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

平成２年３月（1990年）

研究報告書の作成にあたって

厚生省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究」班が昭和59年に結成され，その研究活動が開始されてから本年（平成元年）は2期目の最後の年にあたり，今年をもって本研究班は終止符を打つ事になります．その間不肖，私が班長として研究班のお世話をしてまいりワークショップ，或いは班会議におきましてその成果がまとめられて参りました．本年度も研究報告書を完成し得ました事は，顧問の先生方，班員ならびに共同研究者各位の絶大な努力に負うものであり深い敬意を表したいと思います．

本年度本報告書に集録された成果はいずれも国際的に水準の高いものであり，過去3年間の成果のつみ重ねにより筋ジストロフィー症及び関連疾患としてのミトコンドリア脳筋症の分子生物学的研究は目ざましく進歩し，病態に関する幾つかの核心に迫る問題点が明らかにされつつあります．

本年度も「一日も早い」治療法の開発を待ちわびながら幾多の患児の尊い生命が失われた事に対し深い哀悼の意を表しますと共に本研究班が組織の上では終了致しますが今後の班員の皆様の断えざる研究に大いに期待したいと思います．

本研究班を活動の場として多くの若い研究者が本疾患研究にその情熱と意欲をかきたてて参りました事はまことに喜ばしい事であり，来年度も引続いて新しい班組織が実現される様に努力し，また関係各位の御援助を切に願うものであります．

本研究の推進に賜った厚生省，国立精神・神経センター，並びに日本筋ジストロフィー協会の深い御盡力，御支援と御理解に深く感謝致します．

平成2年3月

〈班長〉杉　田　秀　夫

目　　次

平成元年度総括研究報告…… 7
分担研究報告…… 13
Ⅰ．臨　床…… 21
Ⅱ．生　化　学…… 53
Ⅲ．遺　伝　子…… 77
Ⅳ．ジストロフィン……101
Ⅴ．mdx マウス ……125
Ⅵ．培養・再生……161
Ⅶ．ミトコンドリア(1)……183
Ⅷ．ミトコンドリア(2)……223
Ⅸ．ミトコンドリア(3)……251
平成元年度研究班名簿……279

平成元年度

総括研究報告

総括研究報告

班長　杉　田　秀　夫

〔はじめに〕

本研究班は進行性筋ジストロフィー及び関連疾患として，特にミトコンドリア脳筋症の病態及び病因の解明と治療法の開発を目標とし，内外の分子生物学の進歩に伴い3年間の間に幾つかの飛躍的な成果をあげる事が出来た．本年が研究班の最後の年でもあり過去3年間の研究成果を総括し，今後研究を進めて行く上で重要な意義を持つと考えられる2，3のトピックスについて述べる．

〔Ⅰ．3年間の研究班の研究目標と成果〕

A．進行性筋ジストロフィー

1）デュシャンヌ型（DMD）

DMD, BMDの病因が分子レベルで解明された．即ちDMD遺伝子cDNAのN末端付近の一部から予測されるペプチドに対するポリクロナール抗体は，骨格筋，心筋の表面膜のみを認識する事がわかり，DMD遺伝子産物，ジストロフィンは筋表面膜又はそれと密接に関連している物質である事が明らかになった．またこの抗体はDMDの骨格筋，心筋表面膜とは全く反応しない事からDMDは骨格筋表面膜におけるジストロフィンの欠損する疾患である事が確認された．

この発見は従来から提唱されて来たDMDの病因に関する“膜異常説”を分子レベルで実証した事になり，DMDの病因の解明にむけて“逆遺伝学”がもたらした成果は高く評価されよう．

またDMD患者に認められる心筋障害は心筋におけるジストロフィン欠損がその原因と考えられ，心筋障害は二次現象ではないと想定される．

2）DMD保因者

従来DMD保因者の発見には血清CK活性が用いられ，約70％の症例で異常高値が認められている．血清CK値が上昇し，軽度の筋力低下が認められるmanifested carrierではジストロフィンの免疫染色では陽性，陰性，部分染色の3種，即ちモザイク状を呈しLyon仮説が分子レベルでも証明された．筋細胞はジンキチウムを構成するので大部分の筋繊維は“部分染色”が期待されたが10％以下と少なく，陽性，

又は陰性繊維が大部分であった．また陰性繊維が多くなるに従って臨床症状が強く発現する傾向があり，今後保因者発見の一法となろう．

遺伝子による保因者検出法はDMD cDNAプローブを用いDMDの約60%について欠失が認められている．

3）ベッカー型（BMD）

BMDはDMDとallelicな疾患であると考えられるが検索したBMD全例でジストロフィンは骨格筋表面膜上に弱くかつ部分的（patchy）に発現された．

これらの症例についてジストロフィン分子量，含量を比較検討した．分子量は大部分の症例で正常の400kDより小さい．

Immunoblotによって得られたジストロフィン量は正常の5～60%と幅広く，分子量との間に一定の傾向はなく，免疫染色のデータとも一致しなかった．

臨床症状と関連があるのはジストロフィンの分子量ではなく含量であり，正常の20%以上存在する症例は進行が遅く臨床経過は良好であり，10%以下の症例では進行が速い事が明らかになり，ジストロフィン含量の測定は予後判定に重要な意義を有する事がわかった．

4）その他の神経・筋疾患

DMD，BMD以外の遺伝子性，後天性神経・筋疾患は全て正常筋と全く同じようなジストロフィンの発現が認められた．唯一の例外は福山型先天性筋ジストロフィーと臨床的に診断された症例の中にまれではあるがジストロフィンが全く発現していない例のある事が見いだされ，今後検討を要すると思われる．

5）ジストロフィンの臨床応用

ジストロフィン抗体による免疫染色は臨床的に①DMDとBMD，②DMDと肢帯型筋ジストロフィー，③DMDと福山型先天性筋ジストロフィー，④DMD女性保因者と女性肢帯型の鑑別等に有効であり，今後進行性筋ジストロフィーの鑑別診断上血清CKと共に重要な検査法となろう．またBMDの場合ジストロフィン含量の測定は予後判定上有益である．

B．ミトコンドリア脳筋症

ミトコンドリア(mt)脳筋症は臨床症状の多様性を特徴としているが，本研究班の本邦における症例の分析ではその過半数は進行性外眼筋麻痺（CPEO）を含むKearns-Sayre症候群（KSS）であり，ついでMELAS，MERRFの順となっている．ミトコンドリア内の蛋白合成は核DNAとmtDNAの両者に影響される複雑性

から，その病因や病態の遺伝子レベルでの解明は容易ではない．

当研究班員によりmtの全ゲノムをカバーする28種類の遺伝子プローブが確立され，KSS症候群の約60%でmtDNAの部分欠失を示す事が明らかになった．またCPEOの母娘例で共通部分を含む欠失例が報告された．

KSS症候群についての詳細な遺伝子解析の結果，此等の症例の中には全く同じ配列（direct repeat）間に起こった複製上の誤り（slipped misparing）によるもの，相同性は高いがdirect repeatが認められない症例，或は一種類の欠失ではなく，多種類の欠失，即ち多重欠失の症例も報告された．

MELASに関してはミトコンドリアの明らかな欠失は報告されておらず，クローン化した筋細胞について分子遺伝学的検索が続けられ，複合体IV欠損筋細胞でサブユニット6のmRNAが明らかに減少しており核DNAの異常が予測された．

当研究班の福原班員によって初めて記載された福原病，MERRFは遺伝形式からはmtDNAの異常が強く示唆されるが，まだ明らかなmtDNAの異常は発見されていない．ミトコンドリアの遺伝子の異常が病因として推定されていたLeber病については白人症例について点突然変異が報告されたが，本症例についても白人同様塩基番号11,778の位置がGからAへの置換が認められ，この為にNADH dyhydrogenaseのサブユニット4の340番のArgがHisに置換している事が明らかになり，人種を越えた塩基変異が本症の病因と断定し得ると考えられる．

〔II．未解決の問題点〕

A．進行性筋ジストロフィー

1）ジストロフィン欠損と筋壊死

DNDにおけるジストロフィン欠損がどのような機序で進行性の筋壊死，筋萎縮をもたらすかは完全には解明されていない．BMDはDMDと異なり，不完全ではあるがジストロフィンが発現する事がわかり，この事がDMDより予後が良好である事をある程度説明できると思われる．しかし免疫組織化学で認められるいわゆる“patchy”な染色の機序はなお不明であり，今後の課題である．

更に同じジストロフィンが欠損していてもmdxマウスでは筋力低下は進行しない．両者の臨床経過の著しい差異がいかなる理由によるかを明らかにする事はDMD治療法開発の重要な鍵になろう．

2）治療法開発へのアプローチ

DMDにおけるジストロフィン欠損は遺伝子異常（60%は遺伝子部分欠失）による事が明らかになり，従って当面根本治療は望めない．

現在2つの対症療法が考慮されている．

①正常筋芽細胞注入法

正常筋芽細胞を患者筋肉に注入する事によりジストロフィンを発現させる事を目的としているが，注入細胞の数，注入時期，拒絶反応など解決すべき問題点が多い．

②蛋白分解酵素阻害剤

現在厚生省薬務局新薬開発班で二重盲検法で検討中である．

3）その他の筋ジストロフィー

ジストロフィン抗体の免疫染色，immunoblot法を用い従来臨床的に診断された筋萎縮性，特に肢帯型筋ジストロフィーを再検討する必要があろう．

DMD, BMD以外の進行性筋ジストロフィー，例えば肢体型および福山型先天性筋ジストロフィー，顔面・肩胛・上腕型に関してはその原因は依然として不明であり連鎖解析も進んでいない．DMDとのアナロジーを考えるならばジストロフィン以外の蛋白欠損による筋表面膜異常が考えられるが，推定の域を脱していない．

B．ミトコンドリア脳筋症

1）ミトコンドリア脳筋症の臨床症状は複雑且つ多様であり，その理由として①異常発現臓器の多様性，②酵素活性の時間的変動が挙げられる．この2つの特徴が合理的に説明できれば病態解明は大きく前進するであろう．

2）ミトコンドリアDNか核ADNAか

CPEOを含むKSS症候群では高頻度にmtDNA異常が認められ且つ正常のmtDNAと決失を持つ異常mDNAが混在（heteroplasmy）しているが，MERRF, MELASの臨床的特徴を合わせ持った症例で小さい欠失が見いだされ，そしてその異常mtDNAは単独で存在していた（homoplasmy）．また，MELASでは複合体1のサブユニットに異常があるとの報告がある．一方MERRFに関しては遺伝子レベルの研究は全く進んでおらず，今後に残された課題である．

3）治療に関して

当研究班員の研究によりCoenzyme Q10（CoQ）の大量療法がKSS症候群に対し臨床症状，検査所見の改善効果を持つことが明らかになった．最近KSS症候群以外のミトコンドリア脳筋症に対しても有効であるという報告もあり，今後の検討が必要であろう．

分 担 研 究 報 告

目　　次

I．臨床

1）Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィにおける脊髄前根の変化について
——他の神経筋疾患との対比から——……23
東京都立神経病院　田　邊　　等

2）常染色体劣性遠位型筋ジストロフィーの骨格筋 CT 像……28
東邦大学医学部第四内科　栗　原　照　幸

3）筋緊張性ジストロフィーにおける筋萎縮分布
——CT による検討——……33
東京医科歯科大学医学部神経内科　塚　越　　廣

4）神経筋疾患における Ultrasound Imaging
——実画像のデジタル処理——……40
北海道大学医学部神経内科　田　代　邦　雄

5）Lysosomal glycogen storage disease without acid maltase deficiency
3 症例の組織化学的，生化学的検討……46
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

II．生化学

6）絶食——再摂食時に於ける骨格筋速筋と遅筋のエネルギー代謝……55
信州大学医学部第三内科　庄　司　進　一

7）ラット骨格筋収縮の燐 NMR……59
大分医科大学生理学教室　山　田　和　廣

8）ヒト正常および筋ジストロフィー骨格筋における Ca 依存性
プロテアーゼおよびそのインヒビターの局在および動態について……62
熊本大学医学部第一内科　荒　木　淑　郎

9）ラット培養筋細胞におけるリソソームの動態……67
順天堂大学医学部生化学第一講座　木　南　英　紀

10）筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症における酵素異常について……73
大阪大学医学部第二内科神経内科　垂　井　清一郎

Ⅲ. 遺伝子

11) CANP 遺伝子の発現調節と機能 ……79
東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部　鈴　木　紘　一

12) Kennedy-Alter-Sung の症候群の遺伝子解析 ……85
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

13) ジストロフィンおよびアセチルコリン受容体 mRNA 発現に対する
カルシトニン遺伝子関連ペプチドの修飾に関する研究……88
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

14) 女性筋ジストロフィー患者に関する細胞遺伝学的並びに
分子遺伝学的検索……91
東京医科歯科大学難治疾患研究所遺伝疾患部門　斎　藤　深美子

15) 進行性筋ジストロフィー非定型例の遺伝子欠失部位の解析……96
東京都臨床医学総合研究所臨床遺伝学　鈴　木　義　之

Ⅳ. ジストロフィン

16) Duchenne 型筋ジストロフィーの異常遺伝子産物（ジストロフィン）の
二次元電気泳動での検出 ……103
㈶東京都神経科学総合研究所神経生化学　堀　　眞一郎

17) 悪性肢帯型筋ジストロフィー症の骨格筋における
ジストロフィンの証明 ……107
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

18) Dystrophin : Becker 型筋ジストロフィーにおける dystrophin の
分子異常並びにヒト臓器における dystrophin の局在について……112
熊本大学医学部第一内科　荒　木　淑　郎

19) ベッカー型筋ジストロフィーの筋病理
――ジストロフィン・テストで確定診断された20例の検討―― ……116
国立精神・神経センター神経研究所　杉　田　秀　夫

20) ジストロフィン分子における C 末端ドメインの臨床的意義 ……121
国立精神・神経センター神経研究所　杉　田　秀　夫

V. mdx マウス

21) mdx および control マウスの液体ヘリウム急速凍結骨格筋の freeze fracture, deep etching, rotary shadow replica 法による細胞膜裏打ち構造の研究 ……127
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

22) mdx および control マウスの生後早期における骨格筋細胞膜内 orthogonal array 密度について ……132
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

23) mdx マウス下肢骨格筋の SR-T membrane system および dipeptides ……136
聖マリアンナ医科大学第二生理学教室　吉　岡　利　忠

24) mdx マウスの筋小胞体機能（続報） ……141
虎の門病院神経内科　高　木　昭　夫

25) mdx マウス骨格筋内の Ca イオン濃度 ……145
国立精神・神経センター神経研究所　吉　田　瑞　子

26) mdx マウスの膜電位低下とミオトニー，及びその治療 ……147
東邦大学医学部第四内科　栗　原　照　幸

27) 「Immobilization」による mdx マウス筋変性への影響
——Local tetanus 法による検討—— ……151
東京都立神経病院　田　邊　　等

28) mdx マウスの筋再生能(2)
マーカイン局注後の筋再生に及ぼす除神経の影響 ……156
鳥取大学医学部神経病理　中　村　晴　臣

VI. 培養・再生

29) ヒト培養筋細胞の発達に対する筋収縮活動の影響 ……163
東京医科歯科大学医学部神経内科　塚　越　　廣

30) カルシトニン遺伝子関連ペプチドによる筋芽細胞の分化誘導 ……168
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

31) 損傷筋組織におけるトランスフェリンについて ……172
東北大学医学部神経内科　高　瀬　貞　夫

32) 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 ……177
帝京大学医学部第一内科　寺　尾　寿　夫

Ⅶ. ミトコンドリア(1)

33) ヒトミトコンドリアDNA・Dループ領域の塩基配列の解析 ……185
国立遺伝学研究所　宝　来　　聰

34) シトクロム酸化酵素小サブユニット遺伝子の
クローニングとその発現様式 ……190
順天堂大学医学部脳神経内科　水　野　美　邦

35) MELASクローン化筋細胞の分子遺伝学的検索 ……194
自治医科大学小児科　桃　井　真里子

36) Leber病家系におけるミトコンドリア遺伝子解析 ……198
新潟大学脳研究所神経内科　宮　武　　正

37) 慢性進行性外眼筋麻痺におけるミトコンドリアDNA多重欠失の
PCR法による分析……202
名古屋大学医学部神経内科　杉　村　公　也

38) ミトコンドリアミオパチーのミトコンドリアDNAの解析
——Kearns-Sayre-Shy症候群の一例について—— ……207
九州大学医学部脳研神経内科　後　藤　幾　生

39) ミトコンドリア遺伝子病とミトコンドリアDNA変異のタイプ ……212
名古屋大学医学部第二生化学　小　澤　高　將

40) Kearns-Sayre症候群における異常ミトコンドリアDNAの解析 ……218
大阪大学医学部第二内科神経内科　垂　井　清一郎

Ⅷ. ミトコンドリア(2)

41) MERRFの臨床知見補遺 ……225
国立療養所犀潟病院神経内科　福　原　信　義

42) ミトコンドリアミオパチーの31P MR spectroscopyによる検討……229
北海道大学医学部神経内科　田　代　邦　雄

43) Complex Ⅰ欠損症によるLeigh脳症と思われる2例……234
国立療養所宇多野病院臨床研究部神経内科　斉　田　孝　彦

44) 高カルシウム血症とミオトニア様の手拳開排困難をきたした
mitochondrial neuromyopathyの1例 ……238
東北大学医学部神経内科　高　瀬　貞　夫

45) ミトコンドリア脳筋症における下垂体機能異常 ……243
筑波大学臨床医学系神経内科　金　澤　一　郎

46) チトクローム c 酸化酵素部分欠損
——筋線維ときほぐし標本による検討—— ……247
国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部　埜　中　征　哉

Ⅸ. ミトコンドリア(3)

47) 家族性ミトコンドリア・ミオパチーにおけるミトコンドリア DNA の
解析：non-D loop 領域の多重欠失について ……253
筑波大学臨床医学系神経内科　金　澤　一　郎

48) ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア DNA の欠失 ……259
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　　猛

49) 多重欠失を伴いミトコンドリア DNA の減少のみられた
優性遺伝の疑われるミトコンドリアミオパチーの一例 ……263
順天堂大学医学部脳神経内科　水　野　美　邦

50) 慢性外眼筋麻痺症候群におけるミトコンドリア DNA 異常と
臨床像・筋病理所見との対応 ……267
国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部　埜　中　征　哉

51) Kearns-Shy 症候群における deleted mtDNA の組織分布と
RNA 転写について ……271
東京大学医学部神経内科　清　水　輝　夫

Ⅰ．臨　　床

1）Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーにおける脊髄前根の変化について
——他の神経筋疾患との対比から——

田邊　等*

研究協力者　宮本和人**　磯崎英治**　林　理之**
高元喜代美**　神田　隆***

目　的

Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー（ED）の筋病理像の解釈や，筋電図所見の解釈において従来から筋原性と神経原性変化の種々の程度の混在が指摘されている[1]．剖検例での報告でも脊髄前角及び前根に異常がなかったとする原らの報告[2]と，前角に異常が見られたとする工藤らの報告[3]があり，一定の見解が得られていない．本症が骨格筋自体に変性が起きる疾患であることは間違いがないと思われるが，その並存する神経原性変化の責任病巣を同定するため，脊髄前根の形態学的変化及び定量的計測を実施した．急性脳血管障害（CVD）を対照群とし，四肢の脱力と筋萎縮が軽い筋萎縮性側索硬化症（ALS）も比較検討した．

対象および方法

ED 1例（高元らにより報告[4]：筋電図上も神経原性変化と筋原性変化の混在が確認されている），CVD 2例，ALS 2例，の合計5例の剖検時採取した第7頸髄前根（C_7），第2胸髄前根（Th_2），第3腰髄前根（L_3），腓腹神経，大腿四頭筋を主な検索対象とした．

方法：通常の病理組織学的検索に加えて，脊髄前根及び末梢神経を2.5%グルタール固定後，エポンブロック作成，0.5μ 切片をトルイジンブルーで染色し，デジタイザーとパーソナルコンピューターで短径を計測しヒストグラムを作成した．一部については，有髄線維直径に対する髄鞘の内径の比すなわち G-ratio を計測した．更に各前根横断面総 endoneurial area の面積を計測した．筋組織については凍結切片で通常の組織化学的検索を行った．

結　果

まず，ED 例の筋病理所見で，支配神経として C_7 成分が関与している上腕三頭筋について述べると，H-E染色で正常大線維と萎縮線維よりなる中等度の大小不同を認める．萎縮線維は小角化線維の散在と小数の PNC が認められる．間質に軽度の脂肪浸潤と線維化を認め，また小数の再生線維と横断面円形化を呈する線維も認められる．ただし，明瞭な壊死線維，炎症細胞浸潤は認めない．ATPase 活性像にて小規模な fiber type grouping が認められる（図1 a，1 b）．支配神経として L_3 成分が関与する大腿直筋では，筋線維直径に軽度の大小不同を認め，その内訳は小群集萎縮と小角化線維の散在と思われる．また，間質に軽度ないし中等度の線維化と脂肪浸潤を認め，非萎縮線維で横断面円形化が認められ，病理組織学的にも神経原性変化と筋原性変化の混在が示唆される（図1 c，1 d）．短腓骨筋では，間質の脂肪浸潤や線維化は殆ど認められず，小角化線維の散在及び一部群集が認められ，更に明らかな fiber type grouping が認められる．この筋では筋原性変化の所見に乏しく，神経原性変化が中心と考えられる（図1 e，1 f）．拇指球筋では大小不同が認められるが，萎縮線維も直径30μ までで高度の萎縮線維

＊東京都立神経病院
＊＊東京都立神経病院神経内科
＊＊＊東京都立神経病院検査科病理

はなく，小角化線維も認められず，多くの線維は横断面円形化を呈している．又，ATPase 活性像では，type 1 atrophy が明瞭に認められる（図1 g，1 h）．傍脊柱筋を凸側と凹側で採取し観察したが両方とも変化がきわめて強く，殆ど脂肪組織と線維性結合織により置換されている．以上，観察

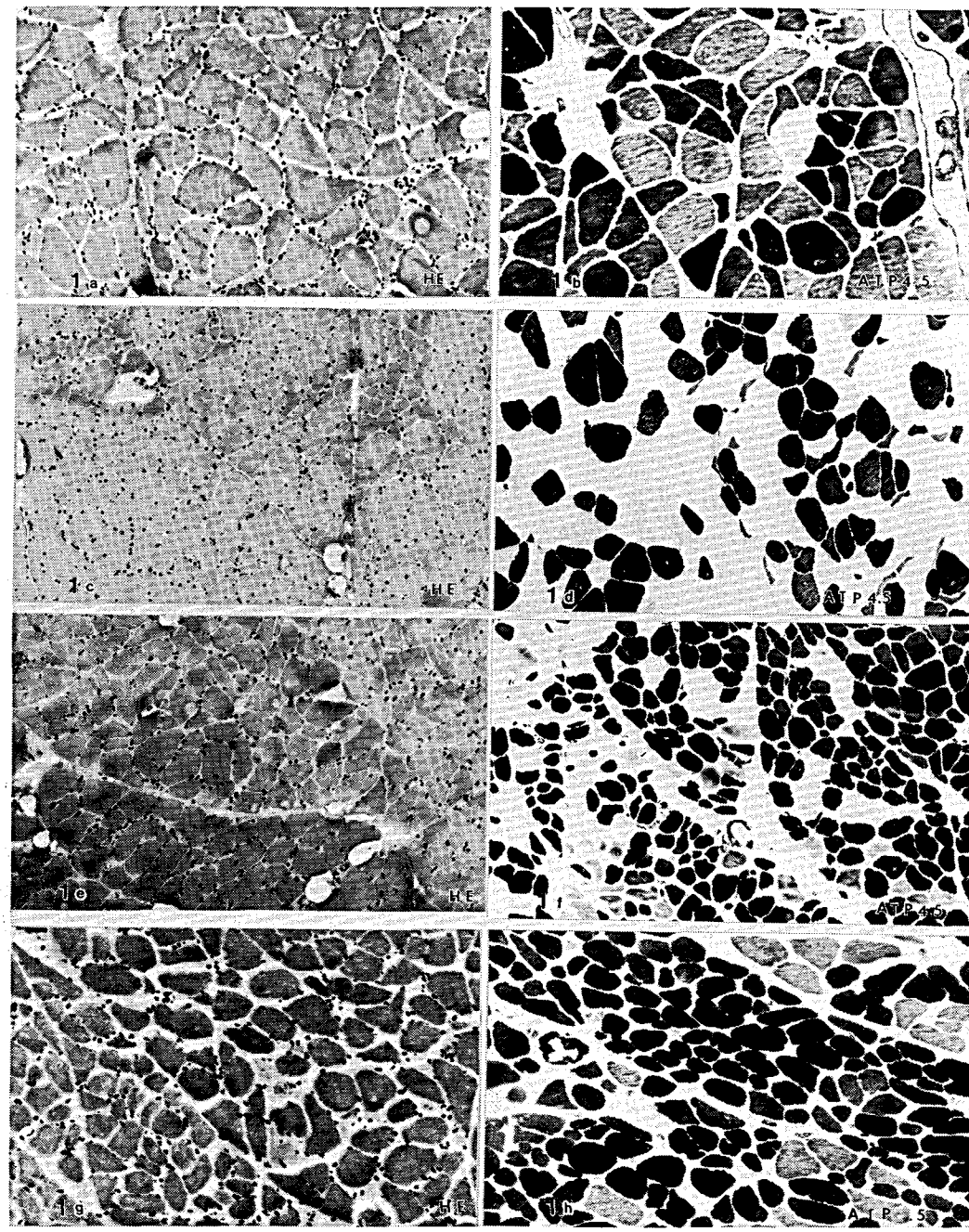


図1

した範囲では筋組織の変化は傍脊柱筋に最も強く，大腿直筋・上腕三頭筋・上腕二頭筋で中等度であり，拇指球筋・短腓骨筋等の遠位筋では比較的軽度であった．なお，変化の内容を質的に見ると，傍脊柱筋では変化高度のため判定不能，上腕三頭筋・上腕二頭筋・大腿直筋では神経原性変化と筋原性変化の混在，遠位筋では短腓骨筋と拇指球筋で異なり，短腓骨筋は殆ど神経原性変化，拇指球筋はいわゆる筋原性変化で横断面円形化と type 1 atrophy が中心で従来 Emery-Dreifuss 症に典型的と言われた[5]所見を呈していた．

C_7 前根で，myelin ovoid や myelin の極度に非薄化した線維も見あたらない（図2 a）．有髄神経密度は5214/mm² で対照例と差はないが，ヒストグラムでは 9 μ から12μ の大径有髄線維が減少し，4 ないし 7 μ の中径の線維が相対的に増加して，正常例の様な二峰性分布パターンは消失し，6 μ 付近にピークを有する一峰性パターンとなり，明らかに対照症例とは異なる（図2 b）．Th_2 前根では，交感神経節前線維が出るため，小径線維が非常に多い．この部位の大径有髄線維は肋間筋や傍脊柱筋を支配すると考えられる．この分節でも，meylin ovoid や cluster は認められないが，9 μ 以上の大径線維が観察されない（図2 c）．ヒストグラムでも大径線維が相対的に減少している傾向が示唆された（図2 d）．L_3 前根のヒストグラムでは対照例のパターンに近く，C_7 前根や Th_2 前根に比して変化が軽度であると思われた（図2 e, f）．

参考のため球麻痺症状が強く四肢の筋萎縮は比較的軽度であった ALS 例の C_7 前根を観察すると，明らかに有髄神経密度が低下し，大径有髄神経が殆ど消失し，残存する神経も myelin の非薄化した線維や逆に線維直径に比して axon の直径の少ない axonal atrophy を呈する線維が多い。ただし，明らかな cluster や myelin ovoid と思われる異常は観察した範囲では少なかった（図2 g）．ヒストグラムでも，有髄神経密度の軽度の減少と大径有髄神経の減少と中径線維の増加が認められ正常の二峰性分布は消失し，5 μ 付近を頂点とする一峰性分布を呈した（図2 h）．

G-ratio の正常値は0.6±0.1とされ，対照群ではほぼその範囲に納まるが，Emery-Dreifuss 例で G-ratio が正常範囲より高い，すなわち髄鞘の菲薄化した線維と逆に G-ratio の低いすなわち axonal atrophy を示す線維が幾分増加している．ALS 例ではこれらの異常線維の出現頻度が更に高い傾向にあった（図3）．

また，本症例の脊髄前角の観察では，一般病理形態異常は指摘できなかった．ただし，morphometric study は今後の課題である．

考　　察

Emery-Dreifuss の剖検例で骨格筋の病理組織像は，①変化が高度で筋組織全体が脂肪織と結合織に置換され，筋原性変化なのか神経原性変化なのか不明な筋，②神経原性変化の強い筋，③筋原性変化の強い筋，④神経原性変化と筋原性変化がほぼ同等に認められる筋組織があったが，検索した範囲で正常像を呈したものはなかった．

前根の病理形態的観察では，明らかな脱髄像や再生像は見られないが，ヒストグラムでは大径有髄の相対的減少と中径線維の増加を認める．原らの報告で脊髄前根は正常だと結論付けているが，そのヒストグラムをみると筆者等のヒストグラム同様，対照と比べて大径のピークが 2 μ 程度左方偏位を示しており，その結論には若干の疑問が残る．脊髄前角の病理形態的観察では明らかな異常は認めない．四肢の筋萎縮が軽度の ALS の観察で，やはり大径有髄神経の相対的減少が認められ，Emery-Dreifuss 例の前根の障害様式に似ていると思えた．G-ratio の測定からも axonal atrophy と髄鞘の菲薄化の両要素が認められ，ALS 例の前根の観察結果と一致する．これらのことから，Emery-Dreifuss での前根大径線維の減少の原因として，前角障害による dyingback 的 process を想定した．

一部の Duchenne 型筋ジストロフィや筋緊張性筋ジストロフィの報告では，脊髄前角細胞の数的減少や大きさの減少が指摘され[6),7)]，その神経の標的臓器がなくなったための一種の disuse atrophy によるものと論じられているが，Emery-Dreifuss

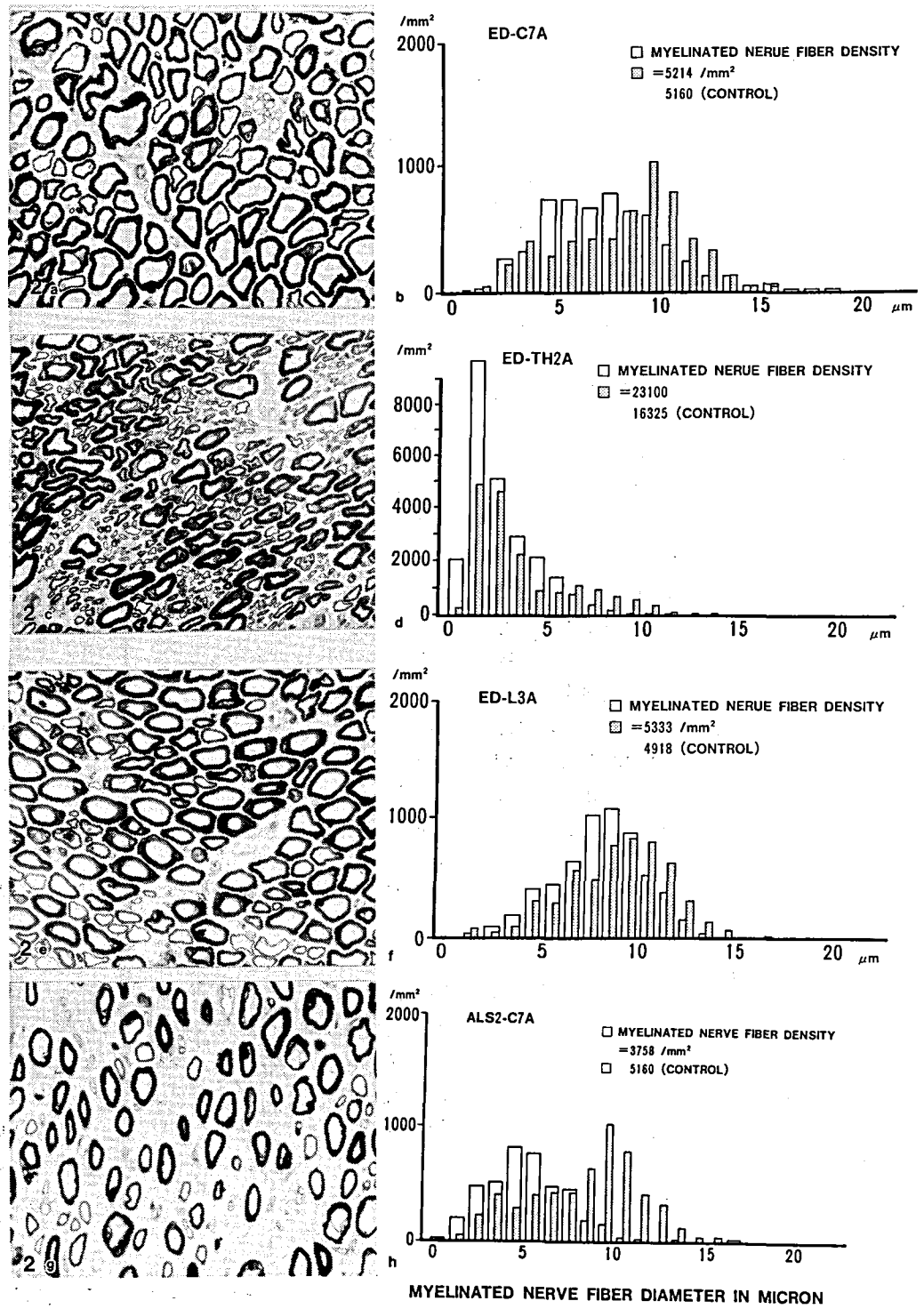

/mm²
ED-C7A
MYELINATED NERUE FIBER DENSITY
=5214 /mm²
5160 (CONTROL)
2000
1000
0
b
0
5
10
15
20
μm
/mm²
ED-TH2A
MYELINATED NERUE FIBER DENSITY
=23100
16325 (CONTROL)
8000
6000
4000
2000
0
d
0
5
10
15
20
μm
/mm²
ED-L3A
MYELINATED NERUE FIBER DENSITY
=5333 /mm²
4918 (CONTROL)
2000
1000
0
f
0
5
10
15
20
μm
/mm²
ALS2-C7A
MYELINATED NERVE FIBER DENSITY
=3758 /mm²
5160 (CONTROL)
2000
1000
0
h
0
5
10
15
20
MYELINATED NERVE FIBER DIAMETER IN MICRON

図2

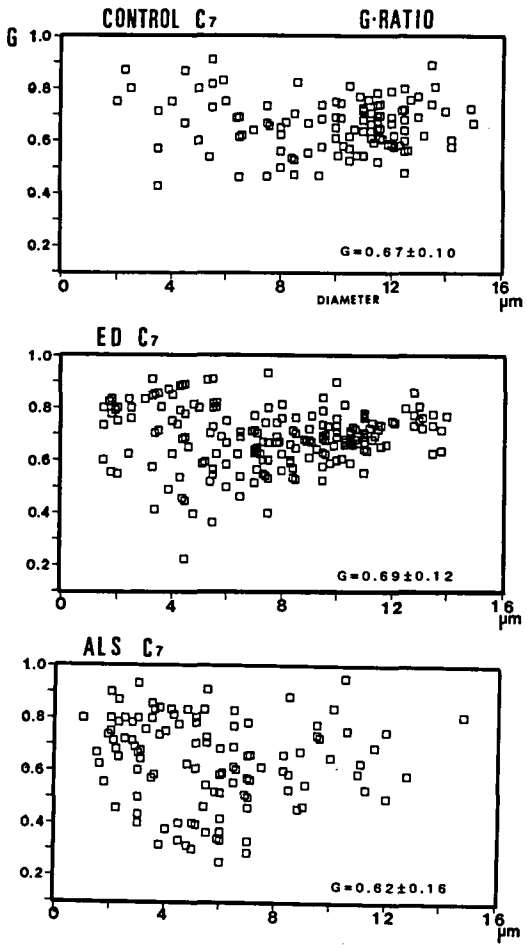


図3

例では筋電図的にも明瞭な神経原性変化の要素を捉えていることから，本質的に神経原性変化と筋原性変化の共存であると考えられた．

結　論

Emery-Dreifussの1例で，筋電図的，筋病理組織学的に神経原性変化と筋原性変化の混在を認めた．その例において，脊髄前根で大径有髄線維の軽度の減少を確認した．

文　献

1) Rowland LP, Fetel M et al: Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Ann Neurol 5: 111—117, 1979.
2) Hara H, Nagara H et al: Emery-Dreifuss muscular dystrophy ——An autpsy case. J Neurol Sci 79: 23—31, 1987.
3) 工藤秀明，谷野定之他：Emery-Dreifuss型筋萎縮症（性染色体劣性遺伝，心筋症を伴う肩甲下腿型筋萎縮症）における脊髄病変．脳と発達 14：363—369, 1982.
4) Takamoto K, Hirose K et al: A genetic variation of Emery-Dreifuss disease. Muscular dystrophy with humeropelvic distribution, early joint contructure, and parmanent atrial paralysis. Arch Neurol 41: 1292—1293, 1984.
5) Hopkin LC, Jackson YA et al: Emery-Dreifuss humeroperoneal muscular dystrophy : An X-linked myopathy with unusual contractures and bradycardia. Ann Neurol 10: 230—237, 1981.
6) Tomlinson BE, Walton J N et al: Spinal cord limb motor neurones in muscular dystrophy. J Neurol Sci 22: 305—327, 1974.
7) Walton J N, Irving D et al: Spinal cord limb motor neurons in dystrophia myotonica. J Neurol Sci 34: 199—211, 1977.

2）常染色体劣性遠位型筋ジストロフィーの骨格筋CT像

栗原照幸*

研究協力者　吉村牧子*　根本　博*
高宮清之*　木下真男*

常染色体性劣性遠位型筋ジストロフィー(三好)は若年成人に発症し，下肢筋を主に障害する遠位型ミオパチーでその筋障害様式は下腿屈筋群が障害されやすいという特徴があり[1]，これは病初期より臨床症状や骨格筋CTで下腿屈筋群のdensityの低下として認められている．

今回我々は，生検筋標本でragged red fiber様所見やtype 1 predominanceを認めミトコンドリアミオパチーも疑われたが，臨床像および骨格筋CTにて診断しえた症例を経験したので，同胞の検索も含め報告する．

症　例

症例1：29歳，男性，教師

主訴：歩行障害

既往歴：特になし

家族歴：父方曽祖父と母方祖母が兄妹という血族結婚で，同胞3人のうち長姉も発症し，双胎の次姉にも高CK血症を認める（図1）．

現病歴：出生，運動発達歴は正常であった．18歳頃に運動後，つま先立ちができないことに気づく．近医整形外科を受診するも原因不明だった．徐々に進行し歩行時に下肢に力が入りにくく，走るのが遅くなり，26～27歳頃よりしゃがみ立ちにも不自由を感じるようになってきた．経過中，上肢の脱力は自覚していない．29歳時，精査目的にて当科入院となった．

入院時現症：身長171.5cm，体重64kg，一般内科学的には異常を認めない．

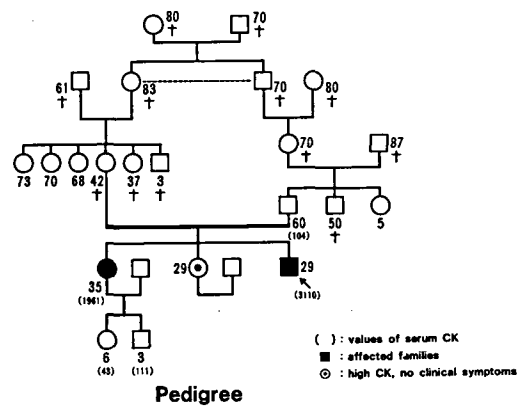


図1　家系図

神経学的には高次機能，脳神経系，知覚系に異常なく，深部腱反射正常，小脳症状も認められなかった．運動系では，筋力検査で腓腹筋4/5，大腿屈筋群4/5，大腿四頭筋4＋/5，腸腰筋4＋/5と軽度の低下を認める以外正常，Gowers' sign(＋)，かかと立ちはできるがつま先立ちはできなかった．また下腿屈側優位に筋萎縮が下肢遠位部に認められた（図2）．

入院時検査所見：末梢血，尿，便異常なし．血液生化学では，TP 6.1g/dl，albumin 3.4g/dl，GOT 51U，GPT 63U，LDH 352U，BUN 13mg/dl，creatinin 0.7mg/dl，UA 8.7mg/dl，T-chol 122 mg/dl，FBS 85mg/dl，血清CKは3110Uと高度上昇（MM76%，MB 6%，Alb 0%，BB 1%，Bandl 17%），血清myoglobin 500ng/dl以上，aldolase55.6U/Lと上昇，安静時血清pyruvateは1.11mg/dlと正常上限，lactateは11.9mg/dlと正常であった．CRP(－)，抗核抗体(－)，75g

＊東邦大学医学部第四内科

図2　症例1の下肢像（前・後）
大腿下1/3から腓腹筋に著しい筋萎縮を認める．

OGTT 正常パターン，前腕阻血下運動負荷試験，エルゴメーター運動負荷試験では，lactate, pyruvate は正常反応を示した．胸部レ線，心電図異常なし．針筋電図では大腿屈筋群，下腿伸，屈筋，傍脊柱筋に short duration, low voltage の筋原性変化を認め，一部 fibrillation の混入を認めた．神経伝導速度は正常だった．

筋病理所見：左大腿四頭筋より施行．H-E 染色では筋線維大小不同，中心核の増加に加え，opaque fiber も散見された．壊死線維，再生線維も散在していたが，vacuolation は認められなかった．NADH 染色で内部構築の乱れはない．Gomori-Trichrome 染色では ragged red fiber 様所見が1％以下に認められたが，電顕ではミトコンドリアの集積をみたがクリステ等の微細構造に異常なかった．また cytochrome C oxidase (CCO) 染色でも酵素欠損を示唆する所見はなかった．PAS 染色では陽性物質は認められず，電顕でも glycogen の蓄積はなかった．ATPase 染色では約66％に type 1 predominance を認めたが，他の神経原性変化は認められなかった．

骨格筋 CT 像：頸部，上腕の筋群は異常なく，paraspinal muscle には外側にごく軽度の低吸収域を認めた．臀筋は異常ない．大腿では大腿屈筋群に低吸収域，萎縮を認める他，大腿四頭筋にも軽度の変化を認め，縫工筋，薄筋はやや肥大傾向を認めた．下腿では腓腹筋，ヒラメ筋に著しい低吸収域を認めたが伸筋群はよく保たれていた．その変化は特にヒラメ筋で顕著であった（図3）．

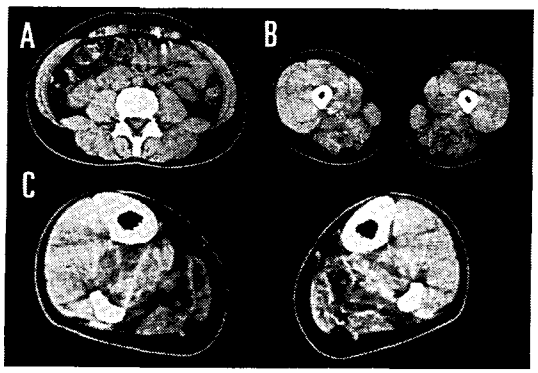


図3　症例1の骨格筋CT像
A：L_3レベル
B：大腿最大径のレベル
C：下腿最大径のレベル

症例2：35歳，女性，主婦

主訴：階段昇降困難

既往歴：特になし

家族歴：症例1の姉

現病歴：18歳頃運動後につま先立ちができないのに気づいた．最初は1週間位で再びつま先立ちが可能となったが，徐々に症状が持続するようになる．その後お尻をつき出して歩くようになり，29歳頃より走ることができなくなった．時々膝関節がカクンと力がぬけることがあった．32歳頃より階段昇降に不自由を感じるようになり，特に降りる時にかかとから先に足をつくようになってきた．しゃがみ立ちも不便となったが，両上肢は日常生活で不自由はない．

初診時現症：体格中等度，一般内科学的には異常はない．

神経学的には高次機能，脳神経系異常なく，深部腱反射正常，知覚障害はない．小脳症状も認められなかった．運動系では，筋力検査で腓腹筋4/5，大腿四頭筋4/5，腸腰筋3/5と低下していた．それに加え，頸部屈筋4/5，三角筋4/5，握力(右)14.5kg，(左)10.5kgと上肢，頸部筋群も軽度低下していた．Gowers' sign(+)，かかと立ちはできるがつま先立ちはできなかった．また，大腿遠位部から下腿特に腓腹筋に明らかな筋萎縮を認めた(図4)．

検査所見：末梢血，尿検では異常ない．血液生化学では，TP 7.5g/dl, albumin 4.2g/dl, GOT 34 U, GPT 51U, LDH 556U, BUN 13mg/dl, T-chol 164mg/dl, BS 99mg/dl, 血清CKは1961Uと上昇(MM99%，MB 1%，Alb 0%，BB 0%)，血清myoglobin 1450ng/ml，aldolase 39.6U/mlと上昇していた．

骨格筋CT像：Paraspinal muscleの最外側の腰肋筋に明らかな低吸収域，萎縮が認められ臀筋群にも小低吸収域が散在していた．大腿では大腿四頭筋の変化が目立ち，屈筋群に比し低吸収域，萎縮が強かった．下腿では腓腹筋，ヒラメ筋に著しい低吸収域，萎縮を認めるが伸筋群はよく保たれていて，右下腿の腓骨筋に軽度の変化を見るのみであった．症例1と同様ヒラメ筋の変化の方が腓腹筋より顕著であった(図5)．

考　　案

症例1，2ともに18歳頃につま先立ちができないことで発症し，脱力は徐々に腰帯筋まで進行してきた．遠位型筋萎縮にしては高度の血清CK値上昇を認めた．家族歴は常染色体劣性遺伝形式をとっている．症例1で施行した筋生検で，筋線維大小不同，中心核の増加，壊死及び再生線維の散在といったdystrophic changeの他にragged red fiber様の所見を認めたことより，mitochondrial myopathyも考慮されたが，1%以下であり電顕でも明らかなミトコンドリアの異常は検出されず，CCO染色でも酵素欠損を示唆する所見はなかった．またglycogen debrancher enzymeの欠損でも成人型でdistal優位のmyopathyをきたす[2]が，PAS，電顕にてもglycogenの蓄積はなく，阻血下負荷試験の結果からも否定的であった．

常染色体劣性遠位型ジストロフィーの骨格筋CT像は，①下腿屈筋群が高度に侵され，伸筋群が保たれる．②大腿では屈筋，内転筋群とともに大腿四頭筋も障害されやすい．③縫工筋，薄筋，長内転筋，大腿二頭筋，半膜様筋，大腿屈筋の一部分が肥大し，高吸収域となる，④paraspinal muscleでは進行例で外側から内側へ侵される，⑤臀では小臀筋に限局性の低吸収域を初期より認める，といった特徴が示されており[3]，今回の2例も

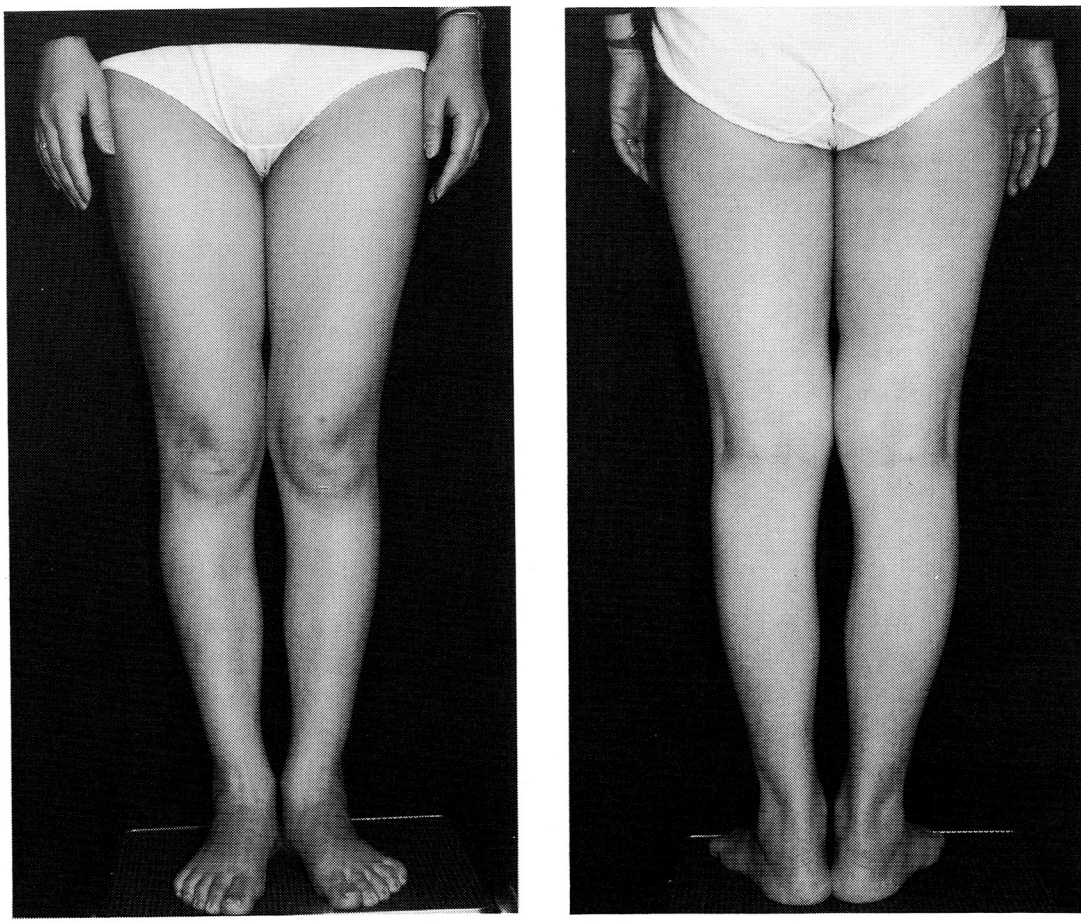


図4　症例2の下肢像（前・後）
大腿下1/3から腓腹筋に著しい筋萎縮を認める．

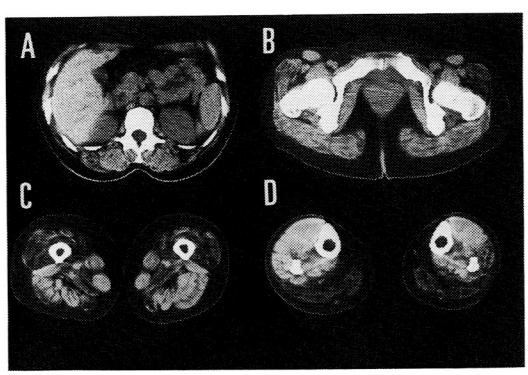


図5　症例2の骨格筋CT像
A：L_1レベル
B：恥骨結合上のレベル
C：大腿最大径のレベル
D：下腿最大径のレベル

ほぼそれに見合った所見であり，以上より症例1，2を常染色体劣性遠位型筋ジストロフィーと診断した．特に症例1，2ともに腓腹筋の変化よりもヒラメ筋の変化の方が著明であったことが注目された．また，症例1では筋生検でtype 1 predominanceを約66%に認めており，主にtype 1 fiberより成るヒラメ筋の変化が著しかったCT所見との関連に興味がもたれた．従来の報告例では剖検例も含めいずれも進行例での検索が多く，ごく初期には腓腹筋よりヒラメ筋の障害の方が先行する可能性がある．実際に症例1では徒手筋力テストでは大腿，下腿屈筋群の筋力は4/5～4+/5と比較的保たれているにもかかわらず，つま先立ちやしゃがみ立ちができなかった．このようなと

ころにヒラメ筋の筋力低下が反映されていると考えられる．

ところで，本疾患のしゃがみ立ちについて福田らは他の筋ジストロフィーとは異なり，足首を支え手を膝につかずに前へ体重をかけて立ち上がることに注目している[4]．つまり本疾患では腰帯筋の筋力は割合保たれているにもかかわらず下腿屈筋群，特にヒラメ筋の脱力と萎縮が初期よりみられるため“Gowers' sign”も他のmyopathyと異なっていると考えられる．このような筋萎縮の分布が骨格筋CTによって明らかにされ，診断上も有用であった．

まとめ

1）常染色体劣性遠位型筋ジストロフィー症（三好）の一家系2症例を報告した．

2）本疾患の診断には次の5項目が大切である．

①18歳位から下腿屈筋群の脱力より始まってつま先立ちができないという病歴を有すること．

②常染色体劣性の遺伝歴．

③CKがdistal myopathyであるのに高値を示す．

④CTが筋萎縮の分布を示し診断上有用である．

⑤筋生検でmyopathyはあるがrimmed vacuoleがなく，glycogenの蓄積がないこと．

文献

1) Miyoshi K et al: Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. Brain 109: 31, 1986.

2) 納 光弘ら：Debrancher deficiency myopathy-inclusion body myositisあるいはrimmed vacuoleを伴ったdistal myopathyとの関連．“筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究”（三好班），昭和57年度研究報告書，1983，p255.

3) 水沢英洋ら：常染色体劣性遠位型筋ジストロフィーにおける骨格筋障害様式：臨床的ならびにCTによる検討．臨床神経27：177，1987.

4) 福田恵一ら：三好型末梢型筋ジストロフィーにみられた特徴的なしゃがみ立ち．神経内科24：201，1986.

3）筋緊張性ジストロフィーにおける筋萎縮分布
——CTによる検討——

塚越　廣*

研究協力者　小田嶋　奈津**　松永高志**　古川哲雄*

はじめに

筋緊張性ジストロフィー（以下MDと略す）におけるCT上の全身の筋萎縮分布については，Bulckeら[1]が12症例で計20スキャンを検討したのみである．また先天性筋緊張性ジストロフィー（以下CMDと略す）の筋CT所見の報告は未だない．CMDを含めMDの全身の筋萎縮分布について検討したので報告する．

対象および方法

対象はMD 8例（32～56歳，男性3例，女性5例）と生下時からの精神発達遅滞を主訴に受診し，ミオトニア現象を認め，母親をMDと診断した（1例は既に死亡しており，診察できなかった）CMD 3例（18～31歳，男性2例，女性1例）の計11例である．

方法はGE社製CT9800を用い，①下顎中央部，②第4，5頸椎間の椎間板，③気管分岐部下縁，④第3腰椎の椎体中央，⑤恥骨結合上縁より2～3 cm上方，⑥大腿中央部および⑦下腿の最大径部の7レベルで横断撮影した．撮影条件は120 kVp, 140mA, スライス幅10mm, スキャン時間3秒に設定した．

下肢運動機能障害の軽い順にstage 1（支え無しに階段昇降可能），stage 2（階段昇降に手すりを要す），stage 3（椅子から立ち上がりが支えなしに可能），stage 4（椅子からの立ち上がりに支えを要し，独立歩行可能），stage 5（支え立ちは可能だが，歩行不能）に分類した．またCT上の各筋を図1の様に分類し，筋萎縮の強さを3段階に分け比較した．

また1例では33歳と38歳時の下肢CTを比較した．

結　果

筋萎縮の画像上の変化は，①筋内部への低吸収域の浸潤と②筋面積の縮小である．これに対し筋肥大は，①筋面積の増大と②高吸収域で示された．下肢機能障害の順に筋萎縮分布を図2と図3に示した．MD, CMDとも筋萎縮分布に明らかな違いを認めなかったため，両者を一緒に検討した．このうち症例1，2，9，10の4例は異常を自覚していなかった．

下顎部では咬筋と内側翼突筋の筋断面積の縮小を，下肢筋萎縮を認めない例（症例9）も含め全例に認めた．

頸部では胸鎖乳突筋の著明な萎縮を全例で認めた．脊柱直立筋および板状筋と横突棘筋の萎縮を10/11例で認め，程度は直立筋の方が強い萎縮を示した（図4）．後頸筋のうち僧帽筋と肩甲挙筋は障害を受けにくく，他の頸筋が萎縮した例では肩甲挙筋の肥大傾向を示した（図4）．最終的には頸筋全体が脂肪に置き換えられた（図4）．

肩甲部では筋萎縮を傍脊柱筋10/11例で認め，さらに大胸筋6/11例，肩甲骨周囲筋である棘下筋と肩甲下筋4/11例に認めた（図4）．

腰腹部では下肢筋萎縮をみないCMDの1例（症例9）で腹筋および傍脊柱筋の肥大を認めたが，残りの全例では腹筋と傍脊柱筋の萎縮を認めた．腹筋の中では特に腹直筋の萎縮が強く，4例で脂肪に置き換わっていた．腸腰筋のみは障害を

＊東京医科歯科大学医学部神経内科
＊＊埼玉県障害者リハビリテーションセンター内科

受けず，傍脊柱筋が高度に萎縮した2例では肥大傾向を示した（図4）.

傍脊柱筋萎縮程度のレベルによる違いは，頸部の方が強いもの，腰部の方が強いもの，レベルによる差が明らかでないものと種々あり，障害の受け方は一定しなかった（図4）.

臀部では大臀筋が障害を受けがたく最後まで残る傾向があり，萎縮を小臀筋7/11例，中臀筋5/11例，大臀筋4/11例で認めた.

大腿筋萎縮は大腿四頭筋，特に大腿広筋の萎縮（6/11例）（内側から外側へ）から始まり，次いで大腿内転筋2/11例，半腱様筋2/11例，半膜様筋1/11例，縫工筋2/11例，薄筋2/11例の萎縮をみた．一方肥大を大腿直筋3/11例，内転筋2/11例，二頭筋1/11例，半腱様筋1/11例，縫工筋1/11例，薄筋1/11例で認め，これらの筋肥大を認めた

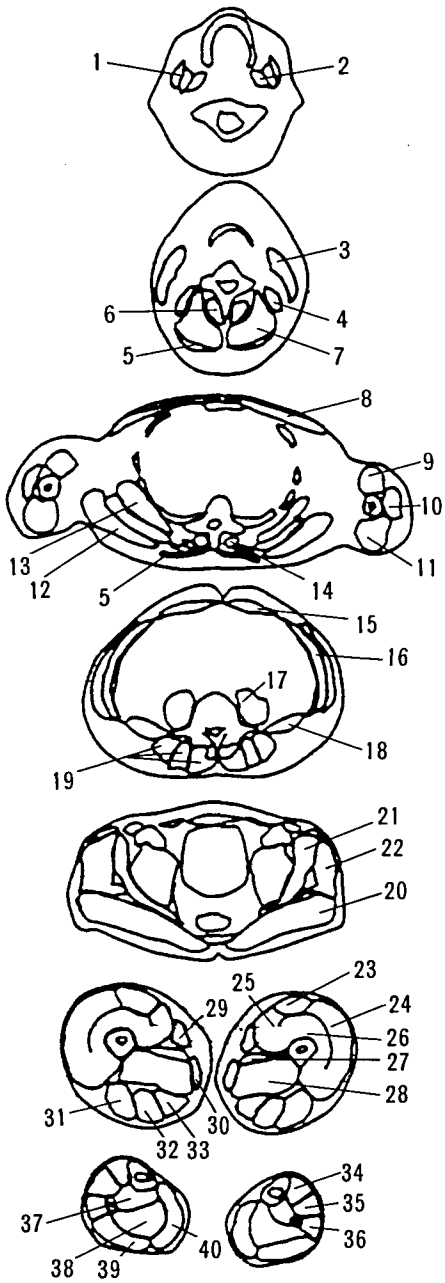
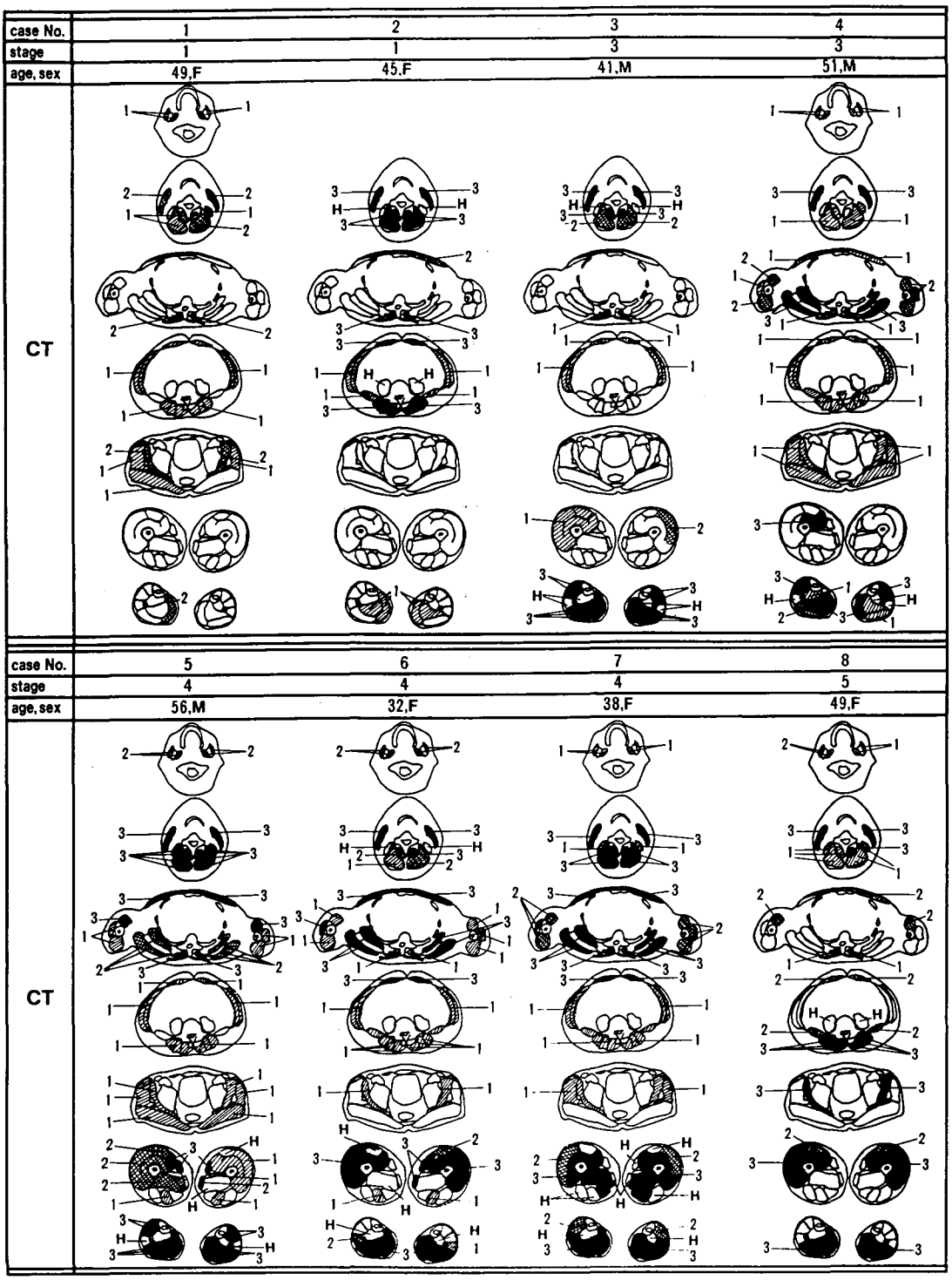


図1　筋CTの模式図
下顎部：1.M. masseter 2.M. pterigoideus medialis 頸部：3.M. sternocleidomastoideus 4.M. levator scapulae 5.M. trapezius 6.M. erector spinae 7.M. splenius, M. transversospinalis 肩甲部：8.M. pectoralis major 9.M.biceps brachii 10.M. deltoideus 11.M. triceps brachii 12.M. infraspinatus 13.M. subscapularis 14.M. erector spinae, M. serratus superior. M. rhomboideus 腹部：15.M. rectus abdominalis 16.M. transversus abdominalis, M. obliquus internus abdominis, M. obliquus externus abdominis 17.M. iliopsoas 18.M. quadratus lumborum 19.Mm. dorsi proprii 臀部：20.M. gluteus maximus 21.M. gluteus mininus 22.M. gluteus medius 大腿：23.M. rectus femoris 24.M. vastus lateralis 25.M. vastus medialis 26.M. vastus intermedius 27.M. adductor longus 28.M. adductor magnus 29.M. sartorius 30.M. gracilis 31.M. biceps femoris 32.M. semitendinosus 33.M. semimembranosus 下腿：34.M. tibialis anterior 35.M. extensor digitorum longus, M. extensor hallucis longus 36.M. peroneus 37.M. tibialis posterior 38.M. soleus 39.M. gastrocnemius, caput laterale 40.M. gastrocnemius, caput mediale



1▨:mild atrophy, 2▩:moderate atrophy, 3■:severe atrophy, H:hypertrophy

図2　筋緊張性ジストロフィーの筋CT所見

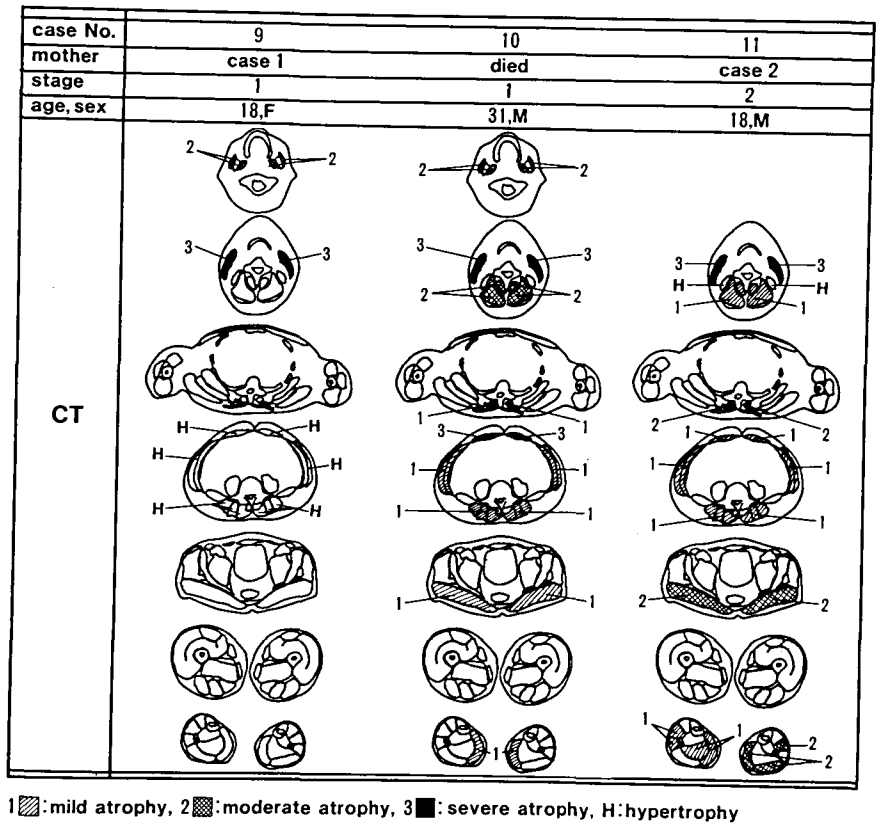


図3　先天性筋緊張性ジストロフィーの筋CT所見

のは，他の大腿筋萎縮が進行した3例であった．

下腿筋萎縮は腓腹筋内側頭（10/11例）から始まり，ヒラメ筋8/11例，腓腹筋外側頭7/11例，前脛骨筋4/11例，長指伸筋と長母指伸筋5/11例，腓骨筋3/11例，後脛骨筋1/11例の萎縮を認めた．特に後2者は障害を受けにくく，腓骨筋3/11例と後脛骨筋4/11例で肥大を認めた．この筋肥大の混在は大腿同様他の下腿筋萎縮が強いにもかかわらず独歩可能な例で認められ，筋萎縮の軽い例や，歩行不能例では認められなかった．

大腿と下腿の比較では，下腿のみに病変が限局しているものは4例あり，下肢筋萎縮は遠位筋優位を示した．

以上の変化は左右ほぼ対称的であった．また下肢障害度で分類したstageの進行とともに，CT上の下肢筋萎縮も強くなっていた．頸部および軀幹の筋萎縮の程度と下肢筋萎縮とは必ずしも並行しなかった．

経過を追跡しえた症例7の33歳時（stage 2）と35歳時（stage 4）の比較では，下腿では後腓骨筋のみを残し，大腿では大腿直筋，二頭筋，半腱様筋，縫工筋および薄筋を残し筋萎縮が進行した．残された筋の大部分は肥大傾向を示した（図5）．臨床症状の進行とともに，筋CTも明らかな変化を認めた．

考　　察

MDのCT上の筋萎縮分布について，Bulckeら[1]は胸鎖乳突筋，傍脊柱筋，腹筋，下肢遠位筋優位の萎縮を特徴として挙げた．これらの特徴は本研究でも同様に早期から認められた．本研究ではさらに多くのスキャンを検討した結果，彼らの所

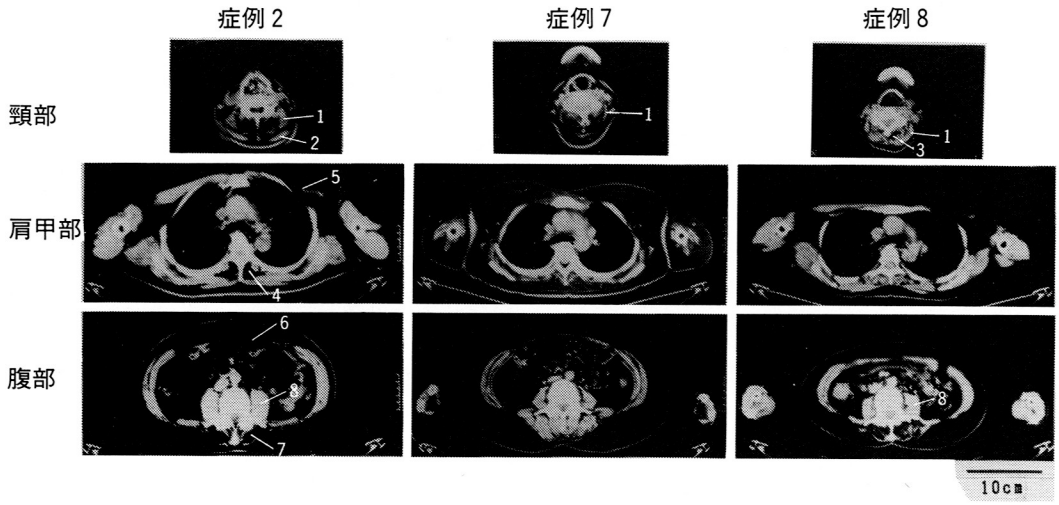


図 4　症例 2，7，8 の頸部，肩甲部，腹部 CT
頸部：症例 2 では肩甲挙筋(1)と僧帽筋(2)のみを残し，ほかの頸部は脂肪に置き換わり，症例 8 に比較して肩甲挙筋は肥大している．症例 7 では肩甲挙筋(1)の痕跡を認めるのみで他は全て脂肪に置き換わっている．症例 8 の後頸筋は直立筋(3)が脂肪に置き換わっている．肩甲部：症例 2 では傍脊柱筋(4)と左大胸筋(5)が脂肪に置き換わり，症例 7 では傍脊柱筋の痕跡を認めるのみで，残りの肩甲骨周囲筋は脂肪に置き換わっている．症例 8 では，左大胸筋の高度萎縮と傍脊柱筋に軽度低吸収域の混在を認める．腹部：症例 2 は腹直筋(6)と傍脊柱筋(7)，症例 7 では腹直筋，症例 8 では傍脊柱筋が脂肪に置き換わり，症例 2 と 8 の腸腰筋(8)は症例 7 に比較して肥大している．

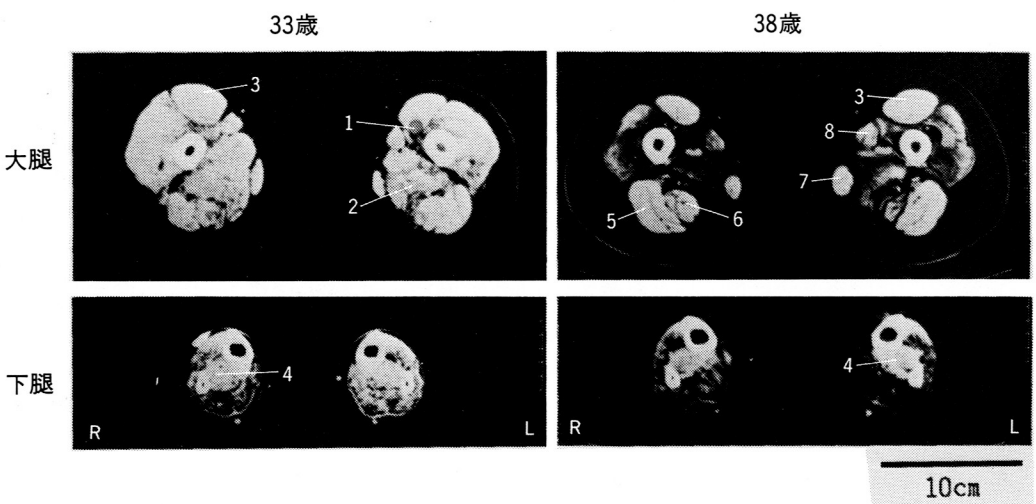


図 5　症例 7 の下肢 CT
33歳時大腿では内側広筋(1)と内転筋(2)に低吸収域の浸潤を認め，大腿直筋(3)のみは高吸収域となり，面積も増大し肥大している．下腿では後脛骨筋(4)のみを残し，前面の筋は中等度萎縮し，後面の筋は高度萎縮し，右に強い．38歳時には大腿では大腿直筋(3)，二頭筋(5)，半腱様筋(6)，薄筋(7)，縫工筋(8)のみを残し，下腿では後脛骨筋(4)のみを残し，他はほとんど脂肪に置き換わっている．これらの残った筋の大部分は33歳時に比較して形が丸くなり，むしろ面積も増大し肥大している．

見に加えて新しい幾つかの知見を得ることができた．

従来MDの咬筋萎縮についてCT上の検討はないが，本研究では下肢筋萎縮以前から両側咬筋と内側翼突筋の萎縮を認め，胸鎖乳突筋萎縮に加えて本疾患で早期に出現する重要な所見と考えられた．

MDの下肢筋萎縮は遠位筋優位であり，本研究で認めたCT上の筋萎縮あるいは肥大の分布は従来の報告[1)~7)]とほぼ同様であった．

一方，Bulckeら[1)]はMDの臨床的特徴として，肩甲帯筋と臀筋は障害を受けにくいと報告したが，CTでは検討していない．本研究で臀筋，特に大臀筋は障害を受けにくいことを確認したが，肩甲帯筋と大胸筋は比較的早期から脂肪に置き換わっている例があった．また腹直筋の早期からの高度萎縮もMDに特異的な所見と考えられた．

脊椎レベルによる傍脊柱筋の障害程度については，Bulckeら[1)]は，胸腰部に始まり，次第に頸部へ上行するとし，鷲崎ら[8)]は頸部優位の例も報告した．本研究でも両者があり，一定しないことを確認した．

MDの筋肥大は，腹筋と腰部傍脊柱筋[1)]，また一部下肢筋[1),6)]で報告されている．本研究では大腿と下腿での筋肥大の混在は，周囲の筋萎縮が進行した例でしかも歩行可能な例で認められ，萎縮の軽い例や歩行不能例ではみられなかったこと，また筋萎縮の進行の過程で認められたことから，代償性肥大と考えられた．一方，MDでは肩甲挙筋[1),7),8)]や腸腰筋[1),5)]は障害を受けにくいと記載されているが，本研究でも同様で，むしろ肥大傾向を示した．この両筋の肥大傾向は他の筋疾患では報告されておらず，今後注目していく必要があると考えられた．一方，両側の胸鎖乳突筋と咬筋の萎縮のみを示したCMDの1例で認められた腹筋と傍脊柱筋の肥大は，他の軀幹筋萎縮をみないことから代償性肥大では考えにくい．Bulckeら[1)]も早期のMDの1例で腹筋と傍脊柱筋の肥大を，また高橋ら[10)]は先天性筋緊張症の1例でも両筋の肥大を報告した．これら腹部周囲筋の肥大は筋緊張を有する疾患特有の所見である可能性が考えられた．

また，本研究で認めたMDおよびCMDの筋萎縮分布および強さの障害パターンには個体差があり，下肢筋萎縮と頸部，軀幹の筋萎縮とは必ずしも並行しなかった．

一方，CMDとMDは臨床症状あるいは経過の上で一部違いが報告されているが，本研究ではCT上の筋萎縮分布に明らかな違いを見出せなかった．また自覚症状の無い4例でも筋萎縮を確認でき，CTは筋萎縮の有無を調べるのに有用な方法であった．

ま と め

1）CTは自覚症状のないMDあるいはCMDの筋萎縮を調べるのに有用であった．

2）胸鎖乳突筋の著明な萎縮に加えて，咬筋および内側翼突筋の萎縮も早期に出現した．

3）下肢筋萎縮と頸部，軀幹の筋萎縮とは必ずしも並行しなかった．

文　献

1) Bulcke JAL and Baert AL: Clinical and radiological aspects of myopathies. CT scanning EMG radioscopes. Springer-Verlag, Berlin, 1982.

2) Rickards, D, Isherwood I et al: Computed tomography in Dystrophia Myotonica. Neuroradiology 24: 27, 1982.

3) Serratrice G, Salamon G et al: Resultats scanner x musculare dans 145 cas de maladies neuro-muscularies. Rev Neurol 141: 404, 1985.

4) Calo M, Crisi G et al: CT and the diagnosis of myopathies. Preliminary findings in 42 cases. Neuroradiology 28: 53, 1986.

5) 大石晴二郎，武内透ほか：筋緊張性ジストロフィー症における骨格筋CT所見の検討．第27回日本神経学会総会（プログラム/抄録集）．熊本，1986，p224.

6) 高橋良輔，今井輝国ほか：筋緊張性ジストロフィーの下肢骨格筋CT．CT研究10：73，1988.

7) 川瀬　譲，自見隆弘ほか：筋緊張性ジストロフ

ィー症の骨格筋 CT と ADL. 第26回日本リハビリテーション医学会総会（プログラム/抄録集）. 仙台, 1989, p209.
8) 鷲崎一成, 小島進ほか：筋緊張性ジストロフィー症の傍脊柱筋 CT 所見. 第30回日本神経学会総会（プログラム/抄録集）. 水戸, 1989, p120.
9) Termote J-L, Beart A et al: Computed tomography of the normal pathologic muscular system. Radiology 137: 439, 1980.
10) 高橋良輔, 大竹敏之ほか：先天性筋緊張性にみられた筋肥大の CT 所見. 神経内科29：442, 1988.

4）神経筋疾患におけるUltrasound Imaging
——実画像のデジタル処理——

田　代　邦　雄*

研究協力者　松　浦　　亨*　佐　藤　松　治*
森　若　文　雄*　島　　功　二**

目　　的

前回，神経筋疾患組織標本の固有音響インピーダンス分布をマトリックス変換しシミュレートした画像が臨床超音波画像の形態的特徴をよく反映し，特殊フィルター処理を行うことによって疾患特異性をより強調できる可能性のあることを報告した[1]．今回は画像診断の客観化を行うために以下について検討を加えた．

（A）　超音波画像を安価かつ大量に記録でき，画像処理の元データとして使用に耐えうるデータストレージャーの検討．

（B）　組織像をマトリックス展開しその組織固有音響インピーダンスの分布から実験的に求められた超音波信号ヒストグラムによる神経筋疾患の分離が臨床超音波画像においても有効であるかいなかの検討．

（C）　超音波画像診断を客観化するためのパラメーター抽出の試み．

（A）　データストレージャーの検討

方　　法

超音波診断装置本体は横河RT3600，プローブは5MHzリニア型をもちいた．初期設定はgain 10dB，dynamic range 60dB，focus 20mm，TGC fullと一定にした．アナログ方式では，健常者の右側大腿四頭筋をフリーズした画像のNTSC信号を取り出しスチルビデオプレーヤー，VHSビデオプレーヤー，S-VHSビデオプレーヤーの各記録媒体に収録した．デジタル方式では超音波診断装置からのNTSC信号を8 bit A-Dコンバーターによりデジタル変換し512×512×8 bitのフレームメモリー上に収録した（図1）．

これらの画像を再生し，アナログ方式の場合はさらに512×512×8 bitのデジタル変換を行ってフレームメモリー上にロードし，再現された超音波画像上のグレースケールの濃度断面を得，その直線性を検討することで再現性の評価を行った．

結　　果

再生されたグレースケール輝度信号の直線性を示す模式図をしめす（図2）．縦軸はグレースケールの輝度，横軸はA-D変換後のチャンネル数である．デジタル方式で記録された場合は再生時の信号の歪みはない．アナログ方式ではS-VHS方式が三者中最も良好な再現性をしめした．以下VHS方式，スチルビデオの順に高輝度帯域の再現性が低下し，とくに後者では256階調のうち，低輝度側の1/4程度でしか直線性を得られなかった．

以上述べたように信号の再現性自体はデジタルストレージャーが優れていた．しかし1画面あたりに要する費用は圧倒的に高く，われわれが設定している条件下での実際の超音波画像信号の最高輝度を示す骨の反射でもグレースケール上は最低輝度側から75%程度にしかならないことを考慮すると，S-VHS方式のアナログストレージャーであっても充分利用可能と考えられる結果であった．

（B）　超音波信号ヒストグラムによる神経筋疾患の分離

＊北海道大学医学部神経内科
＊＊国立療養所札幌南病院神経内科

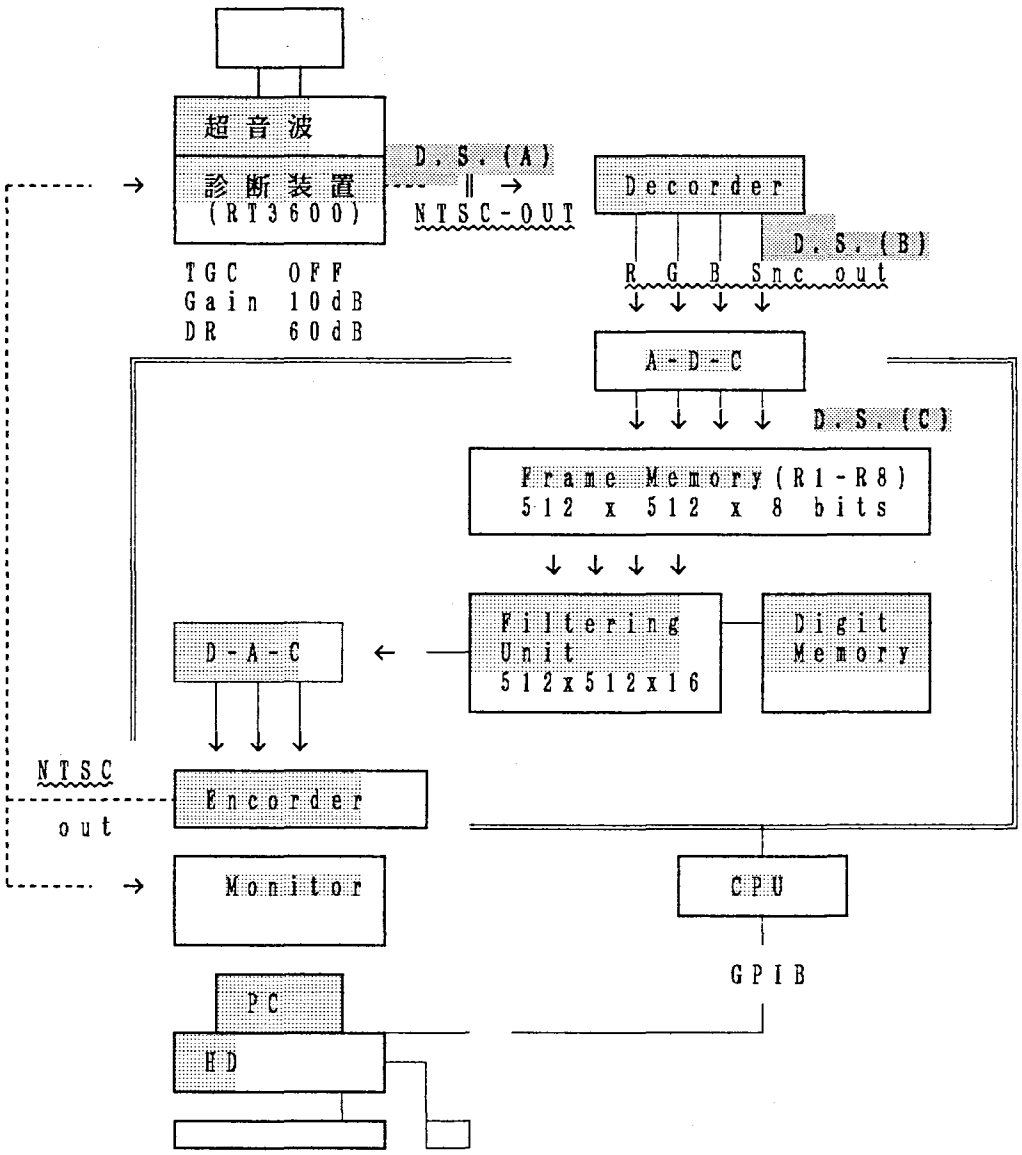


図1　画像収録および処理装置のシステム図

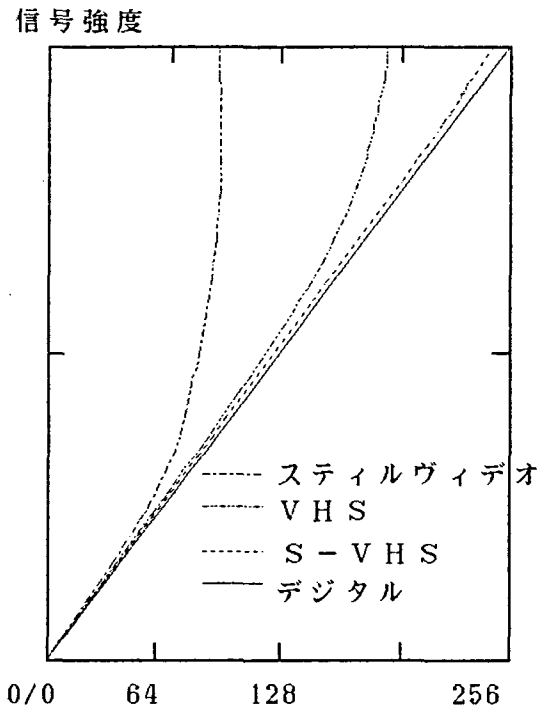


図2　再生されたグレースケール輝度信号の直線性．縦軸はグレースケールの輝度，横軸はA-D変換後のチャンネル数．デジタル方式では再生時の信号の歪みはない．アナログ方式ではS-VHS, VHS, スチルビデオの順に高輝度帯域の再現性が低下した．

方　法

(A)の結果からS-VHSビデオテープを記録媒体とし，超音波診断装置の初期設定も(A)に準じた．健常者および各疾患患者の右側大腿四頭筋・近位1/3部水平断像を同一画面に収録し，再生NTSC信号を8 bit A-Dコンバーターを介して512×512×8 bitフレームメモリー上に展開し，再現された大腿直筋・中間広筋に関心領域を設定して検索の対象部位とし，関心領域内の輝度信号ヒストグラムを算出し，各疾患別に検討した．

結　果

関心領域内の輝度信号ヒストグラムを図3の最左列に示す．上段の健常者では正常な筋組織を示す0 channel（もっとも輝度信号の低い帯域）にpeakを形成し，正常筋膜に由来すると考えられる64 channel未満までの裾野を伴った．多発性筋炎ではpeakは50～60channelにシフトし，K-WおよびLGD群においては100 channel前後にmain peak，50 channel付近にsub peakを形成した．ALSではpeakは100 channel付近に認められた．

今回，上記の各疾患と同様な条件での検討ができなかったドウシェンヌ型筋ジストロフィーでは，デジタル記録された画像をもちいてヒストグラム処理を行ったがそのpeakはさらに高輝度帯域にシフトし，生検組織をもちいたシミュレーションの結果と同様に疾患群の分離が可能であった．

(C)　パラメーター抽出の試み

方　法

(B)で設定した関心領域内を図4にしめす5種類の3×3 matrixデジタルフィルタをもちいてフレームメモリー上で走査して境界強調画像を得るとともに，関心領域内の輝度信号ヒストグラムを求めた．

結　果

各疾患の実画像はデジタルフィルタリング処理を行うことで形態的には特徴が強調された．とくに神経原性変化を呈する場合はそのlaminar structureが顕著となった．スペースの関係で，処理画像の例として健常者（図5A）およびK-W症例（図5B）を示す．

一方，境界強調処理後の関心領域内輝度信号ヒストグラムはRoberts' filterでミオパチーの要素を持つ疾患群のpeakが低輝度側にシフトし強調された程度であった（図3）．

結　論

疾患の診断を客観化するために画像処理を試みる場合，原画像をいかに忠実に記録・再生できるかが重要であるとともにその経済性も無視できない．実際に利用するシステムは解析に必要な信号帯域の再現性がよく保たれかつできるだけ安価であることが望まれる．デジタルストレージャーは長所として画像の再現性に優れているが膨大な情

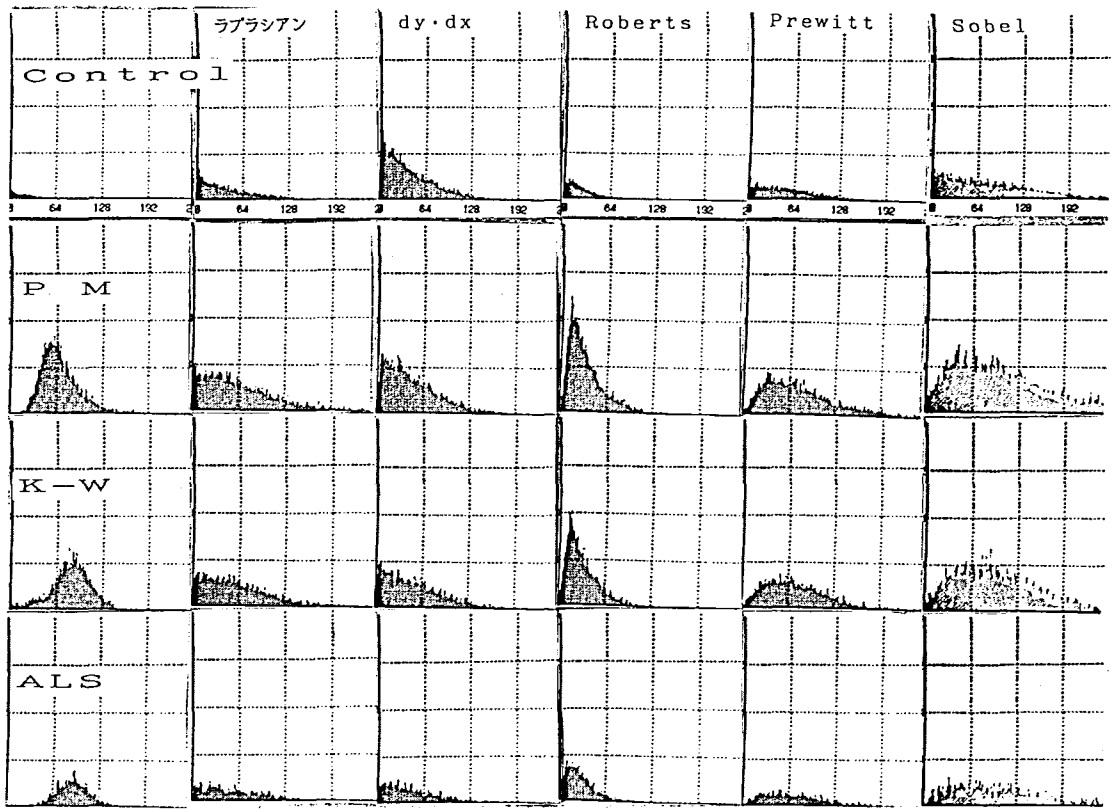


図3　関心領域内の輝度信号ヒストグラムとデジタル処理後のヒストグラム．処理前，健常者では正常な筋組織を示す0 channel に peak を形成した．多発性筋炎では50～60，K-W および LGD 群では100前後に main peak，50channel 付近に sub peak を形成した．ALS では peak は100channel 付近に認められた（最左列）．処理後は Roberts' filter でミオパチーの要素を持つ疾患群の peak が低輝度側にシフトし強調された程度であった．

報量（一画面512×512×8 bit×3として786,432 k byte）をもち画像蓄積のための費用があまりにも大きい．一方，アナログストレージャーの特徴は逆で，蓄積すべき情報量が少なく，記録機器も安価であるが画像の再現性はデジタル画像に比し明らかに劣っている．デジタル方式の画像収録がより安価に実現できるようになればもちろんそれにこしたことはないが，今回の検討で得られたように，少なくても現段階では S-VHS 方式のアナログ画像収録でも筋エコー画像の画像処理には充分利用可能であり，再生時の信号のフラツキはフレームメモリー上で加算平均処理を行うことで無視できた．

実画像の超音波信号をヒストグラム処理すると健常者ではほとんどのピクセルが信号強度0に集積する．この現象はシミュレーションの場合にも認められたもので，正常筋組織内の固有音響インピーダンスの分布がほとんど均一に近いことを示している．もちろん最初に画像を収録するにあたり超音波診断装置の gain をやや高めに設定すれば画像全体の輝度信号も上昇するわけであるから，正常筋組織の輝度信号の peak はやや右方に移動し，その結果 fiber type grouping による音響インピーダンスの空間的分散の低下現象とも分離可能となる可能性がある．ミオパチー群では中輝度帯域に peak を形成したが輝度ヒストグラムのみ

dx

-1	0	1
-1	0	1
-1	0	1

Roberts

0	0	0
0	0	1
0	-1	0

+

0	0	0
0	1	0
0	0	-1

dy

-1	-1	-1
0	0	0
1	1	1

Prewitt

1	1	1
0	0	0
-1	-1	-1

+

1	0	-1
1	0	-1
1	0	-1

ラプラシアン
(全方向エッジの強調)

-1	-1	-1
-1	8	-1
-1	-1	-1

Sobel

1	0	-1
2	0	-2
1	0	-1

+

1	2	1
0	0	0
-1	-2	-1

図4　5種類の3×3 matrixデジタルフィルタ．それぞれ，境界強調を行うために使用した(dx, dy双方で微分フィルターとする)．

ではその細分は不可能であった．神経原性疾患では結合組織の増生に伴い残存する筋組織との間に発生する高輝度の信号が増加しpeakを形成することが確認された．もっとも，病初期では正常筋組織が多く残存するため無信号帯域にもpeak形成が生じた．結合組織と脂肪変性の混在するドウシェンヌ型筋ジストロフィーではさらに輝度信号のpeakは右方移動した．これらの結果はシミュレーションの示した結果と同様であり，神経筋疾患の組織診断に超音波画像が充分利用できることを示している．

ただ，信号強度ヒストグラムは信号分布の空間的特徴をすべて排除してしまうため，診断の客観化のためには今後さらに形態的な特徴量抽出を併用する必要がある．

文　献

1) 田代邦雄，松浦亨，佐藤松治，森若文雄，島功二：神経筋疾患におけるUltrasound imaging

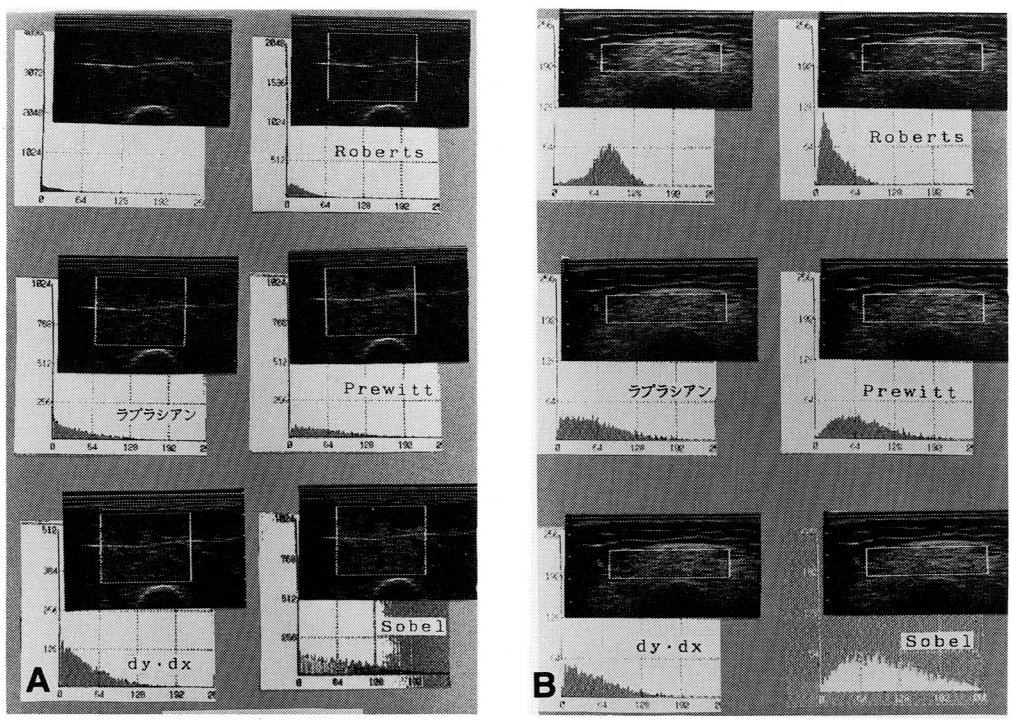


図5　(A)健常者，(B)K-W症例の実画像(左上段)とデジタルフィルタリング処理画像．フィルタリングを行うことで形態的には特徴が強調された．

—画像シミュレーションとフィルター最適化—
“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原因に関する研究”（杉田班）昭和63年度研究報告書，1989，pp30—36.

