

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3年度研究報告書

平成4年3月(1992年)

## 研究報告書の作成にあたって

平成3年は、本研究班発足以来第2年目に当る。初年度の本研究班の研究成  
果は、評価委員会において高い評価を受けたとの知らせを聞きおよび、班長と  
して誠に喜びに耐えない。この機会をかりて研究班員の各位に心から感謝を申  
し上げたい。

本研究班の第2年目の班会議は、平成3年12月6日(金)～7日(土)の2日間、東  
京 全共連ビルで行われた。すでに本研究班の発足時にかかげた、5つの基本戦  
略、すなわち、1) gene の構造上の欠陥 (defect) と変異の有無、2) 遺伝子  
から産生される protein product の正常と異常、3) 細胞障害の病態生理機構、  
4) 臨床上の phenotype、および5) phenotype に影響を与える治療法の開  
発、に向かっての努力がなされ、実りある成果が発表された。

筋ジストロフィーでは、ジストロフィン欠失部位と臨床像との対比、mdx を  
用いての筋の壊死、再生機構ならびに分解酵素の役割、dantrolene sodium を  
用いた治療効果と、myoblast の移植の検討などについての報告がなされた。  
ミトコンドリア脳筋症では、変異ミトコンドリア DNA の解析と臨床的多様性、  
および MERRF や MELAS の組織障害機構などが検討された。以上の2年度  
の研究成果は、初年度と比較して目標に向かって一段と掘り下げる試みがなさ  
れたという印象を受けた。

本研究班としては、今後とも遺伝子、蛋白異常、細胞障害の病態生理ならび  
に臨床との対比を検討し、終局的には遺伝子治療を含めた治療法の開発を求め  
て、最大限の努力を続けて行きたいと希望している。班員各位の一層の御精進  
を御願ひしたい。

おわりに、本研究に対し、終始懇切な御指導を賜った国立精神・神経センターの里吉榮二郎総長、杉田秀夫所長および事務局の方々、また厚生省保健医療局国立療養所の方々に深甚の謝意を表す。また日本筋ジストロフィー協会、河端静子氏の御支援に感謝する。

平成4年3月

〈班長〉 荒 木 淑 郎

## 目 次

平成3年度総括研究報告	7
平成3年度総合班会議研究報告抄録	19
分担研究報告	29
I. 臨床・病理	37
II. ジストロフィン (No. 1)	65
III. シストロフィン (No. 2)	85
IV. mdx マウス	99
V. 遺伝子・生化学	127
VI. ミトコンドリア脳筋症 (No. 1)	167
VII. ミトコンドリア脳筋症 (No. 2)	227
平成3年度研究班名簿	263

平成 3 年度

総括研究報告

# 総括研究報告

主任研究者 荒木 淑郎

## 研究目標

本研究班の研究目標は、“筋ジストロフィーおよび関連疾患を対象として、成因の解明と治療法の開発を行うこと”である。関連疾患として、本班としては、初年度に引きつづき、とくにミトコンドリア脳筋症をとりあげていくことにした。初年度（平成2年）の研究班発足以来、班の構成は、班長のほか、37名の班員と、3名の顧問、計41名である。

第2年目の研究戦略は、次のテーマに焦点をしばった。

### I 筋ジストロフィー

- 1 ジストロフィン
- 2 遺伝子と生化学
- 3 mdx マウス
- 4 治療

### II ミトコンドリア脳筋症

## 研究成果

### I 筋ジストロフィー

#### 1 筋ジストロフィーとジストロフィン

ジストロフィンは、3,685個のアミノ酸配列を有し、大きさ427kdの巨大蛋白質で、4つのdomainを有し、全sarcolemmal proteinの1～5%、全細胞蛋白質の0.01%を占めている。plasma membraneの内側に対してintramembranous glycoproteinを介して強く密着しており、機能的には、骨格筋線維の表面膜に対して構造上安全性を保つための細胞骨格蛋白質の役目をなしている。このジストロフィン蛋白質は、筋ジストロフィーの各病型において検討が加えられ、すでに初年度において各病型での発現様式は明らかにされた。

2年目の研究を紹介する。

- 1) 齊藤、池谷ら（東女医大小児科）は、Becker型筋ジストロフィー（BMD）

2例につき分子遺伝学的検討を行い、リンパ球由来のDNAで、exon45~49の欠失をもつ症例は、exon45~47の欠失をもつ症例と比較して、筋肉痛の訴えが著明であることを認めている。

2) 後藤, 波多江ら(九大神経内科)は、運動時筋痛と高CK血症を呈する症例の生検筋で、ジストロフィン含量の低下を認め、さらに末梢白血球のDNAを分析し、ジストロフィン exon45を含む部分の欠失を認めている。

3) 内野ら(国立療養所再春荘神経内科)は、低IQを示したDMD患者の剖検臓器について、ジストロフィンの発現様式をしらべた。また、16例のBMDの生検筋についても検討を加え、ジストロフィンは、DMDの脳で欠如しており、DMDの知能障害に、脳型ジストロフィンの異常が関与していることを示した。

4) 清水, 砂田ら(東大神経内科)は、7例のmyotubular myopathyの生検筋でジストロフィンの発現を検討し、7例とも約400kdの正常サイズのジストロフィンが発現していることを認めた。しかし生後1ヶ月の重症例では、少数のジストロフィン陰性線維が散在性にみられたと報告した。

5) 荒畑, 有川ら(国立精神・神経センター)は、ジストロフィン分子のC末端ドメインが保たれているにもかかわらず、非常に早期に重篤な臨床症状と経過を示した小児(2歳10ヶ月男)を報告した。ジストロフィンのN末端側の部分に対する抗体では、ジストロフィンは全く染色されず、今後、N末端側の臨床的重要性を見直す必要性をのべた。

6) 濱田, 塩坂ら(宮崎医大衛生学)は、ジストロフィンおよびそのファミリーに属するスベグトリン, アンキリンその他の膜固有蛋白質について、DMD赤血球膜を中心に、生理的機能を検討した。

7) 小林, 宮武ら(東京医歯大神経内科)は、ジストロフィンの局在と機能について検討し、ジストロフィンは、成熟骨格筋では、細胞膜直下でfilamentous networkを形成し、actin-like filamentと結合することを明らかにした。

## 2 筋ジストロフィーの遺伝子と生化学

1) 高守, 安川ら(金沢大神経内科)は、骨格筋特異的遺伝子発現に関するカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)について検討した。筋の決定, 分化因子としてMyoD1, Myogeninを、また筋特異的遺伝子として, CK, MLC1(ミオシン軽鎖1), MHC(ミオシン重鎖)をとりあげ、MyoD1とCKを除いてそ

の発現を証明した。遺伝子発現に CGRP は影響を与えないことを認めた。

2) 斉藤, 福山ら (東女医大小児科) は, DMD と BMD の遺伝子診断において, cDNA プローブを用いた Southern blot 法と PCR 法の結果を比較検討した。1 家系において, リンパ球由来 mRNA を用いた PCR により, 家系内の女性の保因者, 非保因者を明らかにした。

3) 荒畑ら (国立精神・神経センター) は, ジストロフィン関連遺伝のクローニングの重要性を考慮し, 遺伝子単離, degenerate PCR, サブクローニング, シークエンシングでの塩基配列の決定からコンピューター解析を試み, 144 個のクローニングを検索し,  $\alpha$ -アクチニン,  $\beta$ -スペクトリンの他に 17 個の不明のシークエンスを見出している。

4) 川井, 三ツ井ら (徳島大第一内科) は, DMD, ALS および非神経筋疾患患者を対象として, ミオグロビン (Mb)mRNA の局在と定量について検討した。MbmRNA の発現部位は病変にかかわらず大差はなく, MbmRNA 量は DMD 筋では高度萎縮筋以外は増加しており, Mb の生成を促進し細胞代謝障害を少なくしているとの所見が認められた。

5) 庄司ら (信州大第三内科) は, 動脈結紮による筋萎縮は, 速筋で強く, 湿重量当りの glucose uptake は, 速筋と遅筋とでは異なり, 速筋においてのみ有意な増加がみられた。

6) 木南ら (順大第一生化学) は, 筋細胞膜の変性・壊死に伴うリソゾームプロテアーゼの増加は, 筋細胞内の自食作用—リソゾーム内蛋白分解の異常に基づく場合と, 浸潤してきたマクロファージ由来のプロテアーゼによる場合があることに着目して検討し, 今回は, 細胞成分を取り囲みながら形成されるオートファゴゾーム膜は ER 由来であることを報告した。

7) 後藤, 笹ヶ迫ら (九大神経内科) は, 実験的に壊死筋を作成し, その再生の過程で, 塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) が, どのように発現されるかを, 免疫組織染色を用いて検討した。その結果, 筋壊死が強く, 細胞浸潤の著しい段階で, bFGF が局所時に増加している所見を認めた。これらは endomysium 中に貯蔵されている他, 浸潤した貪食細胞や活性化した筋衛星細胞に由来する可能性が示唆された。

8) 小林, 亀田ら (東京医歯大神経内科) は, ヒト成人骨格筋衛星細胞由来の培養筋細胞において, 神経支配によるミオシン重鎖 (MHC) isoform に対する

影響を検討し、adult slow MHC isoform の発現に神経支配の重要な役割を明らかにした。

9) 堀ら (東京都神経科学総合研神経生化学) は骨格筋筋原線維の C 蛋白質分解酵素の局在についてしらべ、骨格筋に特異的に存在していることを明らかにした。C 蛋白質は、骨格筋の AL 帯にあり、actin と myosin の間に介在しており、この蛋白質の分解がおこると、筋原線維の構造の安定性が弱まり、崩壊死へ進むとの見解を述べた。

10) 杉村、伊藤ら (名大神経内科) は、筋緊張性ジストロフィー (MyD) の IgG の糖鎖構造についてしらべ、MyD の血清 IgG の低下は、ガラクトース転移酵素の機能不全による糖鎖構造の変化が関与していることを報告した。

### 3 mdx を用いた病態の検討

mdx mice は、1984年に開発され、ジストロフィン遺伝子に点変異があり、exon 25での stop codon をおこすことが明らかにされている。またジストロフィン は、骨格筋線維と心筋細胞には欠失しており、ヒトの DMD と異なり、筋線維に再生像がみられ、筋壊死に対し再生線維の抵抗性がみられている。

本研究班の病態に関する研究は少ない。

1) 田辺、水野ら (東京都立神経病院神経内科) は、運動負荷と筋変性との関係をしらべ、mdx マウスでは、運動自体が筋変性を促進することを見出した。

2) 栗原、岸ら (東邦大第四内科) は、mdx を用いて電氣的病態と薬物治療、筋活動電位の分析とミオトニーの数理解析を行った。ヒトと先天性のヤギのミオトニーの発現には Na channel 異常や Cl conductance の低下など多くの要因の関与があることを報告した。

3) 吉田ら (国立精神・神経センター) は、mdx マウス胎仔骨格筋の膜電位依存性カルシウムチャンネルについてしらべ、カルシウムイオンが筋細胞内に流入するにあたり、カルシウムが徐々に蓄積する結果、筋細胞の壊死がおこるといふ考えを明らかにした。

4) 若山ら (昭和大藤が丘病院神経内科) は、抗ジストロフィン抗体修飾骨格筋標本について QDR (quick freeze, deep etch. rotary shadow) 法による replica 膜を作製し、ジストロフィン分子を観察した。細胞膜内表面にはビオチン化抗体で修飾されたジストロフィン分子の存在が電顕で確認された。

## 4 治 療

最近では、ジストロフィー筋線維内へ正常ジストロフィン遺伝子のコピーを導入する試みが行われている。その方法は myoblast transfer と gene transfer である。また corticosteroid が試みられている。わが国では、gene therapy はまだ行われていない。mdx マウスを用いて、dantrolene sodium を投与した実験的治療と正常 myoblast の注射に関する 2 つの発表があった。

1) 高木ら (虎の門病院神経内科) は、dantrolene sodium の効果について報告した。Dantrolene sodium には、骨格筋の興奮・収縮連関に直接作用して収縮力を減弱させる作用が認められている。Dantrolene sodium を mdx マウスに投与した結果、血清 CK 値と筋の組織変化は、投与群と非投与群との間に差はみられず、mdx 筋小胞体からの Ca イオン漏出亢進もおこらなかったことを述べた。

2) 寺尾ら (帝京大神経内科) は、正常 myoblast を mdx マウス筋に注射し、ジストロフィン陽性線維の数を目標に、ジストロフィー筋の正常化をしらべてきたが、今回は、拒絶反応を防ぐ目的で放射線処理を行った mdx マウスの長指伸筋に myoblast を注射し影響をしらべた。ジストロフィン陽性線維の出現率は、1 回注射群で 2.0%、3 回注射群で 2.9% となり、若干の増加が認められた。

## II ミトコンドリア脳筋症

最近、ミトコンドリア遺伝子の異常によるミトコンドリア脳筋症の研究は、めざましい進展をみせている。初年度の研究成果で示された如く、本研究班の班員によって MERRF では tRNA<sup>Lys</sup>(8344)、および MELAS では tRNA<sup>Leu</sup>(3243) の点突然変異が発見されたことは、国際的な業績として高く評価をうけている。本年度は、ミトコンドリア脳筋症に関して、次の如く活発な研究活動がみられた。

1) 福原ら (国立療養所犀潟病院神経内科) は、MELAS と糖尿病の合併について検討し、KSS より合併頻度は少ないが、女性で、10~30 歳台の発症が多く、原因としてインスリン分泌低下の可能性をのべた。

2) 福原ら (同上) は、筋生検でミトコンドリア異常を示さない MERRF の症例を検討した結果、MERRF には、筋萎縮が末期まで明らかでない例、ragged-red fiber のない例、胸鎖乳突筋や肩甲帯に筋萎縮のつよい例があることを認

め、mtDNA の分析なくしては、MERRF を否定できないものがあることを報告した。

3) 後藤、松岡ら (国立精神・神経センター) は、ミトコンドリア脳筋症における血管病変として SSV (strongly SDH-reactive blood vessels) の有無をしらべ、MERRF では高頻度に SSV が存在し、また同じ SSV でも、MELAS と MERRF とでは、その CCO (cytochrom c oxidase) 活性が異なることを明らかにした。

4) 田中ら (新潟大神経内科) は、MERRF の選択的な組織障害の機構を明らかにするため、組織の障害程度と電子伝達系酵素各 complex の発現比および変異遺伝子の存在比との相関をしらべた。結果は、いずれも相関は認められず、本症の組織障害は変異 mtDNA の多寡、組織のエネルギー代謝の高低のみでは説明できないと報告した。

5) 垂井ら (大手前病院) は、ミトコンドリア脳筋症について、筋運動時のプリン・尿酸代謝を分析した結果、運動時に筋プリン体の分解が亢進し、血中ヒポキサンチンが著増することを認めた。このことより、ミトコンドリア脳筋症では、運動筋にエネルギー危機が生じ、筋原性高尿酸血症が発現することが示唆された。

6) 佐橋ら (愛知医大第四内科) は、肢帯型症候群を呈したミトコンドリアミオパチーの 1 家系についてしらべた。生検筋に母子ともにミトコンドリア異常を認め、mtDNA 解析では A → G の塩基変異 mtDNA を確認し、塩基番号 3,243 の点変異を認めた。

7) 黒田ら (徳島大小児科) は、ミトコンドリア脳筋症の病因として、PDH (ピルビン酸脱水酵素) 複合体の異常が注目されているが、先天性高乳酸血症を呈した女兒に、PDH 複合体活性の著明な低下を認めたが、培養リンパ球様細胞では活性が正常を示したという興味ある 1 例について、遺伝子変異、変異遺伝子の発現度、両親での変異遺伝子の有無について検討した。

8) 森ら (熊本大学遺伝医学) は、ミトコンドリア形成におけるサイトゾル因子の役割について検討した。ミトコンドリアに存在する大部分の蛋白質は核遺伝子にコードされており、ミトコンドリア外部で合成された後、ミトコンドリア内部へ移行するが、この蛋白質のミトコンドリア移行の障害についてしらべた。実験系として、尿素サイクル酵素の 1 つであるオルニチントランスカルバ

ミラーゼ (OTC) の前駆体を大腸菌で大量に精製し、これを単離ミトコンドリアに取りこませる方法で、このトランスポートに、サイトゾールに存在する蛋白質因子の添加が必要であることを報告した。

9) 杉村, 大野ら (名大神経内科) は、ヒトミトコンドリア DNA の D-loop 領域における新しい調節因子 (Mt5因子) について報告した。ヒト mtDNA には、1,122bp よりなる非翻訳領域があり、mtDNA 発現調節に関わる若干の因子があることが知られている。今回の研究は、コントロール7例と各種疾患11例より DNA を単離し、直接法により非翻訳領域の塩基配列を決定した。Mt5因子と命名される領域は、塩基多様性の高い領域に存在しながら、313例で高度に保存されており重要な因子と考えられた。

10) 太田ら (自治医大第一生化学) は CPEO の大欠失と MELAS の点変異によって生じる mt 蛋白質合成を比較検討した。変異の種類によって蛋白質合成低下がみられることを認め、臨床的特徴の発現の違いに関与する可能性を示した。

11) 小澤, 田中ら (名大第二生化学) は、ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア遺伝子変異について報告した。MELAS 症候群の多くに、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) 遺伝子領域の塩基番号3243に A → G の塩基転位が発見されているが、この3243の変異をヘテロプラズミーの状態でする患者において、臨床症状が多彩であることを明らかにした。

12) 荒木, 箕田ら (熊本大学第一内科) はミトコンドリア脳筋症における変異ミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析に当り、とくに *in situ* hybridization (ISH) を用いて検討した。MERRF と MELAS では、CPEO と同様に SDH 染色で濃染する筋線維において全 mtDNA 量は増加していた。MELAS では、SSV を示す血管で全 mtDNA の著明な増加がみられた。また電顕レベルでの ISH は工夫によっては今後の有力な武器になる可能性を示唆した。

13) 宝来ら (国立遺伝研) は、多数のミトコンドリア脳筋症患者において、mtDNA・D ループ領域の塩基配列を決定し、個々の配列間の塩基置換数に基づいた系統解析を行なった。それらの値より遺伝子系統樹を作成した。その結果、CPEO, MERRF および MELAS の患者は、複数でかつ相互に異なる母系系統に由来すると考えられ、MERRF と MELAS 患者群に特異的にみられる点突然変異は、日本人の集団のなかでも比較的最近独立に生じたものと考えられた。

14) 岡田, 乾ら (大阪大小児科) は、ミトコンドリア脳筋症を呈する10家系に

ついて現在既知の mtDNA 異常と臨床症状との関連を検討した結果、すべての家系において発端者に変異が heteroplasmy として認められた。サザンブロット法による末梢血由来の DNA における変異 mtDNA 量は、臨床症状との相関を示さなかった。今回の検討でミトコンドリア脳筋症の臨床症状は多様であり、末梢血の mtDNA 変異より臨床症状を推定するのは困難であることが明らかにされた。

15) 佐藤ら（順天大神経内科）は、ミトコンドリア脳筋症の病型と遺伝子異常について検討した。

16) 川井、横井ら（徳島大第一内科）は、常染色体優性遺伝を示す CPEO 家系の発端者について骨格筋 mtDNA の遺伝的解析を行った結果、異なる欠失を有する 2 種類の異常 mtDNA が認められた。ヒトの mtDNA は母親由来とされており、常染色体優性遺伝型を示す家系の症例で mtDNA に多重欠失が認められたことは、mtDNA の複製に関与する核遺伝子の異常によって欠失が生じる可能性が示唆された。

17) 納、中川ら（鹿児島大第三内科）は、ミトコンドリア脳筋症における mtDNA 異常と臨床症状の多様性との関連を検討した。ミトコンドリア脳筋症 45 例中 31 例に mtDNA の異常を認め、臨床病型と mtDNA 異常は一定の関連を示したが、なかには対応しない症例がみられた。

18) 桃井ら（自治医大小児科）は MELAS 病態の細胞学的解析を行うため MELAS 細胞系より、正常と変異ミトコンドリア遺伝子をクローニングし、定量法を確立した。この方法により融合細胞における変異遺伝子の増幅機構の解析が可能であることを報告した。

19) 西澤ら（自治医大神経内科）は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の 3,243 位に A → G 点変異を有する MELAS の母親例を 3 年 6 カ月間 follow up し、この間における正常と変異 mtDNA 量の変動の有無と臨床症状との相関について検討した。MELAS が発症するには、各組織において点変異を有する mtDNA 量が一定の threshold を上回る必要があると考えられた。

20) 水澤、白岩ら（筑波大神経内科）は、MELAS の 1 剖検例について、各組織での tRNA (UUR) の塩基置換の分布をしらべた。検査された臓器すべてにおいて、正常 mtDNA と変異 mtDNA が混在していることを認めた。

21) 後藤、作田ら（国立精神・神経センター）は、臨床的に MELAS と診断さ

れたが、nt3,243点変異が認められなかった例を検討し、新たに tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 領域の点変異を認めた。nt3,271点と nt3,243点変異は、ともに MELAS の病因と考えられた。

### 平成3年度の研究成果の要約

筋ジストロフィーでは、ジストロフィン欠失部位と臨床像との対比、mdx を用いた筋の壊死と再生機構ならびに分解酵素の役割、dantrolene sodium を用いた治療効果と myoblast の移植の検討が行われ、ミトコンドリア脳筋症では、mtDNA 変異に関する臨床的（典型例，非典型例），病理学的（全身臓器での分布，ragged red fiber および cytochrome c oxidase 活性線維との関係など），あるいは生化学的（蛋白合成能，mtDNA ループ領域の解析など）検討がなされ、臨床的にも基礎的にも、一步踏みこんだ研究が多かった。

### 平成4年度（第3年目）の研究班の研究計画

平成4年度は、本研究班としては最終の年を迎えるので、筋ジストロフィーを中心に、遺伝子および蛋白異常と臨床との対比、筋障害の発生機構および、遺伝子治療を含めた治療法の開発へ向かって研究を進めたいと希望している。またミトコンドリア脳筋症に対する関心は高く、研究発表が多くなったが、mtDNA 変異と臨床像の解析、筋病変ならびに治療面においての一層の解析を期待したいと思う。

### B166（ダントロレン ナトリウム）に関する筋ジストロフィー治験計画について

1967年に Snyder らによって合成されたヒダントイン誘導体のダントロレン ナトリウムは、1980年以降、我国において臨床応用され、経口剤は種々の原因による痙性麻痺の治療に、また注射剤は、麻酔時における悪性高熱症に対するすぐれた治療薬として用いられている。一方、ダントロレン ナトリウムは、筋小胞体からの Ca<sup>2+</sup> の放出を抑制することから、筋ジストロフィーなどの筋疾患において Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇に伴う筋組織への破壊を軽減することが期待されている。実際、筋ジストロフィーの動物モデルである mdx マウスにおいて本剤は血清 CK 値を下げる事が報告され (Quinlan, et al : Muscle & Nerve 3 :

268—269, 1990), 小数の DMD 患者においても本剤が血清 CK 値を下げ, 本症の進行を遅延させるとの報告がなされている (Bertorini, et al: Muscle & Nerve 14: 503—507, 1991).

以上のことより, 本研究班でも, ダントロレン ナトリウムをとり上げ, 多施設共同により DMD, BMD および L-G 型 MD を対象として, 有効性および安全性を評価するための治験を行うこととなった。

治験総括者は荒木淑郎, 中央委員は田代邦雄 (北大), 木村淳 (京大), 西谷裕 (国立宇多野病院) 後藤幾生 (九大) が担当し, 事務局は京大医学部神経内科 (梶龍兒), これに依頼事務局は山之内製薬株式会社開発本部, 開発第二部, 第三室が担当することとなった。この研究は, 厚生省新薬開発研究委託費研究費を受けて行うこととなる。関係各位の御協力を御願いたい。

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」総合班会議

筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法に関する研究  
研究報告抄録

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

内野 誠\* 寺本 仁郎\* 直江 弘昭\*  
三池 輝久\*\* 岩下 宏\*\*\* 荒木 淑郎\*\*\*\*  
(\*国立療養所再春荘病院神経内科, \*\*熊本大学医学部発達小児科,  
\*\*\*国立療養所筑後病院, \*\*\*\*熊本大学医学部第一内科)

骨格筋や心筋における dystrophin (“d”) の発現様式については、疾病の場合を含め、詳細に検討されているが、筋以外の臓器の “d” の発現状況については不明な点が多い。ヒト臓器特に脳における “d” の発現状況を明らかにするため、抗 “d” 抗体を用いて Western blot (Wb) 及び免疫染色による検索を行った。また BMD 生検筋の “d” の発現様式についても同様に検索を加え、PCR 分析結果と比較検討した。

## 対象, 方法

正常対照 4 例 (42~74 歳), 筋緊張性ジストロフィー 1 例 (54 歳), 及び IQ50 以下の知能障害を認めた DMD 1 例 (26 歳) の各剖検臓器 (骨格筋, 心筋, 大脳・小脳, 胃, 膀胱など) について, モノクロナール抗 “d” 抗体 (NOVO 社の DYS-1, 2, 3) を用いて Wb 及び免疫染色による分析を行った。BMD 16 例 (14~53 歳) の生検筋についても同様に検索し, Chamberlain 及び Beggs の 19 領域での PCR 分析 (SRL) と比較検討を行った。

## 結 果

正常対照及び筋緊張性ジストロフィー例では DYS-1, 3 の Wb にて骨格筋, 心筋のみならず, 胃・膀胱などの平滑筋臓器, さらに脳においても明らかな “d” の発現が認められた。DYS-2 (C 末端抗体) では骨格筋や心筋では明らかであったが, 脳や平滑筋臓器では “d” の発現は不明瞭であった。免疫染色では骨格筋, 心筋はいずれの抗体でも表面膜に抗体の局在がみられたが, 脳においては DYS-3 では neuron の胞体が, DYS-1 では主に glia 系細胞が染色され, DYS-2 では脳には抗体の局在は明らかではなかった。平滑筋線維は Wb では “d” の発現が明らかでなかった DYS-2 を含め, 全ての抗体で表面膜に抗体の局在が認められた。

DMD においてはいずれの抗体を用いても Wb 上全臓器で “d” の発現はみられず, 免疫染色上も心筋の intercalated disc が一部染色される他は明らかな抗体の局在はみられなかった。一方 BMD においては通常の Wb では “d” の分子量に変化がなく, 含量のみ減少するものが多数を占めた (8/12) が, 泳動時間を大幅に延長することにより, 低分子化を示した。遺伝子解析では, PCR が実施できた 15 例中 8 例 (53.3%) に欠失を認めたが, Exon 1~3 ヶの欠失の短い例が多く, 4 ヶ以上の欠失例は 1 例のみであった。欠失を認めなかった 7 例中 5 例も泳動時間を延長することにより Wb 上極軽度ながら “d” の低分子化を認めた。

## 考 案

“d”の mRNA は骨格筋や心筋のみならず、平滑筋組織や脳にも含まれていることが既に明らかにされているが、著者らも1988年以来“d”が健常者の骨格筋、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報告してきた。今回のモノクローナル抗体による検索も基本的には60kd抗体、30kd抗体での成績と一致し、平滑筋組織や脳にも“d”の存在が認められた。一方 DMD では高率に IQ 異常が認められるが、今回の DMD 脳では“d”が欠如しており、DMD の知能障害に脳型“d”の異常が関与する可能性が示唆された。BMD の Wb 所見について Hoffman らは54例の分析を行い、分子量330kd から600kd と広い範囲にわたることを報告しているが、今回の16例の検索では比較的短い欠失が多く、低分子化も軽度のものが大半を占めた。本邦の BMD 例は欧米より欠失の短い症例が多いのか否かについては今後多数例での検討が必要である。

## 結 論

“d”は健常者の脳においても発現しており、DMD では欠如していた。このことは DMD の知能障害に脳型“d”の異常が関与している可能性があり、知能障害の程度により“d”の発現に違いがみられるか否かについて、今後症例を増して検討が必要である。BMD の多くは Wb にて低分子化を示し、いわゆる frame-shift 仮説で説明可能であったが、欠失の短い症例が多く、Wb の泳動条件に工夫が必要であった。

# 骨格筋細胞膜におけるジストロフィンの局在と超微形態

若山吉弘  
(昭和大学藤が丘病院神経内科)

ジストロフィンの光顕レベルにおける正常骨格筋線維周辺部の局在は、杉田、荒畑らによる最初の報告 (Proc Jpn Acad 64B : 37-39, 1988 ; Nature 333, 861-863, 1988) 以来、多数の報告がある。その電顕レベルの筋細胞膜における局在と超微形態についても我々の報告を含めいくつかの報告があるので現時点においてそれらを整理し紹介してみたい。

## 1. ジストロフィンの正常骨格筋細胞膜における局在について

免疫透過電顕的に Watkins ら (Nature 333 : 863-866, 1988) は筋細胞膜裏打ち構造と横管周辺に、Cullen ら (Proc Roy Soc Lond B 240 : 197-210, 1990), Samitt ら (Muscle & Nerve 13 : 493-500, 1990) や著者ら (Acta Neuropathol 80 : 618-623, 1990 ; 同82 : 178-184, 1991) は筋細胞膜裏打ち構造にジストロフィンの存在を証明した。また Samitt らは筋腱接合部にジストロフィン抗体反応が強いことを電顕的に証明した。これらは主にジストロフィンN端近辺に対する抗体を用いた結果であるが、rod domain など他の部位に対する抗体でも類似の結果が得られている。例えば Byers らは最近 rod domain の抗体を用い筋細胞膜裏打ち構造にはジストロフィンの存在を示しているが、横管部にはジストロフィンが見られなかったことを報告 (J Cell Biol 115 : 411-421, 1991) した。彼等は筋腱接合部や神経筋接合部をも免疫透過電顕的に観察しこの部にジストロフィン分子密度が高く、神経筋接合部シナプス後膜では谷の部分に多く分布していることを記載している。

## 2. ジストロフィンの超微形態

生の骨格筋を液体ヘリウムで急速凍結し切断後 deep etching rotary shadow 法にて replica 膜を作製し観察しても細胞膜関連細胞骨格には特に目立った特徴をもったものは見られなかった (Wakayama ら Acta Neuropathol 80 : 618-623, 1990)。従ってジストロフィン分子を観察同定するためにはジストロフィンを骨格筋細胞膜から分離精製し rotary shadow 法により shadowing をして電顕にて観察する方法 (Pons ら Proc Natl Acad Sci USA 87 : 7851-7855, 1990 ; Murayama ら Proc Jpn Acad 66B : 96-99, 1990) や骨格筋細胞を抗ジストロフィン抗体とそのビチオン化二次抗体 (小林ら筋ジス荒木班平成2年度報告書 pp90-95 ; Wakayama ら J Electron Microsc 40 : 143-145, 1991) 又は金コロイド標識二次抗体 (Wakayama ら Acta Neuropathol 82 : 178-184, 1991) で修飾しその急速凍結標本の切断後 deep etching rotary shadow 法による replica 膜を作製して観察する方法を用いなければならない。我々の抗ジストロフィン抗体修飾検体の本法による骨格筋細胞膜付近の観察では筋細胞膜を細胞外から観る面と細胞内から観る面に2大別され、どちらも筋細胞膜関連細胞骨格を観察可能であるが、細胞膜内表面の観察可能な面より容易であった。細胞膜内表面には抗ジストロフィン抗体とそのビチオン化二次抗体で修飾されたジストロフィン分子が存在していた。ジストロフィン分子のなかには5 nmの周期をもつ筋原線維最外層の actin fil-

ament と連絡するものもみられた。更に金コロイド法では筋細胞外から観ると10nm 金コロイドの付着した細胞骨格は筋細胞膜P面にすぐ隣接してみられたが、部分的にしか露出しておらず、筋細胞内から筋細胞膜内表面に付着している金コロイド付着細胞骨格をみるとその全容を観察するのがより容易であった。形態は種々の形の桿状構造物で、多くは一端が他端より細く端がやや拡大したものやしてないもの、ややcurveした桿状構造物など種々であった。この結果は他の報告とおおむね一致するが、細部ではなお微妙な違いがある。今後この点を更に検討し、またジストロフィンと他の細胞骨格分子との相互関係を検討して、ジストロフィンの機能の解明を進める必要があると考えられる。

# ダントロレンナトリウムによる筋ジストロフィー治療の 試み

木村 淳 梶 龍 兒  
秋口 一郎 濱野 利明  
(京都大学医学部神経内科)

近年 Duchenne 型をはじめとする筋ジストロフィー症の病因が遺伝子レベルで解明されてきたが、未だ有効な治療法を確立するに到っていない。Duchenne 型では dystrophin の欠乏が示されているが、その正確な病因論的な役割は明らかではなく、その欠乏がなくとも筋破壊が進行するとの見解もある (Fischbeck et al. Muscle Nerve, in press)。しかし、筋破壊の共通のメカニズムとしてカルシウムの細胞体内への異常な流入が関与していることが示唆されている (Turner et al. Nature 335 : 735, 1988)。細胞体内のカルシウム濃度の異常な上昇は永続的な筋収縮を引き起こし、組織学的に見られる Opaque Fiber などの所見を説明するものと考えられる。

Dantrolene Sodium は、sarcoplasmic membrane を安定化する作用を持つ抗痙縮剤で Duchenne 型筋ジストロフィー症やその動物モデルの dystrophic mouse で血清 CPK を有意に下げ作用があることが報告されている (Quinlain et al. Muscle Nerve 13 : 268, 1990 ; Bertorini et al. Muscle Nerve 14 : 503, 1991)。また本剤はステロイド剤のような長期連用時の重篤な副作用は知られていない。我々は、今回 FSH 型筋ジストロフィー 2 例、Limb-girdle 型筋ジストロフィー 3 例において、Dantrolene Sodium を 12 ヶ月以上投与し、その血清 CK 値と症状の進行に与える影響を検討した。

## 対象, 方法

19~39歳の男性 2 名, 女性 3 名で筋生検および筋電図で診断のついた FSH 型 2 例および Limb-Girdle (L-G) 型 3 例において、投与前 1 年間の臨床症状を患者の申告により現時点で評価し、投与後 1 年間の症状と比較した。評価法は、平成元年度厚生省「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」報告書にもとずいた簡易機能評価スケールによったが患者の記憶がさだかでない項目は除外した。ダントロレンナトリウムは経口にて 25~50mg/日を 1 回~2 回にわけて投与した。CK 値の統計解析は本剤の投与量との相関性を Simple Regression 法 (Stat Works) で検討した。

## 結 果

5 例中 4 例で Dantrolene Sodium の投与量は血清 CK 値の変動に関与しない確立は 0.05 以下であり何らかの関与がある、即ち低下させることが示唆された。

臨床症状の進行に関しては、FSH 型 2 例では投与前後各 1 年間で上肢機能区分における評点に変化は見られなかった。L-G 型のうち 1 例において前 1 年間で障害度区分の 2a, 階段昇降可 (片手すり) の評価が a から b へ進行したが後 1 年間ではそれ以上の進行は見られていない。残りの 1 例でも前 1 年間で動作を分起立動作で手を使わずできたものが (b) できなくなった (c) が、後 1 年間では変化を見なかった。

#### 考察, 結論

以上, Dantrolene Sodium は筋ジストロフィー患者においてCK 値を低下させることが示唆された。臨床症状に関してはレトロスペクティブで症例数も少なく, 統計的に結論を出すことは出来ないが, L-G 型 2 例において, 進行がダントロレンナトリウム投与後に緩和になっている可能性が示唆され, 今後さらに症例を増やして検討する価値があるものと思われる。

# ミトコンドリア遺伝子変異と表現型

小澤 高 將 田 中 雅 嗣 大 野 欽 司

(名古屋大学医学部生化学第二講座)

ミトコンドリア (mt) 脳筋症患者で検出される mtDNA の変異は、主として点変異と欠失である。

ヒト mtDNA は全塩基配列の数%を使った制限酵素消化断片によって解析され、多くの多型が報告されていた。今回、我々が mt ミオパチーを含む30例の mtDNA 全周塩基配列を決定し翻訳領域を分析した結果、244ヶ所もの塩基置換が見いだされ、同義塩基置換 (65%) と同様に、アミノ酸置換を引き起こす非同義塩基置換 (35%) も高い頻度で生じており、この中には哺乳類の間で保存されているアミノ酸残基の置換を引き起こす変異も含まれていた。アミノ酸置換を伴う数多くの点変異がヒト個体相互に存在し、mtDNA 由来の蛋白サブユニットには、標準となるべき一次構造は存在しない。即ち、エネルギー産生系の構築は、一定のゆらぎの範囲に存在すると言える。典型的な mt 脳筋症患者にみられる塩基置換は個体あたり40~60ヶ所も存在する<sup>1)</sup>。これら塩基置換の相当部分は系統的に分岐しており一部は生理的なゆらぎの範囲と考えられるが、多くはその範囲を越え点変異として病理的なものである可能性が高い。これら患者 mtDNA はいずれも大小の欠失を持っており、点変異と欠失の複合が疾患病因と考えられる。

mt 内膜から発生する活性酸素は mtDNA 中の dG を 8-OH-dG へ変化させる。8-OH-dG は複製の際に他の塩基に誤読されることが確認されており、8-OH-dG の蓄積と点変異の蓄積とは互いに同義である。酵母では点変異の蓄積が遺伝子の欠失を引き起こす<sup>2)</sup>。mtDNA が同一鎖内で欠失を起こすためには、一本鎖の状態であることが必須である。欠失を起こす機構については、mtDNA の分子内組み換え、複製時における slipped mispairing は考え難く、持続的な一本鎖の状態における疑似組み換え、ないし再配列が妥当である。即ち、8-OH-dG が蓄積してミスマッチを起こし、部分的に二重鎖が破られ持続的な一本鎖の状態になり欠失を起こすと考えられる。

実際に横隔膜の mtDNA を分析してみると、65歳以上の高齢者では加齢ともなって8-OH-dG が急増し、それに伴って欠失が顕著になる<sup>3)</sup>。心筋においては、ATPase 6 遺伝子とD-ループ上の12塩基の順方向繰り返し配列の間で7.4kbの欠失がみられ、その頻度が加齢と共に増大することを老人心との関係で報告した<sup>4)</sup>。実際にこの欠失を定量してみると、60歳以下では全 mtDNA の0.1%程度であったものが、60歳台から急増し、80歳台で3%、90歳台で9%に達する<sup>5)</sup>。従って、加齢に伴う8-OH-dG の増加が、点変異の蓄積、遺伝子の欠失を引き起こし、加齢に伴う筋力低下の重要因子の一つであると考えられる。mt 脳筋症、特発性心筋症患者の骨格筋、心筋 mtDNA の全周塩基配列を決定したところ<sup>6)</sup>、これら患者組織では発病時にすでに多くの点変異の蓄積と大小の欠失が存在しており、組織局所で早発性加齢が進行していることを示している。

8-OH-dG は加齢とか母系遺伝された点変異の蓄積といった内部要因のみならず、毒物、薬物などの外部要因によってももたらされる。昨年、azidothymidine (AZT) を3~6ヶ月投与された15症例ものエイズ患者が典型的な mt ミオパチーになったことが報告された<sup>7)</sup>。そこで実験動物として組織呼吸量がヒトの10倍高いマウスを選び、患者使用量の1/10のAZTを投与したところ自発的運動実験で運動量が50%低下し4週間で強制運動も不能となり、ほどなく死亡するに至った。筋肉

mtDNA をマイクロ高速液体クロマト/質量分析計で分析すると総 dG の25%が8-OH-dG に変化していた<sup>8)</sup>。この大量の核酸酸化物の生成は AZT の構造、投与期間からして mtDNA が AZT によって直接障害されたこと、それがマウスの運動障害、死亡の直接原因であることは明らかである。エイズ患者の AZT 投与による mt ミオパチーの病因もこれで容易に説明できる。

これらの事実から、毒物、薬物といった外部要因、加齢ないし遺伝された点変異といった内部要因による点変異の蓄積によって mt エネルギー産生系の構築が障害され、活性酸素の産生を促し mtDNA 中の8-OH-dG が増大し、mtDNA が持続した一本鎖状態となり大小の欠失が生まれると考えられる。1細胞内に1コピーの核遺伝子と異なり、総千コピー存在する mtDNA は、変異した遺伝子の総量が一定の閾値を越すと機能の障害として顕在化する。個体発生の段階での細胞分裂に伴い、卵細胞に遺伝した変異 mtDNA の偏在が生じ、偏在した細胞から発生した組織ではある時期、閾値を越え症状が顕在化して、mt 脳筋症、mt ミオパチー、心筋症など組織特異的な表現型を呈する。

要約すると、mtDNA 変異が患者共通にみられ、それがその症状を説明でき、動物実験でも再現されるので、病因の3原則を満たしており、mtDNA 変異は疾患の結果ではなく原因であることは明らかである。従って mt ミオパチーなどの疾患群は“mt 遺伝子病 (mtDNA disease)”と言えよう。

#### 文 献

- 1) Ozawa T, Tanaka M, Ino H, Ohno K, Sano T, Wada Y, Yoneda M, Tanno Y, Miyatake T, Tanaka T, Itoyama S, Ikebe S, Kondo T and Mizuno Y: *Biochem Biophys Res Commun*, 176 : 938-946, 1991.
- 2) Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T and Tanaka M: *Lancet* i: 642-645, 1989.
- 3) Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M and Ozawa T: *Biochem Biophys Res Commun* 179 : 1023-1029, 1991.
- 4) Hattori K, Ozawa T, Kondo T, Mochizuki M, Tanaka M, Sugiyama S, Ito T, Satake T and Ozawa T: *Amer Heart J* 122 : 866-869, 1991.
- 5) Sugiyama S, Hattori K, Hayakawa M and Ozawa T: *Biochem Biophys Res Commun* 180 : 894-899, 1991.
- 6) Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S, Ino H, Ohno K, Hattori K, Ohbayashi T, Ito T, Deguchi H, Kawamura K, Nakane Y and Hashiba K: *Biochem Biophys Res Commun* 177 : 518-525, 1991.
- 7) Dalakas MC, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B and Griffin JL: *N Engl J Med* 322 : 1098-1105, 1990.
- 8) Hayakawa M, Ogawa T, Sugiyama S, Tanaka M and Ozawa T: *Biochem Biophys Res Commun* 176 : 87-93, 1991.

# 分 担 研 究 報 告

# 目 次

## I. 臨床・病理

- 1) 筋疾患の再生線維における true acetylcholinesterase 活性像について  
——Togo 法による検討結果—— .....39  
東京都立神経病院 田 邊 等
- 2) 限局性筋疾患の画像診断.....43  
信州大学医学部第三内科 庄 司 進 一
- 3) Rimmed vacuole を伴った筋症における生検筋カテプシン L の活性,  
局在に関する検討.....47  
昭和大学藤が丘病院神経内科 若 山 吉 弘
- 4) Rimmed vacuole myopathy における熱ショック蛋白 hsp72 の局在.....51  
東京大学医学部脳研神経内科 清 水 輝 夫
- 5) 亜性高熱, セントラルコア病などの骨格筋ライアノジンレセプター異常55  
虎の門病院神経内科 高 木 昭 夫
- 6) 筋疾患の治療効果について  
——運動負荷試験による Anaerobic Threshold の検討—— .....59  
北海道大学医学部神経内科 田 代 邦 雄
- 7) ダントロレンナトリウムによる筋ジストロフィー治療の試み  
——1年間の臨床経験——.....62  
京都大学医学部神経内科 木 村 淳

## II. ジストロフィン(No. 1)

- 8) Becker 型筋ジストロフィー 3 例の分子遺伝学的, 免疫学的検討 .....67  
東京女子医科大学小児科 斎 藤 加代子
- 9) ジストロフィン遺伝子欠失を伴い, 運動時筋痛, 高CK血症を呈した  
症例.....73  
九州大学医学部脳研神経内科 後 藤 幾 生
- 10) Myotubular myopathy におけるジストロフィン発現の免疫学的検討...76  
東京大学医学部脳研神経内科 清 水 輝 夫

- 11) Dystrophin : ヒト臓器分布並びに Becker 型筋ジストロフィーに  
おける発現様式について……………80  
国立療養所再春荘病院神経内科 内野 誠

### III. ジストロフィン(No.2)

- 12) ジストロフィン分子における N 末端ドメインの臨床的意義 ……87  
国立精神・神経センター神経研究所 荒畑 喜一
- 13) 筋ジストロフィー組織ジストロフィンファミリーと生体膜機能……………90  
宮崎医科大学衛生学 濱田 稔
- 14) ジストロフィンの局在と機能：  
急速凍結——ディープエッチング法による細胞骨格蛋白  
との相互関係の検討……………95  
東京医科歯科大学医学部神経内科 小林 高義

### IV. mdx マウス

- 15) 運動負荷による成熟 mdx マウス筋変性への影響 ……101  
東京都立神経病院 田邊 等
- 16) mdx マウスの電氣的病態と薬物治療, 筋活動電位の分析,  
及びミオトニ一の数理的解析 ……106  
東邦大学医学部第四内科 栗原 照幸
- 17) mdx 胎仔骨格筋の電位依存性カルシウムチャンネルについて……………111  
国立精神・神経センター神経研究所 吉田 瑞子
- 18) mdx コントロールマウス骨格筋細胞膜ジストロフィン分子の  
deep etching replica 法による観察 ……114  
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山 吉弘
- 19) dantrolene sodium による mdx マウスの実験的治療 ……119  
虎の門病院神経内科 高木 昭夫
- 20) ジストロフィー筋への正常 myoblast の注射に関する研究  
——注射法の検討—— ……123  
帝京大学医学部神経内科 寺尾 寿夫

## V. 遺伝子・生化学

- 21) 筋特異的遺伝子発現に関する神経ペプチドの研究 .....129  
金沢大学医学部神経内科 高 守 正 治
- 22) Duchenne 型及び Becker 型筋ジストロフィー家系の PCR 法を  
用いた遺伝子診断と保因者診断 .....132  
東京女子医科大学小児科 齋 藤 加代子
- 23) ジストロフィン関連遺伝子のクローニングに関する研究 .....137  
国立精神・神経センター神経研究所 荒 畑 喜 一
- 24) 正常人ならびに神経・筋疾患患者の骨格筋細胞における  
ミオグロビン mRNA の局在  
——in situ hybridization による成績—— .....139  
徳島大学医学部第一内科 川 井 尚 臣
- 25) 動脈結紮後の速筋と遅筋の glucose uptake .....144  
信州大学医学部第三内科 庄 司 進 一
- 26) 筋細胞死と自食作用 .....147  
順天堂大学医学部生化学第一講座 木 南 英 紀
- 27) 筋再生と塩基性線維芽細胞成長因子 .....151  
九州大学医学部脳研神経内科 後 藤 幾 生
- 28) 培養ヒト筋細胞のミオシン重鎖発現に対する神経支配の影響 .....155  
東京医科歯科大学医学部神経内科 小 林 高 義
- 29) 筋原線維の C-蛋白質を分解する酵素の存在とその性質 .....160  
（助）東京都神経科学総合研究所分子研究系神経生化学部門 堀 眞一郎
- 30) 筋緊張性ジストロフィー患者 immunoglobulin G の糖鎖構造 .....164  
名古屋大学医学部神経内科 杉 村 公 也

## VI. ミトコンドリア脳筋症 (No. 1)

- 31) MELAS と糖尿病の合併例について .....169  
国立療養所犀潟病院神経内科 福 原 信 義
- 32) MERRF の筋生検所見  
——組織学的に診断できなかった症例を中心として—— .....173  
国立療養所犀潟病院神経内科 福 原 信 義

- 33) ミトコンドリア脳筋症における血管病変 .....178  
 国立精神・神経センター神経研究所 後藤 雄一
- 34) Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF)  
 の組織障害機序に関する研究 .....182  
 新潟大学脳研究所神経内科 田中 恵子
- 35) ミトコンドリア脳筋症における筋プリン体代謝に関する研究 .....186  
 大手前病院 (国家公務員等共済組合連合会) 垂井 清一郎
- 36) Limb girdle syndrome を示したミトコンドリア・ミオパチー .....190  
 愛知医科大学第四内科 佐橋 功
- 37) ミトコンドリア脳筋症の病因解明  
 ——ピルビン酸脱水素酵素欠損症女児例における分子遺伝学的  
 病因検索—— .....195  
 徳島大学医学部小児科 黒田 泰弘
- 38) 蛋白質のミトコンドリア移行とその異常：サイトゾル因子の役割 .....201  
 熊本大学医学部遺伝医学研究施設 森 正敬
- 39) ヒトミトコンドリア DNA D-loop 領域における新しい調節因子  
 (Mt5因子) .....205  
 名古屋大学医学部神経内科 杉村 公也
- 40) ミトコンドリア脳筋症変異 mtDNA によるタンパク質合成低下  
 ——CPEO と MELAS の比較—— .....211  
 自治医科大学大学生化学 太田 成男
- 41) ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア遺伝子変異 .....216  
 名古屋大学医学部第二生化学 小澤 高将
- 42) ミトコンドリア脳筋症における変異ミトコンドリアDNA(mtDNA)  
 の解析  
 ——In situ hybridization (ISH) を用いての検討—— .....222  
 熊本大学医学部第一内科 荒木 淑郎
- VII. ミトコンドリア脳筋症(No. 2)
- 43) ミトコンドリア脳筋症における mtDNA・D ループ領域の塩基配列に  
 基づいた系統解析 .....229  
 国立遺伝学研究所 宝来 聡
- 44) ミトコンドリア DNA 異常とその臨床的多様性に関する研究 .....233  
 大阪大学医学部小児科 岡田 伸太郎

45) ミトコンドリア脳筋症の病型と遺伝子異常 .....	237
順天堂大学医学部脳神経内科 佐藤 猛	
46) 常染色体優性遺伝を示したミトコンドリア脳筋症症例の骨格筋 ミトコンドリア DNA の解析 .....	240
徳島大学医学部第一内科 川井 尚 臣	
47) 種々のミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア DNA の検討 ...	244
鹿児島大学医学部第三内科 納 光 弘	
48) MELAS 病態の細胞学的解析 .....	249
自治医科大学小児科 桃井 真里子	
49) MELAS における点変異ミトコンドリア DNA の変動 .....	252
自治医科大学神経内科 西澤 正 豊	
50) 変異ミトコンドリア DNA の分布 ——MELAS 患者の一部検例—— .....	255
筑波大学臨床医学系神経内科 水澤 英 洋	
51) MELAS の点変異：塩基番号3243と3271の比較検討 .....	260
国立精神・神経センター神経研究所 後藤 雄 一	

## I. 臨床・病理

# 1) 筋疾患の再生線維における true acetylcholinesterase 活性像について

## ——Tago 法による検討結果——

田 邊 等\*

研究協力者 宮 本 和 人\*\* 林 理 之\*\* 村 橋 真\*\*  
磯 崎 英 治\*\* 八 木 皓 一\*\*

### はじめに

Acetylcholinesterase (以下 AChE) 活性の組織化学的証明には、従来 Karnovsky-Roots 法、辻の変法が行われ、Cholinesterase 活性の Koelle 法もよく知られていた<sup>1)~3)</sup>。これらの方法は、検出感度が低く、神経筋接合部が陽性に出るのみで、得られる情報も限られていた。一方、nonspecific esterase (以下 NSE) 活性は、神経筋接合部以外に、貪食細胞や小角化線維が陽性となり、さらに type 1 線維も弱い陽性反応を示す<sup>4)5)</sup>。

Tago 法による特異的 AChE 活性像は、おもに中枢神経や末梢神経の研究に用いられていた<sup>6)</sup>。骨格筋に於ける研究も見られ、神経筋接合部に強い活性を示し、type 2 線維にも活性を認めることが報告された。

一方、蛇毒である  $\alpha$ -bungarotoxin (以下  $\alpha$ -BT) は、nicotinicacetylcholine receptor (以下 AChR) に特異的かつ非可逆的に結合する物質で、これを用いて神経筋接合部や筋細胞膜に拡散した AChR を認識する方法が知られている<sup>7)</sup>。

今回、Duchenne 型筋ジストロフィー (以下 DMD)、Becker 型筋ジストロフィー (以下 BMD)、肢帯型筋ジストロフィー (以下 LG) 等に、Tago 法を応用し、AChE 活性像の特徴を

NSE 活性像や  $\alpha$ -BT 結合試験の結果と比較検討した。

### 方 法

筋生検組織で Tago 法を実施するには、 $10\mu$  の新鮮凍結切片を、acetylthiocholine を基質とした Karnovsky-Roots 原液を100倍に希釈した反応液に室温で60分間浸漬反応させる。次いで DAB・ニッケル法で発色させた。

$\alpha$ -BT 結合試験の方法は、まず過ヨウ素酸法で HRP 対  $\alpha$ -BT を 1 : 2 に結合させ、次にりん酸緩衝液で  $\alpha$ -BT 濃度を  $0.55\text{pmol}/\mu\text{l}$  に調整して、新鮮凍結切片に一滴加え、湿箱で  $4^{\circ}\text{C}$  にて1晩作用させる。発色法は Tago と同じく DAB ニッケル法で行った。

次いで連続切片で通常組織化学バッテリーと、主に市販の C 末端部に対する ABC 法でジストロフィンを染めた。

対象は、Dystrophin 染色で確認された DMD 3 例、BMD 3 例、その他肢帯型 4 例等、50 例の生検骨格筋である (図 1)。

### 結 果

Tago 法では、AChE 活性の強陽性部が黒く見え、次いで黒味がかかった紫・薄い紫と陰性部は無色に、その間無段階に変化するので便宜的に最強部を 4 + とし、順次 3 + ・ 2 + とした。特に疾患

\* 東京都立神経病院  
\*\* 東京都立神経病院神経内科

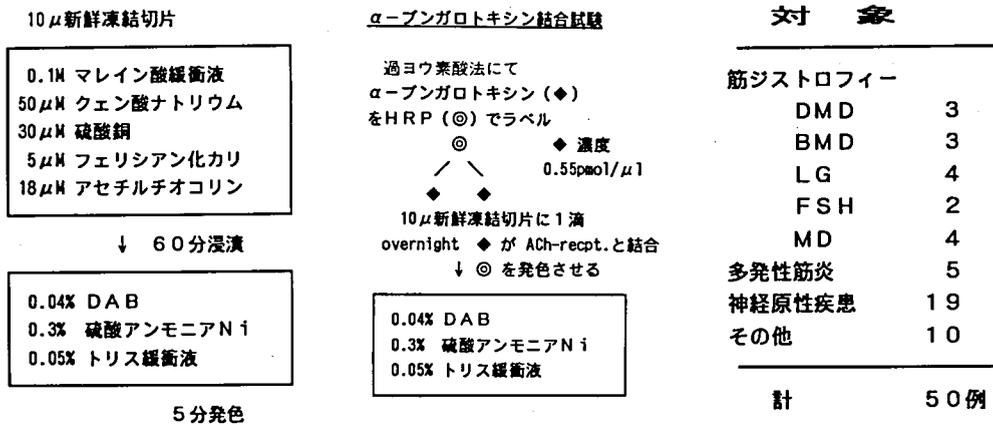


図1 対象と方法

とは関係なく、神経筋接合部は強いAChE活性(4+)を有し、次に、type 2線維の筋細胞膜が正常でも活性(+)を示し、筋細胞質にもわずかに活性(±)が認められた。今回の研究によって、DMD・BMD・LG等の進行性筋ジストロフィーの例で、再生線維の筋細胞膜周囲にendomysiumへ酵素活性が拡散するほど強いAChE活性(3+)を認め、筋細胞質に中等度の活性(+)を認めた。これらの活性はもちろん通常のtype 2線維に認められる活性よりも強く、type 2線維萎縮時の濃縮(2+)よりも強く、特徴的なことは、細胞膜周囲に特に強い活性が認められたことである。これらの線維が再生線維であることは、①HE染色で、中心核を有し、好塩基性に染まり、②Acid phosphatase活性陽性、③Alkaline phosphatase活性も一部で陽性、④ATPase活性pH4.3でtype 2cであることから確かと思える。また、特異的AChE阻害剤を用いた阻害試験では、神経筋接合部をはじめ全ての活性は消失した。

再生線維でAChE活性が認められたことから、acetylcholine受容体の分布を調べる目的で、α-BT結合試験を実施した。それでは、神経筋接合部に相当する部位に強い結合能を認めたが、Tago法陽性の再生線維では、α-BT結合反応は認められなかった(表)。

NSE活性像でも稀に、再生線維に活性が認められるとの報告もあるが、今回筋ジストロフィーを

表 結果

	AChE	α-BT
type 1 sarcoplasm	-	-
type 1 sarcolemma	±	-
type 2 sarcoplasm	+	-
type 2 sarcolemma	2+	-
neuromuscular junction	4+	2+
necrotic fiber	-	-
regenerative fiber	2+	-

AChE:Tago法 α-BT:α-ブングロトキシン結合

中心とした観察ではほとんど高活性を示す線維は認めなかった。逆にTago法では陰性であった貪食細胞が強い活性を示した。

Acid phosphatase活性と対比すると、双方の陽性線維はよく一致する。Tago法の方が線維の輪郭が明瞭で、陽性線維の認識が容易であった。しかし、Acid phosphatase活性は、NSE活性と同様に貪食細胞に強い活性を示すが、前にも述べたようにTago法では陰性であった。

多発性筋炎も、筋病理上壊死再生現象の激しい疾患としてよく知られており、今回自験例でも壊死再生が目だつ症例にTago法を実施してみたが、再生線維において筋ジストロフィーほど強いAChE活性は証明されなかった。

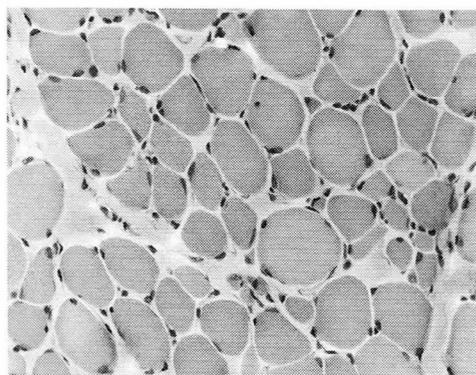
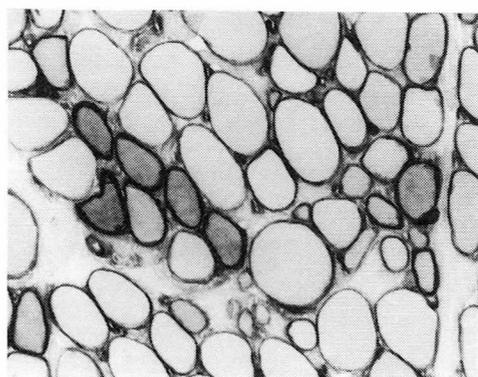


図2 Tago法(左) HE染色 6歳 DMD

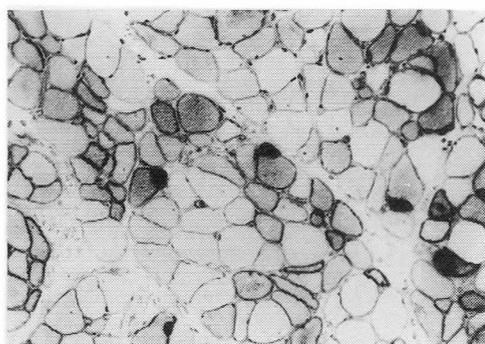


図3 Tago法(左)  $\alpha$ -BT結合試験(右) 45歳 LG

また、神経切断実験の結果では Tago 活性はすべて消失するとされているが、今回筋萎縮性側索硬化症、Charcot-Marie-Tooth 病などの神経原性疾患に Tago 法を応用して観察したが、神経筋接合部や type 2 線維などで AChE 活性は保たれており、急性の切断実験の結果とは一致しなかった。

以上から、Tago 法、NSE 活性、 $\alpha$ -BT 結合試験共、神経筋接合部に強い活性を示した。異なる点は、Tago 法は再生線維に、NSE 活性は小角化線維に強い活性を示し、Tago 法は type 2 に NSE は type 1 にそれぞれ弱い活性を示す点であった(図2)(図3)。

### 考 察

再生筋で強い AChE 活性を証明したのは、我々が最初と思われる。この AChE 活性の由来が筋な

のか、神経末端からなのかは不明であり、ジストロフィーマウスなどを用いて除神経実験をして確かめる必要がある。再生筋が強い AChE 活性を示したのは、筋ジストロフィーが中心であり、多発性筋炎では余り強い活性を示していなかった点も興味をもたれたが、その理由も今後の課題としたい。

また、Engel らは、 $\alpha$ -BT 結合試験で脱神経による小角化線維の筋細胞膜に acetylcholine receptor 活性の拡散や培養筋の筋管細胞表面に acetylcholine receptor 活性の発現を報告しており、再生筋でもある時期筋管細胞を経過すると考えられるので筋ジストロフィーの再生筋でも acetylcholine receptor 活性の発現は予想された。今回検出されなかった原因は、一つには検出感度の問題、もう一つには培養筋管細胞と生体内での現象との差があることが考えられる。これについ

ては今後,  $\alpha$ -BT に対する抗体を用いて免疫組織学的に感度をあげるか, acetylcholine receptor 自体に対する抗体を用いて染めてみるかで解決できるかと思われた。

### 結 論

筋生検に Tago 法を応用することにより通常行われる如何なる染色よりも明瞭かつ特異的に再生線維を検出することが出来た。

### 文 献

- 1) Karnovsky MJ and Roots L: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterase. *J Histochem Cytochem* 12: 219, 1964.
- 2) Tsuji S and Larabi Y: A modification of thiocholine-ferricuanide method of Karnovsky and Roots for localization of acetylcholinesterase activity without interference by Koelle's copper thiocholine ionide precipitate. *Histochem* 78: 317, 1983.
- 3) Koelle GB and Friedwald JS: A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 70: 617, 1949.
- 4) Davis BJ and Ornstein L: High resolution enzyme localization with a new diazo reagent, "Hexazonium Pararosaniline". *J Histochem Cytochem* 7: 295, 1959.
- 5) 石原傳幸: 神経筋疾患生検筋における non-specific esterase 染色の意義. *臨床神経* 24: 248, 1984.
- 6) Tago H, Kimura H and Maeda T: Detailed acetylcholinesterase fiber and neuronal staining in rat brain by a new and highly sensitive histochemical procedure. *J Histochem Cytochem* 34: 230, 1986.
- 7) Bender AN, Rnger SP and Engel WK: The acetylcholine receptor in normal and pathologic state. *Neurology* 26: 477, 1976.

## 2) 限局性筋疾患の画像診断

庄 司 進 一\*

研究協力者 朴 木 清 人\* 吉 田 邦 広\* 柳 澤 信 夫\*

### はじめに

我々は、Heckmattら<sup>1)</sup>および田代ら<sup>2)</sup>の筋超音波診断法(以下筋エコー法)が神経筋疾患の診断に有効との報告以来今まで約600例の神経筋疾患患者に筋エコー法を、約300例の神経筋疾患患者に筋CTを実施してきたが、最近それに加えて筋MRI診断を行うようになった。今回、限局性筋疾患で得られたそれぞれの画像所見について筋病理所見と合わせて検討した。

今回の目的として、

1. 限局性筋疾患におけるそれぞれの画像所見の検討
2. 画像所見と筋病理所見と対比し画像所見の意味を探る
3. それぞれの画像診断法としての有用性および特徴を明らかにする

以上のことを念頭において検討した。

### 対象および方法

対象は、筋サルコイドーシス2例、低カリウム血性ミオパチー2例、クロフィブレートミオパチー1例、Weber-Christian病1例の計6例である。

方法は、筋エコー法は超音波断層装置日立EUB-40を用い、GAIN 30dB、NEAR GAIN-30dB、FAR GAIN 3dBと一定条件で記録した。筋CTは、SIEMENS SOMATOM 2を用いLEVEL25、WINDOW 256の一定条件で撮像した。筋MRIは、0.5テスラMRI装置(島津SMT-50)を用

い、T<sub>1</sub>強調像(TR=500ms, TE=29ms), T<sub>2</sub>強調像(TR=2400ms, TE=90ms)を得た。全例で筋エコー法と筋CTを、5例で筋生検を、3例で筋MRIを施行した。

### 結 果

図1に低カリウム血清ミオパチーの下腿最大径部における左より筋エコー、筋CT、筋MRI T<sub>2</sub>強調の横断像を示した。上段が筋力低下がめだった時期、下段が回復後のものである。筋エコー像では、前脛骨筋で筋力低下がめだった時期には前頸骨筋の筋肉内エコーの増加を認め、筋CTでは明らかな変化はなく、筋MRIではT<sub>2</sub>強調像で前脛骨筋で著しい高信号を認めた。回復後では筋エコー像、筋MRIのT<sub>2</sub>強調像でそれぞれ筋肉内エコーの増加、高信号は消失した。右端は同症例の筋力低下のめだった時期の前脛骨筋の筋病理像だが、壊死、細胞浸潤等の二次性変化と考えられる炎症所見がめだった。

図2に筋サルコイドーシスの下腿最大径部における筋エコー、筋CTおよび筋病理像を示した。筋エコー像では、筋肉内に結節を認めた。筋CT像では明らかな変化を認めなかった。同症例の筋病理像では、細胞浸潤やサルコイド結節を認めた。

図3-1に健常対象の下腿三頭筋の筋エコー像を、図3-2, 3-3, 3-4にWeber-Christian病の下腿三頭筋の筋エコー、筋CTおよび筋病理像を示した。筋エコー像では、健常対象に比べ特にヒラメ筋での筋肉内エコーの増加を認めた。筋CT像では、明らかな変化を認めなかった。筋病理像では、筋外膜および筋周膜の小血管周囲に炎症

\* 信州大学医学部第三内科

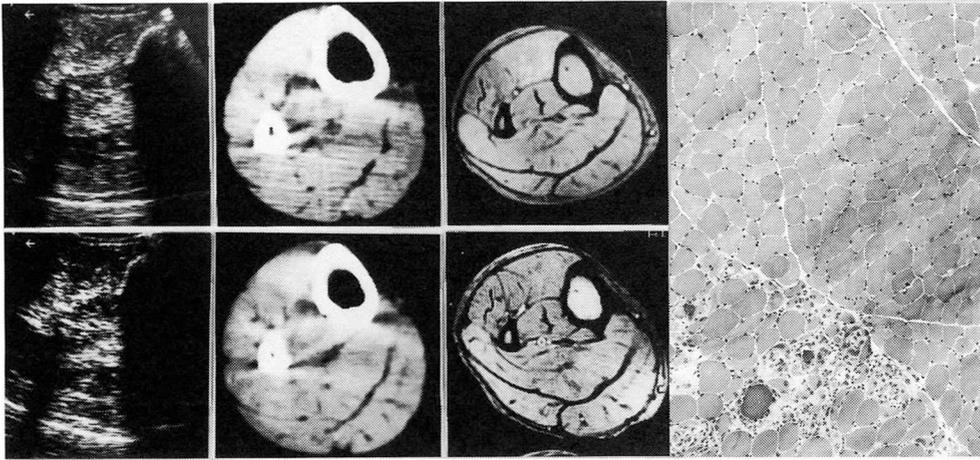


図1 US, CT, MRI and histology of the tibialis anterior in a patient with hypokalemic myopathy

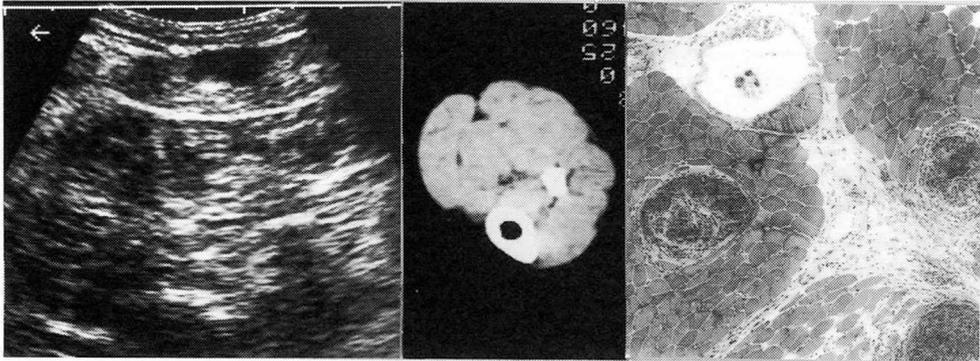


図2 US, CT and histology of the gastrocnemius-soleus in a patient with sarcoid myositis

性の細胞浸潤を認めた。

図4はクロフィブレートミオパチーの大腿中央部の筋エコー像だが、上段は血清CK値の異常上昇を認めた時期に撮像したものだが、筋肉内のECHOGENESITYの平均値は21と筋肉内エコーの増加を認めており、下段のものはCK値の正常化した時期に撮像したものだがECHOGENESITYの平均値17と筋肉内エコーは正常値の平均 $11 \pm 2$  (N=20) に近づいている。

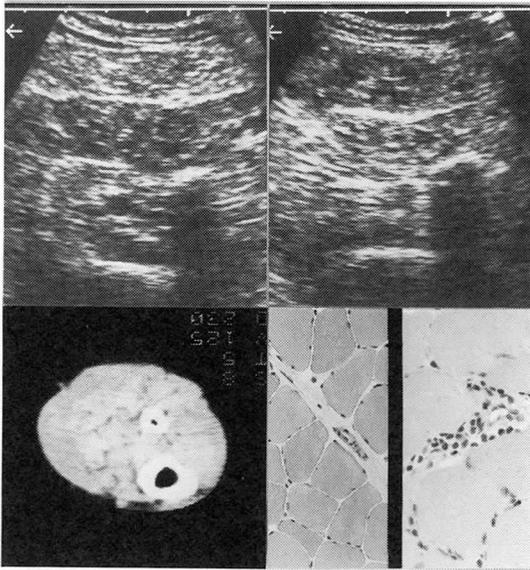
### 考 察

以上の結果より、炎症ないし浮腫の強い病変は、筋MRIのT<sub>2</sub>強調像が筋エコー法を上回る鋭敏性を示す。筋エコー法では、これらの限局性筋疾

患すべてに有意な変化を認める鋭敏さを示し、容易に経過を追え、その簡易さと非侵襲性および低コストは特筆すべきである。これらの限局性の病変を、筋CTでははっきりととらえられない。

限局性筋疾患ではないが、筋CTおよび筋MRIでとらえられないで筋エコー法で異常をとらえた症例をあげ筋エコー法の特性を考える。

図5-1, 5-3に健常対照, 図5-2, 5-4に三好型遠位型ミオパチーの大腿中央部の筋エコー像を示した。上段は3.5MHzでの横断像, 下段は7.5MHzでの縦断像であるが7.5MHzの像で三好型遠位型ミオパチーでは明らかに筋肉内エコーが増加している。3.5MHzでも軽度の筋肉内エコーの増加を認めるが7.5MHzの方がより強く



3-1	3-2
3-3	3-4

図3 US of the gastrocnemius-soleus in a healthy control ; US, CT and histology of that in a patient with Weber-Christian disease

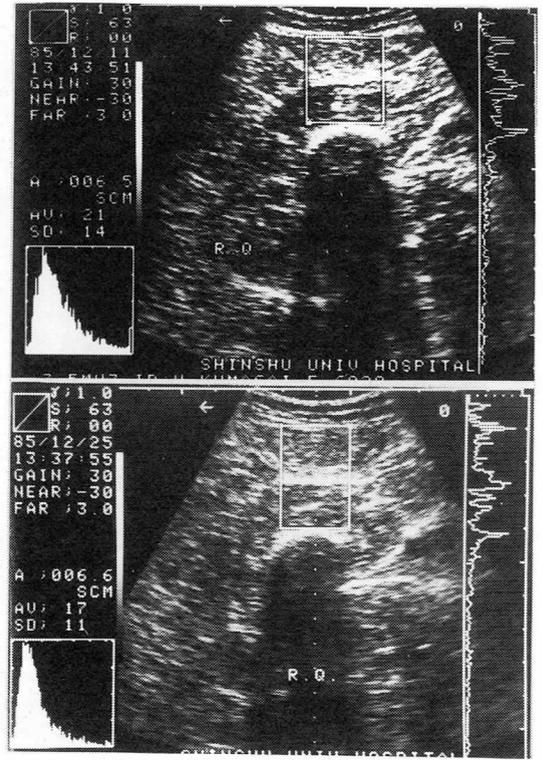


図4 US of the quadriceps in a patient with clofibrate-induced myopathy

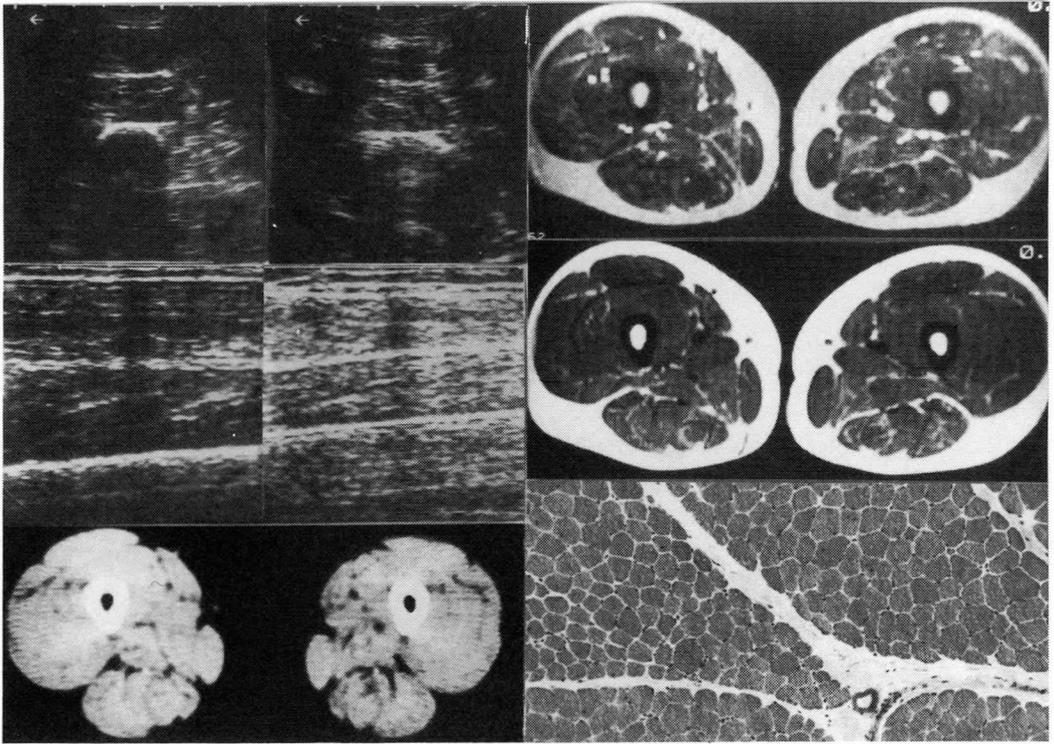
認めており、これは超音波の周波数増加にともなう分解能の向上によると思われる。図5-5、5-6、5-7に同症例の筋CT像、筋MRIのT<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>強調像を示した。明らかな異常を認めない。図5-8は同症例の筋病理像だが、筋線維の大小不同といった軽い筋原性変化を認めるのみであった。

この三好型遠位型ミオパチーの画像診断法の比較の結果から、筋エコー法は、細胞構築の変化といった軽度の筋原性変化では筋CTおよび筋MRIより鋭敏であると言える。MRIは、原理上水素原子核の磁気双極子モーメントに対しラジオ波を与え、切った後に発する磁気共鳴信号を画像化したものであり、これは水素原子密度が高いほど強くなる。CTはX線の透過度をコンピューターで演算してつくった像であり、物質のX線透過性

に依存する。故に、CTは物質の物性自体はよく検出できても微細な筋線維レベルでの構造の違いを検出するのは難しいと思われる。一方、エコー法は超音波の物体に対する反射像を観察しており、微細な構造自体の変化に最も鋭敏であることは容易に理解できる。実際、細胞構築の規則正しい肝臓で2cm以下の肝癌では超音波診断法が最も鋭敏とされ、最近では直径4cmの高分化型肝細胞癌でMRI、CTで描出されず超音波検査のみで描出された症例も報告されている<sup>3)</sup>。従って、超音波診断法が筋疾患でもかなり鋭敏であり、筋疾患の画像診断法として重要な位置を占めると期待される。

### 結 論

筋の炎症ないし浮腫を伴う限局性病変をとらえるための画像診断では、筋MRIのT<sub>2</sub>強調像が最



5-1	5-2	5-6
5-3	5-4	5-7
5-5		5-8

図5 US of the quadriceps in a healthy control ; US, CT, MRI and histology in a patient with distal myopathy (Miyoshi type)

も鋭敏であったが、筋線維の構築の変化のみを認める軽度の筋原性変化には筋エコー法が最も鋭敏であった。

筋エコー法は、これらの限局性筋疾患すべてで有意な変化を認める鋭敏さを示し、また容易に経過を追え、その検査法の簡易さと非侵襲性および低コストを考えると改めてその有用性が示された。

#### 文 献

1) Heckmatt JZ, Leeman S, et al: Ultrasound

imaging in the diagnosis of muscle disease. J Pediatr 101: 656, 1982.

2) 田代邦雄, 松浦 享ほか: 神経筋疾患における ultrasound imaging-CT 所見および筋生検所見との関連について. “厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の臨床, 病態と成因に関する研究”(杉田班) 昭和59年度研究報告書, 1985, pp90-95.

3) 直居 豊, 富田 貴ほか: 超音波検査のみで描出された高分化型肝細胞癌の一症例. 日本超音波学会講演論文集, 1991, p133.

### 3) Rimmed vacuole を伴った筋症における生検筋 カテプシン L の活性, 局在に関する検討

若山吉弘\*

研究協力者 自見隆弘\* 佐藤 温\*\* 武田 篤\*\*\*  
渋谷 誠二\* 杉田 幸二郎\*\*

#### はじめに

Rimmed vacuole (RV) は、リソゾームプロテアーゼ活性の亢進を伴う自己食食に関連した空胞と考えられ、Ii<sup>1)</sup>により RV を伴う遠位型筋症におけるカテプシン B と H の局在の証明がなされている。一方、カテプシン L については、Kominami<sup>2)</sup>によって、MDX マウス筋および plasmocid-induced myopathy における報告があるが、ヒト病的筋における検討はまだなされていない。我々は、自己食食に関連が深いと考えられるカテプシン L について RV を伴うヒト筋症生検筋における活性、局在について検討したので報告する。

#### 対 象

対象は RV を伴う筋症 4 例 (case 1~4) (RV を伴う遠位型筋症 2 例, 封入体筋炎 1 例, 既存の疾患概念には相当せず RV を伴った筋症 1 例), disease control として non-rimmed vacuolar myopathy 2 例 (case 5, 6) (hypokalemic periodic paralysis 1 例, alcoholic hypokalemic myopathy 1 例), 正常対照筋 12 例の計 18 例につき検索した。

#### 方 法

剖検時採取したヒト肝より homogenate を作

製しカテプシン B, H, L を精製 (Schwartz and Barrett, Mason らの方法を改変), ラビットに免疫して得た抗体の IgG 分画にペルオキシダーゼ標識したものを抗体として使用した。これらの抗体を用い酵素抗体直接法により免疫染色を施行した。生化学的には、( )内の基質を用いてカテプシン B (Z-Arg-Arg-MCA), カテプシン B & L (Z-Phe-Arg-MCA), カテプシン H (Arg-MCA) の活性を測定。また, cysteine proteinase inhibitor, 酸フォスファターゼ,  $\beta$ -D-glucosidase の活性もカテプシン群との比較のため測定した。イムノプロットはカテプシン B と L について施行した。12.5%ゲルを用い SDS-PAGE を行い, ホライズプロット法でクリアプロット・P 膜 (アトー社) に転写し, alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit antibody (Promega biotec, USA) にて検出した。

#### 結 果

RV を伴う筋症の生検筋では一般筋病理学的に 4%~12% の筋線維に RV を認めたがいずれの症例も細胞浸潤はないか極めて軽微であった。免疫染色では RV およびその周辺部に一致してカテプシン B と L, 特にカテプシン L で強反応を認めた (図 1)。一方, カテプシン H の染色性は faint であった。正常対照筋では反応を見なかった。non-rimmed vacuolar myopathy 生検筋ではカテプシン B, H, L とも vacuole に反応を見なかった。生化学的活性を表に示す。case 1~4 は RV を伴

\* 昭和大学藤が丘病院神経内科

\*\* 昭和大学医学部神経内科

\*\*\* 昭和大学藤が丘病院臨床病理

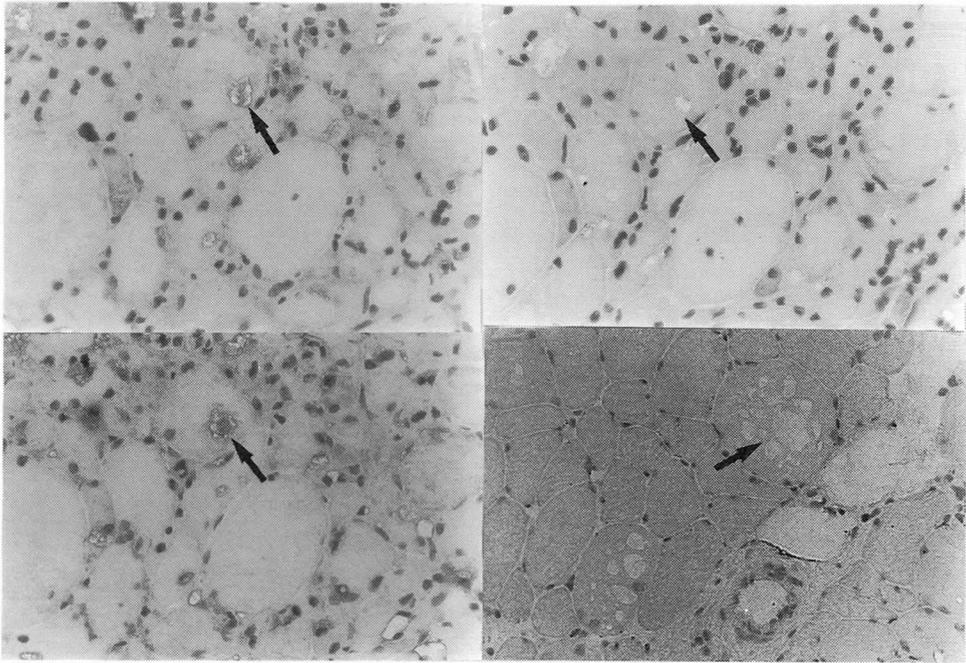


図1 カテプシン免疫染色

A : カテプシンB B : カテプシンH C : カテプシンL D : カテプシンL  
 A ~ C : RV を伴う筋症 D : non-rimmed vacuolar myopathy

A	B
C	D

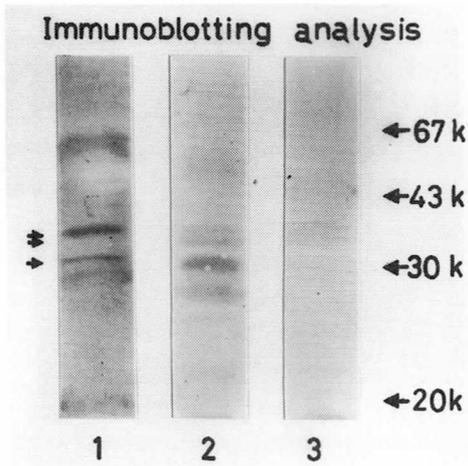


図2 カテプシンLのイムノブロット

lane 1 : 肝 homogenate のマイクロゾーム分画  
 lane 2 : RV を伴う筋症 case 3  
 lane 3 : 正常対照筋

う筋症, case 5, 6 は non-rimmed vacuolar myopathy である. RV を伴う筋症ではカテプシン B ( $P < 0.05$ ), B & L ( $P < 0.01$ ) の活性の上昇を認めた. 一方, カテプシン H については正常対照群と比較しむしろ低い値をとる傾向が認められた. 酸フォスファターゼ,  $\beta$ -D-glucosidase については正常対照と比較し高値をとる傾向が認められたがカテプシン B, B & L と比較するとその上昇程度は軽度であった. non-rimmed vacuolar myopathy については, case 6 でカテプシン B, B & L の活性上昇を認めたが, この症例は中等度の細胞浸潤を伴い, このため特にカテプシン B を中心とした上昇を示したものと考えられた. また, カテプシン L の酸フォスファターゼ,  $\beta$ -D-glucosidase に対する比をとると RV 群が non-RV 群より高値をとる傾向が認められた. カテプシン L のイムノブロット (図2) では, 肝 (lane 1) においては mature form,

表 ライソゾーム酵素活性

	Cathepsin B	Cathepsin B&L (A)	Cathepsin H	CPI	AP (B)	$\beta$ -D-Glu (C)	$A/B \times 10^3$	$A/C$
Normal Controls mean $\pm$ SD	1.21 $\pm$ 0.57	1.76 $\pm$ 0.99	15.17 $\pm$ 8.89	17.6 $\pm$ 4.8	41.4 $\pm$ 5.7	4.6 $\pm$ 1.3	42.5	0.38
Case 1	3.50	5.70	7.03	6.5	62.0	6.8	91.9	0.84
Case 2	1.75	4.36	4.50	22.0	56.9	6.3	76.6	0.69
Case 3	2.85	4.42	11.21	23.4	47.7	10.8	92.7	0.41
Case 4	3.73	5.80	23.10	36.8	35.6	5.3	162.9	1.09
mean $\pm$ SD	2.96* $\pm$ 0.89	5.07** $\pm$ 0.79	11.46 $\pm$ 8.24	22.2 $\pm$ 12.4	50.6 $\pm$ 11.6	7.3 $\pm$ 2.4	100.2	0.69
Case 5	1.44	1.52	6.11		56.3	6.7	27.0	0.23
Case 6	5.50	4.69	7.19		79.4	11.5	59.1	0.41

CPI : cysteine proteinase inhibitor    AP : acid phosphatase

$\beta$ -D-glu :  $\beta$ -D-glucosidase

case 1 ~ 4 : RV を伴う筋症    case 5, 6 : non-rimmed vacuolar myopathy

カテプシン B, B & L, H 活性は nmol/min/mg protein, CPI 活性は  $\mu$ U/min/mg protein, 酸フォスファターゼ活性は mU/min/mg protein,  $\beta$ -D-glucosidase 活性は arbitrary unit で示す.    \* :  $p < 0.05$     \*\* :  $p < 0.01$

proform に相当すると考えられる 30kDa, 39kDa のバンドを認めた。免疫組織学的にカテプシン L が強反応を認めた RV を伴う筋症 case 3 (lane 2) では 30kDa, 39kDa のバンドに加え 36kDa の位置に陽性のバンドを認めた。正常対照筋 (lane 3) では faint なバンドにとどまった。一方、カテプシン B のイムノプロットでは正常筋および RV を伴う筋症のいずれにおいても 29kDa の faint なバンドを認めた。

#### 考 察

我々は、従来より再生筋におけるカテプシン群の活性の検討を進めてきたが<sup>3)</sup>、今回は RV を伴

う筋症 4 症例につき検索した。カテプシン B については従来の RV を伴う筋症での報告を支持する結果を得た。即ち、Ii ら<sup>1)</sup>の報告同様、免疫組織学的に RV およびその周辺部で強反応を示し、また生化学的にも高活性を示した。一方、カテプシン H については弱反応、低活性を示したが、生化学的検索のため今回用いた基質がカテプシン H のみに特異的ではないため他のアミノペプチダーゼの影響も考慮する必要がある。しかし、今回の検索からは、カテプシン B, L に比較しカテプシン H の RV 形成に対する寄与は少ないものと考えられた。カテプシン L については我々の知る限りヒト病的筋における検討は初めてと思われるが、

これらカテプシン群のなかで最も高反応、高活性を認めた。カテプシンLは最も強力な endopeptidase の一つであり、Ii ら<sup>1)</sup>のラット肝での局在の検討からも主として autophagy に関与しているものと考えられている。また、Kominami ら<sup>2)</sup>の plasmocid induced myopathy の報告も併せてカテプシンLは自己食食のかなり初期に作用するとの考え方が妥当であるが、今回の我々の検索<sup>4)</sup>で少なくとも一部のRVを伴った筋症では、完成されたRV中にもカテプシンLが存在することが証明され、RV形成に深く関与することが示唆された。このことの意義、作用機序の詳細についてはさらに多数例の検索が必要である。

#### 文 献

- 1) Ii K, Hizawa K, et al: Abnormal increases of lysosomal cysteine proteinases in rim-

- med vacuoles in the skeletal muscle. *Am J Pathol* 122: 193—198, 1986.
- 2) Kominami E, Ii K, et al: Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy. *Am J Pathol* 127: 461—466, 1987.
- 3) 若山吉弘, 武田 篤ほか: Duchenne 型筋ジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験: 再生筋組織のリソゾームプロテアーゼ活性と含有量について. “厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究”(杉田班)昭和62年度研究報告書, 1987, pp176—178.
- 4) Jimi T, Satoh Y, et al: Strong immunoreactivity of cathepsin L at the site of rimmed vacuoles in diseased muscles. *Brain* (in press).

