厚生省「神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究

第二班（三好班）

昭和54年度研究報告書

昭和55年 3 月

研究報告書の作成にあたって

厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究」班として，昭和54年度の研究報告書を作成する運びとなりました。

本研究班は昨年度に発足し，本年度は第２年目であります。本研究班の目的は筋ジストロフィー症を遺伝，臨床，病態生理，および生化学的見地から追求し，本症の原因を究明し，治療法の開発を目ざすものであります。

本研究班では，各自班員の個性を活かすとともに班全体としての研究を推進するために予めいくつかのプロジェクトを組み組織化を意図しました。本年度の研究成果については，既に昨年12月に研究班会議を開きこれを発表いたしましたが，本報告書はその後のものを加えて完成を得たものであります。

本報告書に集録された成果は，いずれも国際水準のものでありますが，とくに，今回は筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病因究明に関して，新しく核心に迫るいくつかの問題が明らかにされました。内外研究者の今後の研究に大きく影響するところがあるものと思います。このことは，本研究班の班員，並びに共同研究者各位の絶大な努力に負うものであり，班長として心からの敬意を表します。

筋ジストロフィー症の病因の究明と治療法の開発を目ざして，今後も不断の研究を続けることが，まず，この病気に苦しむ人々のために，そして，社会的にも，学問的にも私達に課せられた義務であることに変りなく，今後の精進を念じております。

本研究の推進に，厚生省当局，国立神経センター，日本筋ジストロフィー協会の御努力，御支援そして御理解に深く感謝致します。

昭和55年３月

〈班長〉　三　好　和　夫

目　　次

分担研究報告

Ⅰ．筋ジストロフィーチキン，マウスの研究…… 15

a）筋ジストロフィーチキン，マウス…… 17

Ⅱ．筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病態生理…… 61

a）遺　伝…… 63

b）臨　床…… 66

c）形　態……107

d）生　理……152

e）赤血球など……180

f）生化・治療……206

昭和54年度研究班機構図及名簿…… 247

分　担　研　究　報　告

目　　次

I．筋ジストロフィーチキン，マウスの研究

1）ジストロフィーチキン骨格筋の組織学的，組織化学的研究
——筋線維の発達分化と筋病変出現の関連について—— …… 17
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部　埜　中　征　哉

2）筋ジストロフィーチキンの発達過程における形態学的初期変化 …… 22
九州大学医学部脳研神経内科　黒　岩　義五郎

3）外眼筋の組織学的，組織化学的研究 …… 27
東邦大学医学部第四内科　木　下　真　男

4）ジストロフィーチキン骨格筋の変化と再生
——空胞形成および aberrant myofibrill 形成について—— …… 31
鳥取大学医学部脳研脳神経病理　中　村　晴　臣

5）ジストロフィーチキンにおける activated statellite cell について
——光顕ラジオオートグラフィーによる検討—— …… 37
信州大学医学部第三内科　小　口　喜三夫

6）正常及び筋ジストロフィーチキン培養骨格筋に対する
交感神経の影響…… 41
信州大学医学部第三内科　塚　越　　廣

7）筋ジストロフィー筋における糖および脂質代謝 …… 48
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部　高　木　昭　夫

8）筋ジストロフィーチキン dorsal root ganglia の nerve
growth factor に対する反応性ならびに筋肉中の
nerve growth factor-like immunoreactivity レベル …… 51
京都大学薬学部生物化学　林　　恭　三

9）ジストロフィー実験動物モデルにおける神経成長促進因子の研究
（III）除神経の筋 NGF-L1 への影響 …… 57
京都大学医学部第二内科　井　村　裕　夫

II．筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病態生理

10）筋萎縮性疾患の遺伝分析
——筋緊張性ジストロフィー症について—— …… 63
鹿児島大学医学部衛生　古　庄　敏　行

11）Kennedy-Alter-Sung-Syndrome の2例
——臨床病態に関する検討—— …… 66
大阪医科大学第一内科　茂　在　敏　司

12）特異な臨床型を呈した infantile SPMA の1例 …… 71
愛媛大学保健管理センター　植　田　啓　嗣

13）Distal Dystrophy の二家系 …… 76
神戸大学医学部第三内科　高　橋　桂　一

14）知覚障害を伴わない緩徐進行性遠位型筋萎縮症について
—神経原性病態を主とする5症例の検討を中心として …… 81
虎の門病院神経内科　田　辺　　等

15）筋萎縮症の症候発現部位特異性に関する検討
—— 一側下肢に限局する筋萎縮症9症例を中心として …… 85
虎の門病院神経内科　田　辺　　等

16）脊椎運動制限，Type I 筋線維萎縮中心核を呈する
先天性ミオパチー …… 91
東京大学医学部脳研神経内科　豊　倉　康　夫

17）Ragged red fiber と vacuolar change を認めた
distal myopathy の1孤発例 …… 95
筑波大学臨床医学系神経内科　中　西　孝　雄

18）胃切除後に有痛性筋痙攣を呈した1成人例 …… 100
日赤医療センター神経内科　古　川　哲　雄

19）筋緊張性ジストロフィー症における瞳孔異常について …… 103
京都大学医学部第二内科　井　村　裕　夫

20）神経筋疾患における Frezz-fracture 法による筋細胞膜
の形態学的研究 …… 107
宮崎医科大学第三内科　荒　木　淑　郎

21）筋ジストロフィーの筋病変に関する検討（続報）
——各病型における筋線維病変と血管・間質病変との対比 …… 111
虎の門病院神経内科　田　辺　　等

22）先天性ミオパチーの臨床的・筋病理学的検討 …… 118
鹿児島大学医学部第三内科　納　光　弘

23）進行性外眼筋麻痺のミトコンドリア異常について …… 124
自治医科大学神経内科　宮　武　正

24）ジストロフィーチキンの病態に関する研究
——飼料の影響—— …… 129
東邦大学医学部第四内科　木　下　真　男

25）実験的ミオパチー（II）—— Vinblastin, Colchicine による
ラット骨格筋の形態学的変化 …… 133
大阪医科大学第一内科　茂　在　敏　司

26）アカバネウイルスによる先天性関節拘縮症：
特に筋病変について …… 139
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　猛

27）虚血による実験的ミトコンドリア・ミオパチー：
神経切断の影響 …… 143
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　猛

28）Rimmed vacuole の組織学的・電顕的研究 …… 147
新潟大学脳研究所神経内科　福　原　信　義

29）Duchenne 型筋ジストロフィーにおける未分化筋線維の出現 …… 152
国立武蔵療養所神経センター　高　木　昭　夫

30）筋ジストロフィー症の単一筋線維筋電図（第2報）…… 157
国立療養所宇多野病院神経内科　西　谷　裕

31）哺乳動物の骨格筋に対する E-C Uncoupling …… 162
宮崎医科大学第三内科　栗　原　照　幸

32）微小電極法によるミオトニーの研究 …… 167
宮崎医科大学第三内科　栗　原　照　幸

33）実験的 excessive $[Ca^{++}]_i$-induced myopathy に関する研究 …… 172
長崎大学医学部第一内科　高　守　正　治

34）甲状腺機能低下症にみられる mounding 現象の問題点 …… 177
東京大学医学部脳研神経内科　豊　倉　康　夫

35）アルミナバッチ法とアセチル化を組合わせたラジオイムノアッセイ
によるデュシャンヌ型筋ジストロフィーの赤血球膜アデニレート
サイクレースの測定 …… 180
神戸大学医学部第三内科　高　橋　桂　一

36) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜の Na+KATPase …… 184
九州工業大学保健管理センター　馬　渡　志　郎

37) Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球膜について …… 187
愛媛大学保健管理センター　植　田　啓　嗣

38) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜アセチルコリン
エステラーゼ活性についての検討 …… 192
九州大学医学部脳研神経内科　黒　岩　義五郎

39) 筋ジストロフィー症の細胞膜の物理化学的研究
II. 赤血球形態の経時変化及びカルシウムの影響 …… 195
国立武蔵療養所神経センター　吉　田　瑞　子

40) 筋緊張性ジストロフィー症における赤血球膜
Lipid vesicles の異常 …… 199
新潟大学脳研究所神経内科　近 藤 喜代太郎

41) ジストロフィー鶏赤血球膜のレクチン結合 …… 200
都立府中病院神経内科　宇 尾 野 公 義

42) 筋ジストロフィー症における筋膜脂質に関する研究——続報——
——筋ジストロフィーチキンの筋ガングリオシドについて—— …… 206
自治医科大学神経内科　宮　武　　正

43) Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) におけるクレアチン代謝異常 …… 210
I. creatinase およびsarcosine dehydrogenase の
人骨格筋における存在—— creatine-urea 経路の提唱
II. Duchenne 型筋ジストロフィー症骨格筋中の creatinase 異常
徳島大学医学部第一内科　三　好　和　夫

44) 各種神経筋疾患罹患筋の CANP 活性 …… 215
東京大学医学部脳研神経内科　杉　田　秀　夫

45) トリプトファン代謝異常を認めた小脳失調症
——キヌレニンフオルムアミダーゼ欠損症と思われる1家系—— …… 218
徳島大学医学部第一内科　八 木 田 正 聖

46) 筋・赤血球 PFK 欠損症に関する最近の知見 …… 222
大阪大学医学部第二内科　垂　井　清一郎

47) 各種スポーツにおける血中ミオグロビンの変動パターン …… 226
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

48) 赤筋と白筋に於ける steroid cytosol receptor と
その nuclear binding 231
信州大学医学部第三内科　庄　司　進　一

49) Serotonin myopathy における筋膜の生化学的検索 236
名古屋大学医学部第一内科　飯　田　光　男

50) Compound 48/80 の筋蛋白代謝におよぼす影響 239
徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門　真　田　幸　弘

51) 膵エキスの作用機序と精製法の現状および
筋ジス患者への臨床応用について 242
長崎大学医学部第三内科　高　岡　善　人

Ⅰ．筋ジストロフィーチキン，マウスの研究

a）筋ジストロフィーチキン，マウス

1）ジストロフィーチキン骨格筋の組織学的，組織化学的検討

——筋線維の発達分化と筋病変出現の関連について——

埜中征哉*

研究協力者　春原経彦*　石浦章一*

ジストロフィーチキン（Dy-チキン）では白筋が主として侵されることがよく知られている．白筋の中でも，筋により侵される程度が異なり，胸筋は四肢の筋よりより強く侵される．このことは白筋の中での筋線維タイプの分布が異なるためと思われる．本研究は白筋である浅胸筋と後広背筋 posterior latissimus dorsi（PLD）を用い，白筋の亜型（subtype）の分布の状態と筋ジストロフィー病変の出現との関連につき検討することを目的とした．

対象と方法

Dy-チキン（line 413）と対照（line 412）各々18羽，計36羽をふ化直後からふ化後4月目まで経時的に浅胸筋，PLD より筋を採取し，−160°C で凍結し，連続切片を作成した．切片には HE, modified Gomori's trichrome, NADH-TR, menadione-linked alphaglycerophosphate dehydrogenase（MAG），PAS，oil red O, ATPase（preincubation pH 10.3, 4.6, 4.2），acid phosphatase，alkaline phosphatase，nonspecific esterase, acetylcholinesterase, phosphorylase 染色を行った．個々の例より最低200本の筋線維を ATPase，NADH-TR, PAS 染色で Ashmore ら[1] の定義に従い αW，αR，βR の3種に分け，その分布を検討した．

鶏骨格筋の組織化学的特徴（図1）

鶏の骨格筋は哺乳動物と同じくアルカリ側の routine ATPase（Dubowitz & Brooke の方法では preincubation pH 10.0〜10.3）で活性が低く染出されない赤筋（βR）と，活性が高く濃染する白筋（α）線維の2種類に分けられる．酸性側 ATPase 染色（pre incubation 4.6〜4.2）では逆に赤筋は濃く白筋は淡く染まる．白筋（α）線維は NADH-TR，SDH など酸化酵素染色で顆粒（formazan 顆粒）が大型で密に分布する αR と，逆に顆粒が小さく粗に分布する αW の2種に分けられる[1]．すなわち鶏骨格筋には赤筋（βR）と白筋である αR，αW 線維の3種類が存在する．ただ diformazan 顆粒の大きさや分布のみで3種と分類することは判別困難なことが多い．浅胸筋，PLD の PAS 染色では αR は αW 線維に比べ染色性が低く，この2つの筋線維は比較的よく分別されるので NADH-TR 染色と併用すると線維型の分類はより容易となる[2]．

各種白筋における筋線維タイプの分布と成長過程における変化

浅胸筋：Dy-チキン，対照ともふ化直後では筋線維は細く αW と αR 線維の分別は困難であり何れとも云い難かった．5日目になると対照では NADH-TR で diformazan 顆粒の大きさ，分布はほとんど全ての線維で同じ程度で，また PAS 染色で軽度陽性で αW 線維的となりつつあった．しかし Dy-チキンでは筋線維あたりの顆粒は多く，しかも大型で PAS 染色でよく染出されない αR 的

＊国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

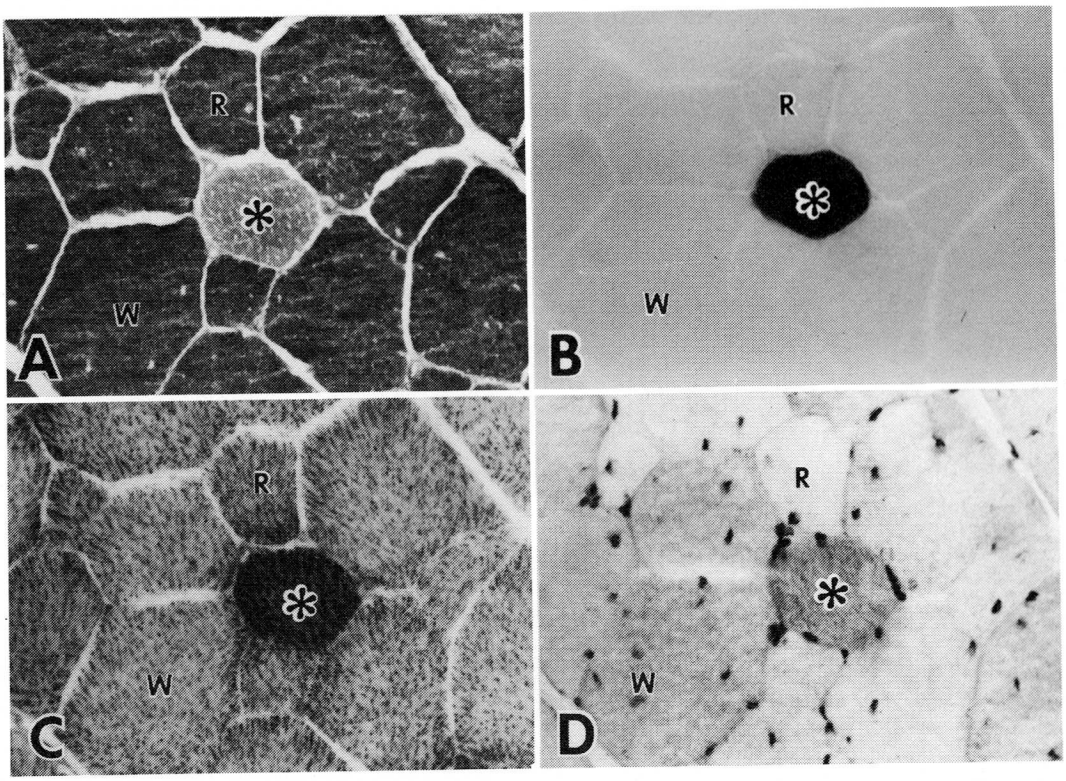


図1　ふ化後4月の正常後広背筋
routine ATPase (pH 10.3) (A) では濃染する白筋と淡染する赤筋である βR 線維(星印) に分けられ，酸化側 ATPase (pH 4.5) (B) では逆の染色性を示す．白筋はさらに NADH-TR 染色 (C) で diformazan 顆粒が大きく密に存在し，PAS 染色 (D) で染色性の低いやや小型の αR 線維 (R) と，逆の染色性を示す αW 線維 (W) に分けられる．×300.

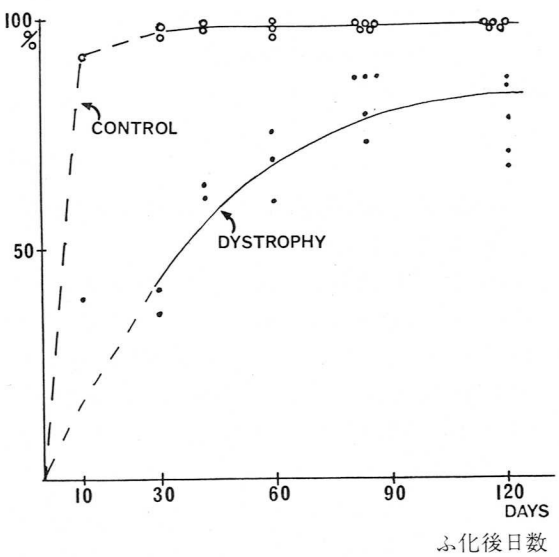


図2　浅胸筋における αW 線維の経時的頻度
コントロール (line 412) ではふ化後10日目頃にはほとんど全ての線維が αW 線維となるのにジストロフィー鶏 (line 413) では αR から αW への変換が遅れている．

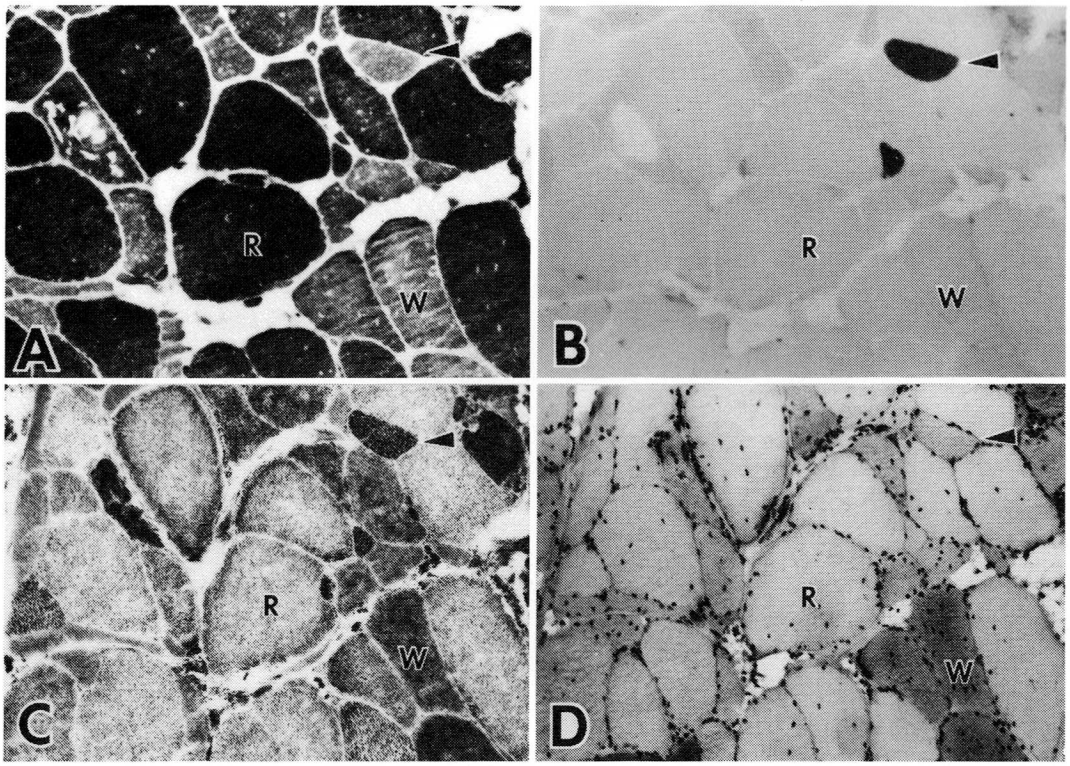


図3　ふ化後4月のジストロフィー鶏後広背筋

routine ATPase (pH 10.3) (A) ではαW 線維 (W) は αR 線維 (R) に比べ若干淡く染まるが酸性側 ATPase (B) では区別がない．NADH-TR 染色 (C) で diformazan 顆粒が大きく，PAS 染色 (D) で染色性の低い αR 線維が対照に比較しより多数存在する．赤筋である βR 線維 (矢印) は数，大きさとも対照と比べ変化がない．　×110.

線維のものが多くみられた．ふ化後10日目頃になると対照ではほとんど全ての線維が αW 線維の特徴を備え，この時期までに αR から αW 線維への変換がほぼ完了することを表していた．

一方 Dy-チキンでは大型の diformazan 顆粒をもち，PAS 染色でほとんど染出されない αR 線維がふ化後60日を経ても約30～40%みられ，αR から αW 線維への変換が遅れていることを示していた．それ以後も NADH-TR で顆粒の大きな αR 線維は多く認められたが，90日目頃になると αR 線維でも PAS の染色性は次第に高くなり αR と αW 線維とはっきり分別することが困難な線維が多く存在した．浅胸筋における αR から αW 線維の変換の経時的分布を図2に示した．

後広背筋 (PLD)：浅胸筋に比べ後広背筋では，同じ白筋でも筋病変が多少軽いことが知られている．対照成鶏でみると PLD が浅胸筋と最も異なる所は PLD では少数の赤筋 (βR) をもつことと，多数の αR 線維が存在し，αR から αW線維への変換が浅胸筋より少ないことであった．

ふ化後10日目頃より PLD を経時的に検索したが，10日目には Dy-チキンで diformazan 顆粒が大型で密に分布する線維が多くみられ，また PAS 染色でも対照と比べ明らかに差が出ていた．その後も Dy-チキンの方に αW線維が少なく，浅胸筋と同じように αR から αW 線維への交換が Dy-チキンで遅れていることを示していた(図3)．

ほぼ成鶏となったふ化後4月目の時点で αW と

表1　ふ化後4月目白筋におけるαWとαR線維の頻度

	αW 線維	αR 線維
浅胸筋		
対照 (line 412)	99.2%	0.8 %
Dy-チキン (line 413)	73.5	26.5
後広背筋		
対照	78.2%	21.8%
Dy-チキン	67.2	32.8

αR 線維の比率を対照5羽, Dy-チキン5羽を使用し，浅胸筋と PLD で比較した（表1）. PLD では αW 線維への変換が少なく4月の時点でも78.2%が αW 線維で21.8%が αR 線維であった．一方 Dy-チキンではさらに変換は遅く67.2%が αW 線維で32.8%が αR 線維であった．

考　　察

Dy-チキンはヒト筋ジストロフィーと異なり白筋のみが選択的に侵される．白筋の中でも胸筋が最も強く，次いで後広背筋が侵され，下肢筋は末期になるまでほとんど侵されない．このことは白筋の中での subtype である αW と αR 線維の分布の違いによることが推定される．今回の結果から明らかとなったように成鶏浅胸筋ではほとんど全ての線維は αW 線維であった．一方下肢筋である前脛骨筋ではふ化後1年目でも αW と αR 線維の頻度は約½ずつで αW 線維がやや多い程度であった．すなわち Dy-チキンでは白筋の中でもより白筋的な αW 線維の方に，赤筋的な αR 線維より筋ジストロフィー病変が出現し易いことを物語っている．αW 線維の線維内小器官の異常がより高度であるという電子顕微鏡的所見はやはり αW 線維に病変が強く出現することを裏付けている[3]．

鶏の骨格筋の分化は赤筋タイプから白筋タイプへと分化するといわれている[1,4]．白筋はより赤筋的である αRからより白筋的である αW 線維へと変換する．この変換は浅胸筋ではふ化後10日目頃には少数の筋を除いてはほぼ完成するが下肢の筋では成鶏となっても完全に変換しない．この分布の差が上記のように病変出現の差ともなって表われていると思われる．Dy-チキンでは今回の研究からも明らかになったように αR から αW 線維への変換が遅れる．Dy-チキンでは筋線維が壊死に陥り再生線維が出現していると考えられるので，Dy-チキンに多くみられる αR 線維は幼若な再生線維をも一部含んでいると思われる．しかし，ふ化後5～10日目で壊死線維がほとんどなく病変の余り強くない時の浅胸筋でも αR 線維が多いことは, αR 線維が全て再生線維とは考え難く，多くは筋線維の変換の遅れを反映していると考えられる．

筋線維の変換の遅れは筋線維自体に何らかの原因があるためか，神経に原因があるためか不明である．Acetylcholinesterase 染色をすると Dy-チキンでは運動終板より遠隔の所でも活性が高く，全体に対照より活性が高く染出される．この所見は脱神経時にもみられるが，胎生筋も同じように広く活性があり，神経の要因が加味しているのか，発達の遅れなのか決め難い．Dy-チキンの筋を対照チキンに移植し，その筋が対照チキンの神経支配をうけてもなお acetylcholinesterase の活性が高くみられることは筋線維自体に何らかの原因があるとの報告もある[5]．もしそれが事実ならば筋ジストロフィー症では筋線維自体に何らかの欠陥があるため筋の分化が遅れているということになる．

ヒト筋ジストロフィー症では活発な再生があるにもかかわらず病状が進行することは筋が完全に再生しないためとも考えられている．筋ジストロフィー症においては胎生からの筋，あるいは再生した幼若な筋が何故に遅れた分化をするのか，このことを明らかにすることは重要な課題であると考えられる．

文　　献

1）Ashmore, C. R. & Doerr, L. : Postnatal development of fiber types in normal and dystrophic skeletal muscle of the chick. Exp. Neurol., 30 : 431, 1971.

2）埜中征哉，春原経彦，杉田秀夫，ほか：筋ジス

トロフィー鶏骨格筋の組織学的，組織化学的研究—Duchenne 型筋ジストロフィー症との対比—．神経内科，11：259，1979.

3) Beringer, T. : Stereologic analysis of normal and dystrophic avian αW myofibers. Exp. Neurol., 61 : 380, 1978.

4) Cosmos, E. & Butler, J. : Differentiation of fiber types in muscle of normal and dystrophic chickens. A quantitative and histochemical study of the ontogeny of muscle enzymes. In "Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders" (edited by Milhorat, A. T.), Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1967, p. 197.

5) Linkhart, T. A., Yee, G. W. & Wilson, B. W. : Myogenic defect in acetylcholinesterase regulation in muscular dystrophy of the chicken. Science, 197 : 549, 1975.

2）筋ジストロフィーチキンの発達過程における形態学的初期変化

黒　岩　義五郎*

研究協力者　石　本　進　士*　後　藤　幾　生*　大　田　典　也**

目　的

昨年，dystrophy chicken の発達過程における形態学的初期変化がふ化後，1週間目以内に白筋に生じる事を酵素組織化学的方法を用いて報告した．今回，動物数を増して再検討するとともに，freeze-fracture 法及び電顕による筋形質膜の変化を観察した．

方　法

実験動物は dystrophy chicken (line 413) と control chicken (line 412) を各々5羽ずつを使用した．ふ化後，1日目，1週間目，2週間目，3週間目，及び6週間目にエーテル麻酔下にて頸動脈を切断，脱血し，red fiber である前広背筋 (ALD) と white fiber である後広背筋(PLD) の凍結切片標本を作製した．染色は HE, DPNH diaphorase, SDH, MDH, α-GPDH, LDH, phosphorylase, acetylcholinesterase 等を施行した．morphometry は HE 染色標本にて，ふ化後，1日目から3週間目迄，各週毎に各々の ALD 筋，PLD 筋から筋線維100本ずつを計測し，5羽の平均値を百分率で棒グラフに示した．DPNH diaphorase 標本では，ふ化後，1日目から3週間目迄各週毎に ALD 筋，PLD 筋のほぼ同一の筋線維径毎に，横断面上の formazan deposit の数を5本ずつ数えた．又，ふ化後，1週間目，2週間目，3週間目及び6週間目の PLD 筋で，筋線維200本を数え，DPNH 活性の程度に応じて high DPNH fiber, intermediate DPNH fiber, low DPNH fiber に分類し，その百分率を各週毎に示した．又，ふ化1日目の白筋において，freeze-fracture 法及び epon 包埋標本の電顕写真にて，筋形質膜の caveolae 数，形，配列等を観察した．

結　果

1）morphometry：white fiber である PLD筋は，ふ化1日目には明らかな差は認めなかったが（図1），1週間目より徐々に fiber size に広がりが生じ，3週間目には dystrophy 群で fiber size distribution が広くなり，大径線維の増加が認められた(図2)．一方 red fiber である ALD 筋は，ふ化後3週間目に於てやや大径線維の割合が増加するが，fiber size distributionの広がりは認めなかった．

2）DPNH diaphorase 染色による各 fiber type の割合の経時的変化：PLD 筋を DPNH diaphorase 染色の活性の程度に応じて，high DPNH fiber, intermediate DPNH fiber, low DPNH fiber に分類すると，ふ化後，1週間目では dystrophy 群，control 群に著差を認めないが，1週間目以後，control 群では high DPNH fiber は漸減し，6週間目では大部分が low DPNH fiber で占められるのに反して，dystrophy 群では，low DPNH fiber の割合は増加せず，intermediate DPNH fiber, high DPNH fiber の割合が高く保たれていた(図3)．

3）DPNH diaphorase formazan deposit 数の経時的変化：ほぼ同一筋線維径毎の筋線維1本あたりの横断面上の formazan deposit 数は，ふ化

＊九州大学医学部脳研神経内科
＊＊九州大学医学部脳研神経病理

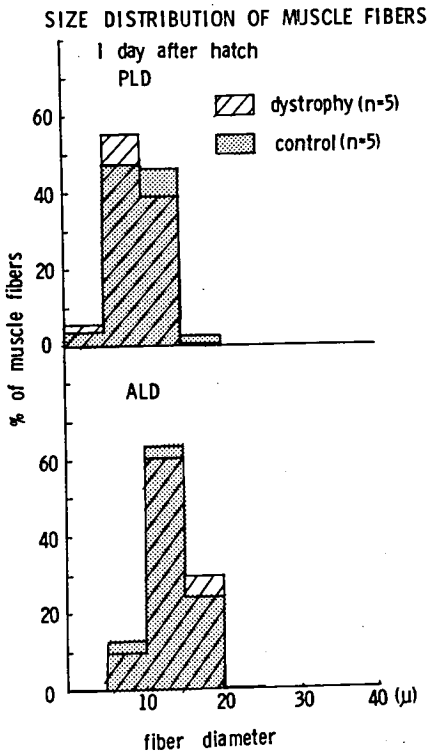


図 1

1日目では dystrophy 群，control 群に差を認めないが，ふ化後1週間目より，dystrophy群の PLD 筋に於て，数の増加を認め(図4)，以後，2週間目，3週間目と，その増加の傾向が著明となり(図5)，さらに個々の formazan deposit の配列の乱れ，不明瞭化が認められた．一方 ALD 筋に於ては，両群に差異を認めなかった．

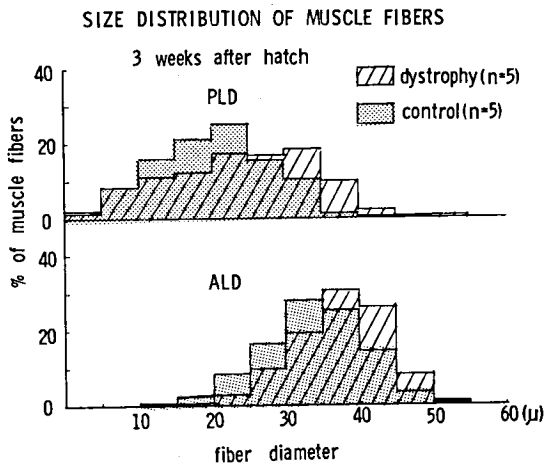


図 2

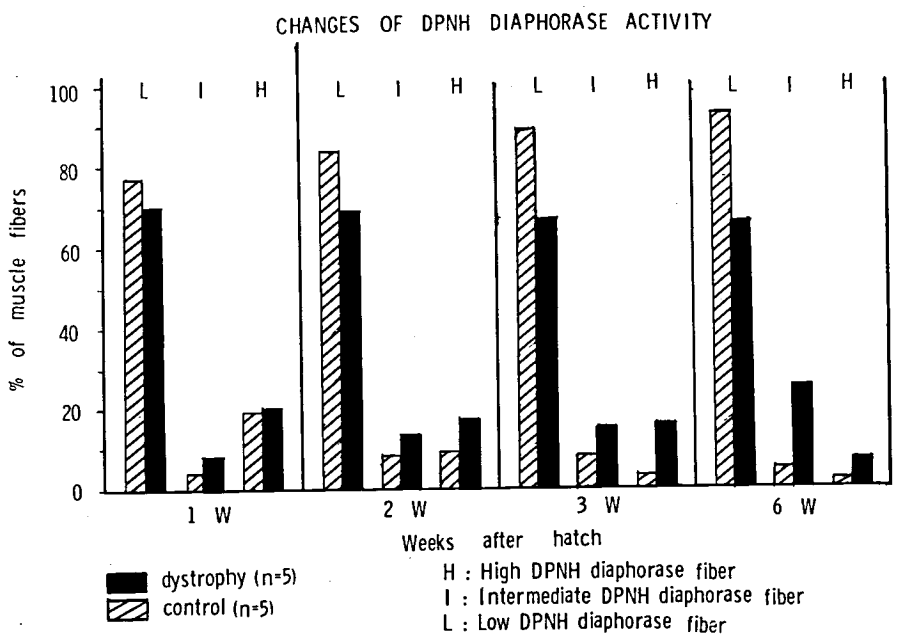
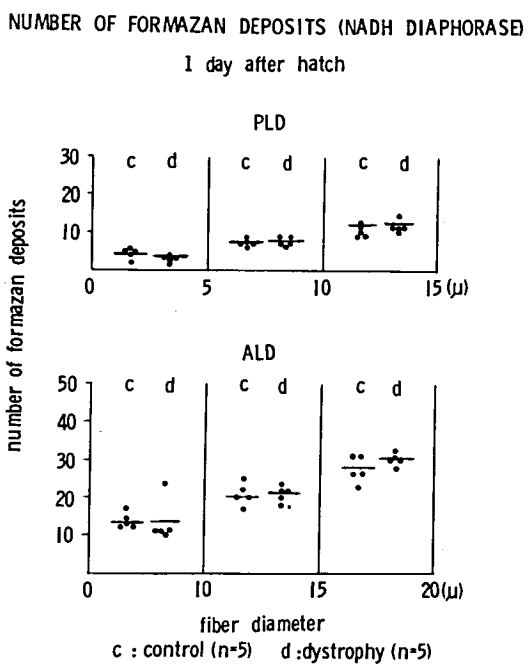


図 3


NUMBER OF FORMAZAN DEPOSITS (NADH DIAPHORASE)
1 day after hatch
PLD
ALD
number of formazan deposits
fiber diameter
c : control (n=5) d :dystrophy (n=5)

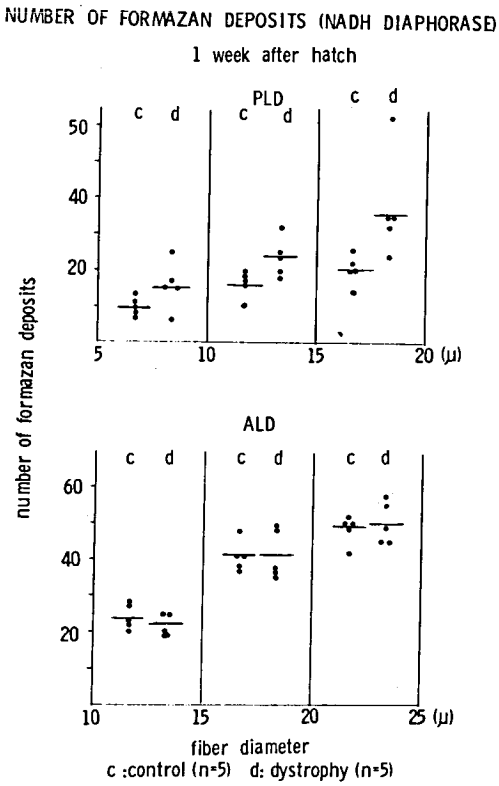

NUMBER OF FORMAZAN DEPOSITS (NADH DIAPHORASE)
1 week after hatch
PLD
ALD
number of formazan deposits
fiber diameter
c :control (n=5) d: dystrophy (n=5)

図 4

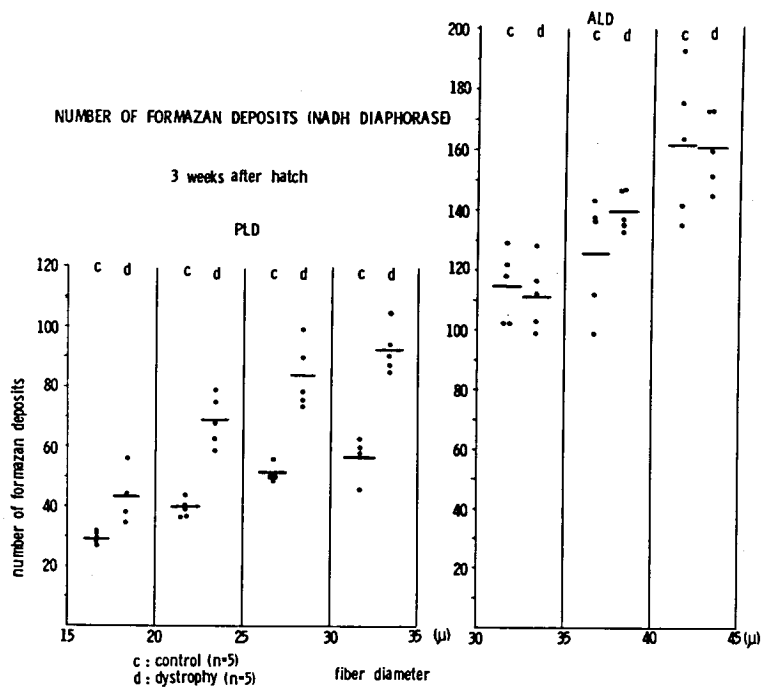

NUMBER OF FORMAZAN DEPOSITS (NADH DIAPHORASE)
3 weeks after hatch
PLD
ALD
number of formazan deposits
c : control (n=5)
d : dystrophy (n=5)
fiber diameter

図 5

4）筋形質膜の変化：ふ化1日目の大胸筋の freeze-fracture replica の電顕にて筋形質膜上の caveolae 数を集計面積100μ^2で単位面積あたりの数を計測すると，dystrophy 群では7.34/μ^2，control 群では11.33/μ^2と，dystrophy 群で減少していた．又，dystrophy 群では個々の caveolae の配列の乱れ，形の不規則性もみとめられた．また，ふ化1日目の PLD 筋の epon 包埋標本の電顕写真にても，freeze-fracture 法による caveolae に対応すると思われる pinocytotic vesicle の形の不規則性を認めた．

考　　察

前回，私達は dystrophy chicken 筋では従来いわれている如く，white fiber である PLD筋が red fiber である ALD 筋より早期に[1]，ふ化後1週間以内に dystrophic な変化が生じる事を報告した．今回，動物数を増して再検討した結果，HE 染色による morphometry，DPNH diaphorase deposit 数共に PLD 筋に早期に変化が発現し，前回と同一の結果を得た．又 dystrophy chicken 筋では embryo 期の SDH 活性等，oxidative enzyme 活性が高いまま持続する傾向があり，ふ化後の maturation の遅延が示唆されている[2,3]．今回，私達は DPNH diaphorase 活性から high, intermediate, low DPNH fiber に分けて，その百分率を経時的にみると，control 群では，しだいに low DPNH fiber が増加するが，dystrophy 群では，low DPNH fiber は変化せず，intermediate, high DPNH fiber の比率の高い事がわかった．以上の結果より，何らかのふ化後の maturation の異常[4]が考えられた．又 PLD 筋の low DPNH fiber に於て，同一筋線維径毎に対応する横断面上の DPNH formazan deposit 数の計測から dystrophy 群では，ふ化後1日目は差異は認めないが，1週間目から増加する傾向を認めた．すなわち酵素組織化学的方法では，dystrophic process の初期変化は少なくともふ化後から1週間以内に oxidative enzyme 活性の変化として現われている事が明らかとなった．又この時期では，HE 染色標本による筋変性所見や，morphometry には変化を認めず，anaerobic metabolism に関与する phosphorylase, LDH, α-GPDH, 神経筋接合部の acetylcholinesterase 等には明らかな変化がなく，NADH diaphorase 以外の aerobic metabolism に関与する SDH, MDH 等の oxidative enzyme には同様の傾向を認めた．以上の結果から，dystrophic process の初期変化として mitochondrial oxidative enzyme 系が何らかの関与をしていると考えられる．又 freeze-fracture 法にて，ふ化1日目の白筋に於て，筋形質膜の caveolae 数の減少，配列，形の乱れをみとめ，又 epon 包埋標本では，pinocytotic vesicle の形に不規則性を認めた．Brain ら[5]は，ふ化後1週目に於て，caveolae 数が dystrophy 群で増加している事を，Schotland ら[6]は，Duchenne 型 dystropy で筋形質膜粒子の減少を報告しており，筋形質膜の変化は今後検討すべき課題と考える．

文　　献

1）Holliday, T. A., Julian, L. M., & Asmundson, V. S. : Muscle growth in selected lines of muscular dystrophic chickens. Anat. Rec., 160 : 207—216, 1968.

2）Cosmos, E. : Enzymatic activity of differentiating muscle fibers. Develop. Biol., 13 : 163—181, 1966.

3）Cosmos, E., & Butler, J. : Differentiation of fiber types in muscle of normal and dystrophic chickens. Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders. ed. A. T. Milhorat. Excerpta Medica Foundation, 197—204, 1967.

4）Ashmore, C. R., & Doerr, L. : Oxidative metabolism in skeletal muscle of normal and dystrophic chickens. Biochem. Med., 4 : 246—259, 1970.

5）Brain, R., Costello, B. S., & Shafiq, S. A. : Freeze-Fracture study of muscle plasmalemma in normal and dystrophic chickens. Muscle & Nerve, 2 : 191—201, 1979.

6) Schotland, D. L., Bonilla, E., & Van Meter, M. : Duchenne dystrophy : Alteration in muscle plasma membrane structure. Science, 196 : 1005—1007, 1977.

3）外眼筋の組織学的，組織化学的研究

木下真男*

研究協力者　若田宣雄*　川崎研一*　亀井敦行*
石塚洋一*　山田信興*

外眼筋は長さ40～60mm，巾約10mmの小さな6コの横紋筋よりなり，精巧な眼球運動に関与し，機能的にも四肢骨格筋とは，かなり異なっている．例えば同じ筋ジストロフィー症でもDuchenne, limb-girdle, facioscapulohumeral type などでは全身の筋が侵される末期になっても，ほとんど外眼筋が侵されることはないが，ocular myopathy, descending ocular myopathy, oculopharyngeal muscular dystrophy などでは外眼筋は高度に侵される．

これらの事実は，外眼筋およびこれらを支配する神経系を含めた，神経筋系が，他の骨格筋とは異なる特異性を持っていることを推定させるものである．

我々は外眼筋の特異性を明らかにするため組織化学をもちい，基礎的研究を行った．

材　料

当院眼科で斜視および下斜筋過動症の手術の際，採取した眼筋，すなわち内直筋5，外直筋3，下斜筋2，計10検体について検索を行った．患者年齢は5～36歳．男女比は7：3であった．採取部位は内直筋，外直筋では付着部より5mm前後の部位，下斜筋では筋腹である．

動物実験では3～4kgの雄家兎の外直筋，内直筋について検索を行った．

検索方法

これらの検体を，それぞれGomori-trichrome, phosphorylase, NADH, ATPase, PAS染色を行い，組織化学的検索ならびに四肢筋との比較を行った．

結　果

1．外眼筋のセンイ直径

図1に示すように5歳，7歳，36歳例について測定した結果，5歳例では12.5μ，7歳例では15μ，36歳例では25μの筋センイが最も多数存在していた．

また，外眼筋を染色標本でみると，眼球例では筋センイ直径が大きく，眼窩例では筋センイ直径が小さいことがわかる．これを数量的に測定してみると，いずれの例でも，図2（7歳例）に示すように眼球側筋センイ直径の方が，眼窩側筋センイ直径より大きいことが明らかであった．

2．筋センイ直径とfiber type

外眼筋のfiber typeについては次ぎに触れるが，とりあえずphosphorylase染色で，四肢骨格筋と同じように淡染するセンイをtype I，濃染するものをtypeIIとして，筋センイ直径を検討した．

7歳例で筋センイ分布は17.5μのものがピークで，fiber typeにより，センイの分布にはあまり変化がなかった．

眼球側と眼窩側のfiber typeを比べてみると7歳側で眼球側でtypeIIがtype Iに比べ多く，眼窩例ではほとんど差がなかった．

次ぎに，この2つのtypeのセンイ直径を眼球側と眼窩側で比べてみると，type I，II共に眼球側の筋センイ直径が大きい傾向を示した．

3．外眼筋のfiber type

骨格筋のfiber typeについては周知のごとく

＊東邦大学医学部第四内科

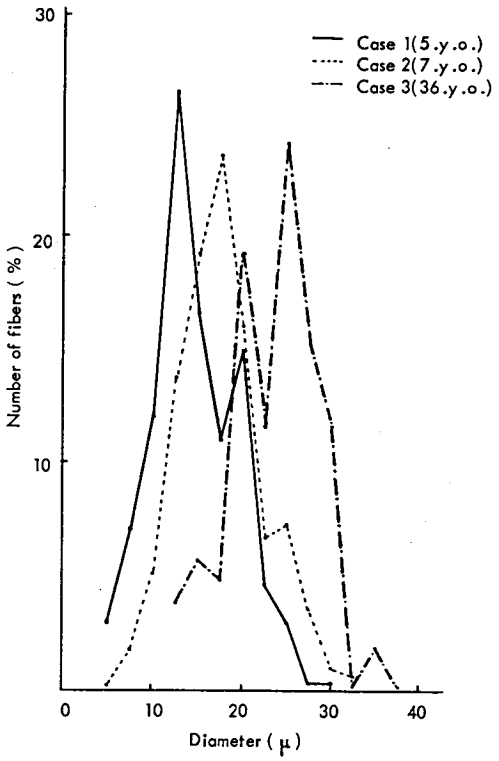


図1　各年齢層の筋センイ直径

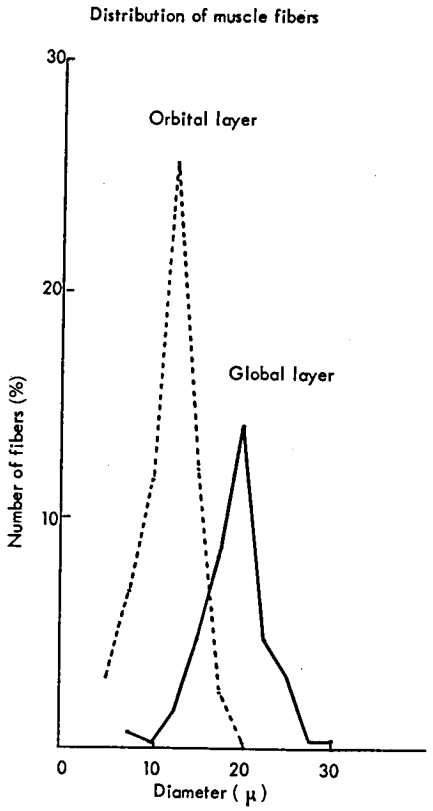


図2　眼球側と眼窩側の筋センイ直径（7歳例）

Dubowitz の分類では type I および type II センイは A, B, C の計4つの型に分類されている.

外眼筋を各染色標本でみると, NADH 染色で濃染するセンイは四肢筋でいえば type I であるが, この同じセンイを pH4.2の ATPase 染色でみると淡染し, 四肢筋の type II の性質を示し, 染色性の上からは四肢筋とは異なっている.

これらをもとに, 下斜筋の連続切片をもちい, pH4.2, 4.6, 9.4の ATPase 染色で, 個々の筋センイについて検討した結果, 図3に示す6つの型に分類するのが妥当と考えられた.

次に家兎の内直筋をみると, 左上の大きな筋センイは phosphorylase でも NADH 染色でも淡染し, 四肢筋の fiber type を応用できないことが明らかであった(図4).

Histochemical classification of human extraocular muscle

	ATP-ase pH 4.2	ATP-ase pH 4.6	ATP-ase pH 9.4
1	○	○	○
2	●	○	○
3	●	●	○
4	○	○	●
5	○	●	●
6	●	●	●

図3　人外眼筋の fiber type

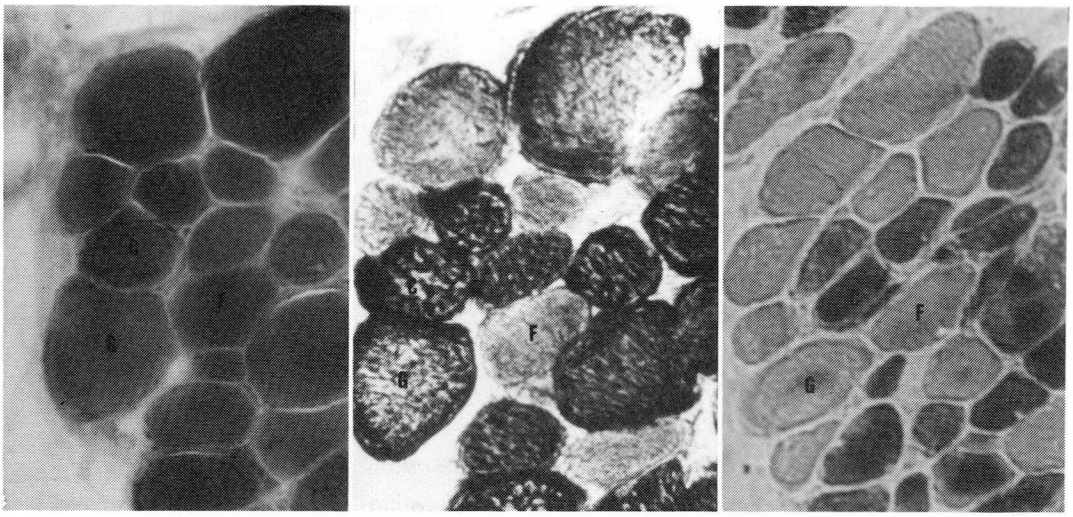


図4　家兎内直筋の連続切片
左　Gomori-trichrome 染色 C : coarse fiber, G : glanular fiber, F : fine fiber.
中　NADH 染色
右　phosphorylase 染色

考　　案

外眼筋は精巧な眼球運動に関与しており，これらの筋は脳神経支配であり，血流も心筋に次いで多い，など多くの外眼筋の特異性が知られている．

外眼筋の組織化学的研究は動物ではカエル，ラット，家兎，ネコ，サル，ヒヒ[1)2)3)]などでみられるが，人外眼筋ではごく僅かしかみられない[4)5)]．

今回の我々の行った実験では外眼筋は加齢と共に筋センイ直径は増大し，同年齢の四肢骨格筋と比べると1/4～1/2の直径で，これは重量の軽い眼球を動かす点に関連しているかも知れない．

また，眼球側と眼窩側の筋センイ直径に差があることは明らかで，ネコなどの動物実験でも，同様な所見が観察されている[6)]．これは運動神経終末の差によるものと考えられ，一般に en plaque 型筋センイの直径は大きく，en grappe 型の筋センイは直径が小さいといわれている．

外眼筋の fiber type は初め Felderstruktur fiber と Fibrillenstruktur fiber に分類されたが[7)]，1960年代になり組織化学が導入され Fibrillenstruktur は fine fiber と granular fiber に分けられ，Felderstruktur は coarse fiber に分類された[3)]．その後は生理学的，あるいは生化学的検討も加わり5ないし7つの fiber type に分類が試みられている．

従来から行われている四肢筋の fiber type の分類では oxidative enzyme による染色と phosphorylase 染色では，同一センイで全く逆の染色性を示すにもかかわらず，外眼筋では同じ染色性を示すものもあり，四肢筋と同じ分類を外眼筋に応用することは不可能であった．また，一部の報告にみられるように coarse fiber, granular fiber, fine fiber を四肢筋の分類にあてはめることも困難と考えられた．

結　　語

今回，我々が検索し得た外眼筋は斜視および下斜筋過動症という特殊な状態であり，正常外眼筋との比較を行うことはできなかった．

1．人外眼筋センイは加齢と共に直径を増すが，四肢筋と比べると1/2～1/4の太さであった．

2．眼球側と眼窩側で筋センイ直径を比べてみると，眼球側の筋センイ直径の方が大きいことが明らかであった．

3．人外眼筋の fiber type は四肢筋と同じ方法で分類することは困難であり，6つのタイプに分類するのが妥当と考えられた．これは家兎外眼筋においても確められた．

文　献

1) Kern, D. : A comparative pharmacologichistologic study of slow and twitch fibers in the superior rectus muscle of the rabbit. Invest. Ophthal. 4 : 901—910, 1965.

2) Peachey, L. : The structure of the extraocular muscle fibers of mammals. In "The control of eye movements" ed. Bach-y-Rita, P., pp.47—66, Academic Press, New York, 1971.

3) Durston, J. H. J. : Histochemistry of primate extraocular muscles and the change of denervation. Brit. J. Ophthal. 58 : 193—216, 1974.

4) Ringel, S. P. : Histochemistry of human extraocular muscle. Arch. Ophthalmol. 96 : 1067—1072, 1978.

5) Ringel, S. P., Wilson, W. B. & Barden, M. T. : Extraocular muscle biopsy in chronic progressive external ophthalmoplegia. Ann. Neurol. 6 : 326—339, 1979.

6) Minoda, K. C. : Fine structure of extraocular muscles. : Adv. Neurol. 19 : 829—844, 1975.

7) Krüger, P. : Über den Zusammenhang von Struktur und Funktion bei Saergetiermuskeln. Anat. Anz. 104 : 193—200, 1957.