5）Lysosomal glycogen storage disease without acid maltase deficiency 3症例の組織化学的，生化学的検討

納　光弘*

研究協力者　臼杵扶佐子*　加塩信行*　中原啓一*
樋口逸郎*　中川正法**　矢田俊彦***

はじめに

Glycogenosomeを呈する疾患はacid maltase deficiency (AMD) が代表的なもので，その他稀にdebrancher deficiencyで認めることもある．最近我々は，acid maltase活性，debrancher活性が正常で，生検筋にて多数のglycogenosomeを認めた3症例を経験した．これらは，1981年にDanonら[1]が報告したlysosomal glycogen storage disease without acid maltase deficiencyに一致すると思われる．本疾患の病因は未だ不明である．生検筋，fibroblastについて組織化学的，生化学的にAMDとの相違を検討し，興味ある知見を得たので報告する．

症　例

3症例はcase 1：21歳，case 2：23歳，case 3：8歳で，いずれも男性である．case 1，3は孤発例，case 2は家系内発症を認める．case 1を呈示する．

症例：21歳，男性

病歴：家族歴には特記すべきことない．幼小児期の発達は正常であったが，11歳時，特殊学級に編入，短距離走も遅くなった．中学時代にしばしば心悸亢進を経験．16歳時，胸写にて心拡大を指摘され，某医科大学に入院．肥大型心筋症の診断をうけた．17歳時には労作時呼吸困難を自覚．20歳時，筋力低下，知能低下精査のため入院となった．

現症：身長175cm，体重59kg．不整脈(−)．心拡大を認め，胸骨左縁にII度の収縮期雑音を聴取した．肝腫大(−)．神経学的には，WAISにてIQ60以下と知能低下を認めた．網膜色素変性(+)．近位筋優位の軽度の四肢筋力低下と筋萎縮を認めた．感覚系，深部腱反射は正常であった．

検査所見：CK値は890IU/lで，MMtype優位の上昇を認めた．安静時の血中乳酸，ピルビン酸は正常．前腕阻血運動負荷試験での乳酸，ピルビン酸，アンモニア，尿酸の反応は正常であった．

方　法

3症例及び成人型AMD(32歳，女性)の生検筋の凍結切片にてルーチンの組織化学及びレクチン組織化学の検索を行った．使用したレクチンは，ConA，WGA，MPA，SBA，PNA，HPA，DBA，LFA，UEA-Iの9種類である．ConAはビオチン化ConAを用いhorseradish peroxidase (HRP) 標識ストレプトアビジンで間接法を実施し，その他のレクチンはHRP標識の直接法を使用した．また，エポン包埋した生検筋及び培養fibroblastにて，PAS-Toluidine Blue染色及び電顕検索を行った．

Acid α-glucosidase活性 (pH4.0) は4MUG基質，天然基質 (maltose, glycogen) にて測定し，neutral α-glucosidase活性 (pH6.5) は4MUG基質にて測定した．Debrancher活性は，^{14}C－

＊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
＊＊＊鹿児島大学医学部第一生理

glucose の glycogen へのとりこみ及び limit dextrin の分解の2つの方法で測定した．また，培養 fibroblast を用い，他のリソゾーム酵素活性（α-galactosidase, α-mannosidase, α-fucosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, N-acetyl-β-hexosaminidase）を測定した．Glycogen 合成は，^{14}C-glucose を培養 fibroblast にとりこませ，経時的に glycogen へのとりこみを口紙・エタノール沈澱法にてみた．DEAE-cellulose column chromatography は，fibroblast extract を DEAE-cellulose に apply，素通り除去後，0-0.5 M NaCl gradient にて各 isoenzyme を溶出させた．また，fibroblast extract より Con A-Sepharose にて糖タンパクを析出させた後，SDS-PAGE, Western blotting を行い，ポリクローン抗 acid α-glucosidase 抗体にて acidα-glucosidase の processing をみた．

Ionomycin の膜感受性は，fibroblast を用いて Ionomycin による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を測定することにより調べた．細胞内 Ca^{2+} 濃度は，カバーグラスに培養した fibroblast に fura-2/AM 1 μM を37°C, 30分 loading 後，単一 fibroblast を顕微鏡下に選び，Ionomycin を滴下させ，二波長(340, 380nm)励起による螢光顕微測光法にて測定した．外液 Ca^{2+} 濃度は2mM $CaCl_2$ とし，Ionomycin は細胞内 Ca^{2+} 濃度が最大となる濃度を用いた．

結　　果

病理組織学的検索：

凍結筋切片の HE 染色では，筋線維の大小不同，空胞形成を認め，vacuolar myopathy の所見であった．Acid phosphatase 染色では一部空胞にて活性亢進を認めたが，成人型 AMD に比しその変化は軽度であった．エポン包埋による PAS-Toluidine Blue 染色では，空胞内に PAS 陽性物

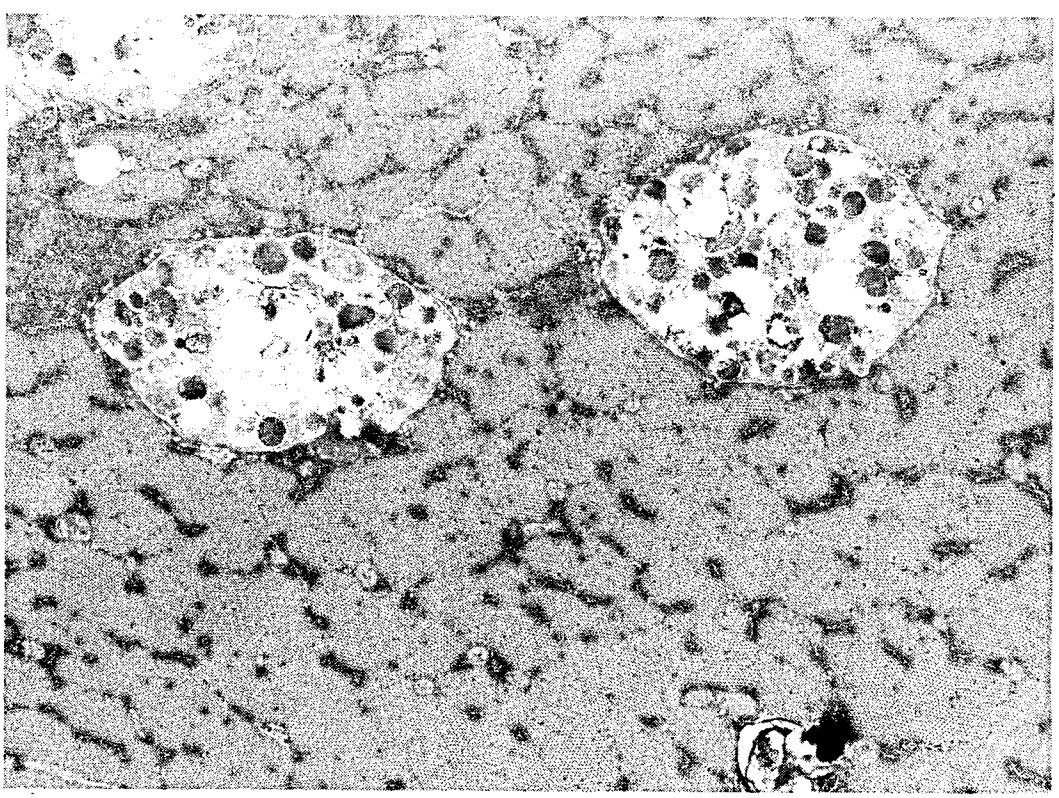


図1　case 2 の生検筋の電顕像（×17,500）多数の glycogenosome とそれをとり囲む膜構造を認める．

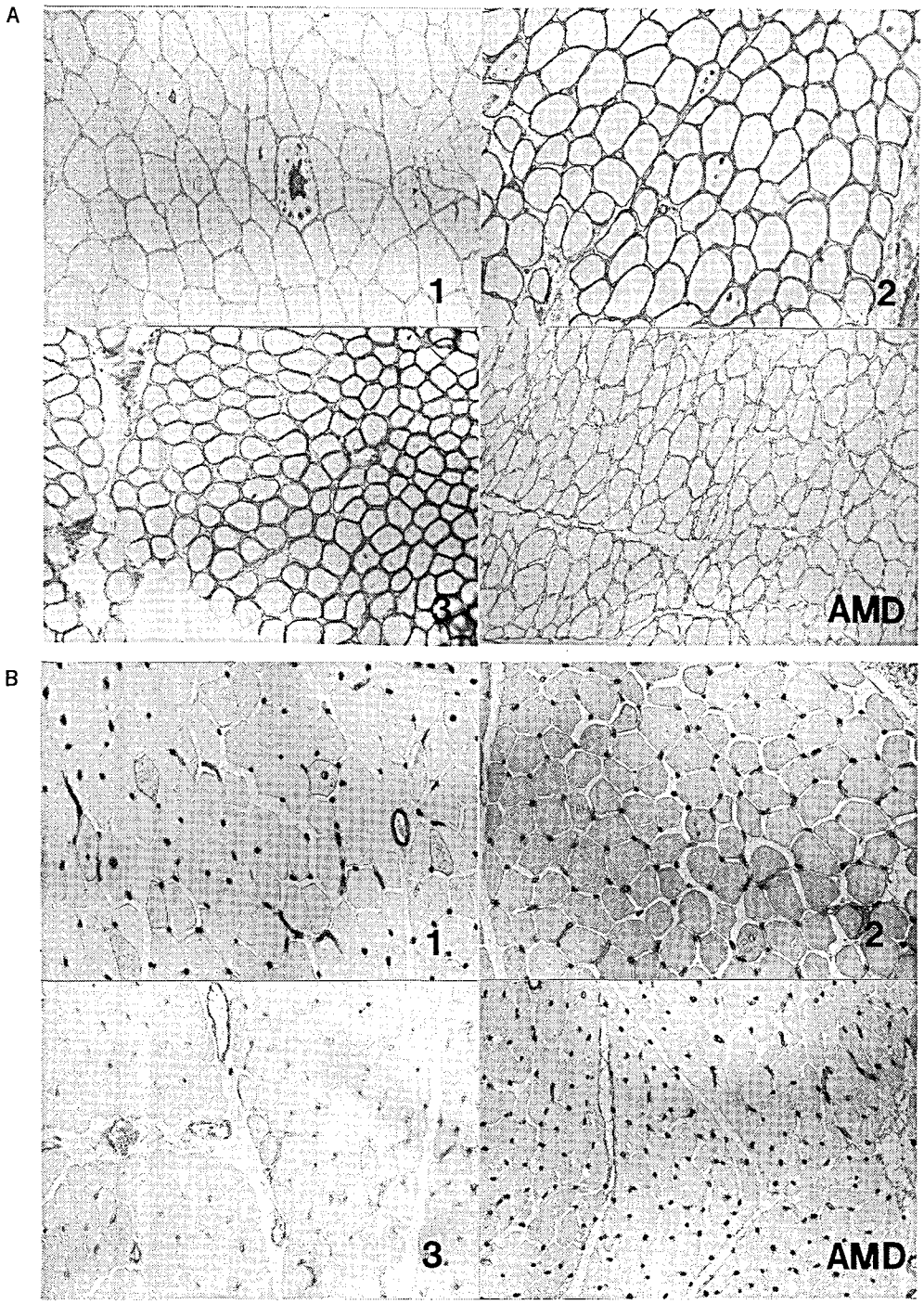


図2　生検筋のレクチン組織化学（×50）
A. PNA レクチン染色
B. UEA-I レクチン染色
1：case 1，2：case 2，3：case 3

表1 Binding characteristics in lectin histochemical analyses

lectin	(residues recognized)	case 1	case 2	case 3	AMD
ConA	(αMan, αGlc)	++	++	++	-
WGA	(βGlcNAc, αNeu)	++	++	++	+
MPA	(αGalNAc, αGal)	++	++	++	+
SBA	(αGalNAc, βGalNAc, αGal)	++	++	++	+
PNA	(βGal)	++	++	++	-
HPA	(αGalNAc)	++	++	++	-
DBA	(αGalNAc)	+	+	+	-
LFA	(αNeu)	++	++	++	+
UEA-I	(αFuc)	+++	+++	+++	-

+++: Cytoplasmic membrane (CM), vacuolar membrane (VM) and vacuolar contents (VC) were positive.
++: VM & VC; +: VM; -: negative

表2 Biochemical analysis of biopsied skeletal muscle and fibroblasts

	case 1	case 2	case 3	normal[1]
A. skeletal muscle				
α-glucosidase activity				
4MUG-degrading[2]				
pH 4.0	11.3	15.6	21.6	13.9 ± 3.3 (6)
pH 6.5	9.3	10.6	13.3	10.4 ± 1.3 (5)
maltose-hydrolytic[3]				
pH 4.0	108.7	86.1	145.8	95.8 ± 36.5 (5)
Debrancher activity				
incorporation of ^{14}C-glucose into glycogen[4]	6.2	11.2	10.8	8.5 ± 2.3 (4)
glucose liberation from limit dextrin[5]	10.7	n.e.	n.e.	10.4
B. fibroblast				
α-glucosidase				
4MUG-degrading[6]				
pH 4.0	107.7	104.0	83.3	115.6 ± 19.2 (7)
pH 6.5	104.0	108.6	114.9	99.3 ± 23.2 (7)
maltose-hydrolytic[7]				
pH 4.0	7.9	12.1	11.1	7.58 (3)
glycogen-degrading[8]				
pH 4.0	193.8	269.1	305.8	201.9 ± 29.9 (4)

1) Values are means ± SD, with the numbers of samples in parentheses. 2) nmol MU/min/g wet wt.
3) nmol of maltose hydrolyzed/min/g wet wt.
4) nmol glucose incorporation/min/g wet wt.
5) nmol glucose/min/g wet wt. 6) nmol MU/hr/mg protein.
7) nmol of maltose hydrolyzed/min/mg protein.
8) nmol glucose/hr/mg protein. n.e.; not examined.

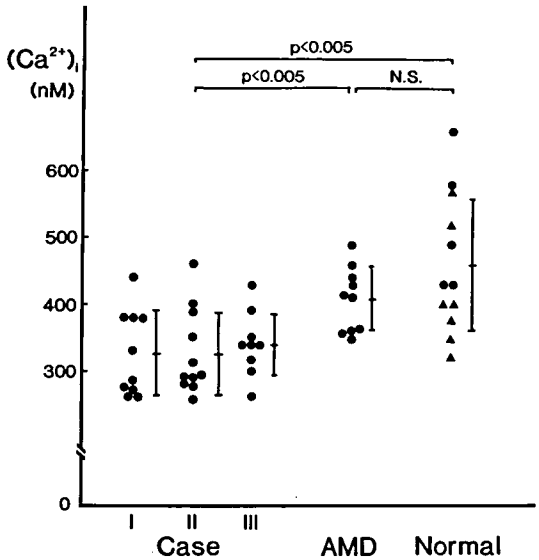


図3　Ionomycin による fibroblast の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇

質の蓄積を認めた．電顕的には，小さい glycogenosome を多数認め，これらをとり囲む膜構造を認めた(図1)．この所見は，3症例に共通の特徴的な所見であった．

レクチン組織化学による検索では，β-galactose を認識する PNA レクチン染色において，3症例ではいずれも vacuole の内容物及び膜が陽性に染色されたが，AMD では全く negative であった（図2A)．また，fucose を認識する UEA-I レクチン染色では，3症例では vacuole の陽性所見に加え，plasma membrane の染色を認めた．一方，AMD では全く negative であった（図2B)．レクチン染色のまとめを表1に示す．PNA, UEA-I 染色以外に，α-mannose, α-glucose を認識する ConA, N-acetyl galactosamin を認識する HPA, DBA 染色にて，AMD では認められない vacuole の陽性所見を3症例において認めた．一方，WGA,MPA, SBA, LFA 染色では，AMD, 3症例ともに vacuole は陽性に染色された．

生化学的検索：

生検筋及び培養 fibroblast における酵素学的検索の結果を表2に示す．Acid α-glucosidase 活性は，4MUG, maltose, glycogen 基質とも正常あるいは上昇していた．Neutral α-glucosidase 活性は正常で，debrancher 活性も ^{14}C-glucose の glycogen へのとりこみ，limit dextrin の分解のいずれの方法でも正常であった．培養 fibroblast における他のリソゾーム酵素活性は，調べた限りにおいては正常から正常の2,3倍の上昇を認めた．培養 fibroblast を用いた DEAE-cellulose column chromatography の α-glucosidase isoenzyme の溶出 pattern は正常であり，acid α-glucosidase は0.14M NaCl にて高い peak として溶出され，neutral α-glucosidase は0.28M NaCl にて peak として溶出された．Fibroblast における acid α-glucosidase の processing の検索では，正常と同じく110K, 70K のバンドを認め，processing は正常で mature な acid α-glucosidase は生成されていると思われた．^{14}C-glucose の glycogen へのとりこみは，測定した16時間までにおいては本疾患と AMD, control 間で差を認めなかった．

Ionomycin の膜感受性：

Ionomycin による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は，AMD, normal の fibroblast に比較し，3症例では有意に低下を認めた（図3)．

考　　察

1981年，Danon ら[1]は筋力低下，肥大型心筋症，知能低下の臨床的特徴を有し，筋病理では glycogenosome を認めるが，acid maltase 欠損を認めない2症例を報告，その後，83年[2]，86年[3]，87年[4]に同様の報告がなされた．今回の3症例も，臨床像，筋病理，生化学所見はこれらの症例に一致し，これらは一つの clinical entity をなすものと思われる．Onset は，若いものでは2歳半からはじまっており，AMD における late-onset type に対応するが，late-onset type の AMD は myopathy が主体であり中枢神経症状，心症状がみられないのに対し，本疾患では心筋障害がめだち，これに加え中枢神経障害，軽度の筋力低下を認め，臨床的にも AMD と差を認めた．

今回の検索では，凍結筋切片におけるレクチン組織化学にて，本症では vacuole の膜及び plasma membrane に AMD では認められない異常な染色性を認めた．この染色性は AMD 以外の vacuole をつくる myopathy 即ち rimmed vacuole を伴う distal myopathy 及び hypothyroid myopathy での検索でも認められず，本疾患に特異的なものと思われる．また，細胞内 Ca^{2+} 濃度測定にてしらべた Ionomycin の膜感受性は，本症の fibroblast において AMD, normal に比し有意に低値が認められた．以上より，本症における膜糖鎖，膜構成の異常が示唆されたが，その原因に関しては，ER，Golgi における糖付加の異常，あるいは core 蛋白の異常など，さらに検討が必要である．リソゾーム膜の成分，その機能と糖鎖の関係については未だ不明な部分が多く，今回示された膜構成の異常が glycogenosome の形成といかに結びつくかはなお今後の課題と思われる．今回，レクチン染色が病態解明に有用であったが，筋肉におけるレクチン染色の報告はまだ数少なく，今後筋疾患の病態解明にも有用な手段となりうると思われる．

文　献

1) Danon MJ, Oh SJ, DiMauro S et al: Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. Neurology **31**: 51, 1981.
2) Riggs JE, Schochet SS, Gutmann L et al: Lysosomal glycogen storage disease without acid maltase deficiency. Neurology **33**: 873, 1983.
3) Byrne E, Dennett X, Crotty B et al: Dominantly inherited cardioskeletal myopathy with lysosomal glycogen storage and normal acid maltase levels. Brain **109**: 523, 1986.
4) Hart ZH, Servidei S, Peterson PL et al: Cardiomyopathy, mental retardation, and autophagic vacuolar myopathy. Neurology **37**: 1065, 1987.

II. 生 化 学

6）絶食—再摂食時に於ける骨格筋速筋と遅筋のエネルギー代謝

庄　司　進　一*

研究協力者　朴　木　清　人*　吉　田　邦　広*
足　立　憲　昭*　柳　沢　信　夫*

絶食時に骨格筋のエネルギー代謝，特に摂食時に主要なエネルギー源であるグルコースの取り込みがどの様に調節されるかについては，ヒトの骨格筋で減少[1]，ラットの遅筋で減少[2]と変化なかった[3]との報告がある．絶食—再摂食時に於ける骨格筋のエネルギー代謝の調節を検索するため，エネルギー産生系の共通の基質であるグルコースの細胞内へのアップテイク（GU）を測定した．このステップは細胞内の糖質代謝の最も重要な律速段階の一つである．骨格筋の中でも速筋と遅筋の代謝調節に差異が認められた．

方　法

Wistar・メス・ラットの60g前後を用い，72時間の絶食（飲水は自由）後再摂食を開始した，各24時間毎のラットの体重を測定し，cervical dislocationでsacrificeし，extensor digitorum longus muscle（EDL）とsoleus muscle（SOL）を*in vivo*でstretchした状態で両側腱を脳外科血管手術用クリップで固定した後に腱で切断し取り出し，Krebs-Henseleit bicarbonate buffer（pH7.4）に95% O_2 − 5% CO_2を通気しながら，37°Cでincubateする．このbufferは5 mM sodium pyruvate, ^{3}H-3-o-methylglucose（1.0 μCi/ml），50mM glucoseと^{14}C-sucrose（1 mM, 0.2μCi/ml）を含む．30分のincubation後筋を洗浄，腱を切除，湿重量を測定，Soluene 350で消化，酢酸で中和，Scintisol EX-H（Wako）を加え，radioactivityを測定した．一部の筋でnon-collagen protein（NCP）を測定した．有意差の検定はStudent's t testを用いた．

結　果

体重の変化（図1）

絶食により，体重は減少し，24時間後には有意になり，平均で57gから72時間後で43gに減少した．再摂食により体重は増加に転じ72時間後で前値に，120時間後では前値より有意に高値に達した．

EDLとSOLの湿重量の変化（図2）

絶食により，筋の湿重量は減少し，24時間後に

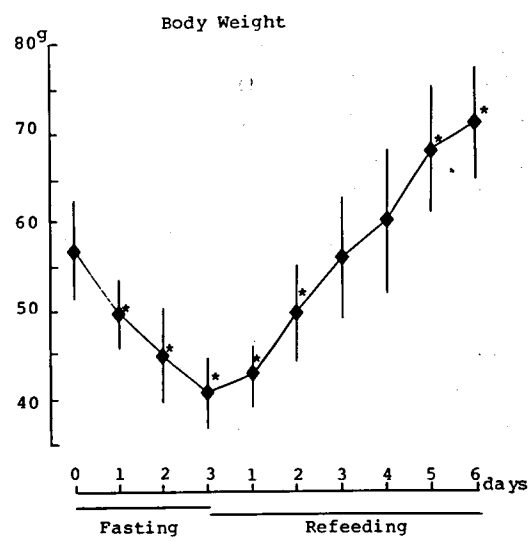


図1　平均±標準偏差
N＝3−45匹
＊　p<0.05　vs　前値

＊信州大学医学部第三内科

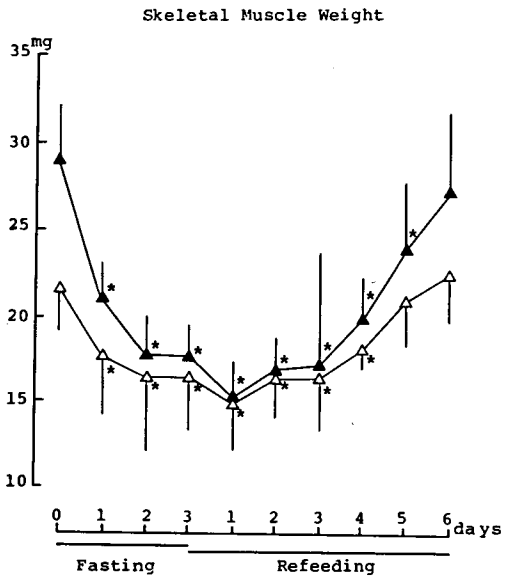


図2　N＝4－12筋
黒三角　EDL
白三角　SOL
他は図1脚注と同じ

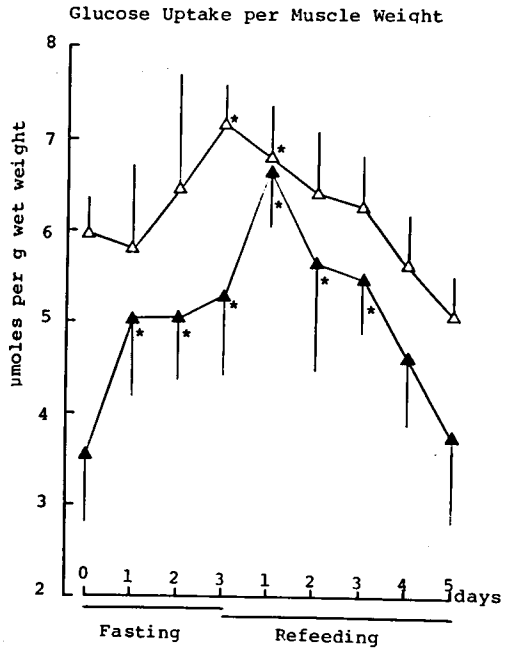


図3　N＝4－10筋
他は図1，2の脚注と同じ

は両筋ともその減少は有意になった．減少率は72時間までは次第に減少した．再摂食開始24時間では減少が続いていたが，48時間では増加に転じた．SOLではEDLより変化が少なく平均で21.4mgから14.7mg（－31%），EDLでは平均で28.8mgから15.2mg（－47%）であった．従って，両筋の湿重量差は48時間後には有意差無くなった．再摂食により湿重量はSOLで再摂食120時間後に前値に回復したのに対し，EDLでは144時間後であった．両筋の湿重量差が出てくるのは再摂食96時間後であった．

EDLとSOLのNCP変化

筋当りのNCPは，湿重量の変化と同様な変化を示したが，程度は湿重量より大きかった．即ち前値に対しEDLは－53%，SOLは－37%の減少が再摂食24時間後にみられた．前値への回復は両筋とも144時間後であった．

EDLのGU変化（図3，4）

筋当りにすると，絶食・再摂食により有意な変化を見なかった．湿重量当りにすると絶食により

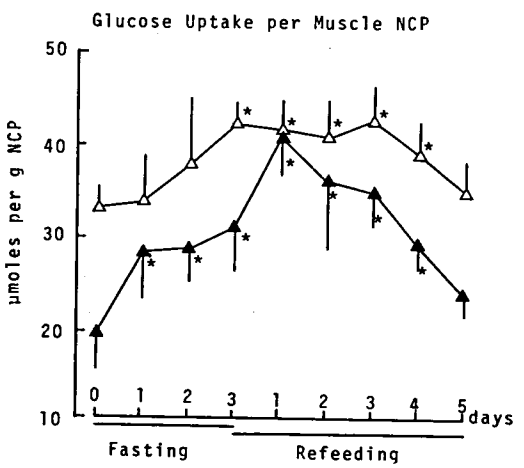


図4　図3の脚注と同じ

24時間より有意な増加を示し，再摂食によりさらに一段と有意な増加を示し，絶食前の値に復するのは再摂食120時間後であった．NCP当りにしても，湿重量当りと同様な変化を示した．

SOLのGU変化（図3，4）

筋当りにすると，絶食により有意に低下し再摂食120時間で回復していなかった．湿重量当りにすると，絶食による増加の変化はEDLに比べ小さく遅く，再摂食により一段と増加することは見られず，絶食前値への回復は速かった．NCP当りにしても，湿重量当りと同様であった．

EDLとSOLのGUの差

両筋のGUの有意差は湿重量当りでもNCP当りでも，再摂食24時間後から消失し，72時間後に再び出現した．

考　　案

絶食時の体重減少の主要な原因が骨格筋の特に速筋の重量減少にあることは，絶食時の骨格筋重量の体重比が速筋では減少し（0.51‰→0.43‰），遅筋ではやや増加している（0.38‰→0.40‰）ことから言える．この骨格筋の重量減少は筋蛋白の減少が主たる原因である．筋蛋白の減少は筋重量の減少率以上で，絶食時の筋は湿重量当り前値より低いNCP濃度を示した．これは水分量が相対的に増加しているためと考えられる．従って，絶食時の体重減少の主たる原因は骨格筋特に速筋の筋蛋白の減少による．これはこの蛋白をエネルギー源として全身で利用しているためと考えられる．その他に脂肪組織なども当然利用されているが，絶対量としては骨格筋が最大の臓器と言える．ここで骨格筋の中で，速筋の蛋白を優先して利用し，遅筋の蛋白の利用は少ない．これは，常に働く姿勢保持に関与する遅筋の機能を出来るだけ温存しようとする調節の様である．筋の蛋白の減少は再摂食によってもすぐには増加に転じず，体重の回復より遅れ再摂食24時間後には絶食72時間後より低値を示した．このことは外からのエネルギー源の補給によって代謝の変化が起こるが，骨格筋の蛋白の分解増加が合成より少なくなるのに24時間以上かかることを示している．

GUは，筋全体としては，遅筋で低下と速筋で不変であった．これは従来の報告のラットの遅筋で低下[2]に一致する．筋の湿重量当りとNCP当りでのGUでは，速筋で増加が強く遅筋では軽度の増加であったという結果は，強い萎縮の来る速筋で血液中で低下してくるグルコースを取り込む能率を上げエネルギー源の確保を計っているのに対し，遅筋では主要なエネルギー源をグルコースから脂質へ変換している[4]ためGUに軽度の増加しか見られないにかかわらず萎縮が軽度であると考えられる．

再摂食時に速筋ではGUが一段と高値にリセットされたことは，絶食による蛋白減少の強い速筋での回復にグルコースの利用率を高度に高めるという調節があると考えられる．

骨格筋の重量，NCP量，GUの再摂食による前値への回復は変化が大きかった速筋が遅筋より遅かった．いずれも体重の回復より遅かった．これは筋のエネルギー代謝が正常化し，蛋白代謝が正常化し，萎縮が回復するのは絶食による変化が大きかった分だけ他の臓器より遅いと考えられる．

結　　論

1．72時間の絶食で，Wistarラットの体重の減少の主要な原因は骨格筋特に速筋の萎縮である．
2．骨格筋の萎縮の主要な原因は筋蛋白の減少である．これは速筋で遅筋より強い．
3．絶食により湿重量当りと蛋白当りの骨格筋のグルコース取り込み速度は増加する．これは速筋で強く早い．
4．再摂食で，速筋ではグルコース取り込み速度が一段と高いレベルにリセットされる．
5．再摂食による，骨格筋の重量，蛋白量，グルコース取り込み速度の前値への回復は体重の回復より遅れる．変化の少ない遅筋では速筋より比較的速い．筋の重量と蛋白量は再摂食24時間後に絶食72時間後より低下を示した．

文　　献

1) Owen OE and Reichard GA : Human forearm metabolism during progressive starvation. J Clin Invest 50 : 1536—1545, 1971.
2) Issad T, Pénicaud L, Ferré P, Kandé J, Baudon M-A and Girard J : Effects of fasting on tissue glucose utilization in conscious resting rats. Major glucose-sparing effect in

working muscles. Biochem J 246 : 241—244, 1987.

3) 前川聡：絶食状態における骨格筋のインスリン作用に関する研究（Ⅰ）—インスリン受容体及び糖取り込みへの影響—・ 糖尿病28：571—577, 1985.

4) Rennie MJ and Holloszy JO : Inhibition of glucose uptake and glycogenolysis by availability of oleate in well-oxygenated perfused skeletal muscle. Biochem J 168 : 161—170, 1977.

7）ラット骨格筋収縮の燐NMR

山　田　和　廣*

研究協力者　武　居　光　雄*　S.K. Phillips*

はじめに

筋収縮のエネルギー変換過程において，収縮中のエネルギー遊離に対応する筋の化学的変化はクレアチン燐酸の分解だけであるとする単純化は実際は成り立たない．このことは，とくに両棲類であるカエルの筋について詳しく調べられてきた．その一つの例として，両棲類の筋では，収縮によるエネルギー産生（初期熱産生＋仕事）には細胞内カルシウム結合タンパクであるパルバルブミンへのCa結合反応熱が加わっていると考えられている．一方，ラットのヒラメ筋にはパルバルブミンが含まれていないことが知られており，両棲類の筋とは異なっている．このように両棲類との違いを意識して哺乳類の筋を対象とする研究が最近ようやく行われるようになった．

本研究の目的は，ラットのヒラメ筋を対象として燐NMRを用いて収縮による化学的変化とその回復の時間経過を知ることであった．

方　法

ラットヒラメ筋を摘出し，足関節が完全に屈曲した位置における筋の長さを標準として20°Cで測定を行った．ラットは4～8週齢のものを選んだ．燐NMR測定は我々の研究室で両棲類の筋を対象とした研究に用いた方法に準じた[1]．即ち8対のヒラメ筋を径20mmのNMR用ガラスチューブ内に保持し，灌流及び刺激を行った．筋重量は合計約1gであった．

筋の刺激は6sおよび9s持続する30Hzのテタヌス刺激により行った．刺激は7及び10分の間隔で48ないし64回繰り返し，各々の収縮についてNMR信号を加算することによってNMR測定のS/N比を向上させた．NMR測定の時間分解能は4ないし16sであった．また1回の実験に要する時間は7ないし12時間であった．

結　果

足関節屈曲位における筋のサルコメア長は平均3.3μmであり，このときテタヌス刺激による張力発生は，単位断面積当りに換算すると，平均1 Nmg^{-1}（乾燥筋重量）であった．また，20°Cにおいて7～12時間における48～64回の繰り返し収縮による張力低下は16%以内であった（図1）．

図2に燐NMRスペクトルの例を示す．6秒及び9秒間持続するテタヌス刺激による収縮によって，クレアチン燐酸（PCr）の濃度減少及び無機燐酸（Pi）の濃度増大が観測された．ATPの変化は認められなかった．これらの変化は収縮後，指数的に回復した．6秒及び9秒間の収縮において，回復の時定数はともに50秒であった．この回復の時定数は，4°Cにおけるカエルの筋での回復の時定数（40分）と比べると非常に小さい[1]．9秒間持続する強縮刺激によるPCr及びPiの変化とその回復の時間経過を図3に示す．尚，このような収縮/回復の繰り返しの定常状態における刺激直前のPCr濃度は，11.1$\mu molg^{-1}$（9秒テタヌス，静止筋では12.7），Pi濃度は4.2$\mu molg^{-1}$（9秒テタヌス，静止筋では2.8）細胞内pHは7.16（9秒テタヌス，静止筋では7.19）であった．このことは先に述べた張力の結果とともに，このような状態の収縮が生理的なものであり，anoxic coreの生じていないことを示している．

細胞内pH（図4）についてはこのような短い収縮によってアルカリ化が生じ，PCrおよびPiと

*大分医科大学生理学教室

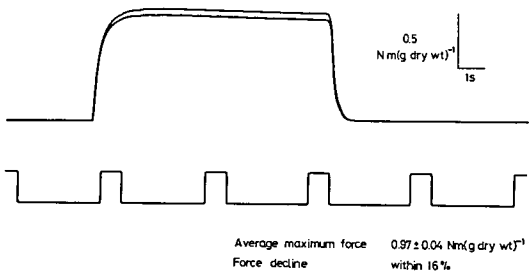


図1　ラットのヒラメ筋（8対）のテタヌス刺激（30 Hz，9秒間）による等尺性張力発生．最初と48回目の収縮を重ねて示している．下方の矩形波はNMR信号測定のゲートを示す．

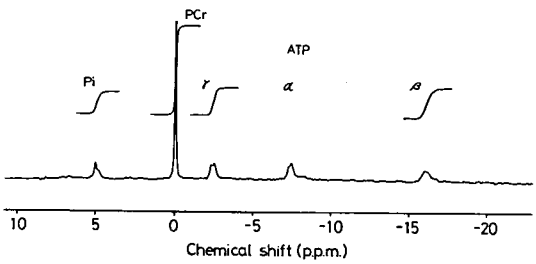


図2　ラットのヒラメ筋（8対）の静止時における燐NMRスペクトル（1024回の測定を加算した）．Pi，無機燐酸；PCr，クレアチン燐酸；α，β，γ，それぞれのATPのα-，β-，γ-位燐酸．

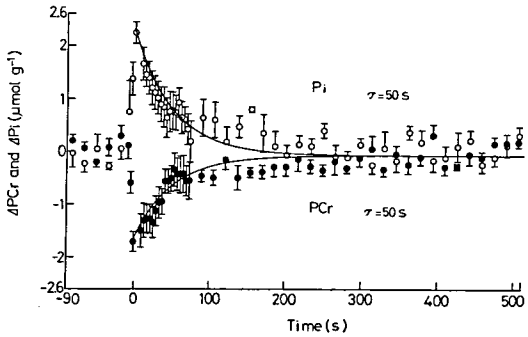


図3　ラットのヒラメ筋の収縮（9秒間のテタヌス刺激）による無機燐酸（Pi）およびクレアチン燐酸（PCr）の変化とその回復の時間経過（mean±SEM，n＝6）．

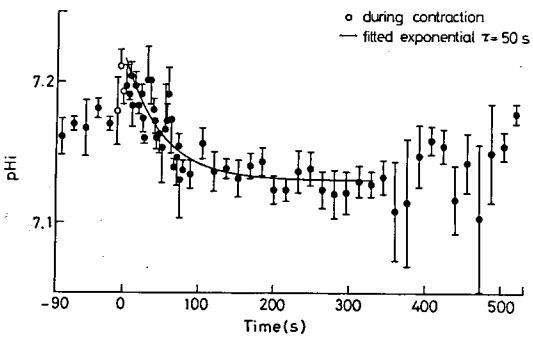


図4　ラットのヒラメ筋の収縮（9秒間のテタヌス刺激）による，細胞内pHの変化とその回復の時間経過（mean±SEM，n＝6）．

同様に指数的に回復する（時定数50秒）．また図4の9秒テタヌスでの結果が示すように一度酸性化の方向へのオーバーシュートを示す．

このような収縮によるアルカリ化は，カエルの筋でも測定されており，クレアチン燐酸の分解によってよく説明することができる[2]．

まとめと考察

哺乳類骨格筋を対象として，摘出灌流標本について，燐NMRを用いて燐化合物の収縮による変化とその収縮後の回復の時間経過を知ることが可能であった．

一方では，血管を確保して灌流することにより，ネコのヒラメ筋などの比較的大きな筋を対象とする方法が行われている[3]．本研究では横断面積の小さい筋を選び，多数の筋を用いてNMR測定におけるS/N比の向上をはかった．この方法の利点の一つは，NMR測定と平行して熱産生の測定によるエネルギー論的研究が行える点にある．

このようにして，長時間にわたり筋内部において低酸素状態の生じない，生理的状態での定常的収縮を生じさせることができた．ΔPCr及びΔPiの回復の時間経過は回復熱産生の時間経過とよく一致し回復熱産生は酸化的燐酸化によるPCr回復の過程に由来することが確かめられた．

文　献

1) Kawano Y, Tanokura M and Yamada K: Phosphorus nuclear magnetic resonance studies on the effect of duration of contraction in bull-frog skeletal muscles. J Physiol (London) 407: 243—261, 1988.
2) Tanokura M and Yamada K: Changes in intracellular pH and inorganic phosphate concentration during and after muscle constraction as studied by timeresolved ^{31}P-NMR. Alkalinization by contraction. FEBS Lett 171: 165—168, 1984.
3) Mayer RA, Brown TR and Kushmerick MJ: Phosphorus nuclear magnetic resonance of fast- and slow-twitch muscle. Am J Physiol 248:C279—287, 1985.

8）ヒト正常および筋ジストロフィー骨格筋におけるCa依存性プロテアーゼおよびそのインヒビターの局在および動態について

荒　木　淑　郎*

研究協力者　熊　本　俊　秀*　D.E. Goll**　L.Z. Stern***

我々は，昨年の本会議で筋ジストロフィー（以下，筋ジス）の筋崩壊に関与が深いとされるCa依存性protease, calpainおよびそのinhibitorであるcalpastatinについて正常ラット骨格筋における細胞内分布と絶食および脱神経筋における動態を検討し，本酵素は筋線維内にびまん性に存在するものの，基本的にはZ-diskを中心に筋原線維上に存在し，脱神経および絶食筋で有意に増加することを報告した[1]．今回はヒト生検筋を用い，筋ジスを含む各神経筋疾患について同様の検討を行なったので報告する．

方　法

検索に用いた症例は表1のごとく，Duchenne型筋ジス（以下，DMD）3例，筋緊張性ジストロフィー3例，多発性筋炎6例，ALSを含む神経原性筋萎縮症7例の計19例で，患者年齢は4歳から72歳に及び，いずれも大腿四頭筋または上腕二頭筋より通常の方法で生検を行い，検索に供した．また，神経症状のない整形外科的疾患患者5例（13～58歳）から手術中に筋肉を一部採取し，対照とした．

表1　Patients

Duchenne muscular dystrophy	3例（4，5，9歳）
Myotonic dystrophy	3例（20, 49, 54歳）
Polymyositis	6例（35-70歳）
Neurogenic muscular atrophy	7例（36-72歳）
Control	5例（13-58歳）
Total	24例

＊熊本大学医学部第一内科
＊＊Arizona大学筋肉生物学教室
＊＊＊Arizona大学内科神経筋部門

摘出筋はアルコール脱水後，LR-White resinに包埋した．超薄切片作成後，一次抗体にmonoclonalの抗80K-DaのμM及びmM calpain抗体またはmonospecificなpolyclonalの抗calpain及びcalpastatin抗体，さらに二次抗体に15または40nmのcolloidal gold標識goat anti-rabbitまたはmouse IgGを用い，それぞれ37°Cで30分間反応させた．対照にはpre-immunoserumを用いた．

定量的検討では，各標本について30,000倍の分割電顕写真を40枚作成し，画像解析装置を用いて筋原線維の各fraction，筋鞘膜，ミトコンドリア，endomysiumのextracellular spaceにおけるcolloidal-goldの単位面積当たりの密度を算定した．

結　果

正常ヒト骨格筋では，calpainおよびcalpastatinはラット骨格筋と同様に殆ど筋原線維上にび慢性に見られた．筋原線維間内にも僅かに見られたが，特に筋小胞体・T管膜上に集簇する傾向は見られなかった．μM-calpainおよびmM-calpainは，共に筋原線維上にびまん性にみられ，Z-diskにより多い傾向を示した．また，筋鞘膜にもμM-calpainおよびmM-calpainは認められた．

表2にヒト正常骨格筋における筋原線維のZ-disk，I-band，A-band及び筋鞘膜におけるcalpainおよびcalpastatin結合のcolloidal-goldの分布密度を示した．これらの抗体は何れもpre-immunoserumに比し，有意に多数のcolloidal-goldを認め，ヒト骨格筋にも反応することが示さ

れた．定量的にはcolloidal-goldの総平均密度で見るかぎりcalpainおよびcalpastatinの各々69.4%，68.4%がZ-bandを含むI-bandに存在し，特にZ-diskに各々44.1%，38.9%と多くみられた．なかでもμMがmMに比し，より多く筋原線維上，特にZ-diskに分布した．しかし，統計学的にはpolyclonal calpainのみがI-bandおよびA-bandに比しZ-diskで有意差を認めた他には，calpastatin，μM-およびmM-calpainでは有意差を認めなかった．一方，筋鞘膜にもcalpainsおよびcalpastatinは共に存在し，μM及びmM-calpainは各々の3.6%，8.5%にみられ，mM-calpainがより多く存在する傾向を認めた．

ミトコンドリアでもpre-immunoserumに比し，colloidal-goldは有意にみられ，僅かながらcalpainおよびcalpastatinが存在したが，ライソゾーム膜および内には殆ど認められなかった（表3）．一方，endomysiumのextracellular spacesではbackgroundとの間に有意差は認められなかった．しかし，筋肉内血管内皮細胞，collagen fiberに両酵素がしばしば認められた．

表4は各神経筋疾患における生検筋の筋線維上におけるcalpainおよびcalpastatin結合のcolloidal-goldの密度を算定したものであるが，DMDではcalpain結合colloidal-goldは1.175±0.11/μm² と対照に比し，有意に増加し，なかでも

表2 The density of colloidal gold particles combined with calpain or calpastatin in the myofibrils and sarcolemma of normal human muscle§

Structural Compartment	Anti-calpain Polyclonals		Anti-calpastatin Polyclonals		Anti-μMcalpain		Anti-mMcalpain	
	No./μm²	% of Total	No./μm²	% of Total	No./μm²	% of Total	No./μm²	% of Total
Myofibrils*								
Z-disk	2.47±0.29	44.1*	0.91±0.22	38.9	0.51±0.24	53.7	0.68±0.24	42.3
I-band	1.42±0.16	25.3	0.69±0.21	29.5	0.22±0.14	23.2	0.42±0.18	26.1
A-band	1.20±0.21	21.5	0.66±0.41	28.2	0.19±0.15	19.9	0.37±0.10	23.1
Sarcolemma*	0.50±0.11	9.1	0.08±0.04	3.4	0.03±0.01	3.2	0.14±0.07	8.5

§ : Figures are means ± S.E.
+ : Background counts on polyclonal antibody were 0.09 ± 0.11 for Z-disk, 0.03±0.02 for I-band, 0.03 ± 0.05 for A-band, and 0.01±0.04 counts/μm² for sarcolemma.
: Background counts on monoclonal antibody were 0 for Z-disk, 0.01±0.04 for I-band, 0.003±0.03 for A-band, and 0 counts/μm² for sarcolemma.
* : Significantly different from the counts in the A-band and I-band regions at P< 0.01. All counts differed at P< 0.01 from background counts.

表3 The density of colloidal gold particles combined with calpain or calpastatin in the mitochondria and endomysium of normal human skeletal muscle§

Structural Compartment	Anti-calpain Polyclonals (No./μm²)	Anti-calpastatin Polyclonals (No./μm²)	Anti-μMcalpain (No./μm²)	Anti-mMcalpain (No./μm²)
mitochondria	1.99±0.13*	0.39±0.14*	0.23±0.20*	0.53±0.45*
endomysium	0.01±0.03	0.04±0.03	0.02±0.02	0.07±0.20

§ : Figures are means ± S.E..
+ : Background counts were 0.0 counts/μm² for anti-calpain, anti-calpastatin, anti-μMcalpain and anti-mMcalpain on mitochondria, and 0.03±0.03 for anti-calpain and anti-calpastatin and 0.0 counts/μm² for anti-μMcalpain and anti-mMcalpain on endomysium.
* : Significantly different from background counts at P< 0.01.

表4 The densities of colloidal gold particles in the muscle fiber of biopsied human muscles that had been treated with polyclonal antibodies to the calpains or to calpastatin or with monoclonal antibodies specific for mM-calpain#

Disorder	Anti-Calpain Polyclonals (No./μm²)	Anti-Calpastatin Polyclonals (No./μm²)	Anti μM-Calpain (No./μm²)	Anti mM-Calpain (No./μm²)
Control	0.875±0.099	0.804±0.088	0.164±0.060	0.242±0.051
Duchenne muscular dystrophy	1.175±0.110*	1.020±0.146	0.224±0.056	0.409±0.079**
Myotonic dystrophy	0.727±0.126	0.810±0.043	0.176±0.078	0.283±0.050
Polymyositis	0.906±0.107	0.933±0.061	0.204±0.058	0.262±0.041
Neurogenic muscular atrophy	1.129±0.112*	1.001±0.136	0.277±0.052*	0.351±0.045**

#: Figures are means plus or minus standard errors of measurements made on 40 separate micrographs for each primary antibody.

+: Background counts: 0.043±0.029 counts/um² for anti-calpain and calpastatin; 0.001±0.001 counts/μm² for anti μM and mM-calpains.

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$

μM-calpain は平均密度では増加を示したが，統計学的に有意差はなく，mM-calpain のみが有意の増加を示した．また，ALS を含む神経原性筋萎縮症筋では，mM-calpain のみならず μM-calpain も有意に増加した．しかし，calpastatin は何れの疾患でも対照に比して colloidal-gold の平均密度は増加したが，統計学的に有意の増加を認めなかった．また，緊張性ジストロフィーや多発性筋炎では calpains および calpastatin の増加は共にみられなかった．

図1は4歳の DMD の生検筋であるが，形態的に筋原線維が比較的保たれている筋線維では，上段に示すように calpain はその量の増加を認めるが，細胞内分布においては対照筋と何ら変わることなく，筋原線維上にびまん性に認められた．一方，同一筋でも下段に示すように変性が進み，筋原線維の崩壊の著しい筋線維では，むしろ calpain の数は減少し，所々矢印に示すように patchy に集簇するところもあるが，概して colloidal-gold は疎らに散見された．

また，同じ DMD 筋における mM-calpain の分布でも，先に示した polyclonal calpain と同様に，形態的に筋原線維の変化の軽微な筋線維では，びまん性に mM-calpain の増加が見られ，筋原線維の変性の著しい筋線維では，やはり減少がみられた．

図2は36歳の ALS の生検筋だが，神経原性筋萎縮症の筋でも上段に示すように，calpain は対照，DMD と同様に筋原線維上にびまん性に見られた．しかし，筋の変性が進行し，筋原線維の崩壊が著しい筋線維では寧ろ減少する傾向を認めた．

また，mM-calpain の局在では，やはり同様に変性・崩壊の著しい筋原線維で colloidal gold は減少した．

考　　察

これまでヒト生検筋を含め *in vivo* level での calpain および calpastatin の局在と動態に関する検討はないが，前回の灌流固定ラット骨格筋での定量的検討では，calpain は筋原線維上にびまん性に存在し，細胞内を流動し易いものの，統計的には calpains および calpastatin は Z-disk を含む I-band に多く，また，筋鞘膜にも比較的認められた[1),2)]．そして calpain のうち筋原線維上には

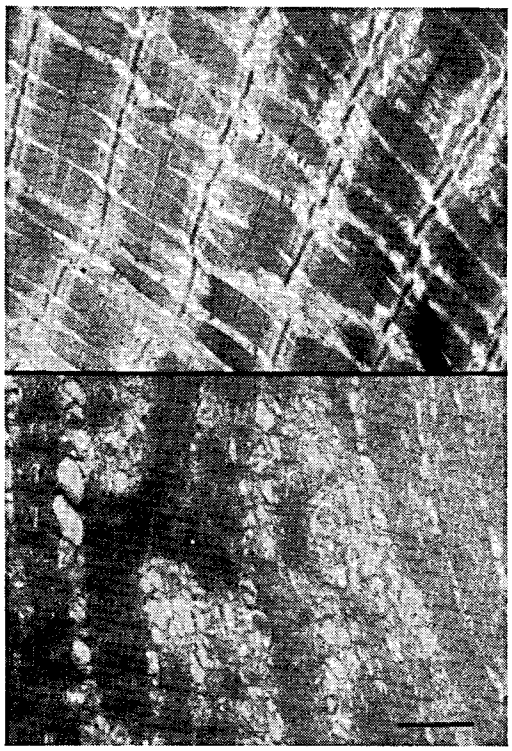


図1　DMD（4歳）患者骨格筋の免疫電顕写真．形態的に変化の軽微な筋線維ではcalpainsは増加し，筋原線維上にびまん性にみられるが（上段），筋原線維の変性・崩壊が著しいところでは，むしろ減少する（下段）．しばしば集簇もみられる（←）．Bar＝1 μm

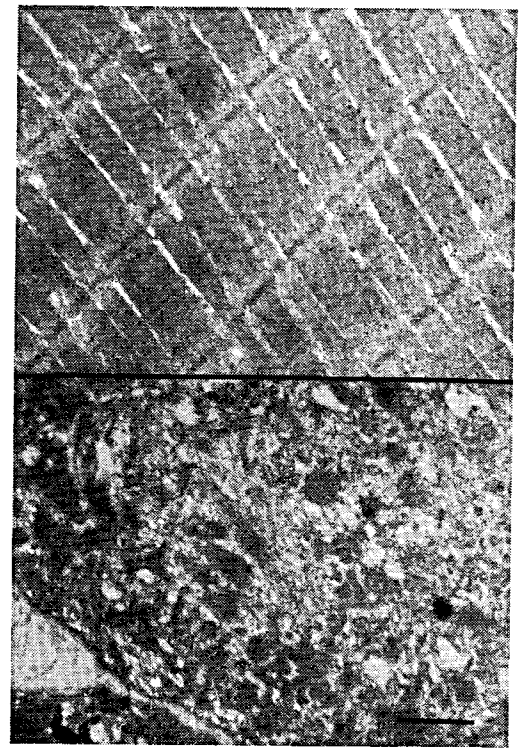


図2　ALS（36歳）患者骨格筋の免疫電顕写真．神経原性筋萎縮筋でも同様に筋原線維の変性・崩壊が著明な筋線維でcalpainsは減少する．Bar＝1 μm

μMが，筋鞘膜にmMがより多く存在する傾向を認めた[1]．しかし，今回のヒト正常骨格筋での検討ではcolloidal-goldの総平均密度で同様の傾向を認めるものの，灌流固定ラット骨格筋と異なり統計学的には，必ずしも有意の結果が得られなかった．これは摘出骨格筋に生検操作による侵襲が加わったためと思われ，それだけに本酵素が細胞内で種々のストレスにより流動し易いことが示唆された．

現時点で本酵素の微量測定がほぼ不可能に近いことから神経筋疾患生検筋におけるcalpainおよびcalpastatinについて十分に検討した報告はない．現時点では，天然型のcalpainと活性型のそれを区別出来ないとか，検索し得る筋線維数に著しい制限がある，あるいは半定量である，など多々問題はあるが，我々は今回colloidal-gold標識免疫電顕法を用いて検討を行った．その結果，定量的にはDMDおよび神経原性筋萎縮症でcalpainは有意に増加し，特に前者ではmM-calpainが，後者ではμM-およびmM-calpainが増加して認められた．そして，これら疾患における局在は形態的に変化の軽微な筋線維では対照と同様に筋原線維上にびまん性にみられるが，筋の変性が進行し，筋原線維の崩壊の著しいところでは，むしろcalpainは減少する傾向を認めた．

以上より，筋ジストロフィー筋，脱神経筋の筋原線維の比較的早期の変性・崩壊に本酵素が何らかの関与をしている可能性が示唆された．本

proteaseの発見以来，折からの筋ジスにおける筋形質膜の欠損の事実と合致して，本酵素がその発症機序の本質を演じていることが強調され，CANP説（Ca^{2+}－dependent neutral protease; calpainと同義語）なるものまで出たが，このproteaseは脱神経筋や絶食筋でも有意に増加し[1)~4)]，必ずしも筋ジス筋にspecificなものではないと思われる．これまでの研究の多くは，本酵素の微量測定が不可能なことから *in vitro* での検討に終始しているが，筋ジスにおける本酵素の意義を明らかにするためには，生検筋を含む *in vivo* levelのdataの集積が必須である．しかし，その本質的な役割の解明には，まず，本酵素の微量測定法並びに天然型と活性型のcalpainの分別法の開発が望まれる．

文　献

1) 荒木淑郎，熊本俊秀，Goll DE and Stern LZ：ラット骨格筋におけるCa依存性プロテアーゼおよびそのインヒビターの局在および動態について．“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究”（杉田班）昭和63年度研究報告書，1989，pp62—67.

2) T.Kumamoto, Kleese WC, Cong JY and Goll DE: Localization in electron micrographs of the Ca^{2+}-dependent proteinases and thier inhibitor normal, starved, and denervated rat skeletal muscle. J Cell Biol (Suppl) **105**: 27a, 1987.

3) Goll DE, Kleese WC, Kumamoto T, Cong J and Szpacenko A: In serch of the regulation and function of the Ca^{2+}-dependent proteinases (calpain). “Intracellular Proteolysis; mechanisms and regulation (ed by Katunuma N and Kominami E), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1989, pp82—91.

4) Elce JS, Hasspieler R and Boegman RJ: Ca^{2+}-activated protease in denervated rat skeletal muscle measured by an immunoassay. Exp Neurol **81**: 320—329, 1983.

9）ラット培養筋細胞におけるリソソームの動態

木 南 英 紀*

研究協力者　武 野 大 策*　須 藤 典 子*　内 山 安 男**

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症で欠損しているジストロフィンの性質が次第に明らかになりつつあるが，筋細胞膜の異常にはじまり，最終的に筋崩壊・壊死に至るプロセス・機構はまだ全く分かっていない．我々は筋蛋白質の終末的な分解には浸潤マクロファージのリソソームプロテアーゼ群が関与すること[1]，およびそれ以前に筋細胞内の自己貪食－リソソーム系が活性化されていることを報告してきた[2]．筋細胞におけるリソソームの動態や自己貪食の誘起の機序に関する研究はほとんどない．本年度は培養筋細胞を用いた生化学的及び形態学的なリソソームの動態の解析結果を報告する．

材料と方法

本研究にはラット由来の筋芽細胞（国立精神・神経センター神経研究所小沢鉄二郎先生より供与）をもちいた．筋芽細胞（L8E63）をはじめ100 mm 径のシャーレに1.5×10^6/dish の細胞を播種し，これを10%の牛胎児血清と3%馬血清を含む DME 液で増殖させ，confluent に達した後，4%馬血清を含む DME 液に換え分化誘導させた．異物貪食をみるため，西洋ワサビペルオキシダーゼ（3 mg/ml）を細胞外に添加し，1時間あるいは15時間（筋芽細胞の場合には8時間）加温の後，それぞれの細胞よりリソソーム分画を得，パコール密度勾配遠心によって分析した．全ての実験で28%パコールを用い，28,000回転（日立 RP-40ローター），40分間遠心し，底から0.6ml ずつ分画し，各種酵素活性を測定した．β-グロクロニダーゼ活性は Glaser らの方法[3]，ペルオキシダーゼ活性は Ishikawa らの方法[4]によった．電子顕微鏡及び免疫電顕の手法は Uchiyama らの方法[5]に従って行った．

結　　果

1．筋芽細胞及び筋管細胞におけるリソソームの密度の差

ラット筋芽細胞（図1－a）は confluent に達すると6日目ごろより筋管細胞を形成し始め10～12日目には殆どは筋管細胞にまで分化する（図1－b）．この12日目の筋管細胞と筋芽細胞より粗リソソーム分画を調製し，パコール密度勾配遠心によってリソソーム密度の差を調べた結果が図2に示されている．リソソームマーカーとしてβ-グルクロニダーゼ活性を測定した．他のβ-ヘキソサミダーゼなどのマーカーでも同様の結果を得ている．筋芽細胞ではリソソームは軽い密度分画にほとんどが回収されるのに対し，筋管細胞では管底近くの重い密度の分画に約30%がシフトしていることがわかる．リソソーム密度が重い原因としては，1）過剰な摂食・貪食，2）消化されない物質のエンドサイトーシス，3）リソソーム内分解の障害，4）分解物のリソソーム外放出の障害などが考えられる．この場合 1）の可能性が最も高いと考えられる．

2．過剰な異物貪食に基づくリソソーム密度の変化

筋細胞が外から加えた西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）を取り込み（異物貪食作用），リソソームへ運搬することは証明されている[6]．しかし，HRP のリソソームへの蓄積によってリソソーム

＊順天堂大学医学部生化学第一講座
＊＊筑波大学医学専門群

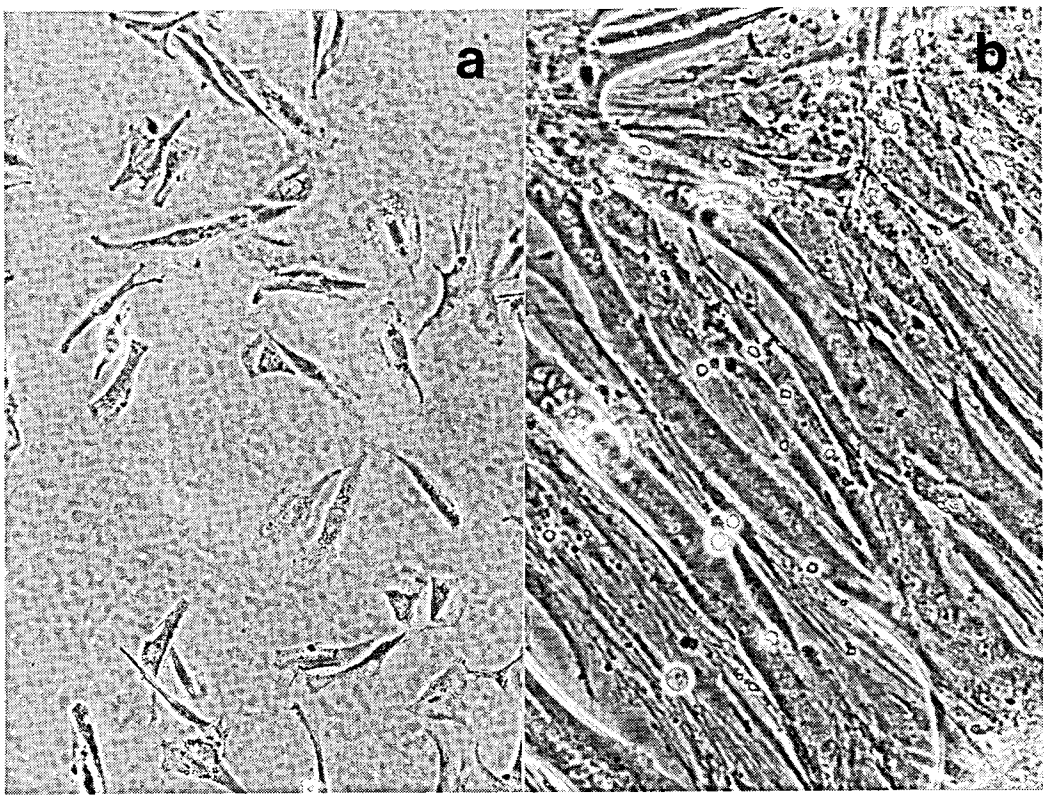


図1　培養2日目の筋芽細胞（a）と15日目の筋管細胞（b）×400

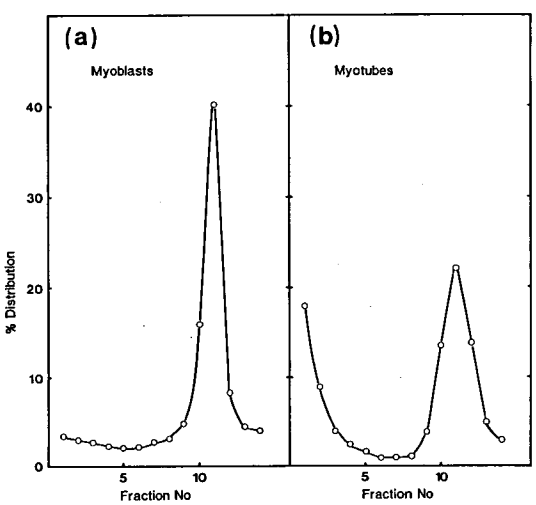


図2　筋芽細胞（a）及び筋管細胞（b）から調整したリソソーム分画のパコール密度勾配遠心におけるマーカー酵素の分布

の密度が大きく変化する程度の貪食能かどうかの検討はなされていない．培養腹腔マクロファージでは培養液に加えたHRPのリソソームへの蓄積に比例してリソソーム密度が大きく増加することを我々は見いだしている．これはマクロファージの強い貪食作用によって，リソソームの分解能を上回るHRPがリソソーム内に蓄積することによることを他の実験結果からも実証している．そこで，同様に大量のHRP(3 mg/ml)を1％の馬血清を含む筋管細胞に加えた解析結果が図3-aに示されている．HRP添加後1時間では細胞内に入ったHRPは軽い密度分画にほとんどが回収され，おそらくエンドソームに局在すると考えられる．15時間後では細胞内HRP量は20倍に達し，25％が重いリソソーム分画に認められる．それにともないリソソームの密度もわずかではあるが重い分画へのシフトが認められる．同様の実験を筋芽細胞でも行った(図3-b)．筋芽細胞では血清濃度

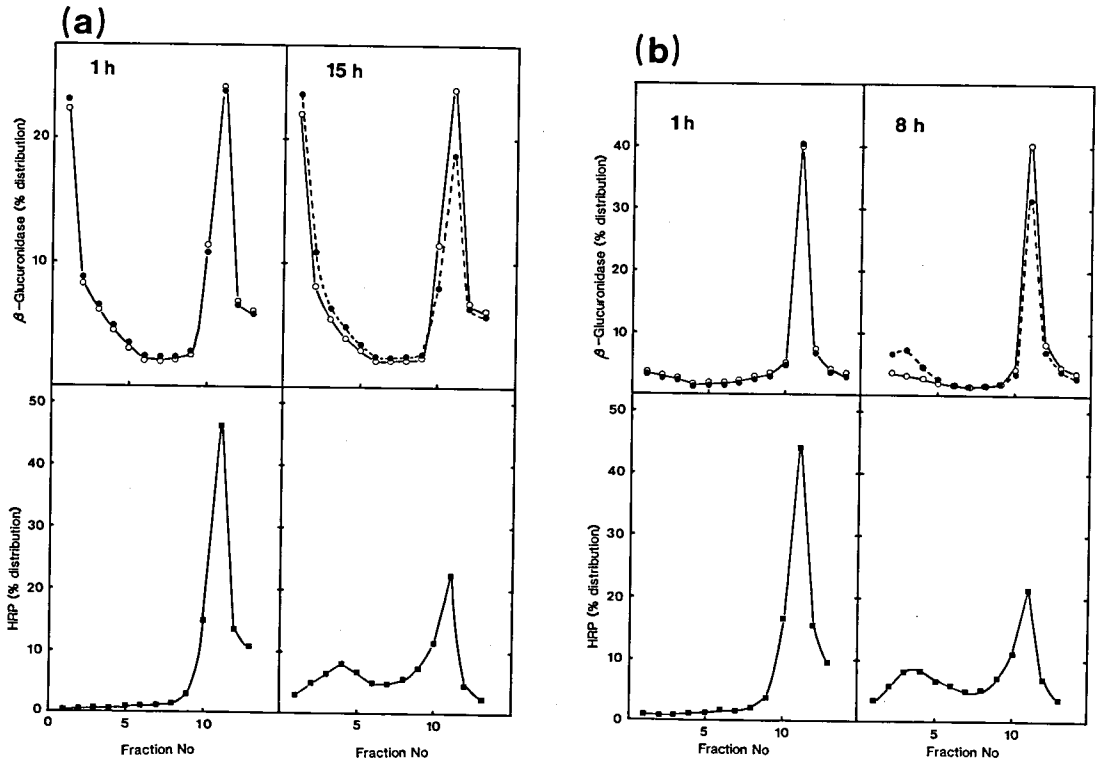


図3　筋管細胞（a）及び筋芽細胞（b）における西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）の異物貪食によるリソソーム密度の変化．対照（○—○），HRP 負荷（●--●）

を下げることが出来ないので，血清濃度は変えず，HRP を負荷した．細胞内に取り込まれた HRP の移行は筋管細胞と同様の動態を示し，8 時間では HRP のリソソームへの蓄積につれわずかにリソソームの密度が増大した．今度は，HRP を負荷せず，自己貪食を抑制する条件下（血清濃度を10%とする，図4参照）でリソソーム内蛋白分解を阻害した場合，リソソーム密度がどう変化するかを調べた．筋芽細胞及び筋管細胞に E-64-d を20μg/ml 添加し，16時間後に細胞からリソソーム分画を調製し，パコール密度勾配遠心で解析した．筋芽細胞，筋管細胞とも E-64-d の添加によりリソソームマーカーの30～40%が重い方へシフトしており，取り込まれた血清蛋白のリソソーム内の分解阻害の結果，リソソーム密度が増大したと考えられる．即ち上記の結果は筋芽細胞，筋管細胞いずれも異物貪食作用を有し，HRP あるいは血清蛋白を取り込み，一部はリソソームへ運搬しているが，リソソーム内蛋白分解を阻害しない限り，リソソーム内に多量に蓄積するほどの貪食能はないことを示唆している．

3．筋管細胞における自己貪食に伴うリソソーム密度の変化

種々の血清濃度に変えた筋管細胞に E-64-d(20 μg/ml）を加え，培養し16時間後に細胞を集めた．粗リソソーム分画をパコール密度勾配遠心で分析した結果が図4に示されている．無血清培地で培養した細胞では重いリソソーム分画即ちオートリソソームに自己貪食のマーカーである LDH の蓄積が E-64-d の添加により認められるが，血清濃度が上がるにつれ，自己貪食が著明に抑制されていることが分かる．一方リソソーム密度は無血清状態の方が血清存在下よりやや高い(E-64-d 無添加群の比較)．これは16時間における自己貪食能の

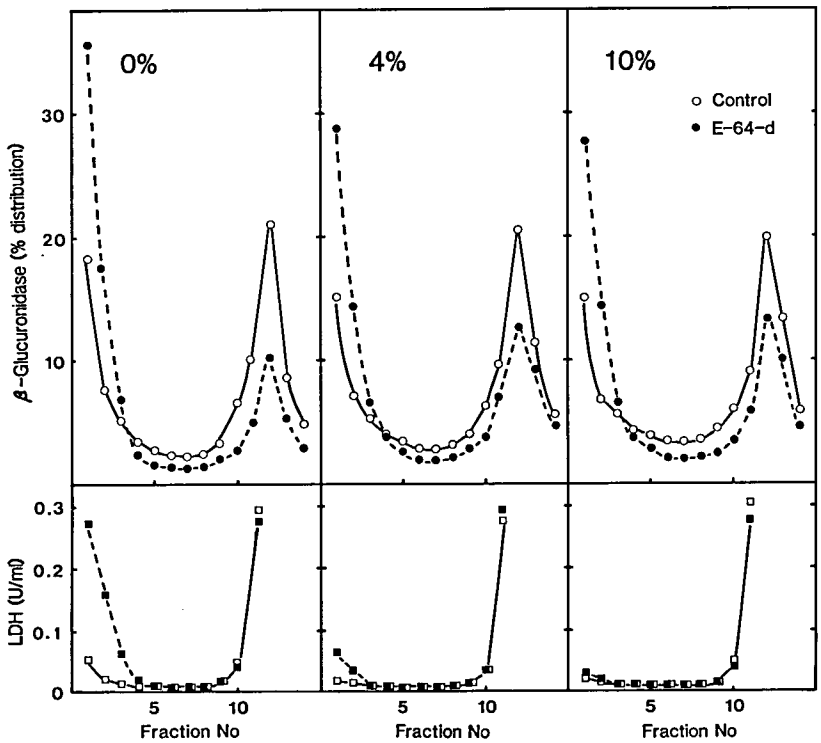


図4　筋管細胞における自己貪食によるリソソーム密度の変化

方が異物貪食能を上回っていることを示唆しているのだろう．そのことはE-64-dの添加によるリソソームマーカーの重い分画へのシフトが，無血清状態の方がやや多いことでも裏付けられる．10％血清で維持した細胞では異物貪食された蛋白質の蓄積によるリソソーム密度の増大であり，0％血清で培養された細胞におけるリソソーム密度の増加は自己貪食された蛋白質の蓄積による．

4．L8細胞の形態学的特徴

筋芽細胞から筋管細胞に分化するとカテプシンB活性は3～4倍増加する．カテプシンBの局在を免疫細胞学的にみると，筋芽細胞では核周囲に限局しているが，分化すると細胞全体に分布するようになる．筋管細胞を無血清培地に移し，E-64-d添加後16時間目の細胞の電顕像を図5-a，bに示す．細胞全体に多数の食胞を認め，種々の内容物が認められる．これらは筋細胞における自己貪食胞の形成を意味している．カテプシンL抗体を用いた免疫電顕的検査でカテプシンLの局在を示す金コロイド粒子を含むリソソーム（図5-c，矢印）が貪食胞と融合しているところがみられる．筋管細胞ではミオシンを多量に含むが，昨年度無血清培養下では自己貪食胞にミオシンが取り込まれていることをウエスタンブロット法で証明した．抗ミオシン抗体を免疫電顕的観察でもその金コロイド粒子を貪食胞の中に見いだすことが出来る．また，時には貪食胞の中にミオシンの重合したような像あるいは切断された一部が見いだされた．

考　　察

リソソームの密度が不均一であることは肝を中心とした多くの研究があり，おそらくリソソーム内の消化状態を反映すると考えられている．培養細胞系でのリソソーム密度の変化が生理的機能にともなったものであるかを追求した報告はなく，

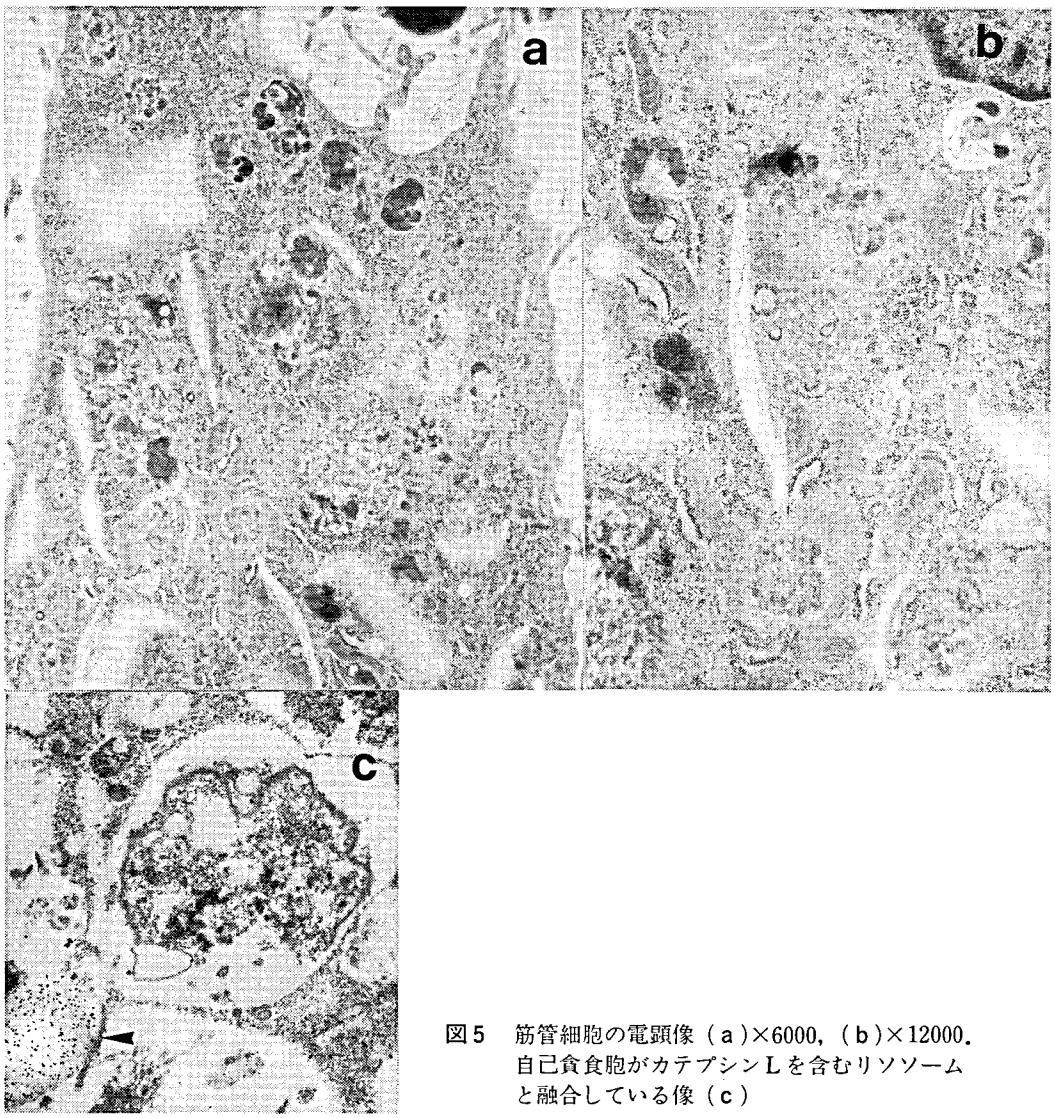


図5　筋管細胞の電顕像（a）×6000,（b）×12000.
自己貪食胞がカテプシンLを含むリソソーム
と融合している像（c）

最近我々は血清の存在がこれに大きく関与することをマクロファージの培養細胞系で明らかにしている．筋芽細胞から筋管細胞へ分化するにつれ，リソソームのカテプシン群を含む酵素活性が増え3～5倍に達することを昨年度報告したが，リソソームの密度もこれと平行して増加している．今回の結果はおそらく細胞内に取り込まれた蛋白(血清蛋白)がリソソームに次第に蓄積していきリソソームの退縮が遅くなり，細胞内のリソソームの数おそらく容積も増え，リソソーム酵素が著しく増加したのではないかと推定している．勿論リソソーム酵素の生合成が分化のプロセスで活性化されることも十分考えられ，おそらく両者とも関与している可能性が高い．筋芽細胞では核周囲だけにみられたカテプシンBが筋管細胞では細胞全体に広く分布するという形態学的観察，筋管細胞では非常に多くの貪食胞が見られるという電顕的観察も上述の推論を支持しているように思われる．筋の分化におけるリソソームの動態は *in vivo* でも調べる必要があろう．

HRPを筋細胞に負荷したとき，リソソーム密度が重い方へ著しく移行するという現象はみられなかった（図3）．ニワトリ筋管細胞はHRPを細胞内に取り込み分解し，一部はエクソサイトージスするという[6]．本実験ではHRPのエクソサイトージスは確認していないが，過剰のHRPを加えており，つねに細胞内に取り込まれている状態であり，休みなくリソソームへも運ばれていると考えられる．筋細胞においてリソソーム密度の変化が小さいことはHRPの細胞内取り込み能，リソソームの数，エンドソーム—リソソーム融合能などがマクロファージよりずっと低いことに由来するのであろう．

何らかの細胞障害（例えば筋ジストロフィー症など）があると異常産物の処理のため自己貪食が誘起され，それが筋線維の崩壊へと導くと考えられるが，障害時にL8筋細胞のリソソーム系がどのような動態を示すか興味ある問題である．

文　献

1) Kominami E, Bando T, Ii K, Hizawa K and Katunuma N: Increases in cathepsin B and L and thiol proteinase inhibitor in muscle of dystrophic hamsters. Their localization in invading phagocytes. J Biochem 96: 1841—1848, 1984.

2) Kominami E, Ii K and Katunuma N: Activation of the intramyofibral autophagic lysosomal system in muscular dystrophy. Amer J Pathol 127: 21—26, 1987.

3) Glaser JH and Sly WS: β-Glucuronidase deficiency mucopoly-saccharidosis. Methods for enzymatic diagnosis. J Lab Clin Med 82: 969—977, 1973.

4) Ishikawa E, Imagawa M, Hashida S, Yositake S, Hamaguchi Y and Ueno T: Enzyme-labelling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. J Immunoassay 4: 209—327, 1983.

5) Uchiyama Y, Watanabe M, Watanabe T, Ishii Y, Matsuba H, Waguri S and Kominami E: Variations in immunocytochemical localization of cathepsin B and thyroxine in follicular cells of the rat thyroid gland and plasma TSH concentrations over 24 hours. Cell Tissue Res 256: 355—360, 1989.

6) Janeczko RA, Carriere RM and Etinger JD: Endocytosis, proteolysis and exocytosis of exogenous proteins by cultured myotubes. J Biol Chem 260: 7051—7058, 1985.

10）筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症における酵素・遺伝子異常について

垂　井　清一郎*,**

研究協力者　中　島　　弘*　河　野　典　夫*　山　﨑　知　行*
堀　田　紀久子*　川　知　雅　典*　大　野　　昭*

はじめに

筋ホスホフルクトキナーゼ（PFK）欠損症（グリコーゲン病Ⅶ型）は，米国MDA（Muscular Dystrophy Association）の検索対象としても注目されている常染色体性劣性遺伝の代謝性筋疾患である．分担研究者らが1965年にその第一家系を報告し，同時に欠損酵素を同定して以来[1]，現在までに世界で約30症例を数える[2]．本症の病態分析のうち，赤血球解糖代謝の変動[3]，筋原性高尿酸血症[4]などについてはこれまで報告してきた．現在私共は，本症の病因を遺伝子レベルで解明したいと考えている．そこで本研究では，まず正常ヒト筋PFKの一次構造をcDNAクローニングから決定し，ついで同遺伝子構造を遺伝子クローニングによって分析した．さらに，筋PFK欠損症患者の変異酵素の構造とその原因となる遺伝子異常を解析した．

方　　法

①正常ヒト筋PFKcDNAのクローニング

ヒト筋mRNAより岡山・バーグ法によりcDNAライブラリーを作成した．家兎筋PFKの部分cDNA（Putney博士より提供さる）を用いてヒト筋PFKクローンpHMP1.10を得た．このクローンは5'末端（蛋白N末端）側を含まなかったため，λgt10を用いてプライマー・エクステンションライブラリーを作成し，λHMPE4.1，λHMP2E1.8をクローニングした（図1）．これらは

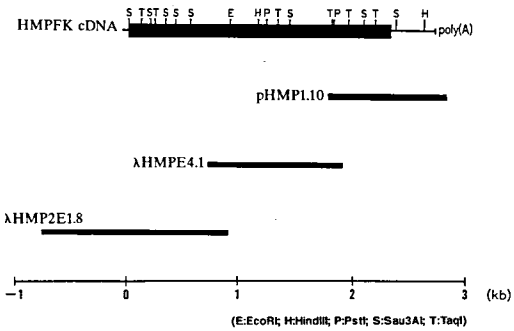


図1　正常筋PFKのcDNAクローン

dideoxy法により全塩基配列を決定した[5]．

②正常ヒト筋PFKゲノムのクローニング

JCRB（日本がん研究振興財団遺伝子バンク）より提供された日本人ゲノミックライブラリー（EcoRI部分消化）をヒト筋PFKのcDNAをプローブとしてスクリーニングし，約20kbのインサートを有するクローンを単離した．次に同クローンの5'端をプローブとして別のライブラリー（Sau3AI部分消化）からオーバーラップを有するインサート長約17kbのクローンを単離した．制限酵素地図作製，塩基配列決定からヒト筋PFK遺伝子の全構造を解析した．

③筋PFK欠損症患者の分析

欠損症患者筋生検標本よりmRNAを抽出し，λgt10によりcDNAライブラリーを作製した．正常cDNAをプローブとして患者筋PFKの完全長を含む複数のcDNAをクローニングし（図2），全塩基配列を決定した．また患者遺伝子については，Taqポリメラーゼを用いた遺伝子増幅（PCR）法により分析した．

＊大阪大学医学部第二内科
＊＊大阪大学医学部神経内科

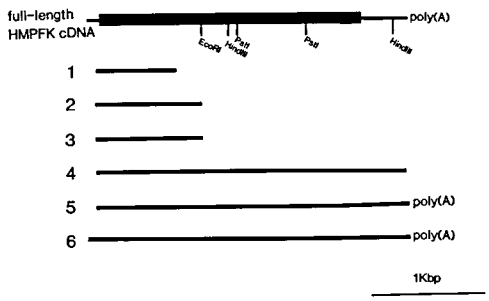


図2　筋PFK欠損症患者の筋PFKcDNAクローン

結　　果

正常ヒト筋cDNAの塩基配列から，そのmRNAの構造が明らかとなった．ヒト筋PFKのmRNAは，5'非翻訳領域，開始コドン（ATG）以下2337塩基対，779アミノ酸残基の翻訳領域，停止コドン（TAA）以下ポリA付加シグナル（AATAAA）を含む399塩基対の3'非翻訳領域とポリA鎖からなっていた．またこのmRNAによってコードされる酵素タンパクの分子量は85,050ダルトンと算定された．家兎筋PFKでは，遺伝子翻訳領域の配列が報告されているが[6]，ヒトと比較すると，翻訳領域内のホモロジーは塩基レベルで89%，アミノ酸レベルで96%であった[5]．

次に，筋PFK遺伝子の構造を解析した．本遺伝子のエキソン構造は，家兎のもの[6]と非常によく類似しており（図3），イントロンの長さに相違を認めたものの，エキソン数，エキソン長は完全に一致していた．各イントロンの5'端はすべてGT，3'端はすべてAGであり，高等動物ゲノムに特有のGT-AGルールにコンセンサスな配列を有していた．

患者cDNAの塩基配列を分析したところ，開始コドン（ATG）のA（アデニン）を1としたとき，第516番にTからCへの単塩基置換が存在したが，これはThr（スレオニン）のコドンを変えないsilentな置換であった．さらに下流には75塩基対すなわち25アミノ酸残基に相当するin-frameの欠失を有した．この欠失部位を含む遺伝子領域をPCR法によって増幅し分析したところ，患者遺伝子上にmRNAの欠失部位に相当するエキソン下流のイントロン5'のスプライスサイトにpoint mutation（GからT）が存在することが明らかとなった．

考　　案

ヒトPFKには少なくとも筋型，肝型および血小板型の三種のアイソザイムが存在するが[2]，血小板型についてはいまだその一次構造や遺伝子構造についての知見は得られていない．骨格筋では，筋型アイソザイムが，ホモ・テトラマーとして機能するが，心筋，平滑筋など他の筋組織で筋型アイソザイムが発現しているか否か，あるいは筋型以外のどのアイソザイムが発現しているかといった組織特異性は，Northern分析によって現在解析中である．

筋PFK欠損症であるグリコーゲン病Ⅶ型は，筋運動時の疼痛，運動持続能力の低下，溶血および高尿酸血症を主徴とし，代謝性筋疾患としては，

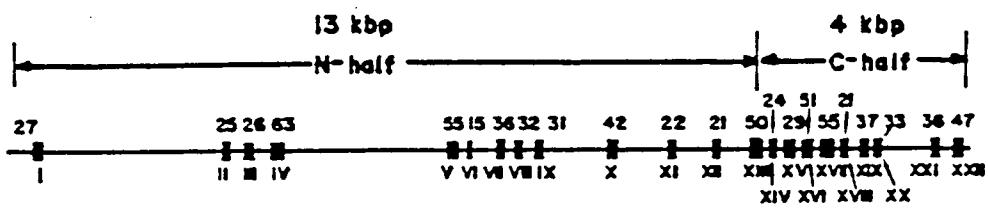


図3　家兎筋PFK遺伝子の構造
文献[6]より改変．ローマ数字はエキソン番号を，アラビア数字は各エキソン内のアミノ酸残基数を示す．

酵素異常の明らかとなっている疾患単位の一つとして重要視される．本症における高尿酸血症の程度は筋グリコーゲン病の中でも特に顕著で，筋原性高尿酸血症の概念を提唱する契機となった所見でもある[4]．筋グリコーゲン病としては比較的多く報告されているグリコーゲン病V型では，複数の患者筋のホスホリラーゼ mRNA の分析が行われている[7]．これによると，V型では mRNA の完全欠損から量的な変化にわたる様々な欠損状態，すなわち遺伝的多様性の存在が示唆されているが，酵素および遺伝子レベルでの変異部位が同定されるまでにはいたっていない．VII型では今回の分析が最初であるが，患者に認められた25アミノ酸残基の欠失は，酵素の一次構造上C末端側2分の1に位置し，アロステリック部位の一つ，ADP/AMP 活性化部位の活性中心の一つの Arg（アルギニン）の欠失を伴う．また同時に，2本の α ヘリックスと1本の β シート構造をも欠失することから酵素全体の立体構造に大きな変化をもたらし，活性の完全な欠損にいたると考えられる．cDNA 上の欠失部位に相当する患者遺伝子領域を現在クローニング中であるが，Taq ポリメラーゼを用いた遺伝子増幅（PCR）法の結果からは，患者遺伝子上の point mutation により RNA スプライシングの異常から75塩基の欠失をきたしたことが示唆された．複数例のVII型患者において筋 PFK の mRNA 欠損ないし量的，質的な変化が認められるか否か，また遺伝子上のいかなる変異をともなっているかを今後検討して行く必要がある．

総　括

本研究の結果，

1．ヒト筋 PFK の一次構造を cDNA クローニングから決定し，家兎筋酵素との構造比較を行った[5]．

2．ヒト筋 PFK 遺伝子をクローニングし，その全構造を解析した[8),9)]．

3．筋 PFK 欠損症患者の変異酵素の構造を分子生物学的手法を用いて分析し，さらにその遺伝子異常部位を同定するに至った[10]．

文　献

1) Tarui S, Okuno G, Ikura Y, Tanaka T, Suda M and Nishikawa M: Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. A new type of glycogenosis BBRC 19: 517—523, 1965.

2) Rowland LP, DiMauro S and Layzer RB: Phosphofructokinase deficiency "Myology: Basic and Clinical" (ed by Engel AG & Banker BQ), 1986, pp1603—1617.

3) Shimizu T, Kono N, Kiyokawa H, Yamada Y, Hara N, Mineo I, Kawachi M, Nakajima H, Wang YL and Tarui S: Erythrocyte glycolysis and its marked alteration by muscular exercise in type VII glycogenosis. Blood 71: 1130—1134, 1988.

4) Mineo I, Kono N, Hara N, Shimizu T, Yamada Y, Kawachi M, Kiyokawa H, Wang YL and Tarui S: Myogenic hyperuricemia. A common pathophysiologic feature of glycogenosis types III, V, and VII. N Engl J Med 317: 75—80, 1987.

5) Nakajima H, Noguchi T, Yamasaki T, Kono N, Tanaka T and Tarui S: Cloning of human muscle phosphofructokinase cDNA. FEBS Lett 223: 113—116, 1987.

6) Lee CP, Kao MC, French BA, Putney SD and Chang SH: The rabbit muscle phosphofructokinase gene. Implications for protein structure, function, and tissue specificity. JBC 262: 4195—4199, 1987.

7) Gautron S, Deagelen D, Mennecier F, Dubocq D, Kahn A and Dreyfus JC: Molecular mechanisms of McArdle's disease (muscle glycogen phosphorylase deficiency). RNA and DNA analysis. JCI 79: 275—281, 1987.

8) Yamasaki T, Nakajima H, Kono N, Hotta K, Yamada K, Kuwajima M, Noguchi T, Tanaka T and Tarui S: Human muscle phosphofructokinase gene — structure and two promoter system, submitted.

9) Nakajima H, Yamasaki T, Noguchi T,

Tanaka T, Kono N and Tarui S: Evidence for alternative RNA splicing and possible alternative promoters in the human muscle phosphofructokinase gene at the 5' untranslated region. BBRC 166: 637—641, 1990.

K, Kawachi M, Kuwajima M, Noguchi T, Tanaka T and Tarui S: Genetic defect in muscle phosphofructokinase gene due to a point mutation at the 5' splice site, in press.

III. 遺　伝　子

11) CANP遺伝子の発現調節と機能

鈴木紘一*

研究協力者　大野茂男*　榎森康文*　川崎博史*
秋田朗子*　反町洋之*　羽田明子*

はじめに

カルシウム依存性中性プロテアーゼ（CANP）は筋タンパク質の崩壊の引金を引くプロテアーゼとして研究され，CANPやカテプシンB，L，Hなどのシステインプロテアーゼに有効な阻害剤としてE64が開発された．その後，筋ジストロフィー症の原因遺伝子としてジストロフィンが同定され[1]，ジストロフィンは主に筋肉細胞の細胞膜部位に存在することが示された[2),3)]．筋ジストロフィー症，特にDuchenne型（DMD）ではジストロフィンの発現が全く見られないことから[2),3)]，CANPと筋ジストロフィー症における筋萎縮の関係は次のように考えられている[4)]．すなわち，DMDではジストロフィンの欠損により筋細胞膜の透過性が変化し，細胞外のカルシウムイオンが細胞内に進入し，CANPが自己消化によって不活性型から活性型に変化し，筋タンパク質の分解がおこる．

ジストロフィンの同定と相前後してCANPの活性化機構に関する研究が大きく進展した[5)~7)]．その結果，これまで活性型と考えられていたCANPは実は不活性型のプロ酵素で，大サブユニットのN末端のプロペプチドドメインが切りとられて活性型に変る．この活性化はカルシウムとリン脂質の存在下で自己触媒的におこるが，細胞膜のない *in vitro* では活性化するのにmM程度の高いカルシウムの存在が必要である．こうしてCANPが *in vitro* で何故非生理的に高いカルシウム濃度を必要とするのかが判明し，CANPに関する矛盾点が解決できた．

ここではCANPの生理機能を考えるため，改めてCANP遺伝子の発現機構を検討し，CANPの生理機能との関係を考察した[8)]．

材料と実験

ヒトmCANP大サブユニットcDNAの最もN末端側のApaI断片（0.35kb）をプローブとし，ヒトの染色体DNAライブラリーをスクリーニングしCANPの5′上流域のDNA断片をえた．CANPの上流域の機能を解析するため，CAT遺伝子とSV40のプロモーター／エンハンサーを含む発現ベクターに種々のCANPのDNA断片を挿入し，CAT活性の変化を観察した．その他の実験方法は文献8に記したものを用いた．

結果と討論

1．mCANP大サブユニットの5′上流域の構造

mCANP大サブユニットの5′上流域の構造を図1に示した．この領域には明確なTATAやCAAT配列はなく，GC含量が高かった．また，複数個の転写開始点が見出された．これらはハウスキーピング遺伝子に一般的に見られる特徴で，CANPの発現が普遍的であることを考え合せると，CANPもハウスキーピング遺伝子の一つと考えられる．

2．5′上流部の機能の解析

CANP遺伝子の発現を制御する部位を同定するため，CAT発現ベクターの上流にCANPの5′上流域の種々の断片を組込み，CAT活性の発現を調べた．図2に示すようにCANPの5′上流域の−2.5k〜−20bの部分をCAT遺伝子の上流に挿入したプラスミド（p−2.5k/−20CAT）は低レベルのCAT活性しか発現しなかった．すなわち，−2.5k〜−20bの部分は弱いプロモーター活性しか示さなかった．次に，上記の断片を5′側

*東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部門

```
CGGCCTCCCAAAGTGTTGGGATTACAGGTGTGAACTACCGCACCCAGCCTTATTGGCCA

                    -700
AATCTGACACCCTATCTATAATCAATAACAGCTGAGCAGTAGTAATTGCAGCATTATGCA

ATAGCTCGGTGCTTAGAGTCCCTGTTCTGCCTGTGACTGGTGTGCCACCATTGGGGCCGT
-600
CATTTAGCGTCTCCGAGGCTCAGTTTTCTCATCTGTAAAATGGGGACAATATCAGCGCCT

                                                -500
TCTTCAGAGTCGCTGGGAGGATTAAATGAGATGATGTATGCAGAGCCGTTAAGACGATGT

TTGGCACAAAGTTCAGGGCAGCTGGTTTAGTTTCCTCGACTTCACTACCTGACCCTCTGC

                    -400
TAACTCCCCGGGTGTTTTCCGGACGGCCACAACTATCCTAGCCTTCTTCCCTATGGGCTG

CAAAGGTGGCCTCGGGTTCCGGTGGGAGCCCCAACTCTGGACCGCGATTCGCGAGCCTCC
-300
CCGGCGCCGGGCCGTGCATCCCGGGAGCTGTCCGCAGATGGCAGCACCGGCCCGTGTCGC
                 negative element ←————————→ promoter
                                    -200
GGCGTTCCCGGCGCTCGGCAGGCCGAGATGGCTGGTCCCGGGCCGGGAGCCCAGCAGGCC
                                                  -130  exon 1
GGGAGCGGCTGAGGCCACACCCCGCGGGGCCGGGCCGCTTCCCTCCGGTGAATCATCGCT
                          Sp1              AP-1 (TRE)
                    100
CGCAGCGGCGGCGCCCGCAGTGGCCGCAGCAGGCCGCCGGGCCCTGGCCGCGCCCCAGCC

                                                          -1
GAGCGCAGCGCGGAGTCGCCCCGACCTTTCTCTGCGCAGTACGGCCGCCGGGACCGCAGC

1
ATGGCGGGCATCGCGGCCAAGCTGGCGAAGGACCGGGAGGCGGCCGAGGGGCTGGGCTCC
MetAlaGlyIleAlaAlaLysLeuAlaLysAspArgGluAlaAlaGluGlyLeuGlySer
1                                   100
CACGAGAGGGCCATCAAGTACCTCAACCAGGACTACGAGGCGCTGCGGAACGAGTGCCTC
HisGluArgAlaIleLysTyrLeuAsnGlnAspTyrGluAlaLeuArgAsnGluCysLeu

GAGGCCGGGACGCTCTTCCAGGACCCGTCCTTCCCGGCCATCCCCTCGGCCCTGGGCTTC
GluAlaGlyThrLeuPheGlnAspProSerPheProAlaIleProSerAlaLeuGlyPhe
                                                      intron
                    200
AAGGAGTTGGGGCCCTACTCCGGCAAAACCCGGGGCATCGAGTGGAAGCGCCCCACGGTA
LysGluLeuGlyProTyrSerGlyLysThrArgGlyIleGluTrpLysArgProArg
                                                          79
GGAAGCGCGCGGCAGGACGCGGGCAGGGCGGAGAGCCGGGCAGGGCGGGGTGCAGGCCGG
300
CCCGCGCGCGCTGGGGGGGGCACCGGGTGCTGCAGTGGGGAAGCCGAAGCAGGCCAGAT

CTGGACACTCGGCGC
```

図1　mCANP 大サブユニット遺伝子の 5′上流域の構造

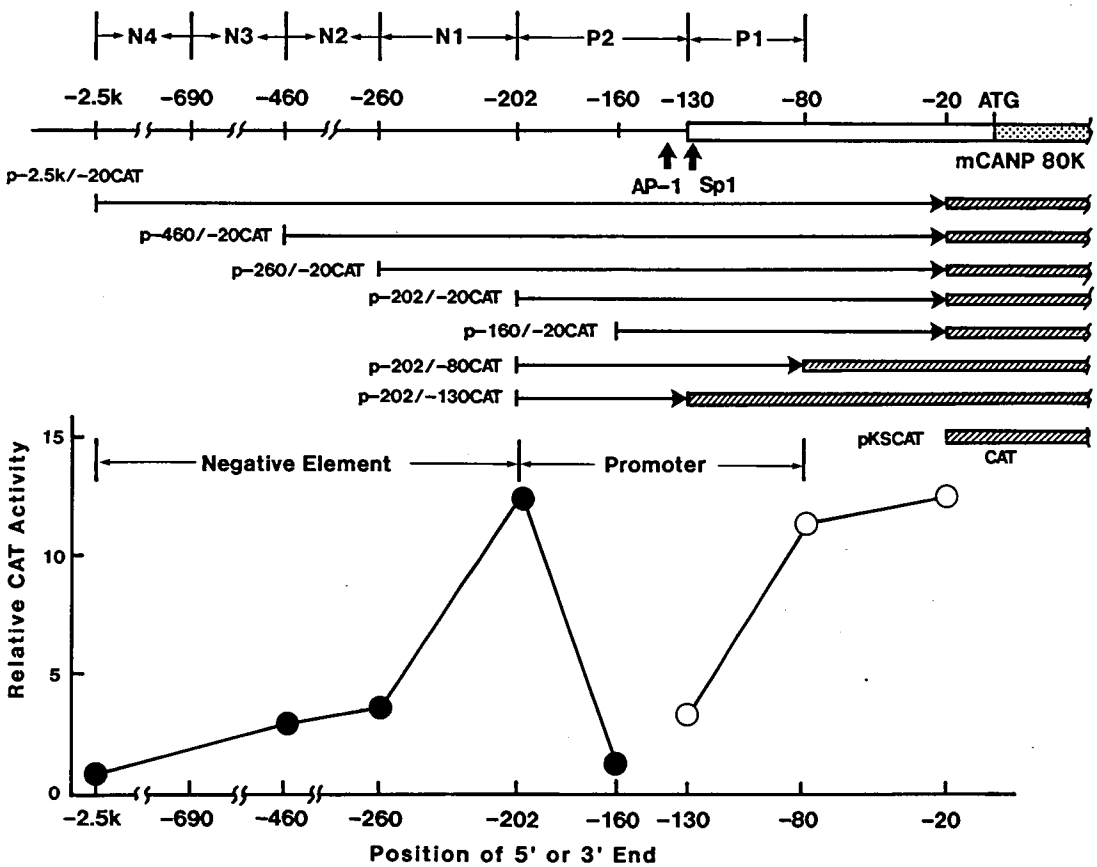


図2　mCANP 大サブユニット遺伝子の 5′上流域の機能解析

から 3′側に向けて順次削除していったところ(p−460/−20CAT, p−260/−20CAT, p−202/−20 CAT), CAT 活性は次第に上昇し, −2.5k〜−202b を除去したものははじめの活性の約13倍に上昇した. 従って, −2.5k〜−202の領域はCANP の発現を負に調節する部位である. さらに5′側を−160まで除去すると CAT 活性の著しい低下がみられた. 一方 3′側から同様な削除実験を行うと, −80〜−20の領域は CAT 活性に影響ないが, −130〜−80領域の除去は CAT 活性の著しい低下をきたした. さらに詳細な解析を行った結果をもとにCANP の 5′上流域の機能の模式を示したのが図 3 である. CANP の 5′上流域の−2.5k〜−202の負の発現調節領域は少なくとも N1〜N4の 4 つの部分に分けることができ, 各々独立に作用しうる. この負の作用は配列の方向には関係なく, CANP のプロモーターの発現を抑制するだけでなく, CANP 以外の外来遺伝子のプロモーターにも全く同じ効果を示した. 一方CANP 遺伝子の発現を正に調節する領域(−202〜−80) は典型的な TATA ボックス等は含まないがプロモーター領域と考えられる. この領域は P1と P2の 2 つに分けることができる. P2 (−202〜−130) は単独では完全なプロモーターとはなりえないが, TATA ボックスを含むインターフェロンのプロモーター等には配列方向には無関係に作用する. すなわち, P2はプロモーターの上流因子といえる. 一方 P1(−130〜−80) も単独では完全なプロモーター活性を持たないが, インターフェロン遺伝子の TATA ボックスを含む

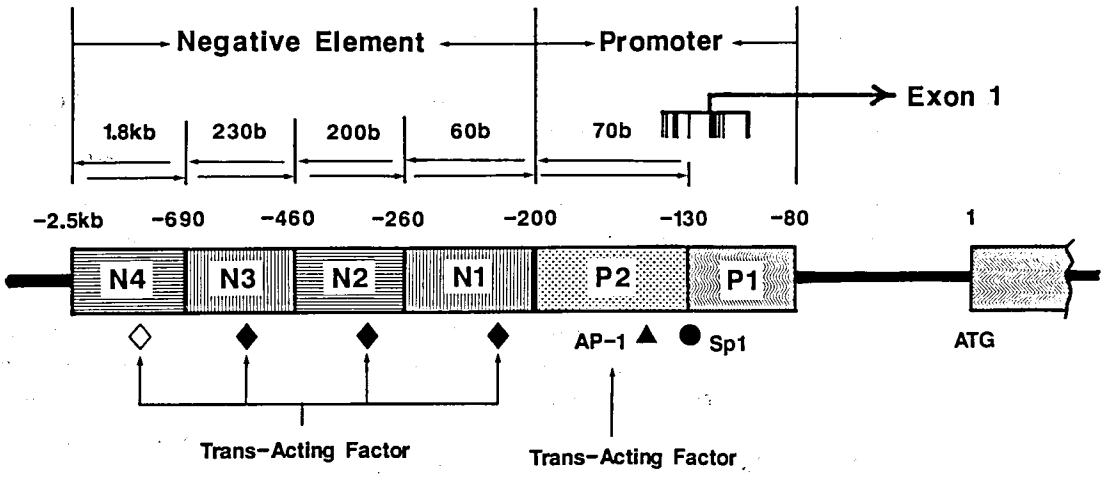


図3　mCANP 大サブユニット 5′上流域の構造模式図

領域の作用をはたすことができる．P2はプロモーターの下流因子に相当すると考えられる．

3．CANP の発現に関与する細胞質因子

CANP 遺伝子の発現は正および負のシスの調節因子によって制御されるが，この発現調節に細胞質の因子，すなわちトランスの因子が関与するか否かを検討した．図4に示すようにCANPのプロモーター領域に相当する−202〜−20をCAT遺伝子の上流につないだプラスミド(pT−2)とその中のP2（−202〜−130）に相当す

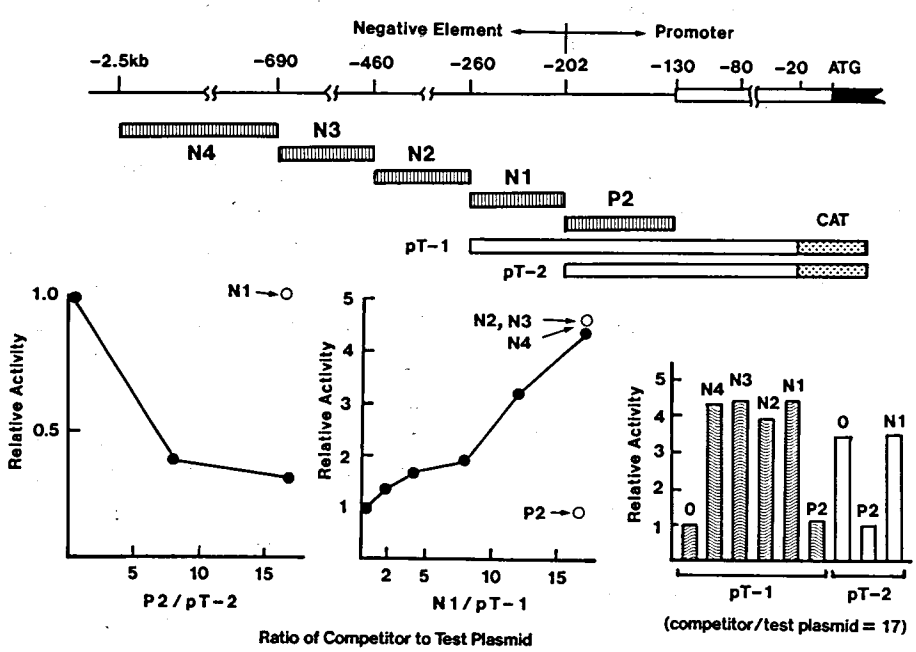


図4　mCANP 大サブユニット遺伝子の発現に関与する細胞質因子の同定

る領域を含むプラスミド (pC−5) を同時に HeLa 細胞にトランスフェクトし，pT−2に対し pC−5 (P2) を次第に増したときの CAT 活性の変化を調べた．図4左下のグラフのように P2の発現量を増すと CAT 活性の減少が見られた．P2と接する DNA 断片 N1を発現しても CAT 活性には影響がなかった．次に N1部分を含む CAT プラスミド (pT−1) と N1部分のプラスミド (pC−4) を使って同様な実験を行った(図4中下グラフ)．N1の発現量が増すと CAT 活性は上昇した．N1以外の断片である N2, N3, N4も N1と全く同じ効果を示したが，P2は効果がなかった．

以上の結果は次のように解釈できる．CANP 遺伝子中にある正 (P2) および負 (N1) のシス因子の作用には細胞内に存在するトランスの因子が必須である．P2や N1を同じ細胞で発現させると，P2や N1と結合して作用を発現する因子が，余分に発現した P2や N1断片に結合して不足する．そのために CAT の発現プラスミド中に P2や N1が作用しなくなると考えられる．P2が作用しなくなればプロモーター活性の低下，すなわち CAT 活性の低下となり，N1の場合には負の制御が作用しなくなるので，CAT 活性は上昇する．細胞内に存在するこのトランス因子，おそらくタンパク質性の転写調節因子，の結合は部位特異的なので，他の領域の DNA を発現させても効果はない．しかし，N1〜4は同じ効果を示したので，この負の調節領域に働くトランス因子は同一または酷似したものと考えられる．

4．CANP 遺伝子の発現調節と機能

上述のごとく mCANP の大サブユニットの遺伝子は正 (P1, P2) および負 (N1〜4) のシス調節因子と，これに作用するトランスの因子によって複雑に制御されている．CANP 遺伝子の配列 (図1) 中には転写因子の結合部位として AP-1, SP1の存在が目立つ．予備的な知見によれば，mCANP 大サブユニットの転写は TPA によって促進する．すなわち，AP-1結合部位が機能していると考えられる．CANP は前述のようにプロテインキナーゼ C (PKC) と非常によく似た条件で細胞質から細胞膜に移行し活性化される．PKC は TPA 処理で活性化されるが，TPA 処理で CANP 遺伝子の転写が促進され，CANP の量が増大する．増大した CANP は PKC を切断し TPA 処理による情報伝達は終了する．このように CANP の生理機能の1つは情報伝達とのかかわりで，PKC のダウレギュレーションにおいて重要な機能をはたすと思われる．

ヒト CANP の小サブユニット遺伝子の詳細な機能解析は終っていないが，その5′上流域のヌクレオチド配列は大サブユニットと非常によく似ていて，AP−1, SP1結合部位も存在する．また μCANP 大サブユニットの構造もよく似ている．おそらく μ, mCANP の大サブユニットと小サブユニットの遺伝子発現の制御機構は基本的には同じと予想される．これら3種の CANP 遺伝子は各々別個の染色体上に存在するが，発現調節機構が良く似ていることによってサブユニットの量比等の制御が同調して行なわれていると考えられる．

文　献

1) Koenig M, Monaco AP et al: The complete sequence of dystrophin products, a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell 53: 219, 1988.
2) Arahata K, Ishiura S et al: Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. Nature 333: 861, 1988.
3) Bonilla, E, Samitt CE et al: Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophine at the muscle cell surface. Cell 54: 447, 1988.
4) 塚原俊文，杉田秀夫：筋ジストロフィーの新展開，実験医学6：1097, 1988.
5) Suzuki K: Calcium activated neutral protease: domain structure and activity regulation. Trends Biochem Sci 12: 103, 1987.
6) Suzuki K, Imajoh S et al: Calcium activated neutral protease and its endogenous inhibitor. FEBS Lett 220: 231, 1987.