## 4) Rimmed vacuole myopathy における熱ショック 蛋白 hsp72の局在

清水輝夫\*

研究協力者 川井 充\* 山崎峰雄\* 蓑田清次\*\*

熱ショック蛋白 (heat shock protein HSP) は熱あるいはそのほかの様々なストレスによって多量に発現してくる一群の蛋白で、細菌から哺乳類にいたるまで広汎な生物種に高い相同性をもってみられることが知られている。HSPは分子量によって hsp60, hsp70, hsp90などいくつかのグループにわけられている。hsp70には hsp72, hsp73, grp75, grp78などが含まれているが、これまでこれらの蛋白の muscle pathology における役割は殆ど検討されていない。われわれはヒト hsp72 に対する特異的抗体が骨格筋 lysosome が異常蓄積している rimmed vacuole に多量に集積していることを見だし、その病理学的意義について考察する。

### 対象および方法

対象：Rimmed vacuole 型遠位性ミオパシー (RVDM) 4例、糖原病2型 (GSD 2) 1例、対照として病理学的に異常を認めない2例の生検筋。

抗体：ヒト hsp72 recombinant protein に対してウサギを免疫して作製したアフィニティ精製抗体。本抗体は2次元電気泳動イムノプロットングで hsp72 を特異的に認識し hsp73 との交叉反応はみられない。

イムノプロットング：10% SDS-PAGE を nitrocellulose 膜に transfer し、PAP 法で標識した。

免疫組織化学：Methacarn で固定したパラフィン包埋切片あるいは methacarn で固定した凍結切片を、PAP 法で染色。

免疫電顕：0.5% グルタルアルデヒド、2.0% パラフォルムアルデヒドで固定した組織を Microslicer で 60 $\mu$ m に薄切。10nm 金コロイド標識2次抗体を用いた preembedding 法により標識を行った。

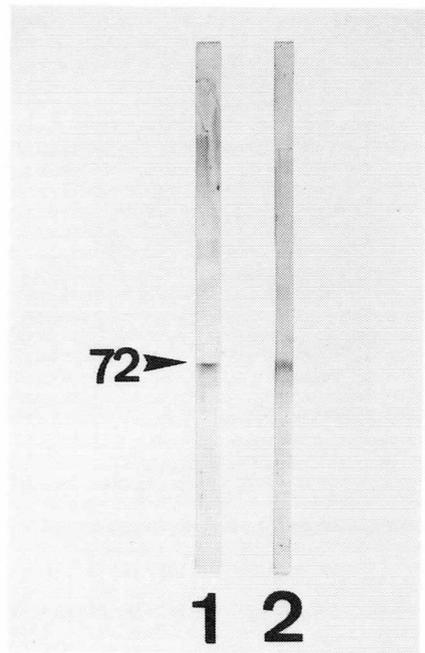


図1 抗 hsp72 抗体によるイムノプロットング  
1. 対照例, 2. RVDM 症例

\* 東京大学医学部脳研神経内科

\*\* 東京大学医学部第三内科

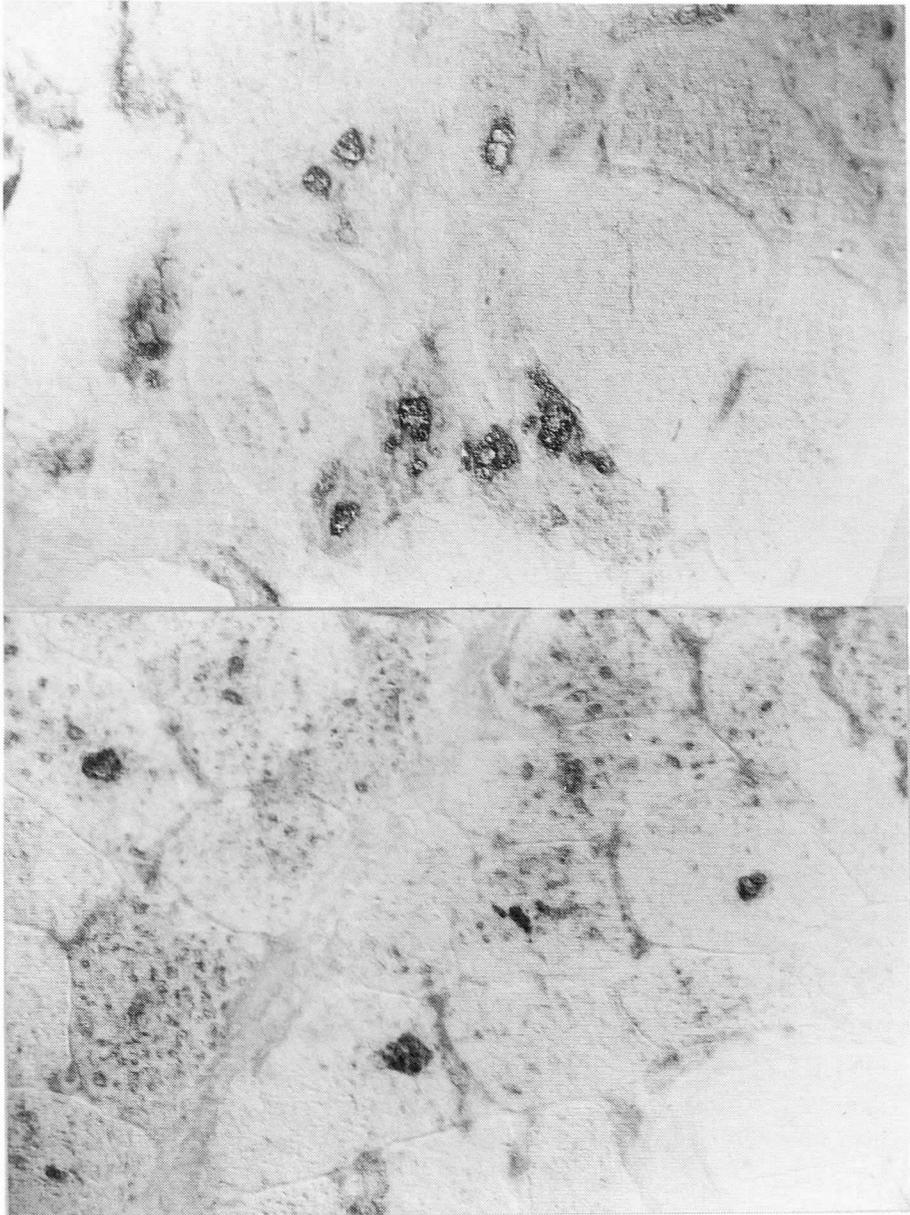


図2 抗 hsp72抗体による免疫染色，凍結切片  
上. RVDV 症例，下. GSD 2 症例

### 結 果

イムノブロッティング：抗 hsp72抗体は RVDV, GSD 2, 対照例いずれにおいても分子量72のバンドを認識した (図1).

免疫組織化学：対照例では筋線維は弱くほぼ均一

に染色され，また核の部分に強い標識がみられた。筋周膜の動脈平滑筋は強く標識された。RVDV では萎縮した rimmed vacuole を持つ筋線維に強い標識がみられ，特に rimmed vacuole が染色過程で流出しなかった標本では，rimmed vacuole

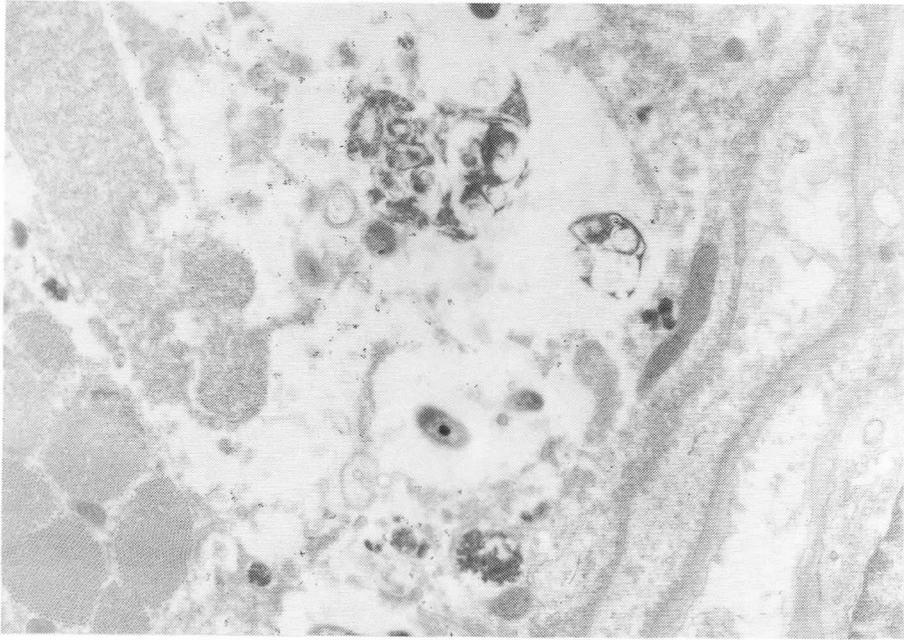


図3 抗hsp72抗体による免疫電顕  
rimmed vacuoleの部分が標識されている。

の部分に強い標識がみられた(図2A)。GSD 2においてもRVDM同様rimmed vacuoleの部分に強い標識が得られた(図2B)。

**免疫電顕：**Lysosomeと考えられるmyeloid bodyの部分が強く標識された。大多数のmyeloid bodyは染色の過程で流出してしまったため、金コロイドの標識はlysosomeの内部であるか外部であるかの確認はできなかった。筋原線維、RVDMの細胞質線維性封入体は標識されなかった(図3)。

### 考 察

本研究で第1に示されたことは、hsp72が正常筋においても常時発現していることである。従来hsp73は構成的に発現しているのに対して、hsp72は構成的には殆ど発現しておらず、熱ショックなどのストレスで大量に発現するといわれていた<sup>1)</sup>。しかし平滑筋や骨格筋のようにたえず力学的な緊張にさらされている細胞では、ある意味では常にストレス状態にあるということもでき、この事実

はこれまでの知見にてらしあわせてもそれほど解釈困難なものではないと考えられる。

第2にhsp72はRVDMにおいて、rimmed vacuoleをもつ萎縮した筋線維の特にrimmed vacuoleの部分に多量に存在することがわかった。この所見はRVDMだけではなく、GSD 2にも同様にみられ、筋のrimmed vacuole degenerationに普遍的にみられる現象であることが推定される。rimmed vacuoleは筋線維内に異常集積したlysosomeであり、hsp72のrimmed vacuoleへの集積は、hsp72がlysosomeにおける物質の代謝、特に蛋白分解に何等かの役割を果していることを示唆するものである。

hsp72は熱ショックなどのストレスで大量に発現してくる主要な蛋白であることはわかっているものの、その機能については殆ど知られていない。hsp70 familyの機能としてこれまでに、1)細胞骨格のrearrangement<sup>2)</sup>、2) coated vesicleのuncoating<sup>3)</sup>、3) リボゾームのassembly<sup>4)</sup>、4) 蛋白のオルガネラ膜通過を助ける<sup>5)6)</sup>などが知ら

れている。特に4)については、hsp73がATPの存在下において蛋白のlysosome内への移動を助け、蛋白分解を促進することが知られており<sup>7)</sup>、hsp72にも同様の機能が推定される。

### 結 論

hsp72は rimmed vacuole の部分に多量に存在する。hsp72は rimmed vacuole のみられる筋変性においてhsp72が変性蛋白のlysosome内への移行に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

### 文 献

- 1) Lindquist S: The heat shock response. *Ann Rev Biochem* 55: 1151, 1986.
- 2) Napolitano EW, Pachter JS and Liem KH: Intracellular distribution of mammalian stress proteins. Effect of cytoskeletal agents. *J Biol Chem* 262: 1493, 1987.
- 3) Ungewickell E: The 70-KD mammalian heat

shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelia from coated vesicles. *EMBOJ* 4: 3385, 1985.

- 4) Welch WJ and Feramisco JR: *J Biol Chem* 259: 1493, 1984.
- 5) Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA and Schekman R: A subfamily of stress protein facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332: 880, 1988.
- 6) Chirico WJ, Waters G and Blobel G: 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332: 805, 1988.
- 7) Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP and Dice JF: A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246: 382, 1989.

## 5) 悪性高熱, セントラルコア病などの骨格筋 ライアノジンレセプター異常

高木 昭夫\*

研究協力者 小島 進\* 竹村 玲子\*\* 井田 雅祥\*  
荒木 誠\*\* 埜中 征哉\*\*\*

### はじめに

Ryanodine receptor 蛋白は筋小胞体の  $Ca^{2+}$  遊離チャンネルを構成している<sup>1)2)</sup>。常染色体性優性遺伝を示す悪性高熱において、その責任遺伝子は第19染色体長腕 (19q13.1) にあり、ryanodine receptor の遺伝子と同一であると推定された<sup>3)4)</sup>。すなわち ryanodine receptor 遺伝子の突然変異が悪性高熱の原因である可能性が指摘された<sup>4)</sup>。

また悪性高熱感受性のある豚において、ryanodine receptor の trypsin 消化による peptide map が正常豚の pattern と異なること<sup>5)</sup>、その遺伝子異常が single point mutation であることが報告された<sup>6)</sup>。しかしヒト悪性高熱の ryanodine receptor 異常の詳細はまだ明かでない。

一方、悪性高熱を合併しやすいことが知られているセントラルコア病でやはりこの ryanodine receptor 遺伝子異常が推定され、本症は悪性高熱の allelic disorder である可能性が示唆された<sup>7)</sup>。

我々は昨年度の本学会議において、ヒト ryanodine receptor 異常を検討する目的で、筋生検 cryostat 標本に “*in vitro* labeling” 法による autoradiography を応用し悪性高熱でその量的異常が存在する可能性を指摘した<sup>8)9)</sup>。今回は症例数を増やして検討すると共にセントラルコア病、その類縁疾患であるマルチコア病などで検討することができたので報告する。

### 対象及び方法

対象は、悪性高熱 5 例、悪性症候群 2 例、熱中症 1 例、セントラルコア病 5 例、マルチコア病 2 例、ヒト正常対照 3 例である。いずれのも -80℃ に保存されていた検体である。また悪性高熱と悪性症候群例は skinned fiber 法により確定診断した例である。

方法は 1979 年に Young & Kuhar らが開発した “*in vitro* labeling” 法に準じた<sup>10)</sup>。その詳細は昨年の本会議報告書で報告した<sup>8)</sup>。

その概要は 6μm のクリオスタット切片を風乾後、0.1% form-aldehyde in PBS (pH7.4) で 10 分間弱固定した。次に緩衝液 A (20mM TrisHCl pH7.0, 25μM  $CaCl_2$ , 4mM ATP, 0.1M KCl) で 4℃, 10分間 preincubation した。その後 100μM の [<sup>3</sup>H]Ryanodine (Du Pont - New England Nuclear) を緩衝液 A 中で 90分間 incubate した。上記条件は昨年度の基礎的検討に依った。

オートラジオグラフィ (ARG) は、incubation 後のスライドガラスを乳剤 (サクラ NR-M 2) 中へ dip した後、暗箱中で 4℃, 4 週間の露出後に現像定着した。後染色は Hematoxylin & Eosin 染色を用いた。もしくは、後染色をせずに暗視野下で観察した。

ARG において銀粒子の密度を 1 標本上で無作為に 30箇所選び計測し、各々計測部位とスライド長軸に対し直角線上 (スライドガラスの短軸上) の点での background activity と比較した。

\* 虎の門病院神経内科

\*\* 冲中記念成人病研究所

\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

統計学的手法は Wilcoxon test を用いた。

## 結 果

Autoradiography (ARG) 上, 筋線維に一致して銀粒子がみられた(図1)。赤筋と白筋, 正常の筋線維と萎縮, 肥大線維などの間に銀粒子の分布の差はなかった。

悪性高熱, 悪性症候群, セントラルコア病, マルチコア病各々において疾患特異的な銀粒子の分布異常は認められなかった(図2, 3)。コアの部分においては若干銀粒子密度が低下しているコアもあったが, 低下が認められないコアも存在した(図4)。各々structured coreとunstructured coreに相当すると考えられた。

半定量的検討では, 悪性高熱では正常対象と比べ有意に銀粒子の密度が減少していた ( $P = 0.025$ )。セントラルコア病では正常対照と比較し有意差を認めなかった。そのほか症例数が少ないので統計学的検討はできないが悪性症候群では3例全例で低下, 熱中症1例でも低下を認めた。マルコチア病では2例中1例では低下していた(図5, 表)。

## 考 察

今回の検討で, 昨年度の報告を概ね再確認できた。ARG上の銀粒子(ryanodine receptor)の分

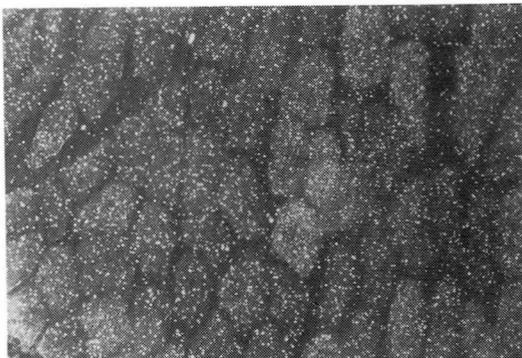


図1  $[^3\text{H}]$ ryanodineを用いた autoradiography (ARG)。正常対照例。暗視野下で観察。筋線維に一致して銀粒子がみられる。type 1, 2線維共に同密度である。

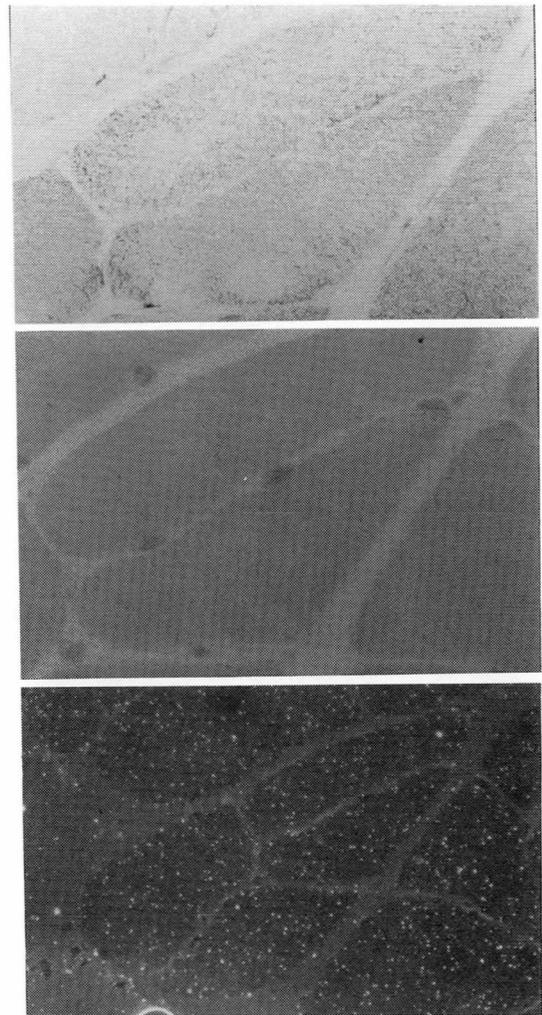


図2 セントラルコア病。上段: NADH-TR染色,  $\times 400$ , 中段: HEで後染色したARG,  $\times 400$ , 下段: 暗視野下でのARG,  $\times 200$ 。コアの部分の銀粒子密度は少ない様にもみえるが一定していない。

布の異常は今回検索した疾患では認められなかったが, 量的異常の存在が示唆された。

ARGでの定量的検査は本報告で用いた乳剤をスライドガラスにdipする方法(dipping法)よりもフィルムをスライドガラスに張り付ける方法(stripping法)が適している<sup>11)12)</sup>。今回はそこで乳剤の厚さによる誤差を少なくするため, スライドガラスの長軸に垂直な線上で各々のbackground

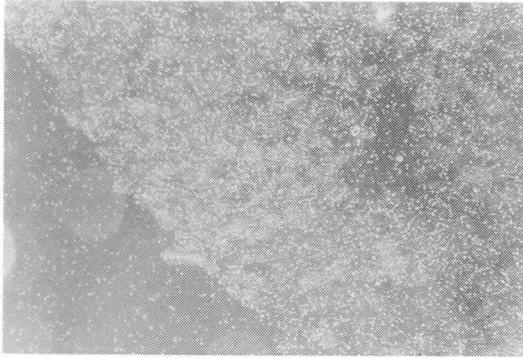


図3 悪性高熱例における $[^3\text{H}]$ ryanodine ARG,  $\times 100$ . 特に分布異常を認めない.

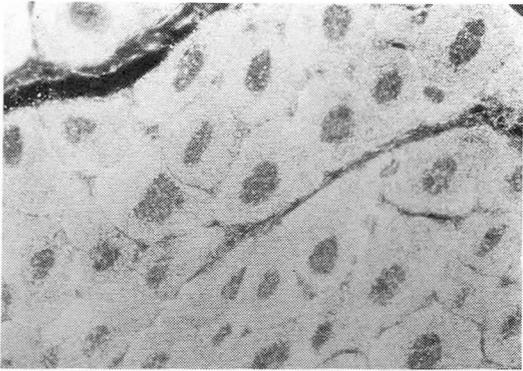


図4 セントラルコア病. 上段: NADH-TR染色を暗視野下で観察,  $\times 200$ . コアの部分は銀粒子密度が低下しているとは必ずしも言えない.

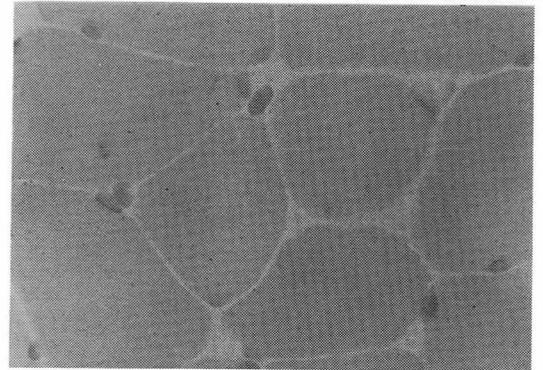
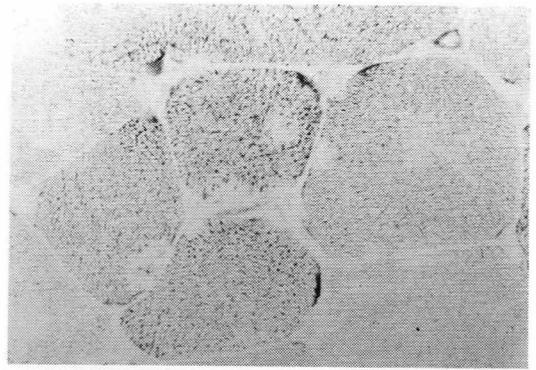


図5 マルチコア病. 上段: NADH-TR染色,  $\times 400$ . 下段: HEで後染色したARG  $\times 400$ . やはり銀粒子とコアの部分との間に一定の関連を認めない.

表 Autoradiographにおける silver grains の計測.

対象患者	個/ $55 \times 55 \mu\text{m}^2$	(M $\pm$ SD)
正常	61 $\pm$ 2 (55~67)	n.s.
セントラルコア病	59 $\pm$ 9	
マルチコア病	54, 46 ↓	
悪性高熱	48 $\pm$ 2	p=0.025
悪性症候群	43 ↓, 50 ↓, 42 ↓	
熱中症	42 ↓	

Wilcoxon test

各標本で無作為に30箇所を count した.

ていても像的に差がでる可能性のあること、切片の厚さにより Kd 値が異なる可能性などが指摘されており、定量化にはより高エネルギーの核種が適しているとも言われている<sup>11)12)</sup>.

今回は切片の厚さを $6 \mu\text{m}$ で施行したことや(前

activity も計測した.

$^3\text{H}$  は低エネルギーであり約1ヶ月間の感光を必要とすること、組織内に同じ放射線活性を持つ

年度報告書で6 $\mu$ m となっているのは10 $\mu$ m の誤りです。ここに訂正お詫びいたします。), standard を置いてないことから昨年の結果と絶対値の比較はできないが, 2 回の series において少なくとも悪性高熱例は銀粒子が量的に減少している結果が得られたことは意味のあることと考える。

現時点で悪性高熱の ryanodine receptor の分子構造がどのように変化しているかについては判明していない。また豚の悪性高熱と同様の point mutation があるか否かについても報告がない。分子構造の異常が量的減少とどのように結びつくか今後の検討が必要と思われる。

### ま と め

- 1) 悪性高熱, セントラルコア病などで [<sup>3</sup>H] ryanodine を用いた autoradiography を施行した。
- 2) 悪性高熱, 悪性症候群, 熱中症, セントラルコア病, マルチコア病の各々において疾患特有の分布異常は認められなかった。
- 3) 銀粒子の半定量的検討では正常対照群に比較し悪性高熱では有意の減少 (P=0.025) が見られたがセントラルコア病では差を認めなかった。悪性症候群 3 例, 熱中症 1 例, マルチコア病 1 例でも銀粒子密度の低下があった。
- 4) 今後より厳密な定量的検討が必要と考える。

追記: 本稿脱稿後ヒトの悪性高熱の一家系で, 豚と同じ ryanodine receptor 遺伝子の一塩基置換が報告された (Gillard EF et al. Genomics 11, 751-755, 1991)。

### 文 献

- 1) 高木昭夫, 小島 進: 悪性高熱研究の進歩, 日本臨牀 48: 197, 1990.
- 2) Takeshima H, Nishimura S, et al: Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. Nature 339: 439, 1989.
- 3) McCarthy TV, Healy JMS, et al: Localiza-

tion of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13. 2. Nature 343: 562, 1990.

- 4) MacLennan DH, Duff C, et al: Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. Nature 343: 559, 1990.
- 5) Knudson CM, Mickelson JR, et al: Distinct immunopeptide maps of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release channel in malignant hyperthermia. J Biol Chem 265: 2421, 1990.
- 6) Fujii J, Ohtsu K, et al: Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science 253: 448, 1991.
- 7) Kausch K, Grimm T, et al: Evidence for linkage of the central core disease locus to chromosome 19q. J Neurol Sci 98(suppl): 549, 1990.
- 8) 高木昭夫, 小島 進ほか: 骨格筋リアノジンレセプターのオートラジオグラフィ (ARG). “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, 1991, pp45-50.
- 9) 小島 進, 高木昭夫ほか: 悪性高熱, 悪性症候群におけるライアノジンレセプター異常——生検骨格筋のオートラジオグラフィによる検討。麻酔と蘇生 27 (別冊): 107, 1991.
- 10) Young WS and Kuhar MJ: A new method for receptor autoradiography, [<sup>3</sup>H] opioid receptors in rat brain. Brain Research 179: 255, 1979.
- 11) 重松和人: 定量的 in vitro autoradiography 法. “組織細胞化学1987”日本組織細胞化学会編, 学際企画, 1987, p192.
- 12) 服部隆則, 細川洋平ほか: 光顕オートラジオグラフィの手技と応用. “組織細胞化学1991”日本組織細胞化学会編, 学際企画, 1991, p54.

## 6) 筋疾患の治療効果について ——運動負荷試験による AT (Anaerobic Threshold) の検討——

田代邦雄\*

研究協力者 伊藤和則\* 牧野均\*\* 佐藤貴一\*\*  
森若文雄\* 島功二\*\*\*

筋疾患に対して運動療法が種々の程度施行されているが患者個々の病状の差による運動強度が要求されるが、運動療法の効果を客観的に判定することは比較的むずかしい。今回 AT (anaerobic threshold, 嫌気性閾値) を指標として検討する。AT は有氣的、無氣的代謝、緩衝作用の一連の変化に注目して、運動強度の増加に伴う乳酸の上昇、ガス交換変化の起こる直前の運動強度を AT と定義した。AT の上昇が有氣的代謝にもとづく運動能力が高いことを示し、また筋組織の酸化能力と関連が示唆されている。今回われわれは運動療法前後の AT 変化を測定し、その妥当性を検討する。またミトコンドリア ミオパチー、多発性筋炎の AT 変化から運動能力改善等について検討する。

### 方 法

実験 1 まず健常人 8 名 (男性 4 名, 女性 4 名) 20~38 歳 (平均  $24.6 \pm 6.3$ ) を対象として自転車エルゴメーター運動負荷を行い、初期 AT 測定後、7 週間の期間、運動を継続した。頻度は週 3 回、各 10 分間とし、運動強度は 100~200% AT 酸素摂取量でおこなった。初期 AT を測定し、7 週間後での比較をおこなった。

\* 北海道大学医学部神経内科

\*\* 美唄労災病院リハビリテーション科

\*\*\* 国立療養所札幌南病院神経内科

実験 2 つぎに慢性進行性外眼筋麻痺を伴うミトコンドリア ミオパチー 3 症例の検討をした (表 1)。CoQ10 150mg を投与し、投与前と投与 4 週、8 週、12 週後の AT を測定した。また 61 歳、女性、18 年間の罹病期間を有する多発性筋炎の症例にたいして運動療法とステロイド療法の有効性についても検討した。

### 結 果

実験 1 全被験者の運動強度は各々の初期評価時

表 1 ミトコンドリア ミオパチーの症例  
対象は年齢が 45~55 歳の女性 2 名、男性 1 名の 3 症例であり、3 症例とも血液中のピルビン酸の上昇が見られ、症例 1, 2 は共に CCO の低下が認められた。

	症例 1	症例 2	症例 3
年齢	45 歳	51 歳	55 歳
家族歴	+	-	-
罹病期間	12 年	10 年	10 年
乳酸 (mg/dl) (9-16mg/dl)	12.2	10.3	10.6
ピルビン酸 (mg/dl) (0.36/0.59mg/dl)	0.7	0.8	1.27
NADH cyt C R (78.1-170.8)	344.5	250.2	352.2
Succinate cyt C R (197.2-366.6)	270.8	258.8	244.2
Cyt C Oxidase (144.7-355.6)	93.2 ↓ ↓	122.2 ↓	145.2

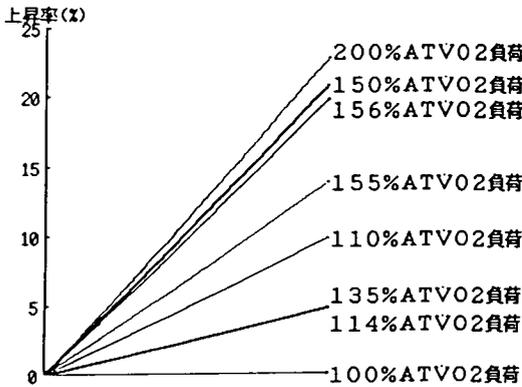


図1 AT 酸素摂取量と運動強度の関係  
200%の運動強度をかけた症例のAT 酸素摂取量が23%と最も高い上昇率を示したが、100%の運動強度ではAT 酸素摂取量の変化は、認められなかった。

のAT 酸素摂取量の100~200%の間にあった(図1)。運動プログラム終了時のAT 酸素摂取量は200%の運動強度で施行した2例が23%と最も高い上昇率を示し、100%の運動強度を与えた例では変化がなかった。上位4名による平均上昇率は19.5%(165.3%AT 酸素摂取量)であり、下位4名による平均上昇率は8.5%(114.7%AT 酸素摂取量)であった。

また行った運動強度とAT 酸素摂取量の上昇率の間には $r=0.86$ と高い相関があった。運動強度の違いによる運動療法の訓練効果を客観的に評価可能であった。

実験2 症例1, 2はCoQ10投与前のATは16.71ml/kg/m, 15.73ml/kg/mと健常人の正常下限ないし、低下が認められた(表2)。症例3は投与前のATを測定していなかった。症例1, 2ともに8週後以後のATは投与前と比較すると有意に上昇していた。臨床症状特に外眼筋麻痺、眼瞼下垂の症状改善はみられなかったが、持久力、易疲労感の改善が見られた。症例3は4週, 12週後のATは20.46, 20.88ml/kg/mと健常人と比較しても高い値をとり、CoQ10の効果が予想された。

多発性筋炎の症例はCKが1000~950IU/lを推移するため、ステロイドを投与し、CKが100~200

表2 ATの結果

症例1, 2共にCoQ10投与前に比較して8週, 12週後は有意にATの上昇が見られた。症例3は投与前値が測定出来なかったため比較できないが、健常人と比較しても高い値を示し、CoQ10の効果が予想された。

	症例1	症例2	症例3
投与前	16.71	15.73	
投与4週後	18.81	16.82	20.46
8週後	20.65	20.77	
12週後	20.68	20.12	20.88

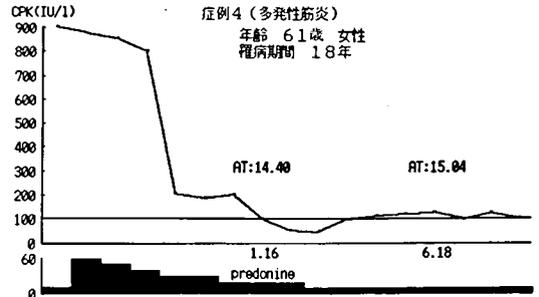


図2 多発性筋炎の経過

CK値が900IU/l前後を推移していたが、プレドニンを使用することで100~200代まで改善した。この時点でATを測定した。ATは14.40ml/kg/mであり、50ワットの運動強度をかけて運動療法を施行した。運動開始20週後ATは15.04と上昇は認められなかったが、CKの上昇はなく経過した。

IU/lまで低下した時点で運動療法を開始した(図2)。運動開始時点のATは14.40ml/kg/mであり、年齢を考慮しても低下していた。

運動プログラムとして50ワットの負荷量を基準として20週間運動を継続した。20週後のATは15.04ml/kg/mとやや上昇したが有意の差は認めなかった。しかしCKの上昇は認めず、また運動能力特に腰肢帯筋の脱力の改善が見られた。

### 考 察

Wassermannは有氣的代謝、無氣的代謝、緩衝作用の一連の運動変化に注目し、漸増運動負荷に

より、血中の乳酸の上昇に伴う代謝性アシドーシス、それに伴うガス交換変化が起こる直前の運動強度ないし VO<sub>2</sub> (酸素摂取量) のレベルを AT と定義したり、測定法として VE (分時換気量) -VO<sub>2</sub> 曲線の変移点、VO<sub>2</sub>-VCO<sub>2</sub>(二酸化炭素排出量) (V-slope 法)、VE-VO<sub>2</sub>曲線の変移点を使用。

AT はまた血中乳酸濃度や乳酸/ピルビン酸比が急激に増加する時点での VO<sub>2</sub>である。VO<sub>2</sub> kinetics は AT を境として変化する。AT 以下の強度での一定負荷運動では運動開始から数分で VO<sub>2</sub>は定常状態に到達するが、AT 以上の運動強度では定常状態に到達するまでの時間の遅延が起こる。この現象を利用して VO<sub>2</sub>の増加の程度を指標として AT を判定可能である<sup>2)</sup>。

乳酸の蓄積により生じた代謝性アシドーシスの為、換気ドライブが刺激される。AT 以上の強度で運動を持続した時は VE は呼吸数の増加として代償する<sup>3)</sup>。AT 以下での運動強度では 1 時間以上も運動を持続可能である。AT は細胞代謝に関連している呼吸循環系の異常を鑑別診断する為に用いることができる。

われわれは今回健康人の AT の変化を運動前後で比較し、運動効果の客観的評価をおこなったが、酸素摂取量の増加、AT の上昇は運動強度と相関が認められた。また運動時間は 1 日 10 分でも AT 以上の運動で体力の増進が可能であることが示唆された。運動中に活動筋に対する酸素供給が制限されると AT は低下する。AT は組織への酸素供給の変化に敏感で、主観的な努力感とは無関係なので治療効果判定に使用できるのではないかと考え、ミトコンドリア ミオパチーとくにエネルギー代謝の障害にもとづく疾患に AT を指標として運動能力の改善、症状の変化を観察した。電子伝達系の障害による障害、とくに CCO (cytochrome C oxidase) の低下がみられた症例に CoQ10 の 150mg を投与した場合、血中の CoQ10 の濃度が上昇し、自覚的に症状の改善が認められたが、客観的に捕られる指標がなかった。今回 AT を指標として使用することで AT の変化を時間と共にその推移を観察することで薬剤の効果が判定可能であった。

多発性筋炎は筋痛、近位筋優位の筋力低下、腿反射低下等の症状が出現し、CK、アルドラーゼ、GOT、GPT、LDH などの筋肉由来の酵素の上昇が見られるが、経過が長く、筋力低下に対しての運動療法をどの程度が各症例に対して最も妥当かなどの疑問がある。筋肉組織の崩壊がある程度おさまった状態で運動療法を開始するのであるが、今回 CK を指標として AT を測定し、心拍数を目安にし約 50ワットの運動強度で運動療法を継続した。AT の上昇は見られなかったが、酸素摂取量の改善と心拍数の減少があり、運動療法の効果があった。長期間運動療法を継続することで CK の変化、筋脱力の進行がどのように推移するか今後の課題である。

## 結 語

1. 運動強度と AT 上昇率について検討した。
2. 運動強度 (% AT 酸素摂取量) と AT 上昇率には相関が認められた。AT を測定することで運動療法施行前後での訓練効果の客観的評価が可能であった。
3. ミトコンドリア ミオパチーの 3 症例とも CoQ10 の投与にて AT、酸素摂取量の上昇が認められ、自覚症状と相関が見られ、薬剤効果判定の尺度として有効と思われた。
4. 多発性筋炎の運動負荷量を AT を基準として AT 以下の運動を継続することで CK 等の上昇と筋脱力の改善に有用と思われた。

## 文 献

- 1) Wasserman K, Hansen JE, Sue DY and Whipp BJ: Principles of exercise testing and interpretation. Lea & Febiger, 1987.
- 2) Beaver WL, Wasserman K and Whipp BJ: A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. J App Physiol 60: 2020-2027, 1986.
- 3) Wasserman K: Dypnea on exertion: Is it the heart or the lung?. JAMA 248: 2039-2045, 1982.

# 7) ダントロレンナトリウムによる筋ジストロフィー治療の試み

## —— 1年間の臨床経験 ——

木 村 淳\*

研究協力者 梶 龍 児\* 秋 口 一 郎\* 濱 野 利 明\*

### 要 約

筋ジストロフィー患者において血清CK値を低下させる効果のあるダントロレンナトリウムが、本症の進行を遅延させるのに有効であるか否かを調べるために、5名の患者において、本剤(0.5~1mg/kg 体重)を投与しながら、臨床症状を1年以上追跡した。この間の症状の進行度を投与前1年間とレトロスペクティブに比較したところ、前1年間で進行が5例中2例で見られたのに対し、後1年間では進行は見られなかった。例数が少なく、統計的解析も不可能であるが、今後さらに治療を試みる価値があるものと思われた。

### はじめに

筋ジストロフィーにおける筋組織の破壊には細胞体内へのカルシウムの異常な流入が関与していることが指摘されている<sup>1)</sup>。近年、筋小胞体膜を安定化させる作用のあるダントロレンナトリウムがmdxマウスまたはDuchenne型筋ジストロフィーで血清CK値を低下させるとの報告がなされており<sup>2,3)</sup>、我々も同様の結果を他のジストロフィーにおいて得た<sup>4)</sup>。

今回我々は、ダントロレンナトリウムが、実際に筋ジストロフィー患者において症状の進行を遅延させる効果があるか否かを調べるために、5名の患者で臨床症状を1年以上追跡し、症状の進行

度を投与前1年間とレトロスペクティブに比較した。

### 方 法

19~39歳の男性2名、女性3名で、筋生検および筋電図で診断のついたFSH型2例、およびLimb-Girdle(L-G)型3例において、投与前1年間の臨床症状の変化を患者の申告により現時点で評価し、投与後1年間の症状の変化と比較した。

評価法は、平成元年度厚生省「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」報告書<sup>5)</sup>にもとづいた簡易機能評価スケールを用いた。患者の記憶がさだかでない項目は除外した。

ダントロレンナトリウムは経口にて25~50mg/日(0.56~0.91mg/kg 体重)を1回~2回にかけて投与した。

### 結 果

各例のまとめを表に示す。

前年度に報告した様に症例1~4では、血清CK値の変動はダントロレンナトリウム投与量と逆の相関が見られ、本剤が血清CK値を低下させている可能性が示唆された<sup>4)</sup>。

FSH型2例(症例3, 4)では、投与前後各1年間で上肢機能区分における評点に変化は見られなかった。L-G型の症例1において、前1年間で障害度区分2a, 階段昇降可(片手すり)の評価

\* 京都大学医学部神経内科

表

Case	age/sex	Dose/BW (mg/kg)	1 yr BEFORE	1 yr AFTER
1 L-G	19M	0.91	IV:2a: a to b	No Change
2 L-G	39M	0.90	II:1: b to c	No Change
3 FSH	21F	0.56	No Change	No Change
4 FSH	34F	0.96	No Change	No Change
5 L-G	24F	0.61	Study Incomplete	

が a から b へ進行したが、後 1 年間ではそれ以上の進行は見られていない。同じく L-G 型の症例 2 では前 1 年間に動作区分一起立動作で手を使わずにできたもの (b) が、できなくなった (c) が、投与開始後 1 年間では変化を見なかった。

副作用としては、症例 1 で約 1 ヶ月、症例 4 で約 1 週間続いた一過性の脱力感があったほか、症例 5 で軽度の肝機能障害が疑われたが、筋由来の血清酵素と重複していたため判定が困難であった。

### 考 察

本研究はレトロスペクティブな聞き取り調査で、プラセボ効果が否定できず、また症例数も少なく統計的に結論を出すことはできない。しかし、その効果に否定的なデータは得られず、少なくとも今後より多くの施設で治験を行なう価値があるも

のと考えられた。またダントロレンナトリウムの作用機序からは脱力が起こり ADL の悪化をきたすことも考えられたが、本研究で用いた用量 (< 1 mg/kg 体重) では、全く問題にならなかった。

### 文 献

- 1) Turner LFG, Westwood T, et al: Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mouse. *Nature* 335: 735-738, 1988.
- 2) Quinlain JG, Johnson SR, et al: Dantrolene normalizes serum creatinine kinase in mdx mouse. *Muscle Nerve* 13: 268-269, 1990.
- 3) Bertorini TE, Palmieri GMA, et al: Effect of dantrolene in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 14: 503-507, 1991.
- 4) 木村 淳, 梶 龍児: 筋ジストロフィー症における Dantrolene Sodium の血清 CPK 値に及ぼす影響. “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, 1991, pp43-44.
- 5) 井形昭弘, 福永秀敏ほか: 筋ジストロフィー症患者のデータベースの活用(3). 厚生省「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」報告書, pp251-265.

## II. ジストロフィン (No. 1)

## 8) Becker 型筋ジストロフィー 3 例の分子遺伝学的、免疫学的検討

斎藤 加代子\*

研究協力者 池谷 紀代子\* 山内 あけみ\* 池中 晴美\*  
三島 真弓\* 原田 隆代\* 小沢 鉄二郎\*\*  
福山 幸夫\*

### はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) と Becker 型筋ジストロフィー (BMD) は共にジストロフィン遺伝子の異常により生じる疾患であるが<sup>1)</sup>, BMD では DMD と比較して, 家系により臨床症状が大きく異なっていることが知られている。これは変異したジストロフィン遺伝子によって, それぞれ異なった異常タンパクが作られるため, 多彩な症状が出現するものと考えられる。今回我々は, 臨床的に BMD と診断された 3 男児例について, リンパ球由来 DNA におけるジストロフィン遺伝子の欠失の解析と生検筋の免疫学的検討を行った。遺伝子の異常とタンパクの異常について, 臨床症状と比較して報告する。

### 対象及び方法

#### 1. 症例

東京女子医大病院小児科外来通院中で, 臨床的に BMD と診断された 3 例を対象とした。図 1 にそれぞれの臨床像を簡単に示した。

**症例 1** 現在 7 歳の男児。家族歴に特記すべき事はなく, 運動発達もほぼ正常のパターンを示した。2 歳すぎより風邪などで発熱した時, 下肢の筋肉痛を訴えて歩けなくなるエピソードが繰り返見られ, 4 歳頃からは運動後にも下肢痛が出現している。ごく軽度の筋力低下があるが, 片足立

ち, ジャンプは可能であり, また下肢の仮性肥大が認められる。血清 CK は 2593mU/ml, IQ は正常。

**症例 2** 現在 18 歳の男子。母方の祖父が 10 歳頃から歩行障害が出現し, 50 歳頃までは杖を使って歩いていたが, 58 歳から歩行不能になった。患者の運動発達に特に遅れはなかったが, 立ち上がる時につかまって立ち, また他の子供達に比べ走るのが遅く, 運動が苦手だった。4 歳下の弟も同様に運動が不得意だが, 二人とも筋肉痛を訴えたことはない。普通高校 3 年生に在学しており, IQ は正常。両足跳び, 片足立ちは可能で, 下腿に仮性肥大を認める。患者の血清 CK は 3477mU/ml。

**症例 3** 現在 8 歳の男児。家族歴に特記すべきことなし。座位獲得まではほぼ正常の運動発達を示したが, 歩行開始が遅れ, 転びやすい児であった。4 歳すぎから, 運動後に下肢の痛みを訴えるようになった。下肢に著しい全身の仮性肥大があり, 両足跳びは可能だが, 片足跳びはできない。IQ50 と遅れがあり, 血清 CK は 17160mU/ml と著明に上昇していた。

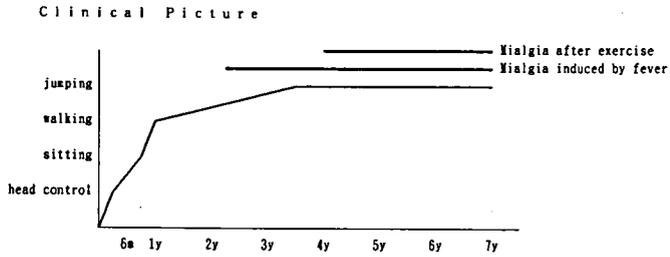
#### 2. 免疫学的検討

ジストロフィンの cDNA<sup>2)</sup> に基づく 5 種類のアミノ酸を用いて, ウサギで作成した 4 種のポリクローナル抗体 (P00, P04, P23, P34) と, マウスで作成された 2 種のモノクローナル抗体 (2.5 E2, 4C5—富士レビオ株式会社より) を使用して (図 2), 間接蛍光抗体法による免疫組織染色とイノムプロットを行った<sup>3)</sup>。

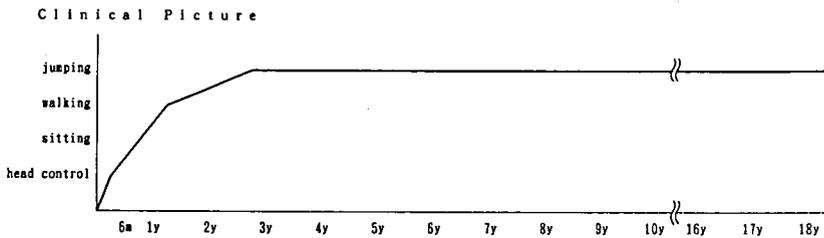
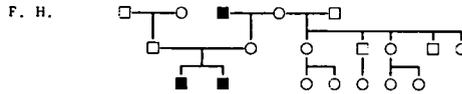
\* 東京女子医科大学小児科

\*\* 国立精神・神経センター神経研究所機能研究部

Case 1



Case 2



Case 3

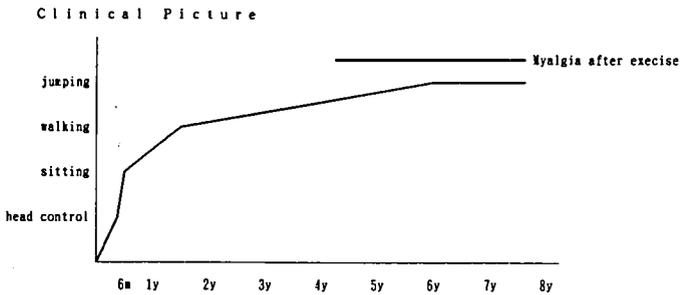


図1 症例1～3の臨床像

3. 分子遺伝学的検討

リンパ球より高分子DNAを抽出し、ジストロフィンcDNAをプローブとしたサザンブロットと、Chamberlainら<sup>4)</sup>及びBeggsら<sup>5)</sup>の報告に基づいて作成したプライマーをもちいたPCRを行った。

結 果

1. 免疫学的検討

症例1における免疫組織染色では、ポリクローナル抗体P23を除き、細胞膜が染色されたが、染色性は低下していて、不連続的に染色された(図3A)。P23は筋細胞膜とまったく反応しなかつ

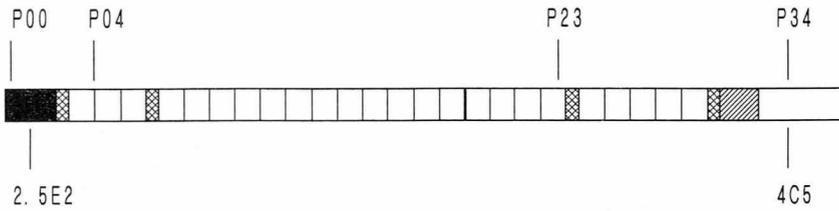


図2 免疫学的検討に使用した抗体  
ジストロフィンタンパク模式図の上側にポリクローナル抗体の位置、  
下側にモノクローナル抗体の位置を示した。

た。ポリクローナル抗体を用いたイムノブロットでは、P23を除く3種の抗体でおよそ370kDaの、正常のジストロフィンより分子量の小さなバンドがやや淡く検出された。

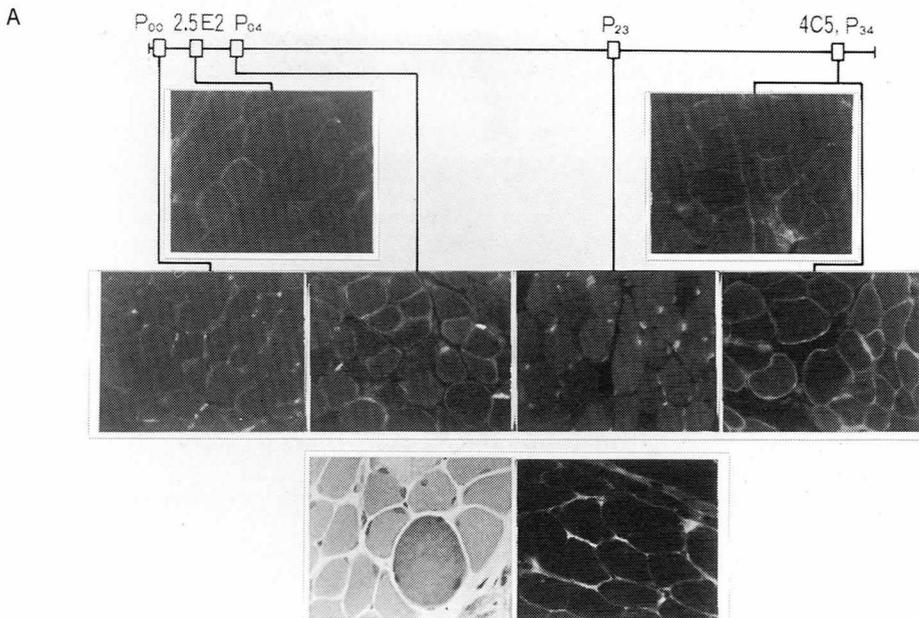
症例2では、全ての抗体がBMDに特徴的とされる筋細胞膜の不連続染色パターンを示した(図3B)。患者の弟も同じ染色所見を示した。イムノブロットでは、全てのポリクローナル抗体で正常よりわずかに分子量の小さいバンドが淡く検出された。

症例3では、P04を除くすべての抗体で筋細胞膜は連続的に均一に染色された。ポリクローナル抗体を用いたイムノブロットで、約260kDaの分

子量の小さなバンドが強く検出された。抗体P04は、患児の筋と反応しなかった(図3C)。

## 2. 分子遺伝学的検討

cDNAプローブを用いたサザンブロットと、BeggsらおよびChamberlainらの報告に基づいて作成したプライマーを用いたPCRの両者で、症例1では exon45から49、症例2では exon45から47の、いずれも in-frame の欠失が検出された(図4)。また、症例3においては、サザンブロットで exon10から37の広範囲の欠失が見られた。この例については、欠失をもつDNAがそのまま mRNA に転写されていて、スプライシングは正常に保たれていることが、exon9と exon38の中に



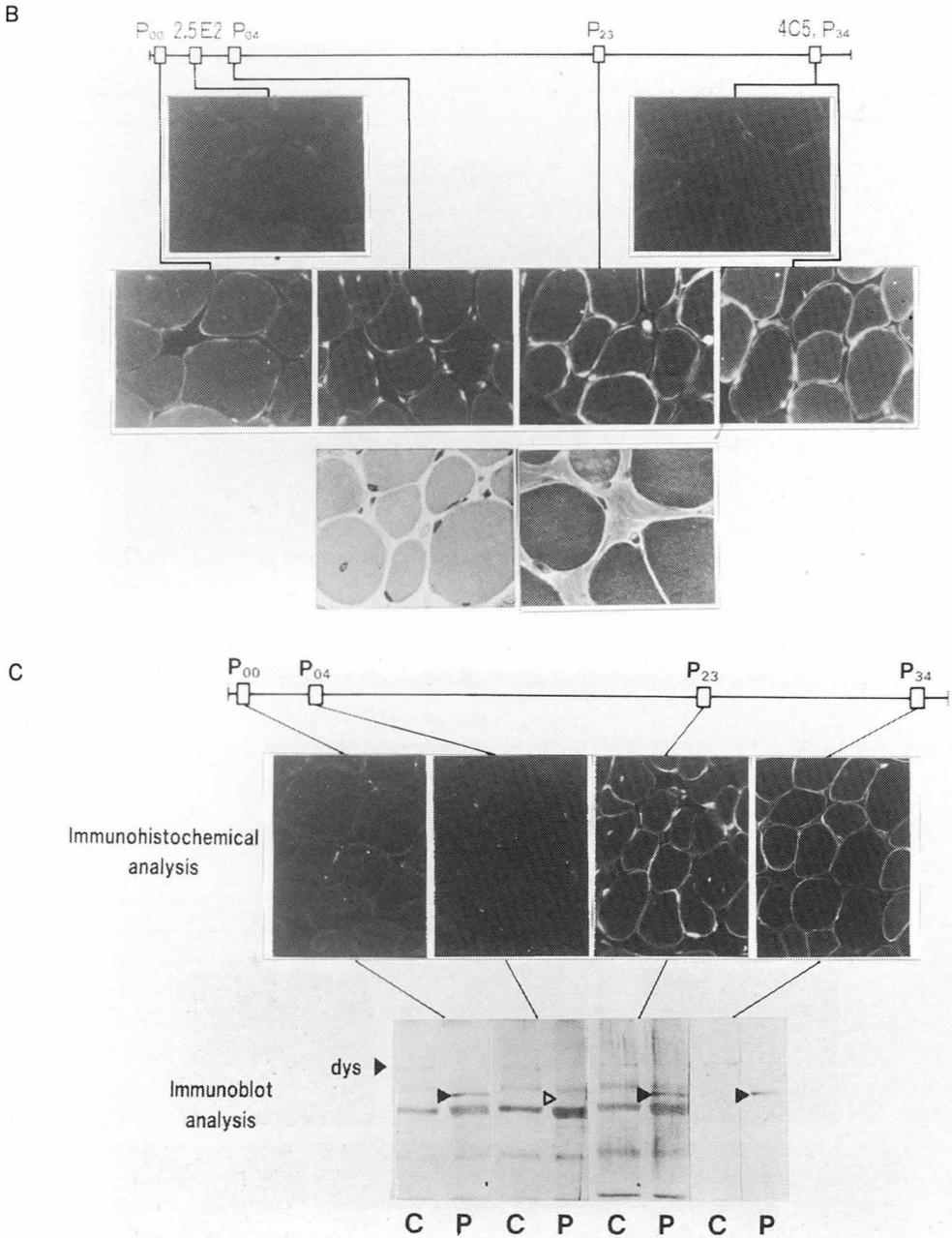


図3 症例1～3の免疫学的検討

A：症例1の免疫組織染色とHE染色（最下段左側）及びGomori-Trichrome染色（最下段右側），P23を除き，筋細胞膜が淡く染色されている。

B：症例2の免疫組織染色とHE染色（最下段左側）及びGomori-Trichrome染色（最下段右側），全ての抗体が筋細胞膜を淡く染色している。

C：症例3のポリクローナル抗体での免疫組織染色とイムノブロット．P04は筋と反応しない．イムノブロットのPは患者，Cはコントロール。

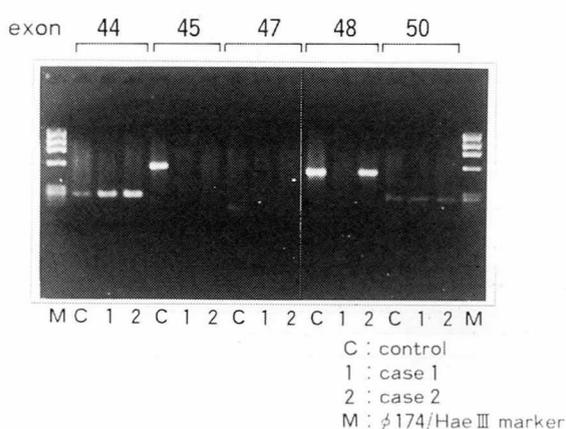


図4 症例1, 2のPCR

Chamberlainら及びBeggsらの報告に基づいて作成したプライマーを用いて、exon44から50における欠失の有無について調べた。症例1においてはexon44とexon50は存在していることが確認され、症例2の欠失はexon45からexon47であることが示された。

作成したプライマーを用いて行った、筋 mRNA のPCRにより確認されている<sup>9)</sup>。

## 考 案

ジストロフィン遺伝子の異常と、それによって生じる異常タンパクが、BMDの臨床症状とどのような関係にあるのかを知るために、複数の抗体を用いた免疫学的検討と、分子遺伝学的検討とが、共に行われているBMDの報告例についてまとめ<sup>7-10)</sup>、図5に示した。いずれの例においても、遺伝子の欠失が抗体の作成に用いられたアミノ酸部位を含んでいる場合、その抗体は生検筋と反応しない。その部位特異性の高さは、小さな欠失を持つ症例1と2のP23に対する反応性の差としてよく示されている。すなわち、P23はexon48の3'端からexon50の5'端までの配列を元に合成されたアミノ酸に対する抗体であるから、exon45から49の欠失を持つ症例1とは反応せず、exon45から47の欠失を持つ症例2とは反応した。数多くの抗体について検討することで、遺伝子の欠失部位の特定がある程度可能になると思われる。

Beggsらは異常ジストロフィンを持つ68例の検討により、遺伝子と臨床的重症度との関係を示し、Englandらの例やその他の例から三重螺旋構造ドメインの欠失は、大きくても臨床的な影響は少ないとのべた<sup>9)</sup>。しかし、Arahataら<sup>7)</sup>、Ohtaniら<sup>10)</sup>は我々の症例3と同じように重症の経過をとっている例を報告しており、我国においてはこの部位の大きな欠失をもつ重症BMDの存在が確認されている。また、共に三重螺旋構造ドメインの後半に小さなin-frameのDNA欠失をもつ症例1と2の臨床症状を比較すると、症例1は筋肉痛を主訴とし、症例2は筋肉痛がなかった。しかも症例2の欠失は症例1の欠失に含まれる形になっている。この相違が筋肉痛の有無に直接関係があるかどうかはまだ不明であるが、興味深い2例であり、さらに症例を増やして検討したい。さらに、図5に示した報告例3例と症例3ではジストロフィンの発現量は保たれていたが、症例1と2では減少していた。

筋ジストロフィーの臨床症状は変異DNAから作られるタンパクの量と機能により決定されると考えられている。ジストロフィンの機能解明のためには、BMDの臨床症状をDNAやタンパクの異常と比較検討していくことが重要であると考えた。

## 結 語

1. BMD 3例について、ジストロフィン遺伝子とタンパクについて調べ、臨床症状と比較した。
2. 筋痛を主訴とした症例1では、exon45~49のin-frameの欠失と分子量およそ370kDaの異常ジストロフィンを認め、その発現量は減少していた。筋痛の訴えのなかった症例2では、exon45~47のin-frameの欠失があり、ジストロフィン発現量の減少を認めた。臨床症状の重い症例3では、exon10~37の大きなin-frameの欠失と約260kDaの分子量の小さい異常ジストロフィンを認めたが、発現量は正常であった。
3. ジストロフィンの機能解明のためには、BMDの臨床症状とDNAやタンパクの異常との比較検討が重要であると考えた。

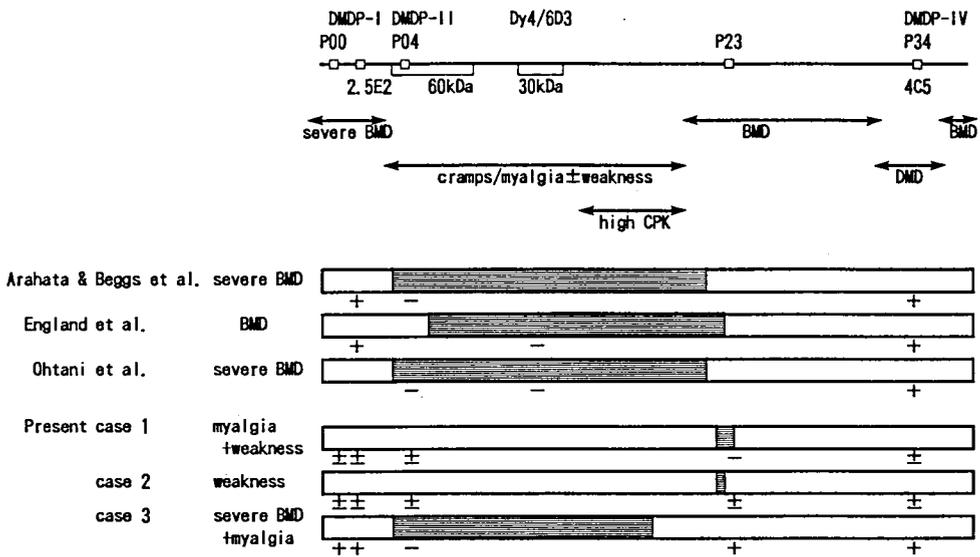


図5 BMD筋組織の免疫学的反応，遺伝子欠失と臨床像との関係  
 図の上より抗体の位置，Beggsらの示した遺伝子欠失と臨床像との関係<sup>9)</sup>，報告例における臨床像と免疫学的反応との関係<sup>7)-10)</sup>，今回我々の症例における臨床像と免疫学的反応との関係を示した。図の塗り潰した部分は遺伝子欠失を，+，-，±はそれぞれ抗体の組織との反応性を表わす。

### 文 献

- Hoffman EP and Kunkel LM: Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 2 : 1019-1029, 1989.
- Koenig M, Monaco AP and Kunkel LM: The complete sequence of dystrophin predicts a rod shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53 : 219-228, 1988.
- Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, et al: Dystrophin diagnosis: comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescent and immunoblot analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 7154-7158, 1989.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al: Deletion screening of Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic acids Res* 16 : 11141-11156, 1988.
- Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, et al: Detection of 98% of DMD/BMD deletions by PCR. *Hum Genet* 86 : 45-48, 1990.
- Ikeya K, Saito K, Hayashi 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)
- Arahata K, Beggs AH, Honda H, et al: Preservation of the C-terminus of dystrophin molecule in the skeletal muscle from Becker muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 101 : 148-156, 1991.
- Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, et al: Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Gene* 49 : 54-67, 1991.
- 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.
- Ohtani H: personal communication.

## 9) ジストロフィン遺伝子欠失を伴い、運動時筋痛、高CK血症を呈した症例

後藤 幾生\*

研究協力者 波多江 智子\* 山田 猛\* 小林 卓郎\*  
塚本 浩子\*\* 内野 誠\*\*\*

### はじめに

ジストロフィン遺伝子の異常は一般に Duchenne 型または Becker 型筋ジストロフィーをきたすと考えられている<sup>1)</sup>。今回われわれはジストロフィン遺伝子の欠失を認めるが、臨床上明らかな筋力低下はなく、運動時筋痛、腓腹筋仮性肥大、翼状肩甲、高CK血症を呈した非進行性ミオパチーの男性例を経験したので報告し、病態について考察する。

### 症 例

症例：30歳，男性 (NM900956)

主訴：運動時筋痛

家族歴：血族結婚なく、家族内に同様の症状の者はいない。

現病歴：小学生の頃より800m程走ると下肢に筋痛が生じ走れなくなっていた。日常生活動作では筋痛は生じず支障なかった。1990年1月、スキーを一日行なったところ、全身の筋痛、褐色尿が生じたが数日で軽快した。同年7月、動悸のため循環器内科受診。一過性心房細動を指摘されたが、器質的心疾患は認められなかった。その際、高CK血症を指摘され精査のため、8月当科入院となった。

入院時現症：一般内科的に異常なし。神経学的には腓腹筋仮性肥大、翼状肩甲を認める以外、筋力

低下等なく、特に異常なかった。

検査所見：血液生化学的所見ではCK1105 (MM 96%) IU/L (正常：60~160) aldolase 9.3 IU/L (正常：1.7~5.7) ミオグロビン110ng/ml (正常：60以下) と上昇していた。LDHは460 IU/L と正常で isozyme の欠損はなかった。阻血下運動負荷試験で血中乳酸、ピルビン酸は正常に増加した。60時間絶食試験で血中CKの上昇はなかった。心電図、心エコー所見に異常なし。針筋電図では上下肢筋に short duration, low amplitude MUP を認め、筋原性変化を示した。

左上腕二頭筋生検所見：H.E.染色では、筋線維の大小不同、中心核の増加、fiber splitting がみられた。筋線維の貪食、壊死、再生像はみられなかった。ATPase 染色で type grouping, grouped atrophy は認めなかった。グリコーゲン、脂質の蓄積、ragged-red fiber は認めなかった。3種の抗ジストロフィン抗体<sup>2)</sup> (ジストロフィン蛋白アミノ酸配列407~815に相当するペプチドを認識する抗60KDa抗体、1181~1388を認識する抗30KDa抗体、3495~3544を認識する抗ペプチド-IV抗体) による免疫組織化学的所見では筋膜はほぼ全周性に染色されたが、染色性は低下していた。同じ抗体による生検筋の western blot では患者ジストロフィン heavy chain に比較して明らかに含量が減少しているが、分子量の異常は明らかでなかった (図1)。ジストロフィン遺伝子の構造異常を Chamberlain ら<sup>3)</sup> の方法により PCR 法で末梢血白血球のDNAを増幅して検索したとこ

\*九州大学医学部脳研神経内科

\*\*大阪大学医学部小児科

\*\*\*国立療養所再春荘病院神経内科

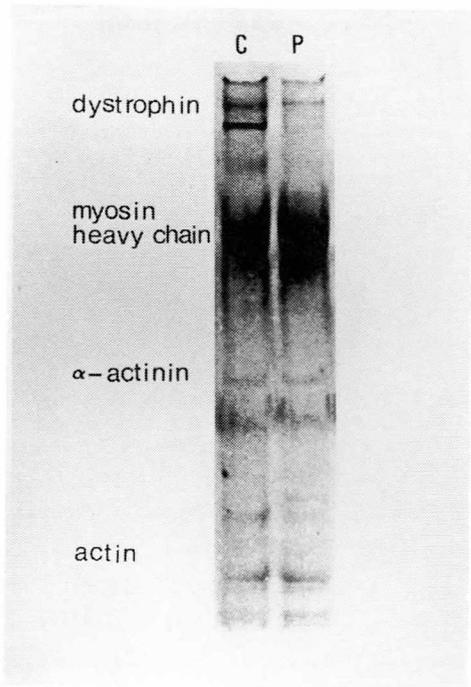


図1 生検筋の western blot  
 生検筋をホモジュネートで可溶性分画をとり SDS ゲル電気泳動後ニトロセルロース膜にプロットし、抗ジストロフィン抗体(抗ペプチドIV抗体)及びABC法で染色した。  
 C: 正常コントロール  
 P: 本症例

る exon45 を含む遺伝子の欠失を認めた (図2)。

### 考 察

本例は運動時筋痛、腓腹筋仮性肥大、翼状肩甲、高CK血症を呈した。運動時筋痛、高CK血症は、糖原病、脂質代謝異常による筋疾患でよくみられ、特に McArdle 病、垂井病、CPT 欠損症等を鑑別する必要がある。運動時筋痛はまた myoadenylate deaminase 欠損症、type II fiber predominance、あるいは前角細胞又は末梢神経障害等でも認められる。本例は筋電図、筋生検所見、各種負荷試験の結果から以上の疾患は否定的と考えられた。

近年ジストロフィンの検索が盛んに行なわれ

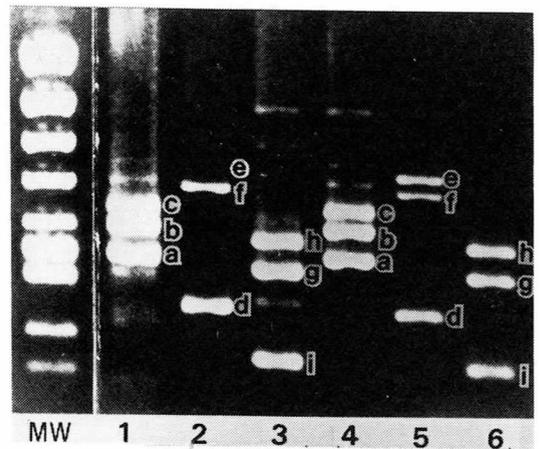


図2 PCR法で増幅したDNAの電気泳動パターン  
 図中 a ~ i は Chamberlain らの報告した DNA の断片でそれぞれジストロフィン遺伝子の exon 8, 17, 19, 44, 45, 48, 12, 51, 4 に相当する。  
 MW: Hinc II digested  $\phi$ X174 DNA molecular standard  
 lane 1, 2, 3: 患者 DNA  
 lane 4, 5, 6: 正常対照 DNA

ジストロフィン遺伝子の異常による臨床症状の多様性が報告されている。

Gospe ら<sup>4)</sup> はジストロフィン遺伝子の exon10 から22までの欠失があり、分子量の小さい異常ジストロフィンを認めるが、筋力低下はなく、筋痛、筋 cramp、腓腹筋仮性肥大、高CK血症のみを呈し、臨床的に筋ジストロフィーとは言い難い、X染色体劣性非進行性ミオパチーの家族例を報告している。本例も欠失部位は異なるが、ジストロフィン遺伝子の欠失があり、筋生検所見は非特異的ミオパチーの所見のみで、臨床症状も Gospe らの症例と非常に似ており、類似の疾患の弧発例と考えられた。

ジストロフィン遺伝子の欠失の大きさや部位と臨床症状との関係は明らかではないが、本症例の欠失部位が含まれるジストロフィンのスペクトリン様三重らせん構造の繰返しを code する部分に関して、この部分の in frame の欠失では、細胞骨格蛋白等と結合しているであろうと考えられてい

るジストロフィンのN末端, C末端が保たれるため比較的正常機能に近いジストロフィンが生成され, 臨床上無症状例や軽症例が生ずる可能性が考えられている<sup>5)</sup>.

本例や Gospe らの症例と同様に, 筋力低下がなく, 筋痛と高CK血症のみを呈し, 筋ジストロフィーとしては非定型的な症例においても, エネルギー代謝に異常がないような場合, ジストロフィンの異常も鑑別診断として考慮する必要があると考えられた.

## 文 献

- 1) Hoffman EP and Kunkel LM: Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 2 : 1019, 1989.
- 2) 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, 1989.

- 3) Chamberlain JS, Gibbs RA, et al: Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16: 11141, 1988.
- 4) Gospe SM, Lazaro RP, et al: Familial X-linked myalgia and cramps: A nonprogressive myopathy associated with a deletion in the dystrophin gene. *Neurology* 39: 1277, 1989.
- 5) 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) Myotubular myopathy におけるジストロフィン 発現の免疫学的検討

清水輝夫\*

研究協力者 砂田芳秀\* 金澤一郎\* 埜中征哉\*\*

## はじめに

昨年度、先天性筋緊張性ジストロフィー (CMyD) の乳児症例では、骨格筋の成熟異常に伴うジストロフィンの発現遅延があることを報告した。正常な骨格筋の発達では、ミオシンの分化に先駆けてジストロフィンの発現がみられるのに対して、CMyD ではジストロフィンの発現がミオシン分化よりも遅延していた。このようなジストロフィン発現遅延という病態が他の dysmaturational myopathy (筋の成熟異常を特徴とする先天性ミオパチー) にも存在するのであろうか。今回重症型 3 例を含む 7 例の myotubular myopathy (MM) におけるジストロフィン発現を検討した。

## 対象と方法

生後 1 ヶ月から 28 歳までの 7 例 (男 6 例, 女 1 例) の MM を対象とした (表 1)。症例 1 から 3 の 3 例は生下時より floppy infant で、重篤な呼吸障害を合併した重症型である。いずれの症例にも明かな遺伝歴は認めない。なお、多発筋炎 1 例を疾患対照とした。

抗ジストロフィン抗体：認識部位の異なる 3 種類の単クローン抗体を用いた。2-5E2 は rod domain を、4-4C5 は C 末 domain を、DYS2 は C 末端を認識する抗体で、前二者は富士レビオ株式会社より供与された。

免疫組織化学：8 $\mu$ m の凍結切片を用いて ABC 法により免疫組織化学を行った。3 種類の単クローン抗体はいずれも室温で 1 時間反応させた。

ウエスタンブロット：骨格筋ホモジェネートを蛋白定量し、100 $\mu$ g 相当量の試料を Doucet & Trifaro (1988) の方法により電気泳動した。泳動後、PVDF 膜に転写し、抗ジストロフィン抗体 DYS2 と反応させ、ABC 法で検出した。

## 結果

(1) 組織化学所見：今回検討した 7 例の MM の筋病理組織所見を表 2 に示す。いずれの症例も 15~30% の筋線維に (症例 7 では 90% 以上の線維に) 中心核がみられた。症例 1~3 の重症型では 80~90% の線維に NADH-TR 染色で peripheral halo がみられた。症例 4~7 でも peripheral halo が少数残存し、intermyofibrillary network の放射状配列がみられた。ミオシン ATPase 染色では、type 1 predominancy の傾向があり、症例 1 で type 2A, 2B の分化が不明瞭で、症例 1, 2 では type 2C の割合が高く、ミオシン分化の遅延が示唆された。なお、いずれの症例でも壊死線維はみられなかった。

(2) 免疫組織化学：重症型 3 例を含む 7 例の MM 全例でジストロフィンは筋線維の形質膜全周にわたって均一に発現していることが、3 種類の抗ジストロフィン抗体で確認された (図 1 a~g)。症例 2 においては、ジストロフィン陰性線維が散在してみられたが、これらの線維はエオジンに濃染する比較的大径の線維であり、生検時の過収縮に

\* 東京大学医学部脳神経内科

\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

表1 Clinical findings of seven patients with myotubular myopathy

case #	age	sex	delivery	floppy infant	respiratory distress	biopsied site
case 1	1m	M	31w	+	+	rt. rect. femoris
case 2	2m	M	34w	+	+	lt. biceps brachii
case 3	15m	M	full	+	+	lt. biceps brachii
case 4	9y	M	full	-	-	lt. biceps brachii
case 5	9.5y	F	full	-	-	lt. biceps brachii
case 6	20y	M	full	-	-	lt. biceps brachii
case 7	28y	M	full	-	-	lt. biceps brachii

表2 Muscle histopathologic findings of seven patients with myotubular myopathy

age	case 1 1m	case 2 2m	case 3 15m	case 4 9y	case 5 9.5y	case 6 20y	case 7 28y
central nuclei	20-30%	20%	15%	20%	20-30%	15-20%	>90%
peripheral halo	100%	80%	>90%	10%	10%	<5%	-
type 1	60%	33%	86%	71%	96%	66%	80%
type 2A	20%	22%	13%	8%	0.5%	30%	5%
type 2B	20%	18%	0%	16%	0%	2%	0%
type 2C	20%	27%	1%	5%	3.5%	2%	15%
necrotic fiber	-	-	-	-	-	-	-

よる artifact と考えられた (図1 h)。

(3)ウエスタンプロット: MMの7例はいずれも、対照とした多発筋炎症例と同様、正常サイズのジストロフィンが発現していた(図2)。発現量についてもミオシン重鎖との相対比で見ると、低下した症例はなかった。

### 考 察

骨格筋の成熟異常を特徴とする先天性ミオパチーにはCMyD, MM, congenital fiber - type disproportion, myopathy with type 2 hypoplasia などが知られている。昨年度の本会議でCMyD乳

児症例の未熟筋線維においてはジストロフィンの発現遅延があることを報告した。CMyDでは、NADH-TR染色でperipheral haloを持つような未熟筋線維においても、ジストロフィン発現が不良であった。今回重症型の乳児症例を含めてMMにおけるジストロフィン発現を検討した。重症型MMの乳児症例においてはperipheral halo線維が大量に残存し、ミオシンの分化にも遅延がみられたが、これらの未熟筋線維においてもジストロフィンは正常に発現していた。このようにperipheral haloを持つ未熟筋線維におけるジストロフィンの発現はこの2つの先天性ミオパチー

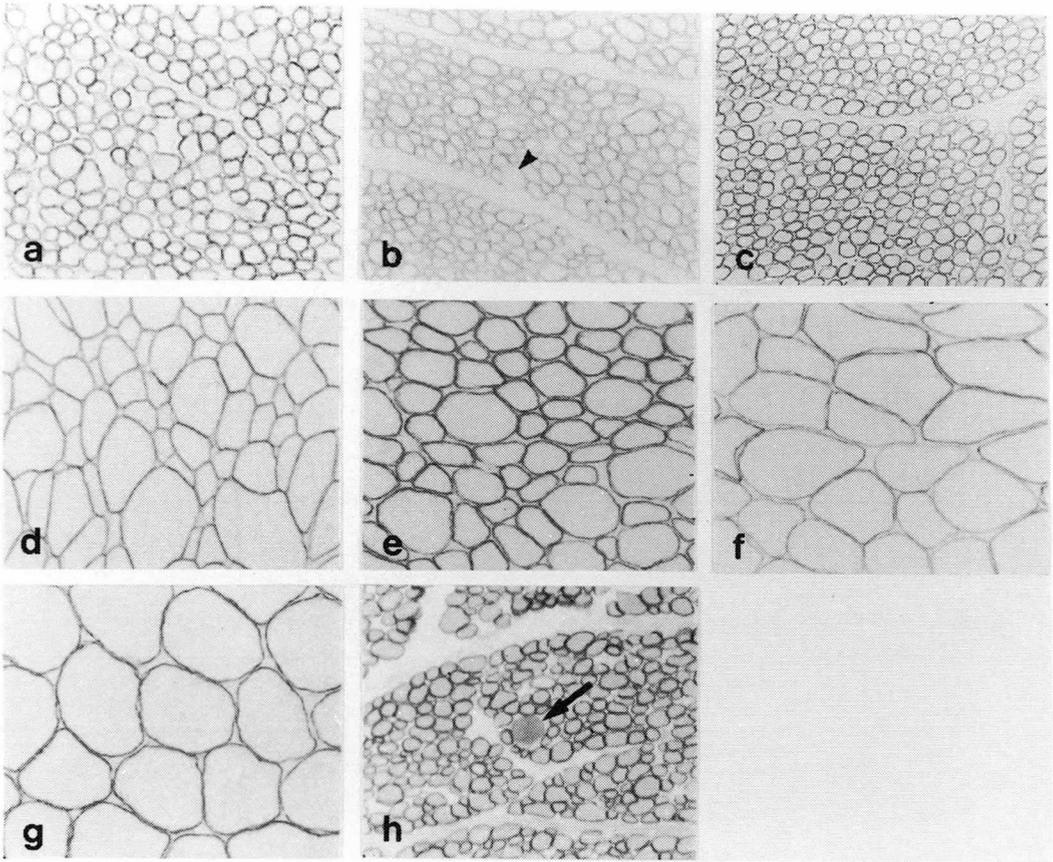


図1 抗ジストロフィン抗体 DYS2による免疫組織化学

a～g：MM 症例1～7。症例2ではジストロフィン陰性線維 (arrow head) が散見される。h：エオジンで counter stain してみるとジストロフィン陰性線維 (arrow) は大径でエオシンに濃染する過収縮線維であることがわかる。

で全く異なる。

正常な骨格筋の発達では、ジストロフィンの発現は、胎生11週頃より<sup>1)</sup> ミオシンの分化に先んじて始まり、胎生22～35週にかけてほぼ成人と同じレベルの発現が完成する<sup>2)3)</sup>。ミオシンの分化は胎生20週頃より type 1 への分化が始まり、37週以降に急速に type 2A, 2B への分化をとげる<sup>4)</sup>。また胎生25週にほとんどの筋線維に NADH-TR 染色で peripheral halo がみられるが、胎生34週になるとみられなくなる<sup>5)</sup>。

そこで両疾患の乳児症例における筋線維の未熟性を peripheral halo, ミオシン分化, ジストロフィン発現の3つの観点から比較してみる (表3)。

CMyD では peripheral halo を持つ線維の割合は MM よりも少ないものの、type 2C 線維が 55～90% を占めミオシン分化はかなり遅延している。そしてジストロフィンの発現はミオシンの分化よりも更に遅延している。一方、MM では大部分の筋線維が peripheral halo を持っているものの、ミオシン分化の遅延は CMyD に比べ軽度であり、ジストロフィンの発現に遅延はみられない。この2つの疾患では、筋線維の未熟性が質的に異なることがわかる。つまり、MM では骨格筋の成熟が全般に遅れているわけではなく、未熟性の主体は骨格筋発達過程で核の peripheral migration が障害されている点にある。これにに対して、

表3 Distinguishing features between myotubular myopathy and congenital myotonic dystrophy

	<i>Myotubular Myopathy ( Severe Form )</i>	<i>Congenital Myotonic Dystrophy</i>
Age	1m-15m	40d-10m
Peripheral halo	++	+
Myosin differentiation	delayed	< delayed
Dystrophin expression	normal	delayed

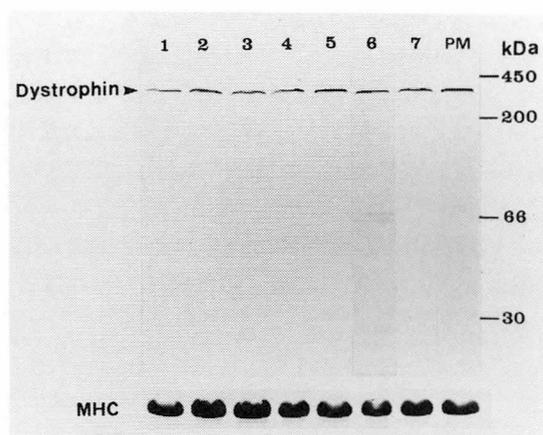


図2 抗ジストロフィン抗体 DYS2によるウエスタンブロット  
lane 1～7: MM 症例 1～7, lane 8: 多発筋炎, 下段には筋タンパク量の指標として MHC (ミオシン重鎖) を示した。

CMyD では核の migration, peripheral halo の消失, 筋タンパクであるミオシンの分化, 膜の細胞骨格タンパクであるジストロフィン発現のすべてが遅延しており, その中でもジストロフィン発現の大幅な遅延は, CMyD に特異な病態であることが示唆される。

### 結 語

7 例の MM 生検筋で, ジストロフィン発現を検討したところ, 全例でジストロフィン発現は正常であった。重症型 3 例の筋線維には peripheral

halo やミオシン分化の軽度遅延という未熟性はあるが, CMyD でみられたようなジストロフィンの発現遅延は認めなかった。

### 文 献

- 1) Strong PN, Clerk A, Sherratt TG and Sewry CA: Dystrophin expression in fetuses at risk for DMD and BMD. *J Neurol Sci* 98 (supple): 231a, 1990.
- 2) Prella A, Chianese L, Gallanti A, Moggio M, Scarpini E, Bonilla E and Scarlato G: Appearance and localization of dystrophin in normal human fetal muscle. *J Neurol Sci* 98 (supple): 229a, 1990.
- 3) Shimizu T, Matsumura K, Hashimoto K, Mannen T, Ishiguro T, Eguchi C, Nonaka I, Yoshida M and Ozawa E: A monoclonal antibody against a synthetic polypeptide fragment of dystrophin (amino acid sequence from position 215 to 264). *Proc Japan Acad* 64B: 205-208, 1988.
- 4) 熊谷俊幸, 袴田 亨ほか: ヒト胎児期の筋発達について——腸腰筋と大腿四頭筋の組織化学的比較——: *脳と発達* 16: 150-156, 1984.
- 5) Schloon H, Schlottmann J, Lenard HG and Goebel HH: The development of skeletal muscles in premature infants. I. fiber size and histochemical differentiation. *Eur J Pediatr* 131: 49-60, 1979.

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

内 野 誠\*

研究協力者 寺 本 仁 郎\* 直 江 弘 昭\* 三 池 輝 久\*\*  
岩 下 宏\*\*\* 荒 木 淑 郎\*\*\*\*

## はじめに

骨格筋や心筋における dystrophin (“dy”) の発現様式については、疾病の場合を含め、詳細に検討されているが、筋以外のヒト臓器における“dy”の発現状況については不明な点が多い。ヒト臓器特に脳における“dy”の発現状況を明らかにするため、昨年に続き、今回はモノクローナル抗“dy”抗体を用いて検索を行った。また Becker 型筋ジストロフィー (BMD) 生検筋の“dy”の発現様式についても同様の検索を行い、PCR 分析結果と比較検討した。

## 対象と方法

正常対照例 4 例 (42~77歳), 筋緊張性ジストロフィー 1 例 (54歳), 及び IQ50以下の知能障害を認めた Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 1 例 (26歳) の各剖検臓器 (大脳, 小脳, 骨格筋, 心筋, 胃, 腎臓, 膀胱, 肺など) について, 抗“dy”抗体 (NOVO 社の DYS-1, 2, 3) を用いて, Western blot 及び免疫組織化学染色による分析を行った。また BMD16例 (14~53歳) の生検筋についても同様の検索を行い, SRL に依頼して実施した Chamberlain の 9 領域及び Beggs の 10 領域による多重 PCR による遺伝子解析<sup>1)</sup> 結果と比較検討した。なお Western blot に際しては従来

Tefco 社の 3.5~12% gradient gel (8 cm×8 cm×1 mm) を用い, 約 3 時間 15mA の通電を行い, 免疫反応には Vecstain ABC kit, 発色基質にはナフトールを用いていたが, 今回は通電時間を 4~5 時間と大幅に延長し, またミニサイズの他に 16cm×16cm×1 mm の 7.5% 均一ゲル及び 3.5~12% gradient gel も用い, 免疫反応には Vecstain elite ABC kit, 発色基質には DAB, NiCl<sub>2</sub> を使用した。

## 結 果

正常対照及び筋緊張性ジストロフィーにおいては DYS-1, 3 の Western blot にて骨格筋, 心筋のみならず, 胃・膀胱などの平滑筋組織, さらに脳においても明らかな“dy”の発現が認められた (図 1)。DYS-2 では骨格筋, 心筋は“dy”は明瞭であったが, 脳や平滑筋組織は不明瞭であった (図 2)。免疫染色では骨格筋, 心筋, 平滑筋組織では“dy”は筋表面膜に局在していたが, 脳においては DYS-3 では neuron の胞体, 特に膜が DYS-1 では主に glia 系細胞の胞体及び突起が染色され, DYS-2 では明らかな局在は認めなかった。DMD においてはいずれの抗体を用いても全臓器で“dy”の発現はみられず, 免疫染色でも心筋の intercalated disc の一部が染色される他は明らかな抗体の局在はみられなかった。

BMD の Western blot パターンについては従来の泳動条件では①“dy”バンドを検出できないグループ, ②“dy”の分子量異常, 主として低分

\* 国立療養所再春荘病院神経内科

\*\* 熊本大学医学部発達小児科

\*\*\* 国立療養所筑後病院

\*\*\*\* 熊本大学医学部第一内科

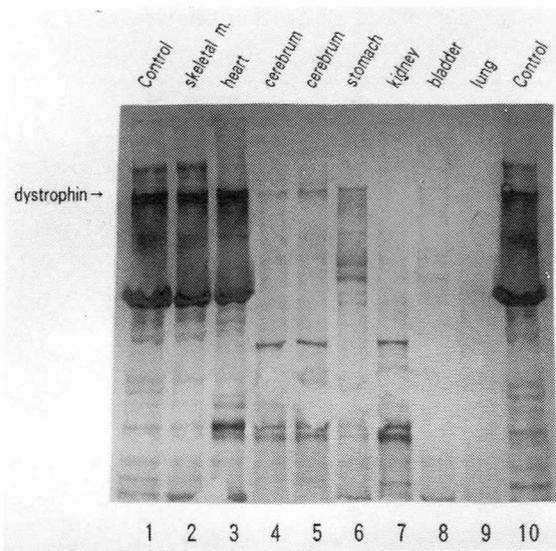


図1 正常対照剖検例(74歳♀)の各臓器の Western blot (一次抗体に DYS-1 を使用). 大脳, 胃, 膀胱においても dystrophin band の発現は明らかである. 腎, 肺は痕跡的である.

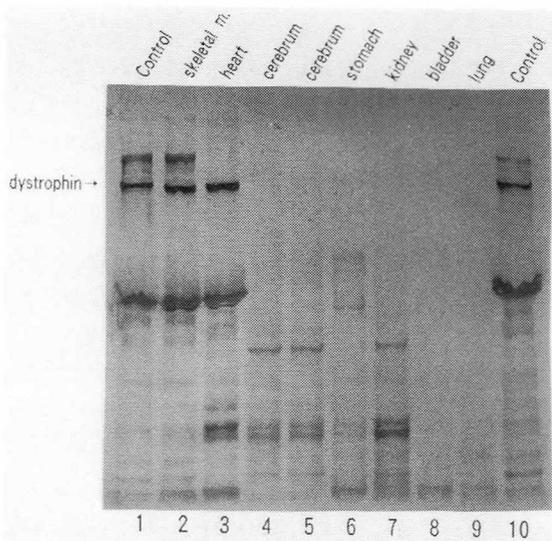


図2 正常対照剖検例(74歳♀)の各組織の Western blot (一次抗体に DYS-2 を使用). 骨格筋, 心筋では dystrophin band は明瞭であるが, 大脳では不明瞭である.

子化を示すグループ, 及び③正常分子量で含量の減少を示すグループと3つのグループに区別される. ②については Kunkel らの frame shift 仮説で説明可能であるが, ①, ③については説明困難である. 今回検出感度を高めるため, Vecstain elite ABC kit, DAB,  $\text{NiCl}_2$  を使用したところ, 殆どの症例は痕跡的ながら “dy” バンドを検出可能であった (図3). また従来の Western blot では③のグループに属するものが15例中8例と最も多数を占めたが, 今回 SDS-PAGE の通電時間を3時間から約4~5時間と大幅に延長して blotting を行ったところ, 正常対照と明らかに差を認め, 全例低分子化しているのが明らかになった (図4). 16cm×16cm×1 mm の gradient gel 及び 7.5%均一ゲルでも低分子化が認められたが, 7.5%均一ゲルでは高分子蛋白の基点からの移動距離が短く, gradient gel に比較して軽微な “dy” の分子異常を検出するのは困難であった. 免疫染色では全例全体的に染色性が低下し, 線維ごとに染色性が異なり, またいわゆる patchy stain の像を認め, BMD に compatible な所見を呈した. PCR

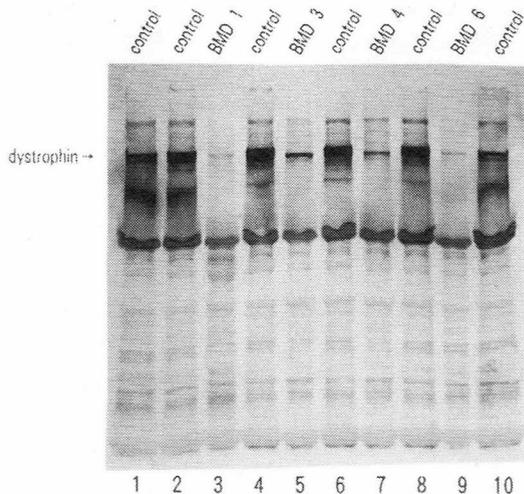


図3 Becker 型 (BMD 1, 3, 4, 6) 及び正常対照の骨格筋の Western blot (DYS-1). 通常の泳動法では検出困難であった BMD<sub>1</sub> においても痕跡的ながら dystrophin の発現がみられる. Becker 型では全例低分子化しているのが明らかである.

