせ，膝窩部において脛骨神経から下腿三頭筋支配の交感神経活動（筋交感神経活動）を微小神経電図法により導出・記録した。筋血流量測定のためには直径 0.5 mm，長さ10 cm の針型プローブを装備したレーザードップラー血流量計（ALF-21，アドバンス社製）を用いた。測定部位の皮膚を 0.5 %リドカイン皮内注により局所麻酔した後，測定用の針型プローブを皮下2～4 cm の深さに刺入した。同時に容積補償法による連続指血圧測定器（フィナプレス2300，Ohmeda 社製）により指動脈圧を連続測定した。さらにインピーダンス法による心拍出量の測定も併せ行った。被験者に対し，以下の交感神経賦活試験を負荷した（図1）。

(1)　Valsalva 法

被験者に十分な吸気の後に声門を閉じさせ，胸腔内圧を 40 mmHg に上昇させた。20秒間の息こらえを行わせて，血圧を低下させた際の，筋交感神経活動，血圧，筋血流量の変化を解析

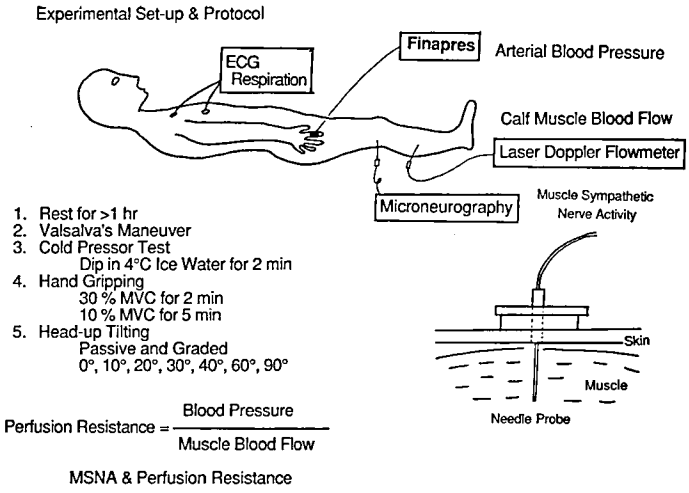


図1　実験のブロックダイヤグラムならびにプロトコール
被験者をティルトベッド上に仰臥位にさせ，微小神経電図法により膝窩部から筋交感神経活動を，レーザードップラー血流量計により下腿三頭筋の筋血流量を，容積補償法による経皮的連続動脈圧測定器（フィナプレス）により動脈圧を測定した。

した。

(2)　静的掌握試験

仰臥位のままで，ストレインゲージ式の握力計を掌握させ，最大随意収縮力を測定した。被験者にオシロスコープで自分自身の掌握力をモニターさせながら，安静2分間の後に最大随意収縮力の 30％ の力で2分間掌握させ，さらに2分間の回復をとらせた。次に2分間の安静の後，最大随意収縮力の 10％ の力で5分間掌握させ，2分間の回復をとらせた。これら2回の静的掌握試験のそれぞれにおいて，筋交感神経活動，血圧，筋血流量の変化を解析した。

(3)　寒冷昇圧試験

仰臥位のままで，2分間の安静の後に，4℃の氷水に手関節まで2分間浸し，さらに2分間の回復をとらせた。初回の精神的な負荷を除去するため，同様の試験を4回繰り返し，2回目から4回目までの試行時の筋交感神経活動，血圧，筋血流量を解析した。

(4)　Head-up tilting

被験者を仰臥位で3分間安静に保った後，ティルトベッドで段階的に 10°, 20°, 30°, 40°, 60°, 90°（立位）とティルトアップした。各角度には3分間停留し，安定化を待って計測を行った。それぞれの角度における筋交感神経活動，血圧，筋血流量の変化を解析した。指血圧測定位置は，左心室の高さに保ち，静水圧の影響がないようにした。

(5)　解析方法

それぞれの交感神経賦活試験における筋交感神経活動，筋血流量，動脈血圧の三者の関係を解析した。筋交感神経活動は，burst rate（1分間のバースト数）として定量的に評価した。血圧を組織血流量で除した商を灌流抵抗として，筋交感神経活動との関係を解析した。

結　果

(1)　安静時における筋交感神経活動と血圧，筋血流量の関係

筋血流量は動脈血圧と相同的な脈波を呈した（図2）。筋交感神経活動の発射後（図2積分筋交感神経活動の△），血圧の上昇がおこり（図2動脈圧の△），それとともに筋血流量の上昇が観察された（図2下腿筋血流量の△）が，その直後に筋血流量は僅かに低下した（図2下腿血流量の▲）。

このような動脈血圧と筋血流量が，相同性変化を示したり（図3左），逆に相反性変化を示し

たりすることが（図3右），しばしば観察された。

安静時における筋交感神経活動の burst rate の1分毎の平均は，25.4±4.5 bursts/min，指

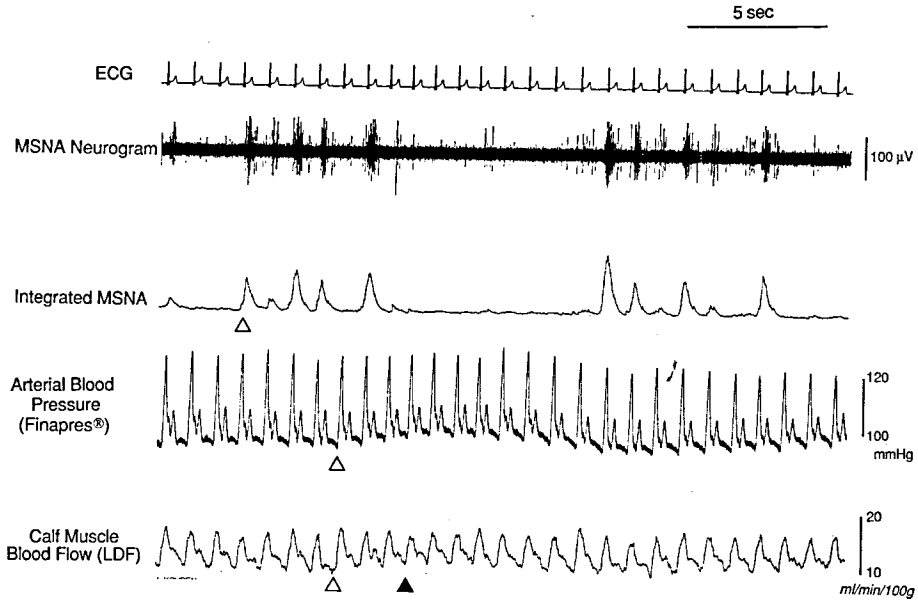


図2 上から安静時における心電図，筋交感神経活動のニューログラム，その全波整流積分波形，動脈圧波形，レーザードップラー血流量計による下腿三頭筋血流量を示す。詳細に関しては，本文参照。

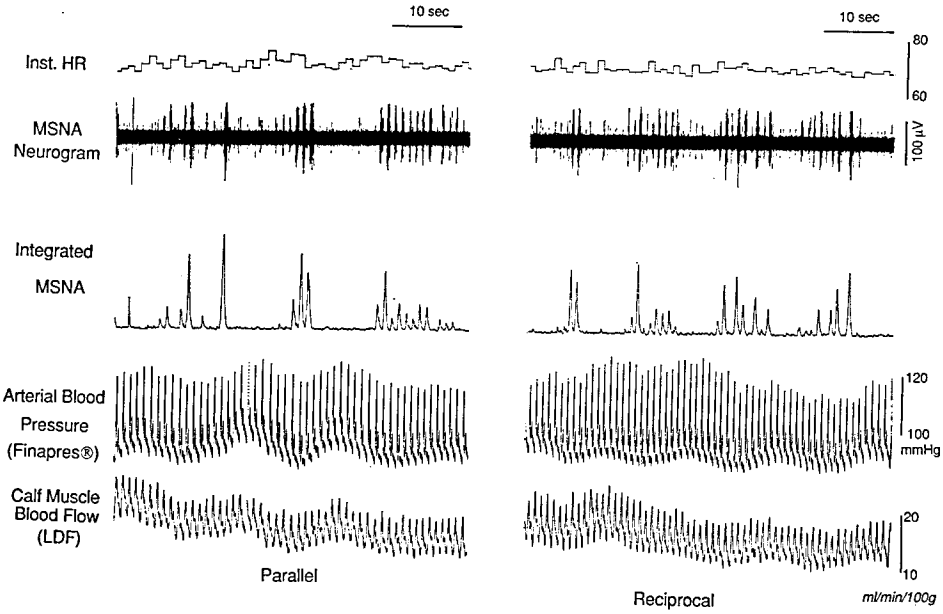


図3 上から安静時における瞬時心拍数，筋交感神経活動のニューログラム，その全波整流積分波形，動脈圧波形，下腿三頭筋血流量を示す。左のように血圧と筋血流量が相同的に変化するときと，右のように相反的に変化するときがある。

動脈血圧は，101.8±7.3 mmHg，下腿筋血流量は，23.4±8.7 ml/(min・100 g 組織)，また灌流抵抗は 4.35±0.84 mmHg・min・100 g 組織/ml であった。

(2) Valsalva 法施行時の筋交感神経活動と血圧，筋血流量の関係

Valsalva 法施行時における，第Ⅰ相の血圧上昇時においては，筋交感神経活動は抑制され，筋血流量は血圧と相同的に増加した。第Ⅱ相の血圧下降時においては，筋交感神経活動は賦活化され，筋血流量は血圧と相同的に低下した。第Ⅲ相では，負荷開放直後の血圧低下に筋交感神経活動が反応し，やや筋血流量の低下をみたが，第Ⅳ相でのオーバーシュート時には，血圧の上昇，筋交感神経活動の抑制とともに筋血流量の増加が観察された。

図4左では，十分な息こらえがなされており，典型的な反応（筋血流量は少々のアーティファクトを含む）であるが，図4右は反応が不十分であった。

(3) 静的掌握試験に対する筋交感神経活動，血圧，筋血流量との関係

最大随意収縮力の 30％で2分間掌握した場合，筋交感神経活動はコントロール値の28.1±5.1 bursts/min から 38 bursts/min（1分目）と55 bursts/min（2分目）に増加し，その結果，血圧はコントロール値の 100.8±4.4 mmHg から1分目に 108 mmHg，2分目には 142 mmHg まで上昇した。筋血流量は血圧と相反的にコントロール値の 15.6±5.3 ml/(min・100 g 組織）から1，2分目とも 11.6 ml/(min・100 g 組織）に低下した。灌流抵抗は，コントロール値の 6.4±0.8 から1分目には 9.3，2分目には 12.3に増加した（図5）。

最大随意収縮力の 10％で5分間掌握した場合，筋交感神経活動はコントロール値の29.4±3.4 bursts/min から次第に増加し（1分毎に 31→33→32→44→42 bursts/min），血圧もコントロール値の 107.1±4.7 mmHg から徐々に増加した（115→116→118→134→141 mmHg)。筋血流量は血圧と相同的にコントロール値の 12.9±5.3 から徐々に増加したが（34.6→34.8→36.8→43.2→46.4 ml/(min・100 g組織)）最後にやや低下した（図6)。灌流抵抗はコント

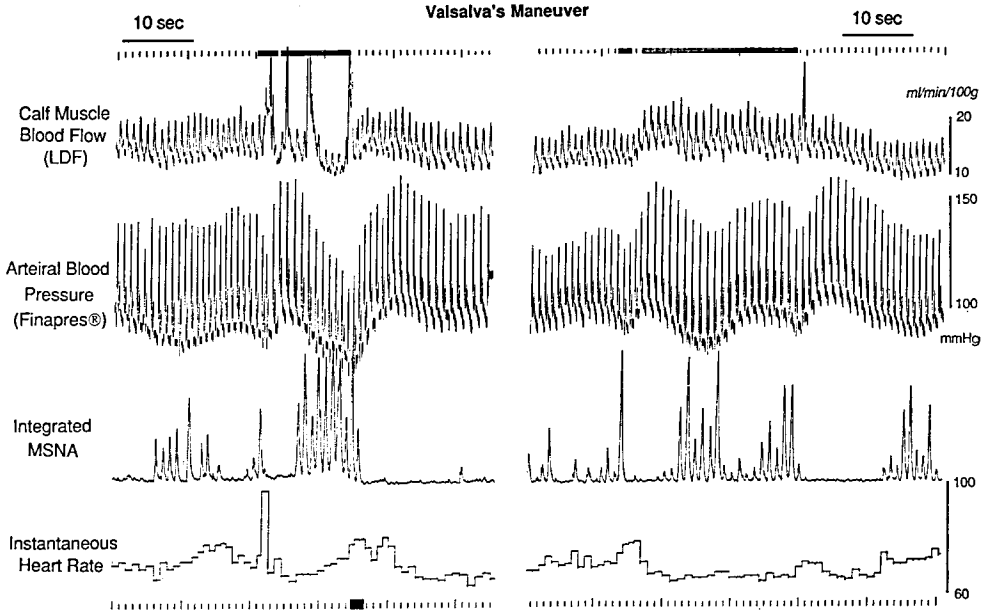


図4　上から Valsalva 法負荷時の下腿三頭筋血流量，動脈圧波形，筋交感神経活動の全波整流積分波形，瞬時心拍数を示す。左は十分な胸腔内圧の上昇が起っているが，右では不十分である。

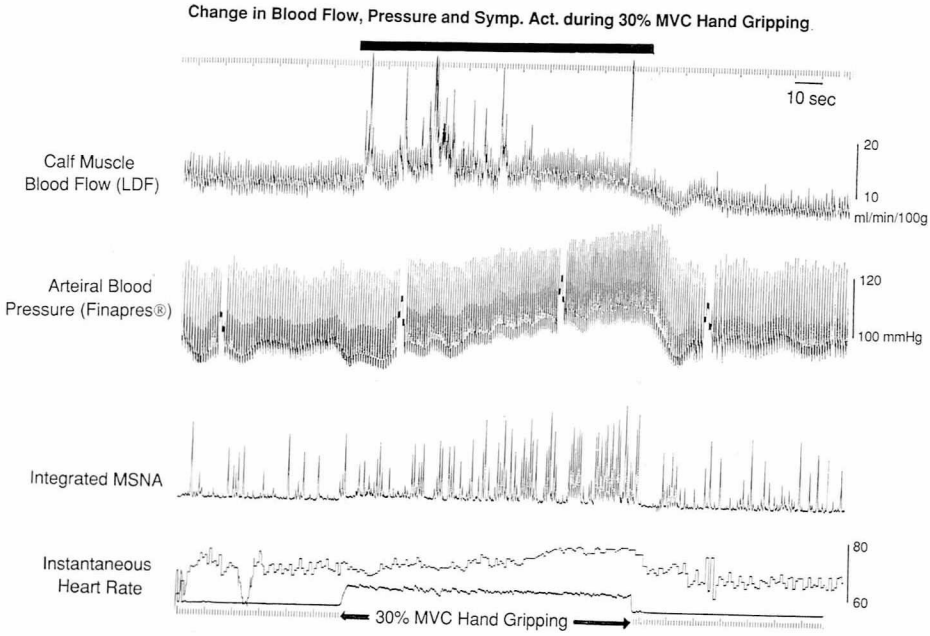


図5　上から最大随意収縮の 30％ の力での静的掌握試験負荷時の下腿三頭筋血流量，動脈圧波形，筋交感神経活動の全波整流積分波形，瞬時心拍数，収縮筋力を示す。筋交感神経活動は２分目には 1.5 倍に増加し，血圧も 1.4 倍に上昇した。筋血流量は血圧と相反的に低下し，灌流抵抗は増加した。

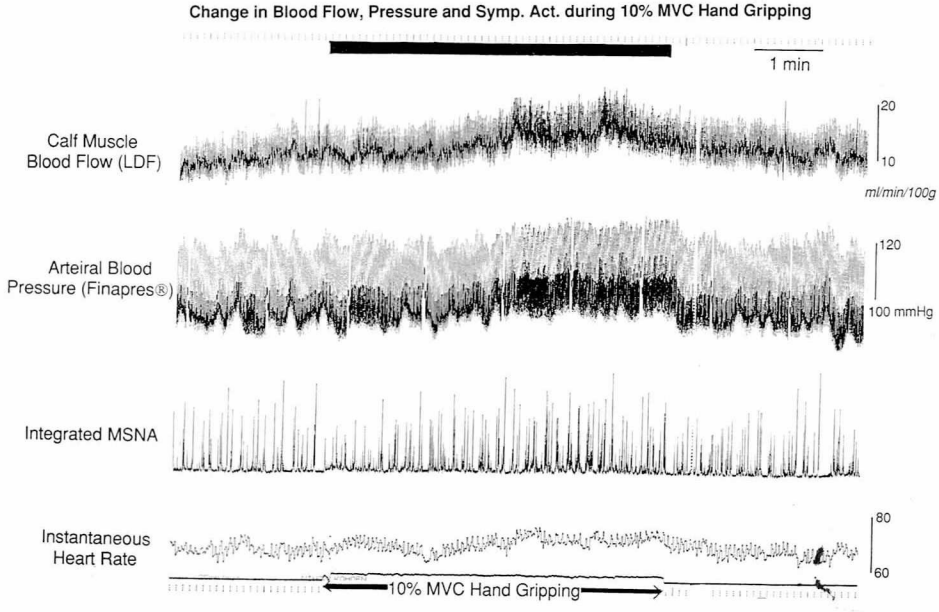


図6　上から最大随意収縮の10％の力での静法掌握験負荷時の下腿三頭筋血流量，動脈圧波形，筋交感神経活動の全波整流積分波形，瞬時心拍数，収縮筋力を示す。掌握時には，筋交感神経活動は次第に増加し，血圧も徐々に上昇した。筋血流量は血圧と相同的に徐々に増加したが最後にやや低下した。灌流抵抗は徐々に減少した。

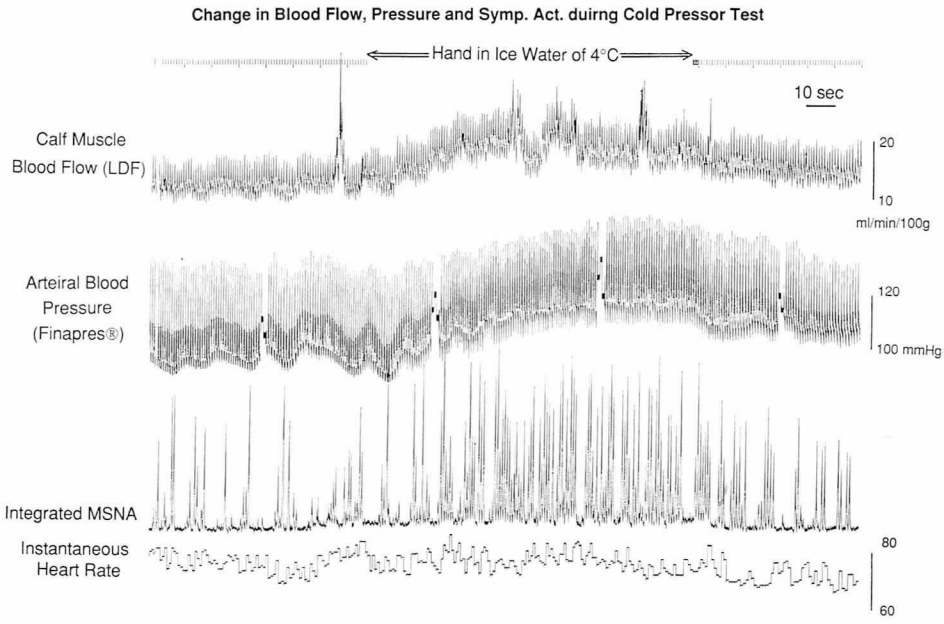


図7 上から寒冷昇圧試験負荷時の下腿三頭筋血流量，動脈圧波形，筋交感神経活動の全波整流積分波形，瞬時心拍数を示す。前半1分間では，筋血流量は血圧と相同的に変化し，両者ともに徐々に増加した。最初の1回を除き，2回目から4回目までの寒冷昇圧試験により，筋交感神経活動，血圧，血流量には増加がみられた。その結果，灌流抵抗は変化しなかった。ところが，後半1分間においては血圧と筋血流量は相反性変化を呈し，血圧は上昇したが，血流量は低下し，その結果，灌流抵抗は増加した。

ロール値の8.3±0.9から徐々に減少した（4.6→4.7→4.5→4.4→4.3）。

(4) 寒冷昇圧試験時の筋交感神経活動，血圧，筋血流量の関係

冷水に手根部まで2分間浸したところ，前半の1分間では，筋血流量は血圧と相同的に変化し，両者ともに徐々に増加した。最初の1回を除き，2回目から4回目までの寒冷昇圧試験において，平均して筋交感神経活動はコントロール値の 22.6±4.6 bursts/min から 46.7±3.7 bursts/min に増加し，血圧はコントロール値の 103.7±6.4 mmHg から 125.8±4.7 mmHg に，同様に筋血流量もコントロール値の 20.6±3.6 ml/(min・100 g 組織) から 29.4±4.2 ml/(min・100 g 組織) に増加した。その結果，灌流抵抗はコントロール値の 5.0±1.8 に比して4.35±0.43と変化がみられなかった。

ところが，後半1分間においては血圧と筋血流量は相反性変化を呈した。血圧は144.9±8.2 mmHg に上昇し，筋血流量は 28.5±5.0 ml/(min・100 g 組織) に低下した。灌流抵抗は後半1分間は5.19±0.60で筋交感神経活動の賦活化（50.7±8.5 bursts/min）に応じた増加を示した（図7）。

(5) Head-up tilting に伴う筋交感神経活動，血圧，筋血流量の変化

筋交感神経活動は，体位傾斜角度の正弦値と線型関数をなして増加した。血圧にはどの角度においても有意な差は認められなかった。筋血流量は，体位傾斜角度の増加とともに，60°を除き減少した（10°: 23.2, 20°: 17.6, 30°: 11.8, 40°: 7.3, 60°: 15.0, 90°: 2.9 ml/(min・100 g 組織)，図8）。灌流抵抗も60° 以外では体位傾斜の増加に伴い増加した。

(6) 筋交感神経活動と，各種交感神経賦活化状態下における灌流抵抗との関係

上記の各種交感神経賦活化状態下における筋交感神経活動と灌流抵抗との間の相関を解析し

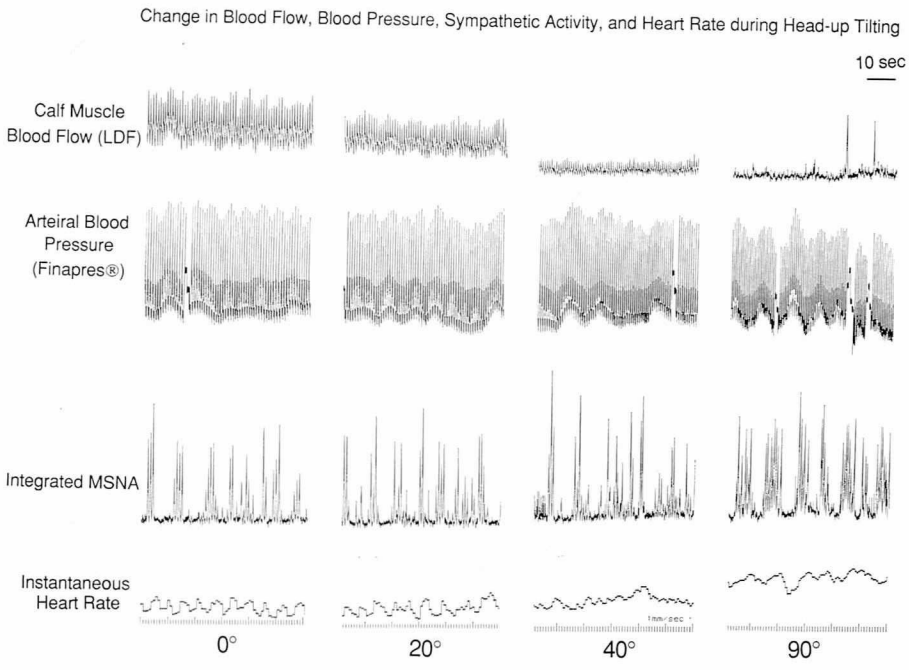


図8　上から head-up tilting 時の下腿三頭筋血流量，動脈圧波形，筋交感神経活動の全波整流積分波形，瞬時心拍数を示す。筋交感神経活動は，体位傾斜角度とともに増加した血圧にはどの角度においても有意な差は認められなかったが，体位傾斜角度の上昇に伴い，筋血流量は減少し，灌流抵抗は増加した。

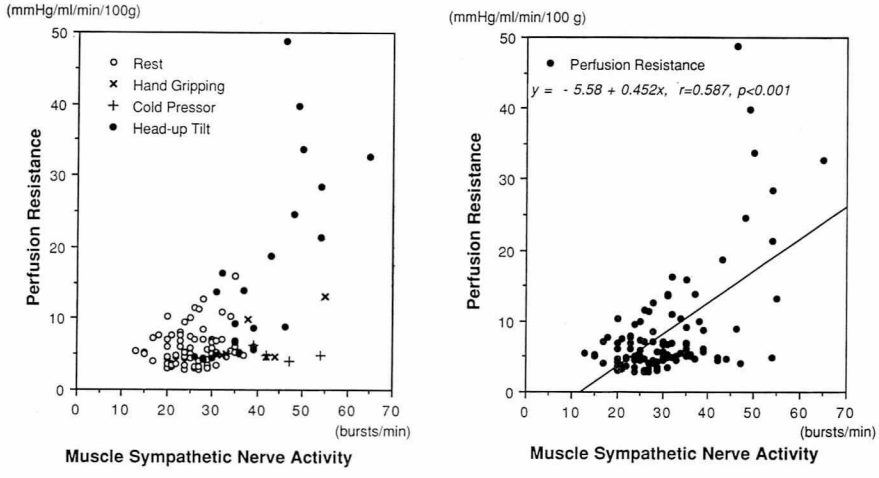


図9　筋交感神経活動と灌流抵抗との関係を示す。両者間には有意な正の相関が成立した。

てみたところ，筋交感神経活動の1分間のバースト数とその1分内における血圧を筋血流量で除した値，すなわち灌流抵抗値との間には，有意な正の相関が成立した（図9）。

考　察

Valsalva 法負荷時と寒冷昇圧試験時の筋交感神経活動，血圧，筋血流量は増加し，既報[2~3]と同様の結果を示した。静的掌握試験を負荷した際には，最大随意収縮力の 30％での掌握時には，筋交感神経活動が2倍以上に増加し，血圧が上昇したが，筋血流量は血圧とは相反的に低下した。ところが，最大随意収縮の10％の力での掌握時には，筋交感神経活動の増加

は最大でも1.8倍であり，筋血流量も最後の1分間を除き血圧とほとんど相同的に増加を示した。

さらに head-up tilting 時には，血圧の変化はほとんど観察されなかったが，筋血流量は筋交感神経活動と負の相関を示し，筋交感神経活動の増加に応じて減少した。

一般に筋血流量は，灌流圧と灌流抵抗により規定されるが，後者は筋交感神経活動の支配下にある。前者は全身血圧と比例すると考えられるが，それを規定する心拍出量と総末梢血管抵抗のうち，後者は筋交感神経活動の支配下にあるので，後者は筋交感神経活動は筋血流量に対し，あるときは相同的に，あるときは相反的に働く（図10）。

今回の結果を考えると，筋交感神経活動の賦活化があまり強くない状態，たとえば，寒冷昇圧試験の前半1分，最大随意収縮の 10％ の掌握試験時など血圧上昇に筋交感神経活動の寄与があまり高くない状態では，筋血流は血圧と相同的に変化すると考えられる。逆に筋交感神経活動の賦活化が強い状態，たとえば寒冷昇圧試験の後半1分，最大随意収縮の 30％ の掌握時，head-up tilting 時には，筋血流は血圧と相反的に変化すると思われる。

血圧調節に関与する β-アドレナリン系と α-アドレナリン系のうち，前者は主に心拍数の増加に，後者は主に末梢血管抵抗の上昇に関係している。松川ら[4]は，暗算のような心理的ストレス負荷により心拍数の増加が，寒冷昇圧試験のような物理的ストレス負荷では末梢血管抵抗を高める筋交感神経活動の賦活化がおきると報告している。これまでに行った2分間の寒冷昇圧試験でも，前半1分の冷水による冷覚刺激はむしろ心拍数を増加させ，後半1分の冷痛覚による痛み刺激が筋交感神経活動を増加させることを示しており[5]，本研究において寒冷昇圧試験の負荷が，前半においては血圧と筋血流量の相同的な変化を後半においては相反的な変化を惹起していることと合致している。

Head-up tilting による変化としては，筋交感神経活動の増加は既報[6]のとおりであるが，体位傾斜角度60° までは α-アドレナリン系優位に血圧制御が働く[7]ため，筋交感神経活動と筋血流量が相反性変化を示したものと考えられる。

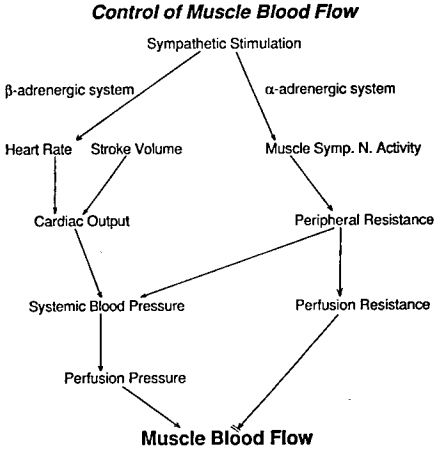


図10 筋血流制御の模式図

結　論

筋血流量は，血圧に対し相同的に変化するときと相反的に変化するときがあるが，血圧が心拍数に依存している際には相同的に，末梢血管抵抗に依存している時には相反的に変化すると考えられた。筋血流量は血圧，筋交感神経活動とともに連続的に測定することにより，筋の血行動態はより明らかになることが判明した。同様の方法により筋ジストロフィー症例における筋の血行動態の解明を行う予定である。

文　献

1）間野忠明，齊藤　満ら：レーザードップラー法によるヒト骨格筋血流量の測定・厚生省精神・神経疾患研究　平成2年度研究報告書（班長　高橋桂一）筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究，1991，P. 112.

2）渡辺丈貞，間野忠明ら：レーザ血流量計により測定した筋血流量と血圧，筋交感神経活動との関係．環研年報 **41**：330，1990

3）齊藤　満，岩瀬　敏ら：レーザードップラー血流量計による筋組織血流測定。環研年報 **42**：300，1991

4）松川俊義，吉田三知ら：若年境界域高血圧者における交感神経系の異常。自律神経 **27**：627，1990

5) Yamamoto K, Iwase S et al: Responses of muscle sympathetic nerve activity and cardiac output to the cold pressor test. Jpn J Physiol 42 : 239, 1992
6) Iwase S. Mano T et al: Effect of graded head-up tilting on muscle sympathetic activities in man. Physiologist **30** : S62, 1987
7) 白水重尚，岩瀬　敏ら：体位変換時における心拍数と筋交感神経活動の関係。環研年報 **39** : 80, 1988

定量的筋電図法の研究（第三報）

——distal myopathy における myopathy index——

班　員　廣　瀬　和　彦
東京都立神経病院神経内科

共同研究者　大　竹　敏　之，小　森　哲　夫，田　邊　　等
東京都立神経病院神経内科

要　旨

定量的筋電図法的に，最大随意収縮時筋電図の筋原性変化の特徴を表わす myopathy index (MI) (12項目，10点満点) を今年度は，いわゆる distal myopathy (DM) に応用し，昨年度報告の Duchenne 型筋ジストロフィ (DMD) の成績とも対比し，障害分布の差について検討した。対象は，下肢から発病し，遠位筋優位障害分布を示す rimmed vacuole 型 DM 5例の上腕二頭筋（B筋）と第1背側骨間筋（I筋）から記録した，それぞれ17，20の筋電図である。MI (平均値) は，B筋1.3，I筋4.7で，遠位優位障害に合致し，DM においても，DMD と同様，MI 値は障害度を反映した。項目別異常出現率は，MI 値に符合し，一秒間の棘数 (NS) とその平均振幅の項目を除き，各項目でI筋の方が高率で，DMD で認めたと同様，DM でもI筋における筋原性変化の現われ方は，B筋と異なり，NS 増加の過程が目立たなかった。

目　的

最大随意収縮時筋電図波形の筋原性変化の特徴を定量的に表わす，定量的筋電図法的 myopathy index (MI) の臨床的意義について検討を進めてきている[1)2)]。

昨年度 Duchenne 型筋ジストロフィ (DMD) の上腕二頭筋（B筋）と第1背側骨間筋（I筋）での MI の筋肉差を比較し，I筋の MI はB筋の MI より低値で，この差は障害度の違いを反映し，また，I筋では一秒間の棘数の変化が，現われにくい傾向のあることを指摘した[2)]。

今年度は，distal myopathy (DM) でのB筋とI筋での MI を比較検討し，昨年度の DMD における成績とも対比した。

対象と方法

対象は，表1に示すように，男4，女1の5症例で，年齢は25歳から42歳，初発症状は歩行障害ないし下肢脱力など下肢から発症し，下肢でより著しい遠位筋優位障害分布を示し，筋生検を施行した3例中2例で，rimmed vacuole (RV) を伴うミオパチーの組織所見を，1例で far advanced のミオパチー所見を認め，臨床的に均一な一群を形成すると推測される RV 型 DM の症例である。

なお，比較対照の DMD のB筋とI筋の成績は，昨年度報告したものを用いた。

分析方法は，これまでの報告[1)]と同じである。略述すると，1秒間の最大随意収縮時筋電図波形を 250 μV の時間間隔で AD 変換し，noise level 100 μV または 50 μV 以上の修正波形から，1秒間の棘 (spike) 数 (NS) と，その振幅 (A) と持続 (D) のヒストグラムおよびA・D相関表（A：区間，100 μV，級1～

表1 対 象

Case No.	年齢 (歳)	性	診 断	罹病期間 (年月)	初発症状	上肢 MMT 近位	上肢 MMT 遠位	下肢 MMT 近位	下肢 MMT 遠位	分析筋電図数 (I/B)
1	25	M	DM	3.10	歩行障害	5⁻	4	4	2	4/3
2	42	M	DM	8. 2	手指・下肢脱力	4	3	3	2⁻	4/4
3	41	M	DMRV*	4.11	下肢脱力	5	4	4	2⁻	3/3
4	36	M	DMRV*	10. 0	歩行障害	4	3	4	2	6/3
5	34	F	DM*	8. 6	下肢脱力	5	4	4	3	3/4

DM: distal myopathy
DMRV: distal myopathy with rimmed vacuole
*: muscle biopsy 施行例

表2 Myopathy Index (MI)

	Normal B	Limit I	MI score
(1) No. of Spikes (NS)	>306	*>402	1
(2) Mean Amplitude, μV (MA)	<120	**<260	0.5
(3) Maximum frequency (MxF)	>92	>86	0.5
(4) % to NS (%)	>37.7	>29.8	1
(5) Increase NS (INS)	>71	>80	0.5
(6) % to NS (%)	>29.8	>28.2	1
(7) Class A1 NS (A1)	>30	>32	1
(8) % to NS (%)	>12.9	>11.2	1
(9) Class A1, 2 NS (A1, 2)	>119	>118	0.5
(10) % to NS (%)	>50.6	>40.9	1
(11) Class A1,D2 NS (A1, D2)	>13	>11	1
(12) % to NS (%)	>4.9	>3.7	1
	(mean±3SDs)		10

Normal: 6 cases, 36 EMGs, B: Biceps brachii, I: Interosseus dorsalis 1,
*: more than Mean+3SDs, **: less than Mean−3SDs,
Class: Class interval of frequency distribution, A: Amplitude, D: Duration

40：D：区間1 ms, 級1～40）を作成し，さらに noise level を 100 μV から 50 μV に下げた際の NS 増加分 (increse of NS, INS) を算出し，表2に示すように，MI を求めるものである。平均値±3SD で設定した正常の限界は，B筋とI筋で差があり，NS はI筋で大きく，平均振幅 (MA) もI筋で高い値を示している。

結 果

1．distal myopathy (DM) の成績

DM の成績は，表3に示すように，MI 値はB筋1.3，I筋4.7で，MMT，B筋4.6，I筋3.6に照しても明らかなように，障害度を反映して，I筋で高値を示している。項目別異常出現率に関しても表4，図1のように NS, MA を除き，各項目でI筋の方が高率になっている。そして筋肉差の特徴としては，NS と INS にアクセントのある筋肉差がみられ，さらにI筋では，低振幅，短持続のスパイクに関連する項目の異常出現率が高い傾向も指摘される。

2．DMD との比較

昨年度報告の DMD のデータとの比較は，表4のようである。I筋の MI は，DMD 3.8

表3　MI 主要項目と MMT（B筋と I 筋の比較）

MI 項目		Normal	DMD	Distal M
NS	I	242±53	219±40*	252±87
	B	223±28	250±68*	333±92**
MA (μV)	I	720±330	290±13**	261±179**
	B	440±100	210±60**	511±203
INS	I	37±16	62±19**	78±19**
	B	41±10	90±29**	61±18**
%	I	14.1±4.7	28.9±8.1**	35.3±15.1**
	B	18.4±3.6	36.1±6.9**	19.3±6.1
MI (平均)	I	0	3.8	4.7
	B	0.04	6.8	1.3
MMT (平均)	I	5.0	3.4	3.6
	B	5.0	3.0	4.6

*：P<0.05,　**：P<0.01
B：biceps brachii,　I：interosseus dorsalis 1

表4　MI score と項目別異常出現率
（B筋と I 筋の比較）

MI 項目	B 筋		I 筋	
	DMD	Dist M.	DMD	Dist M.
(1) NS	25%	71%	0%	0%
(2) MA	5	0	0	0
(3) MxF	50	12	25	55
(4) %	65	6	59	75
(5) INS	65	35	19	40
(6) %	75	6	50	55
(7) A1	80	6	44	55
(8) %	75	6	63	55
(9) A1 ,2	60	6	34	70
(10) %	75	6	59	65
(11) A1, D2	55	6	19	35
(12) %	60	0	44	50
MI (mean±SD)	6.8±2.5	1.3±1.4	3.8±3.3	4.7±3.3
（範囲）	(1-9.5)	(0-6)	(0-8)	(0-8.5)

で，DM 4.7より若干低値であるが，異常出現率には類似したパターンがみられ，筋電図的には類似の病態にあると考えられる。B筋では，明らかに両者間に差があり，DMD は MI6.8で，DM 1.3より，はるかに高値で，低振幅，短持続の成分が支配的な典型的筋原性パターンがみられる。DM では，NS が増加し，それが 100 μV から 50 μV の成分である INS の増加と関連していることが示唆され，それ以外の要素の変化はほとんどないとみることができ，これまでに報告した[1] ミオパチーの初期像に相当するとみなしうる。

考　察

昨年度の近位筋優位障害の各種ミオパチーにおける MI に関する検討は，臨床像に符合し，B筋高値，I 筋低値を示した。また DMD ではI筋にも障害がかなり及んでいることが示された。そしてB筋と I 筋での運動単位（motor unit, MU）の差が，筋原性変化の出現の難易を左右する可能性が考えられるとともに，表現型としての症状の現われ方に差を生じる可能性も推察された。

今回の RV 型 DM に関する成績は，①MI 高値（B筋1.3，I 筋4.7）は，障害度を反映する，②I 筋における筋原性変化の現われ方は，B筋と異なり，NS 増加の過程が目立たない，ことが認められた。

この筋肉差は，DM でも，両筋での MU の差から説明可能と思われる。運動単位電位（motor unit potential MUP）は，I 筋の方が

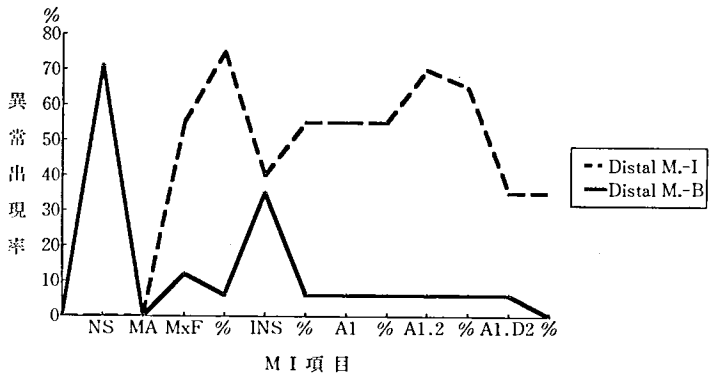


図1 Distal myopathy における各 MI 項目の異常出現率の筋肉差
I：第1背側骨間筋，B：上腕二頭筋

短持続，高振幅，単純波形の傾向があり，これから推測される MU の構造は，I 筋では MU territory が狭く，筋線維密度が高いとみなされる[3]。この違いがランダムに筋線維が脱落するというミオパチー性変化[4]は同一で，違いは単に，MU の構造の差に由来するとすれば，近位または遠位筋優位障害性を決める要因は，別にあると推定される。

従来，RV 型 DM の筋電図変化に関しては，持続時間が短く，多相性，低電位の筋原性パターンが必ず得られるが，一部には持続時間の長い，高振幅の MUP などの神経原性変化も混在することが多いとの記載がある[5]。今回の定量的筋電図所見での，典型的ミオパチー所見とのずれについては，さらに文献上の混在性変化に関するデータを詳細に分析し，その本態を MU の点から究明する必要があると考えている。

文　献

1）廣瀬和彦，大竹敏之ら：定量的筋電図法の研究—myopathy index 応用—，厚生省精神神経疾患研究委託費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，平成2年3月，p.200-204

2）廣瀬和彦，大竹敏之ら：定量的筋電図法の研究—myopathy index の筋肉差—，厚生省精神神経疾患研究委託費筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究，平成2年度研究報告書，平成3年3月，p. 96-102

3）廣瀬和彦，祖父江逸郎：随意収縮時筋電図波形の分析—健常者における M biceps brachii M interosseus dorsalis I の比較—．臨床神経，**10**：626-633，1970

4）Buchtal. F, Kamieniecka. Z: The diagnostic yield of quantified electromyography and quantified muscle biopsy in neuromuscular disorders. Muscle & Nerve **5**：265-280，1982

5）水澤英洋，豊倉康夫：遠位型ミオパチー，神経内科，**20**：555-572，1984

筋ジストロフィーにおける jitter 現象の異常

——筋緊張性ジストロフィーと他の型の筋ジストロフィーの比較——

班　員　大　城　盛　夫
国立療養所沖縄病院

共同研究者　竹　永　　智[1)]，迫　田　俊　一[1)]
吉　嶺　厚　生[1)]，有　村　公　良[2)]
[1)] 国立療養所沖縄病院神経内科　[2)] 鹿児島大学医学部第3内科

要　旨

筋緊張性ジストロフィー5例（MYD群），その他の筋ジストロフィー7例（PMD群），神経原性筋萎縮症2例（NA群）において一側総指伸筋で通常の SFEMG での筋線維密度と，jitter 現象の MCD（V-MCD）の測定，および微小電気刺激下 SFEMG での MCD（A-MCD）の測定をおこなった。筋線維密度，V-MCD, A-MCD では，PMD 群と MYD 群の有意差はなかったが A-MCD と V-MCD/$\sqrt{2}$ の比の検討では，MYD 群が有意に neurogenic な factor の関与が大きかった。また，通常の針筋電図や神経伝導速度検査で motor unit が反復発火する所見がみられた症例の存在などから，筋緊張性ジストロフィーでは，他の型の筋ジストロフィーにはみられない，筋線維膜の異常と類似した興奮性の異常および軽度の脱髄などの末梢運動神経障害の存在が示唆された。

はじめに

我々は，microphysiology の解明に有用である単一筋線維筋電図（single fiber EMG, SFEMG）を用いて，筋ジストロフィーの神経筋運動単位の病態解明を目的として取り組んできた。昨年の班会議では，筋ジスでは高率に jitter の増加がみられることを報告し，神経筋運動単位の再構築がおこるための機能的な不安定さの反映であると考察した[1)]。今回は疾患特異性について検討し，筋緊張性ジストロフィーで jitter の異常が他の筋ジストロフィーとは異なり，neurogenic な要素が大きく関与していることを見いだした。筋緊張性筋ジストロフィーにおいて論議になっている末梢神経障害との関連について報告する。

対象・方法

対象は，筋緊張性ジストロフィー5例（MYD群，年齢31歳から64歳，平均51歳）その他の型の筋ジストロフィー7例（デュシェンヌ型1例，ベッカー型3例，肢帯型3例：PMD 群，年齢21歳から48歳，平均30歳）。そして神経原性筋萎縮症2例（NA 群，年齢53歳と71歳）である。以上14例に対して，一側総指伸筋で，随意収縮時の SFEMG（voluntary SFEMG, 以下 V-SFEMG）での筋線維密度測定と，随意収縮時の同一神経支配下の棘波成分のペアの jitter 現象の mean consecutive difference（MCD）測定，および myogenic jitter が除外できる。筋内神経軸索刺激時 SFEMG（Axonal stimulated SFEMG, 以下 A-SFEMG）での MCD 測定をおこなった。以下，V-SFEMG で測定した MCD を V-MCD, A-SFEMG で測定した MCD を A-MCD と略す。

結　果

筋線維密度は，PMD 群が 1.96±0.52, MYD 群が 2.68±0.73, NA 群が3.12（平均のみ）と，増加していたが PMD 群と MYD 群間での有意差は見られなかった（図1）。V-SFEMG による jitter の検討では，V-MCD は PMD 群が 55.5±23.0, MYD 群が42.2±12.1, NA 群が78.3（平均のみ）であったが，PMD 群と MYD 群間での有意差は認めなかった（図2）。A-SFEMG での jitter の検討では，A-MCD は PMD 群が 28.3±9.0, MYD 群が 34.1±7.9, NA 群が74.5（平均のみ）であったが，これも PMD 群と MYD 群間の有意差は見られなかった（図3）。

今回おこなった jitter の検討の方法を比較すると，V-SFEMG では2組の神経・神経筋接合部・筋線維が関係するが，A-SFEMG では1組

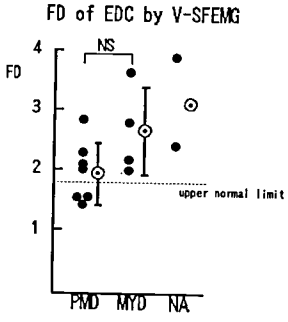


図1　V-SFEMG による筋線維密度測定結果

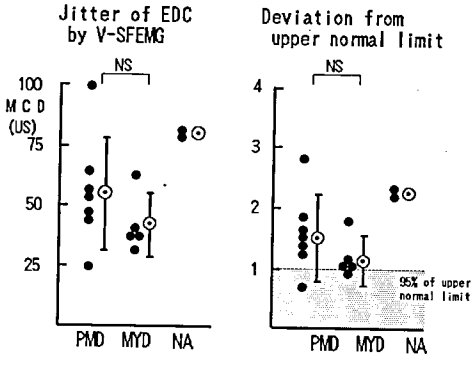


図2　V-SFEMG による jitter の検討．左は測定結果，右は各年代における95%正常上限に対する比．

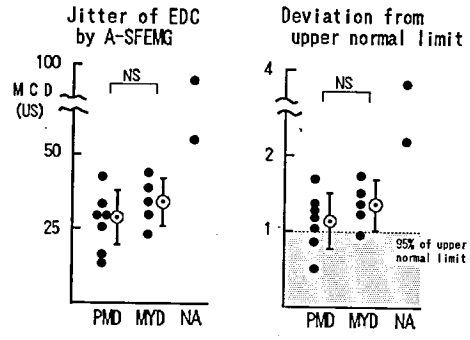


図3　A-SFEMG による jitter の検討．左は測定結果．右は95%正常上限に対する比．

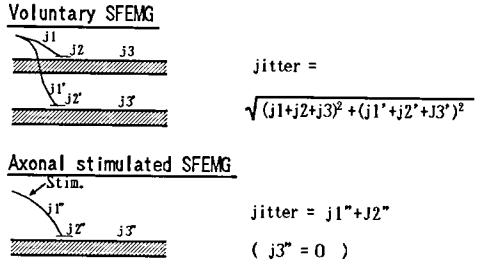


図4　voluntary SFEMG と axonal stimulated SFEMG

のみの神経・神経筋接合部・筋線維が関係する（図4）。そのため健常人の場合 A-MCD≒V MCD/$\sqrt{2}$ の関係が成立する[2]。しかし myogenic あるいは neurogenic jitter が大きくなるとこの関係が成り立たず，理論的には，myogenic jitter は A-SFEMG で除外できるため myogenic jitter が大きくなると（図4の j3, j3'が大となると），A-MCD<V-MCD/$\sqrt{2}$ となる。一方 neurogenic jitter は，A-SFEMG および V-SFEMG の両方に関与するため，neurogenic jitter が大きくなると（図4の j1, j1' j1"が大となると）A-MCD≧V-MCD/$\sqrt{2}$ となると考えられる。そこで今回は，表1にしめす式で MCD 比と Normalized MCD 比（N-MCD 比）を算出して，myogenic jitter および neurogenic jitter のそれぞれの関与の程度を検討しようと試みた。その結果を図5に示す。MCD 比は PMD 群では0.79±0.31で MYD 群では1.17±0.25, N-MCD 比は，PMD 群では

表1　MCD 比と Normalized MCD 比 (N-MCD 比) の算出方法

$$\text{MCD 比}=\frac{\text{A-MCD}}{\text{V-MCD}/\sqrt{2}}$$

$$\text{Normalized MCD 比}=\frac{\dfrac{\text{A-MCD}}{\text{A-MCD の95\%正常上限値}}}{\dfrac{\text{V-MCD}}{\text{V-MCD の95\%正常上限値}}}$$

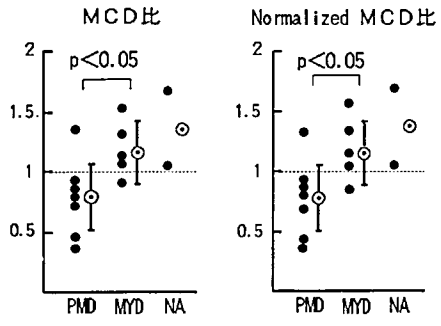
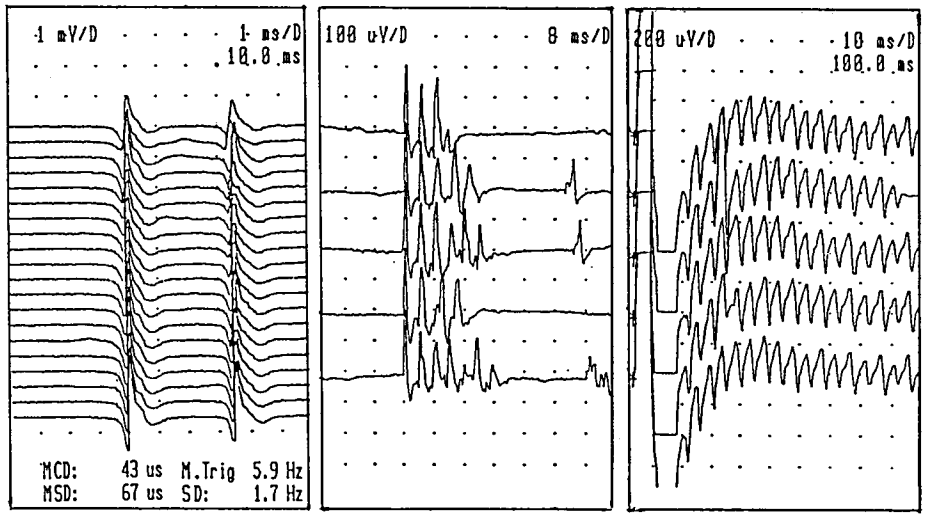


図5　MCD 比と normalized-MCD比. 結果.

0.78±0.31で, MYD 群では1.18±0.26と, いずれも MYD 群は1より大きくなり, PMD 群と MYD 群間に有意差が認められた。

考　察

今回の検討における V-SFEMG による jitter の異常は, MYD 群, PMD 群ともに中等度以上の下位運動ニューロンの障害や, 神経筋伝達障害にみられるより軽度で, 通常の筋疾患にみられるものとほぼ同程度であった。しかし, MCD 比, N-MCD 比の検討結果より, 筋緊張性ジストロフィーでは, 他の型の筋ジストロフィーに比べ, neurogenic jitter の関与が大きいという結果が得られた。このことより, 他の筋ジストロフィーにはみられない筋緊張性ジストロフィー固有の末梢運動神経障害の存在が示唆された。一方, 筋線維密度の検討で MYD 群と PMD 群間で有意差はみられなかった。通常の筋疾患での筋線維密度の増加は, fiber splitting や, 筋線維の変性と再生に伴う myog-enic reinnervation や, ephatic transmittion などの, myogenic mechanism が想定されている[3]。今回の検討では, 筋緊張性ジストロフィーで myogenic mechanism 以上に強い神経筋運動単位の再構築が生じているという証拠は得られず, 筋緊張性ジストロフィーにおける末梢運動神経の, 特に軸索の障害との関連は指摘できなかった。よって, 今回の検討でみられた



Abnormal jitter　Repetitive discharge by concentric EMG　Stimulus induced repetitive discharge

図 6

neurogenic jitter の増加の機序としては軽度の脱髄によるものが示唆される。筋緊張性ジストロフィーにおける末梢神経の異常については，腓腹神経の形態学的な検討による有髄線維の減少の報告[4] や myelin の異常の報告[5] などがあるが，このような異常に基ずく神経伝達の障害が neurogenic jitter の増加としてあらわれているものと思われた。また，今回の検討症例には含まれていないが，我々は筋緊張性ジストロフィー患者で，通常の針筋電図や神経伝達速度検査で motor unit が反復発火する所見がみられた症例を経験している（図6）。この所見は reinnervation の初期やテタニーなどにもみられ，末梢神経の興奮性の異常との関連が示唆されており，このことより筋緊張性ジストロフィーの末梢運動神経障害の一部には筋線維膜の異常と類似した興奮性の異常の存在も示唆された。

参考文献

1）大城盛夫，竹永　智他：筋ジストロフィーの Axonal stimulation Single Fiber EMG。筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究。平成2年度研究報告書 108-111. 1991

2）Trontelji JV, Mihelin M, et al: Axonal stimulation for end-plate jitter studies. J Neurol Neurosurg Psychiatry **49**: 677, 1986

3）Stalberg E, Trontelji JV: Single Fibre Electromyography. Mirvalle Press, Old Working, Surrey (UK), 1979

4）Cros D, Harnden P et al: Peripheral neuropathy in myotonic dystrophy: A nerve biopsy. Ann Neurol **23**: 470, 1988

5）岩下　宏，田中　薫他：筋緊張性ジストロフィー症の末梢神経病変。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 353-356, 1989

事象関連電位を用いた筋強直性ジストロフィー患者の知的機能の検討

班　　員　春　原　経　彦
国立精神神経センター武蔵病院神経内科

共同研究者　富　　英　明，永　野　　哲
国立精神神経センター武蔵病院神経内科

要　旨

17例の筋強直性ジストロフィー患者を対象に聴覚刺激と体性感覚刺激を用いた事象関連電位を測定し，知的機能の評価をおこなった。この結果，聴覚刺激で3例，体性感覚刺激で2例にP300 潜時の著明な延長が認められたが，疾患群全体としてコントロール群とは差が認められなかった。P300 の振幅は疾患群で聴覚刺激，体性感覚刺激とも低下していた。P300 の異常と罹病期間，長谷川式知能スケール，Mini-Mental State などの知能検査の成績との間に相関はみられなかった。

P300 の振幅低下は，本症患者の知的機能異常を反映したものと考えられるが，皮質性痴呆や皮質下性痴呆とは異なった情動障害が関与している可能性も考えられた。

目　的

事象関連電位により各種痴呆性疾患を対象に認知機能障害の検索，評価が行なわれているが，今回筋強直性ジストロフィー患者における知的機能の評価を目的に聴覚刺激と体性感覚刺激を用いた事象関連電位を測定した。

対象・方法

対象は，筋強直性ジストロフィー17例，年令は21-59才，平均39.7才，コントロールとしてage match させた正常人19例を用いた。課題遂行困難な痴呆例，高度難聴例は含まれていない。

方法は知能検査として長谷川式，Mini Mental State, WAIS を測定した。ERP 測定は聴覚刺激と体性感覚刺激による odd ball 課題を用いた。聴覚刺激はヘッドフォーンを介し2000 Hz の純音を 20％，1000 Hz の純音を 80％になるように at random にあたえ，低頻度音の回数をカウントさせた。低頻度音の回数は全40回とした。体性感覚刺激には痛覚閾値下の電気刺激を用い，利き手の第II指を標的に 20％，第III指に 80％となるように at random にリング電極を介し刺激を与え，第II指への標的刺激の回数をカウントさせた。標的刺激数は全40回。記録は基準電極を両耳朶連結として，Fz, Cz, Pz より導出した。測定項目は低頻度刺激に対する ERP 成分で，聴覚刺激では N100, P200, N200, P300，体性感覚刺激では P100, N140, P300 の各潜時，振幅とした。

結果および考察

P300 潜時に明らかな遅延を認めたものは聴覚刺激の場合17例中3例。体性感覚刺激の場合15例中2例であった。群としては両パラタイムともコントロールより延長傾向を認めたものの有意差はなかった。振幅は疾患群で両パラダイムともコントロールより有意に延長していた。

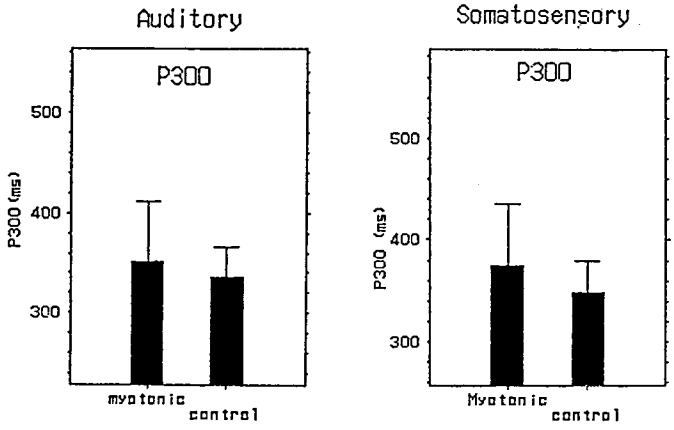

Auditory
P300
500
400
300
P300 (ms)
myotonic
control
Somatosensory
P300
500
400
300
P300 (ms)
Myotonic
control

図 1

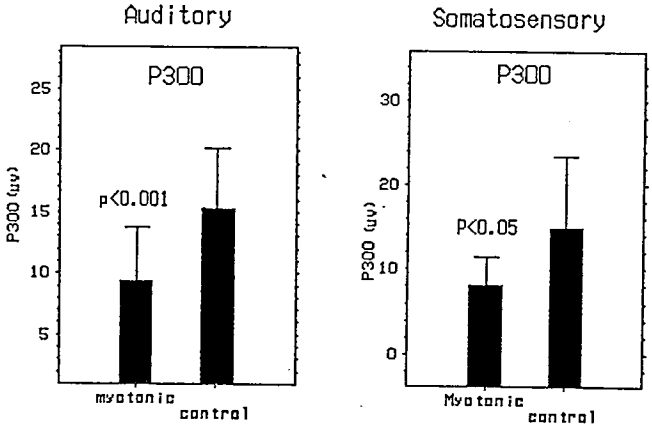

Auditory
P300
25
20
15
10
5
P300 (μv)
p<0.001
myotonic
control
Somatosensory
P300
30
20
10
0
P300 (μv)
P<0.05
Myotonic
control

図 2

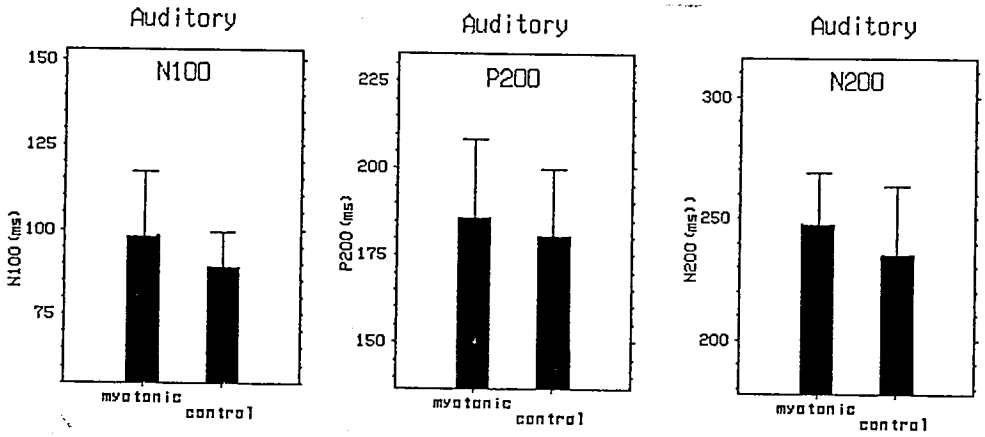

Auditory
N100
150
125
100
75
N100 (ms)
myotonic
control
Auditory
P200
225
200
175
150
P200 (ms)
myotonic
control
Auditory
N200
300
250
200
N200 (ms)
myotonic
control

図 3

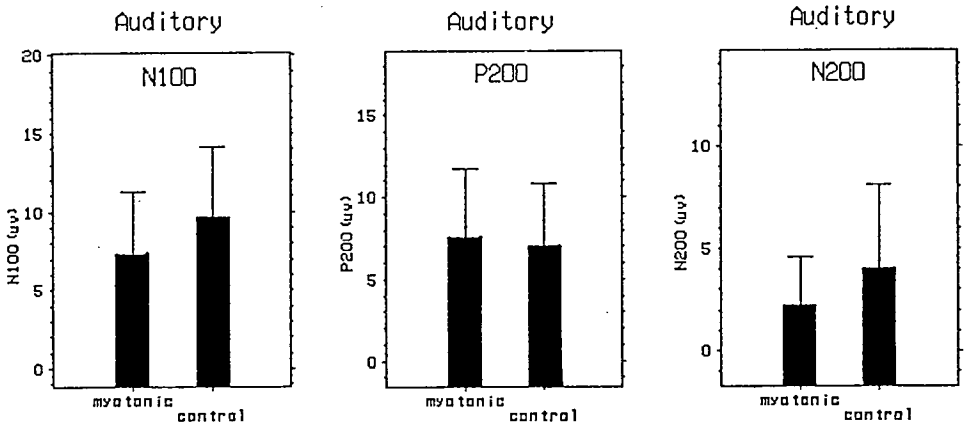

Auditory
N100
N100 (μv)
20
15
10
5
0
myotonic
control
Auditory
P200
P200 (μv)
15
10
5
0
myotonic
control
Auditory
N200
N200 (μv)
10
5
0
myotonic
control

図 4

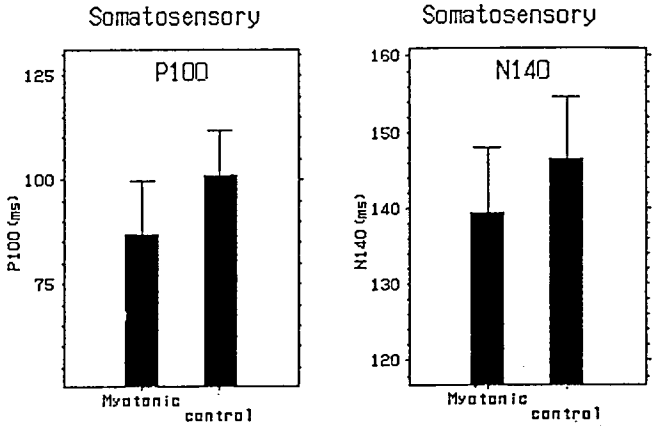

Somatosensory
P100
P100 (ms)
125
100
75
Myotonic
control
Somatosensory
N140
N140 (ms)
160
150
140
130
120
Myotonic
control

図 5

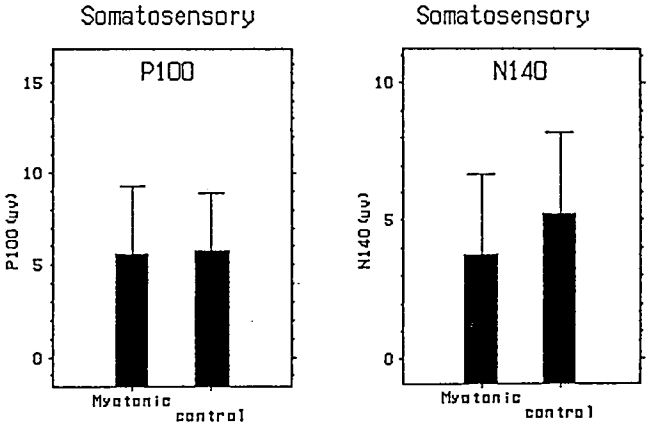

Somatosensory
P100
P100 (μv)
15
10
5
0
Myotonic
control
Somatosensory
N140
N140 (μv)
10
5
0
Myotonic
control

図 6

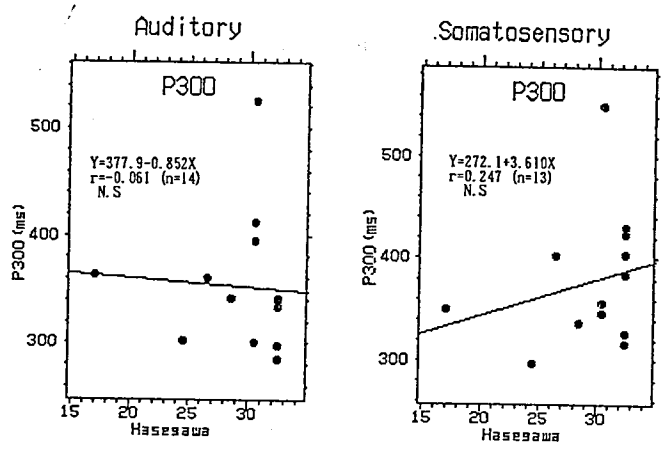


図 7

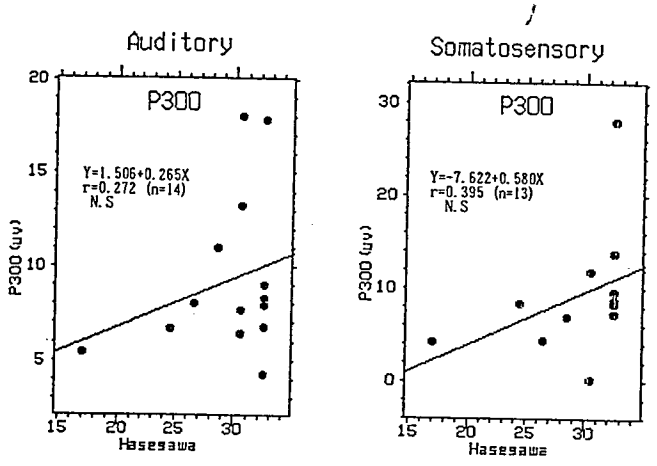


図 8

音刺激の早期成分については注意関連電位とされる N100, P200 や N200 潜時は差がみられなかった。

振幅についても同様であった。

体性感覚刺激の早期成分についても差は認められなかった。

長谷川式スケールは1例で低下を認めたほか subnormal 程度が多く，P300 潜時との相関は，両パラダイムとも認められなかった。

P300 振幅は長谷川式スケール値と正の相関傾向がみられたが有意ではなかった。

MMS と P300 潜時との相関は，両パラダイムとも認められなかった。

P300 振幅についても同様であった。

その他の早期成分についても知能検査と相関は認められなかった。

考　案

P300 の振幅低下は難聴などの合併症による影響のみでは説明つかず，本症患者の知的機能異常を反映したものと考えられた。知能検査成績と相関がみられないことや P300 潜時に明らかな遅延を示す例が少なかったことより，皮質性痴呆や皮質下性痴呆とは異なった情動障害が関与している可能性も考えられた。

ま と め

1．聴覚刺激で3例，体性感覚刺激で2例に P300 潜時の著明な延長が認められたが，疾患群全体としてコントロール群とは差が認められ

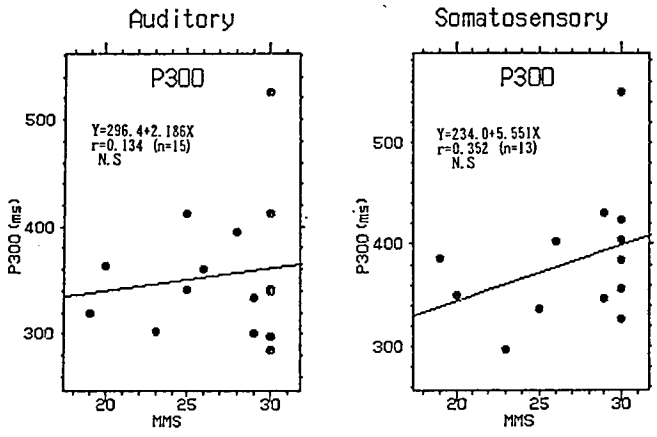


図 9

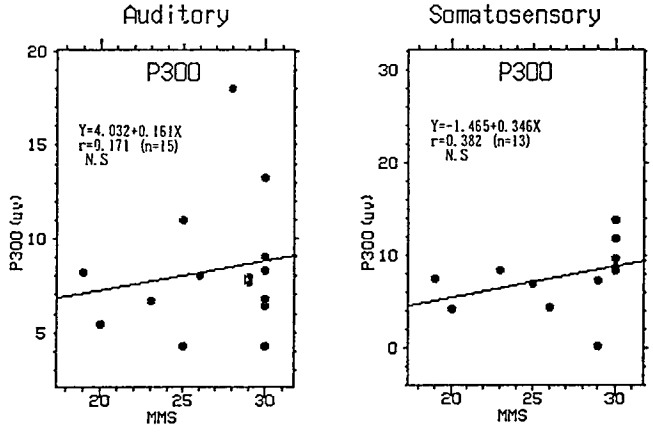


図 10

なかった。

2．P300 の振幅は疾患群で聴覚刺激，体性感覚刺激とも低下していた。

3．P300 の異常と罹病期間，知能検査の成績との間に相関はみられなかった。

参考文献

1) Perini GI, Colombo G et al: Intellectual impairment and cognitive evoked potentials in myotonic dystrophy. J Nery Ment Dis **177**: 750, 1989

2) Hanafusa H, Motonuma N et al: Event-related potentials (P300) in myotonic dystrophy. Acta Neurol Scand **80**: 111, 1989

筋緊張性ジストロフィーにおける睡眠ポリグラフィーの検討

班　員　大　城　盛　夫
国立療養所沖縄病院
共同研究者　迫　田　俊　一，竹　永　　智，吉　嶺　厚　生
国立療養所沖縄病院神経内科

要　旨

筋緊張性ジストロフィーの患者にみられる睡眠構築の障害，傾眠傾向，睡眠時無呼吸に対して，終夜と昼寝の睡眠ポリグラフィーを施行し，検討を加えた。対象は当院に入院中の患者5名で，このうちの2名に日中傾眠傾向がみられており，一側前頭葉，頭頂葉，後頭葉からの脳波，眼球運動，頤筋電図，鼻腔の呼吸曲線，胸郭および腹部の呼吸運動を記録し，さらに指尖型オキシメーターで酸素飽和度（SaO_2）を測定した。総じて，終夜睡眠では中途覚醒による睡眠の分断化と stage 4 の消失，stage 1 と REM 期での主に中枢型の無呼吸および低換気による SaO_2 の低下が目立っていた。また，傾眠傾向のない二症例の昼寝に終夜睡眠でみられなかった stage 4 が出現したことが注目された。傾眠傾向のない患者が昼寝さえすれば居眠りはしないと言うように，昼寝が筋緊張性ジストロフィーの傾眠軽減に役立つ可能性が示唆された。

目　的

筋緊張性ジストロフィーは多系統変性疾患であり，日中にみられる傾眠傾向も重要な臨床症状の一つである。その他に睡眠時無呼吸や睡眠構築の障害を呈する症例も報告されており，これらの症状については，日中の傾眠傾向と肺胞低換気との関連性が指摘されたり[1]，中枢神経系そのものの異常に起因するのではないかと推察されているが[2)3)4)]，今だに不明な点も多いところである。

当院に入院している5名の筋緊張性ジストロフィー患者のうち，2名に傾眠傾向がみられており，この5名に対して昼寝時と終夜の睡眠ポリグラフィーを施行して，睡眠時の状態について検討を加えた。

対象と方法

対象は，当院に入院中の筋緊張性ジストロフィーの患者5名で，内訳は51歳と53歳の男性2人，54歳，59歳と66歳の女性3人である（表1）。全員が歩行および立位保持困難となっており，日常的に車椅子を使用している。53歳の男性と59歳の女性に以前から日中の傾眠傾向がみられている。5症例とも傾眠傾向のあるなしにかかわらず，日課として昼食後に昼寝をしている。

睡眠ポリグラフィーの記録は，一側前頭葉，頭頂葉，後頭葉からの脳波と眼球運動，頤筋電図，サーミスターによる鼻腔の呼吸曲線，ストレインゲージによる胸郭および腹部の呼吸運動の記録を行い，さらに，指尖型オキシメーター（Pulsox-8，ミノルタ社製）によって酸素飽和度（SaO_2）の記録を行った。終夜睡眠の記録は first night effect を少しでも抑えるために原則として2夜連続で行い，昼寝の記録も第2日目に行った。睡眠ステージ分類は，米国睡眠心理・生理学会 APSS (Association for the psy-

表1　Patient characteristics

Patient No.	Sex	Age (yrs)	Height (cm)	Weight (kg)	Duration of illness (yrs)	VC (l)	%VC	FEV 1.0%
1	M	51	159.2	37.5	19	2.12	60.7	78.64
2*	M	53	165.5	50.0	17	1.06	29.5	100.0
3	F	54	149.5	37.0	29	1.89	77.5	73.65
4*	F	59	150.0	44.0	21	1.29	54.5	54.4
5	F	66	142.5	31.5	29	1.04	48.4	100.0

* hypersomnia tendency

chophysiological study of sleep) の方法に基ずいたが，MT は movement time で体動による筋緊張とアーチファクトにより，判読できなかった時間である。

結　果

(1)51歳，男性例。終夜睡眠では，入眠潜時が延長し，中途覚醒しやすい。REM 期の出現は遅く，REM 期に一致して中枢型低換気による SaO_2 の低下がみられた。また，stage 4 はみられない（図1）。症例1の昼寝であるが，興味深いことに終夜睡眠でみられなかった stage 4 が出現している（図2）。

(2)53歳，男性例。終夜睡眠では，いびきが聞かれ，REM 期に閉塞型，混合型，中枢型の無呼吸と SaO_2 の低下を認める。無呼吸後，一時的に覚醒脳波がみられるが，すぐに REM 期に戻っている(図3)。昼寝では，傾眠傾向を反映して電極装着時から入眠し，いびきをかいているが，REM 期はなく無呼吸もみられない（図4）。

(3)54歳，女性例。終夜睡眠では入眠潜時が延長し，stage 4 はみられず，中途覚醒しやすい。stage 1 で中枢型無呼吸が出現し，SaO_2 の低下がみられる（図5）。昼寝では入眠が比較的早く，症例1と同様に終夜睡眠ではなかった stage 4 がみられている（図6）。

(4)59歳，女性例。終夜睡眠では入眠潜時が短く，stage 4 と REM 期がほとんどみられない。昼寝では，stage 1 で中枢型の低換気と SaO_2 の低下がみられた。

(5)66歳，女性例。終夜睡眠では中途覚醒が非常に多く，また，REM 期に SaO_2 の低下と中枢型の無呼吸がみられた。症例2と同様に無呼吸後，一時的に覚醒脳波と促迫呼吸となったが，すぐに REM 期に戻った。昼寝では stage 2 で中枢型の低換気がみられた。