7) Suzuki K, Imajoh S et al: Regulation of activity of calcium activated neutral protease. Adv Enzyme Regul **27**: 153, 1988.
8) Hata A and Ohno S et al: Tandemly reiterated negative enhancer-like elements regulate transcription of human gene for the large subunit of calcium-dependent protease. J Biol Chem **264**: 6404, 1989.

12) Kennedy-Alter-Sung 症候群の遺伝子解析

高　守　正　治*

研究協力者　横　地　英　博*　松　原　四　郎*　島　　孝　仁*

はじめに

球脊髄性筋萎縮症 Kennedy-Alter-Sung 症候群（以下 KAS と略する）は伴性劣性遺伝型式をもつ遺伝性運動ニューロン疾患で[1]，同疾患の遺伝子を明らかにすることは，運動ニューロン疾患の病因解明の糸口として重要な意味をもつと思われる．Fischbeck らは Xq21.31に位置するプローブ DXYS1 と KAS 遺伝子の間に有意の連鎖を認め，KAS 遺伝子がX染色体長腕近位部にあると推定した[2]．我々は昨年度の本班会議で DXYS1 による遺伝的多型が本邦でも認められることを報告した．今回は DXYS1 による KAS 家系の検索の結果，および平行して行っている Pulsed field gel electrophoresis（以下 PFGE と略する）による巨大 DNA レベルでの解析結果を報告する．

対象および方法

KAS 6 家系より検体を得た．

方法 1． 末梢血白血球から単離した DNA を制限酵素 TaqI にて切断，アガロースゲル電気泳動により分離した．ナイロン膜にサザントランスファー後，American Type Culture Collection を通じ Dr. Page より供与された DXYS1 を^{32}P でラベルしたものとハイブリダイズさせ，バンドをオートラジオグラフィーにより検出した．

方法 2． PFGE は，van Ommen らの方法[3]に従い，末梢血白血球を低融点アガロースに包埋し除蛋白後，制限酵素 SfiI にて切断した．泳動はパルスタイム50秒，約20時間展開し，約600kb 以下の DNA 断片を分離した．DNA のサイズマーカーとしてラムダ DNA の concatemer と Saccharomyces cerevisiae の染色体を用いた．

結　　果

KAS 6 家系の解析結果を図 1 に示す．DXYS1 はX染色体において11.8kb と10.6kb の多型を示し，11.8kb のバンドのみられた個体を A，10.6kb のバンドのみられた個体を B で示す．左肩に矢印のついた個体で検体が得られたが，6 家系中 3 家系で母親がすでに死亡しており検体が得られなかった．

PFGE では DXYS1 は正常男性，正常女性ともに約150kb のバンドを認め，女性のバンドは男性のバンドの倍程度の濃さを示していた（図 2）．これに加えて男性では約250kb のバンドを認めた．同様に KAS 患者の SfiI digest を DXYS1 とハイブリダイズさせた結果が図 3 である．KAS 1，2，3は互いに別の家系に属する患者で，cont1，2，3は正常男性である．KAS2，3は正常男性と同じ約150kb のバンドを示したが，KAS1 は約170 kb のやや大きいバンドを示した．この他の 2 名の KAS 患者では正常男性と同じ大きさのバンドを認めた．

正常個体の SfiI digest と DXYS1 近傍のプローブ DXS1（Xq11－13），DXS178（Xq21.2－22）を

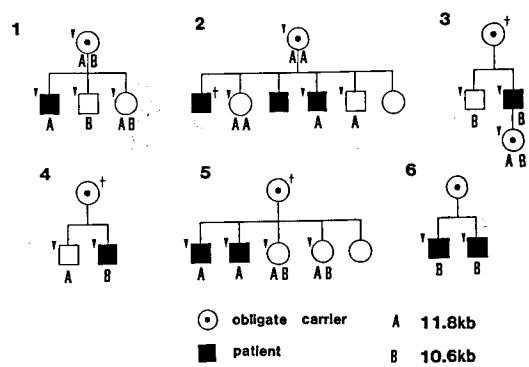


図 1　KAS 6 家系の分析結果

*金沢大学医学部神経内科

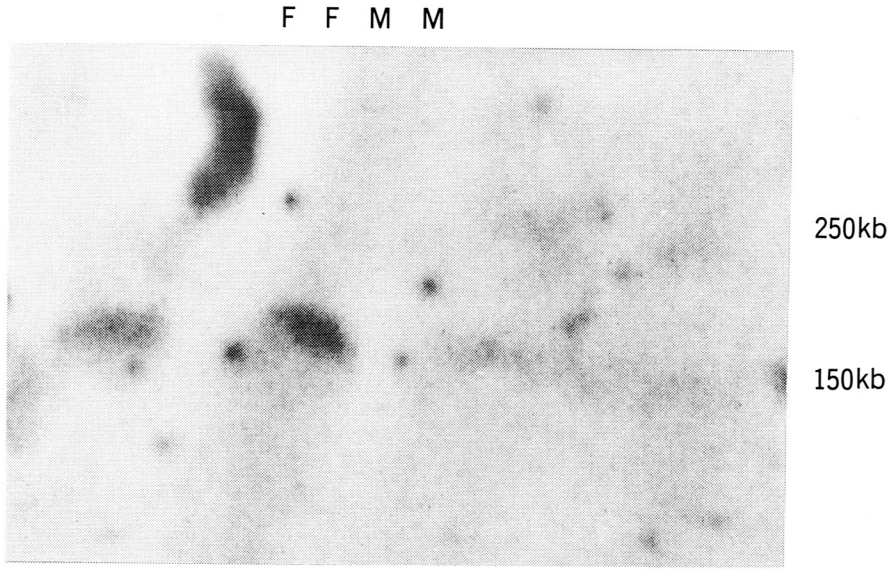


図2　正常男性と女性の PFGE 分析結果

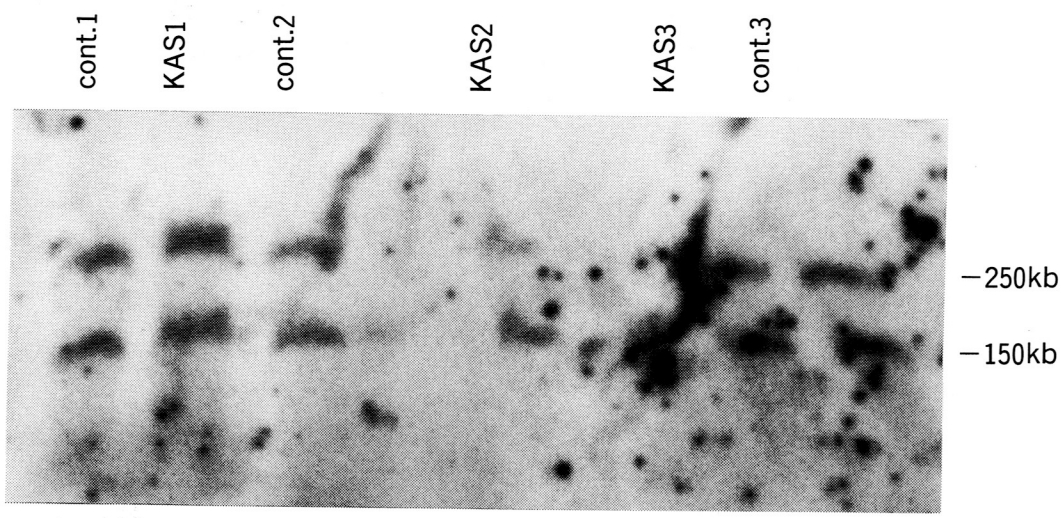


図3　KAS 患者 3 名と正常男性 3 名の PFGE 分析結果

ハイブリダイズさせた結果，DXS1は約80kbのバンド，DXS178は約100kbのバンドを検出した．

考　　察

Pageら[4]の報告同様，DXYS1は，TaqI digestでX染色体において11.8kbと10.6kb，Y染色体において14.6kbのバンドを検出した．この疾患の場合，連鎖について情報が得られるのは母親が2重ヘテロ接合体の場合であるが，図1で第1家系と第4家系がこれに相当し，いずれにおいても組み換えが生じていない可能性が強い．今後，家系を増やしKAS遺伝子とDXYS1との間のlod scoreを求めたい．同時にDXYS1近傍の他のプローブを用い，より強く連鎖するプローブをみつけ出す必要があると考えられる．

PFGEを用いることにより，DXYS1はSfiI digestで男女共通に約150kbのバンドを認めることから，このバンドはX染色体由来と考えられる．これに加えて男性で認められた約250kbのバンドはY染色体由来と推定したが，X染色体のpartial digestionである可能性もある．互いに別の家系に属するKAS患者6例中，5例で正常男性と同じ約150kbのバンドを認めたが，1例では約170kbとやや大きいバンドを認めた．これはRFLPである可能性の他，疾患自体による遺伝子の変異である可能性も考えられる．しかしFischbeckらの報告では[2]KAS遺伝子とDXYS1は組み換え価$\theta=0.04$において最大のlod score 3.53を示しており，まだかなり距離があると推定される．またPFGEの分解能として数10kbの不正確さが出るという報告もあり[5]，この点も除外する必要がある．

正常個体ではSfiI digestでDXS1は約80kb，DXS178は約100kbのバンドをそれぞれ検出した．いずれもDXYS1によって検出されるバンドと大きさが異なっており，未だこれらのプローブ間の距離は不明である．今後，DXYS1近傍の種々のプローブを用い，またSfiI以外のrare cutting enzyme (XhoI, SalI, MluI等) を使ってPFGEによるX染色体長腕近位部の解析を進めたい．

結　　語

KAS 6家系のうち，2家系においてKAS遺伝子座とDXYS1の連鎖が認められた．PFGEによる分析ではDXYS1はX染色体由来の約150kbのSfiI断片を検出した．KAS 6例中5例で同じ大きさのバンドを認めたが，1例で約170kbのやや大きなバンドを認めた．

文　　献

1) Kennedy WR, Alter M and Sung JH: Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset A sex-linked recessive trait. Neurology (Minneap) 18: 671—680, 1968.
2) Fischbeck KH, Ionaescu V, Ritter AW et al: Localization of the gene for X-linked spinal muscular atrophy. Neurology 36: 1595—1598, 1986.
3) Van Ommen JTB and Verkerk JMH: Restriction analysis of chromosomal DNA in a size range up to two million base pairs by pulsed field gradient electrophoresis. "Human Genetic Disease, a practical approach", IRL presse, 1986, pp113—133.
4) Page D, De Martinville B, Barker D et al: Single-copy sequence hybridizes to polymorphic and homologous loci on human X and Y chromosomes. Proc Nat Acad Sci USA 79: 5352—5356, 1982.
5) Van Ommen GTB, Verkerk JMH, Hofker MH et al: A physical map of 4 million bp around the Duchenne muscular dystrophy gene on the human X-chromosome. Cell 47: 499—504, 1986.

13) ジストロフィンおよびアセチルコリン受容体 mRNA 発現に対するカルシトニン遺伝子関連ペプチドの修飾に関する研究

高守正治*

研究協力者　吉川弘明*　安川善博*

骨格筋における支配神経の役割は，単に興奮の伝達にとどまらず，筋の栄養因子の供給という意味でも重要である．筋の神経性栄養因子としてアセチルコリン（ACh）が重要視されてきたが，近年神経終末部にはAChとともにカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が存在することが知られるようになり[1]，その神経性栄養因子としての役割が注目されるようになった．CGRPは37個のアミノ酸よりなるペプチドで，カルシトニン遺伝子上にコードされており，mRNAのスプライシングの過程で臓器特異的にカルシトニンとCGRPという異なったmRNAが発現することが知られている[2]．我々はこれまでに，筋膜にはCGRP特異的結合部位が存在し，それがG蛋白質にカップリングしていること，さらにセカンドメッセンジャーとしてcAMPを介してAChR誘導増加や筋単収縮張力増強をもたらすことを示してきた[3]．これはCGRPが神経性栄養因子として働くことを示すものと思われる．今回は骨格筋構成蛋白であるAChRおよびジストロフィンの発現に神経性栄養因子であるCGRPが影響を及ぼすか否かについて調べた．

材料および方法

ウィスター系ラット胎児の下肢筋をトリプシン処理し初代培養細胞を作成した．Dulbecco改変Eagle培地に10% FBS，1%ペニシリン—ストレプトマイシン液を加え5日間培養したあと，ディッシュを2群に分け，一方には10^{-7}MのCGRPを添加した．8時間培養後，Guanidinium／Cesium Chloride法によりtotal RNAを抽出しサンプルとした．このサンプルを使いホルムアルデヒド法によるノーザンブロットハイブリダイゼーション，スロットドットハイブリダイゼーションを行なった．フィルターはナイロンフィルターを使用し，RNA固定にはUV照射を行なった．プローブにはβ-actin, AChR α-subunit, ジストロフィンのcDNAを用いた．ジストロフィンのプローブはKunkel博士の了承を得てAmerican Type Culture Collectionより入手したcDNAの4-5aと8を使用した．この部位はスペクトリン様3重ら旋構造の一部に相当する(図1)．cDNAはRandom Primer DNAラベリング法により^{32}Pラベルした．ハイブリダイズ後洗浄したフィルターをフィルムに露光し，デンシトメーターでフィルム上の特異的バンドの濃度を定量した．結果はβ-actinをinternal controlとしてAChR α-subunitとジストロフィンmRNAの変化を調べた．

結　果

β-actinとAChR α-subunitをプローブとして使ったノーザンブロットハイブリダイゼーションでは各々に特異的な一本のバンドが検出できた(図2)．β-actin mRNAをinternal controlとしてAChR α-subunit mRNAの変化を調べるとCGRP添加群は対照に比べ，約1.7倍に増加していることがわかった．スロットドットハイブリダイゼーションの結果も同様であった．

ジストロフィンのcDNA4-5aをプローブに使ったスロットドットハイブリダイゼーションの結

*金沢大学医学部神経内科

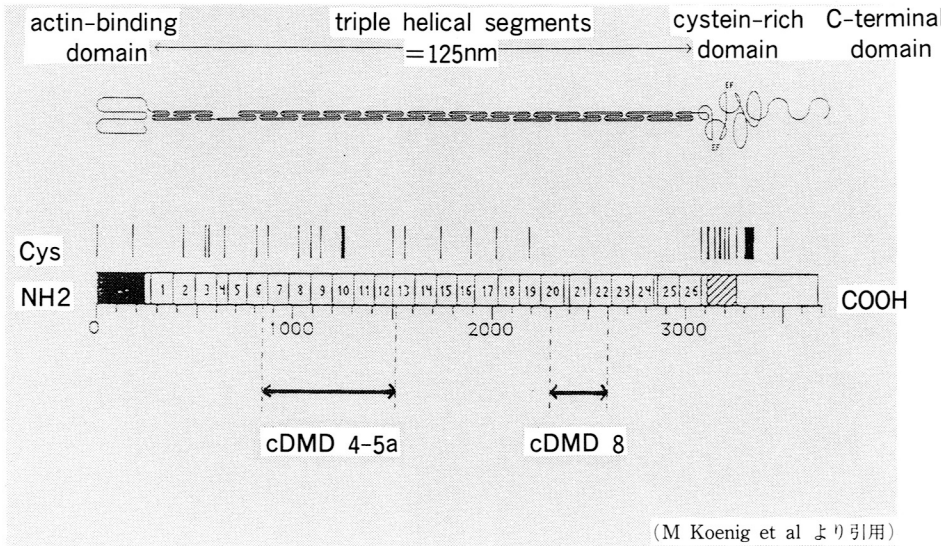


図 1

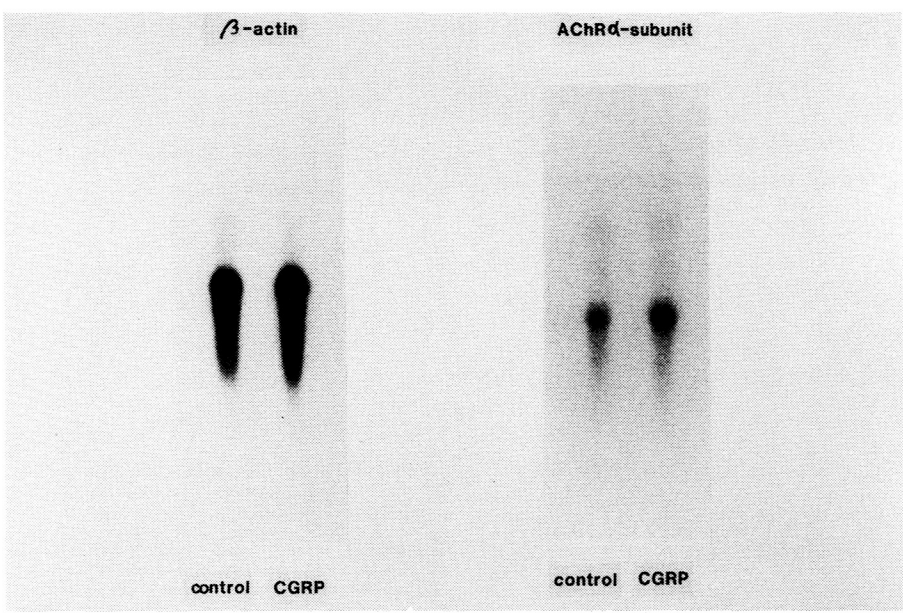


図 2

果は，CGRP 添加群と対照群の間には差がなかった(図 3)．cDNA8をプローブに使った場合も同様であった．

考　　察

ジストロフィンは細胞骨格蛋白のひとつと考えられるようになったが[4]，その機能はまだわかっていない．一方，AChR は筋細胞の機能をつかさどる膜蛋白であり脱神経などの条件によって発現量や分布が大きく変わることが知られている．骨格筋の支配神経は，筋の性質や機能を調節することが知られているが，それは AChR のように特定

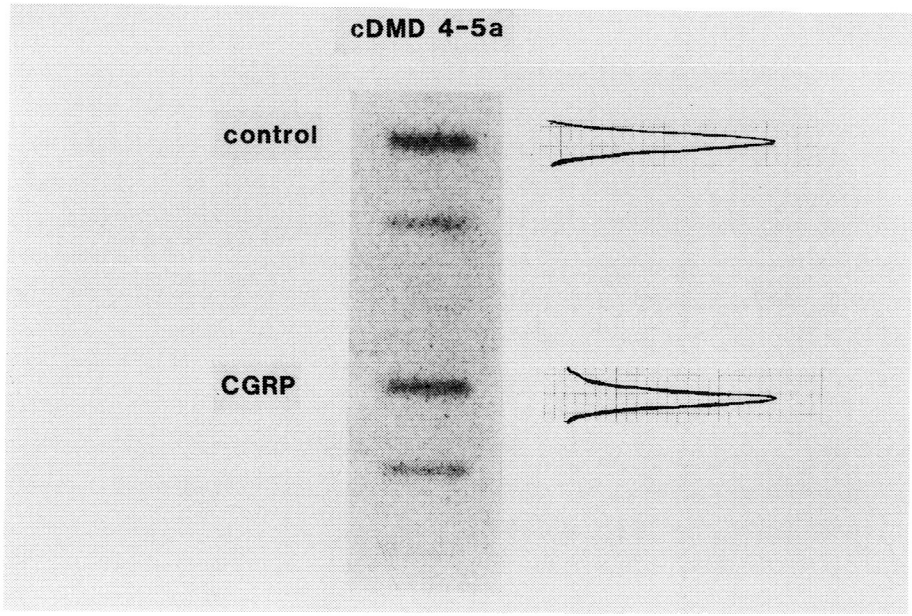


図3

の蛋白合成促進もしくは抑制によるものと考えられる．CGRPは骨格筋の神経性栄養因子として，AChR mRNAの増加をもたらし，結果として筋膜上のAChR数を増加させる．一方，ジストロフィンは少なくとも10^{-7}MのCGRP添加後8時間で，cDMD4-5a, 8を用いて検索するかぎりmRNAの発現に影響を受けなかった．しかし，ジストロフィンが筋の構成蛋白のひとつとして神経因子の修飾を受ける可能性は否定しきれず，今後さらに別の条件，因子について検討する必要がある．

謝辞　本研究で使用したβ-actinとAChR α-subunitのプローブは大阪大学医学部第二内科，上野聡先生からいただきました．また本研究の一部は金沢大学がん研究所分子生物部 飯田慈子先生，亀山忠典教授にご指導いただきました．謝意を表します．

文　献

1) Takami K, Kawai Y et al: Effect of calcitonin gene-related peptide on contraction of striated muscle in the mouse. Neurosci Lett **60**: 227—230, 1985.
2) Amara SG, Jonas V et al: Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. Nature **298**: 240—244, 1982.
3) Takamori M and Yoshikawa H: Effect of calcitonin gene-related peptide on skeletal muscle via specific binding site and G protein. J Neurol Sci **90**: 99—109, 1989.
4) Hoffman EP and Kunkel LM: Dystrophin Abnormalities in Duchenne／Becker Muscular Dystrophy. Neuron **2**: 1019—1029, 1989.

14）女性筋ジストロフィー患者に関する細胞遺伝学的並びに分子遺伝学的検索

斎　藤　深美子*

研究協力者　外　村　　晶*　山　本　興太郎**

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は伴性劣性の遺伝疾患で，新生男児3,500人に１人の割合で発生する．この症例の３分の１は新生突然変異と考えられ，ヒトの遺伝子突然変異率としては非常に高い値を示している．近年の研究の進展により，DMD の遺伝子座は Xp21.1～21.3上に存在し，遺伝子の全長は2,300kb の巨大なもので[1]，X 染色体の約１％を占める大きさであることが明らかとなってきた．DMD 遺伝子の突然変異率の高さもこの遺伝子の巨大さに起因していると考えられる．また，遺伝子本体の cDNA は75個以上のエクソンからなる14kb にわたるもので，産生されるたん白質はジストロフィンと命名された分子量427KD のポリペプチドである．このジストロフィンの遺伝子の cDNA を用いて男子 DMD の細胞を検索したところ，その50～70％に遺伝子欠失が発見されたため[2)~4)]，男児患者での DMD 発症機構に DNA 欠失が大きな意義を持つことが明らかになった[5]．

一方，男児 DMD に対して稀に女性も発症するが，一般的に臨床症状は軽く，その発症機構については(1)ホモ接合体の発症[6]，(2)ターナー症候群での発症（45,X およびそのモザイク）[7]，(3)ヘテロ接合体（保因者）の発症[8] および (4)X染色体を含む転座保有者での発症[9),10)] が考えられており，染色体の数的異常あるいは構造的異常と深い関わりあいのあることが推測された．この点を考慮し，我々は数年来，女性患者に関して細胞遺伝学的な検索を行ない，同時にそのリンパ球由来のリンパ芽球細胞株を作成してきた．今回は，女性患者での細胞遺伝学的解析結果をまとめて提示し，またその中の家系内発症例（ヘテロ接合体の発症例と思われる）について分子遺伝学的検索を行なったので，その結果もあわせて報告する．

対　　象

女性筋ジストロフィー患者

１．孤発例（特に10歳以前の若年発症例）

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

方　　法

１．細胞遺伝学的検索

対象者からヘパリン採血した末梢血に RPMI1640を加え，PHA を添加後48時間から72時間培養する．その後細胞を回収して，0.075M の KCl で低張処理する．通常どおりに細胞をカルノア固定した後，染色体標本を作製する．分析は，通常のギムザ染色，G分染法，高精度分染法，およびX染色体の不活性化パターンを調べる目的でR分染法をおこなった．

2　分子遺伝学的検索

１）cDNA プローブ

DMD の cDNA は，American Type Culture Collection（ATCC）より入手したもので14kb の cDNA は図１に示すように，６種類の断片としてプラスミドに挿入されている．

２）genomic DNA の isolation

家系内発症例の女性患者（５名），未発症の保因者（２名）および同一家系内の男児 DMD（３名）

＊東京医科歯科大学難治疾患研究所遺伝疾患部門
＊＊東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス/免疫疾患部門

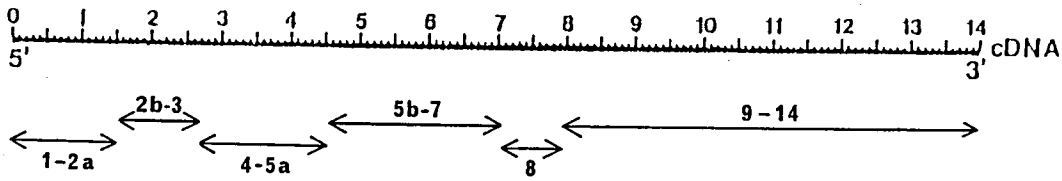


図1

のリンパ芽球細胞株を用いてgenomic DNAを抽出し，Hind IIIで切断した．

3）Southern hybridization

0.6～0.8% agarose gelで電気泳動後，Southern blot法により，各genomic DNA断片をNylon membrane filterへtransferした．cDNAはプラスミドより切り出して精製し，マルチプライムDNAラベリングシステムを用いてPで標識した後hybridizationを行なった．

結　　果

1．細胞遺伝学的検索

得られた検体は全部で26例で，(1)孤発例および(2)家系内発症例に分けてまとめた（表1および表2）．

(1) 孤発例（表1）；15名

細胞遺伝学的検索を行なった年齢は2歳から3歳まで様々ではあるが，ほとんどの例で発症年齢が低く，特に2～3歳のものが多い．既に歩行不能の患者については，カッコ内にその時期を示した．また精神発達遅延（MR）を示すものも約50%存在した．患者15名の中4名にX染色体を含む転座染色体が発見され，皆共通にXp21で切断が生じていた．これらの例でのX染色体不活性化パタ

表1　Female patients with muscular dystrophy（I）sporadic cases

Patient	Age at Exam.	Age at Onset	Still Walking	MR	Cytogenet. Results (X^n inact)
1-MaSu	11y	2-3y	+	-	46,X,t(X;5) (100%)
2-KiSa	14y 7m	2y	-(11y)	-	46,XX
3-TeIn	16y	2y	-(12y)	+	46,X,t(X;3) (94.5%)
4-ItIt	19y 9m	2-3y	+	+	46,XX
5-YoMo	24y 6m	2-3y	-(14y)	+	46,X,t(X;15) (96.4%)
6-ReSa	21y11m	3y	-(9y)	+	46,XX
7-ShSh	34y 7m	12-13y		+	46,XX
8-EiSo	4y 1m	2-3y	+		46,X,t(X;19)
9-NaFu	5y 5m	3y 3m	+	(-)	46,XX
10-NaMo	2y11m	2y	+	(-)	46,XX
11-MaSh	9y 4m	3y	-(8y)	+	46,XX
12-KiIs	31y 7m	30y 9m	+	-	46,XX
13-KuSh	13y 5m	6-7y	+	-	46,XX
14-AnIs	11y 6m	4y	+	-	45,X/46,XX/47,XXX
15-KiKa	39y10m	30y	+	-	46,XX/47,XXX

表2　Female patients and carriers with muscular dystrophy (II) familial cases

Patient	Age at Exam.	Age at Onset	Still Walking	MR	Cytogenet. Results
1-YoYa	22y 1m	5-6y	+	-	46,XX 45,X/46,XX(LCL,F)
2-MoMi	40y	7y	+	-	45,X/46,XX/47,XXX
3-HaSh	16y 3m	4y	-(7-8y)	+	46,XX
4-ToYa	30y 7m	6y	-(10y)	+	46,XX
5-AsTs	3y 8m	2y 5m	+	-	46,XX
6-RyYo	9y 5m	8y	+	-	46,XX
7-MeKo	14y 2m	10y	+	-	46,XX
KaKo	11y 1m	10y	+	-	46,XX
8-MoYa	38y	34-36y	+	-	45,X/46,XX/47,XXX
9-HiOn	53y 3m	52y	+	-	45,X/46,XX 45,X/46,XX/47,XXX(F)
10-MiIs	35y 2m	16y	+	-	46,XX
11-MaMo	40y 2m	30y-	+	-	46,XX
C1-SaSa	34y 3m				46,XX
C2-FuNa	63y 6m				46,XX

ーンを調べると，正常なXが，ほぼ100%不活性化していた．これら転座染色体に対し，2名にX染色体の異数性を示す細胞が観察された．

(2)　家系内発症例（表2）；11名

発症年齢は2～52歳と非常に幅が広いことが特徴である．また，臨床症状の軽度な人が多い．11名中4名にXの異数性を示す細胞が観察された．

2．分子遺伝学的検索

女性の家系内発症例，保因者および各家系内のDMD男児のリンパ芽球細胞を用いて欠失の有無について検索した．図2にcDNA断片1-2aに対する分析の結果を示す．各レーンの番号のうち，F1～F11は女性患者，C1,C2は未発症の保因者，Mは母親，そしてSは息子のDMDあるいはBMD患者を示している．正常の場合，Hind IIIによる切断で，このcDNAに対し10.5，8.5，8.0，7.5，4.6，4.2，3.25，3.2，3.1kbの9つのバンドを示した．F2-SのDMD男児は，このcDNAに対する8つのバンドが欠失しており，一番5′側の3.2kbのバンドのみ存在していた．次のcDNA断片2b-3に対する結果では，上記の男児は5′側の5つのバンドが欠失していた．また，その母親の発症者（F2）でも同様に，cDNA断片1-2aから2b-3に対する13ケのバンドが欠失していた．一方，cDNA断片8については，C2-Sの男児BMDに10.0kbのバンドの欠失が見られ，この欠失は母親由来であることが分かった．

考　　察

細胞遺伝学的検索の結果，孤発例および家系内発症例の合計26例において，(1)ホモ接合体の発症あるいは(2)ターナー症候群での発症は検出できなかったが，(3)の保因者の発症例と思われるケースでX染色体のモザイクが計6例（23%）に観察された．また，(4)のXを含む転座例は，4例（15%）発見された．このことから，臨床的には全く

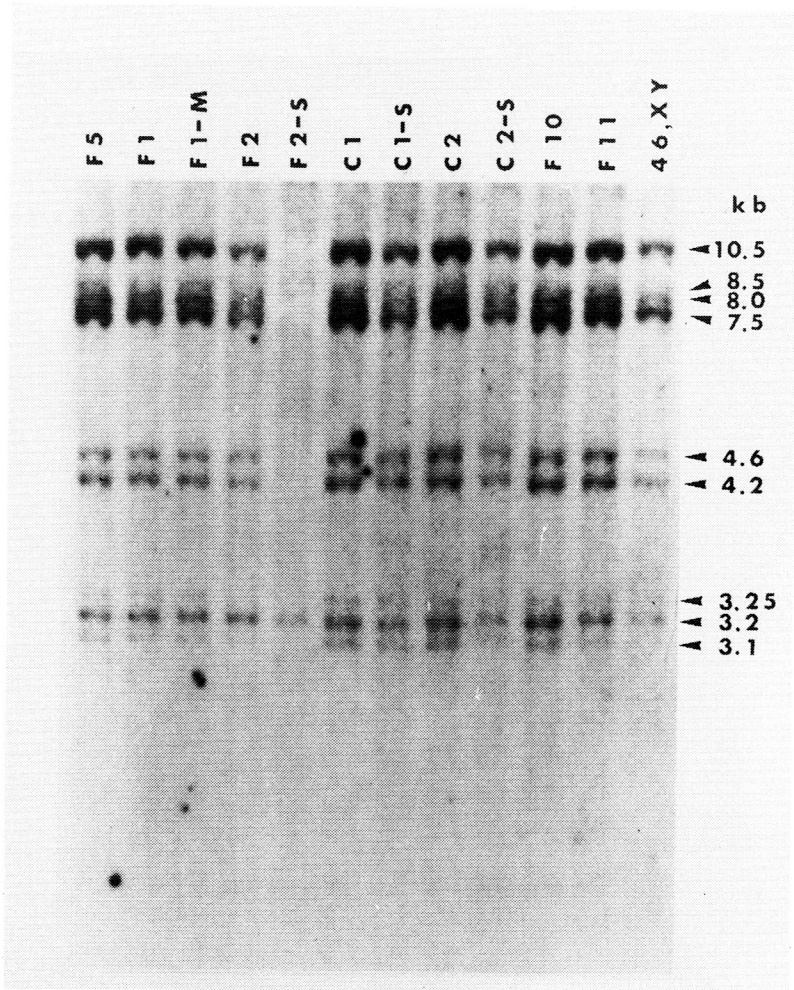


図2

ターナー症候群の症状を示さない女性の軽度の発症者の中には，体細胞分裂における染色体不分離により生じたXのモザイクを有する者がかなり存在する可能性が示唆される．この点に関しては，細胞遺伝学的検索の有用性が強調されよう[11]．

一方，分子遺伝学的検索により，家系内発症例女性患者5名中1名にcDNAの5′側の断片1-2aから2b-3にわたる欠失が検出され，また，未発症の保因者にcDNA 8に対する10.0kbのバンドが欠失していた．この欠失は，それぞれ息子の患者に伝わり，前者はDMD，後者はBMDの症状を呈している．ちなみにBMDではこの10.0kbのバンドが高率に欠失しているため，その意義についてはさらに検索を必要とする．

今後，転座あるいは正常核型を有する孤発例について，同様の検索を行なうと共に，転座例についてはさらに，Xの不活性化との関連性を持たせた検索を進める予定である．

謝辞：最後に，検体を提供して下さった次の先生方およびそのスタッフの方々に，深く感謝の意を表します．

国立療養所東埼玉病院内科	石原傳幸先生
東京医科歯科大学神経内科	塚越　廣先生
国立療養所下志津病院神経内科	中野今治先生
昭和大学藤が丘病院神経内科	若山吉弘先生
福岡大学医学部小児科	満留昭久先生
愛知医科大学内科	佐橋　功先生

信州大学医学部内科　　武田伸一先生
国立精神・神経センター　　杉田秀夫先生

文　献

1) Mandel JL : The gene and its product. Nature 339 : 584, 1989.
2) Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C and Kunkel LM : Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50 : 509, 1987.
3) Den Dunnen JT, Bakker E, Klein Breteler EG, Pearson PL and vanOmmen GJB : Direct detection of more than 50% of the Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels Nature 329 : 640, 1987.
4) Wapenaar MC, Kievits T, Hart KA, Abbs S, Blomden LAJ, Den Dunnen JT, Grootscholten PM, Bakker E, Verellen-Dumoulin Ch, Bobrow M, vanOmmen GJB and Pearson PL : A deletion hot spot in the Duchenne muscular dystrophy gene. Genomics 2 : 90, 1988.
5) Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H and Kunkel LM : An explanation for the phenotypic difference between patients bearing partial deletions of the DMD locus. Genomics 2 : 90, 1988.
6) Danieli GA, Mostacciuolo ML, Bonfante A and Angelini C : Duchenne muscular dystrophy. A population study. Hum Genet 35 : 225, 1977.
7) Bortolini ER, da Silva DM, Chequer RS, Vianna-Morgante AM and Zats M : Duchenne muscular dystrophy in a girl with a 45, X/46, XX/47, XXX chromosome constitution. Am J Med Genet 25 : 239, 1986.
8) Sugita H and Tyler FM : Pathogenesis of muscular dystrophy. Trans Ass Am Physicians 76 : 231, 1963.
9) Saito F, Tonomura A, Kimura S, Misugi N and Sugita H : High resolution banding study of an X/4 translocation in a female with Duchenne muscular dystrophy. Hum Genet 71 : 370, 1985.
10) 富　英明，埜中征哉，杉田秀夫，里吉営二郎，斎藤深美子：X染色体—常染色体間の相互転座を認めた進行性筋ジストロフィーの女児例．臨床神経26：965，1986.
11) Sano M, Saito F, Yamamoto K, Tonomura A and Tsukagoshi H : Duchenne muscular dystrophy in a female with 45, X/46, XX chromosome constitution. Jpn J Hum Genet 32 : 257, 1987.

15）進行性筋ジストロフィー非定型例の遺伝子欠失部位の解析

鈴木義之*

研究協力者　新本美智枝*　大島章弘*　桜庭　均*

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）及びBecker型筋ジストロフィー（BMD）の遺伝子座はKoenigらにより解明され，その病因となる蛋白ジストロフィンの約14kbにわたるcDNAの全構造も決定されている[1),2)]．我々はDMD及びBMDの遺伝子診断を，この遺伝子座内もしくはその近傍に座位を有する11種の多型プローブを用い，RFLPs(Restriction fragment length polymorphisms）による連鎖解析により行ってきた[3),4)]．またジストロフィンcDNAをプローブとして用い，DMD，BMD患者における欠失について検討し，様々な欠失を見出し報告した[5)]．また我々がこれまでに診断した患者家系の中に，DMD遺伝子座の外にある多型プローブ754に対し欠失を示す非定型的筋ジストロフィー患者を見出し，この患者の欠失範囲について検討してきた[5)]．

今回我々はこの患者の欠失部位の末端を明らかにする目的で，ジストロフィンcDNAの5′末端側からいくつかのエクソンに対応するようにcDNAを切り出し，これらをプローブとして用いサザンブロット分析を行った．またエクソン3に相当する合成オリゴヌクレオチドをプローブとして，ヒトX染色体ライブラリーよりエクソン3を含むゲノムDNA断片をクローン化し，これを用いてエクソン3近傍についてこの患者の欠失の末端の有無について検討した．

対象および方法

1）cDNAプローブ

ジストロフィンcDNAはAmerican Type Culture Collection（ATCC）より入手した．このcDNAを各種制限酵素で切断しアガロースゲル電気泳動後，各DNA断片をDEAE膜（Schleicher & Schuell. NA45）を用いて回収した．

2）DNAの抽出

患者および正常人コントロールのEpstein-Barrウィルス（EBV）により株化したリンパ球より，プロテアーゼK処理，フェノール抽出，リボヌクレアーゼA処理でDNAを抽出した．

3）サザンブロット

抽出したDNAを各種制限酵素で切断し，0.7%アガロースゲル電気泳動後，DNAをニトロセルロース膜に転写した．

4）ハイブリッド形成

ニックトランスレーション，マルチプライム標識システムもしくは5′末端標識により，プローブDNAを^{32}P標識した．このプローブを用いハイブリダイゼーション後，−80℃でオートラジオグラフィーを行った．

5）ゲノムDNAのクローン化

ATCCよりヒトX染色体ライブラリーを入手した．エクソン3に相当するオリゴヌクレオチド（331—360nt）をDNA合成装置（Applied Biosystems 381A）にて合成し，これをプローブとして，ヒトX染色体ライブラリーよりエクソン3を含むDNA断片をクローン化した．

結　果

1）ジストロフィンcDNAの各エクソンに対するサザンブロット分析

ジストロフィンcDNAより主にエクソン1を

*東京都臨床医学総合研究所臨床遺伝学

含む断片（1—248nt Xmn I 断片）を切り出しプローブとして用い，患者及び正常人コントロールのサザンブロット分析を行った(図1)．正常人コントロール(レーン1—4)では，EcoR I による切断で6.5kb のバンドが，また Hind III による切断で3.0kb のバンドが検出された．しかし患者(レーン5）においては，これらのバンドは検出されなかった．

図2にエクソン1，2を含む cDNA 断片(29—268nt Dde I 断片)，及びエクソン1，2，3を含むcDNA断片（1—407nt BamHI 断片）をプローブとした場合のサザンブロット分析の結果を示す．エクソン1，2を含む cDNA 断片に対し，正常人コントロールでは先の6.5kb のバンドに加え，新たに2.7kb のバンドが検出されたが，患者においては両バンドは検出されなかった．またエクソン1，2，3を含む cDNA 断片に対するサザンブロット分析の結果では，正常人コントロールは先の6.5kb, 2.7kb のバンドに加え，新たに4.8kb のバンドが検出された．しかし患者においては4.8 kb のバンドのみが検出された．

同様な結果がHindIIIによる切断においても得られた．正常人コントロールではエクソン1，2に対し3.0kb のバンドが検出された．またエクソン1，2，3をプローブとした場合，3.0kb のバンドに加えて4.8kb のバンドが検出された．しかし患者においては3.0kb のバンドは検出されず，4.8 kb のバンドのみが認められた（図は省略)．

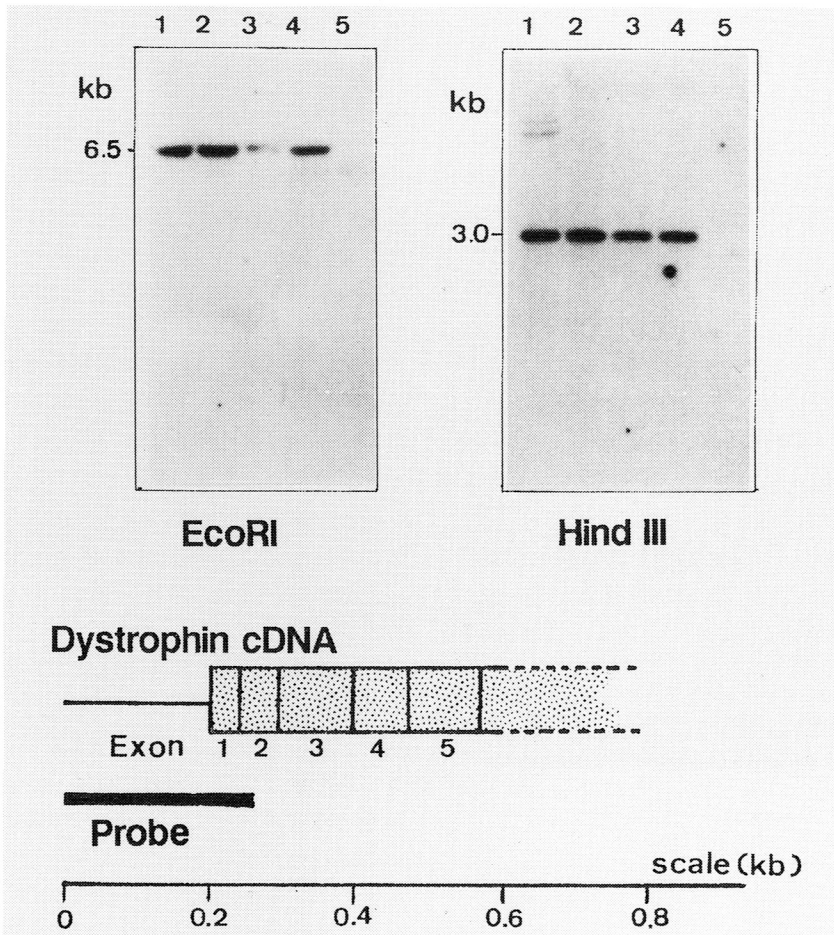


図1　ジストロフィン cDNA 断片（エクソン1）をプローブとしたサザンブロット分析

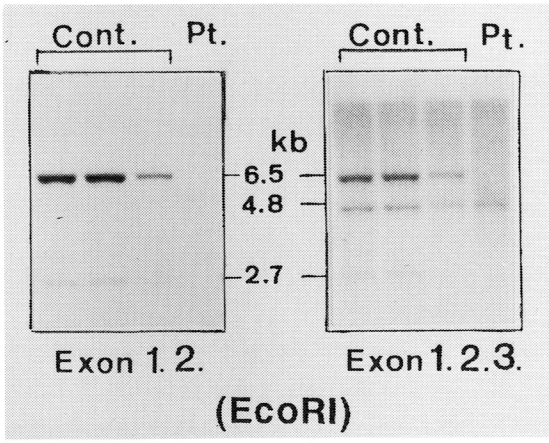


図2　ジストロフィン cDNA 断片（エクソン1，2及びエクソン1，2，3）をプローブとしたサザンブロット分析

2）ゲノム DNA のクローン化とこれを用いたサザンブロット分析

ジストロフィン cDNA エクソン3に相当する合成オリゴヌクレオチドを用い，ATCC より入手したヒトX染色体ライブラリーよりエクソン3を含む DNA 断片をクローン化した．3種の異なったクローンが得られた．これらのクローンは15～20kb のヒトX染色体ゲノム DNA をインサートとして含んでいる．これらのクローンのサザンブロット分析の結果，合成オリゴヌクレオチド（エクソン3）に対しいずれのクローンも，EcoR I または HindIII による切断で4.8kb のバンドを示した（図は省略）．

次にこれらのクローンの制限酵素地図を作成した．結果を図3に示す．各種制限酵素で切断後のサザンブロット分析の結果，エクソン3は Pst I

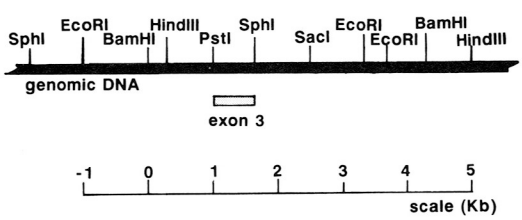


図3　エクソン3近傍の制限酵素地図

と Sph I 切断部位の間に位置していることが確認された．

これらのクローンの BamHI 断片をプローブとして，患者及び正常人コントロールのサザンブロット分析を行った．その結果を図4に示す．Sph I による切断で4.0kb，HindIIIによる切断で4.8 kb，Sph I，HindIIIの両酵素での切断で1.5kb，3.2 kbのバンドが検出され，正常人コントロールと患者の間に差は認められなかった．

考　　察

ジストロフィンcDNAの各エクソンに対応する断片をプローブとして用いたサザンブロット分析の結果より，この患者においてはエクソン1を含むEcoR I 断片（6.5kb）及びエクソン2を含むEcoR I 断片（3.0kb）が欠失していた．しかしエクソン3を含むEcoR I 断片（4.8kb）は検出され，その大きさも正常人コントロールと差は認められなかった．このことより，この患者の欠失の一方の末端はエクソン2と3の間にあると推定される．同様の結果は，HindIII断片に対するサザンブロット分析の結果からも得られた．そこで我々はこの患者の欠失の末端を含むDNA断片を得るために，患者DNAを数種の制限酵素で切断し，エクソン3を含むcDNA断片に対しサザンブロット分析を行ったが，今までのところ欠失の末端を含む異常なバンドは検出されていない．

そこでさらに広範囲にエクソン3近傍を調べるために，ヒトX染色体ライブラリーよりエクソン3を含むゲノムDNA断片をクローン化した．得られたクローンは先のサザンブロット分析の結果から予想されたように，エクソン3を含む4.8kbのEcoR I 及びHindIII断片を含んでいた．このクローンの BamHI 断片をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果，患者及び正常人コントロールにおいて，これらのクローンの制限酵素地図から予想されたようなバンドが検出され，両者に差は認められなかった．以上の結果より，この患者のエクソン3より5′側約5kbは正常であり，欠失の末端はさらにそれより上流にあると推定された．

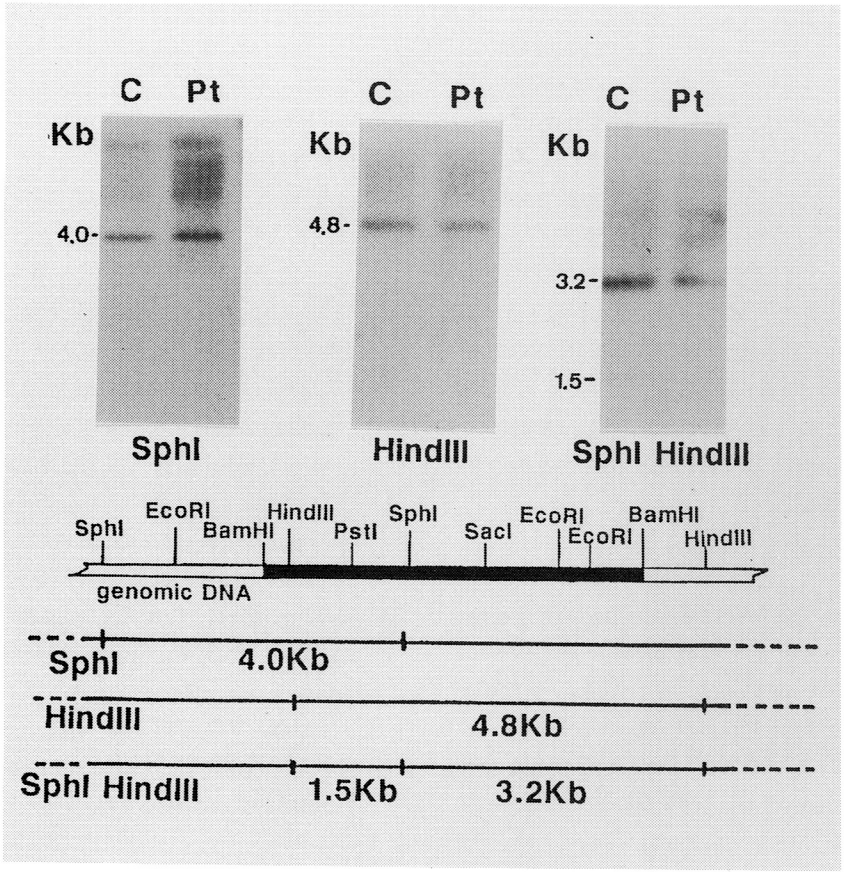


図4　ゲノムDNA断片をプローブとしたサザンブロット分析

近年Zubrzycka-Gaarnらにより，ジストロフィンcDNAの5′側2kbのエクソンのゲノムDNA上での分布が報告された(図5)．これによるとエクソン2と3の間は比較的離れており，この間で欠失の生じる確率は他のイントロンと比べて高いと考えられる．

近年Nudelらによりジストロフィンは脳においても発現しており，その転写産物はalternative

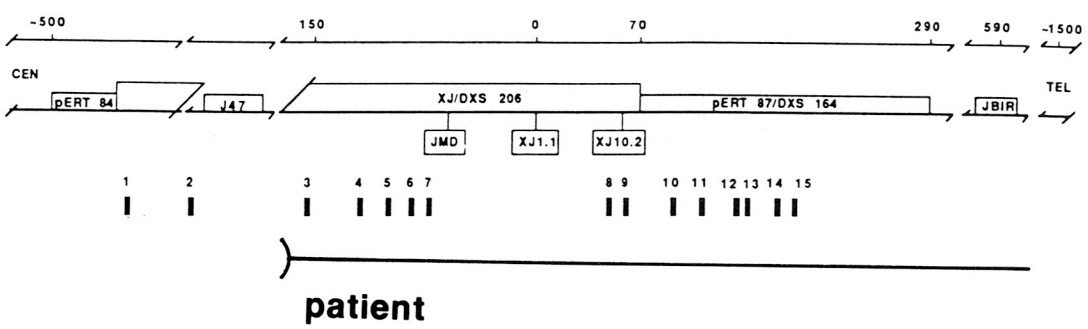


図5　ゲノムDNA上での各エキソンの分布と患者の欠失部位（文献6，7を改変）

splicingにより第1エクソンが筋肉のそれと異なっていることが報告された[8]．またFeenerらにより，ジストロフィンは組織により数種のアイソフォームが存在する可能性も示唆されている[9]．

患者の臨床像と欠失の範囲の関連を考える上で，上記のジストロフィンの多様性は重要であると考えられる．また，それぞれのアイソフォームにそれぞれ異なった調節部位が関与している可能性もある．この患者のジストロフィン遺伝子座の5′上流部分の欠失部位を調べることは重要であろうと考えられる．今後パルスフィールドゲル電気泳動，ジーンウォーキングにより，この患者の欠失の末端を明らかにし，臨床像との関連について検討していく予定である．

文　献

1) Koenig M, Hoffman EP, Monaco AP, Feener C and Kunkel LM : Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50 : 509—517, 1987.
2) Koenig M, Monaco AP and Kunkel LM : The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell 53 : 219—288, 1988.
3) Shimmoto M, Tsuji A and Suzuki Y : Restriction fragment length polymorphisms on the short arm of X chromosome among the Japanease population. Jpn J Human Genet 33 : 333—338, 1988.
4) Shimmoto M, Tsuji A, Yang R-C, Nomura Y, Segawa M and Suzuki Y : DNA deletions and recombinations in the gene locus of X-linked muscular dystrophies. J Metab Dis 11 : 324—328, 1988.
5) 鈴木義之，新本美智枝，楊　瑞成，大島章弘，桜庭　均："厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究"（杉田班）昭和63年度研究報告書，1988，pp209—222.
6) Zubrzycka-Gaan EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AHM, Bellfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN and Worton RG : The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. Nature 333 : 466—469, 1988.
7) Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobroy M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN and Worton RG : Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. Science 242 : 755—759, 1988.
8) Nudel U, Zuk D, Einat P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S and Yaffe D : Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. Nature 337 : 76—78, 1989.
9) Feener CA, Koenig M and Kunkel LM : Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. Nature 338 : 509—511, 1989.

IV. ジストロフィン

16）Duchenne 型筋ジストロフィーの異常遺伝子産物（ジストロフィン）の二次元電気泳動での検出

堀　眞一郎*

研究協力者　杉浦弘子*　清水輝夫**　平林民雄***
大谷幸子*　吉田幹晴****宮本和人*****
田邊　等*****

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィーにおける欠損遺伝子が単離され，それにコードされている蛋白質（ジストロフィン）が推定された[1]．更に，欠損遺伝子の核酸配列からジストロフィンのアミノ酸配列を推定し，ペプチドを部分的に化学合成した後，このペプチドに対する抗体を使って，ジストロフィンの局在が組織化学的に明らかになってきた[2]．しかし，この蛋白質の化学的性質，生理的役割は推測の域を出ていない．よって，ジストロフィンの検出単離はこの疾患の診断・病因解明における今日的課題である．ここでは，ジストロフィン蛋白を二次元電気泳動によって単離検出することに成功したので報告する[3]．

実験方法

筋肉：120日齢筋ジストロフィーマウス（C57BL/10ScSn-MDX，MDX-マウス）及び正常対照マウス（C57BL/10ScSn）の長指伸筋，ヒラメ筋，心筋，ウサギの背筋，4ヵ月齢ラットの長指伸筋，76歳女性パーキンソン病患者の前脛骨筋の生検筋，35歳男性肢帯型筋ジストロフィー患者の大腿四頭筋の生検筋について検索した．

抗ジストロフィン・モノクローン抗体：ジストロフィンのN末より215番から264番のペプチドを抗原として，清水ら[4]により作られたモノクローン抗体を使用した．

筋蛋白の可溶化と抽出：摘出した筋組織を筋湿重量の20倍（ml/gm）の8 M塩酸グアニジン-0.1M Tris-HCl, pH7.5-10% β-メルカプトエタノール-2% NP40-10mM pyrophosphate 混液（塩酸グアニジン混液）にガラスホモゲナイザーで懸濁した後，5 M尿素-1 Mチオ尿素-0.167% β-メルカプトエタノール混液（尿素混液）に対して一晩透析した．透析した筋組織の懸濁液を遠心し，その上清を可溶化された蛋白質標品とした．

二次元電気泳動：平林の開発した二次元電気泳動法[5]により，抽出した蛋白質を分離した．分離された蛋白質は銀染色あるいは Western blotting 後ジストロフィンに対するモノクローン抗体で検出した後，観察した．

結　果

Duchenne 型筋ジストロフィーと類似の遺伝子異常をもつとされている MDX-マウスの長指伸筋の筋蛋白質を二次元電気泳動し，銀染色によって観察したところ，大部分の蛋白質は MDX-マウス，正常対照マウス共に認められたが，中性領域で，ミオシン重鎖よりもややアルカリより（pI5.5）で分子量350KD と推定される蛋白質（MD350/5.5-protein）は，MDX-マウスでは欠損していた[6]．なお，この領域は，電気泳動による分離に際して，筋組織に多量に含まれるミオシン蛋白により，影響を受け易い．そこで，ミオシン蛋白が低イオン濃度で沈澱することを利用して，筋組織を塩酸グアニジン混液で処理し，筋蛋白質を可溶化

*(財)東京都神経科学総合研究所神経生化学
**東京大学医学部脳研神経内科
***筑波大学生物科学系
****国立精神・神経センター神経研究所
*****東京都立神経病院

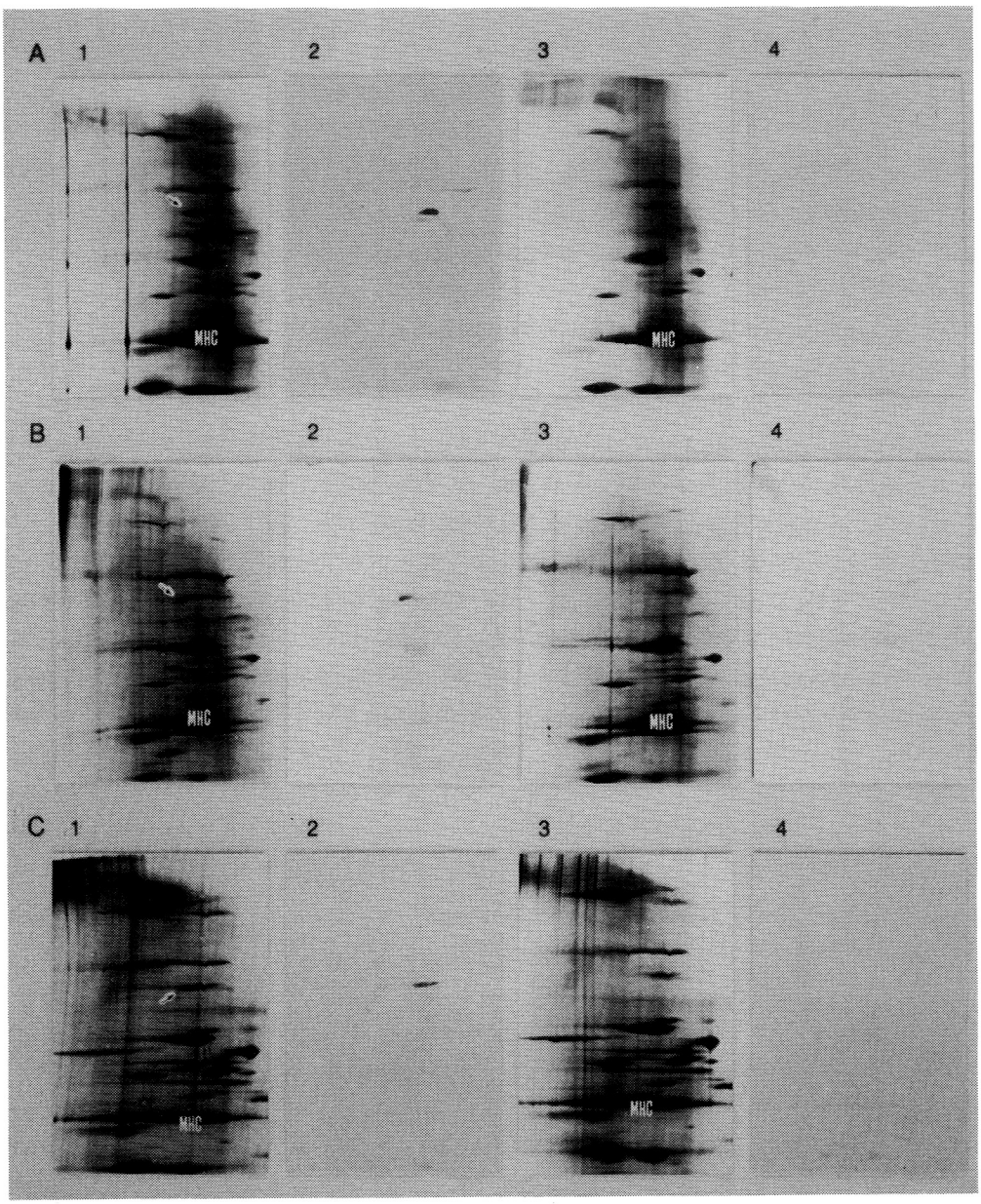


図1　二次元電気泳動によるマウス筋におけるジストロフィンの検出
A；長指伸筋，B；ヒラメ筋，C；心筋．1；正常対照マウス(C57BL/10ScSn)筋の蛋白質スポットを銀染色したもの．2；正常対照マウス筋の蛋白質スポットを抗ジストロフィン・モノクローン抗体で immunoblott したもの．3；筋ジストロフィーマウス(C57BL/10ScSn-MDX)筋の蛋白質スポットを銀染色したもの．4；筋ジストロフィーマウス筋の蛋白質スポットを抗ジストロフィン・モノクローン抗体で immunoblott したもの．MHC；ミオシン重鎖．矢印は MD350/5.5-protein を示す．

した後，0.15M KCl 溶液に対して透析した．ミオシン蛋白の大部分は沈澱分画に回収されたが，正常対照マウスで認められた MD350/5.5-protein は上清分画に回収された．さらに，筋蛋白質全体の分布を観察するためには，二次元目の SDS-PAGE におけるアクリルアミドの濃度勾配を 5%—12%にする必要があるが，問題の部分を拡大して観察するため，二次元目の SDS-PAGE に際してアクリルアミドの濃度を 4%に均一にして泳動してみたところ，正常対照マウスでは存在する MD350/5.5-protein が MDX-マウスでは消失していることが，より明瞭に確認された（図1 A 1 及び3）．そこで，ジストロフィンに対するモノクローン抗体に対してこの蛋白質が特異的に反応するか否かを Western blotting により観察したところ，MD350/5.5-protein はこの抗体に特異的に反応した（図1 A 2及び4）．MDX-マウスにおける筋ジストロフィーの発症は長指伸筋のみならずヒラメ筋あるいは心筋においても認められることが知られている．これらの筋組織についても同様に検索してみた．長指伸筋と同様に，ヒラメ筋および心筋においても，正常対照マウスでは MD350/5.5-protein は認められるが，MDX-マウスでは欠損した（図1 B 1 及び3，C 1 及び3）．また，この蛋白質はジストロフィンに対するモノクローン抗体に対して特異的に反応した（図1 B 2及び4，C 2及び4）．またウサギ，ラット及びパーキンソン病あるいは肢帯型筋ジストロフィーの患者の筋組織においても，ジストロフィンに対するモノクローン抗体に特異的に反応する MD350/5.5-protein が検出された（図2）．ジストロフィンは0.6M KCl 溶液では可溶化出来なかったが，塩酸グアニジン混液で組織を処理した後には，0.15M KCl 溶液に溶解できた．

考　　察

正常対照マウスには認めることができるが，MDX-マウスでは欠損している MD350/5.5-protein はジストロフィンのアミノ酸配列から推定される分子量（420KD）及び蛋白質の等電点（~5.56）に近似していた．さらに，ジストロフィンに対するモノクローン抗体に特異的に反応することから，この蛋白質はジストロフィンであると結論した．

Feener ら (1989)[7] はジストロフィンの mRNA の解析からジストロフィン分子の多様性，殊に C 末部分の変化を推測しているが，MD350/5.5-protein は，マウスの長指伸筋，ヒラメ筋及び心筋において同様に認めることができたことは筋の種類による蛋白質の差は無いか，有ってもその差は小さいと思われる．また，この蛋白質はラット，ウサギ，さらには人においてもマウスと同じ分子量及び等電点に認めることができた．ジストロフィンの二次元電気泳動による結果からはジストロフィンの種差および筋組織による差は小さいのではないかと推測される．

ジストロフィン蛋白質の二次元電気泳動上での検出の成功は，ジストロフィン蛋白質の単離精製が可能であることを示しており，ジストロフィンの蛋白化学的研究の新たな展開を期待できる．また，各種筋疾患の病態の変化あるいは鑑別診断にジストロフィンの含量および性状が問題になっているが，この分野への応用も可能である．

ま と め

マウス，ラット，ウサギおよび人の筋組織中のジストロフィン蛋白質を二次元電気泳動により単離検出することが出来た．この方法でみるかぎり，ジストロフィン蛋白質の種差，および筋組織の間の差は小さいと推測された．

ジストロフィン蛋白質を二次元電気泳動で単離検出できたことはジストロフィンの蛋白化学的研究およびジストロフィンによる各種筋疾患の病態の解析あるいは鑑別診断に新たな展開を可能にする．

文　　献

1) Hoffman et al: Dystrophin. The protein product of the Duchenne muscular locus. Cell 51：919, 1987.

2) 杉田秀夫 ほか：Duchenne 型筋ジストロフィーの欠損蛋白質—免疫組織化学的検討— “厚生

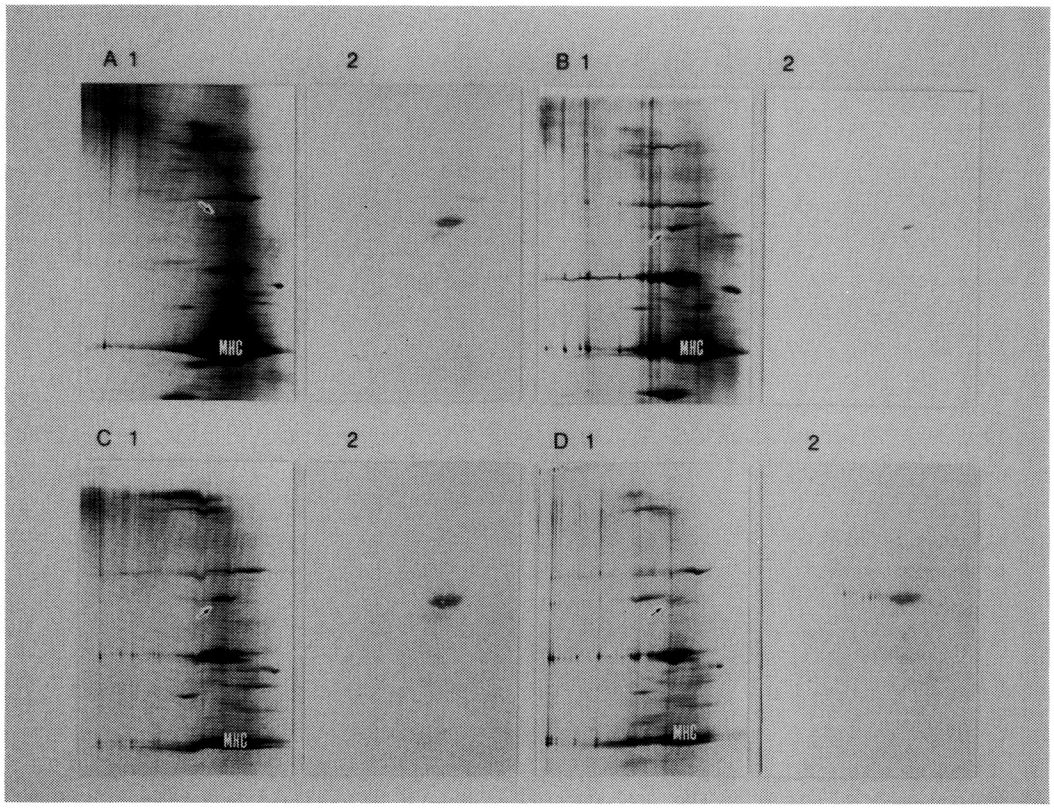


図2　二次元電気泳動によるラット，ウサギ及び人の筋におけるジストロフィンの検出
A；Wistar ラットの長指伸筋，B；ウサギの背筋，C；パーキンソン病患者の前脛骨筋，D；肢帯型筋ジストロフィー患者の大腿四頭筋．1；筋蛋白質スポットを銀染色したもの．2；筋蛋白質スポットを抗ジストロフィン・モノクローン抗体で immunoblott したもの．MHC；ミオシン重鎖．矢印は MD350/5.5-protein を示す．

省「神経疾患委託費」筋ジストロフィー及び関連疾患の病態とその病因に関する研究”（杉田班）昭和63年度研究報告書，1989，p239.

3) Hori S et al : Detection of dystrophin on two-dimensional gel electrophoresis. Biochem Biophys Res Comm **161** : 726, 1989.

4) Shimizu T et al : A monoclonal antibody against a synthetic polypeptide fragment of dystrophin (amino acid sequence from 215 to 264). Proc Japan Acad **64** : 205, 1988.

5) Hirabayashi T : Two-dimensional gel electrophoresis of chicken skeletal muscle proteins with agarose gels in the first dimension. Anal Biochem **117** : 443, 1981.

6) 堀眞一郎 ほか：筋ジストロフィーマウス（MDX）筋の高分子領域での欠損蛋白質について．“厚生省「神経疾患委託費」筋ジストロフィー及び関連疾患の病態とその病因に関する研究”（杉田班）昭和63年度研究報告書，1989，p239.

7) Feener CA et al : Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. Nature **338** : 509, 1989.

17）悪性肢帯型筋ジストロフィー症の骨格筋における ジストロフィンの証明

川　井　尚　臣*

研究協力者　玉　木　康　民*　増　田　健二郎*　須　原　芳　宏*
佐　野　雄　二*　乾　　俊　夫**　米　田　賢　治***

はじめに

我々の教室では，臨床症状や臨床経過はDuchenne型と似ているが，常染色体劣性の遺伝型を示す筋ジストロフィー症を，一つの独立した遺伝・臨床型の悪性肢帯型 malignant limb-girdle type として分類してきた．本病型はDuchenne型とは遺伝型が異なっており，その骨格筋細胞にはジストロフィンが存在すると推定される．本研究では，悪性肢帯型の生検骨格筋中のジストロフィンを免疫組織学的に検索した成績を述べる．

対象と方法

対象：対象症例は，当科で過去に悪性肢帯型と診断された3症例（図1）で，うち2例（症例1，症例2）は現在も経過を観察中の症例であり，残りの1例（症例3）は十数年前に経験した症例である．これらの症例の生検骨格筋についてジストロフィンを検索した．

方法：上記3症例の生検骨格筋の凍結切片或いはホルマリン固定の組織切片をヘマトキシリン・エオシン（H·E）染色し，ジストロフィー性変化を確認した後，その標本の連続切片についてジストロフィンの免疫組織化学的染色（ABC法）を行った．ジストロフィンに対する抗体はDr.Hoffmanから供与を受けたものであり，1,000倍に稀釈して用いた．

また，症例1については，ジストロフィン遺伝子の6種類のprobe（ATCCより入手）を用いて，白血球より抽出したDNAをHind IIIにて分解しSouthern blot解析を行った．

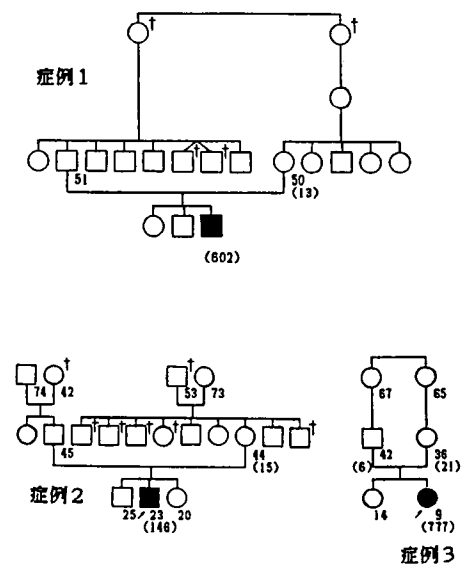


図1　悪性肢帯型の3症例と家系図．数字は過去の検索時の年齢を示した．（　）内は血清CK活性値．正常値は25U/以下．

以下，検索症例の要約を示した．

症例1　図2a：30歳男性．単発例であるが，両親は近親婚である．頸定1歳7ヵ月，処女歩行は2歳6ヵ月と遅れていた．その頃から登攀性起立がみられた．15歳までは，手摺を持って階段の昇降が可能であった．その後症状は進行し，現在，起立は不能である．筋萎縮は全身にみられるが頸部，軀幹，四肢近位部に強い．厚生省研究班の下肢機能障害度は7度である．血清CK活性値は現在は正常値に近いが，20歳時には604単位(正常25

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

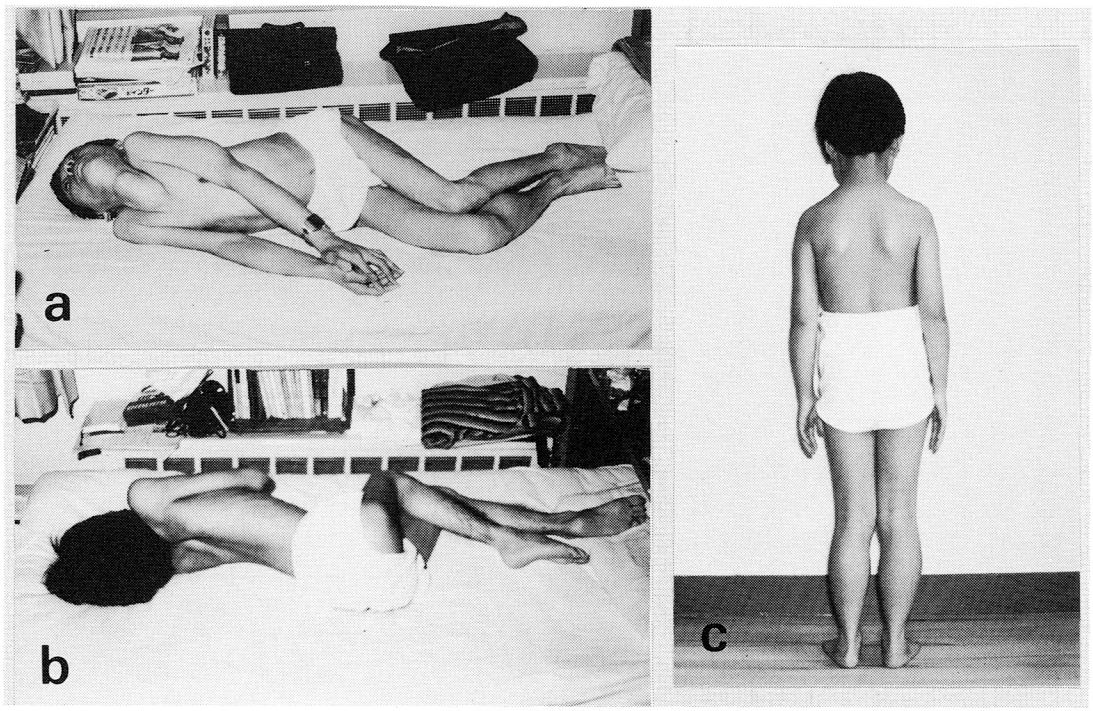


図2　a：症例1　b：症例2　c：症例3

単位以下）と高値を示した．母の血清CK値は正常である．

症例2　図2b：33歳，男性，単発例である．両親の近親婚はない．処女歩行1歳3ヵ月，3歳時に走るのが遅く，転びやすかった．14歳で歩行不能になった．現在は殆ど寝たきりである．筋萎縮は全身にみられるが，特に頸部，軀幹，腰帯，四肢近位に強い．下肢機能障害度は7度，血清CK活性値は現在は正常値に近いが，23歳時は146単位であった．母の血清CK活性値は正常である．

症例3　図2c：9歳女性，両親は近親婚で，単発例である．処女歩行は1歳6ヵ月と遅れ，転倒しやすかった．3歳時ふくらはぎが太いのに気づいた．6歳時に登攀性起立が出現，9歳初めより坐位からの起立が不能になった．末梢血リンパ球の染色体検査では正常核型を示した．筋萎縮は上腿，臀部に中等度に認められ，上腕，肩甲部にも軽度にみられる．血清CK活性値は777単位と上昇，母のCK値は正常である．

下肢機能障害度の経過：図3に3症例の下肢機能障害度の経過を示した．12～13歳頃まではDuchenne型の経過と極めて類似している．その後はDuchenne型に比べ少し緩やかである．

成　　績

1．筋病理組織像：（生検筋組織のH・E染色）

症例1の検索組織は30歳時の左外側広筋，症例2のものは33歳時の左外側広筋であり，それらの凍結組織標本を観察した．症例3については9歳時の左大腿筋の生検筋のホルマリン固定標本を観察した．いずれの症例の組織標本でも筋細胞の大小不同と壊死，間質の増殖，並びにopaque細胞などがみられ，特殊な構造物や蓄積は認めなかった．すなわち，ジストロフィー性の変化がみられた（図4a，図5a，図6a）．

2．骨格筋中ジストロフィンの免疫組織化学

症例1，症例2について検索したのは凍結組織標本であるが，症例3はホルマリン固定標本である．症例1，症例2では筋細胞の表面膜に一致して全周性に明確に褐色の染色がみられ，その部位

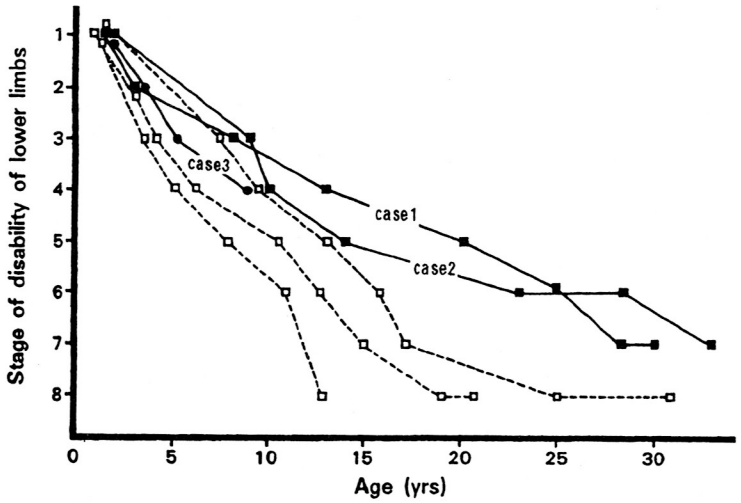


図3　3症例の下肢機能障害度の経過（実線）対照としてDuchenne型のものも示した（点線）．
■—■ mLG (male)，●—● mLG (female)，□---□ DMD (male)．

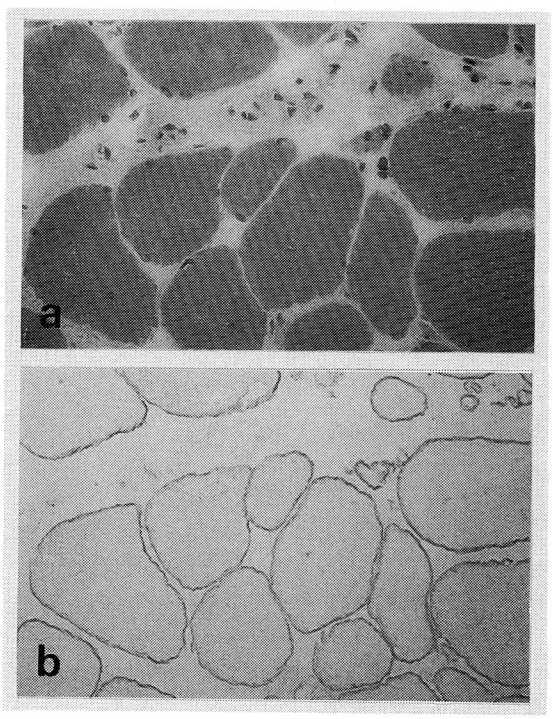


図4　症例1．外側広筋．a：生検骨格筋組織像（H・E染色），b：ジストロフィンのABC染色．×310

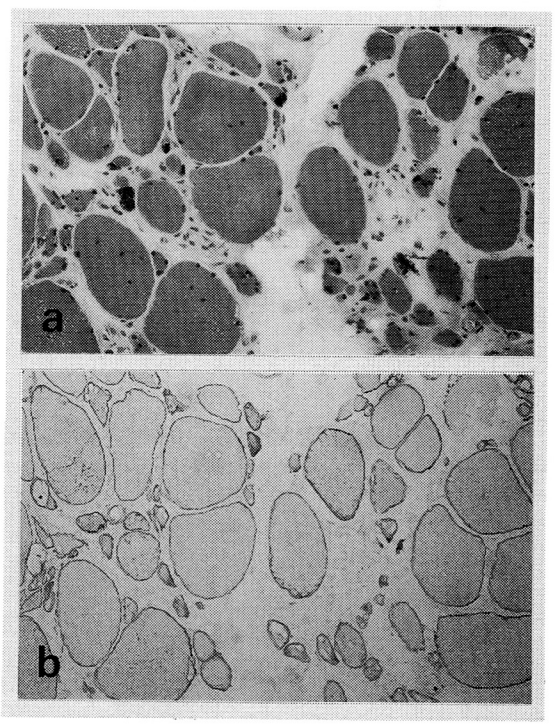


図5　症例2．外側広筋．a：生検骨格筋組織像（H・E染色），b：ジストロフィンのABC染色．×160

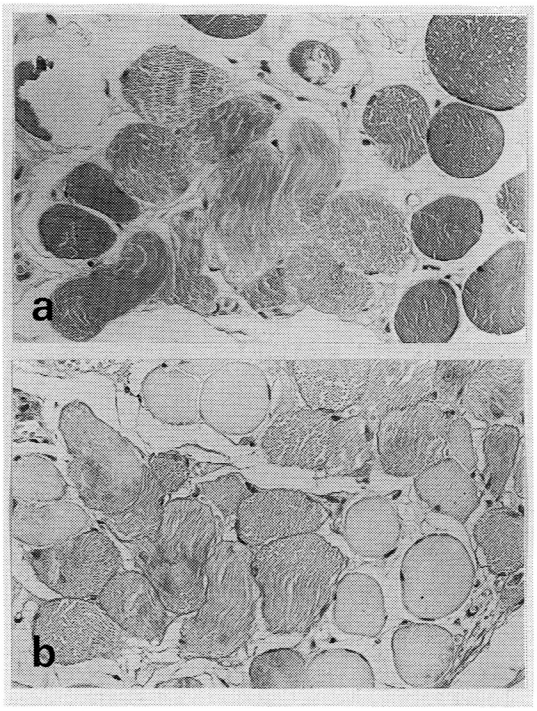


図6　症例3．大臀筋，a：生検骨格筋組織像（H・E染色），b：ジストロフィンのABC染色．×310

にジストロフィンの存在が確認された（図4b，図5b，図6b）．そして，ジストロフィンの染色性は筋細胞の大小，内部の変化などに殆ど関係なくどの細胞でも明確に認められた．症例3でも同様の染色性がみられたが，ホルマリン固定のためか非特異的反応と思われる染色性が細胞内部にも認められた．

3．ジストロフィン遺伝子の検索

症例1についてのみ検索を行った．ジストロフィン遺伝子を全てカバーするprobe 7種類を用いて検討したが，どのprobeでも対照（正常人）と全く同じパターンが得られた．すなわち，少なくとも本研究で用いたHind IIIで切断したジストロフィン遺伝子のDNA断片には異常が見られなかった．

考　　察

悪性肢帯型の筋ジストロフィー症は当教室の三好ら[1),2)]により提唱され，確立された筋ジストロフィー症の一遺伝・臨床型であるが，臨床症状がDuchenne型と類似していることもあり，個々の症例の診断に当ってはDuchenne型との鑑別が容易でないことがある．また，男性病者の場合は一部のBecker型や肢帯型とも鑑別を要することもあるなど，遺伝・臨床的事項により診断する場合は問題がないわけではない．

最近，Kunkelらのグループ[3),4)]の研究によりDuchenne型ではジストロフィン遺伝子が欠損していることが明らかにされ，また，その遺伝子産物のジストロフィンが筋細胞の表面膜部分に存在することが明らかにされた[5)]．そして，免疫組織化学的に本蛋白質を染色するとDuchenne型ではまったく染色されないが，その女性保因者ではモザイク状に，またBecker型ではpatchyに染色されるなど，それぞれの疾患や病態により染色性に特徴のあることが報告されている[6)]．従って筋組織中のジストロフィンの染色は特に臨床症状や経過がお互いに似ている筋ジストロフィー症の診断確定には不可欠と考えられる．

本研究において，3症例の骨格筋組織が筋ジストロフィー性の変化を示し，ジストロフィンが細胞の大小にかかわらず明確に横断面で全周性に染色されたとの成績が得られた．このことは，これらの症例が鑑別を要するDuchenne型やBecker型とはジストロフィンの遺伝子に関しては明らかに異なるものであることを示唆する成績であり，悪性肢帯型の存在がジストロフィンの面からも確かめられたことになる．

悪性肢帯型は，勿論，三好ら[1),2)]によって多数の家系例によって遺伝・臨床的に確立されたものであるが，本論文の3症例個々については，臨床症状，血清CK活性値，筋組織像だけでは悪性肢帯型とは決定し難い．しかし，ジストロフィンの検索により前述の病型（疾患）とは鑑別でき，診断が確定された．このように，単発例の個々の症例の診断確定にも筋細胞中のジストロフィンの検索は特に重要であり，従来，単発例でDuchenne型，Becker型，あるいは女性のDuchenne型病者などとされていた症例の中からも今後ジストロフィ

ン検索の普及によって，本病型が発見されるものと思われる．

DNA の分析については，1例のみ行い正常パターンが得られたが，他の例についてもひき続き検討したい．また，これら症例のジストロフィンの Western blotting は現在検討中である．

おわりに

筋ジストロフィー症悪性肢帯型の骨格筋細胞の表面膜部分に一致して，全周性に明確にジストロフィンを証明し，本病型の存在を改めてジストロフィンの面からも確認した．

文　献

1) 三好和夫，多田嘉明ほか：進行性筋ジストロフィー症の悪性肢帯型 malignant limb-girdle type．この型の存在と本症分類上における意義．厚生省進行性筋ジストロフィー症研究班業績集（II），1974，p39.
2) 多田嘉明：進行性筋ジストロフィー症の悪性肢帯型 malignant limb-girdle type．四国医誌 26：496，1970.
3) Koenig M, Hoffman EP et al: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50：509, 1987.
4) Hoffman EP, Brown RH Jr. et al: Dystrophin. The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51：919, 1987.
5) Sugita H, Arahata K et al: Negative immunostaning of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and mdx muscle surface membrane with antibody against synthetic peptide fragment predicted from DMD cDNA. Proc Japan Acad 64：37, 1988.
6) Arahata K, Hoffman EP et al: Dystrophin diagnosis: Comparison of abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analyses. Proc Natl Acad Sci USA 86：7154, 1989.

18) Dystrophin：Becker 型筋ジストロフィーにおける dystrophin の分子異常並びにヒト臓器における dystrophin の局在について

荒　木　淑　郎*

研究協力者　内　野　　誠**　三　池　輝　久***

はじめに

Becker 型筋ジストロフィー（BMD）においては分子量427kd の正常の dystrophin（"d"）とは質的に異なる"d"が産生されており[1]，遺伝子レベルの説明としては DNA の reading frame が残存し，exon の欠失程度に応じて，短縮した蛋白質が産生されているとする説（いわゆる frame shift 仮説）[2]が最も注目されている．今回我々は BMD における"d"の分子異常について検討するため，western blot による"d"の分析を行ない，また併せて"d"のヒト臓器内分布を明らかにすることを試みたので，その結果について報告する．

対象並びに方法

対象は BMD 6 例（13～41歳），Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）6 例（2～12歳），正常対照 8 例（10～74歳）で，その生検筋を用いて抗"d"抗体による western blot 並びに免疫組織化学染色による検索を行った．またヒト各臓器内の"d"の分布について検討するため，筋緊張性ジストロフィー（54歳女性）及び DMD（26歳男性）の剖検臓器（骨格筋，心筋，大脳，小脳，胃，肺，肝臓，腎臓，膀胱など）について同様の検索を行った．Western blot による"d"の検索は生検あるいは剖検組織の一部を秤量後，10倍量の SDS 液（2％SDS，5％β-mercaptoethanol，4 mM EDTA，0.1mM PMSF，40mM tris，0.24M glycine，40％glycerine，pH8.5）を加えて homogenize 後，遠沈して得られた上清の蛋白濃度を測定して10mg/ml となるように調整し，4～12％ gradient polyacrylamide gel の各レーンに100μg の蛋白を添加して SDS ゲル電気泳動を行った．electroblotting は Hoffman らの方法に従って－20℃の冷凍室内で100V，0.36A で約 3 時間の通電を行った．Immunostaining は Hoffman より供与された羊抗"d"抗体（30kd 及び60kd の二種類の抗原に対する抗体）を一次抗体に用い，biotinylated rabbit antisheep IgG を二次抗体として Avidin Biotin peroxidase complex（ABC）法にて行った．免疫組織化学染色は10μ の凍結切片を作成し，アセトン固定後，抗"d"抗体を一次抗体に用いて，ABC 法による染色及びヘマトキシリンによる後染色を行って鏡検に供した．

結　　果

Western blot による検索で，正常対照の骨格筋では分子量427kd の位置に一致して，明瞭な"d" band の発現がみられた．DMD では 6 例全例で"d" band は欠如していた．BMD では DMD と同様に"d" band が発現しない例（1 例），正常の427 kd より低分子化した"d"を有する例（2 例），並びに正常分子量で含量が減少した例（3 例）がみられた（図 1）．DMD 及び BMD における"d"の欠如ないし減少が添加した蛋白量の違いによるものではないことを証明するため，同一のサンプルをアミドブラック染色（蛋白染色）して，myosin heavy chain（MHC），α-actinin，actin などの各筋構造蛋白を発色させると，MHC に比較して，明らかに"d"の含量が減少しているのが確認された

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

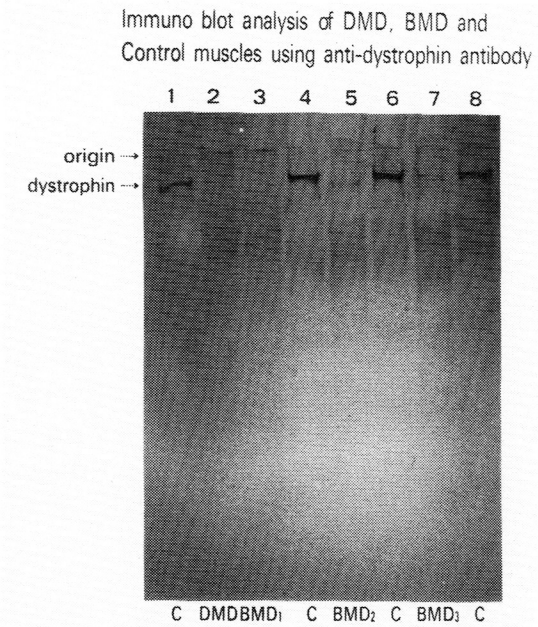


図 1　Duchenne 型（DMD），Becker 型（BMD 1，2，3）および正常対照（C）の骨格筋の western blotting. 正常対照においては明瞭な dystrophin band の発現をみるが，DMD では欠如している．BMD では欠如する例（BMD_1），低分子化した dystrophin も有する例（BMD_2），正常分子量で含量の減少する例（BMD_3）がみられる．

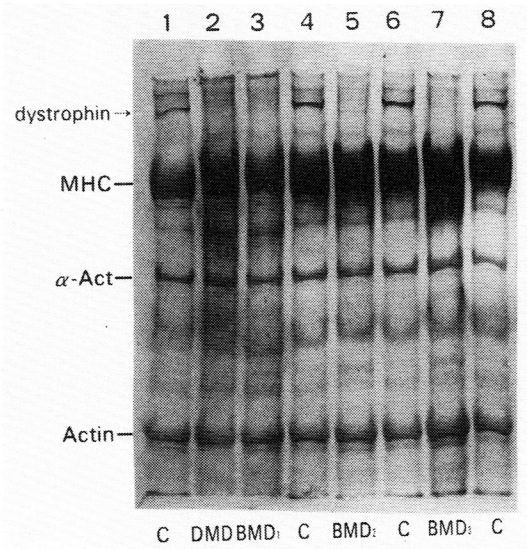


図 2　抗 dystrophin 抗体で immunostaining を行った後に蛋白染色（アミドブラック染色）したもの（図 1 と同一サンプル）．MHC：myosin heavy chain. α-Act：α-actinin, BMD においては MHC に比較して明らかに dystrophin の含量が減少している．

（図 2）．

免疫組織化学染色では正常対照は筋線維の表面膜に一致して全周性に均等な“d”の局在が認められ，DMD では全例欠如していた．BMD では全体に染色性が悪く，また線維間で抗体の沈着に濃淡がみられ，部分的消失（いわゆる patchy stain）がみられた．

次に preliminary study であるが，筋緊張性ジストロフィー（死後 5 時間）並びに DMD（死後 1 時間）の剖検臓器を用いて，前述した western blot 及び免疫組織化学染色による検索を行った．筋緊張性ジストロフィーにおいては死後 5 時間経過した組織でも western blot で骨格筋と心筋に明瞭な“d”band の発現がみられた（図 3）．ただ大脳，胃，膀胱など骨格筋，心筋以外の臓器組織では明らかな“d”band の発現はみられなかった．

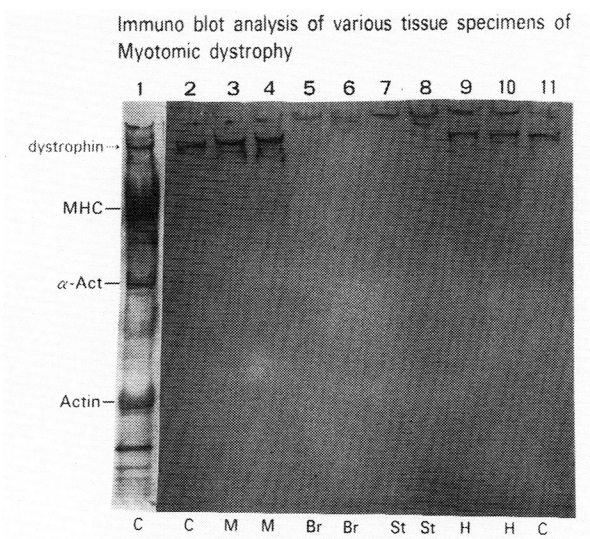


図 3　筋緊張性ジストロフィー（54歳，剖検例）の各組織の western blotting. C：正常対照の骨格筋．M：筋緊張性ジストロフィーの骨格筋．Br：大脳，St：胃，H：心筋．

DMDでは死後1時間と早い時期に採取された剖検臓器であったが，骨格筋，心筋を含め，全臓器で“d” bandの発現はみられなかった（図4）．免疫組織化学染色では筋緊張性ジストロフィーの骨格筋や心筋の筋表面膜に局在が認められ，western blot所見と一致する所見が得られた．大脳皮質では神経細胞の胞体が正常羊血清を用いたnegative controlと比較すると軽度褐色に染まる傾向がみられたが，骨格筋や心筋のように明瞭ではなく，胃・膀胱などでも同様に明らかな局在は確認できなかった．DMDでは骨格筋，心筋を含め，検索した全臓器で“d”の局在は認めなかった．

考　　察

DMD及びBMDは同じくX染色体短腕の“d”遺伝子の欠陥に基づく疾患であるが，臨床像に大きな差がみられ，遺伝子レベル・蛋白質レベルでの違いについて種々検討されている[3),4)]．欠失するexonの大きさや部位にはあまり関連がみられないところから，DNAのreading frameのshiftの有無により，DMDとBMDの違いが生じるとするKunkelらのいわゆるframe shift仮説が現在最も有力視されており，BMDの90%はこの仮説で説明可能といわれている．しかしこれに対する反論もあり，Malhotraら[5)]はBMD, DMD及び中間型29例の遺伝子解析の結果，BMDの6例全例，中間型の10例中8例，1番目のexonを欠失している2例を除く11例のDMD全例においてframe shiftを伴う欠失がおこっていることを明らかにしている．すなわちframe shift仮説に従わないBMDも少なからず存在する可能性があるが，今回の我々の検索でもBMDには異常分子量の“d”を有する症例の他に，正常分子量で含量が減少した例がみられ，前者についてはframe shift仮説で説明が可能であるが，後者についてはframe shift仮説では説明は困難と思われた．Hoffman自身も同様のBMD例の存在を明らかにしている[6)]が，今後正常分子量で量が減少する場合の遺伝子レベルの機序について，“d”の生理的役割と同様に多面的検討が必要と思われた．

一方ヒト剖検例では大脳・胃・膀胱などに“d”の発現を確認できなかったが，マウスでは確認できるので，今後新鮮な検体を用いて再検が必要と考えられた．

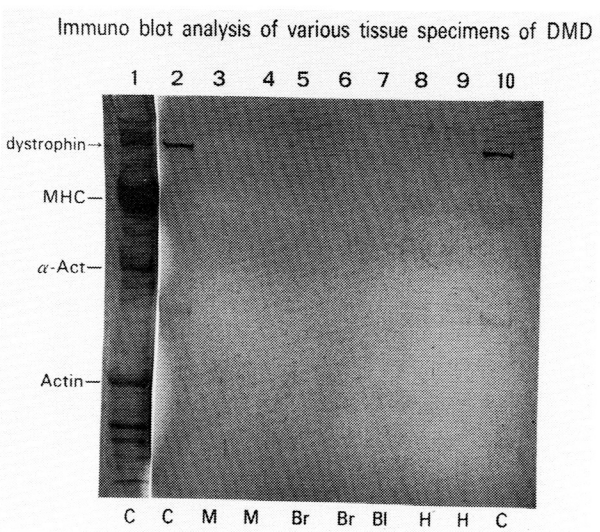


図4　DMD剖検例（26歳）の各組織のwestern blotting．C：正常対照の骨格筋，M：DMDの骨格筋，Br：大脳，Bl：膀胱，H：心筋．

ま　と　め

1）BMDにおける“d”の分子異常並びに“d”のヒト臓器内分布を明らかにするため，western blot及び免疫組織化学染色による検索を行った．

2）BMDにおいては427kdより低分子化した“d”を有する例，“d”を欠如する例及び正常分子量で“d”が著減する例がみられた．一方筋緊張性ジストロフィーの剖検例において骨格筋及び心筋においては筋表面膜に“d”の局在がみられたが，その他の臓器では“d”は確認できなかった．

3）Frame shift仮説だけでは説明困難なBMDが少なからず存在する可能性があり，“d”の産生機構について多面的検討が必要である．また“d”のヒト臓器内分布についても再検が必要である．

文　　献

1）Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH,

Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, Specht L, Kupsky W, Chamberlain J, Caskey CT, Shapiro F and Kunkel LM: Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. N Engl J Med 318 : 1363—1368, 1988.

2) Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H and Kunkel LM: An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. Genomics 2 : 90—95, 1988.

3) Gutmann DH and Fischbeck KH: Molecular biology of Duchenne and Becker's muscular dystrophy: clinical applications. Ann Neurol 26 : 189—194, 1989.

4) Hoffman EP and Kunkel LM: Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. Neuron 2 : 1019—1029, 1989.

5) Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobrow M, Harperps, Thompson MW, Ray PN and Worton RG: Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. Science 242 : 755—759, 1988.

6) Hoffman EP, Kunkel LM, Angelini C, Clarke A, Johnson M and Harris JB: Improved diagnosis of Becker muscular dystrophy by dystrophin testing. Neurology 39 : 1011—1017, 1989.

19）ベッカー型筋ジストロフィーの筋病理
——ジストロフィン・テストで確定診断された20例の検討——

杉田秀夫*

研究協力者　階堂三砂子*　有川恵理*
荒畑喜一*　埜中征哉*

Kunkel, Hoffmanらによるジストロフィンの発見[1]以後，鑑別困難な臨床像を呈する症例においてもデュシャンヌ型，ベッカー型（以下BMD）及び肢帯型筋ジストロフィーの診断が可能となった．我々は今回ジストロフィン・テストで診断の確定されたBMD患者20例につき一般筋病理所見の再検討を試みた．

対　象

1979年～1989年に当センターで検索されたBMD20例（2～32歳）の生検筋（上腕二頭筋）を検討した．表に対象患者の臨床像を示す．筋生検時，全例自力歩行可能であった．症例2はpre-clinical caseで，10と13，18と20は各々兄弟例であった．明らかな家族歴は12例に認め，CPKは549—18,365U/1と全例で上昇，筋電図では2例で筋原性変化に加え神経原性変化が混入していた．

方　法

ジストロフィン・テストは免疫組織化学法[2]及びウエスタンブロット法[3]を行った．ウエスタンブロット法では分子量400kd，蛋白量100%を正常値とした．

一般組織化学染色は，H&E, modified Gomori-trichrome, NADH-TR, ATPase, NSE, acid phosphatase, alkaline phosphataseについて主に検討した．

表　Clinical features of BMD patients

patient	age at biopsy	family history	CPK• (U/l)	EMG
1	2	-	11200	np
2	3	-	3372	M
3	4	+	3200	
4	6	-	18365	
5	7	-	600	
6	8	+	549	
7	8	-	4150	M
8	10	+	3103	np
9	12	+	8004	M
10	12	+	3349	
11	13	-	9999	M
12	14	-	3044	M
13	17	+	ND	M
14	23	+	3699	M+N
15	27	+	748	M+N
16	27	+	4367	M
17	28	+	788	
18	31	+	4420	M
19	32	-	1790	M
20	32	+	1373	M

• normal<110U/l, np: not particular, M: myogenic, N: neurogenic.

結果及び考察

抗ジストロフィン抗体による免疫組織化学染色では正常筋では筋表面膜の全周にジストロフィンが認められるが[4]，BMDでは全例筋表面膜のジストロフィンの免疫染色は淡く，いわゆる“patchy staining像[4),5)]”を示した．

ウエスタンブロット法によるジストロフィンの分析結果では，全例で分子量異常と蛋白量減少を

＊国立精神・神経センター神経研究所

同時にあるいはいずれかを認めた（図1）.

以上のように免疫組織化学法及びウエスタンブロット法から全例BMDと確認された.

一般組織化学染色では従来の報告と同様に，筋線維の大小不同，中心核増加，壊死再生，splitting，反応性の細胞浸潤，間質結合織の増生，内部構築の乱れ等の筋原性変化に加え，小角化線維，fiber type grouping，pyknotic nuclear clumpsといった神経原性変化の混在が見られた．BMDにおける神経原性変化については従来より強調されてきた[6]が，今回の検討では明らかな群集萎縮はなく，fiber type groupingも軽度であった.

注目すべき点は，これらの筋病理所見に筋生検時の年齢によって一定の傾向が見られたことである．図2は左に15歳以下の若年群，右に16歳以上の年長群における特徴的な筋病理像を示した．若年例では活発な壊死・再生像がしばしば群をなしてみられ(a)，反応性炎症像を伴う事が多いのに比し，16歳以降の年長例では壊死・再生線維は少なく，著明な大小不同，中心核増加やsplittingが認められた(b). NADH-TR像では，若年群の筋線維内部構築が保たれている(c)ことに比べ，年長例ではmotheaten fiberやwhorled fiberなど筋線維内部構築異常が目立った(d). ATPase染色では，若年群にはpreclinical caseでも既に著明なtype 2C線維増加を認める(e)一方，年長群ではtype 2C線維は減少し散在性にみられる程度(f)であった．図3にBMD患者を15歳以下の若年群及び16歳以上の年長群にわけて，筋病理所見の出現頻度をそれぞれ棒グラフで示した.

次に，以上のような筋病理像の年齢による差異と，BMDの発症年齢・罹病期間・進行の度合との関係を調べた.

まず，発症から筋生検までの期間が同様で年齢の異なる3例を検討した．症例5（7歳），13（17歳），17（28歳）はいずれも筋力低下に気づかれてから6～7年の経過であったが，H&E, mGt像では壊死・再生が若年者ほど活発で，NADH-TR像では年長例ほど内部構築異常が目立っていた．ヒストグラムでは若年例で多数のtype 2 C線維を

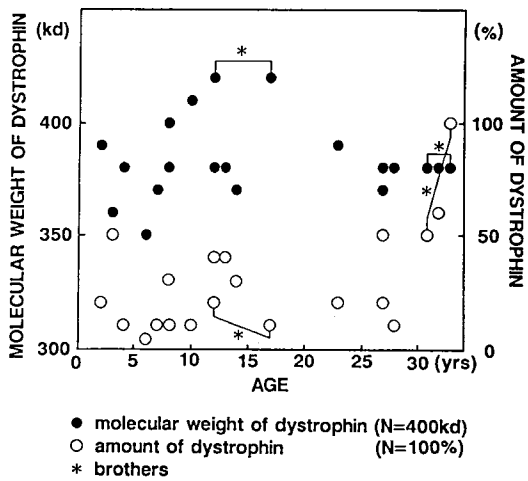


図1 Westernblot analysis of the BMD patients

認め，年長例ではtype 2C線維は減少し大小不同が著明であった（図4）.

一方，免疫組織化学法でのジストロフィンの染色性には年齢による差異は認められず，いずれも抗ジストロフィン抗体による染色性は弱く，同様のpatchy staining像を呈していた.

次に，発症年齢の著しく異なる兄弟症例を検討した.

兄：症例20（32歳）は幼少年期発症・緩徐進行性で10歳より養護学校で過ごした．現症では，近位筋優位に中等度の筋萎縮を認め，Gowers' sign陽性，waddling gaitあり．筋電図上，筋原性変化（+）．CPK 1,373 IU/1.

弟：症例18（31歳）は25歳で初めて症状を自覚．現症では下肢近位に認めるのみ．筋電図上，筋原性変化（+）．CPK 4,420 IU/1.

発症年齢・罹病期間・進行の度合が著しく異なるにも係わらず，筋病理像では若干程度の差はあるもののどちらも年長者BMDの特徴を有していた．ジストロフィン・テストでは，兄弟ともに免疫染色でpatchy stainingを呈し380kdの分子量異常を伴っていた．兄弟で臨床経過がかなり異なる理由は不明であるが，兄・弟ともにジストロフィン蛋白量が20%以上で緩徐進行例と考えられた[3].

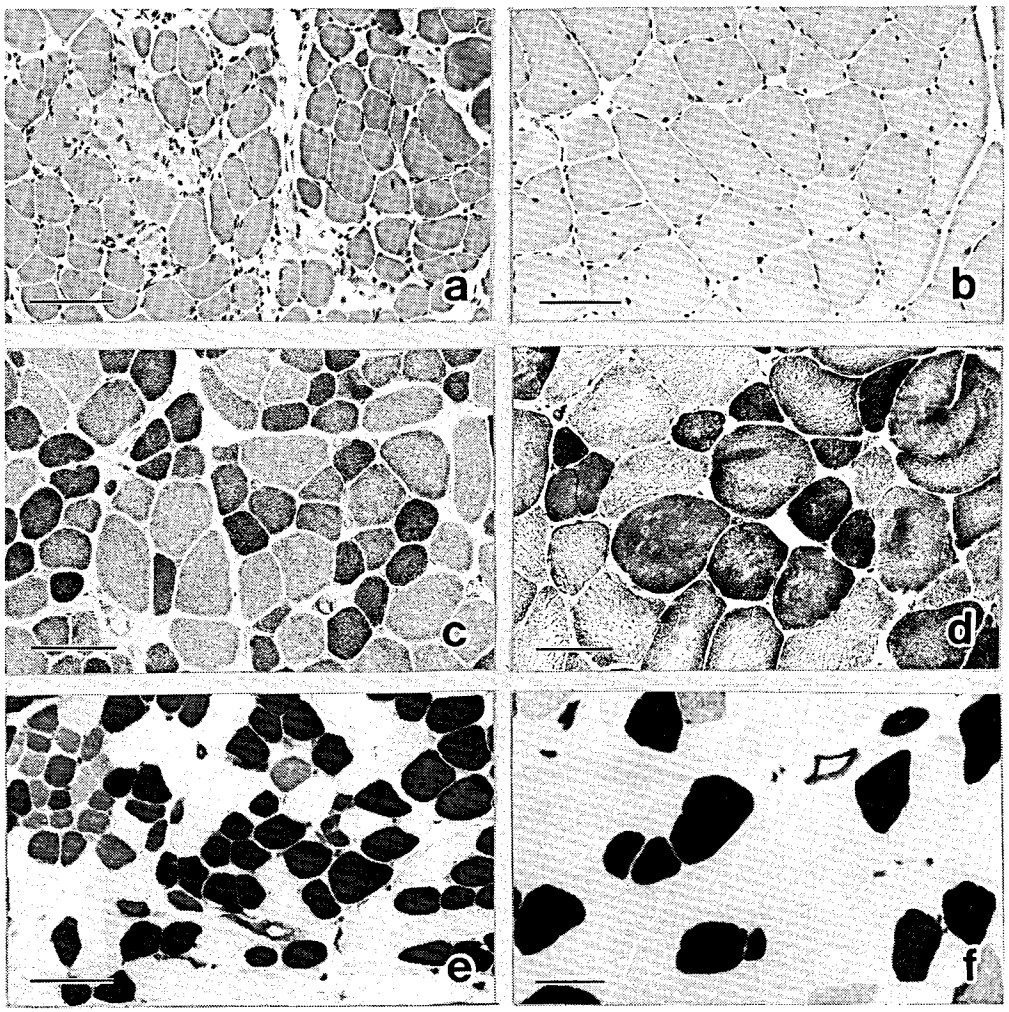


図2　Morphological changes by age
a：Patient 5 (7 y. o.), H&E
b：Patient 14 (23 y. o.), H&E
c：Patient 7 (8 y. o.), NADH-TR
d：Patient 20 (32 y. o.), NADH-TR
e：Patient 2 (3 y. o.), ATPase pH4.2
f：Patient 16 (27 y. o.), ATPase pH4.2
Bar=100μ

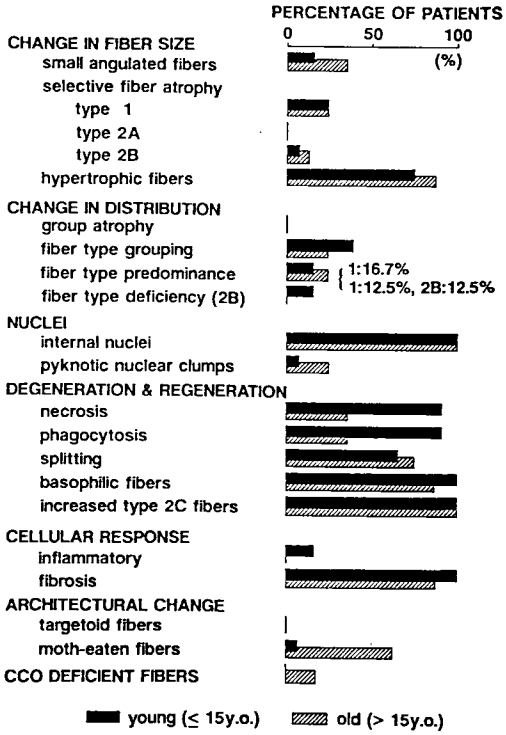


図3　Histological features in BMD
Frequencies of abnormal findings in 20 patients are summarized on bargraph.

ま と め

1．ジストロフィン・テストで確定診断されたベッカー型筋ジストロフィー症20例（2～32歳）の筋病理（上腕二頭筋）を再検討した．従来の報告と同様に，筋原性変化を主に認め，一部神経原性変化の混在を認めた．

2．筋病理所見は筋生検時の年齢によって一定の傾向を認めた．

3．15歳以下では活発な壊死・再生像が中心であった．

4．16歳以降では内部構築の乱れ・splitting・中心核増加などの慢性変化が主であった．

5．年齢に伴う筋病理像の変化は，今回検索した限りでは臨床像（発症年齢・罹病期間・進行の度合）やジストロフィンの免疫染色性・分子量・蛋白量とは無関係であった．

謝辞：ジストロフィン・テスト（ウエスタンブロット法）は Harvard Medical School, the Devision of Genetics の Hoffman, Kunkel 両先生にご協力いただきましたことを深謝します．

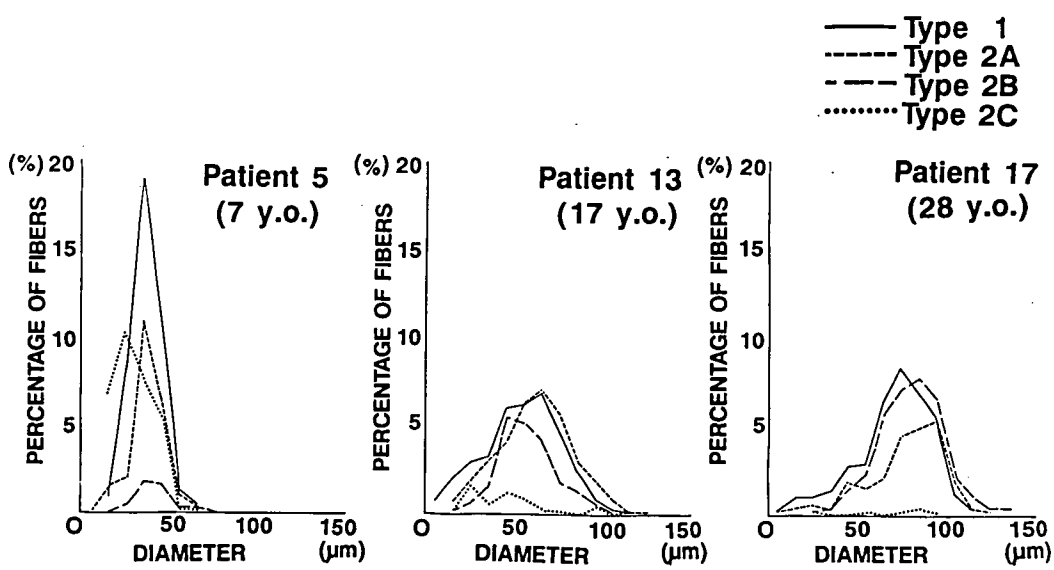


図4　Change in distribution by age
Histograms of 500 fibers are shown. 3 different aged-patients had nearly the same suffering periods of 6-7 years.

文　献

1) Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM: Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51 : 919—928, 1987.

2) Sugita H, Arahata K, Ishiguro T, Suhara Y, Tsukahara T, Ishiura S, Eguchi C, Nonaka I, Ozawa E: Negative immunostaining of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and mdx muscle surface membrane with antibody against synthetic peptide fragment predicted from DMD cDNA. Proc Jpn Acad 64 (SeriesB) : 37—39, 1988.

3) Hoffman EP, Kunkel LM, Angelini C, Clarke A, Johnson M, Harris JB: Improved diagnosis of Becker muscular dystrophy by dystrophin testing. Neurology 39 : 1011—1017, 1989.

4) Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, Ishihara T, Nonaka I, Ozawa E, Sugita H: Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. Nature 333 : 861—863, 1988.

5) Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, Ishiura S, Tsukahara T, Ishihara T, Sunohara N, Nonaka I, Ozawa E and Sugita H: Dystrophin diagnosis: comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescent and immunoblot analysis. Proc Natl Acad Sci (USA) 86 : 7154—7158, 1989.

6) Bradley WG, Jones MZ, Mussini JM, Fawcett PRW: Becker-type muscular dystrophy. Muscle Nerve 1 : 111—132, 1978.

20）ジストロフィン分子におけるC末端ドメインの臨床的意義

杉田秀夫*

研究協力者　荒畑喜一*　石浦章一*　塚原俊文*
有川恵理*　階堂三砂子*　埜中征哉*

目的

我々はこれまでデュシャンヌ型筋ジストロフィー（DMD）で，特異的に欠損しているタンパク質―ジストロフィン―の骨格筋における発現様式を明らかにし，その臨床診断的意義を検討してきた．特に免疫組織化学的に見てDMDとBMD（ベッカー型筋ジストロフィー）とが異なる事を初めて見いだし報告した[1)~5)]．そもそもBMDは1955年Beckerにより記載された筋ジストロフィーで，臨床的に良性DMDとも言われているとおり発症年齢はDMDよりやや遅く，臨床経過・予後ともに軽症であるが，今日ではその分子遺伝学的背景が解明されつつある．すなわちBMDとDMDとは同じジストロフィン遺伝子のヘテロな欠陥による疾患（allelic disease）である事が判明している．

今回我々は，Kunkelらの提唱するDMDとBMDの差異に関するジストロフィンのreading frame仮説の妥当性について検討した．これをタンパク質レベルから明らかにする目的で，ジストロフィンのC末端ドメインに特異的なモノクローナル抗体を用いその発現様式を検討したので報告する．

対象と方法

対象はDMD18，BMD20，その他の各種神経筋疾患（OND）32の計70例である．抗ジストロフィンC末端ドメイン・モノクローナル抗体はペプチドIV（ヒトC末端アミノ酸番号3495-3544）をマウスに免疫して型どおり調製された．ジストロフィンの局在は蛍光抗体間接法にて，また分子量とタンパク量は隣接の凍結切片を用いたウエスタンブロット法にて測定した．なお蛍光の定量化も試みた．

結果

ウエスタンブロット法と免疫組織化学法の両者の結果から，DMDではジストロフィンの完全欠損が，ONDでは正常の発現が確認された．しかしBMDではジストロフィン分子量の変化（減少17，増加3例），タンパク量の減少（5～60%）および免疫染色の異常（全体的な淡染性と部分的欠損）が認められた（表，図）．またMPM200microscope photometry systemによる筋形質膜の蛍光強度はDMD；1.0±1.4，BMD；27.4±12.2，OND；102.9±7.7であった．

考察および結論

DMDで欠損している筋細胞膜関連タンパク質であるジストロフィンは4つのドメインから構成されN末端から順に，アクチン結合ドメイン，ス

表　Immunocytochemical analysis of the dystrophin C-terminus with a monoclonalantibody '4C5'

Clinical diag.	No. of caases	Dystro phin	kDa n=400	% n=100	Immuno-staining
DMD	18	absent	—	0	—
BMD	20	abnormal			+
	(17)		<400	5～60	(faint
	(3)		>400	10～30	& patchy)
OND	32	normal	400	100	++(normal)

*国立精神・神経センター神経研究所

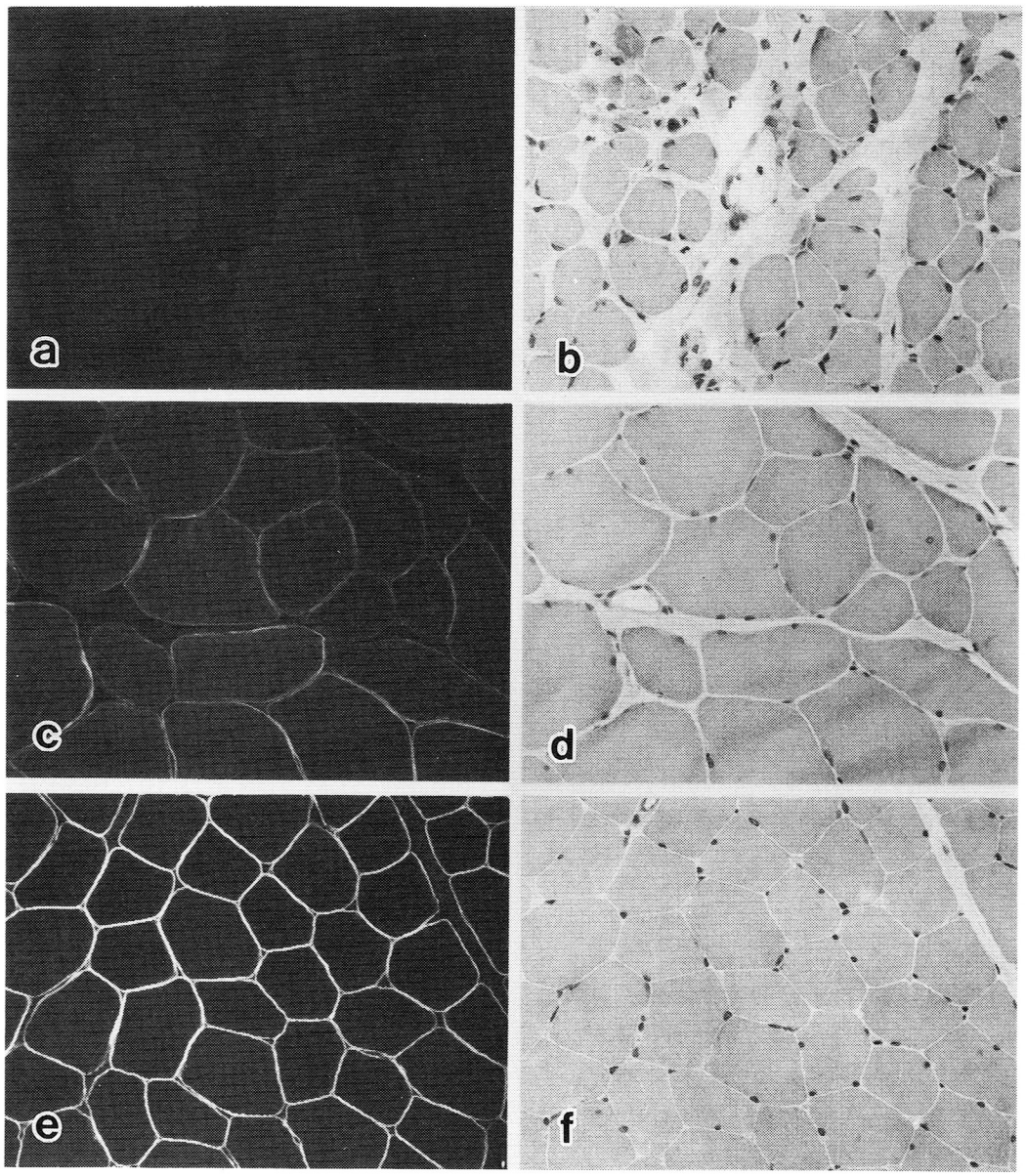


図　抗ジストロフィンC末端モノクローナル抗体'4C5'による骨格筋の螢光染色およびこれと対応したH&E染色．DMD（a，b），BMD（c，d），正常筋（e，f）を示す．ジストロフィンC末端の免疫反応はBMDと正常筋では存在するが，DMD筋では欠損している．（×340）

ペクトリン類似の3重螺旋構造を24回繰り返す中間ドメイン，EFハンド構造をもつ高システインドメイン，およびC末端ドメインの順に並んでいる．このうちC末端については，他のいかなる既知タンパク質ともアミノ酸配列に相同性が認められないという事実や，ヒトとニワトリの間で95%のホモロジーを認めることから，ジストロフィンの生理機能発現にとって重要な役割を担っているドメインである可能性が示唆されてきた．またCampbellらは（1989）ジストロフィンの部分精製

に成功し，ジストロフィンがC末端で筋細胞膜を構成する糖タンパク質と結び付いていることを示した．さらにFeenerらは(1989) C末端のスプライシングの差によって多くの臓器特異的アイソフォームが作られていることを発見している．つまり少なくとも骨格筋では3種の，脳ではそれとは異なる3種の，平滑筋ではもっと短い2種のジストロフィンが作られていることが判明した．従って，Campbellらの言うようにC末端が膜タンパク質との結合部位であるならば，臓器によってそれぞれ異なるジストロフィン結合タンパク質が存在している可能性がある．そして最近，英国のLove, Daviesら（1989）によってヒト第6染色体上にジストロフィンのC末端と73%ものホモロジーのある塩基配列が見いだされ，しかもこのcDNA・B3をプローブとしてヒト胎児骨格筋培養細胞のmRNAを検索したところ，ジストロフィンmRNA（14kb）とは異なる13kbのmRNAが検出されたことで新たな問題提起がなされている．

今回我々はDMD/BMDを含む70例の各種神経筋疾患について，ジストロフィンのC末端ドメインの発現様式を検討したわけであるが，これらの結果から，BMDとONDにおいてはジストロフィンのC末端ドメインが保たれているが，DMDでは欠損していることが判明した．これはジストロフィン・タンパクの安定化または生理機能の発現にとって，そのC末端部分を含む構造が必須であることを示唆しているものと考えられ，極めて重要である．また，同時に，PCR法とサザンブロット法によるDMD遺伝子の欠失解析に基づいてKunkelらによって提唱されてきたジストロフィンのreading frame仮説がタンパク質レベルから具体的に裏づけられたと言える．

なおこの仮説は，タンパク質レベルで見たDMD（ジストロフィンは欠損）とBMD（ジストロフィンは分子量に異常があっても存在）の差異が遺伝子レベルでは具体的にどうなっているのかという疑問に対する最も有力な考え方である．仮にジストロフィンのreading frameがシフトしてしまえばstop codonが働いてしまうなどして，譬え僅かの欠失であるとしてもジストロフィンの欠損を来してしまうし（C末端は欠損；DMDの場合），他方reading frameがシフトせずに残っていれば，譬え大きなinternal deletionが存在していてもジストロフィンは（不完全ながらも）発現する（C末端は存在；BMDの場合）と考えられる．

文　献

1) Sugita H, Arahata K, Ishiguro T, Suhara Y, Tsukahara T, Ishiura S, Eguchi C, Nonaka I and Ozawa E: Negative immunostaining of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and mdx mouse muscle surface membrane with antibody against synthetic peptide fragment predicted from DMD cDNA. Proc Japan Acad 64: 210—212, 1988.

2) Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, Ishihara T, Nonaka I, Ozawa E and Sugita H: Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. Nature 333: 466—469, 1988.

3) Arahata K, Ishihara T, Kamakura K, Tsukahara T, Ishiura S, Baba C, Matsumoto T, Nonaka I and Sugita H: Mosaic expression of dystrophin in symptomatic carriers of Duchenne's muscular dystrophy. N Engl J Med 320: 138—142, 1989.

4) Arahata K, Ishiura S, Tsukahara T and Sugita H: Dystrophin digest. Nature 337: 606, 1989.

5) Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, Ishiura S, Tsukahara T, Ishihara T, Sunohara N, Nonaka I, Ozawa E and Sugita H: Dystrophin diagnosis: comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescent and immunoblot analysis. Proc Natl Acad Sci (USA) 86: 7154—7158, 1989.

V．mdxマウス

21) mdxおよびcontrolマウスの液体ヘリウム急速凍結骨格筋のfreeze fracture, deep etching, rotary shadow replica法による細胞膜裏打ち構造の研究

若山吉弘*

研究協力者　渋谷誠二*

緒言

Heuserにより開発された急速凍結，deep etching, rotary shadow法によるreplica膜の観察は細胞の3次元的観察に適しており，membrane cytoskeletal interactionやcytoskeletal elementsの微細構造の詳細を研究するのに極めて有用である．特に細胞膜と細胞膜関連細胞骨格との相互関係を究明するにはきわめて有力な手段となりうると考えられる．近年Duchenne筋ジストロフィー症(DMD)の遺伝子産物である分子量427 kDaの蛋白質dystrophinは正常骨格筋細胞膜の細胞質側に存在することが明らかにされつつあり，DMDではdystrophinが筋細胞膜に欠如している．我々は同じくdystrophinが欠損していると報告されているmdxマウスとdystrophinが存在するmdxコントロールマウスを用い，免疫透過電顕的ならびにdeep etching replica法によるreplica膜の電顕的観察にてdystrophinの超微形態と存在様式を研究するため本研究をおこなった．

材料と方法

免疫透過電顕的観察には6匹の成熟mdxマウスと6匹の成熟mdxコントロールマウスの大腿四頭筋を4％パラフォルムアルデヒド液で1時間固定後，クリオスタットで細切し，7.5％蔗糖入り0.1Mリン酸バッファーで4回洗浄後over nightで更に洗浄後正常家兎血清で非特異的反応をブロックした．次にKunkel博士より供与された60 kDaジストロフィン抗体を4℃で72時間反応させ，家兎抗羊2次血清の1000倍希釈液を4℃にてover night反応後ABC法にて試料を作製，無染色で電顕にて観察した．

Deep etching replica法では7匹の成熟mdxマウスと6匹の成熟mdxコントロールマウスの長趾伸筋（EDL筋）を用いた．方法は

1）mdxマウスとコントロールマウスのEDL筋を採取する．
2）急速試料凍結装置Eiko RF-23型に液体窒素と液体ヘリウムを入れ−269℃まで冷えた純銅blockに採取した筋の小片を圧着し急速凍結する．
3）上記標本をEiko FD-5A凍結割断装置に移し−110〜−120℃で凍結面の表層を割断する．
4）割断後試料台の温度を−90℃まで上昇し真空度1〜2×10^{-7} Torrで約30分間deep etchingをおこなう．
5）deep etching後試料台に装着した標本の温度を−160℃前後まで冷やす．
6）その後電子銃に装着した白金を膜圧計でその厚さを監視しながら，また試料台を回転しながら蒸着し，次に同じく電子銃に装着したカーボンを試料の上の白金膜に回転蒸着してreplica膜を作製する．
7）次に試料のついたreplica膜を凍結割断装置から取り出し，塩素系漂白剤で筋肉だけを消化しreplica膜を得る．
8）replica膜を蒸留水で3分ずつ3回洗浄する．
9）replica膜を銅メッシュにすくい取る．
10）得られたreplica膜を乾燥後，電顕にて観察し，写真を撮影する．

*昭和大学藤が丘病院神経内科

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

結　　果

免疫透過電顕的には抗ジストロフィン抗体は mdx コントロールマウスの筋細胞膜に一致して見られ(図1 A)，更に高倍率で観察すると筋細胞膜直下で筋細胞膜に接して図1 B の矢印のように強い免疫反応が見られた．一方，筋細胞の内部を観察すると図1 C の矢印のように SR-T 結合が3相構造を形成しているが，この部を含め筋細胞の横管 (t-tubule) は抗ジストロフィン抗体では染色されなかった．他方 mdx マウスの筋細胞膜は図1 D, E に見られるように mdx コントロールマウスで見られるような筋細胞膜直下の強い抗ジストロフィン抗体反応が欠如していた．尚非免疫羊血清を用いた対照標本では mdx コントロールマウスには抗ジストロフィン抗体反応は見られなかった．

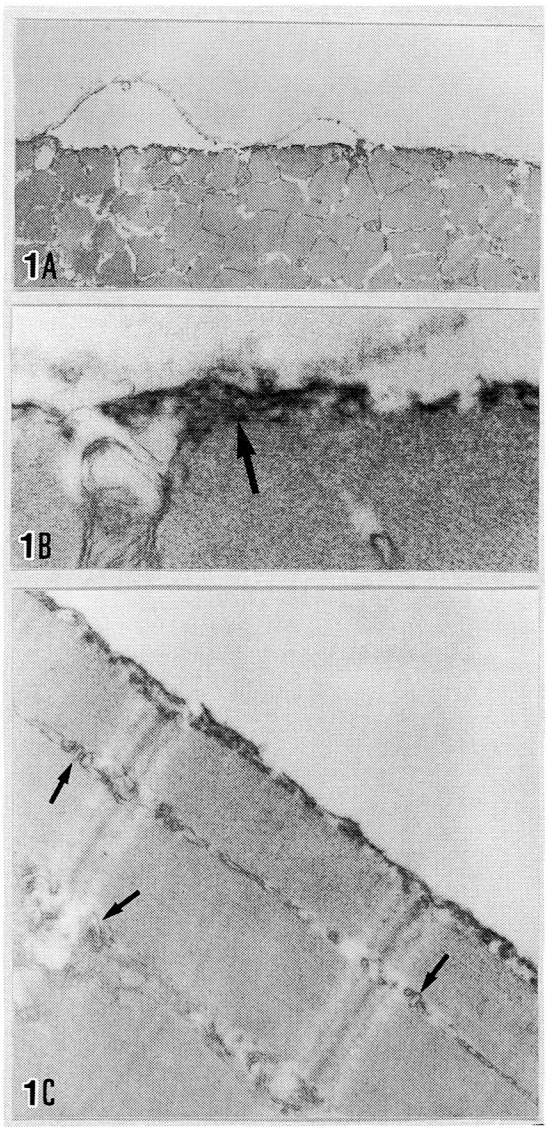
次に液体ヘリウムによる急速凍結標本の deep etching replica 膜の電顕的観察では筋細胞への割断面の入り方に関し2種類が見られた．すなわち collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan などの基底膜物質を通り筋細胞の真の外表面，筋細胞膜P面，ここから筋形質に入り筋細胞膜直下から筋細胞の内部が観察できる面（図2 A, B) ともう1つは筋細胞の内部から筋細胞膜の真の内表面，ここから筋細胞膜の脂質2重層へ割断面が入り筋細胞膜E面そして基底膜層から細胞外腔が観察できる面（図3）である．このようにして観察できる筋細胞膜は真の外表面と真の内表面には粒子の存在は少なく，筋細胞の脂質2重層の内面はP面，E面とも膜内粒子が著しく多く存在していた．またグルタールアルデヒド固定標本と異なり，なまの急速凍結標本では筋細胞膜のP面に粒子がE面より多いという傾向は見られなかった．

さて mdx マウスと mdx コントロールマウス EDL 筋の筋細胞膜直下の細胞質側には形態の異なる細胞骨格成分が網状構造をなし(図4)，とくに筋細胞膜E面の観察できる視野では細胞膜直下の細胞骨格成分が，筋細胞膜の真の内表面に付着している像がみられた（図4）．

考　　察

筋細胞膜裏打ち構造には spectrin[1], fodrin[2], ankyrin[1] などがあるとされていたが，最近 DMD gene product である dystrophin も筋細胞膜裏打ち構造として存在すると考えられている．細胞骨格成分は従来の透過電顕的手法ではその超微形態の詳細を研究することは困難であり，本研究では個々の細胞骨格成分を1個1個詳細に観察するために deep etching, rotary spadow replica 法を用いた．分離精製した spectrin の rotary shadow replica 法による検討では，その太さは約2～3 nm，長さが約100nm であるとされている[3]．また actin filament は約5 nm 間隔の周期をもつ subunit structure が長く縦に並び縞紋様の構造を呈している[4]．この様に細胞骨格同定の手がかりは多少あるものの，spectrin などは dimer や tetramer などを形成している可能性もあり事情は複雑である．dystrophin に関してはその分子量などからコンピューター解析により，長さ約150 nm と想定され，その大部分は25個の triple helical segment をもつ桿状構造からなっていると考えられている[5]．

本研究では mdx マウスおよび mdx コントロールマウス EDL 筋細胞膜裏打ち構造は共に網状構造を呈し，その一部が筋細胞膜の真の内表面に付着していた．その細胞骨格の形態の詳細は現在定量的に検討中であり，更に抗ジストロフィン抗体で標識し，その標識標本の本法による検討も加



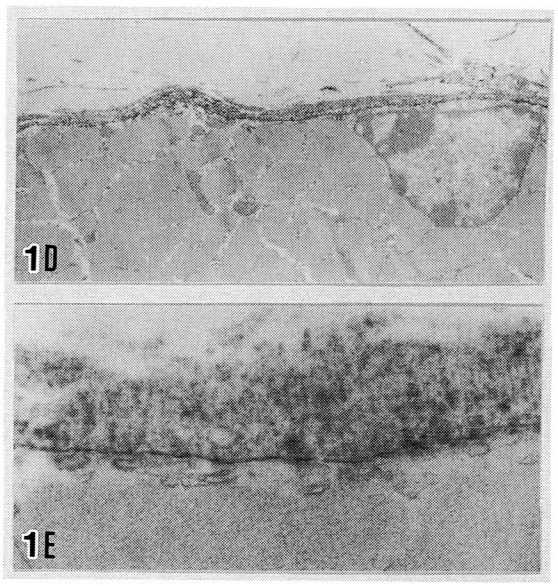


図1A，B，C；mdx コントロールマウス EDL 筋の抗ジストロフィン抗体による免疫染色像
Aでは免疫反応は筋細胞の表面に一致して見られる．BはAの高倍像で，免疫反応は矢印のように筋細胞膜直下に見られる．Cでは免疫反応は筋細胞膜の表面に見られるが，矢印のように SR-T junction を含めた横管系には見られない．
（A：×5300，B：×42300，C：×21100）
D，E；mdxマウス EDL 筋の抗ジストロフィン抗体による免疫染色像で，EはDの高倍像．筋細胞表面には免疫反応が見られない．（D：×5300，E：42300）

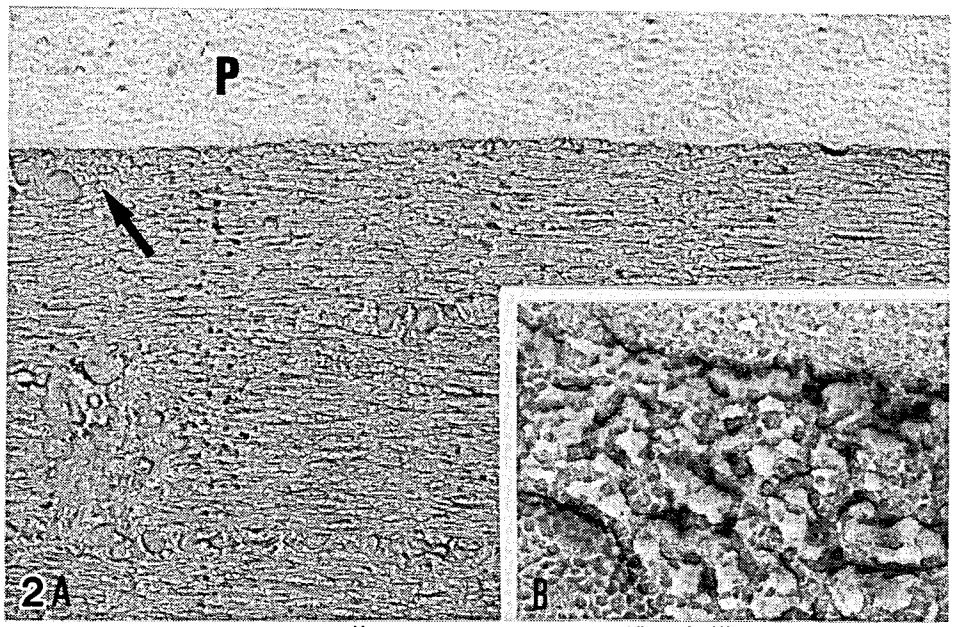


図2　mdx コントロールマウス EDL 筋の deep etching replica 膜の電顕像
従来の透過電顕像より filament は格段にはっきりと観察出来る．P は細胞膜 P 面でBはAの矢印の部分の拡大像．個々の細胞膜裏打ち構造がはっきりと観察出来る．（A：×18700，B：×149300）

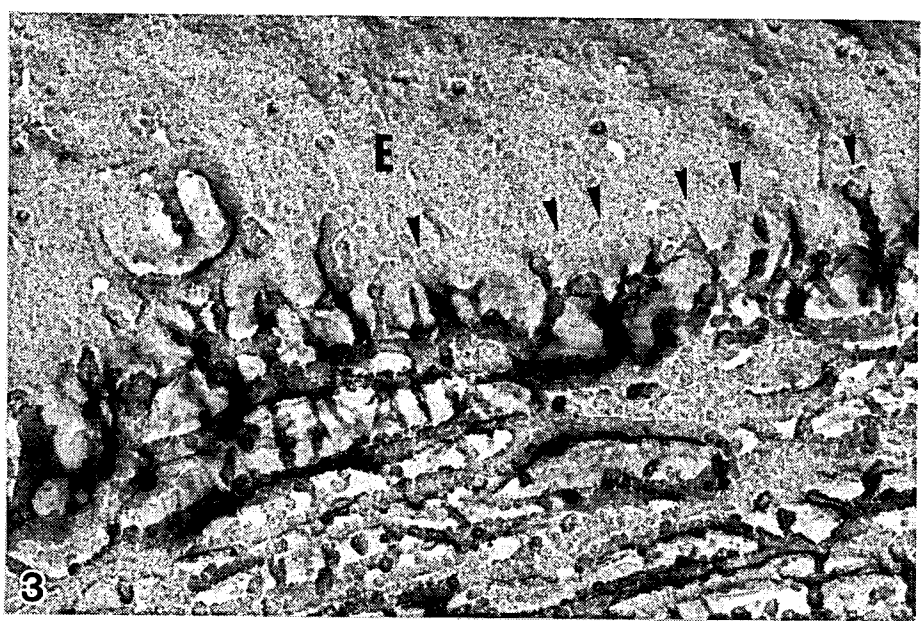


図3　mdx コントロールマウス EDL 筋の筋細胞膜裏打ち構造
E は筋細胞膜 E 面．矢尻の線より下に筋細胞膜の真内表面が見られ，ここへ細胞質側から多くの細胞骨格成分が付着している．（×149300）

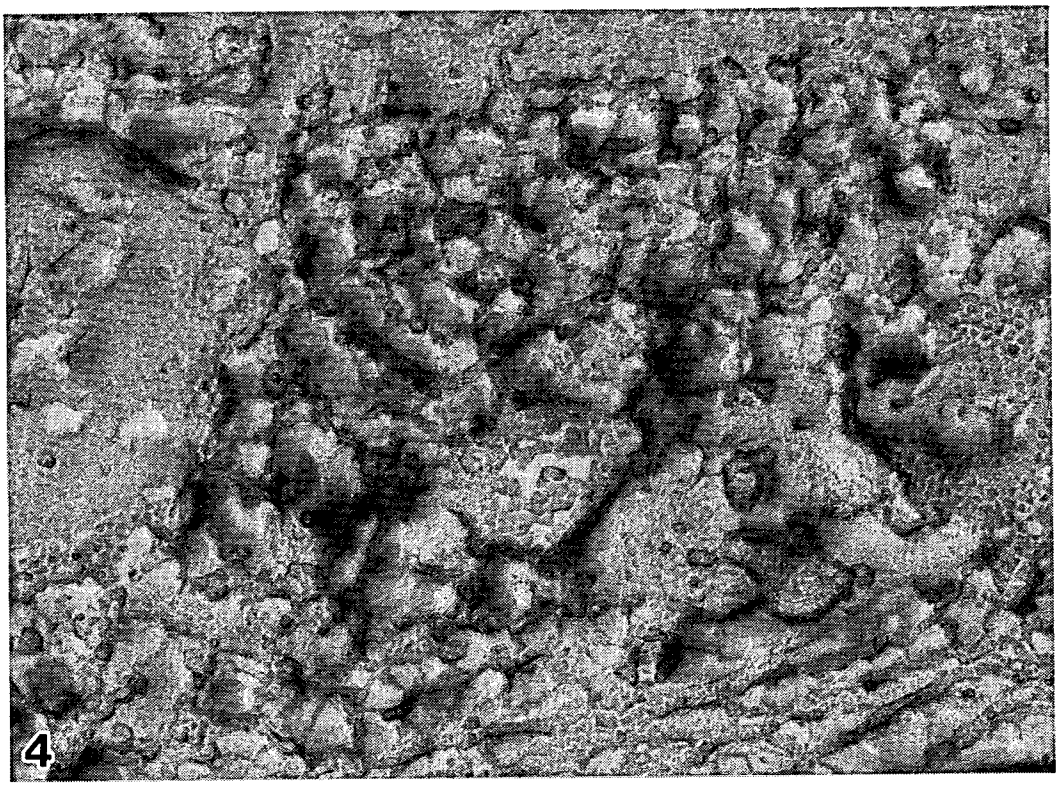


図4　mdx マウス EDL 筋の細胞膜裏打ち構造
画面上方には網状構造をした細胞膜裏打ち構造の細胞骨格成分がみられ，その一部が筋細胞膜の真内表面に付着している．(×149300)

え，個々の筋細胞膜裏打ち細胞骨格の同定を進めていきたい．

文　献

1) Branton D, Cohen CM et al: Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. Cell 24 : 24—32, 1981.
2) Miranda AF, Bonilla E et al: Immunocytochemical study of dystrophin in muscle cultures from patients with Duchenne muscular dystrophy and unaffected control patients. Am J Pathol 132 : 410—416, 1988.
3) Shotton DM, Burke BE et al: The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies. J Mol Biol 131 : 303—329, 1979.
4) Heuser JE, Kirschner: Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. J Cell Biol 86 : 212—234, 1980.
5) Koenig M, Monaco AP et al: The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell 53 : 219—228, 1988.

22）mdx および control マウスの生後早期における骨格筋細胞膜内 orthogonal array 密度について

若　山　吉　弘*

研究協力者　　渋　谷　誠　二*

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）と欠損遺伝子部位がほぼ同様で，その遺伝子産物である dystrophin も欠如する mdx マウスの筋細胞膜微細構造異常については昨年度報告した[1]．そのなかで我々は DMD および mdx マウスにみられる膜内粒子異常の内，特に orthogonal array（OA）の減少が最も顕著であることを見いだし，dystrophin との関係に注目した．

今年度は，昨年度が成熟 mdx マウスを用いたのに対し，より早期の生後間もない early stage での mdx および control マウスの骨格筋細胞膜標本を，Freeze-Fracture 法により作製し，膜内粒子，特に OA 密度についてさらに検討をおこなった．

方　　法

生後３日，７日および14日の雄 mdx（C57BL/10ScSn-mdx）ならびにその control（C57BL/10 ScSn）マウスを各々６匹ずつ使用し，その両側前脛骨筋（TA 筋）を摘出し，右側 TA 筋はイソペンタンおよび液体窒素下で凍結固定後，光顕組織標本を作製した．左側 TA 筋は十分に露出し，下腿骨につけたまま，直ちに2.5%グルタールアルデヒドリン酸緩衝液の中で２時間固定し，実体顕微鏡下で TA 筋の筋膜を注意深く取り除いた後，約１×２ mm の小さなブロックに切り，10%～30%グリセリン溶液に浸軟し，Freeze-Fracture（F-F）法により，筋細胞膜電顕標本を作製した．F-F 法による標本割断には，Eiko FD II A（−120℃，2.5～４×10^{-7}Torr の条件下）を用いた．

電顕にて観察し，撮影された筋細胞膜写真中の OA 密度を算出するため，最終倍率が16万倍の写真を各々のマウス１匹につき，最低10本の筋線維（５Ｐ面および５Ｅ面）について，mdx 群と control 群それぞれ60枚ずつ，各 stage ごと計120枚（３ stages で合計360枚）を code し，すべて混ぜ合わせ，mdx 群か control 群か不明の状態で，１本の筋線維の1.5～1.85μm^2 の面積をもつ領域内でのOAの数を算出し，この後，これらはdecodingし，各々の時期における mdx 群と control 群で統計学的に検討した．

結　　果

光顕的に生後３日および７日の mdx マウスでは壊死線維の存在は明らかでなく，control マウスと比較しても外観上大きな違いはみられなかった．一方，生後14日の mdx マウスでは，その一部で壊死線維の集塊が散見された．

各 stage 別の F-F 法による TA 筋筋細胞膜標本における１μm^2 あたりの OA 密度は（表），生後３日，７日，14日の順に，mdx 群では，その Median 値および Midrange 値（25%～75%）（括弧内）が，0.54（０～1.62），4.37（2.24～9.40），4.31（0.54～7.54）であり，一方，同様に，control 群においては，0.54（０～2.69），8.08（3.87～16.33），11.85（5.39～16.65）であった．生後３日 mdx 群ならびに control 群では，すでに，少数ながら，両群ともに OA の発現を認めているが，統計的には両群で有意差はみられなかった（$p>0.1$by Wilcoxon rank-sum test）．しかしながら，生後７日になると，control 群の OA の数は著明に増加し，かつ mdx 群も増加を認めたものの，その密度

＊昭和大学藤が丘病院神経内科

表 Density of orthogonal arrays and their pits per μm^2 in tibialis anterior muscle plasma membranes of mdx and control mice at different early stages.
P values were calculated by Wilcoxon rank-sum test.

Age		Median	Midrange(25% - 75%)	
3 days	MDX	0.54	0 - 1.62	p>0.1
	Control	0.54	0 - 2.69	
7 days	MDX	4.37	2.24 - 9.40	p<0.01
	Control	8.08	3.89 - 16.33	
14 days	MDX	4.31	0.54 - 7.54	p<0.01
	Control	11.85	5.39 - 16.65	

は明らかにcontrol群に比べて少なく，統計的にも有意に少なかった（p<0.01）．さらに生後14日においては，control群のOA密度は生後7日以上に増加し，一方，mdxマウスではその密度が横這いか，やや減少傾向にあり，やはり統計的にもcontrol群より有意に減少していた(p<0.01)（図A-D）．

考　　察

Duchenne型筋ジストロフィー症（DMD）およびmdxマウスの筋細胞膜微細構造異常の内，直径約60～70Åのsubunitから成り結晶様構造を示すorthogonal array（OA）の減少が，最も顕著であることはすでに報告している[2]．一方，preclinical DMDのOA密度に関しては若山ら[3]がsymptomatic DMDと同様に，その著明な減少を報告しているが，mdxマウス生後早期におけるOA密度については未検討のままであった．本研究の結果，臨床的，光顕組織学的に，また電顕的にも異常がみられない[4]生後7日のearly stage mdxマウスにおいて，すでにOA密度の統計的に有意な減少を認めたが，より早期の生後3日のmdxマウスでは，controlマウスと比べて有意差はなかった．しかしながら，これらのOA密度はヒトpreclinicalおよびsymptomatic DMDと比較した場合には，early stage mdxマウスではかなり多くのOAが発現しているといえた．

OAの機能については現在ほとんど不明であるが，正常マウスやヒトでは成長過程にある若いマウスやヒトの方が多いことを，我々はF-F法を用いた研究にて発見している[5]．このことは，OAが骨格筋の活発な機能と強い関係をもち，逆にOAの少ないことが骨格筋機能を減じることに結びつくかもしれない．mdxマウスでは，今までの報告を含め，すべてのstageでヒトDMDよりもOAが多く認められ，このことがmdxマウスがDMDより機能障害が軽いことと関係しているかもしれない．

また本研究の結果から，mdxマウスでは生後極めて早期には同時期のcontrolマウスと同等に，すでにその骨格筋細胞膜内にOAが発現しているが，生後3日から7日の短期間の内にOAはある程度まで増加するが，その数に関しては成熟が停止してしまうといえた．その原因がdystrophinであるとするならば，OAの発生成熟には，その極めて早期の過程でdystrophinと何らかの繋がり

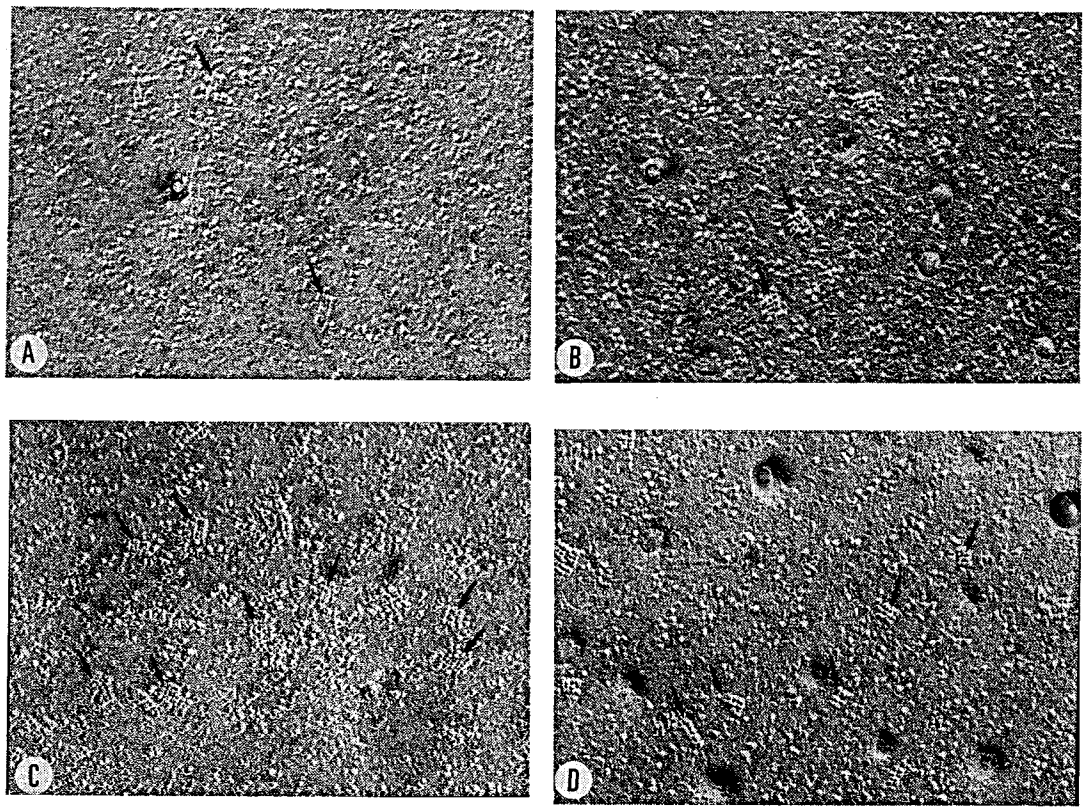


図 High magnification electron micrographs of freeze-fracture preparations illustrating orthogonal array density of protoplasmic (P) face in tibialis anterior (TA) muscle plasma membrane of control and mdx mice at different early stages.
Fig.A ; control mouse at 3 days after birth, Fig.B ; mdx mouse at 3 days after birth, Fig.C ; control mouse at 7 days after birth, Fig.D ; mdx mouse at 7 days after birth.
Decreased density of orthogonal arrays (arrows) is apparent in mdx membrane at 7 days after birth.
C=Caveolae. ×80,000

を必要とする可能性が推測されるが，OA 減少はヒト DMD や mdx マウスの他に，顔面肩甲肢帯型筋ジストロフィー症[6] や福山型筋ジストロフィー症[7] でも認められ，OA の減少は dystrophin 以外の要因も考慮すべきであろう．

今後さらに，OA 発生成熟過程における dystrophin 関与の有無，神経支配の影響，neuromuscular junction や myotendinous junction における OA の存在様式と密度，OA 以外の膜内粒子の early stage mdx マウスにおける変化などを F-F 法を用いて検討する必要がある．

結　　語

①幼弱 mdx マウスではより多くの OA が発現していた．

② mdx マウスが DMD より機能障害が軽い点に関して，mdx マウスではその control マウスよりは有意に OA が減少しているものの，DMD より，すべての stage で，mdx マウスの方が OA 密度が多いことと関係している可能性も考えられた．

③臨床的，光顕組織学的にほとんど異常を認めない mdx マウス生後 1 週の時期で，すでに，OA 密度の統計的に有意な減少がみられたことは，

筋ジス症状発現機序に関して，dystrophin 欠如の他に，OA の発生成熟過程の異常の関与も示唆された．

文　献

1) 若山吉弘，渋谷誠二，: mdx マウス長趾伸筋細胞膜の Freeze-Fracture 法による微細構造の経時的変化について．“厚生省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究（杉田班）昭和63年度研究報告書”，1989，p 231.
2) Shibuya S and Wakayama Y: Freeze-fracture studies of myofiber plasma membrane in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mice. Acta Neuropathol (Berl) 76 : 179, 1988.
3) Wakayama Y, Bonilla E et al: Freeze-fracture study of human dystrophic muscle with special emphasis on Duchenne and preclinical Duchenne dystrophy. “Muscular dystrophy” (ed by Ebashi S) University of Tokyo Press, Tokyo, 1982, p 355.
4) Cullen MJ, Jaros E: Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse; comparison with Duchenne muscular dystrophy. Acta Neuropathol (Berl) 77 : 69, 1988.
5) Wakayama Y, Jimi T et al: Dystrophin immunostaining and freeze-fracture studies of muscle of patients with early stage amyotrophic lateral sclerosis and Duchenne muscular dystrophy. J Neurol Sci 91 : 191, 1989.
6) Schotland DL, Bonilla E et al: Freeze-fracture studies of muscle plasma membrane in human muscular dystrophy. Acta Neuropathol (Berl) 54 : 77, 1981.
7) Wakayama Y, Kumagai T et al: Freeze-fracture studies of muscle plasma membrane in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Neurology (Cleveland) 35 : 1587, 1985.

23) mdx マウス下肢骨格筋の SR-T membrane system および dipeptides 含有量

吉 岡 利 忠*

研究協力者　田 中 みどり*　山 下 勝 正*　山 田 幸 宏*

緒　言

筋ジストロフィー症モデル動物である mdx マウス骨格筋細胞の形質中やミトコンドリアに結合しているカルシウムイオン濃度は上昇しており[6),11)]，カルシウム依存性蛋白分解酵素の賦活化が議論されている[9),10)]．記録された張力をみると，生後数日のひらめ筋（SOL）および長趾伸筋（EDL）では，その収縮曲線は Close[3)] の報告と同様であり，たとえ mdx マウスの骨格筋であっても加齢によってそれぞれの特徴を示すようになった[11)]．すなわち張力発揮は対照群と比較してなんら有意的な差は認められなかったが，微細構造学的知見を踏まえた前報では[11)]，三連構造（triads）に含まれる筋小胞体（SR）および横行小管系（T-tubule）の間隙に存在する junctional gap 幅の拡大を認めた．最近，数多く報告されている ryanodine receptor (calcium-activated-calcium release channel) あるいは dihydropyridine-binding protein について junctional gap 幅との関係をさらに検討するために①三連構造の微細構造の詳細，②膜系におけるエクオリン抗体から直接的カルシウムイオンの検出の試み，③筋収縮エネルギー産生に緩衝作用を持つ dipeptides 含有量，について研究した．

実験方法

当研究室で繁殖し，飼育している筋ジストロフィー症モデル動物である mdx マウスとその対照マウスのひらめ筋（SOL）および長趾伸筋（EDL）を用いた．生後4日および2週齢の片側摘出筋を4℃で2.5%グルタールアルデヒド0.1M リン酸緩衝液で前固定し，2%オスミウム酸で後固定，その後脱水，包埋，薄切した．電子顕微鏡像は直接倍率20,000倍で三連構造（triads）を中心に撮影し，3.3倍のプリントを得，feet あるいは junctional gap の幅は0.1mm 精度のルーペを用い測定した[4)]．この場合，feet 構造が明瞭なものをランダムに抽出して行った．

Dipeptides の分析には除蛋白された SOL および EDL を逆相分配型高速液体クロマトグラフィーを用いて行い，hypersil ODS 系カラムから anserine および carnosine を分析した．

細胞内小器官に結合するカルシウムイオン検出の目的で，その発光蛋白である aequorin を数本の筋線維に注入し，凍結，薄切後，ウサギで得られた anti-aequorin と反応させ DAB (diaminobenzidine) による反応粒子を電子顕微鏡学的に観察した．

結　果

図1および2には生後4日目および2週齢における mdx マウスとその対照マウスの SOL および EDL の三連構造の電子顕微鏡写真が示されている．一般的に SOL では EDL に比較して細胞内膜系の発達が悪く，対照群（AおよびC）の junctional gap 中の feet 構造（bridge structure）は SOL で完成されていないことが多い．mdx 群（BおよびD）では細胞内膜系に未発達な構造が時々観察され，その特徴として筋原線維の走行と parallel に位置する三連構造を認める．2週齢の mdx 群（D）では，junctional gap 幅に拡大が認められている．測定された結果から（表1），mdx

*聖マリアンナ医科大学第二生理学教室

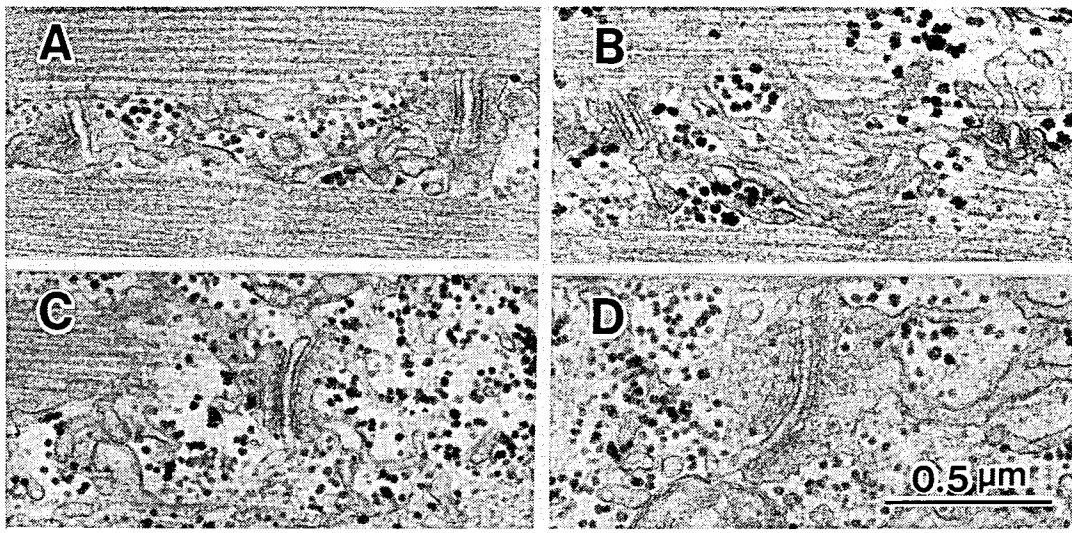


図1　ひらめ筋の三連構造
A：生後4日目の対照筋，B：生後4日目のmdxマウス筋，C：2週齢の対照筋，D：2週齢のmdxマウス筋

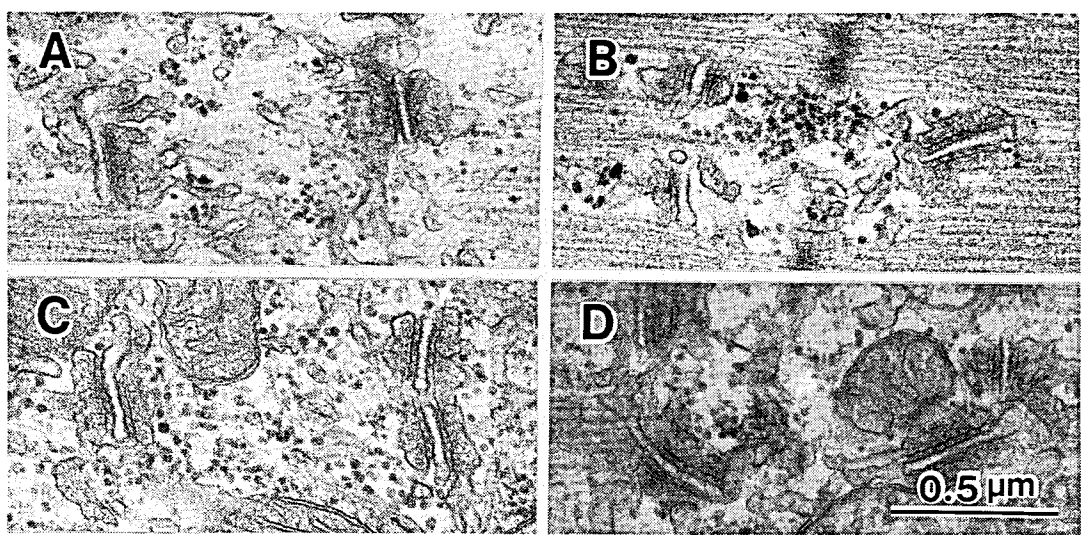


図2　長趾伸筋の三連構造
A：生後4日目の対照筋，B：生後4日目のmdxマウス筋，C：2週齢の対照筋，D：2週齢のmdxマウス筋

群で20nmでありおおよそ対照群と比較して4nm増加しており，有意差（$p<0.01$）が認められた．

図3はEDLのanserineおよびcarnosineの加齢による影響をみたものであるがmdx群(closed symbol）においてcarnosineの低濃度が分析され，anserine／carnosine ratioは上昇する傾向にあった．図には示されていないがSOLの場合も同様であり，いわゆる筋肉の炎症あるいは加齢に付随したその上昇が，生後5～7週齢のmdx群

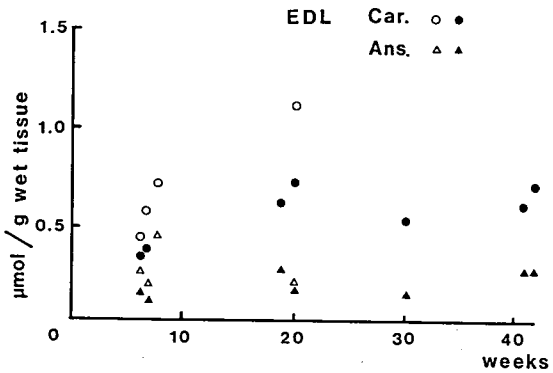


図3　長趾伸筋の anserine および carnosine レベルの加齢による変動
Car.: carnosine, Ans: anserine, ○△：対照筋，●▲：mdx マウス筋.

で認められた.

Anti-aequorin の DAB 反応粒子は主に SR および T-tubule の膜系に局在しており（図4），ミトコンドリア内には発見されなかった．粒子は筋小胞体膜の終槽に特徴的であり，一部筋原線維上のM線や太・細フィラメントの重なり合う部位にもその局在が認められた.

考　　察

mdx 骨格筋の収縮曲線は速筋でも緩筋タイプを示すと報告されているが，我々の用いた週齢の筋肉においては前回[11] 同様に収縮時間や張力に変化は認められなかった．SOL および EDL 全筋の中に壊死線維が少なく，再生筋線維の占める比率が高いことによるものであろう．表に示されるように，mdx マウス骨格筋線維の junctional gap の幅の拡大から T-tubule に局在するという ryanodine receptor[2),8)] あるいは feet 構造[5)] にある種の構造変化が生じていることが疑われる.

最近，Dulhunty[4)] が報告しているように，T-tubule 中に認められ，negative charge を有する構造，すなわち glycocalyx は，junctional gap を介して直接 SR の終槽に到達し，そこに集積しているカルシウム結合蛋白である calsequestrin に影響を与えているという．もしそのような系があれば，筋鞘からの信号は直接，SR からのカルシウムイオン放出をコントロールすることになる．Junctional gap 幅の拡大が，興奮収縮連関にどの程度の影響を与えているか不明であるが，mdx マウスの筋形質中やミトコンドリア中のカルシウムイオンの上昇[6),9),10)] から考えると，カルシウムイオンの遊離機構調節になんらかの影響を与えても不思議はない．すなわち幅の拡大自体が SR 膜からのカルシウムイオンの passive なリークに関与して，筋細胞内カルシウムイオンの上昇を引き起こしているかも知れない．さらに mdx マウス骨格筋細胞の dystrophin の欠落は，現在のところ筋鞘の微細構造変化として捉えられていないが，もしあるとすれば筋鞘と連続している横行小管系との関係は興味深い問題である．静止状態において筋線維内に圧注入された aequorin はカルシウムイオンと結合し，DAB の反応粒子として検出されたと考えられるが（図4），SR 中のイオンとの結合には疑問が残る．この写真から DAB 反応粒子は膜上に認められ，フリーなカルシウムイオン

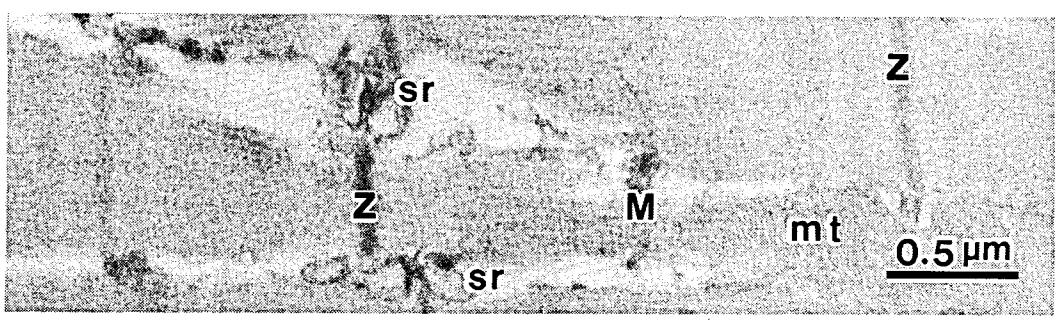


図4　Anti-aequorin 処理筋の免疫電子顕微鏡写真
Z: Z帯，M: M線，sr：筋小胞体，mt：ミトコンドリア

表　対照マウスおよびmdxマウス下肢骨格筋細胞のjunctional gap幅

The width of the junctional gap in the triads of mdx and control mouse skeletal muscle (mean ± S.D., nm)

	mdx	control
4-day mouse	15 ± 2.9 (121)	15 ± 2.1 (162)
2-week mouse	20 ± 4.3 (154)	16 ± 2.8 (173)

Results were obtained on the three-fold photograph of electron-micrograph with direct magnification of 20,000×.

は試料作成過程においてほとんど消失してしまったと考えられる．筋原線維に残る反応粒子はその一部としてみることができるであろう．今後収縮中の条件を得て検討してみたい．

Dipeptidesは筋組織に多量に含まれ，筋収縮エネルギー供給において大きな緩衝作用を持つといわれる．Myoglobin濃度が低く，ATPエネルギー産生を嫌気的代謝に依存している白筋においては，高い濃度のanserineを含み，carnosineとともにミオシンATPaseを活性化する[1),12)]．加齢においてあるいは筋肉の炎症においてanserine／carnosine ratioが上昇することが知られており[7)]，5～7週齢のmdxマウスのEDLにおいても上昇が認められた（図3）．骨格筋へのトレーニング，特に持久性運動を与えた場合，このratioは下降し，筋組織における好気的代謝由来のエネルギー獲得の性質が生じ，加齢に抵抗していることが報告されている(未発表データ)．このことから考えるとmdxマウス骨格筋では，若年齢においてすでに加齢状態にあるdipeptidesの性格を示していることになり，筋収縮エネルギー産生には好気的より嫌気的解糖によるpathwayが主となっていることが考えられた．週齢の若いmdxマウスに持久的運動を負荷したときのdipeptidesの動きについては興味深い問題であり，今後の課題である．

結　　語

mdxマウスのSOLおよびEDLの筋線維において，その細胞内小器官の一部である筋小胞体と横行小管系が構成するjunctional gapに，前報と同様に拡大が認められた．このことからカルシウム遊離機構が考察された．筋収縮エネルギー産生を緩衝しているとされるdipeptidesの含有量はmdx骨格筋で，特にcarnosineが低下していたことから，anserineとのratioは上昇し，嫌気的解糖作用によって筋収縮エネルギーの供給が考えられた．

文　　献

1) Avena RM and Bowen WJ: Effects of carnosine and anserine on muscle adenosine triphosphatases. J Biol Chem 244 : 1600—1604, 1969.
2) Block BA, Imagawa T, Campbell KP and Franzini-Armstrong C: Structural evidence for direct interaction between the molecular components of transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. J Cell Biol 107 : 2587—2600, 1988.
3) Close RI: Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. Physiol Rev 52 : 129—197, 1972.
4) Dulhunty AF: Feet, bridges, and pillars in triad junctions of mammalian skeletal muscle. Their possible relationship to calcium buffer in terminal cisternae and T-tubules and to excitation-contraction coupling. J Membrane Biol 109 : 73—83, 1989.
5) Franzini-Armstrong C: Membranous system in muscle fibers. In "The Structure and Function of Muscle"(ed by Bourne GH) Academic Press, New York, London, 1973, Vol. II 2nd edn, pp531—619.
6) Glesby MJ, Eduardo Rosenmann BSc, Nylen E and Wrogemann K: Serum CK, calcium, magnesium, and oxidative phosphorylation in mdx mouse muscular dystrophy. Muscle Nerve 11 : 852—856, 1988.
7) Parkhouse WS, McKenzie DC, Hochachkd PW and Ovalle WK: Buffering capacity of

deproteinized human vastus lateralis muscle. J Appl Physiol 58 : 14—17, 1985.

8) Smith JS, Imagawa T, Ma J, Fill M, Campbell KP and Coronado R: Purified ryanodine recepter from rabbit skeletal muscle is the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. J Gen Physiol 92 : 1—26, 1988.

9) Soza M, Karpati G, Carpenter S and Prescott S: Calcium-induced damage of skeletal muscle fibers is markedly reduced by calcium channel blockers. Acta Neuropathol (Berl) 71 : 70—75, 1986.

10) Turner PR, Westwood T, Regen CM and Steinhardt RA: Increased protein degradation results from elevated free calucium levels found in muscle from mdx mice. Nature 335 : 735—738, 1988.

11) 吉岡利忠, 田中みどり, 竹倉宏明：ジストロフィー筋の細胞内膜系と収縮. "厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症および関連疾患の病態とその病因に関する研究(杉田班) 昭和63年度研究報告書", 1989, pp254—257.

12) Yun J and Parker CJ : The effect of carnosine on myofibrillar ATPase activity. Biochim Biophys Acta 110 : 212—214, 1965.

24）mdx マウスの筋小胞体機能（続報）

高　木　昭　夫*, **

研究協力者　小　島　　進*　井　田　雅　祥*
紫　芝　良　昌**　荒　木　　誠**

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）患者が全身麻酔に際して，しばしば悪性高熱に類似する全身反応を呈することが知られている[1]．この現象は DMD 骨格筋においてなんらかのカルシウムイオン（Ca）調節異常の存在を示唆している．ヒトやブタの典型的悪性高熱では筋小胞体（SR）の Ca 誘発性 Ca 遊離の亢進が指摘された[2]．我々は昨年にひきつづき，DMD のモデルとして mdx マウスを使用して，SR の Ca 遊離につき分析を行った．昨年度は生後 8 ～20週のマウスに於て，Caffeine 拘縮の亢進と Ca 漏出の増加を報告した．本年は 3 ～ 4 週齢の筋壊死のさかんな時期の動物を使用して，SR における Ca 遊離を分析した．

方　　法

3 ～ 4 週齢の mdx マウス（mdx，C57BL/10 ScSn-mdx）および対照（B10，C57BL/10SnSc）の前脛骨筋を使用した．Caffeine 拘縮の分析はスキンドファイバー法によった[1]．スキンドファイバーは Wood らの化学的スキンドファイバーを使用した[3]．SR よりの Ca 漏出は図 1 の模式図に従って分析した．即ち，SR に一定条件下で Ca を摂取させた後，2mM EGTA を含む弛緩溶液（G-2）に一定時間接触させた．その後 SR の残存する Ca 量を Caffeine 拘縮の大きさ（収縮曲線の積分値）から推定した．1 分間に SR 中の Ca が全て漏出した場合の速度を 1 min^{-1} とした．

Ryanodine 受容体の定量には筋凍結切片を使用した．H^3-ryanodine を含む溶液（20mM Tris-HCl，0.1M KCl，4mM ATP，0.025mM $CaCl_2$，pH7.0）中で，スライドガラスに付着した筋切片（0.3mg）を incubate 後，洗滌した．筋切片をソルエンにて溶解後放射能を測定した．

結　　果

1）Caffeine 拘縮（図 2，表 1）

0.1mM　EGTA を含む弛緩溶液中で 1 ～ 5 mM　Caffeine による拘縮の大きさを比較した．mdx でより大きな拘縮を観察した．統計的には 2 mM　Caffeine による拘縮にのみ有意差を認めた（p＝0.05）．50％活性化に要する Caffeine 濃度は mdx 2.3mM, B10 3.3mM であり，mdx で有意に低下していた（p＝0.01）．

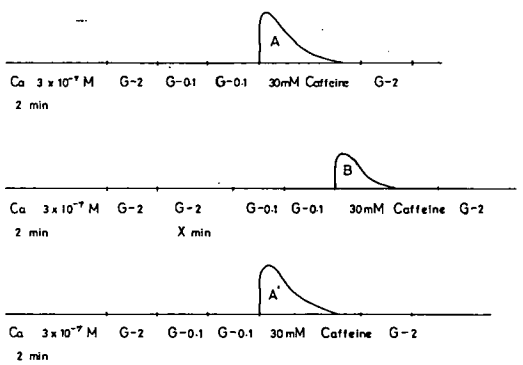


図 1　スキンドファイバー法による SR よりの Ca 漏出実験の模式図
（中段）SR に Ca 溶液中で 2 分間，Ca 摂取させた後，2mM EGTA を含む溶液（G-2）に X 分間接触させる．0.1mM EGTA を含む溶液中（G-0.1）で Caffeine 拘縮を発生させ（B），その大きさを測定する．
（上・下段）G-2，X 分の操作をはぶいた対照実験である．この Caffeine 拘縮 A と A' の平均と B の大きさを比較して，X 分間に漏出した Ca 量を推定した．

＊虎の門病院神経内科
＊＊冲中記念成人病研究所

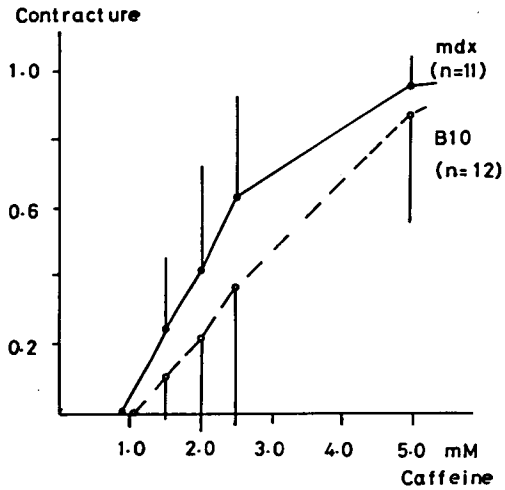


図2　Caffeine 拘縮の濃度・反応関係
縦軸：Caffeine 拘縮の大きさ
横軸：Caffeine 濃度
● mdx，○対照(B10)，平均値±S.D. を図示した．

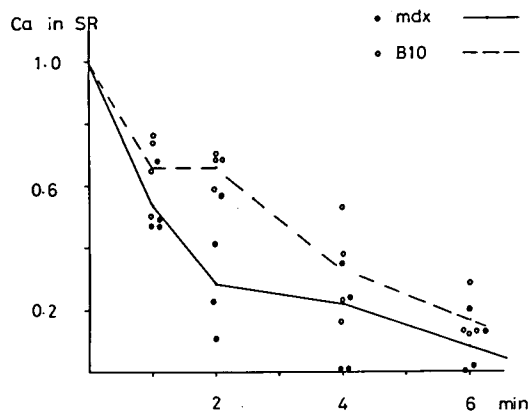


図3　筋小胞体（SR）よりの Ca 漏出
縦軸：SR 中に残存する Ca 量
横軸：G-2 溶液との接触時間
2 分間での Ca 漏出は mdx で B10より大きい（p=0.05）

表1　Caffeine 拘縮の50%活性化に要する Caffeine 濃度（平均値±S.D.）

mdx	2.3 ± 0.7 mM (n=12)*
B10	3.3 ± 0.9 mM (n=11)

*mdxと B10の間には有意差有り（p=0.01）

表2　SR よりの Ca 漏出速度に対する procaine および Mg の影響（平均値±S.D.）

A. B10	rate(min⁻¹)
2mM EGTA	0.15 ± 0.05 (5)
+ 5mM procaine	0.14 ± 0.06 (5) (n.s.)
+ 6mM Mg	0.17 ± 0.07 (5) (n.s.)
B. MDX	
2mM EGTA	0.32 ± 0.10 (4)*
+ 5mM procaine	0.29 ± 0.11 (4) (n.s.)
+ 6mM Mg	0.29 ± 0.09 (4) (n.s.)

*mdxと B10の比較では有意差有り（p=0.01）

2）SR よりの Ca 漏出（図3，表2）

2 mM EGTA を含む溶液中での Ca 漏出の時間経過を検討した．筋線維間でのばらつきが大きいが，mdx では Ca 漏出量がより大きな傾向を認めた．2 分間の Ca 漏出は mdx で有意に増加していた(p=0.05)．Ca 漏出に対する 5mM procaine あるいは 6 mM magnesium ion (Mg) の影響を調べた(表2)．mdx および B10のいずれにおいても procaine や Mg は Ca 漏出速度に影響を与えなかった．

3）Ryanodine 受容体の測定（図4）

Ryanodine 結合は mdx および B10ともに，80～100mM で飽和され，結合定数もほぼ同一であった．筋切片による測定のため正確ではないが，最大結合量はほぼ 1 nmole/wet gram であった．

考　察

昨年度は 8 ～20週齢のマウスを使用して実験を行った．この週齢となると，mdx 骨格筋はほぼ再生筋線維より成るといわれる．そのため結果の解釈に問題を残した．本年は筋細胞壊死が頻発して

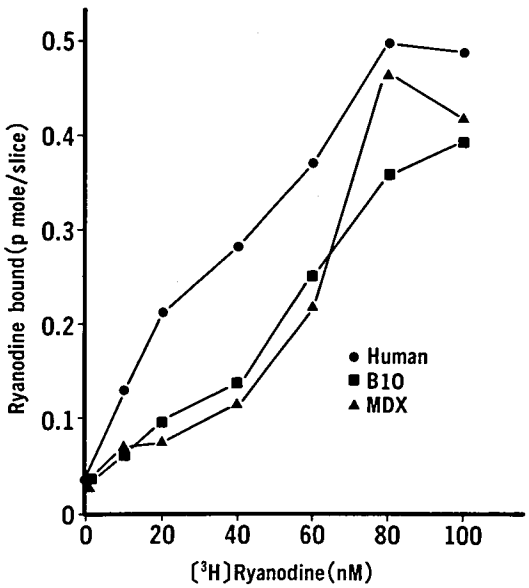


図4　筋凍結切片による H^3-ryanodine 結合
MDX と B10ではともに，80～100mM で飽和され，両者間に差をみとめない．

いる3～4週齢のものを使用した．その結果前年同様に Caffeine 拘縮の亢進および SR からの Ca 漏出増加を mdx で確認した．また mdx では筋線維間でデータの変動が大きいのが注目された．

SR 膜を通しての Ca 移動に関しては，i)Ca pump，ii)Ca release channel，iii)Ca leakage channel などの機構が想定されている．Ca 誘発性 Ca 遊離（CICR）は Ca release channel を介するものといわれる[4]．CICR の機序は Caffeine により促進され，procaine や Mg により抑制される事実がある．今回とりあげた Ca 漏出は procaine や Mg により影響されなかった．それ故，CICR とは独立した現象であろう．mdx における CICR は Caffeine 拘縮以外に，より直接的に今後評価する必要がある．また CICR に関連して ryanodine 受容体に関する予備実験を開始し，その一部を記載した．

mdx で観察した Ca 漏出亢進の機序や意義については現時点で不明の事が多い．Ca 漏出は CICR と独立の channel によると仮定しているが，その分子レベルの証拠は皆無である．CICR との関連を更に追求する必要があろう．

今回は 2 mM EGTA を含む溶液中での Ca 漏出を比較した．Ca-chelator，すなわち EGTA を 0 とした溶液中でのこの種の分析は技術的に困難であろう．したがって生体内の条件下で Ca 漏出の証明は困難である．Ca 漏出が生じていても，正常に作動する Ca pump により再摂取される．遊離 Ca 濃度上昇をきたすことはないと推定される．ただ Ca 漏出増加があれば Ca pump は常時作動し，ATP 消費は増加し，筋障害の原因となりうるであろう．また SR 近傍で Ca 濃度が多少なりとも上昇するならば，Caffeine あるいは halothane といった薬剤の効果は増強する可能性がある．すなわち Caffeine 拘縮亢進は Ca 漏出増加によって招来されうるであろう．

Ca 漏出増加は mdx 遺伝子異常の一次的発現とは考えにくい．mdx においても筋線維間の変動が大きい．3週齢より4週齢でより著明との印象をうけている（data 未発表）．このように筋変性にともなう2次的現象である可能性は大である．Ca 漏出増加の機序の追求は臨床的意義があるものと考えている．

ま と め

3～4週齢の mdx マウスの筋小胞体機能を分析した．8～20週齢のマウスで観察されたのと同様に，Caffeine 拘縮亢進を確認した．筋小胞体からの Ca 漏出が増加しており，これが Caffeine 拘縮亢進の一因と推定した．Ca 漏出は procaine や Mg イオンの影響を受けず，おそらく Ca 誘発性 Ca 遊離の機序とは別のものと推定した．

文　献

1) 高木昭夫，小島進，荒木誠：悪性高熱および Duchenne 型筋ジストロフィーにおけるカフェイン拘縮亢進の機序と診断的意義．臨床神経 29：301—305，1989.
2) Ohta T, Endo M, Nakano T et al: Ca-induced Ca release in malignant hyperthermia-susceptible pig skeletal muscle. Am J Physiol 256 (Cell Physiol 25): C358—367,

1989.
3) Wood DS, Zollman JP et al : Human skeletal muscle : Properties of the chemically skinned fiber. Science 187 : 1075, 1975.
4) Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T et al : Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. Nature 339 : 439—445, 1989.

25) mdx マウス骨格筋内の Ca イオン濃度

吉 田 瑞 子*

研究協力者　柴 崎　浩*

昨年に引続き筋ジストロフィー症モデルマウス，mdx の静止状態における骨格筋細胞内 Ca イオン濃度を検索した．

試料および方法

3週齢と16週齢の mdx とその対照マウス B10 の雄を各々10匹ずつ検索した．骨格筋は長指伸筋を筋束で使用した．腱から腱まで採取した筋束は，緩衝液中で長指伸筋以外のものをできる限り除去した．

緩衝液は Hank's-HEPES (137mM NaCl, 5.36 mM KCl, 1.27mM $CaCl_2$, 4.17mM $NaHCO_3$, 0.44mM KH_2PO_4, 0.168mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0.81mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.55mM glucose, 10mM HEPES) を用いた．

細胞内 Ca イオン濃度の検出は，蛍光プローブ fura-2 を用い，画像解析法で行った． fura-2 の筋細胞内負荷は，膜透過性の fura-2-AM (10 μM) とその膜透過性を高める pluronic F-127 (0.08%) を緩衝液に加えて，超音波で1分間分散し，その中に筋束を入れ，微量の O_2 : CO_2 = 95 : 5 を吹込みながら10℃で1時間半浮置した．その筋束を25℃の緩衝液で洗滌後セルにセットした．セルは昨年使用したものと同じであるが，筋束の固定は，腱をアロンアルファーで培養用カバーグラスに直接接着した．この筋束を倒立型蛍光顕微鏡下に設置し，緩衝液を灌流した．

画像処理を行うために，筋細胞をキセノン光源からの340nm と360nm の2波長で励起し，それぞれの蛍光像を超高感度カメラで撮り，モニターテレビジョンで観察しながらビデオテープに記録した．

筋細胞は自己発光があるが，細胞の重なりが少ないところは自己発光強度が小さいので，その部位の細胞を1肢につき20本以上検索した．fura-2 を負荷した筋細胞が，機能を維持していることを 5 mM カフェイン処理で調べ，また蛍光が Ca イオンと結合した fura-2 であることを 1 μM イオノマイシンで確認した．

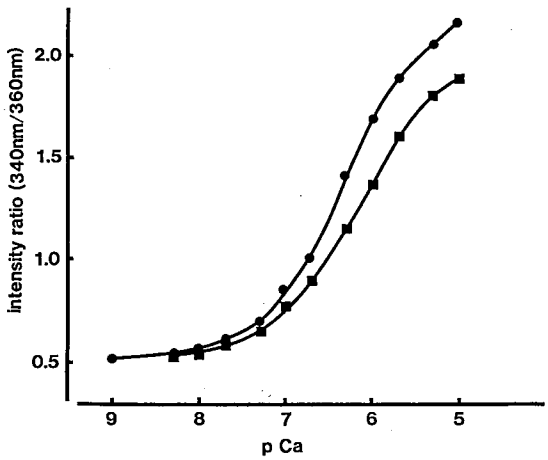
細胞内の Ca イオン濃度は，ビデオに記録した蛍光像を画像解析装置で処理し，蛍光強度比 (I340/I360) を求め検量線より細胞内Caイオン濃度を算出した．

検量線は Ca 緩衝液に fura-2 とタンパク質を加えて作成した．Ca 緩衝液は Harafuji-Ogawa[1] に則った Horiuchi[2] の方法を模倣した．溶液は 25℃で pH7.00, I=0.20の条件で10mM EGTA, 4.3mM ATP, 5.0mM $MgCl_2$に，作成する Ca イオン濃度に必要な $CaCl_2$量とそれに対応した KCl 量を加えて調製した．この Ca 緩衝液に40μM fura-2 と γ-グロブリン (シグマ G5009) を50mg/ml および100mg/ml を加えて検量線用標準溶液とした．この標準溶液を筋細胞とほぼ同じ太さのガラス毛細管に封じ，25℃の水中に入れ，蛍光顕微鏡下で筋細胞と同じように340nm と360nm の蛍光像より蛍光強度比を求めて検量線を作成した．

結果と考察

最近 fura-2 を初めとする蛍光プローブは，タンパク質と結合する[3]ので，蛍光プローブと塩溶液のみの Ca 緩衝液で作成した検量線は，細胞内の Ca イオン濃度を正しく反映していないと云われ始めた．そこで筋細胞内に近づけた溶液で検量線を得るため，Ca 緩衝液に50mg/ml と100mg/ml の割合で γ-グロブリンを加えて作成した．その検量線を図に示す．γ-グロブリンが増加する

* 国立精神・神経センター神経研究所



図

と，Ca イオン濃度が高い領域で蛍光強度比が小さくなった．しかし低濃度領域では大きな差はなかった．実際，筋細胞内で fura-2 が作用しているタンパク質量が不明なので，この 2 種類の検量線を用いた．

fura-2 を負荷した筋細胞に，5 mM カフェインを作用すると筋細胞は収縮運動をし，筋細胞の機能を維持していることを示した．また 1 μM のイオノマイシンを作用させると，340nm による蛍光強度が大きく増加した．これは細胞外から細胞内に Ca イオンが流入して，fura-2 と結合したことを示した．すなわち fura-2-AM が細胞外から細胞内に透過して，細胞内で fura-2 に分解して Ca イオンと結合していることを示した．

3 週齢と16週齢の mdx と B10マウス雄の各々10匹の長指伸筋の蛍光強度比は，いずれの場合も 0.65～0.80であった．mdx と B10間，週齢間において差異は認められなかった．この蛍光強度比を検量線を用いて Ca イオン濃度に換算すると，50 mg-γ-globulin/ml では35nM～80nM となり，100mg-γ-globulin/ml では50nM～130nM となった．細胞内の Ca イオン濃度が130nM というのは，わずかに高いが，これ等の Ca イオン濃度は，現在まで予測されている細胞内 Ca イオン濃度に一致する．これ等の結果より，mdx の静止状態における長指伸筋内 Ca イオン濃度は正常値であることを結論する．

ま と め

3 週齢と16週齢の mdx と B10マウスの静止状態における骨格筋（長指伸筋）内の Ca イオン濃度は，いずれの場合も最大130nM 以下で，正常値を示した．mdx と対照の B10間に差異は認められなかった．

文 献

1) Harafuji H and Ogawa Y: Re-examination of the apparent binding constant of ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid with calcium around neutral pH. J Biochem 87: 1305, 1980.
2) Horiuchi K: Some properties of the contractile system and salcoplasmic reticulum of skinned slow fibres from xenopus muscle. J Physiol 373: 1, 1986.
3) Konishi M et al: Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. Biophys 54: 1089, 1989.