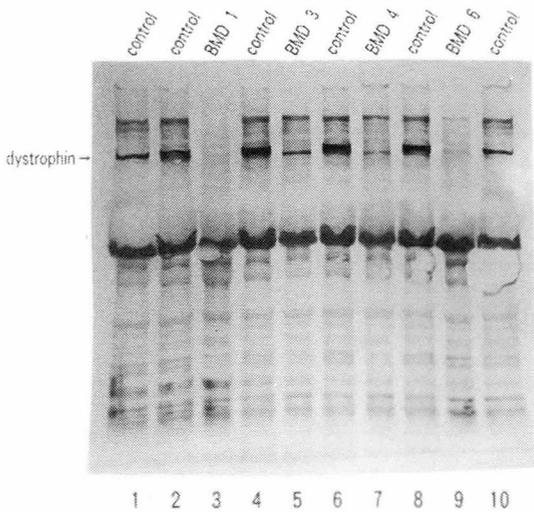


図4 Becker型及び正常対照骨格筋のWestern blot (DYS-2). Becker型では全例dystrophinの低分子化及び含量の減少がみられる。

分析では15例中8例に欠失がみられたが、うち7例はExon 1～3ヶの欠失で、Exon 4ヶ以上の欠失は1例であった(表)。欠失を認めなかった7例中、Western blotで“dy”バンドを検出できた5例はいずれもわずかながら“dy”の低分子化が確認された。

### 考 察

著者らはこれまでHoffmanらのオリジナル抗体(30kd, 60kd抗体), P-20, ペプチドIVなどのポリクロナール抗体による検索で、Western blot上“dy”は健常者の骨格筋、心筋のみならず、胃・膀胱・肺などの平滑筋組織、さらに脳でも発現しており、免疫染色では大脳のneuronや小脳のPurkinje細胞の胞体特に膜に抗体の局在が認められることを報告してきた<sup>2)3)</sup>。今回より抗原特異性の高いモノクロナール抗体による検索を行ったが、DYS-1, 3の成績はポリクロナール抗体特に60kd抗体, 30kd抗体での成績と基本的には一致し、平滑筋組織や脳でも“dy”の局在が認められた。DYS-2では脳に明らかな局在がみられなかったが、DYS-2は筋型“dy”のC末端領域

表 Results of dystrophin analysis in 16 BMD patients

Patient	age (y)	stage	deletion	Western blot		Immunostaining
				reduced levels of dystrophin	size of dystrophin(Kd)	
1	16	2	(-)	##	425	patchy
2	29	CK ↑ cramp	(+) E 45	+	410	patchy
3	16	1	(+) E 45 ~47	##	410	patchy
4	14	CK ↑	(+) E 45 ~47	nd	nd	nd
5	30	2	(+) E 45 ~47	##	410	patchy
6	30	2	(-)	##	425	patchy
7	16	3	(-)	##	425	patchy
8	16	3	nd	##	380	patchy
9	26	7	(+) E 45	nd	nd	patchy
10	26	7	(+) E 44 ~47	nd	nd	patchy
11	34	8	(-)	nd	nd	patchy
12	43	7	(-)	##	nd	patchy
13	51	7	(+) E 45 ~47	##	nd	patchy
14	53	6	(-)	+	425	patchy
15	47	7	(+) E 45 ~47	##	410	patchy
16	36	6	(-)	##	390	patchy

nd ; not done

\* Normal dystrophin molecular mass, 427kd

## ; <10% Normal level, or undetectable

## ; 10-20% normal levels, + ; 20-50% normal levels

に対する抗体であり、骨格筋や心筋とは反応しても、脳型“dy”とは反応しない可能性も考えられた。一方低IQのDMD例では脳でも“dy”を欠如しており、DMDで高率にみられるIQ異常に脳型“dy”の異常が関与する可能性が示唆された。

BMDのWestern blotパターンについては前述したように3つのグループが存在し、特に正常分子量で、量のみ減少を示すグループが多いことを報告してきた。この場合に想定される機序として、(1)欠失距離が短く、通常のSDS-PAGEでは移動度に差がでない、(2)N端あるいはC端の非翻訳部で“dy”の安定化に関係すると考えられる領域の異常、あるいは(3)上流のpromoter領域, enhancer領域の異常、(4)その他の異常が考えられたが、今回の検索で結果的には欠失距離が短く、通常のSDS-PAGEでは移動度に差がでない症例が大半であることが明らかになった。BMDとDMDの鑑別及び予後判定にWestern blotは重要な指標であるので、検出困難な場合もより感度の高い反応系を用いて検索すること、並びに“dy”の分子

量異常を証明するために泳動条件に工夫を加えることが重要と思われた。なお本邦のBMD例は欧米のBMD例より欠失の短い症例が多い可能性があり、今後更に多数例について遺伝子解析と“dy”の分子量異常についての検索を集積していくことが必要と思われる。

## 要約と結論

### I. Dystrophin のヒト臓器分布

- 1) ヒト各臓器における“dy”の分布を明らかにするため、モノクローナル抗体を用いて、Western blot 及び免疫染色による検索を行った。
- 2) 正常対照では DYS-1, 3 にて“dy”は骨格筋、心筋のみならず、胃・膀胱などの平滑筋組織、さらに脳においても発現が認められた。DYS-2 では骨格筋、心筋と異なり、脳では“dy”の発現はみられなかった。DMD では全臓器で“dy”の発現はみられなかった。
- 3) DMD の知能障害に脳型“dy”の異常が関与している可能性があり、今後知能障害の程度により“dy”の発現に違いがみられるか否かについて、症例を増して検討が必要である。

### II. Becker 型筋ジストロフィーにおける dystrophin の発現様式について

- 1) BMD における“dy”の発現様式について検討するため、Western blot による分析並びに免疫染色による検索を行った。
- 2) 通常の Western blot では分子量に変化がなく、含量のみ減少するものが多数 (8/15) を

占めたが、泳動時間延長により、低分子化を示した。PCR 分析では、Exon 1～3 への短い欠失例が多く、欧米での成績と若干違いがみられた。

- 3) BMD の多くは“dy”の低分子化を示し、frameshift 仮説で説明可能であったが、欠失の短い症例が多く、Western blot に工夫が必要であった。

謝辞：本研究に種々御協力いただいた九州大学医学部神経内科 波多江 智子先生、山田 猛先生、熊本大学医学部第一内科 宇山 英一郎先生に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Beggs AH, Koenig M, et al : Detection of 98% of DMD/BMD gene detections by polymerase chain reaction. Hum Genet 86 : 45-48, 1990.
- 2) 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.
- 3) 内野 誠ほか : Dystrophin : Becker 型筋ジストロフィーにおける dystrophin の分子異常並びにヒト臓器における dystrophin の局在について。“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”(杉田班)平成元年度研究報告書, 1990, pp112-115.

### III. ジストロフィン (No. 2)

## 12) ジストロフィン分子におけるN末端ドメインの臨床的意義

荒畑喜一\*

研究協力者 有川恵理\* 松井 潔\* 林 由紀子\*  
石浦章一\* 埜中征哉\*

### はじめに

一昨年の本研究班において我々は、BMD(20例)ではジストロフィンのC末端のドメインが保たれているが、DMD(18例)では欠損していることを示し、ジストロフィン分子におけるC末端ドメインの臨床的意義を提示した<sup>1)</sup>。今回我々はC末端ドメインが保たれているが、N末端側にジストロフィン遺伝子のエクソン2から始まる巨大な欠損を持ち、早朝から重篤な臨床症状と経過を示した筋ジストロフィー患者を経験したので報告する。

### 対 象

症例は2歳10ヶ月男性。主訴は、高CK血症と歩行障害。生後8ヶ月時、高CK血症を指摘され(20,000~30,000U/L)、その後独歩が1歳5ヶ月と遅れ、また独歩開始後すぐにGowers'徴候を認めたことからDMDを疑われ筋生検が施行された。

筋生検時所見：低身長(-2SD)の他一般身体所見に問題は認めなかった。知能は遠城寺式で正常範囲。近位筋優位の筋力低下あり、歩行は不安定で、走ることは出来なかった。股関節、足関節に拘縮があり、筋の仮性肥大は下腿筋、大腿四頭筋、上腕二頭筋、三角筋に認められた。

検査結果：骨格筋CTで大内転筋、大臀筋に低吸収域を見た。心電図上、V<sub>1</sub>、V<sub>2</sub>、V<sub>3</sub>で陰性T波を認めた。血清CK値64285、GOT 511、GPT 798、LDH 2,641、ALD 154と何れも上昇し、尿中ミオグロビンも5 mg/dlと高値を示していた。

一般筋病理所見：筋生検は左上腕二頭筋にて施行。HE染色にて壊死再生像とともに間質結合織の増生、筋線維径の大小不同と円形化、多数のオペク線維を認める典型的な筋ジストロフィーの病理像を呈していた。Gomori-Trichrome変法にて、ragged red fiber、ネマリン小体等は観察されず、ミオシンATPase活性像ではtype2C線維が15%と増加、type2B線維が3%と減少していた。

### 方 法

抗ジストロフィン抗体：ジストロフィンのN末端からC末端までの異なる領域に対して調製された10種類の抗体(N末端から順にD1-2a、2-5E2、3-4C4、3-4G4、D8、6-10、D9、D10、D11、4-4C5)を用いた(図1)。これらの抗体は同時に染色したDMD筋の筋形質膜は染色しないことから、第6染色体によってコードされるいわゆるジストロフィン関連タンパク質(B3/DRP)との交差反応性はないものと考えられた。(Dシリーズと6-10はハーバード大学Kunkel教授より供与された。)

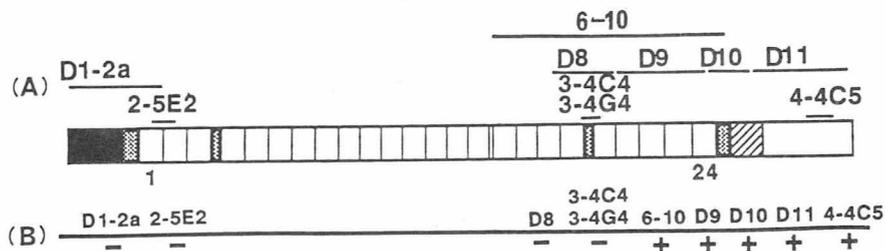
免疫組織化学染色：6 $\mu$ の凍結切片を用いて蛍光抗体法にて免疫染色を行った<sup>2)3)</sup>。

イムノプロット：生検筋の20 $\mu$ 凍結切片15枚からのサンプルは予めミオシン重鎖の量を揃えることにより、筋タンパク質の量が一定になるよう調整し、抗体4-4C5を用いてイムノプロットを行った。

遺伝子解析：生検筋のブロックよりDNAを抽出し、Chamberlain<sup>4)</sup>、Beggs<sup>5)</sup>らにより調製され

\* 国立精神・神経センター神経研究所

A schematic diagram of dystrophin showing locations of regions used to raise antisera (adapted from Koenig and Kunkel)



The four main domains are : Amino-terminus (black box), central repeating rod (repeats 1 and 24 are indicated below), cysteine-rich region (diagonal lines) and carboxy-terminal domain (open box). Four putative hinge regions are indicated by gray boxes. Thus, this battery of antisera allowed us to determine the presence or absence of several different regions of dystrophin.

図1 上段 (A) に用いた抗原ペプチドのジストロフィン分子に対する位置を示し、下段 (B) に免疫組織化学的検討の結果のまとめを表示した。D1-2a, 2-5E2, D8, 3-4C4, 3-4G4, では全てジストロフィンの染色性は陰性であるが、6-10, D9, D10, D11, 4-4C5ではジストロフィンの染色性は陽性であった。これより、少なくとも免疫組織化学的にはジストロフィン蛋白分子のC末端側が保たれていることが解る。

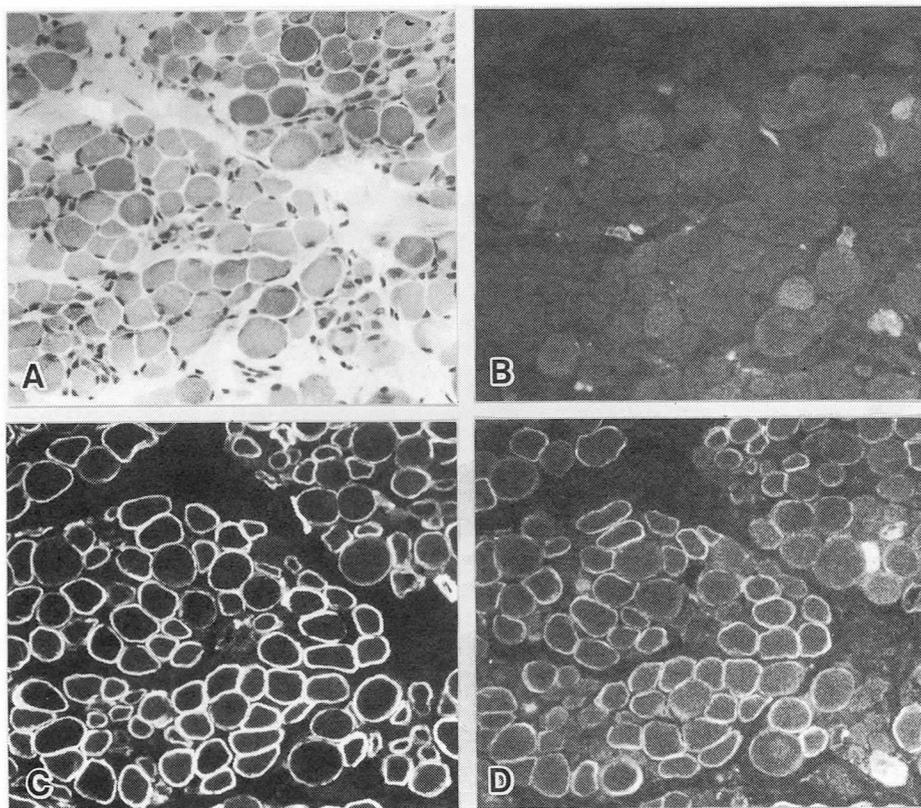


図2 ジストロフィンの免疫組織化学染色像。  
 A) HE 染色像, B) 2-5E2, C) 6-10, D) 4-4C5.

た multiplex プライマーを用いた multiplex PCR 解析を施行した。

## 結 果

免疫組織化学：抗ジストロフィン抗体 D1-2a, 2-5E2, 3-4C4, 3-4G4, D8ではジストロフィンが全く染色されず、抗体6-10, D9, D10, D11, 4-4 C5ではジストロフィンが筋形質膜に沿って確認された(図1, 2)。ただし、コントロールに比べると淡く不均一な染色であった。

イムノブロット：抗体4-4C5を用いたイムノブロットではジストロフィン検出されず、蛋白質は検出感度以下に減少しているものと考えられた。

遺伝子解析：ジストロフィン遺伝子のエクソン2-44にわたる巨大な欠損を認めた。理論上フレームシフトを伴っていた。

## 考 察

ジストロフィン遺伝子のエクソン2-44の巨大な遺伝子欠損が存在し、免疫組織化学的にN末端側を欠如する短いジストロフィンタンパク分子の存在が示された、しかも臨床的には極めて重篤な経過をとっている重症筋ジストロフィーの一例を報告した。この症例は今後ジストロフィンと臨床症状との関わりを考えていく上で重要な問題を提起しているものと考えられた。特に、エクソン2に始まるN末端のアクチン結合ドメインを含む領域に欠損をみる場合にはジストロフィンが正常に機能しない可能性が示唆された。

また、遺伝子解析で確認されたジストロフィンの欠損領域を越えてさらに大きな欠損がタンパク質レベルで存在したが、エクソン45より下流でフレームが修復された可能性が考えられた。なお、我々がC末端領域に認めた免疫反応は Yaffe らのいう第3のジストロフィン<sup>6)</sup>である可能性も残

されている。

## 結 語

C末端が保持されているにもかかわらず重篤な臨床経過をとる症例の存在することが示された。今後N末端側の臨床的重要性も見直す必要があるものと考えられた。

## 文 献

- 1) 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—156, 1991.
- 2) Arikawa E, Hoffman EP, et al: The frequency of patients with dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population. *Neurology* 41: 1491—1496, 1991.
- 3) Arikawa E, Ishihara T, et al: Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 105: 79—87, 1991.
- 4) Chamberlain JS, Gibbs RA, et al: Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acid Research* 16: 1141—1156, 1991.
- 5) 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—67, 1991.
- 6) Sara B, Barnea E, et al: A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* 272: 557—560, 1990.

# 13) 筋ジストロフィー組織ジストロフィンファミリーと生体膜機能

濱 田 稔\*

研究協力者 塩 坂 孝 彦\*\* 竹 中 均\* 丸 山 英 晴\*  
佐 田 栄 司\*\* 仲 地 剛\*\*\* 井 上 謙 次 郎\*\*\*  
澄 田 道 博\*\*\*\*

## はじめに

本研究の目的は興奮、収縮ないし変形能を有する細胞の膜構成要素の一つとして明らかにされたジストロフィンに注目し、ヒト赤血球膜をモデルに、形質膜の直下に規則的なネットワークを形成しているスペクトリンスーパーファミリーの生体膜機能に果たす生理的役割を解明することにある。ヒトのジストロフィンの欠損あるいは不完全な断ち切られたジストロフィンは骨格筋細胞では、臨床的にはその萎縮や消失による二次的な筋力低下や早期死を招くが、細胞レベルにおいては細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入、細胞質局在タンパク質そのものやカルパインなどによる分解産物の慢性的なleakageが生じるものと考えられる。筆者の一人(M.H.)はさきに、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)患者赤血球において、ヘモグロビン(Hb)およびアデニル酸キナーゼのleakage kineticsを観察して興味ある結果を明らかにした<sup>1)</sup>。その成果を要約すると、低浸透圧ショック処理(0.05M NaCl, 0.02M Tris-acetate, 0.01M Glucose (pH8.0), 3°C)によって、Hb-leakage kineticsの速度定数(k')およびt<sub>1/2</sub>は対照がそれぞれk'=3.9×10<sup>-4</sup>min<sup>-1</sup>, t<sub>1/2</sub>=1.8×10<sup>3</sup>minであるのに対して、DMDの場合はk'=8×10<sup>-2</sup>

min<sup>-1</sup>, t<sub>1/2</sub>=9minと速やかなHbの漏出が観察された。また、アデニル酸キナーゼのleakage kineticsでは、対照のk'=8.5×10<sup>-5</sup>min<sup>-1</sup>, t<sub>1/2</sub>=8.2×10<sup>3</sup>minであったが、DMDではk'=3.8×10<sup>-2</sup>min<sup>-1</sup>, t<sub>1/2</sub>=18minと種々の分子量のタンパク質の迅速な漏出が確認された。以上の基礎データに基づいて今回の検討を試みた。そのために、Koenigら<sup>2)</sup>, Bryanら<sup>3)</sup>, のヒト骨格筋ジストロフィン一次構造(Res<sub>95-121</sub>)、ならびに、Louvard<sup>4)</sup>が報告しているヒトβ-スペクトリン(Res<sub>130-156</sub>)の構造に基づいてactin binding domainの合成ペプチドやN-端およびC-端ペプチドの合成標品、さらに抗体認識に関与する部分のペプチド<sup>5)</sup>を合成することによってそれらのポリ不飽和モノクローナル抗体を家兎やマウスで得て、形質膜の裏打ちタンパク質との相互作用から赤血球膜leakageの本態を明らかにする。同時に本研究を行った筋ジストロフィー患者についてChamberlainら<sup>6)</sup>のプライマーを合成してPCRを用いたmultiplex gene analysisを行ったのでその成果を併せて報告する。

## 方 法

人工合成ペプチドはさきの報告書<sup>7)</sup>と同じ方法(図1)に依った。ヒトジストロフィンのアクチン結合領域はRes<sub>95-121</sub>(LVNIGSTDIVDGNHK-LTLGLIWNILH)の27残基のフラグメントを、ヒトβ-スペクトリンのそれはRes<sub>130-156</sub>(LEN-

\* 宮崎医科大学衛生学  
\*\* 愛媛県立医療短期大学  
\*\*\* 国立療養所宮崎東病院  
\*\*\*\* 愛媛大学医学部生化学

Peptide Synthesizer(9050)

Fmoc-L-Leu-OPfp  
 Fmoc-L-Leu-OPfp  
 ↓  
 Fmoc-L-Thr(But)-OH/BOP/HOBt  
 Fmoc-L-Trp-OPfp  
 ↓  
 Fmoc-L-Ser(But)-OH/BOP/HOBt

(活性エステル化アミノ酸誘導体)

カップリング：60分間  
 (カップリング：10%無水酢酸/DMF  
 Fmoc除去：2%DBu(1,8-Diazabicyclo[5,4,0]-7-undecene/  
 DMF(N,N'-Dimethyl formamide)  
 TFAクリーベジ：  
 TFA: m-crezol:thioanisol:EDT(Ethanedithiol)  
 (9.0: 0.25 : 0.25 : 0.5)  
 ↓ 2hr, room temp, shaking  
 ↓ filtration, ppt.c diethylether  
 ppt

図1 ペプチド合成

Sequence:

LENMGSHDIVDGNHRLVLGLIWTIILR

[Synthesizer (Milligen/Bioscience 9050)]

Purification and Fractionation (HPLC)

System:M600 U6K M481 M740  
 Column:  $\mu$ Bondasphere 5  $\mu$ C<sub>18</sub> 100A  
 3.9x150 mm(19x150mm)  
 Solvent: A; 0.1% TFA, B; 0.1% TFA(in acetonitril)  
 Gradient: B; 30-60%(linear, 30min)  
 Flow Rate: 1.0ML/min (23ML/min)  
 Detector: UV 220nm

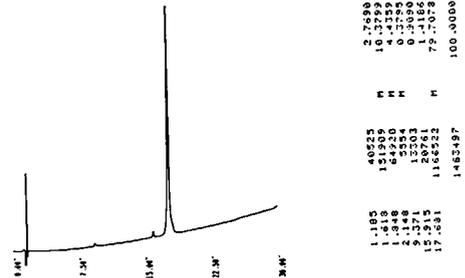


図2 Synthetic peptide of human  $\beta$ -spectrin (Res<sub>130-156</sub>)

MGSHDIVDGNHRLVLGLIWTIILR)の27残基のフラグメントをそれぞれ合成した(図2)。さらに、ジストロフィンのN-末端15残基(MLWVEVEDCYERED), C-末端12残基(PGKPMRMREDTM)およびLove<sup>9)</sup>らの報告による第6染色体関連ジストロフィンのC-末端13残基ペプチド(CCCPNVPSRRQAM)の合成を行った。

結果および考察

まずヒト赤血球膜構成タンパク質の検索は, ghostの調製, さらにLaemmliらの方法によるSDS-PAGE(ポリアクリルアミドゲル濃度8%)を行った。その結果を病型別に(図3)に示した。 $\alpha$ -および $\beta$ -スペクトリン, アンキリン, Band3, 4.1, 4.2, アクチンなど同ヒタンパク質量をチャージしていても病型によって, 染色(CBB)バンドの多寡が異なっているところから, プロテアーゼによる修飾を考慮に入れると, 基本的な形質膜の裏打ちタンパク質の量的ないしは質的差異も考慮する必要がある。

各合成ペプチドについて, ヘモシアニンやウシ血清アルブミンをcarrierタンパク質としてcarbodiimideによるcouplingで得られた抗原をも

とにポリクロナール抗体を家兎に形成させる型通りの数回のブーストにより, immunizationを行い, 数週間後に得られた血清の30%硫酸飽和沈澱を得て, Vectastain ABC kitを用いてさきの赤血球ghostのSDS-PAGEとのimmunoblottingを行ったが, 検出が十分に得られなかった。

Hoffman博士および富士レビオ社より供与されたジストロフィン認識抗体(それぞれ抗30kD抗体および, モノクローナル4-4C5抗体)との同様のプロットも十分な検出が得られず, 現在では, 抗原ペプチドのC-末端のアセチル化や, Vectastain ABC Elite kitへの変更などによる検出感度上昇の検討を行っている。

さらに, 現在検出が十分に出来ないことは発現しているタンパク質の方に構造上の変異が生じていることによる検出が的確に出来ないことも考えられよう。可能であれば, 赤血球ジストロフィンスーパーファミリーを電気泳動によって分離した後に抽出してそれを抗原にするか, 線維芽細胞や筋細胞からmRNAを抽出し, 逆転写酵素でcDNAを合成させてプラスミドに組み込み, その

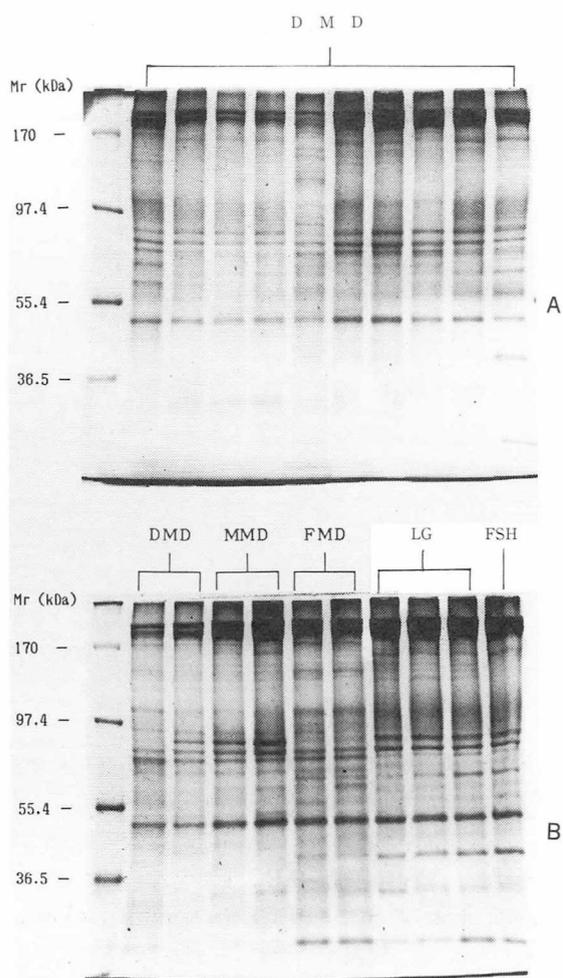


図 3

個人に固有なタンパク質を発現させることによってジストロフィンスーパーファミリーの諸特性を生体膜機能との関連で明らかにして行く予定である。

このほか、ヒト赤血球 ( $\alpha + \beta$ ) スペクトリンに対するマウス抗スペクトリンモノクローナル抗体、ヒト赤血球 protein4.1 に対するモノクローナル抗体、マウス脳スペクトリンの家兎抗体を入手しているので、さらに抗グリコフォリン A 抗体、抗グリコース-6-リン酸脱水素酵素抗体などヒト赤血球膜構成タンパク質の抗原性の差異に基づく量

的ないし質的な差異の検出を試みる。これらの検討から、赤血球膜ジストロフィンスーパーファミリーが膜機能、特に赤血球内タンパク質の漏出に果たす病態生理的役割を明らかにする。これらの手がかりが得られれば、患者の早期診断、保因者の検索、患者の予後判定や合併症の特徴を識別することに臨床応用できるものと期待されよう。

遺伝子検索の PCR による結果を最後に追加したい。

(1)末梢血単核球と好中球の分離と DNA の抽出：23名の筋ジストロフィー患者より得られた EDTA 加血液を Ficoll-Conrey 法で単核球と好中球を分離し、その細胞を Proteinase K で処理しフェノール抽出を行った後エタノール沈澱をし DNA を抽出した。

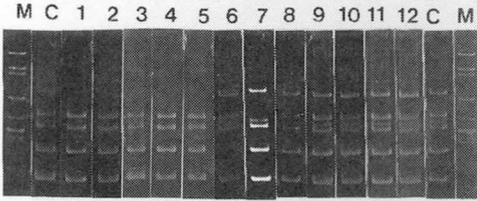
(2)遺伝子増幅法：プライマーは Chamberlain らの DMD 遺伝子の Exon 部分を認識する b, d, e, g, h, i を用いた。認識する Exon はそれぞれ 17, 44, 45, 12, 51, 4 である。反応条件はまず 93度で 7 分間 DNA の熱変性を行った後、93度熱変性 1 分、56度アニーリング 1 分、70度ポリメラーゼ反応 2 分で 30 サイクル増幅を行った。

(3)増幅した DNA は 5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動しエチジウムブロマイドで染色した。

DMD の患者は図 4 の A に示す 1~12 番の患者である。すべて男性で年齢は 10 歳から 23 歳までであった。結果はジストロフィン遺伝子の Exon 45 と 51 の欠失を示すものが 4 例、Exon 51 のみの欠失を示すものが 1 例、Exon 44, 17 の欠失を示すものがそれぞれ 1 例で 7 例 (58.3%) にみられた。福山型 (FCMD) では 6 例中 2 例でそれぞれ Exon 12, 17, 45, 51 と Exon 45 の欠失がみられた。Limb-girdle 型 (LG) では 5 例のうち 2 例で Exon 45 の欠損がみられたのみであった (図 4 の B)。

今回 Chamberlain らのプライマー 6 組を用いて施行した DMD 型筋ジストロフィー患者 12 例のうちなんらかの遺伝子欠失がみられたものは 7 例 (58.3%) であった。これは本邦での報告とほぼ一致するものであった。欠失部位は Exon 45, 51 の欠失が多くみられた。これは Southern hybridiza-

A

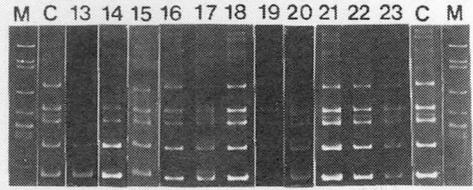


Deletion Screening of the Dystrophin Gene of DMD Patients by Multiplex DNA Amplification

M: Size Marker( $\phi$ X174/Hinc II Digested)  
C: Normal Control  
1-12: Sample DNA from DMD Patients

No.	Sex	Age	Gene Deletion
1	M	20	Exon 45, 51
2	M	15	Exon 45, 51
3	M	17	Exon 45, 51
4	M	17	Exon 45, 51
5	M	14	Exon 51
6	M	16	Exon 44
7	M	16	Exon 17
8	M	10	Not Detected
9	M	13	Not Detected
10	M	23	Not Detected
11	M	16	Not Detected
12	M	23	Not Detected

B



Deletion Screening of the Dystrophin Gene of FCMD and LG Patients by Multiplex DNA Amplification

M: Size Marker( $\phi$ X174/Hinc II Digested)  
N: Normal Control  
13-18: Sample DNA from FCMD Patients  
19-23: Sample DNA from LG Patients

NO.	Sex	Age	Gene Deletion
13	F	26	Exon 12, 17, 45, 51
14	F		Exon 45
15	F	21	Not Detected
16	M	5	Not Detected
17	F	8	Not Detected
18	M	5	Not Detected
19	M	57	Exon 45
20	M	40	Exon 45
21	F	27	Not Detected
22	F		Not Detected
23	F	56	Not Detected

図 4

tion 法で言われているようにこの部位が障害されやすいホットスポットであるためと考えられた。今回の結果を模式的にまとめると(図5), これらの欠失は Exon45, 51を中心とした比較的広い範囲の欠失と, ただ単一 Exon の欠失と思われる狭い範囲の欠失もみられることより Exon をすべてカバーしえるプライマーを用いるか, Northern hybridization 法で mRNA を調べることが出来ればさらにその欠失頻度は上がるものと考えられ, DMD の診断に有用であると考えられた。また, FMD, LG のそれぞれ2例ずつでジストロフィン遺伝子の欠損がみられた。これらの患者は家族歴がない孤発例であった。このことについては, これらの常染色体性の遺伝形式をとるものにもジストロフィン遺伝子が何らかの関連性を持つのか, 臨床診断に問題があるのか現在のところ不明である。

## 文 献

1) Kuby SA, Hamada M, Nasset CC, Tyler FH and Ziter FA: Biochemistry of Metabolic

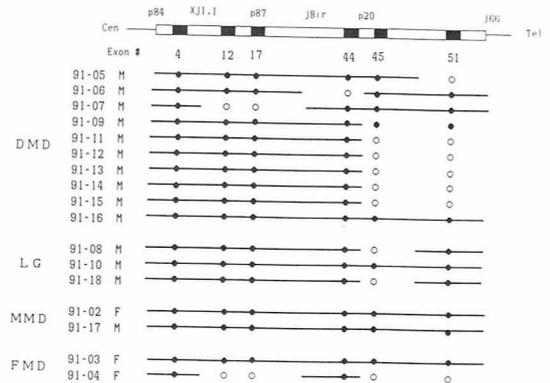


図 5 DMD, Duchenne muscular dystrophy: LG, Limb-girdle muscular dystrophy: MMD, Myotonic muscular dystrophy: FMD, Fukuyama muscular dystrophy.

Processes (ed by Lennon DLF, Stratman FW & Zahlten RN) Elsevier Biomedical, New York, 1983, pp303-322.

2) Koenig M, Hoffman EP, Bertleson GJ, Monaco AP, Feener CC and Kunkel LM: Cell

- 50: 509—517, 1987.
- 3) Bryan J and Kane RE: J Mol Biol 125: 207—224, 1978.
  - 4) Louvard D: Curr. Topics Cell Biol 1: 51—57, 1989.
  - 5) Hoffman EP and Kunkel LM: Neuron 2: 1019—1029, 1989.
  - 6) Chamberlain JS, Gibbs EJ, Nguyen PN and Caskey CT: Nucleic Acid Res 16: 11141—11156, 1988.
  - 7) 濱田 稔, 丸山英晴, 山下秀一, 澄田道博, 塩坂孝彦, 仲地 剛, 井上謙次郎: “筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法に関する研究”(荒木班)平成2年度研究報告書, 1991, pp112—115.
  - 8) Love DR, Hill DF, Dickson G, Spurr NK, Byth BC, Marsden RF, Walsh SF, Edwards YH and Davis KE: Nature 339: 55—58, 1989.

## 14) ジストロフィンの局在と機能：

### 急速凍結-ディープエッチング法による細胞骨格蛋白との相互関係の検討

小林 高 義\*

研究協力者 松本 容 秋\* 大野 伸 一\*\*  
馬場 健\*\*\* 宮武 正\*

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の遺伝子産物であるジストロフィン (DP) の筋細胞内での3次元的局在及びその機能は依然として未解決の問題である。それを明らかにするために、我々は未熟なマウス培養筋管細胞を使用して急速凍結-ディープエッチング (QF-DE) 法によって DP の細胞内局在及び actin-like filament との関係を検討し、昨年の本班会議で発表した。今回は成熟した筋肉内での DP の3次元的局在及び他の細胞骨格蛋白との相互関係をみる目的で *in vivo* の筋組織による検討を行ったので報告する。

#### 材料及び方法

DMD の model 動物である mdx マウス及びその control マウスである scn マウスを使用した。Scn 及び mdx マウスをネブタール麻酔下で開胸し、左心室よりパラホルムアルデヒドで灌流固定し、下肢より筋組織を取り出し“組織細切法”あるいはサポニン処理により、細胞内可溶性蛋白質を除去した。免疫染色は DP の C-terminal に対するモノクローナル抗体 (Novocastro) で染色後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体で染色した。免疫染色対照群として正常マウス血清と PBS を一次抗体として使用し、mdx マウス筋組織に DP

抗体を使用した。0.25%グルタルアルデヒドで30分間再固定後 DAB 反応を5分間行い、レプリカ膜を作成した。通常の超薄切片は、四酸化オスミウム固定後、脱水、包埋した。電顕レプリカ膜作成のためにメタノール浸漬後、液体窒素で冷却したイソペンタン・プロパン混合液中あるいは JFD-RFA による銅ブロック圧着法で急速凍結した。更に凍結試料は液体窒素中で凍結割断を加え、FD-3S 装置内でディープエッチング後、白金と炭素で回転蒸着し、型のごとくレプリカを作成し電顕観察した。

#### 結 果

##### I 透過電顕的観察

超薄切片による電顕免疫染色では、scn 筋組織において DP は無染色切片で細胞膜に沿って局在し (図1-A)、ウラン・鉛二重染色で DP は細胞膜直下に局在することが確認された (図1-B)。対照として、scn 筋組織に PBS 及び正常マウス血清を使用したもの (図1-C) 及び mdx 筋組織に抗 DP 抗体を使用した対照群では、無染色 (図1-D)、ウラン・鉛二重染色像においても免疫反応産物は陰性であった。

##### II QF-DE 法による観察

Scn 及び mdx においても細胞膜直下に細胞骨格の線維構造が存在した。Scn 筋組織において、抗 DP 抗体のみで免疫染色したものと二次抗体免疫

\* 東京医科歯科大学医学部神経内科

\*\* 信州大学医学部第一解剖学

\*\*\* 信州大学医学部第二病理学

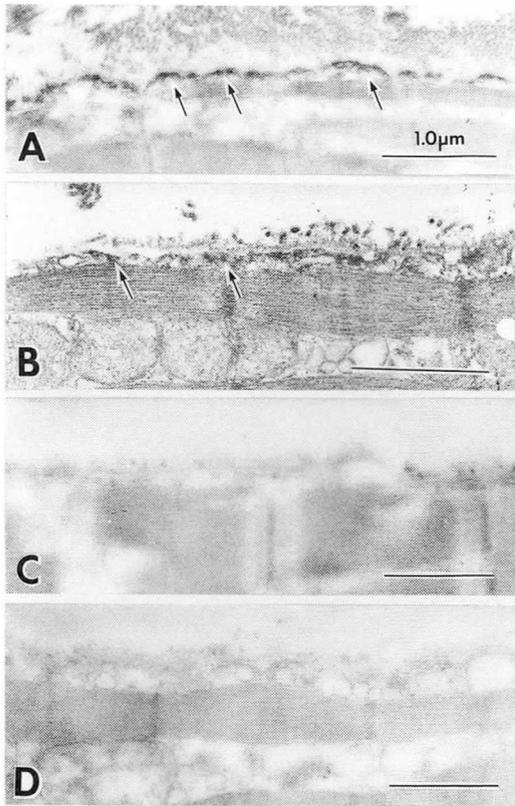


図1 Electron micrographs of immunoperoxidase staining for scn (A, B, C) and mdx (D) muscle fibers. (A) Immunoreaction products (arrows) are localized along the cell membrane. Unstained section. (B) Stained section with uranyl acetate and lead citrate. (C) and (D) No reaction product is observed as immunostaining control with normal mouse serum (C) and in a mdx muscle fiber (D).

染色後DAB反応したものと比較検討すると抗DP抗体のみでは、細胞骨格はわかるがDPの免疫反応産物は不明であった。それに対してDAB反応を施すとDAB反応産物で修飾された線維が明瞭になり、DABで修飾されない細胞骨格と結合する像が観察された(図3)。一方、scn筋組織に正常マウス血清を加えた群では、細胞膜直下の細胞骨格に図3で見られるような免疫反応産物は認められなかった(図2)。細胞膜にほぼ水平に凍結切断され細胞膜直下がよくみられるレプリカ像

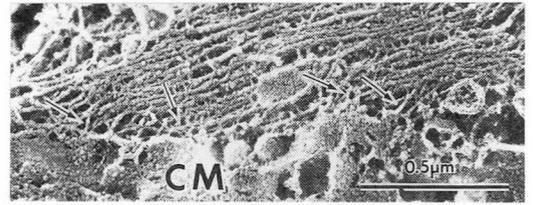


図2 A replica electronmicrograph for immunostaining control with normal mouse serum. No reaction product is observed among filamentous networks (arrows) under cell membranes (CM).

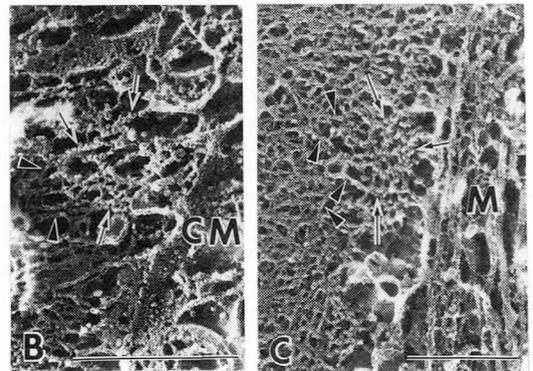
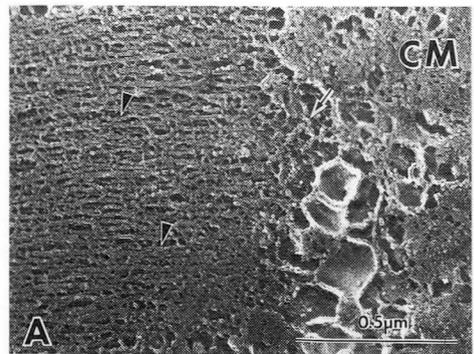


図3 Replica electronmicrographs for immunostaining of dystrophin in scn muscle fibers. (A) Microfilaments (arrowheads) are regularly organized deep inside the cytoplasm. The DAB decorated networks (arrows) are localized under the cell membrane (CM). (B) Most of 5-10 nm filaments (arrows) in subsarcolemmal networks are immunostained to identify dystrophin filaments (arrows) and other filaments are not decorated (arrowheads). (C) Some decorated networks (arrows) are associated with actin-like filaments (arrowheads). M: collagen matrix.

(図3)で細胞膜直下の構造を観察すると図3-B, Cの矢印で示すごとくDABで修飾されたDP線維の網目状構造が散在性に認められた。また、一部で図3-B, Cの矢印のごとくアクチン様線維との結合も認められた。

### 考 察

今回我々は、成熟した筋組織の *in vivo* におけるDPの細胞内局在をQF-DE法により検討し、DPは細胞膜直下で細胞骨格の一部を構成し、部分的に網目状構造を呈し、その一部はアクチン様線維と結合を有することをあきらかにした。

また我々は、ヒト筋細胞-ラット脊髄片併置培養系を使用して、筋の分化、成熟に伴うDPの局在について検討をおこなったが、DPは未熟な筋管細胞では、細胞内及び細胞膜直下に不規則に存在し、innervationを受け持続的に筋収縮している細胞では、細胞膜直下にDPは連続性に存在するようになる。一方、tetrodotoxinにより筋収縮をblockすると、chemical transmissionが存在していても、DPの分布は未熟な筋管細胞と同様な細胞膜直下での不規則な分布に留まることを既に報

告している。このことからDPの細胞膜直下での一様な配列は、筋の収縮-弛緩に対し筋肉細胞の生理的形態の保持に重要な役割を果たしていることが推測されるが、*in vivo*の成熟した筋組織でのDPの細胞膜直下での網目状の配列と、そのDPの他の細胞骨格蛋白との結合の確認は、DPの細胞膜直下での裏打ち機能を明らかにする上で重要な所見と考えられる。

### 結 論

DPは成熟した骨格筋では、その細胞膜直下にfilamentous networkを形成し、actinlike filamentと結合を有する。

### 文 献

- 1) Park-Matsumoto YC, Kameda N, Kobayashi T and Tsukagoshi H: Developmental study of the expression of dystrophin in cultured human muscle aneurally and innervated with fetal rat spinal cord. Brain Res 565: 280-289, 1991.

## IV. mdx マウス

# 15) 運動負荷による成熟 mdx マウス筋変性への影響

田 邊 等\*

研究協力者 水 野 美 彦\*\*

## 目 的

MDX マウス (以下 MDX) は, Duchenne 型筋ジストロフィー (以下 DMD) と同様にジストロフィン (Dy) 欠損を示しながら, 臨床的にも筋病理学上も進行性を示さないが, その機序は充分には解明されていない. これまでの研究で我々は MDX マウスに不動化あるいは運動制限を加えることにより, 筋変性が抑制されることを報告し, 筋変性は運動それ自体で促進される可能性について述べてきた. 本年は逆に筋運動を負荷することによる変性への影響を調べたので報告する.

## 対象・方法

生後 3 ~ 4 ヶ月の MDX12 匹, 及び対照として B-10 マウス 6 匹を使用した. この月齢では MDX は再生過程を経て, 変性に関してはほぼ安定期に入っていると考えられる. 方法としては, MDX 群 8 匹, 及び対照群 6 匹に Tetanus toxin を 1 回, 右腓腹筋 (GAC) に筋注し, local tetanus を生じさせた. 残りの MDX 4 匹は無処置にて自然飼育とした. Local tetanus を誘発した MDX 群の内 2 匹については, local tetanus 発現後 GAC, ヒラメ筋 (SOL), 前脛骨筋 (TA), 長母趾伸筋 (EDL) について針筋電図を施行し, 筋収縮の状態を観察した. 実験群では, local tetanus 出現後 3, 5, 7 日後に両側 SOL, EDL を採取, 無処置群 4 匹については実験開始 5 日目の時点で SOL, EDL を採取し組織学的に検索した. 検索内容としては筋

腹中央部の全横断面切片について, 初期変性所見である, hyaline degeneration, 及び, phagocytosis の占有面積の全横断面積に対する比率を調べた. 各群の略語は, 無処置群 (Ux), 実験群の Tetanus 側 (Tx), 同じく非 Tetanus 側 (Cx) とする.

## 結 果

### (1) 筋電図

Local tetanus における針筋電図所見は図 1 に

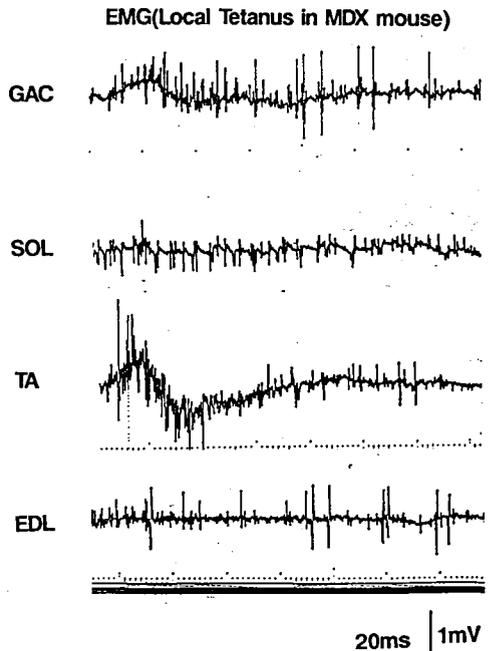


図 1 Local tetanus における針筋電図所見. GAC, EDL の一部には myotonic discharge も認められる.

\* 東京都立神経病院

\*\* 東京都立神経病院神経小児科

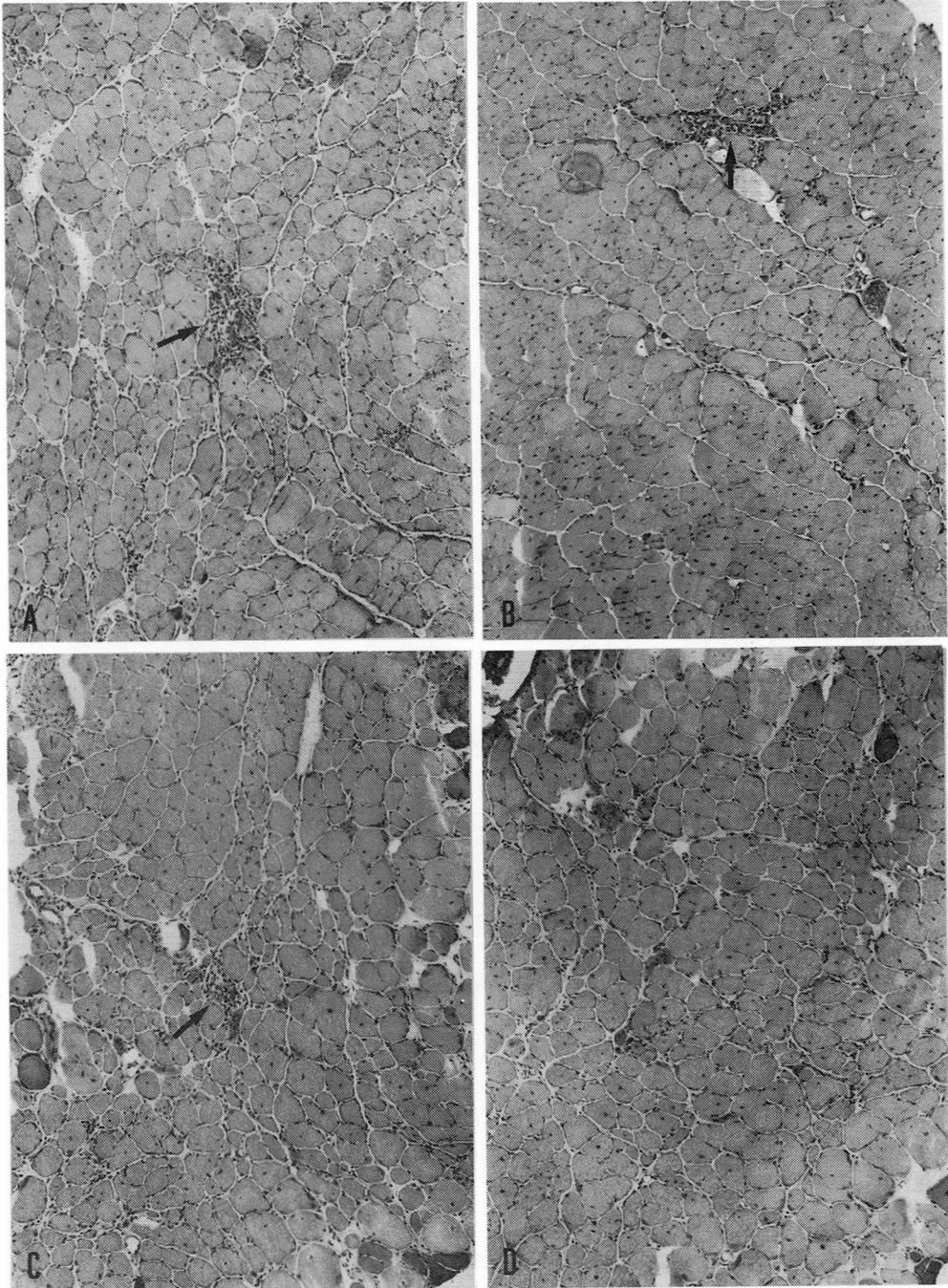


図2 A. Ux-SOL. Focal phagocytosisが認められる (→). HE 95×  
 B. Ux-EDL. Focal phagocytosisが認められる (→). HE 95×  
 C. Local tetanus 7日目のCx-SOL. Focal phagocytosisが認められる (→). HE 95×  
 D. 同Tx-SOL. 初期変性像は認められない. HE 95×

表 急性変性部の平均比率 (%)

実験日	SOL		EDL	
	Cx	Tx	Cx	Tx
3	1.0	0.3	2.3	4.6
5	1.4	0.2	9.5	0.8
7	2.5	0.3	11.5	0
Ux	0.4		0.1	

示す如く、検索した4つの筋全てにおいて中等度収縮に相当すると思われるNMUが観察された。一部にはmyotonic dischargeも観察された。

(2)無処置MDXにおける筋組織所見

自然飼育した生後3~4ヶ月のMDXではSOLでは図2Aに示す如く4匹中3匹に、また、図2Bに示す如くEDLでは1匹に、きわめて局所的な初期変性像が認められたが、いずれにおいてもmassive degenerationの所見は認められなかった。平均変性面積は表に示す如く0.4%であった。

(3)Local tetanus時の対照B-10マウスにおける筋組織所見

B-10マウスにおいては、Tx, Cxいずれにおいても変性は全く認められなかった。

(4)Local tetanus時のMDXの筋組織所見

先ず、SOLについて見ると、表に示す如くTxではUxと比較して差がなく、一方、Cxでは3, 5, 7日共Ux, Txに比較して変性部の比率が多いがその程度は軽微である。図2C, Dに7日目のCx, Txの組織像を示す。一方、EDLでは3日目ではTxの方がCxより変性部の比率が若干高くなっているが、5, 7日後ではCxで変性がかなり強く、Txでは殆ど変性は見られなくなっている。図3A, B, C, Dに5, 7日目のCx及びTxのEDLの組織像を示す。また、図4に表の結果をグラフで示す。

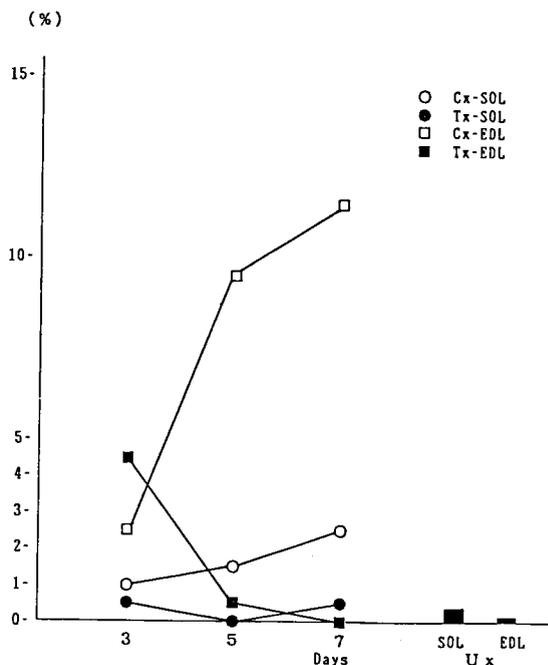


図4 急性変性像の比率

考 察

MDX マウスでは生後3週頃から始まる変性・再生のサイクルを経て、3ヶ月頃を過ぎるともはやmassive degenerationは見られず、今回のUx群に見られた様な僅かな局所的な変性が散発する程度となり、その他の線維は大半が中心核を有する再生線維となる。これがMDXでは進行性を示さない要因となっているが、同じDy欠損を示しながら何故DMDでは変性が進行し、MDXでは進行しないのかは未だ充分には解明されていない。今回の実験ではlocal tetanus側では筋電図所見から分かるように、筋の収縮は中等度に見られるが、関節運動は伴わず固定されている。MDXのTx側で変性の亢進が見られなかったことは、関節運動を伴う筋収縮が変性の成立には必要であることを示唆していると思われる。一方、Cx側は片足で歩くため運動負荷が加わっていることになる。Cx-SOLでの変性増強は軽度で、Cx-EDLの方が変性増強が強かった。片足での歩行を観察すると、前進時、足関節を底屈する際にはSOL及び

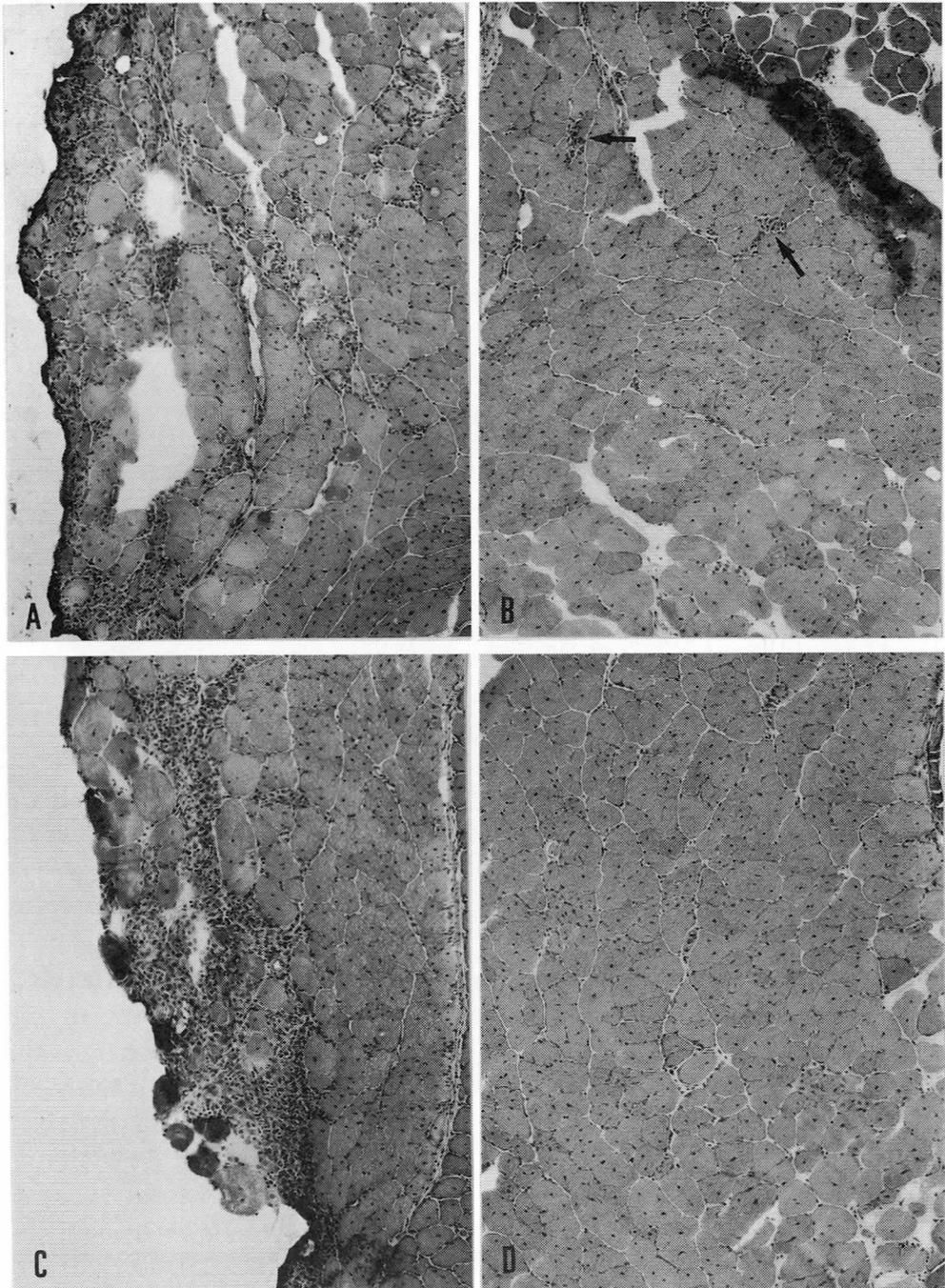


図3 A. Local tetanus 5日目のCx-EDL. 筋腹の周辺部を中心に、広汎なphagocytosisが認められる。HE 95×  
 B. 同Tx-EDL. 極めて軽微なphagocytosisが認められる(→)。HE 95×  
 C. Local tetanus 7日目のCx-EDL. 筋腹の周辺部を中心に、広汎なphagocytosisが認められる。HE 95×  
 D. 同Tx-EDL. 変性像は認められない。HE 95×

Plantaris muscle (PL) に強く負荷がかかることになる。一方、EDL は底屈した足趾を急いで背屈する際に働くわけだが、負荷の程度は SOL や PL の方が強いと考えられる。それでも EDL の方が変性増強の程度が強かったことは、筋線維タイプによる変性への態度にも違いがある可能性を否定できない。DMD ではタイプ 1 優位が見られるが、タイプ 2 線維の方が変性に陥り易いと仮定すれば説明がつく。この点は更に検討する必要があるが、いずれにせよ、安定期にある成熟 MDX マウスにおいても、運動負荷がかかれば更に変性が進むという事実は、MDX は基本的には DMD 同様進行性であることを示唆している。それでは何故非進行性を示すのかは、例えば DMD と比べて体重は 500分の 1 位小さく、一方、筋線維直径は DMD の半分位もあり、更に四つ足歩行による負荷の軽減などの条件の違いが、筋線維に対する負荷の違いとなって表れ、DMD に比べて変性が起こりにくいという機序が推定される。これまでの MDX における筋変性に与える影響に関する研究では、脱神経<sup>1)</sup>、脊髄切断による廃用性萎縮<sup>2)</sup>、不動化<sup>3)</sup>、運動制限<sup>4)</sup>による変性抑制が報告されている。Karpati ら<sup>5)</sup>は、MDX の外眼筋である rotator muscle では変性が全く見られず、同じ外眼筋の一つである retractor muscle では変性が見られることを報告している。この場合、前者は後者に比べて筋線維直径が小さく、その事が筋線維膜への単位面積当りの緊張の減少となって表れ、変性を起こさない機序ではないかと推論している。但し、前者はミトコンドリアに富みタイプ 1 線維であると思われ、一方、後者はミトコンドリアが少なく、

タイプ 2 線維であることを考慮に入れると、先に述べたように筋線維タイプによる差と直径の両者が関係していることも否定できない。いずれにせよ、これらの成績を考え合わせると、DMD では運動負荷を出来るだけ避けて生活した方が、病気の進行が遅くなるのではないかとということが示唆された。

## 文 献

- 1) Karpati G, Carpenter S and Prescott S: Small caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. *Muscle Nerve* 11: 795-803, 1988.
- 2) 中村晴臣, 高田邦安, 加藤信介, 本田誠四郎: mdx マウス骨格筋に対する神経切断の影響。"厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の臨床、病態と成因に関する研究"(杉田班)昭和60年度班会議報告書, 1986, pp39-43.
- 3) 田邊 等, 水野美彦: 「Immobilizationによるmdx マウス筋変性への影響」-Local tetanus法による検討- "厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究"(杉田班)平成元年度研究報告書, 1990, pp151-155.
- 4) 田邊 等, 水野美彦: 「Immobilizationによるmdx マウス筋変性への影響」-第2報- "厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の成因とその治療法開発に関する研究"(荒木班)平成2年度研究報告書, 1991, pp191-196.

# 16) mdx マウスの電氣的病態と薬物治療, 筋活動電位の分析, 及びミオトニーの数理解析

栗原照幸\*

研究協力者 岸 雅彦\* 寺田和子\*\* 西村千秋\*\*  
吉沢修治\*\*\* 根本博\* 日高隆信\*  
木下眞男\*

mdx マウスでは筋細胞膜の裏打ち蛋白である dystrophin が欠如している。mdx マウスの筋細胞膜の機能的異常としては、電気生理学的に検討した結果、膜電位の低下した筋線維と正常な筋線維が混在すること及び電氣的ミオトニーが認められることである<sup>1)</sup>。

現在までミオトニーの発症機序としては、①先天性筋緊張症 (Thomsen 病) のように筋細胞膜の Cl conductance が低下して起こるものと<sup>2)</sup>、②筋緊張性ジストロフィーや paramyotonia のように fast Na current の異常によるもの、③ recessive generalized myotonia (Becker) のように Cl conductance の低下と Na channel が random に開くことによってミオトニーが起こるもの<sup>3)</sup>が報告されている。

今回 mdx マウスの電氣的ミオトニーは神経筋接合部のブロックによっても、興奮収縮連関阻止 (EC-uncoupling) によってもミオトニーが生じることから筋細胞膜の異常によって起こっていることを実験的に確認した。イオンチャンネルの異常については特に Na channel について筋活動電位の立ち上がり時間、Vmax 等を計測した。又、薬物を用いた治療的研究結果をまとめた。

ミオトニーの数理解析は、昨年度はカエルのパラメーターを用いたが、本年度は哺乳動物骨格筋

のパラメーターを Hodgkin-Huxley の方程式に入れてミオトニーの発症機序を解析し、ミオトニーがどのような膜の異常で起こり得るかを明らかにした。

## 対象と方法

### 1) 電気生理学的実験

mdx マウス、及びコントロールの C<sub>57</sub>BL/10Sc マウス、Wistar 系ラットを対象とした。横隔膜神経を付けた横隔膜標本を作成して、ガラス管微小電極を用いて筋細胞内記録を行った。Excitation-contraction uncoupling は 400mM の高張グリセロール溶液と等張の washing solution を用いて t-tubular system を選択的に破壊する方法をとった。神経筋伝達 block は d-tubocurarine を用いた。

又、mdx 及び B10 マウスの標本において横隔膜神経刺激を施行し、細胞内筋活動電位を測定した。活動電位波形は A/D コンバーター及びパーソナルコンピュータを用いて、サンプリングクロック 10KHz にて取り込み、10~20本の筋線維から活動電位の peak voltage, rising time, half decay time, Vmax を測定し、統計学的な検索を行った。

### 2) 数理解析

解析を対象としたモデルは、昨年報告したカエルの場合<sup>4)</sup>と同じ Hodgkin-Huxley 方程式 (但し Na 活性化の移動速度  $\alpha_m$  の時間微分の分母を、6.8<sup>5)</sup>と置き換えた) で、主に文献<sup>6)</sup>に基づき、以

\* 東邦大学医学部第四内科

\*\* 東邦大学医学部医学情報学研究室

\*\*\* 東京大学工学部計数工学科

下の哺乳動物骨格筋のパラメータを用いた,

$\overline{g_{Na}}=50$	$\overline{\alpha_m}=0.08$	$\overline{V_h}=-41$
$\overline{V_{Na}}=50$	$\overline{\beta_m}=0.8$	$\overline{\alpha_n}=0.0088$
$\overline{g_K}=22$	$\overline{V_m}=-55$	$\overline{\beta_n}=0.037$
$\overline{V_K}=-70$	$\overline{\alpha_h}=0.006$	$\overline{V_n}=-40$
$\overline{g_l}=0.4$	$\overline{\beta_h}=1.3$	$\overline{C_m}=1.9$
$\overline{V_l}=-81$	(記号と単位は昨年と同じ.)	

モデル方程式上でこれらのパラメータを変化させて、連続発火の起こりやすさを調べた。

## 結 果

### 1) 電気生理学的実験

図1 aは、mdx マウスの電気的ミオトニーが d-tubocurarine によって神経筋接合部を block しても起こることを示す。図1bは E-C uncoupling をしても mdx マウスでは電気的ミオトニーが起こることを示す。

mdx マウスの電気的ミオトニーの特徴をまとめると次の5点が特徴的である。

- ①臨床症状として behavior myotonia はない。(righting response が遅くなることはない.)
- ②低温 (26°C 以下) で起こりやすい。
- ③神経筋伝達阻止でも E-C uncoupling でも burst は止まらない→筋細胞膜の異常で起こっている。
- ④ Na channel を阻止する薬物 (tetrodotoxine や DPH) で burst は阻止できる。
- ⑤ bestatin と mexiletine は burst を阻止し、RMP も改善し得る。

mdx マウスでは、RMP の正常な線維と低下した線維が混在するが、RMP の低下した線維では筋活動電位は出現しなかった。図2に示すように、筋活動電位の波形は mdx 及び B10 マウスで差は認められなかった。又、peak voltage にもほとんど差は無く、50mV 以下の波形は、測定条件不良と判断し、peak voltage が50mV 以上の波形に限定して各パラメーターを計測した。しかし、Vmax, rising time, half decay time の non-matched t-test を用いた比較では、表1のように検定P値はどれも5%以下であり、有意差は認められなかった。Vmax は fast Na current を反映すると考

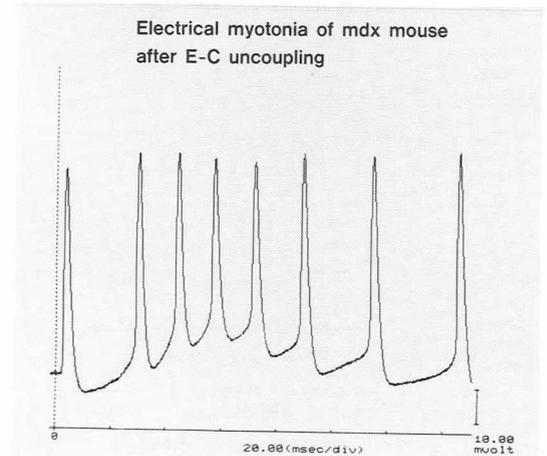
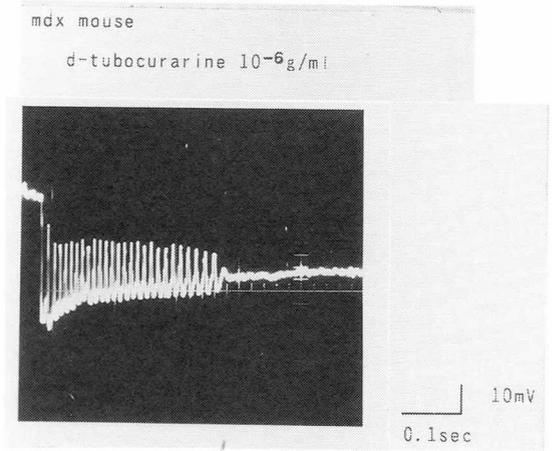


図1 a: mdx mouse で神経筋伝達ブロックをしても電気的ミオトニーが起こること  
b: E-C uncoupling をしても電気的ミオトニーが起こることを示す。

えられるが、今回の実験では mdx マウスにおける fast Na current の異常は検出できなかった。

### 2) 数理解析

図3に、 $g_l$  (Cl を主とするリークコンダクタンス) と、 $\overline{V_m}$  (Na チャンネル活性化因子mの移動度の電位依存性定数) の値の組に対し、周期発火が生じる領域を示した。周期発火は、 $g_l$  の低下のみでも生じるが、同時に  $\overline{V_m}$  が過分局側に変化 (上昇) すると、 $g_l$  のより高い値から起こるようにな

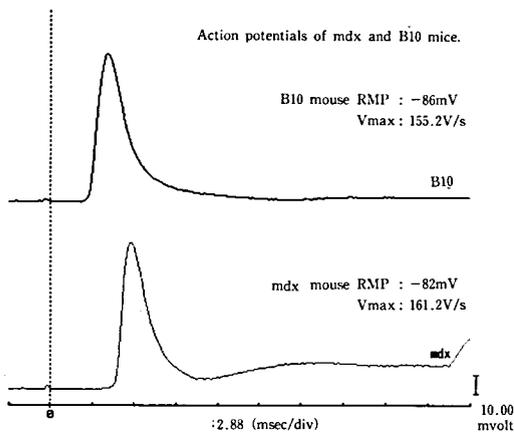


図2 mdx マウスと B10マウスの筋活動電位の比較。両者に差は認められない。

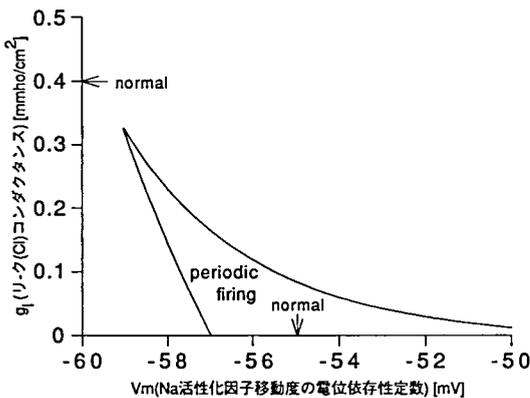


図3 周期発火が生じる  $g_1$  と  $\overline{V}_m$  の範囲。図の三角形の領域内で生じる。

表1 mdx 及び B10マウス間の活動電位に関する各パラメータの比較。  
Vmax を含む各パラメータ間の検定でも P 値はすべて 5% 以上であり、有意差は認められない。fast Na current の異常は検出できなかった。

Parameters of action potentials B10(control) and mdx mice

	B10 mice (n = 18)	mdx mice (n = 8)	P value (non- matched t-test)
RMP (mV)	86.1 ± 4.5	82.0 ± 4.9	0.06
Vmax (V/sec)	118.8 ± 26.5	113.1 ± 19.0	0.61
Peak voltage (mV)	62.3 ± 7.3	67.1 ± 6.4	0.13
Rising time (ms)	1.06 ± 0.13	1.11 ± 0.11	0.36
Half-decay time (ms)	1.04 ± 0.17	1.06 ± 0.15	0.80

る。すなわち両方の変化が起きると周期発火がより生じやすくなる。周期発火の生じる領域の周辺では、初期刺激の強さにより、数回の連続発火が生じる。

以下、周期発火の生じる  $g_1$  の最大値を指標に他のパラメータについて連続発火の起こりやすさを調べたところ、パラメータが以下のように変化すると、連続発火が生じるか、または生じやすくなった。

- ・ Cl コンダクタンス低下:  $g_1$  低下
- ・ Na 透過性の増大:  $\overline{V}_m$  上昇・ $\overline{g}_{Na}$  上昇等
- ・ K 平衡電位低下:  $V_k$  低下
- ・ K 透過性の増大:  $\overline{V}_n$  上昇・ $\overline{g}_k$  上昇等
- ・ RMP 低下:  $V_1$  低下

但し、K 透過性の増大の影響は小さく、単独では連続発火を生じない。

### 考 察

ミオトニーの発症機序については現在までの文献を review すると表 2 のような報告がある。これをまとめると① Cl conductance の低下によるミオトニー、② fast Na current の異常によるミオトニー、③ Cl conductance の低下と Na channel が random に再び開くということの両方でミオトニーが起こる<sup>3)</sup> という三つの場合が報告されている。

数理解析で求めた連続発火を起こす膜の電気特性の変化方向は、現在までに各種ミオトニーの原

表2 文献的考察 ヒトのミオトニー疾患及び動物モデルにみられるミオトニーの病態生理や特徴を示した報告のまとめ。

種々の“ミオトニー”	病態生理・特徴	報告者
1) myotonia congenita (Thomsen) 2) hereditary myotonia of goat 3) A-9-Cによる myotonia 4) 低Cl溶液による myotonia	Cl conductanceの低下	Lipickyら (1971) Lipickyら (1966) Bryantら (1971) Kuriharaら (1984)
5) myotonic dystrophy 6) paramyotonia 7) adynamia episodica her.	fast Na currentの異常	Rudelら (1980, 1989) Lehmann-Hornら (1987) Lehmann-Hornら (1987)
8) hereditary generalized myotonia (Becker)	① fast Na currentの異常 ② Na ch.の異常とCl cond.低下	Rudelら (1989) Frankeら (1991)
9) murine genetic myotonia (mto mouse)	① true myotonia ② Cl conductanceの低下と考えられる	Aicheleら (1985) Mehrkeら (1988)
10) dystrophic chicks	筋の肥大と萎縮による	Enrikinら (1982)
11) dystrophic (dy/dy) mouse	末梢神経の異常による	Enrikinら (1987)
12) mdx mouse	低温で起る電気的ミオトニー	Kuriharaら (1990)

因と考えられている変化の方向を含んでいる。また現在知られているミオトニー治療薬の薬効にも合っており、生理的事実をよく説明している。

mdx マウスについては、fast Na channelの異常ではないという結果を今回報告し、Cl conductanceの低下の有無については今後の検討に俟つ。

### 結 語

mdx マウスの電気的ミオトニーは神経筋伝達ブロックをしてもE-C uncouplingをしてもburstが起こるので、筋細胞膜の異常で起こることを実験的に証明した。次に膜のどのような異常かについては今回 fast Na currentの異常は見出されなかったため、更にCl conductanceの低下があるか否かを中心に検索を進めればよい。

数理的に哺乳動物のパラメーターを用いて検討した結果では、ミオトニーの起こる原因としては、Cl conductanceの低下、Na conductanceの増大、K平衡電位低下、K conductanceの増大、RMP低下等の変化が筋細胞膜に生じ、時には一つだけでなく複数の項目が変化してミオトニーが起こると

考えられる。mdx マウスのように dystrophinが欠損していても、または他のミオトニー疾患のように dystrophinが存在していても筋細胞膜の生理的变化により上記のような方向へ変化すればミオトニーが生じ得ることを数理的に示した。

### 文 献

- 1) Kurihara T, Kishi M, Saito N, et al: Electrical myotonia and cataract in X-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. J Neurol Sci 99: 83-92, 1990.
- 2) Lipicky RJ, Bryant SH and Salmon JH: Cable parameter, Sodium, potassium, chloride, and water content, and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. J Clin Invest 50: 2091-2103, 1971.
- 3) Franke C, Iaizzo PA, Hatt H, et al: Altered Na<sup>+</sup> channel activity and reduced Cl<sup>-</sup> conductance cause hyperexcitability in recessive generalized myotonia (Becker). Muscle

- Nerve 14 : 762–770, 1991.
- 4) Terada K, Yoshizawa S and Nishimura C :  
Periodic firing in muscle membrane at low  
chloride conductance. IEICE Trans E74 :  
999–1002, 1991.
  - 5) Pappone PA : Voltage-clamp experiments in  
normal and denervated mammalian skeletal  
muscle fibers. J Physiol 280 : 377–410, 1980.
  - 6) Adrian RH and Marshall MW : Sodium  
currents in mammalian muscle. J Physiol  
208 : 223–257, 1977.

# 17) mdx 胎仔骨格筋の電位依存性カルシウムチャンネル について

吉田 瑞子\*

研究協力者 井上 勲\*\* 松崎 哲也\*

## はじめに

Duchenne 型ジストロフィー症 (DMD) とそのモデルマウス mdx はジストロフィン欠損の膜異常である。しかし未だに骨格筋壊死の原因は不明である。これまでの報告書から、この原因が骨格筋の刺激-応答機構、特にカルシウムイオンの細胞内への流入機構にあるのではないかと考えた。即ち 1) 筋組織内にカルシウムの蓄積がある<sup>1)</sup>。しかし 2) 細胞内カルシウムイオン濃度は正常値を示す<sup>2)</sup>。3) 脱神経した筋細胞は壊死しない<sup>3)</sup>。4) Z-line の乱れがある<sup>4)</sup>。5) 筋小胞体の機能は正常<sup>5)</sup>。6) 筋壊死が起こるまで、筋細胞として機能している (例えば mdx は発生から誕生後 3 週齢頃まで壊死が起こらない)<sup>6)</sup>。これらのことから、刺激-応答機構に異常があり、刺激を受ける度に、細胞外から細胞内にカルシウムイオンが流入し、その一部のカルシウムイオンが、細胞内に徐々に蓄積していく。そのため細胞内の局部に乱れが生じ、筋壊死へ陥ると考えた。

T-管の膜電位依存性 L-型カルシウムチャンネルは、筋細胞が刺激を受けた時、その刺激を細胞内に伝達する為に重要な役割を果たし、それと同時にカルシウムイオンが細胞内に流入する。そこでこのチャンネルについて調べた。

## 試料と方法

mdx とその対照マウス B10 の胎仔 16~18 日齢

の肋間筋の myotube を用いた。Myotube は肋間筋を 3 mg/ml collagenase (type I, Sigma) と 1 mg/ml trypsin (type III, Sigma) を含む, phosphate buffered saline (pH 7.2) 中で 10~14 分間 37°C で浮置して得た。分離した myotube を Krebs 溶液中でカバーガラス上に接着させ、カルシウムチャンネル測定用溶液に移し、顕微鏡下に置いた。カルシウムチャンネル電流は、whole-cell voltage clamp 法で、膜電位を -80mV に固定して、そこから脱分極を与え、内向きの Ba<sup>2+</sup>電流として記録した。L-型カルシウムチャンネル電流は、prepulse (-30mV, 100ms) を与え、T-型カルシウムチャンネルを不活性化させた後 (40ms) 記録した。細胞外溶液は 10mM Ba-methanesulfonate [Ba(MeSO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 120mM Tetraethylammonium-MeSO<sub>3</sub> [TEA-MeSO<sub>3</sub>], 10mM MOPS-TEA, 3μM tetrodotoxin (TTX) (pH 7.4), ピペット内溶液は、140mM Cs-aspartate, 10mM MOPS-Na, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7.2) を用いた。電極抵抗は約 1 MΩ で、総ての実験は室温で測定した。

## 結 果

17日齢の mdx と B10胎仔骨格筋の膜電位を -80mV に固定し、その電位から脱分極した各電位における、電流及び電圧-電流曲線を図1A と B に示す。mdx の L-型カルシウムチャンネルは約 -40~-30mV の膜電位で活性化した。その膜電位は対照 (B10) に比べ約 10mV 低い電位だった。L-型カルシウムチャンネルが最大に活性化され

\* 国立精神・神経センター神経研究所  
\*\* 徳島大学医学部情報生物

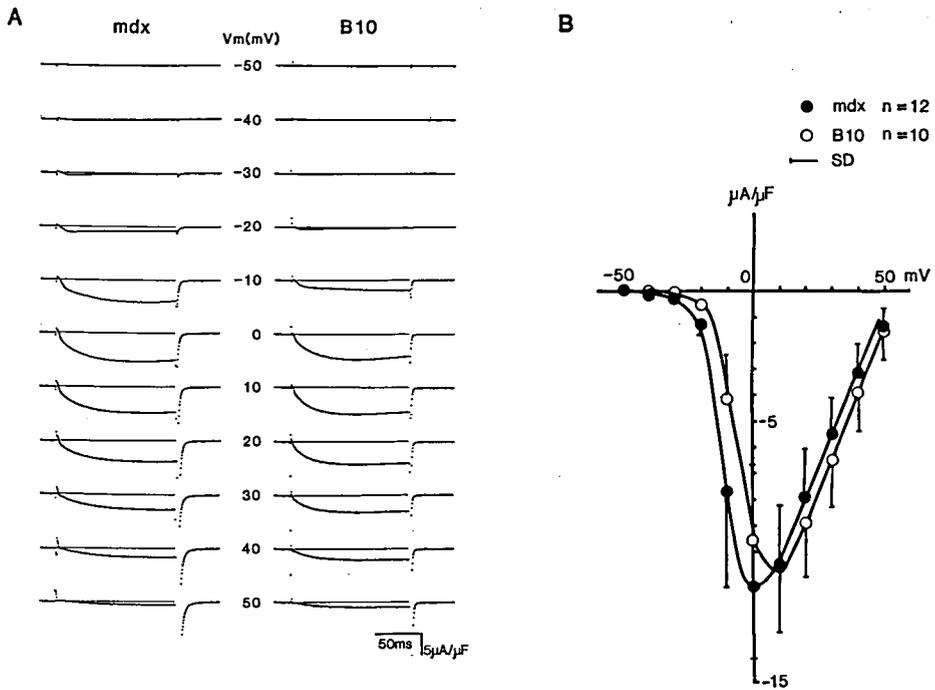


図1 A) mdx と B10の myotube の L-型カルシウムチャンネル電流  
whole-cell voltage clamp 法で、 $-80\text{mV}$  の固定電位より脱分極した時の  $\text{Ba}^{2+}$  電流  
B) A) の電圧-電流曲線

る膜電位は約  $0\text{mV}$  で、この電位も B10のそれに比べ約  $10\text{mV}$  低い膜電位だった。図1Bの電圧-電流曲線から得られる最大コンダクタンスには、mdx と B10間に差がなかった。

最大コンダクタンスに対する、各膜電位のコンダクタンスの比を図2に示す。17日齢の mdx は約  $-40 \sim -30\text{mV}$  でコンダクタンスが大きくなり始め、B10のそれに比べ約  $10\text{mV}$  低い電位だった。1/2コンダクタンス比では約  $6.5\text{mV}$  であった。16日齢の mdx と B10では、この差が小さくなり、約  $4\text{mV}$  だった。18日齢は17日齢の結果とほぼ同じだった。

このように異常を示すカルシウムチャンネル電流が、T-管にある L-型カルシウムチャンネルであることは、その特異的阻害剤で確認した(図3)。17日齢の mdx 骨格筋に(図3A)、 $1\ \mu\text{M}$ ニフェジピンを作用させると10分後に、電流はほとんど流れなくなった(図3B)。このことは、正しく L

-型カルシウムチャンネルを測定したことを示す。

### 考 察

mdx 骨格筋の膜電位依存性 L-型カルシウムチャンネルが、対照の B10のそれよりも低い膜電位(約  $-40 \sim -30\text{mV}$ )で活性化されることが明らかになった。即ち mdx 骨格筋は、刺激により対照の B10よりも低い電位で、カルシウムイオンが細胞内に流入することがわかった。

この異常は mdx 骨格筋の発達により亢進することが図2より示唆されている。

これらの結果より私達が予想したように、mdx 骨格筋は細胞内に徐々にカルシウムの蓄積が起これ、乱れが生じ、筋細胞は壊死に陥るのであろう。今後この確認を行う。

### ま と め

1) mdx 胎仔骨格筋の電位依存性 L-型カルシウ

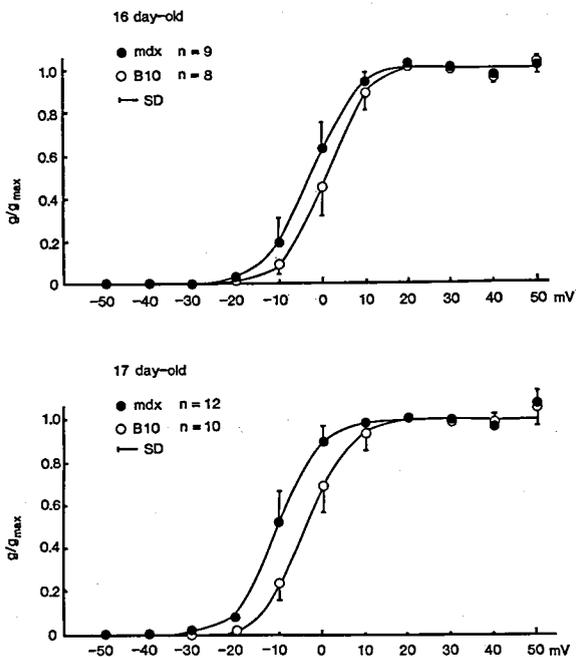


図2 mdx と B10 の最大コンダクタンスに対する、脱分極した各電位でのコンダクタンス比  
A) 16日齢, B) 17日齢

ムチャンネルは、対照のそれよりも低い電位で活性化された。

- 2) 1) の為に mdx 骨格筋内に、B10 よりも低い膜電位で、カルシウムイオンが流入する。
- 3) 1) の現象は、骨格筋の発達によって亢進することが示唆された。

## 文 献

- 1) Dunn JF and Radda GK: Total ion content of skeletal and cardiac muscle in the *mdx* mouse dystrophy:  $Ca^{2+}$  is elevated at all ages. *J Neurol Sci* 103: 226-231, 1991.
- 2) 吉田瑞子, 柴崎 浩: mdx マウス骨格筋内の Ca イオン濃度. “厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究 (杉田班) 平成元年度研究報告書”, 1990, pp145-146.
- 3) Karpati G, et al: Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx

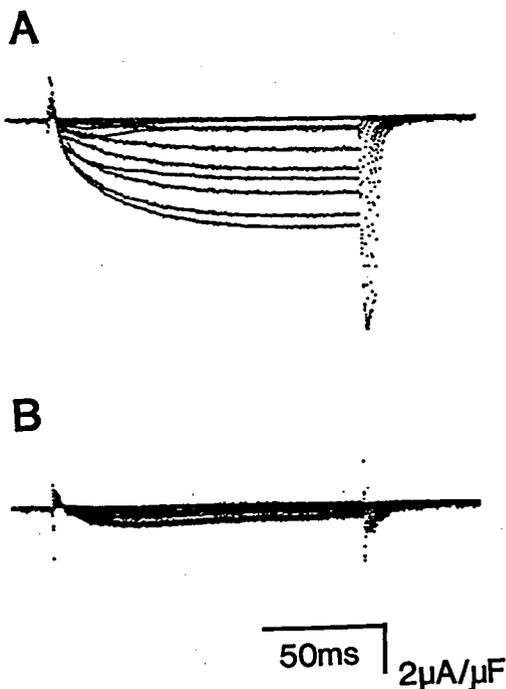


図3 L-型カルシウムチャンネルに対するジヒドロピリジン誘導体の効果  
A) 17日齢 mdx 胎仔骨格筋の L-型カルシウムチャンネル電流 (固定電位は  $-80mV$ )  
B) A) の細胞に  $1 \mu M$  ニフェジピンを作用させ、10分後の  $Ba^{2+}$  電流

mouse dystrophy. *Muscle & Nerve* 11: 795-803, 1988.

- 4) Torres LFB and Duchon LW: The mutant *mdx*: Inherited myopathy in the mouse. *Brain* 110: 269-299, 1987.
- 5) 高木昭夫ほか: mdx マウス骨格筋における (Ca) 濃度調節, “厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の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”, 1991, pp167-169.
- 6) Tanabe Y, et al: Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. *Acta Neuropathol (Berl)* 69: 91-95, 1986.