4）ジストロフィーチキン骨格筋の変性と再生
——空胞形成および aberrant myofibrill 形成について——

中村晴臣*

研究協力者　頼田孝男*　今岡健次*

ジストロフィー鶏（Dy チキン）の骨格筋をふ化後経時的に観察すると，ふ化後約3週目頃より，多数の変性筋線維が急速に出現してくる．それとほぼ同時に，多くの myoblast，あるいは myotube が認められるようになる．かかる myoblast や myotube をもって，筋線維の再生像とみなすか，あるいはまた，未熟筋線維の持続的存在と考えるかは，ジストロフィー筋の本質に関係する事項である．著者らは，ジストロフィー筋の機能を規定するものは，筋線維の変性と再生とのバランスであるとする作業仮説に基づき，Dy チキン骨格筋の変性と再生の形態学的特徴を追究してきた．筋線維に出現する空胞形成は，Dy チキンの筋変性を特徴づける所見の一つであるが，空胞の起源については，なお実証に乏しいので，今回はその微細構造上の所見を記載する．他方，Dy チキンにみられる myoblast は，大部分のものが正常の形態を示すのであるが，時には myofibril の配列に異常のある myoblast も認められるので，Dy チキンの筋線維に認められる aberrant myofibril の成因を，筋線維の再生と関係づけて考察する．

方　法

Dy チキン（line 413）及び対照チキン（line 412）夫々18羽を使用，いずれも3羽ずつ6群に分け，ふ化後5日から40日に亘り，1週間隔にて浅胸筋を摘出し，0.1M 燐酸緩衝液加2.5%glutaraldehyde（pH 7.3）にて固定した．更にオスミウム酸による後固定，あるいはランタン染色を加え，型の如く Epon 包埋超薄切片を作り，酢酸ウラニウムと鉛塩による重染色を施し，電顕的検索を行った．

結　果

1．空胞形成：筋線維の空胞化は，少数ながらふ化後5日目には出現するが，26日目以降は多数の線維に認められるようになる．空胞には，従来指摘されているように膜構造がみられ，空胞内部には細顆粒状物質，並びに剥離収縮したような膜様物が認められた．小空胞壁には小陥凹が散見され，T-system 形成の初期像である小窩（caveolae）に極めて類似している．小空胞の辺縁部を追ってみると，全体として馬蹄形ないし蟹鋏形を呈し，それが管状構造に連なっているのが認められた（図1）．かかる空胞は一般に筋線維の中心部に存在するため，ランタン金属の浸入はみられなかった．ランタン金属の浸入し易い筋線維周辺部をみると，Dy チキンの T-system は馬蹄形走行を示している（図2）．従って，上記の空胞に連なっている管状構造は，T-system と考えるのが妥当であろう．更に，直線状の管状構造の末端部が拡大し，細顆粒状物質を満たす所見も認められた．これらの所見は，いずれも Dy チキンの筋線維空胞の起因として，T-system の拡大を示唆するものである．

しかしながら他方では，前述の馬蹄形あるいは蟹鋏形に拡大した管状構造に近接して，小楕円形の構造物が認められる．これは管状構造との位置

* 鳥取大学医学部脳研究施設神経病理

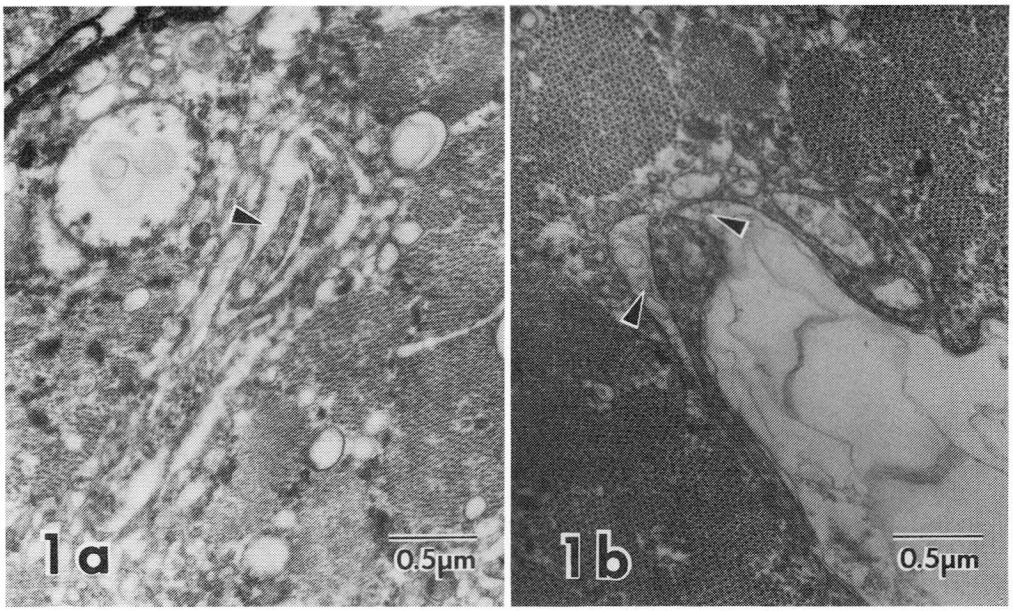


図1　a：蟹鋏状ないし馬蹄状に拡大した管状構造（arrow head）. b：空胞辺縁部では半島状の細胞質が，蟹鋏状に拡大した管状構造（arrow heads）に取囲まれている．33日目 Dy チキン．

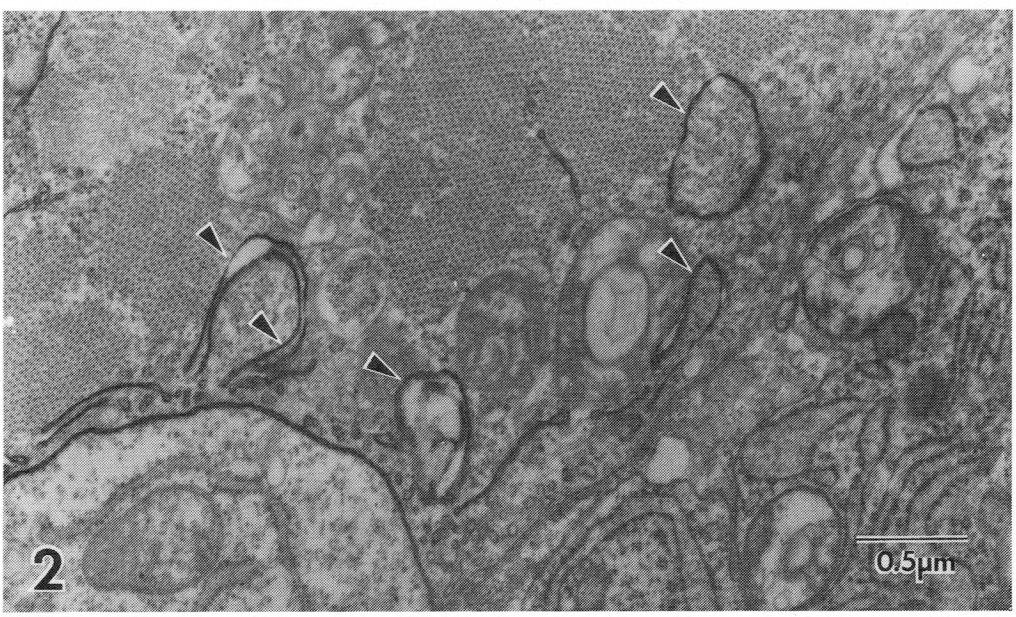


図2　馬蹄形走行を示す T-system（arrow heads）．33日目 Dy チキン．

関係から推察すると，筋小胞体の拡大したものとするのが妥当と考えられる．すなわち，T-system のみでなく，筋小胞体もまた空胞の起源となりうる可能性がある．

空胞を有する筋線維をみると，myofibril が巣状に変性崩壊し，それが筋線維の所々に散在して認められる．かかる myofibril の変性巣のうち，空胞に隣接した部位に生じたものは（図３），空胞の拡大の一因となるものと推定される．

２．aberrant myofibril 形成：ふ化後４週目以降の Dy チキンにおいては，対照チキンに比し，myoblast あるいは myotube が多く認められる．それらに含まれる幼若な myofibril は，Allbrook (1962[1])が指摘するように，筋細胞胞体の辺縁部にゆくほど細く，胞体中心部に近づくほど太い．myofibril を構成する myofilament は，多くの myotube でほぼ正常の形態を示した．しかし，極めて少数の myotube においては，筋線維の長軸に直交して配列する myofibril が認められた．かかる myotube においても，胞体辺縁部にゆくほど小径の myofibril がみられた．図４では，このような再生筋細胞と，それに相対する筋線維の双方の細胞膜が部分的に密着し，それに沿って無数の小窩の発達が認められる．これらの発達した小窩は，培養筋細胞の融合に際して報告されている所見（Shimada, 1971[10]; Lipton & Konigsberg, 1972[5]）と同じ意義をもつものと考えられる．同一標本を連続切片で検索すると，二つの細胞の境界の一部が消失しているのが確認された．

このような方向性を失った myofibril は，一見正常とみなされる成熟線維の subsarcolemmal region にも観察され，いわゆる aberrant myofibril として認められた（図５）．

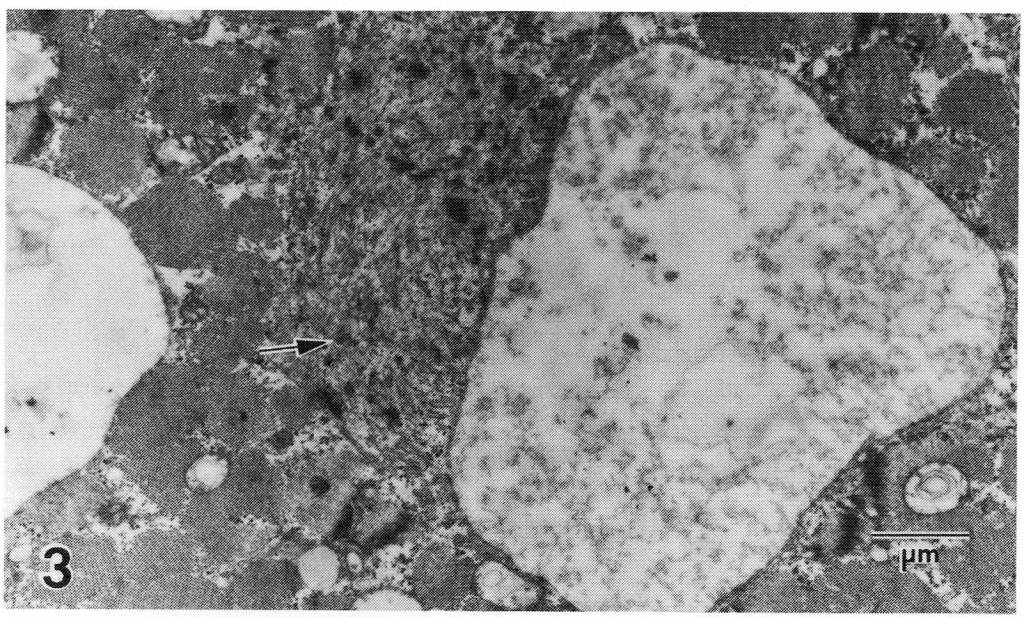


図３　空胞隣接部にみられた myofibril の崩壊（arrow）．33日目 Dy チキン．

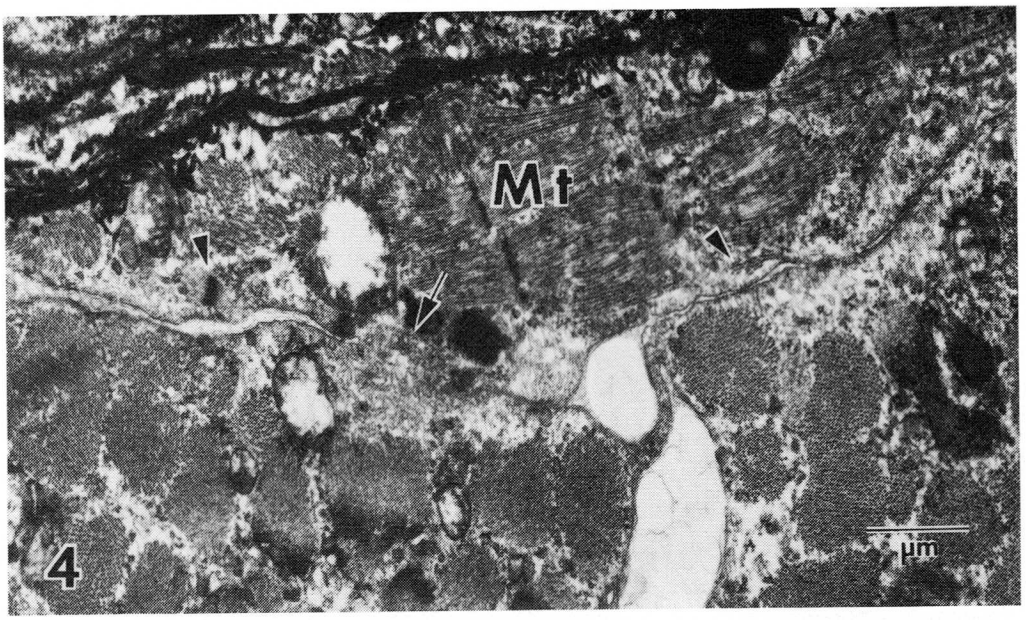


図4　Myotube(Mt) にみられた myofibril の異常配列．Myotube と parent fiber の相対する細胞膜面に多数の caveolae が増生し，一部では両者の細胞間隙が認められない (arrow)．Myotube 辺縁部には小径の myofibril がみられる (arrow heads)．33日目 Dy チキン．

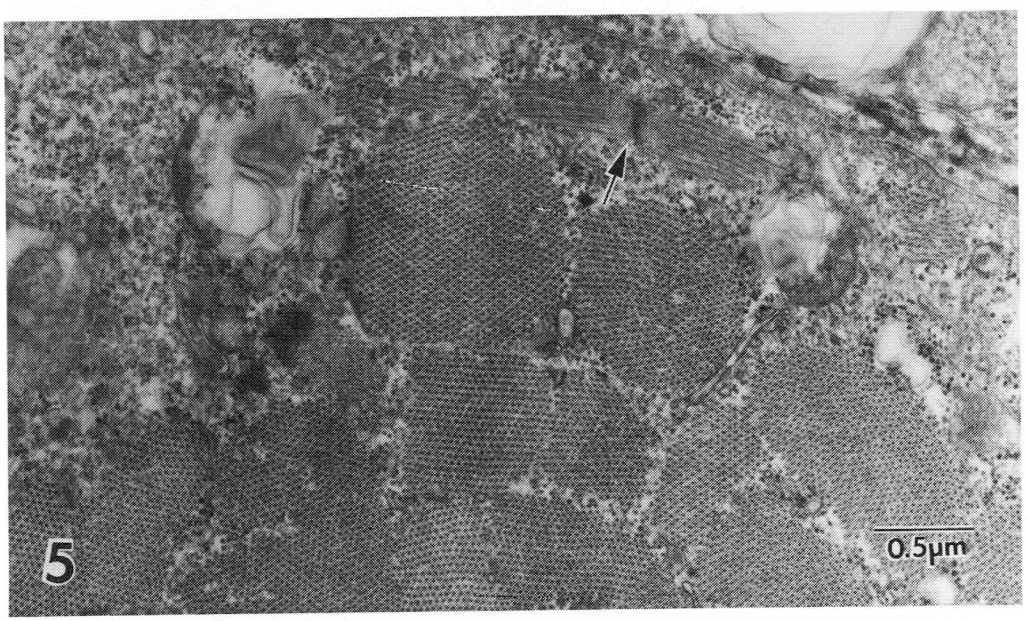


図5　筋線維辺縁部に認められる aberrant myofibril (arrow)．33日目 Dy チキン．

考　　察

従来，ジストロフィー筋の形態学的異常所見として，筋線維の空胞化，壊死，fiber splitting，筋線維ならびに周囲組織における脂肪浸潤や線維化などが報告されており，いくつかの微細形態学的変化も明らかにされてきた．しかしこれらの個々の所見は，いずれをとってみても特定の筋疾患，神経筋疾患，あるいは動物種に限定されるものではない．すなわち，実験的ミオパチーを含む幾多の筋疾患に共通して認められるものである．これらのうち，膜系の微細形態的変化としては，1）筋小胞体の拡大および増生（Banker, 1967）[2]，2）T-systemの拡大およびT-system の増生による tubular networks の形成（Schotland 1970）[9]が指摘されてきた．

Dy チキンにみられる空胞壁には膜様構造物が存在するため，その空胞の起源を上記の膜系の異常と関連づけようとする試みが行われ，Baskin (1970)[3]は筋小胞体の拡大を示唆する報告をしている．小口ら(1978)[8]は Mg-dependent ATPase 染色を駆使して，筋小胞体の拡大を証明している．一方，Malouf 及び Sommer(1976)[6]は horseradish peroxidase を tracer として用い，Dy チキンにおける T-system の拡大を主張している．今回の著者らの観察では，空胞壁における小窩の存在，特異な空胞形態および管状構造との連結所見などが認められ，空胞の起源として T-system の拡大を強調したい．しかし，同時に筋小胞体の拡大も，軽度ながら存在するため，筋小胞体の関与を完全に否定しえなかった．種々の tracerを使用しての今後の検討が必要と思われる．空胞近接部のmyofibril の変性壊死は，形成された空胞の伸展助長の一因となりうると考えられるが，空胞そのものの原因とは思えない．

Myofilament および myofibril の配列方向を決定づける因子に関しては，未だ確定した見解はえられていない．Cytoplasmic streaming の関与 (Fischman, 1967)[4]，あるいは発育途上の筋線維が管状形を呈していることそれ自体が，これらのfilament および fibril の配列を整える役割を果しているものと想像されている．myofibril の成長は，その周辺部に filament が集積することによって行なわれ，ある一定の太さになると停止するものと考えられている．これについては，autoradiography による Morkin (1970)[7]の報告がある，このような一連の myofibril 形成過程は，筋線維の辺縁部において観察され，その結果として，筋線維の中心部から辺縁部に亘って，myofibril 直径の勾配が出来上る（Allbrook, 1962）[1]．

今回著者らが観察しえた点は，myofibrilの異常配列を示す myotube が，成熟筋線維と融合しうることである．かかる事実は，Dy チキンにみられる aberrant myofibril の原因の一つとして，異常な myotube の融合による可能性を示唆するものである．aberrant myofibril と所謂 ring fiber と呼ばれるものとの異同については，確実な見解を述べる所見をえていない．

総　　括

Dy チキン（line 413）の浅胸筋を用い，筋線維の空胞および再生筋線維の電顕的検索を行い，以下の結果をえた．

1）空胞の起源として T-system の関与が明らかとなったが，筋小胞体の関与も否定できなかった．2）myofibril の巣状変性壊死は，空胞の伸展助長の一因となりうる．3）いわゆる aberrant myofibril の形成の一因は，myofibril の異常配列をもった幼若筋細胞と筋線維との融合であると推定される．

文　　献

1）Allbrook, D. : An electron microscopic study of regenerating skeletal muscle. J. Anat., 96 : 137, 1962.

2）Banker, B. Q. : A phase and electron microscopic study of dystrophic muscle. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 26 : 259, 1967.

3）Baskin, R. J. : Ultrastructure and calcium transport in dystrophic chicken muscle microsomes. Lab. Invest., 23 : 581, 1970.

4）Fischman, D. A. : An electron microscope study of myofibril formation in embryonic

chick skeletal muscle. J. Cell Biol., 32 : 557, 1967.

5) Lipton, B. H. & Konigsberg, I. R. : A fine-structural analysis of the fusion of myogenic cells. J. Cell Biol., 53 : 348, 1972.

6) Malouf, N. N. & Sommer, J. R. : Chicken dystrophy. The geometry of the transverse tubules. Am. J. Pathol., 84 : 299, 1976.

7) Morkin,E.: Postnatal muscle fiber assembly : Localization of newly synthesized myofibrillar proteins. Science, 167 : 1499, 1970.

8) 小口喜三夫，加賀谷肇，井上憲昭：ジストロフィーチキンにおける筋微細構造の電顕的研究．筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究（冲中班），昭和52年度報告書，1978，p.86.

9) Schotland, D. L. : An electron microscopic investigation of myotonic dystrophy. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 29 : 241, 1970.

10) Shimada, Y. : Electron microscopic observations on the fusion of chick myoblasts in vitro. J. Cell Biol., 48 : 128, 1971.

5）ジストロフィーチキンにおける activated satellite cell について——光顕ラジオオートグラフィーによる検討——

小　口　喜三夫*

研究協力者　永　田　哲　士**

目　　的

Mauro[1]によって初めて筋組織における satellite cell の存在が報告されて以来，この細胞が種々のミオパチーにおいて増加していることが明らかとなって来た．又 satellite cell の電顕による形態学的研究から，satellite cell が myoblast に移行することが推定され，筋線維の再生に重要な役割を果していることが明らかとなった．

今回私達は，dystrophic chicken(DC)と control chicken (CC) に^{3}H-Thymidine (^{3}H-TdR)を投与し DNA 合成能を持つ satellite cell 即ち activated satellite cell を光顕 radioautography により観察し，DC において activated satellite cell の増加とその時期を検討することを目的とした．

方　　法

ふ化後1日と21日の DC, CC それぞれ2羽，合計8羽の pectoralis muscle を用いた．ふ化後1日の DC，CC に6時間毎に4回，合計60～67μCi/g，ふ化後21日の DC，CC には合計22～25μCi/g の^{3}H-TdR を腹腔内注射し，最終注射6時間後に屠殺した．屠殺後直ちに pectoralis muscle の表在筋を採取し，3％グルタールアルデヒドで20分間固定，カコジレイト緩衝液中にて24時間洗滌後1％オスミウム酸で1時間30分間固定．シリーズアルコールおよびプロピレンオキサイドで脱水後 epon-araldite に包埋した．厚さ1μm の標本を作製し，標本はすべて筋線維の coronal section とし数個を1枚のスライドガラス上に載せた．

Dipping[2]法により Sakura NR-M_2 の乳剤を蒸溜水で2倍に希釈したものの中に標本を2～3秒間浸した後，余計な乳剤をおとし，温度28°C，湿度70～80％のふ卵器内で乾燥，次いで4°Cの冷蔵庫内で30日間露出した．SDX－1現像液20°C，4分間現像，定着後トルイジンブルー染色液にて淡い染色を行った．

標本は油浸レンズで観察し，1資料につき100視野を観察した．次の labeling index を定め，activated satellite cell の出現頻度を算出した．

$$\text{Labeling index} = \frac{\text{1視野中の}^3\text{H-TdRによってlabelされた核数}}{\text{1視野中に観察された総ての核数}} \times 100$$

さらに^{3}H-TdR によって label された核の光顕的形態学的観察を行った．

結　　果

定量的解析：DC，CC のふ化後1日，21日の labeling index は表1に示す．ふ化後1日では DC の labeling index＝4.19，CC の labeling index＝4.54で両者の間に activated satellite cell の出現頻度に明らかな差はなかった．

ふ化後21日では DC の labeling index＝5.68，CC の labeling index＝3.86で DC の方が activated satellite cell の出現頻度が多い傾向を示した．

形態学的観察：ふ化後1日では DC, CC 共に^{3}H-TdR の取り込まれている核は chromatin の比較

＊信州大学医学部第三内科

＊＊信州大学医学部第一解剖

的少ない球形の核であった（図１）.

ふ化後21日では，DCにおいては^{3}H−TdRの取り込まれた核の大部分は，chromatinに富む桿状形の核であった（図２）．他にchromatinの少ない球形の核への取り込みも認められた．CCでは^{3}H−TdRの取り込みは殆んどがchromatinに富む桿状形の核であった．なお観察した限りでは，activated satellite cellと変性線維，空胞線維との明らかな関係は見出し得なかった．

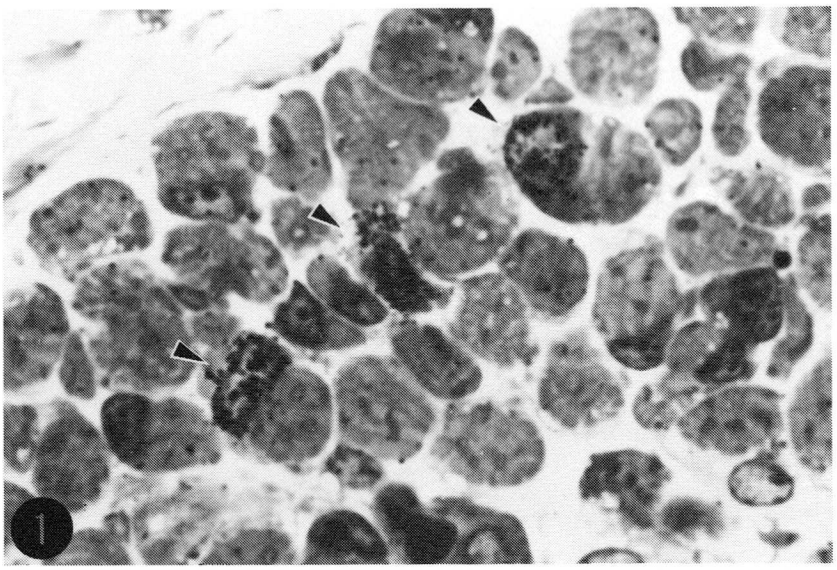


図１　DC１日．矢印の核に^{3}H-TdRの取り込みがあるため銀粒子として観察される．（×1,000）

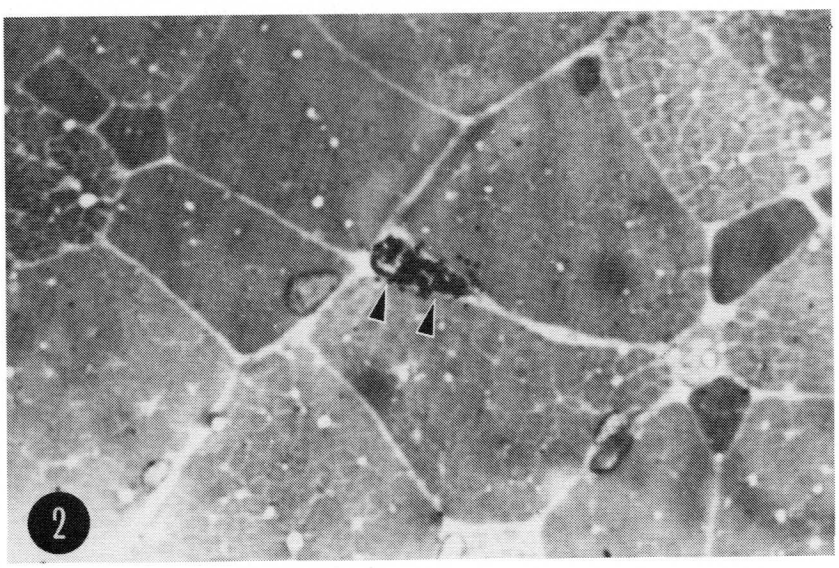


図２　CC 21日．矢印のchromatinに富む桿状の核に^{3}H-TdRの取り込みがみられる．（×1,000）

表1　ふ化後1日と21日の dystrophic chicken (DC) と control chicken (CC) の labeling index.

Chicken	mean & SD
CC (1d)	4.54 ± 0.17
DC (1d)	4.19 ± 2.24
CC (21d)	3.86 ± 2.02
DC (21d)	5.68 ± 4.54

考　　察

1961年 Mauro がカエルの筋の電顕的観察で，筋核よりも数が少なく，基底膜と形質膜間に存在し，cytoplasma の乏しい核を見出し satellite cell と名づけた．その後の報告[3)4)5)6)]でこの satellite cell は胎生期と筋の再生時に増加し，形態学的には free ribosome, rough ER, Goldi 装置, mitochondria, の増加や actin filament, myosin filament, T-system の存在などが明らかとなり，satellite cell は myoblast に変化し得る能力を持った細胞であることが形態学的面から推定されるに至った．

一方^{3}H-TdR を chick の腹腔内に注射すると直ちに DNA 合成を行っている S 期の核に取り込まれるので，radioautography により核の上に銀粒子として検出される（図1，2）．24時間内に6時間おきに4回^{3}H-TdR を注射すると DNA を合成している核をほぼ完全に検出できるので，この方法により実際に DNA を合成している satellite cell 即ち activated satellite cell を確実に認定できた．DC と CC との比較検討では，ふ化後1日では，^{3}H-TdR の取り込む核（activated satellite cell）の出現頻度は両者に差はなく，又形態学的には chromatinの少ない球形の核が殆んどであった．ふ化後1日では DC と CCに activated satellite cell の出現頻度および形態学的面からも差のなかったことは，ふ化直後では両者の間に satellite cell の活性化の面で違いがないことを示している．核の形態からしてこの時期のものは殆んどが myoblast まで分化していることが推定される．

DC ではふ化後2週～3週間で flip test が陽性となり，大胸筋の筋力低下が明らかで，形態学的にも空胞線維，変性線維が出現して DC ではほぼこの時期から筋線維の変化が始まるものと思われる．この時期（ふ化後21日）における DC と CC の activated satellite cell の出現頻度は DC の方が多くなっている．形態学的には CC では殆んどが chromatin に富む桿状核であったが，DC では桿状核以外に chromatin の少ない球状核が出現していた．従ってふ化後21日では筋組織の変化と共に satellite cell の活性化があり，一部では myoblast に移行しているものと思われた．

Satellite cell が活性化され，myoblast に発達するためには parent 細胞の障害がひとつの原因と考えられているが，今回観察した限りでは，^{3}H-TdR を取り込んだ核が変性線維，空胞線維の附近に多くはなかった．しかし今回の観察は総て筋線維の coronal section の標本であるので今後筋線維に対し longitudinal section 標本により変性線維，空胞線維と activated satellite cell の関連を検索すること，さらに電顕 radioautography により^{3}H-TdR の取り込まれる核（activated satellite cell）とその胞体の微細構造の観察が必要である．

結　　語

1．^{3}H-TdR による activated satellite cell の出現頻度の検討で，DC 1日 labeling index＝4.19, CC 1日 labeling index＝4.54差はなかった．ふ化後21日では DC labeling index＝5.68, CC labeling index＝3.86であり，DC における activated satellite cell の出現頻度が多かった．

2．形態学的にはふ化後1日では DC, CC 共に chromatin の少ない球形の核が大部分であったが，ふ化後21日では DC は chromatin の少ない球形の核と chromatin に富む桿状の核がみられ，CC では殆んどが chromatin に富む桿状の核であった．

文　　献

1）Mauro, G. : Satellite cell of skeletal muscle fibers. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9 : 493,

1961.
2) 永田哲士，柴田治，名和橙黄雄：ラジオオートグラフ量作製のための簡便法．解剖学雑誌，**42**：162，1967.
3) Ishikawa, H. : Electron microscopic observations of satellite cells with special reference to the development of mammalian skeletal muscles. Z. Anat. Entwicklungsgesch., **125**：43，1966.
4) 埜中征哉，三池輝久，上野留夫，三吉野産治：先天性筋ジストロフィー生検筋にみられる satellite 細胞の電子顕微鏡的研究．脳と発達，**5**：520，1973.
5) Wakayama, Y. : Electron microscopic study on the satellite cells in the muscle of Duchenne muscular dystrophy. J. Neuropath. exp. Neurol., **35**：532，1976.
6) Chou, S. M. & I. Nonaka : Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscles. J. Neurol. Sci. **34**：131，1977.

6）正常及び筋ジストロフィーチキン培養骨格筋に対する交感神経の影響

塚越　廣*

研究協力者　小林高義*　栢沼勝彦*
小松　繁**　志水義房**

我々は正常鶏胚（White Leghorn）を使用し，培養骨格筋が，交感神経節の併置培養で，骨格筋単独培養に比し長期に維持され，両 explant 部に交感神経線維及び筋細胞からなる太い bridge が形成され，交感神経が骨格筋に対し直接的な trophic な影響を与えることを示し，更にその筋細胞上にボタン状あるいは珠子状の膨みをもった神経終末を認め，その部位に相当すると思われる部位に限局した点状あるいは線状のAChE 高活性を認め，交感神経が骨格筋に対し innervation している可能性を指摘した[1]．

一方，筋ジストロフィー症（以下筋ジスと略す）の成因に交感神経が関与している可能性は，呉，冲中らの幼犬交感神経節剔除による支配筋のジストロフィー様変化の出現の報告[2]以来問題とされてきており，我々は筋ジス骨格筋に対する交感神経の影響を直接みる目的で，正常及び筋ジスチキン交感神経節及び骨格筋の単独あるいは種々の併置培養を作成し，検討を行った．

実験方法

正常及び筋ジス鶏胚11日目（Line 412及び413）の大胸筋を実体顕微鏡下に無菌的にとり出し，培養液中で細切し，コラーゲン塗布カバースリップに explant し，2日後13日目頸部交感神経節を同様にとり出し，周囲の結合織を充分とり除き，併置培養の場合は，大胸筋より約2～3 mm 離して explant した．骨格筋及び交感神経節の単独及び相互に併置した組み合せを以下の如く作成，A正常筋のみ，B筋ジス筋のみ，C正常交感神経節のみ，D筋ジス交感神経節のみ，E正常筋＋正常交感神経節，F正常筋＋筋ジス交感神経節，G筋ジス筋＋正常交感神経節，H筋ジス筋＋筋ジス交感神経節．培養液は，Eagles MEM with Hank's salts 80%，馬血清15%，Embryonic juice（鶏胚9日目）5%，penicillin 200u/ml,(glucose 5g/l, $NaHCO_3$ で pH 調整）を使用し，週3回培養液を交換．倒立位相差顕微鏡で経時的観察を行い，同時に，Jenner-Giemsa 染色，Gomori-Trichrome 染色，Bodian 鍍銀染色，Karnovsky-Roots 変法（buffer pH 5.0）による AChE 染色を行い神経線維の走行，AChE 活性の有無の検索をあわせて行った．

実験結果

I．筋単独培養

筋単独培養では，正常，筋ジスチキンとも筋芽細胞は24時間以内に融合を始め合胞細胞となる．2～3日目に explant を中心に筋管細胞はほぼ放射状に伸び出し，両者の筋細胞の融合，筋管細胞の形成に明らかな差を認めないが，筋ジス筋の方が正常筋に比し筋細胞径の大小不同が目立つ傾向がある．筋管細胞の中央に多数の核が配列した後，両者とも筋細胞は3～7日に自発収縮が始まり，核は次第に偏在していく．6～11日に両者とも横

＊信州大学医学部第三内科
＊＊信州大学医学部第二解剖

紋を形成し，2週までは両者にはっきりした差は認められない．その後，筋ジス筋は16～19日頃より空胞変性，横紋が消失し核が集簇，筋細胞が膨化断裂，変性する細胞が増し，3週以降には横紋を形成した筋細胞は殆ど消失するが，横紋形成のはっきりしない細い筋細胞はその後もわずか残存する．それに対し，正常筋は，4週まで維持され，その後次第に変性崩壊を始める．

II．交感神経節単独培養

交感神経節単独培養では，explant 後24時間以内に explant より無髄神経が網目状，放射状に伸び，図1に示す如く explant より小型神経細胞が遊走し，大型神経細胞は explant 部によく維持されており，両者とも交感神経線維は放射状に伸び続け長期に維持され，その神経線維の伸び，密度に明らかな差は認められなかった．

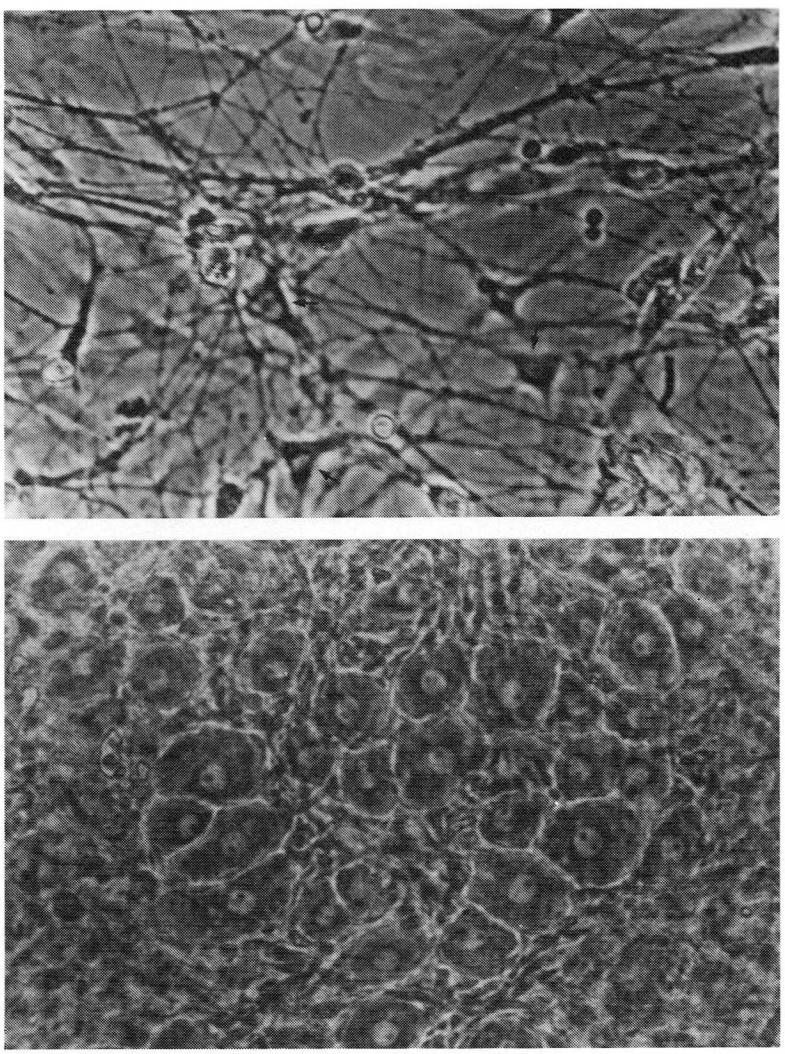


図1　上段：筋ジス交感神経節単独培養3日目，位相差顕微鏡100倍．無髄神経が網目状をなし，小型神経細胞（↓矢印）が migrate してきている．
下段：筋ジス交感神経節単独培養10日目，位相差顕微鏡100倍．explant 部に残存している大型神経細胞を示す．

III．骨格筋＋交感神経節併置培養

併置培養では，それぞれのexplantより筋管細胞，交感神経線維がそれぞれほぼ放射状に伸び始め，筋培養3～5日頃には図2の如く，神経線維は筋管細胞に接触，更にその上を横走あるいは伴走していく．筋細胞の自発収縮，横紋形成の時期は筋単独培養の場合と明らかな差を認めないが，交感神経との併置培養の方がより収縮は強く，持続的で早い収縮を認めた．併置培養の場合，いずれの組み合せでも図3，5の如く両explant間に筋細胞が密に配列その間に神経線維が走るbridgeが形成される．Bodian鍍銀染色で神経線維の走行をみると，神経線維は筋細胞に接触しながら伴走，時に横走し，ボタン状あるいは数珠状の膨みをもった神経終末と思われるものを認める．更に神経線維は筋のexplantに達した後，そのexplantより放射状に伸びている筋細胞に沿って伸び続ける（図3，右下）．3～4週以降は，併置培養の筋細胞の収縮は，単独培養に比し良好で，時にexplant，bridge部を中心に肉眼的にもわかる激しい収縮を認めた．収縮の程度は正常，筋ジス筋にはっきりした差は認められなかった．正常筋と正常または筋ジス交感神経の併置培養では6週以上筋の維持が可能であった．一方，筋ジス筋と正常または筋ジス筋交感神経の併置培養では，筋ジス筋単独培養より，筋細胞はよく維持されたが，23～26日頃から筋ジス筋は変性を始めた．図4に示す如く，交感神経の接触している筋の方が，同じ培養カバースリップ中でもよく維持される傾向があった．

(AChE染色)筋と交感神経の併置培養では約2週にはbridgeを形成した交感神経のexplant側の筋細胞の筋腹に数μ～十数μの点状あるいは線状のAChE高活性がmultipleに認められた．その後3

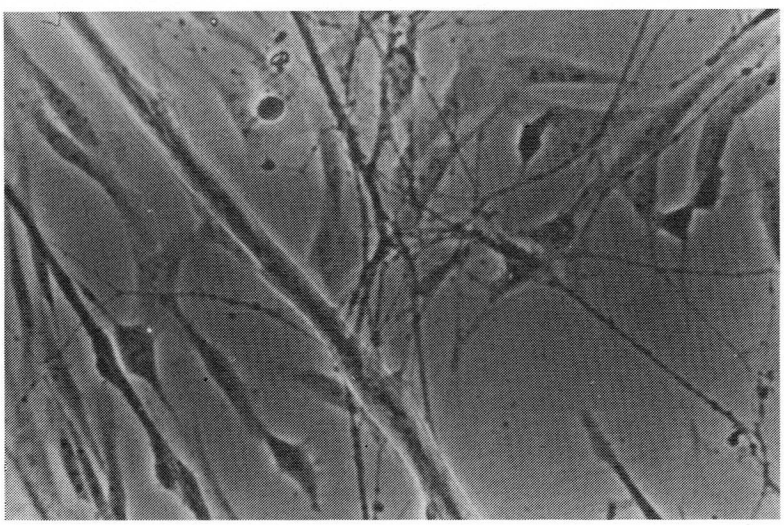
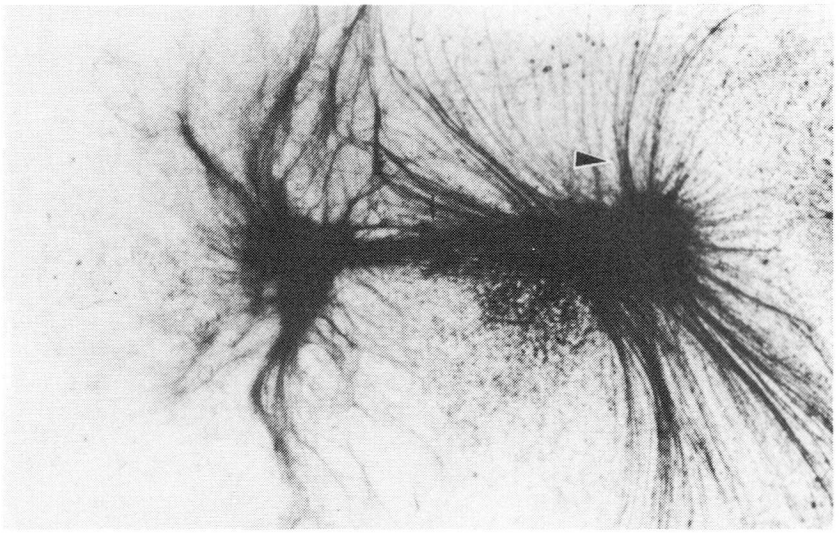
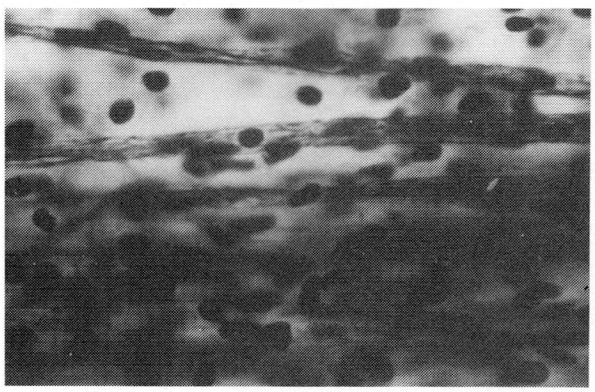


図2　正常筋培養4日目，正常交感神経節2日目併置培養初期像，位相差顕微鏡100倍．神経線維は，筋管細胞に接触，更に，横走，斜走していく．





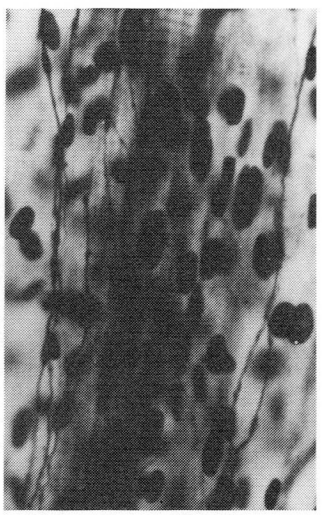


図3　筋ジス筋培養30日目，正常交感神経節28日目，Bodian 鍍銀染色
上段：弱拡写真．左，交感神経節 explant 部．右，筋 explant 部．両 explant の間に太い bridge が形成されている．
左下：bridge 部（↓矢印）の拡大写真，200 倍．交感神経線維が密に走っている．
右下：筋の explant 部より上方（▶矢印）の拡大写真，200 倍．explant部に到達した神経線維は更に explant 部より放射状に伸び出している筋細胞に接触しながら伴走している．

週位には bridge 部全体の筋細胞の筋腹に点状，半月状，連鎖状，線状の AChE 高活性が multiple に認められ(図5，上段) 3 ～ 4 週頃には,explant 内,更に explant より放射状に伸び出している筋細胞の explant 側を中心にして AChE高活性をmultiple に認めた．長期培養で，筋の explant より伸びている変性の始まった筋細胞の筋腹に数十μ以上にわたって線状に拡散した AChE 高活性を認め，また膨隆変性した筋細胞に点状の拡散した AChE 活性もみられた．

（AChE ＋ Bodian 鍍銀，重染色）AChE 高活性の筋細胞に接触，併走，斜走，横走している交感神経線維がみられ，図5下段に示すごとく AChE 高活性部位に終る神経終末を認めた．時に交感神経が筋細胞に接触する前に枝状に分枝し筋細胞に接触，不規則な珠子状の終末を形成，更に一部は斜走していく神経も認められ，その終末部位にも AChE 高活性を認めた．

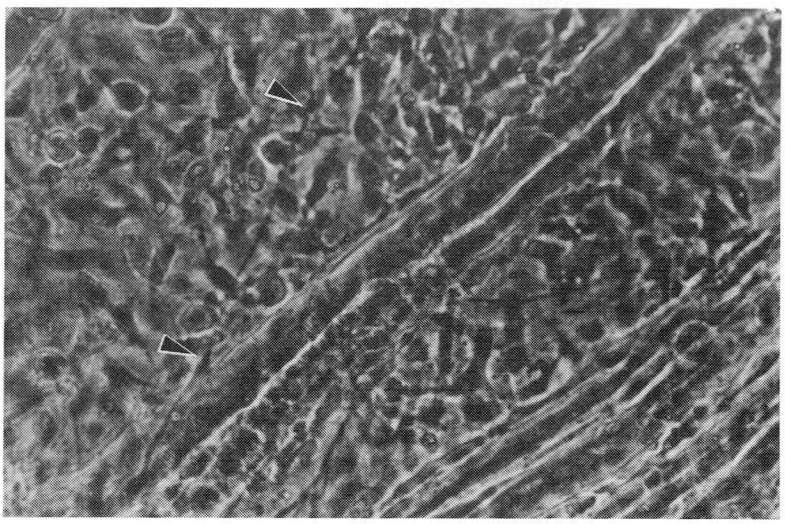
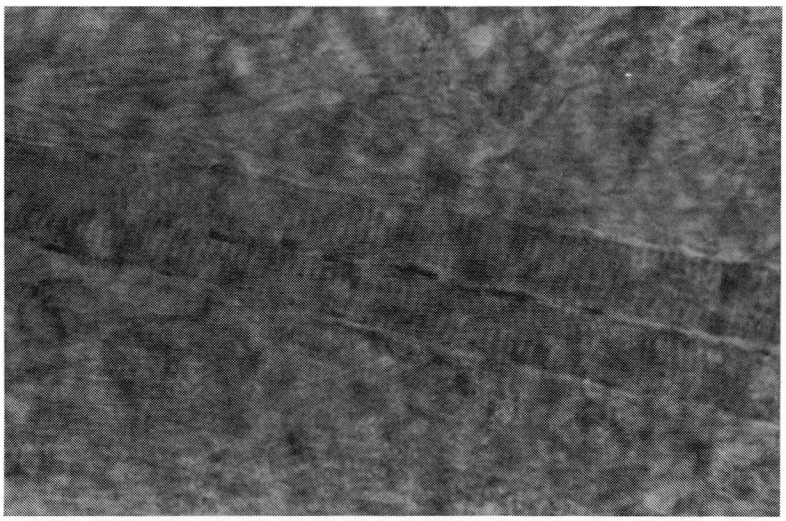


図4　筋ジス筋培養23日目，正常交感神経節21日目，位相差顕微鏡 100 倍．横紋形成のはっきりした筋細胞に，斜め上方から交感神経が走り接触，更に斜走している（▼矢印）．一方,隣り下の筋細胞の下半分は，横紋が消失，筋細胞の膨化，変性が始まっている．



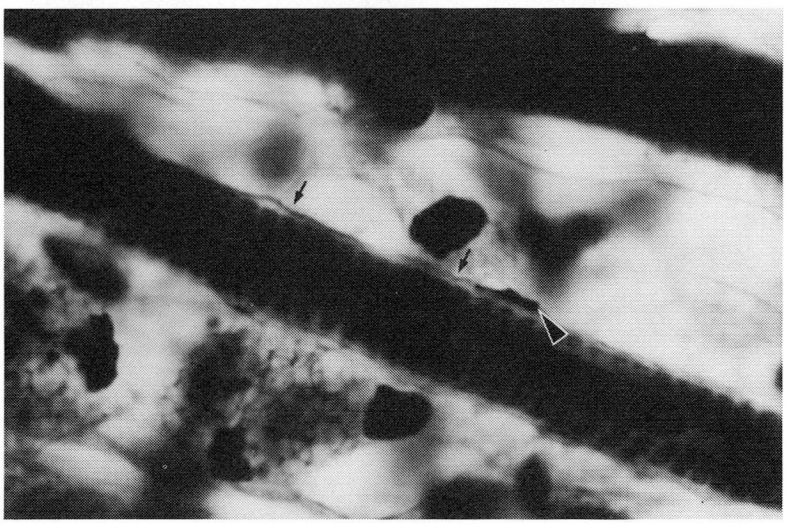


図5　上段：正常筋培養21日目，正常交感神経節19日目，AChE 染色, 200 倍．横紋を形成した筋細胞の筋腹に点状あるいは線状のAChE高活性部位を multiple に認める．下段：正常筋培養23日目，筋ジス交感神経節21日目，AChE, Bodian 鍍銀重染色, 500 倍．筋腹上のAChE高活性部位（▼矢印）に，筋細胞に伴走してきた交感神経線維（↓矢印）がおわっている像を示す．

考　　察

筋ジストロフィー症に対する神経因子の関与は古くより問題とされてきたが，米沢ら[3]は，下肢筋と脊髄の併置培養及び下肢筋のみの単独培養を行ない，筋ジス筋は正常筋に比し早く変性崩壊し，脊髄との併置培養でも，単独培養より長く維持されるが，筋ジス筋が早く変性崩壊することを示し，筋ジスチキン筋の変性は筋原性因子が大であると考えた．今回の我々の実験では，交感神経単独培養では，両者に明らかな差はなく，筋単独培養では筋ジス筋は早く変性崩壊し，併置培養の場合，正常あるいは筋ジス交感神経節のいずれの組み合せでも，正常筋がより長く維持され，筋ジス筋は単独培養より長く維持されるが，正常筋単独培養より早く変性崩壊し，脊髄との併置培養所見と同じ傾向を示した．以上の所見から，脊髄及び交感神経には，一般的に骨格筋の維持に関与する trophic な因子が存在すると思われるが，筋ジスチキンのジストロフィー変化は，神経性因子の関与より，筋自身の問題が大きいと推察される．

一方，骨格筋と交感神経のいずれの併置培養でも，骨格筋単独培養に比し，長期間維持され，かつ両者の explant 間に，筋細胞と交感神経からなる bridge が形成され，trophic effect が考えられた．Crain[4]，Nurse ら[5]は，培養ラット骨格筋と交感神経の併置培養で，α-tubocurarine，α-bungarotoxin で block される nicotinic cholinergic synapse を認めたが，組織化学的，電顕的検索は行なわれていない．我々は，筋細胞上に膨みをもった神経終末が存在し，AChE 染色で筋腹に multiple に高活性を認め，AChE，Bodian 鍍銀重染色で，AChE 高活性部位におわる神経終末を認め，正常，筋ジスチキン骨格筋に対し，交感神経が innervation している可能性が推察された．この点に関しては，更に電気生理学的，電顕的に検索中である．交感神経の trophic な因子が innervation によるものか，また液性因子が存在するのか，更に逆に骨格筋が交感神経の維持に役割を果しているかどうかは今後に残された問題と思われる．

結　　語

1．筋ジス筋単独培養は正常筋単独培養に比し早く変性崩壊する．

2．交感神経節単独培養では正常，筋ジスの間に明らかな差を認めない．

3．正常筋に交感神経節を併置培養すると筋細胞単独培養より長期間維持される．

4．筋ジス筋と交感神経節の場合は，筋ジス筋単独培養に比し，筋ジス筋はより長く維持されるが，正常筋単独培養の場合より早く崩壊する．

5．3，4，とも併置した交感神経節が正常，筋ジスのいずれでも差を認めない．従って筋ジスチキン筋の変性は筋自身の問題が大きいと推察される．

文　　献

1）小林高義，栢沼勝彦，塚越廣ほか：培養骨格筋に対する交感神経の影響に関する実験的研究（会），第32回日本自律神経学会総会プログラムおよび講演抄録，26，1979.

2）呉建，冲中重雄：自律神経各論．改訂6版，金原出版，東京，京都，p.250，1956.

3）米沢猛，有薗直樹，岡部英俊ほか：in vitroでの筋ジスチキンの神経・筋結合について．筋ジストロフィー症の基礎的研究，江橋班，昭和52年度研究報告書，77，1977.

4）Crain, S. E. & Peterson, E. R. : Development of neural connections in culture. Ann. N. Y. Acad. Sci.,28：6，1974.

5）Nurse, C. A. & O'Lague, P. H. : Formation of cholinergic synapses between dissociated sympathetic neurons and skeletal myotubes of the rat in cell culture, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72：1955, 1975.

