

厚生省「精神・神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー及び類縁疾患の  
病態と治療法に関する研究

高木班

平成5年度研究報告書

平成6年3月（1994年）

# 総括研究報告

主任研究者 高木 昭夫

## 研究班の発足と一年のまとめ

### A) 研究目標と班構成

平成5年4月より当研究班が新たに発足した。班員34名，協力班員2名，顧問5名の構成である。本研究班は三好班，杉田班および荒木班の後継班である。これまでに輝かしい成果を挙げてきたことは周知であり，本年度の活動においても，随所にその伝統と遺産の恩恵を享受したといえる。

本研究班の目的は，筋ジストロフィーおよび類縁疾患について，診断，病態および治療に関する研究を行うことである。筋ジストロフィーとしては，Duchenne型（DMD），Becker型（BMD），顔面肩甲上腕型（FSH），肢帯型（LG），福山型（FCMD），遠位型などを対象とした。類縁疾患としては，ミトコンドリア脳筋症や筋緊張性ジストロフィー（MyD）を対象疾患とした。

班員各位から提出いただいた研究計画を以下の7群に分類した。

- i) DMD, BMDにおける dystrophin とその isoform, dystrophin related protein (DRP, utrophin), dystrophin associated glycoprotein (DAG) などの発現や病態に関する研究（担当幹事；若山吉弘，清水輝夫）
- ii) FSH, FCMD, 遠位型などの染色体や遺伝子解析（同；荒畑喜一）
- iii) カルシウムイオン調節，自己食食誘起物質など（同；高木昭夫）
- iv) 筋ジストロフィーの治療法開発（同；寺尾寿夫，高木昭夫）
- v) 筋緊張性ジストロフィーの病態研究（同；後藤幾生）
- vi) ミトコンドリア脳筋症に関する研究（同；佐藤 猛，小澤高將）
- vii) SCARMMD (Adhalin 欠損症)，筋炎などに関する研究（同；佐藤 猛，清水輝夫）

### B) 研究成果

- i) Dystrophin, DAG, Laminin, DRP など

Dystrophin 研究は DAG と称される一群の膜蛋白の発見につながり，細胞生物学の新しい頁を開いたといえる。現在 dystrophin は DAG を介して，細胞外マトリックスと連結し，細胞の補強や信号伝達に関与する可能性が考慮されている。43K-DAG は形質膜内側で dystrophin と相対していることが double immunogold labelling 法で証明された（若山ら）。光顕レベルでは，43K-DAG は DMD で中等度に低下していた（若山ら）。50K-DAG

(Adhalin) は SCARMD (severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy) で欠損することは既に報告されている。Adhalin 欠損症は北アフリカのアラブ人において発見されたが、その後人種を越えて広く分布するとされた (清水ら), また本邦においても同一症例が報告された (納ら)。Adhalin 欠損症は遺伝的には単一ではないといわれる (清水ら)。末梢神経には Dp116 (dystrophin isoform) や dystroglycan の発現をみたが adhalin の発現はなかった (清水ら)。

156K-DAG ( $\alpha$ -dystroglycan) は細胞外マトリックスの laminin M 鎖と結合している。Laminin M 鎖の免疫組織染色によると dy/dy 筋ジストロフィーマウス骨格筋で染色性が消失していた (荒畑ら)。FCMD における laminin subunit の染色性も検討された (水野ら)。

DRP (Utrophin) は DMD 女性保因者の心筋で dystrophin を欠く細胞で代償性に発現していた (川井ら)。ヒト培養筋細胞では未熟期には細胞質内に, 成熟すると NMJ に局在した (小林ら)。Utrophin は中枢神経では軟膜や血管壁に発現していたが, neuron での発現はなかった (内野ら)。Utrophin はまた血管内皮細胞に多く発現していた (清水ら)。

## ii) 遺伝子解析

BMD は多様な臨床症候を呈することで知られる。この中には, 拡張型心筋症を主徴とするものがあり, X-linked dilated cardiomyopathy と呼ばれる。この群では dystrophin 遺伝子の exon 1-2 近傍の欠損が報告された。Intron 1 には転写調節機構が存在しその障害のための発病と推定された (吉田ら)。DMD のいわゆる revertant fiber においては, dystrophin 陰性筋線維と同一の DNA 欠失が証明された。発現している dystrophin 蛋白も不完全タイプのものであった (水野ら)。体細胞 mosaicism を呈する DMD 剖検症例が報告された。リンパ球では exon 1-7 の欠失を認めたが, 胸鎖乳突筋, 側頭筋, 横隔膜, 腎からの DNA には欠失を認めていない (斉藤ら)。FSH の DNA 診断には p13E-11 probe を使用する Southern 解析が行われている。新しい probe pFR 1 が開発された (荒畑ら)。

FCMD は本邦に多く, また中枢神経病変を伴うことで注目されている。ホモ接合性マッピング法を応用した連鎖解析から, 遺伝子局在は 9q31-33 と判明し, 今後の発展が期待される (戸田ら)。

## iii) 筋ジストロフィーの治療

筋芽細胞移植による筋ジストロフィーの治療に関しては種々の検討が加えられている。Myoblast が基底膜を通過しにくいことに鑑み, collagenase 1 併用を行い, 生着率を向上させた (寺尾ら)。本邦でも mdx マウスの実験的遺伝子治療が開始された。HVJ-リポゾーム法により dystrophin の全 cDNA を筋注して, dystrophin の発現をみた (岡田ら)。緩和的治療として, dantrolene や bestatin の効果が分析された (梶ら, 栗原ら)。

## iv) ミトコンドリア脳筋症

Mitochondrial DNA 欠失の検索は主として Southern 法で行なわれてきた。Multiplex

PCR法による検査法が開発された(湯浅ら)。3243変異を伴うMELASにおいて各種組織や細胞における変異mtDNAの比率が検討された。Ragged red fiber (RRF)ではmtDNA量はnon-RRFの5~17倍に増加しており、かつ変異mtDNA比率は有意に増加していた(内野ら)。いわゆるSSVと呼ばれる筋内小動脈でも変異mtDNAが増加していた。変異mtDNAによる細胞障害はその分配量に関係するとされる。MELAS症例の単一リンパ球における変異mtDNA量が検討された。各リンパ球におけるheteroplasmyの比率はほぼ一定であった(桃井ら)。MELASにおけるtRNAロイシン(UUR)の点変異として、3243(A→G)は80%、3271(T→C)は10%を占めている。残り10%はまだ不明である。3291(T→C)が新しい変異として報告された(宝来ら)。3291Tは種をこえて広く保存された塩基である。tRNA・チロシン遺伝子近傍の挿入変異の病因的意義が検討された(後藤ら)。慢性腎不全を主徴としミトコンドリア病の疑われた症例で12SrRNA遺伝子において、827A→G変異が報告された(小澤ら)。

MELASの発症機序の解明を目的として、cybridを応用した実験が行われた(太田ら)。3271変異では呼吸鎖酵素活性の低下が、また3243変異では酵素蛋白合成の低下が観察された。

#### v) その他

筋緊張性ジストロフィー(MyD)症例におけるCTGリピートの増大が分析された。いわゆるanticipationには世代間でのリピートの増幅が深く関係することが確認された。先天性MyDの出現機序にもCTGリピートの増加の関与が推定された(辻ら)。MyD剖検脳を使用して、MyD遺伝子のallele別発現を検討した。mRNA発現量の比較ではallele別に差を認めていない(後藤ら)。Ryanodine受容体遺伝子の1840(C→T)変異は一部の悪性高熱(MH)の病因とされている。本邦の4例のMHではこの変異は認められなかった(高木ら)。

### C) 総合班会議

平成5年度班会議は12月3日、4日(於:全共連ビル)で開催された。48題の研究報告があった。

「筋ジストロフィー」総合班会議は平成6年1月25日(於:日本都市センター)で行われ、第2班からは以下の発表を行った。

- 1) Adhalin (50kDa dystrophin-associated glycoprotein) 欠損症と筋ジストロフィー  
松村喜一郎(帝京大学医学部)
- 2) 福山型先天性筋ジストロフィーの遺伝子座  
戸田 達史(癌研究会研究所)
- 3) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの分子遺伝学  
荒畑 喜一(国立精神・神経センター)

4) ミトコンドリア脳筋症に関する最近の研究の進歩

後藤 雄一（国立精神・神経センター）

5) Duchenne型筋ジストロフィーの遺伝子治療 ——現況と遺伝子導入法の開発——

乾 幸治（大阪大学医学部）

## 追 悼

本年報の冒頭で深い悲しみの中で九州大学後藤幾生教授を追悼することとなった。

後藤教授は平成6年3月2日夕刻に急逝された。昨年12月の班会議に於いては、常時と変わらぬ穏やかさで御発言や御指導をいただいた私共にとって、まさに夢幻のような出来事であり、とても信じることはできない。

後藤教授は昭和57年より班員として活躍されてきた。平成2年からは幹事として指導的役割を分担されている。本研究班の年報を繙くだけでも、この分野における著明な御業績を伺い知ることが出来る。Rigid spine syndrome, Isaacs 症候群, scapulo-peroneal syndromeなどの症例研究がある。筋ジストロフィーモデル動物、塩基性線維芽細胞成長因子、ミトコンドリア脳筋症などに関しては、パイオニア的研究をされた。筋緊張性ジストロフィーの分子遺伝学的研究はまさに開花しつつあるお仕事であった。今後の研究班活動に生じた空白の大きさに茫然とするのみである。

ユーモアに富む優しいお人柄への哀惜は私共班員の共通の思いであろう。永年に亘る先生の御指導と御尽力に衷心よりの感謝を捧げるとともに、謹んで冥福をお祈りする次第である。

# 目 次

## I. 臨床・病理

- 1) 筋疾患における運動機能の評価 ..... 15  
北海道大学医学部神経内科 田代邦雄
- 2) 常染色体優性肢帯型筋ジストロフィーの1家系：  
臨床的・筋病理組織学的検討 ..... 19  
筑波大学臨床医学系神経内科 庄司進一
- 3) 筋緊張性ジストロフィーの糖鎖変化(Ⅲ) ..... 23  
名古屋大学医療技術短期大学 杉村公也
- 4) Marinesco-Sjögren 症候群の筋病理所見 ..... 26  
国立療養所犀潟病院神経内科 福原信義
- 5) 病的筋の細胞膜における免疫組織化学的検討 ..... 29  
愛知医科大学第四内科 佐橋功
- 6) Danon disease (lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase)  
の膜異常について ..... 32  
国立精神・神経センター武蔵病院 後藤雄一
- 7) 福山型先天性筋ジストロフィーにおける細胞外  
マトリックスの免疫組織学的研究 ..... 35  
東京都立神経病院神経内科 田邊等
- 8) 筋ジストロフィーマウスにおける細胞外マトリックスの検討 ..... 38  
国立精神・神経センター神経研究所 荒畑喜一

## II. 遺伝子 (Part 1)

- 9) 筋ジストロフィー及びその類縁疾患に関する細胞遺伝学的研究  
I. リンパ芽球細胞株を用いた高精度分染法の検討 ..... 43  
東京医科歯科大学難治疾患研究所遺伝疾患研究部門 斎藤深美子
- 10) 拡張型心筋症を主徴とするベッカー型筋ジストロフィーと  
ジストロフィン遺伝子異常について ..... 46  
信州大学医学部第三内科 吉田邦広
- 11) ジストロフィン分子の高システイン及びC末端領域が保持された  
重症 DMD 症例 ..... 49  
国立精神・神経センター神経研究所 荒畑喜一
- 12) Duchenne 型筋ジストロフィーにおけるジストロフィン陽性筋線維の解析 ..... 51  
順天堂大学医学部脳神経内科 水野美邦
- 13) ジストロフィンにおける体細胞モザイシズム ..... 54  
東京女子医科大学小児科 斎藤加代子
- 14) 福山型先天性筋ジストロフィー遺伝子は9q31-33に存在する ..... 58  
癌研究会癌研究所生化学部 戸田達史

### III. 遺伝子 (Part 2)

- 15) 筋緊張性ジストロフィー——CTGリピートの増大に関する臨床遺伝学的研究…………… 65  
新潟大学脳研究所神経内科 辻 省 次
- 16) 筋緊張性ジストロフィー症関連遺伝子の脳内発現の検討…………… 68  
九州大学医学部脳研神経内科 後 藤 幾 生
- 17) Ryanodine 受容体遺伝子突然変異の検討…………… 71  
虎の門病院神経内科 高 木 昭 夫
- 18) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の遺伝子解析…………… 74  
国立精神・神経センター神経研究所 荒 畑 喜 一
- 19) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの臨床的多様性と遺伝子診断…………… 77  
鹿児島大学医学部第三内科 納 光 弘

### IV. DRP

- 20) 培養下におけるDRPの発現に関する免疫組織学的研究…………… 83  
東京医科歯科大学医学部神経内科 小 林 高 義
- 21) 心症状を呈したDuchenne型筋ジストロフィーの症候性女性保因者2症例の骨格筋  
ならびに心筋におけるジストロフィンとジストロフィン関連蛋白の発現…………… 87  
徳島大学医学部第一内科 川 井 尚 臣
- 22) Duchenne型筋ジストロフィーの中樞神経系におけるDystrophin (Dy)と  
Dy関連蛋白…………… 91  
熊本大学医学部第一内科 内 野 誠
- 23) Utrophin (dystrophin-related protein) の抽出と血管内皮細胞における同定…………… 94  
帝京大学医学部神経内科 清 水 輝 夫

### V. DAG

- 24) 抗Dystrophin-associated glycoproteinペプチド抗体によるヒト生検筋の  
免疫組織化学的検討…………… 97  
昭和大学藤が丘病院神経内科 若 山 吉 弘
- 25) Double immunogold labelling法による43kDa dystrophin-associated  
glycoproteinとdystrophinの正常骨格筋細胞における超微局在  
——免疫透過電顕的検討——…………… 100  
昭和大学藤が丘病院神経内科 若 山 吉 弘
- 26) 末梢神経のdystroglycan複合体の検討…………… 105  
帝京大学医学部神経内科 清 水 輝 夫
- 27) 50kDa dystrophin-associated glycoprotein欠損を認めた重症筋ジストロフィーの  
一症例…………… 107  
鹿児島大学医学部第三内科 納 光 弘
- 28) Adhalin (50kDa dystrophin-associated glycoprotein) 欠損症の臨床病態…………… 110  
帝京大学医学部神経内科 清 水 輝 夫

## VI. 壊死・再生ほか

- 29) ジストロフィン欠損細胞のチャネル機能に関する研究 ..... 115  
金沢大学医学部神経内科 高 守 正 治
- 30) Duchenne型筋ジストロフィーの筋内血管壁における  
nerve growth factor receptor (NGFR) の発現について ..... 118  
東京都立神経病院 田 邊 等
- 31) 外液Ca<sup>2+</sup>による骨格筋崩壊現象 ..... 121  
国立精神・神経センター神経研究所 吉 田 瑞 子
- 32) 筋細胞死と再生に伴う各種プロテアーゼ群の変動 ..... 125  
順天堂大学医学部生化学第一講座 木 南 英 紀

## VII. ミトコンドリア (Part 1)

- 33) 進行性外眼筋麻痺症候群の眼科的異常 ..... 131  
国立精神・神経センター国府台病院神経内科 佐 藤 猛
- 34) Kearns-Sayre症候群患者の無症状の母親に認められた運動負荷時の高乳酸血症と  
筋ミトコンドリア異常 ..... 134  
徳島大学医学部第一内科 川 井 尚 臣
- 35) MERRFにおけるミトコンドリアDNA異常と臨床症状 ..... 138  
国立療養所犀潟病院神経内科 福 原 信 義
- 36) ミトコンドリア異常症の病態解析 ..... 141  
自治医科大学小児科 桃 井 真 里 子
- 37) Multiplex PCR法を用いたミトコンドリア病におけるmitochondrial DNA  
deletionの検索 ..... 144  
東京医科歯科大学医学部神経内科 湯 浅 龍 彦
- 38) ミトコンドリア異常症の臨床亜型の検討 ..... 150  
虎の門病院神経内科 高 木 昭 夫
- 39) 全身性カルニチン欠乏マウス (jvsマウス) のミトコンドリアの変化に関する研究 ..... 153  
国家公務員等共済組合連合会大手前病院 垂 井 清 一 郎

## VIII. ミトコンドリア (Part 2)

- 40) MELASにおけるミトコンドリアDNAの変異 ..... 159  
国立遺伝学研究所・人類遺伝研究部門 宝 来 聰
- 41) MELASの筋病理における変異 mtDNA の役割 ..... 163  
熊本大学医学部第一内科 内 野 誠
- 42) ミトコンドリア脳筋症MELASにおける複合体形成異常 ..... 165  
自治医科大学生化学第一教室 太 田 成 男
- 43) ミトコンドリアチロシン転移RNA遺伝子近傍の挿入変異とミトコンドリア病  
との関係 ..... 168  
国立精神・神経センター武蔵病院 後 藤 雄 一

44) ミトコンドリア病における12SリボソームRNA遺伝子変異 .....	170
埼玉医科大学総合医療センター第四内科 小澤高將	

## IX. 治療

45) mdxマウスを用いた治療開発に関する研究 .....	175
東邦大学医学部第四内科 栗原照幸	

46) mdxマウスに対するダントロレンナトリウムの影響——CK値，運動量および 組織学的検討 .....	178
京都大学医学部神経内科 梶龍兒	

47) Myoblast transferに関する研究——collagenaseの効果—— .....	181
帝京大学医学部神経内科 寺尾寿夫	

48) Duchenne型筋ジストロフィーにおける遺伝子治療の可能性に関する研究 .....	184
大阪大学医学部小児科 岡田伸太郎	

平成5年度研究班名簿 .....	189
------------------	-----

# I . 臨 床 · 病 理

# 1) 筋疾患における運動機能の評価

田代邦雄\*

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

## はじめに

運動能力を客観的に把握する方法としてAT(anaerobic threshold), max VO<sub>2</sub>(最大酸素摂取量)が代表的な指標であるが、運動処方を行う場合、peak VO<sub>2</sub>や最大心拍数を基準とする方法は最大運動が必要となり、健常人でも困難な点が多い<sup>1)2)</sup>。また、種々の疾患を有する患者にはこの方法では判定できない。ATは最大運動を必要とせず、トレーニング効果、運動能力を鋭敏で安全な方法である。ATを考える場合、種々のパラメーターが存在し、それぞれの状態で区別して用いられているが、われわれが使用しているのはVT(換気閾値)を基準としている<sup>3)4)</sup>。今回われわれは筋疾患筋緊張性ジストロフィー(MyD)、多発筋炎の運動機能をVO<sub>2</sub>/W(AT)、心拍数(HR)、Load(W)、下腿(Hamstring, Quadriceps muscle)の筋力を測定することで薬剤の効果、および運動処方の妥当性について検討したので報告する。

## 対象と方法

筋緊張性ジストロフィー(MyD)5例について検討した。年齢は23歳-52歳(平均33.6歳)の男性4例、女性1例であり、5例とも歩行可能であり、握力は7~19kg(平均11.2kg)であり、CK(creatine phosphokinase)は154~688IU/I(平均369.2IU/I)であった(表1)。  
1. 各症例についてVO<sub>2</sub>/W, HR, Loadを測定した。症

例1, 症例5に対して塩酸プロカインアמיד250mg/day, 他3例にはplacebo(胃薬)を投与し, 1年間投与を継続した。その後VO<sub>2</sub>/W, HR, Load, peak時のLoad等を測定し, 投与前値と比較した。

2. 各症例に筋訓練測定装置(KIN/COM)を使用し, 右下腿(Hamstring, Quadriceps muscle)の筋力を測定し, 1同様に塩酸プロカインアמיד投与前後での筋力差を検討した。

多発筋炎2例についてVO<sub>2</sub>/Wの50%程度のLoadで運動を処方し, 運動を継続した場合, VO<sub>2</sub>/W, HR, Loadの変化, および筋力について検討した。症例は63歳, 38歳女性, 罹病期間は13年, 2年であり, CKは68-184IU/Iであった。プレドニソロン15mg~17.5mg/dayで連日投与をおこなっていた(表1)。

## VO<sub>2</sub>/W, HR, Load, 筋力の測定

呼気ガス分析はMINATO医科製エアロモニターAE280を使用しbreath by breath法で3秒毎, 酸素摂取量, 二酸化炭素排出量, 換気当量, 心拍数等を連続して測定した。運動負荷はエルゴメーターを使用し, 漸増運動負荷(ramp負荷)でおこなった。

筋力測定は筋訓練測定装置(KIN/COM)を用い, 右下腿(Hamstring, Quadriceps muscle)の最大筋力を測定した。Isokinetic modeで角速度30°, 90°にてconcentric contraction, eccentric contractionの動作で

表1 左: MyD 5例のプロフィール。症例は23歳から52歳までの男性4例, 女性1例である。  
右: 多発筋炎のプロフィール。63歳, 38歳のともに女性であり, 現在もステロイド治療を継続している。

筋緊張性ジストロフィー (MyD)						多発筋炎		
	症例1	症例2	症例3	症例4	症例5	症例1	症例2	
年齢	25歳	23歳	52歳	49歳	19歳	63歳	38歳	年齢
性別	♂	♂	♂	♂	♀	♀	♀	性別
体重	37kg	58kg	47kg	52kg	51kg	13年	2年	罹病期間
CK(IU/I)	356±45	154±58	187±89	461±38	688±157	184±64	68±36	CK(IU/I)
						17.5mg/day	15mg/day	Prednisolone

\*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

実施した。concentric contractionとは蹴り挙げる運動、eccentric contractionとは膝関節を伸ばそうと努力するにもかかわらず、測定装置の力に負けて、膝関節が屈曲を強いられる運動である。

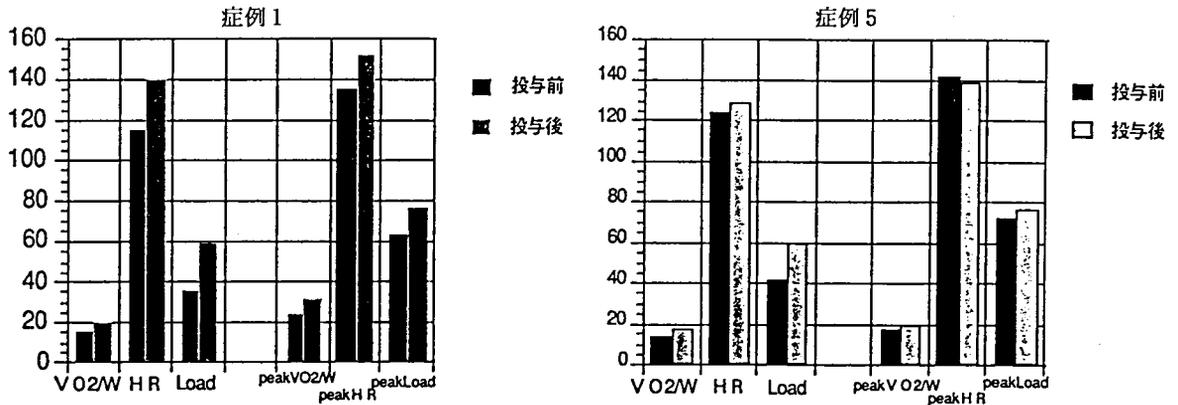
### 結 果

MyD例に対して塩酸プロカインアミドを投与した症例1はAT前値が15.1ml/kg/minであり、年齢を考慮しても著明に低下していた。またLoad 35Wと同様に低下し、ATからpeakまでのHR、Loadは比較的に良好であった。投与後のVO<sub>2</sub>/Wは20.1ml/kg/minと有意に上昇が認められAT時のLoadも59Wと上昇した。しかしATからpeakへの時間が短く、AT以降における運動の持続性が少ないことが見られた。症例5も同様に塩酸プ

ロカインアミド投与前は13.5ml/kg/min、Load 42W、peak時のLoadが55WとAT以降急速に運動能力が低下する。投与後はATが17.3ml/kg/min、Load 60W、peak時のVO<sub>2</sub>/Wが19.5と有意に上昇していた(図1)。しかしAT以降の運動能力は依然として低下していた。placebo投与群(症例2, 3, 4)は投与前後で比較して14.5ml/kg/minから15.3ml/kg/min、11.2ml/kg/minから12.1ml/kg/min、症例4は投与前値がATまで測定できなかったが、1年後は10.2ml/kg/minと著明に低下しており、ほとんど変化がないと考えられた(表2)。

右下腿の筋力に関しては症例1, 2, 5で施行した。角速度30°でconcentric contractionの動作で施行したものが再現性が見られ、これによると塩酸プロカインアミド投与例の症例1, 5はともにQuadriceps muscleの

(MyD) 塩酸プロカインアミド投与例



(MyD) placebo投与例

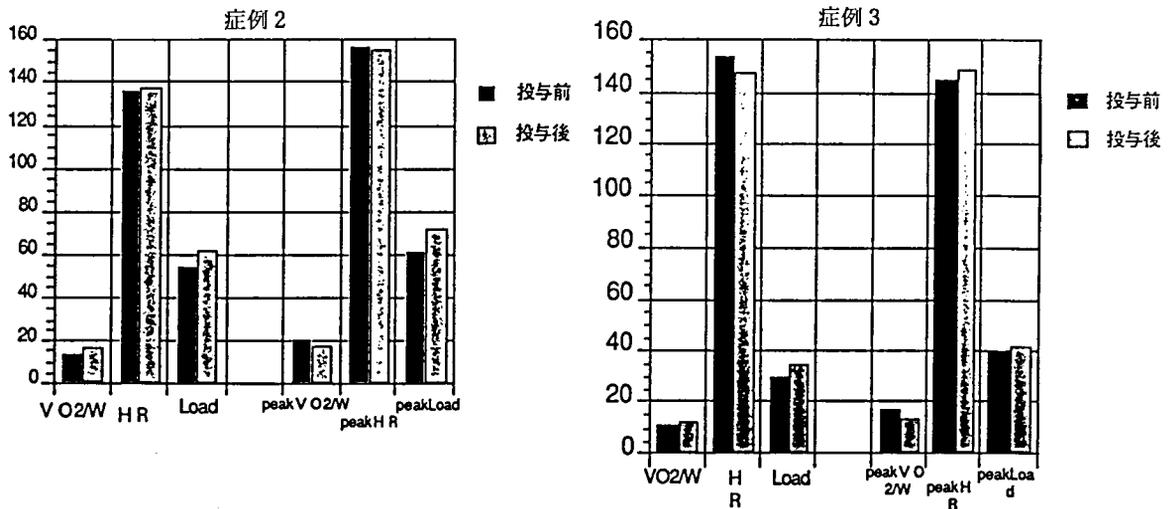


図1 上段：症例1, 5. プロカインアミド投与群, ATの上昇とpeak時のLoadの増加が認められた。  
下段：症例2, 3. placebo投与群, AT, HR, Loadともに変化を認めなかった。

表2 上段：MyD例の塩酸プロカインアミド投与群と placebo 投与群における AT, HR, Load である。症例 1, 5 は塩酸プロカインアミド投与群で投与前 AT が 15.1, 13.5 から投与後 1 年経過した時点の AT は 20.1, 17.3 ml/kg/mm と有意な上昇が見られた。下段：症例 1, 2, 5 の筋力を角速度 30° で concentric contraction で検討したもの。塩酸プロカインアミド投与群が Quadriceps muscle で上昇していることが認められた。

筋緊張性ジストロフィー 5 例のまとめ

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5
投与前					
VO <sub>2</sub> /W	15.1	14.5	11.2		13.5
HR	115	137	142		124
Load	35	55	30		42
peak VO <sub>2</sub> /W	24.0	20.5	17.5	12.0	17.5
peak HR	135	157	145	130	142
peak Load	60	62	39	39	55
投与後					
VO <sub>2</sub> /W	20.1	15.3	12.1	10.2	17.3
HR	140	138	147	132	129
Load	59	62	35	34	60
peak VO <sub>2</sub> /W	31.1	17.6	13.4	13.0	19.5
peak HR	152	155	148	142	139
peak Load	77	72	42	40	77

筋緊張性ジストロフィーの筋力変化

投与前 投与後  
Quadriceps/Hamstring Quadriceps/Hamstring

症例 1	158/58	197/78
症例 2	235/144	230/110
症例 5	57/98	88/158 (N)

concentric contraction (角速度 30°)

表3 上・中段：多発筋炎の AT, HR, Load の推移を示す。症例 1 は運動療法を毎日施行した場合 12.7 から 15.1 ml/kg/mm まで上昇したが、その後、運動量が減少することで AT はやや下降してきたが、peak 時の Load は平衡状態であった。症例 2 も同様な経過を推移した。下段：症例 2 における筋力の経過を追い検討した。角速度 30°, 90° で検討したが、比較的再現性が良好であり、筋力としての評価が可能であることが予想された。

多発筋炎

症例 1	5/12 91	7/13 91	6/2 92	6/3 93
VO <sub>2</sub> /W	12.7	15.1	13.8	12.9
HR			137	138
Load			41	42
peak VO <sub>2</sub> /W			18.2	17.8
peak HR			156	166
peak Load			85	84

症例 2	8/19 92	9/17 92	5/24 93	11/11 93
VO <sub>2</sub> /W	16.0	22.0	18.3	18.8
HR	141	133	127	133
Load	41	71	69	69
peak VO <sub>2</sub> /W	22.0	27.0	22.0	25.7
peak HR	150	146	150	153
peak Load	54	89	105	107

多発筋炎

症例 2	5/25 93	11/11 93
con/con (角速度 30°)	280/192	300/179
con/con (角速度 90°)	215/161	231/158
con/ecc (角速度 30°)	303/473	293/466
con/ecc (角速度 90°)	225/492	254/482 (N)

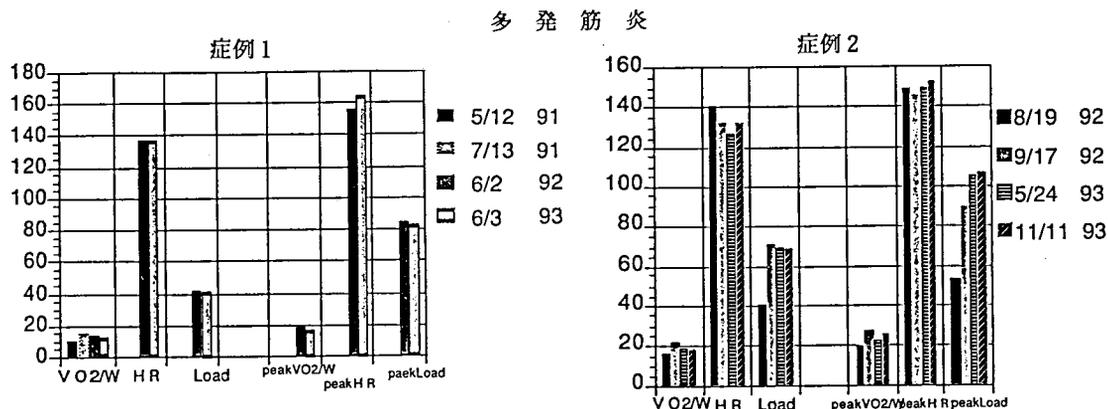


図2 左：症例 1. AT, HR, Load であるが、peak 時の Load は低下していなかった。右：症例 2. 同様に運動継続は peak 時の Load の維持に役立ち、運動量に比例して AT の増減が見られた。

筋力増加が認められた。筋力測定は特に最大筋力を測定する場合、疲労が問題であり、そのためこの値が有意なものかは今後の症例の集積が必要であると考えられた(表2)。多発筋炎に関して症例1はATが運動処方をおこない、連日運動療法を継続した場合は12.7ml/kg/minから15.1ml/kg/minと比較的上昇傾向が見られたが、その後、日常生活の場での運動療法だけでは13.8~12.9ml/kg/minと下降傾向となってきた。しかしATから以降の運動が比較的持続可能であり、AT時のLoadが41, 42Wからpeak時の85, 84Wと運動の持続性が見られた(図2)。症例2は運動療法開始以前はAT 16.0ml/kg/min, 運動開始1か月で22.0ml/kg/minと年齢を考慮してもほぼ正常なところまで改善していた。しかし日常生活と、週1回程度の運動量ではATが18.3, 18.8ml/kg/minと低下しているが、AT時のLoadは69Wと比較的高く維持されていた。またpeak時のLoadは105, 107Wと上昇しており、AT以降における運動持続性の向上が考えられた(表3)。筋力の測定は症例2で施行したが、それぞれの角速度とconcentric, eccentric contractionの検討したが、約6か月での筋力を検討したが、20~30Nの差はあるものの、有意な変化はなく、筋力は保持されていることが予想された(表3)。

#### 考 察

筋疾患の機能と呼気ガスを使用したATを指標として薬剤、または運動機能自体を測定、検討してきた。筋緊張性ジストロフィーに対して塩酸プロカインアミドの投与をおこなったが、この薬剤がmyotoniaにたいして効果があることは以前から知られており、臨床の場で使

用されている。この薬理学的特徴である細胞膜の安定化がmyotoniaの症状軽減に関与していることは周知であるが、今回われわれはこの薬剤が運動機能自体にも関与し、効果的であることが、AT, HR, Load, 筋力から推察された。その薬理学的機構に関しては今後の課題ではあるが、長期間の投与で運動能力の改善が多少なりとも認められることは、今後の治療の指標として重要であることが考えられた。また多発筋炎の運動は週1-2程度度の運動療法ではATの低下が見られるが、運動を継続することでpeak時のLoadが低下せず、平衡状態が保持できることが予想された。このことでAT以降での運動でも比較的長時間持続可能である。

#### 文 献

- 1) 谷口興一：心肺運動負荷テスト。南江堂，東京，1993，p155.
- 2) 中村好男：乳酸閾値と換気閾値との関連についてのBeaver, Wasserman, Whippの主張に対する疑問。体育の科学 40：453-460, 1990.
- 3) 田代邦雄，伊藤和則ほか：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—。“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，1992，pp59-61.
- 4) 田代邦雄，伊藤和則ほか：筋疾患の治療効果“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4年度研究報告書，1993，pp64-67.

## 2) 常染色体優性肢帯型筋ジストロフィーの1家系： 臨床的・筋病理組織学的検討

庄 司 進 一\*

研究協力者 小 國 英 一\* 大 越 教 夫\* 安 達 充 芳\*  
林 明 人\* 水 澤 英 洋\*

### はじめに

我々は常染色体優性肢帯型筋ジストロフィーの1家系例を経験した。この家系は推定発症者を含め、両性に渡り7人の患者を認めた(図1)。この家系例の特徴を明らかにするため、発症者を含めた同胞3例について、臨床所見、筋CTによる障害筋の分布、生検筋の筋病理組織を調べ、常染色体劣性肢帯型筋ジストロフィーの自験例と比較検討した。

### 対 象

症例1(発端者)：44歳女性 筑大神内 234420-1

主訴：四肢筋力低下

現病歴：25歳頃から両下肢を重く感じ、走れなくなった。30歳時、第2子出産後、階段昇降が困難となった。44歳時、当科外来を受診し、精査目的で当科入院となった。

一般身体所見は身長153cm、体重55kg、血圧140/80mm Hg、ほか胸部腹部に異常なし。神経学的には意識は清明で高次機能は異常なし。上腕三頭筋に徒手筋力テスト(MMT)4、大腿四頭筋・膝屈筋・前脛骨筋にMMT3の筋力低下を認めた。筋トーンスは低下し、腓腹部は肥大していた。深部反射は全般性に低下し、歩行は動揺性でGowers'徴候を認めた。感覚系、協調運動、自律神経系には異常を認めなかった。

検査所見ではCKが165 IU/mlと正常のほか、尿、血算、生化学、免疫系、髄液はいずれも異常を認めなかった。針筋電図では上下肢とも低振幅多相性運動単位放電を認めた。

筋CT(図2A)では、大腿部で全般性に著しい筋萎縮と脂肪変性を認めるが、その程度は伸筋群で比較的軽く、大腿直筋はよく保たれていた。下腿部では大腿に比べ全般性に障害の程度は軽く、腓腹筋やヒラメ筋に比べ前脛骨筋等の屈筋群に強い筋萎縮と脂肪変性を認めた。

前脛骨筋で行った筋生検のHE染色標本では、筋線維

の大小不同を認め、著明に肥大線維が増加し、中心核、fiber splittingを認めた(図3A)。また、Phagocytosisを伴う壊死線維も認めた(図3B)。DYS3抗体を用いたジストロフィン染色では正常に染色された(図3C)。また、DYS1、DYS2でも同様に正常パターンに染色され、DRPでは染色されなかった。以上より本例を肢帯型筋ジストロフィーと診断した。

症例2(発端者の姉)：49歳女性 筑大神内 238769-5  
主訴：下肢筋力低下

現病歴：30歳頃より疲労時の下肢筋力低下を自覚したが、日常生活には支障なく、階段で4階までの新聞配達を続けていた。発端者の入院を契機に、精査目的で入院した。

神経学的には上肢・上肢帯に筋力低下なく、下肢近位筋にMMT4、下腿屈筋MMT3の筋力低下を認めた。筋トーンスは全般性に低下し、歩行は動揺性歩行に加え鶏歩を認め、爪先立ちは可能だが、踵立ちは不能であった。検査所見はCK119IU/mlと正常であった。筋CTでは症例1と同様に大腿は屈筋・内転筋群に著しい筋萎縮と脂肪変性を認め、伸筋群は比較的軽く、大腿直筋はよく保たれていた。同様に下腿は伸筋群に比べ屈筋群がより高度に障害されていた。

症例3(発端者の兄)：59歳男性 筑大神内 242478-9

現病歴：40歳頃から歩行時の疲労を感じるのみで、大工仕事で梯子で屋根に登れ、日常生活に支障なかった。発

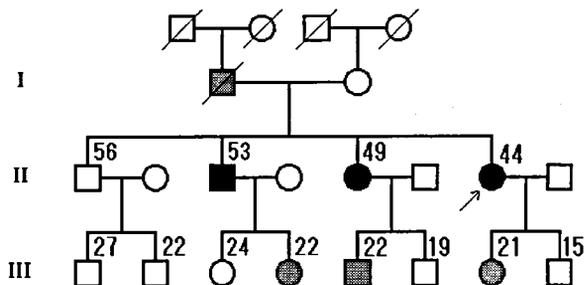


図1 家系図 発症者を黒、灰色で示す。黒は本研究の対象例

\*筑波大学臨床医学系神経内科

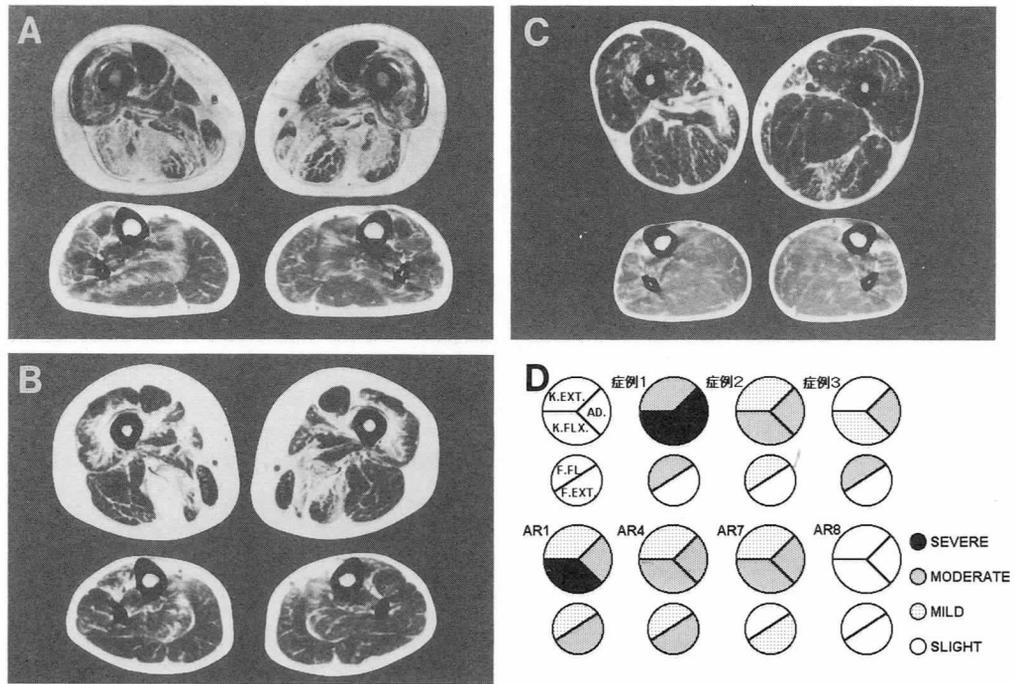


図2 下肢の筋CT

A：症例1 B：症例2 C：症例3 それぞれ上段は大腿，下段は下腿

D：筋障害パターンの比較 各症例の上段は大腿，下段は下腿．AR1, AR4, AR7, AR8は表1のAR1, AR4, AR7, AR8と同一例．K. EXT.は膝伸筋群，K. FLX.は膝屈筋群，AD.は大腿内転筋群，F. FL.は足関節屈筋群，F. EXT.は足関節伸筋群を表す．

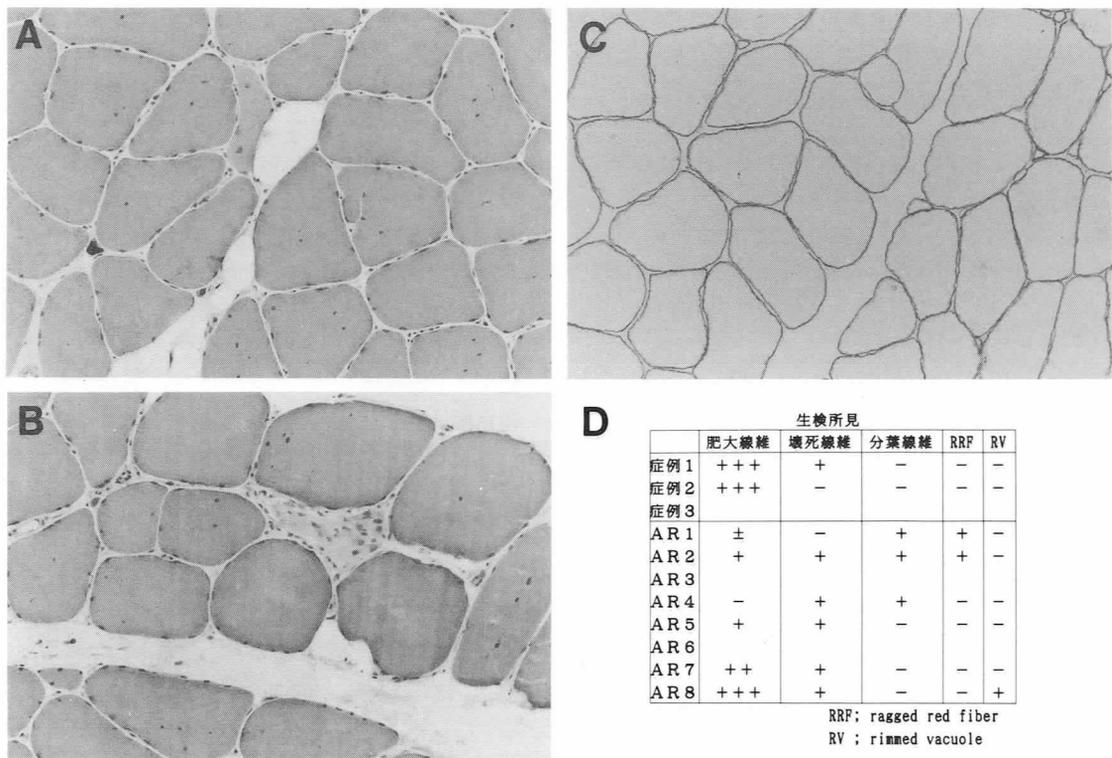


図3 A：症例1の左前脛骨筋のHE染色標本．筋線維の大小不同，中心核，fiber splittingを認める．B：症例1の左前脛骨筋のHE染色標本．壊死線維を認める．C：症例1の左前脛骨筋のDys3抗体でのジストロフィン染色．正常パターン染色を示す．×40 A, B, C. D：筋生検所見のまとめ．

表1 臨床像の比較

	性	発症年齢	罹病期間	ADL制限	CK値	上肢筋力低下	下肢筋力低下
症例1	F	25	20	+	165	±	++
症例2	F	30	19	-	119	-	±
症例3	M	40	12	-	224	-	±
AR1	M	18	19	+++	1109	+++	+++
AR2	M	22	17	+++	1460	++	+++
AR3	F	29	4	+	2600	-	±
AR4	M	19	15	+	1890	+++	+++
AR5	M	30	28	++	1270	++	+++
AR6	M	30	22	+	2172	++	+
AR7	M	16	10	+	291	++	+++
AR8	M	24	5	+	812	+	-

端者の入院を機に要請に応じ、当科外来を受診した。

神経学的には上肢・上肢帯に筋力低下を認めず、下肢近位筋MMT4、前脛骨筋MMT3の筋力低下を認めた。前2例同様、爪先立ちは可能で、踵立ちは不能だった。検査所見はCK224IU/mlと正常上限の約1.2倍の上昇のほか正常であった。筋CTでは、症例1・2に比べ大腿の障害は軽度だが、その分布は類似し屈筋・内転筋群に高度で、伸筋群は保たれていた。また、下腿は屈筋群に障害を認めた。

他の患者は、発端者受診時にその父親は既に死亡していたが、生前に動揺性歩行を呈しており、発症が推定された。発端者の長女、症例2の長男、症例3の次女は、いずれも筋力低下の自覚なく、日常生活に支障を認めなかったが、動揺性歩行を呈し、踵立ち不能を確認した(図1)。以上より、両性3世代に渡る発症者の存在から、本家系が常染色体優性肢帯型筋ジストロフィーと診断した。

また、臨床的に肢帯型筋ジストロフィーと診断した自験例のうち、家系内発症を認めるが、2世代以上の発症者を認めない例、4家系8例を常染色体劣性と診断し、比較対象とした。このうち筋生検施行の機会を得た4家系6例は全てジストロフィン染色(DYS1, 2, 3)で正常パターンに染色され、DRPで染色されないことを確認した。

#### 方法・結果

本家系例の臨床的特徴を調べるため症例1, 2, 3を他の自験例と発症年齢、罹病期間、ADL制限の程度、CK値、上肢・下肢の筋力低下の程度を表(表1)にし比較した。

発症年齢は本家系、常染色体劣性(AR)群共に青年期発症で、両者に明らかな差異を認めなかった。しかし、本家系例は罹病期間に比しADL制限が軽く、AR群よりも進行が緩徐であり、かつCK値は正常ないし軽度上昇に止まっていた。MMTでの障害分布ではAR群で上肢のみに筋力低下を認める1例があり上肢の障害を呈さない例も1例あり、同一家系例でも上肢と下肢での障害程度に一定の傾向を認めない家系例があった。これに対し本家系例では、どの例も上肢の筋力低下は認めない

表2 常染色体優性筋ジストロフィーの報告例

報告者	発症年齢	分布	経過	重症度	CK値	生検	CT検査
Schneiderm	30-40	下肢帯 上肢帯	緩徐	中等度	正常	RV+	
Chutkow	20-60	下肢帯 上肢帯	緩徐	中/高度	軽度上昇	RV+	
Gilchrist	20-30	下肢帯	緩徐	中/高度	上昇	RV+	
Serratrice	10-40	下肢帯 上肢帯	緩徐	中等度	軽度上昇		
Sower	30	下肢帯 上肢帯 下腿前部	緩徐	中等度	軽度上昇		
Marconi	20-50	下肢帯 上肢帯	緩徐	中/高度	軽度上昇	RV+	施行
本家系	20-40	下肢帯 下腿前部	緩徐	軽/中度	正常/軽度上昇		施行

Marconi: Acta Neurol Scand, 1991より改変

か、または極く軽度であり、下肢にはほぼ限局する分布を呈した。

下肢筋の障害パターンを比較するために、筋萎縮、脂肪変性の程度を筋CTで評価し、本家系例とAR群を比較した。その結果のまとめを図2Dに示した。各症例の障害筋分布を大腿では伸筋、屈筋、内転筋の3筋群、下腿では屈筋、伸筋の2筋群に分けて示した。

大腿での障害は、本家系例およびAR群共に、内転筋群・屈筋群が高度に障害され、伸筋群は比較的保たれていた。下腿ではAR群で屈筋群の障害に比べ伸筋群の障害が高度であった。これとは逆に、本家系例では伸筋群に比べ屈筋群の障害が強いという、特徴的な所見を示した。

筋病理組織学的所見のうち肥大線維、壊死線維、分葉線維、ragged red fiber(RRF), rimmed vacuole(RV)についてその出現頻度を半定量的に表(図3D)にまとめ比較した。

本家系例では著明な肥大線維の増加を認めた。壊死線維、分葉線維については本家系例とAR群に明らかな違いを認めなかった。またAR群に散見されるRRF, RVは、本家系例に全く認めなかった。

#### 考察・まとめ

本家系例はAR群に比べ、緩徐進行性、CK値はほぼ正常、筋力低下が下肢にはほぼ限局する特徴を有していた。障害筋分布は大腿ではAR群と同じ分布パターンを呈したが、下腿ではAR群とは逆に屈筋群で高度の障害を呈した。筋病理組織学的にはAR群に比べ著しい肥大線維の増加を認めた。この所見は筋力低下の代償機転を反映し、緩徐な進行様式と関係すると考えられた。

報告例が少ないとされる成人発症の常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー<sup>1)</sup>と比較すると(表2)、緩徐進行性で下肢から発症し、CK値が軽度の上昇に止まる点<sup>2)3)</sup>は

同様の特徴と考えられる。しかし、早期から下腿屈筋の障害を呈し、筋病理所見でRVを認めない例はSommerらの報告例<sup>13)</sup>のみであり、本家系例は常染色体優性肢帯型筋ジストロフィーの中でも特異なタイプと考えられた。

#### 文 献

- 1) Jerusalem F and Sieb JP : The limb girdle syndromes. "In Handbook of Clinical Neurology" (ed by Rowland LP & DiMauro S) Myopathies, Elsevier, Amsterdam, 1992, Vol 62, p 179.
- 2) Schneiderman LJ, Sampson WI, et al : Genetic studies of a family with two unusual autosomal dominant conditions : Muscular dystrophy and Pelger-Huet anomaly. Am J Med 46 : 380, 1969.
- 3) Chutkow JG, Heffner RR, et al : Adult-onset autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. Ann Neurol 20 : 240, 1986.
- 4) Gilchrist JM, Pericak-Vance M, et al : Clinical and genetic investigation in autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. Neurology 38 : 5, 1988.
- 5) Marconi G, Pizzi A, et al : Limb girdle muscular dystrophy with autosomal dominant inheritance. Acta Neurol Scand 83 : 234, 1991.

### 3) 筋緊張性ジストロフィーの糖鎖変化 (Ⅲ)

杉村 公也\*

研究協力者 伊藤 慶太\*\* 青木 真一郎\*\* 高野 明美\*\*  
河合 邦幸\*\* 本田 仁\*\* 高橋 禮子\*\*\*

#### はじめに

筋緊張性ジストロフィー (以下MyD) は, 近年, 原因遺伝子が myotonic kinase, 及びその後続く CTG repeat の延長による不安定領域である<sup>1)</sup>と判明し, かつ anticipation 及び重症度もこの triplet codon の異常な延長で説明しうる<sup>2)</sup>といわれている. しかし, MyD の個々の多彩な病変がどのようにして形成されるかに関しては, 近年の molecular biology の進歩にも関わらず, ほとんど解明されていないといっても過言ではない.

昨年度までに私達は, MyD 患者血清 immunoglobulin G (以下IgG) において galactose 含量の低下が認められる<sup>3)</sup>こと, かつ従来慢性炎症性疾患において報告されてきたIgG の galactose 含量の低下の様式とは異なった性格を持っている<sup>4)</sup>ことを報告した. 今年度, 私達は, 他の血清糖蛋白質糖鎖部分に変化が起きている可能性を調べる目的で, 血清そのものより asparagine 結合糖鎖を切り出して解析した.

#### 方 法

血清中の asparagine 結合糖鎖は血清100ulを100℃, 3分間処理し, 熱変性させた後, pH 8.2 overnight で trypsin, chymotrypsin により蛋白質を分解し糖ペプチドを得た. 得られた糖ペプチドを glycoamidase A にて処理をし, asparagine 結合糖鎖を遊離した. 遊離した asparagine 結合糖鎖をBio Gel-P4にて粗精製した後, 2-aminopyridine にて標識し, ODS-silicaカラム, Amide-80カラム, DEAEカラムを用い, 高速液体 chromatography にて分析した. 構造が推定されたものはexoglycosidase method (sialidase,  $\beta$ -galactosidase, hexosaminidase) を用い, 2次元map上で確認した.

#### 結 果

健康人血清より得られた asparagine 結合糖鎖は, ODS-silicaカラム (Nakanopak) 上でbutanolの gradient を用いた高速液体 chromatography により, mannose

type, complex typeに大別することができた (図1). Mannose typeは, この条件下では elution time の早い段階で分離されてくるが, 血清中の asparagine 結合糖鎖の約15%を占めることが明らかになった (図1). それに対して elution time の遅い時間に detect される complex typeが約85%を占めていた. complex typeの中では2個のシアル酸を持ち, fucoseを持たない2本鎖構造が圧倒的に多く, complex typeの約65%を占め, その次に, シアル酸を持たない2本鎖構造や fucose を持った2本鎖構造などが血清中の asparagine 結合糖鎖の大きな割合を占めていた. complex typeの中で3本鎖, 4本鎖構造を取るものは, 総和として negligible levelにとどまった. asialo-form で存在するものは, mannose typeを含め約45%に達していた. complex typeを charged oligosaccharide と neutral oligosaccharide に分けると, charged oligosaccharide では, fucose を持たない2本鎖構造が圧倒的に大きな割合を占め, fucose を持った2本鎖構造, bisecting N-acetylglucosamine を持った2本鎖の順で

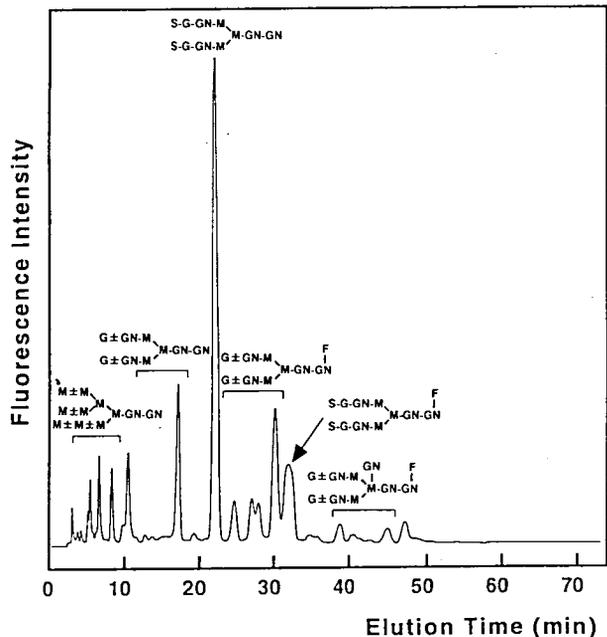


図1 HPLC profiles of pyridylamino-derivatives of oligosaccharides of serum from healthy controls

\*名古屋大学医療技術短期大学  
\*\*名古屋大学医学部神経内科  
\*\*\*中野酢店高橋糖鎖研

あった。neutral oligosaccharideは、charged oligosaccharideとは異なり、fucoseを持った2本鎖が最も多く、次にfucoseを持たない2本鎖、bisecting N-acetylglucosamineを持った2本鎖の順であった。

健常人とMyD群とで血清全体における asparagine 結合糖鎖を比較すると、mannose typeと complex typeの割合や、complex type中における neutral oligosaccharideと charged oligosaccharideの割合、fucoseを持たない2本鎖、fucoseを持つ2本鎖、bisecting N-acetylglucosamineを持つ2本鎖の割合、そのいずれにも統計学的有意差は認められなかった(図2, 3)。一方、charged oligosaccharideに関し、fucoseを持たない2本鎖の割合が5%水準において有意にMyDにおいて増加していたが、他のものの割合に統計学的差異は認めなかった(図2, 3)。

galactoseを2個とも持つ2本鎖構造の割合に関しては、fucoseを持たない2本鎖、fucoseを持つ2本鎖、bisecting GNを持つ2本鎖共に、MyD患者群と健常人との間に統計学的有意差は認められなかった(図2, 4)。

### 考 察

MyD患者血清IgGで認められる hypogalactosylation (健常人の約50%)が、今回の検討で血清全体の糖蛋白質 asparagine 結合糖鎖において認められなかったことに関していくつかの可能性が考えられる。まず、血清糖蛋白質糖鎖のうち2本鎖構造が約65%を占めていたが、そのうちのほとんどが2個とも galactoseを持つ、いわば中性糖合成系の完了した状態のものであった。逆に言えば、血清中の糖蛋白質の中で、IgGは中性糖糖鎖合成系が完了しないままに血清中に放出されるものが多いとい

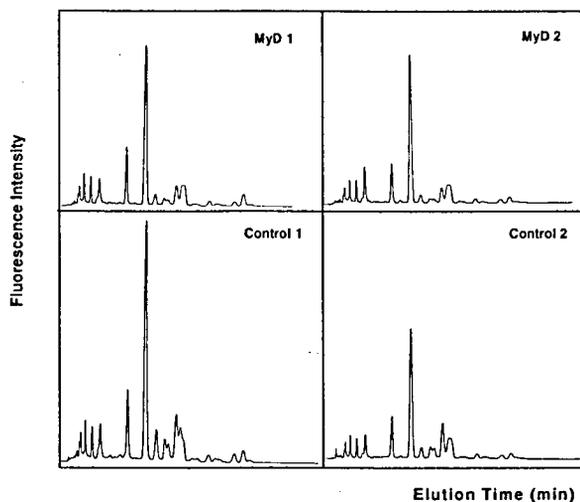


図2 Comparison of HPLC profiles of pyridylamino-derivatives of oligosaccharides of serum between from the patients with MyD and controls

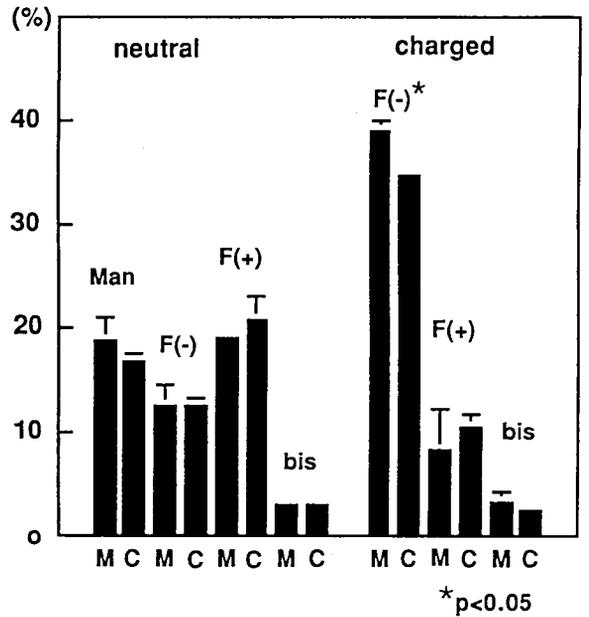


図3 Comparison of the N-linked oligosaccharides of serum between from the patients with MyD and controls. Man means mannose-type oligosaccharides, F(-) means complex type oligosaccharides with no fucose and with no  $\beta$  1-4 GlcNAc, F(+) means complex type oligosaccharides with fucose and with no  $\beta$  1-4 GlcNAc, and bis means complex type oligosaccharides with fucose and with  $\beta$  1-4 GlcNAc.

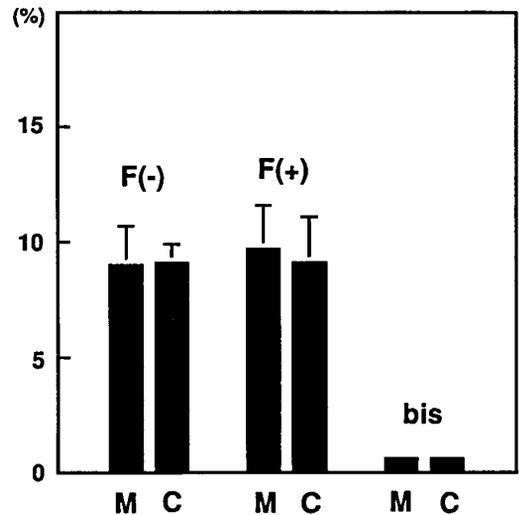


図4 Comparison of the digalactosyl oligosaccharides of serum between from the patients with MyD and controls. F(-) means complex type oligosaccharides with no fucose and with no  $\beta$  1-4 GlcNAc, F(+) means complex type oligosaccharides with fucose and with no  $\beta$  1-4 GlcNAc, and bis means complex type oligosaccharides with fucose and with  $\beta$  1-4 GlcNAc.

う点で稀有な糖蛋白質である可能性が高い。健康人血清IgGで糖鎖の特徴が他の多くの血清糖蛋白質と異なる理由として、IgGが形質細胞で作られるのに対し、他の多くの血清糖蛋白質が肝臓で作られるという差が影響している可能性や、IgGで糖鎖のつく部位であるFc部位が高次構造上、糖転移酵素の作用を受けにくいいため、他の血清糖蛋白質に比し galactose が入りにくく<sup>9)</sup>、結果として、中性糖合成系が完了する前に血清中に放出されてしまう可能性等が考えられる。そして、MyDにおけるIgGの hypogalactosylation は上記のような、IgG 生合成過程の特異性が関与していると考えられる。

今後、MyDにおいて糖鎖変化がどんな糖蛋白質に生じているか、そして病態にどのように関わっているかを検討するために、molecular biologyの手法を用いて、myotonin kinaseと糖転移酵素のmRNA量の変化、活性の変化等を検討する必要がある。

### 結 語

- 1) 血清全体におけるアスパラギン結合糖鎖は manose typeが約15%、complex typeが約85%であった。complex typeのうち2本鎖構造を取り、かつシアル酸を持つものが約60%を占めていた。
- 2) 健康人と比較して、筋緊張性ジストロフィー患者では、disialyl digalactosyl oligosaccharideの割合の増加を認めたが ( $p < 0.05$ )、charged oligosaccharideと neutral oligosaccharideの割合や、fucoseの有無、

bisecting N-acetylglucosamineの有無等、他の oligosaccharideに、明らかな差異は認めなかった。

3) galactose含有糖鎖の割合も、血清全体として明らかな差異は認められず、IgGに認められる変化は、多くの血清中の糖蛋白質には存在しないことが示唆された。

### 文 献

- 1) Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, et al: Cell 68: 799-808, 1992.
- 2) Buxton J, Shelbourne P, Davies J, Jones C, Van TT, Aslanidis C, de JP, Jansen G, Anvret M, Riley B, et al: Nature 355: 547-548, 1992.
- 3) Ito K, Takahashi N, Hirayama M, Honda H and Takahashi A: J Clin Biochem Nutri 14: 60-69, 1993.
- 4) 杉村公也, 伊藤慶太, 本田 仁, 高橋 昭, 高橋禮子: “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4年度研究報告書, 1993, pp80-83.
- 5) Fujii S, Nishiura T, Nishikawa A, Miura R, Taniguchi N: J Biol Chem 265(11): 6009-6018, 1990.

## 4) Marinesco-Sjögren症候群の筋病理所見

福原信義\*

研究協力者 松原奈絵\* 坂尻顕一\* 中島孝\*

Marinesco-Sjögren症候群は、先天性白内障、小脳性失調、精神発達遅滞を主症状とする常染色体劣性遺伝疾患だが、骨格異常や、二次性徴発育不全なども伴い、障害が多臓器に及ぶことが知られている。本症に筋病変を伴うことは、比較的近年になって注目され、本症の主症状として捉えられてきているが、その筋病理所見については必ずしも解釈が一致していない。

今回我々は、5例のMarinesco-Sjögren症候群の生検筋に、組織化学的、電顕的観察を加え、その病態解析を試みたので報告する。

### 症 例

症例：Y. O. 42歳，男性。

家族歴：両親いとこ婚，同胞4人中，兄（症例2），妹が同病。

現病歴：生下時正常分娩で精神運動発達遅滞があり，1歳で先天性白内障と診断され，2歳で手術。小学校入学後に歩行可能となったが運動失調性であった。29歳で福祉施設へ入所した際には，杖歩行可能であったが，転倒による左大腿骨の骨折後は車椅子生活となっている。その後も筋力は徐々に低下し，42歳で入院時には車椅子駆動が何とか可能であった。

現症：ろうと胸，脊柱側弯を認める。知能は，鈴木ビネー式で67，内斜視，水平性眼振，断綴性言語，両側感音性難聴があり，四肢に著明な筋萎縮，筋力低下を認め，腱反射は低下，上肢に協調運動障害が見られた。頭部CTで小脳，特に虫部に強い萎縮が見られた。骨格筋CTでは，大腿では伸筋群に，下腿では屈筋群に強い筋萎縮が認められた。

症例：Z. O. 45歳，男性。

家族歴：症例1の兄。

現病歴：生下時よりfloppyで，3歳で白内障の手術。小学校入学後，松葉杖歩行可能となったが，自力歩行は不能。31歳で福祉施設入所後より，車椅子生活となる。

現症：ろうと胸を認める。知能は，WAIS-RにてVIQ 64，PIQ scale out.内斜視，水平性眼振，断綴性言語あり，四肢の筋萎縮，筋力低下著明，腱反射低下，上肢に

協調運動障害を認める。

頭部CTにて小脳虫部に強い萎縮，骨格筋CTにて症例1と同様のパターンを認めた。

症例3：S. I. 30歳 男性。

家族歴：血族結婚なし。

現病歴：3歳で白内障の手術，4歳時松葉杖にて歩行可能となった。18歳で施設へ入所。29歳より車椅子使用。

現症：ろうと胸を認める。知能はWAIS-Rにて，VIQ 62，PIQ scale out.顔面にチック，四肢に中程度の筋萎縮，筋力低下，腱反射低下，上肢に企図振戦を認める。

頭部CTにて，小脳虫部に強い萎縮，骨格筋CTにて症例1と同様のパターンを認めた。

症例4：Y. Y. 33歳 女性。

家族歴：両親いとこ婚。兄が同病。

現病歴：生下時よりfloppyで，4歳で白内障手術，6歳でつかまり立ち可能，20歳で施設入所時松葉杖歩行（失調性），33歳車椅子使用。

現症：低身長，鳩胸，脊柱側弯あり。知能は田中ビネー式で精神年齢5歳2ヶ月，内斜視，水平性眼振，構音障害，四肢の筋萎縮，筋力低下を認め，腱反射は低下，病的反射陽性，両上肢に協調運動障害，また体幹失調を認めた。

頭部CTにて，小脳虫部に強い萎縮，骨格筋CTでは症例1と同様のパターンを認めた。

症例5：T. Y. 12歳 男性。

家族歴：血族結婚あるが，詳細不明。

現病歴：生下時吸引分娩，5ヶ月で先天性白内障と診断され，11ヶ月で手術。13ヶ月より一人歩き可能となり，3～4歳から失調性歩行。

現症：潜在性二分脊椎，右胸心，内反尖足あり，知能は，WISCにて，IQ 45.水平性眼振，上肢遠位部の筋力低下，下肢に協調運動障害。

頭部CTにて，小脳萎縮の所見。

これらの症例の1～3は前脛骨筋より，4は大腿四頭筋，5は下腿三頭筋より生検を施行し，組織化学的，電顕的検討を加えた。

\*国立療養所犀潟病院神経内科

## 結 果

症例1, 2においては, ほぼ同様の所見を呈していた. HE, Gomori-trichrome 染色では著明な筋線維の大小不同, round atrophyを示し, 間質の線維化, 脂肪変性が強く, 明らかな壊死, 再生の所見は見られなかった. 残存する筋線維には, 多数の rimmed vacuole (RV)が, また1%程の筋線維に ragged-red fiber (RRF)が認められた (図1). Acid-Pase 染色では, RVに一致して活性の上昇が認められ, NADH-TR 染色では, RRFに一致して筋線維周辺が濃染, また, 虫喰い線維が見られた. cytochrome c oxidase 染色では, RRFで活性が欠損し, RRF以外にも活性欠損線維が散在性に認められた. ATPase 染色では, 症例1でtype 1優位及びtype 2B欠損 (Type 1 72%, 2A 26%, 2B 0%, 2C 2%)がみられたが, 症例2では認めなかった (Type 1 50%, 2A 39%, 2B 11%).

症例3では, 同様に筋線維の大小不同, 間質の線維化, 脂肪変性, 中心核の増加, 多数のRVの出現が見られたが, RRFは見られず, 少数だが壊死, 再生線維が認められた.

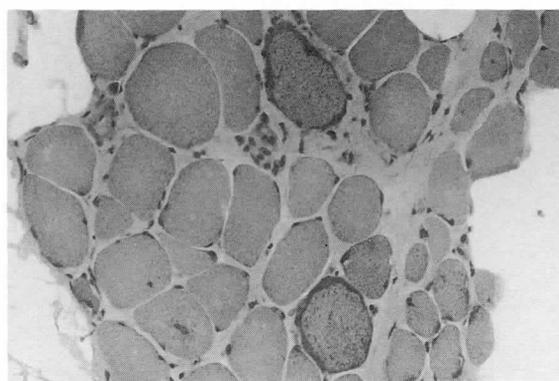


図1 著明な筋線維の大小不同, 間質の線維化, 脂肪変性, rimmed vacuole, ragged red fiberの出現がみられる (HE染色×110)



図2 グリコーゲン顆粒, ミエリン像, 膜様構造物よりなる多数の自己貪食胞がみられる (×4,400)

表1 Light microscopic findings in biopsied muscles

Patient number	1	2	3	4	5
Biopsied muscles	TA	TA	TA	QF	Ga
Change in fiber size					
variation in fiber size	++	++	++	+	+
fiber atrophy	all	all	all		all
fiber hypertrophy	-	-	-		-
Change in fiber distribution					
fiber type predominance	1	-	-		-
fiber type deficiency	2B	-	-		-
Nuclei					
internal nuclei	-	-	+		-
Degeneration					
necrosis with phagocytosis	-	-	+	-	-
fatty degeneration	++	++	++	++	-
Regeneration					
regenerating fibers	-	-	+	-	-
Changes in architecture					
moth-eaten fibers	+	+	+		-
rimmed vacuoles	++	++	++	+	-
ragged-red fibers	+(1%)	+(1%)	-	-	-

TA=Tibialis anterior, QF=Quadriceps femoris, Ga=Gastrocnemius

症例4では, 脂肪変性が著明で十分な検索が困難であったが, 筋線維が島状に残存し, 大小不同, RVを認めた.

症例5では, ごく軽度の大小不同が見られ, 全体的に筋線維径が小さい以外, 明らかな壊死, 再生の所見は認めず, RVの出現も見られなかった.

以上の光顕所見を, 表1にまとめて示した. 変化に乏しい症例5を除いて, 筋線維の大小不同, 脂肪変性といった慢性筋原性変化のほか, RVの出現が特徴的で, ほぼ同様の所見が認められた.

次に, RRFの認められた症例1, 2に対し電顕観察を行った. 最も目立った所見は, 多数のmyelin figureを有した自己貪食胞で, 形成初期段階のものから, 多数の, debrisを有しglycogen顆粒の蓄積した完成されたものまで種々の段階のものがみられた (図2).

同一筋線維のRVに近接する部位に, 結晶様封入体を有する異常ミトコンドリアの集積が見られ (図3), 結晶構造を有した変性ミトコンドリアが自己貪食胞に取り込まれる所見も認められた (図4).



図3 結晶様構造物を有する巨大ミトコンドリアの集積 (×11,300)

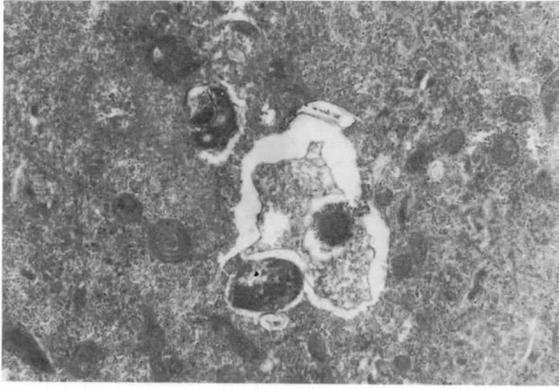


図4 結晶様構造物を持つ変性ミトコンドリアを貪食している (×16,000)

### 考 察

Marinesco-Sjögren症候群 (MSS) の筋病変に関しては、比較的近年になって注目され、本症の進行性の筋力低下の原因と見なされてきている。当初は神経原性変化とするものが多く、剖検で脊髄前角細胞の変性を認めたとする例<sup>1)</sup>、筋生検で群集萎縮のあった例<sup>2)</sup>、神経伝導速度の遅延例<sup>3)</sup>などが報告されていたが、近年の報告では筋原性とされており、その病理所見は、筋線維の大小不同、壊死再生所見、間質の線維化、脂肪変性のほか、多数のRVや、散発的なRRFの出現で、慢性に経過する筋原性変化が主体であり、今回我々の症例で認めた所見とほぼ同様であった。Komiyaら<sup>4)</sup>、Tachi<sup>5)</sup>は、若年例では壊死、再生所見が目立つことより先天性筋ジストロフィー様所見と見なしており、Gotoら<sup>6)</sup>はそれに加え、若年例で光顕的にはRVを認めなくても、電顕的にはすでに自己貪食胞が形成されていることにより、本症の筋病変にRVが重要な役割を果たしているだろうと推察している。自己貪食胞の出現に注目し本症を lysosomal storage disease とみなした報告に、Walkerら<sup>7)</sup>の報告がある。彼らは培養線維芽細胞内にも myelin figure が出現したことより想定しているが、欠損酵素は同定されていない。また、RRFに着目しミトコンドリアミオパチーとする報告がTorbergsenら<sup>8)</sup>よりあり、Marksらも同様の所見を報告しているが<sup>9)</sup>非特異的所見としている。いままですら本症の筋病変に於けるRVとRRFの関係について

注目した報告はなく、今回我々の症例では、異常結晶構造を有したミトコンドリアの集積と自己貪食胞が同一筋線維上に見られ、またその異常ミトコンドリアが vacuole に取り込まれていく過程を捉えることができた。この所見は rimmed vacuole の成立機序を考える上でも重要と思われる。MSSは、その病変の多彩さより、何らかの代謝性疾患を疑わせる症候群と思われるが、ライソゾーム異常症、ミトコンドリア異常症についてまた検討を加えていくことが必要と思われる。

### 文 献

- 1) Skre H, et al: Linkage studies on Marinesco-Sjögren syndrome and hyper-gonadotropic hypogonadism. Clin Genet 11: 57, 1977.
- 2) 吉本 裕: Rebound nystagmus を認めた Marinesco-Sjögren 症候群 (脊髄小脳変性症のまれな一例). 耳鼻咽喉科 50: 1037, 1978.
- 3) 山永裕明ら: 末梢神経障害を呈した Marinesco-Sjögren 症候群の 1 家系 3 例. 臨床神経 20: 326, 1980.
- 4) Komiya A, et al: Muscle pathology in Marinesco-Sjögren syndrome. J Neurol Sci 89: 103, 1989.
- 5) Tachi N, et al: Congenital muscular dystrophy in Marinesco-Sjögren syndrome. Pediatr Neurol 7: 296, 1991.
- 6) Goto Y, et al: Myopathy in Marinesco-Sjögren syndrome: An ultrastructural study. Acta Neuropathol 80: 123, 1990.
- 7) Walker PD, et al: Marinesco-Sjögren syndrome: Evidence for a lysosomal storage disorder. Neurology 35: 415, 1985.
- 8) Torbergsen T, et al: Mitochondrial myopathy in Marinesco-Sjögren syndrome. J Ment Defic Res 35: 154, 1991.
- 9) Marks HG, et al: Muscle mitochondrial abnormalities in the Marinesco-Sjögren syndrome. Ann Neurol 8: 122, 1980.

## 5) 病的筋の細胞膜における免疫組織化学的検討

佐 橋 功\*

研究協力者 衣 斐  
周 防

達\* 中 尾 直 樹\*  
拡\* 荒 畑 喜 一\*\*

### はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー (DMD), Becker型筋ジストロフィー (BMD) を中心としたミオパチーにおいて筋細胞膜の異常がその病態と密接に関連している。

本研究は筋細胞膜の各種構成蛋白に対する単クローン抗体を用い, 種々の神経筋疾患生検筋の凍結連続切片における免疫組織化学染色を実施しその臨床的意義を検討した。

### 対象および方法

対象は神経筋疾患生検242筋を用いた。その主な疾患はDMD 4, DMD保因者 4, BMD 12, 肢帯型筋ジストロフィー 9, 筋緊張性ジストロフィー 13, 多発性筋炎 37, 慢性進行性外眼筋麻痺 7, 筋萎縮性側索硬化症 13, Charcot-Marie-Tooth病 6, 球脊髄性筋萎縮症 4, 脊髄小脳変性症6などであった。

方法は新鮮凍結連続切片にて免疫組織化学をABC法により行なった。一次抗体として筋細胞膜の構成蛋白を認識する単クローン抗体を用いた。すなわち筋形質膜構成成分としてはジストロフィン(N末端よりA1C (Dia Yatron), Dys3 (Novocastra), 2-5E2 (富士レビオ), Dys1 (Novocastra), 4-4C5 (富士レビオ), Dys2 (Novocastra)を用い, さらにスペクトリン(Novocastra), ユートロフィン (Novocastra)を用いた。基底膜構成成分としてラミニンに対してはA, M, B1, B2の各サブユニットに対する抗体 (Chemicon) を使用し, その他ミオシン重鎖の fast twitch, slow twitch, neonatal, developmentalの各アイソフォームの抗体 (Novocastra) を用いた。

### 結 果

1. ジストロフィン: ほぼ全抗体で既報告<sup>1)</sup>と同様にDMDではいわゆるごく僅かに出現するジストロフィン陽性線維である revertants を除き筋細胞膜は陰性, DMD保因者では陽性・陰性線維のモザイクパターン, BMDでは染色性の低下を示した。しかしN末端側を認

識するA1C抗体ではDMD筋の細胞膜, DMD保因者の筋細胞膜においても弱く染色されていた。

DMD例における revertants の各単クローン抗体の反応性は同一症例においても線維毎によりその染色性に相違が見られた。すなわち rod domain 中央部では染色されず, N端およびC端抗体で染色される傾向にあり, ジストロフィン遺伝子解析での欠失部位に対応しない部分を認識する抗体に対し反応しない revertants が見られた (図1, 表1)。

BMDでは欠失部位に相当する抗体では染色されず, また multiplex PCR法にて欠失が確認されなかった兄弟例においてC末端抗体に反応がなかった。

なお主に神経原性疾患にみられる target fiber の target 部はC末端を認識する Dys2, 4C5 で陽性所見を示した。

2. スペクトリン: すべての対照筋, 疾患筋の筋細胞膜は染色され, 神経筋接合部や筋腱接合部でより濃染した。target fiber の target 部がジストロフィンC端部抗体と同様に染色される線維も見られた。

3. ユートロフィン: 対照筋では筋細胞膜は陰性であったが, 神経筋接合部, 衛星細胞と考えられる部分で陽

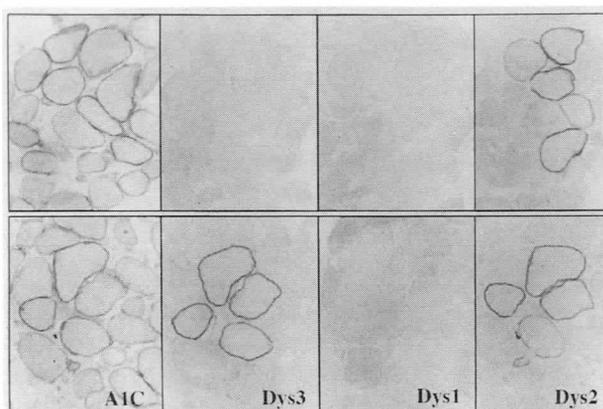


図1 DMD revertantsの連続切片における各抗ジストロフィン単クローン抗体による染色態度  
同一症例においても線維毎に各抗体の染色パターンが異なり, rod domain中央部を認識する抗体に対する反応が消失している線維が多い。

\*愛知医科大学第四内科

\*\*国立精神・神経センター神経研究所

表1 DMD revertants連続切片における各抗ジストロフィン単クローン抗体による染色態度  
60kdはrod domainを認識する多クローン抗体。  
%の列はその revertantsが全線維に占める比率。  
N. D.: not detected.