# 18) mdx コントロールマウス骨格筋細胞膜ジストロフィン分子の deep etching replica 法による観察

若山吉弘\*

研究協力者 渋谷誠二\*

## 緒言

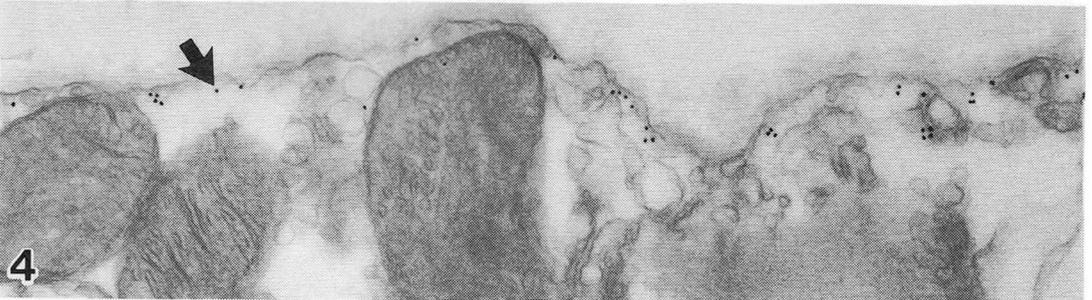
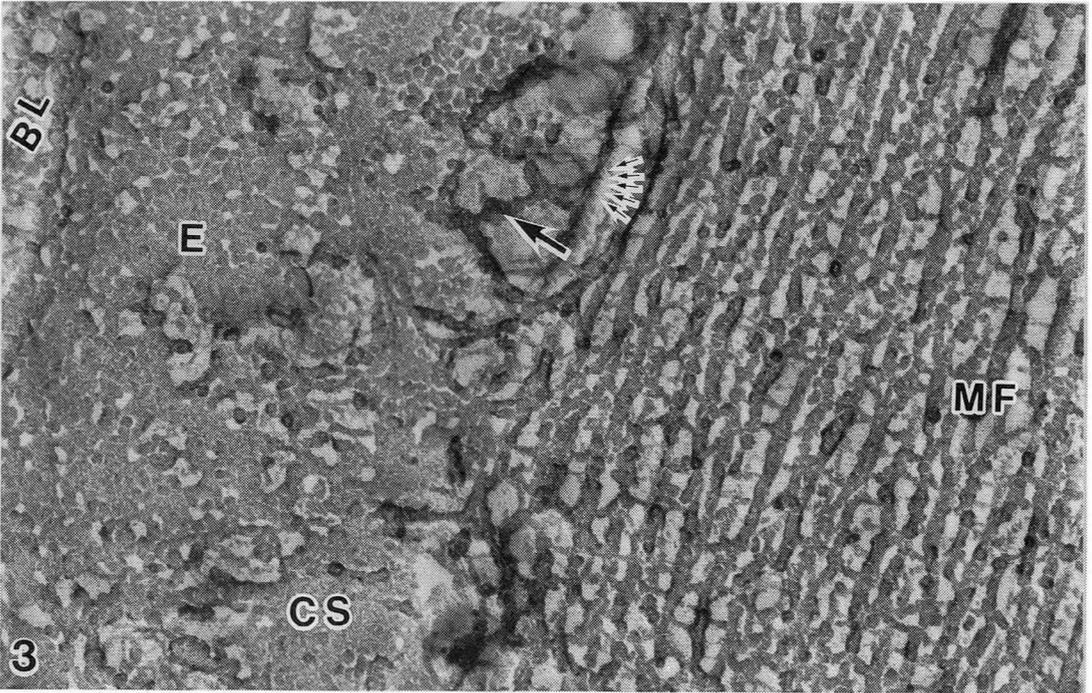
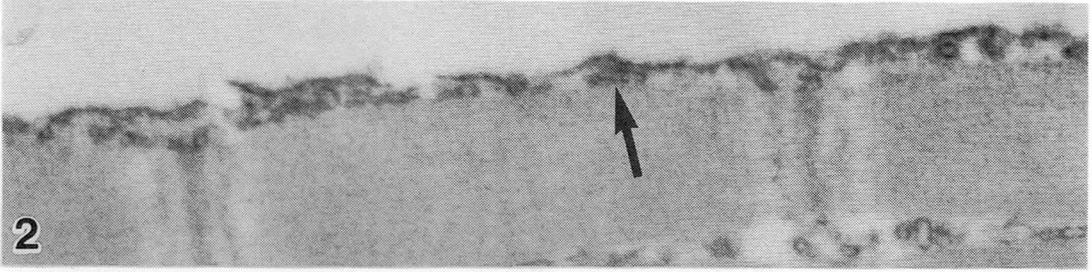
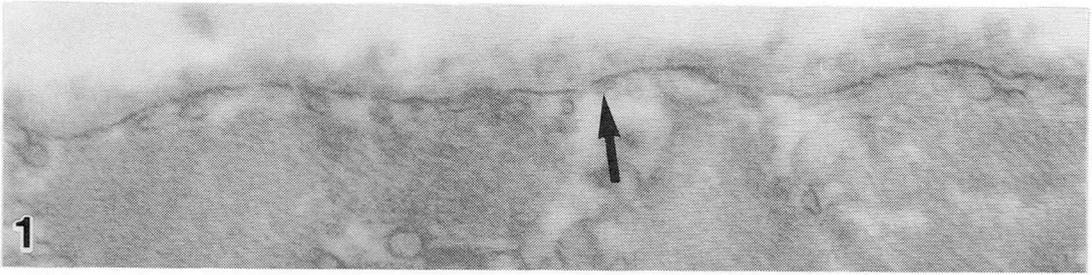
Quick freeze, deep etch, rotary shadow (QDR) 法による replica 膜の電顕的観察は細胞骨格の 3 次元的観察に適しており, membrane cytoskeletal interaction や cytoskeletal elements の微細構造の解明やその相互間の関連を研究するのに極めて有力な手段であり, 特に細胞膜と細胞膜関連細胞骨格との相互関係を解析するには極めて有用である。従来我々は mdx コントロールマウスや mdx マウスを用い, QDR 法による replica 膜の電顕的観察にてジストロフィンの超微形態とその存在様式を研究してきている。本年度は抗ジストロフィン抗体標識骨格筋標本の本法による研究を行ったので報告する。

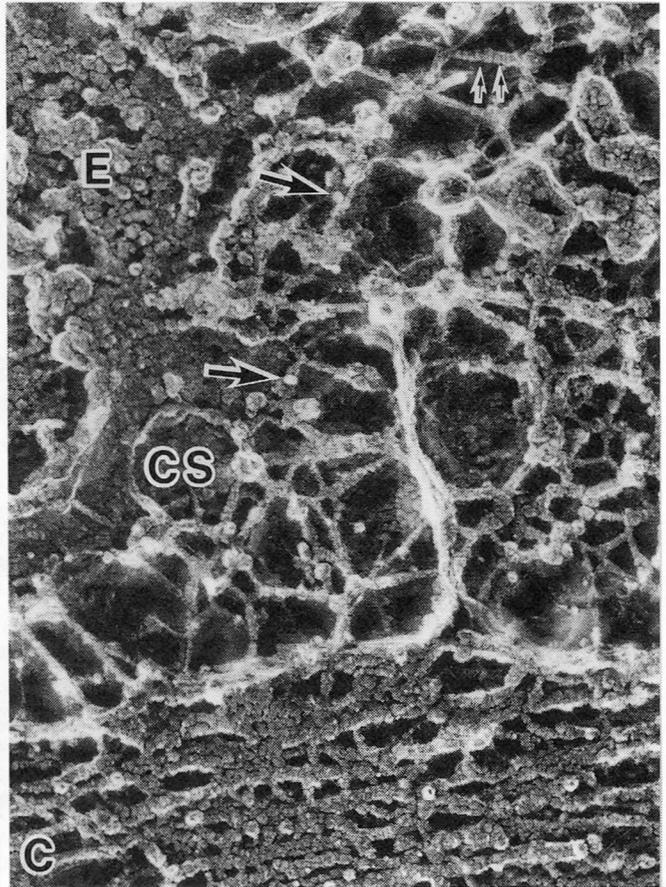
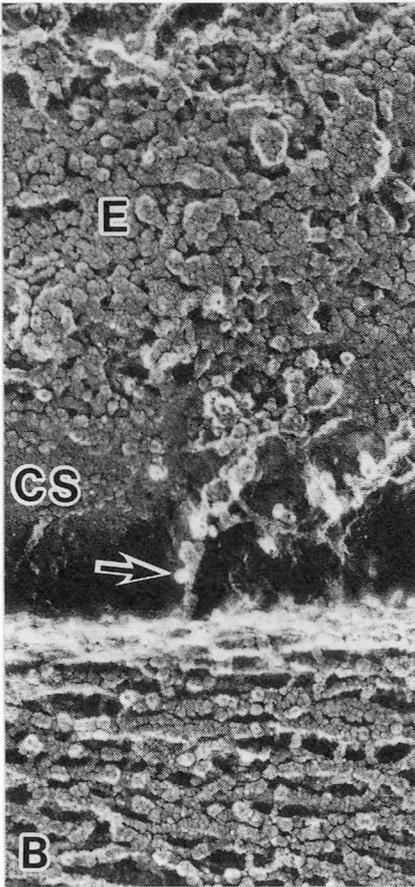
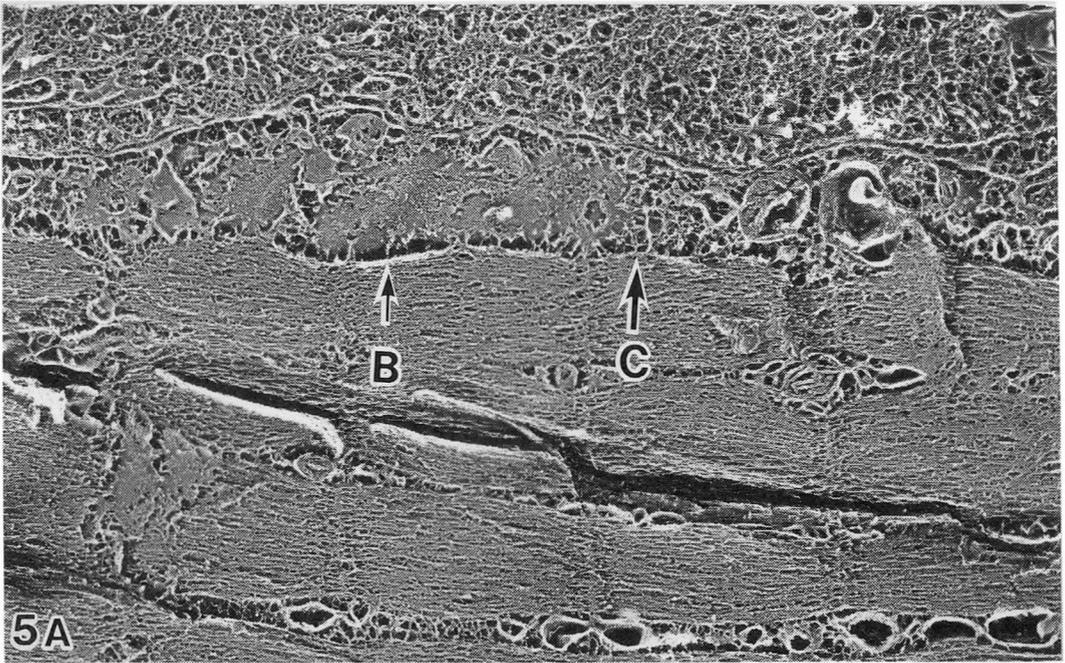
## 材料と方法

6 匹ずつの mdx コントロールマウス, mdx マウスの大腿四頭筋を冷却した 4%パラフォルムアルデヒドの 0.1M リン酸バッファー溶液 (pH7.2) で 1 時間固定後 0.1M リン酸バッファーにてよく洗浄し, 液体窒素冷却イソペンタン液中で凍結後, クリオスタットにて細切した。細切標本をよく洗浄後, 非特異的反応を除去するため 5%正常ロバないしヤギ血清を室温にて 30 分間反応させた。そして 1 次抗体として Drs. Hoffman, Byers より供与された羊抗 60kDa ジストロフィン抗体又はウサギ抗 6-10 抗体のそれぞれ 1000 倍希釈液にて 4°C 24 時間反応させ, 0.1M リン酸バッファー溶

液にて 4 回洗浄した。2 次抗体は 100 倍希釈ビオチン化ウサギ抗羊抗体 (Vectastain, Vector Lab. U.S.A) あるいは 20 倍希釈 10nm 金コロイド標識ロバ抗羊 (Bio Cell, UK) 又はヤギ抗ウサギ (Amersham, UK) 抗体を 4°C over night から 24 時間反応させ, よく洗浄後冷却した 2.5% グルタルアルデヒド溶液にて 4°C 30 分間再固定した。2 次抗体標識標本のうちビオチン化 2 次抗体反応標本の一部を ABC 法にて DAB 反応させたものと, 金コロイド標識標本の一部をとともに冷却 1%  $O_3O_4$  溶液で 1 時間固定後エポキシに包埋し超薄切片を電顕にて観察した。QDR 法用には金コロイド標識 2 次抗体液がグリセロールを含むためにこれを除去し, またバッファーの塩類除去のため蒸留水にてよく洗浄した。急速凍結はエイコー社製 RF23 型急速凍結装置にて液体ヘリウムで行った。急速試料凍結装置 Eiko RF23 型に液体窒素と液体ヘリウムを入れ -269°C まで冷えた純銅 block に採取した筋の薄片を圧着し急速凍結した。その後標本を Eiko FD5A 凍結切断装置に移し -150~-170°C, 真空度  $1 \sim 2 \times 10^{-7}$  Torr で凍結面の表層を切断した。切断後試料台の温度を -90°C まで上昇し約 30 分間 deep etching をおこなった。Deep etching 後試料台に装着した標本の温度を -160°C 前後まで冷やし, プラチナとカーボンを回転蒸着して replica 膜を作製した。電顕写真は金コロイド抗体標識標本のは金粒子の判別を容易にするため白黒反転して焼き付けた。

\* 昭和大学藤が丘病院神経内科





## 結 果

図1 mdx コントロールマウス筋細胞膜の高倍電顕像で、矢印は筋細胞膜裏打ち構造を示す。(×85,800)

図2 羊抗60kDa ジストロフィン抗体による immunoperoxidase 染色 mdx コントロールマウス筋細胞膜の電顕像。筋細胞膜直下に陽性反応産物(矢印)がみられる。(×42,900)

図3 羊抗60kDa ジストロフィン抗体とビオチン化ウサギ抗羊2次抗体反応 mdx コントロールマウス骨格筋標本の QDR 法による replica 膜の電顕像。筋原線維(MF)と筋細胞膜真内表面(CS)との間に細胞膜裏打ち細胞骨格が観察される。それらのなかに矢印で示す様な抗体で太く修飾されたジストロフィン分子と考えられる細胞骨格がみられ、これは筋原線維最外層の5 nm(小さな矢印)の縞紋様外観をもつアクチンフィラメントと考えられるものと連絡している。

E: Extracellular fracture face,  
B L: Basal lamina (×139,200)

図4 ウサギ抗6-10ジストロフィン抗体による immunogold 染色 mdx コントロールマウス筋細胞膜の電顕像。筋細胞膜に沿いそのすぐ内側に金粒子(矢印)の存在がみられる。(×49,300)

図5 A-C 羊抗60kDa ジストロフィン抗体と金コロイド標識ロバ抗羊2次抗体修飾 mdx コントロールマウス骨格筋の QDR 法による replica 膜の電顕像。A は低倍写真で写真上半の筋細胞膜内表面に沿い細胞膜裏打ち細胞骨格が不均一に存在するのがみられる。B, C はそれぞれ A の小さい矢印, 大きい矢印の拡大像で、それぞれ大きな矢印のような10nm 金粒子の付着したジストロフィン分子と考えられる細胞骨格がみられ、多くは1端が他端より細い桿状構造で、端が拡大しているものもみられる。

CS: 細胞膜真内表面, E: Extracellular fracture face (A×34,800; B, C×139,200)

mdx コントロールマウス骨格筋の通常の透過電顕写真では筋細胞膜裏打ち構造(図1矢印)は雲霞状にしか観察出来ない。これを QDR 法により replica 膜を作製し観察すると低倍像では細胞膜に付着した細胞骨格の群集としてみられその密度は細胞膜内表面に沿い一様ではなかった。更に拡大すると筋細胞膜真内表面に付着した桿状の細胞骨格が網状構造を形成しているが、特に規則的な形状の網状構造ではなかった。

次に、羊抗60kDa ジストロフィン抗体の immunoperoxidase 法による染色標本の透過電顕所見では免疫反応は mdx コントロールマウスの筋細胞膜直下にみられた(図2)。更に羊抗60kDa ジストロフィン抗体とビオチン化ウサギ抗羊抗体で染色した標本の QDR 法による replica の電顕所見では正常骨格筋細胞膜真内表面に付着する多数の細胞骨格がみられる(図3)。図3の大きい矢印は抗ジストロフィン抗体修飾ジストロフィン分子で、これは筋原線維に組み込まれた約5 nm の縞紋構造(小さな矢印)をもつアクチンフィラメントと連絡しているのがみられた。

一方金コロイド標識法による染色標本でも免疫反応による金粒子は透過電顕的には mdx コントロールマウスの筋細胞膜直下に認められた(図4)が、mdx マウスの筋細胞膜には認められなかった。金コロイド標識 mdx コントロールマウスの QDR 法による replica 膜の電顕的観察では筋細胞膜を細胞外腔から見ると筋細胞膜の protoplasmic fracture face に接し、ジストロフィン分子に付着した金コロイド粒子がみられた。他方筋細胞膜を細胞内から観察すると低倍では筋細胞膜内面に沿い筋細胞膜関連細胞骨格の付着がみられるがその分布は一様ではなかった(図5 A)。更に高拡大で観察すると個々の細胞骨格分子が明瞭にみえ、そのなかに10nm 金コロイド粒子が付着したジストロフィン分子と考えられる細胞骨格が観察された。ジストロフィン分子の多くは1端が他端より細い桿状構造であり、端が拡大しているものもみられた(図5 B)。またその多くは図5 C のように筋細胞膜付着細胞骨格の網状構造に組み込ま

れていた。

mdx マウス骨格筋細胞の細胞膜関連細胞骨格は一見 mdx コントロールマウスのそれと大差はみられなかったが、金コロイド標識ジストロフィン分子はみられなかった。

#### 考察とまとめ

筋細胞膜裏打ち細胞骨格にはジストロフィン、スペクトリン、フォドリン、アンキリンなど種々のものが含まれている。我々はここ3・4年来 mdx コントロールマウス骨格筋の生の無化学固定標本<sup>1)</sup>、化学固定標本<sup>2)</sup>について更に化学固定標本の抗ジストロフィン抗体修飾標本<sup>3,4)</sup>のQDR法による検討を続けているが、筋細胞膜裏打ち細胞骨格には際だって特徴的な形態をとったものはなさそうである。本研究ではジストロフィン分子は(1)正常骨格筋細胞膜関連細胞骨格の網状構造に組み込まれた細胞骨格であること(2)筋原線維最外層の5 nmの縞紋様構造をもつアクチンフィラメントと考えられるものとlinkしているものがあること(3)その形態が桿状構造で1端が他端より細いもの、1端ないし両端が拡大しているものなど種々であったことが判明した。今後更に種々の抗体を用い、ジストロフィン分子の筋細胞膜関連細胞骨格における存在様式を研究してゆきたい。

#### 文 献

- 1) Wakayama Y and Shibuya S: Observations on the muscle plasma membrane-associated cytoskeletons of mdx by quick-freeze, deep etch, rotary shadow replica method. *Acta Neuropathol (Berl)* 80: 618-623, 1990.
- 2) Wakayama Y, Shibuya S and Oniki H: Sarcolemma-associated cytoskeletons as seen in the deep etching replica-with special reference to the ultrastructural difference between chemically unfixed and fixed murine muscles. *J Clin Electron Microsc.* 印刷中
- 3) Wakayama Y and Shibuya S: Antibody decorated dystrophin molecule of murine skeletal myofiber as seen by freeze-etching electron microscopy. *J Electron Microscop* 40: 143-145, 1991.
- 4) Wakayama Y and Shibuya S: Gold-labelled dystrophin molecule in muscle plasmalemma of mdx control mice as seen by electron microscopy of deep etching replica. *Acta Neuropathol (Berl)* 82: 178-184, 1991.
- 5) Heuser JE and Kirschner MW: Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J Cell Biol* 86: 212-234, 1980.

# 19) dantrolene sodium による mdx マウスの実験的治療

高木 昭夫\*

研究協力者 小島 進\* 井田 雅祥\*  
渡辺 知司\* 黒岩 義之\*

Dantrolene sodium は骨格筋に直接作用する筋弛緩薬として、臨床的に応用されている<sup>1)</sup>。近年、Quinlan らは本剤による mdx マウスの実験的治療を行い、血清 creatine kinase (CK) 値の低下を報告した<sup>2)</sup>。また Bertorini らは Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の治療に使用し、有効性を報告した<sup>3)</sup>。我々は、mdx マウス骨格筋において Ca 調節異常があること、すなわち筋小胞体からの Ca 漏出の亢進があることを既に報告した<sup>4)</sup>。今回、筋小胞体からの Ca 漏出が dantrolene により影響されるかどうか？ mdx マウスの血清 CK 値や筋病理が dantrolene により改善するかどうか？ の2点を検討した。

## 方 法

筋小胞体からの Ca 漏出速度は skinned fiber 法により測定した<sup>4)</sup>。dantrolene の効果は 37°C で分析した。dantrolene の全身投与は 3 週齢 mdx マウスで開始して、4 週間に亘って行った。1 日 0.3mg (15~20mg/kg/日に相当) を腹腔内に注射した。非投薬群には 0.5ml 蒸留水 (D-mannitol 50mg を含む) を腹腔内投与した。終了時点で、

pentobarbital による深麻酔下で開胸し、心穿刺により採血した。血清を凍結保存して、CK 活性を Rosalki 変法で測定した。1,000IU/L 以上の場合は 4% BSA 生理食塩水で希釈して測定した。前

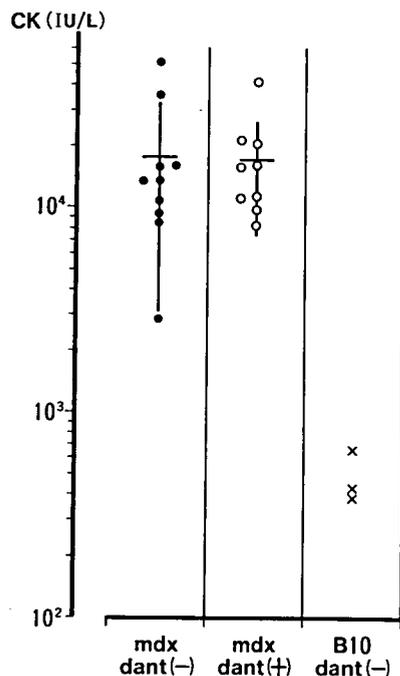


図1 mdx マウス血清 creatine kinase (CK) 値に対する dantrolene 投与の影響。dant (-): dantrolene 非投与。dant (+): dantrolene 0.3mg/日を腹腔内注射。B10: 対照マウス。dantrolene 投与は血清 CK 値に影響しなかった。

表1 筋小胞体からの Ca 漏出速度に対する dantrolene の影響 (1/min, 37°C, mean ± S. D.)

Dantrolene (-)	0.38 ± 0.06 (8)
(+)	0.38 ± 0.09 (8) n. s.

\* 虎の門病院神経内科

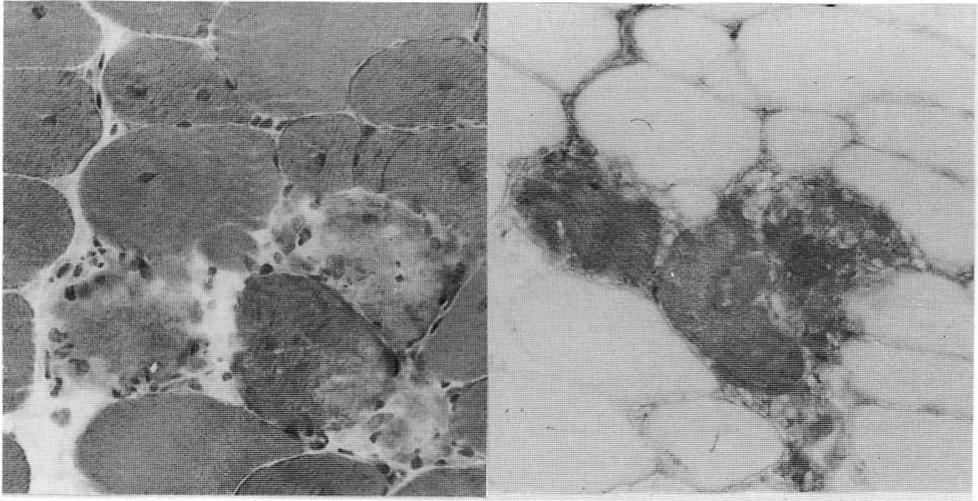


図2 H.E.染色(左)とIgG免疫染色(右)(ともに200倍). 貪食細胞の浸入した壊死線維やH.E.染色で濃染した筋線維は、IgG染色も陽性であった。

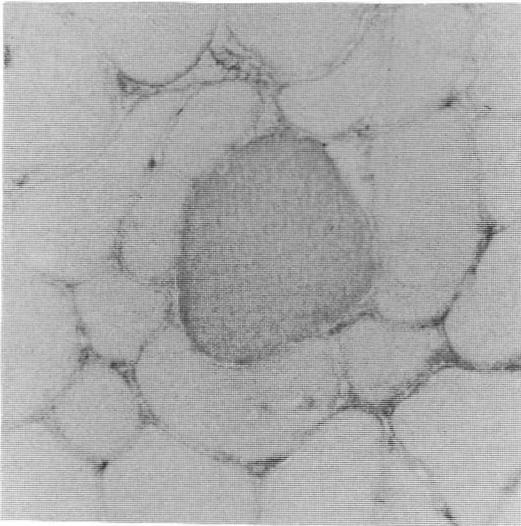


図3 “opaque fiber”のIgG免疫染色(200倍). 中央のopaque fiberはIgG染色で淡染した。しかしopaque fiberの染色性には種々の段階があり、全く染色されないものも存在した。

脛骨筋および大腿四頭筋を採取し、凍結切片を作製した。病理学的検索は主としてH.E.標本において、周辺核線維、壊死線維数を計測した。広範な壊死巣で個々の筋線維が識別できない場合は、大壊死巣として計測した。

またWellerらの方法で、IgGの免疫染色を行

い、壊死線維識別に応用した<sup>5)</sup>。

## 結 果

### 1) 筋小胞体よりのCa漏出に対する影響(表1)

37°Cにおけるmdx筋小胞体からのCa漏出速度は $0.38 \pm 0.06$  ( $n=8$ )  $\text{min}^{-1}$ であった。50 $\mu\text{M}$  dantroleneを加えた時の速度は $0.38 \pm 0.09$  ( $n=8$ )であり、全く変化しない。B10の筋小胞体でも同様の実験を行った。この場合にもdantroleneの影響はみとめられなかった。

### 2) 血清CK値に対する効果(図1)

血清CK値は薬剤投与群 $17,100 \pm 9,800$  IU/L ( $n=9$ )、非投与群 $16,700 \pm 15,300$  ( $n=10$ )であり、両群間に有意差をみとめなかった。また薬剤非投与の正常対照マウスの血清CKは、434, 665, 292 IU/Lの値であった。

### 3) H.E.染色とIgG免疫染色の比較(図2, 3)

IgG染色では細胞浸潤を伴う大壊死巣、貪食細胞の浸入したghost fiber(図2)、一部のopaque fiber(図3)が染色された。opaque fiberの染色性には種々の程度のもが存在した。H.E.染色のみで、組織計測は正確に行いえると判断した。

### 4) 周辺核線維と壊死線維の定量(表2, 3)

周辺核線維(非壊死および非再生線維と同義)

表2 Dantrolene の効果(1)  
前脛骨筋 (mean±S. D.)

周辺核線維 (%)			
dant	(-)	21.3±7.4	
	(+)	18.7±6.3	n. s.
大壊死巣 (個/100本)			
dant	(-)	0.8±0.6	
	(+)	0.2±0.2	p=0.05
小壊死巣 (個/100本)			
dant	(-)	1.0±0.8	
	(+)	2.1±2.0	n. s.

の頻度は、前脛骨筋および大腿四頭筋の両者において薬剤投与の影響を受けず同等であった。大壊死巣の頻度は前脛骨筋においてのみ dantrolene 投与により有意に減少した(表2)。小壊死巣の数は両者の筋において dantrolene の影響を受けなかった。

#### 考 察

Dantrolene sodium は骨格筋の興奮・収縮連関に直接作用するというユニークな筋弛緩薬である<sup>1)</sup>。その作用機序として、筋小胞体からの Ca 遊離機構への影響が推定されている<sup>6)7)</sup>。DMD や mdx マウス骨格筋では、筋変性・壊死の成因として、Ca 調節異常の関与が推定されてきた<sup>3)</sup>。この観点から、dantrolene による試験的治療が行なわれた。Quinlan らは mdx マウスに 30mg/kg/日 dantrolene を腸管に投与して、血清 CK がほぼ正常化したと報告した<sup>2)</sup>。Bertorini らは DMD 症例に 6 mg/kg/日 dantrolene を 4 年間に亘って投与して、筋力や血清 CK 値の改善を報告した<sup>3)</sup>。木村と梶は、FSH 型や LG 型筋ジストロフィー症例で dantrolene が血清 CK 値低下をきたしたと報告した<sup>8)</sup>。dantrolene は従来より悪性高熱の治療薬として評価されている<sup>9)</sup>。この作用機序は Ca 誘発性 Ca 遊離 (CICR) を抑制するためと理解されている<sup>10)</sup>。今回我々は skinned fiber 標本を使用して、dantrolene の *in vitro* での効果を検討した。mdx 筋小胞体では EGTA を含む溶液中での Ca 漏出亢進があることを報告した<sup>4)</sup>。しかしこの Ca 漏出亢進は dantrolene により影響されなかった。

表3 Dantrolene の効果(2)  
大腿四頭筋 (mean±S. D.)

周辺核線維 (%)			
dant	(-)	10.7±6.1	
	(+)	18.3±9.9	n. s.
大壊死巣 (個/100本)			
dant	(-)	0.6±1.0	
	(+)	0.3±0.4	n. s.
小壊死巣 (個/100本)			
dant	(-)	1.9±4.1	
	(+)	0.6±0.6	n. s.

既に procaine や Mg ion の影響をうけないことも判明している<sup>4)</sup>。したがって Ca 漏出亢進には CICR が関係ないものと思われる。

今回の実験では、Quinlan らの結果と異なり、血清 CK 値は dantrolene 投与の影響を受けなかった。投与量、投与方法、投与時期などの条件は、両者間で相違しているの、厳密な比較はできない。また mdx の血清 CK 値は Quinlan らの結果ではかなり低値なことも問題となろう。

形態学的指標の比較において、前脛骨筋においてのみ、大壊死巣の出現頻度は dantrolene により有意に減少した。しかし小壊死巣(壊死線維数に相当する)には変化なく、また周辺核線維数にも影響なかった。多くの筋線維が群集して壊死する現象(今回は大壊死巣として計測)は、DMD や mdx で時々観察される。この成因や意義には余り言及されていない。通常の散在する単細胞壊死とは異なるのか否かは今後の問題である。

Weller らによると、IgG 免疫染色は H.E. 標本では識別できぬ早期の壊死線維の確認に有効であるとされた<sup>5)</sup>。確かに H.E. 標本でわずかに淡明化した筋線維内に IgG の蓄積を認める場合がある。しかし明らかな硝子化線維 (opaque fiber) でも IgG 染色されないものがあり、IgG 染色標本のみで定量化は困難であった。opaque fiber の場合でも、IgG 染色強度には種々の段階があるようであり、今後の興味ある検討課題と思われる。

今回の実験的治療では、dantrolene の確実な有効性を証明するには至らなかった。しかし、一部有効性を示唆する結果を得ており、今後投与量や

投与方法を検討する意義はあるものとする。

### 結 論

*In vitro* の実験において、mdx 筋小胞体からの Ca 漏出亢進は dantrolene により影響されなかった。 dantrolene (15~20mg/kg/日) を 4 週間に亘って腹腔内注射した。 前脛骨筋において大壊死巣数は dantrolene により有意に減少した。 しかし、壊死線維数や再生線維数には変化をみとめなかった。 血清 CK 値は dantrolene 投与の影響をうけなかった。

### 文 献

- 1) Ward A, Chaffman MD and Sorkin EM: Dantrolene: A review. *Drugs* 32: 130-168, 1986.
- 2) Quinlan JG, Johnson SR and Samaha FJ: Dantrolene normalizes serum creatine kinase in mdx mice. *Muscle Nerve* 13: 268-269, 1990.
- 3) Bertorini TE, Palmieri GMA, et al: Effect of dantrolene in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 14: 503-507, 1991.
- 4) 高木昭夫, 小島 進ほか: mdx マウス骨格筋におけるカルシウム濃度調節。 “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” 1991, pp167-169.

- 5) Weller B, Karpati G and Carpenter S: Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions. *J Neurol Sci* 100: 9-13, 1990.
- 6) Morgan KG and Bryant SH: The mechanism of action of dantrolene sodium. *J Pharmacol Exper Therapent* 201: 138-147, 1977.
- 7) Ohta T and Endo M: Inhibition of Calcium induced Calcium release by dantrolene at mammalian body temperature. *Proc Japan Acad* 62(B): 329-332, 1986.
- 8) 木村 淳, 梶 龍治: 筋ジストロフィー症における dantrolene sodium の血清 CPK 値に及ぼす影響。 “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” 1991, pp43-44.
- 9) Kolb ME, Horne ML and Martz R: Dantrolene in human malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 56: 254-262, 1982.
- 10) Ohta T, Endo M, et al: Ca-induced Ca release in malignant hyperthermia—susceptible pig skeletal muscle. *Am J Physiol* 256 (CP25): C 358-367, 1989.

## 20) ジストロフィー筋への正常 myoblast の注射に 関する研究 ——注射法の検討——

寺尾 寿夫\*

研究協力者 加藤 洋司\* 岡下 恭子\* 石岡 邦明\*\*

### 目 的

筋肉を移植した場合、移植された筋は一度変性に陥り、乏血に強い衛星細胞が生き残り、活性化され、これらから新たな筋線維が形成されてくる。

最近この muscle precursor cell (mpc) または stem cell を培養により増殖させ、これを直接ジストロフィー筋に注射し、病的な筋の genetic constitution を変化させようとする試みが行なわれるようになった。ここ数年間の研究により<sup>1)</sup>この方法を筋ジストロフィーの治療に用い得る可能性が高まると共に、その問題点も明らかになってきた。

問題点の一つは、正常 mpc の注射によって起るジストロフィーの個体側の拒絶反応をいかに防ぐかという点と、ジストロフィー筋の中に正常 mpc をいかに多く、しかも拡散した状態で注射するかという点である。

我々は昨年度は正常の mpc を筋ジストロフィーマウス (mdx マウス) に注射し、拒絶反応を防ぐために host に対する放射線の照射と cyclosporin A の投与を行い、これらがジストロフィン陽性線維の出現に如何に影響を与えるかを比較した。

今回は、注射する mpc の数を増していった場合にジストロフィー筋に起る変化をジストロフィン陽性線維の数を指標として調べた。

### 方 法

Precursor cell の培養法は、昨年報告した<sup>2)</sup>のと同様に、まず C57BL/10Sc の幼若マウスの下肢筋を取り出し、これから結合織、血管などを除く。その後これを trypsin で処理し、滷過後 collagen coating dish に移し、培養を行なった。培養に用いた medium は Dulbecco's modified medium である。培養が終了したら、trypsin を用いて増殖した muscle precursor cell (mpc) を集め、遠心した後に medium を加えて細胞数が  $5 \times 10^8$ /ml になるようにし、これをジストロフィー筋に注射した。

注射するジストロフィー筋は生後 2 ヶ月の mdx マウスの長指伸筋 (EDL) を用いた。1本の EDL に注射する総細胞数は  $3 \times 10^6$  個である。なお、先回報告したごとく<sup>2)</sup>、正常 mpc を注射後 host に起る拒絶反応を抑制するために注射 24 時間前に mdx マウスを特殊な cage に入れ、これを回転しながら 1 匹当たり 450rad の X 線を全身に照射した。

注射にあたっては mdx マウスを 3 群に分けた。第 1 群は 18 匹より成り、これには 1 回のみ注射を EDL に行なった。第 2 群は第 1 回の注射後 1 週間目に再び同じ EDL に  $3 \times 10^6$  個の mpc を再度注射したもの計 8 匹である。

また第 3 群は  $3 \times 10^6$  個の mpc を 1 週間隔で計 3 回行なったもの計 8 匹である。なお注射はいずれも皮膚を切開し、直視下に行なった。各群と

\* 帝京大学医学部神経内科

\*\* 帝京大学医学部放射線科

も最後の注射後10日目に EDL を取り出し、H-E 染色などの一般組織標本を作製し、また抗ジストロフィン抗体を用いて免疫組織学的に検討した。

なお以上の他に EDL を細切して得た minced fragment に mpc を混じて移植し、ジストロフィン陽性線維の出現を観察した。方法は生後2ヶ月の mdx マウスの EDL を取り出して細切し、これに  $3 \times 10^6$  個の mpc を混じた後、host の元の EDL の場所に移植した。移植2ヶ月後に再生筋を取り出し、抗ジストロフィン抗体で染色を行なった。この場合も host に移植24時間前に X 線を450 rad 照射した。

### 結 果

図1は mdx の EDL に正常 mpc を1回注射後の抗ジストロフィン抗体によるジストロフィンの染色を示したものである。この様に数本~10数本のジストロフィン陽性の線維群が散在性に出現するようになる。2回注射、3回注射の場合の陽性線維群も、この1回注射の場合に比べ、線維群の出現の状況は変らなかった。何れにも拒絶反応は見られていない。

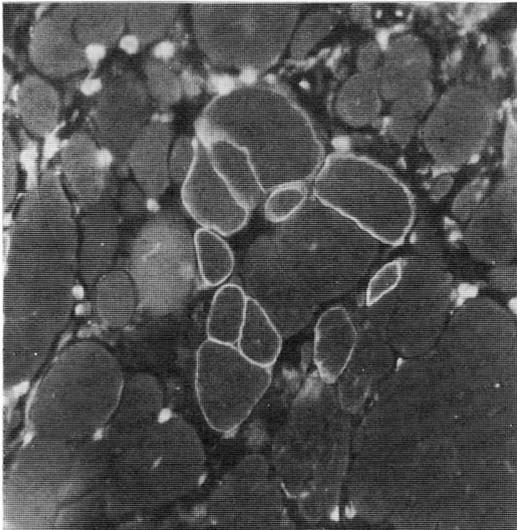


図1 Muscle precursor cell 1回注射後1ヶ月目の mdx の EDL 中のジストロフィン陽性線維 (抗ジストロフィン抗体による immunostaining)

表1 Dystrophin positive fibers in mdx EDL 1month after normal myoblast transfer (whole body X-ray irradiation)

host no.	number of positive fibers/total fibers		%	
	myoblast transfer	control	myoblast transfer	control
1	30/917	5/1398	3.3	0.4
2	20/673	2/630	3.0	0.3
3	10/1194	10/1278	0.8	0.8
4	53/1045	0/524	5.1	0
5	20/705	3/541	2.8	0.6
6	15/796	0/623	1.9	0
7	25/1235	2/1041	2.0	0.2
8	16/900	7/857	1.8	0.8
9	22/910	12/1258	2.4	1.0
10	18/1570	9/1748	1.2	0.5
11	16/1343	12/1002	1.2	1.2
12	36/1417	28/1070	2.5	2.6
13	20/1341	4/1313	1.5	0.3
14	6/890	10/961	0.7	1.0
15	15/951	3/1000	1.6	0.3
16	3/520	5/779	0.6	0.6
17	40/2076	9/899	1.9	1.0
18	22/1406	5/660	1.6	0.8
average			2.0±1.1	0.7±0.6

P<0.01

表2 Dystrophin positive fibers in mdx EDL two times injection of normal myoblast

host no.	number of positive fibers/total fibers		%	
	myoblast transfer	control	myoblast transfer	control
1	15/702	8/941	2.1	0.9
2	15/765	6/706	2.0	0.8
3	10/697	5/622	1.4	0.8
4	23/980	4/900	2.3	0.6
5	15/1026	5/1102	1.5	0.5
6	16/726	0/634	2.2	0
7	25/1102	9/1596	2.3	0.6
8	28/1070	7/1459	2.6	0.5
average			2.1±0.4	0.6±0.3

P<0.01

さて、これらのジストロフィン染色標本を用いて、1本の EDL のいくつかの切片から約1000本前後の筋線維を観察し、その中のジストロフィン陽性線維の数を数えた。

表1は第1群18匹の結果を示したものである。これを%で見ると、myoblast を transfer した EDL では  $2.0 \pm 1.1\%$  であった。一方生理的食塩水を注射したコントロール側は  $0.7 \pm 0.6\%$  の陽性線維がみられたが、この差は推計学的に有意であった。(P<0.01)

表2は第2群の8匹の結果を示したものである。2回注射の場合は、myoblast transfer 筋のジストロフィン陽性筋の比率は  $2.1 \pm 0.4\%$  で、この場合にもコントロールに比し有意に増加していた。し

表3 Dystrophin positive fibers in mdx EDL three times injection of normal myoblast

host no.	number of positive fibers/total fibers		%	
	myoblast transfer	control	myoblast transfer	control
1	22/859	5/924	2.8	0.5
2	28/1181	3/1209	2.4	0.2
3	28/951	9/1278	2.9	0.7
4	12/1158	10/1143	1.0	0.9
5	25/568	2/601	4.4	0.3
6	36/1000	3/1007	3.6	0.3
7	25/798	5/913	3.1	0.5
8	46/1368	3/689	3.0	0.4
average			2.9±0.9	0.5±0.2

P<0.01

かし、1回だけの注射の場合に比し、増加は認められなかった。

表3は3回注射の場合の結果である。この場合は myoblast transfer 側の筋では、ジストロフィン陽性線維の比率は2.9±0.9%とコントロールより有意に増加していたばかりでなく、1回注射の場合の陽性率と比較しても有意に増加していた。

図2は以上3群の結果を棒グラフで示したものである。これでもわかるように1群2群3群ともコントロールに比し myoblast を注射された筋ではジストロフィン陽性線維の数は増加していた。また3回注射の場合は1回注射の場合より有意に増加を示した。

以上3群の実験では host の EDL の衛星細胞は休止状態にあるわけで、注射時の骨格筋の損傷がこれを活性化することが考えられる。この活性度を高めるため minced fragment に mpc を混ぜて移植を行なった。この場合も陽性線維群が出現するが、各線維群の線維の数は単純注射の場合に比し変化はなかった。現在混ざる mpc の数を増加しつつ観察しているところである。

### 考 察

近年 DMD の gene の異常やジストロフィンの欠損が明らかになったが、ジストロフィンの働きやこの欠損と筋萎縮との関係は明らかになっていない。しかしジストロフィンは immunostaining による検出が容易であり、また陰性筋線維はこの蛋白質を encode した gene を有する核を入れる以

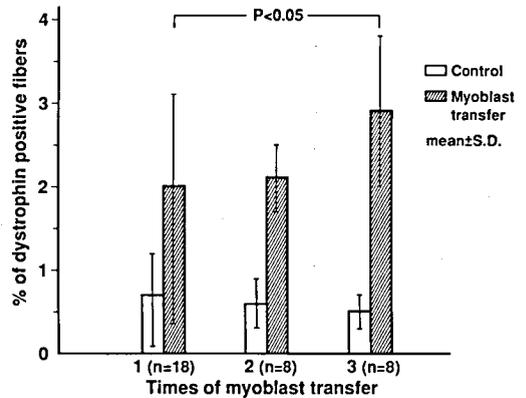


図2 Change of numbers of dystrophin positive fibers after myoblast transfer (mdx EDL)

外陽性とならないため myoblast transfer の効果を判定する指標としては都合が良い。そのためこの方面の多くの研究がこれらを指標としてなされている。しかしこれらの動物実験の成果をヒトの筋ジストロフィーの治療に使用するためには、なお多くの基礎的な情報が必要である。

たとえば mpc の source は何が一番良いか、注射する mpc の量はどの位必要か、またどの位の範囲に注射したら良いか、ジストロフィー筋の生化学的、機能的異常を補うにはどの位の割合で mpc が癒合する必要があるか、拒絶反応をいかにして防ぐかなどである。

まず拒絶反応に関してであるが、移植した mpc に対する骨格筋の拒絶反応に関してはまだ明確でない点が少ない。とくに major histocompatibility complex (MHC) のミスマッチはヒトでもマウスでも class I MHC 抗原が正常筋にはないとの報告があり<sup>3)</sup>、問題ないとも考えられるが、一方で class I MHC 抗原はヒト筋で炎症、変性により出現するといわれ<sup>4)5)</sup>、また class II 陽性線維も多発性筋炎で出現しているとの報告もある<sup>6)</sup>。さらにジストロフィンそのものも DMD の患者にとっては異種蛋白質であり、陽性線維の peptide 抗原は当然問題になると考えられる。我々は X 線を照射することにより、拒絶反応を抑制しているが、拒絶反応が myoblast transfer をヒトに応用した

場合どの程度障害になるかという問題の結論は必ずしも明らかになっているとは言えない。次に大きな問題となるのは mpc の注射法についてである。とくに筋肉内における dispersion の困難さが指摘されている。移植した mpc の効果を最高にするには、これを有効に散布し、できるだけ多くのジストロフィー筋細胞と癒合させる必要がある。ここで問題となるのは mpc を筋肉内に注射した場合、これが注射場所からどの位離れた場所まで移動し、定着するかということである。mpc はマウスの筋内では数 mm 以上移動するといわれる<sup>78)</sup>。しかし 0.5cm を越えないともいわれ、その最大限の移動距離は明らかになっていない。mpc を筋肉内にいかに disperse させるか、また血流を介して筋内に送りこむ方法があるかなどが将来の研究目標になると思われる。なお今回の実験に使用したのは生後 2 ヶ月を経た mdx マウスである。この時期の筋線維は大部分が変性と再生を終え、その中の衛星細胞は dormant の状態にあると考えられる。これが activate された状態にあれば正常に筋管細胞との間により有効に fusion を起しうると考えられる。そのため我々は mdx マウスの EDL の minced fragment を作り、これに  $3 \times 10^6$  の正常 mpc を混じて移植を行い再生筋中の陽性線維を観察した。この程度の数の mpc では陽性線維の出現率は単純注射の場合と同程度だったが、注射する mpc の数を増加して検討中である。

#### ま と め

- 1) mdx マウスの EDL に B10 の骨格筋から培養して得た muscle precursor cell (mpc) を 1 回  $3 \times 10^6$  個ずつ 1 ~ 3 回注射した。
- 2) 正常の mpc 注射による拒絶反応を防ぐため、注射 24 時間前に host に 450rad の X 線を照射した。
- 3) 最終注射後 1 ヶ月を経た EDL ではジストロフィン陽性線維はいずれの注射回数でも有意に増加し、また 3 回注射では 1 回注射に比し陽性率は有意に高かった。
- 4) minced fragment に mpc を混じて移植し、ジストロフィン陽性線維の出現を観察した。

#### 文 献

- 1) Partridge TA: Invited review: Myoblast transfer: A possible therapy for inherited myopathies? *Muscle and Nerve* 14: 197-212, 1991.
- 2) 寺尾寿夫: ジストロフィー筋への正常 myoblast の注射に関する研究——X 線照射の効果。"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, 1991, pp200-203.
- 3) Karpati G, Pouillot Y and Carpenter S: Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. *Ann Neurol* 23: 64-72, 1988.
- 4) Appleyard ST, Dunn MJ, Dubowitz V and Rose ML: Increased expression of HLA ABC class I antigens by muscle fibres in Duchenne muscular dystrophy, inflammatory myopathy and other neuromuscular disorders. *Lancet* i: 361-363, 1985.
- 5) Emslie-Smith AM, Arahata K and Engel AG: Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. *Hum Pathol* 20: 224-231, 1989.
- 6) Fletcher JA: Skeletal muscle expressions of class II histocompatibility antigens (HLA-DR) in polyomyositis and other disorders with inflammatory infiltrate. *J Clin Pathol* 41: 410-414, 1988.
- 7) Morgan JE, Coulton GR and Partridge TA: Muscle precursor cells invade and repopulate freeze-killed muscle grafts. *J Muscle Res Cell Motil* 8: 386-396, 1987.
- 8) Watt DJ, Morgan JE, Clifford MA and Partridge TA: The movement of muscle precursor cells between adjacent, regenerating muscles in the mouse. *Anat Embryol* 175: 527-536, 1987.

## V. 遺伝子・生化学

## 21) 筋特異的遺伝子発現に関する神経ペプチドの研究

高 守 正 治\*

研究協力者 安 川 善 博\* 吉 川 弘 明\* 沖 野 惣 一\*

### はじめに

近年、筋細胞の決定分化因子として Lassar らによる MyoD1<sup>1)</sup> や Wright らによる myogenin<sup>2)</sup> が発見され、骨格筋細胞分化調節機構の遺伝子レベルの解析という新たな展開が始まった。一方、運動神経終末部にはカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) がアセチルコリン (ACh) と共存することが示され、その生理作用としては筋細胞のアセチルコリン受容体 (AChR) の増加を mRNA 転写のレベルで促進することや、筋の張力を増強することが明らかとなった。

昨年、我々は骨格筋培養細胞におけるプロトオンコジーン発現に及ぼす CGRP の影響について報告したが、本報では、筋分化制御因子である MyoD1, myogenin 及び筋特異的遺伝子であるミオシン、クレアチンキナーゼ (CK) に関してその発現の有無と CGRP の影響について検討した。

### 方 法

培養筋細胞はウイスター系ラット胎児下肢筋をトリプシン処理して得られた初代培養細胞を用いた。60mm のゼラチンコートディッシュに細胞をいれ、Dulbecco 改変 Eagle 培地に10%胎児牛血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシン液を加えた培地で5日間培養した。10<sup>-7</sup>M の CGRP 添加群と無添加群に分け、8時間培養後、guanidine/thiocyanate 液を加え細胞を回収し、CsCl のクッションを置き超遠心により total RNA を集めた。この total RNA をサンプルとしてノーザンブ

ロットハイブリダイゼーションを行った。

今回プローブとして、Dr. Davis より供与された MyoD1, ミオシン軽鎖1 (MLC1), ミオシン重鎖 (MHC), Dr. Wright より供与された myogenin, Dr. Buskin より供与されたマウスクレアチンキナーゼの5つを選び、ランダムプライマー DNA ラベリングキットにより <sup>32</sup>P でラベルして使用した。

### 結 果

ラット下肢筋初代培養細胞では2つの筋分化制御因子のうち myogenin のみ発現が認められた (図1)。筋特異的遺伝子については、MLC1 と MHC の発現は確認されたが CK は認められなかった (図2)。

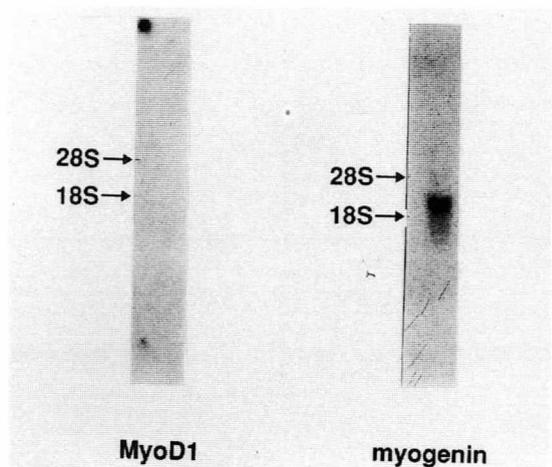


図1 Northern blot analysis of rat myotube total RNA probed with MyoD1 and myogenin

\* 金沢大学医学部神経内科

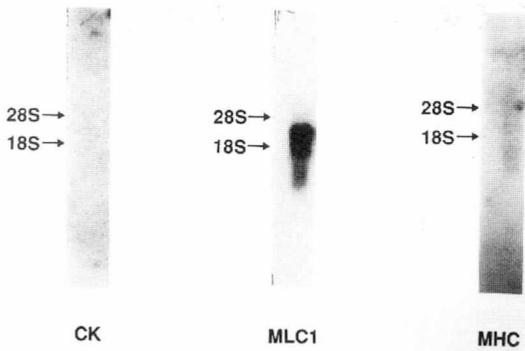


図2 Northern blot analysis of rat myotube total RNA probed with CK, MLC1 and MHC

myogenin, MLC1, MHC の発現量は CGRP 添加群と無添加群との間で差がなかった (図3)。

### 考 察

MyoD1 と myogenin は、両者とも筋の決定もしくは分化を誘導する細胞内因子として、MyoD1 はマウス線維芽細胞株 C3H10T1/2 から、myogenin はラット骨格筋細胞株 L6 より得られたものである。ともに分子の中程に癌遺伝子 myc ファミリー相同性の領域を持ち、それに隣接して N 末端側に塩基性のアミノ酸が多数並んでいる (図4)。これらの部分は二量体形成と DNA 結合に重要であり、両者が DNA 結合性蛋白質として機能する核蛋白質であることを示唆する。筋分化制御因子としてはこの他に、Myf 群<sup>3)</sup>、MRF4<sup>4)</sup> が知られている

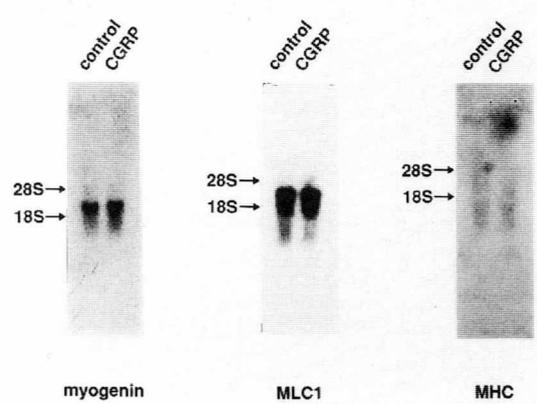
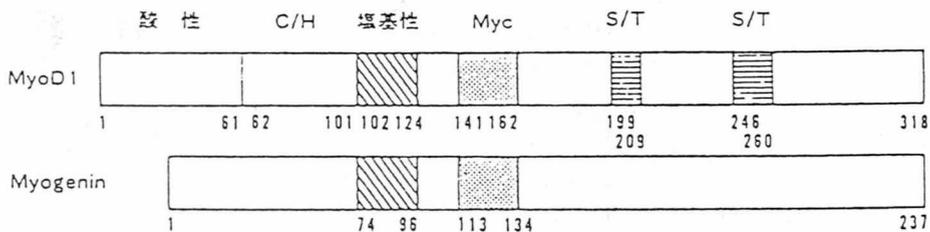


図3 Northern blot analysis of rat myotube total RNA probed with myogenin, MLC1 and MHC  
These expression was not changed by the addition of CGRP to the culture medium

が、いずれもその構造に共通性を有する DNA 結合性蛋白質であることが確認されている。我々が使用しているラットの初代培養細胞では myogenin の発現は認められたが MyoD1 の発現は見られなかった。これは、ラットとマウスという種の違いによると考えられるが、ちなみに MyoD1 はヒト、マウス、ニワトリ、ウズラ、アフリカツメガエル、ショウジョウバエ、線虫から報告されており、myogenin は、ヒト、マウス、ラット、ニワトリから分離されている。今回用いた他の3つの筋特異的遺伝子のうち、CK は発現が認められなかった



(遠藤より引用)

図4 Structure of MyoD1 and myogenin

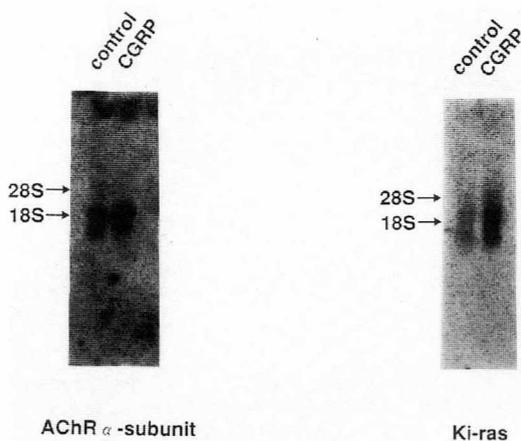


図5 Northern blot analysis of rat myotube total RNA probed with human AChR  $\alpha$ -subunit and Ki-ras. These expression was increased by the addition of CGRP to the culture medium.

が、これも CK の cDNA プロブがマウス由来のものであることに起因すると考えられる。

我々は昨年までに、培養骨格筋細胞において、ジストロフィン、AChR  $\alpha$ -subunit、プロトオンコジーン erbA, src, raf, sis, fos, myc, Ha-ras, Ki-ras の発現が見られること、そしてそのうち AChR  $\alpha$ -subunit と Ki-ras は CGRP 添加により約 2 倍に発現が増強されることを示してきた(図5)<sup>5)6)</sup>。Ki-ras は GTP 結合蛋白質をコードしており、Ki-ras 産物がさらに多くの遺伝子の発現を制御する可能性があり、重要な変化として注目し値すると思われる。この結果をふまえ、今回発現の見られた myogenin, MLCl, MHC についても CGRP の修飾を検討したが、その結果、有意な変化は認められなかった。

筋芽細胞より筋管細胞に分化する過程では、ミオシン、アクチン、トロポニン、トロポミオシンなどの一連の収縮蛋白質や CK など筋特異的に発現する酵素群、AChR などの転写が誘導される。我々の方法では、CGRP を添加しているのはほと

んどの筋芽細胞が筋管細胞へと分化している時期であるが、AChR  $\alpha$ -subunit は発現増強効果が得られた。このことより、AChR の発現が筋の生化学的分化の遅い時期に強くなる可能性が示唆される。培養時間の影響や CGRP 添加の時期について検討の余地が残されている。

## 文 献

- 1) Davis RL, Weintraub H and Lassar AB: Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987-1000, 1987.
- 2) Wright WE, Sassoon DA and Lin VK: Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56: 607-617, 1989.
- 3) Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, et al: A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J* 8: 701-709, 1989.
- 4) Rhodes SJ and Konieczny SF: Identification of MRF4: A new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes and Development* 3: 2050-2061, 1989.
- 5) 高守正治, 吉川弘明, 安川善博: ジストロフィンおよびアセチルコリン受容体 mRNA 発現に対するカルシトニン遺伝子関連ペプチドの修飾に関する研究。"厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究"(杉田班)平成元年度研究報告書, 1990, pp88-90.
- 6) 高守正治, 吉川弘明, 安川善博, 沖野惣一: 骨格筋特異的蛋白発現に関する神経ペプチドの研究。"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, 1991, pp204-206.

## 22) Duchenne 型及び Becker 型筋ジストロフィー家系の PCR 法を用いた遺伝子診断と保因者診断

齋藤 加代子\*

研究協力者 山内 あけみ\* 池谷 紀代子\* 佐久間 泉\*  
原田 隆代\* 福山 幸夫\*

### はじめに

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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>。Chamberlainら<sup>3)</sup>が遺伝子欠失を短時間に効率よくスクリーニングする multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) 法を開発し、Beggsら<sup>4)</sup>の方法とあわせて98%の欠失を同定できるようになった。我々は、DMD、BMDの患者のリンパ球から調製した高分子DNAについてcDNAプローブを用いた Southern blot 法と PCR 法を行ない、その結果を比較した。さらに、遺伝子欠失を有する家系において、保因者が疑われる女性—特に患者の母親についてcDNAプローブによる Southern blot 法、リンパ球由来の mRNA の nested RCR 法により保因者診断を行ない、家族歴や母親のCK値とあわせて検討した。

### 対象と方法

DMD26家系、BMD 5家系のうち Southern 法により major hot spot に欠失を示した患者(図1)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 らおよび Beggs ら

の報告に基づいて、また一部はジストロフィン遺伝子 cDNA の塩基配列より、図2に示す塩基配列を Applied Biosystems DNA synthesiser, model 381A にて作成した。また、mRNA の nested PCR でも図2の primer を使用した。

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 set1~3では exon43~52を、primer set4では筋型プロモーターを調べた。exon53, exon54はそれぞれ single PCR を行なった。

### 結 果

#### 1) PCR 法と Southern blot 法

図3に示すように、症例1では exon45, 47の欠失を示す。症例2は exon47の、症例3は exon45の欠失を示す。

図4の primer set では exon47, 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、exon47, 50, 51に関しては、図5に示すようにすべて欠失していた。exon53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 exon45~52と考えられる。Southern blot 法の結果も、症例1では、exon45~52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法の結果はほぼ一致したが junctional fragment を有す

\*東京女子医科大学小児科

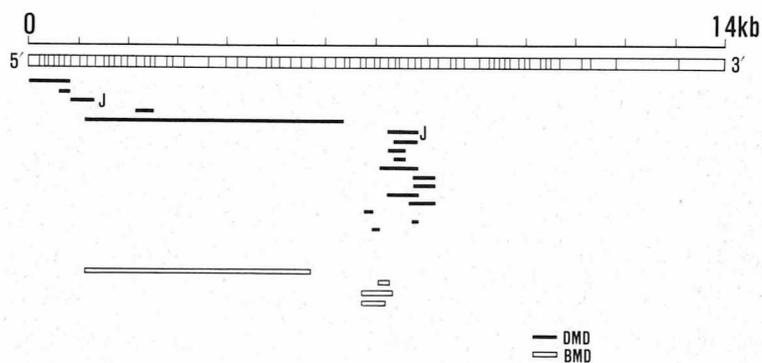


図1 Mapping of deletions detected with DMD cDNA

Primer	Sequence (5'-3')
PmF	GAAGATCTAGACAGTGGATACATAACAATGCATG
PmR	TTCTCCGAAGGTAATGCCTCCAGATCTGAGTCC
43F	GAACATGTCAAAGTCACTGGACTTCATGG
43R	ATATATGTGTTACCTACCCTTGTCGGTCC
45F	AAACATGGAACATCCTGTGGGGAC
45R	CATTCCATATTAGATCTGTCGCCCTAC
47F	CGTTGTTGCATTGTCTGTTTTTCAGTTAC
47R	GTCTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG
48F	TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG
48R	CCTGAATAAAGTCTTCCCTTACCACAC
50F	CACCAAATGGATTAAGATGTTTCATGAAT
50R	TCTCTCTCACCCAGTCATCACTTCATAG
51F	GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC
51R	GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC
52F	AATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCC
52R	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC
53F	CAGAATCAGTGGGATGAAGTAC
53R	GCATCTACTGTATAGGGACCC
54F	ACCTCCGCCAGTGGCAGACAA
54R	TGAATGCTTCTCCAAGAGGC
60F	AGGAGAAAATGGCCCTCTGAAAGAGAACG
60R	CTGCAGAAGCTTCCATCTGGTGTTCAGG
-----	
46F	GGAGGAAGCAGATAACATTGCT
46F2	GAACCTGGAAAAGAGCAGCAAC
52R	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC
52R2	GGAGCCCTCTGTCCAAAATCCTGCATT

図2 Sequence of primers

### PCR WITH PRIMER SET 1

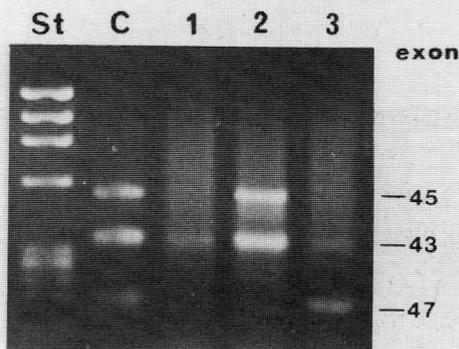


図3 DNA amplification of lymphocyte DNA from healthy male (C) and from subjects of DMD (1, 2, 3)

る1例が例外だった。症例5の multiplex PCR では図4のように exon48のバンドが認められた。ところが、Southern blot法では、exon48に相当する11kbのシグナルはなく、16kbの新たなシグナルの出現を患者とその母親に認めた(図6)。

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7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。

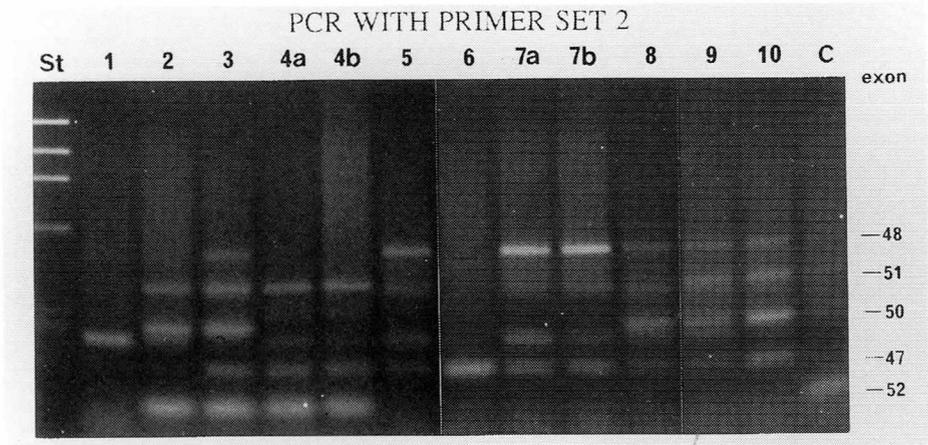


図4 DNA amplification of lymphocyte DNA from subjects of DMD (1, 3~10) and BMD (2)

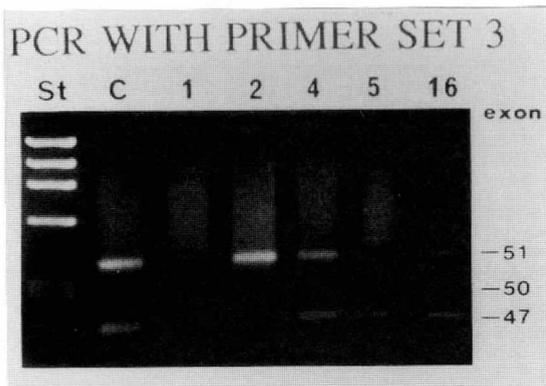


図5 DNA amplification of lymphocyte DNA from subjects of DMD (1, 4, 5, 16) and BMD (2)

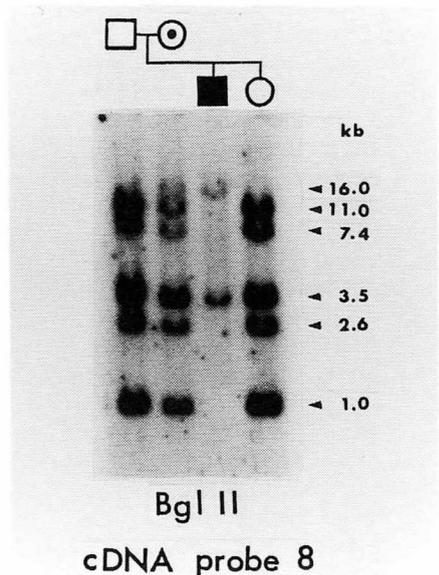


図6 Southern blot analysis of the lymphocyte DNA from subjects of the DMD family (case 5)

## 2) mRNA の nested PCR による保因者診断

Roberts ら<sup>5)</sup>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。ここでは、図8のように、リンパ球より調製した RNA について、exon46の塩基配列の一部を forward primer (46F), exon52の塩基配列の一部を reverse primer (52R) として、1回目のPCRを行なった。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バンドを示す。この家系で

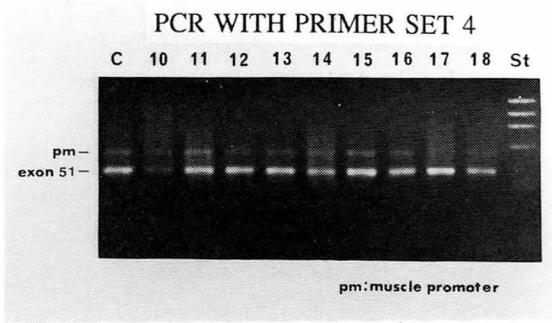


図7 DNA amplification of the lymphocyte DNA from subjects of DMD (10~18)

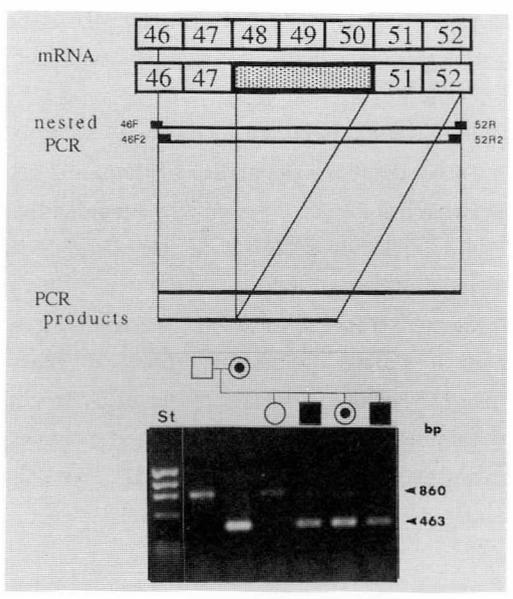


図8 Carrier detection with the nested PCR

は患者は欠失により463bpのバンドのみが認められた。長女は正常サイズ860bp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<sup>2)</sup>と一致していた。

考 察

PCR 法は DNA の熱変性、プライマーのアニリング、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。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。Chamberlain ら<sup>3)</sup>、Beggs ら<sup>4)</sup>は数ヶ所の exon の欠失を同時に検索する multiplex PCR 法を発表し、これは臨床应用到有効な方法である。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 PCR の結果と合致しなかった。これは症例 5 において、exon48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、exon48は Southern blot 法の16kbのシグナルとして示されていると推定される。

分子遺伝学的手法を用いた保因者診断法として

	Total		DNA deleted	
	Families	%	Families	%
Definite carrier	5/31	16	3/19	16
Probable carrier	14/31	45	10/19	53
High CK titer				
Sporadic case with normal CK	18/31	58	9/19	47
Carrier detected	19/31	61	14/19	74
New mutation (no deletion in mothers' DNA)			5/19	26

図9 Carrier status of the mothers of DMD/BMD patients

は、cDNAプローブを用いたSouthern法でgene doseを調べる方法、junctional fragmentを検出する方法<sup>2)</sup>、ここに述べたmRNAのnested PCR法、pERT87やXJなどを用いたRFLPによる方法、CA repeatsの多型解析<sup>6)</sup>がある。我々はcDNAプローブを用いたSouthern blot法とnested PCR法を行なった。これらの保因者診断の結果に家系図の分析、家族の血清CK値を合わせてまとめると(図9)のようになる。家族歴聴取により、5/31(16%)がdefiniteまたはprobable carrierだった。14/31(45%)では、母親のCK値の高値をみた。遺伝子欠失を示した家系の14/19(74%)で、母親にも遺伝子欠失を有していた。5/19(26%)はnew mutationであった。16/19家系は孤発家系であり5/16(31%)は孤発例におけるnew mutationであった。

#### 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. *Fetal and Perinatal Neurology*, Basel, Karger, in press.
- 3) Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al: Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (ed by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ) Academic Press, New York, London, 1990, pp272—281.
- 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) Roberts 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.
- 6) Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, et al: Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet* 49: 951—960, 1991.

## 23) ジストロフィン関連遺伝子のクローニングに関する研究

荒 畑 喜 一\*

研究協力者 石 浦 章 一\* 林 由起子\* 有 川 恵 理\*  
後 藤 加奈子\* Alan H. Beggs\* Louis M. Kunkel\*

### 目 的

ジストロフィン(Spectrin・スーパーファミリーの一員)である。ジストロフィンの欠陥は重篤な筋疾患であるDMD/BMDを、Spectrinの欠陥は遺伝性楕円赤血球症を来することが知られている。また脊髄性筋萎縮症に高い連鎖を示すMAP-1B遺伝子のコードするタンパクは、抗ジストロフィン抗体によっても検出されることが報告されている。このような事実から、ジストロフィン関連遺伝子のクローニングの重要性が示唆されている。我々は逆行遺伝学的アプローチにより、神経筋疾患原因遺伝子の検索を進めている。

### 方 法

遺伝子の単離にはヒト胎児骨格筋と大脳cDNAライブラリー(Koenig & Kunkelら<sup>1)</sup>; λgt10ファージ)を調製した。Degenerate PCRにはジストロフィン、Spectrin、α-アクチニンで共通に保存されているN末端側の配列(KTFTK/AW)より、degenerateプライマーをデザインした(図1)。サブクローニングにはpBS II SK+プラスミドベクターを用いた。これをTB-1にtransfection後X-gal/IPTG selectionを行った。さらにインサートDNAのシーケンスを決定し、コンピューター解析(GenBank, GenEmbl)を実施した。

全体のフローチャートを図2に示す。

DEGENERATE PCR PRIMERS	
ENDING METHOD:	Trityl ON
SEQUENCE NAME:	KA1 & KA2
SEQUENCE LENGTH:	30
5'- GCG GAG CGG CCG CCA	ATC AGT AAA AGT TTT -3'
	GGT G G G C
	C C C
	T T T
5'- GCG GAG AAT TCG CCA	AGT AGT AAA AGT TTT -3'
	GTC G G G C
	C C C
	T T T

図1 ジストロフィン、Spectrin、α-アクチニンにホモロジーの高い配列部位を認識するプライマー。

1. 脳と筋のcDNAライブラリー(λgt10)の titration, bacteriophageの精製を実施する。
2. Degenerate PCRを実施する。
3. pBS S IIS K+プラスミドベクターにPCR amplified DNAをライゲーションする。
4. TB-1を形質転換する。
5. X-Gal/IPTG selection (Blue/White selection)を実施する。
6. プライミドミニプレップを実施する。
7. インサートDNAのシーケンスを実施する。
8. コンピューター解析(GenBank, GenEmbl)にて意味のあるシーケンスを発見した時にはサブクローニングのためのプローブを作る(PCR label/ランダムプライマー法)。
9. cDNAライブラリーのフィルターとハイブリダイゼーションする。
10. 遺伝子全長を得る/特異抗体を得る。
11. 染色体マッピングも試みる。

図2 ジストロフィン関連遺伝子のクローニング

\* 国立精神・神経センター神経研究所

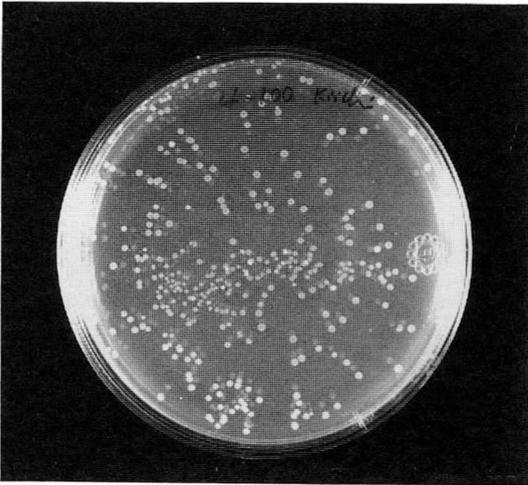


図3 形質転換されたTB-1バクテリアのコロニー (Blue/White selection).

### 結 果

Degenerate プライマーの degeneracy は1024通りであった。これまでに287のコロニーを得た(図3)。このうち144のコロニーについて、プラスミドミニプレップを実施した(図4)。さらにこれらをシークエンスしたところ、17個のジストロフィン関連遺伝子を得た。今後個々のクローンについてさらにサブクローニングを行って行く予定である。

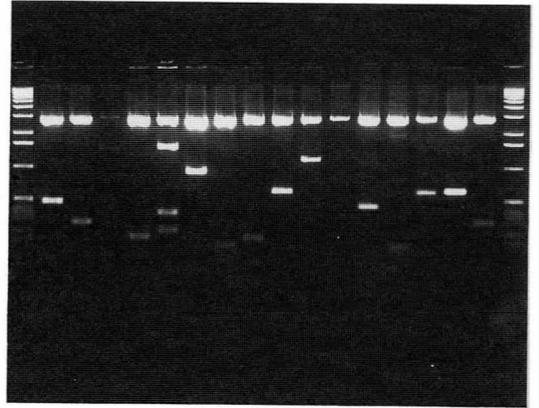


図4 プラスミドミニプレップの制限酵素 (Sac I, Kpn I)による digestion, 様々のサイズのインサート DNA が確認される。

### 文 献

- 1) Koenig and Kunkel : Molecular Cloning 2nd ed (ed by Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis) Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. 1989.

## 24) 正常人ならびに神経・筋疾患患者の骨格筋細胞 におけるミオグロビン mRNA の局在 ——in situ hybridization による成績——

川 井 尚 臣\*

研究協力者 三ツ井 貴 夫\* 鳴 尾 隆 子\* 有 井 敬 治\*  
土 橋 孝 之\* 玉 木 康 民\*

### はじめに

ミオグロビン (Mb) は筋細胞中で酸素の貯蔵やミトコンドリアへの酸素の運搬を担っているヘム蛋白であり、筋細胞のエネルギー代謝にも関与している。Mb は筋細胞の崩壊時には急速に血中へ流出し、その量は筋障害の程度が大きいほど多い。一方、筋細胞は Mb が遊出し減少すると酸素の貯蔵やミトコンドリアへの酸素の補給が減少し、細胞障害がさらに増強することになる。このため筋細胞では Mb の生成を増やしこれを補充しようとする反応が生じることが推定される。筋細胞で Mb の生成がどのような状態になっているかを知ることは筋細胞の障害と修復の状態を把握する上で重要である。本研究では Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 筋と、神経原性筋萎縮症筋について、筋細胞中の Mb の生合成を in situ hybridization によって調べたのでその成績を述べる。

### 対象と方法

対象：DMD (11歳, 男性) 筋と、疾患対照筋としての筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者 (56歳, 女性) の生検筋、ならびに正常筋としての非神経・筋疾患患者 (28歳, 男性) の外科手術時に得られた骨格筋である。DMD と ALS では外側広筋を用い、正常筋は腸腰筋を用いた。

方法：得られた筋組織より 6  $\mu$ m の新鮮凍結切片を作製し、ただちに 4% パラホルムアルデヒドで固定した。プローブはブタ Mb の cDNA を Pst1 で処理して得られた 209bp の断片をビオチンで標識して作成した。In situ hybridization は組織を除蛋白処理し、後固定、脱水、prehybridization のち 37°C, 14 時間前記のプローブと反応させ、洗浄の後 streptavidin-alkaline phosphatase で処理し NBT/BCIP で発色した。標本の一部はメチルグリーンで核染色し、一部は核染色せず顕微分光測光装置 (Karl-Zeiss 社) により 530nm の吸光度を測定した。筋組織は採取後ただちに液体窒素中に保存し、2~4 週間以内に使用した。また、筋の凍結切片作成から in situ hybridization, そして発色の過程までは DMD 筋, ALS 筋, 正常筋同時に行った。

陰性対照としては切片を RNase 処理した後 in situ hybridization を施行した筋組織標本を作成し、プローブの対照としてプラスミドの pBR322 をビオチン化して用いた筋組織標本を作成した。また肝細胞においても筋組織と同様に Mb の in situ hybridization を行いシグナルのないことを確認した。

組織標本中の Mb mRNA 吸光度の測定：顕微分光測光法により筋組織標本 1 枚につき 200 細胞の Mb mRNA のシグナルの 530nm における吸光度を測定し (1 細胞につき 1 箇所測定), 陰性対照

\* 徳島大学医学部第一内科

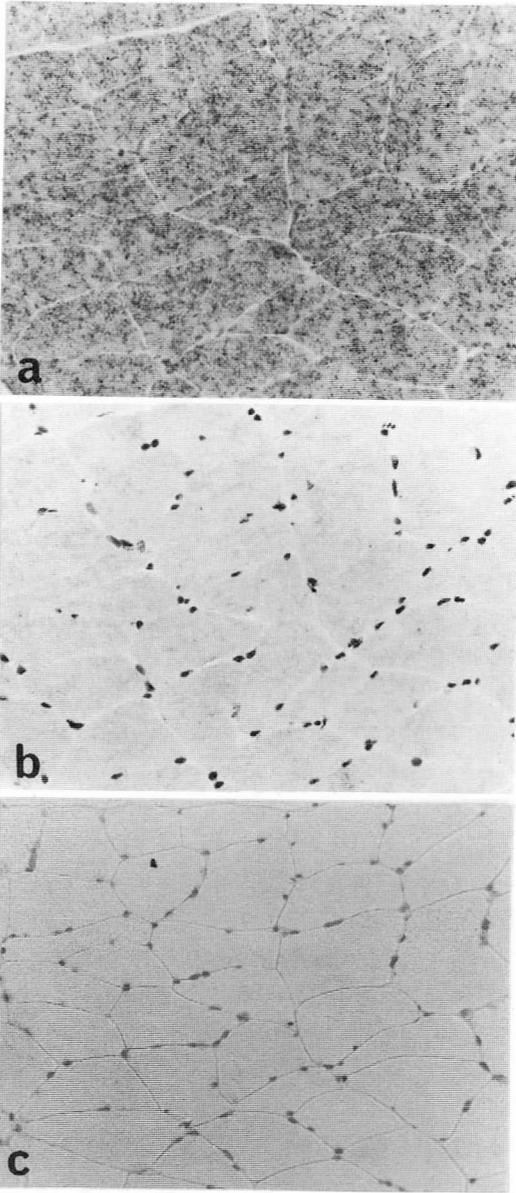


図1 a 正常筋横断面の Mb mRNA の in situ hybridization 像, 224倍. Mb mRNA は小顆粒状のシグナルとして認められ, 筋細胞質にほぼ均等に分布している. 筋核はメチルグリーンで染色してある.  
 b ビオチン化 pBR322 を用いた陰性対照, 128倍. Mb mRNA のシグナルはほとんど認めない. 筋核はメチルグリーンで染色してある.  
 c RNase 処理による陰性対照, 128倍. Mb mRNA のシグナルはほとんど認めない. 筋核はメチルグリーンで染色してある.

(pBR322) の吸光度の平均値を差し引き Mb mRNA の吸光度とした. 疾患筋を非萎縮筋 (直径  $>40\mu\text{m}$ ) と萎縮筋 (直径  $<20\mu\text{m}$ ) に分け, 測光面積は前者と正常対照筋は  $314\mu\text{m}^2$ , 後者は  $78.5\mu\text{m}^2$  とした.

### 成 績

正常筋: 横断像で Mb mRNA は筋細胞質にほぼ均等に分布する小点状の赤紫色のシグナルとして認められた (図1a). 拡大像では一部の筋核にもシグナルが認められた (図2a). 縦断像ではシグナルは小顆粒状, 網目状に筋細胞質に分布して認め

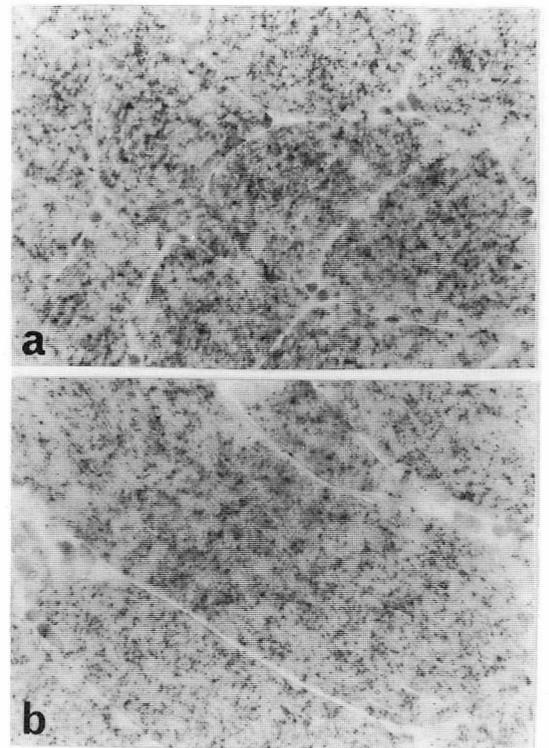


図2 a 正常筋横断面の Mb mRNA の in situ hybridization 像, 256倍 (強拡大像). 小顆粒状のシグナルが認められ, 一部の筋核にも重なってシグナルが認められる. 筋核はメチルグリーンで染色してある.  
 b 正常筋縦断面の Mb mRNA の in situ hybridization 像, 256倍 (強拡大像). シグナルは小顆粒状, 網目状に分布して認められる. 筋核はメチルグリーンで染色してある.

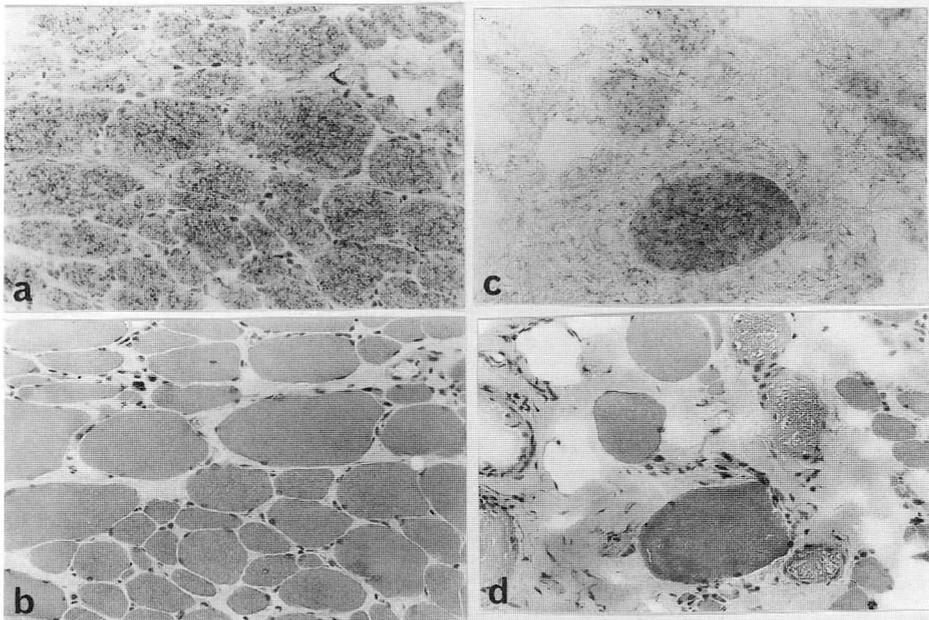


図3 a DMD筋のMb mRNAのin situ hybridization像, 128倍, 殆どすべての筋細胞中にほぼ均等に小顆粒状のMb mRNAのシグナルが認められる, 萎縮細胞では染色性の低下が認められる, 筋核はメチルグリーンで染色してある。  
 b 図3 aの連続切片のHE像, 128倍, 筋細胞の大小不同と間質の増殖がみられる。  
 c DMD筋のMb mRNAのin situ hybridization像, 128倍, Opaque線維でもMb mRNAのシグナルが認められた, 筋核はメチルグリーンで染色してある。  
 d 図3 cの連続切片のHE像, 128倍, 筋細胞の大小不同, 間質の増殖, opaque細胞がみられる。

られた(図2b)が, 明らかな横紋状の分布は見られなかった。

陰性対照のヒオチン化pBR322(図1b), RNase処理(図1c)の組織標本にはMb mRNAシグナルは殆ど認められなかった。

**DMD筋:** 殆どすべての筋細胞質にほぼ均等に小顆粒状のMb mRNAのシグナルが認められた(図3a)。しかし高度の萎縮細胞ではMb mRNAのシグナルの濃度はやや低下し, 小顆粒状のMb mRNAの分布もやや減少していた。Opaque線維でもMb mRNAのシグナルは明瞭に認められた(図3c)。

**ALS筋:** 筋細胞は中のMb mRNA正常筋とほぼ同様の分布を示し, 萎縮細胞ではやはり染色性の低下が認められた(図4)。

**Mb mRNAのhybridizationシグナルの吸光度の比較(図5):** 正常筋では吸光度は $0.114 \pm$

$0.022$  (mean $\pm$ S.D.)であった。DMD筋の非萎縮筋細胞では $0.136 \pm 0.023$ と正常筋に対し有意の増加が認められた( $P < 0.001$ )。しかし高度萎縮筋細胞では $0.087 \pm 0.024$ と減少していた。これに対しALS筋では非萎縮筋細胞, 高度萎縮筋細胞ともにそれぞれ $0.098 \pm 0.0810$ ,  $0.083 \pm 0.022$ と有意の減少がみられた( $P < 0.001$ )。同一疾患の非萎縮筋細胞と萎縮筋細胞との比較ではDMD, ALSともに萎縮筋で減少がみられた( $P < 0.001$ )。

## 考 察

人の骨格筋におけるMb mRNAの局在に関し, 正常筋細胞では細胞質に散在性に, ほぼ均等に小顆粒状あるいは網目状のシグナルとして検出されることを示した。この分布は正常筋とDMD筋およびALS筋で大差がなく, 筋線維の縦断面にて一部網目状に見られることより, 疾患筋において

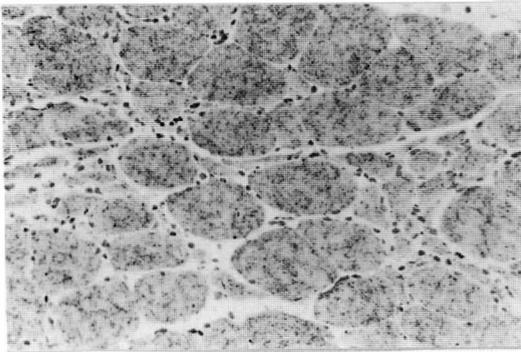


図4 ALS筋のMb mRNAのin situ hybridization像。128倍。筋細胞中のMb mRNAは正常筋とほぼ同様の分布を示し、萎縮細胞では染色性の低下が認められる。筋核はメチルグリーンで染色してある。

もMbの生合成は正常とほぼ同等に行われていることが推定でき、またその存在部位は筋の収縮系と無関係ではないことが推定された。

DMDでは、opaque線維でも他の筋細胞とほぼ同様に検出された。Opaque細胞は免疫組織学的にMbの染色性が全く認められない<sup>1)</sup>ことよりMbは過収縮により逸脱してしまっていると考えられているが、MbのmRNAの面からみるとその生合成の機能は保持されていると思われる。

Mb以外の筋蛋白のmRNAの分布では、myosin heavy-chainのmRNAは筋線維中でMbと同様の顆粒状の分布を示すが、その分布は筋細胞中に均等ではなく筋鞘付近に多く局在しており、Mb mRNAの局在とは若干異なっている。また電顕的には筋原線維間に存在することが知られ<sup>2)</sup>ており、myosin heavy-chainのmRNAも筋細胞で収縮系と密接に関連して存在すると考えられている。

Mb mRNAの量については、DMD筋では正常筋に比べ非萎縮筋ではMb mRNAが平均19%増加し、萎縮筋では24%減少していた。この成績はDMD筋細胞よりMbが流出し減少すると<sup>3)</sup>酸素の供給が減り、細胞の代謝障害はさらに進むのでMbの生合成を増加させ筋細胞の障害を軽減していると考えられる。しかし筋障害が進行し細胞萎縮が高度になると、Mbの生成も低下してしまう

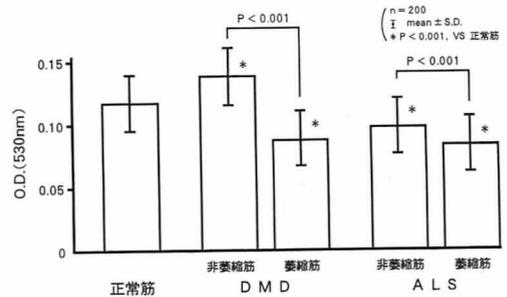


図5 Mb mRNAのhybridizationシグナルの吸光度の比較。DMDの非萎縮筋ではMb mRNAの増加があり、その他の疾患筋細胞では減少している。

ものと推定される。

ALS筋では正常筋に比べ、非萎縮筋ではMb mRNAは平均14%、萎縮筋では27%減少し、筋細胞の障害の程度に応じて低下していた。脱神経時には、一般に急性期では蛋白分解は亢進し蛋白合成も促進するが、経過と共に蛋白合成は低下し、筋細胞の萎縮が進行すると考えられている<sup>4)</sup>。Mbについては実験的な脱神経では筋細胞中の濃度は急性期には増加するが、2~3ヶ月以後には脱神経前と同じレベルまで低下すると報告されている<sup>5)</sup>。脱神経による筋細胞の萎縮には、脱神経により軸索流の減少などにより栄養因子の供給が途絶すること、筋線維の電氣的収縮能が低下すること、などが関係していると考えられており、脱神経筋に直接電気刺激を加え筋収縮をおこすと筋萎縮は抑制されることが知られている。以上の結果より、筋細胞の収縮能が低下すると酸素需要が減少し、Mbの需要が減少しその生成が低下するものと推定される。

In situ hybridizationは従来、組織中や細胞中の核酸の存在の有無の証明、局在部位の決定などに用いられており、その定量化は殆ど行われていない。わずかながらRI標識プローブを用いた研究でin situ hybridizationによる検出物質の定量化の試みが報告されており<sup>6)7)</sup>、プローブが結合するmRNA量と銀粒子数、およびその吸光度には一定の相関性があるとされている。本研究のピオ

チン化プローブを用いた in situ hybridization によるシグナルの定量化は方法論的になお検討を要するが、上記のように mRNA 量と吸光度には一定の関係があり、本研究では Mb mRNA の吸光度 (530nm) を測定し定量に用いた。

本研究では、DMD 筋、ALS 筋において Mb mRNA の局在とその量を検討し、障害筋細胞がその病態に応じて Mb 蛋白の生合成を調節し、筋障害に対応していることが理解される。

#### おわりに

Duchenne 型筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症および正常者の筋細胞中の Mb mRNA を in situ hybridization 法にて調べ、それぞれの疾患の筋細胞中の局在と量を明らかにした。これによって人の骨格筋ではそれぞれの病態に応じて、Mb の生合成を調節し障害に対応していると思われる。

#### 文 献

- 1) Kagawa N and Hizawa K: Immunohistochemical study of myoglobin in neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* 8: 9, 1985.
- 2) Dix DJ and Eisenberg BR: In situ hybridization and immunocytochemistry in serial sections of rabbit skeletal muscle to detect myosin expression. *J Histochem Cytochem* 36: 1519, 1988.
- 3) Miyoshi K, Saito S, Kawai H, Kondo A, Iwasa M, Hayashi T and Yagita M: Radioimmunoassay for human myoglobin; methods and results in patients with skeletal muscle or myocardial disorders. *J Lab Clin Med* 92: 341, 1978.
- 4) Tawa NE and Goldberg AL: Protein and aminoacid metabolism in muscle "Myology" (ed by Engel AG & Banke BQ) McGraw-hill, New York, 1986, p735.
- 5) Askmark H, Carlson M and Roxin LE: Myoglobin in rat hind limb muscles after denervation and during reinnervation. *Muscle Nerve* 7: 656, 1984.
- 6) Nunez DJ, Davenport AP, Emson PC and Brown MJ: A quantitative in-situ hybridization method using computer-assisted image analysis. *Biochem J* 263: 121, 1989.
- 7) Miller MA, Urban JH and Dorsa DM: Quantification of mRNA in discrete cell groups of brain by in situ hybridization histochemistry "Gene Probes" (ed by Conn PM), Academic Press, San Diego and California 1989, p164.