7）鶏ジストロフィー筋における糖および脂質代謝

高木昭夫*

研究協力者　村上博彦*　石浦章一*

はじめに

進行性筋ジストロフィー症の成因に関連して，筋ジストロフィー鶏をその疾患モデルとした検討が種々なされている．今回，我々は筋ジストロフィー鶏の筋組織に PAS 染色で濃染する筋線維が多数存在する点に注目し，筋ジストロフィー鶏における糖代謝の検討を行なった．又，従来よりその本質が問題にされている脂質異常に関して，成鶏及び鶏胚期の変化を観察し比較検討を行なった．

方法

筋ジストロフィー鶏（line 413，筋ジス鶏），正常対照鶏（line 412，正常鶏）及び20日目鶏胚（筋ジス鶏胚，正常鶏胚）の浅胸筋を分析に用いた．糖代謝に関しては，Keppler & Decker[1]の方法により，Amyloglucosidase を用いグリコーゲン含量を測定した．一部は筋よりグリコーゲンを抽出し，同様の方法で定量した．又，嫌気性解糖能を検討する目的で，Schmid & Mahler[2] の方法に従い，*in vitro* で嫌気性の乳酸生成を行なわせた．

脂質の分析は Folch の方法により脂質を抽出し，総脂質，リン脂質，コレステロールを定量した．リン脂質の定量は Bartlett 法により，コレステロールの定量は Searcy ら[3]の方法によった．リン脂質は薄層クロマトグラフィーにより，クロロホルム：メタノール：水＝65：25：4 の条件で一次元展開により分画し，上記の方法でリン定量を行なった．

＊国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

結果

筋グリコーゲン含量は湿重量当り正常鶏7.6mg/g に対し，筋ジス鶏6.2mg/g である．noncollagen protein（NCP）当りに換算すると，正常鶏39mg/g NCP，筋ジス鶏52mg/g NCP と筋ジス鶏で高値を示した（表Ｉ-A）．グリコーゲンを抽出し測定した値も同様の傾向を示した（表Ｉ-B）．次に，グリコーゲン利用を見るために，嫌気性解糖を検討した．湿重量当りの乳酸生成は，正常鶏18.2μmole/g·30min に対し，筋ジス鶏8.6μmole/g·30min と筋ジス鶏で約１/２に低下していた．又，基質であるグリコーゲンを反応系に加え，同様に実験を行なった．これでは正常鶏52μmole/g・30min，筋ジス鶏18μmole/g・30min と筋ジス鶏で低下していた．NCP 当りでも，１/２～１/３に低下していた（表２）．

表Ｉ　Glycogen content

	Control	Dystrophy
A.	7.64 mg/g	6.18 mg/g
B.	6.55	5.40

脂質の分析では，総脂質は正常鶏11.2±5.4

表２　Anaerobic glycolysis *in vitro*
（μ mole lactate/g/30min.）

	Control	Dystrophy
no addition	18.15	8.64
with glycogen	52.26	18.38

mg/g（6.4～22.1 mg/g），筋ジス鶏24.5±11.7mg/g（11.6～33.5mg/g），リン脂質は，正常鶏4.1±0.5 mg/g（3.5～5.0 mg/g），筋ジス鶏6.2±1.3 mg/g（5.0～7.5 mg/g），コレステロールは，正常鶏1.35±0.41 mg/g（0.74～2.10 mg/g），筋ジス鶏3.36±0.74 mg/g（1.31～4.19 mg/g）とすべて筋ジス鶏で増加を示した（表３）．両者の差は総脂質においては危険率２％，リン脂質及びコレステロールにおいては危険率0.1％で統計学的に有意であった．

表３　Muscle lipid content (adult)

	Control(9)	Dystrophy(5)
Total lipid	11.2±5.4 mg/g	24.5±11.7 mg/g
Phospholipid	4.1±0.5	6.2±1.3
Cholesterol	1.35±0.41	3.36±0.74

(Mean±SD)

リン脂質の亜分画に関しては，スフィンゴミエリン（Sph）は，正常鶏11.7％，筋ジス鶏18.2％と筋ジス鶏で増加し，レシチンは，正常鶏71.1％，筋ジス鶏 60.5％ と筋ジス鶏で低下を示した（表４）．又，Rouser らに従って二次元展開を行なっても，同様の傾向を認めている．

表４　リン脂質亜分画

	成鶏		鶏胚	
	対照(5)	筋ジス(5)	対照(4)	筋ジス(4)
DPG	0.3%	0.3%	2.5%	2.0%
PE	9.9	11.1	27.6	27.1
PC	71.1	60.5*	60.1	58.3
Sph	11.7	18.2*	9.6	11.9
PS＋PI	7.0	9.9	0.2	0.2

＊P≒0.02

（略語）

DPG：カルジオリピン，PE：エタノルアミン燐脂質，PC：コリン燐脂質，Sph：スフィンゴミエリン，PS＋PI：セリンおよびイノシトール燐脂質その他

20日目鶏胚の脂質分析では，総脂質は正常鶏胚20.0 mg/g，筋ジス鶏胚20.3 mg/g，リン脂質は正常鶏胚7.8mg/g，筋ジス鶏胚10.0mg/g，コレステロールは正常鶏胚4.5mg/g，筋ジス鶏胚4.0mg/g と筋ジス鶏胚で，軽度のリン脂質の増加を認める以外，両者に著明な差は見られなかった（表５）．

鶏胚のリン脂質亜分画では，正常鶏胚および筋ジス鶏胚の間に有意の差は認められなかった(表4)．

表５　Muscle lipid content (20 days embryo)

	Control	Dystrophy
Total lipid	20.0 mg/g	20.3 mg/g
Phospholipid	7.8	10.0
Cholesterol	4.5	4.0

考　　察

組織化学的に，PAS 陽性の物質としては，グリコーゲン，ムコ多糖類，糖脂質，リン脂質などが知られている．筋ジストロフィー鶏における糖質代謝に関しては，あまり報告が見られない．今回のグリコーゲン含量の検討では，筋ジス鶏でグリコーゲン含量（湿重量当り）の軽度の低下が認められた．しかし，蛋白量当りのグリコーゲンに換算すると逆に筋ジス鶏では増加していた．このように，ジストロフィー筋のグリコーゲン量の増減の判定はまだ問題がある．

In vitro での嫌気性解糖による乳酸生成が，筋ジス鶏で低下しており，基質であるグリコーゲンを充分量添加しても，正常鶏の約１/３にとどまった．蛋白量による補正を考慮してもなお筋ジス鶏では，乳酸生成は低下していると推定される．文献的には，筋ジス鶏の筋 Aldolase 活性が，40～50％に低下していると報告された[4]．筋ジス鶏の病初期には phosphorylase 活性が増加し，筋症状の進行に伴って低下を示した[5]．我々の予備的な実験では，筋ジス鶏で LDH 活性が約１/３に低下していた．ジストロフィー筋でこの様に乳酸生成や種種の酵素活性の低下が認められる事実は，酵素生合成の調節異常が直接病因と関連する可能性を考えさせる．この問題は更に検討を続ける予定である．

ジストロフィー筋における脂質異常に関しては，

種々検討されてきた．脂質の増加に病因的意義を認めるもの，単なる脂肪組織による置き換りとするものなど，現在のところまだ病因的意義は確定されていない．我々の検討では，筋ジス鶏で総脂質，リン脂質，コレステロールはすべて増加を示し，諸家の報告と一致している．リン脂質亜分画の分析結果では，Sph の増加とレシチンの低下を認めている．これらは，Duchenne 型ジストロフィー症における変動と同一傾向である．

鶏胚の浅胸筋における分析では，筋ジス鶏胚で軽度のリン脂質の増加を認める以外，両者に著明な差は見られなかった．しかし，これを成鶏と比較すると，正常成鶏に比して正常鶏胚では，総脂質，リン脂質，コレステロールとも，すべて高値を示した．又，筋ジス鶏の脂質組成は，正常鶏胚に類似しており，より鶏胚に近い状態と考えられる．鶏胚のリン脂質亜分画では，正常鶏胚と筋ジス鶏胚の間で差異は認められなかった．しかし，正常成鶏と比べ PE が高値を示したが，この理由は不明である．

このように，成鶏に見られるジストロフィー筋の脂質組成は，鶏胚期のそれに一部類似していた．20日目の鶏胚筋の脂質組成は，正常と筋ジスの間に差異はなかった．したがって，成鶏のジストロフィー筋脂質の変化はいずれも二次的なものであり，その一部は，筋細胞の成育遅延に由来する可能性が示唆された．

今後は，孵化後のいかなる時期に両者の差異が出現するか検討してゆきたい．又，筋ジストロフィー鶏における脂質異常は膜系の異常と関連して論じられており，この面でも検討を加えたい．

結　　論

1）筋ジストロフィー鶏の浅胸筋ではグリコーゲン含量が軽度に減少していた．*In vitro* での嫌気性解糖による乳酸生成は対照の1／2～1／3に減少していた．

2）ジストロフィー筋の脂質組成に関しては，総脂質，リン脂質，コレステロールのいずれも増加している．リン脂質亜分画では，スフィンゴミエリンの増加，レシチンの減少が認められた．

3）鶏胚期の筋の脂質組成は，対照と筋ジスの間に差異は認められない．したがって，成鶏での変化は二次的現象である可能性が大きい．

文　　献

1）Keppler, D. & Decker, K. : Glycogen Determination with amyloglucosidase. Methods of Enzymatic Analysis. Vol.3, p.1127. Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Inc., New York & London.

2）Schmid, R. & Mahler, R. : Chronic progressive myopathy with myoglobinuria : demonstration of a glycogenolytic defect in the muscle. J. Clin. Invest. 38 : 2044, 1959.

3）Searcy, R. L. & Bergquist, L. M. : A new color reaction for the quantitation of serum cholesterol. Clin. Chim. Acta, 5 : 192, 1960.

4）Petell, J. K. & Lebherz, H. G. : Regulation of fructose diphosphate aldolase concentrations in skeletal muscles of normal and dystrophic chickens. J. Biol. Chem., 254 : 7411, 1979.

5）Ashmore, C. R. & Doerr, L. : Phosphorylase in skeletal muscle of normal and selected lines of dystrophic chickens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 137 : 1066, 1971.

8）筋ジストロフィーチキンdorsal root gangliaのnerve growth factorに対する反応性ならびに筋肉中のnerve growth factor-like immunoreactivityレベル

林　恭三*

研究協力者　古川昭栄*　井村裕夫**
大井長和**　西谷　裕***

神経成長促進因子（nerve growth factor：NGF）は胎生期の知覚神経節，交感神経節神経細胞の分化，成長に必須の一群のポリペプチドであり，特に交感神経系の機能維持に重要な役割を担っている[1]．

著者らはすでに筋ジストロフィーマウスの顎下腺，後肢筋肉中のNGFレベルが正常マウスより低いことを明らかにしている[2)3)6)]．今回はNGFと本症の関連性をさらに検討するため筋ジストロフィーチキンと正常チキンを用いて胚の脊髄後根神経節（dorsal root ganglia：DRG）のNGFに対する反応性および幼若期から成熟期に至る期間の骨格筋中のNGF様免疫活性（NGF-like immunoreactivity：NGF-LI）を測定した．

材料と方法

筋ジストロフィーチキン：筋ジストロフィーチキンはニューハンプシャー種413系，正常チキンはニューハンプシャー種412系を用いた．

DRGのNGFに対する反応性の測定：筋ジストロフィーチキン，正常チキンの8日および14日齢胚からDRGを摘出する．Varonら[4)]の方法に従い正常チキン血漿とEagle's MEM mediumとマウス顎下腺から精製したβNGFを含む生理食塩水液とから成るmedium中で摘出したDRGを培養する．培養は37°Cで行い20時間後に顕微鏡下で神経節周囲から伸びた神経線維を観察し，その密度を主な判定基準として0，＋1，＋2，＋3，＋4，＋5のランクにより神経節のNGFに対する反応性を評価した．

マウス顎下腺βNGFの精製：生後80日齢のDD系オスマウス顎下腺よりVaronら[4)]の方法で精製した7S NGFをCM-Sephadex C-50カラムクロマトグラフィーにより各サブユニットに分離し，均一なβNGF（βサブユニット）を得た．

βNGF特異抗体の調製：Vaitukaitisら[5)]の方法でウサギに対してマウスβNGF抗血清を調整し，この抗血清からマウス7S NGFを結合させたNGF-Sepharose 4Bカラムを用いてマウスβNGF特異抗体を精製した．

^{125}I-βNGFの調製：βNGF 10μg（10μl），0.4Mリン酸緩衝液，pH 7.4（50μl），^{125}I-Na 1mCi(10μl)を混合し，クロラミンT 10μg(10μl)を加え30秒間反応後，Sephadex G-50カラムにより遊離の^{125}Iを除去した．^{125}I-βNGFの比活性は30～60μCi/μgであり，特異抗体との免疫学的結合は80%以上であった．

固相radioimmunoassay法：βNGFの特異抗体を0.05Mトリス－塩酸緩衝液pH 8.5で1μg～5μg/mlの濃度に調製し，ポリスチレンチューブ

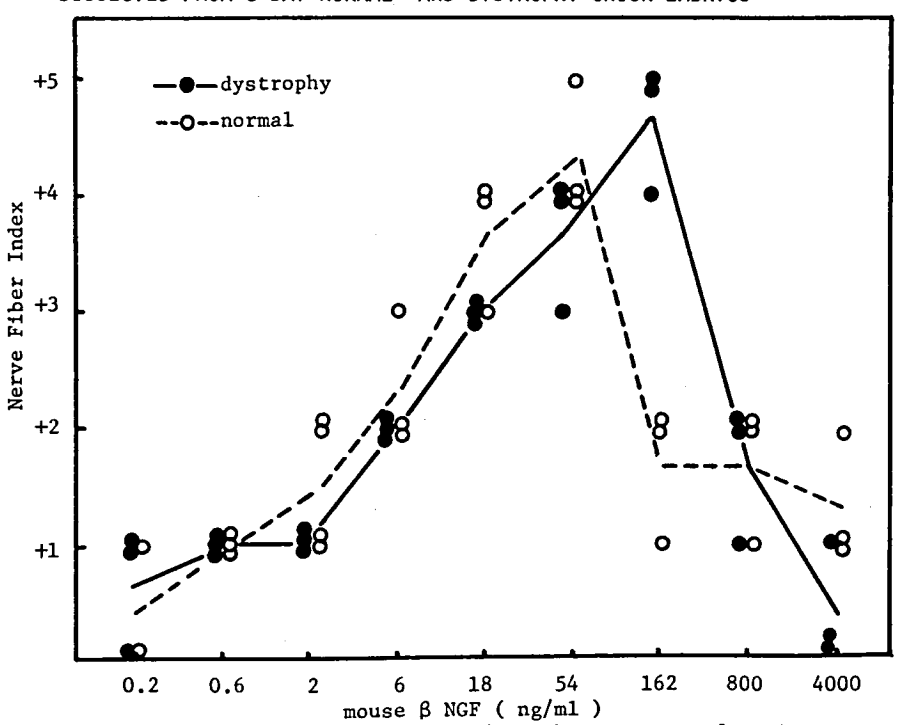
＊京都大学薬学部生物化学
＊＊京都大学医学部第二内科
＊＊＊国立療養所宇多野病院神経内科

に500μlずつ分注する．4℃で一夜放置した後抗体溶液を除き0.05Mトリス－塩酸緩衝液pH 8.0（0.075M塩化ナトリウム，0.1%ウシ血清アルブミン，0.02%アジ化ナトリウム）で2回洗浄する．このチューブに測定試料を500μlずつ加え4℃で24時間放置する．試料を除き上記緩衝液で2回洗浄する．つぎに^{125}I βNGFを500μl（約20,000 cpm）加え4℃で24時間放置した後同じ緩衝液で2回洗浄し，チューブに残った放射活性をダイナボットAuto-LOGIC γカウンターで測定した．

radioimmunoassay用試料の調製：採取したチキンの筋肉は冷却した0.05Mリン酸緩衝液pH 7.2（0.1mM PMSF, 0.1mM EDTA, 0.1%ウシ血清アルブミン）中でホモジナイズした．筋肉と緩衝液の重量/体積比は50%とし，一方使用量に限りのある筋肉は33%または25%で用いた．NGF量は単位湿重量筋肉あたりで算出した．

結　　果

8日齢の筋ジストロフィーチキン胚，正常チキン胚各々1個体ずつからdorsal root ganglia を摘出し，種々の濃度のマウスβNGF存在下で培養した．たて軸に神経節の反応を，横軸にβNGF濃度をとり，各NGF濃度での反応をプロットしたのが図1である．培養前の神経節の大きさ，外観には両チキン群で差を認めなかったが正常チキンDRGはβNGF 54 ng/mlで最大反応を示すが筋ジストロフィーチキンDRGは162 ng/mlで最大反応を示した．筋ジストロフィーチキンDRGは正常チキンDRGより反応性が低く，正常チキ

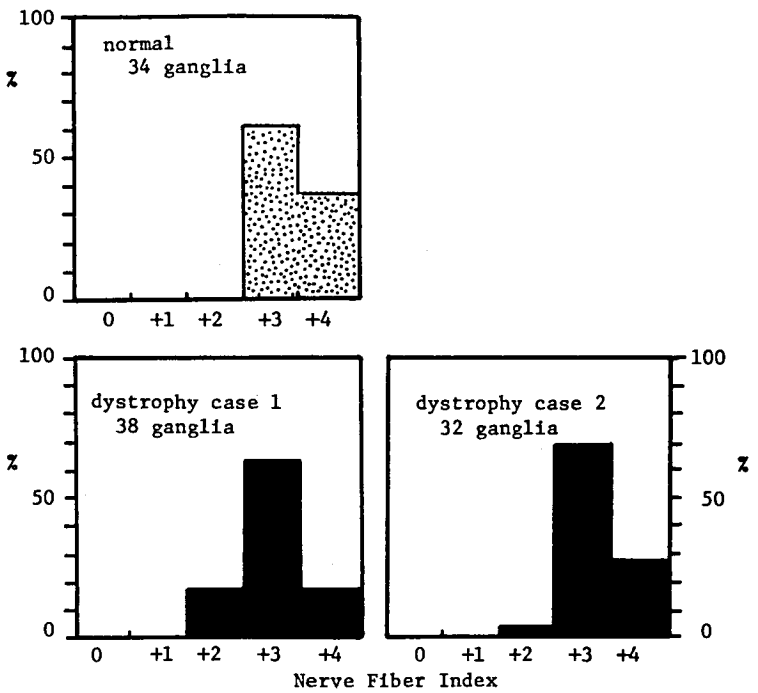


Tissue cultures were performed in the presence of various amounts of mouse β NGF at 37°C for 24 hr.

図1

ン DRG は同程度の反応をひき出すためには３倍高濃度の NGF が必要であることを示唆している．この点をさらに詳しく検討するために NGF 濃度を一定(18 ng/ml)にして 20個～40個の神経節を培養し，その反応性を比較したのが図２と図３である．図２は８日齢胚の筋ジストロフィーチキンと正常チキンの DRG の反応の分布を示したものである．正常 DRG では培養した34個の神経節のうち，62%が＋３を，38%が＋４を示したが筋ジスチキンの DRG は＋２の反応しか示さない神経節が dys １で18%, dys ２で３%みられた．また最大反応である＋４を示す神経節の割合も正常より低下していた．図３は同様の実験を14日齢胚を用いて行ったものである．反応の分布を筋ジストロフィーチキンと正常チキン DRG で比較すると正常では＋２を示す神経節が約60%で＋３を示すものも約10%みられた．しかし３例の筋ジストロフィーチキンでは＋３を示す神経節は全く見られず，＋１しか示さない神経節の比率が最も高い．すなわち14日胚でも筋ジスチキン DRG は正常チキンのそれより NGF に対する反応性が弱いと推定される．一般に DRG の NGF に対する反応性は８日胚 DRG が最も高く以後徐々に低下する．このため14日胚 DRG は全体に反応性が低く図３に示す通り最大反応は＋３しか示さない．この反応性の日齢変化は DRG 中の知覚神経節神経細胞表

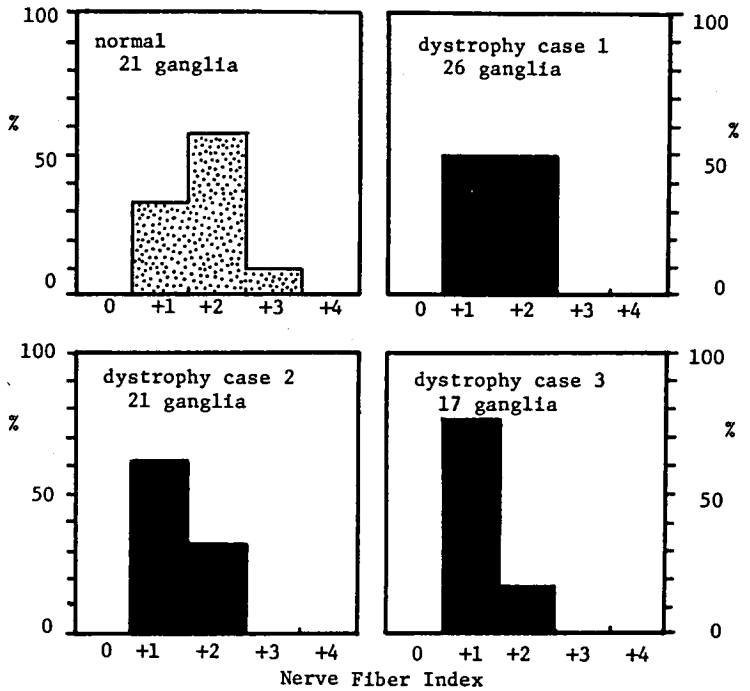
COMPARISON BETWEEN THE RESPONSIBILITIES TO MOUSE β NGF OF DORSAL ROOT GANLIA FROM 8 DAY NORMAL AND DYSTROPHY CHICK EMBRYOS



Tissue cultures were performed in the presence of mouse β NGF (18 ng/ml) at 37°C for 24 hr.

図２

COMPARISON BETWEEN THE RESPONSIBILITIES TO MOUSE β NGF OF DORSAL ROOT GANGLIA FROM 14 DAY NORMAL- AND DYSTROPHY-CHICK EMBRYOS



Tissue cultures were performed in the presence of mouse β NGF (18 ng/ml) at 37°C for 24 hr.

図3

面膜上の NGF 受容体の密度の日齢変化とほぼ相関関係にあり，受容体密度が高い程 NGF に対する反応性が高い[7]. この観点に立てば上記の結果は筋ジストロフィーチキン DRG 神経細胞の NGF 受容体に何らかの障害があるかまたは密度の低下をきたしていることが示唆される.

すでに著者ら[3)6)]により，筋ジストロフィーホモマウス後肢筋肉中の NGF レベルが正常マウスに較べ低下していることが見出されている. この現象をチキンで検討するため，発症前後の日齢の筋ジストロフィーチキンと正常チキン骨格筋中の NGF-LI レベルを測定し比較した. 測定はマウス顎下腺 β NGF の特異抗体を被覆したポリスチレンチューブを用いる固相 RIA 法で行った. 測定に用いた筋肉は胸筋 (M. pectoralis)，大腿二頭筋 (M. biceps femoris)，内転筋 (M. adductores) の3種類である. この方法でマウス β NGF を標準品として用いた場合の標準曲線は図4の実線で示した. ほぼ5 ng/ml まで定量が可能である. 今回測定した筋ジストロフィーチキンの3種類の筋肉ホモジネート上清の希釈曲線を破線または一点鎖線で示した. これらの希釈曲線はほぼ β NGF の標準曲線と平行となり，この方法でチキン筋肉中の NGF-LI レベルの測定が可能と考えられる.

胸筋の NGF-LI レベルを示したのが図5である. 生後1日から70日に至る期間に徐々にレベルの上昇がみられるが筋ジストロフィーチキンと正常チキンの間に有意差は認めなかった. 内転筋と大腿二頭筋についても生後日齢15日から70日まで測定したが筋ジストロフィーチキンと正常チキン

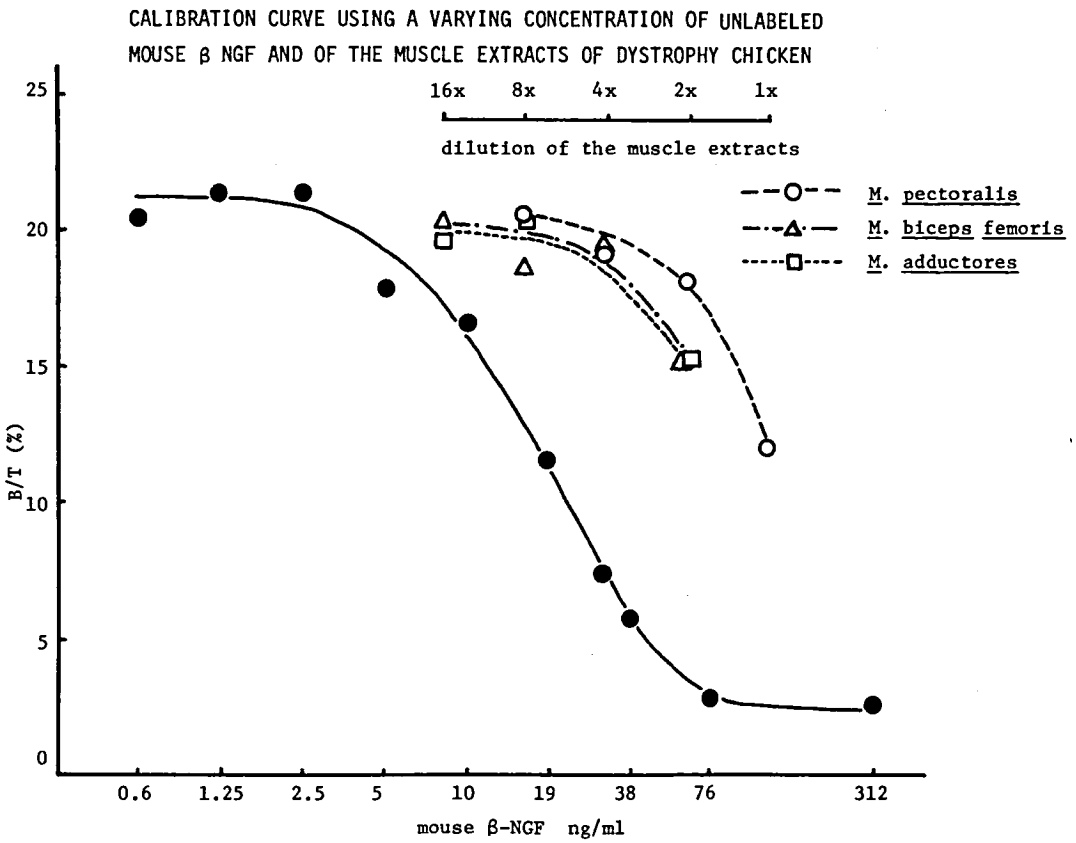


図4

群の間に有意差は認めなかった．以上の結果より，筋ジストロフィーチキン骨格筋中の NGF-LI レベルは罹患部位の胸筋をはじめ大腿二頭筋，内転筋とも正常チキンの NGF-LI レベルと差がないことが結論される．

考　　案

著者らはすでに筋ジストロフィーマウス顎下腺[2]および後肢筋肉中[3]の NGF レベルの低下を報告したが今回，筋ジストロフィーチキン骨格筋中の NGF-LI レベルと正常チキンのそれとの間に有意差は見出せなかった．チキンとマウスの筋ジストロフィー症の違いを反映しているものと思われるが，特にマウスでは神経系に異常があるとする多くの報告[8)9)]が提出されている．

一方，胎生期のチキンにおける NGF の動態を知るために DRG の NGF に対する反応性を検討した．その結果，筋ジストロフィーチキンの DRG は正常チキンの DRG にくらべマウス NGF に対する反応性が低下していることが明らかとなった．^{125}I-NGF を用いた定量的な検討が必要であるが NGF 受容体に何らかの異常もしくは細胞膜上での受容体の密度に変化をきたしている可能性がある．

以上の結果から，筋ジストロフィーチキンでは胎生期に NGF 動態の何らかの異常をきたしていることが示唆される．今後，筋ジストロフィーチキン，マウスの胎生期の DRG および sympathetic ganglia における NGF 受容体と NGF の相互作用を動力学的，定量的に検討する予定である．

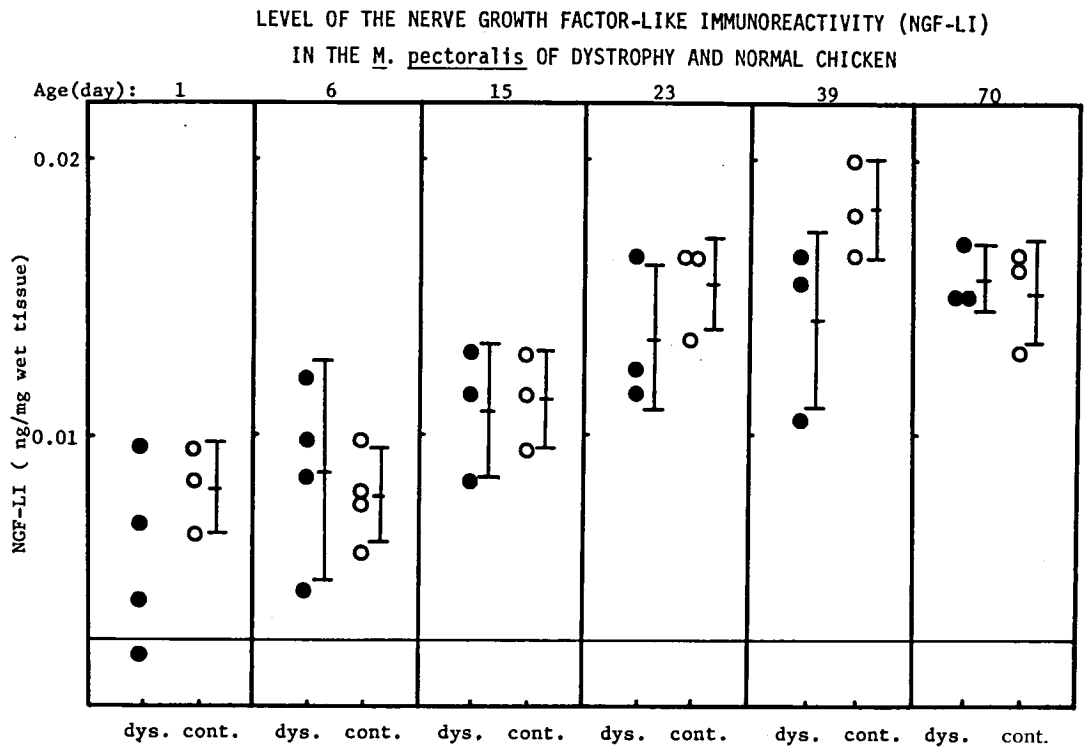


図 5

文　献

1) Levi-Montalcini, R. & Angeletti, P. U.: Physiol. Rev., 48 : 534, 1968.

2) Furukawa, S., Nishitani, H. & Hayashi, K.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 76 : 1202, 1977.

3) Furukawa, S., Hayashi, K., Ohi, T. & Imura, H.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 90 : 130, 1979.

4) Varon, S., Nomura, J., Perez-Polo, J. R., Shooter, E. M. & Kennedy, J. P. Jr.: Methods in Neurochemistry (ed. Fried, R.) Vol.III, 203, Marcel Dekker, New York, 1972.

5) Vaitukaitis, J., Robbins, J. B., Nishlag, E. & Ross, G. T.: J. Clin. Endocrinol., 33 : 988, 1971.

6) 古川昭栄, 大井長和, 井村裕夫, 林　恭三: 医学のあゆみ, 110 : 402, 1979.

7) Frazier, W. A., Boyd, L. F., & Bradshaw, R. A.: J. Biol. Chem., 249 : 5513, 1974.

8) Huizar, P., Kuno, M. & Miyata, Y., J. Physiol., 248 : 231, 1975.

9) Komiya, Y. & Austin, L.: Exp. Neurol., 43 : 1, 1974.

9）ジストロフィー実験動物モデルにおける神経成長促進因子の研究（Ⅲ）除神経の筋 NGF-LI への影響

井村裕夫*

研究協力者　大井長和*　鈴木將夫*　古川昭栄**
林　恭三**　西谷　裕***

はじめに

神経成長促進因子（nerve growth factor, NGF）は，交感神経ニューロンの分化と機能維持及び感覚神経ニューロンの分化に必要な蛋白質である．このNGFは，軸索内を逆行性に流れる[1]ことが知られている．また，ラットの培養骨格筋細胞系でNGF様の物質が産生[2]されることが示された．私達は，髄鞘形成異常をともなうジストロフィーマウスの筋NGF-like immunoreactivity（NGF-LI）が，ヘテロ群に比しホモ群で低値[3]であることを報告した．ジストロフィーマウスの発症機序の1つの可能性として，髄鞘形成異常による神経原性変化[4)5)]も考えられている．そこで，運動神経と筋NGF-LIの関係を明らかにする目的で，除神経マウス筋肉のNGF-LIをone-site法によるラジオイムノアッセイ法[6]で測定した．

材料と方法

1．β-NGFの分離

オス成熟マウス顎下腺からVaronら[7]の方法で精製した7S-NGFをCM-Sephadex G-50のカラムクロマトグラフィーにてα，β，γの各サブユニットに分離した．

2．β-NGF抗血清の作製

β-NGFの100μgをVaitukaitus[8]らの方法により，ニュージランドホワイト種のウサギの皮内に免疫を3週間毎に4回反復し，その耳静脈より採血することによって抗血清を得た．

3．β-NGFの特異抗体の作製

上記の方法で得た抗血清を，33%飽和硫安にて塩析し，得た沈澱を0.05Mリン酸緩衝液で透析した．NBr-Sepharose 4 Bに7 S-NGFを結合させたNGF-Sepharose 4 Bカラムに透析液をアプライし，Stoeckelらの方法[9]に従ってβ-NGF特異抗体を精製した．

4．one-site法によるラジオイムノアッセイ法

β-NGF特異抗体溶液を0.05Mトリス塩酸緩衝液（pH8.5）で0.5～10μg/200μlの濃度に調整し，ポリスチレンチューブに200μlずつ分注した．4℃24時間静置した後に，過剰の抗体を回収した．次に0.05Mトリス緩衝液（0.075M塩化ナトリウム，0.1%BSA，0.02%アジ化ナトリウム）で洗浄し，4℃にて保存した．このβ-NGF特異抗体被覆チューブにサンプルを200μlずつ加え，4℃で24時間静置した後に，上記の緩衝液で洗浄して抗体と結合した物質以外を洗い落した．続いて，^{125}I-βNGF 200μl（2×10^{4}CPM，β-NGF 0.5ng）を加え，4℃にて一晩静置後に^{125}I-βNGFを吸収除去した．これを上記の緩衝液で洗浄後にポリスチレンチューブに残った放射活性を測定した．

5．除神経マウス筋の作製

正常オスマウス（ddk）の4週齢12匹及び8週齢

＊京都大学医学部第二内科
＊＊京都大学薬学部生物化学
＊＊＊国立療養所宇多野病院神経内科

10匹の各個体の右坐骨神経をペントバルビタール麻酔下で外科的に除神経した．対側の左下肢をコントロールとして用いた．この2週後に両側の下肢筋を採取し，リン酸緩衝液（25％ w/v）中で粉砕した．この後4℃30分間3300rpm遠心して得た上澄みを検体として用いた．

結　　果

1．マウス筋NGF-LIと標準曲線

マウス筋抽出物を倍数希釈して得られた曲線は，マウスβ-NGFによる標準曲線と平行した(図1)．

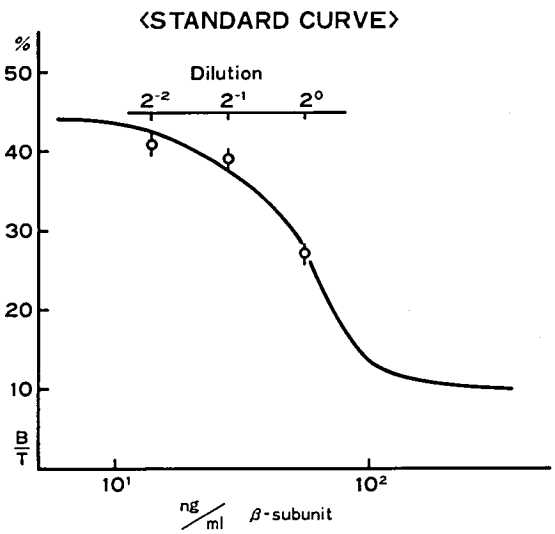


図1　マウス筋抽出物の希釈曲線がマウスβ-NGFによる標準曲線と平行である

2．マウス筋NGF-LIの値

4週齢マウスの場合，正常筋0.037±0.001，除神経筋0.030±0.001であり，8週齢マウスの場合，正常筋0.037±0.003，除神経筋0.027±0.002（単位：ng/mg. wet weight，M±SD)．除神経筋NGF-LIは，正常筋NGF-LIに比して低値で，その差は8週齢でより大であった(図2)．

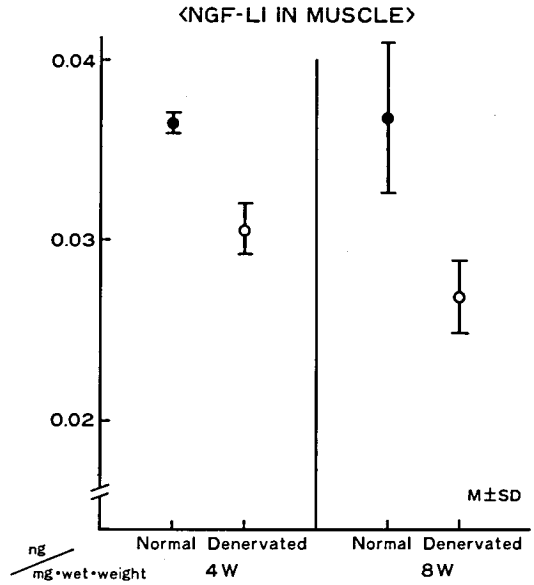


図2　除神経筋NGF-LIは，正常筋のそれに比較して低値である

考　　察

ジストロフィーマウスは，生後2～3週から臨床症状が発現し，以後進行性である．私達が観察したホモ群とヘテロ群の筋NGF-LIの差は，週齢が小さい程大きく週齢が増加するにつれて小さくなっていた．このことは，胎生期におけるNGF動態異常と本症の発症機序との関連を示唆した．しかし，除神経筋でも筋NGF-LIの減少が認められたことから，筋NGF-LIは運動神経にも何らかの関連をもつのではないかと推測される．従って，ジストロフィーマウスの筋NGF-LIの低値は，髄鞘形成異常による機能的除神経の状態を示している可能性も考えられ，この点今後の検討が必要である．また，cast fixationによる廃用性筋萎縮でも筋重量の減少[10]が，すでに4週で著明に認められること及び骨ピンによる固定の第1日目からミトコンドリアの機能低下[11]が発現するとの報告から，NGF-LIの低値の機序については，廃用性筋萎縮の関与の有無の検討も必要と考えられる．

ま と め

マウス除神経筋の筋 NGF-LI レベルは，正常筋に比して低値であり，これは運動神経が筋 NGF-LI に関与していることを示唆した．

文 献

1) Stoeckel, K. & Thoenen, H. : Retrograde axonal transport of nerve growth' factor. Specificity and biological importance. Brain Res., 85 : 337, 1975.

2) Murphy, R.-A., Singer, R. T., Saide, J. D., et al. : Synthesis and secretion of a high molecular weight form of nerve growth factor by skeletal muscle cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 4496, 1977.

3) Shoei, F., Kyozo, H., Takekazu, O., et al. : Levels of nerve growth factor-like immunoreactivity in the lower limb muscles of muscular dystrophic mice. B. B. R. C., 90 : 130, 1979.

4) Madrid, R. E., Taros, E., Cullen, M. J., et al. : Genetically determined defect of Schwann cell basement membrane in dystrophic mouse. Nature, 257 : 319, 1975.

5) Bradley, W. G. & Taros, E. : Axoplasmic flow in axonal neuropathies. II Axoplasmic flow in mice with motor neuron disease and muscular dystrophy. Brain, 96 : 247, 1973.

6) Suda, K., Barde, Y. A. & Thoenen, H. : Nerve growth factor in mouse and rat serum. Correlation between bioassay and radioimmunoassay determinations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 : 4042, 1978.

7) Varon, S., Nomura, J., Perez-Polo, J. R., et al. : Methods of neurochemistry (edited by Fried, R.) Marcel Dekker, New York, 1972, Vol.3, p.203.

8) Vaitukaitus, J.,Robbins, J. B., Nieschlag, E., et al. : A method for producing specific antiserum with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr., 33 : 988, 1971.

9) Stoeckel, K., Gagnon, C., Guroff, G., et al. : Purification of nerve growth factor antibodies by affinity chromatography. J. Neurochem., 26 : 1207, 1976.

10) Booth, F. W. & Kelso, J. R. : Production of rat muscle atrophy by cast fixation. J. Appl. Physiol., 34 : 404, 1973.

11) Max, S. R. : Disuse atrophy of skeletal muscle. Loss of functional activity of mitochondria. B. B. R. C., 46 : 1394, 1972.

II．筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病態生理

a）遺　　伝

b）臨　　床

c）形　　態

d）生　　理

e）赤血球など

f）生化・治療

10）筋萎縮性疾患の遺伝分析
——筋緊張性ジストロフィー症について——

古庄敏行*

研究協力者　金久禎秀**　中島洋明**
納　光弘***　井形昭弘***

著者らは1977年来進行性筋ジストロフィー症およびその類縁疾患6種について遺伝分析を試みた．本年度は筋緊張性ジストロフィー症（以下My. Dy. と略）について，その遺伝形式の分析を行ったので報告する．

本症の資料収集にあたっては，昭和47年より54年8月までの8年間に，難病検診，主要病院病歴調査，身体障害手帳調査，全学級担任アンケート調査，在宅訪問検診，戸籍調査，逐次情報など可能な限りの方法を用いて，鹿児島県内全域のMy. Dy. の家系調査および疫学調査を行った．

My. Dy. の診断に際しては，その特有な臨床症状及び電気生理学的検査，眼科学的検査を用いて慎重に診断し，とくに生存中の両親，同胞に対しては臨床所見の他に，可能な限りslit lampなどによる検査を併せて実施した．本資料からは，先天性筋硬直症，パラミオトニア，chondro dystrophic myotonia, Schwartz-Jampel 症候群，acquired myotonia，いわゆるpseudo myotoniaなどは除外した．その結果，収集した自験例は56家系，386名となり，両親の組合せ別では正常×正常家系32家系224名，正常×My. Dy. は24家系162名であった．収集した資料を下記の点について分析を試みた．

＊鹿児島大学医学部衛生
＊＊国立療養所南九州病院神経内科
＊＊＊鹿児島大学医学部第三内科

My. Dy. の年齢分布について

年齢群によってMy. Dy. の頻度が異なれば，遺伝分析の際もこの点を考慮に入れる必要がある．そこで両親の組合せ別，すなわち両親ともに正常の家系と，両親の一方は正常で他方はMy. Dy.の家系に分けてMy. Dy. の頻度について，χ^2-検定を行ったところ，いずれも統計的有意差は認められなかった．

My. Dy. の頻度の性差について

本資料のMy. Dy. の頻度をみると，数字の上からは男の方が多いようである．そこで，まず両親の組合せ別に性差を検定したところ，正常×正常では$\chi^2=1.895$, 自由度1で統計的には0.2～0.1の有意水準であり，統計的有意差は認められない．つぎに正常×My. Dy. についても同様な検定を行ったところ，$\chi^2=7.203$, 自由度1で有意水準0.01～0.001，統計的に有意差が認められる．両組合せを合計した場合には，$\chi^2=8.217$で自由度1，有意水準0.01～0.001で有意差が認められる．これら一連の結果から，両親の組合せによって性差が異なるのか，あるいは調査例が少ないために結果が異なるのか，この点は現在のところ明確な結論を得ないため，今後更に検討する余地があると思われる．

分離比の検定

まず正常×正常の分離比は表1に示す如く，男では0.2698±0.0559，女では0.1692±0.0465の推定値が得られた．平均をとると，0.2188±0.0365

で，劣性遺伝の期待値0.25との差は誤差より小さく，したがって本研究資料では劣性遺伝の仮説に適合する．つぎに正常×My.Dy.の分離比は表2に示す如く，男では0.5000±0.0737，女では0.2273±0.0632の推定値が得られた．この場合，前節で述べた如く，男女の差は統計的有意水準0.01～0.001で有意差がみられる．もしこれが遺伝的なものであれば，すなわち伴性劣性的なものであれば，父正常×母My.Dy.の組合せの方が母正常×父My.Dy.の組合せに比べて多いことが期待されるが，表2に示した如く，前者の組合せは10家系，後者の組合せは14家系であることから，直ちに伴性劣性的なものとは言えない．したがって，男女の頻度の違いは従性的なものか，あるいは偶然による資料の偏りが影響しているのか検討する必要がある．この点については今後さらに資料を収集し分析することとし，ここでは一応この性差を無視して両分離比の平均をとると，0.3667±0.0598で，期待値0.5との差は5％水準で統計的有意差がみられる．つぎに，正常×正常と正常×My.Dy.の分離比を比較すると有意水準0.05～0.02で有意差が認められる．このことは本症が遺伝性を示す1つの証拠といえる．

My.Dy.の遺伝的異質性について

本症は従来の報告[1]によると概ね常染色体性優性遺伝とされている．しかし，すでに本研究資料に示した如く，発端者の両親について調査を行ったところ，正常×正常32家系，正常×My.Dy.24家系で，全家系のうち前者家系の占める割合は，

表1　正常×正常の組合せ（32家系）における子の分離比

いとこ結婚率＝6.25±4.28％

年齢	男			女			計		
（歳）	総数	My.Dy.	分離比	総数	My.Dy.	分離比	総数	My.Dy.	分離比
0－19				2	0	0	2	0	0
20－29	9	2	0.2222±0.1386	10	1	0.1000±0.0949	19	3	0.1579±0.0837
30－39	7	2	0.2857±0.1707	15	1	0.0667±0.0644	22	3	0.0136±0.0247
40－49	14	2	0.1429±0.0935	4	1	0.2500±0.2165	18	3	0.1667±0.0878
50－	31	11	0.3548±0.0859	30	8	0.2667±0.0807	61	19	0.3115±0.0593
不明	2	0	0	4	0	0	6	0	0
計	63	17	0.2698±0.0559	65	11	0.1692±0.0465	128	28	0.2188±0.0365

表2　正常×My.Dy.の組合せ（24家系）における子の分離比

近親婚なし

年齢	男			女			計		
（歳）	総数	My.Dy.	分離比	総数	My.Dy.	分離比	総数	My.Dy.	分離比
0－19				1	0	0	1	0	0
20－29	9	5	0.5556±0.1656	8	5	0.6250±0.1712	17	10	0.5882±0.1194
30－39	10	6	0.6000±0.1549	10	3	0.3000±0.1449	20	9	0.4500±0.1112
40－49	9	4	0.4444±0.1656	6	0	0	15	4	0.2667±0.1142
50－	14	8	0.5714±0.1323	13	2	0.1538±0.1000	27	10	0.3704±0.0929
不明	4	0	0	6	0	0	10	0	0
計	46	23	0.5000±0.0737	44	10	0.2273±0.0632	90	33	0.3667±0.0598

32/56＝0.57, すなわち57％も占めている．もしこれが事実であれば，My. Dy. をすべて常染色体性優性遺伝とする仮説に問題もあると考えられる．ここでもし，本症をすべて常染色体性優性遺伝とすれば，正常×正常の場合，(1)不完全浸透が考えられる．家系組合せから本症を優性として浸透率を計算すると，$\frac{24}{56}\times100=42.86$％である．しかし，浸透率70％以下の場合は他の要因を考慮する必要があるとされている．(2)突然変異　(3)本症が環境要因のみによって発生するなどが考えられる．しかし，分離比がほぼ25％であることを考えれば，今述べた(1)(2)(3)は考慮に入れる必要はほぼないものと思われる．また，正常× My. Dy. のいとこ結婚率は0であるのに対して，正常×正常は6.25％であることなどを併せて考えると，本症の中に劣性型が存在することを全く否定することに問題があると思われる．つぎに，正常× My. Dy. の分離比について検討する．この場合，分離比が期待値0.5に適合したとしても優性型，劣性型と一方的に決定することはできない．というのは正常が優性で，My. Dy. が劣性と仮定しても，あるいは正常が劣性で My. Dy. が優性と仮定しても，My. Dy. の分離比は50％になることが期待される．もし本症がすべて優性型であるとすれば両親の組合せ家系数は常識的に正常×My. Dy. ＞正常×正常が期待され，逆に本症がすべて劣性型とすれば両親の組合せ家系数は正常×正常＞正常×My. Dy. が期待される．しかし，(1)正常×正常の家系，正常×My. Dy. の家系がほぼ1：1であること，(2)すでに述べた如く，正常×正常の分離比が劣性遺伝仮説に適合し，(3)近親婚率も正常×My. Dy. に比べ正常×正常の方が高いことを考慮すると，本症には劣性型と優性型があり，したがって正常×My. Dy. の家系には劣性型と優性型の家系が混合していることが考えられ，全体からみて本資料の家系は劣性型が多いことを示している．しかし，いずれにしても今後さらに資料を増やして，この点については詳細な遺伝分析を行う予定である．

文　献

1）納光弘，川平稔，大勝洋祐，井形昭弘：My. Dy. の遺伝形式に関する検討―南九州地区の疫学調査結果の分析―．厚生省心身障害研究費補助金昭和49年度．冲中班研究報告書，5～8，1974.

11）Kennedy-Alter-Sung-Syndrome の2例

——臨床病態に関する検討——

茂在敏司*

研究協力者　小西慎吾*　増井義一*　竹中正純*
山本隆一*　島田徹*　寛紘一*

1968年，Kennedy らは，特異な下位運動ニューロン疾患の2家系11症例を報告した[1]．その臨床的特徴は，1)中年での発症，2)伴性劣性遺伝，3)近位性脊髄性ならびに球性筋萎縮と筋力低下，4)全身性の筋線維束性れん縮，5)錐体路，知覚ならびに小脳症状の欠如，6)緩徐進行性，7)乳房肥大，手指振戦，有痛性痙れんなどの随伴症状が高頻度にみられるといった点である．最近私共は，これらの特徴と顔面，前胸部に毛細血管拡張を有した2家系2症例を経験し，肝脂肪変性，筋線維内脂肪沈着を認めたので報告する．

症　例

症例Ⅰ：39歳　男　事務員(図Ⅰ)．

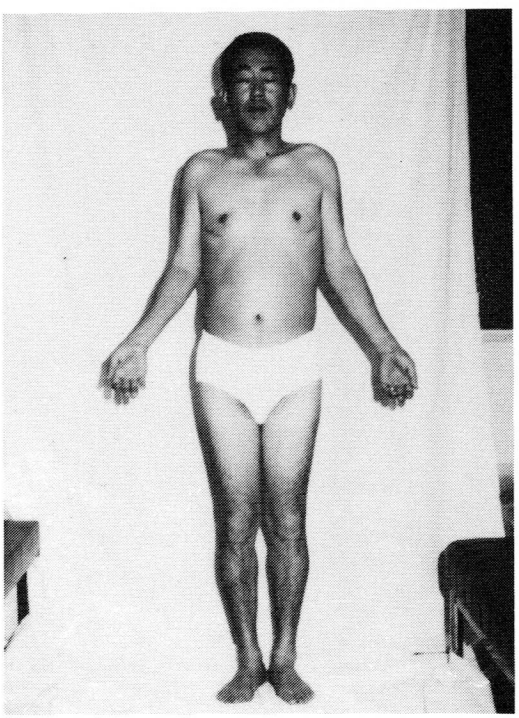
家族歴：母方従兄弟に，本例と同様の筋萎縮，女性化乳房，手指振戦などを呈する者がある．血族結婚はない．タバコ20本/日．ビール1本/日．

既往歴：特記すべきことはない．

現病歴：昭和35年，19歳乳房肥大に気づき，某大学病院受診し，そこで両側乳腺摘除術を受けた．またこの頃より手指振戦を自覚．27歳頃より，安静時に，下腿，大腿，時には腹筋に，こむらがえり様の有痛性けいれんが起こるようになった（多い時は，1日5～6回出現）．33歳頃より歩行時下肢の脱力を覚えるようになり，また走ることが次第に困難となってきた．その後症状は，緩徐ながら次第に進行し，37歳頃には，階段の昇降に際して，手すりを必要とするようになった．38歳上肢脱力も加わり，昭和54年10月入院した．

入院時所見：身長163cm，体重55kg．顔面，前胸部に毛細血管拡張があり，両側胸部に乳腺摘除術の瘢痕を認める．胸部打聴診上異常なく，腹部では肝を2横指触知した．

神経学的所見：顔面特に眼輪筋および口輪筋，舌，胸鎖乳突筋に線維束性れん縮を認め，手指に



図Ⅰ　症例1の全身像
両側乳腺摘除術の瘢痕を認める

＊大阪医科大学第一内科

は姿勢時に増強する振戦をみる．筋萎縮は，舌筋に中等度，上下肢帯，大腿および下腿に軽度みられる．筋力低下は，軀幹部および下肢近位部優位で，臥位より上半身を起すことや，蹲踞よりの起立が困難である．上肢の筋力低下は軽度であり，握力は右26kg，左23kgである．深部反射は上肢減弱，下肢は消失している．病的反射なく，知覚障害や小脳症状を認めなかった．

検査所見：検尿，検便，血液一般，血液像異常なし．CRP，RA，抗核抗体，梅毒反応すべて陰性．血清電解質，Ca，P，BUN，Creat．血清蛋白分画正常．GOT 47mU/ml，GPT 42mU/ml と軽度上昇．Al-p，LDHは正常．CPK 741U/l（正常100以下）と上昇．血清脂質では，T.chol 185 mg/dl と正常であるが，T.G. 432mg/dl，リポ蛋白分画でpre βリポ蛋白46.6%と増加がみられIV型高脂血症の型をとっている．50g経口糖負荷試験は正常型．髄液検査異常なし．内分泌機能は，下垂体，副腎，甲状腺すべて正常．心電図は正常．筋電図では，検査したすべての筋に，典型的な神経原性変化がみられた．運動神経伝導速度は，尺骨神経53.8m/sec，脛骨神経45.5m/sec．三角筋筋生検H.E.染色では（図2），萎縮した小径線維群および脂肪織の増加が目立ち，神経原性萎縮が主体であるが，一部には中心核を示す線維や，非萎縮筋線維のmyophagiaの像もみられ軽度の筋原性変化が加わった所見であった．Oil red O染色では（図3 A），筋線維内に脂肪滴の沈着が多く認められた．図3 Bは，Oil red O染色と対比させた，同部位のRoutine ATPase染色pH9.4（図3 B）で，脂肪の沈着は，fiber typeと関係なく，各筋線維内にほぼびまん性に認められた．本症例では，軽度のGOT，GPTの上昇があり，肝生検により，肝細胞の脂肪変性が明らかにみられた（図4）．

症例2：51歳，男，会社役員

家族歴：患者は同胞5人中の末弟である．次兄に本例と同様の筋萎縮が認められ，発症より約10年後59歳の時，突然死している．血族結婚はない．

既往歴：幼児期，尋常性魚鱗癬を指摘された．35歳より，気管支喘息で治療を受ける．

現病歴：昭和20年，17歳頃より，手指振戦が出現．43歳頃より下腿特にふくらはぎに，有痛性痙れんを認めた（週1回程度）．44歳海外旅行中，バスから降りる時，下肢に力が入らず転倒，以後歩行時下肢筋力低下を自覚するようになった．51歳

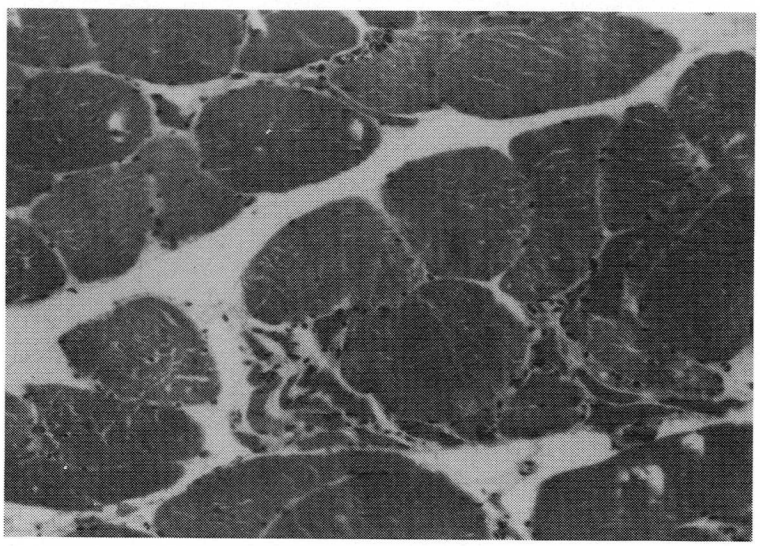


図2　症例1の筋生検像
萎縮した小径線維群，中心核を有する筋線維が認められる（三角筋　H.E. 染色×200）

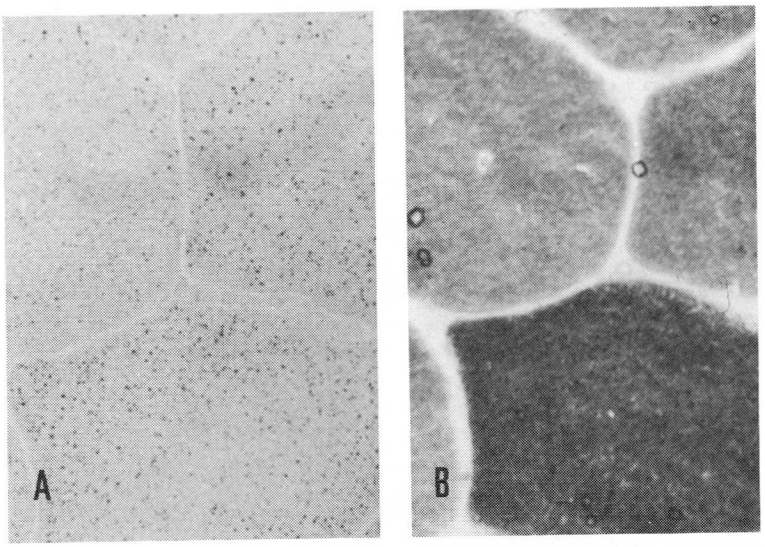


図3　症例1の筋生検像
A：Oil red O染色（×200）.筋線維内に多数の脂肪滴を認める.
B：ルーティンATPase染色（×200）

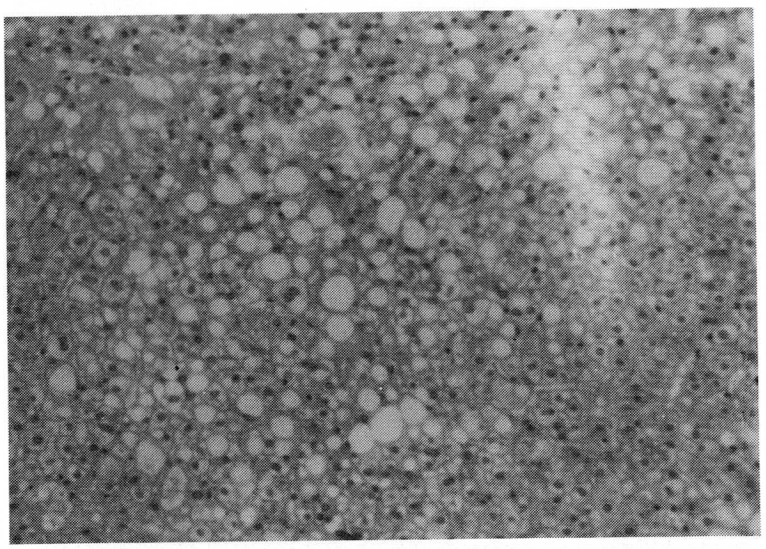


図4　症例1の肝生検像（H.E. 染色　×100）
肝脂肪変性が認められる

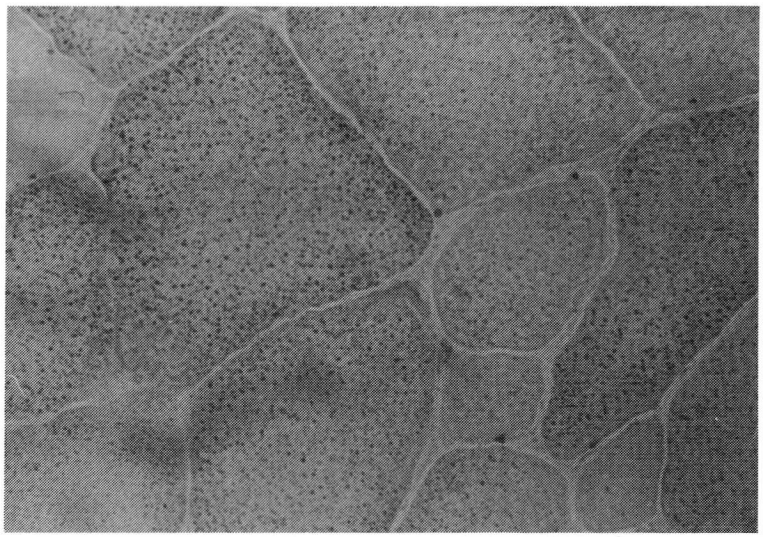


図5　症例2の筋生検像
大腿四頭筋 Oil red O染色（×200）．筋線維内に，多数の脂肪滴を認める

筋力低下は上肢にもみられるようになり，昭和54年5月入院．この前後軽い構音障害も認めた．

入院時所見：身長168cm,体重68kg.血圧140/90.皮膚は角化傾向強く魚鱗癬に一致した所見.顔面，前胸部に毛細血管拡張がみられ，また女性化乳房を認め，圧痛を伴う乳腺組織を触知した．胸部聴診にて，乾性ラ音聴取．腹部では，肝を1横指触知した．手指振戦，頭部に振戦様の動きがみられる．顔面では，眼輪筋，口輪筋，および舌に線維束性れん縮が認められ，筋萎縮は舌筋，四肢近位部に軽度みられた．深部反射は消失しており，病的反射は認めない．

検査所見：GOT 49mU/ml，GPT 51mU/ml と軽度上昇．CPK 923 U/l と中等度の上昇．脂質では，T.chol 277mg/dl と正常であるが，T.G.165 mg/dl，pre-β リポ蛋白分画34.28%と軽度の増加を認めた．その他の血液生化学的所見には特別な異常は認められなかった．内分泌学的検査正常．心電図は左室肥大．筋電図は，典型的な神経原性変化がみられた．左大腿四頭筋生検では，萎縮した小径線維群が散在し，神経原性の異常を呈したが，一部の筋線維では，中心核を有する線維や，横紋が消失した線維が認められ，筋原性の変化が加わっているものと考えられた．Oil red O による脂肪染色では，脂肪滴の沈着が多く認められた（図5）．肝生検では，肝脂肪変性の所見であった．

考　　察

以上報告した2症例の臨床的特徴は以下の点である．

①発症年齢：筋力低下の発症は，それぞれ33歳，44歳といずれも中年である．

②筋萎縮及び筋力低下：四肢近位優位であり，発症は下肢より始まっている．また舌萎縮などの球性筋萎縮が認められるが，球症状は比較的軽度である．

③全身性の線維束性れん縮：全身性にみられるが，特に眼輪筋，口輪筋，舌に明瞭である．症例2では，項部筋の線維束性れん縮に伴い頭部の振戦様の動きがみられる．

④錐体路，知覚路，および小脳症状の欠如．

⑤緩徐進行性：筋力低下は発症より，症例1では6年，症例2では7年が経過しているが，日常生活に著しい問題はなく，仕事も可能である．

⑥手指振戦，女性化乳房，下肢有痛性痙れんなどの合併症が共通してみられ，これらの症状は，

筋力低下の発症よりずっと早期にみられ，ことに前2者は思春期に始まっている．

以上述べた臨床的特徴は，Kennedy らの報告した例にほぼ一致する．但し遺伝歴については，Kennedy らの例では，伴性劣性遺伝が明らかであるが，私共の2家系については，伴性劣性遺伝を十分疑えるが，確定し得ず，今後なお検討すべき点と考えられる．Marsden は，遺伝性の Motor Neuropathy を，筋萎縮の部位及び遺伝型により分類しているが，Kennedy らの例は，近位性脊髄性筋萎縮症の Type IIIに分類され，極めて稀な例としている[2]．実際 Kennedy らの症例と同様な報告は，塚越[3]，Stefanis[4]，Schoenen[5] などがみられるにすぎない．

私共の症例で注目すべき点で，従来の報告にみられなかった点は，肝脂肪変性，毛細血管拡張である．ただ肝脂肪変性については，Kennedyらの報告した，唯一の剖検例の副所見として，肝脂肪変性の記載がみられることを考えると，今後注目していく必要があると思われる．

本症例における筋生検像では，神経原性変化が主体であるが，両例共に Kennedy らの報告と同様に軽度の筋原性変化が加わってみられたのみでなく，Oil red O 染色により，筋線維内に数多くの脂肪滴の沈着が証明されたことが，肝脂肪変性の存在とともに重要な所見として指摘される．

本例における CPK の増加など，筋障害を示唆する所見の成り立ちに関して，Oil red O 染色における脂肪滴の沈着が，何らかの役割を果している可能性は，十分推測しうる．また本症例の肝細胞の変化と，筋線維内脂肪の沈着の増加を考え合わせると，本症の Base には，何らかの脂質代謝異常の存在の可能性が疑われ，今後この点についての十分な検討が必要と思われる．

結　　論

①Kennedy らの報告した症例にほぼ一致した2例を呈示し，女性化乳房，手指振戦，有痛性痙れんなどに加えて，肝脂肪変性，毛細血管拡張などが重要な所見としてみられることを指摘した．

②筋生検所見，肝生検所見においては，脂質代謝異常がなんらかの役割を演ずる可能性を推測した．

（2症例ともに，既往に心悸亢進があり，1例では心筋生検所見を含めて心筋症の合併がみられた．この点に関しては本報告では省略した．）

文　　献

1）Kennedy, W. R., Alter, M. and Sung, J. H.: (1968) Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. a sex-linked recessive trait. Neurology (Minneap.). 18：671—680.