欠失Exon	A1C	Dys3	5E2	60kd	Dys1	4C5	Dys2	%
DMD1 45	++	++	++	++	++	++	++	0.19
	++	++	++	++	-	++	++	0.06
	+	-	-	-	-	-	+	0.13
DMD2 49-52	+	-	-	-	-	-	+	0.44
DMD3 N.D.	++	++	++	++	-	++	++	0.05
	+	-	-	-	-	-	+	0.05
DMD4 N.D.	++	++	++	++	-	++	++	0.54
	+	-	-	-	-	-	+	0.18

表2 各疾患筋における各ラミニンサブユニットなどによる染色態度  
Dys: dystrophin, Spec: spectrin, Utro: utrophin

	Dys	Spec	Utro	Laminin			
				A	M	B1	B2
対照筋							
錘外線維	++	++	-	+	++	++	++
錘内線維	++	++	+	+	++	++	++
神経筋接合部	+++	+++	+++	+++	+++	?	+++
病的筋							
dystrophinopathy							
DMD	-	++	+	++	++	++	++
BMD	+	++	+/-	++/+	++	++	++
その他の疾患							
再生筋	++	++	+/-	++	++	++	++
筋内血管							
毛細血管	-	-	+	++	-	++	++
中小血管	-	-	+	++	±	+	++
筋内神経							
perineurium	-	-	+	++	-	+	++
endoneurium	-	-	±	±	++	++	+
筋紡錘被膜	-	-	+	++	-	+	++

性, 筋紡錘の錘内線維および被膜, 筋内神経, 毛細血管, 筋内血管で陽性であった。

一方DMDでは大部分の筋線維が陽性であり, DMD保因者ではジストロフィン陰性線維を中心に陽性, BMDでは再生線維に陽性であり, 一部のBMDでは非再生線維にも陽性所見をみた。また多発性筋炎などの他の筋疾患においても再生線維で陽性のものがあつた。しかしそれら線維を連続切片でミオシン重鎖 neonatal form 陽性線維と比較すると, ジストロフィンパッチ筋でユートロフィンの陽性線維との一致率は高く, 他の筋疾患では低かつた(図2)。

4. ラミニン: 筋細胞基底膜はラミニンAで薄く染まり, 他は濃染した。神経筋接合部ではラミニンA, M, B2で強く染色されたが, B1は明らかではなかつた。

筋紡錘は錘内線維は錘外線維と同様の染色態度を示し, 被膜がラミニンA, B2で陽性, 筋内神経は神経周膜囲がA, B1, B2で陽性, endoneuriumがB1, B

2, Mで陽性, Aで弱陽性であつた。筋内血管は中小血管ではA, B2で陽性, B1およびMで内膜の一部のみ弱陽性, 毛細血管はM以外陽性であつた(表2)。

病的筋においてはラミニンAの染色性に相違がみられたが, 他の抗ラミニン抗体では疾患による差異は見られなかつた。すなわちラミニンAではDMD筋, DMD保者筋, BMD再生筋ではその染色性が増強していた。また他の疾患の再生筋においてもその染色性が増強していた。連続切片においてミオシン重鎖 neonatal form による染色と比較した再生筋での強陽性を示す線維の一致率はラミニンAで高く, ユートロフィンでは低かつた(図2, 表2)。

また筋緊張性ジストロフィーの萎縮したtype 1線維,

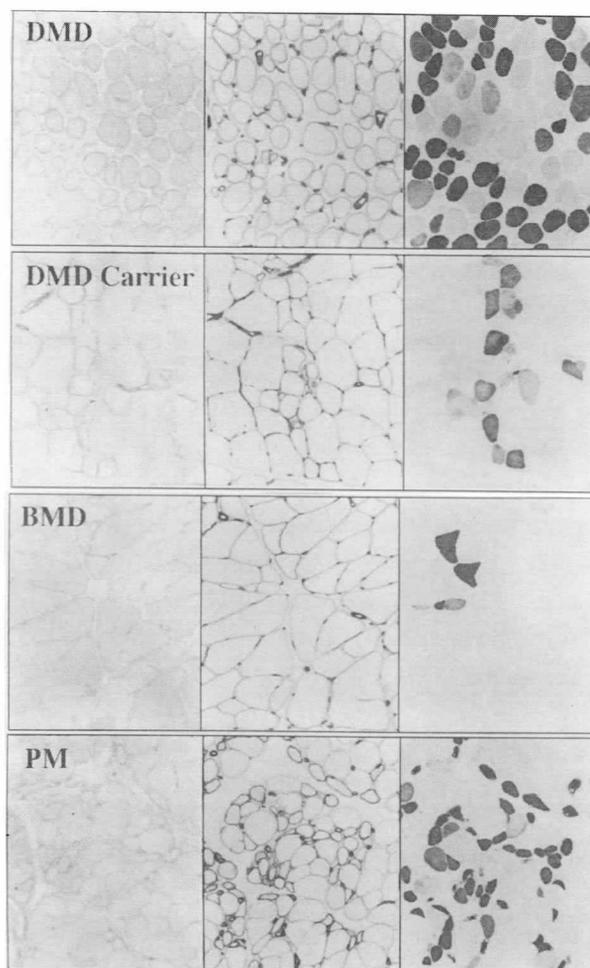


図2 DMD, DMD保因者, BMD, 多発性筋炎(上段から)における連続切片でのユートロフィン, ラミニンA, ミオシン重鎖 neonatal form (左列から)染色。DMDを除きミオシン重鎖 neonatal form 陽性の再生筋ではラミニンA強陽性である。ユートロフィン陽性線維はジストロフィンパッチにおいて再生筋でその陽性率が高い。またラミニンAでは毛細血管が鮮明に染色され病的筋での観察に有用である。

神経原性疾患では群集萎縮線維で若干染色性が増加していた。

ミトコンドリアミオパチーではragged-red fiber辺縁に存在する毛細血管の増加がよく観察でき、fiber splitting内に陥入した毛細血管が認められ、多発性筋炎では毛細血管の拡張像がよく観察できた。

### 考 察

本研究では骨格筋の筋膜（形質膜，基底膜）を構成する蛋白4種，計12単クローン抗体に一部筋原性線維構成蛋白を加えた免疫細胞染色を各種神経・筋疾患につき検討した。

その結果抗ジストロフィン抗体の染色は大略既報告と同様の結果を確認したが，A1C抗体ではDMD筋が薄く染色された。これはN端側においてジストロフィンが部分的に発現している可能性あるいは，ユートロフィンなどのジストロフィン類似蛋白との交差反応を示している可能性が示唆された。

つぎにrevertantsにおける各抗体の反応性の相違，とくにrod domain中央部での抗体の反応が多くは陰性であり，N端およびC端部抗体でよく反応を見たことは線維別に新たに欠失などの変異が加わり，frame shiftからin frameになったことが推察された。

一方自験BMD例においてC末端部抗体に反応しない症例があった。これは既報告ではC末端部欠損例でありDMDとなるが<sup>2)</sup>，本症例のBMDとして良性的臨床所見を得たことは，ジストロフィンの欠損部位がdystrophin associated glycoprotein(DAG)結合部位よりC末端側で欠損した可能性が考えられた。

なおtarget fiberのtarget部にジストロフィンC末端部抗体への反応が見られたことは同部位にジストロフィンC末端部と類似の構造を持つ蛋白の存在が示唆された。

つぎにユートロフィンについて，ジストロフィノパチー筋でユートロフィンが発現しやすいのはジストロ

フィンの脆弱性あるいは欠損と深く関連しているものと考えられた。また他疾患での再生筋線維におけるユートロフィンの発現は筋の発生過程と同様の機序によるものと推察された。

ラミニンについてはラミニンAにおいて再生筋線維が濃染されたことは，再生筋のひとつのマーカーとして有用であり，また病的筋における毛細血管の観察にも有用であった。

### ま と め

ジストロフィノパチーを含む，多数の神経・筋疾患生検筋において筋細胞膜構成蛋白に対する単クローン抗体を用い免疫染色を行ない，その結果を比較検討した。

ジストロフィンではDMD revertantsは同一症例においても各筋線維毎に各抗体に対する染色態度が異なり，rod domain中央部を認識する抗体で染色されない傾向にあった。N末端側のA1C抗体はDMDでも弱く染色された。Target部はC末端部およびスペクトリンで染色された。ユートロフィンではジストロフィノパチー以外の疾患でも低頻度ながら再生筋細胞膜に陽性であった。ラミニン染色ではラミニンAにおいて再生筋線維基底膜で濃染し，また毛細血管の検索に有用であった。

以上筋細胞膜構成蛋白の各抗体における免疫染色は病的骨格筋の臨床・病理診断および病態の解析に重要な手段と考えた。

### 文 献

- 1) Arahata K, Hoffman EP, et al: Dystrophin diagnosis: Comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analyses. Proc Natl Acad Sci 86: 7154, 1989.
- 2) 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.

## 6) Danon disease (lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase) の膜異常について

後藤 雄 一\*\*

研究協力者 村上 信行\*\* 埜中 征哉\*\*

### はじめに

Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase は1981年に Danon<sup>1)</sup>により最初に報告された疾患である。本症の臨床症状は、肥大型心筋症、精神発達遅滞、近位筋の筋力低下および高CK血症であり、遺伝形式は常染色体優性遺伝などの報告がされているが、確定していない。本症の筋病理所見では、筋線維内に多数の小空胞を有し、空胞内に糖の蓄積が認められる。また、電顕的には糖を含む自己貪食胞の集積が認められる。このことから、糖原病Ⅱ型に似た疾患であると考えられたが、酸マルターゼ活性が正常であることから本症の名称が付けられることとなった。その後、本症と同様の症例が報告された<sup>2)~4)</sup>が、その病因は未だ明らかにされていない。今回、我々は組織化学、電顕および免疫組織化学的に検討し、本症の空胞形成について知見を得たので報告する。

### 対象と方法

対象は国立精神・神経センターにて臨床症状、組織化学および生化学的に本症と診断した3例である(表1)。この3例について組織化学、電顕および免疫組織化学的に検討した。免疫染色には、ジストロフィンのC末端の抗体である4-4C5、抗ユートロフィン抗体、膜貫通蛋白である50kDaと43kDaのジストロフィン結合糖蛋白に対する抗体、Chemicon社のラットモノクローナル抗ラミニン抗体および富士薬品のマウスモノクローナル抗ヒトコラーゲン(Ⅳ型)抗体を用いて間接法にて染色した。

### 結 果

HE染色では、筋線維の大小不同に加えて、好塩基性の顆粒を含む小空胞を有する筋線維が散在性に認められた。時に、筋鞘膜の陥入が認められた。PAS染色では小空胞にわずかな糖の蓄積が認められた。非特異エステラーゼ(NSE)およびアセチルコリンエステラーゼ

(AChE)染色では、空胞および筋鞘膜の陥入部に両酵素が高活性であった。

電顕所見では、多くの空胞が単位膜と基底膜により境界されていた。この中に自己貪食胞や細胞質の変性産物が認められた。時に、筋鞘膜の陥入が認められ、この中に単核細胞が認められた。

ジストロフィン、ジストロフィン結合糖蛋白、ラミニンおよびⅣ型コラーゲンについての免疫染色では、空胞および陥入部は陽性所見が認められた。しかし、Ⅳ型コラーゲン陽性空胞は他の免疫染色の陽性空胞に比して頻度の少ないものであった。また、ジストロフィン関連蛋白の免疫染色では極弱い反応が認められた。これらの免疫染色において、よく空胞と筋鞘膜が陥入により連続する像が認められた。

### 考 察

我々の検討した3例は、心筋症、精神発達遅滞、空胞を有するミオパチーを呈し、これまでの報告例と臨床症状、組織化学および生化学的に類似しており、本症に合致するものであると考えられた。本症の組織化学では、HE染色で筋線維内に好塩基性の顆粒を有する小空胞が多数認められる。また、時に筋鞘膜の陥入が認められる

表 1

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Age last examined/sex	16 y/M	26 y/M	19 y/M
Family history	-	+*	-
Cardiomyopathy	hypertrophic	congestive	hypertrophic
Muscle weakness	-	mild	mild
Mental retardation	moderate	moderate	borderline
Serum CK(<185 IU/L)	2004	514	1025
Acid maltase activity in muscle (7.3±2.2 nmols 4MU/mg/30min)	10.8	5.9	5.8
Neutral maltase activity in muscle (18.1±5.1 nmols/min/mg·protein)	18.0	16.7	8.4

\*国立精神・神経センター武蔵病院  
\*\*国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部

M: male \*mother died from congestive cardiomyopathy at 52 years. normal values are shown in the parentheses

(図1 A). 糖原病Ⅱ型と異なり, 小空胞を有する筋線維のPAS陽性物質の蓄積は極少量である(図1 B). また, 酸フォスファターゼ活性の上昇もわずかであった. これに対して, NSE(図1 C)およびAChE染色(図1 D)では本症の空胞および膜陥入部は共に高活性を示し, よくこれらを抽出するものであった. 糖原病Ⅱ型では, 空胞を有する筋線維でNSE活性が高いが, 空胞それ自体は高活性は示さない. すなわち, これは本症の組織化学的特徴である.

電顕所見において本症の空胞の多くは単位膜と基底膜によって境界されており, この中に自己貪食胞および細胞質の変性産物が認められた(図2). これは, 糖原病Ⅱ

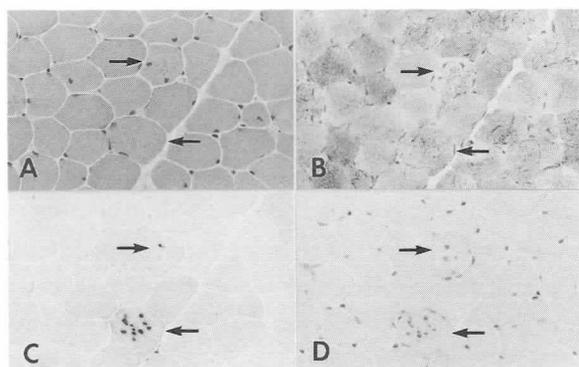


図1 軽度の筋線維の大小不同に加えて, 散在性に塩基好性の顆粒を含んだ小空胞を有する筋線維(矢印)が認められる(A). これらの筋線維にPAS陽性物質のわずかな蓄積がみられる(B). 小空胞は非特異エステラーゼ(NSE)(C)およびアセチルコリンエステラーゼ(AChE)(D)染色でともに高活性を示す. Patient 3 A: H&E染色, B: PAS染色, C: NSE染色, D: AChE染色, A-D(連続切片):  $\times 280$ .

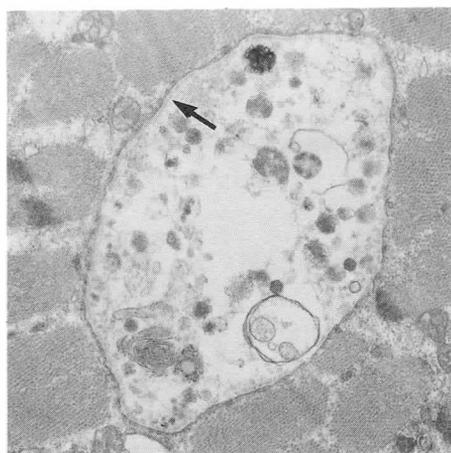


図2 小空胞は単位膜および基底膜(矢印)によって境界され, この中に糖を含む自己貪食胞や細胞質の変性産物がみられる. Patient 3  $\times 4,200$ .

型などに認められる自己貪食胞が集積して形成された空胞とは全く異なるものであった. 本症の空胞膜および陥入膜の特性を検討するために免疫染色を行った. ジストロフィン結合糖蛋白は筋鞘膜の膜貫通蛋白とされている. 本症の空胞膜にジストロフィンおよびジストロフィン結合糖蛋白免疫染色において陽性所見が認められた(図3). すなわち, 本症の空胞膜は筋鞘膜の特徴を有するものである. また, ラミニンおよびⅣ型コラーゲン免疫染色において本症の空胞膜に陽性所見が認められたことから, 本症の空胞膜は基底膜の特徴も有す

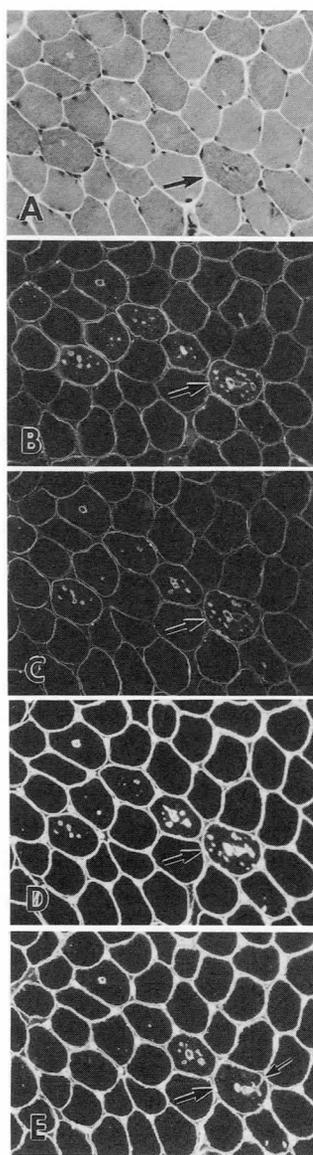


図3 空胞膜はジストロフィン(A), ジストロフィン結合糖蛋白(B), ラミニン(C)およびⅣ型コラーゲン(D)陽性である. また, 小空胞と筋鞘膜の連続がみられる(小矢印). Patient 3 A-D(連続切片) $\times 185$ .

表2 Immunohistochemical and histochemical characteristics of vacuolar membrane and junctional folds in normal neuromuscular and myotendinous junctions

	Danon disease	Infantile and childhood form AMD	Adult form AMD	Neuromuscular junction	Myotendinous junction
Dystrophin	+	-	±	+	+
Utrophin	±	-	-	+	-
DAG	+	-	±	+	+
Laminin	+	-	-	+	+
Type 4 collagen	+	-	-	+	-
AChE	+	-	-	+	+
AChR	-	-	-	+	-

AMD: acid maltase deficiency, DAG: dystrophin-associated glycoproteins  
AChE: acetylcholinesterase, AChR: acetylcholine receptor

るものである。

以上の結果と糖原病Ⅱ型、神経筋接合部および筋腱接合部の所見を表2にまとめた。本症の空胞膜は、糖原病Ⅱ型とは異なり、筋鞘膜および基底膜の特徴を有していた。また、この基底膜はAChEをも含んでいた。このことから、表2に示したように本症の空胞膜は神経筋接合部または筋腱接合部に似るものであると考えられた。また、小空胞と筋鞘膜が陥入により連続する像が認められることから、本症の空胞形成には膜の陥入を引き起こすような膜の異常が関与するものと考えられた。

#### まとめ

- 1) 本症の空胞膜は筋鞘膜および基底膜の特徴を有していた。
- 2) 空胞と細胞膜が筋鞘膜の陥入により連続した。
- 3) 基底膜はAChEを含み、神経筋接合部または筋腱接合部に似た。
- 4) 本症は糖原病Ⅱ型のようなライソソームの異常ではなく、陥入を引き起こすような膜の異常が病因であると考えられた。

#### 文献

- 1) Danon MJ, Oh SJ, et al: Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* 31: 51, 1981.

- 2) Riggs JE, Schochet SS Jr, et al: Lysosomal glycogen storage disease without acid maltase deficiency. *Neurology* 33: 873, 1983.
- 3) Byrne E, Dennett X, et al: Dominantly inherited cardioskeletal myopathy with lysosomal glycogen storage disease and normal acid maltase level. *Brain* 109: 523, 1986.
- 4) Hart ZH, Servidei S, et al: Cardiomyopathy, mental retardation, and autophagic vacuolar myopathy. *Neurology* 37: 1065, 1987.
- 5) Tachi N, Tachi M, et al: Glycogen storage disease with normal acid maltase: Skeletal and cardiac muscles. *Pediatr Neurol* 5: 60, 1989.
- 6) Kashio N, Usuki F, et al: Cardiomyopathy, mental retardation, and autophagic vacuolar myopathy: Abnormal MRI findings in the head. *J Neurol Sci* 105: 1, 1991.
- 7) 伊藤昌弘, 浅野 優, ほか: 酸マルターゼが正常な糖原病 (lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase) の1例. *脳と発達* 25: 459, 1993.
- 8) Muntoni F, Porcu M, et al: Cardiomyopathy, mental retardation and vacuolar myopathy associated with desmin type intermediate filaments. *Can J Neurol Sci* 20 (suppl14): S159, 1993.

# 7) 福山型先天性筋ジストロフィーにおける細胞外マトリックスの免疫組織学的研究

田 邊 等\*

研究協力者 水 野 美 彦\*\*

## はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) における筋病変の発生機転は未だ不明である。昨年の本会議で林ら<sup>1)</sup>はFCMDにおいて細胞外マトリックスであるラミニンの動態について免疫組織学的検索を行い、対照疾患では染色されないラミニンA鎖がFCMD, デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) において染色されること, ラミニンB1, B2がFCMDにおいて著明に染色性が低下していることを報告し, FCMDにおいては基底膜に何らかの障害があることを示唆している。今回, 我々もこの

点について検討を加え, 特に筋変性の進行度との関係を検討したので報告する。

## 対象・方法

FCMD 6例 (Case 1. 1ヶ月男児, Case 2. 6ヶ月女児, Case 3. 1歳男児, Case 4. 1歳女児, Case 5. 1歳男児, Case 6. 1歳男児) よりの生検筋, 心不全にて死亡した21歳のFCMDの剖検例よりの喉頭筋 (L), 横隔膜 (D), 前脛骨筋 (T) を用いた。対象としたのはDMD 4例, その他の神経筋疾患 6例 (中枢神経疾患

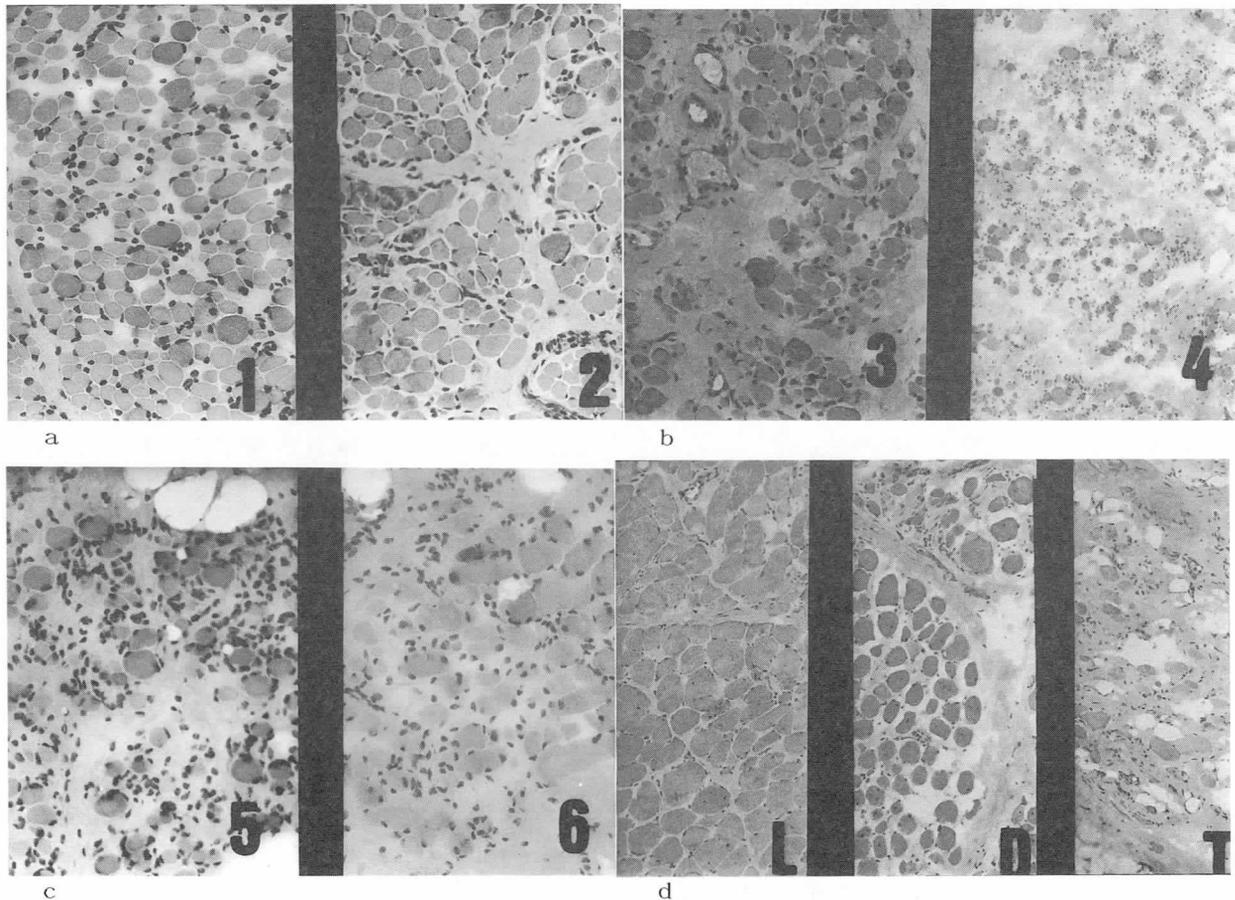
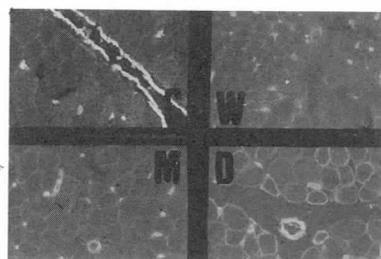
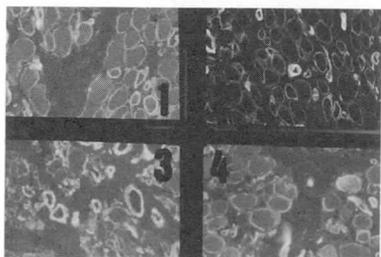
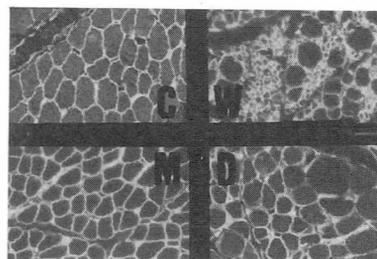


図1 FCMDの組織所見。数字は症例番号。 L: 喉頭筋, D: 横隔膜, T: 前脛骨筋

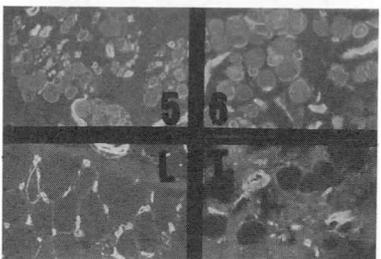
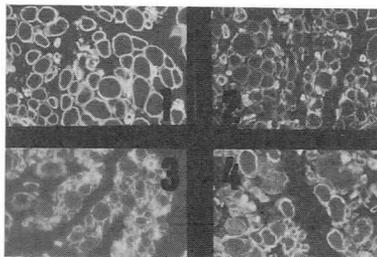
\*東京都立神経病院神経内科  
\*\*東京都立神経病院神経小児科



C	W
M	D



1	2
3	4



5	6
L	T

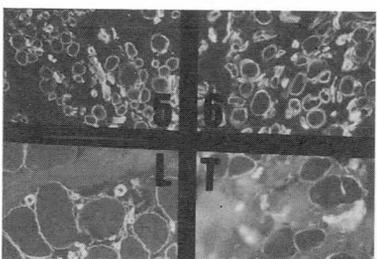


図2 FCMDにおけるラミニンAの免疫蛍光染色所見. 数字は症例番号.

C : CNS W : WH M : DM D : DMD  
L : 喉頭筋 T : 前脛骨筋

図3 FCMDにおけるラミニンB1の免疫蛍光染色所見. 数字は症例番号.

C : CNS W : WH M : DM D : DMD  
L : 喉頭筋 T : 前脛骨筋

(CNS) 2例, 皮膚筋炎 (DM) 2例, 脊髄性進行性筋萎縮症 (WH) 2例) である. 方法はヒストファインキットを使用した免疫蛍光法を用いた. 使用した抗体は抗ヒトラミニンA, B1, B2, 及び, 抗ヒトコラーゲンタイプIVの各モノクローナル抗体を用いた.

### 結 果

まず, 組織学的所見ではFCMD生検筋では1ヶ月例 (症例1), 6ヶ月例 (症例2) では比較的組織は良く保たれていたが, 1歳例 (症例4-6) ではかなり変性が強く見られた (図1 a, b, c). 剖検例では喉頭筋, 横隔膜ではよく保たれており, 前脛骨筋ではきわめて高度の変性が認められた (図1 d). 喉頭筋と横隔膜は免疫染色性に殆ど差が認められなかったので, 剖検例については喉頭筋と前脛骨筋について結果を示す.

次に, 免疫蛍光染色の結果では, ラミニンAは対照群では殆ど染色されなかったがDMD, FCMDではいずれも明らかに染色性が認められた. DMDとFCMDの間には染色性に差は認められなかった. 変性高度な剖検例のTAでは染色性の低下が認められた (図2). ラミニンB

1では対照群はよく染色され, 一方, DMD, FCMDでもほぼ同様に染色されていたが, 一部の肥大線維では染色性の低下が認められた (図3). ラミニンB2 (図4), ヒトコラーゲンタイプIV (図5) についても同様の染色態度が認められた. 剖検例では喉頭筋, 横隔膜が同様によく染色されたが前脛骨筋では染色性の低下の見られる線維が認められた. 表1に以上の染色性の比較を示すが, まとめるとラミニンはFCMDにおいてDMDと同様染色性が認められ, 対照と態度を異にした. ラミニンB1, B2, コラーゲンタイプIVに関しては基本的に対照と差はなく, 筋変性が強くなると染色性の低下が認められる傾向があった.

### 考 察

林らはFCMDにおいてやはりラミニンAの染色性の出現, ラミニンB1, B2の染色性の減弱を指摘しているが, 今回の結果では, ラミニンAに関しては同様の所見であったが, ラミニンB1, B2に関しては対照と差を認めず, 一方, 変性の強い筋での染色性の低下は, 変性に伴う二次的な変化と考えられた. 林らはその後ラミ

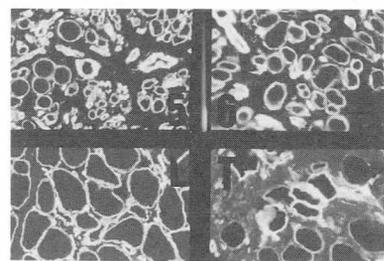
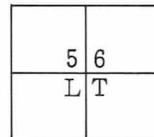
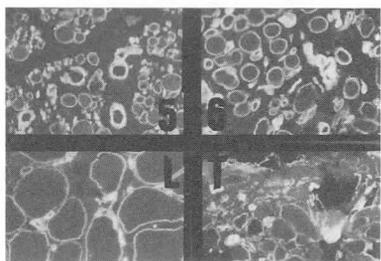
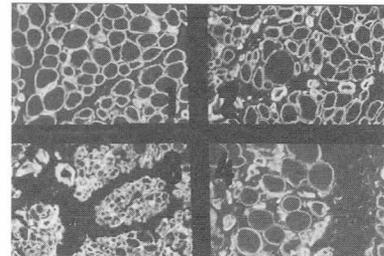
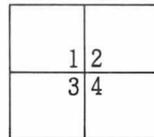
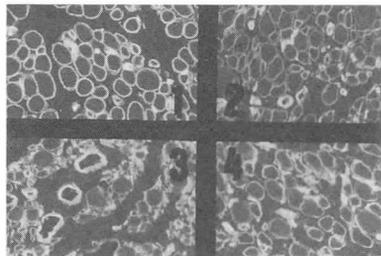
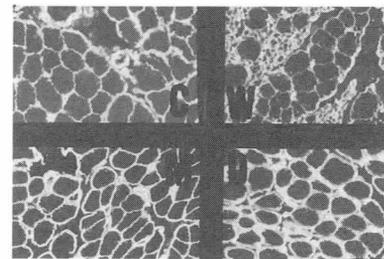
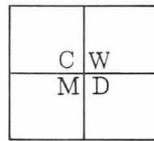
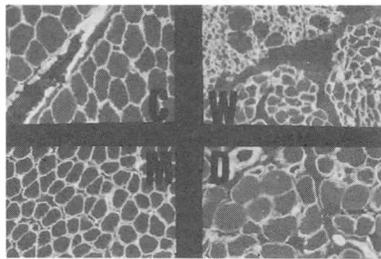


図4 FCMDにおけるラミニンB2の免疫蛍光染色所見. 数字は症例番号.  
C : CNS W : WH M : DM D : DMD  
L : 喉頭筋 T : 前脛骨筋

図5 FCMDにおけるヒトコラーゲンタイプIVの免疫蛍光染色所見. 数字は症例番号.  
C : CNS W : WH M : DM D : DMD  
L : 喉頭筋 T : 前脛骨筋

表1 染色性の比較

	Lam A	Lam B1	Lam B2	CI-IV
<OND>	-	++	++	++
<DMD>	+	++	++	++
<FCMD>				
1. TM (1M)	+	++	++	++
2. AT (6M)	+	++	++	++
3. YD (1Y)	+	++	++	++
4. AI (1Y)	+	+	++	++
5. KK (1Y)	+	++	+	++
6. MY (1Y)	+	++	+	++
<剖検例>				
喉頭筋	+	++	++	++
横隔膜	+	++	++	++
前脛骨筋	±	+	+	+

OND:対照群

ニンM鎖についても検討を加えており, FCMDにおいて染色性が欠如することを報告している. 今回我々はM鎖の抗体が入手出来なかったため, この点の検討は出来なかったが, M鎖が筋特異性があり, A鎖はその他の細胞の基底膜に特異性があることを考えると, FCMDにおいてはM鎖の欠損に対してA鎖が代償するような機転が働いているのかも知れない. 今後M鎖についても検討を加えてゆきたい.

#### 文 献

- 1) 林 由起子, 荒畑喜一, 平澤恵理, 武田伸一, 塚原俊文, 壘中征哉, E. Engvall: 筋ジストロフィーにおける細胞外マトリックスの変化. “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4年度研究報告書”, 1993, pp172-175.

## 8) 筋ジストロフィーマウスにおける 細胞外マトリックスの検討

荒 畑 喜 一\*

研究協力者 林 由起子\* 宮 越 友 子\* 李 濟 賢\*  
後 藤 加奈子\* 古 賀 律 子\* 塚 原 俊 文\*  
武 田 伸 一\* E. Engvall\*\* 石 井 弘 子\*\*\*

### はじめに

これまで我々は、ヒトのジストロフィー筋における基底膜の変化を検討し、特に福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) におけるラミニンM鎖の異常を指摘してきた。すなわち、FCMDでは、ラミニンM鎖の免疫染色性が他の疾患対照筋と比較して著しく低下している<sup>1)</sup>。

細胞の基底膜は細胞外マトリックスが特殊な形態をとったもので、筋線維においては、各筋細胞膜の周囲を被っている。これは主としてラミニン、IV型コラーゲン、プロテオグリカン等で構成されている。一方、細胞骨格タンパクであるジストロフィン<sup>2)</sup>は、筋細胞膜の糖タンパクと複合体を形成しており、さらに、このうちの細胞外サブユニットである156 K dystrophin-associated glycoprotein (DAG)は基底膜の主成分であるラミニンと結合能をもつことが報告されている<sup>3)</sup>。

ラミニンは3本のサブユニット鎖から構成されており、多くの組織では1本のlong chainであるA鎖と2本のshort chain (B1, B2鎖)からなるA-B1-B2という構成をとっている。しかしながら、正常筋組織においてはA鎖のかわりにM鎖が発現しており、M-B1-B2という構成をとっている。このM鎖は骨格筋、シュワン細胞、及び胎盤のトロホブラストに特異的に存在することが知られている<sup>3)</sup>。

今回我々は、筋のジストロフィー変化に及ぼすラミニンM鎖、およびその他の細胞外マトリックス成分の意義をさらに詳細に解明する目的で、各種の筋ジストロフィーモデル動物を用いてこれらの変化を検討した。

### 対象および方法

対 象：筋ジストロフィーモデル動物 (line413チキン, BIO14.6ハムスター, mdxマウス, C57BL/6J-dy/dy [いわゆる dy マウス]), およびそれぞれに対するコント

ロール動物の骨格筋を用いた。dyマウスは実中研より入手した凍結受精卵を仮親に移植して得た。

免疫組織化学：クリオスタットで6  $\mu$ mの切片を作成し、ラミニン (M鎖, EHS), IV型コラーゲン, フィブロネクチン, ジストロフィン, ユートロフィンに対するポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。

イムノブロット：凍結筋組織より10mMEDTA加バッファーにてラミニンM鎖を抽出し、そのC末端側を認識する抗体と反応させた。

RNA分析：生後2週齢のdy及びコントロールマウスの凍結筋組織よりAGPC法によりRNAを抽出し、ラミニンM鎖のC末端側塩基配列を認識するプライマーセットを用いてRT-PCRを行った。

### 結 果

免疫組織化学：ラミニンM鎖は、コントロールマウスにおいては筋線維周囲の基底膜に一致して明瞭に染色され、神経筋接合部ではより強い染色が認められた。さらに筋内末梢神経も明瞭に染色された。また、mdxマウス、ジストロフィーハムスター、ジストロフィーチキンでも同様、筋周囲に明瞭な染色性が認められた。

ところが、dyマウスで検討したところ、ラミニンM鎖の染色性は認められなかった。dyマウスは常染色体劣性遺伝形式をとるので、ヘテロのマウスは無症状であるが、ヘテロマウスではコントロールマウス同様ラミニンM鎖が明瞭に認められた (図)。

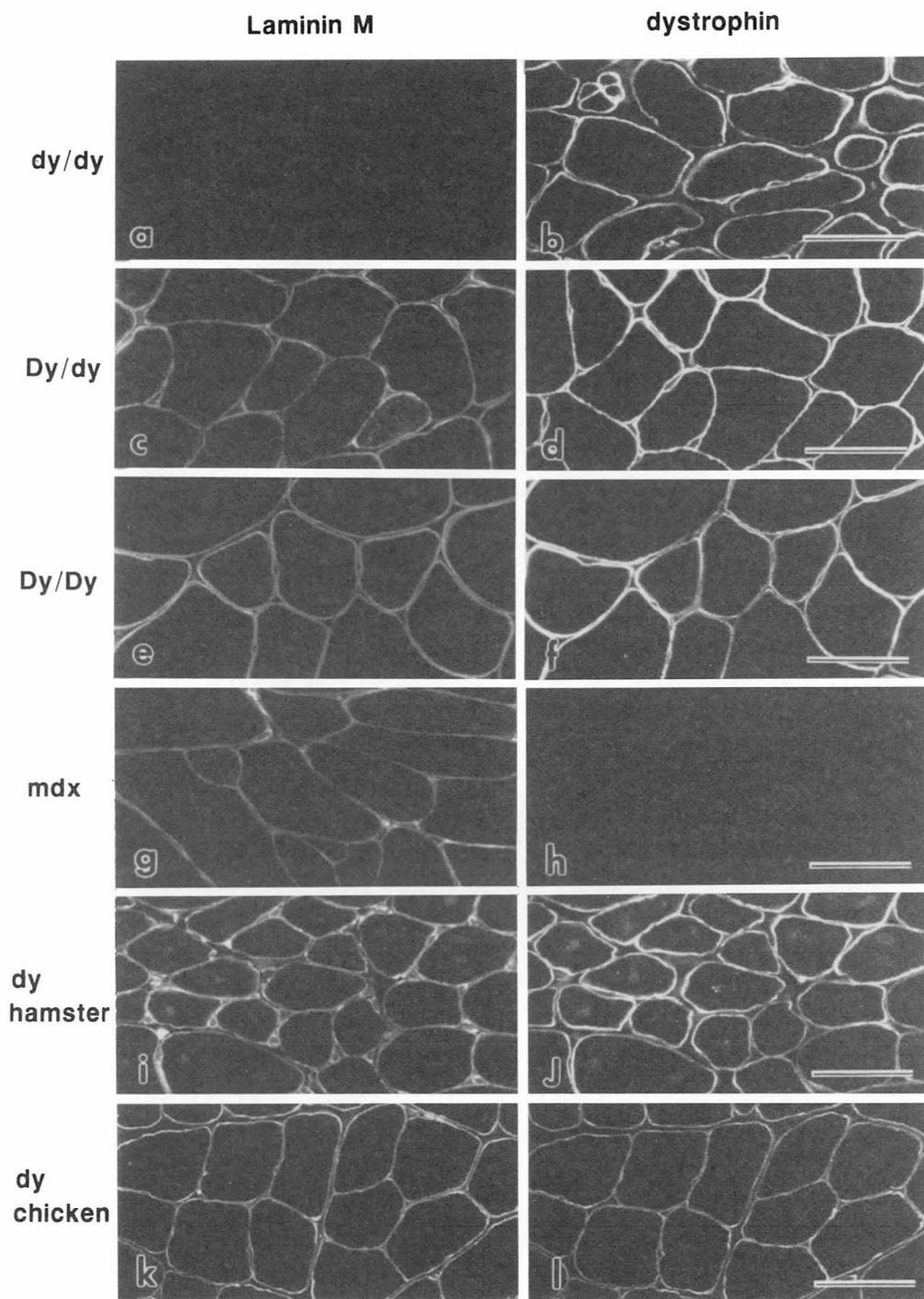
dyマウスは、筋のジストロフィー変化に加え、もう1つの特徴として脊髄神経根付近の髄鞘形成不全が知られている。そこで脊髄神経根についても検討した。コントロールマウスではラミニンM鎖は脊髄軟膜、神経節周囲、脊髄神経根および脊髄周囲の傍脊柱筋群に明瞭に認められたが、dyマウスではいずれの部分にもM鎖は染色されなかった。

一方、dyマウスのジストロフィン<sup>2)</sup>はmdxマウスと異なり、明らかな異常は認められず、また、IV型コラーゲ

\*国立精神・神経センター神経研究所

\*\*La Jolla Cancer Research Foundation

\*\*\*都立東大和療育センター



図

ン、フィブロネクチンにも異常は認められなかった。

さらに、dyマウスの遺伝子座は、ユートロフィン (DRP) と同じ染色体10番の上に存在するので、ユートロフィンの変化を検討した。dyマウスのユートロフィン変化は神経筋接合部に明瞭に認められ、一部再生筋にも存在するという、コントロールと同様の免疫染色パターンが認められ、これまで報告されているものと同様の結

果であった。

イムノブロット：凍結筋組織を用いてラミニンM鎖の抗体でイムノブロットを施行したところ、コントロール、dyのヘテロマウス、コントロールハムスター、およびジストロフィーハムスターではいずれもラミニンM鎖を認識するバンドが認められたが、ホモのdyマウスではバンドが認められなかった。

RT-PCR：そこでRNAレベルでの検索を試みた。ラミニンM鎖のC末端側塩基配列を認識するプライマーセットを用いてPCRを施行したところ、PCRサイクル数が増えるにつれ、コントロール、dyマウスともにシーケンスより予想された468bpの位置に一致したバンドが増幅された。現在、Northern blotによる検討を進めている。

#### ま と め

- 1) C57BL/6J-dy/dy (dyマウス) では、筋細胞基底膜のラミニンM鎖が免疫染色されなかったこと、イムノブロットでもバンドが認められなかったことより、M鎖が欠損しているものと考えられた。
- 2) dyマウスの遺伝子座は、ユートロフィンと同じマウス第10番染色体上にあるとされているが、免疫組織化学的にはユートロフィンに明らかな異常は認められなかった。
- 3) ジストロフィーハムスター、ジストロフィーチキン、およびmdxマウスではラミニンM鎖の免疫染色性に異常は認められなかった。

#### 考 察

- 1) dyマウスにおけるラミニンM鎖欠損は、細胞外マトリックスの異常によっても筋のジストロフィー変化を引き起こされうることを示唆しており重要である。

- 2) 本モデル動物は今後、筋ジストロフィーの発症と病態の解明に加えて、ラミニンM鎖の機能の解明にも重要な意義を持つてくるものと考えられる。

最後に、dyマウスを供給して下さいました実験動物中央研究所の野村達治所長、抗ユートロフィン抗体を供与して下さいました東京大学分子生物学研究所の石浦章一助教授に深謝致します。

#### 文 献

- 1) Hayashi YK, Engvall E, et al : Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies. *J Neurol Sci* 119 : 53-64, 1993.
- 2) Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, et al : Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355 : 696-702, 1992.
- 3) Leivo I and Engvall E : Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscles, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 1544-1548, 1988.
- 4) Arahata K, Hayashi Y K, et al : Laminin in animal models: Defect of laminin M in skeletal and cardiac muscles and peripheral nerve of the homozygous dystrophic dy/dy mice. *Proc Japan Acad Ser B* : 259-264, 1993.

## Ⅱ. 遺伝子 (Part 1)

# 9) 筋ジストロフィー及びその類縁疾患に関する細胞遺伝学的研究

## I. リンパ芽球細胞株を用いた高精度分染法の検討

齋藤 深美子\*

研究協力者 葉 美華\* 池内 達郎\*

遺伝性疾患の中には、多くの研究者や医師の様々な角度からの検索にも関わらず、その原因遺伝子を解明できない疾患が、まだ数多く存在する。しかし、近年の分子生物学的手法の進歩により、その本体の遺伝子を直接同定する可能性がでてきた。この戦略法は、ポジショナルクローニング法と呼ばれている。その原理は、

1. まず、様々な多型マーカーを使用して、その疾患の患者の存在する家系に関して、Linkage analysis (連鎖解析) を行い、疾患遺伝子が何番染色体のどの領域に存在するかを決定する。

2. 次に、その領域周辺を詳細に解析し、PFGEを用いた制限酵素地図の作製、YAC (酵母人工染色体) による巨大DNA断片のクローニング、特定の領域における発現遺伝子の同定等の手法を駆使して、その疾患に共通した変異の存在する遺伝子を決定する。

現在までの研究例を見ると、このポジショナルクローニング法を成功させるか否かは、染色体レベルでの再配列 (転座、部分欠失あるいは逆位等) を有する稀な症例を発見しているか否かに懸かっていることが多い。

我々の目的は、筋ジストロフィー症およびその類縁疾患における細胞遺伝学的な検索を行い、疾患に関連する染色体異常の発見に努めること、および、患者を含む家系の細胞を収集・保存することである。そこで、第一年目に相当する本年度は、リンパ芽球細胞株 (lymphoblastoid cell line: LCL) を用いた、高精度染色体解析のための手法開発に関する基礎的な研究を計画した。

LCLは、DNA型EBウイルスにより形質転換したBリンパ球で、半永久的に増殖し、凍結保存・DNA解析も容易なため、分子遺伝学的解析用資料としては大変に有用で、最も一般的に用いられている細胞である。しかし細胞遺伝学的解析用としては、通常、染色体の凝縮性が強いために、構造異常等の詳細な分析が難しいという難点がある。そこで本研究では、その高精度染色体像を効率

よく得る方法、特に細胞同調・BrdU処理による高精度R分染法を検討し、良好な成績を得たので、その結果を報告する。

### 資料と方法

実験に用いたLCLは、3種類の細胞株で、RPMI 1640培養液 (20%牛胎児血清を含む) にて培養・保持されたものである。

図1に示されてある様に、最初に細胞数をカウントして、 $2 \times 10^5$ 個/mlに揃えてから培養をスタートする (0時間)。24時間目に、細胞同調剤としてチミジン (TdR,  $300 \mu\text{g/ml}$ ) またはメソトレキセート (MTX,  $10^{-7}\text{M}$ ) を添加して、17時間培養する。これを洗浄して同調を解除した後に、BrdU ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) で5~8時間培養し、経時的に細胞を収穫・固定して染色体標本作製する<sup>1)</sup>。その際、(1)同調処理のみの場合: 固定30分前にコルセミド ( $0.04 \mu\text{g/ml}$ ) を添加する、(2)同調処理及びエチジウムブロマイド (EB: 染色体凝縮阻害剤<sup>2)</sup>) 処理の併用の場合: 固定の1.5時間前にEB ( $7.5 \mu\text{g/ml}$ ) を、30分前にコルセミド ( $0.01 \mu\text{g/ml}$ ) を添加する (図1)、あるいは(3)EB単独処理の場合: 同調処理は行わずEB処理のみすることにし、各々の効果を比較した。

作製した染色体標本をHoechst 33258で染色した後、ホットプレート及びブラックライトで処理してから、ギムザ液で染色し<sup>3)</sup>、光学顕微鏡にて最低500~1000の細胞をカウントして分裂頻度を算出し、その染色体像及び染色体分染像の観察を行った。

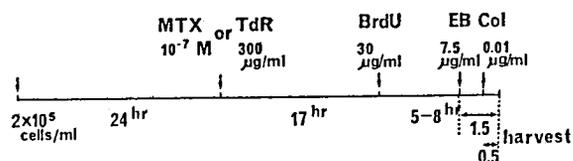


図1 細胞同調及びEB処理併用法のプロトコール

\*東京医科歯科大学難治疾患研究所遺伝疾患研究部門 (細胞遺伝)

## 結 果

(1)の同調処理のみの場合、BrdU添加後、5～8時間の間に経時的に染色体標本を作製し、その分裂頻度を算出した結果、TdRあるいはMTXのどちらで同調しても、分裂細胞の頻度が最高値を示す時期は、6.5時間目であることが判った(図2)。その際の分裂頻度は、TdR同調の場合の方(3～4%)が、MTX同調の場合(2.5%)に比べて、一般に高値であった。しかし、高精度バンド解析に必要な分裂初期細胞(1P: late prophase + Pm: prometaphase)の全分裂細胞中の頻度は10～20%で必ずしも高いとはいえなかった。

そこで次に、(2)のTdRによる同調処理及びEB処理併用法を試みたところ、分裂初期細胞(1P + Pm)の頻度が著しく増加し、最高値は全分裂細胞中の60～70%の割合にまで達した(図3)。このピークを示す時期は、分裂頻度の最高値を示す時期と同じ、6.5時間目であった(図3)。

一方、細胞同調を行わないEB単独処理(3)では、EBの染色体凝縮阻害効果により、分裂初期細胞を50～55%の高頻度で得ることが可能であるが、染色体に粘着性が生じるため、標本を作製する際、スライドガラス上に染色体を良好に展開させるのが困難であった。

## 考 察

今回の結果から、リンパ芽球細胞株においては、細胞同調培養及びエチジウムブロマイド処理の併用により、約70%の高頻度で、分裂初期の伸張した染色体を得ることが可能であることが判明した<sup>4)</sup>。その一番のピークは同調解除・BrdU添加後、6.5時間目に得られる<sup>4)</sup>。この時間は、末梢血を用いた同調培養後に得られる同様のピーク(約5時間目)に比べて1.5時間程遅いが、これ

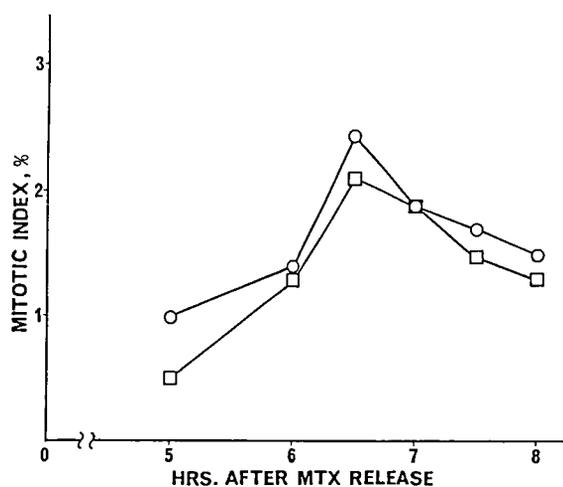


図2 細胞同調(MTXによる)解除及びBrdU添加後の経時的な細胞分裂頻度(○及び□は、実験に使用した細胞株の種類を表す)

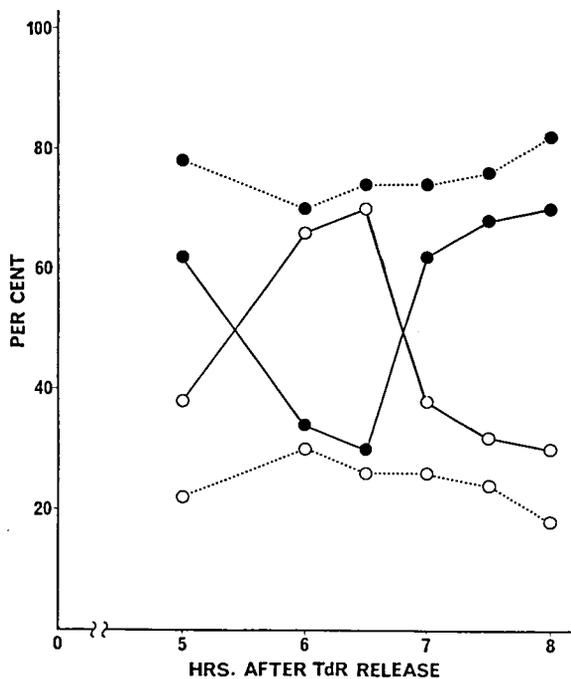


図3 細胞同調(TdRによる)解除及びBrdU添加後の、経時的な分裂初期細胞(1P + Pm)の全分裂細胞中の割合(○及び●は、実験に使用した細胞株の種類を表す)

は、これらの培養細胞に固有の細胞周期に依存するものと思われる。

また、得られた分裂初期の細長く伸張した染色体の展開については、エチジウムブロマイド単独処理の場合ではなかなか困難であるが、今回用いた、細胞同調・エチジウムブロマイド処理併用法の場合では、かなり良好な成果が得られた<sup>4)</sup>。

上記の技法は、リンパ芽球細胞における染色体構造異常の詳細な解析のみならず、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法による、各種DNAクローンの高精度マッピングにも非常に有用と期待される<sup>5)</sup>。今後、筋ジストロフィー症及びその類似疾患に関する分子細胞遺伝学的研究に適応して行きたい。

## 文 献

- 1) Viegas-Péquignot E and Dutrillaux B: Une méthode simple pour obtenir des prophase et des prometaphases. Ann Génét (Paris) 21: 122-125, 1978.
- 2) Ikeuchi T: Inhibitory effect of ethidium bromide on mitotic chromosome condensation, and its application. Cytogenet Cell Genet 38: 56-61, 1984.
- 3) Takahashi E, Yamauchi M, Tsuji H, Hitomi A, Meuth M and Hori T: Chromosome mapping of

the human cytidine-5'-triphosphate synthetase (CTPS) gene to band 1p34.1-34.3 by fluorescence in situ hybridization. Hum Genet 88 : 119-121, 1991.

- 4) 葉 美華, 斎藤深美子, 池内達郎: リンパ芽球細胞株を用いた高精度R分染法の検討: 細胞同調とエチジウムブロマイド処理との併用. 日本人類遺伝学会

第38回大会 (1993).

- 5) Sasaki S, Saito F, Fushimi K Marumo F and Ikeuchi T : Regional assignment of the human collecting duct water channel (WCH-CD) gene to chromosome band 12q13.11-q13.12 by fluorescence in situ hybridization. Human Gene Mapping Workshop 93 : 25, 1993.

# 10) 拡張型心筋症を主徴とするベッカー型筋ジストロフィーとジストロフィン遺伝子異常について

吉田 邦 広\*

研究協力者 柳 澤 信 夫\* 小 林 慶\*\* 古 賀 律 子\*\*  
武 田 伸 一\*\* 荒 畑 喜 一\*\*

## はじめに

我々は昨年の本班会議において拡張型心筋症を呈したベッカー型筋ジストロフィー (BMD) 4 症例の臨床像と遺伝子異常との対応を報告した<sup>1)</sup>。その中で明らかな筋萎縮, 筋力低下を欠く 2 名は PCR 法にて exon 1 が増幅されず, Southern blot の結果と合わせ intron 1 を中心とした欠失と判断した。他の 2 名は典型的な BMD の筋症状を有する症例で exon 47 の単独欠失であった。この自験例および文献例を踏まえて, 我々は拡張型心筋症を呈する BMD 症例を 2 つのグループに大別することが妥当ではないかと考えた。まず 1 つは BMD に典型的な骨格筋障害を示すグループで, 2 つ目は拡張型心筋症を主体とし, 明らかな筋力低下, 筋萎縮を欠くグループである。後者の中には最近注目されているジストロフィン異常症である X-linked dilated cardiomyopathy (XLCM)<sup>2,3)</sup> 症例が含まれるものと考えた。

一方, ジストロフィン遺伝子の欠失部位との対応を要約すると, 典型的な BMD の筋症状を備えたグループは BMD の hot spot である exon 45-47 の欠失であることが多く, 他方, 筋症状を欠くグループは 5' 端の exon 1-2 近傍の欠失である点が興味深いと思われる。そこで今回は exon 1-2 近傍の欠失がいかんして早期より心筋が選択的に強く障害されるような病型をもたらすのかという点に注目し, 以下の 2 つの可能性について検討した。

## 対象と方法

### (1) ジストロフィン遺伝子の 5' 端の alternative transcription により, 心筋特異的なジストロフィンの isoform が存在する可能性について

ジストロフィンの N 端には 3 つの isoform (脳型, 筋型, プルキンエ細胞型) が知られており, それぞれ異なる promoter により転写の調節を受けている<sup>4)</sup>。ただしすべての isoform において exon 2 は共通していることが知ら

れている。そこで心筋特異的な isoform の存在を確認するために, 正常心筋より抽出した mRNA と, ジストロフィンの exon 2 に対応する reverse primer を用意し, 逆転写酵素を用いて exon 2 の 5' 端側に相当する cDNA 断片を合成した。次いで RNase 処理により鋳型 mRNA を分解した後, TdT (Terminal deoxynucleotide Transferase) により一本鎖 cDNA の 3' 端にアンカーを取り付けた。さらにこの一本鎖 cDNA を鋳型にして PCR を用いてこの部分の cDNA 断片をクローニングし, その塩基配列を決定した。

### (2) ジストロフィン遺伝子の intron 1 に転写制御部位が存在する可能性について

今回は, intron 1 の 5' 端寄りに存在する MEF2 (Myocyte-specific Enhancer-binding Factor 2) の結合モチーフ<sup>5)</sup>に注目した。骨格筋型ジストロフィンの promoter には TATA ボックスや CArG ボックスと称される配列がある。まず最初に, この部位の promoter としての機能を見るために, 部分的に削り取った deletion mutant を作成し, おのおのの下流にレポーター遺伝子として chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝子をつなぎ, C 2 筋芽細胞系に導入してその活性を検討した。次に intron 1 の MEF2 結合モチーフをつないだコンストラクトを作成し, 同様に C 2 筋芽細胞系に導入し, CAT 活性を測定した。

## 結 果

(1) 正常心筋の mRNA を材料として 5' 端のクローニングを行ったが, 少しずつサイズの異なるいくつかの cDNA 断片が得られた。いずれも exon 2 に続いて骨格筋型の exon 1 の塩基配列が確認された。

(2) TATA ボックスや CArG ボックスを含むコンストラクト-100/+68 が最も転写活性が高いことが判明した (図 1)。次に, 最も高い転写活性を示したこのコンストラクトに intron 1 に認められた MEF2 結合モチーフをつなぐと, さらに数倍の活性の上昇が確認された (図 2)。培養系の血清濃度を変えて同じコンストラクトを用いて

\*信州大学医学部第三内科

\*\*国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部

CAT活性を測定してみたところ、MEF2結合モチーフをつないだコンストラクトでは血清の濃度が減少するにつれて活性が著増した(図3)。

### 考 察

今回の検討により、ジストロフィンの心筋特異的な isoform は少なくとも major component としては存在せず、心筋で発現するジストロフィンは骨格筋型と同一であると考えられる。

Intron 1 に転写制御部位が存在する可能性に関しては、今回はその 5' 端側に位置する MEF2 結合モチーフに注目して検討した。MEF2 結合モチーフは、A と T に富む配列で、転写を活性化する因子 (MEF2) が結合する部位である<sup>9)</sup>。MEF2 は MyoD ファミリーにより誘導され、分化した筋管細胞以降に発現する組織特異的な転写因子とされている<sup>9)</sup>。すでに骨格筋や心筋においていくつかの MEF2 が同定されており、最近ではマウス MEF2 に対応するヒトの遺伝子群もクローニングされた<sup>10)</sup>。一方、血清中の FGF や TGF- $\beta$  などの成長因子は筋芽細胞の増殖を促進し、筋管細胞への最終分化を抑制することが知られている。

今回の実験からは少なくとも骨格筋においては、この MEF2 結合モチーフが転写の活性化に関与していることが推測された。また培養系の血清濃度を下げ、筋芽細胞から筋管細胞への分化をすすめてやると CAT 活性が上昇したことは、MEF2 が分化した筋管細胞以後に発現してくるという事実とよく相応する所見と考えられ、この系での MEF2 の積極的な関与を示唆するものである。

以上より intron 1 の MEF2 結合モチーフは、単一の cis element として見た場合には骨格筋でのジストロフィンの転写を高める方向に作用していることが推測される。当然ながらこの結果を非常に選択的な心筋障害を特徴とする dystrophinopathy と直結させるにはいくつかの問題点がある。まず今回の実験系では骨格筋を使用しており、この MEF2 結合モチーフが心筋でのジストロフィンの転写においてどのように機能しているかは今後の検討課題である。また *in vitro* の実験系での結果がどの程度、個体での臨床症状として反映されるかという点がある。

ジストロフィンの intron 1 は巨大 (200~300kb) であるため、その中のごく一部の cis element だけでは全体の機能的意義を類推することは困難である。しかしながら “experiment of nature” としてこのような特異な臨床例を詳細に検討することにより、種々の臓器でのジストロフィンの転写調節に関する新しい知見が得られるものと期待している。

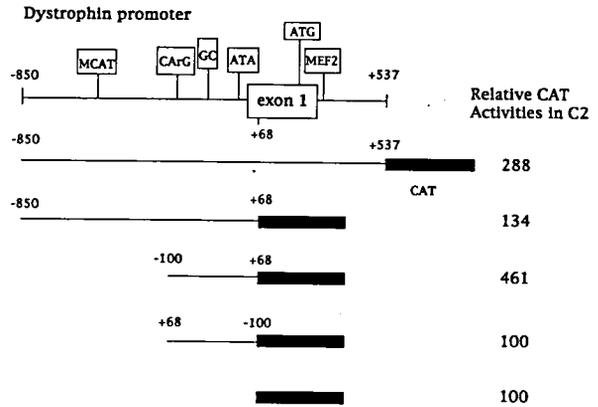


図1 ジストロフィン・プロモーターの deletion mutants の CAT 活性  
deletion mutants の CAT 活性を、プロモーターを欠く CAT 遺伝子の示す CAT 活性に対する相対値として示した。

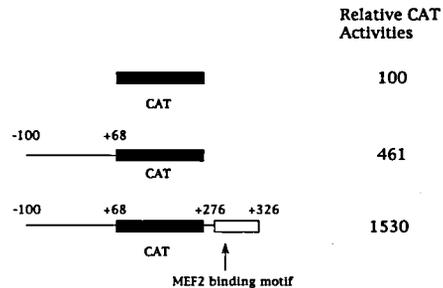


図2 MEF2結合モチーフの効果  
ジストロフィン・プロモーターに対して、MEF2結合モチーフを付加した際の CAT 活性を相対値として示した。

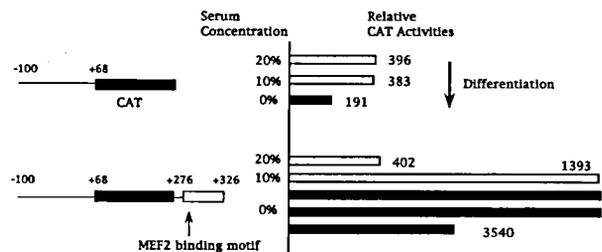


図3 培養液中の血清濃度の効果  
MEF2結合モチーフ付加ジストロフィン・プロモーターについて、C2細胞を異なった血清濃度で維持した場合の CAT 活性の比較を示した。

### ま と め

心筋が早期より選択的に強く障害される BMD 型患者家系において、intron 1 を中心とする特異な欠失を見出し、その意義について検討した。その結果、心筋特異的な isoform の存在は否定的であり、intron 1 の転写調節機構の障害に基づく可能性が高いと考えられた。今後は培養心筋細胞を用いた遺伝子導入実験により、MEF2 結合モチーフの意義をさらに検討する予定である。

## 文 献

- 1) Yoshida K, Ikeda S, Nakamura A, et al : Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene in patients with Becker muscular dystrophy presenting with dilated cardiomyopathy. *Muscle & Nerve* 16 : 1161-1166, 1993.
- 2) Towbin JA, Hejtmanick JF, Brink P, et al : X-linked dilated cardiomyopathy; molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 87 : 1854-1865, 1993.
- 3) Muntoni F, Cau M, Ganau A, et al : Deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 329 : 921-925, 1993.
- 4) Ahn AH and Kunkel LM : The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet* 3 : 283-291, 1993.
- 5) Cserjesi P and Olson EN : Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Mol Cell Biol* 11 : 4854-4862, 1991.
- 6) Yu YT, Breitbart RE, Smoot LB, et al : Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev* 6 : 1783-1798, 1992.

# 11) ジストロフィン分子の高システイン及びC末端領域が保持された重症DMD症例

荒畑喜一\*

研究協力者 古賀律子\* 平澤恵理\*\* 後藤加奈子\*  
埜中征哉\*\*\* 塚原俊文\* 武田伸一\*

## はじめに

一昨年の本研究班において我々は、ジストロフィン遺伝子の高システイン及びC末端ドメインは保持しているが、N末端側にエクソン2から始まる巨大な欠失を持ち、早期から重篤な臨床症状、経過を示したDMD症例を報告した。本症例ではゲノムDNAのマルチプレックスPCR解析の結果エクソン2-44の欠失が認められており、フレームシフトを伴う欠失であるにもかかわらず、抗ジストロフィン抗体による免疫組織化学染色ではジストロフィン分子のC末端部分を認識する抗体において染色性が認められている。今回は本症例で発現しているジストロフィンについて、イムノブロットによるタンパク質レベルでの検討、及びRT-PCR、クローニング後の塩基配列決定によるRNAレベルでの検討を行ったので報告する。

## 方法

**イムノブロット<sup>1)</sup>**: 生検筋の20 $\mu$ m凍結切片10枚をSDS電気泳動試料溶液とともにホモジナイズし、同様に調製した正常対照筋とミオシン重鎖量を一定にした条件で電気泳動した。泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、抗体IV (ジストロフィンC末端部分に対するポリクローナル抗体) と反応させABC法で検出した (ABCキット, Vector社)。

**RNA解析**: 生検筋の20 $\mu$ m凍結切片20枚よりAGPC法によりtotal RNAを抽出した<sup>2)</sup>。上流と下流のプライマーをそれぞれエクソン1とエクソン51, エクソン1とエクソン46に設定したプライマーセットを用いてRT-PCRを行った。PCRは1回目の増幅の後、最初のプライマーセットより内側のプライマーセットを用いて2回目のPCR増幅を行った<sup>3)</sup>。増幅産物をクローニング (TAKクローニングキット, Invitrogen社) の後、プラスミドDNAの精製 (Qiagenカラム) を行い、塩基配列を決定

した (Autoread sequence kit, A.L.F. Autosequencer, Pharmacia社)。

## 結果

**イムノブロット**: 抗ジストロフィンC末端抗体 (抗体IV) を用いたイムノブロットで、正常対照筋では分子量420kDaのジストロフィンが検出されたのに対し、本症例筋では分子量約110kDaの短いジストロフィンが検出された (図1)。

**RNA解析**: total RNAのRT-PCR増幅の結果、4種の産物が得られた (図2)。このうちProduct 1及び4はゲノムDNAの欠失と一致するエクソン2-44の欠失をもつmRNAより増幅されてきたものであることが、そのサイズより予想された。またProduct 2はアガロースゲルより抽出後再度PCRによる確認実験を行った結果、非特異的増幅産物であることが確認された。Product 3及び4をクローニングの後シーケンシングを行った結果 (図3)、Product 4はゲノムDNAと同じ欠失 (エクソン2-44) をもつmRNA由来であり、Product 3はエクソン2-50の欠失をもつmRNA由来であることが確認された。

## 考察

ジストロフィン遺伝子のエクソン2-44の巨大な遺伝子欠失が存在し、臨床的に極めて重篤な経過をとっているDMD症例において、イムノブロットにより分子量約110kDaのジストロフィンの存在が確認された。またRNA解析により、本症例にはゲノムDNAの欠失と一致したエクソン2-44のフレームシフトを伴う欠失をもつmRNAの他に、エクソン2-50のフレームシフトを伴わない欠失をもつmRNAが検出され、分子量約110kDaのジストロフィンを発現するmRNAの存在が確認された。

本症例において発現しているジストロフィンは、免疫組織化学染色により筋細胞膜にそって存在していることが確認されている<sup>4)</sup>。また高システイン及びC末端領域

\*国立精神・神経センター神経研究所

\*\*順天堂大学医学部脳神経内科

\*\*\*国立精神・神経センター武威病院

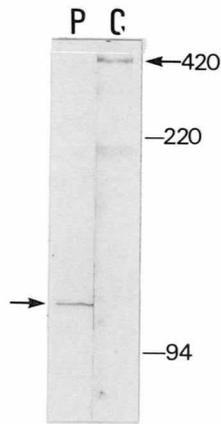


図1 生検筋のイムノブロット  
抗ジストロフィンペプチドIV抗体によるイムノブロット。C；コントロール筋，P；症例筋，ジストロフィン（420kDa）及び分子量マーカーとしてミオシン重鎖（220kDa），フォスフォリラーゼb（94kDa）の位置を示した。

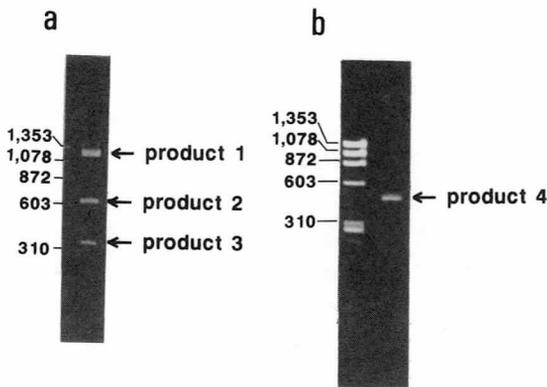


図2 RT-PCR増幅産物  
1回目PCRはExon 1（5'-CTTTCCCC-TACAGACTCAG-3'）とExon 51（5'-GTCACCCACCATCACCTCTG-3'）のプライマーセットを用いて増幅し，2回目PCRはExon 1（5'-CTGGGAGGCAATTACCTTCGG-3'）とExon 51（5'-GGTAAGTTC-TGTCCAAGCCCGG-3'）(a)，Exon 1（5'-CTGGGAGGCAATTACCTTCGG-3'）とExon 46（5'-GCAATGTTATCTGCTTCCTCC-3'）(b)のプライマーセットを用いて増幅した。

を保持していることより，筋細胞膜のジストロフィン結合性糖タンパク質（DAG）と結合しているものと思われる。それにもかかわらず重篤な臨床症例を示しているのは，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を欠損しているため，ジストロフィンが正常に機能していないことに起因する可能性，またこの短いジストロフィンが筋細胞膜と結合して存在しているため，DMDでジストロフィンの補填をしているといわれ

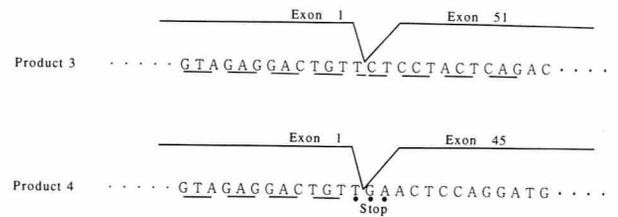


図3 RT-PCR増幅産物の塩基配列  
Product 3はExon 1とExon 51，Product 4はExon 1とExon 45の連結部分の塩基配列を示した。  
Exon 1の3'端（5'-GACTGTT-3'）はProduct 3ではExon 51の5'端（5'-CTCCTA-3'）と，Product 4ではExon 45の5'端（5'-GACTGTT-3'）と連結している。そのためProduct 4ではStop codonが生じている。

ているユートロフィンが筋細胞膜と結合して存在できないことに起因する可能性が示唆された（結果は示していないが，DAG及びユートロフィンの免疫組織化学染色ではDAGはほぼ正常に近い染色像，ユートロフィンは他のDMD例ほどには染色されず，ほとんどup regulationされていないことが示唆された）。

謝辞：本研究にあたり，抗DAG抗体を供与して下さいました国立精神・神経センター神経研究所 小沢鉄二郎所長，並びに抗ユートロフィン抗体を供与して下さいました東京大学分子細胞生物学研究所 石浦章一助教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) Koga R, Ishiura S, Arahata K, Takakuwa T, Nonaka I and Sugita H: Quantitative analysis of dystrophin in human and rodent muscles. Biomedical Research 13 (3) : 215-219, 1992.
- 2) Chomczynski P and Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-choroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159, 1987.
- 3) Roberts RG, Barby TFM, Manners E, Bobrow M and Bentley DR: Direct detection of dystrophin gene rearrangement by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. Am J Hum Genet 49: 298-310, 1991.
- 4) 荒畑喜一，有川恵理，松井 潔，林由起子，石浦章一，埜中征哉：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。“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，1992，pp87-89.

## 12) Duchenne型筋ジストロフィーにおける ジストロフィン陽性筋線維の解析

水野美邦\*

研究協力者 平澤恵理\*\*\* 古賀律子\*\*  
後藤加奈子\*\* 荒畑喜一\*\*

### はじめに

ジストロフィンの欠損しているmdxマウスやDMD患者筋では免疫組織化学染色にて、少数 (<1%)ながら明瞭に抗ジストロフィン抗体によって染色される筋線維いわゆる revertant fiber (RF) が観察される<sup>1)~3)</sup>。しかし、その存在様式は各症例ごとに異なり発現機序についても一様ではないことが推定される。そこで我々はジストロフィン遺伝子に欠失の判明している症例を中心に RF に

おけるジストロフィンの解析を試みた。

### 対象及び方法

対象は、2ヶ月から26歳までの42名のDMDで、疾患対照としてその他の神経筋疾患5名、DMD保因者1名を検索した。ジストロフィンの検索は、1) RFを筋切片より実体顕微鏡下で取りだしたPCR解析、2) 欠失を含む領域のRT-PCR, nested PCR解析<sup>4)</sup>、3) N端からC端

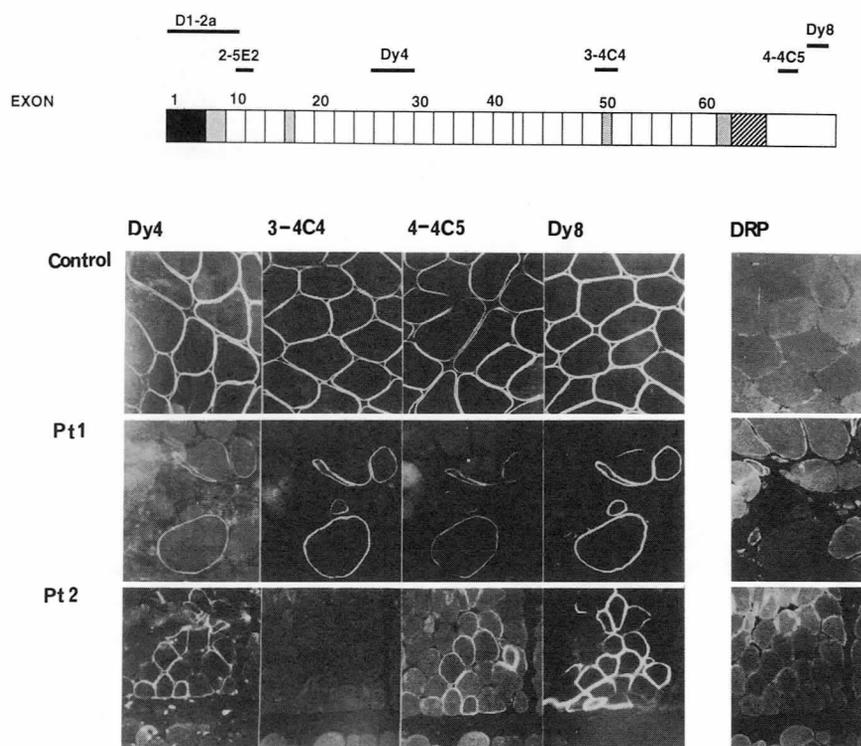


図1 6種類の抗ジストロフィン抗体の認識部位と免疫組織化学染色の例  
症例1 (Pt1) はエクソン45, 症例2 (Pt2) はエクソン50が欠失している。Pt2  
のRFはエクソン50に一致する部位を認識する抗体3-4c4で染色されない。

\* 順天堂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

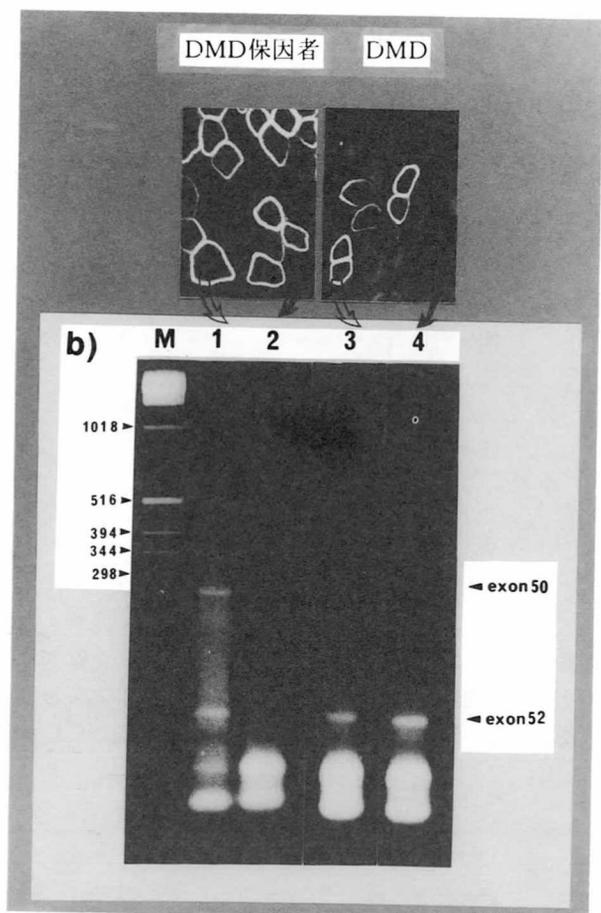


図2 RFのPCR解析-エクソン50と52に対する primer を用いたPCR解析 3% NuSieve agarose gel 使用 疾患対照として同時に検索したDMD保因者(欠失; エクソン45-52)のジストロフィン陽性筋線維 (lane 1) ではエクソン50, 52の増幅を認めジストロフィン陰性筋線維 (lane 2) ではエクソン50, 52とも認めなかった. DMD例(欠失; エクソン50)ではRF (lane 3), ジストロフィン陰性筋線維 (lane 4) ともにエクソン50は認めず, エクソン52の増幅のみを認めた.