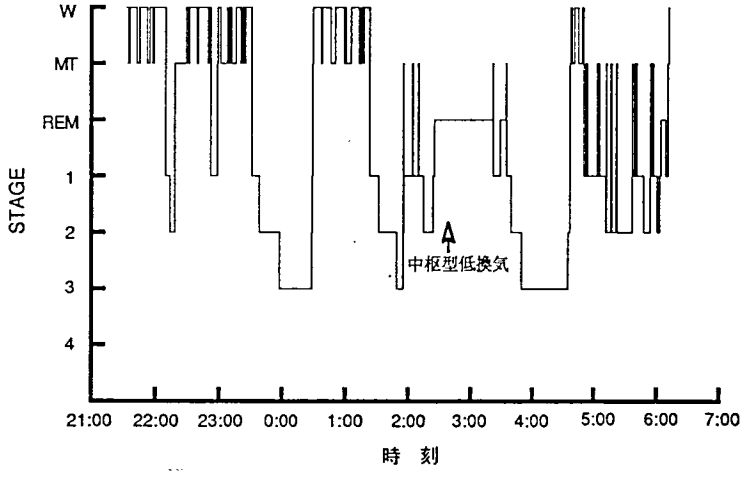


図1　51歳　男性　終夜睡眠

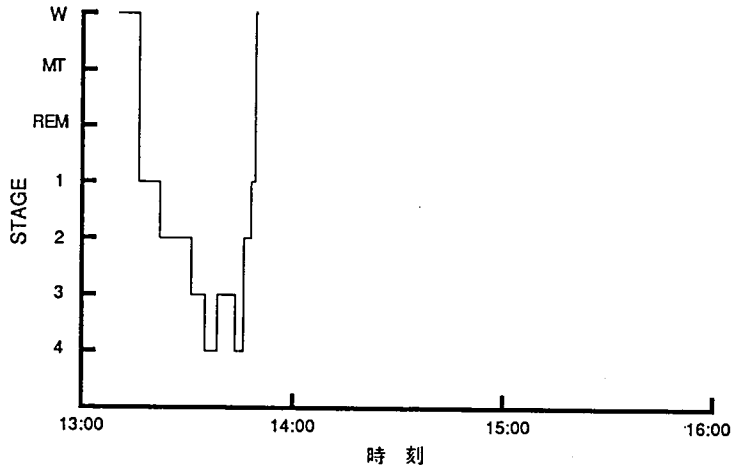


図2　51歳　男性　昼寝

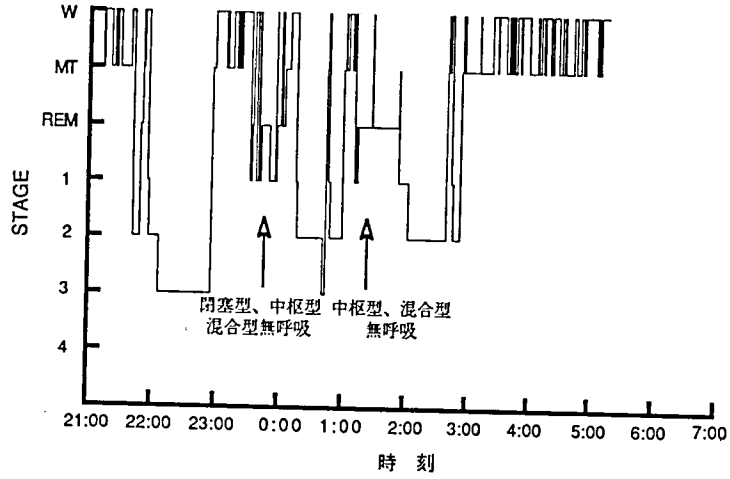


図3　53歳　男性　終夜睡眠

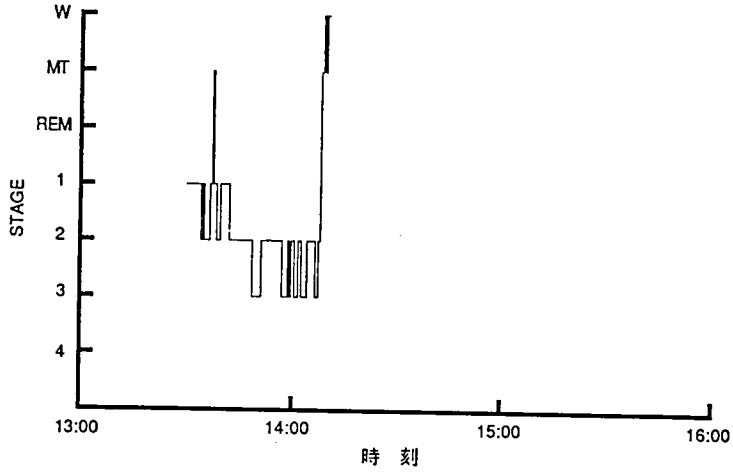


図4　53歳　男性　昼寝

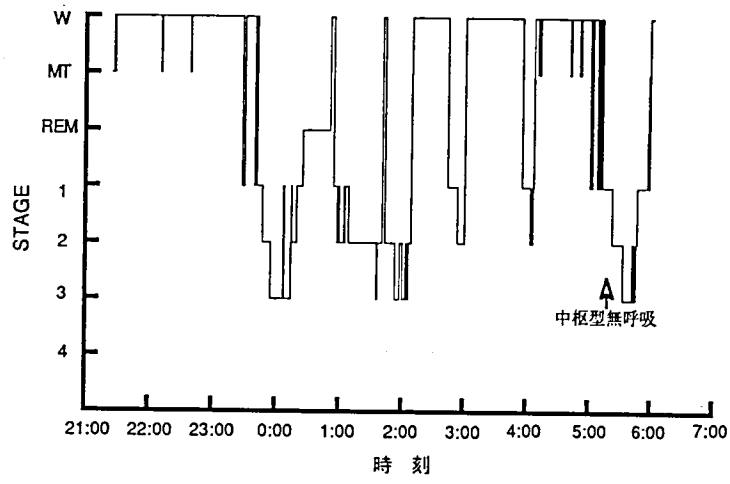


図5　54歳　女性　終夜睡眠

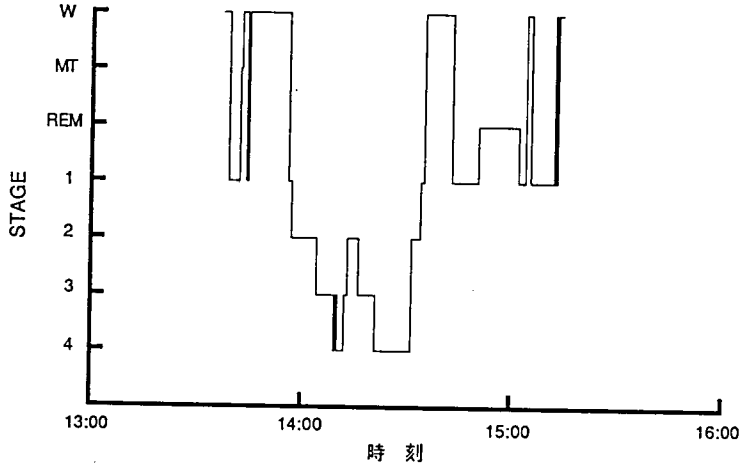


図6　54歳　女性　昼寝

考　案

筋緊張性ジストロフィー患者の睡眠構築異常の特徴として，入眠潜時の延長，高頻度の中途覚醒による睡眠の分断化，REM 潜時の短縮と REM 睡眠の減少，sleep onset REM の出現，slow wave sleep の総量は比較的保たれている，などが報告されている[2)4)5)]。また，睡眠中にみられる無呼吸，低換気としては，閉塞型，中枢型，混合型のいずれも報告されているが[2)3)4)5)]，中枢型が優位で REM 期に多いようである。

我々の検査では終夜睡眠の中途覚醒による分断化と stage 4 の消失，stage 1 と REM 期での主に中枢型の無呼吸及び低換気による SaO_2 の低下が目立っていた。しかしながら5症例とも50歳以上であり，一般に first night effect として REM 睡眠の減少と stage 1 の増加，stage 3・4 の減少が認められ，加齢現象として中途覚醒の増加と stage 1・2 の増加，Stage 3・4 と REM の減少がみられることから，さらに広い年令層にわたってデータを蓄積する必要性を感じた。

今回，日中に傾眠傾向のある患者とない患者

間の睡眠ポリグラフィー上の差異は見いだせなかったが，二症例の昼寝に終夜睡眠でみられなかった stage 4 が出現していたことが興味深く思われた。二症例とも傾眠傾向のない症例であり，傾眠傾向のない患者が昼寝さえすれば居眠りはしないと言っていたように，昼寝によって終夜の睡眠不足を充分に代償しているのであろう。ナルコレプシーと同様に，昼寝が筋緊張性ジストロフィーの傾眠軽減に役立つ可能性が示唆された。

参考文献

1) Kilburn KH, Eagan JT et al: Cardiopulmonary insufficiency in myotonic and progressive muscular dystrophy. N Engl J Med **261**: 1088, 1959

2) Coccagna G, Mantovani M et al: Alveolar hypoventilation and hypersomnia in myotonic dystrophy. J Neurol Neurosurg Psychiatry **38**: 977, 1975

3) Hansotia P, Frens D. Hypersomnia associated with alveolar hypoventilation in myotonic dystrophy. Neurology **31**: 1336, 1981

4) Broughton R. Stuss D et al: Neuropsychological deficits and sleep in myotonic dystrophy. Can J Neurol Sci **17**: 410, 1990

5) Guilleminault C, Cummiskey J et al: Respiratory and hemodynamic study during wakefulness and sleep in myotonic dystrophy. Sleep **1**: 19, 1978

筋緊張性ジストロフィーにおける脳核磁気共鳴スペクトロスコピーの検討

班　　員　秋　口　一　郎
京都大学神経内科
共同研究者　田　中　まや子[1)]，中　村　道　三[1)]，木　村　　淳[1)]
椎　野　顯　彦[2)]，半　田　譲　二[2)]
[1)] 京都大学神経内科　[2)] 滋賀医科大学脳神経外科

要　旨

磁気共鳴 spectroscopy (MRS) は核種 ^{31}P を用い種々の臨床応用が為されてきた。一方プロトン ^{1}H を使った MRS は巨大な水ピーク抑制をしなければならない事，化学シフト巾が狭い為磁場の調整を詳細にしなければならない事，異なる化学基の物質が，非常に近い化学シフトを示す為その同定が困難な事などの問題があるが，技術の改良により最近臨床応用される様になった。特に ^{1}HMRS で得られる N-acetyl-aspartate (NAA) は脳内神経細胞にのみ含まれ，神経細胞脱落や神経細胞の代謝を反映しているとされ種々の変性疾患で変化し，脳腫瘍や虚血性病変に対し有力な情報を提供する。また Alzheimer 病など痴呆を呈する一次疾患における NAA の動きが注目されている。我々は ^{1}HMRS を用い従来から報告のある筋緊張性ジストロフィー (MYD) の中枢性の変化を明らかにする目的で NAA を中心にして検討をおこなった。

対象及び方法

1．MYD 5例（15歳-50歳，平均35.6歳，男性3例女性2例）について，正常対照例24例と痴呆群9例（probable Alzheimer 病6例 probable Pick 病1例 dementia を伴う Parkinson 病2例）を対象にして，^{1}HMRS を検討した。2．関心領域は側頭葉 Insula で 3×3×3 cm 27 m*l* の部分を選択した。3．機種は1.5 tesla 超電導 MRCT, GE Signa system で routine birdcage imaging head coil を使用し，STEAM 法で行った。Tr 2500 msec, echo time 19 msec, 積算回数256回で行った。4．各各の示す spectrum のうち，最も大きいピークを示す NAA と，内部標準 creatine に対する比，NAA/CR ratio を算出し，比較検討した。

結　果

NAA/CR ratio の結果を表1に示す。表の上より3例は，convolution による補正を行い数値を算出しているが，下の2例は signal noise 比が悪い為，baseline correction によって相対値を取ると，正常から軽度低下であると考えられる。なお，この study での NAA/CR ratio の正常範囲は11.4±0.2で 95％ confidence interval が0.9から1.9までとなっている。従って，MYD 5例とも有意の低下を示している。尚 NAA 自体は加令による変化を受けるとされているが NAA/CR ratio は，加令による変化は受けない。従って，MYD 群でも痴呆群でも NAA/CR ratio に対する加令の影響は考慮しなくてよいものと思われる。痴呆群の NAA/CR ratio は0.9±0.2, MYD 3例での ratio は0.7±0.1と正常対照例の値1.4±0.2に比し有意の低下を示した。

表1 RESULT

Name	NAA/Cr	NAA/Cho	Cr/Cho	
Kinoshita Shinji	0.82	0.80	0.98	*
Amagase Kumiko	0.86	1.37	1.60	*
Amagase Masayoshi	0.64	1.13	1.77	*
Kaminakano Michiko	→～↓			**
Miura Takashi	↓			**

* convolution による
** baseline correction による

表2 Clinical Features and NAA/CR ratio in MYD

NO	AGE	SEX	DURATION	HDS	BRAIN ATROPHY	NAA/CR
1	48	F	7 yrs	Normal	+	→～↘
2	34	M	15 yrs	Normal	−*	↓
3	50	M	10 yrs	Normal	+	↓↓
4	15	F	10 yrs	Subnormal	−	↓
5	31	M	5? yrs	Normal	−	↓

>31 NORMAL
>22 SUBNORMAL
>10.5 PREDEMENTIA
<10 DEMENTIA

* Periventricular T_2lesion

滋賀医科大学椎野先生からの data では，痴呆群での臨床像と NAA/CR ratio とを対比した結果興味深い結論が得られた。NAA/CR ratio が加令による影響を受けないとされたのは前述した通りだが，その他に長谷川痴呆スケール (HDS) は痴呆群全例で低下していたが，その低下の軽い者でも，NAA/CR ratio が低下している点，病歴の長さと ratio が相関していない点，また CT scan や MRI 上脳萎縮が見られない例や SPECT によって計測した脳血流量が低下していない例でも ratio の低下が見られた点が注目された。おそらくは NAA/CR ratio は臨床症状や画像上の脳萎縮が明瞭になるよりもっと早期からの何らかの脳内神経細胞の変化を反映しているものと予想される。

表2は MYD 5例の臨床像，知的機能，病悩期間，画像上の変化と NAA/CR ratio を比較検討した結果である。痴呆群の結果と同様，長谷川痴呆スケールが正常域でも ratio の低下が見られ，CT scan, MRI 上脳萎縮が認められなくても ratio が低下しており，また病悩期間と ratio との相関ははっきりしなかった。尚，表2の case 2 は MRI 上脳萎縮は見られなかったが，側脳室周囲白質にT_2 病変を認めた。

考　察

従来から MYD の中枢病変については種々の報告があり画像上の変化，剖検脳での病理像が物語る様に MYD としての特異的な病理像は見いだされてはいないが，中枢に何らかの変化を伴うことは明白である。今回我々は ^{1}HMRS における NAA の変化を検討することにより，MYD の中枢性変化の一面を見いだした。MYD においても痴呆群と同様に，臨床的に知的機能低下が明らかになったり画像上脳萎縮が現れる以前から NAA/CR ratio は低下していた。この点はやはり早期から神経細胞に何らかの変化が起こっていることが予想される。NAA は脳以外の諸臓器にはほとんど含まれていないとされ，脳内では神経細胞にのみ認められグリア細胞には認められない。脳内の分布は monoclonal 抗体で rat の脳を染めて検討した報告

によると，染まり方は各神経細胞で均一に染まり比較的大型の神経細胞がよく染まる傾向があり，当然白質は染まらない。NAA の脳内での分布に特異性はなくトランスミッターとしての可能性は否定的だが，これだけの広範囲の分布から推すと，NAA が神経細胞の何らかの代謝や機能に関わっていることは充分予想される。現在 NAA の脳内での機能は不明であるが，神経細胞脱落や神経細胞の代謝を反映している事は確実と思われる。今回の MYD での NAA /CR ratio の低下は choline/creatine ratio が正常域であることより，内部標準である creatine の増加によるものではなく NAA 自体の低下である。NAA/CR ratio の低下自体は疾患特異性はないものの神経細胞の代謝や機能の変化が MYD においても早期から起こっていることは興味深い点であると思われ、今後症例を増やして更に検討していきたい。

文　献

1）永山素男：ヒト脳の MRS (in vivo NMR spectroscopy) とその臨床応用
臨床精神医学 **19**(12)：1817, 1990

2）M. I., Simmons, C. G. Frondoza et al: Immuno cytochemical localization of N-acetylaspartate with monoclonal antibodies. Neuroscience Vol 45 No. 1：37, 1991

3）J. Frahn, H. Bruhn et al: Localized proton NMR spectroscopy in different regions of human brain in vivo. Magn. Res. Med **11**：47 1989

4）Ingrid l, Kwee, Tsutoku Nakada et al: Elevation in relative levels of membrane unsaturated fatty acids in Alzheimer's disease: High resolution proton spectroscopic studies of membrane lipid extracts. Magn. Res. Med **21**：49, 1991

5）Robert Vink Tracy K Mclntosh et al: Nonedited ^{1}HNMR lactate/N-acetyl aspartate ratios and the in vivo determination of lactate concentration in brain. Magn. Res. Med **7**：95, 1988

Myotonic dystrophy における中枢神経障害の臨床的検討

——睡眠中動脈血酸素飽和度および安静時動脈血ガス分析と髄液中神経組織特異蛋白の関連性について——

班　員　松　岡　幸　彦
名古屋大学神経内科

共同研究者　米　山　　榮[1]，本　田　　仁[1]，杢　野　謙　次[1]
清　澤　和　弘[1]，高　橋　　昭[1]，安　間　文　彦[2]
飯　田　光　男[2]

[1] 名古屋大学神経内科　[2] 国立療養所鈴鹿病院

要　旨

Myotonic dystrophy (MyD) の中枢神経障害と呼吸障害との関連性に注目し，MyD 15例（男10例，女5例）を対象に検討した。呼吸障害の指標として，動脈血ガス分析 (ABG)，呼吸機能検査，夜間動脈血酸素飽和度連続記録を行った。MyD 患者は睡眠時無呼吸を含む夜間の低酸素状態を頻回に繰り返し，ABG においても持続的な高 CO_2 血症を示した。さらに，中枢神経障害の指標の神経組織特異蛋白の検討から，NSE 値と $PaCO_2$ の間に正の相関が見られた。今回の検討は，MyD 患者の呼吸障害（すなわち，hypoxia とこれに伴う hypercapnea）が本症の中枢神経障害の病態の一因となっていることを示唆している。

はじめに

Myotonic dystrophy (MyD) では，Thomsen[1] らの指摘以来臨床的に多くの例で dementia 様の中枢神経症状を呈することが知られている。さらに，MyD 患者では脳室の拡大，脳萎縮や[2]，大脳の細胞構築の乱れ，種々の封入体の存在，アルツハイマー神経原線維変化といった病理学的変化[3][4]とともに，脳波上の diffuse slow α pattern などの機能的変化が報告されてきた[5]。しかしながら，このような中枢神経障害の病態については不明な点が多い。昨年，我々は本班研究において神経組織損傷の指標と考えられている髄液中 neuron-specific enolase (NSE), S-100b 蛋白，CK-BB を指標とし，知能，頭部 CT などの臨床所見との対比により，MyD の中枢神経障害が神経組織損傷に起因する可能性について報告した[6]。

一方，MyD の進行例では呼吸筋群の筋萎縮，筋力低下による低換気に基づく呼吸障害を伴い，また，sleep apnea syndome (SAS) を合併する症例の存在することが報告されている[7]。今回，我々は，睡眠中動脈血酸素飽和度の連続記録と安静時動脈血ガス分析を行い，神経組織特異蛋白値をはじめとする中枢神経検査所見とも比較し，MyD の精神神経症候と呼吸障害の関連性の有無について検討を行った。

対象と方法

国立療養所鈴鹿病院に入院中の MyD 15例（男：10例，女：5例，年齢：21～57歳，平均45.9±8.4歳）を対象に以下の検討を行なった。呼吸障害の指標として，各症例の安静覚醒時の動脈血ガス分析 (ABG) と呼吸機能検査パルスオキ

シメーター（ミノルタ製 Pulsox-R7）による，夜間（pm：9：00-am：5：00）の動脈血酸素飽和度（SaO_2）の連続モニタリングを行なった。夜間の連続 SaO_2 モニタリングのデータは personal computer，(NEC，PC9801-VM2) にて解析した。また，うち5例に polysomnography を施行した。中枢神経障害の指標として，知能検査（WAIS），EEG 検査，頭部 CT 検査，髄液中 neuron-spicific enolase (NSE)，S-100b，CK-BB の測定を行なった。NSE，S-100b，CK-BB の測定および頭部 CT 検査の評価については，先に報告した方法と同様に，それぞれ enzyme immunoassay (EIA) 法[8]，CVI% (cerebral ventricular index) を用いた[9]。

結　果

1）動脈血ガス分析，睡眠中の SaO_2 連続モニタリング，polysomnography 所見

表1に MyD 例のパルスオキシメーターによる睡眠中の SaO_2 連続モニタリング，ABG の結果を示す。desaturation time/sleep time (%) は，desaturation (SaO_2 <90%) を示した一晩の延べ時間の，総睡眠時間に対する割合 (%) であり，Min. SaO_2 % は測定中の SaO_2 の最低値を示している。MyD 例の desaturation time/sleep time(%) は，12.7±24.8% (mean±SD) であり，また，Min. SaO_2 は，67.5±16.3% (mean±SD) で，最低値は18% (症例8) であった。症例13では，睡眠中に高頻度に desaturation 現象を繰り返していた（図1）。ま

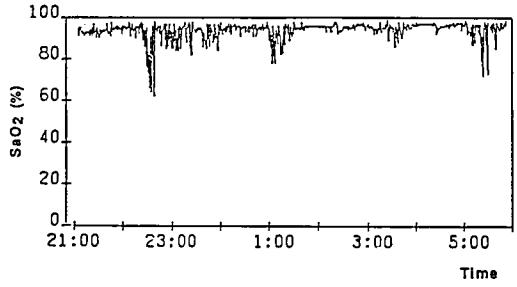


図1　SaO_2 monitoring during night in the patient with myotonic dystrophy. (Case 13)

表1　Arterial oxygen saturation (SaO_2) and arterial blood gas (ABG) during night in 15 patients with myotonic dystrophy.

Case. No.	Age	Sex	pulse oximeter		ABG		
			desaturation time /sleep time (%)	Min. SaO_2 (%)	PaO_2 (Torr)	$PaCO_2$ (Torr)	pH
1	21	F	7.9	77	82.6	47.6	7.36
2	41	M	7.6	72	65.3	51.8	7.38
3	42	M	2.8	81	78.8	50.9	7.35
4	42	M	2.9	77	69.6	59.1	7.34
5	43	M	3.2	50	87.8	50.4	7.39
6	46	M	11.4	68	64.4	50.4	7.39
7	47	M	2.6	70	87.2	59.3	7.35
8	47	M	98.2	18	59.1	51	7.33
9	48	M	2.3	75	72.1	56.7	7.34
10	49	M	3	78	90.7	48.9	7.41
11	49	F	1.7	66	71.1	48.7	7.41
12	51	M	8	77	86.7	51.8	7.36
13	51	F	7.1	60	71.6	55.7	7.38
14	55	M	0.6	82	75.9	51.8	7.37
15	57	M	31.1	61	79.1	49.5	7.34

desaturation time/sleep time (%): SaO_2<90%の総時間/全睡眠時間×100%
Min. SaO_2 (%)：睡眠時間中の SaO_2 の最低値 (%)

た，desaturation time/sleep time（%）が健常者では 1% 以下とされているが[10]，これを越える症例が15例中14例であった。昼間の安静時動脈血ガス分析の結果は，全例の平均は PaO_2 75.9±9.6 Torr (mean±SD)，$PaCO_2$ 51.8±3.7 Torr であった。

$PaCO_2$（正常35-45 Torr）は，15例すべてにおいて 45 Torr を越える値を示し，持続的な高 CO_2 血症の存在が認められた。一方，PaO_2（正常80-100 Torr）では，80 Torr 未満の低 O_2 血症が15例中10例に認められた。また，pH（正常7.35-7.45）が軽度の acidosis に傾いている例が4例みられた。呼吸機能検査においては，全例に著しい拘束性呼吸障害の型を示した。

睡眠時 polysomnography の結果では，5例中3例に上気道閉塞型，1例に中枢型の睡眠時無呼吸が認められた。また，残りの1例も睡眠時に著しい呼吸運動の抑制（低換気）が認められた。

2）知能検査，脳波，頭部 CT

WAIS 法での知能の検討では，正常 IQ を示したものは3例で，1例が境界領域 IQ（70-79），3例が70以下の IQ を示し，8例は60以下の評価不能であった。脳波検査においては，15例中12例で基礎波が slow α wave (8 Hz) と θ wave (6-7 Hz) が混在する pattern を示し，2例のみ正常所見を示した。頭部 CT では，全例に軽度から中等度の脳萎縮と脳溝の開大が見られ，側脳室拡大の程度を表す CVI%[9] については，全例において中等度から高度の側脳室拡大が認められた。髄液中 NSE 値が高値を示した12例は全例で明らかな知能低下を認めた。

3）髄液中の NSE, S-100b, CK-BB値

NSE, S-100b, CK-BB 値の測定の対照基準値は，既に報告した測定値を用いた[6]。MyD 15症例の神経組織特異蛋白値の結果は，NSE: 12.7±4.5 ng/ml, S-100b: 0.51±0.39 ng/ml, CK-BB: 0.72±0.37 ng/ml であった。対照群の mean+2SD 値 (NSE=8.5, S-100b=0.82, CK-BB=0.62) を越えるものを NSE では15例中12例（80%），S-100b では15例中5例（33.3%），CK-BB では14例中9例（64.2%）に認めた（図2）。

4）髄液中 NSE, S-100b, CK-BB 値と呼吸機能との関係

神経組織特異蛋白値と呼吸障害に関する各指標との関連を検討した結果，図3に示すように，NSE と $PaCO_2$ との間に正の相関が認められた ($R=0.649$, $P<0.001$)。NSE が最も高値を示した症例4 (NSE=21.1 ng/ml) では，Min. SaO_2 は 77% と高度の hypoxia を認め

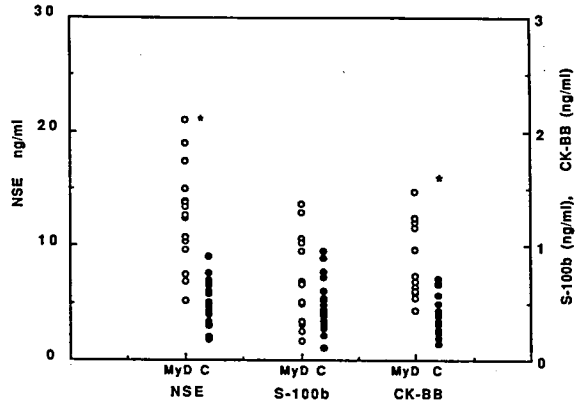


図2 Cerebrospinal fluid NSE, S-100b and CK-BB levels in 15 patients with myotonic dystrophy.
NSE: neuron-specific enolase
MyD: myotonic dystrophy
C: control subjects (n=25)
*: $p<0.001$

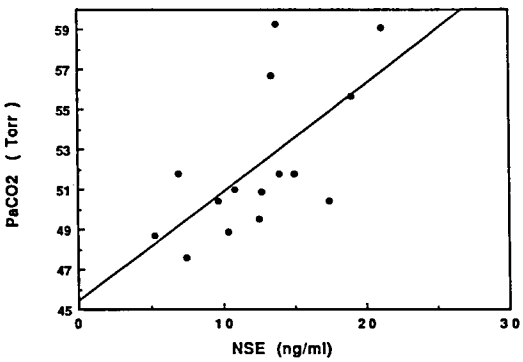


図3 Correlation between CSF NSE levels and $PaCO_2$ in 15 patients with myotonic dystrophy

た。また，症例13は，NSE が 19.0 ng/ml と上昇し，睡眠時 polysomnography にて，10秒以上の上気道閉塞型の無呼吸が 113 回観察された（図4）。

考　察

我々は MyD の精神神経症候に注目し，本症の中枢神経障害の病態について検討を加えてきた。このことに関連して，我々は既に MyD 患者について，神経組織損傷の指標と考えられている髄液中 NSE，S-100b，CK-BB 値を検討し，本症の中枢神経障害が神経組織損傷に起因する可能性について報告した[6]。一方，MyD の進行例では低換気に伴う呼吸障害がしばしば認められ，また，SAS を合併することが報告されている[7]。この MyD の呼吸障害と中枢神経障害との関連性について我々が検討した結果から，MyD 例では，昼間の低 O_2 血症に伴う高 CO_2 血症が存在するとともに，SAS を含む睡眠時の呼吸障害が高頻度に合併し，夜間の持続的な SaO2 の低下が存在するという特徴が確認された。MyD 例は進行とともに呼吸筋とその補助筋の萎縮が生じ，持続的に低換気状態を来たし，それとともに低酸素状態が続き，CO_2 の retention が生じてくることが推定される。今回対象にした MyD 例はいずれも進行例であり，呼吸機能検査で %VC の明らかな低下が全例に認められている。しかしながら，Caroll らは，筋力低下があまり進行していない MyD 例において低酸素，高炭酸ガスに対する呼吸中枢における換気応答の低下が存在することを指摘し[13]，MyD の呼吸中枢における化学受容器の感受性の低下について議論している。その意味で，MyD 例の呼吸障害の特徴は，呼吸筋萎

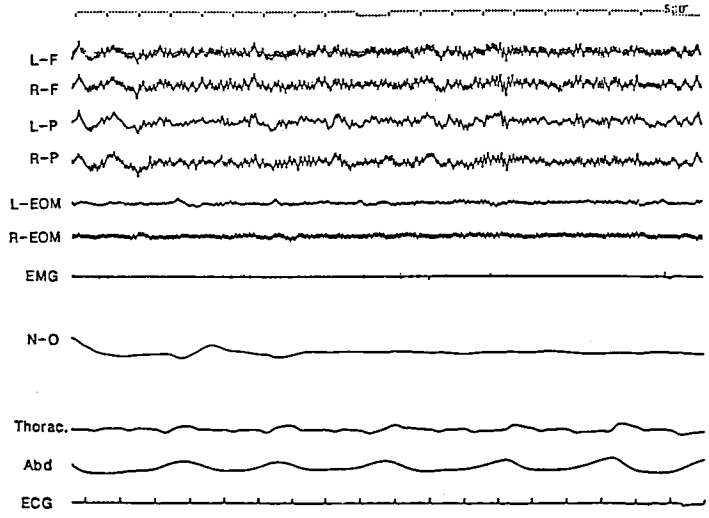


図4 Polysomnography (Case 13)
Case13：52歳，女性
N-O：naso-oral air flow
Thorac：thoracic movement
Abd：abdominal movement

縮による低換気という末梢性の要素と呼吸中枢の機能低下という中枢性要素の両面を持っている可能性がある。実際に我々が polysomnography の検討を行った5例全例に睡眠時無呼吸が認められ，過去の報告[11)12)14)]と同様に，そのパターンは，上気道閉塞型と中枢型の両方が認められた。MyD の SAS の発症のメカニズムについては未だ不明であるが，今回の検討結果からも MyD の呼吸障害は単に低換気による末梢性の要因だけでは説明が困難と思われる。

そこで，今回認められた MyD の呼吸障害と中枢神経障害の関連性について検討したところ，頭部 CT の検討では，ほとんどの症例に脳溝の開大，CVI% の高値が見られ，MyD の年齢に比し早期の脳萎縮が疑われ，EEG 検査では，症例の 80% に基礎波の徐波化が認められた。この結果は，MyD の中枢神経障害の形態的，及び機能的異常を反映している所見と考えられた。さらに，中枢神経障害の指標と考えられている髄液中神経組織特異蛋白値の検討では，明らかな呼吸障害を伴う MyD 例では，NSE が異常高値を示す例が多く，なんらかの中枢神経組織損傷を反映していることが考えられた。また，呼吸機能障害と神経特異蛋白値の関連性では，$PaCO_2$ と NSE が正の相関を示し，desaturation time/sleep time (%) が，14例で 1% を越え，そのうち10例で NSE が異常高値を認めた。

また，さらに興味あるのは，MyD 15例中12例で SAS の臨床症状として知られている昼間の hypersomnia を示し，その程度が高度なほど知能検査時の反応時間の遅延，日常臨床での意志疎通の低下傾向がみられたことである。この事実は SAS の進行例では，集中力の低下などの精神神経症状が生じるとの報告[15)]に類似する所見と考えられた。このことからも，MyD の SAS を含む呼吸障害と精神神経症状が関連があることは十分考えられる。以上の結果より，MyD の中枢神経障害は何らかの神経組織障害を伴い，かつ持続的な低 O_2 血症とこれに伴う高 CO_2 血症がこのような MyD の中枢神経障害の病態の一因をなしている可能性が示唆された。

文　献

1) Thomsen J: Toniche Krämpfe in willkürlich beweglichen Muskeln Folge in von ererbter psychischer Diposition (Ataxia muscularis?). Arch Psychiatr Nervenkr **6**: 702, 1876
2) 尾野精一：筋緊張性ジストロフィーの中枢神経の病理．神経内科 **29**: 469, 1988
3) 三竹重久，稲垣俊明ら：筋緊張性ジストロフィーの2剖検例におけるアルツハイマー神経原線維変化の出現．臨床神経 **29**: 488, 1989
4) 川沢修平，楠瀬幸雄ら：筋強直性ジストロフィー症の CT 所見について．脳神経 **36**: 737, 1984
5) Beijeersbergen RS, Van Leeuwen WS et al: EEG observations in dystrophia myotonica (Cruschmann-Steinert). Electroencephalogr Clin Neurophysiol **49**: 143, 1980
6) 松岡幸彦，米山　榮ら：Myotonoic dystrophy における中枢神経障害の臨床的検討．厚生省筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究—平成2年度研究報告書，P. 123
7) Cummiskey J, Davis LP et al: Sleep study and respiratory function in myotonic dystrophy. In Sleep apnea syndrome. ed by Guilleminault, C& Demant, WC. Alan R Liss, New York, 1978, p295
8) 加藤兼房：酵素免疫測定法と神経組織関連蛋白質．蛋白質核酸酵素 **35**: 321, 1990
9) 高橋信次：図解コンピューター断層法．第10版，秀潤社，東京，1985, p. 93
10) Yoshiko K, Okada T et al: A home monitoring for screening of sleep apnea syndrome (SAS) using pulse oximetry and APNOMONITOR®. abstr. 3rd Word Congress on Sleep apnea and Rhondropathy, 1991
11) Caroll J E, Zwillich C W et al: Ventilatory response in myotonic dystrophy. Neurology **27**: 1125, 1977
12) 安間文彦，米山　榮ら：筋強直性ジストロフィー患者の夜間低酸素血症とその治療としての経鼻的持続気道内陽圧呼吸（鼻 CPAP）の効果．神経内科，印刷中
13) 松本博之，長内　忍ら：筋緊張性ジストロフィー症における睡眠時呼吸病態．日胸疾会誌 **29**: 961, 1990
14) Fletcher EC, Bowno D: Nocturnal oxyhemoglobin desaturation following tracheostomy for obstructive sleep apnea. Am J Med **79**: 35, 1985
15) 大井元春，平井正志ら：呼吸不全の病態—睡眠時呼吸異常—．結核 **36**: 54, 1988

筋緊張性ジストロフィーにおける血圧の日内変動
—第二報—

班　員　坂　井　英　一
国立療養所道北病院
共同研究者　橋　本　和　季，黒　田　健　司
国立療養所道北病院神経内科

要　旨

昨年度の本研究報告で，我々は独歩不能で車椅子生活を余儀なくされている筋緊張性ジストロフィー患者では収縮期血圧が低下しており血圧の日内変動が小さくなる傾向があることを示した。本年度は病期の進展にともない血圧の低下が認められるかどうかを明らかにするため，歩行可能患者3例，車椅子患者5例，先天型筋緊張性ジストロフィー患者3例について24時間血圧計を使用し，その日内変動をみた。

車椅子群及び先天性群で日中・夜間を通して収縮期間血圧及び拡張期血圧が有意に低下しており病期の進展にともない血圧が低下して来ることが示された。また，歩行可能群においても血圧のコサイナーカーブが平坦化する傾向があり，筋緊張性ジストロフィーの初期変化の特徴である可能性が示唆された。

目　的

筋緊張性ジストロフィー（以下 MYD と略す）患者では，起立性低血圧や陰萎などの自律神経症状を呈することが知られているが，その研究報告は少ない。昨年度の本研究報告で，我々は独歩不能で車椅子生活を余儀なくされている MYD 患者では収縮期血圧が低下しており，血圧の日内変動が小さくなる傾向があることを携帯型24時間血圧計を用いて示した[1]。本年度は，尿中のカテコールアミンを測定し，交感神経系の機能について検討を加えるとともに，この収縮期血圧の低下が病気の進行度と平行するものかを明らかにするため，独歩可能な患者を含めて検討した。

対象と方法

対象はすべて当院入院中の MYD 患者で歩行可能（A）群3例（男性2名，女性1名，平均年齢48.7歳），車椅子（W）群5例（男性4名，女性1名，平均年齢46.4歳），先天性筋緊張性ジストロフィー（CMYD）群3例（男性2名，女性1名，平均年齢31.3歳）である。尚，CMYD 群の3例は独歩可能である。

方法は，A&D 社製非観血式携帯型自動血圧計（TM-2420）を使用し6時から21時までを昼間（DAY TIME），21時から6時までを夜間（NIGHT TIME）として，前者を15分間隔，後者を30分間隔でそれぞれ収縮期血圧（SBP）・拡張期血圧（DBP）・脈拍数（HR）を測定した。検討項目は，SBP・DBP・HR それぞれの平均値（M）と標準偏差（SD），及びコサイナー法により求めた mesor・amplitude・acrophase とした。尿中カテコールアミンはアドレナリン，ノルアドレナリン，ドーパミンの3分画を測定した。

結　果

表1，表2に各群の DAY TIME および NIGHT TIME における SBP・DBP・HR そ

表1　DAY TIME

		歩行可能群	車椅子群	先天性 MYD
SBP	M	116.00	99.80	96.67
	SD	2.16	7.57	6.18
DBP	M	85.67	71.80	70.33
	SD	4.64	5.19	3.30
HR	M	75.33	74.60	77.00
	SD	2.06	5.82	4.55

表2　NIGHT TIME

		歩行可能群	車椅子群	先天性 MYD
SBP	M	113.67	88.20	83.00
	SD	9.35	6.24	3.74
DBP	M	81.33	62.00	56.00
	SD	5.31	6.78	1.63
HR	M	66.33	57.20	58.33
	SD	5.79	6.94	9.46

れぞれの平均と標準偏差をしめす。両時間帯を通して SBP, DBP ともに車椅子群・先天性筋緊張性ジストロフィー群では歩行可能群に比較して有意に低下していることがわかる。HR については各群ともに有意差を認めなかった。

図は各群の代表的な1例ずつのコサイナー曲線である。SBP・DBP・HR のそれぞれについて mesor・amplitude・acrophase を各群間で比較検討したが, SBP とDBP の mesor でW群と CMYD 群がA群に比べ有意に低下していた。しかし amplitude と acrophase については各群間に有意差を認めず, コサイナー曲線上, 血圧を示す曲線のみがW群と CMYD 群で下方に平行移動していた。正常コントロールに比べると三群ともカーブが平坦になる傾向がみられた。

表3は尿中カテコールアミンの測定結果である。車椅子群5例と当院入院中の車椅子生活の肢帯筋ジストロフィー (LGD) 4例を測定し比較した。MYD 群・LGD 群ともに正常のサイクルと同様に夜間に低下が認められた。MYD 群の尿中アドレナリンとノルアドレナリンは正常範囲ではあるが比較的低値で, LGD 群に比較すると有意に低下していた。

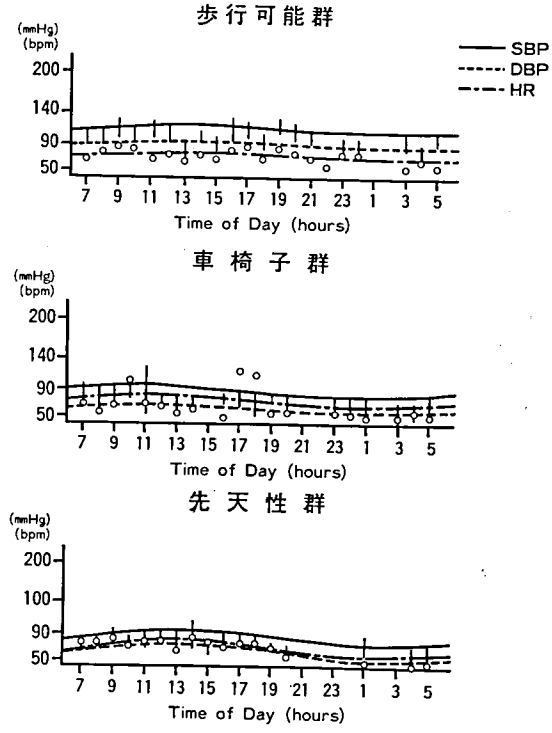


図 1

表3　尿中カテコラミン (μg/day)

		MYD	LGD
アドレナリン	DAY	4.1	14.5
	NIGHT	1.5	6.3
	TOTAL	5.6	20.8
ノルアドレナリン	DAY	43.9	95.4
	NIGHT	27.3	68.7
	TOTAL	71.2	164.1
ドーパミン	DAY	303.7	313.4
	NIGHT	125.7	200.2
	TOTAL	429.4	513.6

考　察

筋緊張性ジストロフィーにおける血圧の検討は少なく, Evans[2] や O'Brien ら[3] は低血圧とし, Church[4] は正常であると報告している。我々は, すでに独歩不能で車椅子生活の MYD 患者で正常コントロールに比べて有意に低血圧であること, そして運動障害レベルが同程度 (車椅子生活) の LGD 患者よりも低血圧であ

ることから MYD 患者における低血圧は単純に運動能力の低下に起因するものではないことを示した。本研究ではさらに，MYD 患者では，運動障害の進行にともなって血圧が低下してくることを明らかになった。また，先天性筋緊張性ジストロフィーでは歩行可能な段階でも有意に低血圧になっていることが示された。これらの結果より，MYD における血圧について論じる際には，運動障害の程度（独歩可能か車椅子か）及び病型（成人発症か先天型か）を考慮にいれて検討する必要があると考えられ，従来の報告結果の相違は，このことによる可能性があると思われる。

血圧低下の機序として，尿中カテコラミン測定の結果で比較的低値となっており交感神経系の機能低下が関与している可能性が考えられた。しかし，後藤ら[5]は副交感神経系の機能亢進を報告しており，両自律神経系のバランスの問題かも知れない。MYD では平滑筋の障害もあることが知られており，血管平滑筋自体の障害を含め総合的に判断する必要があると思われる。

本研究でもう一つ注目したい点は，コサイナー曲線の平坦化である。車椅子生活の MYD 患者では平坦化する傾向があることをすでに示したが，独歩可能群及び先天性群でも同様に平坦化することを示した。このことは病初期から認められる変化ということになり，MYD に特徴的な変化と考えられる。症例数がまだ少なく，さらに増やして検討する必要があると思われる。

結　語

筋緊張性ジストロフィーを歩行可能群，車椅子群，先天性群に分類し携帯型24時間血圧計を使用して血圧の日内変動を検討した。その結果，歩行可能群は車椅子群よりも日中・夜間を通して有意に低下しており，病期の進行にともない血圧の低下が出現するものと考えられた。

文　献

1）坂井英一，黒田健司ら：筋緊張性ジストロフィーにおける血圧の日内変動，筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究．平成2年度研究報告書，P120

2）Evans W: The heart in myotonia atrophica. Br Heart J **4**: 41, 1944

3）O'Brien T, Harper PS et al: Blood pressure and myotonic dystriphy. Clin Genet **23**: 422, 1983

4）Church SC: The heart in myotonia atrophica. Arch Intern Med **119**: 176, 1967

5）小松本悟，後藤文男：筋緊張性ジストロフィーにおける自律神経障害．神経内科　**29**: 589, 1988

Ⅱ. 臨床病態

C. 生化学・内分泌

プロジェクト研究Ⅱ　臨床病態
Ⅱ-C　生化学・内分泌

筋強直性ジストロフィー症に併発する糖尿病の実態調査

班　　員　松　永　宗　雄
弘前大学脳神経内科

班　　員　島　　功　二[1]，林　　恭　三[2]
共同研究者　奥　島　敏　美[3]，筒　井　理　裕[4]
[1] 国療札幌南病院神経内科　[2] 岐阜薬科大生物学
[3] 青森県立中央病院神経内科　[4] 弘前大第三内科

要　旨

筋強直性ジストロフィー症に随伴する多彩な症状や疾病のうち，糖尿病は古くから論じられ，治療上重要な合併症の一つである。しかし，その合併頻度も報告により大きな開きがあり，またその病因・病態にもなお未解決な点が少なくない。本年度は本症に合併する糖尿病の頻度を知るとともに，その治療上の問題点を明らかにすることに主眼を置いて自験例の分析と全国アンケート調査を行った。

自験例のうち，耐糖能検査の施行された56例では7例（13％）に糖尿病が確認された。137施設を対象としたアンケート調査では，86施設（63％）から解答を得たが，うち60施設（70％）で最近2年以内に本症を診断し，糖尿病を合併した症例があったのは34施設であった。これらの延べ症例数は619例，その中で糖尿病を伴った者が63例，糖尿病(−)が489例で，不明が67例であった。不明例を除外した552例中，11.4％とかなり高い頻度に糖尿病があったことになる。

目　的

筋強直性ジストロフィー症（myotonic dystrophy，以下MyD）は単に筋病変のみならず多彩な諸症状を伴うことは周知のところである。合併する内分泌・代謝異常のうちで，治療上重要なものの一つとして糖尿病が挙げられる。MyDにおける糖尿病の病態に関して，種々の報告がなされて来たが[1)2)]，なお未解決の問題が少なくなく，特にその治療面で一定の指針が示されていないのが実態である。

糖尿病の有病率が本邦で急速に増加している趨勢にある今日[3)]，MyDで有意に糖尿病が多いのか否かの再検討を行うとともに，その病態の把握を介して，治療上の問題点を明らかにすることを目的としてアンケート調査を施行した。

対象・方法

まず，われわれが弘前大学第三内科において診療をした自験MyD症例について検討した。耐糖能検査が施行された56例を対象とした。

次に，筋ジス研究班（第3班を中心に）の班員および各大学の神経内科，更に一部の内科・小児科を対象としたアンケート調査（第一次）を施行した。第一次調査では，平成2年度以降に受診したMyD症例数，そのうちの糖尿病合併例数とその臨床的重症度について問い合わせた。この調査をスクリーニングとし，第二次調査を行って糖尿病合併症例の個人票を作成する予定としている。

結　果

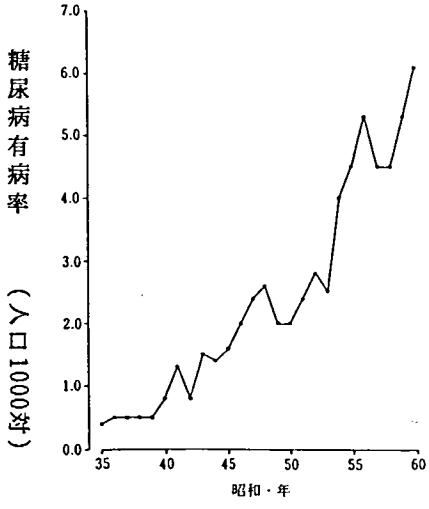
①自験例の実態：耐糖能チェックがなされたMyD 56例中，7例（13％）に糖尿病の合併が確認された。糖尿病を臨床的に判断して，うち2例が重症，3例が中等度，2例が軽症であった。49例は非糖尿病と判定されたが，その中に

表1　筋強直性ジストロフィー症における耐糖能異常の頻度

Diabetes in Myotonic dystrophy		Cases	DM	(%)	impaired GTT
Thomsen	(1948)	101	0	(0.0)	
Klein	(1958)	241	7	(2.9)	
Drucker	(1961)	40			7
Walsh	(1970)	20			3
Barbosa	(1974)	29	2	(6.9)	
Harper	(1976)	169	11	(6.5)	
	*control	122	2	(1.6)	
Araki	(1983)	19	1	(5.3)	
Saita	(1986)	764		(8.4)	(35%)
Matsunaga	(1991)	552	62	(11.4)	
		56	7	(12.5)	

表2　本邦における糖尿病有病率
Incidence of Diabetes in Japan
(Uehata, Kuzutani et al ; 1989)

		Area	Objects (n)	Incidence (%)
Kitazawa	(1983)	Tokyo	5170	M : 4.0　F : 2.2
Morita	(1984)	Rural Area	4820	M : 5.1　F : 3.6
Yoshizawa	(1985)	Nagano	1646	M : 2.8　F : 1.5
Tohyama	(1988)	Nagasaki	3380	M & F 4.5



厚生省：国民健康調査より

図1　本邦糖尿病有病率の推移

は血糖曲線が二峰性パターンを呈したり，反応性低血糖やオキシ過血糖などの異常を示した症例が含まれていた[1]。

②第一次アンケート調査成績：アンケートを送付した137施設のうち86施設（63%）から回答が得られた。そのうち，MyD 症例なしの回答が24施設，症例ありが60施設，その他・不明が2施設であった。MyD ありと答えた60施設中で糖尿病合併例ありの回答は34施設，合併例なしは26施設であった。

以上のアンケート調査で，回答を得た施設全体における MyD の総症例数は619例であった。その中で糖尿病の有無が不明であった67例を除く552例中，63例（11.4%）に糖尿病が見られた。489例（88.6%）は糖尿病の合併がないと判定された。合併した糖尿病の重症度は，重症3例，中等症15例，軽症35例，程度不明3例の内訳であった。

考　察

MyD のかなりの数の症例に高インスリン血症を伴うことは広く知られている。反面，本症に糖尿病がしばしば併発することもかなり以前から指摘されてきた事実である。一見正反対にも見える二つの事柄には関連がある可能性が高い。すなわち，受容体の感受性低下などによって惹起された高インスリン血症が持続しているうちに，膵のラ氏島を疲弊を来して遂にはインスリン分泌不全を招くという図式が想定される。実際，MyD に糖尿病を併発した例の大半はインスリン分泌は不良であり，また罹病期間の長い者が多い傾向にある[4]。無論，中にはMyD 発症早期から，あるいは MyD の存在に気づかれるより前に糖尿病に罹患している症例も散見される。かかる例は偶然の両者の合併であるのか，やはり大半の例と同様，両者間に因果関係を認め得るのかはなお十分な検討を要する。

MyD に合併する糖尿病の頻度に関する報告のデータはまちまちであるが，国による差，時代による推移も念頭に入れねばならず単純に比較することは困難である。コントロール群と対比させた報告は Harper[5] によるもののみで，これによれば MyD に有意に多いと結論された。しかし，コントロール群設定の仕方によって著しく結果が異なる懸念も否定出来ない。本邦について云えば，一般社会における糖尿病有病率が年々増加している[3)4)]中では，MyD においての糖尿病合併率との対比は容易ではない。今回のアンケート調査では，糖尿病合併率が 11.4％と高値であった。しかし，糖尿病の有無に着目して調査をすれば，高めに出るきらいがあるのは否めず，また母集団となる MyD全体の年齢構成は調査し得ず，対比すべくコントロール群を設定出来なかった。従って，直ちに MyD では糖尿病が有意に多いと結論付けることは論旨の飛躍であろう。

また，MyD に合併する糖尿病が，非 MyD 糖尿病者の成人型のそれと質的な差があるかといえば，その可能性は小さいと考えられている。しかし治療上の問題点として，自験例から指摘されることは，糖尿病や食事療法に対する理解が不十分で，説明をよく飲み込めないかあるいは関心を示さないことであった。これは，MyD における性格の偏奇や知能低下が主因と考えられた。そのため食事療法が守れず，また次第に受診が不規則となり，コントロールが悪化して行く傾向にあった。しかし，アンケート全体の症例中で糖尿病が重症化していた症例の比率は意外に低かった。今後，個々の症例のデータ集積との分析によりこれらの点の解明を試みたい。

結　語

筋強緊性ジストロフィー症における糖尿病合併率について検索した。自験例56例中では 7 例（13％）に，全国アンケート調査では 552 例中 63例（11.4％）に糖尿病の合併が見られた。しかし，これが非 MyD 者に比し有意に多いか否かは直ちに判断し得なかった。

参考文献

1）松永宗雄，増田光男ら：筋強直性ジストロフィー症の耐糖能異常にかんする臨床的検討．筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究．昭和59年度研究報告書．1985, p. 209.

2）斎田恭子，東　理ら：筋緊張性ジストロフィー症の遺伝・疫学　第Ⅱ報；重症度と糖代謝異常，発病年齢，罹病期間の関連．筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究．昭和61年度研究報告書，1987, p. 71.

3）後藤由夫：日本の糖尿病の疫学．日本臨床　48（1990年増刊号）：217, 1990

4）松永宗雄，奥島敏美ら：筋強直性ジストロフィー症の臨床経過；耐糖能・心電図異常と罹病期間について．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62年度研究報告書．1988, p. 66.

5）Harper, PS : Endocrine abnormalities in myotonic dystrophy. in Myotonic Dystrophy. Saunders, Philadelphia, 1979, p. 126.

シビレエイ電気器官からのジストロフィン タンパクの精製の試み

班　員　林　　恭　三
岐阜薬科大学分子生物

共同研究者　庄　司　浩　気[1]，野　元　　裕[1]，太　田　光　熙[2]
[1] 岐阜薬科大学分子生物　[2] 国立療養所宇多野病院臨床研究部

要　旨

ジストロフィンの生理的機能を解明する目的で，カリホルニア産シビレエイの電気器官からのジストロフィンタンパクの精製を試みた。cDNA より推定されるヒトジストロフィンタンパクの部分ペプチドを6種合成し，それらに対する抗血清を作製した。それらのうち，C末端側の表面膜の糖タンパク質と結合し膜の構造保持に機能すると考えられる部分のペプチドに対するものが，シビレエイジストロフィンとよく反応した。そこで，これを用いて電気器官ホモジネート中のジストロフィンタンパクを免疫沈降させ，ゲルろかによりジストロフィンを SDS-PAGE でほぼ1本のバンドとして精製することができた。このとき，SDS-PAGE での移動度はヒトジストロフィンと一致しなかった。

目　的

ジストロフィンタンパクの生理的ならびに生化学的諸性質の詳細については，現在不明な点が多い[1)2)]。一方，シビレエイ電気器官中には，他の動物骨格筋に比較して，多量のジストロフィンが含まれている[3)]。

そこで我々は，ジストロフィンの生理的機能を解明する目的で，カリホルニア産シビレエイの電気器官からのジストロフィンタンパクの精製を試みた。電気器官は，ニコチン性アセチルコリン受容体（AChR）の精製に広く用いられ，さらにそこから精製された AChR については盛んに研究が進められており[4)5)]，ジストロフィンタンパクの構造と機能との関連を明らかにする上で有用なモデルとなり得ると考えられる。

方　法

cDNA より推定されるヒトジストロフィンタンパクの一次構造に基づき，hydropathy 分析の結果，親水性と推定される，6種のペプチドを固相法により合成した（図1）。これらは，N末端から1番目のリピート部分（R1，アミノ酸457～476），2番目のリピート部分（R2，アミノ酸489～508），5番目のリピート部分（R5，アミノ酸765～785），8番目のリピート部分（R8，アミノ酸1102～1121），9番目のリピート部分（R9，アミノ酸1157～1201），およびC末端側の表面膜の糖タンパク質と結合し膜の構造保持に重要な役割を果たしていると考えられている部分（アミノ酸3632～3673）である。リピート1～9の5種類のペプチドについてはチログロブリンと結合させたものを，C末端側のペプチドはそのままを抗原として家兎に免疫し，抗血清を得た。

シビレエイの電気器官を 0.75 mM benzamidine, 0.1 mM A-PMSF, 67.5 TIU aprotinin を含む 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4（R緩衝液）中でホモジナイズ（15000 rpm, 30秒5回，4℃）し，低速遠心分離後（3000 rpm, 10分，4℃），上清をさらに超遠心分離し（30000

1. Dystrophin peptide **457-476**

   Lys-Glu-Leu-Asn-Asp-Thr-Leu-Thr-Lys-Thr-Glu-Glu-Arg-Thr-Arg-Lys-Met-Glu-Glu-Glu

2. Dytstrophin peptide **489-508**

   Gln-Val-Gln-Gln-His-Lys-Val-Leu-Gln-Glu-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Gln-Val-Arg-Val-Asn

3. Dystrophin peptide **765-785**

   Ala-Ileu-Glu-Arg-Glu-Lys-Ala-Glu-Lys-Phe-Arg-Lys-Leu-Gln-Asp-Ala-Ser-Arg-Ser-Ala-Gln

4. Dystrophin peptide **1102-1121**

   Gln-Phe-Ser-Leu-Asn-Ser-Val-Asn-Glu-Gly-Gly-Gln-Lys-Ileu-Lys-Asn-Glu-Ala-Glu-Phe

5. Dystrophin peptide **1157-1201**

   Glu-Lys-Thr-Val-Ser-Leu-Gln-Lys-Asp-Leu-Ser-Glu-Met-His-Glu-Trp-Met-Thr-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Tyr-Leu-Glu-Arg-Asp-Phe-Glu-Tyr-Lys-Thr-Phe-Asp-Glu-Leu-Gln-Lys-Ala-Val-Glu-Glu-Met-Lys

6. Dystrophin peptide **3632-3673**

   Lys-Leu-Leu-Arg-Gln-His-Lys-Gly-Arg-Leu-Gly-Ala-Arg-Met-Gln-Ileu-Leu-Glu-Asp-His-Asn-Lys-Gln-Leu-Glu-Ser-Gln-Leu-His-Arg-Leu-Arg-Gln-Leu-Leu-Glu-Gln-Phe-Gln-Ala-Glu-Ala

図1　化学合成したヒトジストロフィンタンパクの部分ペプチド構造

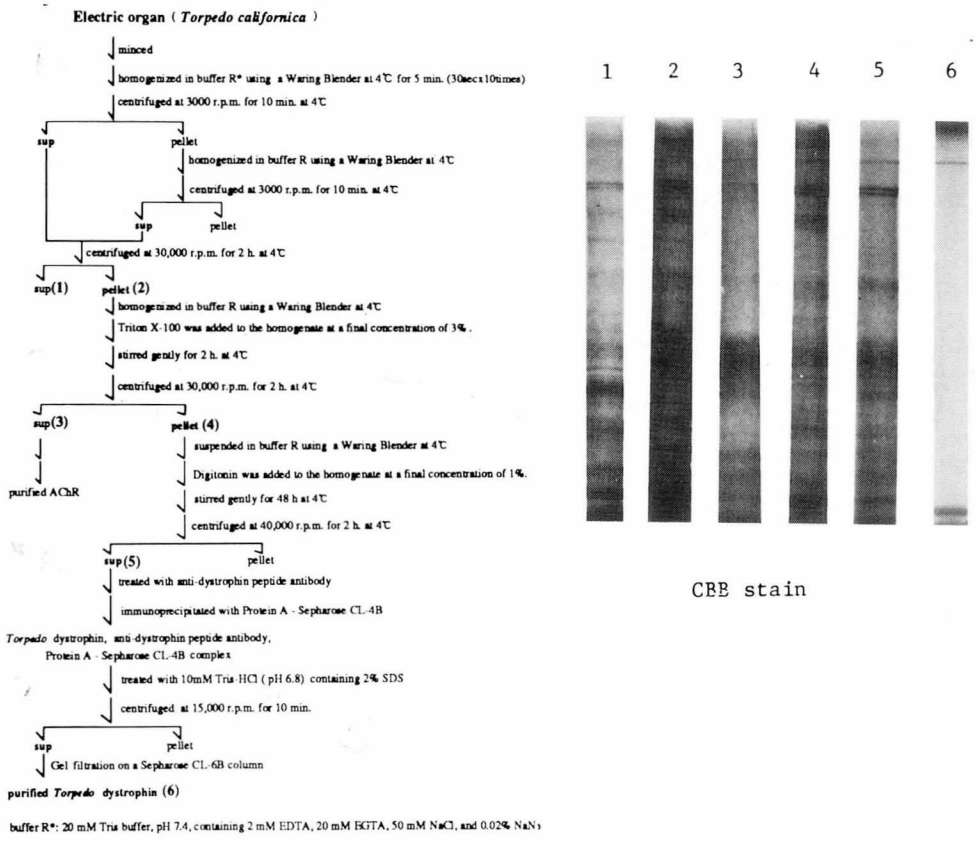


図2　*Torpedo* ジストロフィンの精製手順と精製過程における電気泳動パターン

rpm, 1時間, 4℃), その沈澱を3% TritonX-100 を含むR緩衝液で可溶化した。さらに超遠心分離し (30000 rpm, 1時間, 4℃), その沈澱を1% digitonin を含むR緩衝液中でホモジナイズ化し, 超遠心分離 (30000 rpm, 1時間, 4℃) して上清を得た。これに抗体を加え, 1時間, 4℃ でインキュベート後, Protein A-Sepharose を加えてさらにインキュベーションを続け, ジストロフィンタンパクを免疫沈降させた。沈降物を2% SDS を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で処理して解離後, 上清を Sepharose CL-6B によりゲルろかした。

結果及び考察

合成ペプチド抗体6種類のシビレエイジストロフィンに対する反応性を, イムノブロット法により検討した結果, R2 および R9 ペプチドに対する抗体, さらにC末端側ペプチドに対する抗体の反応性が高かった。また, ヒトおよびマウス骨格筋ジストロフィンの場合には, R9 ペプチドに対する抗体が強く反応した。そこで, C末端側ペプチドに対する抗体を用いてジストロフィンタンパクの精製を試みた。1% digitonin を含む緩衝液に可溶化した試料に, この抗体を加え, さらに Protein A-Sepharose を加えてジストロフィンタンパクを免疫沈降させ, 沈降物を解離後, Sepharose CL-6B でゲルろかして, ジストロフィンを SDS-PAGE でほぼ1本のバンドとして精製することができた (図2)。このとき, SDS-PAGE での移動度はヒトジストロフィンと一致しなかった。

今後, さらに効率の良い精製法を検討するとともに, 得られたジストロフィンを用いて, その生理化学的諸性質を検討したいと考えている。

文　献

1) Jasmin B, Cartaud A. et al.: Asymmetric distribution of dystrophin in developing and *Torpedo marmorata* electrocyte : Evidence for its association with the acetylcholine receptor-rich membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87** : 3938, 1990

2) Lidov H., Byers T. et al. : Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. Nature. **348** : 725, 1990

3) Chang H., Bock E. et al. : Dystrophin in electric organ of *Torpedo californiea* homologous to that in human muscle. J. Biol. Chem. **264** : 20831, 1989

4) Sealock R., Butler M. H. et al. : Localization of dystrophin relative to acetylcholine receptor domains in electric tissue and adult and cultured skeletal muscle. J. Cell Biol. **113** : 1153, 1991

5) Galzi J.-L., Revah F. et al. : Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor : from electric organ to brain. Annu. Rev. Pharmacol., **31** : 37, 1991

血清 CA-Ⅲ 測定の普及にむけて，多施設での臨床検討

班　員　島　　功　二
国立療養所札幌南病院神経内科

共同研究者　引地敬二[1)]，日比　望[1)]，塚田　裕[1)]
吉田一人[2)]，森若文雄[2)]，田代邦雄[2)]
武井麻子[3)]，中根一好[3)]，土井静樹[3)]
柳原哲郎[4)]，深沢俊行[4)]，浜田　毅[4)]
伊藤和則[5)]

[1)] SRL 研究部　[2)] 北大神経内科　[3)] 国療札幌南病院
[4)] 北祐会神経内科病院　[5)] 美唄労災病院神経内科

目　的

炭酸脱水素酵素アイソザイムⅢ型（CA-Ⅲ）は，骨格筋に多量かつかなり特異的に存在することから新しい筋疾患マーカーとして注目されている[1)]。CA-Ⅲ は骨格筋中，Type Ⅰ fiber に多く局在することから，Type Ⅰ fiber の異常を良く反映するマーカーとなりうることが期待され[2)3)]，また心筋では含量が非常に少ないため，急性期心筋梗塞患者で高 CK 血症を示す症例でも CA-Ⅲ は正常範囲にとどまることが多く CK，ミオグロビンなど従来のマーカーと異なる特徴を有する[4)]。昭和60年度，筋ジス第3班（西谷班）での CA-Ⅲのワークショップにおいて新しい筋疾患マーカーとして CA-Ⅲ がおおむね受入れられるところとなったが，いまだ全国レベルでの普及にはいたっていない。そこで今回，SRL 研究部と共同でいままでの ASSAY 系[5)] に検討を加え，さらに全国レベルでの普及にむけてパイロットスタデーとして4施設での臨床症例の検討を施行した。

方　法

血清 CA-Ⅲ の測定；既に我々が報告した方法，即ちマイクロプレートを固相とし，peroxidase を標識酵素とするサンドイッチ ELISA 系[5)] において精度向上のため Assay Buffer と検体希釈液に若干の変更を加え測定を行なった（図1）。本 ASSAY 系は，再現性，定量性ともに満足のいくものであった（図2）。患者より得た血清は，直ちにデープフリーザーにて凍結保存し1週間毎に SRL 研究部に送付し，毎週まとめて測定を行なった。

検討対象；国立療養所札幌南病院，北大医学部神経内科，北佑会神経内科病院，美唄労災病院神経内科の4施設で神経内科外来及び入院患者を対象に平成3年2月よりスタートし以後，継続して血清 CA-Ⅲ 測定用の採血を施行した。CK，CK-ISOZYME，GPT，GOT，ALP，LDH，LDH_1〜$_5$，ALDOLASE，LAP，a—HBD など，他の血清諸酵素についても必要に応じて CA-Ⅲ との比較検討のため測定した。また一部の病院では，悪性腫瘍や肝炎，その他の一般内科疾患患者も検討範囲に加えた。血清 CA-Ⅲ の正常範囲を求めるために健常と思われる SRL 職員（101名）の血清を用いた。

結　果

健常成人の血清101件（男54件，22—52才，女47件，21—40才）の血清 CA-Ⅲ は全例 40 ng/m*l* 未満であり性差は認められなかった。その分布は対数正規分布に近く基準値は，25 ng/

アッセイ・プロトコール［ELISA 法］

1）抗 CA-III 特異抗体の固相［10 μg/ml（PBS にて調製）：100 μl/well 分注）イムノアッセイ用プレートにて室温・1時間固相

↓

2）Blocking：抗 CA-III 特異抗体をプレートより回収後，Blocking 剤を 100 μl/well 分注し，室温・1時間 Blocking

↓

3）一次反応：Blocking 溶液を捨て，Standard・検体調製液を 100 μl/well 分注後，室温・2時間反応

［標準抗原を各濃度（0.1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/ml）に Assay buffer にて調製したもの］

［被検血清は Assay buffer にて10倍希釈したもの］

：各 Duplicate assay

↓

4）洗浄：一次反応液を捨て，Washing buffer にて3回洗浄

↓

5）二次反応：POD 標識抗体希釈液にて POD 標準抗 CA-III 抗体を希釈調製し（X1/50—X1/500），その調製液を 100 μl/well 分注後室温・2時間反応

↓

6）洗浄：二次反応液を捨て，Washing buffer にて3回洗浄

↓

7）三次反応：OPD diluent にて OPD を 2 mg/ml に使用時調製し，100 μl/well 分注し室温・5～10分反応

↓

8）反応停止：1N HCl を 10 μl/well 分注

↓

9）吸光度測定：イムノリーダー（490 nm）にて測定

注1）検出限界：0.2 ng/ml（0濃度における吸光度の平均値±2SD）

注2）測定下限値：0.5 ng/ml（0濃度における吸光度の平均値±4SD）

注3）報告下限値：1.0 ng/ml（血清濃度 10 ng/ml）［再現性が10%以下を示す下限値］

注4）健常人による基準値測定は測定下限値（0.5 ng/ml）にて行い，血清濃度 5 ng/ml まで測定した。

図 1

ml 未満と計算された（図3）。平成3年11月のデータ解析の時点で総検体数は 844 件でその内訳は神経疾患 392 件，神経筋疾患 311 件，一般内科疾患 141 件であった（図4）。患者数と疾患の範囲を増やしても高度の血清 CA-III 高値（100 ng/ml 以上）を示す疾患は，多発筋炎，種々の進行性筋ジストロフィー，ミオグロビン尿症，筋外傷などの筋疾患が圧倒的に多く，いままでの小規模での検討結果とおおむね異同はなかった。主要疾患別データを図5に示したが，多発筋炎，種々の進行性筋ジストロフィーの他では，運動ニュウロン疾患，特にクーゲルベルグ・ウェーランダー病で軽度～中等度高値を示すことが多かった。種々の先天性ミオパチーでは，血清 CA-III は正常範囲に分布していた。パーキンソン病の1例で血清 CA-III の高度高値が認められたが臨床経過を調べたところ転倒による筋外傷がはっきりしておりその後の同一患者の経時的検索で正常値に復していることからこの症例は筋外傷として分類した。一般内科疾患において肝炎，肝癌，肝硬変などの肝疾患（38例）では，有意と思われる血清 CA-III の変動は認められず，図4に示した他の内科疾患（103例）でも血清 CA-III の高値例は認められなかった。なお CA-III は微量ながら赤血球中にも存在することから溶血の強い検体は，

【再現性】

単位：ng/ml

	試料	N	$\bar{X}$	SD	CV/(%)
Intra-Assay Variance	A	9	50.1	1.69	3.37
	B	9	118	5.73	4.86
	C	9	523	43.3	8.28
Inter-Assay Variance	D	5	45.4	3.76	8.28
	E	5	121	7.63	7.14
	F	5	571	53.3	9.33

【定量性】

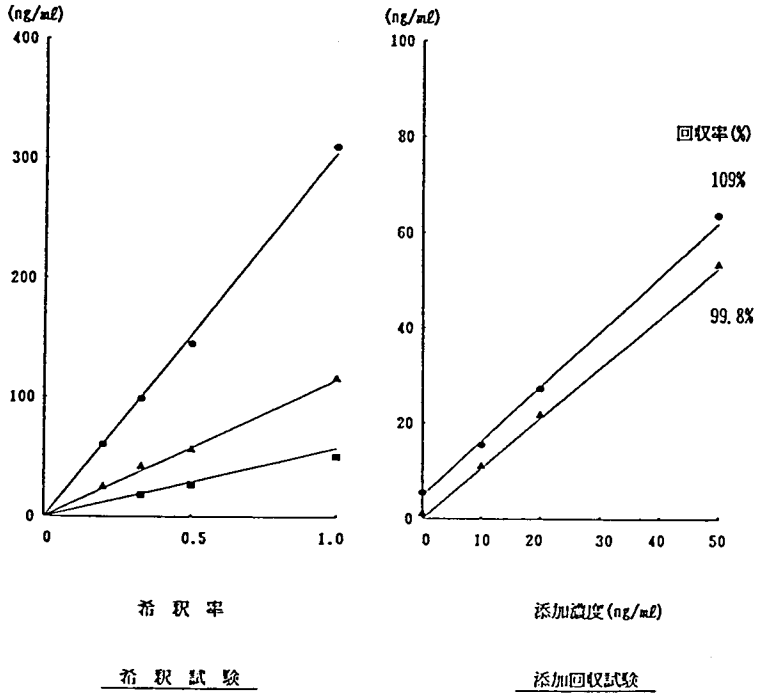


図 2

擬陽性を示し注意が必要であった。そのため強溶血検体は，検討データから除外した。

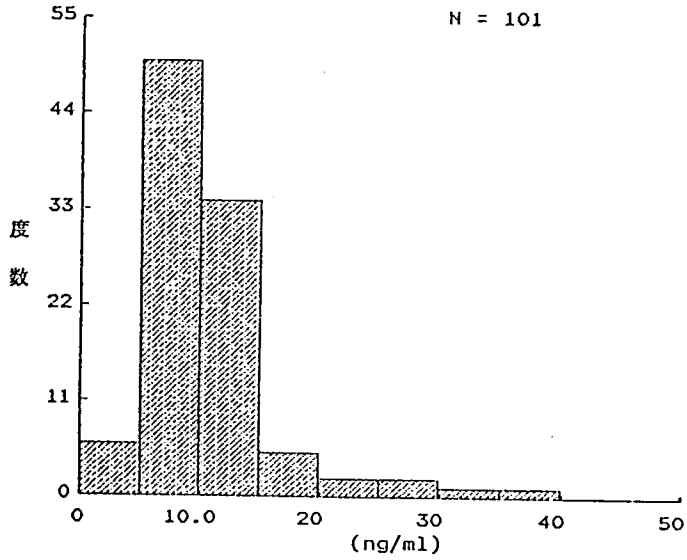
結　論

筋疾患患者の血清 CA-III 測定を普及させる目的で SRL 研究部と共同で血清 CA-III ASSAY の精度の再検証と，多施設にまたがる患者血清の測定を行なった。その結果，いままでの小規模での検討結果と，ほぼ異同はなく CA-III が心筋障害や肝障害にも影響されない骨格筋特異のマーカーとして有用であることが確認された。今後全国的に臨床応用が可能となるように努力していきたい。

文　献

1) Shima, K.: Human muscle carbonic anhydrase III (CA-III)-Purification, Immunohistochemical localization in the human skeletal muscle and its clinical application to the neuromuscular diseases., 北海道医学雑誌, **59**: 98, 1984

健常成人分布



＜炭酸脱水素酵素III＞

【基準値】

検査方法：ELISA 法

標　　本：健常成人の血清　101件

（男54件22～52才，女47件21～40才）

分　　布：対数正規分布

基 準 値：25 ng/m*l* 未満（確率紙による 95% 信頼限界）

図　3

1）神経疾患（392）；

脳血管障害 27，パーキンソン病 50，多発性硬化症 32，脊髄小脳変性症 27，てんかん 12，本態性振戦 7，筋緊張性頭痛 12，その他 225

2）神経筋疾患（311）；

筋疾患：

進行性筋ジストロフィー 16，筋緊張性ジストロフィー 29，多発性筋炎 87，皮膚筋炎 5，その他のミオパチー 35

神経筋接合部：

重症筋無力症 63，EATON-LAMBERT 1

末梢神経：

多発性神経炎 10，多発性単神経炎 3，CIDP 6，GBS 2，CMT 3

運動ニュウロン疾患：

筋萎縮性側索硬化症 15，脊髄性進行性筋萎縮症 4，KW 5，その他 27

3）一般内科疾患（141）；

膠原病 6，感染症 11，肝障害 18，肝臓癌 20，肺癌 14，乳癌 2，その他 70

検体総数 844件

図4　対象患者内訳

主要疾患別データ

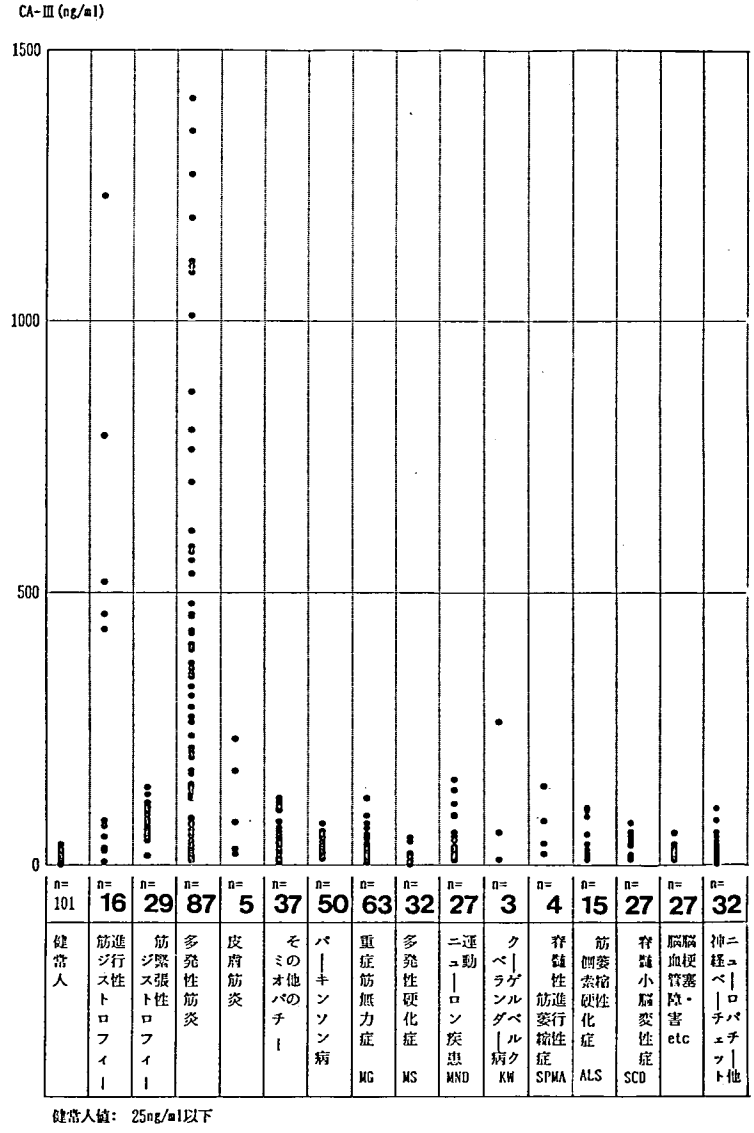


図 5

2) Shima, K., Tashiro, K., et al.: Carbonic an hydrease- III Immunohistochemical localization in Human skeletal muscle., Acta Neuropathol (Berl), **59**, 237, 1983

3) Mokuno, K., Riku, S., at al.: Serum carbonic anhydrase III in myotonic dystrophy. Muscle & Nerve, **9**: 257-260, 1986

4) 島 功二, 日比 望, ほか: CA-III の臨床応用に関する検討—急性期心筋梗塞多数例における経時的血清 CA-III 値の検討. 厚生省神経疾患研究委託費, 筋ジストロフィー症の疫学, 病態および治療開発に関する研究, 昭和62年度研究報告書, 1988, p. 174

5) Hibi, N., Shima, K., et al: Development of a highly sensitive enzyme immunoassay for serum carbonic anhydrase-III., J. Neuro. Sci., **65**: 333, 1984

筋萎縮マウス (wobbler) の脊髄蛋白異常について

班　員　松　永　宗　雄
弘前大学脳研神経内科

共同研究者　冨　山　誠　彦[1)]，倉　橋　幸　造[2)]
[1)] 弘前大学第3内科　[2)] 青森県立中央病院神経内科

要　旨

Wobbler マウス（常染色体劣性遺伝）は脊髄前角細胞の変性，脱落を呈し，脊髄性筋萎縮症のモデル動物と考えられている。今回，脊髄蛋白を2次元電気泳動法により検討した。2カ月齢の wobbler マウスおよび健常同胞マウスを各々6匹用いた。wobbler マウスで等電点 (pI) 6.2, 分子量 (Mr) 33 kDa の特異的な異常蛋白を見出した。また，wobbler で glial fibrillary acidic protein の増加と pI 5.7, Mr 48 kDa で隣り合う蛋白の増加を認めた。それぞれの蛋白異常に遺伝的に対応する蛋白は正常群では確認できなかった。しかし，wobbler で特異的に認められた蛋白は微量であり，本検討では遺伝的に対応する蛋白は見出せなかった可能性がある。この蛋白は生化学的な wobbler の指標として発症前診断に有用であると考えられる。また本モデルの病態解明に結びつくものとも考えられ，今後の検討の課題となろう。

はじめに

wobbler マウスは脊髄前角細胞の変性，脱落を呈し，生後4週頃より，前肢，頭部および頸部筋の神経原性筋萎縮が明らかになってくる。脊髄性筋萎縮症のモデル動物と考えられており，遺伝形式は常染色体劣性である[1)]。本モデルの遺伝マーカーは知られておらず，脊髄前角細胞の選択的変性の原因は明かとなっていない。本研究では，wobbler マウスの蛋白異常の検出を主たる目的とし，本モデルの組織学的特徴である前角細胞の空胞変性の最も顕著な頸髄[1)] の蛋白パターンを2次元電気泳動法により検討した。

対象および方法

wobbler マウスは Cleveland Clinic 由来で，自家繁殖したものをもちいた。前肢筋萎縮が明らかとなる2カ月齢の wobbler マウスの6匹およびコントロールとして同性，同齢の健常同胞マウスを使用した。ネンブタール麻酔下に心腔穿刺し，生理食塩水で灌流，屠殺した。屠殺後速やかに頸髄 (C1～C8) を摘出し，直ちに液体窒素にて凍結した。−70 °C 下に保存した。メタノール：クロロホルムの1：1溶液で磨砕し，脱脂した。以後の試料作製操作および電気泳動法は記載したもの以外は O'Farrell の方法[2)] に従った。超音波処理を行なった後，凍結乾燥し，湿重量の5倍量の lysis buffer [9.5M urea, 2% v/v Nonidet P-40, 2% v/v Biolyte (pH 5-7/pH 3-10=4/1), 5% β-mercapto-ethanol] に溶解し，DNAase 溶液 (1 mg/ml in 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$) を DNAase 濃度が 50 μg/ml となるように加えた。546,000 g にて10分間，20°C で遠心し，可溶性画分を得た，10 μl (脊髄湿重量 2 mg に相当) のサンプルを電気泳動に供した。ゲルは銀染色を行ない，乾燥後，wobbler マウスとコントロールマウスで蛋白スポットの位置および濃度を比較した。

結　果

1次元等電点電気泳動の範囲は pH 4.8 から 6.8 であった。全てのゲルに共通して 157 個の蛋白スポットが認められた（Fig. 1）。

スポットの位置に関しては，認められる全てのスポットを対象に，スポットの濃度に関しては，全てのゲルに共通して認められた 157 の蛋白スポットに対し，wobbler とコントロールとで検討した。

wobbler とコントロールのあいだで蛋白スポットの位置の差異を 1 カ所認めた（Fig. 1a, 2a）。この蛋白スポット（スポット 1＝S1）は，wobbler で常に認められたが，コントロールでは認められなかった。S1 は小さく，薄いスポットであるが，バックグラウンドよりも明らかに濃く，他のスポットから十分に分離可能で，等電点（pI）6.2，分子量（Mr）33 kDa の蛋白である。また，コントロール群では S1 に対応するスポットは過剰染色を行なっても見出すことはできなかった。

スポット濃度の差は，3 個の蛋白で認められた。pI 5.7, Mr 48 kDa のスポット（スポット 2＝S2）（Fig. 1b, 2b），pI が 5.5 と同じで，Mr が約 36 kDa で隣り合う蛋白スポット（スポット 3, 4＝S3, 4）（Fig. 1c, 2c）が，wobbler 群

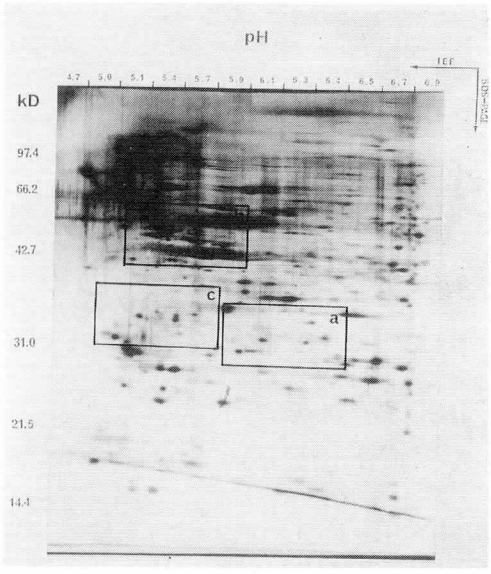


Fig. 1 Two dimensional gel electrophoresis of extract of the cervical cord from a wobbler mouse. Molecular masses are based on marker proteins run in parallel. The areas in boxes are shown in Fig. 2.