## 25) 動脈結紮後の速筋と遅筋の glucose uptake

庄 司 進 一\*

研究協力者 朴 木 清 人\* 柳 澤 信 夫\*

### はじめに

閉塞性動脈硬化症や Burger 病の様な閉塞性末梢動脈疾患では、間欠性跛行・安静時疼痛・虚血性壊疽などが、疾患の程度によって現れる。この様な閉塞性末梢動脈疾患の患者の障害部骨格筋の酵素活性・毛細管濃度・基質利用能などの変化に関する研究報告は背反するものが多い。これらの報告の中で糖質の利用能に関してのみは一致している。即ち、閉塞性末梢動脈疾患の患者の障害下肢筋の glucose 取込みが安静時で増加していた、ないし筋運動時に増加していた。患者の生検筋で、glucose から glucogen, lipids, carbon dioxide への取込みが増加していた。患者生検筋で、phosphofructokinase 活性が増加していた。これらの報告は glucose の利用能が動脈循環不全では増加することを示唆している。

動物実験では、障害筋の hexokinase<sup>1)2)</sup>, phosphofructokinase<sup>2)</sup> などの活性増加や glucose uptake の増加<sup>3)</sup> が報告されている。

以前我々は、無酸素状態では、glucose uptake が速筋で増加するが、遅筋では変化しないと報告した<sup>4)</sup>。動脈循環不全の骨格筋への影響の主要な因子が無酸素ないし酸素欠乏であるならば、速筋と遅筋の glucose uptake は速筋と遅筋で異なると考えられる。しかし、Challiss らの報告<sup>3)</sup>では、速筋と遅筋の差異が明らかではない。これを確めるために、動脈結紮後の速筋と遅筋の glucose uptake を測定した。

### 材料と方法

#### 実験動物

本研究に使用したのは、体重60g位のメスの Wistar ラットである。ラットは水と飼料を自由に摂取できた。

#### 動脈結紮と切除

軽いエーテル麻酔下で、左大腿の動脈・静脈・神経束部を開き、鈍的に大腿動脈を単離し、浅腹壁動脈の分枝より近位0.5cmで絹で結紮を2ヶ所行い、その間で動脈を切除する。他の動物に、動脈の結紮と切除のみを行わない模擬手術も行った。傷を縫合し、回復させた。結紮を行った動物は手術を行わない対照と変わらず活発に動き、結紮した後肢も変わらず動かしていたし、体重の増加も対照と変わらなかった。

#### 筋

ラットは動脈結紮ないし模擬手術の7ないし14日後に、頸椎脱臼で殺し、両側のヒラメ筋 (Sol) と長趾伸筋 (EDL) を *in vivo* の伸展位で腱でホルダーに固定し、切り出した。

#### インキュベーション

筋はホルダーに固定したままで、95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> で飽和し軽く震盪したフラスコの溶液中で 37°C のインキュベートをした。溶液は Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液 (pH7.4) に 10mM sodium pyruvate, <sup>3</sup>H-3-o-methylglucose (1.0 μCi/ml), 5mM glucose, <sup>14</sup>C-sucrose (1mM, 0.2μCi/ml) を含んでいる。この条件下では glucose uptake は60分まで直線状である。

#### 放射活性

30分のインキュベーション後、ホルダーから外

\* 信州大学医学部第三内科

した筋を氷冷生理的食塩水で洗浄，濾紙上で余分の水分を除き，腱を取り除いた。筋の湿重量を測定し，Soluene350 (Packard) 中で消化し，酢酸で中和した。筋の消化液とインキュベーション溶液のアリコートに Scintisol EX-H (和光純薬) を加え，シンチレーション・カウンター (Packard 3225) 中で一晩静置後，二重放射活性を測定した。計算

Glucose uptake は，glucose space と sucrose space (細胞外スペース) の差から算出した。データの統計学的分析を Student の t 検定を用いて行った。有意差検定は 5% のレベルで判定した。

### 結果

予備実験で，模擬手術を行った肢の筋と何も行わなかった肢の筋の湿重量や glucose uptake に有意差は無かった。従って本実験では，動脈結紮肢の筋と何もしない対側肢の筋の比較を行った。

動脈循環不全肢の EDL の湿重量は動脈結紮 7 日と 14 日後に有意に低下していた。Sol は有意差は無かった (図 1)。

湿重量当りの glucose uptake は，動脈循環不全肢の EDL で，動脈結紮 7 日と 14 日後に平均で 29% と 85% の増加がそれぞれあり，有意であった。Sol では有意差は無かった (図 2)。Glucose up-

take を筋当りで表すと，EDL・Sol 共に有意差は無くなった (図 3)。

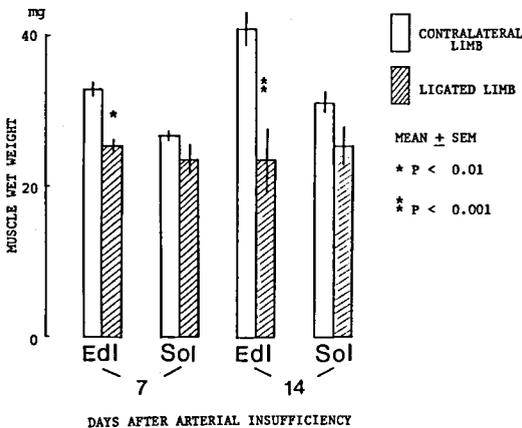


図 1 動脈不全の筋湿重量に対する影響  
7, 14: 動脈結紮・切除 7 日及び 14 日後  
平均±標準偏差 各カラムは 7 筋から計算

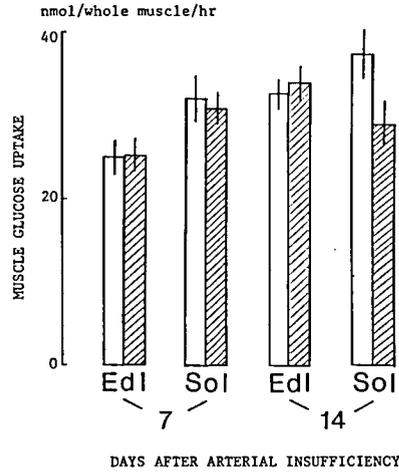


図 2 動脈不全の筋湿重量当りの glucose uptake に対する影響  
平均±標準偏差 各カラムは 6~7 筋から計算  
他は図 1 と同様

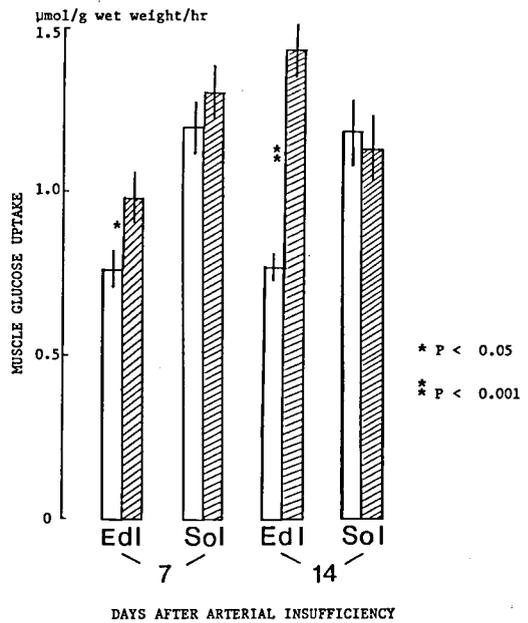


図 3 動脈不全の筋当りの glucose uptake に対する影響  
図 2 と同様

## 考 察

本研究は、動脈循環不全が湿重量と湿重量当りの glucose uptake の変化からすると、主として速筋に影響することが明らかに示された。動脈不全下では、速筋の glucose uptake が増加する。これは、glycogen 合成や嫌氣的解糖の基質として glucose の利用が速筋で増加していることを示唆する。この動脈不全下での筋 glucose uptake の増加は、患者の生検筋や下肢筋での報告でも支持される。しかし、Challiss らのラットによる実験では、一側大腿動脈の結紮・切除の7日後の gastrocnemius と Sol で glucose uptake が有意に増加し、plantaris で有意な変化が無かったと報告している<sup>3)</sup>。速筋と遅筋の glucose uptake に関する今回の我々の結果と Challiss らの結果との相違は、方法の相違によると考えられる。彼らは *in vivo* で我々は *in vitro* でアイソトープを付けた基質を投与している。

以前、我々は無酸素条件下では glucose uptake が速筋でのみ増加し、遅筋では有意な変化が無かったと報告した<sup>4)</sup>。今回の結果はこれと一致する速筋でのみ glucose uptake の増加が見られたことは、動脈循環不全が酸素欠乏を主要な要素として、速筋の代謝調節に影響を与えていることを示唆する。

動脈循環不全下では、速筋は湿重量当りの glucose uptake が増加するが、湿重量は主として蛋白の減少によって有意に減少する。従って、この条件下での glucose uptake の増加という適応的調節でも、筋蛋白の異化亢進を阻止しえないこととなる。

動脈循環不全下の遅筋では、glucose uptake も湿重量も変化しない。それらの点からは、遅筋の方が動脈循環不全に抵抗性だと言える。

動脈循環不全下では、速筋と遅筋の代謝調節は大きく異なる。

## 要 約

1. 一側の動脈結紮と切除7日と14日後の骨格筋の湿重量と glucose uptake を測定した。
2. 動脈循環不全下で筋湿重量は EDL で有意に減少したが、Sol では有意な変化は認められなかった。
3. 動脈循環不全下で湿重量当りの glucose uptake は EDL で有意に増加したが、Sol では有意な変化は認めなかった。
4. 動脈循環不全下で筋当りの glucose uptake は EDL と Sol 共に有意な変化を認めなかった。

## 文 献

- 1) Bass A, Gutmann E, Hanzlikova V and Teisinger J: Effects of ischaemia on enzyme-activities in the soleus muscle of the rat. Pflugers Arch 379: 203—208, 1979.
- 2) Hayes DJ, Challiss RAJ and Radda GK: An investigation of arterial insufficiency in rat hindlimb. An enzymic, mitochondrial and histochemical study. Biochem J 236: 469—473, 1986.
- 3) Challiss RAJ, Hayes DJ, Petty RFH and Radda GK: An investigation of arterial insufficiency in rat hindlimb. A combined P-n.m.r. and blood flow study. Biochem J 236: 461—467, 1986.
- 4) Shoji S: Regulation of glucose uptake in rat slow and fast skeletal muscles. Comp Biochem Physiol 91A: 363—365, 1988.

## 26) 筋細胞死と自食作用

木 南 英 紀\*

研究協力者 上 野 隆\* 内 山 安 男\*\* 埜 中 征 哉\*\*\*

### はじめに

筋の病理的变化に伴うオートファジーの亢進は、その原因から2つの型に分けることができる。1つは筋細胞に局所的障害があり、これを清掃・除去するために誘起されるオートファジーである。各種筋ジストロフィー症や、多発性筋炎などの炎症性ミオパチーで、筋原線維間に多数の自己貪食胞の出現とその顆粒に一致してカテプシン群などのリソゾーム酵素の染色性の増加が認められる。もう1つは何かの機転でリソゾーム内の消化が抑制された結果誘起されるオートファジーである。自己貪食胞は普通10分ぐらいの半減期で形成・退縮しているが、食胞内の消化が進行せず、退縮が著しく遅延するため多数の自己貪食胞が出現する。その典型的な例はリソゾーム内 pH が上昇することに起因するクロロキンミオパチーである。脂質や糖の障害により、二次的に蛋白質の分解も抑制され、オートファジーが亢進したようにみえる代表的な疾患として  $\alpha$ -グリコシダーゼ欠損症がある。

しかし正常の細胞における自己貪食胞の隔離膜の由来、リソゾームとの融合の機序などオートファジーに関する機構さえ、まだわかっていない。昨年に引き続き、自己貪食胞の隔離膜の由来に関する機序と神経・筋細胞内に自己貪食胞・空胞形成のみられる Batten 病についての知見について報告する。

### 材料と方法

オートリソゾーム分離：ロイペプチン投与肝よりオートリソゾーム<sup>1)</sup>分離した。分離した小胞から膜分画を密度勾配遠心で得、さらに炭酸ナトリウムで洗浄して膜標品とした。

免疫学的手法：ウエスタンブロットィングは5~15%のグラディエントゲル(チトクローム P450, アルドラゼ)および16%ゲル(サブユニット c)に SDS-PAGE を行なった後、ニトロセルロース膜に転写し、特異抗体を反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いた。抗チトクローム P450抗体<sup>2)</sup>、抗アルドラゼ抗体<sup>2)</sup>、抗サブユニット抗体<sup>3)</sup>はすべてウサギで作成したポリクロナール抗体である。蛍光抗体による免疫細胞染色は木南の方法によった<sup>3)</sup>。

対象：Batten 病の筋材料は5歳男子および13歳男子からのもの(国立精神・神経センター・埜中先生)、脳および線維芽細胞は Wolfe 博士(モンリオール神経研究所、カナダ)から供与されたものである。

### 結 果

#### 1) 自己貪食胞の隔離膜の由来

絶食した動物の肝では自己貪食胞が多数出現する。絶食12時間後の肝より得た自己貪食胞の膜分画には小胞体膜のマーカーが認められるが、長時間絶食した肝の自己貪食胞画には小胞体膜のマーカーが認められないことを昨年報告した<sup>4)</sup>。より厳密な食事コントロールの下での自己貪食胞の形成過程を調べるため、24時間絶食後、夜9~12時の3時間餌を食べさせ、自己貪食を抑制した。そ

\* 順天堂大学医学部生化学第一講座

\*\* 岩手医科大学解剖学第二講座

\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

こから再び絶食を開始した。図1に示した各時間の1時間前にロイペプチンを注射し、肝より自己食食胞を分離し、膜標品を得た。膜上の小器官および取り込まれたタンパク質のイムノプロットィングによる解析結果をデンシドメーターでスキャンし、定量的に現した。ここでは小胞体のマーカーとしてチトクローム P450をみているが、絶食後12時間くらいにピークがあり、その後急速に減少した。他の小胞体マーカーについても同じ動態を示した。食食胞への取込の指標として細胞質局在の酵素をみると（これは膜分画ではなく、沈殿分画に回収される）、15時間後にピークがあり、やはり時間と共に減少している。しかし、食食胞全体の蛋白量は長時間の絶食の間変化なく、取り込まれた蛋白量も変化しないと考えられる。カタラーゼなどは絶食の経過につれて大きな変化はなく、用いたアルドラーゼは良いマーカーでないかもしれない。今回の結果も自己食食の隔離膜の由来は小胞体膜である可能性を強く示唆した。

## 2) ユビキチン-蛋白質複合体のリソゾーム内蓄積

Rimmed vacuole を伴う遠位性筋炎 (DMRV) および封入体筋炎にみられる RV に一致してユ

ビキチン複合体が局在することを昨年報告した。ユビキチン-複合体のリソゾーム内蓄積はリソゾーム内蛋白分解の抑制による可能性が考えられ、それを調べる一つの方法として、培養ヒト線維芽細胞にクロロキン、E-64、あるいは蔗糖を加えて、リソゾーム内消化を阻害した。それらの中でクロロキンが最も強い効果を示した。ユビキチン抗体を用いた免疫染色を行なうと、対照細胞ではびまん性に染まるのに対して、クロロキン処理細胞では細胞全体に渡り顆粒状に強く染色された。又、イムノプロットィングによる解析でも細胞内のユビキチン複合体の増加が確認できた。

## 3) Batten 病におけるミトコンドリア ATP 合成酵素サブユニット c の蓄積

Batten 病は筋細胞に自己食食胞が多数出現する病態の一つである。しかし、原因は勿論のこと蓄積物の本体については全く不明であった。最近、羊のモデル動物で蓄積物の主たるものはミトコンドリア ATP 合成酵素のサブユニット c であることがわかった。遅幼児型および若年型 Batten 病患者脳ホモジネートのサブユニット c の量を免疫学的に調べてみると、図2-aに示すように、両病型ではサブユニット c のバンド (1-6) が

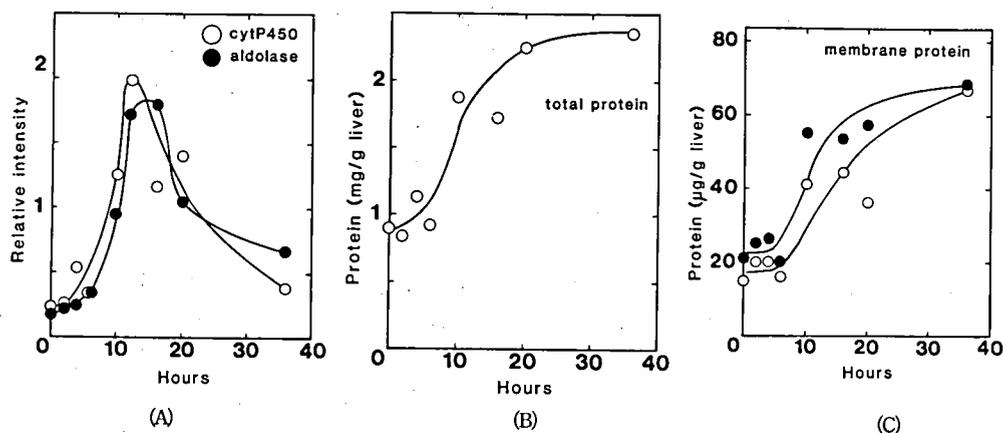


図1 摂食後の絶食過程におけるチトクローム P450の出現、アルドラーゼの取込み及び自己食食胞の蓄積

- (A) 膜分画のチトクローム P450 (○), 沈殿分画のアルドラーゼ (●)
- (B) 食食胞の蛋白量
- (C) 膜分画の蛋白量

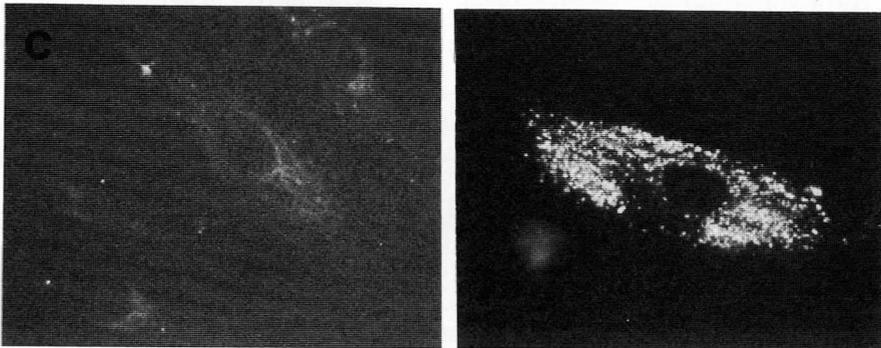
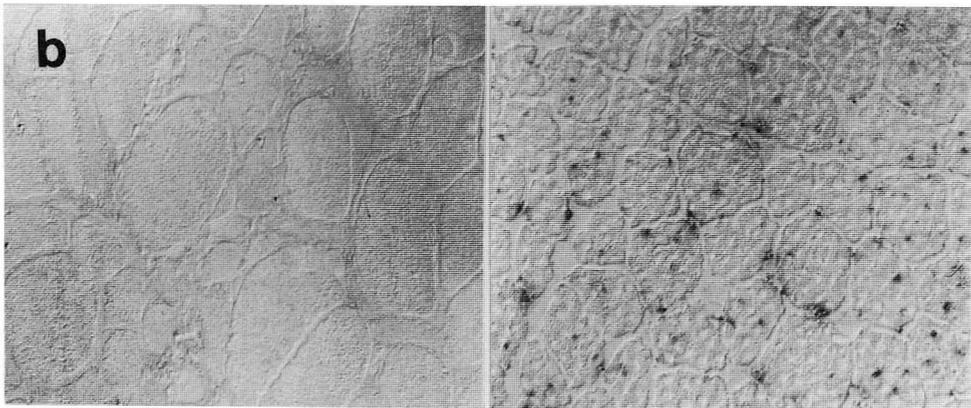
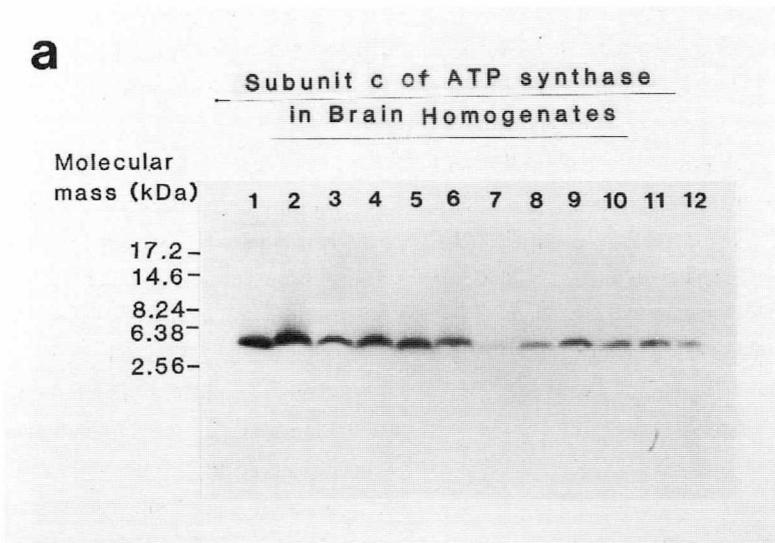


図2 Batten 病における ATP 合成酵素サブユニット c の蓄積  
 (a) ヒト脳ホモジネートにおける蓄積の免疫プロテイングによる解析。レーン 1-3, 遅幼児型；レーン 4-6, 若年型；レーン 7, 幼児型；レーン 8-12, 対照  
 (b) 封入体筋炎 (左), 若年型 Batten 病 (右) 筋における免疫組織学的検査  
 (c) 対照 (左) および幼児型 Batten 病線維芽細胞 (右) におけるサブユニット c の局在

対照脳（8-12）よりずっと濃いことがわかった。幼児型（7）ではサブユニットの量はむしろ正常よりも低い。骨格筋におけるサブユニットcの局在を免疫組織学的に観察すると、対照では全く染色されないのに対して、若年型では小顆粒状の染色象が見える（図2-b）。線維芽細胞でも、対照では染色性が極めて低いのにに対し、患者細胞では非常に強い顆粒状の染色像が得られた（図2-c）。パコール密度勾配遠心におけるサブユニットcとマーカー酵素の分布から患者細胞では主としてサブユニットcはリソゾームに存在すると思われた。また、ATP合成酵素の他のサブユニット（ $\alpha$ ）の蓄積はないことを確認している。

### 考 察

自己貪食は細胞内の局所的な障害の修復のための応答と思われる。筋ジストロフィー症の筋変性の初期過程がこれにあたる。DMRVや封入体筋炎でみられるRVはリソゾームの種々の酵素活性や量は著しく増えているが、その中で消化は阻害されていると思われる。でなければ、自己貪食胞が多数融合あるいは集合したRVは形成されない。ユビキチン複合体の蓄積もこれを支持する結果であろう。しかし、同時にカテプシン陽性の小さな小胞（自己貪食胞）も筋細胞内に多数見いだされ、初期には局所的な筋蛋白の崩壊が先行していると思定される。

Batten病も酸ホスファターゼ陽性の多数の自己貪食胞が出現する疾患の一つであるが、これは今回の結果からいえば、ミトコンドリア合成酵素サブユニットcのリソゾーム内蓄積の結果生じたものであり、筋細胞障害のために誘起されたものでない。患者細胞のサブユニットc遺伝子のコーディング領域の塩基配列には異常がなく<sup>5)</sup>、またmRNAの産生量も正常細胞と変わらないこと<sup>5)</sup>、ミトコンドリアへの輸入およびアセンブリーの過

程の異常もない可能性が高く、結局分解の異常の仮説が立てられている。本症の原因については今後の研究の発展を待ちたい。

### 文 献

- 1) Kominami E, Hashida S, Khairallah EA and Katunuma N: Sequestration of cytoplasmic enzymes in a autophagic vacuole-lysosomal system induced by injection of leupeptin. *J Biol Chem* 258: 6093-6100, 1983.
- 2) Ueno T, Munro D and Kominami E: Membrane markers of endoplasmic reticulum preserved in autophagic vacuolar membranes isolated from leupeptin treated rat liver. *J Biol Chem* 266: 18895-18999, 1991.
- 3) Kominami E, Ezaki J, Munro D, Ishidoh K, Ueno T and Wolfe LS: Specific storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in lysosomes of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease). *J Biochem* 112: 278-282, 1992.
- 4) 木南英紀, 上野 隆, 武野大作, 埜中征哉, 内山安男: 筋細胞死とリソゾームプロテアーゼ。"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, 1991, pp211-214.
- 5) Palmer DN, Fearnley IM, Medd SM, Walker JE, Martinus RD, Bayliss SL, Hall NA, Lake BD, Wolfe LS and Jolly RD: Lysosomal storage of the DCCD reactive proteolipid subunit of mitochondria ATP synthase in human and ovine ceroid lipofuscinoses. *Adv Exp Med Biol* 266: 211-224. 1990.

## 27) 筋再生と塩基性線維芽細胞成長因子

後藤 幾生\*

研究協力者 笹ヶ迫 直一\* 神 武 直 子\*  
山 田 猛\* 小 林 卓 郎\*

### はじめに

塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) は様々な生理活性を持つが、培養筋芽細胞に対してはその増殖を促進させる効果を持つ<sup>1)</sup>。昨年度我々は生体の筋壊死・再生の過程における bFGF の果たす役割を検討するため、実験的壊死筋および mdx マウス筋の bFGF 量を radio-immunoassay をもちいて測定した<sup>2)</sup>。今年度は実験的壊死筋および mdx マウス筋の bFGF を免疫組織化学染色を用いて検討したので報告する。

### 対象・方法

#### 実験的壊死筋作成

8週齢の C57BL マウスを用いた。ネブタール麻酔下に右後脚を切開、ヒラメ筋を露出し直視下に 0.5% bupivacaine hydrochloride 100 $\mu$ l を注入、皮膚を縫合した。1, 3, 5, 11日目に屠殺しヒラメ筋を採取した。

#### ジストロフィー筋

3, 40週齢の mdx マウスのヒラメ筋を用いた。正常対照筋として、同週齢の C57BL/10ScSn マウスのヒラメ筋を用いた。

#### 組織染色

凍結切片に対し HE 染色および免疫染色をおこなった。免疫染色は凍結切片を蛍光抗体法で染色した。一次抗体は anti-bovine bFGF Ab (monoclonal IgG<sub>1</sub>, Promega 社) を PBS で 50 倍に希釈したものを、二次抗体は FITC anti-mouse

IgG Ab (Vector 社) を PBS で 100 倍に希釈したものをを用いた。

### 結 果

正常マウス筋では、bFGF は endomysium に限局して均一に染色された (図 1 A)。bFGF で一次抗体を吸収すると蛍光は僅かであった (図 1 B)。

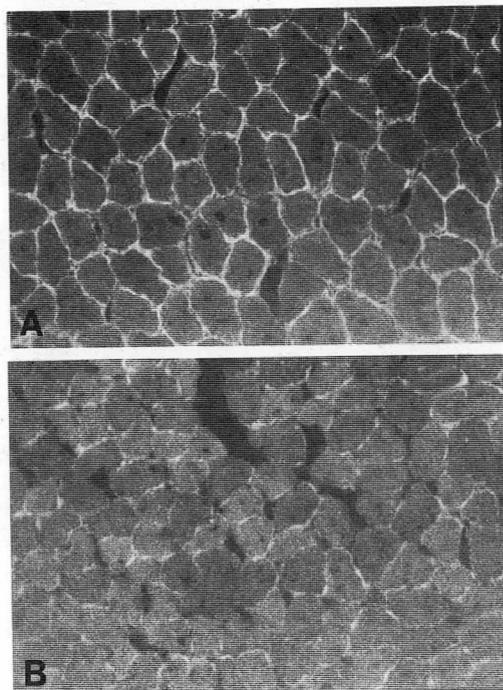


図 1 正常マウスヒラメ筋 (C57BL, 8週齢) における bFGF 免疫蛍光染色  $\times 50$   
A: endomysium に限局して染色性が見られる。  
B: bFGF による一次抗体の吸収後。

\*九州大学医学部脳研神経内科

Bupivacaine 注入1日後では広範に壊死線維が存在し、少数のマクロファージと思われる細胞の浸潤がみられた。免疫染色では endomysium のみならず壊死に陥った筋線維の、細胞質にも淡く bFGF が染色された(図 2 A)。注入3日後の壊死巣では多数の貪食細胞が浸潤し壊死線維を埋めつくしていた。bFGF は壊死巣に、侵入した貪食細胞の核の周囲にほぼびまん性に染色された(図 2 B)。この段階では細胞質、細胞間質の染色性に差は無かった。注入5日後の壊死巣では HE 染色にて好塩基性の胞体を持つ再生線維の出現が認められた。貪食細胞の数は3日後に比べて減少していた。免疫染色では再生線維の周囲を囲むように bFGF が染色され、またその細胞質にも淡い染色

性が見られた(図 2 C)。貪食細胞の多い部分ではやはりびまん性に bFGF が染色されていた。注入後11日後では壊死巣はほぼ再生線維に置換されていた。免疫染色では bFGF は再び endomysium に限局して染色され、正常筋と比べて染色性の程度に差は無かった(図 2 D)。注入5日後と違って再生線維の細胞質は染色されなかった。

3週齢の mdx マウスではすでに筋壊死・再生の過程が始まっていたが、bFGF は正常対照筋と同程度に endomysium に限局して染色された(図 3 A)。40週齢の mdx マウスでは強いジストロフィー性変化が認められ、bFGF は endomysium のみならず増生した間質結合組織にも染色された(図 3 B)。少数見られた壊死線維では実験的壊死

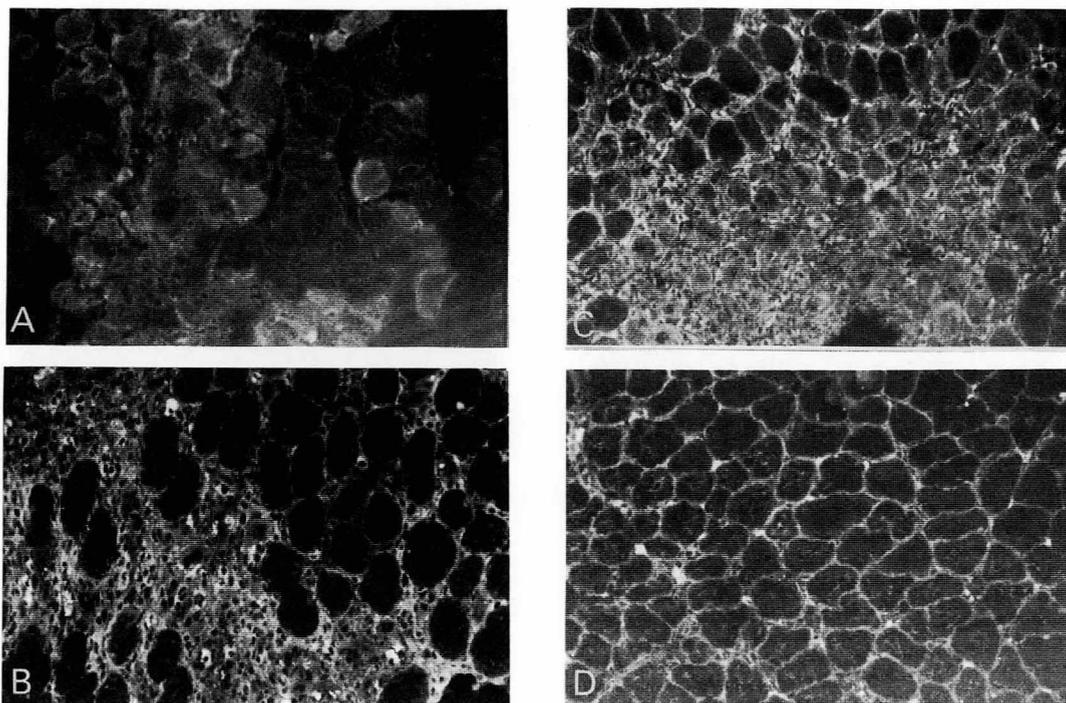


図 2 実験的壊死筋における bFGF 免疫蛍光染色 (×50)

- A : bupivacaine 注入1日後、図の左側は壊死巣であり、同部の筋線維の胞体が淡く染色されている。貪食細胞の核の部分は点状に抜けている。
- B : 注入3日後、壊死巣では貪食細胞の核以外の部分がびまん性にかなり強く染色されている。
- C : 注入5日後、壊死巣に再生線維が出現し始めている。再生線維の胞体にも淡い染色性がある。
- D : 注入11日後、ほぼ再生線維に置換され、ふたたび endomysium に限局して染色されている。染色性は正常筋(図 1 A)と比べて同程度であった。胞体は染色されなくなっている。

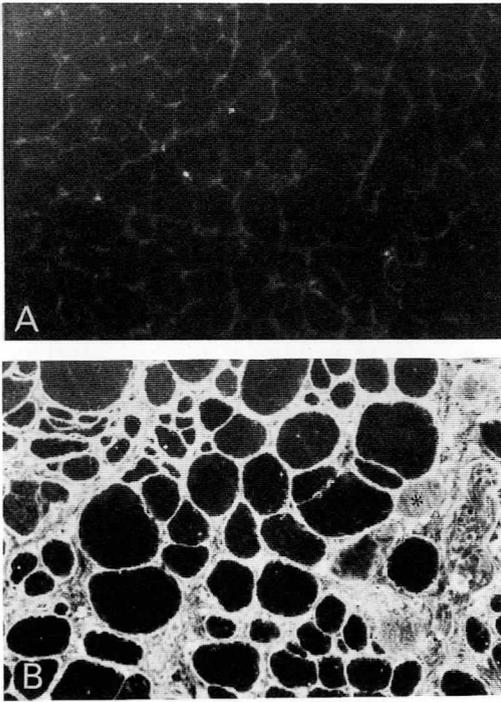


図3 mdx マウス筋における bFGF 免疫蛍光染色 (×50)  
 A : 3 週齢. endomysium に限局して染色されている.  
 B : 40 週齢. endomysium および間質結合織に染色されている. \*印の壊死線維の胞体にも染色性が見られる.

筋と同様に細胞質も淡く染色されていた。

### 考 察

今回の免疫組織化学染色を用いた検討では bFGF は正常筋では endomysium に限局して染色がみられること、実験的壊死筋では壊死線維および初期の再生途上の線維の細胞質にも染色性がみられること、貪食細胞の浸潤の強い部分ではかなり強く染色されること、mdx マウス筋では基本的には endomysium に限局されるが壊死線維の細胞質や増生した間質結合織にも染色性がみられることが分かった。

bFGF は paracrine 的、つまり局所で産生されその近傍で生理活性を示すことがわかっており、正常血漿中にはほとんど存在しない<sup>3)</sup>、bFGF は細

胞外基質中のプロテオグリカンに結合した形で貯蔵され、その結合が protease や heparinase 等の酵素により切れ、遊離の状態になって初めて活性を示すことが明らかになってきている<sup>4)</sup>。bFGF はすでに正常筋の endomysium に認められたことから、壊死巢の bFGF はこれらの endomysium 中のものが筋線維壊死に伴う酵素の活性化により放出された可能性が考えられる。一方、bFGF はマクロファージでも産生される<sup>5)</sup> こと、培養筋芽細胞では増殖の段階で mRNA 量が増えている<sup>6)</sup> ことが報告されている。これらのことから、壊死巢に侵入したマクロファージや、活性化された筋衛星細胞が自己刺激的に産生している可能性も考えられる。

3 週齢の mdx マウスにおいては正常対照と比べて endomysium 中の bFGF の染色性に大差はなく、このジストロフィーマウスの示す活発な筋再生能と bFGF の関わりについては不明であった。

今後は bFGF の mRNA レベルでの検討を行い、壊死・再生筋において発現が促進されるか否か検討を行いたい。

### 文 献

- 1) Gospodarowicz D, Weseman J, Moran JS, et al: Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts. *J Cell Biol* 70 : 395-405, 1976.
- 2) 後藤幾生, 笹ヶ迫直一, 宮田清典ほか: 筋再生と成長因子. “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” 1991, pp207-208.
- 3) Burgess WH and Maciag T: The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58: 575-606, 1989.
- 4) Klagsbrun M and Baird A: A dual receptor system is required for basic fibroblast factor activity. *Cell* 67: 229-231, 1991.
- 5) Baird A, Pierre M and Bohlen P: Immunor-

eactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 358—364, 1985.

6) Alterio J, Courtois Y, Robelin J, et al: Acidic

and basic fibroblast growth factor mRNAs are expressed by skeletal muscle satellite cells. *Biochem Biophys Res Commun* 166: 1205—1212, 1990.

## 28) 培養ヒト筋細胞のミオシン重鎖発現に対する 神経支配の影響

小林 高義\*

研究協力者 亀田 典佳\* 松本 容秋\*  
宮武 正\* 清水 輝夫\*\*

骨格筋細胞は運動神経細胞からの神経支配によって type 別分化が生じると考えられているが、その詳細は不明である。今回我々は、ヒト筋細胞のタイプ別分化を検討するため、最近我々が確立したヒト筋細胞—ラット脊髄片併置培養法 (Kobayashi et al, 1987) によって、培養下で継時的にヒト筋細胞のミオシン重鎖 (MHC) isoform に対するモノクローナル抗体 (McAb) を使用し、免疫組織化学的手法で検討したので報告する。

### 材料及び方法

診断目的で行われた19例の神経筋疾患 (筋萎縮性側索硬化症 5 例; 脊髄性進行性筋萎縮症 3 例; 筋緊張性ジストロフィー症 2 例; Joseph 病, Charcot-Marie-Tooth 病, 多発筋炎, 慢性関節リウマチ, リウマチ性多発筋痛症, 顔面—肩甲—上腕型筋ジストロフィー, サルコイドーシス, 血管炎, rigid spine syndrome 各 1 例) の生検筋の一部を培養用に使用した。既に報告した方法で筋単層培養を行い、未熟な筋管細胞が出現する筋単独培養約 7~10 日目に妊娠 13 日目の後根神経節を付けた胎児ラット脊髄片を併置培養した。単独培養ヒト筋細胞 (AM) は 3 週間培養したものを使用し、神経付加成熟ヒト筋細胞は脊髄片付加後約 2 週間培養し自発収縮し横紋を形成した筋細胞 (ICM) を使用した。

免疫組織化学に使用する一次抗体として 4 種類の McAb すなわち type I, IIA, IIB, & IIC のすべての myosin を認識する McAb-1 (QM355), type IIA, IIB & IIC を認識する McAb-2 (E35-3) と MY32 (Sigma), そして type I だけを認識する McAb-3 (SM1-11-2) を用い、培養皿上で染色を行った。更に myosin isoform の発現率を計算するために、培養筋細胞をラット腓腹筋内に挟み凍結した筋肉ブロックから連続凍結切片を作製し、これらの切片に対して myosin ATPase 染色と、免疫組織化学染色を行った。培養筋細胞数全体に対する McAb-2, McAb-3 陽性細胞の発現率を計算するために、まず McAb-2 または McAb-3 を使用して酵素抗体法により筋細胞を染色した後、同じ切片を McAb-1 を使用し蛍光抗体法を行い二重染色した。更に、同一筋細胞における fast 及び slow MHC isoform の発現を検討するために、McAb-2 と McAb-3 を各々 FITC 及び rodamine でラベルし二重染色を行い蛍光免疫組織化学的に検討を行った。

### 結 果

培養皿上での観察では、一部の筋芽細胞、及び大多数の AM, ICM で McAb-1 は陽性であった (図 1)。また多くの AM 及び ICM は McAb-2 に対しても陽性であった (図 2-A, B)。一方 McAb-3 に対しては、AM では陽性細胞は小数であり、ICM では陽性細胞の数が AM に比し増加した (図 2-C, D)。

\* 東京医科歯科大学医学部神経内科

\*\* 東京大学医学部脳研神経内科

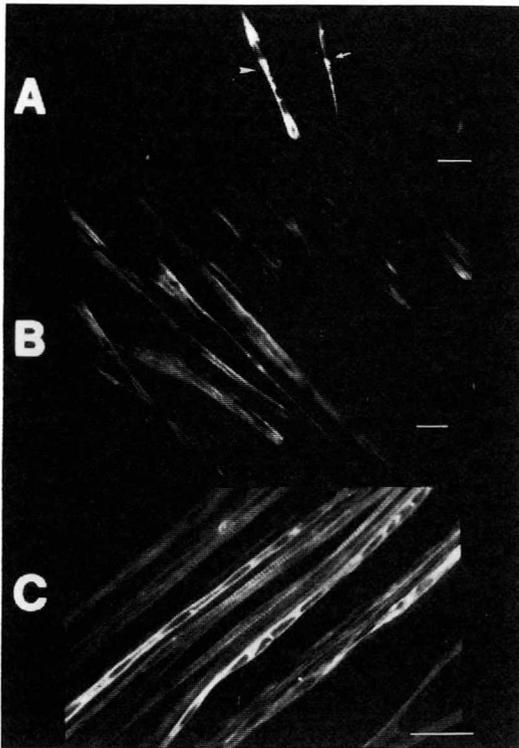


図1 Indirect immunofluorescence staining of McAb-1 on cultured dishes of aneurally (A & B) and innervated contracting cultured human muscle cells (C). Bar=50  $\mu$ m.

- (A) Myosin-positive reaction is observed on a myoblast (arrow) and an immature multinucleated cells with 4 nuclei (arrowhead) in 12 days of culture.
- (B) Intense diffuse myosin-positive staining is observed on myotubes in 12 days of culture.
- (C) Myosin-positive staining is localized on cross-striations in innervated well cross-striated contracting muscle fibers in 10 days of co-culture with rat spinal cord.

凍結切片による定量的観察では、pH10.6, pH 4.6でpreincubateしたmyosin ATPase染色による組織化学的検討では、全てのAMは酸性、アルカリ性の両方で濃く染色されtype IIcの染色 patternを示した。一方、ICMでは3%がtype

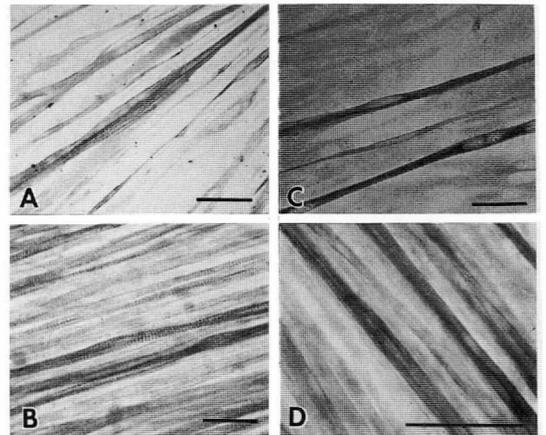


図2 Immunocytochemical peroxidase staining using anti-rabbit fast myosin (MY32: A & B) and anti-human slow MHC (McAb-3: C & D) on entire human muscle culture dishes. Bar=50  $\mu$ m.

- (A) Some myotubes have diffuse staining of fast myosin in 48 days of culture.
- (B) Fast MHC-positive staining is well localized on cross-striations in many innervated well cross-striated contracting muscle fibers in 17 days of co-culture.
- (C) Only a few myotubes has positive staining of slow MHC in 19 days of culture.
- (D) Some innervated contracting muscle fibers have positive staining of slow MHC on cross-striations in 17 days of co-culture.

I, 6%がtype II A, 91%がtype II B+Cの染色性を示した。McAb-2あるいはMcAb-3とMcAb-1の二重染色では、McAb-2陽性筋細胞はAMで $92.1 \pm 4.1\%$ 、ICMで $88.8 \pm 5.0\%$ と神経付加による差は認められなかったが、McAb-3とMcAb-1の二重染色ではMcAb-3陽性細胞はAMで $0.9 \pm 0.6\%$ であったのに対しICMで $8.3 \pm 2.6\%$ と神経付加によりMcAb-3陽性細胞の数は有意に上昇した(図3:表)。

同一筋細胞のMcAb-2とMcAb-3による二重染色では、AMではほとんどの筋細胞がMcAb-2

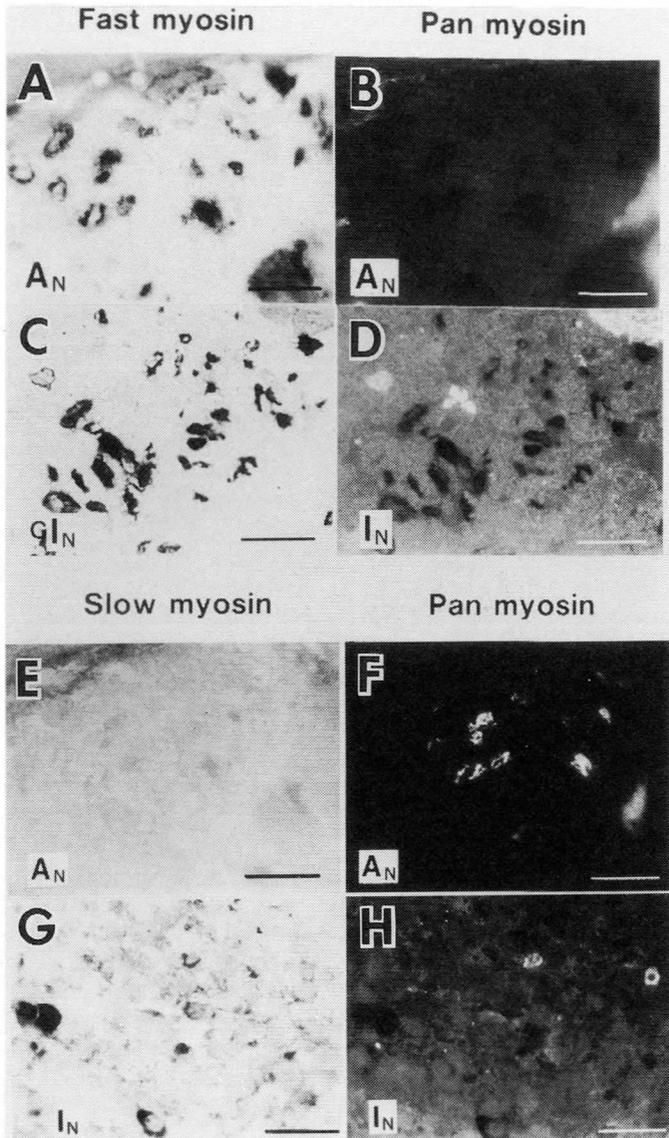


图 3 Double staining of immunocytochemical peroxidase using McAb-2 (A, C) & McAb-3 (E, G) and immunofluorescence using McAb-1 (B, D, F & H) on cross-sections of aneurally (A, B, E & F) and innervated contracting cultured human muscle cells (C, D, G & H). Bar=50 $\mu$ m.

A-D : Many aneural (A) and innervated (C) muscle cells have positive reaction of fast MHC in 12 days of culture and 22 days of co-culture, respectively. However, several muscle fibers with negative peroxidase staining of fast MHC had positive immunofluorescent reaction of McAb-1 (D: possibly slow MHC-positive cells).

E-H : In aneural cultures, many myosin-positive muscle cells are observed (F) , however no slow myosin-positive muscle cells are detected in this section (E) in 18 days of culture. Some dark immuno-peroxidase positive muscle fibers are observed in innervated contracting muscle fibers (G) in 22 days of co-culture. The number of myosin positive muscle cells are considered as the number of McAb-1 positive muscle cells (B, D, F & H) + the number of McAb-2 or -3 positive cells (A, C, E & G) because peroxidase immuno-reaction positive muscle cells have no more fluorescent positive immuno-reaction of McAb-2 or -3 (see dark DAB staining in B, D, F & H).

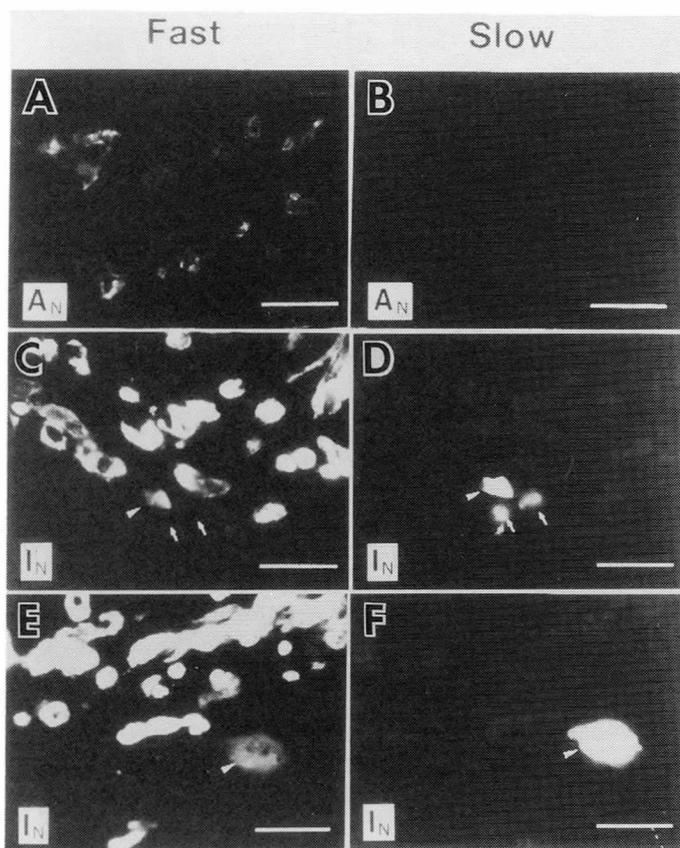


図4 Double FITC (A, C, E) and rodamine (B, D, F) immunofluorescence staining using McAbs -2 and -3 in cross-sections of aneural (A, B) and innervated contracting muscle fibers (C, D, E & F) in 18 days of culture and 22 days of co-culture, respectively. Bar=50 $\mu$ m. In aneurally cultured muscle, only fast myosin-positive cells are observed. In innervated contracting cultured muscle, however, some muscle fibers have positive staining of both fast and slow MHC (arrowheads) and a few muscle fibers have positive staining of slow MHC with negative staining of fast MHC (C & D, arrows).

にのみ陽性で McAb-3には陰性であったが、ICMでは McAb-2と McAb-3の両方に陽性な筋細胞及び McAb-3のみに陽性な筋細胞の出現が認められた(図4)。

#### 考 察

Ecob-Princeら(1989)は、ヒト筋肉片とマウス脊髄片との organotypic co-culture を使用し、MHC isoform の検討を行い、slow MHC は innervation により変化を受けないことを報告している。我々の系による検討では、ICMにおいて

AMに比して有意に slow MHC を発現する筋細胞が増加した。この系では ICM は平均5Hzで、ほぼ持続性に収縮しており、一方 Ecob-Prince らの培養系では、横紋を形成している筋細胞は平均20%で、収縮している筋細胞は10%以下であるため、筋収縮あるいは innervation の影響が反映されていない可能性が考えられる。我々の系における slow MHC の ICM における増加が、機械的な筋収縮のみによるのか、あるいは chemical transmission による影響があるのか、更に adult type の fast MHC の発現が innervation により影響を

表 The expression of slow and fast MHC isoforms in cultured human muscle

Case	% of slow MHC-positive cells		% of fast MHC-positive cells	
	AM	ICM	AM	ICM
1	0.0 (n=879)	7.8 (n=193)	100.0 (n=1129)	95.7 (n=117)
2	2.6 (n=117)	4.0 (n=858)	89.5 (n=105)	99.3 (n=117)
3	0.0 (n=25)	10.0 (n=20)	75.0 (n=8)	100.0 (n=7)
4	-	10.7 (n=121)	-	90.1 (n=172)
5	-	83.3 (n=174)	-	70.7 (n=116)
6	-	9.1 (n=33)	-	77.1 (n=214)
7	0.0 (n=75)	-	100.0 (n=35)	-
8	2.9 (n=34)	-	88.1 (n=42)	-
9	0.0 (n=42)	-	100.0 (n=42)	-
mean ( ± SEM)	0.9 ± 0.6	20.8 ± 12.5	92.1 ± 4.1	88.8 ± 5.0

• The percentage of slow MHC-positive or fast MHC-positive cells indicates the number of slow MHC (McAb-3) or fast MHC (McAb-2) positive cells / the number of McAb-1-positive cells (see in Fig.3) in a single section x 100.

AM: aneural muscle, ICM: innervated contracting muscle

• P < 0.01.

受けるかどうか, 更に今後検討をする予定である.

### 結 論

1. 今回初めてヒト成人骨格筋衛生細胞由来の培養筋細胞において, 神経支配によるMHC isoform に対する影響を検討した.
2. この系の中で, adult slow MHC isoform の発現に神経支配が重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした.

### 文 献

- 1) Kobayashi T, Askanas V and Engel WK: Human muscle cultured in monolayer and co-cultured with fetal rat spinal cord: importance of dorsal root ganglia for achieving successful innervation. J Neurosci 7: 3131-3141, 1987.
- 2) Ecob-Prince M, Hill M and Brown W: Myosin heavy chain expression in human muscle co-cultured with mouse spinal cord. J Neurol Sci 90: 167-177, 1989.

## 29) 筋原線維の C-蛋白質を分解する酵素の存在とその性質

堀 眞一郎\*

研究協力者 小 島 崇\* 大 谷 幸 子\*

### はじめに

筋ジストロフィーマウス (C57BL/10ScSn-MDX, MDX-マウス) はヒトの Duchenne 型筋ジストロフィーと同様に, ジストロフィン遺伝子に異常を持った動物である。我々は, このマウスを用いて, 筋蛋白質における遺伝子の情報発現の異常を二次元電気泳動で検討している過程で, MDX-マウスの速筋型 C-蛋白質のスポットが消失あるいは正常対照マウスに比量的に減少していることを見いだした<sup>1)</sup>。さらに, この C-蛋白質の変化はヒラメ筋や心筋では見られず, 速筋型 C-蛋白質に特異的であることが分かった。また, この C-蛋白質の変化は C-蛋白質を分解する酵素の存在によっていること, この C-蛋白質を分解する酵素の活性は, 生体内に一樣に存在するのではなく, 骨格筋に特異的に存在していることが, 明らかになった<sup>2)3)</sup>。ここでは, 阻害剤による活性の阻害効果からセリンプロテアーゼの性質をもっていることが分かったので報告する。

### 実験方法

**速筋型 C-蛋白質の精製:** 速筋型 C-蛋白質は, ウサギ (New Zealand white) の背筋から, Starr<sup>4)</sup>の方法に従って精製した。

**C-蛋白質分解酵素の調整:** 生後120日のマウス (C57BL/10ScSn 及び C57BL/10ScSn-MDX) の骨格筋を 0.6MKCl-10mM EDTA-10mM Tris-HCl (pH7.8) に懸濁し, 不溶性画分をさらに同溶

液で3回洗ったものを酵素標品として使用した。  
**C-蛋白質分解酵素の活性検定:** 精製した速筋型 C-蛋白質に酵素標品を加えたものを, 5M 尿素存在下で, 25°C, 1時間インキュベーションした後, SDS 処理し, SDS-PAGE とイムノプロット法を組合せ, C-蛋白質の変化を検出した。イムノプロットには, SDS-PAGE 終了後, 48mM Tris-39mM glycine-1.3mM SDS-20% methanol 溶液 (pH8.8) 中で電気的にニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を 1.5%ゼラチン-TBS (Tris buffered saline: 0.5M NaCl-20mM Tris-HCl, pH7.5) 溶液に浸しブロッキングした後, 一次抗体と 1時間インキュベーション, 次いで, TBS で洗浄後, 二次抗体と 1時間インキュベーションし, 再度 TBS で洗浄の後, Ni<sup>++</sup>-Co<sup>++</sup>-DAB 法で発色させた。一次抗体には, 千葉大学理学部の大日方教授より供与された, 速筋型 C-蛋白質に対するモノクローナル抗体 Fc-18 を, 二次抗体には TBS で 3000 倍希釈した Bio-Red 社の HRP-GAM IgM を用いた。酵素活性の定量化には resorufin 標識をした casein を基質として用いた。Resorfin 標識 casein を酵素標品と共に, 25°C, 1時間インキュベーションした後, 5% TCA で酵素反応を停止し, 遠心後, 上清 (80 $\mu$ l) を 0.75M Tris-HCl, pH8.8, 120 $\mu$ l に移し, 574 nm での吸光度から, 分解された casein 量を定量し, 酵素活性を測定した。

### 結 果

図 1 は MDX-マウスの骨格筋から調整した酵

\* 東京都神経科学総合研究所分子研究系神経生化学部門

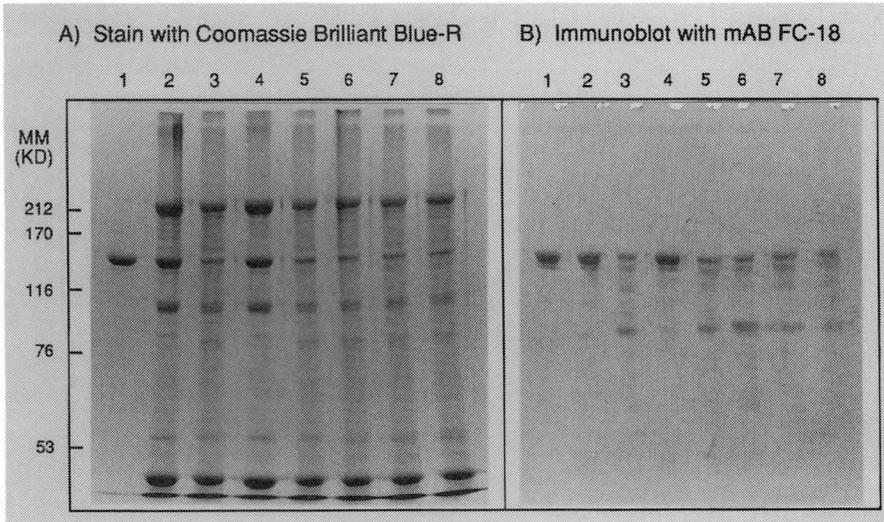


図1 蛋白分解酵素阻害剤の効果

精製したC-蛋白質 (0.2mg/ml), 5M 尿素, 10mM DTT 及び各種蛋白質分解酵素阻害剤を含んだ反応液に酵素を加えて, 反応を開始し, 25°C, 1時間インキュベーションした後, SDS 処理液を加え, 沸騰水中に1.5分浸して酵素反応を停止した. 遠心後, 各々の上清を SDS-PAGE で分離した後, Coomassie Brilliant Blue 染色(A), FC-18抗体によるイムノブロット(B)をした. 1 : C-蛋白質のみで酵素を加え無かったもの, 2, 3 ; C-蛋白質に酵素を加えたもので, 2は酵素を加えた直後に, SDS 処理液を加えたもの, 3は酵素を加えて1時間後に, SDS 処理液を加えたもの, 4-9 ; C-蛋白質, 酵素に, 蛋白分解酵素阻害剤を加えたもので, 4は chymostatin 100 $\mu$ g/ml, 5, 6はそれぞれ pepstatin を8および0.8 $\mu$ g/ml, 7, 8はそれぞれ bestatin を400および40 $\mu$ g/ml 加えた.

素標品とウサギ骨格筋から精製したC-蛋白質とを5M 尿素存在下でインキュベーションした後, SDS-PAGE により分離し, Coomassie Brilliant Blue 染色 (図1 A) および FC-18によるイムノブロット (図1 B) したものである. 調製したC-蛋白質は分子量約140kd で95%以上の純度である. (図1 A 及びB, 1列). C-蛋白質と酵素標品を混ぜた直後に SDS 処理した場合にはC-蛋白質の分子量の変化はなかった (図1 B, 2列) が, 25°C, 1時間インキュベーションした後には, 低分子量に分解されていた (図1 B, 3列). Chymostatin (100 $\mu$ g/ml) はこの分解を抑制した (図1 B, 4列). Pepstatin (8, 0.8 $\mu$ g/ml), bestatin (400, 40 $\mu$ g/ml) はこの分解を抑制しなかった (図1 B, 5, 6, 7, 8列). なお, chymostatin の

濃度が10 $\mu$ g/ml では分解抑制効果は弱かった. 図2は PMSF, APMSF の作用をみたものであるが, PMSF は17.4 $\mu$ g/ml で, C-蛋白質の分解を抑制したが, APMSF は1 mg/ml でも分解を抑制しなかった (図2 B, 5, 6, 7, 8列). その他, TPCK (0.1, 1mg/ml), TLCK (10, 100 $\mu$ g/ml), E-64 (1, 10 $\mu$ g/ml), antipain (60, 600 $\mu$ g/ml), leupeptin (1, 10 $\mu$ g/ml), phosphoramidon (30, 300 $\mu$ g/ml), aprotinin (1, 10 $\mu$ g/ml) のいずれも分解活性を阻害しなかった. また, 金属キレーターである EDTA (1, 10mM), EGTA (1, 10 mM), o-phenanthroline (1mM),  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl (1mM), SH 阻害剤である NEM (0.1, 1mM), PCMB (10, 100 $\mu$ M), DTNB (0.1, 1mM) のいずれによっても分解は抑制されなかった. なお,

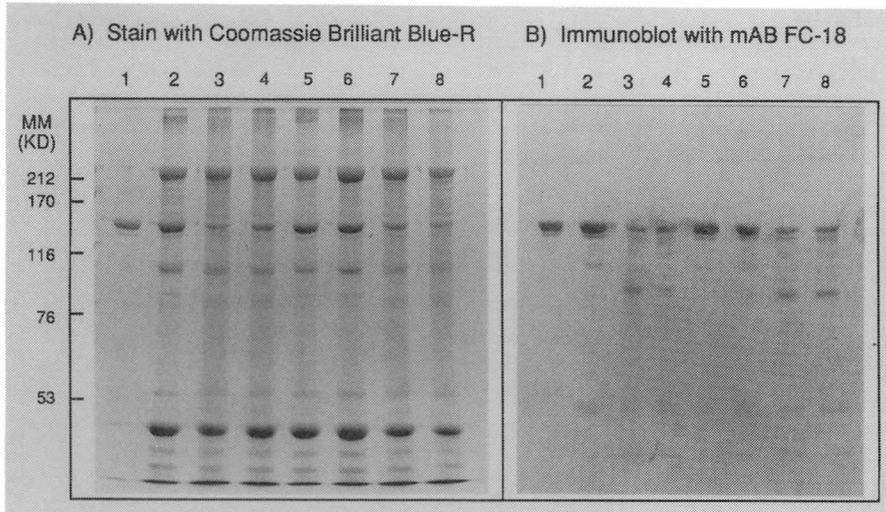


図2 PMSF と APMSF による阻害効果

実験方法は図1に同じ。1；C-蛋白質のみで酵素を加え無かったもの、2,3,4；C-蛋白質に酵素を加えたもので、2は酵素を加えた直後に、SDS処理液を加えたもの、3,4は酵素を加えて1時間後に、SDS処理液を加えたもの、4にはPMSFを溶解するのに使用したethanolを5,6と同じ濃度に加えてある。5-8；C-蛋白質、酵素に、蛋白分解酵素阻害剤を加えたもので、5,6はそれぞれPMSFを174および17.4 $\mu$ g/ml, 7,8はそれぞれAPMSFを1および0.1mg/ml加えた。

SH 阻害剤の効果を検討するときには、酵素反応液に DTT は加えなかった。阻害効果を定量化するため、resorufin で標識した casein を基質として、阻害剤の効果を検討してみたところ、ここで用いた酵素標品は、尿素が無くても casein を分解することが分かった。その分解の至適 pH は尿素存在下では pH8 にあり、尿素無しでは、pH10 以上のアルカリにあった。また、C-蛋白質を基質として、SDS-PAGE で観察した阻害剤の効果を、resorufin 標識 casein を基質としてしらべたところ、表で示すように、chymostatin (10 $\mu$ g/ml)、PMSF (0.1mM) は完全に阻害したが、他の阻害剤は効果がなかった。ただし、TPCK は尿素存在下で弱い阻害効果を示した。Casein 分解に対する阻害剤の抑制効果の特異性は C-蛋白質を用いた時と同じであった。

C-蛋白質の分解様式を SDS-PAGE によって、ここで用いた酵素標品と  $\alpha$ -chymotrypsin 及び trypsin との間で比較したところ、 $\alpha$ -chymotryp-

sin による分解産物と同じであり、trypsin とは異なっていた。

## 考 察

骨格筋には cathepsin, calpain の様な蛋白分解酵素が存在しており、筋崩壊との関連が検討されているが、ここで報告した C-蛋白質分解酵素は、阻害剤による阻害効果の特異性から、serine protease であり、cathepsin, calpain とは異なった蛋白分解酵素であると考えられる。また、この酵素は  $\alpha$ -chymotrypsin 様の活性を持っていることも分かった。

遺伝的進行性筋ジストロフィーの病理学的特徴は白筋あるいは赤筋の変性壊死である。筋原線維の崩壊には lysosomal protease が重要な働きをしていると考えられている。殊に、筋原線維内の cathepsin B あるいは L の活性増強はこの筋変性の引金になっているのではないかと報告されているが、筋ジストロフィーの病態における蛋白分解

表 Effect of inhibitor

Inhibitor	Urea (+)	Urea (-)
None	100 %	100 %
Chymostatin 10 µg/ml 100 µg/ml	4 1	29 13
PMSF 0.1 mM 1 mM	0 0	35 20
APMSF 40 µM 400 µM	113 115	96 93
Aprotinin 1 µg/ml 10 µg/ml	110 102	96 93
TLCK 27 µM 270 µM	98 66	100 91
TPCK 0.28 mM 2.8 mM	57 59	83 91
E-64 2.8 µM 28.0 µM	98 94	111 125
Leupeptin 2.1 µM 21.0 µM	114 92	106 105
Antipain 99 µM 990 µM	101 107	105 94
PCMB 10 µM 100 µM	102 107	106 106
NEM 0.1 mM 1 mM	89 79	112 116
Phosphoramidon 55 µM 550 µM	98 109	109 106
EDTA 1 mM 10 mM	92 94	84 75
EGTA 0.2 mM 2.0 mM	69 80	100 83
Bestatin 0.13 mM 1.30 mM	101 77	88 66
Pepstatin 1.2 µM 12.0 µM	102 66	64 70

酵素の役割は未だ不明である。ここで報告したC-蛋白質分解酵素は先に、明らかにしたように<sup>3)</sup>、骨格筋に特異的に局在している。C-蛋白質は骨格筋のAL帯に局在し、actinとmyosinの間に介在している蛋白質である。この蛋白質が分解されると筋原線維の構造の安定性は弱まり、崩壊壊死は促進されると想像される。このことから、この酵素は進行性筋ジストロフィーの病態に関連しているのではないかと予想される。故に、この酵素の筋原線維構成成分のそれぞれに対する作用の特異性、筋肉内における局在、活性調節について、研究を更に進める必要がある。

また、この酵素の基質であるC-蛋白質は、免疫

グロブリンスーパーファミリーに属しており<sup>5)</sup>、この酵素が免疫グロブリンにも作用する可能性も考え得る。この酵素の生理的役割を考える上で検討すべき問題である。

### まとめ

C-蛋白質分解酵素は $\alpha$ -chymotrypsin様の活性をもった serine protease である。

### 文献

- 堀真一郎, 杉浦弘子, 大谷幸子, 平林民雄, 中村瑞穂: 筋ジストロフィーマウス (MDX) における筋蛋白質の高分子領域における異常について。"厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究" (杉田班), 昭和62年度研究報告書, 1988, pp69-73.
- 堀真一郎, 杉浦弘子, 大谷幸子, 平林民雄: 筋ジストロフィーマウス (MDX) 筋のC-プロテインの動態について。"厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究" (杉田班), 昭和63年度研究報告書, 1989, pp243-246.
- 堀真一郎, 小島 崇, 田中知仁, 大谷幸子: 骨格筋筋原線維の構成成分であるC-蛋白質を変換する因子について。"厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の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, 1991, pp215-218.
- Starr R and Offer G: Preparation of C-protein, H-protein, X-protein, and phosphofructokinase. Meth Enzymol 85: 130-138, 1982.
- Einheber S and Fischman DA: Isolation and characterization of a cDNA clone encoding avian skeletal muscle C-protein: An intracellular member of the immunoglobulin superfamily. Proc Natl Acad Sci USA 87: 2157-2161, 1990.

# 30) 筋緊張性ジストロフィー患者 immunoglobulin G の糖鎖構造

杉村公也\*

研究協力者 伊藤慶太\* 高橋禮子\*\* 米山 榮\*  
 本田 仁\* 高橋 昭\*

### はじめに

筋緊張性ジストロフィー (以下 MyD) は、筋萎縮やミオトニアに加え、白内障や耐糖能低下、知能低下など多彩な症状を呈する疾患である。その多彩な症候の中で、古くより血清 immunoglobulin G (以下 IgG) の低下が報告されており、いままで様々な角度より検討が加えられてきたが、その成因は明らかになっていない。IgG は、基本的に、Fc 部分に一对の糖鎖を持っていることが知られている。糖鎖は X 線解析により、立体構造上は中心付近に位置し、いろいろな IgG の機能に関与していることが推定されているが詳細については不明の点が多い。

今回我々は MyD の低 IgG 血症の成因に関して糖蛋白質である IgG の糖鎖に着目し、検討を加えたのでここに報告する。

### 対 象

思春期以降に診断された MyD14例 (男性 6 例, 女性 8 例) および 20 歳の congenital myotonic dystrophy の女性例を対象とした。対照には健康成人 9 例 (男性 6 例, 女性 3 例) を用いた。年齢は MyD 群が 24~53 歳, 平均 40.7 歳であり, 対照の健康成人 9 例では年齢 20~45 歳, 平均 33.4 歳であった。血清 IgG の平均値は MyD 群で 992mg/dl であり 1000mg/dl 以下の症例が 7 例あった。

### 方 法

患者群及び対照血清 1~2 ml を 40% 硫酸アンモニウムにて塩析し, さらにそれを Mono Q column 及び protein G を用いての affinity chromatography により IgG を精製した。精製度は sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis により確認した。

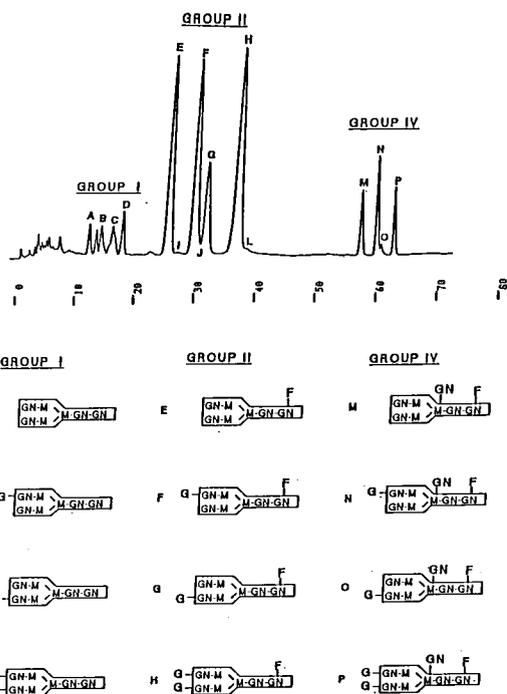


図 1 Oligosaccharide moiety of IgG from normal control

\* 名古屋大学医学部神経内科  
 \*\* 名古屋市立看護短期大学

精製した IgG をペプシンにて消化し糖ペプチドにした後、アーモンドより精製した glycopeptidase を作用させオリゴ糖を遊離した。遊離させたオリゴ糖を Bio-Gel P4 column にてゲル濾過し、オリゴ糖画分を集め、2-アミノピリジル化し、ODS-silica, 及び Amide-80 column を用いて 2次元マップ法にて糖鎖構造の解析を行った。

## 結 果

1) 正常対照より精製した polyclonal IgG の糖鎖構造は大別すると、単純な二本鎖群 (group I), フコースを持った二本鎖群 (group II), フコース及び bisecting N-acetylglucosamine を持った二本鎖群 (group IV) の 3 群に分けられた (図 1)。各 group の糖鎖全体に占める割合は group II が約 80% で、group I, group IV はおののおの約 10% 程度であった。各 group 間の糖鎖の割合の比較では agalactosyl oligosaccharide の割合が digalactosyl oligosaccharide に比し、相対的に少なかった。以上の結果は今まで報告された human polyclonal IgG の oligosaccharide の pattern と一致していた<sup>1)</sup>。

2) MyD 群血清より精製した polyclonal IgG oligosaccharide の pattern は、正常対照群に比し明らかな差異を持っていた (図 2)。各 group と同 agalactosyl oligosaccharide (oligosaccharide A, E, M) の増加と digalactosyl oligosaccharide の減少が見られた。全体の約 80% を占める group II

に関し詳細に検討すると、agalactosyl oligosaccharide, digalactosyl oligosaccharide のみならず、monogalactosyl oligosaccharide の割合にも正常対照群と有意差を持って、相違が見られた (表)。

3) MyD 群における血清 IgG 濃度と agalactosyl oligosaccharide (oligosaccharide E) との関係調べてみると、agalactosyl oligosaccharide の割合も少ないものは全体として血清濃度は低い傾向にあり、逆に agalactosyl oligosaccharide の割合の多いものでは、血清濃度が正常域のものが多かった (図 3)。

## 考 察

筋緊張性ジストロフィーにおける血清 IgG の低下は 1956 年に Zinneman らによって記載されて以来知られ、catabolism の亢進<sup>2)</sup>であるとか血管外への漏出<sup>3)</sup>であるとか、おもに血清 IgG の動態に関しての検討がなされてきた。しかし、IgG 分子そのものに着目してその変化をとらえたという研究は今までほとんどなかった。IgG 分子における糖鎖の機能に関しては、依然として明らかでないことが多い。これまでに糖鎖の変化により補体への結合性が変わる<sup>4)</sup>などの事実が明らかになってきている。

表 Comparison of oligosaccharide moiety of IgG (%) between MyD and control

	MyD (n=14)	Control (n=9)	
Group I	7.50 ± 3.04	9.31 ± 4.15	
oligosaccharide A	2.86 ± 0.15	1.67 ± 0.23	***
oligosaccharide B	1.57 ± 0.16	2.12 ± 0.22	*
oligosaccharide C	1.20 ± 0.57	2.17 ± 0.37	**
oligosaccharide D	1.00 ± 0.60	2.52 ± 0.70	**
Group II	80.63 ± 5.00	78.78 ± 4.94	
oligosaccharide E	32.15 ± 5.97	18.53 ± 3.30	***
oligosaccharide F	17.72 ± 2.28	22.70 ± 4.25	**
oligosaccharide G	13.19 ± 3.01	9.87 ± 1.10	***
oligosaccharide H	15.33 ± 4.18	28.03 ± 5.71	***
Group IV	11.86 ± 4.03	11.87 ± 3.60	
oligosaccharide M	5.90 ± 1.39	3.51 ± 0.40	***
oligosaccharide N	5.00 ± 1.00	5.10 ± 0.47	
oligosaccharide O	0.67 ± 0.29	0.65 ± 0.12	
oligosaccharide P	2.32 ± 1.17	2.55 ± 0.38	

\*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

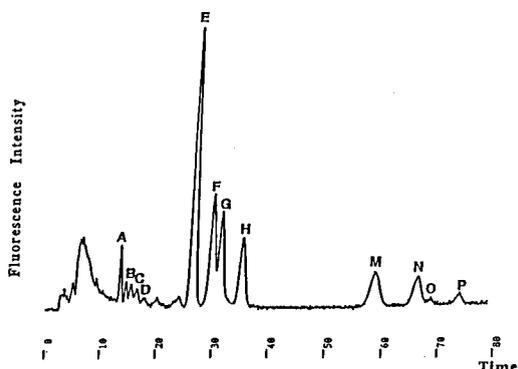


図 2 Oligosaccharide moiety of IgG from MyD

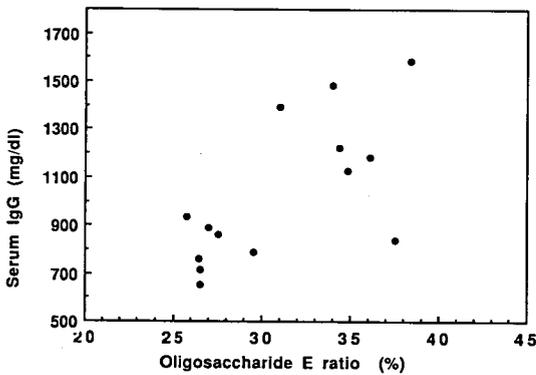


図3 Relationship between oligosaccharide E ratio and serum IgG concentration in MyD

糖蛋白質糖鎖の機能に関してはその蛋白質ごとに異なり、機能の解析はいままでにごく少数の糖蛋白質を除いてほとんどなされていない。血清中の糖蛋白質において、特にセルロプラスミン等で脱シアル化したものでは、血中半減期が激減することが知られている。この現象を説明する理由として、肝臓に存在する galactose receptor が表面に露出した galactose を特異的に認識して取り込むという事実がわかっている<sup>5)</sup>。このことに関連して表面の galactose を galactosidase によりはずして N-acetylglucosamine を露出させると半減期は脱シアル化の90%までに回復することから生体内における galactose receptor の重要性がわかる<sup>5)</sup>。人における IgG の糖鎖は立体構造上酵素処理も難しく、かつほとんどアシアロの状態で存在するにもかかわらず高い血清濃度を維持しており galactose receptor の関与に関してははっきり

しないままであった。しかし、今回の研究により少なくとも MyD 患者の血清 IgG 濃度を規定する因子の1つとして、IgG 分子中の galactose 量が関与していることが推察された。

## 文 献

- 1) Takahashi N, Ishii I, Ishihara H, et al: Comparative structural study of the N-linked oligosaccharides of human normal and pathological Immuglobulin G. *Biochemistry* 26: 1137—1144, 1987.
- 2) Wochner RD, Drews G, Strober W and Waldman TA: Accelerated breakdown of immunoglobulin G (IgG) in myotonic dystrophy: A hereditary error of immunoglobulin catabolism. *J Clin Invest* 45: 321—329, 1966.
- 3) Suzumura A, H Yamada H Matuoka Y, et al: Immunoglobulin abnormalities in patients with myotonic dystrophy. *Acta Neurol Scand* 74: 132—139, 1986.
- 4) Jefferis R, Lund J and Pound J: Molecular definition of interaction sites on human IgG for Fc receptors (huFc gamma R). Source (Bibliographic Citation): *Mol Immunol* 27: 1237—40, 1990.
- 5) Ashwell G and Morell AG: "Glycoproteins of Blood cells and Plasma" (ed by Jamieson GA & Greenwalt TJ) Lippincott Philadelphia, 1971, pp173—189.

## VI. ミトコンドリア脳筋症 (No. 1)

# 31) MELAS と糖尿病の合併例について

福原信義\*

研究協力者 新田永俊\* 石黒英明\* 多久肇一\*  
樋口砂里\* 中島孝\*

## はじめに

ミトコンドリア脳筋症は Kearns-Sayre 症候群 (KSS), MELAS, MERRF に大別されているが、筋症状以外に種々の臓器の合併症を伴うことがあり、Egger ら<sup>1)</sup>は全身のミトコンドリア異常症と捉えて mitochondrial cytopathy なる概念を提唱している。種々の合併症の1つとして糖尿病が知られている<sup>1)-10)</sup>が、ミトコンドリア脳筋症における糖尿病の発生機序についての報告は少ない。我々は、糖尿病とけいれん重積発作で発症した MELAS の症例を経験したが、本例をもとにミトコンドリア脳筋症における糖尿病の発生機序について若干の文献的考察を加え報告する。

## 症 例

症 例：34歳，女性。  
主 訴：けいれん発作。  
既往歴：特記すべきことなし。  
家族歴：母，糖尿病，脳卒中にて死亡。姉，けいれん発作にて37歳で死亡。母方従姉妹，20歳で死亡（詳細不明）。  
現病歴：22歳時に糖尿病を指摘され，25歳よりインシュリン療法を行っている。33歳の時全身硬直，意識消失が出現しけいれん重積状態にて近医に入院。この時，血糖265mg/dl で，以後糖尿病のコントロールは極めて不良となった。当科外来初診時，両側難聴，全身の軽度筋萎縮，深部腱反射の低下と発作波を含む脳波異常がみられ，その後右視野

の異和感，けいれん発作が出現したため当科へ入院した。

入院時現症：身長158cm，体重41kg と全体に痩せているが低身長はない。一般内科的には特に問題はなかった。神経学的に意識は清明で痴呆はなく，眼底も正常。両側の側方注視性水平性眼振，感音性難聴，軽度の構音障害，全身の軽度筋萎縮を認め，深部腱反射は低下していたが，筋力低下や病的反射はなく，筋緊張の低下，上肢の軽い運動失調と歩行時のふらつきを認めた。感覚障害はなかった。

入院時検査所見 (表 1)：尿糖陽性，血糖，HbA<sub>1c</sub>，フルクトサミンの上昇を認め，血液および髄液中の乳酸，ピルビン酸は高値を示した。心電図は正常，脳波では徐波の混入と発作波を認め，神経伝導速度は腓骨神経34.5m/s，脛骨神経33.0 m/s，腓腹神経35.6m/s と下肢で低下していた。頭部 CT (図 1) では両側後頭葉の萎縮と白質の低吸収域を認め，<sup>99m</sup>Tc HM-PAO による SPECT に

表 1 検査成績

尿糖	1.0g/dl	尿中C-peptide	<3.2μg/日
FBS	128mg/dl	インスリン受容体抗体	陰性
HbA <sub>1c</sub>	9.8%	膵島細胞抗体	陰性
Fruct	430μM/L	膵島細胞膜抗体	陰性
乳酸	20.6mg/dl		
ピルビン酸	0.93mg/dl		
髄液：蛋白24mg/dl、乳酸30.2mg/dl、ピルビン酸1.65mg/dl			
【グルカゴン負荷試験】 前 3分 6分 10分			
C-peptide (ng/ml)	0.7	1.2	1.2 1.1

\* 国立療養所厚済病院神経内科

て頭部 CT で異常のない部位にも血流低下域が散在していた。右大腿四頭筋生検 (図 2) にて筋の大小不同と中心核のほか ragged-red fiber を多く認め、電顕では結晶状封入体を含む多数の巨大異常ミトコンドリアとグリコーゲンの増加を認めた。また患者白血球のミトコンドリア遺伝子の検索では tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) の点変異が確認され、以上より MELAS と診断した。糖尿病に関して本例では、尿中 C-peptide の 1 日排泄量は 3.2 $\mu$ g 以下と少なく、グルカゴン負荷試験でも血中 C-peptide の低反応を認め、インシュリン受容体抗体、膵島細胞抗体、膵島細胞膜抗体は陰性であった。

### 考 察

ミトコンドリア脳筋症の中では KSS で糖尿病の合併が多く、MELAS での報告は稀である。Tanabe ら<sup>2)</sup> は KSS を含むミトコンドリア筋症で糖尿病や耐糖能異常を合併した 17 例を総括しており、糖尿病の平均発症年齢は 21.6 歳、半数以上は 30 歳以下の発症で糖尿病のコントロールにインシュリンを必要とした。6 例は糖尿病の発症がミトコンドリア筋症に先行し、両者の合併は単なる

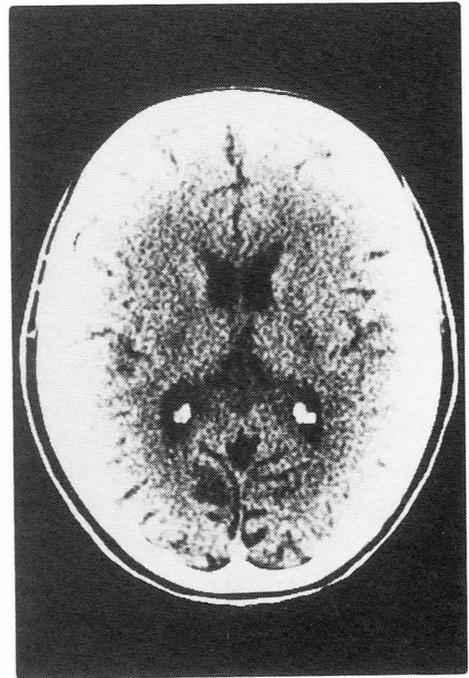


図 1 頭部 CT：両側後頭葉の萎縮と白質の低吸収域を認める。

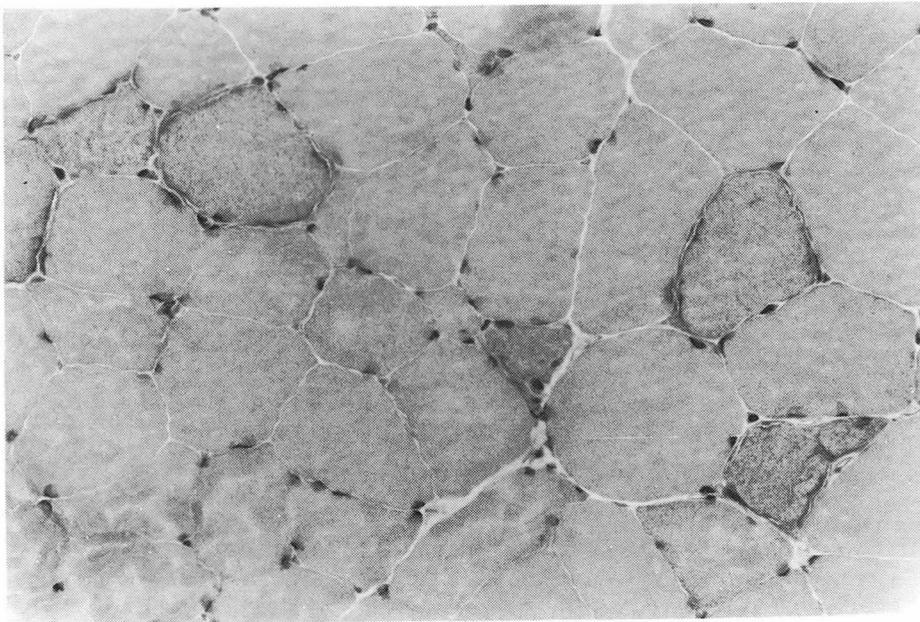


図 2 右大腿四頭筋 (HE 染色  $\times 280$ )：筋の大小不同と多くの ragged-red fiber を認める。

表2 糖尿病 (DM) を合併した MELAS の報告例

報告者	症例	MELAS発症年齢	DM発症年齢
Shimojiら <sup>9)</sup> (1987)	30歳、男	21歳	26歳
石津ら <sup>9)</sup> (1987)	34歳、男	22歳	24歳 (インシュリン非依存性)
今井ら <sup>7)</sup> (1989)	34歳、女	小児期	33歳
小澤ら <sup>9)</sup> (1991)	18歳、女	詳細不明	詳細不明
岡田ら <sup>9)</sup> (1991)	22歳、女	6歳	18歳 (22歳インシュリン療法)
西澤ら <sup>10)</sup> (1991)	51歳、女	41歳	36歳
本例	34歳、女	34歳	22歳 (25歳インシュリン療法)

偶然ではないとしている。KSSにおける糖尿病の発生機序に関して Toppet ら<sup>3)</sup>は糖負荷試験でインシュリンの分泌低下を認めており、Tanabe ら<sup>2)</sup>はグルカゴン負荷試験で血中 C-peptide が低反応にもかかわらず、euglycemic glucose clamp technique にてインシュリン感受性が正常なことから糖尿病の発生機序としてインシュリンの分泌低下を考えた。また Piccolo ら<sup>4)</sup>も糖負荷試験やグルカゴン負荷試験でのインシュリンや C-peptide の分泌低下を認める一方、患者の白血球や線維芽細胞ではインシュリン受容体の数やインシュリンに対する親和性が正常なことから、糖尿病の発生機序に関して Tanabe らと同様、インシュリン分泌障害を示唆した。

MELAS で糖尿病を合併した症例は検索した限り現在までに 6 例あり<sup>5)~10)</sup>、女性に多く、糖尿病の発症は 10~30 歳代と若く、MELAS の発症に先行するものもあった(表 2)。しかし糖尿病の発生機序については言及していない。本例ではインシュリンの感受性や結合能についての十分な検索は行っていないが、インシュリン受容体抗体、膵島細胞抗体、膵島細胞膜抗体が陰性で、尿中 C-peptide 1 日排泄量が少なく、グルカゴン負荷試験での血中 C-peptide の低反応から MELAS でも KSS と同様、インシュリン分泌低下が糖尿病の原因となる可能性が考えられた。ミトコンドリアの異常がインシュリン分泌低下による糖尿病を引き起こす機序の詳細は不明であるが、糖尿病を合併する神経筋疾患の一つである Friedreich 病

でもミトコンドリア酵素の異常が指摘されており、ミトコンドリアの異常と糖尿病を関連づけるうえで興味深く、今後の検索が必要と思われる。

## まとめ

1. 糖尿病とけいれん重積発作で発症した MELAS の症例を報告した。
2. KSS と同様、MELAS でも糖尿病の発生機序としてインシュリンの分泌低下が示唆された。

## 文 献

- 1) Egger J, Lake BD, et al: Mitochondrial cytopathy. A multisystem disorder with ragged red fibres on muscle biopsy. Arch Dis Child 56: 741, 1981.
- 2) Tanabe Y, Miyamoto S, et al: Diabetes mellitus in Kearns-Sayre syndrome. Eur Neurol 28: 34, 1988.
- 3) Toppet M, Telerman-Toppet N, et al: Oculocranosomatic neuromuscular disease with hypoparathyroidism. Am J Dis Child 131: 437, 1977.
- 4) Piccolo G, Aschei M, et al: Normal insulin receptors in mitochondrial myopathies with ophthalmoplegia. J Neurol Sci 94: 163, 1989.
- 5) Shimoji A, Katsuragi S, et al: Familial mitochondrial encephalomyopathy with stroke-like episodes and episodic disturbances of consciousness. A study of pedigree including three generations with multisystemic abnormalities. J Neurol Psychiatry 41: 47, 1987.
- 6) 石津棟暎, 松田一郎ほか: Mitochondrial cytopathy の 1 家系例. 臨床神経 27: 983, 1987.
- 7) 今井博之, 木本圭一ほか: 母と母方祖母にも類似の症状がみられた複合体 1 欠損症の 1 例. 日児誌 93: 967, 1989.
- 8) 小澤高将, 田中雅嗣ほか: MELAS におけるミトコンドリア tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) 変異. “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, 1991, pp129-133.
- 9) 岡田伸太郎, 乾 幸治ほか: MELAS 症候群の臨床的検討とミトコンドリア DNA の解析. “厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー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, 1991, pp254-257.
- 10) 西澤正豊, 大塚美恵子ほか: MELAS 母娘例におけるミトコンドリア DNA の解析. “厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー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, 1991, pp258-260.

## 32) MERRF の筋生検所見

——組織学的に診断できなかった症例を中心として——

福原信義\*

研究協力者 多久肇一\* 新田永俊\* 中島孝\*  
樋口砂里\* 丹野芳範\*\*

MERRF (mitochondrial encephalomyopathy associated with ragged-red fibers)<sup>1)</sup> は、本来、DRPLA (dentatorubral - pallidolusian atrophy)<sup>2)</sup> より分離、確立された疾患であるが、その名前のように ragged-red fiber を伴うことが、DRPLA との重要な鑑別点の1つと考えられてきた。しかし、我々は筋生検で ragged-red fiber を認めることの出来なかった DRPLA の症例を経験したので報告するとともに、我々が過去に経験した MERRF の7症例と比較、検討した。

### 症 例

症例 58歳 男性

家族歴：両親は従兄結婚であるが、母、姉、姪(姉の子)、姪の子など家系内に同様の症状をもつ人が5人いる。何れの症例も今まで DRPLA と診断されていた。遺伝形式は常染色体優性遺伝も考えられるが、maternal inheritance でも説明可能である。

既往歴：特記すべきものはない。

現病歴：45歳頃より言語がもたつくようになったが、徐々に悪化してきた。47歳には意識消失発作があり、ミオクローヌスが出現してきた。50歳時に新潟大学神経内科を受診し、変性型のミオクローヌステんかんと多発性脳梗塞の診断を受けている。その後、当科を紹介され、外来で経過を観察されてきたが、この間、筋力低下には気付かれて

おらず、筋萎縮についても認められてはいない。本年4月3日に2回目の入院となった。

入院時所見

全身理学的所見：特記すべき事はない。

神経学的所見：意識は清明だが、痴呆があり、IQ (WAIS) 59。脳神経系では両側視神経萎縮があり、眼球運動は saccadic。眼振(-)、軟口蓋の挙上不全、構音障害を認めた。全身の筋萎縮があり、筋トーンスは低下していたが、特に胸鎖乳突筋と肩甲帯に強い筋萎縮を認めた。しかし、筋力はほぼ正常であった。抗てんかん剤を服用していることもあり、不随意運動はみられなかった。腱反射は全体に亢進していたが、病的反射は認められなかった。歩行は小脳失調性であったが、感覚には異常を認めなかった。足の変形はなかった。

臨床検査成績：一般検査では特に異常はなかった。髄液は細胞数0/3、蛋白33mg/dl。乳酸、ビリルビン酸値は血液でそれぞれ6.5、0.67mg/dl、髄液ではそれぞれ12.2、0.86mg/dl と正常であった。末梢神経伝導速度は MCV が腓骨神経26.1、脛骨神経39.6m/sec で、SCV は腓腹神経21.2m/sec と低下していた。

脳 CT (図1)：小脳の萎縮と大脳基底核に多発性の小梗塞巣がみられた。

脳波：全体に徐波化し、全誘導で多棘徐波結合が認められた。

感覚神経誘発電位：giant SEP は認められなかった。

筋生検所見：MERRF を疑ったため、かなり大き

\* 国立療養所犀潟病院神経内科

\*\* 新潟大学脳研究所神経内科

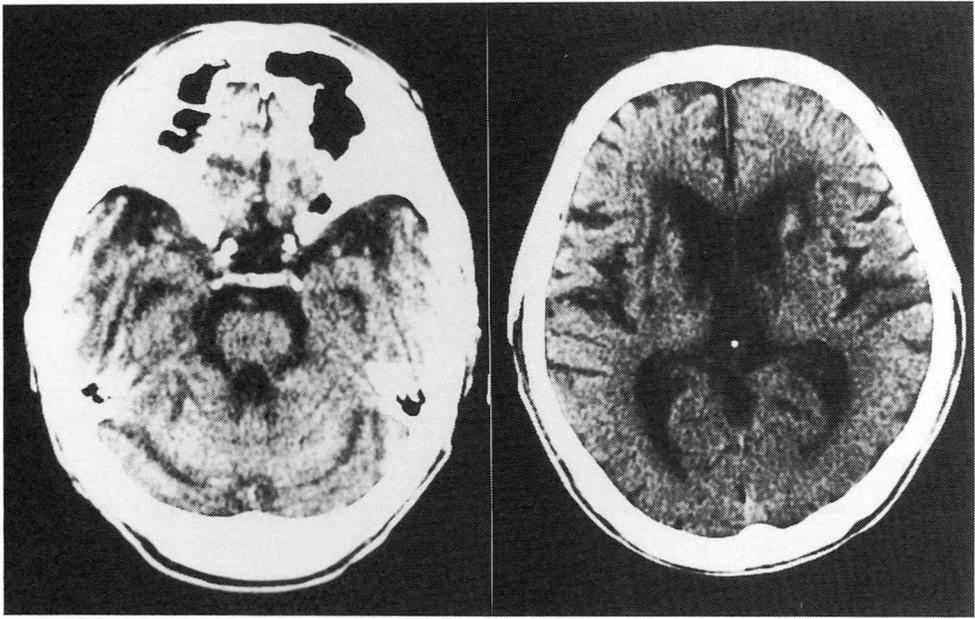


図1 脳 CT. 小脳, 脳幹部の萎縮と大脳基底核部の多発性小梗塞巣がみられる.