までの異なるドメインに対して調整された6種類の抗ジストロフィン抗体(図1)を用いた免疫組織化学染色等を実施した.

### 結 果

1) PCR解析の結果, ジストロフィン陰性の筋線維, ジストロフィン陽性のRFとも同じ欠失がジストロフィンDNA上に確認された. 一方, 疾患対照として検討したDMD保因者ではジストロフィン陰性の筋線維では欠失を認めジストロフィン陽性の線維では欠失を認めなかった(図2). エクソン45に欠失を認めた1剖検例で3種(上腕二頭筋, 腹直筋, 肋間筋)の筋で検討したが, 何れの筋においても同じ欠失が存在した(図3).

2) 凍結切片から抽出したRNAのRT-PCR, nested

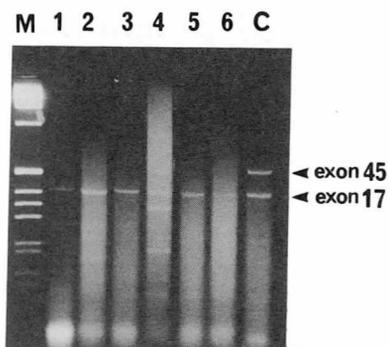


図3 剖検例でのPCR解析-筋種差の検討 lane 1, 2; 腹直筋, 3, 4; 肋間筋, 5, 6; 上腕二頭筋, C; control lane lane 1, 3, 5のRF, 2, 4, 6のジストロフィン陰性筋線維何れもエクソン45が欠失している.

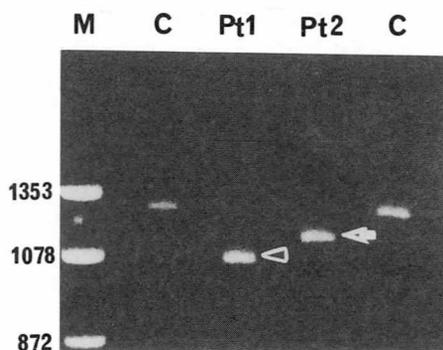


図4 ジストロフィンmRNAのRT-PCRの例 4% polyacrylamide gel 使用 lane 1-4はRT-PCRによりcDNAを後nested PCRを行っている. Pt 1; エクソン45欠失, Pt 2; エクソン50欠失, C; control lane. Pt 1, 2では各々の欠失に対応した短いcDNAが増幅されている.

PCR解析ではジストロフィンDNAの欠失に一致した短いcDNAが増幅された(図4).

3) RFでのジストロフィン免疫組織化学染色パターンはこれまでの報告同様, 欠失と一致した部位の抗体では陰性であったがその他の部位を認識する抗体では染色され, RFのDNA解析の結果と一致するものであった. また, 一部の抗体では, 染色性がBMDで観察される faint & patchy patternを呈した. 連続切片にて検索したジストロフィン関連タンパク質はRFの約80%で陰性であった.

4) RFの出現頻度は42例中35例で1%以下と少数であったが比較的年齢の高い患者群で多数認める例があった(図5).

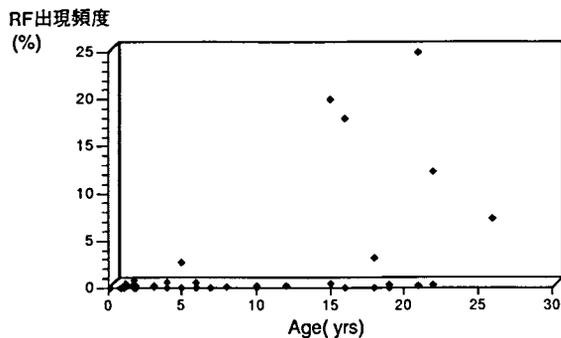


図5 RFの出現頻度と患者年齢の相関

### 考 察

今回検索したRFには免疫組織化学的にジストロフィンが存在するがPCR解析ではジストロフィン陰性の筋線維と同じエクソンの欠失を認めゲノムDNAの修復はないこと、体細胞モザイシズムではないことが解った。DMD保因者1例で行ったPCR解析ではジストロフィン陽性の線維では欠失を認めず、メチル化を受けて不活化したX染色体からはPCR増幅が行われない可能性が示唆された。今回行ったRT-PCR, nested PCR産物のシーケンスでは欠失に一致した out-of-frame のcDNAが確認されたが、RFは欠失部位の下流にあたる領域を認識する抗体でも染色され in-frame のスプライシングが

併存する可能性が強いと考えられた。また、一部の抗体での染色性が faint & patchy pattern を呈したが、これはRFに存在するジストロフィンが不完全かつ不安定であるBMDでの染色性と共通しDNA変異を skip した短いジストロフィンの存在を裏付ける所見と考えられた。

### 文 献

- 1) Hoffman EP, Brown RH Jr, et al: Somatic reversion/suppression of the mouse mdx phenotype in vivo. *Journal of the Neurosciences* 99: 9-25, 1990.
- 2) Burrow K, Coover DD, et al: Dystrophin expression and somatic reversion in prednisone-treated and untreated Duchenne dystrophy. *Neurology* 41: 662-666, 1991.
- 3) Klein JK, Coover DD, et al: Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD): Evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers. *Am J Hum Genet* 50: 950-959, 1992.
- 4) Roberts RG, Barby TFM, et al: Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am J Hum Genet* 49: 298-310, 1991.

# 13) ジストロフィンにおける体細胞モザイシズム

齋藤 加代子\*

研究協力者 池谷 紀代子\* 近藤 恵里\* 原田 隆代\*  
山内 あけみ\* 小峯 聡\* 佐久間 泉\*  
小峯 真紀\* 大澤 真木子\* 宍倉 啓子\*  
鈴木 陽子\* 福山 幸夫\*

Duchenne 型および Becker 型筋ジストロフィー (DMD/BMD) 患者の遺伝子変異, ジストロフィン異常, 臨床症状との関連を解明することにより, genotype と phenotype の関係やそれらの heterogeneity を明らかにしていくことを我々の研究目標の 1 つとしている. DMD/BMD の変異を人類遺伝学, 発生生物学的見地から考察することも重要なことであると考えている.

遺伝子モザイクとは, 個体が遺伝子構成の異なる 2 種以上の細胞群からなる場合をいう. 発生途上の細胞群の 1 つに遺伝子の突然変異が起こることによって生じる. 体細胞に生じる場合を体細胞モザイシズムという.

生前にリンパ球由来の DNA 検査で DMD と診断していた 1 症例において, 剖検時に得られた各臓器で DMD 遺伝子およびジストロフィンレベルで体細胞モザイシズムを証明したので, 発生学的考察と revertant との関連の考察を行った.

## 症例と方法

症例: 4 歳時に転びやすいことを主訴に, 他院を受診し, 骨格筋生検にて DMD と診断された. 6 歳まで早歩き可能, 10 歳より歩行不能, 車イスとなった. 7 歳 11 か月に行った IQ テストは鈴木ビネー式で 98, 知能障害を認めない. 21 歳 6 か月の肺炎罹患時より夜間に体外式人工呼吸装置を使用した. 在宅にて療養するも次第に装着時間は増加し, 22 歳 10 か月, 呼吸不全にて死亡した.

方法: 生前の DNA 検査は血液よりリンパ球を分離して, DNA を調製し, DMD の cDNA プローブを用いた Southern blot 法により遺伝子変異を同定した. また polymerase chain reaction (PCR) 増幅法によって, プロモーターの変異も調べた.

剖検時に採取した筋組織に抗ジストロフィン抗体を用いた免疫蛍光抗体法を施行した.

各臓器より DNA を調製し, multiplex PCR を行った.

## 結 果

1) DNA 検査: 18 歳時, 血液よりリンパ球を分離して, Southern blot 法による遺伝子診断を行い, エクソン 1-7 の欠失を認めた. 母親, 姉ともに, 遺伝子欠失を示さず, 患者は new mutation であろうと推定した. PCR によってプロモーター領域の変異を調べたところ, 筋型プロモーターとさらに上流の脳型プロモーターの欠失を示していた<sup>1)</sup>.

2) 剖検臓器のジストロフィンと DNA 検査: 呼吸不全にて本症例が死亡し, 剖検時に採取した筋組織に抗ジストロフィン抗体を用いた免疫蛍光抗体法を施行した (図 1, 2). 舌筋では抗スペクトリン抗体では細胞膜にスペクトリンが認められるが, ジストロフィンは細胞膜に陰性であった. 肋間筋, 腸腰筋でもジストロフィンは陰性であった. しかし, 胸鎖乳突筋ではジストロフィン陽性細胞と陰性細胞がグループとして認められた. 心筋ではジストロフィン陰性細胞の中に陽性細胞群が島状に存在していた. 横隔膜は全ての細胞はジストロフィン陽性であった. 各臓器より DNA を調製し, multiplex PCR を行った. 胸鎖乳突筋, 側頭筋, 横隔膜, 腎臓由来の DNA では DMD 遺伝子の欠失を見いだせなかった (図 3). 脳型プロモーター, 筋型プロモーターに関しても, PCR では胸鎖乳突筋, 側頭筋, 横隔膜, 腎臓由来の DNA において DMD 遺伝子の欠失を見いだせなかった (図 4). 抗ジストロフィン抗体を用いたイムノブロット法では側頭筋, 胸鎖乳突筋, 腸腰筋で約 400kD, 横隔膜, 腹直筋で 380kD のバンドが認められた (図 5).

## 考 察

この症例は体細胞モザイシズムであると考えられる. 本症例の成り立ちについて以下のように考えた (図 6). 患者の両親の生殖細胞においては変異がなかったが, 受精後のある時期, しかも器官形成以前の時期に DMD 遺伝子の突然変異が生じ, その後の細胞分裂によって, ジストロフィンの陽性細胞群と陰性細胞群がモザイク状に

\*東京女子医科大学小児科

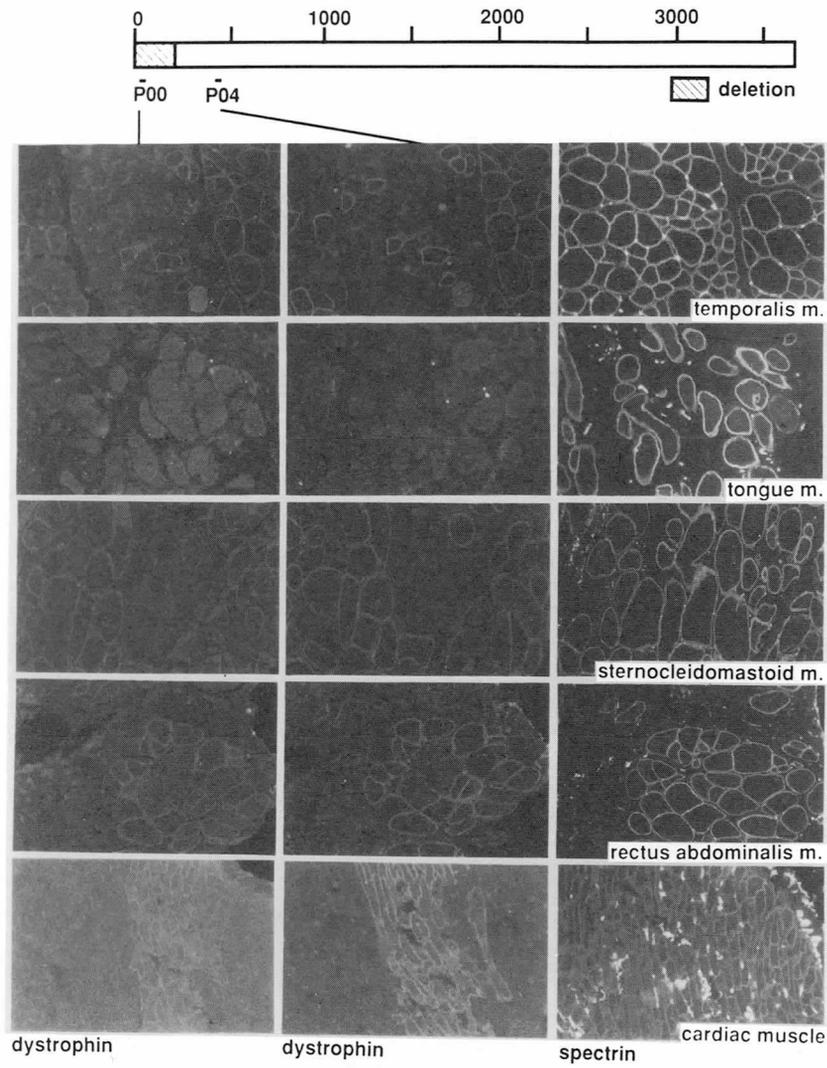


図1 剖検時に採取した筋組織の免疫蛍光抗体法によるジストロフィンとスペクトリン

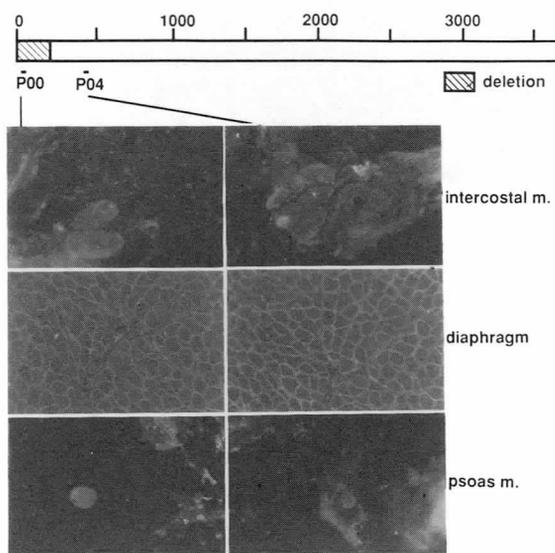


図2 剖検筋のジストロフィン

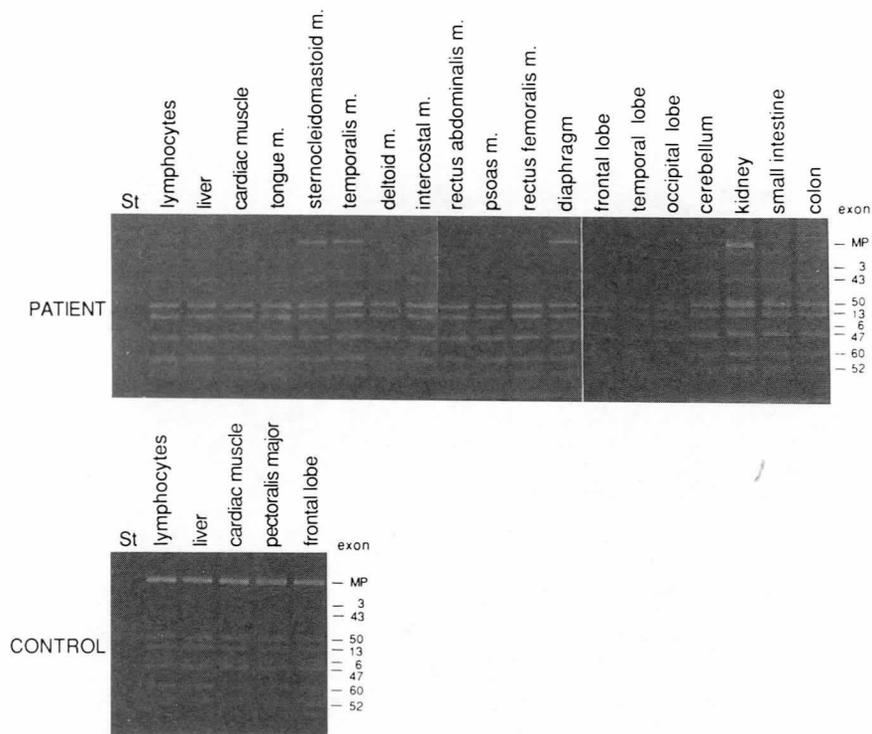


図3 各臓器由来のDNAにおける multiplex PCRによる遺伝子部分欠失

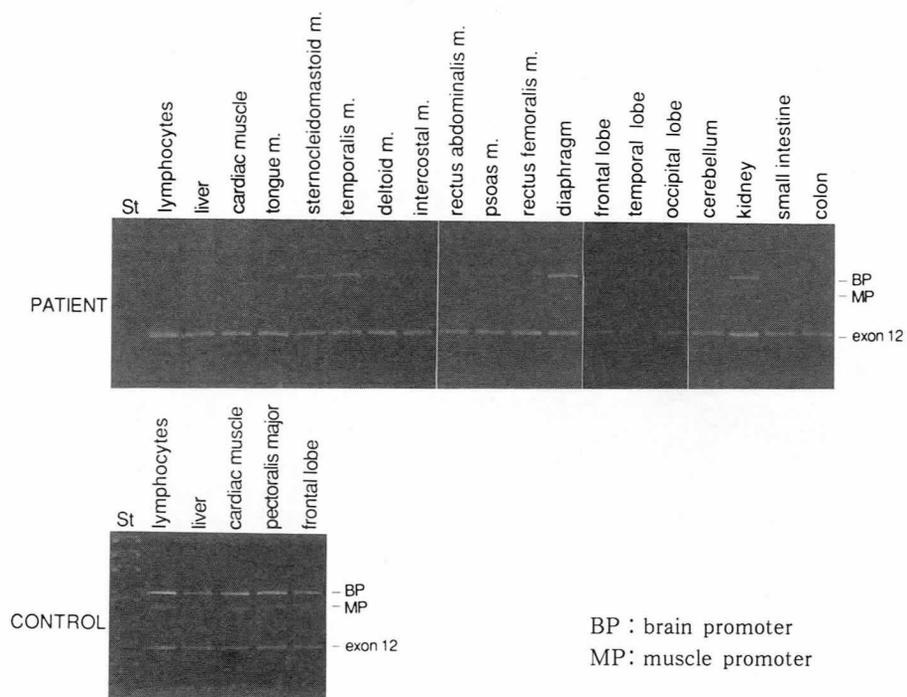


図4 PCRによる脳型，筋型プロモーターの欠失．内部標準としてエクソン12を同時に増幅した．

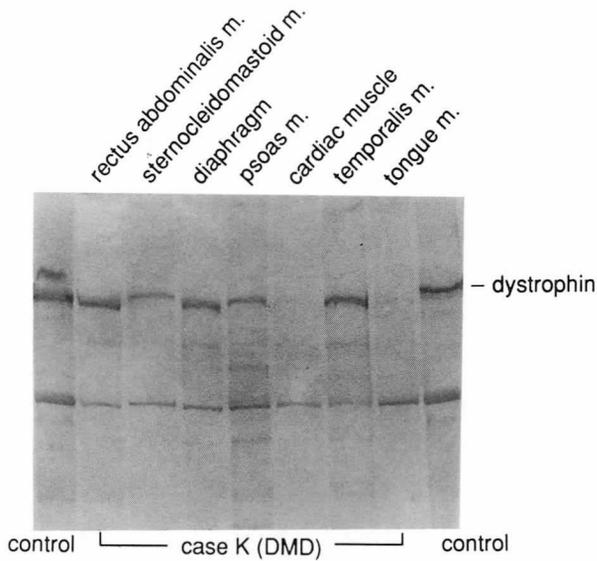


図5 剖検筋における抗ジストロフィン抗体を用いたイムノブロット法

配列した。各組織において陰性細胞と陽性細胞の分布の割合の差によって、ジストロフィーの変化が多様になっているのであろう。

DMD/BMDの骨格筋において、revertant fiberを示す症例が認められる<sup>2)</sup>。その機序の1つとして体細胞モザイシズムが考えられているが、revertant fiberの発生メカニズムを考える上で、本症例のような体細胞モザイシズムの証明できる例は興味深いと考えた。

#### 文 献

- 1) 斎藤加代子, 佐久間泉, 山内あけみ, 原田隆代, 池谷紀代子, 森田玲子, 福山幸夫: 筋ジストロフィー

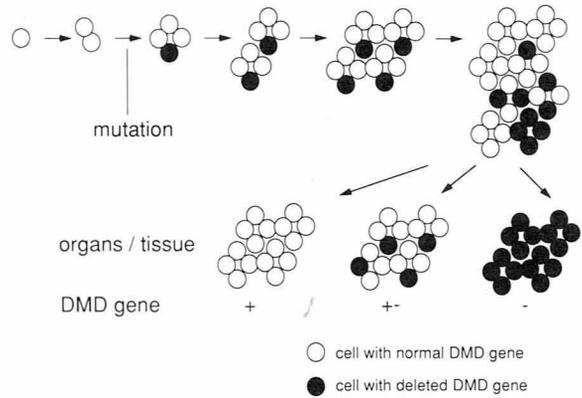


図6 本症例における体細胞モザイシズムの成立機序

におけるジストロフィンの脳型及び筋型プロモーターの検討. “厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー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4年度研究報告書, 1993, pp153-156.

- 2) Klein CJ, Coovert DD, Bulman DE, Ray PN, Mendell JR and Burghes AHM: Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD): Evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers. Am J Hum Genet 50: 950-959, 1992.

# 14) 福山型先天性筋ジストロフィー遺伝子は 9q31-33に存在する

戸田 達史<sup>\*,\*\*,\*</sup>

研究協力者 金澤 一郎<sup>\*\*</sup> 中村 祐輔<sup>\*</sup> 高木 昭夫<sup>\*\*</sup>

## 要 旨

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) の病因を解明する第一歩として、主にホモ接合性マッピングの方法を用いて連鎖解析を行い、FCMD 遺伝子座を明らかにすることを試みた。近親婚13家系を含む21家系58名を対象にし、マイクロサテライトDNA多形マーカーを用いて各人のアレルを決定し、LINKAGEプログラムにて解析した。その結果、第9番染色体長腕31-33に存在するマーカーD9S58, D9S59, HXBにて有意な連鎖を認めた。さらに多点連鎖解析により、FCMD 遺伝子座は、D9S58とD9S59の間の約8 cMの領域に置かれた。これらのマーカーはFCMD家系において、出生前診断、発症前診断、保因者診断に有用なだけでなく、FCMD原因遺伝子単離へむけての重要なアンカーポイントとなると考えられる。

## はじめに

Duchenne型筋ジストロフィーの遺伝子産物であるジストロフィンが、ポジショナルクローニングにより発見されて以来、筋ジストロフィーの病態解明とその治療的アプローチに向けて、精力的な研究が行われている。

福山型先天性筋ジストロフィー<sup>1)</sup> (Fukuyama type Congenital Muscular Dystrophy, FCMD) は、先天性筋ジストロフィーに、知能障害や痙攣発作などの中枢神経症状を伴う常染色体性劣性遺伝をとる特異な疾患であり、1960年福山らにより一臨床単位として提唱されたものである。本症は骨格筋の広範囲な筋ジストロフィー病変のみならず、小多脳回を基本とする高度の脳奇形(神経細胞遊走障害)が必発である。

日本人の筋ジストロフィーとしては、すでに遺伝子が発見されているDuchenne型筋ジストロフィーに次いで多く、その発生率は10万人当り2~4人、一般集団において約100人に1人が保因者である。

患児は生後1年以内に筋緊張低下、筋力低下にて発病

する。運動障害はDuchenne型より重症で、通常、起立歩行能力を獲得せず生涯歩行不能であり、また同時に高度の知能・言語発達遅延を伴い、全面的な介護を必要とする。決定的な治療法はない。本症患者の運命はDuchenne型筋ジストロフィー患者のそれより更に悲惨である。

このように日本に多く、悲惨な病気であるにもかかわらず、Duchenne型に比べ本態はほとんどわかっておらず、一日も早い病態の解明が望まれている。またさらに、なぜ脳と筋肉が同時に障害されるのかも不明であるが、両者とも発生異常を示しており、FCMDの原因遺伝子を追求することは、筋ジストロフィーの病態を考えるだけでなく、脳や筋肉の正常の発生を考える上でも重要なことである。

我々はFCMDの原因遺伝子を追求する第一歩として、おもに近親婚を利用した解析法(ホモ接合性マッピング)を用いてFCMDの連鎖解析を行った。そしてFCMD遺伝子を第9番染色体長腕31-33にマップした<sup>2)</sup>のでここに報告する。

## 対象と方法

ホモ接合性マッピングの原理を示す<sup>3)</sup>。図1のように、常染色体劣性遺伝病の場合、いとこ婚家系で、仮にある共通祖先の片方の染色体にFCMD変異(ここではFとし、正常をプラスとする)をもつとすると、その一つのFが両側に伝わり、患者ではじめてF、Fのホモになり病気が出現する場合が多く考えられる。その疾患遺伝子にごく近いマーカーのアレルが仮に1である場合、近くて組み換えがおきにくいので、この1はFとともに動いて患者において同祖ホモになる。逆に言えば近親婚により生まれた患者において、常にホモとなるようなマーカーを探せば、それは原因遺伝子に近いことが示唆されるわけである。しかし正常日本人の多くがホモとなるような、すなわちheterozygosityが低いマーカーでは、FCMDと連鎖していなくてもホモになるので、マイクロサテライト多型DNAマーカーのような多型性の高いものが必要である。

\*癌研究会癌研究所生化学部

\*\*東京大学医学部脳研神経内科

\*\*\*虎の門病院神経内科

\*\*\*\*現)東京大学医学部人類遺伝学

故に我々は、日本中からなるべく近親婚で生まれた患者と、また非近親婚でも遺伝学的に情報の多い兄弟例をおもに集め、マイクロサテライトDNA多形マーカーを用いて各人のアレルを決定し、LINKAGEプログラムにて連鎖解析を行った。図2に解析した家系を示すが、21家系58名（患者29名）中、13家系が近親婚であり、15人の近親婚患者を含む。

### 結果

さて近年 dystrophin は筋鞘膜の糖蛋白 (dystrophin-associated proteins, DAPs) と大きな oligomeric complex を形成し、Duchenne型では dystrophin とともにこれらの DAPs も崩壊し、筋細胞死につながるといわれている<sup>4)</sup>。さらに最近 Matsumura らはこの糖蛋白のうちとくに43 DAG の染色性が大きく低下していることを報告しており<sup>5)</sup>、また Hayashi らは、その外側の extracellular matrix である Laminin の muscle form である merosin の染色性が大きく低下していることを報告している<sup>6)</sup>。これらは FCMD の primary defect の一つの候補といわれている。

故に、連鎖解析を行う手がかりとして、FCMD筋で染色性の低下している糖蛋白である43DAGをコードする遺伝子<sup>7)</sup>が、3p21にマップされているので、まず3p21に存在するマイクロサテライトマーカーを用いて解析を行ったが、有意な連鎖は認めなかった。また merosin 遺伝子はごく最近6q22-23にマップされたが<sup>8)</sup>、この時点では不明であった。もう一つは近親婚により生まれた FCMD 患者が色素性乾皮症A群 (XPA) を合併していたことである。この病気は9q32-34.1にマップされている<sup>9)</sup>。ここで我々は先程の図1でFに近いマーカーをXPAとおきかえてFCMDとXPAがごく近くて組み換わらず、一緒に両側へ伝わり患者でホモ、ホモとなって両者が合併した可能性を考えた。

そこで9番染色体長腕遠位端に存在するマイクロサテライトマーカー、D9S59 (ref.10) を用いて解析したとき近親婚患者において皆ホモであった (図2)。一方、非近親婚患者ではホモの割合は一般集団と同じであった。これは先ほどホモ接合性マッピングの原理のところ述べたように、このマーカーがFCMD遺伝子と近いことを意味している。

さらにLINKAGEプログラムを用いて2点連鎖解析を行った。疾患遺伝子頻度は以前の報告に沿って0.0052とし<sup>1)</sup>、近親婚はループを中断して、double individualを想定した。このマーカー-D9S59で組み換え率2%で最大ロッド得点4.33を得た。さらにこの周辺のマーカーD9S58 (ref.10) でも6%で5.81, HXB (ref.11) でも9%で3.28と有意な連鎖を認めた (表1)。

これらのマーカーは蛍光 *in situ* hybridization 法によ

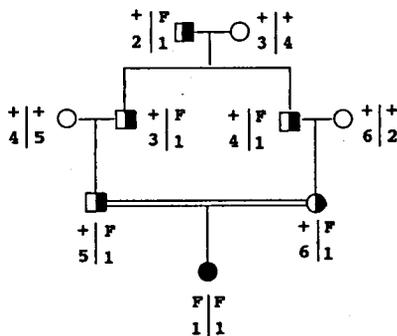


図1 Principle of homozygosity mapping. Hypothetical inbred pedigree demonstrating cosegregation of a disease (with 2 alleles d and +) with an informative DNA marker (with 6 alleles). The patient has inherited two copies of an identical chromosomal fragment from her great grandfather.

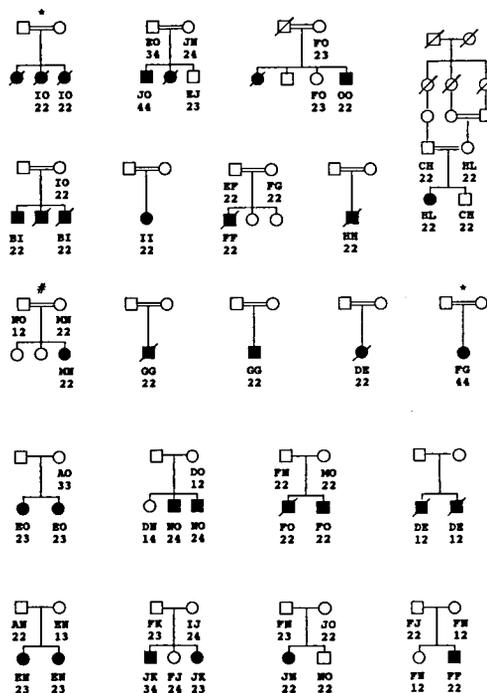


図2 Pedigrees of 21 FCMD families showing disease status and segregation of the two closest markers, D9S58 (top) and D9S59 (bottom). Alleles for D9S58 are: A, 147 bp; B, 145 bp; C, 143 bp; D, 137 bp; E, 135 bp; F, 133 bp; G, 131 bp; H, 129 bp; I, 127 bp; J, 125 bp; K, 123 bp; L, 121 bp; M, 119 bp; N, 117 bp; O, 115 bp. Alleles for D9S59 are: 1, 116 bp; 2, 114 bp; 3, 112 bp; 4, 96 bp. Solid symbols represent affected subjects, and a slash indicates that the subject is deceased. '\*' and '#' indicate second-cousin marriage and first and half-cousin marriage, respectively; other consanguineous marriages are first-cousins.

表1 Pairwise lod scores of chromosome 9 markers with FCMD

Marker	Recombination fraction ( $\theta$ )									
	0.00	0.01	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40	$\frac{1}{2}$	$\hat{\theta}$
D9S58	3.29	4.53	5.77	5.53	4.73	3.84	1.98	0.65	5.81	0.06
D9S59	$-\infty$	4.25	4.03	3.35	2.31	1.74	0.86	0.28	4.33	0.02
HXB	$-\infty$	1.21	3.00	3.27	2.96	2.44	1.33	0.46	3.28	0.09
D9S60	$-\infty$	-3.78	-0.83	0.24	0.57	0.59	0.30	0.06	0.63	0.17

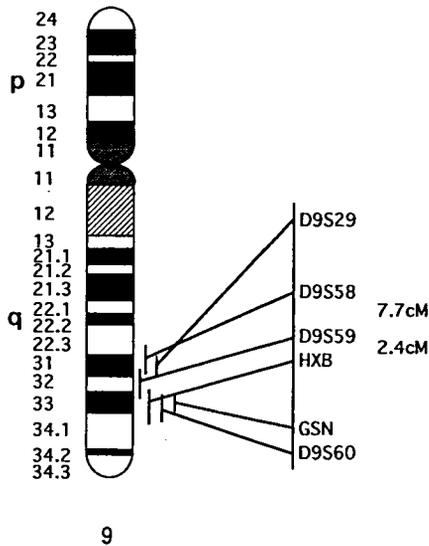


図3 Physical and genetic locations of markers on chromosome 9q.

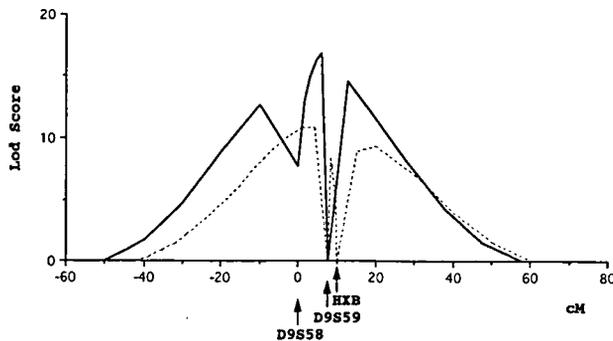


図4 Diagrammatic representation of the results of multipoint linkage analysis of three markers and the disease phenotype. Solid line, analysis using map of [D9S58-7.7-cM-D9S59]. Dotted line, analysis using map of [D9S59-2.4-cM-HXB].

り, 9q31-33にマップされている. D9S58とS59の間が7.7cM, S59とHXBが2.4cM離れている(図3).

さらにすでに公表されたデータから遺伝的距離を固定して, 病気のphenotypeと各マーカーとの間で多点連鎖解析を行った(図4). コンピューターソフトウェア上の制限から, 考えられるすべてのハプロタイプを数えることは不可能だったので, 連鎖の情報を損なわないように注意しておおのこのマーカーでのアレルの数を減らし, さらに2つのマーカーと病気, また別の2つのマーカーと病気との間で解析を行い, その2つを重ね合わせる形をとった. 実線はD9S58, S59とFCMD, 破線はS59, HXBとFCMDでの結果を示す. 実線の結果より, FCMD遺伝子は最大ロッド得点16.9でS58とS59の間に存在し, 破線の結果もこれを支持している. すなわち, FCMD遺伝子はD9S58とS59の約8cMの領域に存在すると思われる.

#### 考 察

我々はおもにホモ接合性マッピングを使って, FCMD遺伝子座を9q31-33に決定した. この方法は多数の患者を含む大家系がほとんどみられない常染色体性劣性遺伝病の連鎖解析に有用である. これらの連鎖しているマーカーは, FCMD家系において出生前診断, 発症前診断, 保因者診断に使えるだけでなく, Walker-Warburg syndrome, muscle-eye-brain diseaseのような類似の病気がallelicであるかを検討するのに有用であり, さらにFCMD原因遺伝子単離へむけての重要なアンカーポイントとなると考えられる. 今後はさらに症例を増やし, 有用なマーカーを増やして, この領域をせばめ, FCMD遺伝子の単離, 蛋白レベルでの解析へと進みたい.

## 文 献

- 1) Fukuyama Y, Osawa M and Suzuki H : Congenital muscular dystrophy of the Fukuyama type - clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev* 3 : 1-30, 1981.
- 2) Toda T, et al : Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nature Genet* 5 : 283-286, 1993.
- 3) Lander ES and Botstein D : Homozygosity mapping : a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236 : 1567-1570, 1987.
- 4) Ervasti JM and Campbell KP : Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66 : 1121-1131, 1991.
- 5) Matsumura K, Nonaka I and Campbell KP : Abnormal expression of dystrophin-associated proteins in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Lancet* 341 : 521-522, 1993.
- 6) Hayashi YK, et al : Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies. *J Neurol Sci* 119 : 53-64, 1993.
- 7) Ibraghimov-Beskrovnyaya O, et al : Human dystroglycan : skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosome localization. *Hum Mol Genet* 2 : 1651-1657, 1993.
- 8) Tryggvason K : The laminin family. *Current Opinion in Cell Biology* 5 : 877-882, 1993.
- 9) Tanaka K, et al : Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature* 348 : 73-76, 1990.
- 10) Kwiatkowski DJ, et al : Construction of a GT polymorphism map of human 9q. *Genomics* 12 : 229-240, 1992.
- 11) Ozelius L, et al : Dinucleotide repeat polymorphism for the hexabrachion gene (HXB) on chromosome 9q32-34. *Hum Mol Genet* 1 : 141, 1992.

### Ⅲ. 遺伝子 (Part 2)

# 15) 筋緊張性ジストロフィー — CTG リピートの増大に関する臨床遺伝学的研究 —

辻 省 次\*

研究協力者 江口郁代\* 小池亮子\* 小野寺 理\*  
田中恵子\* 近藤 浩\*\* 中島 孝\*\*\*  
福原信義\*\*\* 新田初美\*\*\*\* 東條 恵\*\*\*\*  
山形崇倫† 桃井真里子†

## はじめに

本症の原因遺伝子は、David Brookらをはじめとする複数のグループにより、1992年に明らかにされた<sup>1)3)</sup>。これは19番染色体長腕の13-3領域に位置し、塩基配列の解析から、cyclic AMP dependentのprotein kinaseに相補性が高い領域が存在し、リン酸化機能を有する蛋白をコードしているのではないかと推定されている。このmyotonin-protein kinase遺伝子の3'非翻訳領域にCTGの3塩基繰り返し構造が存在し、その数は健常者においても5から36と変動があり、患者では50以上、ときに3,000コピー以上にまで達し、これが本症の病因と密接に関連していると考えられている。昨年は、この遺伝子不安定領域が増大するほど発症年齢が早くなる傾向があること、40~45歳での日常生活動作でみた筋力の重症度や知的機能の重症度と良く相関することを報告した。

今回は従来からの臨床遺伝学的観察から知られているanticipationとリピートの増大がどう関連しているか、また先天性筋緊張性ジストロフィーの発症機序においてリピートの増大がどの程度関連するかについて検討した。

## 対象と方法

対象は生後4カ月から81歳までの女性32名、男性25名の患者57名である。母子症例は17組で、このなかに先天型10組を含む。父子症例は7組である。遺伝子解析は次のように行った。患者白血球のゲノムDNAを常法により抽出し、制限酵素Pst Iで消化した後、アガロースゲルに電気泳動しニトロセルロース膜にトランスブロットした。これを<sup>32</sup>Pでラベルしたプローブでサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブはDr. Brookより

供与されたpM10M-6をさらに制限酵素Hinc IIで消化しCTGの繰り返し構造を除いて使用した。使用酵素Pst Iを使用することで100塩基対程度の軽度のリピート増大の検出は容易となる。また、よく使用されるのはEcoR Iであるがこの消化で見られるような挿入欠失多型部位を含まないため、より正確な評価が可能である。異常バンドはsmearとなって増大するためこの中間値をとり、これから正常バンドとして認められる1.1キロ塩基対を引いた値をCTGリピートの増加値とした。

## 結 果

1. 親子間のCTGリピート増大程度を検討した。22組のうち、子の方が減少していたのは1組の母子例である。他の21組で子の世代でさらなる増大が認められた。図1に父から子、母から子へのリピートの増加値を比較した。父子間でのリピートの差は $2.20 \pm 1.43$  (M $\pm$ SD) キロ塩基対、母子は $1.60 \pm 1.31$  キロ塩基対であった。有意差は認められなかったが、父から子に伝わる過程で増大程度は強い傾向にあった。

2. 患者親子の発症年齢とリピート増大の関連について8組で検討した。発症年齢はミオトニア、または筋力低下を最初に自覚した年齢とした。8組の親子で発症年齢は子の世代では $29.0 \pm 1.97$  (M $\pm$ SD) 歳早くなっていた。一方リピート増大は、子の方がむしろ減少していた先の母子症例を除いた7組で、子の世代でさらに増大し、この増大差の平均は $1.74 \pm 0.28$  (M $\pm$ SD) キロ塩基対だった。図2に、親子間でのリピート差と発症年齢の差を示す。x軸に各親子でのリピート増大の差を、y軸に発症年齢の差をとっているが、危険率10%以下で、親子のリピート差が大きくなるほど発症年齢の差も広がる傾向にあるということができた。

3. 子の世代でのリピート増大とIQ scoreの関連を検討した。全例の親が社会生活上支障のなかったのに対し、子はほとんどが特殊教育を必要とする程度のつよい知能

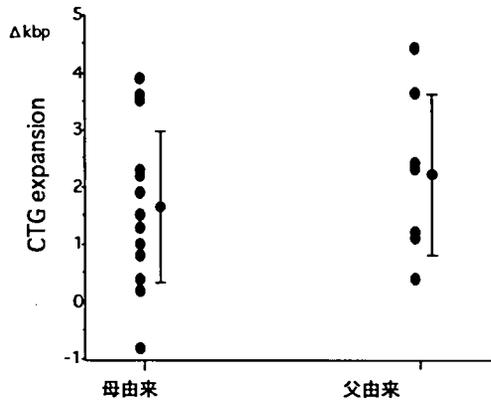
\*新潟大学脳研究所神経内科

\*\*国立療養所新潟病院神経内科

\*\*\*国立療養所犀潟病院神経内科

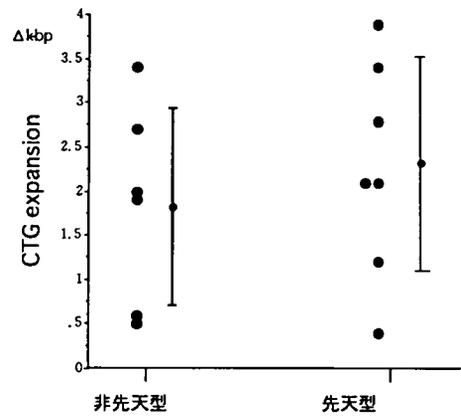
\*\*\*\*新潟県立はまぐみ小児療育センター小児科

†自治医科大学小児科



母由来 M±SD=1.60±1.31 (キ口塩基対) n=16  
 父由来 M±SD=2.20±1.43(キ口塩基対) n=7

図1 親子間のCTGリピートの増大差



非先天型 M±SD=1.85±1.14 (キ口塩基対) n=6  
 先天型 M±SD=2.37±1.23 (キ口塩基対) n=7

図4 非先天型と先天型の子をもつ母のCTGリピート増大

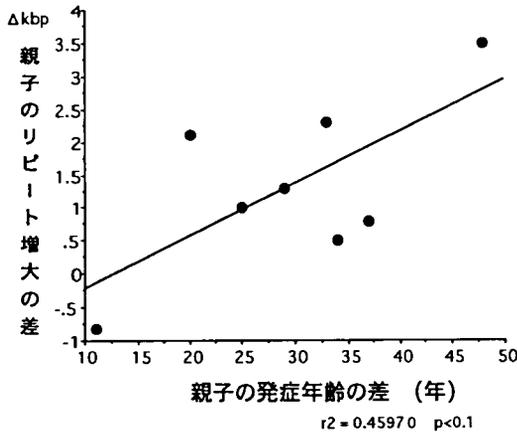


図2 親子のリピート差と発症年齢の差

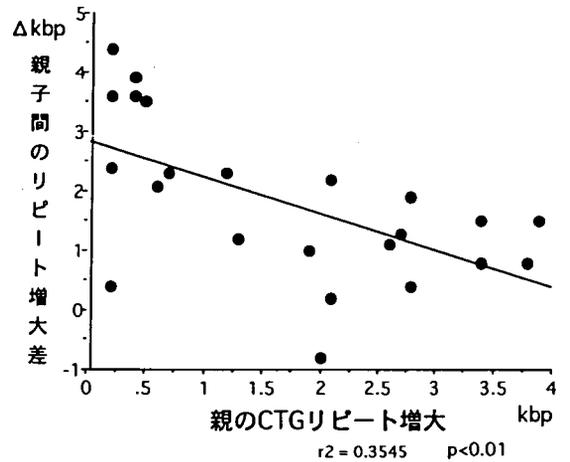
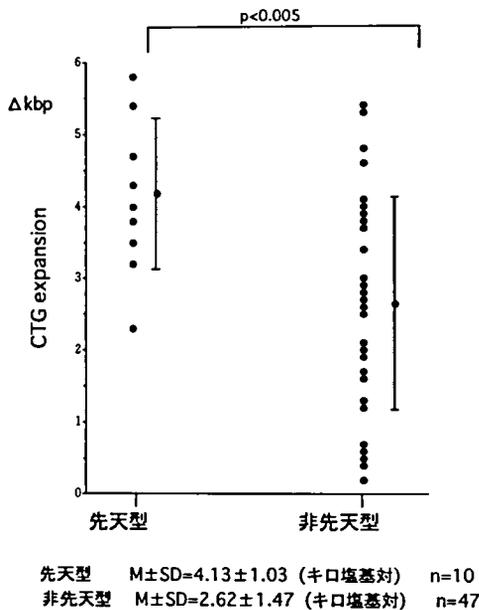


図5 親のCTGリピート増大と次世代への増幅の程度の間連



先天型 M±SD=4.13±1.03 (キ口塩基対) n=10  
 非先天型 M±SD=2.62±1.47 (キ口塩基対) n=47

図3 先天型、非先天型のCTGリピート増大

低下を示しIQの平均値は75±12 (M±SD)であった。リピートが増大するほどIQ scoreが低下する傾向が認められた。

4. 先天性筋緊張性ジストロフィーの発症機序においてリピートの増大がどの程度関連するかについて検討した。先天性筋緊張性ジストロフィーは、胎児期の羊水過多、発育不全に始まり、出生直後の横隔膜挙上を伴う呼吸不全、哺乳障害、全身の hypotonia、顔面脱力筋脱力に特徴付けられる。これらはやがて軽快し、思春期以降に成人型で発症する。我々は病歴から、明らかに新生児期に呼吸不全、哺乳障害、全身の hypotonia を呈したものを先天型とした。我々が経験した症例は全て母親が発症者の場合であった。図3に示すように先天型のリピートの平均値は4.13±1.03 (キ口塩基対) で非先天型の2.90±1.47 (キ口塩基対) に比べ、t検定により危険率0.5%で有意に増加しているといえた。しかし先天型、非先天

型ではオーバーラップする症例もかなり認められた。

一方患者である母親について、非先天型の子を持つ母親と、先天型の子を持つ母親のレポートを比較したが、図4に示したように明らかな差は認められなかった。

5. 最後に親のCTGレポートと次世代への増幅程度との関連をみた。図5はX軸に親のCTGレポート値を、Y軸に各親子間でのレポートの差を示している。これより、親のCTGレポートが小さいほど、次世代での増幅の程度は強くなり、逆に親のレポートが大きいほど子のレポートとの差が小さい傾向が認められた。

### 結 論

筋緊張性ジストロフィー親子の臨床症状とCTGレポートについて検討した。CTGレポートは子の世代で1組を除いて更に増大していた。しかし、この母子例も含めて発症年齢は、全て子の世代で早くなっていた。親子のレポート差が大きいほど発症年齢の差も広がる傾向にあったことは、親の発症年齢と親子のレポート差をもとに、子の予後がある程度予想できることを示した。また、親のCTGレポートが軽度の場合は、その子のレポートは大きく増幅する傾向を示したが、軽症の親であっても次世代には重症化する可能性の十分あることが明らかになった点、今後の遺伝相談において重要な問題となろう。

先天性筋緊張性ジストロフィーの発症機序にはCTGレポートの増大が関与していることは明らかである。し

かし、先天型は同胞発症が多いと指摘されていること<sup>9)</sup>、先天型と非先天型のCTGレポートはオーバーラップしている症例もあること、先天型の子を持つ母親のCTGレポートが、必ずしも非先天型の子を持つ母親のCTGレポートに比べて大きいとはいえないことから、以前から言われている胎内環境などの他の要因も大きく関与する可能性があると思われた。従って、本症の最重症型である先天型に対しての遺伝子による出生前診断には慎重を要する。

### 文 献

- 1) Brook JD, McCurrach ME, et al: Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase member. *Cell* 68: 799, 1992.
- 2) Fu Y-H, Pizzuti A, et al: An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255: 1256, 1992.
- 3) Buxton J, Shelbourne P, et al: Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 355: 547, 1992.
- 4) Koch MC, Grimm T, et al: Genetic risks for children of women with myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 48: 1084, 1991.

# 16) 筋緊張性ジストロフィー症関連遺伝子の脳内発現の検討

後藤 幾生\*

研究協力者 古谷 博和\* 小林 卓郎\* 林 健志\*\*

## はじめに

筋緊張性ジストロフィー症(以下MyDと略す)は近年ミオトニンカイネース遺伝子(以下MK遺伝子)3'非翻訳領域の(CTG)繰り返し配列の延長が疾患発症およびその症状の程度と関連していることが解明され、実質上の遺伝子診断も可能となっている<sup>1)</sup>。しかしMK遺伝子自体の機能、その組織別の発現に関してはいまだに不明であるとともに、常染色体優性の発現形式をとるMyDと、(CTG)繰り返し配列延長のメカニズムとの関連も現在までのところ全く解明されていない。これらの解析を行うための第一歩として、我々はMyDで筋組織同様に病変の認められる中枢神経系に関して、MK遺伝子のallele別の発現を検討したので報告を行う。

## 対象・方法

### 1) ゲノムDNAおよびtotal RNAの抽出

MK遺伝子ハプロタイプ解析のためのゲノムDNAは、MyD患者末梢白血球(9例)および-20℃で凍結保存されたMyD剖検脳(4例)から抽出した。またコントロールとして、正常人の末梢白血球(18例)および、凍結保存されたアルツハイマー病(以下AD)患者剖検脳(4例)、正常人脳(2例)からゲノムDNAを抽出した。またこれと同時に、凍結脳サンプルからはtotal RNAを抽出し、RT-PCRによるmRNA発現量解析に用いた。

### 2) SSCP法およびダイレクトシーケンシング法によるポリモルフィズムの検出

MK遺伝子のエクソン内に存在するポリモルフィズムをSSCP法<sup>2)</sup>によって検出し、そのハプロタイプを解析することでalleleを区別することにした。

MK遺伝子は全長約10kbで、15個のエクソンから形成されている<sup>3)</sup>。このうちの転写開始コドンより下流の部分のエクソン内のポリモルフィズムを検出するために、エクソン領域が約200~400bpの長さで特異的に増幅出来るよう、エクソン、イントロン接合部位近くのイントロン内に25個のプライマーを設計した。

次に、MyDおよび正常コントロールのゲノムDNAを

テンプレートとしてそれぞれのエクソン領域を [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTPでラベルしてPCR後、5%グリセロールを含むアクリルアミドネイティブゲルでPCR産物を分離して、その移動度の違いによりポリモルフィズムの有無を正常人コントロールとMyD群との間で比較検討した(SSCP法)<sup>2)</sup>。その結果として移動度の違いが見いだされた場合には、SSCP-PCRに用いたのと同じプライマーを用いて正・逆両方向から塩基配列を決定して、ポリモルフィズムの部位を同定した。

またこのようにして同定されたポリモルフィズムのうち、RFLPであるものは制限酵素を用いて、そうでないものについてはSSCP法を用いて正常コントロール群およびMyD群の解析を行い、allele frequencyの算出を行った。

### 3) RT-PCR法によるallele別mRNA発現量の解析

このようにして解析したサンプルのうち、エクソン内のポリモルフィズムをヘテロで有する凍結脳サンプルに関して、RT-PCR法によるallele別mRNA発現量の比較定量を試みた。

まず、延長した(CTG)繰り返し配列のあるalleleとポリモルフィズムとの関連を調べるために、ポリモルフィズムをヘテロで有する凍結脳サンプルのゲノムDNAを制限酵素Hind III, Xba Iで処理してサザンブロッティングを行い、延長した(CTG)繰り返し配列の

表1 Allele frequency of polymorphism

[Intron IX]		
	G	T
MyD		
Japanese (13 members)	17 (0.8)	9 (0.2)
CNT		
Japanese (20 members)	20 (0.5)	20 (0.5)
Cocasian <sup>(3)</sup>	(0.47)	(0.53)
[Exon X]		
	C	G
MyD		
Japanese (13 members)	22 (0.85)	4 (0.15)
CNT		
Japanese (20 members)	36 (0.9)	4 (0.1)
Cocasian <sup>(4)</sup>	(0.85)	(0.15)

\*九州大学医学部脳研神経内科

\*\*九州大学医学部遺伝情報実験施設・ゲノム解析部門

サイズを同定した後に、同時にゲル電気泳動を行ったサンプルから正常 allele 周辺 (5.8kb) を切り出し、ポリモルフィズム周辺の領域 (257bp) を増幅した後にポリモルフィズムの有無を検出して、ポリモルフィズムが延長した (CTG) 繰り返し配列のある側か、正常の allele の側にあるかを検討した。

次に cDNA 合成キット (ファーマシア社) を用いて、total RNA より cDNA を合成した後、これをテンプレートとしてポリモルフィズム周辺の領域 (257bp) を [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP でアイソトープラベルして 40 サイクルの PCR を行った。

5 サイクルごとに一部のサンプルを取り出し、ポリモルフィズムを認識する制限酵素 (*Bsr* I) で切断して 10% アクリルアミドゲルで電気泳動後オートラジオグラフィを行い、バンドの濃度をデントメーターで測定することによって、正常群と MyD 患者群との間の mRNA 発現量の差異を比較した。

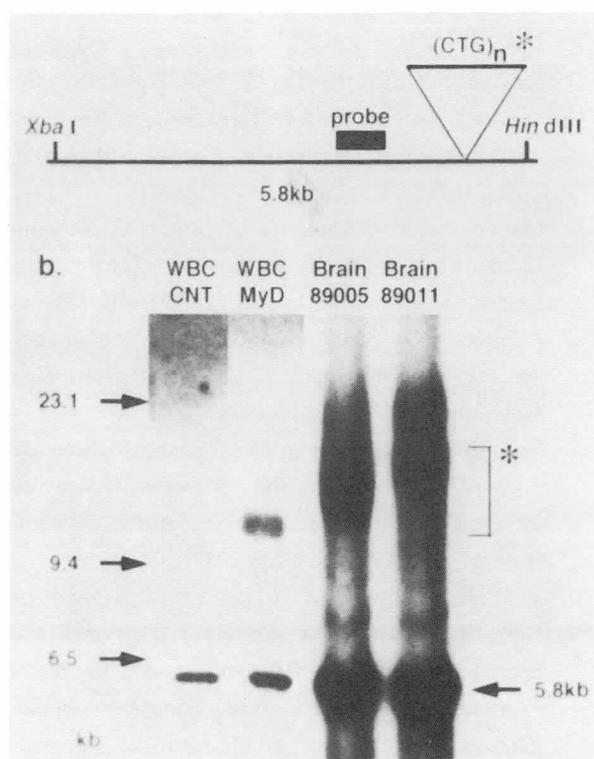


図1 MyD患者のDNA診断. 正常人, MyD患者末梢血, MyD患者脳組織から抽出したゲノムDNAを制限酵素 *Xba* I, *Hind* III で処理後, MK遺伝子イントロン10をプローブとしてサザンブロットを行った. MyD患者では正常 allele の 5.8 kb バンドに加えて, (CTG) 繰り返し配列の延長した allele (\*で示す) のバンドが認められる.

## 結果・考察

### 1) MK 遺伝子エクソン内ポリモルフィズムの検出

日本人 MyD 患者 13 例を SSCP 法とダイレクトシーケンシング法により解析した結果, 第 10 エクソン (G → C; Val → Leu) と第 9 イントロ (T → G) の中に既報のポリモルフィズムがそれぞれ 1 個ずつ確認された. このうちエクソン内のポリモルフィズムは変異型 (C; Leu) の場合が制限酵素 *Bsr* I の認識部位に相当しており, この制限酵素を用いることで容易に変異が同定された. 一方イントロン内の変異は SSCP 法により同定可能であった. これにより算出された allele frequency は表 1 に示したが, エクソン内の変異は日本人 MyD 患者群, 正

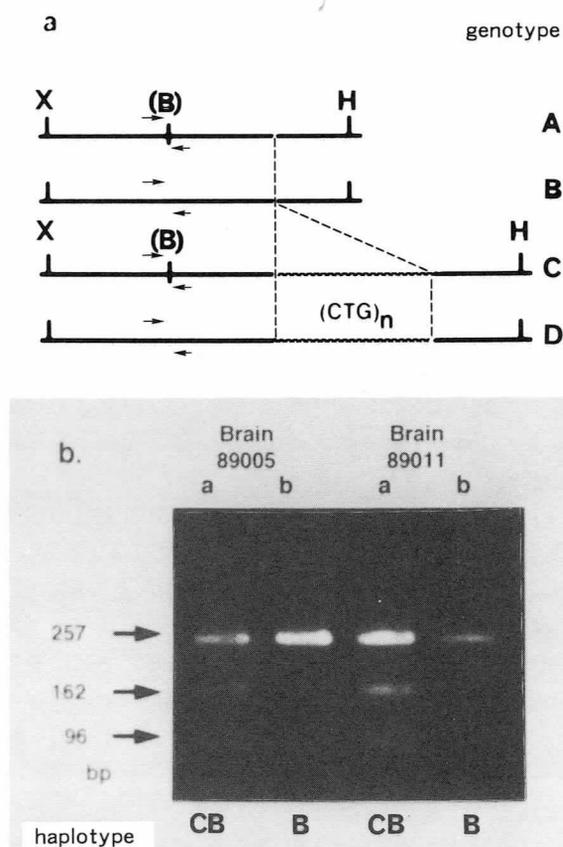


図2 (CTG) 繰り返し配列と *Bsr* I RFLP との相関. MyD 患者の DNA 診断と同様にしてアガロースゲル電気泳動を行い, 正常 allele の 5.8 kb バンドをゲルから切り出した後に *Bsr* I RFLP を含む領域 (矢印で示した) を PCR で増幅後, *Bsr* I で処理した. MyD 患者脳組織から抽出したゲノム DNA をテンプレートとしたものをレーン a, 切り出した正常 allele の 5.8 kb バンドをテンプレートとしたものをレーン b に置いた. その結果, この 2 例の正常 allele は, (a.) の genotype B に相当することがわかる. 従って延長した (CTG) 繰り返し配列のある allele は, genotype C に相当すると考えられた.

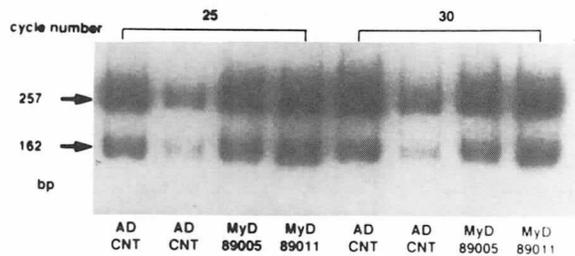


図3 allele別MK遺伝子mRNA発現量の比較. RT-PCR後にBsr Iで処理した. 257bpのバンドが図2aのgenotype B, 162bpのバンドがgenotype Cに相当する. この2本のバンド濃度の比にコントロールとMyDとの間で有意な差は認められなかった.

常日本人群, Sabouri<sup>4)</sup>らによる正常人群の報告の間に大きな差はなく, この変異が遺伝子多型である可能性が高いと考えられた. 一方, イントロン内の変異では<sup>4)</sup>, 正常日本人群, 白人正常人群の報告の間ではほぼ(G/T=0.5/0.5)と大きな差はなかったのに対して, 日本人MyD患者群では(G/T=0.8/0.2)とやや偏りが認められた.

## 2) MK遺伝子のallele別発現の検討

MyD患者14名中6名にMK遺伝子エクソン上のBsr I RFLPが確認され, MyD剖検脳4例中2例がこの変異をヘテロで有していた. サザンブロッティングによる解析の結果, これら2例では7~10kbの(CTG)繰り返し配列の延長が確認された(図1).

また, (CTG)繰り返し配列とBsr I RFLPとの相関に関する解析の結果, とともに(CTG)繰り返し配列とRFLPとが同じallele上にあることが判明した(図2).

さらにこのRFLPをヘテロで有するコントロール3例(AD2例, 正常人1例)とMyD2例との間でMK遺伝子mRNA発現量を比較したが(図3), allele別の発現にコントロールとMyD患者との間で大きな差は認められなかった.

これまでに先天性筋緊張性ジストロフィー症の筋組織や, MyD患者の筋組織でMK遺伝子mRNAの発現量がallele別に検討されており, (CTG)繰り返し配列の延長があるallele側のmRNAの発現量が正常alleleに比べて増加することとMyD発症との相関が考えられている<sup>4)5)</sup>. しかし, 今回の我々の検討結果からは筋組織で認められたような明らかな差異は脳組織では認められなかった. この原因として, ①(CTG)繰り返し配列の延長があるallele側のMyD遺伝子の発現は組織別に異なること, ②MyDの中枢神経系での異常が筋組織ほど著明でない

ためにallele別の発現量の差も筋組織ほどでなく, RT-PCR法では定量しにくいこと, ③脳組織中でも灰白質と白質との間でallele別の発現に差異があり, 今回の方法ではその微妙な差異を検出できなかったこと, ④中枢神経系の異常は(CTG)繰り返し配列の延長と直接的には関連しないこと, などが考えられる.

近年MyD同様に(CTG)繰り返し配列の延長が病因となっていると考えられる疾患として, ハンチントン舞踏病, 脊髄小脳変性症, 脆弱X染色体症候群, 球脊髄性筋萎縮症, DRPLAなどがわかっているが, いずれの疾患でもその発症機序の解明はまだ行われていない. 今後MK遺伝子の組織・allele別の発現を検討することで, その発現制御に関与する因子を解明することが可能になると考えられ, ひいてはそれが疾患発症のメカニズムを解明する上で有力な手がかりになると予想される.

## 参考文献

- 1) Fu YH, Pizzuti A and Fenwick RG: An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255: 1256-1258, 1992.
- 2) Hayashi K: PCR-SSCP: A Simple and sensitive methods for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR: Methods and applications* 1: 34-38, 1991.
- 3) Mahadevan MS, Amemiya C, Jansen G, Sabourin L, Baird S, Neville CE, Wormskamp N, Sefers B, Batzer M, Lamerdin J, Jong P, Wieringa B and Korneluk RG: Structure and genetic sequence of the myotonic dystrophy (DM kinase) gene. *Hum Mol Genet* 2: 299-304, 1993.
- 4) Sabouri LA, Mahadevan MS, Narang M, Lee DS, Surh LC and Korneluk RG: Effect of the myotonic dystrophy (DM) mutation on mRNA levels of the DM. *Nat Genet* 4: 233-238, 1993.
- 5) Fu YH, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman MB, Scarlato G, Fenwick RJr, and *et al*: Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260: 235-238, 1993.

# 17) Ryanodine 受容体遺伝子突然変異の検討

高木 昭夫\*

研究協力者 小島 進\*\* 松村 多可\*\* 中瀬 浩史\*  
井田 雅祥\* 渡辺 知司\* 真先 敏弘\*

悪性高熱は、麻酔薬に起因する重篤な合併症で致死率が高い。その予防のためには麻酔前に本症の保因者であるか否かを的確に診断する必要がある。最近、常染色体性優性遺伝を示す本疾患の家系において、連鎖解析により責任遺伝子が第19染色体上のライアノジン受容体（筋小胞体カルシウム遊離チャンネル）遺伝子にあることが報告された<sup>1)2)</sup>。また悪性高熱を合併することの多いセントラルコア病においても、連鎖解析によりその責任遺伝子がRyanodine 受容体遺伝子にあることが指摘された<sup>3)4)</sup>。その後この遺伝子のone point mutation (C1840→T: Arg614→Cys) が確認された<sup>5)6)</sup>。現在悪性高熱の確定診断には生検筋を用いた生理学的検討（Skinned fiber法）が必要であるが侵襲的な検査であり、白血球を用いたDNA診断ができればその有用性は非常に高い。そこで今回上記の突然変異が日本人でも認められるか否か、認められればその解析で本症の発症の予測が可能か否かを検討することを目的とした。

## 対象・方法

対象は悪性高熱との関連が疑われ、かつdeep freezerに筋生検検体が保存されている15例を対象とした。その臨床的特徴とskinned fiber法によるcaffeine拘縮試験の結果は表1に示した。最長6年間の保存期間である。悪性高熱の既往もしくは家族歴のあるものが4例、悪性症候群2例、高CK血症4例、先天性ミオパチー3例、家族性周期性四肢麻痺1例、正常対照1例の計15例である。悪性高熱例で家族歴がはっきりしているのは症例12、14の2例でskinned fiber法で明らかな異常を呈したのは症例14の1例である。先天性ミオパチー例のなかには典型的なセントラルコア病と思われる症例はなく、ネマリンとコアが共存した症例7、ネマリンミオパチーの症例8、組織化学上minimal change（数本の線維にコアあり）と考えられる症例13の3例である。

筋生検 cryostat 標本からの genomic DNA の抽出は Millerら<sup>7)</sup>の塩析法に準じて行った。すなわち cryostat にて10μの筋生検薄切切片を20枚とり、15 ml ポリプロピ

レン遠沈管に3 mlの核溶解緩衝液（10mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 2mM Na<sub>2</sub> EDTA, pH8.2）を加え、一晚消化液（0.2mlの10% SDS+0.5 ml protease K solution ; protease K 1 mg in 1% SDS+ 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA ; 37℃）で消化、消化終了後1 mlの飽和食塩（6 M相当）を各々遠沈管に入れ15秒間激しく混和し遠心（2500rpm, 15分間）。塩析された蛋白 pellet は管底に残り、DNAを含む上澄み液を他の15mlポリプロピレン遠沈管に入れ、正確に2倍量の室温の純アルコールを加え、管をDNAが析出するまで転倒混和、析出したDNA糸をピペットにとり100~200μlのTE緩衝液（10mM Tris-HCl, 0.2mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH7.5）を含むマイクロ遠沈管（1.5ml）に移した。DNAは37℃、2時間で溶解し使用した。

PCRはFujiiら<sup>8)</sup>、Gillardら<sup>9)</sup>の方法の準じて施行した。Primerはforward : CCCTGTGTGTGTGTAATGGTG-3', reverse primerが5'-ATCTCTAG·AGCCAGGGA-GCAAGTTCTCAGTAAT-3'を作成精製し各々100 ng 用いた。そのほかの試薬はGeneAmp PCR Reagent Kit (Perkin-Elmer Cetus Instruments: Takara) を用いた。PCRの条件としては、熱変性96℃、45秒、アニーリング55℃、1分、extension 72℃、2分で40回の条件で施行した。

その後制限酵素 Rsa I (BRL-5424SA) で消化後、ミュービッド-2（コスモバイオ）を用いて、4% NuSieve GTG agarose もしくは4%ポリアクリルアミド

表1 対象患者

患者番号	年齢	性別	診断	Skinned fiber法
1		男性	正常対照	nd
2	42	女性	家族性低K血症性周期性四肢麻痺	nd
3	60	男性	高CK血症	nd
4	45	女性	高CK血症	正常
5	13	男性	悪性高熱の既往	正常
6	16	男性	悪性高熱	nd
7	48	男性	先天性ミオパチー（ネマリン+コア）	nd
8	20	女性	先天性ミオパチー（ネマリン）	nd
9	72	男性	悪性症候群	異常
10	53	男性	高CK血症	正常
11	21	女性	高CK血症	異常
12	31	女性	悪性高熱の家族歴	ほぼ正常
13	20	女性	先天性ミオパチー（minimal change）	nd
14	64	女性	悪性高熱の家族歴	異常
15	43	女性	悪性症候群	nd

\* 虎の門病院神経内科  
\*\* 三宿病院神経内科

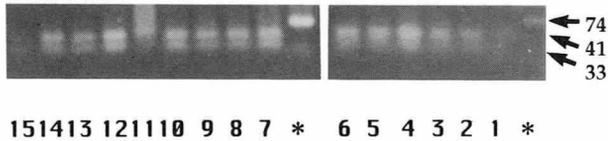


図1 PCR産物を制限酵素Rsa Iでdigestし4%アガロースゲル上で電気泳動した。\*印は制限酵素を加えていない未消化のもの、1から15の番号は各々、表1に示した症例番号である。各症例とも、すべて41, 33bpの二つのバンドに消化された。即ち、C1840Tの変異は認められなかった。

上で電気泳動し、エチジウムブロミドで染色しAGT-AC1840からAGTAT1840へのpoint mutationの有無を調べた。DNAのサイズマーカーは $\phi$ X174Hae III digestを用いた。

### 結 果

Genomic DNAは上記方法で電気泳動後エチジウムブロミドで染色し単一のバンドであることを確認した。図1に示したように今回の対象例はすべて41, 33bpの二つのバンドに消化された。即ち、C1840Tの点変異は認められなかった。

### 考 案

現在までのところ本邦でRyanodine受容体遺伝子のC1840T(Arg 614 Cys)へのpoint mutationを確認したと言う報告はされていない。この変異は悪性高熱の家系の2~5%に認められるとされている<sup>8)</sup>。その後Gly 248 Arg:C742Aが報告されたが<sup>9)</sup>、この変異は45家系中1家系のみとやはり少数であり追試確認した報告はない。

最近になり新たにRyanodine受容体遺伝子異常としてG7301A(Arg 2434 His), C487T(Arg 163 Cys), C1209G(Ile 403 Met)の3つの変異が報告された<sup>10)</sup>。G7301AとC1209Gの変異はセントラルコア病の各々1家系に認められたが、C487Tはセントラルコア病と悪性高熱の両疾患の家系にまたがり認められた初めの変異である。しかし、その頻度はやはり低い。現在までのところ、多くの症例に認められる共通の遺伝子異常は発見されていない。

むしろ、近年になり悪性高熱、セントラルコア病共に他の遺伝子異常を指摘する報告がある。すなわち第17染色体上のナトリウムチャンネル $\alpha$ -subunitの遺伝子異常が悪性高熱の原因であるとする報告も見られている<sup>11)</sup>。セントラルコア病では第14染色体上の $\beta$ -myosin heavy-chain遺伝子の突然変異が報告された<sup>12)</sup>。すなわち、遺伝子の立場からみても悪性高熱、セントラルコア病が単一の疾患でないことが確認されてきており、本症の遺伝子診断は今後新たな展開があると予想される。現在、悪性

高熱、セントラルコア病の確定診断には筋生検という侵襲的検査が必要であることから遺伝子診断の確立が重要と考える。

### ま と め

- 1) 骨格筋ryanodine受容体(RYR1)遺伝子のC1840T(Arg 614 Cys)の突然変異の有無に関してdeep freezer保存筋よりDNAを抽出しPCR法により検討したが、今回の対象例ではこの突然変異は認めなかった。
- 2) 悪性高熱、セントラルコア病共にgenetic heterogeneityが存在し、遺伝子診断の臨床応用のためにはより多くの症例の蓄積が必要である。

### 参 考 文 献

- 1) MacLennan DH, et al: Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature* 343: 559, 1990.
- 2) McCarthy TV, et al: Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13, 2. *Nature* 343: 562, 1990.
- 3) Kausch K, et al: Evidence for linkage of the central core disease locus to the proximal long arm of human chromosome 19. *Genomics* 10: 765, 1991.
- 4) Mulley JC, et al: Refined genetic localization for central core disease. *Am J Hum Genet* 52: 398, 1993.
- 5) Fujii J, et al: Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448, 1991.
- 6) Gillard EF, et al: A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics* 11: 751, 1991.
- 7) Miller SA, et al: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215, 1988.
- 8) Hogan, et al: A cysteine-for-arginine substitution (R614C) in the human skeletal muscle calcium release channel cosegregates with malignant hyperthermia. *Anesth Analg* 75: 441, 1992.
- 9) Gillard, et al: Polymorphisms and deduced amino acid substitutions in the coding sequence of the ryanodine receptor (RYR1) gene in individuals with malignant hyperthermia. *Genomics* 13: 1247, 1992.
- 10) Zhang Y, et al: A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with central

- core disease. *Nature genetics* 5 : 46, 1993.
- 11) Quane KA, et al : Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia. *Nature genetics* 5 : 51, 1993.
  - 12) Olckers A, et al : Adult muscle sodium channel- $\alpha$  subunit is a candidate for malignant hyperthermia susceptibility. *Genomics* 14 : 829, 1992.
  - 13) Fananapazir L, et al : Missense mutations in the  $\beta$ -myosin heavy chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 3993, 1993.

# 18) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の遺伝子解析

荒畑 喜一\*

研究協力者 李 濟賢\* 後藤 加奈子\* 小林 慶\*  
 中村 昭則\* 塚原 俊文\* 武田 伸一\*  
 古川 哲雄\*\* 佐橋 功\*\*\* 野村 芳子\*\*\*\*  
 瀬川 昌也\*\*\*\* 松原 四郎† C. Wijmenga††  
 R. R. Frants††

## 目 的

FSHDは顔面と上肢帯～上腕の筋肉が主として障害される常染色体優性の筋ジストロフィーであり、浸透率は極めて高い(～98%)。罹患率は10万人に0.2～2人で筋ジストロフィー全体の1～8%を占める。本症は高率(70～80%)に網膜症や神経性難聴等の合併が、またしばしば組織のリンパ球浸潤が出現することでも知られており、一日も早い発症機構の解明が待たれている。しかし本症についての病因は未だ解明されておらず、早期診断法も確立されていない。

最近の研究から、ヒトの染色体4q35-qterにマップされているp13E-11のプロープを用いた遺伝子解析の結果、FSHDでは制限酵素EcoRI切断断片サイズに差があり、おそらくFSHDの発病に関与する遺伝子には遺伝子欠失また突然変異が生じている可能性があるものと推測されている(Wijmengaら, 1992)<sup>1)</sup>。また荒畑ら(1993)は日本人FSHDにおいてもこれを確認した<sup>2)</sup>(図1)。さらにp13E-11に反応するFSHD関連EcoRI断片には3.2kbのKpnI断片のrepeatがあり、その中にhomeo-domainの配列とCpGs islandなどの特殊配列が存在することが解明されつつあり、その機能とFSHDの関連が注目されている<sup>1)</sup>。

我々はFSHDの原因遺伝子をクローン化し、その構造と機能を明らかにするために研究を進めている。しかし、p13E-11プロープは非特異的に反応する部分が多く、クローニングベクターにも弱いながらも反応するのでライブラリースクリーニングに適當ではなかった。本研究ではFSHDに特異性の高い新しいプロープの作製及

びFSHDゲノムライブラリーの作製を報告する。

## 方法及び結果

コスミドクローンC51(Wijmengaら, 1992)<sup>1)</sup>、プラスミドpSM1(Weiffenbachら, 1993)について制限酵素マッピング及びサブクローン化を行い、FSHD関連EcoRI断片に特異性が高い新しいプロープpFR1を作製した(図2)。またFSHD関連ゲノム断片はEcoRI、HindⅢの二重消化によりさらに短くなる事が分かった(図3)。現在、FSHD症例ST13についてEcoRI、HindⅢの二重消化による断片のゲノムライブラリーを作製して、新しいプロープpFR1を用い、PCR法、コロニハイブリダイゼーション法、サザン法でスクリーニングを行っている。

## SOUTHERN ANALYSIS WITH p13E-11 OF EcoRI-DIGESTED DNA

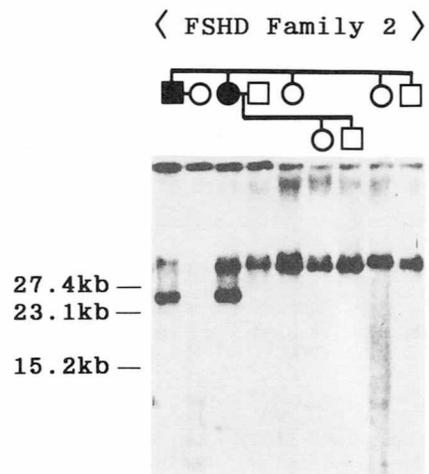


図1 サザンプロット法によるFSHDの遺伝子診断  
 FSHD患者では、健常家族には認めない27kb以下の短いバンドが検出された。

\*国立精神・神経センター神経研究所  
 \*\*東京医科歯科大学医学部保健衛生学科  
 \*\*\*愛知医科大学第四内科  
 \*\*\*\*瀬川小児神経学クリニック  
 †金沢大学医学部神経内科  
 ††Leiden University, The Netherlands

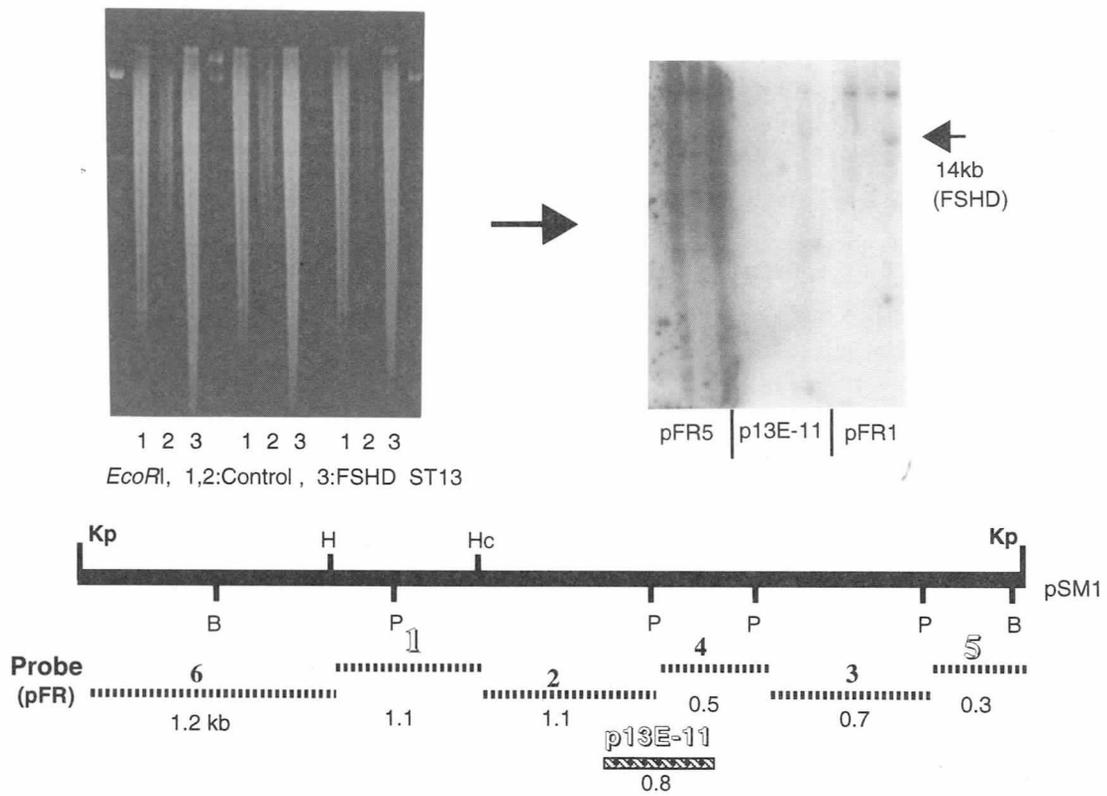


図2 プローブの開発  
FSHD関連EcoRI断片により特異性の高いプローブpFR1が得られた。

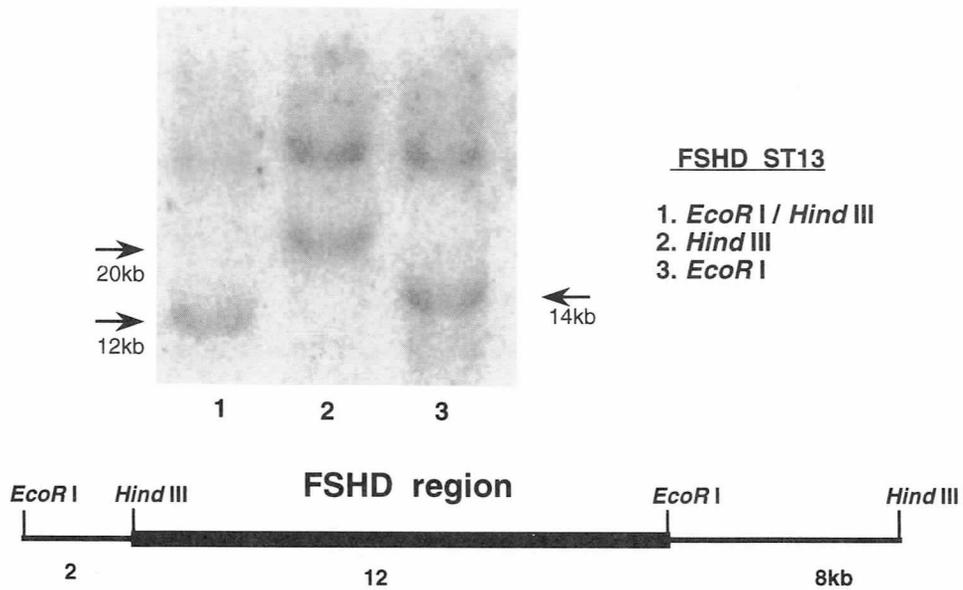


図3 制限酵素地図  
FSH関連ゲノムDNA断片はEcoRIとHind IIIの二重消化によりさらに短く切られた。

### 考察および結論

FSHD関連遺伝子は4q35-qterにマップされ、その領域にはhomeo domain配列、3.2kbのタンデムリピート等が存在するが、現在その構造と機能が注目されている。

本研究によって、FSHDの遺伝子診断と遺伝子クローニングに有効に使用できる新しいプローブ pFR1 が得られて意義は大きいものと考えている。今後FSHD関連遺伝子部分に存在する3.2 kb 反復配列の決定と、break pointの検索を進めることが重要になろう。さらに mRNA と原因蛋白の解析を予定している。

### 文 献

- 1) Wijmenga C, Hewitt J, et al: Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature Genet* 2: 26-30, 1992.
- 2) 荒畑喜一, 古川哲雄ほか: 染色体 4q35-qter マーカー p13E-11 による顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの遺伝子診断. *医学のあゆみ* 164: 865-866, 1993.