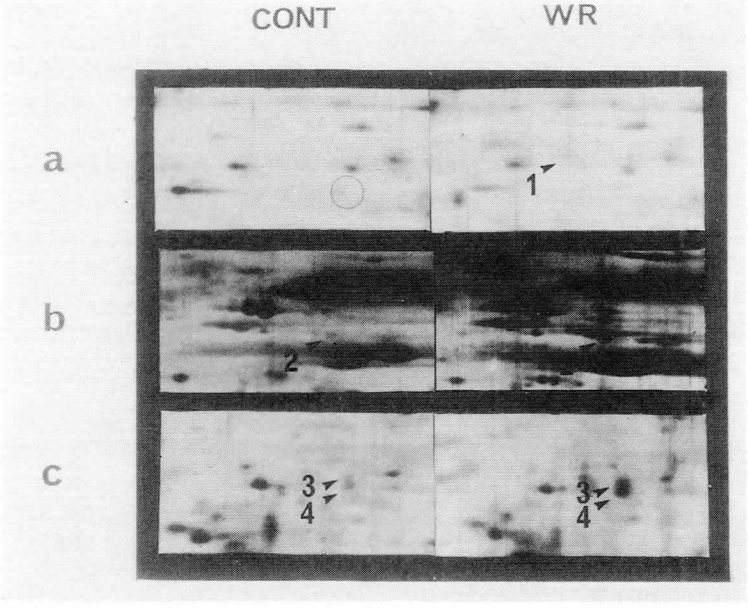


Fig. 2 Close-up three regions (a, b and c), showing consistent protein differences between wobbler mice (WR) and control mice (CONT).

で増加していた。

考　察

今回の研究では，wobbler でコントロールにはない蛋白1個，wobbler でコントロールに比べて増加している蛋白を3個認めた。

最も注目すべきは wobbler にのみ存在する S1 である。この蛋白が wobbler マウスの遺伝的異常を反映したものならばコントロールのゲルに S1 に対応する蛋白が認められなくてはならない[3]。wobbler は常染色体劣性遺伝であるため，コントロールとしている健常同胞マウスは，表現型は一様に正常だが遺伝子型はヘテロ接合体あるいは全く異常遺伝子を持たないものが混在している可能性がある。すなわち，コントロールがヘテロ接合体であれば通常，S1 と同じ部位に S1 の半量のスポットが認められ，正常遺伝子による S1 の半量の蛋白が別の位置認められることが期待される。また，コントロールが遺伝子的にも正常である場合は S1 と同量の位置の異なる蛋白が期待される[3]。しかし，コントロール群に上記のような蛋白は認められなかった。しかしながら，S1 は電気泳動ゲルでは極めて小さなスポットであり，対応する蛋白が存在したにしても，検出できない可能性がある。現在まで wobbler マウスに特異的な生化学的異常は報告されておらず，wobbler マウスの診断は症状が明らかになって初めて可能であった。従って，発症前からの研究には困難があったが，本蛋白は発症前診断に役立つ可能性がある。

S2 は pI, Mr は wobbler 脊髄で増加の報告[4)5)]がある glial fibrillary acidic protein (GFAP) のそれとほぼ一致し，GFAP であると考えられ，前角細胞変性に伴うグリオーシスを反映したものと思われる。Laage ら[4]は wobbler 脊髄で前角のみならず脊髄全体にグリオーシスが起こっていることを指摘しており，グリア細胞の代謝異常の存在について言及しており，注目される。しかし，彼らは我々と同様に2次元電気泳動にて検討しているにも関わらず，GFAP の増加のみ指摘している。おそらく，Coomassie Blue 染色を用いたため，感度が低かったことによると考えられる。

S3, 4 は如何なる蛋白であるかは不明であるが，対応する蛋白スポットはコントロール群にはなく，細胞変性の2次的な産物である可能性が高い。

まとめ

wobbler 脊髄で異常蛋白が見出された。遺伝的異常であるか否かは明らかにできなかったが，本モデルの病態解明に結びつくものと考えられ，今後の検討の課題となろう。

文　献

1) Mitsumoto H, Bradley WG : Axonal pathology of myelinated fibers in murine motor neuron disease (wobbler mouse). in The pathology of myelinated axon. ed. by Adachi M, Hirano A et al, Igaku-Shoin, New York, 1985, p. 126.

2) O'farrell PH : High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. J Biol Chem **250** : 4007, 1975

3) Comings DE : A search for the mutant protein in Huntington's disease and schizophrenia. Adv Neurol **23** : 335, 1979

4) Laage S, Zobel G et al : Astrocyte overgrowth in the brain stem and spinal cord of mice affected by spinal atrophy, wobbler, Dev Neurosci **10** : 190, 1988

5) Kurahashi K, Mitsumoto H et al : Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in wobbler mice. J Neuropath Exp Neurol (in press)

Myotonic dystrophy におけるホルモン負荷試験の検討

——Ellsworth-Howard 試験，Arginine 負荷試験，Insulin 負荷試験——

班　員　廣　瀬　和　彦
東京都立神経病院神経内科

共同研究者　木　下　正　信[1]，相　楽　達　男[1]，長　澤　龍　司[1]
長谷川　　節[2]，大　竹　敏　之[2]，田　邊　　等[3]
[1] 埼玉医科大学総合医療センター第四内科　[2] 東京都立神経病院神経内科
[3] 東京都立神経病院

要　旨

Myotonic dystrophy の臨床症状は骨格筋のみならず内分泌異常を含め多臓器に及び，その病因の1つに個々の臓器の情報伝達機構の異常が示唆されている。我々は腎尿細管 PTH 受容体に注目し，Ellsworth-Howard (EH) 試験を用いて本症の情報伝達機構の異常を検討してきた。その結果，正常群と Pseudohypoparathyroidism (PHP) type II群に大別され adenylcyclase cAMP (AC-cAMP) 系の障害を明確にした。今回，AC-cAMP 系伝達機構を有する下垂体 GH・ACTH 分泌細胞に着目し，Arginine 負荷 (Arg) 試験，Insulin 負荷 (Ins) 試験を施行し，PHP type II群の多臓器にも同様に伝達機構の障害が存在するかを検討した。PHP type II の群では Arg 試験，Ins 試験で血清 GH，ACTH はともに低反応を示し，EH 試験の ΔP と ΔGH (頂値—前値)，ΔP と ΔACTH (頂値—前値) がそれぞれ有意な正相関を示すことから AC-cAMP 系の下垂体細胞にもその伝達機構の障害が確認された。

I　はじめに

Myotonic dystrophy (MyD) の臨床症状は骨格筋のみならず内分泌異常を含め多臓器に及ぶため，個々の臓器において共通の細胞内情報伝達機構の異常が存在する可能性が示唆されている。我々はこれまで腎尿細管 PTH 受容体に注目し Ellsworth-Howard (EH) 試験を用いて MyD の伝達機構の異常を検討してきた。その結果，EH 試験において Pseudohypoparathyroidism (PHP) type II と判定されたものが，臨床症状においても PHP type II に合致することを確認し adenylcyclase-cAMP (AC-cAMP) 系の障害を明らかにした[1]。今回，AC-cAMP 系の細胞内情報伝達機構を有する下垂体 GH 分泌細胞，ACTH 分泌細胞に着目し，Arginine 負荷試験 (Arg 試験)，Insulin 負荷試験 (Ins 試験) を用いて PHP type II の患者群の他臓器にも同様な細胞内情報伝達機構の異常が存在するかを検討した。

II　対　象

対象は MyD 群11例 (男6例，女5例，年齢21—61歳，平均40.8歳)，control 群は MyD 群と age match した4例 (男3例，女1例，年齢28—45歳，平均37.3歳) である。

III　方　法

1) EH 試験

合成ヒト 1-34 PTH 100単位を静脈内投与し，投与前・後のリン酸反応，cAMP 反応で検討した[1]。

2）Arg 試験

arginine 0.5 g/kg·BW を30分で点滴静注し血清 GH を経時的に測定した。頂値から0分値を引いた値を ⊿GH とした。

3）Ins 試験

速効性 insulin 0.1 単位/kg·BW を静脈内に投与し，血糖，血清 GH 及び ACTH をそれぞれ経時的に測定した。血清 GH，ACTH の頂値から0分値を引いた値を同様にそれぞれ ⊿GH，⊿ACTH とした。

IV 結　果

1）EH 試験

全 MyD 症例は，リン酸反応正常（44.9±9.2 mg/2hrs），cAMP 反応正常（⊿cAMP 2.64±1.02 μmol/hr，after/before cAMP ratio 20.4±6.3）の I 群（4例），リン酸反応低下（5.52±17.0 mg/2hrs），cAMP 反応正常（⊿cAMP 3.42±1.31 μmol/hr，after/before cAMP ratio 64.2±74.1）の II 群（7例）のいずれかに分類できた。リン酸反応では両群間に有意差を認めたが，cAMP 反応では有意差を認めなかった（Fig. 1）。

2）Arg 試験

⊿GH は I 群，II 群，control 群で各 6.5±4.6, 1.5±1.6, 28.5±13.8 ng/ml を示し，I・II 群ではそれぞれ control 群に比べ有意な低下が確認されたが，I・II 群間には有意差は認めなかった（Fig. 2）。さらに，⊿GH と ⊿P の間に有意な正相関を認め，AC-cAMP 系の異常が示唆された（Fig. 3）。

3）Ins 試験

本試験中の最低血糖値は I 群，II 群で各43.0±14.5，52.9±35.8 mg/dl と十分な血糖の低下を示し，判定条件を満足すると考えられた。

⊿GH は I 群，II 群，control 群で各 12.8±4.2, 6.3±5.8, 22.9±7.8 ng/ml を示した。II 群は control 群に比べ有意な低下を示したが他の群間には有意差は認めなかった。⊿ACTH は I 群，II 群，control 群で各 139.3±11.26, 32.0±20.1, 109.3±29.6 pg/ml を示した。II 群は control 群に比べ有意な低下を示したが他の群間には有意差は認めなかった（Fig. 2）。さらに ⊿GH と ⊿P，⊿ACTH と ⊿P の間にそれぞれ有意な正相関を認め，ここでも AC-cAMP 系の異常が示唆された（Fig. 4, 5）。

V 考　案

MyD の腎尿細管 PTH 受容体の細胞内情報伝達機構の異常を明確にする目的で EH 試験

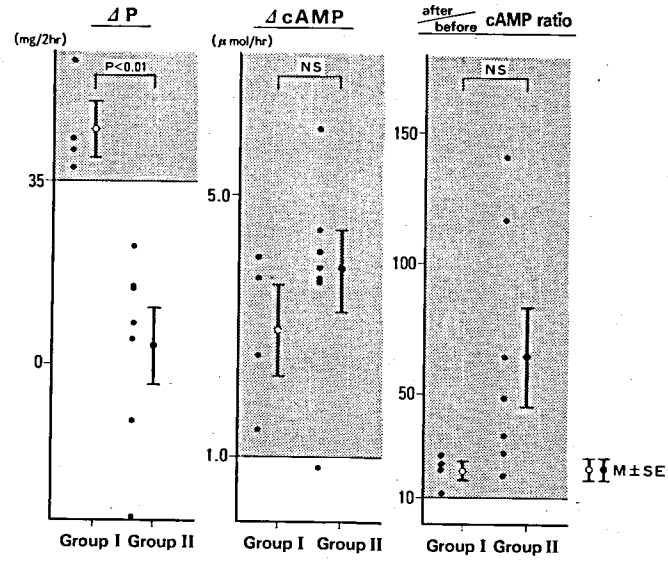


Fig. 1 Ellsworth-Howard test

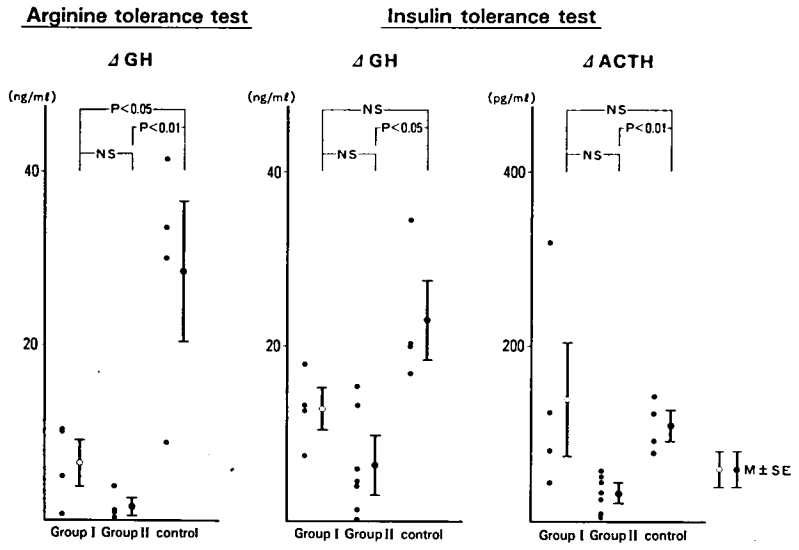


Fig. 2 Arginine and Insulin tolerance test

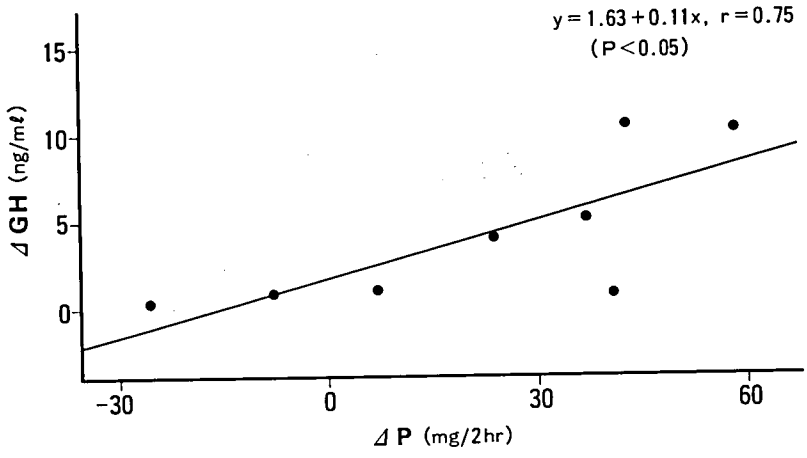


Fig. 3 Regression line of ⊿GH in Arginine tolerance test v. s. ⊿P in Ellsworth-Howard test

を施行してきた。その結果，EH 試験，臨床症状及び検査成績からほぼ正常と考えられるⅠ群と PHP type Ⅱを示すⅡ群に分類され，この成績から MyD の一部の症例で AC-cAMP 系の障害が存在する可能性が考えられた[1]。今回，AC-cAMP 系の細胞内情報伝達機構を有する下垂体 GH 分泌細胞，ACTH 分泌細胞に着目し，Arg 試験，Ins 試験を施行し，血清 GH，ACTH を経時的に測定することにより間接的にその情報伝達機構の異常を検討した。これらの負荷試験では arginine や insulin による低血糖により視床下部の GRF, CRF 分泌が刺激され下垂体前葉細胞から GH，ACTH が分泌される[2]。GH，ACTH の分泌促進の情報伝達機構は，それぞれ GRF や CRF により AC-cAMP を介して行われるが[3][4]，GRF や CRF の分泌促進機序については不明である。

今回，EH 試験で PHP type Ⅱを示したⅡ群の症例では Arg 試験，Ins 試験で血清 GH，ACTH がともに有意な低反応を示したこと，

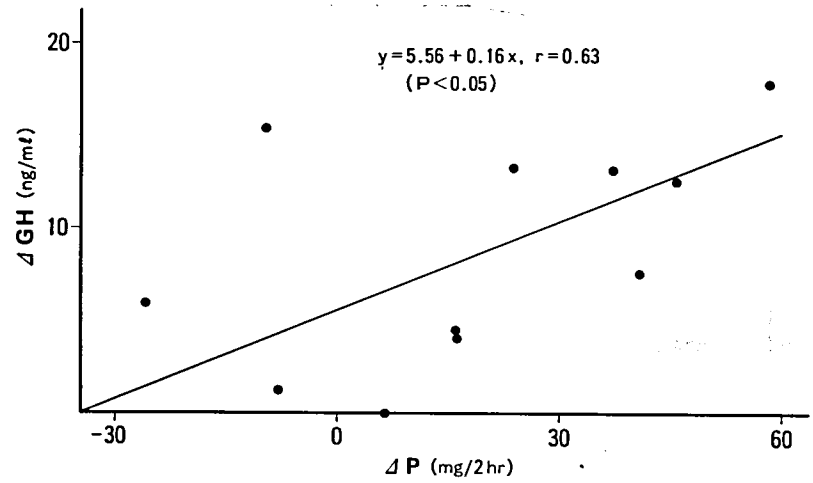


Fig. 4 Regression line of ⊿GH in Insulin tolerance test v. s. ⊿P in Ellsworth-Howard test

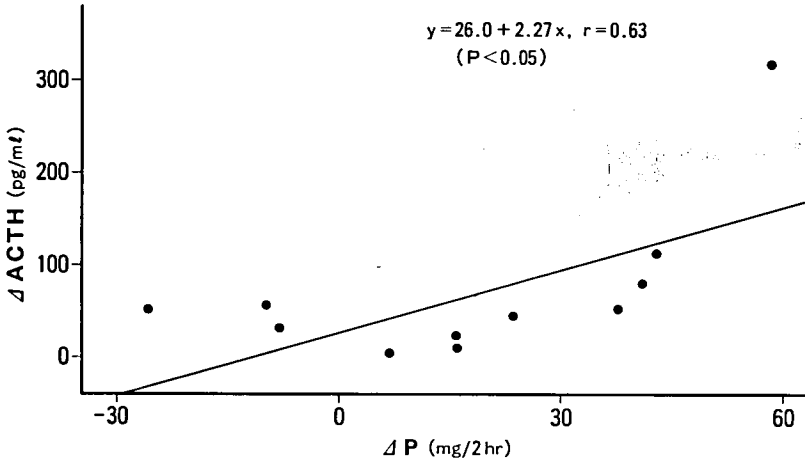


Fig. 5 Regression line of ⊿ACTH in Insulin tolerance test v. s. ⊿P in Ellsworth-Howard test

さらにEH試験の⊿Pと⊿GH, ⊿Pと⊿ACTHがそれぞれ有意な正相関を示したことから, AC-cAMP系の下垂体GH分泌細胞, ACTH分泌細胞にも情報伝達機構の異常が示唆された。しかし, GRF, CRFの分泌に関与する情報伝達機構は不明な点が多く, 上記の異常を確認するためには今後Arg試験, Ins試験で経時的なGRF, CRFの測定が必要と考えられた。

Arg試験では, Ⅰ群もⅡ群もともに低反応を示した。MyDの病因は同一機序であることが考えられ, Ⅰ群, Ⅱ群の平均年齢が36.3±2.5歳, 43.4±13.9歳と約10歳の年齢差を有することを報告しており[1], Ⅰ群では病勢に伴い完成された病態, すなわちⅡ群に移行していくものと考えられた。したがって, Arg試験のⅠ群の低反応も, 早期のAc-cAMP系の異常を反映しているものと思われた(表1)。

MyDのArg試験, Ins試験の成績は散見され, GHの反応性は一部の症例で低反応を示

表1 Summary

	Age (ys) (mean±SD)	Ellsworth-Howard test P response	Ellsworth-Howard test cAMP response	Arginine tolerance test GH response	Insulin tolerance test GH response	Insulin tolerance test ACTH response
Group I	36.3± 2.5	+ (normal response)	+	↓	→～↓	→～↓
Group II	43.4±13.9	− (PHP type II)	+	↓↓	↓↓	↓↓

PHP : Pseudohypoparathyroidism

すことが指摘されているが ACTH の反応性を検索した文献はないようである[5)6)]。今回の我々の検討のように細胞内情報伝達機構に着目し EH 試験と併せて解析した成績はなく MyD の有する多臓器障害を考える上でも細胞膜もしくは細胞内情報伝達系の解析が必要であると考えられた。

VI まとめ

EH 試験で PHP type II を示した症例では，Arg 試験，Ins 試験で血清 GH，ACTH は同様に低反応を示し，ΔP と ΔGH，ΔP と ΔACTH が有意な正相関を示すことから細胞膜もしくは細胞内情報伝達機構の異常の存在が示唆された。

文 献

1) 廣瀬和彦，木下正信ら：平成2年度厚生省研究報告書，1990, p. 199
2) Martin, J. B. : New Engl. J. Med. **288** : 1384, 1973
3) Bilezikjian, L. M., Vale, W. W. : Endocrinology, **113** : 1726, 1983
4) Tomori N, Suda T. et al : J Clin Endocrinol Metab **68** : 87, 1989
5) 山本みゆき，鬼頭昭三ら：臨床神経 **14** : 406, 1974
6) Takase, S., Okita, N et al : Tohoku J. Exp. 153 : 355, 1987

筋緊張性ジストロフィーに於ける free T3, 及び free T4 値の検討

班　員　村　上　慶　郎
国立療養所箱根病院神経内科

共同研究者　西　岡　昌　紀，鈴　木　光　一，岡　崎　　隆
国立療養所箱根病院神経内科

要　旨

筋緊張性ジストロフィー（My. D）に於ける甲状腺機能は正常とする従来の見解は free T3, free T4 が測定不能であった時代の報告を反映しており，free T3, free T4 が直接測定可能と成った現在再検討が必要である。従来の見解は，My. D 患者の TSH, T3, T4 のみに着目して居たが，今回我々は入院中の My. D 患者19例，及び LG. D 10例，FSH. D 5例，Duchenne. D 3例での TSH, T3, T4 に加えて free T3, free T4 を測定した。その結果，My. D では19例全例が TSH, T3, T4 は正常でありながら，7例（36.8％）で free T3 低下，又，7例（36.8％）で free T4 で低下が認められた。free T3 低下は他型筋ジストロフィーにも認められたが，free T4 低下は My. D 群以外には1例も無い事が注目される。ただし，GOT, GPT, CPK 値との相関関係は認められなかった。

目　的

筋緊張性ジストロフィー（My. D）に於ける甲状腺機能は正常であるとする見解が支配的だが，その見解は，free T3 及び free T4 が直接測定出来無かった時代の報告に依る処が大きい。free T3 及び free T4 が直接測定可能と成った現在，筋緊張性ジストロフィーの甲状腺機能についての従来の見解は再検討が必要と考え，入院中の同疾患患者及び他型の筋ジストロフィー患者の甲状腺機能の再検討を試みた。

方　法

筋緊張性ジストロフィー（My. D）患者19名（男12名，女7名，全員入院患者，平均年令51.4才），L-6 型筋ジストロフィー10名（男5名，女5名，全員入院患者，平均年令54.6才），FSH 型筋ジストロフィー患者5名（全員男，全員入院患者，平均年令58.4才），Duchenne 型筋ジストロフィー患者3名（全員男，全員入院患者，平均年令27.3才）より早朝採血し，T3, T4, TSH, T3-RSU, 及び free T3, free T4 を測定した。食後採血した者も有るが，上記項目は食事によっては変動しないとされて居る。各項目の正常値は次の通りである。

TSH；10以下（μU/ml）
T3･RSU；22～35（％）
T3；70～190（μg/dl）
T4；5.0～13.0（ng/dl）
free T3；2.6～5.0（pg/ml）
free T4；0.9～2.0（ng/dl）

結　果

1）My. D；TSH, T3, T4 は全例とも正常範囲内。free T3 は7例で低下，free T4 は7例で低下していた。（TSH のみ不測例が4例有り。）

2）LG. D；TSH は全例が正常範囲内。T3 が2例で低下，T4 が1例で上昇。free T3 が

3例で低下していたが，free T4 は全例が正常範囲内に有った。

3）FSH. D；TSH は全例が正常範囲内。T3 が1例で低下，T4 が1例で上昇。free T3 が2例で低下していたが，free T4 は全例が正常範囲内に有った。

4）Duchenne. D；TSH は測定された2例ともに正常範囲内。全例3例の内，1例で T3 低下，1例で T4 上昇。free T3 は2例が低下を示したが，free T4 は3例とも正常範囲内。（各疾患群での測定結果は表の通り）

特に My. D 群については，甲状腺機能低下症で繁々上昇の見られる GOT，GPT，CPK を採血により測定したが，これらのいずれも，free T3, free T4 のいずれとも有意の相関関係を示さなかった。又，採血10日前の平均体温と free T3, free T4 の相関関係を検討したが，これも有意の相関関係を認める事が出来無かった。

考　察

筋緊張性ジストロフィー（My. D）は，多彩な内分泌異常を合併する疾患である。My. D 患者に繁々に見られる臨床症状の内，自発性低下，知能障害，脱毛，ミオトニア等は甲状腺機能低下症の症状に類似する為，My. D に於ける甲状腺機能異常の有無は他の内分泌的異常と共に臨床家の関心を集めて来た。1948年，Thomsen は，My. D 患者の BMR 低下を指摘。是に続き1954年，Stanbury らが，甲状腺機能低下症と糖尿病を合併した My. D 1例を報告したが，1961年，Drucker らは，大多数の My. D 患者の甲状腺機能は正常と報告した。更に1963年，Caughey と Myrianthopoulos は，大多数の My. D 患者の甲状腺機能は正常であり，かつ甲状腺ホルモン投与は My D の症状に対して無効と報告した為，My. D の甲状腺機能は正常であるとする見解が支配的なものと成った。（1976年，1981年には，甲状腺機能亢進症を合併した My. D 例の報告も有る）。1982年，Steinbeck と Carter は，My. D 患者での TRH に対する TSH 反応低下を報告したが，同時に My. D 患者の甲状腺ホルモンは正常とし，従来の見解を正しいものとして

表1　My. D 患者群（n=19）の甲状腺機能と主な検査値
男 12名　女7名　平均年令 51.4才

	TSH (μU/ml)	T3·RSU (%)	T3 (μg/dl)	T4 (ng/dl)	f-T3 (pg/ml)	f-T4 (ng/dl)	GOT	GPT	CPK	Na	K	Cl
T. M. (47y, M)		24.3	120	9.8	3.2	1.4	30	18	87	148	5.7↑	107
K. K. (56y, M)	3	28.3	100	8.3	2.6	0.9	33	25	64	146	4.9	108
H. K. (34y, M)	2	28.4	160	9.3	3.2	0.9	45↑	46↑	97	152	5.1	110↑
H. S. (62y, M)	1	31.7	80	6.8	2.2↓	0.6↓	70↑	66↑	89	147	4.0	109↑
Y. K. (44y, M)	2		110	10.8	2.8	1.2	26	26	82	149↑	4.7	110↑
J. N. (47y, F)			180	10.9	3.5	1.1	58↑	74↑	105	146	4.6	106
T. M. (44y, F)		26.0	120	9.7	2.5↓	0.9	54↑	46↑	80	144	4.2	109↑
S. K. (62y, M)	2	26.2	110	10.2	2.7	1.2	92↑	106↑	24	144	5.1	104
M. O. (49y, M)	2	27.0	110	11.9	3.5	1.2	31	28	175↑	148	4.1	112↑
K. O. (46y, F)	2	26.5	70	9.0	1.8↓	0.8↓	27	16	42	150↑	4.3	112↑
E. K. (61y, F)	2	29.9	130	9.2	2.5↓	0.8↓	46↓	34	101	150↑	5.1	113↑
Y. T. (45y, F)		26.0	100	7.3	2.4↓	0.9	35	43↑	31	143	5.3	107
T. K. (55y, F)	2	30.0	100	5.9	3.2	0.8↓	25	36↑	87	151↑	3.5	113↑
K. H. (56y, F)	3	28.1	100	6.2	2.2↓	0.6↓	20	9	75	147	4.0	111↑
M. H. (58y, F)	3	28.8	90	6.1	2.6	1.0	14	35	188↑	147	5.3	113↑
T. G. (55y, M)	2	31.5	100	7.4	2.8	0.8↓	29	19	67	146	4.6	111↑
N. I. (45y, M)	7	32.4	90	6.1	2.6	0.8↓	46↑	47↑	94	149↑	3.9	109
M. T. (52y, M)	1	29.8	80	9.8	1.9↓	0.9						
K. Y. (59y, M)	1	26.7	100	7.9	2.6	0.9	56↑	39↑	31	146	3.9	112↑

表2　FSH 患者群 (n=5) の甲状腺機能
男5名　女0名　平均年令 58.4才

	TSH (μU/ml)	T3-RSU (%)	T3 (μg/dl)	T4 (ng/dl)	f-T3 (pg/ml)	f-T4 (ng/dl)
A. Y. (35y, M)	4	32.6		13.7↑	4.7	1.6
J. S. (76y, M)	3	41.2↑	50↓	6.4	2.2↓	1.2
T. K. (56y, M)	6	32.7	110	11.7	2.9	1.3
R. M. (67y, M)	3	35.1↓	70	9.2	2.0↓	1.3
N. M. (39y, M)	3		120	7.3	3.0	1.1

表3　Duchenne-D 患者群 (n=3) の甲状腺機能
男3名　女0名平均　年令 27.3才

	TSH (μU/ml)	T3-RSU (%)	T3 (μg/dl)	T4 (ng/dl)	f-T3 (pg/ml)	f-T4 (ng/dl)
Y. K. (26y, M)	2	28.8	80	6.2	2.2↓	0.9
T. I. (31y, M)		28.4	150	13.9↑	3.9	1.9
T. I. (25y, M)	4	34.9	50↓	7.7	1.6↓	1.7

表4　LG-D 患者群 (n=10) の甲状腺機能
男5名　女5名　平均年令 54.6才

	TSH (μU/ml)	T3-RSU (%)	T3 (μg/dl)	T4 (ng/dl)	T3 (pg/ml)	f-T4 (ng/dl)
S. M. (42y, M)	2	33.0	160	10.7	4.6	1.5
M. H. (62y, M)	2	28.9	60↓	8.8	1.6↓	1.4
H. S. (52y, F)	2	30.4	100	8.6	2.7	1.4
T. O. (62y, M)	4	22.3	70	10.2	2.0	0.9
T. W. (60y, F)	2	28.8	130	9.1	3.0	1.0
M. Y. (47y, F)	5	34.3	70	6.8	2.7	1.1
H. T. (49y, F)	3	31.6	120	10.0	3.3	1.1
Y. F. (65y, M)	2	37.8↑	60↓	7.4	2.1↓	1.1
M. K. (44y, M)	1	27.3	160	18.2↑	4.5	1.9
M. O. (63y, F)	4	29.4	80	10.0	2.4↓	1.3

居る。しかし，1990年，Fukazawa らは遊離型甲状腺ホルモンの測定によって是を再検討し，My. D では，T3, T4, free T4 TSH は正常であるが，free T3 は有意に低下している事を報告した。即ち，My. D の甲状腺機能を正常と結論づけた従来の見解は遊離型甲状腺ホルモン (free T3 及び free T4) を直接測定出来無かった時代の報告を反映した物であり，free T3, free T4 を直接測定可能と成った今日では再検討が必要な物である。

我々は今回 My. D のみならず他型の筋ジストロフィー (LG. D, FSH. D, Duchenne. D) 患者をも対象として甲状腺機能の検討を行なひ，従来の指標である TSH, T3, T4 と共に遊離型甲状腺ホルモン (free T3, free T4) を測定した。その結果，My. D 19例の内全例が TSH, T3, T4 では正常範囲内に在りながら，7例に free T3, 又7例に free T4 の低下を認めたが，是は My. D の甲状腺機能を正常と結論づけた従来の見解に疑問を投げ掛ける物である。我々の症例に於いて TSH, T3, T4 は全例正常値に在った事は，従来の見解が是等の指標のみに着目し，遊離型甲状腺ホルモンを測定出来ぬまま My. D の甲状腺機能を「正常」と結

論づけた事を良く説明する物と思われる。一方，他型筋ジストロフィー患者との比較では，free T3 低下は LG. D 3例 (30.0%), FSH. D 2例 (40.0%), Duchenne. D 2例 (66.7%) にも認められたが free T4 低下は My. D のみ(7例=36.8%)にしか認められていない。此の結果は free T4 低下は free T3 低下よりも特異的な変化である事を考慮すると，My. D での遊離型甲状腺ホルモン低下が他型筋ジストロフィーでのそれよりも特異的な現象である事を示す物と思われ興味深い。他型筋ジストロフィー患者では TSH は全例正常に在りながら T3, T4 が幾つかの例で各々低下，上昇しているが，free T4 は全例が正常範囲内にあり，甲状腺機能の異常は明らかでなかった。甲状腺ホルモンの生物学的活性は遊離型に於いて発現する事を考えれば，free T4 値に於ける My. D と他型筋ジストロフィーとの此の様な違いは My. D の甲状腺機能を考える上で興味深い結果と思われた。

まとめ

1) My. D 19例に於いて TSH, T3, T4 は正常であったが free T3 は7例 (36.8%), free T3 は7例 (36.8%) で低下を示した。

2) free T4 低下は My. D 群のみに見られ他型筋ジストロフィーでは見られなかった。

進行性筋ジストロフィーにおける骨代謝についての検討

班　　員　井　上　謙次郎
国立療養所宮崎東病院

共同研究者　宮　内　恵　子，仲　地　　剛
吉　原　明　子，諸　冨　康　行
国立療養所宮崎東病院

要　旨

国立療養所宮崎東病院筋ジス病棟に入院中のDuchenne 型筋ジストロフィー(以下 DMD)の患者10名（9歳から23歳）の脊柱変形と骨代謝の調節因子及び筋原性酵素との関連性を検討した。それぞれのデータを Gibson の分類[1]による Stable Pathway と Unstable Pathway の2群に分けて検討した結果，PTH, myoglobin において有意差を認めた。また，myoglobin と PTH, myoglobin と尿中 Ca との間にそれぞれ負及び正の相関を認めた。以上のことから脊柱変形の一因として PTH が関与し，さらに骨代謝系と筋障害との関連が示唆された。

はじめに

DMD では脊柱変形が，予後に重大な影響を及ぼしていると一般に考えられている。宮崎東病院では Gibson の分類を用いて脊柱変形の程度から患者を分類し，骨代謝の調節因子[2]及び筋原性酵素などの生化学的な面より脊柱変形との関連を検討した。その結果，筋ジストロフィー患者において，骨代謝の調節因子と脊柱変形との関連が示唆されたので報告する。

対象及び方法

対象は，当院筋ジス病棟に入院中の DMD 患者 10 名。全例男性。年令は 9 歳～23歳。全例歩行不能。測定は毎年 9 月～10月に行っている。カルシウム・骨代謝に影響するような薬物は投与されていない。

全脊柱2方向のX線撮影を行ない，Gibson の分類を用いて患者の脊柱変形を Stable Pathway（以下S群），Unstable Pathway（以下U群）の2群に分けた。

骨代謝の調節因子として血清の Ca, P, PTH, Vit D_3, 筋原性酵素として CPK, myoglobin myosin を測定した。また尿中 Ca, P とを測定した。

結　果

骨代謝の調節因子をU群とS群に分けその差を検討した結果，PTH では1990年，1991年ともに，0.05％の危険率でU群において高値を示した。(図1)

筋原性酵素をU群とS群に分けその差を検討した結果，myoglobin では 0.05％の危険率で，S群において高値を示した。(図2)

次に骨代謝の調節因子と筋原性酵素との相関を検討した。

図3・図4では，U群を open circle, S群を closed circle でプロットしてある。myoglobin と PTH の間に負の相関 ($y=-2.0\ x+490$, $r=-0.7$, $p<0.05$) を認めた。(図3)

さらに，U群において myoglobin が低値かつ PTH が高値，S群において myoglobin が高値かつ PTH が低値といった傾向が認められた。

myoglobin と尿中 Ca をみると，両者の間に

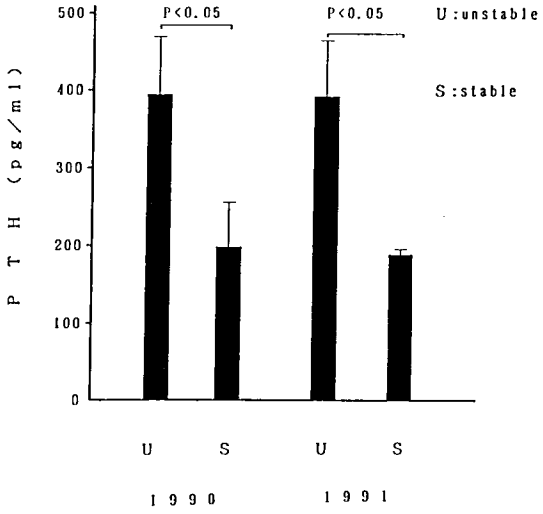


図 1

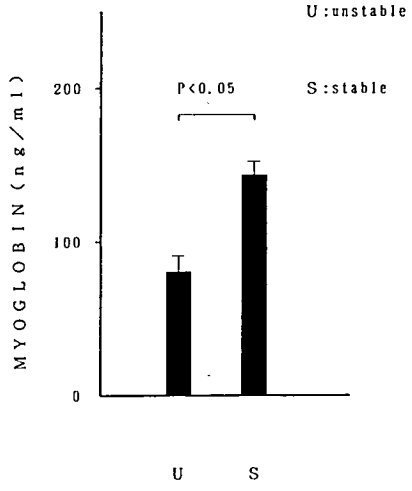


図 2

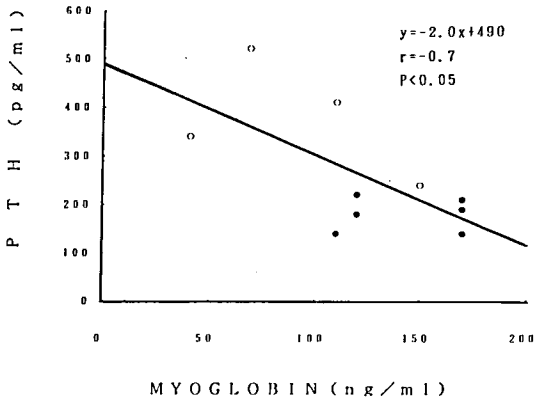


図 3

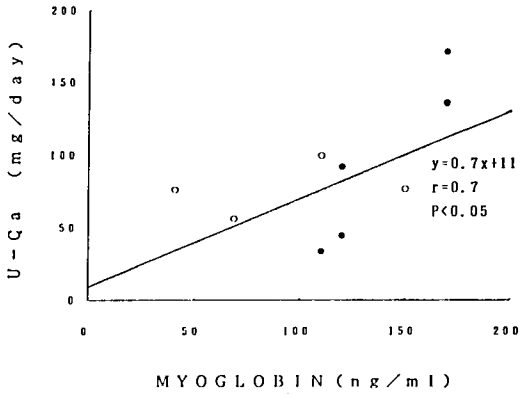


図 4

正の相関 ($y=0.7x+11$, $r=0.7$, $p<0.05$) を認めた。(図4)

考　察

PTH においてU群とS群に有意差を認めたことから脊柱変形に骨代謝が関与していることが想定された。

前年度当院の井上[3]が，年令と筋原性酵素との間に負の相関を認めたことから，筋の崩壊の進展とともに筋原酵素の放出が減少するとの報告をした。今回は myoglobin と尿中 Ca, myoglobin と PTH との間に相関を認め，筋の崩壊の進展と骨代謝の調節系との間に何らかの関連があることが推定された。

そのメカニズムについては今後検討を加えていく必要があると思われる。

また，今回は歩行不能例のみの検討で，病状の軽い時期でのデータは少ないので PTH, Ca 等が病状によってどの様に変化するか早い時期からの検討を行なえば DMD における病勢と骨代謝との関連がさらに明らかになり，何らかの治療上の手掛りが得られるのではないかと思われる。

ま と め

1．DMD 患者の血清 Ca, P, PTH, Vit D_3, CPK, myoglobin myosin を測定し，また尿中の Ca, P を測定した。U群とS群に分けて，各々の差を検討した。

2．U群で PTH が高値を示し，PTH の骨作用が脊柱変形の一因となっている可能性が考えられた。

3．U群で myoglobin が低値であり，筋の障害と脊柱変形が示唆された。

4．myoglobin と PTH の間に負の相関，myoglobin と尿中 Ca 排泄量との間に正の相関を認め，DMD の進展と骨代謝との関連が推定された。

文　献

1）Gibson DA, Wilkins KE : The management of spinal deformities in Duchenne muscular dystrophy : a new concept of spinal bracing. Clin Orthop **41** : 108, 1975

2）佐藤幹二：骨代謝の調節因子．medicina 25：**9**：1486, 1988

3）井上謙次郎，後田義彦ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症における脊柱変形の検討，筋ジストロフィー症の臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究．高橋班，平成2年度研究報告書．p. 57, 1991

Ⅱ. 臨床病態

D. 先天性筋ジストロフィー

(特別プロジェクト)

プロジェクト研究Ⅱ　臨床病態
Ⅱ-D　先天性筋ジストロフィーの臨床病態（特別プロジェクト）

先天性筋ジストロフィー児に認められるけいれんに関する検討

班　　員　福　山　幸　夫
東京女子医科大学小児科

共同研究者　炭　田　沢　子，大　澤　真木子，鈴　木　典　子
平　沢　恭　子，新　井　ゆ　み，村　杉　寛　子
東京女子医科大学小児科

要　旨

先天性筋ジストロフィー症（CMD）98例において，痙攣発作につき，37.5度C以上の発熱に伴う痙攣群（FS），無熱時痙攣群（AFS），痙攣の既往のない群（NS）にわけて検討した。

最終観察時年齢6歳以上例では60.7％（AFS 24.6％，FS 36.1％）に痙攣が見られた。Ⅰ型とⅢ/Ⅳ型では痙攣発症率に差はなかった。男女別検討ではⅠ型で男児により高率に痙攣を認めた。発症年齢の中央値は，FS群ではⅠ型，Ⅲ/Ⅳ型とも1歳であった。AFS群はⅠ型1歳，Ⅲ/Ⅳ型は10歳であった。Ⅰ型の1歳未満発症FS例は，AFS移行傾向があった。発作型は全般性強直間代発作が多かった。FS群では38度C未満の発熱誘発例，発作頻回例，クラスター例が多く，持続時間が長い特徴を示した。過去3年以上発作消失例は，AFS群では17％，FS群Ⅰ型では86％，Ⅲ/Ⅳ型では75％であった。

目　的

福山型先天性筋ジストロフィー症（FCMD）の中枢神経症状として，知能障害の他に痙攣が合併することはよく知られている。しかし，痙攣に関する症例報告[1)2)3)]は散見されるも，系統的研究[4)5)6)]は少ない。今回我々は，CMDに合併した痙攣につき検討し，若干の知見を得たので報告する。

対象および方法

対象は当院を受診したCMD児97例，福山分類のⅠ型80例，Ⅱ型2例，Ⅲ/Ⅳ型15例で，最終観察時年齢は順に6ヶ月～25歳，7～19歳，3～31歳である。診療録に加え，アンケート調査により得た情報を追加し検討した。37.5度C以上の発熱に伴う痙攣群をFS群，無熱時痙攣をAFS群，痙攣の既往のない群をNS群とし，初回発作がFSで経過中AFSを生じた例（以下移行例と称す）はAFS群として検討した。

結　果

発症率：全症例における痙攣発作発現累積率（以下発症率と略）は58.2％で，AFSは姉弟両者に発症した1組を含む19.4％，FSは3同胞を含む38.8％に認めた。最終観察時年齢6歳以上例（61例）での発症率は60.7％で，AFS 24.6％，FS 36.1％であった。CMDの型別では，発症率に大きな差は認めなかった。男女別での発症率は男児で高く，特にⅠ型でその傾向は顕著であった。

発症年齢：FS群Ⅰ型およびⅢ/Ⅳ型ではそれぞれ0～4歳，0～2歳に亘り，中央値，ピーク値いずれも1歳であった。AFS群Ⅰ型では0～10歳に亘って発症しており，ピーク値は0

歳代であった。AFS 群 Ⅲ/Ⅳ 型では8歳以降に発症していた。AFS 移行例における移行年齢は1～8歳にわたっていた。

発作型：全般性強直間代発作（主に保護者の観察に基づく）が最も多く，FS 群では 95％，AFS 群でも 50％を占めた。AFS 群には，点頭てんかん，部分起始性強直間代発作，ミオクロニー発作，複雑部分発作，半身痙攣などを認めた。点頭てんかんの1例で頭蓋内出血，髄膜炎の既往があった。

脳波所見：FS 群では1/3にてんかん性発作波を認め，焦点性棘波，全般性棘徐波を同率に認めた。AFS 群では焦点性棘波を多く認めた。

発作の有無別発達指数分布（Ⅰ型）：NS 群は AFS 群，FS 群に比し DQ がやや高い傾向があった。

FS 群の臨床特徴：38度c以下の発熱による痙攣誘発例 51％，発作持続時間15分以上経験例 19％，24時間以内の痙攣反復経験例を 35％に認め，いわゆる熱性痙攣複合型の要素を多く認めた。抗痙攣剤投与例は 51.7％であったが，発作回数10回以上経験例を 25％に認めた。

発作予後：発症後5年以上経過観察し，詳細が明かな例で検討した。AFS 群では，発症5年後の発作継続例は 5/6 例（83％），過去3年以上発作消失例は 1/6 例（17％）であった。これに対し FS 群Ⅰ型では，過去3年以上発作消失例は 12/14 例（86％）で，最終発作年齢は，1～8歳に亘り，中央値，ピーク値とも4歳であった。FS 群 Ⅲ/Ⅳ 型では，過去3年以上発作消失例 3/4 例（75％）で，最終発作年齢は3～5歳であった。

発症年齢別経過を検討してみると，Ⅰ型では1歳未満で FS を発症した5例中3例，60％が AFS へ移行しており，1歳以降 FS を発症した29例では1例，3％のみが AFS へ移行していた。

考　察

FCMD の過半数に痙攣が合併する[4)6)7)]と言われているが，今回の我々の研究でもほぼ60％に認められた。一般人口のてんかんの頻度は，0.5～1％であり，一般児童の2～8％が熱性痙攣を有すると言われているのに比し，CMD では明らかに高頻度に痙攣を合併している。これは CMD に見られる脳奇形すなわち大脳小多脳回，組織学的な細胞層構築異常などに起因するものであろう。Ⅰ型と Ⅲ/Ⅳ 型では痙攣発症率に差はなかったが，男女別検討では，Ⅰ型で男児に有意に高率に発症していた。一般小児における痙攣は男児にやや多い傾向があるが，有意差は無いと言われている。CMD の痙攣発症要因として脳奇形に性差がどの程度加味しているのか興味深い。

小児てんかんの発症年齢のピークは0歳代，熱性痙攣は1歳代であり，CMD Ⅰ型についてはこれに差異はなかったが，Ⅲ/Ⅳ 型 AFS 群は8歳以降と発症年齢が遅かった。

脳奇形に伴う痙攣発作型の多くは，全般発作，焦点発作，ミオクロニー発作で，高度な脳奇形では点頭てんかんを伴うことが多いと言われている[8)]。今回の我々の発作型の検討は，主に保護者の観察に基づくものであるが，FS，AFS とも全般性強直間代発作が多く，その他点頭てんかん，ミオクロニー発作，複雑部分発作など見られた。他書[2)]では，欠神発作も報告されている。脳波は他の報告[4)5)]と同様，焦点性棘波が多かった。

Segawa ら[4)]は，発熱に伴う痙攣はすべて1年以内に無熱性痙攣に移行したと報告しているが，我々の研究では，終始 FS であった例の方が多く，AFS への移行例も FS 発症後1～7年と幅広かった。しかしながら，FS 群ではいわゆる複合型の特徴を多く示し，1歳未満発症 FS 例は AFS への移行率が高いので，FS 例も発症により，てんかんに準じた抗痙攣剤治療が必要と思われた。

結　語

CMD 児の約 60％に痙攣を認めた。型別では発症率に差はなかったが，男女別ではⅠ型で男児に高率であった。FS 群ではいわゆる複合型熱性痙攣の要素を多く示した。Ⅰ型の1歳未満発症 FS 例は，AFS 移行傾向があった。発作予後は，AFS 群は FS 群に比し不良であった。

文　献

1）Martinelli P, Gabellini AS et al : Congenital muscular dystrophy with central nervous system involvement : case report. Eur Neurol **26** : 17, 1987

2）金沢　治，嶋戸敏幸：てんかんを合併した福山型先天性筋ジストロフィー症の発作時脳波の検討―点頭てんかんとは異なると思われる2症例について―．小児科紀要　**33** : 5, 1987

3）長尾秀夫，佐野のぞみら：部分てんかん，West 症候群，Lennox 症候群を合併した先天性筋ジストロフィー症の3例．日児誌　**91** : 169, 1987

4）Segawa M, Nomura Y et al : Fukuyama type congenital muscular dystrophy as a natural model of childhood epilepsy. Brain Dev **1** : 113, 1979

5）平山義人，大沢真木子ら：進行性筋ジストロフィー症の脳波．臨床脳波　**19** : 714, 1977

6）西谷　裕：先天性筋疾患と神経病変について．脳と発達　**5** : 477, 1973

7）Fukuyama Y, Osawa M et al : Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type-clinical, genetic and pathological considerations-. Brain Dev **3** : 1, 1981

8）菅沼育雄，竹下研三：脳奇形とけいれん．小児のけいれん，馬場一雄他編，小児科 Mook no. 21, 金原出版　1981, p. 79

福山型先天性筋ジストロフィー症の遺伝学的・臨床的検討

——同胞罹患例を中心に——

班　員　吉岡三恵子
神戸市立中央市民病院小児科

共同研究者　黒木茂一，仁紙宏之
神戸市立中央市民病院小児科

要　旨

我々がこれまでに経験した福山型先天性筋ジストロフィー症（FCMD）40家系について，遺伝学的及び臨床的検討を行った。40家系中，両親の血族結婚は5家系（12.5%）にみられ，同胞罹患は9家系（22.5%）にあった。同胞間における臨床像は，筋肉・中枢神経系及び眼科所見において，一般に類似していたが，1家系2兄弟例においては，兄がFCMDと診断されたのに対し，弟は生下時より水頭症，脳瘤，両側網膜剝離，高CK血症及び先天性多発性関節拘縮症を示し，FCMDよりもむしろWalker-Warburg症候群（WWS）に近い病像であった。兄弟の中にFCMDとWWSがみられたことは，この二つの症候群が対立形質であることを示唆するものと考えられた。

目　的

福山型先天性筋ジストロフィー症（以下，FCMDと略）の遺伝学的検討では，従来から両親の血族結婚が多いこと及び，同胞罹患のみられることが注目されている[1]。今回，同胞罹患のある家系について，同胞間の臨床像の差異を検討した。

対象及び方法

我々がこれまでに経験したFCMD 40家系46名の患者について，両親の血族結婚，同胞数，同胞罹患の有無等の遺伝学的背景を聴取した。又，各症例の臨床像を検討するために筋肉については運動能力，関節拘縮，筋萎縮，血清CK値，筋電図，筋生検所見等を調べ，中枢神経系については言語能力，痙攣発作の有無，IQ又はDQ，CT又はMRI，脳波所見等を，又，眼科的には視力，前眼部，眼底等について調べた。

結　果

FCMD 40家系中，両親の血族結婚は5家系（12.5%）にみられ，両親がいとこであるものが3家系（7.5%），その他が2家系であった。一方，同胞罹患は9家系（22.5%）にみられ，この内血族結婚も認められたのは一家系であった。姉妹例が5家系と最も多く，兄弟例は1家系，姉弟又は兄妹例がそれぞれ1及び2家系であった。同胞罹患のみられた代表的な家系とその臨床像を示す。So家：両親には血族結婚はみられない。姉は現在，6才5カ月，妹は3才7カ月。姉は頸定不十分であるが，妹は頸定及び寝返りがみられている。姉は生後1カ月の時に筋生検を受け，筋の変性と結合織の増生が著明で，FCMDに典型的な像を示している。姉妹共，関節拘縮が上下肢共にみられ，仮性肥大も存在する。有意語は共にみられず，これまで何度も無熱性痙攣をくり返している。頭部CT



図1　So 家姉妹の頭部 CT，左：姉，14カ月，右：妹，12カ月。
姉妹共に，白質低吸収域が認められ，側頭部には脳回肥厚もある。

では図1に示すように，姉妹共に白質の低吸収域が著明であり，側頭部には脳回肥厚も認められる。眼科的には，姉妹共，視神経萎縮があった。

T家：両親には血族結婚はみられない。姉は11才で，妹は12才で共に呼吸不全のため死亡している。姉は坐位保持が可能であったが，妹は頸定まで可能。姉妹共に無熱性痙攣がつよく，妹は特に難治で，しばしば重積をくり返していた[2]。脳波では姉妹共に棘徐波結合がくり返し認められている。頭部CTでは図2に示すように，姉は6才4カ月という年令の関係もあり，妹につよい白質低吸収域は認められていないが，大脳萎縮は姉妹共に強く，脳回肥厚も側頭部や前頭部にみられている。眼科的には姉には視神経萎縮が認められるが，妹には内眥贅皮がみられる程度である。

S家：両親の血族結婚はない。兄は現在，6歳5カ月，弟は10カ月である。兄は以前に特異な眼所見を示したFCMDの一例として報告している[3]。この兄は坐位保持が可能であるが有意語はない。生後4カ月のときに強度の近視，

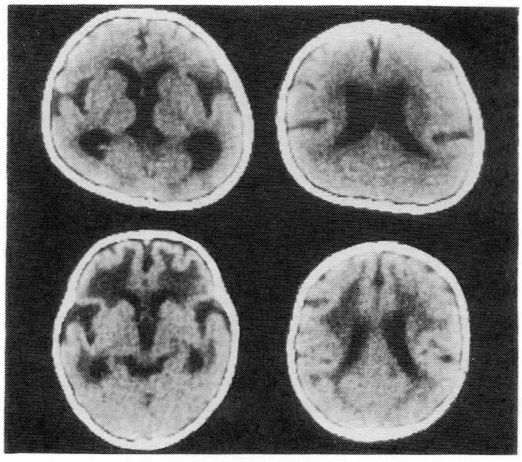


図2　T家姉妹の頭部 CT，上2枚：姉，6才4カ月，下2枚：妹，1才。
姉には白質低吸収域は明らかでないが，妹には著明である。大脳萎縮は姉妹共にみられ，脳回肥厚も前頭部や側頭部に認められる。

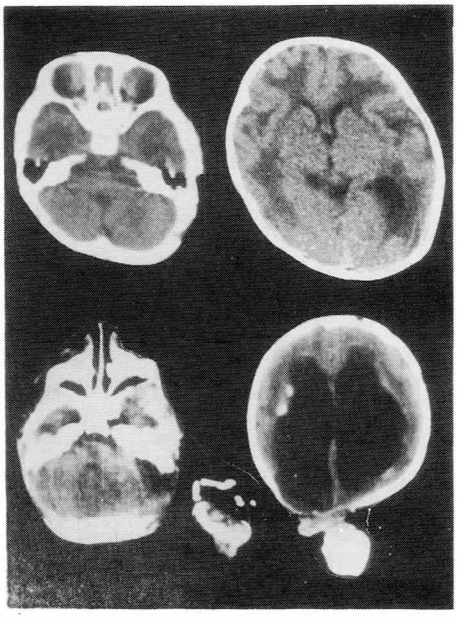


図3　S家兄弟の頭部 CT．上2枚：兄，5カ月，下2枚：弟，生下時。
兄には白質低吸収域が明らかであり，脳回肥厚も側頭部に認められる。弟は水頭症，脳瘤を示し，第Ⅳ脳室の大きさが小さいことから，中脳水道の狭窄が疑われる。

視神経萎縮，内斜視及び内反症を指摘された。3才時には左，その10カ月後には右の網膜剝離をきたした。DQ は13で，痙攣はない。筋生検では筋線維の大小不同や変性，間質の線維化や脂肪浸潤等，FCMD と診断されるような所見を示している。頭部 CT では図3に示すように，白質の低吸収域が著明で，脳回肥厚も認められる。一方，弟は生下時より著明な水頭症及び脳瘤が認められ，生後8日目に脳室腹腔吻合術及び脳瘤の整復術を受けている。術後の MRI によって，水頭症は中脳水道の閉塞によるものであることが明らかとなり，又，脳梁欠損や脳回肥厚も認められた。この症例は生下時より血清CK値の上昇が著しく，先天性多発性関節拘縮症も認められることから，筋の所見も明らかである。兄弟共，染色体は正常であった。この兄弟の間にもう一人弟がおり，この第2子は胎児エコーで無脳児であることがわかり，在胎7カ月で出生し，生後5分後に死亡している。この例の筋や眼の所見は得られていない。

考　察

今回の FCMD の遺伝学的所見を大沢の報告[1]と比較すると，近親婚率は大沢の26.8%に対し，我々は 12.5％と低いが，同胞罹患は大沢の 21.19～24.20％に対し，我々は 22.5％とほぼ類似の値を示している。いずれも常染色体劣性遺伝としての期待値 25％にほぼ近似の値といえる。同胞例の臨床像は，筋肉・中枢神経系及び眼科的所見において，一般に類似していたが，1家系2兄弟例においてはかなりの差異がみられた。この家系では兄は FCMD と診断されたが，弟は生下時より水頭症，脳瘤及び両側の網膜剝離を示し，FCMD よりもむしろ Walker-Warburg 症候群 (WWS)[4] に近い病像を示していた。従来から，FCMD と WWS との異同については議論の多い所であるが，この家系における発症をみると，この二つの症候群は恐らく対立形質であろうと推測された。

まとめ

FCMD の40家系について，同胞罹患を調べた所，9家系 (22.5％) に認められ，常染色体劣性遺伝としての期待値 25％にほぼ近似の値であった。同胞間の臨床症状は，筋肉・中枢神経系・眼科所見において一般に類似していたが，1家系では兄が FCMD，弟が WWS と診断された。これは FCMD と WWS が対立形質であることを推測させるものといえる。

文　献

1）大沢真木子：先天性進行性筋ジストロフィー症（福山型）の遺伝学的ならびに疫学的研究．東女医大誌 **48**：204-241, 1978

2）金沢　治，扇谷　明，河合逸雄：福山型先天性筋ジストロフィー症に合併した非定型欠神発作重延状態―バルプロ酸の注腸投与の試み―．てんかん研究 **3**：141-150, 1985

3）Yoshioka M, Kuroki S, Kondo T : Ocular manifestations in Fukuyama type congenital muscular dystrophy. Brain Dev **12** : 423-426, 1990

4）McKusick VA : Mendelian Inheritance in Man : Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive and X-linked Phenotypes. 9th Ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1990, p. 1248

Ⅲ．病理

A. 剖検例集積

プロジェクト研究Ⅲ　病　理
Ⅲ-A　剖検例集積

筋ジストロフィー剖検登録例の集計と解析

班　員　向　山　昌　邦
国立療養所中部病院臨床研究部

共同研究者　檜　澤　一　夫，香　川　典　子
徳島大学第一病理

要　旨

1）登録総数は327例で，そのうちDuchenne型が249例と最も多い。2）死亡年別登録数は最近漸減傾向にある。3）月別では1月の死亡例が多い。4）Duchenne型の平均寿命は18.96歳。最近5年間の平均寿命は20.50歳と著しく延長している。5）最近5年間に死亡したDuchenne型症例に対する人工呼吸器の装着状況を調べた結果，半数以上の症例で装着されておらず，最近の寿命の延長に人工呼吸器の装着が大きく関与しているとは考えられない。6）Duchenne型症例の死因は，肺炎などの感染症が減り，心不全や呼吸不全の割合が増加している。4)～6)の背景として筋ジスに対する医師，看護婦，パラメヂカルスタッフの治療，看護ケアの知識や能力の向上が大きく寄与していると思われる。

目的と方法

当プロジェクト研究班では，1981年以来全国の主要筋ジス施設で実施された筋ジストロフィーの剖検例を1例ごとに剖検登録票に記入してもらい，プロジェクトリーダー施設（徳島大学第一病理）へ送付された登録票をもとにして，死亡年齢，死因，病理所見などのデータをコンピューターへ入力している。1991年11月末までに24施設より327例が登録された。

本報告では，これらの症例について統計的に検討した結果について述べる。

結果と考察

1．病型別分類（表1）

327登録例のうち，Duchenne型が249例（76.1％）と最も多く，ついで福山型24例（7.3

表1　筋ジストロフィー症病型別剖検登録数

Duchenne type	249 cases
Famale Duchenne	2
Becker type	3
Emery-Dreifuss type	2
Limb-Girdle type	13
Malignant Limb-Girdle type	2
Facioscapulohumeral type	3
Fukuyama type CMD	24
Ullrich type CMD	2
Distal type	2
Myotonic MD	17
Unclassified	8
Total	327

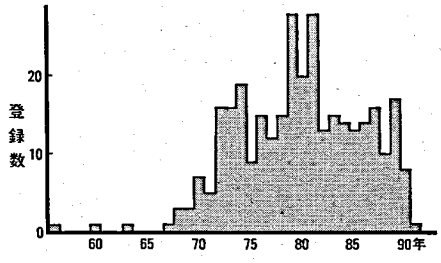


図1　死亡年別剖検登録数

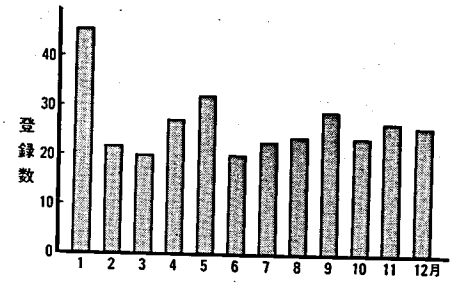


図2　死亡月別登録数

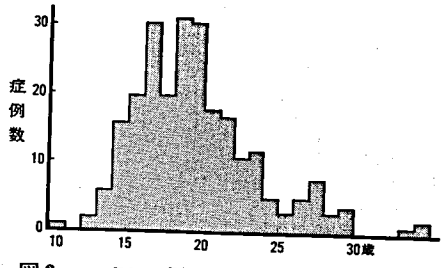


図3　DMD例の死亡年齢分布

表2　歴年別平均寿命

歴年別区分	症例数	死亡年齢分布	平均±標準偏差
1970～1974年	60	10～29歳	17.82±3.84歳
1975～1979年	69	12～29歳	18.06±3.41歳
1980～1984年	66	13～28歳	19.82±3.87歳
1985～1989年	44	13～34歳	20.50±5.62歳

%)，筋強直型17例（5.2%）の順である。

2．死亡年別剖検登録数（図1）

死亡年の記載のある症例は321例である。このうち一番古いのは1956年の1例である。登録数が増えてくるのは1970年以降で，最も多いのは1979年と1981年の各々28例である。しかし最近は漸減傾向にある。

3．死亡月別登録数（図2）

1月の死亡例が46例と他の月より多い。向山ら（1983年）が Duchenne 型症例について月別死亡数を調査したさいにも1月の死亡数が突出して多かった。

4．Duchenne 型筋ジストロフィーの寿命と死因

1）Duchenne 型249例の寿命（図3）は10歳から34歳の間に分布しており，平均寿命は18.96±4.11歳である。歴年別に5年ずつ区切って平均寿命の推移を検討する（表2）と，年を追うごとに寿命が確実に延長しており，最近の5年間の寿命が20.50±5.62歳と最も長くなっていることがわかる。

表3　人工呼吸器装着状況

	症例数	装着期間
体外式陰在呼吸器	8例	150～1,290日（平均616.1日）
陽圧式呼吸器	11例	1～705日（平均241.6日）
装着せず	24例	／
計	43例	

表4　人工呼吸器装着状況調査協力施設

国療八雲病院	国療原病院
国療岩木病院	国療徳島病院
国療東埼玉病院	国療筑後病院
東京女子医科大学	国療西別府病院
東京都立神経病院	国療川棚病院
国療鈴鹿病院	国療南九州病院
国療兵庫中央病院	

2）人工呼吸器装着状況（表3）

近年筋ジス患者に人工呼吸器を装着する場合がある。この処置が Duchenne 型症例の平均寿命にどの程度関与しているかを調べる目的で，1985～1989年の5年間に死亡した症例の剖検例をもつ筋ジス施設（44例，14施設）に人口呼吸器の装着状況を問い合わせた。表4の13施設から43例について回答があり（回答率 97.7%），人工呼吸器を装着した症例は体外陰圧式8例，陽圧式11例の計19例であった。また装着しない症例が24例あった。

装着期間は体外陰圧式では平均616.1日，陽圧式では平均241.6日であり，回答のあった43例についての平均は17.5日であった。この値は最近5年間の剖検例の平均寿命（表2）20.50歳が，1つ前のグループの平均寿命19.82歳より延長した0.68歳（248.2日）に及ばない。従って最近の Duchenne 型症例の平均寿命の延長に人工呼吸器の装着が大きく関与していたとはいえない。Duchenne 型筋ジストロフィーの

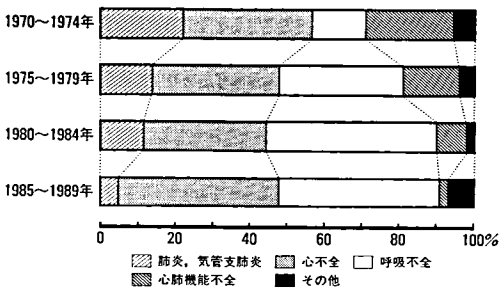


図4　歴年別DMD例の死因

寿命の延長には，以前の報告の中でも考察したように，筋ジスに対する医師，看護婦，パラメゲカルスタッフの治療，看護ケアの知識や能力の向上が寄与していると考えられる。

3）Duchenne 型の死因（図4）

最近の死因をみると肺炎などの呼吸器感染症の割合は減少し，心不全や呼吸不全の割合が増加している。

文　献

1）向山昌邦，檜澤一夫ら：筋ジストロフィー症剖検登録票の集計．厚生省神経疾患研究委託費・筋ジストロフィー症の疫学，臨床および治療に関する研究・昭和57年度研究報告書．1983, p. 61.