2）Marsden, C. D. : (1975) Inherited neuronal atrophy and degeneration predominantly of lower moter neurons. In : P. K. Thomas et E. H. Lambert (Red.), Peripheral Neuropathy, Saunders, Philadelphia, London, Toronto, ch, 39：771—790.

3）Tsukagoshi, H., Shoji, H. and Furukawa, T.: (1970) Proximal neurogenic muscular atrophy in adolescence and adulthood with X-linked recessive inheritance-Kugelberg-Welander disease and its variant of late onset in one pedigree. Neurology (Minneap.), 20：1188—1193.

4）Stefanis, C., Papapetropoulos, Th., Scarpalezos, S., Lygidakis G. et Panayiotopoulos, C. P.:(1975) X-linked spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. J. Neurol. Sci., 24：493—503.

5）Schoenen, J., Delwaide, P. J., Legros, J. J. et Franchimont, P.: (1979)Motoneuropathie héréditaire : la form proximale de l'adulte liéé au sexe (Ou Maladie de Kennedy). J. Neurol. Sci., 41：343—357.

12）特異な臨床型を呈したinfantile SPMAの1例

植田啓嗣*

研究協力者　畑中良夫*　山下正郎**
井上正史**　野島元雄**

はじめに

筋原性の筋萎縮である筋ジストロフィー症では，発症時期の違いで，先天型，幼児型，成人型と大別され，それに筋萎縮型，進行度や遺伝様式が加味されて，現在6病型に分類されている．

一方，脊髄性の筋萎縮症にあっても，乳幼児期に発症するWerdnig-Hoffmann病，成人型のDuchenne-Aran型，Vulpian-Vernhard型などは古くから知られているが，幼児期と思春期に発症するKugelberg-Welander病が提示されて[1]，またこれら各病型相互間に関連のある整理分類の必要性が叫ばれるようになり[2]，また病因論的にも，治療的並びに社会的な対策上でも，ある種の病型は筋ジストロフィー症と関連性を持って考察が進められるようになっている．

私どもは，乳児期に発症し，知能低下を伴ない，近位筋優位の筋萎縮を来し，良性の経過をたどり，四肢拘縮とともに強度の頸部拘縮を来した特異な臨床型を呈したSPMAを経験したので，ここで報告する．

症　例

症例：30才の男．無職．

主訴：歩行不能と頸部の前屈障害

家族歴：両親と曽祖父母が従兄妹結婚をしている（図1）．また本症例の長兄は1才6ヶ月で感染症で死亡しているが，その時点でも首は坐らず，歩行が出来ていなかったという．　又，従兄弟の息子も類似の神経症状を呈しているとのことである．

既往歴：16才の時，左脛骨を骨折し，2ヶ月間ギブス固定をしていた．

現病歴：妊娠，出産は正常であったが，頸定は生後1年と遅延し，独歩も2才で可能となり，脳性麻痺と診断されていた．そして，その後尖足，腓腹筋の仮性肥大を来しながらも，10才頃まで成長し，学校は小学校6年生まで通学している．

しかし10才頃より，頸の前屈困難，上肢挙上困難，登攀性起立，動揺性歩行が現われ，16才の時，左脛骨を骨折し，ギブス固定した時から歩行が不能となっている．そして肥満が著明となり，また頸部のほかに，肘，膝，足関節にも拘縮が現われ，車椅子の生活を続けていたが，30才，項筋及び項靱帯の切離術のため愛媛大学整形外科に入院となった．

入院時現症：身長160cm，体重72kgで肥満度33%の肥満体である（図2）．脈拍は110/分でやや頻脈気味であるが，不整脈は認めない．血圧156—98mmHg．肺肝境界は第4肋骨で横隔膜も少し挙上している．心雑音は聴取しない．腹部は膨満しているものの，肝臓，脾臓，腎臓は触知しない．

精神・神経学的所見：意識清明．知能は九・九がやっと，2ケタの足し算や引き算が不能で，読み書きも仮名がやっとの状態である．感情はややeuphorishである．

眼瞼下垂を認めず，瞳孔は正円同大で，光反射は迅速，眼球運動，顔面筋運動も正常であった．舌では挺出は直，萎縮を認めず，線維束性搐搦は認めなかった．

上肢挙上は両側とも30度がやっとの状態である

＊愛媛大学保健管理センター
＊＊愛媛大学医学部整形外科

家　系　図

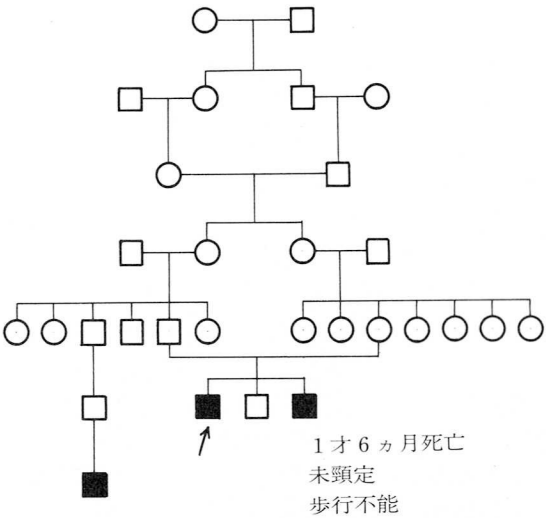


図1

図2

が，握力は両側とも20kg以上で，手の機能は保持されていた．そして起立並びに歩行が不能であった．

筋萎縮は肥満のために外見上目立たないが，筋力低下は頸筋，項筋，肩甲筋，腰帯筋で著明であり，特に下腿部では仮性肥大は既に消失していて，筋萎縮は大腿部より顕著であった．また筋線維束性攣搦は認めなかった．深部腱反射は上下肢で減弱ないしは消失し，病的反射は認められなかった．

知覚障害，運動失調，異常運動，膀胱直腸障害なども認めなかった．

関節拘縮は頸部，肘，膝，足関節で左右対称性に認められた．

検査成績：末梢血一般で赤血球581万，ヘモグロビン16.0g/dlとややpolycythemiaの傾向を示す以外，検尿，血清電解質，肝機能，血清学的検査に異常を認めなかった．なお血清CPK値が166u（正常＜90u），尿中クレアチンは607mg/日と軽度上昇していた．

内分泌検査ではTSH，T_4，T_3，尿中17-OHCS，17-KSは全て正常域値を示した．しかし糖負荷試験で50gブドー糖負荷後30分には血糖値が201mg/dl，2時間値が198mg/dlと上昇していたが，インスリンも213u，320uとそれぞれ上昇し，肥満による糖尿病型を示した．

心電図は，洞性頻脈の上に，両室負荷の所見を呈したが，心筋変性の所見は認められなかった．

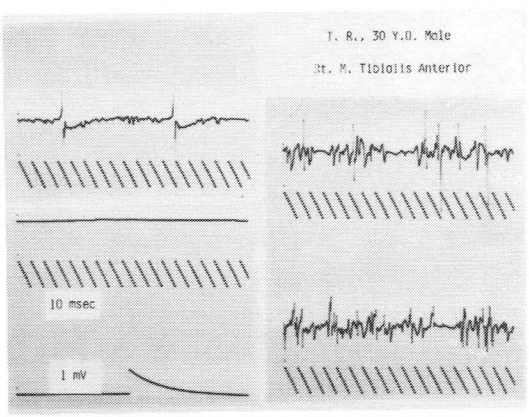


図3　T.R., 30Y.O. Male　Rt. M. Tibialis Anterior

肺機能検査では肺活量1890ml, % vital capacity 48%と低値を示したが，時間肺活量は97.9%で，典型的な拘束性換気障害の所見であった．

筋電図：左前脛骨筋の筋電図では（図3），安静時放電は認めず，最小随意収縮時に6 mVのgiant spikeが出現して，最大収縮時のNMUが減少していた．しかし一部low voltageの部分も混入していた．peroneal nerveの運動神経伝導速度は53 m/secで正常域値を示した．

筋生検所見：項筋拘縮整形術施行時採取せる頭半棘筋のGomori trichrome染色の200倍（図4，上）と100倍（図4，下）の新鮮凍結切片の組織像では脂肪とfibrosisの層の間に，比較的基本構築の保持された筋線維束が認められ，神経原性変化

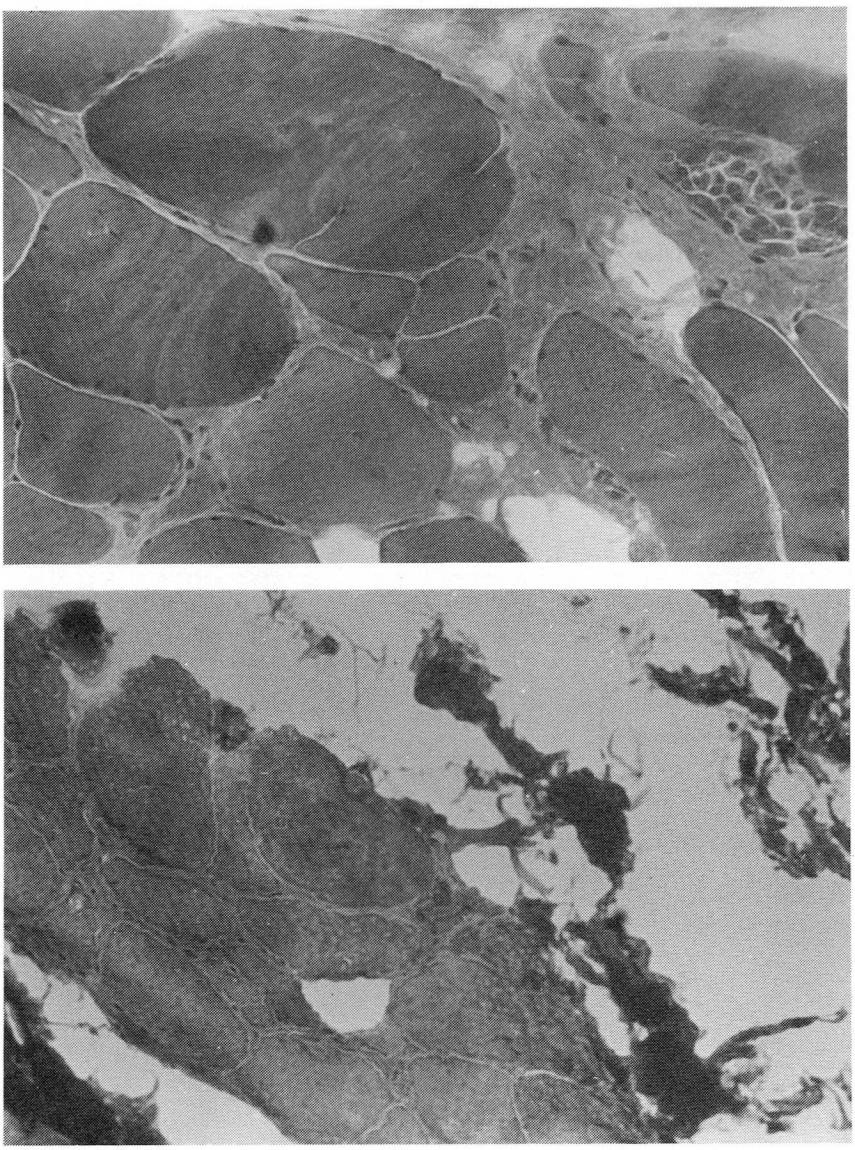


図4　頭半棘筋　　新鮮凍結切片
Gomori trichrome 染色
上段×200，下段×100

が伺えたが，強拡大にすると，筋線維の大小不同や，型，染色性にも不揃が認められた．pH9.4のATPase染色ではtype 1，type 2ともに障害されていて，type特異性を認めなかった．

考　　察

本症例は知能低下を伴っている点，また仮性肥大を伴っていたことや経過からみると，先天型やDuchenne型の筋ジストロフィー症と似ているところがあるが，下肢遠位部の筋萎縮や四肢にみられた冷感，軽度の血清CPKの上昇，それに筋電図や筋生検の所見からみて，乳幼児期に発症したとみなされるSPMAかKugelberg-Welander病とするのが妥当なものと考える．

SPMA，特に乳児期のSPMAはいくつかに分類されているが，Emeryらは，新生児期から発症するWerdnig-Hoffmann型のI型，歩行前に発症する中間型のII型，歩行以後に発症するKugelberg-Welander病型のIII型に分類している[3)4)]．

また私どもも1976年にinfantile SPMA 11例を報告し，生後8ケ月でなお頸定のみられないA群，頸定，坐位保持，つかまり立ちまでは，ほぼ正常に発育し，その後に独歩をしたことのないB群，独歩はしたものの，その後に発症しているC群の3型に分け，それぞれの特徴を挙げた（図5）[5)]．

いま，ここで本症例で問題となる点を挙げてみると，

第1はその発症時期とその後の経過である．すなわち頸定，歩行とも遅れているが，一応ある期間，歩行が可能であったこと，そして30才の現在尚生存している点である．先の私どもの分類中のC群のなかにはこの種症例も含まれている可能性もあるが，本症例の異常はすでに乳児期で気づかれており，一応C群とは区別されるべきものと考える．

第2は家族歴である．経過は良性で，筋電図，筋生検や血清CPK値の態度からみると，Kugelberg-Welander病として矛盾するものではないが，本症例の兄をWerdnig-Hoffmann型と考えると，同胞内に悪性型と良性型が含まれていることにな

図5　Infantile SPMA 11症例の臨床像

		年齢	性	頸定	独歩	発症年齢	筋萎縮部位 上肢 P	上肢 D	下肢 P	下肢 D	仮性肥大	舌搖搦	高口蓋	登攀性起立	過伸展	拘縮	脊柱彎曲	同胞発症	筋電図
A	I	8 M	女	−	−		(+)	(−)	(+)	(−)	−	+	+		+	−	+	−	
B	II	6	男	+	−		+	+	+	+	−	−	+		+	+	−	+	N
	III	10	男	+	−		−	+	−	+	−	−	+		+	+	+	−	N
	IV	12	女	+	−		−	+	+	−	−	+	+		+	+	+	−	N
	V	14	女	+	−		+	−	+	++	−	+	−		+	+	+	−	N
	VI	20	男	+	−		−	+	−	++	−	+	−		+	+	+	+	N
C	VII	8	女	+	+	2	−	−	+	++	−	−	+	+	+	−	+	+	N
	VIII	12	女	+	+	4	−	−	+	++	−	−	+	+	+	+	+	−	N
	IX	15	女	+	+	2	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	+	−	N
	X	18	女	+	+	3	−	+	+	++	−	−	−	+	+	+	+	−	N
	XI	20	女	+	+	8	−	+	−	+	−	+	+	−	+	+	−	−	N

N : neurogenic

るだろう．

第3は私どもの過去の報告例11例は全例知能は正常であったが，本症例の知能は低く，この点，等しく知能低下のみられる先天型筋ジストロフィー症との比較で興味のあるところである．

その他，肥満傾向，拘縮傾向の強いことなども，従来のinfantile SPMAの報告例とは，また趣きを異にしている．

まとめ

1.歩行不能と頸部前屈不能を主訴とした特異なSPMAの男子症例を報告した．

2.両親と曽祖父母は従兄妹結婚で，同胞と家系内に一人ずつ類症者がいた．

3.頸定と処女歩行が生後12ケ月，2才とそれぞれ遅延していたが，10才頃まで成長し，16才でまた歩行不能となった．進行は緩徐で，30才の現在も生存している．

4.知能低下を伴ない，筋萎縮は上肢では近位部に，下肢で遠位部が優位であった．筋電図，筋生検所見は神経原性を主としていたが，血清CPK値は軽度上昇していた．

5.SPMAでも筋ジストロフィー症類似の病型が存在しており，したがってそれぞれに適合した対策が必要である．

文献

1）Kugelberg, E. & Welander, L.: Heredofamiliar muscular atrophy simulating muscular dystrophy. Arch Neurol Psychiat, 75：500, 1956.

2）Pearn, J. H., Carter, C. O. & Wilson, J.: The genetic identity of acute infantile spinal muscular atrophy. Brain, 96：463, 1974.

3）Fried, K. & Emery, A. E. H.: Spinal muscular atrophy type 2, a separate genetic and clinical entity from type 1 (Werdnig-Hoffmann disease) and type 3 (Kugelberg-Welander disease). Clinical Genetics, 2：1971.

4）Kloepfer, H. W. & Emery, E. H.: Genetic aspects of neuromuscular disease (spinal muscular atrophy). "Disorders of volantary muscle." 3rd ed., Walton, J. N., London, 1974, p.870.

5）植田啓嗣，畑中良夫，西川光夫ほか：Infantile SPMA 11症例の検討．大阪神経・筋疾患難病研究会51年度報告書，大阪府，大阪，1976，p.61.

13) Distal Dystrophyの二家系

高橋桂一*

研究協力者　後藤和子*　陣内研二*　春藤文子*
小嶺幸弘*　藤田拓男*

はじめに

Distal myopathyは1902年Gowersによってこの名称が用いられて以来[1]，神経原性筋萎縮をもふくめた種々の症例が報告されている．Gowersの報告例はmyotonic dystrophyの可能性があるが，1951年スエーデンのWelanderにより72家系249例の検討より，この病名が1つのentityとして確立された．彼女の症例は常染色体優性遺伝で，40～60歳に手と足の小筋と指及び趾の伸展筋の萎縮にはじまり次いで手及び足の伸展筋群が侵され進行の緩徐な疾患で[2]，血清CPKはあまり上昇しない．これに比し三好らは本邦例7家系14症例の検討より常染色体劣性遺伝をとり，10～20歳台に下肢末梢に初発し，進行性で，血清CPKは中等度に上昇を示すdistal myopathyの存在を1974年に報告し[3]，これをautosomal recessive distal dystrophyとして位置づけている．ここでは三好らの報告に一致する二家系を報告する．

症例及び家系

症例1：28歳男性，無職．

主訴は上下肢の筋萎縮と脱力．現病歴は19歳より幅飛びが出来なくなり，22歳で階段昇降に手摺を必要とするようになった．23歳で下腿の筋萎縮に気付いた．24歳には上肢の筋力低下も加わり，52年6月当科を受診した．既往歴では5歳でジフテリヤ，8歳で下顎の骨髄炎があり，15歳より精神分裂症として薬物治療を受けている．現症は身長176cm，体重67kg，血圧140/84，脈拍96/分整，胸部腹部異常なし．脳神経異常なし．腱反射上下肢にて消失，知覚障害なし．かなり全身的な筋萎縮を示し筋力テストの結果は左右差なく握力5kg，三角筋3＋，上腕二頭筋4，上腕三頭筋3＋，手関節屈曲3＋，同伸展3＋，腸腰筋2，大腿四頭筋2，大腿屈筋2，前脛骨筋2，腓腹筋2，ヒラメ筋2であった．

症例2：25歳女性．症例1の妹で洋裁学校の教師．

現病歴は小学生の時には走るのが苦手であった．高校生の時には垂直跳躍が出来ず，18歳でつま先歩行が不能になった．23歳で下腿筋の萎縮が明らかになって階段昇降にも手摺を必要とするようになった．52年8月当科受診．既往歴に特記することはない．現症は身長163cm，体重60.8kg，血圧135/52，脈拍84/分整，胸部腹部異常なし，脳神経異常なし．腱反射上肢低下，下肢で消失．知覚障害なし．筋萎縮は下腿屈側のみにみられ，握力は右21kg，左23kg．上肢軀幹及び腸腰筋は筋力5，大腿四頭筋は4，大腿屈筋3，前脛骨筋5，腓腹筋2，ヒラメ筋2で左右差はなかった．

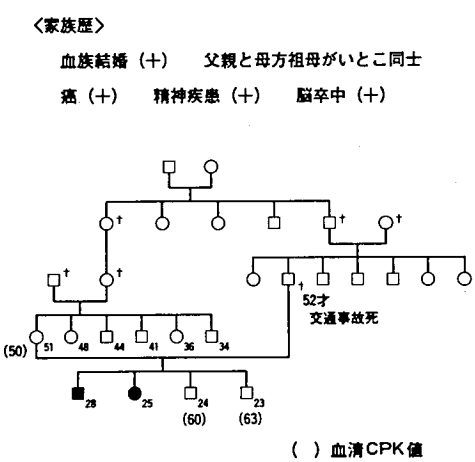
図1に家系図を示す．父親と母方の祖母がいとこ同士である．母親と弟達のCPKは正常であった．表1に症例1及び2の検査結果を示す．兄に軽度の貧血がある．両者でtransaminaseの上昇がみられるが筋由来と考えられ，LDHも上昇して，そのアイソザイムではV分画が上昇している．血清CPKは両者とも極めて高値で妹のCPKアイソザイム分析ではMM92.5%，MB 4.1%，BB 3.4%であった．プレドニソロンテスト[4]にてCPKは両者で上昇を示しdystrophic patternを示した．クレアチン尿を認め尿中クレアチニンはやや減少している．筋電図ではlow amplitude, shot dura-

*神戸大学医学部第三内科

表Ⅰ　症例1と2の入院時検査所見

	症例 1	症例 2
検尿・検便	異常なし	異常なし
RBC	381 万/mm³	425 万
Hb	12.3 g/dℓ	13.6
Ht	35.4 %	39.2
Platelets	18.8 万/mm³	20.9
WBC	4600 /mm³	6800
T.P	7.0 g/dℓ	6.7
Bilirubin(直接)	0.46(0.07)mg/dℓ	0.57(0.13)
TTT	0.8 U	1.0
GOT	106 K.U	73
GPT	115 K.U	63
ChE	0.66 ΔpH	0.61
Aℓp	1.0 mMU	1.2
LDH	814 wu-mℓ	711
Ⅰ	22.1 %	18.5
Ⅱ	27.8	36.5
Ⅲ	27.8	25.7
Ⅳ	13.0	10.5
Ⅴ	9.1	8.7

	症例 1	症例 2
CPK	3190 mU/mℓ	3010
血清クレアチン	1.4 mg/dℓ	1.4
血清クレアチニン	0.6 mg/dℓ	0.6
一日尿中クレアチン量	622 mg/day	875
一日尿中クレアチニン量	864 mg/day	653
BUN	16 mg/dℓ	9
Na	136 mEq/ℓ	141
K	4.2	4.2
Cℓ	102	95
蛋白分画　Aℓb	58.5 %	68.3
α_1	3.3	1.5
α_2	7.6	5.7
β	11.5	10.4
γ	17.7	13.8
A/G	1.4	2.16
IgA	336 mg/dℓ	298
IgG	1449	1302
IgM	124	210



図Ⅰ　症例1と2の家系図

tionの混入，interference の減少を認め myogenic であった．心電図も両者共正常範囲にあった．

図2に症例2の左大腿四頭筋の生検の結果を示す．図2のAはHE染色で筋線維の大小不同，硝子様変性，脂肪変性がみられる．

modified Gomori trichrome 染色では（写真略）nemaline rod, ragged red fiber などを認めなかった．図2のBはNADH染色でtype Ⅰ，type Ⅱの両線維の萎縮と変性がみられた．phosphorylase 染色でも fber type に関して同様の所見がみられた（写真略）．

pH 9.4，4.6，4.3における myosin ATPase染色でも type atrophy は明らかでなかった．図2のCにpH 4.6でのATPase 染色のみを示す．図2のDに電顕像を示す．myofibril の消失部位に mitochondria の増生と変形を認めるがその構造や封入体などの異常なく mitochondria myopathyは否定された．

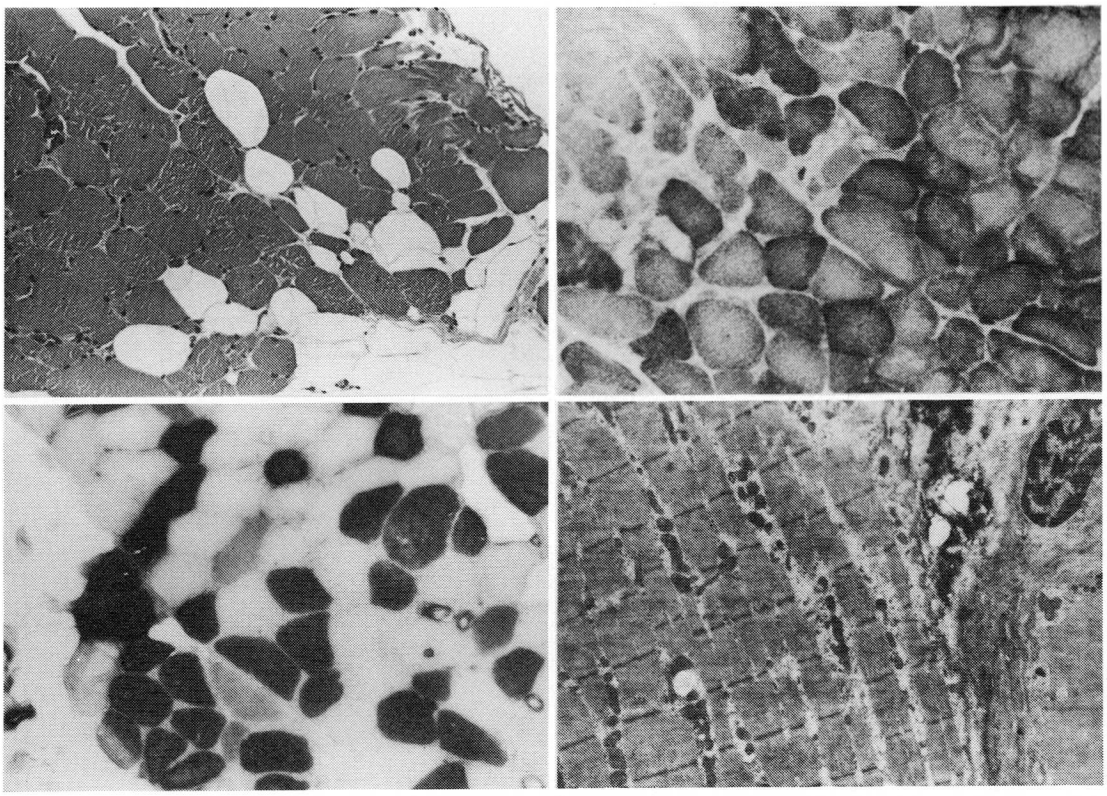


図2　症例2の左大腿直筋の生検

A｜B
C｜D

A：HE 染色，×160　　B：NADH 染色，×160

C：ATPase 染色，pH 4.6　　D：電顕

症例1の左三角筋の生検でも略同様の所見がみられた．

症例3：図3に第二の家系を示す．発端者は35歳の女性で看護婦．両親がいとこ結婚である．姉と兄が幼時に感染症のため死亡している．現病歴は27歳よりつま先歩行が不能になり，漸次大腿筋の萎縮と弱力も現われ，歩行困難のため51年3月当科へ入院した．上肢筋は概ね5，下肢筋力は大腿屈曲，伸展，外転いずれも左右共3＋，外転は2，膝関節屈曲は3＋，伸展は3－，足の底屈は2で左右差なく腓腹筋，ヒラメ筋共に極めて萎縮していた．腓骨短筋及び腓骨長筋は3＋と低下，後脛骨筋も2と低下を示した．これに比し前脛筋は5と正常であった．足趾の屈筋及び伸筋群共5で正常．短母趾屈筋5．短及び長母趾伸筋は4，

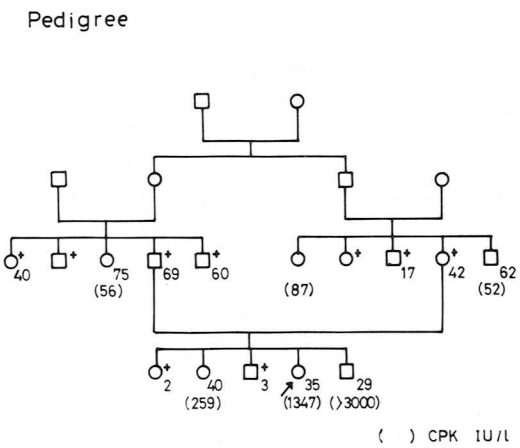


図3　症例3と4の家系図

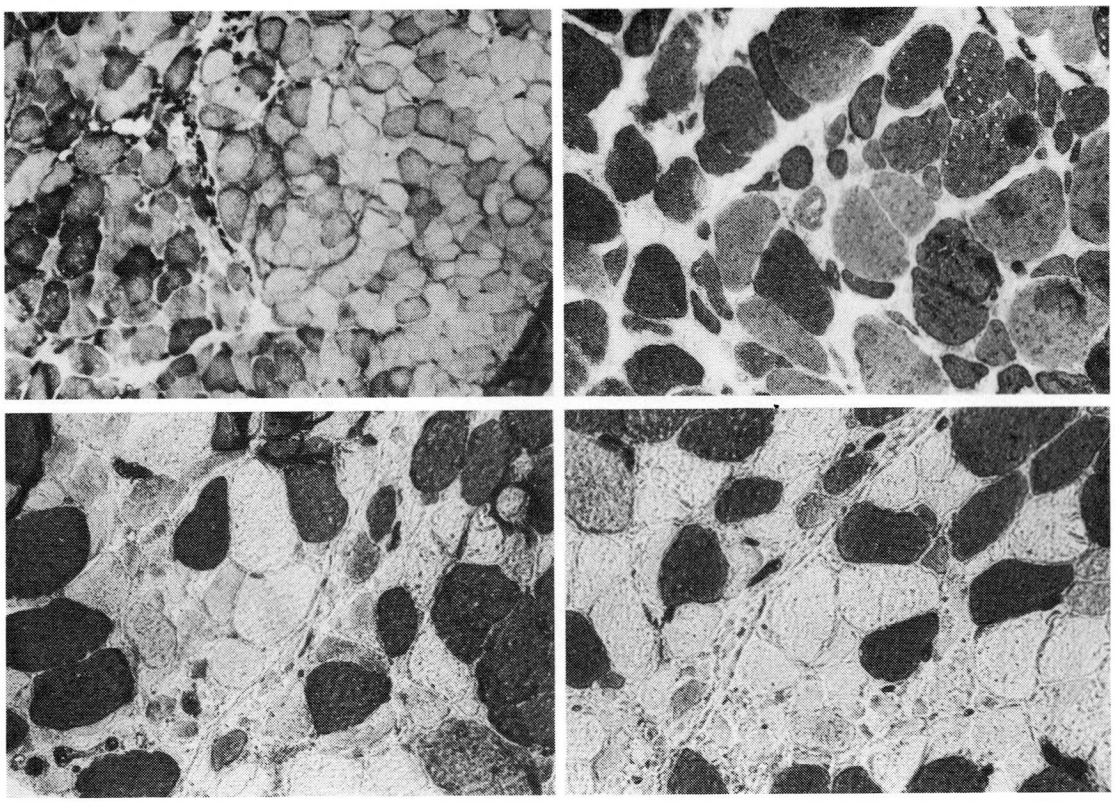


図4　症例4の右大腿直筋の生検

A	B
C	D

A：NADH 染色，×100　　B：ATPase 染色，pH9.4，×200
C：ATPase 染色，pH4.6　　D：ATPase 染色，pH4.3

長母趾屈筋は3と低下していた．

血清CPKは1,349IU（MM98.4％ MB1.6％，BB 0）．尿クレアチンは479mg/日．尿中クレアチニンは624mg/日．筋電図はmyogenic pattern. 心電図正常．大腿四頭筋生検で極めて著明な脂肪変性像を認め細胞浸潤なし．

症例4：症例3の弟．52年1月診察時（29歳）自覚症状はないが，つま先歩行不能，踵歩行は可能で下腿屈側筋群の萎縮が認められた．血清CPKは3000IU以上．尿中クレアチンは10mg/dl，尿中クレアチニンは57.3mg/dl．筋電図は myogenic pattern. 右大腿直筋で行なった生検では HE 染色及び trichrome 染色で筋線維の大小不同がみられ，NADH，ATPase 染色で type I，type II 共に萎縮変性像がみられた（図4 A—D）．

図3の家系図に併記した如く家族の血清 CPK 値は興味がもたれる．40歳の姉は症状を欠くも259IUと明らかな高値であり，母方の伯母（80歳）も87IUのやや高値（正常女性の CPK は5～50IU）を示し，これらは保因者と考えられた．この伯母の筋力は全身概ね4であったが下腿の筋萎縮は認めなかった．父方の伯母は56IUを示し，筋力は全身概ね4であったが下腿筋の萎縮は認めなかった．

考　　察

以上の家系の検討よりこの疾患は常染色体劣性遺伝をとり，男女ともに発症し，10～20歳台で下肢遠位筋特に屈側筋群より発症して上肢に及ぶ myopathy で，CPK はは相当に高値を示し，プレドニソロンテストでも dystrophic pattern を示すことが明らかになった．はじめにも述べた如く，この疾患は Welander の報告による distal myo-

pathy とは遺伝形式や臨床像で全く異なるものであり，三好らのいう autosomal recessive distal dystrophy に一致するもので一つの独立した entity と考えられた．遺伝性の distal myopathy は常染色体優性遺伝をとり幼児期に発症する型と晩発型（Welander 型）が知られている．最近 Miller らは early adult onset の distal myopathyの孤発例を報告した[5]．26～33歳で発症し，徐々に進行し最初下肢を侵し，のち上肢を侵す点は我々の例によく似ている．その上血清 CPK も著しく高値を示す．筋電図では fibrillation と positive sharp wave がみられたが彼等は myopathy に伴なう二次的なものと解釈している．しかし彼等の例の筋萎縮の分布は我々の例と異なり，遺伝歴も勿論ない．Markesbery らは同様血清 CPK の高い early adult onset の distal myopathy の孤発例2例を報告し[6]，電顕と組織化学による検討を行なっている．同時に家族歴のある一例も比較している．その第一例は27歳男．20歳で発症し26歳頃には大腿の萎縮に気付いている（CPK 1,178IU）．前脛筋は 4 ＋，腓腹筋は 3 ＋で弱力の分布においても我々の症例に似ている．第二例は27歳男．19歳で発症し steppage gait を示し（CPK 5,415IU），足の背屈は 3 ＋，底屈は 3 －である．これらの組織化学的検索では我々の症例でみられた如く type I，type II 両線維の病変がみられている．これらはいずれも孤発例として報告されているが常染色体劣性遺伝の完全な否定がなされねばならないであろう．late onset の Welander 型の distal myopathy の組織化学的検索では type I fiber atrophy が報告されている[7]．この点も我々の症例と相違するものである．現在のところ類似の遺伝歴をもつ報告例は欧米になく，上述の所見より myopathy は dystrophy と考えられ，三好らのいう autosomal recessive muscular dystrophy に一致する．但し臨床経過をみると下腿より発症するが病変は全身に及ぶ例もあり，これを distal myopathy あるいは distal dystrophy と称ばない方がよいという意見もある．1945年 Milhorat らは下腿よりはじまり大腿に萎縮の及んだ症例の報告に progressive muscular dystrophy of atrophic distal type なる表現を用いている．遠位筋よりはじまる常染色体劣性の進行性筋ジストロフィーであることは間違いない．

文　献

1）Gowers, W. R. : A lecture on myopathy and a distal form. Br. Med. J. 2 : 89, 1902.

2）Welander, L. : Myopathia distalis farda hereditaria. Acta Med. Scand. 141 : (Suppl. 265) : 1, 1951.

2）三好和夫，多田嘉明，岩朝　勝，ほか：Distal myopathy の遺伝・臨床型．自験 7 家系 14 症例とわが国文献例についての成績．臨床神経学，14 : 963, 1974.

4）Takahashi, K., Oimomi, M., Shinko, T., et al. : Response of serum creatine phosphokinase to steroid hormone. Prednisolone test for muscle diseases. Arch. Neurol. 32 : 89, 1975.

5）Miller, R. G., Blank, N. K. & Layzer, R. B. : Sporadic distal myopathy with early adult onset. Ann. Neurol. 5 : 220, 1979.

6）Markesbery, W. R., Griggs, R. C. & Herr, B. : Distal myopathy : Electron microscopic and histochemical studies. Neurology 27 : 727, 1977.

7）Edström, L. : Histochemical and histopathological changes in skeletal muscle in late-onset hereditary distal myopathy (Welander). J. neurol. Sci. 26 : 147, 1975.

14）知覚障害を伴わない緩徐進行性遠位型筋萎縮症について ——神経原性病態を主とする5症例の検討を中心として

田辺　等[*,†]

研究協力者　松原四郎[*]　内潟雅信[*]　野沢胤美[*]

はじめに

神経筋疾患の病態解明上，一般に症状発現部位の特徴や進行度などは重要な要素となっている．慢性脊髄性筋萎縮あるいはKugelberg-Welander病（KW）で遠位部の筋萎縮のめだつ少数の報告例があり[1)2)3)4)]，一方Charcot-Marie-Tooth病（CMT）に知覚障害を欠き，末梢神経伝導速度（NCV）がほぼ正常な例が知られている[5)]．これらの例は知覚障害を伴わない緩徐進行性遠位型筋萎縮を呈する点で鑑別上問題となると共に，KWとCMTの二病態についても何らかの関係を知る手掛りともなりうるので，我々は実験例5例を報告した．

症　例　（表参照）

症例1　N.I.，43才，女性，無職．

主訴：四肢筋力低下．家族歴：特記事項なし．既往歴：24才時に肋骨カリエスに罹患．現病歴：26才頃より下肢がだるく，前に出にくく感じ，1年後に指の力が入りにくくなった．31才で階段で手摺り使用，35才で杖歩行，37才でいざりとなった．入院時現症：一般所見；体格中等，るいそうあり．脈拍72/分，整．血圧140/90mmHg．貧血や黄疸なく，胸腹部異常なし．神経学的所見；意識清明，知能正常，脳神経に異常なし．四肢，軀幹に筋萎縮があり（図1），四肢で近位より遠位に，上肢より下肢で障害が強い．翼状肩甲を認めた．

表　臨床的事項の要約

症　例	1	2	3	4	5
性	女	女	男	女	男
年　齢	43	22	26	28	29
発症年齢	26	21	25	25	10
家族歴	(−)	(−)	(+)	(+)	(+)
知能障害	(−)	軽度	(−)	(−)	軽度
CPK（Rosalki 変法）	70	155	209	106	265
神経伝導速度（m/sec）					
▶ motor（N.tibialis）（44−52）	80	40	52	50	46
▶ sensory（N.suralis）（53−63）	50	測定せず	66	52	55

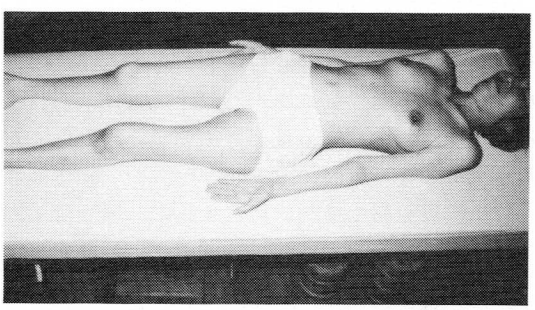


図1　症例1

＊虎の門病院神経内科
†冲中記念成人病研究所

線維束性攣縮なし．坐位保持に支持具を要し，寝返り不能．四肢の腱反射は総て消失し，病的反射はなかった．知覚障害や明瞭な失調は無し．検査成績：血算，血液生化学は血清CPK活性(Rosalki変法・正常18～86単位）を含めて正常・その他の血液，尿，糞の諸検査も正常であった．髄液は水様透明で，圧，細胞数，蛋白，糖は正常．心電図および頸椎レ線上著変を示さなかった．筋電図では安静時放電なく，随意収縮でunit数の減少があり，近位筋では筋原性の，遠位筋では神経原性の変化をそれぞれ示唆する所見を得た．NCVは上下肢で，運動性伝導速度（MCV）は正常，知覚性伝導速度（SCV）はやや遅延の傾向を示した．生検を左上腕二頭筋，左腓骨筋と左腓腹神経で行ったが，それらの所見は他の症例と一括して後述する．

症例2　M.I.，22才，女性，店員．

家族歴，既往歴に特記事項なし．約1年前よりつまずきやすく，時に下肢が痛んだ．6ヶ月前より階段で手摺り使用．入院時現症：四肢，特に手内筋と下腿筋に萎縮と筋力低下があり，爪先立ち不能で，動揺性歩行を示した．知覚障害なし．軽度の知能障害が疑がわれた．検査成績：血液ではCPKが軽度上昇を示した以外著変なし．筋電図は大臀筋と前脛骨筋で神経原性変化を示した．右脛骨神経のMCVはやや低下の傾向を示した，WAIS知能検査で言語性IQ68，動作性74，全検査で63と鈍であった．左腓腹筋と左上腕二頭筋で生検を行った．

症例3　M.S.，26才，男性，会社員．

家族歴：（図2）長兄が類似の疾患に罹患している．既往歴に特記事項なし．現病歴：約1年前から脚がはった感じで，左脚をひきずるようになり，また左下腿が細くなったことに気づいた．入院時現症：四肢特に遠位部の筋萎縮と筋力低下があり，上肢より下肢の障害が強かった．知覚障害なし．検査成績：血算，血液生化学的検査はCPKが軽度に増加を示す以外は正常範囲内．筋電図上，大多数の筋で神経原性変化を示したが，右手の第一背側骨間筋で筋原性変化を認めた．NCVは上下肢で運動，知覚とも正常．右前頸骨筋，左腓骨筋と左腓腹神経の生検を行った．6年後の現在まで，症状は緩徐進行性で，最近は杖歩行している．

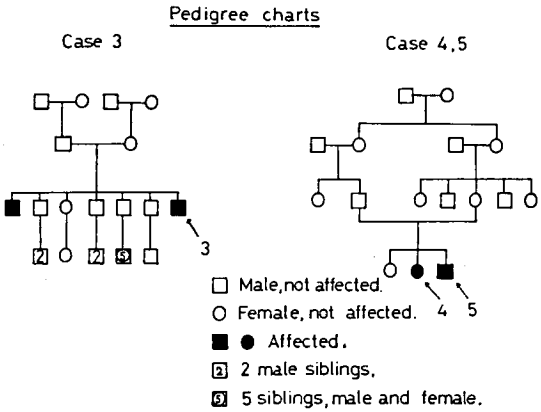


図2

症例4　Y.K.，28才(昭47年入院時)，女性，無職．

家族歴：（図2）両親はいとこどうしで，弟（症例5）は同病に罹患．既往歴：特記事項なし．現病歴：25才頃爪先立ち困難に気づき，27才よりつまずきやすくなった．その後歩行が徐々に遅く不安定になった．入院時現症：四肢遠位部に比較的限局した筋萎縮と筋力低下があり，症状は下肢に強い．腱反射はアキレス腱反射が消失している以外正常に保たれており，病的反射なし．知覚障害は認めなかった．検査成績：血清CPK活性が軽度に上昇している以外血液検査上異常なし．筋電図は上肢の一部の筋で筋原性変化がみられたが，前脛骨筋等の下肢筋では神経原性変化を示した．NCVは右腓腹神経のSCVが正常下限を示したが，その他の上下肢のMCV，SCVは正常であった．左大腿外側広筋，左腓骨筋と左腓腹神経を生検した．7年後の現在，患者は短下肢装具と杖を使用して歩いている．

症例5　R.H.，29才(昭54年入院時)，男性，会社員．

家族歴：症例4の弟．既往歴：特記事項なし．現病歴：子供の頃（10才頃）から転倒しやすく，体育は不得意だった．28才頃から歩行が遅くなり，周囲から歩き方が変だと指摘された．入院時現症：軽度の知能障害が推定された．筋萎縮の分布と腱反射は症例4と同様で，知覚障害なし．検査成

績：血算，血液生化学ではCPK活性が265単位（isoenzymeはMM 100%，MB，BBはみられなかった）と軽度増加を示した以外正常．筋電図は随意収縮でunit数の減少を示し，神経原性変化が腓骨筋などで，筋原性変化が腕橈骨筋で，両方の変化が前脛骨筋でみられた．NCVは上下肢で，運動性，知覚性ともに正常であった．WAIS知能検査では言語性73，動作性74で，全得点73と魯鈍であった．左前脛骨筋より生検した．

病理組織学的検索

方法　筋生検標本はParaffin切片と凍結切片を作製し，前者はHE染色，後者はHE染色に加えて，trichrome変法，PAS反応，DPNH-TR活性，phosporylase活性，LDH活性，succinic dehydrogenase活性，myosin ATPase活性（pH9.4）の組織化学的検索を行った．症例1，2，5で電顕的に観察した．神経生検材料はparaffin切片で，HE，髄鞘染色と塗銀染色を行った．症例1は電顕的にも観察した．

結果　5例の生検筋における変化はその程度に差異がみられたが，性質は互いに類似していた．全例で筋線維の横径は著しい大小不同を呈した（図3）．萎縮線維の一部は小角化線維で，小型から中型の規模の群集を形成するが，一方，一部の線維は円形化した輪郭を有していた．これらに伴いendomysiumの開大がみられ，間質に線維化と脂肪浸潤を認めたが，血管に著変をみなかった．個々の線維には，中心核の増加，空胞変性，split fibreが高頻度にみられた．trichrome染色で紫色に染るmyelin様物質が一般的にみられた．DPNH-TR活性像では萎縮線維内の濃縮現象があり，他の線維の一部で軽度のsubsarcolemmal hyperactivityがみられた．fibre typeについて特異的な変化はなかった．電顕では筋線維内の種々の変性所見が観察されたが，中でも空胞形成は高頻度かつ大規模で，しばしば内部にmyelin figureを含んでいた．mitochondriaの筋鞘下での集積が一般的にみられ，症例5の一部の筋線維内では長方形の結晶様封入体を含むものがあった．

末梢神経の変化の性質は生検を施行した3例で類似していたが，程度には大きな差があり，症例1では中等度，3と4では軽度だった．有髄線維の数は減少し（図4・左），間質は開大して線維化がみられたが，onion bulb formationはみられなかった．髄鞘は脱落と膨化を示し，症例1では明瞭なmyelin球が形成されていた．軸索には膨化，断裂，内部の空胞形成が種々の程度に認められた（図4・右）．

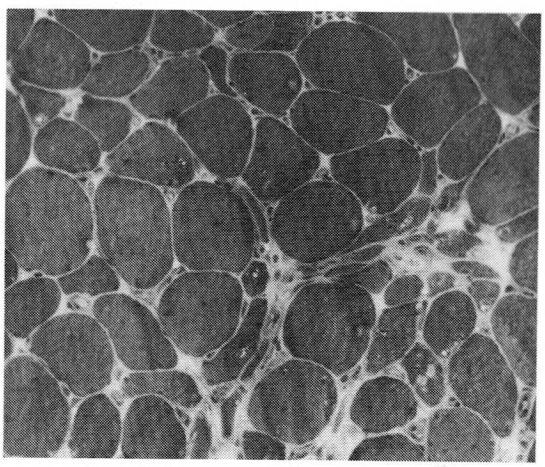


図3　症例4　左腓骨筋 trichrome 変法
撮影倍率　×200

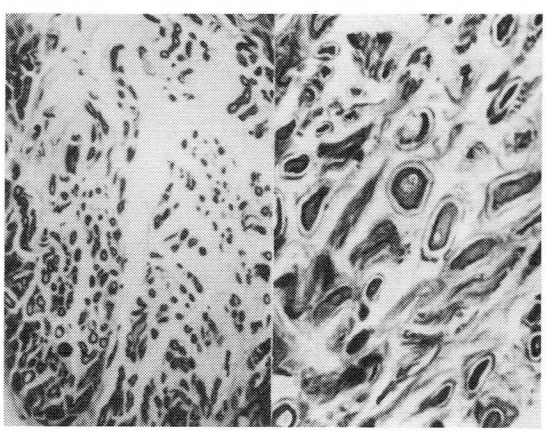


図4　症例1　左腓腹神経
左はKB標本（×100）右はBodian（×400）

考　　察

NCVが一部で軽度の遅延を示すことは本シリーズの症例が，CMTに近い病態を含んでいる可能性を示唆する．DyckとLambert[5]によるCMTの分類中，知覚障害のめだたない病型としては，neuronal typeと脊髄性進行性筋萎縮症のCMT typeの2つがあるが，前者は優性遺伝，後者は非家族性であり，この点発現形式から常染色体性劣性遺伝が最も考えられる本シリーズの症例と必ずしも一致しない．末梢神経の病理学的変化はCMTのみでなく，KWでも記載されている[1)6)]．本シリーズにおける各症例は，これらにみられた末梢神経伝導速度および病理学的変化をCMTとKWの中間的な所見と解釈すれば，或種の変性疾患のspectrumの一部，例えばCMTとKWの移行的な病態として把握されることも可能だと思われる．今後も同様の症例の検索を通じて，これらの病態が明らかにされることが望まれる．

ま と め

知覚障害を伴わない緩徐進行性遠位型筋萎縮で神経原性病態を主に示した5例（女3，男2；年令22～43才）を報告した．3例は家族性で，常染色体性劣性遺伝が示唆された．10～26才時に下肢より発症し，2例に軽度の知能障害を伴った．血清CPKは正常ないし軽度上昇，筋電図上は神経原性と筋原性の混在を示した．NCVは運動性，知覚性とも大多数の測定で正常であったが，一部に軽微な遅延を示した．筋生検で神経原性と筋原性の混在に加えて種々の特異な変性像を認めた．末梢神経の病理変化は症例によって程度に差があったが，軸索と髄鞘の両者の変化が観察された．CMTやKWと比較して若干の考察を加えた．

文　　献

1）Magee, K. R. : Familial progressive bulbar-spinal muscular atrophy. Neurology (Minneap.), 10 : 295, 1960.

2）Meadows, J. C. & Marsden, C. D. : A distal form of chronic spinal muscular atrophy. Neurology (Minneap.), 19 : 53, 1969.

3）Meadow, J. C., Marsden, C. D. & Harriman, D. G. F. : Chronic spinal muscular atrophy in adults. Part 2. Other forms. J. Neurol. Sci., 9 : 551, 1969.

4）塚越　廣：Kugelberg-Welander病．筋肉病学（豊倉康夫，里吉営二郎編），南江堂，東京，1973，p.643.

5）Dyck, P. J. & Lambert, E. H. : Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. Arch. Neurol., 18 : 619, 1968.

6）山本耕平，武上俊彦，伊藤不二夫，ほか：Kugelberg-Welander syndromeの2症例にみられた，いくつかの稀な徴候について．神経研究の進歩，19：172，1975.