# 19) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの臨床的多様性と遺伝子診断

納 光 弘\*

研究協力者 中川正法\* 大窪隆一\* 樋口逸郎\*  
山田博久\* 末原雅人\* 松崎敏男\*\*  
C. Wijmenga\*\*\* R. R. Frants\*\*\*

## 目 的

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（以下FSHD）は、顔面・肩甲・上腕筋の障害を主症状とする常染色体優性遺伝を示す疾患である。家系内または家系間でその臨床症状が多様であることがひとつの特徴であり<sup>1)2)</sup>、非定型的な臨床症状を示す孤発例の場合などは確定診断が困難な場合がある。

今回、Leiden大学のDr Frantsより供与された第4染色体長腕末端部の遺伝子マーカー p13E-11<sup>3)</sup>を用いて、非定型的な臨床症状を呈したFSHDを中心に遺伝子診断を行ったので報告する。

## 対 象

症例1：41歳，男性（図1）。

主訴：四肢筋力低下，構語障害，難聴。

家族歴：同様の疾患なし。

現病歴：乳児期より顔面筋力低下，聴力障害あり。発語は4，5歳頃。14歳頃より上肢挙上困難，腰部筋力低下，脊柱前彎が出現。

現症：知能正常範囲。両側混合性難聴，構音障害，顔面筋力の著明な低下，網膜動脈の走行異常（蛇行）と末梢での過剰分枝を認める（図2）。肩甲・上腕・前脛骨筋を中心とする高度の筋力低下・萎縮と著明な脊柱前彎を認める<sup>4)</sup>。筋生検を施行したが，endstage muscleであった。

症例2：22歳，女性（図3）。

主訴：階段昇降困難，上肢挙上困難。

家族歴：同様の疾患なし。

現病歴：幼児期より顔面筋の筋力低下，肩甲部，大腿部の筋萎縮あり。中学校の頃より下腿が太くなったのを自覚。高校3年の頃より，右下腿の筋力低下（drop foot）が出現し，階段昇降困難，歩行困難が徐々に進行。その

後，両上肢の挙上困難を自覚している。

現症：知能，眼底，聴力は正常。顔面，頸部，肩甲（翼状肩甲），大腿，前頸骨筋群を中心とする筋力低下・萎縮と，下腿筋群の仮性肥大を認める。感覚障害なし，筋生検では，血管周囲を中心に炎症細胞と考えられる小円形単核球の浸潤が見られた。

症例3：56歳，男性。

主訴：右上肢挙上困難，下肢冷感。

家族歴：母親，弟，長男に同病の疑いあり。

現病歴：小学校の頃より懸垂が苦手であった以外には，小児期に異常を自覚していない。25歳頃より右上肢の筋力低下を自覚。51歳頃より腹を突き出して歩くようになり，階段昇降が不安定となる。その後，左肩甲部にも筋力低下・萎縮を自覚している。54歳頃より，両下肢の冷

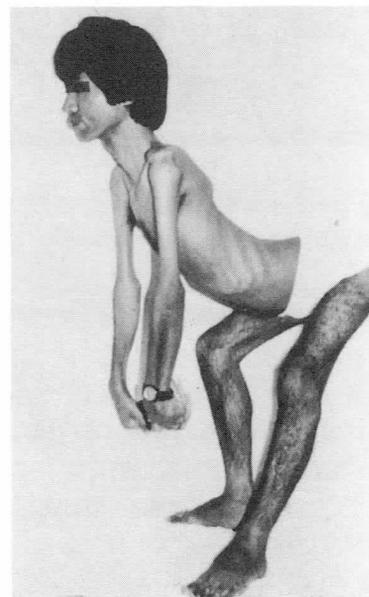


図1 症例1の全身像。肩甲・上腕・前脛骨筋を中心とする高度の筋力低下・萎縮と著明な脊柱前彎を認める。

\* 鹿児島大学医学部第三内科  
\*\* 国立療養所沖縄病院神経内科  
\*\*\* Leiden University

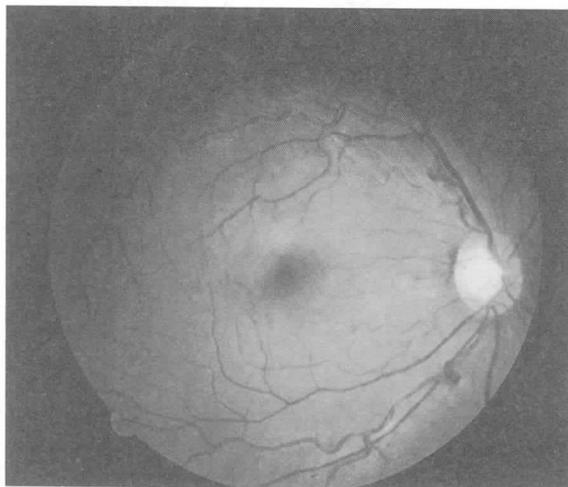


図2 症例1の眼底写真。網膜動脈の蛇行と末梢での過剰分枝を認める。

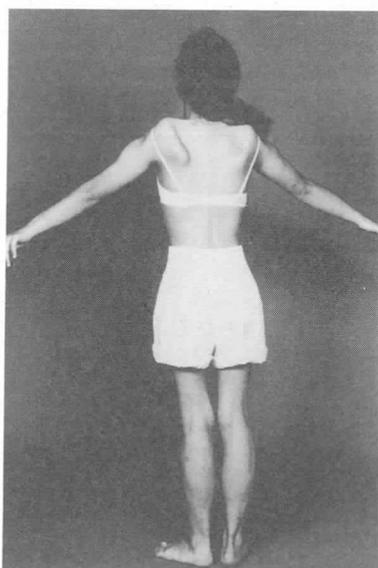


図3 症例2の全身像。翼状肩甲，下肢近位筋群の筋萎縮，下腿の仮性肥大を認める。

感が出現している。

**現症：**知能，眼底正常。聴力：軽度低下，耳鳴あり。顔面筋の軽度筋力低下・筋萎縮。左胸鎖乳突筋，両肩甲および右上腕二頭筋の著明な筋萎縮・筋力低下，翼状肩甲，漏斗胸，脊柱前彎，下肢近位筋と左下腿筋群の軽度の筋力低下。握力右16kg，左42kg。右前腕部表在覚の軽度低下と下肢振動覚の軽度低下。筋生検では，筋線維の大小不同，type grouping, nuclear clumps等の所見を示し，神経原性変化と考えられた。

**症例4：**61歳，女性。

**主訴：**四肢筋力低下。

**家族歴：**姉（症例5）と従兄弟に同病あり。

**現病歴：**20歳頃より上肢挙上困難出現。43歳頃より腰部部の筋力低下を自覚し徐々に進行。現在，自力歩行可能。

**現症：**知能正常。眼底，聴力正常。顔面筋の軽度筋力低下。肩甲上腕腰部部の筋力低下。翼状肩甲あり。下腿の仮性肥大を認める。筋生検にて，lobulated fibersを多数認めた。

**症例5：**66歳，女性。

**主訴：**四肢筋力低下，呼吸困難。

**家族歴：**症例4の姉。

**現病歴：**21歳頃より下肢筋力低下を自覚。39歳頃より歩行不能となり，同時期より上肢挙上困難，肥満傾向も出現。59歳時に呼吸困難となり，Pickwickian症候群，単純性肥満（身長155cm，体重90kg）と診断される。

**現症：**知能，眼底，聴力正常範囲。顔面筋，頸部，肩甲の筋力低下，筋萎縮。下腿近位筋の著明な筋力低下，筋萎縮，下腿の軽度の仮性肥大。歩行不能。筋生検にて，lobulated fibersを多数認めた。

**症例6：**77歳，女性。

**主訴：**四肢筋力低下。

**家族歴：**父親と長男が同病。

**現病歴：**33歳頃より左上肢の筋力低下を自覚。徐々に右上肢，両下肢へと筋力低下が出現し，62歳頃より歩行困難が著明となり，現在，車椅子使用中。

**現症：**顔面，両側肩甲部（翼状肩甲），上腕，下肢近位筋の筋力低下・筋萎縮，下腿筋の仮性肥大を認める。握力右10kg，左13kg。

**症例7：**17歳，男性。

**主訴：**右上肢挙上困難。

**家族歴：**兄が同病。

**現病歴：**中学校までは特に異常を自覚していない。16歳になって右上肢の挙上困難が出現し，徐々に進行。

**現症：**瞳孔不整。ごく軽度の顔面筋筋力低下。右側優位の三角筋，上腕二頭筋の筋力低下，萎縮と右側のみに翼状肩甲を認める。握力右25kg，左42kg。筋生検では，血管周囲を中心に炎症細胞と考えられる小円形単核球の浸潤とタイプI線維萎縮を認めた。

表に今回検索したFSHD症例の特徴と検査所見のまとめを示す。

#### サザンブロット解析

以上の7例について，サザンブロット解析を行った。末梢血または生検筋よりフェノール法にてゲノムDNAを抽出し，制限酵素EcoRIと2～4時間反応後，0.5%アガロースゲル，15～20Vにて電気泳動を行い，ナイロン膜（BIODYNE B®）にblottingし， $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTPにて標識したプローブp13E-11と65℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜を1% SSC，0.5% SDSにて洗浄後，-70℃で3～7日間autoradiographyを

行った。

### 結 果

症例1, 2では約14kbのEcoRI fragmentがみられたが, 症例3では男性に見られる8.9kbのバンド以外に28kbと9kbの間には異常バンドは見られなかった(図4)。症例4, 5では24kb, 症例6では20kb前後の異常バンドが検出された。症例7では, 約24kbのバンドが患者本人と兄および無症状の母親に認められたが, 父親と弟には異常は認められなかった。なお, 正常対照10例には, 28kbと9kbの間には異常バンドを認めなかった(表)。

### 考 察

今回検討したFSHD例はいずれも非典型例であったが, 症例3を除く6例で, EcoRI消化にて異常バンドの出現がみられ, プローブp13E-11に連鎖した遺伝子異常

があることが示された。EcoRI消化による異常バンドのサイズとFSHDの重症度との相関は言われていないが, 今回の検討では最も若年発症であった症例1, 2にて, 特に短いEcoRI fragmentが検出された。患者家族の検討から, 症例2は新突然変異であることが確認されたが, 症例1については今後家族の検索にて新突然変異であるか否かを確認する必要がある。症例3は, EcoRI消化による異常バンドの出現が見られなかった。本例は臨床的にはFSHDの特徴がそろっていたが, 筋生検を行った6例中本例のみ神経原性変化を示していた点が注目される。同様の症例は, Weiffenbachらにより24家系中1家系に認められており<sup>9)</sup>, 彼らはその家系では28kbより大きいサイズのEcoRI fragmentが疾患とco-segregateしている可能性は否定できないとしている。われわれの例でも, EcoRIの異常バンドが検出されなかった原因として, 今回のサザンブロット法にて検出できないようなサイズの異常の可能性が考えられるが, そのほか, 他の遺伝子異常に基づくもの, FSHD類似の他の筋疾患などの可能性も否定できない。症例7では, 臨床的に無症状と考えられて母親に患児と同じサイズの異常バンドが認められた。今後, 本家系の詳細な臨床的, 筋組織学的検討が必要である。

今回の検討では, 各家系の神経学的所見, 臨床検査およびDNA検査に不十分な点もあり, 今後さらに詳細な家系調査とDNA診断を行い, FSHDの臨床的多様性と遺伝子異常の関連について検討して行きたい。

### 結 論

1. 第4染色体長腕末端部のマーカーであるp13E-11を用いて, FSHDの7例中Coats症候群を合併した例や非定型孤発例を含む6例に28kbより短いEcoRI断片が検出され, 本マーカーと連鎖した遺伝子異常が存在することが示された。
2. 臨床的にFSHDと診断された1家族発症例で, 28kbより短いEcoRI断片が検出されなかった。この原因としてサザンブロット法にて検出できないような大きなサ

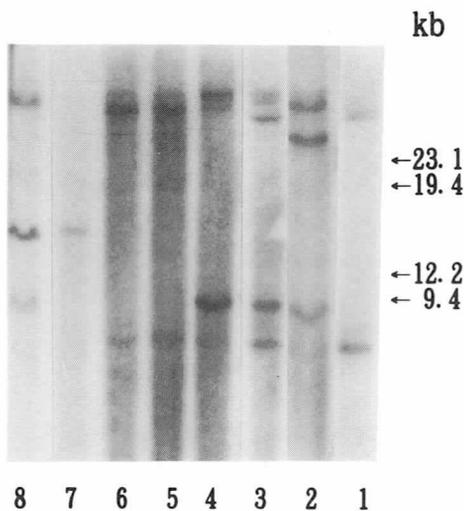


図4 Southern blot analysis of FSHD

Lane 1: 正常女性      Lane 5: 症例2の姉  
Lane 2: 正常男性      Lane 6: 症例2の母親  
Lane 3: 症例3      Lane 7: 症例2  
Lane 4: 症例2の父親      Lane 8: 症例1

表 検討したFSHDの臨床的特徴と遺伝子分析のまとめ

症例	性/年齢	発症年齢	家族歴	CK値	仮性肥大	網膜血管走行異常	難聴	知能低下	筋生検所見	EcoRI fragments (kb)
1	男/41	乳児期	-	軽度	-	+	+	-	結合組織の著明な増加	14
2	女/22	幼児期	-	軽度	+	-	-	-	炎症細胞の浸潤	14
3	男/56	25歳頃	+	中等度	-	-	-	-	神経原性変化	>28
4	女/61	20歳頃	+	軽度	+	-	-	-	Lobulated fibers	24
5	女/66	21歳頃	+	正常	+	-	-	-	Lobulated fibers	24
6	女/77	33歳頃	+	正常	+	-	-	-		20
7	男/17	15歳	+	中等度	-	-	-	-	炎症細胞浸潤 タイプI線維萎縮	24
正常対照10例										>28

イズの異常か、他の遺伝子異常に基づくものか、FSHD類似の他の筋疾患などの可能性が考えられた。

謝辞：症例7およびその家族の遺伝子診断をして頂きました国立精神・神経センター後藤加奈子先生、荒畑喜一先生に深謝致します。

#### 文 献

- 1) Tawil R, Storvick D, Feasby TE, et al : Extreme variability of expression in monozygotic twins with FSH muscular dystrophy. *Neurology* 43 : 345 - 348, 1993.
- 2) Brouwer OF, Wijmenga C, Frants RR, et al : Facioscapulohumeral muscular dystrophy : The impact of genetic research. *Clin Neurol Neurosurg* 95 : 9-21, 1993.
- 3) Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, et al : Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature Genetics* 2 : 26-30, 1992.
- 4) 末原雅人, 中原啓一, 川平 稔ほか : 難聴, 眼底血管走行異常を伴った顔面肩甲上腕型筋萎縮症. *神経内科* 25 : 268-272, 1986.
- 5) Weiffenbach B, Dubois J, Storvick D, et al : Mapping the facioscapulohumeral muscular dystrophy gene is complicated by chromosome 4q35 recombination events. *Nature Genetics* 4 : 165-169, 1993.

IV. D R P

# 20) 培養下におけるDRPの発現に関する免疫組織学的研究

小林 高 義\*

研究協力者 亀田 典 佳\* 大野 伸 一\*\*

今までに、我々はジストロフィン (DP) の細胞内の3次元的な超微構造的局在を急速凍結-deep etching (QF-DE) 法によって明らかにし、アクチン (AC) 及びスペクトリン (SP) との相互関係に関して検討してきた。今回は、ヒト及びマウス培養骨格筋細胞を使用して、蛍光二重染色によるDP, AC及びSPの相互関係、innervationによるDP及びdystrophin-related protein (DRP) の局在を検討すると共に、培養マウス筋細胞におけるDRPの超微構造的局在をQF-DE法による検討を行ったので報告する。

## 材料及び方法

### 1. ヒト筋細胞-ラット脊髄片併置培養系

4例のヒト生検筋から、explant-re-explantation法によって、筋芽細胞、筋管細胞を作成し、更に13日目胎児ラット脊髄片を併置培養し、innervation cultureを作成した。この培養系を使用して、DP及びDRPの筋細胞の発達段階における局在を免疫組織化学的に検討した<sup>1)</sup>。

### 2. マウス単独筋細胞

DMDのmodel動物であるmdxマウス及びそのcontrolマウスであるscnを使用した。新生マウス下肢筋より無菌的に筋組織を取り出し、コラーゲン塗布カバースリップ上にexplant cultureした。培養液は、Dulbecco's modified Eagle's MEM 67%, medium 199 23%, fetal bovine serum 10%の組成のものを使用した。培養は、約1週間行い、免疫組織化学的に検討した。培養細胞を2%パラホルムアルデヒドで5分間固定し、その後0.5%サポニンで15分間処理した。

光顕的免疫染色には、DPはC末端に対するモノクローナル抗体、SPは抗ヒトあるいはチキンポリクローナル抗体、ACは、F-actinを認識するrhodamine-palloidinを使用し、DPとSP、DPとAC、SPとACとの相互関係をみる目的で、FITCとrodamineによる蛍光免疫二重染色を行った。また、DP、DRPとacetylcholine receptors (AChRs) との相互関係をみる目的で、rodamineでラベルした $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -BGT) を使用した。

DRPは石浦章一博士(東京大学分子細胞生物学研究所)から供与を受けたポリクローナル抗体を使用した。

電顕レプリカ膜作成のために、10%メタノール浸漬後、液体窒素で冷却し、液体窒素中で凍結割断を加えた。Eiko社製FD-3S装置内(-95°C, 2~6×10<sup>-7</sup>Torr)で15~30分間deep etching後、白金と炭素で回転蒸着した。型の如くレプリカを作成して、日立HS-9, H-700電顕で観察した<sup>2)</sup>。

## 結 果

### 1) ヒト筋細胞, scn, mdxマウス筋細胞の免疫蛍光二重

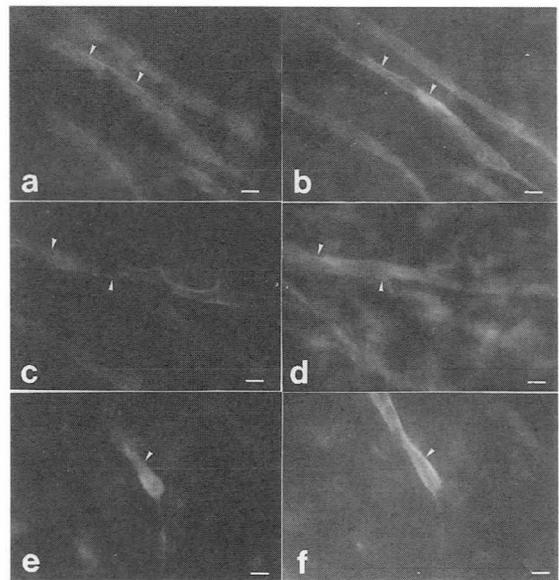


図1 Immunofluorescent double labelling of dystrophin, spectrin or F-actin on scn myotubes at 12 days of culture.

Dystrophin (a, c), spectrin (d, e) and F-actin (b, f) are diffusely distributed in scn myotubes with discontinuous linear patterns on the sarcolemma.

Dystrophin and F-actin are co-localized in most areas of scn myotubes (arrowheads in a, b). In some areas dystrophin and spectrin or spectrin and F-actin are not co-localized (arrowheads in c, d, e & f).

Bar = 50  $\mu$ m.

\*東京医科歯科大学医学部神経内科  
\*\*山梨医科大学第一解剖

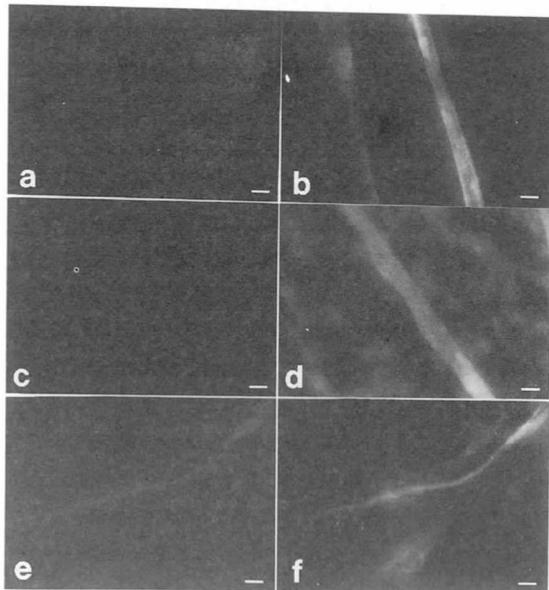


図2 Immunofluorescent double labelling of dystrophin, spectrin or F-actin on mdx myotubes at 12 days of culture. No dystrophin expression is detected in mdx myotubes (a, c). Spectrin (d, e) and F-actin (b, f) are diffusely distributed in mdx myotubes. There were no difference of the localization of spectrin and F-actin between cultured scn (図1) and mdx (図2) myotubes. Bar = 50  $\mu$ m.

染色による観察 (図1, 2).

mdx 培養筋管細胞においては, DPの発現はなく, SP及びACは細胞質内に瀰漫性にあるいは, 細胞膜にlinearに存在した. SPとACでは, co-localizationしない部分がかかなり認められた.

Scn培養筋管細胞においては, DPとACでは細胞膜において, 多くの部位でco-localizationしていた. 一方, DPとSPあるいはSPとACではco-localizationしない部位がかかなり認められた<sup>3)</sup>.

2) ヒト培養筋細胞におけるDP, DRPの局在(図3, 4)

DPは培養筋芽細胞では, 発現はなく, 未熟な筋管細胞では, 瀰漫性に細胞質全体に染色され, innervationを受けた筋細胞においては, 細胞膜にlinearに染色されると同時に, 神経筋接合部に一致してpletzel様の構造を呈していた. 一方, DRPはDPと異なり, 筋芽細胞, 未熟な筋管細胞において細胞質全体に強く瀰漫性に発現しており, innervationした細胞では, 細胞膜上にlinearに発現し, 細胞質内の発現は低下した. 更に, 神経筋接合部においてDRPはDPと同様に強く発現しており,  $\alpha$ -BGTとの二重染色では, AChRs clustersと一致した発現が認められた<sup>3)</sup>.

3) DRPの Maus培養筋細胞における3次元的超微構

造的局在 (図5)

Maus培養筋管細胞では, 超微構造的には, DRPは細胞質内及び細胞膜直下に顆粒状に存在し, 他の細胞骨格蛋白との関係は明らかでなかった<sup>3)</sup>.

### 考 察

DPは, 筋細胞膜の裏打ち蛋白として, N末端側でACと, C末端側でdystrophin related glycoprotein(DRG)と結合し, 更にDRGは細胞外でlamininと結合し, 筋細胞の骨格維持に重要な役割を果たしていると考えられているが, SPあるいはDRPなどの蛋白との相互関係は明かではない.

成熟した骨格筋では, DPは細胞膜直下に periodicityを有してlinearに存在し, 神経筋接合部および腱終末部に強く発現し, DRPは神経筋接合部に限局して存在することが報告されている. またSPあるいはACは細胞膜に存在し, 光顕レベルでは, DP, AC, SPはco-localizationしていると考えられている. 一方, 我々の培養法を使用した筋細胞の発達段階による筋細胞骨格蛋白の発現, 局在の検討では, DRPが筋芽細胞及び筋管細胞で強く発現するのに対して, DPは筋芽細胞では発現せず,

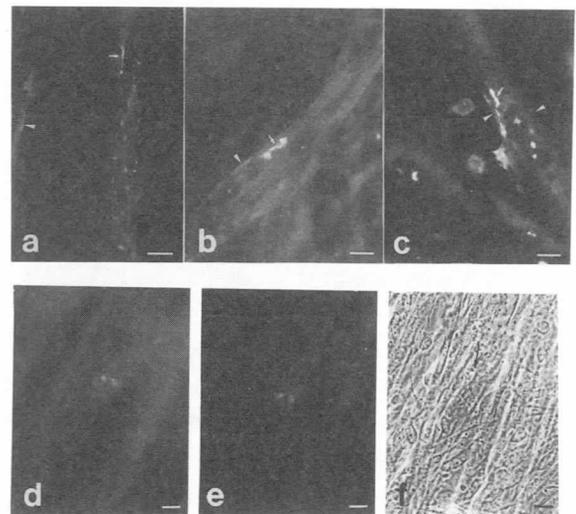


図3 Immunofluorescent labelling of dystrophin (a-c) and double-labelling (d-f) of dystrophin and  $\alpha$ -BGT on innervated human muscle fibers with nerve terminals (arrows).

Linear and discontinuous patterns of dystrophin are also observed on the sarcolemma (arrowheads). (d, e, f) A nerve terminal (arrows in f: the proximal portion of the nerve is out of focus in this phase-contrast photomicrograph) has positive reaction of dystrophin (d) and  $\alpha$ -BGT (e). Bar = 10  $\mu$ m.

未熟な筋管細胞で細胞質内に瀰漫性に発現し、次第に細胞膜に局限していくこと、筋細胞の発達段階では、DPとSPあるいはDPとACは必ずしも co-localization せず、筋細胞の発達過程でのDRP、DP、SPの発現様式は異なることが明かにされた。三次元的な超微構造による観察では、SPは未熟な筋細胞においても赤血球膜の裏打ち構造にみられるような lattice-like structure を既に有しており、一方DPは、*in vivo*で見られる filamentous network は認められず、むしろ顆粒状に存在し、ACと考えられる microfilaments がDPと結合される像が観察される。しかしながらDRPは、innervation されていない未熟なマウス培養骨格筋では、細胞内の filamentous network との関係は明らかでなく、細胞内に顆粒状に存在していた。筋細胞が神経支配を受け、自発収縮を開始し、生体の中で運動器官としての機能を完成させていく過程でDP、SPあるいはDRPなどの細胞骨格蛋白の構造的相互関係を更に詳細に検討していくことが、これらの蛋白の生理的役割及びDMD/BMDなどの筋細胞の変

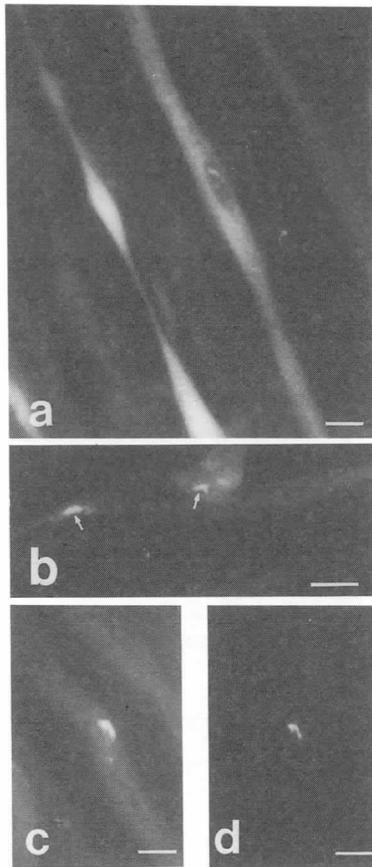


図4 Immunofluorescent labelling of dystrophin related protein (DRP) on aneurally (a) and innervated human muscle fibers (b) and double labelling of DRP and  $\alpha$ -BGT on an innervated human muscle fiber at 14 days of co-culture (c, d).



図5 Replica electron micrograph for immunoperoxidase labelling of DRP in scn myotubes at 7 days of culture.

The upper side of the plasma membrane has been removed and the cytoplasm and the plasma membrane of cultured myotubes can be seen. Granular DAB immunoproducts (large arrows) are localized irregularly under the plasma membrane and also in the cytoplasm. Small arrows indicate actin-like filaments. Bar=0.5  $\mu$ m.  $\times$ 90000. PM : plasma membrane.

性、壊死の機序を解明するうえで重要と考えられる。

### 結 論

培養下において、DRPは*in vivo*のdevelopmentalな発現と同様な経過で、成熟すると神経筋接合部に局在するようになる。しかし未熟な筋管細胞を使用した三次元的超微構造的検討では、DRPは細胞内に顆粒状に存在し、他の細胞骨格蛋白との関係はあきらかではなく骨格筋細胞において、発達段階でのDP、DRP、SPの発現様式は異なると考えられた。

### 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.
- 2) Park-Matsumoto YC, Ohno S, Baba T, Kobayashi T and Tsukagoshi H: Immunocytochemical study of dystrophin in cultured mouse muscle cells by the quick-freezing and deep-etching method.

Histochem J 24 : 383—392, 1992.  
3) Kobayashi T, Ohno S, Park-Matsumoto YC,  
Kameda N and Baba T: Developmental studies of

dystrophin and other cytoskeletal proteins in  
cultured muscle cells. Microscop Res Tech (1994 in  
press).

# 21) 心症状を呈した Duchenne 型筋ジストロフィーの症候性女性保因者 2 症例の骨格筋ならびに心筋におけるジストロフィンとジストロフィン関連蛋白の発現

川 井 尚 臣\*

研究協力者 鳴尾隆子\*\* 足立克仁\*\* 赤池雅史\*  
西田善彦\* 乾俊夫\*\*\* 柏木節子\*\*

## はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、骨格筋障害に加え心筋障害もあるため心機能障害をきたすが、DMD の女性保因者の心病変や心機能についてはまだ殆どわかっていない。本研究では、心症状を訴えた DMD の症候性女性保因者 2 例について、骨格筋と心筋におけるジストロフィン (Dys) 並びにジストロフィン関連蛋白 (DRP) (utrophin) を調べ、これら蛋白質の筋細胞における発現の相互関係、並びにこれらと女性保因者における心症状との関係について述べる。

## 対象と方法

対象は心症状を呈した DMD の症候性女性保因者の 2 症例である。

### 1. 症 例

症例 1 : 51 歳女性。主訴は胸部圧迫感と動悸。長男は DMD 患者で 22 歳にて死亡した。両親の近親婚はない。本例は幼少より徒競走が遅かった。平成 4 年 5 月頃より胸部圧迫感、動悸が出現し、同年 6 月国療徳島病院に入院した。血圧は 160/90mmHg とやや高かったが、胸腹部には異常を認めなかった。四肢の筋萎縮や筋力低下はなかったが、腓腹筋に軽度の肥大が認められた。血清クレアチンキナーゼ (CK) 活性値は 886IU/ML (正常値 38-109) と上昇、血清ミオグロビン (Mb) 値も 410ng/ml (正常値 50<) と上昇していた。筋電図では筋原性変化がみられ、心電図では、II, III, aVF の ST 低下、aVL に Q 波が認められた。心胸郭比は 56% と拡大していた。心エコー検査では左房径は 38mm、左室拡張末期径は 58mm と拡大し、左室後壁のび漫性壁運動の低下もあり拡張型心筋症様の所見がみられた。駆出率は 48% と低下しており、僧帽弁における逆流もみられた。タリウム 201 心筋

シンチグラムで後下壁の欠損像が認められた。冠動脈造影では異常所見はみられなかったが、この時右室心室中隔の心筋生検を施行した。骨格筋の病理組織所見では軽度のジストロフィー性変化がみられた (後述)。母親と DMD の長男の両方ともサザンブロット法あるいは PCR 法でジストロフィン遺伝子の欠失は検出されなかった。しかし長男の生検筋の免疫組織学ではジストロフィンは欠失していた。

症例 2 : 32 歳女性、主訴は不整脈と息切れ。両親の近親婚はない。弟は DMD のため 18 歳で死亡しており、10 歳の長男は DMD 患者である。本例は幼少時より徒競走が遅かった。平成 3 年 3 月頃より胸部圧迫感と動悸が出現した。32 歳時 (外来受診時) 脈拍 60/分、不整脈があったが一般理学所見には異常所見はみられなかった。四肢の筋萎縮は明らかでなかったが、筋力テストで下肢に軽度の筋力低下が認められた。腓腹筋の肥大はみられなかった。血清 CK 活性値は 1032IU/ML、血清 Mb 値 150 ng/ml と上昇しており、筋電図は筋原性変化を示した。心電図では aVL に Q 波および心室性期外収縮がみられた。心エコー検査では左房径は 26mm、左室拡張末期径は 53mm と拡大し、拡張型心筋症様の所見を示した。駆出率は 35% と低下していた。僧帽弁における逆流も認められた。またタリウム 201 心筋シンチグラムでは前壁、後下壁の欠損像が認められた。骨格筋の病理組織所見で軽度のジストロフィー性変化が認められた (後述)。母親と DMD の長男はサザンブロット法あるいは PCR 法でジストロフィン遺伝子の欠失は検出されなかった。しかし長男の生検筋 (大腿四頭筋) のジストロフィン染色は陰性であった。

以上の成績より、これらの 2 症例は心症状を呈し、心機能低下が認められた DMD の症候性女性保因者と診断した。

\* 徳島大学医学部第一内科  
\*\* 国立療養所徳島病院内科  
\*\*\* 国立療養所徳島病院神経内科

## 2. 生検骨格筋組織標本の骨格筋ならびに心筋におけるジストロフィン (Dys) 染色

骨格筋および心筋のジストロフィン (Dys) は NOVO castra 社の Dys2 抗体を用いて ABC 法 (Avidin - Biotin - peroxidase Complex method) により検出した。骨格筋では横断面で細胞膜が一様に全周性に染色される細胞を Dys 正常陽性細胞, 部分的に染色される細胞を Dys - patchy 陽性細胞, 染色されない細胞を Dys 陰性細胞とした。心筋では, 横断面で心筋細胞の全周のうち 1/2 以上にジストロフィンが染色される細胞を Dys 陽性細胞, 1/2 以下の細胞を Dys - patchy 陽性細胞, 染色されない細胞を Dys 陰性細胞とした。抗 DRP 抗体は Morris 博士<sup>1)</sup>より供与を受けたものを用いた。

### 成 績

#### 1. 骨格筋と心筋の組織所見

**骨格筋:** 図 1 a に症例 1 の生検三角筋の Hematoxylin - Eosin 染色 (HE 染色) を示した。筋線維の軽度の大小不同, 円形化がみられたが, 壊死・変性細胞や再生細胞はほとんどみられなかった。症例 2 でも同じ所見がみられた。

**心筋:** 図 3 a は症例 1 の HE 染色であるが, 筋線維の軽度の大小不同がみられたが, 間質の増殖はごくわずかであった。

#### 2. 骨格筋と心筋のジストロフィン染色像および DRP 染色像

**骨格筋:** 図 1 b に骨格筋の Dys 染色像を示した。横断面で細胞膜が一様に染色される Dys 正常陽性細胞, 部分的に染色される Dys - patchy 陽性細胞, 全く染色されない

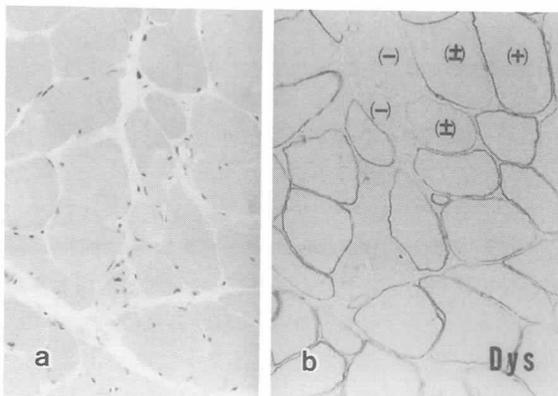


図 1 a DMD 女性保因者 (症例 1) の生検骨格筋 (左三角筋) の染色。250倍。筋線維の軽度の大小不同, 円形化が認められる。壊死・変性細胞や再生細胞はほとんど認められない。  
b DMD 女性保因者 (症例 1) の生検骨格筋 (左三角筋) の Dys 染色。250倍。Dys 正常陽性細胞 (+), Dys - patchy 陽性細胞 (±), Dys 陰性細胞 (-) がみられる。

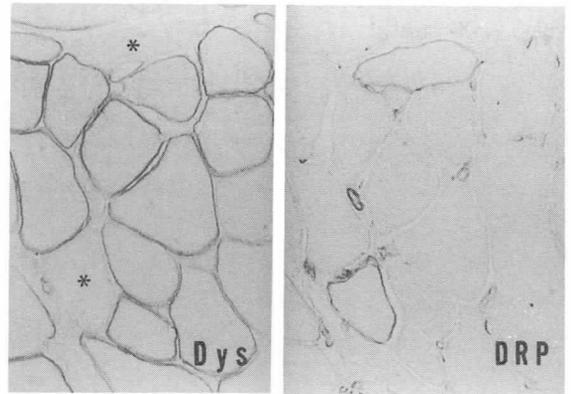


図 2 DMD 女性保因者 (症例 1) の生検骨格筋 (左三角筋) のジストロフィン染色 (左) と DRP 染色 (右)。300倍。Dys 陰性細胞のうち少数の DRP 陽性細胞 (\*) が認められる。

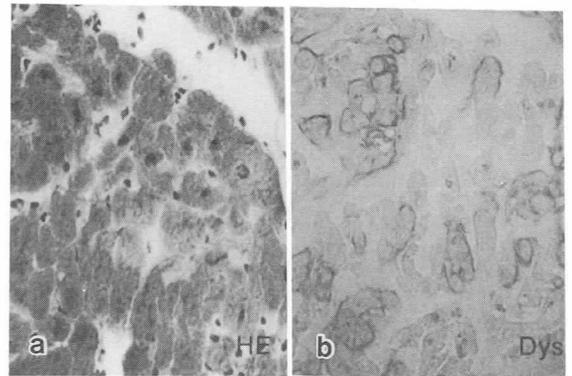


図 3 a DMD 保因者 (症例 1) の生検心筋 (右心室) の染色。370倍。筋線維の軽度の大小不同が認められるが, 変性, 壊死細胞はみられない。間質の線維化はごくわずかである。  
b DMD 女性保因者 (症例 1) の生検心筋 (右心室) のジストロフィン染色。370倍。Dys 陽性細胞, Dys - patchy 陽性細胞, Dys 陰性細胞が認められるが, Dys 陰性細胞が多い。

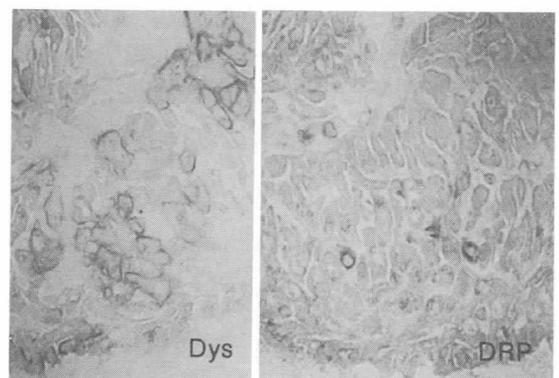


図 4 DMD 女性保因者 (症例 1) の生検心筋 (右心室) のジストロフィン染色 (左) と DRP 染色 (右)。370倍。一部の Dys 陰性細胞に DRP が認められる。

Dys陰性細胞などが認められた。図2は連続切片のDys染色とDRP染色であるが、Dys陰性細胞のうち極少数(8%)にDRPが認められた。症例2でも同様の所見が認められた。

心筋：心筋のDys染色像(図3b)では、Dys陽性細胞、Dys-patchy陽性細胞、Dys陰性細胞が認められた。図4は連続組織切片のDys染色とDRP染色であるが、心筋細胞のDys陰性細胞の少数(2%)にDRPの染色が認められた。

### 3. Dys染色性の異なる筋細胞の比率

骨格筋：Dys正常陽性細胞がこれら2症例で、それぞれ18.2%、36.5%、Dys-patchy陽性細胞が79.3%、52.2%、Dys陰性細胞が2.5%、11.3%認められた。このようにDys-patchy陽性細胞が多く、必ずしもDys陽性細胞と陰性細胞のモザイク様の様相は示さなかった。Dys陰性細胞のうちでDRP陽性細胞はそれぞれ0.2%、2.6%と少数認められた(図5)。

心筋：Dys陽性細胞は23.3%、Dys-patchy陽性細胞は1.3%、Dys陰性細胞75.4%と骨格筋に比べDys陰性細胞

が多くみられた。Dys陰性細胞ではDRP陽性細胞が1.5%と少なかった(図6)。

### 考 察

本文で述べたDMD保因者の2症例は心電図、心臓超音波検査、心臓核医学検査などの所見から左室後下壁を中心としたDMDと同部位に心筋障害のあることが示唆された。心症状を示したDMD保因者の報告は、文献的には少なく、それらのうち生検心筋組織についてジストロフィン染色を行った報告はわずか2例<sup>23)</sup>である。

本2症例の骨格筋では従来報告<sup>4)</sup>されているようなジストロフィン陽性細胞と陰性細胞のモザイクではなく、Dys-patchy陽性細胞が多くみられ、そして正常陽性細胞が比較的少なかった。

Lyon仮説<sup>5)</sup>によると胎生期の初期に雌の2本のX染色体のどちらか一方のX染色体が不活化される。従ってDMD保因者の骨格筋の核にはジストロフィンの生成に関与している核と関与していない核があると推定される。骨格筋は多核細胞であるため、上記の2種類の核が混在している筈であり、ジストロフィンがpatchyに染色される細胞が存在すると推定される。一方、心筋ではDys陽性細胞は約25%と少なく、Dys陰性細胞が75%と多かった。このことが本例の心症状の発現および心機能低下の主要原因になっているのではないかと考えられる。Schmidt-Achertら<sup>6)</sup>は心症状のないDMD保因者の心筋の60%がDys陰性細胞であると報告していることから、心筋におけるDys陰性細胞の割合がある一定の割合を越えると心症状を現すものと考えられる。勿論、血圧、その他の因子も心機能に影響を与えることは考慮しなければならない。心筋細胞は単核細胞であるので、25%の心筋細胞の核は正常に働き、残りの75%には不活化が生じていることが考えられる。

一方DRPは、第6染色体6q24上にコードされ、Dysとはほぼ同じ分子量でありC末端部の80%のアミノ酸配列がジストロフィンと同じ蛋白である<sup>7)</sup>。DMD保因者の骨格筋ではDys陰性細胞のうち15.5%はDRP陽性であったが、残りの84.5%はDRP陰性であった。加えて心筋ではDys陰性細胞のほとんどがDRP陰性であった。DRPはDys欠失に対して代償的に増加すると報告されているが、我々の症例ではDys陰性細胞の大部分がDRP陰性であることから、必ずしもDRPはDysに代償的に増加するものであるとは言えない。

### ま と め

心症状を呈したDMD症候性女性保因者2例の骨格筋並びに心筋におけるジストロフィンとDRPの発現を検討し、これらの例の骨格筋症状や心症状は骨格筋や心筋のDys陰性細胞が比較的多いことによると思われた。ま

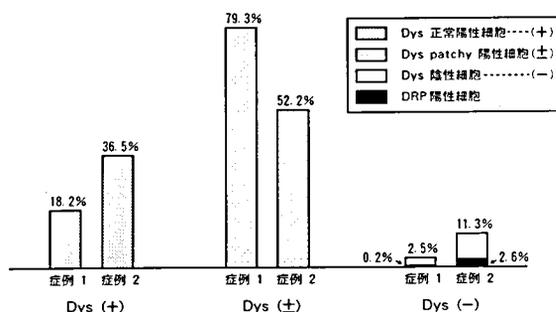


図5 骨格筋細胞のジストロフィン染色像とDRP染色像の成績。Dys-patchy陽性細胞がそれぞれ79.3%、52.2%と多くみられる。

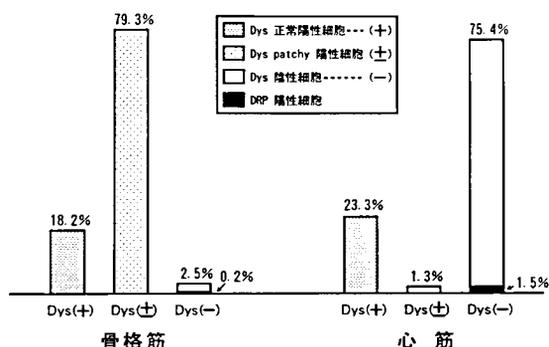


図6 DMD女性保因者(症例1)の骨格筋細胞および心筋細胞のジストロフィン染色像とDRP染色像の成績。骨格筋に比べ心筋ではDys陰性細胞が75.4%と多い。

たDys陰性細胞の大部分はDRP陰性であることから、DRPはジストロフィンの欠失に対して必ずしも代償性に増加したものではないと考えられた。

#### 文 献

- 1) Man N, Ellis JM, Love DR, Davies KE, Gatter KC, Dickson G and Morris GE: Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: Presence at neuromuscular junction, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J Cell Biol* 115: 1695, 1991.
- 2) 山崎元義, 松原奈絵, 神田武政, 夏井正明, 渡辺賢一: 心不全にて発症したDMD manifesting carrierの一例—骨格筋および心筋の免疫組織学的検討—。“筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝および疫学に関する研究”平成2年度研究報告書, 1991, p 258.
- 3) 猪又孝元, 鈴木正孝, 宮北靖, 小山仙, 渡辺賢一: Duchenne型筋ジストロフィー保因者の心筋と骨格筋ジストロフィン. *日本心臓病学会雑誌* 22 (suppl 29): 151, 1992.
- 4) Arahata K, Ishihara T, Kamakura K, Tsukahara T, Ishiura S, Baba C and Matsumoto T: Mosaic expression of dystrophin in symptomatic carriers of Duchenne muscular dystrophy. *N Engl J Med* Jan 19: 138, 1989.
- 5) Lyon MF: X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev* 47: 1, 1972.
- 6) Schmidt-Achert M, Fischer P, Muller-Felba W, Mudra H and Pongratz D: Heterozygotic gene expression in endomyocardial biopsies: A new diagnostic tool confirms the Duchenne carrier status. *Clin Investig* 71: 247, 1993.
- 7) Love DR, Hill DF, Dickson G, Spurr NK, Byth BC, Marsden RF, Walsh FS, Edwards YH and Davies KE: An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339: 55, 1989.

## 22) Duchenne型筋ジストロフィーの中樞神経系における Dystrophin (Dy) と Dy 関連蛋白

内野 誠\*

研究協力者 徳永 誠\* 箕田 修治\* 三池 輝久\*\*\*  
寺本 仁郎\*\* 安藤 正幸\*

1987年に Hoffmanら<sup>1)</sup>により dystrophin が発見されて以来、最近の6年間に得られた多くの知見から、dystrophinは筋の収縮と弛緩の過程で形質膜に弾力を与え、またイオンチャンネルやレセプターなどの膜構成成分を細胞骨格に結びつける膜骨格構造として参加し、これらの成分に対して構造的かつ規制的役割を果している可能性が推定されている<sup>2)3)</sup>。ただその正確な生理機能は今日なお不明であり、近年モデル動物を用いた研究では筋肉組織のみならず、収縮・弛緩に無関係と考えられる中枢神経系でも dystrophinの局在が明らかにされ、これらの組織においては dystrophinはさらに多様な生理機能に参与している可能性がでてきている。

Dystrophinの発見以前より Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)では低IQないし精神発達遅滞児の頻度が高いことが知られていたが<sup>4)</sup>、本症の疾患過程に密接した一次的現象か、教育機会の不足などによる二次的影響なのか、意見の一致をみていない。

今回まだ明らかになっていないヒトの中樞神経系における dystrophin、及び第6染色体にコードされ、dystrophinと類似の役割が推定されている dystrophin-related protein (DRP)の局在並びに特性を明らかにするため、免疫組織化学及び Immuno blotによる検索を行った。

### 対象と方法

正常対照5例(42~74歳)、運動ニューロン疾患4例(53~71歳)、筋緊張性ジストロフィー1例(54歳)、DMD3例(17~26歳、全例低IQ)の剖検脳(前頭葉、頭頂葉、後頭葉、小脳、脊髄)について、7種の抗 dystrophin抗体、2種の抗DRP抗体による免疫組織化学染色、Immuno blotによる検索を行った。

### 結 果

正常対照及びDMD以外の神経筋疾患患者では、dystrophinは大脳の neuronや小脳の purkinje細胞の胞

体表面及び樹状突起に小斑点状に局在がみられたが、知能低下を呈したDMDでは全例欠如していた(図1)。DRPは検索した全例で脳軟膜や血管壁、あるいは脈絡膜に局在がみられたが、neuronには局在はみられなかった(図2)。Immuno blotでは正常対照及びDMD以外の神経筋疾患患者では427kDの dystrophin bandがみられた

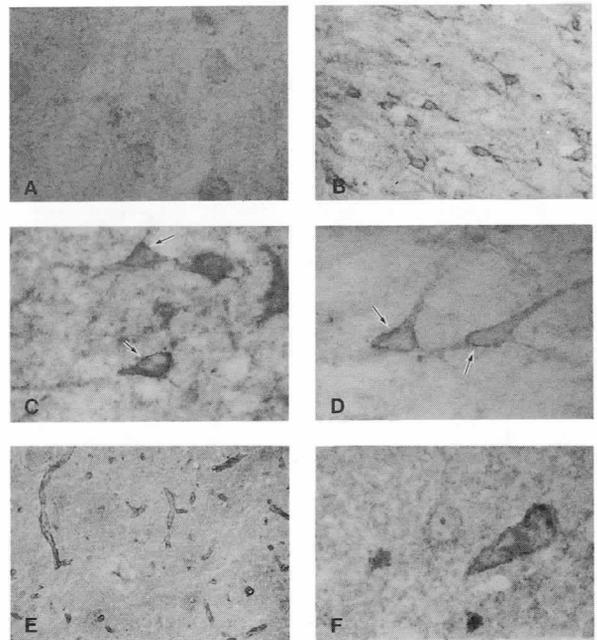


図1 Immunohistochemical localization of dystrophin and dystrophin-related protein (DRP) in the cerebral cortex (frontal lobe) of normal controls (A-C,E,F) and a patient with amyotrophic lateral sclerosis (D), labelled with preimmune serum (A), antibody 6-10 (B,C,D), antibody "LDP" (E,F). Note the punctate immunoreactivity along the cell bodies and dendrites of the cerebral cortical neurons (arrows). With antibody "LDP", small arteries were positively stained, but neuronal cells were negative. A,C,D,F  $\times 785$ ; B,E  $\times 238$

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

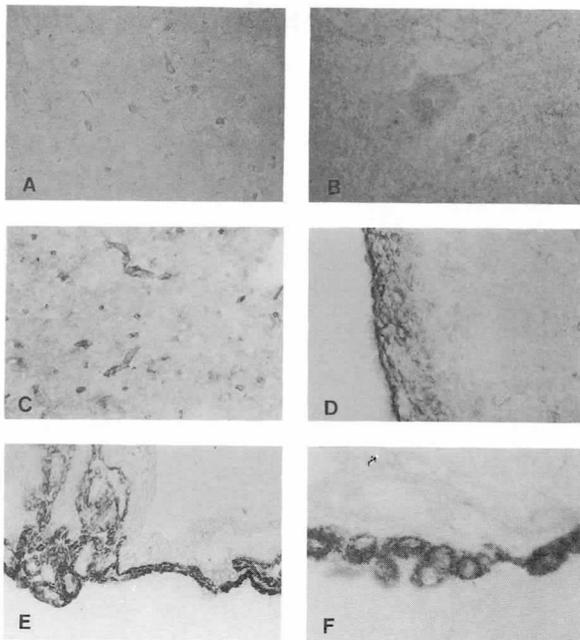


図2 Immunohistochemical localization of dystrophin and DRP in the cerebral cortex (frontal lobe) of Duchenne muscular dystrophy (DMD), labelled with antibody 6-10 (A,B), antibody "LDP" (C-F). With anti-dystrophin antibody (antibody 6-10), no apparent immunoreactivity was noted in DMD. With antibody "LDP", the vascular walls (C), pia mater (D), and choroid plexus (E,F) were positive, but the neuronal cells were negative. A,C,D,E  $\times 238$ ; B  $\times 785$ ; F  $\times 476$

が、DMDでは欠如していた。DRPは痕跡的に認められ、正常対照とDMD間で明らかな量的違いはみられなかった(図3)。

### 考 察

著者らは1989年にマウスの脳にも dystrophin が局在し、一方 mdx マウス脳では dystrophin を欠如することを報告した<sup>5)</sup>。同様の報告は既に Hoffman らによっても行われている<sup>6)</sup>。ただヒトの脳についての成績は、検体入手が困難なこともあって、殆んど報告がない。今回健常対照、DMD、及びDMD以外の神経筋疾患の中樞神経系について検索したが、dystrophin は健常者及びDMD以外の神経筋疾患患者では、neuron の胞体表面に小斑点状に局在し、知能低下を有するDMDでは全例 dystrophin を欠くことが明らかになった。正常マウス脳の免疫電顕による検索で Lidov ら<sup>7)</sup>は neuron の post synaptic membrane に dystrophin が局在することを報告しているが、Lidov らの我々の免疫染色パターン類似性から、ヒトでも dystrophin は post synaptic membrane に存在す

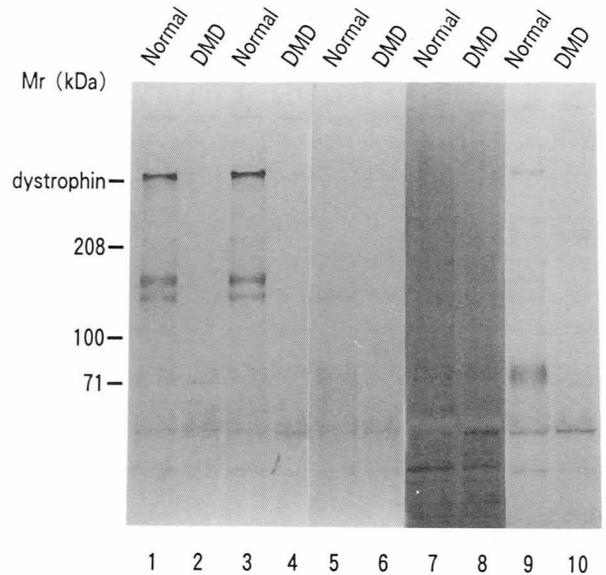


図3 Immunoblot of the brains from normal controls and DMD. Normal control, lanes 1,3,5,7,9; DMD, lanes 2,4,6,8,10. Lanes 1 and 2, frontal lobe; lanes 3 and 4, parietal lobe; lanes 5 to 10, frontal lobe. Blots were stained with antibody 6-10 (lanes 1 to 4), antibody "LDP" (lanes 5,6), Dys-2 (lanes 7,8), and antibody IV (lanes 9,10). The dystrophin band is clear in the normal control brain (lanes 1,3). With antibody "LDP", DRP band was noted very faintly at 427 kDa on the actual nitrocellulose membrane in both normal (lane 5) and DMD brain (lane 6).

る可能性が充分考えられる。共同研究者の池田らが、DMD患者では age matched control に比較して、聴覚刺激P-300に異常が認められることを明らかにしているが、dystrophin は post synaptic membrane においてレセプターのようなシナプスの構成成分を正しく配置するのに関与している可能性があり、DMD患者では本来 neuron に存在すべき脳型 dystrophin を欠如しているため、レセプターの不安定化を招き、ひいては認知機能の異常やIQ異常が生じる可能性が示唆された。今後、DMD、BMDの脳における各種のレセプターの分布、知能障害程度と dystrophin の質的・量的異常の関連を詳細に検討することが、まだ明らかになっていない脳型 dystrophin の生理機能を解明する上でも重要と考えられる<sup>8)~10)</sup>。

謝辞：抗DRP抗体を供与いただいた石浦章一先生（東京大学応用微生物研究所）に深謝いたします。

文 献

- 1) Hoffman EP, Knudson CM, Campbell KP and Kunkel LM : Subcellular fraction of dystrophin to the triads of skeletal muscle. *Nature* 330 : 754 - 758, 1987.
- 2) Koenig M and Kunkel LM : Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* 265 : 4560 - 4566, 1990.
- 3) Byers TJ, Kunkel LM and Watkins SC : The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Cell Biol* 115 : 411 - 421. 1991.
- 4) Prosser EJ, Murphy EJ and Thompson MW : Intelligence and the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child* 44 : 221 - 230, 1969.
- 5) Uchino M, Araki S, Miike T, Teramoto H, Nakamura T and Yasutake T : Localization and characterization of dystrophin in muscle biopsy specimens from Duchenne muscular dystrophy and various neuromuscular disorders. *Muscle Nerve* 12 : 1009 - 1016, 1989.
- 6) Hoffmann EP, Hudecki MS, Rosenberg PA, Pollina CM and Kunkel LM : Cell and fiber-type distribution of dystrophin. *Neuron* 1 : 411 - 420, 1988.
- 7) Lidov HGW, Byers TJ, Watkins SC and Kunkel LM : Localization of dystrophin to postsynaptic regions of nervous neurons system cortical neurons. *Nature* 348 : 725 - 728, 1990.
- 8) Uchino M, Teramoto H, Naoe H, Miike T, Yoshioka K and Ando M : Dystrophin and dystrophin-related protein in the central nervous system of normal controls and Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 1993 (in press).
- 9) Uchino M, Teramoto H, Naoe M, Yoshioka K, Miike T and Ando M : Localization and characterization of dystrophin in the central nervous system of normal controls and Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psych* (in press)
- 10) Uchino M, Yoshioka K, Miike T, Ando M, Tokunaga M, Uyama E, Teramoto H and Naoe H : Dystrophin and dystrophin-related protein in the brains of normal and mdx mice. *Muscle Nerve* (in press).

## 23) Utrophin (dystrophin-related protein) の抽出と血管内皮細胞における同定

清水輝夫\*

研究協力者 松村喜一郎\* 山田広樹\*  
Douglas M. Shasby\*\* Kevin P. Campbell\*\*\*

Utrophin (dystrophin-related protein) は dystrophin の常染色体性ホモログであるが、F-actin 結合部位のある N-terminal domain と、細胞膜糖蛋白複合体との結合部位のある cysteine-rich and C-terminal domains において特にホモロジーが高い<sup>1)2)</sup>。

我々は utrophin が神経筋結合部において、dystrophin と同一、もしくは免疫学的に類似した筋細胞膜蛋白の一群と複合体を形成していることを報告した<sup>3)4)</sup>。また Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD), mdx マウスの大径骨格筋では dystrophin の欠如が dystrophin 結合細胞膜糖蛋白の著明な減少を来すのに対して、障害の軽い小径骨格筋や心筋では utrophin が筋細胞膜全体に分布し、dystrophin 結合細胞膜糖蛋白も良く保たれていることより、utrophin が dystrophin 欠損をある程度代償できる可能性を指摘した<sup>3)</sup>。このことは utrophin を dystrophin 欠損筋すべてで高度に upregulate することができれば、DMD 治療の 1 つになり得る可能性を示唆する。そのためには utrophin の組織・細胞内分布、生理機能等の特徴を明らかにすることが必要である。

我々はまず utrophin の組織分布を知るために、各組織の膜分画をイムノプロット法で検討した。その結果、utrophin の最も多い組織は肺であり、筋がこれに続いた<sup>5)</sup>。そこで骨格筋、肺よりの utrophin の抽出、生化学的特徴付けを試みた<sup>5)</sup>。Utrophin と dystrophin は骨格筋より pH 11 のアルカリ処理で抽出され、heparin-agarose column に吸着した。これは utrophin が dystrophin 同様細胞骨格蛋白であることを示唆する。肺の utrophin も同じ挙動を示した一方、肺に dystrophin は認められなかった。Heparin-agarose column の 0.6M NaCl 溶出分画を anti-utrophin immunoaffinity column にかけて pH 3 で溶出した。その結果、骨格筋、肺両組織より抽出された utrophin はともに分子量約 400kDa の蛋白であった<sup>5)</sup>。抽出された utrophin は F-actin や細胞膜糖蛋白複合体との

binding assay、形態分析等に有用であろう。

Utrophin が肺に多い理由として、血管内皮細胞に発現している可能性が考えられた。肺動脈血管内皮細胞を培養、digitonin もしくは Triton-X 100 で可溶化後、anti-utrophin immunoaffinity beads で免疫沈降実験を行った結果、同細胞における utrophin の発現を確認した<sup>5)</sup>。Utrophin は静脈系、毛細管系血管内皮細胞にも発現していた<sup>5)</sup>。

Utrophin が血管内皮細胞に発現していることは DMD 治療としての utrophin upregulation に重大な問題を投げかける。すなわち筋のみでなく血管内皮細胞でも細胞骨格蛋白である utrophin が過剰発現した場合、血流に影響を与えかねないからである。よって DMD 治療法として応用するには筋特異的に utrophin を upregulate する手法の開発が必要であろう。現在我々は、① utrophin upregulation を観察する系の開発、②各組織における utrophin の生理機能の解明<sup>6)</sup>に取り組んでいる。

### 文 献

- 1) Tinsley JM, Blake DJ, Roche A, et al : Nature 360 : 591-592, 1992.
- 2) Suzuki A, Yoshida M, Yamamoto H, et al : FEBS Lett 308 : 154-160, 1992.
- 3) Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendieck K, et al : Nature 360 : 588-591, 1992.
- 4) Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, et al : Nature 345 : 315-319, 1990.
- 5) Matsumura K, Shasby DM, Campbell KP. FEBS Lett 326 : 289-293, 1993.
- 6) Matsumura K, Yamada H, Shimizu T, et al : FEBS Lett 334 : 281-285, 1993.

\* 帝京大学医学部神経内科  
\*\* University of Iowa  
\*\*\* HHMI, University of Iowa

V . D A G

# 24) 抗dystrophin-associated glycoprotein ペプチド抗体 によるヒト生検筋の免疫組織化学的検討

若山 吉弘\*

研究協力者 自見 隆弘\* 澁谷 誠二\* 武田 篤\*\*  
小林 拓也\*\*\* 鈴木 ゆめ\*\*\*\* 長谷川 修\*\*\*\*  
黒岩 義之\*\*\*\* 熊谷 俊幸† 山下 純正††  
三杉 信子†††

## はじめに

ジストロフィンはそのN末端側でF-アクチンとリンクしC末端側ではdystrophin-associated glycoproteins (DAG)と複合体を形成している<sup>1)</sup>。DAGは筋細胞膜を貫通し、細胞外マトリックスであるラミニンとリンクすることによりジストロフィンとともに筋細胞膜の安定性に重要な働きを担っているものと考えられる<sup>2)</sup>。また、アフリカの severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMD)では50K DAGの欠損が一次的な原因と想定されている<sup>3)</sup>。さらにDuchenne型筋ジストロフィー症(DMD)とそのモデル動物であるmdxマウスでもDAGの減少が指摘され<sup>4)</sup>、その病態との関連が注目されている。我々は、dystrophinopathyおよび他のヒト筋疾患におけるDAGの存在様式を明らかにするために、ヒト生検骨格筋に免疫染色とイムノブロットを施行した。

## 対象及び方法

DMD, Becker (BMD), 福山 (FCMD) 型筋ジストロフィー症それぞれ10, 6, 9例, DMD保因者1例, 他の神経筋疾患19例(肢帯型筋ジストロフィー症1, 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症1, 筋緊張性ジストロフィー症3, 多発筋炎又は皮膚筋炎3, rimmed vacuoleを伴う遠位型筋症2, ミトコンドリア筋症2, ネマリンミオパチー1, アルコールミオパチー1, 筋萎縮性側索硬化症3, 末梢神経疾患2), 成人正常対照15

例, 小児正常対照8例, 計68生検筋を使用した。DAGの抗体は、DAG precursor protein cDNAの43K DAGに相当する部分のC末端15個のアミノ酸(アミノ酸番号880-894)<sup>2)</sup>よりペプチドを合成し(図1), これに thyroglobulinをハプテンとしてつけ羊に免疫して得た。抗43K DAG抗体のELISA titerは72000倍であった。43K DAGの他, Hoffman博士より供与された羊抗60Kジストロフィン抗体, ウサギ抗ラミニン抗体(マウス EHS sarcoma由来)にても免疫染色した。43K DAGの免疫染色は約6 μm凍結切片をアセトン固定, 正常ウサギ血清により非特異的染色をブロックした後, 200倍希釈した同抗体を室温1時間, 蛍光標識2次抗体を室温1時間反応させ観察した。イムノブロットは, 一部の正常対照筋にて施行した。凍結状態で粉碎した生検筋(約100mg)を約10倍量の処理buffer(0.1M Tris-HCl, pH8.0 含10% SDS, 10mM EDTA, 1% 2-メルカプトエタノール, 10% グリセロール)で抽出し, 2分間煮沸水中で処理後, 遠心上清として得た。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は5~20%濃度勾配ゲルを用いてLaemmliの方法によって行った。泳動後蛋白質はホライズブロット法によりゲルからP膜(アトー社製)に転写し, 抗43K DAG抗体と反応後, 発色するバンドを得た。

## 結 果

抗60Kジストロフィン抗体に対する免疫染色性はこれまでの諸家の報告と一致した。免疫染色で, 43K DAG

43K DAG Pro-Lys-Asn-Het-Thr-Pro-Tyr-Arg-Ser-Pro-Pro-Pro-Tyr-Val-Pro

図1 合成ペプチドのアミノ酸配列

\*昭和大学藤が丘病院神経内科  
\*\*昭和大学藤が丘病院臨床病理  
\*\*\*横浜市立大学医学部小児科  
\*\*\*\*横浜市立大学医学部神経内科  
†愛知県コロニー中央病院小児神経科  
††神奈川県こども医療センター神経内科  
†††神奈川県こども医療センター整形外科

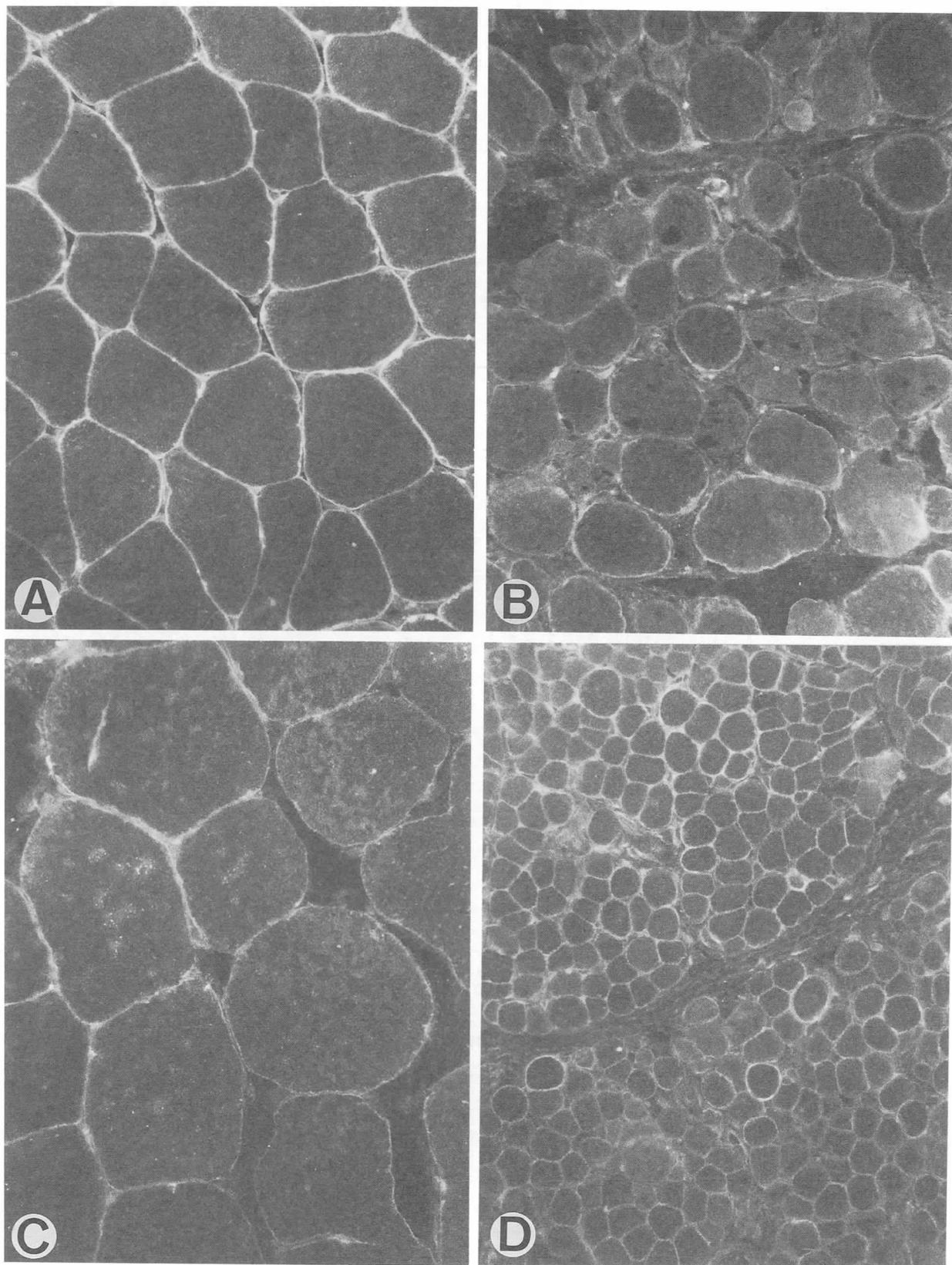


図2 ヒト生検筋の43K DAG免疫染色  
 A：正常対照筋. 全周性, 明瞭に染色されている  
 C：BMD筋. patchy, faintに染色されている

B：DMD筋. 染色性が低下している  
 D：FCMD筋. 染色性は比較的保たれている

に対する抗体は、正常対照および dystrophinopathy 以外の疾患対照筋の筋表面膜を連続性に、明瞭に認識した (図 2 A)。DMD 筋では正常対照と比較し、染色性が中等度から高度に低下していた (図 2 B)。抗 60 K ジストロフィン抗体陽性で、ジストロフィン C 末端に対する抗体で陰性に染色される DMD 1 例でも、DAG の染色性は高度に低下していた。BMD 筋では正常と区別できない染色性を示す症例と、抗 60 K ジストロフィン抗体の染色性と同様の faint, patchy な染色性を示す症例とが存在した (図 2 C)。FCMD では染色性が、軽度低下するものかなり保たれている症例が多かった (図 2 D)。ラミニンの免疫染色性は正常対照、疾患対照、DMD、BMD、FCMD とも筋線維周囲、基底膜に一致して明瞭に染色され、明らかな異常を認めなかったが、DMD、FCMD では染色部分の幅がやや厚い印象を受けた。DMD 保因者の 1 例では、ジストロフィン欠損線維には、43 K DAG の染色性が低下している筋線維と、かなり保たれている筋線維と両者が存在した。イムノブロットでは 43 kDa の位置に 1 本のバンドを検出した。

#### 考 察

Ohlendieck ら<sup>4)</sup>は、DMD および mdx マウスの筋細胞膜で dystrophin-associated proteins (DAP) が著減していることを示し、これはジストロフィン欠損の二次的現象と考えている。一方、Yoshida ら<sup>5)</sup>は DMD では 43 K DAG がかなり保たれていることを示し、前者との違いは抗体の差に起因するものと推定している。我々は、今回 43 K DAG の C 末端の一部に対応する合成ペプチドを羊に免疫して得た抗体で DMD 筋を免疫染色したところ、DMD 筋では 43 K DAG は存在するものの正常対照と比較するとかなり染色性が低下していた。また、BMD では 43 K DAG はかなり保たれている症例が多かった。我々の結果からは、dystrophinopathy における 43 K DAG は、ジストロフィンほどではないが、ジストロフィンと関連した何らかの量的変化を生じているものと考えられた。また、Matsumura ら<sup>6)</sup>は FCMD で DAG が著減していることを示し病態との関連を指摘している。今回の我々の結果は Arahata ら<sup>7)</sup>と同様に、FCMD における 43 K DAG は若干の低下を見るものの比較的保たれていたが、FCMD における 43 K DAG の存在様式については、今後更に検討を要するものと考えられた。ラミニンに関

しては Hayashi ら<sup>8)</sup>が FCMD において M サブユニットの減少を指摘しているが、今回我々が使用した抗体はサブユニットを特異的に認識する抗体ではないため異常を認めなかったものと思われた。

#### 文 献

- 1) Ervasti JM and Campbell KP: Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66: 1121-1131, 1991.
- 2) Ibraghimov-Beskrovnya O, Ervasti JM, Leveille CJ, et al: Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking to the extracellular matrix. *Nature* 355: 696-702, 1992.
- 3) Matsumura K, Tomé FMS, Collin H, et al: Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 359: 320-322, 1992.
- 4) Ohlendieck K, Matsumura K, Ionasescu VV, et al: Duchenne muscular dystrophy. Deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43: 795-800, 1993.
- 5) Yoshida M, Mizuno Y, Nonaka I, et al: A dystrophin-associated glycoprotein, A3a (one of 43 DAG doublets), is retained in Duchenne muscular dystrophy muscle. *J Biochem* 114: 634-639, 1993.
- 6) Matsumura K, Nonaka I and Campbell KP: Abnormal expression of dystrophin-associated proteins in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Lancet* 341: 521-522, 1993.
- 7) Arahata K, Hayashi YK, Mizuno Y, et al: Dystrophin-associated glycoprotein and dystrophin co-localisation at sarcolemma in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Lancet* 342: 623-624, 1993.
- 8) Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E, et al: Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies. *J Neurol Sci* 119: 53-64, 1993.