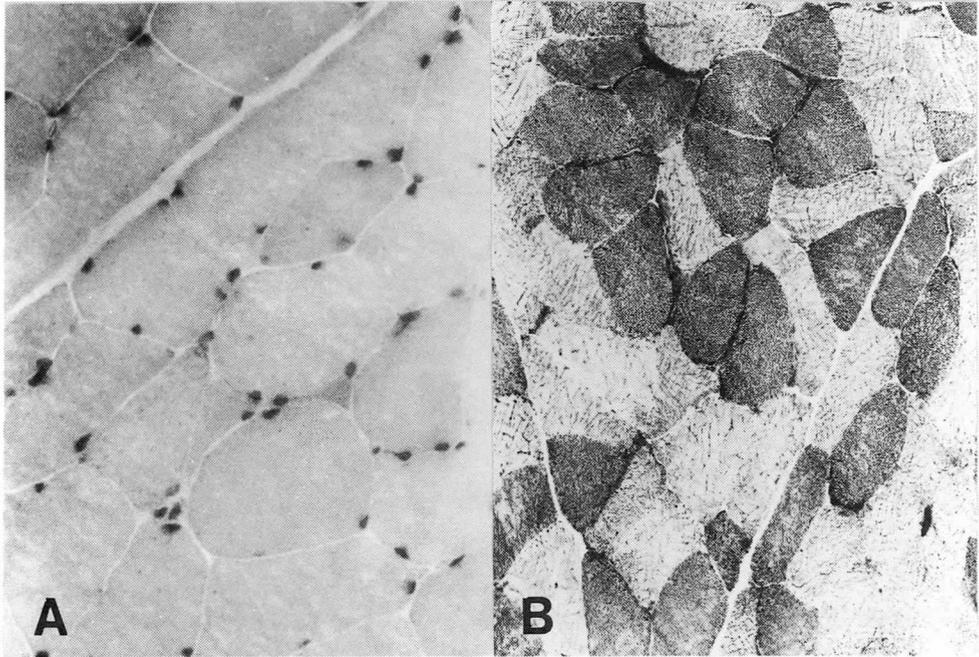


図2 大腿四頭筋の生検組織. Ragged-red fiberは見られない.  
A: Gomori trichrome 染色 ×180, B: NADH-TR 染色 ×95

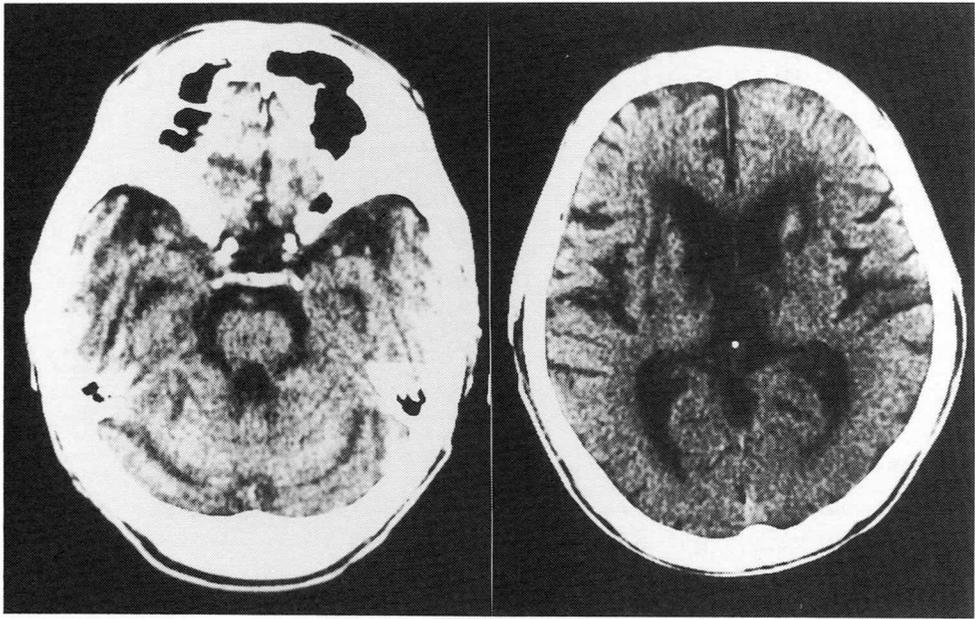


図1 脳 CT. 小脳, 脳幹部の萎縮と大脳基底核部の多発性小梗塞巣がみられる.

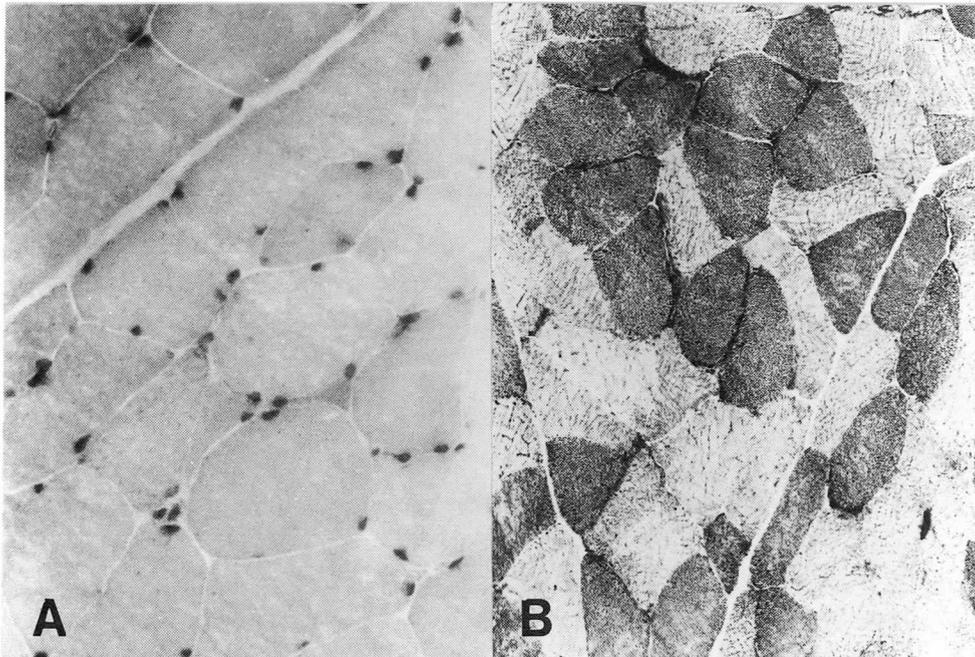


図2 大腿四頭筋の生検組織. Ragged-red fiberは見られない.  
A: Gomori trichrome 染色 ×180, B: NADH-TR 染色 ×95

なブロックの生検をしたが、Gomori trichrome 染色（図2）では小角化線維が散在していたが、ragged-red fiber は全く見られなかった。NADH-TR 染色でも同様であった。ただ、cytochrome *c* oxidase 染色で、3.5%の線維で陰性であった。cytochrome *c* oxidase negative fiber はタイプ I 線維にもタイプ II 線維にもある。ATPase 染色では、小さな type grouping がみられた。電顕（図3）で筋膜下にミトコンドリアの異常な集積が無いことは勿論のこと、通常、ミトコンドリアがよく見られる Z 帯の周辺のミトコンドリアの形態にも異常はなかった。

白血球のミトコンドリア DNA 分析（図4）： primer423 と primer530 (mismatched primer) を用い PCR をおこなった<sup>3)</sup>。P はこの症例，A，B はそれぞれ、すでに MERRF として我々が報告している20歳男性と21歳女性の骨格筋である。A では正常人にまれにあるといわれる9 bp の deletion を伴っている。MERRF 患者の DNA は制限酵素 Nae I により digest されたとき、塩基番号

8344における A から G への point mutation<sup>4)</sup> のため156 bp と18 bp の2つに切断されるが、この症例の DNA も9 bp の deletion のある患者 A と同じパターンで切断されており、同じ point mutation があると診断された。

その後の臨床経過：この患者は入院後、急速に筋萎縮が進行し、今ではねたきりとなっている。

症例のまとめ：この症例は、それまで臨床的に DRPLA と考えられてきたが、胸鎖乳突筋と肩甲帯部に特に強い筋萎縮があるため、DRPLA としても特異であり、MERRF の可能性も否定できず、筋生検を行った。筋生検の所見は基本的には神経原性の変化であり、形態的にミトコンドリア異常は認められず、ミトコンドリア DNA の分析によりはじめて MERRF の診断が確定された。この症例では、脳 CT で大脳基底核に小梗塞巣が見られ、いわゆる stroke-like episodes によるもの<sup>5)</sup> も考えられるが、今までの報告で脳 CT で認められるほど大きな梗塞巣の見られた症例はない<sup>6)</sup> ので、この症例の梗塞も MERRF とは無関係の偶発

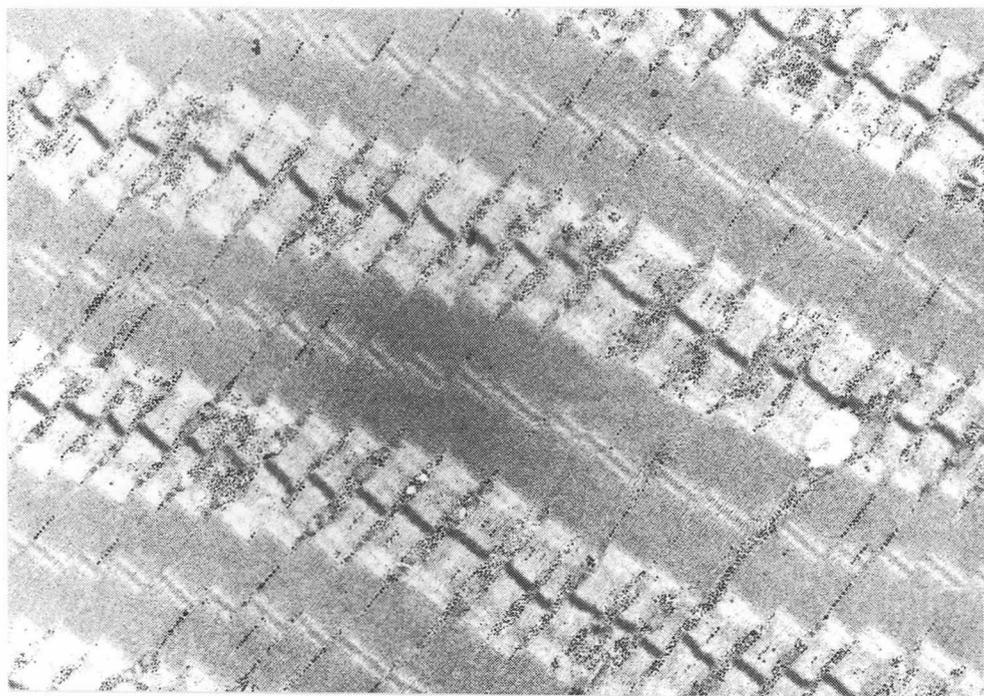


図3 大腿四頭筋の電顕像：ミトコンドリア異常は見られない。×8,000

表 MERRF の筋生検所見

症例	年齢	性	経過	CCO(-)		angular type	type	type	target
				RRF	fiber				
1	20	M	15y	12.4	5.0	(+)	(-)	(-)	(+)
2	25	M	20	9.0	3.6	(+)	(-)	(-)	(+)
3	21	F	7	12.0		(+)	(-)	(-)	(+)
4	52	M	13	0.7	6.4	(+)	(+)	(-)	(-)
5	22	M	6	20.0		(+)	(-)	(-)	(-)
6	62	F	5	6.7	10.9	(+)	(+)	(-)	(-)
7	22	M	20	6.7	0	(+)	(-)	(+)	(-)
-----									
8	58	M	13	0	3.5	(+)	(+)	(-)	(-)

RRF=ragged-red fiber; CCO(-)=cytochrome c oxidase negative;  
group.=grouping; atr.=atrophy; hypertr.=hypertrophy;

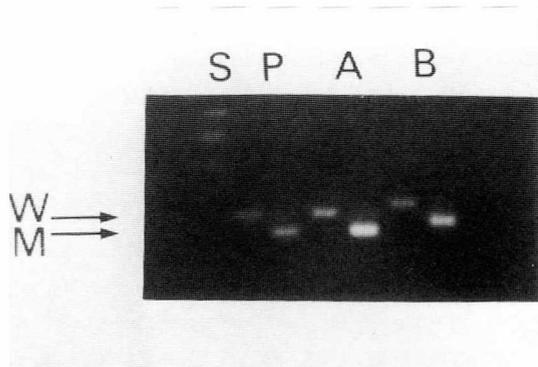


図4 mtDNAの電気泳動像。S: size marker ( $\phi$ -Hae III), P(患者:症例8), A(症例1), B(症例3)はそれぞれ, Nae IIIで未処理のもと, Nae IIIにより切断したものと2種類の泳動が示されている。W, Mはそれぞれ wild type, mutant typeの位置を示している。患者(症例8)は9 bp deletionをともなうA(症例1)と同じ泳動パターンである。

的なものと思われる。

### MERRF 症例の筋生検所見の比較

我々は、上記症例の他に、7例のMERRFを経験している。それらの組織学的にも診断の出来た症例と筋生検所見について比較、検討してみた(表)。

結果:年齢、臨床経過は様々であるが、ragged-red fiberの出現頻度は1例で0.7%というのを除き、6%から20%であった。全例でsmall angulated fiberがみられ、タイプI線維またはタイプII線維のtype grouping, タイプII線維萎縮, target fiberなどがみられた。Ragged-red fiberという点を除いては筋線維の内部構築の異常などmyopathicの所見はほとんど見られず、基本的には神経原性の変化であった。

### 考 察

MERRFでは60%以上の患者で深部反射は消失しており、深部反射の亢進する症例は稀である<sup>9)</sup>。したがって、今回の症例のように深部反射が亢進し、筋萎縮が末期まで明らかではなく、

DRPLAとは臨床的には区別できない症例はMERRFとしても稀である。筋の組織学的検索でもragged-red fiberが全く0%というのは稀かもしれないが、ミトコンドリア異常という点を除けば基本的には神経原性の所見であり、DRPLAとは区別できない。この症例では、ミトコンドリアDNAの分析によりMERRFの診断が確定された。家族歴でもDRPLAとは矛盾せず、ミトコンドリアDNAの分析無くしてはMERRFを否定することはできなかった。

### 結 論

- 1) MERRFの筋生検所見は、ragged-red fiberという点を除いては基本的には神経原性変化である。Ragged-red fiberがみられず、ミトコンドリアDNAの分析なくしてはMERRFの診断が出来ない症例がある。
- 2) MERRFの症例には、深部反射が亢進し、筋萎縮が末期まで明らかではなく、DRPLAとは区別の出来ない症例がある。

### 文 献

- 1) Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, et

- al: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities) : Disease entity or a syndrome? Light- and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci* 47: 117—133, 1980.
- 2) Naito H and Oyanagi S: Familial myoclonus epilepsy and choreoathetosis ; hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Neurology* 32: 798—807, 1982.
  - 3) Yoneda M, Tanno T, Nonaka I, Miyatake T and Tsuji S: Simple detection of tRNA<sup>Lys</sup> mutation in myoclonus epilepsy associated with ragged - red fibers (MERRF) by polymerase chain reaction with a mismatched primer. *Neurology* 41: 1838—1840, 1991.
  - 4) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, et al: Myoclonus epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell* 61: 931—937, 1990.
  - 5) Fukuhara N: Strokeliike episodes in MERRF. *Ann Neurol* 18: 368, 1985.
  - 6) Fukuhara N: MERRF : a clinicopathological study. Relationships between myoclonus epilepsies and mitochondrial myopathies. *Rev Neurol (Paris)* 147: 476—479, 1991.

## 33) ミトコンドリア脳筋症における血管病変

後藤 雄 一\*

研究協力者 松岡 太郎\* 作田 亮 一\*  
長谷川 ひとみ\* 埜 中 征 哉\*

### はじめに

卒中様症状を伴うミトコンドリア病 (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes; MELAS) の剖検例の電顕による検索で、その中枢神経系の小・中動脈の平滑筋細胞内に異常なミトコンドリアの集積が観察された。中枢神経系のこの血管病変と、MELAS に特徴的な反復する卒中様症状との関連が注目された<sup>1)</sup>。

その後、MELAS の骨格筋においても、その筋内小動脈の平滑筋細胞にミトコンドリアの数および形態の異常が電顕レベルで確認された。MELAS における血管病変は中枢神経系に限局したものではなく、全身性のものである可能性が示唆されたのである<sup>2)</sup>。

私達は、MELAS の骨格筋を組織化学的、および電顕的に検索し、以下の所見を得た<sup>3)</sup>。

- ① MELAS の骨格筋の凍結切片に、succinate dehydrogenase (SDH) 染色を行うと、動脈壁が顆粒状に濃く染まる筋内小動脈が観察される。
- ② 連続切片を電顕的に処理すると、この SDH 染色で濃染する動脈壁では、その平滑筋細胞に異常なミトコンドリアの集積が確認される。
- ③ すなわち、小動脈の平滑筋細胞におけるミトコンドリアの数および形態異常を、SDH 染色にて光顕レベルで確認できる。

私達はこの異常な筋内小動脈を MELAS の診断、および病態の解明上有用な所見と考え、

strongly SDH-reactive blood vessels (SSV) と呼び報告してきた<sup>3)</sup>。今回私達は、MELAS 以外のミトコンドリア脳筋症における SSV の有無を調べ、その病型による違いにつき検討したので報告する。

### 対象と方法

臨床所見および筋病理所見より診断した以下の症例を対象とした。

- ① MELAS50例 (ミトコンドリア DNA の検索を行った47例中、38例に塩基番号3243の、3例に塩基番号3271の点変異有り)
- ② ragged-red fibers を伴うミオクローヌスてんかん (MERRF; myoclonus epilepsy with ragged-red fibers) 7例 (全例にミトコンドリア DNA 塩基番号8344の点変異有り)
- ③ 慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO; chronic progressive external ophthalmoplegia) 50例 (ミトコンドリア DNA の検索を行った45例中37例にサザン法にて欠失を検出)
- ④ 臨床的にいわゆる Leigh 脳症が疑われ、骨格筋を用いた組織化学的および生化学的検討にてチトクローム c 酸化酵素 (CCO) 欠損が確認された8例
- ⑤ ミトコンドリア脳筋症以外の神経筋疾患100例 (進行性筋ジストロフィー57例、遠位型ミオパチー2例、筋緊張性ジストロフィー8例、先天性非進行性ミオパチー10例、糖原病3例、炎症性筋疾患10例、神経原性筋疾患10例)  
生検骨格筋の連続凍結切片に Gomori トリクロ

\* 国立精神・神経センター神経研究所

ーム変法染色とSDH染色を行い、前者で小動脈と同等された血管につき、後者にてSSVかどうかの判定を行った。SSVを多数認められたMELASとMERRFにおいては、さらに連続凍結切片にSDH染色とCCO染色を行い、前者で確認されたSSVにつき、後者にてその動脈壁のCCO活性を組織化学的に検討した。

## 結 果

各病型におけるSSVの陽性率を表1に示す。

MELASにおいては、50例中42例、84%の症例にSSVを認めた。小動脈あたりでは、502本中175本、35%がSSVであった。

MERRFにおいては、7例中6例にSSVが陽性であった。高乳酸血症および脳波異常が認められるものの無症状で経過している、患者の母の生検骨格筋にもSSVが存在した。卒中様症状を合併したものはなかった。小動脈あたりでは、80本中28本、35%がSSVであった<sup>4)</sup>。

CPEOにおいては、50例中2例にSSVを認めた。SSV陽性の2例では、それぞれ小動脈10本中5本、5本中3本がSSVであった。この2例にはともに卒中様症状はなかったものの、うち1例に明らかな知能障害があった<sup>5)</sup>。

CCO欠損を伴ういわゆるLeigh脳症 [Leigh (CCO def.)] では、8例中2例にSSVが陽性であった。卒中様症状の既往のあるものはなかった。小動脈あたりでは、79本中11本、14%がSSVであった。

ミトコンドリア脳筋症以外の神経筋疾患 (Control) では、筋緊張性ジストロフィー8例中の1例

表1 今回対象とした症例のSSV陽性率。各病型ごとに症例あたり、および小動脈あたりの値を示す。

	Patients		Vessels	
	Total	with SSV	Total	SSV
MELAS	50	42 (84%)	502	175 (35%)
MERRF	7	6 (86%)	80	28 (35%)
CPEO	50	2 (4%)	289	8 (3%)
Leigh (CCO def.)	8	2 (25%)	79	11 (14%)
Control	100	1 (1%)	783	5 (1%)

に明らかなSSVが認められた以外、SSV陽性のものはなかった。

次にSSVが多数認められたMELASとMERRFにつき、SSVの動脈壁のCCO活性を組織化学的に検討した。図に示すように、MELASにおいては、SDH染色で表出されるミトコンドリアの集積に対応して、CCO染色で動脈壁が強く陽性に染まっていた。これに対し、同じく図に示すように、MERRFにおいては、ミトコンドリアの集積にもかかわらず、SSVの動脈壁はCCO活性が陰性であった<sup>4)</sup>。

MELASおよびMERRFにおけるSSV動脈壁のCCO染色性を表2に示す。MELASでは、検討した175本のうち、82%のSSVがCCO活性陽性であった。これに対し、MERRFでは、検討した28本のSSV中、CCO活性陽性のものはなかった<sup>4)</sup>。

## 考 察

今回の検討で、MELASのみならずMERRFにもSSVが高率に認められること、他のミトコンドリア脳筋症においても頻度は低いもののSSVが存在すること、そしてSSVはミトコンドリア脳筋症以外の神経筋疾患では例外的にしか認められないこと、が明らかになった。私達はこのことより、SSVはミトコンドリアの機能異常を強く反映する形態異常所見で、ミトコンドリア脳筋症の有力な診断根拠になると考えた。この意味で、血管におけるSSVの所見は、筋線維におけるragged-red fibers (RRF) の所見と同じ意義をもつものと思われた。

RRFがミトコンドリア脳筋症以外の神経筋疾患でも時に認められることは、よく知られている。

表2 MELASとMERRFのSSVのCCO染色性。はっきりと陽性(+)、あるいは陰性(-)と判定できないものは、(±)とした。

	SSV	CCO staining		
		(+)	(±)	(-)
MELAS	175	144 (82%)	26	5
MERRF	28	0 (0%)	4	24

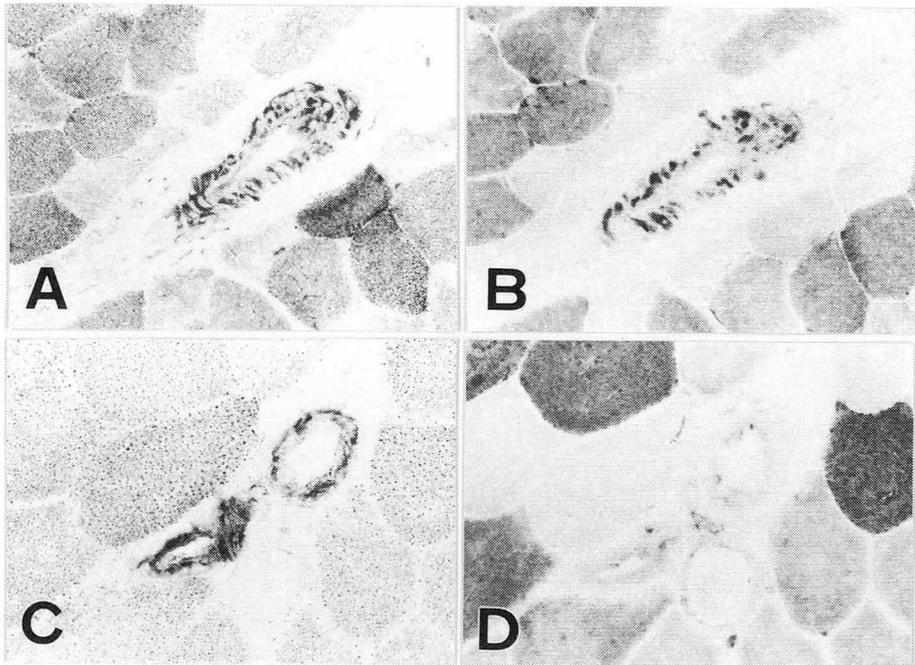


図 MELAS と MERRF の SSV. MELAS の SSV (A)は、連続切片で見ると、その動脈壁のミトコンドリアの集積に対応して CCO 活性が強陽性である(B). これに対し、MERRF の SSV (C)では、その動脈壁のミトコンドリアの集積にもかかわらず、CCO 活性が陰性である(D). A, C: SDH 染色. B, D: CCO 染色. A, B:  $\times 300$ , C, D:  $\times 400$ .

特に、筋緊張性ジストロフィーは、筋病理学的にしばしば RRF や CCO の部分欠損を呈し、またミトコンドリア DNA の検索にて欠失が認められるなど、ミトコンドリア異常が指摘されている疾患である。この筋緊張性ジストロフィーの一例で明らかな SSV が認められたことは注目される。

ミトコンドリア脳筋症各病型における SSV の陽性率は、MELAS や MERRF と、他の病型との間には明らかな差があった。この違いが、MELAS や MERRF における卒中様症状や知能障害などの中枢神経系症状の出現に関与している可能性は否定できない<sup>4,5)</sup>。今後は、この骨格筋にみられた血管病変が中枢神経系にも同じく存在することの確認を、剖検例にて行う必要がある。さらに、CPEO や Leigh 脳症でみられた少数の SSV 陽性例につき、その臨床経過の詳細な追跡が必要と思われた。

SDH 染色だけでは区別のできない MELAS と

MERRF における SSV も、その動脈壁の CCO 活性は対照的であった<sup>4)</sup>。すなわち、同じ形態異常として現れる SSV でも、その機能的な面では異なることが示唆された。この MELAS と MERRF における血管平滑筋細胞のミトコンドリア酵素異常の違いは、それぞれの筋線維のミトコンドリア酵素異常の違いを再現している可能性が高い。今後は、この SSV のミトコンドリアの酵素異常の違いが、血管全体としてどのような機能異常の違いを引き起こすのかの解明が課題であると思われた。

## 文 献

- 1) Ohama E, Ohara S, et al: Mitochondrial angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalomyopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 74: 226, 1987.
- 2) Sakuta R, Nonaka I: Vascular involvement

- in mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 25: 594, 1989.
- 3) Hasegawa H, Matsuoka T, et al: Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Ann Neurol* 29: 601, 1991.
- 4) Hasegawa H, Matsuoka T, et al: Cytochrome *c* oxidase deficiency in MERRF blood vessels. (submitted).
- 5) 長谷川ひとみ, 松岡太郎ほか: Ragged-red fiber を伴なう慢性進行性外眼筋麻痺症候群における血管病変—生検筋での検討—. *臨床神経学* (印刷中).

# 34) Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) の組織障害機序に関する研究

田 中 恵 子\*

研究協力者 丹 野 芳 範\* 米 田 誠\* 辻 省 次\*  
宮 武 正\*\* 山 田 光 則\*\*\* 若 林 孝 一\*\*\*  
武 田 茂 樹\*\*\* 生 田 房 弘\*\*\* 田 中 雅 嗣\*\*\*\*  
小 澤 高 將\*\*\*\*

Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) は、動作性ミオクローヌス、小脳失調、てんかん、筋萎縮を中核症状として緩徐に進行するミトコンドリア脳筋症の一型である<sup>1)</sup>。本症は病理学的に、歯状核-赤核系、淡蒼球-視床下核系、黒質、橋被蓋、小脳皮質、下オリブ核、青斑核、さらに Friedreich 病で見られる脊髄後索、後根、クラーク柱などに病変を認める系統変性疾患である<sup>2)</sup>。MERRF は母系遺伝を呈することから、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の異常が考えられていたが、Schoffner ら<sup>3)</sup>、米田ら<sup>4)</sup>により本症患者 mtDNA の tRNA<sup>Lys</sup> 塩基番号8344のAがGに置換していることが明らかになり、本症診断の“hallmark”として頻用されるようになった。

神経変性疾患は、それぞれ一定の組織系統に変性を生じることから病型が分類されるが、その選択的組織障害機序は不明のままである。そこで、MERRF において組織障害の程度と mtDNA 異常に基づく組織のエネルギー代謝障害のレベルの関係を明らかにする目的で以下の検討を行った。

## 対象と方法

### 対象

臨床像および病理学的所見、mtDNA 解析の結果から典型的であった MERRF の 2 症例の剖検組織各部位を分析対象とした。

### 方法

#### 1) 変異 mtDNA の組織内存在比の定量

患者の剖検臓器より genomic DNA を抽出した後、後述するような PCR の変法を用いて、各臓器における変異型 mtDNA の割合を定量した。

使用した primer は、sense (5'-AAAC-CACAGTTTCATGCCCA : 塩基番号8,190-8,210) 及び antisense (5'-TCACTGTAAGAG-GTGCCGG : 塩基番号8,345-8,364の mismatched primer) である。この mismatched primer を用いることにより、PCR の結果、変異型 mtDNA は新たに制限酵素 NaeI の認識部位が出現し、2本の DNA 断片に切断される。しかしながら変異型と野生型が annealing した heteroduplex が定量性をそこなうことが考えられ、その解決のため PCR の最後の 1 cycle にのみ  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP により 5'-end labeling した primer を加え良好な定量性を得ることができた。定量性の確認のため、MERRF 患者の tRNA<sup>Lys</sup> 領域を含む塩基番号8,191-8,364の領域をクローン化し、正常のクローンと変異を持ったクローンを種々の比率で混合して PCR を行い、富士の imaging analyser

\*新潟大学脳研究所神経内科

\*\*東京医科歯科大学医学部神経内科

\*\*\*新潟大学脳研究所実験神経病理

\*\*\*\*名古屋大学医学部第二生化学

を用いて回帰直線を求め、実際に template として使用した比率によく一致する結果が得られた。

2) 電子伝達系酵素各複合体に対する抗体を用いた免疫組織化学

剖検時採取された MERRF の各組織は、4%パラフォルムアルデヒドで固定後、パラフィンに包埋し、10 $\mu$ m 厚の切片を作製した。抗体は牛心筋から精製した複合体 I・III・IV・V を家兎に免疫して得られた抗体を用い、200倍に希釈して4°Cで一晩反応させた後、ABC法、ジアミノベンチジンで染色した。連続切片を Kluver-Barrera で染色し、神経細胞を計数し、免疫染色された神経細胞数の比率を求めた。

## 結 果

### 1) 変異型 mtDNA の組織内存在比の定量(表)

症例1では、大脳皮質の mtDNA の96%、小脳皮質97%、腎臓97%、骨格筋97%が変異型 mtDNA であった。症例2では、変異型 mtDNA の比率は前頭葉皮質82%、同白質97%、側頭葉皮質93%、小脳皮質94%、小脳白質95%、脊髄93%、後根神経節95%、心筋94%、腎皮質90%、腎髄質91%、

表 変異 mtDNA の臓器別存在比

症例 1

大 脳 皮 質	96	腎 臓	97
小 脳 皮 質	97	骨 格 筋	97

症例 2

前 頭 葉 皮 質	82	後 根 神 經 節	95
側 頭 葉 皮 質	93	心 臓	94
前 頭 葉 白 質	97	腎 皮 質	90
小 脳 皮 質	94	腎 髄 質	91
小 脳 白 質	95	副 腎	80
脊 髄	93	横 隔 膜	92

副腎80%、横隔膜92%と部位にかかわらず高率であった。

2) 電子伝達系酵素各複合体に対する抗体を用いた免疫組織化学

症例1および2の生検時得られた骨格筋では、2例とも複合体IVの活性が著明に低下していたため、対照として組織学的に正常な剖検脳各部位で複合体IVに対する抗体で免疫染色を行ったが、どの部位も神経細胞は明瞭に染色された。次に剖検時得られた MERRF の前頭葉、淡蒼球、歯状核、海馬について、複合体 I・III・IV・V それぞれに対する抗体で免疫染色を行ったところ、組織学的にはほぼ正常な前頭葉・海馬でも、神経細胞の中等度脱落を認める歯状核・淡蒼球でも同様に、複合体 I および IV の染色性が著明に低下しており (I : 1~2%、IV : 6~48%)、III および V に対する染色性は保たれていた (III : 63~86%、V : 62~74%)。 (図1, 2)

## 考 察

MERRF は臨床的・病理学的に系統変性疾患としての病像を呈し、母系遺伝の明らかなミトコンドリア脳筋症である。本症では mtDNA の tRNA<sup>Lys</sup> に点変異が存在することが明らかになり、さらに組織内で変異型と野生型 mtDNA が heteroplasmy の状態で存在することが明らかにされている<sup>3)</sup>。我々は本症の選択的組織障害が変異 mtDNA の存在量、ひいてはその結果として生じる電子伝達系酵素の合成障害によるエネルギー代謝障害の程度と並行関係にあるか否かを検討した。そのためには、変異 mtDNA の定量を正確に行う必要があるが、昨年度報告した mismatched primer を用いた PCR-RFLP 法では、PCR の増幅過程で正常 mtDNA 同士、変異 mtDNA 同士の homoduplex 以外に野生型と変異型が annealing する heteroduplex が生じると考えられ、この heteroduplex は NaeI で消化されないことから変異型 mtDNA の比率を underestimate する可能性があった。そこで今回は、PCR を labeling されていない primer にて開始し、最後の cycle のみに 5'-end labeling した primer を加えることでこ

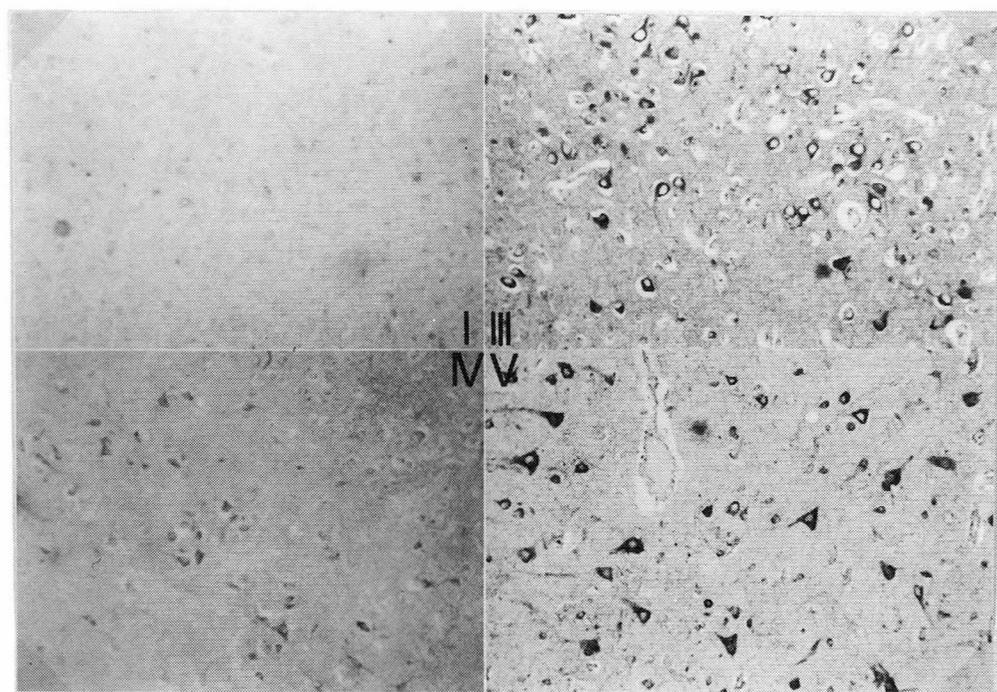


図1 MERRF 患者前頭葉の抗複合体抗体での免疫染色

左上：抗複合体 I 抗体，左下：抗複合体IV抗体，右上：抗複合体III抗体，右下：抗複合体V抗体

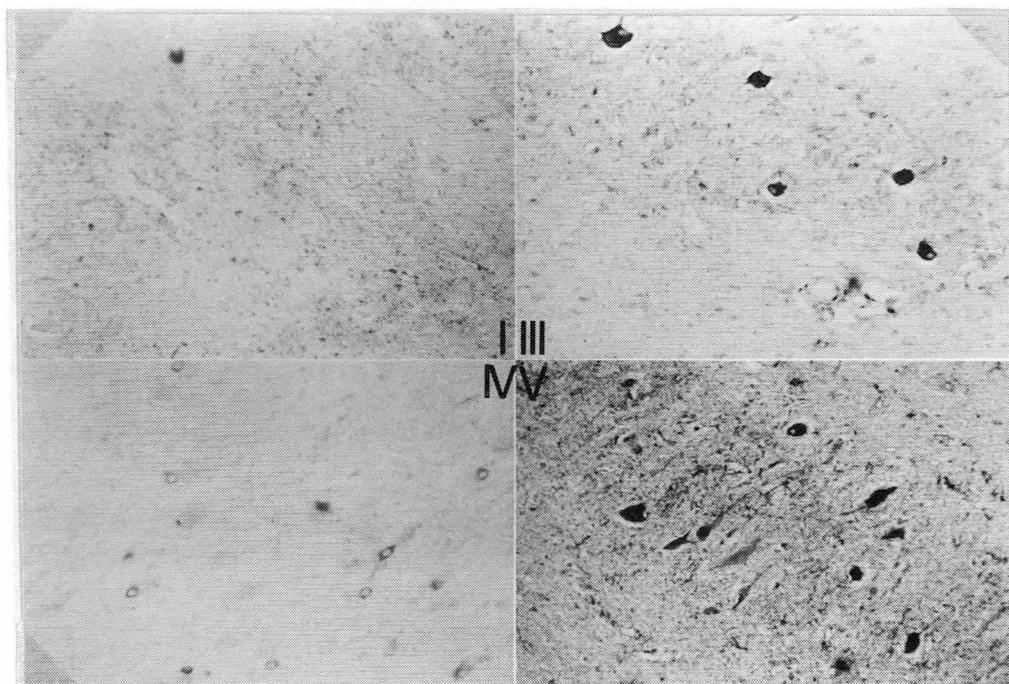


図2 MERRF 患者歯状核の抗複合体抗体での免疫染色

左上：抗複合体 I 抗体，左下：抗複合体IV抗体，右上：抗複合体III抗体，右下：抗複合体V抗体

の問題を解決した<sup>5)</sup>。この方法で定量した変異型 mtDNA の量は、組織障害の程度にかかわらずほぼ一定で82~98%と高比率であった。PCRを用いる定量法では、組織を一塊として処理するため個々の神経細胞における動態も確認しておく必要があり、抗体を用いて電子伝達系酵素各複合体の合成を細胞レベルで検討した。この免疫染色の結果も組織の変性程度と無関係で、複合体 I および IV に対する抗体の染色性は一様に低下し、III および V は保たれており、mtDNA にコードされる subunit の数に依存するという結果であった。以上のように本症の組織障害は変異 mtDNA 量の多寡のみでは説明が困難であるが、ミトコンドリア脳筋症各病型の中枢神経組織内変異 mtDNA の存在比の報告と比べてみると、MELAS では84%<sup>6)</sup>、KSS の欠失 mtDNA は45%<sup>7)</sup>とされ MERRF の93%は特に多い。そのため MERRF では組織のエネルギー代謝障害に対する代償能力が乏しいと考えられ、虚血やエネルギー需要に感受性が高い一連の組織に障害が生ずる可能性はある。しかしながら、エネルギー産生能力の高低のみで MERRF と MELAS や KSS といった病像の差が生ずるとは考えにくい。unclearDNA による制御機構など、いまだ明らかにされていない組織固有の factor についても今後検討が必要と思われる。

#### 文 献

- 1) Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K and Tsubaki T: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities); disease entity or a syndrome. *J Neurol Sci* 47 : 117-133, 1980.
- 2) Takeda S, Wakabayashi K, Ohama E and

Ikuta F: Neuropathology of myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (Fukuhara's disease). *Acta Neuropathol* 75 : 433-440, 1988.

- 3) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW and Wallace DC: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell* 61 : 931-937, 1990.
- 4) Yoneda M, Tanno Y, Horai S, Ozawa T, Miyatake T and Tsuji S: A common mitochondrial DNA mutation in the tRNA<sup>Lys</sup> of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. *Biochem Inter* 21 : 789-796, 1990.
- 5) Tanno Y, Yoneda M, Nonaka I, Tanaka K, Miyatake T and Tsuji S: Quantitation of mitochondrial DNA carrying tRNA<sup>Lys</sup> mutation in MERRF patients. *Biochem Biophys Res Comm* 179 : 880-885, 1991.
- 6) Ciafaloni E, Ricci E, Servidei S, Shanske S, Silvestri G, Manfredi G, Schon EA and DiMauro S: Widespread tissue distribution of a tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mutation in the mitochondrial DNA of a patient with MELAS syndrome. *Neurology* 41 : 1663-1665, 1991.
- 7) Shanske S, Moreas CT, Lombes A, Miranda AF, Bonilla E, Lewis P, Whelan MA, Ellsworth CA and DiMauro S: Widespread tissue distribution of mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 40 : 24-28, 1990.

## 35) ミトコンドリア脳筋症における筋プリン体代謝に関する研究

垂井清一郎\*

研究協力者 嶺尾郁夫\*\* 河野典夫\*\* 西村隆通\*\*  
大野昭\*\* 川知雅典\*\* 桑島正道\*\*  
曾我文久\*\*\* 西川嘉郎\*\*\* 上野聡\*\*\*  
依藤史郎\*\*\*

### はじめに

ミトコンドリアは、TCA サイクル、脂肪酸 $\beta$ 酸化、電子伝達系に関する酵素群を内包し活発にATPを合成する細胞内小器官であり、細胞のエネルギー工場とも呼ばれる。heterogenousな疾患群からなるミトコンドリア脳筋症の臨床像は多様であるが、ミトコンドリアの機能異常に基づいて、骨格筋や脳などエネルギー要求の強い組織に障害が現われ易い点で共通している。私どもは、グリコーゲン病III型(脱分枝酵素欠損症)、V型(筋ホスホラーゼ欠損症)、VII型(筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症)において運動時に筋肉のプリン分解が著しく亢進する結果、高尿酸血症が発現することを明らかにしてきた(筋原性高尿酸血症, myogenic hyperuricemia)<sup>1)~3)</sup>。同様の病態は、副甲状腺機能低下症や甲状腺機能低下症など内分泌疾患に伴う続発性ミオパチーにおいても発現することを見だし<sup>4)5)</sup>、筋原性高尿酸血症が筋肉のエネルギー代謝の障害(エネルギー危機)に広く共通する病態と考えるに至った。そこで本研究では、ミトコンドリア脳筋症について、筋運動時のプリン・尿酸代謝を分析した。

### 方 法

患者：臨床像、筋生検、ミトコンドリアDNA分析を通じて診断確定した5例のミトコンドリア脳筋症患者を対象とした。それぞれの特徴を表に示した。全例で、exercise intoleranceを認めている。症例N.N.は高尿酸血症(7.2mg/dl)を呈するが、他の症例では血清尿酸値は正常であった。コントロール群として、6例の健常人(男性5名、女性1名)を検索した。

方法：昼食を絶食し、少なくとも30分以上の安静の後、自転車エルゴメーター運動を実施した。運動負荷量は15Wから開始し、患者の運動能力に応じて漸次増加した。各負荷量について運動時間は5~15分間とし、5分間の休息の後、次の運動負荷を再開した。患者が疲労を訴えたところで運動試験を終了した。症例S.S.とH.Y.は15W、症例N.N.は20W、症例M.K.は35W、症例N.T.は50Wまでの運動を行うことができた。健常コントロールについては、症例N.T.に準じた運動負荷を行なった。運動後は安静を保ち、肘静脈より経時的に採血した。既に報告したように<sup>1)</sup>、血清尿酸・血漿乳酸・血漿アンモニアは酸素法で、血漿ヒポキサンチンはHPLC法で測定した。

### 結 果

図に、自転車エルゴメーター運動による、各メタボライトの血中変動を示した。いずれの患者に

\* 大手前病院 (国家公務員等共済組合連合会)

\*\* 大阪大学医学部第二内科

\*\*\* 大阪大学医学部神経内科

表 ミトコンドリア脳筋症患者の特徴

Patient (Age/Sex)	H.Y. (36/F)	S. S. (36/M)	N.T. (30/F)	M. K. (44/F)	N.N. (39/F)
Diagnosis	KSS	KSS	CPEO	Oculopharyngeal	MELAS
Ragged-red fibers	+	+	+	+	+
Exercise Intolerance	+	+	+	+	+
mt DNA Abnormality*	N.D.	N.D.	Deletion (5.2 kb)	-	tRNA for Leu 3243A to G

KSS: Kearns-Sayre Syndrome, CPEO: chronic external ophthalmoplegia

MELAS: mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes

\* N.D.: not determined, -: not detected

においても乳酸は運動後に著しく増加した(図-A)。一方、通常コントロールでは、この程度の運動負荷に対して乳酸はほとんど変動しなかった。

アンモニアやヒポキサンチン(図-B, C)も、健常コントロールでは筋運動による変動をほとんど認めないのに対して、患者では明瞭に増加した。特に症例 H.Y. では、患者群の中で最も軽い負荷量にかかわらず、アンモニアやヒポキサンチンの増加が顕著であった。

血清尿酸は、症例 H.Y. と M.K. と N.N. において運動後の増加を認めた(図-D)。

### 考 察

本研究で検討したミトコンドリア脳筋症患者は、いずれも、筋運動に対しアンモニアやヒポキサンチンの過大な増加反応を示した。アンモニアやヒポキサンチンは、筋肉におけるプリン分解に由来するメタボライトであり ATP → ADP → AMP → IMP (+アンモニア) → イノシン → ヒポキサンチン → 尿酸の反応により生じる。私共は、エネルギー代謝障害を示す代表的な筋疾患であるグリコーゲン病Ⅲ型、Ⅴ型、Ⅶ型において、運動によってプリン分解が著しく亢進することを明らかにした<sup>1)~3)</sup>。その後、グリコーゲンと並ぶ重要な筋肉のエネルギー基質である脂肪酸の利用が障害されるカルニチン・パルミトイルトランスフェラーゼ欠損症においても、筋プリン分解の亢進することが報告されている<sup>6)</sup>。ミトコンドリア脳筋症では、ミトコンドリア機能の異常によって、運動時にエ

ネルギー危機に陥り筋プリン分解が亢進すると考えられる。

ミトコンドリア脳筋症における *in vivo* の筋エネルギー代謝について、これまで<sup>31</sup>P-NMR を用いた分析がなされている<sup>7)8)</sup>。その結果アデニンヌクレオチド代謝の異常が示唆されているが、筋プリン分解の亢進を示した本研究の成績はこれを立証するものである。

筋グリコーゲン病では、筋肉のプリン分解が著しく亢進する結果、運動後に高尿酸血症が発現する。私どもはこの病態を筋原性高尿酸血症(myogenic hyperuricemia)と呼んでいる。本研究においても、3例の患者で運動後に血清尿酸の増加が認められた。筋肉での乳酸産生が欠如する筋グリコーゲン病とは対照的に、筋運動後に著しい高尿酸血症を呈するのがミトコンドリア脳筋症の特徴である。このため、ミトコンドリア脳筋症においては腎からの尿酸排泄が阻害される結果、運動後に血清尿酸が増加する可能性が考えられる(腎性機序)。実際、本研究で検討した患者においても、運動後に高尿酸血症(図-A)と尿酸排泄の低下(data not shown)が認められた。しかし、血清尿酸値の上昇は、患者群の中で特に筋プリン分解の著しい症例(H.Y., M.K.)で明瞭に認められた。一方、これらの症例と同等の高尿酸血症を呈したがプリン分解はそれほど激しくない症例 S.S. においては、血清尿酸の上昇は認められなかった。また、症例 M.K. と同程度の筋プリン分解を示したグリコーゲン病Ⅶ型患者は、やはり症例 M.

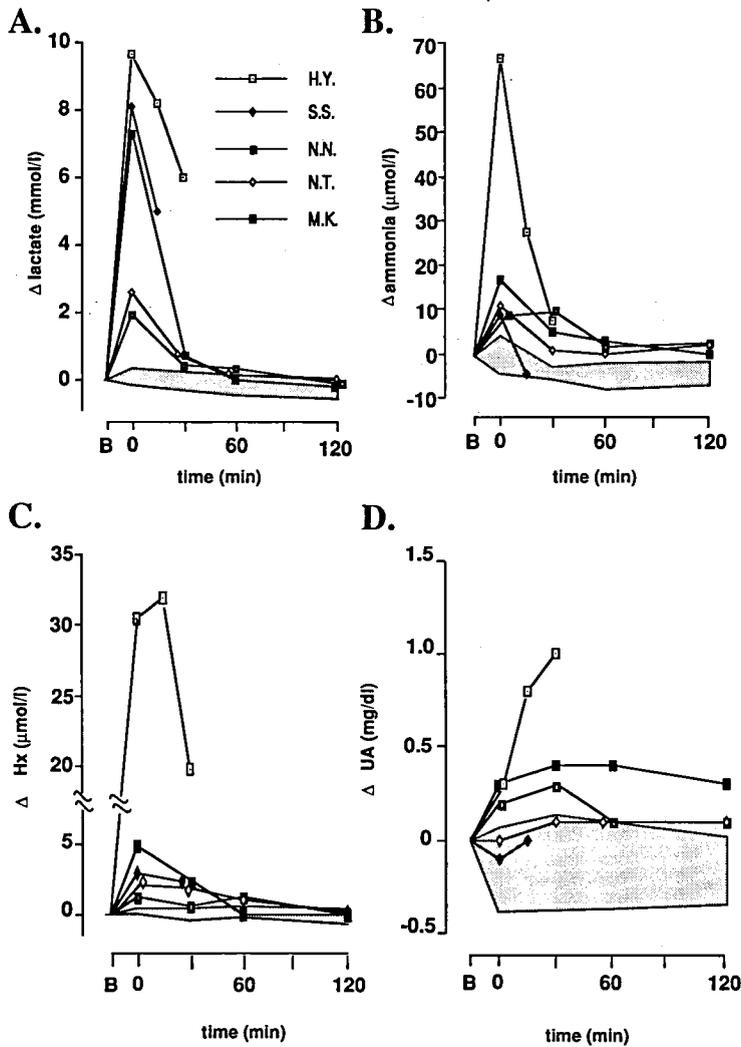


図 ミトコンドリア脳筋症における自転車エルゴメーター運動後の乳酸とプリン代謝物の血中変動。斜線部は、健常コントロール(M±SD)を示す。

K.と同程度の血清尿酸の増加であった(未発表)。したがって、ミトコンドリア脳筋症においても、筋プリン分解亢進に基づいた筋原性高尿酸血症が発現すると考えられる。

#### まとめ

5例のミトコンドリア脳筋症患者において自転車エルゴメーター運動試験を行い、血中メタボラ

イトの変動を分析した。アンモニアやヒポキサンチンは、運動後に異常増加し、運動筋におけるエネルギー危機に基づいてプリン体分解が亢進することを明らかにした。特に著しい筋肉のプリン分解を示した患者では、運動後に血清尿酸も増加し、本症においても筋原性高尿酸血症が発現すると考えられた。

### 参考文献

- 1) Mineo I, Kono N, Shimizu T, et al: Excess purine degradation in exercising muscles of glycogen storage disease types V and VII. *J Clin Invest* 76 : 556—560, 1985.
- 2) Kono N, Mineo I, Shimizu T, et al: Increased plasma uric acid after exercise in muscle phosphofructokinase deficiency. *Neurology* 36 : 106—108, 1986.
- 3) Mineo I, Kono N, Hara N, et al: Myogenic hyperuricemia: a common pathophysiologic feature of glycogenoses types III, V and VII. *New Engl J Med* 317 : 75—80, 1987.
- 4) Hara N, Mineo I, Kono N, et al: Enhanced release of ammonia and hypoxanthine from exercising muscles in patients with idiopathic hypoparathyroidism. *Muscle Nerve* 10 : 599—602, 1987.
- 5) Nishimura T, Mineo I, Shimizu T, et al: Myogenic hyperuricemia in hypoparathyroidism. "Human purine & pyrimidine metabolism" (ed by Elion GB et al) Plenum Publishing (in press).
- 6) Bertorini TE, Shively V, Taylor B, et al: ATP degradation products after ischemic exercise; hereditary lack of phosphorylase or carnitine palmyltransferase. *Neurology* 35 : 1355—1357, 1985.
- 7) Arnold DL, Taylor DJ, Radda GK, et al: Investigation of human mitochondrial myopathies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Ann Neurol* 18 : 189—196, 1985.
- 8) Argor Z, Bark WJ, Maris J, et al: Bioenergetic heterogeneity of human mitochondrial myopathies; phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *Neurology* 37 : 257—262, 1987.

## 36) Limb girdle syndrome を示したミトコンドリア・ミオパチー

佐 橋 功\*

研究協力者 衣 斐 達\* 中 尾 直 樹\* 周 防 弘\*  
田 代 伯 為\* 大 野 欽 司\*\*\* 田 中 雅 嗣\*\*\*  
小 澤 高 将\*\*\*

### 緒 言

Limb girdle syndrome (L-G Sy) は大凡6群に大別され炎症性ミオパチーである多発性筋炎や筋ジストロフィである大腿四頭筋ミオパチー (Becker 型 PMD) などがある<sup>1)</sup>。また L-G Sy の中で代謝性ミオパチーとして一部ミトコンドリア病の報告もなされている<sup>2)</sup>。本研究は L-G Sy を主徴とし、母系遺伝を示しミトコンドリア異常が世代を越え同一であった一家系に関し詳細な臨床・病理・分子遺伝学的検索結果を報告する。

### 症 例 報 告

愛知医科大学第四内科で過去5年間に実施した主な431生検筋のうち、L-G Sy は28例であり、その内7例は最近 Becker 型 PMD と判明し、さらに本家系例も含まれた。

症例1: 発端者, 52歳, 女性。先祖代々, 愛知県一地方の在住者である(図1)。近親婚はなく, 発端者の兄弟や子供の多数が乳幼児期に原因不明にて死亡し, 生存中の実子の一名が症例2である。主訴は頭部下垂, 頸部痛としゃがみ立ち困難。現病歴では38歳, 重い物を持ち上げ難くなり, 両上肢の筋力低下は次第に進行し, 頭部が前下がり(首下がり)となり自転車の昇降に際し転倒するようになった。45歳で自転車に乗れなくなり, 48歳には万歳・しゃがみ立ちが困難となり入院。小柄(148

cm, 体重34kg) であり, 肝・脾腫なし。前傾姿勢と円背, 下腹部は突出。二次性徴は正常で閉経は48歳。神経所見は知能障害・性格異常なし。眼瞼下垂・眼球運動障害は極軽度あったが, 難聴を含みこれらの自覚的愁訴はなかった。視力, 白内障・網膜変性なし。嚥下・構語は正常。顔面筋の軽度筋力低下, 広頸筋を含む頸部諸筋の高度の筋萎縮・筋力低下を認め, 四肢・体幹運動系の筋萎縮・筋力低下は近位筋とくに上肢帯筋により優位であった。動揺性歩行, 爪先・踵立ち可能, しゃがみ立ち不能。筋トヌスは低下し, 筋緊張反応・不随意運動・運動失調はなかった。深部反射消失, 病的反射陰性, 感覚・自律神経障害はなかった。主な異常検査所見では, 軽度ないし中等度の<sup>s</sup>-LDH, <sup>s</sup>-CK, <sup>s</sup>-myoglob., myosin 軽鎖 I の増加(12ng/ml)をみた。血清葉酸の低値, 染色体は14q, 1を含み異常なかった。脳波異常なし。筋電図は筋原性で一部に筋緊張反応をみた。胸 X-P は軽度の心拡大, 心電図は p-cardiale を認めた。骨格筋 CT では四肢近位筋優位(上肢帯>下肢帯)に低吸収・萎縮が認められた。頭部 CT では限局性(stroke 様)病変はなかった。内分泌検査は ACTH, cortisol の軽度異常, 甲状腺・副甲状腺ホルモン・耐糖能は正常。自転車運動負荷試験は, 血清中の乳酸(L 値)12.2→48.2mg/dl, ビルビン酸(P 値)0.88→1.58mg/dl, L/P 比13.86→30.51, 心拍数は85→104/分へ夫々異常増加した。髄液では L 値(24.2mg/dl), P 値(1.26mg/dl)の増加をみたが, 蛋白量は正常。テンシロン・テ

\* 愛知医科大学第四内科

\*\* 名古屋大学医学部神経内科

\*\*\* 名古屋大学医学部第二生化学

[ Family Tree ]

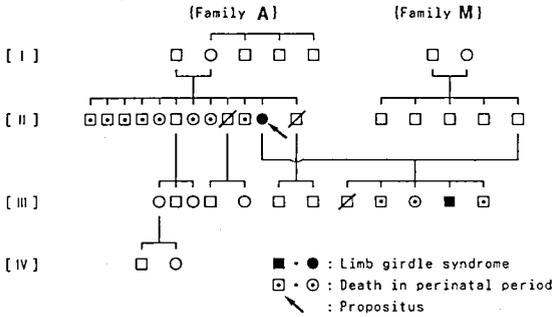


図1 家系図：斜線は検索された健常者を示す。

スト陰性。

症例2：症例1の第4子，24歳，男性。高卒。主訴は運動能力の低下。現病歴は幼小児期より小柄で痩せており，左眼外斜視があった。学校は休みがち，駆けっこは何時もビリ。10歳（小4）の冬，風邪引き後，四肢脱力が出現し，しゃがみ立ち・箸の持ち上げが出来なくなり筋生検にて“筋炎”と診断され，約2か月間の入院で緩解した。なお筋力低下の左右差，大脳の局所症状はなかった。高校卒業後に運動時に頭部下垂・円背が出現し，24歳入院。身体所見では小柄（156cm，32.5kg）であり，脈拍・心音に異常なし。扁平胸・円背で，肝・脾腫なく二次性徴は良好。神経所見は，知能正常，性格温厚。軽度の遠視，眼瞼下垂はなく，軽度の先天性左外斜視以外に眼球運動は正常，白内障・網膜変性なし。眼輪筋・口輪筋の極軽度筋力低下，広頸筋の軽度筋萎縮・筋力低下，嚥下良好，胸鎖乳突筋は中等度の筋萎縮・筋力低下。四肢・体幹運動系は上肢帯優位にび慢性筋萎縮があったが，握力，歩行，小走り，しゃがみ立ち・爪先・踵立ち，階段昇降は正常であった。運動失調はなく，深部反射は軽度減弱。すなわち症例1と極めて近似した臨床所見を呈した。異常検査所見では<sup>s</sup>-LDH，<sup>s</sup>-CK（MB型6.4%），<sup>s</sup>-myosin 軽鎖I，<sup>s</sup>-myoglob.，<sup>s</sup>-aldolase.の軽度増加と葉酸低値があり，抗mt抗体は陰性。その他血清銅の低値，IgG，IgEの増加。染色体に異常なく，代謝性acidosisなく，心電図・脳波・ERGに異常なかった。筋電図は軽度の筋原性変化，NCVは正常であ

った。筋CTでは腎筋の軽度萎縮があったが，大腿・下腿筋はほぼ正常。頭部MRIはやや年齢対照に比し皮質は萎縮傾向を認めたが，梗塞様病変はなかった。内分泌検査では17-KSのやや低値。自転車運動負荷試験では血清中のL値21.3→57.0mg/dl，P値1.27→2.30mg/dl，L/P比は16.77→24.87，心拍数は54→150/分へ変化した。血清アミノ酸分析はtaurine，phosphoethanolamine，aspartate，glutamate，cystine，arginineの軽度の異常がみられた。髄液中L値（39.6mg/dl），P値（1.78mg/dl）は高値であった。神経耳科検査にて耳小骨筋反応異常（あぶみ骨筋障害）による低音域の伝音性難聴に加え高音域の神経性難聴が軽度示されたが，ABRは正常であった。なお家系内で検索した症例1の兄・弟，症例2の兄は身体また臨床検査上の異常はなかった。

骨格筋病理所見

光顕筋生検は両症例とも上腕二等筋にて実施し，高度のragged-red fibers [RRF]，cytochrome c oxidase 活性陰性 [CCO (-)] 線維があり，RRFは必ずしもCCO (-) 線維と対応しなかった。その他strongly succinate dehydrogenase reactive blood vesselsは明瞭ではなかった。なお症例1では変性線維が多くまた間質結合織の増生に加え，rod formationまたcytoplasmic bodyをみた(図2)。なお症例2の10歳時パラフィン包埋切片のレビューでは炎症性病変はなく，中等度のRRFが確認された。電顕では巨大ミトコンドリア，桿棒状・線維様のミトコンドリア内封入体が明らかであった(図3)。

ミトコンドリア DNA (mtDNA) 解析

mtDNA解析は，骨格筋または末梢血より抽出して行った。サザン・プロット法では欠失はなく，PCR産物のApa I消化をtRNA<sup>Leu</sup>上の塩基番号3,243を含む530bpの領域にて実施した所，症例1，2の骨格筋にて3,243のA→G transitionをheteroplasmy型に確認したが3,271変異はなかった。なお母親の末梢血また検索しえた母方兄弟，症例2の兄にその変異を認めなかった(図4)。ま

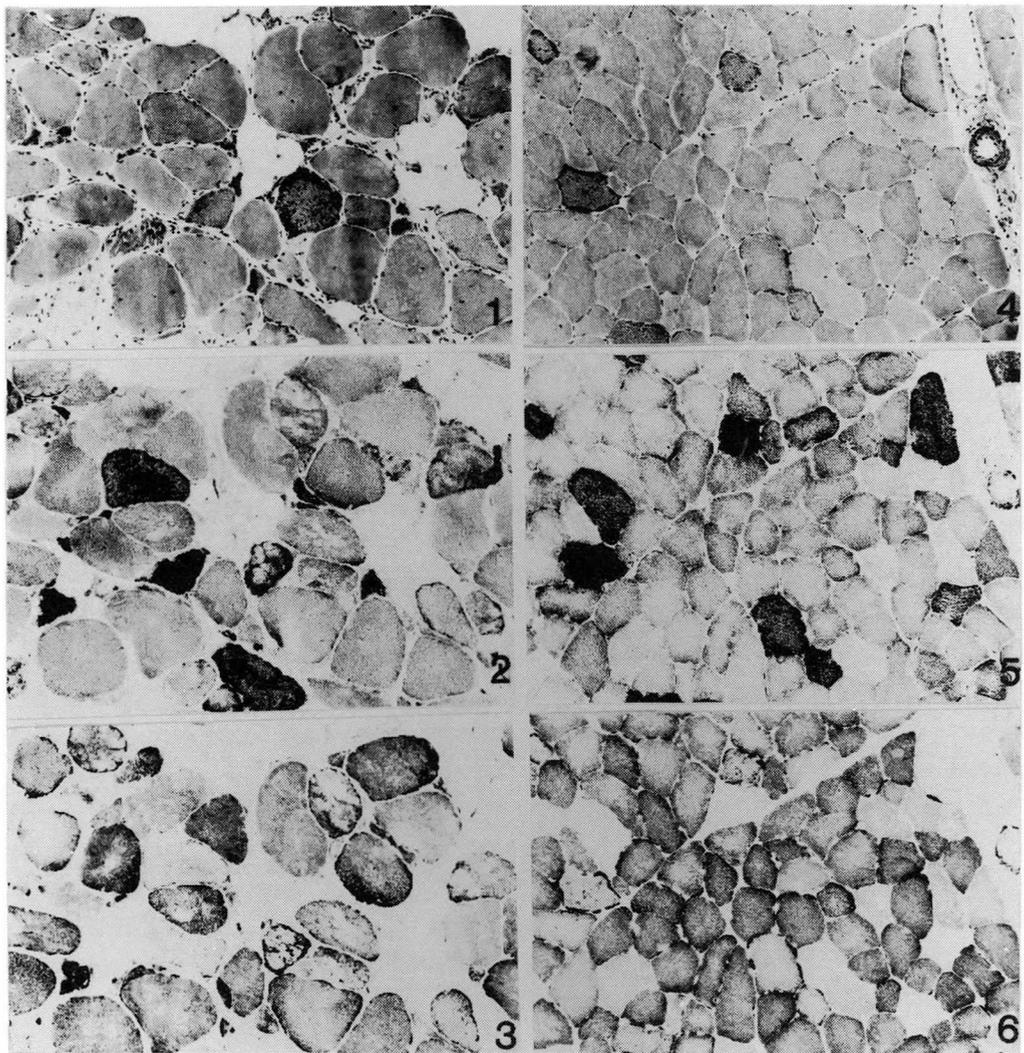


図2 骨格筋凍結連続切片所見(上腕二頭筋) Original mag.( $\times 200$ )  
 左列1, 2, 3: 症例1(母), 右列4, 5, 6: 症例2(子)  
 (上段1, 4: Gomori's modified trichrome  
 中段2, 5: Succinate dehydrogenase 活性染色  
 下段3, 6: Cytochrome *c* oxidase 活性染色)

た mtDNA の全周シーケンスを症例2で行ない Anderson<sup>3)</sup> の報告した塩基配列に比し変異した配列が tRNA<sup>L<sup>eu</sup></sup> 上の3,243 mutation を含み合計48個あり, mtDNA の翻訳領域においてアミノ酸の非同義置換をもたらす変異が12個, 同義置換をもたらす変異が16個, その他リボゾーム RNA 部に4個, D-loop を含む非翻訳領域に15個の一塩

基置換を認めた(表).

#### 考察及びまとめ

緩徐進行性の L-G Sy を呈したミトコンドリア・ミオパチーの母子例を報告した. ミトコンドリア・ミオパチーは慢性進行性外眼筋麻痺, MELAS, MERRF, LHON, 労作性ミオグロビン

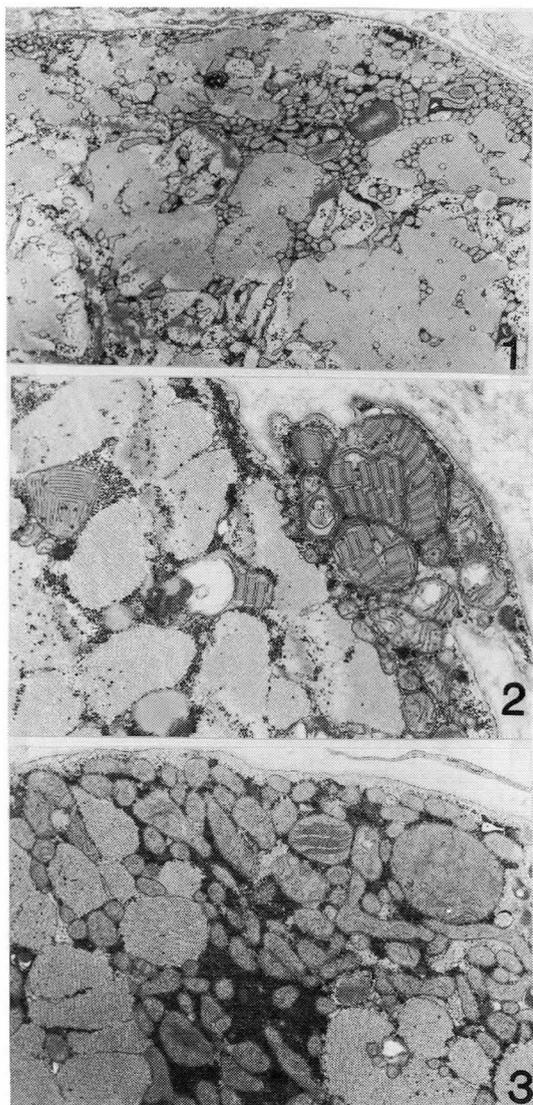


図3 電顕所見(上腕二頭筋)  
 上段1: 症例1(母), 中段2, 3: 症例2(子)  
 1. 筋鞘膜下に異常ミトコンドリアの集積と変性産物を認める.  $\times 4,500$   
 2. Parking-lot 型の封入体が巨大ミトコンドリア内に観察される.  $\times 11,250$   
 3. 線維性または amorphous な封入体を含む巨大ミトコンドリアが観察される. ( $\times 11,250$ )

尿症などを呈し多彩な臨床徴候が報告され, その病態に mtDNA の単一・多重欠失また点変異などが深く関与していることが明らかにされつつある。さてミトコンドリア・ミオパチーの中で L-G Sy を示す例が時に報告されている。しかしその病像は他の身体・神経症候(進行性外眼筋麻痺, 知能低下, 白内障, 網膜変性, 運動失調など)をむしろ主体とし, L-G Sy は強調されておらず, かつ詳細な記載もない。そして遺伝形式は孤発例<sup>1)</sup>, 常染色体性劣性<sup>2)</sup>または優性遺伝<sup>3)</sup>をとる疾患群に加え, 神経原性所見の一部として L-G Sy を来した疾患<sup>4)</sup>などがある。今回報告した母・子例は長期間におよぶ臨床経過にて進行性 L-G Sy を示し, 筋症を主体としたほぼ唯一の共通病態を呈し, 瘵

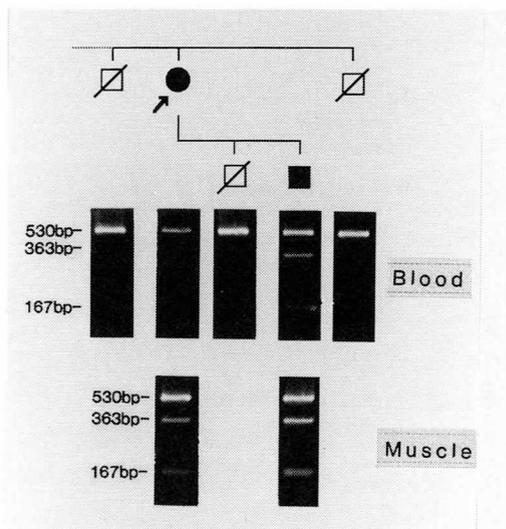


図4 ミトコンドリア DNA (mtDNA) 解析  
 骨格筋または末梢血より抽出して実施した。サザン・プロット法では欠失はなく, PCR 産物の *Apa I* 消化を tRNA<sup>Leu</sup> 上の塩基番号 3,243 を含む 530bp の領域にて実施した。  
 症例 1, 2 の骨格筋 mtDNA および症例 2 の末梢血 mtDNA にて 3,243 の A  $\rightarrow$  G transition により新たな切断点が確認された。なお mutant mtDNA と wild mtDNA は heteroplasmy を呈した。また母親の末梢血または検索した母方兄弟, 症例 2 の兄にはその点変異を認めなかった。矢印: 発端者, 斜線: 検索正常者。

表 Nucleotide mutations in whole mtDNA  
症例 2 の全周 mtDNA 解析における  
mtDNA 点変異

Region	Mutations
<b>Nonsynonymous</b>	<b>12</b>
ND2	1
ND4	1
ND5	3
ND6	3
CO3	1
ATPase6	2
Cytb	1
<b>Synonymous</b>	<b>16</b>
ND1	2
ND2	3
ND3	1
ND4	3
ND5	2
ND6	2
CO1	3
<b>tRNA</b>	<b>1</b>
tRNA-Leu	1
<b>rRNA</b>	<b>4</b>
12SrRNA	2
16SrRNA	2
<b>Noncoding region</b>	<b>15</b>
D-loop	9
Noncoding	6

攣や脳卒中様発作歴などの急性また慢性中枢神経障害また明らかな心筋症も観察されなかった。また本家系では同一疾患で mtDNA 異常を示す多数例の乳児死亡があり、また現存の近親健常者の中にはミトコンドリア病の所見は明らかではなか

った。故にこの L-G Sy は比較的低浸透率の母系遺伝が示唆された。また mtDNA 解析結果は多くの MELAS 例での変異の一指標と報告<sup>5)</sup>されている tRNA<sup>Leu</sup> 上の塩基番号3,243の A → G 点変異 (heteroplasmy 型) を確認したが、他の多くの点変異も認めた。以上 L-G Sy の中には母系遺伝をとり家系内で同一病態を呈し、点変異を有するミトコンドリア病の存在が確認された。

#### 引用文献

- 1) Shields RW Jr.: Limb girdle syndrome. "Myology" (ed by Engel AG & Banker BQ) McGraw-Hill, New York. 1986, p1349.
- 2) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457, 1981.
- 3) Zeviani M, Servidei S, Gellera C, et al: An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. Nature 339: 309, 1989.
- 4) Holt IJ, Harding E, Perry RKH, et al: A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. Am J Hum Genet 46: 428, 1990.
- 5) Tanaka M, Ino H, Ohno K, et al: Mitochondrial DNA mutations in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). Biochem Biophys Res Comm 174: 861, 1991.

# 37) ミトコンドリア脳筋症の病因解明 ——ピルビン酸脱水素酵素欠損症女児例における 分子遺伝学的病因検索——

黒田 泰弘\*

研究協力者 伊藤 道徳\* 内藤 悦雄\*  
西條 隆彦\* 武田 英二\*

## 緒言

ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) は6つの成分, すなわちピルビン酸脱水素酵素(E1), リポ酸アセチルトランスフェラーゼ(E2), リポアミド脱水素酵素(E3), PDH ホスファターゼ, PDH キナーゼおよび Protein-X (X) から構成されており, その活性はPDH ホスファターゼおよびPDH キナーゼによる脱リン酸化—リン酸化機構によって調節されている。また, PDH は $\alpha$ および $\beta$ の2種類のサブユニット (E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ ) の4量体として存在している。ミトコンドリア脳筋症の病因としてPDHC異常が報告されている。PDHC異常の中ではE1欠損症が最も多く報告されている。最近E1の $\alpha$ サブユニット (E1 $\alpha$ ) の遺伝子変異が明らかにされており, 我々もPDH欠損症の1例において4塩基対の挿入を見出している<sup>1)</sup>。E1 $\alpha$ に対する遺伝子はX染色体上にあり, 女児患者では変異遺伝子の発現度は症例により, また臓器によって異なっていることが報告されている<sup>2)</sup>。最近, 我々は培養皮膚線維芽細胞のPDHC活性が著明に低下しているにもかかわらず, EBウィルスで株化した培養リンパ芽球様細胞のPDHC活性が正常であった先天性高乳酸血症の1女児例を見出した。そこで, 本症例および両親についてE1 $\alpha$ に対する遺伝子の変異を検索し, さ

らに患児の培養皮膚線維芽細胞と培養リンパ芽球様細胞, 末梢リンパ球およびIL2で増殖させたT細胞での変異遺伝子の発現について検討したので報告する。

## 研究対象

対象は培養皮膚線維芽細胞PDHC活性が著明に低下していたにもかかわらず, EBウィルスで株化した培養リンパ芽球様細胞PDHC活性が正常であった先天性高乳酸血症の2歳女児例 (表) とその両親からえた培養細胞および末梢リンパ球である。

表 先天性高乳酸血症1女児例における培養皮膚線維芽細胞および培養リンパ芽球様細胞のピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) 活性。ピルビン酸脱水素酵素複合体活性を無処理での活性 (Native), ジクロル酢酸で活性化した活性 (DCA-activated) および Broad specificity protein phosphatase で活性化した全活性 (Total) として測定した。

	PDHC activity (nmol/min/mg protein)		
	Native	DCA-activated	Total
Fibroblasts			
Patient	0.08	0.13, 0.19	0.86
Controls	1.44±0.46	2.38±0.60	2.41±0.59
Lymphoblastoid cells			
Patient	2.94	3.69, 2.87, 3.66	4.98
Controls	1.94±0.25	3.60±0.62	3.59±0.47

\* 徳島大学医学部小児科

### 研究方法

牛心臓から精製した E1 $\alpha$ , E1 $\beta$  に対する抗血清を用いた Immunoblot 法で培養皮膚線維芽細胞, 培養リンパ芽球様細胞の E1 $\alpha$ , E1 $\beta$  蛋白質の量およびサイズを検討した。

培養皮膚線維芽細胞から Chomczynski らの方法<sup>3)</sup>で total RNA を抽出した。この total RNA を鋳型にして単鎖 cDNA を作製してこれを PCR の鋳型にした。ついですでに報告されている塩基

配列を参考にして, 4 種類のプライマーを合成した。それぞれのプライマーには 2 または 3 塩基を置換してほぼ中央に Eco RI の認識部位を作製した。これらのプライマーを用いた PCR 法により E1 $\alpha$  に対する cDNA を -30 から 705 までと 641 から 1205 までの 2 つのフラグメントに分けて増幅した (図 1A)。PCR 法は Taq DNA polymerase を利用した Gene Amp™ キット (Perkin-Elmer Cetus 社) を用い, 変性 94°C 1 分間, アニーリン

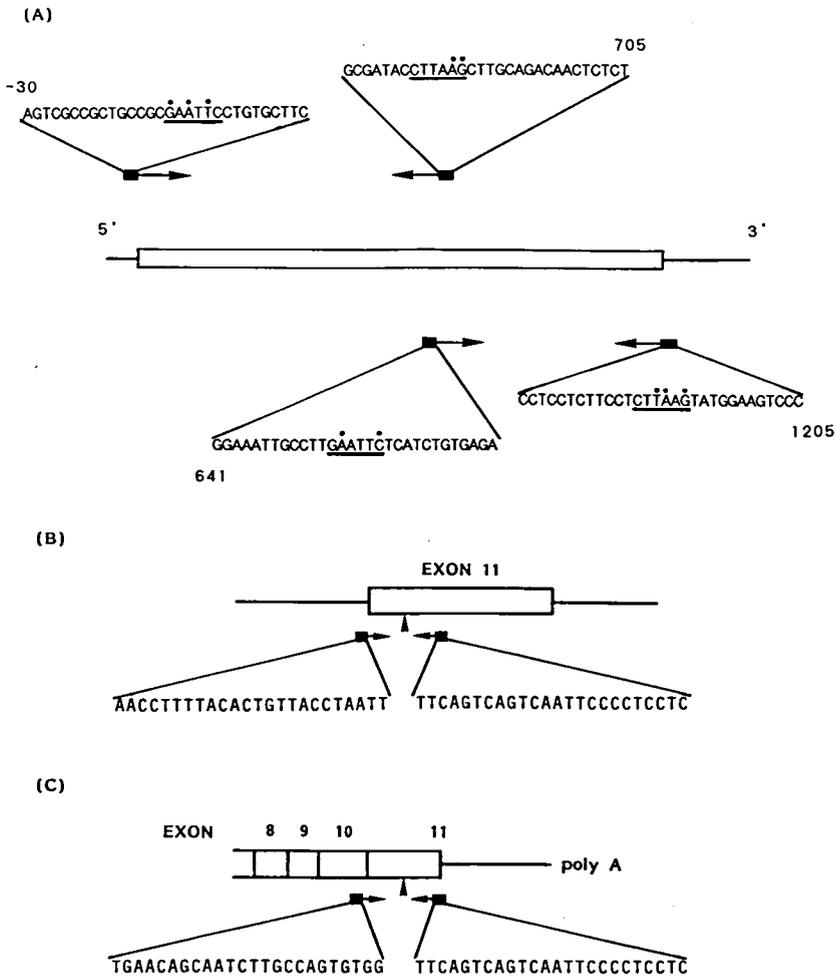


図 1 PCR による cDNA および DNA フラグメントの増幅  
 (A)塩基配列決定のための total RNA から作製した単鎖 DNA を鋳型とした E1 $\alpha$  cDNA の増幅 (\*は Eco RI 認識部位作製のための塩基置換部位を示す。)  
 (B)患者のゲノム DNA を鋳型とした変異部位を含む DNA フラグメントの増幅  
 (C)患者の単鎖 cDNA を鋳型とした変異部位を含む cDNA フラグメントの増幅  
 矢印は変異部位を示す。



Control	1054	PheAlaThrAlaAspProGluProProLeuGluGluLeuGlyTyrHisIleTyrSerSer TTTGCCACGGCCGATCTGAGCCACCTTTGGAAGAGCTGGGCTACCACATCTACTCCAGC	1113
Patient	1054	TTTGCCACGGCCGATCTGAGCCACCTTTGGAAGATGAGCCACCTTTGGAAGAGCTGGGC PheAlaThrAlaAspProGluProProLeuGluAspGluProProLeuGluGluLeuGly	1113
Control	1114	AspProProPheGluValArgGlyAlaAsnGlnTrpIleLysPheLysSerValSer*** GACCCACCTTTTGAAGTTCGTGGTGCCAATCAGTGGATCAAGTTTAAGTCAGTCAGTTAA	1173
Patient	1114	TACCACATCTACTCCAGCGACCCACCTTTTGAAGTTCGTGGTGCCAATCAGTGGATCAAG TyrHisIleTyrSerSerAspProProPheGluValArgGlyAlaAsnGlnTrpIleLys	1173
Control	1174	GGGGAGGAGAA	1184
Patient	1174	TTTAAGTCAGTCAGTTAAGGGGAGGAGAA PheLysSerValSer***	1202

図4 患者における遺伝子変異とアミノ酸配列の変異

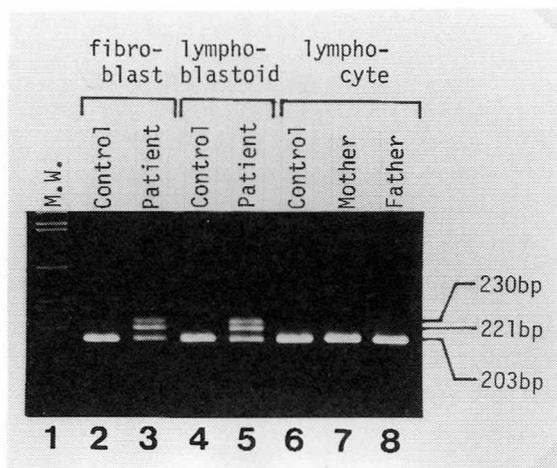


図5 ゲノム DNA を鋳型として PCR 法で増幅した変異部位を含む DNA フラグメントの電気泳動パターン

- レーン 1 : サイズマーカー
- レーン 2, 3 : 培養皮膚線維芽細胞
- レーン 4, 5 : 培養リンパ芽球様細胞
- レーン 6, 7, 8 : 末梢リンパ球
- レーン 2, 4, 6 : 対照
- レーン 3, 5 : 患者
- レーン 7 : 母親
- レーン 8 : 父親

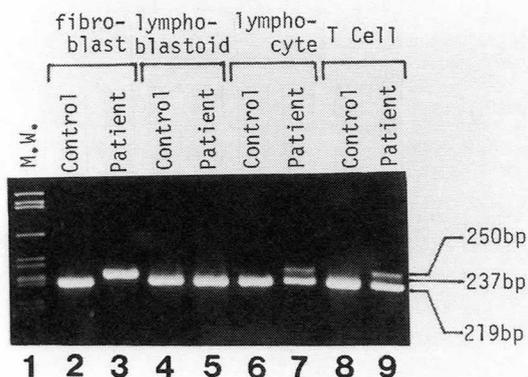


図6 total RNA から作製した単鎖 cDNA を鋳型として PCR 法で増幅した変異部位を含む cDNA フラグメントの電気泳動パターン

- レーン 1 : サイズマーカー
- レーン 2, 3 : 培養皮膚線維芽細胞
- レーン 4, 5 : 培養リンパ芽球様細胞
- レーン 6, 7 : 末梢リンパ球
- レーン 8, 9 : IL-2 で増殖した T 細胞
- レーン 2, 4, 6, 8 : 対照
- レーン 3, 5, 7, 9 : 患者

## 結 果

Immunoblot 分析では患児由来の培養皮膚線維芽細胞の E1 $\alpha$ , E1 $\beta$  蛋白質量はともに著明に減少していたが, 培養リンパ芽球様細胞の E1 $\alpha$ , E1 $\beta$  蛋白質量およびサイズはともに対照と差を認めなかった (図 2).

患児由来の培養皮膚線維芽細胞から作製した cDNA の塩基配列では, 塩基配列を決定した 20 クローン全てにおいて塩基番号 1089 の位置に 18 塩基対の挿入が認められた (図 3). この 18 塩基対の挿入ではフレームシフトは生じなかったが, 6 アミノ酸残基が挿入された (図 4). ゲノム DNA の解析では培養皮膚線維芽細胞, 培養リンパ芽球様細胞ともに正常遺伝子由来の 203 塩基対の DNA フラグメントに加えて変異遺伝子由来の 221 塩基対の DNA フラグメントを認め患児が変異遺伝子と正常遺伝子をもつヘテロ接合体であることが明らかとなった (図 5). さらに, 230 塩基対の DNA フラグメントも認められた (図 5) が培養皮膚線維芽細胞, 培養リンパ芽球様細胞の染色体分析では患児は 46XX であり, この 230 塩基対の DNA フラグメントは正常 DNA 鎖と変異 DNA 鎖のヘテロデュプレックスと考えられた. 両親のゲノム DNA の解析では両親ともに正常遺伝子由来の 203 塩基対の DNA フラグメントだけが認められた (図 5).

患児の cDNA 解析において培養皮膚線維芽細胞では, 変異遺伝子由来の 237 塩基対の cDNA フラグメントのみが認められたのに対して, 培養リンパ芽球様細胞では, 正常遺伝子由来の 219 塩基対の cDNA フラグメントしか認められなかった (図 6). また, 末梢リンパ球と T 細胞では, 正常遺伝子由来の 219 塩基対の cDNA フラグメントに加えて変異遺伝子由来の 237 塩基対の cDNA フラグメントと, 正常 cDNA 鎖と変異 cDNA 鎖のヘテロデュプレックスと, 考えられる 250 塩基対の cDNA フラグメントが認められたが, 正常遺伝子由来の 219 塩基対の cDNA フラグメントが優位であった (図 6).

## 考 案

今回, 我々は培養皮膚線維芽細胞の PDHC 活性が著明に低下しているにもかかわらず, EB ウイルスで株化した培養リンパ芽球様細胞の PDHC 活性が正常であった先天性高乳酸血症の 1 女児において E1 $\alpha$  に対する遺伝子の変異を検討した. 患児は 18 塩基対の挿入をもつ E1 $\alpha$  の変異遺伝子と正常遺伝子のヘテロ接合体であり, 培養皮膚線維芽細胞ではこの正常遺伝子をもつ X 染色体が, また培養リンパ芽球様細胞では変異遺伝子をもつ X 染色体が優位に不活性化されているものと考えられた. 今回, 本症患児の諸臓器での変異遺伝子の発現度は検討できなかったが, 脳, 肝臓, 筋肉などの組織においても培養皮膚線維芽細胞と同様に変異遺伝子が優位に発現しているために, 本患児はヘテロ接合体であるにもかかわらず高乳酸血症, 中枢神経障害などの臨床症状をきたしたものと考えられる. また, 患児の両親はともに変異遺伝子をもっていなかったことから, 患児の変異は突然変異によるものと考えられた.

最近, 女性における X 染色体の不活性化には組織による偏りが認められることが報告されている<sup>2)</sup>. 本症例では培養皮膚線維芽細胞で変異遺伝子をもつ X 染色体がほとんどの細胞で発現しており診断が可能であったが, 脳など生検が困難な組織においてのみ変異遺伝子が発現している女児例の可能性もある. 実際, 脳においてのみ PDHC 活性が低下していた女児例が報告されている<sup>4)</sup>. したがって, E1 $\alpha$  の異常による PDH 欠損症の女児例の診断のためには遺伝子診断法の確立が必要と考えられる.

## 文 献

- 1) 黒田泰弘, 伊藤道徳, 内藤悦雄ほか: ミトコンドリア脳筋症の病因解明—ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症における変異遺伝子解析—. “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, 1991, pp107—111.

- 2) Brown RM, Fraser NJ and Brown GK: Differential methylation of the hypervariable Locus DXS255 on active and inactive X chromosomes correlates with the expression of a human X-linked gene. *Genomics* 7: 215—221, 1990.
- 3) Chomczynski P and Sacchi N: Singlestep method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156—159, 1987.
- 4) Prick M, Gabreels F, Renier W, et al: Pyruvate dehydrogenase deficiency restricted to brain. *Neurology (Ny)* 31: 398—404, 1981.

## 38) 蛋白質のミトコンドリア移行とその異常： サイトゾル因子の役割

森 正 敬\*

研究協力者 村 上 薫\*

### はじめに

ミトコンドリアは細胞のエネルギー産生、アミノ酸代謝、糖代謝 (TCA サイクル)、脂肪酸 $\beta$ 酸化、尿素合成前半などを担う重要な細胞小器官(オルガネラ)の一つである。ミトコンドリアはそれ自身が複雑な構造を持っており、サイトゾルに面している方から外膜、膜間分画、内膜およびマトリックスの4つの区画より成っている。ミトコンドリアの大きな特徴の一つは、固有の遺伝子DNAと蛋白質合成系を持ち、部分的には自律性を備えていることである。しかしミトコンドリアDNAはきわめて小さく、2種のリボソームRNA、22種のtRNAおよび呼吸鎖に関与する13種のポリペプチドのみがコードされていることが分っている。最近ミトコンドリアDNAの異常によるミトコンドリア病(ミトコンドリア脳筋症)が発見され、その研究が急速に進んでいる。一方、外膜、膜間分画、マトリックスに存在する全ての蛋白質および内膜の大部分の蛋白質は核染色体DNAにコードされており、ミトコンドリア外部で合成されたのち、1枚または2枚のミトコンドリア膜を通過して内部へ移行し、または膜に組み込まれる。すなわち、ミトコンドリアの形成はミトコンドリア遺伝子と核染色体遺伝子の2重支配を受けている。したがって核支配ミトコンドリア蛋白質のミトコンドリア移行の障害はミトコンドリア病を来す。蛋白質のミトコンドリア移行の異常は①個々のミトコンドリア蛋白質の異常と②

蛋白質のミトコンドリア移行のシステムを構成する因子の異常に分けて考えることが出来る。①については症例が報告されはじめているが、②については先ず蛋白質のミトコンドリア局在化の分子機構を明らかにすることが重要である。我々は肝臓のミトコンドリアマトリックスに局在する2つの尿素サイクル酵素—カルバミルリン酸合成酵素I (CPSI) とオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) —を実験系として蛋白質のミトコンドリア局在化とその異常の研究を進めている。

我々はまずラット CPSI と OTC の *in vitro* 合成を行い、両酵素が分子量の大きい前駆体の形で合成されることを明らかにした。引き続き多くの研究室で種々のミトコンドリア蛋白質について同様の実験が行われ、ミトコンドリア蛋白質の大部分が前駆体として合成されることが明らかとなった。さらにミトコンドリア蛋白質の合成部位が遊離リボソームであること、前駆体がサイトゾルのプールより数分以内にミトコンドリアに移行し、ミトコンドリアに存在するプロセシングプロテアーゼによって成熟蛋白質に転換されることを明らかにした。

さらに *in vitro* で合成した蛋白質前駆体を単離ミトコンドリアに取り込ませて成熟酵素に転換する *in vitro* のトランスポート再構成系を開発し、このトランスポートとプロセシングの系が①組織特異性がなくどのミトコンドリアでも使用出来る、②種特異性が低く、ラットやマウスのミトコンドリアが使用出来る、③複数の前駆体に共通である、④トランスポートのステップにエネルギーが必要

\* 熊本大学医学部遺伝医学研究施設

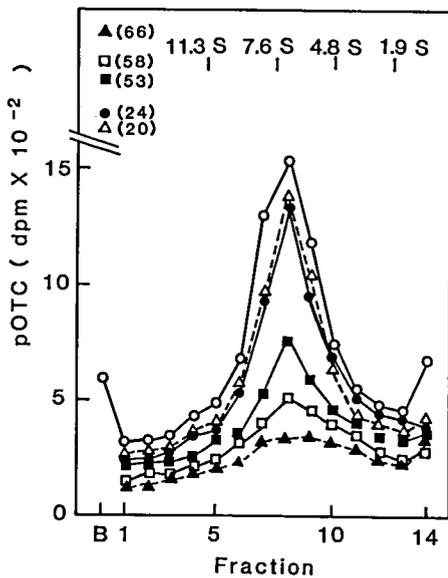


図1 OTC 前駆体と PBF の複合体形成. [<sup>35</sup>S] 標識 OTC 前駆体 (pOTC, 70ng) と種々の量の精製 PBF を混ぜ、蔗糖密度勾配遠心法で解析した. PBF の量は 0 ng (▲), 50ng (□), 100ng (■), 200ng (●), 400ng (△), 2 μg (○). B は遠心管の底を示す.