2）向山昌邦，檜澤一夫ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症の寿命，死因，病理解剖所見に関する研究．神経内科　**20**：377, 1984

3）Mukoyama M, Kondo K et al : Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan. J Neurol Sci **81**：155, 1987

Duchenne 型筋ジストロフィー症の心肥大について

——臨床ならびに剖検所見の検討——

班　員　松　家　　豊
国立療養所徳島病院

共同研究者　足立克仁[1]，木村千代美[1]，鳴尾隆子[1]
美馬伸章[1]，十枝紀巳代[1]，春藤玲子[1]
乾　俊夫[2]，森内　幹[3]，小野一雄[3]
川井尚臣[4]

[1] 国立療養所徳島病院内科　[2] 国立療養所徳島病院神経内科
[3] 徳島大学第一病理　[4] 徳島大学第一内科

要　旨

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）の男子剖検29例について，生前の臨床症状・所見と剖検所見を検討した。心重量が各年齢における正常範囲を逸脱し増加した例（心肥大群）は8例（27％）で，これらの症例の平均死亡年齢は17.9歳であった。残りは非心肥大群で21例あり，死亡年齢は20.0歳であった。歩行開始年齢には両群に差はなかったが，歩行不能年齢は心肥大群では9.9歳であり，非心肥大群の10.7歳に比べ有意に若年であった。心肥大群の心胸郭比(CTR)は，10歳で50％を越え，16歳の56％までは徐々に拡大し，その後は急速に拡大し，20歳で最大66％までになった。これに対し非心肥大群では全経過を通し50％以下でほぼ一定であった。心肥大群では心重量と心筋線維径は非心肥大群の約2倍であった。早期に骨格筋障害の進行が速く，CTR の拡大がみられる例は，心筋障害が強く，心不全となる可能性がある。

はじめに

DMD の多くは呼吸不全により死亡するが，早期から心拡大をきたし心不全により比較的若年で死亡する例があり，このような症例の心不全が注目されている[1]。本研究では，当院の剖検例について臨床所見と剖検所見を検討し，本症の心不全の病態について述べる。

対象と方法

対象は昭和46年から平成2年までに当院で剖検した DMD の男性29例である。図1に示したように，心重量が各年齢における正常範囲[2]

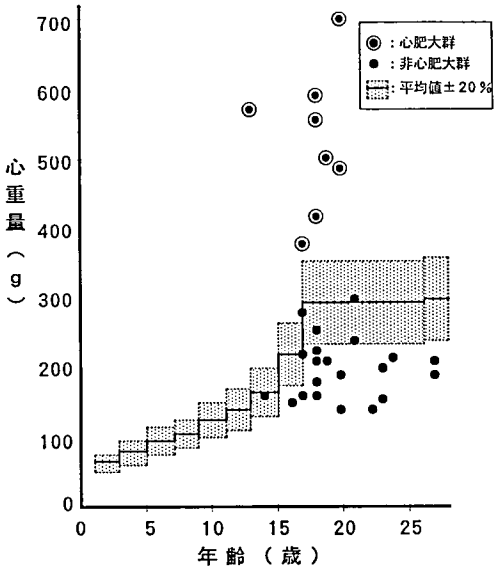


図1　DMD 剖検例の心重量
網目は正常心重量の各年齢における平均値の±20％の範囲を示した。

を明らかに逸脱し増加した例を心肥大群として分けると8例（27.6％）あり，死亡年齢は13～20歳（17.9±2.2, mean±SD）であった。残りの心重量が正常または減少した例を非心肥大群として分けると21例であり，死亡年齢は14～27歳（20.0±3.4）であった。

これら2群について，生前の臨床所見ならびに剖検所見を検討した。

さらに，剖検心では DMD 7例，正常対照（非筋疾患）1例において心筋細胞をコンピューターディスプレイ上に投影して横断面の短径を500個について測定した。

成績の統計処理は Student'st test で行い，$p<0.05$ を有意差ありと判定した。

結　果

1）下肢機能障害の推移

歩行開始年齢は心肥大群で 1.4±0.3 年，非心肥大群で 1.5±0.3 年と両群に差は見られなかったが，歩行不能年齢は，心肥大群で 9.9±1.2年，非心肥大群で 10.7±0.9年と前者が有意に早期に歩行不能に陥った。坐位保持不能年齢には差はなかった（図2）。

2）CTR の経時変化

心肥大群では，非心肥大群に比べ9歳頃より CTR が有意に大きくなり，10歳で 50％を越え，16歳の 56.3％までは徐々に拡大し，その後は急速に拡大し，20歳で最大 66％までになった。非心肥大群では全経過を通し 50％以下でほぼ一定であった（図3）。

3）死亡前の各種検査成績（図4）

下肢機能障害度は両群に差はなく，血清 CK 活性値は心肥大群で 93.1±61.9 U/m*l*（正常 25>）とやや高い傾向がみられた。

動脈血ガス分析では，O_2 分圧は両群に差はなかったが，CO_2 分圧は心肥大群で 45.0±11.5 mmHg，非心肥大群で 76.1±22.2 mmHg と後者において高値を示した。

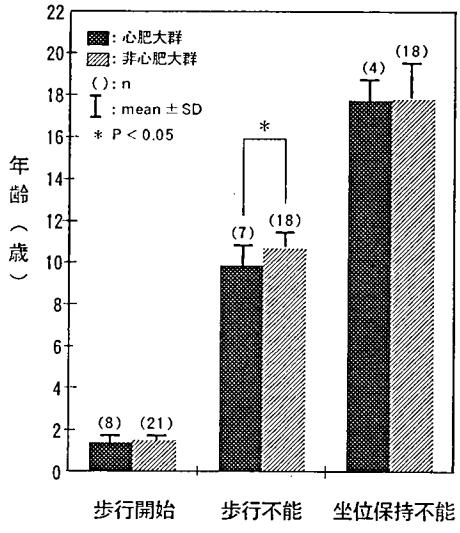


図2　下肢機能障害の推移

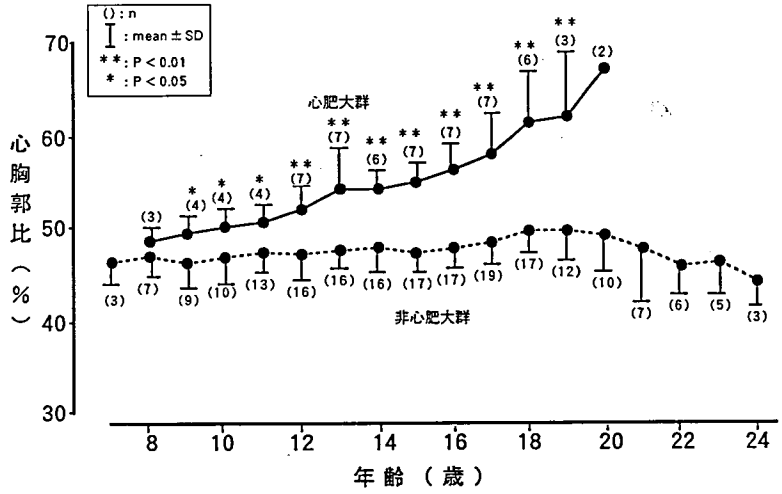


図3　心胸郭比の経時的変化

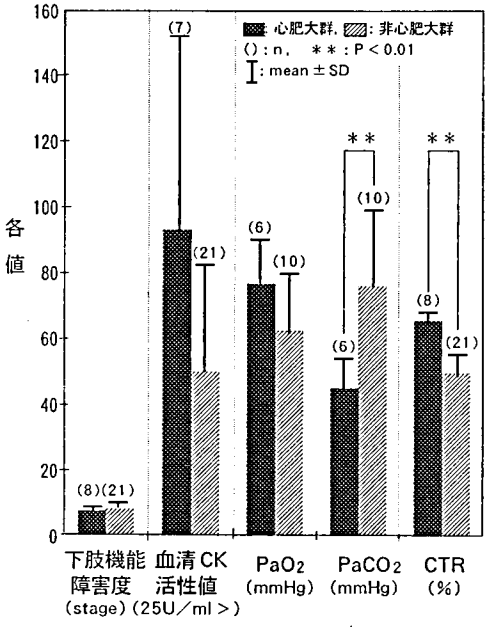


図4　死亡前の検査成績

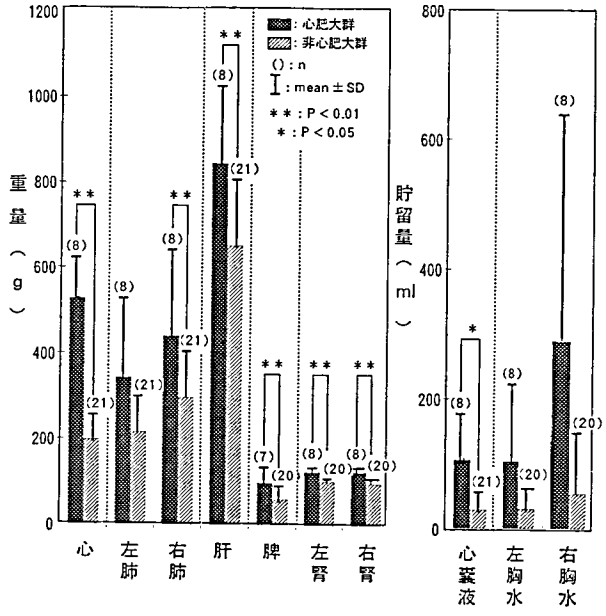
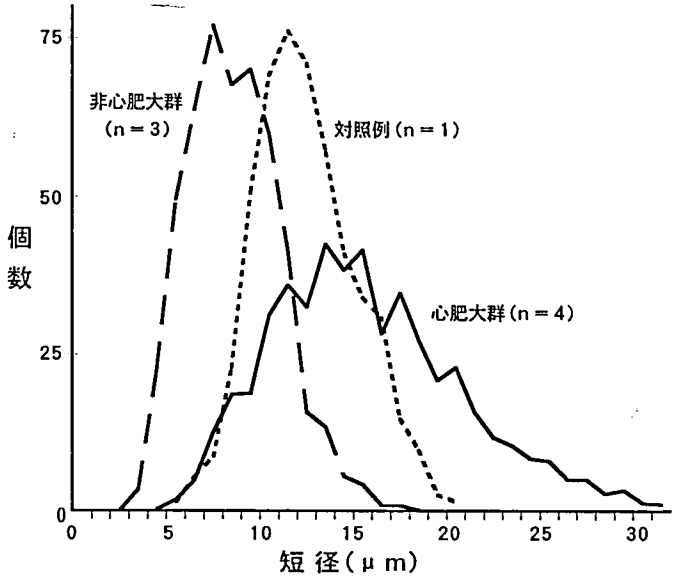


図5　各臓器重量と貯留液量



対照例の平均径：12.5 μm (27歳、男、胃癌、心重量300g)

心肥大群の平均径：16.0 μm
(13歳,570g、18歳,560g、19歳,500g、20歳,490g)

非心肥大群の平均径：8.7 μm
(20歳,140g、27歳,190g、27歳,210g)

図6　心筋線維径の分布

4）各臓器の重量と貯留液量（図5）

心重量では，心肥大群（526.3±101.4g）は非心肥大群（198.1±44.0g）に対し2倍以上の増加がみられた。

また，図5に示すように右肺，肝，脾，腎は心肥大群で増量がみられ，組織所見では高度の

うっ血所見も認められた。

心嚢液でも，心肥大群（105.0±78.1 m*l*）は非心肥大群（29.3±31.9 m*l*）に比べ増えていた。胸水は心肥大群で増加がみられたが有意差はなかった。

5）心筋線維径

図6は心筋線維径の両群の平均値を示したものである。対照例は正規分布を示し，平均径は12.5 μm であった。非心肥大群は対照と比べ径が細かい方に偏位していた。心肥大群では心筋径のバラツキが大きく，また対照と比べ太い方に偏位していた。

心筋細胞の短径は心肥大群（16.0±3.1 μm）では非心肥大群（8.7±1.4 μm）の約2倍太くなっていた。

考　察

DMD 患者の療護，治療に携わっている我々にとって，心不全の管理，治療は重要な課題の一つである。本研究では，本症の心不全の病態を明らかにするため，剖検例を心肥大群と非心肥大群に分けて，その臨床所見および剖検所見を検討した。

心肥大群は29例中8例，27.6％であった。この頻度は檜澤らの DMD 194 剖検例についての成績[3)4)]とよく一致している。

心肥大群の運動機能障害について歩行開始年齢には差はなかったが，歩行不能に陥る年齢は10歳頃が多く，非心肥大群に比べ約1年早く歩行不能に陥っていた。すなわち，発症から10歳前後までの骨格筋障害は心肥大群の方が進行が速いことを示す。この成績は田村らの若年心不全例の報告[5)]と一致しており，彼らの例の多くは我々の心肥大群に属すると思われる。晩期では，両群の骨格筋の障害度に差はなく，また血清 CK 活性値にも差はみられなかった。晩期には心肥大群では心不全の要因が加わり，安静が保たれ骨格筋障害の進行速度が軽減されることが考えられる。

心筋障害の一指標としての CTR は非心肥大群では全経過を通し 50％以下で，ほぼ一定であったが，心肥大群では10歳頃に50％を越え，16歳までは徐々に拡大し，17歳からは急速に拡大するパターンを示した。本症の心肥大は心筋の筋力低下に対し代償的に生じたものと考えられるが，これがさらに肥大すると心筋の収縮力低下が逆に増強され，その後急速に拡大するものと考えられる。また，心肥大群で心筋線維径の増大がみられたが，これは心筋の代償性肥大の存在を裏付ける成績である。

死因については，非心肥大群では CO_2 の増加が認められ，呼吸不全が強いことが示唆された。一方，心肥大群では剖検で心，右肺，肝などの重量の増加や高度のうっ血所見，多量の心嚢液などを認め心不全死が示唆された。

以上，早期より骨格筋障害の進行が速く，CTR の拡大がみられる例は，心筋障害が強く，心不全死となる可能性があるので，早期に心不全に対する対策が必要である。

本症はジストロフィンの欠損により発症するので臨床的に異なる2群が存在することは病因と矛盾する。著者らはその成因として，ジストロフィン以外の膜構成成分の個体差の関与を考えている。

文　献

1）酒井素子，本田　仁ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症における心不全死の検討．筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝および疫学に関する研究．平成2年度研究報告書，p. 173, 1991

2）Aimi S, Yasoshima S et al : Studies on the weight and size of internal organs of normal Japanese. Acta Pathol Jpn **2** : 173, 1952

3）檜澤一夫，森内　幹ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症剖検例の臓器重量について．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62年度研究報告書，p. 311, 1988

4）Moriuchi T, Fujii Y et al : Autopsy study on the weight of the heart, liver, kidney and brain in Duchenne muscular dystrophy. Tokushima J exp Med **38** : 5, 1991

5）田村拓久，高橋秀敏ら：若年で心不全を来して死亡した Duchenne 型筋ジストロフィー症患者の評価．医療　**44** : 455, 1990

Duchenne 型筋ジストロフィー患児に発生した横紋筋肉腫の免疫組織化学的検討

班　　員　福　山　幸　夫
東京女子医科大学小児科

共同研究者　小　峯　　聡[1]，斎　藤　加代子[1]，山　内　あけみ[1]
池　谷　紀代子[1]，大　沢　真木子[1]，高　橋　理恵子[1]
相　羽　元　彦[2]，河　上　牧　夫[2]，田　口　信　行[3]
[1] 東京女子医科大学小児科　[2] 東京女子医科大学病理科　[3] 国立小児病院血液科

要　旨

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）に悪性腫瘍を合併する例はきわめて稀であり，文献検索した限りではまだ3例の報告しかない[1)~3)]（表1）。横紋筋肉腫を合併した症例については1969年 Miller[1)] が悪性腫瘍の基礎疾患について集計した表に1例示されているが，筋ジストロフィーの病理については記載されていない。我々は，12歳の DMD に脊柱起立筋原発と考えられる横紋筋肉腫を合併した症例を経験した。本例の腫瘍組織を基礎疾患のない横紋筋肉腫と比較する目的で頬部原発例（8歳・女児），中耳原発例（4歳・男児）の横紋筋肉腫とあわせて，組織学的ならびに免疫組織学的検討を行い，筋の分化との関係について若干の考察を加えた。

症　例

左背部腫瘤を主訴として入院した DMD の12歳男児である。処女歩行は1歳6カ月で，運動発達の遅れに気づかれ，7歳時に他院にて DMD と診断された。当科では7歳9カ月から約3年間ベスタチン治療を行った。9歳時，右外果骨折後，10歳時から車椅子の生活となっ

表1　Muscular Dystrophy に合併した悪性腫瘍の文献的検討

報告年	筋ジストロフィー症病型（発症年齢）	悪性腫瘍（発症年齢）	治療法	予後（死亡年齢）
1969	不　明	①横紋筋肉腫［胎児型］ ②小脳腫瘍 ③急性白血病	不　明	不　明
1983	DMD	左視床腫瘍	V-P shunt	不　明
1984	limb-girdle (30y) limb-girdle (50y) pelvic girdle (50y)	多発性骨髄腫 (30y) 多発性骨髄腫 (63y) 多発性骨髄腫 (69y)	化学療法 化学療法 記載なし	死亡（58y） 死亡（64y） 死亡（76y）
1986	DMD (3y6m)	神経芽細胞腫 (9m)	手　術 化学療法	記載なし
1988	DMD (3y)	急性リンパ性白血病 (8y)	化学療法	死亡（10y）
1991（本症例）	DMD (1y6m)	横紋筋肉腫［胎児型］ (12y)	化学療法 放射線療法	生　存

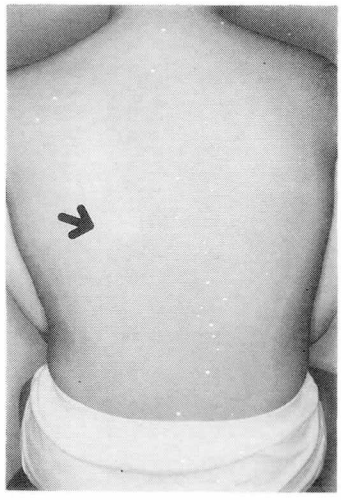


図1 患児の背部の写真
左背部（Th8～Th10 の高さ）に 4.5×5 cm の腫瘍が見られる。

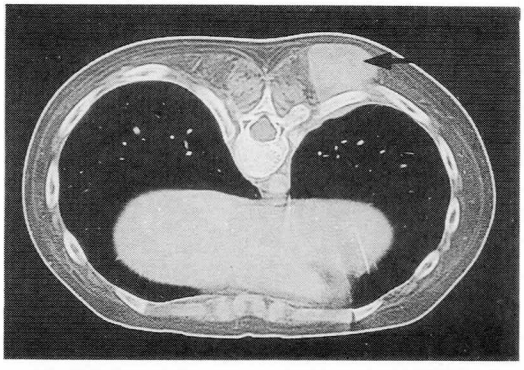


図2 胸部 CT
腫瘍の大きさは 3.9×3.7×4.5 cm である。肋骨を取り巻き胸膜への浸潤を一部に認める。

た。現在，座位保持可能である。

12歳7カ月車椅子の背に左背部(図1)がすれると訴え，直径 1.5 cm の腫瘤が触知された。腫瘤は増大傾向を示したため当科受診し，入院となった。胸部 CT(図2)では，腫瘤の大きさ 3.9×3.7×4.5 cm で肋骨を取り巻き胸膜への浸潤を一部に認めた。ガリウムシンチでは取り込みは見られなかった。患児のリンパ球由来の DNA を cDNA プローブを用いたサザンブロット法により分析したところ，患児に exon 49～52の欠失が認められ，母親は，CK の高値と DNA 検査における 16 kb の junctional fragment の存在により保因者であると証明された（図3）。

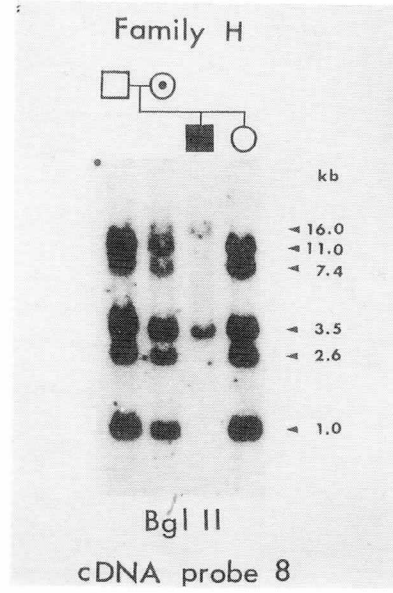


図3 患児・家族の DNA 検査
サザンブロット法。患児には exon 49～52 の欠失と，16 kb の junctional fragment を認める。母親にも 16 kb の junctional fragment があるため保因者であることが証明された。

方　法

筋蛋白，細胞骨格蛋白である vimentin[7] (Dakopatts)，muscle actin[6] (ENZO)，desmin[6][7] (Dakopatts)，myoglobin (Dakopatts)，dystrophin（国立精神神経センター小澤鍈二郎先生より供与を受けた）に対する抗体を一次抗体として，上記症例について ABC 法，dystrophin は螢光抗体法により免疫組織染色[4][5]を行った。

結　果

生検を行った腫瘍組織の HE 染色では，核小体と豊富なクロマチンを有する楕円形の核とわずかに好酸性の胞体を有する sarcoma cell の増殖が認められた。各種の筋蛋白に対する抗体を用いた免疫組織化学染色では，vimentin (+)，muscle actin(−)，desmin(+)，myoglobin(−)，dystrophin(−) であった（図4）。病理学的には，幼若性を残存した胎児型の横紋筋肉腫[8]と診断した。他の合併疾患のない女児例

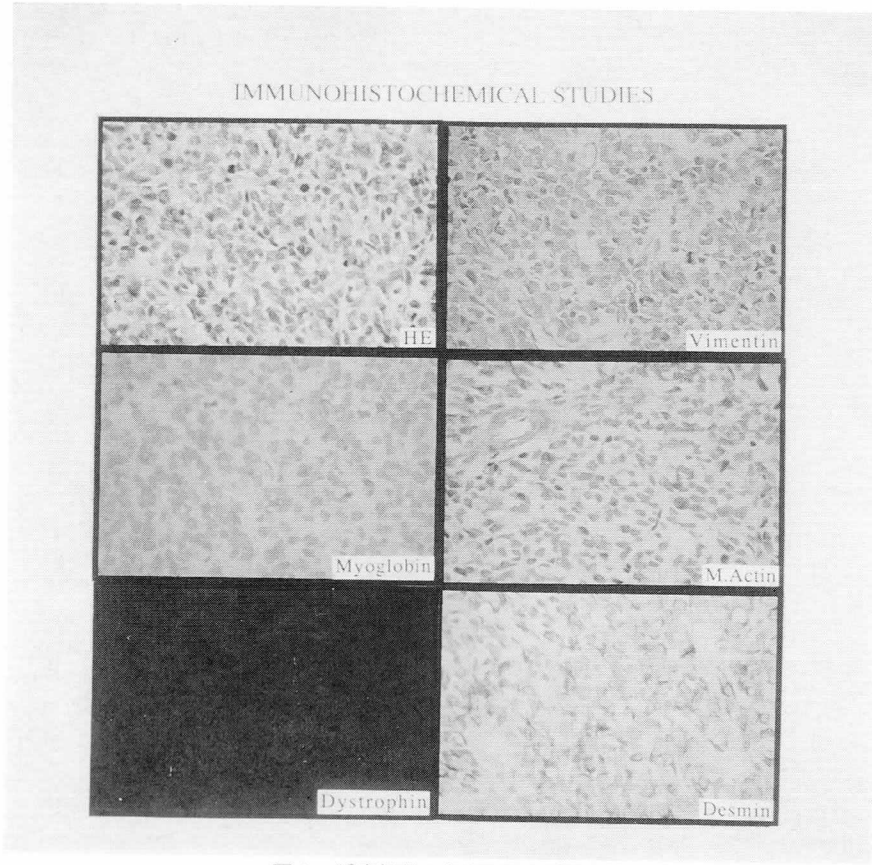
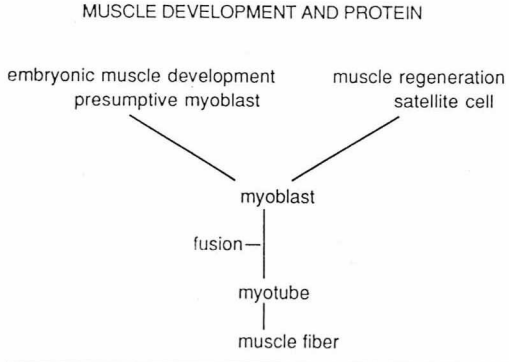


図4　腫瘍組織の免疫組織化学染色



protein	myoblast	myotube	muscle fiber
vimentin*	+	+	+
muscle actin	+	+	+
desmin*	−	+	+
myoglobin	−	−/+	+
dystrophin**	−	−	+

*Gomer RH & Lazarides E : Cell 23 : 524-532, 1981
**Hagiwara Y et al : Protoplasma 151 : 11-18, 1989

図5　筋発生，再生と筋蛋白，細胞骨格蛋白の関係
上段：筋発生，再生と筋細胞の分化の流れ
下段：筋芽細胞，筋管細胞，筋線維における筋蛋白，細胞骨格蛋白の発現。

（8歳）の頬部原発の横紋筋肉腫では，vimentin（±），muscle actin（−）細胞〜（+）細胞の混在，desmin（−）細胞〜（+）細胞の混在，myoglobin（−）であった。男児例（4歳）の中耳原発の横紋筋肉腫では vimentin（±），muscle actin（−）細胞〜（+）細胞の混在，desmin（−）細胞〜（+）細胞の混在，myoglobin（+）であった。

考　察

筋線維の発達について，胎児筋の発達と成熟筋の再生は同じようなプロセスを取ることが知られている。胎児筋では予定筋芽細胞，再生筋では筋衛星細胞が分化して筋芽細胞となる。さらに，分裂，増殖，融合して多核の筋管細胞を形成する[9)〜11)]。myosin などの筋特有の蛋白質合成は，筋細胞の融合の開始とともに急速に増加することが知られており，vimentin, desmin などの細胞骨格蛋白も筋の成熟により合成蓄積

表 2　本症例および基礎疾患を有さない胎児型横紋筋肉腫の腫瘍組織の免疫組織化学的検討の結果のまとめ

	本症例：12歳7カ月	8歳11カ月女	4歳11カ月男	正常筋細胞
基礎疾患	DMD	—	—	
部位	背部（左）	頬部（左）	中耳（右）	
光顕横紋構造	−	−	+	
rhabdomyoblast	− （核：大小不同） 細胞質：狭い	+	+	
vimentin	+	±	±	+
m. actin	−	−〜+ 混在	−〜+ 混在	+
desmin	+	−〜+ 混在	−〜+ 混在	+
myoglobin	−	−	+	+
dystrophin	−	not done	not done	+

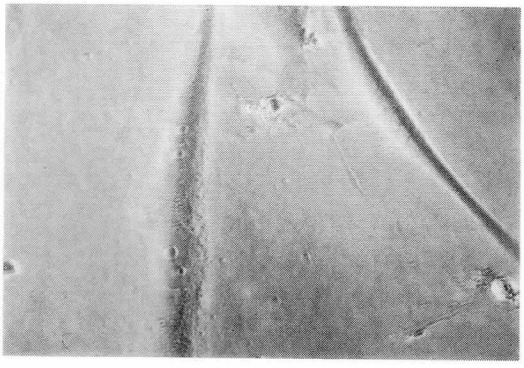


図 6　本例の培養腫瘍細胞
位相差顕微鏡で観察すると多核の筋管細胞を形成している。

が盛んになる。これらの蛋白が myofibril に組み込まれ，横紋を形成し，筋線維となる。

筋芽細胞，筋管細胞，筋線維における筋蛋白質・細胞骨格蛋白質の発現状態をまとめると，図のように合成されている[9)~11)]（図5）。vimentin, muscle actin は筋芽細胞の段階で，desmin は筋管細胞の段階で，それぞれ合成される。成熟した筋線維ではさらに多種の蛋白質の合成を見る。本研究では，これらの蛋白質が横紋筋肉腫において，特に DMD 患児に発生した腫瘍においてどのようになっているかを免疫組織学的に検討した。本症例を含む胎児型横紋筋肉腫3例の腫瘍組織の免疫組織学的検討の結果を表にまとめた（表2）。本症例では，横紋構造がなく，免疫組織化学染色の結果から3例中では最も未分化な段階の腫瘍細胞であると判定され，筋発達の段階では，ほぼ筋芽細胞に相当すると考えられた。頬部原発横紋筋肉腫の女児例では，腫瘍細胞は vimentin 弱陽性，muscle actin 陽性細胞の存在，myoglobin 陰性であった。したがって中等度の分化を示し筋管細胞に相当する蛋白の合成を示していた。中耳原発横紋筋肉腫の男児例では，光顕所見で横紋構造がみられ，免疫組織化学上からも分化した腫瘍組織と考えられ，最も分化の程度の高い筋線維に相当する筋蛋白，細胞骨格蛋白の合成を行っていると考えられた。

3例中，本症例が最も未分化で，生検した腫瘍細胞を培養し，その形態を顕微鏡で観察したところ多核の筋管細胞を形成した（図6）。従って in vitro では筋細胞に分化する potentiality を有していると判断できる。しかし，培養細胞は継代できず，免疫組織化学染色は施行できなかった。

結　語

1）DMD に悪性腫瘍を合併する例はきわめて

稀であり，現在までに報告されているものは3例であった。2）基礎に DMD をもつ本症例を含む embryonal rhabdomyosarcoma 3例につき免疫組織学的比較検討を行った。3）本症例は光顕所見・免疫組織所見から未分化な腫瘍組織と考えられ，正常筋の発達段階の筋芽細胞に相当する蛋白合成が認められた。4）DMD と未分化な横紋筋肉腫発生の因果関係は不明であった。

参考文献

1）R. W. Miller : Childhood cancer and congenital defects : A study of U. S. death certificates during the period 1960. Pediatr Res. **3** : 389, 1969

2）K. M. Johnston, S. Zoger et al : Neuroblastoma in Duchenne muscular dystrophy. Pediatrics **78** : 1170, 1986

3）E. Svarch, A. Menendez, et al : Duchenne muscular dystrophy and acute lymphoblastic leukaemia. Haematologia. **21** : 123, 1988.

4）R. Scupham, E. F. Gilbert, et al : Immnohistochemical studies of rhabdomyosarcoma. Arch Pathol Lab Med. **110** : 818, 1986

5）E. Lazarides : Intermediated filament : A chemically heteogenous, developmentally regulated class of proteins. Ann Rev Biochem. **51** : 219, 1982

6）S. Rangdaeng, L. D. Truong, et al : Comparative immunohistochemical staining for desmin and muscle-specific actin. Anatr Pathol. **96** : 32, 1991

7）F. M. Enzinger, S. W. Weiss : Rhabdomyosarcoma Soft Tissue Tumor **18** : 448, 1988

8）斎藤加代子：筋の細胞培養．槍澤一夫ら（編）筋病理学，文光堂．108, 1989

9）小沢鍥二郎：筋発生の形態学．槍澤一夫ら（編）筋病理学，文光堂．25, 1989

10）埜中征哉：筋の再生．槍澤一夫ら（編）筋病理学，文光堂．51, 1989

筋萎縮性側索硬化症における呼吸筋の組織化学的検討

班　　員　石　原　傳　幸
国立療養所東埼玉病院

共同研究者　川　村　　潤，佐々木　　明，青　柳　昭　雄
国立療養所東埼玉病院内科

要　旨

神経筋疾患患者の多くは呼吸不全で死亡する所から我々は1980年から呼吸筋を病理学的に検討してきた。その結果筋ジストロフィー剖検呼吸筋に「呼吸筋のセントラルコア変化」が高率に認められることを見いだして発表してきた。この変化は肺線維症などの一般呼吸不全患者の呼吸筋にも認められることから，現在では呼吸筋の疲労を反映すると考えられている[1)2)3)]。

今回は代表的な神経原性疾患である筋萎縮性側索硬化症（以下 ALS と略す）の呼吸筋におけるセントラルコア変化の有無を検討しましたので発表する。

対象と方法

対象は当院で死亡した ALS 4症例（表1）。すべて男性で，最終的には呼吸不全で死亡した。年齢は44から65歳，罹患期間は1年から5年。解剖時に採取した骨格筋を組織化学的に検討した。表2には今回検討した筋を示す。表に示すように23個の筋肉を染色した。

表1　対象患者

番号	年齢	罹病期間
438	44歳	約5年
491	65	約1年
574	57	約2年
706	50	約2年

表2　検索筋

	438	491	574	706
横隔膜	+	+	+	+
第2肋間筋		+	+	+
第9肋間筋			+	+
第5肋間筋		+		
上腕2頭筋		+	+	+
大腿4頭筋	+	+		
前脛骨筋		+		
SCM			+	
喉頭筋				+
食道		+		+
腹筋			+	+
肛門筋				+

結　果

四肢骨格筋については，4症例ともに group atrophy を含む典型的な神経原性所見が認められた。図1は症例2の第5肋間筋であるが，呼吸筋にも神経原性所見が認められる。図2は症例1の横隔膜の NADH-TR 染色である。「呼吸筋セントラルコア」を示す。この症例ではセントラルコア変化が存在すると考えた。症例2の横隔膜にはコア構造は認められなかった。図3は症例3の横隔膜である。矢印の部分にコアのような構造が認められるが，周辺部が濃染しておりまた，他の骨格筋には標的線維が認められているためにこれは標的線維であると考え

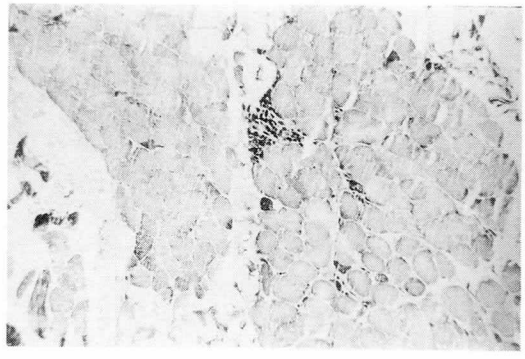


図1　症例2の第5肋間筋．神経原性所見を認める。

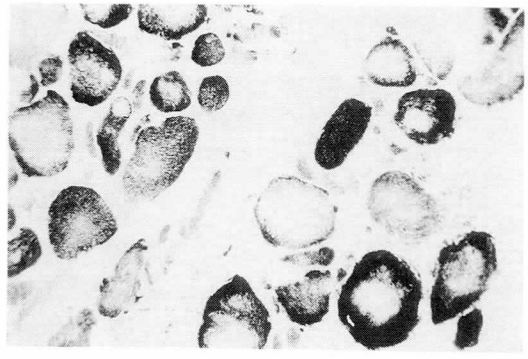


図2　症例1の横隔膜。NADH-TR 染色呼吸筋セントラルコアが認められる。

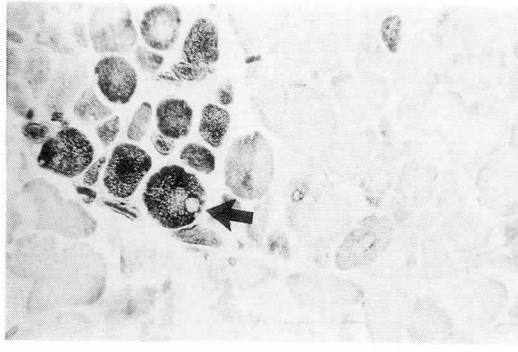


図3　症例3の横隔膜。NADH-TR 染色。矢印の線維は標的線維と考えられる。

表3　呼吸筋セントラルコアの有無

番号	右横隔膜	左横隔膜	第2肋間筋	第9肋間筋	第5肋間筋
438	＋				
491	−	−	−		−
574	−	−	−	−	
706	＋?		−	−	

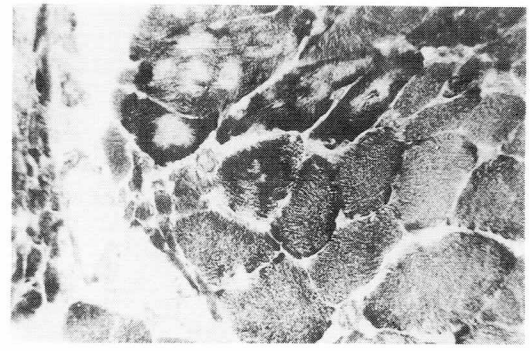


図4　症例4の横隔膜。コアか target fiber かの鑑別困難。

た。症例4の横隔膜でも標本の一部にはコアが標的線維と呼ぶべきか迷う場所が認め，？と判定した。表3にはまとめを示す。1例で典型的と思われるコアが認められたが，あとの症例ではっきりしたコア構造は認められなかった。

考　案

神経原性疾患では骨格筋に標的線維が出現することは周知の事実である。標的線維とセントラルコア病のコアは電顕的には区別できないといわれている。Gomori のトリクローム変法では標的線維の一部が homogenous に染色されることもあり，従来のわれわれの呼吸筋セントラルコアの criteria が標的線維でも満足しうる場合があることに気付いた。

図5は preliminary なデータではあるが

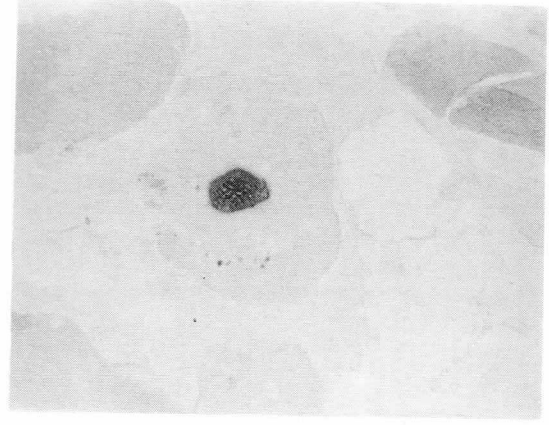


図5　DMD 症例第2肋間筋。コア部が Alizarin red 染色で陽性に染色された。標的線維の target 部分では陰性であった。

DMD 呼吸筋のセントラルコアをアリザリン red で染色したものである。このように呼吸筋セントラルコア変化の一部にはカルシウムが増加している部分もある。標的線維が多数認められた症例の骨格筋で染色してみたところ，target における Ca 増加は認められなかった。今後は呼吸筋の Ca^{-} 染色結果を検討し神経原性変化と呼吸筋のセントラルコアの鑑別に有用かどうかを報告する予定である。

呼吸筋のセントラルコア変化については現在呼吸筋疲労を反映する病理学的変化と考えている。DMD では横隔膜では全例に高率に認められるし，第2肋間筋でも高率に認められる。DMD とおなじように肺胞低換気に陥る ALS では対照的に呼吸筋疲労を反映するコア変化が存在しても低率にしか認められないことは，ALS では神経が変性に陥るために呼吸筋肉自体は運動することなく肺胞低換気に陥ると考えられる。従って ALS においては呼吸筋肉自体は疲労していないことからコアの出現が低率なのであろうと思われる。

結　論

1．筋萎縮性側索硬化症4例における剖検呼吸筋を組織化学的に検討した。

2．検討した呼吸筋は横隔膜と肋間筋である。

3．「呼吸筋のセントラルコア」変化と標的線維の鑑別は組織化学的には困難であった。

4．筋萎縮性側索硬化症の呼吸筋には神経原性変化が認められたが，「呼吸筋のセントラルコア」変化は著明には認められず筋ジストロフィーの呼吸筋と対照的であった。

5．呼吸筋疲労により出現すると想定されている「呼吸筋のセントラルコア」変化が筋萎縮性側索硬化症の呼吸筋で著明には認められないことの原因は横隔膜神経の変性により呼吸筋自体の運動が減少しているためであろうと推定される。

文　献

1）石原傳幸，宮川雅仁，五味慎太郎，儀武三郎，青柳昭雄：呼吸筋疲労にみるセントラルコア．呼吸と循環　**36**：137-143, 1988

2）石原傳幸，宮川雅仁，五味慎太郎，儀武三郎，青柳昭雄：筋疾患と呼吸筋．呼吸　**6**：1356-1361, 1987

3）石原傳幸，清水輝夫，杉田秀夫，儀武三郎，青柳昭雄：呼吸不全における呼吸筋の病理—組織化学および免疫組織化学的検討—．日本胸部臨床　**47**：379-385, 1988

増殖細胞核抗原（PCNA）を指標とした骨格筋再生の動態

班　員　檜　澤　一　夫
徳島大学医学部第1病理学教室

共同研究者　小　野　一　雄[1]，森　内　　幹[1]，阿　部　潤　一[1]
伊　井　邦　雄[1]，香　川　典　子[2]
[1] 徳島大学医学部第一病理学教室　[2] 徳島大学医療技術短期大学部

目　的

細胞動態の検索の方法として，radioisotope や flow cytometry などが広く用いられているが，近年，増殖細胞の核内に現れる蛋白（PCNA）に対するモノクローナル抗体が作られ[1] パラフィン包埋材料を用いて非常に簡便に増殖細胞の局在が可能となった。PCNA は，従来 Cyclin とよばれていたもので，細胞周期の G_1 後期～S期に DNA ポリメラーゼ δ の活性に必要な蛋白として出現する核内蛋白である[2]。

今回，この抗 PCNA 抗体を増殖細胞の特異マーカーとして，また抗 DESMIN 抗体を筋芽細胞の初期分化マーカーとして用い，

1）骨格筋の再生過程における増殖細胞の出現，消退する時期とその局在
2）再生筋芽細胞が分化を開始する時期
3）人の神経筋疾患における DNA 合成細胞の有無とその局在

について，明らかにすることを試みた。

材料と方法

A）動物実験；成熟ラット（Wister，♂，平均350g）のヒラメ筋に，マーカイン（塩酸ブピバカイン0.5％）5～6.5mg/kg を1回注射し，注射後3時間から6日まで経時的に，筋を摘出して，ホルマリン固定，パラフィン切片を作製した。対照として，0.1M 燐酸緩衝液 0.1ml を同様に注射し，24時間後に摘出した。

表1　人の神経筋疾患の検索対象

病名	症例数	平均年齢
Muscular dystrophy		
Duchenne	20	15
Becker	1	16
Limb-girdle	4	35
Congenital	2	5m
Myotonic	5	40
Polymyositis & Dermatomyositis	20	49
Werdnig Hoffman 病	4	5m
Amyotrophic lateral sclerosis	5	59
Charcot-Marie-Tooth 病	1	60
Spinal progressive muscular atrophy	1	54

B）人の神経筋疾患；別表のような症例について，過去の筋生検の材料を用いた（表1）。

C）組織化学；HE，PTAH 等
免疫組織化学；1次抗体として，
抗 PCNA（PC10，Novocastra-labo）
抗 DESMIN（D33，Dakopatts）を用い，
SAB 法，APAAP 法によった。

結　果

I）動物実験

6時間：好中球が壊死筋線維内に浸潤し始める。PCNA 反応は陰性。

12時間：壊死筋線維内に好中球に加えて Mφ（貪食細胞）の浸潤が目立ち始める。PCNA 反

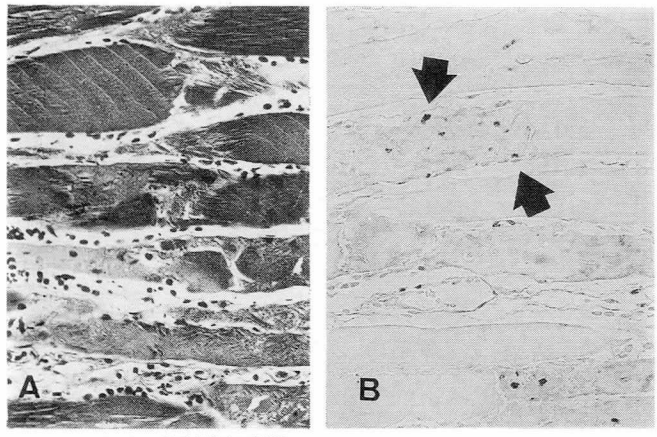


Fig. 1 マーカイン注射後24時間
A）壊死筋線維と細胞浸潤［HE 染色］
B）壊死筋線維の筋鞘に沿って残存する紡錘形細胞（↑）に PCNA 陽性［抗 PCNA］

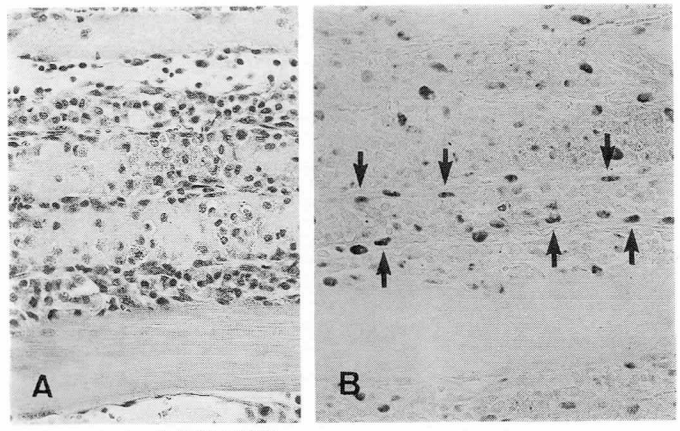


Fig. 2 マーカイン注射後48時間
A）壊死筋線維の基底膜沿いに筋芽細胞が増殖［HE 染色］
B）増殖する筋芽細胞（↑）の核に PCNA 陽性［抗 PCNA］

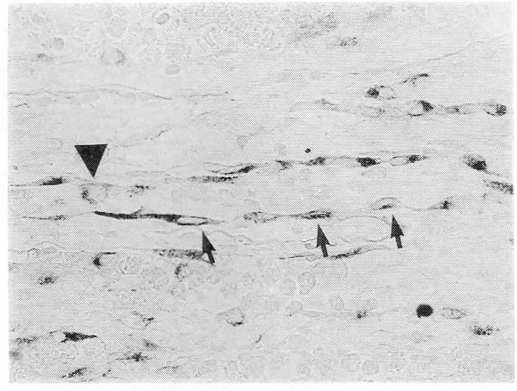


Fig. 3 マーカイン注射後48時間
増殖する単核の筋芽細胞に DESMIN 陽性（↑），中には分裂像を示す細胞にも DESMIN 陽性（▲）である［抗 DESMIN］

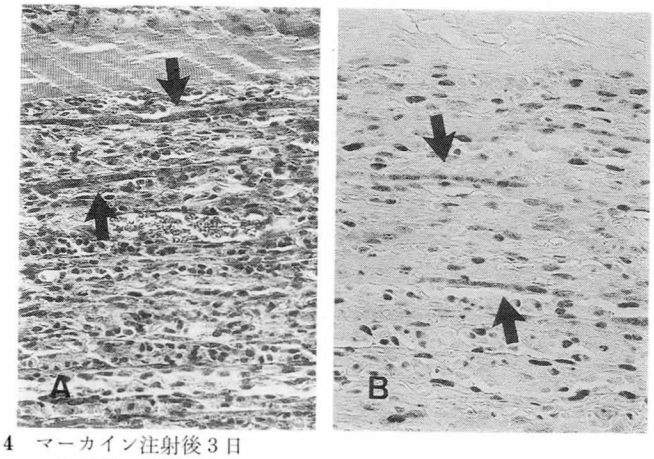


Fig. 4 マーカイン注射後3日
A）幼若な筋管が現れる（↓）［HE 染色］
B）それら再生筋管の核に PCNA 陽性（↑）［抗 PCNA］

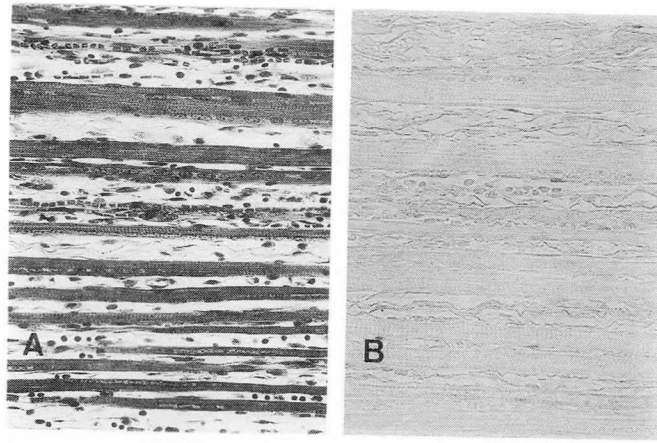


Fig. 5 マーカイン注射後6日
A）再生筋線維［HE 染色］
B）再生筋線維の核は PCNA 陰性［抗 PCNA］

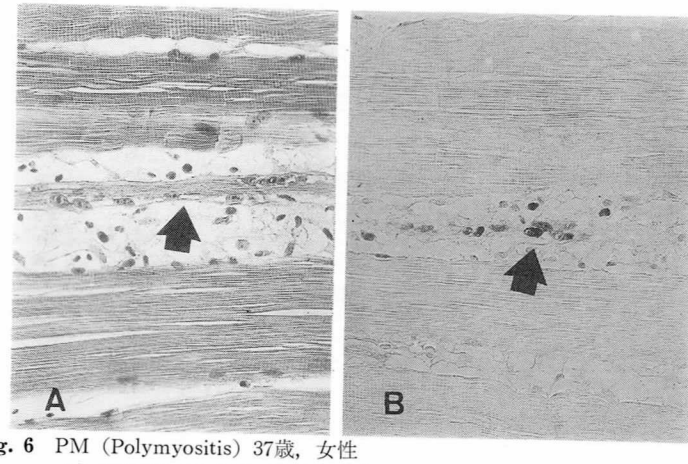


Fig. 6 PM（Polymyositis）37歳，女性
A）再生筋線維（↑）［HE 染色］
B）再生筋線維の核に PCNA 陽性（↑）［連続切片，抗 PCNA］

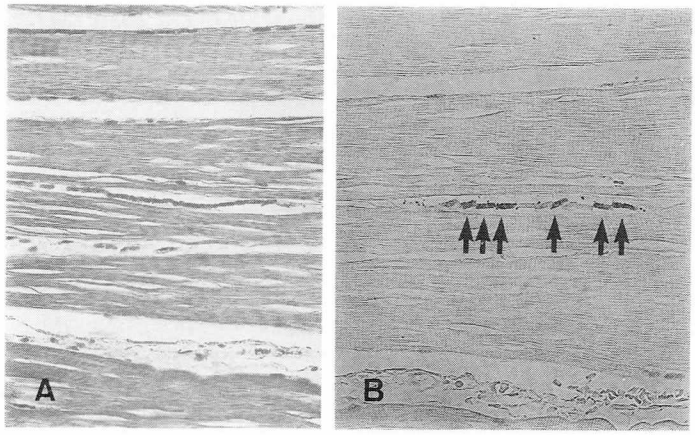


Fig. 7 MyD（Myotonic Dystrophy）63歳，男性
A）中心核の核鎖［HE 染色］
B）核鎖に PCNA 陽性（↑）［連続切片，抗 PCNA］

応は，線維芽細胞，血管内皮，浸潤細胞の一部に弱陽性となる。

24時間：壊死筋線維の元の筋鞘に沿って，紡錘型の細胞が残存しており，PCNA はそれらの核の少数に陽性，また残存筋線維の壊死断端の筋鞘核に陽性のものがある。(Fig. 1)

36時間：壊死筋線維の筋鞘沿いに残った紡錘形細胞（衛星細胞）がその数を増し始め，それらの核に PCNA 反応が陽性。

48時間：筋芽細胞の増殖が続き，それらの核の多くに PCNA が強陽性で（Fig. 2），一部の筋芽細胞に既に DESMIN 反応が見られている (Fig. 3)。DESMIN 陽性細胞の内には，分裂像を示すものや，二重染色で核に PCNA 陽性の細胞もある。

3日：筋芽細胞の融合による幼若な筋管が現れ始める。PCNA 反応は，それら幼若な筋管の核にも陽性のものがある（Fig. 4)。DESMIN 反応は筋管を形成して後，急激に強くなる。

4日：再生筋管が径を増して筋線維へと成熟が進み，それらの筋鞘核の PCNA 反応は減弱，陰性化する。DESMIN 反応もやや弱くなる。

6日：再生筋線維の筋鞘核の PCNA 反応は陰性で，間質の線維芽細胞のみに陽性（Fig. 5)。

II）人の神経筋疾患の PCNA 反応

1）DMD，PM など筋原性疾患の壊死，再生の病変部で PCNA が陽性の筋芽細胞が見られたが，陽性核の分布，数は病変の新旧，範囲などにより様々であった。マーカインによる再生実験で，単核の筋芽細胞だけでなく，幼若な筋管の核にも PCNA 反応が見られたが，同様の所見が人の病変にもみられた（Fig. 6)。進行した DMD で筋線維の大小不同，間質の線維化が著明なものでは，PCNA は筋鞘核には陰性で，間質の線維芽細胞にのみ陽性であった。

2）MyD（筋緊張性筋ジストロフィー症）で見られた中心核の核鎖に PCNA 反応がしばしば強陽性であった（Fig. 7)。

3）神経原性病変（萎縮筋線維，核塊）には，PCNA 反応は陰性であった。

考　案

マーカインの1回筋肉注射による壊死，再生過程において壊死筋線維の筋鞘に沿って残存した筋芽細胞（衛星細胞）がその数を増すのを確認できるのは，HE 染色切片では36時間を経てからであるが，抗 PCNA 抗体を用いた検索では，少数ながら，24時間頃既にこれらの細胞に反応が見られ，DNA 合成期に入ったものがあると思われる。その後，筋芽細胞も急速にその数を増し，PCNA 陽性細胞数は60〜72時間頃最大となり，筋芽細胞が融合して筋管となり筋線維へと成熟するに従い陽性細胞は減少し，筋核の PCNA は6日で全く陰性化する。この過程で筋芽細胞が融合して間もない幼若な再生筋管の核にも相当数の PCNA 反応が見られたことは，筋管の核は細胞周期内にはないとする従来の説[3)4)] に矛盾する結果であった。これは，

S期に発現した PCNA 蛋白が筋芽細胞の融合して後，残存したものとすれば考えやすいが，PCNA の細胞周期内での増減，半減期等，生化学的性質には未だ一致をみていない点もあり今後の検討を要する。

極めて未分化な活性化筋衛星細胞がいつ頃，分化へむかうか？という点について，DESMIN を初期分化マーカーとして調べた結果，マーカイン注射後48時間で，既に単核の筋芽細胞の一部に DESMIN が発現しており，中にはその核に PCNA 陽性であるものや，分裂最中のものなど明らかに増殖期の筋芽細胞に DESMIN は陽性であった。再生筋芽細胞は，増殖期にあって，既に分化を開始していると思われ，これは In-vitro での検索結果[5] とは異なっていた。

人の神経筋疾患を対象にした PCNA の病理組織学的検索の報告は未だない。DMD, PM 等筋原性疾患の壊死，再生の部位に PCNA 反応は陽性であったが，PM に比べ DMD では病変部では同反応はその数も強さも弱く，進行した DMD では，同反応は間質の線維芽細胞のみであった。PM において再生筋管の筋核に PCNA 強陽性のものが見られたことは，マーカインによる再生実験において再生筋管の筋核に同所見を得たことと合わせてその解釈については今後の課題としたい。

MyD で見られた中心核の核鎖に PCNA 反応が陽性であった。中心核，核鎖の形成期序は不明な点が多いが，無糸分裂性の核増殖が起こっている事を示す所見かもしれない[6]。

ALS, Werdnig-Hoffmann 病等の神経原性病変において，萎縮筋線維や核塊には PCNA 反応は陰性であった。相対的に筋核が多く，増えているように見えても核の増殖によるものではないと考えられた。

まとめ

PCNA と DESMIN に対する抗体を用い，骨格筋の実験的再生，人の筋病変を検索した結果，1）筋芽細胞は増殖期にあって，既に分化を開始している。2）MyD で見られる中心核の核鎖は核増殖による。3）神経原性病変の核塊は核増殖によるものではない，などの示唆がえられた。

文　献

1）Waseem NH, Lane DP, Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). J. Cell Science (1990) **96**: 121-129.

2）Bravo R, Frank R, et al: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ. Nature (1987) **326**: 515-517.

3）Buckley PA, Koninsberg IR, Myogenic fusion and the duration of the post-mitotic gap. Develop, Biol. (1974) **37**: 193-212.

4）Bischoff R, Holtzer H. Mytosis and the processes of differentiation of myogenic cells in vitro. J. Cell Biology (1969) **41**: 188-200.

5）Gard DL, Lazarides E. The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro. Cell (1980) **19**: 263-275.

6）檜澤一夫，北室直男ら：筋緊張性ジストロフィー症の組織学的，組織化学的，および電子顕微鏡的研究．脳と神経　1968, **20**: 33-44.

mdx マウスにおける筋再生能の検討

班　員　斎　田　恭　子
国立療養所宇多野病院神経内科

共同研究者　板　垣　泰　子[1]，岩　村　京　子[2]
丸　山　秀　子[2]，西　谷　　裕[3]

[1] 国立療養所宇多野病院小児科　[2] 国立療養所宇多野病院臨床研究部　[3] 国立療養所宇多野病院神経内科

要　旨

mdx 及びコントロールマウスの右・左のヒラメ筋に，マーカイン及び生食を2～4回注入した。3.5カ月及び5カ月後に，筋肉の凍結切片を作成し，HE，アザン染色にて壊死・再生を観察した。mdx 筋では，マーカインで4回壊死させた筋でも再生は活発であったが，筋線維の小径化，大小不同，肥大筋線維の出現，筋内鞘間線維の増加がみられた。この間質の線維化はマーカイン注入側では，生食注入側に比し1.3倍進行していた。これは対照マウス筋の7倍であった。

はじめに

mdx マウスは，X-linked の dystrophic mouse で，その筋膜に dystrophin 蛋白が欠損していることが知られ，ヒト Duchenne 型筋ジストロフィー症のモデルと考えられている。しかしその臨床像は，DMD と異なり，はっきりした筋力低下は認められず，寿命も正常である。その原因の一つとして mdx では，生後15日頃より広範囲な筋壊死が生じるが，それらは活発な筋再生により，ほぼ完全に修復され，これらの再生筋は再度壊死に陥りにくいと言われている。

今回我々は，dystrophin 蛋白欠損と mdx マウスの筋肉の機能・病理の関連をさらに追求するために，マーカインを用いて，mdx 筋に数回の壊死・再生を起こさせ，mdx 筋の筋再生能力，線維化，病理形態を，対象マウスのそれと比較検討した。

方　法

対象は mdx マウス及びコントロールマウス各12匹である。壊死・再生は，生後7週目より，4週毎に，エーテル麻酔下で，右側ヒラメ筋には0.5％マーカイン 0.1 m*l* を，左側ヒラメ筋には生理食塩水 0.1 m*l* を注入した。組織標本の作成には3.5カ月（2回注入）後，及び5カ月（4回注入）後に各6匹より，左右ヒラメ筋を摘出，その筋腹を中心として，凍結切片を作製し，HE，ATPase，アザン染色にて，壊死・再生状態を観察，写真撮影，ピアス画像解析装置により定量した。

結　果

(1)平均体重の変化：実験開始時 mdx は17.5 g，コントロールは 18.8 g であった。3.5カ月目では，mdx は 26.1 g，コントロールは29.8 g であった。5カ月目では，mdx は28.6g，コントロールは34.0 g であり，mdx マウスの体重増加はコントロールのそれに比し小さかった。

(2)再生ヒラメ筋の組織像とヒストグラム：マーカイン等注入後3.5カ月目では，mdx マウスでは，マーカイン及び生食注入側共に，筋線維の大小不同，核内方転位，軽度の筋内鞘内間質の増加がみられた。筋線維の中には，どちら側にもかなり肥大化した大径線維が散在していた。

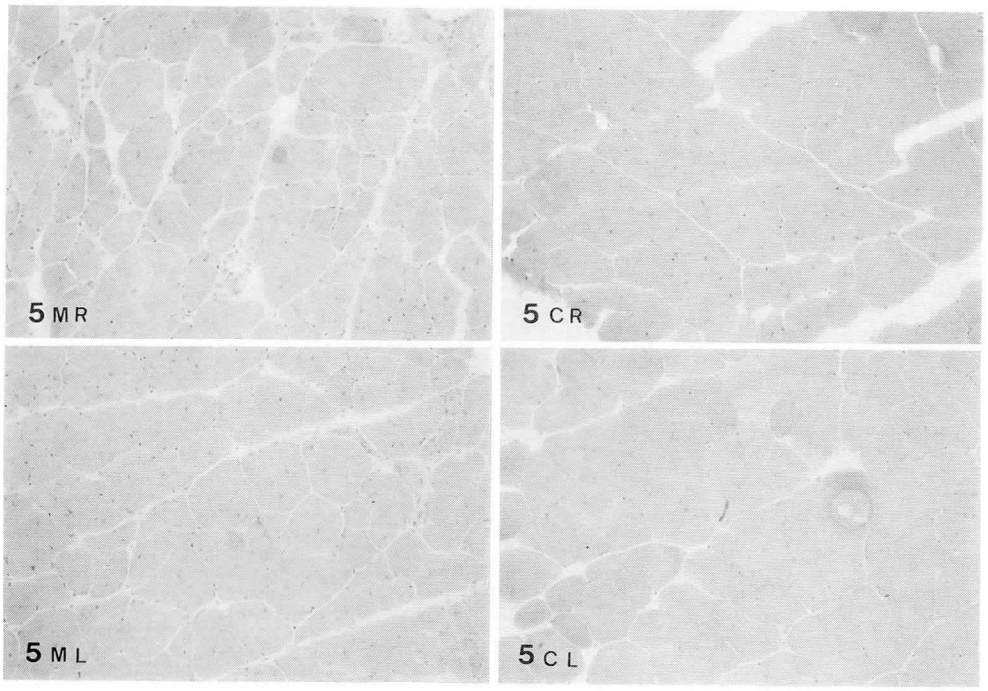


図1 マーカイン及び生食注入（4回）后5カ月目のマウスヒラメ筋.
5MR：mdx, マーカイン注入側, 5ML：mdx, 生食マーカイン注入側
5CR：コントロールマウス, マーカイン注入側, 5CL：コントロールマウス, 生食マーカイン注入側
mdx, マーカイン側で特に筋内鞘の線維化 筋線維大小不同, 肥大化巨大筋線維（矢印）の出現がみられる。

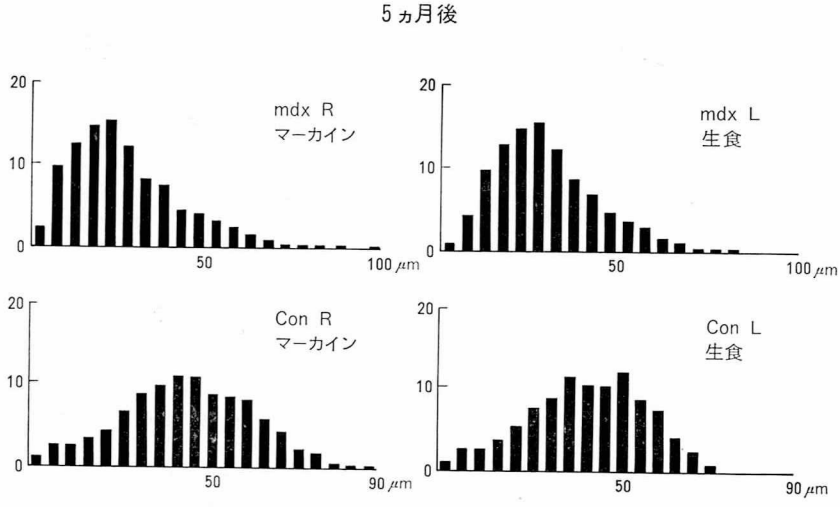


図2 マウスヒラメ筋の再生筋線維ヒストグラム. 上段が mdx マウス筋, 下段がコントロール・マウス筋である。mdx 筋では, コントロールに比し小径化が著明である。mdx, マーカイン側では mdx, 生食側に比し, より小径化線維が多い。また, コントロールに比し大径線維が存在する。

コントロールマウスでは, マーカイン側で核内方転位がかなりみられた。大小不同, 間質増加は著明ではなかった。ヒストグラムでは, mdx マウスで両側に小径線維の増加がみられたが,

表1　再生ヒラメ筋の結合織面積率（%）

	3.5カ月 マーカイン	3.5カ月 生食	5カ月 マーカイン	5カ月 生食
mdx マウス	0.029	0.025	0.043	0.032
コントロールマウス	0.016	0.008	0.006	0.002

マーカイン側と生理側に差はなかった。5カ月目では，図1に示すように，mdx マウスのマーカイン注入側でより著明な筋内鞘内間質増大がみられた。しかし筋線維の大小不同，核内方転位の程度，肥大筋線維の存在の割合に差はなかった。mdx マーカイン側で，より肥大化した筋線維が目立った。ときに，このような線維に opaque fiber 様の変化がみられた。ヒストグラムでは，図2のように，mdx において，小径化線維が多数ある一方で，大径線維が存在した。再生ヒラメ筋のヒストグラムのデータをまとめると表1のようになる。即ち，mdx マウスの筋線維平均直径はコントロールに比し小さい。最小径の大きさは mdx とコントロール間に差はないが，最大径には差がある。即ち，3.5カ月目では，直径 65 μm 以上の筋線維数は mdx のマーカイン側では2.14%存在するのに対して，コントロールでは0.65%である。同じく5カ月目で，直径 80 μm 以上の筋線維は，mdx マーカイン側では0.88%存在するのに対して，コントロールでは0.37%である。この様な，その平均値径に比して著明に肥大化した筋線維は，コントロールマウス筋をマーカインで破壊したものでは出現していない。mdx 及びコントロールにおいて，マーカイン側と生食側には顕著な差はみられない。

(3)再生ヒラメ筋の結合織の一定筋肉断面積に占める割合：表2にみられるように，3.5カ月目では，mdx マーカイン側ではコントロールのそれの約2倍，5カ月目では約7倍の筋内鞘の線維化がみられた。

まとめ

1．mdx マウスひらめ筋では，マーカインにより壊死・再生を惹起させた筋肉の筋線維のヒストグラムは，生食を注入して壊死・再生が殆んどない筋肉のそれとは，大きな差はみられなかった。又，筋線維平均直径にも差はなかった。即ち，マーカインで2回壊死させた筋肉も，4回壊死させた筋肉も，その再生は活発であると考えられた。

2．しかし，mdx 筋では，明らかに，生食注入側に比し，マーカイン注入側では5カ月後に間質の線維化が1.3倍進行した。これは対照マウス筋の7倍である。

3．mdx 筋では平均直径は 30±16 μm で，対照の 40±15 μm に比し明らかに小さい。mdx 再生筋では，大小不同が強く，巨大ともいえる内方転位した多核を有する肥大筋線維が対照の 2.5～4.0 倍と多い。これは3カ月でも5カ月でも同様である。

考　案

これまで，mdx にマーカインを1回投与した

表2　再生ヒラメ筋のヒストグラム・データのまとめ

		3.5カ月 マーカイン	3.5カ月 生食	5カ月 マーカイン	5カ月 生食
mdx (コントロール)	平均直径	28±15 μm (36±12)	28±15 (36±13)	36±12 (40±15)	36±13 (41±14)
	筋線維分布 最小径	5 μm (6)	5 (6)	5 (5)	5 (5)
	最大径	116 (68)	104 (77)	104 (84)	99 (90)
	直径＞65 μm 筋線維%	2.14% (0.65)	3.03 (0.48)		
	直径＞80 μm 筋線維%			0.88 (0.37)	0.51 (0.18)

あとでの筋再生は，対象とはあまり変りがないと報告されている。今回我々は，マーカインを繰り返し筋肉内に注入することにより，筋線維の大小不同傾向の増加，巨大肥大筋線維の出現，筋 endo- 及び peri-mysium 内での線維化の増強を認めた。mdx マウスは再生をくり返すと，多くの再生筋線維は小径化しているが，なかに直径が2～4倍に肥大した筋線維が出現してくることがわかった。これまで mdx の再生筋は小径で成熟形にならず，このため筋肉への筋緊張も小さく，壊死を起さないといわれて来たが，少くとも壊死・再生をくり返すうちに，mdx 筋は肥大してくること，更にそれら肥大筋にはときに opaque fibers 様の変化もみとめられることがわかった。dystrophin の筋線維の機能に果す役割について興味ある所見と考えられる。

参考文献

1）中村晴臣，高田邦安：mdx マウスの筋再生能．マーカイン局注による筋壊死と再生．厚生省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．昭和63年度研究報告書，1989, p. 223.

2）中村晴臣，高田邦安，高瀬 靖：mdx マウスの筋再生能 (2)．マーカイン局注後の筋再生に及ぼす除神経の影響．厚生省筋ジス研究報告書，1990 p. 156.

3）Martin H, Ontell M : Regeneration of dystrophic muscle following multiple injections of bupiracaine. Muscle & Nerve **11** : 588, 1988

4）Marshall PA, et al : Accumulation of collagen and altered fiber-type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in the mdx dystrophic mouse. Muscle & Nerve **12** : 528, 1989

Heterozygote mdx マウスの培養筋細胞における ジストロフィン発現に関する研究

班　　員　木　下　眞　男
東邦大学医学部第4内科
共同研究者　吉　村　牧　子，杉　本　英　樹
東邦大学医学部第4内科

要　旨

Duchenne 型筋ジストロフィーの女性発症者の特徴ある筋病理所見発現機序をheterozygote mdx マウスの培養筋細胞を用い，ジストロフィン発現経過を観察することにより検討した。対象は C57BL/10ScSn 雄マウスと C57BL/10-mdx 雌マウスとを交配した雌マウスである。生後7日齢のマウスより腓腹筋を採取，培養しジストロフィン染色（抗体：60 kd）を行った。細胞膜に一部でも染色性を認める細胞全てを陽性細胞とし，細胞膜にまったく染色性が認められない細胞を陰性細胞とした。培養7日目筋管細胞では陽性細胞と陰性細胞の二種類が存在した。また，陽性細胞比率を培養7日目と14日目で経時的に観察した結果約10%程度の上昇を認めたが，これは陽性細胞と融合し陰性細胞にも部分的にジストロフィンが発現したためと考えられた。今回の研究より，陽性細胞と陰性細胞が種々の比率で融合する結果，生検筋でみられる種々の染色性をが出現すると考えられた。

目　的

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の女性発症者の発現機序を考えることは重要であるが，その早期筋病変を実際に検討することは困難である。そこで今回，我々はそのモデルマウスである heterozygote mdx マウスの培養筋細胞を用いジストロフィンの発現形態について検討を加えたので報告する。

対象および方法

対象は C57BL/10ScSn 雄マウス（B-10雄マウス）と C57BL/10-mdx 雌マウス（mdx 雌マウス）を交配して得た雌マウス（heterozygote mdx マウス）である。

1．heterozygote mdx マウスの筋細胞培養，生後7日齢の heterozygote mdx マウスの腓腹筋を採取，小剪刀にて細片としトリプシン処理した。次に血清入り培養液［RPMI 1640 (GIBCO) 10% fetal bovein serum］を加えてトリプシンを失活させた後ナイロンメッシュに通し不要な組織片を除去した。そこで得られた細胞塊に上記の培養液を加えプラスチックの培養皿に撒き，30分後別のゼラチンでコートしたカバーグラスが敷かれている培養皿に内容を移した。線維芽細胞は早期に培養皿に付着するのでこの過程で除去された。2日ごとに培養液を交換し，3日目，7日目，14日目にカバーグラス上に分裂増殖した筋芽細胞，筋管細胞に対しABC 法による抗ジストロフィン抗体（60 kd）を用いたジストロフィン染色を施行し，染色性につき検討した。対照として同日齢の B-10雌マウス，mdx マウスを用いた。

2．heterozygote mdx マウス培養筋管細胞におけるジストロフィン発現細胞の経時的検討

ジストロフィン染色を施行した培養筋管細胞の7日目，14日目におけるジストロフィン発現

細胞の比率を経時的に対照と比較検討した。

結　果

1．heterozygote mdx マウスの筋細胞培養 heterozygote mdx マウスの培養7日目の筋管細胞ではジストロフィン染色の結果，二種類の細胞が存在した。先ず，一種類は細胞膜の一部あるいは全周性に染色性を認める細胞でありこのような細胞全てをジストロフィン陽性細胞とした(写真1)。もう一種類は細胞膜にまったく染色性を認めない細胞でありこのような細胞をジストロフィン陰性細胞とした（写真2)。また，培養3日目の筋芽細胞段階では対照の B-10マウスを含め，全て抗ジストロフィン抗体に



写真1　Heterozygote mdx（培養7日目）のジストロフィン陽性細胞　×200



写真2　Heterozygote mdx（培養7日目）のジストロフィン陰性細胞　×200

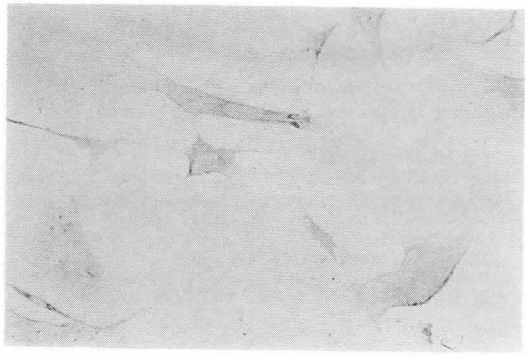


写真3　B-10（培養7日目）の筋管細胞ジストロフィン染色　×100

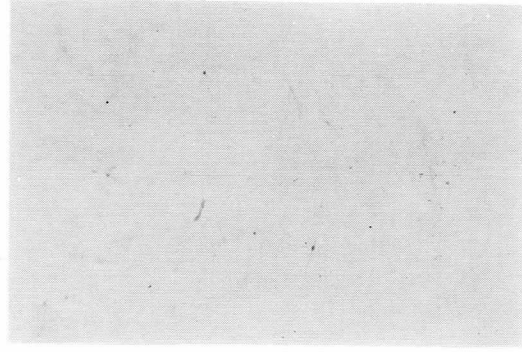


写真4　mdx（培養7日目）の筋管細胞ジストロフィン染色　×50



写真5　Heterozygote mdx（培養7日目）の筋管細胞ジストロフィン染色　×50

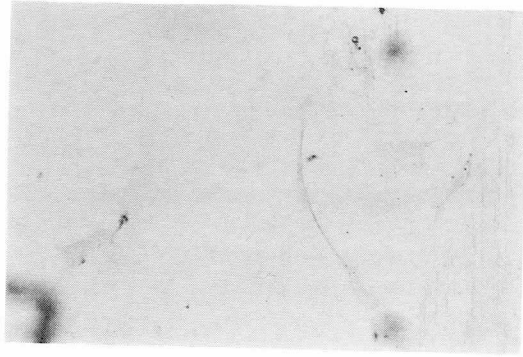


写真6　Heterozygote mdx（培養14日目）の筋管細胞ジストロフィン染色　×50

表1　Heterozygote mdx マウス（No. 1～3）の培養7日目，14日目におけるジストロフィン陽性細胞比率

	ジストロフィン陽性細胞比率	
	7日目	14日目
No. 1	58.6%	67.6%
No. 2	50.0%	65.6%
No. 3	50.1%	57.1%
B-10	92.1%	94.7%

よる染色性は認められなかった。対照であるB-10 マウスの培養7日目の筋管細胞に対するジストロフィン染色の結果，ほぼ全ての細胞に細胞膜を中心とした染色性が認められた（写真3）。同 mdx マウスの培養7日目の筋管細胞に対するジストロフィン染色では逆に，ほぼ全ての細胞で染色性はまったく認められなかった（写真4）。

2．heterozygote mdx マウス培養筋管細胞におけるジストロフィン発現細胞の経時的検討

培養7日目（写真5），14日目（写真6）における培養筋管細胞のジストロフィン陽性比率を検討した結果，heterozygote mdx マウスのNo. 1～No. 3 の3個体においてばらつきは認めるものの，培養7日目で50.0～58.6%の陽性細胞比率が14日目では57.1～67.6%と各個体とも約10%程度の上昇を認めた。対照の B-10 マウスでは92.1%から94.7%の増加にとどまった（表1）。

考　察

1988年，Miranda らはヒトの筋衛生細胞を培養，筋芽細胞では認められなかったジストロフィンが筋管細胞へ成長していく段階で認められてくることを報告した[1]。また，1991年，Huard らによって mdx マウスでは培養系における筋芽細胞，筋管細胞においてもジストロフィンが欠如していることが報告された[2]。今回の我々の研究においても，正常コントロールマウスである B-10 マウスの筋管細胞においてはジストロフィンを認め，mdx マウスの筋管細胞においてはジストロフィンは認められなかった。これらの結果より培養筋管細胞に対するジストロフィン染色法による染め分けは確立したと考えられる。近年，Watkins らが heterozygote mdx マウスのジストロフィン発現頻度を経時的に観察し，成長に伴ないその発現頻度が次第に高くなることを報告した[3]。しかし，さらに幼弱な筋管細胞段階においてはいまだ確認されていなかった。そこで我々が今回検討した結果，筋管細胞段階ではジストロフィン陽性細胞と陰性細胞が認められ，その2種の細胞が融合したと思われる細胞も特に培養14日目では多数認めた。また，培養7日目と14日におけるジストロフィン陽性細胞を経時的に観察したがその比率は約 10% 程度の上昇を認めた。ジストロフィン陽性細胞の上昇比率が対照の B-10 マウスに比べ高値を示したことは成熟過程におけるジストロフィン発現の他に陰性細胞が陽性細胞と融合することにより新たにできた筋管細胞の一部に陽性細胞のジストロフィンが移行するということが中心となって，経時的なジストロフィン陽性細胞比率の上昇をおこしているものと考えられた。DMD の女性発症者の生検筋においてジストロフィン陽性細胞と陰性細胞がモザイク様を呈することはよく知られている[4]。このようなことは今回の結果を踏まえると陽性細胞と陰性細胞が種々の比率で融合する結果であり，そのことにより種々の染色性も示されるということが考えられた。

まとめ

以上より，heterozygote mdx マウスの培養筋管細胞ではジストロフィン陽性細胞と陰性細胞の二種類に分別でき，そのジストロフィン陽性細胞比率の経時的な上昇は陰性細胞が陽性細胞と融合することにより部分的にジストロフィンが発現してくるためと考えられた。

文　献

1）Miranda AF, Bonilla E et al : Immunocytochemical study of dystrophin in muscle cultures from patients with Duchenne muscular dystrophy and unaffected control patients. Am. J. Pathol. 132 : 411, 1988

2）Huard J, Labrecque C et al : Dystrophin expression in myotubes formed by the fusion of

normal and dystrophic myoblasts. Muscle. Nerve. **14** : 178, 1991

3) Watkins SC, Hoffman EP et al : Dystrophin distribution in heterozygote mdx mice. Muscle. Nerve. **12** : 861, 1989

4) Arahata K, Ishihara T et al : Mosaic expression of dystrophin in symptomatic carrier of Duchennesmuscular dystrophy. N. Engl. J. Med. **320** : 138, 1989

先天性筋緊張性ジストロフィー症筋における細胞骨格蛋白（ジストロフィン，ジスミン，スペクトリン）の免疫組織学的研究

班　員　舘　　延　忠
札幌医科大学小児科
共同研究者　渡　辺　幸　恵，若　井　周　治
札幌医科大学小児科

要　旨

先天性 MyD 3症例において，新生児期に筋生検を行ない，抗デスミン，抗ジストロフィン抗体を用いてこれらの発現様式を検討した。重症死亡例では，大型の中心核を有する myotube が 50％を占め，これらの筋線維では，ジストロフィン陰性でデスミン陽性であった。他の2例内の1例では，少数のジストロフィン陰性デスミン陽性の線維を認めたが，他の1例は，全ての筋線維にジストロフィンは発現され，デスミンは陰性であった。先天性 MyD 筋の未熟性とジストロフィンおよびデスミンの発現とは相関していた。

目　的

先天性筋緊張性ジストロフィー症（先天性 MyD）3例において新生児期に筋生検を行ない，一般組織化学に加え細胞骨格蛋白を免疫組織学的に検討した。

[症例] 症例1（28日目の女児），症例2（1カ月男児），症例3（3カ月男児）で，全例母は，成人型 MyD である。生直後より，重度の筋緊張低下と呼吸障害のため人工呼吸器をそれぞれ，28日間，1週間，3カ月間，使用した。症例1は，重度の呼吸不全，関節拘縮，浮腫により28日目に死亡した。筋生検は全例大腿直筋にて行ない，症例1は，腸腰筋，横隔膜筋も検索した。

方　法

一般組織化学染色（H & E, modified Gomori trichrome, NADH-TR, ATPase pH 4.2, 4.6, 10.7）を行なった。免疫組織化学染色は，間接 peroxidase 法により，一次抗体として以下の mono および polyclonal 抗体を用いた。抗ジストロフィンモノクローナル抗体（4-4C5, DYS1, DYS2, DYS3），抗デスミン抗体（DAKO），ポリクローナル抗スペクトリン抗体（TRI）を使用した。

結　果

症例1では，筋線維は全体に著明に細く，大小不同を呈し，大型の中心核によって占められる未熟な myotube は 50％を占めていた（図1－a）。NADH-TR 染色は，著明な sarcoplasmic holo を示した。ATPase 染色ではどの pH でも同じ染色性を示し，type IIC 線維によって占められていた。H-E 染色で myotube は，ジストロフィン染色では，筋細胞膜は，染色されなく（図1－b），デスミン染色では，細胞質は，陽性に染色された（図1－c）。myotube 以外は，ジストロフィン陽性で，デスミン陰性であった。腸腰筋では，中心核を有する myotube は 10％に認め，大小不同は，軽度であった。sarcoplasmic halo は，大腿筋と同様に全ての筋線維に認めた。ATPase 染色では，全ての筋線維は type IIC 線維であった。

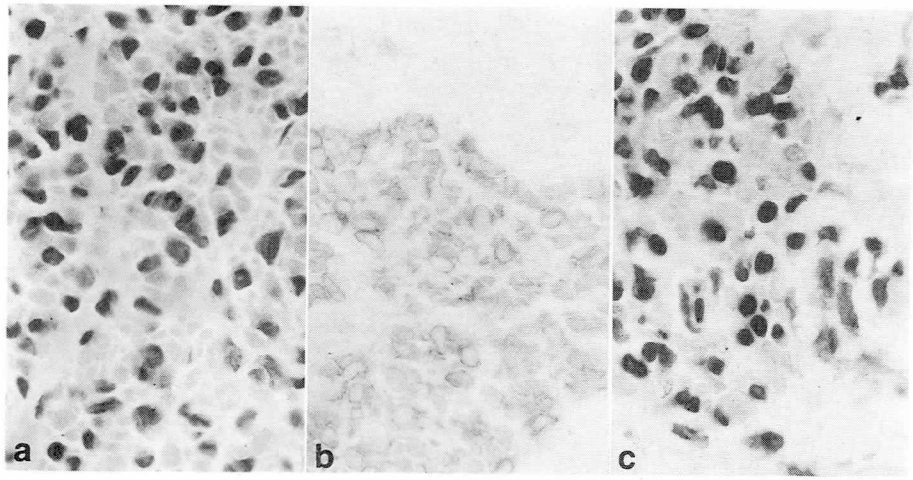


図1　症例1の大腿直筋．a：大型の中心核を有する myotube を50%に認める。H-E ×1,000　b：これらの myotube はジストロフィンは筋細胞膜に認めない．ジストロフィン染色 ×1,000　c：これらの myotube はジスミン陽性である。デスミン染色 ×1,000

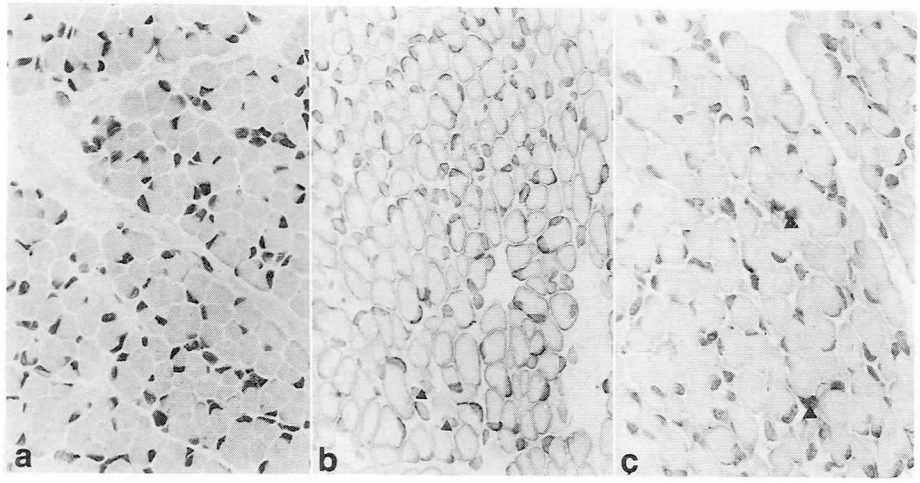


図2　症例2の大腿直筋．a：筋線維の大小不同，約2%に中心核を有する。H-E ×500　b：1%の myotube（▲）はジストロフィン陰性である。ジストロフィン染色 ×500　c：これらの myotube（▲）はデスミン陽性である。デスミン染色 ×500

ジストロフィン染色では，myotube は，陰性でデスミン染色では，細胞質は，陽性であった。横隔膜筋では，H & E 染色では，軽度の大小不同，中心核を有する myotube は，5%に認めた。sarcoplasmic halo は示さなく，ATPase 染色でも，type IIC 線維 89%に混じって，大型の type I 線維を 11% に認めた。ジストロフィン染色では，5%の myotube は，ジストロフィン陽性で，細胞質のデスミンは陽性であった。症例2では，筋線維の軽度の大小不同，2%の中心核を有する筋線維(図2－a)，type I 線維は，27%，II線維は73%，type I 線維直径 6.6 μ，Type II線維平均値径 12.1 μ と typeII 線維 predominance と type I 線維の萎縮を示した。Type I および II線維ともに軽度の sarcoplasmic halo を示した。未熟な myotube 1% にジストロフィン陰性でデスミン陽性を示した(図2－b，c)。

症例3では，筋線維の大小不同，中心核を有する細胞は1%，type I 線維 68% で平均直径

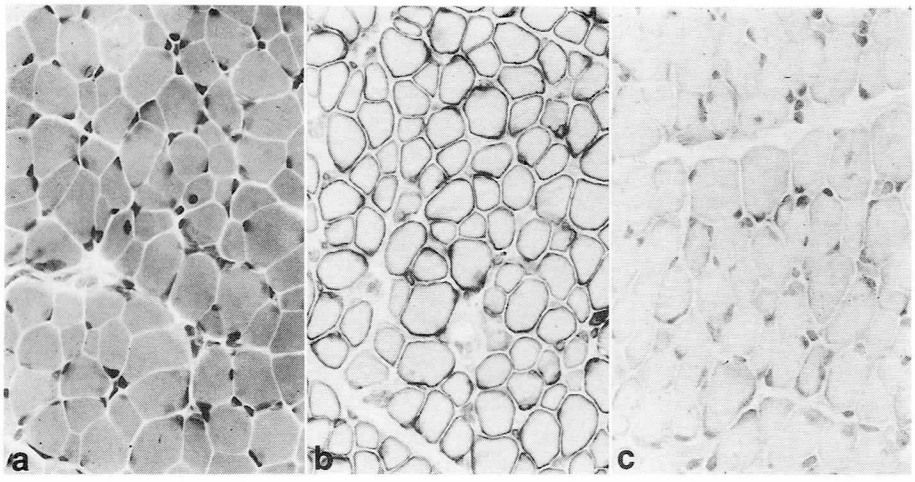


図3 症例3の大腿直筋. a：筋線維の著明な大小不同を示す。H-E ×500 b：全ての筋線維はジストロフィン陽性である。ジストロフィン染色 ×500 c：デスミンは発現されていない。デスミン染色 ×500

は，9.8μ，type II 線維は 32％で平均直径は，19.5μ と，type I 線維の萎縮と predominance を示した（図3－a）。sarcoplasmic halo は認めなく，ジストロフィンは全ての筋細胞膜に発現され，デスミンは全ての筋細胞質内には陰性であった（図3－b，c）。

考　按

先天性 MyD は，臨床的に著明な筋緊張低下，facial diplegia，哺乳力および呼吸障害を生下時より認める[1~3]。筋病理所見は，成人型 MyD と全く異なり，未熟な myotube の存在，筋線維別分化の遅延，peripheral halo を示すこと等が挙げられる[4~8]。胎児期の筋発達に関しては，胎生18週以前では，大腿直筋は，未分化な type IIC 線維によって占められている。胎生30週までに，小径の type IIC 線維にまじって少数の大径の type I 線維が出現してくる。胎生30から40週にかけて，type I 線維の占る割合が徐々に増加してくる[9]。

胎生25から33週にかけて，NADH-TR 染色において，筋鞘下に myofibrils と mitochondria を欠く peripheral halo を認める[10]。これらのことより，症例1は，17週，症例2は，33週以前の胎児筋と考えられる。デスミンは，Z-band を支持する重要な中間型フィラメントであり，最初は，myoblast がゆ合する時期に出現し，myotube 形成時には，増加してくる[11]。デスミンの増加は，胎児筋，筋ジストロフィー症および筋炎に認められる再生筋において観察される[12]。抗デスミン抗体を用いての免疫組織化学的検索では，胎生8から15週の筋では，デスミンは強く細胞質内に観察される。31週までは，弱い反応を示すが，40週では，デスミンは全く認めない[13]。

ジストロフィンは，Duchenne 型筋ジストロフィー症遺伝子が同定された蛋白であり[14]，Duchenne 型筋ジストロフィー症では，この蛋白は，認めなく，Becker 型筋ジストロフィー症には，種々の分子量のジストロフィンが認められる[15]。ジストロフィンは，胎生9週以前の筋には発現していなく，11週には，細胞質内に弱く観察される。14から19週にかけて，筋細胞膜に出現し，徐々に増加してくる。22週では，全ての筋細胞膜にジストロフィンは，発現される[16]。これらのデスミンおよびジストロフィンの胎生筋における発現様式より，症例1の筋は，胎生14から19週に相当し，症例2および3は，症例1よりさらに成熟した筋と言える。先天性 MyD 筋において，従来の組織化学所見に加えて，抗デスミンおよび抗ジストロフィン抗体を用いた免疫組織化学所見においても筋の未熟性を確認し得た。

文　献

1) Vanier TM : Dystrophia myotonica in childhood. Br Med J 1960, **2** : 1284-1288.