# 25) Double immunogold labelling法による43kDa dystrophin-associated glycoproteinと dystrophinの正常骨格筋細胞における超微局在

## — 免疫透過電顕的検討 —

若山 吉弘\*

研究協力者 澁谷 誠二\* 自見 隆弘\*  
武田 篤\*\* 鬼木 弘明\*\*\*

### 緒 言

Duchenne筋ジストロフィー症で欠損する dystrophin と骨格筋細胞膜で link すると考えられているものには dystrophin associated glycoproteins(DAG)と dystrophin associated proteins (DAP) とがある。その分子量は 156, 59, 50, 43, 35, 25kDa であり、それぞれ 156-DAG, 59-DAP, 50-DAG, 43-DAG, 35-DAG, 25-DAP と呼ばれている。59-DAG (A1) は骨格筋細胞膜の周辺蛋白であるが、50-DAG (A2), 43-DAG (A3), 35-DAG (A4), 25-DAG (A5) は膜内粒子であるとされる。一方 156-DAG は骨格筋細胞外の膜周辺蛋白であり、この 156-DAG と 43-DAG (A3) は 1 つの cDNA より翻訳され、156-DAG はその後 dystroglycan と呼ばれ基底膜の laminin と結合し<sup>1)</sup>、43-DAG は細胞膜を貫通し細胞膜の内側で dystrophin と結合していると考えられている。今回我々は 156-DAG と 43-DAG の前駆体蛋白の cDNA より、それぞれのアミノ酸配列の一部を読み取りペプチドを合成し、ニュージーランドにて羊に免疫しその抗体を得た。これらの抗体の超微局在と dystrophin との相互関係を検討する目的で本研究を行ったが、156-DAG は immunoblot が今ひとつうまくいかなかったの

で、ここでは 43-DAG の所見を述べたい。

### 材料と方法

#### (1) 合成ペプチドとその性状分析

ペプチドは、DAG precursor protein cDNA より Ibraghimov-Beskrovnaya O<sup>2)</sup>らにより決定されたアミノ酸配列の 43-DAG について、アミノ酸番号 880-894 に相当する部分 (PKNMTPYRSPPPYVP) を合成し、ハプテンとして thyroglobulin をつけニュージーランドにて羊

に免疫して得た。ELISA 抗体価は  $\times 72,000$  であった。Immunoblot の試料は、凍結状態で粉碎したマウス骨格筋 (約 100mg) を約 10 倍量の処理 buffer (0.1M Tris-HCl, pH8.0 含 10% SDS, 10mM EDTA, 1% 2-メルカプトエタノール, 10% グリセロール) で抽出し、2 分間煮沸水中で処理後遠心上清として得た。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は 5-20% の濃度勾配ゲルを用いて Laemmli の方法によって行った。泳動後蛋白質はホライズプロット法でゲルから P 膜 (アトー社製) に転写し、抗体と反応後発色させた。

正常マウス骨格筋の光顕レベルでの免疫蛍光抗体法による標本は、6  $\mu$ m の厚さの骨格筋の cryostat 横断標本を間接免疫蛍光抗体法により作製した。

#### (2) Immunogold labelling法による 2 重免疫電顕標本の作製について

6 匹の mdx コントロールマウス大腿四頭筋を冷却した 4% パラフォルムアルデヒド 0.1M リン酸バッファー液で氷漬して 1 時間固定後、4 回 PBS で洗浄、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結後、cryostat で厚さ約

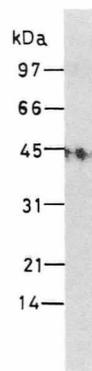


図 1 mdx コントロールマウス骨格筋のイムノプロットでは 43kDa の分子量の蛋白を認識するバンドが得られた。

\*昭和大学藤が丘病院神経内科  
\*\*昭和大学藤が丘病院臨床病理  
\*\*\*昭和大学藤が丘病院電顕室

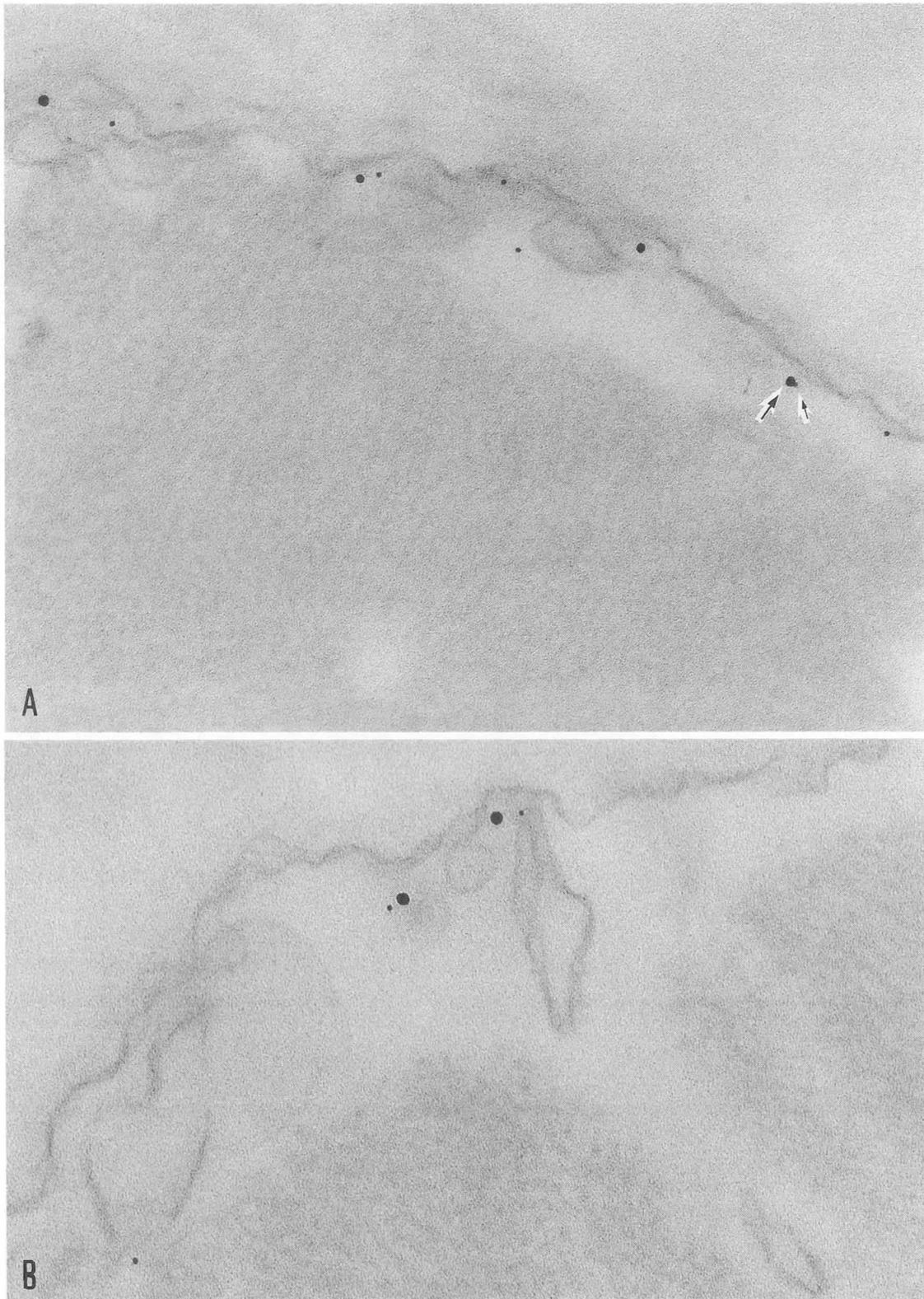


図2 A-C : Double immunogold labelling法によるウサギ抗 6-10 dystrophin 抗体と羊抗43-DAG 抗体の存在部位を示す。  
 A : 10nm (dystrophin), 5 nm (43-DAG) 金粒子は正常マウス骨格筋の細胞膜の内側に細胞膜に随伴して認められた。2 Aの写真右半の大きい矢印は10nm, 小さい矢印は5 nm 金粒子を示す。×168,000  
 B : 2 Aと同様な所見であるが、それに加え5 nm, 10nm金粒子が20nm前後の間隔を置き doublet の形で存在している。×188,000

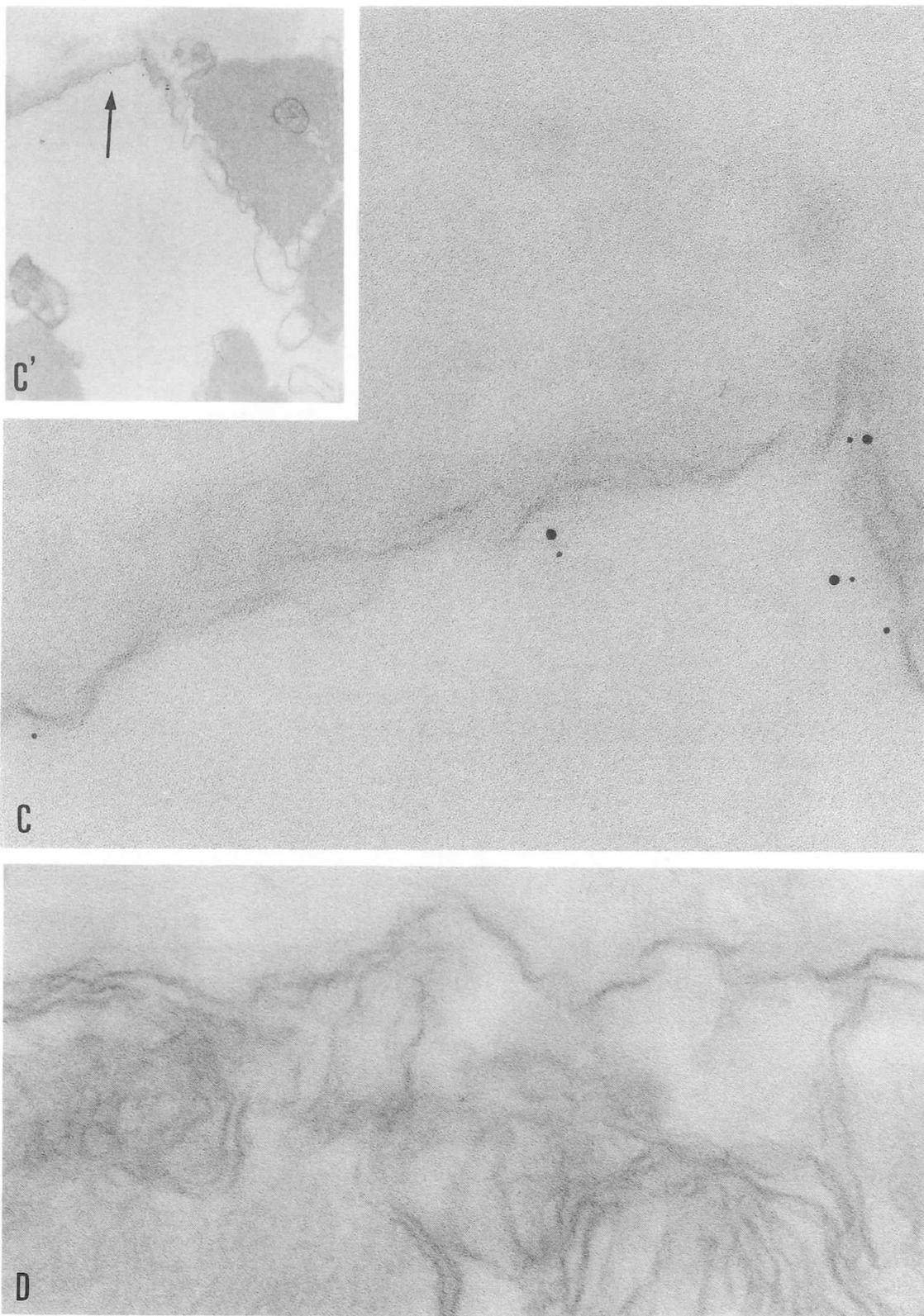


図2 C, C': 2 CはC'の矢印の部分の拡大像で, 骨格筋細胞膜の内側に細胞膜に随伴して5 nm, 10nm金粒子がdoubletの形で3組存在している. C×188,000, C'×20,000  
 D: Double immunogold labelling法による正常ウサギ, 正常羊血清による免疫電顕所見. この正常血清による対照標本には金粒子のsignalは認められない. ×168,000

1  $\mu$ mに細切した。この標本を冷却したPBSで更に4回洗浄し、5%正常ヤギ、ロバ血清混合液で30分間室温にて反応させ非特異的の反応を除去した。次に1次抗体として(I-a) 100倍希釈羊抗43-DAG抗体、(II-a) 500倍又は1000倍希釈ウサギ抗6-10 dystrophin抗体<sup>9)</sup>(Dr. Byersらより供与)を使用し、(I-a)のみ又は(I-a)(II-a)の混合液とcold roomで24時間反応させた。反応後試料を冷却PBSで1次抗体を十分洗浄除去するため4回よく洗浄した。2次抗体は(I-b) 20倍希釈5 nm金コロイド標識ロバ抗羊抗体(Bio Cell)、(II-b) 20倍希釈10nm金コロイド標識ヤギ抗ウサギ抗体(Amersham)を使用し、1次抗体で(I-a)のみを使用した標本は2次抗体は(I-b)を使用。1次抗体で(I-a)と(II-a)を使用した試料は2次抗体では(I-b)と(II-b)を使用し、その混合液とcold roomで24時間反応させた。また免疫対照標本として抗43-DAG抗体のみの染色標本に対しては正常羊血清で、また抗43-DAG抗体と抗6-10 dystrophin抗体染色標本に対しては正常のウサギと羊血清と反応させた骨格筋標本作製した。

これらすべての標本を冷却PBSで4回洗浄し、更に冷却2.5%グルタルアルデヒド溶液で30分間固定し、洗浄した。後固定は冷却した1%オスミウム酸液で1時間行い、上昇系列のアルコールとプロピレンオキシドにて脱水、エポンに包埋し、厚切り、薄切後、無染色にて電顕にて観察した。

## 結 果

### (1) Immunoblot及び光顕蛍光抗体染色所見

Immunoblotでは骨格筋の43-kDaの成分を認識するbandが認められた(図1)。光顕蛍光抗体染色標本では骨格筋の周辺部に抗体の認識部位が認められた。

### (2) Immunogold labelling法による2重免疫電顕標本所見

抗43-DAGだけの免疫染色標本では抗体の存在を示す5 nmの金粒子は骨格筋細胞膜の内側に細胞膜に随伴して認められた。筋細胞の筋原線維、小胞体、横管などの内部構造には有意なシグナルは認められなかった。また、細胞外基質例えば基底膜や基底膜側の細胞膜近辺にも有意なシグナルは認められなかった。

次に、抗43-DAGと抗6-10 dystrophin抗体との2重免疫染色標本では、それぞれの抗体の存在を示す5 nm金粒子と10nm金粒子はいずれも骨格筋細胞膜の内側で細胞膜に随伴して認められた(図2 A)。興味ある所見として5 nm金粒子と10nm金粒子が約15~30nmの間隔を置きdoubletで存在する所見がしばしば認められた(図2 B, 2 C)。なお、抗体を正常血清と置き換えて作製した免疫対照標本では金粒子の存在は認められなかつ

た(図2 D)。

## 考 察

正常骨格筋細胞膜蛋白であるdystrophinと、これにlinkしている膜蛋白や他の細胞骨格やその細胞外基質との関係を検討することは、dystrophinの機能を追及する意味においても重要と考えられる。これらの関係は生理学的また生化学的手法を用いてよく研究されているが、超微形態学的側面よりの研究は少ない。この点を研究する一環として我々は、今回156-DAGと43-DAGの前駆体蛋白をコードするcDNAから156-DAGや43-DAGのアミノ酸配列の一部を読み取り合成ペプチドを作製、thyroglobulinをハプテンとしてつけ羊に免疫し抗体を得たが、156-DAGに対するものはimmunoblot解析が今ひとつうまくゆかず、現在156-DAGの別の部位のアミノ酸配列を読み、合成ペプチドを作製し、同様にしてニュージーランドにて羊に免疫中であり、平成6年初頭には入手出来る予定である。一方43-DAGに対する抗体はすでに以上で記したように使用可能であり、結果の項のような研究成果を得た。

抗6-10 dystrophin抗体はdystrophinのアミノ酸配列の約2000~3100部分を認識するので、この抗dystrophin抗体と抗43-DAG抗体を用いた金コロイド標識2重免疫電顕所見で見られた約15~30nmの間隔を置き、5 nm、10nm金粒子がdoubletの形で存在する所見はdystrophinと43-DAGがlinkしていることを示唆する所見として興味深い。

今後同様な金コロイド標識法を用いた2重免疫電顕法<sup>1)</sup>を用いて、43-DAGとspectrin等、他の細胞膜細胞骨格成分との相互関係の研究や156-DAG、更には他のDAG、DAP成分との関係、またそれらのdystrophinとの関係をdeep etching replica法をも含めて研究し、骨格筋細胞膜とその周辺構造の超微形態的研究を進めてゆきたい。

## ま と め

- (1) 抗43-DAG抗体は正常骨格筋細胞膜の内側に細胞膜に随伴して認められた。
- (2) 抗43-DAG抗体と抗6-10 dystrophin抗体による2重免疫染色でも両抗体は正常骨格筋細胞膜の内側に筋細胞膜に随伴して認められた。
- (3) 抗43-DAG抗体と抗6-10 dystrophin抗体の存在を示すそれぞれ5 nm、10nm金粒子は、しばしば約15~30 nmの間隔を置きdoubletの形で存在するのが認められた。

## 文 献

- 1) Ahn AH and Kunkel LM: The structural and functional diversity of dystrophin. Nature Gene-

- tics 3 : 283-291, 1993.
- 2) Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, et al : Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355 : 696-702, 1992.
  - 3) Byers TJ, Kunkel LM, et al : The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac and smooth muscle. *J Cell Biol* 115 : 411-421, 1991.
  - 4) Wakayama Y, Shibuya S, et al : Size and localization of dystrophin molecule : immunoelectron microscopic and freeze etching studies of muscle plasma membranes of murine skeletal myofibers. *Acta Neuropathol* 86 : 567-577, 1993.

## 26) 末梢神経の dystroglycan 複合体の検討

清水輝夫\*

研究協力者 山田広樹\* Kevin P. Campbell\*\* 松村喜一郎\*

Dystrophinは筋細胞膜において、 $\alpha/\beta$ -dystroglycan (156/43kDa dystrophin-associated glycoprotein)を含むこれまで未知の複数の細胞膜蛋白 (dystrophin-associated proteins)と結合、複合体を形成している<sup>1)~6)</sup>。筋の $\alpha$ -dystroglycanは細胞膜外側に存在するプロテオグリカンと推定され、細胞外基質の主要構成要素である laminin と特異的に結合する<sup>4)~7)</sup>。筋において $\alpha$ -dystroglycanと結合する laminin 3 イソフォームは merosin である<sup>5)</sup>。

本複合体は全く新しいタイプの筋細胞 laminin 受容体であり、実際に laminin と結合するのが dystroglycan であることにより、dystroglycan 複合体と呼ぶのが合理的である。Integrinに代表される既知の laminin 受容体は、単に細胞膜の構築維持のみならず、細胞の成長・分化、移動・接着、信号伝達、等各種の機能に関与すると考えられており<sup>8)</sup>、今後 dystroglycan 複合体の機能の解明が待たれる所である。

では同様な細胞膜 laminin 受容体・細胞接着因子は筋以外の組織・細胞にも存在するだろうか？ またその場合その機能は何であろうか？ 現在我々は末梢神経の dystroglycan 複合体の機能解析を行っているが、本研究ではまず dystroglycan 複合体の構成要素の末梢神経における発現様式を検討した<sup>9)</sup>。

- (1) 末梢神経のシュワン細胞・髄鞘最外層に $\alpha/\beta$ -dystroglycan, 59kDa dystrophin-associated protein, 35kDa dystrophin-associated glycoprotein, utrophin, Dp116 (分子量116kDaの dystrophin 遺伝子産物)の発現を認めた。ほぼ同部位に laminin サブユニットの M, B1, B2 も発現していた。
- (2) 末梢神経に adhalin (50kDa dystrophin-associated glycoprotein), フルサイズの dystrophin は発現していなかった。
- (3) 末梢神経の $\alpha$ -dystroglycanの分子量は約120 kDaであり、筋型の156 kDaと異なった。これは glycosylation の差によるのかも知れない。 $\beta$ -Dystroglycanの分子量は筋とほぼ同じで約43kDaであった。

以上の結果 (表) は、末梢神経 (シュワン細胞・髄

表 Components of dystroglycan

	Complex (DGLC)	
	Skeletal muscle	Peripheral nerve
Dystrophin	+	-
Dp116	-	+
Utrophin (DRP)	+	+
$\alpha$ -Dystroglycan (156DAG)	+	+
$\beta$ -Dystroglycan (43DAG)	+	+
59DAP (Syntrophin?)	+	+?
Adhalin (50DAG)	+	-
35DAG	+	+?

鞘)にも dystroglycan 複合体が存在し、laminin 受容体である可能性を示唆する<sup>9)</sup>。しかし複合体の組成は筋と異なり、従ってその機能も末梢神経と筋で異なるものと推定される。今後我々はこれらの点を検討し、dystroglycan 複合体の末梢神経における生理機能を解明したい。Adhalin 欠損症では Duchenne 型筋ジストロフィーと類似した臨床像を呈するが、神経症状は欠如する<sup>10)</sup>。これは adhalin の発現が筋特異的であることと関連があるのかも知れない<sup>9)11)</sup>。

### 文 献

- 1) Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, et al: Nature 345: 315-319, 1990.
- 2) Yoshida M and Ozawa E: J Biochem 108: 748-752, 1990.
- 3) Ervasti JM and Campbell KP. Cell 66: 1211-1131, 1991.
- 4) Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, et al: Nature 355: 696-702, 1992.
- 5) Ervasti JM and Campbell KP. J Cell Biol 122: 809-823, 1993.
- 6) Ibraghimov-Beskrovnaya O, Milatovich A, Ozcelik

\* 帝京大学医学部神経内科

\*\* HHMI, University of Iowa

- T, et al : Hum Molec Genet 2 : 1651 - 1657, 1993.
- 7) Gee SH, Blacher RW, Douville J, et al : J Biol Chem 268 : 14972 - 14980, 1993.
- 8) Tryggvason K : Current Opinion. Cell Biology 5 : 877 - 882, 1993.
- 9) Matsumura K, Yamada H, Shimizu T, et al : FEBS Lett 334 : 281 - 285, 1993.
- 10) Matsumura K, Tome FMS, Collin H, et al : Nature 359 : 320 - 322, 1992.
- 11) Roberds SL, Anderson RD, Ibraghimov-Beskrov-naya O, et al : J Biol Chem 268 : 23739 - 23742, 1993.

## 27) 50kDa dystrophin-associated glycoprotein 欠損を認めた重症筋ジストロフィーの一症例

納 光 弘\*

研究協力者 樋口逸郎\* 中川正法\* 福永秀敏\*\*  
松村喜一郎\*\*\* K. P. Campbell\*\*\*\*

Dystrophin-associated glycoprotein (DAG) はジストロフィンのC末端側と結合し、また細胞外ではラミニンと結合することが明らかになり<sup>1)</sup>、筋細胞膜の保持に不可欠であると考えられている。最近、松村らは北アフリカのアラブ人にみられる重症小児常染色体性男性筋ジストロフィー<sup>2)</sup>において、50K-DAGの欠損が存在することを明らかにした<sup>3)</sup>。今回我々は、日本人で最初の50K-DAGを経験したので臨床的、筋病理学的検索結果を報告する。

### 症 例

患者は33歳男で出身地は鹿児島県喜界島である。家族歴では、両親がまたいとこ結婚であり、父のおじが17歳時に筋疾患で死亡している。現病歴は、5歳時歩行障害が出現し、9歳時階段昇降困難となり13歳で歩行困難で車椅子となった。13歳時に国療南九州病院に第1回目の入院となった。20歳時に退院し以後自宅療養をしていたが、27歳時肺炎を併発し呼吸困難となり2回目の入院となった。翌年には気管切開し、以後陽圧式人工呼吸器を使用している。30歳時に前脛骨筋において筋生検を施行した。現症及び検査所見では、初回入院時には近位筋優位の筋萎縮、筋力低下及び下腿筋の仮性肥大が認められた。腱反射は低下していたが、感覚系及び知能は正常であった。血清CK値は940U/L(正常<195)と中等度上昇していた。2回目入院時には筋萎縮はびまん性となっており、四肢の関節拘縮、側彎もみられ呼吸不全、心不全の状態であった。血清CK値は335U/Lとかなり正常値に近づいていた。尚、現在のCK値は正常範囲となっている。神経伝導速度は正常であり、針筋電図では筋原性変化を認めた。心電図は左室肥大を認め血液ガスでは、pH:7.43, P<sub>CO2</sub>:63, P<sub>O2</sub>:67であった。骨格筋のCTでは、最近まで比較的筋力が保たれていた下腿筋にも著明な脂肪変性が認められた(図1)。ジストロフィ

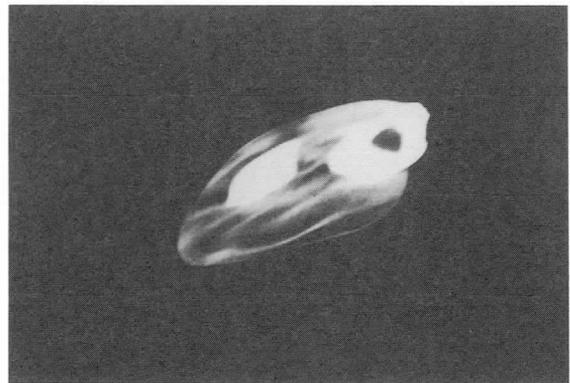


図1 下腿部のCT  
伸筋優位に脂肪変性がみられる。

ン遺伝子のPCR分析では異常は認められなかった。

### 方 法

生検筋の凍結切片に対して通常の組織学的、組織化学的染色とともに各種抗体を用いた免疫組織化学的染色を施行した。使用した抗体は、抗ジストロフィンモノクローナル抗体(N末端, rod, C末端)及び、抗DAGポリクローナル抗体(156K, 59K, 50K, 43K, 35K)である。

### 結 果

組織化学的には、筋線維の大小不同, fiber splitting, 中心核の軽度増加及び結合織の著明な増殖が認められたが、壊死線維は稀であった。明らかなopaque fiberは認められなかった(図2)。

免疫組織化学的には、3種類の抗ジストロフィンモノクローナル抗体を用いた染色では正常であり、156K-DAG, 59K-DAP及び43K-DAGに対する抗体を用いた染色でも正常であった。一方、筋膜上の50K-DAGは著明に減少しており、Duchenne型筋ジストロフィー患者の生検筋における減少の程度より著明であった。しかし、本患者においては50K-DAGの欠損は完全欠損ではなく、少量の50K-DAGのpatchyな染色性が筋線維上に

\*鹿児島大学医学部第三内科  
\*\*国療南九州病院  
\*\*\*帝京大学医学部神経内科  
\*\*\*\*HHMI & University of Iowa

認められた(図3). 35K-DAGは本症例では正常筋に比  
べ中等度低下していたが, Duchenne型筋ジストロー

のような著明な低下ではなかった.

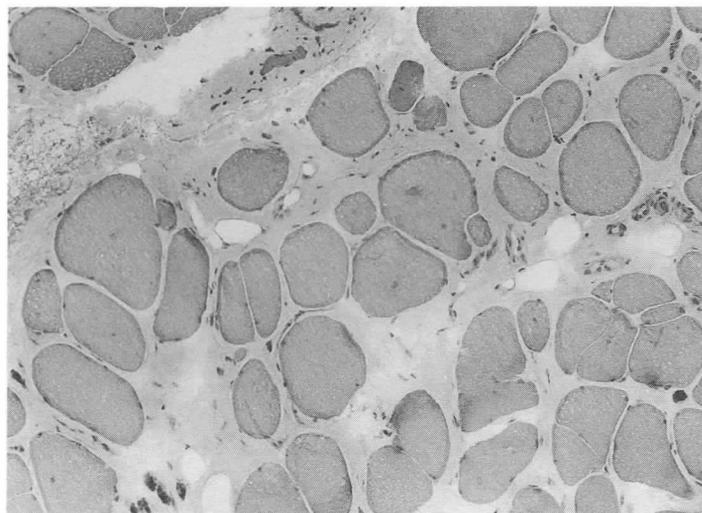


図2 HE染色×130  
筋線維の大小不同, fiber splitting, 著明な結合織の増殖がみられる.

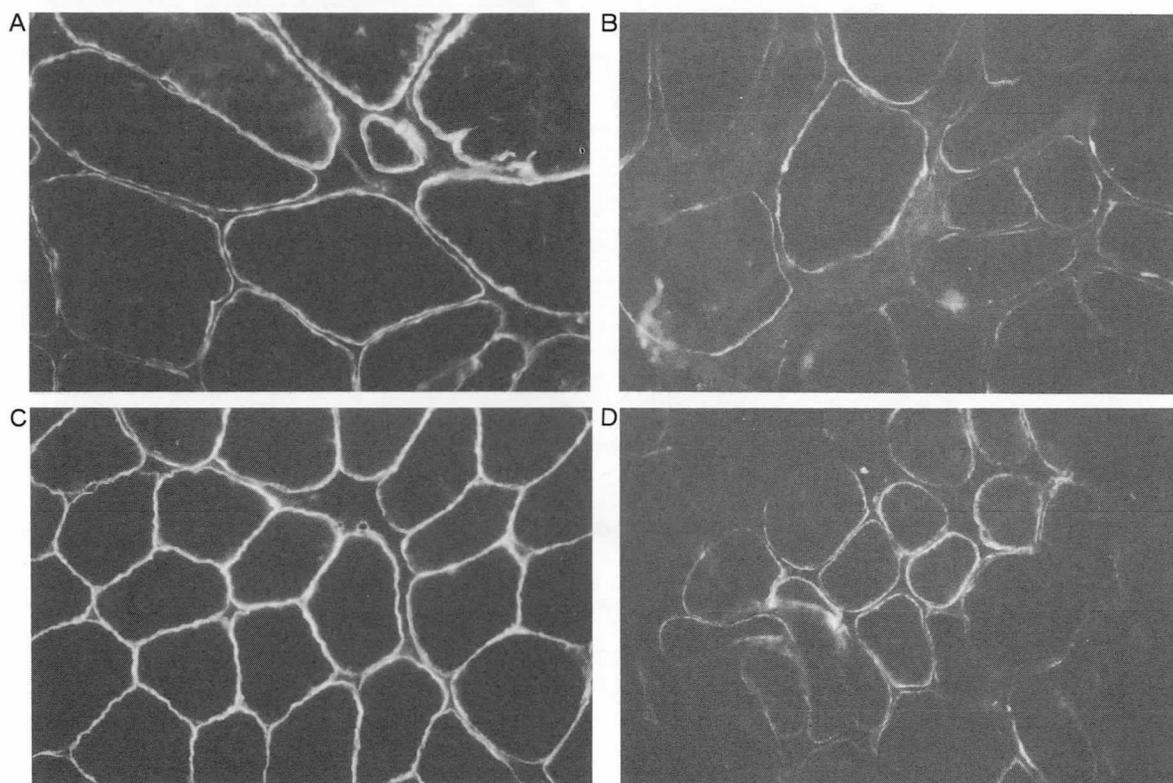


図3 免疫組織化学的染色  
A: 本症例の抗ジストロフィン染色  
B: 本症例の抗50K-DAG染色  
C: 正常対照例の抗50K-DAG染色  
D: Duchenne型筋ジストロー例の抗50K-DAG染色

## 考 察

本症例は筋生検によりジストロフィンが正常であり、50K-DAGの欠損が存在することが証明されるまではDuchenne型、あるいは重症のBecker型筋ジストロフィーと診断されていた。これまでの50K-DAG欠損症の報告例に比べ、本例では血清CK値の上昇が比較的軽度であり、また50K-DAGは完全欠損ではなく少量のpatchyな発現が筋膜上に認められた。これらの事実は50K-DAGの欠損の程度と臨床症状に多様性があることを示唆している。50K-DAGの欠損の程度と臨床的重症度の上に相関があるか否かについて症例数を増やし検討する必要がある。

今回の報告により、50K-DAG欠損症は特定の人種のみが存在する疾患ではなく、世界的な広がりを持つものであることが明らかになった。今後、本邦においてもDuchenne型及びBecker型筋ジストロフィーの鑑別疾患のひとつとして、50K-DAG欠損症に留意する必要がある。

## ま と め

- (1) 50K-DAG欠損症の最初の日本人例を報告した。
- (2) 臨床症状からはDuchenne型あるいはBecker型筋

ジストロフィーとの鑑別が困難であった。

- (3) 50K-DAGの欠損の程度と臨床症状に多様性が存在する可能性がある。
- (4) 50K-DAG欠損症は特定の人種のみに見られるものではなく、本邦においてもDuchenne型あるいはBecker型筋ジストロフィーの鑑別疾患のひとつとして重要である。

## 文 献

- 1) Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, et al: Primary structure of dystrophin-associated glycoprotein linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355: 696-702, 1992.
- 2) Ben Hamida M, Fardeau N and Attia N: Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. *Muscle Nerve* 6: 469-480, 1983.
- 3) Matsumura K, Tome FMS, Collin H, et al: Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 359: 320-322, 1992.

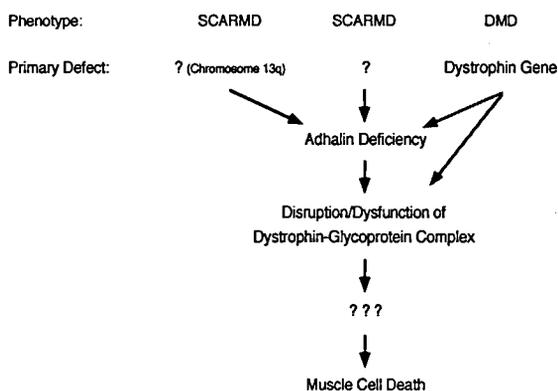
## 28) Adhalin (50kDa dystrophin-associated glycoprotein) 欠損症の臨床病態

清水輝夫\*

研究協力者 松村喜一郎\* 山田広樹\* Kevin P. Campbell\*\*

Dystrophinは筋細胞膜において, dystroglycan(156/43 kDa dystrophin-associated glycoproteins)を含む複数の細胞膜蛋白と結合している<sup>1)~6)</sup>. Dystrophinは細胞内でF-actin細胞骨格と結合し, dystroglycanは細胞外で細胞外基質の主要構成要素である lamininと結合する<sup>4)~6)</sup>. このことは, dystrophin-glycoprotein complexが筋細胞膜を介して細胞の内外の骨格/基質を連携する構造体であることを意味する<sup>9)</sup>. 本複合体は全く新しいタイプの laminin受容体であり, 従来知られる代表的な laminin受容体と同様, 単に筋細胞膜の構築維持のみならず, 筋細胞の分化, 成長, 移動・接着, 信号伝達など各種の機能に関与する可能性が考えられるが<sup>7)</sup>, その実態は今後の研究によって解明されねばならない. 本複合体の構成要素の中で実際に lamininと結合するのが dystroglycanであることより, 本複合体は dystroglycan複合体と呼ぶのが合理的であろう.

Dystroglycan複合体中の50kDa dystrophin-associated glycoproteinは現在 adhalinと呼ばれている<sup>9)</sup>. 昨年我々は, 北アフリカのアラブ人に多発し, Duchenne型筋ジストロフィー (DMD)と類似した臨床像を呈する常染色体劣性遺伝の重症筋ジストロフィー (SCARMD, severe childhood autosomal recessive muscular dystrophyの略)で adhalinが特異的に欠損していることを報告した<sup>9)</sup>. DMDでは dystrophinの欠如のため



図

adhalinが二次的に著減していることより<sup>10)11)</sup>, adhalinの欠損がこれら2疾患における筋細胞死の分子機構において重要な役割を果たしているものと考えられる<sup>9)</sup>.

さて SCARMD という病態名は必ずしも明確でなく混乱を招きやすいので, その生化学的特徴に基づいて我々はこれを adhalin欠損症と呼びたい. Adhalin欠損症の臨床的特徴は表に示す通りである. 本症はその臨床的類似性のために男性の場合 DMD/重症の Becker型筋ジストロフィーと, 女性の場合有症候性 DMD 保因者と誤診・暫定診断されやすいので注意を要する.

昨年 DMD/SCARMD 類似の臨床像を呈するチュニジア人の重症筋ジストロフィーが第13番染色体にリンクすることが示された<sup>12)</sup>. しかしこの疾患が adhalin欠損症と同一かは不明であった. 我々は同様の病像を呈するアルジェリア人患者多数例を検索した結果, これらの患者は adhalinを欠損していることを発見した<sup>13)</sup>. また連鎖解析可能例は全例第13番染色体にリンクしていた<sup>13)</sup>. このことは北アフリカのアラブ人の SCARMDは adhalin欠損症であり, 原因遺伝子は第13番染色体上に存在することを示唆する.

SCARMDの臨床像を呈する患者はアラブ人以外の人種にも存在するが, これらの患者が adhalinを欠損するか検討した. その結果我々は adhalin欠損症がフランス

表 Adhalin欠損症 (SCARMD) の臨床病態学的特徴

\*DMDに類似する点

- # 1 発症は5才前後, 腓腹筋仮性肥大を高頻度に認める
- # 2 血清CK著明高値
- # 3 重症の場合, 10才で歩行不能, 20才で死亡することあり
- # 4 進行期に心筋障害あり得る
- # 5 筋生検上著明なジストロフィー性変化あり

\*DMDと異なる点

- # 1 常染色体性劣性遺伝 (血族結婚高頻度, 男女同頻度)
- # 2 人種差あり (アラブ人に多発) ?
- # 3 重症度は患者間でばらつく (同一家系内でも)
- # 4 知能障害はない
- # 5 Dystrophinは良く保たれる (進行期には二次的減少あり)

\* 帝京大学医学部神経内科  
\*\* HHMI, University of Iowa

人, イタリア人, ギリシャ人などの南ヨーロッパ人, またパキスタン人, ブラジル人にも存在することを発見した<sup>14-16)</sup>. すなわち adhalin 欠損症はアラブ人以外の人種にも存在する. 興味深いことに連鎖解析可能であったブラジル人家系は第13番染色体にリンクしていなかった<sup>15)</sup>. このことは, adhalin 欠損症には遺伝的多型性がある, つまり筋における adhalin 欠損を引き起こす原因遺伝子は複数あることを示唆する. 最近 adhalin 欠損症の本邦初例が鹿児島にて発見され, 本症は日本人にも存在することが示された. よって本症は人種・地域を問わず世界中に分布するらしい. 人種間で原因遺伝子が異なる可能性も考えられる.

Adhalin の欠損が何故筋細胞死を引き起こすのかは未だ不明である (図). 我々は, adhalin の欠損が dystroglycan 複合体の laminin 受容体としての機能障害・崩壊をもたらし, これが筋細胞膜の不安定性を引き起こすのではないかと考え, 現在これを検証中である.

#### 文 献

- 1) Ervasti JM, Ohlndieck K, Kahl SD, et al: Nature 345 : 315-319, 1990.
- 2) Yoshida M and Ozawa E: J Biochem 108 : 748-752, 1990.
- 3) Ervasti JM and Campbell KP: Cell 66 : 1121-1131, 1991.
- 4) Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, et al: Nature 355 : 696-702, 1992.
- 5) Ervasti JM and Campbell KP: J Cell Biol 122 : 809-823, 1993.
- 6) Ibraghimov-Beskrovnaya O, Milatovich A, Ozcelik T, et al: Hum Molec Genet 2 : 1651-1657, 1993.
- 7) Tryggvason K: Current Opinion in Cell Biology 5 : 877-882, 1993.
- 8) Roberds SL, Anderson RD, Ibraghimov-Beskrovnaya O, et al: J Biol Chem 268 : 23739-23742, 1993.
- 9) Matsumura K, Tome FMS, Collin H, et al: Nature 359 : 320-322, 1992.
- 10) Ohlndieck K, Matsumura K, Ionasescu VV et al: Neurology 43 : 795-800, 1993.
- 11) Matsumura K, Tome FMS, Ionasescu VV, et al: J Clin Invest 92 : 866-871, 1993.
- 12) Ben Othmane K, Ben Hamida M, Pericack-Vance MA, et al: Nature Genet 2 : 315-317, 1992.
- 13) Azibi K, Bachner L, Beckmann JS, et al: Hum Molec Genet 2 : 1423-1428, 1993.
- 14) Fardeau M, Matsumura K, Tome FMS, et al: CR Acad Sci Paris 316 : 799-804, 1993.
- 15) Passos-Bueno MR, Oliveira JR, Bakker E, et al: Hum Molec Genet 2 : 1945-1947, 1993.
- 16) Sewry CA, Sansome A, Matsumura K, et al: Neuromusc Dis, in Press.

## VI. 壊死・再生ほか

## 29) ジストロフィン欠損細胞のチャネル機能に関する研究

高 守 正 治\*

研究協力者 浅 賀 知 也\* 岩 佐 和 夫\*

### はじめに

筋ジストロフィー症では筋力低下や筋萎縮など骨格筋の症状が主体となるが、不整脈や拡張型心筋症などの心筋症状や急性胃拡張、便秘といった消化器症状も比較的多く見られる。今までのジストロフィン欠損細胞の生理機能に関する研究は、主に骨格筋細胞中心に行われてきたが、心筋や腸管平滑筋<sup>1,2)</sup>においても症状を呈することから、ジストロフィンが各細胞に於いて同一のチャネルやレセプター機能と関係しているとすれば、心筋や腸管平滑筋でも骨格筋に於いて認められたのと同様の生理学的機能異常を呈する可能性がある。心筋或いは腸管平滑筋では既にジストロフィンの発現が確認されており<sup>3)</sup>、更にデュシャンヌ型筋ジストロフィー症では腸管平滑筋がジストロフィックな変化を呈するとの報告<sup>4)</sup>もあることから、ジストロフィンの持つ生理的役割を評価する目的で、本研究では特に胃平滑筋に注目しそのチャネル機能の検討を行った。

### 方 法

胃平滑筋細胞は筒井等の方法に従って、mdxマウス及び対照としてB10マウスよりコラーゲナーゼとトリプシンを用いて単離し、直ぐに使用するか或いはCa-free Ringer液中に4℃で保存し3時間以内に使用した。生理学的にはホールセルクランプ法を用い、ホールディングポテンシャルを-60mVとし、+40mVまで10mVずつの脱分極刺激を加え電位依存性のチャネルについて検討した。細胞外液は評価するチャネルの種類によりそれぞれ正常Ringer, Ca-free Ringer, TEAを含むRinger液を使用し、同様に電極内液も評価するチャネルによりアスパラギン酸カリウム或いはセシウムクロライドを使用した。

更に、胃平滑筋の浮遊している1000 $\mu$ lのCa-free Ringer液に対してDMSOに溶いたFura-2 AMを5 $\mu$ g加え、37℃で40分インキュベートした後340nm及び380nmの紫外線を用いて細胞内カルシウム濃度を測定した。

### 結 果

本研究では胃平滑筋細胞はmdxマウス、B10マウス共に少なくともA-likeチャネル、Ca依存性Kチャネル、L型Caチャネル及び電位依存性Naチャネルを有すると思われた。

外向き電流にはTEAにless sensitiveで、Ca-free Ringerで減少傾向を示し、更にCsCl<sub>2</sub>により完全に抑制されるA-likeカレント、その後TEAにsensitiveで、Ca-free Ringerで減少傾向を示し、やはりCsCl<sub>2</sub>により完全に抑制されるCa依存性Kチャネルが認められたが、これらのチャネル電流に関してはmdx胃平滑筋細胞、B10胃平滑筋細胞の間に有意差は認められなかった( $p < 0.05$ ) (図1)。

内向き電流には細胞外液をCa-free Ringerに置換しても不変で、テトロドトキシンにより抑制される電位依存性Naチャネル電流とCa-free Ringerに置換することで減少し、ニフェジピンでも抑制されるL型Caチャネル電流が認められた。このうちL型カルシウムチャネルについてはB10胃平滑筋細胞では-20mVから0mVで開き始めるのに対して、mdx胃平滑筋細胞では-40mVから-20mVで開き始める傾向が認められた( $n = 5$ ) (図2)。

胃平滑筋細胞内カルシウム濃度はmdxマウスで36.9nM、対照のB10マウスが38.3nMであり、両者の間には有意差を認めなかった (図3)。

### 考 案

本研究は、骨格筋ではなく胃平滑筋を用いることによりジストロフィン蛋白の持つ生理機能の普遍性の検討を行った。電位依存性チャネルについては、L型カルシウムチャネル電流がやや低い膜電位で開く傾向を持つ以外にジストロフィン欠損細胞に特徴的な所見を見出し得なかった。このL型カルシウムチャネルの差についての意味は検討中であるが、骨格筋でも同様の異常報告<sup>5)</sup>があることから、ジストロフィン欠損が各組織において共通に認められる現象とすれば、ジストロフィンの持つ生理的役割の1つと考えられる。従って、今後心筋細胞、そ

\*金沢大学医学部神経内科

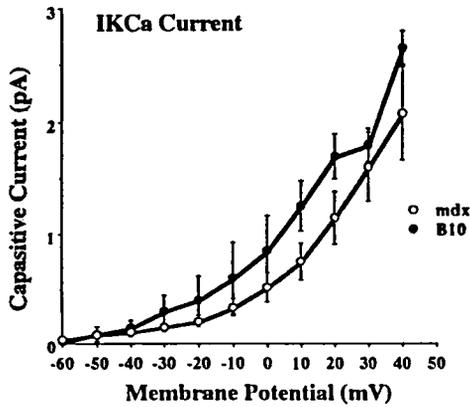
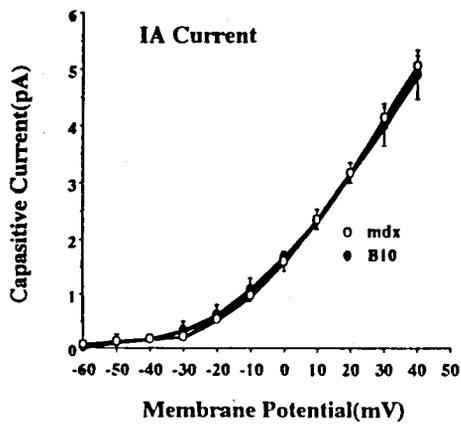
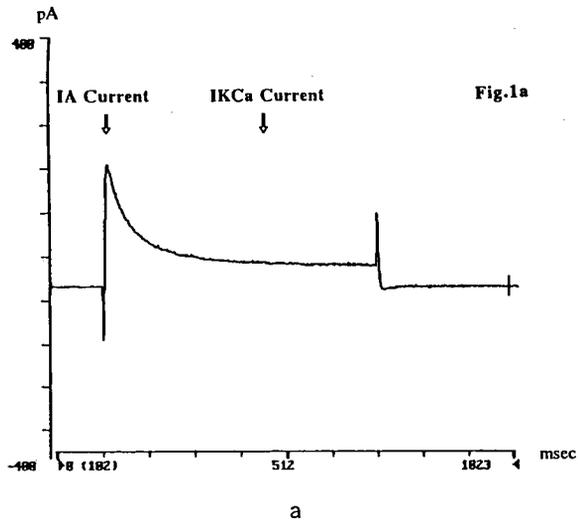


図1 a. 外向き電流  
 b. A-likeチャネルの電流電圧曲線  
 c. Ca依存性Kチャネルの電流電圧曲線  
 ○がmdx胃平滑筋細胞, ●がB10胃平滑筋細胞

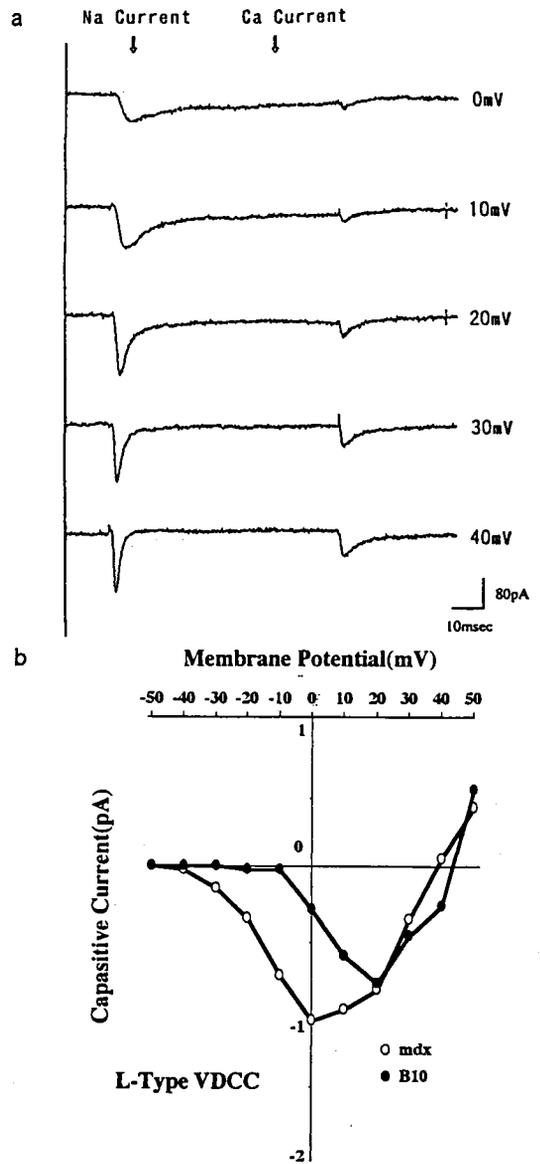


図2 a. 内向き電流  
 b. L型Caチャネルの電流電圧曲線  
 ○がmdx胃平滑筋細胞, ●がB10胃平滑筋細胞

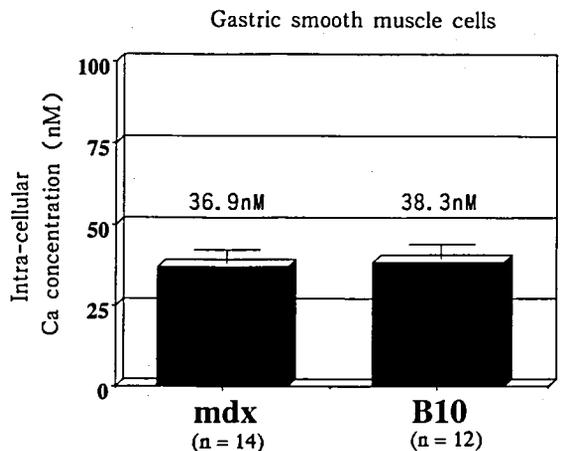


図3 mdx及びB10胃平滑筋細胞内カルシウム濃度

他のジストロフィン欠損細胞についても検討する必要があるものと思われる。また本研究の結果では少なくとも安静時の状態では細胞内カルシウム濃度の異常は確認できず、L型カルシウムチャネルの peak 電流量にも有意差を見ないことから、ジストロフィン欠損細胞崩壊の原因を細胞内カルシウム上昇に求めるとする場合、細胞膜内のカルシウム放出機構と細胞骨格蛋白であるジストロフィンの関係にも注目する必要があると思われた。

#### 文 献

- 1) Jaffe KM, et al: Symptoms of upper gastrointestinal dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: Case-control study. Arch Phys Med Rehabil 71: 742-744, 1990.
- 2) Robin GC and Falewski GL: Acute gastric dilatation in progressive muscular dystrophy. Lancet 1: 171-172, 1963.
- 3) Byers TJ, et al: The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. J Cell Biol 115: 411-421, 1991.
- 4) Miyatake M, et al: Possible systemic smooth muscle layer dysfunction due to a deficiency of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy. J Neurol Sci 93: 11-17, 1989.
- 5) 吉田瑞子ほか: mdx 胎仔骨格筋の電位依存性カルシウムチャネルについて。"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, 1992, pp111-113.

# 30) Duchenne型筋ジストロフィーの筋内血管壁における nerve growth factor receptor(NGFR)の発現について

田邊 等\*

研究協力者 磯崎英治\*\* 宮本和人\*\*

## はじめに

Nerve growth factor(NGF)は、末梢神経系においては主として交感神経節、後根神経節細胞の分化、機能維持に関与し、その受容体であるNGFRには high および low affinity type が存在する。特に、low affinity type のNGFRは、全身の非神経細胞にも広く分布することから様々な作用が考えられている。近年、Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)においてもNGFの役割について研究されており、血清NGFの見かけ上の低値<sup>1)</sup>、mdxマウスの顎下腺中の著明なNGF高値<sup>2)</sup>などが報告されている。加えてZhaoら<sup>3)</sup>は、特にDMDにおいて、筋内血管の周囲(外膜)にNGFRの発現が認められることを述べている。

我々は、生検神経におけるNGFRの発現を検討しているが<sup>4)</sup>、その際しばしばperineuriumに加え、血管周囲にもNGFR活性を認めている。そこで今回、こうした血管壁のNGFR発現がDMDに特異的であるのか否かを検討するため、以下の研究を行った。

## 対象および方法

対象は、DMD 7例および疾患対照として13例(多発性筋炎5例、先天性ミオパチー2例およびWerdnig-Hoffmann症候群、ミトコンドリアミオパチー、polymyalgia rheumatica、低カリウム性ミオパチー、Churg-Strauss症候群、筋緊張性ジストロフィーの各一例)である。これらの生検筋の凍結切片(10 $\mu$ m)を、冷アセトンにて10分間固定した後、以下の免疫染色を行った。正常ヤギ血清(10分間)で処理した後、抗ヒトNGFR抗体(ベリンゲーマンハイム、1:20、2時間)をおき、FITC-抗マウスIg(Amersham、1:20、1時間)で標識した後、抗ニューロフィラメント抗体(Sigma、1:200、一晚)をおき、ビオチン化した抗ウサギIg(1:50、1時間)についてTexas Red-ストレプトアビジン(Amersham、1:200、1時間)で標識した。判定は、個々の血管壁において、間質(perimysium)

より強い蛍光を発した場合をNGFR陽性とし、陽性血管数を、数えた全血管数(20本以上)で除した百分率を、NGFR陽性率として算出した。

## 結果

抗NGFR抗体による単染色のみでは、血管とperineuriumとは、しばしば鑑別困難であったが、同時にaxonを染色することにより両者の鑑別は容易になった(図1)。疾患対照群では、神経原性疾患(Werdnig-Hoffmann症候群)および筋原性疾患(先天性ミオパチー、ミトコンドリアミオパチー、低カリウム性ミオパチー、筋緊張性ジストロフィー)、さらに組織学的には軽度のtype 2 fiber atrophy以外に著変をみなかったpolymyalgia rheumaticaの各症例における筋内血管壁のNGFR陽性率は、0~14%であった(表)。図2上段は、先天性ミオパチー(非特異型)の例であるが、NGFR活性は陰性である。一方、DMD群では7例の平均が43%と、明らかに疾患対照群より高値を示し、血管外膜に一致して強いNGFR活性を認め、時に間質(perimysiumまたはepimysium)にまで一部広がっていた(図2下段)。

Endomysiumにある毛細血管は常にNGFR陰性であった。Churg-Strauss症候群の例でも同様に、血管周囲のNGFR発現は42%と高率であった(表および図3上段)。さらに多発性筋炎の5例でも平均25%と、DMDよりNGFR陽性率は低いものの、疾患対照群よりは高値であった(表および図3下段)。今回の検索においては、動脈と静脈あるいは血管の太さによるNGFR活性の違いについては特に検討しなかったが、観察した限りではこれらの間で大差は認められなかった。

## 考察

Zhaoら<sup>3)</sup>によれば、DMDではかなり特異的に筋内血管壁にNGFRの発現を認めるとしており、血管中膜(平滑筋細胞)のジストロフィン欠損が、血管障害を招き、その結果NGFRを発現すると述べている。しかし、我々の結果では、検索した種々の疾患の中では、確かに

\*東京都立神経病院

\*\*東京都立神経病院神経内科

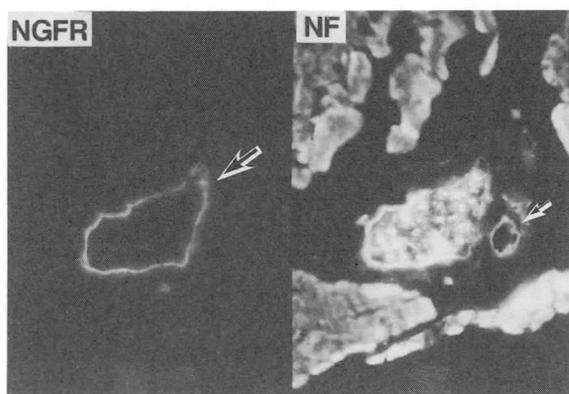


図1 筋内血管と神経  
(Werdnig-Hoffmann症候群×50)  
NGFR陽性の構造(大きい矢印)は、その中に多数のaxonを有することから、perineuriumであることがわかる。一方、隣接する血管(小さい矢印)は、NGFR陰性である。

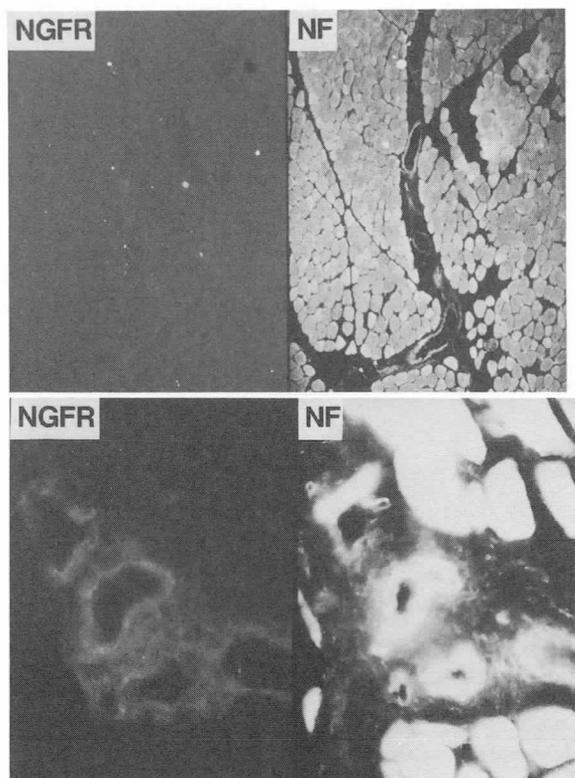


図2 筋内血管壁のNGFR発現  
先天性ミオパチー(上段、×25)では、血管壁のNGFRは陰性であるが、DMD(下段、×100)では強い活性を有する。

DMDが最も高率に血管壁のNGFR陽性率を示したが、この他、血管炎(Churg-Strauss症候群)や多発性筋炎でも高率であり、血管壁のNGFR発現は少なくともDMDに特異的ではなかった。Churg-Strauss症候群例でのHE標本では、いわゆる血管炎vasculitisとしての所見の他に、ischemic myopathyによると思われる筋の壊死、再生所見も強く認められた。従って、高いNGFR陽性率

表 各疾患における血管壁のNGFR陽性率

症 例	NGFR陽性率
DMD (7例)	平均 43% (22~83%)
Churg - Strauss症候群	42%
Polymyositis (5例)	平均 25% (2~39%)
先天性ミオパチー (2例)	0%
Werdnig - Hoffmann症候群	10%
ミトコンドリアミオパチー	14%
低カリウム性ミオパチー	14%
Polymyalgia rheumatica	10%
Myotonic dystrophy	4%

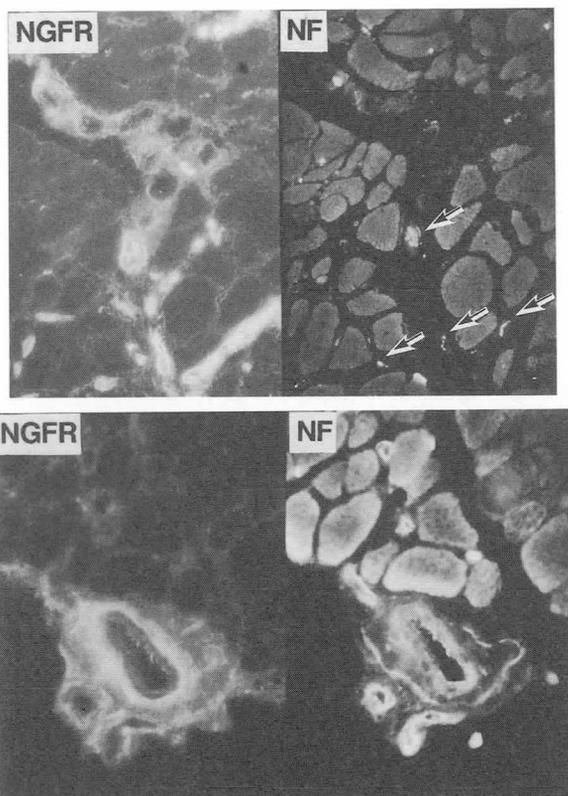


図3 筋内血管壁のNGFR発現  
Churg-Strauss症候群(上段、×50)では、血管周囲に強いNGFR発現を認める。矢印は、axonを有したNGFR陽性のperineuriumを示す。多発性筋炎(下段、×100)でも血管周囲に著明なNGFR陽性所見を示す。

を示した3つの疾患 - DMD、多発性筋炎、Churg-Strauss症候群 - に共通する筋病理所見として、筋線維の種々な程度の壊死、再生現象および間質の線維化を挙げることができる。筋線維に著明な壊死がおこると、scavengerとしてのmacrophageが動員される。通常そのoriginは、血球成分であるmonocyte由来とされているが、その他、血管外膜に存在するfibroblastが活性化され、macrophageの性質を獲得するようになることが

報告されている<sup>9)</sup>。

一方、血管外膜には交感神経終末が net work を形成し、平滑筋細胞に terminate しているが、それとともに多数の Schwann cell も存在している。こうした血管外膜に存在する活性化細胞は、Schwann cell から直接的に、あるいは macrophage から分泌される interleukin-1 を介することによって間接的に、NGF の分泌を促すと考えられる。さらに、交感神経終末ではノルエピネフリンが神経伝達物質として分泌されるが、そのノルエピネフリンそのものが NGF を up-regulate しているとの報告がある<sup>6)</sup>。この様にして血管外膜で活性化細胞から分泌された NGF は、同時にそれらの細胞表面において、NGF を capture するべく NGFR が発現することは容易に想像される。NGF の機能の一つに、白血球遊走能があり、組織の修復機能と深く関連することが分かっている<sup>7)</sup>。従って、前述したように筋線維の壊死が起これば広い意味で炎症機転が働き、組織修復のためのプロセスが開始される。NGF および NGFR は、単に神経細胞の分化、維持機能だけでなく、浮腫、壊死、線維化といった一連の炎症修復過程に関連した役割も有していると思われる。

#### 文 献

- 1) 林 恭三, 村瀬勝人ほか: 筋ジストロフィー疾患患者血清中の NGF レベル—ヒト NGF に対する酵素免疫測定法の確立—。“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝及び疫学に関する研究”平成 2 年度研究報告書, 1990, pp 186-188.
- 2) 林 恭三, 篠田一三ほか: 筋ジストロフィーマウス (mdx マウス) 顎下腺中の EGF と NGF レベル。“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の遺伝, 疫学, 臨床及び治療開発に関する研究”平成元年度研究報告書, 1989, p 184.
- 3) Zhao J, Yoshioka K, Miike T, et al: Nerve growth factor receptor immunoreactivity on the tunica adventitia of intramuscular blood vessels in childhood muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders* 1: 1135-141, 1991.
- 4) 磯崎英治, 宮本和人ほか: Onion bulb における nerve growth factor receptor の発現—免疫蛍光組織化学的検討—。神経内科, 1994 (印刷中)。
- 5) Brierley JB and Brown AW: The origin of lipid phagocytes in the central nervous system: II. The adventitia of blood vessels. *J Comp Neurol* 211: 407-417, 1992.
- 6) Furukawa Y, Tomioka N et al: Catecholamines increase nerve growth factor mRNA content in both mouse astroglial cells and fibroblast cells. *FEBS Lett* 247: 463-467, 1989.
- 7) Boyle MD, Lawman MJP, et al: Nerve growth factor. A chemotactic factor for polymorphonuclear leucocytes in vivo. *J Immunol* 134: 564-568, 1985.

# 31) 強縮刺激時に於ける外液 $\text{Ca}^{2+}$ による骨格筋崩壊現象

吉田 瑞子\*

研究協力者 松崎 哲也\* 和田 圭司\*

昨年、私達は正常骨格筋細胞が、強い電気刺激で崩壊する事を見出し、報告した。この筋崩壊像は、Duchenne型筋ジストロフィー症 (DMD) やそのモデルマウス (mdx) の崩壊した骨格筋に酷似していた。そこでこの筋崩壊現象の原因を追求すれば、未だに解明されていないDMDやmdxの骨格筋崩壊の原因を、究明する手がかりが得られると考えた。

DMDやmdxの筋細胞の崩壊に、細胞外液の  $\text{Ca}^{2+}$  が関与していると考えられている。そこで、電気刺激による筋崩壊現象と、それに対する細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  の影響を、正常状態にあると考えられているB10マウス (mdxの対照マウス) を用いて、画像解析した。

## 試料と方法

試料は、約3~4週齢のB10マウスの長指伸筋を用いた。無傷の筋細胞を必要とするため、腱と結合組織を付けたまま束で使用した。緩衝液は、Krebs-HEPES(147: NaCl, 2: KCl, 2:  $\text{CaCl}_2$ , 1:  $\text{MgCl}_2$ , 10: HEPES, 11: Glucose (mM), pH7.4)又は  $\text{CaCl}_2$  の代わりに、2 mMのEGTAを含む  $\text{Ca}^{2+}$ -freeのKrebs-HEPES (pH 7.4)を使用した。興奮を防ぐために、 $10\mu\text{M}$ のTTxを使用し、L型  $\text{Ca}^{2+}$ -channel阻害の為に、 $2.5\text{mM}$   $\text{CoCl}_2$  及び  $40\mu\text{M}$ のnifedipineを使用した。

長指伸筋はKrebs-HEPESを満たしたセルに入れ、ピンで腱を押さえて、倒立顕微鏡下に設置した。酸素を液面にそよがせ、温度を約25度に保ち、外液は10分おきに置換した。

電気刺激は、強縮電流刺激 (30 ms interval, 1 ms duration) を与え、電流値は、オシロスコープ上で測定した。電流の増加は、 $50\mu\text{A}$ まで  $10\mu\text{A}/2\text{sec}$ ,  $50\mu\text{A}$ 以上は  $10\mu\text{A}/\text{sec}$ の割合で増加した。刺激電極は先端  $10\mu\text{m}$ のガラス管に外液を満たし、白金黒電極を挿入した。その電極は、観測する筋細胞に電流を効果的に作用させる為に、先端を観測する筋細胞表面に接触させた後、その表面から  $25\mu\text{m}$ の位置に固定した (写真1-a, b)。対極には白金黒電極を用いた。

電流刺激に反応する筋細胞の速いかつ微細な形態変化

は、倒立顕微鏡にCCDカメラを設置、画像解析装置を経由し、ビデオレコーダーで記録、モニター上で510倍に拡大して観測した。

## 結 果

### 電流刺激に依る筋崩壊現象

B10マウス (3週齢) の筋細胞は、刺激電流の増加に従い、収縮、こぶの膨立、過収縮を起こし崩壊に至った (写真1)。即ち筋細胞の静止状態に (写真1-b) 電流刺激を与え、その電流を増加して行くと約  $33\mu\text{A}$  位のところで、Huxley等<sup>1)</sup>が見出した様な収縮が始まった (写真1には示していない)。さらに電流を増加すると、筋細胞は収縮が進み膨化した (写真では分かりにくい)。約  $175\mu\text{A}$  のところで、こぶの膨らみが飛び出して来た (c)。写真では分かりにくい、こぶと同じ幅でより収縮した部分が細胞内に生じた。さらに電流を増加すると、こぶの膨立部分が大きくなった (d)。この状態で電流を固定すると、筋細胞はこの変形のまま維持していた。またこの状態で、電流刺激を切り放置すると、こぶは無くなり静止状態の形態に戻った。(d)の状態からさらに電流を増加すると、約  $500\mu\text{A}$  で急激かつ衝撃的な過収縮が生じた (f)。即ち両側からサルコメアの幅はそのままに、筋原線維、細胞内物質が過収縮部位に寄ってきて、過収縮の中に吸い込まれて行った。過収縮を起こしている筋細胞は過収縮を起こしているところから、遠く離れるに従って細くなっていた。しかし筋細胞内には、断裂や空洞は無かった。さらに電流を  $700\mu\text{A}$  位に増加すると、過収縮を起こしている両側の、外液に接している表面の部分から筋原線維の断裂が始まり (g)、筋原線維は逆の方向に、即ち両端に引っ張られた (h)。その時断裂部位は、袖口をまくり上げるような状態を呈した (i, 矢印)。過収縮部位の両側は筋鞘を残したまま空洞化した (写真1(j))\*。引っ張られていった先の断裂部位は、過収縮を起こしたままで (写真1(j)\*\*)、それより先は、正常状態の筋細胞の様相を示していた (写真1(j)\*\*\*)。

以上の実験を3~3.5週齢で、平均体重9.0gのマウス筋細胞で行った結果を表1に示した (TTx)。筋収縮開始から筋崩壊まで、4の段階的閾値があることが明らか

\*国立精神・神経センター神経研究所

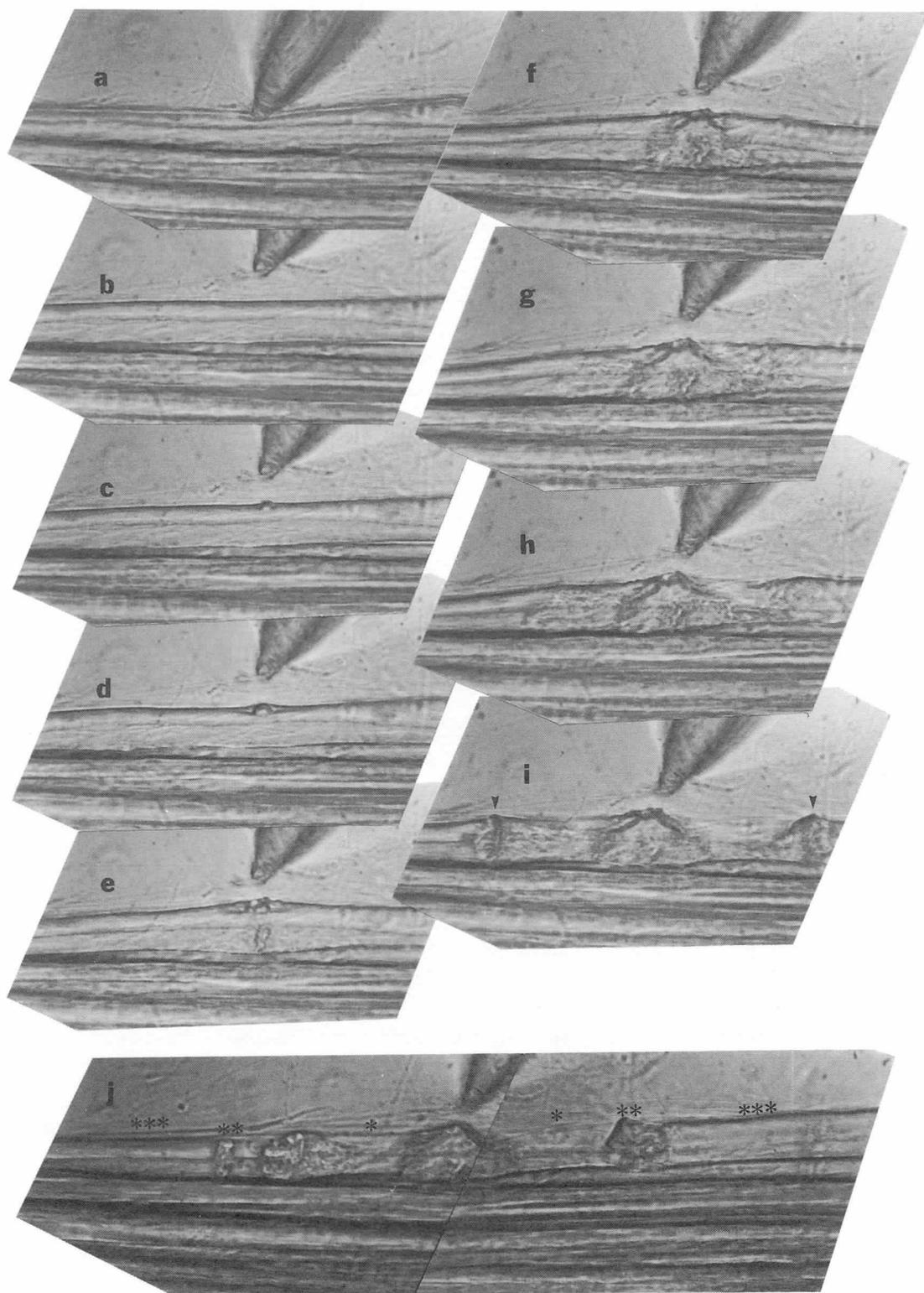


写真1 筋細胞 (B10マウス: 3.5週齢) の電流刺激 (強度) による崩壊過程  
 a) 観測する細胞に電流が効果的に作用する為の電極の位置決定 b) 静止状態  
 c) こぶの膨立 (電流強度; 約 $175\mu\text{A}$ ) d), e) 電流の増加に伴うこぶの膨大  
 f) 急激かつ衝撃的過収縮 (電流強度;  $500\mu\text{A}$ ) g) 筋原線維の断裂開始 (電流強度;  $700\mu\text{A}$ ) h), i), g) の電流刺激を切った後の崩壊過程 j) 崩壊した筋細胞 矢印, \*, \*\*, \*\*\*は本文参照.

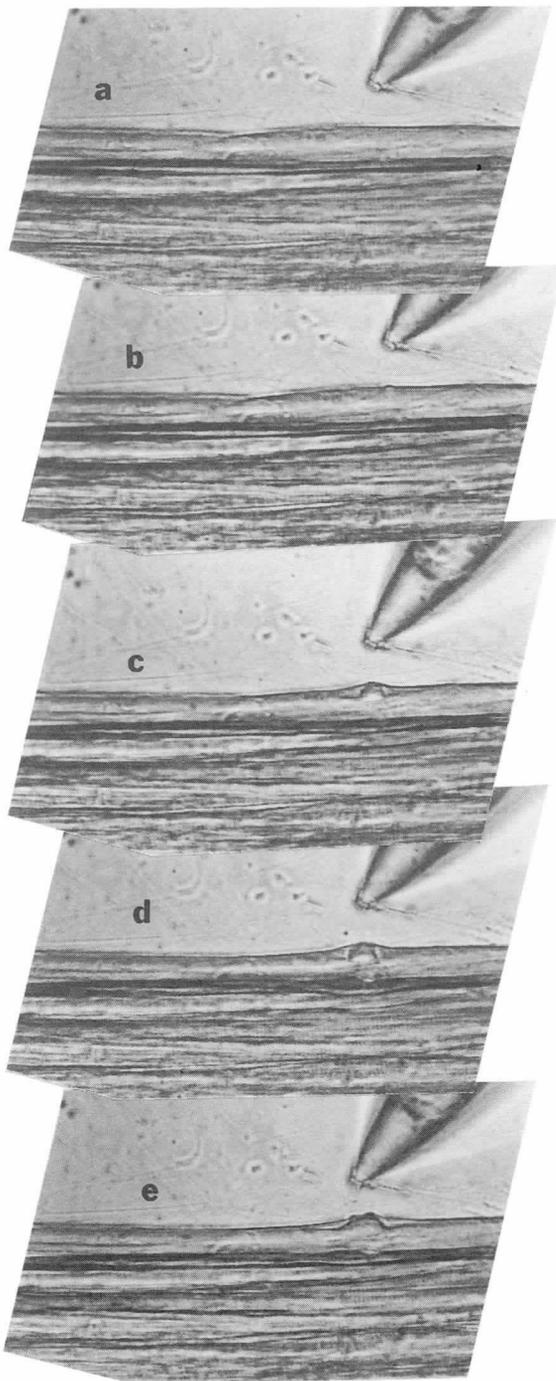


写真2 筋細胞 (B10マウス: 3.5週齢) の崩壊に対するL型Ca<sup>2+</sup>-channel阻害(2.5mM CoCl<sub>2</sub>)効果  
 a) 静止状態 b) こぶの膨立(電流強度; 約225~250μA)  
 c), d) こぶの膨大過程(電流強度; c) 400μA d) 600μA  
 e), d) の電流刺激を停止15分後の筋形態.

表 筋細胞 (B10マウス: 3~3.5週齢) の電流刺激による形態変化の閾値  
 外溶液 (Krebs-HEPES) に10μM TTx(TTx), 2.5mM CoCl<sub>2</sub>+10μM TTx (Co<sub>2+</sub>+TTx), 40μM nifedipine+10μM TTx (nifedipine+TTx) のそれぞれが含まれている場合の形態変化に対する閾値. ND: 観測不可能, \*: 急激かつ衝撃的な過収縮及び筋原線維の断裂は生じなかった.

channel blockers	contraction μA	wen μA	hyper-contraction μA	rupture μA
TTx	34 ± 3 (SD) n=35	174 ± 2 (SD) n=31	400 ~ 500 n=10	> 600 n=10
Co <sup>2+</sup> + TTx	ND	231 ± 13 (SD) n=22	*	*
nifedipine + TTx	ND	237 ± 13 (SD) n=27	*	*

になった.

このような筋崩壊は写真1で見られるように, 常に複数の隣接した筋細胞のグループで派生した.

#### 筋崩壊に対する細胞外液Ca<sup>2+</sup>の影響

Krebs-HPESの2mM Ca<sup>2+</sup>の代わりに2mM EGTAを加えた, Ca<sup>2+</sup>-free溶液(10μM TTxを含む)中で, 筋細胞を電流刺激した. 電流を増加すると, 筋細胞は収縮を起こし膨化した. これは電流刺激により, 膜電位の変化が生じ, 筋小胞体からCa<sup>2+</sup>が放出され, 収縮が生じるためと考えた. しかし筋崩壊が生じる600~700μAの電流刺激を加えても, 筋細胞はこぶの膨立, 急激かつ衝撃的な過収縮, 筋原線維の断裂を生じなかった. 電流刺激を停止すると, 筋細胞は静止状態の形態と変わらなかった.

この実験結果から, 写真1で示されるような, 筋崩壊現象は, 細胞外のCa<sup>2+</sup>の流入によって生じることが明らかになった.

#### 細胞外Ca<sup>2+</sup>の流入channelと筋崩壊抑制

強縮電流刺激(30ms interval)を筋細胞に与えたため, T型Ca<sup>2+</sup>-channelが不活性化されていた. 従って細胞外から細胞内に流入するCa<sup>2+</sup>の殆どは, T-管にある電位依存性L型Ca<sup>2+</sup>-channelを通して, 細胞内に流入すると考えられた. そこで2.5mM Co<sup>2+</sup>と40μM nifedipineのそれぞれで, L型Ca<sup>2+</sup>-channelを阻害し, 電流刺激を行った.