15）筋萎縮症の症候発現部位特異性に関する検討
——一側下肢に限局する筋萎縮症９症例を中心として——

田　辺　　等[*,†]

研究協力者　内　潟　雅　信[*]　松　原　四　郎[*]
野　沢　胤　美[*]　塩　沢　瞭　一[*]

目　　的

筋ジストロフィー症を含む神経筋疾患の病態解釈上，症候発現部位特異性は１つの重要な要素である．その検討の一環として，筋萎縮の分布に注目し，表題の如き特異な症例群を経験したので報告する．このような検討は筋ジストロフィー症の病態を解明する上で貴重な示唆を与えるものと考えられる．

対象・方法

最近５年間に経験した一側下肢にほぼ限局して筋萎縮のみられた９例につき，臨床的検討ならびに患側下肢における生検筋の組織学的・組織化学的検索を行い，合わせて他疾患と対比した．

結　　果

臨床所見（表１）

年令は29才より60才(平均43才)，性別は男６例，女３例で男性にやや多い．患側については右４例，左５例でほとんど差がなく，また利き手（足）との関連もない．発病様式に関しては，歩行中の突然の脱力に始まる症例８を除く他の７例はいずれも潜行性に発症し，その症状は表１に示す通りである．以後の経過は前述の症例８のみが進行性で，他の８例については長くて４年間観察しているが，ほとんど変化がなく停止性と考えられる．症例８は例外的で初診１年後に他側下肢，次いで上肢の脱力が加わり，２年後には遂に車椅子生活を余儀なくされるに至った．筋萎縮・筋力低下は一側下肢のみで，図１に一部の症例を示したが，他例もほとんど同様であり，またその分布には一定の傾向がない．凹足は２例にみられた．深部反射については，患側下肢の PTR・ATR が７例で低下ないし消失し，残る２例は正常範囲にあった．一方，患側の上肢および他側の上下肢の深部反射にはいずれも著変を認めなかった．知覚については，１例（症例７）の患側下肢外側に軽度の異常知覚・知覚鈍麻を認めた以外異常なく，全体として知覚障害に乏しいといえる．特異な所見として，症例８で患側の膝窩動脈の閉塞が認められた．この原因として，動脈硬化性，Buerger 病などを疑い検討したが不明であった．なお遺伝性はなく全例孤発性と考えられ，またポリオの既往もない．

検査所見（表１）

患側下肢で行った筋電図については，症例９で軽度筋原性パターンを示す以外他の８例は全て神経原性変化で，かつそのうち４例では他側下肢にも同様な傾向を示した．つまり，臨床的には一側性と考えられるも，筋電図上一部に両側性障害を示す例の存在することが指摘される．この神経原性所見は，放電数減少，多相性電位，持続時間の延長および高振巾電位よりなり，その程度は症例によって種々である．末梢神経伝導速度（患側下肢）は７例に行われた．脛骨神経の MCV が２例で明らかに低下し，別の２例は正常下限にあり，そのうち１例で腓骨神経の活動電位を得ることができなかった．血清 CPK 値は５例で明らかな高

＊虎の門病院神経内科
†冲中記念成人病研究所

表1　臨床所見のまとめ

症例	年・性	患側	患側下肢				筋電図	伝導速度 m/sec		血清CPK活性 (Rosalki変法)	髄液		ミエログラフィー
			初発症状	筋萎縮・筋力低下	PTR・ATR	知覚障害	(下肢)	脛骨神経	腓腹神経		細胞数	蛋白 mg/dl	
1	38男	左	下腿のやせ	下肢全体	正　低下	−	神経原性	48.7		104	3/3	34	OPLL (L_{1-2})
2	29男	左	跛行	下腿に強い	低下　消失	−	神経原性	51	48	107	1/3	84	正
3	60女	右	垂足	下肢全体	低下　正	−	神経原性（両側）	42		118	4/3	86	L_{4-5} 稍狭少
4	33男	左	下肢のやせ	下腿	正　正	−	神経原性（両側）	39	46	81	4/3	37	
5	56男	左	跛行	下肢全体	低下　低下	−	神経原性	44	導出不能	90	2/3	24	正
6	36男	右	脱力	下肢全体	正　消失	−	神経原性（両側）			496	1/3	38	正
7	36男	右	下肢外側しびれ	下腿	低下　消失	（下肢外＋側知覚低下）	神経原性	45		87	29/3	43	正
8	49女	右	脱力	下肢全体	低下　低下	−	神経原性（両側）	37		176	12/3	68	正
9	50女	左	下肢のやせ	下腿に強い	正　正	−	筋原性			42	5/3	77	

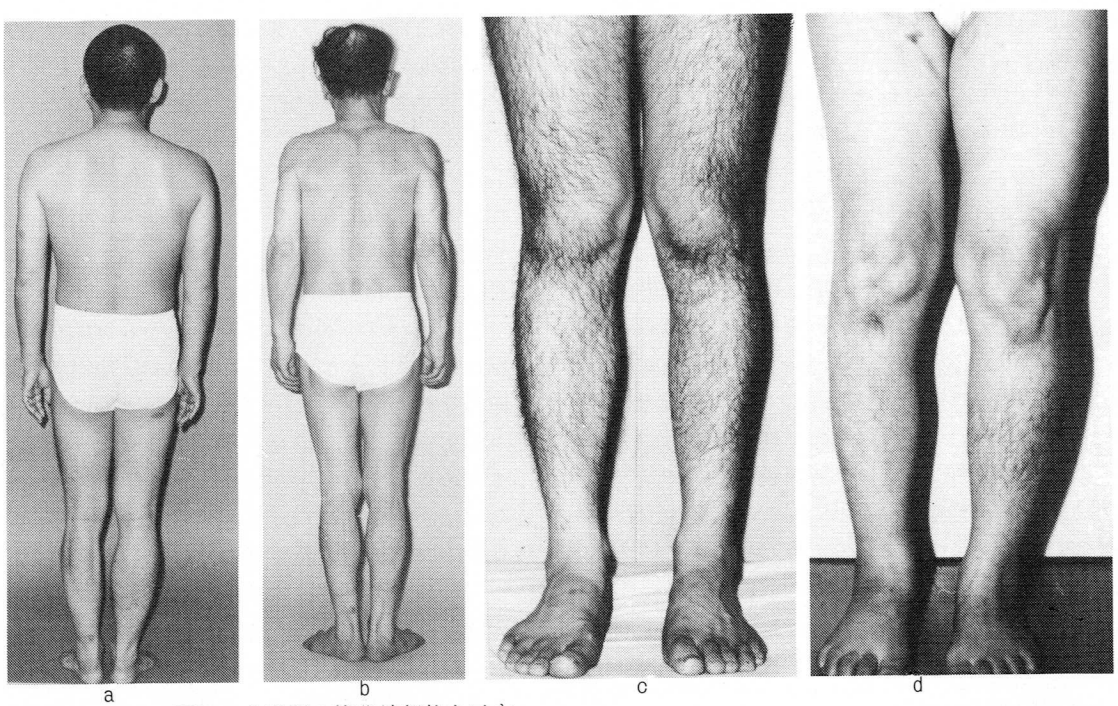


図1　各症例の筋萎縮部位を示す
a：症例1（左），b：症例5（左），c：症例2（左），d：症例8（右）．

値を示したが，その多くは軽度である．髄液所見では軽度の細胞増多1例，蛋白増加4例を示した．ミエログラフィーを含むレ線学的検索では，2例に表1の如く軽い異常を認めたが，程度は軽く，また障害レベルに一致しない．なお，血液，尿その他の一般検査には特記すべき異常は認められなかった．

筋生検所見

筋病変から9例を便宜上3群，すなわち，神経原性変化を主とする症例1～7，神経原性変化＋筋炎像を示す症例8，および type II atrophy を示す症例9に区分した．

まず，症例1～7については，ほぼ共通した所見として，大小の群集萎縮（図2a，b，症例2，3，4，6，8），小角化線維の散在（図2a，症例1，2，3，5，6，7，8）などが認められた．一部には，非萎縮線維間に点々と散在もしくは群集して存在する極度の萎縮線維（図2a，症例2，

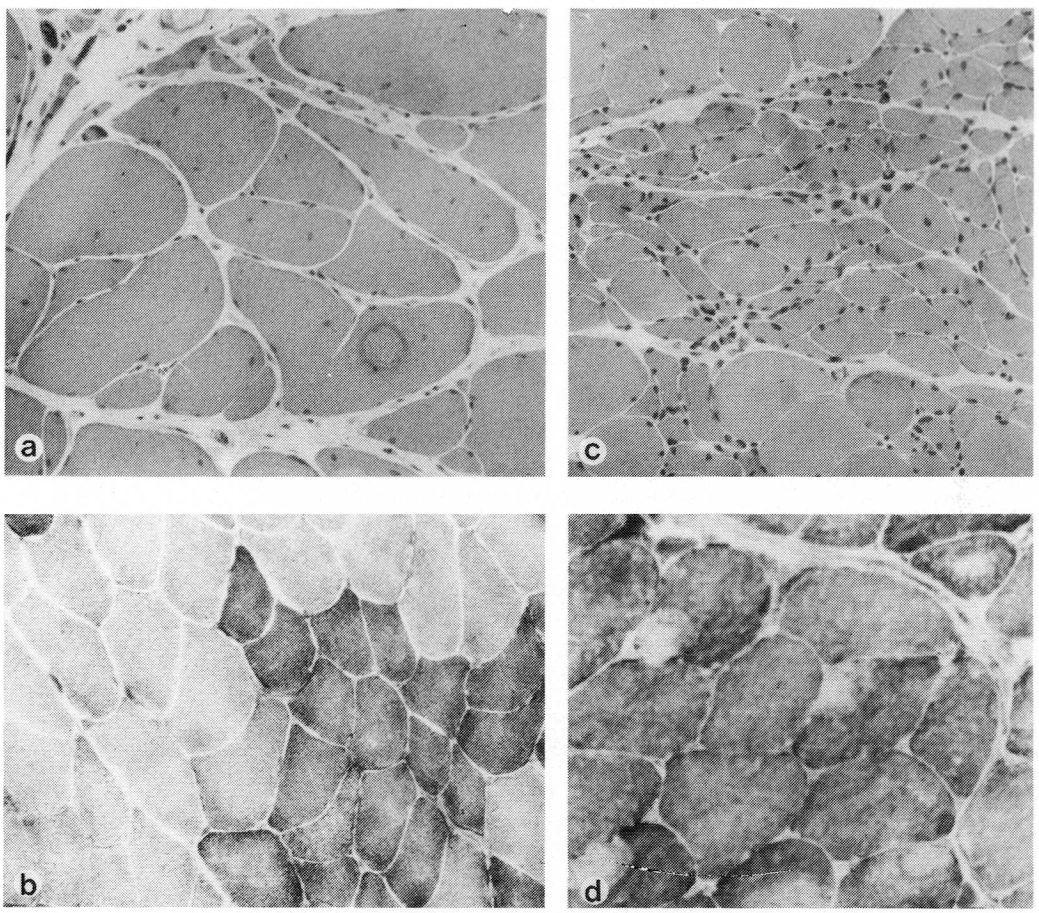


図2　神経原性変化主体（症例1～7）の腓骨筋生検像

a（症例2）：群集萎縮，小角化線維の散在，非萎縮線維の肥大・splitting，中心核および非萎縮線維間に点在する極度の萎縮線維（一部群集）を示す．（HE ×100）

b（症例3）：大小の群集萎縮を示す．非萎縮線維の一部は横断面円形化し肥大傾向にある．（HE ×100）

c（症例1）：DPNH-TR 活性像で fiber type grouping を示す．（×200）

d（症例3）：DPNH-TR 活性像で targetoid fiber を示す．なお fiber type 分別は不良．（×200）

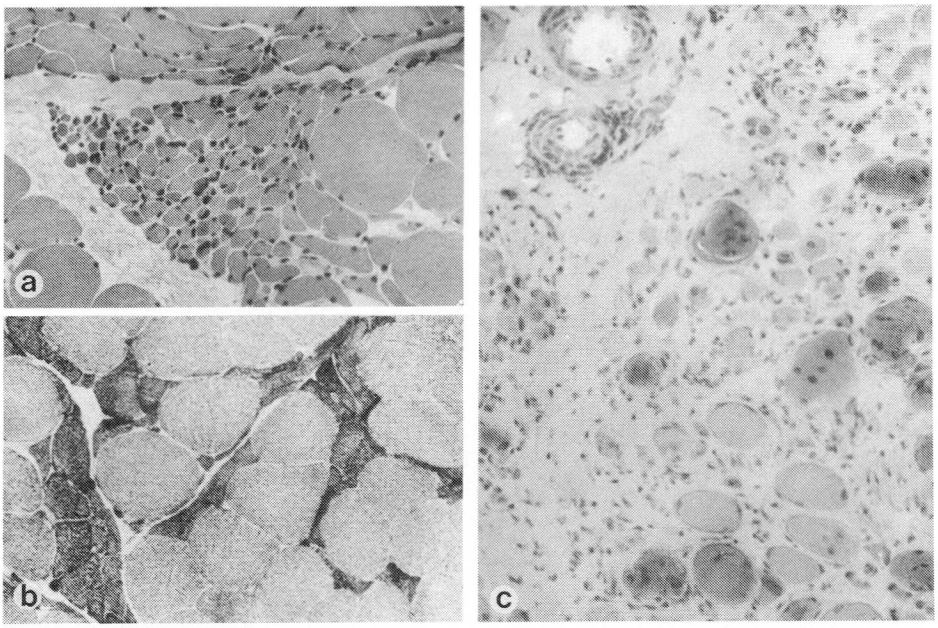


図3　症例8の筋生検像（a，bは大腿四頭筋，cは腓腹筋）
a：著明な大群集萎縮を示す．　（HE ×100）
b：DPNH-TR 活性像で type Ⅰ atrophy（一部群集）を示す．　（×100）
c：筋線維の変性・壊死，間質の線維化，血管壁の肥厚，血管周囲の円形細胞浸潤などが認められる．（HE ×200）

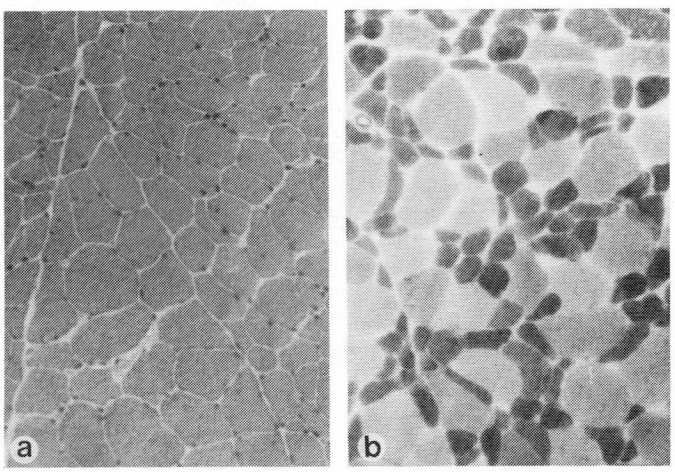


図4　症例9の腓骨筋生検像
a：筋線維の著明な大小不同を示す．　（HE ×100）
b：type Ⅱ atrophy を示す．　（myosin ATPase 染色 ×100）

5）も観察された．その他，中心核（図2a，症例1，2，6），肥大線維（図2a, b，症例1，2，3，6，9），横断面の円形化した線維（図2b，症例1，2，3，6，8），筋線維のsplitting（図2a，症例2）などの所見が症例によっては明瞭に認められた．これらは上述の神経原性所見に混在した筋原性所見である．組織化学検索では，種々の変化を示し，例えばtargetoid fiber（図2d，症例3，6），fiber type grouping（図2c，症例1，2，4，5，8）などであり，いずれも神経原性所見とみなされる．

症例8では，先に述べた動脈の閉塞部位の近位筋（大腿四頭筋）は症例1～7とほぼ同様な所見（図3a，b）を示すのに対し，その遠位筋（腓腹筋）はこれとは全く異なり，筋線維の変性・壊死，間質の線維化，血管の肥厚およびその周囲の円形細胞浸潤など筋炎に一致する像（図3c）を呈した．

症例9は，HE染色で筋線維の著明な大小不同（図4a）を示したが，組織化学的検索から，この所見はtype II atrophy（図4b）によるものと判断された．なお，炎症および神経原性変化を示唆する所見は認められなかった．

考　　案

以上呈示した9症例のうち，最初の症例1～7は臨床的にもかなり共通しており，次のようにその特徴を述べることができる．すなわち，成人に発症し，緩徐進行性ないしは非進行性の経過を示す，一側下肢に限局した神経原性筋萎縮症の孤発例群である．なお，臨床的には一側性であるが，筋電図検査から両側性障害を示す例も一部にみられた．筋病変は神経原性変化を示したが，そのうち大群集萎縮あるいは極度の萎縮線維の散在（一部群集）などの所見は特異であり，先に著者の1人が報告[1]した如く，これらの所見は前根を中心とした神経病変（radiculopathy）を示唆するものと考えられる．

さて，この7例の神経筋疾患における位置づけおよび既知疾患との鑑別について考察すると，まず脊椎を中心とした整形外科的疾患は，臨床症状，筋病変およびレ線学的検査などから除外することができる．筋萎縮性側索硬化症，脊髄性進行性筋萎縮症などの運動ニューロン疾患については，臨床経過，病変分布，筋病変よりこれも鑑別可能である．運動ニューロン疾患のなかでも特殊な例として著しい非対称性を示す例の報告[2]があるが，この場合下肢のみならず同側上肢にも病変が及んでおり著者らの症例とは異なるようである．また，ポリオに関連した運動ニューロン疾患類似の病態に関しては，ポリオの既往のないことだけでは完全に否定し得ないにしても，臨床症状，経過などよりほぼ鑑別されると考えられる．Kugelberg-Welander病については，一側下肢にこれほど特異な分布を示す例の報告は著者らの調べ得た限りみられない．しかし臨床経過および筋病変（筋原性所見の混在など）は本症例群と共通するところがある．Charcot-Marie-Tooth病については，発病初期の一時期，一側下肢のみに留まることも稀ならずあるという記載[3]もあるが，引用文献がなく詳細は不明である．その他，文献的には著者らの症例に類似したものとして安藤らの報告[4]がある．彼らはその報告で血管運動神経障害の徴候(皮フ温低下など）を特徴の1つにあげCharcot-Marie-Tooth病との関連を論じているが，我々のシリーズではこれらの症状はみられなかった．しかし，その他の点では極めてよく類似している．以上の如く，この7例は既知疾患とは病像のかなり異なる特異な症例群であり，独立した疾患の可能性もあるが，それについては今後なお症例を蓄積し検討しなければならない．なお，上肢，下肢の違いはあるが，平山の“若年性，非進行性の手・前腕に限局する筋萎縮症[5]”の病像とは共通するところが多く興味深い．

次に，症例8は種々の点で先の7例とは異なっている．例えば，経過は明らかに進行性で，かつ神経原性とは別の筋病変（筋炎像）を示した点などである．しかし，動脈閉塞の近位で再検した筋生検所見はこれら（症例1～7）と非常によく類似しており，上述の筋炎病態の共存はこの血管病変に関連したものとみなす事も可能である．従って，進行性の経過を示したことについては，血管病変に関連した病態が更に加わったためと解され

得るが，それとは別に本質的に症例1～7とは異なる進行性の神経原性筋萎縮症である可能性も残されている．

第3の症例9については，臨床像が前述の7例に類似するにも拘わらず筋電図はこれらとは異なる筋原性所見を示した．この筋原性変化の病因として，既往に慢性関節リウマチを有し，筋生検上 type II atrophy を示したことから慢性多発性筋炎の可能性をあげることもできよう．

結　　語

以上，9例は必ずしも同一病態とはいえないが，既知疾患との鑑別は困難であり，特異な筋萎縮分布を示す示唆に富む症例群として提示した．

文　　献

1）田辺等，野沢胤美，内潟雅信，塩沢瞭一，原満：諸種神経筋疾患の筋病変における fiber type 異常と motor unit 内局在病態との関連について．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー病の病因に関する臨床的研究，第二班(三好班)昭和53年度研究報告書，p.102，1979.

2）古川哲雄，井原康夫，高須健次，豊倉康夫：著しい非対称性を示し，経過の緩徐な非定型的運動ニューロン疾患．神経内科，1：555,1974.

3）De. Recondo, J. : Hereditary neurogenic muscular atrophies (Charcot-Marie-Tooth disease). In Handbook of clinical neurology (edited by Vinken, P. J. & Bruyn, G. W.), North-Holland, Amsterdam, 1975, Vol.21, p. 271.

4）安藤一也，飯田光男，高城晋，渡辺英夫，祖父江逸郎：主として若年者にみられる手袋状及び長靴下状の筋萎縮症．日本医事新報，No.1981, p.21，1962.

5）平山恵造：若年性，非進行性の手・前腕に限局する筋萎縮症—38症例の観察—．臨床神経学，12：313，1972.

16）脊椎運動制限，Type I 筋線維萎縮中心核を呈する先天性ミオパチー

豊倉康夫*

研究協力者　北村久美子*　高津成美*　栗崎博司*
清水輝夫*　杉田秀夫*

Rigid spine syndrome は，脊椎前屈制限を伴ったミオパチーとして，Dubowitz[1)~4)]が報告したが，我々は脊椎運動制限を呈し，本疾患と思われる症例を経験した．しかも本症例は，筋生検上，中心核を伴った Type I 筋線維萎縮を示したので，本疾患と Type I 筋線維萎縮について，検討を加えた．

症例　24歳，女性．

主訴：歩行障害，脊椎運動制限．

家族歴：神経筋疾患なし．

現病歴：出産および処女歩行等の乳児期の発育は正常．幼児期に，歩行が不安定で，よく転倒した．その後歩行は安定したが，7歳頃から，やせが目立ちはじめ，又走るのがきわめて遅くなった．学業成績は普通．14歳頃，全身倦怠感，易疲労感，筋痛出現し，階段の昇降が困難となる．16歳頃，動揺性歩行，頸部前屈筋力の低下がみられ，脊椎前屈制限を指摘された．17歳頃，登攀性起立出現し，CPK の軽度上昇を認めた．20歳頃，爪先立ち不能となり，CPK の高値を呈したが，ステロイド治療は無効であった．

入院時現症：一般内科的には特に異常を認めず，神経学的には，知能は正常で，上肢帯筋を主とする上肢近位筋，及び骨盤帯筋をはじめとする下肢全体の，軽度から中等度の萎縮を認めた．筋力は，頸部前屈筋群，胸鎖乳突筋，上肢近位筋，特に三角筋の軽度筋力低下，又下肢近位筋，特に大臀筋，大腿屈筋の中等度筋力低下を認め，Gowers' sign が陽性であった．外眼筋，顔面筋，球筋は異常がなく，又 fasciculation, myotonia も認められず，腱反射はすべて著明に低下していた．脊椎については，生理的彎曲の消失，軽度の側彎を示し，高度の前屈制限，中等度の側屈制限を認めた．後屈制限はない．又他の関節の運動制限は認められなかった．

検査所見：血清 CPK は 1048 IU/L（正常値24—140）と高値だが，CRP，RA 等は陰性であった．糖負荷試験，筋阻血試験，内分泌学的諸検査はすべて正常であった．骨 X 線では，先に述べた脊椎の彎曲異常の他に異常を認めず，髄液所見は正常であった．筋電図では，全体に low amplitude, short duration, polyphasic NMU を認めた．大腿四頭筋の筋生検では，HE 染色（図1）で，小径化した筋線維が目立ち，その多くは中心核を呈していたが，myotube 様構造は認められなかった．Gomori-Trichrome 染色で，opaque 様 fiber が散在性に認められたが，間質の増生はみられず，nemaline rod もみられなかった．ATP ase 染色では，Type I 筋線維萎縮が見られた（図2）．筋線維直径のヒストグラムでは，Type II B はほぼ正常範囲にあるが，Type I は II B に比べ小径化が著明であった．Type II A は軽度肥大傾向を示した．Type I 筋線維は全体の32%，Type II A，II B はそれぞれ31%，37%で比率はほぼ正常であった（図3）．尚，筋線維の壊死，細胞浸潤等はみられず，Oil-red O，PAS 染色で，沈着物質は認められなかった．電顕的には，筋原線維の変性が，萎縮線維に少数みられたが，glycogen, lipid の増加は特にみられなかった．

* 東京大学医学部脳研神経内科

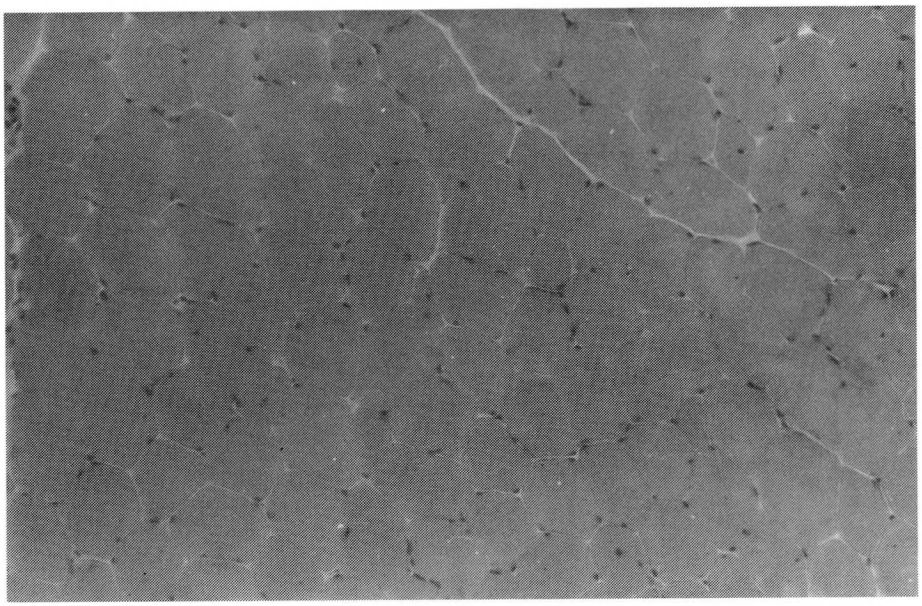


図1　大腿四頭筋生検所見　HE 染色×100
小径化した筋線維が目立ち，さらにその多くは中心核を呈している．

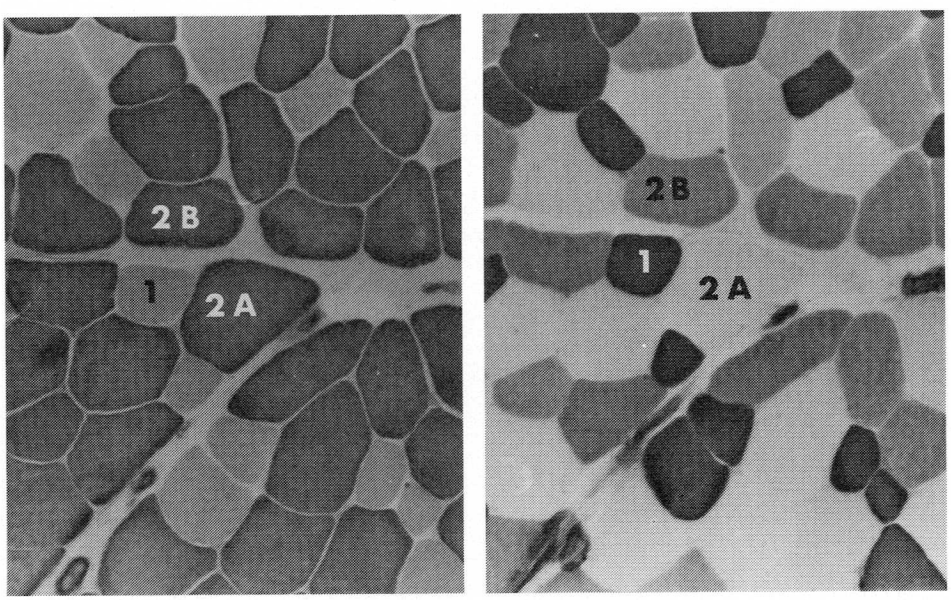
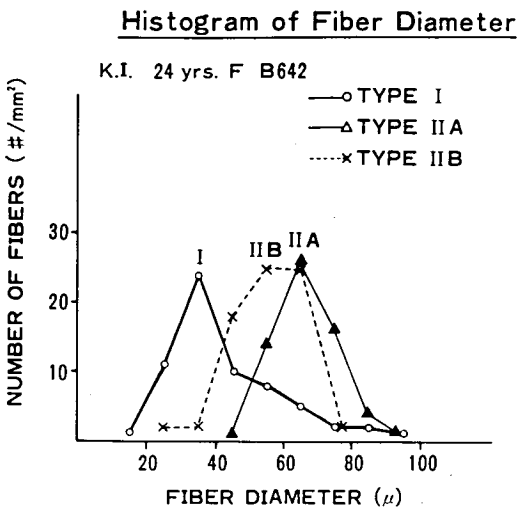


図2　大腿四頭筋生検所見　ATPase 染色×100
左 pH 9.4，右 pH 4.6
Type Ⅰ 筋線維の萎縮が認められる．



	I	IIA	IIB
Fiber Proportion (%)	32	31	37
Mean Diameter (μ)	43.1	66.8	55.1
Variability Coefficient	389↑	145	186
Atrophic Factor	203↑	0	27
Hypertrophic Factor	141	435↑	27

図3 Histogram of fiber sizes in a muscle biopsy (Quadriceps femoris muscle) Type II B fiber の径はほぼ正常範囲であるが，Type I fiber の著明な小径化，Type II A fiber の軽度肥大傾向を示す．比率はほぼ正常である．

考　　察

Type I 筋線維萎縮は，一部の筋疾患，膠原病，筋拘縮，神経疾患等に認められる（表1）.しかし，本例においては，myotonia もなく，筋生検にて nemaline body, myotube 様所見もない.脊椎前屈制限を示す本例の特徴的な臨床像からは，congenital fiber type disproportion あるいは type 1 fiber hypotrophy with central nuclei も考えにくく，又膠原病を思わす所見もなく，筋拘縮もない．従って，我々は rigid spine syndrome に伴った Type I 筋線維萎縮を考えた．

Dubowitz が，脊椎運動制限，側彎，肘関節拘縮等を伴う，比較的進行の遅い myopathy を rigid spine syndrome として報告して以来，これまで8例の報告がある[1)~7)](表2)．本例も，関節拘縮を除き，臨床的にきわめてよく似ている.さらに，これらの報告の中で，組織化学的記載のあるのは3例で[5)~7)],そのうち Seay ら[5)]，及び Goebel ら[6)]の報告した2例が，本例と同様の Type I 筋線維萎縮を示している．このことから，本疾患と,Type I 筋線維萎縮との関連が示唆され，きわめて興味深いと考える．

表1

Differential Diagnosis of Type I Fiber Hypotrophy

1. Myotonic dystrophy
2. Nemaline myopathy
3. Myotubular myopathy
4. Type I fiber hypotrophy with central nuclei
5. Congenital fiber type disproportion
6. Rigid spine syndrome
7. Polymyositis
8. Rheumatoid arthritis
9. Prolonged immobilization due to contracture
10. Glycogen or lipid storage disease
11. Cerebellar disease, Werdnig-Hoffmann disease etc.

表2

〔Rigid Spine Syndromeの報告例〕

Author	Age	Sex	
Dubowitz (1969)	20y	M	Rigid Spine Syndrome
	8y	M	同　上
	10y	M	同　上
Seay et al (1977)	18y	M	Rigid Spine Syndrome A type I fiber myopathy
Goebel et al (1977)	16y	M	Fiber type disproportion in the rigid spine syndrome
Dubowitz (1978)	15y	M	Rigid Spine Syndrome
	?	F	同　上
Goto et al (1979)	16y	M	同　上

結　　論

我々は，臨床的に，脊椎前屈制限，近位筋優位の筋萎縮，筋力低下，CPK 高値を呈し，筋生検上，中心核を伴った Type I 筋線維萎縮を示す，rigid spine syndrome と考えられる症例を経験した．さらに，本疾患の報告例8例中，組織化学的記載のある3例のうち2例に本例と同様の Type I 筋線維萎縮がみとめられることから，本疾患と Type I 筋線維萎縮との関連が示唆されると思われる．

文　献

1) Dubowitz V: Some unusual neuromuscular disorders, in Walton JN, Canal N, Scarlato G (ed) : Muscle Diseases. Proceedings of an International Congress (May 19—21, 1969, Milan) International Congress Series No.199, Amsterdam, Excerpta Medica, 1970, pp.233—238.

2) Dubowitz V : Recent advances in neuromuscular disorders. Rheumatol Phys Med 11 : 126—330, 1971.

3) Dubowitz V, Brooke MH : Rigid spine syndrome, in Muscle Biopsy : A Modern Approach. London, WB Saunders Co, 1973. pp.368—371.

4) Dubowitz V : Rigid Spine Syndrome . Major Problems in Clinical Pediatrics, 1978, vol. 16, pp.239—243.

5) Seay AR, Ziter FA, Petajan JH : Rigid spine Syndrome. A Type 1 Fiber Myopathy. Arch Neurol, 34 : 119—122, 1977.

6) Goebel HH, Lenard HG, Görke W et al : Fiber type disproportion in the rigid spine syndrome. Neuropädiatrie, 8 : 467—476, 1977.

7) Goto I, Nagasaka S, Nagara H, Kuroiwa Y : Rigid spine syndrome . J Neurol Neurosurg Psychiatry 42 : 276—279, 1979.

17) Ragged red fiber と vacuolar change を認めた distal myopathy の1孤発例

中西孝雄*

研究協力者　尾崎行雄*　金澤一郎*
出水干二*　吉田紀明*

はじめに

末梢型の筋原性筋萎縮症は distal myopathy と総括されており，家系例については，すでにいくつかのまとまった報告がある．欧米では Welander (1951)の例に代表される常染色体優性遺伝を示すものが1つの clinical entity としてあげられているが，本邦では三好ら (1974) が常染色体劣性遺伝型式を示し，従来の欧米例と異なる病型を報告している．

今回，我々は，下肢遠位部の筋力低下・筋萎縮を呈し筋生検にて空胞変性と ragged red fiber とを認めた distal myopathy の1孤発例を経験したが，家系例に比して孤発例の報告は数が少なく，さらに組織学的に空胞変性と ragged red fiber を有する症例は稀であるので，ここに報告する．

症　例

患者：36才，男性．自動車販売．

家族歴：血族結婚(－)．家系内発症(－)．

既往歴：昭和45年から約6年間，亜鉛・クロムなどの重金属を扱う仕事に従事していた．アルコール少量．糖尿病(－)．

現病歴：昭和51年11月(33才)，検診で CPK 高値を指摘され，この頃より徐々に四肢の筋力低下を自覚しはじめた．筋力低下は歩行時の脱力感が主体であり，下肢に初発したものと思われた．昭和52年1月，フォークリフトに接触転倒し，骨盤骨折にて約6ヵ月入院した．以来，リハビリによる訓練にもかかわらず，下肢の脱力が進行してきたため，昭和53年10月，精査・治療のため入院した．

入院時現症：一般身体所見には特記すべきものはなかった．神経学的には，意識清明，大脳高次機能正常，眼瞼下垂・眼球運動障害なく，視力・視野・眼底ともに正常だった．顔面筋や胸鎖乳突筋の萎縮はなく，嚥下障害・舌萎縮もなかった．筋力低下が，上肢では上腕二頭筋・上腕三頭筋にごく軽度みられ，下肢では遠位筋群に強く認められた．筋萎縮は上肢にはほとんどなく，下肢で遠位部優位に中等度みられた．線維束攣縮・感覚障害なく，深部反射は四肢でほとんど消失していた．錐体路障害・小脳症状・膀胱直腸障害は認めなかった．

入院時検査成績：血算・生化・血清・血糖・検尿・検便・胸部X線・心電図などの一般検査には異常なし．甲状腺機能・尿中17 OHCS・17 KS 正常．抗核抗体・抗 DNA 抗体陰性・血中の鉛・亜鉛定量正常．クロム・銅・ニッケル・水銀・砒素・コバルトを用いた patch test による皮膚反応は全て陰性．CPK 207.7 U (正常0～90 U)．尿中クレアチン 334 mg/日．脳脊髄液；初圧125 mm H_2O，採液6 ml 后，終圧100 mm H_2O．Queckenstedt 現象陰性．水様透明で蛋白60 mg/dl，糖48 mg/dl，細胞数7/3/mm^3単核球のみ．筋電図；上肢では正常，下肢では前脛骨筋・腓腹筋に著明な筋原性変化．末梢神経伝導速度は，MCV；尺骨神経59.4 m/sec，腓骨神経42.5 m/sec．SCV；腓腹神経46.8 m/sec．

左腓腹筋で施行した筋生検では，HE 染色で著明な筋線維の大小不同・中心核が見られ，fiber

*筑波大学臨床医学系神経内科

splitting, phagocytosis, necrotic fiber などのほか結合織の増生も見られたが，炎症所見は認められなかった．これらの中に空胞を有する小径線維が散在性あるいは小群をなして存在し，空胞周囲に basophilic granule の集合が認められた．これを Gomori-Trichrome 染色で見ると，赤紫色の顆粒ないし糸屑様に見えるところから，これらの線維はいわゆる ragged red fiber の範疇に入るものと考えられた．NADH-TR 染色像では，これらの異常線維は全体に濃染し，空胞の部分に酵素活性は認められなかった．ATPase 染色でも同様の空胞として認められたが，これらは type I, type II の両者に見られ，わずかに type I fiber に多かった．PAS 染色は陰性であった．電顕では筋原線維内に filamentous な構造物は見られず，ミトコンドリアの形態ならびに量的な異常はなかったが，空胞内には，いわゆる myeloid body と呼ばれる膜様構造物が見られた．glycogen 顆粒の集積はなかった．

考　　察

本症例を特徴づける所見をまとめてみると，1）33才頃，下肢の脱力で発症．2）緩徐な進行．3）上肢にほとんど障害なく，下肢遠位部の筋力低下・筋萎縮が主体．4）CPK 高値．5）筋電図で筋原性変化．6）筋生検上，著明な筋原性変化に加えて空胞変性を有するいわゆる ragged red fiber を多数認め，電顕で空胞内に myeloid body がみられる．7）孤発例．が，あげられる．すなわち本症例は，若年発症で進行が緩徐な下肢遠位部優位の myopathy である．

遠位部優位の myopathy としては myotonic dystrophy・distal type の polymyositis・distal myopathy があげられるが，myotonia を欠く点で myotonic dystrophy は否定される．また血沈亢進がなく，嚥下障害や顔面・頸部・近位筋の障害を伴わず，組織学的に炎症所見を欠くなど，いわゆる distal type の polymyositis とも異なっている．さらに眼瞼下垂・眼筋麻痺などもみられず，Kearns-Shy 症候群とも臨床像を異にしている．最終的には，distal myopathy の範疇に入るものと考えた．

distal myopathy の家系例は，1951年 Welander[1] が72家系249例の詳細な報告を行って以来，常染色体優性遺伝を示す1群としてとらえられているが，本邦ではこれに対して三好ら（1974, 1977[2]）が常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症なる新しい病型を提唱した．Welander の例が常染色体優性遺伝をとり，主な筋萎縮が手にあり，その小手筋に初発し，発病年令が40～60才と高令であるのに対し，三好らの例では，遺伝型式が常染色体劣性で，筋萎縮が下肢末梢に始まり下腿に強い点で異なり，多くは10代後半～20才代と若年発症であり CPK 上昇例が多い．三好らの示した病型は，従来の欧米例にはない本邦独特の臨床病型であると考えられている．

孤発例の報告（表1，表2）は欧米では25例みられ，発病年令は3～59才で20才台発症例が多い．初発症状の部位は下肢に始まるものが若干多いが Gowers, Naville, Moya の例では，顔面筋・舌の萎縮，胸鎖乳突筋欠損を伴っている．また Miller[3] の例は，若年発症で下肢脱力で始まり CPK の著明な上昇を伴っており，孤発例であることを除けば，三好らの報告した症例と臨床像がきわめて類似している．

本邦における孤発例の報告は自験例を含めて19例（男13例女6例）で発病年令は15～45才で20才代に多く，下肢に初発するものが圧倒的に多い．CPK 値は正常2例のほかは全て軽度～中等度の上昇を示している．胸鎖乳突筋欠損が黒岩ら，鬼頭らの例にみられるほか，眼瞼下垂を伴うものが佐々木らの1例，森脇ら，角田らの例にみられる．

空胞変性は，Moya の1例，Miller の1例，室根ら[4]，佐々木らの2例，三好ら[5]，水沢らの2例，そして自験例にみられ，本邦家系例の報告でも鹿井ら（1971），森ら（1972），出田ら（1973）の1例，山口ら（1974）に記載がある．ragged red fiber の記載は我々の調べえた限り，1例もみられなかった．

空胞変性は，周期性四肢麻痺，SLE，クロロキン・ビンクリスチンなどによる toxic myopathy, steroid myopathy, glycogen storage disease

表 I　distal myopathy 孤発例（欧米例）

報　告　者		症　例	発病年齢	初発部位	空胞変性	備　考
Gowers	(1902)	男	12歳	足→手	?	顔面・舌の筋萎縮 胸鎖乳突筋欠損
Spiller	(1907)		24歳	下　肢	?	
Batten	(1910)		3歳	下肢→手	?	麻疹后発病
Naville	(1923)	6例 男1　女5	男＜30歳 女＞40歳	下肢　前腕	?	顔面・舌の筋萎縮 胸鎖乳突筋欠損
Walton	(1954)	男　2例	21，23歳	足	?	近位筋罹患
Moya	(1960)	男	22歳	下　肢	(+)	顔面・舌・頸部の筋萎縮
		女	50歳	手	(−)	近位筋罹患
Dahlgaard	(1960)	女	57歳	手　指	(−)	
Barrows	(1962)	男	59歳	足	(−)	
Huhn	(1966)	3例 男　女	19〜46歳	手　指	(−)	
Hallen	(1966)	男	22歳	手	(−)	
Ceroni	(1966)	女	17歳	?	?	
Markesbery	(1977)	2例	19，20歳	下　肢		CPK 高値
Miller	(1979)	3例 男	26, 29, 33歳	下　肢	1例(+)	CPK 高値

などの疾患でもみられることが知られているが，本症例ではこれらの原因疾患は考えられない．Denny-Brown (1960) の提唱した vacuolar myopathy は多発性筋炎の1型と考えられており予后不良の進行性疾患で，本症例とは異なる形であると思われる．また，Carpenters (1970) の示した著明な空胞化と燐脂質の沈着，筋原線維内の virus-like filaments を認めた例も，臨床像は本症例に類似しているが cytoplasmic inclusion がみられない点で否定的である．本症例の電顕でみられた myeloid body は一般にミトコンドリアの破壊産物，小胞体よりの産生，secondary lysosome など，さまざまな解釈があるが，いずれにしても非特異的変化と考えられている．

表2　distal myopathy 孤発例（本邦例）

報　告　者	症　例	発病年齢	初発部位	空胞変性	備　考
室　根　(1963)	男	20歳	下肢→手	(+)	CPK 正常
黒　岩　(1963)	男	21歳	足	(−)	胸鎖乳突筋欠損
平　山　(1968)	男	15歳	上下肢	(−)	近位筋罹患
友　松　(1969)	男	38歳	下肢→手	(−)	CPK 正常
土　屋　(1969)	男	20代後半	足→手	(−)	
佐々木　(1969)	男3例	35歳	手・足	(−)	
		26歳	下　肢	(++)	
		45歳		(+)	眼瞼下垂・嚥下障害 顔面筋力↓　MCV↓
村　井　(1970)	男	32歳	下　肢	(−)	
三　好　(1970)	女	27歳	下肢→手	(++)	Rod like body (+)
鬼　頭　(1972)	男	21歳	下　肢	(−)	胸鎖乳突筋欠損
村　上　(1975)	女	19歳	下　肢	(−)	下肢仮性肥大
小　田　(1976)	男	16歳	足	(−)	
森　脇　(1977)	女	30歳	眼瞼下垂	(−)	眼瞼下垂・顔面筋力↓
皆　内　(1977)	男	30歳	足	(−)	心拡大
水　沢　(1978)	女2例	26，26歳	下　肢	(++)	
角　田　(1979)	女	21歳	上下肢	(−)	眼瞼下垂
自験例　(1979)	男	33歳	下　肢	(+)	ragged red fiber ⊕

ragged red fiber は，元来 Kearns-Shy 症候群にみられる異常な筋線維をさすもので，ミトコンドリアの形態・数の異常によって生ずると考えられていたが，最近ではこのほかに，筋線維内の脂肪の増加，筋小胞体の異常などでも生じうるとされており，非特異的変化であると考えられている．

以上のように本症例で認めた ragged red fiber，空胞変性はともに疾患特異性に乏しいと言わざるを得ない現状ではあるが，これらの変化が distal myopathy の症例に共存していた点はきわめて稀であり，本症例の特徴と考えられる．両者の共存の意義については今后症例を集め検討する予定である．

結　語

33才頃，下肢の脱力で発症し経過が緩慢な下肢遠位部主体の myopathy の1例を呈示し，孤発型 distal myopathy として文献的考察を行なった．本症例でみられた ragged red fiber・空胞変性はいずれも非特異的変化ではあるが，両者の共存はきわめて稀であり，今后症例の集積により検討を加える必要がある．

文　献

1）Welander, L. : Myopathia distalis tarda hereditaria. 249 examined cases in 72 pedigrees. Acta Med. Scand., 141 : (Suppl. 265) : 1, 1951.

2）三好和夫：常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症 Autosomal recessive distal muscular dystrophy. 日本臨床，35：3922，1977.
3）Miller,R.et al.：Sporadic distal myopathy with early adult onset. Ann. Neurol., 5：220, 1979.
4）室根郁男：Distal myopathy-Non-hereditary distal myopathy の1例. 臨床神経学，3：387, 1963.
5）三好正堂：筋線維内に著明な空胞変性および桿状体(Rod-like Body)を認めた孤発性 Distal myopathy の1例. 臨床神経学, 10：111, 1970.

18）胃切除後に有痛性筋痙攣を呈した1成人例

古川哲雄*

研究協力者　黒岩義之*　神宝知行*

症　例

56歳男性，右きき（日赤医療センター　79—194—24）

家族歴：高血圧症，脳卒中で死亡した者が少なくない．

既往歴：第2次世界大戦後，シベリアで捕虜として2年間の飢餓生活をおくり，夜盲症を伴う著しい栄養失調症を経験した．長い飲酒歴があるが，1969年（46歳）胃十二指腸潰瘍に対してBillroth II法の胃切除術を受けた．それ以来，甘い食べ物や脂肪の多い食品，乳製品を食べるとすぐ強い嘔気が生じ，それらを見るだけでも嘔気をもよおすようになった．この傾向は最近，特に著しく，この5—6年間，それらをほとんど食べていない．このような事は胃切除以前にはなかったことである．下痢はない．なお1975年以降，高血圧症を指摘されている．

現病歴：鉄筋組立工として肩に鉄材をかついだりする筋肉労働に従事していたが，胃切除4年後にあたる1973年頃から，6月から10月にかけての暑い時期になると，力仕事をしている最中に左上肢の筋肉が緊くつっぱり痛くなる現象に気づいた．次第にこれは両上肢に起るようになり，一旦，これが起ると有痛性筋けいれんは1—3時間持続し，仕事を中断せざるを得なくなった．この時には筋肉の膨隆が実際に外から見られ手で感じることができた．1976年頃から，筋肉労働に従事すると毎日のように有痛性筋痙攣が起き，両上肢のみならず両下肢にも起るようになった．時には腹部の筋肉に起ることもあった．1979年7月21日の早朝，仕事をしていなかったにもかかわらず全身に，すなわち両上下肢，下顎筋，腹筋すべてを含んだ有痛性筋収縮発作が起り，約3時間持続したため，当センターに入院の運びとなった．

入院時現症：脈拍数84/分整．血圧180/90．両下腿や両前腕の軽度脱毛と前頭部脱毛．骨格筋の発達は良好で筋肉質の体格．左大胸筋や両側上腕三頭筋，大腿四頭筋など近位部を中心として筋線維束攣縮を認める．左上肢近位筋に軽度の筋萎縮と筋力低下．四肢深部反射の亢進．知覚正常．頸部運動制限なく，頸部の運動痛を認めず．腹部に胃切術時手術創．

入院時検査所見：

1）血液検査：血清総蛋白　5.8 g/dl（正常6.5～8.0 g/dl）血清Mg 2.3 mg/dl（正常2.5～3.5mg/dl）安静時の血清CPK 15 mU/ml（正常20～75）運動負荷後の血清CPK 1771 mU/ml．

以下に挙げる諸項目はすべて正常であった．血清Ca，P，副甲状腺ホルモン，Cu，Fe，血算，血沈，甲状腺機能検査，肝機能検査，腎機能検査，血清IgG，IgA，IgM，IgD，IgE．血清vitamin B_1，B_{12}，E．葉酸．血清Na，K，Cl．

2）血清学的検査：CRP(－)，RA(－)，STS(－)抗核抗体(－)．

3）尿・便検査：尿creatine排泄75 mg/day（正常10—50 mg/day）以外は正常．

4）髄液検査：正常．

5）消化吸収試験：D-xylose排泄試験正常．I^{131}-Triolene テスト；2時間0.8%，4時間9.6%，6時間9.3%（正常：3～6時間値が約15%）50 gm-ブドウ糖負荷試験；FBS 84 mg/dl，30分値169，60分値106，90分値82，120分値58，150分値65，180分値78（図1）．

6）放射線学的検査：頭蓋骨レ線正常，頸椎レ線

＊日赤医療センター神経内科

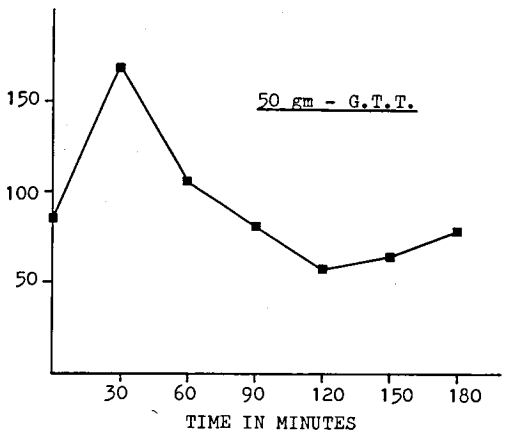


図1　50グラムブドウ糖経口負荷試験

でosteoporosis，上部消化管造影及び小腸追跡検査でBillroth II法のanastomosisが証明され，小腸像は粘膜の萎縮を示唆する所見を呈した．大腸造影正常．CTスキャン正常．

7）内視鏡検査：食道；正常．胃；残胃粘膜の萎縮．大腸；正常．

8）阻血前腕運動負荷試験：血中乳酸値の上昇が正常に認められた．

9）筋電図：随意筋収縮時に四肢の全被検筋で多相性高振幅電位が記録され，特に左上下肢では最大収縮にてdischargeの数の減少を認めた．運動神経伝導速度は正常．

10）筋生検：正常組織像．

NEUROMUSCULAR DISORDER FOLLOWING GASTRECTOMY

	OUR CASE	KNIFFEN,J.C. & QUICK,D.T.				
		CASE 1	CASE 2	CASE 3	CASE 4	CASE 5
AGE / SEX	56 M	51 M	65 F	75 F	60 F	53 F
ANASTOMOSIS	Billroth II.	B.II.	B.II.	B.II.	B.II.	B.I.
ONSET OF SYMPTOMS AFTER SURGERY	4 YEARS	0.5 Y.	13.5 Y.	18 Y.	14 Y.	0.5 Y.
FASCICULATIONS	++	++	++	+	++	+
MUSCLE WEAKNESS & ATROPHY	+	+	+	+	+	+
DENERVATION AT E.M.G.	+	+	+	+	+	+
MUSCLE CRAMPS	+	+		+	+	
BULBAR SIGNS			+	+		
WEIGHT LOSS	+	++	++		+	+
DIARRHEA		+				
STEATORRHEA		+			+	
REDUCTION IN SERUM MAGNESIUM	+					+
REDUCTION IN SERUM IRON		+				+
REDUCTION IN XYLOSE EXCRETION				+		

表1　Neuromuscular disorder following gastrectomy

考　　察

胃の主要な部分を切除する事が術後に様々の代謝性変容をきたすことが知られている．dumping 症候群，osteoporosis，osteomalacia，などが胃切後におこることが諸家により記載されている[1]しかし，胃切後に生じる神経学的合併症の記載は稀である．1950年に Ask-Upmark[2] は胃切後に遠位筋の萎縮と深部反射の亢進を呈した症例を報告し，1964年には Ekbom ら[3] は胃切後に近位筋の萎縮と osteoporosis を呈した症例を記載している．1969年には Kniffen and Quick[4] が筋萎縮，筋力低下，体重減少を呈する5例の胃切後患者を報告しているが，表Ⅰに示すごとく，自験例と共通点が少なからず認められる．すなわち，全例に筋線維束攣縮，筋電図での Denervation の所見が見られるが，なかんずく Kniffen and Quick[4] の5例のうち3例に，"muscle cramps" が記載されている点が注目に値する．舌の筋線維束攣縮，言語障害，えん下障害などの延髄症状が Kniffen and Quick の5例中2例にみられるが自験例には認められなかった．消化吸収機能に関しては，体重減少，下痢，脂肪便，血清 Mg 低下，血清 Fe 低下，D-xylose 排泄低下などが表Ⅰの如くみられる．自験例における血清 Mg の低下は興味ある所見であり，消化吸収障害の重要な証拠と考えられる．Valleeら[5] は，5例の Mg欠乏に起因するテタニーを報告している．全例とも小腸吸収障害や慢性アルコール中毒による栄養障害を伴っていた．著者らは，最近，前述の自験例とは別に，64歳男性で52歳の時，胃切除術を受け，その後に下痢と体重減少をきたし，58歳頃から四肢の有痛性筋痙攣を呈している症例を経験した．自験例2例における有痛性筋痙攣の原因は不明であるが，脊髄前角細胞群の異常な興奮によるものであることが推察され，何らかの代謝異常が根底にあるものと考えられる．

文　　献

1) Haubrich, W. S. : Sequelae of gastric surgery for peptic ulcer. In "Gastroenterology", (edited by Bockus, H. L.), W. B. Saunders Co., Philadelphia. 1963, Vol.1, p.702.

2) Ask-Upmark, E. : Amyotrophic lateral sclerosis observed in five persons after gastric resection. Gastroenterology, 15 : 257, 1950.

3) Ekbom, K., Hed, R., Kirstein, L. et al. : Weakness of proximal limb muscles, probably due to myopathy after partial gastrectomy. Acta. Med. Scand., 176 : 493, 1964.

4) Kniffen, J. C., Quick, D. T. : Neuromuscular disorder following gastric resection. Arch. Intern. Med., 124 : 336, 1969.

5) Vallee, B. L., Wacker, W. E. C., Ulmer, D. D. : The magnesium-deficiency tetany syndrome in man. N. Engl. J. Med., 262 : 155, 1960.