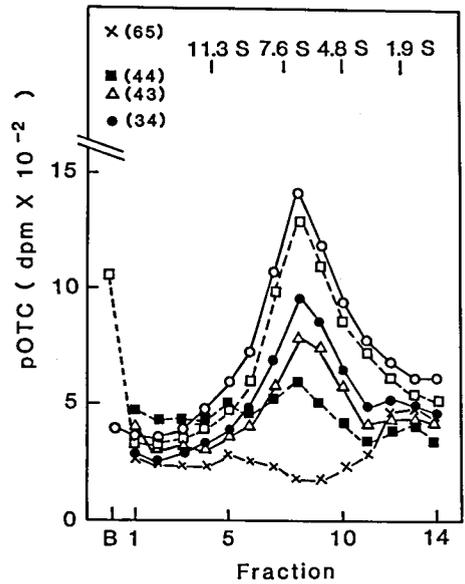


図2 合成延長ペプチドによる複合体形成の阻害. 精製 [<sup>35</sup>S] OTC 前駆体80ng, 精製 PBF200ng と種々の濃度の合成延長ペプチドを混ぜ、蔗糖密度勾配遠心法で解析した. 延長ペプチドの濃度は 0 μM (○), 0.2μM(□), 2 μM(●), 5 μM (△), 20μM (■), 50μM (×).

であることなどを明らかにした。ついで OTC 前駆体 cDNA をクローン化し、成熟酵素の N 末端に 32 アミノ酸残基の“延長ペプチド (presequence)”が付着していることを明らかにした。この前駆体の性状およびミトコンドリアへの移行の仕組みを明らかにするためには前駆体を大量調製する必要がある。そこで遺伝子工学の手法を用いて大腸菌で OTC 前駆体の大量発現させ、均一に精製すると共に、精製前駆体を用いる *in vitro* のトランスポート系を開発した<sup>2)</sup>。そして、精製前駆体のミトコンドリア移行にサイトゾルに存在するタンパク質因子が必要であることを発見し、この因子を PBF (presequence binding factor) と名付けると共に、それを均一に精製した<sup>3)</sup>。この精製 PBF を用いてタンパク質の移行における PBF の役割を解析した。

#### 方法と結果

OTC 前駆体を大腸菌で大量に発現させ、尿素存在下に均一に精製した。PBF はウサギ網状赤血球ライセートより OTC 前駆体セファローズクロマトグラフィー、DEAE 高速液体クロマトグラフィー、蔗糖密度勾配遠心法により均一に精製した。

OTC 前駆体と PBF の相互作用を蔗糖密度勾配遠心法で解析した。OTC 前駆体のみを遠心すると、凝集体を形成し、遠心管の底に沈澱した (図 1)。ところが OTC 前駆体と PBF を混ぜた後に遠心すると、沈降係数 7S の可溶性の複合体を形成した。70ng の OTC 前駆体を用いた場合、PBF100ng で中程度の複合体形成が見られ、400ng でほぼ最大の複合体形成が見られた。

この複合体に PBF が含まれていることを確かめるために SDS-PAGE で解析したところ、OTC 前駆体と PBF が共沈降することが明らかとなった。複合体中での OTC 前駆体と PBF の比はほぼ

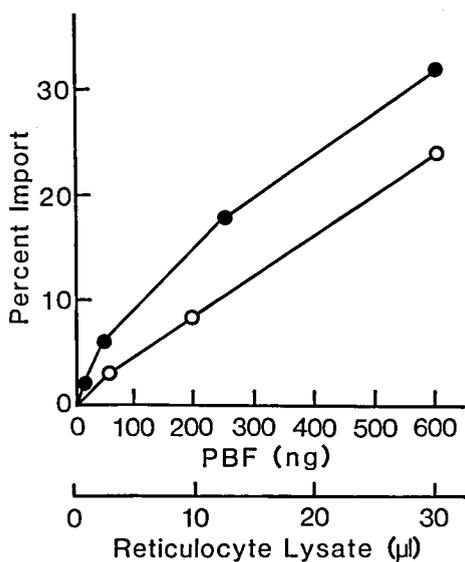


図3 精製 OTC 前駆体のミトコンドリア移行に対する精製 PBF の効果. 精製 OTC 前駆体を精製 PBF (●) または透析網状赤血球ライセート (○) 存在下にラット肝ミトコンドリアと 25°C, 90 分インキュベートし, ミトコンドリアへの取り込みを測定した.

1 : 1 と推定された.

PBF が OTC 前駆体の延長ペプチド部分に結合するのか, あるいは成熟酵素部分に結合するのかを明らかにするために, 化学合成延長ペプチドによる複合体形成の阻害実験を行った. 複合体形成は数  $\mu\text{M}$  の延長ペプチドで中程度阻害され, 50  $\mu\text{M}$  で完全に阻害された (図 2). 一方, 複合体形成は精製成熟型 OTC ではほとんど阻害されなかった. したがって, PBF は OTC 前駆体の延長ペプチド部分に結合することが明らかとなった.

PBF が他の前駆体のミトコンドリア移行にも関与するか否かを明らかにするために, 他の延長ペプチドの阻害効果を調べた. アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼおよびリンゴ酸脱水素酵素の化学合成延長ペプチドは, OTC 前駆体と PBF の複合体形成を強く阻害した. したがって, PBF は少なくとも一群の前駆体タンパク質のミトコンドリア移行に関与することが示唆された.

ついで, 精製 OTC 前駆体のミトコンドリア移行に対する PBF の効果を調べた. 精製前駆体は単独ではミトコンドリアに取り込まれないが, 精製 PBF を添加すると, 効率のよい取り込みが見られた (図 3). このことより, 精製 OTC 前駆体のミトコンドリア移行には PBF が必要であることが示された.

## 考 察

前駆体タンパク質がミトコンドリア膜を透過して内部へ移行するためには, ほどけた状態にななければならない. 延長ペプチド部分が成熟タンパク質部分の folding を防ぐ可能性も考えられたが, OTC 前駆体の延長ペプチドは成熟酵素部分の folding を直接には強く阻害しないことが分かった<sup>4</sup>. 前駆体蛋白質がリボソームで合成されて延長ペプチド部分がリボソームより出てくると PBF が結合し, 可溶性の複合体を形成して前駆体の凝集を防ぎ, 前駆体を膜透過可能な状態に保つものと思われる<sup>5</sup>. この複合体は恐らくミトコンドリア表層に存在すると思われる“PBF レセプター”に結合し, 延長ペプチド部分が次いで PBF から延長ペプチドに対する別のレセプターに移された後, 外膜と内膜のコンタクトサイトを通してマトリックスに移行すると考えている. 今後 PBF の性質を更に明らかにすると共に, 遺伝子を単離し, “PBF レセプター”の検索を行う予定である. これらの基礎に基いて蛋白質のミトコンドリア局在化の障害を解析したい.

## 文 献

- 1) 森 正敬: 蛋白質のミトコンドリア膜識別とミトコンドリア内移行. “タンパク質の細胞内輸送と膜透過”. 現代化学, 増刊10: 1987, pp174—185.
- 2) Murakami K, Amaya Y, Takiguchi M, Ebina Y and Mori M: Reconstitution of mitochondrial protein transport with purified ornithine transcarbamylase precursor expressed in *Escherichia coli*. J Biol Chem 263: 18437—

18442, 1988.

- 3) Murakami K and Mori M: Purified presequence binding factor (PBF) forms an import-competent complex with a purified mitochondrial precursor protein. *EMBO J* 9: 3201—3208, 1990.
- 4) Murakami K, Tokunaga F, Iwanaga S and Mori M: Presequence does not prevent folding of a purified mitochondrial precursor protein and is essential for association with a reticulocyte cytosolic factor(s). *J Biochem* 108: 207—214, 1990.
- 5) Mori M and Murakami K: Transport of mitochondrial precursor proteins ; their conformational competence and related factors (Minireview). *Cell Struct Funct* 14: 643—647, 1989.

# 39) ヒトミトコンドリア DNA D-loop 領域における 新しい調節因子 (Mt 5 因子)

杉村 公也\*

研究協力者 大野 欽司\* 田中 雅嗣\*\* 鈴木 寛\*\*  
Sanjeev Kumar\*\* 佐橋 功\*\*\* 高橋 昭\*  
小澤 高将\*\*

## 目 的

ヒトミトコンドリア DNA (mtDNA) は、電子伝達系複合体の13種のサブユニットをコードしており<sup>1)</sup>、他のサブユニットは核 DNA によりコードされている。従って、ミトコンドリア電子伝達系の分子構築のためには、両者の協調発現が必要となる。ヒト mtDNA には、1,122bp の非翻訳領域があり、mtDNA 複製・転写に重要な役割を担ういくつかの調節因子がこの領域に存在する。これらの調節因子はその機能により3つのクラスに分けられる。第1のクラスには、L鎖とH鎖のプロモータ (LSP, HSP) から構成され、ともに mtDNA の転写に必須の因子である<sup>2)~4)</sup>。第2のクラスには、mtTF1 (L-strand), mtTF1 (H-strand), Mt3, Mt4が含まれ、これらは核によってコードされたトランス因子と協調し発現調節を行うシス因子として提唱されたものである<sup>5)~8)</sup>。第3のクラスには、CSB-I, -II, -III (control sequence block), TAS (termination associated sequence) が含まれ、種間で保存された配列として提唱されたものである<sup>9)10)</sup>。第3のクラスの内、CSB-IIとCSB-IIIはRNaseMRPによるミトコンドリアRNAの切断に必須であることが最近解明された<sup>11)</sup>。一方、CSB-IとTASの機能は現在不明である。

我々は、これら調節因子の種内での塩基配列保存の有無を検討し、さらに、新たな調節因子を見出す目的で、ヒト mtDNA の1,122bp の非翻訳領域の直接塩基配列決定を行った。

## 対象と方法

コントロール7例と患者11例 (MELAS 2例<sup>12)</sup>、乳児致死型心筋症1例<sup>13)</sup>、パーキンソン氏病2例、肥大型心筋症4例、拡張型心筋症2例)よりDNAを単離した。PCR法を用いて、非翻訳領域全長を含む mtDNA 断片を増幅した。さらに、M13ファージのユニバーサル配列を5'末端に持つ38-merのプライマー7種類を用いて、非対称PCR法により1本鎖DNAを増幅した。増幅された1本鎖DNAを蛍光プライマー法による自動化塩基配列決定の鋳型として用いた。この方法により得られた非翻訳領域塩基配列をGenetyx-Macを用いて解析を行った。

## 結 果

非翻訳領域において塩基変異を有する部位を表1に示す。18例の mtDNA 非翻訳領域塩基配列決定にて、Andersonら<sup>1)</sup>の塩基配列と異なる部位が66ヶ所存在した。変異は45ヶ所の塩基転位、4ヶ所の塩基転換、7ヶ所の挿入、10ヶ所の欠失から構成されていた。塩基変異はこの1,122bpの領域内で不均一に分布しており、34ヶ所(52%)の変異部位がtRNA-Proline側の400bpの領域に存在

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

表1 ヒトミトコンドリア DNA 非翻訳領域における塩基多様性

Anderson らの報告した塩基配列と異なる塩基のみを示す。ドットは Anderson らの塩基と同一であることを示す。ハイフンは塩基挿入および欠失を示す。Camb は Anderson らの塩基配列を示す。

Nucleotide number	Camb.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
16092	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16093	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16129	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16136	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16155	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16172	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16182	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16183	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16184.1	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16184.2	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16184.3	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16184.4	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16189	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16190.1	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16193	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16209	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16217	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16223	C	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16245	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16256	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16257	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16261	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16266	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16278	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16284	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16289	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16304	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16311	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16316	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16319	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16324	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16325	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16362	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16399	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16497	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16519	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
41.1	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
65	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
73	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
106	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
107	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
108	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
109	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
110	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
111	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
150	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
151	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
152	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
185	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
188	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
191.1	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
194	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
199	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
200	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
202	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
207	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
215	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
228	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
263	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
303.1	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
303.2	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
311.1	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
489	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
514	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
515	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
568.1	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
568.2	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
568.3	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

表2 各種調節因子の種内塩基配列保存

	Variable sites per length	Frequency among humans
1. Strictly conserved elements		
LSP	0/16	-
HSP	0/14	-
mtTF1 for HSP	0/22	-
Mt3	0/8	-
Mt3 (H)	0/8	-
2. Relatively conserved elements		
Mt4 (H)	1/9	1/70
CSB-III	1/15	1/70
mtTF1 for LSP	1/23	2/28
3. Variable elements		
TAS	8/15	47/313
CSB-I	6/24	6/95
CSB-II	2/15	91/95

した。

mtDNA 非翻訳領域の一部の塩基配列が、主として分子進化の解析の目的で行われており<sup>14)-19)</sup>、これら289例のデータを加えるとさらに150ヶ所の変異部位が加わる。我々が決定した変異部位と、既報告の変異部位を、この領域における調節因子と合わせて図1に示す。

### 考 察

今回の研究により、非翻訳領域における調節因子を種内塩基配列保存の程度から3つのグループに分類することができた(表2)。第1のグループは、種内で完全に保存された因子で、LSP, HSP, Mt3, Mt3 (H), mtTF1 (H-strand) が含まれる。第2のグループは、比較的種内保存が認められる調節因子で、CSB-III, Mt4 (H), mtTF1 (L-strand) が含まれる。これらの調節因子はそれぞれ1ヶ所の変異部位を認め、その変異を有する頻度も低かった。すなわち、CSB-IIIとMt4 (H)の1塩基変異は、ともに70例中1例のみに認めた。一方、mtTF1 (L-strand)の変異は28例中2例に認めたが、その部位はこの調節因子の端に存在していた。第3グループは、種内塩基配列保存が認められない因子で、CSB-I, CSB-II, TASが含まれる。CSB-Iでは24塩基中6塩基、CSB-IIでは15塩基中2塩基、TASでは15塩基中8塩基に変異を認めた。さらに、これらの変異を有する例の頻度も高く、CSB-Iでは95例中6例、CSB-IIでは95例中91例、CSB-Iでは313例中47例に変異を認めた。

TASは、ヒトとマウスのD-loop strandの3'側終始点近傍に認められる繰り返し配列<sup>10)</sup>で、その機能は解明されていない。CSB-Iは、非翻訳領域において種間で保存された配列として提唱されたが<sup>9)</sup>、RNase MRPによるミトコンドリアRNAの消化には不必要な因子である<sup>11)</sup>。CSB-IIの塩基変異は特異で、塩基挿入のみが認められている。CSB-IIにおけるシトシンの繰り返し配列における塩基挿入と塩基欠失は、RNase MRPによる認識に影響を与えないことが知られている<sup>11)</sup>。一方、第1と第2のグループに属する種内で塩基配列が



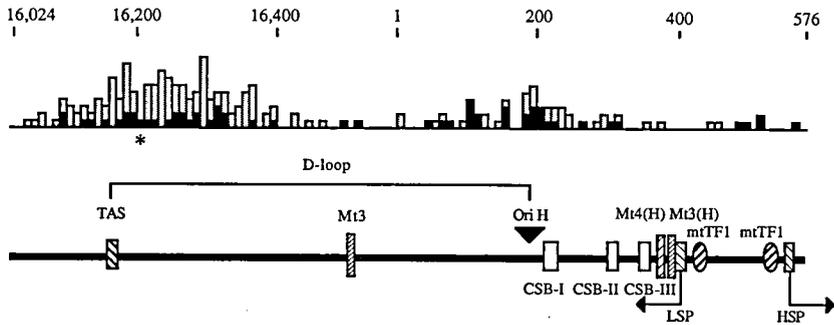


図2 ヒトミトコンドリア DNA 非翻訳領域における塩基多様性の分布  
10塩基対ごとの塩基多様性を棒グラフで示す。黒塗りの部分は我々が決定した塩基多様性を示す。  
Mt5 因子を星印で示す。

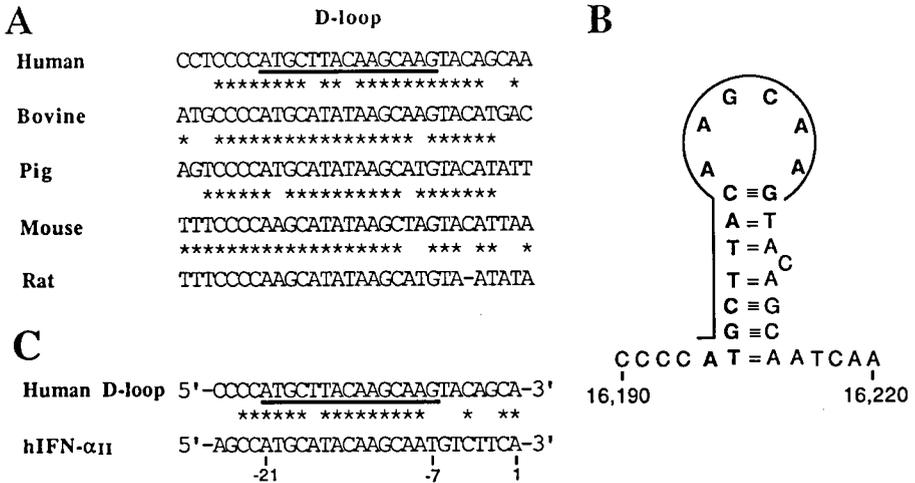


図3 (A)哺乳類における Mt5 因子およびその周囲の塩基配列保存。下線はヒトの Mt5 因子を示す。  
(B) Mt5 因子周囲の核酸二次構造予測。Mt5 因子を太字および下線で示す。  
(C) Mt5 因子とヒトインターフェロン  $\alpha$ 5' 上流域のホモロジー比較。インターフェロン遺伝子の塩基番号 1 は、転写開始部位を示す。

保存された因子 (LSP, HSP, mtTF1s, Mt3, Mt4, CSB-III) は核によってコードされた蛋白因子と結合することが知られている<sup>2)~7)11)</sup>。逆の視点で見ると、新しい調節因子が存在するとすれば、その塩基配列は種内で保存されていることが期待される。すなわち、種内での塩基配列保存は mtDNA の複製・転写調節における重要性を反映していると期待される。

10塩基ごとの変異部位の数を図2に示す。この

図より Mt3 と Mt3 (H) の周囲の 2ヶ所に種内保存されたクラスタを認めることができる。一方で、TAS と ori-H の周囲の 2ヶ所には変異の多いクラスタが存在する。図2において、TAS の周囲の変異の多いクラスタの中心部に種内で塩基配列保存された領域が存在する。この領域は図1では、塩基番号16,197から16,208の5'-CTTACAAGCAAG-3'の配列に相当する。この12bpの塩基配列は313例で完全に保存されていた<sup>14)~19)</sup>。さらに、

その上流に存在する塩基番号16,194から16,196の5'-ATG-3'は、313例中1例のみで5'-ATA-3'に変異しており<sup>17)</sup>、この3 bp を含めた塩基番号16,194から16,208の15bp (5'-ATGCTTACAAG-CAAG-3')を我々は新しい調節因子(Mt5因子)として決定することができた。

他のほ乳類のmtDNA非翻訳領域を調べることにより、mt5因子とその前後の配列は種間でも保存されていることが明らかになった(図3A)。mtDNA非翻訳領域の塩基配列は一般に種間で多様なため、Mt5因子が種間保存されていたことは、その機能的重要性を示唆している。Mt5因子とその前後の塩基配列のコンピュータによる検索では、7bpのステムよりなる二次構造が予測された(図3B)。Mt5を含む領域はD-loop strandの存在により一本鎖DNAとなっており、この二次構造は生理的な意味を持っていると考えられた。

Mt5因子は、D-loop strandが終結するTASの近傍に位置している<sup>10)</sup>。この位置と、TASには認められない種内・種間塩基配列保存<sup>12,21-23)</sup>により、Mt5因子はD-loop strandの終結に関与している可能性が考えられる。遺伝子データベースのコンピュータによる検索では、Mt5類似配列がヒトインターフェロン $\alpha$ クラス2遺伝子<sup>24)</sup>の5'上流領域に存在した(図3C)。Mt5を認識する蛋白因子が、ウィルスに感染した細胞内で発現し、インターフェロンの発現を増加させるとともに、感染細胞のミトコンドリア機能を抑制することにより感染細胞を殺す機序が考えられた。

非翻訳領域における種内塩基配列保存の検索は、ミトコンドリアDNAの複製・転写調節因子の機能的重要性を検討する上で、また新たな調節因子を同定する上で有効な方法であった<sup>25)</sup>。

## 文 献

- 1) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465, 1981.
- 2) Chang DD and Clayton DA: Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell* 36: 635-643, 1984.
- 3) Chang DD and Clayton DA: Precise assignment of the heavy-strand promoter of mouse mitochondrial DNA; cognate start sites are not required for transcriptional initiation. *Mol Cell Biol* 6: 3262-3267, 1986.
- 4) Chang DD and Clayton DA: Precise assignment of the light-strand promoter of mouse mitochondrial DNA; a functional promoter consists of multiple upstream domains. *Mol Cell Biol* 6: 3253-3261, 1986.
- 5) Fisher RP and Clayton DA: A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J Biol Chem* 260: 11330-11338, 1985.
- 6) Fisher RP, Topper JN and Clayton DA: Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements. *Cell* 50: 247-258, 1987.
- 7) Suzuki H, Hosokawa Y, Toda H, et al: Common protein-binding sites in the 5'-flanking regions of human genes for cytochrome c1 and ubiquinone-binding protein. *J Biol Chem* 265: 8159-63, 1990.
- 8) Suzuki H, Hosokawa Y, Nishikimi M and Ozawa T: Existence of common homologous elements in the transcriptional regulatory regions of human nuclear genes and mitochondrial gene for the oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 266: 2333-2338, 1991.
- 9) Walberg MW and Clayton DA: Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research* 9: 5411-5421, 1981.
- 10) Clayton DA: Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705, 1982.

- 11) Bennett JL and Clayton DA : Efficient site-specific cleavage by RNase MRP requires interaction with two evolutionarily conserved mitochondrial RNA sequences. *Mol Cell Biol* 10 : 2191–201, 1990.
- 12) Ino H, Tanaka M, Ohno K, et al : Mitochondrial leucine tRNA mutation in a mitochondrial encephalomyopathy. *Lancet* 337 : 234–235, 1991.
- 13) Tanaka M, Ino H, Ohno K, et al : Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomyopathy. *Lancet* 336 : 1452, 1990.
- 14) Aquadro CF and Greenberg : BD : Human mitochondrial DNA variation and evolution; analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103 : 287–312, 1983.
- 15) Greenberg BD, Newbold JE and Sugino A : Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene* 21 : 33–49, 1983.
- 16) Vigilant L, Pennington R, Harpending H, et al : Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 9350–9354, 1989.
- 17) Horai S and Hayasaka K : Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 46 : 828–842, 1990.
- 18) Di Rienzo A and Wilson AC : Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 1597–1601, 1991.
- 19) Stoneking M, Hedgecock D, Higuchi RG, et al : Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet* 48 : 370–382, 1991.
- 20) Bibb MJ, Van Etten RA, Wright CT, et al : Sequence and Gene Organization of Mouse Mitochondrial DNA. *Cell* 26 : 167–180, 1981.
- 21) Anderson S, deBruijn MH, Coulson AR, et al : Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J Mol Biol* 156 : 683–717, 1982.
- 22) MacKay SL, Olivo PD, Laipis PJ and Hauswirth WW : Template-directed arrest of mammalian mitochondrial DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 6 : 1261–1267, 1986.
- 23) Gadaleta G, Pepe G, DeCandia G, et al : The complete nucleotide sequence of the rattus norvegicus mitochondrial genome; cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J Mol Evol* 28 : 497–516, 1989.
- 24) Capon DJ, Shepard HM and Goeddel DV : Two distinct families of human and bovine interferon- $\alpha$  genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol Cell Biol* 5 : 768–779, 1985.
- 25) Ohno K, Tanaka M, Suzuki H, et al : Identification of a possible control element, Mt5, in the major noncoding region of human mitochondrial DNA as intraspecific nucleotide conservation. *Biochem Int* 24 : 263–272, 1991.

# 40) ミトコンドリア脳筋症変異 mtDNA による タンパク質合成低下 ——CPEO と MELAS の比較——

太 田 成 男\*

研究協力者 小 林 葉 子\*\* 桃 井 真里子\*\*  
林 純 一\*\*\* 埜 中 征 哉\*\*\*\*

## はじめに

ミトコンドリア脳筋症の原因遺伝子の同定に関する研究は最近急速に進展し、ミトコンドリア脳筋症の病型と mtDNA の変異の種類と部位がよく対応することが判明した。しかしながら、mtDNA の変異によっていかにして各々の病型に特徴的な症状があらわれるかは依然として不明である。mtDNA の変異によって生じるミトコンドリア機能異常と各々に特徴的な症状の発症機序を解明することが必要である。今回、MELAS と CPEO の変異によってミトコンドリアのタンパク質合成がどの様に影響されるのかを調べ、病型の違いを呈する分子の基礎を確立することを目的とした。ここでは、タンパク質合成について述べる。

## 方 法

### CPEO 由来欠失 mtDNA をもつ細胞の分離<sup>1)</sup>

CPEO 患者由来線維芽細胞で、欠失 mtDNA を 17% 持つ培養細胞をサイトカラシン B で処理し、遠心によって核を除去した。次に、mtDNA が完全に失われた HeLa 細胞と脱核した細胞質をポリエチレングリコール存在下で融合した。増殖して

きた細胞塊を分離して増殖させ、全 DNA を抽出しサザンプロットにより mtDNA と欠失 mtDNA の有無を検出した。正常 mtDNA と欠失 mtDNA の割合もサザンプロットにより判定した。

### MELAS 点変異 mtDNA3243G をもつ培養細胞の分離

MELAS 患者生検試料細胞を培養し、SV40 DNA を導入することによって株化した<sup>2)3)</sup>。このなかで、大部分が塩基番号3243G の点変異 mtDNA である細胞株と大部分が正常 mtDNA をもつ細胞株を分離した。さらに、これらの細胞株を再びクローニングし、様々な割合で変異 mtDNA をもつ細胞株を分離した。変異 mtDNA と正常 mtDNA の割合は PCR で増幅した DNA 断片を制限酵素 Apa I で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。一方の PCR プライマーをアイソトープラベルし、定量に用いた。ミトコンドリアタンパク質合成の測定

培養細胞をメチオニン不含培地で30分培養し、エメチン（細胞質タンパク質合成阻害剤）を加え10分さらに培養する。ついで、メチオニン不含培地にアイソトープラベルメチオニンとエメチンを加え、1時間培養し、アイソトープをとりこませた。ミトコンドリア画分を分離し、6 M 尿素を含む12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にてタンパク質を分画した。定量は Fuji-Film Bioimaging Analyzer BAS2000 によって行った。

\* 自治医科大学生化学

\*\* 自治医科大学小児科

\*\*\* 埼玉ガンセンター

\*\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

## 結 果

### CPEO 由来欠失 mtDNA をもつ細胞の分離

欠失 mtDNA として用いた mtDNA は図 1 に示すように 13塩基の direct repeat がある hot spot で欠失がおこったものである<sup>4)</sup>。この欠失によって、ATP 合成酵素サブユニット 6 と 8 遺伝子を N 端側にもち、ND 5 遺伝子の別枠をコードするタンパク質を C 端側に持つ融合タンパク質の遺伝子が新たに形成される。また、この欠失領域には 5 つの tRNA 遺伝子がコードされている。欠失 mtDNA を持つ CPEO 患者由来線維芽細胞の細胞質と mtDNA を完全に失った HeLa 細胞の融合細胞 (サイブリッド) を長期にわたって培養すると、図 2 に示すように欠失 mtDNA の割合が次第に増加し、80% 以上に達した。線維芽細胞では欠失 mtDNA の割合は 17% で長期にわたってほぼ安定であった。長期の培養によって欠失 mtDNA が増加したが、欠失 mtDNA と正常 mtDNA の合計はほぼ不変であった。さらに、80% 欠失 mtDNA を含む細胞を再びクローニングすると、73~92% の範囲に分布した細胞が得られた。このようにして、さまざまな割合で欠失 mtDNA を含む、細胞が得られた<sup>4)</sup>。

### 欠失 mtDNA を含む mtDNA に於けるタンパク質合成

様々な割合で欠失 mtDNA を含む細胞においてミトコンドリアのタンパク質合成を測定した。その結果を図 3 に、定量結果を図 4 に示す。これによって、以下の点が明らかとなった。

1. mtDNA の部分欠失によって、ATP 合成酵素サブユニット 6 と 8 遺伝子を N 端側にもち、ND 5 遺伝子を別枠をコードするタンパク質を C 端側に持つ融合タンパク質が合成されている。

2. 欠失部に含まれている遺伝子、COX III や ND 4 の合成量は相対的に低下している。

3. 欠失 mtDNA の割合が 63% をこえると急激にタンパク質合成全体が低下する。

### MELAS 由来点変異 3243G をもつ細胞のミトコンドリアタンパク質合成

3243G 点変異 mtDNA が大部分を占める細胞再クローニングすると再び 96% 変異 mtDNA を含む細胞が得られた。しかし、変異 mtDNA を 100% 持つ細胞と 88% 含む細胞も僅かながら得られた。正常 mtDNA を主に持つ細胞からは 100% 正常 mtDNA を持つ細胞のみがクローニングされた。これらの細胞を用いてミトコンドリアタンパク質合成をおこなわせた。合成タンパク質を図 5 に示す。正常 mtDNA のみを持つ細胞の合成した値を

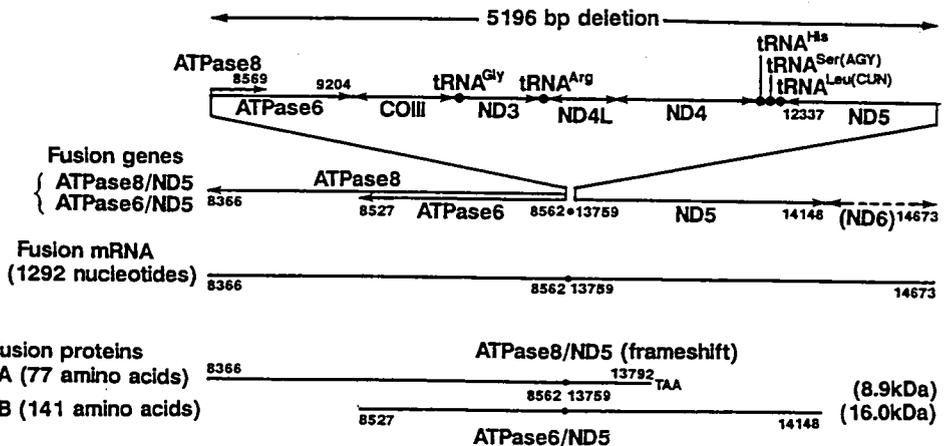


図 1 ある CPEO 患者由来線維芽細胞に含まれた mtDNA の欠失部位。欠失によって融合タンパク質遺伝子が 2 つ形成される。また、この間には 5 つの tRNA 遺伝子がコードされている。

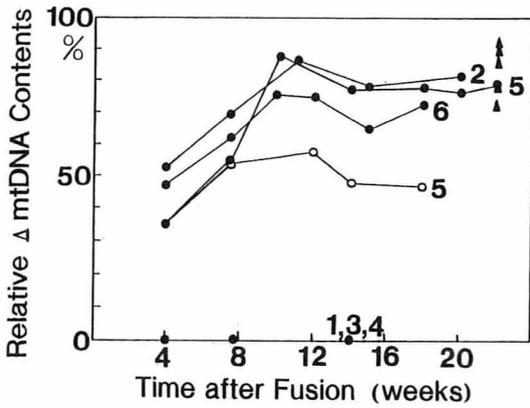


図2 HeLa細胞核の支配下における欠失mtDNAと正常mtDNAの割合の変化。長期培養によって欠失mtDNAは17%から次第に増加した。▲は、クローン5をさらに再クローニングによって得られた細胞株の欠失mtDNAの割合である。○は、グルコース欠損培地における変動を示す。

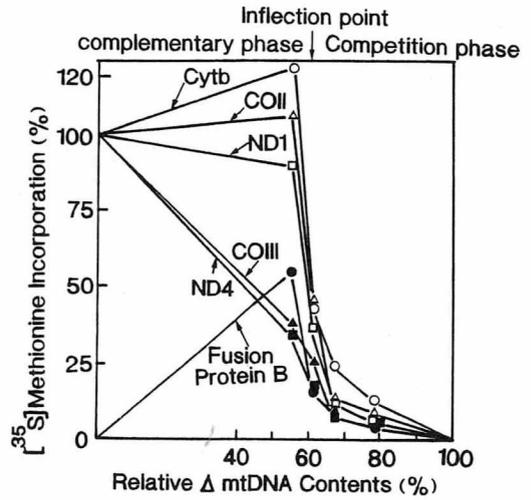


図4 タンパク質合成相対量。図3の結果をグラフにまとめた。63%を境に急激にタンパク質合成が低下した。



図3 様々な割合の欠失mtDNA存在下でのタンパク質合成。アイソトープラベルされたタンパク質をオートラジオグラフィにした図。ND1, ATP6, COXI, cytbは、それぞれ、複合体Iのサブユニット1, ATP合成酵素サブユニット6, 複合体IVサブユニット1, cytochrome bをしめす。新たに融合タンパク質が合成されているのが観察できる。

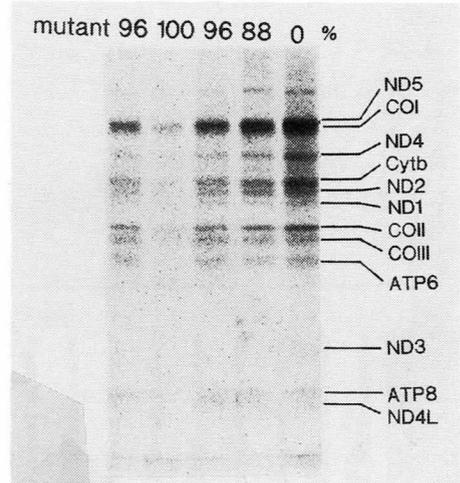


図5 MELAS3243G変異mtDNAによるタンパク質合成。変異mtDNAを様々な割合で含む細胞におけるミトコンドリアタンパク質合成。略号は図3と同一である。

100とした相対値を図6に示す。

変異 mtDNA を100%もつ培養細胞では、正常 mtDNA100%をもつ細胞に比べ、タンパク質合成自身は20分の1に低下していた。正常 mtDNA96%、変異 mtDNA が4%の細胞では、低分子タンパク質の合成はほぼ正常におこなわれるものの、高分子タンパク質は4分の1に低下した。また、88%変異 mtDNA を含む細胞では、96%変異 mtDNA をもつ細胞と低分子タンパク質側では違いが見られなかったが高分子タンパク質側では、やや合成能は高かった。

### 考 察

欠失 mtDNA を含む細胞質と mtDNA を失った HeLa 細胞を融合し、サイブリッドを作製した。こうすることによって、核を置換し、核がミトコンドリアに及ぼす影響を調べることが可能となった。実際、欠失 mtDNA 線維芽細胞では欠失 mtDNA が17%で安定な状態であったのにたいし、HeLa 細胞の核のもとでは、80%まで欠失 mtDNA が次第に増加した。この現象は以下のように説明できる。欠失 mtDNA は正常 mtDNA にくらべ、複製速度が相対的に速くある程度まで増加する。しかし、細胞にとって欠失 mtDNA は不利に働くのである程度まで増加すると生育できなくなる。そこである一定の割合で定常状態となる。

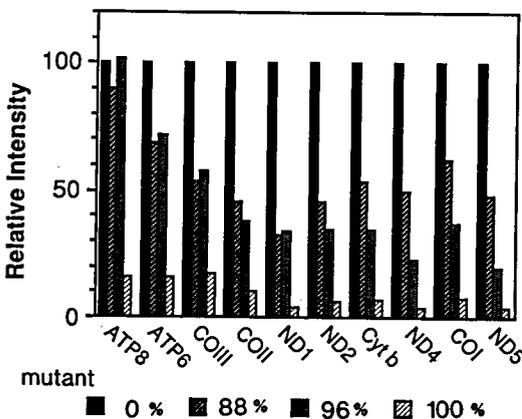


図6 タンパク質合成相対値。図5の結果をグラフにまとめた。

核の遺伝子発現の状態によってその割合は規定される、と考えられる。

さらに、欠失 mtDNA によって形成した融合遺伝子の産物である融合タンパク質の合成が検出できた。欠失 mtDNA 部分には5つの tRNA 遺伝子を含んでいるので、融合タンパク質が合成されるには、欠失 mtDNA と正常 mtDNA が1つのオルガネラに共存していることが必要である。

欠失 mtDNA によるタンパク質合成低下の型はほとんど all or none 式であった。この閾値は63%前後である。MELAS の点変異 mtDNA による点変異では4%の正常 mtDNA でも低分子タンパク質の合成はほぼ正常に行われた。ところが、高分子タンパク質の合成は著しく低下し、タンパク質合成のアンバランスによって、タンパク質複合体が正常に形成されないことが示唆された。この点が CPEO と MELAS の違いであると言える。MERRF において、Attardi らは、サイブリッドを作製し、タンパク質合成の低下を測定した<sup>5)</sup>。そして、高分子タンパク質側の合成が相対的に低下していることを見だしている。この点は MELAS と似ているが、MERRF では未同定タンパク質が新たに合成されていた。MELAS では、新たにタンパク質が合成されることはない。この点が MELAS と MERRF との違いである。

このように、CPEO, MELAS, MERRF 間でのタンパク質合成低下の様式が各々異なることが明らかにされた。この違いが細胞、組織、個体でどのように反映されるかは今後の課題である。

### 文 献

- 1) Hayashi J-I, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y, and Nonaka I: Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction Proc Natl Acad Sci USA 88: 10614-10618, 1991.
- 2) Kobayashi Y, Momoi M Y, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y and Ohta S: A point mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in MELAS

- (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) *Biochem Biophys Res Commun* 173 : 816–822, 1990.
- 3) Kobayashi Y, Momoi M Y, Tominaga K, Shimoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, and Ohta S: Respiration-deficient colles are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) *Am J Hum Genet* 49 : 590–599, 1991.
- 4) Schon E A, Rizzuto R, Moraes C, Nakase H, Zeviani M and DiMauro S: A direct repeat is a hotspot for a large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* 244 : 246–349, 1989.
- 5) Chomyn A, Meola G, Bresolin N, Lai S T, Scarlato G, and Attardi G: In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-Patient mitochondria *Mol Cell Biol* 11 : 2236–2244, 1991.

# 41) ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア遺伝子変異

小澤 高 將\*

研究協力者 田 中 雅 嗣\* 早 川 美 佳\* 杉 山 理\*  
服 部 和 樹\* 大 野 欽 司\* 池 辺 紳一郎\*  
大 林 利 博\* 鳥 居 啓 三\* 太 田 由 枝\*  
佐 野 正\*\*

## はじめに

我々は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の世代に対して水平な変異の蓄積、即ち個人がその生涯に獲得する体細胞変異は各世代にわたって伝えられた垂直な変異の蓄積よりも遙かに速い速度で起き、この両方向からの変異の蓄積が加齢変化および退行性疾患を起こす重要な因子であると提唱した<sup>1)</sup>。

この命題を検証するために本年度は次の三つの方法によって人体標品および実験動物について検索を行い結論的な成績を得た。

1. 微量の標品中の mtDNA を PCR によって増幅し、個人別に mtDNA 全周塩基配列を決定する。点変異の系統的な分岐を解析することにより垂直な変異の蓄積を検索し、個人に固有の点変異から水平な変異 (体細胞変異) の蓄積を検索する。
2. PCR 増幅した mtDNA では失われる体細胞変異の情報、特に活性酸素によって生成し、複製に際して誤読される事が確認されており、体細胞変異の原因となる 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) を、mtDNA の加水分解物を直接質量分析することによって定量する。
3. mtDNA 変異の蓄積が加齢変化や退行性疾患の結果でなく原因であることを、外部要因により短期間に体細胞変異を起こした実験動物で症状

を再現する事によって証明する。

## 結 果

1. 図 1 に、典型的な mt 脳筋症、パーキンソン氏病および乳児致死型心筋症患者の mtDNA 全周塩基配列にみられた塩基置換を示した<sup>2)</sup>。これら塩基置換の集積には顕著なクラスターが認められ、変異が順次系統的に分岐したことを示しており患者達はいわば一つの遺伝子ファミリーを形成している。患者相互に共有している塩基置換の集積、即ちクラスター 1 から 5 は遠い近いの差はあるが世代に垂直な遺伝された変異の蓄積と考えられ、一方、患者固有の変異の蓄積の内少なくともその一部は患者の体細胞変異と考えられる。MELAS の患者二名の固有の変異の内 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子領域の塩基番号 3243 に A → G の変異があり患者に共通であったので、病態への関与が注目され速報した<sup>3,4)</sup>。相前後して MELAS の患者について同一の変異が報告された<sup>5,6)</sup>。しかし、この塩基置換のない患者も見いだされ、逆に全塩基配列決定の例数が蓄積するにつれて、全く神経症状を伴わない特発性心筋症患者<sup>7)</sup>の mtDNA にもこの塩基置換が見られた所から、この単一の塩基置換のみが病因ではなく、他の多くの点変異 (図 1)、欠失との複合が多彩な臨床症状として発現されるものと考えられる。mt 脳筋症はしばしば肥大型心筋症を併発するが、神経症状の見られない特発性心筋症患者の mtDNA

\*名古屋大学医学部第二生化学

\*\*名古屋市立大学医学部小児科

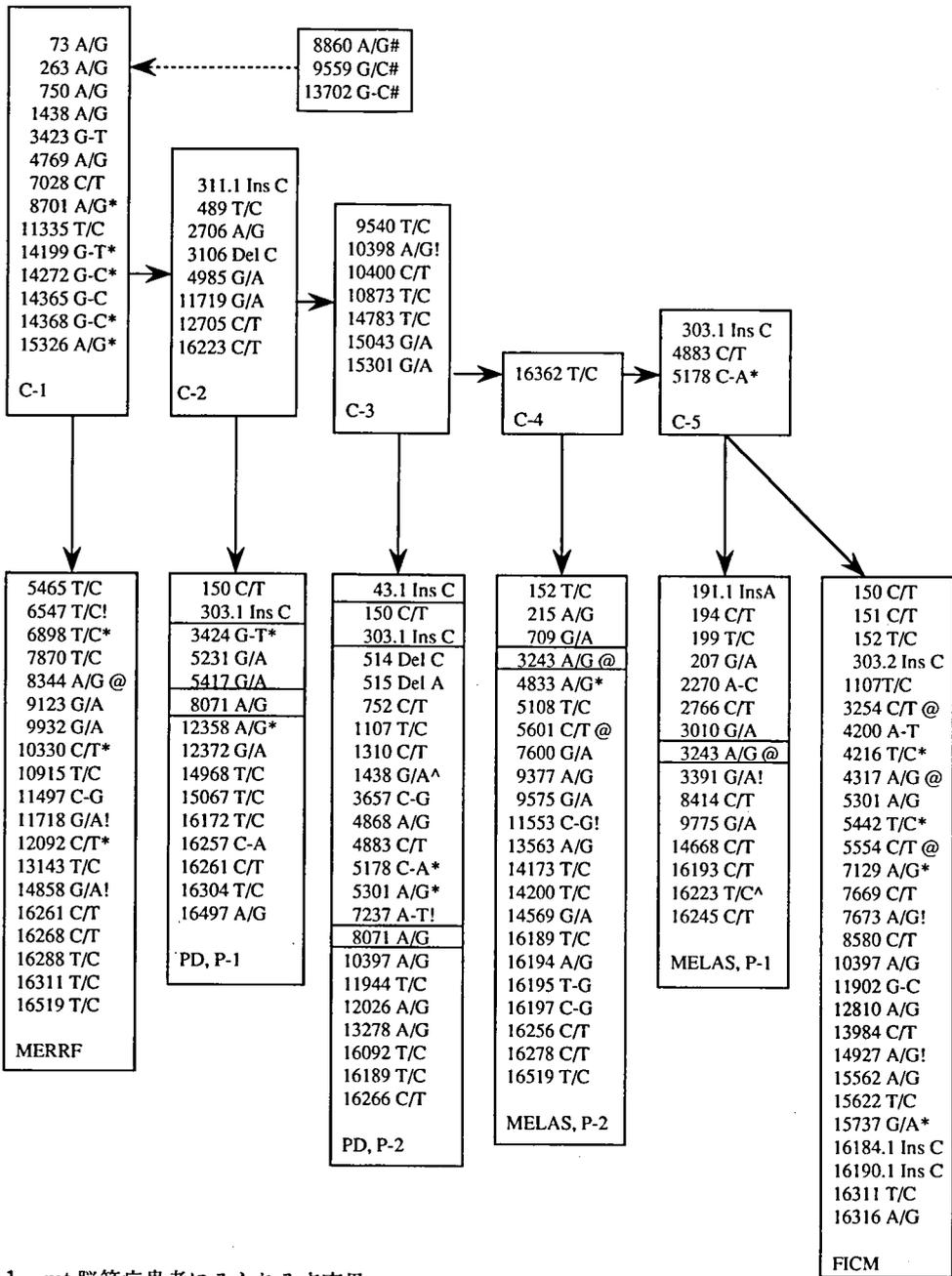


図1 mt 脳筋症患者にみられる点変異

系統的に分岐した点変異のクラスター (C-1からC-5) と患者固有の点変異を示した。塩基番号で示した塩基と置換した塩基が表示してある。#はAnderson配列の誤り、/は transition mutation, -は transversion mutation, Insは塩基挿入, Delは塩基欠失, \*はアミノ酸置換を伴う変異, !は動物種間で保存されているアミノ酸置換を伴う変異, @は tRNA 遺伝子上の変異, ^は先祖帰り変異, Pは患者, MERRFはMERRF症候群, PDはパーキンソン氏病, MELASはMELAS症候群, FICMは乳児致死性心筋症を示す。

(Ozawa T et al: *Biochem Biophys Res Commun* 176: 938-946, 1991)

全周塩基配列においても、その点変異の一部は図1のmt脳筋症の系統的に分岐した塩基置換のクラスターを共有している<sup>7)</sup>。即ち世代に垂直に遺伝された変異の蓄積があり、これに加えて患者固有の変異の蓄積があった。これら塩基置換には同義塩基置換と同様に、アミノ酸置換を引き起こす非同義塩基置換も高い頻度で生じており、哺乳類で保存されているアミノ酸残基の置換を引き起こすものも含まれていた。従って、これら塩基置換の一部は生理的な範囲と考えられるが、一部はこの範囲を越えた点変異として病理的なものである可能性が高い。これら患者のmtDNAは発病時にすでに多くの母系遺伝された点変異の蓄積と小欠失が存在し、それに伴って老化組織に見られる大きな欠失<sup>8)</sup>(図2)を体細胞変異として獲得しており、組織局所で早発性加齢が進行していることを示している。

2. 高齢者の多くは筋力低下、パーキンソン氏病(PD)様運動障害、震えを示し、心拍出量が減少する老人心(presbycardia)となり、横隔膜筋力の低下に伴って肺活量が減少する。これらはmtDNAの体細胞変異の蓄積による細胞エネルギー産生能の低下であろうと考え以下分析を行った。

我々はPD患者および高齢者の剖検脳の黒質・線条体部においてmtDNAのATPase8遺伝子からND5遺伝子にわたる5kbpの欠失を報告した<sup>8)</sup>

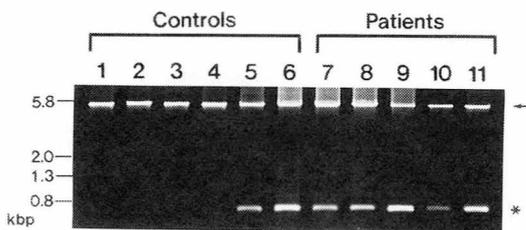


図2 パーキンソン氏病患者および高齢者の黒質線条体部にみられるmtDNAの欠損患者(Patients)および正常対照人(Control)は番号順に若年から高齢へと配列してある。患者全例および高齢者で矢印で示した正常mtDNAと\*でしめした5kbp欠失したmtDNAが混在している。(Ikebe S et al: *Biochem Biophys Res Commun* 170: 1044-1048, 1990)

(図2)。この欠失は皮質よりも有意に多い。黒質・線条体にはドーパミンと鉄が多いため活性酸素が作られ易くmtDNAの欠失の原因となる8-OH-dG、点変異が蓄積し易いためと考えられる。実際に欠失したmtDNAの正常mtDNAに対する割合を定量してみると、30歳台で事故死した人の黒質・線条体部で0.3%、患者では5%であった<sup>9)</sup>。この変異mtDNA量は、mtミオパチー患者骨格筋で時に50%以上に達するmtDNA変異量と比較すると低いとの指摘<sup>10)</sup>もあるが、神経細胞は高度に分化しており、細胞間の変異mtDNAの偏在を考えれば、閾値として十分に意味あるものである。我々が使用したプライマーを使って、この欠失が加齢によって各種臓器に蓄積することが報告され<sup>8)11)12)</sup>、mtミオパチーに共通に見いだされるので共通欠失と呼ばれている。

心臓においては、共通欠失の外に、ATPase6遺伝子とD-ループ上の12塩基の順方向繰り返し配列の間で7.4kbpの欠失がみられ、その頻度が加齢と共に増大することを老人心との関係で報告した<sup>13)</sup>。欠失量を定量してみると、60歳以下では全mtDNAの0.1%程度であったものが、60歳台から急増し、80歳台で3%、90歳台で9%に達する<sup>14)</sup>(図3)。

剖検例の横隔膜からはマイクロ高速液体クロマト/質量分析に充分な量の筋肉が得られるので、そのmtDNA中の8-OH-dGを定量してみると、65歳以上の高齢者では加齢によって8-OH-dG量が急増し、これに伴ってmtDNAの欠失が顕著になる<sup>15)</sup>(図4)。酵母では点変異の蓄積が遺伝子の欠失を引き起こす事が知られている。mtDNAが同一鎖内で欠失を起こすためには、その部分が一本鎖の状態であることが必須である。mtDNA二本鎖中に8-OH-dGが所々に生成すると、その部分は相補鎖とミスマッチを起こし、結果的に二本鎖の一定範囲が解け持続的な一本鎖になった状態での疑似組み換え、ないし再配列が欠失を起こす機構として考えられる。従って、8-OH-dGの増加が、体細胞変異の蓄積、遺伝子の欠失を引き起こし、加齢に伴う筋力低下をもたらす重要因子の一つであると考えられる。

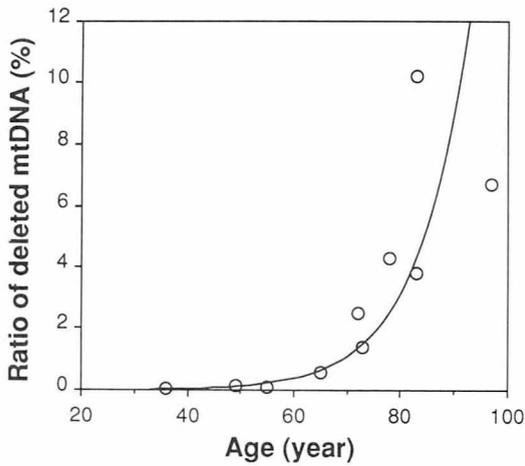


図3 ヒト心筋の加齢に伴う欠失 mtDNA 量の増加  
各年齢層にわたる47の剖検例について心筋の加齢に伴う欠失 mtDNA の増加を確認した<sup>13)</sup>。そのうち、十分な試料の得られる10例について、kinetic PCR 法<sup>9)</sup>によって7.4kbpの欠失を有する mtDNA の正常 mtDNA に対する比率を定量した。  
60歳台から加齢に伴って欠失 mtDNA 量が急増する点はヒト横隔膜筋 mtDNA と軌を一にしている。  
(Sugiyama S et al: *Biochem Biophys Res Commun* 180: 894, 1991)

3. 1990年 azidothymidine (AZT) を投与された15症例ものエイズ患者が典型的な mt ミオパチーを発症したことが報告された<sup>16)</sup>。そこで組織呼吸量がヒトの10倍高いマウスを選び、患者使用量の1/10の AZT を投与した所、自発的運動実験で運動量が50%低下し4週間で強制運動実験も不能となり、ついには死亡するに至った。骨格筋には mt 脳筋症の典型的な形態変化、ragged-red fibers の集積がみられた。mtDNA をマイクロ高速液体クロマト/質量分析計で分析すると総 dG の25%が8-OH-dG に変化していた<sup>17)</sup>。即ち実験動物の体細胞変異によって mt ミオパチーの症状が再現された。この大量の8-OH-dG 生成は AZT の構造、4週間の投与期間から考えて、mtDNA が AZT 投与によって直接活性酸素障害を受けマウス mt が急速に加齢した事が運動障害、死亡の直接原因であることを示している。

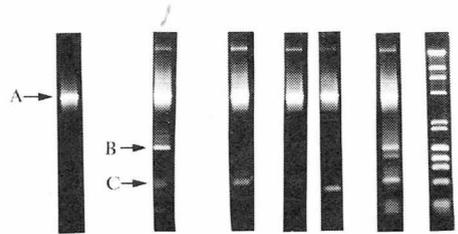
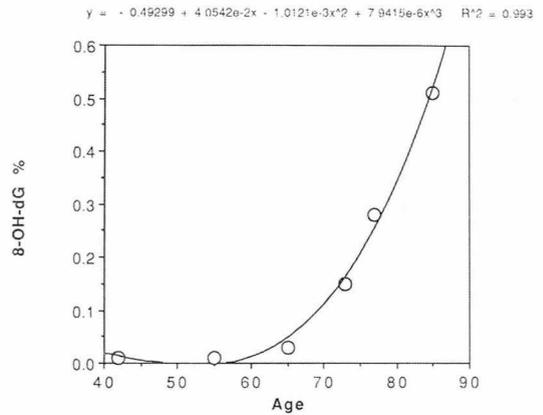
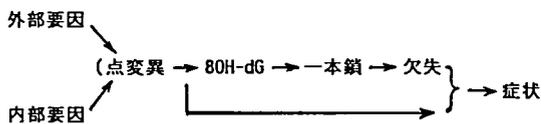


図4 ヒト横隔膜筋 mtDNA の加齢に伴う8-OH-dG の蓄積と欠失の増加  
各年齢層にわたる34の剖検体について横隔膜筋 mtDNA の加齢に伴う欠失の増加を確認した。その中、充分な試料の得られた6例について、マイクロ高速液体クロマト/質量分析<sup>17)</sup>を行い8-OH-dG を定量し(上段)、同時に mtDNA の欠失を検索した(下段)。A は正常 mtDNA 断片、B、C はそれぞれ欠失した mtDNA 断片である。右端は標準 DNA 断片、40歳台では8-OH-dG 及び欠失は検出されないが、加齢に伴って8-OH-dG が急増し、多重欠失を生ずる。  
(Hayakawa M et al: *Biochem Biophys Res Commun* 179: 1023-1029, 1991)

実験的に PD を引き起こす1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>)は、ロテノンが結合する複合体 I の ND1サブユニット<sup>18)</sup>に結合することが確かめられており、PD 患者の ND 遺伝子点変異の蓄積<sup>2)</sup>(図1)によく対応している。ロテノンは複合体 I からの活性酸素産生を著しく増大させることはよく知られており、活性酸素障害が PD 患者脳に見られる mtDNA 欠失の直接的要因と考えられる。

これらの事実を総合すると、AZT, MPP<sup>+</sup>, 毒物などの外部要因, 世代に対して垂直および水平な変異の集積などの内部要因によりエネルギー産生系の構築が障害され, 活性酸素の産生を促し mtDNA 中の8-OH-dGが増大し, mtDNA が数千塩基対にわたって持続した一本鎖状態となることにより大小の欠失が新たな体細胞変異として獲得され, 点変異の蓄積と複合した変異 mtDNA 量はその細胞の閾値を越すと, 機能の障害として顕在化し症状として発現するものと考えられる(下模式図)。



#### 治療にむけて

本年度までの成果によって, 世代に垂直および水平な変異の蓄積とそれによってもたらされる体細胞変異, 欠失の獲得とその機構が明らかになり, 動物実験によって変異による病態が再現できたので, 治療の試みを開始する条件は整ったと考えられる。

mt 脳筋症の治療はいろいろ難しい面のある遺伝子治療よりも mt の特徴を理解した治療法が現実的であろう。その一つは mt が酸化還元によってエネルギーを得ている所から, エネルギー産生系の必須成分で経口補給が可能な Coenzyme Q<sub>10</sub> のように電子伝達複合体と類似の酸化還元電位を持つ物質を投与する redox therapy<sup>19)</sup> が考えられる。特発性心筋症では心筋虚血の指標である陰性 T 波が心電図にしばしば出現し, 本症の成因として虚血説が唱えられていた。我々が mtDNA の全塩基配列から多くの変異を証明し心筋虚血と同じ状態にあると考えられ, 実際に陰性 T 波が見られた久留米大学の症例では, Coenzyme Q<sub>10</sub> の単剤投与によって, 従来憎悪するのみで治療不可能であった陰性 T 波を陽性化することができた。

ヒトの体細胞変異の速さは心筋, 横隔膜筋での欠失, 8-OH-dG の蓄積速度として実測された<sup>14)15)</sup>。これは LDL-コレステロールに対する血

清 Coenzyme Q<sub>10</sub> 濃度の低下が coronary risk factor である所見<sup>20)</sup>と相関するものと考えられる。

#### 文 献

- 1) Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T and Tanaka M: Lancet 1 : 642-645, 1989.
- 2) Ozawa T, Tanaka M, Ino H, Ohno K, Sano T, Wada Y, Yoneda M, Tanno Y, Miyatake T, Tanaka T, Itoyama S, Ikebe S, Kondo T and Mizuno Y: Biochem Biophys Res Commun 176 : 938-946, 1991.
- 3) Ino H, Tanaka M, Ohno K, Hattori K, Ikebe S, Sano T, Ozawa T, Ichiki T, Kobayashi M and Wada Y: Lancet 337 : 234-235, 1991.
- 4) Tanaka M, Ino H, Ohno K, Ohbayashi T, Ikebe S, Sano T, Ichiki T, Kobayashi M, Wada Y and Ozawa T: Biochem Biophys Res Commun 174 : 861-868, 1991.
- 5) Goto Y, Nonaka I and Horai S: Nature 348 : 651-652, 1990.
- 6) Kobayashi Y, Momoi M, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y and Ohta S: Biochem Biophys Res Commun 173 : 816-822, 1990.
- 7) Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S, Ino H, Ohno K, Hattori K, Ohbayashi T, Ito T, Deguchi H, Kawamura K, Nakane Y and Hashiba K: Biochem Biophys Res Commun 177 : 518-525, 1991.
- 8) Ikebe S, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Hattori K, Kondo T, Mizuno Y and Ozawa T: Biochem Biophys Res Commun 170 : 1044-1048, 1990.
- 9) Ozawa T, Tanaka M, Ikebe S, Ohno K, Kondo T and Mizuno Y: Biochem Biophys Res Commun 172 : 483-489, 1990.
- 10) Zeviani M and DiDonato S: Neuromuscular Disorders 1 : 165-172, 1991.
- 11) Linnane AW, Baumer A, Maxwell RJ, Preston H, Zhang C and Marzuki S: Biochem

- Int 22 : 1067—1076, 1990.
- 12) Yen TC, Su JH, King KL and Wei YH: Biochem Biophys Res Commun 178 : 124—131, 1991.
  - 13) Hattori K, Ogawa T, Kondo T, Mochizuki M, Tanaka M, Sugiyama S, Ito T, Satake T and Ozawa T: Amer Heart J 122 : 866—869, 1991.
  - 14) Sugiyama S, Hattori K, Hayakawa M and Ozawa T: Biochem Biophys Res Commun 180 : 894—899, 1991.
  - 15) Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M and Ozawa T: Biochem Biophys Res Commun 179 : 1023—1029, 1991.
  - 16) Dalakas MC, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B and Griffin JL: N Engl J Med 322 : 1098—1105, 1990.
  - 17) Hayakawa M, Ogawa T, Sugiyama S, Tanaka M and Ozawa T: Biochem Biophys Res Commun 176 : 87—93, 1991.
  - 18) Early FGP, Patel SD, Ragan CI and Attardi G: FEBS Lett 219 : 108—113, 1987.
  - 19) Ozawa T, Tanaka M, Suzuki H and Nishikimi M: Brain Dev 9 : 76—81, 1987.
  - 20) Hanaki Y, Sugiyama S, Ozawa T and Ohno M: N Engl J Med 325 : 814—815, 1991.

## 42) ミトコンドリア脳筋症における変異ミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析

—In situ hybridization (ISH)を用いての検討—

荒木 淑郎\*

研究協力者 箕田 修治\* 徳 永 誠\*  
石井 弘子\*\* 埜 中 征 哉\*\*

近年ミトコンドリア脳筋症として、mtDNAの異常が相次いで報告され、CPEOではmtDNAの大きな欠失(欠失部位に少なくとも一つのtRNAを含む)<sup>1)2)</sup>、MERRFではtRNA<sup>Lys</sup>(8344)<sup>3)</sup>、MELASではtRNA<sup>Leu</sup>(3243)<sup>4)</sup>のpoint mutationが見い出された。そして、これらは正常と変異mtDNAが混在するheteroplasmyであることが明らかになった。しかしながら、これらのmtDNA変異とミトコンドリア脳筋症の主要な筋病理学的特徴であるragged red fibers (RRF)及びcytochrome c oxidase (CCO)欠損線維との関係、さらにはmtDNA変異と神経症候との関連については、未だ不明な点も多い。本研究の目的はこの点を明らかにし、ミトコンドリア脳筋症の病態解明を目指すものである。先に、我々は、CPEO患者筋において欠失mtDNAとRRFとの関係を明らかにした<sup>5)</sup>。今回の研究ではMERRF及びMELASにおいてpoint mutationを有する変異mtDNAとRRFとの関連をISH法を用いて光顕レベルで検討するとともに、個々のミトコンドリアと変異mtDNAとの関係を明らかにするために、電子顕微鏡レベルでのISH(電顕ISH)法の応用を検討した。

### 対象及び方法

対象は、mtDNAの欠失が4977bpで断端に13bpのdirect repeat (common deletion)を有するCPEO患者、上記mtDNA変異をもつMERRF及びMELAS患者の生検筋各1症例である。用いたprobeはCPEO患者の欠失部に含まれるCPEO患者では正常mtDNAのみを検出するprobe 1と非欠失部で正常と変異mtDNAの両方(total mtDNA)を検出するprobe 2である。

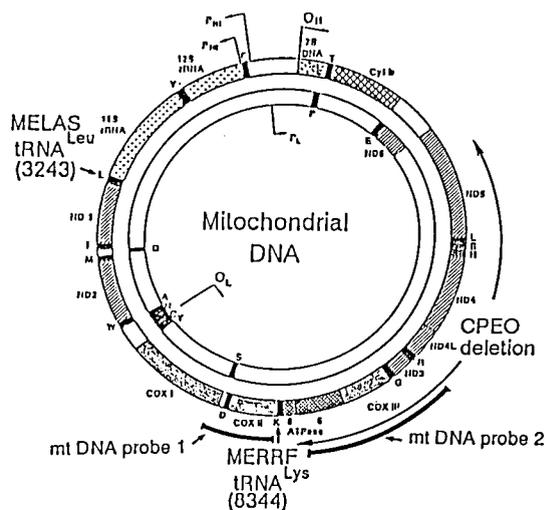


図1 ミトコンドリア脳筋症患者のmtDNA変異部とmtDNA probe

\* 熊本大学医学部第一内科  
\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

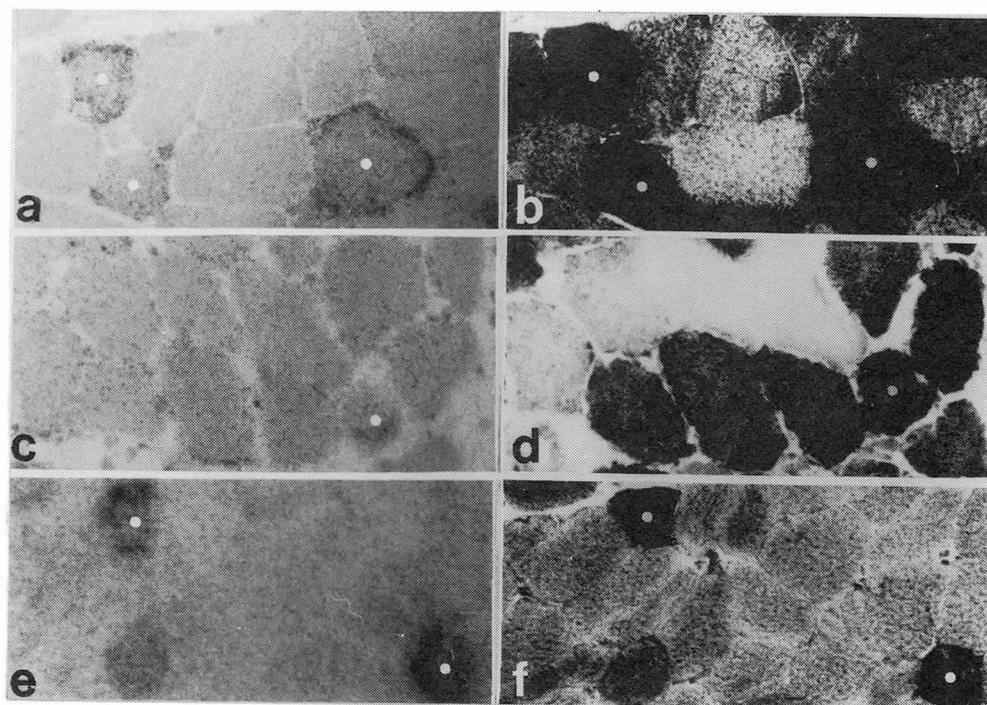


図2  $^{35}\text{S}$ -dCTP 標識 mtDNA probe を用いた ISH と SDH 染色 CPEO (a, b), MERRF (c, d), MELAS (e, f) 患者筋肉における probe 1 による ISH (a, c, e) と、連続切片の SDH 染色 (b, d, f).

この probe 1, probe 2 は MERRF 及び MELAS においては、そのいずれを用いても正常及び変異 mtDNA の両方、すなわち total mtDNA を検出する (図1)。ISH 法としては以下の方法を用いた。

- (1) 上記 3 患者筋において  $^{35}\text{S}$ -dCTP 標識 mtDNA probe を用いて ISH を行い、乳剤を用いて mtDNA を silver grain として検出した。同時に、連続切片を CCO 染色, succinate dehydrogenase (SDH) 染色を行い比較検討した。
- (2) CPEO 患者筋において、非 RI 標識である Digoxigenin (DIG)-dUTP で標識した mtDNA probe を用いて ISH を行い、以下の検出法を検討した。a) Alkaline phosphatase (AP) 法：AP 付加抗 DIG 抗体を用いて、nitroblue tetrazolium salt (NBT), X-phosphate を基質として発色させた。b) Peroxidase (POD) 法：POD 付加抗 DIG 抗体を用いて、diaminoben-

zidine (DAB),  $\text{H}_2\text{O}_2$  により発色させた。c) Gold 法：抗 DIG 抗体と用い Gold 付加二次抗体を用いて検出し、光顕での観察のため silver enhancement を行った。

- (3) (2) の方法のうち b) c) の光顕レベルで ISH がうまくいったことが確認された筋切片をエポン包埋し電顕にて観察した (pre-embedding 法)。
- (4) CPEO 患者筋組織を樹脂包埋して作成した超薄切片を DIG 標識 mtDNA probe を用いて ISH を行った後、Gold で mtDNA を検出し、電顕にて観察した (post-embedding 法)。

## 結 果

- (1) CPEO 患者筋では、先に報告したように CCO 活性のない RRF において total mtDNA が著明に増加しており、正常の mtDNA は CCO 活性陽性線維に多く認められたことから、RRF における mtDNA の増加は主に変異 mtDNA 由来で

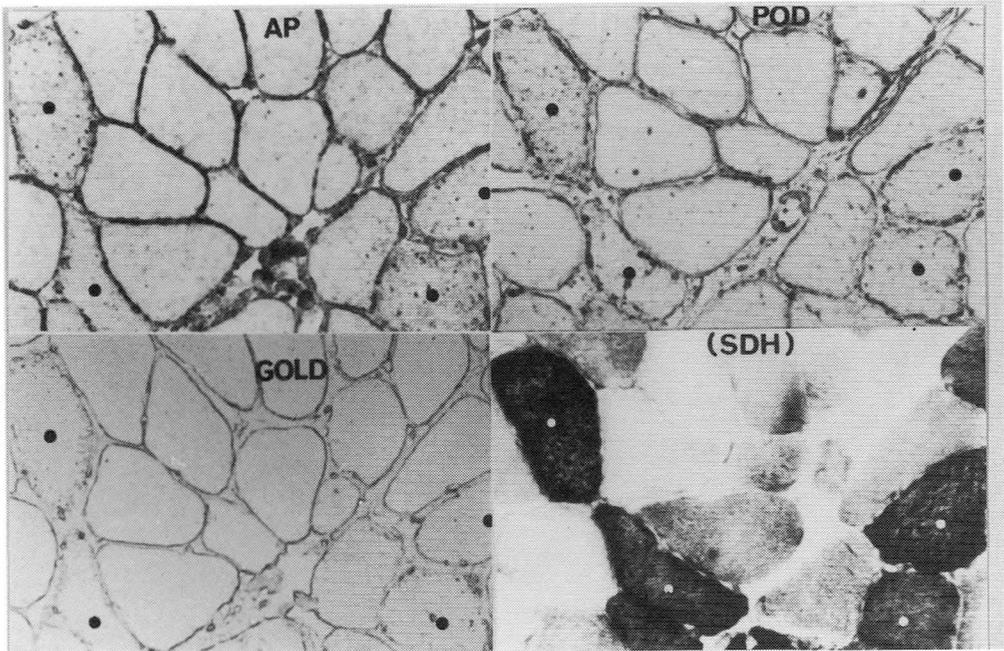


図3 非 RI 標識 (DIG-dUTP) mtDNA probe を用いた ISH probe 1 を用いて CPEO 患者筋連続切片の ISH を行い AP 法, POD 法, Gold 法にて検出した. ・は RRF を示す.

あることが推察された(図2 a, b). MERRF 及び MELAS 患者筋においても, CPEO 患者筋と同様に RRF に対応して total mtDNA 量は増加していた(図2 c, d 及び e, f). MELAS では, SSV (strongly SDH-reactive blood vessels) を示す血管<sup>6)</sup>で total mtDNA の著明な増加が見られた. (2)非 RI 標識 mtDNA probe を用いた光顕レベルにおける ISH 法では, AP 法, POD 法, Gold 法いずれの検出法においても, その検出感度に多少の差異はあるものの mtDNA の検出が可能であった(図3).

- (3)しかし, これらの組織切片の電顕観察(pre-embedding 法)では, 光顕レベルで見られた mtDNA のシグナルは形態の保持が悪くシグナルと mtDNA の対応ができなかった.
- (4)Gold を用いた post-embedding 法では, シグナルの多くはミトコンドリア存在部位に対応しているように思われたが, 場所によってはミトコンドリアと対応しない部位にもシグナルを認めた.

### 考 察

MERRF, MELAS において RRF では total mtDNA の著明な増加が認められた. そして, Southern blot 法及び PCR 法による変異 mtDNA の解析の結果, MERRF 及び MELAS 患者筋ともに約90%程度の比率で変異 mtDNA の混在を認め, これらの RRF において増加した mtDNA は, 主に変異 mtDNA 由来であることが示唆された. total mtDNA の増加した RRF は, CPEO 及び MERRF では CCO 活性が消失していたが, MELAS においては CCO 活性は陽性であり, その染色パターンは total mtDNA が増加していない CCO 活性陽性線維のそれと異なっていた. また, MELAS では SSV に一致して total mtDNA の著明な増加を認めたが, 今回検討した CPEO, MERRF 患者ではこのような所見を認めなかった. このような相違が何故生じるのか病態生理を考える上で興味深いことであり, 今後検討したい. 電顕 ISH の pre-embedding 法において光顕レベルでは mtDNA のシグナルが明らかに認められ

た筋切片が、電顕観察ではミトコンドリアとシグナルとの対応が出来なかった。固定法等形態の保持のためいろいろ検討したが、形態を保つとmtDNAのシグナルが消失するという結果が得られ、今後、この形態保持とシグナルの強さとの相反する関係をどのように解決するか問題として残った。post-embedding法では得られたシグナルがmtDNAに特異的なものであるか否か今後の検討が必要と思われる。

#### 文 献

- 1) Moraes CT, et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *New Engl J Med* 320: 1293—1299, 1989.
- 2) Mita S et al: Recombination via flanking direct repeat is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucl Acids Res* 18: 561—567, 1990.
- 3) Schoffner JM, et al: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell* 61: 931—937, 1990.
- 4) Goto Y et al: A mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348: 651—653, 1990.
- 5) Mita S, et al: Detection of deleted mitochondrial genomes in cytochrome c oxidase deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9505—9513, 1989.
- 6) Hasegawa H, et al: Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. *Ann Neurol* 29: 601—605, 1991.

## Ⅶ. ミトコンドリア脳筋症 (No. 2)

# 43) ミトコンドリア脳筋症における mtDNA・D ループ領域の塩基配列に基づいた系統解析

宝 来 聰\*

研究協力者 後 藤 雄 一\*\* 埜 中 征 哉\*\*

ミトコンドリア脳筋症は、Kearn-Sayre 症候群を含む慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (CPEO), ミオクロノスを特徴とする Myoclonus epilepsy with ragged-red fibers (MERRF), 卒中様症状を特徴とする mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) の 3 型に大きく分類できる。1988年に、まず CPEO において、ミトコンドリア DNA (mtDNA) に欠失があることが発見され、その後1990年には、相次いで、MERRF, MELAS に mtDNA の tRNA 遺伝子上の点突然変異が証明された<sup>1)~3)</sup>。散発例の多い CPEO を除けば、MERRF, MELAS では、変異遺伝子の母性遺伝も明らかにされている。本研究では、これら疾患の遺伝的背景を明らかにするため、多数の脳筋症患者において、mtDNA・D ループ領域の塩基配列を決定し、個々の配列間の塩基置換数に基づいた系統解析を行った。

## 材料および方法

mtDNA・D ループ領域に関しては、宝来らにより、日本人62人を含む、正常現代人128人の塩基配列データが得られている<sup>4)</sup>。さらに制限酵素切断型多型でミトコンドリア全ゲノムを解析した場合の塩基多様性の度合いが、0.4%であるのに対し、この領域ではその約 4 倍の値を示し、ヒトの集団内変異および系統解析には極めて有効な領域である<sup>4)5)</sup>。図 1 には、D ループ領域における正常人

(128人) で観察された多型部位および本研究で用いた 2 種類の PCR プライマーを示した。正常人集団全体では125ヶ所で多型が観察されたが、多型部位はこの配列中の 5' 側に多く集積していることが明らかである。また、それぞれのプライマーを作成した20塩基内には多型は全く観察されない。プライマー-11は L 鎖プライマーで、プライマー-14は H 鎖プライマーである。これら 2 種類のプライマーで増幅される断片の長さは413塩基対で、この領域には全領域中に観察される変異のうちの90%以上が含まれている。ミトコンドリア脳筋症の患者で塩基配列の決定は、非対称 PCR 産物のダイレクトシーケンス法により行った。配列を決定したのは、CPEO(欠失のあるもの21例および、欠失のないもの2例)23例、MERRF(塩基番号8344の tRNA リジン遺伝子に変異をもつ) 3 例および、MELAS(塩基番号3243の tRNA ロイシン(UUR) 遺伝子に変異をもつ) 9 例である。

## 結果と考察

図 2 には、ミトコンドリア脳筋症計35例の配列中に観察された多型部位を示した。Anderson ら(1981)の標準配列と比較すると全体で41ヶ所で多型が観察された。表 1 には Horai & Hayasaka(1990) によって分析された 3 大人種よりなる100名の正常人対照と、35名のミトコンドリア脳筋症患者の比較分析による、D ループ領域における塩基置換のパターンを示した。この結果、観察された全塩基置換に占めるトランジション型置換の割合は、正常人対照では97%であり、患者群では

\* 国立遺伝学研究所

\*\* 国立精神・神経センター神経研究所



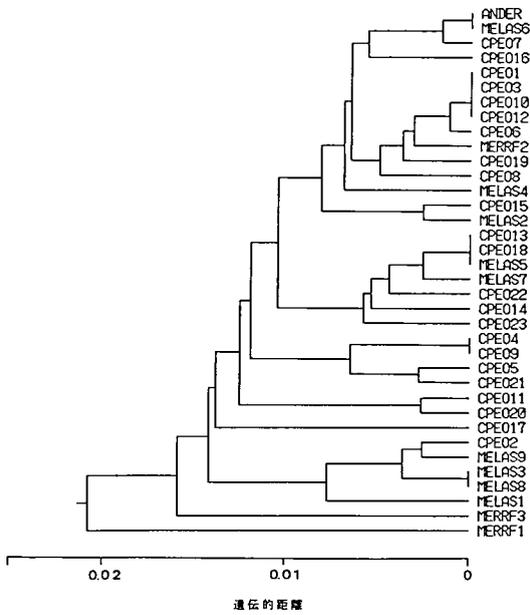


図3 ミトコンドリア脳筋症患者のDループ領域の塩基配列に基づくUPGMA法による遺伝子系統樹

92%とやや低値を示すものの有意の差異はなかった。さらにトランジション型置換の中では、ピリミジン塩基 (TおよびC) 間の置換は、患者群では84%、正常人群では82%と両者の間に差はなかった。表2には、正常人集団および患者集団におけるこの領域での塩基多様性の度合 (Nucleotide diversity) を示した。この値は、集団中からランダムに抽出した2人の塩基配列間の塩基置換数の平均である。3大人種からなる128名の正常人集団の値 (Horai, et al. 1991) は、2.26%であった<sup>4)</sup>。このうち62名のうち日本人集団での値は2.03%となり、患者集団で観察された値1.98%とはほとんど差はなかった。このことは、今回検討したミトコンドリア脳筋症の日本人患者における塩基多様性は、正常人のそれと同レベルであることを示している。

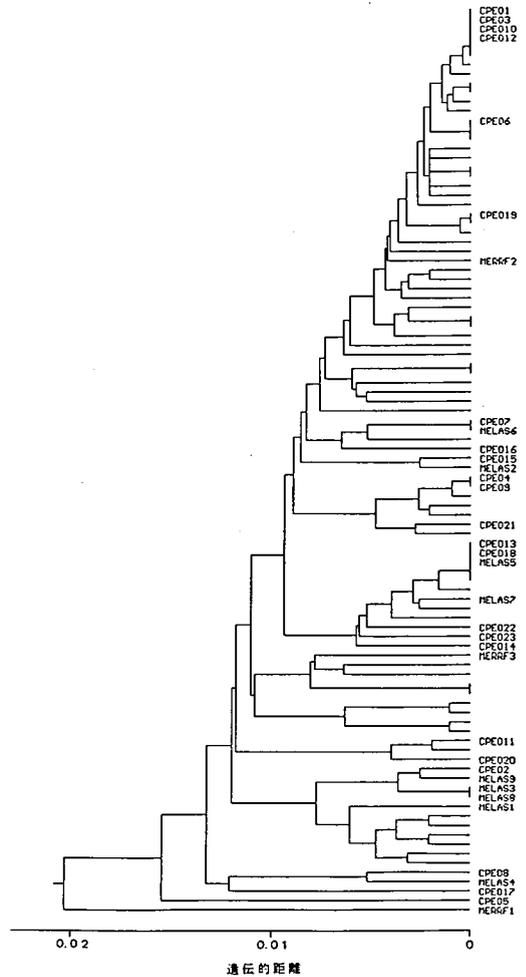


図4 正常日本人 (62名) およびミトコンドリア脳筋症患者 (35名) のDループ領域の塩基配列に基づくUPGMA法による遺伝子系統樹

Ozawaら (1991) は、ミトコンドリア脳筋症を含む神経筋変性疾患患者10名におけるミトコンドリアDNA全塩基配列を報告している<sup>6)</sup>。それぞれミトコンドリア全ゲノムおよびDループ領域のデータを基にして、各配列間の塩基置換数を算出し、遺伝子系統樹を作成したところ、2種類の系統樹の樹型および各系統のしめる位置はほぼ一致した。このことは、変異性のきわめて高いDループ領域の塩基配列の情報は、おおむねミトコンドリア全ゲノムの情報を反映していると考えられる。

本研究でDループ領域の塩基配列を決定した、35名のミトコンドリア脳筋症患者の配列間で塩基置換数を算出し、それを基にUPGMA(unweighted pair-group method with arith metic mean)法で作成した遺伝子系統樹を図3に示した。この系統樹からは3大病型、すなわちCPEO, MELAS, MERRFに特異的なクラスターは存在せず、各疾患は様々な母系系統において発症していることを示している。さらに正常日本人62名およびミトコンドリア脳筋症患者35名の計97名の塩基配列を基に遺伝子系統樹を作成した(図4)。その結果、散発性の多いCPEOだけでなく、MERRFおよびMELASの患者は、複数でかつ相互に異なる母系系統に由来することが示唆された。このことより、MERRFおよびMELAS患者群に特異的に見られる点突然変異は、日本人集団の中でも、ごく最近に独立に生じた遺伝的変異であると考えられる。

#### 文 献

- 1) Holt IJ, Harding AE and Morgan-Hughes JA: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717-719, 1988.
- 2) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, et al:

Myoclonie epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell* 61: 931-937, 1990.

- 3) Goto Y, Nonaka I and Horai S: A mutation in the transfer RNA<sup>Lys(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalo myopathies. *Nature* 348: 651-653, 1990.
- 4) Horai S, Kondo R, Murayama K, et al: Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Phil Trans R Soc Lond B* 333: 409-417, 1991.
- 5) Horai S and Hayasaka K: Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 46: 828-842, 1990.
- 6) Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S, et al: Patient with idiopathic cardio-myopathy belong to the same mitochondrial gene family of Parkinson's disease and mitochondrial encephalomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 518-525, 1991.

## 44) ミトコンドリア DNA 異常とその臨床的多様性に関する研究

岡田 伸太郎\*

研究協力者 乾 幸治\* 福島久雄\* 塚本浩子\*  
谷池雅子\* 田中順子\*

### はじめに

ミトコンドリア脳筋症を呈する10家系(典型的 MELAS2家系, 非典型的 MELAS4家系, 脳筋症3家系, KSS1家系)において現在知られているミトコンドリア DNA (mtDNA) 異常と, 臨床症状との関連を検討した。

### 症 例

いずれの家系も発端者は高乳酸血症, 筋生検にて RRF (ragged-red fibers) を示した。10家系の臨床所見, 筋生検所見を表に示す。発端者は, 家系3, 6は典型的 MELAS 病像を呈し, 家系1, 2, 4, 5, はそれぞれ心症状を呈する, 外眼筋麻痺を呈する, 卒中様症状を欠く, 周期性嘔吐を欠き心症状を呈する点において非典型的とした。家系7, 8は MELAS, MERRF, KSS のいずれにも分類不能でミトコンドリア脳筋症とした。家系9は KSS の病像を呈したが, 家系10は網膜色素変性を呈したが外眼筋麻痺, 心症状を欠きミトコンドリア脳筋症とした。家系2の姉, 家系10の発端者はインスリン依存型糖尿病を合併していた。家系1, 7の発端者は蛋白尿を示し, 腎生検で巣状糸球体硬化症と診断されていた。家系2の姉, 母は筋弱力を含む神経症状を呈し, 家系3の母, 母方叔母は同様に筋症状, 神経症状を呈したが MELAS に認められる症状と大きく異なっていた。

いずれの症例も呼吸鎖酵素 (Complex I, II,

III, IV) は正常であったが Cytochrome C Oxidase 染色にて部分欠損を家系7, 8, 9, 10の発端者に認めた。

### 実験方法

末梢全血, 筋生検材料より常法により DNA を抽出した。

#### PCR 法による tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>の変異の検出

tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>を含む mtDNA #3130~4262の領域を1サイクル(94°C30秒, 55°C30秒, 72°C 2分)を30回行い, その後 PCR 産物を抽出後, 制限酵素 Apa I で消化し, 1.5%のアガロースゲルにて電気泳導し解析した。

#### PCR 法による tRNA<sup>Lys</sup>の変異の検出

tRNA<sup>Lys</sup>を含む mtDNA8278~8375の領域を Zeviani ら<sup>1)</sup>が報告した2ヶ所の mismatch を含む antisense プライマーを用い上記の方法にて増幅し, 制限酵素 Bgl I にて消化後, 3%のアガロースゲルにて電気泳導し解析した。

#### サザンプロット法による解析

mtDNA #3243変異の量的解析は, 抽出 DNA を Apa I にて消化後, PCR 法にて増幅した産物 (#3305~4262) をプローブとして用い常法にてサザンプロットを行い, スポットを切りとり液体シンチレーションカウンターにて測定した。mtDNA の欠失の検索は, 抽出 DNA を Pvu II にて消化後, 胎盤よりの抽出 mtDNA をプローブとして同様に行った。

#### mtDNA の塩基配列の決定

家系10の発端者においては PCR 法, ABI 社の

\*大阪大学医学部小児科

シーケンサーを用い直接法にて mtDNA の塩基配列の決定を行った。

### 結果と考察

#### PCR study

全血, 筋よりの DNA を用い, #3130~4262 の領域は 1.1kbp として増幅され, #3243 に変異 (A → G) があると新たな Apa I 切断部位が形成され<sup>2)</sup>, 1.0kbp のバンドが生じる。家系 1~6 の発端者, 家系 1~4, 6 の母, 家系 3 の母方の親族, 家系 2, 5, 6 の姉, 妹に 1.0kbp のバンドが認められた(図)。これらの結果は検索できた筋生検材料にても確認された。一方, MERRF の変異はいずれの家系においても見いだされなかった。正常人においては MELAS, MERRF の変異は見いだされなかった。

#### サザンプロット解析

PCR の結果を確認し, mtDNA 変異を量的に評価するためサザンプロットを行った。測定した異常ミトコンドリア量を表に示す。筋における異常 mtDNA は 60% 以上であった。しかし全血の検索では典型的 MELAS の発端者では, 28%, 70% であったが, 非典型例では 50~58% であった。一方, 何らかの症状を呈した親族では 9~51% であり, 正常の母では 0~17% であった。父, 臨床的に正常な弟では 0% であった。mtDNA の欠失は家系の発端者 9, 10 で認められたが, 母においては認められなかった。欠失 DNA 量は筋では両者とも 80% であったが(表), 家系 9 の発端者では血液では認められなかったが, 家系 10 の発端者では 60% 認められた。家系 9 の発端者での欠失範囲はおおよそ mtDNA #5900~12000, 約 5.6kbp であった。また家系 10 の発端者での欠失範囲は, mtDNA 8469~13460, 4977bp の欠失でその両端はいままで報告されている acctcctcacca の 13bp の繰り返し配列を含んでいた<sup>3)</sup>。

本研究にて mtDNA 3234 の A → G 変異は家系 1~6 の発端者, 家系 5 の母を除く母, およびその母方の親族, 姉, 妹において heteroplasmly の状態で存在することがあきらかとなった。家系 5 では変異は母では見いだされなかったが, 無症状の

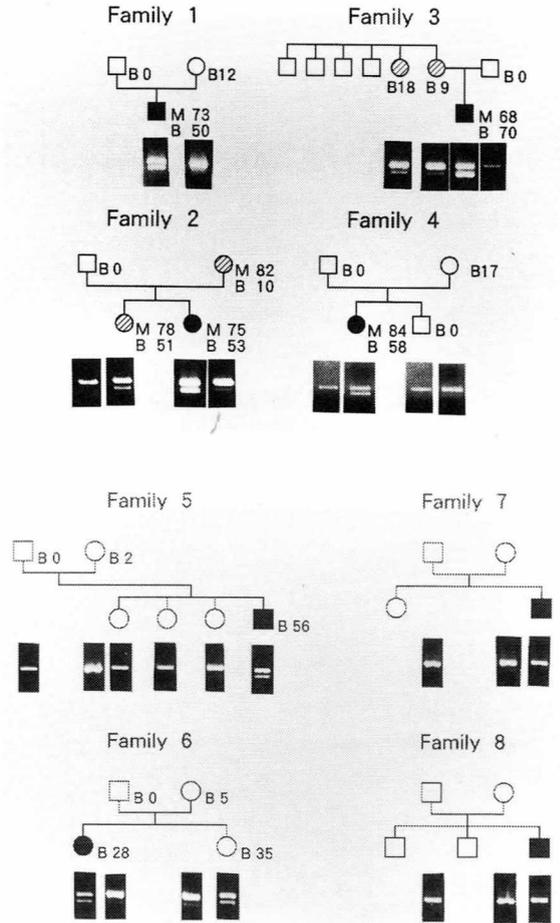


図 ミトコンドリア脳筋症家系図と mtDNA 3243 変異の PCR 検出

黒く塗りつぶしてあるのが発端者, 斜線は何らかの症状をもつ家族。1.1kbp の PCR 増幅産物は正常では Apa I 消化後変化無いが, 3243 に変異 (A → G) があると新たな 1.0kbp のバンドを生じる。家系シンボル右側の数字はサザンプロットでの変異 mtDNA 量 (M: 筋, B: 全血)。

姉に変異が認められたことより, germline の mosaicism が考えられる。以上の結果は, mtDNA 3243 変異が母系遺伝することを示し, この変異が MELAS の主な変異ではあるが, 成人でこの変異を持ち症状を示す場合には筋弱力, 精神症状など MELAS と異なった症状を呈し臨床症状は多彩であることが判明した。この症状の多彩

表 Summary of clinical and laboratory features in 10 families

	F-1	F-2			F-3		F-4	F-5	F-6	F-7	F-8	F-9	F-10
	P	P	S	M	P	MA	P	P	P	P	P	P	P
Age at onset (Y)	7	6	6	52	2	28	18	8	7	7	11	11	3?
Present age	21	22	23	53	6	34	38	12	16	11	19	16	19
Family history	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	(dead)	-	-
Features													
Ophthalmoplegia	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Retinal degeneration	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	+
Cardiomyopathy	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CSF protein 100mg/dl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Myoclonus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muscle weakness	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Seizure	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Dementia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Short stature	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
*Episodic vomiting	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
*Cortical blindness	+	+	-	-	+	-	-	+	+	?	-	-	-
*Hemiparesis, hemianopsia	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Hearing loss	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactic acidosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Low density on CT	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
RRF	+	+	-	-	+	?	+	+	+	+	+	+	+
SSV	+	-	+	-	-	?	?	-	?	?	-	+	-
CCO	N	N	N	N	N	?	?	N	?	?	FD	FD	FD
Leu(UUR) mutation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
% of mutation in muscle	73	75	78	82	68	ND	84	ND	ND	0	0	0	0
in blood	50	53	51	10	70	9	18	58	56	28	0	0	0
tRNA(Lys) mutation in blood	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% of deletion in muscle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	80
in blood	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60

F: Family, P: Proband, M: Mother, MA: Maternal Aunt, RRF: Ragged Red Fibers, SSV: Strongly Succinate Dehydrogenase Positive Vessels, CCO: Cytochrome C Oxidase Staining, ?: Uncertain, N: Normal, FD: Focal Deficiency, ND: not determined. \*: Characteristic features of MELAS.