Ca<sup>2+</sup>存在下での結果を写真2に示す. Ca<sup>2+</sup>-channelが阻害されているために, 約33μAでのHuxley等が見出したような筋収縮の開始は見られなかった. 電流を増加するとしだいに筋細胞が膨化し, 225~250μAのところまで, こぶが飛び出した(写真2-b). しかし, さらに電流を増加しても, こぶが膨大するだけで, 最大電流

(600  $\mu$ A)を加えても、筋細胞の急激かつ衝撃的な過収縮、空洞化は生じなかった。電流刺激を切って15分後も(写真2-e)の形態を示していた。

Nifedipineの場合も、筋細胞の形態変化は、 $\text{Ca}^{2+}$ の場合とまったく同じだった。

同様の実験を3~3.5週齢、平均体重9.0gのマウスで行った結果を表1に示した。 $\text{Ca}^{2+}$ -channel阻害剤を加えると、こぶの膨立は173  $\mu$ Aから約237  $\mu$ Aの高電流強度にシフトした。明確な閾値は、この一つだけだった。

## 考 察

DMDやmdxの骨格筋には、Z-lineの乱れやカルシウムの蓄積があり、また脱神経筋は筋崩壊を起こさないとの報告がある。また私達はmdxの静止状態の骨格筋細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は正常値<sup>2)</sup>であるが、L型 $\text{Ca}^{2+}$ -channelは、正常骨格筋のそれよりも低い電位で活性化し、細胞内に対照よりも多くの $\text{Ca}^{2+}$ が流入する<sup>3)</sup>ことを報告した。

これらの報告から、私達は、DMD或いはmdxの骨格筋が崩壊する過程を、次のように予想している。筋細胞が刺激を受けたとき、T-管の $\text{Ca}^{2+}$ -channelから $\text{Ca}^{2+}$ が細胞内に対照よりも多く流入し、その $\text{Ca}^{2+}$ の一部が細胞内に徐々に蓄積して行く(細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を正常に保つ為に)。そのために、筋細胞の一部が収縮したままの状態であったり(膨化)、或いはZ-lineの乱れが生じたりする。さらにカルシウムの蓄積が進み、ある時期に衝撃的な過収縮が生じ、空洞が生じるような筋崩壊が起きると予想している。

この予想から、正常マウスでも筋細胞に刺激を与え、細胞外から細胞内に $\text{Ca}^{2+}$ -channelを通し、 $\text{Ca}^{2+}$ を流入し続けると、カルシウムが細胞内に蓄積し、過収縮を起こし、DMDのような筋細胞の崩壊を招くことが出来ると考えた。実験の結果、昨年は電気刺激による筋崩壊を実現させた。

今回この筋崩壊現象を究明した結果、筋細胞は、強縮刺激の電流を増加すると、段階的4つの閾値を以て、穏

やかな収縮を開始し、膨化、こぶの膨立膨大を順次生じ、遂には急激かつ衝撃的な過収縮、筋原線維の断裂を起こし、崩壊することが明らかになった。即ち筋細胞が刺激電流の増加に伴い、収縮、膨化、過収縮、断裂を起こした。この一連の変化は、細胞外から流入したカルシウムの蓄積が考えられる。何故なら、 $\text{Ca}^{2+}$ -free溶液中では筋崩壊が生じなかったこと、L型 $\text{Ca}^{2+}$ -channelの阻害により、こぶが生じる電流が高電流強度にシフトし、筋崩壊の抑制が見られたことなどによる。

この研究がDMDの筋崩壊のメカニズムの解明に寄与出来るよう、mdxを用いてさらに本研究を進める。

## ま と め

電流刺激に依る筋崩壊は、細胞外の $\text{Ca}^{2+}$ の流入、蓄積により、4つの閾値を以て穏やかな収縮に始まり、こぶの膨立膨大、急激かつ衝撃的な過収縮、そして筋原線維の断裂を生じて崩壊に至った。

筋崩壊は、常に複数の隣接する筋細胞にも及んだ。

筋原線維の断裂を引き起こす筋崩壊は、L型の $\text{Ca}^{2+}$ -channelの阻害剤で抑制された。

## 文 献

- 1) Huxley AF and Taylor RE: Local activation of striated muscle fibres. J Physiol 144: 426-441, 1958.
- 2) 吉田瑞子, 柴崎 浩: mdx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) 吉田瑞子, 井上 勲, 松崎哲也: mdx胎仔骨格筋の電位依存性カルシウムチャンネル. “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, 1992, pp111-113.

## 32) 筋細胞死と再生に伴う各種プロテアーゼ群の変動

木南英紀\*

研究協力者 上野 隆\* 武野大策\* 江崎光江\*

### はじめに

DMDの病因の研究は大幅に進歩したが、ジストロフィンの欠損がどのようにして最終的に筋肉の崩壊に結びつくかは依然として不明である。筋細胞死とそれに続く再生に細胞内、外の種々のプロテアーゼとインヒビターが大きな役割を担っていることは間違いない。最近、次第に明らかになりつつあるプロテアーゼがもつ多種多様なバイオモジュレーター機能を考慮すると次のようなことが想定される：筋細胞死に至るプロセスには種々のプロテアーゼが協同的に働き筋崩壊をもたらすこと、再生の促進にも蛋白質分解が必要なこと、さらに筋前駆細胞の増殖にプロテアーゼとインヒビター自体が促進活性をもつことなどである。しかし、これらプロテアーゼ群の働きを系統的に調べた研究がない。

これらの課題の解析を進めるため、今回はズビバカインによる急性筋壊死実験モデルにおける細胞内・外の各種プロテアーゼ群の活性変動を調べてみた。

### 材料と方法

#### 実験的急性壊死筋作成

8週齢のウイスター系ラットを用いた。ネブタール麻酔下に右後脚を切開し、ヒラメ筋を露出し直視下に0.5%塩酸ズビバカイン200 $\mu$ lを注入し、皮膚を縫合した。1, 2, 3, 4, 5, 6, 10日目に屠殺しヒラメ筋を採取した。

#### 酵素活性測定材料の調整法

ヒラメ筋を9倍量の0.025M蔗糖の中でポリトロンホモゲナイザーを用いてホモゲナイズした。このホモジェネートをコラーゲナーゼ活性測定のために用いた。ホモジェネートを15,000 $\times$ g, 20分間遠心し、その上清をプロテアゾーム活性測定に用いた。遠心沈澱を0.6MKClを含む50mMリン酸バッファーpH8.0に懸濁し、ホモゲナイズ後15,000 $\times$ g, 20分間遠心し、その上清をマスト細胞キマーゼの活性測定に供した。リソソーム酵素の活性はホモジェネートに終濃度0.25%のトリトンX-100を加え、攪拌後15,000 $\times$ g, 20分間遠心し、その上清を用いて測定した。

### 酵素活性測定法

カテプシンBおよびLの活性はZ-Arg-Arg-MCA, Z-Phe-Arg-MCAをそれぞれ基質として測定した<sup>1)</sup>。 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ活性はGlaserらの方法<sup>2)</sup>、プロテアゾーム活性はSuc-Leu-Leu-Tyr-MCAを基質として田中らの方法<sup>3)</sup>、キマーゼ活性は木戸らの方法<sup>4)</sup>、コラーゲナーゼ活性はDNP-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-D-Argを基質として早川の方法<sup>5)</sup>にそれぞれよった。

### 結 果

#### 1) 筋細胞死に伴う種々のプロテアーゼ活性の変動

リソソームのカテプシン群(カテプシンB, L)および $\beta$ -ヘキソサミニダーゼは以前報告したように、ズビバカイン注入後2日目に上昇しはじめ、3日目には5~10倍まで増加し、その後漸減した(図1)。今回の実験では注入後1日目にカテプシンBおよびLの小さな活性上昇のピークがみられるが、これはおそらく筋細胞内の自食作用の亢進に由来すると思われる。次に、細胞内蛋白質の分解系としてリソソーム経路と並んで重要な役割をもつプロテアゾーム活性を測定した。SDS非存在でATP存在下およびSDS存在下で測定したプロテアゾーム活性を図2に示す。いずれの活性もカテプシン群と同様にズビバカイン注入後3日目には著明に上昇していた。対照群やズビバカイン注入後1日目および6日目以降ではSDS添加による活性増加が認められるが、3日目ではSDSの添加効果はまったくみられない。細胞外のプロテアーゼであるマスト細胞キマーゼおよびコラーゲナーゼ活性はズビバカイン注入後の時間経過では大きな変化はなく、注入後2~3日目にむしろ活性は低下した(図3)。

#### 2) 筋再生とプロテアーゼ

筋再生に働く種々の増殖因子の一つとしてプロカテプシンLに我々は注目している。ズビバカイン注入後2~3日目にみられる筋壊死巣には高いカテプシンLレベルをもった多数のマクロファージが浸潤してきており、マクロファージは大量のプロカテプシンLを細胞外に放出している。プロカテプシンLが種々の細胞に対して増殖促進活性を示すことを最近明らかにしており、筋芽細胞に対して増殖効果を示すかどうか現在検討中である。

\*順天堂大学医学部生化学第一講座

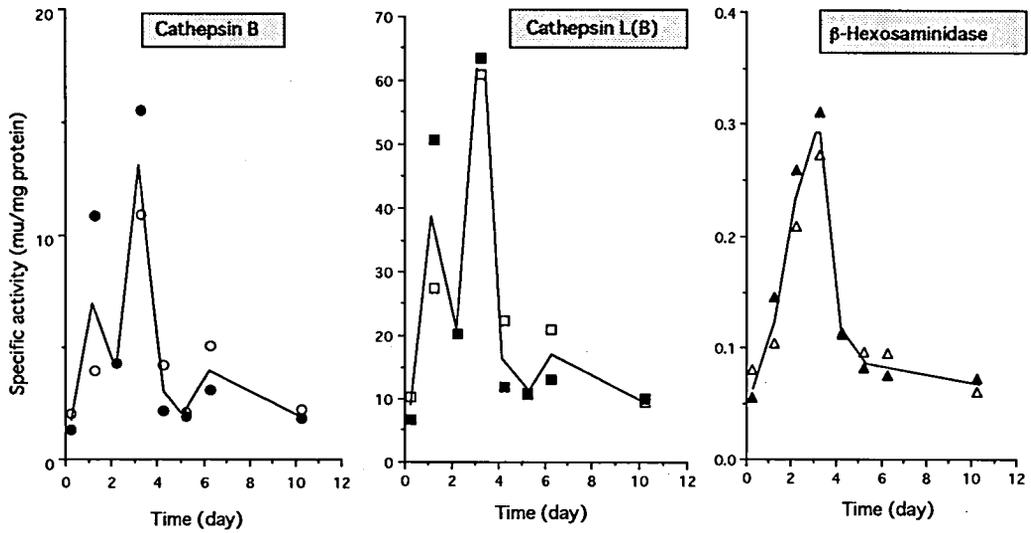


図1 プビパカイン注入後のヒラメ筋のリソソーム酵素活性の変動  
2回の独立した実験の結果。各1点は2匹の平均値

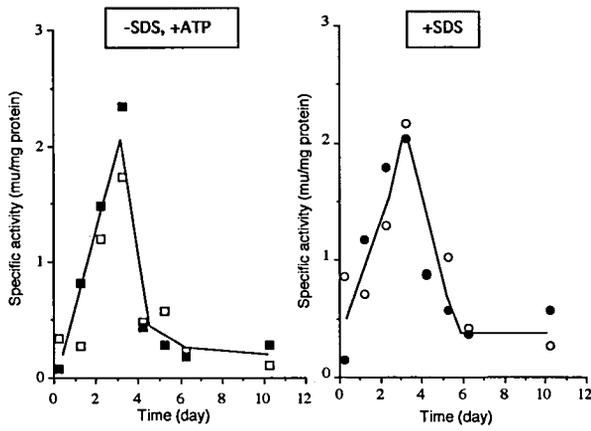


図2 プビパカイン注入後のヒラメ筋のプロテアゾーム活性の変動

### 考 察

筋ジストロフィー症および類縁疾患における筋細胞膜の異常は細胞内カルシウムの上昇をもたらし、細胞骨格の破綻、ミトコンドリア呼吸の阻害、スーパーオキシドの産生などを介して筋細胞の障害・死を導く。変性・崩壊細胞はマクロファージにより貪食・清浄された後、種々の増殖因子・遊走因子を介して筋前駆細胞は活性化され、増殖し、筋再生がおこる。この細胞膜の異常に基づく筋細胞死、再生のプロセスにおけるプロテアーゼ系の働きの仮説を図4に示す。筋細胞内で初期に働くとして推定されるのは細胞内Ca<sup>2+</sup>の増加によって活性化されるカルパインである。カルパインの大部分は不活性型で存在すると考えられるので、活性化されたカルパインだけを測定する必要がある。最近カルパインのN末部分が限

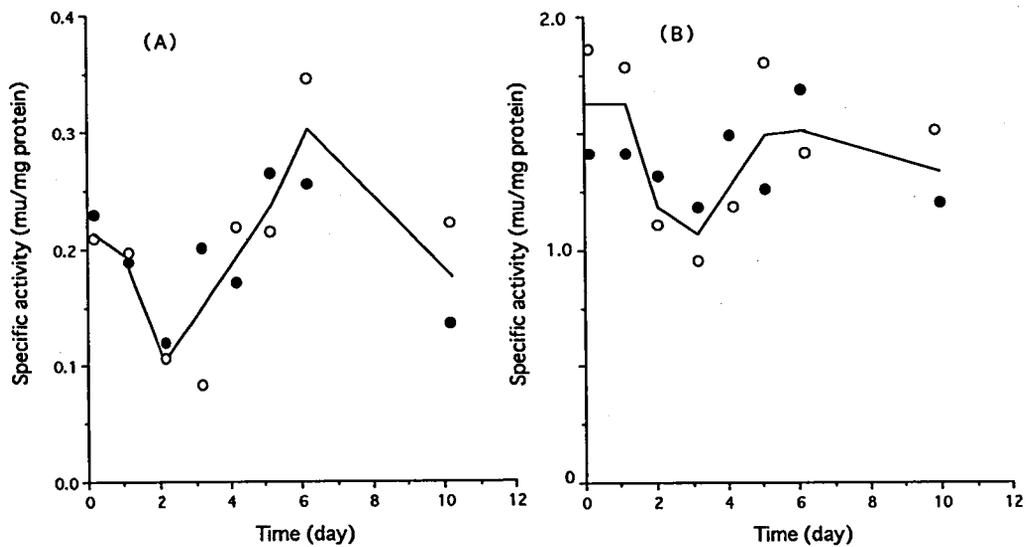


図3 プビパカイン注入後のヒラメ筋の細胞外プロテアーゼ活性の変動  
(A)マスト細胞キマーゼ(B)コラーゲナーゼ

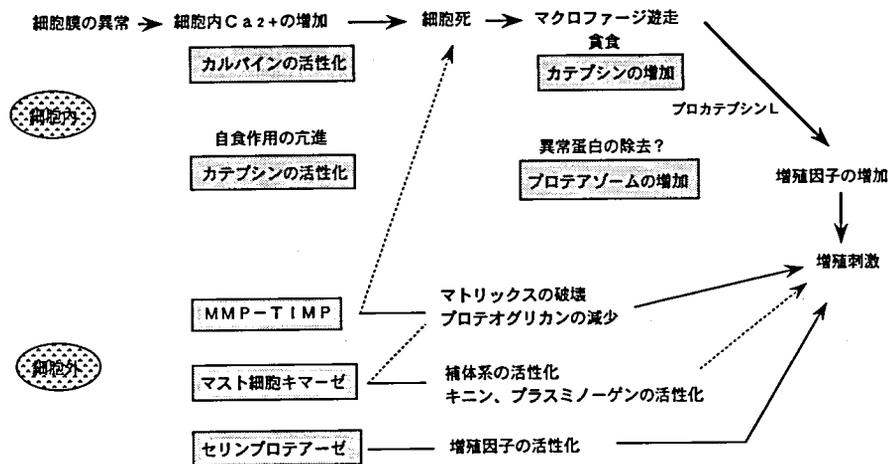


図4 筋細胞死と再生におけるプロテアーゼの働き

定分解された活性型カルパインに特異的な抗体が作成されており、カルパインの活性化がいつ、どの程度おこっているか明らかになることが期待される。カルパインの持続的な活性化は細胞骨格タンパクの分解、不可逆的な細胞骨格の破綻をもたらすだろう。ジストロフィー筋の変性細胞内にはカテプシンの染色性が増加し、自食作用亢進像がみられることは以前に報告した<sup>6)</sup>。ブピバカイン注入による急性筋崩壊では、カテプシン活性、プロテアゾーム活性ともに3日目に活性増加のピークがある。カテプシンの著明な増加は浸潤してきたマクロファージ由来であることは以前免疫組織学的手法で明らかにした。プロテアゾーム活性の上昇が筋細胞由来か、マクロファージ由来か今後調べる必要がある。正常細胞内の20Sプロテアゾームは不活性であり、試験管内での活性化にはSDSがよく用いられる。SDSの添加により、実際正常筋では5倍以上、肝臓では10倍程度の活性上昇が観察された。しかし、ブピバカイン注入後3日目の筋ではSDSを添加せずとも、ATP 1mMがあれば、SDS添加時と同じ程度の活性の強さを示した(図2)。これはブピバカイン注入後3日目の筋での活性増加は20Sではなく、26Sプロテアゾームが主体である可能性を示唆する。20Sと26Sプロテアゾームの基本的な相違はユビキチン化タンパク質を分解するか否かの差であるので、これを調べる必要がある。勿論、プロテアゾームの分子サイズの検討、mRNAと蛋白量の変化を合わせ解析しなければならぬ。26Sプロテアゾームは寿命が極めて短いのでmRNAは増加しても、蛋白量の増加は捉えられないこともありうる。昨年度筋内のユビキチン化タンパク質は壊死巣の拡大に伴い減少していることを報告したが<sup>7)</sup>、これにはマクロファージのカテプシンばかりでなく、プロテアゾームも関与している可能性が高いことを今回の結果は支持する。

細胞外プロテアーゼとしては種々のメタロプロテアー

ゼ、マスト細胞キマーゼ、プラスミノゲンアクチベーター、補体系、増殖因子(例えば、TGF- $\beta$ )の活性化プロテアーゼなどが細胞の障害、細胞外マトリックスの破壊、さらに再生に働いていると考えられる。今回はコラーゲナーゼとマスト細胞キマーゼ活性を調べたが、大きな変動は捉えられなかった。前者は不活性型として分泌され、正確な活性測定は容易でないので、さらに測定法を吟味する必要がある。

筋前駆体細胞の増殖には種々の増殖因子が関与している。コンピテンス作用をもつFGF、PGDFに加えてEGF、IGF-I、IGF-II等のプログレッション因子が必要だといわれている。今回、我々はそれらに加えてプロカテプシンLも重要であることを示唆した。プロカテプシンLの分泌源としては量的には浸潤マクロファージと思われるが、筋細胞、筋芽細胞由来のものも否定はできない。筋細胞の再生に実際、どのような増殖因子、ホルモンが重要であるのか培養細胞のレベルおよび*in vivo*でプロカテプシンLを含め調べる必要がある。筋ジストロフィーの治療を遺伝子治療以外の方法で考える場合、筋細胞の変性・壊死が始まれば種々のプロテアーゼの活性化など筋崩壊に向けてのカスケード反応が進行するため、この段階を阻止するのは難しいと思われる。細胞障害の初期の段階での抑制か、むしろ再生を促進するアプローチの方が可能性は高いと思われるので、増殖因子の研究は重要である。

#### 文 献

- 1) 木南英紀, 板東祥晃: チオールプロテアーゼ, 蛋白質分解酵素I. 生物化学実験法30(鶴大典, 船津勝編) 学会出版センター. 1993, pp39-56.
- 2) Glaser JH and Sly WS:  $\beta$ -Glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis. Methods for enzymatic diagnosis. J Lab Clin Med 82: 969-977,

- 1973.
- 3) 田村具博, 田中啓二: 高分子多機能プロテアーゼ (プロテアゾーム), 蛋白質分解酵素 I. 生物化学実験法30 (鶴大典, 船津勝編) 学会出版センター. 1993, pp170-223.
  - 4) 木戸 博: 蛋白質分解酵素 I. 生物化学実験法30 (鶴大典, 船津勝編) 学会出版センター. 1993, pp 5-38.
  - 5) 来住準一, 早川太郎: 蛋白質分解酵素 I. 生物化学実験法30 (鶴大典, 船津勝編) 学会出版センター. 1993, pp130-169.
  - 6) Kominami E, Ii K and Katunuma N: Activation of the intramyofibrillar autophagic lysosomal system in muscular dystrophy. *Amer J Pathol* 127: 21-26, 1987.
  - 7) 木南英紀, 上野隆, 武野大策ほか: 筋細胞死と自食作用および再生. “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4年度研究報告書, 1993, pp92-95.

## VII. ミトコンドリア (Part 1)

# 33) 進行性外眼筋麻痺症候群の眼科的異常

佐藤 猛\*

研究協力者 宗 像

紳\*\* 山崎 広子\*\*

## 目 的

Kearns-Sayre症候群 (KSS) を含む進行性外眼筋麻痺症候群 (progressive external ophthalmoplegia, PEO) では、ミトコンドリアの形態的、組織化学的異常に加え、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の部分的欠失が指摘されており、一連の疾患群と考えられている。KSSでは網膜色素変性症がtriasの1つとされているが、PEOでは検眼鏡的に異常はみられないとされている。

このたび、ミトコンドリアの形態的、組織化学的異常を認め、検眼鏡的に網膜の異常の見られなかったPEO 6例12眼につき、眼科的検査を行った。

## 対象及び方法

対象は男性1名、女性5名の計6例である。初診時の年齢は25~54歳、経過は6~18年、初症時の年齢は13~44歳となっている。全例に外眼筋麻痺を認めたが、網膜色素変性、心電導障害は認めなかった。全身のミオパチーを認めるものが2例あった(表1)。

mtDNAの解析を5例に行ったが、4例にmtDNAの欠失がみられた。そのうち3例は欠失部位の同定がされており、症例1は8035~11433の3399塩基対、症例5は10050~15293の5244塩基対、症例6は8483~13459の4977塩基対の欠失がそれぞれみられた。症例3は現在部位を同定中である。

表1 全身ミオパチーを2例に、外眼筋麻痺を全例に認める。網膜色素変性および心電図異常は全例で認めていない。

症例	年齢 性別	経過 年数	全身のミオパチー (四肢筋力低下)	外眼筋 麻痺	網膜色素 変性	心電図 異常
1	54F	18年	+	+	-	-
2	29F	13年	+	+	-	-
3	54M	10年	-	+	-	-
4	49F	9年	-	+	-	-
5	25F	6年	-	+	-	-
6	29F	10年	-	+	-	-

\*国立精神・神経センター国府台病院神経内科  
\*\*国立精神・神経センター国府台病院眼科

以上の症例につき、視力、細隙灯顕微鏡、眼底、ゴールドマン動的量的視野、蛍光眼底造影、網膜電図 electroretinogram (ERG)、視覚誘発電位 visual evoked cortical potential (VECP)、暗順応の諸検査を施行した。

ERGは30分暗順応後、角膜電極を用いて、キセノンフラッシュランプ20Jで眼前30cmにて発光させ、暗順応下で記録した。刺激記録装置は日本光電社製の ERG PHOTIC STIMULATORを用いた。

VECP記録には、白黒テレビモニター上に白黒市松模様を2回/秒で反転させるtransientのパターン視覚刺激を用いた。刺激視野は11°×7°、チェックサイズ21分、コントラスト80%とし、閃電極を0zに、不閃電極を耳だにおき、増幅器の電気フィルタ1.5Hzから100Hzの帯域にて増幅したのち、解析時間500msecにて100回加算平均した。刺激、増幅、加算装置は日本光電社製のNEURO-PACK FOURを用いた。

暗順応はゴールドマンウイークーズ暗順応計にて5分間明順応したのち測定した。

## 結 果

表2にまとめる。矯正視力は0.6から1.2の間に分布し、比較的良好であった。細隙灯顕微鏡検査はいずれの症例も明らかな異常はみられなかった。ゴールドマン動的量的視野では、1例に中心部視野感度の低下を認めた

表2 眼科的検査の結果

症例	矯正視力	ゴールドマン視野	暗順応 桿体最終閾値	蛍光眼底 造影	ERG	VECP (msec)
1 右	0.8	異常なし	上昇	(施行せず)	b波減弱	114
1 左	0.8					108
2 右	0.7	異常なし	正常	過蛍光	b波減弱	114
2 左	1.2					112
3 右	0.9	中心部感度低下	上昇	正常	b波減弱	130↑
3 左	0.6					131↑
4 右	1.0	異常なし	上昇	正常	正常	85
4 左	1.0					108
5 右	0.6	異常なし	正常	過蛍光	正常	134↑
5 左	0.6					136↑
6 右	1.2	異常なし	上昇	過蛍光	b波減弱	108
6 左	1.2					115

が、他の症例では正常であった。

眼底は症例2で両眼の軽度視神経萎縮を認めたが、網膜の明らかな変性はいずれの症例にもみられなかった。

しかし、蛍光眼底造影検査では、検査の施行できた5例10眼中、3例6眼で後極部を中心に顆粒状の過蛍光がみられた(図1)。これは、window defectによるものと思われ、網膜色素上皮の萎縮が疑われた。

ERGは6例12眼中、4例8眼でb波の減弱を認めた(図2)。VECPは6例12眼中、2例4眼でP100頂点潜時の延長を認めた(図3)。

暗順応は6例中4例で桿体最終閾値の上昇を認めた。

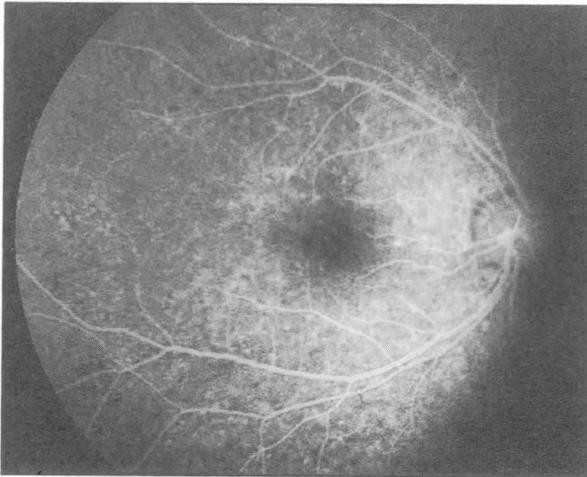


図1 症例5の蛍光眼底造影。window defectと思われる顆粒状の過蛍光を認める。

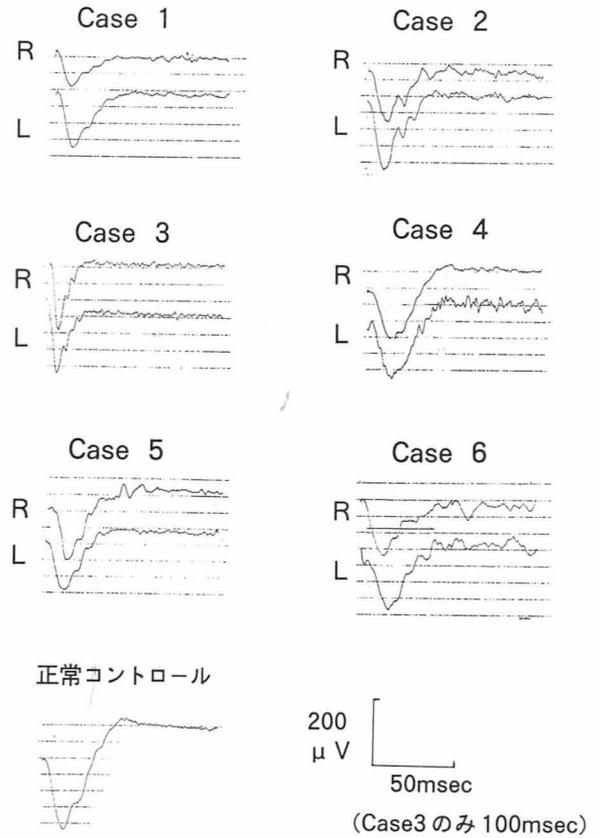


図2 ERG。症例1, 2, 3および6にb波の減弱を認める。

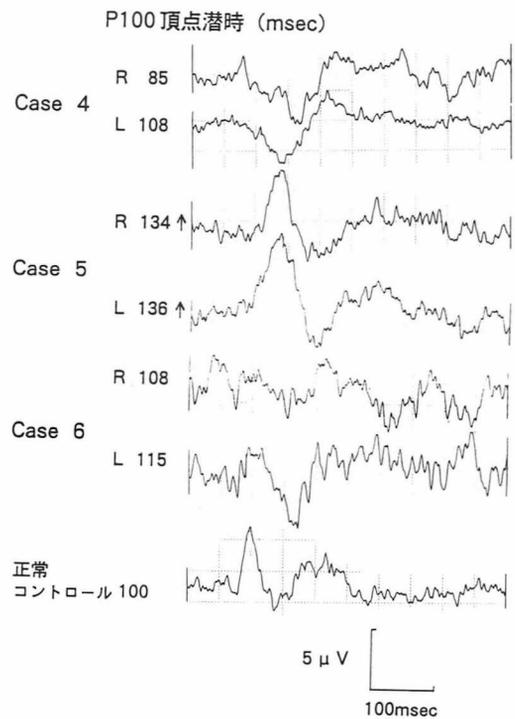
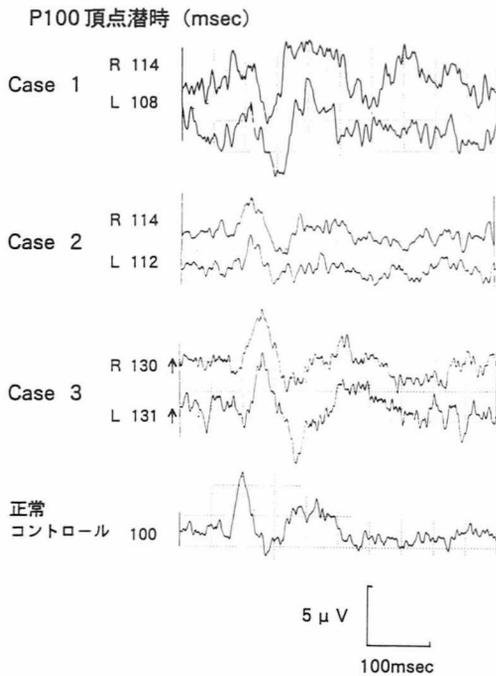


図3 VECP。症例3および5でP100頂点潜時の延長を認める。

## 考 察

KSSは外眼筋麻痺に加え、網膜色素変性、心伝導障害を3主徴とし、ミトコンドリアの形態的、組織化学的異常を認め、mtDNAの部分的欠失がその原因と考えられている。PEOは上記3主徴のうち外眼筋麻痺を認めるにすぎないが、やはり多くの症例でミトコンドリア異常を認め、mtDNAの欠失がみられる症例がある<sup>1)</sup>。

本報告において眼科的検査を行った症例でも、全例に骨格筋の ragged-red fiber および、cytochrome c oxidase 欠損線維を認めており、うち5例には電子顕微鏡的にミトコンドリアの形態異常を認めた。また、mtDNAの解析を行った5例のうち4例にmtDNAの欠失を認めている。臨床的には2例に全身のミオパチーを認めるものの、外眼筋麻痺のみであり、検眼鏡的には網膜色素変性を認めなかった。

しかし、蛍光眼底造影検査の結果では、後極部を中心に window defect によるものと思われる顆粒状の過蛍光を認めており、網膜色素上皮の変性、あるいは萎縮が示唆される。このような過蛍光を認めたという報告は、KSSおよびPEOについてもいくつかみられる。実際、KSSについていえば、病理学的にも網膜色素上皮ではメラニンの量が減少しており、腫大したミトコンドリアがみられ、さらに視細胞の集まる網膜外層にマクロファージの遊走が認められ、二次的な炎症性の網膜色素変性であろうと考えられている<sup>3)</sup>。ERGについては、a波減弱、b波減弱、両方の減弱、律動様小波の消失などさまざまな報告がなされているが<sup>4)5)</sup>、もっとも多いものはわれわれの症例同様、b波の減弱である。KSSについては、典型的な網膜色素変性症と同様a、b両波ともほぼ消失がみられた症例の報告もある。通常b波の減弱は網膜内層の障害で起こるとされており、網膜外層に位置する網膜色素上皮の萎縮、変性では説明がつかない。これについては、網膜内の細胞間の neurotransmitter の異常によるもの、あるいは網膜内層に位置する細胞、つまり内顆粒層のミトコンドリアの機能異常によるものなど、さまざまな原因が考えられているが、はっきりしていない。

暗順応下での single flash ERG の b 波は桿体系の機能異常を反映しており、網膜色素上皮ないし視細胞、特に桿体を含めた異常も考えられる。

これは、暗順応検査においても桿体の最終閾値が上昇していることからもうかがえるが、b波の減弱した症例

が必ずしも暗順応検査で桿体最終閾値の上昇が認められていたわけではなかった。

VECPに関しては、P100頂点潜時の延長のみられた報告があり<sup>6)</sup>、本研究の結果と一致する。中心視野から大脳視覚領域に至るいずれかの部位での障害が示唆されるが、部位の同定はできない。症例2では両眼視神経の軽度萎縮を認めたが、P100頂点潜時は正常であった。

今まで報告されたKSSの網膜色素変性は、1958年にKearnsおよびSayreらが報告した症例も含めて、骨小体様変性や網膜血管の狭細化などを認める、いわゆる典型的な網膜色素変性症の報告はほとんどない<sup>2)</sup>。多くは網膜の顆粒状の色素沈着ないしは色素脱失、萎縮である。網膜血管の太さも正常であったというものが多い。

## 結 論

検査したPEO 6例12眼は、検眼鏡的に網膜色素変性などの網膜の異常を認めなかったにもかかわらず、蛍光眼底造影、ERG、VECP、暗順応などの眼科的検査にて、眼筋ミオパチーのみのPEOにおいても潜在的な網膜、特に網膜色素上皮の異常および視路の異常が示唆され、KSS同様mtDNAの部分的欠失が原因と考えられた。

## 文 献

- 1) 宗像 紳, 山崎 広子, 佐藤 猛: ミトコンドリア遺伝子の欠失を伴う進行性外眼筋麻痺の1例. 日眼, 1993, 投稿中.
- 2) Kearns TP and Sayre GP: Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block. Arch Ophthalmol 60: 280-289, 1958.
- 3) Eagle Jr RC, Hedges TR and Yanoff M: The atypical pigmentary retinopathy of Kearns-Sayre syndrome. A light and electron microscopic study. Ophthalmology 89: 1433-1440, 1982.
- 4) Berdjis H, Heider W and Demisch K: ERG and VECP in chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO). Documenta Ophthalmologica 60: 427-434, 1985.
- 5) 星野育男, 山本嘉彦, 武田憲夫: Kearns-Shy症候群における電気生理学的検討. 臨眼 45: 593-596, 1991.

# 34) Kearns - Sayre 症候群患者の無症状の母親に認められた運動負荷時の高乳酸血症と筋ミトコンドリア異常

川井 尚 臣\*

研究協力者 赤池 雅 史\* 横井 健 治\* 市原 寿 江\*  
三ッ井 貴 夫\* 斎藤 美 穂\* 西田 善 彦\*  
斎藤 史 郎\*

## はじめに

ミトコンドリアDNA(mtDNA)は母から子へ伝えられるため、ミトコンドリア病には母系遺伝を示す家系例のあるのが特徴である<sup>1)</sup>。しかし、Kearns - Sayre 症候群(KSS)を含む慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)ではその殆どが孤発例であり<sup>2)</sup>、その遺伝型や発生機序については未だ不明な点が多い。本研究では無症状の母親に筋ミトコンドリア異常が認められたKSSの1家系について報告する。

## 症 例

発端者：56歳，男性。家系内に患者と同様の症状を示す者はなく，両親の近親婚はない(図1)。30歳から眼瞼下垂，易疲労感，35歳から眼球運動障害，40歳から難聴，嗄声があり，48歳時に当科で三角筋の筋生検をうけ，ミトコンドリアミオパチーと診断された。上記の諸症状は，その後徐々に増強している。

一般理学所見：身長は150.7cmと低身長である。脈拍60/分，整。血圧112/80mmHg。眼底に網膜色素変性が認められた。胸腹部に異常所見はなく，下腿の浮腫もない。

神経学的所見：知能は正常。両側の眼瞼下垂と外眼筋麻痺がみられ，難聴，声帯萎縮，嗄声，嚥下障害などもある。不随意運動はない。筋萎縮は明らかでないが，頸筋に軽い筋力低下が認められた。耐運動能の低下も認められた。協調運動は正常で，Romberg徴候は陰性である。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：血清クレアチンキナーゼ(CK)活性は正常値を示したが，安静時の血中乳酸値は20.1 mg/dlと軽度上昇していた。そして，この値は好氣的運動負荷(エルゴメータにて15ワット，15分間)により最高45.0 mg/dlまで上昇した。心電図では1度房室ブロックと不完全左脚ブロックが認められた。頭部CT，MRI，脳波に

は異常所見はなかった。髄液では蛋白62 mg/dl，乳酸18.4 mg/dlと軽度の上昇がみられた。筋電図には軽い筋原性変化が認められた。骨格筋(三角筋)のミトコンドリア酵素の活性値は複合体I，II，III，およびIVのいずれも正常範囲であった。生検骨格筋の病理組織像ではGomori-Trichrome染色変法で筋細胞の9.7%にragged red fiberが認められ(図2)，電顕像では異常クリスタ，結晶様封入体を有する異常ミトコンドリアの増加がみられた(図3)。生検三角筋から抽出したDNAを鋳型としてのpolymerase chain reaction(PCR)法によりmtDNAの塩基番号7,311-13,733，7,897-13,733，7,311-13,613，7,897-13,613を増幅し，それぞれ1.4 kbp，860bp，1.3kbp，740bpの異常バンドが認められ，これらの塩基配列から塩基番号8,483から13,459までの4,977bpの欠失が存在することが確認された(図4)。

以上の臨床症状，筋生検所見，ならびに骨格筋のmtDNA欠失などより本症例はKSSと考えられた。発端者の母：78歳，女性。76歳時に老人性白内障の診断

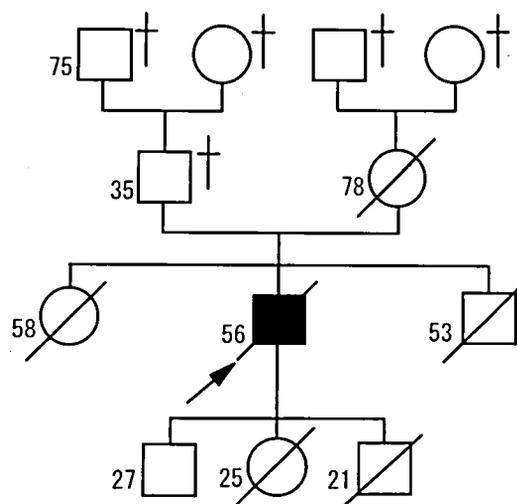


図1 Ni家家系図。□，○：エルゴメータ運動負荷施行例。数字は年齢を示す。

\*徳島大学医学部第一内科

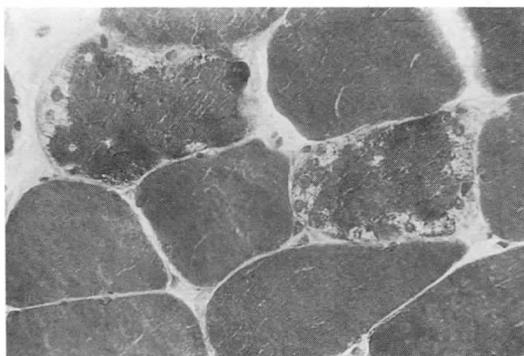


図2 発端者の骨格筋（三角筋）の病理組織像。Gomori-Trichrome 染色変法。Ragged red fiberが認められる。150倍。

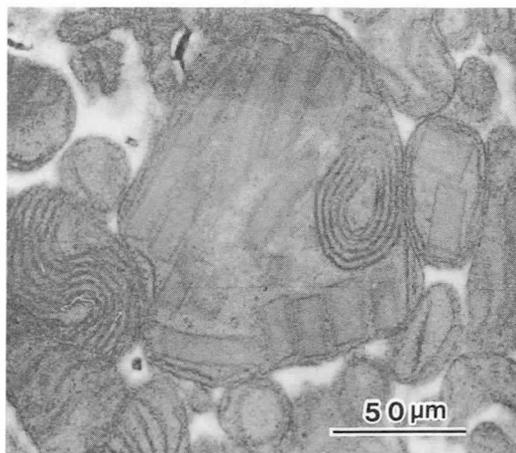


図3 発端者の骨格筋（三角筋）のミトコンドリアの電顕像。ミトコンドリアの増加と大小不同があり、内部に複雑に増殖したクリスタや結晶様封入体などを含有するミトコンドリアが認められる。

のもとに水晶体摘出術をうけた。眼瞼下垂，外眼筋麻痺，網膜色素変性，運動機能障害などはない。検査成績では血清CK活性値は212IU/L（正常値30～200）と軽度の上昇がみられたが，安静時の血中乳酸は正常値を示した。心電図や筋電図に異常所見はなく，三角筋のミトコンドリア酵素の活性値は複合体I，II，III，およびIVのいずれも正常範囲であった。生検三角筋の病理組織像ではGomori-Trichrome染色変法で筋細胞の0.3%にragged red fiberが認められ，ragged red fiberではcytochrome oxidase活性が陰性であった（図5）。電顕像ではミトコンドリアの増加や大小不同，クリスタの形態異常などが認められた（図6）。骨格筋のmtDNA欠失はPCR法では検出できなかった。

#### 運動負荷による家系員の血中乳酸値上昇の検索

発端者の母，姉，弟，長女，次男にエルゴメータによる15ワット，15分間の好氣的運動負荷を行い，血中乳酸値を運動開始後5分，10分，15分，20分，および30分に

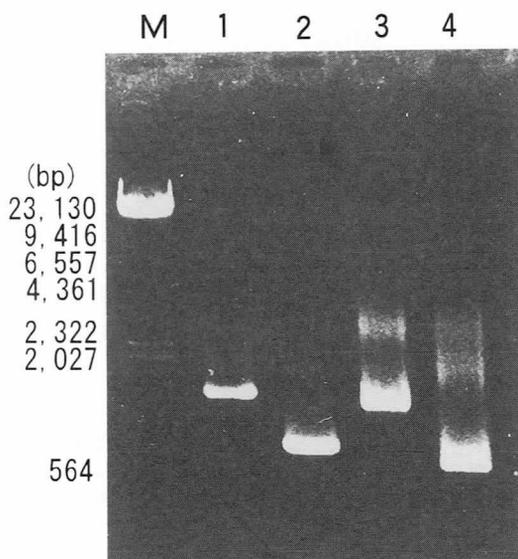


図4 PCRによる発端者の骨格筋ミトコンドリアDNA解析。レーン1から4において短い異常バンドが認められた。primer shift PCRを行うと，それらに応じて異常バンドの長さが変化した。増幅領域：レーン1：7,311-13,733，レーン2：7,897-13,733，レーン3：7,311-13,613，レーン4：7,897-13,613。M： $\lambda$ -HindIII digest。

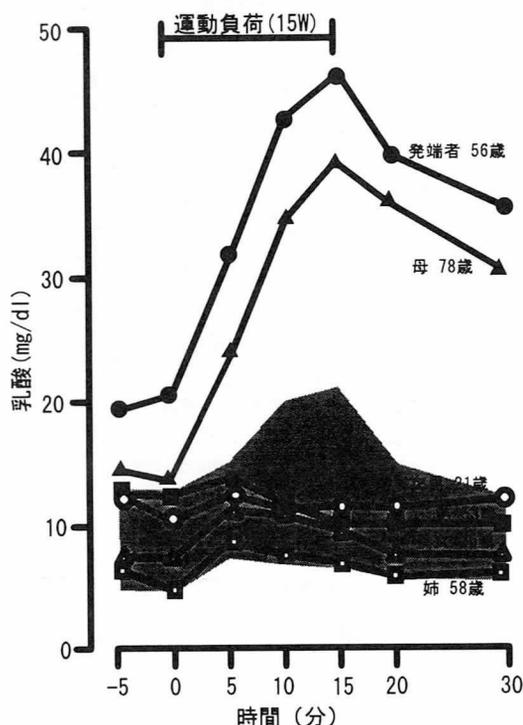


図5 エルゴメータによる運動負荷試験。発端者および母親では運動負荷により血中乳酸値の著明な上昇が認められた。網掛けは正常対照(年齢22～80歳，n=10)の成績を示す。

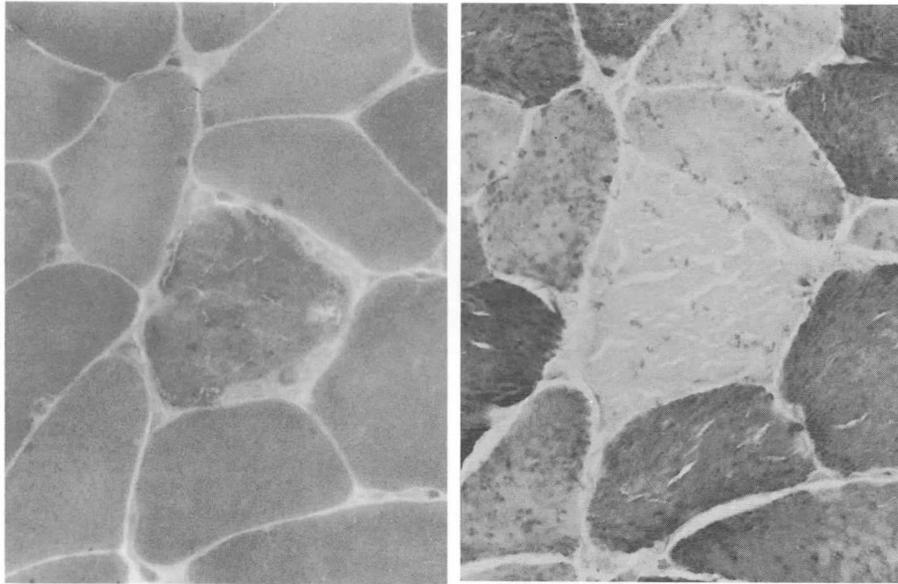


図6 母親の筋病理組織像（三角筋）. 左：Gomori-Trichrome染色変法. 0.3%と少数であるが ragged red fiberがみられる.  
右：cytochrome oxidase (COX)染色. Ragged red fiberに一致してCOX活性の陰性線維がみられる. 130倍.

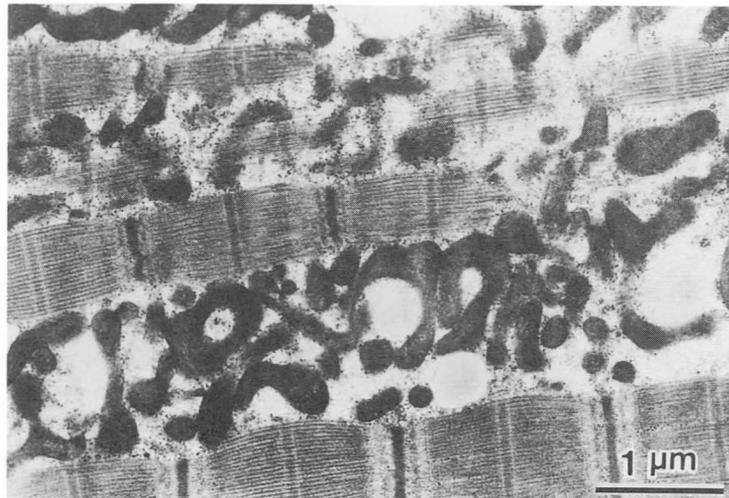


図7 母親の生検筋の電顕像（三角筋）. ミトコンドリア数の増加, 大小不同, 変形およびクリスタの形態異常が認められる.

測定した. 発端者の姉, 弟, 長女, 次男では血中乳酸値の上昇はわずかであったが, 発端者の母では最高37.6 mg/dlと著明な上昇が認められた (図7).

### 考 察

発端者の母は生検骨格筋にragged red fiberが認められ, 電顕像でもミトコンドリアの増加と形態異常がみられたことから, 骨格筋にミトコンドリア異常が存在すると考えられた. ミトコンドリアの異常は加齢でも生じることが知られているが<sup>2)</sup>, 発端者の母では運動負荷による血中乳酸値の上昇が対照群の約2倍と高く, この上昇

は加齢のみでは説明できない. 発端者の母には骨格筋のmtDNAに欠失が検出されなかったが, これは生検筋中のmtDNAに欠失mtDNAがきわめて微量であることにもよると思われるが, 一方, 発端者と母のmtDNA欠失部位が大きく異なり, 本研究で用いたプライマーでは異常バンドが増幅されなかった可能性もある.

本家系の発端者は孤発のKSS症例であるが, 母親の骨格筋に形態的にミトコンドリア異常があることより, 発端者の異常mtDNAは母から伝わったものと考えられる.

孤発のKSS/CPEO症例ではその母や同胞の骨格筋に

mtDNAの欠失が見られないとする報告が多く、KSS/CPEOの多くは受精卵から個体が形成されていく過程で新たにmtDNAに欠失が生じ、それが骨格筋、心臓、神経組織などに分配され発症すると考えられてきた<sup>34)</sup>。本症例のように孤発のKSS/CPEO症例にて無症状の親に筋ミトコンドリア異常が認められる家系は、現在までにCormierらの1家系<sup>5)</sup>とLarssonの1家系<sup>6)</sup>の報告があるのみである。Cormierらの家系では母と母方叔母の骨格筋mtDNAに多重欠失が認められる<sup>5)</sup>。この家系では発端者の弟にはmtDNA欠失がないことから、常染色体優性遺伝によると報告されており、受精卵が分裂・増殖する過程で異常な核遺伝子がmtDNAに作用し、欠失を生じたと報告されている<sup>7)</sup>。一方、Larssonらの家系では母と妹の骨格筋において発端者と同じ部位の単一欠失が認められたことから、germ lineでmtDNAの欠失があり、それが母から子へ伝えられたと考察されている<sup>6)</sup>。以上のように孤発のKSS/CPEO症例では個体発生の過程で新たにmtDNA欠失が生じたものだけでなく、核遺伝子の異常によるものや、母に生じた欠失mtDNAが母系遺伝によりその子へ伝わり発症したものなど、その発症機序は単一でなく、遺伝子異常のおこり方からみると均一な疾患ではないことが示唆される。無症状の家系員における骨格筋のミトコンドリア異常についてはまだ十分な検討がなされていないのが現状である。我々の症例に適用した好氣的運動負荷試験を用いることにより、本論文の母親のような症例は多くなるものと思われる。

本家系例は孤発のKSS/CPEO症例が遺伝的に発症することを示した症例であり、KSS/CPEOの発症機序を解明する上で貴重と考えられる。

#### ま と め

孤発のKSS症例の無症状の母親に好氣的運動負荷により、高乳酸血症が認められ、また筋組織像で ragged

red fiberが認められたことより、この母親例では筋ミトコンドリア異常が存在することが示唆された。本家系の存在は孤発のKSS/CPEO症例の中に遺伝性のあることを示唆する。

#### 文 献

- 1) DiMauro S, Bonilla E, et al: Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 17: 521, 1985.
- 2) Trounce I, Byrne E, et al: Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in aging. *Lancet* 1: 637, 1989.
- 3) Moraes CT, DiMauro S, et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320: 1293, 1989.
- 4) Shoffner JM, Lott MT, et al: Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: A slip-replication model and metabolic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7952, 1989.
- 5) Cormier V, Rotig A, et al: Autosomal dominant deletions of the mitochondrial genome in a case of progressive encephalomyopathy. *Am J Hum Genet* 48: 643, 1991.
- 6) Poulton J, Deadman ME, et al: Germ-line deletions of mtDNA in mitochondrial myopathy. *Am J Hum Genet* 48: 649, 1991.
- 7) 川井尚臣, 赤池雅史ほか: 常染色体優性の遺伝型を示すミトコンドリアミオパチー—自験例と文献例における臨床的特徴とミトコンドリアDNA異常. *臨床神経学* 33: 162, 1993.

# 35) MERRFにおけるミトコンドリアDNA異常と臨床症状

福原信義\*

研究協力者 中島孝\* 坂尻顕一\*  
松原奈絵\* 巻洵隆夫\*\*

## 緒言

MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers)はFukuhara<sup>1)</sup>により母系遺伝形式をとり、ミトコンドリアミオパチーと進行性ミオクロヌスてんかんを主症状とする疾患で、平均発症年齢16.8歳、ミオクロヌス、小脳失調、痴呆、痙攣発作、ミオパチーなどが認められるものとして報告されてきた。1990年にShoffner<sup>2)</sup>らおよびYoneda<sup>3)</sup>らによりtRNA<sup>Lys</sup>の塩基番号8344番A→Gの変異によるMERRFの発症が報告されて以来、この点変異をもつ症例の症例間の臨床症状の差や発症年齢の多様性についての検討が行われてきている。個体間や臓器間のミトコンドリア遺伝子のヘテロプラスミーの割合の違いにより臨床多型が作られるという考え方が報告されてきている。

Tanno<sup>4)</sup>らの報告のように、tRNA<sup>Lys</sup>の塩基番号8344番A→Gの変異の臓器間のヘテロプラスミーの割合がほぼ一定であるならば白血球レベルでミトコンドリア遺伝子のヘテロプラスミーを分析し、臨床症状に一定の傾向があるかどうか検討することは重要であると思われる。今回の発表では、MERRFの一家系7人について臨床症状とミトコンドリア遺伝子異常の関係を比較検討し、その臨床的意味について考察した。

## 症例

家系図に基づいて、症例1, 2, 3および神経学的所見で異常を認めない4人の計7人について検討した。

症例1(ST) DNA-8: 60歳, 男性。母が30歳代からよく転倒したことから、いとこ婚の家族歴があった。生来健康であったが45歳頃から構音障害があり、47歳頃より右手のミオクロヌス、50歳頃からconvulsion, 小脳失調症が出現し、徐々に痴呆が進行した。58歳まで筋萎縮は目立たなかった。頸部筋を中心に筋萎縮が始まり、急速に全身に広がり、60歳肺炎で死亡した。神経学的所見として中程度の痴呆、構音障害、四肢体幹の小脳性失調症、深部腱反射亢進、全身の筋萎縮、神経因性膀胱を認めた。頭部CTで小脳脳幹の萎縮を認め、筋生検所見では大腿

直筋の生検で muscle fiber の大小不同は認めたが、ragged-red fiberは認めなかった。剖検脳肉眼所見は小脳脳幹の萎縮が著明であった。

症例2(KT) DNA-95: 40歳女性。症例1の姪。大学を優秀な成績で卒業したが、33歳頃より性格の変化があり、次第に痴呆症状が明らかになった。全身痙攣、手のミオクロヌス、ふらつきが進行した。神経学的所見は会話可能だが痴呆を認め(WAISで測定不能)左右の注視眼振、四肢体幹失調、MMT4レベルの筋力低下、手のミオクロヌス、asterixisを認めた。歩行は失調性だが可能だった。頭部MRI所見は小脳虫部の軽度の萎縮のみだった。上腕二頭筋の生検で muscle fiber の大小不同とragged-red fiberを認めた。

症例3(MT) DNA-17: 17歳男性、症例2の長男。満期産。独歩は15ヶ月で尖足歩行であった。3歳より転倒や意識消失あり、6歳頃より明らかな全身痙攣発作を認めた。精神遅滞あり、中学校より特殊学級であった。神経学的所見はビネー式IQ 69, dysarthria(+), 小脳失調(+), 四肢体幹のミオクロヌスが運動時に出現、筋力低下と萎縮は全身性だった。DTR軽度亢進し、Babinski反射は両側陽性で、転倒しやすいが歩行可能であった。脳MRI所見は年齢に比して全体に萎縮していた。

無症状者(神経学的所見で異常がないのを確認したもの)は以下の4人で、KTs(DNA-65)65歳女性: 症例3の母、症例1の姉。JT(DNA-112)14歳男性、症例3の弟。NT(DNA-114)7歳男性、症例3の弟。KS(DNA-111)27歳女性、症例2の妹であった。

## 方法

### 1. ミスマッチプライマーを用いたPCRによる simple detection

Yoneda<sup>3)</sup>らの方法を用い末梢血の白血球分画からフェノール・クロロフォルム法で全ヒトDNAを抽出した。Primer 1: 5'-TCACTGTAAGAGGTGCCG-3' (塩基番号8345-8364), Primer 2: 5'-AACACAGT-TTCATGCCCA-3' (塩基番号8191-8210)を使いPCRを93℃30sec, 50℃1min, 72℃3minの条件で25 cyclesで行った。Nae I digestion後2.5% agarose gelにて

\*国立療養所厚淵病院神経内科

\*\*国立療養所厚淵病院神経病理

電気泳動し、エチジウムブロマイド染色のDNAのバンドを写真撮影した。

## 2. ヘテロプラスミーの分析

Tanno<sup>4)</sup>の方法を用いて Primer 2 に対して  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP を使い polynucleotide kinase でエンドラベルし PCR の最後の cycle に入れ、一回反応させた。8% の非変性 polyacrylamide gel にて電気泳動し、gel dryer で乾燥後に X ray フィルムに exposure した。同時に BAS 2000 による定量も試みた。

## 結 果

今回家系内 7 人について検討したが、家系図 (図 1) より母系遺伝により全員が発病する可能性があると思われた。症例 1 は高齢になるまでミトコンドリアミオパチーが明らかにならず、MERRF としての症状が典型的となったのは病末期であった。また、明らかな ragged-red fiber を認めなかった。症例 2 は 33 歳に発症とやや発症年齢が高かったが、臨床症状所見からは典型的と思われた。症例 2 の母は 65 歳であるが神経学的所見や臨床症状はまったく正常で非発症のまま経過していた。症例 2 の妹 (KS) は 27 歳の時点ではまったく神経学的所見、臨床症状に異常を認めなかった。2 人の子がいるが今のところ異常がない。症例 3 は症例 2 の第一子で 1 歳時より異常があり、MERRF の発症としては早期であるといえた。症例 3 の兄弟の 14 歳の JT と 7 歳の NT については現時点での症状は認められなかった。ミスマッチプライマーを用いた PCR 法による制限酵素 Nae I 消化により、tRNA<sup>Lys</sup> の塩基番号 8344 の A → G の点変異を検出可能で、点変異があると通常 174 bp の部分が 156 bp と 18 bp に切断され gel 上で 156 bp の短バンドが認められる。正常コントロールと家系内の 7 人を含め計 8 人について検索を行った。図 2 に示すように、症例 1 (ST)、症例 2 (KT)、症例 3 (MT) は明らかに Nae I で切断され tRNA<sup>Lys</sup> の塩基番号 8344 に A → G の変異があることが明

らかであった (図 2)。症例 2 の母親は臨床症状に欠け変異 DNA は agarose gel では明らかに認めなかった。症例 3 の兄弟の JT は軽度変異 DNA が認められたが、NT ではまったく変異 DNA を検出できなかった。KS は非発症者であるが変異 DNA を認めた。

ヘテロプラスミーの割合をエンドラベルした primer を使い分析した (図 3)。コントロールである TN の uncut, cut と比較検討すると、症例 1 (ST) ではコントロールと同じサイズの 174 bp の wild type と、アジア人に

TN	KTS	KT	MT	JT	NT	KS	ST
14	97	95	113	112	114	111	8
U C	U C	U C	U C	U C	U C	U C	U C

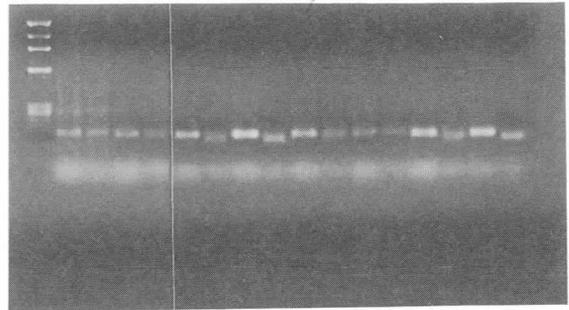


図 2 agarose gel による PCR 診断。C : Nae I cut, U : uncut を示す。TN は正常コントロール。

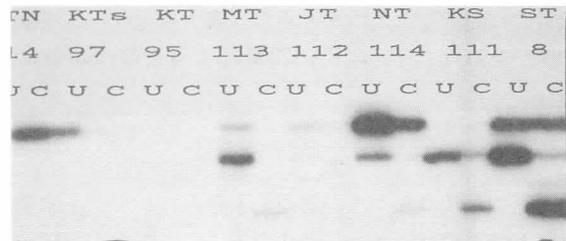


図 3 ヘテロプラスミーの分析, <sup>32</sup>P を利用した PCR, acrylamide gel 電気泳動。

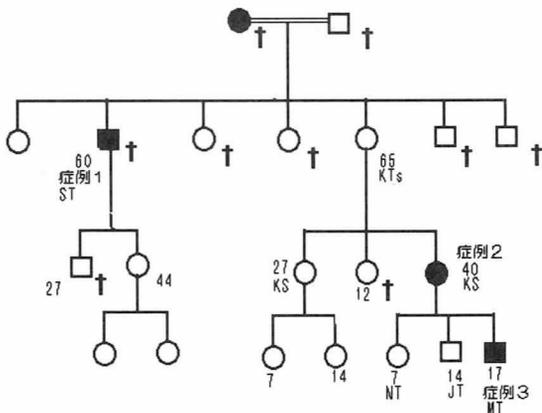


図 1 家系図

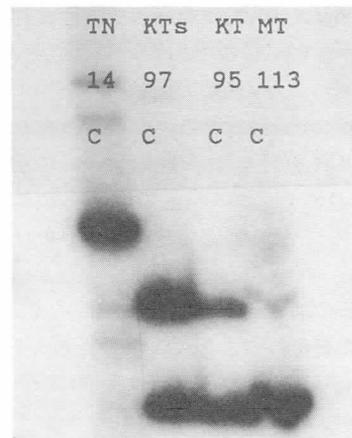


図 4 ヘテロプラスミーの分析, <sup>32</sup>P を利用した PCR, acrylamide gel 電気泳動。図 3 で不明瞭なもの、cut のみを示す。

表1 ヘテロプラスミーと発症年齢、臨床症状の比較

	wild type	deletion without A→G mutation	deletion with A→G mutation	症状発症年齢
KTs 97 (症例3の母) 65才	+	++++	++	無症状
KT 95 (症例2) 40才	+	++	++++	33才
MT 113 (症例3) 17才	+	+	++++	1-3才
JT 112 (症例3の弟) 14才	+++	++	++	無症状
NT 114 (症例3の弟) 7才	++++	+	++	無症状
KS 111 (症例2の妹) 27才	-	++	+++	無症状
ST 8 (症例1) 60才	++	+	++++	45-50才

約16%認められる9 base deletionがnt8272-8280にある165 bpの uncut のバンドと, 147 bp の cut された mutant のバンドの3種類が認められた。uncut の165 bp のバンドは存在するが量的に少なかった。一方症例3では3種類のバンドは同様に認められたが147 bp の cut されたバンドが一番多かった。症例2でも3種類のバンドがあり、同様の傾向にあった。発症していないNTも3種類のバンドがあったが174 bp の wild type がほとんどで165 bp, 147 bp とともに極少量であった。KSはまったく174 bp のバンドを持たず, 165 bp と147 bp のバンドのみであった。臨床経過発症年齢とヘテロプラスミーの割合を相対的に評価した表にまとめた(表1)。gelごとの条件の差があるため今回はBAS2000による正確な定量は行わなかった。

### 考 察

共通の母親からつながる同一家系のなかで, 1歳より発症した早期発症者から発症者を子にもちながら65歳になっても臨床的に発症していない者まで, 発症年齢や症状の多様性が認められた。またPCR法 agarose gelを用いた simple detection では発症者を陰性と判定することはなかったが, 同じ母親である兄弟や発症者の母親において制限酵素による切断が明らかにできない症例があった。ところが primer に <sup>32</sup>P でエンドラベルして最後の1回にいれ PCR を行い, polyacryl gel で分析すると agarose gel のエチジウム染色では明らかにされないバンドが見えることが確認できた。NTではほとんどが174 bp のバンドで165 bp のバンドが少なかった。Nae I で切断される割り合いもわずかに見えるのみで, MERRF の変異を持つことは明らかであるがその割合が少ないことが明らかにされた。量的に少ないため, agarose gel では Nae I で切断されたバンドを明らかにすることができなかった。またKTsのように発症者の母親が agarose gel のみでは異常が見出せず false negative

となったが, ヘテロプラスミーを分析すると165 bp の A → G mutation を持たないバンドが mutation のある147 bp のバンドより多く認められた。このような場合は agarose gel では十分に判別できないことがあるといえた。臨床症状の多型性については, ミトコンドリア遺伝子の卵細胞レベルで細胞間のヘテロプラスミーの割合が異なることによる可能性と, 臓器間のヘテロプラスミーの割合が異なる可能性の両者について検討することが重要である。Tannoらの報告によればMERRFの臓器間, 白血球のヘテロプラスミーの割合はほぼ一定であるとのことであるが, もしこれが普遍的であるとすれば, 白血球遺伝子レベルでMERRFを遺伝子解析することで脳や筋などの異常も同様に推定できるといえ, 今回の研究のように白血球レベルのヘテロプラスミーの分析と臨床症状の対比が臨床的に意味があると思われる。症例3で明らかのように mutation のバンドの割合が多いほど発症が早期である傾向が見出された。また本家系のように3種類バンドからなるヘテロプラスミーは今まで報告がないが, これにより微妙な臨床症状の差が出ているように思われる。

今後本家系の継続的な観察と他の家系を含む症例数の増加により, より正確な分析をすることが必要である。同じ母親から生まれた者の発症または非発症予測が可能であるか否か, 今後検討されるべきであると思われる。

### 参 考 文 献

- 1) Fukuhara N : MERRF : A clinicopathological study. Relationships between myoclonus epilepsies and mitochondrial myopathies. Rev Neurol 147 : 476-479, 1991.
- 2) Schoffner JM, 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.
- 3) Yoneda M, et al : A common mitochondrial DNA mutation in tRNA<sup>Lys</sup> of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. Biochem Int 21 : 789-796, 1990.
- 4) Tanno Y, et al : Uniform tissue distribution of tRNA<sup>Lys</sup> mutation in mitochondrial DNA in MERRF patients. Neurology 43 : 1198-1200, 1993.
- 5) Yoneda M, et al : 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.

## 36) ミトコンドリア異常症の病態解析

桃井 真里子\*

研究協力者 斎藤 茂子\* 山形 崇倫\*  
藤井 幹久\*\* 中内 啓光\*\*\*

### 目 的

ミトコンドリア異常症は変異ミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) が患者においてヘテロプラスミーであることが基本であり、核遺伝子支配疾患と本質的に異なる点である。MELASにおいてもわれわれが3243変異mtDNAの定量的解析で示したように、正常遺伝子と変異遺伝子が組織により量比は異なるがヘテロプラスミーである<sup>1)</sup>。各細胞内ではどのようなヘテロプラスミーを形成するのか、または、segregationの結果、ホモプラスミーの状態であるのかは不明である。ミトコンドリア異常症における組織障害性の発現を考えると、各々の細胞内における変異遺伝子の量は重要な因子である。

この視点から、ミトコンドリア異常症における細胞内変異mtDNAの定量的検討を行った。

### 方 法

1 細胞分取：3243変異を有するMELAS患者、その母親、3243変異を有するIDDM家系の患者より、研究目的を明らかにしたinformed consentを得て採血し、リンパ球を分離し、RPMI1640に浮遊保存した。24時間以内に遠心後、PBSに浮遊させ、Fluorescence-activated cell sorter (FACSster Plus, Becton Dickinson, CA)で1細胞毎に0.15% Triton溶液中に分離採取した<sup>2)</sup>。

PCRによる変異mtDNAの定量：96穴プレートに採取した細胞溶液10 $\mu$ lを直接PCR反応に使用した。プライマーは塩基番号3153~3172, 2551~3531を使用し、PCR反応はすでに報告した方法で行った<sup>3)</sup>。PCR産物をApal処理後、アルカリブロットし、サザン解析を行った。プローブは、正常筋細胞より得た正常mtDNAの同様のPCR産物399bpを<sup>32</sup>P dCTP標識後、使用した。検出されたバンドはBAS2000にて定量後、分子量換算を行い、変異mtDNAの割合を求めた。

### 結 果

MELAS患者リンパ球におけるmtDNA解析の結果を

図1に示す。1細胞から、標識しない状態でも検出可能なPCR産物が得られた。サザン解析の結果は、非標識の結果と呼応した。定量解析の結果、正常mtDNAのみ、変異mtDNAのみの細胞はなく、どの細胞も正常mtDNAと変異mtDNAのヘテロプラスミーであった。定量結果を図2に示す。比較的幅の広い分布を示し、細胞集団の変異mtDNAの割合55%を中心にした割合分布を示した。

MELAS患者母親のリンパ球におけるmtDNAの解析結果を図3に示す。細胞集団では約10%の変異mtDNAであり、個々の細胞内では10%前後の変異mtDNAを持つヘテロプラスミーであった。正常mtDNAのみ、変異mtDNAのみの細胞は検出されなかった。

IDDM家系の患者の結果を図4に示す。MELAS母親と同様のパターンを示し、細胞集団の26%周辺の比較的均一なヘテロプラスミーを示した。

### 考 察

ミトコンドリア遺伝子の細胞内ヘテロプラスミーは不安定と考えられており、細胞分裂にともない、継代後には、おのおのの遺伝子からなるホモプラスミーを形成し、細胞集団としてのヘテロプラスミーは、細胞内ホモプラスミーの集団と想定されていたが、本研究の結果は、3243変異においては、細胞内ヘテロプラスミーが患者、およびその母におけるリンパ球での変異mtDNAの存在様式であることが判明した。

MELAS母親における比較的均一な変異ミトコンドリアの割合は、stochastic segregationの過程とは考えにくい存在様式であり、ヒト細胞内で、変異ミトコンドリアDNAは正常遺伝子と安定した状態でヘテロプラスミーを形成し得ることを示唆している。また、リンパ球発生初期に変異mtDNAは細胞内で均一に分布している状態が考えられる。すなわち、母親に見るような均一の分布は、変異mtDNAが限られたミトコンドリアに局在するような状態では早期にsegregationがかかることが予想され、変異mtDNAは各ミトコンドリアに正常mtDNAと混在する形で分配されていることが推定される。

3243変異を有するIDDM家系の患者においても

\*自治医科大学小児科

\*\*自治医科大学大宮医療センター循環器内科

\*\*\*理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター造血制御部門

mtDNA 3243変異のMELAS患者  
リンパ球内ヘテロプラスミー

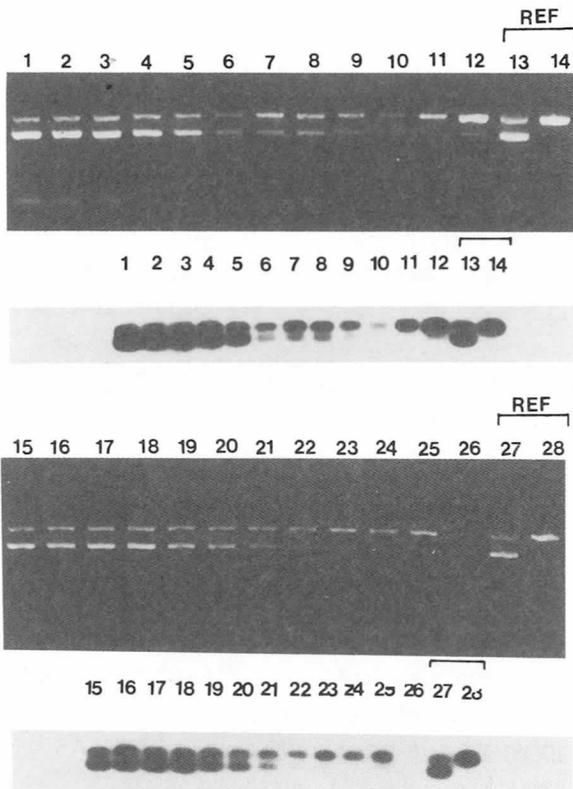


図1 3243変異を持つMELAS患者のリンパ球における1細胞mtDNA解析. 各々, 上段は非標識PCR産物のアガロースゲル電気泳動結果, 下段はサザン解析の結果を示す. 1~12, 15~25, 1細胞のPCR産物; 13, 27, 変異mtDNA, 正常mtDNA. 非標識とサザンの結果が呼応していることを示す.

MELAS母親と同様の結果であったことは, 少なくとも, リンパ球における変異 mtDNA の存在様式は MELAS と IDDM とは大きく異なることを意味している. リンパ球においては同様の変異 mtDNA の分配様式で, 他組織においては異なるという病態は考えにくく, MELAS と DM の病態の差は, 変異 mtDNA の分配様式の差では説明し難いと考えられる. 3243変異の有する NIDDM 家系や IDDM 家系の報告が相次いでおり<sup>4)</sup>, MELAS と DM 家系を分ける因子は何か重要な課題であるが, 変異 mtDNA の分配様式の差ではないことが示唆された. この病像の差の解析は今後の課題である.

mtDNA 点変異が細胞内ヘテロプラスミーを主としているということは, 病態発現には細胞内の変異 mtDNA の量が主要因子であり, その治療には, 細胞内正常 mtDNA の増加, または, 発現増強の方向性が必要であることを意味している.

リンパ球1個における変異mtDNAの分配

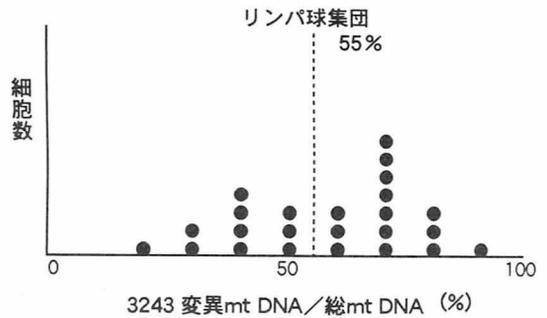


図2 MELAS患者リンパ球の変異 mtDNA の割合の分布. 平均値中心に分布しており, 正常, 変異 mtDNA のピークには分離していないことを示す.

リンパ球1個における変異mtDNAの分配

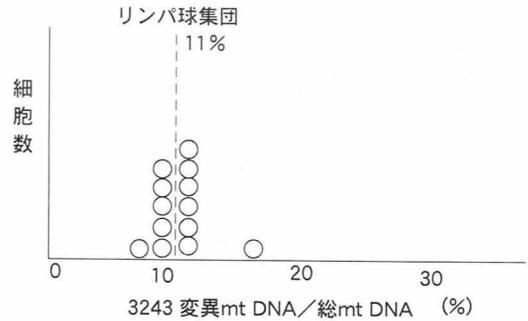


図3 MELAS母親のリンパ球における変異 mtDNA の割合の分布. 細胞集団平均値 11% 周辺の均一な割合を示す.

リンパ球1個における変異mtDNAの分配

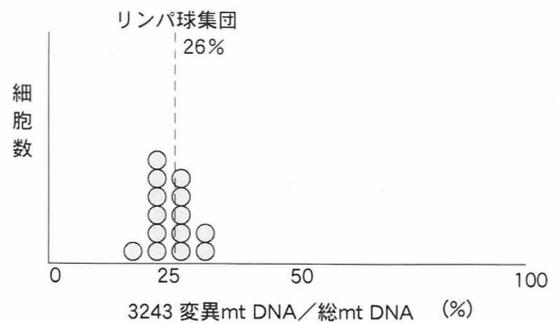


図4 3243変異を有する IDDM 家系患者のリンパ球における変異 mtDNA の割合の分布. MELAS 患者母親に類似した分布であり, segregation 過程の分布を示していない.

文 献

- 1) Kobayashi Y, Momoi MY, Ohta S, Kagawa Y and Yanagisawa M : The mutant genes in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes are selectively amplified ththrough generations. *J Inher Metab Dis* 15 : 803 - 808, 1992.
- 2) Ema H, Suda T, Miura Y and Nakauchi H : Colony formation of clone-sorted humajn hematopoietic progenitors. *Blood* 75 : 1841 - 1846, 1990.
- 3) Kobayashi Y, Momoi MY, Shimoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y and Ohta S : Respiration-deficient cells are caused by a single point mutataion in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes (MELAS). *Am J Hum Genet* 49 : 590 - 599, 1991.
- 4) van den Ouweland JMW, Lemkes HHPJ, Ruitenbeek W, Sandkuijil LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PAA, ven de Kamp JJP and Maassen JA : Mutation in mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nature Genetics* 1 : 368 - 371, 1992.