2) Dyken PR, Harper PS. : Congenital dystrophia myotonica. Neurology 1973 : **23**, 465-73.

3) Harper PS. : Congenital myotonic dystrophy in Britain. I. Clinical aspects. Arch Dis Child 1975 ; **50** : 505-13.

4) Karpati G, Carpenter S, Watters GV, Eisen AA, Anderman F. : Infantile myotonic dystrophy. Histochemical and electron microscopical features in skeletal muscle. Neurology 1973 ; **23** : 1066-77.

5) Farks E, Tome FMS; Fardeau M, Arsenio-Nunes ML, Drefus P, Diebler MF. : Histochemical and ultrastructural study of muscle biopsies in 3 cases of dystrophia myotonica in the newborn child. J Neurol Sci 1974 ; **21** : 273-88.

6) Sarnat HB, Silbert SW. : Maturational arrest of fetal muscle in neonatal myotonic dystrophy. Arch Neurol 1976 ; **33** : 466-74.

7) Neuen-Jacob E, Voit TH, Turski J, Lenard HG, Wechsler W. : Neonatal myotonic dystrophy in a premature infant : clinical and morphological findings. Clini Neuropathol 1987 ; **6** : 236-40.

8) Farkas-Bargeton E, Barbet JP, Dancea S, Wehrle R, Checouri A, Dulac O. : Immaturity of muscle fibers in the congenital from of myotonic dystrophy : its consequences and its origin. J Neurol Sci 1988 ; **83** : 145-59.

9) Kumagai T, Hakamada S, Hara K, Takeuchi T, Miyazaki S, Wetanabe K. : Development of human fetal muscles : A comparative histochemical analysis of the psoas and the quadriceps muscles. Neuropediatrics 1984 ; **15** : 198-202.

10) Schloon H, Schlottmann J, Lenard HG, Goebel HH. : The development of skeletal muscles in premature infants. I. Fiber size and histochemical differentiation. Eur J Pediatr 1979 ; **131** : 49-60.

11) Gard DL, Lazarides E. : The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro. Cell 1980 ; **19** : 263-75.

12) Sarnat HB. : Vimentin/desmin immunoreactivity of myofibres in developmental myopathies. Acta Pediatr Jpn 1991 ; **33** : 238-46.

13) Sarnat HB. : Myotubular myopathy : Arrest of myogenesis of myofibres Associated with persistence of fetal vimentin and desmin. Four cases compared with fetal and neonatal muscle. Can J Neurol sci 1990 ; **17** : 109-23.

14) Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. : Dystrophin : The protein product the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 1987 ; **51** : 919-28.

15) Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Kunkell LM. : Characteristics of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenn's or Becker muscular dystrophy. N Engl J Med 1988 ; **318** : 1363-8.

16) Prelle A, Chianese L, Gallanti A, Moggio M, Scarpini E, Bonilla E, Scarlato G. : Appearance and localization of dystrophin in normal human fetal muscle. J Neurol Sci 1990 ; **98**(Supple) : 229.

Ⅲ. 病理

B. ジストロフィン関連

プロジェクト研究Ⅲ　病　　理
Ⅲ-B　ジストロフィン関連

症例におけるジストロフィン反応の多様性

班　　員　三　池　輝　久
熊本大学医学部小児発達学

共同研究者　Zhao　Ji-en[1)]，吉　岡　　毅[1)]
斎　田　恭　子[2)]，埜　中　征　哉[3)]
[1)] 熊本大学医学部小児発達学　[2)] 国立療養所宇多野病院神経内科　[3)] 国立精神・神経センター

要　旨

臨床的および組織学的に Duchenne（DMD）型あるいは Becker（BMD）型と診断された生後5ヶ月から16歳までの筋ジストロフィー症患児生検筋を7種類の抗ジストロフィン（dy）抗体を用いて免疫組織化学，免疫電気泳動法を用いて検討した。典型的な臨床症状を示す DMD においても生検筋切片中 dy 反応陽性を示す組織がほぼ全例に数本程度存在していた。また臨床的に DMD と診断された症例のなかに反応は弱いものの全ての抗体でほとんど全筋線維に陽性反応が見られる例や，ある抗体では全く染色されないが他の抗体では明らかに染色される症例などが含まれており dy の存在パターンと臨床診断の間の矛盾が著明なため DMD, BMD を区別することは困難であった。今後 DMD と BMD の病型をどのように区別し診断していくかについて詳細な検討が必要になった。

はじめに

この研究の目的は有用なジストロフィン（以下 dy）抗体の供給とそれを用いた筋ジストロフィー症の確実な診断法の普及をはかることにある。今回は4種類の polyclonal 抗体と3種類の monoclonal 抗体を用い筋ジストロフィー患者より得た生検筋を免疫組織化学及び免疫電気泳動法を用いて検討したので報告する。

対象と方法

対象は女児1例を含む臨床的および筋生検で筋ジストロフィー症と診断された5ヶ月から16歳の22例。（表1）使用した polyclonal 抗体は Hoffman ら[1)]の1-2, 60 kd, Van Ommenn ら[2)]の P-20, Taq, monoclonal 抗体は 4-4C5 と NOVO の dys-1 および2である。

結　果

免疫組織化学：臨床症状および組織学的に DMD と診断されていた11例のうち症例1（5ヶ月）を除く全例に1～数本の dy 陽性線維の存在が確認された。この陽性線維は使用した抗体全てに反応した。（図1）

症例2は臨床的に先天型，組織学的に DMD と診断されていたが免疫組織化学的には BMD のように弱いながらも全体的に陽性反応を示し免疫電気泳動でも 360 kd のバンドを認めた。症例6は歩行開始の遅れがあり仮性肥大を伴うなど臨床・組織診断ともに DMD と考えられたが免疫組織化学的には BMD タイプの染色性が見られ，（図2）免疫電気泳動では 370 kd のバンドを確認した。（図3）

また症例9は3歳時に走るのが遅い，階段昇降が下手，Gowers' sign が陽性などの所見があり，7歳ではつま先立ち，仮性肥大が目立つなど臨床診断，組織診断共に典型的な DMD と考えられたが，免疫組織化学では1-2, 60 kd のみが全くの陰性反応を示し dys-1, P-20, Taq,

表1　Dystrophin immunohistochemistry

Cases (Age)	Antibodies 1-2 Control	60 kd	dys-1	P-20 ++～+++	Taq	IV	dys-2	CD	HD	IB
1. 5m	−	−	−	−	−	−	−	D	D	
2. 1y	±	±	±	±	±	±	±	C	D?	360 kd
3. 1y4m	±	+	±	+	+	−～±	−～±	D	D	
4. 1y6m	−	−	−	−	−	−	−	D	D	
5. 1y9m	−～±	−	−	−～±	−～±	−	−	D	D	
6. 2y	+	+	±～+	+	+	±	±～+	D	D	370 kd
7. 2y10m	±	±～+	±～+	+	+	+	+	D/B	D	
8. 4y	±	+	±～+	+	+	±～+	±～+	D	B	
9. 4y	−	−	+	+	+	+	+	D	D	450 kd
10. 5y	−	−	−	−	−	−	−	D	D	
11. 5y	−	−	−	−	−	−	−	D	D	
12. 5y	±～+	+	±～+	±～+	±～+	±～+	+	PMD		400 kd
13. 5y	−	−	−	−	−	−	−	D	D	
14. 6y(F)	±～+	+	+	+	±～+	+	+	PMD		400 kd
15. 6y	±～+	±	−～±	±	±	±	−	C	PMD	
16. 6y	−	−	−	−	−	−	−	D	D	
17. 6y	−	−	−	−	−	−	−	D	D	
18. 7y	−	−	−	−	−	−	−	D	D	
19. 8y	+	−	−	±	+	+	+	D/B	B	200 kd
20. 9y	+	+	+	+	?	+	+	D/B	B	
21. 10y	+	−	−	±	+	+	+	D/B	B	200 kd
22. 16y	±	±～+	±～+	+	+	+	±～+	B	B	

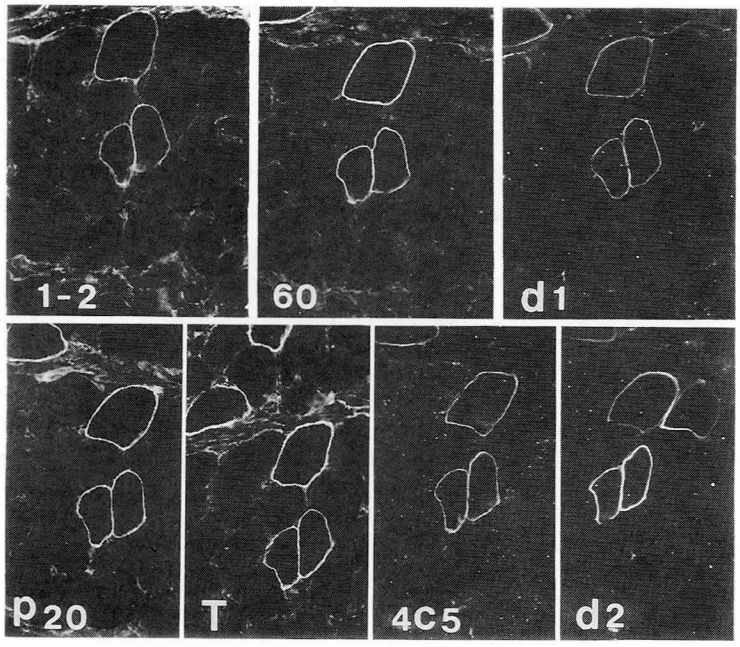


図1　使用した抗体全てで染色される筋線維が数本存在する。(症例　11：5才)

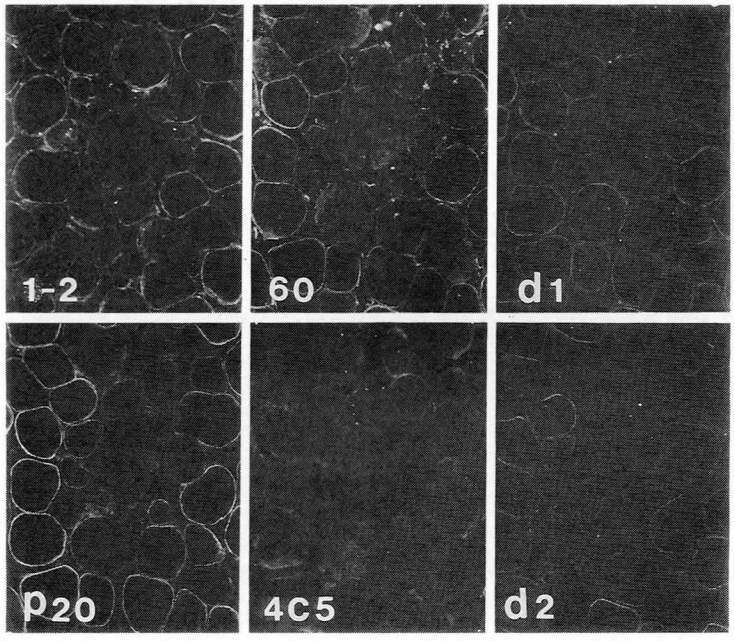


図2　反応は弱いがほぼ全ての筋線維が patch に染色される。(症例　6：2才)

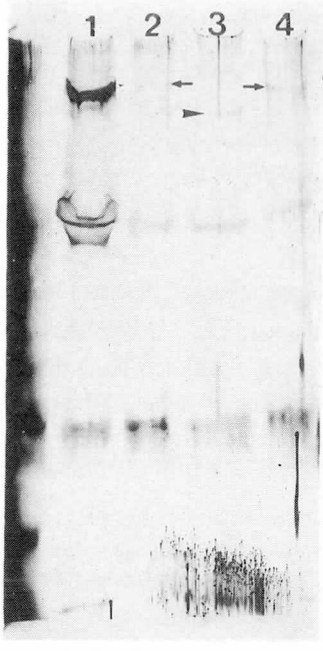


図3　P-20 の抗体を用いた免疫電気泳動。450 kd (矢印) (lane：2 & 4：症例9), 370 kd (鏃) (lane：3：症例6) 部位に薄いが明らかにバンドが検出される。1：コントロール

4-4C5, dys-2 ではほとんど全ての筋線維が明らかに陽性反応を示した。(図4) この症例ではエクソン3から25の間の欠失が確認された。免疫電気泳動法では 450 kd のバンドが認められたが (図3) 大きな欠失を持ちながら正常 dy よりも大きな分子量を示す矛盾があり欠失と重複の両方が存在する可能性を検討中である。同様のパターンが症例19, 21の兄弟例にも見られエクソン10から44までの欠失が認められた。この兄弟例は臨床的には DMD と BMD の中間的な状態にあり症例9よりも欠失部位は長いが臨床症状は軽度である。以上の結果を表1にまとめたが症状の軽重と免疫組織化学的所見と臨床症状の間に相関性が乏しく臨床診断における DMD および BMD の免疫組織化学的な違いを明らかにできなかった。

考　案

フレームシフト仮説[3] で説明されているように mRNA のリーディングフレームが変わらない欠失の場合には小さな dy が発現され BMD となるが，欠失によりフレームが変化すると dy が作られず症状の重い DMD になると考えられている。また BMD においては臨床的重症

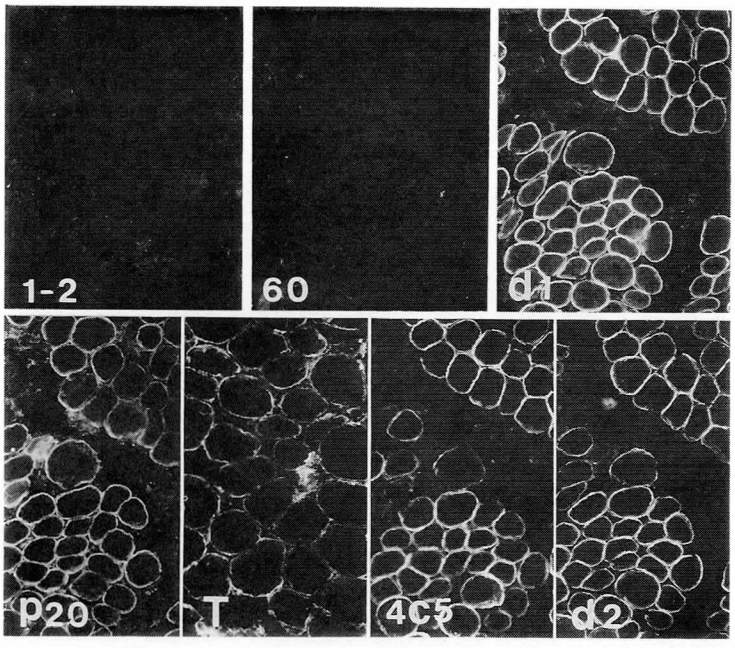


図4　4歳（症例9）：1-2，60 kd では全く染色されないが dys-1，P-20，Taq，4-4C5，dys－2 ではほぼ全線維が陽性反応を示す。

度とジストロフィン蛋白量の間に一定の関係があり10％以下では重症に，20％以下では中間型，それ以上では軽症になると考えられている。いずれにしろ DMD では dy が存在しないはずであるが今回の研究では明らかな重症例の中にも dy が存在していて BMD と考えざるを得ぬものがあり，臨床症状と免疫組織化学，免疫電気泳動法による所見からどのように病型を診断するのか混乱が出てきた。また dy の蛋白量だけで症状の軽重が全て説明できるわけではないことが知られており England ら[4]は dy の 46％の欠失を持ちながら61才でなお自力歩行可能な症例を報告している。私たちの症例19，21はエクソン10～44のほぼ 50％の欠失でエクソン17～48の欠失を示す England らの症例と大きな違いはないのであるが DMD よりやや進行が遅い程度で England らの症例に比してかなり重症である。また私たちの症例9はエクソン3～25の欠失でその程度は短いが重症度は高く典型的な DMD の臨床像を示す。これらのことは病型診断に当たっては抗 dy 抗体による免疫組織化学や免疫電気泳動法による検討のみで明らかに診断や重症度の説明ができるわけではなくまだまだ不明瞭な点が残されていることを示している。

結　論

1．DMD においても例外的に dy 陽性筋線維が数本の単位で存在する。

2．臨床的・組織学的に DMD と診断された症例の中に相当量の dy を所有し BMD と診断せざるを得ない症例があり DMD と BMD との臨床的な異同が不明確である。

3．in-frame 欠失を示す症例ではエクソンの欠失の大きさと臨床症状との関連性は見いだせない。このような症例には少なくともN-端，中央部，C-端をカバーする3種類以上の抗体が使用されるべきである。

4．臨床診断，組織学，免疫組織化学，免疫電気泳動法による診断に蛋白量検査を加えて今後綿密な分析を行うことが病型診断上必要である。

参考文献

1）Hoffman EP, Brown RHJr, Kunkel LM: Dystrophin: the protein product of the Duchenne

muscular dystrophy locus. Cell **51** : 919-928, 1987

2) Van Ommenn GJB, Ginjaar HB, Casula L, et al.: From dystrophy to dystrophin: Tracing back structure to (dys) function, in, Ozawa E (ed): 3rd Uehara Memorial symposium "Frontiers of muscle research". Tokyo, July 16-19, 1990 Elsevier, Amsterdam, in press.

3) 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

4) England SB, Nicholson LVB, Johnson MA, et al.: Very mild muscular dystrophy associated with deletion of 46% of dystrophin. Nature **343**: 180-182, 1990

Mdx mouse 及び control mouse における dystrophin の局在及び組織特異性について

——モノクローナル抗体による検討（第4報）——

班　員　寺　本　仁　郎
国立療養所再春荘病院

共同研究者　内　野　　誠[1]，坂　下　直　実[1]
直　江　弘　昭[1]，三　池　輝　久[2]
[1] 国立療養所再春荘病院神経内科　[2] 熊本大学医学部発達小児科

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）及び mdx mouse の原因蛋白 dystrophin（"dy"）は骨格筋や心筋のみならず，平滑筋組織，さらに脳にも存在することを1988年以来報告してきた[1]。今回これまで用いてきた各種のポリクローナール抗体に加え，より抗原特異性の高いモノクローナル抗体を用いて，マウス及びラットの各臓器における"dy"の局在及び組織特性について検討するため，Western blot 並びに免疫組織化学染色による検索を行ったので報告する。

対象及び方法

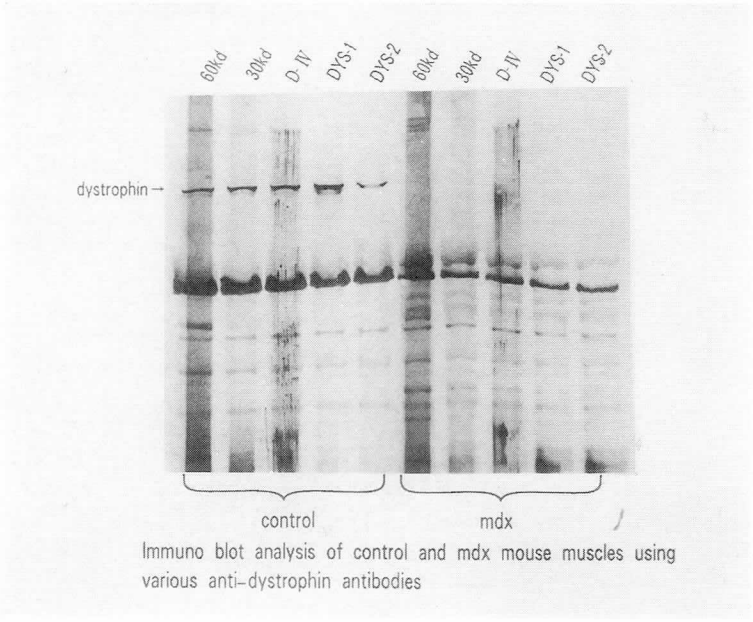
mdx 及び control（B10）mouse 各6匹（1～6ヶ月齢），Wister 系 Rat 2匹（2ヶ月齢）の各臓器（骨格筋，心筋，大脳，小脳，胃，腎臓，膀胱，肺など）について，Novocastra 社のモノクローナル抗体（DYS-1, 2, 3）を用いて，Western blot 及び免疫組織化学染色（ABC 法）による検索を行った。なお DYS-3 は"dy"の N 端側（a.a. 321～494），DYS-1 は Hoffman らの 30 kd 抗体に相当し rod 領域（a.a.1181～1388），DYS-2 は C 末端領域（a. a. 3669～3685）を認識するモノクローナル抗体で，マウスで作成されたものである。

結　果

1）Western blot による検索

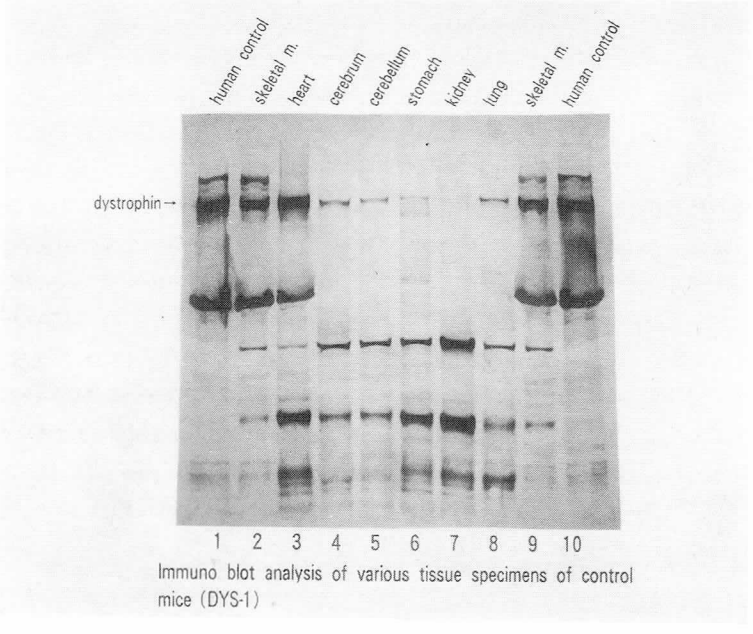
最初にこれまで用いてきた各種のポリクローナール抗体（60 kd 抗体，30 kd 抗体，P-20，ペプチドIV）と DYS-1, 2,3の抗原検出感度について比較するため，control 及び mdx mouse の骨格筋（蛋白量100 μg）について"dy"バンドの発現状況を観察したが，1000倍稀釈のポリクローナール抗体に対し，DYS-1 は50倍稀釈，DYS-2は30倍稀釈でほぼ同等の反応が認められた（図1）。mdx mouse 筋では DYS-1，DYS-2 並びに 60 kd, 30 kd 抗体では全く"dy"バンドは欠如していたが，ペプチドIVでは同じ移動位置に痕跡的なバンドの発現がみられ，"dy"関連蛋白か，あるいは mdx mouse 筋に1％程度存在する"dy"陽性の revertant muscle fiver を反映している可能性が考えられた。なお DYS-3 はヒト骨格筋に特異性を有し，mouse 骨格筋とは反応がみられないため，Western blot では DYS-1, DYS-2 のみを使用した。

control mouse においては DYS-1, 2で骨格筋，心筋に明瞭な"dy"バンドの発現がみられ，大脳・小脳，胃，腎臓，膀胱，肺においても痕跡的ながら，明らかな"dy"バンドの発現が認



Immuno blot analysis of control and mdx mouse muscles using various anti-dystrophin antibodies

図1



Immuno blot analysis of various tissue specimens of control mice (DYS-1)

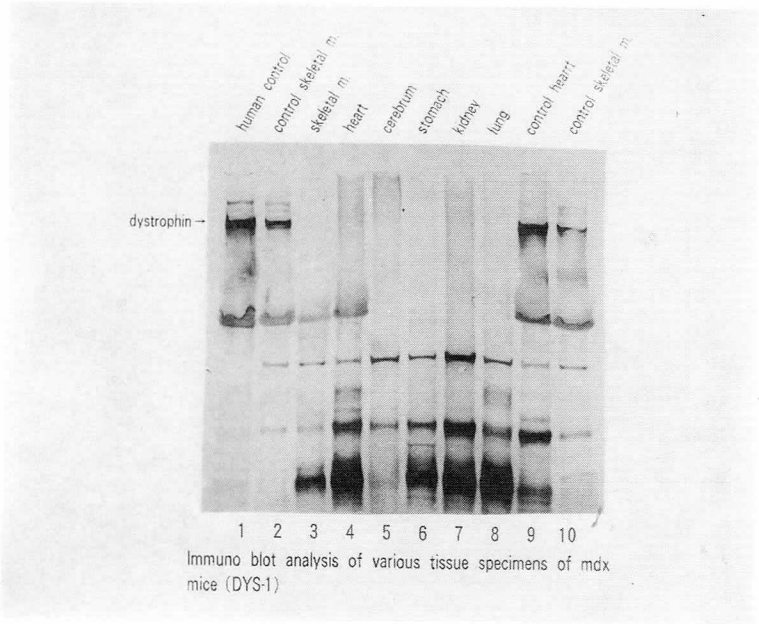
図2

められた（図2）。

一方 mdx においては検索した全臓器で“dy”の発現はみられなかった（図3）。

2）免疫染色による検索

control mouse の骨格筋や心筋では筋表面膜に一致し，全周性に抗体の局在がみられ，胃・膀胱・肺などの平滑筋線維表面膜にも抗体の局在がみられた。また大脳の neuron，小脳の Purkinje 細胞では胞体が淡く染色される傾向がみられた。ただ Western blot では全く“dy”



Immuno blot analysis of various tissue specimens of mdx mice (DYS-1)

図3

バンドの発現がみられなかった mdx mouse でも免疫染色では骨格筋や心筋の表面膜や間質がびまん性に染色された。これは DYS-1, 2 がマウスで作成された IgG 抗体のため，組織内に存在するマウス IgG に抗マウス IgG 2次抗体が結合し，非特異的反応が起るものと思われた。すなわち抗体と検体の動物種が同種の場合，false positive が不可欠と思われるので，今回動物種を変え，Wister 系ラットについても同様の検索を行ったが，control mouse と同様に骨格筋，心筋，胃・膀胱の平滑筋線維の表面膜に抗体の局在がみられ，大脳・小脳については neuron の胞体特に膜に抗体の局在が認められた。ただ neuron に関しては抗体の種類によって染色性が異なり，DYS-1, 3 では比較的明瞭に染色されたが，DYS-2 では不明瞭であった。

考　案

“dy” の mRNA が骨格筋や心筋のみならず，平滑筋や脳組織にも含まれていること[2]，またこれらの組織において実際に “dy” が産生されていること[3]，さらに脳においては neuron の postsynaptic membrane に局在する[4]ことが既に明らかにされている。我々もこれまで各種のポリクロナール抗体を用いた検索で，平滑筋や脳にも “dy” が存在していることを報告してきた。今回より抗原特異性の高いモノクローナル抗体を用いて検討したが，基本的には 60 kd 抗体や 30 kd 抗体で得られた成績と同様の結果で，平滑筋組織や大脳・小脳など中枢神経組織にも “dy” の発現が認められた。今回使用した DYS-1, 2, 3はヒトの “筋型dy” に対する抗体であるが，免疫染色上はマウス及びラットの neuron も DYS-1 及び DYS-3 で陽性に染色され，Western blot では DYS-1 及び DYS-2 で “dy” バンドの発現が認められた。DYS-3 を使用した Western blot は実施していないので不明である。“dy” には “筋型”，“脳型”，“平滑筋型” など複数の isoform が存在し，“dy” の 4 つの領域のうち特にC末端領域は最も variation が大きい領域とされている[5]ので，マウスの脳がヒトの “筋型dy” のC末端部に対する抗体である DYS-2 で陽性に反応した理由については今後更に検討が必要である。

要約並びに結論

1）mdx, control (B10) mouse, 並びに con-

trol rat の各臓器における“dy”の局在と特性を明らかにするため，モノクローナル抗体 (DYS-1, 2, 3) を用いて，western blot 及び免疫染色による検索を行った。

2) Western blot による分析で，“dy”は control mouse の骨格筋，心筋のみならず，胃・膀胱・肺などの平滑筋組織，さらに大脳・小脳でも発現していた。mdx mouse では全臓器で“dy”の発現はみられなかった。免疫染色による検索では control mouse 及び rat の骨格筋，心筋，胃・膀胱など平滑筋組織の表面膜，大脳の neuron 及び小脳の Purkinje 細胞の胞体特に膜が陽性に染色された。

3) 今後はヒトの各組織についての検索，更に“dy”がこれらの細胞機能維持に果す役割を明らかにすることが重要と考えられる。

文　献

1) Uchino M, Araki S. et al. : Localization and characterization of dystrophin in muscle biopsy specimens from Duchenne muscular dystrophy and various neuromuscular disorders. Muscle Nerve **12** : 1009-1016, 1989

2) Chelly J, Kaplan JC, et al. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. Nature **333** : 858-860, 1988

3) Hoffman EP, Hudecki MS, et al. : Cell and fiber-type distribution of dystrophin. Neuron **1** : 411-420, 1988

4) Lidov HGW, Byers TJ, et al. : Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. Nature **348** : 725-728, 1990

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

先天性ミオパチーにおけるジストロフィン

班　　員　三　池　輝　久
熊本大学医学部小児発達学

共同研究者　吉　岡　　毅[1]，Zhao Ji-en[1]，埜　中　征　哉[2]
[1] 熊本大学医学部小児発達学　[2] 国立精神神経センター

要　旨

先天性ミオパチー群11例におけるジストロフィン（dy）の態度の観察を行った。myotubular myopathy の1例において dy の欠損状態が観察され，3ヶ月および3歳の症例においても dy 蛋白量が低下していた。更に myotonic dystrophy の2例に dy 染色性の低下が認められた。このことは筋ジストロフィー症の他にも dy の欠損状態を示すミオパチーが存在することを示唆している。これらのミオパチーでは筋の崩壊現象は認められず dy の機能を探る上で重要な症例と思われた。また先天性ミオパチーの症例において，筋線維周囲における nerve growth factor receptor がヒト胎児期の筋組織と同様に著明に増加していた。

はじめに

ジストロフィン（dy）が発見されて筋ジストロフィー症の研究は飛躍的に進んできたが dy の機能については現在もまた十分に解明されたとは言えない。また dy の異常を示すのは筋ジストロフィー症だけであろうかとの疑問もある。これらのことについて情報を得るために今回は著明な筋緊張低下を主症状とする先天性ミオパチーの症例について dy がどのような態度を示すのか検討してみた。

対象と方法

対象は生後1週間から6才までの先天性ミオパチー患者11例［Myotubular myopathy(MM) 4例 congenital myotonic dystrophy (MD) 4例 nemalin myopathy, congenital fiber type disproportion (CFTD) それぞれ1例］（表1）から得た生検筋を用いた。免疫組織化学染色は4種類の polyclonal 抗体（30 kd, 60 kd, Taq, DMDP IV），3種類の monoclonal 抗体（NCL-DYS-1, 2, 3, NOVO社）による抗ジストロフィン抗体を用いて間接蛍光抗体法にて行った。また筋ジストロフィー症の血管系において著しい増加が報告されている[1] nerve growth factor receptor(NGF-R)についてもその抗体(ME82-11）を使って免疫組織化学的に検討した。免疫電気泳動法は各生検筋を秤量後20倍の10％SDSを含むPH 8.5 Trisglycin Buffer（5％ β-

表1

No.	Age	Disease
1	1W	myotubular myopathy
2	1M	〃
3	3M	〃
4	3Y	〃
5	1M	myotonic dystrophy
6	1M	〃
7	2M	〃
8	3Y	〃
9	6M	nemalin myopathy
10	5M	CFTD
11	1M	Prader-Willi

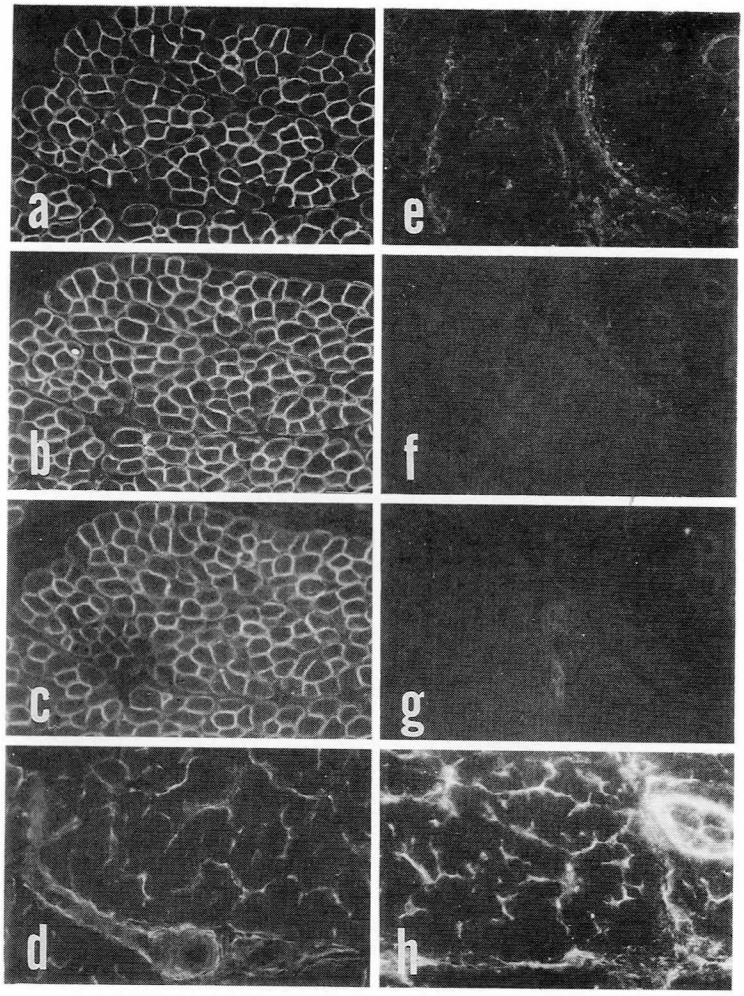


図1 (a～d)：1M congenital myotonic dystrophy (e～h)：1W Myotubular myopathy (a, e) 60 kd, (b, f) DYS 1, (c, g) DYS 2, 抗ジストロフィン抗体による間接蛍光抗体染色。e, f, g, は dy 反応を認めない。(d, h) 抗 NGF-R 抗体による間接蛍光抗体染色。

mercaptoet-hanol, 4mMEDTA, 2mM PMSF, 40% glycerine, 0,03% bromophnol blue) でホモジナイズ, 95°C 3分加熱処理した上清 (100 ug/レーン) を用いて4～12% グラジェントゲルにて泳動後, トランスファーを行いABC 法にて染色。dy 蛋白量はデンシトメーターにて dy のバンドを計測し, dy/MHC を求めて定量化を行った。

結　果

生後1週間 (在胎36週1日) の MM の1症例において免疫組織化学染色ですべての抗体において dy 反応が陰性であった (図1)。また, western blot でも 400 kd のバンドを確認できなかった (図2：3レーン)。また3ケ月と3才の MM においても dy 量が約57%と低下していた。1ケ月と2ケ月の MD においては免疫組織化学染色でコントロールに比較して dy 反応が弱かった (図3)。しかし一方では3才の症例1例のみではあるが dy 量が 157% とコントロールに比較してやや増加していた (図2：5レーン)。先天性ミオパチー症例の筋線維周囲において NGF-R は2～3歳まで増加した状態にあり (図1：d, h) それ以後減少消

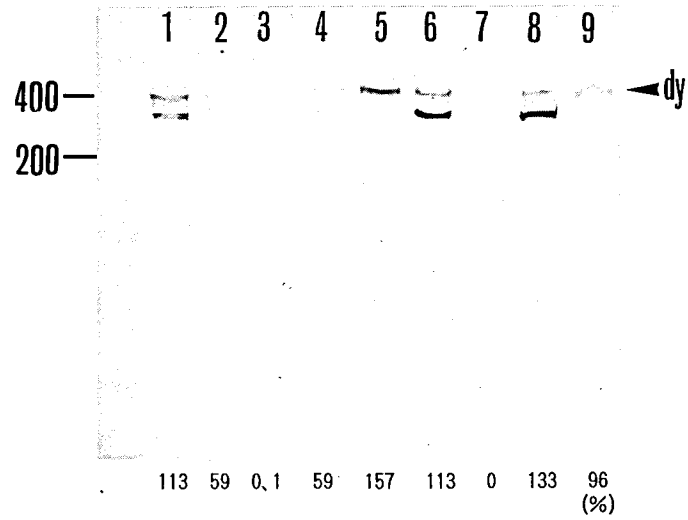


図2 Western blot (2,3,4) : Myotubular myopathy 5 : congenital myotonic dystrophy 6 : congenital myopathy 7 : autopsy 8 : P-W (1,9) : control

失する。また NGF-R の筋線維周囲における反応はヒトコントロールにおいて胎生期早期に認められるが胎生20〜30週までに消失してしまうことが観察されている（未発表データ）。

考　察

先天性ミオパチーにおける dy の態度について検討を行った結果 MM 1例において dy 欠損を認め2例に dy 蛋白量の低下を認めた。MD においても免疫電気泳動法で dy 蛋白量の低下が示唆されており，筋ジストロフィー症のほかにも dy 欠損状態を示すミオパチーが存在することが観察された。これらのミオパチーでは筋線維の壊死，再生の所見は認められず[3] dy 欠損が直ちに筋崩壊につながってはいない。MM, MD 共に新生児期・乳児期を通して強い筋緊張低下状態を示すが MD においては年齢が長じれば次第に筋緊張が亢進し易くなることが知られている。今回の検討の結果は乳時期早期の筋緊張低下が著しい時期には dy が欠損状態を示したが，特に MD 症例において筋緊張低下状態が改善もしくはむしろ亢進状態が起こり始める状況下では dy が逆に増加していることを示した。言い換えれば dy が欠損状態にあれば筋緊張は落ち増加すれば筋緊張が増すことになる。これまで dy の生理機能については①膜強化蛋白説，②カルシウムに関連した機能を持つ蛋白という二つの説が述べられてきたが，私たちの今回のデータは第二の説を支持するものと考えられる。今後さらに検討を加え生理機能の解明に努力する必要がある。また，先天性ミオパチー症例の組織学・組織化学的検討では筋線維には B fiber が認められ，ATP ase 染色では明らかな分化の遅れは観察されなかったが，NGF-R を用いた免疫組織化学的検討により NGF-R が筋線維膜上に著明に存在することが観察された。NGF-R は交感神経系の分化，維持にかかわっているとの報告がなされている[4]。我々の検討ではヒト胎児期早期には NGF-R が筋線維膜上に存在しており胎生20週を過ぎると次第に減少・消失することを観察している。マウスにおいても胎児期にのみ観察される[2]ことから NGF-R・NGF は筋線維周囲に存在することにより何らかの筋組織発達・分化に，あるいは筋組織内の神経系の発達，分化に関わっている可能性が示唆される。NGF-R の態度だけを見ると先天性ミオパチー群の筋組織は胎生期初期の状態といえる。

結　語

①先天性ミオパチーの中にも dy 欠損状態が存在することを観察した。dy 欠損状態が直接

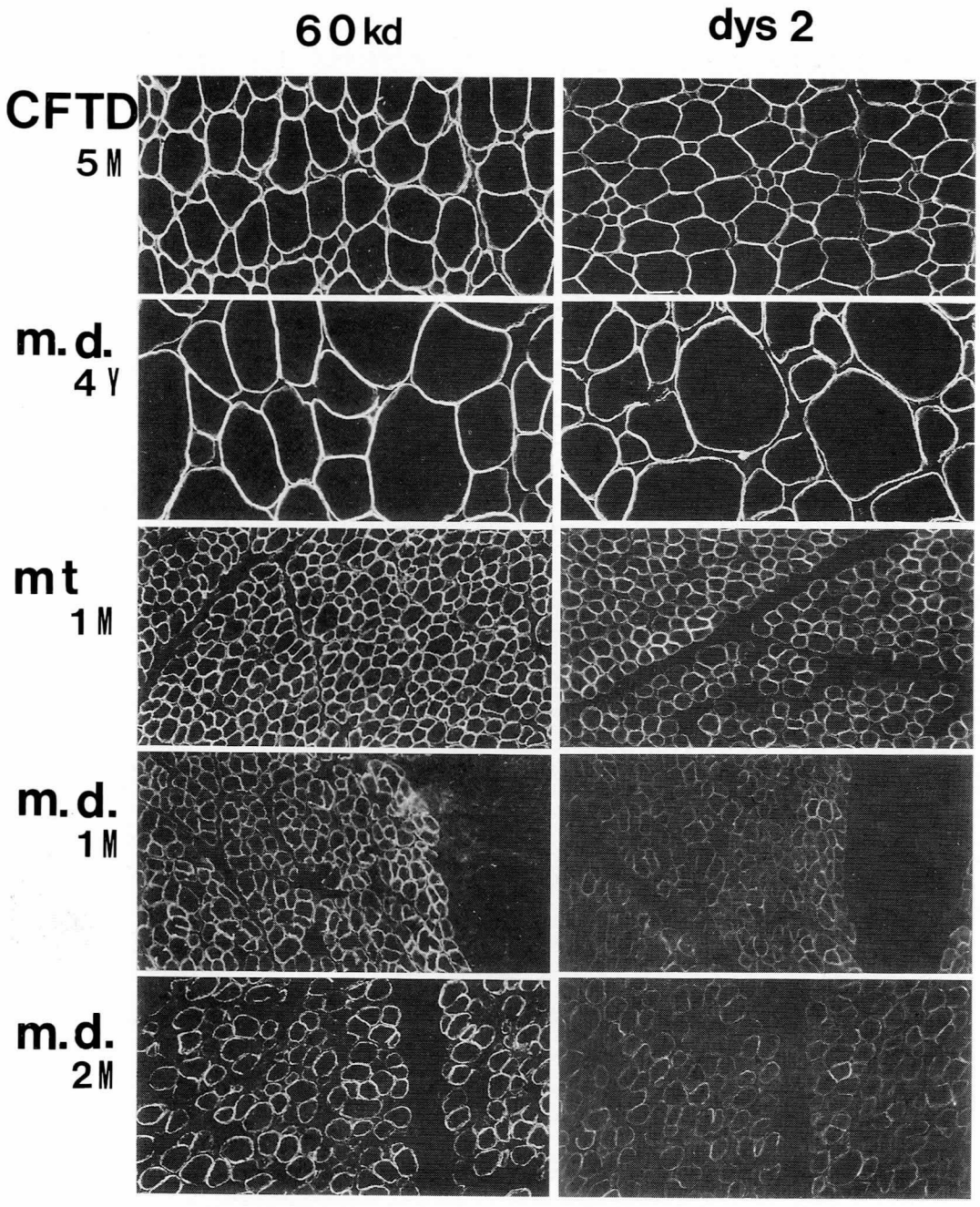


図3 60 kd, DYS 2 抗ジストロフィン抗体による間接蛍光抗体染色。
m. d.: congenital myotonic dystrophy m. t.: Myotubular myopathy

筋崩壊とはつながらないのかもしれない。

②dy の生理機能は膜の強化ではなくカルシウムと関連したものである可能性がある。

③NGF-R の態度から見ると先天性ミオパチーの筋組織は胎児期早期の状態にあると言える。

④先天性ミオパチー群における dy の態度の観察は dy 生理機能を探る上で重要であると思われる。

文　献

1) Zhao J, Yoshioka K, et al: Nerve growth factor receptor immunoreactivity on the tunica adventitia of intramuscular blood vessels in child-hood muscular dystrophies. Neuromusclar Disorders. **1** ; 135-141, 1991

2) Qiao Y, Eugene M, et al: An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. J. Neurosci. **8** ; 3481-3498, 1988

3) Kinoshita M, et al.: Myotubular myopathy, Arch. Neurol, **18** : 265-271, 1968

4) Thocen H, Barde YA: Physiology of nerve growth factor. Physiol Rev **60** : 1284-1355, 1980

先天性筋ジストロフィーの筋組織におけるジストロフィンの研究

班　員　福　山　幸　夫
東京女子医科大学小児科

共同研究者　池　谷　紀代子，斎　藤　加代子，山　内　あけみ
池　中　晴　美，石　井　のぞみ，近　藤　恵　理
坂　内　優　子，三　島　真　弓，高　橋　理恵子
原　田　隆　代，大　沢　真木子
東京女子医科大学小児科

要　旨

抗ジストロフィン抗体を用いた免疫組織染色は，現在，神経筋疾患の診断に有用なものとなってきている。我々は，当院小児科で経過を観察され，臨床的に先天性筋ジストロフィー（CMD）と診断された8例を亜型に分類し，複数の抗ジストロフィン抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。CMDのいずれの亜型においても，筋細胞膜は染色されて，ジストロフィンが存在することが示されたが，組織内に混在する壊死線維，再生線維では，ジストロフィン反応は低下していた。イムノブロットではおよそ400 kDaのバンドが検出され，ジストロフィン遺伝子の異常も認められなかったことから，対象としたCMD 8例においては，正常のジストロフィンが存在すると考えた。

はじめに

抗ジストロフィン抗体を用いた免疫学的検討[1]は神経筋疾患の診断に必須のものとなってきている。我々は先天性筋ジストロフィー（CMD）と診断された8症例を経時的な臨床症状の観察により亜型に分類し[2]，複数の抗ジストロフィン抗体を使用した免疫組織染色を行った。Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）例と比較して報告する。

対　象

臨床的にCMDと診断される8例と，DMDと診断される1例を対象とした（表1）。症例1，2はCMD type Ⅰ，すなわち最高獲得運

表1　対象CMD 8例とDMD 1例の臨床症状

症例	診断（type）	年齢	性	知能障害	顔面筋罹患	最高獲得運動機能	
1	FCMD（Ⅰ）	0y6m	F	＋，DQ34	＋	坐位	（1y6m時）
2	FCMD（Ⅰ）	0y11m	F	＋，DQ56	＋	坐位	（1y2m時）
3	CMD（?）	20day	M	＋，not done	＋	頸定未	（1y6m時）
4	CMD（Ⅲ/Ⅳ）	0y11m	M	＋，DQ62	＋	四つ這い位	（1y10m時）
5	CMD（Ⅲ/Ⅳ）	14y0m	M	＋，IQ13	＋	独歩	（6～7y）
6	CMD（Ⅲ/Ⅳ）	20y3m	F	＋，IQ23	＋	階段昇降	（4y頃）
7	CMD（Ⅲ/Ⅳ）	21y7m	F	＋，IQ30	＋	つかまり歩行	（10y頃）
8	CMD/scoliosis	12y1m	F	－	＋	階段昇降	（6y～）
9	DMD	1y9m	M	＋，DQ59	±	階段昇降	（2y8m頃）

動能力が歩行に達しない典型的福山型（FCMD I）の例，症例3は，典型例よりさらに重症の経過をとっている例である。現在までの発達経過から，今後歩行機能獲得が予測される症例4と，一時的でも歩行可能であった症例5～7はtype Ⅲ/Ⅳ，いわゆる非福山型とした。症例8は著しい側彎を特徴とし，運動機能が良く保たれている特殊な例で，知能も高い。症例9は，2歳4か月でようやく歩行可能となったDMD例で，典型的DMDと比較して発症時期が早く，CMD type Ⅲ/Ⅳと酷似する問題症例と思われる。

方　法

今回使用した抗ジストロフィン抗体について図1に示した。ウサギポリクローナル抗体P00 P04，P23，P34は国立精神神経センターの小沢先生から頂き，マウスモノクローナル抗体2.5E2と4C5は富士レビオ株式会社から供与された。いずれもKoenigらにより報告されたジストロフィンcDNAの塩基配列[3]に基づいて合成されたアミノ酸に対して作成された抗体である。これらの抗体を用いて，生検筋の間接蛍光抗体染色とイムノブロットを行った。

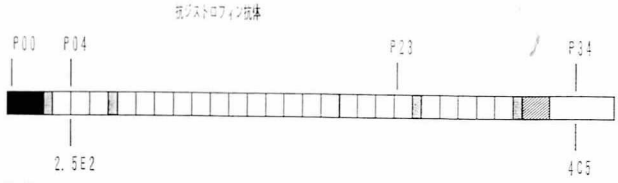


図1　抗体
ジストロフィンタンパクと抗体の位置との関係。上側にポリクローナル抗体，下側にモノクローナル抗体の位置を示した。

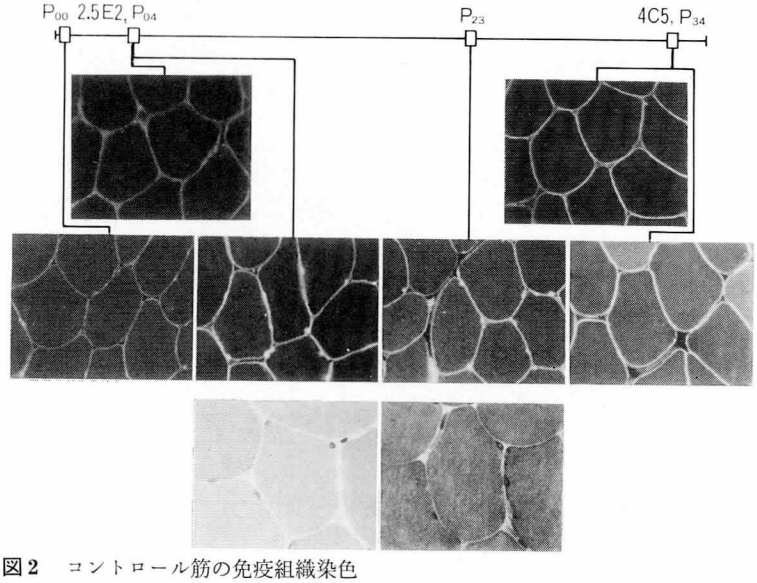


図2　コントロール筋の免疫組織染色
モノクローナル抗体2種（上列），ポリクローナル抗体4種（中列）のすべてで，筋細胞膜は均一に連続的に染色されている。最下列にHE染色（左），Gomori-trichrome染色（右）を示した。

結　果

コントロール筋での結果を図2に示す。いずれの抗体も筋細胞膜を均一に連続的に染色している。CMD type Ⅰ（図3）では，いずれの抗体においても筋細胞膜が染色されて，ジストロフィンの存在が確認された。また，ジストロフィン反応が低下した再生線維や壊死線維の混在

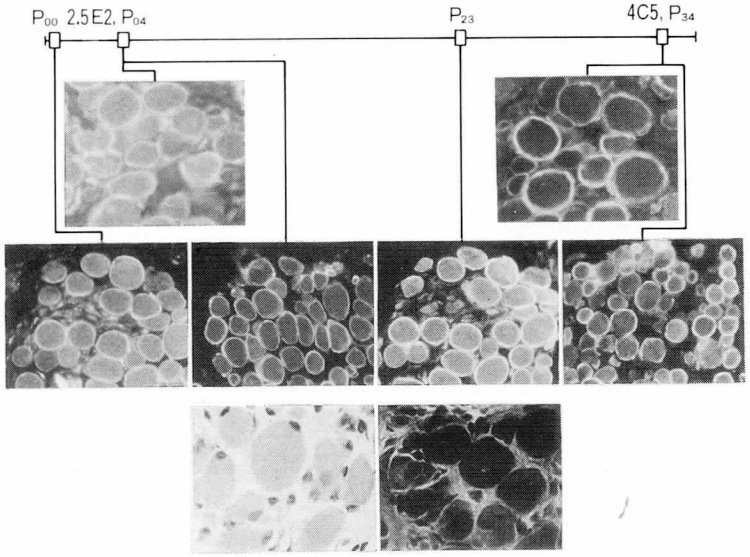


図3　CMD type Ⅰ の免疫組織染色
ほとんどの筋細胞膜は染色されているが，染色性の低下した細胞の混在が認められ，HE 染色，Gomori-trichrome 染色により，これらは壊死あるいは再生線維であることが示された。抗体による染色性の違いはない。

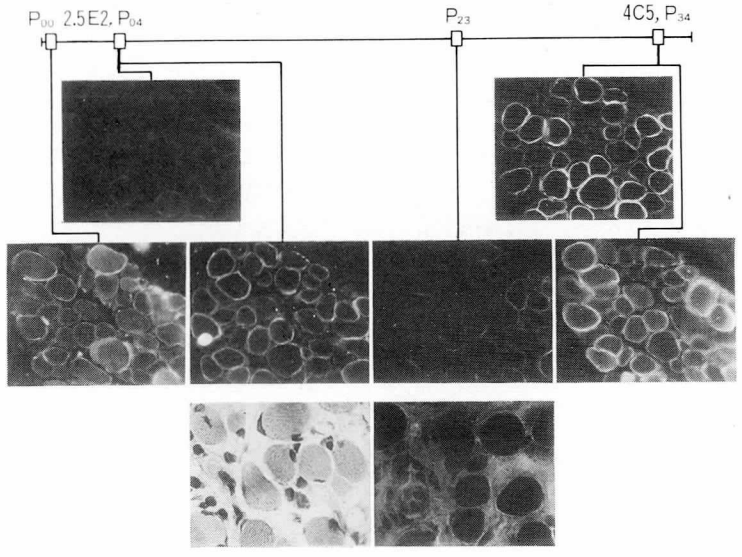


図4　CMD type Ⅲ/Ⅳ の免疫組織染色
CMD type Ⅰ の免疫組織染色所見とほぼ同じような染色性を示している。

が観察された。CMD type Ⅲ/Ⅳ（図4）では，type Ⅰ 同様，いずれの抗体においても筋細胞膜は染色されたが，再生線維や壊死線維でのジストロフィン反応は低下していた。これらの結果は有川らの報告[4]を支持するものである。CMD type Ⅲ/Ⅳ の年齢の高い例では，再生線維や壊死線維はほとんど見られなくなり，組織の大部分は脂肪と結合織におきかわっていたが，残ったわずかな筋線維は抗体によりほぼ完全に染色された。著しい脊柱の側彎を伴った症例8では，染色した標本には再生筋も壊死線維も見られず，すべての筋細胞膜がすべての抗体で完全に

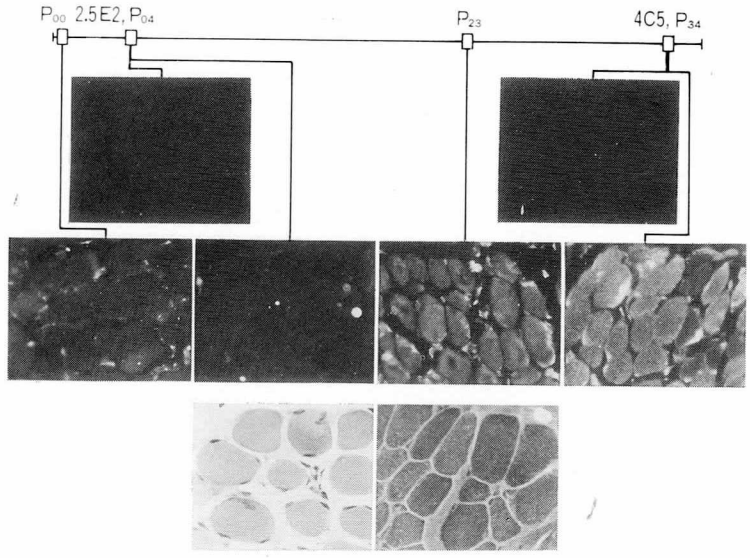


図5　DMD の免疫組織染色
いずれの抗体も筋細胞膜をまったく染色しなかった。

染色されていた。これに対し，DMD 例（症例9）では，図5のように，筋細胞膜はいずれの抗体とも全く反応せず，ジストロフィンは存在しないことが示された。

考　察

一部の BMD では，複数の抗体を用いた免疫染色で，抗体によりジストロフィンが検出されたりされなかったりといった大きな染色性の差が観察されている[5)6)]。しかし，今回検討した8例の CMD では，4か所のアミノ酸配列に対して作製された6種の抗体による染色性の差は見られなかった。1歳未満の CMD type Ⅰ，およびⅢ/Ⅳにおいて認められたジストロフィン抗体の染色性が低下している筋線維は再生線維，壊死線維であり，いずれの抗体でも染色性は同様に低下していた。ポリクローナル抗体4種を用いたイムノブロットで，CMD type Ⅰ およびⅢ/Ⅳの全例で，ジストロフィンの分子量である約400 kDa のバンドがいずれの抗体によっても検出された。さらに，CMD 10例に関して，ジストロフィンの cDNA プローブを用いて行った Southern blotting でも，ジストロフィン遺伝子内に異常は発見されなかった。これらの結果より，CMD においては，正常のジストロフィン遺伝子から正常のタンパクがつくられて，筋細胞膜上に存在していると考えられる。即ち，CMD の臨床症状がジストロフィンの異常により生じたものであるとは考えにくい。これに対し，DMD の病因は，ジストロフィン遺伝子の異常とそれに起因するタンパクの欠如である。DMD の中には，ここに示した症例9のように乳児期から発達の遅れが目立ち，臨床所見のみでは CMD type Ⅲ/Ⅳ との鑑別が困難な例が存在する。このような例を診断する際，ジストロフィンの免疫染色は，DMD と一部の CMD を鑑別する有効な手段になり得ると思われる。

結　語

経時的な臨床症状の観察により，CMD の亜型分類を行い，複数の抗体を用いて免疫学的検討を行った。いずれの亜型においても，組織内に混在する壊死線維，再生線維ではジストロフィン反応の低下や欠如が見られたが，筋細胞膜には正常のジストロフィンが存在していた。分子遺伝学的検討においても，ジストロフィンの遺伝子内に異常はなく，CMD における正常ジストロフィンの存在が示された。

文　献

1) Arahata K, Hoffman EP et al: Dystrophin diagnosis: comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescent and immunoblot analysis. Pros Natl Acad Sci USA **86**: 7154-7156, 1989

2) 鈴木陽子, 宍倉啓子ら：福山型先天性筋ジストロフィー症骨格筋病変の組織学的研究　日本小児科学会雑誌　**88**: 1763-1774, 1984

3) Koenig M, Monaco AP et al: The complete sequence of dystrophin predicts a rod shaped cytoskeletal protein. Cell **53**: 219-228. 1988

4) Arikawa E, Ishiura T et al: Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy. J Neurol Sci 10579-87, 1991

5) England SB, Nicolson LVB et al: Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. Nature **343**: 180-182, 1990

6) Ikeya K, Saito K et al: Molecular genetic and immunological analysis of dystrophin of a young patient with X-linked muscular dystrophy. Am J Med Genet, in press

ヒト正常筋と Duchenne 型筋ジストロフィー症罹患筋の筋肉培養における各種細胞骨格蛋白発現に関した免疫組織学的検討

班　員　舘　　延　忠
札幌医科大学小児科
共同研究者　渡　辺　幸　恵，若　井　周　治
札幌医科大学小児科

要　旨

Duchenne 型筋ジストロフィー症（以下 DMD と略す）の発病メカニズムを解明する上で，筋肉の増殖・分化の過程を経時的に観察できる筋肉培養の方法を用いることは有用と考えられている[1]。そこで DMD 罹患筋と正常筋における dystrophin, desmin, vimentin, spectrin, troponin, myosin の細胞骨格蛋白の性状を培養系を使って免疫組織学的に比較検討した結果以下のことが明らかになった。

1．Dystrophin はヒト正常筋の myoblast ではまだ発現せず myotube で核周囲の筋細胞質に出現し分化とともに筋細胞膜に移動する。DMD 筋では myoblast・myotube はともに dystrophin の発現は認めなかった。

2．Desmin・vimentin・spectrin・myosin・troponin の性状は DMD 筋と正常筋とで相違は認められず，DMD 筋でこれらの蛋白発現の異常はないと考えられた。

はじめに

DMD は発育とともに筋細胞が変性・壊死していく疾患だが，DMD の発病にジストロフィンがどのようなメカニズムで関与しているかいまだあきらかになっていない。各分化段階のジストロフィンと他の細胞骨格蛋白の関係を明らかにするために DMD 患者と正常者の培養筋における細胞骨格蛋白を免疫組織学的に調べた。

方　法

対象は DMD と診断された2名（5歳・6歳）の小児の生検筋と整形外科手術時に得られた2名（8歳・15歳）小児の正常筋肉を用いて行った。

培養は，Blau らの方法[2] と Delaporte らの方法[3] を一部改変して行った（図1）。培養経過を位相差顕微鏡で観察した後，アセトン固定を行い，免疫組織染色（蛍光抗体法と ABC 法）を施行した。抗細胞骨格抗体として，N末端 60 kd fusion protein に対する polyclonal 抗 dystrophin 抗体・Novocastra 社の3種類の monoclonal 抗 dystrophin 抗体（N末端, rod

muscle sample in Ham F-10 medium at 4 °C
↓
tissue dissociation
↓
trypsinization at 37 °C
↓
cell attachment technique
↓
cloning in GM (cell density 10 cells/plate)
↓
change the medium to FM

GM; growth medium
Ham-F10 with 2% chick embryo extract and 20% fetal calf serum
FM; fusion medium
Dulbecco's modified Eagle's medium and 2% horse serum

図1　細胞培養の方法

domain, C末端に対する抗体)・monoclonal 抗 vimentin 抗体・polyclonal 抗 desmin 抗体・polyclonal 抗 spectrin 抗体・monoclonal 抗 troponin 抗体・popyclonal 抗 myosin 抗体を使用した。

結　果

正常筋・DMD 筋ともに培養開始後4－5日目より筋芽細胞(myoblast)が出現した。DMD 筋では2症例とも正常筋と同じ形態の myoblast のほかに，大型で平坦に広がった細胞質内に空胞を有する myoblast が全体の約30%に認められた(図2)。これは Blau らが altered muscle phenotype という名称で報告した[4] DMD 筋に特有に認められる myoblast であると思われた。また正常筋の myoblast が分化したものと，前述した DMD 筋特有の myoblast が

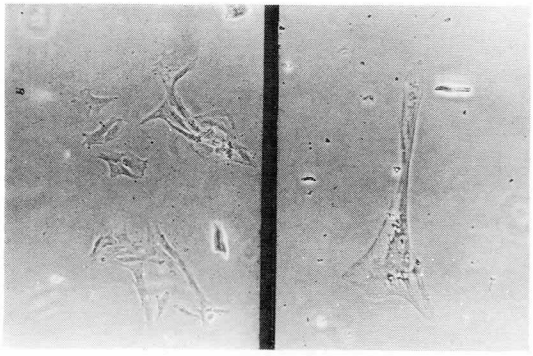


図2　正常筋(左側)と DMD 筋(右側)の培養5日目に出現した myoblast(位相差顕微鏡×200/×400)
DMD 筋では大型で平坦に広がった細胞室内に空胞を有する細胞が認められた。

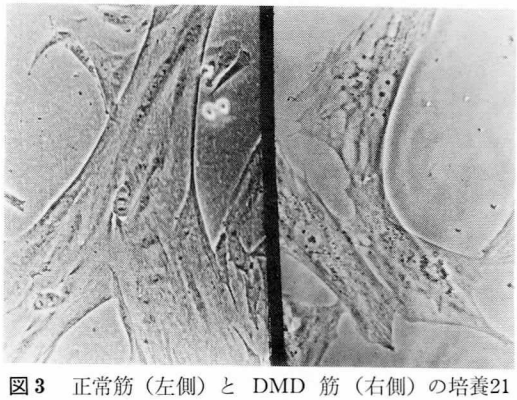


図3　正常筋(左側)と DMD 筋(右側)の培養21日目の myotube(位相差顕微鏡×400)
DMD 筋では細胞質内に空胞形成が顕著に認められた。

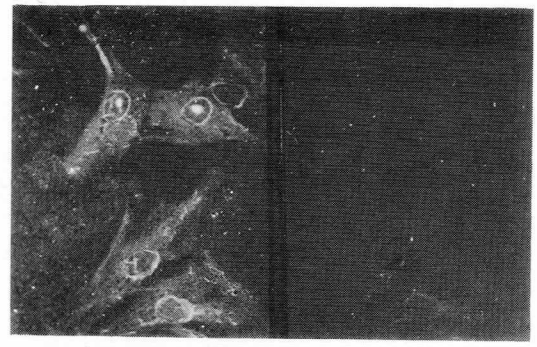


図4　正常筋の myoblast
RITC 標識 spectrin(左側)と FITC 標識 dystrophin(右側)で二重染色(蛍光抗体法×400)
spectrin は陽性だが dystrophin は染色されなかった。

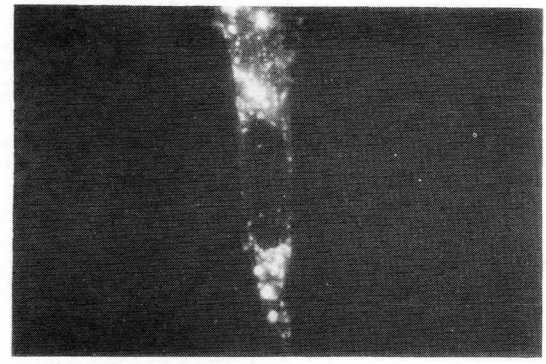


図5　正常筋の培養開始後15日目の myotube FITC 標識 dystrophin 染色(蛍光抗体法 ×400)
核周囲の筋形質が spot 状に染色された。

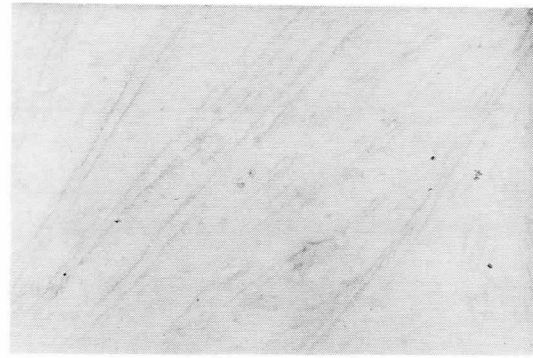


図6　正常筋の培養開始後25日目の myotube dystrophin 染色(ABC 法 ×400)
筋細胞膜が薄く染色された。

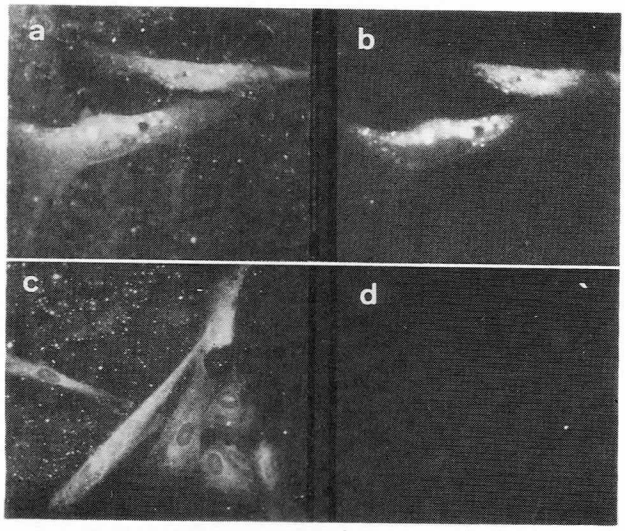


図7　正常筋と DMD 筋の spectrin と dystrophin の二重染色（蛍光抗体法 ×400）
a　正常筋 RITC 標識 spectrin 抗体　　b　正常筋 FITC 標識 dystrophin 抗体
c　DMD 筋 RITC 標識 spectrin 抗体　d　DMD 筋 FITC 標識 dystrophin 抗体

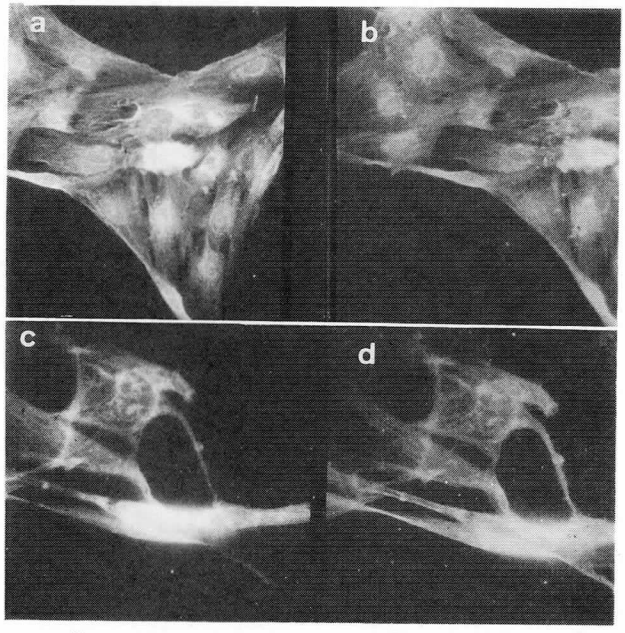


図8　正常筋と DMD 筋の desmin と vimentin の二重染色（蛍光抗体法 ×400）
a　正常筋 FITC 標識 desmin 染色　　b　正常筋 RITC 標識 vimentin 染色
c　DMD 筋 FITC 標識 desmin 染色　d　DMD 筋 RITC 標識 vimentin 染色

分化したものとを比較すると，DMD 筋では細胞質内に空胞形成が顕著に認められた（図3）。

次に正常筋を分化の各段階ごとに FITC で dystrophin 染色した結果，myoblast では陰性であったが（図4），myotube の初期では核周囲の筋細胞質に spot 状に発現した（図5）。なお Myoblast・myotube はともに今回使用した4種類の dystrophin 抗体によって染色状態に差異はなかった。Myotube のさらに分化したものを ABC 法で dystrophin 染色したとこ

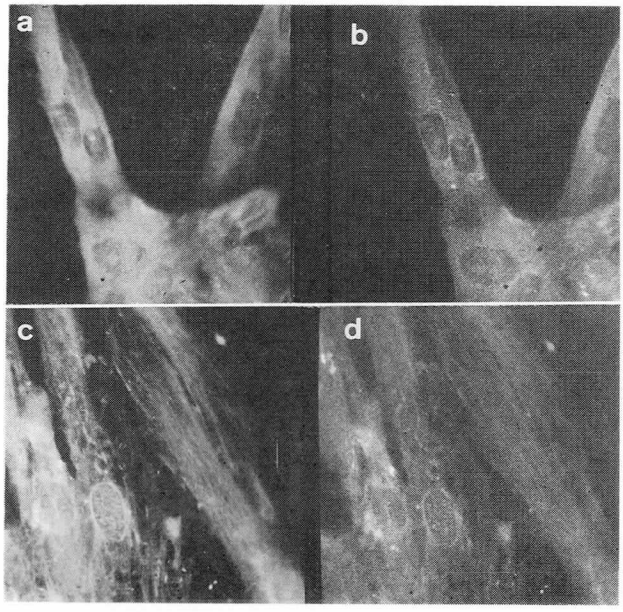


図9　正常筋と DMD 筋の troponin と myosin の二重染色（蛍光抗体法 ×400）
a　正常筋 FITC 標識 troponin 染色　　b　正常筋 RITC 標識 myosin 染色
c　DMD 筋 FITC 標識 troponin 染色　d　DMD 筋 RITC 標識 myosin 染色

ろ，筋細胞膜に薄く発現した（図6）。これは dystrophin が筋細胞のごく未分化な段階ではまだ発現せず，ある程度分化が進んだところで核周囲の筋細胞質に斑状に出現し，分化とともに筋細胞膜に移動するという Miranda らの報告[5]と一致した。

次に正常筋と DMD 筋の myotube を各種の細胞骨格蛋白で二重染色して比較した。RITC 標識抗 spectrin 抗体と FITC 標識抗 dystrophin 抗体で二重染色した結果，正常筋はいずれの抗体も筋細胞質に発現したのに対し，DMD 筋では spectrin は正常筋と同様に発現したが dystrophin は陰性であった（図7）。DMD 筋は今回使用した4種類の dystrophin 抗体はすべて陰性で生検筋の凍結切片の組織染色の結果と一致した。

FITC 標識抗 desmin 抗体と RITC 標識抗 vimentin 抗体で二重染色した結果も（図8）FITC 標識抗 troponin 抗体と RITC 標識抗 myosin 抗体で二重染色した結果とも（図9），正常筋と DMD 筋で発現状態に差が認められなかった。