26) mdx マウスの膜電位低下とミオトニー，及びその治療

栗 原 照 幸*

研究協力者　岸　雅 彦*　日 高 隆 信*
根 本　博*　木 下 眞 男*

はじめに

Mdx マウスは，X-linked recessive の遺伝形式を持つ筋ジストロフィー症のモデル動物で，近年，荒畑らにより mdx マウスの筋細胞膜では dystrophin が Duchenne 型筋ジストロフィーと同様に欠損していることが見いだされた．この事より，mdx マウスの筋細胞膜異常を調べる事は，Duchenne 型筋ジストロフィーの発症のメカニズムを知る上でも重要な事と思われる．

我々は，今まで mdx マウスの筋細胞膜を電気生理学的に検討して，筋細胞内記録により静止膜電位（RMP）の低下や electrical myotonia などの電気生理学的異常が見られる事を報告してきた．今回は mdx マウスの筋細胞膜の電気生理学的異常をさらに詳しく調べた．この異常を改善する薬剤として，前回 Ca 拮抗剤の作用を検討した．今回は，プロテアーゼ阻害作用を持つ事から Duchenne 型筋ジストロフィー症への効果が期待されている bestatin について検討を加えたので報告する．

方　法

生後 4 日から218日までの年齢の異なる mdx マウス14匹と，4 匹の C_{57}BL/10Sc マウスの横隔膜標本を作成し，95% O_2 と 5 % CO_2 の混合ガスで酸素化した Tyrode 溶液に浸しながら 3M KCl を満たしたガラス管微小電極を用いて筋細胞内記録を行なった．RMP の測定を30～100本の筋線維に対して施行し，ヒストグラムを作成した．又，electrical myotonia の出現の有無も記録し，burst の頻度や burst と RMP 低下との関連についても検討した．

Mdx マウスの横隔膜標本に神経筋伝達阻害剤の d-tubocurarine を作用させ，electrical myotonia が細胞膜の異常により生じている事を確認した．又，Cl channel blocker である anthracene-9-carboxylic acid を作用させ，electrical myotonia の変化を観察した．

Bestatin の効果を見る為に，4 週齢の mdx マウスを使用し，bestatin を Tyrode 溶液1000ml に対し40mg 加えて，30分後に筋細胞内記録を行ない，Ca 拮抗剤と比較しながら筋細胞への作用を検討した．

結　果

Mdx マウスの RMP 平均値はコントロールの B10マウスに比べて低い．しかし，ヒストグラムを作成すると，−75mV 付近を境としてそれより RMP の高い筋線維と低い筋線維があり，2 相性のパターンを示していることがわかる．B10マウスの場合は，ほとんどが−75mV 以上の筋線維で，単相性のパターンである（図 1）．したがって，mdx マウスでは RMP の正常な筋線維と RMP の低い筋線維が混在するため，平均としての RMP が低くなると考えられる．Electrical myotonia の頻度も計測し，筋線維の RMP が −77 mV 以下である事と myotonia が生じる事との間で χ^2検定を施行したが，各日齢の mdx マウスでは，この 2 つの事象の間には有意な関係は見られなかった．しかし，すべての mdx マウス

＊東邦大学医学部第四内科

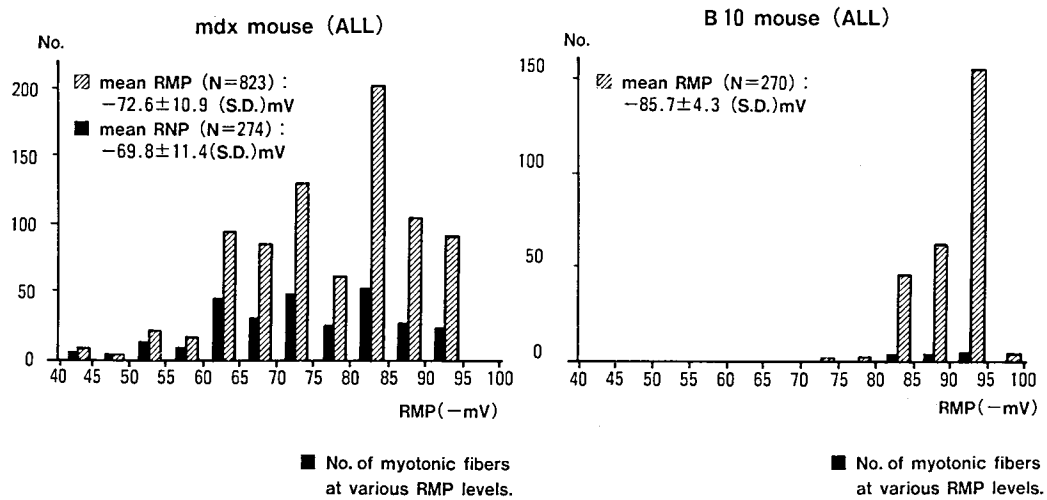


図1　ヒストグラムによるmdxマウスとコントロールマウスのRMPの比較.検索した全ての年齢のマウスを総計している．mdxマウスではRMPが正常な線維と-75mV以下の筋線維がそれぞれグループを形成し，2相性のパターンをとっている．

のRMPを総計すると，electrical myotoniaはRMPの低い線維で出現しやすい傾向が見られた．年齢の変化で，ヒストグラムのパターンや，electrical myotoniaの頻度に変化が来ないかどうかも検討したが，はっきりとした傾向は認められなかった（図2）．

Mdxマウスの横隔膜標本にd-tubocurarine (dTc) を用いて神経筋接合部をブロックしても，electrical myotoniaは出現し，これはelectrical myotoniaが末梢神経ではなく，筋細胞膜の異常に由来している事を意味している（図3）．又anthracene-9-carboxylic acidを用いてClチャンネルをブロックすると，正常筋に用いたのと同様にほぼすべての線維でburstが認められた（図4）．これは，mdxマウスで従来見られたものよりも，持続の長いものであった．

Mdxマウスにbestatinを用いて同様の検討を行った．Bestatinの投与により，mdxマウスの筋線維のうちRMPの低い線維群の減少でRMPが改善し（図5），electrical myotoniaの頻度も低下した．Ca拮抗剤では前回の報告のとおりで，electrical myotoniaは減少するが，RMPには変化をきたさない．

考　　察

Mdxマウスは，Duchenne型筋ジストロフィー症と同様に，その細胞膜のdystrophinが欠損している事が発見され，Duchenne型筋ジストロフィー症の病因解明のモデル動物として重要なものと考えられている．しかし，人間のDuchenne型筋ジストロフィー症とmdxマウスには，後者で再生が活発であることなどから臨床像や経過に大きな違いがあり，それが単に種の違いによるものなのか，筋再生が活発で筋力低下が軽いためだけなのか，臨床症状の発症にdystrophin以外のfactorが関与しているかどうかは不明である．

今回の我々の研究では，dystrophinが全ての筋線維で欠損しているにもかかわらず，電気生理学的には正常な筋線維と異常な筋線維の混在が見られた．この事から，我々が電気生理学的に見いだ

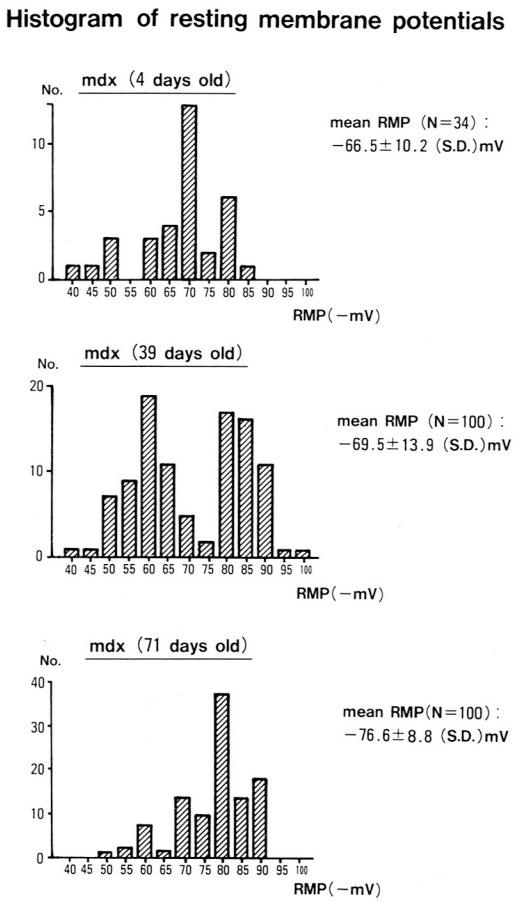


図2　年齢の異なる mdx マウスの RMP のヒストグラム．年齢によるヒストグラムのパターンの変化はない．

す事の出来る膜異常は，dystrophin 欠損を直接反映しているものでは無いと思われる．このようにすべての筋線維が一様にではなく部分的に現れてくる生理学的異常は，形態学的に正常筋線維の中に壊死線維の群集がみられる事と似た現象と思われる．しかし，微小電極が入って計測出来た筋線維は，ある程度の直径のある線維で，すでに壊死に陥ったものではなく，壊死に陥る前の段階における筋細胞膜の機能障害を示しているものと考えられる．したがって今回見られた生理学的異常は dystrophin 欠損に伴う膜異常が筋線維壊死を引き起こすまでの過程を反映するものと思われる．しかし，全ての線維で dystrophin が欠損している

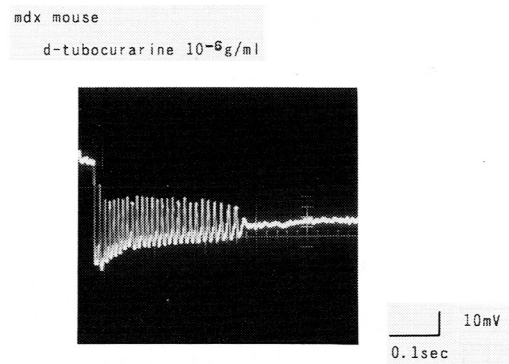


図3　Mdx マウスに d-tubocurarine を用いて神経筋接合部をブロックしても electrical myotonia は消失しない．

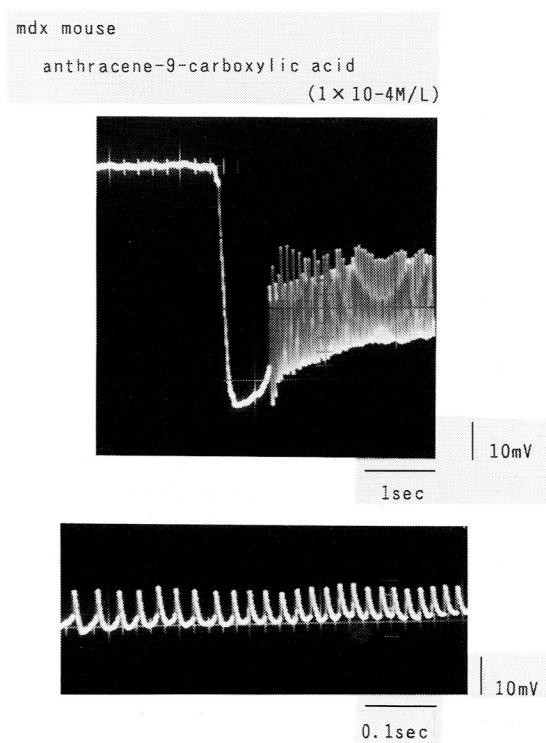


図4　Mdx マウスに anthracene-9-carboxylic acid を用いて Cl チャンネルをブロックすると，正常筋に用いたのと同様に，ほぼすべての筋線維で burst が認められた．

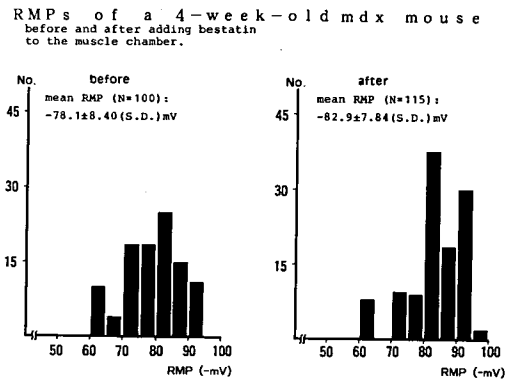


図5　Mdxマウスに bestatin を用いると，筋線維のうち，RMPの低い筋線維群のRMPが改善した．

のに全ての線維が一様には壊死に陥らないという事は，dystrophin 欠損という事以外にも他の factor が関与している可能性がある．

Myotonia を呈する動物としては，先天的にヤギにみられる myotonia が有名であり，myotonia の研究に用いられてきた．1965年にジストロフィーチキンに myotonia が認められる事が報告された．これは dTc により消失しないので膜異常に伴うものと考えられている[1]．1973年には，やはり筋ジストロフィー症のモデル動物である dy/dy マウスに myotonia が認められる事が報告されたが[2]，dy/dy マウスでは同時に神経筋接合部や末梢神経の障害も伴っており，dTc で myotonia が消失することから myotonia のモデルとしては不適切と考えられている[3]．しかし，dy/dy マウスで脱神経によるものとは考えられない膜異常（Cl コンダクタンスの低下）を指摘する報告もある[4]．1978年に mto マウスが発見され[5]，小動物の中では最も myotonia のモデルとして適した動物と考えられている．mto マウスの myotonia は dTc により消失する事はなく，末梢神経障害も指摘されていないので，本当の myotonia と考えられている．

Mdx マウスに見られた electrical myotonia は dTc によってブロックされないので，末梢神経ではなくて筋細胞膜の異常によって起こっているものと考えられる．そして，mto マウスのように myotonia の症状として立ち直り反射が遅い事も mdx マウスではなく，又，普通の針電極で筋細胞外記録を行った時でも myotonic burst は起こらない．筋細胞内に電極を入れた時にはじめて electrical myotonia として burst が記録出来る．これは mdx マウスでは，myotonia の程度としては軽く，イオンチャンネルの異常を薬物によって増強して始めて myotonic burst が長時間起こるようになるものと思われる．しかし，mdx マウスにみられる electrical myotonia が，膜のどのようなチャンネルの障害によって生じているのかは，現時点では明らかではない．薬剤の作用機序を含めて，さらに検討が必要と考えられる．

文　献

1) Holliday TA, Van Meter JR et al: Electromyography of chickens with inherited muscular dystrophy. Am J Physiol **209**: 871—876, 1965.

2) Gilbert JJ, Steinberg MC and Banker BQ: Ultrastructural alterations of the motor end-plate in myotonic dystrophy of the mouse (dy^{2J}/dy^{2J}). J Neuropatho Exp Neurol **3**: 345—364, 1973.

3) Eberstein A, Goodgold J and Pachter BR: Effect of curare on electromyographic and contractile responses in the myotonic mouse. Exp Neurol **49**: 612—616, 1975.

4) Farnbach GC, Brown MJ and Barchi RL: A maturational defect in passive membrane properties of dystrophic mouse muscle. Exp Neurol **62**: 539—554, 1978.

5) Heller AH, Eicher EM et al: Myotonia, a new inherited muscle disease in mice. J Neurosci **2**: 924—933, 1982.

27)「Immobilization」による mdx マウス筋変性への影響
——Local tetanus 法による検討——

田　邊　　等*

研究協力者　水　野　美　彦**

目　的

mdxマウス及びドゥシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)では筋膜におけるジストロフィン(Dy)欠損が報告されているが，Dy 欠損と筋変性との因果関係については未だ解明されていない．昭和60年度の本班会議において中村ら[1]は生後3週の mdx マウスの坐骨神経を切断し，腓腹筋を経時的に組織学的に検討し，筋線維の変性が抑制されることを報告した．彼等は mdx マウスにおける筋変性には神経支配が存在し，かつ筋の自発的収縮が必要であると結論している．我々は神経切断の効果としての筋の immobilization（不動化）に注目し，脱神経を伴わない状況下での不動化による筋変性への影響を検討した．

対象・方法

生後3週の mdx マウス12匹を用い，その内8匹に tetanus toxin を従来の方法に従って右腓腹筋に1回筋注した．4匹は無処置とした．Local tetanus 出現後1，2週後に tetanus 群各4匹，及び無処置群各2匹を殺し，両側ヒラメ筋（SOL）及び長趾伸筋（EDL）を採取した．各筋について横断面標本で中心核線維及び変性線維の合計数を計測し，全線維数に対する比率を求めた．又全標本について中心核線維・変性線維を除く線維の平均直径を求め，無処置群，処置群の不動側，対照側の間で比較した．

結　果

1週後（図1），2週後（図2）の各1例の不動側，対照側の組織所見を示す．各例共程度の差はあれ，不動側において中心核線維・変性線維の出現が少なくなっている．特に SOL においてこの傾向が著明である．表1に各筋の変性度の比率を示したが，1週目では SOL において不動側は無処置群（$p<0.01$）及び対照側（$p<0.05$）と比較して有意に変性が抑制された．一方，2週目でも無処置群と不動側の間（$p<0.01$），及び対照側と不動側の間（$p<0.05$）で有意差を持って不動側で変性が抑制された．対照側では無処置群より変性度が強い傾向があり，特に1週目でこの傾向が大であった．不動側でも中心核線維は徐々に成長しており，不動化により再生は抑制されなかった．EDL においては1週目，2週目とも有意な変性の抑制は認められなかった．

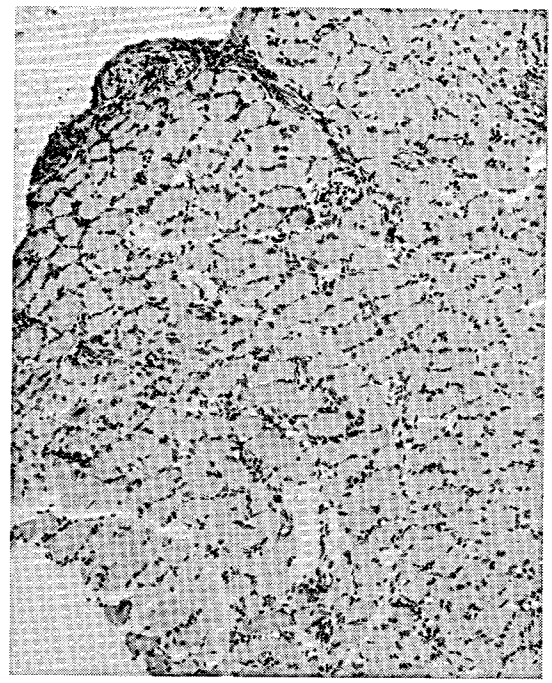
表1　中心核線維・変性線維の比率

日	種類	SOL(%)	EDL(%)
7	Ux	32.6± 2.0*	26.9±6.4
	Cx	58.5±20.3#	13.9±2.2
	Tx	9.3± 4.9	12.8±3.4
14	Ux	57.6±10.4#	26.9±0.7
	Cx	61.6± 5.8*	41.9±5.2
	Tx	28.8± 2.1	29.7±4.7

Ux:無処置群
Cx:処置群対照側、Tx: 処置群 Tetanus 側
* $p<0.01$, # $p<0.05$ (Tx に対して)

*東京都立神経病院
**東京都立神経病院神経小児科

A



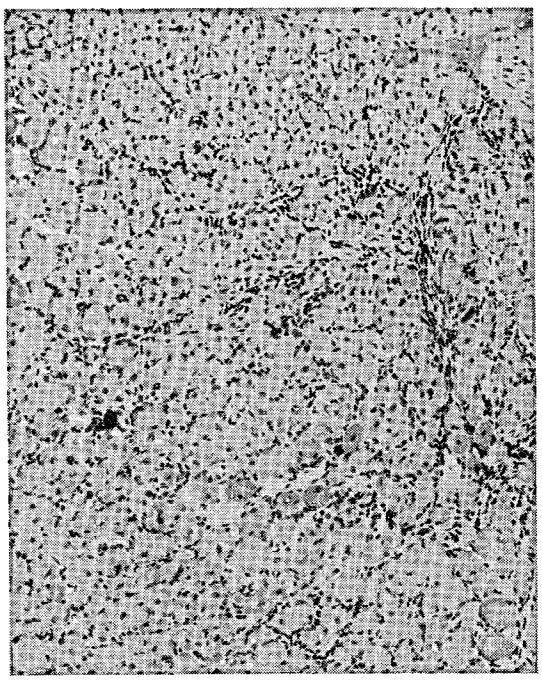
B

C

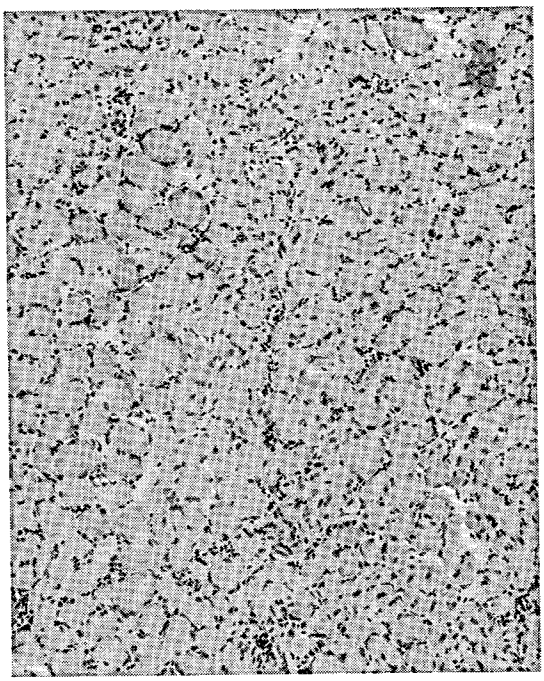
D

図1　1週目の処置群

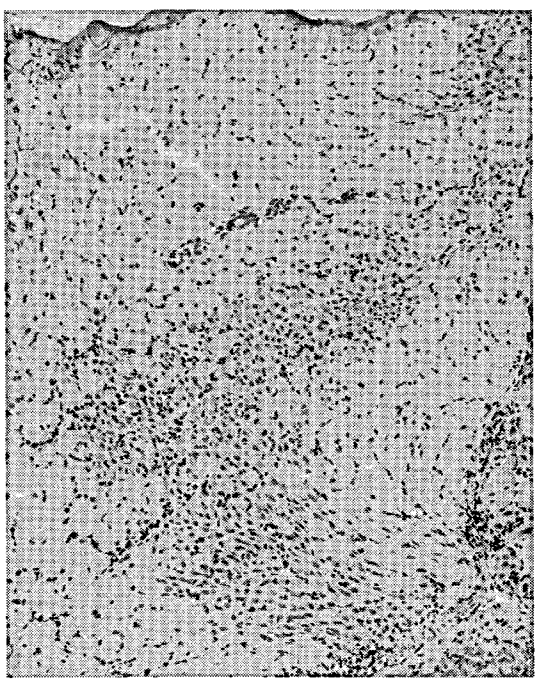
A：Tetanus 側 SOL，B：対照側 SOL，C：Tetanus 側 EDL，D：対照側 EDL．HE×90



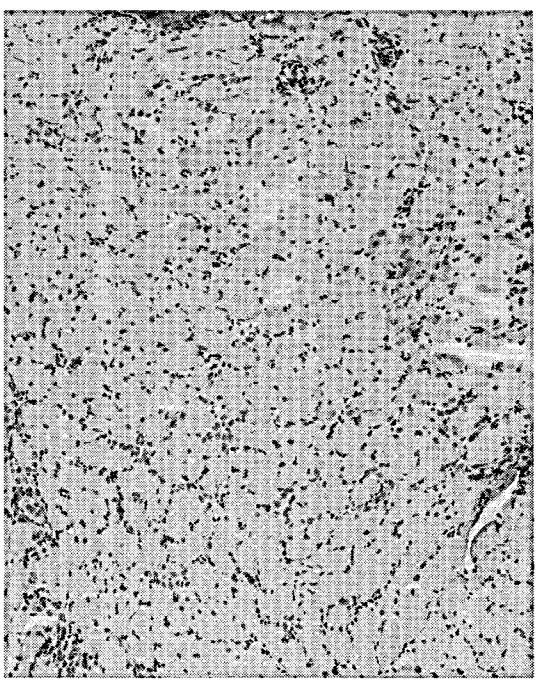
A



B



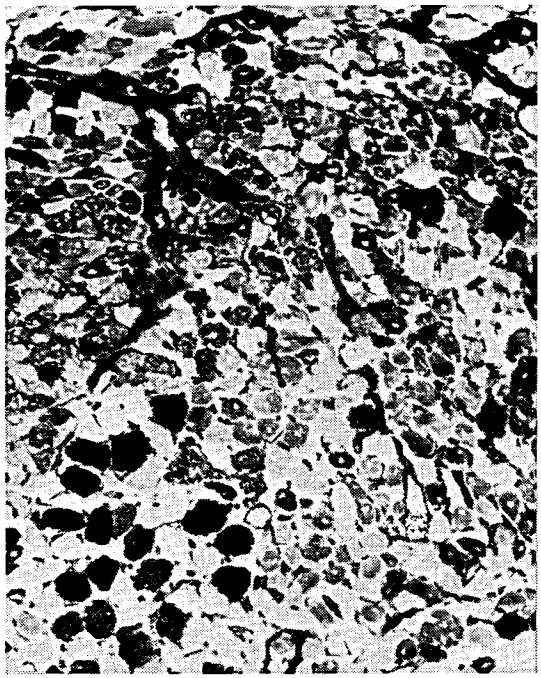
C



D

図2　2週目の処置群

A：Tetanus 側 SOL，B：対照側 SOL，C：Tetanus 側 EDL，D：対照側 EDL，HE×90



E

F

E：Tetanus 側 SOL，F：対照側 EDL．ATPase pH4.6．×90

表2　平均直径

日	種類	SOL(μ)	EDL(μ)
7	Ux	22.0±2.0	20.0±0.5
	Cx	24.1±2.9	19.8±2.1
	Tx	25.5±3.2	21.8±1.2
14	Ux	28.7±1.0	30.7±0.2
	Cx	25.4±2.3	23.9±1.2
	Tx	25.0±3.1	26.1±1.4

Ux：無処置群
Cx：処置群対照側、　Tx：処置群 Tetanus 側

一方，平均直径の比較では表2に示すように無処置群では SOL, EDL 共増加を示した．また処置群の EDL も若干の増加を示したが，SOL では不動側，対照側とも2週までの間では殆ど変化が認められず，両者の間でも殆ど差は認められなかった．

考　　察

Tetanus　toxin の1回筋注によって得られる local tetanus では，SOL は短縮位で，EDL は伸展位で保持される．これまでの成熟ラットでの実験ではこの状態は約4週間持続したが[2]，生後3週の mdx マウスでは1週間，長くても2週間しか持続しなかった．この差が何によるのかは今後検討する予定である．

Karpati ら[3]は dystrophy　hamster に脱神経を施し，筋変性の抑制を報告している．その中で変性の抑制の機序については不明であるとしながらも，最も可能性のある説明として脱神経により筋の成熟が抑えられたことを挙げている．

Karpati らの実験は dystrophy hamster におけるものであったが，中村らは既に述べたように mdx マウスにおいて脱神経を施行し，やはり筋変性の抑制を見ている．そして筋変性には通常の筋活動が必要であると述べている．脱神経の影響がどのように筋変性の抑制に関係しているかは複雑

な問題を含んでいるわけで，脱神経を伴わないlocal tetanusにおける実験はその点で有意義と思われる．

今回の実験で分かったことは(1) mdxマウスの筋変性は筋の短縮位における持続的不動化によって有意に抑制されること，(2)伸展位における持続的不動化では有意な変性の抑制は見られないこと，(3)筋変性の抑制と筋線維の直径との間には相関はないこと，そして(4)処置群の対照側では無処置群に比べてむしろ変性が強い傾向にあったこと，などである．同じように不動状態にありながら短縮位のSOLで変性の抑制がみられ，伸展位のEDLで抑制が充分見られなかったことは，伸展刺激が変性の誘引と何か関連があることを示唆している．即ちジストロフィンは筋膜の内側に存在していることが示唆されているわけであるが，短縮位で固定される場合は膜の構成物は緊密な状態になり，伸展位では逆に疎になることが予想される．膜の構成物が疎になれば膜の透過性が亢進し細胞外カルシウムが流入し，変性を引き起こす機序が考えられる．一方，SOLにおいて処置群の対照側が無処置群と比較して変性が強い傾向が見られたが，これは処置群ではtetanus側が歩行に際して使用できなくなるので，対照側に負荷がかかり変性が強くなったことが考えられる．従って筋活動そのものが変性を促しており，運動が激しいほど変性も強くなることが考えられた．

Karpatiらは筋の成熟の停止，言い替えれば筋線維の直径が増加しないことが変性の抑制と関係があることを示唆しているが，今回の実験に於て変性が抑制されたSOLにおいても筋線維の平均直径は対照側，無処置群と比べて変わりなく，1週目ではむしろ若干増加している．従って筋線維の直径が増えないことは単に不動化に伴う廃用性萎縮の結果に過ぎないと考えられ，筋の成熟度と変性との間には関係は無いと思われた．

結　　語

生後3週のmdxマウスにlocal tetanusを適用し，1，2週後に持続的短縮位にあるヒラメ筋において筋変性の有意な抑制を見た．持続的伸展位にある長趾伸筋においては抑制は軽度で有意ではなかった．mdxマウスにおける筋変性は筋活動によって促進される可能性が示唆された．今回の実験は例数も期間も少ないので今後それらを増やして検討してゆく予定である．

文　　献

1) 中村晴臣，高田邦安，加藤信介，本田誠四郎：mdxマウス骨格筋に対する神経切断の影響．“厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究”(杉田班)昭和60年度班会議報告書，1986，pp39—43.
2) 水野美彦，Chou SM，田邊　等：Local tetanusによる実験的ミオパチーに関する研究．“厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究”(杉田班)昭和60年度班会議報告書，1986，pp57—62.
3) Karpati G, Carpenter S and Prescott S: Prevention of skeletal muscle fiber necrosis in hamster dystrophy. Muscle Nerve 5 : 369—372, 1982.

28) mdx マウスの筋再生能(2)
マーカイン局注後の筋再生に及ぼす除神経の影響

中 村 晴 臣*

研究協力者　高 田 邦 安*　高 瀬　靖*

はじめに

mdx マウス (mdx) は Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 同様，伴性劣性遺伝に基づく筋ジストロフィー症モデル動物であり，DMD と同じく dystrophin の欠損が示されて以来，積極的に検索されている．しかし，mdx では筋線維再生が活発で臨床症状を殆ど示さず寿命もほぼ正常で，筋萎縮が進行し死に至る DMD と大きく相違している．mdx で筋の再生が活発な理由はまだ明らかでない．我々が従来行った実験により，mdx では進行性筋萎縮をきたす dy マウスと異なり末梢神経に明らかな形態学的異常を認めないこと[1]，若い mdx の坐骨神経を切断すると下腿筋は成長を止め同時に壊死がほぼ完全に阻止され，やがて神経再支配を受けると再び壊死・変性を示すこと[2]，更に局所麻酔剤マーカイン（塩酸ブピバカイン：BPVC）で惹起した筋壊死とその後の筋線維の再生能について，mdx と対照動物との間に再生能自体の有意な差はないこと[3]が明らかになった．BPVC は血管や末梢神経に殆ど影響せず選択的に筋線維壊死をきたすところから，上記の実験は神経支配の保たれた状態の筋再生能を観察している．我々は mdx における正常な神経支配が進行性の筋線維壊死や筋萎縮を防ぐ要因である可能性を考え，本年は BPVC 局注による筋壊死後の再生に神経支配の有無がいかなる影響を及ぼすかを検討した．

方　法

実験には昨年同様生後35～45週の mdx マウスおよび同時期の対照マウスを用いた．この時期の mdx は，一度壊死に陥った後の再生筋が大部分を占めるので筋線維の性状が比較的均一であり，また若い動物に比べ，ヒラメ筋が太く薬液の漏出が少なく比較的一定の結果が得られやすい．ネンブタールで全身麻酔した後下腿の皮膚を切開し，両側ヒラメ筋を露出し，直視下に0.5% BPVC 0.1 ml を注射し，十分筋が膨張するのを確認して，皮膚を縫合した．さらに左側については大腿後面皮膚を切開し，坐骨神経を約10mm にわたって切除した．注射後 3 日，7 日，10日，14日後に屠殺し，左右ヒラメ筋を採取後，カコジル酸緩衝液加2.5% グルタール溶液で固定し，型のごとくエポキシ樹脂包埋し，1 μ 切片・超薄切片をそれぞれ光顕・電顕で観察した．また，mdx・対照とも同量生食水をヒラメ筋に注射し，同様に標本を作成したものを生食水注射の対照とした．動物数は各時点で mdx・対照各々 3 匹である．

結　果

BPVC 注射 3 日後には mdx・対照とも筋線維壊死と活発な筋貪食像，多数の活性化された筋衛星細胞が認められた（図 1）．間質に多数の単球・マクロファージさらに線維芽細胞の浸潤を伴い，左ヒラメ筋ではさらに神経線維の変性像を伴っていたが，壊死，衛星細胞の量に，除神経の有無による差は認められなかった．7 日後では mdx・対照あるいは神経切除側・非切除側のいずれも，myotube および中心核をもつ多数の再生筋線維が形成され，なお一部には筋貪食像も残存していた．また，この時点では 4 者のいずれも間質の細胞浸潤，膠原線維の増加が比較的目立った．再生

* 鳥取大学医学部神経病理

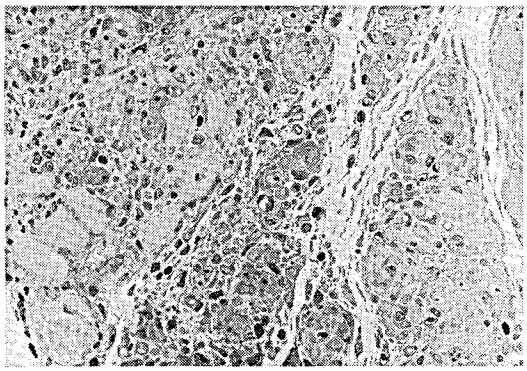


図1　BPVC注射3日後，mdx除神経側
筋線維壊死と活発な筋食食像，多数の活性化された筋衛星細胞を見る．エポン1 μm-トルイジン青．×248

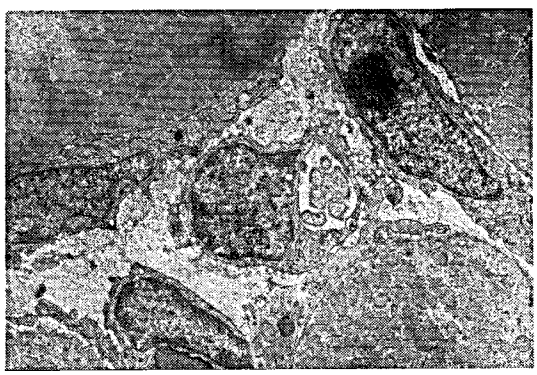


図2　10日後，mdx除神経側
間質に多数の線維芽細胞があり，膠原線維が増生．×4,340

筋線維の直径分布はmdx・対照のいずれも除神経の有無による顕著な差はなかった．10日後には対照動物の非神経切断側で間質の組織反応がわずかだったのに比べ，同じ動物の除神経側では間質の細胞浸潤や線維症が目立ち，mdxでは両側とも間質線維症が目立った(図2)．再生筋線維の直径分布はmdx・対照とも除神経の有無でその平均値に大きな差はなく，mdxでやや直径のバラツキが大きかった．14日目ではmdx・対照の両者の除神経側で再生筋線維の直径の有意な減少が認められ，とくにmdxでやや細かった（図3）．また，間質線維症は14日目ではmdx・とくにその除神経側ではかなり残存していたが，対照動物では7～10日と比べかなり減少傾向にあった．4者の再生筋線維の直径を計測した結果を図4に示した．

考　　察

BPVCは血管や末梢神経に殆ど影響せずほぼ選択的な筋線維壊死をきたす．昨年度我々はmdxおよび対照動物のヒラメ筋にBPVCを注射して筋壊死を惹起し，その後の筋再生について検討しmdxと対照との間で有意の差がないことを示した[3]．

一方，神経支配が筋線維の発達に不可欠なことは言うまでもなく，以前の我々の除神経の実験でも，坐骨神経の切断直後から下腿筋（腓腹筋）はNADH-TRによるタイプ分化が失われ，非切断側で認める急速な筋線維の直径増大も見られない[2]．また，同時に除神経による筋の脱分化はmdxの筋変性に対し抑制的に作用し，筋線維壊死が抑制されることが示されたが，除神経が筋再生に関してどのような影響をあたえるかは従来余り検討されていない．

今回の実験の結果，筋の壊死変性と初期における筋衛星細胞の活性化に対して支配神経の有無は殆ど影響がなく，mdx・対照ともmyotube，中心核線維の形成にまで至った．直径増大も注射10日目まで，非切断側とほぼ変わりないが，14日目では非切断側と比べ萎縮が明らかとなった．また，この直径増減はmdx・対照がほぼ同様に推移していた．以上から，mdxにおいても筋の再生過程で神経支配の有無は直接影響しないが，引続く筋線維の成熟に神経支配が必須であると思われた．また，同様の結果が対照動物でもあてはまるものと考えられる．

次に，BPVC注射後の筋再生過程では，当初mdx・対照動物とも除神経側で10日まで間質線維症が残存するが，14日目ではmdxでのみ線維症が明らかだった．

従来，mdxマウスでは筋再生が活発に行われ，DMDと違って間質線維症が殆ど起こらないとされ[4]，さらに線維症が起こらないことが筋線維再生の盛んな所以との見解もある．しかし最近週齢の進むとともにmdxにおける筋の膠原線維の増加傾向は著しく，52週のmdxでは対照に比較し

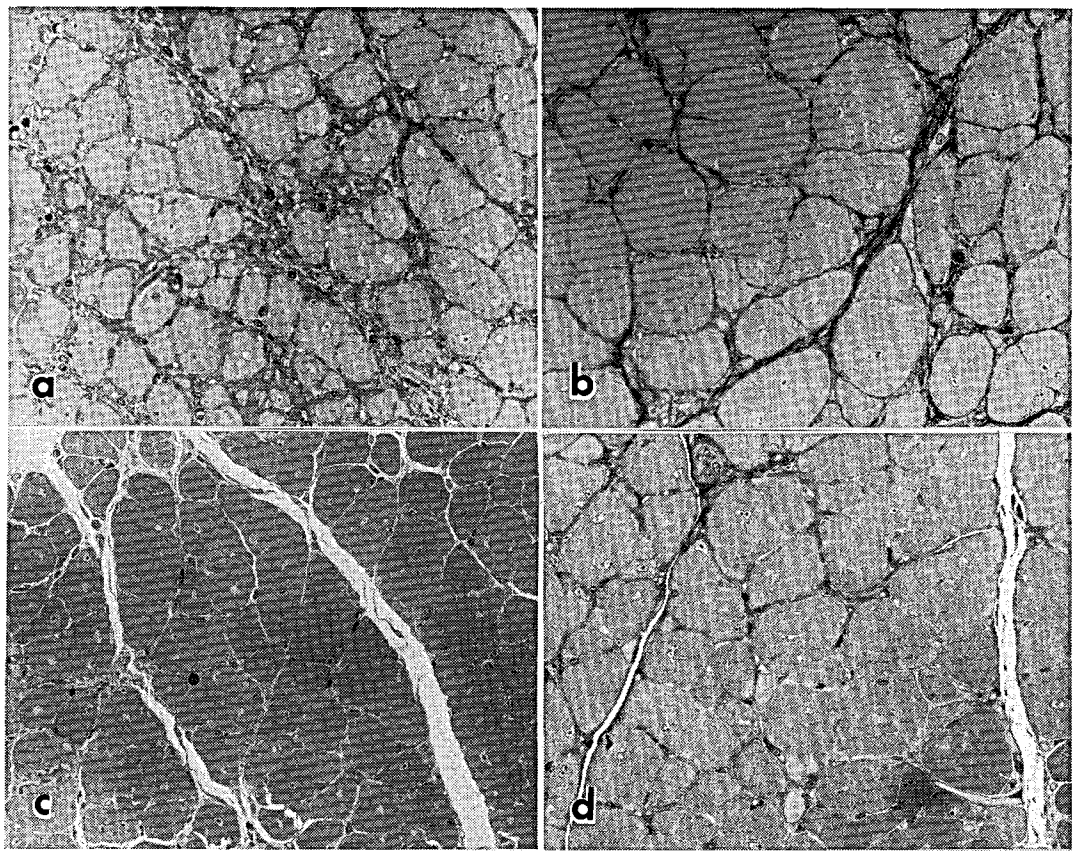


図3　14日後，a：mdx 除神経側，b：同非切断側，c：対照除神経側，d：同非切断側．
除神経側で再生筋線維の直径の減少．間質線維症は mdx で残存，対照では減少．
エポン 1 μm-トルイジン青．×150

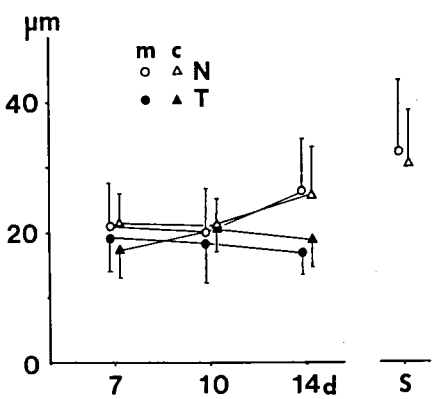


図4　各群再生筋線維の平均直径の推移
m＝mdx；c＝対照；N＝神経非切断側；
T＝除神経側．Sは生食水注射の対照．

2～3倍以上に増加しているとの報告がある[5]．我々の実験動物もかなりの老齢であり，元来の線維症に加えて，BPVC による壊死で間質の組織反応が一時的に活発化したのかも知れない．除神経側で線維症がより明らかに見えるのは，単に筋線維の直径増加の停止による見掛けだけの可能性も否定できないが，あるいは筋線維の直径増加の停止のため，mdx に特有の膠原線維の過剰な反応がおこるという可能性も残り，今後検討が必要と思われる．

結　　語

マーカイン局注後の筋再生に対する支配神経の除去の影響を検討した．mdx・対照とも再生筋の

形成に至る10日後までは，有意の影響を与えなかった．また，14日後では除神経の影響による筋線維萎縮が明らかとなった．間質線維症はmdxとくにその除神経側でより明らかであり，mdxの間質線維症は再生筋線維の発育程度に影響される可能性が示唆された．

文　献

1) 中村晴臣，田中順一，高田邦安：mdxマウスの坐骨神経所見“厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィーの臨床，病態と成因に関する研究”（杉田班）昭和59年度研究報告書，1985，pp39—41.
2) 中村晴臣，高田邦安，加藤信介，本田誠四郎：mdxマウス骨格筋に対する神経切断の影響“厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィーの臨床，病態と成因に関する研究”（杉田班）昭和60年度研究報告書，1986，pp39—43.
3) 中村晴臣，高田邦安：mdxマウスの筋再生能マーカイン局注による筋壊死と再生“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究”（杉田班）昭和63年度研究報告書，1989，pp 223—226.
4) Cullen MJ and Jaros E : Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. comparison with Duchenne muscular dystrophy. Acta Neuropathol (Berl) **77** : 69—81, 1988.
5) Marshall PA, Williams PE and Goldspink G : Accumulation of collagen and altered fiber-type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in the mdx dystrophic mouse. Muscle Nerve **12** : 528—537, 1989.

VI. 培養・再生

29）ヒト培養筋細胞の発達に対する筋収縮活動の影響

塚越　廣*

研究協力者　松本容秋*　V. Askanas**　W.K. Engel**

筋収縮活動は，筋細胞の発達に重要な役割を果たしていると考えられているが，ヒトの筋細胞の発達に及ぼす影響については未だ明らかではない．また，筋疾患の病因，病態を理解する上で，筋収縮活動が筋細胞の発達に及ぼす影響を検討する事は重要と考えられる．そこで，我々は，ヒト培養筋細胞の発達に対する筋収縮活動の影響につき，形態学的に検討したので報告する．

材料及び方法

4例の内因性筋疾患を有しないと考えられるヒトの生検筋より，既に報告した方法により，筋単独培養を行ない，それに，後根神経節をつけた13日目妊娠ラット脊髄片を併置培養した[1]．併置培養後，平均10日前後で筋細胞は自発収縮を始めるが，その最初の収縮が見られた時点で，tetrodotoxin (TTX) 2 μM を投与し，収縮活動を4週間ブロックした(実験A)．更に，4週間自発収縮させた後に，TTX を投与し，筋収縮活動を4週間ブロックした（実験B)．実験A，Bに於いて，上記の期間終了後，培養細胞は，通常のグルタールアルデヒド，オスミウムの二重固定後，電顕用に包埋した．包埋後，観察したい領域を，光学顕微鏡下にて選択し，直径3 mm 前後のドリルにて打ち抜き，ブロックに再包埋し，3 μm 切片及び超薄切片を作成した．3 μm 切片を作成後，実験A，Bに於いて，以下の parameter につき，光学顕微鏡下にて，定量した．1）横紋形成した筋細胞の割合：培養皿に対して平行な面で切断して，3 μm 切片を作成し，メチレンブルー，アズールII染色施行後，横紋形成した筋細胞の割合を算出した (%)．2）単位長さ当たりの核の数：上記の切片上にて，単位長さ当たりの核の数を算出した (/mm)．3）末梢核，中心核の割合：培養皿に対して垂直な面で切断して，3 μm の横断切片を作成し，メチレンブルー，アズールII染色施行後，末梢核，中心核の割合を算出した(%)．また，同じ切片上にて，筋線維の最大径，最小径を算出した (μm)．

結　果

実験A：筋単独培養では，explant 後1週間で，遊走した筋芽細胞が融合し始め，筋管細胞を形成するが，脊髄片併置培養後，平均10日前後で，筋管細胞は自発収縮を始める．この時点では，すべての筋管細胞に於いて，横紋形成は認められなかった．自発収縮後，数日で，一部の筋管細胞に，横紋形成が認められ，その数は徐々に増加し，4週間後には，多数の横紋形成した筋管細胞が認められた（図1 a)．また，多数の集合した筋線維が，explant した脊髄片の周辺に認められた．一方，TTX を投与した筋細胞では，自発収縮は完全にブロックされ，横紋形成した筋細胞は，ほとんど認められなかった（図1 b)．また，多数の筋線維が集合する傾向も認められなかった．3 μm 切片上での定量の結果は，表に示してある通りであるが，まとめると，4週間自発収縮させた筋細胞では(4 WCM)，4週間自発収縮をブロックした筋細胞（4 WPM）に比し，横紋形成した筋細胞の割合は有意に増加し($p<0.001$)，単位長さ当たりの核の数は，有意に減少し($p<0.001$)，末梢核の割合は有意に増加していた．また，筋線維の最大径，最小径共，4 WCM で，有意に減少していた ($p<0.001$)．

実験B：4 WCM では，上記の結果の様に，ほぼ半数の筋細胞に横紋形成が認められるが，TTX

＊東京医科歯科大学医学部神経内科
＊＊USC Neuromuscular Center

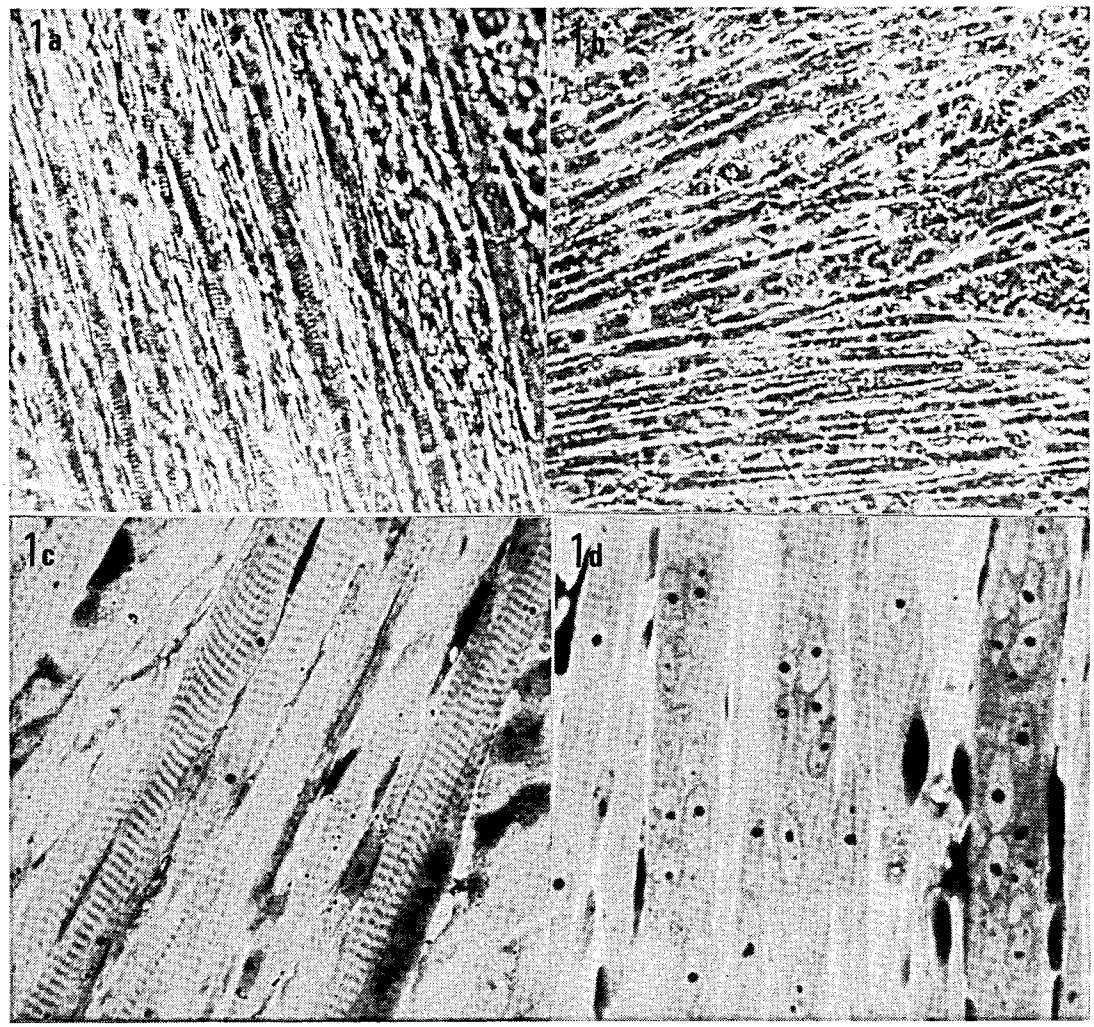


図1　a　4週間自発収縮させた筋細胞の位相差顕微鏡写真：ほとんどすべての筋細胞に横紋形成が認められる．(×400)　b 4週間自発収縮をブロックした筋細胞の位相差顕微鏡写真：横紋形成は認められない．(×400)　c 4週間自発収縮させた筋細胞の3 μm 切片：多数の横紋形成を認める．(×625)　d 4週間自発収縮をブロックした筋細胞の3 μm 切片：横紋形成は認められず，多数の中心核を認める．(×625)

を投与後，自発収縮は速やかに停止し，数日後には，一部の筋細胞で，横紋が消失し始め，1～2週間後には，位相差顕微鏡下では，ほとんどの筋細胞にて，横紋は消失した．3 μm 切片上での定量の結果では，表に示されているように，8週間自発収縮させた筋細胞（8 WCM）では，4週間自発収縮後，TTX を投与して4週間自発収縮をブロックした筋細胞に比し，横紋形成した筋細胞の割合は，有意に増加し（$p<0.001$），単位長さ当たりの核の数は，有意に減少し（$p<0.001$），末梢核の割合は，有意に増加していた（$p<0.001$）．また，筋線維の最大径，最小径共，8 WCM では，有意に減少していた（$p<0.001$）．これらの結果は，筋収縮活動をブロックする事によって，一旦，形成された横紋が消失し，末梢に局在していた核が，再び，中心に遊走する事を示している．

表

		EXPERIMENTAL DESIGN A Contracting	EXPERIMENTAL DESIGN A Paralyzed	EXPERIMENTAL DESIGN B Contracting	EXPERIMENTAL DESIGN B Paralyzed
CROSS-STRIATION AREA (%)		(p < 0.001) 49.5 ± 4.8 (SEM) (n=6) (nMFs=624)	3.3 ± 1.7 (n=6) (nMFs=654)	(p < 0.001) 52.8 ± 4.6 (n=6) (nMFs=421)	0.3 ± 0.2 (n=6) (nMFs=470)
NUMBER OF NUCLEI PER mm LENGTH		(p < 0.001) 5.4 ± 0.6 (n=6) (nMFs=137)	18.5 ± 1.4 (n=6) (nMFs=130)	(p < 0.001) 3.8 ± 0.4 (n=6) (nMFs=132)	15.6 ± 1.3 (n=6) (nMFs=126)
LOCATION OF NUCLEI (%)	Internal	(p < 0.001) 49.3 ± 5.8 (n=3) (nMFs=306)	91.7 ± 1.4 (n=3) (nMFs=214)	(p < 0.001) 44.2 ± 5.2 (n=3) (nMFs=342)	83.3 ± 1.2 (n=3) (nMFs=202)
	Peripheral	(p < 0.001) 50.7 ± 5.8 (n=3) (nMFs=306)	8.3 ± 1.4 (n=3) (nMFs=214)	(p < 0.001) 55.8 ± 5.2 (n=3) (nMFs=342)	16.7 ± 1.2 (n=3) (nMFs=202)
FIBER DIAMETER (um)	Smallest	(p < 0.001) 6.0 ± 0.09 (n=3) (nMFs=366)	8.2 ± 0.22 (n=3) (nMFs=249)	(p < 0.001) 5.8 ± 0.13 (n=3) (nMFs=233)	7.2 ± 0.19 (n=3) (nMFs=200)
	Largest	(p < 0.001) 8.0 ± 0.12 (n=3) (nMFs=366)	13.6 ± 0.56 (n=3) (nMFs=249)	(p < 0.001) 8.0 ± 0.22 (n=3) (nMFs=233)	11.4 ± 0.40 (n=3) (nMFs=200)

CHMFs = CULTURED HUMAN MUSCLE FIBERS; n = NUMBER OF CULTURES; nMFS = NUMBER OF MUSCLE FIBERS COUNTED
± = SEM

EXPERIMENTAL DESIGN A - 5 weeks innervated CHMFs, control-contracting for 4 weeks; TTX-treated paralyzed for 4 weeks.

EXPERIMENTAL DESIGN B - CHMFs innervated for 9 weeks; control-contracting for 8 weeks, Experimental - contracting for the first 4 weeks and paralyzed by TTX for the next 4 weeks.

透過型電子顕微鏡による検討：4 WCM では，myofibril の形成が良好で，Z 帯，A 帯，I 帯，M 帯の区別が明瞭に認められた（図 2 a）．横断切片では，多数の末梢核が認められ，個々の筋線維内には，myofibril が，dense に詰まっている像が観察された（図 2 c）．一方，4 WPM では，myofibril の形成は，不良で，Z 帯，A 帯，I 帯，M 帯の区別は，不明瞭であり，一部の筋細胞では，Z 帯は完全に消失しており（図 2 b），また，一部では，変形した Z 帯が認められ，いわゆる dense body の形成が認められた．横断切片では，多数の中心核を認め，個々の筋線維は，大小不同があり，筋線維内には，myofibril は，ほとんど認められなかった（図 2 d）．

考　　察

今回の我々の検討から，ヒトの筋細胞に於いては，横紋形成及び末梢核の発達は，筋収縮活動によって支配されている事が明らかになった．

我々の検討から，自発収縮させた筋細胞では（CM），収縮活動をブロックした筋細胞に比し（PM），次の様な特徴を持つ事が明らかとなった．1）横紋形成が良好である．2）核は，末梢に局在している．3）単位長さ当たりの核の数が少ない．4）筋線維の直径が小さい．5）より多くの筋線維が集合する傾向を持つ．

横紋形成に関しては，動物（ラット，鶏，蛙）の培養筋細胞を用いた検討でも，種族により程度の差はあるが，横紋形成は，筋収縮活動に支配されている事が報告されている[2),3),4)]．ヒトの筋細胞でも，これらの動物の筋細胞とほぼ同様の結果が得られたが，ヒトの場合は，他の種族（ラット，蛙）と比べて，筋収縮活動に支配されている度合が強いと思われる．また，鶏培養筋細胞の生化学的検討で，筋収縮活動により，myosin の合成が促進され，筋収縮活動をブロックする事により，myofibrillar protein の変性が促進される事が報告されている[5)]．我々の検討でも，PM では，myofibril の形成が不良である事から，ヒトの筋細胞に於いても，myosin を含めた myofibrillar protein の合成は，筋収縮活動に支配されていると考えられる．

実験 B に於いて，筋収縮活動をブロックする事により，一旦，形成された横紋が消失し，末梢に

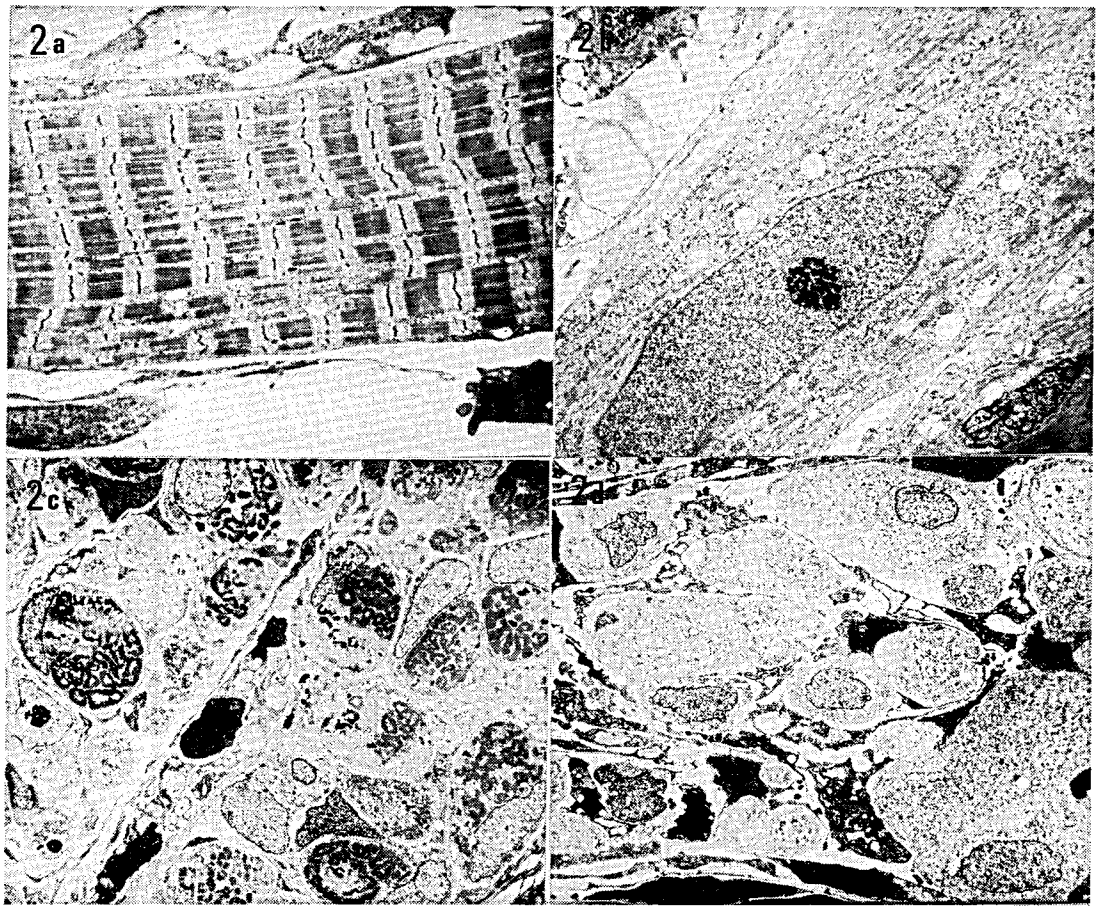


図2　透過型電子顕微鏡写真
a　4週間自発収縮させた筋細胞の縦断切片：Myofibril の形成が良好である．(×3600)
b　4週間自発収縮をブロックした筋細胞の縦断切片：Myofibril の形成が不良である．(×3600)　c　4週間自発収縮させた筋細胞の横断切片：多数の末梢核を認める．(×3200)
d　4週間自発収縮をブロックした筋細胞の横断切片：多数の中心核を認める．(×3200)

局在した核が再び中心に遊走する事から，横紋及び末梢核の発達のみならず，維持にも筋収縮活動が必要であると考えられる．

従来，末梢核の発達に対する筋収縮活動の影響につき，検討を加えた報告はない．今回の我々の検討で，末梢核の発達及び維持は，筋収縮活動に支配されている事が明らかとなった．一般に，動物の骨格筋では，desmin を含めた中間大フィラメントが，末梢核の支持組織としての役割を果たしていると考えられている[6]．最近，マウスの培養筋細胞の検討で，TTX を投与した筋細胞では，desmin 中間大フィラメントの分布，配列に乱れを生じる事が報告されており[7]，これらの事実は，ヒトの筋細胞に於いても，筋収縮活動をブロックする事により，desmin を含めた細胞骨格蛋白の分布，配列に乱れを生じ，核が中心に局在する可能性が考えられる．一般に，筋疾患では，中心核が増えるが，これらの事実は，筋疾患の病態を考える上で，興味ある事実と思われる．

一般に，筋細胞の発達に於いて，primary myotubes から分かれて secondary myotubes が形成されていくと考えられており，この secon-

dary myotubesへの分化は，nerve-muscle contact及び筋収縮活動により支配されていると報告されている[9]．我々の検討では，CMでは，PMに比し，より多くの筋線維が集合する傾向がある事，単位長さ当たりの核の数が少ない事，及び筋線維の直径が小さい事などが認められたが，これらの事実は，筋線維数の増加を反映していると考えられる事から，ヒトの筋細胞に於いても，primary myotubesからsecondary myotubesへの分化，発達が，筋収縮活動により支配されている可能性が，考えられる．この点に関しては，今後，更に詳しく検討していく必要があると思われる．

今後は，筋細胞の発達に対する筋収縮活動の影響に関して，分子レベルでの機序を解明していく必要があると思われる．

文　献

1) Kobayashi T, Askanas V and Engel WK: Human muscle cultured in monolayer and co-cultured with fetal rat spinal cord: Importance of dorsal root ganglia for achieving successful innervation. J Neurosci **7**: 3131—3141, 1987.
2) Anderson MJ and Cohen MW: Nerve induced and spontaneous redistribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. J Physiol (London) **268**: 757—773, 1977.
3) Churuk HM and Holland PC: Effect of tetrodotoxin relaxation of cultured skeletal muscle on the sarcoplasmic reticulum Ca-transport ATPase. Exp Cell Res **144**: 143—157, 1983.
4) Koenig J, Oren M and Melone MAB: Establishment of neuromuscular contacts in cultures of rat embryonic cells: Effect of tetrodotoxin on maturation of muscle fibers and formation and maintenance of acetylcholinesterase and acetylcholine receptor clusters. Dev Neurosci **5**: 314—325, 1982.
5) Bandman E and Cerny LC: Myosin transition in cell culture: muscle activity is required for the expression of neonatal myosin. J Cell Biol **101**: 45a
6) Tokuyasu KT, Dutton AH and Singer SJ: Immunoelectron microscopic studies of desmin localization and intermediate filament organization in Chicken skeletal muscle. J Cell Biol **96**: 1727—1735, 1983.
7) Tassin AM, Paulin D and Rieger F: Unusual organization of desmin intermediate filaments in muscular dysgenesis and TTX-treated myotubes. Dev Biol **129**: 37—47, 1988.
8) Duxson MJ, Ross JJ and Harris AJ: Transfer of differentiated synaptic terminals from primary myotubes to new-formed muscle cells during embryonic development in the rat. Neurosci Lett **71**: 147—152, 1986.
9) Harris AJ: Transfer of synaptic terminals from primary to secondary myotubes. Muscle & Nerve (Suppl) **9**: 44, 1986.

30）カルシトニン遺伝子関連ペプチドによる筋芽細胞の分化誘導

川　井　尚　臣*

研究協力者　佐藤幸一*　鳴尾隆子*　有井敬治*
瀬部俊彦*　斎藤史郎*　山口久雄**

はじめに

我々は培養筋細胞を用いて筋細胞の成長，分化，および蛋白合成の促進因子について研究を行なっており，昨年度の本研究班会議ではCaイオノフォア（A23187）が筋細胞の分化を促進させることを報告した[1]．しかし，A23187は生理的物質でないので，本年度は人体において中枢神経や末梢神経に広く存在し，運動神経末端部ではアセチルコリン（Ach）と共に，Achによる筋収縮作用を増強するなど，筋細胞に対する作用が注目されているカルシトニン遺伝子関連ペプチド（calcitonin gene-related peptide：CGRP）[2]について，筋細胞の分化に及ぼす作用を検討した．

対象と方法

培養細胞にラット筋芽細胞（L 6）を用いた．培養液は2％馬血清と6 μg/mlのインスリンを含むDulbecco's modified Eagle's（DME）液を用いた．これに最終濃度が1nM，10nM，100nMになるようにCGRPを添加した3種類の培養液を作製し，細胞培養を行なった．すなわち，それぞれの培養液を入れた直径60mmのシャーレに1×10^5個/dishの筋芽細胞を播種し，10日間培養した．この間2日毎に新しい培養液に交換し，培養6日目，8日目，10日目に細胞の形態変化を観察すると共に細胞を採取し，DNA量[3]，クレアチンキナーゼ（CK）活性値，ミオグロビン（Mb）量を測定した．なお，CK活性値，Mb量としてはDNA当たりの値（mUCK/μgDNA，ngMb/μgDNA）を示した．対照としてはCGRP非添加培養液により培養した細胞を用い，同様の検索を行なった．

成　績

CGRP非添加培養系を用いた対照実験では，筋芽細胞は培養6日目頃より筋管細胞を形成し始め，10日目には殆どの細胞が筋管細胞に分化し，これに伴いDNA当たりのCK活性値，Mb量は急速に増加した．CGRP添加培養系では，筋細胞は形態的には対照群との間には明らかな違いは見られなかったが（図1），CGRPの濃度が1nM，10nM群ではDNA当たりのMb量はいずれの培養日数でも対照群に比べ，濃度依存的に増加した．特にCGRP10nM群の培養10日目では対照の3.4倍に増加した．しかし，CGRPの多い100nM群では，どの培養日数でもCGRP 1nMあるいは10nM群に比べてMb量の増加は少なかった（図2）．一方，CK活性値はCGRPのどの濃度の群，あるいはどの培養日数においても対照群との間に差は見られなかった（図3）．

考　察

我々は筋芽細胞の培養系を用いて，細胞の形態的な分化や筋固有蛋白の増加を指標として筋細胞の分化促進物質の発見に努めると共に，それらの物質の分化促進作用の機構について検討を加えてきた．本研究では，同じ培養系を用いてCGRPの筋細胞分化促進作用について検討し，このペプチドが，分化促進作用を有することを示唆する成績

＊徳島大学医学部第一内科
＊＊徳島大学医学部第一生理

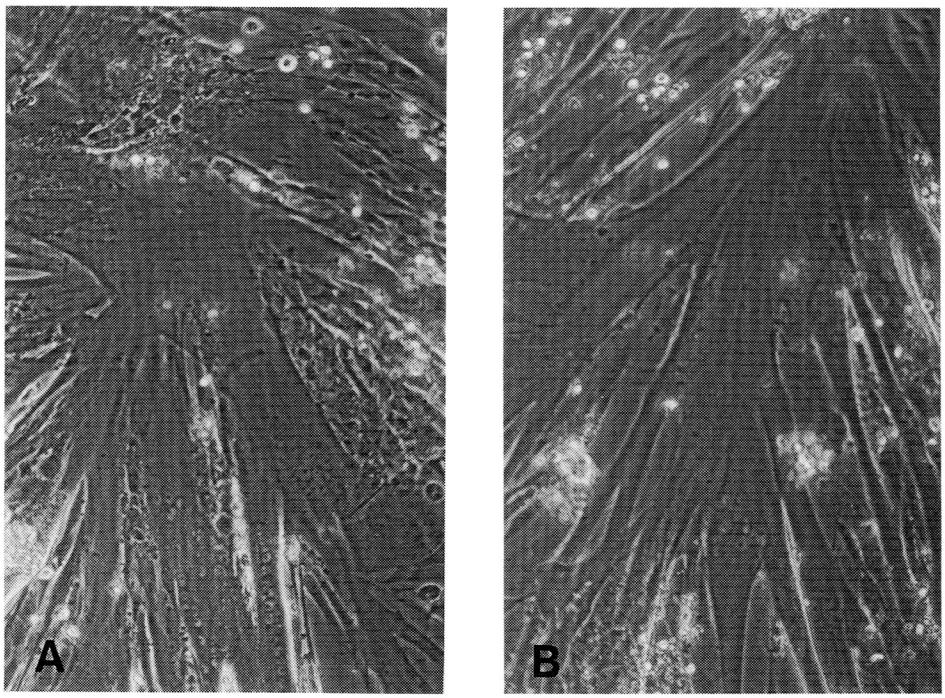


図1　A：CGRP 非添加培養液中の培養10日目の筋細胞．×530
B：CGRP 濃度が10nM の培養液中の培養10日目の筋細胞．×530

を得た．CGRP は11番染色体の短腕のカルシトニンと同じ遺伝子上にコードされ，組織特異的なスプライシングを受けて生成される37個のアミノ酸よりなるペプチドである．神経系では脳内の各部位，脊髄後角および運動神経に存在することが知られているが，鶏の培養骨格筋細胞ではアセチルコリンレセプターの合成促進作用[4]があるなど，筋に対する作用も注目されている．本研究では，CGRP は10nM の濃度までは濃度依存的に細胞内 Mb 量を増加させ，100nM ではこの増加がやや減少するとの成績を示した．Mb 量が筋細胞内に増加することを筋細胞の分化の一つの指標とすると，CGRP は筋細胞の分化促進作用を有すると考えられる．この作用機序としては，CGRP には細胞内カルシウム濃度を増加させる作用があるとされているので，まず細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし，これによって筋細胞の分化を促進する可能性が考えられる．カルシウムイオノフォアが同様に筋細胞内の Mb 合成を促進したことも，この考えを支持する成績である．しかし，CGRP には細胞中の cyclic-AMP を増加させて adenylate cyclase 活性を上昇させたり[5]，運動神経では，終末部で Ach と共存し，Ach の筋収縮作用を増強する作用[6]など種々あり，筋細胞の分化促進はカルシウム以外の因子による可能性も残されている．

本研究では CGRP は筋細胞内の Mb 量の増加を促進したが，筋細胞の形態には CGRP 非添加の対照筋細胞との間に明らかな違いは認められなかった．しかし，細胞形態の変化の有無についてはさらに詳細に検討する必要がある．一方，CK 活性値は CGRP 非添加の対照群と CGRP 添加群との間に明らかな差は認められなかったが，これは CGRP が Mb の生合成のみを特異的に促進する特性を持つためか，または CK が筋細胞の分化に際し Mb より遅れて出現するためかも知れない．

以上の成績から CGRP は筋芽細胞に対して分化促進作用を示し，特に生化学的分化作用を有するものと考えられる．このことは，CGRP が生理

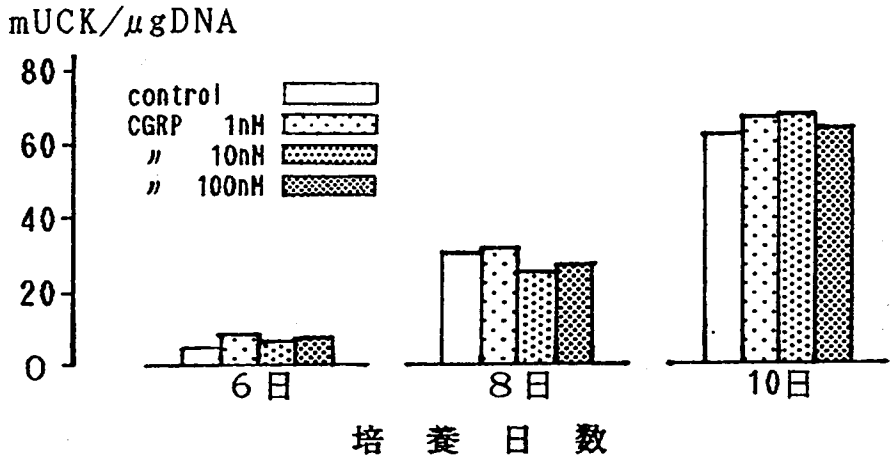


図2　筋細胞内 Mb 量に対する CGRP 添加の影響（平均値　n＝3）

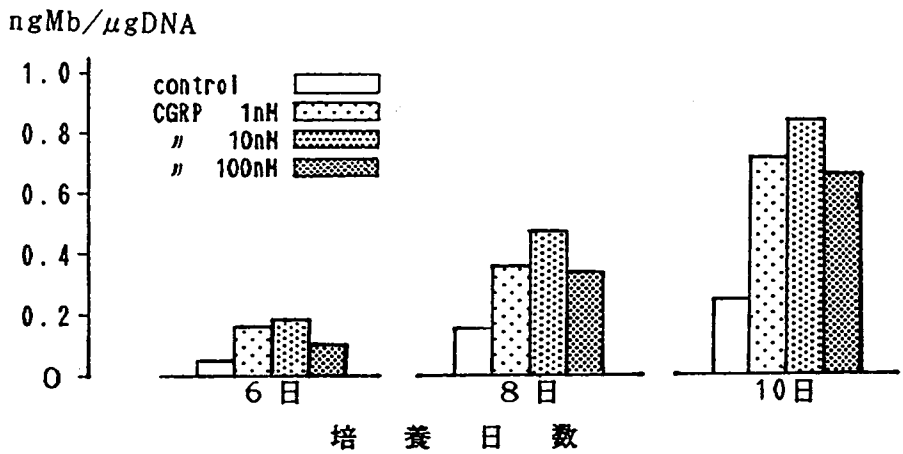


図3　筋細胞内 CK 活性値に対する CGRP 添加の影響（平均値　n＝2）

的に人体に存在する物質であることより筋細胞の分化や蛋白合成に神経終末部の神経ペプチドが関与していることを示唆し，筋の蛋白合成制御機構の解明や筋萎縮の治療法の開発に重要な知見と思われる．

おわりに

CGRP は筋細胞の分化過程で Mb 合成促進作用を示すが，このことは筋細胞の蛋白合成や分化の制御に神経終末部のペプチドが関与していることを示唆し，興味深い知見である．

文　献

1) 川井尚臣，佐藤幸一ほか：培養筋芽細胞の増殖，分化とリソゾーム酵素並びにミトコンドリア酵素．“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究”（杉田班）昭和63年度研究報告書，1989，p73.
2) Amara SG , Jonas V et al : Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. Nature 298 : 240, 1982.

3) Erwin BG, Stoscheck CM et al: A rapid fluorometric method for the estimation of DNA in culture cells. Anal Biochem 110: 291, 1981.
4) Fontaine B, Klarsteld A et al: Calcitonin gene-related peptide, a peptide present in spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo myotubes. Neurosci Lett 71: 59, 1986.
5) 橋本和哉：運動神経終末で，Ach と共存する遺伝子関連ペプチドの作用について．阪大医誌 40：293，1988.
6) 遠山正弥：神経ペプチドの生理的意義をめぐって共存—CGRP を中心として．自律神経 23：197，1986.

31）損傷筋組織におけるトランスフェリンについて

高　瀬　貞　夫*

研究協力者　　小　林　和　夫*

はじめに

我々は筋損傷時の筋芽細胞を増殖させる因子（MPF；分子量96kの蛋白質）の存在について報告してきた[1]．しかし筋芽細胞を増殖させる既知の物質の中で，トランスフェリン（Tf）は分子量が80kで，熱に不安定でありMPFと類似していた．Tfは球形の糖蛋白質で，同じ大きさのNドメインとCドメインからなり，1分子に2個のFe^{3+}を結合する鉄の供与体としての機能を持つが，近年鉄の供与と関係しない細胞増殖因子としての可能性も指摘されている[2),3)]．Tfは多くの培養細胞の成長に必須のものであり，種々の培養細胞の増殖を促進することが明らかにされてきた[4)]．特にニワトリの筋芽細胞の増殖促進因子として良く知られている[5)]．しかし筋損傷時の筋再生にTfが関わっているかについては不明である．そこで我々はラットの損傷筋においてTfは増殖促進因子として作用しているか，又Tfは筋芽細胞の増殖の引金になりうるかについての検索を行なった．

材料・方法

(1) 損傷筋組織における抗Tf抗体による組織学的検索

ウイスター系雄ラット250gの前脛骨筋に，液体窒素で冷却した7gの鉄棒（径7mm）を15秒間押し当てて凍結損傷を作製した．経時的に損傷筋を採取し（3，15分，1，2，3，6，12時間，1，2，3，5，7，10日後），採取筋の凍結標本にHE染色，methylgreen pyronine染色及び抗ラット抗体による免疫染色（ABC染色）を行ない光顕的に観察した．

(2) 筋損傷ラットにおける各種臓器抽出液の作製

ラット前脛骨筋に約5mmの切断損傷を5～6回加えた後，12時間後に損傷筋及び種々の臓器（筋，肝，腎，心，脳，血漿，血球，肺）を採取し，PBSを加え25%抽出液を63年度本班会議報告と同様の方法で作製した[6)]．対照として非損傷筋ラット（皮膚だけ切開し筋を損傷しないもの）の各種臓器を用いた．

(3) 臓器抽出液による筋芽細胞増殖の測定

ラット筋芽細胞L6を15mm径シャーレに5～7×10^4個培養した．培養液は63年度本班会議に報告したと同様の方法で行なった[6)]．24時間後臓器抽出液（3%）を含む培養液と取り替え3日間培養した．トリプシンにて細胞浮遊液を作製し，血球計算盤にて細胞数を算出した．各値は3検体の平均をもって表わした．

(4) 臓器抽出液中のTfの測定

損傷筋ラットにおける各種臓器抽出液のTf量をロケット免疫電気泳動法にて測定した．トリス緩衝液（pH8.6，μ=0.025）による1%アガロースにウサギで免疫した抗ラットTf抗体を添加（0.7%）してアガロースゲルを作製した．ゲルの試料穴に7μlの抽出液及び既知濃度のTfを入れ100V，150分間泳動した．ゲル乾燥後Coomassie Blueで染色し，泳動距離を測定することによりTfの量を算定した（図1）．

(5) 抗Tf抗体を加えた損傷筋抽出液による筋芽細胞増殖の測定

ラット前脛骨筋に切断損傷を加え，12時間後の損傷筋抽出液を作製した．培養筋芽細胞L6の培養液に抽出液（2.45%），及び種々の濃度の抗ラットTf抗体（0，5，12.5，25μl/ml）を加え培養した．3日後トリプシン処理による細胞浮遊液よ

＊東北大学医学部神経内科

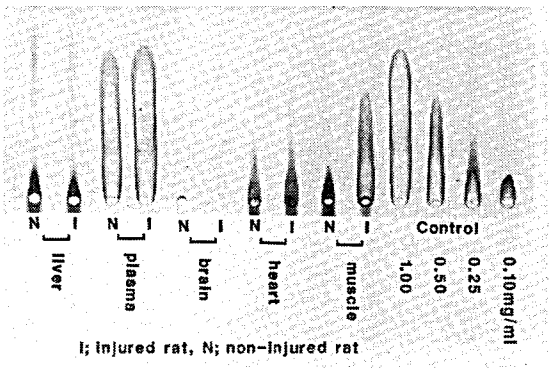


図1　ロケット免疫電気泳動法によるTfの測定

り筋芽細胞数（cells × 10^4/dish）を算出した．

(6)　**Tf添加による培養筋芽細胞増殖の測定**

ラット筋芽細胞L 6の培養液中に，種々の濃度（0，6.25，12.5，25，50，100μg/ml）のFe飽和ラットTfを加えて培養した．3日後にトリプシン処理後，培養細胞数を算出した．

結　　果

(1)　**損傷筋組織におけるTfの局在**

凍結損傷筋における筋再生は，損傷12時間後に損傷部と非損傷部の境界域に筋芽細胞が出現して始まり，損傷3～4日で最も増加する．Tfは損傷6時間後よりやはり境界域に出現し，主に壊死線維の胞体内にみられ，間質にも認められる（図2）．12時間後にてTfは最大となり，その後減少した（図3）．損傷5日目にmyotubeが形成されるがTfはmyotube内にみられず，おもに間質に軽度みられた．

(2)　**筋損傷ラットにおける各種臓器抽出液の筋芽細胞増殖性とTfの相関性（図4）**

Tf量は血漿にて最も高く（3.95±0.63mg/ml），脳では最も低かった（0.10±0.22）．筋では非損傷筋より損傷筋に高かった（$P<0.05$）．筋芽細胞増殖性については，損傷筋に最も強く（30.83±0.62cells × 10^4/dish），脳でも高値であった（24.25±3.54）．血漿ではTf値が高いにもかかわらず筋芽細胞増殖性は12.26±0.75にとどまり，Tfと筋芽細胞の増殖性に必ずしも相関性はみられなかった．

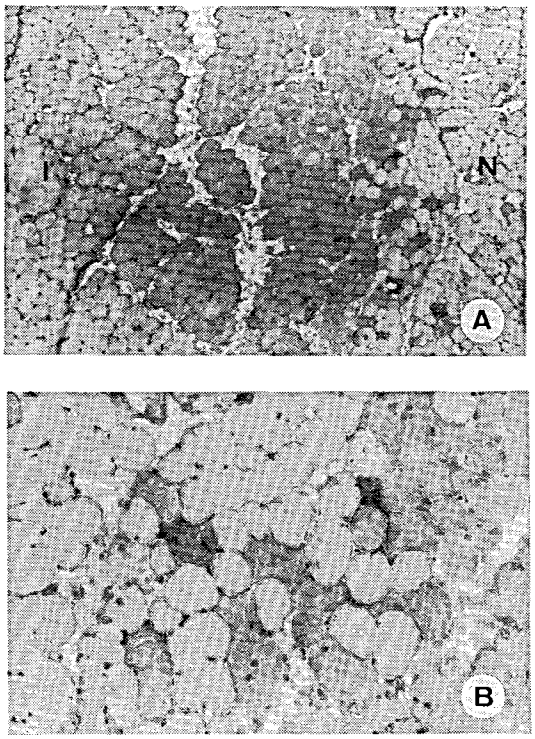


図2　凍結損傷筋（損傷12時間後）におけるTfの分布（酵素抗体法）
A；損傷部（I）と非損傷部（N）の境界域に帯状のTfを認める（×16），B；境界域ではTfは主に壊死線維内に認められるが間質にも分布する（×50）

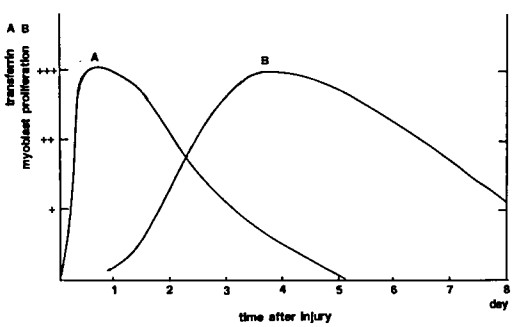


図3　損傷筋組織におけるTf及び筋芽細胞増殖の経時的変化

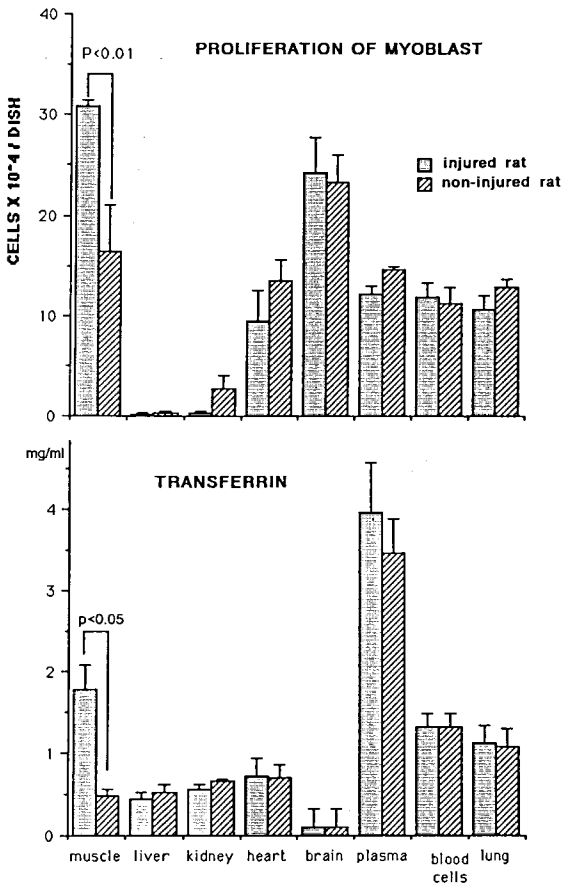


図4　筋損傷ラットにおける各種臓器抽出液の筋芽細胞増殖性とTf

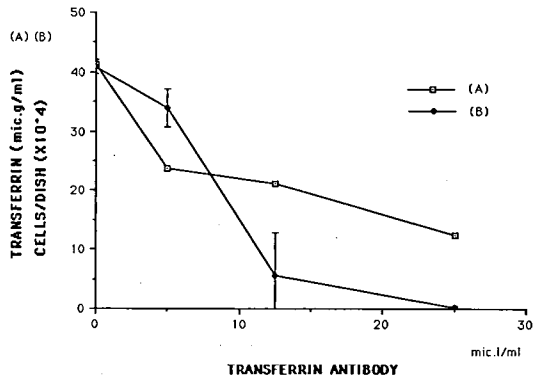


図5　抗Tf抗体を加えた損傷筋抽出液のTf及び筋芽細胞増殖性

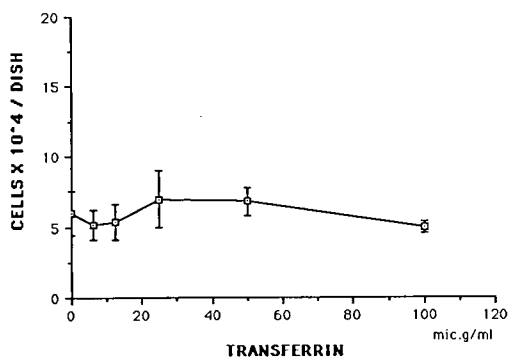


図6　Tf添加による培養筋芽細胞の増殖

(3)　抗Tf抗体を加えた損傷筋抽出液の筋芽細胞増殖性

抗Tf抗体の添加量に比例して，培養中のTfの量が減少した．筋芽細胞の増殖も抗Tf抗体の添加量に比例して抑制された（図5）．

(4)　Tf添加による培養筋芽細胞の増殖

培養液に種々の濃度のTfを添加しても筋芽細胞の増殖に有意の変化を認めなかった（図6）．

考　　察

筋損傷後の再生過程における我々のこれまでの研究では，損傷筋組織には筋芽細胞増殖因子(MPF)が存在し，MPFは損傷12時間後にピークを持って出現する[7]．筋芽細胞の増殖はそれより遅れて損傷3日後に最大となり，損傷部と非損傷部の境界域より再生が始まることがわかった[8]．今回損傷筋組織のTfの分布を免疫組織学的に検索した結果，Tfの出現は損傷12時間後に最大となり，その時間経過はMPFの経過とほぼ一致してみられた．又Tfの出現部位は筋再生の場である境界域の壊死線維内及び間質に認められた．これらの事よりTfは早期の筋再生過程に関連した物質であることが示唆された．

抗Tf抗体を加えた損傷筋抽出液による筋芽細胞増殖を検討した場合でも，抗Tf抗体により筋芽細胞の増殖が抑制され，Tfは筋芽細胞の増殖に関連した因子であることがわかった．

しかし筋損傷ラットの各種臓器抽出液の筋芽細

胞増殖性とTf量を検討した場合では，両者に明らかな相関はみられなかった．特にTf量は血漿が損傷筋より約2倍も多かったが，筋芽細胞増殖性はむしろ損傷筋抽出液がより高かった．つまり損傷筋抽出液による筋芽細胞増殖作用は，Tfのみによるとすると矛盾する結果であった．

又Tfの添加による培養筋芽細胞増殖性を検討した場合，Tfの添加のみでは筋芽細胞の増殖はみられなかった．Bischoffも種々の哺乳動物（ラット，ウシ，ヒト）の鉄飽和Tfを培養液に加え，ラット筋衛星細胞の活性について検討したが，いずれのTfにても活性化させることはできなかったと報告している[9]．以上の結果をまとめるとTfは筋損傷後の再生過程の一因子と考えられるが，Tfだけでは筋芽細胞増殖の引金にはならないと考えられた．

ではTfに類似していて筋芽細胞を増殖に導く物質はどのようなものであろうか．このことについて最近興味ある二つの報告がある．Brownらはヒト黒色腫に特異的に存在する膜抗原蛋白P97を発見した．P97は分子量は97Kで鉄を結合する性質をもち，TfのN末端とホモロジーがあり，P97に対する抗体はTfと交叉反応することが確かめられた[10]．又GoubinらはニワトリのB cell lymphomaのDNAをNIH3h3マウス細胞にトランスフェクトした後，癌遺伝子ChB lym-1を検出した．そのChB lym-1の塩基配列より予想される蛋白質はTfのNドメイン，CドメインのN末端側によく類似していることを報告した[2]．

これらのTf類似の蛋白は，腫瘍細胞の膜蛋白や癌遺伝子蛋白であり細胞の増殖因子である可能性を示唆している．又細胞膜のTf受容体は成長の盛んな細胞や，癌細胞に高密度で存在し，細胞増殖の表面マーカーとも言われている．分子生物学のめざましい進展とともに今後もおそらく増殖と関連したTf類似の蛋白がさらに明らかにされるであろうし，MPFもこれらに属するグループの増殖因子なのかも知れない．

まとめ

1）筋損傷早期より損傷筋組織にTfの増加を認めた．2）損傷筋抽出液の培養筋芽細胞増殖性は，抗Tf抗体の添加により抑制された．3）損傷筋ラットの各種臓器抽出液のTf量と筋芽細胞増殖性の関連性はみられない．4）Tf添加のみでは培養筋芽細胞の増殖はみられない．

以上より，Tfは筋損傷後の初期再生過程に関連した因子であるが，Tfだけではラット筋芽細胞増殖の引金にはならないことがわかった．従ってMPFはTfに類似するがTfとは異なる物質と考えられた．

文　献

1) 小林和夫，高瀬貞夫ほか：実験的再生筋における筋芽細胞増殖因子の研究．臨床神経 27：1602，1987．
2) Goubin G, Goldman DS et al: Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA. Nature 302: 114—119, 1983.
3) Tormey DC, Imurie RC et al: Identification of transferrin as a lymphocyte growth promoter in human serum. Expel Cell Res 74: 163—169, 1972.
4) Barnes D and Sato G: Serum-free cell culture: a unifying approach. Cell 22: 649—655, 1980.
5) Ii I, Kimura I et al: A Myotrophic protein from chick embryo extract: Its purification, identity to transferrin, and indispensability for avian myogenesis. Dev Biol 94: 366—377, 1982.
6) 高瀬貞夫，小林和夫：脱神経による筋芽細胞増殖因子への影響，“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究”（杉田班）昭和63年度研究報告書，1989，p95．
7) 高瀬貞夫，小林和夫ほか：実験的再生筋における筋芽細胞増殖促進因子について，“厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究”（杉田班）昭和60年度

研究報告書，1986，p151.
8) 高瀬貞夫，小林和夫ほか：凍結損傷による筋病変の組織学的研究，“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病態とその病因に関する研究”（杉田班）昭和62年度研究報告書，1988，p279.
9) Bischoff R: A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. Dev Biol 115: 140—147, 1986.
10) Brown PJ, Hewick RM et al: Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin. Nature 296: 171—173, 1982.

32）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

寺尾寿夫*

研究協力者　高津成美*　加藤洋司*　岡下恭子*
永井由紀子*　弘中哲治**　五十里良生**
荒畑喜一***

はじめに

最近，Law[1]，Partridge[2]，Karpati[3]らは，正常のmyoblastをジストロフィー動物の筋に注射することにより，ジストロフィー筋の性質を正常化することを試みている．

われわれも正常のmyoblastのジストロフィー筋への注射を行って，その変化につき研究しているが，本報告は現在までの結果をまとめたものである．

方法

1）myoblastの採取および培養

正常のmyoblastはC57 BL/10ScSn（以下B-10と略す）の生後1～4日目の幼若マウスの下肢筋を取り出し，血管，神経，筋膜，腱などを取り除いた後にtrypsin処理し，沪過後collagen coating dishに移し，培養を行って得たものである．なお使用したmediumはDulbecco's modified Eagle medium（66%）にmedium199（23%）とFBS（10%）を加えたものである．

培養の終ったprecursor cellはtrypsinを用いて再び集め，遠心後適量のmediumを加えて5×10^7/mlになるようにし，筋に注射した．

2）注射法

Hostは生後2か月のmdxマウスでターゲットとした筋は主として長指伸筋（EDL），一部は大腿四頭筋を用いた．注射は筋の数か所に分割して行い，1本のEDLにつき，注射する細胞数は3×10^6前後とした．

なお注射は経皮的に行う他，皮膚を切開し，直接筋を見ながら注射し，注射後皮膚を縫合する方法もとった．

3）組織学的・電気生理学的研究

注射後，種々の時間後取り出し，組織学的に検討し，また抗ジストロフィン抗体を用いて免疫組織化学的に観察した．

なお，myoblast注射後2か月のEDLにつき電気生理学的に収縮特性の変化を調べたが，この際には刺激は*in vivo*で行い，twitch tensionの測定には0.2m secのsupramaximal square pulsを，またtetanic tensionには100Hz，31回の刺激を使用して測定した．

4）Cyclosporin Aの投与

一部のマウスには拒絶反応を抑制するため，cyclosporin A（Cy A）を使用して実験を行った．この場合にはCy AをmdxマウスのEDL体重1kg当り50mgの割合にオリーブ油を溶かして，30日間連続経口投与した．Myoblastの注射は経口投与開始の翌日行い，Cy Aの経口投与終了後2週～1か月後に，sacrificeして検討した．

結果

図1は正常myoblast注射後2か月のmdxのEDLに見られた再生部位のH-E染色を示している．中心核を有するmdxの筋線維に囲まれて，やや細い再生筋線維がみられる．これらの再生筋は注射による機械的損傷後活性化されたmdx由来

＊帝京大学医学部第一内科
＊＊帝京大学医学部薬理
＊＊＊国立精神・神経センター神経研究所

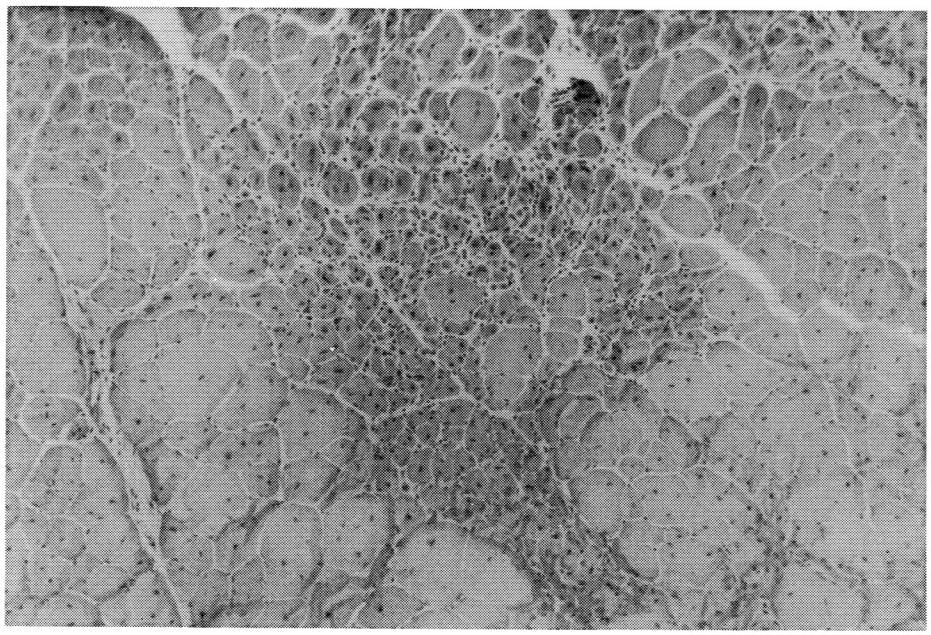


図1　正常 myoblast 注射後2か月の mdx の EDL（H-E 染色）

の myoblast や，注射された B-10の myoblast から形成されたものと思われる．

このような再生筋線維を抗ジストロフィン抗体を用いて immunostaining を行ったのが図2である．一部に抗ジストロフィン抗体で染色される線維がみられる．これらのジストロフィン陽性の筋線維群は注射時の筋損傷後の再生時に，B-10の myoblast がとり込まれ，mosaic 線維を形成したか，または B-10の myoblast 同志から生ずる myotube 由来の筋線維のいずれかであると考えられる．

図3も同様なジストロフィー陽性の線維群を示すが，よく見ると筋線維膜は一様に染色されず，膜の一部のみが染色されたり，全周が染色されても著しく不均一だったりする線維があるのがわかる．

図4は縦切りの陽性線維を示すが，ジストロフィンは非常に長い範囲に亘って証明される．Karpati[3] によると，陽性線維の部分は90～800μm に達するというが，われわれの所見もこれと一致していた．

なお myoblast 注射後には，一部に拒絶反応と思われる細胞浸潤がみられる．図5はその1例を示している．但し，このような組織像は medium のみ注射した EDL または単に生食のみを注射した場合にも見られることがあり，真の拒絶反応との鑑別は H-E 染色のみでは必ずしも容易ではない．

上述の如く，B-10の myoblast 注射後のジストロフィン陽性の線維は数本の線維群としてしか現れないが，その理由としては，1）注射された precursor cell は僅かしか移動しないこと，2）Karpati[3] らが指摘しているように，注射時筋肉中にとどまらず，流出してしまうものが多いこと，3）拒絶反応が起こることなどが考えられる．

そこでわれわれは拒絶反応を抑制するため，cyclosporin A を使用して実験を行った．Cy A の投与法は方法の項で述べた通りであるが，Cy A 使用下に正常 myoblast の注射を行った mdx の EDL の抗ジストロフィン抗体による染色でも，ジストロフィン陽性の線維数が増加したという所見は得られなかった．

一方，拒絶反応とみられる細胞浸潤について Cy A 投与群と非投与群を比較すると，投与群で

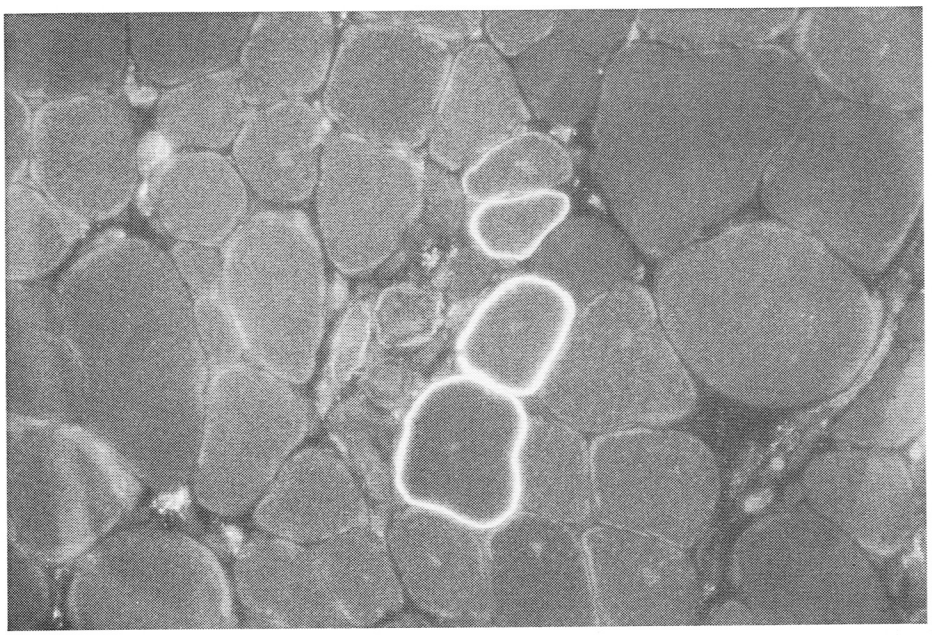


図 2　正常 myoblast 注射後 2 か月の mdx の EDL の抗ジストロフィン抗体による immunostaining

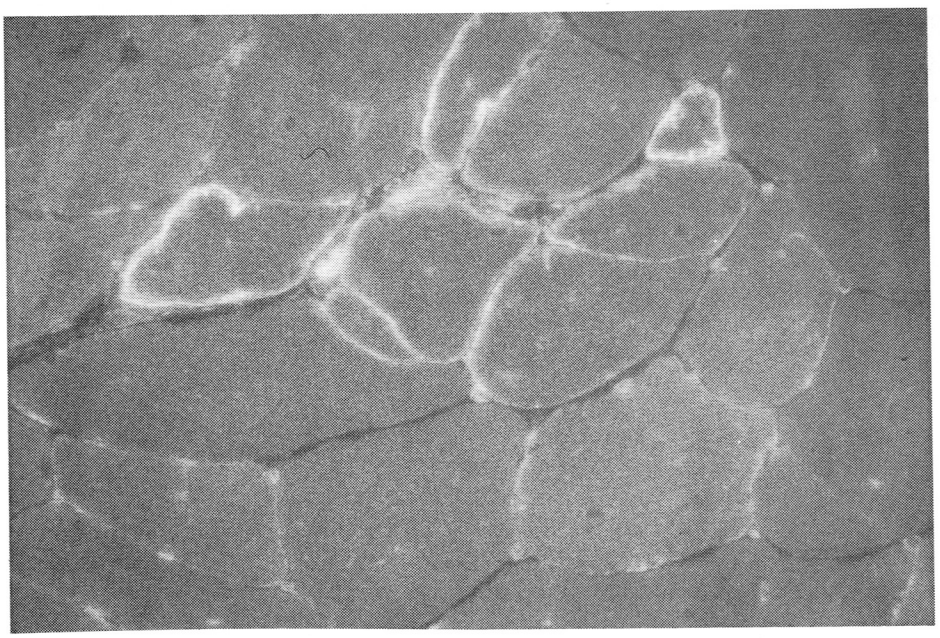


図 3　正常 myoblast 注射後 2 か月の mdx の EDL の抗ジストロフィン抗体による immunostaining

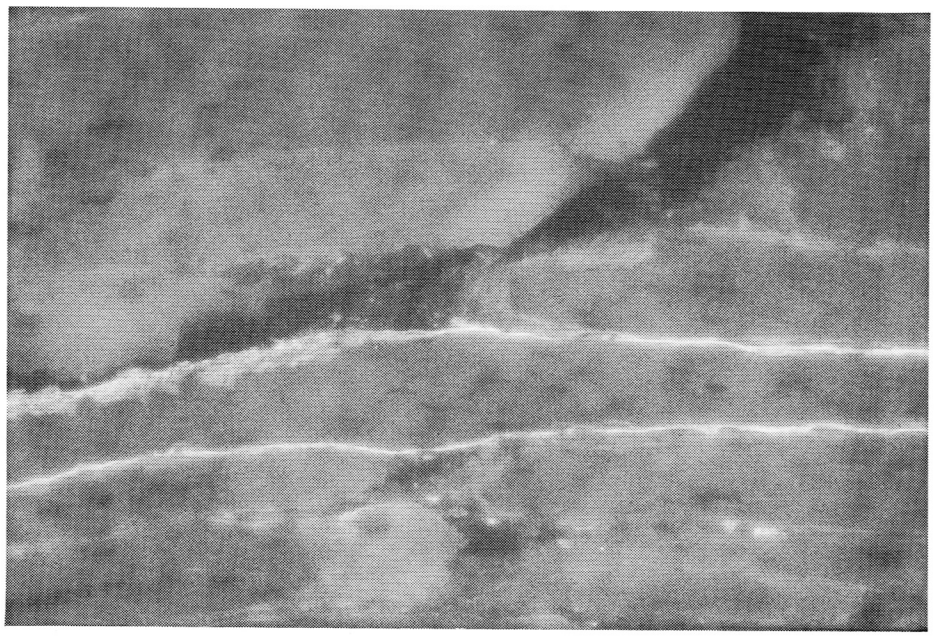


図4　正常 myoblast 注射後 2 か月の mdx の EDL の抗ジストロフィン抗体による immunostaining（縦切り）

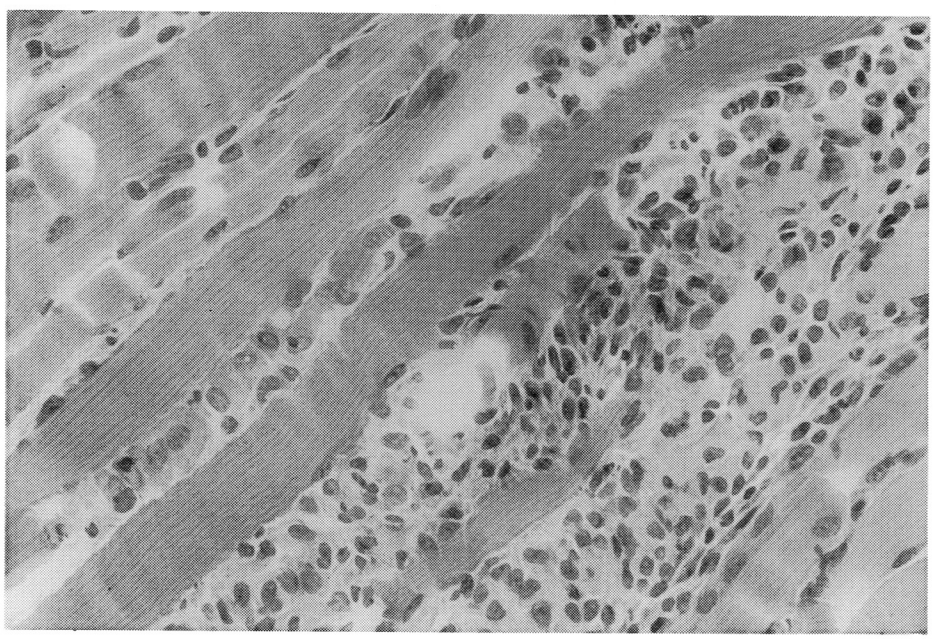


図5　正常 myoblast 注射後 2 か月の mdx の EDL にみられた細胞浸潤

減少がみられたが，Cy A 投与例でも細胞浸潤は10匹中3匹にみられた．そのため Cy A の投与量，投与期間などにつき検討中である．

次にわれわれは，正常 myoblast を注射した mdx の EDL の収縮力に変化がみられるか否かについて電気生理学的な測定を行った．10匹の mdx の一側の EDL に正常の myoblast を 2 ～ 3 ×10^6 注射し，他側の EDL には同量の medium を注射して，2か月後に収縮特性を比較した．これらの mdx には全例 Cy A を50mg/kg，30日間経口投与した．

その結果 myoblast 注射 EDL の単位断面積当りの twitch tension は46.5±10.0（対照 55.9±21.7），同じく tetanic tension は92.5±29.4（対照114.7±61.7）で，対照との間に有意な差はみられなかった．

なお，これについては myoblast 注射後の経過を追って検討中である．

考　　案

正常 myoblast のジストロフィー筋への注射は Law ら[1]により始められ，その後 Partridge[2]，Karpati[3]らにより研究されている．元来ヒトの骨格筋は HLA の class 1 抗原を欠き[4]，動物の骨格筋も H2抗原を持たないことが知られている[5]ので，移植後の拒絶反応は弱いと考えられるが，myoblast 注射に際しては拒絶反応が起こってくることは確かなようである．そのため Partridge らは mdx マウスをヌード化した double mutant のマウスを host として用い，Karpati らはヒトの myoblast をクローン化して注射している．また Law らも C57BL/6J の immunocompatible な host と donor を使用したり，Cy A を用いたり[6]している．

われわれは cyclosporin A を使用したが，拒絶反応の抑制や収縮力の改善には不充分であり，なお検討が必要と思われる．

Law ら[1]によれば，ジストロフィー筋に正常 myoblast を注射した場合，再生筋の出現が筋力の回復に役立ったのは2つの場合が考えられる．第1は正常の donor の myoblast がジストロフィーの host の satellite cell と fuse して mosaic fiber が形成され，ジストロフィーの発現が抑制される場合である．第2は正常の donor の myoblast 同志が fuse して正常の筋管細胞が作られ，これから生ずる正常の筋線維が作られることである．

事実彼は mdx の soleus に正常の myoblast を注射し，6か月後に筋の重量が増加し，tetanic tension も増すことを示している[1]．しかしわれわれの注射後2か月目の EDL の結果は twitch および tetanic tension ともに増加がみられなかった．これが実験に使用した筋の差によるのか，注射後の時間の差によるのか，他の原因によるのかは明らかでない．

Karpati ら[3]によれば，ヒトの myoblast を mdx の quadriceps に10^6程度注射した場合，ジストロフィン陽性の線維は全体の4～7％しかみられないという．したがってこれを増すためにはさらに多くの myoblast を注射する技術的な問題の解決が必要である．

結　　語

1）B-10マウスの下肢筋の myoblast を培養し，これを生後2か月目の mdx マウスの EDL 等に 3 ×10^6 個注射した．

2）注射後2か月目に筋を取り出して観察すると注射部位に再生筋線維が多数みられ，これを抗ジストロフィン抗体を用いて免疫組織化学的に染色するとジストロフィン陽性線維の数本の束が出現していた．

3）myoblast 注射後の筋肉中の拒絶反応を抑制するため，host に Cy A を50mg/kg，30日間に亘り毎日経口投与したが，細胞浸潤を完全に抑制することはできなかった．またジストロフィン陽性の線維の増加もみられなかった．

4）mdx の EDL に正常 myoblast を注射し，2か月目に電気生理学的に調べた．しかし，対照の EDL に比し，単位断面積当りの twitch tension, tetanic tension, contraction time, half-relaxation time は有意の変化がみられなかった．

文　献

1) Law PK, Goodwin TG and Wang MG: Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. Muscle and Nerve 11: 525—533, 1988.
2) Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP and Kunkel LM: Conversion of mdx myofibers from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. Nature, 337: 176—179, 1989.
3) Karpati G, Pouliot Y, Zubrzycka-Gaarn E et al: Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. Am J Path 135: 27—32, 1989.
4) Appleyard ST, Dunn MJ, Dubowitz V and Rose ML: Increased expression of HLA ABC class 1 antigens by muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, inflammatory myopathy, and other neuromuscular disorders. Lancet 1: 361—363, 1985.
5) Ponder BAJ, Wilkinson MM, Wood M and Westwood JH: Immunohistochemical demonstration of H2 antigens in mouse tissue sections. J Histochem Cytochem 31: 911—919, 1983.
6) Law PK, Goodwin TG, and Li H-J: Histoincompatible myoblast injection improves muscle structure and function of dystrophic mice. Transplant Proc 20: 1114—1119, 1988.