# 37) Multiplex PCR法を用いたミトコンドリア病におけるmitochondrial DNA deletionの検索

湯 浅 龍 彦\*

研究協力者 濱 田 恭 子\* 山 本 雅 彦\* 宮 武 正\*

## はじめに

慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (CPEO)の多くでミトコンドリアDNA(mtDNA)の大欠失,多重欠失の存在が認められている。

CPEO患者のmtDNAではサザン解析によれば,50~70%の患者にmtDNAの大欠失を認められるが,残りは,筋病理でragged-red fiber(RRF)やCCO欠損線維を呈する臨床的に典型的なCPEO患者であってもmtDNAの大欠失を認められなかった<sup>1)~3)</sup>.CPEOの欠失mtDNA非検出例には,mtDNAの点変異例,あるいは,非常に小さい欠失のため分離できない例が含まれると想定されている<sup>4)</sup>.CPEO患者で進化上保存されたtRNA<sup>Lew(UAG)</sup>のnt12308 AからGへの点変異が特異的として報告された<sup>4)</sup>が,後にこの点変異は正常人口の中に,約16%存在しており,ヒトmtDNAの多型性は進化上保存されている部位にも起こり得ることが示された<sup>5)</sup>.従って,欠失ミトコンドリアの非検出例に関しては,点変異のみによるわけではなく,サザン解析の検出の感度が劣るために,見逃された欠失によるものも含まれているのではないかと考えられる.欠失を有するmtDNAはヘテロプラスミーの状態で存在する,mitotic segregationによって欠失を持ったmtDNAが各組織に不均一に分配されるため,欠失mtDNA量の少ない生検組織片では欠失を見逃すことがありうる.したがって,サザン解析に優る感度のよい方法が必要となってくる。

そこでわれわれは従来のサザン解析よりも感度の高い,欠失ミトコンドリアDNA神経筋疾患の診断法を樹立するため,PCRを用いて,mtDNAの欠失を感度よく検出する方法の開発を試みた。

## 対象と方法

### 患者及び対照患者

患者は外眼筋麻痺を伴い,臨床的にCPEOと診断された10例,平均年齢42.5歳.対照は筋萎縮性側索硬化症8例,甲状腺機能低下性ミオパチー2例,平均年齢は64歳。

\*東京医科歯科大学医学部神経内科

## Oligonucleotide primers

これまで報告されたミトコンドリアDNA欠失<sup>6)~9)</sup>をはさんで,2Kb以下のPCR産物が得られるようにプライマーの位置を設定し(図1),11個のプライマーを複製した.KLはL鎖,KHはH鎖を増幅するためのプライマーである。

## Multiplex

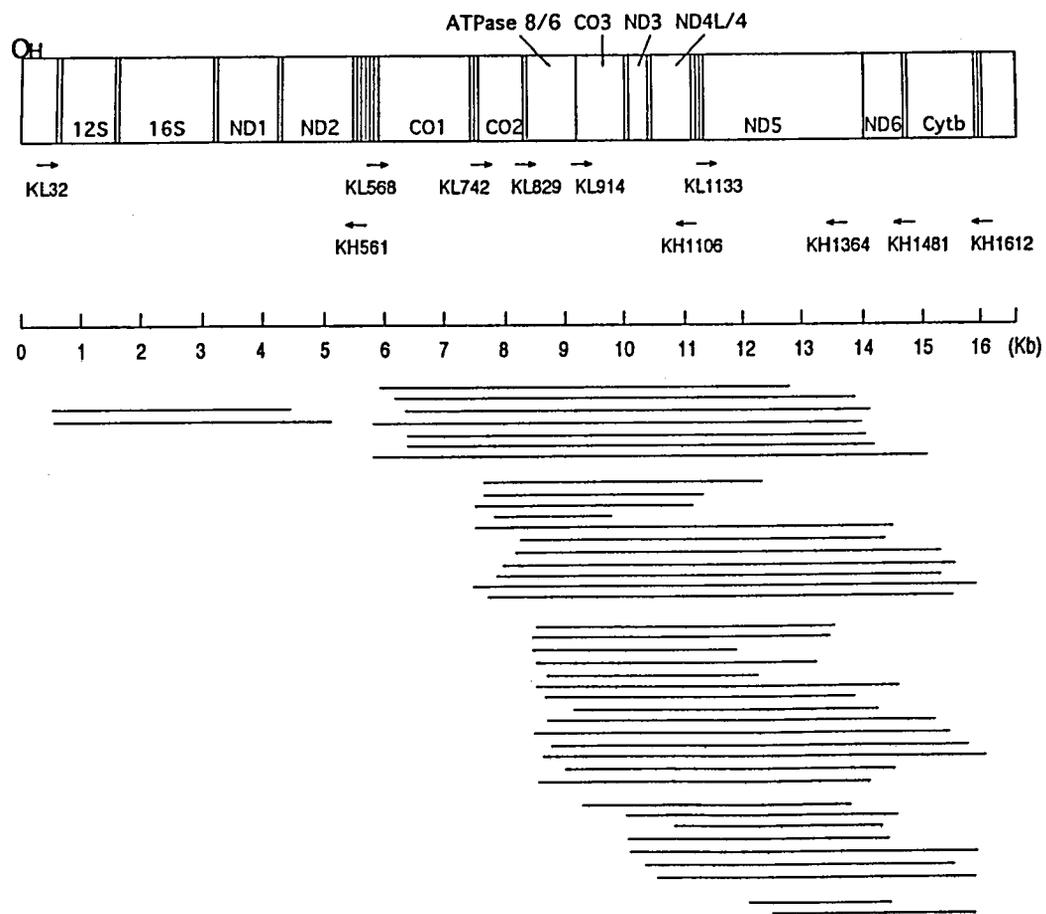
widely-interspaced primer PCR (Multiplex WISP-PCR). Multiplex WISP-PCR反応は,10mM トリスCl (pH8.8),2.5mM MgCl<sub>2</sub>,50mM KCl,100mg/ml ウシ血清アルブミンの反応液50ml中でTaq DNA polymerase2.5U/50mlを250mMの各dNTP,25pmolの各oligonucleotide primer,10から250ngの骨格筋総DNAとともにいった.反応時間は,93℃1分,58℃1分,70℃3分で33サイクル行った。

## Single widely-interspaced primer PCR (Single-WISP-PCR)

Multiplex WISP-PCRでミトコンドリアDNA欠失の存在が示された場合,表1に示すような2個ずつのプライマーのセットで欠失の両端をはさむようにPCRを行い,欠失の部位と大きさを同定した。

表1 Single WISP-PCRのためのプライマーセット

Tube	Primers	If amplified
1	KL32 - KH561	5361 bp
2	KL568 - KH1364	7959 bp
3	KL568 - KH1481	9130 bp
4	KL742 - KH1106	3638 bp
5	KL742 - KH1481	7386 bp
6	KL742 - KH1612	8791 bp
7	KL829 - KH1364	5348 bp
8	KL829 - KH1481	6519 bp
9	KL829 - KH1612	7924 bp
10	KL914 - KH1106	1915 bp
11	KL914 - KH1481	5663 bp
12	KL914 - KH1612	7068 bp
13	KL1133 - KH1364	2309 bp
14	KL1133 - KH1481	3480 bp
15	KL1133 - KH1612	4885 bp



Primers	5' - 3' Sequence	Position(np)
KL32	TGGCCACAGCACTTAAACACATCTC	321 → 345
KL568	CAACACTTAGTTAACAGCTAAGCA	5681 → 5705
KL742	CCCGTATACATAAAAATCTAGACAA	7425 → 7458
KL829	GCCCACTGTAAAGCTAACTTAGCA	8292 → 8315
KL914	TTAATCCAAGCCTACGTTTTCACA	9148 → 9171
KL1133	CCAATAACTTAATATGACTAGCTT	11331 → 11354
KH561	CAGAGTGGGGTTTTGCAGTCCTTAG	5610 → 5586
KH1106	GGAGATTAGTATAGAGAGGTAGAG	11062 → 11039
KH1364	GTTGACCTGTTAGGGTGAGAAGAA	13639 → 13616
KH1481	GGAGGTCGATGAATGAGTGGTTAAT	14810 → 14786
KH1621	TGCTGTACTTGCTTGTAAGCATGGG	16215 → 16191

図1 CPEO患者で報告されたミトコンドリアDNA欠失部位とMultiplex WISP-PCRのためのオリゴヌクレオチド・プライマー位置及びプライマー塩基配列  
 O<sub>H</sub>: 重鎖 (H鎖) の複製開始点. 12S, 16S: リボゾーム RNA 遺伝子. ND1, ND2, ND3, ND4L/4, ND5, ND6: 複合体 I のサブユニット. CO1, CO2, CO3: 複合体 IV のサブユニット. ATPase 8/6: 複合体 V のサブユニット. Cytb: 複合体 III のチトクローム b 遺伝子.

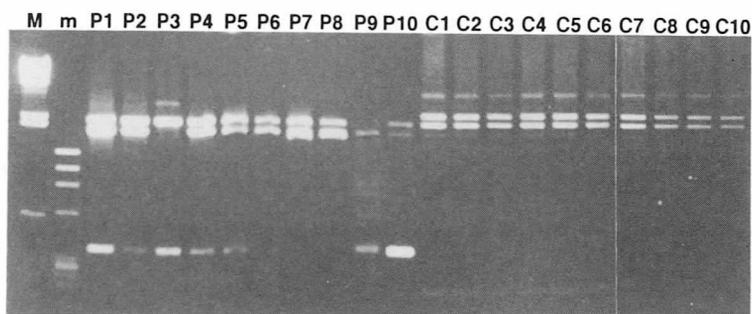


図2 CPEO患者10例, 対照患者10例の multiplex WISP-PCR  
M: 分子量マーカー 1 DNA-Hind III の断片. m: 分子量マーカー fX174 DNA-Hae III 断片. P 1~P 10: CPEO 患者 1~10.  
C 1~C 10: 対照患者 1~10.

### 直接DNA塩基配列決定法

欠失部位をはさんでPCR産物が得られた場合, 同じプライマーを用いて, dideoxy terminator cycle塩基配列決定法でABI社 373A DNA オートシーケンサーにより, 塩基配列を決定した.

### サザン解析

骨格筋DNAは制限酵素PvuIIにより消化し, 標識したヒト胎盤mtDNAをプローブとしてサザン解析を行った. オートラジオグラフィは6時間ないし60時間行った. BAS2000イメージアナライザー(富士フィルム社)にて欠失mtDNA半定量を行った.

### 結 果

1) CPEOの患者10例にMultiplex WISP-PCRを行い, 約2300bp, 約1900bpのバンドが得られた. プライマーKL1133~KH1364間2309bp, プライマーKL914~KH1106間1915bpはこの条件下で増幅され得るため, 内部コントロールとして用いることができる. ミトコンドリアDNA欠失がある場合, バンドは2Kb以内に出現する. 患者1から患者6と患者10ではそれぞれ約400bp, 患者7と患者8では約1800bpのPCR産物が得られた(図2). 患者9では複数のバンドが出現した. 対照患者ではKL1133~KH1481間, KL829~KH1106間, KL1133~KH1364間, KL914~KH1106間に相当するそれぞれ3480bp, 2800bp, 2300bp, 1900bpの4本のバンドが得られた. CPEO患者で見られた400bp, 1800bpのバンドはどの対照患者でも見られなかった.

2) 次に, 欠失部位を同定するために表1に示すようなプライマーの組合せでSingle WISP-PCRを行い, 患者1から6, 患者10ではKL829~KH1364プライマーでレーン7に約400bpのバンドが得られた.(図3; P1~P6, P10). 患者7ではレーン7にKL829~KH1364プライマーで約1800bpのPCR産物が得られた(図3; P7). 患者8ではレーン12にKL914~KH1612プライマーで約

1800bpのPCR産物が得られた(図3; P8). 患者9では図3のP9に示すように, 各組み合わせで複数のバンドが出現し, 多重欠失と考えられた. 以上の結果から, 患者1から6, 患者10では, np8292とnp13639との間に約4.9Kbの欠失, 患者7ではnp8292とnp13639との間に約3.6Kbの欠失, 患者8ではnp9148とnp16215との間に約7.4Kbの欠失が, 患者9では多重欠失があることがわかった. いずれも, Multiplex WISP-PCRで得られた異常バンドはSingle WISP-PCRでも対応する長さのバンドが出現しており, 特異的な増幅産物である.

3) 直接塩基配列決定法では, 患者1から6, 患者10の7例では全てnp8483からnp13459までのいわゆる“common deletion”と呼ばれる4977bpの欠失, 患者7ではnp8640からnp12208までの3569bpの欠失, 患者8ではnp7383からnp14412までの7030bpの欠失であった.

4) サザン解析を行った結果, 図4に示すように, 全DNA50ngで行うと, 患者7, 患者8, 患者10でそれぞれ13Kb, 9Kb, 11.5Kbの欠失ミトコンドリアのヘテロプラスミーが検出された. 全体に対する欠失mtDNAの比率は, 各々42%, 27%, 49%と算定された. 欠失を検出できなかった患者についてDNA量を500ngに増量すると患者1で11.5Kbの欠失DNAミトコンドリアが検出され, 欠失ミトコンドリアの割合は7%であった. 対照患者10例では欠失mtDNAは検出されなかった. サザン解析で検出できた患者1, 7, 8, 10の欠失の長さPCRで検出した欠失の長さは一致していた. 臨床的にCPEOと診断されたが, サザン解析でmtDNAの欠失の認められなかった6例で, PCR法によりミトコンドリア欠失が証明された.

### 考 察

多重PCR法は, ジストロフィン遺伝子の欠失の診断に実用化されているが<sup>10)</sup>, 本報告では, この多重PCR法をmtDNAの欠失を検出するために応用した. ミトコン

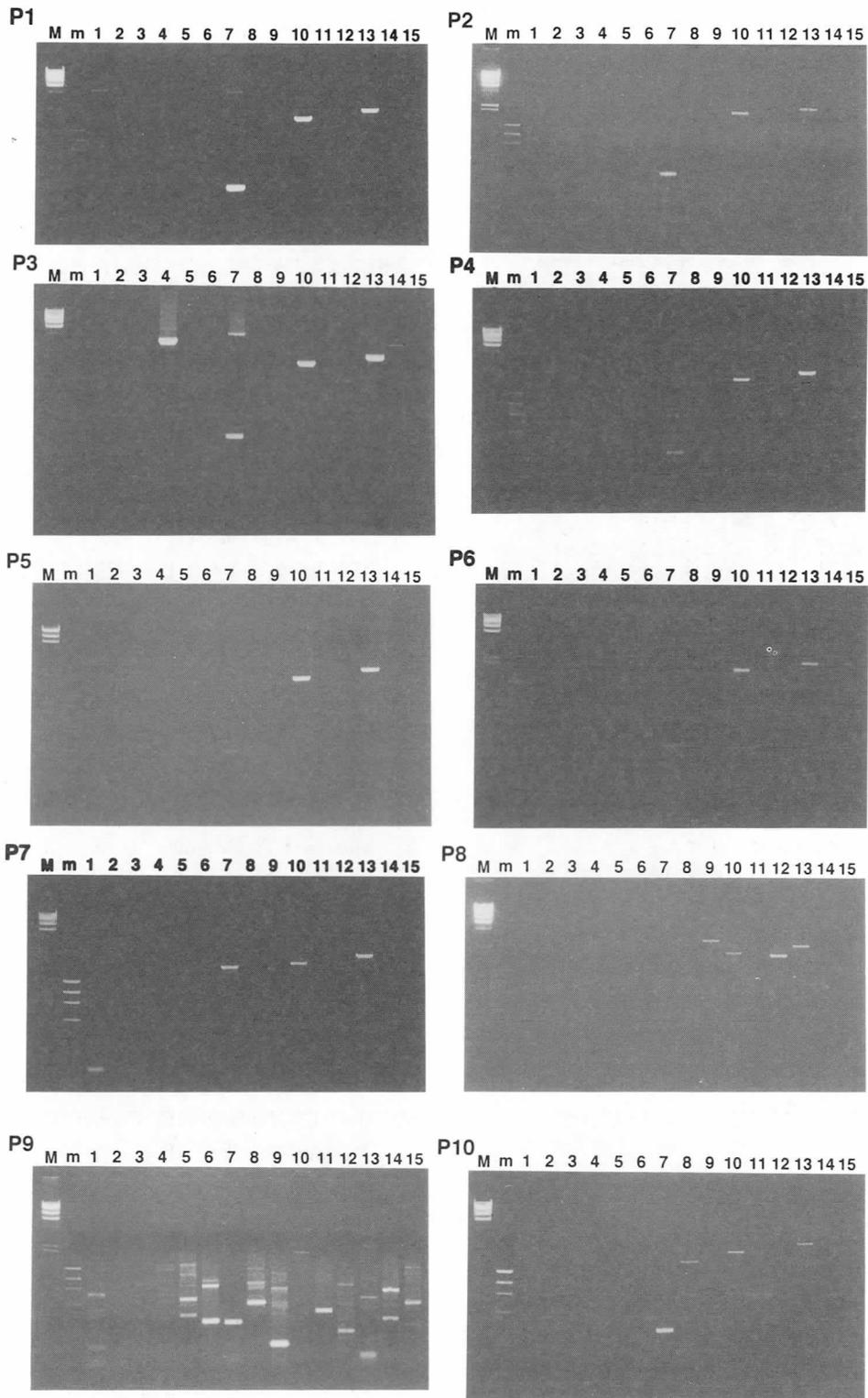


図3 CPEO患者10例のSingle WISP-PCR  
P 1～P10：CPEO患者1～10. M：分子量マーカー1 DNA-Hind Ⅲ断片.  
m：分子量マーカーfX174 DNA-Hae Ⅲ断片. 1～15：表1のチューブ1～15  
と対応する.

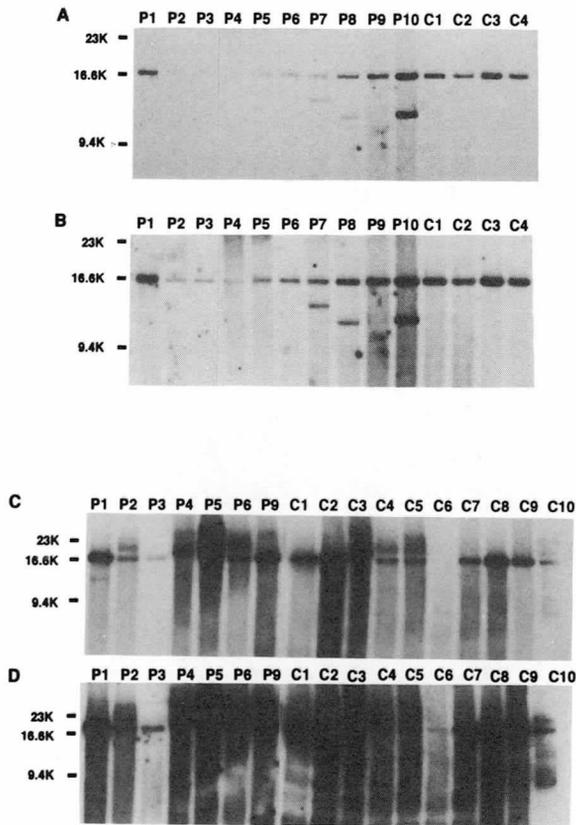


図4 CPEO患者と対照患者のミトコンドリアDNA サザン・ハイブリダイゼーション  
 A : 全DNA 50ng. 6時間曝露. B : 全DNA 50ng. 60時間曝露. C : 全DNA 500ng. 6時間曝露. D : 全DNA 500ng. 60時間曝露. P 1 ~ P 10 : CPEO患者1 ~ 10. C 1 ~ C 10 : 対照患者1 ~ 10. 23K, 9.4K : 1 DNA-Hind III断片より得られた23130bp, 9416bpのマーカ位置. 16.6K : 正常ミトコンドリアDNA全長16569bpの出現位置.

ドリアの場合、正常なmtDNAと欠失のあるmtDNAとはヘテロプラスミーの状態が存在している。したがって、ジストロフィン遺伝子と同様に多重PCR法を行うと、正常mtDNAも混在するために正常のバンドが増幅されて出現してしまい、単に欠失部位がPCR法で増幅されないということで欠失が存在しないとは言えない。そのため、本報告では想定欠失部位をはさんだWISP-PCRを、1本のチューブ内で行うこととした。

これまでCPEOの診断は、臨床症状、筋生検所見から行われ、さらにサザン解析によるDNA診断により確定診断されてきた。サザン解析で確定診断に至らなかった患者がこの方法で診断でき、Coenzyme Q10などの治療の恩恵に浴することができるようになった。

一方、PCR法に伴う注意点もいくつか考えられる。PCRのサイクル数、スタートの鋳型DNA量、プライマーのanneal温度や、extensionの時間が不適切な場合、非特異的な増幅の起こる原因となる。本報告の方法は、様々な条件を検討して得たもっとも妥当な条件である。

また、今回使用したプライマーは、これまでの報告で知られているCPEOのmtDNAの欠失は全てカバーできるよう設計したものである。本報告の患者7、患者8の2例では新しい型の欠失が見いだされたが、これらは今回設計したプライマーにより検出される部位に存在していた。今後、CPEOにおいて、サザン解析により、新しいmtDNAの欠失の型が報告され、もしその欠失が、これらのプライマーでカバーできないところにあるならば、プライマーも変更・改善しなければならない。しかし、現在のところは、本法で既知の欠失はすべてカバーでき、今回10例中10例の欠失を診断できた。本法は現時点では十分実用に耐え得ると考える。

mtDNA欠失により生じる病態はCPEO以外にも様々な症状を呈することが知られ、今後、様々な神経筋疾患の各組織で、mtDNA欠失を検索する必要があると考えられる。その際も、本法はその感度の高さからサザン・ハイブリダイゼーションを補う実用的な診断方法として併用されるべきであろう。

## 文 献

- 1) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S, Nonaka I, Koga Y, Spiro A, Brownell KW, Schmidt B, Schtland DL, Zupang M, DeVivo DC, Schon EA and Rowland LP : Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320 : 1293-1299, 1989.
- 2) Holt IJ, Harding AE, Cooper JM, Schapira HV, Toscano A, Clark JB and Morgan-Hughes JA : Mitochondrial Myopathies : Clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA. *Ann Neurol* 26 : 699-708, 1989.
- 3) Goto Y, Koga I, Horai S and Nonaka I : Chronic progressive external ophthalmoplegia : a correlative study of mitochondrial DNA deletion and their phenotypic expression in muscle biopsies. *J Neurol Sci* 100 : 64-69, 1990.
- 4) Lauber J, Marsac C, Kadenbach B and Seibel P : Mutations in mitochondrial tRNA genes : a frequent cause of neuromuscular diseases. *Nucl Acid Res* 19 : 1393-1397, 1991.

- 5) van den Ouweland JMW, Bruining GJ, Lindhout D, Wit J - M, Veldhuyzen BFE, Maassen JA : Mutations in mitochondrial tRNA genes : non - linkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmoplegia. *Nucl Acid Res* 20 : 679 - 682, 1992.
- 6) Wallace DC, Lott MT, Torroni A, Schoffner JM : Report of the committee on human mitochondrial DNA. *Cytogenet Cell Genet* 58 : 1103 - 1123, 1991.
- 7) Moraes CT, Ricci E, Petruzzella V, Shanske S, DiMauro S, Schon EA and Bonilla E : Molecular analysis of the muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions. *Nature Genet* 1 : 359 - 367, 1992.
- 8) Larsson NG, Eiken HG, Boman H, Holme E, Oldfors A and Tulinius MH : Lack of transmission of deleted mtDNA from a women with Kearns - Sayre syndrome to her child. *Am J Hum Genet* 50 : 360 - 363, 1992.
- 9) Rotig A, Bessis JL, Romero N, Cormier V, Saudubray JM, Narcy P, Lenoir G, Rustin P and Munnich A : Maternally inherited duplication of the mitochondrial genome in a syndrome of proximal tubulopathy, diabetes mellitus and cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 50 : 364 - 370, 1992.
- 10) Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN and Caskey CTT : Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl Acids Res* 16 : 11141 - 11156, 1988.

## 38) ミトコンドリア異常症の臨床亜型の検討

高木 昭夫\*

研究協力者 中瀬 浩史\*

ミトコンドリア異常症の診断に関してはミトコンドリア DNA の変異が明らかになり、遺伝子診断が重要となっており、典型的な臨床病型との間に一定の対応があることが知られている。一方、ミトコンドリア異常症の臨床病型の広がりを見ていくと、このような一定の対応がつかず問題となる場合もあることが知られてきた。また、ミトコンドリア DNA の異常が既知の変異の screening において明らかでない場合には形態的に判断をしなければならない場合がある。このような場合においては従来どおり ragged-red fibers や CCO 染色における欠損線維の有無が診断の手がかりとなる。その場合においても従来の診断基準が問題となることがある。一つには高齢者の場合であり、ragged-red fibers が高率で認められることである。また他疾患に合併してミトコンドリア DNA の異常が存在し、その症状発現と必ずしも結びつかないと思われる場合もある。ここに 2 症例を呈示し、ミトコンドリア異常症の診断に関して考察したい。

### 症 例

症例 1 : 75 歳, 女性

主訴 : 四肢筋痛, 脱力

既往歴, 家族歴 : とともに特記すべきことなし。

現病歴 : 1992 年 2 月 両肩の疼痛が出現し, 上肢挙上困難が緩徐に出現する。1992 年 4 月両側大腿疼痛が出現し, 四肢脱力を認める。鎮痛剤 (非ステロイド系) の効果が十分でなく, 頻回投与により消化性潰瘍をもたらした。1992 年 7 月入院となる。

現症 : 全身症状に異常はなく, 平熱であり, 側頭部に圧痛はない。軽度眼瞼下垂を認める。四肢近位筋に運動時痛, 把握痛を認める。筋力は遠位において 4, 近位で 3+ であった。筋萎縮はきわめて軽度, 腱反射も正常であった。知覚障害はない。

検査所見 : 血算, 生化学に関しては CK, pyruvate, lactate を含めて異常なし。ESR, CRP, ANA, CH<sub>50</sub>などに異常なく, 炎症所見を認めなかった。筋電図は筋原性変化を認めるが, 末梢神経伝導速度は正常であった。Tensilon 試験は陰性。mtDNA に関する塩基置換 (3243

A-G などの 6 変異) 及び欠失に関する Southern blotting による screening は異常を認めなかった。

骨格筋生検所見 : 炎症細胞の浸潤はなく, 筋線維の大小不同とともに Gomori-TR 染色において ragged-red fibers を多数認めた (図 1 参照)。

経過 : 本例は治療を行わず, 安静を保っていたが, 回復が遅いため Ubiquinone 300mg 投与により, 経過を見ていたが, 次第に回復した。診断的には PMR 類似の病態を考えたが, ミトコンドリア異常が一次的に生じた可能性も考えられた。

症例 2 : 85 歳 女性

既往歴, 家族歴 : いずれも特記すべきことなし。

現病歴 : 65 歳 両下肢より始まる痙性麻痺を認めた。

67 歳 上肢より始まる筋萎縮。構音障害を認めた。筋電図, 上腕二頭筋生検においても神経原性変化を認めた。

73 歳 起立時の動揺を認めた。77 歳 伝い歩き不能, 記名力低下が出現した。83 歳 痴呆症状進行するが, 失見当識, 記憶障害が主体であり, 人格変化, 異常行動は見られなかった。85 歳 嚥下性肺炎にて入院。

入院時神経所見 : 高度の痴呆 (発語はほとんどなく, 覚醒時には常に笑顔を示し, 視線が合うと表情に反応が認められるが, 何らかの意思の疎通はなく, また合目的な運動はほとんど認められない。軽度ではあるが舌の萎縮を認める。構音障害著明であり, 嚥下は不可。四肢の痙性は著しく, 下顎反射, 四肢腱反射は高度の亢進を示した。筋力は 3 ないし 3+ であった。筋萎縮は上肢主体に軽度認められる。膀胱直腸障害は失禁を認めた。

検査所見 : 血液生化学 CK, pyruvate, lactate を含め正常, 髄液異常なし。

MRI : 広範な大脳皮質の萎縮を認める。大脳白質, 小脳, 脳幹部には異常は認めない (図 2 参照)。

SPECT : 前頭葉及び側頭葉に血流の低下を認める。頭頂葉も軽度低下はしているが著明ではない。

EEG : 8~9Hz  $\alpha$  wave, 6Hz  $\theta$  wave

ABR : 正常

EMG : 神経原性変化

筋生検所見 : 神経原性変化を認めるが, ragged-red fibers などのミトコンドリア異常を示唆する所見はない。

DNA 解析 : 非典型的な痴呆症を来す疾患として prion 異

\* 虎の門病院神経内科

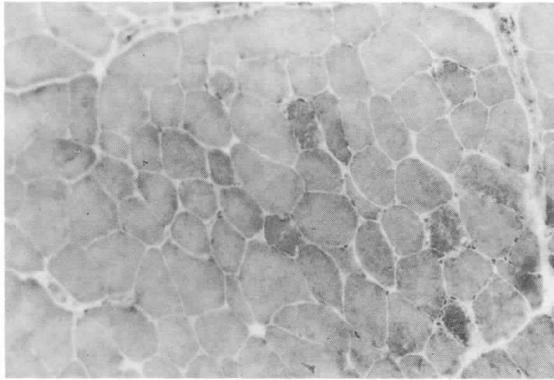


図1 症例1の筋生検像  
Ragged-red fibersを多数認める。Gomori-TR染色

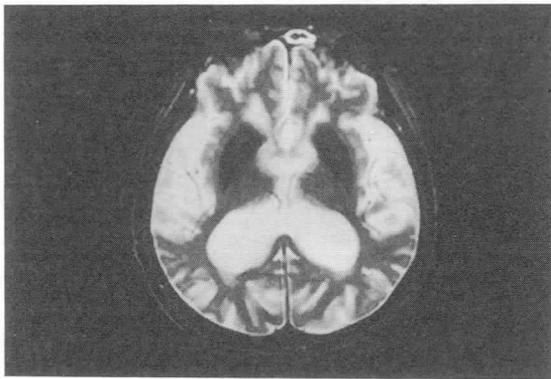


図2 症例2のMRI像  
広範な大脳皮質の萎縮を認めるが、白質には大きな変化を認めない。

常症があげられるが、prion geneには既知の変異は認められなかった。一方、mtDNAの検索においては欠失はなく他の変異も認められなかったが、いわゆるMERRFに認められる8344 A-Gの変異が白血球の解析において認められた(図3参照)。また、このような所見が本症に類似の症例(光山型と異なり経過が緩徐である痴呆症を伴う運動ニューロン疾患で症性が主体のもの)で認められるかを4症例において検討したが同様の変化は認められなかった(図4参照)。

### 考 察

**症例1に関して：**本例の臨床症状はミトコンドリア異常症の中でも筋痛を主症状とする筋症状を呈するものがあり、必ずしも本症の臨床症状とするに否定されるものではない。しかし、本症の診断には筋組織所見あるいは遺伝子診断によるが、本例においては遺伝子異常の同定はなされておらず、組織学的診断による。本例におけるragged-red fibersの頻度は高く、示していないがCCO染色における欠損線維の頻度も高い。高齢者においてはこのようなミトコンドリア異常を示唆する所見は正常者においても、また他の疾患においてもしばしば認められ

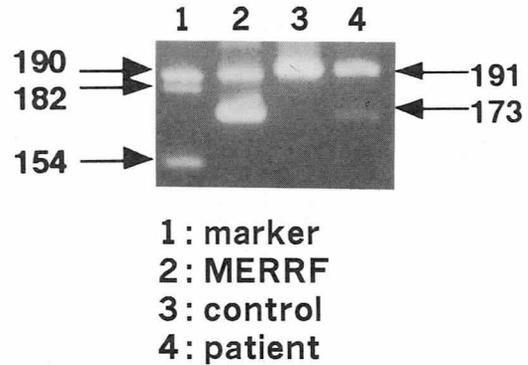


図3 症例2におけるmtDNA変異(8344 A-G)の検討  
米田らの方法<sup>4)</sup>により mismatched primerを用い、PCR後Dra Iで切断し、変異mtDNAは173bp(正常191bp)となる。

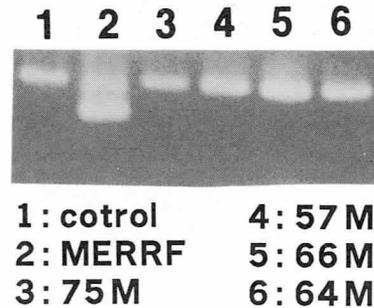


図4 臨床症状が類似する4症例におけるmtDNA変異の検討  
図3と同様に検索したが、変異mtDNAは認められなかった。

るものである。この場合異常所見と正常高齢者の所見とを区別する基準として、Muller-Hockerは正常者で認められたCCO欠損線維の頻度を示しているが<sup>1)</sup>(最大50~60/cm<sup>2</sup>)、本例のような多数の線維に認められる場合は少なく、組織所見において一つの診断基準を決定することの困難さを示している。

**症例2に関して：**本例の臨床症状は原発性側索硬化症に類似した臨床経過をたどっていた症例であるが、その末期になって痴呆症状が全量にたった症例である。臨床的には光山型とは異なる痴呆症状を伴う運動神経疾患の一種と考えられるが、末梢血白血球DNAの検索においてミトコンドリア遺伝子異常が認められたことが問題となる。本例をミトコンドリア異常症と考えるには問題が多い。この点を列挙すると、① 神経症状にミオクロヌスを欠く。8344 A-G変異の神経症状で根幹をなすものはミオクロヌスと考えられる。② 筋生検所見が異な

りragged-red fibersなどのミトコンドリア異常を示唆する所見を欠く。③ 異常mtDNAの割合が少ない。8344変異は臓器間の異変DNAの差が少ないとされ<sup>2)</sup>、その白血球異常ミトコンドリアの割合は多くは80%以上であり<sup>3)</sup>、本例のような少量の異常ミトコンドリアで発症している例では白血球以外の各臓器においてどのような割合で存在するか明らかでなく、直ちに罹患臓器での症状を出現しうる割合で存在するといいたい。④ 類似症例4例で陰性であり、本病型がミトコンドリア異常による根拠はない。⑤ 類似症例はすべて孤発例であり、母性遺伝の報告はない。⑥ 本例を含め全身的な合併症がない。このような点から本例をミトコンドリア異常症と断定するには慎重でなければならないと考える。

ミトコンドリア異常症と臨床亜型は一つの問題点と考えられるが、どのような症状が本症において認められるのかはさらに個々の症例において慎重に検討されなければならない。特に高齢者の場合には判断が難しい。一つの基準として類似症例が多数あることは一次性にせよ二次性にせよミトコンドリア異常の関与を考えさせるものであり、今後の検索によりここにあげた症例と類似の症例があるか否かが問題となる。

## ま と め

2症例を呈示して特に高齢者におけるミトコンドリア異常症の診断の困難さに関して述べた。従来提唱されてきた組織学的、数量的な判断基準、あるいはDNA診断も必ずしも絶対でないと考えた。

## 文 献

- 1) J Muller-Hocker: Cytochrome c oxidase deficient fibers in the limb muscle and diaphragm of man without muscular disease: an age-related alteration. *J Neurol Sci* 100: 14-21, 1990.
- 2) Y Tanno, et al: Uniform tissue distribution of tRNA<sup>Lys</sup> mutation in mitochondrial DNA in MERRF patients. *Neurology* 43: 1198-1200, 1993.
- 3) Y Tanno, et al: Quantitation of mitochondrial DNA carrying tRNA<sup>Lys</sup> mutation in MERRF patients. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 880-885, 1991.
- 4) M Yoneda: Simple detection of tRNA<sup>Lys</sup> mutation in myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) by polymerase chain reaction with mismatched primer. *Neurology* 41: 1938-1840, 1991.

# 39) 全身性カルニチン欠乏マウス (jvs マウス) の ミトコンドリアの変化に関する研究

垂井 清一郎\*

研究協力者 桑島 正道\*\* 堀田 紀久子\*\* 大野 昭\*\*  
宮川 潤一郎\*\* 中島 弘\*\* 嶺尾 郁夫\*\*  
松沢 佑次\*\*

## はじめに

カルニチンは、筋肉での長鎖脂肪酸のミトコンドリア内転送に必須の物質である。従ってカルニチン欠乏に陥ると、筋組織は脂肪酸代謝障害にもとづくエネルギー代謝異常をひきおこすと考えられる<sup>1)</sup>。

しかし、実際には臨床の場合において、カルニチンについての関心は薄く、カルニチンの重要性についても否定的意見が多い。その理由の一つとしてカルニチン欠乏とわかっていくつかの臓器の障害を経時的に分析したり、治療の効果を評価することは、ヒトの場合には難しいことがあげられる。

1988年、金沢大学の小泉らにより常染色体劣性の遺伝形式を示し、脂肪肝・低血糖・高アンモニア血症を呈するC3H系マウスが報告された<sup>2)</sup>。私共は、これら症状がヒトにおける全身性カルニチン欠乏症と似ていることに注目し分析したところ、血清、肝、骨格筋において遊離カルニチン、アシルカルニチン共に低下していることを見出した<sup>3)</sup>。その後の分析により心筋においても同様の結果を得た。このマウスは後に Juvenile visceral steatosis (jvs) マウスと呼ばれるようになった<sup>4)</sup>が、私共の分析によりその病態は全身性カルニチン欠乏によりおこしていると考えられた。

## 目的

本研究は、この jvs マウスを用いカルニチン欠乏によって各組織中のミトコンドリアがいかなる変化をこうむるかを分析し、カルニチン欠乏などの代謝変動に対するミトコンドリアの特性を明らかにすることを目的とした。

## 対象と方法

2, 4, 8 週齢の homozygote (jvs/jvs), heterozygote (+/jvs) および jvs の母系である C3H マウス (+/+)

を用いた。

屠殺時大腿二頭筋、前頸骨筋、ヒラメ筋を摘出、迅速凍結切片を作製し組織化学的検索を行った。また上記諸筋および外眼筋、横隔膜を電顕用に固定し電顕的観察を行った。さらに骨格筋と心筋より AGPC 法にて total RNA を抽出し、COX I の cDNA 断片をプローブとしてドットプロット法にてミトコンドリア mRNA 量を分析した。

## 結果

2 週齢の homozygote の骨格筋の HE 染色では heterozygote や母系 C3H マウスに比し、比較的小さい筋組織に微細な空胞が多数みられた。次に電顕的に分析するとミトコンドリアが巨大化し、数が増えており、またミトコンドリアに接して脂肪滴が多く見られた (図 1, A)。この様な形態変化は骨格筋では 4 週, 8 週を追ってみても大きな違いはなかった。

次に心臓について分析すると、HE 染色では心筋細胞の肥大が見られ、また核が大きくなる傾向があった。電顕像では核はやや拡大しミトコンドリア増加の著明な細胞も少なくなかった。(図 1, B)。

この 2 週齢に見られた心筋のミトコンドリアの増加は骨格筋の場合と異なり加齢と共に進み、生後 2 ケ月の心臓では細胞質の大部分がミトコンドリアによって占められるようになり、電子密度の高いリソゾーム様の顆粒も見られた (図 1, C)。

ミトコンドリアを詳しく見ると、jvs マウスではミトコンドリアは細長くなる傾向がみられたが、クリステには大きな異常は見られなかった (図 1, D)。またミトコンドリアの変性像やミエリン様の構造物も多数見られた (図 1, E)。

他の筋線維、例えば外眼筋でもミトコンドリアの著しい増加はみられたが、脳血管を含め冠動脈内の血管平滑筋細胞には異常増加は見られなかった。

骨格筋をゴモリトリクロム染色すると ragged red

\*国家公務員等共済組合連合会大手前病院  
\*\*大阪大学医学部第二内科

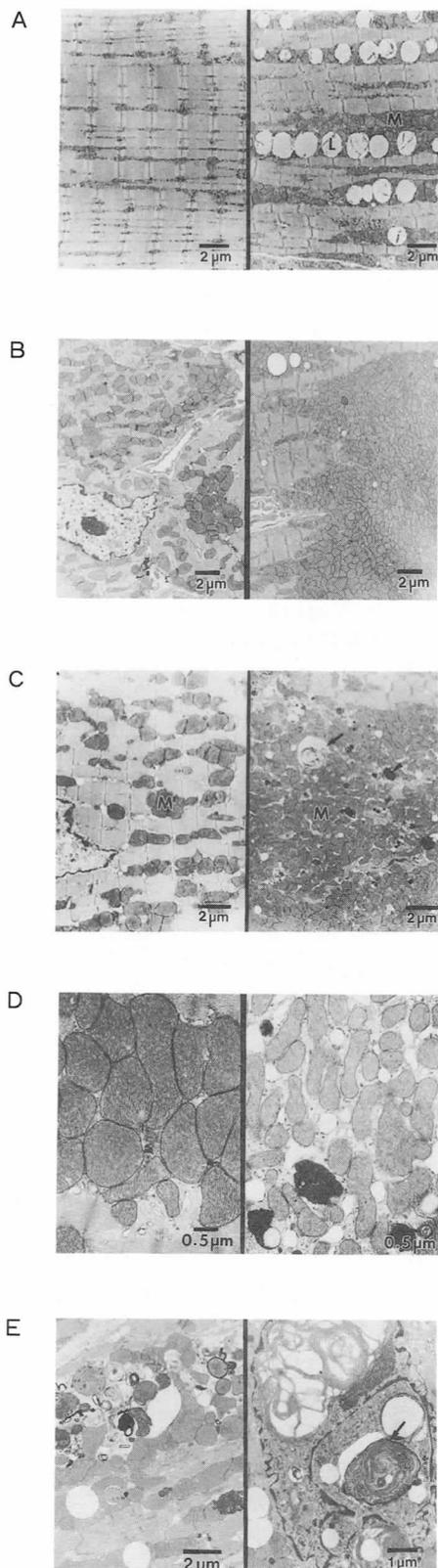


図1 全身性カルニチン欠乏マウスの骨格筋、心筋の電顕像 (A～D: 左は+/+, 右は jvs/jvs. E: jvs/jvs)  
A. 大腿二頭筋 (2週齢), B. 心臓 (2週齢)  
C. D. E. 心臓 (8週齢)

fiberが見られたが、陽性細胞は筋線維の約12%程度あった。また心筋について同様の分析を行うとほとんど全ての筋線維は赤く染まり、骨格筋で見られる ragged red fiberと同様の形態異常を示していた。

このように心筋、骨格筋においてミトコンドリア異常を伴っていたので、次にミトコンドリアDNAの量的異常を伴っているかどうか、を分析した。

まず、心筋より、total DNAを抽出し、20 $\mu$ gのtotal DNAをEcoR Iで切断後、COX IのcDNAをプローブとしてサザン分析を行った。母系C3Hマウス, heterozygote, homozygote, カルニチン治療を行った homozygote 群の4群の間には著明な変化は認められなかった。次に心筋よりAGPC法にてtotal RNAを抽出しCOX IのcDNA断片をプローブとしてサザン分析を行い、ミトコンドリアmRNA量を分析したが、心筋のtotal RNAあたりのCOX I mRNAは4つの群の間に明確な差を認めなかった。骨格筋においても同様であった。

### 考察とまとめ

カルニチンは長鎖脂肪酸のミトコンドリア内転送には必須の物質であり、全身組織に存在する。しかし生体におけるカルニチンの役割の重要性については一般的には否定的意見が多く、特に内科の分野では注目されることは少ない。その理由の1つとして、生体から材料を得ることに限界があり、分析も十分にされないことがあげられる。

今回私共は、全身性カルニチン欠乏マウスを用い、

- 1) 心筋、骨格筋、外眼筋では、ミトコンドリアの増加が著明であった。血管平滑筋においては変化がみられなかった。
- 2) 心筋においては、加齢と共にミトコンドリアの増加は進み、リソゾーム様顆粒の増加、ミエリン様構造物の出現などが見られた。
- 3) 心筋、骨格筋におけるミトコンドリアのDNA量、RNA量については、COX Iを選び分析したが、著明な変化はみられないことなども明らかにした。

今回得られた結果が、ヒトの場合にもあてはまるかどうかは、今後の検討をまたなければならない。また増加しているミトコンドリアの呼吸機能の分析や、ミトコンドリアの増殖のメカニズムについて更に今後検討する予定である。

### 文 献

- 1) Bieber LL: Carnitine "Ann Rev Biochem 1988" (ed by Richardson CC, Boyen PD, Dawid IB & Meister A), Annual Reviews Inc, Palo Alto, 1988, pp261-283.
- 2) Koizumi T, Nikaido H, et al: Infantile disease

- with microvesicular fatty infiltration of viscera spontaneously occurring in the C3H-H-2<sup>+</sup> strain of mouse with similarities to Reye's syndrome. *Lab Animals* 22 : 83-87, 1988.
- 3) Kuwajima M, Kono N, et al : Animal model of systemic carnitine deficiency : Analysis in C3H-H-2<sup>+</sup> strain of mouse associated with juvenile visceral steatosis. *Biochem Biophys Res Commun* 174 : 1090-1094, 1991.
- 4) Hayakawa J, Nikaido H, et al : Inheritance of juvenile visceral steatosis(jvs) found in C3H-H-2<sup>+</sup> mice. *Mouse Genom* 86 : 261, 1990.

## VIII. ミトコンドリア (Part 2)

# 40) MELASにおけるミトコンドリアDNAの変異

宝 来 聡\*

研究協力者 梶 根 一 夫\* 後 藤 雄 一\*\*  
作 田 亮 一\*\*\* 埜 中 征 哉\*\*

## 目 的

ミトコンドリア脳筋症MELASにおいては、tRNA・ロイシン (UUR) 遺伝子の塩基番号3243の変異が約80%の患者に、同遺伝子上の塩基番号3271の変異が10%の患者に見出されている。しかし、約10%の患者はいずれの変異も検出されていない。昨年、白人患者においてND4遺伝子上の塩基番号11084におけるA→G置換が報告された。本研究では、この11084変異に関する検討を行うとともに、3243および3271の検出されない症例に関して、全tRNA領域の塩基配列の解析を行った。

## 結果と考察

### ND4遺伝子11084変異

昨年Lertritらにより、ミトコンドリアDNAにコードされる複合体IのサブユニットのひとつであるND4の11084塩基部位のAからGへの塩基置換が、MELASに関連するとの報告がされた。この変異は、スレオニンからアラニンへのアミノ酸置換を生じること、正常白人集団には存在しないこと、およびヘテロプラスミーなDNA変異であることから、著者らはMELASの発症に特異的なミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子変異であると推定した。しかしこの変異は、MELASの白人一患者にのみしか見出されず、正常対照も白人集団に限られていることから、その疾患特異性に問題があること、およびスレオニン・アラニン間のアミノ酸置換は、正常人集団でも高頻度に生じる置換であることから(宝来ら、未発表)、再検討の必要が感じられた。我々は本邦における症例に関して、50例のMELAS患者を検討したところ、3243変異が34例、3271変異が4例、11084変異が3例に観察された。このうち2例においては、3243変異と11084変異を併せ持っていた。11084変異に関して、この変異がMELASに特異的かどうかを検討するためMELAS以外のミトコンドリア脳筋症40例(MER-RF: 7例, CPEO: 19例, 分類不明のミトコンドリア脳筋症: 14例) および正常対照105例に関する検討を行っ

た。図1には、ミトコンドリア脳筋症および正常対照におけるミスマッチプライマーを用いたPCRおよびNheI消化による11084変異の検査結果の一部を示した。表1には、今回用いた全症例におけるタイプ分類と11084変異の有無を示した。日本人のミトコンドリア脳筋症患者計90例については、3例のMELAS患者、4例のCPEO患者および分類不明のミトコンドリア脳筋症患者2例にこの変異が観察されたが、いずれもホモプラスミーの変異であった。さらに正常対照105例を検討した結果、15例(14%)にホモプラスミーな変異として見出された。この結果、11084変異は白人においては極めて頻度が低く、日本人では高頻度に存在する正常の多型である可能性が高く、MELASに特異的な変異でない結論した。

### 本邦MELASにおける第3の変異

典型的MELAS症状を呈し、かつ3243および3271変異の検出されない6例に関して全tRNA領域の塩基配列を決定した。その結果、1例において新たにtRNA・ロイシン (UUR) 遺伝子上の塩基番号3291におけるT→C変異を見出した(図2)。前述の変異と同様にして、この変異を同定するために、ミスマッチプライマーを用いたPCRとBamHI消化による簡便な遺伝子診断法を導入した。さらに患者の母親および姉の血液よりDNAを抽出し、上述の遺伝子診断法により遺伝性の検討を行った

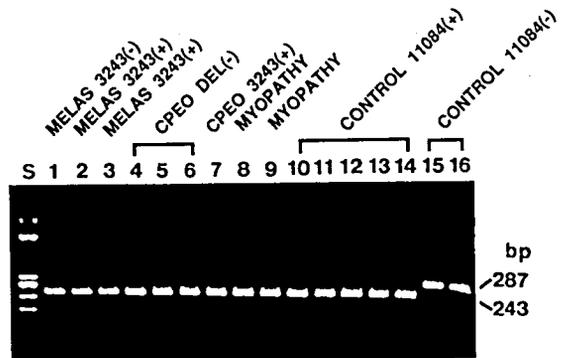


図1 ミスマッチプライマーPCRおよびNheI消化による11084変異の同定

\*国立遺伝学研究所・人類遺伝研究部門  
\*\*国立精神・神経センター武蔵病院  
\*\*\*国立精神・神経センター神経研究所

表1 各種臨床型と11084変異の関係

Clinical Features and Observed Mutations	No. of Patients	No. with nt11084 Mutation
<b>MELAS:</b>		
With 3243 mutation .....	34	2
With 3271 mutation .....	4	0
With no 3243 or 3271 mutation .....	12	1
<b>MERRF:</b>		
With 8344 mutation .....	4	0
With no 8344 mutation .....	3	0
<b>CPEO:</b>		
With deletion .....	2	0
With no deletion .....	16	3
With 3243 mutation .....	1	1
<b>Miscellaneous mitochondrial myopathies .....</b>		
	14	2
<b>Total .....</b>	<b>90</b>	<b>9 (10%)</b>
<b>Normal controls .....</b>	<b>105</b>	<b>15 (14%)</b>

表2 3291変異の特異性の検討

	No. of samples	No. with 3291 mutation
<b>MELAS (N = 46)</b>		
With 3243 mutation ...	36	0
With 3271 mutation ...	4	0
With no 3243 or 3271 mutation .....	6	1
<b>Normal controls (N = 55)</b>		
Japanese .....	33	0
European .....	15	0
African .....	7	0

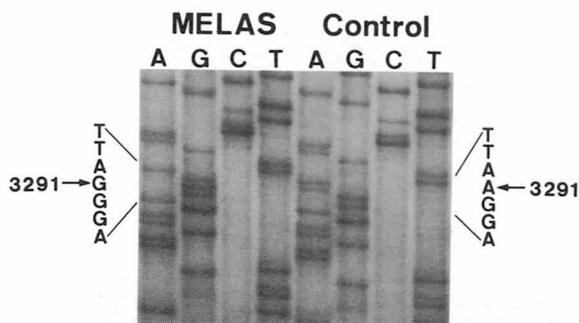


図2 tRNA・ロイシン(UUR)領域のH鎖シーケンス. MELAS患者ではControlと比較して, 3291部位にAからGへの置換(L鎖ではTからCへの置換)が観察された

(図3). この結果, 3291変異は, 患者の筋肉, 血液, Bセルラインでは, いずれもヘテロプラスミーであったが, 母親および姉の血液DNAでは, 検出できる異常型は見出されず, この変異は新生突然変異であることが明らかとなった. この変異の特異性を検討した結果, 3243 (+) および3271 (+) のMELAS患者での複合変異はなく, 正常対照には見出されないことより, 本邦MELAS患者における第3の変異と考えられた(表2). またこの変異はtRNA・ロイシン(UUR)遺伝子における2次構造上では, T<sub>ψ</sub>Cループの最後の塩基である(図

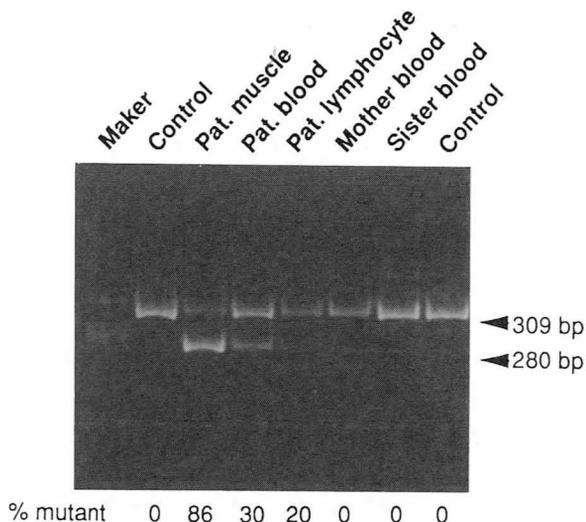


図3 患者および家族試料に関する3291変異の示すポリアクリルアミド電気泳動

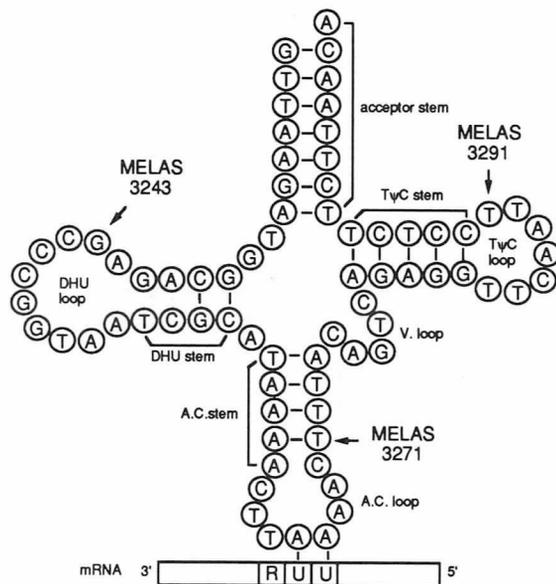


図4 A tRNA・ロイシン(UUR)遺伝子の2次構造を示す図. 3291部位はT<sub>ψ</sub>Cループの最後の塩基

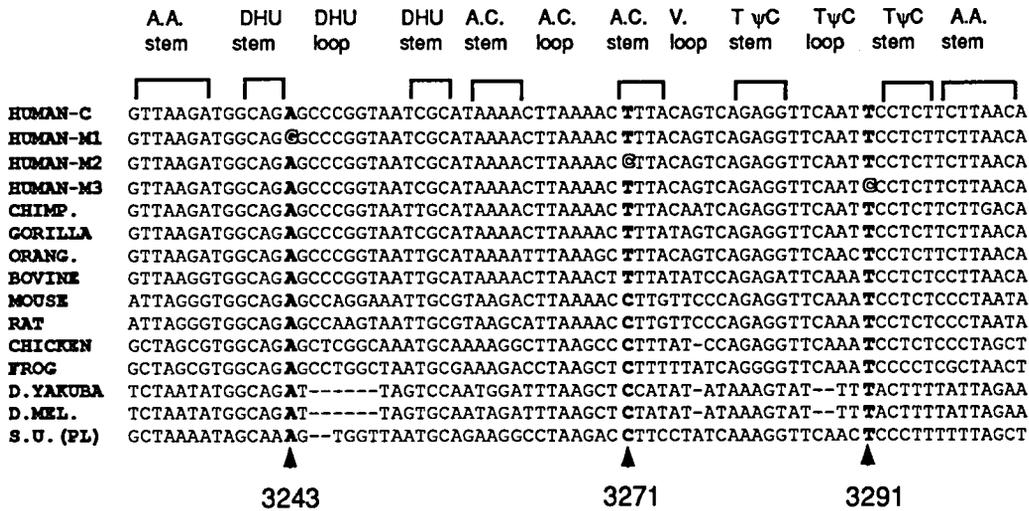


図4B tRNA・ロイシン (UUR) 遺伝子の種々の動物種の塩基配列のアライメント  
HUMAN-C ; 正常人, HUMAN-M1 ; MELAS3243変異, HUMAN-M2 ; MELAS3271  
変異, HUMAN-M3 ; MELAS3291変異

4 A). この部位は生物進化上, ヒトを含む霊長類, ウン, マウス, ラットの哺乳類, 鳥類, 両生類, ショウジョウバエからウニまで厳密に保存されていることが明らかとなった (図4B). このことは, この塩基部位が tRNA・ロイシン (UUR) の機能に関して極めて重要であることを示している. 以上より, 3291変異はMELASの発症と強く関連していることが示唆された. tRNA・ロイシン (UUR) 遺伝子の疾患特異的な変異に関しては, 今回の3291変異を含めて, MELASにおいては3部位 (3243, 3271, 3291) が同定された. さらに他のミトコンドリア脳筋症においては, 3250, 3260, 3302部位での変異が報告されており, tRNA・ロイシン (UUR) 遺伝子は, 種々のミトコンドリア脳筋症に関連した変異発生のホットスポットであることが示唆された.

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) Goto Y, Nonaka I and Horai S : A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalomyopathy, lactic acidosis and strokelike episodes ( MELAS ). Biochem Biophys Acta 1097 : 238 - 240, 1990.
- 3) Howell N and McCullough D : An example of Leber hereditary optic neuropathy not involving a mutation in the mitochondrial ND4 gene. Ann J Hum Genet 47 : 629 - 634, 1990.
- 4) Huoponen K, Vilkkki J, Savontaus M-L, et al :

Analysis of mitochondrial ND4 gene DNA sequence in Finnish families with Leber hereditary optic neuropathy. Genomics 8 : 583 - 585, 1990.

- 5) Lertrit P, Noer AS, Jean-Francois MJB, et al : A new disease-related mutation for mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes ( MELAS ) syndrome affects the ND4 subunit of the respiratory complex I. Am J Hum Genet 51 : 457 - 468, 1992.
- 6) Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S, 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 - 525, 1991.
- 7) Sakuta R, Goto Y, Horai S, et al : Mitochondrial DNA mutations at nucleotide positions 3243 and 3271 in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes : A comparative study. J Neurol Sci 115 : 158 - 160, 1993.
- 8) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, 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.
- 9) Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al : Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science 242 : 1427 - 1430, 1988.
- 10) Zeviani M, Gellera C, Antozzi C, et al : Maternally

inherited myopathy and cardiomyopathy : association with mutation in mitochondrial DNA tRNA-Leu(UUR). *Lancet* 338 : 143-147, 1991.

- 11) Goto Y, Tojo M, Tohyama J, et al : A novel point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene in a family with mitochondrial myopathy.

*Ann Neurol* 31 : 672-675, 1992.

- 12) Bindoff LA, Howell N, Poulton J, et al : Abnormal RNA processing associated with a novel tRNA mutation in mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 268 : 19559-19564, 1993.

# 41) MELASの筋病理における変異mtDNAの役割

内野 誠\*

研究協力者 箕田 修治\* 徳永 誠\*  
安藤 正幸\* 埜中 征哉\*\*

## はじめに

我々はミトコンドリア (mt) 脳筋症における筋病理学的特徴である ragged-red fibers (RRF), および cytochrome c oxidase (CCO) 活性欠損線維と変異 mtDNA との関係性を明らかにし, mt 脳筋症の各病型における変異 mtDNA の役割を明らかにすることを目標に研究を進めている<sup>1)2)</sup>. 今回は, RRF および CCO 活性欠損線維が, 実際は各病型間で少しずつ異なった所見を呈している点<sup>1)4)</sup>に着目し, MELAS 患者筋における変異 mtDNA の役割について検討した<sup>5)</sup>.

## 対象と方法

- 1) 対象として mtDNA tRNA<sup>Leu</sup> (3243) 変異を有する MELAS 患者 3 例を用いた.
- 2) これら生検筋の連続切片を用いて CCO 染色, SDH 染色 ATPase 染色等の histochemistry を行い, また mtDNA 断片をプローブに *in situ* hybridization (ISH) を行い, 各筋線維における RRF, CCO 活性, fiber type および total (正常と変異) mtDNA の関係性を検討した.
- 3) RRF および non-RRF における正常と変異 mtDNA の割合を明らかにするために, SDH 染色した 20  $\mu$ m の筋切片から 1 個の筋線維を採取し, primer pair の一方の 5' 端を放射性同位元素 (RI) [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP でラベルして polymerase chain reaction (PCR) 法にて mtDNA 変異部を含む領域の mtDNA 断片を増幅した. 変異部認識の制限酵素 (Cfr13I) で切断し, polyacrylamide gel にて電気泳動後, その DNA 断片の RI の強さで正常と変異 mtDNA の割合を検討した (single fiber PCR).

## 結 果

- 1) MELAS 患者筋では, type 1-RRF の多くは CCO 活性陽性であったが, type 2-RRF はそのほとんどが CCO 活性陰性であった. しかしながら, type 1-RRF と type 2-RRF において total mtDNA の量や分布状態, 変異 mtDNA の割合において有意な変化は認められなかった (図 1, 2).

- 2) RRF において total mtDNA は non-RRF に比べ著明に増加しており (non-RRF の約 5 ~ 17 倍), 変異 mtDNA の割合も non-RRF に比べ有意に高かった (RRF で 88.1  $\pm$  5.5%, non-RRF で 63.2  $\pm$  21.6%) (図 2) が, total mtDNA 量の増加に比し軽度であった.
- 3) 筋内小動脈においては SDH にて濃染する血管 (SSV: strongly SDH-reactive blood vessels) で total mtDNA の著明な増加を認めたが, その多くは変異 mtDNA 由来であった.

## 考 察

MELAS 患者筋の type 1-RRF と type 2-RRF において total mtDNA の量や分布状態, 変異 mtDNA の割合において有意な変化は認められないにもかかわらず, type 1-RRF と type 2-RRF の CCO 活性が異なっていたことは, 本来 fiber type が neuron 支配によって行われていることを考慮すると, CCO 活性の有無には何らかの核由来の因子が関与している可能性を示唆した. RRF の total mtDNA の増加量に比較して, 変異 mtDNA の割合は non-RRF において RRF とほとんど変わらないものから, 少なくとも 1/2 ~ 1/3 程度とその差異が軽度であった. このことは絶対量としての正常 mtDNA 量もまた RRF において non-RRF に比較して増加していることを示唆した. この結果は, 先に, cybrid cell clones を用いて変異 mtDNA に著明な複製上の利点 (a marked replicative advantage) があったとする報告<sup>6)</sup>と異なり, MELAS 患者筋においてはそれほど著明な複製上の利点はないことを示唆した. また MELAS では SSV における変異 mtDNA の役割は基本的には RRF のそれとほぼ同様と考えられ, 全身的に血管系, 特に小動脈系の障害への関与が示唆され, 脳内での stroke like episodes 発症に深く関与しているものと思われた.

## 文 献

- 1) Mita S, Schmidt B, Schon EA, et al: Detection of "deleted" mitochondrial genomes in cytochrome-c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. Proc Natl

\* 熊本大学医学部第一内科  
\*\* 国立精神・神経センター武蔵病院

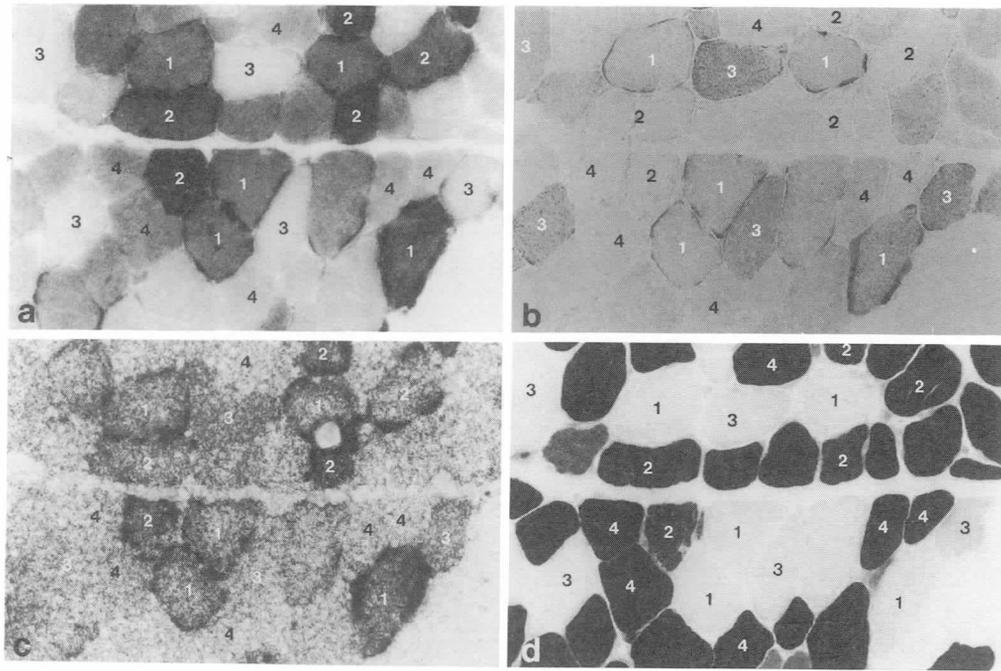


図1 MELAS患者筋の連続切片における histochemistry および *in situ* hybridization (ISH)  
 a. SDH 染色 b. CCO 染色 c. ISHによる total mtDNA の検出 d. ATPase (pH10.7) 染色  
 1 : type 1-RRF, 2 : type 2-RRF, 3 : type 1-non-RRF, 4 : type 2-non-RRF

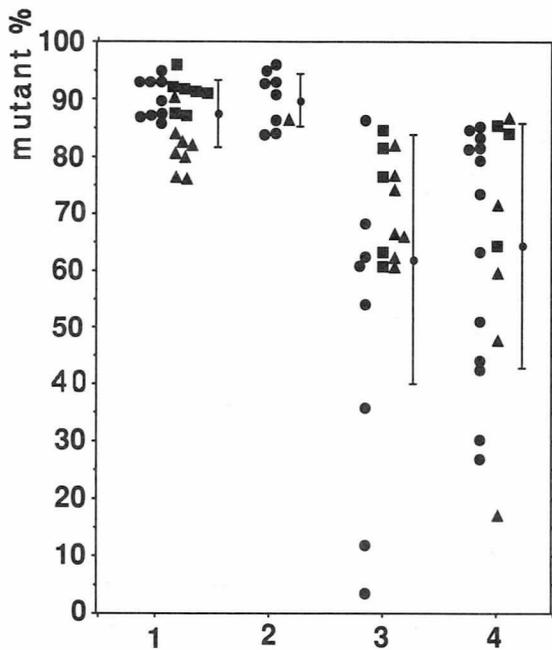


図2 MELAS患者3症例の個々の筋線維における変異mtDNA割合  
 RRFでは $88.1 \pm 5.5\%$ , non-RRFでは $63.2 \pm 21.6\%$ であった  
 1 : type 1-RRF, 2 : type 2-RRF, 3 : type 1-non-RRF, 4 : type 2-non-RRF ●▲  
 ■各々の症例を示す。

Acad Sci USA 86 : 9509 - 9513, 1989.

- 2) Tokunaga M, Mita S, Sakuta R, et al : Increased mitochondrial DNA in blood vessels and ragged-red fibers in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). Ann Neurol 33 : 275 - 280, 1993.
- 3) Johnson MA, Turnbull DM, Dick DJ and Scherratt HSA : A partial deficiency of cytochrome c oxidase in chronic progressive external ophthalmoplegia. J Neurol Sci 60 : 31 - 53, 1983.
- 4) Goto Y, Horai S, Matsuoka T, 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 : 545 - 550, 1992.
- 5) Tokunaga M, Mita S, Murakami T, et al : Single muscle fiber analysis of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). Ann Neurol, in press.
- 6) Yoneda M, Chomyn A, Martinuzzi A, et al : Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 11164 - 11168, 1992.

## 42) ミトコンドリア脳筋症 MELAS における 複合体形成異常

太田 成 男\*

研究協力者 鷺見正人\*\* 吉田賢右\*\* 埜中征哉\*\*\*  
作田亮\*\*\*\* 林純一†

### はじめに

ミトコンドリア脳筋症 MELAS の約 80% の患者はミトコンドリア DNA (mtDNA) の塩基番号 3243 の変異によって発症するが<sup>1)~3)</sup>, 約 10% の患者は塩基番号 3271 の変異によっても発症する<sup>4)</sup>. ミトコンドリア脳筋症の各々の病型の特徴がどの様にして生じるかは, 発症のメカニズムを知るうえで極めて重要である. MELAS では 3243 変異と 3271 変異では臨床症状の上では区別できないので, 3243 変異と 3271 変異の共通な現象と各々独自の現象を見出せば発症機構解明の糸口になる可能性が期待される.

今までに CPEO の mtDNA の大欠失では, 変異 mtDNA と正常 mtDNA の比率がある閾値を超えると急激にミトコンドリアのタンパク質合成が低下すること<sup>5)</sup>, MERRF 8344 変異ではミトコンドリア内で未同定のタンパク質が合成されること, MELAS 3243 変異では高分子側のタンパク質が顕著に低下することを示した<sup>6)</sup>. この分子レベルでの差異と臨床症状の違いになんらかの関連がある可能性もあり, 興味深い点であった. そこで, 今回は双方とも MELAS の変異である 3243 変異と 3271 変異を比較した.

### サイブリドの作製

ミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体 I, III, IV と ATP 合成酵素はミトコンドリア遺伝子産物と核遺伝子産物の両者のサブユニットから構成される. そのため, mtDNA の変異の効果を調べるには共通の核を持つ細胞を人為的に作製する必要がある. 3243 変異あるいは 3271 変異をもつ患者由来線維芽細胞と mtDNA を完全に失った HeLa 細胞を融合した<sup>7)</sup>. これは細胞質との融合であるので, サイブリドと呼ぶ. 変異 mtDNA を主に持つサイブリドと正常 mtDNA のみを持つサイブリドを選択した. さらに変異 mtDNA を 90% 持つ細胞を再クローン化

表 1 MELAS 3271 変異を持つサイブリドの作製  
変異 mtDNA と正常 mtDNA の比率は mismatches PCR を用いて行った. 定量には変異を持つ断片と持たない断片をクローン化して標準試料とした.

Cells	Relative content of MELAS 3271 mtDNA (%)
mtDNA recipient $\rho^0$ HeLa cells	-
mtDNA donor skin fibroblasts from a MELAS patient	12
Cybrid clones	
MLS-1	87
-2	9
-3	0
-4	0
-5	0
-6	0
-7	84
-8	0
-9	0
-10	0
-11	0
-12	16
-13	0
-14	0
-15	0
-16	0
-17	0
-19	0
-20	0
-1-13*	>95

\*MLS-1-13 is subclone of MLS-1

によって 95% 以上変異 mtDNA をもつ細胞を選択した (表 1).

### 酵素活性の測定

シトクロム酸化酵素 (複合体 IV) 活性は, 培養細胞を活性染色することによって酵素活性の有無を判定した. 3243 変異あるいは 3271 変異を 95% 以上持つサイブリドはシトクロム酸化酵素では陰性であった. また, 複合体 I の活性を測定した. 3243 変異あるいは 3271 変異を 95% 以上もつ細胞は複合体 IV (シトクロム酸化酵素) と複合体

\*自治医科大学学生化学第一教室  
\*\*東京工業大学資源化学研究所  
\*\*\*国立精神・神経センター武蔵病院  
\*\*\*\*国立精神・神経センター神経研究所  
†筑波大学生物科学系

I 活性いずれも著しく低下していた (図 1)。このサイブリドは HeLa 細胞の核を共通に持つので mtDNA の変異によって呼吸鎖酵素活性が低下することが 3243 変異と同様に 3271 変異でも明らかとなった。3271 変異は MELAS 患者にのみ認められること、ヘテロプラズミーであることが、MELAS の原因遺伝子の根拠であったが、ここに 3271 変異によって呼吸鎖酵素活性が低下することがはじめて証明された<sup>7)</sup>。

#### ミトコンドリア内でのタンパク質合成

サイブリドに細胞質タンパク質合成阻害剤であるエメチン存在下で、<sup>35</sup>S メチオニンをとりこませ、ミトコンドリアを分画後、SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) で解析した。図 2 に 6 M 尿素存在下 SDS-PAGE と非存在下での結果を示す。

3243 変異ではタンパク質合成速度が著しく低下していた。特に高分子側の合成が低下していた。一方、3271 変異ではタンパク質合成速度には殆ど変化はなかった。ところが、矢印で示されるようなバンドが新たに検出された。とりわけ、複合体 I のサブユニット 6 (ND6) のバンドは顕著に移動していた (矢印のバンド)。また、シトクロム酸化酵素のバンド (CO) のバンドでもいくつかのバンドで移動度の異なるバンドが見られた。3243 変異と 3271 変異は tRNA-Leu(UUR) 遺伝子上に相当する。ロイシンをコードする遺伝子暗号は UUR と AUN の 2 種類がある。ND6 は UUR の頻度が高くと、もし変異 tRNA-Leu(UUR) が別のアミノ酸を運ぶとすれば、タンパク質の性質が異なり電気泳動においても移動度が異なることが推定できる。すなわち、3243 変異ではタンパク質合成を停止させ、酵素活性を低下させるのに対し、

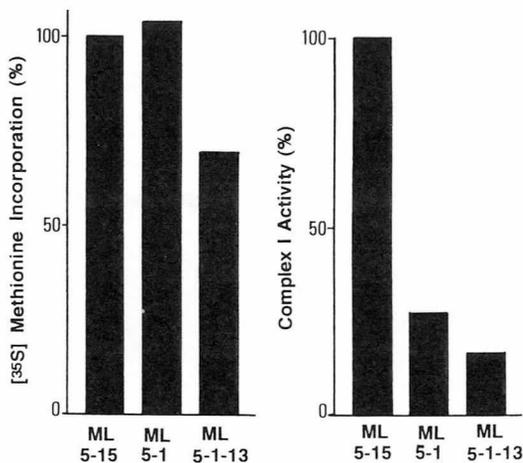


図 1 3271 変異を持つサイブリドの複合体 I の酵素活性とタンパク質合成速度  
ML 5-15 は 100% 正常 mtDNA を、ML 5-1 は 87% の変異 mtDNA を、ML 5-1-13 は 95% 以上変異 mtDNA を持つ。

3271 変異では間違っただアミノ酸を運ぶことによって酵素活性を低下させることが示唆された<sup>7)</sup>。

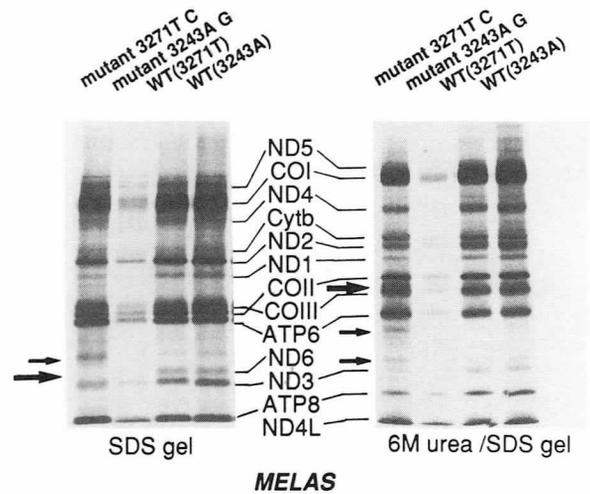
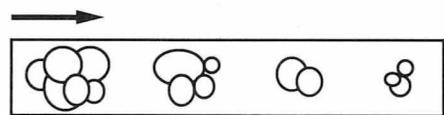


図 2 3243 変異あるいは 3271 変異を持つサイブリドのミトコンドリア内タンパク質合成  
Mutant 3271, mutant 3243 は変異 mtDNA を 95% 以上持つサイブリド。WT (3271 T) と WT (3243 A) は同じ患者より分離した細胞から得たサイブリドで正常 mtDNA のみを有する。ND は複合体 I, cytb は複合体 III, CO は複合体 IV, ATP は複合体 V で数字はサブユニットの番号である。6 M urea / SDS は 0.1% SDS のほかに 6 M 尿素を含むゲルである。矢印は 3271 変異サイブリドに出現あるいは消失したバンドである。

#### 1st electrophoresis (Native Gel)



#### 2nd electrophoresis (with SDS)

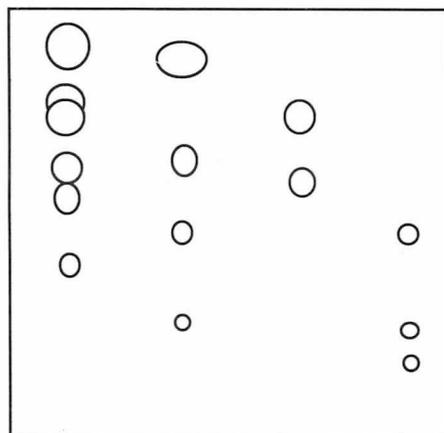


図 3 二次元電気泳動の原理

一次元ゲルは複合体を形成したまま泳動し、二次元目は SDS 存在下で泳動する。同じ複合体由来のサブユニットは縦に一列に並ぶので解析が容易である。

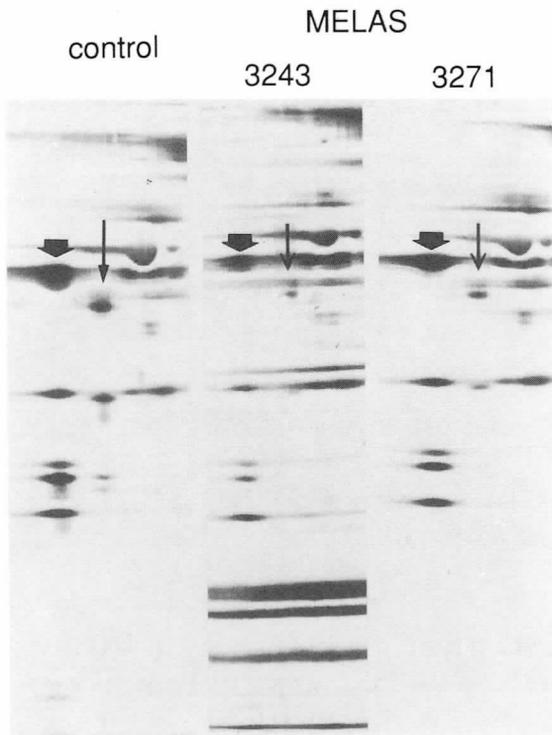


図4 二次元電気泳動の一部  
Controlは正常細胞, 3243と3271はそれぞれの変異mtDNAをもつサイブリッドから得たミトコンドリアである. 細い矢印は複合体Ⅲ, 太い矢印は複合体Ⅴ(ATP合成酵素)を示す.

#### 複合体の解析

ミトコンドリア遺伝子のコードされるタンパク質はすべて核遺伝子産物のサブユニットと複合体を形成してはじめて機能を持つ. そこで, 実際上は複合体の形成状況が重要となってくる. そこで複合体の形成状況を一度に解析する方法を開発した. この方法は, 二次元電気泳動を用いる方法で, 一次元目は穏やかな可溶化剤で溶解し, 複合体を形成させたままで電気泳動する. 二次元目はSDS存在下で泳動し, サブユニットを完全に分離する(原理は図3). こうすることによって同一複合体由来のサブユニットは一列に並ぶことになり, 解析が容易である. 二次元電気泳動図の一部を図4に示す. 3243変異では複合体Ⅲの移動度が速くなり, 複合体が小さくなっていることを示唆した. また, 量的にも少なくなっている. 複合体Ⅴのサブユニットも少なくなっており, 複合体が正常に形成されていないことを示す. その他複合体Ⅳにおいても同様に形成されているサブユニットは少なくなっている.

一方, 3271変異では複合体Ⅲの形成量はやや少ない傾向を示したが, その他の複合体の量は対照に比して顕著な差異は認められなかった. すなわち, 3271変異ではタンパク質合成だけでなく複合体までほぼ正常に形成する

が酵素活性は低下していた.

#### 結 論

3243変異と同様に3271変異によっても酵素活性が低下し, MELASの原因遺伝子変異であることが証明された. しかし, 3243変異ではミトコンドリア内のタンパク質合成速度が低下し, 複合体形成にまで影響を及ぼした. 一方, 3271変異では全体的なタンパク質合成速度はほぼ正常で複合体もほぼ正常に形成した. これはロイシンの代わりに別のアミノ酸を運ぶために酵素活性に影響を及ぼすものと推定された.

#### 文 献

- 1) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, et al: A point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene in MELAS. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 816-822, 1990.
- 2) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, et al: Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene in MELAS. *Am J Hum Genet* 49: 590-599, 1991.
- 3) Goto Y, Nonaka I and Horai S: mutation in the tRNA-Leu(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348: 651-653, 1990.
- 4) Goto Y, Nonaka I and Horai S: A new mtDNA mutation associated with MELAS. *Biochim Biophys Acta* 1097: 238-240, 1991.
- 5) Hayashi J-I, Ohta S, Kikuchi A, et al: Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletion into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10614-10618, 1991.
- 6) 太田成男, 林 純一, 埜中征哉ほか: 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. “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 1992, pp211-215.
- 7) Hayashi J-I, Ohta S, Takai D, et al: Accumulation of mtDNA with a mutation at position 3271 in tRNA-Leu(UUR) gene introduced from a MELAS patient to HeLa cells lacking mtDNA results in progressive inhibition of mitochondrial respiratory function. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1049-1055, 1993.