考　察

現在 DMD は，DMD 遺伝子の変異によりその遺伝子産物であるジストロフィンが欠損，あるいは異常なジストロフィンが合成されていること[6][7]が明らかになっている。特にC末端ドメインは，ジストロフィンの安定性と機能が正常に働くために重要な役割を果たしており[8]，DMD ではC末端部を欠いていることが症状発現に深くかかわっていると考えられている[7][8]。DMD の胎児[9]や一部の症例で[6][7]，ジストロフィンのC末端部は陰性であるが，N末端部や rod domain などの truncated dystrophin を有する症例が報告されており，DMD は dystrophin の合成障害ではなく integration defect であるという指摘もある[9][10]。もしそうならば培養系の分化のごく初期で truncated dystrophin が発現している可能性もある。今回の筋肉培養法を用いた検索では正常筋も DMD 筋も myoblast の段階で4種類のジストロフィンはいずれも陰性であった。しかし免疫組織学的検査だけでは確定的なことはいえず今後はさらに未分化な myoblast の段階から免疫電気泳

動法も併用してジストロフィンの各ドメインについて調べる必要があると考えられる。

DMD 生検筋におけるジストロフィン以外の細胞骨格蛋白の異常についていくつか報告があるが，生検筋はほとんどが myotube であることから DMD 筋が変性した二次的な結果である可能性もある。それゆえ in vitro で未分化な段階から細胞骨格蛋白について調べていくことは重要であると思われる。今回の結果では spectrin・vimentin・desmin・troponin・myosin は DMD と正常筋で免疫組織学的には大きな相違は認められなかった。今後は altered myoblast phenotype と思われる細胞の細胞骨格蛋白について免疫電気泳動法を用いて詳細に検索を進めていきたい。

文　献

1) Sklar RM, Beggs AH et al: Defective dystrophin in Duchenne and Becker dystrophy myotubes in cell culture. Neurol **40**: 1854, 1990

2) Blau HM, Webster C: Isolation and characterization of human muscle cells. Proc Natl Acad Sci USA **78**: 5623, 1981

3) Delaporte C, Dautreaux B et al: Changes in surface morphology and basal lamina of cultured muscle cells from Duchenne muscular dystrophy patients. J Neurol Sci **95**: 77, 1990

4) Blau HM, Webster C et al: Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. Proc Natl Acad Sci USA **80**: 4856, 1983

5) Miranda AF, Bonilla E et al: Immunocytochemical study of dystrophin in muscle cultures from patients with Duchenne muscular dystrophy and unaffected control patients. Am J Pathol **132**: 410, 1988

6) Bulman DE, Murphy EG et al: Differentiation of Duchenne and Becker muscular dystrophy phenotypes with amino-and carboxy-terminal antisera specific for dystrophin. AM J Hum Genet **48**: 295, 1991

7) Hoffman EP, Garcia CA et al: Is the carboxy-terminus of dystrophin required for membrane association? A novel, severe case of Duchenne muscular dystrophy, Ann Neurol **30**: 605, 1991

8) Arahata K, Beggs AH et al: Preservation of the C-terminus of dystrophin molecule in the skeletal muscle from Becker muscular dystrophy. J Neurol Sci **101**: 148, 1991

9) Ginjaar IB, Bakker E et al: Immunohistochemical studies show truncated dystrophins in the myotubes of three fetuses at risk for Duchenne muscular dystrophy. J Med Genet, **28**: 505, 1991

10) Wessels A, Ginjaar IB et al: Different localization of dystrophein in developig and adult human skeletal muscle, Muscle Nerves **14**: 1, 1991

ベッカー型筋ジストロフィーにおけるジストロフィン分析

班　員　岩　下　　宏
国立療養所筑後病院

共同研究者　安　徳　恭　演[1)]，酒　井　徹　雄[1)]，小　池　文　彦[1)]
金　井　信　子[1)]，内　野　　誠[2)]
[1)] 国立療養所筑後病院・神経内科　[2)] 国立療養所再春荘病院・神経内科

要　旨

ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）患者11名（年齢6～69歳，平均37歳）とその女性親族4名についてジストロフィン分析を行った。ジストロフィン遺伝子欠失は BMD 11名中，Chamberlain らの方法で6名，Beggs らの方法では前法の6名のほかに1名，計7名（64%）にみられたが，保因者と考えられる母親，娘を含む女性親族にはみられなかった。

BMD 5名の生検筋における Western blot 法では，3名にジストロフィンの低分子化がみられた。2種類のモノクロナール抗体，3種類のポリクロナール抗体の比較では，モノクロナール抗体が faint，patchy に染色され，BMD のジストロフィン異常検出にはモノクロナール抗体が優れていると考えられた。

目　的

BMD はデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）に比し，良性の臨床症候のほか，ジストロフィン欠失状態も異なり，臨床症候との関連が注目されている[1)2)]。われわれも，BMD 自験例とその女性親族について，ジストロフィン分析を行ったので報告する。

対象と方法

筑後病院入院，外来の BMD 患者11名，年齢6～69歳，平均37歳と51歳患者の娘21歳，43歳患者の妹37歳，17歳患者の母42歳および6歳患者の母40歳の女性親族4名を対象とした。親族は全員無症候性である。

全員から採血して，DNA 増幅法によるジストロフィン遺伝子欠失状態を検査した。検査は SRL に依頼した。方法は，ジストロフィン遺伝子の9つの領域（Exon 4,8,12,17,19,44,45,48,51）について Chamberlain らの方法で，さらに10領域（muscle-specific promotor, Exon 3,6, 13,43, 47,49, 50,52,60）について Beggs らの方法により，合計19領域を調査した。

患者5名，親族1名（43歳患者の妹37歳，T氏）について患者1名は腓腹筋，他は上腕二頭筋で生検を行い，2種類のモノクロナール抗体，3種類のポリクロナール抗体でジストロフィンの免疫染色を実施した。同時に，Western blot 法を行い，ジストロフィンバンドの状態を調査した。また HE 染色を行い，組織像を観察した。

結　果

BMD 患者11名の検査時年齢，性（全員男性），発症年齢，最終歩行年齢，家族歴，下肢障害度（筋ジストロフィーの障害段階，ニューヨーク大学式，上田改変，1～8），仮性肥大およびジストロフィン遺伝子欠失を表1に示す。症例1，8，11は同一家系，症例4と6は兄弟である。即ち，同じ家系では，欠失部位が一致していた。

表1　ベッカー型筋ジストロフィーにおけるジストロフィン分析

症例	年齢	性	発症年齢	最終歩行	家族歴	下肢障害度	仮性**肥大	ジストロフィン遺伝子欠失（Exon） Chamberlainらの方法	ジストロフィン遺伝子欠失（Exon） Beggsらの方法	ジストロフィン***バンド
1．HY	6	M	2	6	祖父	2	＋	45	47	
2．HM	14	M	10	14	−	2	＋	−	−	
3．KM	17	M	2	17	−	2	＋	−	3	
4．HK	32	M	10	20	兄2人	8	＋	4	3,6	
5．KH*	36	M	21	36	−	2	＋＋	−	−	低分子化
6．YK	42	M	12	20	弟2人	8	＋	4	3,6	
7．HT*	43	M	7	32	弟	7	＋	−	−	減少
8．YK*	47	M	13	22	弟	7	＋	45	47	低分子化
9．EN*	51	M	16	49	（娘2人）	7	＋＋	45	47	減少
10．HM*	53	M	13	51	弟，叔父	5	＋＋	−	−	低分子化
11．DI	69	M	6	58	孫1，甥3人	8	±	45	47	

*筋生検実施　　**＋軽度，＋＋中等度　　***Western blot 法

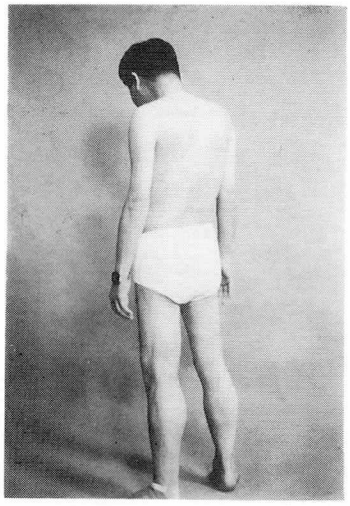


写真1　ベッカー型筋ジストロフィー EN（51歳，男）全身像

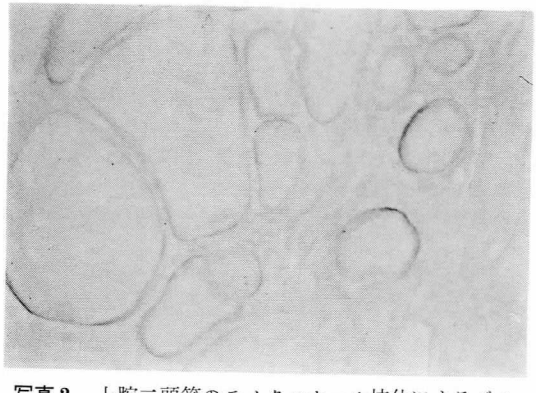


写真2　上腕二頭筋のモノクロナール抗体によるジストロフィン染色（症例 EN）

女性親族4名にジストロフィン遺伝子欠失はみられなかった。

写真1は症例 EN（51才）の全身像である。本患者の上腕二頭筋生検におけるモノクロナール抗体使用によるジストロフィン染色を写真2に示す。筋表面膜のジストロフィンが faint, patchy に染色されている。ポリクロナール抗体では，筋表面膜が濃淡はあるものの，全周性に染色される傾向があった。他の4例でも同様であった。T氏の筋表面膜ジストロフィンはモノクロナールとポリクロナール抗体の双方で全周性かつ均等に染色され，正常と判定された。

Western blot 法では，BMD 5例中2例（ともに下肢障害度7）にジストロフィンバンドの減少，3例（下肢障害度2，5および7）にその低分子化がみられた。T氏では，ジストロフィンバンドの減少も低分子化もみられなかった。

5例における生検筋 HE 染色組織像は，下肢障害度の高いものに筋線維減少，脂肪浸潤，結合織増加が著しかった。

考　察

BMD における筋生検のジストロフィン分析の結果から，1989年 Hoffman ら[1] は DMD/BMD を次の四型に分類している。(1)DMD：車椅子約11歳，ジストロフィン量正常の3％以下，(2)Severe BMD：車椅子13〜20歳，ジスト

ロフィン量3％～10％，(3)Moderate BMD (4) Mild BMD：車椅子20歳以上，ジストロフィン量20％以上。

一方，春原ら[2]は，臨床症状の軽重が認められたBMD兄弟例の分析から，ジストロフィン量が20％以上でも，臨床症状の重い例（兄）にジストロフィン量が低いと報告している。今回の私共の検討では，下肢障害度の高い例にジストロフィンバンドの減少を，低い例にその低分子化の傾向がみられた。Hoffman ら[1]，春原ら[2]の成績に符合する所見と考えられる。今回検索した女性親族のうち，T氏は必ずしも保因者とは限らないのでジストロフィン遺伝子欠失も筋生検での異常もみられなかった点は肯定できる。しかし，51歳患者（症例9，EN）の娘21歳と6歳患者（症例1，HY）の母であり69歳患者（症例11，DI）の娘である40歳の2人は，BMD の保因者と臨床遺伝学的には考えられるが，Chamberlain らの方法と Beggs らの方法でジストロフィン遺伝子欠失は，みられなかった。BMD 自身にも必ずしも欠失が証明されないと同様に，保因者診断におけるジストロフィン遺伝子欠失検索の限界を示すものと考えられる。

BMD 筋生検ジストロフィン染色の特徴は，faint, patchy とされており，この特徴を出すためにはモノクロナール抗体が今回の検索で優れていることが分かった。

文　献

1）Hoffman EP, Kunkel LM et al: Improved diagnosis of Becker muscular dystrophy by dystrophin testing, Neurology **39**：1011-1017, 1989

2）春原経彦，山田人志ら：Becker 型筋ジストロフィーにおける臨床症状とジストロフィンの関連，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，103，1989

ジストロフィン神戸にみられた mRNA 前駆体2次構造の異常

班　員　松　尾　雅　文
神戸大学小児科

共同研究者　西　尾　久　英，木　藤　嘉　彦，成　田　奈緒子
神戸大学小児科

要　旨

ジストロフィン神戸では，ジストロフィン遺伝子の第19エクソンに欠失が存在する結果，遺伝子より転写された mRNA 前駆体のスプライシング時にこのエクソンのスキッピングを生じる。今回，このスキッピングの原因を明らかにするため，ジストロフィン遺伝子の第19エクソンの近傍の塩基配列を対象に，その mRNA 前駆体の2次構造を検討した。

野生型では，エクソン19の配列自体がヘアーピン構造を形成していた。一方，ジストロフィン神戸のエクソン19はそれ自体でヘアーピン構造を形成することなく，すべての塩基がイントロン19の塩基とステム構造を形成していた。また，解析したジストロフィンのすべてのエクソンが，エキソン内のヘアーピン構造を有していた。

この結果は，ジストロフィン神戸に見られた mRNA のスプライシング時のエクソンのスキッピングが，エクソン内ヘアーピン構造の消失により発生したことを示した。

はじめに

私共は，Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）患者のジストロフィン遺伝子の異常をスクリーニングするため，PCR 法を用いた遺伝子欠失の診断を実施してきた。ジストロフィン遺伝子欠失の頻度及び部位には，日本人と欧米人でほぼ同一であることを明らかにしてきた[1,2]。

最近私共は，ジストロフィン遺伝子のエクソン19に微細な欠失を有する症例を見いだし，世界で初めてジストロフィン遺伝子欠失部位の塩基配列を明らかにし，これをジストロフィン神戸として報告した[3]。さらに，ジストロフィン神戸では，この微細な遺伝子の欠失の結果，遺伝子からの転写産物である mRNA 前駆体のスプライシング時にこのエクソンがスキッピングされ，異常な mRNA が生成されることを明らかにした[4]。ジストロフィン神戸では，mRNA 前駆体のスプライシング部位認識のコンセンサス配列には異常は認められず，このエクソンのスキッピングを惹起した原因は不明であった。

今回，ジストロフィン神戸のエクソンのスキッピングの原因を探るため，mRNA 前駆体2次構造を解析したところ，欠失を有するエクソンのヘアーピン構造が消失している結果を得た。他のジストロフィンのエクソンでもこのエクソン内ヘアーピン構造が存在することから，ヘアーピン構造の消失がジストロフィン神戸でのエクソンのスキッピングの原因と考えられたので報告する。

対象及び方法

（症例）

ジストロフィン神戸は，ジストロフィン遺伝子第19エクソンの3'端側に52塩基の微細な欠失を有し，88塩基存在すべきエクソン19の塩基数がわずか36塩基となっていた[3]。また，ジストロフィン神戸では筋肉のジストロフィン mRNA を逆転写して合成した cDNA の塩基

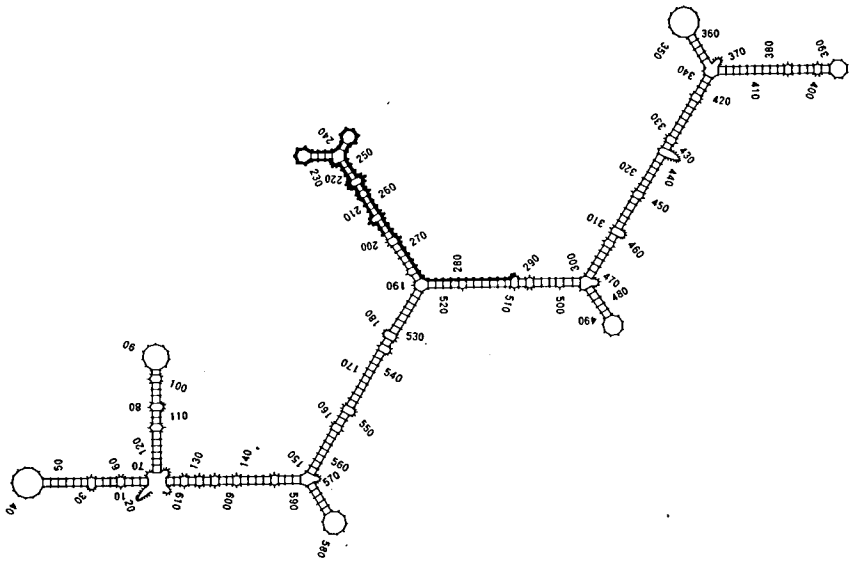


図1　mRNA 前駆体の二次構造．太線がエクソン

配列から，残存すべき36塩基のエクソン19配列が完全に消失していた[4]。

（方法）

ジストロフィン遺伝子から転写されたmRNA 前駆体の２次構造の解析は，最もエネルギー的に安定した塩基結合を求める Zuker らの方法を用い，コンピューターにより行なった[5]。２次構造の解析にはエクソン19および両側のイントロンのすでに明らかにされているエクソンの塩基配列を入力した。エクソン19では正常では617塩基，ジストロフィン神戸では565塩基であった。

結　果

野生型のジストロフィンエクソン19及びその両側のイントロンの配列から mRNA 前駆体の２次構造を演繹した。その２次構造は，全体として比較的単純な１つのステムループと８つの小さなヘアーピン構造を呈した（図１）。一方，エクソン19の配列では，エクソンの5' 端側はエクソンの配列と塩基対をなしたヘアーピン構造をとり，エクソンの3' 端はイントロン18と19の配列とステム構造を形成していた（図２）。

欠失を有するジストロフィン神戸のエクソン19の mRNA 前駆体２次構造を解析した。全体

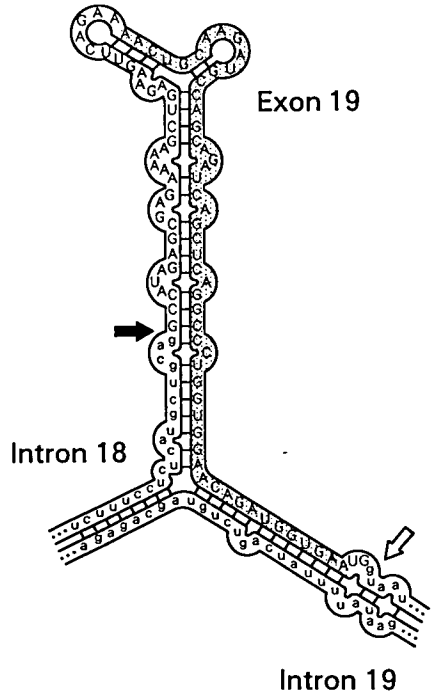


図2　エクソン19の形成するヘアーピン構造．
大文字がエクソン，小文字がイントロン

としてやや複雑な３つのステムループ構造の集合構造を呈した（図３）。この２次構造中のエクソン配列についてみると，エクソン配列のすべての塩基はエクソン自体の配列と塩基対を形

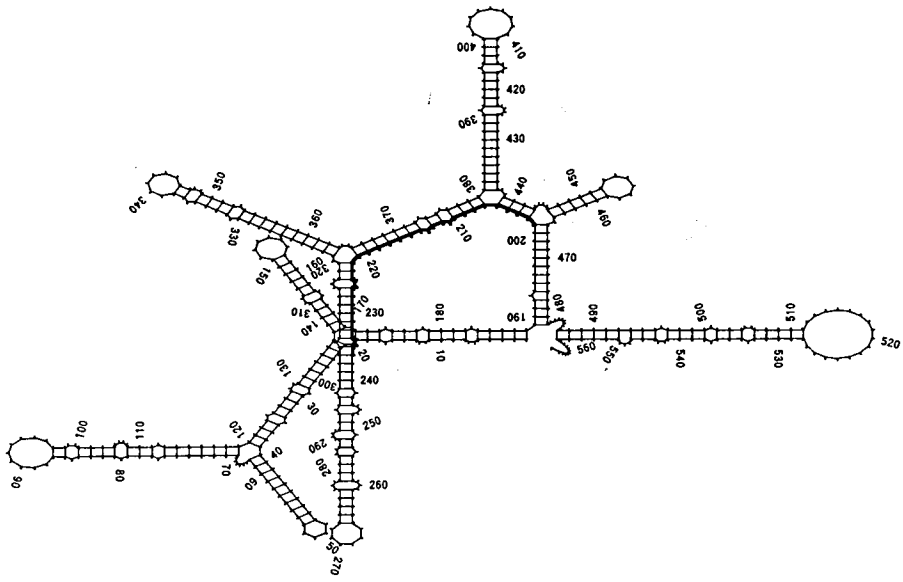


図3　ジストロフィン神戸の mRNA 前駆体二次構造.　太線がエクソン

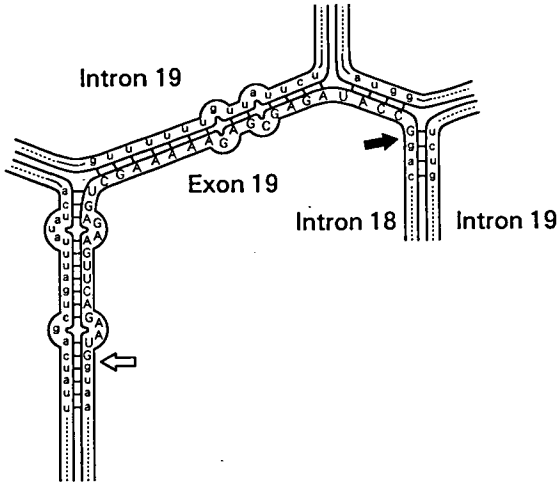


図4　ジストロフィン神戸が形成するシステム構造
大文字がエクソン，小文字がイントロン

成することなく，イントロン19の配列のみと塩基対をなしたステム構造を形成していた（図4）。

また，ジストロフィン遺伝子の近傍の塩基配列が判明している他のエクソンの mRNA 前駆体2次構造を解析した。解析したジストロフィンの22エクソンすべてにエクソン内ヘアーピン構造が見られ（表1），ジストロフィンの mRNA 前駆体のエクソンにはエクソン内ヘアーピン構造が必須な構造であることを示した。

表1　ジストロフィンのエクソンとヘアーピン構造

Exon No.	Hairpin
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
10	+
12	+
17	+
22	+
36	+
37	+
41	+
44	+
45	+
47	+
48	+
49	+
50	+
51	+
53	+
54	+
55	+

考　察

ジストロフィン神戸ではmRNA前駆体2次構造中のエクソン19のエクソン内ヘアーピン構造が消失したため，スプライシング部位認識機構に異常が生じ，エクソン19のスキッピングが生じたものと考えられる。

最近，mRNA 前駆体2次構造がスプライシング部位を制御するとの報告が多くの遺伝子で報告されている。しかし，このスプライシング制御因子としてエクソン内ヘアーピン構造に着眼した報告は見られず，今回の成果はスプライシングの制御に新たな観点を開くものである。

今後，DMD の治療法として，分子生物学的にスプライシング部位を変化させるにという新たな観点にたった方法の開発も可能と考えられた。

文　献

1) Nakajima, T., Matsuo. M, Kitoh, Y., Takumi, T., Nishio, H., Masumura, T., Koga, J. & Nakamura, H. Screening of gene deletions by polymerase chain reaction in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy. J. Neurol. **238**, 6-8, 1991

2) Kitoh, Y., Matsuo, M., Nishio, H., Takumi, T., Nakajima, T., Masumura, T., Koga, J., & Nakamura, H. Amplification of ten deletion-rich exons of the dystrophin gene by polymerase chain reaction shows deletions in 36 of 90 Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy. Am. J. Med. Genet. 42, 453-457, 1992

3) Matsuo, M., Masumura, T., Nakajima, T., Kitoh, Y., Takumi, T., Nishio, H., Koga, J., & Nakamura, H. A very small frame-shifting deletion within exon 19 of the Duchenne muscular dystrophy gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. **170**, 963-967, 1990

4) Matsuo, M., Masumura, T., Nishio, H., Nakajima, T., Kitoh, Y., Takumi, T., Koga, J., &Nakamura, H. Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intra-exon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy Kobe. J. Clin. Invest. **87**, 2127-2131, 1991

5) Matsuo, M., Nishio, H., Kitoh, Y., Francke, U., & Nakamura, H. Partial deletion of a dystrophin gene leads to exon skipping and to loss of an intra-exon hairpin structure from the predicted mRNA precursor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 182, 495-500, 1992

ジストロフィン C 末端ドメインが保たれた筋ジストロフィーの重症例

班　員　福　永　秀　敏
国立療養所南九州病院神経内科

共同研究者　森　豊　隆　志[1)]，大　窪　隆　一[1)]，樋　口　逸　郎[2)]
臼　杵　扶佐子[2)]，中　川　正　法[2)]，納　　光　弘[2)]
[1)] 国立療養所南九州病院神経内科　[2)] 鹿児島大学医学部第三内科

要　旨

症例は急速に筋力低下が進行し，10歳台で車椅子となったX染色体劣性遺伝の筋ジストロフィーの重症例である。筋生検組織における免疫組織化学的な筋形質膜の染色性の検討では，C末端及び rod 中央部に対するモノクローナル抗体を用いたジストロフィン染色では不連続な染色を示し，N末端ドメインに対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色では全く染色されなかった。ウェスタン・ブロット法による検討では，C末端モノクローナル抗体を用いた検討では，分子量約 340 kd の小分子量のジストロフィンが認められその蛋白量はよく保たれていた。N末端モノクローナル抗体では抗原性は全く認められなかった。更に，multiplex-PCR 法による解析では exon 3,4,6,8,12,13,17,19の部位の欠失が認められた。このデータよりC末端蛋白がよく保たれているにもかかわらず，ジストロフィンN末端ドメインの欠失が重症型を引き起こす可能性があると考えられる。

目　的

Duchenne 型筋ジストロフィー（以下 DMD）と Becker 型筋ジストロフィー（以下 BMD）は共にジストロフィン遺伝子の遺伝的変異によって起こる。Hoffman らは生化学的及び臨床的データとの関係を基に DMD と BMD とが 4 種のカテゴリーに分けられると報告している。DMD（11歳で車椅子となる。ジストロフィンの量は正常の3％以下)。severe BMD（13歳から20歳で車椅子。ジストロフィン量は3～10％)。moderate/mild BMD（20歳以上で車椅子。ジストロフィン量20％以上)[1)]。

今回我々は臨床的重症度とジストロフィンC末端に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的及び免疫ブロット解析との間に解離を認めた例を経験したので報告する。

症　例

13歳，男性。胎生期，出生時異常なし。首のすわり，寝返り，坐位保持等の発育は正常。つかまり立ちは10～11ヶ月にて可であったが，処女歩行は1歳半と遅れた。幼時期はよく転倒していた。4歳時，階段を昇るのが困難なことに気づかれた。waddling gait 及び Gowers 徴候陽性。近位筋優位の筋力低下を認め，calves の肥大を認めた。血清 CK 値は 2129U/L（24～195U/L）と著明に上昇していた。筋生検施行され DMD と診断された。9歳までは一人でゆっくりと歩行ができた。9歳時，階段昇降不能となり，10歳時歩行時介助必要になる。11歳時より伝い歩き不能となり，車椅子となった。12歳時，養護学校入学のため，当院に入院となった。

家族歴：血族結婚は認めない。母親は神経学

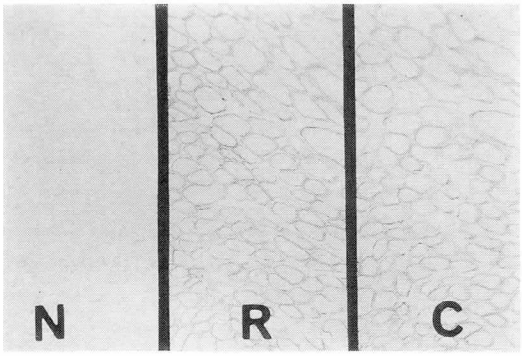


図1 C末端（C）及び rod 中央部（R）に対するモノクローナル抗体を用いたジストロフィン染色では patchy 或は不連続な染色を示し，N末端ドメインに対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色（N）では全く染色されなかった。×400.

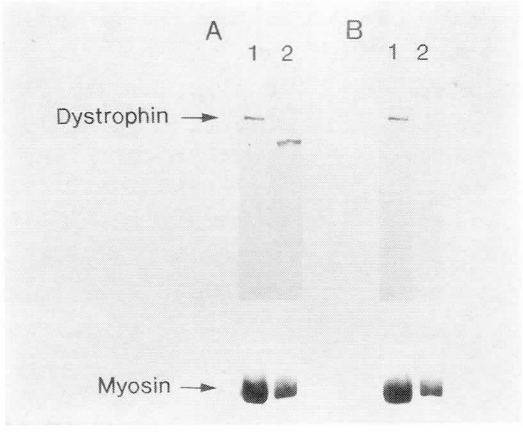


図2 筋生検組織でのウェスタン・ブロット法．C末端モノクローナル抗体では，分子量約340 kdの小分子量のジストロフィンが認められその蛋白量はよく保たれていた（A-2），N末端モノクローナル抗体では抗原性は全く認められなかった（B-2），（A,B-1：対照，A, B-2：本症例）

的に正常だが血清 CK 値は 228U/L と軽度上昇を認めた。母の兄は臨床的には DMD と診断され，15歳で死亡した。

4歳時に左上腕二頭筋生検が施行された。標準的な組織化学的検索では筋線維の大小不同，necrotic fiber, opaque fiber, 再生線維, internal nuclei を認め，脂肪及び線維結合織の増生が認められた。筋生検組織において免疫組織化学的に筋形質膜の染色性を検討したところ，C末端及び rod 中央部に対するモノクローナル抗体を用いたジストロフィン染色では patchy 或いは不連続な染色を示し，N末端ドメインに対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色では全く染色されなかった（図1）。

Hoffman らの方法[2] によるウェスタン・ブロット法による検討で，C末端モノクローナル抗体を用いた検討では，分子量約 340 kd の小分子量のジストロフィンが認められその蛋白量はよく保たれていた。N末端モノクローナル抗体では抗原性は全く認められなかった（図2）。

更に，SRL で multiplex-PCR 法により，血液の DNA 解析を施行した。Chamberlain らによる方法では，exon 4,8,12,17,19の部位の欠失が認められた。Beggs らによる方法では，exon 3,6,13の部位の欠失が認められた。

考　察

この症例はX染色体劣性遺伝を示し，11歳で車椅子となったために臨床的には DMD と診断されていた。しかし，免疫組織学的にC末端及び mid rod domain に対するモノクローナル抗体を用いた染色で筋形質膜の patchy 或いは不連続な染色を呈したことは BMD に一致する[3]。又，ウェスタン・ブロット法による検討でも，C末端モノクローナル抗体を用いた検討で，患者のジストロフィンは分子量は正常より小さいが，その蛋白量はよく保たれていた。BMD ではジストロフィンの Qualitative alterations が特徴的所見であると報告されている[2]。一方，N末端モノクローナル抗体では抗原性は全く認められなかった。multiplex-PCR 法による解析では exon 3から19に欠失を認め免疫組織学的解析と一致した。

最近欠失の size 及び位置と疾患の重症度との相関に関する報告が散見されている。荒畑らはC末端のジストロフィンが BMD ではよく保たれているが，DMDでは保たれていないことを報告し，ジストロフィンの適切な機能のためにはC末端ドメインが重要であることを強調している[4]。本症例はジストロフィンC末端が保たれているにもかかわらず重症な臨床経過を示した。このことは，C末端蛋白がよく保たれているにもかかわらず，ジストロフィンN末端ドメ

インの欠失が重症型を引き起こす可能性があることが考えられる。松村らは，exon 3の single in-frame deletion を伴った筋ジストロフィーの長期生存兄弟例を報告している[5]。起立・歩行不能年齢に基づく分類では DMD と診断されていたが，10歳台後半では通常とは異なる臨床経過を示したもので，本症例でも10歳台後半で進行が変化するかどうかを観察する必要がある。ジストロフィンのドメインの機能の解析には，欠失の size 及び位置と臨床的重症度の相関に関するより詳細な研究が必要であると思われる。

まとめ

急速に筋力低下が進行し，10歳台で車椅子となったX染色体劣性遺伝の筋ジストロフィーの重症例を報告した。臨床的重要度とジストロフィンC末端に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的及び免疫ブロット解析との間に解離を認めた。multiplex-PCR 法による解析では exon3,4,6,8,12,13,17,19の部位の欠失が認められた。このデータよりC末端蛋白がよく保たれているにもかかわらず，ジストロフィンN末端ドメインの欠失が重症型を引き起こす可能性があると考えられる。

文　献

1）Hoffman EP, Kunkel LM et al: Improved diagnosis of Becker muscular dystrophy by dystrophin testing. Neurology **39**: 1011, 1989

2）Hoffman EP, Fischbeck KH et al: Dystrophin characterization in muscle biopsies from Duchenne and Becker muscular dystrohy patients. N Engl J Med **318**: 1363, 1988

3）Arahata K, Ishiura S et al: Immunostaining of skeltal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. Nature **333**: 861, 1988

4）Arahata K, Beggs AH et al: Preservation of the C-terminus of dystrophin molecule in the skeletal muscle from Becker muscular dystrophy. J Neurol Sci **101**: 148, 1991

5）松村喜一郎，伊本夏樹：Dystrophin 遺伝子の exon 3の in-frame deletion を伴った筋ジストロフィーの長期生存兄弟例．臨床神経 **31**: 286, 1991

Ⅳ．治療

A. 評価法と治療法の開発

プロジェクト研究V　治　　療
V-A　評価法と治療法の開発

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するプレドニゾンの臨床効果

班　　員　姜　　進
国立療養所刀根山病院神経内科
共同研究者　宮　井　一　郎，野　崎　園　子，松　村　　剛
国立療養所刀根山病院神経内科

要　旨

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するプレドニゾン治療効果の検討を開始した。1991年11月末現在，8歳未満で機能障害度2度までの3例に体重1 kgあたり1 mg，隔日に投与している。

臨床評価は機能障害度(8段階)評価，日常生活動作（ADL）テスト，運動機能テスト（10 m走行時間の測定など)，関節可動域テストを投与開始時，投与後12週ごとに行い，それらの成績を総合して下す予定である。

投与期間が2～6週間の現時点では，プレドニゾンの効果については言及することは困難であるが，2例において血清 CK は2週後著明に下降した。副作用に注意しながら長期投与の効果を検討したい。

目　的

昨年度の本会議では，これまでに筋ジストロフィーに対して試みられた薬物治療のうち主要なものを取り上げ概説した。そして従来の薬物治療の中ではプレドニゾン治療が最も有力であり，多施設による検討の必要性を呼びかけた。しかしプレドニゾン長期投与には副作用など問題点も多く，多施設による検討に先駆けて少数施設による pilot study を行うことにした。現在，兵庫中央病院と刀根山病院において pilot study が行われているが，プロジェクト研究としては刀根山病院の中間成績を報告することにする。

対象および方法

対象は歩行可能なデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）患者である。プレドニゾン投与開始年齢は5歳から10歳である。試験の実施にあたり患者および親権者に充分な説明を行い，同意を得た。プレドニゾン投与量・投与期間：体重 1 kg あたり 1 mg を隔日に投与する。服薬は朝食後とする。投与期間は48週間以上とする。

臨床評価：機能障害度（8段階)，日常生活動作(ADL）テスト，運動機能テスト（動作遂行所要時間を測る)，関節可動域テストを投与開始時，投与後12週ごとに行う。

臨床検査：末梢血液像，血清電解質，血液生化学（CK, CK アイソザイム，血糖など）尿化学の各項目は投与開始時，投与開始後4，8，12週後，12週後以降は12週ごとに実施する。心電図検査は投与開始前，24週後，48週後，投与終了時に行う。

副作用：プレドニゾンとの関連性が否定できない症状の出現や臨床検査値の異常変動について，その発現日，種類，程度，処置，経過・転帰，薬剤との関連性について記載する。

総合評価：臨床効果はプレドニゾン投与後の経過を総合し，投与48週後および投与終了時（あるいは中止時）に判定する。概括安全度は副作

プレドニゾン服用 DMD 患者

1991. 11月末現在

患者	生年月日	発症年齢	服薬開始日	体重	身長	機能障害度	家族歴
1) M. S.	1984. 5.12	1歳11カ月	1991.10. 9	16.0 kg	107.6 cm	1	なし
2) I. R.	1984. 7. 7	3歳2カ月	1991.10.30	25.0	125.0	1	あり
3) K. A.	1983.11. 8	3歳1カ月	1991.11. 6	22.0	120.0	2	なし

用を考慮し，有用度は臨床効果および概括安全度を総合的に考慮し，それぞれ投与48週後および投与終了時（あるいは中止時）に判定する。

結　果

1991年11月末までにプレドニゾン投与を開始した DMD 患者は表に示す3名である。服薬開始時の年齢は7歳3カ月，7歳4カ月，7歳11カ月であり，いずれも8歳未満であった。機能障害度は1～2度であった。明らかな家族歴は症例2に認められた。

投与後の経過については，投与期間が2～6週間であり，現時点では客観的指標をもとに論じることができないが，症例1は服薬2週間後から少し動きが良くなったという印象を母親はもっている。

プレドニゾン投与後の血清 CK の変動を図に示す。投与2週後に検査した2例では血清 CK は著明に下降した。投与4週後に検査した症例1でも血清 CK は若干下降した。

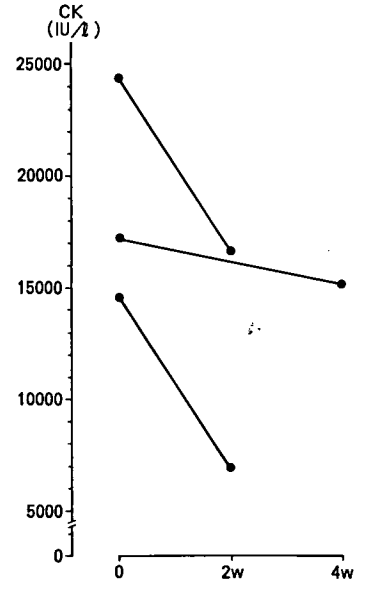


図　プレドニゾン投与前後の血清 CK 値

考察およびまとめ

DMD に対するプレドニゾン治療は Drachman に始まる[1]。1987年，DeSilva, Drachman らは，16例の DMD 患者にプレドニゾンを投与し，投与群では対照群に比し，約2年間歩行が延長することを報告した[2]。1991年，Griggs らは randomized, controlled trial を行い，投与量に比例してプレドニゾン投与群において筋力の増強を認めた[3]。すなわち，体重1 kg あたり0.75 mg を連日投与した群ではプラセボ群は言うに及ばず，0.3 mg/kg 連日投与群よりも筋力の増強がみられた。しかし，副作用の出現率も少量投与群に比し高かった。

私達が今回，体重1 kg あたり1 mg 隔日投与という方法を採用したのは，投与量としては0.5 mg/kg 連日に匹敵し，副作用の出現を押さえ薬効が期待できること，また隔日投与で副腎皮質機能抑制を軽減しうることによる。

最長6週間投与の時点ではプレドニゾンの効果について言及することは困難であり，副作用に注意しながら長期投与の効果を観察していく予定である。

文　献

1) Drachman DB, Toyka KV, Meyer E: Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. Lancet, 2 : 1409-1416, 1974

2) DeSilva S, Drachman DB, Mellits D, Kuncl RW: Prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. Arch. Neurol. 44 : 818-822, 1987

3) Griggs RC, Moxley RT, Mendell JR, Fenichel GM, Brooke MH, Pestronk A, Miller JP: Prednisone in Duchenne dystrophy, A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. Arch. Neurol. 48 : 383-388, 1991

可動型等尺性筋力計の開発と治療評価への応用

班　員　高　橋　桂　一
国立療養所兵庫中央病院
共同研究者　堀　川　博　誠，苅　田　典　生，森　下　智　行
国立療養所兵庫中央病院神経内科

要　旨

筋疾患の評価手段として，筋力の測定は最も直接的である。既に我々は，平成元年度に，等尺性握力測定器を開発し，その有用性を報告した。今回は移動可能な四肢筋力の等尺性測定器を開発し，先ず正常者での筋力測定の再現性を検討した。平均年齢 20.5 歳の 20 名の右上腕二頭筋の 3 回連続測定の最大値トルクは 390.0±44.0 kg・cm で，1 ケ月後の測定値は 390.0±52.5 kg・cm と極めて高い再現性がみられた。測定時の固定条件が重要であり，通常は市販の固定用椅子を用い再現性を高めた。筋ジストロフィーその他の筋疾患での筋力の経過を記録し，治療の評価を試みた結果を報告した。等尺性筋力測定は，薬物治療の評価において客観的指標として不可欠である。

目　的

筋疾患の評価手段として，筋力の測定は最も直接的であるが，精度，再現性疲労などに関して，機器や測定条件などが重要である。既に我々は，等尺性握力測定器の開発を行い，その有用性を報告した（平成元年度報告書293頁）。今回は移動可能な四肢筋力の等尺性測定器を開発し，ジストロフィーなどの筋疾患に応用し，治療の評価に用いた結果を報告する。

方　法

前回の握力計に用いたロード・センサーと増幅器を一部改造し，センサー位置の設定が容易なクランプとボードを使用した。正常女性20名（20.5±0.6歳）に連続 3 回の前腕屈曲と伸展の筋力測定を行った。この20名を含む42名（20.6±0.6歳）に 1 カ月後再度測定を行い，再現性の検討を行った。下肢については移動型では治療用ベッド上で下腿を下垂させて座った位置で，軀幹傾斜によるトリックモーションをさけて，膝伸筋および屈筋を外踝の高さにセンサーを当て測定した。通常は市販の固定用椅子を用い再現性を高めた。

筋ジストロフィーの臨床例についても，前腕屈伸，膝屈伸，等尺性握力測定などを行い評価した。有意差検定は paired t 検定および wilcoxon 検定によった。

結　果

表 1 に42名の正常女性の右上腕二頭筋と三頭筋の 3 回連続等尺性筋力測定の結果を示す。1 回測定後に約 5 秒の休息をとり測定した。繰り返しで軽度の筋力の低下がみられ，疲労と考えられる。二頭筋では 1 回目と 2 回目の間に有意な低下がみられ，1 回目と 3 回目では二頭筋と三頭筋ともに有意な低下がみられた。三頭筋では CV% が二頭筋より高く，今回は三頭筋は肘部の用手固定により測定したためと考えられた。二頭筋の測定は用手固定は不要であり CV%は小さくなっている。表 2 は20名の正常女性で 1 ケ月の間隔をおいて右上腕二頭筋の筋力測定を行った結果である。この20名では 3 回連続

測定間に有意差はなく，初回と1ヶ月後の測定値の間にも有意差はなく，3回測定の最大値をとると，同じ値となり，極めて高い再現性がみられた。CV％も初回と1ヶ月後で類似の5％以下の値を示した。これらの結果から3回測定の最大値（最大随意等尺性収縮力：MVIC）をとることが妥当と考えられた。

図1に52歳の肢帯型筋ジストロフィーの上肢筋力（MVIC）の測定例を示す。4ヶ月間で右

表1 随意性等尺性筋力
（正常女性42名，20.6±0.6歳）

	肘関節屈曲(二頭筋) 単位：トルクkg・cm		
第1回	372.5±64.4	p<0.01	p<0.05
第2回	363.5±59.8	ns	
第3回	362.5±59.2		
CV(％)	4.26±2.85		

	肘関節伸展(三頭筋) 単位：トルクkg・cm		
第1回	206.8±36.6	ns	p<0.05
第2回	203.7±40.5	ns	
第3回	198.5±38.7		
CV(％)	6.54±3.99		

表2 随意性等尺性筋力（右上腕二頭筋）
正常女性（20.5±0.6歳） 20名

	初 回	1ヶ月後	差
第1回	374.3± 50.3	382.4± 56.1	ns
	ns	ns	
第2回	377.5± 45.9	373.9± 49.9	ns
	ns	ns	
第3回	370.4± 47.5	369.7± 50.1	ns
CV(％)	4.36± 3.28	4.15± 2.39	ns
最大値	390.0± 44.0	390.0± 52.5	ns

ns：有意差なし
平均±標準偏差（単位：トルク kg・cm）

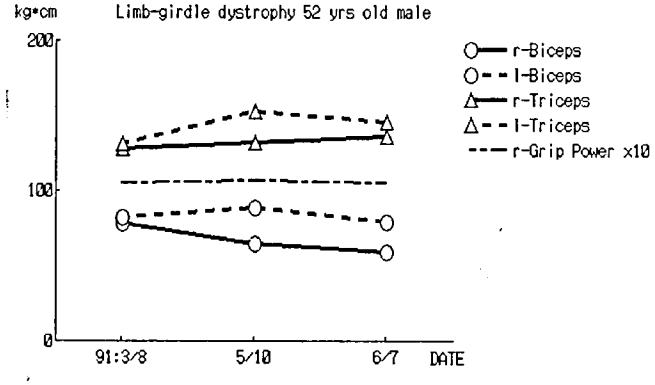


図1 Muscle Power (MVIC) of Arms in L-G dystrophy

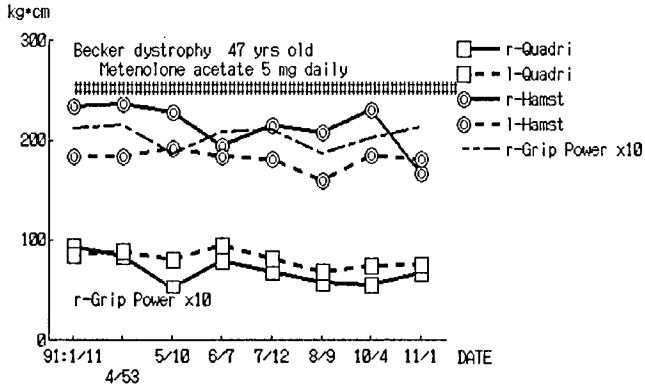


図2 Muscle Power (MVC) of Lower Extremities in BMD and Grip Power

二頭筋の筋力低下が観察された。図2に47歳のベッカー型筋ジストロフィーの下肢筋力と握力の経過を示す。この症例は蛋白同化ホルモン(Metenolone acetate 5mg 毎朝)の投与例である。膝伸筋(四頭筋)と膝屈筋と握力のMVIC は右膝屈筋で変動はあるが11ヶ月で徐々に低下している。左膝屈筋の筋力低下は少ない。握力は殆ど変化がなかった。図3は48歳男性の遠位型筋ジストロフィー(三好型)に Metenolone acetate 5 mg を毎朝投与した結果で

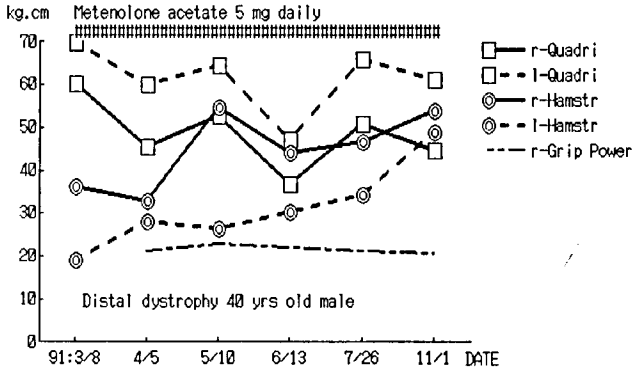


図3 Effect of Metenolone on MVC in Distal Dystrophy

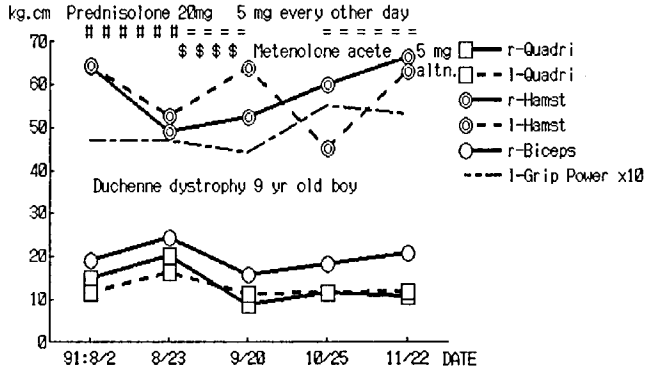


図4 Effects of Steroids on Muscle Power (MVIC)

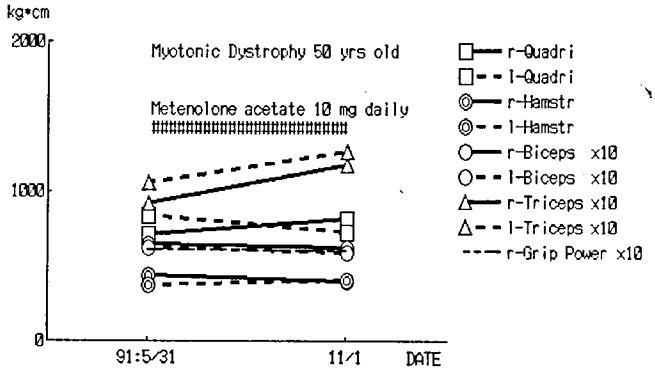


図5 Effect of Metenolone on MVC in Myotonic dystrophy

ある。8ヶ月の経過で膝屈筋は左右ともに増加を示し，膝伸筋は変動を示しながら漸減した。図4は DMD の9歳男児にプレドニソロンを20 mg 隔日に経口投与したところ，21日後には膝伸筋の筋力増加がみられ，膝屈筋の筋力は低下した。プレドニソロン5 mg とメテノロン5 mg の隔日交互投与で膝伸筋は低下し，膝屈筋力は増加した。中止でほぼ自然経過で予測されるレベルに戻っている。図5は筋緊張性ジストロフィーの50歳男性例で，メテノロン 10 mg 毎日投与の6ヶ月の上下肢の筋力測定結果である。上腕三頭筋の筋力の増加がみられた。

考　察

図6に Munsat によって示された徒手筋力テストと等尺性筋力測定値の関係を示す[1]。筋力4の占める範囲がいかに広く，徒手筋力テストで薬効を判定することの困難さが容易に理解される。ここに用いたロードセンサーは非直線性，ヒステリシス，繰り返し性いずれも0.05%定格出力以下の性能を有し，市販の増幅器にホイートストンブリッジ回路で接続して10 g単位で測定するようにセットした。ここに示したように，適当な測定姿位を設定すれば，極めて高い再現性で等尺性筋力の測定が可能である。プレドニソロン投与例では屈筋と伸筋で効果の相違があり，白筋と赤筋線維に対する効果の相違を表している可能性がある。Fenichel らは体重 kg あたり0.75 mg のプレドソロンの投与で筋力の増加が最も効果的であると報告している[2]。個々の症例で定量的な筋力測定がなされ，客観的な効果の判定が望まれる。

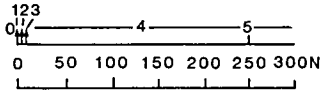


図6　徒手筋力テスト（上段）と等尺性筋力（下段）の比較筋力4の範囲の広いことに注目（文献1より）

結　論

移動可能な等尺性筋力計を開発した。正常人で測定の高い再現性が確かめられた。筋ジストロフィーでも測定可能な感度を有し，臨床例での測定結果を示した。筋力計による筋力測定は，薬物療法の評価において，客観的指標として不可欠である。

文　献

1）Munsat TH. Clinical trials in neuromuscular disease. Muscle & Nerve **13**: Supplement 3-6, 1990

2）Fenichel GM et al. Lomg-term benifit from prednisolone therapy in Duchenne Muscular dystrophy. Neurology **41**: 1874-1877, 1991

先天性筋ジストロフィーの脊柱変形

班　　員　五十嵐　勝　朗
国立療養所岩木病院

共同研究者　大　竹　　進[1]，工　藤　正　育[1]，黒　沼　忠由樹[2]
小　出　信　雄[2]，秋　元　義　巳[3]，高　瀬　　洋[3]
[1] 国立療養所岩木病院整形外科　[2] 国立療養所岩木病院小児科
[3] 国立療養所岩木病院内科

要　旨

先天性筋ジストロフィー（以下 CMD と略）の脊柱変形について検討した。CMD 11例（平均10.8才）のうち非福山型は2例で年齢も若年で側彎はみられなかった。福山型は9例で15度以上の側彎を7例に認めた。40度以上の高度側彎例は4例で15才以上であった。性差はなく，2例は100度を越えていた。脳波の異常を調べ得た8例全例に認めた。経年的に観察できた福山型は5例で5度以上進行したのが3例，不変が2例であった。8才から15才の間に107度と進行している例もあった。急速に進行した例では growth spurt との関連も考えられた。非福山型については，対象症例数が少なく，まだ若年であることから，引続き経過観察が必要と思われた。

はじめに

先天性筋ジストロフィー（以下 CMD と略）では，下肢の関節拘縮が早期から出現することがよく知られているが，脊柱変形については，明らかにされていない[1]。今回は，CMD の脊柱変形について検討したので報告する。

対　象

当院を受診した CMD のうち，脊柱についてX線写真にて評価出来た11例を対象に検討した。男6例，女5例で，検査時年齢1才—19才（平均10.8才）であった。福山型は，9例（男5例，女4例），非福山型は2例（男1例，女1例）であった。

経年的に経過観察できたのは，5例で4—7年平均5.2年の経過についても検討した。

方　法

坐位にて全脊柱のX線撮影を2方向で行ったが，自力で坐位保持の困難な症例は坐位保持装置を用いた。

側彎は Cobb 法にて計測し，前後彎については，modified kyphotic index を求めて評価した[2][3]。さらに，脳波異常との関連についても検討した。

結　果

非福山型は，2例と少なく，年齢も若年で側彎はみられなかった。

福山型は，9例で全例歩行不能であったが，15度以上の側彎を7例，78％に認めた。40度以上の高度側彎例は4例，44％であった。

double curve は1例で，胸椎部右凸，腰椎部左凸側彎であった。

single curve は6例で，胸椎部3例，胸腰移行部1例，腰椎部2例であった。男女別では，男2例，女2例と性別による差はなかった。しかし100度を越えている2例は，いずれも男であった。

左右別では，右凸2例，左凸4例で，100度を

越える高度側彎例は，右凸でC型の long curve であった。

前後彎の指標としての modified kyphotic index は－16から＋18平均＋1.1でほぼ垂直な脊柱であった。側彎と前後彎変形の関連は認められなかった（表1）。

表1　FCMD の脊柱変形

症例	年齢・性	Cobb角	K. I.	高位・彎曲
1	8・男	17°	＋18	腰椎・左
2	8・女	24°	＋ 1	胸椎・左
3	9・女	なし		
4	11・男	18° 10°	＋ 9	胸椎右・腰椎左
5	13・男	なし		
6	15・男	107°	＋10	腰椎・右
7	17・女	55°	0	胸椎・左
8	19・女	54°	－14	胸椎・左
9	18・男	101°	－	胸腰・右

脳波の異常を調べ得た8例全例に認めた。異常の側方性についても検討したが，脊柱変形との関連は認められなかった。

経年的に観察できた CMD は5例で5度以上進行したのが3例で，不変が2例であった。8才から15才の間に107度と進行している例もあった（表2）。単純に年齢と側彎度の関係についてみると r＝0.71 と年齢と共に有意にCobb 角は大きくなり，15才以上の症例は，全例30度以上の側彎であった（図1）。

表2　FCMD の脊柱変形・経年的変化

症　例	検査時年齢	年数	Cobb角
1	4 → 8	4	18° → 17°
2	4 → 8	4	9° → 24°
4	4 → 11	7	18° → 15°
6	8 → 15	7	9° → 107°
8	15 → 19	4	32° → 54°

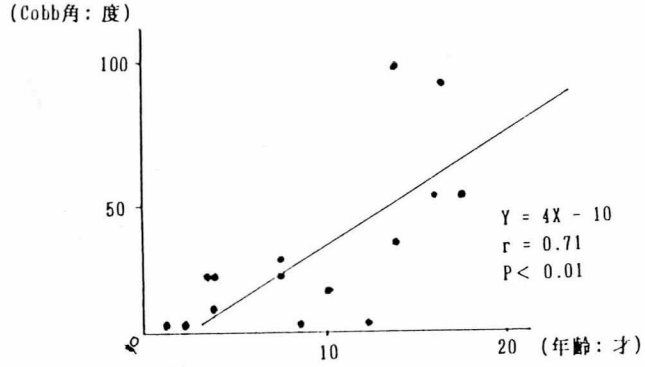


図1　CMD における年齢と側彎

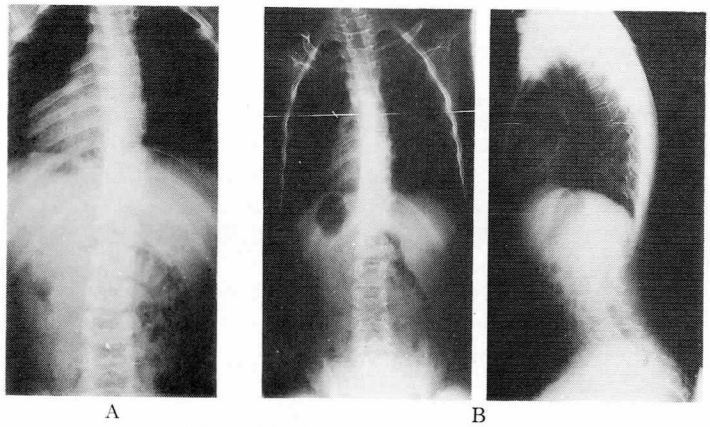


図2　症例4　A：4才　B：11才

代表症例を供覧する。

症例4　福山型　男　4才でT1-T12 18度の側彎を認めたが，7年後の11才でも側彎の進行はみられない（図2）。

症例6　福山型　男　15才で　T7-L5　107度と高度の側彎を認めるが，modified kyphotic index は＋10と後彎は少ない（図3）。この例の経年的な変化をみると，10才より側彎が出現し，13—14才の1年間で急激に側彎が進行し現在に至っている。このように変形が進行すると右の大転子で体重を支えるため体幹装具を使用しても長時間の坐位が困難となっている（図4）。

症例8　福山型　女　15才で32歳の側彎を認め，19才では　T10-L4　54度と腰椎部側彎が進行した（図5）。

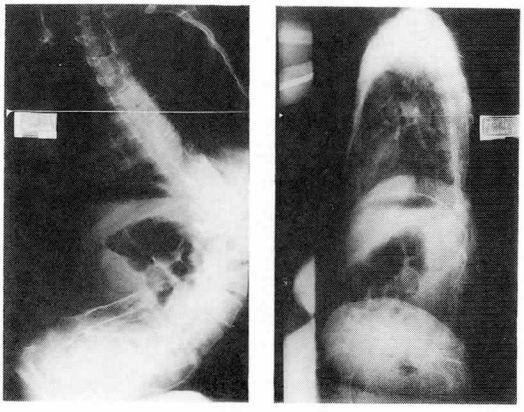
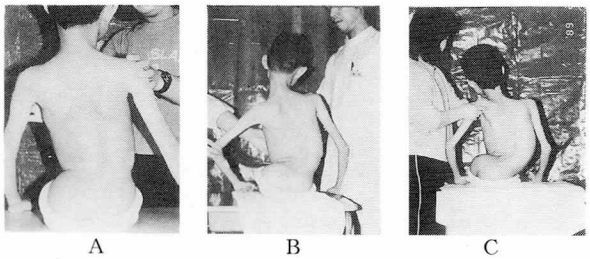


図3　症例6　15才

考　察

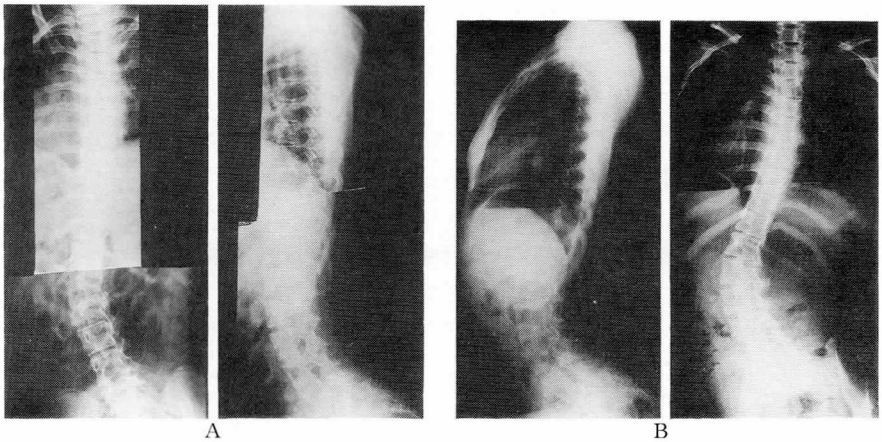
DMD では，全身の筋力低下にともない歩行不能になり，左右の関節拘縮が非対称になってくる時期に一致して脊柱変形が出現するといわれている[4)5)]。

福山型は全例歩行不能であったが，9例中4例（44％）に40度以上の側彎がみられ，デュシェンヌ型筋ジストロフィー（以下 DMD と略）とほぼ同様の頻度であった。



A　　B　　C

図4　症例6　A：10才　B：13才　C：14才



A　　B

図5　症例8　A：15才　B：19才

また，DMD の高度側彎例では，腰椎部左側彎例が約7割に認めるが[2]，福山型では，左右別の明らかな傾向はみられなかった。

思春期特発性側彎症では，女性が約8割と頻度が高いが，CMD の高度側彎例では，男2例，女2例と性差は認められなかった。

年齢と共に Cobb 角は大きくなり，100度を越えている症例が2例あった。しかし，CMD の中にも，進行する症例と，進行しない症例があると思われ[4]，長期に渡る経年的な検討が必要である。

今回は筋力・関節可動域・呼吸機能などの項目と脊柱変形について検討しなかったが，CMD の側彎の成因として筋力低下，関節拘縮との関連が考えられる。さらに特発性，DMD の側彎で言われ，今回も，13から14才の1年で急速に進行した症例を見ると growth spurt との関連も考えられた。また，脳波異常との関連は明らかではなかったが，中枢神経系の異常とくに左右差との関連について検討することが重要と思われた。

非福山型については，今回の対象症例数が少なく，まだ若年であることから，引続き経過観察が必要と思われた。

ま と め

1．福山型の 44％に40度以上の高度側彎がみられた。
2．高度側彎例は男2例，女2例で性差はなかった。
3．高度側彎例は，15才以上であった。
4．筋力低下・関節拘縮・中枢神経系の異常との関連についての検討が必要と思われた。

参考文献

1）Kukuyama Y, Osawa M, et al: Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type. —Clinical, genetic and pathological considerations—. Brain Dev, **3**：29, 1981.
2）大竹　進，増岡昭生ほか：Duchenne 型筋ジストロフィー症における脊柱変形について．東北整災紀要 **26**：179, 1983.
3）大竹　進，高橋真一郎ほか：Duchenne 型筋ジストロフィー症の脊柱変形について—高度進行群の検討—．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の臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究研究成果報告書 **93**, 1991.
4）松家　豊，河野那一ほか：筋ジストロフィー症に伴う側彎の経時的変化とその対策．脊柱変形 **1**：69, 1986.
5）坪井　順，森山明夫ほか：進行性筋ジストロフィー症の脊柱変形について．整・災外 **28**：439, 1985.

Duchenne型筋ジストロフィー患者の余命の予測

班　　員　畑　野　栄　治
広島大学医学部整形外科

共同研究者　長　谷　好　記[1]，升　田　慶　三[2]，大　瀧　　慈[3]
生　田　義　和[1]

[1] 広島大学整形外科　[2] 国立療養所原病院　[3] 原爆放射能医学研究所生物統計学教室

要　旨

Duchenne型筋ジストロフィー症（以下，DMD）に対する治療効果の判定法の一つとして，余命の予測を行った。余命を目的変数，①身長，②体重，③胸囲，④肺活量，⑤CPK，⑥ADL 補正得点を組合わせて説明変数とした予測モデルを作成し，重回帰分析を用いて，予測を行った。その結果，体重を身長の2乗で割った値（KAUP 指数）と CPK を説明変数とするモデルの適合性が最も良かった。この結果，log 余命＝A×KAUP 指数＋B×log CPK＋定数項という予測式が得られた。

ADL 補正得点は病状を鋭敏に反映しないため，肺活量は測定値のばらつきが大きいため説明変数とならなかった。予測値に KAUP 指数が強く関与するのは15才以降となり，これは死亡年令に体格が関係している事を裏付けるものと思われた。予測値と実測値の相関係数は15才以降では0.5以上となり，不確定要素の多い余命の予測ではかなりの精度があるものと考えられた。

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー症（以下，DMD）に対する治療効果の判定法は，未だ確立したものがない。現在我々は，治療効果を判定する指標として，ADL と余命に注目している。ADL に関しては，昨年の本研究会において，厚生省進行性筋ジストロフィー症対策研究会による ADL 評価基準の得点の補正（以下，ADL 補正得点）の報告を行った。

今回は，補正得点，血液検査データ，身長，体重などの身体数値を用いて，余命の予測を試みたので報告する。

I　対　象

対象は国立療養所原病院に入院していた DMD 患者81名で，毎年，誕生月に身体測定，血液検査，機能評価を行なっている。初回評価年齢は6才から20才，平均10.8才，最終評価年齢は12才から30才，平均18.8才である。すでに全員死亡しており，平均死亡年齢は19.7才である。

今回は①身長，②体重，③胸囲，④肺活量，⑤CPK，⑥ADL 補正得点の6項目に関して検討を行った。余命と CPK は常用対数に変換した数値を使用した。身長は，加齢とともに高度の側彎や関節拘縮のため測定値が減少する場合がある。よって，その年令までの身長の最大値を使用した。やせの程度を表すために，体重（kg）を身長（cm）の二乗で割った値（以下，KAUP 指数）を用いた。測定結果は，測定した症例数の多い10才から20才のものを使用した。

6項目のデータがすべてそろっているのは，22症例（以下，A群），胸囲を除いた5項目では41症例（以下，B群），身長，体重，CPK の3

項目では81症例（以下，C群）であった。なお，測定回数は，A，B，C群，それぞれのべ79，165，542回である。（図1）

II 方法と結果

1．解析の方法

各年令ごとに余命を目的変数，前に述べた6項目を組み合わせて説明変数とした予測モデルを作成し，最小二乗法を用いて重回帰分析を行った。モデルの選択には，赤池の情報量基準（以下，AIC）を用いた。

2．予測モデル

A群を用いて，6項目すべてを説明変数とするモデルについて検討した。次に，B群を対象とし，説明変数を，1）身長，体重，肺活量，CPK，ADL 補正得点の5項目，2）肺活量を除外した4項目，3）ADL を除外した4項目，4）肺活量と ADL を除外した3項目，5）KAUP 指数と CPK の2項目の5つのモデルについて解析を行い，AIC を比較した。

3．予測モデルの選択

A群では，ほとんどの年令で測定数が10以下となり計算が困難となるため，胸囲を説明変数として採用することを控えた（図1）。

1）～5）の5つのモデルの中では，KAUP 指数と CPK を説明変数とする場合が AIC が最小となり，最も適合性が良いことが示された（図2）。この結果，予測式は，log 余命＝A×KAUP 指数＋B×log CPK ＋定数項と表すことができた。

4．年令と説明変数の関係

以上の結果より，予測式の精度を高めるため症例数の多いC群を対象に，1）KAUP 指数のみ，2）CPK のみ，3）KAUP 指数と CPK

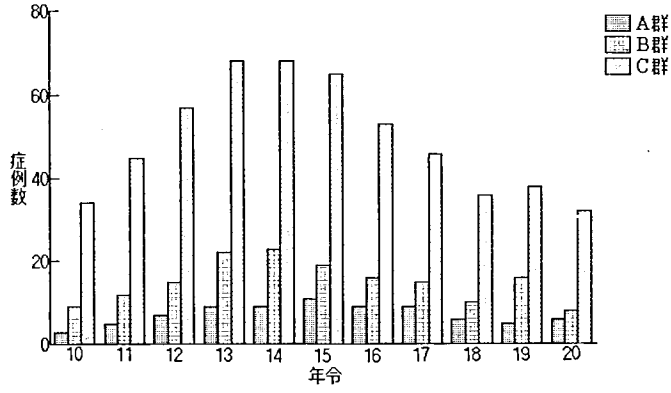


図1 年令別症例数分布

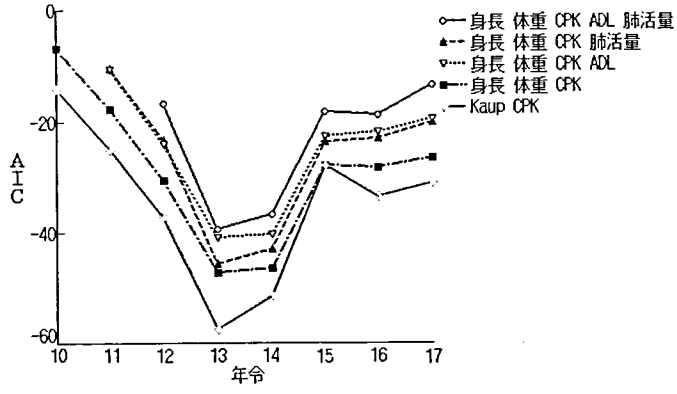


図2 各予測モデルの AIC の比較

を説明変数としたモデルで重回帰分析を行った。その結果，15才以下では CPK のみを説明変数するモデルのほうが AIC が小さいという結果が得られた（図３）。

５．予測式の係数（図４）

各年令ごとに得られた回帰係数，定数項の散布図を作成し，スムージングを行い，それぞれの曲線のグラフを得た。このグラフより各年令に相当する値を読み取り，予測式に代入することにより予測値を求める事が可能となった。

６．実測値と予測値（図５，図６）

余命の実測値と予測値の相関係数は12才では0.31であるが，以後年令とともに徐々に大きく

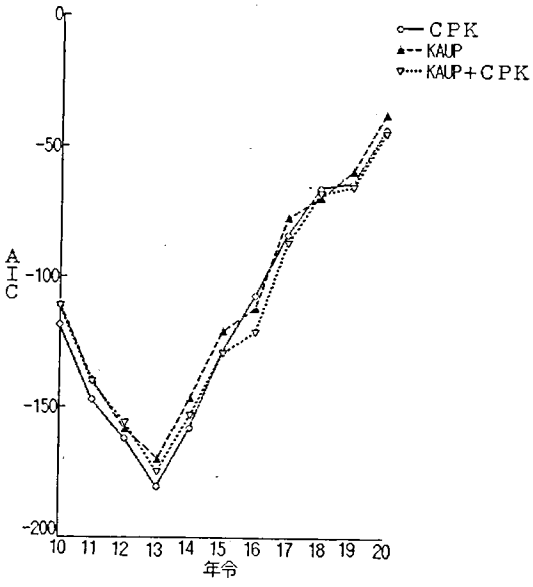


図３　年令による AIC の変化

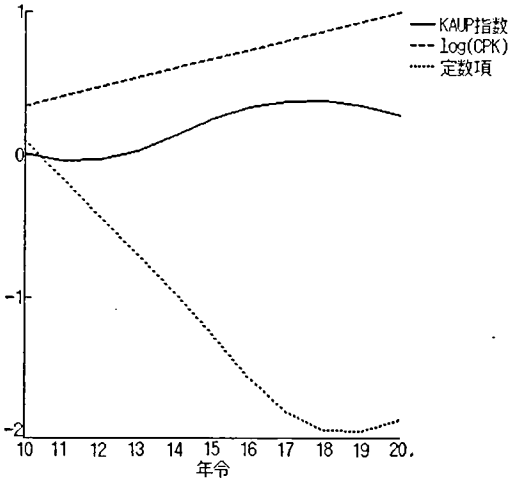


図４　予測式の係数

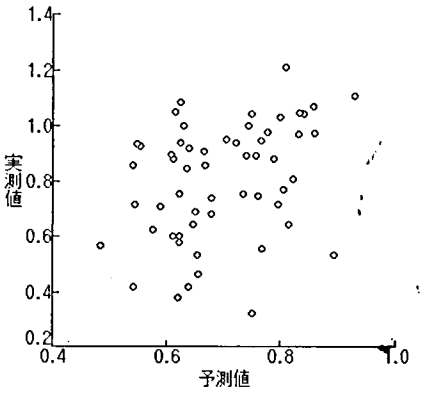


図5a　実測値と予測値　12才

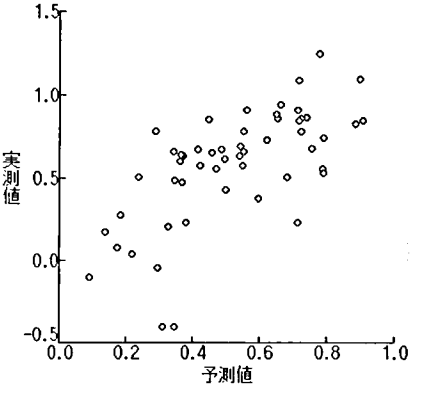


図5b　実測値と予測値　16才

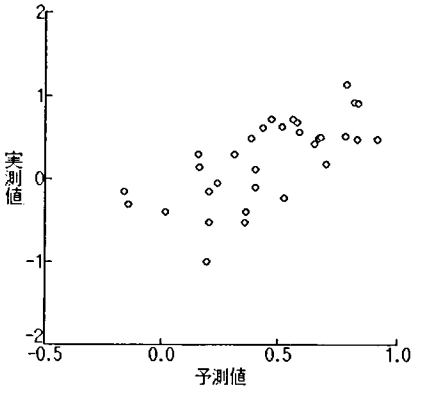


図5c　実測値と予測値　20才

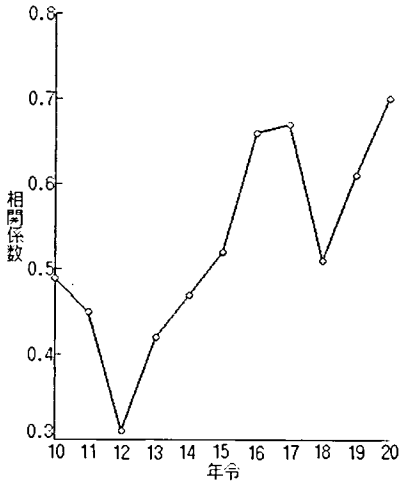


図6 実測値と予測値の相関

なり，18才で一時的に低下するものの，20才では0.7となった。

III 考　察

1．説明変数について

ADL 補正得点が説明変数に採用されなかった原因は，体幹や下肢の項目は早期に0点となり，末期には「息が続く」や「首の坐わり」などの項目の得点だけになり，得点を補正してもCPK 等に比べて，病状を鋭敏に反映していないためと思われた。

肺活量は，被験者の努力が要求される検査であるため，体調による変動が激しく，測定によるばらつきが大きくなり易い。末期には急激に減少するものの，その変化は必ずしも病状に一致していないために説明変数とはならなかったと思われる。呼吸障害の評価は，最近では Pa-CO2 の値を基にした分類が報告されるなど，比較的簡便で，信頼性の高い血液がガスのデータが採用されているようである[1]。これらの値を用いれば，有効な説明変数になる可能性はあると考えている。

2．CPK と KAUP 指数

15才以上で KAUP 指数と CPK を目的変数とするモデルの AIC が最小となったのは，この年代で CPK の値が急激に減少する事[2]，以前より指摘されていた，死亡年令と体格に関係がある事を裏付ける結果と思われる[3]。身長や体重ではなく，KAUP 指数が説明変数となったのは，単に身長の高低や体重の軽重ではなく，肥満の度合い（あるいは痩せの度合い）が重要である事を示唆しているものと思われる。

3．予測式の精度

余命の実測値と予測値の相関係数が18才で低下するのは，早期に死亡する症例がこの付近に集中しているためと考えている。しかし15才以降では0.5以上となり，不確定要素の多い余命の予測においては，かなりの精度があるものと思われる。

文　献

1）里宇明元，千野直一：Duchenne 型筋ジストロフィー症のリハビリテーション．PT ジャーナル **23**：607-614，1989

2）高柳哲也，小長谷正明：Duchenne 型筋ジストロフィー症の血清 CK 値からみた筋崩壊・「筋ジストロフィー症の疫学，臨床及び治療に関する研究」昭和58年度研究報告書：247-255，1985

3）畑野栄治ほか：体格と死亡年令の関係について．「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：293-296，1989

長期器械的人工呼吸療法における動脈性出血の検討

班　員　笠　木　重　人
国立療養所松江病院小児科

共同研究者　石　井　尚　吾[1)]，井　後　雅　之[2)]，江　原　寛　昭[1)]
[1)] 国立療養所松江病院小児科　[2)] 国立療養所松江病院内科

要　旨

筋ジストロフィー等の進行性筋萎縮性疾患において臨床末期の呼吸不全に対し，気管切開を伴う陽圧人工呼吸法を長期間施行すると動脈性出血を生ずる頻度が高い。本研究はその原因と予防法を検討することを目的とした。対象は当院に入院し長期延命目的で気管切開をし陽圧人工呼吸法を施行した15例であった。使用した気管切開チューブ，臨床経過上の特徴，病理所見等調べた。15例中5例が動脈性出血で死亡した（D型4例，福山型1例）。気管腕頭動脈ろうを形成し出血した。死亡例は生存例に比較し，チューブが腕頭動脈と気管の交叉する位置より深かった。また脊椎の変形が著明であった。D型のような発育途上で筋萎縮が進み脊椎変形が出現し気管の変形を生じやすい症例では，チューブの挿入位置に注意することが重要である。また気管切開術式やチューブの選択を各症例に応じて行なうことが，併せて重要だと考えた。

はじめに

筋ジストロフィー等の進行性筋萎縮性疾患において，臨床末期の呼吸不全に延命目的で種々の人工呼吸療法が試みられている。そして，気管切開を伴う陽圧人工呼吸法を長期間実施した場合の致命的な合併症として，動脈性出血の頻度が高いことに気づかれて来た。本研究では自験例にもとづき，その原因と予防対策につき検討することを目的とした。