VII. ミトコンドリア(1)

33）ヒトミトコンドリアDNA・Dループ領域の塩基配列の解析

宝来　聰*

研究協力者　早坂謙二*　村山久美子*

制限酵素切断型多型による分析で，ヒトmtDNAは，顕著な人種特異性を示す事が知られている．我々は，95人のヒトの胎盤から得たmtDNAのnon-coding領域の塩基配列を決定した．これらの配列は，Dループ領域を形成しているほとんどの領域を含む少なくとも482塩基対である．既に決定されている6個体の配列と合わせた比較分析の結果，数多くの塩基置換・挿入・欠失という注目すべき特徴が観察された．配列間の塩基置換数の平均値は1.45%と算出され，この値はmtDNAのゲノム全体を対象とした制限酵素による解析から得られた値よりも3～4倍高い．さらに，高頻度に変化しやすい部位も同定された．この14塩基対の部分では，17種類の異なる配列が同定された．また，塩基置換の97%以上がトランジッション型によるものであった．また，塩基置換・挿入・欠失の部位の分布には偏りが観察された．系統解析では，コーカソイド間，モンゴロイド間での相違よりも，ネグロイド間での相違の方が大きいことが明らかになった．事実，ネグロイドの一部は系統樹においては最初に分岐している．系統樹による解析できわだった知見は，モンゴロイドが異なった2つのグループに分けられることである．モンゴロイドの一部の分岐は，ネグロイドの一部の最初の分岐に続いて起こっている．残りのモンゴロイドはその後コーカソイドと共に分岐している．このことは，制限酵素による解析から日本人のなかには2つの異なったグループが存在することを示した我々の以前の研究を確証するものであった[1]．

＊国立遺伝学研究所

対象および方法

mtDNAは，3大人種よりなる95人の胎盤から得た．内訳は制限酵素による解析で異なったタイプを示す61人の日本人，日本人以外のモンゴロイド10人（朝鮮人3人，中国人4人，インドネシア人，フィリピン人，パプアニューギニア人各1人），コーカソイド17人，異なる7つの地域出身のアフリカ人7人である．胎盤よりmtDNAを分離精製し，Kpn I，Sac Iの2重消化を行い，non-coding領域（Dループ），約500塩基対を，pBluescriptにクローニングし，ダイデオキシ法によって塩基配列を決定した[2]．Kpn Iサイトは，non-coding領域では，1あるいは2サイトをもつ個体がありKpn IおよびSac I消化により得た563塩基対あるいは482塩基対の断片の配列を決定した．

結　果

すでにこの領域の配列が決定されている6個体の配列を含めて計101個体の配列を比較したところ，563塩基のうち113の部位で多型性を示した（図1）．この図では，Andersonらにより報告されたnoncoding領域のL鎖の塩基配列を示してある[3]．Kpn Iサイト1とSac Iサイトは，すべての個体でみられたが，Kpn Iサイト2は多型性を示した．そのため，各個体において563塩基対あるいは482塩基対のクローニングと配列決定を行い，100個体の配列についてAndersonによる配列と比較した．図1では，少なくとも一個体で観察された塩基置換・挿入・欠失をAndersonらの配列の下に示してある．合計113サイトで，変異が観察され，4つのサイトでは2種類の異なる塩基置換が

```
KpnI-1
GGTACCACCC AAGTATTGAC TCACCCATCA ACAACCGCTA TGTATTTCGT ACATTACTGC
↑                                            C      CC         C
bp 16048
                           KpnI-2
CAGCCACCAT GAATATTGTA CGGTACCATA AATACTTGAC CACCTGTAGT ACATAAAAAC
T     A                A    T C    C    A   T T    G       GGG  T

CCAATCCACA TCAAAA----CCCC CTCCCCATGC TTACAAGCAA GTACAGCAAT CAACCCTCAA
 T  C   T   T  --CCCCTTTT AC  TT  A              C  GAT  C T CTTTC  G
                          G                                  G

CTATCACACA TCAACTGCAA CTCCAAAGCC A-CCCCTCACC CACTAGGATA CCAACAAACC
  GCAGT       GTC      C  G G  A  C TT CT T   G    A    T G   G TT
                                         A

TACCCACCCT TAACAGTACA TAGTACATAA AGCCATTTAC CGTACATAGC ACATTACAGT
  TT GTTTC C    CC     G C       TAT  CC T          G          T
     C

CAAATCCCTT CTCGTCCCCA TGGATGACCC CCCTCAGATA GGGGTCCCTT GACCACCATC
     T TC    TAC      C                        A    T    G

CTCCGTGAAA TCAATATCCC GCACAAGAGT GCTACTCTCC TCGCTCCGGG CCCATAACAC
                   C     T           C                        G

TTGGGGGTAG CTAAAGTGAA CTGTATCCGA CATCTGGTTC CTACTTCAGG GTCATAAAGC
                   A              G                        C

CTAAATAGCC CACACGTTCC CCTTAAATAA GACATCACGA TGGATCACAG GTCTATCACC
                                                     G  A

                     SacI
CTATTAACCA CTCACGGGAG CTC
                     ↑
                    bp 36
```

図1 Nucleotide sequences of the major noncoding region
The sequence reported by Anderson et al (1981) is shown in the upper lines with the base numbers. Mutations observed at least in one individual are shown in the lower lines. -'s stand for deletions/insertions and letters represent base substitutions. Cloning sites (SacI and KpnI-1 or KpnI-2) are also indicated by bold face letters. A hypervariable domain is boxed.

観察された．また，塩基置換はこの領域の配列の3′側よりも5′側に，より高頻度に観察された．これら多型部位のうち，塩基置換によるものが106部位であった．また一塩基の欠失・挿入の起きている部位が7カ所で観察された．観察された配列変異をパターンの違いに従って分類したものを表1に示した．全てのデータからの分類では，トランジッション型による変異の方がトランスヴァージョン型によるものよりも圧倒的に顕著であった．すなわち97%はトランジッション型であり，トランスヴァージョン型はわずか3%であった．さらに，ピリミジン塩基間（T—C間）でのトランジッションはプリン塩基間（A—G間）より高頻度に起こっていた．各サイトにおける塩基置換数を数えたところ，なおトランスヴァージョンより10倍多くトランジッションが観察された．本研究では，すでに報告されているmtDNAのnoncoding領域でのいくつかの配列の特徴を確認すると共に[4),5)]，2箇所で塩基Aの欠失を，5箇所で塩基Cの挿入を観察した．これらの挿入・欠失は，AあるいはCが連続的に繰り返されている特殊な領域で見つかっている．また，多型部位の分布を調べたところ，non-coding領域中においてもかなりの偏りが観察された（図2）．ヒストグラムは連続する20塩基

表 1　Analysis of nucleotide substitutions, deletions and insertions

Type of mutation		Observed number	
		Whole data	Each position
Substitution	T → C	229	27
	C → T	137	41
	A → G	34	22
	G → A	46	10
	Transition	446	100
	C → A	6	5
	C → G	1	1
	A → C	2	2
	A → T	2	1
	G → C	1	1
	Transversion	12	10
% Transition		97%	91%
Deletion	A → -	32	2
Insertion	- → C	69	5

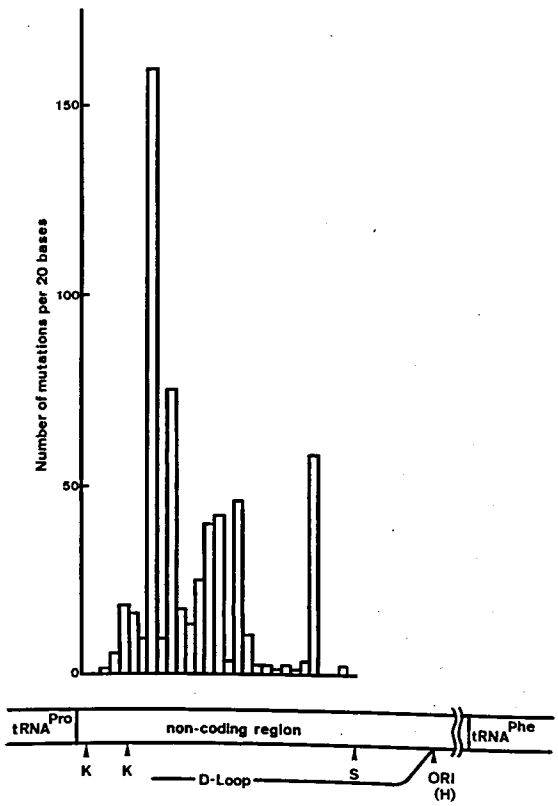


図 2　Distribution of mutations
The histogram shows the total number of base substitutions, deletions and insertions within contiguous non-overlapping blocks of 20 iases. A hypervariable domain is apparent near one of the KpnI sites within the D-loop region. K and S stand for KpnI and SacI recognition sites, respectively, used for cloning.

の配列内での変異数の合計を示してある．高頻度に変異が起こっている部分は，tRNA-Pro 遺伝子側にみられ，1箇所だけ高い多型性を示す部分が，Sac I サイト側にも観察された．この部分は3大人種全てにおいて多型性を示すことより，古い由来の多型によるものと思われる．超可変領域は16178bp から16197bp までの20塩基の中に存在することが明らかになった．このように変異の分布に顕著な偏りが観察されたことは，D ループ内においても機能上の制約に差異があることを示唆している．超可変領域では，わずか14塩基の領域で，塩基置換・欠失・挿入等で17種類の異なる配列が観察された．すなわち約60%の個体が表 2 中の No.1配列であったが，その他の個体では C ストレッチ内の塩基置換，T から C の置換とそれに伴う C ストレッチの伸長と A ストレッチの減少などの種々の配列が観察された．表 2 中の J1，J2は，制限酵素による分析での日本人のグループ I とグループ II に相当している．特に No. 10から No. 17 の配列にみられる A および C の塩基数の変異は，mtDNA の複製時の誤りによるものと考えられる．またこの T から C (bp16189) へのトランジッションは異なる系統の中で何回か起こっていることが，系統樹による分析により確認された．以上のように non-coding 領域の多型性はいちじるしく，制限酵素切断型多型分析による nucleotide diversity の値（0.4%）の約 4 倍の値（1.5%）を示し，ヒトの集団内変異を同定するのに極めて有効な領域であると考えられた．

101個体の配列間の塩基置換数をもとに，Unweighted Pair Grouping 法（UPG 法）[6] により系統樹を作成した（図 3）．クラスタリングのパターンから，少なくとも C1から C10までの10個の

表2 Mitochondrial DNA sequences in a hypervariable domain and observed numbers in the three racial groups

	mtDNA sequences	C	N	M	J1	J2	Total
1.	AAAA----CCCCCTCCCC	15	5	7	1	33	61
2.	AAAA----CCCCCTCCCT	1	-	-	-	-	1
3.	AAAA----CCCCCTCCTC	-	-	1	-	-	1
4.	AAAA----CTCCCTCCCC	-	-	-	-	1	1
5.	AAAA----CCCTCTCCCC	-	-	-	-	3	3
6.	AAAA----CCCTCCCCCC	-	2	-	1	-	3
7.	AAAA----CCCTGCCCCC	-	1	-	-	-	1
8.	AAAA----TCCTACCCCC	-	1	-	-	-	1
9.	AAAA----CCTCCCCCCC	1	-	-	-	-	1
10.	AAAA---CCCCCCCCCCC	1	-	1	-	3	5
11.	AAAA--CCCCCCCCCCCC	1	-	-	-	-	1
12.	AAA-CCCCCCCCCCCCCC	-	-	-	1	-	1
13.	AAA--CCCCCCCCCCCCC	-	-	-	1	-	1
14.	AAA---CCCCCCCCCCCC	1	-	-	4	4	9
15.	AAA-----CCCCCCCCCC	-	-	-	-	1	1
16.	AA--CCCCCCCCCCCCCC	-	-	-	4	2	6
17.	AA---CCCCCCCCCCCCC	-	1	1	2	-	4
	Total	20	10	10	14	47	101

N, C, M, J1 and J2 stand for Negroids, Caucasoids, non-Japanese Mongoloids, Japanese group 1 and Japanese group 2, respectively.

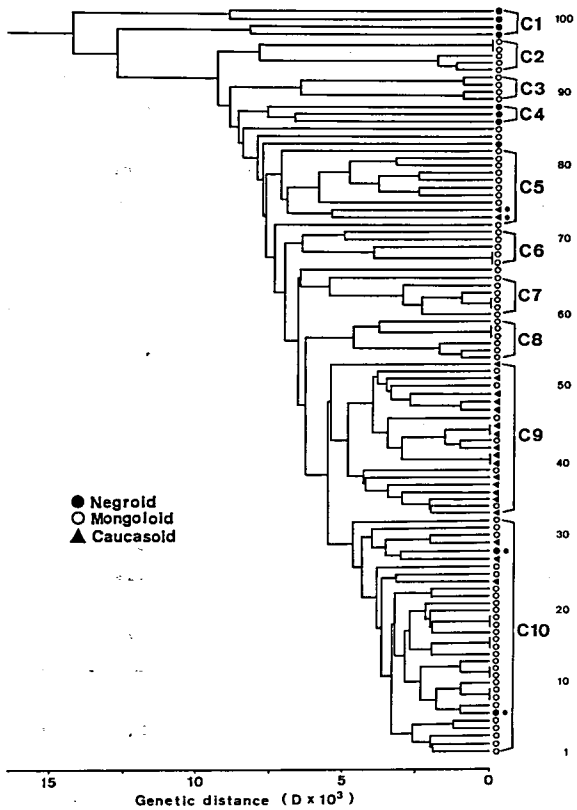


図3 A phylogenetic tree showing the 101 mtDNA lineages from the three racial groups
All lineages are tentatively classified into ten clusters designated as C1 to C10. Distances (D) are expressed by the number of nucleotide substitutions/site/lineage.

クラスターに分類することができる．これらのクラスターの中で，C5, C9, C10は異なる人種が混じり合っている．しかし，残り7つのクラスターは同じ人種から形成されている．C1とC4は黒人クラスターで，C2, C3, C6, C7, C8はモンゴロイドにより形成されている．コーカソイドについては特有なクラスターがないが，C9はおもにコーカソイドより成り立っている．C1に属する黒人は他のクラスターから最初に分岐し，続いて，2つのモンゴロイド集団（C2とC3）が残りの黒人（C4）と他のクラスターから分岐した．これは，モンゴロイド集団の一部は他のモンゴロイド集団と異なった系統的位置づけになることを示唆している．この結果は，黒人の一部とモンゴロイドの一部が残りの個体から最初に分岐したという，我々の制限酵素による解析を確認するものである[7)~9)]．

さらに我々が明らかにしてきた日本人が2大クラスターに分かれることが，今回の日本人以外のアジア人の分析によりモンゴロイド集団としての特徴であることが明らかとなった．人種内および人種間の比較分析では，黒人集団の多様性が著しく，モンゴロイドの一部（日本人のグループIに相当）がそれに続き，白人集団と他のモンゴロイド集団（日本人のグループIIに相当）内の多様性が低い値を示した．

文　献

1) Horai S and Hayasaka K: Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial

DNA. Am J Hum Genet, 1990 (in press).
2) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463—5467, 1977.
3) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MHL, Coulson AR Drouin J, Eperon ICE et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457—465, 1981.
4) Aquadro CF and Greenberg BD: Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. Genetics 103: 287—312, 1983.
5) Greenberg BD, Newbold JE and Sugino A: Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. Gene 21: 33—49, 1983.
6) Sokal RR and Sneath PHA: Principles of numerical taxonomy. W.H.Freeman, San Francisco, 1963.
7) Horai S and Matsunaga E: Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese. II. Analysis with restriction enzymes of four or five base pair recognition. Hum Genet 72: 105—117, 1986.
8) Horai S, Gojobori T and Matsunaga E: Distinct clustering of mitochondrial DNA types among Japanese, Caucasians and Negroes. Jpn J Genet 61: 271—275, 1986.
9) Horai S, Gojobori T and Matsunaga E: Evolutionary implications of mitochondrial DNA polymorphism in human populations. "Human Genetics" (ed by Vogel F & Sperling K) Proceedings of the 7th International Congress, Springer-Verlag, Heidelberg, 1987, pp 177—181.

34）シトクロム酸化酵素小サブユニット遺伝子のクローニングとその発現様式

水野美邦*

研究協力者　太田成男**　中野康伸**
富永　薫**　大塚美恵子***

はじめに

ミトコンドリア脳筋症において，シトクロム酸化酵素欠損がしばしば見られる[1]．シトクロム酸化酵素の3サブユニットはミトコンドリアにコードされており，残りの10小サブユニットは核DNAにコードされている[2]．また，これらの小サブユニットは，抗体との反応性などが各組織によって異なっており，組織特異的に遺伝子が発現することが想像されている[2]．実際，SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって，心筋と肝臓で分子量の異なるサブユニットが検出されている[3]．また，サブユニット6aでは，cDNAのクローニングによって，別の遺伝子にコードされていることが明らかとなっている[4]．

ミトコンドリア脳筋症においてシトクロム酸化酵素の小サブユニットの異常遺伝子の同定の報告はないが，ミトコンドリア脳筋症患者の中には，シトクロム酸化酵素の小サブユニットの欠損に起因する例もあると思われる．とりわけ，ミトコンドリア脳筋症の組織特異的発症とシトクロム酸化酵素小サブユニットの組織特異的発現や組織特異的アイソフォームの存在の関連は注目に値する．

昨年は，サブユニット6cのcDNAクローニングについて報告したが[5]，ひきつづき，小サブユニットcDNAのクローニングをすすめ，各組織に於ける発現量を調べた．また，塩基配列の決定された遺伝子についての遺伝子診断法についても述べる．

＊順天堂大学医学部脳神経内科
＊＊自治医科大学生化学
＊＊＊自治医科大学神経内科

実験方法

PCR (polymerase chain reaction) によるクローニング

発表された塩基配列[6)~8)]を基にオリゴヌクレオチドを作製し，ヒト繊維芽細胞cDNAライブラリーをPCRの鋳型として各々のcDNAをPCR[9)]で増幅した．アガロース電気泳動で対応するバンドを切り出し，もう一度PCRにて増幅した．これによって，サブユニット4，6a，8のcDNAをクローニングした．

アイソフォームの遺伝子のクローニングの試み

直腸癌細胞cDNAライブラリーをPCRクローニングしたcDNAをプローブとして，スクリーニングした．アイソフォームのcDNAクローニングのためにハイブリダイズの条件を50℃にした．

Northern blot

死後1.5時間の剖検組織より，全RNAを抽出，精製した．凍結した組織を液体窒素温度下で乳鉢で粉末にして，グアニジンチオシアネートに溶解する．ついで，超遠心法によってCsFクッションを通し精製した．そして常法によりクローン化されたcDNAをプルーブにして，各組織のmRNAの量をNorthern blotにより，検索した．

PCRによるmRNAの半定量化

全RNAをシトクロム酸化酵素欠損株と正常株から上に述べた方法により分離し，サブユニット4と6cのcDNAの5′側と3′側の配列のオリゴヌクレオチドを作製し，2組のプライマーとRNA0.1μgを混ぜて，PCRし，アガロース電気泳動にて分画した．また，全RNA中のmRNA量をNorthern blotで，定量した．

結　　果

cDNA のクローニング

シトクロム酸化酵素小サブユニット遺伝子のクローニングに関する論文は1989年のみで，10を越し，ヒトの cDNA でクローニングされていないのは，サブユニット7b のみとなった[10]（表）．しかし，アイソフォームの遺伝子のクローニングは，緒についたばかりである．私たちは，今回直腸癌組織から作製した cDNA ライブラリーをスクリーンし，サブユニット6a，8の cDNA をクローニングして，塩基配列を決定し，Shorn らの報告した肝 cDNA と比較した[7),8)]．結果は，発表された塩基配列と完全に一致した．ハイブリダイズの条件を弱くし，アイソフォームの cDNA をクローニングできることを期待したが，陽性クローンはすべて同一であり，6a，8の新たなアイソフォームの遺伝子はクローニングできなかった．

シトクロム酸化酵素小サブユニット遺伝子の組織特異的発現

次に剖検組織から抽出した RNA を用いて，各々のサブユニットの mRNA の相対量を比較した．図1に結果を示す．例えば，6c は肝細胞でよく発現しており，8は腎で肝よりも発現しているなど，各々のサブユニット遺伝子によってその相対量は一定ではなかった．心筋と骨格筋の遺伝子発現も各サブユニットによって異なっていた．

微量組織からの mRNA の半定量と遺伝子診断

小サブユニット遺伝子の塩基配列が明らかとなったので，PCR による遺伝子の増幅が可能になった．そこで，次に，微量組織における mRNA の半定量を試みた．Northern blot による方法は，組織が0.1μg ほど必要で微量生検組織から mRNA を定量するのは困難である．全 RNA0.1μg を oligo dT をプライマーとして，逆転写酵素で cDNA を作製し，PCR によって増幅した．プライマーは，サブユニット4と6c の cDNA の5′側と3′側配列に相補的な2組のプライマーを作製し，4種のプライマー共存下で PCR により増幅した．その後アガロース電気泳動により分画した．サブユニット4と6c の cDNA に対応するバンドが2本みられ，その比率は Northern blot の結果と一致した（図2）．したがって，PCR 法によって mRNA の相対量は定量化できると結論された．この方法によって，小サブユニットの欠失などの

表　シトクロム酸化酵素小サブユニット遺伝子のクローニングの現状（Trends Biochem Sci 14: 501—503, 1989より抜粋）

COX subunit	No. of amino acids	Bovine tissue	N-Terminal sequence	cDNAs			Genes	Human chromosomes	Refs
				Bovine	Human	Rat			
IV	147	Heart	AHGS	+	+	+	bovine: 2 human	 15(*COX4*) 14(*COX4P1*) *COX4X*	a, b, c, d e,
Va	105	Heart	SHGS	−	+	+	human: 2–4		f, g
Vb	98	Heart	ASGGG	+	+	−	human: 6–7		h, i,
VIa	84	Heart	ASAAKGDH	+	+	+	human: 1–2	15(*COX6A*)	i, j, k, l, m,
	84	Liver	SSGAHGEE	−	+	+	human: 4–6		l, m, n
VIb	85	Heart	AcAEDI	+	+	−			o, p
VIc	73	Heart	STAL	+	+	+	rat: >2		o, q, r, s, t
VIIa	56	Heart	FEQRVA	−	−	−			
	61	Liver	FENKVP	+	+	−	bovine: 8–9		u, v, w
VIIb	56	Heart	SGYS	+	−	−			o
VIIc	47	Heart	SHYEEGPG	+	+	−	bovine: 6–7 human: 3		k, w
VIII	46	Heart	ITAKPA	+	none	−			o
	44	Liver	IHSKPP	+	+	+	human: 1*	11(*COX8*)	o, s, x,

a Lomax, *et al.* (1984) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81, 6295–6299; b Zeviani, *et al.* (1987) *Gene* 55, 205–217; c Gopolan, *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 1276; d Bachman, *et al.* (1987) *Gene* 55, 219–229; e Lomax, *et al. Gene* (in press); f Rizzuto, *et al.* (1988) *Gene* 69, 245–256; g Droste, *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 4375; h Zeviani, *et al.* (1988) *Gene* 65, 1–11; i Francke, pers. commun.; j Grossman, Aqua, and Lomax, unpublished; k Schon, pers. commun.; l Schlerf, *et al.* (1988) *EMBO J.* 7, 2387–2391; m BeMent and Lomax, unpublished; n Fabrizi, *et al. Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 6409; o Capaldi, pers. commun.; p Taanman, *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 1766; q Otsuka, *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 16, 10916; r Parimoo, *et al.* (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 118, 902–909; s Suske, *et al.* (1987) *Eur. J. Biochem.* 168, 233–237; t Suske, *et al.* (1988) *DNA* 7, 163–171; u Seelan, *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 6410; v Fabrizi, *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 117, 7107; w Aqua, *et al. Nucleic Acids Res.* (in press); x Rizzuto, *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 10595–10600.

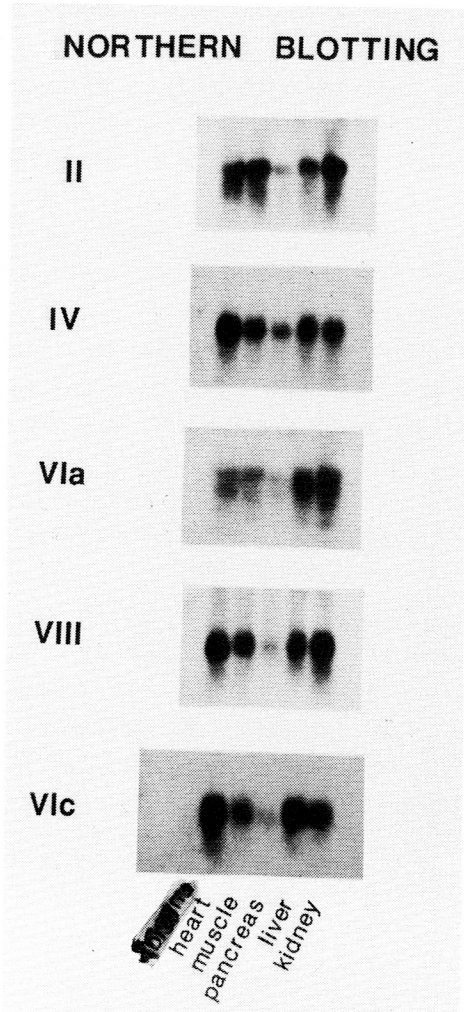


図1　シトクロム酸化酵素小サブユニットのヒト各組織に於ける遺伝子発現．左の数字は，各サブユニットに対応する．各々のサブユニットの相対値が組織によって異なり，組織特異的なアイソフォームの存在を仮定すると説明できる．

遺伝子診断が可能となった．

考　　察

1989年には，シトクロム酸化酵素核遺伝子のクローニングについての10を越す論文が発表され，関心の高さを物語っている[10]．私たちは昨年ヒトサブユニット6cのクローニングについて報告し，今年度は，4を繊維芽細胞（DNAライブラリー）より6a，8のcDNAを直腸癌細胞よりcDNAをクローニングした．アイソフォームのクローニングも試みたが，未だ成功していない．今後は，アイソフォームの遺伝子のクローニングが精力的に行われると思われる．

クローニングされたcDNAを用いて，各組織におけるmRNAの相対量をみた．もしも，各サブユニットの遺伝子が一種類であるならどの組織でも相対量は一定であることが期待される．ところが結果は，各サブユニット遺伝子の発現は組織によってまちまちで，複雑な発現様式を示した．これは，組織特異的に発現するアイソフォームの存在を仮定すると説明できる．

つぎにPCRを用いた半定量法を開発した．cDNAのクローニングによって塩基配列が決定され，PCRが適用できるようになったからである．2組のプライマーを共存させて，cDNAを増幅させるとその相対量が維持されるので，PCR法によって相対量を半定量化できることが明らかとなり，PCRによる遺伝子診断に道を開いた．この，増幅されたcDNAの塩基配列を直接決定することも可能である．

文　　献

1) Capardi RA : Mitochondrial myopathies and respiratory chain proteins. Trends Biochem Sci 13 : 144—148, 1988.
2) Kadenbach B et al : Evolution of a regulatory enzyme : Cytochrome-c oxidase (Complex IV). "Current topics in Bioenergetics" (ed by Lee CP) Academic Press, 1987, Vol 15, pp114—162.
3) Kadenbach B et al : Tissue-specific genes code for polypeptide VIa of bovine liver and heart cytochrome c oxidase. FEBS Letters 138 : 236—238, 1982.
4) Schlerf A et al : Characterization of two different genes (cDNA) for cytochrome c oxidase subunit VIIa from heart and liver of the rat. EMBO J 7 : 2387—2391, 1988.

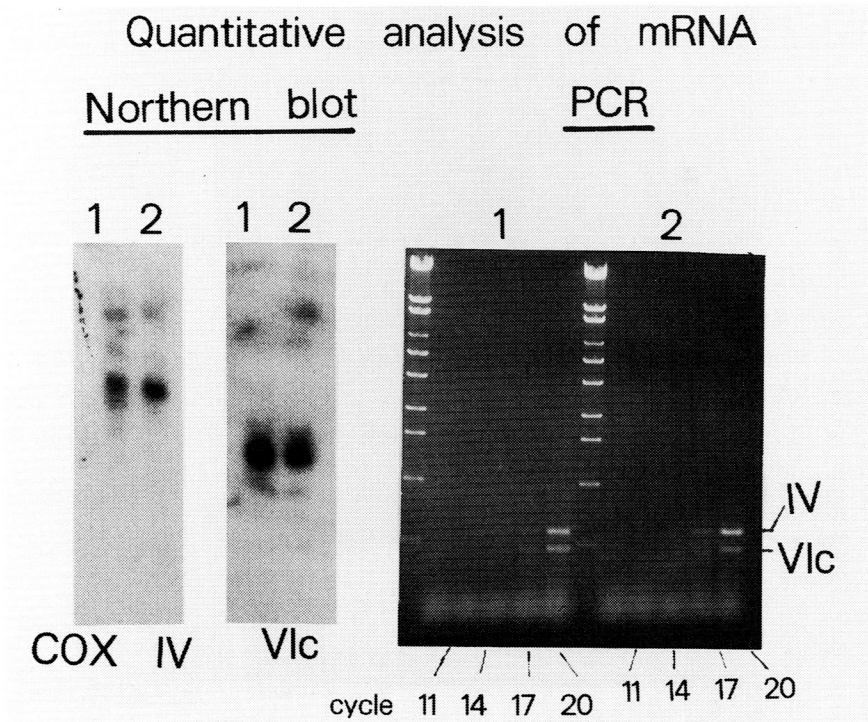


図2　PCR による mRNA の半定量法
左は，Northern blot で，1は，シトクロム酸化酵素正常株，2は欠損株（Shimoizumi et al : cytochrome c oridase-deficient myogenic cell lines in mitochondrial myopathy, Ann Neurol **25** : 615, 1989）.
右は，2組のプライマー存在下での PCR．サイクル数をかえてアガロース電気泳動によって，2つのサブユニット遺伝子を分離した．Northern blot でも PCR でも，シトクロム酸化酵素欠損株（2の列）でサブユニット VIc が減少している．

5) Otsuka M et al : Nucleotide sequence of cDNA encoding human cytochrome c oxidase subunit VI c. Nuc Acids Res **16** : 10916, 1988.
6) Zeviani M et al : Isolation of cDNA clone encoding subunit IV of human cytochrome c oxidase. Gene **55** : 205—217, 1987.
7) Fabrizi GM et al : Sequence of a cDNA specifying subunit IV a of human cytochrome c oxidase. Nuc Acids Res **17** : 6409, 1989.
8) Rizzuto et al : A gene specifying subunit VIII of human cytochrome c oxidase is localized to chromosome II and is expressed in both muscle and nonmuscle tissues. J Biol Chem **264** : 10595—10600, 1989.
9) Saiki RK et al : Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239** : 487—491, 1988.
10) Lomax MI and Grossman LI : Tissue-specific genes for respiratory proteins, Trends Biochem Sci **14** : 501—503, 1989.

35）MELAS クローン化筋細胞の分子遺伝学的検索

桃　井　真里子*

研究協力者　太　田　成　男**　富　永　　薫**
下　泉　秀　夫*　小　林　葉　子*

はじめに

MELAS (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes) 発症の機序を遺伝子レベルで解明するには，酸化リン酸化に関連する酵素活性の失われた細胞株を分離確立することが必要である．

私たちは，昨年報告したように，MELAS 患者骨格筋生検試料から，筋芽細胞を分離し，複製開始点を欠く SV40ウイルス DNA を導入することによって，形質転換し，培養細胞をクローン化した[1]．これらのクローンのなかには，シトクロム酸化酵素活性の欠損した細胞株がみられた[2]．同時にシトクロム酸化酵素活性を有する筋芽細胞株も同時に分離することができた[2]．

MELAS 筋組織においてシトクロム酸化酵素の活性がモザイク状に欠損していることがしばしばみられ，本症の特徴のひとつで病因をさぐるうえで重要な視点である．同一の患者の同一組織からシトクロム酸化酵素欠損株と正常株が同時に分離されたことは，組織化学の結果と一致し，これらの培養細胞系におけるシトクロム酸化酵素欠損の原因の究明は MELAS における酵素欠損の機構を明らかにすることを意味すると言える．

シトクロム酸化酵素は，核遺伝子とミトコンドリア遺伝子の二重支配を受けている．すなわち，3サブユニットはミトコンドリア DNA にコードされ，残りの10サブユニットは，核遺伝子にコードされている[3]．そこで，酵素活性の失活は，ミトコンドリア遺伝子の異常によるものか，核遺伝子の異常によるものなのかを決定することが，まず必要である．

本研究では，シトクロム酸化酵素サブユニットをコードしているミトコンドリア DNA の塩基配列を決定することによりその病因を明らかにしようと試みた．さらに，核にコードされる小サブユニットの mRNA 量を Northern blot により比較し，核 DNA 遺伝子の発現についても考察した．

実　験　法

培養細胞

患者骨格筋からの筋芽細胞株の分離および，シトクロム酸化酵素欠損株の分離については昨年報告した．

ミトコンドリア DNA の塩基配列決定

全 DNA を培養細胞から分離し，BamHI で切断後ショ糖密度勾配超遠心法によって部分精製し，PCR 法[4] (polymerase chain reaction method) によって mtDNA 断片を増幅した．さらに非対称 PCR[5] で一本鎖 DNA を増幅し，その DNA 断片をそのまま塩基配列決定の鋳型として，dideoxy nucleotide chain termination 法によって塩基配列を決定した．この方法によっては明瞭な結果が得られなかった領域については，PCR で mtDNA 断片を増幅し M13ファージ DNA にサブクローニングし，塩基配列を決定した．

mRNA の定量

培養細胞をグアニジンチオシアネートで処理し，抽出し，CsCl 密度超遠心法によって全 RNA を分離精製した．Northern blot は常法に従った．サブユニット I，II，III のプローブは mtDNA を PCR で増幅した DNA 断片を用いた．サブユニット 4，6a，6c，8 のプローブはクローン化された cDNA を用いた[6),7)]．

＊自治医科大学小児科
＊＊自治医科大学生化学

結　　果

ミトコンドリア内の転写

昨年までの結果によりシトクロム酸化酵素欠損株のmtDNAにはSouthern blotによって検出される程度の欠失は認められていない．したがって，もし，mtDNAに異常があるならば，点変異か短い欠失である．また，可能性としては，転写の低下も考えられる．そこで，まず，mtDNAにコードされるサブユニットI，II，IIIのmRNA量をNorthern blotにより調べた．結果は，図1に示すようにシトクロム酸化酵素欠損株と正常株では量，長さ共に差が認められなかった．

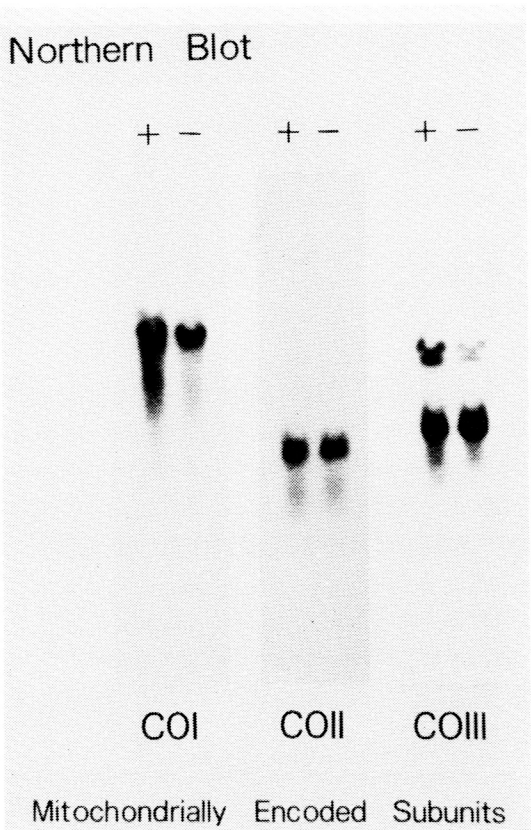


図1　ミトコンドリアDNAにコードされるシトクロム酸化酵素サブユニットI，II，IIIの転写
＋は，シトクロム酸化酵素正常株，－はシトクロム酸化酵素欠損株．mRNAの長さ，量に＋－間で有意な差が認められない．

mtDNAの塩基配列

ミトコンドリアの転写に異常がなかったので，mtDNAに異常があるとすればシトクロム酸化酵素サブユニットの構造遺伝子に変異があると思われた．そこで，シトクロム酸化酵素欠損株のmtDNAのシトクロム酸化酵素サブユニット領域の塩基配列を決定し（図2），報告されたヒトmtDNA塩基配列と比較した．その結果，10の塩基置換が認められた（図3）．このうち，6塩基は，アミノ酸の変換を伴わない変化であり，1塩基は，tRNAの変化であった．残りの3塩基はアミノ酸の変化を伴う変化であったので，同じ患者から得たシトクロム酸化酵素正常株のミトコンドリアDNAの塩基配列も決定し比較した．この正常株のmtDNAの塩基配列もシトクロム酸化酵素欠損株のmtDNAのと同一であり，また他の動物種のmtDNAで塩基配列が保存されておらず，これらの変異はシトクロム酸化酵素活性に影響を及ぼさないと結論された（図3）．

核DNAにコードされる小サブユニットの転写

次に核にコードされる小サブユニットのmRNA量をNorthern blot法によって調べた．全RNAを電気泳動後，ナイロン膜に写し取り，クローニングされたcDNAをプローブとして各々のmRNA量を調べた．結果は図4に示すように6cが減少しており他のサブユニットには，変化がなかった．

考　　察

シトクロム酸化酵素のサブユニットは核遺伝子とmtDNA遺伝子にコードされているので，シトクロム酸化酵素欠損の原因として，ミトコンドリアDNAの異常か核DNAの異常か，あるいは双方かを決定する必要がある．mtDNAの異常か否かを決定するにはmtDNAの塩基配列を決定すればよい．昨年報告したように，シトクロム酸化酵素欠損株ではすべてのミトコンドリアのシトクロム酸化酵素が欠損していたので，もし，mtDNAに異常があるとすれば，均一であると仮定した．そこで，mtDNAの塩基配列をPCR直接塩基配列決定法で決めた．結果として，少なくともシト

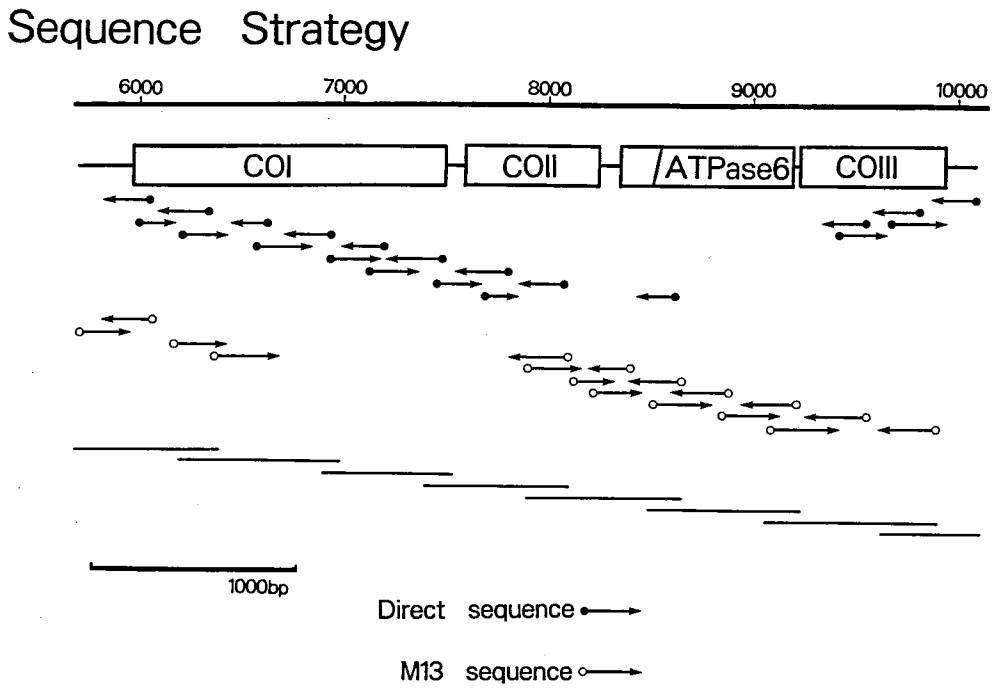


図2　塩基配列決定法
PCR法でDNA断片を増幅し(———)，非対称PCR法によって，あるいはM13ファージに組み込んで，一本鎖DNAを作製し，塩基配列決定のための鋳型にした．

クロム酸化酵素のサブユニットをコードする領域には，ミトコンドリアDNAの異常はみつからなかった．問題点としては，別の複合体のサブユニットをコードする領域に異常があって，その複合体の分子集合などの異常によって，シトクロム酸化酵素の活性が影響をうけるという新しい考え方の可能性も理論的には否定できない．しかし，現段階では，シトクロム酸化酵素サブユニット領域のミトコンドリアDNAに異常がないことが確定したので，核遺伝子の異常によってシトクロム酸化酵素欠損がひきおこされる可能性が強い．

しかし，もし，核遺伝子の異常とすれば，何故同一患者の同一部から採取した細胞で酵素活性が異なるのかを説明するのは容易ではない．核DNAは免疫系細胞を例外とするとすべての組織で核DNAは同一であると考えられているので，組織特異的に発現する遺伝子の異常によると考えなければ，説明できない．また，転座などによって，遺伝子発現が組織特異的に，あるいは細胞特異的に変化するようになった可能性も考えられる．しかし，同一部から得た細胞がどのように異なって遺伝子発現様式に変化を与えるのかについては現在の知識では容易に説明できない．

核遺伝子のサブユニット6c遺伝子の発現が欠損株で有意に減少していたが，これは，シトクロム酸化酵素欠損の原因と考えるよりも酸化リン酸化の異常により二次的に引き起こされたものと考えている．

いずれにしても，現在の知識では説明がつかない現象が見られ，MELASの発症には未知の機構が働いていると考えられる．今後は，ミトコンドリアDNAの異常によるのか否かを確定するためにミトコンドリアDNAの全塩基配列を決定し，もし，ミトコンドリアDNAに異常が見つからなければ，発現ベクターライブラリーDNAを欠損株に導入し，酸化リン酸化の回復を指標に核

	HeLa	COX(-)	
COI	ATA(6737)	ATG	(Met)
	GCC(7028)	GCT	(Ala)
COII	GCG(7600)	GCA	(Ala)
COIII	TGA(9377)	TGG	(Trp)
	TTA(9540)	CTA	(Leu)
	CCG(9575)	CCA	(Pro)

	HeLa	COX(-)	COX(+)	Bovine	Mouse	Xenopus
ATPase 6	ACC(8701)	GCC	GCC	AGT	CTA	CAA
	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Gln
	ACA(8860)	GCA	GCA	GCC	GCC	ACA
	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr
CO III	CGA(9559)	CCA	CCA	CCA	CCA	CCA
	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro

tRNA-Asp	HeLa	AAGGTA ------
	COX(-)	AAGATA ------
	COX(+)	AAGATA ------
	Bovine	GAGGTA ------
	Mouse	AAGATA ------
	Xenopus	GAGATG ------

図3　塩基配列の比較
HeLa 細胞の塩基と異なる塩基部分のみを記した．COX（−），COX（＋）は，それぞれシトクロム酸化酵素欠損，正常株を示す．

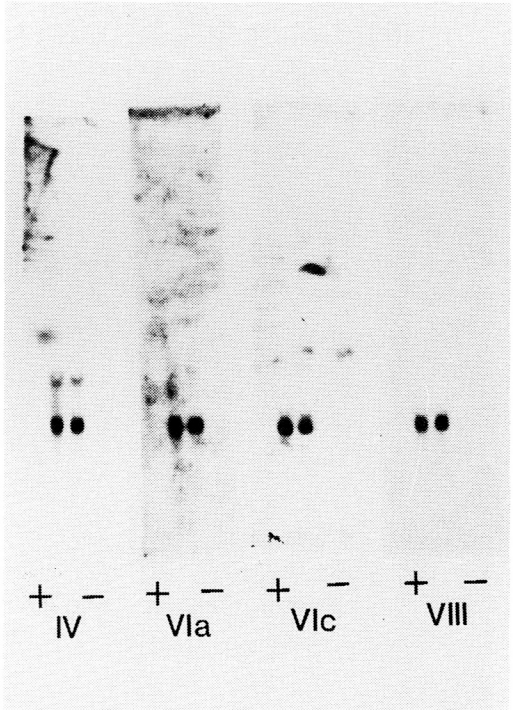


図4　核DNAにコードされるシトクロム酸化酵素小サブユニット遺伝子の転写
＋，−は，それぞれ，シトクロム酸化酵素正常株，欠損株を示す．IV，VI a，VI c，VIII は，それぞれ，各サブユニットをしめす．VI c においては，有意に欠損株でmRNA量が少なかった．

DNAの異常遺伝子の同定を試みようとしている．

文　献

1) Gluzman Y et al: Origin-defective mutants of SV40. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol **44**: 293—300, 1980.
2) Shimoizumi H et al: Cytochrome c oxidase -deficient myogenic cell lines in mitochondrial myopathy. Ann Neurol **25**: 615—621, 1989.
3) Capardi RA: Mitochondrial myopathies and respiratory chain proteins. Trends Biochem Sci **13**: 144—148, 1988.
4) Saiki RK et al: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**: 487—491, 1988.
5) Gyllensten UB and Erlich HA: Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. Proc Natl Acad Sci USA **85**: 7652—7656, 1988.
6) Otsuka M et al: Nucleotide sequence of cDNA encoding human cytochrome c oxidase subunit VIc. Nucl Acids Res **16**: 10916, 1988.
7) manuscript in preparation

36) Leber 病家系におけるミトコンドリア遺伝子解析

宮武　正*

研究協力者　米田　誠*　辻　省次*　田中恵子*
阿部春樹**　宝来　聰***　小澤高将****

はじめに

Leber 病は，思春期から成人期にかけて急性あるいは亜急性の視力低下で発症する遺伝性の視神経萎縮症である．視神経の病変以外にも WPW 症候群などの不整脈や，精神・神経症状を伴うことがある．母系遺伝を呈する家系が存在することや，骨格筋生検で形態異常を伴うミトコンドリアの増殖が認められることなどから，ミトコンドリアの遺伝子の異常が病因として推察されていた[1]．

最近，Wallace ら[2]によって Leber 病の病因に関連したミトコンドリア遺伝子の変異が初めて報告された．彼らは，北欧および北米の主に白人の Leber 病患者家系のミトコンドリア遺伝子を分析し，塩基番号11778の位置に G から A の置換が存在することを見いだし，この塩基置換が Leber 病の病因と関連があることを指摘した．この塩基置換によってミトコンドリア電子伝達系酵素複合体の NADH-dehydrogenase subunit 4 の340番目の Arg から His への置換が生じる．

ミトコンドリア遺伝子は核の遺伝子に比べ十数倍の高い頻度で自然の塩基置換を生じるため，正常でも人種間での多型性を有している．また，Leber 病は白人に多く発症することが知られており，彼らの見いだした塩基置換が Leber 病に関連するものなのか，正常でも認められる多型性に過ぎないのかを判断する必要があった．

そこで我々は，彼らの分析した家系とは全く人種的に独立した日本人の Leber 病の二家系のミトコンドリア遺伝子を解析し，この塩基変異が Leber 病に普遍的に存在するものかどうかを検討した[3]．

方　法

塩基番号11778の G から A の置換が制限酵素 *Sfa*NI の認識部位の消失を生じることから，患者および家族の白血球 DNA の *Sfa*NI による RFLP (restriction fragment length polymorphism) をクローン化したミトコンドリア DNA 断片をプローブとして用い，サザーン解析を行った．図1は，*Sfa*NI の制限酵素地図である．図の下には，プローブとして用いたクローン化 mtDNA 断片を示した．正常では，1.1kb，0.92kb，0.68 kb，0.37kb の4つの mtDNA 断片がこのプローブとハイブリダイズする．もし，日本人の Leber 病患者においても Wallace らが白人で見いだしたのと同一の塩基変異が塩基番号11778に存在すれば，一箇所の *Sfa*NI 認識部位の消失により0.92 kb および0.68kb の断片が消失し，新たに1.6kb の断片が現れることが予想される．

mtDNA に欠失や挿入などの大きな構築異常が無いことを確かめるため，他の制限酵素 *Hha*I, *Hind* III, *Hpa* II によって白血球 DNA を消化後，サザーン解析を行った．

次に，この *Sfa*NI の認識部位の実際の塩基配列を検討した．まず初めにこの部位をはさむ形で20 mer の oligonucleotide を合成し，TaqDNA polymerase を用い，一定の条件で denaturing, primer annealing, primer extension を40回繰り返し，この二つの primer ではさまれた233bp の遺伝子領域を PCR (polymerase chain reaction) [4]

＊新潟大学脳研究所神経内科
＊＊新潟大学医学部眼科
＊＊＊国立遺伝学研究所人類遺伝学
＊＊＊＊名古屋大学医学部第二生化学

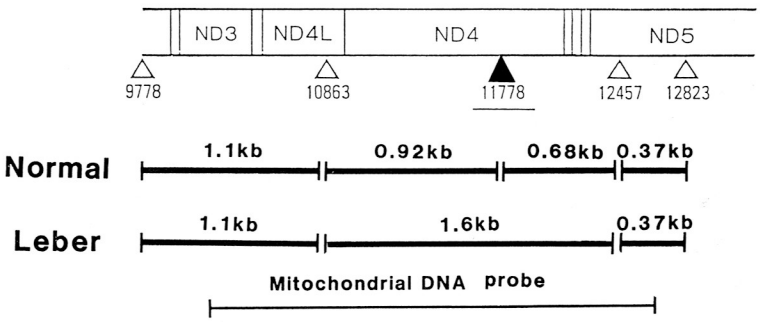


図1　制限酵素 *Sfa*NI の restriction map

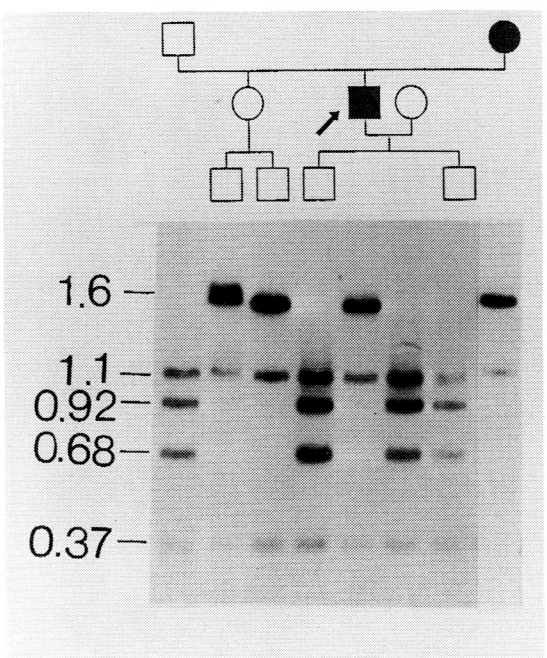


図2　Leber 病家系の制限酵素 *Sfa*NI を用いたサザーン解析（1）

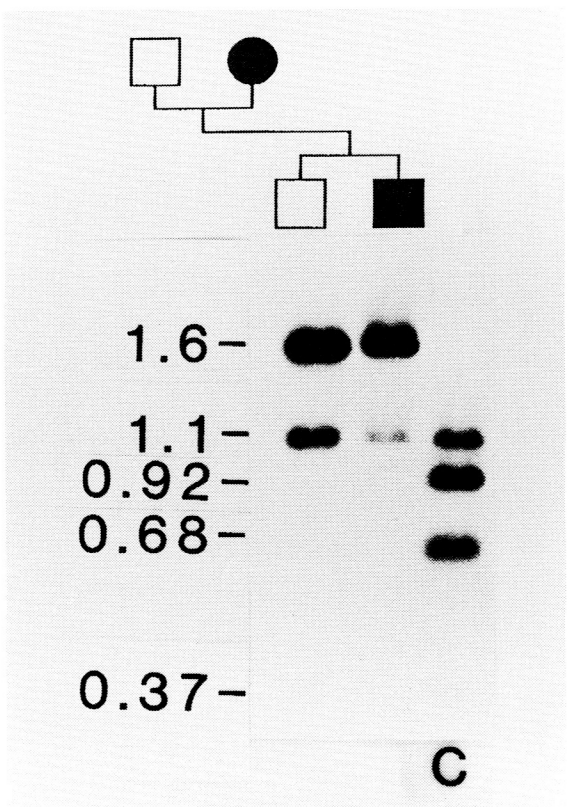


図3　Leber 病家系の制限酵素 *Sfa*NI を用いたサザーン解析（2）

を用い増幅した．さらに，このDNA断片をpUC19 plasmidにsubcloningし，Sanger法によって塩基配列を解析した．また，この得られた結果がPCRによるmisreadingあるいはcloning artifactである可能性を否定するため，PCRによって増幅したDNA断片のdirect seaquencingも同時に行った．

結果と考察

図2は一家系目の制限酵素*Sfa*NIを用いたサザーン解析の結果である．二人の発症者を含む4人で，通常では認められない位置に*Sfa*NI認識部位の消失による1.6kbのDNA断片が認められた．

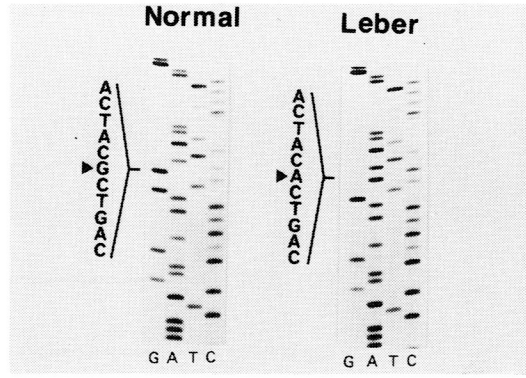


図4　正常人およびLeber病患者のミトコンドリア遺伝子の塩基配列Leber病においては塩基番号11778のGからAへの置換が見いだされる．

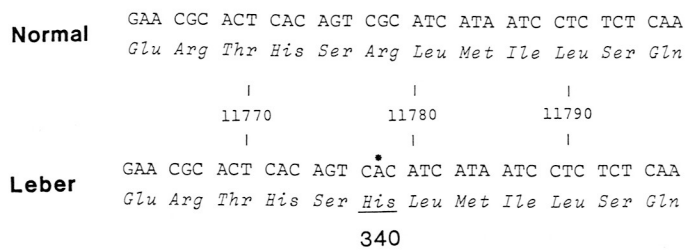


図5　Leber病患者におけるミトコンドリア遺伝子の塩基変異

ミトコンドリア病の一つである慢性進行性外眼筋麻痺においては，正常のmtDNAと変異を持つmtDNAが混在して存在しheteroplasmyをなすことが知られているが，今回分析したLeber病の家系のmtDNAにおいては，遺伝子のpopulationは単一で，変異mtDNAのみで構成されていた．また，この異常は女性を介してのみ三世代にわたって伝えられ，完全な母系遺伝形式をとっていた．この結果はミトコンドリア病が母系遺伝を示すことを遺伝子レベルで証明した例と考えられる．

図3は，二家系目のサザーン解析の結果である．この家系においても発症者及びその兄に1.6kbの異常なDNA断片が見いだされた．

他の制限酵素*Hha* I，*Hind* III，*Hpa* IIによるサザーン解析においては，発症者は正常と全く同一のパターンを示しmtDNAの大きな欠失やrearrangementはないことも確かめられた．

図4はsubclon化したPCR断片の塩基配列の解析結果である．今回分析した日本人のLeber病の二家系において，塩基番号11778の部位にGからAの塩基置換が認められた．PCRで増幅したDNA断片のdirect sequencingによっても同一の結果が得られた．この塩基置換はWallaceらが，北欧および北米の主に白人の家系において見いだしたものと全く同一の塩基置換であり，この人種を越えた塩基変異がLeber病の病因と断定しうると考えられた（図5）．

今後は，他のmtDNAの領域に塩基変異は存在しないのか，この塩基置換がNADH-coenzyme Q酸化還元酵素の高次構造・活性にどのように影響しているのか，なぜ病変が視神経に限局しているのかなどの問題が検討される必要があると思われる．

文　献

1）Nikoskeleinene E, Hassinen IE et al : Leber's

hereditary optic neuropathy, a maternal disease?. Lancet ii : 1474, 1984.
2) Wallace DC, Singh G et al: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science 242: 1427, 1988.
3) Yoneda M, Tsuji S et al : Mitochondrial DNA mutation in family with Leber's hereditary optic neuropathy. Lancet i : 1076, 1989.
4) Saiki R and Gelfeld DH: Primer-detected enzymic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487, 1988.

37）慢性進行性外眼筋麻痺におけるミトコンドリアDNA多重欠失のPCR法による分析

杉村公也*

研究協力者　大野欽司*　金桶吉起*　村山知行*
高橋昭*　斉藤浩一**　馬淵千之**
佐藤弥***　山本智子***　田中雅嗣***
小澤高将***

はじめに

近年，Kearns-Sayre症候群や慢性進行性外眼筋麻痺におけるミトコンドリアDNA（mtDNA）の欠失が明らかにされている[1]．正常の長さのmtDNAと大きな欠失を伴ったmtDNAの2種類のmtDNAが存在するheteroplasmy型の変異が，KSSとCPEOのおよそ1/3の症例において，Southern blot法により検出されている[2]．しかし，従来のSouthern blot法にて検出されるmtDNA欠失は，欠失mtDNAが全mtDNAの10%以上存在する場合に限られている[2]．我々は，より少数のmtDNA欠失を検出する目的で，polymerase chain reaction（PCR）法による骨格筋mtDNA欠失の検索を行なった．

対　象

対象は，慢性進行性外眼筋麻痺の3症例で，30歳・男，37歳・女，40歳・女である（**表1**）．症例2，3においては兄弟に難聴を認めた．症例1，3の両親はいとこ結婚であった．全例に眼瞼下垂・外眼筋麻痺を認めたが，網膜色素変性は認めなかった．症例3では，構音障害を認め，難聴は全例に認めた．心電図は，全例正常範囲内であった．症例1，3においては典型的なragged-red fiberを認めなかったが，形態学的にミトコンドリアの増加を認め，安静時の血清および髄液の乳酸・ピルビン酸も高値を示した．

表1　Symptoms and the laboratory results of the patients

Case	1 (H.K)	2 (F.S.)	3 (Y.Y)
Age, Sex	30 M	37 F	40 F
Onset	5	15	12
Family history	-	+	+
Consanguinity	+	-	+
Blepharoptosis	+	+	+
EOM limit	+	+	+
Pig. retinopathy	-	-	-
Dysarthria	-	-	+
Hypoacusis	+	+	+
EMG	WNL	WNL	WNL
RRF	-	+	-

方　法

Total DNAは，10mgの生検骨格筋をproteinase K/SDS処理後，phenol/chloroform処理を2回行い，ethanol沈澱により得た．

Southern blot分析は，mtDNAを1ケ所で切断する制限酵素*Pvu* IIを用いて50ngのtotal DNAを消化し，0.6% agarose gelにて電気泳動を行ない，membrane filterアルカリ・プロットした後，PCR法にて増幅したD-loop領域のmtDNA断片をプローブとしてhybridizationを行ない，ECL法により検出を行なった．

PCR法は，total DNA 10ngをtemplateとして用い，TakaraのGene Amp kitに従って反応

＊名古屋大学医学部神経内科
＊＊名古屋掖済会病院神経内科
＊＊＊名古屋大学医学部第二生化学

液を調製した．即ち10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 200μM deoxiribonucleoside triphosphateとした．反応に用いたprimer pairは7種類で，コントロールにおいて異常バンドが検出されないことが確認されたpairを用いた(**表2**)．反応はThermal cyclerのstep cycle programを用い，cycling parametersは，denaturing step 94℃×15秒，annealing step 45℃×15秒，extension step 72℃×80秒とし，35サイクルの増幅を行なった．

PCR法により検出された異常バンドがmisannealによるものでないことを確認するために，必要に応じてprimer shift法を行った．最初に増幅に用いたprimer pairをそれぞれ約300bpずつずらしてPCR増幅を行ない，そのずれに一致するだけ異常バンドの長さが変化することを確認した．

結　　果

Southern blot分析の結果，症例1と3ではコントロールと同じ16.6kbの正常mtDNAのみが検出されたが，症例2においては，16.6kbの正常バンドに加え，9.5kbの異常バンドを認め，7.1kbのmtDNA欠失の存在が示された（**図1**）．

mtDNAの塩基番号7,900から13,650の5.8kbの断片を増幅するprimer pair L790-H1363を用いたPCRの結果を**図2**左のパネルに示す．コントロールにおいて認められた5.8kbの正常バンドに加えて，症例1，2，3においては，1.1kbの異常バンドが認められた．

表2　Primer pairs used for the PCR

Primer pair	Flanking region	Distance
L4 - H580	nt.40 - 5820	5.78 kb
L434 - H815	nt.4340 - 8170	3.83 kb
L651 - H1136	nt.6510 - 11380	4.87 kb
L790 - H1363	nt.7900 - 13650	5.75 kb
L820 - H1338	nt.8200 - 13400	5.20 kb
L853 - H1338	nt.8530 - 13400	4.87 kb
L1076 - H1450	nt.10760 - 14520	3.76 kb

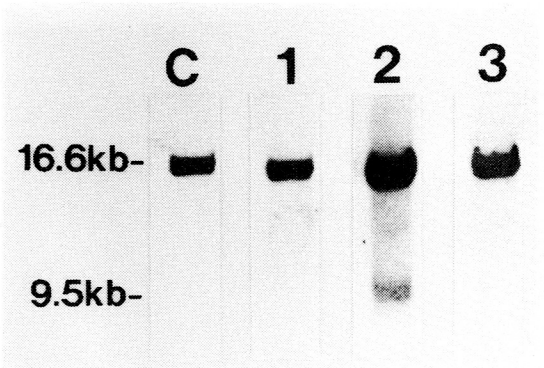


図1　Southern blot analysis

次に，この異常バンドがmisannealによるものでないことを確認するためにprimer shift PCR法[3]を行なった．**図2**中央のパネル（L820-H1338）に示すように，左のprimerをL790より0.3kb右方のL820に置換し，右のprimerをH1363より0.3kb左方のH1338に置換しPCR増幅を行なった．すなわち，primer pair L790-H1363よりprimer間距離が0.6kb短いprimer pair L820-H1338を用いて増幅を行なった．その結果，症例1，2，3に0.5kbの異常断片が増幅され，primer pair L790-H1363にて認められた1.1kbの異常バンドが4.7kbの欠失をもったmtDNAに由来するものであることが確認された．**図2**右のパネル（L853-H1338）は，右方のprimer H1338を固定したままで，左方のprimerを0.3kb右方のL853に置換してPCRを行なった結果である．期待された0.2kbのバンドは検出されず，症例1，2，3においてそれぞれ0.9, 0.3, 0.5kbの異常断片が増幅された．この結果，**図2**左のパネル（L790-H1363）と中央のパネル（L820-H1338）で認められた4.7kbのmtDNA欠失の開始点は，primer L820とL853の間，すなわち塩基番号8,201から8,531の間にあることが確認された．さらに，塩基番号8,531より右方から始まるmtDNA欠失は，症例ごとに異なっていることが示された．すなわち，症例1，2，3における，それぞれ4.0, 4.6, 4.4kbの欠失の存在が示唆された．

他の4種類のprimer pairを用いたPCR増幅

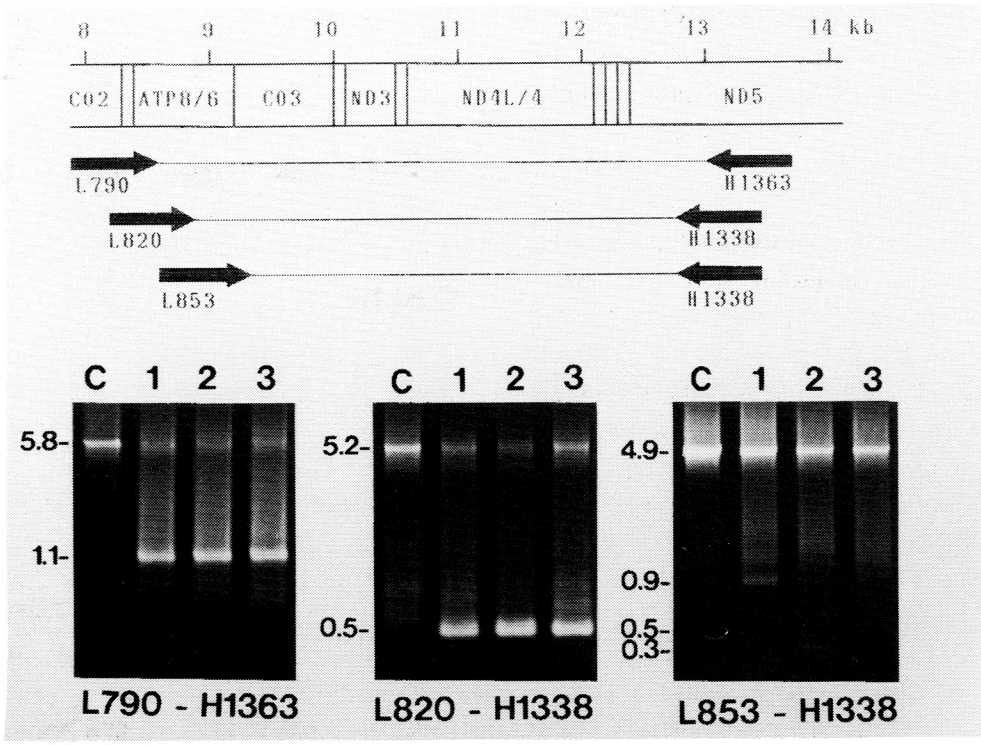


図2　Primer shift PCR method

の結果を含めて**表3**に示す．塩基番号40から5,820の5.8kbの断片を増幅するprimer pair L4-H580を用いたPCR増幅の結果，症例1と3にそれぞれ1.0kbと2.1kbの異常バンドを認め，それぞれ4.8kbと3.7kbの欠失の存在が示唆された．症例2においては，1.8, 1.3, 1.0kbの少なくとも3本の異常バンドを認め，この領域におけるmtDNAの複数の欠失(4.0, 4.5, 4.8kb)が示された．この領域は，12S rRNAとND2の間を増幅するprimer pairであり，この領域のmtDNA欠失は，我々が調べた限りでは，1例が報告されているのみである[1]．

塩基番号4,340から8,170の3.8kbの断片を増幅するprimer pair L434-H815を用いたPCR増幅の結果，症例1，2，3において，それぞれ0.7, 0.4, 0.7kbの異常バンドを認め，それぞれ3.1, 3.4, 3.1kbの欠失が示唆された．このprimer pairにより増幅される領域には，ND2とCO1の間にあるL鎖複製開始点が含まれており，このL鎖複製

表3　Muscle mtDNA deletions detected by the PCR

Primer Pair (Distance)		Patient 1	2	3
L4 - H580 (5.8 kb)	fragment*	1.0	1.8, 1.3, 1.0	2.1
	deletion†	4.8	4.0, 4.5, 4.8	3.7
L434 - H815 (3.8 kb)	fragment	0.7	0.4	0.7
	deletion	3.1	3.4	3.1
L651 - H1136 (4.9 kb)	fragment	0.4	0.6	0.4
	deletion	4.5	4.3	4.5
L790 - H1363 (5.8 kb)	fragment	1.1	1.1	1.1
	deletion	4.7	4.7	4.7
L820 - H1338 (5.2 kb)	fragment	0.6	0.6	0.6
	deletion	4.7	4.7	4.7
L853 - H1338 (4.9 kb)	fragment	0.9	0.3	0.5
	deletion	4.0	4.6	4.4
L1076 - H1450 (3.8 kb)	fragment	1.6, 0.8	1.6, 0.8	0.8
	deletion	2.2, 3.0	2.2, 3.0	3.0

Underlined are identified by the primer shift PCR method.
Sizes of the abnormal fragments and the calculated deletions are expressed in kb.
* Size of the abnormal fragments amplified by the PCR.
† Size of the mtDNA deletions calculated by subtracting the size of the abnormal fragments from the primer distance.

開始点を含む欠失が存在する可能性があり興味深い.

次に,塩基番号6,510から11,380の4.9kbの断片を増幅するprimer pair L651-H1136を用いたPCR増幅の結果,症例1,2,3において,それぞれ0.4,0.6,0.4kbの異常バンドが増幅され,4.5,4.3,4.5kbのmtDNA欠失が示された.この領域は,Southern blot法で確認された単一欠失の好発部位である.

さらに,塩基番号10,760から14,520の3.8kbの断片を増幅するprimer pair L1076-H1450を用いたPCR増幅の結果,3.8kbの正常バンドに加え,3症例に共通の0.8kbの異常バンドを認めた.これらは,3.0kbの欠失の存在を示している.さらに,症例1,2においては,1.6kbの異常バンドも認め,2.2kbの欠失も示された.この領域も前の領域と同様にSouthern blot法でのmtDNA単一欠失の好発部位である.

考　　察

PCR法により検出される異常バンドには,3種類の可能性がある.すなわち,①mtDNA欠失に由来するもの,②他のsampleのcontaminationによるもの[4],③primerの一方が期待したmtDNAの部位よりも内側にannealするか,あるいは,primerがともに核DNAの不定の部位にannealするものの3種類の可能性がある.これらのうち,②のcontaminationの可能性に関しては,症例ごとに異なる異常バンドがprimer pairを適当に選択することにより検出されることから,sample DNA間のcontaminationは否定される.さらに,コントロールでは異常バンドが検出されないことから,PCR反応系への他のsampleのcontaminationも否定される.③のmisannealの可能性に関しては,primer pairs L790-H1338とL820-H1338を用いたprimer shift法により否定される.しかし,他のprimer pairsに関しては,primer shift法を施行していないため,misannealか否かの判断は慎重でなくてはならない.しかし,今回用いた6種類のprimer pairsでは,いずれもコントロールでは,異常バンドが検出されなかったことから,misannealの可能性は低いと考えられた.

今回用いた7種類のprimer pairでは,異常バンドが全症例に検出され,mtDNA多重欠失が存在することが示唆された.L790-H1338とL1076-H1450のprimer pairによるPCR増幅で認められたように3症例に共通の欠失が存在し,mtDNA欠失には好発部位が存在することが示された.今回の症例については検索を行なっていないが,正常に存在する数bpのdirectly repeated sequenceにおけるrecombination類似の機構がmtDNA欠失の発生機序として提唱されており[5],今回の症例においても同様の機序がmtDNA欠失の発現に関与していると考えられた.症例2ではSouthern blot法にて7.1kb欠失を認め,正常mtDNAと欠失mtDNAの2種類が存在するheteroplasmy型の変異と判断されたが,PCR法ではさらに多種類のmtDNA欠失が検出された.これは,Southern blot法で検出された7.1kbの欠失は,多くのmtDNA欠失の中の1つのpopulationを示しているにすぎないことを示している.症例1,3では,従来のSouthern blot法では,16.6kbの正常バンドのみが認められたが,PCR法ではmtDNA多重欠失が検出された.生検骨格筋の量が少量であったため,PCR法で検出される欠失mtDNAの正常mtDNAに対する比率を,大量のDNAを用いたSouthern blot分析によって決定することはできなかった.しかし,PCR法のみにて検出される少量の欠失mtDNAであっても,それらの欠失mtDNAが多種存在し,総体として慢性進行性外眼筋麻痺を発症し得ると考えられ,mtDNA多重欠失が本症の病因であると考えられた.

文　　献

1) Holt IJ, Harding AE and Morgan-Hughes JA : Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331 : 717, 1989.

2) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M et al : Mitochondrial DNA deletions in progressive

external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Med **320**: 1293, 1989.

3) Sato W, Tanaka M, Ohno K, Yamamoto T, Takada G and Ozawa T: Multiple populations of deleted mitochondrial DNA detected by a novel gene amplification method. Biochem Biophys Res Commun **162**: 664, 1989.

4) Lo YD, Mehal WZ and Fleming KA: False-positive results and the polymerase chain reaction. Lancet ii : 679, 1988.

5) Tanaka M, Sato W, Ohno K, Yamamoto T and Ozawa T: Direct sequencing of deleted mitochondrial DNA in myopathic patients. Biochem Biophys Res Commun **164**: 156, 1989.

38) ミトコンドリアミオパチーのミトコンドリアDNAの解析
——Kearns-Sayre-Shy 症候群の一例について——

後藤幾生*

研究協力者　古谷博和*,**　山田猛*
小林卓郎*　榊佳之**

目的

Kearns-Sayre-Shy 症候群（KSS）を含むミトコンドリアミオパチーにおいてはこれまでに筋組織にミトコンドリアDNA（mtDNA）の欠失が高頻度に存在することが報告されている．しかしながらこの欠失は末梢血には認められず，欠失mtDNAの存在は組織により異っており，その機序に関しては不明である．

これまでに我々は3例のミトコンドリアミオパチーについてDNA blotting法とpolymerase chain reaction（PCR）を用いて欠失mtDNAの検出を試みたが，そのうち2例の筋組織mtDNAに欠失を認めた．今回そのうちのKSSの一例に関して，mtDNAの欠失領域を決定するとともに筋組織以外のmtDNAに関して欠失の有無を検討したので以下に報告を行う．

対象・方法

症例は36歳の女性．家族歴，既往歴に特記することはない．30歳頃より眼球運動障害で発症，35歳頃より年数回起こる痙攣発作を主訴として九大神経内科を受診した．

神経学的所見では眼瞼下垂，全方向への外眼筋麻痺，近位筋優位の軽度の筋力低下と筋萎縮を認めたが眼底に色素沈着はなかった．検査所見では心電図で不完全右脚ブロック，脳波で全般的な徐波化，MRI-CTでのcortical atrophy，髄液検査で髄液蛋白の上昇（90mg/dl）が認められた．また，筋電図で軽度のミオパチーの所見，筋生検でragged-red fiberが認められ，KSSと診断された．なお組織染色でcytochrome c oxidase部分欠損を認めたが電子伝達系酵素はcomplex IV（CCO）を含めて正常範囲内であった．

この患者の筋組織，培養線維芽細胞，末梢血中の白血球のmtDNAを抽出してサザンブロッティング，polymerase chain reaction（PCR）によりmtDNAの欠失の有無を調べ，その塩基配列を決定することでその領域を決定した．

結果

1．制限酵素 *Pvu* II，*Pst* Iで処理後，正常人cytochrome oxidase I（COI）領域をプローブとしてsouthern blottingを行ったところ，mtDNA中一ケ所しか認識部位の無い制限酵素 *Pvu* IIで処理した場合には，筋組織と培養線維芽細胞から抽出したmtDNAにおいて約16.5kbの正常バンドに加えて約14.5kbの短いバンドが認められた．この二本のバンドの濃度をdensitometerで比較したところ，欠失バンド濃度は筋組織では正常型の90%と約1対1の比で存在したのに対して，線維芽細胞では24%で約4分の1であった．一方，白血球では全く検出されなかった．

またmtDNA中に二ケ所認識部位のある *Pst* Iで処理した場合にも筋組織と培養線維芽細胞から抽出したmtDNAにおいて約2.0kb短いバンドが出現していた．

2．この結果から患者mtDNA中には欠失のあ

＊九州大学医学部脳研神経内科
＊＊九州大学遺伝情報実験施設

ることが疑われたので，次にPCR法を用いて欠失部位の同定を行なった．

図1にPCR法で用いた6種類の合成プライマーの位置を示した．プライマー20と23，22と24を用いた場合には正常コントロールに比べて差は認められなかった．一方，プライマー25と42を用いたPCRでは，筋組織と線維芽細胞では正常（4.5 kb）及び欠失型（2.6kb）の二本のバンドが認められているが，末梢血白血球では正常のバンド（4.5kb）しか認められなかった（図2）．

次に筋組織に認められた欠失型（約2.6kb）の短いバンドを切り出して制限酵素地図を作成して欠失部位の位置を予想したところ，制限酵素 *Eco* RV と *Ssp* I部位の間に欠失部分の存在することが判明した．その部分をミトコンドリアゲノムに対応させると，NADH dehydrogenase subunit 5と cytochrome B遺伝子の間の約1.8kbであることが判明した（図3）．

3．さらに欠失型（2.6kb）のバンドをプラスミドpUC18にサブクローニングしてその塩基配列を決定した結果，欠失はミトコンドリアゲノムの13,644から15,403まで[1]の1,758塩基対であり，欠失部分の塩基配列を詳細に検討すると，欠失開始部分と融合部分の5′末端に3塩基の挿入を挟んで17塩基の相同性のある配列が存在していた．この結果NADH dehydrogenase subunit 5（ND5）遺伝子と cytochrome B（Cyt. B）遺伝子が融合することが判明した．しかし読み枠にずれはなく，接合部分で新たにアルギニン（Arg）が出現しNADH dehydrogenase subunit 5（ND5）と cytochrome B（Cyt. B）が融合した遺伝子が形成されると予想された（図4）．

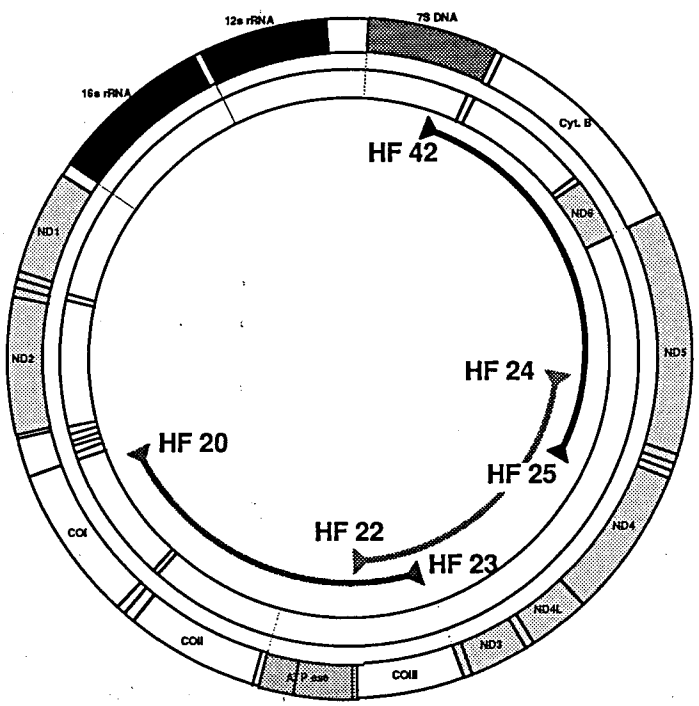


図1　PCR法で用いた6種類の合成プライマーの位置を示す．正常mtDNAではプライマーHF20とHF23を用いてPCRを行なった際には3.8kb，HF22とHF24を用いた際には3.9kb，HF25とHF42を用いた際には4.5kbのバンドが出現する．

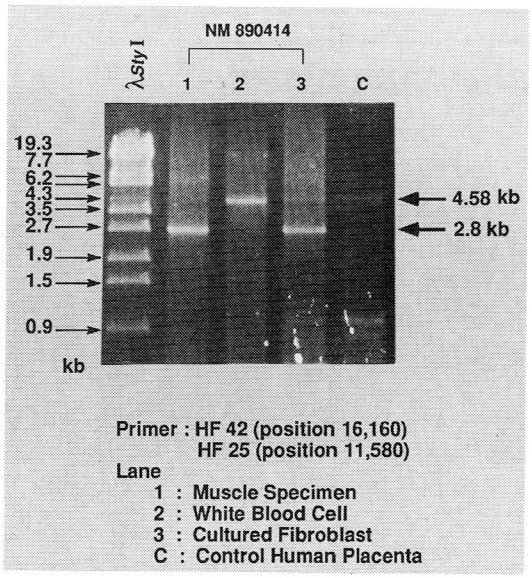


図 2　プライマー HF25と HF42を用いた際の PCR の結果を示す．コントロールの正常人胎盤組織（レーン C）には4.5kb のバンドが認められている．患者筋組織（レーン 1），線維芽細胞（レーン 3）では4.5kb の正常バンドに加えて約2.6kb の短いバンドが出現している．筋組織（レーン 1）では4.5kb の正常バンドも薄く認められている．白血球（レーン 4）には短いバンドは認められない．

考　　案

これまでにミトコンドリアミオパチーの mtDNA の欠失については数多く報告されているが，その中には D-loop 部分から始まる多種類の欠失[2]や，direct repeat sequence を境界として始まるものなどがある[3]．本症例では D-loop 以外の部分に欠失が存在しており，また境界部分に相同性のある領域の存在することなどから欠失の種類は後者に属すると考えられる．

欠失 mtDNA の組織による分布の違いはこれまでにも報告されているが，本症例でも筋組織のみならず線維芽細胞にも同様の欠失が認められている．しかしながら正常型と欠失型との量比は筋組織ではほぼ同量であるのに対して線維芽細胞では約 4 分の 1 にしかすぎなかった．近年 Nelson らは KSS 症例の中枢神経系での欠失型 mtDNA の分布を検討し，筋組織，脊髄，大脳皮質にも正常型，欠失型がほぼ同量存在することを示している[4]．本症例で線維芽細胞で欠失型の量が少ないことの理由は現時点では不明であるが，異常 mtDNA を多く持つ細胞は増殖能が低く，細胞分裂の頻度が多いほど欠失型 mtDNA を有する細胞の割合が減少してゆくと考えられる．この場合細胞分裂の頻度の低い中枢神経系などでは欠失型 mtDNA が多く存在し，頻繁に細胞分裂を行っている線維芽細胞などでは正常型のみが生き残ると考えられる．

しかし，末梢血白血球に欠失型mtDNA を認めたとする報告もあることや[4]，同じくミトコンドリアの異常で起こると考えられている Leber 病では遺伝子内の一塩基置換が原因と考えられることなどから[5,6]，ミトコンドリアミオパチーにおいて必ずしも疾患の発症機序が同一とは考えられず，今後は各症例において筋組織だけでなく全身組織での欠失型mtDNA の分布を検討することが必要であると考えられる．

結　　論

mtDNA に欠失の認められた KSS の一例を報告した．

筋組織同様に培養線維芽細胞にも欠失の認められたことから，mtDNA の欠失は全組織に及ぶこと，その割合は組織によって異なることが予想された．

欠失部は NADH dehydrogenase subunit 5（ND5）遺伝子と cytochrome B（Cyt. B）遺伝子の間の約1.8kb であり，境界には17塩基の相同性のある配列が認められた．このことから，相同配列が mtDNA 欠失の機序に関与していることが予想された．

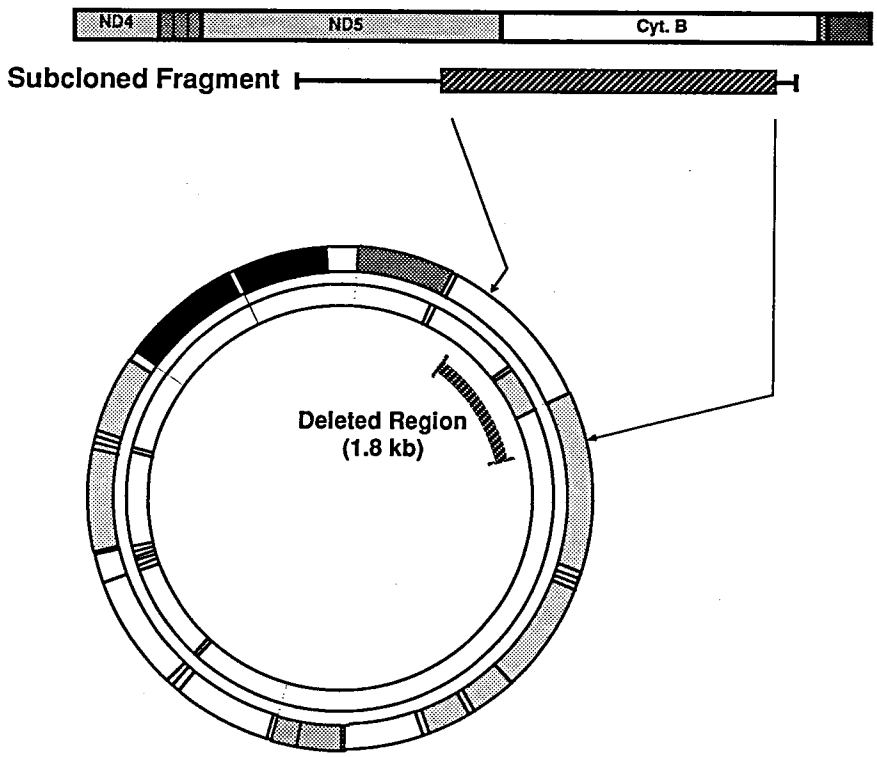


図3　ミトコンドリアゲノムに対応させた欠失領域．筋組織に認められた欠失型約2.6kbの短いバンドを切り出して制限酵素地図を作成して欠失部位の位置を予想した．これはNADH dehydrogenase subunit (URF5) (ND5) からcytochrome B (Cyt. B) に及ぶ (約1.8kb).

1,758-bp deletion

Wild-type sequence

13,644
↓

ND 5　5'-TCACCCTAACAGGTCAACCTCGCTTCCCCACCCTTACTAACATTAAC-3'

Cyt. B　5'-CCTCCCATTCCGATAAAATCACCTTCC--ACCCTTACTA-CACAATC-3'

↑
15,403

Deleted mtDNA sequence

```
5'-  ACCCTAACAGGTCAACCTCGCTTCCACCCTTACTACACAATC  -3'
  -  SerLeuThrGlyGlnProArgPheHisProTyrTyrThrIle  -
```

ND 5　**Cyt. B**

図4　欠失領域の塩基配列を示す．上段に正常mtDNAの塩基配列，下段に患者mtDNAの欠損部分の配列を示す．相同性のある部分を下線で示した．

文　献

1) The numbering system for base position of human mitochondrial genome sequence is employed in GenBank™ DNA data base.
2) Zeviani M et al: An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. Nature 339: 309—311, 1989.
3) Yuzaki M et al: Multiple deletions in mitochondrial DNA at direct repeats of non-D-loop regions in cases of familial mitochondrial myopathy. Biochem Biophys Res Commun 164: 1352—1357, 1989.
4) Nelson I et al: Mapping of heteroplasmic mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. Nucl Acids Res 17: 8117—8124, 1989.
5) Wallace DC et al: Mitochondrial DNA deletion associated with Leber's heveditary optic neuropathy, Science 242: 1427—1430, 1988.
6) Vilkki J et al: Genetic heterogeneity in Leber hereditary optic neuroretinopathy revealed by mitochondrial DNA polymorphism. Am J Hum Genet 45: 206—211, 1989.