19）筋緊張性ジストロフィー症における瞳孔異常について

井村裕夫*

研究協力者　大井長和*　西谷裕**　岡本佳子***
北真行***　森弘***　奥田隆章****

はじめに

筋緊張性ジストロフィー症（以下本症と略す）は，常染色体優性遺伝で発現するmultisystem disorderとして知られている．また，本症は横紋筋のみならず平滑筋[1]も障害部位として含まれる．白内障，網膜変性及び追従運動異常などの多彩な神経眼科的所見[2),3),4)]をも示す．私達は，本症患者の瞳孔運動機能を赤外線電子瞳孔計[5)]を使用して計測するとともに，瞳孔運動異常を定量化することによって，本症の薬剤応答性を調べた．

対　象

正常人19名（10代7名，20代7名，30代以上5名）及び中等度から高度の重症度の本症患者5名（30代1名，40代3名，50代1名）の瞳孔運動を調べた．

方　法

浜松テレビ製の双眼イリスコーダ(HTV-C831)を用いて，暗順応15分後に，午後1時～4時の間に測定した．直接対光反射の瞳孔運動は，角膜受光面140 luxの照度で1秒間の光刺激を与え，各眼5回ずつ施行した．輻輳は，単眼の眼前約10 cmの距離に指標を提示して単眼にて固視させた非対称性輻輳を行なわせて，固視眼の瞳孔運動を記録した．分析項目は，潜時，1/2縮瞳時間，光刺激後の変化面積値及び最大縮瞳速度の計4項目とした．また，本症患者に認められた瞳孔運動異常に対しての薬剤効果を知る目的で，diphenylhydantion (DPH)[6)]を1日150 mgを7日間投与し，その前後で計測した．

結　果

1）潜時

30代以降の正常人の値は，261.29±17.16 msecであり，本症患者の値は252.40±12.60 msecであった（M±SD）．両者間に有意の差が認められなかった．

2）1/2縮瞳時間

30代以降の正常人の値は294.63±37.80 msecで，本症患者の値は316.64±29.05 msecであった（M±SD）．両者間に有意の差を認めなかった．

3）光刺激後の変化面積値

30代以降の正常人の値は23.66±4.85 mm^2であり，本症患者の値は14.15±2.19 mm^2であった（M±SD）．両者間の差は有意であった（図1，$P<0.05$）．

4）最大縮瞳速度

30代以降の正常人の値は52.80±6.50 mm^2/secで，本症患者の値は29.78±2.14 mm^2/secであっ

＊京都大学医学部第二内科
＊＊国立療養所宇多野病院神経内科
＊＊＊大阪北野病院耳鼻咽喉科
＊＊＊＊大阪北野病院眼科

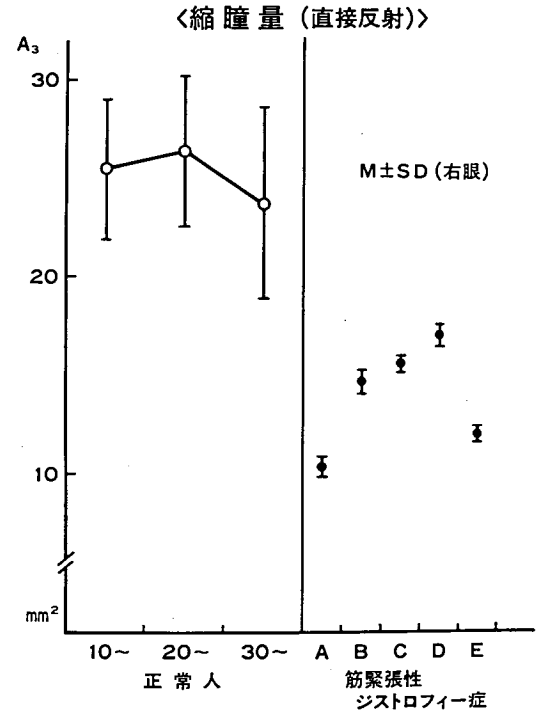


図1　本症患者の縮瞳量は，正常人より有意に小さい

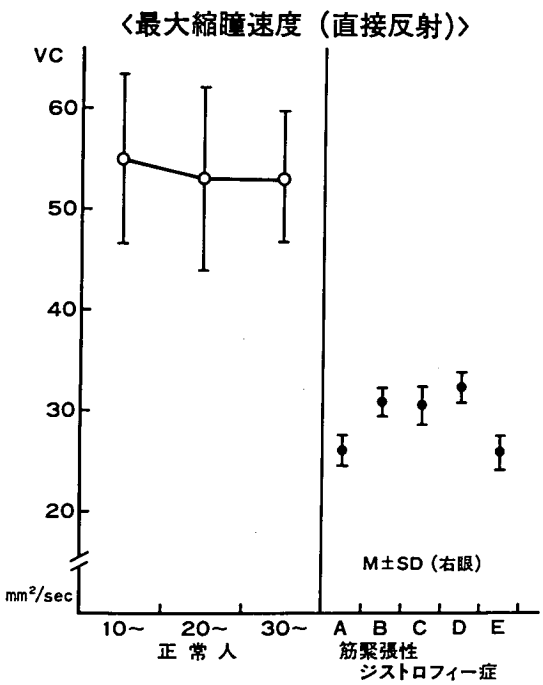


図2　本症患者の最大縮瞳速度は，正常人より有意に遅い

た（M±SD）．本症患者の最大縮瞳速度は，有意に遅かった（図2，$P<0.05$）．1/2縮瞳時間は，正常人と本症患者で有意差を認めないことから，最大縮瞳速度の減少は，変化面積値の減少によると考えられた．

5）DPH投与前後の最大縮瞳速度

DPH経口投与1.50 mg/day 7日間を試みた4例中1例のみが有意な最大縮瞳速度の改善を示した（図3，$P<0.05$）．最大縮瞳速度の改善を示さなかった3例も，手指のミオトニーは，改善傾向を認めた．

6）非対称性輻輳時の最大縮瞳速度

本症患者5例とも，セミダークルームでの理学的検査にてlight-near dissociationを示した．非対称性輻輳と直接対光反射の最大縮瞳速度の解離を認め，上記の理学的所見を支持した（図4）．

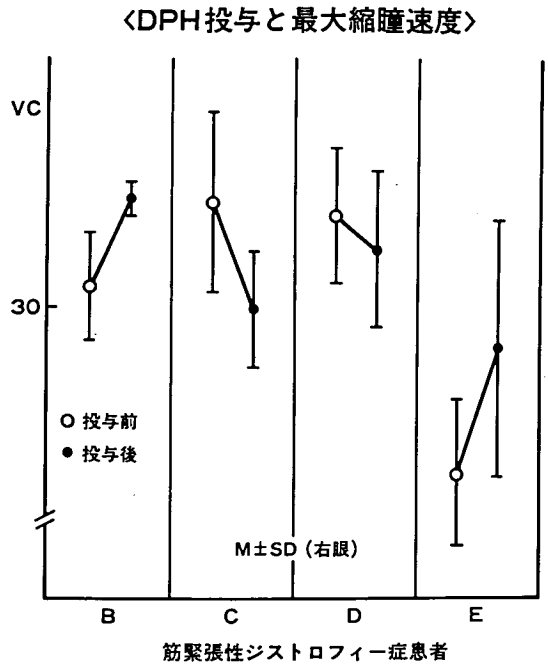


図3　DPH投与にて症例Bのみが，最大縮瞳速度の改善を示した

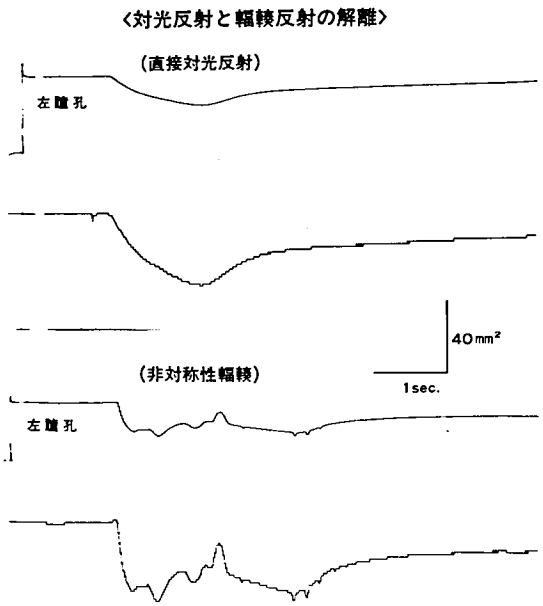


図4　light-near dissociation を示す

考　　察

今回検査した本症患者の全例で，瞳孔は正円形で極めて軽度の瞳孔不同しかなく，コカイン点眼で両眼とも同程度の散瞳を示したので，括約筋固有病変と毛様神経節病変は考えるのが困難である．また視力視野に著変がなく，潜時の延長がなくかつ1/2縮瞳時間の短縮を示さなかったことから，透光体異常[7]や網膜病変が，light-near dissociation の原因とは想定しにくい．以上から，本症患者に見られた light-near dissociation の責任病巣[8]は中脳と推定された．しかし，CT-scan にて全例とも異常所見を中脳に認めなかった．

DPHは中枢神経系に作用するので，中脳病変に基づくと思われる最大縮瞳速度の改善を期待して使用したが，4例中1例しか有効ではなかった．無効例でも，手指のミオトニーの改善が見られたことは，最大縮瞳速度の低下の発現機序が，ミオトニーと異なるとの考えを支持する．私達も，瞳孔に反復光刺激を施行したが，ミオトニー様現象を瞳孔運動に認めなかった．

本症はその障害部位として，中枢神経系を含むことが知られている．性格変化，知能低下[9]を示す症例が多く，軽度の脳波異常[10]を認める症例もある．また剖検例の視床の神経細胞内に好酸性の封入体[11]を多数認められた症例もある．双眼イリスコーダーを使用した瞳孔運動の定量化は，本症の中枢神経系の病変の把握と経過観察に便利な方法であると考えられる．

ま　と　め

筋緊張性ジストロフィー症患者の瞳孔運動異常は，縮瞳量の減少による最大縮瞳速度の低下であり，DPHは一部の症例にしかこれの改善を示さなかった．本症では中脳病変によると思われる light-near dissociation を認めるが，脳の CT-scan では中脳に異常所見を認めなかった．

文　　献

1) Harvey, J. C., Sherbourne, D. H. & Siegel, C. I. : Smooth muscle involvement in myotonic dystrophy-Am. J. Med., 39 : 81, 1965.
2) Harper, P. S. : Myotonic dystrophy. W. B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 1979, p.150.
3) Thompson, H. S., Van Allen, M. W. & Von Noorden, G. K. : The pupil in myotonic dystrophy. Int. Ophth., 3 : 325, 1964.
4) Von Noorden, G. K., Thompson, H. S., Van Allen, M. W. : Eye movements in myotonic dystrophy. Int. Ophth., 3 : 314, 1964.
5) 東野差世子，平田英差子，木村　徹ほか：双眼赤外線電子瞳孔計，双眼イリスコーダーについて．日眼会誌，80：946，1976.
6) Roses, A. D., Butterfield, D. A., Appel, S. H., et al. : Phenytoin and membrane fluidity in myotonic dystrophy. Arch. Neurol., 32 : 535, 1975.
7) Lowenstein, O. : Clinical pupillary symptoms in lesions of the optic nerve, optic chiasm, and optic tract. A. M. A. Arch. Ophth., 52 : 385, 1954.
8) Wolsh, F. B. & Hogt, W. F. : Clinical neuro-

ophthalmology. 3rd ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1969, p.507.

9) Adie, W. J. & Greenfield, J. G. : Dystrophia myotonia. Brain, 46 : 73, 1923.

10) Barwich, D. D.,Osselton, J. W. & Walton, J. M. : Electroen cephalographic studies in hereditary myopathy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry., 28 : 109, 1965.

11) Wisniewski, H. M., Berry, K. & Spiro, A. J. : Ultrastructure of thalamic neuronal inclusions in myotonic dystrophy. J. Neurol., Sci., 24 : 321, 1975.

20）神経筋疾患における Freeze-fracture 法による筋細胞膜の形態学的研究

荒　木　淑　郎*

研究協力者　　岡　本　定　昭*

進行性筋ジストロフィー症（以下 PMD と略）の病因の１つとして患者赤血球及び筋肉の膜異常が形態学的及び生化学的面から注目され，本症が systemic membrane disease である可能性が示唆されるようになってきた．

私共も昭和52年の班会議総会において患者赤血球を走査型電顕で観察し，対照群に比して患者赤血球が変化しやすいことを報告し，膜異常の可能性を論じた[1]．さらに細胞膜の変化をより詳細に検索する目的で昭和53年より神経筋疾患患者より得られた生検筋を対象に Freeze-fracture 法を用いた電顕で形態学的に検索し，同年の班会議総会においてその一部を報告したが，その後さらに症例を増やし検討し，若干の知見を得たので報告する．

対　　象

すべて生検筋を用い，その内訳は PMD 群５例（Duchenne 型２例，肢帯型３例），運動ニューロン疾患（MND）５例，筋疾患のない患者８例（小児２例，成人６例）より外科手術中に得られた筋を対照とした．すべての筋はできるだけ同一条件下で採取を行った．

方　　法

生検筋を 2.5％グルタールアルデヒドで固定後，30％グリセリンで処理し，真空蒸着装置を用い，液体窒素で約－110°C，２～８×10^{-6} Torr の真空下で割断を行い，白金パラジウム，カーボンを用い蒸着し，ブリーチを用い処理し，400 メッシュ

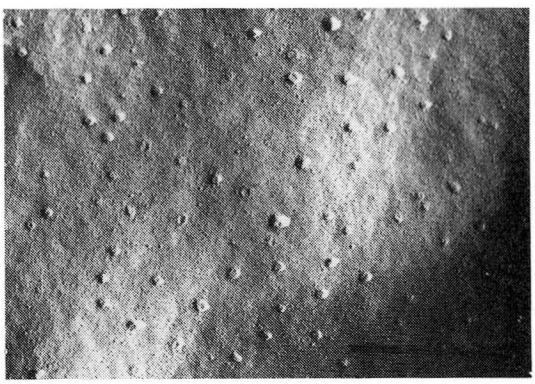


図１上　Duchenne 型の particle

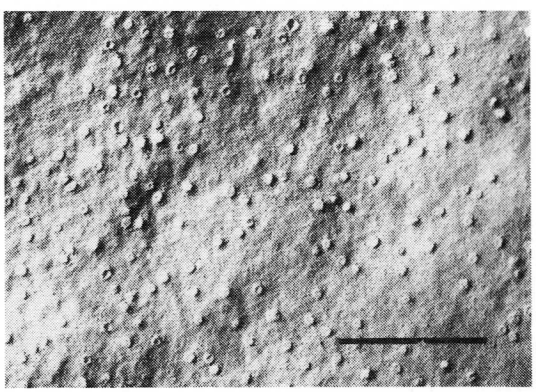


図１下　Control の particle

Duchenne 型では control に比し particle の減少がみられる

＊宮崎医科大学第三内科

に切片をのせ，乾燥後透過型電顕を用い検索した．

検索方法としては protoplasmic surface（P面），extracellular surface（E面）を at random に10～20ヶ所ずつ1μ平方あたりの particle の数を数え，PMD群，MND群，対照群で比較検討した．

結　　果

1）Duchenne 型PMD 2例のP面の平均particle density は61±17/μm^2で2例の小児対照群では268±19/μm^2であった．E面の particle density は Duchenne 型PMD 27±12/μm^2，小児対照群169±12/μm^2であった（図1，表1）．

2）肢帯型PMD，MND，成人対照群で比較すると，P面の平均particle density は肢帯型PMD 258±22/μm^2，MND 268±20/μm^2，成人対照群272±16/μm^2，E面の平均particle density は肢帯型PMD 151±14/μm^2，MND 176±21/μm^2，成人対照群171±15/μm^2であった（図2，表2）．

3）各病型群と正常対照群とを比較すると，Duchenne 型PMD群では小児対照群，成人対照群，肢帯型PMD群，MND群に比し，明らかにP面，E面共に平均particle density の減少がみられた（表3）．

表1　Particle Density per Square Micron on Muscle Plasma Membrane

RESULTS (1)

DUCHENNE			CONTROL		
Age	P face	E face	Age	P face	E face
6 (N=20)	73±18	31±13	15 (N=13)	249±19	184±11
5 (N=20)	47±15	23±15	7 (N=16)	284±19	154±14
Mean	61±17	27±12		268±19	169±12

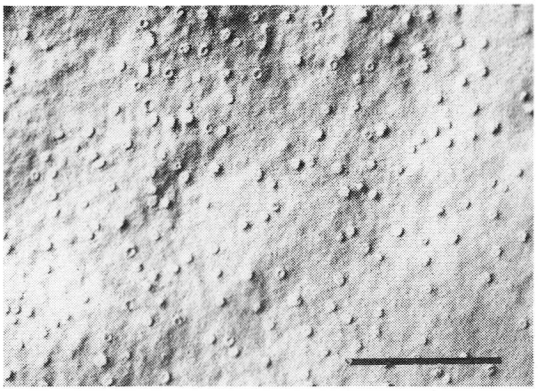


図2上　Control

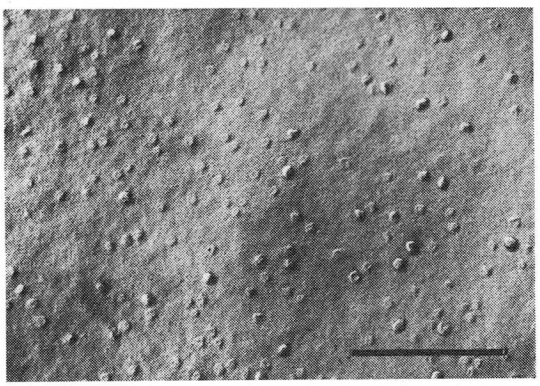


図2中　MND

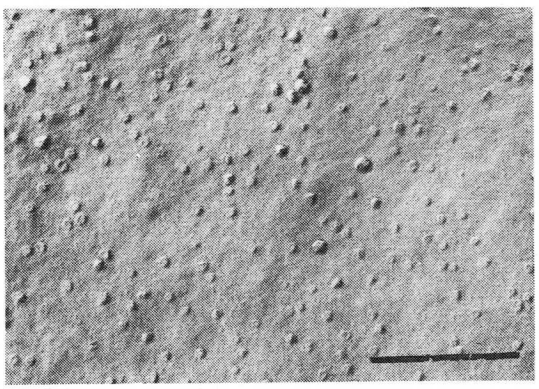


図2下　L—G型

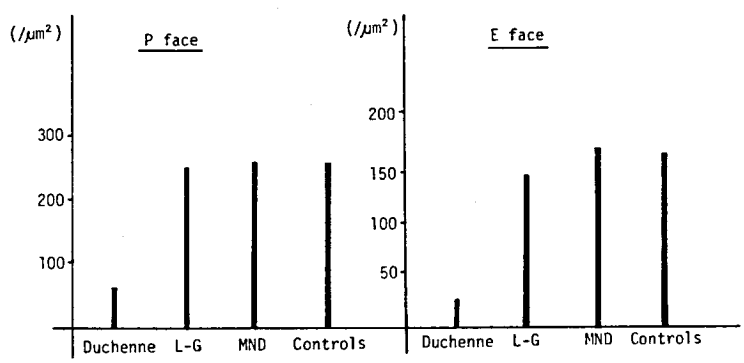
肢帯型(L-G) PMD，MNDおよび対照群間にparticle の数の差は見られない

表2　Particle Density per Square Micron on Muscle Plasma Membrance

RESULTS (2)

LIMB-GIRDLE TYPE			MOTOR NEURON DISEASE			CONTROL		
Age	P face	E face	Age	P face	E face	Age	P face	E face
18 (N=12)	270±20	160±16	45 (N=18)	294±22	190±19	50 (N=13)	269±15	174±11
28 (N=10)	243±23	144±10	52 (N=20)	249±23	192±24	51 (N=15)	280±18	173±10
36 (N=16)	261±19	149±13	55 (N=20)	277±19	160±16	34 (N=10)	272±16	167±10
			46 (N=10)	272±15	184±22	41 (N=20)	282±16	169±26
			60 (N=14)	250±19	158±15	51 (N=18)	276±20	197±18
						43 (N=15)	264±17	155±18
Mean	258±22	151±14		268±20	176±21		272±16	171±15

表3　Mean Particle Density per Square Micron on P and E faces.



考　　按

進行性筋ジストロフィー症の病因は未だ不明であるが，最近，生化学および形態学的研究より細胞膜の異常が指摘されている．

私共も走査型電顕を用い，患者赤血球が対照に比し容易に変化しやすいことを昭和52年の班会議において報告した[1]が，これには反論もあり必ずしも一定の結果が得られていないのも事実である．しかしながら，PMD では，はたして筋細胞膜に異常があるのか否かを証明することは極めて重要なことである．

最近，細胞膜を観察する最適の方法として Freeze-fracture 法があげられている．Freeze-fracture 法は1966年 Branton[2]がこの方法を用いると細胞単位膜の内面がリピッド２重層間で破断されて露出し，その表面が観察可能であることを報告して以来注目されるようになり，各方面の研究に応用されつつある．

神経筋疾患への Freeze-fracture 法の応用としては Ketelson, Schotland ら[3]，Wakayama ら[4][5]

の文献が散見されるにすぎない.

1977年 Schotland ら[3]は 8 例の Duchenne 型 PMD 患者より得られた骨格筋を Freeze-fracture 法を用い検索し, muscle membrane の P 面, E 面の particle の distribution の乱れと減少を報告し, Duchenne 型 PMD では muscle surface membrane の異常があり, その異常は membrane の内部分子構造に存在することを強調した.

次に1978年 Wakayama ら[4]は 8 例の Duchenne 型 PMD と 8 例の age-matched control の赤血球について Freeze-fracture 法で検討し, Duchenne 型で明らかに plasma membrane の P, E 両面での particle の減少を認め, Duchenne 型 PMD が generalized membrane abnormality である可能性を示唆する報告をした. さらに Wakayama ら[5]は1979年 Duchenne 型 PMD 8 例, age-matched controls 8 例, adult controls 3 例, 他の神経筋疾患36例を対象に検索を行い, 前報告と同様に Duchenne 型 PMD での膜内粒子の著明な減少を再確認する報告をした.

一方岩崎[6]は未固定新鮮血の赤血球膜を Freeze-fracture 法で観察し, 従来のグルタールアルデヒドによる固定が, 膜内粒子の大きさと分布, 特に E 面のそれに影響をおよぼしている可能性を報告し, さらに人および chicken の PMD の赤血球膜について検討した結果では対照群との間に差がないことを報告している.

私共の生検筋を対象にした結果では明らかに Duchenne 型 PMD では P, E 両面共に減少がみられ, さらに肢帯型 PMD, MND 群, 対照群 3 者間には差がないことを示した.

これら muscle membrane の異常が Duchenne 型 PMD に特異的なものであるのか, あるいは primary の変化であるのか否か, carrier ではどうであるのか, 各病期別による変動はないかなどいくつかの問題が残されているが, 今後個体数を増やすと共に同一患者で赤血球と筋での対比を検討する必要があると思われる.

結　語

私共は, 神経筋疾患患者より得られた生検骨格筋を Freeze-fracture 法を用い検索し, Duchenne 型 PMD では対照群に比し, P, E 両面の particle の減少がみられ, 本症では muscle surface membrane の異常があり, その変化は膜の内部分子構造にある可能性を示唆した.

一方, 肢帯型 PMD, MND, 対照群間には P, E 両面共 particle に差を見いだしえなかった.

文　献

1) 荒木淑郎, 岡本定昭, 北野正二郎：進行性筋ジストロフィー症患者の赤血球膜に関する形態学的異常. 筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究. 冲中班. 昭和 52 年度研究報告書. p. 311.

2) Branton, D. : Fracture faces of frozen membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 55 : 1048, 1966.

3) Schotland, D. L., Bonilla, E. & Van Meter, M. : Duchenne Dystrophy : Alteration in Muscle Plasma Membrane Structure. Science 196 : 1005, 1977.

4) Wakayama, Y., Hodson, A., Pleasure, D., Bonilla, E. & Schotland, D. L. : Alteration in Erythrocyte Membrane Structure in Duchenne Muscular Dystrophy. Ann. Neurol. 4 : 253, 1978.

5) Wakayama, Y., Hodson, A., Bonilla, E., Pleasure, D. & Schotland, D. L. : Freeze-fracture studies of erythrocyte plasma membrane in human neuromuscular disease. Neurology 29 : 670, 1979.

6) 岩崎祐三：筋細胞膜の微細形態学. 1. 凍結割断法による赤血球膜の超微形態の研究. 筋ジストロフィー症の基礎的研究. 江橋班. 昭和 53 年度研究報告書. p. 145.

21）筋ジストロフィーの筋病変に関する検討（続報）
——各病型における筋線維病変と血管・間質病変との対比——

田辺　等[*,†]

研究協力者　内潟雅信[*]　松原四郎[*]
野沢胤美[*]　原　満[**,†]

目　的

筋ジストロフィーは，遺伝・変性・進行性・ミオパチーという点で，本質的な共通点をもちながらも，一方では臨床的に，遺伝形式・発症時期と経過・症状発現部位などから，疾患単位に近いような諸病型が区別される点も，また一つの特徴である．しかし諸病態の基礎的な検討結果は，概して病型特異性に乏しく，筋病変についても，全体に共通な特徴の方が強調される傾向にある．

我々はこの観点から，むしろ各病型ごとの差異に着目して検討し，その一部は昨年度の本会議でも報告した[1]が，今回はその続報として，主として間質および血管の病態につき報告し，考察を加える．

対象および方法

対象は，虎の門病院における自験例（1970年以降，355例）のうち，適応を考慮した筋生検施行例で病型が確定されたもの50例（年齢3～51歳；男36，女14）で，内訳は，Duchenne 型13（男），Becker 型3（男），肢帯型17（男11，女6），顔面肩甲上腕型6（男4，女2），先天（福山）型11（男5，女6）であった．なお，筋緊張性ジストロフィー31例（男18，女13）についても同様に検討対比した．また血管・間質病変についての対照として，諸種先天性ミオパチー8，筋萎縮性側索硬化症20，多発性筋炎20，糖尿病性 neuropathy および amyotrophy 10，正常所見を呈した4例についても同様に検索した．

筋生検部位はすべて四肢近位筋で，組織学的・組織化学的・電顕的検討をおこない[2),3)]，その所見と，臨床症状・経過・他検査所見と対比した．筋病変は，パラフィン切片による一般病理組織学的染色法，クリオスタット切片による一般染色および組織化学的方法（HE，trichrome 変法，PAS 反応；myosin ATPase，DPNH-TR，phosphorylase，cholinesterase などの活性像），グルタールアルデヒド・オスミウム酸二重固定法による電顕的検索を総合して解析した[2),3)]．

間質および血管病変に関する検索についても上記の方法によったが，それらの計測については，種々の方法を検討した結果，共通に，クリオスタット切片（厚さ8 μ）の HE 染色像により施行した．計測法の実際については以下の「結果」の項に検索成績の一部として示す．

結　果

前回（第1報）までに検討した主な内容[1),2)]は，

1）筋線維大小関係パターンに関する megahistogram の所見では，筋ジストロフィー各病型とも，base の広い spectrum 型を示しながらも，各病型にある程度の差異を認めた．すなわち，①Duchenne 型は約55 μ を中心としたほぼ典型的な spectrum 型を示すが，②肢帯型では肥大線維の比

＊虎の門病院神経内科
＊＊虎の門病院病理学科
†冲中記念成人病研究所

率が高く右方への延長を認め，③顔面肩甲上腕型では平均直径は前2者よりもやや多いが，萎縮線維としての左方推移が目立っている．④先天（福山）型では平均直径が全体として低く，前3者に比して全般的な左方偏位を特徴とすること．

2） 一方筋病変個々について，病型別差異の比較的著明なものは，①fibrosis および小動脈壁肥厚：とくに Duchenne 型(他型にも種々の程度に)，②反応性変化, necrobiosis ：各型にみられるが，顔面肩甲上腕型・肢帯型に優位，③splitting, moth eaten 状変化，mitochondria 異常, ring fiber：とくに肢帯型・顔面肩甲上腕型に著明，④type I predominance, type II deficiency ：Duchenne 型・肢帯型に著明，⑤胎生期構築の一部遺残（未分化性）：先天型に特有であること，などである．今回は，以上のうち，2)①に示した fibrosis や小動脈肥厚など，血管・間質病変について，より客観的な解析を試みた．

間質病変とくに fibrosis の検討

間質病変の検討の一環として，我々は従来筋病変解析の都度，図1に示した方法を併用した測定結果を蓄積している．すなわち，筋組織標本（クリオスタット切片，厚さ8 μ，HE 染色）の横断面に，1辺200 μ の正方形の区画を連続した状態で20個仮設し（配列は横断面の形により適宜)，それぞれの区画を含む100倍像の写真を撮影(20個)，それぞれを手札版大に焼付けた後，方眼紙にトレ

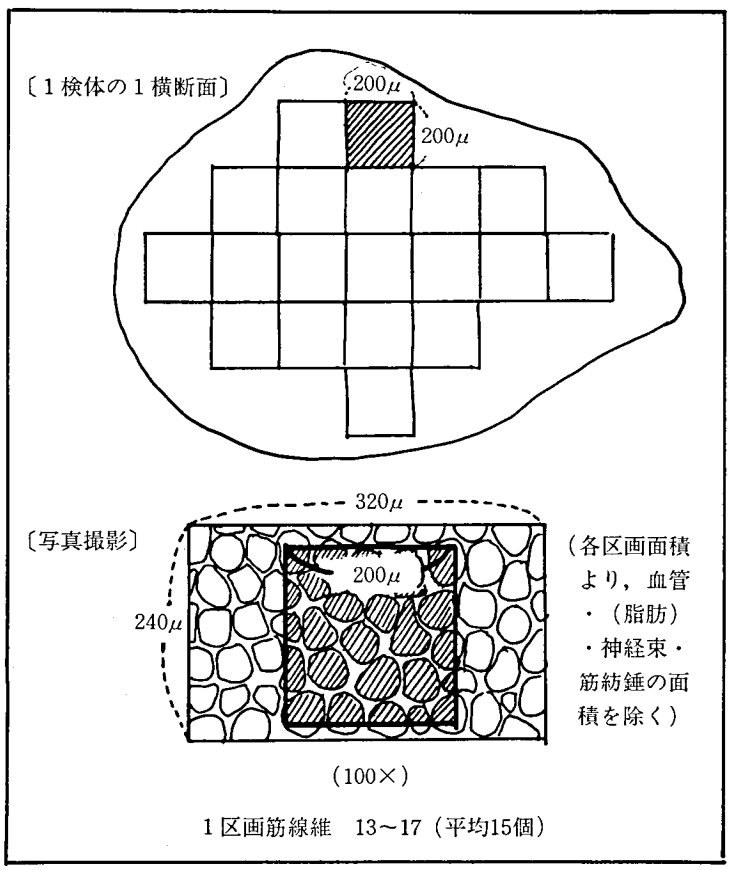


図1 筋組織横断面の筋線維・間質面積の比率測定（本文参照）．〔筋線維の面積 / 筋線維 ＋ 間質の面積；(%)〕

ースし，区画ごとの筋線維部分の面積と間質部分の面積とを測定し，再合成的に合計値を求める．その際，脂肪・血管・神経束・筋紡錘等の面積を除去すると，ほぼ筋組織と間質結合組織のみの比率が得られる．

図2（A）は200 μ 平行の例示で，正常所見を示す．正常4例の筋線維面積比は平均約94％であった．また，各病型ごとに筋線維と間質結合組織との比率を同様に測定した．図2（B）～（D）は，それぞれDuchenne型（筋線維面積67％の部分），肢帯型（筋線維面積78％の部分），先天型（筋線維面積32％の部分）を示す〔図は種々の染色像につ

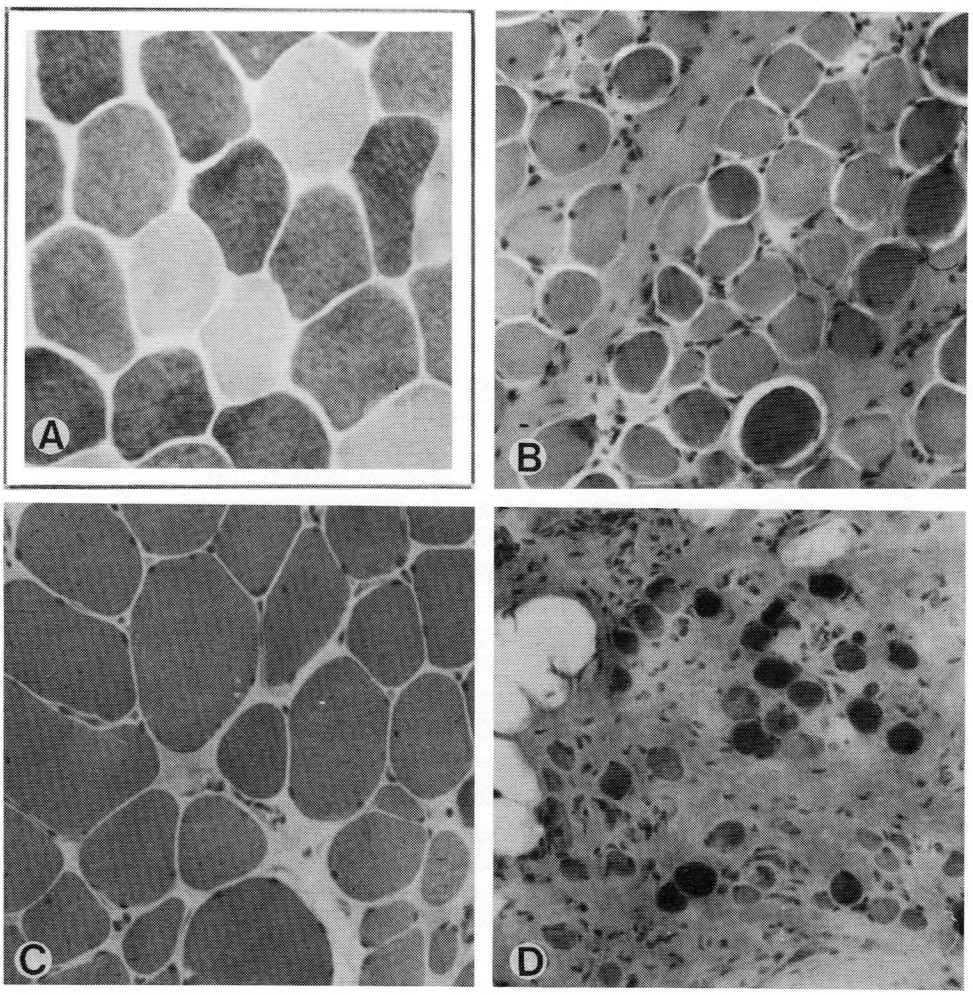


図2　筋線維面積比率に関する例示
Ⓐ 200μ平方区画の正常所見（myosin ATPase, 100×），脂肪・血管・神経束・筋紡錘などを除く全面積に対する筋線維面積約96％の部分（HE像でも同結果），Ⓑ Duchenne型筋ジストロフィー（HE, 100×），筋線維比率（同一条件）約67％の部分，Ⓒ 肢帯型筋ジストロフィー（HE，200×），約78％の部分，Ⓓ 先天（福山）型筋ジストロフィー（trichrome 変法，100×），約32％の部分（HE像でも同結果）．〔いずれも大腿四頭筋；倍率は撮影倍率を示す（引伸倍率はⒶのみが，ⒷⒸⒹ（それぞれ同率）の2倍となっている〕

き例示したが，上記それぞれの数字（%）は連続切片 HE 染色像における測定値〕.

図3はこの方法により測定した各病型ごとの，症例全体の平均値をグラフに示したもので，病型内訳の（ ）内の数字はその例数を示し，最上段は正常所見，最下段の4項目は比較のため例示した他の対照疾患の一部を示す．各項目ごとの棒グラフを2本ずつのうち，それぞれ上段は筋線維（左方の黒い部分）と間質（右方の白い部分）との，またそれぞれの下段は，これに脂肪浸潤部（中央の点の部分）を加えた比率を，%で表わしたものである．その結果，筋ジストロフィー群では先天型・Duchenne 型に最も fibrosis が著明，次に肢帯型，さらに Becker 型と顔面肩甲上腕型の順となる．筋緊張性ジストロフィーや，他の対照疾患については，先天型・Duchenne 型ジストロフィー以外の病型とほぼ同程度の平均値を示す．なお，平均値でない個々の症例の病変の程度には当然差異があるが，本シリーズでは同一病型で5～10%程度のばらつきを示すに止まっている．

血管とくに動脈病変の検討

筋ジストロフィーの血管とくに小動脈には種々の変化が見られ，血管周囲の fibrosis，血管壁肥厚

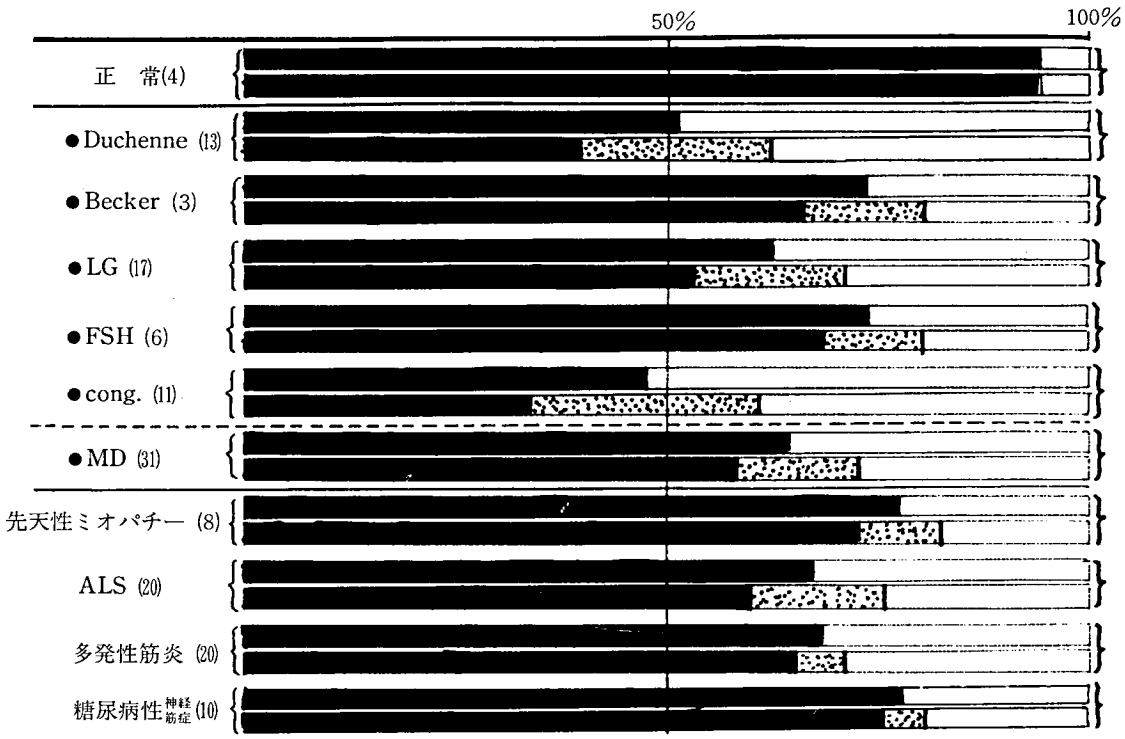
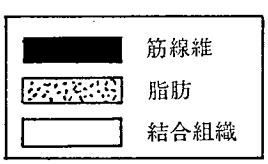


図3　正常，筋ジストロフィー各型，対照疾患（4種）における筋組織横断面の筋線維面積比率〔筋線維面積/筋線維＋間質（結合組織，または/および，脂肪）;(%)〕〔LG：肢帯型，FSH：顔面肩甲上腕型，cong.：先天（福山）型，MD：筋緊張性ジストロフィー，ALS：筋萎縮性側索硬化症〕



（中膜筋層の肥大または血管壁内のfibrosis），一部の内腔狭窄・閉塞（稀に血栓形成），血管周囲の小円形細胞浸潤などが主な所見である．その一部は図4（A）～（D）に例示した．

次に本シリーズの症例で検索した筋組織内血管のうち，筋型小動脈の肥厚度を，図5の下部に示した方法で測定した．すなわち，表現の便宜上，血管壁の厚さ l と，外縁の半径Rとの比率 l/R を

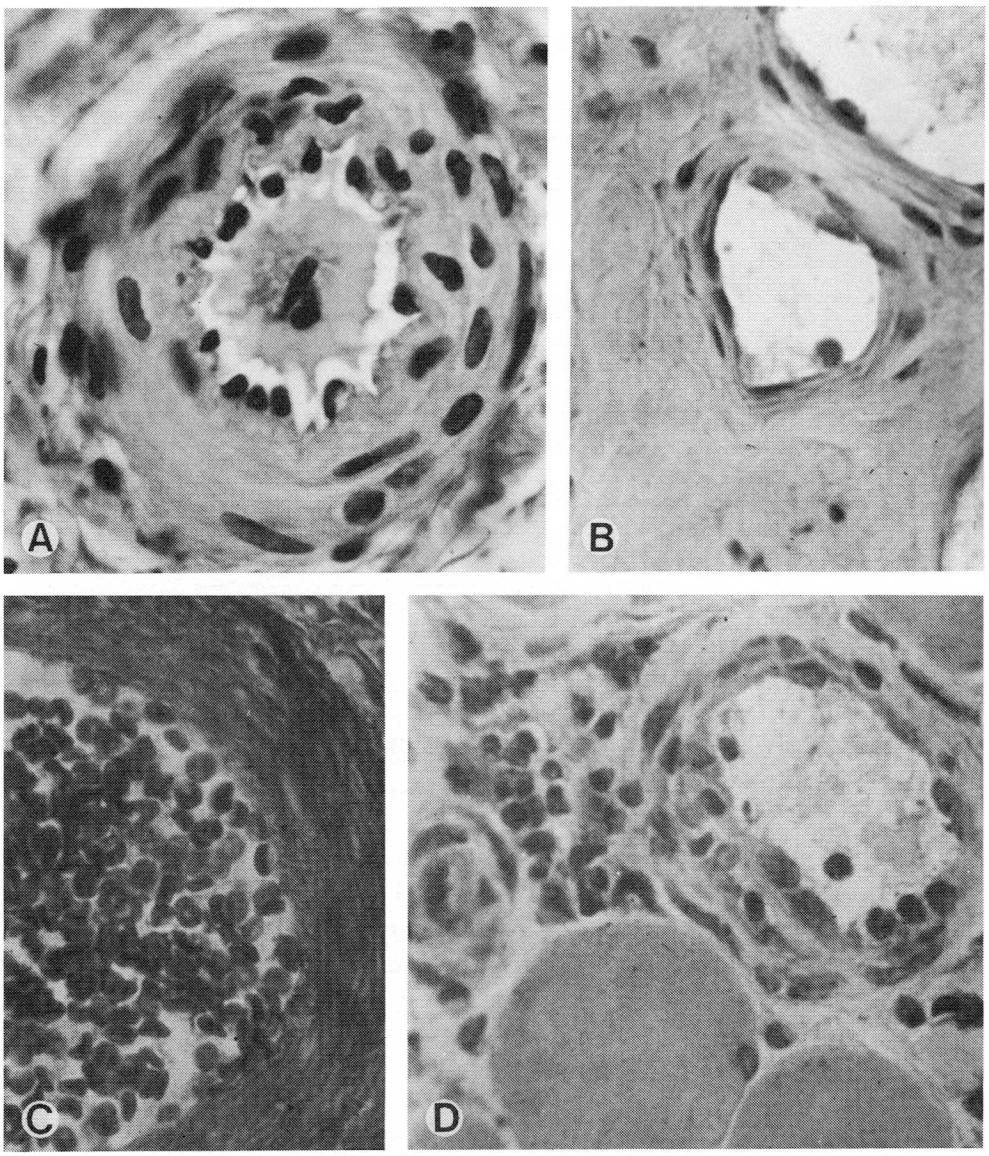


図4　筋ジストロフィーにおける血管変化の例示
Ⓐ Duchenne 型にみられた小動脈壁肥厚（l/R 約70%），Ⓑ 同，外膜に連続する高度の線維化，Ⓒ 腓帯型にみられた小動脈中・外膜の線維化，Ⓓ 顔面肩甲上腕型にみられた血管周囲小円形細胞の小浸潤巣．〔いずれも大腿四頭筋，ⒶⒷⒹは HE 染色，Ⓒは Azan 染色；撮影倍率はいずれも 400×（引伸倍率も各同比）〕

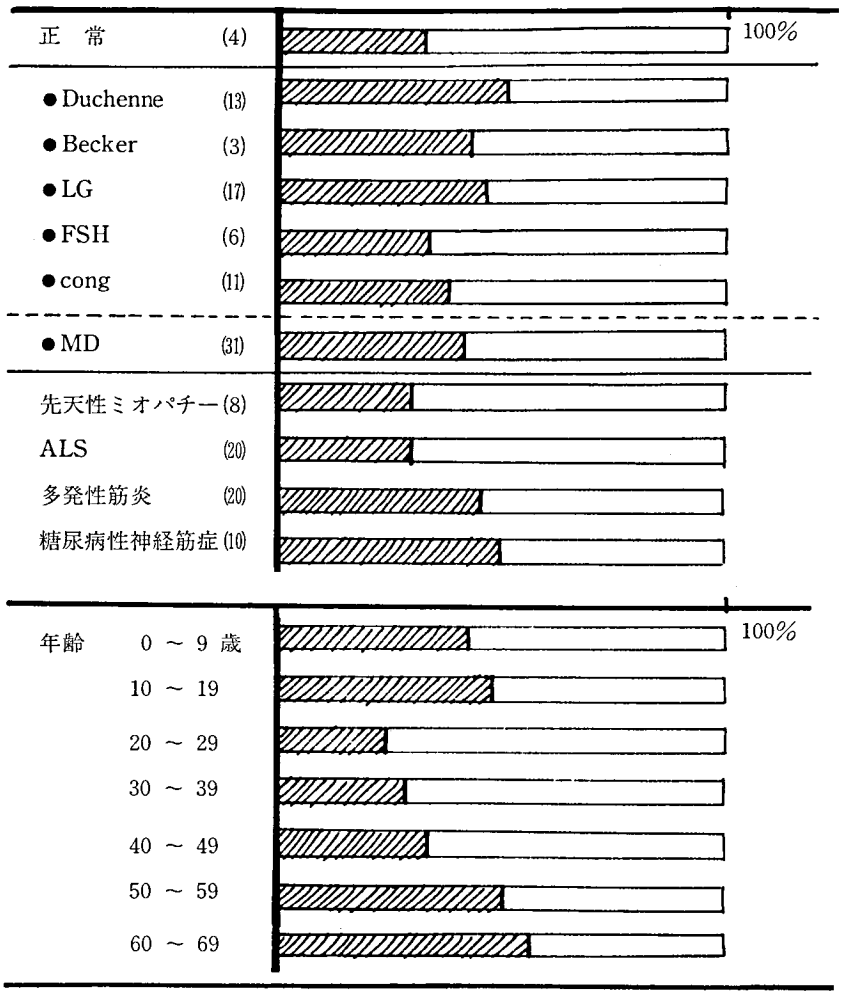
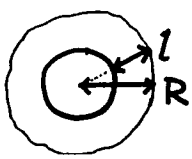


図5　正常，筋ジストロフィー各型，対照疾患(4種)における筋組織内筋型小動脈の肥厚度〔▨ l/R(%)〕，上段：疾患病型別平均値分布．下段：これら全例の年齢別平均値分布．(本文参照)
〔LG：肢帯型，FSH：顔面肩甲上腕型，cong.：先天（福山）型，
MD: 筋緊張性ジストロフィー，ALS：筋萎縮性側索硬化症〕



%で表わしたものである．個々の数値は，一般に小さい動脈の方が高値となる傾向があり，また筋の部位別差・年齢差の要素も含めたやや複雑な表現も可能であるが，ここでは簡便な表現として，平均値のみを示し，病型・疾患別と，同一母集団の年齢別分布とを対比した（図5の棒グラフ）．病型別には前述の fibrosis の強い Duchenne 型・肢帯型・先天型（福山型）ジストロフィーに，低年齢にも拘わらず壁の肥厚傾向を認め，且つ年齢別には加齢漸増傾向以外に低年齢層にもピークを認め，2峰性分布を示しており，fibrosis 特に血管周囲の膠原線維増生との関連が示唆される．また血管

壁の肥厚の主体は中膜平滑筋層の肥大とその線維化で，また一部の外膜には周囲の fibrosis のため構築の破壊がしばしば見られる．

考　　察

1）筋ジストロフィーの間質結合組織の増生は，Duchenne 以来最も本質的な病態であるという考え方が示唆されていたが，筋病変を伴う他の変性疾患の場合と同様，一つの共存病態にすぎない可能性も少なくない．いずれにしても筋ジストロフィーの各病型における程度の差，特に Duchenne 型において特に著明な fibrosis が認められるという事実に対する直接的な説明は困難である[2),4)]．然し結果的には，fibrosis は筋線維病変や血管・神経束・筋紡錘などにも逆に影響を与え，これらの病態を更に修飾している重要な因子の一つであると考えられる[1),2)]．

2）一方血管については，壁の肥厚などの病変に関し，Engel ら[5)]がそれを重視して筋ジストロフィー特に Duchenne 型の成因と関連づけてはいるものの，それを直接的に証明するに足る資料にはなお乏しい．むしろ，筋線維の破壊に対する反応性変化や，前述の fibrosis による力学的影響（血管周囲の抵抗･圧迫などによる血管中膜筋層の癆作性肥大など）その他により結果的に生じた二次的変化である可能性が強いように思われる．本症の四肢血流量は測定上必ずしも減少していないともいわれるが，実際に筋内血管の内腔の総和は減少しているとはかぎらない．本シリーズに関する上記の血管壁肥厚の測定結果は相対的な値で，動静脈系全体を通じての絶対的な内腔の大きさは示されてはいない．静脈系についての病変も動脈とほぼ同質ではあるが，計測上の困難さより今回はその結果の数量化は保留した．

3）以上，臨床的に重要なことは，これらの血管・間質病変が，①筋血流の部分的障害，②筋の癆作による hypoxia，③膜透過性の障害，④筋束内末梢神経障害などと関係し，本来の筋病態を修飾している可能性が強く疑われる点である．本症の筋病変でしばしば問題となる所見，例えば局所的な群集萎縮状所見（必ずしも神経原性変化とはいえない），小角化線維散在状の変化，筋終板の変化など[2),3),4)]，また筋電図上の神経原性様所見の説明に，一部の根拠を与え得る病態と考えられる．

結　　語

以上我々は筋ジストロフィーにおける筋病変の病型別検討を行い，間質結合組織・血管系の変化，およびこれが全体の筋病変におよぼす影響などを中心に考察した．また正常所見，他の対照疾患についても比較検討し，筋ジストロフィーと他疾患との間の相違，筋ジストロフィー諸病型相互の相違について若干の知見を報告した．形態学的な吟味の上に，計測法を導入し，更に客観性を含め得たものと考える．

文　　献

1）田辺　等，野沢胤美，内潟雅信，塩沢瞭一，原満：筋ジストロフィー諸病型における筋病変の特徴について．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究，第二班（三好班）昭和53年度研究報告書，pp. 97—101，1979.

2）田辺　等：筋ジストロフィー症における筋生検．神経内科，3：209—219，1975.

3）田辺　等：筋生検．綜合臨床，24：845—867，1975.

4）Dubowitz, V. & Brooke, M. H. : Muscle biopsy : A modern approach. Saunders, London, Philadelphia, Toronto, pp. 168—252, 1973.

5）Engel, W. K. : Duchenne muscular dystrophy. A histochemically based ischemia hypothesis and comparison with experimental ischemia myopathy. In "The striated muscle" (eds. : Pearson, C. M. and Mostofi, F. K.), Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 453—472, 1973.

22）先天性ミオパチーの臨床的・筋病理学的検討

納　光弘*

研究協力者　福永秀敏*　中里興文*
大勝洋祐*　井形昭弘*

はじめに

近年，組織化学と電子顕微鏡的研究法の進歩に伴い，筋組織形態学的特徴をもとに種々の新しいミオパチーが報告されてきた．これらの先天性ミオパチーのうち主なものは，mitochondrial myopathy, nemaline myopathy, central core disease, myotubular myopathy などである．

しかし最近，例えば同一の患者でまた同一の筋組織中に，いくつかの異った筋の形態異常を共有する症例も報告されるに至り，筋の形態異常に基づく先天性ミオパチーの疾患特異性も問題になりつつある．

そこで我々は現在まで経験した種々の先天性ミオパチーをもとに，その臨床的並びに筋病理学的特徴と疾患特異性について検討を加えた．

症例と方法

症例は15例で，その内訳は mitochondrial myopathy 7例，nemaline myopathy 4例，central core disease と思われる一家系，myotubular myopathy 1例である．

おのおのの症例について，臨床的，並びに筋電図，筋生検等の諸検査を施行した．

症　例

(1) mitochondrial myopathy（表Ⅰ）

男性3例，女性4例で，年齢は13歳から57歳までと多岐にわたり，臨床的な発病年齢は1例が47歳とおそいが，多くは30歳までに発病している．家族歴では，1例のみ血族結婚が認められる．発病はほぼ全例眼瞼下垂や眼球運動障害で発病しており，次第に咽頭，頸部，四肢特に近位筋の筋力低下，筋萎縮へと進行している．そのため経過が長くなると，鼻声や咀嚼障害の出現をみている．進行は全例極めて緩徐に進行している．現在，難聴や網膜色素変性などは認めなかった．

検査成績では，症例2でBMR-16%と若干低下，また症例1では心電図異常を認める以外には特に異常を認めなかった．血清CPK値は正常のものから軽度上昇するものまであった．糖負荷テストでは，2例で負荷後の血糖の上昇がみられず，いわゆる flat pattern であり，1例では糖尿病型パタンを示していたのが注目された．筋電図では1例にのみ神経原性変化の混在を認めるが，他の症例では筋原性変化を示唆する所見であった．

筋生検は症例2と症例5は上腕三頭筋で行い，他は大腿四頭筋で施行した．

組織化学的には全例でGomori-Trichrome染色でragged-red fiberを認めた(図Ⅰ-A).またNADH染色では，主にtype 1線維で筋鞘下を中心にミトコンドリア酵素活性の増加がみられたが，4例では限局性に酵素活性の欠如した，いわゆるmoth-eaten様線維やmulti-core様の筋線維もみられた(図Ⅰ-B)．ATPase染色では全般的にtype 1線維が小さい傾向にあった．

電顕的には，筋鞘下を中心に多くの異常ミトコンドリアが観察され，種々の形態の結晶様封入体が認められた[1]．

(2) nemaline myopathy（表Ⅰ）

男性3例，女性1例で年齢は20歳から35歳までで，発病年齢は mitochondrial myopathy より

＊鹿児島大学医学部第三内科

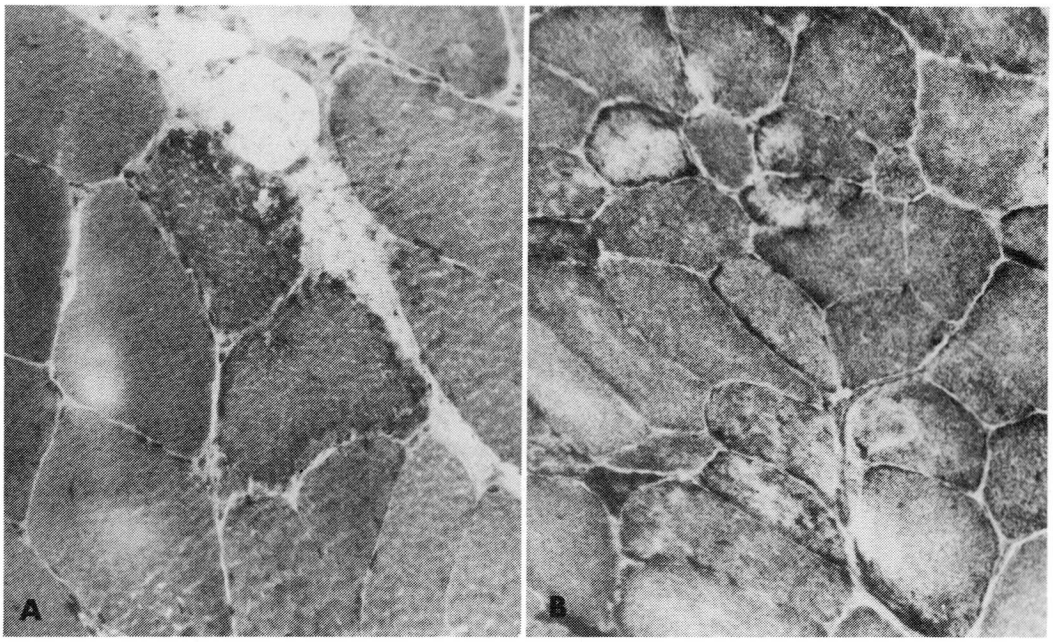


図1　mitochondrial myopathy（症例4）
A: ragged-red fiber（トリクローム染色 ×200）
B: 虫くい像や multicore 様の変化（NADH 染色 ×200）

もやや早く全例15歳までに発病している．また家族歴では4例中3例がいとこ結婚であり，症例2の母親と姉では共にCPK値が上昇しており，また症例4では同胞内発症もみられる．臨床症状は症例2を除いて，特徴的な顔貌とslenderな体型が特徴的で，全身のdiffuseな筋萎縮がみられ，また症例2で内反尖足，症例3と4では高口蓋，scoliosisが認められた．一方症例2では，顔貌はほぼ正常であり，一時期仮性肥大がみられ，また筋力低下，筋萎縮の分布も肢帯型筋ジストロフィー症に類似していた．また症例3，4では眼瞼下垂と眼球運動障害があり，これはoculogramでも確認されている．

血清CPK値は，症例2では200単位と上昇しているが，他の例ではほぼ正常の値を示した．筋電図では，神経原性と筋原性の混在を示唆する所見が得られた．

筋生検は，症例4で腓腹筋で行ったが他の例では大腿四頭筋で施行した．

組織化学的には，Gomori-Trichrome染色で全例でrodの赤色の顆粒を認め，NADH染色では，rodの部分では酵素活性の低下がみられた．ATPase染色では，症例2，4ではtype 1線維の萎縮がみられた．

ここで我々の症例でみられた筋病理学的特徴を要約すると，①rodの長さが，1 sarcomere以内と小径のものが多いこと，②症例3と4では核内rodを認めたこと，③rodの形態を電顕的にみると，横断像で140Å，縦断像で180Åと140Åまたは100Åのperiodicityを有していたこと，④症例3，4では，分葉化した多数の筋断裂を認め，この部位に多数のrodを認めたこと（図2-A），⑤症例3，4では同一筋線維内に結晶様封入体を含む異常ミトコンドリアを多数認めたこと（図2-B），⑥症例2では，NADH染色でtarget fiberなど多数の筋構築の異常を認めたことなどがあげられる．特に臨床的に眼瞼下垂，眼球運動障害を認めた症例3，4で筋病理学的に，rodと共にミ

表 I

(1) mitochondrial myopathy

症例	年齢	性	発病年齢	家族歴	臨床症状	CPK	筋電図
1	13	M	6	(−)	眼瞼下垂　眼球運動障害 顔咽頸四肢筋萎縮	52	myo.
2	32	M	17	(−)	眼瞼下垂　眼球運動障害 顔咽頸四肢筋萎縮	6	myo.
3	40	F	25	(−)	眼瞼下垂　眼球運動障害 顔咽頸四肢筋萎縮	68	myo.
4	50	F	23	(−)	眼瞼下垂　眼球運動障害 鼻声 顔咽頸四肢筋萎縮	38	myo. neuro.
5	51	F	32	いとこ結　婚	眼瞼下垂　眼球運動障害 鼻声 顔咽頸四肢筋萎縮	32	myo.
6	53	M	20	(−)	眼瞼下垂　眼球運動障害 鼻声 顔咽頸四肢筋萎縮	29	myo.
7	57	F	47	(−)	顔瞼下垂　眼球運動障害 鼻声 顔咽頸四肢筋萎縮	78	myo.