表　1

対象　(1)死亡群	病型	気管切開時年齢	死亡年月日	経過年月	剖検
症例1	D	23y	'85-11-13	4m	有
2	D	18	'88- 5- 6	1y2m	有
3	D	24	'90- 1-22	4m	無
4	F	18	'91- 1-17	4m	有
5	D	16	'91- 3- 2	1m	有

D；Duchenne Muscular Dystrophy
F；Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy

対象と方法

1972年に当院筋ジストロフィー病棟（定床80床）が開設されて以来，そこで長期に人工呼吸療法が実施された全症例を調べた。生存例については治療歴が2年以上の症例を対象とすることにした。その結果，動脈性出血での死亡例5例（表1，以下死亡群），生存例6例（以下生存群）及び筋萎縮性側索硬化症4例（以下ASL群。2例は動脈性出血以外で死亡，他の2例は生存中）計10例（表2），合計15例を対象とした。以上の対象例について気管切開チューブ使用状況，臨床経過上の特徴，病理解剖所見，胸部レントゲン写真所見，気管支ファイバー所見（生存群6例のみ）をまとめた。

結　果

(1)気管切開チューブ使用状況（表3）。使用したチューブの種類，大きさ（内径），カフの使

表 2

	病型	気管切開時年齢	経過年月	
(2)生存群				
症例6	D	18y	5y8m	
7	D	17	5 7	
8	UL	23	5 5	
9	WH	1	5 1	
10	D	19	4 8	
11	D	17	3 3	
(3)ALS群				
症例12	ALS	55y	5y0m	†事故
13	ALS	69	4 0	†心筋梗塞
14	ALS	38	4 0	
15	ALS	59	2 7	

UL; Ullrich Congenital Muscular Dystrophy
WH; Werdnig-Hoffmann Disease
ALS; Amyotrophic Laterosclerosis

表 3 使用した気管切開チューブ

			カフ内空気 日中	夜間
(1)死亡群				
症例1	Mallinckrodt カフ付	9mm	+	+
2	〃	6	−	+
3	〃	6	−	+
4	〃	7	−	+
5	〃	6	−	+
			1/5	5/5
(2)生存群				
6	Mallinckrodt カフ付	6	−	+
7	〃	7	−	+
8	Portex カフ付	6	−	+
9	Mallinckrodt カフ付	7	−	−
10	〃	7	−	−
11	〃	6	−	+
			0/6	4/6
(3)ALS群				
12	Mallinckrodt カフ付	8	+	+
13	〃	8	+	+
14	〃	8	+	+
15	〃	8	+	+
			4/4	4/4

用状況をまとめた。死亡群と，生存群，ALS群の3群間では，カフの使用状況のみが異なっており，ALS群においてはカフを常時利用していた。(2)臨床経過上の特徴。まず死亡群について出血時の前兆と誘因についてまとめた（表4）。5例中3例で前兆なく，突然の大出血を生じていた。誘因として気管壁を強く損傷する処置はなかった。尚いずれの症例も出血後2～3分以内に昏睡に至り20分以内に死に至った。次に死亡群において治療経過の中で他の2群にないエピソードとして，従圧式人工呼吸器で吸気が入りにくい，呼気時にぜい鳴や呼吸困難がある，これらの状態が気管切開チューブをより深く挿入すると改善する，といったことが目立った（5例中4例）。症例1のみ，出血に至るまでの数カ月間断続的に，のどの痛みや胸の痛みを訴えた。(3)病理解剖所見。5例中4例で剖検が為された。その全てにおいて，気管腕頭動脈ろう（Tracheo-Innominate Artery Fistula）が確認された。ろうの大きさは動脈側の径として約2 mm程度であった。更に印象的な所見として，動脈と気管が密に接触しており，気管に動脈が強く食い込んでいた症例もあった。(4)胸部レントゲン写真における気管切開チューブの位置。解剖学的に腕頭動脈は右鎖骨の胸骨端の近在にあると考えられるため，チューブ先端の位置と右鎖骨胸骨端の位置関係を胸部レントゲン写真上で調べた。また頸椎での側彎の有無も併せ調べた（表5）。その結果，死亡群では全例，下縁ないしそれより深い位置までチューブが挿入されていた。生存群では症例9のWHの症例のみ深く，他の症例はいずれも上縁あるいはそれより浅い位置であった。ALS群は全例深かった。頸椎の側彎については死亡群と生存群の2群間に差違はなかった。(5)気管支ファイバースコープによる気管・気管支の変形と，気管の血管性拍動（表6）。生存群6例のみに

表 4 出血の前兆と直接的誘因

	〔前兆〕	〔誘因〕
症例1	半日前に少量出血	ガーゼ交換時
2	半日前から少量出血持続	チューブ抜去時
3	なし	なし
4	なし	なし
5	なし	気管内吸引時

表5　気管切開チューブと鎖骨との位置関係

		頸椎側彎
(1)死亡群		
症例1	下　25 mm	なし
2	下　25	なし
3	下　0	なし
4	下　0	左
5	下　0	右
(2)生存群		
6	上　0 mm	左
7	上　0	なし
8	上　8	左
9	下　7	なし
10	上　5	右
11	上　30	左
(3)ALS 群		
12	下　25 mm	なし
13	下　10	なし
14	下　22	なし
15	下　7	なし

表6　気管・気管支の変形と，気管の血管性拍動（気管支ファイバースコープ所見）

(2)生存群	気管	気管支 右	気管支 左	血管性拍動	
症例6	−	−	＋	＋	後壁
7	＋	＋＋	−	＋	前壁
8	＋	（施行せず）		＋	後壁
9	−※	＋	＋＋	＋	前壁
10	＋※	＋	−	＋	前壁
11	＋＋	＋＋	＋＋	−	
	2/6	4/5	3/5	5/6	

変形；　−；認めず
　　＋；前後径の圧迫あり
　　＋＋；前後径の圧拍あり，ファイバー通過困難
※：肉芽組織あり

ついて調べた。6例中4例に気管前後径が著明に短縮しており，前後方向への圧迫による変形と考えた。気管に変形のなかった2例も気管支には変形を認めた。また気管壁の血管性拍動を6例中5例に認めた。

考　察

従来の報告では一般に気管切開の後期合併症としての動脈性出血の頻度は少ない。1976年のJones らの報告では約 0.7％であった。また致死率も高く，同じく Jones らは137例中10例の生存しか報告していない[1]。また損傷される動脈は，7～8割が腕頭動脈であり，他には総頸動脈，甲状腺動脈が挙げられる[2]。

今回，死亡群では出血部位は確認出来た症例全て気管腕頭動脈ろうであった。従来の報告に比較すると頻度が異常に高い。気管切開を伴う陽圧人工呼吸法は呼吸不全改善のための確実性が高い治療法であるだけに，生命予後を不良とする大きな要因である動脈性出血への対応が緊急の課題となった[3]。

今回の検討の結果をまず死亡群と生存群の2群間で比較すると，死亡群において，気管切開チューブの深さが鎖骨胸骨端下縁より深いことが特徴的である。また結果(2)の臨床経過上の特徴から，チューブが気管前壁を圧迫していたと推測する。一方死亡群と ALS 群の2群間の結果を比較すると，チューブは ALS 群のほうがより深く，かつカフでの気管粘膜の圧迫も多い。しかし出血は1例もない。以上の結果と，結果(5)の気管・気管支の変形の所見から，動脈性出血の頻度が高かった理由を以下のように考える。即ち Duchenne 型や福山型のような小児の発育期に筋萎縮が進行する疾患では頸椎や胸椎の前後彎・側彎が生じることが多く，その結果気管にも変形を生じやすい。気管と腕頭動脈の位置関係も異常を生じやすくなる。そして気管切開チューブを，気管と動脈の交叉部位より深く挿入した状態に長期間おくと，動脈壁の拍動による力で徐々にろう孔が形成される，以上のように考える。一方 ALS のように発育が終了してから病状の悪化をみる疾患では気管の変形が少なく出血の可能性は少ないと考える。

予防対策としてまず基本的には，脊椎変形の目立つ症例に対して気管切開チューブを腕頭動脈と気管が交叉する位置よりも浅く挿入しておくことが重要であると考える。更に，変形のある気管内においてチューブが気管前壁を圧迫しないように，気管切開術式，切開創の作り方，チューブでの材質や形状を各症例に応じて検討することが必要であると考える。

文　献

1）Jones JW, Reynolds M et al: Tracheo-innominate artery erosion. Ann. Surg. **184**: 194-204, 1976

2）勇木　清，児玉安紀　他
気管切開後の気管腕頭動脈瘻の治験例．救急医学 **11**：377-381，1987

3）笠木重人
筋ジストロフィー終末期における人工呼吸療法の治療経過に関する研究脳と発達　**23**：590-595，1991

Duchenne 型筋ジストロフィー呼吸不全期のレニン—アンギオテンシン—アルドステロン系の動態と血圧上昇に対するカプトプリルの効果について

班　　員　本　家　一　也
国立療養所医王病院

共同研究者　南　　聡，梶　原　荘　平
国立療養所医王病院小児科

要　旨

Duchenne 型筋ジストロフィー（以下 DMD）では呼吸不全期になると，血圧上昇を認める例が多い。本研究では，呼吸不全期のレニンーアンギオテンシンーアルドステロン（以下 R-A-A）系の動態と血圧上昇に対するカプトプリルの有効性について検討した。R-A-A 系の動態については，DMD 患者9名で血しょうレニン活性，アンギオテンシンⅠ，Ⅱ，アルドステロン値，及び%努力肺活量（以下 FVC）を測定し，比較検討した。その結果，% FVC の低下に伴い，レニン，アンギオテンジンⅡは上昇し（$p<0.05$），アルドステロンも上昇（$p<0.001$），% FVC 15% 以下では異常高値を示した。カプトプリルの効果については，呼吸不全期の DMD 患者9名に 37.5 mg/日を投与し，その前後での血圧の変化を検討したが，収縮期，拡張期血圧とも有意（$p<0.01$）に低下し，正常化した。

目　的

Duchenne 型筋ジストロフィー（以下 DMD）では呼吸障害が進行してくると，呼吸不全，呼吸筋疲労，心不全の悪循環に入るが，最近では，主に体外式人工呼吸器（以下 CR）を用いた夜間の呼吸管理を積極的におこない，この悪循環を防止しようとしている。しかし，このような呼吸管理は十分なものではなく，延命効果を上げるためには心，血管系の管理も併せておこなっていく必要がある。DMD では呼吸不全期に血圧上昇を認める例が多く，心後負荷の軽減のために血圧のコントロールは重要と思われる。本研究では，呼吸不全期のレニンーアンギオテンシンーアルドステロン（以下 R-A-A）系の動態について調べ，血圧上昇との関連について検討し，さらに，アンギオテンシン変換酵素阻害剤（以下 ACEI）の一種であるカプトプリルの血圧上昇に対する効果についても検討した。

方　法

R-A-A 系の動態については，心不全症状を認めず，利尿剤を投与していない運動機能ステージ6から7＋の DMD 患者9名で早朝臥位時に血しょうレニン活性，アンギオテンシンⅠ，Ⅱ，アルドステロンを1～3回測定し，その値を各症例の%努力肺活量（以下 FVC）と比較することにより検討した。

血圧上昇に対するカプトプリルの効果については，呼吸不全期に入り血圧上昇を認めた DMD 患者9名（CR 導入前4名，導入後5名）にカプトプリル 37.5 mg/日 を投与し，血圧の変化について比較検討した。なお，血圧の比較

には各症例において3回，異なる日に測定した血圧の平均値を用いた。

結　果

1）R-A-A 系の動態

血しょうレニン活性は% FVC の低い症例ほど高値を示したが（$p<0.05$），最も高い例でも 6.4 ng/ml/hr であった（図1）。アンギオテンシンIは全て 500 pg/ml 以上と全体に高値であったが，% FVC 20 % 以下の例で異常高値を認める傾向にあった（図2）。アンギオテンシンIIは% FVC の低い例ほど高値を示したが（$p<0.05$），% FVC が 20 % 以下の例でも40～50 pg/ml と異常高値ではなかった（図3）。アルドステロンも% FVC の低い例ほど高値を示

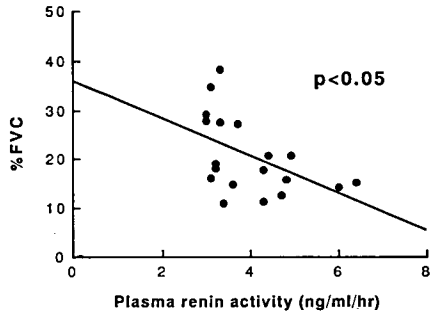


図　1

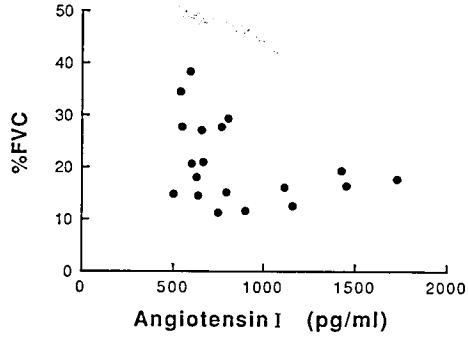


図　2

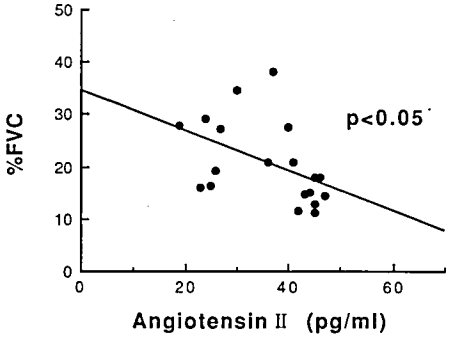


図　3

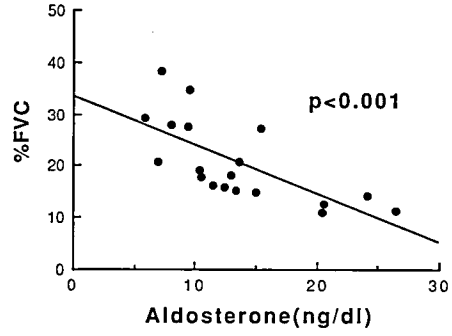


図　4

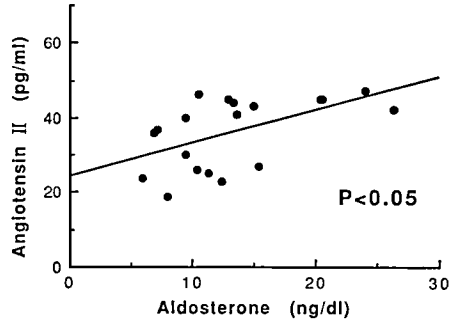


図　5

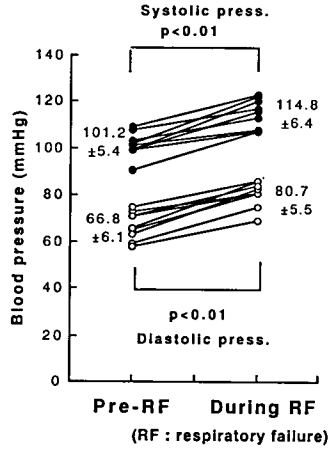


図6　呼吸不全期における血圧の上昇

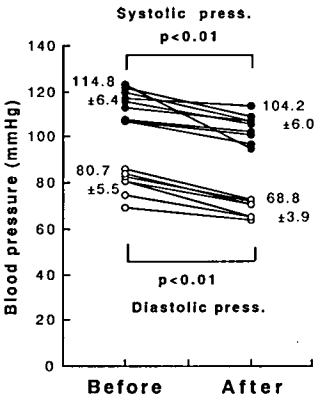


図7 カプトプリル投与開始前後における血圧の変化

し（$p<0.001$），% FVC 15% 以下の例では 26.4 ng/dl までの異常高値を認めた（図4）。なお，アルドステロン値とアンギオテンシンII値には正の相関を認めた（図5）。

2）カプトプリルの効果

今回，カプトプリルを投与した9名の呼吸不全前の血圧は収縮期 101.2±5.4 mmHg (mean ±SD)，拡張期 66.8±6.1 であったが，呼吸不全期に入り，カプトプリル投与前の血圧はそれぞれ，114.8±6.4, 80.7±5.5 と有意（$p<0.01$）に上昇していた（図6）。カプトプリル投与により血圧はそれぞれ，104.2±6.0, 68.8±3.9へと有意（$p<0.01$）に低下し，正常化した（図7）。なお，血圧はほぼ全例で投与翌日には低下していたが，とくに低血圧症状は認められなかった。

考　察

DMD では呼吸機能の低下とともに，心機能，とくに左心機能が低下し，呼吸障害の悪化した例では，たえず白色泡末たんを認める等，肺高血圧の症状や血圧上昇を認めることが多い。今回，横断的検討ではあるが，呼吸機能の低下とともに，R-A-A 系の活性のこう進を認め，とくに，% FVC が 15% 以下の例ではアルドステロンの異常高値を認めたことから，DMD の呼吸不全期の血圧上昇には R-A-A 系の活性こう進が関与していると考えられる。一般の心不全では腎血流の低下に基ずき，R-A-A 系が活性化されるが，この代償機構が過度に働くと，心後負荷が増大し，心不全はさらに悪化する[1]。このため，最近では心不全のコントロールに ACEI が併用されるようになり，その有効性も確認されている[2]。DMD の呼吸不全期においても，CR 等による呼吸管理やジギタリス，利尿剤投与だけでは心不全のコントロールは難しく，血圧の上昇も認めることから，ACEI の投与は必要と思われる。今回の検討では，カプトプリル投与により血圧はほぼ正常化し，いずれの症例においても低血圧症状や，acidosis，血清カリウムの上昇は認められず，泡末たんの減少した例も認めた。ACEI の併用により CR 等による呼吸管理の延命効果をさらに上げることができると思われるが，今後，投与量，薬剤の差異について，さらに検討していく必要がある。

ま と め

1）DMD は呼吸機能の低下とともに R-A-A 系の活性こう進が認められ，% FVC が 15% 以下の例では血しょうアルドステロンの異常高値を認めた。

2）DMD の呼吸不全期に認められる血圧上昇に対してカプトプリル 37.5 mg/日 を投与したところ，血圧はほぼ正常化し，とくに副作用は認められなかった。

文　献

1）Curtiss et al: Role of the reninangiotensin system in the systemic vasoconstriction of chronic congestive heart failure. Circulation **58**: 763, 1978

2）The Captopril-Digitoxin Multicenter Research Group: Comparative effects of therapy with captoril and digitoxin in patients with mild to moderate heart failure. JAMA **259**: 539, 1988

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の心不全に対する captopril の治療効果

班　員　金　沢　　一
国立療養所川棚病院
共同研究者　田　村　拓　久，渋　谷　統　寿
国立療養所川棚病院

要　旨

DMD 心不全の治療に captopril を長期間使用し，その効果を検討した。

投与後の左室機能では駆出率と後壁速度の改善を認めた。また，肺動脈楔入圧の減少により Forrester 分類のⅡ群よりⅠ群に移行した。心胸郭比は心室と心房径の減少に伴い正常化した。一方，norepinephrine 値や ANP 値も心機能の改善により正常化した。

心胸郭比は左室拡張終期径，収縮終期径，左房径および ANP 値と正相関を示し，肺動脈楔入圧は左房径と心胸郭比との間に正相関を認めた。

DMD 心不全の治療に captopril は極めて有用であり，延命が期待できる。

目　的

DMD 心不全の治療として calcium antagonist[1)2)], denopamine[3)], coenzyme Q_{10}[4)] 等が使用されているが，いずれの薬剤でも長期間の心機能改善の効果は期待できない。

そこで，我々は DMD 心不全に対し angiotensin converting enzyme 阻害剤の1つである captopril を長期間使用し，その効果を検討した。

対象・方法

対象は心不全を有する男性 DMD で年齢は18才，骨格筋機能障害度はⅦ度である。

方法は captopril を初回量 9.375 mg/日 より開始し，2週ごとに倍量し，37.5 mg/日 を維持量とし，合計28週間使用した。

captopril 投与前後に胸部X線および心エコー図を経時的に施行し，さらに catecholamine (CA), plasma renin activity (PRA), atrial natriuretic peptide (ANP) および captopril 血中濃度等を測定した。

心エコー図では左室収縮および拡張機能を検討した。また，肺動脈楔入圧と心係数より Forrester 分類を行った。

結　果

①胸部X線

平成3年2月1日の captopril 投与前の心陰影では明かに心拡大を示し，肺うっ血も軽度認めたが，投与後28週目（8月19日）には心胸郭比は正常化し，肺うっ血は消失した（図1）。

図2のごとく心胸郭比は投与前は 57.9％ と拡大しており，投与後8週までは変化はなかったが，その後減少し18週目より 50％ 以下を維持した。

②心エコー図

ⓐ左室径・左房径

左室径では拡張終期径，収縮終期径ともに減少した（図3）。

左房径では投与後12週目より縮小した。

ⓑ左室機能

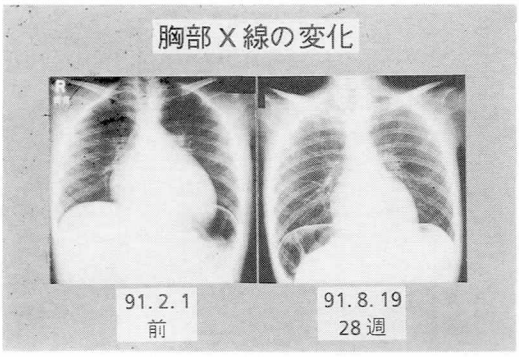


図　1

左室駆出率は投与前 18％であったが投与後増加し24週目には最高の 31％まで改善した。(図4)。

後壁速度は収縮，拡張ともに改善したが，特に拡張速度では投与前毎秒 36.3 mm より投与後毎秒 87.0 mm と著明に改善した。

ⓒ左室壁運動

captopril 投与前後で心室中隔の動きに変化は認めなかったが，左室後壁は投与前の無収縮の状態から投与後明かに改善した（図5）。

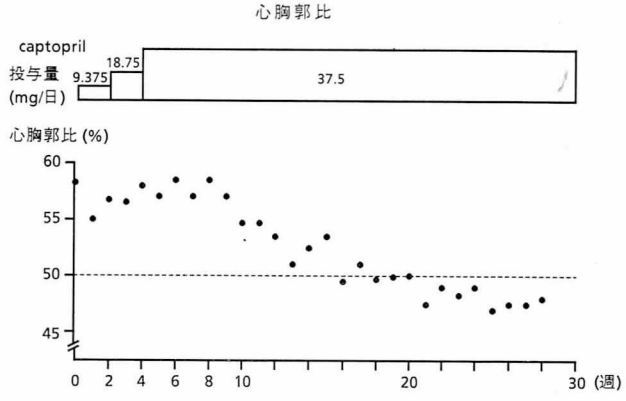


図　2

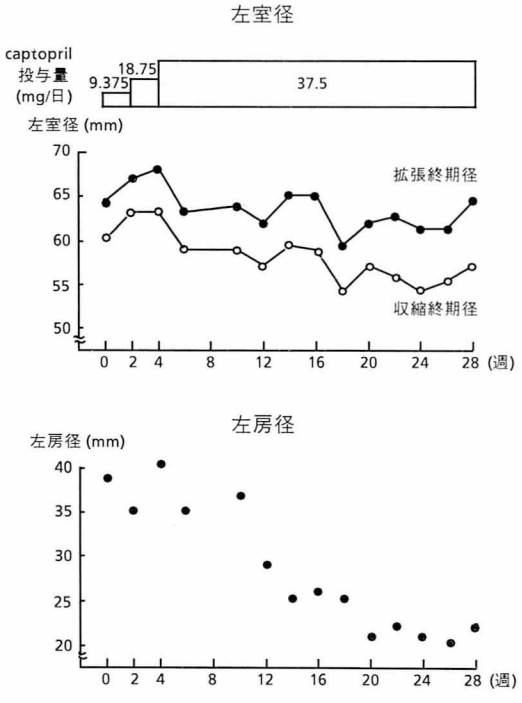


図　3

ⓓ肺動脈楔入圧・Forrester 分類

肺動脈楔入圧では投与前は 58.4 mmHg と上昇していたが，投与後 22 週目には 15.1 mm Hg と正常化した（図6）。Forrester 分類では矢印の方向に進み，Ⅱ群よりⅠ群に移行した。

③ホルモン・captopril 血中濃度

PRA は投与前 9.5 ng/m*l*/h であったが，投与後はさらに上昇し，以後減少傾向を示した（図7）。

norepinephrine は投与前 554 pg/m*l* であったが，以後低下し15週目より正常範囲を維持した。

captopril 血中濃度は投与量の増加に伴い上昇したが，長期投与により血中濃度は低下し15週目よりほぼ一定の値を維持した。

ANP は投与前 109 pg/m*l* と高値を示し，投与後も 8 週目までは上昇したが，その後低下し25週目より正常範囲となった。

④相関関係

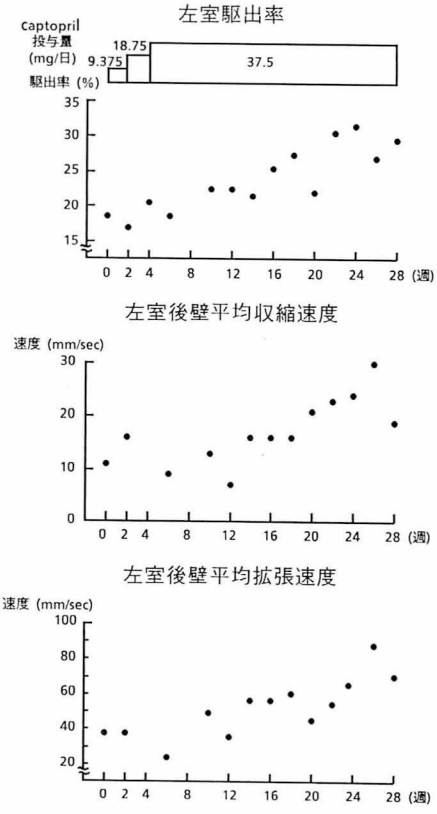


図　4

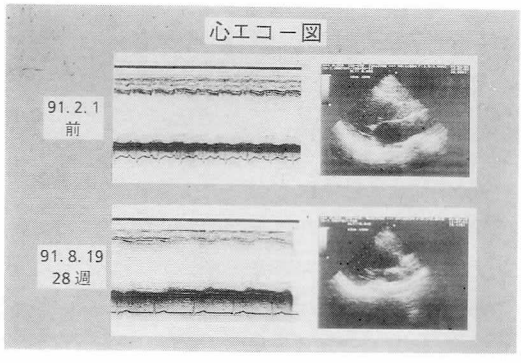


図　5

ⓐ心胸郭比との相関

図８のごとく心胸郭比は左室拡張終期径，収縮終期径，左房径の全てと相関があるが，左房径と極めて有意な正相関を示した。

一方，ANP との間にも相関を認めたが，心拡大の進行に伴い ANP 値にばらつきが認められた。

ⓑ肺動脈楔入圧との相関

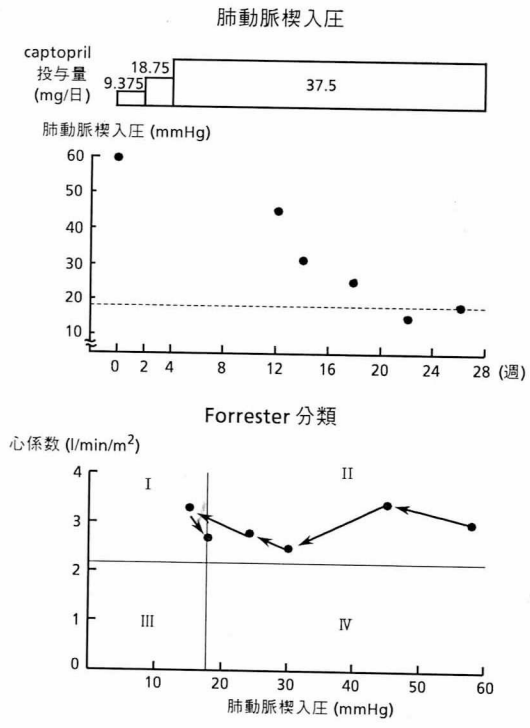


図　6

肺動脈楔入圧は左房径および心胸郭比との間に強い正相関を認めた（図９）。

考　察

DMD の慢性心不全に対する有効な治療法はこれまで無く，また，治療による予後の検討もなされていない。

欧米では種々の心不全に captopril が使用され有効であることが証明されている[5)6)]。

そこで我々は DMD 心不全を captopril で長期間治療しその効果を検討した。

左室収縮と拡張機能の改善に伴い左室負荷は減少し，心房および心室径の減少に伴い心胸郭比が正常化した。さらに，norepinephrine 値や ANP 値も心機能の改善に伴い正常化した。

心不全に対する captopril の薬理作用は明かではないが，動静脈の拡張に伴う前後負荷の軽減，軽度の利尿作用および心筋保護作用[7)] 等により心機能が改善したと考えられる。

以上より DMD 心不全の治療に captopril は極めて有用であり，延命が期待できる。

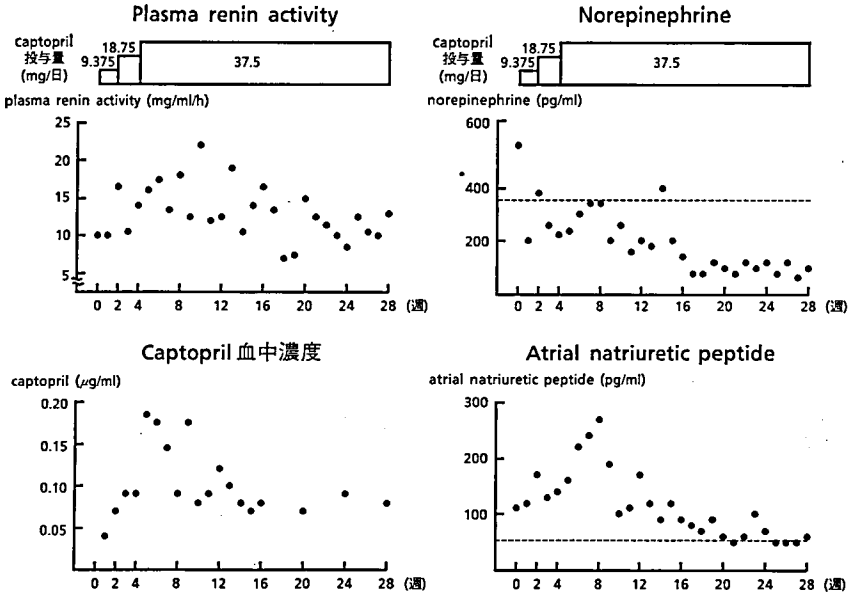


図　7

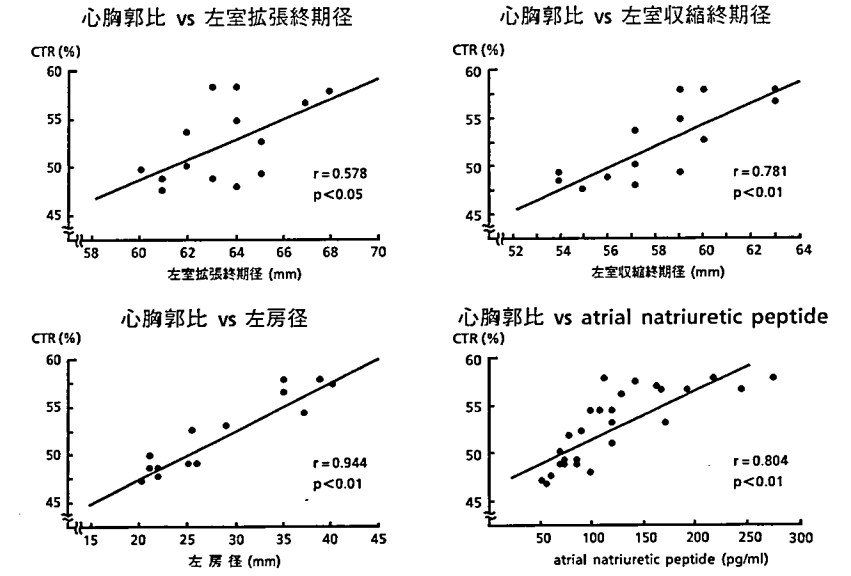


図　8

文　献

1) W. Pernice et al: A Double-Blind Controlled Trial of Diltiazem in Duchenne Dystrophy. Klin Wochenschr, **66**: 565, 1988

2) T. E. Bertorini et al: Effect of chronic treatment with the calcium antagonist diltiazem in Duchenne muscular dystrophy. NEUROLOGY, **38**: 609, 1988

3) 山本秀平：筋ジストロフィー症患者における新強心薬 denopamine の薬効評価. 医療, **40**: 830, 1986

4) Karl Folkers et al: Biochemical rationale and the cardiac response of patients with muscle

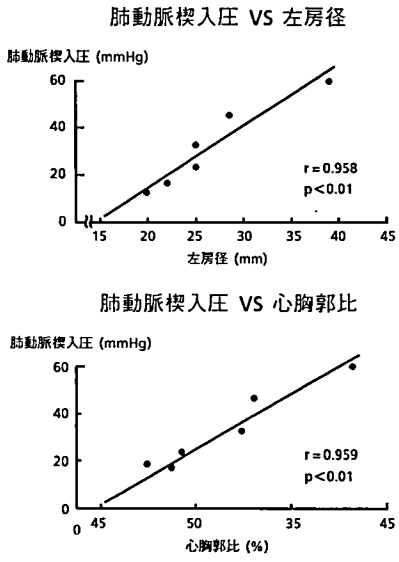


図 9

disease to therapy with coenzyme Q_{10}. Proc Natl Acad Sci, **82** : 4513, 1985

5) G. J. Wenting et al: Effects of captopril in acute and chronic heart failure. Correlations with plasma levels of noradrenaline, renin, and aldosterone. Br Heart J, **49** : 65, 1983

6) T. R. D. Shaw et al: Plasma free captopril concentrations during short and long term treatment with oral captorpril for heart failure. Br Heart J. **54** : 160, 1985

7) M. Chopra et al: OXIDATIVE DAMAGE IN CHRONIC HEART FAILURE: PROTECTION BY CAPTOPRIL THROUGH FREE RADICAL SCAVENGING ? Adv Exp Med Biol, **264** : 251, 1990

ワークショップ

精神・神経疾患研究委託費

筋ジス第３班

筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究

平成３年度

ワークショップ　プログラム

日時；平成３年７月１８日(木)　９：５５～１６：３０

場所；日本都市センター　第２講堂

東京都千代田区平河町２－４－１

☎０３－３２６５－８２１１（大代表）

ワークショップ

≪第1部　遺伝相談・遺伝子診断≫

遺伝相談の問題点

大　澤　真木子
東京女子医科大学小児科

Duchenne (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD) の分子遺伝学的研究は，近年長足の進歩を遂げた。しかし，その進歩を患者及び家族への遺伝相談サービスに役立てようとすると，サービス業務に対する経済的援助の問題，情報の確実性に関する技術的限界，技術的安全性の問題，倫理的に，患者および家族の知る権利・知らないでいる権利・医師の秘密の保守義務・患者および保因者の人権保護，更には生命倫理と関わる問題が残されている。

1．遺伝相談の背景：技術の進歩と限界

1）DMD/BMD に於ける検出可能な DNA の異常：DMD/BMD の遺伝子座はX染色体短腕21にあり，cDNA プローブ利用により DMD 患者では43%-70%に欠失が，約2-5%に重複が発見される。同異常のない例では，点突然変異，スプライシングの異常などの可能性がある。PCR (polymerase chain reaction) の導入により，微量の検体から（患者他界後も保存材料で），迅速な遺伝子診断が可能となり，multiplex primer 利用で DNA 欠失の98%を発見可能という。

2）DMD/BMD の臨床像の差と DMD/BMD の遺伝子座の正常遺伝子産物 dystrophin：臨床像の差は frame shift 仮説で説明され，DMD では抗 dystrophin 染色で染まらず，BMD では薄く染まる。BMD の dystrophin を western blot で検索すると，分子量／蛋白量或いは両者の異常がある。臨床像と dystrophin 蛋白量には相関があり，少ない程重症となる。本法で DMD と BMD，両者と他の神経筋疾患を鑑別可能という。

3）胎児における dystrophin：N，C両末端の抗体で胎児筋を染色し，9-14週の正常児では陽性だが，13-20週の DMD の可能性のある児では陰性という。家族歴や血清 CK 値からは母の保因者の確率が低く，羊水診断上欠失はなく，RFLPs 分析で8%の確率で病児とされた流産男胎児が dystrophin 分析で DMD と判断され，結果的に母が保因者と判明した報告もある。

4）遺伝子異常があるが症状が非常に軽微な例：同じ DNA 欠失が2兄弟例で認められ，一方は発症，他方は18歳現在健康男性と同じ運動が可能という BMD の報告，DMD 遺伝子内の intron の欠失を示して無症状な男児と，同欠失に exon の欠失も合せもち患者となった兄弟例の報告，遺伝子の 46% が欠失しながら，61歳時なお杖にて歩行可能な BMD 例の報告もある。

5）女性の発症：26例の報告があるが，Xp21 と常染色体の均衡相互転座の女性で，転座染色体に DMD 遺伝子異常があれば，X染色体不活化不均衡が生じ DMD を発症する。転座が父の生殖細胞由来である事が6例で確認されている。染色体正常な一卵性双生児の一方に，女性発症例が認められる。Richard らは一卵性双胎になる過程に伴い双生児各々におけるX染色体の不活化過程が不均等に生ずる可能性を推測している。Isaacs らの女性発症3例の報告には，保因女性が遺伝相談後妊娠し，女児の診

断下に継続・出生した二卵性双生児の一方がDMDを発症した例が含まれている。その他，Turner症候群の場合を除き，女性が典型な患者の場合，原則的には父が患者，母が保因者である。その他は常染色体性優性遺伝やARの肢帯型との鑑別が必要である。

6）保因者診断法：家系図上保因者の可能性を持つ女性に対し，家系によっては保因者でないと否定する事も可能となった。欠失を示す患者の姉妹のDNAのdensitometer scanningによる量分析，junctional fragment出現の有無で診断可能な場合もある。末梢血リンパ球からmRNAを取り増幅する事も試みられている。Kaarilainenらは DNA分析を駆使しても判定困難な例を9.5％に認めた。生殖細胞mosaicの場合には判定不能である。

7）制限酵素断片長多型とDMD遺伝子の連鎖を用いた遺伝子分析：制限酵素断片長多型（RFLPs）の連鎖解析で，DMDの遺伝子診断，保因者診断，出生前診断が可能である。家族員多数例の血液が得られれば，欠失や重複が発見不能な家系でも同診断が高い確率で可能である。しかし配偶子形成時の組み換えの問題がある。Boileauは，RFLPs分析で胎児診断・妊娠中絶したが，実は生殖細胞mosaicの家系で，児が病気でない事が判明したと報告した。

8）遺伝子診断が陰性でも尚残るリスク：生殖細胞mosaic：孤発例患者にDNA異常があり，母に同異常がないと，患者の発症は突然変異によると判断され，同母がもう一人子を設ける場合，その子に同疾患発症の可能性はないと考える。しかし稀にこの様な場合でも第2子以降がDMDとなり，母の生殖細胞にDMD遺伝子異常がmosaicで存在する可能性が報告されている。Bakkerらは，新突然変異と思われる家系で患児と母のX染色体のハプロタイプが同じなら14％，不明なら約7％の確率で次子に発症の可能性があると推定した。全患者の母の62.3％が保因者，30.97％が非保因者，6.74％が生殖細胞mosaicを持つとの推論もあり，出生前診断は不可避とする人もいる。

9）出生前診断の技術的可能性：性別判定法に加え，cDNAによる方法，RFLPs連鎖解析法とPCR法がある。羊水診断では，穿刺時期が妊娠15-19週，結論は妊娠18-21週となり，病児という結論で中断すると，母体への負担が大きい。また最近は法の解釈が変更され，流産と認められる限界が“22週未満まで”となり，時間的制約がある。絨毛膜採取法は，本邦では採取細胞由来の判定の確実性，流産誘発の危険性など問題が多く，比較的安全に実施可能な施設は現在2,3しかない。技術が向上し実用性が確立されれば，採取時期は8-10週，キナクリン蛍光法あるいはDNAの簡便抽出で，PCRで男児と判明すればすぐにPCRによるDNA分析と細胞培養を併行して開始し実際的に有用な方法となり得る。最終的にはSouthern blottingで確認を要する。絨毛採取女児と判定された場合母の組織混在の可能性があり，羊水細胞培養で再確認を要する。

10）性選択の方法：人工授精時にPercollによる遠心分離法が応用され，同法では女児が産まれる事が偶発的に経験されてきた。兼子らは，12段階の密度勾配でヒト精子を遠心分離した所X精子純度が90％以上であった事から，XR疾患での本法利用の可能性を提唱した。現在日本医師会と産婦人科学会の倫理委員会は性の出生前選択の臨床応用に関し，その対象を重篤なXR疾患に限定し，実施に際し事前登録と結果報告を求めている。

2．出生前診断に対する倫理的考察

1）適応：倫理的コンセンサス，法的支持を得ないまま，出生前診断技術は急速に進歩したが，その手技自体苦痛や危険を伴い得る。1990年度の班員対象のアンケート調査で6施設で出生前診断実施と回答し，倫理的配慮の要否についての意見は，必要25（57％），不要7（16％），無回答12施設（27％）であった。一般に表1のように出生前診断適応基準が設定されている。『障害が重篤』という点は，個人の価値観・患者の人生観の相違もあり一概には言えないが，表面的には表2に示した正常集団の異常発生の危険率よりも胎児罹患の可能性が高い場合が該当する。DMD児の多くが他界する18歳までの本邦男児の累積死亡率は2.43％，歩行不能に陥る10歳までの累積死亡率は1.60％である。

表1　出生前診断の基準

- 妊娠中絶を是認するほど障害が重症である
- 治療法がないか，あっても満足すべきものでない
- その夫婦が妊娠中絶をうけいれる用意がある
- 正確な出生前診断が可能である
- その妊娠に対する遺伝的危険率が十分に高い

(Harper, P. S.: Practical Genetic Counseling.)

表2　正常集団における異常発生の危険率

子供が何らかの先天異常を持って生れる危険率	1/30
子供が重大な身体的あるいは知的欠陥を持って生まれる危険率	1/50
妊娠が自然流産に終わる危険率	1/8
出生前死亡の危険率*	1/30〜1/100
子供が生後1週間から1年以内に死亡する危険率	*1/150
その夫婦が不妊である危険率	1/10

* 先進国における数値，大きな地域差がある
(Harper, P.: Practical Genetic Counseling. Bristol John Wright & Sons Ltd., Bristol. 1981. p. 11より引用，和訳)

表3　生命倫理の立場から出生前 DNA 分析の意義の検討（大沢）

	DNA 診断		
	メリット	問題点	適　応
既妊娠保因女性が，中絶を希望し，来院した場合，（患児 DNA 欠失が未確認または確認不能）	女児救済 正常男児救済可能	遺伝子異常なしと判断された男児が病児である可能性約30%有	希望があれば有***
患児の DNA 欠失または重複が判明しており保因者が妊娠した場合**	女児救済 正常男児救済可能。陰性なら精神的安定	病児の中絶を正当化する根拠はない	希望があれば有***
患児に DNA 欠失または重複が認められず，保因者が妊娠した場合***	判断不可能		無****

*羊水診断に伴う苦痛・リスク，**絨毛採取に伴う苦痛・リスク，***養子や避妊のカウンセリングにより，中絶の可能性を含む妊娠を回避可能，****RFLP 分析を用いる方法では希望があれば有（？）

従って患児出産の可能性が同値より低ければ出生前診断の適応にならない。

2）出生前診断の倫理的側面からみた意義（表3）：遺伝的危険率を持つ夫婦が妊娠後来訪し，中絶を希望する場合，たとえ性別判定法でも胎児が女児なら救える可能性がある。この際男児という結果で妊娠を中断する場合，同胎児が健康である可能性が50%であった。これに対し cDNA による遺伝子診断では，その家系の病児の DNA 異常が明らかなら，健康男児の流産を防止しうる。出生前診断手技自体，苦痛や危険を伴なうし，cDNA による遺伝子診断で遺伝子異常を証明不能の場合がある。DMD 保因者の可能性が高い女性が出生前診断を望む際には，妊娠前に，患児と父母を含むその家系の遺伝子診断を行い，保因者か否かの診断と出生前診断の可否を確認しておく必要がある。現在では，患児の DNA 異常の証明された家系でのみ出生前診断が可能である。RFLPs の連鎖解析でも高い確率で出生前診断可能だが，組み換えが生ずる可能性がある。本法施行に際し，『病児ならば妊娠の継続を断念する』という仮定がある事が大きな問題を含む。また女性例は常染色体との転座例以外は防げない。時には DMD の診断下に妊娠継続を決意する母もいる。病苦と戦いその人生に真剣に取り組む DMD 児を思う時，本法がこのまま普及してよいのかと疑問にも思う。著者が長期に診療している DMD 児の母達は息子を不憫に思いながらも，異口同音に患児のお陰で得難い経験を得たとその存在を喜び感謝する。しかし彼女らの娘の妊娠・出産に際し健康児を得る事を切望し，あらゆる可能性を追求する。

女子医大では，患者の DNA 異常判明後家系

に限り，保因者が妊娠した場合出生前診断を実施という条件で大学倫理委員会の承認を得た。班としても一定の方針を決定する必要がある。

3．今後遺伝相談システム確立に必要な人材・施設・システム：1）確実な診断を可能な臨床医と病理検査可能な技術者・施設（生検筋の抗 dystrophin 染色，western blotting），2）遺伝的検討可能な人材（該当家族の状況別に，該当女性の息子が本症に罹患する確率を明確にし，必要な具体的手順を計画），3）遺伝子診断／保因者診断可能な人材・施設，4）出生前診断の為の材料採取可能な産婦人科医・施設，5）情報交換の為の資料／検体保存システムと施設，6）遺伝相談施行者に対する倫理的コントロール・教育システム，7）経済的保障

文　献

兼子　智：性の選択（ヒトX，Y精子の分離法），細胞 **21**：327-329, 1989

日本産婦人科学会会告　医学のあゆみ **150**：436, 1989

大沢真木子，他：Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝相談 Brain & Nerve **43**：429-441, 1991

筋ジストロフィーの遺伝子診断の現状と問題点

鈴　木　義　之
東京都臨床医学総合研究所

現在，分子遺伝学的解析の可能な筋ジストロフィーは，Duchenne 型および Becker 型のみであり，ここではこの2つの病型という意味で，筋ジストロフィーと呼ぶことにする。その遺伝子診断という場合，2つの意味を持つ。第1にジストロフィン遺伝子との連鎖解析法であり，第2にこの遺伝子自体の変異の検出である。我々はこの数年間，これらの方法による診断を試みてきたので，その成果を中心に，今後の問題，展望を考えてみる。

1）連鎖解析

正常人の遺伝子の塩基配列はその機能に関係のない場所に個体差があり，これを多型と呼ぶ。これが特定の制限酵素で切断したときに生ずる DNA 断片の長さの違い（制限酵素断片長多型：RFLP, restriction fragment length polymorphism）となってあらわれる。この塩基配列はそのまま親から子に伝えられる。多型部位が特定の疾患遺伝子の近くにあれば，疾患とその塩基配列，つまり特定の多型とが常に一緒に動くはずである。その距離が大きくなるほど，間で交叉が起こる確率が高くなる。

この方法の利点は，遺伝子構造の情報なしに分析が可能であるということであるが，他方，いわば間接的な検査法であり，結果の解釈が必ずしも一義的でないこと，患者（発端者）自身の診断には用いられないことなどの問題がある。

図1は連鎖解析の1例であり，発端者（III-3）のほかに2名の家系内発症があったことから，遺伝子が世代を越えて伝えられた家系であると考えられた。そのイトコの診断を頼まれ，

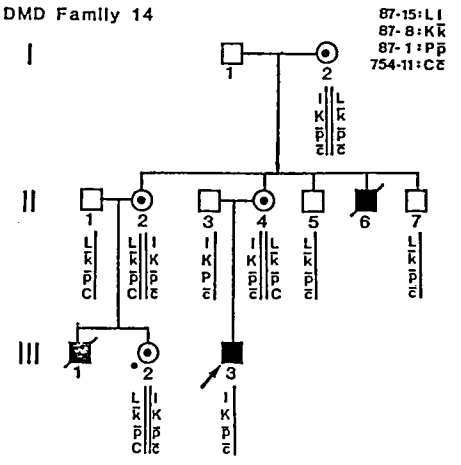


図1

分析を行なった。4つの遺伝子内あるいは近傍の多型プローブのハプロタイプは，発端者，その母，母の姉，並びにその娘（イトコ）に共通であり，イトコはこの病気の保因者と診断された。しかしいつでもこのような結果が得られるとは限らず，中には同胞発症例で異なったハプロタイプを生じた家系もあった。つまりどこかで組みかえが起こったと考えねばならず，連鎖解析による診断は不可能であった[1]。

最近では，塩基配列の分っている部分をPCR増幅（後述）により合成し，連鎖解析に用いる試みもはじめられている。サザンブロットのような手間のかかる手法を用いる必要がないので，今後は更に分析法の改良のための検討を進める必要がある。

2）遺伝子プローブを用いた診断

cDNA の断片を用いたジストロフィン遺伝子構造解析は，わが国でも広く行なわれるよう

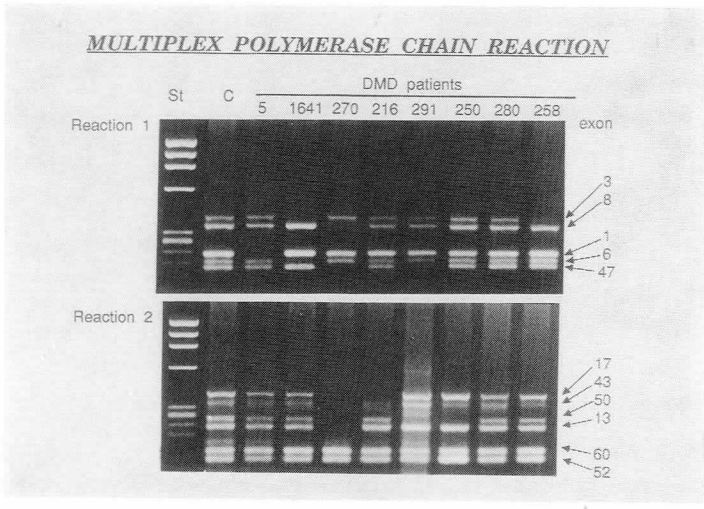


図2

になった。サザン分析による大きな構造異常の検出が主なものであるが，欠失例まれに挿入例が発見されつつある。世界的に見て，Duchenne 型あるいは Becker 型症例の半数あるいはそれ以上に検出が可能と報告されている。当初は使用するプローブの改良により，検出頻度を増すための努力が払われたが，最近のエキソン増幅法の普及により，その必要性は減じつつある。

3）PCR 法によるエキソン構造異常の診断

PCR とは一定の構造を持つ遺伝子フラグメントを一度に 2 倍づつ増幅する方法である。20-30回のサイクルにより，微量試料を通常の分析に用いられる量にまで増幅することができる。病原微生物，変異遺伝子の検出に有用であるが，筋ジストロフィーに対しては，ジストロフィン遺伝子エキソンを個別的に増幅，検出する方法が開発された。

これまでの多くの研究により，ジストロフィン遺伝子の欠失が起こりやすい場所があることが分っており，その部位のエキソンを増幅し，大きさの異常の有無を調べることができるようになった[2]。図2に我々が行なっている11種のエキソンの同時増幅による分析例を示す。いわゆる hot spot を含む幾つかの場所に存在するエキソンを2つのグループにわけ，2枚の電気泳動ゲルとして検査した。正常人（C）には，すべてのバンドが検出されるが，患者の中には幾つかのバンドが見えないものがある。たとえば No 5 にはエキソン1が見えず，No 1641 にはエキソン3，6が見えない。No270のように，エキソン8から50までのバンドが失われ，広い範囲の欠失が想定された症例もある。

この方法は，すべてのエキソンを調べるものではなく，また極めて小さな欠失や挿入を検出することはできないにしても，PCR 増幅が可能でさえあれば，患者由来の遺伝子 DNA を用い，簡便に検査できるという意味で，利用価値がある。我々の研究室での経験によると，異常の検出感度は cDNA プローブを用いたサザンブロットとほぼ同じである。

4）遺伝子量の分析

筋ジストロフィーの診療において現在重要なのは，保因者の同定である。上に述べたきた幾つかの方法において，変異遺伝子と正常遺伝子との間に異なったパターンが得られる場合には，保因者の診断はそのまま可能であるが，ある塩基配列を持った DNA の量に差がある場合，これまでの方法ではかならずしも定量的に保因者を診断することができないという難点があった。

我々はこの問題を解決するため，ある特定の

エキソンの欠失のある変異遺伝子が，ある個体に1つあるのか2つあるのかを定量化する試みを行なった。これまで一般的には，PCR 増幅には定量性がないと信じられていたが，実験条件を極めて厳密に設定すると，実際にはかなり正確に定量することができることが示された[3]。その詳細は本年度の我々の報告に記載されているので参照されたい。現在は未だ極めて少数のエキソンに適用できるのみであるが，少なくとも欠失頻度の高いエキソンの定量は可能と予想されるので，今後の検討課題としておきたい。

5）遺伝子診断の将来の課題

ジストロフィー遺伝子は巨大であり，従って変異も多く，また患者数も多いということになる。しかし，これまで臨床のレベルで分析されてきたのは主に遺伝子の部分欠失のような極めて大きな構造異常であった。その結果，多数の変異の検出が可能になったが，いくら精度をあげても，現在の分析法を踏襲する限りは，すべての患者遺伝子変異を同定することは論理的にも不可能である。より小さい欠失や挿入，あるいは1塩基置換を調べる方法が開発されねばならない。

それを阻むものは遺伝子自体の大きさであり，実際，ずっと小さい遺伝子では多くの点変異が発見され，診断に応用されていることは周知のとおりである。おなじ方法をこの巨大遺伝子に適用することは実際上無理があり，より簡便なスクリーニングの後で，対象となる部位を絞り，塩基配列の分析をすべきである。

上述の PCR 増幅後，hot spot 内に存在するエキソンのみを試みに分析してみるのもよいであろうが，欠失の起こりやすさと塩基置換の起こりやすさとは同じでない以上，どこまで成果をあげることができるか，疑問である。その意味で，塩基置換が起こっている可能性が高いエキソンを選び出すことは重要である。

最近開発された SSCP (single strand conformation polymorphism) の筋ジストロフィー遺伝子変異への応用は期待してよいであろう。これは塩基配列の違いが，電気泳動度の違いとして観察される現象であり，正常人の多型でも，遺伝子変異による違いでも検出される[4~5]。実際，Tay-Sachs 病やフェニルケトン尿症の遺伝子変異部位が同定されたという報告がある。エキソン両端の構造が分っていれば実施が可能であり，スクリーニングのためのシステムが確立されることを望みたい。

文　献

1）新本美智枝他：日本小児科学会雑誌　**91**：3440-3447, 1987

2）Sakuraba H, et al: Brain Dev, 13：339-342, 1991

3）Ishii K, et al: Brain Dev, in press.

4）Orita M, et al: Proc Natl Acad Sci USA **86**: 2766-2770, 1989

5）Orita M, et al: Genomics **5** : 874-879, 1989

≪第2部 ジストロフィンテスト≫

ジストロフィン総論

——ジストロフィンとその抗体について——

三 池 輝 久
熊本大学医学部発達小児科

はじめに

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症（以下 DMD）の筋組織においてジストロフィン（dy）が欠損していることが報告されて[1] DMD の診断レベルは保因者診断や胎児診断を含めて著しく進歩した。しかし dy の生理的な機能はまだ明らかではなくまた本症における筋崩壊の機序も明らかにされたとは言えない。そのために患児達の治療に関して大きな進歩をもたらすことはできなかった現状がある。そこでこの大きな dy 蛋白の様々な部位からの抗体作成が行われそれを用いてヒト症例についてあるいは動物モデルを用いた dy の存在部位やその機能についての検討がなされてきた。ここでは現在使用されている抗体の概要とそれを用いた dy の局在について述べる。

ジストロフィン抗体

現在，市販されているものや研究室レベルのものを含めると少なくとも7～8種類のポリクロナール（以下ポリクロ）抗体および4～5種

表1 Dystrophin 抗体の取扱法。

抗体	免疫動物	至適濃度	2次抗体（FITC）
Anti 60 kd	(Sheep)	700～800倍	R 100～200倍
Anti 30	(〃)	250～500	R 100～200
Anti 60-A	(Rabbit)	500	G 100～200
Anti 60-B	(〃)	500	G 100～200
Anti 30-A	(〃)	400	G 100～200
Anti DMDP II	(〃)	250	G 100～200
Anti DMDP IV	(〃)	1000	G 100～200
Anti P-20	(〃)	500	G 100～200
Anti Taq (KO-u37)	(〃)	400	G 100～200
NCL-DYS 1	(M-monoclonal)	20～ 30	G 100～200
NCL-DYS 2	(〃)	40～ 50	G 100～200
NCL-DYS 3	(〃)	50～100	G 100～200
4-4C5	(〃)	30～ 50	G 100～200

R：rabbit G：goat

抗体の保存方法
一般的に市販の抗体は 4 °C 冷蔵保存が多いが，抗体が希少な場合が多い抗ジストロフィン抗体は5倍程度に1％ PBS（1%精製 BSA 加）で希釈し 10 μl に分注して−80 °C に保存する。容器は密閉できる小チトックチューブなどを使用する。数が多くなる場合には 100 μl 分注しておき使用時 10 μl に分注する。

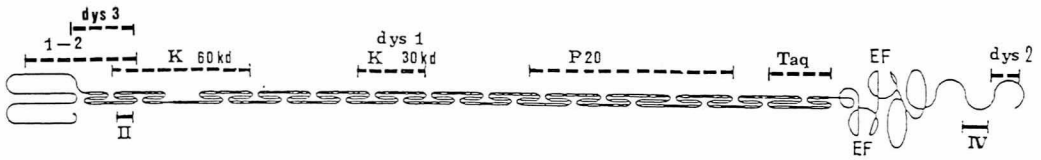


図1　ジストロフィン抗体の部位

類のモノクロナール（以下モノクロ）抗体が検討されてきた。(表1）その中で現時点ではオリジナル[2]の60および30 kd のポリクロ抗体（シープとラビットがある）と既に市販されているNOVOCASTRA（以下 NOVO）社の day-1（オリジナル 30 kd と同じ部位から作製），2（C—末端），3（N—末端）のモノクロ抗体（図1）が入手しやすく一応その評価も得ている。

ヒト症例の検討：

1）免疫組織化学的検討：モノクロ抗体が適している。NOVO 社の3つの抗体はポリクロ抗体に比してやや弱いながらも免疫組織化学染色性はよくほぼ良好な結果が得られる。これらのモノクロに加えて1～2のポリクロ抗体を追加検討すれば十分と言えよう。ポリクロ抗体の一般的欠点は筋ジストロフィー症に認められる増殖した結合織を染色する点である。これはオリジナル60および30 kd[2]，P20[3]，Taq[3]，DMDP-IV[4] の全ての抗体に共通していてそのために筋線維膜が陽性に染まって見えることがあるので必ずコントロール染色を行って比較検討することが大事である。また 30 kd（シープ）は時に毛細血管を染色し，DMDP-IV は交差性のある蛋白を神経筋接合部で示すことがある。症例の中にはN—末端およびC—末端の抗体には陽性反応を示しながら中央部の抗体には無反応，つまり中央部の欠質が有るにもかかわらず前後で短い dy を作っているものがあり（図2）1つあるいは2つの抗体のみの検討では診断を誤ることがあると考えられるので少なくともN端，中央部，C端の3つの抗体による検討が望ましい。

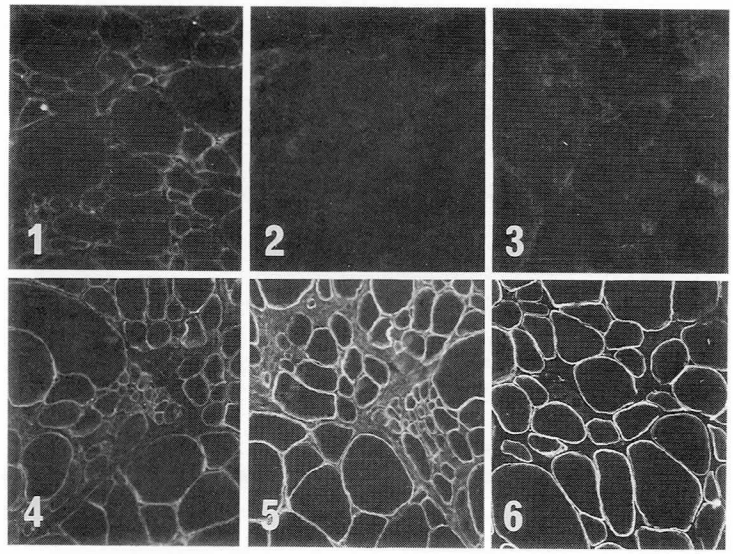


図2　10歳，男児。臨床的には軽症の DMD，あるいは重症 BMD と考えられた。ジストロフィン染色ではN—端，C—端は陽性反応を示し，中央部は染まらない。PCR 法によりエクソン10から44までの欠失が確認された。
1：1-2，2：60 kd，3：Dys-1，4：P20，5：4-4C5，6：Dys-2 による染色。

免疫電気泳動法による検討：ポリクロおよびモノクロ抗体とも大きな違いはなくそれぞれ有用である。

mdx などの動物を用いた検討：

1）免疫組織化学・免疫電気泳動的検討：

モノクロ抗体は使用できずポリクロ抗体のみが有用であるがヒトとの間に大きな差はない。

ジストロフィンの局在

1987年に Kunkel, Hoffman らによりマウス cDNA の塩基配列が明らかにされると同時に dy に対する抗体が作成され[1]，dy が正常の筋および心筋組織には存在するが DMD と mdx のそれには存在しないことが明らかにされた。そして杉田らにより dy が正常筋組織においてはその形質膜に本来存在するものであることそして DMD や mdx では認められないことが免疫組織化学的に証明[5]された。また同時に Hoffman ら自身，Chelly ら[6]による mRNA の検討により dy はおそらく全身の臓器に存在するであろうことが示唆されていた。その後様々な研究報告が dy の局在について述べており現在ではその局在についてほぼ判明したと考えられる。要約するとそれは2つの組織系に分けられる[7]。

1）収縮機能を持つ細胞群の表面膜

まず第一に，骨格筋線維及び心筋[5),8),9)]，平滑筋[7),10)]，myoepithelial cells[7]などの細胞群である。神経筋接合部[7]筋腱接合部[11]，筋紡垂内線維[7]などは次のシナプスの中に加えることもできるであろう。

2）シナプス，神経細胞

網膜における光受容器細胞と双極細胞とのシナプス[12]，味蕾[7]，tactile nerve ending[7]，神経細胞後シナプス膜[13]などである。この10年以上の間に DMD の原因病理を考える上でいわゆる「膜説」が主流であったし dy が筋線維形質膜に存在していることは膜の異常を証明する極めて好都合な所見であった。dy は膜の強化蛋白であり dy 欠損によりなんらかの膜の脆弱性がおこりそれによる筋の易崩壊性につながるとの考えは合理性がある。しかしいくつかの疑問点も出現している。たとえば1）筋組織蛋白の0.002％を占めるのみである dy に膜を強化する働きができるかどうか，2）保因者の筋組織中には dy 陽性のものと陰性のものがモザイク状に存在するが dy 陰性線維に壊れやすい状態は観察されない，3）膜の脆さが筋崩壊の原因とすれば筋ジストロフィー症において筋繊維はあちこちでばらばらに壊れてもよいはずであるが実際には少数のグループをなして壊れている[14]，4）重症先天性ミオパチー群や先天性筋緊張性ジストロフィー症の早期には筋組織内に dy の発現が認められないが筋の崩壊は起こっていないことなどである。さらに重要なことはシナプス・神経系に存在する dy をどのように位置付けるかである。中枢神経系に存在する dy が DMD 患者の多くに見られる知能障害と関係ないのかどうか。網膜のシナプスになぜ dy が必要であるのか。疑問はまだまだ多く残されている。古くより DMD の原因病理として，神経説，血管説，膜説が説なえられてきたが dy が発見された現在もこの3つの学説はそのまま残っていると考えられる。dy の生理機能を解明することは DMD の原因病理を解明することでもありとりもなおさず患者の治療法を見いだす近道でもある。dy の生理的機能については現時点では2つの考え方があり，一つは膜の強化蛋白・構造蛋白としての考え方，他の一つはカルシウムに関係した機能を持つ蛋白とする考えである[15]。本症の筋崩壊の機構を「膜の脆さ」のみに目を奪われるのではなく広い視野で検討する必要があると考えられる。

文　献

1）Hoffman EP, Knudson CM, Campbell KP, Kunkel LM. Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle. Nature **330**：754-758, 1987

2）Hoffman EP, Brown RHJr, Kunkel LM. Dystrophin：the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell **51**：919-928, 1987

3）van Ommen GJB, Ginjaar HB, Casula L, Grootscholten PM, Blonden LAJ, van paassen MMB, Bakker E, Wessels A, Moorman AFM, den Dunnen JT. From dystrophy to dystrophin：

Tracing back structure to (dys) function, in Ozawa E (ed) : 3rd Uehara Memorial Symposium "Frontiers of muscle research". Tokyo, july 16-19, 1990. Elsevier, Amsterdam, in press.

4) Ishiura, S., K. Arahata, T. Tsukahara, R. Koga, H. Anraku, M. Yamaguchi, T. Kikuchi and I. Nonaka. Antibody against the C-terminal portion of dystrophin crossreacts with the 400 kd protein in the pia mater of dystrophin-deficient mdx mouse brain, J. Biochem. **107** : 510-513, 1990

5) Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, Ishihara T, Nonaka I, Ozawa E, Sugita H : Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. Nature **333** : 861-863, 1988

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

7) Miyatake M, Miike T, Zhao J, Yoshioka K, Uchino M, Usuku G. Dystrophin : localization and presumed function. Muscle Nerve **14** : 113-119, 1991

8) Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Sarviat G, DiMauro S, Kunkel LM, Hoffman EP, Rowland LP : Duchenne muscular dystrophy : deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. Cell **54** : 447-452, 1988

9) Zubrycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AHM, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN, Worton RG : The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. Nature **333** : 466-469, 1988

10) Miyatake M, Miike T, ghao J, Yohioka K, Uchino M, Usuku G. Possible systemic smooth muscle layer dysfunction due to a deficiency of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy. J Neurol Sci **93** : 11-17, 1989

11) Samitt CE, Bonilla E. Immunohistochemical study of dystrophin at the myotendinous junction. Muscle Nerve **13** : 493-500, 1990

12) Zhao J, Uchino M, Yoshioka K, Miyatake M, Miike T. Dystrophin in control and mdx retina. Brain Dev **13** : 135-137, 1991

13) Lidov HGW, Byers TJ, Watkins SC, Kunkel LM. Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. Nature **348** : 725-727, 1990

14) Miike T : Maturational defect of regenerating muscle fibers in cases with Duchenne and congenital muscular dystrophies. Muscle Nerve **6** : 545-552, 1983

15) Tay JSH, Low PS, Lee WL, Lai PS, Gan GC. Dystrophin function : calcium-related rather than mechanical. Lancet **335** : 983, 1990

ジストロフィン染色 ABC 法の実際

伊　井　邦　雄
徳島大学医学部第一病理

Dystrophin は3685個のアミノ酸，4個のDomain から成る巨大蛋白（427 kD）である。N末端からC末端までの各所の，いくつかのアミノ酸グループ（peptide）で動物を免疫して得られた抗 dystrophin 抗体がいくつか（Poly-及び Monoclonal を含めて現在，少なくとも11種類）実用化している。

著者もこれまで10年余免疫組織化学染色に手を染め親しんできた事もあって，約3年前より三池教授（熊本大）の御協力により Hoffman 博士より作製された抗体を用いて，本学の材料の他，埜中博士（国立神経研究所）の御協力を得て，当初は PAP 法，その後 ABC 法による Dystrophin 染色を行い，昭和63年度，本研究班にて報告した（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，P. 323-326）。最近は NOVOCASTRA社の Monoclonal 抗体(Dys-1, Dys-2)を用いて ABC 法による検索も加えている。染色法そのものはすでに広く知られたものであるが，当初は材料の調整を含め若干の試行錯誤を必要とした。骨格筋，および免疫組織化学は初めての方々を念頭において著者の経験の範囲でまとめてみた。

Ⅰ．材料（切片）の準備：

A．未固定材料：

1）生検材料：切除時の刺激で収縮した筋を，1）生食で濡らせたガーゼに包む，2）スリガラス上に軽く伸展して載せる，3）割り箸の割れ目に骨格筋を結んだ一方の糸を入れ，軽く伸展して他側の糸を箸の固定する，または 4）血管クランプまたはピンセットを用いて作った器具を用いて軽く伸展し，約5分間生食で乾燥を防ぎながら放置して弛緩させる。

2）横断，縦断して約 5 mm 厚の小ブロックに細切し，a．濾紙または b．コルク板に載せ，

3）a．そのまま，または b．アルミホイルで作った小カップに凍結用の包埋剤を入れ，その中に入れて，

4）a．そのまま液体窒素中，または b．液体窒素またはドライアイス／アセトンで冷却したイソペタン中に約1分浸して凍結し，

5）サランラップで密封して deep freezer（−80°C）中に保存。

6）Cryostat にて 8-10 μm 厚の切片を作成。

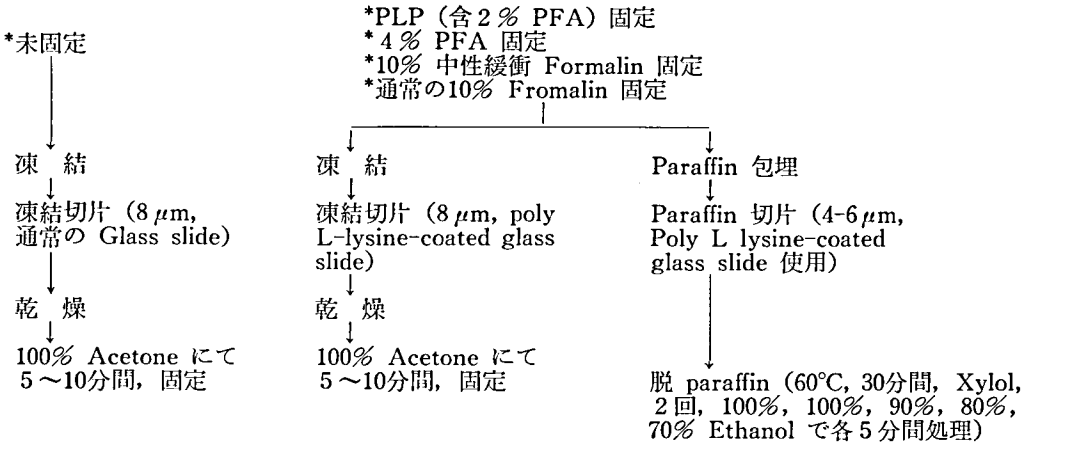
B．固定材料：

1）a．PLP（含2％ Paraformaldehyde）b．PFA（paraformaldehyde, 4％），c．中性緩衝 formalin, または d．通常の10％ formalin 液にて1—3時間固定。

2）凍結し凍結切片，または Paraffin 包埋して paraffin 切片（4-6 μm）を作成。

3）未固定凍結切片はすばやく室温乾燥させ，100％ アセトン液中で5—10分間固定。

C．まとめ：



注：PLP：0.01M NaIO4-0.075M lysine-0.0375M Phosphate buffer-2％ paraformaldehyde.
PFA：4％ paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH7.4).