性は異常 mtDNA と正常 mtDNA が heteroplasmy の状態で存在すること、臓器によるミトコンドリアによるエネルギー依存度の違いによると考えられる。

筋での異常 mtDNA 量は68%~84%であり(表)、この量は筋弱力来すに充分な量であると考えられ、Gotoらの報告<sup>2)</sup>とも一致する。一方血液での異常 mtDNA 量は様々であり、必ずしも臨床症状との相関を認めなかった。罹患臓器での異常 mtDNA の定量が今後重要と考えられる。

mtDNA 欠失に関して、家系9,10の発端者ではKSSによく認められる領域の欠失を認めたが、家系1~8では欠失を認めなかった。家系9の発端者はKSSと考えられるが、家系10では外眼筋麻痺、心伝導障害を欠き、糖尿病、軽度の睥外分泌異常を伴っていた。また異常 mtDNA 量は筋では両症例とも80%と差異を認めなかったが、血液では家系9では0%、家系10では60%であった。一方母では欠失を認めなかった。最近 mtDNA の欠失が明らかにされた Pearson Marrow Syndrome では汎血球減少を伴うが、その後にKSSの症状を呈した症例も報告されており<sup>4)</sup>、家系10はこれに近似した症例ではないかと考えている。

KSSにおいては mtDNA の欠失が、MELASにおいては tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>3243に、MERRFにおいては tRNA<sup>(Lys)</sup>8344に点突然変異が認められ、症候群と遺伝子異常はよく一致すると報告されてきた<sup>2)~5)</sup>。しかしPCR解析やサザンブロットにより簡便に mtDNA 解析がされるようになると逆に表現型の多様性が認識されるようになってきた。今後 mtDNA の異常がいかんして発病にいたるかという点に関し研究を進めていきたい。

## 文 献

- 1) Zeviani M, et al: Rapid detection of the A → G<sup>(8344)</sup> mutation of mtDNA in Italian families with myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). Am J Hum Genet 48: 203, 1991.
- 2) Goto Y, et al: A mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial cephalomyopathies. Nature 348: 651, 1990.
- 3) Schon E A, et al: A direct repeat is a hot spot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. Science 244: 346, 1989.

- 4) Mcshane M A, et al : Pearson syndrome and mitochondrial encephalomyopathy in a patient with a deletion of mtDNA. *Am J Hum Genet* 48 : 39, 1991.
- 5) Shoffner J M, et al : Myoclonic epilepsy and ragged red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell* 61 : 931, 1990.

## 45) ミトコンドリア脳筋症の病型と遺伝子異常

佐藤 猛\*

研究協力者 平 沢 浩 子\* 山 本 剛 司\* 中 村 眞 二\*\*  
北 澤\*\*\* 川 井 元 春\*\*\*\* 立 岡 良 久\*\*\*\*\*

### はじめに

ミトコンドリア脳筋症ではすでに慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (CPEO) における mtDNA の大欠失, MELAS や MERRF における tRNA<sup>Leu</sup> や tRNA<sup>lys</sup> の変異が報告されている。我々はこれらのミトコンドリア脳筋症の症例に加え, 非定型例も含め詳細な mtDNA の解析を施行中であるが, 現在までに得られた成績の概要を報告する。

### 対象と方法

対象症例は典型的なミトコンドリア脳筋症29例 (CPEO19例, MELAS 7例, MERRF 疑 3例), 生検筋の組織化学や Mit. 酵素活性測定などで Mit. 異常が見出された HMSN など 4例, 急性筋壊死症 9例, その他の疾患39例, 計82例である。Southern blotting: mtDNA を宝来聡博士から供与を受けた。これを Pvu II で linearize 後,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP または  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP を multiprime labeling 法で標識したものをを用いた。さらに total mtDNA を適当な制限分解酵素で切断した16種の断片を pUC19ベクターにてサブクローンしたものをを用いた。凍結骨格筋から抽出した DNA を制限分解酵素で切断, 電泳後, gene screen plus 膜に転写し, ハイブリダイゼーションを行った。

さらに polymerase chain reaction (PCR) 法により, 欠失 DNA の両端をはさむように合成し

た origoprimer を用いて, mtDNA の一部を, 1,000~2,000kb 増幅し, 適当な制限分解酵素で切断した後, Southern blot hybridization を施行し, 欠失部位をより正確に同定した。

tRNA の変異は合成 primer を用い, PCR で変異部を中心に増幅した mtDNA を用い, 適当な制限分解酵素で切断し, 電気泳動した (Shoffner 1990<sup>1)</sup>, Goto 1990<sup>2)</sup>。

mtDNA の塩基配列の解析は, mtDNA の一部を PCR法により300~400kb 毎に増幅し, 得られた DNA を Taq dye terminator法にて ABI 373A DNA sequencer により解析した。

### 結果と考察

1. mtDNA の欠失。一部の成績は既に本研究班で報告してあるが, 検索した CPEO19例中12例に mtDNA の大欠失を認めた (表 1)。Kearns-Sayre 症候群不全型および全身ミオパチーを伴う症例では11例中9例, 眼筋ミオパチーのみのものでは8例中3例に欠失がみられた。前者の3例と後者の1例に多重欠失が見出された。眼筋ミオパチーのみの2症例では四肢の筋力が正常にもかかわらず変異 mtDNA を30~68%混在していた。なお, total mtDNA を用いた Southern blotting では表 1 のように他の疾患では欠失 mtDNA は全く検出されなかった。

2. MELAS。臨床的に MELAS と診断された症例全例に報告されているような Mit. 遺伝子番号3423bp の A → G 点変異, すなわち tRNA<sup>Leu</sup> の変異を認めた (図)。検索した2例はリンパ球にも

\* 順天堂大学医学部脳神経内科

\*\* 順天堂大学医学部共同病理

\*\*\* 東京大学医学部研究所寄生虫学

\*\*\*\* 山口大学医学部神経内科

\*\*\*\*\* 京都市立病院神経内科

表 1 Mitochondrial DNA deletions in mit. encephalomyopathies

Groups	No.	Deletions
1. CPEO		
KSS	4	3
Ocular + general	7	6
Ocular	8 (19)	3 (12)
2. Definite mit. encephalomyopathies		
MELAS	7	0
MERRF susp.	3	0
3. Undefined mit. encephalomyopathies		
Mit. myopathies	6	0
Others	19 (25)	0
	54	

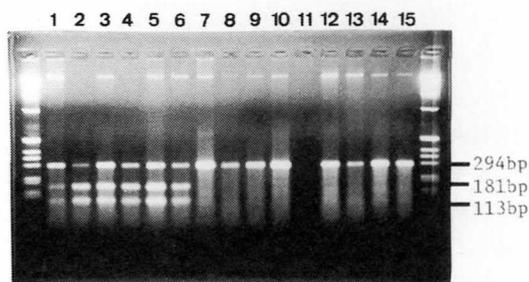


図 MELAS 6 例の PCR  
症例 1 ~ 6 は遺伝子番号 3423bp の A → G 変異を示す

同様の mtDNA 変異が見出された。1 例では変異 mtDNA 部を直接に塩基配列を解析して確認した。3. tRNA<sup>Lys</sup> の変異の有無。ミオクローヌスにミオパチーを伴い MERRF が疑われた 3 例、非定型的 SCD や HSMN に Mit. 異常を伴った症例など計 10 例について、MERRF で報告されている tRNA<sup>Lys</sup> の変異の有無を検索した。しかし、我々の症例ではこの部の変異は 1 例も見出せなかった。PCR にて遺伝子番号 8344 の近傍を検索している際に mtDNA 8278 ~ 8280, もしくは 8281 ~ 8289bp 間の非コード領域の 9bp の欠失がしばしば認められた。この部の欠失は正常者に見出される variation としてすでに記載されているが (Wrischnik, 1987)<sup>3)</sup>, 我々の 82 例の生検筋の mtDNA についてこの 9bp 欠失の有無を検索した。その結果、表 2 のように種々の疾患に見出されることが判明した。4. mtDNA の塩基配列の解析。表 3 に示すよ

うに、ミオクローヌスを伴い、高乳酸血症および生検筋のミトコンドリアの呼吸鎖酵素活性の低下を認めた 2 例(症例 1, 2), 同様に生検筋のミトコンドリア酵素異常を伴った父子例(症例 3, 4), および対照として多発性筋炎の 1 例(症例 5) について現在までのところ mtDNA 4048 ~ 10609 までの塩基配列の解析を行った。Anderson, et al (1981)<sup>4)</sup>, Ozawa, et al (1991)<sup>5)</sup>, Kobayashi, et al (1991)<sup>6)</sup> に記載されている mtDNA の塩基配列を参考とした。

その結果、5 例すべてに Anderson の記載とは異なる部位に多くの塩基置換が見出された。アミノ酸レベルでの変換を表 4 に示す。mtDNA 4769, 5253 および 9559 の変異は全例に共通しており、日本人特有か Anderson の sequence の error かも知れない。アミノ酸の性質からみて大きな変換を示したのは、症例 1 では遺伝子番号 10609 の ND4 領域の疎水性である isoleucine で、親水性である arginine へ変換した。症例 2 では遺伝子番号

表 2 9 bp deletion in 8272-8280

CPEO	2
MELAS	3
HSMN II	2
SCD	2
Alcohol	1
Myoglobinuria	1
Elevated CK	1
Collagen	1

13/83 examined

表 3 Mitochondrial DNA variations in patients with myoclonus epilepsy and lactic acidosis

Pt. No.	1	2	3	4	5
Diagnosis	Myoclonus	Myoclonus	HSMN II	HSMN II	Myositis
Age	30	22	32	64	26
Sex	M	F	M	M	F
Age at onset	10	14	6	34	26
Myoclonus	+	+	-	-	-
Mental retardation	+	+	-	-	-
Ataxia	+	+	-	-	-
Neuropathy	-	-	+	+	-
Myopathy	-	-	-	-	+
Lactic acidosis	+	+	±	-	-
Decreased activity of mit. enzymes	Complex I-III	COX	COX	COX	-

表4 Mitochondrial DNA variations in patients with myoclonus epilepsy and lactic acidosis

Number	Region	Amino acid in							
		Pt.No.							
		1	2	3	4	5	A	O	K
4048	ND1		Asn*				Asp		
4164	"		Met*				Ile		
4231	"				Val		Ile		
4769	ND2	Met	Met	Met	Met	Met	Ile	Met	Met
4824	"			Ala			Thr		
5199	"	Val					Ile		
5253	"	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro		
5460	"		Thr				Ala		
6455	COXI		Leu*				Phe	Leu	
7853	COXII		Val				Ala		
9559	"	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Pro
10609	ND4	Arg*					Ile		

4048, ND1領域の arginine が aspsaginic acid, 4161の isoleucine が methionine に変換していた。これらの2症例の遺伝子変異の意義についてはさらに検討を続ける予定である。

#### 文 献

1) Shoffner JM, et al: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. Cell 61: 931, 1990.

2) Goto Y, et al: A mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. Nature 348: 651, 1990.

3) Wrischnik LA, et al: Length mutations in human mitochondrial DNA; direct sequencing of enzymatically amplified DNA. Nucleic Acids Res 15: 529, 1987.

4) Orita M, et al: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5: 874, 1989.

5) Ozawa T, et al: Patients with idiopathic cardiomyopathy belong to the same mitochondrial DNA gene family of Parkinson's disease and mitochondrial encephalomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 177: 518, 1991.

6) Kobayashi Y, et al: Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). Am J Hum Genet 49: 590, 1991.

## 46) 常染色体優性遺伝を示したミトコンドリア脳筋症 症例の骨格筋ミトコンドリア DNA の解析

川 井 尚 臣\*

研究協力者 赤池 雅史\* 横井 健治\* 横越 浩\*  
西田 善彦\* 増田 健二郎\* 斎藤 史郎\*

### はじめに

ミトコンドリア病は母性遺伝を示すものが多いが、その中の慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO) は多くが孤発例であり遺伝型は不明である。しかし、極めて稀であるが常染色体優性遺伝を示す CPEO の家系例のあることが知られている<sup>1)~3)</sup>。CPEO の多くはミトコンドリア DNA (mtDNA) に大きい欠失があり<sup>4)</sup>、このような家系の存在は細胞の核 DNA と mtDNA との密接な関連を示唆すると考えられているが、両者の具体的な関係については不明である。われわれは常染色体優性遺伝を示す CPEO の家系例を経験し、その発端者について骨格筋 mtDNA の遺伝子解析を行ったのでその成績を述べる。

症例：58歳，男性。既往歴には特記事項なし，発端者の父と姉，妹の各1名に眼瞼下垂と嚥下困難があり，妹と息子，娘の各1名に眼瞼下垂がある (図1)。20歳頃より両側の眼瞼下垂，38歳頃より嚥下困難，41歳頃より上肢の筋力低下があり，これらの症状が次第に進行するため49歳のとき当科に入院し，三角筋の筋生検をうけた。その後，嚥下性肺炎を繰り返している。

一般理学所見：体格中等度，栄養はやや不良である。脈拍70/分，整。血圧130/70mmHg。眼底，胸腹部などに異常所見はなく，下腿浮腫もない。

神経学的所見：意識は清明で，知能は正常である。

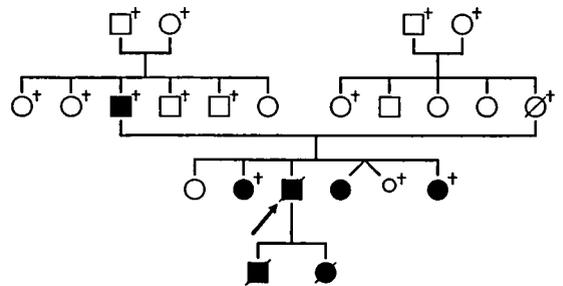


図1 Ka 家家系図，三代にわたり病者がみられ，男女ともに発症している。発端者の父親，息子はともに病者である。○，■，●：診察済み。■，●：眼瞼下垂+ (外眼筋麻痺)。

両側の眼瞼下垂，外眼筋麻痺がみられ，鼻声，嚥下困難などもある。肩甲部及び上肢の筋萎縮と筋力低下がみられるが，ミオクロームなどの不随意運動はみられない。協同運動は正常で，Romberg 徴候もない。四肢の深部反射は正常で，病的反射はなく，知覚系，自律神経系にも異常所見はなかった。

検査成績：血清 CK 活性値，血清 Mb 値は正常で，血中乳酸値11.95mg/dl，ビルビン酸値0.82 mg/dl と正常値である。阻血下前腕試験では負荷後1分で乳酸値が32.23mg/dl と前値の約3倍の上昇を示した。心電図では伝導障害などの異常所見はなかった。頭部 CT では脳梗塞を示唆する低吸収域はなかった。脳波には全般に slow  $\alpha$ -wave が認められた。運動神経伝導速度は正常で，筋電図でも異常所見はなかった。テンシロンテストは

\* 徳島大学医学部第一内科

陰性。三角筋の生検組織の HE 染色では筋細胞の軽度の大小不同がみられ、一部の筋細胞で外郭の不整形を示す細胞がみられた。Gomori-Trichrome 染色で ragged-red fiber が散在性に認められた(図 2)。以上の家系検索、病者の臨床症状ならびに筋生検所見より本症例を常染色体優性のミトコンドリア脳筋症と診断した。

ミトコンドリア DNA の解析：生検三角筋から抽出した DNA を鋳型として、プライマー L981：5'-CGGACTTCACGTCATTATTGG-3' (塩基番号 9818-9838) とプライマー H1505：5'-TCTGAGTAGAGAAATGATCCG-3' (塩基番号 15078-15058) を用いて polymerase chain reaction (PCR) による増幅を行い、得られた DNA をアガロースゲル電気泳動にて分離し、異常バンドを切り出し精製した後、2本鎖 mtDNA を鋳型として 7-deaza sequenase を用いたダイデオキシ法により塩基配列を調べた。

## 成 績

### ミトコンドリア DNA の解析

1. PCR の成績：上記のプライマーを用いて PCR で増幅した DNA を電気泳動した結果、1.0Kbp と 600bp の 2 個の短い異常バンドが認められた。この成績より、mtDNA の複製開始点間に 4.2Kbp と 4.6Kbp の 2 種類の欠失があることが推定された (図 3)。

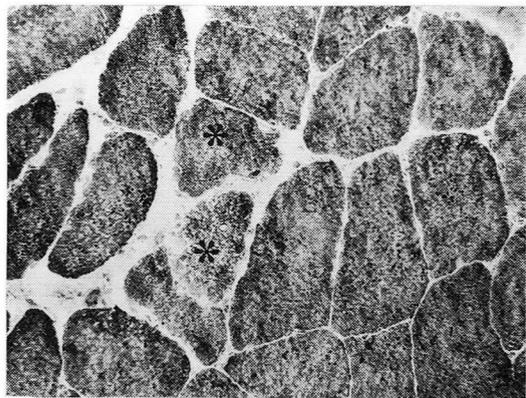


図 2 三角筋生検の Gomori-Trichrome 染色。200倍。Ragged-red fiber が散在性にみられる (\*)。

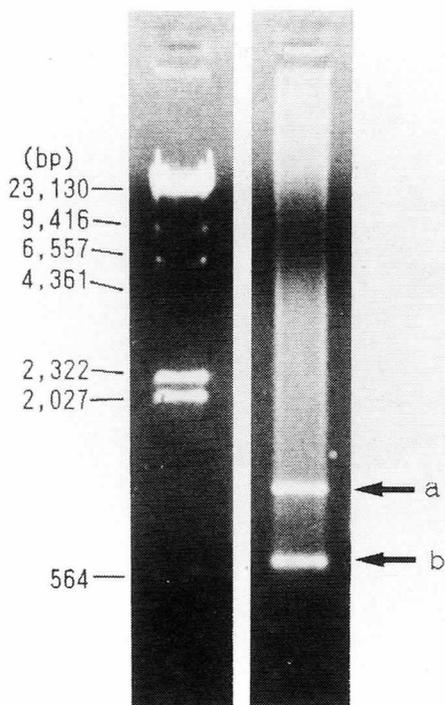


図 3 PCR 法の成績。プライマー L981 とプライマー H1505 を用いた PCR による増幅。1.0Kb (a) と 600bp (b) の 2 個の短い異常バンドが認められた。

2. PCR-直接シーケンス法：上記で得られた 2 つの異常バンドの塩基配列を調べたところ、1.0Kbp のバンドは塩基番号 10,063 から 14,274 までの 4,212bp の欠失によることがわかった (図 4)。そして、この欠失断端には 5'-AA-3' の 2bp の反復配列が認められた。もう一方の 600bp のバンドについては現在塩基配列を解析中であるが、塩基番号 10,360 近傍から 15,060 近傍までの欠失のあることが判明している (図 5)。

## 考 察

本家系では三代にわたり病者がみられ、男女ともに発症し、また発端者の父親、息子ともに病者であることより、本家系の CPEO の遺伝型は常染色体優性と考えられる。このような遺伝型を示す

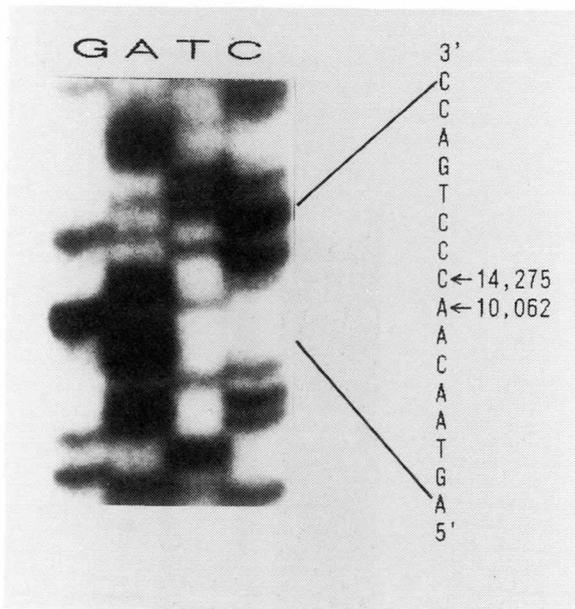


図4 PCR法により増幅された異常バンド(a)の塩基配列(PCR-直接シーケンス法). 塩基番号10063から14274までの4212bpの欠失が認められた.

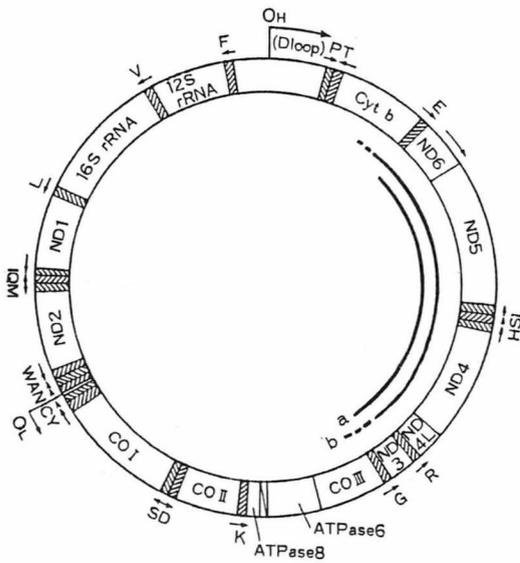


図5 本例におけるミトコンドリアDNAの欠失部位. 2個の欠失はともに複製開始点間にある.

家系例は現在までに Zeviani らの3家系<sup>2)</sup>, Otsuka らの1家系<sup>3)</sup>の報告があるのみである. Zeviani らは当初, 彼らの家系において mtDNA の D-loop 領域を起始部とする多重欠失があると報告したが<sup>1)</sup>, その後常染色体優性遺伝を示す3家系の患者の mtDNA を分析し, その多くは mtDNA の重鎖複製開始点と軽鎖複製開始点の間に複数の大欠失が認められたと報告している<sup>2)</sup>. また, Otsuka らは常染色体優性遺伝を示す CPEO の1家系において, やはり mtDNA の複製開始点間に多重欠失があることを報告している<sup>3)</sup>. 我々の症例でも mtDNA の複製開始点間に2種類の大欠失が認められた. 本例, 文献例ともに常染色体優性遺伝の CPEO では mtDNA の複製開始点間に複数の大欠失があり, これが常染色体優性遺伝を示す CPEO の mtDNA 異常の特徴かも知れない.

人のミトコンドリアについては, 受精時に精子由来のミトコンドリアは卵子の中に入らないため, 人の mtDNA はすべて母親由来であるとされている. 我々の CPEO の家系では異常形質が父親を通じてその子へ遺伝しているが, 上記の理由により欠失を有する異常 mtDNA が父から子へ伝わり発症したとは考え難い. これについては現時点では, 受精卵から個体が形成されていく過程で異常を有する核遺伝子が mtDNA に作用し mtDNA に欠失が生じるのではないかと推定されている<sup>2)</sup>. 我々の症例を含め従来報告された症例<sup>2)3)</sup>で, 欠失部位が mtDNA の重鎖複製開始点と軽鎖複製開始点の間に存在することや, 欠失断端にしばしば反復配列が認められることなどは, mtDNA の複製とこの欠失が密接に関係していることを示唆する成績である. このような欠失を起こす機序としては, 核遺伝子に異常が生じ, その核遺伝子にコードされる mtDNA 結合蛋白質に異常(欠損, 欠失)が起こり, その結果として mtDNA に strand slippage あるいは mispairing が起こるとい報告<sup>5)</sup>がある. すなわち常染色体優性遺伝を示す CPEO では mtDNA の複製に関与している蛋白質をコードしている核遺伝子の異常のあることが推定される.

一方, Gyllensten らは, マウスにおいて低頻度

ながら父親の mtDNA が受精卵へはいることを報告<sup>6)</sup>し、父親の異常 mtDNA が遺伝することによりミトコンドリア病が発症する可能性を指摘している。

以上のように常染色体遺伝を示すミトコンドリア脳筋症における mtDNA 欠失発生の機序についてはいくつか推定されているが未だ解明されていないのが現状である。しかし、このような症例は核による mtDNA 複製の制御機構が存在することを示唆する症例であり、CPEO の mtDNA 異常を起こす機序の解明に役立つのみならず、核とミトコンドリア DNA との相互関係を明らかにする上で貴重と考えられる。

#### ま と め

常染色体優性遺伝を示す慢性進行性外眼筋麻痺家系を呈示し、発端者の mtDNA にて複製開始点間に 4.2Kbp と 4.6Kbp の 2 種類の欠失のあることを明らかにした。これらの成績は mtDNA の複製に核遺伝子の関与を示唆する。

#### 文 献

1) Zeviani M, Servidi S, Gellera C, et al: An autosomal dominant disorder with multiple

deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 339: 309, 1989.

- 2) Zeviani M, Bresolin N, Gellera C, et al: Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome; a new autosomal dominant disease. *Am J Hum Genet* 47: 904, 1990.
- 3) Otsuka M, Nijjima K, Mizuno Y, et al: Marked decrease of mitochondrial DNA with multiple deletions in a patient with familial mitochondrial myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 167: 680, 1990.
- 4) Holt IJ, Harding AE and Morgan Hughes JA: Deletion of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717, 1988.
- 5) Mignotte B, Barat M and Mounolou JC: Characterization of a mitochondrial protein binding to single-stranded DNA. *Nucleic Acid Res* 13: 1703, 1985.
- 6) Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, et al: Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352: 255, 1991.

# 47) 種々のミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア DNA の検討

納 光 弘\*

研究協力者 中川正法\* 山田博久\* 樋口逸郎\*  
栗山 勝\* 伊佐敷 靖\*\* 宮田昌明\*\*\*

## 目 的

ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア DNA (mtDNA) 異常が明らかとなってきたが、遺伝子レベルでの異常が不明な症例も少なくない。今回、自験例を中心にミトコンドリア脳筋症の臨床的多様性と mtDNA 異常との関連について検討した。

## 対象および方法

臨床的、病理学的にミトコンドリア脳筋症と診断された45例 (Kearns-Sayre 症候群 (KSS) 5例、眼筋型ミオパチー (眼筋型) 17例、MERRF 5例、MELAS 8例、Leigh 脳症疑い 3例、病型未定 7例) の生検筋、末梢血または培養線維芽細胞より DNA を抽出し、mtDNA の欠失および点変異 (np3243<sup>1)</sup>、np8344<sup>2)</sup>) の検索を行い、臨床症状・検査所見との比較検討を行った。

## 結 果

慢性進行性外眼筋麻痺：不全型を含む KSS 5例全例と眼筋型 11例に mtDNA の欠失を認めた。臨床症状および検査所見との比較では、KSS 典型例 4例の平均発症年齢が 9.8歳と mtDNA 欠失を認めた眼筋型の 26歳、認めなかった眼筋型の 39歳と比較して明らかに若年発症であった。特に、KSS では、知能障害、MRI 異常、下肢 SEP の中枢伝導

時間遅延、脳波異常、髄液蛋白高値が明らかであった<sup>3)</sup>。mtDNA 欠失を認めた眼筋型と認めなかった眼筋型とは、脳波異常が mtDNA 欠失を認めた群でやや多い以外には明らかな相違を認めなかった。

MERRF：5例中 3例で、塩基番号 8344 の A to G の点変異を認めた。点変異を認めなかった 2例は、姉妹例であり、臨床症状は MERRF として矛盾する点はなく、家族歴も母性遺伝を示唆していた。点変異を認めた 3例中 2例に明らかな心症状を認めた点が注目された。1例は拡張型心筋症を示し心不全にて死亡し、他の 1例は後述する症例 3 であるが非閉塞性肥大型心筋症を示した。

MELAS：8例中 7例で塩基番号 3243 の点変異を認めた。1例は、経過中明らかな脳卒中様発作を認めなかったが、剖検にて多数の脳梗塞巣を認めた。MERRF と比較して低身長 (148cm)、低体重 (34kg) の傾向にあり、発作性頭痛・嘔吐、脳卒中様発作、けいれん発作がほぼ全例に認められた。なお、Leigh 脳症 3例と病型未定例では、mtDNA の欠失および 8344 と 3243 の点変異を認めなかった (表)。

以下、特異な臨床症状を示した例について報告する。

症例 1：14歳女性、診断名 KSS、主訴は歩行障害。

現病歴：4歳10ヶ月、けいれん発作が出現。11歳下垂体性小人症と診断され成長ホルモンの投与を受けるも効果なし。13歳ごろより、学業成績の低

\* 鹿児島大学医学部第三内科

\*\* 鹿児島大学医学部眼科

\*\*\* 鹿児島大学医学部第一内科

表 ミトコンドリア脳筋症の臨床症状と mtDNA 異常

病型	KSS	眼筋型	眼筋型	MERRF	MELAS	Leigh脳症	病型未定
症例数	5	11	6	5	8	3	7
mtDNA欠失	5	11	0	0	0	0	0
3243点変異	0	0	0	0	7	0	0
8344点変異	0	0	0	3	0	0	0
年齢	25	42	60	46	34	11	39
発症年齢	14	26	39	18	23	2	32
家族歴	1/5	1/11	1/6	4/5	0/8	2/3	3/7
外眼筋麻痺	5/5	11/11	6/6	0/5	2/8	1/3	0/7
網膜色素変性	5/5	1/11	0/6	0/5	2/8	1/3	1/7
小脳症状	5/5	0/11	1/6	5/5	4/8	1/3	3/7
難聴	4/5	2/11	1/6	5/5	8/8	1/3	2/7
知能障害	4/5	1/11	1/6	5/5	6/8	3/3	4/7
脳卒中様発作	0/5	0/11	1/6	2/5	7/8	0/3	1/7
けいれん発作	1/5	0/11	0/6	5/5	7/8	3/3	4/7
ミオクローヌス	0/5	0/11	0/6	5/5	4/8	0/3	0/7
頭痛・嘔吐	0/5	0/11	0/6	0/5	7/8	0/3	1/7
心伝導障害	4/5	1/11	1/6	0/5	1/8	0/3	0/7
心筋症	0/5	0/11	0/6	2/5	4/8	0/3	0/7
頭部CT/MRI異常	5/5	2/ 5	2/3	5/5	8/8	3/3	5/6
脳波異常	5/5	3/ 8	0/5	5/5	6/8	3/3	5/5
下肢SSEP遅延	5/5	0/ 3	0/2	—	—	—	—
髄液蛋白 (mg/dl)	107	35	46	38	43	16	31

下、書字の乱れが出現し、当院小児科受診。ミトコンドリアミオパチーを疑われ、当科紹介となる。現症：身長136.5cm、体重36.6kg、IQ=74、眼瞼下垂、軽度の眼球運動制限、網膜色素変性、小脳症状、びまん性の筋萎縮・筋力低下を認める。耐糖能異常、血中および髄液中の乳酸・ビルビン酸高値、脳波異常、MRIT2強調画像にて、白質にびまん性の高信号域を認める。脛骨神経刺激による下肢SSEPにて、中枢伝導時間の遅延を認めた。症例2：13歳女性、症例1と祖父が兄弟、診断名白質ジストロフィー、主訴はけいれん発作。現病歴：歩行開始は1歳6ヶ月と遅れていた。2歳より全身けいれん発作が出現し、当院小児科受診。CT、MRIにて後頭葉優位の白質の変性が示唆されたため、当科紹介となる。現症：身長145cm、体重35kg、知能障害 (IQ=40)、小脳症状、視力低下 (皮質性) を認める以外には、特記すべき異常なし。コメント：図1に示すように、祖父同士が兄弟であり、MRIT2強調画像にて、いずれも白質のびま

ん性の変化を示した点が注目される。mtDNAの欠失は、KSSの症例1にのみ認められたが、2例に共通した小欠失や点変異の有無については今後の検索が必要である。

症例3：38歳男性、診断名MERRF、主訴は全身倦怠感。

家族歴：母親が66歳時に完全房室ブロックにて、ペースメーカー挿入。甥が類似疾患 (てんかん、心疾患) にて死亡。

現病歴：小学校の頃より走るのは苦手であった。19歳時に全身倦怠感、浮腫出現、21歳時に下腿浮腫、下肢筋力低下、心肥大を指摘される。22歳時に脚気心と診断され、ビタミンB1投与により心症状、神経症状ともに軽快した。27歳頃より徐々に下肢および上肢の脱力を自覚し、32歳時に当科にて、ミトコンドリアミオパチーと診断された。同時に心エコー等の所見より、非閉塞型肥大型心筋症の診断を受ける。34歳全身けいれん発作、脳波異常を指摘され、36歳時より上肢・顔面のミオクローヌスが出現している。

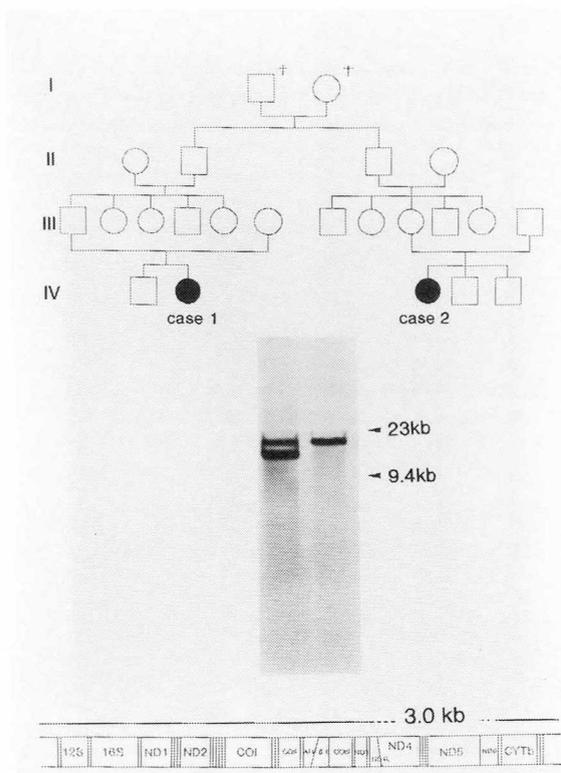


図1 症例1, 2の家族歴および生検筋 mtDNA の Southern blot/DIG-labeled DNA luminescent Detection. (*Pvu* II digestion)

現症：身長165cm, 体重70kg. 知能低下 (IQ=57), 視神経萎縮, 小脳失調, 病的反射出現, ミオクローヌス, 神経性難聴, 四肢筋萎縮・筋力低下を認める. 心電図では, 伝導障害はなく, 頭部MRIでは, 小脳・脳幹・頸髄に萎縮を認め, T2強調画像にて, 白質に点状・非対称性の高信号域を認めた.

コメント：本症例は, 患者本人と母親の末梢血DNAの分析にて, 塩基番号8344の点変異を認め, 最終的にMERRFと診断された(図2). しかし, 臨床経過では非閉塞型肥大型心筋症による心不全症状が先行しており, 約15年後にミオクローヌスやけいれん発作が出現した点が注目される.

症例4：43歳男性, 診断名 MELAS, 主訴は右上肢の筋力低下.

現病歴：中学校の時に神経性難聴を指摘される.

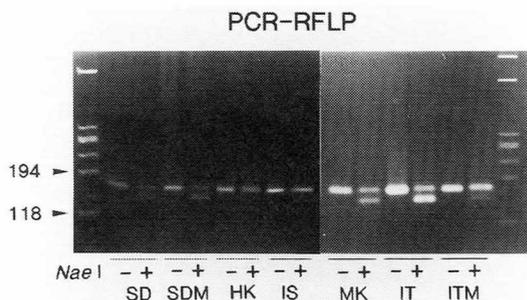


図2 MERRFにおける塩基番号8344の点変異の検出. SD：症例3の末梢血, SDM：症例3の母親の末梢血, HK, IS：8344の点変異を認めないMERRFの姉妹例, ITM：ITの母親の生検筋.

20歳半ばより, 痛風, 34歳時に若年性白内障の手術を受ける. 29歳記憶力・集中力低下, 31歳右不全麻痺が反復して出現し, このころより頭痛・嘔吐および右上肢の不随運動を自覚. 36歳当科入院, 筋生検等よりMELASと診断. 合併症として, 高血圧, 高尿酸血症が認められた. 入院中に全身けいれん発作出現. 39歳左不全麻痺出現し, CTにて外側型脳出血と診断され, 血腫除去術を受ける. 現症：身長154cm, 体重47kg, 血圧150/100, 知能低下, 精神症状, 軽度の外眼筋麻痺, 左不全麻痺, 網膜色素変性, 難聴, 小脳症状を認める. BUN23. 1mg/dl, 尿酸12.0mg/dlと軽度高値を示した. MRIにて, 左右の被殻外側部に陳旧性脳出血巣を認めた.

コメント：臨床経過, 検査所見よりは, MELASと考えられたが, MELASに高率に認められる3243の点変異はなかった(図3). 高血圧, 高尿酸血症が脳出血の危険因子であるが, ミトコンドリア異常が高血圧, 高尿酸血症および脳出血に関与した可能性も否定できない.

症例5：70歳女性,

診断名：未定. 主訴は歩行障害.

家族歴：弟(68歳)にミトコンドリアミオパチー, 心筋梗塞, 高脂血症を認める.

現病歴：50歳頃より階段昇降困難を自覚し, 63歳当科受診. 高血圧, 高脂血症(血中総コレステロールは250mg/dl)があり, 神経学的には, 四肢近

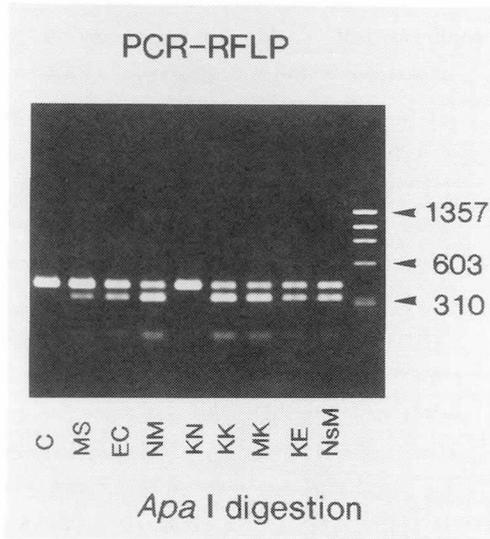


図3 MELASにおける塩基番号3243の点変異の検出。KN：症例4の生検筋，C：control。

位筋の筋萎縮・筋力低下を示す以外には、中枢神経系に異常を認めなかった。筋生検にて、ミトコンドリアミオパチーと診断された。69歳（1990年5月11日）小脳梗塞出現、1991年4月12日MRI T2強調画像にて、白質に多発性の高信号域を認めた。1991年6月30日、脳出血にて死亡した（図4）。  
 現症（1991年4月12日）：身長145cm，体重45kg，  
 血圧150/94。軽度の小脳失調，四肢近位筋筋力低下，深部腱反射亢進を認めた。

コメント：小脳梗塞出現時までは、肢帯型筋萎縮を示すミトコンドリアミオパチーと考えられていたが、最終的には脳出血にて死亡した。塩基番号3243および8344の点変異は認められなかった。脳血管障害の危険因子として、高血圧，高脂血症が合併していたが、ミトコンドリア異常による血管系も含めたエネルギー代謝障害が関与している可能性も考えられる。弟にも、ミトコンドリアミオパチーがあり、遺伝子レベルでの共通した異常が推定された。

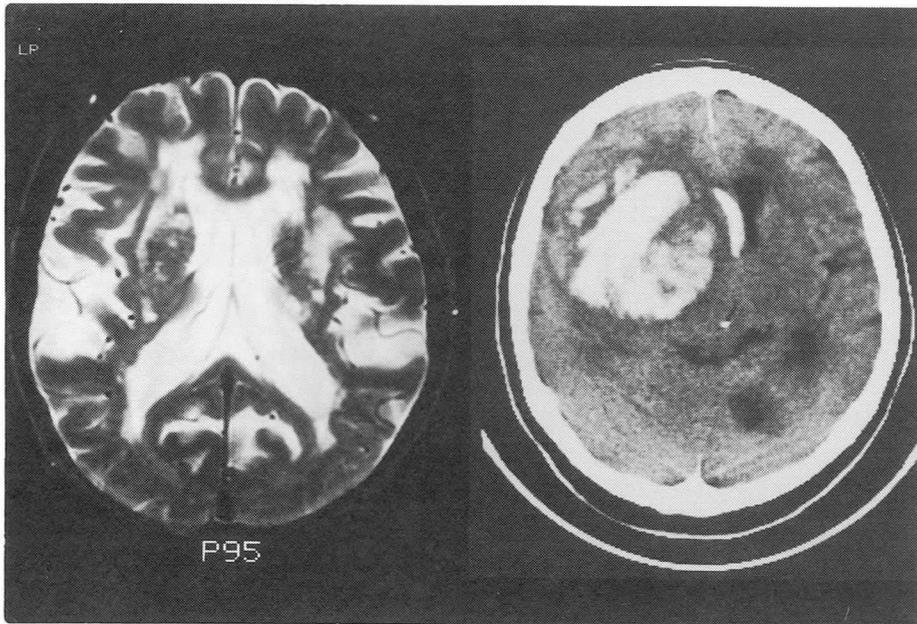


図4 症例5のMRIおよびCT像。  
 左：1991年4月のMRI T2強調画像。  
 右：1991年6月30日死亡時のCT像。

## ま と め

今回検討したミトコンドリア脳筋症45例中26例に mtDNA の異常を認め、臨床病型と mtDNA の異常は一定の関連を示した。しかし、mtDNA 異常と臨床症状が対応していない症例もあり、今後これらの症例の mtDNA の全塩基配列の検討が必要である。

謝辞：貴重な症例を紹介して頂いた北里大学齊藤豊和先生，東邦大学岸 雅彦先生，九州大学大野雅治先生，久留米大学松石豊次郎先生，大手町病院須藤慎治先生，大分医科大学後藤勝政先生，大分県立病院永松啓蘭先生，国立療養所南九州病院福永秀敏先生，沖縄県立中部病院西平竹夫先生，国立療養所沖縄病院竹永 智先生，県立宮崎病院末原雅人先生，鹿児島大学小八重秀彦先生に深謝致します。

## 文 献

- 1) Kobayashi Y, Momoi M, et al: A point mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem Biophys Res Commun* 173: 816—822, 1990.
- 2) Yoneda M, Tsuji S, et al: Molecular genetic analysis of myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. "Progress in Neuro-pathology" (ed by Sato T & DiMauro S) 1991, vol 7, pp169—180.
- 3) 中川正法，時村美香ほか：慢性進行性外眼筋麻痺：頭部 MRI および電気生理学的異常とミトコンドリア DNA 欠失との関連についての検討。 *臨床神経*31: 981—986, 1991.

## 48) MELAS 病態の細胞学的解析

桃 井 真里子\*

研究協力者 小林 葉子\* 伊東 茂子\*  
小黒 範子\* 太田 成男\*\*

我々は1990年に、MELAS の遺伝子変異を同定した。ミトコンドリア DNA (mtDNA) 上の tRNA-Leu (UUR) 遺伝子内の塩基番号3,243の A-G 変異であった<sup>1)2)</sup>。この変異により、変異を含む遺伝子断片は制限酵素 Apa I により切断されることを利用し、MELAS 遺伝子変異は PCR 増幅 mtDNA 断片の Apa I 切断 DNA の解析により容易に同定されることになった。mtDNA 遺伝子変異による病態は、DNA が1細胞内に数千のコピーを有することから、その局在のみならず、量が重要な要素である点に特徴がある。すなわち、細胞の変異形質発現には、変異 mtDNA が一定程度存在する必要がある。さらに、患者の診断のみならず、健康保因者が発症する可能性があるか否かの診断、または、出生児診断を可能にするには、変異遺伝子の定量が正確である必要がある。本研究では、PCR 増幅、制限酵素処理という方法で MELAS 変異遺伝子が正確に定量可能であることを示した。さらに、変異遺伝子発現の修飾の可能性を提示した。

### 方 法

① MELAS 患者骨格筋から癌遺伝子導入により得たクローニング細胞<sup>3)4)</sup>のうち、チトクローム c 酸化酵素活性正常クローンと活性欠損クローンより、正常、変異 mtDNA をクローニングした。おのおの mtDNA を 0~100% の割合に混在した

試料を昨年度報告した方法で 32P 標識 PCR 増幅し、Apa I 処理をした。Apa I 処理は 48 時間行った。処理後は 6% ポリアクリルアミドゲル上に泳動し、標識 DNA 断片を定量した。切断断片を変異 mtDNA 断片とし、非切断断片+切断断片似対する割合を求めた。求めた変異 mtDNA の割合と試料中の変異 mtDNA 断片の%を比較した。

② MELAS 患者とその家族のリンパ球の変異 mtDNA の割合を上記の方法で求め、実際にあるべき%を検量線の式より求めた。

③ MELAS 患者剖検組織の変異 mtDNA の%を②と同様に求めた。

④ 正常クローニング細胞とチトクローム c 酸化酵素 (COX) 活性欠損細胞の通常培養条件に、Dexamethasone (500ng/ml~50ug/ml), T4 (500ng/ml~50ug/ml), Retinoic acid ( $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$ M) を加えて 72 時間培養後、COX 活性染色をし、その変化を検討した。

### 結 果

① クローニングした正常 mtDNA、変異 mtDNA による定量性検討の結果を図 1 に示す。実際に検出した mtDNA と試料中の変異 mtDNA の相関係数は図に示すように 0.99 であり、用いた方法の定量性が確認された。変異 mtDNA が 100% の際はわずかに非切断断片が残り、正常 mtDNA が 100% の場合は切断断片はなかった。この結果は、Apa I による切断が 100% ではないことを示唆したが、相関係数からは、定量性は充分であると考えられた。

\* 自治医科大学小児科

\*\* 自治医科大学第一生化学

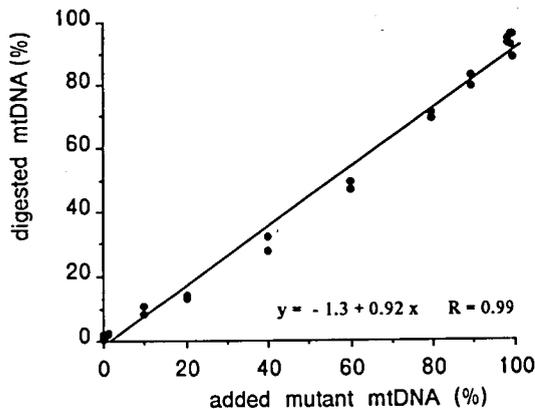


図 1

② 患者及びその家族のリンパ球中の変異 mtDNA の割合を、図 1 の式より換算して(x に相当する数値を) 求めた。結果を図 2 に示す。

③ 組織の変異 mtDNA の割合は、(②と同様に x に相当する%を示す)、大脳(前頭葉)皮質100%、白質100%、心筋96%、肝94%、腎皮質83%、腎髄質82%、骨格筋 2 箇所(70%、76%)横隔膜72%、脾40%であった。各組織内の 3 箇所を試料はいずれも同様の割合を示した。

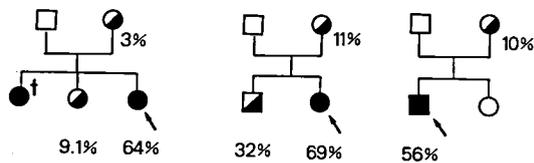
④ T4では活性に変化はみられなかった。RA10<sup>-5</sup>M で一部に COX 活性の染色が認められた。正常活性に比して染色性は弱かった。Dexamethasone 50ug/ml でも RA よりは弱く活性染色が認められた。

### 考 察

PCR 増幅, Apa I 処理による変異 mtDNA の定量性は、クローン化した DNA を用いての実験が相関係数0.99に示すように、定量的解析に使用し得ると考えられた。

家族の変異 mtDNA の定量解析は、変異遺伝子の母系遺伝を示すのみならず、変異遺伝子の割合が母とその子(患者と正常保因者の同胞)の2代を経る過程で増幅していること、母親は種々の割合の変異 mtDNA をヘテロプラスミーに持つ卵細胞を有すること、また、変異遺伝子を持たない子が図 2 に示すように少なかったことは、母の卵

The mutant mtDNA in lymphocytes



(MELAS) A→G in tRNA-Leu

図 2

細胞はかなりの割合が変異遺伝子を有すること、母の卵細胞とリンパ球に変異遺伝子が局在することは、遺伝し変異が母の発生過程の初期か、祖母の卵細胞、あるいはそれ以前に発生していることを示唆することを示している。さらに、健康同胞の一人が32%の変異遺伝子を有したことは、リンパ球でみる限り、発症の閾値は32%以上であること、を示唆している。組織間で明かに変異遺伝子の割合に差があり、同一組織内では差がなかったことは、変異遺伝子の分配が組織発生の初期に決定される機構があるか、または、各組織により、変異遺伝子の増幅率がことなるかの可能性を示唆した。後者とすると、組織特異的な機構は核遺伝子支配であると考えられ、病態決定に核遺伝子がどの様に関与するかは重要な視点であると考えられる。患者、または正常保因者にて変異遺伝子が細胞内にヘテロプラスミーを形成するかホモプラスミーであるかは重要な問題であるが、前者であれば、上記の増幅機構の解析が重要であり、後者であれば、変異形質の発現調節機構の解析が重要となる。後者の視点からまず、培養細胞に於て変異形質の一つである COX 活性の変化をみる系を検索した。MELAS の治療にステロイドホルモンが用いられ、一部の症例には有効である報告もあることから、ステロイドをはじめとして、核遺伝子の発現調節作用が知られるステロイドスーパーファミリーの T4, RA, dexamethasone を検討

した。一部の条件下でCOX 染色性の上昇がみられた。これらがどの様に機構によるものか今後検討することにより、治療への可能性を探ることは重要であると考えられた。

#### 文 献

- 1) Kobayashi Y, Momoi M, Tominaga K, et al :  
Biochem Biophys Res Commun 173 : 816—822,  
1990.
- 2) Kobayashi Y, Momoi M, Tominaga K, et al :  
Am J Hum Genet 49 : 590—599, 1991.
- 3) Nakamigawa T, Momoi M, Momoi T, et al :  
J Neurol Sci 83 : 305—319, 1988.
- 4) Shimoizumi H, Momoi M, Ohta S, et al : Ann  
Neurol 25 : 615—621, 1989.

## 49) MELAS における点変異ミトコンドリア DNA の変動

西澤正豊\*

研究協力者 吉田充男\* 太田成男\*\* 白岩伸子\*\*

MELAS の80%の症例では、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の3243位, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> の DHU ループ領域に A → G 点変異が同定される<sup>1)</sup>。この3243を含む領域は16S ribosomal RNA の転写終了部位を識別する termination factor が結合する部位に相当しており、MELAS においては点変異のためにこの結合が阻害されていることが明らかにされた<sup>2)</sup>。そこで、このような分子レベルの異常が MELAS という特定の phenotype を発症させる機序を解明することが次の課題となる。このためには、1) MELAS 患者の諸組織において、正常 mtDNA と変異 mtDNA の heteroplasmy の割合を定量し、各組織における機能障害の発症と変異 mtDNA の存在量との関連性を検討する、いわば横断面を捉えた分析と、2) 家系例を用いて各世代での変異 mtDNA 量を定量することにより変異 mtDNA の遺伝様式を明らかにし、さらに、同一個体においても、変異 mtDNA 量がいかに変動するか、臨床症状の発現には一定の域値が存在しているのかを検討する縦断面からの分析が必要である。いずれのアプローチにも正常 mtDNA と変異 mtDNA 量を正確に定量できる測定系が不可欠であるが、今回は、共同研究者の太田が確立した定量法を応用し、MELAS における変異 mtDNA 量の経時の変化を追跡した結果、興味ある知見を得たので報告する。

### 対象と方法

対象は昨年度の本班会議において報告した MELAS の母娘例である。娘は25歳で、1982年(14歳)より難治性の痙攣発作、16歳より発作性の頭痛、嘔吐がある。17歳時に脳卒中様発作をおこした際、高乳酸血症と ragged-red fiber (RRF) が確認され、MELAS と診断された。その後、進行性の痴呆と糖尿病を合併している。母は52歳で、1975年(30歳)より糖尿病、46歳より感音性難聴がある。娘が MELAS と診断された際に高乳酸血症の存在を確認されている。50歳頃より進行性の痴呆が目立ちはじめ、51歳には脳卒中様発作をおこし、RRF も認められたため、MELAS の診断が確定した。母娘ともに生検筋の mtDNA の3243位に A → G 点変異が確認されている<sup>3)</sup>。

今回はこの母娘より1986年6月と1990年12月の時点でそれぞれ末梢血単核球 (MNC) から DNA を得、3年6ヶ月間の時間経過における MELAS 点変異 mtDNA の変動の有無を検索した。

正常および変異 mtDNA の定量は以下のように行なった。すなわち、

- 1) mtDNA の H3153~3172 に相当する20mer と、T4 kinase により5'-end をラベルした L3374~3353 に相当する22mer を、前者13:後者1の割合で primer pair とし、非対称 PCR を行ない、3153~3374 の領域を増幅した。
- 2) PCR 産物を Apa I により digestion し、10% polyacrylamide gel にて電気泳動した。
- 3) Autoradiography と densitometry はフジフ

\* 自治医科大学神経内科

\*\* 自治医科大学第一生化学

イルム社製 image analyzer を用いて行なった。

- 4) 検量線を作成するための standard としては、正常および MELAS 点変異 mtDNA よりそれぞれ 3153~3374 を含む領域を plasmid に cloning し、これらを 0~100% の間の適当な割合で混合したものを用いた。

### 結 果

Autoradiography 上、正常 mtDNA は 222 bp, MELAS 点変異 mtDNA はこれより 94bp 短い 128bp のバンドを示した (図)。

検量線は変異 mtDNA の割合が全体量の 0%~100% の間で完全に linear となったので、変異 mtDNA 量の定量もこの範囲内で行なった。

MELAS 点変異を有する異常 mtDNA 量が 3 年 6 ヶ月の間にどのように変動するか、末梢血 MNC において検討した (図): 母親はこの期間中に明らかな脳卒中様発作を生じ、臨床症状に変化が認められたが、MNC においては変異 mtDNA が全体に占める割合は 6.0% から 5.9% へと変化を認めなかった。一方、娘はこの期間中に臨床上、緩徐ながら痴呆症状が進行したが、MNC におい

表 末梢血単核球における MELAS 点変異ミトコンドリア DNA の定量値 (%)

	母	娘
1986年6月	6.0	40.5
1990年12月	5.9	31.3

ては変異 mtDNA の割合は全体の 40.5% から 31.3% へと明らかに減少していた (表)。

### 考 察

MELAS の患者生検筋において 3243 位に A → G 点変異を有する変異 mtDNA 量は従来の報告では全体の 60%~70% 前後であり、残り約 40%~30% は正常 mtDNA からなるとするものが多い。MELAS は臨床的には進行性の経過をとり、また、保存されていた患者臍帯を用いての分析では MELAS 発症時の生検筋に比して変異 mtDNA 量は明らかに少ない。そこで、MELAS においては変異 mtDNA 量は何らかの機構により経過とともに増加しており、各組織のエネルギー需要と供給能力のバランスから決定されるある域値を変異 mtDNA 量が上回るとその組織において energy crisis が発生し、臨床症状が発症するのではないかと想定されてきた。今回の結果はこうした予測には反するものであり、変異 mtDNA 量は末梢血 MNC においてはむしろ減少する可能性があることが確かめられた。もとより、今回の分析は MELAS の 1 家系例について、時間的にも 3 年 6 ヶ月という一時点で比較したのみであるので、結論を下すには慎重でなければならず、以下のような問題点をさらに検討する必要がある。

第一に、変異 mtDNA の量を規定する組織特異的な要因の存在が考えられるので、筋組織について同様の検索が当然必要である。臨床の現場では筋症状の発症の前後で 2 回にわたり筋組織を得ることは非常に困難であるが、MELAS において障害される主要な組織である筋肉についての情報は

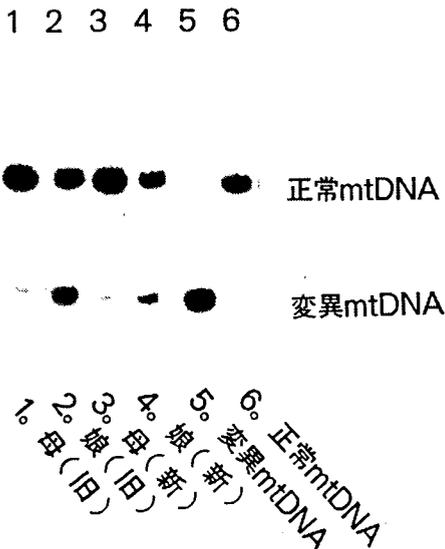


図 正常および変異 mtDNA 量の定量

欠かせない。MNCは試料としては容易に入手できるが、変異mtDNA量の変動を分析する対象として適切か否かは明らかでなく、MELASにおいては末梢血MNCの機能障害は臨床的には認められない。

第二に、MELASが発症するためには当該組織における変異mtDNA量が一定の域値を越えることが必要条件であるのか否かを明らかにする必要がある。このためにはまず、患者の各組織において変異mtDNA量を定量し、臨床的にその組織の機能障害が発症しているか否かとの相関を詳細に分析しなければならない。MERRFにおいてもtRNA<sup>Lys</sup>に点変異が同定され、変異mtDNA量について同様の分析がなされているが、MELASの場合とは異なり、変異mtDNA量はいずれの組織においても90%以上の高率を占めており、臨床症状を呈しているか否かとは関連性がみられない。

第三に、変異mtDNAの量がどのような機構で決定され、維持されているかを明らかにしなければならない。これには世代間での変動と個体レベルでの変動とを規定する要因をそれぞれ分析する必要がある。今回の母娘例においても、筋組織における変異mtDNA量はともに約60%で、母と娘の間に差異はみられないのに対して、末梢血MNCにおいては娘では母の5～6倍に増加していた。しかもMNCにおける変異mtDNA量は母

では不変であったのに対して、娘では量的変化が認められた。従って、世代間でも組織特異的な要因について考慮する必要があること、かつ変異mtDNA量は単純に増加するものでないことが確かめられた。

MELASにおける変異mtDNA量を正確に定量することができ測定系が今回確立されたので、今後以上のような諸問題について順次検討を加えていく予定である。

#### 引用文献

- 1) Goto Y, et al: A mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348: 651~653, 1990.
- 2) Hess JF, et al: Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 351: 236~239, 1991.
- 3) 西澤正豊ほか: MELAS母娘例におけるミトコンドリアDNAの解析. “厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー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, 1991, pp258-260.

## 50) 変異ミトコンドリア DNA の分布 ——MELAS 患者の一部検例——

水 澤 英 洋\*

研究協力者 白 岩 伸 子\* 太 田 成 男\*\*

### はじめに

ミトコンドリア脳筋症は CPEO, MERRF, MELAS などさまざまな病型を持つ遺伝子病である。MELAS は tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> の塩基番号 3243 における A から G への点変異が本疾患の原因として見だされている<sup>1)2)</sup>。また、MELAS においては変異 mtDNA は heteroplasmy を示すことが報告されている。しかし、MELAS の臨床的表現型と変異 mtDNA の関係についてはまだ十分検討されていない。我々は下垂体の機能異常が認められた MELAS 患者の一部検例で、32 試料において上記塩基置換を調べて変異 mtDNA と正常 mtDNA の比率を求め、臨床検査所見と比較した結果、興味ある知見を得たので報告した。

### 症 例

27 歳女性。主訴はけいれん発作、行動異常、身体発育不全。両親、同胞に特記すべき神経筋疾患なし。出生時、幼少児期には特に問題なかった。思春期ごろより低身長が明らかとなり、月経の初来はなかった。17 歳より同名半盲、閃輝暗点を伴う発作性頭痛・おう吐を頻回に認め、学業成績も次第に低下。19 歳時、全身性けいれん発作が出現し、またこの頃から日常生活における異常行動が目だつようになった。24 歳時、大発作を呈し筑波大学神経内科に入院した際、MELAS と診断された。その後は知能低下と精神症状の多少の進行を

認めた他に大きな変化はなく、27 歳時、心タンポナーデのため急死した。

筑波大学神経内科入院当時の身体所見は、-2 SD の低身長、高度のるいそうあり。胸腹部に異常所見はなく、陰毛発達は正常だったが、乳房の発達はきわめて不良。神経学的には中等度の知能低下を認め、性格は未熟で幼稚な振る舞いが目だった。脳神経系では求心性視野狭窄、感覚系では左半身感覚障害、運動系ではびまん性筋萎縮、筋トーンの低下を認めた。明らかな筋力低下はなく、外眼筋麻痺、眼瞼下垂も認めなかった。検査所見では血中乳酸、ピルビン酸の高値、髄液中乳酸の高値、上腕二頭筋筋生検では多数の ragged-red fiber および電顕で異常ミトコンドリアの集積像を認めた。頭部 CT・MRI では大脳、小脳のびまん性萎縮に加えて両側後頭葉に脳梗塞様病変を認めた。内分泌機能検査は甲状腺機能、副腎機能は正常だったが、性腺機能としてエストラジオール、プロゲステロンの低下を認めた。また、本例に特異な点として下垂体機能検査における GH, LH, FSH の分泌障害を認めた (図 1)。

### 方 法

正常 mtDNA と変異 mtDNA の比を得るためのスタンダードとして正常 mtDNA と変異 mtDNA をプラスミドにクローン化した。それらを様々な割合で混合してプラスミド DNA をとり、塩基番号 3243 を含む領域を PCR で増幅した (Primer1: 塩基番号 3153~3172, Primer2: 塩基番号 3374~3353)。その際、Primer1 を 5' 末端ラベ

\* 筑波大学臨床医学系神経内科

\*\* 自治医科大学第一生化学

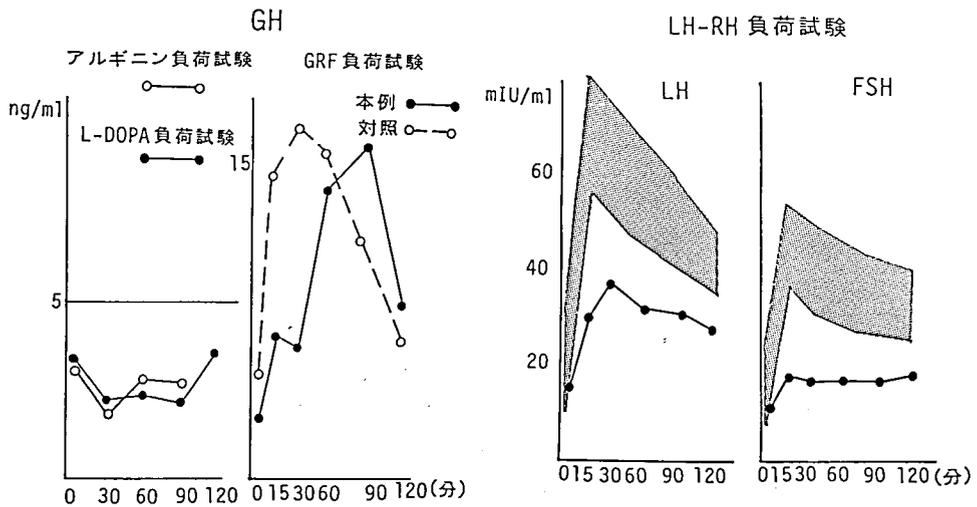


図1 下垂体機能検査. GHはアルギニン負荷試験, L-DOPA負荷試験では無反応, GRF (growth hormone releasing factor) 負荷試験ではGHの上昇は見られたが, 分泌遅延を認めた. また, LH-RH負荷試験ではLH及びFSHの分泌遅延, 低反応を呈した.

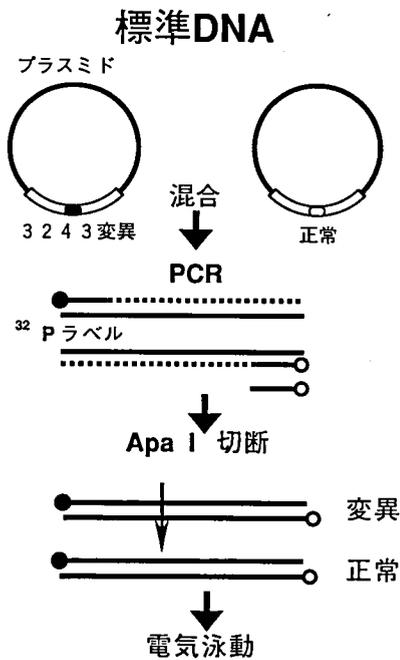


図2 標準DNA. プラスミドDNAを, 変異mtDNAが0, 20, 40, 60, 80, 90, 95, 100%になるように混合し, 塩基番号3243を含む領域をPCRで増幅した. ApaIで切断し, 電気泳動 autoradiography で解析した.

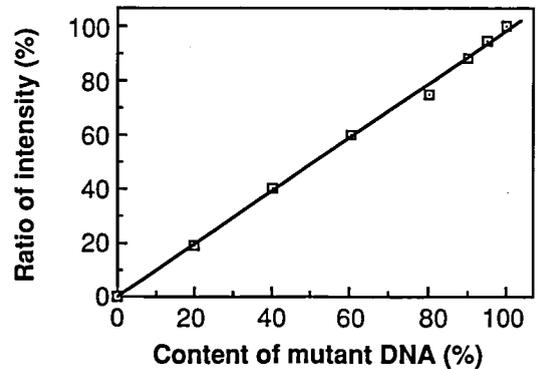


図3 スタandard・カーブ (プラスミドDNA5pg, PCR25サイクル). このようにStandard DNAの混合比と, 切断断片と未切断断片の比は直線関係にある.

番号3374~3353). その際, Primer1を5'末端ラベルし, ヘテロデュプレックスを防ぐために他方のプライマーの1/13量を用いた. 制限酵素ApaIで切断し, 12% polyacrylamide gel上で電気泳動後, 切断断片と未切断断片の比を求め, Standard DNAの混合比と直線関係にある条件を設定した(図2). プラスミド量5pgでPCRは25サイクルすると良好な直線関係が得られた(図3). な

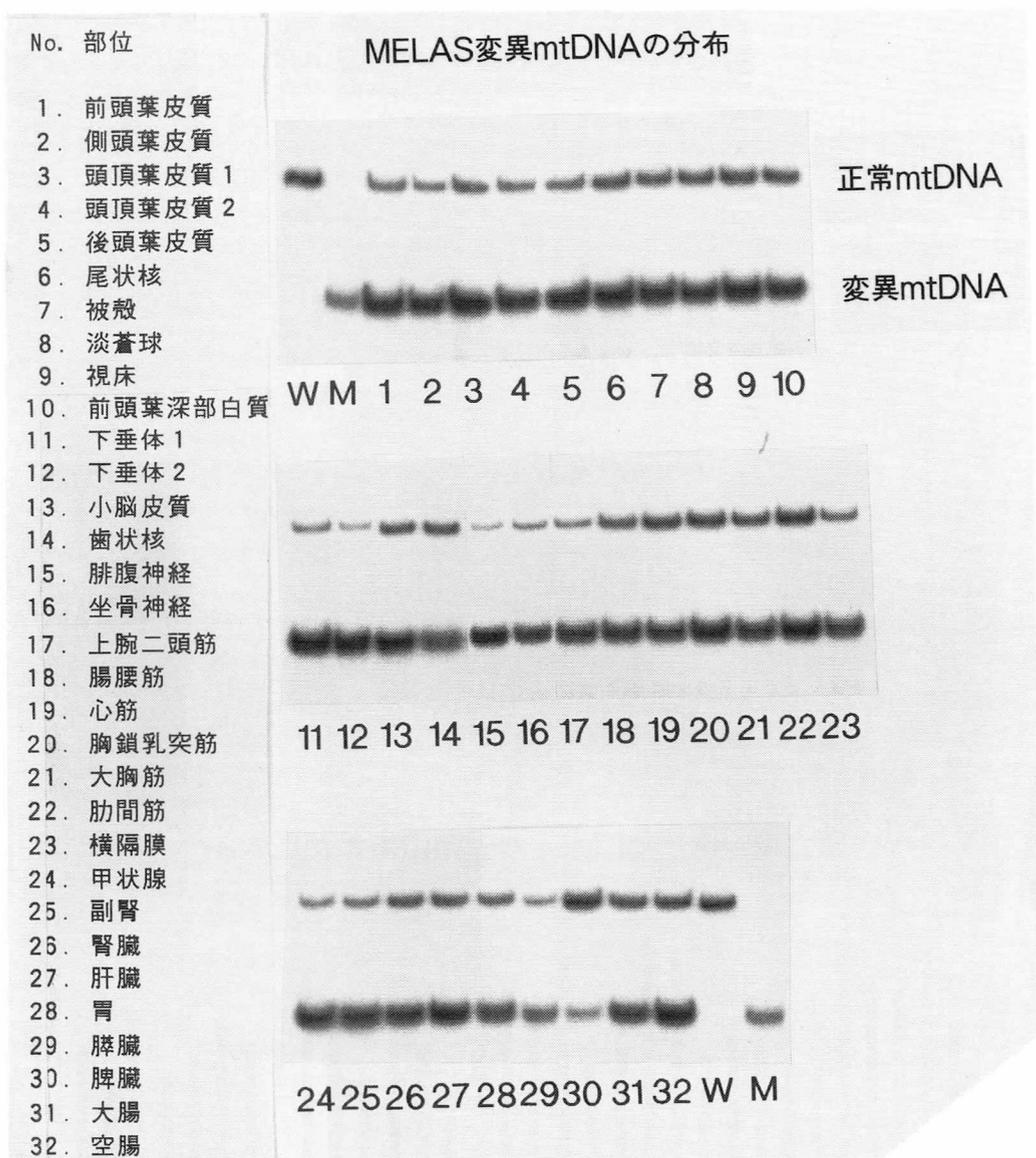


図4 MELAS患者剖検32試料の電気泳動。(W) wild type DNA, (M) mutant type DNA. 1~10: 大脳, 3: 梗塞様病変隣接部, 4, 5: 梗塞様病変部, 11, 12: 下垂体, 13, 14: 小脳, 15, 16: 末梢神経, 17~23: 筋肉, 24~32: その他の全身臓器, 以上の全ての臓器で, 222bpの未切断断片と94bpの切断断片(変異mtDNA由来)が認められ, 正常mtDNAと変異mtDNAのheteroplasmyであることがわかった。

お、プラスミド量を0.5pgと一けた少量にしたり、10pg用いてサイクル数を5回増やすと lineality は悪くなった。また、剖検試料は約10ngの全DNA画分を用い、予備実験をし、スタンダード量と同じになるように増減した。

### 結 果

図4に示すように、本症例の剖検32試料は全て、正常 mtDNA と変異 mtDNA の heteroplasmy であることが明かにされた。これら各臓器の mtDNA の比率を図5に示した。DNA量をいろいろ変えて3回測定し標準偏差を取ったが、ばらつきは多くても1.9%だった。脳下垂体で最も変異 mtDNA の比率が高く、95%だった。この症例では視床下部～下垂体系の機能低下が確認されていることから興味深く思われる。また、大脳皮質は前葉頭に85%、側頭葉に88%、頭頂葉に87%の変異 mtDNA を認めたのに対し、深部白質、大脳基底核はいずれも70%台だった。末梢神経では腓腹神経で88%と高い比率で変異 mtDNA を認めたが、臨

床的には末梢神経障害は認められなかった。副腎、甲状腺はそれぞれ83%、87%の変異 mtDNA を認めたが、臨床的には機能は正常だった。筋は骨格筋、心筋を調べたが骨格筋は上腕二頭筋83%を除いて70%前後と神経組織より低めであった。心筋は61%と比較的低値だった。最も変異 mtDNA の比率が低かったのは脾臓で、22%だった。

本症例の病理的検索については現在検討中であるが、その一部を述べると、大脳では光顕的には皮質から皮質～白質境界部にかけての梗塞様病変が散在性に認められた。下垂体組織の電顕像は下垂体細胞の中にミトコンドリアが非常に多いものがあるが、個々のミトコンドリアは膨化しているのみで、cristae の増加や封入体は認められなかった。また、ミトコンドリアの多くない細胞も多数認められた。このように下垂体電顕像では明らかなミトコンドリア異常は確認できなかったが、光顕的に下垂体ホルモンの免疫染色などを現在進めている。

## Distribution of MELAS mutant mtDNA

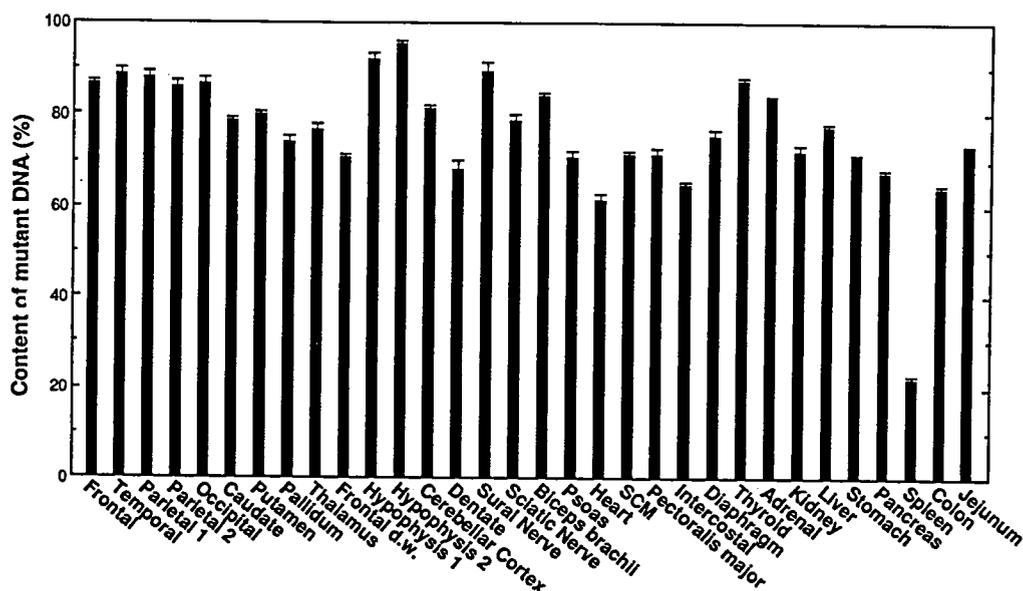


図5 MELAS 患者剖検組織内の変異 mtDNA の分布。

## 考 察

CPEOにおいては既に欠失 mtDNA が多臓器にわたり存在する例が報告されているが<sup>3)4)</sup>、臓器が臨床的に異常を示すか否かは以下の3点に依存していると考えられる。すなわち、(a)欠失 mtDNA の比率、(b)欠失に対し各臓器が機能異常を起こす、閾値があるのではないかという考え方、(c) mtDNA の絶対量が臓器によって異なり、正常 mtDNA が十分にあれば代償しようという考え方がある。

MELAS ではこれまで変異 mtDNA の比率を全身の各臓器にわたって細かく調べた例はなかった。最近、骨格筋・心筋・肝・腎・脳の5臓器を調べた報告があるが、変異 mtDNA の比率には各臓器間の差異ははっきりしなかったとされている<sup>5)</sup>。また、特に脳の中での分布に関する報告はまだない。本例では下垂体機能異常と高率の変異 mtDNA の存在が関連している可能性が示唆された。また、脳全体の中では大脳皮質により高率の異常を認めたが、これは従来の MELAS の病理報告で脳梗塞様病変は大脳白質や基底核より大脳皮質に強いといわれていることと一致している<sup>6)</sup>。一方、脳以外の臓器では変異 mtDNA の割合は必ずしも臨床検査所見と一致しなかった。本例で示された変異 mtDNA の比率と臨床的な表現型との関連には(a)の他に(b)(c)のような機序を考える必要があると思われる。また、さらに症例を重ねて、下垂体細胞の変異 mtDNA が一般に MELAS やその他のミトコンドリア脳筋症でどの位の比率で存在するものなのか調べる必要がある。今後多くの検討すべき点が残されている領域であると考えられる。

## 文 献

- 1) Goto Y, Nonaka I and Horai S: A mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348: 651—653, 1990.
- 2) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y and Ohta S: A point mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem Biophys Res Commun* 173: 816—822, 1990.
- 3) Shanske S, Moraes CT, Lombes A, et al: Widespread tissue distribution of mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 40: 24—28, 1990.
- 4) Zeviani M, Gellera C, Pannacci M, et al: Tissue distribution and transmission of mitochondrial DNA deletions in mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 28: 94—97, 1990.
- 5) Ciafaloni E, Ricci E, Servidei S, et al: Widespread tissue distribution of a tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mutation in the mitochondrial DNA of a patient with MELAS syndrome. *Neurology* 41: 1663—1665, 1991.
- 6) Ohama E, Ohara S, Ikuta F, et al: Mitochondrial angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalomyopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 74: 226—233, 1987.

# 51) MELAS の点変異：塩基番号3243と3271の比較検討

04

後藤 雄一\*

研究協力者 作田 亮一\* 松岡 太郎\*  
 埜 中 征 哉\* 宝 来 聡\*\*

## はじめに

ミトコンドリア脳筋症における変異ミトコンドリア DNA (mtDNA) の報告が次々と行なわれている。特に、昨年、MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) において tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> の塩基番号 (nt) 3243に A から G の一塩基置換が報告され MELAS の診断は飛躍的に進歩した<sup>1)~3)</sup>。我々は、この結果に基づいて PCR-RFLP 法を用いて40例の MELAS の診断を行ない80%の患者に nt3243の変異を認めたが、残りの症例には異常は見られなかった<sup>4)</sup>。今回、我々は、nt3243の変異のない臨床的に MELAS と診断された症例についてさらに mtDNA の異常の有無を検討し、新たな点変異を認めたので報告する<sup>5)</sup>。

## 対象・方法

臨床的に MELAS と診断されているが nt3243の変異を認めない例について mtDNA の全 tRNA を含む領域を PCR 法を用いて増幅し、サングー法にて塩基配列を決定した。

## 結果・考察

アンダーソンの塩基配列と比較検討し tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 領域の nt3271に T から C への一塩基置換を認めた(図1)。この部位は、tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のアンチコドンシステムに位置していた(図2)。

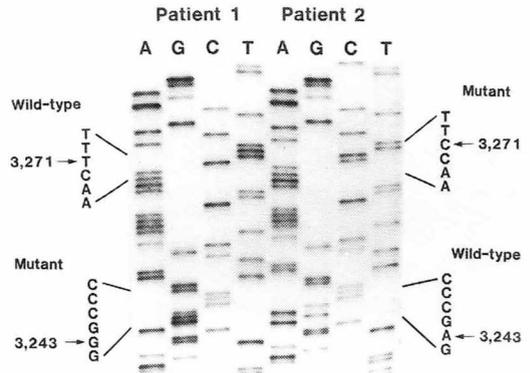


図1 PCR-直接塩基配列決定法。Patient 1 は nt3243変異の MELAS, Patient 2 は nt3271の T: チミンが C: シトシンに一塩基置換している。

人や牛では nt3271は T に保存されており nt3261の A と相補的塩基対を形成している。しかし、nt3271の T が C に変異することによって nt3261の A との相補性は保たれなくなる(図3)。

以上より、nt3271の点変異は tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> の構造や機能に大きな影響を与えるものと考えられた。

この変異は、ミスマッチプライマーを用いた PCR 法と制限酵素を用いることにより簡便に検出することができる。既に、変異部位を含む nt3130から nt3301までを増幅し、得られた170bp の PCR 産物を Af1II で消化する。もし nt3271に変異があれば140bp と 30bp の二つの断片に切断される(図4)。変異のバンドは常に正常なバンド

\* 国立精神・神経センター神経研究所  
 \*\* 国立遺伝学研究所

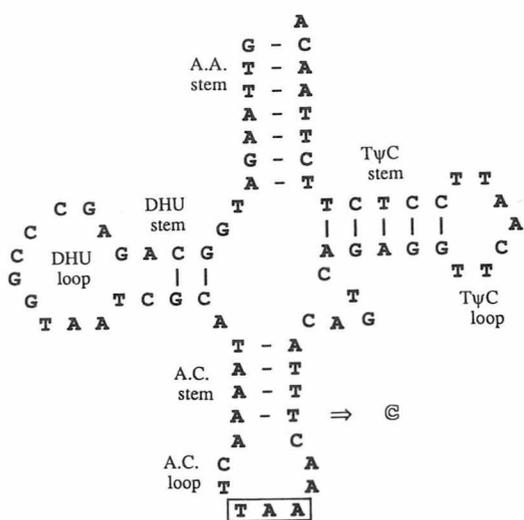


図2 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>の二次元構造. nt3271はアンチコドシステムに存在する.

と同時に認められた(ヘテロプラスミー). このnt3271変異が他のミトコンドリアミオパチーにも認められるのかどうか, nt3243に変異のあるMELAS32例, nt8344に変異のあるMERRF 6例, 欠失のあるCPEO32例, 欠失のないCPEO 8例およびコントロール50例について検索した. その結果, nt3271変異は一例も認められず, この変異がnt3243変異のないMELASにのみ存在していることが明らかになった.

さらに, nt3271変異を有するMELASとnt3243

	A.A. stem	DHU stem	DHU loop	DHU stem	A.C. stem	A.C. loop	A.C. stem	V. loop	TyC stem	TyC loop	TyC stem	A.A. stem
HUMAN-C	GT	TA	AGATGGC	AGCCCGGTAATCGCATAAA	ACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA
HUMAN-M1	GT	TA	AGATGGC	AGCCCGGTAATCGCATAAA	ACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA
HUMAN-M2	GT	TA	AGATGGC	AGCCCGGTAATCGCATAAA	ACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA
BOVINE	GT	TA	AGATGGC	AGCCCGGTAATCGCATAAA	ACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA
MOUSE	AT	TA	AGGTTGGC	AGCCAGGAAATTCGCTAAG	ACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA
RAT	AT	TA	AGGTTGGC	AGCCAGGAAATTCGCTAAG	ACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA	AACTTAA
CHICKEN	GCT	AGC	TGGCAGAGC	TGGCTAATGCGAAAGGCTTAAG	CCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA
FROG	GCT	AGC	TGGCAGAGC	TGGCTAATGCGAAAGGCTTAAG	CCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA	AGCCCTTAA
D. YAKUBA	TCT	AAT	TATGGCAGAT	-----TAGTCCAATGGATT	TAAGCT@CATAT-ATAAAGTAT	---TTACTTTTATTAGAA						
D. MEL.	TCT	AAT	TATGGCAGAT	-----TAGTCCAATGGATT	TAAGCT@CATAT-ATAAAGTAT	---TTACTTTTATTAGAA						
S. U. (PL)	GCT	AAA	TAGCAAAG	--TGTTAATGCAGAAGG	CCCTAAGAC@TTCC	TATCAAAGGTTCAACT	CCCTTTT	TAGT				
			↑		↑		↑					
			3243		3261		3271					

図3 ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>の塩基配列.

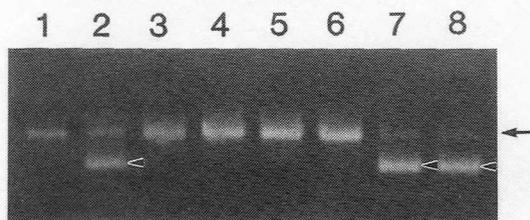


図4 制限酵素 AfIII で消化後の電気泳動. 8例のnt3243変異のないMELASのうち症例2, 7, 8に変異が見られる.

変異を有するMELASの間に臨床的な差が存在するかどうか検討した. nt3271変異のMELAS 4家系5例とnt3243変異のMELAS32例を対象とした. 表のごとく, 脳卒中様発作はnt3271変異でも全例に認められ, その中でも頭痛・嘔吐, 意識障害, 痙攣が多く見られた. また, 筋力低下, 精神遅滞, 低身長が多く, これらはnt3243のMELAS患者と同様の傾向であった.

筋病理学的にも, nt3271変異ではragged-red fiber, SSVが全例で認められ, cytochrome c oxidase欠損も3例にありnt3243変異のMELASと同様の傾向であった.

電子伝達系酵素の検討では, nt3271変異ではcomplex I欠損が1例, IV欠損が1例, I+IV欠損が1例, 生化学的には異常を認めないもの2例であった. nt3243変異では, complex I欠損が11例, IV欠損が4例, I+IV欠損が5例, 異常なしが12例であり両者に大きな差は認められなかった.

表 nt3243変異と nt3271変異の患者の臨床症状の比較

	3243	3271
Stroke-like episodes	32(100%)	5(100%)
Episodic headache with vomiting	30(93.8)	5(100)
Unconsciousness	27(84.4)	3(60)
Convulsion	27(84.4)	3(60)
Visual disturbance	16(50.0)	1(20)
Transient hemiplegia	7(21.9)	1(20)
<b>Additional symptoms</b>		
Muscle weakness	28(87.5)	3(60)
Mental retardation	23(71.9)	3(60)
Short stature	20(62.5)	2(40)
Hearing loss	9(28.1)	1(20)
Cardiomyopathy	3(9.4)	1(20)
Ptosis	3(9.4)	2(40)
Heart block	1(3.1)	0(0)
Delayed development	1(3.1)	0(0)
Retinal pigmentation	0(0)	0(0)

以上より、nt3271変異の患者は、nt3243変異を有する MELAS の臨床症状、筋病理所見、電子伝達系酵素活性において同様であり、このことから nt3271変異は nt3243変異とともに MELAS の病因となると考えられた。

最後に、nt3243変異では、この変異の位置が転写終結因子結合部に存在することから、この異常が RNA 合成に影響を与えたと考えられている。しかし、今回報告した nt3271変異は、この転写終結因子から外れている。にもかかわらず、両者が同様な臨床症状や生化学的異常を示すことは tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 自体の機能や構造の異常が病態に関与していることも考えられる。

## 文 献

- 1) Goto Y, Nonaka I, et al: A mutation in the transfer RNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalopathys. *Nature* 348: 651—653, 1990.
- 2) Kobayashi Y, Momoi MY, et al: A point mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Bioche Biophys Res Commun* 173: 816—822, 1990.
- 3) Tanaka M, Ino H, et al: Mitochondrial DNA mutation in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Bioche Biophys Res Commun* 174: 816—868, 1991.
- 4) Goto Y, Horai S, et al: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS): A correlative study of the clinical features and mitochondrial DNA mutation. *Neurology* 42: 1992 (in press).
- 5) Goto Y, Nonaka I, et al: A new mt DNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim Biophys Acta* 1097: 238—240, 1991.

## 平成3年度研究班名簿

平成3年度 荒木班 名簿

区 分	氏 名	所 属 施 設 名 所 在 地	所属にお ける地位	連絡の際の電話
主 任	荒 木 淑 郎	熊本大学医学部第一内科 〒860 熊本市本庄1-1-1	教 授	096-344-2111 (内5611)
監 事	垂 井 清一郎	国家公務員等共済組合連合会大手前病院 〒540 大阪市中央区大手前1-5-34	副 院 長	06-941-0484
幹 事	寺 尾 寿 夫	帝京大学医学部神経内科 〒173 板橋区加賀2-11-1	教 授	03-3964-1211 (内3000)
"	佐 藤 猛	順天堂大学医学部脳神経内科 〒113 文京区本郷2-1-1	助 教 授	03-3813-3111 (内3322)
"	小 澤 高 將	名古屋大学医学部第二生化学 〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65	教 授	052-741-2111 (内2031)
"	後 藤 幾 生	九州大学医学部脳研神経内科 〒812 福岡市東区馬出3-1-1	教 授	092-641-1151 (内2281)
運 営 幹 事	高 木 昭 夫	虎の門病院神経内科 〒105 港区虎の門2-2-2	部 長	03-3588-1111 (内2016)
班 員	荒 畑 喜 一	国立精神・神経センター神経研究所 〒187 小平市小川東町4-1-1	室 長	0423-41-2711 (内5114)
"	内 野 誠	国立療養所再春荘病院神経内科 〒861-11 熊本県菊池郡西合志町2659	医 長	096-242-1000 (内536)
"	太 田 成 男	自治医科大学生化学 〒329-04 栃木県河内郡南河内町 薬師寺3311-1	講 師	0285-44-2111 (内3151)
"	栗 原 照 幸	東邦大学医学部第四内科 〒153 目黒区大橋2-17-6	教 授	03-3468-1251 (内3324)
"	木 南 英 紀	順天堂大学医学部生化学 〒113 文京区本郷2-1-1	教 授	03-3813-3111 (内3514)
"	斎 藤 加 代 子	東京女子医科大学小児科 〒162 新宿区河田町8-1	講 師	03-3353-8111 (内31230)
"	佐 橋 功	愛知医科大学神経内科 〒480-11 愛知県愛知郡長久手町 岩作雁又21	助 教 授	0561-62-3311 (内2176)
"	田 邊 等	東京都立神経病院 〒183 府中市武蔵台2-6-1	院 長	0423-23-5111 (内3201)
"	西 澤 正 豊	自治医科大学神経内科 〒329-04 栃木県河内郡南河内町 薬師寺3311-1	助 教 授	0285-44-2111 (内3522)
"	後 藤 雄 一	国立精神・神経センター神経研究所 〒187 小平市小川東町4-1-1	研 究 員	0423-41-2711 (内5214)

区 分	氏 名	所 属 施 設 名 所 在 地	所属にお ける地位	連絡の際の電話
"	福 原 信 義	国立療養所犀潟病院神経内科 〒949-31 新潟県中頸城郡大潟町 犀潟468-1	医 長	0255-34-3131 (内553)
"	堀 眞一郎	勸東京都神経科学総合研究所生化学 〒183 府中市武蔵台2-6	副 参 事 研 究 員	0423-25-3881 (内4002)
"	桃 井 真里子	自治医科大学小児科 〒329-04 栃木県河内郡南河内町 薬師寺3311-1	助 教 授	0285-44-2111 (内3445)
"	吉 田 瑞 子	国立精神・神経センター神経研究所 〒187 小平市小川東町4-1-1	室 長	0423-46-1715 (直通)
"	若 山 吉 弘	昭和大学藤が丘病院神経内科 〒227 横浜市緑区藤が丘1-30	教 授	045-971-1151 (内269)
"	岡 田 伸太郎	大阪大学医学部小児科 〒553 大阪市福島区福島1-1-50	教 授	06-451-0051 (内2330)
"	納 光 弘	鹿児島大学医学部第三内科 〒890 鹿児島市宇宿町1208-1	教 授	0992-64-2211 (内2146)
"	川 井 尚 臣	徳島大学医学部第一内科 〒770 徳島市蔵本町3丁目	助 教 授	0886-31-3111 (内3204)
"	木 村 淳	京都大学医学部神経内科 〒606 京都市左京区聖護院河原町54	教 授	075-751-3770
"	黒 田 泰 弘	徳島大学医学部小児科 〒770 徳島市蔵本町3-18-15	教 授	0886-31-3111 (内2320)
"	小 林 高 義	東京医科歯科大学医学部神経内科 〒113 文京区湯島1-5-45	講 師	03-3813-6111 (内3385)
"	清 水 輝 夫	東京大学医学部脳研神経内科 〒113 文京区本郷7-3-1	講 師	03-3964-1211 (内8763)
"	庄 司 進 一	信州大学医学部第三内科 〒390 松本市旭3-1-1	助 教 授	0263-35-4600 (内5321)
"	杉 村 公 也	名古屋大学医学部神経内科 〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65	講 師	052-741-2111 (内2297)
"	高 守 正 治	金沢大学医学部神経内科 〒920 金沢市宝町13-1	教 授	0762-62-8151 (内3950)
"	田 代 邦 雄	北海道大学医学部神経内科 〒060 札幌市北区北14条西5丁目	教 授	011-716-1161 (内6027)
"	濱 田 稔	宮崎医科大学衛生学 〒889-16 宮崎県宮崎郡清武町木原5200	教 授	0985-85-0873 (直通)
"	宝 来 聡	国立遺伝学研究所人類遺伝研究 〒411 三島市谷田1111	助 手	0559-75-0771 (内568)
"	水 澤 英 洋	筑波大学臨床医学系神経内科 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1	助 教 授	0298-53-3224
"	田 中 恵 子	新潟大学神経内科 〒951 新潟市旭町通1番町757	助 手	025-223-6161 (内5183)

区 分	氏 名	所 属 施 設 名 所 在 地	所属にお ける地位	連絡の際の電話
班 員	森 正 敬	熊本大学医学部遺伝医学 〒862 熊本市九品寺4-24-1	教 授	096-344-2111 (内6771)
顧 問	三 好 和 夫	徳島大学医学部第一内科 〒770 徳島市蔵本町3丁目	名誉教授	0886-31-3111
"	宇尾野 公 義	国立静岡病院 〒420 静岡市城東町24-1	院 長	0542-45-0101
"	豊 倉 康 夫	東京都老人医療センター 〒173 板橋区柴町35-2	院 長	03-3964-1131
事務担当者	安 部 和 子	冲中記念成人病研究所 〒105 港区虎の門2-2-2		03-3588-1111 (内2168)