# 43) ミトコンドリアチロシン転移RNA遺伝子近傍の挿入変異とミトコンドリア病との関係

後藤 雄一\*

研究協力者 埜中 征哉\* 宝来 聡\*\* David A Clayton\*\*\*

## はじめに

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) 患者では、ミトコンドリアDNA (mtDNA) 3243変異が約80%に、3271変異が約10%に認められることを我々はすでに報告した<sup>1)~3)</sup>。また一方で、我々は3243変異がCPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia) 患者にも存在することを見出し<sup>4)</sup>、その後同様な症例の報告が相次いだ<sup>4)~6)</sup>。同一変異が、明らかに異なる臨床病型を表現する理由を明らかにするために、3243変異を持つCPEO患者 (OS例) について、mtDNA内の他の部位に変異がないかどうかを検討した。その結果OS例は、3243変異とともにチロシン転移RNAとCOIサブユニットの間に約10塩基の挿入変異を有していた。今回は、この挿入変異のミトコンドリア病患者と正常コントロールでの頻度を調べ、そのミトコンドリア病との関係を検討した。

## 対象と方法

3243変異を有するCPEO例である患者OS例<sup>1)</sup>の骨格筋からDNAを分離し、mtDNAの全転移RNA領域の塩基配列をすでに報告した方法で<sup>1)</sup>決定した。

新たに発見できた挿入変異 (結果の項を参照) を検出するには、プライマー-504: 5' (5757) GGGAGAAGC-CCCGGCAGGTTTGAAGCTGCT (5786) 3' とプライマー-505: 5' (5928) AGAATAGTCAACGGTCGGCG (5909) 3' を用いてPCR法を行い、4% NuSieve 3:1 Agarose (FMC) 上で、電気泳動を行った。対象は、

表1 CPEO患者での挿入変異の頻度

欠失あり	単一欠失	0/55
	多重欠失	0/3
欠失なし	3243あり	2/2
	3243なし	0/22

mtDNAに欠失のあるCPEO患者58例 (うち3例は多重欠失)、欠失のないCPEOの患者24例、3243変異を有するMELAS患者68例、および3243変異を有するミオパチー患者4例である。

## 結果

### 1. 挿入変異の発見

OS例の全ミトコンドリア転移RNA領域の塩基配列の決定を行ったが、3243変異以外の新たな変異は認めなかった。しかし、チロシン転移RNAとCOIサブユニットの間のnon-coding領域に、10塩基の挿入変異を偶然見出した (図1)。このチロシン転移RNAとCOIサブユニットの間の領域は、bovine, mouse, rat, chickenでは1塩基のみ、Xenopusでは2塩基しかなく、ヒトで認められる12塩基は例外的に数が多い。OS例では、この部位にさらに10塩基の挿入があるため、正常ではグアニン (G) が5個並ぶものが、13個に増加していた (図1)。

### 2. CPEO患者での挿入変異の頻度

挿入変異を含むような位置に、一組のプライマーを複製し (プライマー-504と505)、PCR法を用いて挿入変異の有無を検討した (表1)。サザン法で欠失のあった58例には1例も認めなかった。欠失のない24例のうち、3243変異を有する2例にこの挿入変異を認め、残りの3243変異を持たない22例には認めなかった。

### 3. 3243変異を有する患者での挿入変異の頻度

表2に示すように、典型的な臨床症状と筋病理所見を示したMELAS患者68例の中に2例の挿入変異を有する例を認めた。また、3243変異を持ちながら、ミオパチーのみの4例には認めなかった。

表2 3243変異を有する患者と正常対照での挿入変異の頻度

症状	例数	挿入変異陽性者数
MELAS	68	2
ミオパチーのみ	4	0
CPEO	2	2
正常コントロール	116	1

74 } 4 (5.4%)  
2 } (0.9%)

\*国立精神・神経センター武蔵病院

\*\*国立遺伝学研究所

\*\*\*スタンフォード大学

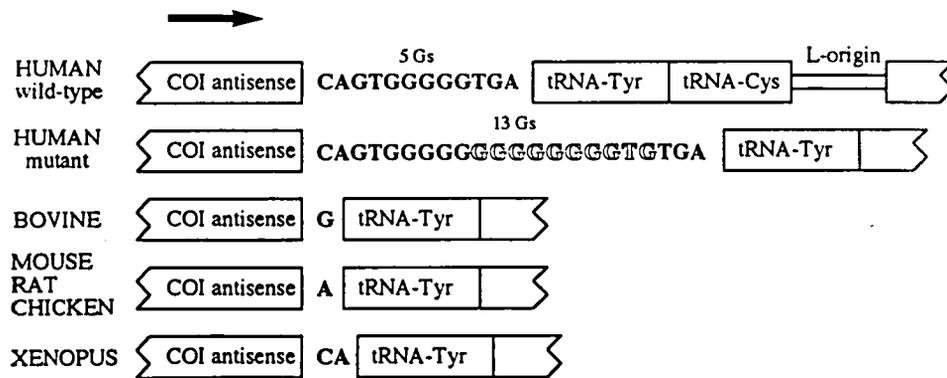


図1 挿入変異近傍の塩基配列を示す (H鎖)  
 矢印がチロシン (Tyr) およびシスチン (Cys) 転移 (t-) RNA の転写方向を示す。  
 白抜き塩基が挿入されたもの。詳細は本文参照。

#### 4. 正常コントロールでの挿入変異の頻度

Horaiらは、日本人116例を対象に種々の制限酵素を用いた切断パターンを調べている<sup>7)</sup>。今回の挿入変異は、HaeIIIを用いた多型の検討で1例に認めており、プライマー-504と505を用いたPCR法でも確認した。ただし、この例は3243変異を有していない。

#### 考 察

臨床病型がCPEOであるのに、3243変異を有するOS例が見つかった時、我々は、(1) 3243変異をもつ変異型ゲノムが、MELASの症状を引き起こす程十分な量がない可能性 (量の問題) と、(2) 別のCPEOを引き起こす異常の方が、MELASを引き起こす3243変異よりも大きい効果を持った可能性 (質の問題) を考えた<sup>7)</sup>。量の問題は、その後のOS例の剖検臓器での検討で、骨格筋での変異型ゲノムの比率が通常のMELAS例に比較してやや低いものの、中枢神経では90%近くであり、他のMELAS剖検例と大差のないことが判明している (詳細は省く)。その意味では、単なる変異型ゲノムの量的差異だけでは、CPEOを表現することを説明するのはむずかしい。

したがって、別の質的異常がOS例に存在するかどうか問題になり、それが今回の研究の出発点である。その結果、mtDNAの中に、新たに挿入変異が見出された。しかし、最も重要なことは、この挿入変異が質的異常たりうるかという点である。

その点を検討するために、多くの症例と正常コントロールでの頻度を検討した。その結果、3243変異を有するCPEO例2例ともにこの挿入変異を認めた。この事実は、挿入変異の病気への関わりを強く示唆した。しかし、次の2つの点で、病気への関わりを疑わせることになった。(1) 典型的MELASの症状をもつ患者2例 (2/68) にこの挿入変異が見つかった。(2) 正常コントロールの中の1例 (1/116) にこの挿入変異が見つかった。

したがって、現在のところ、この挿入変異が質的異常

たりうるかという問題の結論はでていない。さらに詳細な細胞生理学的な発現研究を行い、この問題を追及する必要がある。

#### 文 献

- 1) Goto Y, Nonaka I and Horai S : A mutation in the tRNA - Leu (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348 : 651 - 653, 1990.
- 2) Goto Y, Horai S, Matsuoka T, 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 : 545 - 550, 1992.
- 3) Goto Y, Nonaka I and Horai S : A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke - like episodes (MELAS). *Biochim Biophys Acta* 1097 : 238 - 240, 1991.
- 4) Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, et al : Mitochondrial encephalopathies : Molecular genetics diagnosis from blood samples. *Lancet* 337 : 1311 - 1313, 1991.
- 5) Johns DR and Hurko O : Mitochondrial leucine tRNA a mutation in neurological diseases. *Lancet* 337 : 927 - 928 (letter), 1991.
- 6) Moraes CT, Ciacci F, Silvestri G, et al : Atypical clinical presentations associated with the MELAS mutation at position 3243 of human mitochondrial DNA. *Neuromusc Disord* 1 : 43 - 50, 1993.
- 7) Horai S and Matsunaga E : Mitochondrial polymorphism in Japanese : II. Analysis with restriction enzymes of four or five base pair recognition. *Hum Genet* 72 : 105 - 117, 1986.

# 44) ミトコンドリア病における12SリボゾームRNA 遺伝子変異

小澤 高 將\*\*

研究協力者 田中 雅嗣\* 相楽 達男\* 糸山 進次\*\*\*  
成田 奈緒子\*\*\*\* 布田 伸一†

## はじめに

これまでにミトコンドリアDNA (mtDNA) のtRNA 遺伝子および翻訳領域における塩基置換がミトコンドリア脳筋症において報告されてきた。リボゾームRNA (rRNA) 遺伝子の変異としては、母系遺伝を示すアミノグリコッド誘発性難聴において12S rRNA 遺伝子の塩基番号1555のAからGへの変異が関わっていることが明らかにされているが<sup>1)</sup>、ミトコンドリア脳筋症に関連した変異は解明されていない。我々は既に約50例の個体のmtDNAの全塩基配列を決定している。これらの個体で観察された12S rRNA 遺伝子の変異の中で病態に関連する可能性のあるものを検索した。

## 症例および方法

症例1：20歳，男。

主訴：全身倦怠感，下腿浮腫。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：15歳で蛋白尿を指摘されたが放置した。18歳で全身倦怠感を訴え、近医で腎機能障害を指摘された。19歳時に心肥大，貧血を指摘され、下腿の浮腫を自覚した。慢性腎不全の診断で他院で治療を受けた。全身性强直性痙攣が出現したが、頭部CT上で異常所見を認めなかった。

入院時所見：慢性腎不全，心肥大，低身長（151cm），知能低下（IQ51），小脳症状，ミオクローヌ様発作，強直性痙攣，両側錐体外路徴候，視力低下，角膜混濁，両側感音性難聴を認めた。血液透析を開始。心電図は著明な高電位，巨大な陰性T波，WPW症候群を示した。心エコー図ではび慢性の壁肥厚が著明であった。髄液の乳酸値は18mg/dlと上昇していた。

経過：全身性强直性痙攣が頻発し，頭部CT上で多発性の低吸収域を認めた。痙攣発作出現後，意識状態が低下

した。気管からの急性出血のため死亡。

剖検所見：腎では巣状糸球体硬化が見られた。小脳と大脳には多発性の軟化巣を認めた。心臓の左室と中隔が著明に肥厚し（510g/34kg），電顕上，異常ミトコンドリアの集積を認めた。

症例2：7カ月，女児。

分娩歴：39週，3760g，自然分娩，仮死（一）

現病歴：1カ月検診時，体重増加不良を指摘され，入院。高乳酸血症（乳酸149mg/dl，ピルビン酸4.8mg/dl）筋力低下（+）。

筋生検所見：Ragged-red fibers（+），cytochrome oxidase活性染色低下。気管支炎・呼吸不全のため人工換気を開始。

治療：代謝性アシドーシスの補正，カルニチンとCoQの経口投与の後に全身状態が改善し，人工換気を離脱した。

現症：乳酸14.7mg/dl，ピルビン酸1.19mg/dl。筋力の改善が見られた。

診断：乳児一過性CCO欠損症疑い。

症例3：7歳，女児。

主訴：呼吸困難，食欲不振，全身倦怠感。

家族歴：両親ははとこ結婚。兄は4歳で突然死（拡張型心筋症）。

既往歴：特記すべきことなし。

現病歴：1991年4月上旬より体動時呼吸困難，食欲不振，全身倦怠感が出現したため，M病院受診し，4月15日に同病院に入院。家族性拡張型心筋症が疑われ治療を受けるも症状は一進一退を繰り返した。1991年6月26日，心不全症状の急激な悪化が認められたため，精査および強化療法目的で国立甲府病院内科に入院。

入院時現症：身長120cm，体重27kg。脈拍116/分，整。血圧120/70mmHg。結膜：貧血（-），黄疸（-）。頸部：頸静脈怒張（+）。肺野：両側下肺野で湿性ラ音を聴取。心濁音界：拡大（+）。心雑音：全収縮期吹鳴様逆流性雑音を心尖部（Ⅱ/V）および第4肋間胸骨左縁（Ⅲ/V）にて聴取。心音：Ⅲ音（+），Ⅳ音（+）。腹部：右鎖骨中線

\*名古屋大学医学部第二生化学

\*\*埼玉医科大学総合医療センター第四内科

\*\*\*埼玉医科大学総合医療センター病理部

\*\*\*\*神戸大学医学部小児科

†国立甲府病院内科

で肝臓を3横指触知. 四肢：浮腫(+)。神経学的検査：異常なし。1992年1月ユタ大学で心臓移植を受け帰国。

### 方法

電子伝達系の複合体I~Vの活性測定およびウエスタンブロット分析は既報に従って行った。mtDNAの塩基配列は蛍光法<sup>2)</sup>により Automated DNA sequencer (ABI model 373A) を用いて決定した。

### 結果

症例1の剖検心筋および腎臓組織からミトコンドリアを単離し、複合体I~Vの酵素活性を測定した。複合体IIの酵素活性は正常の122%であったが、複合体Iの酵素活性は正常の24%に低下しており、複合体Vの酵素活性も正常の54%に低下していた(表1)。心筋ミトコンドリアのウエスタンブロットを図1に示す。複合体IIIのサブユニットの量の減少は軽度であったが、複合体Iと複合体Vのサブユニット量の減少は顕著であった。腎臓のミトコンドリアでは、複合体IV、複合体IIIの酵素活性は正常よりはるかに高い値を示したが、複合体Iの酵素活性は正常の48%に低下しており、相対的に複合体Iの酵素活性の減少が存在すると考えられた(表2)。腎臓ミトコンドリアにおいて複合体の間でサブユニット量の減少程度が異なることが観察された。

症例1の心筋DNAからmtDNAを増幅し、全塩基配列を蛍光法を用いて決定した。tRNA遺伝子には変異は観察されなかった。対照群において頻度の高い変異を除外すると、翻訳領域では同義置換が8箇所、非同義置換が1箇所(15236A→G: Ile→Val)に見られた。D-ループ領域および非翻訳領域には8箇所の塩基置換と9塩基対の欠失(8272-8280)が見られた。12S rRNA遺伝子には827A→Gおよび961T→C塩基転位が見られた。

表1 症例1の心筋におけるミトコンドリア電子伝達系複合体の酵素活性

Enzyme	Patient	(%)	Control	(n)	Range
Complex I	168	24	690 ± 267	3	481 - 994
Complex II	737	121	604 ± 98	3	937 - 716
Complex III	706	97	728 ± 223	3	487 - 931
Complex IV	516	87	593 ± 122	3	458 - 697
Complex V	69	52	133 ± 42	3	99 - 179

表2 症例1の腎臓におけるミトコンドリア電子伝達系複合体の酵素活性

Enzyme	Patient	(%)	Control
Complex I	146	48	304
Complex II	1624	159	1020
Complex III	1458	296	493
Complex IV	1627	520	313
Complex V	98	204	48

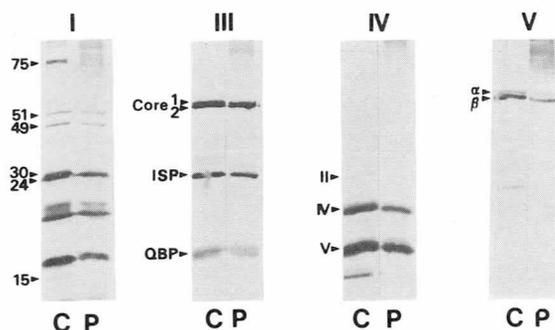


図1 症例1の心筋ミトコンドリアの電子伝達系複合体のサブユニット分析

823-830	AUUAGCCU	Patient mitochondrial 12S rRNA
	AUUAACCU	Human mitochondrial 12S rRNA
	ACAAAAAU	Bovine 12S rRNA
	AUAAAUU	Mouse 12S rRNA
	AUAAAUU	Rat 12S rRNA
	AUAAACAU	<i>Xenopus laevis</i> 12S rRNA
	CUAAACAU	<i>Paracentrotus lividus</i> 12S rRNA
	CUAAAUU	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 12S rRNA
	AUUAUUU	<i>Drosophila yakuba</i> 12S rRNA
	AGGAUUU	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> mitochondria
	AGGAUUU	<i>Aspergillus nidulans</i> mitochondria
	GGGAUUU	<i>Paramecium primaurelia</i> mitochondria
	GGGAUCU	Maize mitochondria
	AGGAUUU	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> chloroplast
	AGGAUUU	<i>Euglena gracilis</i> chloroplast
	GGGAUUU	Maize chloroplast
	GGGAUUU	<i>Anacystis nidulans</i>
	GGGAUUU	<i>Mycoplasma capricolum</i>
360-367	GGGAUUU	<i>E. coli</i>

図2 12S rRNA遺伝子のドメインIのループ構造の種間比較  
塩基番号827のA分子進化的保存を示す。

16S rRNA遺伝子には2831G→A塩基転位が存在した。

症例1に加えて、他の2例においても827A→G変異が観察された。症例2は827A→G変異に加えて、16S rRNA遺伝子の変異(2463A→G)とtRNA-Glu遺伝子の変異(14674T→C)を伴っていた。症例3は827A→G変異に加えて、mtDNAの翻訳領域に3箇所の非同義置換を伴っていた。

### 考察

症例1において12S rRNA遺伝子に2箇所の塩基転位が見られた。塩基番号827のAは12S rRNA分子のドメインIのループ構造の中央部にあった。塩基番号961のTは12S rRNA分子のドメインIIの大きなループ構造の中に存在した。この塩基番号961のTがCに塩基転位することにより、大きなループ構造にC塩基の連続が生じた。この961T→C塩基転位はParkinson病の患者でも観察された。

16S-like rRNAに関しては分子進化の観点から多く

の種に関する塩基配列が決定されており、進化において保存されている領域と種間の変異の頻度の高い領域が明らかになっている<sup>3)</sup>。ヒトのミトコンドリア12S rRNA 遺伝子の塩基番号827のAは、*E. coli*の16S rRNAの塩基番号364のAに相当する。症例1においてA→G塩基転位が観察された塩基番号827のAは、哺乳類、カエル、ウニ、昆虫、酵母、カビ、ゾウリムシ、植物のミトコンドリアで保存されているばかりでなく、緑藻類、原生動物、トウモロコシの葉緑体でも保存されていた。さらに藍藻類、マイコプラズマ、大腸菌でも保存されていた(図2)。

Sternら<sup>4)</sup>は、大腸菌の364AはリボゾームのサブユニットS16によって化学修飾から保護されることから、このループの塩基がサブユニットS16の結合部位になっていると推定している。さらに、大腸菌の塩基番号364のAは塩基番号397のAとの間で架橋され、16S rRNAの立体構造の保持に重要な役割を演じていることが示唆されている。このように塩基番号827のAが種間保存され、サブユニットとの結合に関与し、立体構造の保持にも寄与していることから、ヒトのミトコンドリア12S rRNAにおいて塩基番号827のAからGへの塩基転位した場合に何らかの機能異常がもたらされる可能性が考えられた。

症例1は、MELASあるいはMERRFに類似した臨床症状および電子伝達系欠損が見られたが、tRNA 遺伝子には変異を認めず、12S rRNA 遺伝子の種保存性の高い塩基に置換を見出し、この塩基置換が本症発症の危険因

子と考えられた。ミトコンドリア脳筋症においてrRNA 遺伝子変異の有無を検査する必要がある。

## 文 献

- 1) Prezant TR, Agapian JV, Bohlman C, Bu X, Oztas S, Qiu W-Q, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M and Fischel-Ghodsian N: Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nature Genetics* 4 : 289 - 294, 1993.
- 2) Tanaka M, Ino H, Ohno K, Ohbayashi T, Ikebe S, Sano T, Ichiki T, Kobayashi M, Wada Y and Ozawa T: Mitochondrial DNA mutations in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Biophys Res Commun* 174 : 861 - 868, 1991.
- 3) Guthell RR, Weiser B, Woese CR and Noller HF: Comprehensive anatomy of 16-S-like ribosomal RNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 32, Academic Press, New York, 1985, pp155-216.
- 4) Stern S, Weiser B and Noller HF: Model for the three-dimensional folding of 16S ribosomal RNA. *J Mol Biol* 204 : 447 - 481, 1988.

## IX. 治 療

# 45) mdx マウスを用いた治療開発に関する研究

栗原 照幸\*

研究協力者 岸 雅彦\* 大迫 正行\* 木下 眞男\*

## はじめに

我々はDuchenne型筋ジストロフィー症 (DMD) の治療薬としての可能性を探る意味で, dystrophin が欠損している mdx マウスの筋細胞膜にみられる電気生理学的異常を改善する薬剤の検索を続けてきている。これまでも, 電気的ミオトニーと, 静止膜電位の低下という客観的示標を持って, これらを改善する薬剤について, 報告してきているが, その作用機序が解らないものも存在する。Bestatin は, mdx マウスの膜電位の低下を改善すると報告したが, この作用機序も不明のままである。今回は, 有効と考えられる薬剤と, この bestatin を同時に作用させ, 有用な相互作用の有無を検討した。また, DMD に対して臨床的にもある程度の有効性があると報告されている副腎皮質ステロイド剤に, mdx マウスの電気生理学的異常を改善する効果があるのかどうかを検討したので併せて報告する。

## 対象および方法

mdx マウスの横隔膜標本を作成し, 95% O<sub>2</sub> および 5% CO<sub>2</sub> で酸素化した Tyrode 溶液に浸し, 3M KCl で満たしたガラス管微小電極を自作して, 静止膜電位 (RMPs) および電気的ミオトニーの頻度を測定した。対象: 生後 4 週齢の mdx マウスを用い, Tyrode 溶液に薬剤を投入し, その前後で各 50 本の静止膜電位を測定することにより, 効果判定を行った。薬剤としては, Ca 拮抗剤である nifedipine, Na チャネル阻害剤である lidocaine, mexiletine を用いた。これらの薬剤を作用させた後, さらに bestatin を 40mg/l の濃度で作用させ, 効果を判定した。また, 副腎皮質ステロイドの筋細胞膜への直接作用を見る目的で, prednisolone を 1.5mg/l, 15mg/l の濃度で作用させ, 同様に効果を判定した。

## 結 果

Nifedipine を作用させることによる静止膜電位の変化はほとんど見られず, 電気的ミオトニーの頻度もほとんど低下しなかった。Bestatin の追加により電気的ミオトニーの頻度の低下, 軽度の静止膜電位改善作用が認め

られた (図 1)。Lidocaine は, 電気的ミオトニーの頻度は低下させるが, 膜電位には影響しなかった。Bestatin の追加により, さらに電気的ミオトニーが低下し, 軽度の膜電位の改善が認められた (図 2)。Mexiletine は 20 mg/l の濃度では, 電気的ミオトニーを抑制するが, 完全に阻止するほどの効果はない (図 3)。しかし, 80mg/l の濃度では電気的ミオトニーは完全に阻止された。これに bestatin を追加すると, さらに膜電位の改善が認められた (図 4)。

1987年の Brooke らの報告ではプレドニンの 1.5mg/kg 体重の大量投与を 6 カ月間 DMD 患者 33 人に用いている。今回我々は水溶性 prednisolone を 1.5mg/l の濃度で Tyrode に添加した。しかし膜電位は数値上改善するものの有意差は認められなかった。電気的ミオトニーの頻度にも変化はなかった。さらにその 10 倍の濃度 (15 mg/l) の prednisolone を作用させたが, 濃度依存的に増強する効果は認められなかった (図 5)。

結果として, Na チャネル阻害剤を作用させた状態でも, Ca 拮抗剤を作用させた状態でも, bestatin の電気的ミオトニーを抑制する効果, 膜電位を改善する作用は認められ, これは bestatin を単独で用いた時とほぼ同等であった。そして, ステロイドは mdx マウスの筋細胞膜異常には影響しなかった。

## 考 察

DMD の治療法に対するアプローチには様々な方面で試みられていて, 治療薬として, 候補に上がったものは数多くある。しかし, 治療として副作用がなく, その有効性が明確であると言えるものは未だ存在しない<sup>1)</sup>。mdx マウスでは, 電気的ミオトニーが見られることから, 我々は Mdx マウスの膜異常を改善するものとして, このようなミオトニーを抑制する薬剤の効果を試みている。Na チャネル阻害剤はこの電気的ミオトニーを抑制する。Bestatin の効果の機序は不明であるが, この効果は Na チャネル阻害剤や, Ca 拮抗剤を作用させた状態でも, 単独使用時と同等の効果を発揮した。

副腎皮質ステロイドが, DMD に有効であるという報告は, 1974年の Drachman らの報告以来いくつか見られるが<sup>2,3)</sup>, ステロイド剤の副作用との兼合いで, 大量を 6

\*東邦大学医学部第四内科

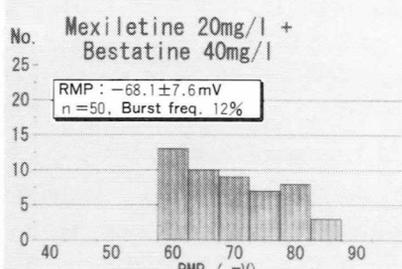
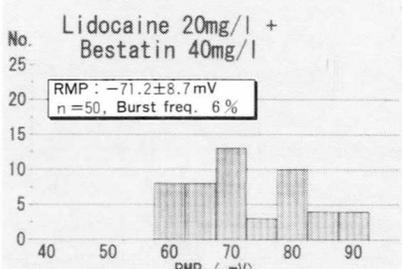
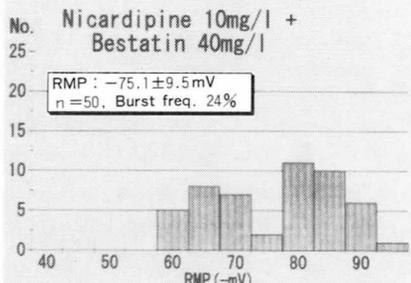
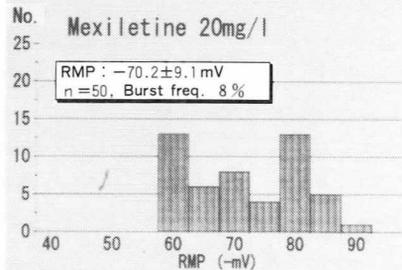
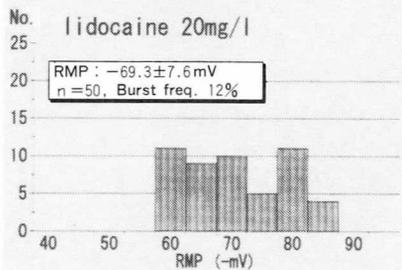
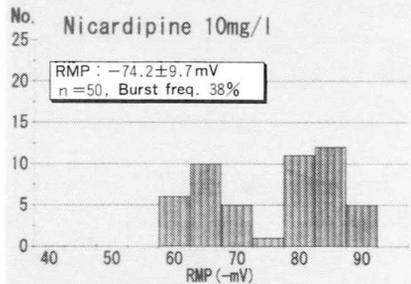
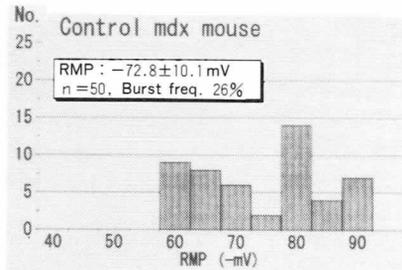
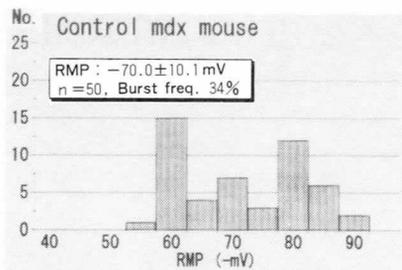
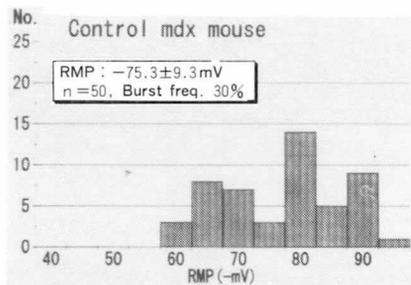


図 1

図 2

図 3

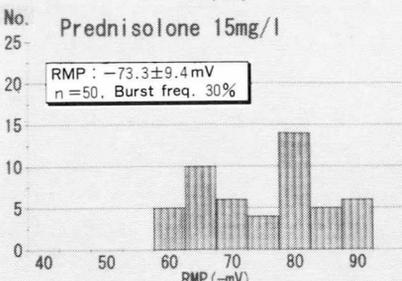
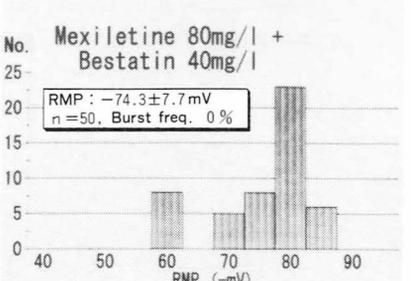
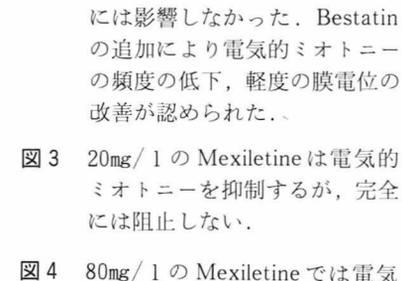
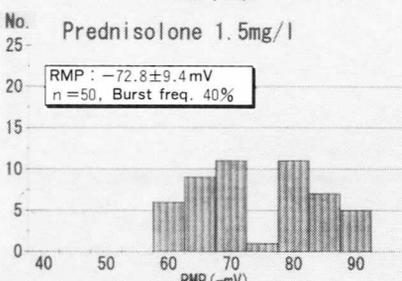
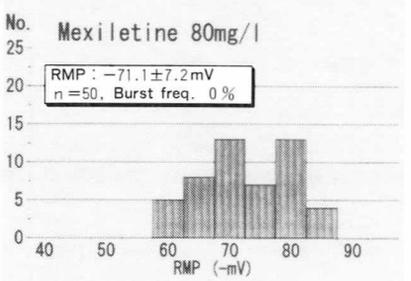
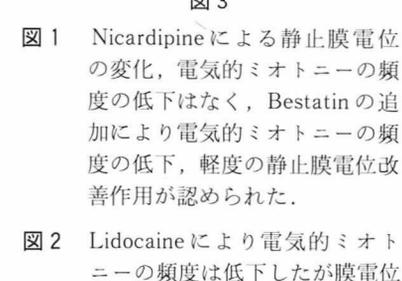
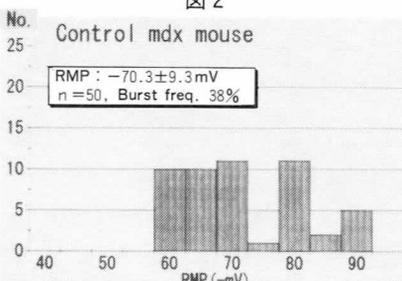
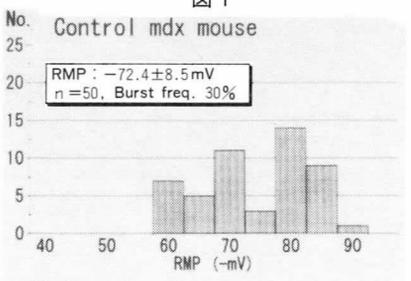


図 4

図 5

図 1 Nicardipine による静止膜電位の変化、電気的ミオトニーの頻度の低下はなく、Bestatin の追加により電気的ミオトニーの頻度の低下、軽度の静止膜電位改善作用が認められた。

図 2 Lidocaine により電気的ミオトニーの頻度は低下したが膜電位には影響しなかった。Bestatin の追加により電気的ミオトニーの頻度の低下、軽度の膜電位の改善が認められた。

図 3 20mg/l の Mexiletine は電気的ミオトニーを抑制するが、完全には阻止しない。

図 4 80mg/l の Mexiletine では電気的ミオトニーは完全に阻止され、bestatin の追加により、膜電位が改善した。

図 5 1.5mg/l の prednisolone では有意な膜電位の改善はなく電気的ミオトニーの頻度にも変化はなかった。15mg/l でも、濃度依存的に増強する効果は認められなかった。

カ月以上の長期に渡って使用することは困難である。1987年のBrookeらの報告で6カ月間に限ってステロイド剤を用いた際には、副作用として①瘡瘡、②体重増加、③行動異常、食欲亢進、多動、不眠、情緒障害がみられたが、生命に関係するような副作用は6カ月間という限られた投与期間では起こらなかった。ステロイドの作用機序としては、筋肉が崩壊する機序を根本的に抑制している訳ではなく、むしろ単純に筋肉の急性壊死、変性、および再生過程を抑制すると考えられている。実際に、筋細胞にステロイドがどのように作用しているのかは不明であるが、神経細胞の場合、ステロイドには直接的な膜安定作用が有ることが報告されている<sup>4)</sup>。しかし、その機序も不明である。今回、mdxマウスの筋細胞膜に対するステロイドの直接的な作用が有るか否かを確認する目的で、検索を行ったが、低下した膜電位を改善したり、電気的ミオトニーを阻止する作用は認められなかった。ステロイドもbestatinと同じく、特定のイオンチャンネルに作用することなく、細胞膜安定化作用をあらわす可能性を考えたが、以上の結果より、ステロイドには、bestatinのような筋細胞膜に対する直接的効果は存在しないと思われた。

その他の有望な治療薬として、dantroleneがあるが、これは昨年の報告にて、電気生理学的にも、組織学的にも効果は認められないことを報告した<sup>5)</sup>。しかし、機械的な負荷がDMDにおいての筋崩壊を促進する可能性を考えると、無駄な筋収縮を抑制する可能性のある筋弛緩剤の効果は、今後も検討してゆく必要があると考えられた。

DMDの筋細胞膜はジストロフィンが欠損していることは理解されているが、そこから筋崩壊への過程に関しては、まだ不明な点が多く存在する。単一チャンネルの検索では、mdxマウスにおいてmechanosensitiveチャンネルの開口頻度が高かったり、圧力をかけて一度開口

させた後、圧力を除去しても元に戻らないような、異常なチャンネルを指摘する報告<sup>7,8)</sup>もあり、今後、mdxマウスの筋細胞膜の電気生理学的検索を行うことにより、この不明な部分が明らかになってゆく可能性があり、またそれに対する改善効果のある薬剤を見出して行くことが、治療開発に役立つと考えられた。

## 文 献

- 1) 栗原照幸：進行性筋ジストロフィー症治療の展望。神経治療学, 10(3)：203-210, 1993.
- 2) Drachman BD, Toyka KV et al: Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. Lancet 2: 1409-1412, 1974.
- 3) Brooke MH, Fenichel GM et al: Clinical investigation of Duchenne muscular dystrophy. Interesting result in a trial of prednisone. Arch Neurol 44: 812-817, 1987.
- 4) Michael S: Rapid membrane effects of steroid hormones: An emerging concept in neuroendocrinology. TINS 13: 359-362, 1990.
- 5) 栗原照幸, 岸 雅彦ほか：ダントロレンNaを用いたmdxマウスの治療的研究。“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成因と治療法開発に関する研究”(荒木班)平成4年度研究報告書, 1993, pp184-187.
- 6) Franco Jr A and Lansman JB: Calcium entry through stretch inactivate ion channels in mdx mouse. Nature 344: 670-673, 1990.
- 7) McBride Jr DW and Hamill OP: Pressure-clamp: A method for rapid step perturbation of mechanosensitive channels. Pflügers Arch 421: 606-612, 1992.

# 46) mdx マウスに対するダントロレンナトリウムの影響 — CK 値, 運動量および組織学的検討

梶 龍 児\*

研究協力者 小 島 康 祐\* 濱 野 利 明\* 西 村 正 樹\*  
鴨 田 早 苗\* 木 村 淳\* 林 理 之\*\*  
西 野 一 三\*\* 磯 崎 英 治\*\* 宮 本 和 人\*\*

## はじめに

Duchenne型筋ジストロフィーでは、細胞骨格蛋白であるジストロフィンが欠損していることが知られている。ジストロフィン蛋白はCaのhomeostasisに関係していることが示唆されており、ジストロフィンの欠損のため細胞内へ過剰のCaが流入し、筋壊死を起こすと推察されている<sup>1)</sup>。

ダントロレンナトリウムは骨格筋の興奮-収縮連関に作用し、筋小胞体からのCa放出を抑制する薬物である。近年、この薬物を筋ジストロフィーの治療に応用した報告がいくつかある。1990年Quinlanらは、Duchenne型筋ジストロフィーと同様にジストロフィン蛋白を欠くmdxマウスにダントロレンを投与し、血清CK値が低下することを報告している<sup>2)</sup>。1991年Bertoriniらはダントロレンを実際にDuchenne型筋ジストロフィー患者に投与して、血清CK値が低下し、筋力はやや改善をみたすと報告している<sup>3)</sup>。

これらのことから、前回我々はダントロレンナトリウムをmdxマウスに投与し、血清CK値、運動量に及ぼす影響を報告した<sup>4)</sup>。ダントロレン投与により血清CKは低下する傾向を示したが、有意差は得られなかった。

今回我々は例数を増やして同様の検討を行い、さらに組織学的な検討を加えた。

## 方 法

4週齢mdxマウスを、ダントロレン投与群、対照群に分けた。投与群にはダントロレンナトリウム0.3mgを4週間連日腹腔内に投与した。ダントロレンナトリウムは0.667mg/mLになるよう蒸留水で溶解し、その0.45mLを投与した。対照群には同量の生理食塩水を同様に4週間腹腔内投与した。

効果の判定には、体重、運動量、血清CK値を用いた。運動量は回転ケージに1時間放置し、その回転数で評価

した。体重及び運動量は投与前と投与後1週間ごとに測定した。投与開始4週間後、ケタミンで深麻酔下で心腔穿刺にて採血を行い、血清CK値を測定した。

実験に使用したマウスは投与群47匹、対照群46匹で、合計93匹を用いた。投与群にて薬物投与とは無関係に3匹、対照群にて1匹が死亡したため、残り89匹(投与群44匹、対照群45匹)にて検討を行った。

組織学的検討は以下のように行った。ダントロレン投与群、対照群各4匹よりそれぞれ前脛骨筋、腓腹筋の2筋ずつを採取した。筋組織は迅速凍結後、cryostatで10 $\mu$ mの切片を作成し、HE染色にて壊死再生現象を中心に観察した。各検体につき2視野(合計面積1.4mm<sup>2</sup>)に出現する総線維数および壊死線維、basophilic fiber、中心核線維、opaque fiberの数を4人の検者で数え、その平均値を検討に用いた。検者にはダントロレン投与の有無、および採取した筋名を伏せ、blindの条件で行った。

統計学的検討には、unpaired t testおよびMann-Whitney U testを用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

## 結 果

### 1) 体重、運動量に対する影響(図1)

投与前および投与後の体重は、ダントロレン投与群、対照群間で差を認めなかった。

運動量は、投与2週後、4週後でダントロレン投与群にて低下する傾向を示したが、統計学的な有意差を認めなかった。

### 2) 血清CK値(図2)

血清CK値は投与群で平均7484IU/L、対照群で9122IU/Lと、平均値ではダントロレン投与群で低下する傾向が認められた。CK値は正規分布をしていなかったため、Mann-Whitney U testで検討を行ったが、統計学的な有意差を認めなかった。

正規化のため対数変換を行った。Log CKの値は投与群で3.71、対照群で3.80と投与群でやや低値であったが、統計学的な有意差は認めなかった。

\*京都大学医学部神経内科  
\*\*東京都立神経病院神経内科

### 3) 運動量とCKの関係

投与群では運動量が少ないため、血清CK値が低下傾向を示したとも考えられるため、投与4週後の運動量と血清CK値の相関につき検討したが、両者の間には相関関係は認められなかった。

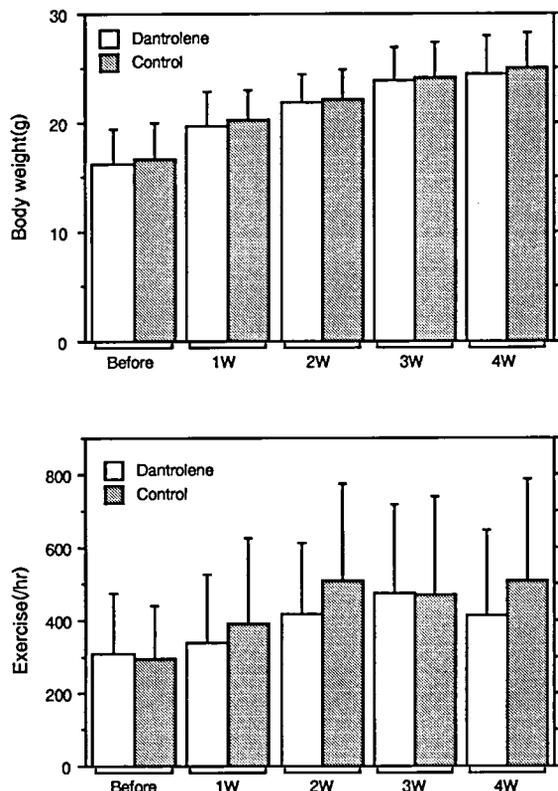


図1 体重、運動量に対する影響  
上段：体重は両群間で差を認めなかった。  
下段：ダントロレン投与2週後、4週後で運動量はやや低下する傾向を示した。

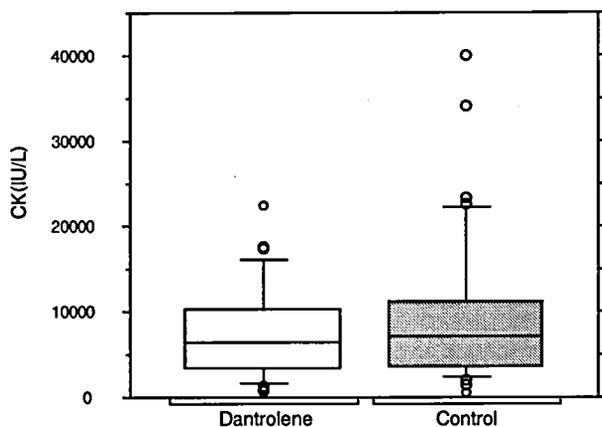


図2 血清CK値  
投与群で血清CKはやや低下する傾向を認めた。

### 4) 組織学的検討 (図3)

#### a) 総線維数

2視野の合計の総線維数は、前脛骨筋では投与群で302、対照群で254、腓腹筋では投与群で409、対照群で287であり、ダントロレン投与群にて総線維数は増する傾向を認めた。腓腹筋では統計学的に有意差を認めた。

(Mann-Whitney U;  $p < 0.05$ )

#### b) 壊死線維

総線維数に対する壊死線維数の割合は、前脛骨筋では投与群で6.3%、対照群で7.2%、腓腹筋では投与群で2.8%、対照群で7.1%であった。例数が少ないため統計学的な有意差は認められなかったが、ダントロレン投与群にて壊死線維数は低下する傾向を示した。この傾向は腓腹筋にてより著明であった。

#### c) Opaque fiber

総線維数に対するopaque fiberの割合は、前脛骨筋では投与群で0.8%、対照群で1.3%、腓腹筋では投与群で1.0%、対照群で1.6%であり、投与群にてopaque fiberは低下する傾向が認められた。

#### d) 中心核線維

総線維数に対する中心核線維の割合は、ダントロレン投与群、対照群間で大きな差を認めなかった。

#### e) Basophilic fiber

総線維数に対するbasophilic fiberの割合は、前脛骨筋では投与群で19.5%、対照群で18.2%、腓腹筋では投与群で23.9%、対照群で18.8%であった。Basophilic fiberの数はダントロレン投与群にて増加する傾向を認めた。

### 考 察

ダントロレン投与により血清CK値は低下する傾向を示したが、有意差は得られなかった。今回の我々の実験条件では、ダントロレンの投与量は約12~20 mg/kgと比較的臨床量に近い量を用いたが、Quinlanらの報告<sup>2)</sup>では30mg/kgと高用量を投与しており、この差がCK値が有意差にいたらなかった一つの要因とも考えられる。

運動量はダントロレン投与群でやや低下する傾向が認められた。この薬剤を筋ジストロフィー患者に実際に投与する場合には、もともと弱い筋力をさらに低下させる可能性があり、注意を要する点と考えられる。血清CKが低下傾向を示したのは、単に運動量が少ないために筋崩壊が起こりにくいという可能性も考えられるが、運動量と血清CK値との間に相関はなく、運動量の差だけでは説明できない。

組織学的には、ダントロレン投与により総線維数は増加し、壊死線維は減少する傾向を認めた。また、opaque fiberも投与群で減少する傾向を示した。Opaque fiberは細胞内にCaが流入し、過収縮を起こした線維で、壊死の前段階と考えられている。投与群にて減少傾向がみ

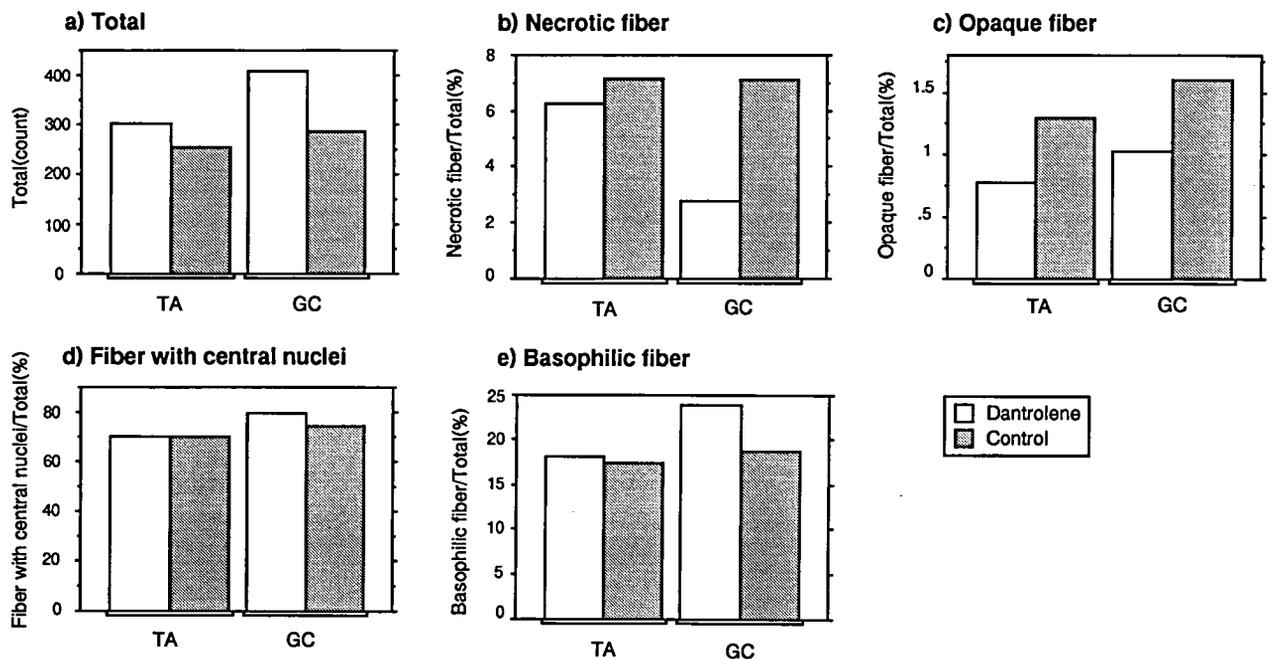


図3 組織学的検討

ダントロレン投与により、a) 総線維数は増加、b) c) 壊死線維および opaque fiber は減少傾向を示した。d) 中心核線維は両群間で差を認めなかった。e) Basophilic fiber は増加傾向を示した。(TA: 前脛骨筋, GC: 腓腹筋)

られたことは、筋小胞体からのCa遊離抑制というダントロレンの薬理効果を反映したものと考えられる。Basophilic fiberは再生初期に出現する線維であり、腓腹筋において投与群に増加傾向がみられたことは、ダントロレンが再生を促進する可能性を示すものとも考えられる。ただし今回はHE染色のみしか行っておらず、また両群での差もわずかであり、今後さらに検討を続ける必要がある。

筋ジストロフィーにおいては細胞内Caが筋線維の壊死に関与していることが推察されている。ダントロレンは筋小胞体からのCa遊離を抑制する作用があり、これが筋ジストロフィーにおいて欠損しているジストロフィンの機能を一部代償し、血清CK値を低下させ、組織学的にも筋壊死を抑制した可能性が推察される。

### まとめ

ダントロレン投与により、有意差にはいたらなかったが、血清CK値は低下する傾向を示した。運動量は投与群でやや低下する傾向がみられた。組織学的には投与群にて壊死線維は減少し、再生線維は増加する傾向を認めた。

### 文献

- 1) Turner LFG, Westwood T, et al: Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature* 335: 735-738, 1988.
- 2) Quinlan JG, Johnson SR, et al: 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) 梶 龍兒, 小島康祐ほか: mdxマウスにおけるダントロレンナトリウムのCK値および運動能力に及ぼす影響。“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4年度研究報告書, 1993, pp188-191.

# 47) Myoblast transferに関する研究 — collagenase の効果 —

寺尾 寿夫\*

研究協力者 清水輝夫\* 臼杵扶佐子\* 松村喜一郎\*  
山田広樹\* 藤田幸子\* 大井博子\*

## はじめに

正常の myoblast をジストロフィー筋に注射し、病的な筋の genetic constitution を正常化しようとする試みが行なわれるようになってからすでに約5年の歳月が経過した。最近では、ジストロフィンの cDNA を直接に筋に注射して、ジストロフィー筋を正常化しようとする gene therapy も行なわれるようになってきている<sup>1)</sup>。

しかし、これらの myoblast transfer または gene transfer を実際に行なうに当たっては、さまざまな障害が指摘されるようになってきた。そのうちのひとつに transfer 実施後のジストロフィン陽性線維の出現率が gene therapy を行なうにはあまりにも低いことがあげられる。この効率を上げるためには、注射された myoblast の sarcolemma への接近を促し、さらに細胞外マトリックスや基底膜の通過を容易にさせることが必要である。

このためにはいくつかの方法が考えられるが、今回は collagenase を使用し、この注射が myoblast transfer 後のジストロフィン陽性線維の出現に如何なる効果を及ぼすかを検討したので現在までの結果を報告する。

## 方 法

今回の実験方法は基本的には従来の方法<sup>2)</sup>と同じである。

使用した動物は mdx マウスおよび mdx/nude マウス<sup>3)</sup>であり、ターゲットとした筋はすべて長指伸筋 (EDL) である。

注射した myoblast は幼若な B10 マウスより採取し、Dulbecco の modified Eagle medium を用いて培養・増殖したものである。また今回はライン化した C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 細胞も使用して実験を行なった。C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 細胞は Yaffe により開発されたもの<sup>4)</sup>で、ATCC より購入し、これを培養増殖して用いた。

注射する細胞数は1本の EDL 当り 3 × 10<sup>6</sup> 前後である。

従来の方法と異なるのは collagenase を注射したことである。これには collagenase I を 0.0002% になるようにメヂウムに溶解し、これを myoblast transfer と同時に筋肉内に注射した。しかし、一部には collagenase 注射 24 時間後に myoblast transfer を行なったものもある。

Myoblast transfer 後の EDL は 1 カ月後に取り出し、cross-section 標本作製後、抗ジストロフィン抗体 (DYS2) を用いて染色した。

## 結 果

すでに報告した如く、mdx マウスの EDL に B10 由来の myoblast を注射した場合には、陽性線維は cluster を作って出現するが、その中に含まれる陽性線維の数は少なく、数本～10数本程度である。そして EDL の横断標本中のジストロフィン陽性線維の全線維に占める比率は、その後動物数を増して18匹の平均を求めると 2.0 ± 1.1% (コントロールは 0.7 ± 0.6%) であった。

また、mdx/nude マウスに、同様に B10 由来の myoblast を EDL に注射して、1 カ月目に観察したジストロフィン陽性線維の出現率は、12匹の平均が 4.7 ± 3.0% であり、Partridge らの報告<sup>4)</sup>にみる 10～40% には遠く及ばなかった。

元来、幼若な B10 マウスの筋から採取し、培養・増殖した myoblast の中には、fibroblast も含まれている。そのため myoblast のみより成る C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 細胞を transfer して陽性線維の出現率を測定してみた。

### 1) mdx/nude マウスの EDL への C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 細胞の transfer

mdx/nude マウスの EDL にライン化された C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 細胞を 3 × 10<sup>6</sup> 注射し、1 カ月目に観察すると、B10 の myoblast を注射した時よりも大きなジストロフィン陽性線維の cluster が形成される。図 1 はそれを示したものである。C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 細胞注射後に再生した直径の小さな筋線維群がジストロフィン陽性に染まっている。

われわれが観察した 9 匹の mdx/nude についてみると

\* 帝京大学医学部神経内科

※ mdx/nude マウスは国立精神・神経センター竹光先生及び昭和大学若山先生より頂いたものを自繁している。

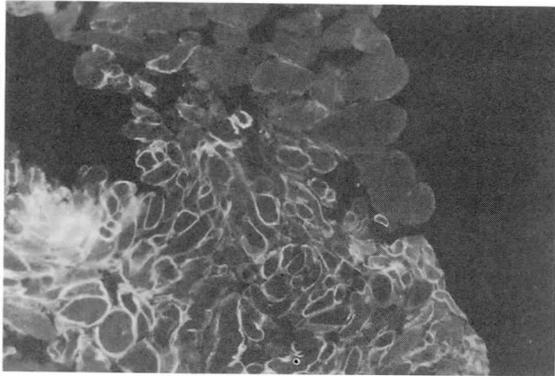


図1 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞をmdx/nudeマウスのEDLにtransferし1か月目のジストロフィン染色

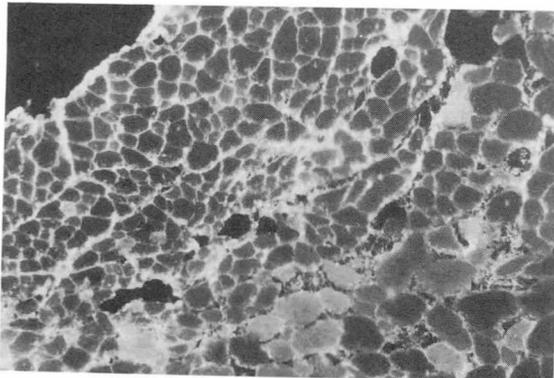


図2 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞をcollagenaseとともにmdxマウスのEDLに注射し1か月目のジストロフィン染色

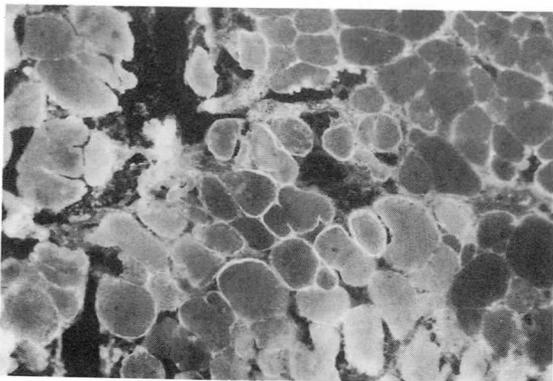


図3 B10マウスのmyoblastをcollagenaseとともにmdxマウスのEDLに注射し1か月目のジストロフィン染色

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞注射後の1か月のジストロフィン陽性線維の比率は平均6.3±4.6% (コントロール0.4±0.3%)であった。

## 2) collagenaseの効果

さらに陽性率を上げる目的でcollagenase Iを使用し実験を行なった。

しかし、mdx/nudeにcollagenaseとともにC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞を注射し、長時間経過すると、注射部位に腫瘤を形成

表1 Dystrophin positive fibers in mdx EDLs  
1 month after C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transfer with 0.0002% collagenase I

	Number of positive fibers/Total fibers		%	
	collagenase (+)	collagenase (-)	collagenase (+)	collagenase (-)
1	114/421	63/503	27.1	12.5
2	129/584	72/484	22.1	14.9
3	44/269	69/589	16.4	11.7
4	102/639	34/390	16.0	8.7
5	33/302	33/406	10.9	8.1
average			18.5±6.2	11.2±2.8

(p<0.05)

してくることが多いため、この実験ではmdxマウスを使用している。0.0002%collagenase Iのみをmdxマウスに注射し、1週後に取り出したEDLのH-E染色を見ると、注射部位中心の筋線維は壊死をきたしており、その周辺の筋線維も構築が乱れ、変性に陥っているのが観察された。

図2はcollagenaseとともにC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞を注射し、1か月を経たEDLのジストロフィン染色である。この図に見る如く、注射部位に再生してきた小径の筋線維はそのほとんどがジストロフィン陽性に染色されており、周辺の陰性筋線維群との間に明瞭な対比を示していた。ただし、この陽性線維群が注射されたC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>のmyoblast同士が融合してできたものであるか、またはC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞とmdxのジストロフィン陰性筋線維の衛星細胞と融合して生じたものであるかは、これだけでは明らかでない。

表1は、このようにcollagenaseとともにC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞を注射し、1か月目のマウス5例の陽性線維の数および比率を示したものである。動物により差があるが、10.9~27.1%、平均18.5±6.2%に陽性線維がみられた。これらのmdxマウスの他側のEDLはcollagenaseを注射せずC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞のみを注射したもの(表ではcollagenase-で示す)であるが、これらの陽性線維の平均は11.2±2.8%であり、collagenaseを同時に注射した方が有意に高率であった。

次に幼若なB10より採取し培養増殖したmyoblastをcollagenase Iと共に注射し実験を行なった。

図3は0.0002%collagenase IとB10のmyoblastを注射し1か月目のEDLのジストロフィン染色である。ジストロフィン陽性線維のclusterはcollagenaseを使用しなかった場合に比し、大きくなるものが多かった。EDLの横断標本につき、観察した筋線維の何%をジストロフィン陽性線維が占めるかを計算したものが表2である。これに示すようにジストロフィン陽性線維の出現率は平均7.6±2.9%であった。この数値はcollagenaseを

表2 Dystrophin positive fibers in mdx EDLs  
1 month after normal (B10) myoblast transfer  
with 0.0002% collagenase I

Number of positive fibers/Total fibers	%
39/558	7.0
32/311	10.3
66/699	9.4
24/810	3.9
average 7.6±2.9	

用いず、B10のmyoblastのみを注射した以前の研究では2.0%であったことを考えると明らかな上昇と考えられる。

### 考 察

ジストロフィー筋に正常 myoblast を注射した後のジストロフィン陽性線維の出現は、1)transferされた正常のmyoblastから生ずる正常の筋管細胞同士が互いに融合して正常の筋線維を形成するかまたは、2)注射時に損傷されたジストロフィー筋線維の衛星細胞から生ずる筋管細胞とtransferされたmyoblast由来の筋管細胞との融合が起るかの何れかによると考えられる。さらにLawら<sup>9)</sup>の言う如く、3)注射された正常myoblastより生ずる“corrective factor”がジストロフィー筋に働く可能性もある。いずれにしても、myoblastの注射後生ずるジストロフィン陽性線維のclusterの大きさを増し、ジストロフィン陽性線維の全筋線維中に占める比率を増すことが、将来myoblast transferを治療に利用する上で大切である。

これにはtransfer時のmyoblastの洩れを少なくすることや、注射されたmyoblastの移動を促すことなどが必要であるが、これらの他に筋細胞の強固な細胞外マトリックスや基底膜に対するmyoblastの透過を容易にし、同時にジストロフィー筋の衛星細胞を活性化することが必要になってくる。

最近、Acsardiら<sup>1)</sup>は full length のジストロフィン cDNA を vector と共に筋に注射し、ジストロフィン陽性線維の出現を報告しているが、この場合も陽性線維の出現率は低く、1～2%程度であったと言う。そしてこの場合 collagenase または DMSO と共に cDNA を注射すると陽性線維の出現率が著しく増加すると報告している<sup>9)</sup>。これは注射された cDNA が細胞外マトリックスや plasma membrane を通過して筋細胞内に移動し易くなったためと考えられる。

今回のわれわれの研究は myoblast そのものの注射で

あるが、collagenaseの同時注射が、myoblastの筋細胞膜の透過性を増し、またmdxマウス筋の衛星細胞の活性化を引き起したことがジストロフィン陽性線維の出現率を高めた一因であることは否定できない。

今後 collagenase の濃度を変えて検討するとともに、他の蛋白分解酵素についても効果を調べる予定である。

### ま と め

- 1) 幼若なB10マウスより採取し、培養・増殖したmyoblastまたはC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞をmdxマウスまたはmdx/nudeマウスのEDLにcollagenaseとともに注射し、ジストロフィン陽性線維の出現率をcollagenaseを注射しなかった場合と比較した。
- 2) collagenaseの注射の有無に拘らず、B10マウス由来のmyoblastよりもC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞を注射した場合の方が一般に陽性線維の出現率は高かった。
- 3) 0.0002% collagenase 溶液を同時に注射するとB10のmyoblast transferの場合でも、C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞のtransferの場合でも、collagenaseを注射しなかった場合より、ジストロフィン陽性線維の出現率が増加した。

### 文 献

- 1) Acsadi G, Dickson G, et al: Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 352: 815-818, 1991.
- 2) 寺尾寿夫ほか: ジストロフィー筋への正常マイオブラストの注射に関する研究。“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」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, pp177-182.
- 3) Yaffe D and Saxel O: Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle, *Nature* 270: 725-727, 1977.
- 4) Partridge TA, Morgan JA, et al: Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 337: 176-179, 1989.
- 5) Law PK, Goodwin TG, et al: Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. *Muscle & Nerve* 11: 525-533, 1988.
- 6) Acsadi C, Jani A, et al: Toward the optimization of direct gene transfer (DGT) into skeletal muscle fibers. *Neurology* 43: A294, 1993.

# 48) Duchenne型筋ジストロフィーにおける 遺伝子治療の可能性に関する研究

岡田 伸太郎\*

研究協力者 柳原 格\* 金田 安史\*\* 塚本 浩子\*  
西本 潤史\* 福島 久雄\* 乾 幸治\*

## 要 旨

Duchenne型筋ジストロフィーの治療として、正常筋芽細胞移植やジストロフィン遺伝子の導入などが検討されてきた。これまでジストロフィン遺伝子は巨大であるため一般に全遺伝子の発現は困難であった。遺伝子治療を考えた場合、安全かつ高効率な遺伝子発現系の開発は重要課題である。我々はHVJ(Sendai virus)-リポソーム法によってmdx筋内で全ジストロフィンcDNAの遺伝子発現に成功したので報告する。

## 目 的

これまでに行われたジストロフィン遺伝子発現実験では全遺伝子を用いた場合、発現効率は1%以下と低かった<sup>1)</sup>。Becker型のミニ遺伝子を導入した場合には効率はよかったが<sup>2)3)</sup>、構造蛋白としての不完全さを問題視する向きもあった。従って、Duchenne型筋ジストロフィーの遺伝子治療を行う場合の条件として第1に安全で組織障害が少ないこと、第2に巨大遺伝子の発現が可能で発現効率が良く、広範囲な筋線維に遺伝子発現が可能であること、第3に発現期間が長期であること、などの条件を満たす発現系の開発が必須であった。本研究において我々はHVJ-リポソーム法を用いることとした。リポソーム法はリポソーム内に封入可能な遺伝子の大きさに制限がなく、ジストロフィン遺伝子発現に適し、また組織障害が少ないという利点がある。反面レトロウイルスと異なりゲノム内にインテグレートされにくく、一過性発現系であるという欠点がある。またHVJはリポソームと細胞膜との融合能を高め、核移行蛋白は発現効率を上昇させる<sup>4)5)</sup>との報告があり、我々はこのHVJ-リポソーム核移行蛋白系を用いた。

## 方 法

### 1. DNA

全ジストロフィンcDNAを含む発現ベクターは英国

\*大阪大学医学部小児科

\*\*大阪大学細胞生体工学センター

UMDSのG. Dickson博士らの開発された、pRSV-Dy, pDMD8, pDyDyを用いた。これらのベクターはそれぞれRous sarcoma virus, マウス白血病ウイルス, ヒト筋型ジストロフィンプロモーターを持つ。

### 2. mdx マウス

実験動物中央研究所斎藤宗雄先生より供与されたSPF化mdxマウスを当動物実験施設内にて繁殖したものをを用いた。

### 3. HVJ-リポソーム法

各種プラスミドDNAとして50,200 $\mu$ gとDNA結合蛋白で核移行性のあるHMG1(high mobility group 1)蛋白質64 $\mu$ gと混和、複合体を形成させた。リポソームはフォスファチジルコリン, フォスファチジルセリン, コレステロールを重量比48:10:20に混ぜ合わせた脂質溶液を調整した。プラスミドHMG1複合体はボルテックス法を用いてリポソーム内に封入し、これに不活化した細胞融合能を有するHVJを震盪混和、密度勾配遠心にて最終的に約2mlのリポソーム液を得た。

### 4. 遺伝子導入および発現

#### A) *In vitro* 発現実験

mdxマウス培養筋芽細胞(5 $\times$ 10<sup>5</sup>個)にE. Coli lac Z遺伝子を持つベクター(200 $\mu$ g)をHVJ-リポソーム法にて導入X-gal染色を行った。

#### B) 筋肉内*in vivo* 発現実験

12~18週齢のmdxマウス大腿四頭筋にプラスミドDNAとして5ないし20 $\mu$ g以下を含むHVJ-リポソーム液を26ゲージ注射針にて直視下に注入した。注入後3, 5, 7, 10日後に大腿四頭筋を取りだし10 $\mu$ mの厚さの凍結連続切片を作成しHE, NADH, ジストロフィン染色を行った。

## 結 果

*In vitro*でのmdxマウス培養筋芽細胞へのlac Z遺伝子導入実験の結果、局所的に青色に染色される酵素活性部位を認めた。このことにより、HVJ-リポソーム法を用いて筋芽細胞への遺伝子導入が可能であることが判明

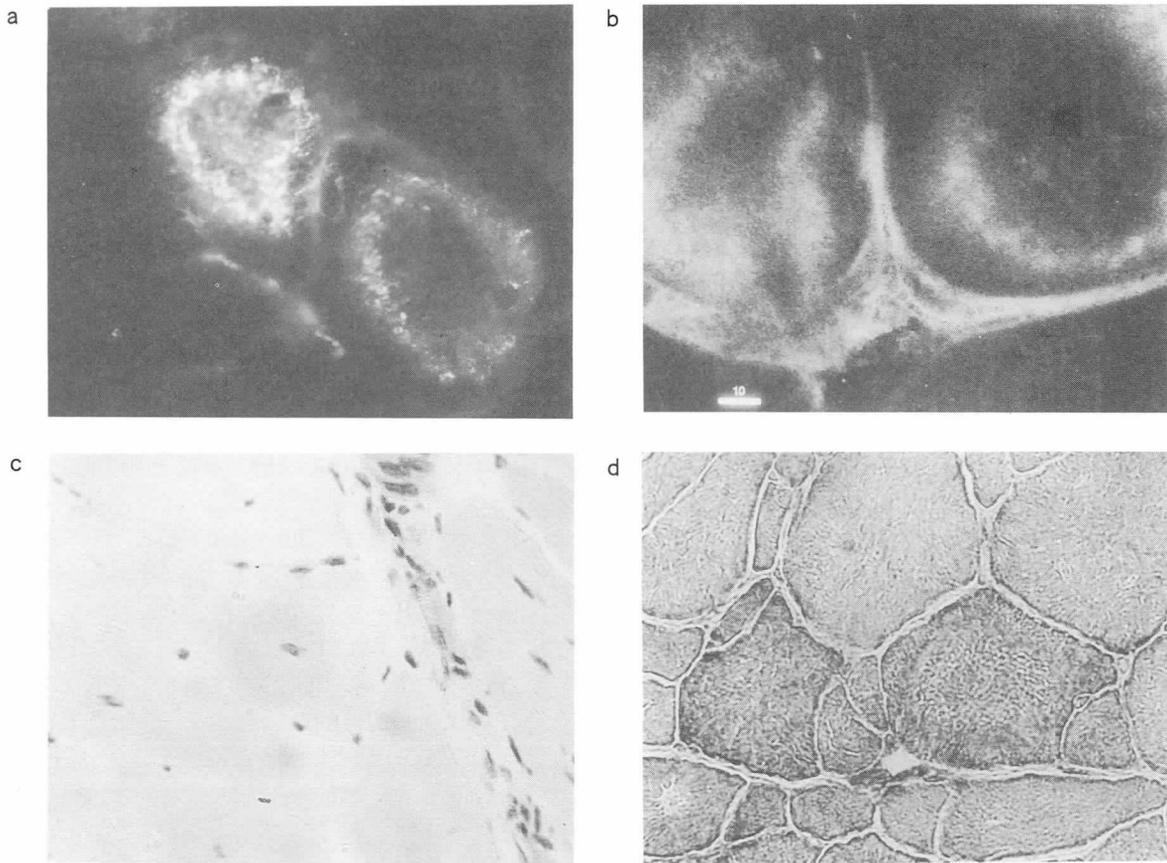


図1 a NCL DYS-3 (N端) ジストロフィン抗体染色光顕像  
 b NCL DYS-2 (C端) 共焦点レーザー顕微鏡像 Bar=10 μm 画像処理により斜め方向より観察し、筋膜を強調した  
 c HE染色像. 組織障害を認めない  
 d NADH染色像. 筋線維内細網構造の乱れを認める

した.

mdx マウス大腿四頭筋内遺伝子導入後のN端, C端に対するジストロフィン染色の結果, 光学顕微鏡レベルで筋細胞質内にリング状のジストロフィン陽性線維と, 筋細胞膜がジストロフィン陽性となる線維を導入後10日目まで認めた(図1 a). さらに, 共焦点レーザー顕微鏡での検索によっても筋細胞内及び膜と一致して染色が認められた(図1 b). また, 同部位でのHE, NADH染色の結果, 正常, 壊死再生, オパーク線維には, 観察されない染色性の濃淡や網目構造の乱れを認め, 過剰な蛋白合成が示唆された(図1 c, d). 一次抗体として, マウスジストロフィンと交差しない, ノボカストラ社のNCL-DYS3抗体を用いた時の遺伝子発現頻度を示す(表1). 当施設におけるDYS3抗体を用いてのコントロールmdxマウスのジストロフィン陽性線維の出現頻度は, 約1.2%であった. ジストロフィン陽性線維の評価は1%未満を-, 1~3%を±, 3~5%を+, 5~20%を++, 20%以上を+++とした.

マウスナンバー1~3はベクターpRSV-Dyを用い,

表1 Summary of dystrophin positive fibers

mouse No.	vector	amount of DNA (μg)	HMG-1	days after transfection	dystrophin positive fibers	
					cell membrane pattern	ring-like pattern
1	pRSV-Dy	20	+	3	+	+
2		20	+	3	+	+/-
3		20	+	3	+++ (26%)	++ (16%)
4	pRSV-Dy	20	+	3	+	+
5		20	+	5	+	+/-
6		20	+	7	+/-	+/-
7		20	+	10	+/-	-
8	pRSV-Dy	5	+	3	+	+/-
9	pDMD8	5	+	3	+	-
10	pDyDy	5	+	3	?	-
11	pRSV-Dy	5	-	3	-	-
12	pDMD8	5	-	3	-	-
13	pDyDy	5	-	3	-	-

0-1%:-, 1-3%: +/-, 3-5%: +, 5-20%: ++, 20%>: +++

HMG-1: high-mobility group-1

DNA 20 μg 直接注入したときの遺伝子発現を示した. 最大で323本の筋線維中, 84本の筋線維の筋細胞膜がジストロフィン陽性を示し, 52本の筋線維でリング状のジストロフィン陽性像を示した. マウスナンバー4~7は, 遺伝子導入後の経時変化に対して, ジストロフィン陽性線維の割合が減少することを示している. 通常 mdx 筋には認めることのできないリング状陽性線維は, 1%以

下と頻度は低いものの10日目にも認められた。マウスナンバー8~10は、導入プラスミドDNAの量を5 $\mu$ gとしたときのジストロフィン発現頻度の比較である。pRSV-Dyベクターの場合、DNA量20 $\mu$ gに比べ発現量が減少する傾向が得られた。ベクターpRSV-Dyが最も発現率が良かった。マウスナンバー11~13は、核移行蛋白であるHMG1を用いなかった際の遺伝子発現の割合を示した。何れのベクターを用いた場合でも、ジストロフィンの発現は認められなかった。

#### 考 察

遺伝子治療の標的として、マウス筋組織は注入したプラスミドが安定であるという優れた特質を持つ<sup>6)</sup>。これが、筋芽細胞が多くの遺伝子発現実験に用いられる根拠となっている。しかしジストロフィン遺伝子は、大きさの問題で、既存のレトロ、アデノウイルスベクターを用いて全ジストロフィンcDNAを組み込むことはできない。このため我々は、HVJ-リボソーム法を用いて全ジストロフィン遺伝子の発現を確認した。我々の方法は従来の方法と異なり、HVJ、核移行蛋白を用い発現を行った。今後、免疫組織学染色以外にもウエスタンブロットや他の方法を用いて蛋白レベル、DNAレベルでの発現の確認をし、さらに発現効率を上げる方法の開発を行っ

ていきたい。

#### 文 献

- 1) Acsadi G, et al: Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 352: 815-818, 1991.
- 2) Ragot T, et al: Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* 361: 647-650, 1993.
- 3) Dunckley MG, et al: Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo. *Hum Mol Genet* 2(6): 717-723, 1993.
- 4) Kaneda Y, et al: Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* 243: 375-378, 1989.
- 5) Tomita N, et al: Direct in vivo gene introduction into rat kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 129-134, 1992.
- 6) Wolff JA, et al: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-1468, 1990.

# 平成5年度研究班名簿

平成5年度 高木班 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	高 木 昭 夫	虎の門病院神経内科 〒105 東京都港区虎ノ門2-2-2	部 長	03-3588-1111 (内2016)
監 事	寺 尾 寿 夫	帝京大学医学部神経内科 〒173 東京都板橋区加賀2-11-1	教 授	03-3964-1211
幹 事	小 澤 高 将	名古屋大学医学部第二生化学 〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65	教 授	052-741-2111 (内2031)
"	後 藤 幾 生	九州大学医学部神経内科 〒812 福岡市東区馬出3-1-1	教 授	092-641-1151 (内2284)
"	佐 藤 猛	国立精神・神経センター国府台病院 〒272 市川市国府台1-7-1	副 院 長	0473-72-3501 (内2112)
"	清 水 輝 夫	帝京大学医学部神経内科 〒173 東京都板橋区加賀2-11-1	教 授	03-3964-1211 (内1911)
"	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)
運 営 幹 事	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	部 長	0423-41-2711 (内5111)
班 員	内 野 誠	熊本大学医学部第一内科 〒861 熊本市本荘1-1-1	助 教 授	096-344-2111 (内5612)
"	太 田 成 男	自治医科大学第一生化学 〒329-04 栃木県河内郡南河内町 薬師寺3311-1	助 教 授	0285-44-2111 (内3151)
"	岡 田 伸太郎	大阪大学医学部小児科 〒565 吹田市山田丘2-2	教 授	06-875-7111 (内2930)
"	納 光 弘	鹿児島大学医学部第三内科 〒890 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1	教 授	0992-75-5330
"	梶 龍 児	京都大学医学部神経内科 〒606 京都市左京区聖護院河原町	講 師	075-751-3772
"	川 井 尚 臣	徳島大学医学部第一内科 〒770 徳島市蔵本町3-18	助 教 授	0886-31-3111 (内3204)
"	栗 原 照 幸	東邦大学医学部第四内科 〒153 東京都目黒区大橋2-17-6	教 授	03-3468-1251 (内2322)
"	後 藤 雄 一	国立精神・神経センター武蔵病院 〒187 小平市小川東町4-1-1	医 長	0423-41-2711
"	小 林 高 義	東京医科歯科大学医学部神経内科 〒113 東京都文京区湯島1-5-45	講 師	03-3813-6111 (内3386)
"	木 南 英 紀	順天堂大学医学部第一生化学 〒113 東京都文京区本郷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 東京都新宿区河田町8-1	講 師	03-3353-8111 (内31230)
"	斎 藤 深美子	東京医科歯科大学難治疾患研究所 遺伝疾患研究部門 〒113 東京都文京区湯島1-5-45	助 手	03-3813-6111 (内6132)
"	佐 橋 功	愛知医科大学第四内科 〒480-11 愛知県長久手町岩作雁又21	助 教 授	0561-62-3311 (内2176)

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	庄 司 進 一	筑波大学臨床医学系神経内科 〒305 つくば市天王台1-1-1	教 授	0298-53-3192
"	杉 村 公 也	名古屋大学医療技術短期大学部 作業療法学科 〒461 名古屋市東区大幸南1-1-20	教 授	052-723-1111 (内303)
"	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	北海道大学医学部付属病院神経内科 〒060 札幌市北区北14条西5丁目	教 授	011-716-1161 (内6028)
"	田 邊 等	東京都立神経病院 〒183 府中市武蔵台2-6-1	院 長	0423-23-5110 (内3201)
"	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	院 長	06-941-0484
"	辻 省 次	新潟大学脳研究所神経内科 〒951 新潟市旭町通1-757	教 授	025-223-6161 (内5180)
"	福 原 信 義	国立療養所犀潟病院 〒949-31 新潟県中頸城郡大潟町犀潟 468-1	副 院 長	0255-34-3131 (内553)
"	宝 来 聰	国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門 〒411 三島市谷田1111	助 教 授	0559-75-0771 (内568)
"	水 野 美 邦	順天堂大学医学部脳神経内科 〒113 東京都文京区本郷2-1-1	教 授	03-3813-3111 (内3321)
"	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)
"	湯 浅 龍 彦	東京医科歯科大学医学部神経内科 〒113 東京都文京区湯島1-5-45	助 教 授	03-3813-6111 (内3386)
"	吉 田 瑞 子	国立精神・神経センター神経研究所 〒187 小平市小川東町4-1-1	室 長	0423-41-2711
"	戸 田 達 史	癌研究会癌研究所生化学部 〒170 東京都豊島区上池袋1-37-1	研 究 生	03-3918-0111 (内4506)
"	吉 田 邦 広	信州大学医学部第三内科 〒390 松本市旭3-1-1	助 手	0263-35-4600
顧 問	荒 木 淑 郎	熊本大学 〒860 熊本市本荘1-1-1	名誉教授	096-344-2111
"	宇尾野 公 義	国立静岡病院 〒420 静岡市城東町24-1	名誉院長	0542-45-0101
"	豊 倉 康 夫	東京都老人医療センター 〒173 東京都板橋区柴町35-2	名誉院長	03-3964-1131
"	三 好 和 夫	徳島大学 〒770 徳島市蔵本町3-18	名誉教授	0886-31-3111
"	杉 田 秀 夫	国立精神・神経センター 〒187 小平市小川東町4-1-1	総 長	0423-41-2711
事務担当者	光 村 征 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		0423-41-2711 (内5111)