(2) nemaline myopathy

1	20	F	10	(−)	dysmorphic face 全身の筋萎縮	50	myo.
2	23	M	14	いとこ結　婚	四肢近位筋萎縮　内反せん足 仮性肥大	220	myo. neuro.
3	30	M	15	いとこ結　婚	眼球運動障害　全身の筋萎縮 dysmorphic face	20	myo. neuro.
4	35	M	10	いとこ結　婚	眼瞼下垂 眼球運動障害 全身の筋萎縮 dysmorphic face	12	myo. neuro.

(3) myotubular myopathy

1	24	F	6	いとこ結　婚	眼瞼下垂　眼球運動障害 四肢近位筋萎縮　仮性肥大	6	myo.

(4) central core disease

1	55	F	15	母	鼻声 嚥下障害 漏斗胸 股関節脱臼 顔面肩甲四肢筋萎縮	26	myo. neuro.
2	17	F	13	姉	漏斗胸 顔面肩甲上腕筋萎縮	65	myo.
3	13	M	10	弟	顔面肩甲上腕筋萎縮	81	myo.

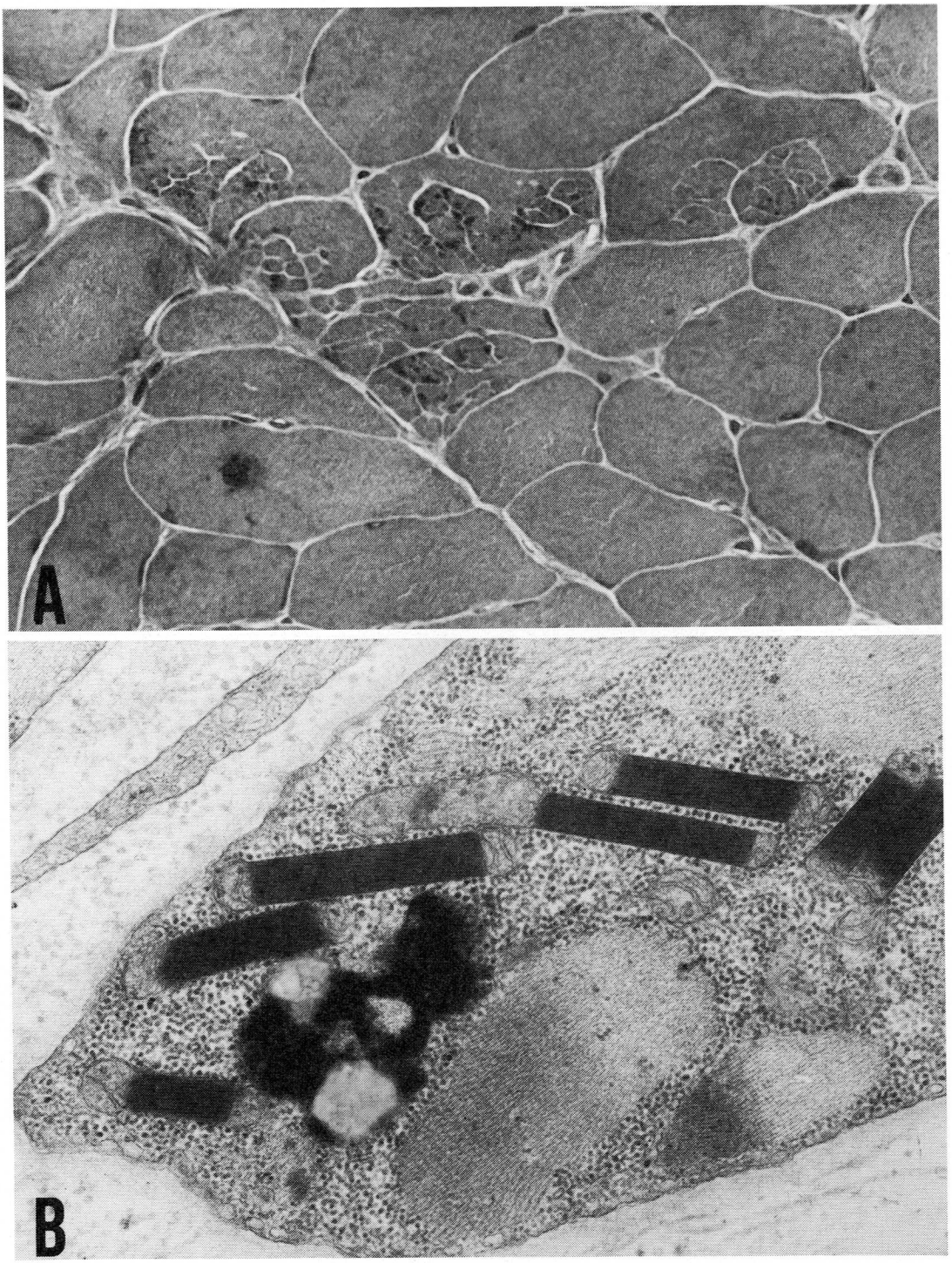


図 2　nemaline myopathy（症例 4 ）
A：筋断裂と多数の rod（トリクローム染色 ×200）
B：異常ミトコンドリア（×43200）

トコンドリアの異常を認めたことは興味ある事実である[2].

(3) myotubular myopathy（表Ⅰ）

24歳の女性で，両親はいとこ結婚であり，臨床的には三角筋，腓腹筋に仮性肥大を認め，外眼筋を含む顔面及び全身の筋力低下，筋萎縮があり，また手指に著明な筋萎縮がみられた．CPK は正常で，筋電図も正常の所見であった．

筋生検は上腕三頭筋で行い，組織化学的にすべての筋線維で中心核と共に，NADH 染色で中心部に活性の上昇をみる線維や，空胞のある筋線維も認められた[3].

(4) central core disease（表Ⅰ）

症例は56歳の母親，17歳の娘，13歳の息子の3例で，3例とも10歳をすぎて筋力低下が始まり，その後緩徐に進行し，現在筋萎縮の程度の差はあるが，その分布は顔面肩甲上腕型の筋ジストロフィー症にもっとも近い．また高口蓋，漏斗胸，骨格の変形を認めた．CPK は3例とも軽度上昇し，筋電図では母親の骨間筋で神経原性変化を認めたが，他はすべて筋原性変化であった．

筋生検は，母親と息子では大腿四頭筋，娘では上腕二頭筋で施行した．母親では，光顕並びに電顕的に central core（図3-A）と nemaline rod（図3-B）を認めたが，子供2人では core も rod も見出し得なかった．また母親では type 1 fiber predominancy，子供2人では共に type 2 fiber predminancy であった[4].

考　　察

従来，筋疾患の分類は，多くの場合基礎にある真の原因が不明なため主に遺伝形式や発病年齢，臨床像などに基づいた分類がなされてきた．しかし1960年以降，組織化学的染色法と電子顕微鏡が筋疾患の研究に応用される様になってから，筋の形態異常を伴なう多くの先天性ミオパチーが新しく分類されてきている．

先天性ミオパチーは，臨床的には疾患相互間にいくつかの共通点もあるが，それぞれに特異性もあり臨床的にもある程度診断可能である．しかし，

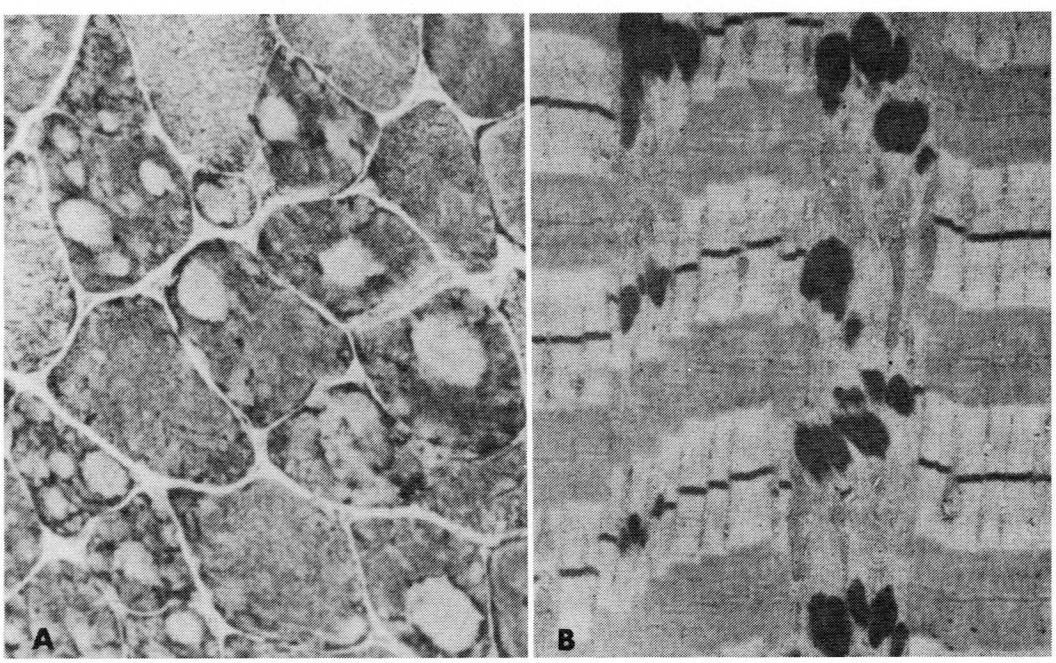


図3　central core disease（症例1）
A：多数の core（NADH 染色，×250）
B：nemaline rod（×6750）

慢性進行性で外眼筋麻痺と眼瞼下垂を主徴とするocular myopathyで，筋生検ではミトコンドリア異常を有しない非特異的な筋病理所見を示す症例や，また臨床的には肢帯型筋ジストロフィー症に類似し，筋生検ではnemalnie rodを認める症例もあり，必ずしも診断が容易でない症例もある．

一方，筋病理学的には結晶様封入体を含むミトコンドリアの異常や，rod，core，中心核など極めて特異的な形態異常を示す場合もあるが，例えば同一の筋線維内にrodとミトコンドリア異常の合併や，coreとrodの合併，またミトコンドリア異常と局所性酵素活性欠如を示す症例などいくつかの形態異常を合併する症例もある．さらに，臨床的にはほぼ同一の疾患と考えられる親子例で，筋生検では母親にのみcoreやrodを認めるが，子供では特徴的な形態異常を示さない症例もある．

このため，これらの形態異常のもつ疾患特異性，またその位置づけについては新しい問題も提起されつつある[5]．

今後，これらの症例の蓄積と，何らかの共通の代謝異常ないし病態追求へのアプローチが必要と考えられる．

まとめ

先天性ミオパチーの臨床的，筋病理学的諸問題について検討を加えた．

文献

1）福永秀敏，浜田陸三，井形昭弘：組織化学的に多彩な筋構築異常を伴うmitochondrial myopathyの1例．神経内科，10：182，1979.

2）福永秀敏，納　光弘，有村由美子ほか：眼筋麻痺とミトコンドリアの異常を伴ったネマリンミオパチーの1例．臨床神経学，18：35，1978.

3）中里興文，永松啓爾，福永秀敏ほか：Myotubular myopathyの1例．神経内科，9：495，1978.

4）福永秀敏，北野治男，徳永秀次ほか：「central core diseaseの一家系」の臨床的研究．臨床神経学，1980，in press.

5）Bethlem, J., Arts, W. F. & Dingemans, K. P.: Common origin of rods, cores, miniature cores, and focal loss of cross-striations. Arch. Neurol. 35：555，1978.

23）進行性外眼筋麻痺のミトコンドリア異常について

宮武　正*

研究協力者　渥美哲至*　新島健司*　吉田充男*

筋線維内ミトコンドリア異常を伴った進行性外眼筋麻痺症例については，Oculo-cranio-somatic neuromuscular disease[1] あるいは Kearns-Sayre syndrome[2] などとして報告されている．

著者らは家族例を含む4例について筋の組織学的検索を行い，家族例と孤発例との比較および両者に共通するミトコンドリア異常について若干の知見を得たので報告する．

症例報告

4例の臨床像を表1に示す．年齢は25～42歳にわたる．第1例は図1に示す如き3代にわたる累

表1　症例のまとめ

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Age. Sex	41 M	42 M	25 M	22 F
Fam. hist.	Aut. dominant	Sp.	Sp.	Sp.
Age at onset	10 y.o.	28 y.o.	20 y.o.	12 y.o.
Initial symptom	Ptosis	Ptosis	Ptosis	Ptosis
Involvements				
E. O. M.	+	+	+	+
facial m.	+	+	+	-
Bulbar m.	+	±	-	-
Proximal limb m.	+	+	+	+
Others			±Incoordination	
O. F.	N	Changes of pig. epithel	N	N
C. P. K. (I. U.)	112	92	N	N
EMG	M	M	M	M
C. S. F. protein	N	N	N	N
ECG	Inc. R.B.B.B.	N	N	Transient AV block

* 自治医科大学神経内科

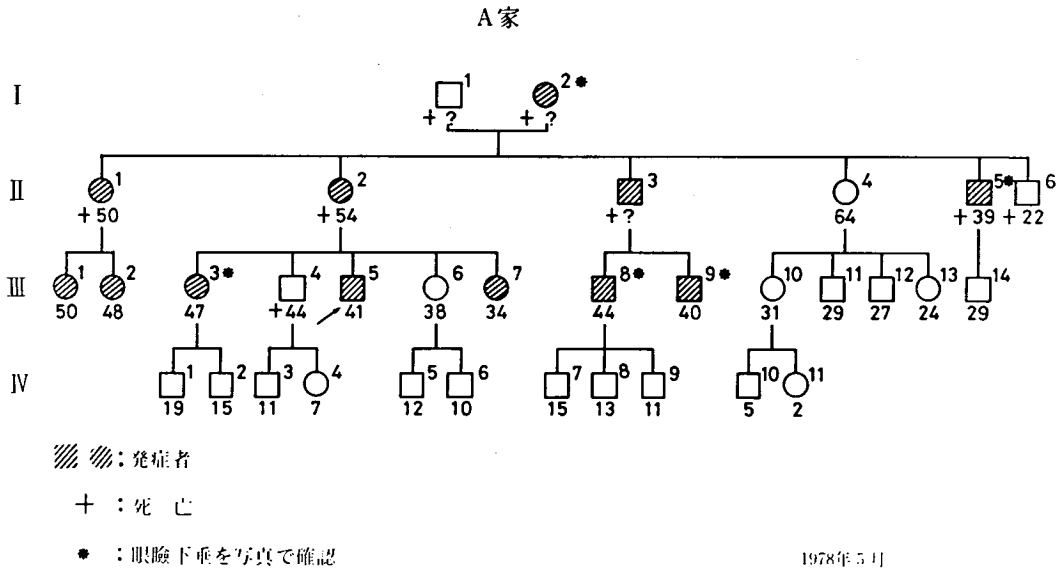


図1　症例1の家系図

代発現を示し，常染色体優性遺伝を有している．2，3，4例は孤発例である．発症年齢は10～28歳，経過は第1例が31年，その他は4～14年にわたる．筋障害分布では眼筋，四肢近位筋障害は全例に共通し，1，2，3例で顔面筋，1，2例で球部筋におよんでいる．その他に第2例で眼底の色素上皮の変化，第3例で軽い四肢の共同運動障害を伴う．

血清CPKは1，2例で軽度上昇，筋電図は筋原性変化に加え一部で神経原性変化の混在を認める．

筋組織所見

筋の生検は大腿四頭筋又は僧帽筋で行った．全例にragged red fiberに相当するGomori trichrome染色で筋膜下に赤染部を有する線維を認め，NADH-TR染色で同部は活性増強および低下の混在を認めた．

筋の電顕観察ではragged red fiberの赤染部に相当して筋膜下に異常ミトコンドリアの集積を認め，筋線維内にグリコーゲン顆粒，脂肪滴の増加を伴っていた（図2A）．異常ミトコンドリアにはクリステの増加，巨大化，脂肪封入体を伴うなどの変化を認め，最も特徴的なことは内膜クリスタ間または，内外膜間腔に連続する腔に層状の構造よりなる結晶様封入体を伴うミトコンドリアの存在であった（図2B）．またこれら筋膜下の異常ミトコンドリアの集積に随伴してfine filamentの集合をいずれの例においても認めた（図2C）．家族発症例と孤発例を比較すると，前者では異常ミトコンドリアはほとんど結晶様封入体を有するミトコンドリアのみよりなり，筋線維の表層に多いが，深部においても認められる（図3A）のに比し，後者では結晶様封入体を伴うミトコンドリアもあるが，巨大化，クリステの増加，脂質封入体の随伴など多様な形態を示し比較的筋線維表層に存在し，筋線維深部では正常形態を示すミトコンドリアが主であった（図3B）．

これらの所見のまとめを表2に示す．

表2　電顕所見のまとめ

	CASE1	CASE2	CASE3	CASE4
1. TYPES OF ABNORMAL MITOCHONDRIA				
CRYSTALLINE-LIKE INCLUSIONS	+	+	+	-
PROLIFERATION OF CRISTAE	±	+	+	+
HUGE MITOCHONDRIA	-	+	+	+
LIPID-LIKE INCLUSIONS	-	+	+	+
2. DISTRIBUTION OF ABNORMAL MITOCHONDRIA				
SUPERFICIAL	++	++	++	++
DEEP	+	±	±	±
3. AGGREGATION OF FILAMENTS				
NEAR ABNORMAL MITOCHONDRIA	+	+	+	+

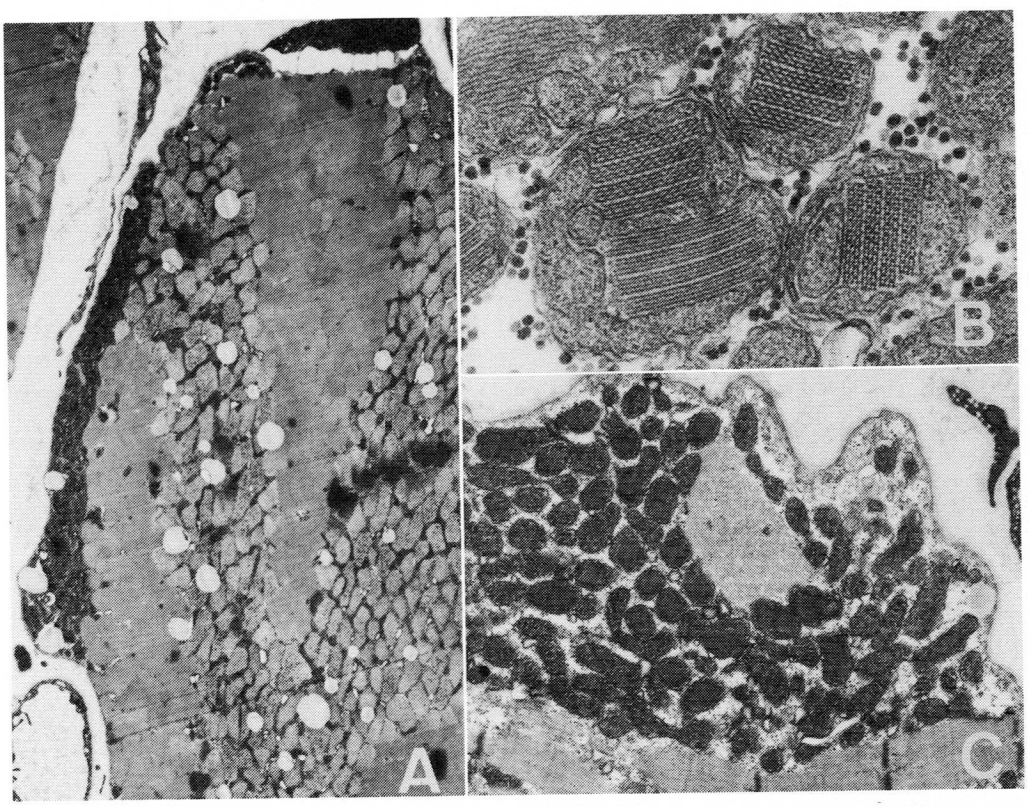


図2　EM.　A：3,240×　症例1　B：66,000×　症例1　C：7,920×　症例1

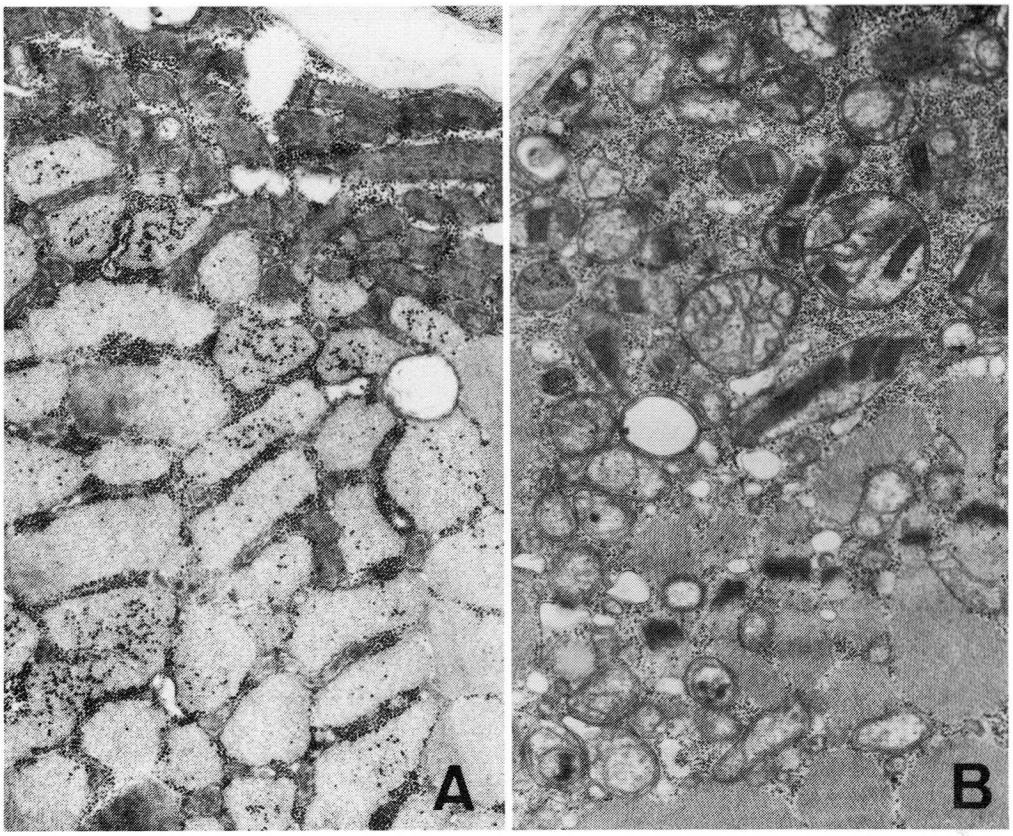


図3　EM.　A ×13,200　症例1　　B ×13,200　症例2

考　　案

四肢近位筋障害を伴った進行性外眼筋麻痺例の筋組織所見では ragged red fiber の存在が特徴とされている[1]. 又網膜色素変化, 心伝導障害やその他の神経症状を伴った進行性外眼筋麻痺例においても ragged red fiber の存在が報告されている[2]. ragged red fiber はミトコンドリア代謝の異常を伴った hypermetabolic myopathy においても認められ[3], さらにその他の筋組織所見に随伴して多発性筋炎などにおいても報告されている[4]. 一般にI型線維に出現しているが, 疾患特異性はなく, その発現機序は不明である.

現在まで ragged red fiber を伴った進行性外眼筋麻痺の報告例はほとんど孤発例であり, 家族性発症例の報告は少ない[5].

今回報告したミトコンドリア異常の所見と進行性外眼筋麻痺の本態との関連は不明である. ragged red fiber の筋線維表層におけるミトコンドリアの集積は, きわだった特徴的所見であるが, 今迄その意義づけはされていない. 最近 Kuroiwa らは粘菌を好気性培養から嫌気性培養へ移すとミトコンドリアが細胞表層へ移動すると報告している. ミトコンドリアの酵素関知機構つまりは電子伝達機能と関連し, その移動の際に細胞内の細線維系の関与を想定している[6]. 粘菌におけるミトコンドリア移動の所見は ragged red fiber における筋膜下のミトコンドリアの集積ときわめて類似している. 同様の機序が ragged red fiber にも存在すると仮定するとミトコンドリアの筋線維表層への集積の機序として2つの可能性が考えられる. 1つは ragged red fiber における低酸素状態の存在であり, 他の1つはミトコンドリア自体

における酸素要求性の亢進状態である．ミトコンドリアの代謝と密接に関連する病態が報告されているのは hypermetabolic myopathy[3]，実験的阻血性ミオパチーでのミトコンドリアの集積[1]，DNP 投与下培養筋細胞でのミトコンドリアの変化[8] などがあげられる．低酸素状態の存在は阻血性ミオパチーに，酸素要求性の亢進は hypermetabolic myopathy，DNP 投与などの際のミトコンドリア異常の存在と一致する．その他の疾患，例えば多発性筋炎などにおいてもその筋線維内においては同様の病態の存在が想定できる．

fine filament の集合はミトコンドリアの筋表層への移動に関与しているものかも知れない．

結晶様封入体を伴ったミトコンドリアは，家族例，孤発例いずれにおいても見出されたが，経過の長い家族例では，異常ミトコンドリアのほとんどをしめており，家族例又は経過の長い例により伴いやすいと考えられる．

結晶様封入体がミトコンドリア内外膜間腔に存在することは，今後ミトコンドリアの代謝障害の場を考える際に重要と考えられる．

文　献

1) Olson, W., Engel, W. K., Walsh, G. O., et al.: Oculocranio-somatic neuromuscular disease with "ragged-red" fibres. Arch. Neurol. (Chic.), 26 : 193—211, 1972.

2) Berenberg, R. A., Pollock, J. M., Di Mauro, S., et al. : Lumping or splitting ?—Ophthalmoplegia plus or Kearns-Sayre syndrome. Ann. Neurol., 1 : 37—54, 1977.

3) Luft, R., Ikkons, D., Palmieiri, G., et al. : A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control : A correlated chemical, biochemical and morphological study. J. clin. Invest., 41 : 1776—1804, 1962.

4) Chou, S. M. : "Megaconial" mitochondria observed in a case of chronic polymyositis. Acta neuropath. (Berl.), 12 : 68—69, 1960.

5) Barron, S. A., Heffner, R. R. Jr., Zwirecki, R. : A familial mitochondrial myopathy with central defect in neural transmission. Arch. Neurol., 36 : 553—556, 1979.

6) Kuroiwa, T., Takahashi, K. : Induction of mitochondrial migration in the slime mold Physarum polycephalum. Plant & Cell Physiol., 19(8) : 1561—1564, 1978.

7) Reznik, M., Hansen, J. L. : Mitochondria in degenerating and regenerating skeletal muscle. Arch. Path., 57 : 601—608, 1969.

8) Askanas, V., Engel, W. K. : Diseased human muscle in tissue culture—A new approach to the pathogenesis of human neuromuscular disorders. In L. P. Rowland (Ed.), Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, Excerpta Medica, Amsterdam, 856—871, 1977.

9) Bonilla, E., Schotland, D. L., Di Mauro, S., et al. : Electron cytochemistry of crystalline inclusions in human skeletal muscle mitochondria. J. Ultrastructure Research, 51 : 404—408, 1975.

24）ジストロフィーチキンの病態に関する研究

——飼料の影響——

木　下　真　男*

研究協力者　石　塚　洋　子*　山　田　信　興*

我々は，ジストロフィーチキン[1]に飼料がどのような影響を及ぼすか，前回にひきつづき検索してみたが以下のような結果であった．

対象及び方法

ジストロフィーチキンの孵化後直ちに実験食を与え，従来の飼料によるジストロフィーチキンの発症状態と比較検討した．また実験食投与後７週目の各々の胸筋の変化を光顕を用いて観察した．今回の実験食としては，

実験食１：日生研の飼料に発芽直後の小麦を混合したもの

実験食２：日生研の飼料$\frac{1}{2}$と小麦胚芽$\frac{1}{2}$を混合したもの

実験食３：日生研の飼料に小麦胚芽油を混合したもの

の３種類を使用した（表Ｉ）．また，小麦胚芽はカナダ産のマニトバ種の種子を加熱処理し，胚芽を分離したものを用い，発芽小麦は水栽培で15度から25度に保温し，発芽させたものを使用した．

結　　果

孵化後７週目に施行した flip test，10回の成績を比較すると（図Ｉ），実験食１群，14羽のチキンにおいては成績は３回から10回であり，平均は8.1回であった．また実験食２群，８羽のチキンでは成績は２回から10回で，平均は5.9回であった．これに対して実験食３群と普通食群は両者とも全く起き上がり不能のものが多く，僅かの個体で１回から２回可能であった．以上のことから実験食群では１，２とも普通食群に比較して，同一週令においては運動機能は比較的良く保たれていると判

表Ｉ　普通食と実験食の成分の比較

	ordinary food	wheat germ
vitamin E	30.00 (mg)	57.78 (mg)
nicotinic acid	39.09	34.47
crude protein	20.48 (%)	32.13 (%)
crude fat	3.19	9.75
crude fiber	3.03	3.15
crude ash	6.88	4.68
	vit. B pantothenate	vit. B folic acid pantothenate

	wheat germ oil
vitamin E	322 (mg)
saturated fatty acid	15.5 (%)
unsaturated fatty acid	84.4 (%)
linoleic acid	52.6
oleic acid	25.5
linolenic acid	6.3

experimental food 1 : ordinary food + germinated wheat
experimental food 2 : ordinary food 1/2 +wheat germ 1/2
experimental food 3 : ordinary food +wheat germ oil

＊東邦大学医学部第四内科

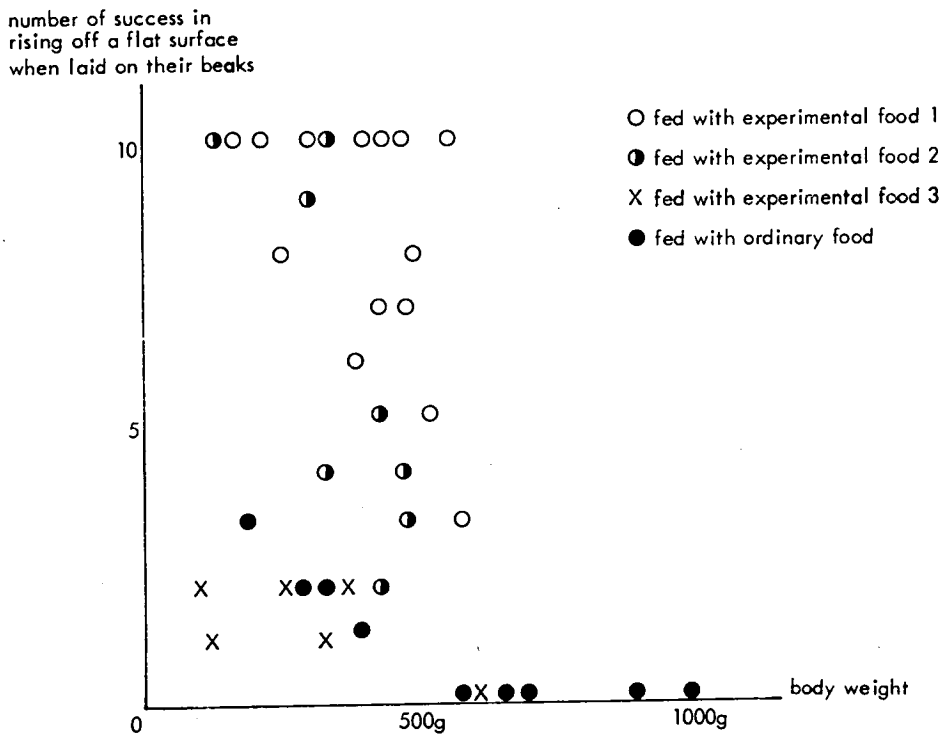


図1　普通食群と実験食群における flip test の成績と体重の関係

断できた．実験食1，2群ではやや体重の増加は少ないが，普通食群で体重の少ないものと比較しても明らかに差があり，運動機能の保持は低体重とは関係ないと考えられた．又実験食1群の方が2群よりもより機能が良好であったとの印象を得たが，統計学的な有意差はなかった．しかし実験食3群においては機能の改善はほとんど認められなかった．実験食の大まかな内容は表1の通りであるが，発芽小麦の成分の詳細に関しては現在検索中である．

また各実験食投与群の孵化後7週目における胸筋の変化を光顕を用いて観察した．ジストロフィーチキンでは筋線維の大小不同が著しく，一部小径線維の grouping を思わせる所見がみられた．又中心核や散在した変性線維が認められた．対照チキンにおいてはやはり大小不同，小径線維群，中心核，変性線維が同様にみられたが，ジストロフィーチキンよりは程度が軽いという印象を得た．またジストロフィーチキン，対照チキン，実験食群すべてにおいて血管壁の軽度の肥厚が認められた．実験食1，2群とも線維束により多少の差が存在するが，実験食1群では，flocc-ular change with phagocytosis が対照チキンよりやや多く散在する．しかし phosphorylase 染色では明瞭に3種類に判別可能で，また PAS 染色でも同様であり，染色性や全体の pattern は普通食群に比して良好であった(図2)．実験食2群においては萎縮筋線維が対照チキンより多く認められたが，程度，頻度の差は個体差のため明らかではなかった．phosphorylase 染色では実験食1群同様，明瞭に3種類に分別され，PAS 染色でも良好であった(図3)．

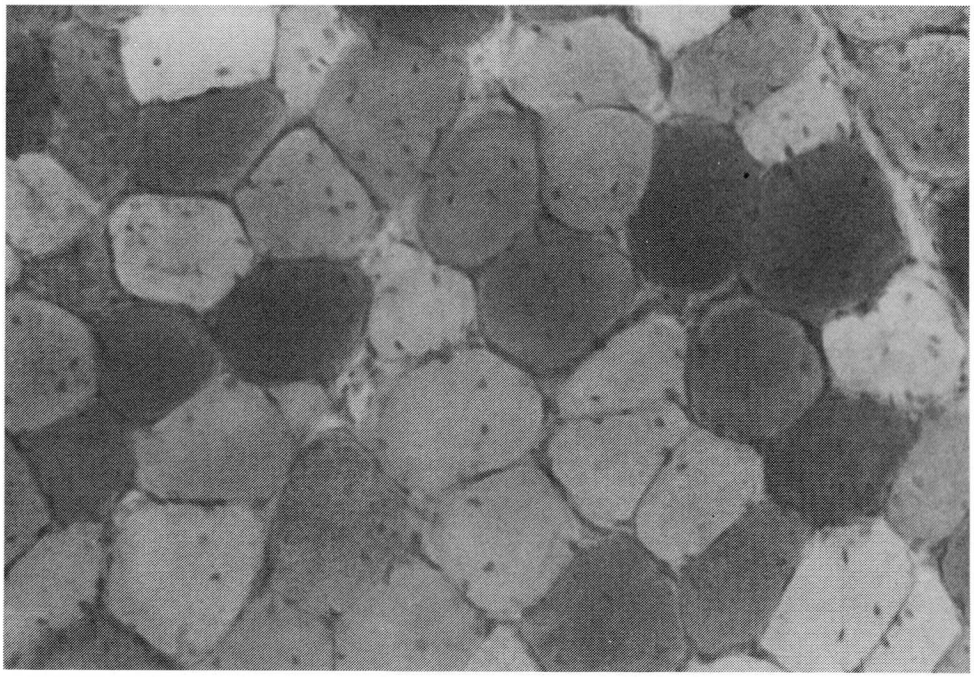


図2　実験食1群の胸筋
PAS 染色，3種類に分別され，全体のpatternは普通食群に比して良好であった．

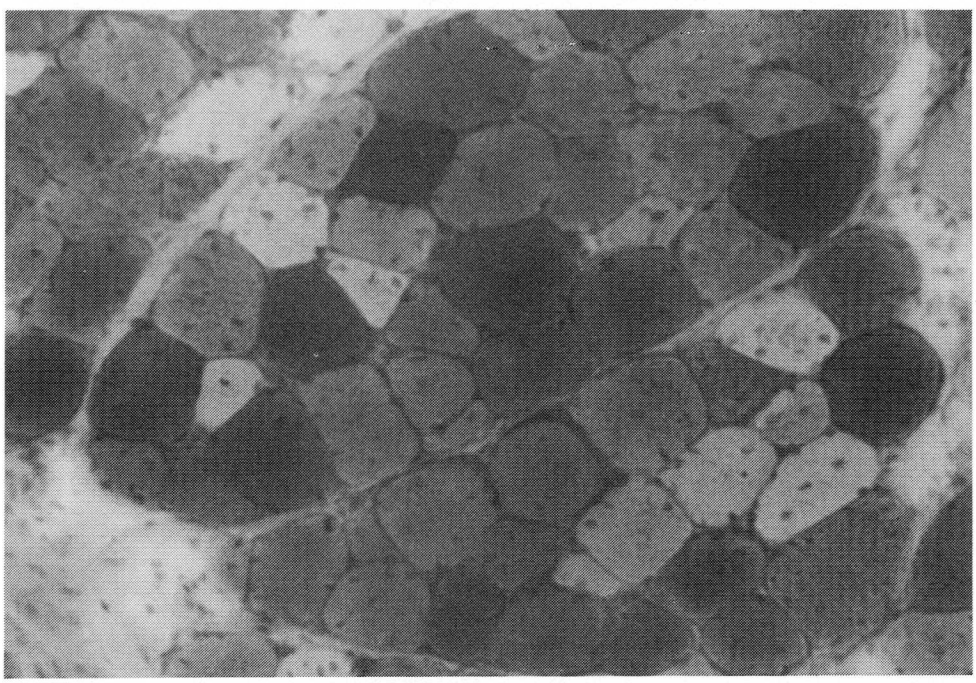


図3　実験食2群の胸筋
PAS 染色，3種類に分別可能だが，萎縮筋線維が対照チキンよりやや多く散在する．

考　　按

筋ジストロフィー症の原因は現在のところ不明であるが，蛋白分解酵素の増加や，RNA異常を中心とする蛋白合成系の障害[2]などが多くの報告者により証明されている．又骨格筋内のATP量の減少，トリグリセライドの増加やホスホリピドの減少，また不飽和脂肪酸による酸化作用なども報告されており，膜構造の異常ないしは機能の異常も指摘されている．我々は今回発芽小麦を利用したが，種子の発芽は周知の通り，複雑な生理化学的な変化が営なまれる現象で，既存のミトコンドリア，リボゾーム，核などの小器官や，酵素，RNAなどの高分子物質の活性化，呼吸の賦活，ATPの生産を経て，蛋白質の合成が進行する．発芽期の小麦における核酸の量的変動が報告されているが，DNA及びRNAは発芽とともに漸次増加しており，発芽の初期にはかなり多くのRNAが生産されていることが証明されている．また，小麦の胚からとりだしたリボゾームの蛋白質合成能，胚の吸水，ポリゾーム量の発芽期における変動の様相が確かめられているが，浸漬期にポリゾームの形成に先立ち，リボゾームの活性化がおこる．その他，発芽に際しては発芽ホルモン，細胞分裂ホルモンなどを含む植物成長ホルモンの生成と活性化が起こり，また，植物によっては，不飽和脂肪酸の分解の促進，トリグリセライドの減少，ホスホリピドの合成なども報告されている．またリンの含量は発芽初期に最高値を示すが，ビタミンA，B，C，D，Eなども発芽に際して生成され，小麦では発芽時のビタミンCの含量は乾燥重量の0.022%にも達している．以上のことをふまえて今回のflip testの結果を考えると，発芽期の植物の摂取がジストロフィー動物の筋に，多方面にわたり有効な作用を及ぼしていることが想定できるが，形態学的には現在までのところ明らかな相違は確認されておらず，発芽小麦が生体内にどのような機序で作用しているかは現在のところ不明である．単に栄養の改善による非特異的な効果か，何らかの特異的な意味を有する作用があるのか，今後充分な数で慎重に検討する必要のある問題と考えた．

文　　献

1）杉田秀夫，埜中征哉，石浦章一：筋ジストロフィーモデル（ニワトリ），神経進歩　23：979，1979.

2）Ross, K. F. A., Jones, K. W., John, H. A.: Tissue culture in muscle disease, in "Disorders of voluntary muscle" (ed. Walton, J. N.), Churchill Livingstone, Edinburgh & London, 1974, p. 443.

25）実験的ミオパチー（II）— Vinblastin, Colchicine によるラット骨格筋の形態学的変化

茂 在 敏 司*

研究協力者　小 西 慎 吾*　増 井 義 一*　竹 中 正 純*

目　的

筋疾患の病因に関連して，種々の毒物による筋障害のなりたちを実験的に比較検討する目的で，S52年度に報告したVincristine(VCR)にVinblastine (VBL), Colchicine (CLH), を加えて検討した．これらの毒物はいずれも植物のアルカロイドであるが，microtubles の蛋白成分と結合することにより有糸分裂阻害等の種々の作用を持つことが知られている．しかし生体内での代謝等に関して，いまだ不明の点が多い薬剤である．またVCR, CLHは，動物に大量投与する事により骨格筋に短期間の内に電顕的にいわゆる membranous body を形成する事が知られている．VBLにおいても同様の結果が予想されるがいまだその記載はみられない．

方　法

毒物としてVBLとCLHを注射用生食水にVBLは1 mg/ml, CLHは0.5mg/mlに溶解し使用した．動物は，Wister 系ラット，オス，体重100～200g を使用，VBLは1～4 mg/kg/日 1～2回を計38匹，CLHは，1.5及び2 mg/kg/日 1回計20匹をそれぞれ腹腔内投与し，投与終了後の24時間目に断頭，ただちに腓腹筋を採取し，左脚にて光顕的，右脚にて電顕的観察を行った．対照としては生食水1 mlを1～2回腹腔内投与した動物を用いた．光顕観察は，凍結切片にてHE染色，Trichrome 染色 Gomori 変法，ATP-ase 染色，NADH-TR 染色，Sudan Black B 染色，Oil Red O 染色，Cholinestelase 染色を施し，行なった．電顕観察は，燐酸緩衝2.6%グルタールアルデヒド及び燐酸緩衝1%オスミウム酸で固定し，エタノール系列脱水を行って，Epon 樹脂に包埋した後1 μの光顕用切片を作製し，Toluidin Blue 染色にて光顕観察を行い，次いで超薄切片を作製，酢酸ウラン，鉛の重染色を行い，日立H500型電子顕微鏡で観察した．

結　果

1．一般状態：VBL, CLHいずれの群でも1～2回投与後に種々の程度の後脚優位の四肢麻痺，下痢と体重減少を認めた．VBL群の運動障害は，他の群に比し軽度のものが多かった．その他，VBL群では，鼻，肛門出血の多発が認められた．2．光顕所見：VBL群の3例（1 mg/kg 2回1匹，2 mg/kg 2回1匹，2 mg/kg 1回1匹）のみに，Trichrome 染色 Gomori 変法で暗緑色に濃染し，ATP-ase (pH9.4) 染色でいわゆるType 2 線維より高活性に染まる筋線維がわずかではあるが認められた．またVBL, CLHの両群にNADH-TR 染色，Sudan Black B 染色で多くはないが筋原線維間網状構造のみだれあるいは破綻などが認められた(図1)．この変化は，VBL群内では投与量に比例してやや変化が強くなる傾向がうかがえ，CLH群内では特定の傾向は認められなかった．また対照群には筋原線維間網状構造の変化はまったく認められなかった．Cholinestelase染色による神経筋接合部の光顕的観察では，毒物投与

＊大阪医科大学第一内科

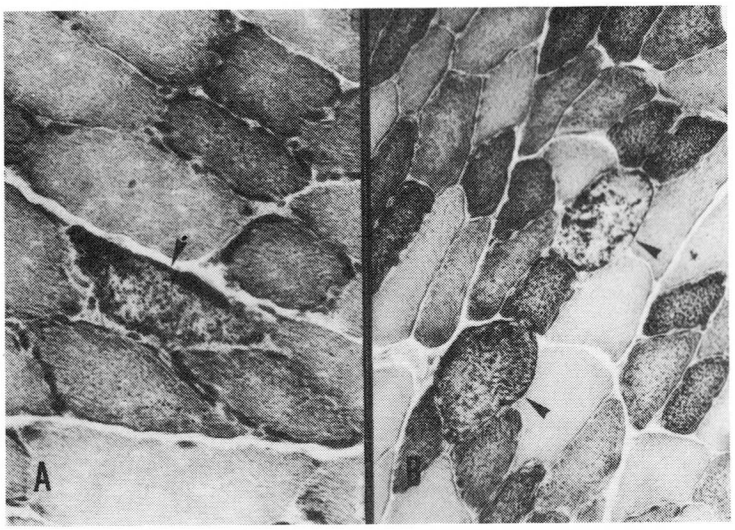


図1 A VBL 3 mg/kg/day 1日投与 Rat 腓腹筋 Sudan Black B 染色 ×200
筋原線維間網状構造の破綻を認める．（◀）
B CLH 1.5 mg/kg/day 1日投与 Rat 腓腹筋 Sudan Black B 染色×100
筋原線維間網状構造の破綻を認める．（◀）

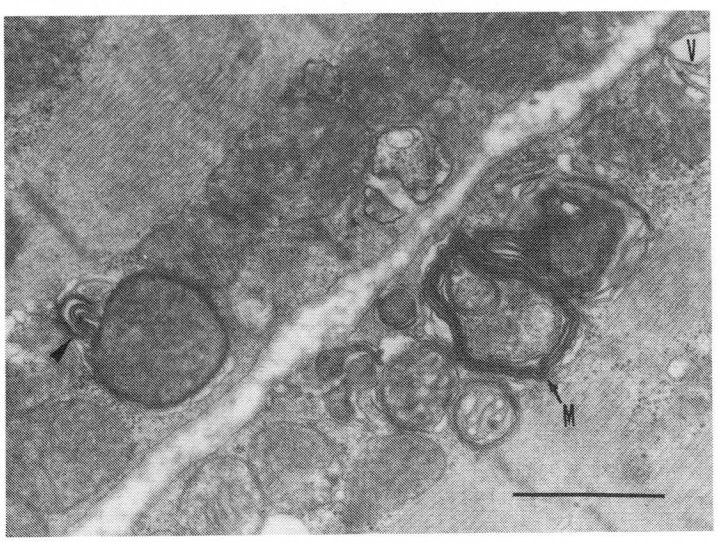


図2 VBL 3 mg/kg/day 2日投与 Rat 腓腹筋
変性した mitochondria と思われる構造物の膜構造の一部が membranous body への進展をうかがわしめる．（◀）
M. membranous body
V. 小空胞

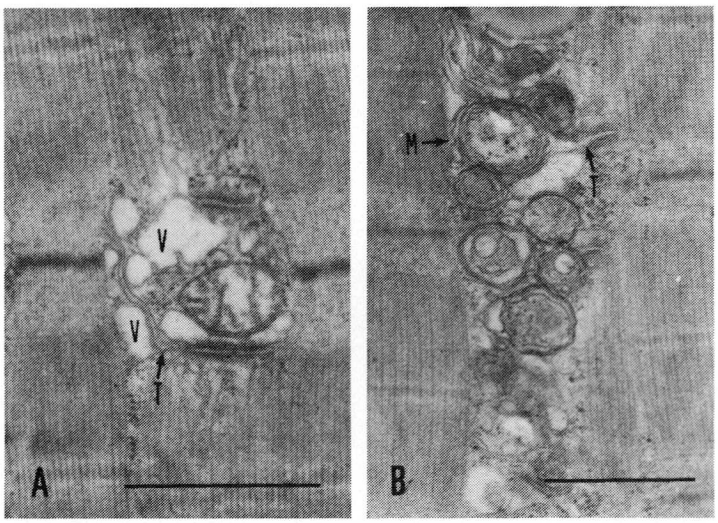


図3 A VBL 1 mg/kg/day 2日投与 Rat 腓腹筋
T-system(T)に隣接して種々の大きさの小空胞(V)が認められる.
B VBL 4 mg/kg/day 1日投与 Rat 腓腹筋
membranous body (M) と T-system (T) に連続性が有るがごとき像を呈している.

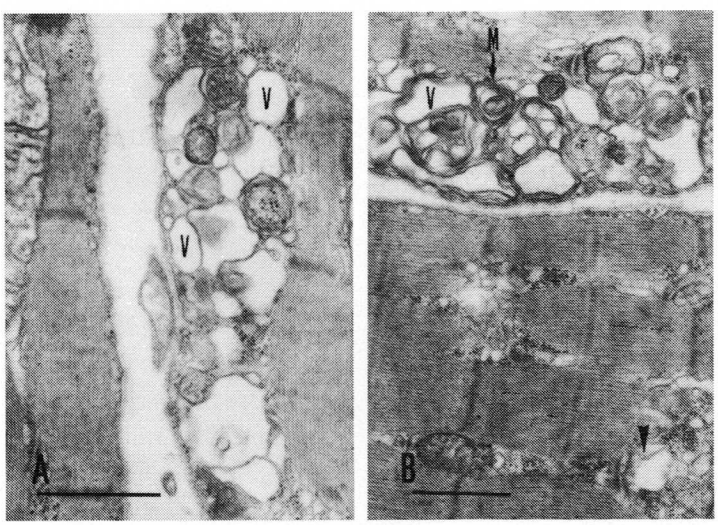


図4 A CLH 2 mg/kg/day 1日投与 Rat 腓腹筋
SRに由来すると思われる多数の小空胞(V)が認められる. membranous body の形成もうかがえる.
B CLH 2 mg/kg/day 1日投与 Rat 腓腹筋
membranous body (M) と小空胞(V)が一体となって認められる. Triad部のSRの小空胞化が認められる. (◀)

群と対照群との間に特に差を認めなかった．その他の染色でも前記以外の特記すべき所見は認められなかった．またEpon包埋試料の1μ切片のToluidin Blue染色による光顕観察でVBL,CLH両群の全例に高倍率観察で，凍結切片では認められなかった微小空胞が認められた．3．電顕所見：VBL群では，筋鞘膜下，筋原線維間に多数のいわゆるmembranous bodyの形成が認められた．membranous bodyのあるものは中心部に変性したmitochondria，あるいはglycogen様顆粒を持っていた．また破綻したmitochondria，種々の形の小空胞が認められた．他，変性したmitochondriaと思われる構造物の膜構造のmembranous bodyへの進展をうかがわしめる像が認められた(図2)．さらにある部位では，T-systemに隣接してSRに由来すると思われる種々の大きさの小空胞が観察され，またT-systemがmembranous bodyと連続性を有するがごとき像が観察された(図3)．また，ところどころのtriad部のSRの膨化，小空胞化が認められた．membranous bodyの形成は，VBLの投与量に比例して強くなる傾向が認められた．

CLH群では筋鞘膜下，筋原線維間に多数の種々の大きさの小空胞が認められ，これらの小空胞と一体となってmembranous bodyの形成が認められた．またところどころのtriad部のSRの膨化，小空胞化も認められた(図4)．小空胞の形成はCLH群では他の群より強い傾向が認められ，また1.5mg/kg投与群に比し2mg/kg投与群にmembranous bodyの形成が強く認められた．なお今回は，neuromuscular junction部の電顕観察はおこなっていない．

考　　案

今回，S52年度当班会議で報告のVCRにVBLとCLHを加えそれら毒物によるラット骨格筋の主として形態学的変化を比較検討した．光顕的変化は，VBL，CLH両群に共通して認められた筋原線維間網状構造の変化で，VCR群のものと同質のものであるが出現頻度，程度ともはるかに軽いのもであった．一方，VBL群の3例にATP-ase染色，Trichrome染色Gomori変法でわずかに認められた変化は，VCR群に同様の染色でみられた変化に類似したものであり，筋線維の障害を示す1つの所見と思われるが同様の所見が対照の1例にもわずかではあるが認められ，必ずしも投与毒物の影響のみによるものとは断定しきれないものであった．

電顕観察で両群に認められた多数の小空胞は，両群とも形としては類似した形態を呈し，ほとんどがmitochondriaより小さく，その大きさ形態からすると，その由来はSRあるいはT-systemが考えられるが，たとえばVBL群で変化の比較的軽い部位をみると，T-systemの変化は認められず，それに隣接する形で小空胞が配列し(図3A)，またtriad部でもSRのみが膨化，小空胞化している事などよりSR由来とする方が妥当と考えられた．しかしmembranous bodyの形成像には，両者間にやや異なる点があった．VBL群では変性したmitochondriaの膜構造の一部がmembranous bodyへの進展をうかがわしめる像がみられたが(図2)，これはVCL群で観察されたmembranous bodyが，その中心部に存在する変性したmitochondriaの膜構造と連続性を示す像と(図5)同質のものと思われ，VBL群のmembranous bodyの一部のものは，VCR群と同様に，mitochondriaに由来すると考えられた．しかしまたSR由来，あるいはSRが膨化した小空胞がmembranous bodyへと進展してゆく事も推測された．一部でmembranous bodyがT-systemの膜構造と連続するがごとき像が観察されたが，先にものべたごとく変化の軽い部位ではT-systemの膜構造には特に変化は認められず，それに隣接する形でSR由来と思われる小空胞が存在することより，SRがmembranous bodyへと進展する過程でT-systemをまきこんだものと推測された(図3AB)．したがってVBL群では，我々の観察も含めSlotwiner (1966)[1] 以来の諸家の報告しているVCR群のものと同様に，membranous bodyはmitochondria, SRの両者に由来するものと考えられた．一方CLH群では，VCR群，VBL群とやや異なりmembranous bodyとmitochondriaとの関連を推測させる像は認められず，VBL群と

図5　VCR 0.4mg/kg/day 3日投与 Rat 腓腹筋
membranous body とその中心に存在する変性した mitochondria の膜構造に明らかに連続性が認められる．（◀）

同様の小空胞の形成がより強く認められ，これらと membranous body とが一体となって認められる点が特徴的であり，membranous body は SR に由来することが推測された．また membranous body の形成は，両群とも投与量に比例して多く認められた．CLHの骨格筋におよぼす影響については，1952年 Fargerson, F. C.[2]がその四肢筋におよぼす影響に注目して以来，1971年 Markand, O. N.[3]，1972年 Hsu, L. ら[4]，1976年小口ら[5]が骨格筋に電顕的に小空胞，及び membranous body の形成が認められる事を記載している．特に Hsu らと小口らは，morter endplate にも同様の変化が強く起る事を指摘し，特に小口らは，endplate 附近の筋原線維間に大きな空胞の形成が認められることを指摘している．そしていずれの報告者も membranous body，空胞の由来は SR と推測している．今回の我々の実験では neuromuscular junction 部の電顕的観察を行っていないので，この点に関する所見をのぞけば，その結果は，諸家の報告に一致するものであった．以上のごとく VCR, VBL, CLH によってひきおこされるこれらの骨格筋変化は，それぞれ非常に類似したものであるが，membranous body の由来に関して，VCR，VBL 群と CLH 群のものにやや異なる点があると思われた．この相違点は毒物の作用の異なる点に基づくことも考えられるが，それがいかなる作用かはまったく不明である．これらの毒物のよく知られている作用は，3者に共通して microtubles の溶解と消失であり，この作用に基づく筋への影響としては，支配神経の axonal flow の停止に基づくものが考えられる．この点からすると前記の形態学的変化の差は，すくなくとも毒物の筋への直接作用によるものである事が推測される．

結　　語

VCR，VBL，CLH の3種のアルカロイドにより起る筋の形態学的変化の主体は，筋原線維間の構造の変化であり，その内容は，多数の小空胞と membranous body の形成であった．その小空胞は，SR に由来するものと考えられ，特に CLH群に強く認められた．membranous body の形成は，VBL

群では VCR 群と同様に mitochondria と SRの両者に，CLH群ではSRに由来するものと考えられた．

文　献

1) Slotwiner, P., Song, S. K., Anderson, P. J.: Spheromembranous degeneration of muscle induced by vincristine. Arch. Neurol., 15: 172, 1966.