II. 免疫組織化学染色（ABC 法）：

1．PBS（0.85％ Nacl 添加 phosphate buffer, 0.05～0.1M, pH 7.4）中に室温下で5分間，浸す。

2．Absolute methanol 100 m*l*
Hydrogen peroxide（31％） 0.3 m*l*
液中で室温，30分間，反応。

3．PBS にて室温下で3回（各5分間）洗浄。

4．2次抗体動物の正常血清（20～30倍希釈）をかけ，室温下で30分間反応。

5．抗 dystrophin 抗体（100～1000倍希釈）をかけ，湿箱中 4°C 下で一昼夜反応。

6．PBS にて3回（各5分間）洗浄。

7．Biotin 化2次抗体（Vectastain, ABC Kit, Vector 社）をかける。

8．PBS にて3回（各5分間）洗浄。

9．Avidin-Biotin-Horseradish peroxidase Complex（ABC）液（Vectastain, ABC Kit, Vector 社）をかけ，室温下で60分間反応。

10．PBS にて3回（各5分間）洗浄。

11．DAB(3.3'diaminobenzidine tetrahydrochloride) 30 mg
0.05M Tris HCl buffer (pH 7.6) 100 ml
液中で室温下，3-15分間，反応（顕微鏡下で見ながら最適のところで停止）。

12．PBS にて3回（各5分間）洗浄。

13．Mayer の Hematoxylin 染色液，10～15秒間染色

または 13′ Methylgreen 染色液にて室温下，10分間，染色。

14．流水（水道水）中で，10分間放置。

14′ 第3ブチルアルコール原液中で2回（各2分間）処理。

15．95，100，100％ Ethanol 水溶液中で各5分間，Carboxylol 液中で3分間，Xylol 原液中で3回（各5分間）処理。

15′ Xylol 原液中で2回（各2～5秒間）処理。

16．Malinol（武藤化学 KK.）または Entellan（new）（Merck 社）などの包埋剤にて包埋。

III. 注意事項：

1．材料採取，伸展後すばやく凍結または固定すること。

2．1次および2次抗体について：

1）抗体がどの動物で作成されたか確認すること。

	1次抗体	2次抗体
Polyclonal 抗体	Rabbit	Goat (or Swine)
	Sheep	Rabbit (Goat, or Swine)
Monoclonal 抗体	Mouse	Horse

2）Monoclonal 抗体は原則として未固定凍結切片にしか使えない。

3．抗 Dystrophin 抗体（1次抗体）について：

Hoffman らの抗体（Polyclonal：anti-sheep）の染色性：

未固定，凍結＞PLP，4％ PFA，または10％ 中性緩衝 Formalin 固定＞ 10％ Formalin 水溶液固定の順に良好。

4．固定材料は background staining が出やすいので，場合により

*1次および2次抗体の希釈倍率を薄くする。

*PBS の NaCl の濃度（0.85％）を3～5倍にする。

*DAB 反応時間を長すぎないようにする。

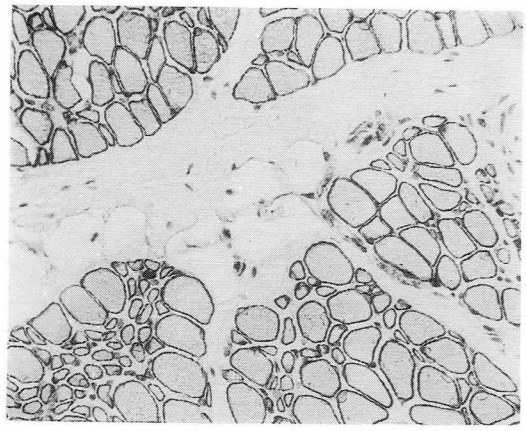
*染色中，切片を乾かせないようとくに注意する。

*PBS 洗浄を充分行う。

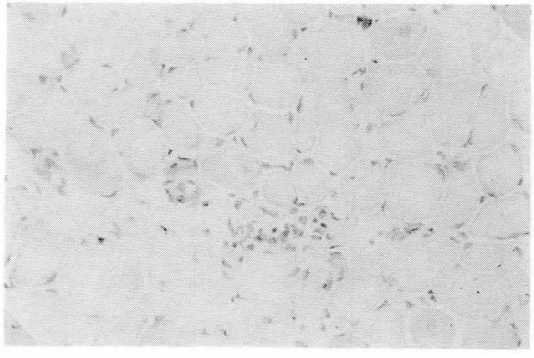
*Trypsin，pronase などの protease による前処理を行う。

*洗浄または抗体希釈用の PBS に0.01～0.2％の Triton X-100 を加える。

などの工夫を加える。



神経原性萎縮筋における dystrophin の局在。萎の縮軽重を問わず筋細胞の辺縁部，（原形質膜と推定されている）に一致して，連続性に Dystrophin が認められる。（TC-82，Werdnig-Hoffman 病，未固定，凍結切片）



Duchenne muscular dystrophy における Dystrophin の局在。萎縮，変性の有無，程度を問わず，いずれの筋細胞にもまったく Dystrophin は認められない。（NC-284，神経センター，未固定，凍結切片）

参考文献

渡辺慶一，中根一穂：酵素抗体法（改訂版）。学際企画。昭和60年。

伊井邦雄：標識酵素抗体法—Maleimide（石川）法による免疫組織化学の 手技臨床化学 14(2)：74-80，1985

伊井邦雄他：骨格筋における免疫組織化学病理と臨床 5（3）：259-265，1987

伊井邦雄他：神経筋疾患骨格筋細胞における Dystrophin の局在。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（西谷班）。昭和63年度研究報告書。P. 323-326

ジストロフィン染色 ABC 法の症例

舘　　延　忠
札幌医科大学小児科
若　井　周　治，渡　辺　幸　恵
札幌医科大学小児科

方　法

凍結筋より 6μ 切片を作製，室温で１時間乾燥後，－20℃ アセトンに10分間固定，室温にて10分間乾燥，２% BSA 溶液にて１時間ブロッキング，１次抗体として抗ジストロフィン抗体を４℃ １晩反応させ，それ以後は Vectastain ABC キットを用い，0.02%H_2O_2 を含む 0.1% DAB 溶液を基質として発色させ，PBS で洗浄し，アルコール脱水後封入した。用いた抗ジストロフィン抗体は，polyclonal 抗体（60 K：Kunkel ら），monoclonal 抗体（4-4C5：味の素と富士レビオ，DYS1 と DYS2：Novocastra）で，その他抗デスミン抗体，抗ビメンチン抗体，抗スペクトリン抗体それぞれ mono および polyclonal 抗体を用いた。

対　象

Muscular dystrophy（DMD とその保因者，BMD，L-G. FSH，FCMD，non FCMD，congenital MyD），Congenital myopathy（congenital nemaline myopathy，central core disease，congenital fiber type disproportion），Inflammatory myopathy（dermatomyositis，polymyositis，MCTD），その他 Werdnig-Hoffman 病，Prader-Willi 症候群，正常ヒトおよび DMD 培養筋細胞を用いた。

結　果

正常筋では，筋細胞膜に一様にジストロフィンが発現（図１-a）されているが，DMD 筋（図 1-b）では，全ての筋細胞膜でジストロフィンは欠如している。L-G 型筋ジストロフィー症（図１-C）では，再生線維も含めてジストロフィンは一様に発現している。５歳以下の DMD

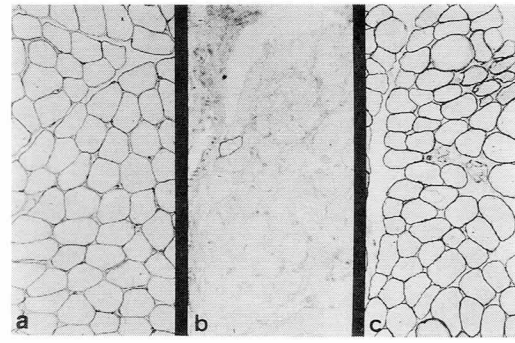


図１　a：正常筋　b：DMD 筋　C：L-G 型筋ジストロフィー筋

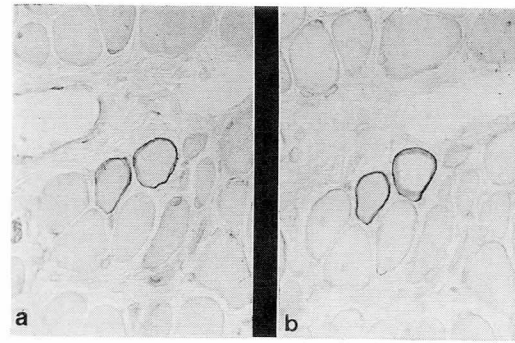


図２　DMD 筋，ジストロフィン陽性線維を認める。a：Dys1　b：Dys２と異なった抗ジストロフィン抗体を用いての染色でも同様の結果である。

児の4例に，筋標本中2～10%にジストロフィン陽性筋線維が2～4本 cluster で存在し，抗ジストロフィン抗体の種類を変えても（エピトープの認識部位を異にする），同様の発現様式を示した（図2a-b)。又，連続切片では，ある切片でジストロフィン陽性筋線維は，別の切片ではジストロフィン陰性と，一本の筋線維膜に一様に発現されているのではなく，部分部分にジストロフィンが発現していた。これは，別の抗ジストロフィン抗体を用いても同様の結果であった。DMD 保因者のジストロフィンの発現様式は，ジストロフィン陽性と陰性線維が混在するモザイク様式をとるが，一本の筋線維でも陽性部分と陰性部分が混在する所見も認めた。これは，筋線維形成の初期において，ジストロフィン陽性 myoblast と陰性 myoblast が接着し，myotube 形成を行なうが，陽性 myoblast と陰性 myoblast は一定の割合でなく at random に接着することによって生じ，Lyon の仮説を支持する所見である。筋力低下，腓腹筋の仮性肥大を示し，高 CK 血症を示す manifesting carrier では，ジストロフィン陰性線維の割合が高く，筋線維の大小不同，軽度の壊死・再生の所見を呈する obligate carrier であっても，血清 CK 値が正常で神経学的に異常を示さない場合，ジストロフィン陰性線維を認めないこともある。保因者100%にジストロフィンの異常が出ないので，ジストロフィン染色の限界がここにあると思われる。

偶然に発見された無症候性高CK血症の中に5例の BMD(兄弟例を含む)が認められた。2例は従来報告された筋線維膜のジストロフィン発現は，“patchy” な所見を示した。1例は，正常と同様のジストロフィン発現様式を示した。western blot によるジストロフィン解析にて，420 kd の molecular weight で，正常の60%のジストロフィンを示したことにより BMD と診断された。BMD の確定診断には，western blot によるジストロフィンの質的および量的解析が必要である。兄弟例では，筋線維の活発な再生所見が観察された。壊死後の再生は，cluster で認められ，myotube および好塩基性に染る線維で占られていた。これらの再生線維は，

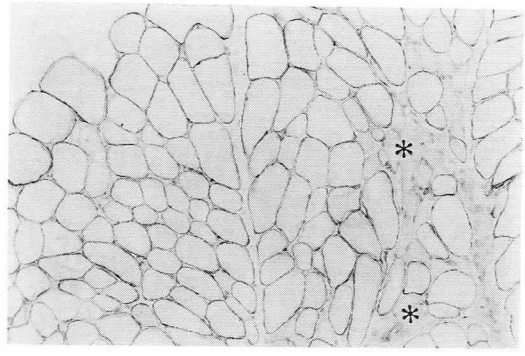


図3　ジストロフィン陰性の再生筋線維が cluster で存在する（※）

ジストロフィン陰性であった（図3)。BMD の再生筋では，正常再生筋では認められないジストロフィンの発現の遅延が推定された。

Congenital MyD の3症例（新生児重症例で1カ月で死亡，生下時より呼吸不全を示し1時的に人工呼吸器を使用した2症例）の生検および剖検筋のジストロフィン，スペクトリン，デスミン，ビメンチン発現様式を検討した。死亡例では，大部分は，大型の中心核を有する未熟な myotube によって占られ，これらの筋細胞膜のジストロフィンは陰性だが，スペクトリンは陽性であった。又，これらの細胞質内は，デスミンおよびビメンチンは陽性であった。一時的に人工呼吸器を使用した2症例の生検筋では，ジストロフィンはほぼ全筋細胞膜に発現され，細胞質内には，デスミンおよびビメンチンは陰性であった（図4)。これらの所見は，未熟な筋を特徴とする先天性 MyD で，特にデスミンお

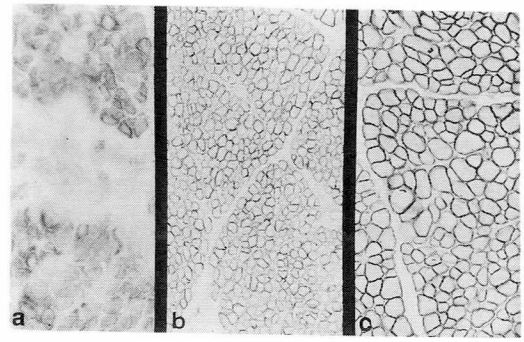


図4　a：新生児重症 MyD 剖検筋，ジストロフィンの発現は，一部の筋線維のみに認められる。b．c：1時的に人工呼吸器を使用した症例，ジストロフィンはほぼ全筋線維に発現されている。



図5 Myotube の細胞膜に淡くジストロフィンの発現を認める。正常ヒト培養筋

よびビメンチン陽性の未熟な myotube ではジストロフィンが発現されていなく，新生児期を生き延びた症例の筋では，成熟も促進されジストロフィンも発現されていることを特徴としていた。ジストロフィンの発現を筋の発生段階から追跡することは，必要である。

正常ヒトおよびDMD筋を初代培養し，myoblost から myotube の過程におけるジストロフィンを中心にデスミン，ビメンチンおよびスペクトリンの発現様式を蛍光2重染色，「ABC法にて検索した。

正常ヒトおよび DMD の myoblast は，ビメンチンは，細胞質に線状に認められたが，デスミン，ジストロフィン，スペクトリンは認めなかった。myotube 初期では，ビメンチン，デスミン，スペクトリンは，細胞質内に線状に認めたが，ジストロフィンは，細胞質内に散在性に点状に認めた。

成熟した myotube では，デスミンは，細胞質内に一様に認められたが，ビメンチンは認めなく，ジストロフィンは，細胞膜に淡く存在した(図5)。ジストロフィンは，myotube 出現と同時に細胞質内に点状に出現し，myotube の成熟と伴に細胞膜へ移行していくことが確認された。

ジストロフィン染色 FITC 法

吉　岡　　毅
熊本大学発達小児科
三池輝久，趙　基恩，大谷宜伸
熊本大学発達小児科

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD），Becker 型筋ジストロフィー（BMD）においては，近年ジストロフィンが発見されて以来その研究は著しく発展してきた[1)2)3)]。そして臨床診断面においても他の疾患との鑑別，病型分類において[4)]生検筋組織を用いたジストロフィンの免疫組織化学的染色，Western Bloting は欠かせないもの[6)7)]となっている。今日，臨床医学的研究に不可欠なジストロフィンテストの普及，標準化の必要性が上げられている[7)]。そこで我々は免疫組織化学的染色，特に間接蛍光抗体法の実際[6)7)]と保有する抗体の特異性および，ジストロフィンの染色性について報告する。

蛍光抗体法（Immunofluorescence stain）
蛍光抗体法は，ある波長を当てることにより長い波長を発光する蛍光色素（FITC 等）を標識した抗体を用い，抗原抗体反応を利用して組織内の抗原と結合した抗体の局在を観察する染色法である。
＜直接法＞
抗原に対応する抗体に蛍光色素を標識し，組織内抗原と反応させて観察する。
＜間接法＞
抗原と対応する抗体（1次抗体）に対する抗体（2次抗体）に蛍光色素を標識し，1次抗体と反応させて観察する。

組織片の処理
組織化学染色を行うためには良い切片を得ることが決め手である。そのためにはまず良い凍結ブロックを作ることが重要である。採取した組織は生食でぬらして固く絞ったガーゼに包んでおく。（湿り過ぎると人工産物の原因となる。）

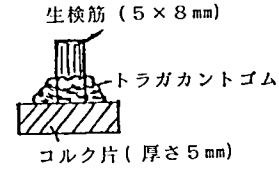


図1　トラガカントゴムを水で耳たぶほどの固さに練って筋を軽く倒れないように固定する。

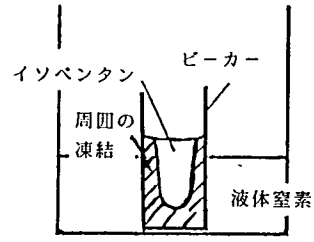


図2　液体窒素の中に入れたイソペンタンが周囲から凍結してきたらピンセットでコルク片に固定した筋を浸す。30〜40秒ほどかるく揺らしながら凍結する。

①(図1）生検筋をコルク片の上にトラガカントゴムでかるく固定する。
②(図2）液体窒素の中に 100 m*l* 用のビーカー（金属容器）にイソペンタンを 70 m*l* ほど入れて冷却する。
③イソペンタンが周囲から半分ほど凍結してきたら組織を入れ30〜40秒間凍結する。

④冷却したクリオスタット内でイソペンタンを乾燥させる。（保存する場合にはサランラップなどで包み密閉容器に入れディープフリーザーに保存する。）

⑤−20℃ ～−25℃ で8～10 μm の厚さで連続切片を作成する。（5～6 μm の厚さではやや難しい。）

⑥冷風で20分乾燥。

⑦切片を保存する場合にはシリカゲルを入れ密閉して冷凍庫に保存。

間接螢光抗体法

①風乾	20分	
②アセトン固定	6分	室温
③風乾	20分	
④洗浄 (0.01M PBS)	10分	3回
⑤正常動物血清	30分	室温
⑥洗浄 (0.01M PBS)	5分	
⑦1次抗体	90分	37℃
⑧洗浄 (0.01M PBS)	10分	3回
⑨2次抗体 (FITC標識)	40分	室温
⑩洗浄 (0.01M PBS)	10分	3回
⑪50%グリセロール/PBS	封入	
⑫蛍光顕微鏡で観察・写真撮影		

抗体の保存方法

一般的に市販の抗体の場合4℃ 冷蔵保存が多いが，抗体が希少な場合が多い抗ジストロフィン抗体は1% PBS（1%精製結晶 BSA 加）で1～5倍程度に希釈し 10 μl に分注して−80℃ に保存するのもよい。容器は密閉できる小ストックチューブなどを使用し，数量が多くなる場合には 100 μl 分注しておき使用時10 μl に分注する。

注意点

※反応はすべて湿潤箱中で行う。

※間接法では必ず negative control 染色を同時に実施する。（1次抗体の代わりに同種動物種の非免疫血清を同一濃度で用いる。）

※反応液をかける前に切片周囲の余分な PBS (pH7,2) をキムワイプなどで拭き取る。

※①③は乾燥を十分におこなわないと切片がはがれやすい。はがれやすい場合にはアルブミン，Poly L Lysin コーティングスライドを用いるのも良い。0.1% ネオプレーントルエン溶液（応研商事）添付スライドを用いるとタンパク分解酵素処理も可能である。

※洗浄に用いる 0.01M PBS (pH7,2) は4℃ に冷却したものを用いる。

※⑤は2次抗体と同一動物種血清 1～5%/1% BSA 加 PBS を用いる。

※⑦は1% BSA 加 PBS でそれぞれの抗体に応じて希釈する。（抗体を倍々希釈して濃度を決定する。）1切片につき30～40 μl の希釈抗体を乗せる。抗体が流れると染色むらの原因となる。

※⑨は1次抗体に対応した標識2次抗体を1% BSA 加 PBS でそれぞれ至適濃度に希釈して用いる。（非特異的染色を抑えるには精製された抗体を用いたほうが良い。）

※⑪封入液は無蛍光グリセロールを用いて調整する。

※⑫蛍光色素は紫外線の照射時間と共に退色するので観察にはむやみに時間をかけないようにし，撮影は染色後なるべく早く行うようにする。（最近，特異蛍光の減弱の防止に p-フェニレンジアミンが用いられている。）

※特異染色が淡い場合は，抗体の希釈し過ぎ，抗体の失活，あるいは抗原性の失活などが考えられる。

抗体の染色性

抗ジストロフィン抗体は，現在までに数多く作成されているが比較的入手しやすいものは anti-60 kd, anti-30 kd,（ポリクロナール），DYS 1, DYS2, DYS3,（モノクロナール）などが上げられる。実際の臨床診断において抗体を使用する際には，その特異性とジストロフィン分子に対する認識部位を充分認識した上で用いることが必要であろう[7]。

ポリクロナール抗体 60 kd, 30 kd を用いる場合は結合織が非特異的に染色されやすいので

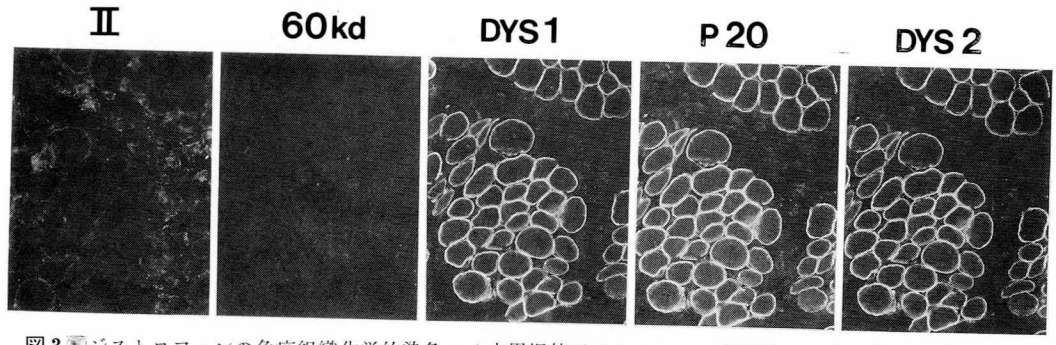


図3 ジストロフィンの免疫組織化学的染色：4才男児筋ジストロフィー症患者，anti-60 kd では染色されない。DMDpⅡ では極く淡く不均一に認められる。

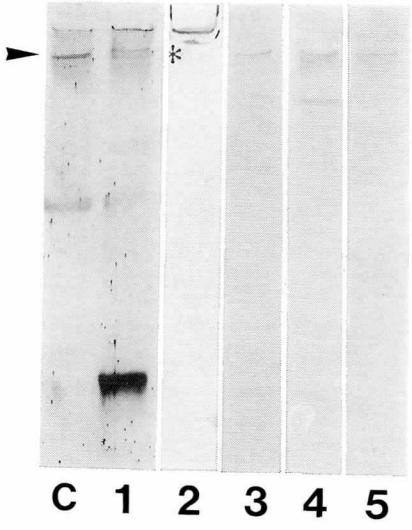


図4 Western Bloting は anti-60 kd ではバンドを認めない。
C：正常筋，1：DMDpⅡ，2：anti-60 kd，3：DYS 1，4：P20，5：DYS 2

判定に際しては慎重な観察を行うことが必要である。モノクロナール抗体はいずれの抗体も非常に良好な染色性を示した。これらの抗体は Western Bloting 法においてもすべて 400 kd のジストロフィンのバンドを認め有用であった[7]。

DMD ではいずれの抗体においても筋線維表面膜は染色されない（数本の線維が染色される場合もある。）が，私たちが経験した exon 10 から exon 44 (in frame) の欠失を持つ (Beggs, Chambelain kit) DMD よりやや軽症の BMD では，anti-60 kd，DYS1 ではまったく染色されなかった。しかしその他の部位に対応する抗体では明らかに染色された。Western Bloting では 200 kd のジストロフィン蛋白が認められた[7),8)]（図3）また，臨床的にはまったく DMD の症状をとる症例で，anti-60 kd だけは染色されず，ほかの抗体は明らかに染色された。Western Bloting は anti-60 kd ではバンドを認めなかった。（図4）このように BMD のジストロフィンの欠失の範囲には多様性が認められている。Hoffman らはジストロフィンの蛋白量と重症度に関連性があることを報告しているがすべてがこれにより説明されたわけではない。

まとめ

DMD, BMD の臨床診断における免疫組織化学にはC末端に対する抗体と他のジストロフィン分子上の異なる部位を認識する抗体を必ず複数用いることが必要であり，免疫組織化学的染色に加え Western Bloting を同時に施行していく必要がある。そして PCR 法などによる遺伝子診断法など[5)] すべてのジストロフィンテストを実施することが望ましい。

参考文献

1）Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM: Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell **51**: 919-928, 1987

2）Koenig M, Monako AP, Kunkel LM: Dystrophin: The complete sequence of dystrophin predicts a rodshaped cytoskeletal protein. Cell **53**: 219-228, 1987

3) Miyatake M, Miike T, Zhao J, Yoshioka K: Dystrophin localization and presumable function.: Muscle & Nerve **14** : 113, 1991
4) Hoffman EP, Kunkel LM : Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. Neuron **2** : 1019-1029, 1989
5) Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, et al : Detection of 98 % of DMD/BMD gene deletions by polimerase chain reaction. Hom Genet **86** : 45-48, 1990
6) Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, Isiura S et al: Dystrophin diagnosis: comparison of Dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analysis. Proc Natl Acad Sci USA **86** : 7154-7158, 1989
7) 三池輝久, 吉岡毅, Zhao Ji-en: 現在使用されている5種類のジストロフィン抗体について. 筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝疫学に関する研究。平成2年度研究報告書 **3** : 277-281, 1991
8) England SB, Nicolson LVB, Johnson MA, et al: Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46 % of dystrophin. Nature **343** : 180-182, 1990

Western blotting の基礎と臨床

内野　誠
国立療養所再春荘病院神経内科

はじめに

近年 Duchenne 型 (DMD) 及び Becker 型筋ジストロフィー (BMD) は原因遺伝子の単離並びに遺伝子産物 dystrophin ("dy") の発見以来，その正確な診断のためには，遺伝子解析及び "dy" の異常の検索が不可欠となってきている。"dy" の異常を検索する方法 ("dy" test) には"dy" の局在を形態学的に観察する免疫組織化学染色法と筋構造蛋白をゲル電気泳動によって分離したのち，ニトロセルローズ膜に移して，免疫反応により "dy" 蛋白の検出を行う Western blotting 法があるが，本稿では新しく Western blotting を始められる人を対象に具体的な手順について述べ，若干の自験例の成績を呈示する。

I．Western blotting の手順

Western blotting は要約すると3つの段階すなわち1）サンプルの調整，2）電気泳動（これには SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動=SDS-PAGE とトランスファーブロッチングがある），及び3）免疫反応に区分される。

1）サンプル調整法：サンプルの調整法は施設により若干異なる。著者らは−90℃ のフリーザーに乾燥しないように保存した生検筋を用い，秤量後眼科用ハサミで細切し，10倍量のサンプルバッファー（40 mM トリス，0.24M グリシン，2％SDS，5％β-メルカプトエタノール，40％グリセリン，4 mM EDTA，1 mM PMSF，0.01％ BPB，pH8.5）を加えて，ホモジナイズ後，95℃ 2分間のインキュベーションを行う。さらに 2300 rpm で遠沈し，その上清を集めて蛋白濃度を測定後，10 mg/ml となるように調整する。直ちに使用しない場合は小容器に分注し，−90℃ に凍結保存する。

2）電気泳動：調整したサンプルを最初 SDS-PAGE にかけるが，著者らは市販の3.5％-12％グラデュエントゲル（10クーム，8 cm×8 cm×1 mm）を用い，各レーンに 10 μl のサンプルを添加（蛋白量として 100 μg）し，最初マーカの色素が基点から1 cm 位移動するまでは電流を 7.5 mA，その後は 15 mA にあげ，色素がゲル末端に達するまで約2時間30分の通電を行う。但し，BMD が疑われる症例の場合は更に30分位追加し，計約3時間程度の通電を行っている。

次にゲル中の蛋白をニトロセルロース膜にトランスファーブロッチングするが，ニトロセルロース膜は使用30分前から泳動バッファー（25 mM トリス，195 mM グリシン，0.1％ SDS，20％メタノール）に浸しておく。陽極側からスポンジ，濾紙，ニトロセルロース膜，ゲル，濾紙，スポンジの順で重畳し，100V，約3時間の通電を行う。かなりの熱発生があり，クーリングシステムあるいは−20〜−30℃ のフリーザ中で行うことが必要である。泳動後はプラスチック容器にいれ，4 ℃ で一晩乾燥させる。

3）免疫反応：以下全て振盪しながら行う。

①5 ％ スキムミルクで1時間ブロッキング。

②TPBS（0.05％ Tween 20を含む PBS 液）で洗浄20分×3回

③一次抗体（ポリクロナール抗体は1000倍稀釈，モノクロナール抗体は50〜100倍稀釈）：2時間インキュベーション，室温

④TPBS 洗浄20分×3回

⑤ビオチン化二次抗体（Vecstain ABC kit あるいは elite ABC kit）：30分，室温
⑥TPBS 洗浄20分×３回
⑦アビチン・ビオチンペルオキシダーゼ混液（ABC液）：45分，室温
⑧PBS 液で洗浄　20分×３回
⑨発色：ペルオキシダーゼ基質溶液（PBS 100 ml に４-クロロ-1-ナフトールのメタノール溶液（3 mg/ml）20 ml を加え，更に 30％ H_2O_2 50 μl を加えてよく混和する）中で15分～30分.
⑩蒸留水で洗浄　10分×２回
⑪写真撮影
⑫アミドブラック液（0.1％アミドブラック，10％メタノール，２％酢酸）で蛋白染色，５分
⑬脱色：50％エタノール，７％酢酸溶液
⑭蒸留水で洗浄
⑮写真撮影

③，⑤，⑦の反応は試薬を節約するためシールバックあるいはスクリーナーブロッターを用いる。10×10 cm のニトロセルロース膜１枚で反応液は約７ ml 程度必要である。ブロッターを用いれば反応液は更に少なくて済む（約３ ml）。シールバッグの場合もニトロセルロース膜の転写面を外側にして，二枚重ねて反応させれば，一枚当りの反応液はブロッターの場合とほぼ同等である。シールバッグは反応液を注入後，空気をおしだしてバッグシーラーで密閉するが，バッグシーラーがない場合は家庭用アイロンでも代用できる。ニトロセルロース膜をあつかう時はゴム手袋を着用し，素手では直接膜に触れないことが大切である。発色が終ったニトロセルロース膜は wet の状態で写真撮影し，さらにアミドブラック液で各筋構造蛋白を染色後，再び写真撮影する。添加する蛋白量は 100 μg と一定にしてあるので，myosin heavy chain（MHC）ののバンド及び正常対照における“dy” バンドはほぼ均一のバンドとして発現するが，定量化するためにはデンシトメーターにかけ，MHC に対する“dy”バンドの相対量を測定する。

II. 各種神経筋疾患，ヒト及びマウス各臓器における Western blotting パターン

前述の方法に従って，各種神経筋疾患の生検筋，ヒト及びマウスの各臓器について Western blotting を行った。抗“dy”抗体はポリクロナール抗体として 60 kd, 30 kd, p-20, ペプチドⅣ（D-Ⅳ），モノクロナール抗体として DYS-1, DYS-2（Novo 社）を使用した。

１）正常対照：正常対照例においては Vecstain 社の ABC kit で４-クロロ-1-ナフトールを発色基質に用いた場合は 60 kd, 30 kd, D-Ⅳとも分子量42.7万に一致して，一本のバンドが発現したが，Vecstain elite ABC ket で DAB, $NiCl_2$ を基質に使用し，DYS-1 を用いた場合42.7万の主要バンドの他に複数の低分子のバンドが認められた。同じ方法でも DYS-2 の場合は42.7万のバンドが主体で，41万付近に痕跡的なバンドがみられた。

２）筋ジストロフィーを除く神経筋疾患：筋萎縮性側索硬化症，多発神経炎，重症筋無力症，低K性ミオパチー，ステロイドミオパチー，ミトコンドリアミオパチーなどにおいては正常対照と同様の Western blotting パターンを呈した。

３）DMD/BMD 以外の筋ジストロフィー：肢帯型筋ジストロフィー，顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー，筋緊張性筋ジストロフィー，遠位型筋ジストロフィーにおいても Western blotting パターンには特に異常はみられなかった。

４）DMD：全ての抗“dy”抗体で，“dy”のバンドの発現は認めなかった。

５）BMD：SDS-PAGE の通電時間を３時間とし，Vecstain ABC kit で発色基質に４-クロロ-1-ナフトールを用いた場合，BMD には①分子量の異常（低分子化あるいは高分子化）を示すもの，②“dy”バンドの発現がみられないもの，③正常分子量で含有量の減少を示すものが認められた（図１）。①は Hoffman らの成績と合致し，いわゆるフレームシフト仮説と矛盾しないものであるが，②及び③についてはフレームシフト仮説では説明は困難である。そこで今回②の問題に対して，通常の Vecstain ABC kit より，染色感度が高い elite ABC kit を用い，また発色基質として４－クロロ－１－ナフトールより感度の高い DAB に $NiCl_2$ を加え

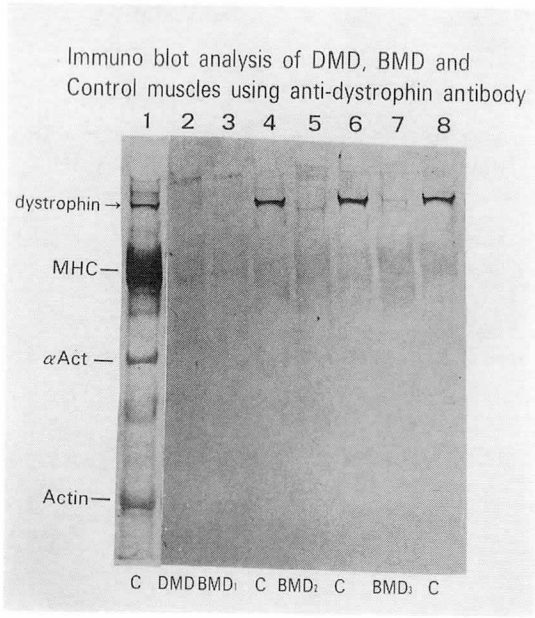


図1 Immuno blot analysis of DMD, BMD and control muscles using anti-dystrophin antibody (60 kd)
Lane 1,4,6,8 : control muscle Lane 2 : DMD. Lane 3, 5,7, BMD.

た基質を用い，検出感度を高めることによって“dy”バンドの発現がみられるか否かについて検討を試みた。また③の問題については，プロモーターやエンハンサー領域の何らかの異常，あるいは“dy”の安定化に関係するといわれる5'端あるいは3'端の非翻訳領域の異常，その他の異常が想定されるが，この他に欠失距離が短かく，通常のSDS-PAGEでは正常対照と移動度に差がでない可能性も考えられる。そこで通常の約3時間から4～5時間と通電時間を大幅に延長することにより，移動度に差が生じるか否かについて検討した。

結果として従来の方法では“dy”バンドの発現を認めなかった症例において，今回のVecstain elite ABC kit, DAB, $NiCl_2$を用いる方法では痕跡的ながら，明らかな“dy”バンドの発現がみられた。ただ従来の方法では“dy”バンドが単一のバンドとして発現し，特異性に優れていたが，今回の方法では“dy”バンド以外に複数のバンドが認められ，特異性の面では若干

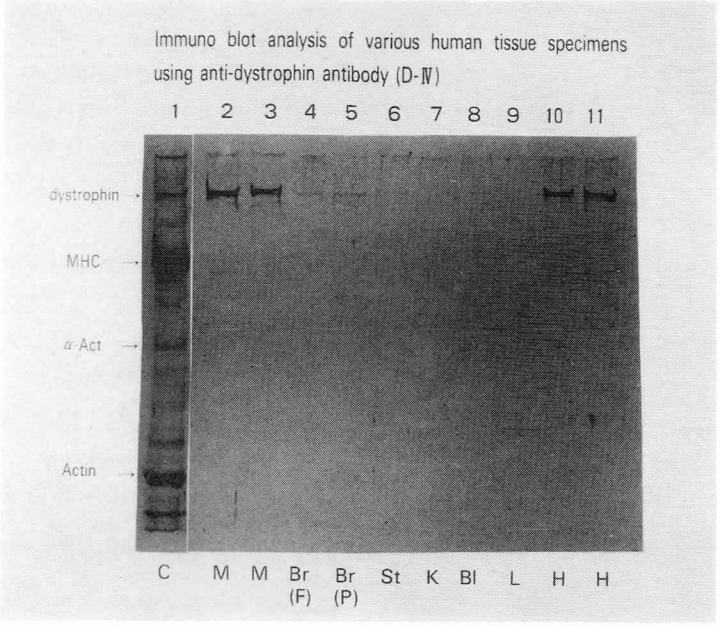


図2 Immuno blot analysis of various human tissue specimens using anti-dystrophin antibody (D-Ⅳ).
Lane 1, 2, 3 : control skeletal muscle. Lane 4 : cerebrum (frontal lobe) Lane 5 : cerebrum (parietal lobe) Lane 6 : stomach. Lane 7 : kidney. Lane 8 : bladder. Lane 9 : lung Lane 10, 11 : heart.

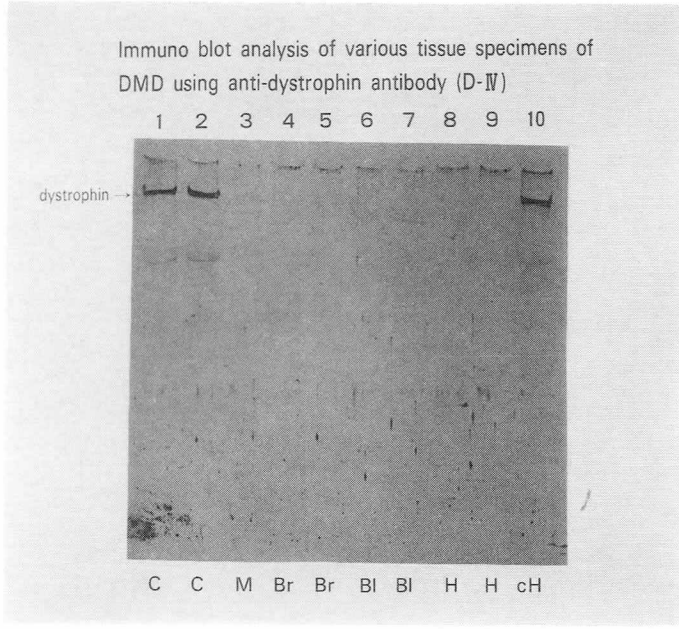


図3

問題が残されているように思われた。一方従来の通電時間では移動度に差がみられなかった症例4例（うち一例は multiple PCR 法により exon 45の欠失が判明している）について，今回4～5時間と通電時間を大幅に延長して検討した結果，4例全例移動度に変化がみられ，軽度ながら低分子化しているのが明らかになった（分子量約41万）。従って通常の通電時間で移動度に差がみられない場合も，約2倍程度に通電時間を延長することにより，exon 1個すなわち塩基数100～200程度の短い欠失例でも検出することが可能と思われた。欧米の BMD 例に比べて我ヶ国の BMD 例では欠失距離の短い症例の頻度が高い可能性があり，今後更に症例の集積が必要と思われる。

6）ヒト臓器：ヒト剖検例の各臓器について，同様の検索を行ったが，死後4時間以内の剖検例では，骨格筋，心筋において，生検筋と変わらない量の“dy”バンドの発現を認め，痕跡的ながら大脳，胃においても“dy”バンドの発現を認めた（60 kd, D-Ⅳ）（図2）。DMD では骨格筋，心筋を含め検索した全臓器で“dy”の発現はみられなかった（図3）。

7）マウス臓器：コントロールマウスにおいては骨格筋及び心筋において，42.7万の明瞭な“dy”バンドの発現を認め，神経組織（大脳，小脳），平滑筋組織（胃，膀胱，肺など）においても痕跡的ながら“dy”バンドの発現がみられた。mdx マウスでは 60 kd, 30 kd 抗体では全臓器で“dy”の発現は認めず，D-Ⅳでは骨格筋，心筋，大脳，小脳において，コントロールマウスよりも薄い“dy”バンドの発現が認められた。

おわりに

“dy”の Western blotting の具体的な手順と各種神経筋疾患並びにヒト，マウス諸臓器における“dy”の発現状況について概説した。“dy” test の中で，免疫組織化学染色法は多くの施設で実施されているが，これに比較して Western blotting は一部の施設で行われているにすぎない。本ワークショップを契機に全国の筋ジス施設に普及していくことが望まれる。

PCR 基礎編

1) PCR 法による DNA 解析の実際的な手順

西　尾　久　英
神戸大学医学部小児科
成田奈緒子[1)]，木藤嘉彦[1)]，松尾雅文[1)]
中村肇[1)]，八若博司[2)]，中島敏博[2)]
[1)] 神戸大学医学部小児科　[2)] 国立療養所兵庫中央病院小児科

(1)試薬を作製する
一般的な試薬については割愛する。
試薬1　BCL 緩衝液
10 mM Tris-HCl pH7.5
5 mM $MgCl_2$
0.32M Sucrose
1% TritonX-100
試薬2　5×緩衝液
83 mM $(NH_4)SO_4$
335 mM Tris HCl pH8.8
33.5 mM$MgCl_2$
50 mM β-Mercaptoethanol
850 μg/mlBSA
34 mM EDTA

(2)白血球から DNA を抽出する
1．EDTA 採血で得た全血 100 μl を試料とする。
2．1．に BCL 緩衝液（試薬1）400 μl を添加する。
3．プロテネース K(10 mg/ml) 5 μl を添加する。
4．10% SDS 12.5 μl を添加する。
5．軽く混和（Vortex mixer 使用）した後，37 ℃ 30分間インキュベートする。
6．0.1 M Tris-HCl pH7.5 で飽和したフェノール 250 μl を添加する。
7．Vortex mixer で混和する。
8．クロロホルム／イソアミルアルコール（24：1）250 μl を添加する。
9．Vortex mixer で混和する。
10．遠心分離を 15000 rpm 10分間行なう。
11．3層に分かれたうち，最も上の層を取り出す。
12．クロロホルム／イソアミルアルコール（24：1）500 μl を添加する。
13．Vortex mixer で混和する。
14．遠心分離を15000 rpm 10分間行なう。
15．2層に分かれたうち，上の層を取り出す（テンプレートとして使用可能）。

(3)DNA を増幅する
1．0．5 ml のチューブに次の反応液（1本分）を入れる。

オートクレーブ水	7.8 μl
5×緩衝液（試薬2）	4.0 μl
5 mM dATP	0.8 μl
5 mM dTTP	0.8 μl
5 mM dCTP	0.8 μl
5 mM dGTP	0.8 μl
センス・プライマー	1.0 μl (=40 pmol)
アンチセンス・プライマー	1.0 μl (=40 pmol)
テンプレート DNA	2.0 μl
1/10 TaqPolymerase	1.0 μl
	20.0 μl

2．ミネラルオイル1滴（約50 μl）で1．の表

面をシールする。

3．サーモサイクラーで PCR を行なう。熱伝導を良くするためにミネラルオイル1滴をサーモサイクラーの穴にも入れておく。温度条件は次の通り。始めに94℃ で7分保持，その後「94℃ 30秒-56℃ 30秒-65℃ 4分」35サイクル，最後に65℃ で7分保持して終了。

(4) 3 % アガロースゲルを作成する

ミュービッド電気泳動装置付属のゲルメーカー17レーン用1枚分あるいは8レーン用2枚分のゲルを作製する。

1．NuSieve GTG：	2	0.6g
Agarose NA：	1	0.3g
		0.9g

2．1．を1xTAE 30 m*l*に混和し，電子レンジで温めて溶解させる。

3．やや冷めてから，ゲルを型に流し込み，固まるのを待つ。

(5)DNA を電気泳動する。

1．ゲルをミュービッド電気泳動装置の中にいれる。

2．1x TAE を，ゲルがすっかり漬かるまで注ぐ。

3．ウェルにサンプル（増幅産物 10 μl, BPB 色素液 1 μl を混じたもの）を注入する。端のウェルには，マーカーサンプル（ØX 174/HaeIII digest 2.0 μl に BPB 色素液 1 μl を混じたもの）を注入する。

4．ミュービッド電気泳動装置を電源につなぎ，スイッチを入れる。＋－の方向を確認しておくこと。

5．電気泳動は30分程度で終了する。

(6)エチジウムブロマイド染色後，写真を撮る

1．蒸留水にエチジウムブロマイドを加え（1 μg/m*l*），その中へゲルを浸して10-20分間放置する。

2．染色の終わったゲルは，紫外線照射下に写真を撮る。

2) フレームシフト理論に基いた PCR 法による DMD/BMD の鑑別診断

木 藤 嘉 彦
神戸大学医学部小児科
成 田 奈緒子[1)]，西 尾 久 英[1)]，松 尾 雅 文[1)]
中 村 肇[1)]，八 若 博 司[2)]，中 島 敏 博[2)]
[1)] 神戸大学医学部小児科 [2)] 国立療養所兵庫中央病院小児科

目 的

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）と Becker 型筋ジストロフィー（BMD）はどちらも Xp21 上にある dystrophin 遺伝子の異常による遺伝性疾患である。

DMD と BMD の運動機能的予後，生命的予後は大きく異なるため，両者を鑑別することは臨床上非常に重要である。この鑑別のために，臨床経過および免疫組織化学染色や Western blot 法によるジストロフィン蛋白の検索が行われる。DNA レベルでは dystrophin 遺伝子の frame-shift の有無が DMD/BMD の表現型を決定すると考えられている（frame-shift 理論）[1)]。すなわち frame-shift があれば DMD, frame-shift がなければ BMD となる。frame-shift の決定は，従来 Southern blot 法により全 exon を検索した上で行われてきた[2)]。しか

し Southern blot 法は時間を要し放射性同位元素 (RI) を使用するためそれに応じた施設を必要とした。また，PCR を用いて frame-shift の検索をするにことはかえって煩雑で不可能とされてきた[3]。

今回私どもは迅速でしかも RI を使わずに行える PCR を用いて簡便に frame-shift の有無を決定できる方法を考案したので報告する。

対　象

DMD/BMD と臨床的に診断された97例のうち高頻度に欠失がみられる5つの exon (44,45,48,50,51) を PCR でスクリーニングし (4,5)，DMD 21例，BMD 3例に遺伝子部分欠失を認めた。

方　法

まず，dystrophin 遺伝子上に60以上存在する exon を3種に分類した。すなわち，各 exon の塩基対数を3の剰余系により分類した。3で割って割り切れる exon を type 0，1余る exon を type 1，2余る exon を type 2 とした。翻訳においては3つの塩基から1つのアミノ酸に置換されるので，遺伝子部分欠失の場合，type 0 の exon の欠失では後続の reading frame は変化しない。これを in-frame と呼び，後続のアミノ酸は正常と同一で，部分的に欠失している短いジストロフィン蛋白が合成される。しかし，type 1 または type 2 の exon が欠失すると reading frame は1塩基対または2塩基対ずつずれる。これを frame-shift と呼び，後続のアミノ酸配列は変異し，stop codon が出現して機能的なジストロフィン蛋白は合成されない (図1)。

また，複数の exon についても同様に考えられる。つまり，frame-shift の有無を決定するためには，type 1 および type 2 の exon のみを検索すればよい。type 0 の exon の有無は frame-shift の判定に影響しないからである。欠失と判定された一連の exon の type を調べその type 番号を足して3で除すると余りの数により欠失全体の type が判明する。type 0 なら in-frame となり，type 1 または2なら frame-shift となって frame-shift の有無が判定できる (図2)。

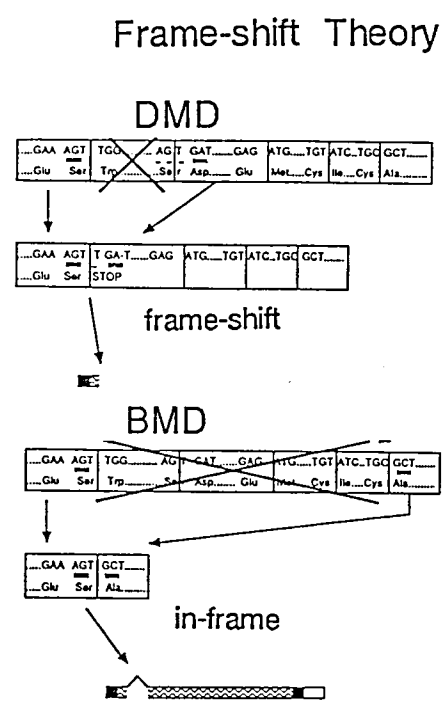


図1　(文献9より改変)

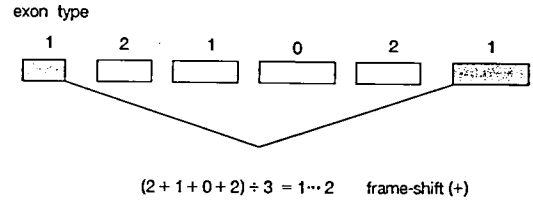


図2

患者より採取した血液 100 μl からフェノール抽出により template DNA を得て，PCR 法にて増幅を行った。増幅部位は，exon 43,46,50 52のうちそれぞれの例の必要に応じて行った。増幅した DNA 断片をアガロース電気泳動し，ethidium bromide にて染色し検出し，検出されなかった場合，欠失と判定した。欠失していた type 1，type 2 の exon について上述の方法に基いて欠失全体の type を調べ frame-shift の有無を判定した。

結　果

検索の結果，表1のように DMD 21例中20

表1 DETECTION OF FRAME-SHIFT IN DYSTROPHIN GENE

exon length (bp) exon type	43 173 2	44 148 1	45 176 2	46 148 1	48 186 0	50 109 1	51 233 2	52 118 1	number of cases	frame-shift
DMD 1	(+)	del	del	del	del	del	del	(+)	1	(+)
DMD 2	(+)	(+)	del	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	4	(+)
DMD 3	(+)	(+)	del	del	del	del	(+)	(+)	5	(+)
DMD 4	(+)	(+)	del	del	del	del	del	(+)	1	in-frame+
DMD 5	(+)	(+)	(+)	del	del	(+)	(+)	(+)	1	(+)
DMD 6	(+)	(+)	(+)	del	del	del	del	(+)	1	(+)
DMD 7	(+)	(+)	(+)	(+)	del	del	(+)	(+)	4	(+)
DMD 8	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	del	(+)	(+)	1	(+)
DMD 9	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	del	(+)	3	(+)
BMD 1	(+)	(+)	del	del	del	(+)	(+)	(+)	1	in-frame
BMD 2	(+)	(+)	del	del	(+)	(+)	(+)	(+)	1	in-frame
BMD 3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	del	del	(+)	1	in-frame

del: deleted exon　　+: inconsistent with frame-shift theory

例が frame-shift, 1例が in-frame, そしてBMD 3例中3例が in-frame となった。表現型と frame-shift の有無が合致したのは24例中23例（95.8%）であった。合致しないのはDMD の1例（4.2%）のみであった。

考　察

DMD/BMD の遺伝子診断はこれまで主に Southern blot 法を用いて行われてきた。それによると約 40-60% の患者に遺伝子部分欠失（deletion）がみられ[2)6)]，約 5～10% に重複（duplication）が見られている[7)]。

frame-shift 理論は1988年に Monaco らが提唱し[1)]，1989年 Koenig らが Southern blot 法を用いた DMD/BMD 273例の解析により92%の症例が表現型と合致していることを報告している[2)]。この frame-shift の有無を検出するためには，欠失範囲を決めれば決定できる。mRNA から蛋白への読み取りの際に3つの塩基に対して1つのアミノ酸が対応するので，欠失によって後続のコドンの読み取りがいくつずれるかさえ知ればよい。つまり，この3という点に着眼して欠失範囲の塩基対数が3で割り切れるか，1余るか，2余るかさえわかれば frame-shift の決定ができる。type 0 の exon（即ち，塩基対数が3の倍数）は frame-shift の有無の判定に影響を与えないので調べる必要はなく type 1 および 2 の exon についてのみ調べればよいことになる。しかも欠失範囲を明らかにするためには両断端を調べるだけでよいので，意外と早く決定できることに気付く。今回私どもは exon 44から51までの欠失高頻度部位において frame-shift の検索を行ったが，同様にして他の部位の欠失例についても行うことができる。

しかしこの方法の問題点をあげるとすれば次のことが考えられる。1つは Southern blot 法でもおこる問題だが，frame-shift 理論に一致しない例が 10% 未満の確率で存在することである。実際には翻訳の鋳型となるのは mRNA であるので，DNA レベルが frame-shift でも RNA レベルでは in-frame となる場合があるし，またその逆もありうる。従ってこのように DNA レベルでの reading frame と表現型とが一致しない場合には，mRNA レベルでの検索が必要となる。もう1つは PCR で行う場合は重複を検出できる例はまれと考えられるので欠失例しか適応できないことである。

PCR 法は，コンタミネーションによる偽陽性，反応不良による偽陰性が問題となる。これに対して，反応毎に陽性コントロール，陰性コントロールで常にチェックを心がけることが肝要であろう。また本法のように1つ欠失が見つかれば前後の exon を調べ，frame-shift の検

索をすることにより誤った遺伝子欠失診断を防ぐことができる。また，PCR 法は遠隔地の親族やすでに亡くなった家族に対しても濾紙血，毛髪，パラフィン切片を用いれば，家系検索を広げることが可能となる[8]。

これまでの DMD/BMD の遺伝子診断に対する PCR 法の応用は欠失の検出に終始していたが，本法によりさらに拡大することができ，表現型（DMD/BMD）の診断が可能となった。

参考文献

1）Monaco et al. Genomics **2**：90-95 (1988)
2）Koenig et al. Am. J. Hum. Genet. **45**：498-506 (1989)
3）Beggs and Kunkel J. Clin. Invest. **85**：613-619 (1990)
4）Nakajima et al. J. Neuro. **238**：6-88 (1991)
5）Kitoh et al. Am. J. Med. Genet. 42：453-457 (1992)
6）Sugino et al. Am. J. Med. Genet. **34**：555-561 (1989)
7）Xiuyuan et al. Am. J. Hum. Genet. **46**：682-695 (1990)
8）中島ら：日本先天代謝異常学会誌 **6**：2-114 (1990)
9）Hoffman and Kunkel Neuron 2：1019-1029 (1989)

PCR の臨床面

斎　藤　加代子
東京女子医科大学小児科

山　内　あけみ，池　谷　紀代子，佐久間　　泉
原　田　隆　代，福　山　幸　夫
東京女子医科大学小児科

はじめに

Polymerase chain reaction (PCR) 法は DNA の熱変性，プライマーのアニーリング，DNA ポリメラーゼによる伸長反応のサイクルの繰り返しにより，目的の DNA を10万-100万倍に増幅する方法である。増幅したい遺伝子領域，遺伝子のサイズは，プライマーを任意に選択し合成することにより，設定することができる。そして PCR により得られた反応液一遺伝子産物をアガロースゲル電気泳動にかけることにより，増幅した DNA を目的のサイズのバンドとして検出することができる。PCR 法により，近年の分子生物学は飛躍的に進歩したといえる。ウイルス感染症，癌遺伝子の研究と同様，遺伝子の塩基配列が明らかになっている遺伝病の遺伝子診断においても応用が可能である。

一方，ジストロフィン遺伝子にはエクソンが70以上存在し，Koenig ら[1]によると Duchenne 型 (DMD) および Becker 型筋ジストロフィー (BMD) 患者の104例中53例 (50%) にエクソンの欠失を認める。我々の検討でも，30例中16例 (53%) に認められた[2]。

これら，DMD, BMD では，Chamberlain らが，遺伝子欠失を短時間 (1-2日) で効率良くスクリーニングする方法一同時に6個の exon の欠失を調べる multiplex PCR 法一を開発した。さらに3個の exon を追加して，cDNA プローブを用いたハイブリダイゼーション法で同定される欠失の80%を同定可能であると述べた[3]。その後，Beggs ら[4]が，さらに9個の exon の multiplex PCR と1個の exon の PCR を追加して，遺伝子欠失の98%を証明可能であるとした。

本稿では，我々の研究室で行なっている方法と得られたデーターに基づき，DMD/BMD における PCR 法を用いた遺伝子異常の解析の実例をあげる。1）遺伝子欠失の同定，2）mRNA による保因者診断，3）筋組織の mRNA による転写解析について述べ，PCR 法の利点と限界，遺伝子診断のプロトコールについて言及する。

I．遺伝子欠失の同定

DMD 26家系，BMD 5家系のうち Southern blot 法により major hot spot に欠失を示した患者の DNA について PCR 法を行なった。exon 1-7 の欠失例では筋型プロモーターを調べた。

プライマーは Chamberlain ら[3]および Beggs ら[4]の報告に基づいて，また一部はジストロフィン遺伝子 cDNA の塩基配列[5]より，Applied Biosystems DNA synthesiser, model 381A にて作成した。

我々の行なった multiplex PCR では，major hot spot における複数の exon を同時にチェックする4種類の primer set を用いた。primer

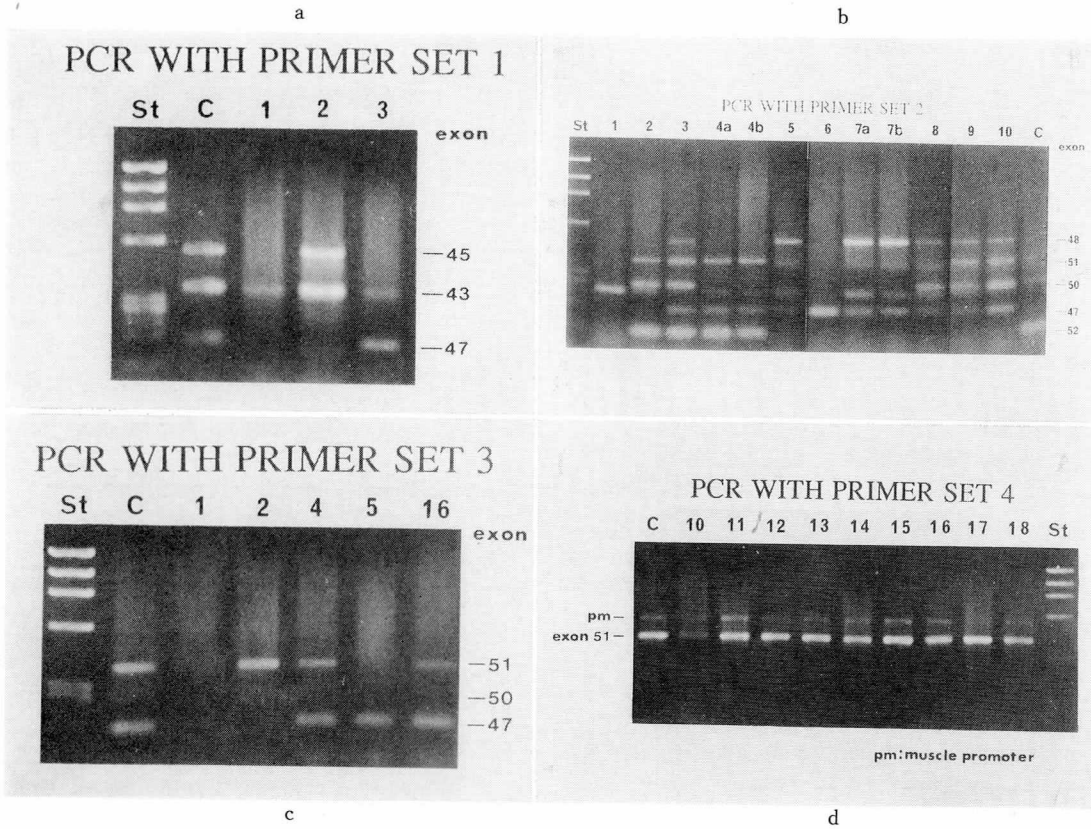


図1 DMD/BMD の遺伝子診断における PCR 法。
a．コントロール（C）および DMD 患者（1-3）のリンパ球由来の DNA において exon 43, 45,47 について，PCR 法により調べた。
b．DMD (1,3-10), BMD (2) 患者では exon 47, 48,50,51,52について PCR 法を行なった。
c．DMD (1,4,5,16), BMD (2) 患者では exon 47,50,51について PCR 法を行なった。
d．DMD (10-18) 患者のリンパ球 DNA について PCR 法により筋型プロモーターを調べた。PCR がうまく行なわれているか調べるために，同時に exon 51 を増幅した。

set 1-3 では exon 43-52 を，primer set 4 では筋型プロモーターを調べた。exon 53，exon 54 はそれぞれ single PCR を行なった。

図 1 a に示すように，症例 1 では exon 45, 47 の欠失を示す。症例 2 は exon 47 の，症例 3 は exon 45 の欠失を示す。

図1b の primer set では exon 47, 48, 50, 51,52を10家系に関して調べた。症例4a, 4b, 症例7a, 7b はそれぞれ兄弟例である。

症例 1 について，exon 47,50,51 に関しては，図1c に示すようにすべて欠失していた。exon 53は，症例 1 では存在しており，これらの PCR の結果より，欠失の範囲は exon 45-52 と考えられる。Southern blot 法の結果も，症例 1 では exon 45-52 の欠失があり，PCR 法の結果と一致した。

このように PCR 法の結果と Southern blot 法の結果はほぼ一致したが junctional fragment を有する 1 例が例外だった。症例 5 の multiplex PCR では図1bのように exon 48 のバンドが認められた。ところが，Southern blot 法では，exon 48 に相当する 11 kb のシグナルはなく，16 kb の新たなシグナルの出現を患者とその母親に認めた（図 2）。これは症例 5 において，exon 48 と49の間のイントロン内の制限酵素切断部位が欠失により変化して，exon 48 は Southern blot 法の 16 kb のシグナルとして示されていると推定される。

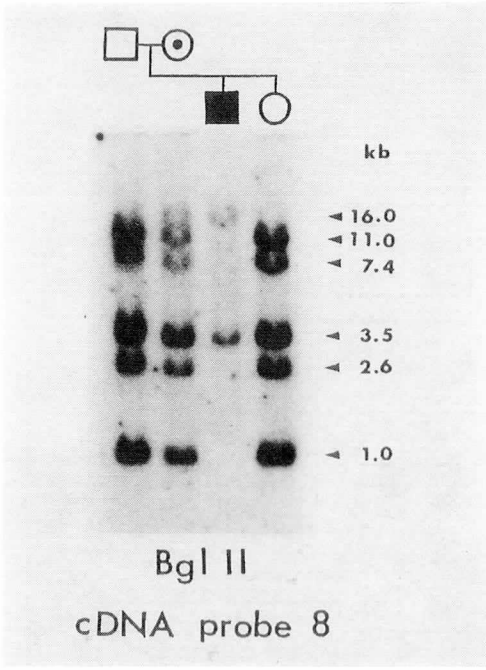


図2 DMD (5) の家族のリンパ球 DNA について cDNA プローブ8を用いて Southern blot 法を行なった。

exon 1-7 の欠失を示す例（症例17）と全領域で欠失を全く示さない Duchenne 型（症例11-16,18)について，筋型プロモーターを PCR によって調べたところ，図1d のように症例17では筋型プロモーターが欠失していることがわかった。

II. mRNA による保因者診断

分子遺伝学的手法を用いた保因者診断法としては，cDNA プローブを用いた Southern blot 法で gene dose を調べる方法，junctional fragment を検出する方法，ここに述べる mRNA の nested PCR 法，pERT 87 やXJ などを用いた RFLP による方法，CA repeats の多型解析がある。遺伝子欠失が証明されている症例については，以下に述べる mRNA の nested PCR 法は有効な方法である。

Roberts ら[6] によると，500-1000個のリンパ球あたり，1コピーのジストロフィン mRNA が存在することを利用して，PCR で2回増幅することにより分析可能な量の産物が得られ，この方法を nested PCR と言っている。ここで

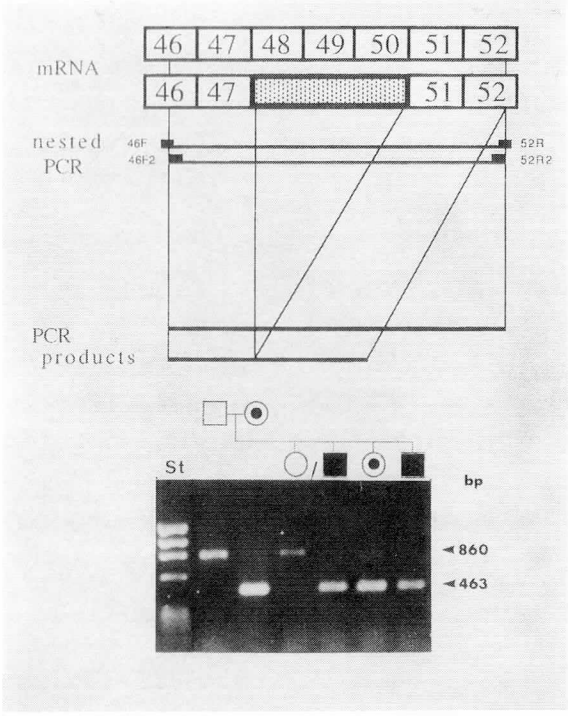


図3 nested PCR 法によるリンパ球由来 mRNA を用いた保因者診断。

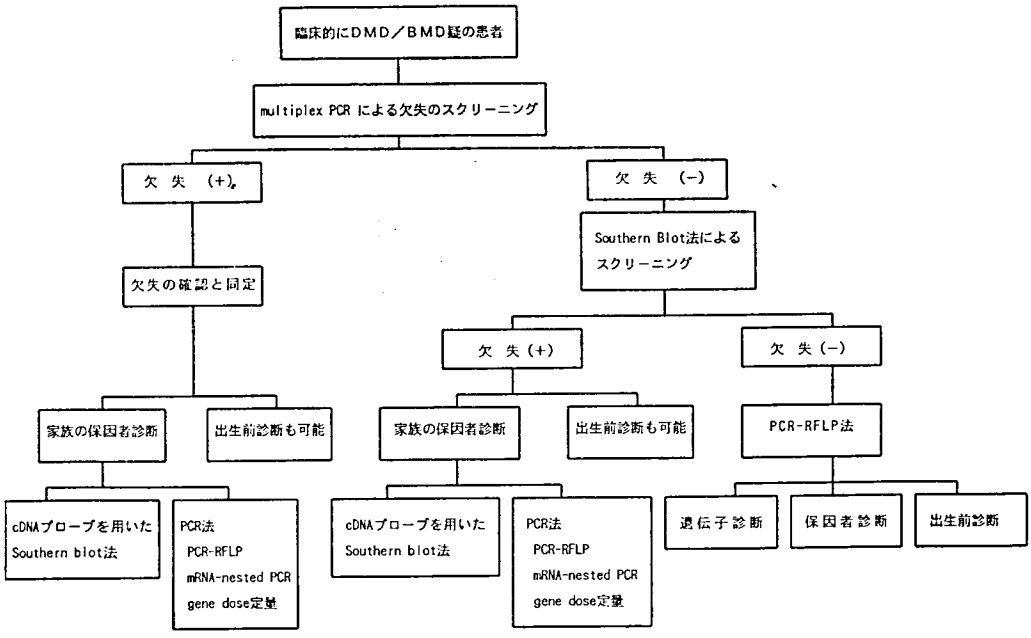


図4 DMD/BMD の遺伝子診断のすすめ方

は，図3のようにリンパ球より調製した RNA について，exon 46 の塩基配列の一部を forward primer (46F), exon 52 の塩基配列の一部を reverse primer (52R) として，1回目の PCR をおこなった。その PCR 産物について 46F の3'側と 52R の5'側を，2回目の PCR のそれぞれ forward primer (46F2), reverse primer (52R2) として増幅した。患者では，PCR 産物は正常より欠失しているエクソンのサイズだけ短いサイズになる。保因者では，PCR 産物は正常サイズと欠失によって短くなったサイズの2本のバンドで示される。この家系では，患者は欠失により463 bpのバンドのみが認められた。長女は正常サイズ860 bpのバンドのみであり，非保因者と判定した。次女では両方のバンドが認められ，保因者と判定した。母親は異常サイズのバンドのみ認められ，正常 mRNA を検討中であるが保因者と判定した。この結果は，cDNA プローブを用いた Southern blot で gene dose によって判定した保因者，非保因者の結果[2]と一致していた。

III. 筋組織の mRNA による転写解析

生検筋組織由来の mRNA から cDNA を合成し，増幅することによって，DMD 遺伝子の転写について調べることができ，その臨床応用もされはじめている。我々は exon 10-37 の遺伝子欠失を有する1例で，exon 9 と exon 38 の一部の塩基配列から，それぞれ forward primer と reverse primer として，合成 oligonucleotide primer を作製し，患者筋生検組織由来の mRNA から cDNA を合成し，PCR にて増幅し，PCR 産物を M13 mp 19 ベクターにてサブクローニングしてその塩基配列を調べた。その結果，塩基番号 1168 番の G（グアニン）が 5534番のGに直接つながっている，即ち，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4）。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，reading frame を保持していることを塩基レベルでも証明できた[7]。

IV. PCR 法の利点と限界そして遺伝子診断のプロトコール

PCR 法には，1）非放射性検査であるため，医療廃棄物の問題が少なく扱いやすい，2）結果が迅速に得られる，3）塩基配列の一部が明

らかであれば増幅可能である，4）塩基配列の同定など研究面で発展させることができる，などの利点がある。先に述べたように，Chamberlain ら[3]，Beggs ら[4] は数ケ所の exon の欠失を同時に検索する multiplex PCR 法を発表し，これは臨床応用に有効な方法である。しかし一方，PCR 法には，1）人工産物が入る可能性がある-false positive，2）求める領域が増幅されないことがある-false negative，3）定量性が困難である，などの欠点，限界もある。今回，我々が PCR 法と Southern blot 法の結果を比較したところ，Southern blot 法で junctional fragment を呈した1例では PCR の結果と合致しなかった。従って，DMD/BMD の遺伝子診断の手順としては，図4のように PCR 法を欠失のスクリーニングとして応用すること，保因者診断は PCR 法，Southern blot 法，CA repeat の多型解析などの方法によって結果の再現性を確認することが必要であると考える。

文　献

1）Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, et al: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell **50**: 509-517, 1987

2）Saito K, Ikeya K, Yamauchi A, et al: Molecular genetic analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy families. In: Fukuyama Y, et al., eds. Fetal and Perinatal Neurology, Basel, Karger, pp. 46-59, 1992.

3）Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al: Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds): PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, New York, London, pp 272-281, 1990

4）Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, et al: Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet **86**: 45-48, 1990

5）Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM: The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell **53**: 219-228, 1987

6）Robarts RG, Bentley DR, Barby TFM, et al: Direct diagnosis of carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy by amplification of lymphocyte RNA. Lancet 336, 1523-1526, 1990

7）Ikeya K, Saito K, Hayashi K et al: Molecular genetic and immunological analysis of dystrophin of a young patient with X-lined muscular dystrophy. Am J Med Genet (In press)

平成３年度　運営の経過

○平成３年４月30日　精神・神経疾患研究委託費分担研究申請書を国立精神・神経センターへ提出

○平成３年７月18日　平成３年度ワークショップ　於：日本都市センター
第１回幹事会開催

○平成３年８月30日　精神・神経疾患研究委託費事業計画書を国立精神・神経センターへ提出

○平成３年９月12日　精神・神経疾患研究委託事業の契約締結

○平成３年10月11日　研究班会議演題および抄録提出締切

○平成３年10月７日　分担研究費配分（90%）

○平成３年11月25日　平成２年度研究班会議（第１日）　於：日本都市センター
第２回幹事会開催

11月26日　研究班会議（第２日）　プロジェクト打ち合せ
班員会議開催

○平成３年１月23日　筋ジス研究班総合班会議　於：日本都市センター

○平成４年１月24日　研究報告書原稿提出締切

○平成４年１月28日　分担研究費配分（10%）

○平成４年２月７日　精神・神経疾患研究委託費評価部会
於：はあといん乃木坂

○平成４年２月28日　収支決算報告書提出締切

○平成４年４月10日　精神・神経疾患研究委託事業実績報告書および収支決算報告書を国立精神・神経センターへ提出

平成３年度　厚生省精神・神経疾患研究委託費

筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究班（筋ジス第３班）組織図

顧　問
- 祖父江逸郎
- 井形　昭弘
- 西谷　　裕
- 三吉野産治
- 近藤喜代太郎

班　長
- 高橋　桂一

幹　事
- 福山　幸夫
- 檜澤　一夫
- 斎田　恭子
- 南　　良二
- 姜　　進
- 石原　傳幸
- 堀川　博誠（運営幹事）

監　事
- 高柳　哲也

事務局
- 片岡　　護
- 大谷美智代

			プロジェクト・リーダー
Ⅰ 遺伝・疫学	A	疫学・データベース	南　良二°　福永　秀敏°　松岡　幸彦　鴻巣　武
	B	遺伝相談・遺伝子診断	福山　幸夫°　鈴木　義之　金沢　一　三木　哲郎（近藤喜代太郎）
Ⅱ 臨床病態	A	画像診断	石原　傳幸°　山田　広樹
	B	臨床・病態生理	高柳　哲也°　松家　豊
	C	生化学・内分泌	松永　宗雄°　林　恭三　島　功二
	D	先天性筋ジストロフィー	福山　幸夫°（三吉野産治）
Ⅲ 病理	A	剖検例集積	檜澤　一夫°　向山　昌邦
	B	ジストロフィン関連	三池　輝久°　斎田　恭子
Ⅳ 治療	A	評価法と治療法の開発	姜　　進°　木下　真男

° 印：プロジェクト責任者

アンダーライン：国立療養所所属

課題番号　2指—3　筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究　平成3年度班構成員名簿

課題番号	区　分	氏　名	所　属	郵便番号	住　所	電話番号	内線	職名
2指-3-01	主　任	高橋桂一	国立療養所兵庫中央病院	669-13	兵庫県三田市大原1314	0795-63-2121	201	副院長
2指-3-02	分担(幹事)	福山幸夫	東京女子医科大学小児科	162	東京都新宿区市ケ谷河田町8−1	03-3353-8111	37308	教　授
2指-3-03	分担(監事)	高柳哲也	奈良県立医科大学神経内科	634	奈良県橿原市四条町840	07442-2-3051	3416	教　授
2指-3-04	分担(幹事)	檜澤一夫	徳島大学医学部第一病理学	770	徳島市蔵本町3−18−15	0886-31-3111	2230	教　授
2指-3-05	分担(幹事)	斎田恭子	国立療養所宇多野病院	616	京都市右京区鳴滝音戸山町8	075-461-5121	284	医　長
2指-3-06	分担(幹事)	南　良二	国立療養所八雲病院	049-31	北海道山越郡八雲町宮園町128	01376-3-2126	201	院　長
2指-3-07	分担(幹事)	姜　進	国立療養所刀根山病院	560	大阪府豊中市刀根山5−1−1	06-853-2001	181	医　長
2指-3-08	分担(幹事)	石原傳幸	国立療養所東埼玉病院	349-01	埼玉県蓮田市大字黒浜4147	048-768-1161	212	副院長
2指-3-09	分担(運営幹事)	堀川博誠	国立療養所兵庫中央病院神経内科	669-13	兵庫県三田市大原1314	0795-63-2121		医　長
2指-3-10	分　担	坂井英一	国立療養所道北病院	070	北海道旭川市花咲町7	0166-51-3161	360	院　長
2指-3-11	分　担	島　功二	国立療養所札幌南病院神経内科	061-22	北海道札幌市南区白川1814	011-596-2211	403 410	医　長
2指-3-12	分　担	舘　延忠	札幌医科大学小児科	060	北海道札幌市中央区南一条西十六丁目	011-611-2111	3415	講　師
2指-3-13	分　担	五十嵐勝朗	国立療養所岩木病院	038-13	青森県南津軽郡浪岡町大字女鹿字平野155	0172-62-4055	210	副院長
2指-3-14	分　担	松永宗雄	弘前大学医学部付属脳卒中研究施設	036	青森県弘前市在府町5	0172-33-5111	2283	教　授

課題番号	区　分	氏　　名	所　　属	郵便番号	住　　所	電話番号	内線	職名
2指-3-15	分　担	鴻　巣　　武	国立療養所 西多賀病院神経内科	982	仙台市釣取字紅堂	022-245-2111	214	医　長
2指-3-16	分　担	山　田　広　樹	国立療養所 下志津病院神経内科	284	千葉県四街道市鹿渡934－5	0434-22-2511	216	医　長
2指-3-17	分　担	保　住　　功	国立療養所新潟病院神経内科	945	新潟県柏崎市赤坂町3－52	0257-22-2126	259	医　長
2指-3-18	分　担	白　井　泰　子	国立精神・神経センター 精神保健研究所	272	千葉県市川市国府台1－7－3	0473-72-0141	1333	室　長
2指-3-19	分　担	木　下　真　男	東邦大学医学部第四内科	153	東京都目黒区大橋2－17－6	03-3468-1251	3324	教　授
2指-3-20	分　担	片　山　　進	東邦大学医学部産婦人科	143	東京都大田区大森西6－11－1	03-3762-4151	2586	助　手
2指-3-21	分　担	春　原　経　彦	国立精神・神経センター 武蔵病院放射線科	187	東京都小平市小川東町4－1－1	0423-41-2711	3511	部　長
2指-3-22	分　担	廣　瀬　和　彦	東京都立神経病院	183	東京都府中市武蔵台2－6－1	0423-23-5111	3202	副院長
2指-3-23	分　担	鈴　木　義　之	東京都臨床医学総合研究所	113	東京都文京区本駒込3－18－22	03-3823-2101	5103	副所長
2指-3-24	分　担	加　藤　真　吾	慶応大学医学部微生物学	160	東京都新宿区信濃町35	03-3353-1211	2693	助　手
2指-3-25	分　担	村　上　慶　郎	国立療養所箱根病院	250	神奈川県小田原市風祭412	0465-22-3196		院　長
2指-3-26	分　担	本　家　一　也	国立療養所医王病院小児科	920 -01	石川県金沢市岩手町2－73	0762-58-1180	137	医　長
2指-3-27	分　担	矢　嶋　茂　裕	国立療養所長良病院	502	岐阜市長良1291	0582-32-7574	215	医　師
2指-3-28	分　担	林　　恭　三	岐阜薬科大学分子生物学教室	502	岐阜市三田洞東5－6－1	0582-37-3931	318	教　授
2指-3-29	分　担	間　野　忠　明	名古屋大学環境医学研究所 高次神経統御部門	464	名古屋市千種区不老町	052-781-5111	5922	教　授

課題番号	区　分	氏　　名	所　　属	郵便番号	住　　所	電話番号	内線	職名
2指-3-30	分　担	松岡幸彦	名古屋大学医学部神経内科	466	名古屋市昭和区鶴舞町65	052-741-2111	2316	助教授
2指-3-31	分　担	佐橋　功	愛知医科大学内科学第4	480-11	愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21	05616-2-3311	2176	助教授
2指-3-32	分　担	向山昌邦	国立療養所中部病院臨床研究部	474	愛知県大府市森岡町源吾36－3	0562-46-2311	260	部　長
2指-3-33	分　担	酒井素子	国立療養所鈴鹿病院研究検査科	513	三重県鈴鹿市加佐登町658	0593-78-1321	302	科　長
2指-3-34	分　担	秋口一郎	京都大学医学部神経内科	606	京都市左京区聖護院川原町54	075-751-3771		助教授
2指-3-35	分　担	三木哲郎	大阪大学医学部第4内科	553	大阪市福島区福島1－1－50	06-451-0051	2248	講　師
2指-3-36	分　担	乾　幸治	大阪大学医学部小児科	553	大阪市福島区福島1－1－50	06-451-0051	2336	講　師
2指-3-37	分　担	松尾雅文	神戸大学医学部小児科	650	神戸市中央区楠町7－5－1	078-341-7451	5722	講　師
2指-3-38	分　担	吉岡三恵子	神戸市立中央市民病院小児科	650	神戸市中央区港町中町4－6	078-302-4321	268	医　長
2指-3-39	分　担	岩垣克己	国立療養所西奈良病院	630	奈良市七条町西浦786	0742-45-4591		院　長
2指-3-40	分　担	笠木重人	国立療養所松江病院小児科	690	島根県松江市上乃木町483	0852-21-6131		医　長
2指-3-41	分　担	亀尾　等	国立療養所原病院	738	広島県廿日市市原926－1	0829-38-0111	200	院　長
2指-3-42	分　担	畑野栄治	広島大学医学部整形外科	734	広島市南区霞1－2－3	082-251-1111	2915	講　師
2指-3-43	分　担	松家　豊	国立療養所徳島病院	776	徳島県麻植郡鴨島町敷地1354	0883-24-2161	200	院　長
2指-3-44	分　担	松田　博	愛媛大学医学部小児科	791-02	愛媛県温泉郡重信町志津川	0899-64-5111	2119	教　授

課題番号	区　分	氏　　名	所　　属	郵便番号	住　　所	電話番号	内線	職名
2指-3-45	分　担	岩下　宏	国立療養所筑後病院	833	福岡県筑後市大字蔵数515	0942-52-2195	201	院　長
2指-3-46	分　担	金沢　一	国立療養所川棚病院神経内科	859-36	長崎県東彼杵郡川棚町下組郷2005－1	0956-82-3121	211	医　長
2指-3-47	分　担	寺本仁郎	国立療養所再春荘病院内科	861-11	熊本県菊池郡西合志町大字須屋2659	096-242-1000		医　長
2指-3-48	分　担	三池輝久	熊本大学医学部小児発達学教室	860	熊本市本荘1－1－1	096-344-2111	5891	教　授
2指-3-49	分　担	三宮邦裕	国立療養所西別府病院	874	大分県別府市大字鶴見4548	0977-24-1221	242	医　長
2指-3-50	分　担	井上謙次郎	国立療養所宮崎東病院	880	宮崎市大字田吉4374－1	0985-56-2311	200	院　長
2指-3-51	分　担	福永秀敏	国立療養所南九州病院神経内科	899-52	鹿児島県姶良郡加治木町木田1882	0995-62-2121	201	副院長
2指-3-52	分　担	大城盛夫	国立療養所沖縄病院	901-22	沖縄県宣野湾市字我如古867	098-898-2121	251	院　長
	研究協力	斉藤浩太郎	国立療養所道川病院	018-13	秋田県由利郡岩城町内道川井戸ノ沢84－40	0184-73-2002	10	院　長
	顧　問	祖父江逸郎	愛知医科大学	480-11	愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21	05616-2-3311		学　長
	顧　問	井形昭弘	鹿児島大学	890	鹿児島市群元1－21－24	0992-54-7141	2000	学　長
	顧　問	西谷　裕	国立療養所宇多野病院	616	京都市右京区鳴滝音戸山町8	075-461-5121	200	院　長
	顧　問	近藤喜代太郎	北海道大学医学部公衆衛生学教室	060	北海道札幌市北十五条西七丁目	011-746-4605		教　授
	顧　問	三吉野産治	国立療養所西別府病院	874	大分県別府市大字鶴見4548	0977-24-1221	200	院　長

厚生省精神・神経疾患研究委託費
筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究　平成３年度研究報告書

発行日　平成４年３月25日
発　行　厚生省精神・神経疾患研究委託費
筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究班
兵庫県三田市大原1314
国立療養所兵庫中央病院
班長　高　橋　桂　一
印刷所　進行印刷出版株式会社