39）ミトコンドリア遺伝子病とミトコンドリアDNA変異のタイプ

小澤高將*

研究協力者　大野欽司*　田中雅嗣*　佐藤　弥*
山本智子*　山本纊子**　佐橋　功***

はじめに

我々は昨年度，ミトコンドリア・サイトパチーにおけるheteroplasmy型のmtDNA欠失が，本疾患の分子遺伝学的病因であることを報告した[1]．今回我々は，このmtDNA欠失の発生機序を検討するとともに，PCR法による小さなpopulationの欠失mtDNAの検出を試みた．

PCR plus S_1 分析

始めに，mtDNA欠失の機序を明らかにするためには，欠失部位の塩基配列を決定する必要がある．その準備段階として，我々は，欠失部位を正確に決定する方法を考案した[2]．PCR法による増幅とS_1 nucleaseによる消化を組み合わせた，PCR plus S_1 法の原理を図1左に示す．heteroplasmy型のmtDNA変異を示す組織には，正常の長さのmtDNAと大きな欠失をもったmtDNAが混在しており，PCR法を用いてそれぞれを特異的に増幅する．正常mtDNAから断片A-Bを増幅し，欠失mtDNAから断片A-Dを増幅する．これらを混合した後，denatureし，これを急冷してheteroduplexを形成させた．これに1本鎖DNAを選択的に消化するS_1 nucleaseを作用させることによって，相補となっていない部分を除去した．S_1 nuclease消化に対してresistantな断片の大きさを測定することによって，点Aから星印で示した欠失の開始点までの距離を正確に求めることができる．また同様に右端の位置を，断片C-Dと断片A-Dの間でheteroduplexを作らせ，求めることができる．

PCR plus S_1 法を用いた分析例を図1右に示す．lane 1に示すように欠失の左端を決定するために，欠失mtDNAから3.1 kbの断片を増幅し，正常mtDNAからは1.9 kbの断片を増幅した．lane 2に示すように，S_1 消化後に0.45 kbの断片が出現している．同様に，欠失の右端を，lane 3，lane 4で示したように決定した．

図2は，PCR plus S_1 法で決定した欠失領域を，他の方法で決定した結果と比較したものである．国立遺伝研の宝来先生より供与して頂いたクローン化したmtDNA断片を用いたSouthern blot法（A）では，プローブに用いた断片の大きさによって欠失領域決定の精度が規定される．Bは，PCR法に用いるprimerをshiftして，欠失mtDNAから断片を増幅できるか否かによって，欠失部位を決定した結果を示している．この方法では増幅のために作成したprimerの間隔によって精度が規定される．これに対し，PCR plus S_1 法（C）では，S_1 nuclease消化にresistantな断片の大きさの測定精度を10%と見積ると，50ないし60bpの正確さで欠失部位を決定することができる．この患者では，欠失が，ATPase subunit 6の遺伝子領域に始まり，cytochrome *b* 遺伝子の領域に終わっていることが明らかになった．

PCR直接塩基配列決定

このように欠失の部位を正確に決定した上で，PCR法で増幅した断片の塩基配列をdirect sequencingにより決定した[3]．始めに，1次増幅を行

＊名古屋大学医学部第二生化学
＊＊藤田学園保健衛生大学医学部神経内科
＊＊＊愛知医科大学第四内科

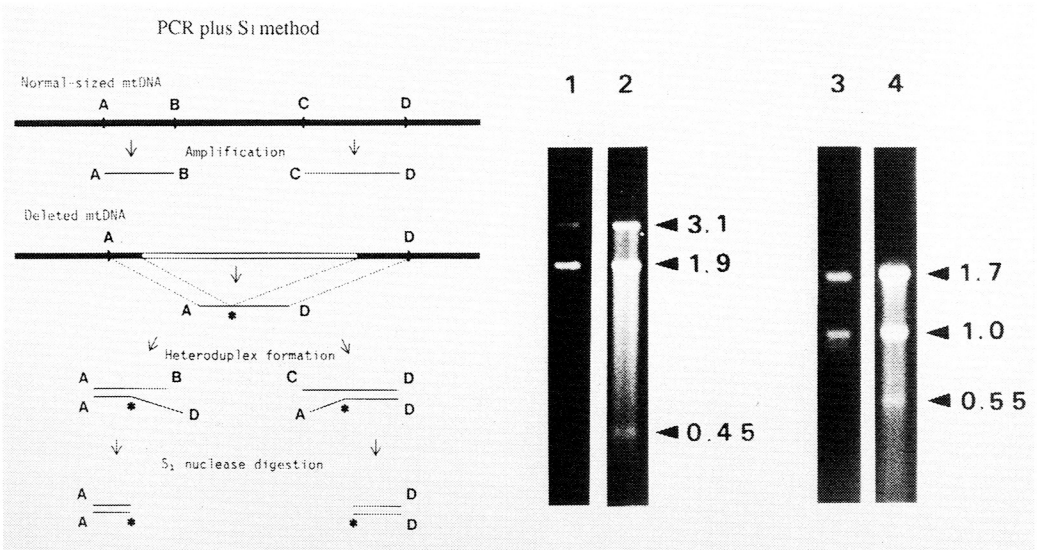


図1　PCR plus S_1 method

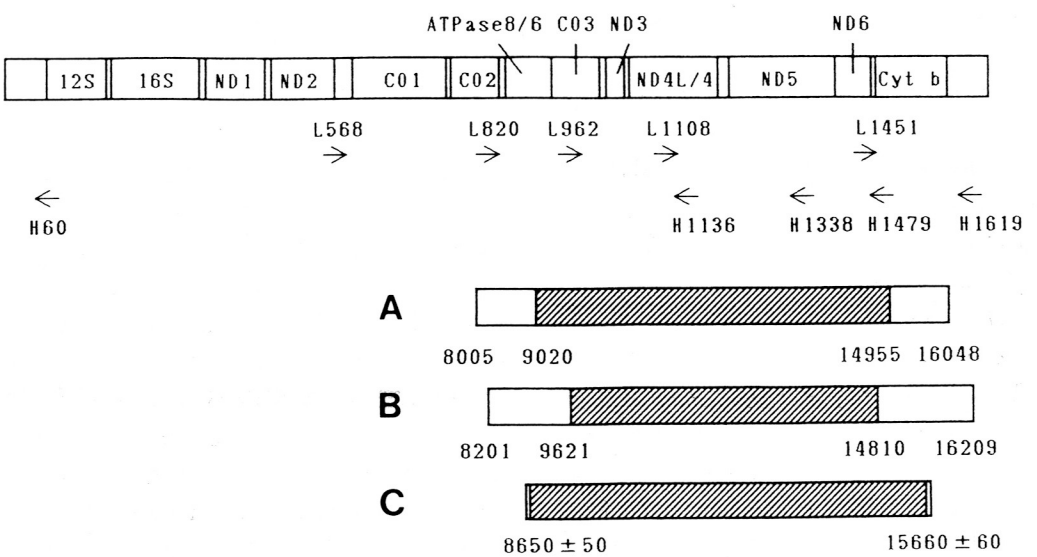


図2　Deleted region of mtDNA determined by three different methods

いdouble strand DNAを得た．これに，2つのprimerのうち，primer 2の量を，もう一方のprimer 1の量の百分の1になるように加えてasymmetric PCR増幅を行い，single strand DNAを得た．これをtemplateとして，primer 2を用いて，通常のSangerのdideoxy nucleotide termination法により塩基配列を決定した．

direct sequencingの結果，この患者では，ATPase 6遺伝子とcytochrome *b*遺伝子の中にそれぞれ存在する5′-ATCCCCA-3′の7塩基対の直接繰り返し配列の間で，7,039 bpの欠失が生じていた(図3上段)．この患者における両者の遺伝子は，frame shiftを起こすことなく欠失部位で連続しており，ATPase subunit 6の一部と，cyto-

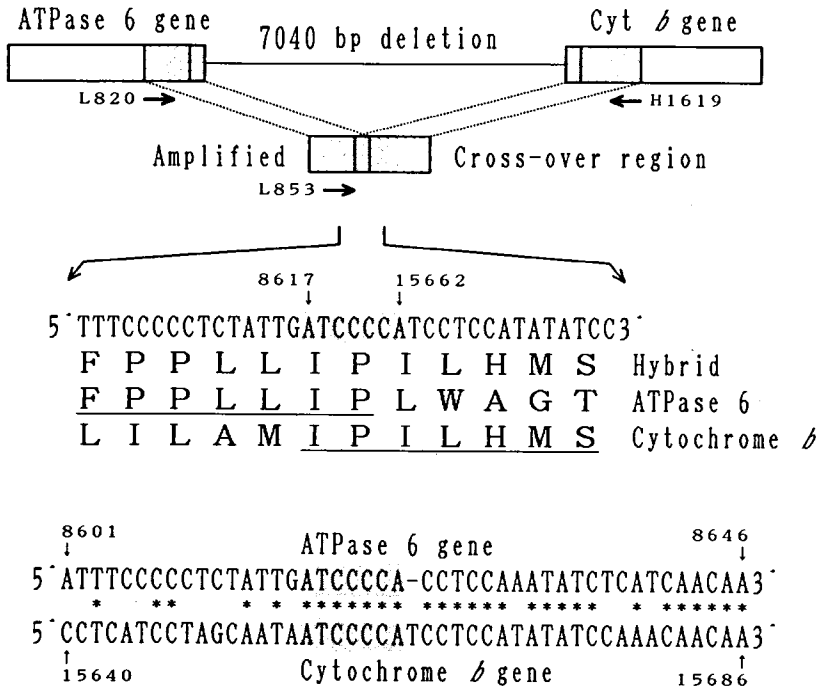


図3　PCR direct sequencing of the crossing over region of mtDNA

chrome *b* subunit の一部からなる hybrid protein が生成される可能性が示された(図3中段)．両遺伝子を並べてみると，7塩基対の直接繰り返し配列の右側にも，かなり高い homology が見られ，この部位で cross over が起きやすくなっていることが示された(図3下段)．mtDNA 欠失の生成の機構として，mtDNA 上の2ケ所に塩基配列の繰り返しがあり，その間で recombination に類似した機構で，cross over が生じていると考えられた．欠失をもった mtDNA には，H 鎖複製開始点と L 鎖複製開始点が保持されており，自己複製が可能であると考えられた．また，欠失 mtDNA は正常 mtDNA よりも短いため，欠失 mtDNA は複製の過程で正常 mtDNA よりも有利となり，次第に population を増すと考えられた．これに対し，切りとられた配列の方は，複製能を持たず，消滅し Southern blot では検出されなくなると考えられた．

これまで塩基配列が決定できた欠失部位と，欠失の結果生じる hybrid gene の塩基配列，さらに，その遺伝子産物のアミノ酸配列を図4に示す．type 1として示した13塩基対の directly repeated sequence によって起きる欠失の場合には，2つ遺伝子の間に frame shift が生じ，異常に短い遺伝子産物が生じる．この欠失では，cross over の直後に TAG の stop codon が生じるため，正常より短い abnormal ATPase 8 subunit が生じることになる．type 2として示した7塩基対の directly repeated sequence によって生じる in frame deletion の場合には，hybrid gene が生じ，hybrid protein が生成されることになる．7塩基対の長さの直接繰り返し配列の間で起こった欠失では，ATPase 6 subunit と cytochrome *b* subunit からなる12 kDa の hybrid protein が生じることになる．さらに，CCT というわずか3塩基対の directly repeated sequence の間で起こった欠失では，ATPase 6 subunit と ND5 subunit の一部ずつから構成される69 kDa の hybrid protein が生じると考えられる．これらの欠失領域には tRNA 遺伝子が含まれているため，欠失 mtDNA が単独で存

Type 1 deletion: Frame shift → Deleted protein

4,977-bp mtDNA deletion → 5-kDa abnormal ATPase 8 subunit

```
                                                  8,483
Wild-type sequence                                  ↓
ATPase 8 gene        5'-AACTACCACCTACCTCCCTCACCAAAAGCCCATAAA-3'
ND5 gene             5'-CTCTCACTTCAACCTCCCTCACCATTGGCAGCCTAG-3'
                                                  ↑
                                               13,459

Deleted mtDNA sequence
hybrid gene          5'-AAC TAC CAC CTA CCT CCC TCA CCA TTG GCA GCC TAG-3'
hybrid protein         -Asn Tyr His Leu Pro Pro Ser Pro Leu Ala Ala stop
```

Type 2 deletion: In frame → Hybrid protein

7,039-bp mtDNA deletion → 12-kDa ATPase 6 + Cyt *b* hybrid protein

```
                                              8,624
Wild-type sequence                              ↓
ATPase 6 gene        5'-CCCCCTCTATTGATCCCCACCTCCAAATATCTCAT-3'
Cytochrome b gene    5'-ATCCTAGCAATAATCCCCATCCTCCATATACCAAA-3'
                                              ↑
                                           15,662

Deleted mtDNA sequence
hybrid gene          5'-CCC CCT CTA TTG ATC CCC ATC CTC CAT ATA TCC AAA-3'
hybrid protein         -Pro Pro Leu Leu Ile Pro Ile Leu His Met Ser Lys-
```

3,717-bp mtDNA deletion → 69-kDa ATPase 6 + ND5 hybrid protein

```
                                              9,192
Wild-type sequence                              ↓
ATPase 6 gene        5'-CTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGACAACACATAA-3'
ND5 gene             5'-GCCTTAGCATGATTTATCCTACACTCCAACTCATGA-3'
                                              ↑
                                           12,908
Deleted mtDNA sequence
hybrid gene          5'-CTT CTA GTA AGC CTC TAC CTA CAC TCC AAC TCA TGA-3'
hybrid protein         -Leu Leu Val Ser Leu Tyr Leu His Ser Asn Ser Trp-
```

図4　Two types of mtDNA deletions

在したとすると，そのミトコンドリアは蛋白合成能を欠如する．ところが，正常mtDNAと欠失mtDNAが共存する結果，欠失mtDNAの遺伝情報も発現していると考えられる．つまり，異常なサブユニットも合成されると予想される．

プレイオプラスミー型mtDNA変異

同様に外眼筋麻痺を呈しながらheteroplasmy型の欠失が従来のSouthern blot分析で検出されない患者がおり，臨床診断と遺伝子レベルの診断の不一致が見られている．そこで我々は，heteroplasmy型の変異を示さない患者においては，Southern blot分析の検出限度以下の量の欠失mtDNAが存在していると考え，PCR法による欠失mtDNAの検索を行なった[4]．primer shift PCR法にて，患者の骨格筋mtDNAを増幅した結果を図5に示す．Aに示すように5.2 kb離れたprimer対を用いてPCRを行なうと，正常の断片に加えて，コントロール（C）では検出されない，少なくとも4本の異常バンドが患者（P）において検出される．次に，misannealingによる異常バンドを否定するために，Bに示すようにprimer Lを0.3 kb内側のL′に移動させてPCRを行なったところ，4.9 kbの正常断片に加えて，Aで認められた4本の異常バンドが，それぞれ0.3 kb短い断片として増幅された．この結果から，この患者では欠失を持ったmtDNAは単一ではなく，多種類の欠失mtDNAが存在し，個々の欠失mtDNAのpopulationは小さいものの，その総体としては，症状を引き起こす閾値に達していると考えられた．このmtDNA多重欠失をpleiosplasmy型mtDNA変異と我々は命名した．pleioplasmy型のmtDNA変異は，外眼筋麻痺を主徴とする疾患以外にも広く存在する可能性があり，各種疾患の病因となっている可能性がある．

ま と め

ヒトにおけるmtDNA変異を，我々は3種類に分類した．第1には，Leber氏病におけるhomoplasmy型の変異がある．第2には，Kearns-Sayre症候群，慢性進行性外眼筋麻痺，Pearson's marrow/pancreas syndromeにおけるheteroplasmy型の変異があり，このtypeのmtDNA欠失の発現機序として，今回報告したようにdirect-

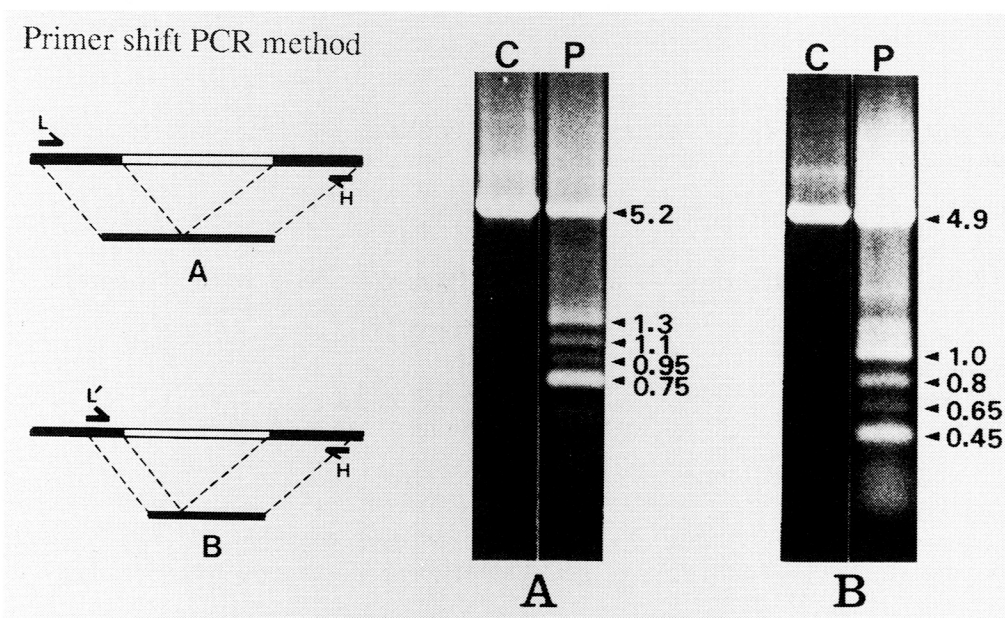


図5　Multiple populations of deleted mtDNA

ly repeated sequencesの間に生じるrecombinationに類似した機構が働いていると考えられた．第3には，Kearns-Sayre症候群や慢性進行性外眼筋麻痺におけるpleioplasmy型の変異がある．これは，主にPCR法によって検出される変異である．我々は，これらのmtDNA変異によって起きる一連の疾患をミトコンドリア遺伝子病と呼ぶことを提唱しており，従来のミトコンドリア・サイトパチーに分類される疾患のみではなく，老化の諸過程や神経および筋の各種変性疾患においても広く認められると考え[5]，さらに検索をすすめている．

文　献

1) Ozawa T, Yoneda M, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Suzuki H, Nishikimi M, Yamamoto M, Nonaka I and Horai S: Biochem Biophys Res Commun **154**: 1240, 1988.
2) Tanaka-Yamamoto T, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Horai S and Ozawa T: Specific amplification of deleted mitochondrial DNA from a myopathic patient and analysis of deleted region with S_1 nuclease. Biochim Biophys Acta **1009**: 151, 1989.
3) Tanaka M, Sato W, Ohno K, Yamamoto T and Ozawa T: Direct sequencing of deleted mitochondrial DNA in myopathic patients. Biochem Biophys Res Commun **164**: 156, 1989.
4) Sato W, Tanaka M, Ohno K, Yamamoto T, Takada G and Ozawa T: Multiple populations of deleted mitochondrial DNA detected by a novel gene amplification method. Biochem Biophys Res Commun **162**: 664, 1989.
5) Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T and Tanaka M: Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. Lancet i: 642, 1989.

40) Kearns-Sayre 症候群における異常ミトコンドリア DNA の解析

垂 井 清一郎*

研究協力者 曽我文久* 上野 聡* 西川嘉郎*
高橋信行* 上道知之* 梅景 正*
藤村晴俊* 依藤史郎* 宝来 聰**

はじめに

Kearns-Sayre 症候群ではミトコンドリア DNA の部分欠失例[1)~3)]が存在し，その欠失機序の一つとして slipped mispairing model が提唱されている[4)]．我々は Kearns-Sayre 症候群 7 例の骨格筋ミトコンドリア DNA を Southern blot 法によって解析し，1.4kb から5.6kb の欠失を伴う 5 例を見いだした．本研究ではこの DNA 欠失機序の解明を目的として，ミトコンドリア DNA の欠失断端周辺の塩基配列を決定した．

対象と方法

対象とした Kearns-Sayre 症候群症例は完全型 1 例，心伝導障害を欠く不全型 6 例で，これら全例において外眼筋麻痺，網膜色素変性，難聴，エルゴメーター運動負荷試験での乳酸，ピルビン酸異常増加，生検筋の ragged-red fibers を認めている（表 1）．生検骨格筋の湿重量当りミトコンドリア内膜電子電達系酵素活性は 2 例が complex Ⅰ＋Ⅲ低下，1 例が complex Ⅰ＋Ⅲ，Ⅳともに低下，他の 4 例は正常範囲を示した[5),6)]．

骨格筋ミトコンドリア DNA の Southern blot 解析：生検筋約20mg から抽出[7)]した全 DNA を BamH Ⅰ, EcoR Ⅰ単独消化，BamH Ⅰ/Pst Ⅰ二

表 1　Kearns-Sayre 症候群症例の臨床的特徴

Case	1*	2	3	4*	5*	6*	7*
Age(yr)/sex	53/M	47/F	20/M	32/M	40/M	23/M	22/M
Age of onset	20	15	14	22	15	10	18
Ophthalmoplegia Retinal degeneration Hearing loss	+	+	+	+	+	+	+
Limb muscle weakness	+	−	−	+	+	+	+
Heart block	−	−	+	−	−	−	−
CSF protein (mg/dl)	51	70	82	58	44	253	35
Ragged-red fibers	+	+	+	+	+	+	+
Exercise induced lactacidemia	+	+	+	+	+	+	+

* Deletions of mitochondrial DNA

＊大阪大学医学部第二内科神経内科
＊＊国立遺伝学研究所

重消化後，アガロース電気泳動で展開し，ナイロンメンブレンに転写，ハイブリダイゼーションを行った．プローブはヒト胎盤組織から抽出精製したミトコンドリアDNAを用いた．ミトコンドリアDNA欠失部位のより正確な同定には，国立遺伝学研究所宝来聰先生から供与されたミトコンドリアDNAクローンをプローブとして用いた．

欠失断端周辺塩基配列解析：Southern blot解析の結果，同定された欠失領域の100～300bp外側に相当するprimer(20～23mer)を合成し，polymerase chain reaction法にて欠失断端周辺を標的として特異的に増幅した．この増幅されたDNA断片を適当な制限酵素で消化後，M13ファージに組み込み，ジデオキシヌクレオチド一酵素法にて塩基配列を決定した．個々の症例における異常ミトコンドリアDNAの塩基配列を正常配列[8]と比較し，断端配列の特異性について検討した．

結　　果

Southern blot解析により同定された欠失の大きさ，部位を図1に示す．欠失の大きさは，それぞれ症例1は3.5kb, 症例4は5.6kb, 症例5は5.5kb, 症例6は9.2kb, 症例7は5.0kbであった．欠失部位はATPase 6/8からND5/6にかけての"hot spot"と呼ばれている部位に集中している．

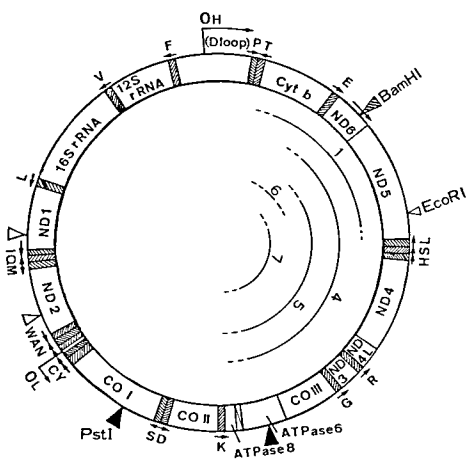


図1　Southern blot法により同定されたミトコンドリアDNA部分欠失の局在

症例4，5，7はほぼ同一部位の欠失を有しているが，ミトコンドリア内膜電子伝達系酵素活性はそれぞれcomplex Ⅰ低下，Ⅳ低下，正常であり，欠失部位と活性低下との関連は見られない．

欠失周辺塩基配列の解析から，症例4は10bp direct repeat "ACCGCTAACA"（9007-9016, 14566-14575）間の5569bp，症例5は5bp direct repeat"CCCAC"（8560-8564, 14115-14119）間の5555bp，症例7は13bp direct repeat "ACCTCCCTCACCA"（8470-8482, 13447-13459）間の4977bpが欠失していることが明らかとなった．症例5における5bp direct repeat "CCCAC"は正常ミトコンドリアDNA中に60カ所存在しているにもかかわらず，その欠失は他の2例とほぼ同一の部位に生じていた(図2)．症例1ではその欠失断端にdirect repeatは存在せず3383bp（12497-15879）の欠失であった（図3）．この欠失断端周辺部位の正常ミトコンドリアDNA塩基配列を用いて，欠失の5′端，3′端の配列を比較すると高いhomologyが認められた（図4）．

考　　案

Schonらは，ND5およびATPase 8にある13bp direct repeatでの欠失を多数例に見いだし，この事実からミトコンドリアDNA欠失機序として，DNA複製過程でDNAが一本鎖になった時生ずるdirect repeat間での欠失，つまり"slipped mispairing"仮説[9]を提唱している[4]．そして，この13bp direct repeat "ACCTCCCTCACCA"は

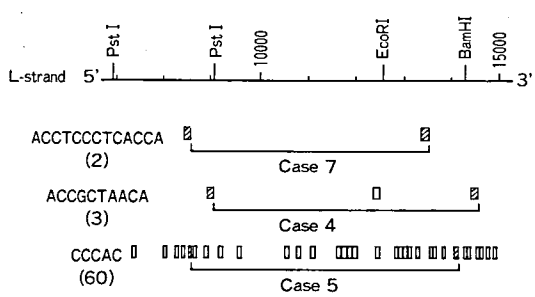


図2　ミトコンドリアDNA欠失断端に見いだされたdirect repeatの局在，個数

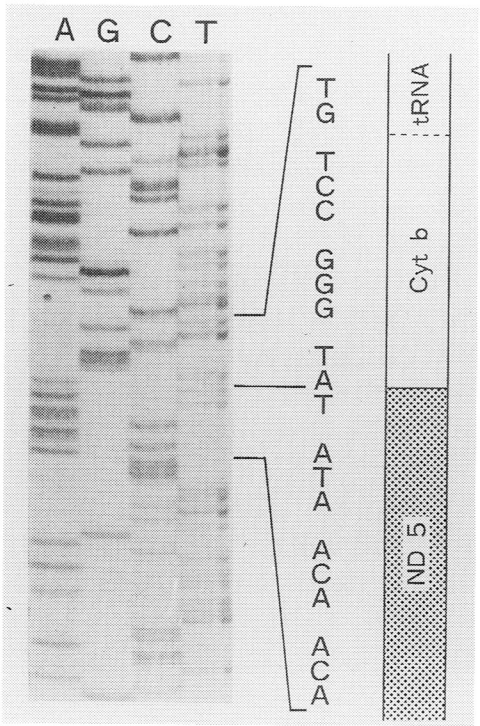


図3　症例1におけるミトコンドリアDNA欠失断端のSequenceオートラジオグラフィー像

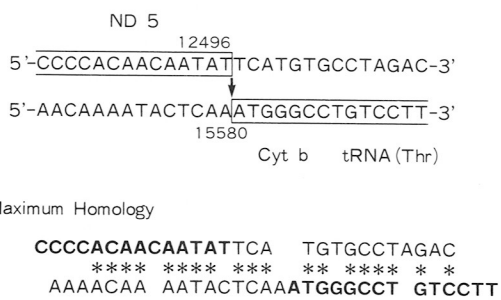


図4　症例1の欠失断端周辺塩基配列とhomology分析

ミトコンドリアDNA中に二カ所（8470-8482, 13447-13459）存在しており，この領域が"hot spot"であるとしている．我々はSchonらと同一の13bp direct repeatに加え，新たに5bp, 10bp direct repeat間での欠失を見いだし，slipped mispairing機序によると思われる欠失が5bpという短い配列間でも生じうることを明らかにした．また，direct repeatが多数かつ広範囲に存在するにもかかわらず欠失はほぼ同じ領域に集中していることから，"hot spot"での欠失がdirect repeatの存在のみで規定されるものではなく，他の因子が関与している可能性が考えられる．さらに欠失断端にdirect repeatが存在していない1症例を見いだしたが，この断端周辺部に相当する塩基配列には13bp中11bpのhomologyが認められた．

結　語

1．Kearns-Sayre症候群5例で3.5～9.2kbのミトコンドリアDNA部分欠失が，いわゆる"hot spot"領域に存在していた．

2．欠失断端に5bp, 10bp, 13bp direct repeatを有する3症例を見いだした．他の1症例にはdirect repeatは存在しなかった．

文　献

1) Lestienne P and Ponsot G: Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. Lancet 1: 885, 1988.

2) Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S et al: Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. Neurology **38**: 1339—1346, 1988.

3) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M et al: Mitochondrial DNA deletion in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Med **320**: 1293—1299, 1989.

4) Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT et al: A direct repeat is a hot spot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. Science **244**: 346－349, 1989.

5) Ogasahara S, Nishikawa Y, Yorifuji S et al: Treatment of Kearns-Sayre syndrome with coenzyme Q_{10}. Neurology **36**: 45—53, 1986.

6) Yorifuji S, Ogasahara S, Takahashi M et al: Decreased activities in mitochondrial inner membrane electron transport system in muscle from patients with Kearns-Sayre

syndrome. J Neurol Sci 71 : 65—75, 1985.
7) Davis LG, Dibner MD, Battey JF : Basic methods in molecular biology. Elsevier, New York, 1986, pp 47—50.
8) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al : Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290 : 457—465, 1981.
9) Efstratiadis A, Posakony JW, Maniatis T et al : The structure and evolution of the human β-globin gen family. Cell 21 : 653—668, 1980.

Ⅷ. ミトコンドリア(2)

41）MERRFの臨床知見補遺

福　原　信　義*

研究協力者　米　持　洋　介*　馬　場　広　子*　長　島　　勝**
鈴　木　正　博***　米　田　　誠****

MERRF（ミトコンドリア異常を伴うミオクローヌスてんかん）[1]が最初に報告されてから約10年がたち，その間に多数の症例が報告され，その疾患としての臨床的，病理学的特徴は明らかになってきたように思われる．

国立療養所犀潟病院において，1988年4月より1989年10月までの入院患者でミオクローヌスを主訴とする患者13例の疾患別頻度（表1）で最も多いのは遺伝性歯状核赤核被殻ルイ体萎縮症（DRPLA）の5例，ついでMERRFの3例となっており，DRPLAとMERRFの2つが進行性ミオクローヌスてんかんの原因として最も多いことが判る．この最近経験したMERRFの3例を今までの経験例[2]と比べて，MERRFの鑑別診断上の問題点を述べたい．

表1　ミオクローヌスの原因疾患

〈国療　犀潟病院入院患者　1988.4～1989.10〉

DRPLA	5例
MERRF	3
中毒（DPH；CBZ）	2
GM_2　ガングリオシドーシス	1
Lance－Adams 症候群	1
Creutzfeldt－Jakob 病	1
計	13例

＊国立療養所犀潟病院神経内科
＊＊新潟県厚生連中央病院
＊＊＊長岡赤十字病院
＊＊＊＊新潟大学神経内科

症　　例

症例1　42歳　男性

主訴：歩行障害

家族歴：類似疾患は見られない

既往歴：生来，知能がやや低かったという．19歳時，胃潰瘍で手術

現病歴：29歳より視力障害があり，眼科医より網膜変性症，白内障と診断され，白内障の手術をうけている．32歳時にミオクローヌスによると思われる脱力発作があり，てんかんの診断を受けている．当時，眼底で視神経萎縮の所見が見られている．34歳頃よりやせが目立ち，次第に歩行が障害されてきた．36歳になると小脳失調が著明となり，アステレキシスも目立ち，38歳時には某病院に入院しているが，当時全身の激しいミオクローヌス発作が認められている．その後も歩行障害がますます強くなるため，42歳時にリハビリのため国療犀潟病院に入院している．

入院時所見：知能低下（長谷川10点），外眼筋は正常，眼振（＋），感音性難聴（＋），構語障害（緩徐言語）．四肢筋は下腿の筋力が低下，筋萎縮はび漫性だが近位筋優位で特に上肢の筋萎縮が著明であった．線維束攣縮（－）．アキレス腱反射消失，両側バビンスキー，チャドック反射（＋）．表在感覚は正常，深部感覚は下肢で著明低下．足変形はないが，左足は下垂していた．上下肢の小脳失調がはっきりしており，支えなしでは立位を維持できなかった．時々，ミオクローヌスによる脱力発作，動作性，企図性ミオクローヌスがみられた．神経因性膀胱（膀胱収縮筋括約筋協調不全）（＋）．

検査成績：脳CT：小脳，脳幹部萎縮．脳波：棘波，棘徐波が頻発．血液乳酸（表2）：正常．大腿

表2　血中乳酸・ピルビン酸値

		乳　酸	ピルビン酸
症例1	安静時	7.9－ 9.2mg／dl	0.62 － 0.48 mg／dl
	運動後	14.6	0.73
症例2	安静時	17.6	1.16
	運動後	55.2	1.63
症例3	安静時	27.9	1.20
	運動後	60.7	2.02
正常	（安静時）	3.3－14.9	0.30 － 0.94

四頭筋生検：ミトコンドリア異常（＋）.

症例2　67歳女性

主訴：歩行障害

家族歴：兄弟，息子（症例3）に同様疾患

既往歴：小児期より中耳炎で難聴があった.

現病歴：57歳頃より難聴が強まり補聴器使用．62歳時，全身痙攣発作があり，脳波でδ波による群発波（＋）で抗痙攣剤の服用開始．66歳より歩行が徐々に障害されてきた．67歳時，精査目的で国療犀潟病院に入院.

入院時現症：IQ76，断綴性言語，感音性難聴（＋），握力やや低下，下肢深部反射消失，バビンスキー，チャドック反射（＋），上下肢，特に下肢の小脳失調が著明で歩行器を必要とする．表在感覚は正常，深部感覚は低下．両上肢，体幹にミオクローヌスがあり，転倒しやすい.

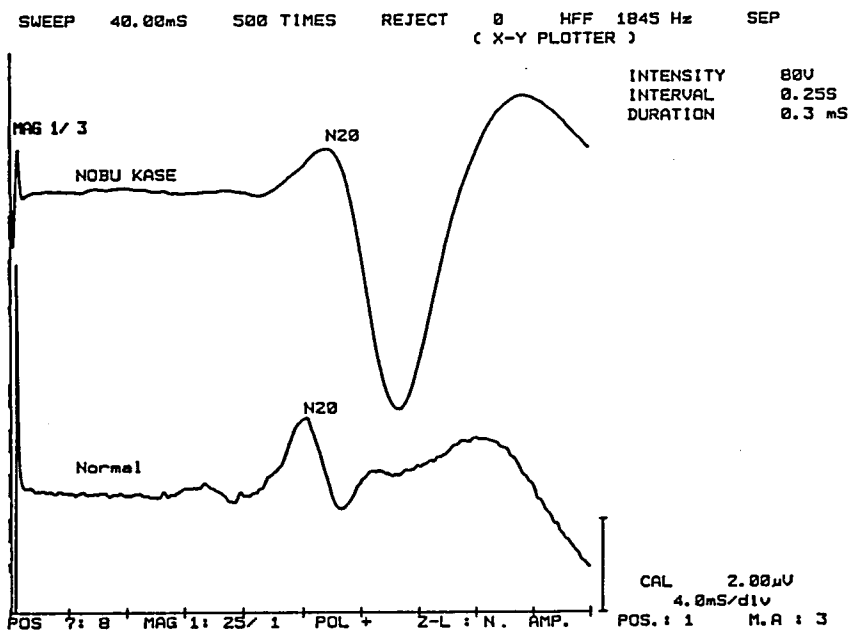
検査所見：脳CT：大脳，特に側頭葉の萎縮，脳幹，小脳の萎縮．脳波：2.5Hzの棘徐波，光刺激で3Hz群発波を誘発．体性感覚誘発電位（図）：24.3μVの巨大波（＋）．大腿四頭筋生検：ミトコンドリア異常（＋），電子伝達系酵素の分析では異常は認められなかった.

症例3　26歳男性

主訴：歩行障害

既往歴：特に無い.

現病歴：6歳ごろより走るのが遅くなる．15歳よりミオクローヌスのため手が不器用になり，階段より転げおちることがあった．17歳時，自転車で転倒，意識消失のため長岡赤十字病院受診し，脳波異常にきづかれ，てんかんの診断を受ける．20歳時，歩行時のふらつきがあり，ミオクローヌスてんかんの診断を受ける．歩行失調，ミオクロー



図

ヌスはその後徐々に悪化する．25歳時，新潟大学に入院，筋生検でMERRFの診断．その後も歩行障害が強くなるため26歳時に国療犀潟病院に入院．入院時現症：IQ72．視神経萎縮（＋），構音障害（＋），四肢はび漫性に筋萎縮，筋力低下があり，上下肢の小脳失調も中等度にあるため，移動には歩行器を必要とする．深部反射消失，バビンスキー，チャドック反射，足クローヌス(＋)．表在感覚は正常，深部感覚は低下．凹足(＋)．上肢にアステレキシスがあるほか，動作性ミオクローヌスのためしばしば転倒した．

検査所見：脳CT：小脳萎縮著明，大脳萎縮は軽度．脳波：多棘徐波，δ波群発（＋）．

考　　察

表1のように，症例数は少ないが進行性ミオクローヌスてんかんの1/3はMERRFであり，MERRFは今まで考えられていた以上にポピュラーな疾患と思われる．表4にMontreal Neurological instituteにおける進行性てんかんの疾患別頻度[3]を示したが，そこでもMERRFはceroidlipofuscinosisについで多い疾患となっている．表3に今回の3症例の臨床症状をまとめ，今までの報告例[2]における症状頻度と比較した．症例2の62歳の発症というのは今までの報告で最高年齢の発症であり，息子（症例3）が6歳で発症しているのと比較すると同一家系内における経過の違いに注目される．

症例1で白内障があったが，今までMERRFでの白内障の報告は無い．しかし，20歳台で白内障が生じていることと，Greeneら[4]，Sengersら[5]により白内障を伴うミトコンドリアミオパチーの家系が報告されていることから症例1の白内障もミトコンドリア代謝の異常と何らかの関係を持って生じてきたものと思われる．症例1では入院当初300～1,000mlの残尿があったが，ミニプレスにより残尿が軽快している．症例3でも300mlの残尿があったが，今までMERRFで排尿障害の報告はなくこれから注目していかねばならない症状の1つと思われる．

体性感覚誘発電位では，症例2でP_{25}，N_{33}の巨大電位がみられた．MERRFにおける巨大SEP

表3　3症例のまとめ

	症例 1 42歳男	症例 2 67歳女	症例 3 26歳男	福 原 (1987)
発病年齢　（歳）	29	62	6	3～42
知能低下	(長谷川式10点)	(IQ 76)	(IQ 72)	85 %
視神経萎縮	(＋)	(－)	(＋)	52.9
難聴	(＋)	(＋)	(＋)	42.9
眼振	(＋)	(－)	(－)	
言語障害	(＋)	(＋)	(＋)	
小脳失調性歩行	(＋)	(＋)	(＋)	100
筋萎縮・筋力低下	(＋)	(＋)	(＋)	81.0
感覚障害　表在覚	(－)	(－)	(－)	
深部覚	(＋)	(＋)	(＋)	21.9
深部反射消失	(＋)	(＋)	(＋)	61.9
バビンスキー反射	(＋)	(＋)	(＋)	17.4
排尿障害	(＋)	(－)	(＋)	
ミオクローヌス	(＋)	(＋)	(＋)	100
全汎性痙攣	(＋)	(＋)	(＋)	69.6
白内障				

表4　進行性ミオクローヌスてんかんの原因疾患 (Montreal Neurological Institute, 1960-1989, E. Andermann et al, 1989)

	患者数	家族数
Unverricht-Lundborg 病	8	4
Lafora病	13	8
Ceroidlipofuscinosis		
幼　児　型	34	23
若　年　型	8	7
成　人　型	2	1
ミトコンドリア脳筋症	23	13
腎不全ミオクローヌス症候群	4	3
神経軸索ジストロフィ	1	1
分類不明	2	2
Ramsay Hunt 症候群	0	0
合　　計	95	62

は未だ1，2の論文にしかみられないが，電気生理学的にはMERRFのミオクローヌスも他の進行性ミオクローヌスてんかんと同様であるという点と，MELASなど他のミトコンドリア脳筋症との鑑別にSEPが役立ちうるという点で重要と思われる．

結　　論

1）MERRFは進行性てんかんの原因として本邦ではDRPLAと並んで多い疾患である．

2）MERRFでは60歳以上の高齢発症があり，同一家系内でも発症年齢が異なることがある．

3）MERRFでも白内障，神経因性膀胱がみられる．

4）血中乳酸，ピルビン酸値は必ずしも診断には役立たない．

5）他のミトコンドリア脳筋症との鑑別にはSEPが役立ちうる．

文　　献

1) Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K et al: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities). Disease entity or a syndrome ? Light- and electron microscopic studies of two cases and review of literature. J Neurol Sci 47: 117—133, 1980.

2) 福原信義：ミトコンドリア脳筋症，神経進歩 31：604—616, 1987.

3) 福原信義：Ramsay Hunt 症候群と福原病．神経進歩 34：125—133, 1990.

4) Greene HL, Schubert WK and Hung G: Chronic lactic acidosis of infancy. J Pediatr 76: 853—860, 1970.

5) Sengers RCA, Ter Haar BGA, Trijbels JMF et al: Congenital cataract and mitochondrial myopathy of skeletal and heart muscle associated with lactic acidosis after exercise. J Pediatr 86: 873—880, 1975.

42) ミトコンドリアミオパチーの ^{31}P MR spectroscopy による検討

田 代 邦 雄*

研究協力者　伊 藤 和 則*　宝 金 清 博**
島　　功 二***　森 若 文 雄*

はじめに

ミトコンドリアミオパチーに対して酵素学的また遺伝子学的アプローチがなされ，その病因が徐々に解明されつつある．*in vivo* の状態で筋肉内のエネルギー代謝を測定することはMRI spectroscopyが出現するまでなかなか容易ではなかったが，最近筋肉内のpH，Pcr/Pi(クレアチニンリン酸/無機リン)，ATP等のパラメータにて細胞内のエネルギー代謝が測定可能になり，非侵襲的にまた容易に行えるようになってきた．今回われわれはミトコンドリアミオパチーの症例に対して，CoQ投与前後の筋肉のspectroscopyを施行した．またMELASの2症例に頭蓋内の病変部に対するspectroscopyも経験したので報告する．

方法と症例

A；前回の本会議で報告した家族歴を有する症例で特に44歳の男性を1年間経過観察した．症状は眼瞼下垂，外眼筋麻痺，胸鎖乳突筋の筋力低下を認めた[1]．

上腕二頭筋の筋生検はGomori Trichrome染色でragged-red fiberが認められ，酵素学的検索にてCCO (cytochrome c oxidase) の活性低下を認めた．治療としてCoQ60mg/day，イデベノン90mg/dayを使用した．治療前後の血液中の乳酸，ピルビン酸の比較では，治療後ピルビン酸が0.4 (0.74) と正常値まで改善している．症状では眼瞼下垂が軽度改善した．しかし外眼筋麻痺に改善は認められなかった．

Siemens社Magnetom (磁場強度1.5Tesla) を用いて5インチのsurface coilを被検者の腓腹筋に置き，安静時及び運動負荷前後の筋肉内のエネルギー代謝を経時的に測定した．ATP, Pi, Pcrのspectraが分離され，Pcr/Piを計算し，時間による推移を検討した．

B；MELASと思われる2症例に対して頭蓋内病変部の ^{31}P MR spectroscopyを施行した．

症例1：15歳　男性

主訴：口がうまく回らない，うまく歩けない．

経過：昭和63年7月頃に歩行の不安定さ，階段の昇降がつらいことを自覚し，某医を受診し，左後頭葉にCTで異常低吸収域を指摘された．10月30日全身性痙攣を起こし，以後入退院を繰り返した．平成1年8月上旬，両手の痙攣が出現し，右第3指を中心とした不随意運動が出現するため，某医より当科に紹介入院となった．

既往歴：特記すべきことなし

家族歴：特記すべきことなし

神経学的陽性所見では軽度意識障害（I－3）があり，脳神経系では右同名半盲，側方注視眼振，対光反射減弱が認められた．運動機能は右痙性片麻痺，腱反射亢進，また腱反射の左右差があり，知覚機能では右感覚鈍麻が認められ，また四肢失調があった．高次脳機能検査ではGerstmann症候群と知能検査 (WAIS；動作性検査IQ<60，言語性検査IQ<60) は高度の知能低下が認められた．

検査所見では乳酸，ピルビン酸以外の血液，生

＊北海道大学医学部神経内科
＊＊札幌麻生脳神経外科病院
＊＊＊国立療養所札幌南病院

化学，検尿，内分泌すべて異常なかった．

	血液中	髄液中
乳酸	12.8mg/dl (9.0-16.0)	56.5mg/dl
ピルビン酸	1.40mg/dl (0.36-0.59)	2.02mg/dl

ECG，chestX-P，腹部X-Pすべて異常なかった．

MRIのT2 weighted image（TR3000msec, TE90msec）の画像では左側頭―頭頂葉に広範囲な高信号域と左後頭葉内面にも同様な異常高信号域を認めた．また入院後約2か月後に同様な条件で右側頭―後頭葉に異常高信号域が新たに認められ，以前の病巣（左側頭―頭頂―後頭葉）はやや縮小されていた（図1）．

症例2：10歳　男性

主訴：痙攣発作

現症：生来健康で正常な発育を示していたが，昭和63年12月12日，突然ベットから転倒し，口角から泡をだしているところを発見された（失禁もともなっていた）．

既往歴：特記すべきことなし

家族歴：特記すべきことなし

神経学的陽性所見では意識清明であり，脳神経，

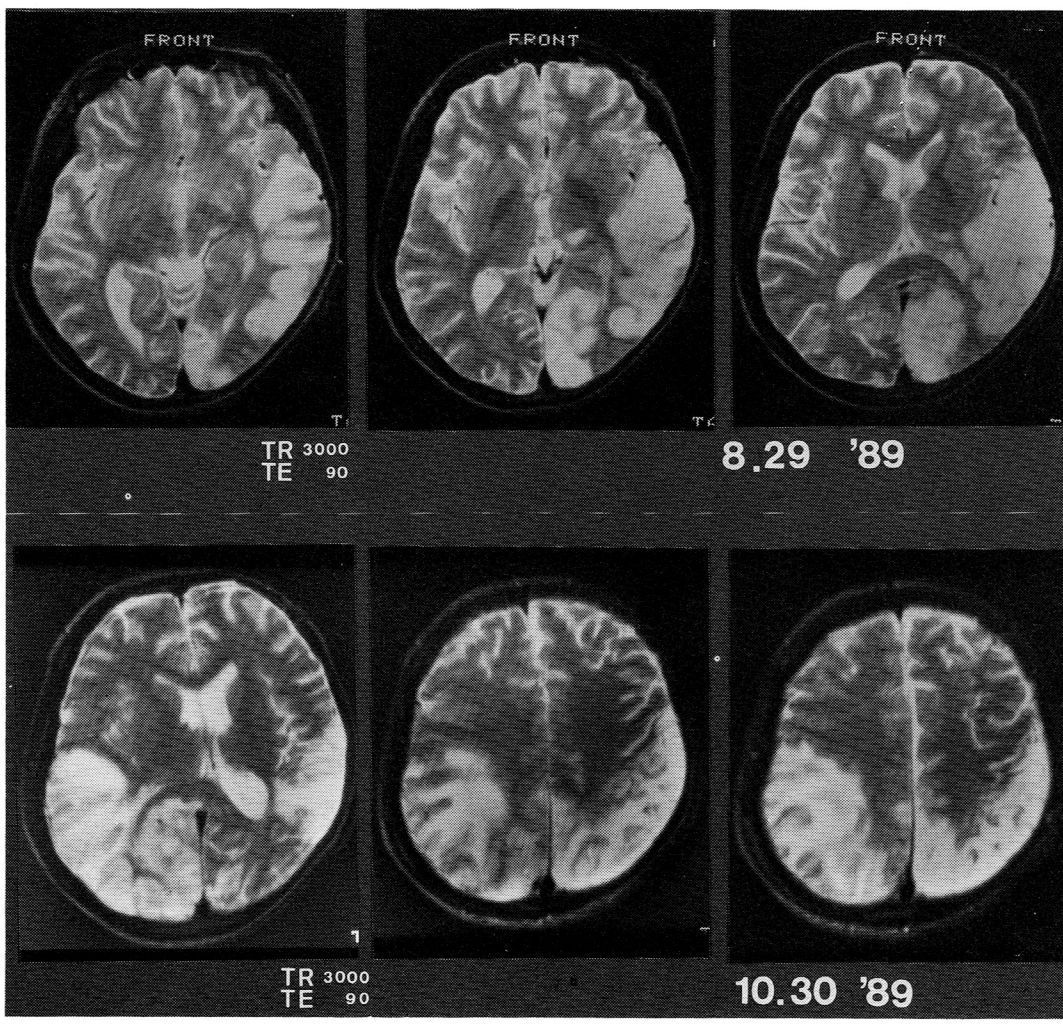


図1　症例1の入院時（上段）と入院後約2か月後のMRIを示す

運動機能，感覚機能，小脳機能すべて正常であった．

検査所見は血液，生化学，電解質，尿検査に異常を認めず．

	血液中
乳酸	21.3（9-16）mg/dl
ピルビン酸	2.38（0.36-0.59）mg/dl

他の検査所見（ECG, Chest X-P, 腹部 X-P 等）も異常を認めなかった．

上腕二頭筋の筋生検では筋原性の変化が認められるが Gomori Trichrome 染色でも ragged-red fiber は出現しなかった．

酵素学的検索

NADH cytochrome c reductase	556.5
Succinate cytochrome c reductase	1339.5
Cytochrome c oxidase	611.1

これらの電子伝達系酵素活性はすべて正常範囲であった．

MRI は（TR3000msec, TE80msec）側頭—後頭葉の境界部に異常高信号域が認められた（図2）．

結　　果

1．ミトコンドリアミオパチーの症例に対しての治療効果を Pcr/Pi をパラメータとして使用して検討した．運動負荷前の Pcr/Pi は治療前後と対照との差は認められなかった．対照では運動負荷前後でも Pcr/Pi に変化は認められないが，この症例は運動負荷後約 2 ～ 3 分で Pcr/Pi が低下し，その後に前値に回復するために約 8 分要した（図3）．しかしこの症例に約 8 か月の治療を施行した後，同様に Pcr/Pi を運動負荷前後で見ると治療後の Pcr/Pi の低下は改善し，また前値に回復するまでの時間約 6 分と短縮が認められた．これは症状の改善と同様な相関が見られ，治療効果の判定に ^{31}P MR spectroscopy が非常に有用であると考えられた．

2．症例 1 の頭蓋内病巣における ^{31}P MR spectroscopy を示す（図4）．左患側と対称の健側部位を Frogs 法にて比較検討した．左側は比較的分離が良好であるが，健側は Pcr, Pi を含めた分離がやや不良であったが左右の Pcr/Pi, pH 等に差は認められなかった（図4）．

症例 2 において Pcr, Pi が分離されているが，ATP が分離不良であったが，Pcr/Pi は明らかに低下し，pH は6.72と酸性側に偏位した（図5）．

考　　察

ミトコンドリア脳筋症における lactic acidosis は異常ミトコンドリアによるピルビン酸代謝の障

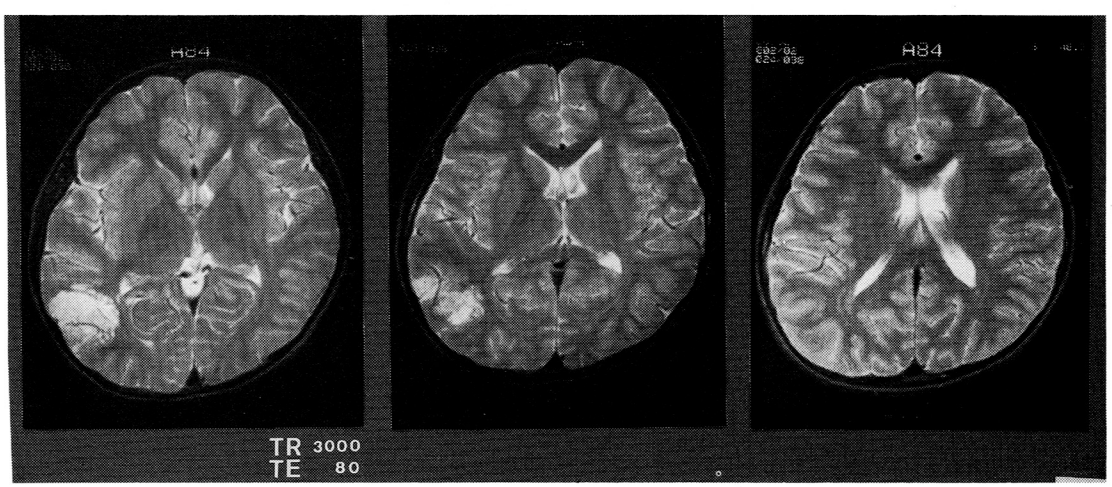


図2　症例 2 の MRI を示す

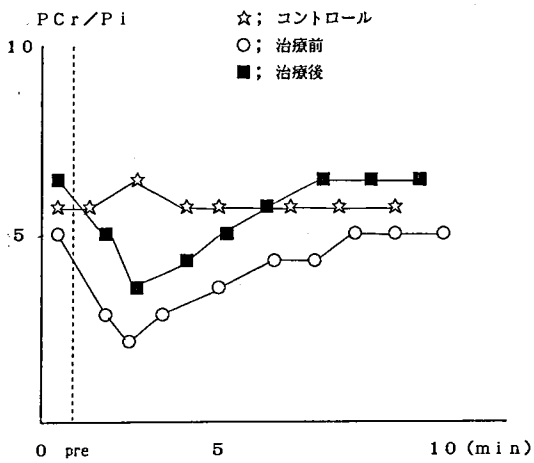


図3　ミトコンドリアミオパチーの症例の筋肉内での ^{31}P MR spectroscopy から得られる Pcr/Pi の運動負荷前後での時間的推移を見た

害に起因し，この解糖系の促進は ADP のリン酸化の程度により，加速される．^{31}P MR spectroscopy は特に細胞内の pH の変化を安静，運動負荷後でモニター可能であり，また Pcr/Pi の低下はミトコンドリアミオパチー以外にも Duchenne 型筋ジストロフィー症，多発性筋炎，その他でも認められるが，これらはすべてミトコンドリアの機能異常（1次性，2次性）にもとづく疾患で起こることが指摘されている[2),3)]．

Pcr/Pi は運動負荷による変化を経時的に観察することはミトコンドリアの機能（動態）を反映する指標としてもっとも有効であり，また特異的である．今回治療の指標として Pcr/Pi の経時的検討をおこなったが，臨床症状の改善と平行して Pcr/Pi 低下の度合が減少し，前値までの回復時間の短縮を認め，容易にしかも鋭敏に変化が観察可能であった[4)~6)]．

MELAS は多彩な臨床症状を示し，また進行性であり，神経症状の他に心電図上の異常を含めた全身の障害が認められる．今回われわれは2例の MELAS を経験し，症例1は症状が常に進行し，それに伴い MRI にて病巣の拡大と古い病巣部の縮小傾向を認め，当初は病巣部の浮腫が出現し，

	r t	l t
Pcr/Pi (1.83±1.03)	1. 21	1. 52
Pcr/PME (1.30±0.52)	0. 78	1. 00
Pcr/PDE (0.55±0.13)	0. 59	0. 51
Pcr/β-ATP (1.88±0.88)	0. 63	0. 78
PH (7.04±0.07)	6. 78	7. 06

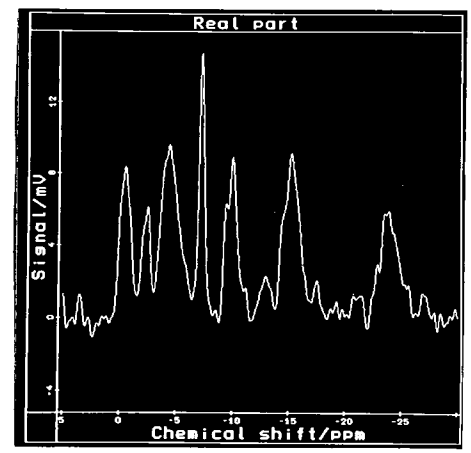


図4　症例1の頭蓋内病巣部の ^{31}P MR spectroscopy とそれぞれのパラメータの比を示す

周囲組織への圧迫をも出現した．

症例2は1年間経過観察をおこなっているが，症状の進行，また病巣部の拡大も認められない．頭蓋内の病変特に脳梗塞，脳腫瘍などの ^{31}P MR spectroscopy は散見されるが，MELAS の病変部に対する検討はわれわれが調べる限りではまだ報告されていない．今回症例1の spectra の分離状態が不良であり，これはテクニック上の問題かと思われた．そのために患側と健側の Pcr/Pi 等の差が認められなかった．また症例2は病巣側の Pcr/Pi の低下，pH の酸性側への偏位を認めた．

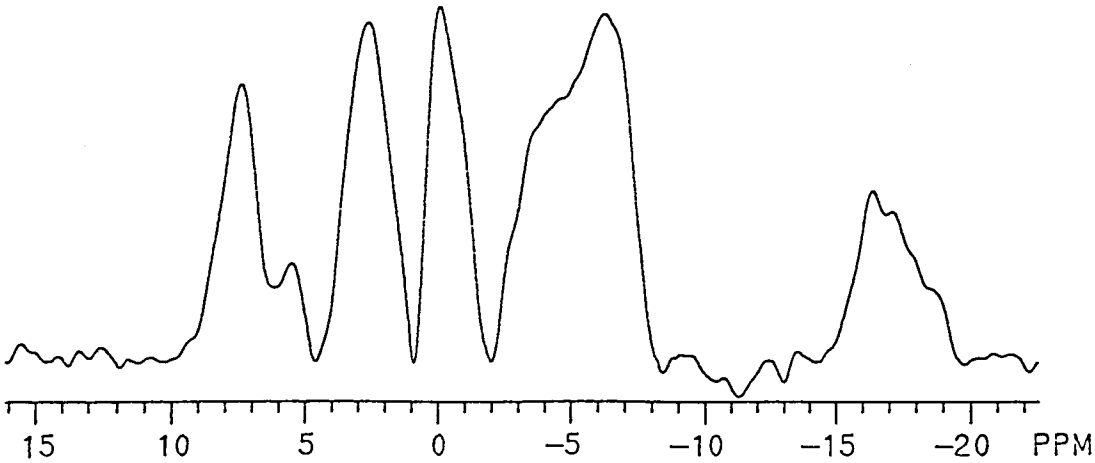


図5　症例2の頭蓋内病巣部の ^{31}P MR spectroscopy を示す

結　　語

1. ミトコンドリアミオパチーの症例に CoQ を約1年間投与したが，臨床症状の改善と筋肉内での ^{31}P MR spectroscopy の Pcr/Pi（運動負荷前後）を CoQ 投与前後で比較すると臨床症状と平行して Pcr/Pi の低下と前値に回復するまでの時間の短縮が認められた．
2. MELAS の2症例に頭蓋内病巣部の ^{31}P MR spectroscopy を施行した．症例1は病巣側と正常側との差は認められなかった．症例2は病巣側の Pcr/Pi の低下が認められた．

文　　献

1) 田代邦雄，伊藤和則，斉藤敏之，森若文雄，島功二，菅野富夫：ミトコンドリア電子伝達系の検討（第3報）．“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその成因に関する研究”（杉田班）昭和63年度研究報告書，1988，pp177—181.
2) Chance B: Application of ^{31}P-NMR to clinical biochemistry. Ann NY Acad Sci 428: 318—332, 1984.
3) Chance B, Clark BJ, Nioka S et al: Phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo. Circulation 75 (suppl): 103—110, 1985.
4) Radda GK and Taylor DJ: Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy in pathology. Int Rev Exp Pathol 2: 1—60, 1985.
5) Argov Z, Bank WJ, Maris J et al: Bioenergetic heterogeneity of human mitochondrial myopathies: phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. Neurology 37: 257—262, 1987.
6) Arnold DL, Matthews PM and Radda GK: Metabolic recovery after excercise and the assessment of mitochondrial function in human skeletal muscle in vivo by means of ^{31}P-NMR. Magnetic Resonance Med 1: 307—315, 1984.

43）Complex I 欠損症による Leigh 脳症と思われる2例

斎田孝彦*

研究協力者　藤井達哉**　奥野武彦**　三河春樹**

はじめに

Leigh 脳症は主として乳幼児にみられる変性疾患で，眼振，低筋緊張，嚥下障害，痙性麻痺等，多彩な症状で発症する．その原因として，pyruvate carboxylase[1]，pyruvate dehydrogenase complex (PDHC)[2]，cytochrome c oxidase[3]，NADH - CoQ reductase (complex I)[4)~6)] 等の欠損が報告されているが，それらのうちで，PDHC および cytochrome c oxidase 欠損症が最も多くみられる．一方，complex I 欠損による Leigh 脳症の発症は，我々の知る限り3例の報告しかない．今回我々は，臨床的に Leigh 脳症と診断された2例に complex I 欠損を認めたので報告する．

症　例

症例1：4歳女児．家族歴に特記すべきものはない．満期安産で出生したが，頸定7ヶ月，つかまり立ち13ヶ月と，発達遅滞に気づかれていた．1歳2ヶ月時に，左眼瞼下垂が出現し，その後さらに両側眼瞼下垂と外眼筋麻痺が出現した．その1ヶ月後には嚥下障害も現われ，坐位も不能となった．理学所見としては，軀幹の低緊張，両側顔面対麻痺を認めたが，深部腱反射，眼底は正常であった．血中乳酸3.6mmol/l，ピルビン酸56.8 μmol/l と，乳酸の高値を認め，CT で両側対称性に低吸収域を，被核，尾状核，橋，中脳に認めた（図1）．Leigh 脳症の疑いの診断のもと，ビタミン B_1 の投与を受け，経過観察されていたが，4歳時に，精査入院となった．入院時所見として，外眼筋麻痺，眼振，顔面対麻痺，軀幹低緊張，痙性四肢麻痺，アテトーゼを認め，膝蓋腱反射は亢進し，Babinski 反射を認めた．髄液中の乳酸，ピルビン酸は，それぞれ4.2mmol/l, 187μmol/l と両者とも上昇していた．心電図，心エコー図は正常，ABR では I 波 V 波頂点間潜時の延長を認めた．筋電図は低振幅多相波を認めた．T_2 強調 MRI では，両側対称性に高信号域を，被核，尾状核頭部，視床，黒質，延髄に認め，また著明な脳室拡大と皮質萎縮を認めた（図1）．

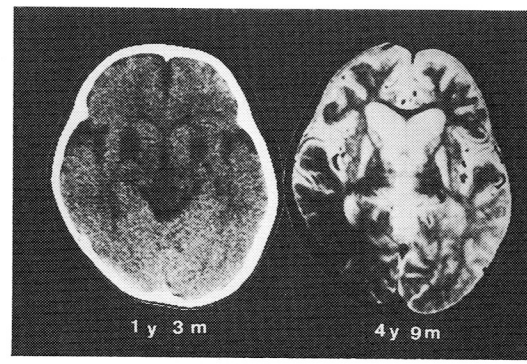


図1　症例1　左：1歳3ヶ月時の CT．両側被核，中脳に低吸収域を認める．右：4歳9ヶ月時の T_2 強調 MRI（TR2500 TE80）．高信号域を両側被核，尾状核頭部に認める．脳室拡大，皮質萎縮もみられる．

症例2：18ヶ月女児．家族歴に特記すべきものはなく，満期安産で出生．6ヶ月までは正常の発達であったが，その頃より退行が始まり，11ヶ月時には痙性四肢麻痺と嚥下困難が出現した．13ヶ月時の理学所見は著明な軀幹の低緊張，右顔面不全麻痺，痙性四肢麻痺を認めた．T_2 強調 MRI で，両側対称性に高信号域を被核，尾状核，視床，黒質，脳梁，前頭側頭葉の白質および小脳白質に認めた（図2）．18ヶ月時の MRI では，白質の高信号域は著明に拡大し，前頭葉の大部分と，側葉，

＊国立療養所宇多野病院臨床研究部神経内科
＊＊京都大学医学部小児科

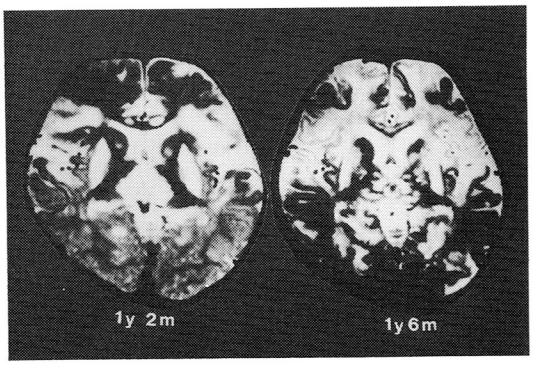


図2　症例2　左：1歳2ヶ月時のT_2強調MRI (TR4000 TE80). 両側対称性に高信号域を尾状核頭部，被核，視床，さらに前頭側頭部の大脳白質に認める．右：1歳6ヶ月時のMRI. 大脳白質の高信号域の著明な拡大を認める．

頭頂，後頭葉の一部にまでおよんでいた（図2）．

方　法

筋生検は大腿四頭筋外側広筋に行なった．ミトコンドリアの分離はBookelman[7]らの方法で行ない，cytochrome c oxidase活性はWharton, Tzagoloff[8]の方法，NADH-cytochrome c reductase, succinate-cytochrome c reductase活性はSottocasa[9]らの方法，PDHC活性はSchofield[10]らの方法で測定した．

結　果

生検筋の光顕検査では，2症例ともragged red-fiberは認めなかった．しかし電顕では，症例1で筋原線維間の空胞と，クリスタの乱れた異常ミトコンドリアを認め（図3 a），症例2では，cristal membraneの増加した巨大ミトコンドリアを認めた（図3 b）．筋ミトコンドリア酵素活性は，症例1，2，ともにNADH-cytochrome c reductaseの有意な低下を認め，一方succinate-cytochrome c reductase, cytochrome c oxidaseは正常であった．症例1はPDHCの活性低下も示した（表）．

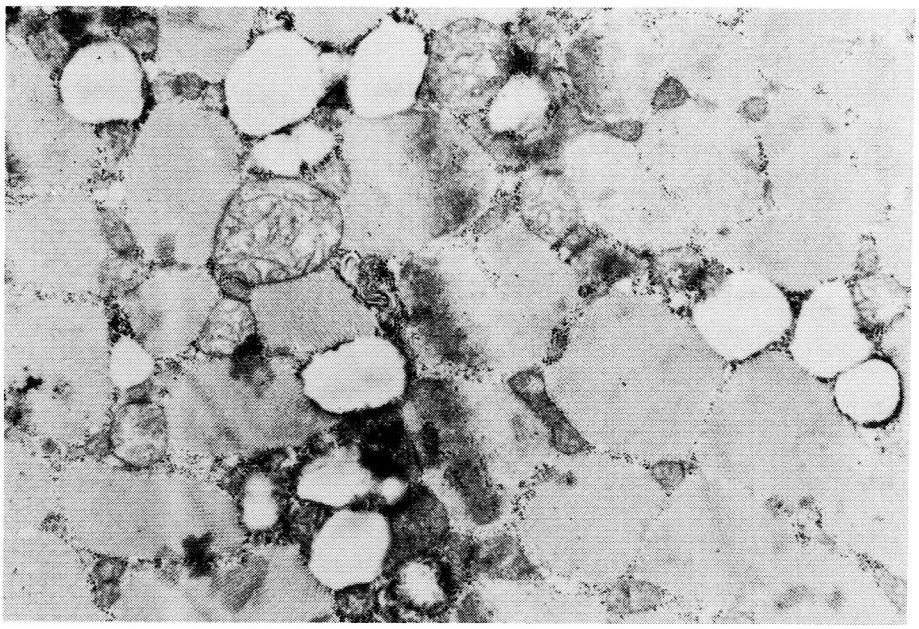
考　察

Leigh脳症の確定診断は培検によらねばならないが，症例1の臨床像およびCT，MRI所見は，Leigh脳症のそれに合致すると考えられる．症例2においては，MRIで白質の広汎な障害を認めた点で，やや非定型的であったが，培検でLeigh脳症の確定診断を得た症例で，広汎な大脳白質の障害を認めた例の報告もあり，これをもってこの症例をLeigh脳症でないと言うことは出来ない．2症例ともNADH-cytochrome c reductaseの低下を認めるが，succinate-cytochrome c reductaseは正常であり，complex I欠損症と診断された．一方症例1ではPDHCの活性低下もあり，この症例において，complex IとPDHCのどちらの欠損が主たる原因であるのか，また両者の低下は同時に起きたものなのか，一方の欠損によってひきおこされた2次的現象なのかという点が問題となった．本例では血中，髄液中の乳酸ピルビン酸比が，それぞれ63.4，22.5と高値を示し，このことは，電子伝達系の障害がエネルギー代謝障害の主たる原因であることを示唆すると考えられた．Complex I欠損症では，しばしば2次的なcytochrome c oxidaseの低下，あるいはcytochrome b欠損の合併を認めるが，本例のようにPDHCの低下を合併する例の報告はなく，その原因について今後の検討が必要と思われた．

Van Ervanら[4)~6)]は3例のComplex I欠損症によるLeigh脳症を報告している．しかし彼らの症例は我々の症例と異なり，その臨床経過は極めてゆっくりとした進行を示し，またCT所見は3例とも異常を認めていない．我々の症例は2例とも亜急性の進行を病初期に示し，CT, MRIで基底核と脳幹に異常を認めた点，より定型的な例に近いと考えられる．Complex I欠損症はその殆んどがMELASとして発症することが知られているが，Leigh脳症の原因にもなり得ることが示され，ミトコンドリア病のheterogenousな側面が，新ためて確認された．

文　献

1) Hommes FA, Polman HA and Reerink JD: Leigh's encephalomyelopathy: An inborn error of gluconeogenesis. Arch Dis Child 43:



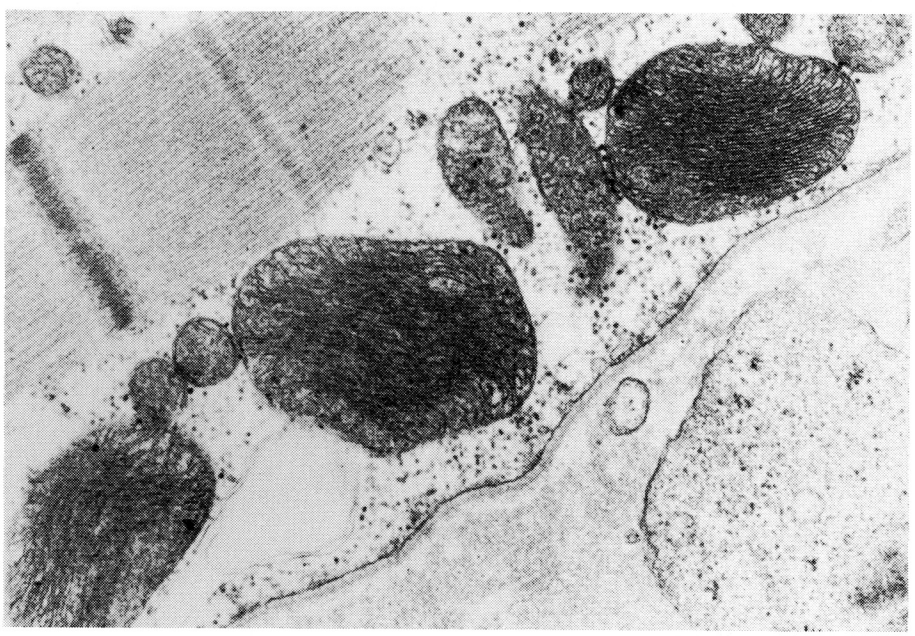


図3　a 症例1　筋原線維間の空胞と cristae の乱れた異常ミトコンドリアを認める．×5000
　　b　症例2　Cristae の増大した巨大ミトコンドリアを認める．×17,000

表 Enzyme activities in muscle mitochondria

	NADH-cytochrome c* reductase	Succinate-cytochrome c* reductase	Cytochrome c oxidase*	Pyruvate dehydrogenase** complex
Patient 1	14	109	1456	170
Patient 2	22	80	1024	306
Control	116±38	146±55	1302±659	934±578
	(56-200)	(58-254)	(401-2793)	(218-1532)

*nmol/min/mg mitochondrial protein. **pmol/min/mg protein.

Control values are expressed as means ± SD with the range in parenthesis (N=9 for pyruvate dehydrogenase complex, N=10 for others).

423—426, 1968.

2) Farmer TW, Veath L, Miller AL et al: Pyruvate decarboxylase deficiency in a patient with subacute necrotizing encephalomyelopathy. Neurology 23: 429, 1973.

3) Willems JL, Monnens LAH, Trijbels JMF et al: Leigh's encephalomyelopathy in a patient with cytochrome c oxidase deficiency in muscle tissue. Pediatrics 60: 850—857, 1977.

4) Van Ervan PMM, Cabreëls FJM, Ruitenbeek W et al: Subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh syndrome) associated with disturbed oxidation of pyruvate, malate and 2-oxoglutarate in muscle and liver. Acta Neurol Scand 72: 36—42, 1985.

5) Van Ervan PMM, Ruitenbeek W, Gabreëls FJM and Renier WO: Disturbed oxidative metabolism in subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh syndrome). Neuropediatrics 17: 28—32, 1986.

6) Van Ervan PMM, Gabreëls FJM, Ruitenbeek W et al: Mitochondrial encephalomyopathy: association with an NADH dehydrogenase deficiency. Arch Neurol 44: 775—778, 1987.

7) Bookelman H, Trijbels JMF, Sengers RCA and Janssen AJM: Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria, isolated from fresh and frozen stored muscle specimens. Biochem Med 19: 366—373, 1978.

8) Wharton DC and Tzagoloff A: Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. Method Enzymol 10: 245—250, 1967.

9) Sottocasa GL, Kuylenstierna B, Ernster L and Bergstrand A: An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. J Cell Biol 32: 415—439, 1967.

10) Schofield PJ, Griffiths LR, Rogers SH and Wise G: An improved method for the assay of platelet pyruvate dehydrogenase. Clin Chim Acta 108: 210—227, 1980.

44）高カルシウム血症とミオトニア様の手拳開排困難をきたしたmitochondrial neuromyopathyの1例

高　瀬　貞　夫*

研究協力者　望　月　るり子*　小　林　和　夫*
望　月　　廣*　宮　林　重　明**

骨格筋の症状を主体とする狭義のmitochondrial myopathyには，緩徐に進行し，時に症状の変動する症例が知られている[1]．今回我々は，骨格筋ミトコンドリア内電子伝達系complex III, IVの欠乏が証明されたmitochondrial myopathyの1例において，軸索障害による慢性進行性のニューロパチーと高Ca血症および高K血症を合併し，一時的にミオトニア様の手拳開排困難をきたした症例を経験した．多様な臨床像を呈するmitochondrial myopathyのなかでも特異な症例と思われたので報告する．

症　　例

患者：29歳，男性

主訴：四肢脱力

家族歴：父は脳出血で死亡．母が糖尿病性腎不全で人工透析中．

現病歴：生下時体重2480g，処女歩行は1歳頃で，その後明らかな精神運動の発達異常には気づかれていなかった．

18歳時，走ると足がつりやすくなり，下肢の腫張感と疼痛を主訴として当院第二内科に入院した．入院時，両側の腓腹筋の硬結と腫脹，四肢の筋力低下が見られ，軽度の高カルシウム血症，高尿酸血症，高脂血症を指摘された．CPKは66 IU/Lと正常であった．筋生検で神経原性筋萎縮，神経生検では軸索変性の所見が得られた．特発性副甲状腺機能亢進症とBeriberi症候群が疑われたが，副甲状腺ホルモンもビタミンB 1も正常だった．確定診断のつかないまま，経口ビタミン剤の投与だけで症状は徐々に改善し，8ヵ月後に退院した．その後10年は，水道の配管の仕事などが可能であった．

28歳時より転びやすくなり，当科を受診した．この時はまだ独歩可能だったが，2週間後に咽頭痛と38度台の発熱が出現し四肢の脱力が急速に進んだため当科に入院した．

当科入院時現症：身長163cm，体重62kg．肘，膝，踵に痛風結節を触れた．胸部腹部に異常なし．神経学的には，知能指数の低下（WAIS full-scaleで65点）を認めた．網膜色素変性はなく，外眼筋麻痺もなかった．顔面と四肢の近位筋の筋力低下が著明で，立位保持もできなかった．

また，握力は測定不能（両側とも0 kg）であったが，hand grippingは可能で，その手を開排しようとすると，第3～5指の中手基節関節での伸展が遅れた（図1）．この手拳開排困難は反復によって軽快することはなかった．Percussion myotoniaは見られなかった．四肢の深部腱反射はすべて低下，病的反射は認めず，知覚系・自律神経系の異常はなかった．

検査所見：尿と末梢血に異常なし．血清Na 141 mEq/l, K4.6 mEq/l, Cl 107mEq/l, Ca 11.0mg/dlと軽度増加，イオン化P 4.1mg/dl．C_{cr} 61ml/minだが，クレアチニン0.8mg/dl, BUN 19mg/dlで，尿中Caも179.3mg/dlと正常範囲内であった．血清総蛋白7.7g/dl，血清アルブミン4.3g/dl，血液ガスpH7.43，P_{O2} 90.5mmHg，P_{CO2} 42.2 mmHg, HCO_3 27.7mEq/l，イオン化Caも2.8mg

＊東北大学医学部神経内科
＊＊　　同　　小児科

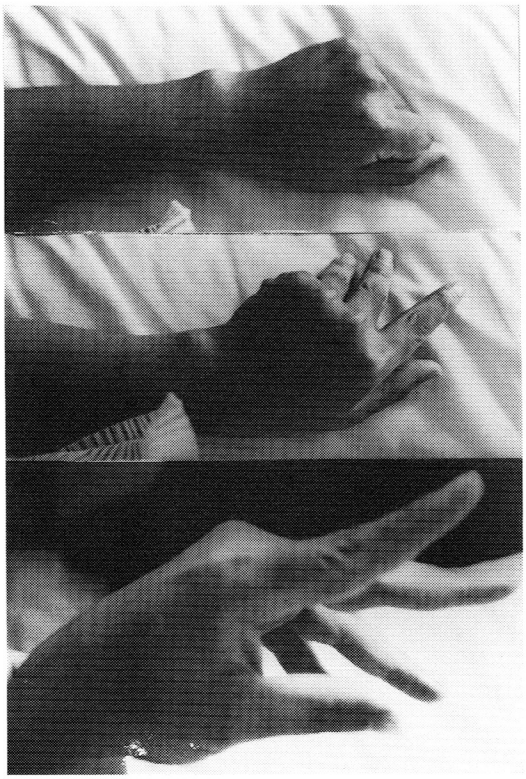


図1　急性期の手拳開排困難

%と正常だった．尿酸7.4mg/dl と軽度増加．LDH 611IU/L，CPK 103IU/L．中性脂肪132mg/dl，総コレステロール185mg/dl．ビタミン B_2 が50ng/ml とやや減少していたが，B_1・B_6・B_{12} は正常だった．甲状腺機能・副甲状腺機能は正常だった．

血中乳酸1.4mg/dl，ピルビン酸25.6mg/dl といずれも上昇しており，エルゴメーターによる15分15watt の運動負荷でも有意の上昇を見せた．

髄液の細胞数0/3，蛋白46mg/dl，糖59mg/dl．乳酸は2.0mg/dl と上昇，ピルビン酸も40.0mg/dl と上昇していた．

神経伝導速度は上肢は正常，下肢では腓骨神経の MCV は正常下限（42.2m/sec）だが，腓腹神経の SCV は導出されなかった．

手拳開排困難が見られた急性期の筋電図では neurogenic pattern と myogenic pattern が混在していた．典型的な myotonic discharge はみられず，percussion にて軽度の被刺激性亢進が認められるだけだった（図2）．

腓腹神経生検では有髄線維が著明に減少し，myelin ovoid も散見された．Onion bulb 形成も僅かだが認められた（図3）．電顕的には denervated schwann cell cluster が所々に認められた．ヒストグラムでみると（図4），前回検査時から有髄線維は大径・小径ともに減少していたが，今回はさらに減少していた．無髄線維は正常範囲内であった．Onion bulb 形成に乏しく，myelin ovoid もある点から，慢性進行性の再生所見に乏しい軸索変性を中核とする変化と考えられた．

上腕二頭筋の生検では，筋線維の大小不同と中心核の増加，多数の ragged-red fiber が認められた（図5 A）．Small angurated fiber と軽度の type 2 fiber atrophy も認められるが，neurogenic change の程度は前回ほどではなく，今回はむしろ myogenic change が主体となっていた．Cytochrome c oxidase 活性染色では75%の筋線維に活性低下が認められた（図5 B）．電顕でも，筏状封入体を持つ異常なミトコンドリアの集積が筋漿膜下や筋線維間に認められた（図5 C）．

生検筋ミトコンドリア分画の電子伝達系酵素の活性は，NADH-cytochrome c reductase68.6（Controls148.2±25.5），Succinate-cytochrome c reductase34.9（Controls135.0±51.7），Succinate dehydrogenase115.9（Controls116.6±27.2），cytochrome c oxidase576（Controls1475±

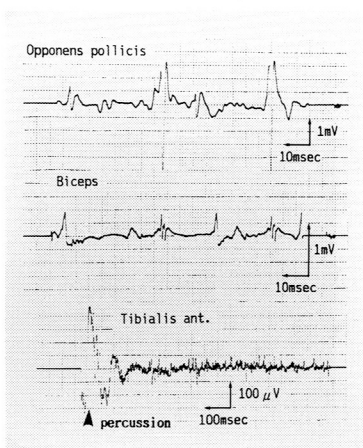


図2　筋電図所見

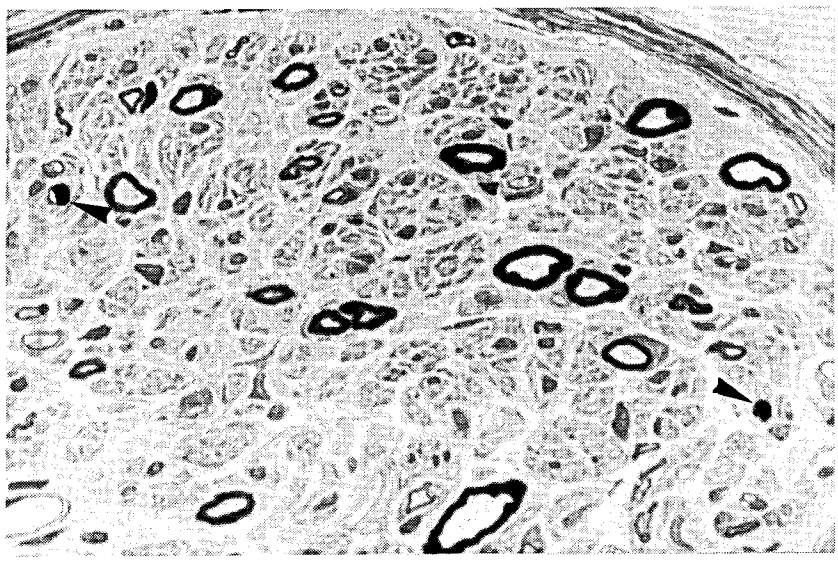


図3　腓腹神経生検像：著明に有髄線維は減少し，ところどころにミエリン球（矢印）を認める．

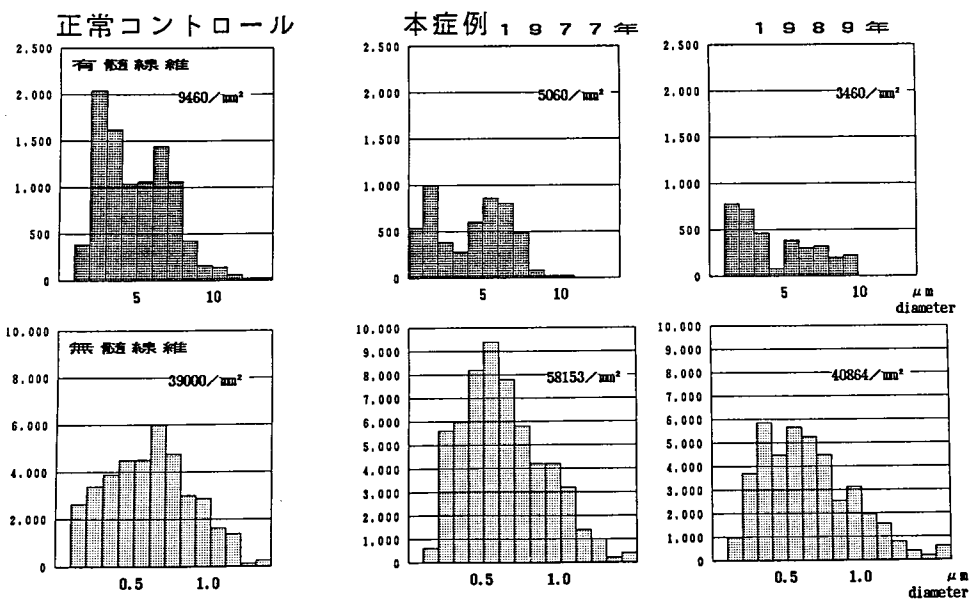


図4　腓腹神経ヒストグラム

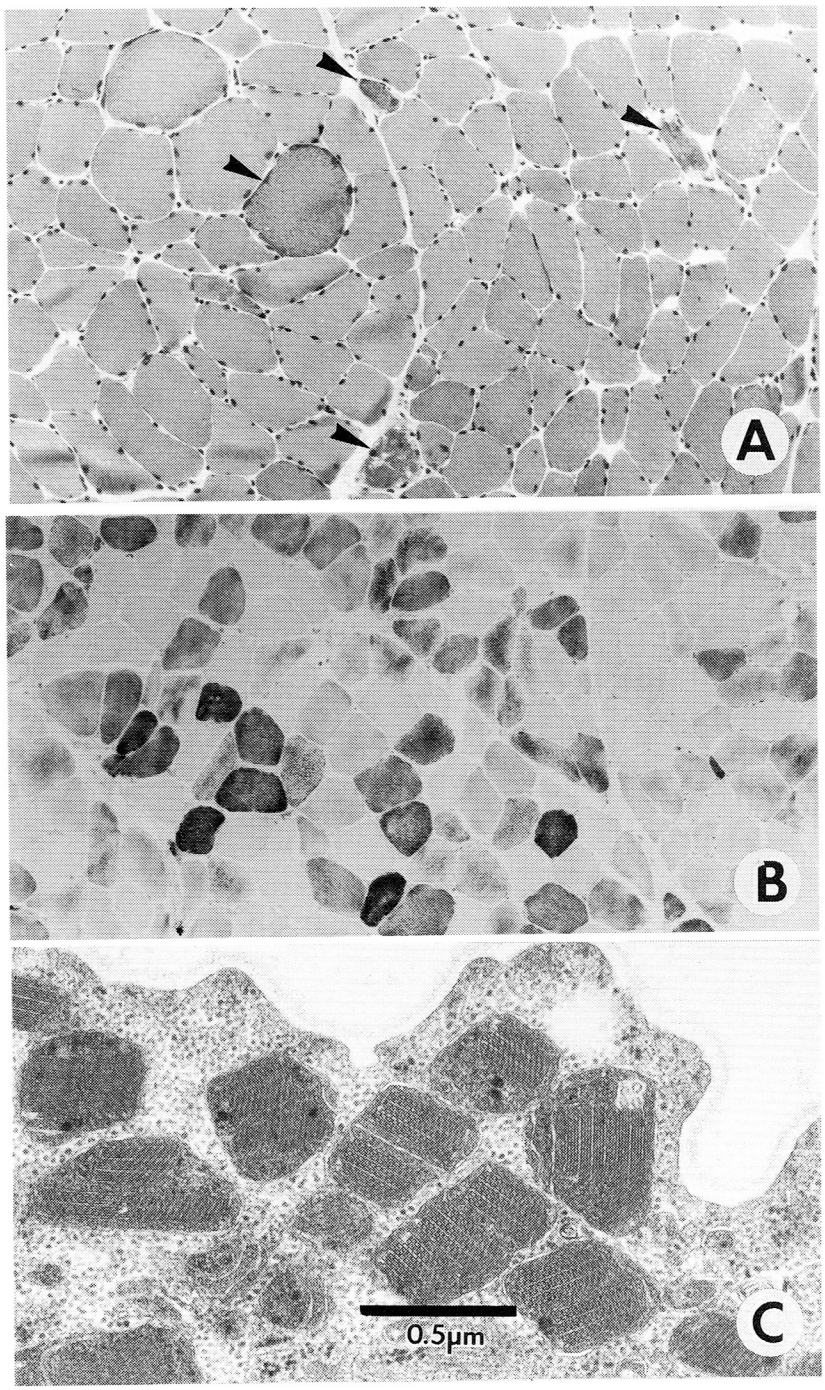


図5　筋生検組織像

A（HE 染色, ×40）；筋線維径の大小不同があり，TG 染色で ragged-red fiber に相応する線維（矢印）が多数見られる．

B（CCO 染色, ×25）；約75%の筋線維に CCO 活性の低下を認めた．

C（電顕像, ×30,000）；細胞膜下に多数の異常ミトコンドリアを認める．

390), ATPase 1419 (Controls875±200)〔いずれも単位はnmol/min/mg〕であった．以上，complex IIIとcomplex IVが，正常コントロールの50%以下に低下していた．

入院後経過：手拳開排困難は日内変動を示しながらも，入院後1か月で消失した．四肢筋力も徐々に改善して4か月後には立位保持が可能となり，7か月後には独歩可能となって退院した．

経過中ビタミンB_1・B_2・イデベノン・ユビキノンが投与されているが，中止後もなお症状の改善が認められた．Ca値は，入院後4か月間は11.0から11.9mg/dlの間にあったが，その後9.9mg/dlに正常化した．K値は4.5から5.9mEq/lの間を変動した．尿酸値は尿酸排泄剤投与にも関わらず，退院時も8.2mg/dlと高いままであった．

考　　察

本症例の特徴は，血中Ca，血清K，尿酸の上昇などの生化学的異常と手拳開排困難にある．

高Ca血症の原因として，内分泌障害，腎障害，悪性腫瘍を疑い検索したが，これらは否定的であった．イオン化Caが正常であることから，尿酸・乳酸・ピルビン酸などの有機酸と結合したCaが多い「見かけ上の高Ca血症」と考えられる．もしそうであるとすると，他のミトコンドリア脳筋症の症例でも見られてよいはずだが，我々の調べたかぎりでは記載しているものがなく，今後の多数例での検討が必要と思われた．

本症例の手拳開排困難は一見grip myotoniaの様だったが，percussion myotoniaも筋電図上のmyotonic dischargeも認められず，true myotoniaとは異なる現象と考えられる．True myotoniaと鑑別すべき手拳開排困難には，Isaacs ら[2]のミオキミアと発汗亢進を伴う症候群，polyneuropathyやpolymyositisに稀に伴うsymptomatic myotonia[3]，慢性頸部神経根障害におけるpseudonyotonia[4]などがある．本症例では拮抗筋の同時筋電図を行っておらず，末梢神経障害の再生過程におけるmisconnectionで，手掌の屈筋群と伸筋群が同時に収縮する機序も否定できない．しかし末梢神経の形態学的検索では，むしろ再生所見に乏しく，しかも症状は一時的であったことから，これも否定的である．経過中変動のあった血清Kと血中Caの高値が筋の興奮性と何らかの関係があった可能性が考えられるため，今後の経過を慎重に追跡したい．

ま　と　め

1）かぜ症状を契機として急激に増悪したmitochondrial neuromyopathyの1例を報告した．
2）生化学的にはcomplex III, IVの部分欠損が認められた．
3）臨床的には，手拳開排困難，高Ca血症，高K血症，高尿酸血症が，急性期に認められたことが特徴であった．

文　　献

1) 福原信義：ミトコンドリア・ミオパチー．神経進歩25：1320，1981.
2) Isaacs H : Continuous muscle fibre activity in an Indian male with additional evidence of terminal motor fibre abnormality. JNNP 30：126, 1967.
3) Walton JN and Gardner-Medwin D: Myotonic disorders, "Disorders of voluntary muscles, 4th ed". (ed by Walton J) Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981. p508.
4) 里吉営二郎，木下真男：慢性頸部神経根障害におけるPseudomyotonia現象について，最新医学28：291，1973.

45）ミトコンドリア脳筋症における下垂体機能異常

金　澤　一　郎*

研究協力者　大　越　教　夫*　石　井　亜紀子*

はじめに

ミトコンドリア脳筋症は，中枢神経系や筋をはじめ多臓器に及ぶ多系統疾患に位置づけられている．従来より，種々のミトコンドリア脳筋症に内分泌異常の合併例が散発性に報告されていたが[1)~5)]，その機序は十分解明されていなかった．近年，大浜らはmitochondrial myopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode (MELAS)およびmyoclonus epilepsy with ragged-red fibers (MERRF)の剖検例にて下垂体前葉細胞におけるミトコンドリアの形態異常を報告した[6)]ことにより，本症における内分泌異常に関して注目されている．我々は，ミトコンドリア脳筋症3例における内分泌機能，特に下垂体前葉機能を検討し，3例全例に視床下部―下垂体系の機能異常を見出したので報告する．

対　象

〔症例1〕25歳，女性．診断：MELAS．17歳より同名半盲を伴う発作性嘔吐・頭痛を頻回に認め，以後，全身痙攣発作の反復や痴呆や精神症状が出現した．神経学的には，高度の痴呆，視力低下，求心性視野狭窄，筋萎縮，左半身の感覚障害，失調性言語を呈した．筋生検にてragged-red fiberを認め，筋の生化学分析では，ミトコンドリア電子伝達系酵素complex Ⅰ～Ⅳの酵素活性は正常であった．CT，MRIにて，大脳・小脳の萎縮および後頭葉領域に脳梗塞様病変がみられた．

〔症例2〕50歳，女性(Sasakiら[2)]，1983)．診断：MERRF．発症は42歳で，小脳症状，動作性ミオクローヌス，筋萎縮，深部反射亢進，病的反射陽性を呈した．筋生検にてragged-red fiberを認め，腓腹神経生検にて有髄神経線維の脱落を呈し，CTにて大脳，小脳の萎縮を認めた．

〔症例3〕19歳，男性．診断：MELASとMERRFの移行型．10歳頃より発症し，難聴，痴呆，痙攣発作，ミオクローヌス，小脳失調，右同名半盲を呈した．筋生検ではragged-red fiberを認め，筋のミトコンドリア電子伝達系酵素の生化学分析ではcomplex Ⅰが正常下限であった．腓腹神経生検では大径有髄線維の脱落を有し，頭部CT，MRIにて脳梗塞様病変を認めた．

内分泌症状と内分泌機能検査

〔症例1〕内分泌症状：思春期より低身長とるいそうが目立ち，身長146cm，体重29.5kgである．陰毛発達は正常であるが，乳房発達はきわめて不良で，これまで月経の発来はなく，二次性徴不全を呈した．

内分泌機能検査：甲状腺機能はT_3 111ng/dl，T_4 5.0μg/dl，free T_4 0.7ng/dlと正常であり，副腎機能はcortisol 8.0μg/dlと正常であったが，性腺機能はestradiol 10pg/dl，progesterone 0.3 ng/dlと低下していた．下垂体前葉機能は，表1に示すようにarginineおよびL-DOPA負荷によるGH分泌は無反応を呈し，growth hormon releasing factor (GRF)負荷試験ではGHの上昇はみられたが，分泌遅延を認めた．したがって，視床下部性GH分泌低下と判定した．LH-RH負荷試験ではLH，FSHの分泌遅延，低反応を呈し，視床下部性LH，FSH分泌低下を認めた．ACTH負荷試験では明らかな異常は示さなかった．

〔症例2〕内分泌症状：身長155cm，体重34.5kgと高度のるいそうを呈したが，性腺発達は正常であった．

内分泌機能検査：甲状腺機能はT_3 101ng/dl，

*筑波大学臨床医学系神経内科

表1　症例1の内分泌機能検査

1．GH

(1)arginine負荷試験（arginine 0.5g/kg i.v.）

time(min)	0	30	60	90
GH(ng/ml)	4.5	3.6	4.0	3.8

(2)L-DOPA負荷試験(L-DOPA 500mg p.o.)

time(min)	0	30	60	90	120
GH(ng/ml)	4.9	3.1	3.5	2.9	5.1

(3)GRF負荷試験(合成hGRF 1μg i.v.)

time(min)	0	15	30	60	90	120
GH(ng/ml)	3.0	7.0	6.5	14.4	16.7	8.6

2．LH，FSH：LH-RH負荷試験（LH-RH 100μg i.v.）

time(min)	0	15	30	60	90	120
LH(mIU/ml)	19.5	38.1	47.0	40.3	38.4	34.4
FSH(mIU/ml)	14.8	22.8	21.0	21.4	20.6	21.1

T_4 10.1μg/dl と正常だが，副腎皮質機能は尿中17-OHCS排泄量1.1mg/day，17-KS排泄量1.5 mg/dayと低下がみられ，ACTH負荷試験にて遅延反応を認めた．下垂体前葉機能検査では表2の

表2　症例2の内分泌機能検査

1．GH

(1)arginine負荷試験（arginine 0.5g/kg i.v.）

time(min)	0	30	60	90	120
GH(ng/ml)	1	2	1	2	7

(2)insulin負荷試験(regular insulin 0.075U/kg i.v.)

time(min)	0	30	60	90	120
GH(ng/ml)	5	2	7	6	4

2．LH，FSH：LH-RH負荷試験（LH-RH 100μg i.v.）

time(min)	0	15	30	60	90
LH(mIU/ml)	68	127	205	261	230
FSH(mIU/ml)	53	86	90	105	97

3．TSH，PRL：TRH負荷試験(TRH 500μg i.v.)

time(min)	0	15	30	60	90
TSH(mIU/ml)	6	20	21	19	16
PRL(mIU/ml)	10	69	59	38	18

4．ACTH試験（ACTH-Z 0.5mg i.m. for 3 days）

	Basal excretion			After(day)		
	vor	vor	vor	1st	2nd	3rd
17-OHCS(mg/dl)	1.5	1.5	2.6	7.6	7.5	32.3
17-KS (mg/dl)	0.8	1.1	1.8	2.5	3.0	11.7

ように，GH が insulin, arginine 負荷のいずれにも無反応であったが，LH-RH 負荷試験による LH, FSH 分泌は正常，TRH 負荷試験による TSH, PRL 分泌は正常であった．ACTH は10pg と低下していた．

〔**症例 3**〕内分泌症状：身長170cm，体重51kg で，全身のやせ以外には特記すべきことなし．

内分泌機能検査：甲状腺機能は T_3 106ng/dl, T_4 7.4μg/dl, free T_4 0.9ng/dl, 副腎機能は cortisol 16.5μg/dl，性腺機能は testosterone 6.1ng/dl と正常であった．下垂体前葉機能は，**表 3** のように LH-RH 負荷試験にて，LH および FSH の分泌遅延・低反応がみられたが，L-DOPA および arginine 負荷試験による GH 分泌，TRH 負荷試験による TSH, PRL 分泌，および ACTH 分泌は正常であった．

考　　察

ミトコンドリア脳筋症 3 例において内分泌機能を検討し，全例に視床下部―下垂体系の機能異常を認めた．臨床症状と内分泌機能異常との関連をみると，症例 1 の無月経および二次性徴障害は視床下部性 LH, FSH の分泌障害が関与するものと考えられる．また，低身長は視床下部性 GH の分泌障害に加えて視床下部性 LH, FSH の分泌障害による二次性徴不全が加わったものと考えられる．症例 2 のるいそうに関しては，筋萎縮および ACTH の分泌障害による副腎皮質機能低下が関与するものと考えられる．しかし，症例 2 では GH が低下していたにもかかわらず，身長が正常であるのは，発症年齢が42歳と遅かったことによるものと考えられる．症例 3 では，明らかな臨床症状がないにもかかわらず LH-RH 負荷試験にて視床下部性 LH, FSH の分泌障害がみられたことは，ミトコンドリア脳筋症の症例にはこのような潜在性の下垂体機能異常が存在することを示唆するものである．したがって，ミトコンドリア脳筋症には内分泌症状の明らかな症例あるいは潜在性の症例も含めて，視床下部―下垂体系の機能異常がかなりの症例に存在している可能性があるものと推定できる．

これまでミトコンドリア脳筋症に内分泌機能異常を呈した報告は散発性に報告されている．Fitzsimons らは視床下部性不妊症を呈した MERRF の症例を報告している[1]．Kuriyama らは低身長を呈し，GH, LH, FSH の分泌低下を認めた Kearns-Sayre の症例を報告しており[3]，我々の症例 1 に類似している．織茂ら[4]，Doriguzzi ら[5] も性腺機能異常を呈した症例を報告しているが，下垂体機能には明らかな異常は認めなかった．

一方，大浜らはミトコンドリア脳筋症の剖検例にて下垂体ホルモン分泌細胞内のミトコンドリアの形態異常を報告しており注目されている．しかし，我々の症例 1 および 3 では一次性の下垂体異

表 3　症例 3 の内分泌機能検査

1．GH：arginine負荷試験（arginine 0.5g/kg i.v.）

time(min)	0	30	60	90	120
GH(ng/ml)	3.2	6.4	8.8	4.8	3.7

2．LH，FSH：LH-RH負荷試験（LH-RH 100μg i.v.）

time(min)	0	15	30	60	90
LH(mIU/ml)	15.6	35.0	41.7	37.3	30.9
FSH(mIU/ml)	8.1	11.0	12.4	11.8	12.7

3．TSH，PRL：TRH負荷試験(TRH 500μg i.v.)

time(min)	0	15	30	60	90
TSH(mIU/ml)	1.2	14.4	14.5	9.3	7.3
PRL(mIU/ml)	8	56	30	17	12

常というより視床下部性下垂体前葉機能異常と考えるべき症例であり，ミトコンドリア脳筋症の下垂体機能異常に関しては，視床下部性，下垂体性の両者を考慮すべきである．また，本症における視床下部—下垂体系機能異常の発現機序として，①大浜らが報告している下垂体ホルモン分泌細胞内のミトコンドリアの形態異常によるもの，②ミトコンドリア異常による視床下部の向下垂体ホルモン産生細胞の障害，③視床下部における mitochondrial angiopathy による虚血性変化，などが考えられるが，これらの解明には，症例の蓄積や病理組織学的検索などによる詳細なる検討が必要である．

ま と め

1．ミトコンドリア脳筋症の3症例において内分泌機能検査を施行し，全例に視床下部—下垂体系の機能異常がみられた．
2．視床下部性下垂体前葉機能の障害が低身長や無月経などの臨床症状に関与している可能性を示した．
3．明らかな内分泌症状がない症例でも，下垂体機能試験にて潜在性の機能異常を見い出した．
4．ミトコンドリア脳筋症における視床下部—下垂体系の機能異常は重要な臨床所見の一つと考えられる．

謝辞　症例1および3の筋ミトコンドリア電子伝達系酵素の測定を施行していただきました国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部埜中征哉先生に深謝いたします．

文　献

1) Fitzsimons RB, Clifton-Bligh P and Wolfenden WH : Mitochondrial myopathy and lactic acidaemia with myoclonic epilepsy, ataxia and hypothalamic infertility : a variant of Ramsay-Hunt syndrome?. J Neurol Neurosurg Psychiatry 44 : 79—82, 1981.
2) Sasaki H, Kuzuhara S, Kanazawa I et al : Myoclonus, cerebellar disorder, neuropathy, mitochondrial myopathy, and ACTH deficiency. Neurology 33 : 1288—1293, 1983.
3) Kuriyama M, Suehara M, Marume N et al : High CSF and pyruvate content in Kearns-Sayre syndrome. Neurology 34 : 253—255, 1984.
4) 織茂智之，冷牟田英三，池田正行ほか：Cytochrome c oxidase 部分欠損による“oculocraniosomatic neuromuscular disease with ragged-red fibers”の1家系2症例．臨床神経 26：194—201，1986.
5) Doriguzzi C, Palmucci L, Mongini T et al : Endocrine involvement in mitochondrial encephalomyopathy with partial cytochrome c oxidase deficiency. J Neurol Neurosurg Psychiatry 52 : 122—125, 1989.
6) 大浜栄作ほか：ミトコンドリア脳筋症の下垂体におけるミトコンドリア異常．第30回日本神経病理学会総会学術研究会抄録集 1989，p232.

46）チトクロームc酸化酵素部分欠損
——筋線維ときほぐし標本による検討——

埜中征哉*

研究協力者　後藤雄一*　長谷川ひとみ*　松岡太郎*

はじめに

Kearns-Sayre症候群(KSS)を含む慢性進行性外眼筋麻痺症候群（chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO）の組織化学的特徴はragged-red fiber（RRF）の存在と，cytochrome c oxidase（CCO）の部分欠損である．またmyoclonus epilepsy with ragged-red fibers（MERRF）でも主な組織化学的異常はCCOの部分欠損である．このCCO部分欠損を形態学的により特徴づけることはミトコンドリア病の病理発生を考える上にきわめて重要である．我々は筋線維のときほぐし法を考案し，CPEO, MERRF生検筋についてそのときほぐし法で1本1本の筋線維についてCCOの欠損の状態を検索し，両者の形態発生上の違いを見出したので報告する．

対象と方法

対象としたのは，ミトコンドリアDNA（mtDNA）に種々の長さの欠失をもつCPEO 4例と，mtDNAに欠失をみないMERRFの2例である．6例とも組織化学的にCCOの部分欠損を認めた（図1）．

生検筋の一部の小筋束を2％グルタールアルデヒド（0.05M phosphate buffer saline PBS緩衝液，pH7.3）で15分固定後，PBSにて洗滌し，Seligmanらの方法でCCO染色し，実体顕微鏡下で，PBS液内で筋線維を1本1本ときほぐした[1),2)]．ときほぐし標本にするとCCO(+)とCCO(−)の部分が節状に分布するのがみられるので，各々の長さを測定し，CCO(−)の節の長さと，mtDNA欠失の位置，長さ，量との対比を試みた．

ときほぐした1本1本の筋線維のCCO(−)の部とCCO(+)と(−)の部の移行部を切りとり，その部をOsO_4で後固定し，脱水後エポンに包埋して電子顕微鏡的に検索した．

結　果

1）ときほぐし標本

上記6例の生検筋（約1～1.5cm長）からときほぐし線維100本ずつ（計600本）を検索した．

CPEO 4例全例でCCO(+)，CCO(−)の節状分布(segmental distribution)がみられた[3)]．CCO(−)の長さは数百ミクロンから4mmまでの長さで，その量，長さは筋線維ごとにより異なっていた（図2）．欠失したmtDNAの量（%），部位とCCO(−)の量（%）を対比したのが表である．症例1ではCCOのサブユニットであるCO 1～CO 3をコードする部は含まれていないのに表現型としてはCCOの部分欠損であった．4症例と検討対象例が少ないので結論的なことはいえないが欠失mtDNAの量の多いものはCCO(−)の量が多い傾向にあった（表）．

MERRFの患者では光顕的にはCCO部分欠損であった．ときほぐしではCCO活性の高低は一本の筋線維内で多少みられたが，明らかな節状分布はみられなかった(図3)．すなわち酵素欠損した部分はかなり長い距離に分布し，CCO(+)とCCO(−)の部の移行はないか，あっても境界不鮮明であった．

2）電顕所見

CPEOの患者のときほぐし標本の電顕ではCCO(+)と(−)の移行部は電顕的にもかなり明

*国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部

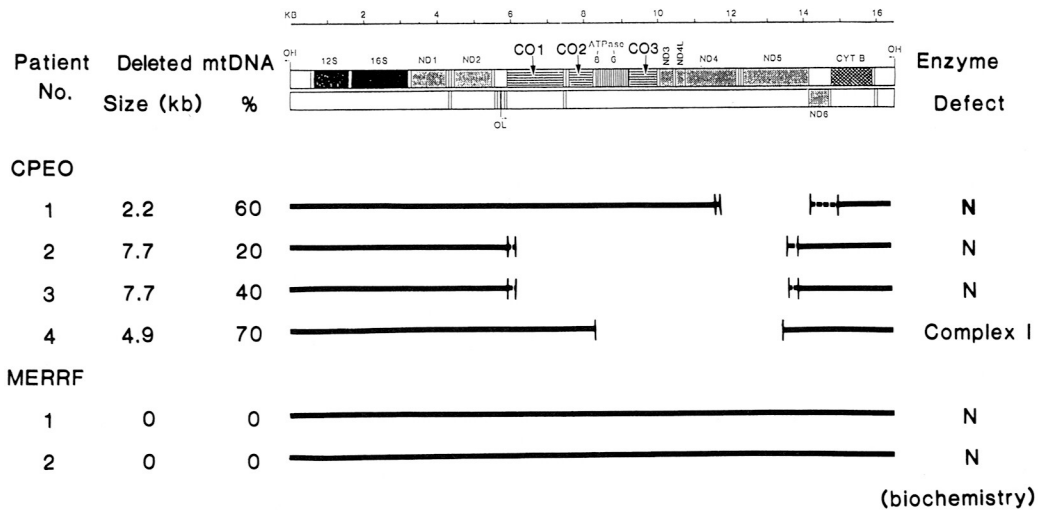


図1　慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)，MERRF 患者生検筋内のミトコンドリア DNA 異常．生化学的には CPEO の症例 4 の複合体 I 欠損を認めた以外は正常（N）である．

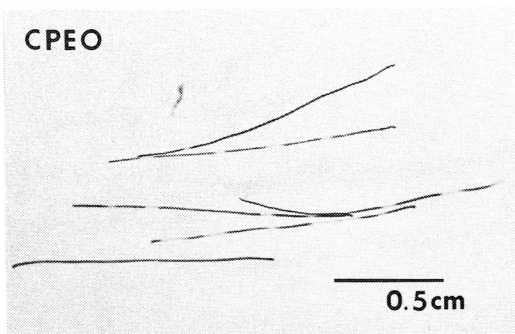


図2　CPEO 生検筋のときほぐし標本（cytochrome c oxidase 染色）．一本の筋線維内に酵素活性が欠損した部位と，正常活性がある部位（濃染している）が節状に分布している．

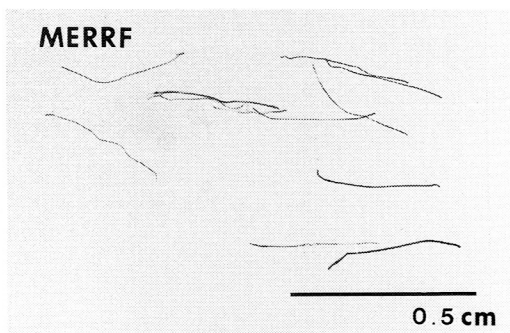


図3　MERRF 生検筋のときほぐし標本（cytochrome c oxidase 染色）．CPEO（図2）と異なり節状欠損の像はみられない．

表　Deleted mtDNA (%) vs CCO (−) segment (length)

Patient No	Deleted mtDNA Size(kb)	Sites	%	Teased Fibers Number*	% of CCO(−)	% of CCO(+)
CPEO						
1	2.2	ND4,5	60	100	20.1	79.9
2	7.7	CO1-3, ND4,5	20	100	16.0	84.0
3	7.7	CO1-3, ND4,5	40	100	12.4	87.6
4	4.9	CO3, ND4,5	70	100	25.4	74.6

*Number of fibers examined

瞭であった．移行部では CCO(+)と(−)のミトコンドリアが共存した部もあったが，多くの場では CCO(+)と(−)のミトコンドリアは集合し，モザイクの場は少なかった(図4)．また CCO(−)の部では巨大化したミトコンドリアが多数集っていて，これは光顕的な RRF の部に相当すると考えられた．CCO(−)の節の部では全てのミトコンドリアは CCO(−)で CCO(+)と CCO(−)のミトコンドリアがモザイクをなすことはなかった．逆に CCO(+)の節では全てのミトコンドリアは CCO(+)であった．

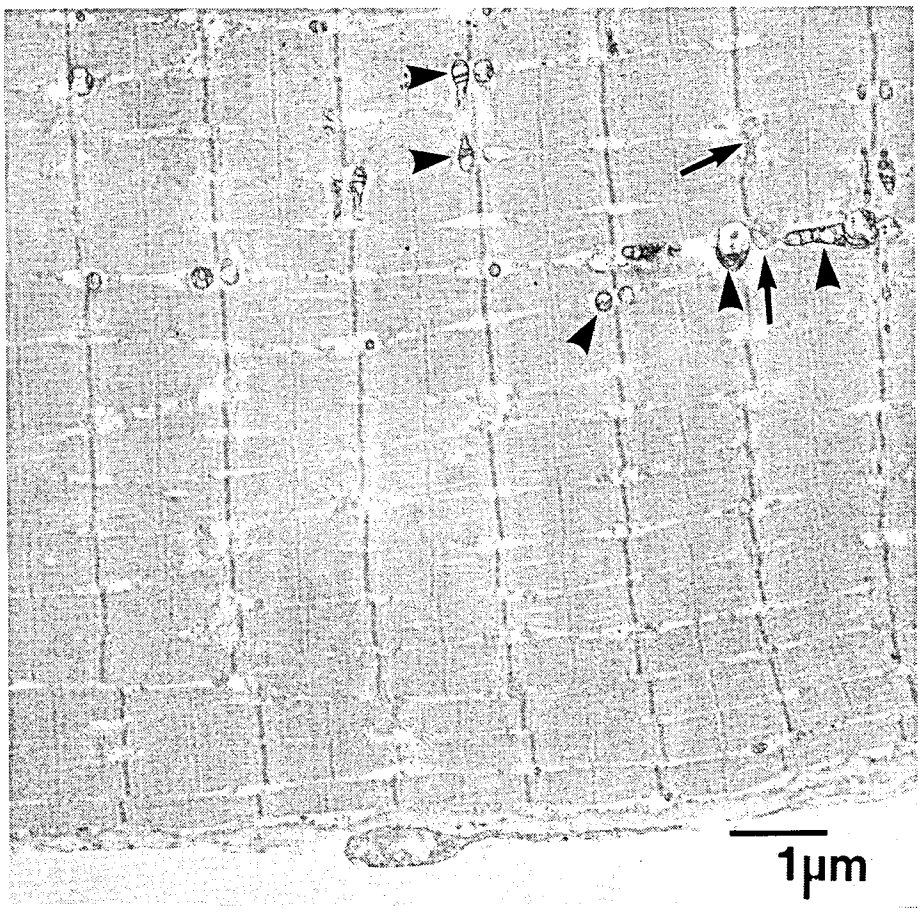


図4　Cytochrome c oxidase（+）と（−）節部の移行部の電顕像．一部に酵素活性が正常（矢頭部）と欠損（矢印）ミトコンドリアが共存するが，大部分の所では共存像（細胞内モザイク）はない．ときほぐし標本を cytochrome c oxidase 染色し，Epon 包埋，超薄切片にウラニール染色のみ行ったもの．

考　　察

KSS を含む CPEO の患者の50〜60% は，mtDNA に欠失のあることが明らかにされ[4),5)]，本症では mtDNA の突然変異が病因的に大きな意味をもつことが示唆されている．mtDNA 欠失部位は患者ごとに異なり，また正常と欠失した mtDNA が共存し（heteroplasmy），その量比も患者ごとに異なっている[5)]．そのために欠失した mtDNA と臨床，病理像との因果関係を求めにくく，欠失した mtDNA が何を意味するか不明な点が多かった．

我々は CPEO には全例 CCO 部分欠損が組織化学的に証明されることより，この CCO 部分欠損の量と mtDNA 欠失部位と量が何か関係あるのではないかと思い検索を進めてきて，欠失した mtDNA の量と CCO 欠損線維数の間に正の相関を見出した（本班会議演題50を参照）．症例1では欠失部に CCO をコードするサブユニットである CO 1〜3が含まれず複合体 I をコードする ND 4，5が含まれていた．この例では複合体 I の欠損は生化学的に証明されず，表現型の異常としては CCO 部分欠損のみで，欠失した mtDNA と表現型の間に因果関係が見出せなかった．このような例の生検筋でも複合体 I 活性を組織化学的に証

明できれば，複合体Ⅰの部分欠損をも証明でき，CCO部分欠損が2次的現象であることが明らかにされるかもしれない．mtDNAの異常では酵素欠損の部は節状であるため，筋組織をホモジェネートして生化学的に酵素活性を測定したのでは，なかなかmtDNA異常の意味するものを明らかにすることはできないため，組織化学的なアプローチが重要な意味をもつだろうと考えられる．

CPEOはmtDNAの異常で酵素欠損の部が節状であることは筋の発育分化途上における"mitotic segregation"で説明がつく．MERRFのCCO部分欠損が節状でないことは，MERRFでは核DNAの異常が一義的であるか，もしくは，もしmtDNAの異常があっても，正常と異常のミトコンドリアが共存する（heteroplasmy）可能性は低い．ではなぜCCO(+)とCCO(−)の線維が共存するかについては，神経支配などの外的因子が影響を与えていると考えられる．代謝性筋疾患（例えばPompe病）でも筋線維のタイプごとでまた筋束ごとによって侵される程度が異なるから，酵素活性の発現様式などの選択性は存在すると考えられるからである．

文　献

1) Nonaka I, Koga Y et al: Tissue specificity in cytochrome c oxidase deficient myopathy. J Neurol Sci 92: 193, 1989.
2) Seligman AM, Karnovsky MJ et al: Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmophylic reagent, diaminobenzidine (DAB). J Cell Biol 38: 1, 1968.
3) Yamamoto M and Nonaka I: Skeletal muscle pathology in chronic progressive external ophthalmoplegia with ragged-red fibers. Acta Neuropathol (Berl) 76: 558, 1988.
4) Holt IJ, Harding AE et al: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331: 717, 1988.
5) Moraes CT, DiMauro S et al: Mitochondrial deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Med 320: 1293, 1989.

IX. ミトコンドリア(3)

47) 家族性ミトコンドリア・ミオパチーにおけるミトコンドリアDNAの解析：non-D loop 領域の多重欠失について

金 澤 一 郎*

研究協力者　大 越 教 夫*　柚 崎 通 介**
太 田 成 男**　香 川 靖 雄**

はじめに

ミトコンドリア・ミオパチー，特にKearns-Sayre症候群や慢性進行性外眼筋麻痺の多数例に筋ミトコンドリアDNA (mtDNA) の部分欠失が認められている[1)~3)]．しかし，その多くは孤発例であり，家族歴を有する症例は少なく[4),5)]，本症の遺伝形式を考察する上で多くの問題点を残している．最近，常染色体優性遺伝を呈する家系に筋mtDNAのD-loop領域における多重欠失を認め，核DNAによるmtDNAの欠失に対する作用を示唆する報告があり[5)]，注目されている．また，従来報告された症例の大多数は単一欠失と考えられていたが，polymerase chain reaction (PCR) 法による分析の結果，mtDNAの多重欠失を有する症例が報告された[5)]．我々はすでに本症の筋mtDNAに兄弟例においてほぼ同一の部分欠失を有するミトコンドリア・ミオパチーの家系を報告した[6),7)]．今回は，PCR法を用いて筋mtDNA断片を増幅することにより部分欠失が兄弟でともに同一のパターンをとるnon D-loop領域の多重欠失であることを証明し，さらに欠失部の塩基配列を決定したので報告する．

症　例

症例1 (51歳男性)，症例2 (49歳男性) は，すでに筋mtDNAの部分欠失の存在することを報告したKearns-Sayre症候群不全型の兄弟例である[6),7)]．両親はいとこ婚で，症例1および2以外の人々は全て臨床的には無症状であった．両症例とも，眼瞼下垂，視力障害，視神経萎縮，ごく軽度の外眼筋麻痺，四肢および体幹の筋萎縮，筋力低下，軽度の知能低下，末梢神経障害を認めた．筋生検にて多数のragged-red fiberを認め，cytochrome c oxidase (CCO) 染色ではCCOの部分欠損を呈し，筋の生化学的分析にてミトコンドリア電子伝達系酵素complex IおよびIVの活性の低下を認めた．

方　法

材料：mtDNA分析には，症例1，2，対照の計3例の生検凍結筋を用い，高分子DNAを抽出した．

Southern blottingによるmtDNA分析：抽出したDNAを制限酵素*Pvu* IIにより消化後，southern blottingを施行した．下記に示すoligonucleotideをPCR法にて増幅したmtDNA断片をhybridization probeとして用いて，random primer labeling法で標識した．異常mtDNAの定量的解析はAMBIS radioanalytic imaging system (AMBIS System Inc., San Diego CA, USA) を用いて測定した．

Oligonucleotides (図1)：自動DNA合成装置model 381A (Applied Biosystems Inc., CA, USA) によりoligonucleotidesを合成後，PCR法により増幅してprobeとして用いた．

Probe 1 (PR 1)；dGATATGTCTCCATACC-CATTAC (nucleotide number 4,214-4,235)

＊筑波大学臨床医学系神経内科
＊＊自治医科大学第一生化学

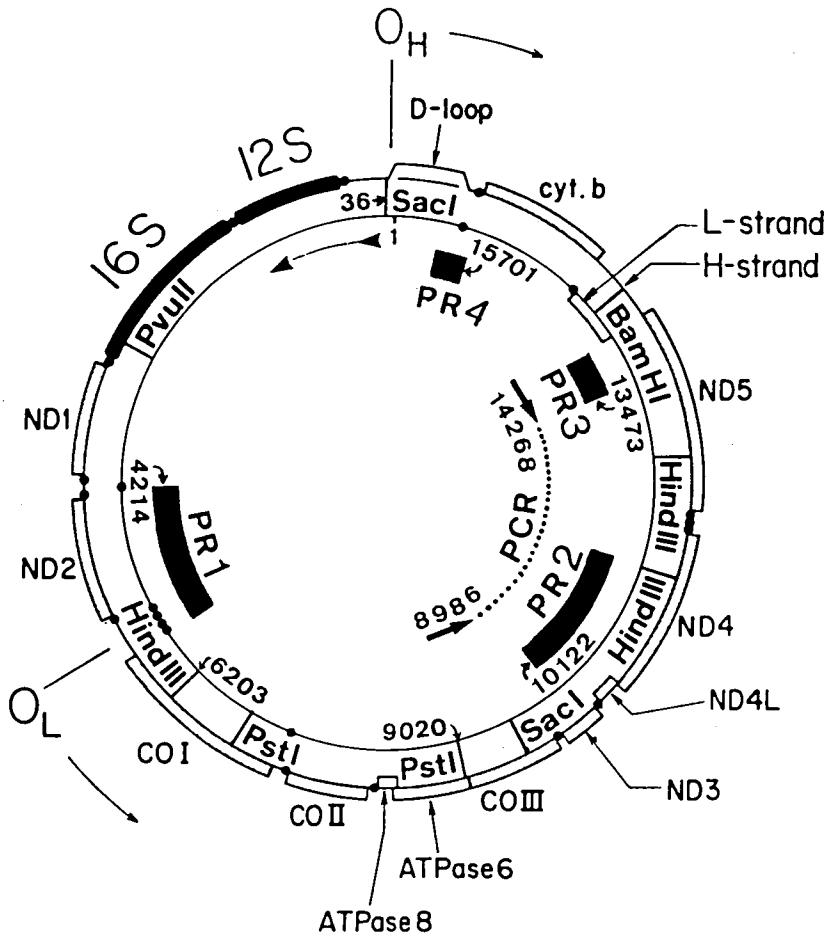


図1 Restriction map of human mitochondrial DNA and locations of hybridization probes (PR1-PR4) and oligonucleotides used as primers in polymerase chain reactions (PCR). The numbers indicate nucleotide numbers of mtDNA according to (1). The hybridization probes used were fragments of mtDNA of residue 4,214 to 5,791 (PR1), 10,122 to 11,609 (PR2), 13,473 to 13,970 (PR3) and 15,701 to 16,039 (PR4). ND, CO, ATPase and cyt b are genes for subunits of NADH-CoQ reductase, cytochrome oxidase, ATPase and cytochrome b, respectively; O_H and O_L, origins of replication for H-strand and L-strand, respectively; 16S and 12S, genes for mitochondrial ribosomal RNA; Sac I, Bam HI, Hind III, Pvu II and Pst I, restriction sites of these restriction enzymes; closed circles on both strands, genes for mitochondrial tRNAs.

and
dCGAAGAAGCAGCTTCAAACCTGC (5,791-5,769)

Probe 2 (PR 2) ; dTTTTGACTAC-CACAACTCAACG (10,122-10,143) and dATTTTAGGTCTGTTTGTCGTAGG (11,609-11,587)

Probe 3 (PR 3) ; dATTAGCAGGAATACCTTTCCTCA (13,473-13,495) and dCTCGTAAGAAGGCCTAG (13,970-13,954)

Probe 4 (PR 4) ; dCCACTAAGCCAATCATTTATTGA (15,701-15,724) and dCTTCCCCATGAAAGAACAGAGAA (16,039-16,017)

PCR 法を用いた mtDNA 分析：すでに報告されている本症例の欠失推定部位[6),7)]を考慮に入れて，症例および対照の筋 mtDNA 断片を dATAGCCCTGGCCGTACGCCTA (8,986-9,006) と dCGGGAGGATCCTATTGGTGCG (14,268-14,248) を oligonucleotide primer として用いて，PCR 法により増幅した（図1の PCR）．増幅した mtDNA を制限酵素 *Bam*HI および *Pst* I により消化後，電気泳動を施行した．

DNA 塩基配列：症例1について上記 PCR 部を増幅した mtDNA 断片を subclone 化し，欠失 mtDNA の塩基配列を dideoxy nucleotide 法により決定した．

結　　果

Southern blotting による mtDNA 分析：全 mtDNA を probe 1～4 を用いて Southern blotting を施行した結果，症例1および2において約 2.5～6.5kb の欠失を有する幅の広い extra band を認めた（図2）．また，これらの欠失を有する mtDNA の割合やパターンが各 probe により異なっており，各 probe ごとに欠失を有する mtDNA を定量的に測定した．Probe 1 では症例1で62%，症例2で70%，probe 2 では症例1で50%，症例2で40%，probe 3 では症例1で56%，症例2で55%，probe 4 では症例1で35%，症例2で30%の mtDNA にそれぞれ欠失がみられた．

PCR 法を用いた mtDNA 分析：それぞれの mtDNA 断片（8,986～14,268）を PCR 法にて増幅後，*Bam*HI，*Pst* I にて消化し，電気泳動にて分離した結果，図3に示すように mtDNA の断片は400bp～2,000bp に及ぶ多数の band を検出した．このことは mtDNA の欠失が多重欠失であることを意味しており，また症例1，2とも全く同一パターンを呈した．したがって，Southern blotting 分析において幅の広い extra band を認めたことは多重欠失によるためと考えられる．

DNA 塩基配列：欠失部位の塩基配列は図4に示すが，少なくとも12個の欠失起始部を認め，その欠失の大きさは490bp から4,642bp であった．それら全ての欠失部の塩基配列には，4～12bp に及ぶ short direct repeat を認めた．

考　　察

PCR 法を用い，筋 mtDNA の多重欠失を有するミトコンドリア・ミオパチーの兄弟例を報告した．検索した範囲ではその多重欠失は兄弟例において同一のパターンを呈し，さらに症例1における塩基配列の分析では，non D-loop 領域に少なくとも12個の欠失が存在し，その欠失部には4～12 bp に及ぶ direct repeat を認めた．

これまでミトコンドリア・ミオパチーにおける筋 mtDNA の部分欠失は，Holt らの報告[1)]以来，多くの報告例がある．しかし，その多くは孤発例であることから遺伝形式に関する mtDNA レベルでの解析は十分ではない．これまで，Ozawa らによる母娘に筋 mtDNA の部分欠失を有する母系遺伝を示唆する報告[4)]や Zeviani らの常染色体優性遺伝例で mtDNA の D-loop 領域を起始部とする多重欠失を認めたとする報告[5)]などがある．ここで Zeviani らは，mtDNA の複製や転写の制御部位が D-loop 領域に集中していることから，D-loop 領域が核と mtDNA の相互作用に重要な役割を有し D-loop 領域から始まる mtDNA の欠失が起こると説明している．しかし，我々の症例は欠失部位が D-loop 領域とは明らかに異なる部位に存在し，また兄弟例ともほぼ同一のパターン

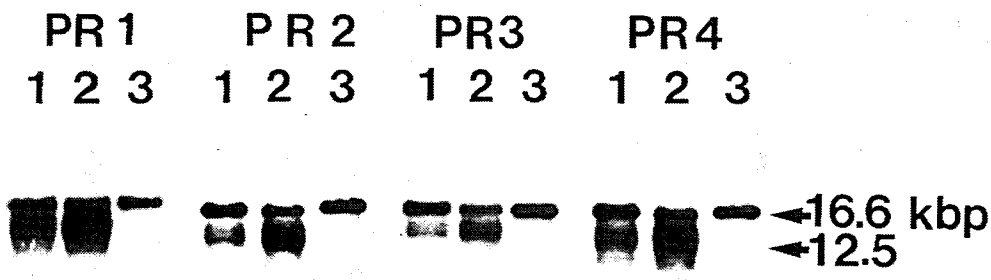


図2　Total Southern blotting. Samples of 5 μg of total DNA were digested with Pvu II and subjected to Southern blotting. The hybridization probes used were PR1, PR2, PR3 and PR4 of Fig 1, which are indicated at the top of each panel. Hybridizations were detected by autoradiography. Lanes 1, 2 and 3, the samples from patient 1, patient 2 and a control, respectively.

を有する多重欠失を認めた点が特異である．この点に関しては以下のような可能性が考えられる．1）本家系の遺伝形式を常染色体劣性遺伝と仮定すると両親の核遺伝子の作用により兄弟のmtDNAの同一部位が変異を起こした可能性，2）母親の筋mtDNAに検出できない程度の少量の欠失が存在するために母系遺伝により兄弟に欠失が起こった可能性，3）兄弟ともに筋mtDNAに欠失を起こしやすい部位が存在し，何らかの機序により兄弟の同一の変異が起こった可能性，などが考えられる．

MtDNAの欠失が起こるメカニズムは未だ十分に解明されていないが，Schonらは13bpよりなるdirect repeatが大きな欠失に対するhot spotsであり，direct repeatによるhomologous recombinationが欠失に関与していると提唱している[9]．我々の症例でも4～12bpのdirect repeatを認め，homologous recombinationが欠失に関与している可能性もあるが，すべての欠失をhomologous recombinationで説明するにはdirect repeatが短すぎることから，むしろslipped mispairing modelによる可能性のほうが強いと考えられる．

まとめ

1．家族性ミトコンドリア・ミオパチー症例においてPCR法を用いてミトコンドリアDNAの解析を行なった．

2．兄弟ともに同一のパターンをとる筋mtDNAの多重欠失を認め，欠失部位はD-loopとは明らかに異なっていた．

3．欠失部の塩基配列には，4～12bpに及ぶ12種類のdirect repeatを認めた．

4．欠失の発現機序には，direct repeat部におけるslipped mispairing modelの関与が推定される．

文献

1) Holt IJ, Harding AE and Morgan-Hughes JA: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331: 717—719, 1988.

2) Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S et al: Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. Neurology 38: 1339—1346, 1988.

3) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Med 320: 1293—1299, 1989.

4) Ozawa T, Yoneda M, Tanaka M et al: Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family with mitochondrial myopathy. Biochem Biophys Res Commun

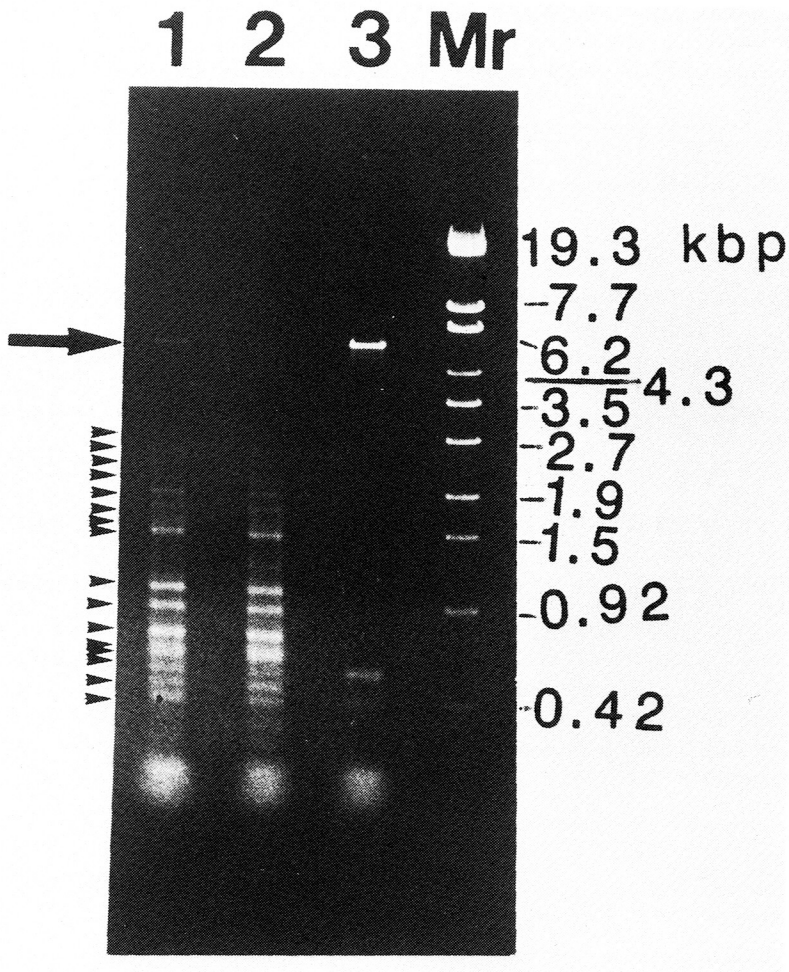


図3 Fragments amplified by the polymerase chain reaction. Fragments between residue 8,986 and 14,268 (Fig. 1, center) were amplified from the total DNA (1 μg) from two patients (lanes 1 and 2, patients 1 and 2, respectively) and the nomal muscle DNA (lane 3). Mr is a standard DNA mixture (lane 4). The fragments were stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. The fragment of normal mitochondria without any deletion appeared at 5 kbp (indicated by an arrow). The samples from the two patients gave at least 16 different bands as indicated by arrowheads, and the amplification patterns resembled one another.

```
     9270        9280                          13820
CAGGGGCCCTCTCAGCCCTC(----cagccctc)GCTGTCACTTTCCTAGGACT   9282-13809 (-4528)
       9430        9440                        14090      14100
CACCACCTGTCCAAAAAGGC(----ccaaaaaggc)ATAATTAAACTTTACTTC   9441-14082 (-4642)
  9430        9440                            13970      13980
ACCTGTCCAAAAAGGCCTTC(----aggccttc)TTACGAGCCAAAACCTGCCC   9445-13963 (-4519)
9480      9490                                13740      13750
TTTTTTTCTTCGCAGGATTT(----ttcgcaggattt)CTCATTACTAACAACA   9498-13734 (-4237)
    9520        9530                        14140      15150
CACTCCAGCCTAGCCCCTAC(----ccctac)TCCTAATCACATAACCTATTCC   9533-14134 (-4602)
  9560        9570                            13960      13970
CCCCGAACAGGCATCACCCC(----cccc)TATCTAGGCCTTCTTACGAGCCAA   9575-13950 (-4377)
          9580                                13960      13970
TCACCCCGCTAAATCCCCTA(----aatccccta)TCTAGGCCTTCTTACGAGC   9588-13952 (-4366)
      9590        9600                        14150      14160
TCCCCTAGAAGTCCCACTCC(----actcc)TAATCACATAACCTATTCCCCCG   9601-14137 (-4537)
        9600                            14150      14160
AGTCCCACTCCTAAACACAT(----cacat)AACCTATTCCCCCGAGCAATCTC   9611-14146 (-4536)
        10750                           14140      14150
ACATAACCTAAACCTACTCC(----cctactcc)TAATCACATAACCTATTCCC   10759-14137 (-3379)
            10920                           14160      14170
ATTTAGCTGTTCCCCAACCT(----aacct)ATTCCCCCGAGCAATCTCAATTA   10926-14151 (-3226)
    13750       13760                           14260      14270
CTAACAACATTTCCCCCGCA(----cccccgca)CCAATAGGATCCTCCCGAAT   13762-14251 (-490)
```

図4 Nucleotide sequences of the breakpoint regions in mtDNA from patient 1. Twelve different deletion patterns were observed in 14 clones. Numbering of nucleotides is according to that of HeLa cell mtDNA(1). Breakpoints are indicated in parentheses. Small letters indicate nucleotides within deletions. Regions of direct repeats are underlines.

154: 1240—1247, 1988.

5) Zeviani M, Servidei S, Gellera C et al: An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. Nature 339: 309—311, 1989.

6) 中西孝雄，大越教夫，金澤一郎ほか：ミトコンドリア・ミオパチー1家系におけるミトコンドリアDNAの解析．"厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究"（杉田班）昭和63年度研究報告書，1989，pp139—144.

7) Ohkoshi N, Harihara S, Nakanishi T and Kanazawa I: A familial mitochondrial myopathy with possible multiple deletions of mitochondrial DNA. Biomedical Res (Tokyo) 10: 453—457, 1989.

8) Mizusawa H, Watanabe M, Kanazawa I et al: Familial mitochondrial myopathy associated with peripheral neuropathy: partial deficiencies of complex I and complex IV. J Neurol Sci 86: 171—184, 1988.

9) Schon EA, Rizzuto R, Moreas CT et al: A direct repeat is a hot spot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. Science 244: 346—349, 1989.

48）ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリアDNAの欠失

佐藤　猛*

研究協力者　平訳浩子*　関公一*　石垣泰則*
田中茂樹*　中村眞二**　宝来聰***

はじめに

ミトコンドリア(mt.)脳筋症で骨格筋などにおいて，ミトコンドリアの電子伝達系酵素の欠損，さらにmtDNAの欠失が報告されている[1),2)]．われわれは種々の疾患の骨格筋のmtDNAの解析を行い，mtDNA欠失例を見いだし臨床像との対比を行った[3)]．さらにmtDNAの欠失部位の正確な同定を試みたので報告する．

症例

次の32例の骨格筋を検索した．

慢性進行性外眼筋麻痺症候群（CPEO）		11例
Kearns-Sayre症候群（KSS）不全型	4	
眼筋ミオパチー	7	
MELAS		4
MERRF		1
他のミトコンドリアミオパチー		5
急性筋壊死症		6
アルコール中毒	1	
ゲルマニウム中毒	2	
悪性高熱	2	
不明	1	
CMT		4
その他		1
	計	32例

なおKSS不全型2例は兄妹例である．兄は47歳で死亡した．3歳で難聴，34歳頃から進行性外眼筋麻痺と四肢筋の萎縮が始まっている．妹は44歳で，15歳から難聴，27歳から下肢筋力低下，34歳から眼瞼下垂が始まっている．母は健康であるが下肢筋のmtDNAを同様に検索した．

方法

ミトコンドリアの電子伝達系酵素活性：骨格筋からミトコンドリアを抽出し，二波長分光光度計にて各複合体の活性を測定した．

Southern blotting：mtDNAプローブはヒト胎盤から精製したtotal mtDNAをPvu IIでlinearize後，α-^{32}P-dCTPまたはα-^{32}P-dATPをmultiprime labeling法で標識したものを用いた．さらにtotal mtDNAを適当な制限分解酵素で切断した16種の断片をpUC19ベクターにてサブクローンしたものを用いた．凍結骨格筋から抽出したDNAを制限分解酵素で切断，電泳後，gene screen plus膜に転写し，ハイブリダイゼーションを行った．

さらにpolymerase chain reaction（PCR）法により，欠失DNAの両端をはさむように合成したorigoprimerを用いて，mtDNAの一部を1,000～2,000kb増幅し，適当な制限分解酵素で切断した後，Southern blot hybridizationを施行し，欠失部位をより正確に同定した．

結果と考察

Total mtDNAプローブおよびそのfragment mtDNAプローブを用いた．

Southern blottingにて8例の患者に3.3～8.1

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

kbにわたりmtDNAの大きな欠失を認めた(表1). Southern blottingにより得られたautoradiography上の正常及び異常mtDNAのbandをdensitometerにて計測して両者の比率を求めた. 異常mtDNAの占める比率は1.0～68.0%と大きな割合を占めていた. 8例中3例は外眼筋症状のみを呈しており四肢筋力は全く正常であったが異常mtDNAの占める比率は30～68%と大きな割合を占めていた. 即ち, 臨床症状と異常mtDNAの占める比率とは対応していなかった.

MERRFおよびMELASではSouthern blottingで検出できるような大きなmtDNAの欠失は認められなかった. この結果はMoraesら[2]の報告と全く同一であった(表2). さらに横紋筋融解症など他のミオパチーではmtDNAの欠失は見られなかった. Charcot-Marie-Tooth病では筋生検にてragged-red fiberが認められることがあるがやはり異常は見られなかった.

骨格筋のmt.電子伝達系酵素活性の測定ではmtDNAの欠失を示した症例はほとんどの例がcytochrome c oxidase, succinate cytochrome c reductaseの低下を示していた(図1).

PCR法にて欠失mtDNAの両端をはさむ残存部を約2,000～3,000kb増幅後, 制限分解酵素にて切断してから電気泳動して欠失部をより正確に同定した. 欠失領域はcytochrome c oxidaseのsubunit III, complex Iのsubunit 4, 5に対応する部位が多かった(図2). この欠失領域はSchonら[4]の報告した部位と大体一致していた. 彼らが示しているように欠失部の両端の塩基配列の繰り返し構造の存在によりslipped misspairingが生じやすいのかもしれない. 塩基配列を正確に同定することによりこの問題をより明確にする予定である.

Kearns-Sayre症候群の兄妹例では8.1kbと

表1 Deletions of mitochondrial DNA in CPEO

Case	Age Sex	Age at Onset	Symptoms CNS	Myopathy General	Myopathy Ocular	DNA deletions Size kb	per cent %
1.	47/M	3	+	+	+	8.1, 7.6	2.4, 4.4
2.	44/F	15	+	+	+	8.1, 7.6	1.0, 1.0
3.	21/F	17	+	+	+	5.1	24.1
4.	55/M	45	+	+	+		
5.	15/F	11	-	+	+	5.0	
6.	50/F	30	-	+	+	3.3	63.4
7.	26/M	17	-	-	+	5.2	67.9
8.	20/M	18	-	-	+	5.0	29.8

表2 Mit.DNA deletions in three mitochondrial myopathies

Groups	Moraes, 1989 No.	Moraes, 1989 mtDNA deletions	Sato, 1989 No.	Sato, 1989 mtDNA deletions
1: CPEO				
KSS	18	15	3	2
Ocular myopathy	44	17	5	4
2: Defined mit.encephalomyopathies				
MERRF	2	0	1	0
MELAS	13	0	4	0
Leigh	9	0		
3: Undefined mit.encephalomyopathies				
Cong.lactic acidosis	6	0		
Others	8	0	3	0

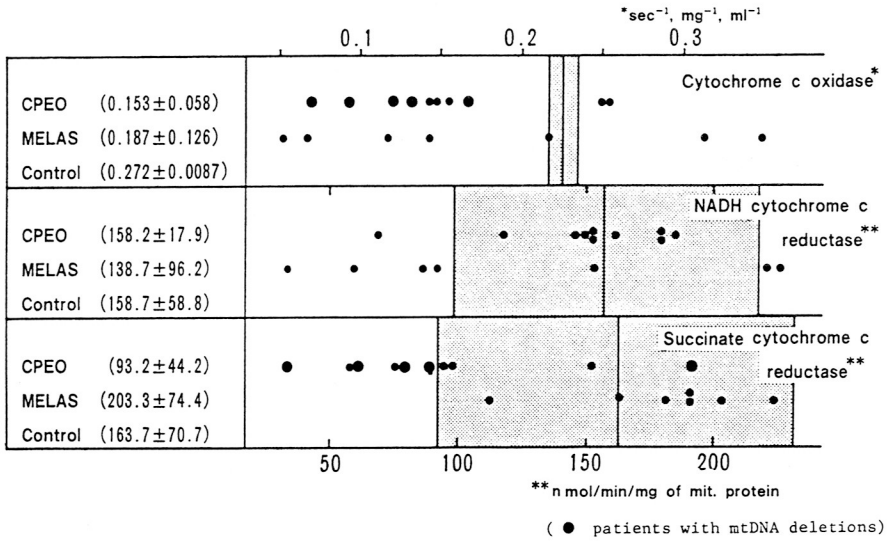


図1 Mitochondrial enzyme activity in biopsied muscles

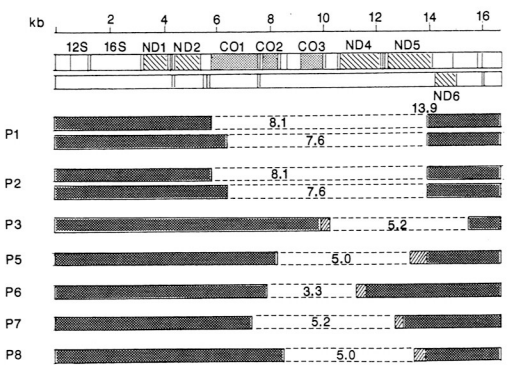


図2 Localization of mitochondrial DNA deletions

7.6kb との全く同一の領域に欠失を有する2種類の異常 mtDNA が1～2%混在していた(図3). 症状のない母親には大きな欠失はみとめなかった. しかしながら兄妹共に全く同一部位に mtDNA の欠失を示していたことは母親から何らかの異常 mtDNA を受け継いでいたことが強く示唆される.

文　献

1) Holt IJ et al: Deletions of mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331: 717, 1988.

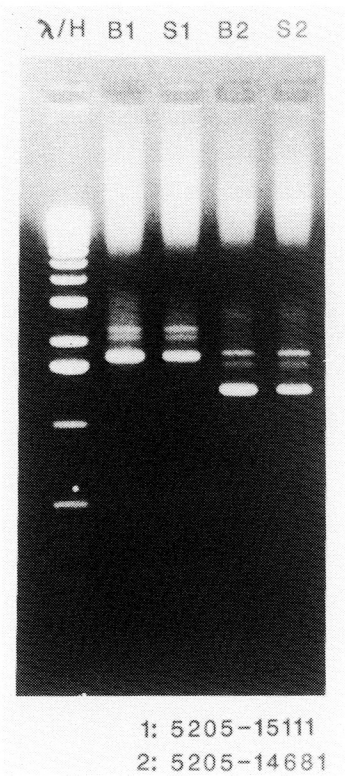


図3 Amplified products of PCR of muscle mit.DNA from siblings of CPEO

2) Moreas CT et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Eng J Med **320**: 1293, 1989.
3) Sato T et al: Mitochondrial myopathies. Morphological approach to molecular abnormalities. "Molecular Biology, Biochemistry, and Pathology" (ed by Kim CH & Ozawa T), Proceedings of International Symposium on Bioenergetics, Plenum, New York, 1989, in press.
4) Schon EA et al: A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. Science **244**: 346, 1989.

49) 多重欠失を伴いミトコンドリアDNAの減少のみられた優性遺伝の疑われるミトコンドリアミオパチーの一例

水 野 美 邦*

研究協力者　大 塚 美恵子**　太 田 成 男***　吉 田 充 男**

はじめに

ミトコンドリア脳筋症患者骨格筋において，しばしばragged-red fiberが認められ，ミトコンドリアが蓄積すると考えられている[1]．これは，エネルギー代謝の異常によって，何らかの機構が働き，ミトコンドリアが増殖すると推定されている．逆に，ミトコンドリアDNA (mtDNA) の減少によって引き起こされたミトコンドリア脳筋症例の報告はない．

Kearns-Sayre症候群(KSS)や進行性外眼筋麻痺progressive external ophthalmoplegiaにおいては，mtDNAの欠失の例が多数報告されている[2),3)]．これらの場合，ほとんどは家族歴がなく，孤発例が大部分であり，欠失部は単一である．最近，常染色体優性遺伝を示す家系で，多重欠失が報告されている[4)]．

今回，私たちは，常染色体優性遺伝が疑われる家系のKSS不全型患者でmtDNAの著しい減少と多重欠失が見られたので報告する．

実験方法

症例A：54歳女性．10年来の進行性外眼筋麻痺，全身筋力低下，難聴，脳波異常及び髄液タンパク質増加がみられた．筋生検ではragged-red fiberが確認され，不全型KSSと診断された．54歳時，呼吸不全にて死亡後，大腿四頭筋を摘除，検索した．

家族歴：症例Aの家族歴を図1に示す．生検試料に基づく確定診断ではないが，眼筋下垂を示し，症例Aと同様の兆候を示すことより，図のような常染色体優性遺伝様式を示すと判断した．

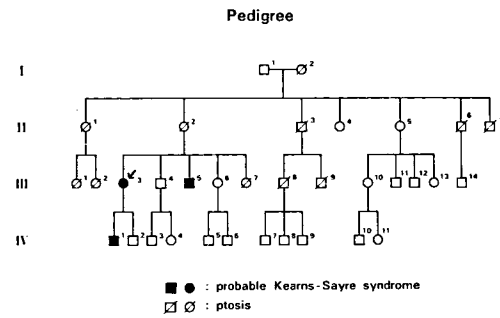


図1　症例Aの家系図．矢印は症例Aを示す．

症例B：20歳男性，兄弟発症のmitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) である．

症例C：30歳男性．孤発例のMELASである．

対照：正常対照として，筋疾患のない症例の大腿四頭筋を検索した．

Southern blot

全DNAの精製とSouthern blotは，常法に従った．プローブは，ヒトmtDNAをクローニングした断片あるいは，ヒトmtDNAを部分精製したDNA画分をPCR[5)]で増幅した断片を用いた．プローブの位置を図2に示した[6)]．

Western blot

Western blotは生検試料をTCAによりタンパク質分解酵素活性を完全に止め，その後全タンパク質をSDSに溶解し，SDSポリアクリルアミド電気泳動にかけた．抗体は，抗酵母ATP合成酵素

＊順天堂大学医学部脳神経内科
＊＊自治医科大学神経内科
＊＊＊自治医科大学生化学

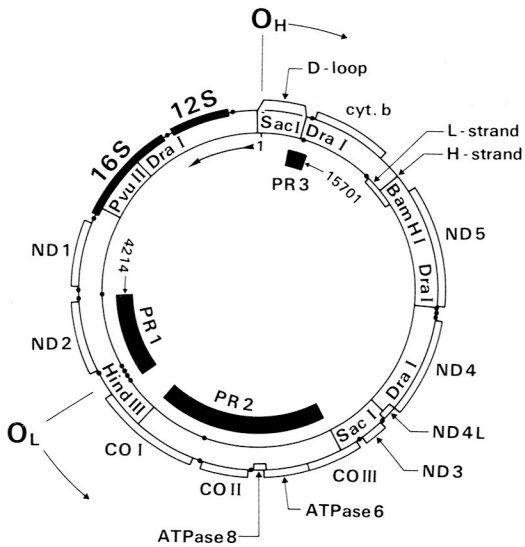


図2　ミトコンドリアDNAの制限酵素地図．PR1，2，3はそれぞれSouthern blotに使用したプローブを示す．

ベータサブユニット抗体を用いた．

結　　果

ミトコンドリアDNAの減少

3人の患者骨格筋及び正常対照よりDNAを精製し，Southern blotによりmtDNA量および長さを調べた．これらの試料で16.6キロ塩基対のmtDNAのバンドを認めたが，その強度は異なっていた．すなわち，症例AではmtDNAの強度は対照の15%以下に減少していた．逆にMELAS患者はmtDNAが増加していた．下段パネルはEtBr染色の結果であり，全DNA量はほぼ一定である．また，湿重量あたりの全DNA量は対照群とほとんど変わらず，症例AのmtDNAの減少は，特異的であると結論された．DNA源が剖検試料でありそのためにmtDNAの減少の可能性もあるが，他の剖検試料ではmtDNAの減少はみられないことから，mtDNAの減少は，症例Aの場合に特異的な現象であると思われる．

また，電子顕微鏡写真によると明らかなミトコンドリアの減少は観察されなかった．そこで，ミトコンドリアタンパク質であるATP合成酵素の抗体を用いてWestern blotによりミトコンドリアタンパク質量を比較すると症例AでややATP合成酵素の減少がみられたものの（図3），mtDNAほどは減少しておらず，ミトコンドリアの数というよりもミトコンドリア内のDNA分子数の減少が推定される．

ミトコンドリアDNAの多重欠失

また，症例AのmtDNAのSouthern blotで，感光時間を長くすると16.6kbpの他に連続的な短いバンドが認められた．この短いバンドが非特異

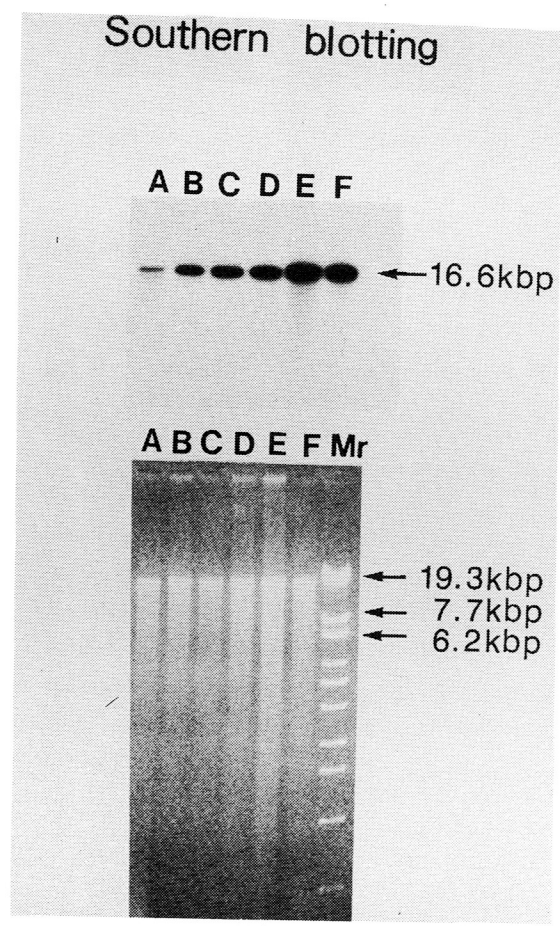


図3　ミトコンドリアDNAのSouthern blot
A，E，Fは，それぞれ，症例A，B，Cを示す．B，C，Dは，正常対照．
下段は，EtBr染色した全DNA．E，FのミトコンドリアDNAは増加しているが，Aは逆に著しい減少を示した．

的な分解切断に起因しているのではないことを示すために，様々な制限酵素で切断し，種々のmtDNAの箇所のプローブでハイブリダイズした（図4）．もし，精製過程や死後変化などの非特異的分解によるものであれば，どの制限酵素で切断しても短い断片が検出されるはずである．結果は，SacI断片や，DraI断片には，連続的な短いバンドがほとんど認められず，2つの複製開始点間（図2におけるO_HO_L間の右半分側）にのみ多重欠失が存在すると思われた．

また，プローブ3でハイブリダイズした時（図5）も，多重欠失が認められた．Zevianiらは，常染色体優性遺伝を示す家系患者において，多重欠失を認め，PCRで増幅後サブクローニングして，欠失部を同定しており，D-loopから欠失が始まっているとしている[4]．もしも，患者Aにおいても欠失がD-loop領域から開始していればプローブ3でハイブリダイズしたときには，短い断片は検出されないはずである．結果は他のプローブを用いたときと同様短い断片が検出され，本症例の多重欠失の開始点はD-loop領域に限定されていない．Zevianiらは，先にも述べたように，PCRで増幅した断片をサブクローニングして，塩基配列を決め，欠失開始点がD-loop領域に限定していると結論しているが，その塩基配列から得られた欠失の長さとSouthern blotの結果とは一致せず，むしろ，彼らのPCRでは，D-loopから開始する欠失部のみを増幅させたと考えられる．そこで，わ

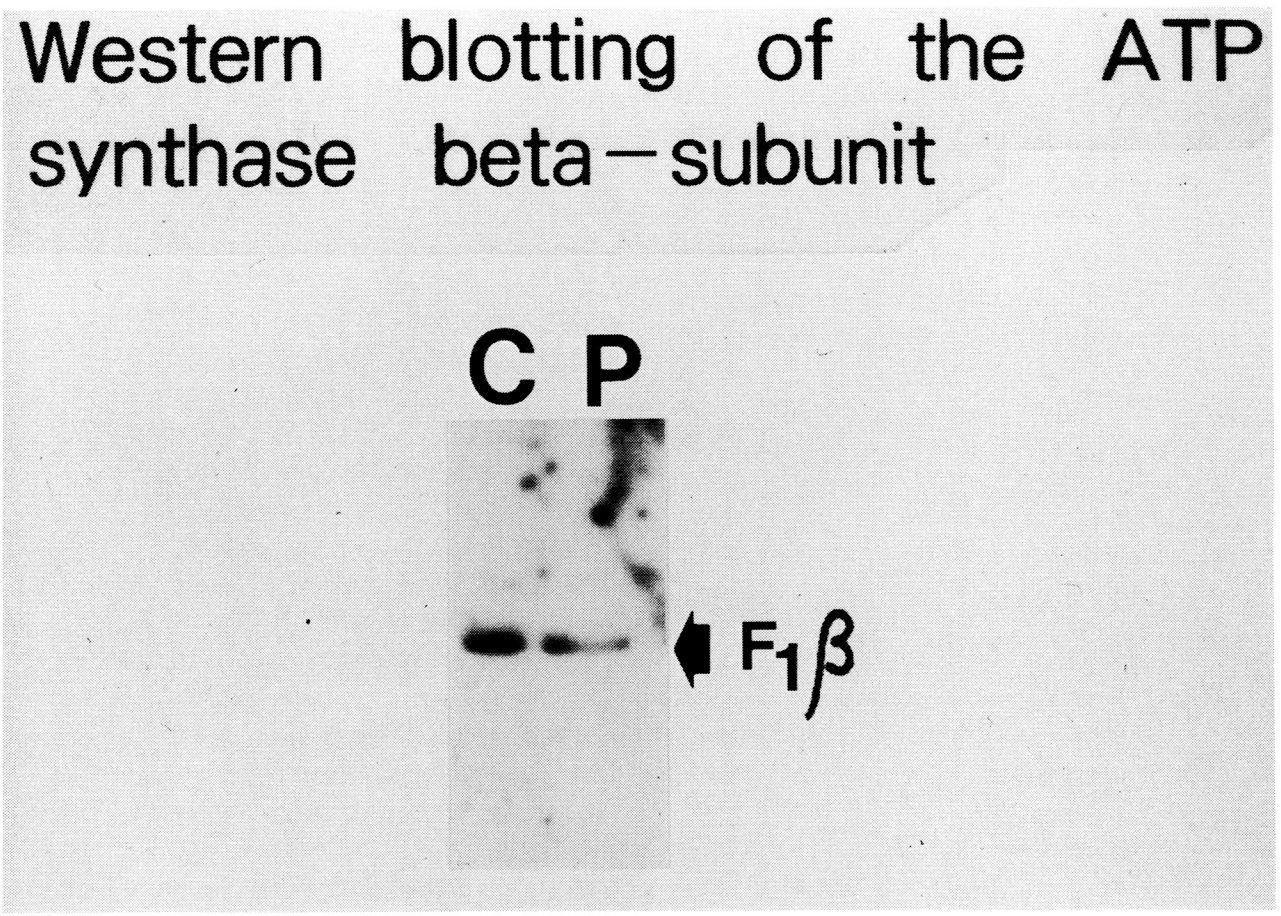


図4　ATP合成酵素ベータサブユニット（F 1 β）のWestern blot
症例A（P）では正常対照（C）に比べタンパク質の軽度減少がみられる．

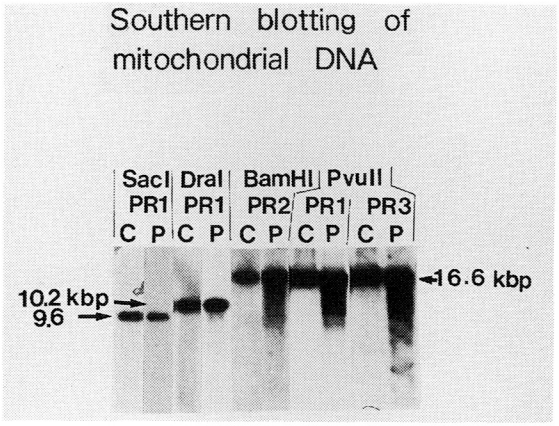


図5　ミトコンドリアDNAのSouthern blot
Cは正常人の血球細胞，Pは症例Aの骨格筋を示す．(症例Aの骨格筋ミトコンドリアDNAは著しく減少していたので全DNAをあわせるために対照として，血球細胞を用いた)．PR1，2，3は，それぞれ図2に示したプローブに対応する．症例Aでは，BamHI，Pvu II断片で連続的な短い断片が見られた．一方，SacI，DraI断片では，短い断片が検出されず，図2の左側領域には，多重欠損が，存在しないことを示す．

たしたちは，彼らの症例も本症例と同様欠失部は，特定部に極在していないと考えている．

考　　察

常染色体優性遺伝が疑われる家系のKSS不全型症例の骨格筋よりDNAを抽出し，mtDNAをSoutern blotにより検索した．その結果mtDNAが特異的に減少していることが明らかとなった．mtDNAの減少によってミトコンドリア脳筋症が引き起こされた症例はなく，興味深い例である．さらに，mtDNAの多重欠失も同時に観察された．この二つの現象の関連は明らかではなく，今後の課題である．

この症例は常染色体優性遺伝がうたがわれており，核遺伝子の関与が示唆されている．この核遺伝子の実体は明らかにされていないが，核遺伝子とミトコンドリア遺伝子の相互作用を明らかにしていく過程でミトコンドリア脳筋症の本体がより明らかにされていくものと思われる．

文　　献

1) Briel V et al: Oculoskeletal myopathy with abnormal mitochondria. Can J Neurol Sci **11**: 390—394, 1984.
2) Holt I J et al: Deletion of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature **331**: 717—719, 1988.
3) Morares C T et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive external opthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Eng J Med **320**: 1293—1299, 1989.
4) Zeviani M et al: An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. Nature **339**: 309—311, 1989.
5) Saiki R K et al: Primer directed enzymatic amplification of DNA with at thermostable DNA polymerase. Science **239**: 487—491, 1988.
6) Anderson S et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature **290**: 457—465, 1981.

50）慢性外眼筋麻痺症候群におけるミトコンドリアDNA異常と臨床像・筋病理所見との対応

埜中征哉*

研究協力者　後藤雄一*　宝来　聡**

目　的

外眼筋麻痺を伴うミトコンドリアミオパチー(MMP)の症例では，高頻度にmtDNAの大きな欠失が認められている[1)~3)]．欠失mtDNAは，正常の大きさのものと混在しており，その割合は症例ごとで違いがある．Moraesらはすでに，mtDNAの欠失は慢性外眼筋麻痺症候群(CPEO)の症例にのみ認められ，欠失の大きさや位置と酵素活性とは相関がないと述べているが，個々の症例ごとの臨床症状や筋病理所見との関係については言及していない[3)]．我々は，欠失mtDNAが病態にどのように関わっているかを知る目的で，欠失の有無と臨床症状・酵素活性・筋病理所見との関係を調べた．特に外眼筋麻痺を伴うMMP患者の筋組織に存在するcytochrome c oxidase (CCO) の部分欠損に注目し，CCO欠損線維の頻度とmtDNA欠失との関係を中心に検討した．

対象と方法

対象は筋生検にてCCOの部分欠損の像を呈した49例で，内訳は眼瞼下垂か外眼筋麻痺を有するMMPの症例が33例(グループA)，眼瞼下垂も外眼筋麻痺もないMMPの症例が12例（グループB)，MMP以外の症例（筋緊張性ジストロフィー3例，高CK血症1例）が4例である（表1）．全症例の生検筋について各種の組織化学染色を行い，特にCCO染色では横断面で500～1000本の筋線維のうち活性のない筋線維の出現頻度を計算した．また分離ミトコンドリアタンパクの呼吸鎖酵素活性を測定した[4)]．DNAについては，ヒト正常mtDNAをプローブとしてサザンブロッティング法を行い欠失の有無を調べた[5),6)]．正常に対する欠失mtDNAの割合はデンシトメトリー法にて算出した．さらに欠失断端を含む領域をPCR法にて増幅し，Hae IIIとHinf Iによる切断パターンから欠失部位を同定した[7)]．

表1　サザンブロット法によるミトコンドリアDNA検索の結果
PEO: progressive external ophthalmoplegia, KSS: Kearns-Sayre syndrome, MMP: mitochondrial myopathy

	No. of Patient	Sex M/F	mtDNA Deletion
Group A: PEO			
Typical KSS	3	1/2	3
PEO	27	14/13	19
Ptosis only	3	1/2	0
Group B: MMP without PEO or ptosis			
MERRF	6	2/4	0
Others	6	4/2	0
Group C: Non-MMP			
Myotonic dystrophy	3	1/2	0
HyperCKemia	1	1/0	0

結　果

mtDNAの欠失は全てグループAの外眼筋麻痺を有する例（22例，67%）に認められた（表1）．Moraesらの指摘するように，臨床症状として外眼筋麻痺が必発していた[3)]．頻度は欧米の報告（40%台）よりやや高めであった[3),8)]．外眼筋麻痺以外の症状で，欠失の有無による差を認めた症状はなかった．

欠失の部位はH鎖とL鎖の複製点の間の

*国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部
**国立遺伝学研究所

1.8～8.8kilobaseで，Schonら[9]の報告したいわゆるhot spotの例は5例（23%）で，その頻度は欧米より低かった（表2）[3),8)]．欠失の大きさや位置は，酵素活性との間に明らかな相関は認めなかった(表3)．また同じ大きさ，同じ部位の欠失をもつ10a～10eの5例についてみても，欠失mtDNAの割合と酵素活性との間に相関は認めなかった（表3）．

CCO活性のない線維の頻度は，外眼筋麻痺を有するグループAにおいて，欠失のある群は，ない群より有意に高かった(表4)．また欠失のある群は，他のグループと比較しても有意に高かった(表4)．一方，欠失のある症例についてみると，CCO欠損線維の頻度と欠失mtDNAの割合との間に強い正の相関を認めた（図）．

考　　察

まずはじめに，mtDNA欠失と臨床症状との関係について考えてみたい．欠失を認めたCPEO患者の半数以上は眼瞼下垂が初発症状であり，眼瞼下垂も外眼筋麻痺とともに重要な臨床症状に違いない．しかし，Moraesらがすでに報告しているように，今回の研究でも，臨床症状として外眼筋麻痺が必発していた[3)]．このことは，外眼筋麻痺だけが疾患特異的症状なのかどうか，外眼筋麻痺と眼瞼下垂は本質的に違う発症機序で起こっているのかどうかという問題を残すことになる．また，全てのCPEO患者がmtDNAの変異を有するのかどうかということも今後の問題であり，この点は患者mtDNAの全塩基配列を決めることで解決される可能性がある．

一方，生化学的酵素活性とmtDNA欠失との間には，今回の研究で示されたように，明らかな関係は認めなかった．その理由は三つ程考えられる．まず第一に，ミトコンドリアの生合成やミトコンドリア内代謝がmtDNAと核DNAの両者に支配されていることがあげられる．欠失mtDNAが病気と何らかの関係があると考えられても，核DNAからの影響が強いために表現型としては酵素欠損にならないことが考えられる．この点の解明は，核・ミトコンドリア相互関係の生理的作用の基礎的研究の発展を待たねばならない．第二に，核DNAの変異と違って，このmtDNAの変異に正常のDNAが共存していることである．一部の

表2　ミトコンドリアDNA欠失の部位
破線内に欠失断端が存在することを示す．番号右の括弧内の数字は症例数を示す．

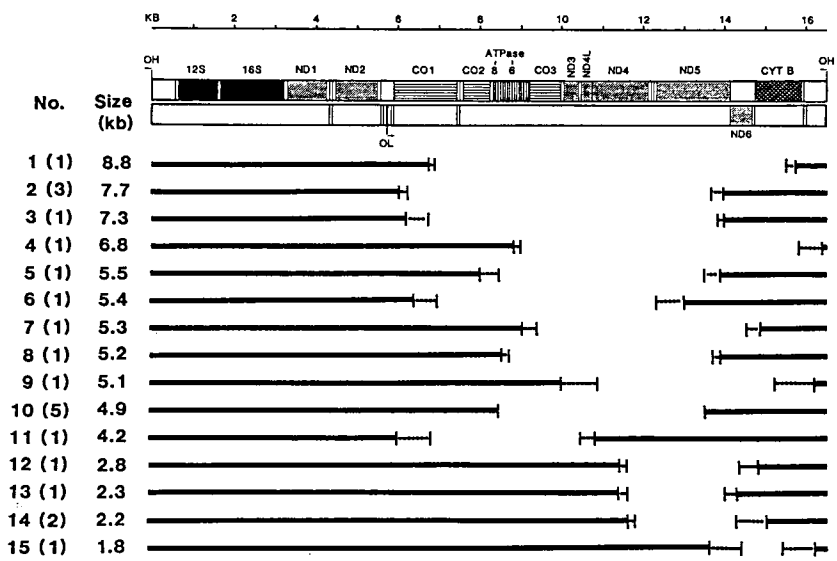


表3　欠失例22例のまとめ
I, IV and V : complex I, IV and V, cyt : cytochrome, n : normal, RRF : ragged-red fibers

Case No.	Size of Deletion (kb)	Areas of Deletions	Ratio of Deleted mtDNA (%)	Enzyme Activities I	Enzyme Activities II	Enzyme Activities IV	RRF (%)	CCO Deficient Fibers (%)
		IV 1 IV 2 V 8 V 6 IV 3 I 3 I 4L I 4 I 5 I 6 Cyt B						
1	8.8		-	n	n	n	1.6	17.3
2a	7.7		40	n	n	n	0.8	27.2
2b	7.7		30	-	-	-	4.0	15.3
2c	7.7		20	n	n	n	3.0	14.5
3	7.3		40	n	n	n	4.1	17.2
4	6.8		30	n	n	n	4.6	11.6
5	5.5		80	n	n	n	-	-
6	5.4		60	n	n	↓	0.5	23.9
7	5.3		90	n	n	n	22.0	50.0
8	5.2		90	n	n	↓	5.4	40.6
9	5.1		70	n	n	n	8.0	14.0
10a	4.9		80	n	n	n	11.5	40.2
10b	4.9		70	↓	n	n	8.0	41.4
10c	4.9		50	n	n	n	1.5	18.5
10d	4.9		40	n	n	n	2.8	12.8
10e	4.9		20	n	n	n	5.0	5.0
11	4.2		30	n	n	n	5.8	19.0
12	2.8		50	n	n	n	5.4	16.6
13	2.3		50	n	n	n	7.4	10.7
14a	2.2		50	n	n	n	17.0	19.3
14b	2.2		60	↓	n	n	0.0	7.2
15	1.8		50	n	n	n	10.0	12.6

表4　CCO 欠損線維の頻度

	No. of patients	Ragged-red fibers(%)	CCO-deficient fibers(%)
Group A:			
With deletion	22	6.11	20.71
Without deletion	11	3.44	9.12
Group B:	12	5.67	14.36
Group C:	4	1.33	3.73

*P<0.05　*P<0.01

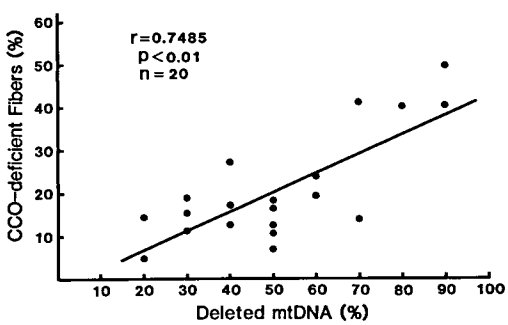


図　欠失例20例における CCO 欠損線維の頻度と欠失 mtDNA の割合

mtDNA が機能を失っても残っている正常 mtDNA が表現型としては十分な活性をもっている可能性がある．変異 mtDNA がある一定のレベルを超えて優位になると，急に酵素活性が低下してくるのかもしれない．最後の理由は，現在行っている生化学的酵素活性の測定方法が，ある量の組織全体としてしか測定できないことによると考えられる．すなわち，一部に活性低下の部分があっても，他の正常の部分でマスクされる可能性が高い．このことは，組織化学的な結果と比較しても明らかと思われる．

最後に欠失 mtDNA と筋病理所見，特に CCO 欠損線維との関係について述べる．CCO 欠損線維が散在する病理所見（CCO 部分欠損）は種々の疾患で認められ，ミトコンドリア内外の異常による CCO 機能不全の最終的な表現型と考えられる．今回の研究では，mtDNA の欠失は CCO 部分欠損のある症例にのみ認められたこと，また欠失 mtDNA の割合が高いほど CCO 欠損線維の数が多いことが示された．このことは，CCO 部分欠損が mtDNA の異常の十分条件とは言えないが，必

要条件である可能性を示している．

ところで欠失 mtDNA は CCO 欠損部位でどのような役割を担っているのであろうか．今回の研究の結果から，CCO 欠損部位には他の部位より欠失 mtDNA が多く存在することが予想されるが，さらに in situ ハイブリダイゼーションなどで確認する必要がある．また，CCO 部分欠損の起こるメカニズムを筋発生と関係づけて研究することで，より欠失 mtDNA の病態への関わりが明らかにされると思われる．

文　献

1) Holt IJ, Harding AE and Morgan-Hughes JA : Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature **331** : 717, 1988.
2) Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S et al : Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. Neurology **38** : 1339, 1988.
3) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M et al : Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Med **320** : 1293, 1989.
4) Koga Y, Nonaka I, Sunohara N et al : Variability in the activity of respiratory chain enzymes in mitochondrial myopathies. Acta Neuropathol **76** : 135, 1988.
5) Southern EM : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol **98** : 503, 1975.
6) Horai S, Gojobori T and Matsunaga E : Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese. I. Analysis with restriction enzymes of six base pair recognition. Hum Genet **68** : 324, 1984.
7) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al : Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239** : 487, 1988.
8) Holt IJ, Harding AE and Morgan-Hughes JA : Deletions of muscle mitochondrial DNA in mitochondrial myopathies. Nucleic Acids Res **17** : 4465, 1989.
9) Schon EA, Rizzuro R, Moraes CT et al : A direct repeat is a hot spot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. Science **244** : 346, 1989.

51) Kearns-Shy 症候群における deleted mtDNA の組織分布と RNA 転写について

清 水 輝 夫*

研究協力者 中 瀬 浩 史*

はじめに

Holt ら[1]によって large-scale deletion をもつミトコンドリア DNA (mtDNA) が wild type mtDNA とともに存在することが証明された．その後の検索によって large-scale deletion はミトコンドリア・ミオパチーの多様な臨床病型のうちでは Kearns-Shy 症候群 (KSS)[2]及びその不全型である Progressive external ophthalmoplegia (PEO)[3]にのみ存在すると考えられている．本症の発症機構を理解する上で以下の点が検討すべき問題として残されている．1)mtDNA の deletion の発生機転についての考察は不十分である．2)外眼筋麻痺の合併は必発であり，この臨床病型の均一性が何に起因するのか一つの問題である．この点から deleted mtDNA の臓器別分布を検索することはきわめて重要と考えられる．3)Deletion 部位と生化学的異常との対応の欠如は本症の発症機序と関連して重要な問題である．以上の諸点を明らかにするために以下の実験を行なった．

方　法

129例のミトコンドリア・ミオパチー (KSS, PEO, MERRF, MELAS, Benign, infantile form, Malignant infantile form, Leigh's syndrome etc.；米国コロンビア大学・国立神経研究所及び東京大学神経内科症例) の骨格筋 DNA を抽出し，Pvu II にて切断後アガロース・ゲル電気泳動を行い，Southern blotting にて検討した．プローブはヒト骨格筋より抽出した mtDNA を Pvu II にて切断後 random-primer 法により P^{32} ラベルしたものを用いた．Deletion の認められた症例に関しては EcoR I，Xba I，Hind III，Pst I の各制限酵素切断部位の有無を Southern blotting にて検討し，deletion 部位を mapping した[2]．次に一部の症例において polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて deleted mtDNA の deletion 部位の塩基配列を決定した．Deleted mtDNA の臓器別分布を KSS 3 症例で検討した[4]．第 1 例は骨格筋，白血球，血小板，第 2 例では大脳，肝，骨格筋，第 3 例では大脳，小脳，骨格筋，心筋，平滑筋，肝臓，腎臓について DNA 抽出し，Southern blotting を行い，normal mtDNA と deleted mtDNA の相対量比をみた．

Deletion のある PEO 例及び deletion のない PEO 例について生化学的検索を行なった．Cytochrome c oxidase (Complex IV)，NADH cytochrome c reductase (Complex I＋III)，Succinate cytochrome c reductase (Complex II＋III)，NADH dehydrogenase，Succinate dehydrogenase，Citrate synthetase を測定した．また KSS 症例骨格筋及びクローン培養した線維芽細胞[5]より Guanidium/Cesium Chloride 法により RNA を抽出し，Northern blotting により RNA 解析を行なった[6]．プローブは deletion により生じた fusion gene の deletion 切断部位の“右側”“左側”各々の DNA 断片を Attadi らの作製した m13 vecter の insert よりあるいは PCR 法にて増幅された DNA 断片から作製し，random-primer 法によりラベルして用い，fusionRNA の有無を検討した．また KSS 症例よりクローン培養した線維芽細胞の homoplasmic clone と heteroplasmic clone を用い，100mM emetine 存

＊東京大学医学部脳研神経内科

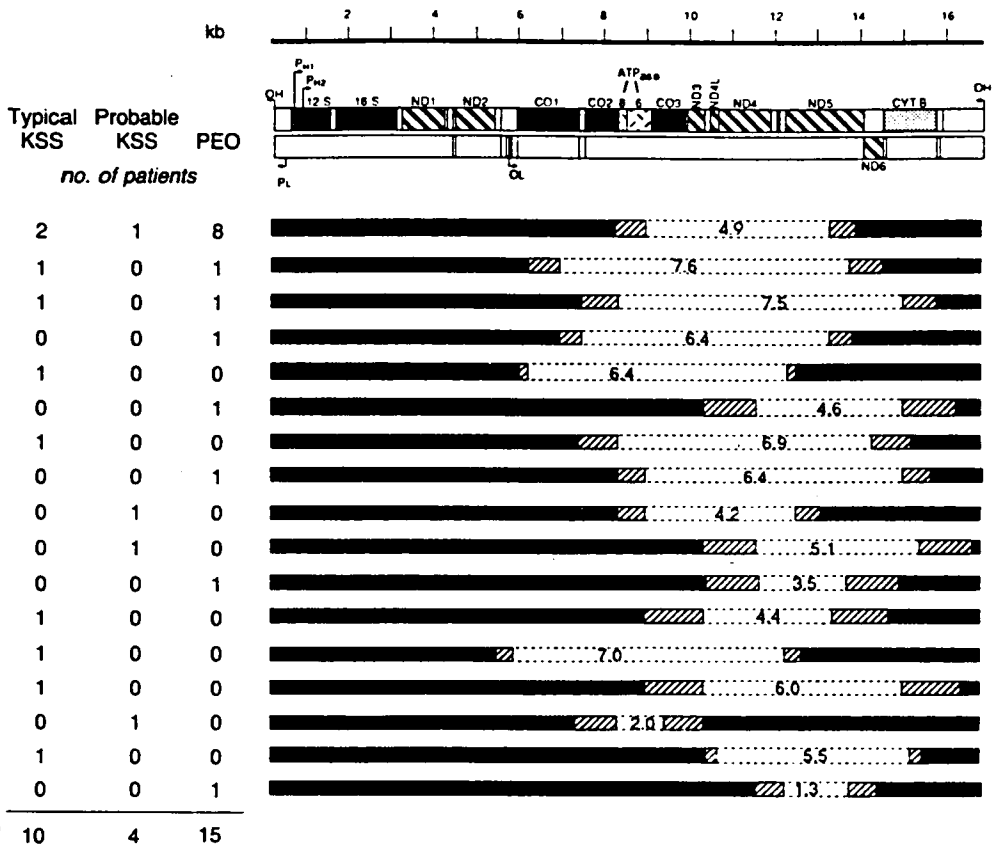


図1　Kearns-Shy 症候群における mtDNA の deletion 部位
破線部は制限酵素切断部位の有無から判断した deletion の確実な部分，斜線部は deletion の可能性のある未確定部分．KSS：Kearns-Shy syndrome, PEO：progressive external ophthalmoplegia.

WIDE SPREAD TISSUE DISTRIBUTION OF MITOCHONDRIAL DNA DELETIONS IN KEARNS-SHY SYNDROME
(Percent of deleted mtDNA population)

TISSUE		PERCENT DELETED mtDNA
Skeletal muscle:	pectral	60%
	psoas	58%
	diaphragm	55%
Smooth muscle:		4%
Heart:		39%
Crebellum:		15%
Frontal lobe:		44%
Liver:		14%
Kidney:		44%

図2　KSS 剖検例における各臓器ごとの deleted mtDNA の割合

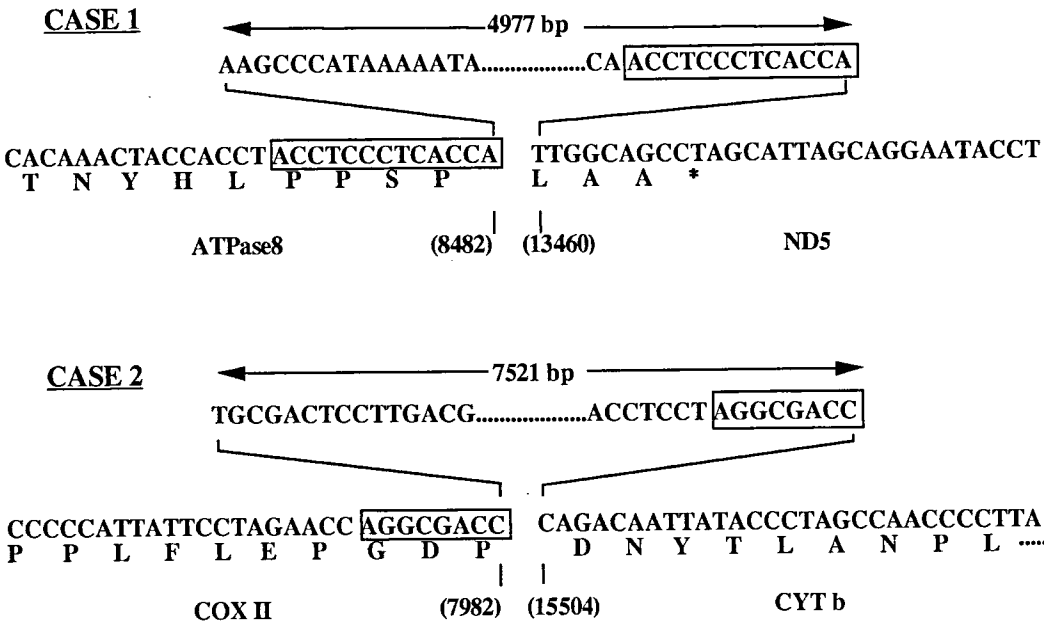


図3　Kearns-Shy 症候群の2症例にみられた deletion 部位の direct repeat (A) と Northern blotting による RNA 解析 (B, C)

A：症例1は13bp の direct repeat を示し，"hot spot" で生じた selection である．症例2は8bp の direct repeat を認めるが frame shift はない．

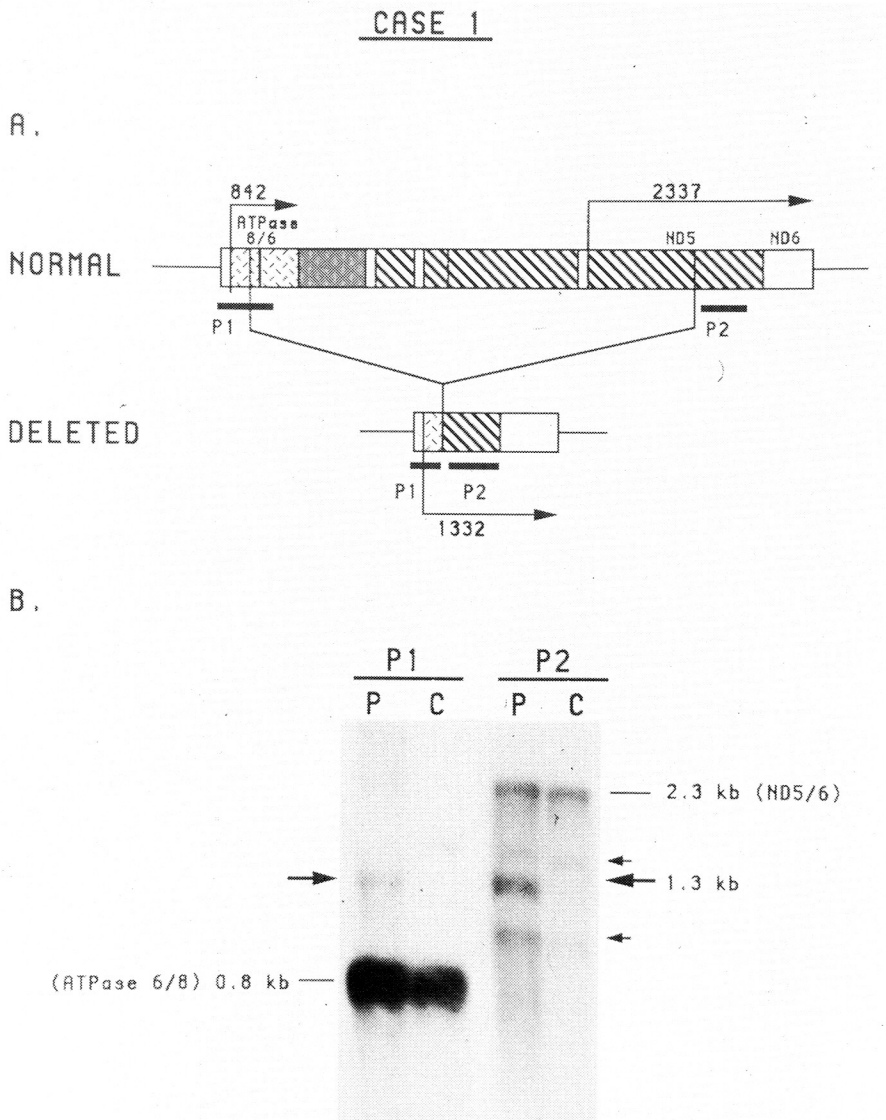
在下細胞質での蛋白合成を抑制し，S^{35}-methionine を用い，ミトコンドリア合成蛋白のみをラベルし，4M Urea 存在下の SDS-PAGE にて検討した．

結　　果

KSS18例中15例，PEO44例中17例に deletion が認められ，各症例の deletion の大きさと部位を図1に一覧として示した．H鎖L鎖の mtDNA 複製開始部位(O_H及びO_L)は必ず保存されるが，O_H及びO_Lの間はほぼ全域にわたり deletion が存在していた．また全例に共通して deletion している部位はない．この deletion の部位を見ると29例中11例（38%）の症例はほぼ同一の部位に deletion があると考えられる．これらの共通の deletion を持つ症例について，PCR 法を用いて deletion 部位の塩基配列をみると，"hot spot" となる deletion において13bp の direct repeat を認めた．13 bp の direct repeat は mtDNA の複製開始部位を deletion に含まない条件下において mtDNA の direct repeat 中最長のものである．また deletion を持つ症例の60%近くになんらかの direct repeat が存在している．

mtDNA の組織分布について KSS 剖検例を含む検索を行なったところ，deleted mtDNA は骨格筋ばかりでなく中枢神経系（大脳，小脳），心筋，腎臓，肝臓，消化管平滑筋においても存在し，白血球においても一部の症例で認められた．しかし deleted mtDNA と normal mtDNA との相対量比は組織ごとに異なり，骨格筋に多く，ついで心筋，中枢神経，腎臓に多く，肝臓，平滑筋では乏しかった．

生化学的には，各症例において deletion の部位とどの呼吸酵素活性が低下するかには相関関係は認められず，deletion のある PEO 例及び deletion のない PEO 例の対比においては mtDNA にコー

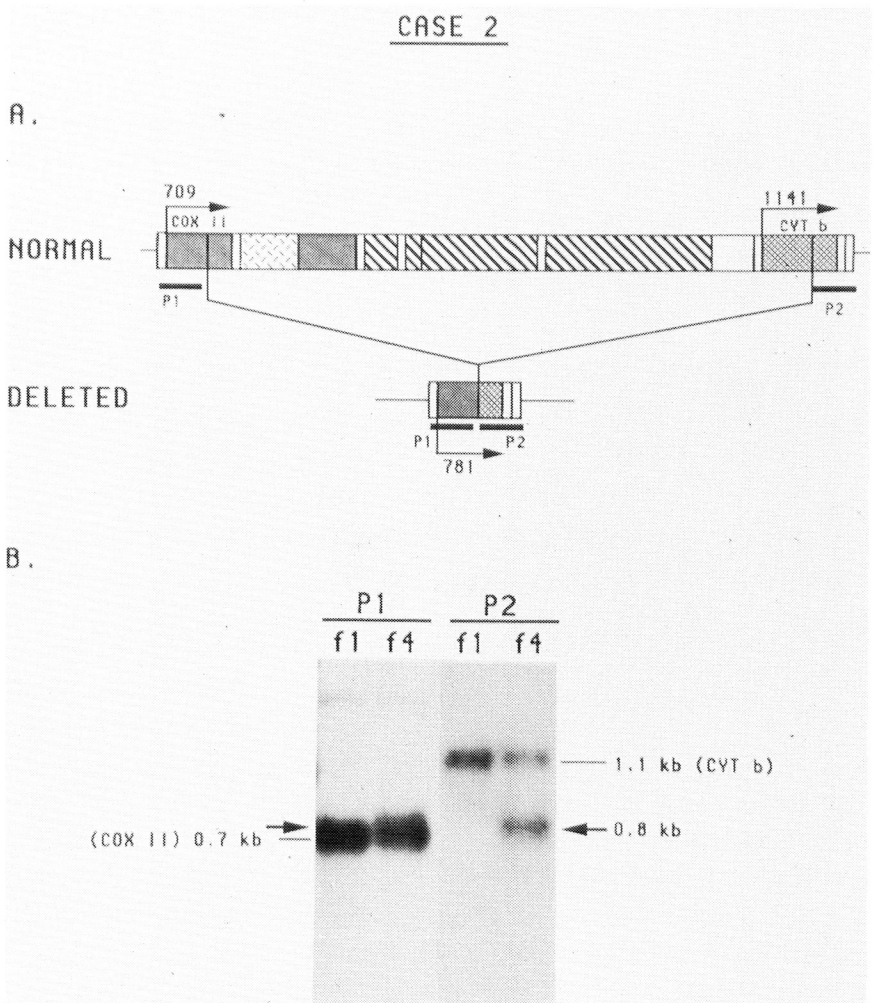


B：症例1におけるRNA転写．Deleted mtDNAよりfusion RNA（1.3kb）が合成されていることを示す．C：control, P：patient. P1：probe 1, P2：probe 2.

ドされるサブユニットを持つ酵素（すなわちComplex Ⅰ，Ⅲ，Ⅳ）はすべて活性の低下する傾向を認めた．そこで，deleted mtDNAのRNA転写を調べると，第1例では1.3kb，第2例では0.8 kbの正常では存在しないバンドを認め，deletionによって生じたfusion geneに対応するfusion mRNAの存在がNorthern blottingにて証明され，deleted mtDNAもRNA転写されていると考えられる．一方，S^{35}-methionineの取り込みによるmitochondriaにおける蛋白合成の検討をしたが，このfusion mRNAに対応した蛋白の存在は証明されなかった．

考　　察

Direct repeatの存在は半数以上のKSS症例のdeletionの発症機序としてintramolecular



C：症例2における RNA 転写．0.8kb の fusion RNA の存在を示す．f1：homoplasmic clone, f4： heteroplasmic clone.

recombination が想定される．とくに40%近いものは13bp の direct repeat をもつ特定部位で生じており“hot spot”となっている．KSS は多くは sporadic であるが，mtDNA に deletion を引き起こす素因が常染色体優性に遺伝する家系が報告されていることからも[7]，この deletion は各個体の発生初期あるいは oocyte 内で発生したと考えられる．

外眼筋が必ずおかされるという臨床像の特徴の一つの説明として threshold effect によるものがあり，外眼筋は骨格筋・心筋などとともにエネルギー消費の高い組織であり，中枢神経系とともに骨格筋・心筋などは酵素活性の低下が表現型としてあらわれやすいと考えられる．しかし，異常 mtDNA の組織分布をみることによって別の観点が示された．KSS 剖検例では骨格筋についで心筋・腎臓においてでは deleted mtDNA の割合が多いが，中枢神経・肝臓・平滑筋においては量的に少なく，組織ごとに mutant mtDNA と wild type mtDNA の割合が異なっていた．このような genotype の差は発生途上で mitotic segregation が生じることにより基本的には説明される．ほと

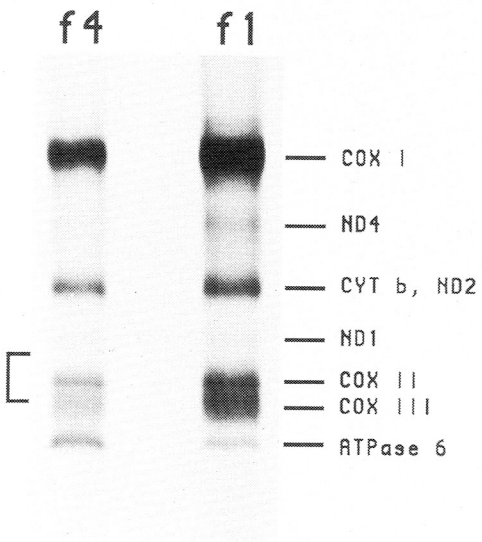


図4　KSS症例2におけるミトコンドリア蛋白合成. Emetine存在下におけるheteroplasmic及びhomoplasmic cloneのS^{35}-met-hionineにラベルされた蛋白を示す. Fusion RNAに対応するbandは存在しない.

んどの例で骨格筋にdeleted mtDNAが多い理由として生体内で細胞分裂の続いている組織においてはdeleted mtDNAを持つ細胞が選択的に脱落していくと考えられる. この考えは正常なmtDNAとdeleted mtDNAの両者を持つ培養細胞と正常mtDNAのみを持つ培養細胞をクローン化したとき, その成長速度は正常なmtDNAのみを持つ細胞が圧倒的に早く, 混合培養したときはほとんど正常なmtDNAを持つ細胞のみが選択されてしまうという培養細胞系の観察によって支持されている[5]. さらにKSSが進行性の疾患であることより逆に細胞内のレベルではmtDNAの割合が増加するような機序が考えられるとする立場もあるが, 現在のところまだ実験的裏付けを欠いており, 臓器分布の問題はさらに検討が必要である.

一方deletionの部位と生化学的異常との間には対応関係がなく, deletionの部位がいずれにあってもmtDNAにコードされたサブユニットを持つ電子伝達系酵素活性がすべて低下する傾向にある. RNA転写は両鎖ともDループ近傍より開始し, 一本の長い前駆RNAが合成され, 原則としてtRNAあるいはtRNAの相補部位が切りとられて, H鎖の転写からは14個のtRNAと2個のrRNAそして10個mRNAが合成される. そのため, mtDNAのRNA転写がpolycisternicであり全体としてまったく転写されていないか, あるいはRNA転写は行なわれているが, deletionによっていくつかのtRNAが欠損しているために蛋白合成がされていないか二つの機序が考えられる. 本研究で示したように, deleted mtDNAもRNA転写はほぼ正常に行なわれており, emetine存在下での蛋白合成実験においてもfusion RNAに対応するbandはSDS-PAGE上にも存在せず, いく種類かのtRNAの欠損により蛋白合成系が障害されていると考えられる. Mutantとwild typeの二種類のmtDNAが同一のミトコンドリア内に存在した場合, 両者はco-predominantであるので, 正常なmtDNAによってtRNAが補われて, mutant mtDNAによる酵素欠損が表現型として現われにくいと考えられる. したがって, この事実は同一のmitochondria内では正常のmtDNAからtRNAの補給はほとんどないこと, すなわち多くの場合各mitochondriaはhomoplasmyであり, mitochondria内でのgenetic complementationは行なわれていないと考える一つの根拠を示している[6].

文　献

1) Holt FJ et al: Deletion of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331: 717—719, 1988.
2) Zeviani M et al: Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. Neurology 38: 1339—1346, 1988.
3) Moraes CT et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Shy syndrome. New Eng J Med 320: 1293—1299, 1989.
4) Schon EA et al: A direct repeat is a hot spot for large-scale deletion of human mitochon-

drial DNA. Science 244: 346—349, 1989.
5) Moraes CT et al: Heteroplasmy of mitochondrial genomes in clonal cultures from patients with Kearns-Sayre syndrome. Bioch Biophys Res Com 160: 765—771, 1989.
6) Nakase H et al: Transcription and translation of Kearns-Sayre syndrome: Implications for pathogenesis. submitted.
7) Zeviani M et al: An Autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. Nature 339: 309—311, 1989.

平成元年度研究班名簿

平成元年度　杉田班　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
班長	杉田秀夫	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	所長	0423－41－2711 (内5101)
監事	荒木淑郎	熊本大学医学部第一内科 〒860　熊本市本庄1－1－1	教授	096－344－2111 (内5611)
幹事	垂井清一郎	大阪大学医学部第二内科 〒553　大阪市福島区福島1－1－50	教授	06－451－0051 (内2221)
〃	寺尾寿夫	帝京大学医学部第一内科 〒173　板橋区加賀2－11－1	教授	03－964－1211 (内1562)
〃	佐藤猛	順天堂大学医学部脳神経内科 〒113　文京区本郷2－1－1	助教授	03－813－3111 (内3322)
〃	鈴木紘一	東京都臨床医学総合研究所 遺伝情報 〒113　文京区本駒込3－18－22	部長	03－823－2101 (内5416)
〃	宮武正	新潟大学脳研神経内科 〒951　新潟市旭町通1番町757	教授	025－223－6161 (内5180)
〃	高木昭夫	虎の門病院神経内科 〒105　港区虎ノ門2－2－2	部長	03－588－111 (内2016)
班員	栗原照幸	東邦大学医学部大橋病院第四内科 〒153　目黒区大橋2－17－6	教授	03－468－1251 (内15－436)
〃	木南英紀	順天堂大学医学部第一生化学教室 〒113　文京区本郷2－1－1	教授	03－813－3111 (内3514)
〃	斉田孝彦	国立療養所宇多野病院臨床研究部神経内科 〒616　京都市右京区鳴滝音戸山	部長	075－461－5121 (内275)
〃	鈴木義之	東京都臨床医学総合研究所臨床遺伝学 〒113　文京区本駒込3－18－22	副所長	03－823－2101 (内5103)
〃	田邊等	東京都立神経病院 〒183　府中市武蔵台2－6－1	院長	0423－23－5111 (内3201)
〃	埜中征哉	国立精神・神経センター神経研究所 〒187　小平市小川東町4－1－1	部長	0423－41－2711 (内5211)
〃	堀真一郎	東京都神経科学総合研究所神経生化学 〒183　府中市武蔵台2－6	副参事研究員	0423－25－3881 (内4020)
〃	水野美邦	順天堂大学医学部脳神経内科 〒113　文京区本郷2－1－1	教授	03－813－3111 (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3448)
〃	吉岡利忠	聖マリアンナ医科大学第二生理 〒213　川崎市宮前区菅生2－16－1	教授	044－977－8111 (内3408)

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
〃	吉田瑞子	国立精神・神経センター神経研究所 〒187　小平市小川東町4－1－1	室　長	0423－41－2711 (内5143)
〃	若山吉弘	昭和大学藤が丘病院神経内科 〒227　横浜市緑区藤が丘1－30	教　授	045－971－1151 (内269)
〃	福原信義	国立療養所犀潟病院神経内科 〒949－31　新潟県中頸城郡大潟町犀潟468－1	医　長	0255－34－3131 (内553)
〃	納　光弘	鹿児島大学医学部第三内科 〒890　鹿児島市宇宿町1208－1	教　授	0992－64－2211 (内2146)
〃	小沢高將	名古屋大学医学部第二生化学 〒466　名古屋市昭和区鶴舞町65	教　授	052－741－2111 (内2031)
〃	金沢一郎	筑波大学臨床医学系神経内科 〒305　茨城県つくば市天王台1－1－1	助教授	0298－53－3192 (直通)
〃	川井尚臣	徳島大学医学部第一内科 〒770　徳島市蔵本町3丁目	助教授	0886－31－3111 (内3204)
〃	後藤幾生	九州大学医学部神経内科 〒812　福岡市東区馬出3－1－1	教　授	092－641－1151 (内2281)
〃	斉藤深美子	東京医科歯科大学難治研細胞遺伝 〒113　文京区湯島1－5－45	助　手	03－813－6111 (内6132)
〃	清水輝夫	東京大学医学部脳研神経内科 〒113　文京区本郷7－3－1	講　師	03－815－5411 (内8763)
〃	庄司進一	信州大学医学部第三内科 〒390　松本市旭3－1－1	助教授	0263－35－4600 (内5321)
〃	杉村公也	名古屋大学医学部神経内科 〒466　名古屋市昭和区鶴舞町65	助　手	052－741－2111 (内2297)
〃	高瀬貞夫	東北大学医学部脳研神経内科 〒980　仙台市青葉区星陵町1－1	助教授	022－274－1111 (内2323)
〃	高守正治	金沢大学医学部神経内科 〒920　金沢市宝町13－1	教　授	0762－62－8151 (内3950)
〃	田代邦雄	北海道大学医学部神経内科 〒060　札幌市北区北14条西5丁目	教　授	011－716－1161 (内6027)
〃	塚越　廣	東京医科歯科大学医学部神経内科 〒113　文京区湯島1－5－45	教　授	03－813－6111 (内3380)
〃	中村晴臣	鳥取大学脳研神経病理 〒683　米子市西町86	教　授	0859－33－1111 (内2371)
〃	宝来　聡	国立遺伝学研究所 〒411　三島市谷田111	助　手	0559－75－0771 (内568)
〃	山田和廣	大分医科大学生理学 〒879－56　大分県大分郡狭間町医大が丘1－1506	教　授	0975－49－4411 (内2640)
顧　問	三好和夫	徳島大学医学部第一内科 〒770　徳島市蔵本町3丁目	名誉院長	0886－31－3111

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
〃	豊倉康夫	東京都老人医療センター 〒173　板橋区栄町35－2	院　長	03－964－1131
〃	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
事務担当	安部和子	冲中記念成人病研究所 〒105　港区虎ノ門2－2－2		03－588－1111 (内2168)