2) Ferguson, F. C.: Colchicine, 1. General pharmacology. J. Pharmacol. Exp. Ther., 106: 261, 1952.

3) Markand, O. N., D'Agostino, A. N.: Ultrastructual changes in skeltal muscle induced by cholchicine. Arch. Neurol., 24: 72, 1971.

4) Hsu, L., Lentz, T. L.: Effect of colchicine on the fine structure of the neuromuscular junction. Z. Zellforsch., 135: 439, 1972.

5) 小口喜三夫，S. M. Chou：バキュオラーミオパチー――コルヒチンによる実験的Segmental Vacuolar Myopathyについて―．神経研究の進歩，20：59，1976．

26）アカバネウイルスによる先天性関節拘縮症：特に筋病変について

佐藤　猛*

研究協力者　荒畑喜一*　森　秀生*

目　的

昭和47年から50年にかけ日本各地に流行した異常産仔牛は先天性四肢関節拘縮や大脳欠損を主症状とし，arthrogryposis-hydroanencephaly (AH) 症候群と呼ばれている．

この異常仔牛の脳組織からアルボウイルスに属するアカバネウイルスが分離された[1]．また仔牛と母牛の血清中にこのウイルスに対する抗体の上昇が証明され，AH症候群の病因はアカバネウイルスの胎内感染によることが明らかにされた．

AH 症候群では大脳欠損と中枢神経系の炎症所見に加え，脊髄前角細胞の脱落，骨格筋萎縮などが記載されている[2]．筋病変の成立機序として胎生期の神経原性変化と同時に筋炎が合併しているのではないかと考えられている．

ウイルスによる先天性関節拘縮症の動物モデル作成と筋線維におけるウイルスの侵襲形態を明らかにするため，乳のみハムスターや妊娠ハムスター，あるいは培養筋組織にウイルスを接種し，電子顕微鏡で観察したので報告する．

材料と方法

ウイルス：アカバネウイルス（NB 45株）は尾田進博士から分与された．Vero 細胞でよく増殖し，titer は 10^4 TID 50/ml であった．

動物：(1) 乳のみハムスター（生後3日目）の脳内あるいは腹腔内に10^{-4}倍に稀釈したウイルス原液0.02 ml を接種した．(2) 妊娠ハムスター（妊娠9—15日）の皮下に10^{-2}～10^{-3}倍稀釈ウイルスを0.3 ml 接種した．

神経筋組織培養：(1) 11日令ラット胎児の脊髄とその近傍の筋組織（myotom）を Maximow's double coverslip 法にて培養，8日目にウイルス（10^{-3}，0.02ml）を接種し，8日後に電子顕微鏡で観察した．(2) 新生ラットの後肢筋を細切後，トリプシン処理し，単離細胞浮遊液を Maximow's double coverslip 法にて培養した．2日後ではほとんど全てがまだ筋芽細胞の時期であったが，これにウイルス（10^{-3}，0.02ml）を接種した．

結　果

1．乳のみハムスターの脳内接種：昭和52年度本研究班で既に報告したが，大脳，脊髄，骨格筋からウイルスが分離された[3]．電子顕微鏡では脊髄前角細胞の胞体内に多数のウイルス粒子が認められた．螢光抗体法では脊髄前角細胞（+++），大脳皮質（+），髄膜（++），骨格筋内神経終末（++），筋線維（±）とウイルスに対する特異螢光が認められた．

2．乳のみハムスターの筋肉内接種：骨格筋の散在性筋線維壊死，間質の細胞浸潤などがみられた．電子顕微鏡では筋原線維の濃縮，糸屑状の変性などが認められたが，明らかなウイルス粒子は見出し難かった．

3．妊娠ハムスターへの投与：生まれたハムスターは四肢の運動が，対照ハムスターに比して弱く，生後3日以内にほとんどが死亡した．骨格筋では変性に陥っているものも散見された．Endomysium には反応細胞がやや増加していたが，筋芽細胞との区別が難しく，炎症反応と断定出来な

*順天堂大学医学部脳神経内科

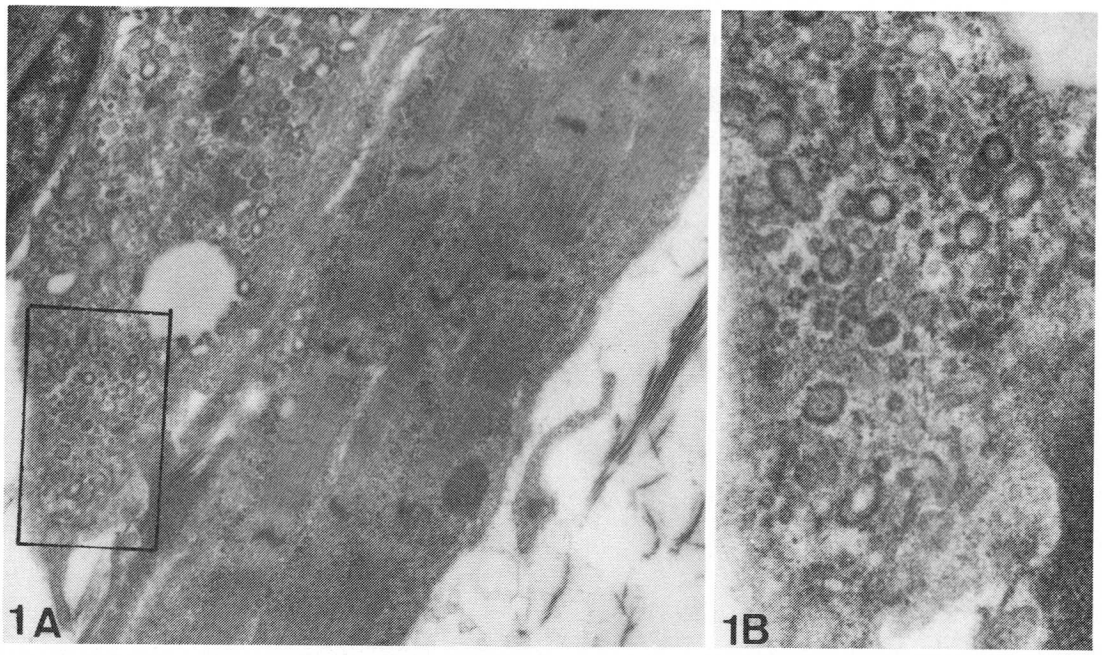


図1　Myotomの組織培養．アカバネウイルス接種後8日目の神経接合部．神経終末部には多数のウイルス粒子が認められるが，筋線維内には見出されない．（A：×15,000，Bは強拡大×38,000）

かった．また電子顕微鏡でもウイルス粒子は見出されなかった．

4．筋線維の組織培養：(1)　Myotom培養では脊髄内の前角細胞と軸索突起，髄膜細胞，神経筋接合部，Schwann細胞，筋線維などが発育していた．筋線維では筋原線維がよく発達し，横紋が形成されていた．

ウイルス接種8日後の培養組織では神経細胞の胞体には多数のウイルス粒子が見出された．異常に発達したゴルジ装置内や空胞内に存在し，coreとenvelopeより成る完全なウイルス粒子や小空胞のみのものなどが認められた．髄膜細胞やSchwann細胞の中にもウイルス粒子はみられ，また神経筋接合部の神経終末内にも多数見出された．なかには完全に壊死に陥って，細胞膜が融解し，ウイルス粒子が細胞外に散在している神経終末などもみられた．しかるにこれに接している筋線維ではなお内部の筋原線維や横紋構造はよく保たれており，ウイルス粒子も見出されなかった（図1）．培養中に混在している筋芽細胞内にはウイルス粒子に類似した小空胞が見出されることがあったが，少数であり，完全な形態のものはほとんどみられなかった．

(2)　筋芽細胞の培養では数個の細胞が融合し，初期のmyotubeを形成しているものもあったが，大半のものはまだ筋芽細胞の時期のままで，胞体内にはわずかであるが筋フィラメントが形成されていた．

これらの筋芽細胞内には多数のウイルス様粒子が存在していた．胞体内の異常に発達したゴルジ装置や空胞内に完全型あるいは小空胞だけのウイルス粒子が多数見出された．また壊死に陥っている細胞もみられた．大半の細胞内には大きな空胞が形成されていた（図2）．

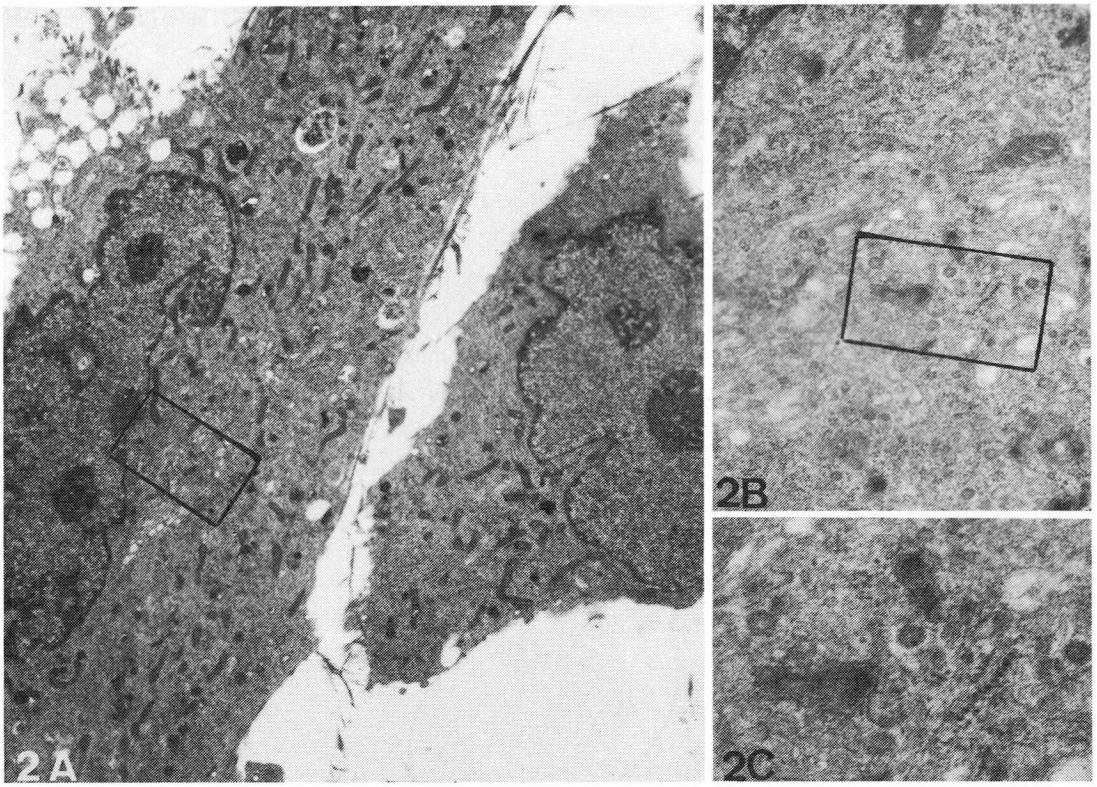


図2　筋芽細胞にアカバネウイルスを接種，8日後のもの．細胞質内のゴルジ装置にウイルス様粒子(矢印)が認められる．(A：×5,400，B：×9,700，C：×45,000)

考察と結論

異常産仔牛のAH症候群の病因はアカバネウイルスの胎内感染であることが解明されている．妊娠ハムスター[4]や孵化鶏卵[5]へのウイルス接種実験により，胎盤を通過して胎児へ感染することが実証されている．

仔牛のAH症候群の筋病変は神経原性変化に加え，筋線維自体の変化が加わったものと解される．比較的直径の太い筋線維における筋原線維の絮状変性やマクロファージの侵入などの所見が筋原性病変を示唆しているためである．

紺野[2]は妊娠母牛の静脈内あるいは妊娠山羊の胎児に直接アカバネウイルスを接種し，胎児に多発性筋炎を発症させている．

本研究においても乳のみハムスターの筋肉内接種，あるいは妊娠ハムスターへの接種実験の結果，筋線維に散在性の壊死が起こることを認めている．

仔牛のAH症候群の筋病変は，以上の種々の研究成果から胎生期の脊髄前角細胞の病変による神経原性萎縮と多発性筋炎による直接的な筋線維の傷害，さらに神経支配の欠落に起因する再生あるいは発達障害が加わっているものと考えられる．

次に組織培養の結果から，神経筋接合が成立し，神経支配が完成した筋線維ではウイルスに対する感受性が低く，筋芽細胞ではウイルスが容易に増殖することが分かった．この実験から筋線維の発達が未熟で，神経支配の完成していない胎生初期では，筋組織へのウイルス侵襲が起こり易いことが示唆される．また神経支配が成立した後にも，前角細胞へのウイルス感染により二次的に脱神経を受け，ウイルス感染への感受性が増大することも考えられる．

ヒトの先天性関節拘縮症では骨格筋萎縮と中枢神経異常が知られている．筋萎縮の原因として胎生期前半の関節形成期あるいはその直後に起った骨格筋の筋炎，あるいは下位，上位運動ノイロンの障害のためと考えられる．アカバネウイルスの感染実験より得られた結果は，ヒトの先天性関節拘縮症の成因を研究する上に多くの示唆を与えてくれるものである．

文　献

1）尾田　進，鍋谷政広，安原敏治ほか：新潟県内に発生した牛の異常産とアカバネウイルスの分離について．新医会誌，90：614，1976.

2）紺野　悟：昭和47年以降本邦に多発した牛の異常産―アカバネ病の病理―．家畜繁殖誌．22：39，1977.

3）佐藤　猛，尾田　進，鍋谷政広：神経研究の進歩，23：461，1979.

4）Anderson, A. A. & Cambell, C. H. & Experimental placental transfer of Akabane virus in the hamster Am. J. Vet. Res. 39：301，1978.

5）Ikeda, S. & Yonaiyama, K. : Deformities of chick embryos in experimental Akabane virus infection. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 18：89，1978.

27）虚血による実験的ミトコンドリア・ミオパチー：神経切断の影響

佐藤　猛*

研究協力者　西　克典*

目　的

ミトコンドリア・ミオパチーあるいはKearns-Shy症候群などにおいては，巨大ミトコンドリアやミトコンドリア内結晶状封入体などが特徴的である．

実験的ミトコンドリア・ミオパチーの動物モデルとしては腹部大動脈を結紮する方法や大腿部をゴムバンドなどで結紮する方法が報告されている．

われわれはミトコンドリア内結晶状封入体の形成過程を明らかにするため，ゴムバンドで大腿部を結紮する方法を追試すると共に，支配神経切断の影響の有無を検索したので報告する．

方　法

Wistar系成熟雄ラットをもちい，次の3群にわけて実験をおこなった．各群は5匹ずつとした．

第1群；1側大腿部をゴムバンドにて強く結紮し，24時間後エーテル麻酔下にて前脛骨筋を採取し，光顕，電顕で検索した．

第2群；あらかじめ大腿基部にて両側坐骨神経を切断し，24時間後1側大腿部をゴムバンドにて強く結紮し，更に24時間後エーテル麻酔下で前脛骨筋を採取し，第1群と同様に検索した．

第3群；第2群の対側の前脛骨筋を，神経切断のみの対照群として，同様に検索した．

光顕：採取した筋組織の一部を直ちに凍結して厚さ8μの切片を作製し，HE染色，ATPase染色，Gomori Trichrome変法，SDH染色を行った．

電顕：各筋の一部を2％グルタルアルデヒドで一時間固定後，2％OsO_4で固定し，エポン　アラルダイト包埋し観察した．

結　果

神経切断のみの第3群では，48時間後，光顕上

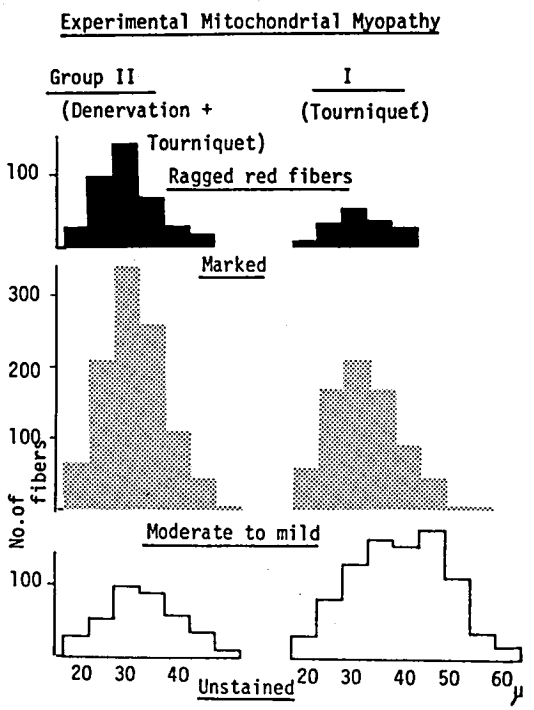


図1　Gomori Trichrome変法による赤染の程度を3段階に分けヒストグラムで示してある．縦軸は筋線維の数で横軸は直径（μ）．第2群でragged red fiberが著明に増加している．

*順天堂大学医学部脳神経内科

は殆ど差を認めなかった（図２Ａ）.

電顕による観察では，筋小胞体の大小様々な空胞状膨化や，ミトコンドリアのクリステの数の増加を認めたが，虚血をほどこした第１群と第２群におけるような結晶状封入体は全く見出されなかった.

虚血を24時間おこなった第１群では，従来報告されているごとく，Gomori Trichrome 変法で若干の ragged red fiber を認めた（図２Ｂ）. 他方，24時間前に支配神経を切断し，24時間虚血した第２群では，ragged red fiber の数が著しく増加したばかりでなく，筋線維の内部迄濃赤染したfiberが目立ち，著明なミトコンドリア異常を示唆する所見が得られた（図２Ｃ）.

図１に第１群と第２群の ragged red fiber の出現頻度を比較してあるが虚血のみの第１群で９％なのに比し，あらかじめ神経切断を加えた第２群では22％と著明な増加を示している.

ragged red fiber を電顕で観察すると，膨大化したミトコンドリアが無数に集積しており，ミトコンドリア内部ではクリステの数が著しく増加し，直線状のいわゆる trilaminar plate や顆粒状封入体を多数認めた（図３Ａ）.

trilaminar plate と称されているものは，異常に延長したクリステから新しい直線状構造が形成されたものであるが，このような構造はミトコンドリアの内膜と外膜との間にも形成されていた（図３Ｂ）.

この trilaminar plate を強拡大で観察した．ミトコンドリアのクリステ膜は内外２枚の unit membrane より成っているが，異常な直線状構造物の一端はこの内側 unit membrane と連続していた.

この新生された直線状構造は，よく観察するとさらに２本の細いフィラメント状のものから成っており，周期性を有する規則的な配列をしているようである.

すなわち細い２本のフィラメントがらせん状に組み合わされ，このものがさらに網目状の膜構造を形成しているようにみえる.

この trilaminar plate は隣接のものどうしが，たがいに接しているものがあり，さらにこの隣接のものが癒合している場合もある.

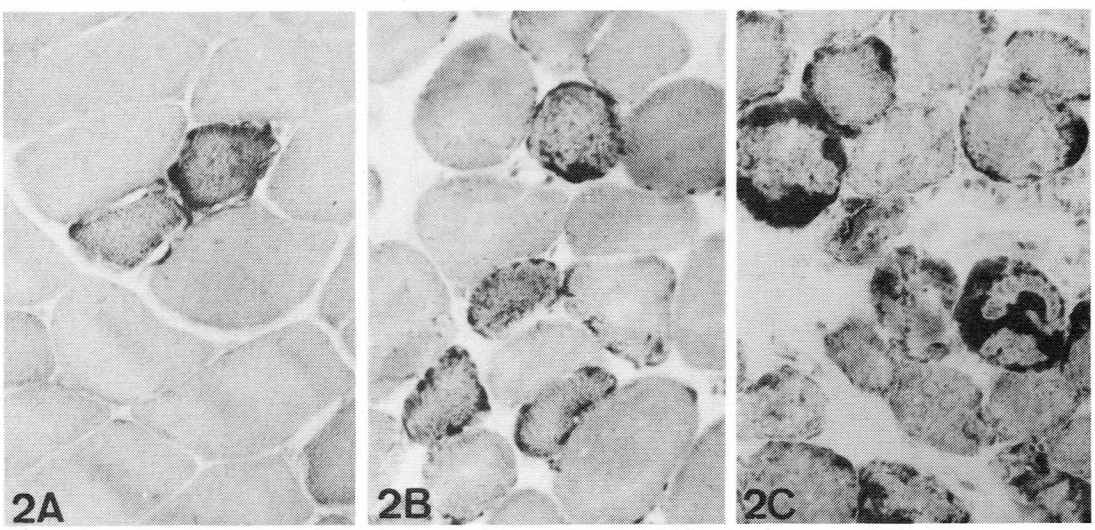


図２　Gomori Trichrome 変法で図２Ａは第３群（神経切断のみの対照群）．２Ｂは第１群（虚血のみ）．２Ｃは第２群（あらかじめ神経切断を加えた後虚血したもの）.
２Ｃでは筋線維の内部迄著明に赤染している.

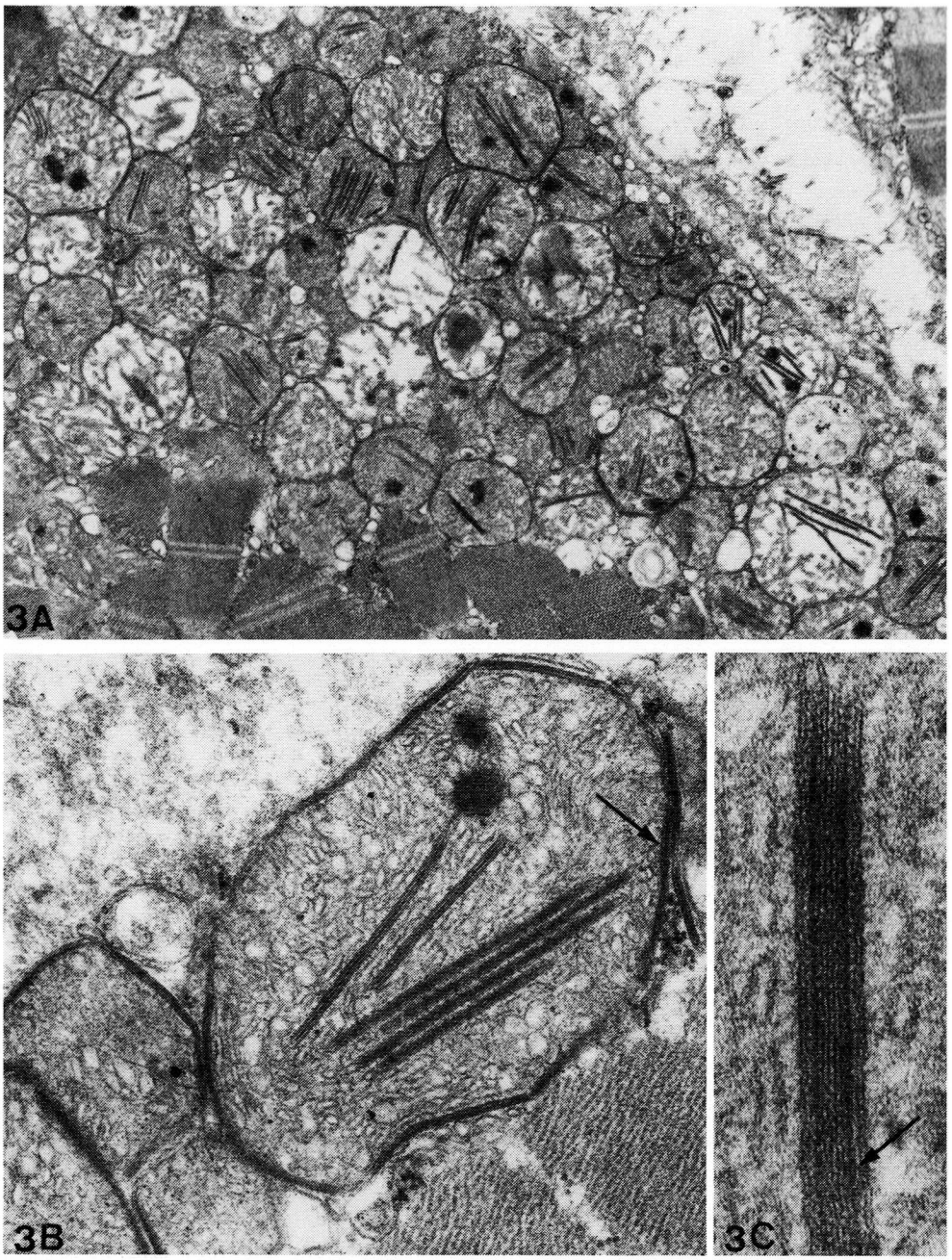


図3　3A（×16,000）　ragged red fiber の一部；ミトコンドリアの著明な集積と trilaminar plate, 顆粒状封入体及び結晶状封入体を認める.

3B（×55,000）　ミトコンドリアの内膜と外膜の間にも trilaminar plate が形成されている.（矢印）

3C（×200,000）　2本の trilaminar plate が癒合している.

直線状構造にみえたものは両側の内膜が合わさって形成されていることが判る（矢印）.また，2本の細いフィラメント状のものがらせん状に組み合わさっているようにみえる.

癒合した内部は網目状構造を呈している.

考　　察

虚血により ragged red fiber が出現し，ミトコンドリア封入体が生ずることは，Karpati (1974) 等が，ラットの腹部大動脈を結紮した後，Soleus, gastrocnemius の筋について検索，報告している．

Heffner 等 (1978) は直接大腿部を rubber band で結紮する方法により同じ現象をみている．rubber band による方法は当然支配神経もある程度 block していると考えられるが，われわれの第3群（神経切断のみの対照）でみたように，坐骨神経を48時間前に切断しておいても除神経のみの操作では決して今回認めたような封入体は出現しない．従ってこの封入体出現には虚血による Hypoxia が大きく関与していると思われる．

又，虚血を生ぜしめる操作としては，大動脈結紮では，側副路による血行の存在する可能性を否定し得ず (Karpati 等)，rubber band による結紮の方がより完全であると考えられる．

今回われわれが行った，除神経により ragged red fiber の形成が加速化されるという事に関しては今迄に検索されていない．

Karpati (1974) 等は腹部大動脈結紮時に同時に坐骨神経切断を加えた場合，われわれと反対に虚血による変化は少なくなり，それを不動化による energy 需要の減少による為と考えている．われわれの行ったのはこれと異なり24時間前に支配神経切断を加えており，このように除神経を先行させることが muscle の側に何らかの準備状態を形成しているのではないかと考えられる．実際支配神経を切断しておくと小胞体膜の異常やミトコンドリア内クリステの増加等が認められ，このように神経支配を断たれたことによる膜の異常があらかじめ生じていることが結紮によるミトコンドリア内封入体をさらに生じやすくしているとおもわれる．

Paracrystalline inclusion body 及び trilaminar plate に関して Heffner (1978) 等は前者は ragged red fiber に認められ，後者は主に necrotic fiber に存在し，両者は別個のものであるとしているが，われわれの観察では両者は同じ性格のものであり，単に発達の stage の違いによるものと考えられる．

trilaminar plate の形成過程に関しては，Hanzlíková と Schiaffino (1977) は，形成された膜状構造物はペプシンで消化され，また，pH 6.0 でジアミノベンチジンにより変化を受けないことから，ミトコンドリアクリステ膜に存在する酵素が異常に重合したものではないかと推量している．

われわれの観察でも形成された直線状構造物は，こまかい filament がらせん状に組みあわされ，さらに網目状構造をつくっているのではないかと考えられる．

結　　論

1．ラットの大腿部を結紮し，24時間後に前脛骨筋を採取し光顕及び電顕で観察したところ ragged red fiber 即ち異常ミトコンドリアを認めた．

2．支配神経をあらかじめ切断しておくと異常ミトコンドリアはさらに形成されやすくなった．

3．ミトコンドリア内結晶状封入体の形成過程について考察を行った．

文　　献

1) Hanzlíková, V. & Schiaffino, S. : Mitochondrial changes in ischemic skeletal muscle, J. of Ultras. Res. 60 : 121—133, 1977.

2) Heffner, R. R. & Barron, S. A. : The early effects of ischemia upon skeletal muscle mitochondria, J. of Neurol. Sci. 38 : 295—315, 1978.

3) Karpati, G.,Carpenter, S.,Melmed, C.& Eisen, A. A. : Experimental ischemic Myopathy, J. of Neurol. Sci. 23 : 129—161, 1974.

28) Rimmed vacuoleの組織学的・電顕的研究

福原信義*

研究協力者　熊本俊秀*　椿　忠雄*

はじめに

1973年，Dubowitz & Brookeは，oculopharyngeal dystrophyの筋生検で，9例中8例(89%)に筋肉の一部が打ちぬかれたようにはっきりとしたvacuoleがあり，周囲がGomori trichrome染色で赤く，hematoxylin-eosin染色で好塩基性に染まる線維状の物質で囲まれていることを見出し，rimmed vacuoleと名づけた．しかし，このrimmed vacuoleの本態・微細構造についての報告はみられない．我々は，今までに新潟大学神経内科およびその関連施設において行われた約300例の筋生検中9例の筋生検でrimmed vacuoleを観察し，組織化学的および電顕的に検討を行ったので報告する．

症　例

用いた症例のうち代表的なものを簡単に記すと，

症例1　70才，男

既往歴・家族歴：特別のことなし．現病歴：56才頃より眼瞼下垂が出現，徐々に悪化す．57才時，風船をふくらませないことに気づく．62才時，左眼瞼挙上術をうけたが，その頃より構語障害出現．64才頃より，歩行障害出現，次第に悪化し，特に階段の昇降が困難となってきた．嚥下・咀嚼力も次第に低下し，その頃，嚥下性肺炎を生じたこともある．68才頃より，複視に気づく．51年9月新潟大学神経内科に入院．入院時所見：眼底：乳頭・網膜は正常．眼瞼下垂・外眼筋麻痺のほか，嚥下障害(＋)．全身，特に軀幹部に筋萎縮がみられ，翼状肩胛(＋)，Gowers徴候(＋)，深部反射消失．テンシロン・テスト(－)．髄液：正常．末梢神経伝導速度：正常．筋電図：眼輪筋で低電位(＋)．血清CPK：正常．診断：Oculopharyngeal dystrophy．

症例2　28才，女

家族歴：血族結婚(＋)．現病歴：小さい頃より歩行は遅く，走ることはずばぬけて遅かった．27才時の第2子の妊娠後より，特に歩行が悪くなり，買物かごも持てないなど上肢の筋力低下にも気づく．50年7月入院．入院時所見：筋萎縮は肥満のためはっきりしないが，4程度の筋力低下がみられ，Gowers徴候(＋)，感覚障害(－)．筋電図：混合型．CPK：32—36．診断：Kugelberg-Welander病．

症例6　36才，女

既往歴・家族歴：特別のことなし．現病歴：12才頃より起立困難に気づく．次第に階段の昇降が困難になり，自転車をまたげなくなった．27才頃からは上肢の挙上も困難となってくる．診断：進行性筋ジストロフィー症（肢帯型）．

方　法

通常の手技にて筋生検を行い，電顕用に2.5%グルタールアルデヒドと1%オスミュウム酸の二重固定を行い，アラルダイトに包埋したが，一部はイソペンタン中で直ちに凍結し，凍結切片についてGomori trichrome染色，hematoxylin-eosin染色，PAS, reduced diphosphopyridine nucleotide diaphorase (DPNH), ATPase, oil red O, Sudan black B, Luxol fast blue, Alcian blue, toluidine blue, acid phosphatase(Barka & Anderson法）などの染色を行った．

＊新潟大学脳研究所神経内科

表1　Rimmed vacuole のみられた症例

Case	Age	Sex	Cl.Dx.	duration of illness(years)
1	70	M	Oculopharyngeal dystrophy	14
2	28	F	Kugelberg-Welander disease	3
3	45	M	"	2
4	16	M	"	3
5	29	F	Polymyositis	2
6	36	F	DMP(Limb-girdle type)	14
7	53	M	SPMA + optic atrophy	4
8	29	M	Unclassified hereditary neuropathy with ophthalmoplegia	7
9	23	F	"	10

結　　果

1）臨床的検討

Rimmed vacuoleのみいだされた9症例の臨床診断は表1のごとく，16～70才，男5例女4例で，臨床診断はoculopharyngeal dystrophy 1例のほか，Kugelberg-Welander病3例，分類不定の遺伝性ニューロパチー2例，多発性筋炎，進行性筋ジストロフィー症，進行性脊髄性筋萎縮症が各1例とさまざまであり，臨床経過も2年～14年と一定しておらなかった．

2）組織学的検討

Rimmed vacuoleは，Gomori trichrome染色で周囲が赤い線維状物質でふちどりされたvacuoleとしてみられる（図1）が，筋線維の中心部にあるもの，はじに偏在するものとさまざま．1本の筋線維中に数個みられるものから1個だけのものとさまざまであった．Rimmed vacuoleを有する線維は，症例1（oculopharyngeal dystrophy）では0.9%の筋線維でみられたが，他の疾患でも7.9%，5.6%（症例2，4：Kugelberg-Welander病），8.2%（症例8：分類不定のニューロパチー）と多数みられるものもあった（表2）．ATPase染色標本による形態計測分析（表2）では，肥大がtype I線維で8例中4例に，type II線維で8例中3例にみられ，萎縮は，type I線維で8例中6例に，type II線維で8例中4例にみられたが，rimmed vacuoleの出現率との関係はみいだされなかった．Rimmed vacuoleを有する線維は，type I線維に多かったが，type II線維にもまれにみられた．

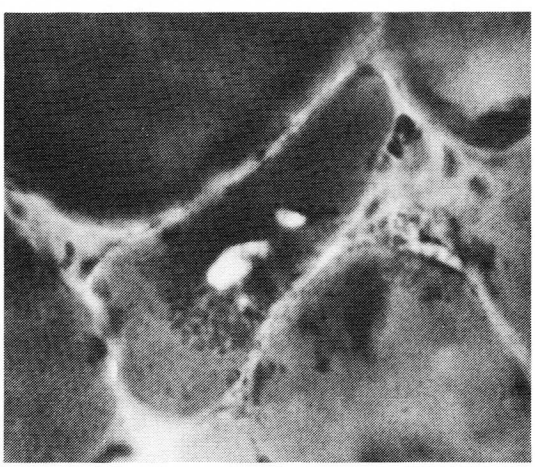


図1　Rimmed vacuole, Gomori trichrome染色 ×600

表2　組織化学的所見

Case	Muscle	Type I fibers	Hypertrophy Factor I	Hypertrophy Factor II	Atrophy Factor I	Atrophy Factor II	Rimmed vacuoles*	Acid Pase positive fibers
1	Q	18.3%	3444	344	222	164	0.9%	0.1%
2	G	56.4	271	2310	317	76	7.9	8.9
3	B						0.2	1.4
4	Q	38.6	20	279	162	66	5.6	62.1
5	Q	38.9	37	81	457	32	2.4	3.3
6	B	38.8	3423	758	90	521	2.1	42.2
7	B	47.9	3	14	607	320	1.0	25.7
8	Q	26.4	303	140	38	90	8.2	0
9	Q	40.9	1033	577	433	1122	0.5	0

Q: quadriceps femoris,　G: gastrocnemius,　B: biceps brachii

*　gomori trichrome stain

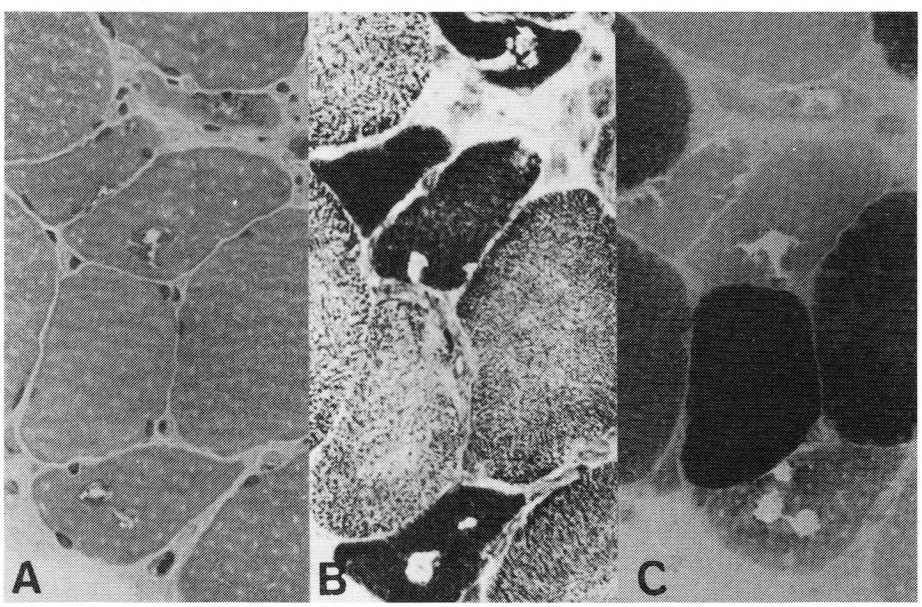


図2　A（Gomori trichrome 染色），B（DPNH 染色），C（ATPase 染色）は連続切片　×350

図3　Rimmed vacuole の電顕写真　×17,400

3）　Rimmed vacuole の組織化学的検討

Rimmed vacuole は，DPNH，ATPase では全く染まらず（図2），PAS 染色では染まるものと染まらないものとがあった．Oil red O,Sudan black B では全く染まらなかった．Alcian blue, Luxol fast blue では vacuole の辺縁のみわずかに染色されたが，vacuole の内部は染まらないものがほとんどであった．酸性フォスファターゼ染色では，大部分の vacuole は染まらないが，一部の vacuole の辺縁部が軽度に染まっていた．しかし，rimmed vacuole のみられた症例では，vacuole の部位とは無関係に酸性フォスファターゼが顆粒状に陽性となる筋線維が多く，症例4のように62.1%の筋線維で陽性顆粒のみられるものもあり，リソゾームの活性亢進がうかがわれた．一方，症例8のように，筋線維の8.2%に rimmed vacuole がみられたにもかかわらず，酸性フォスファターゼ染色で陽性顆粒のみられないものもあった．

4）　Rimmed vacuole の電顕的検討

Rimmed vacuole の凍結切片による標本では全くの vacuole となり，vacuole の中には何もみられないものが多かったが，オスミュウム酸固定，アラルダイト包埋標本では，toluidine blue で濃染する物質を多数入れていた．それらの物質は電顕では多層性膜状構造物（図3）から主になっていることが判った．この膜状構造物の間には，多数のグリコーゲン様顆粒に加えて，小さな myelin figures, dense bodies や顆粒状，線維状の種種の構造物がつまっていた．しかし，それらの周囲の myofilaments は，比較的きちんと配列しており，vacuole の内部の著明な異常構造とはきわだった対照をなしていた．変化の非常に軽いところでは，ほぼ正常に配列している myofilaments の間に，小さな膜状物質で囲まれたグリコーゲン顆粒や，いわゆる myelin figures が数珠状に出現しており，いわゆる myelin figures がこの rimmed vacuole のでき始めと推定された．

考　　案

Rimmed vacuole は，DPNH，ATPase などで染まらないことから筋肉の普通の構成成分とは異るか，または変質したものと考えられる．Alcian

blue, Luxol fast blue, PAS で染まることから，酸性ムコ多糖体，リン脂質，グリコーゲンなどを有すると考えられるが，電顕でみられた多層性膜状物質をはじめとする所見とも矛盾しないと思われる．この vacuole は，光顕標本作製時に内容物が流出するが，その構成成分が多層性の膜状構造物のために，周囲に線維状にはみ出したままつながって残り，rimmed vacuole としての特徴的な形態を示すにいたると考えられる．Carpenter ら(1978)は，慢性筋炎で同じような vacuole と膜状構造物が多数みられた症例を“封入体筋炎”として集めているが，光顕では“lined vacuole”が特徴的であるとしている．この“lined vacuole”は，rimmed vacuole と非常によく似ており，恐らく同じものと思われる．Rimmed vacuole のみられた症例の筋肉の多くが，リソゾームのマーカーとされる酸性フォスファターゼ陽性顆粒を有していたことから，これらの症例ではリソゾームの活性が高まっていることが判る．しかし，rimmed vacuole 自体にはまれに vacuole の辺縁部でのみ軽度に染まっていただけであり，rimmed vacuole となっているものは，リソゾーム活性のほとんど失われた残余小体であって，筋肉外へ排泄される前段階にあるものと考えられる．

結　　論

Rimmed vacuole は，autophagic vacuoleの一種であり，oculopharyngeal dystrophy 以外にも種々の疾患でみられる．その構成成分は主に多層性膜状構造物よりなり，光顕標本作製時にそれらが vacuole の周囲に線維状にはみ出して，rimmed vacuole に特徴的な形態を示すようになる．

文　　献

1）Dubowitz, V. & Brooke, M. H.: Muscle biopsy: A modern approach. Saunders, London-Philadelphia-Toronto, 1973, p.231.

2）Carpenter, S., Karpati, G., Heller, I. et al.: Inclusion body myositis: A distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy. Neurology (Minneap.), 28：8，1978.

29）Duchenne 型筋ジストロフィーにおける未分化筋線維の出現

高　木　昭　夫*

研究協力者　　埜　中　征　哉*

スキンドファイバー標本は，骨格筋細胞の収縮系や小胞体の機能の解析に適している．我々は Duchenne 型ジストロフィーを中心に各種の神経筋疾患の生検筋に本方法を応用した．Duchenne 型ジストロフィーでは，筋収縮蛋白分化の不完全な細胞が多数観察された．

対象および方法

対象とした神経筋疾患は，Duchenne 型ジストロフィー６名，その他の小児期の神経筋疾患７名，成人型のもの９名である(図３，４)．診断を目的とした筋生検に際して，上腕二頭筋より小切片を採取し，直ちに氷冷した弛緩溶液(G-５）に移した．実験法や試薬の組成は既報に準じた[1]．化学的スキンドファイバーの作製や筋切片の保存は Wood らの方法にしたがった[2]．

結　　果

A）Duchenne 型ジストロフィーの収縮系

3×10^{-5} M の free strontium ion を含む溶液(pSr 4.5）中でスキンドファイバーの発生する相対張力（P/Po，Po は 3×10^{-5} M free calcium ion により発生する最大張力）を検討した．対照のスキンドファイバーは pSr 4.5の溶液中での相対張力の程度により２群に分類される．タイプ１線維では P/Po は0.98±0.08であり，タイプ２線維では0.02±0.014である[1]．この方法によると Duchenne 型の筋線維はおおよそ３群に分類された(図１)．対照筋にみられる通常のタイプ１と２の他に，P/Po が0.5前後を呈する第３のタイプが観

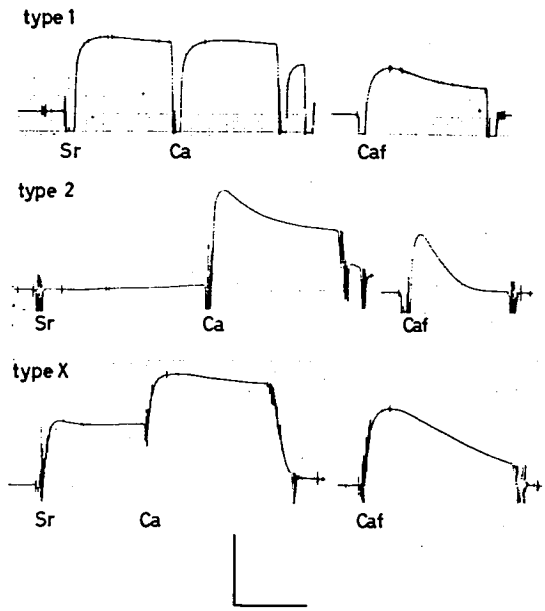


図１　Duchenne 型ジストロフィーよりの３種類の筋線維のストロンチウムとカルシウムによる活性化，およびカフェイン拘縮について実例を呈示した．タイプ１では 3×10^{-5}Mストロンチウムイオン（Sr）により 3×10^{-5}Mカルシウムイオン（Ca）と同程度の張力を発生した．タイプ２では Sr により殆んど張力を発生しない．タイプ X では Sr により Ca による最大張力（Po）の58％の張力を呈した．カフェイン拘縮はカルシウムを負荷したスキンドファイバーに40mM カフェイン（Caf）を G-0.1 の溶液中で投与して発生させた．筋小胞体にカルシウムを負荷するために，スキンドファイバーを10^{-6}Mカルシウムイオンを含む溶液中にて２分間 incubate した．カフェイン拘縮の peak tension と Po の比をカルシウム摂取の指標とした．較正は横棒20秒，縦棒18 mg（上，下）と36 mg(中）である．

＊国立武蔵療養所神経センター 疾病研究第一部

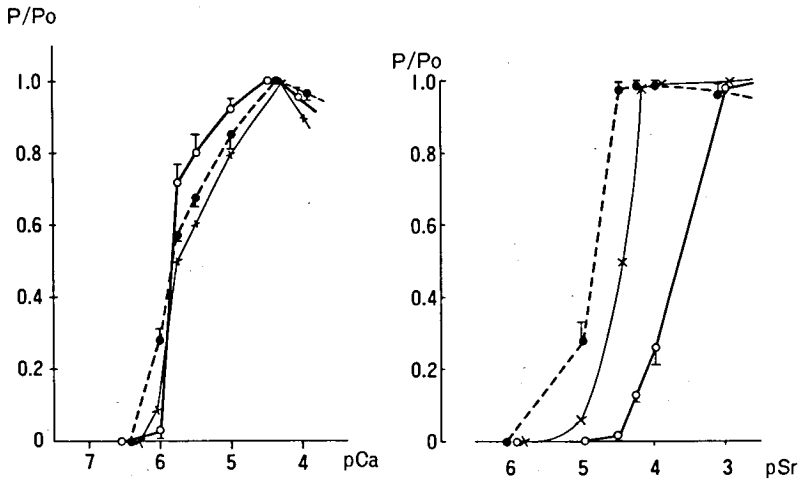


図2　タイプX筋線維の各種濃度のカルシウムやストロンチウムイオンによる活性化の程度をタイプ1や2のそれと比較した．タイプX（X）はpCa 6 で張力を発生し，pCa 4.5 でPo に達する．活性化の程度は，タイプ1（●）やタイプ2（○）と差違はない．ストロンチウムイオンに関しては，タイプXは，タイプ2とタイプ1の丁度中間的な活性化のパターンを呈した．タイプXに関しては1本の線維についての結果を，タイプ1と2については，5本の結果の平均と標準誤差を提示した．

察された．この群の筋線維をタイプXと仮称した．各種のカルシウムやストロンチウム濃度によるタイプXの活性化の程度を通常のタイプ1や2のそれと比較した(図2)．カルシウムによる活性化の程度は，タイプ1，2やXの間に著明な差はみられない．タイプXは，pSr 5の溶液中で収縮を開始し，pSr 4.2の中で最大張力を発生した．タイプ1や2との比較では，丁度中間的反応を呈した．

B）タイプX線維の出現頻度（図3，4）

pSr 4.5の溶液による相対張力は，0から1.1の広範囲に分布したが，0.5前後に分布する一群が存在すると推定される（図3）．0.3から0.7の相対張力を呈するものをタイプX線維と便宜的に分類した．Duchenne 型では，49本中の20本の筋線維がタイプXと分類された．小児期の他の神経筋疾患では，タイプX線維は観察されなかった(図5)．成人の神経筋疾患では，ALSや近位型脊髄性筋萎縮症で少数のタイプXが出現したのみであった．その頻度は成人では58本中の5本であった．

C）タイプX線維の特長

タイプXの筋線維直径，最大張力(P_0)，筋小胞体のカルシウム摂取容量について，Duchenne 型のタイプ1や2のそれらと比較した．まず筋直径は，タイプ1（n=18)：42±2（μm)，タイプ2(n=20)：45±2，タイプX(n=22)：37±2とタイプXで有意に小さい($0.01<p<0.05$)．しかしタイプX線維には例外的に60μmと直径の大きな線維も存在した．Poはタイプ1：0.8±0.1（kg/cm²)，タイプ2：0.8±0.1，タイプX：0.5±0.3とタイプXで若干低値であった（p=0.05，図5）．しかしいずれの筋線維タイプにおいても，Poが0.5kg/cm²にみたない筋線維が多量に存在した．

筋小胞体のカルシウム摂取指数は，タイプ1：0.5±0.1（n=12，範囲0.1～0.7)，タイプ2：0.6±0.1（n=13，0.2～1.0)，タイプX：0.6±0.1(n=14，0.2～0.8）であり，各群の間に有意差はなかった．カルシウム摂取指数が0.5に満たない筋線維は，タイプ1では4/12，タイプ2では3/13，

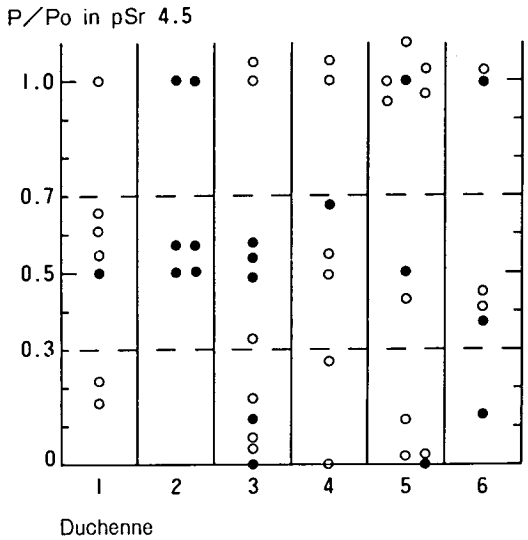


図3　6例のDuchenne型ジストロフィーから作製したスキンドファイバーにつき，pSr 4.5 の溶液中での相対張力（P/Po）を測定した．タイプ1線維ではP/Poは1.0に近く，タイプ2線維ではP/Poは0に近い．Duchenne型ではP/Poが0.3から0.7に分布する線維が多い．黒丸は最大張力が0.5 kg/cm² 以下に低下していた筋線維を意味する．

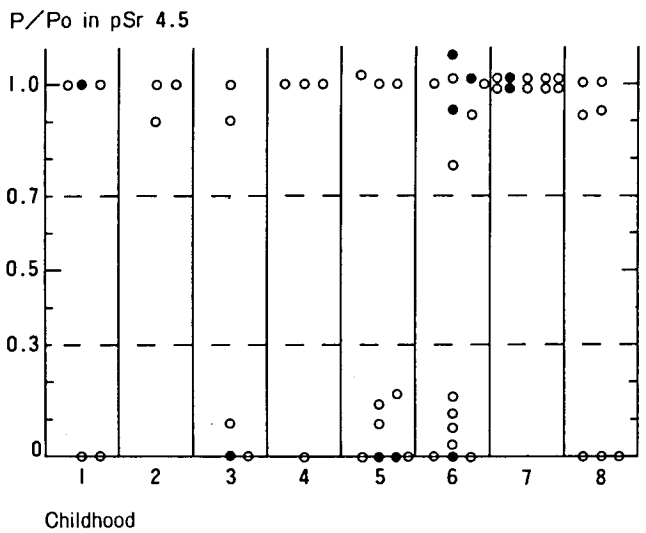


図4　主として小児期の神経筋疾患につき，図3と同様の測定を行った．各症例の診断と年齢は，1.（4歳男）と2.（1.5歳男）；脊髄性筋萎縮症，3.（12歳男）と4.（5歳男）；多発性筋炎，5.Becker型ジストロフィー，10歳男，6.Becker型ジストロフィーの疑い，27歳男，7.ネマリンミオパチー3歳男，8.眼瞼下垂と筋緊張低下，(14歳女)．黒丸は図3と同じく，Poが0.5kg/cm²以下の筋線維を示す．上記の疾病では，タイプXと分類される筋線維は検出されない．

タイプXでは4/14である．カルシウム摂取容量が，特定の線維タイプで低下している事実はないと推定した．

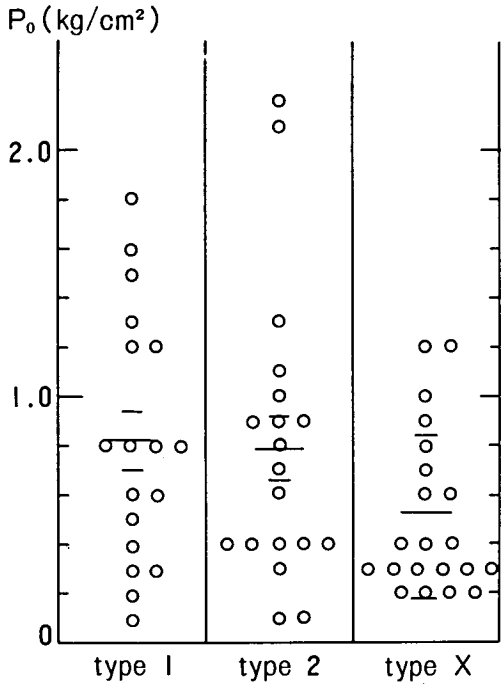


図5　Duchenne 型における各タイプの筋線維が発生した最大張力（Po）を提示した．各タイプにおいて，Po は広範囲に分布した．統計的にはタイプXで，有意に Po が減少していた（P＝0.05）．

考　　案

Duchenne 型ジストロフィーには，ストロンチウムイオンによる活性化に関して，通常とは異なった態度をとる一群の筋線維が存在した．このグループの筋線維をタイプXと仮称した．タイプX線維は直径がやや細く，断面積当りの最大張力はやや低下している．しかし筋小胞体のカルシウム摂取能に変化はない．このタイプX線維は筋萎縮性側索硬化症などに少数ながらみとめられたが，Duchenne 型ジストロフィーで圧倒的に多数観察された．

Kerrick ら[3]によると，生後5日目の家兎のひらめ筋のストロンチウムによる活性化はタイプ1とタイプ2の中間型を呈した．我々は生後第1日のラットのひらめ筋と長趾伸筋のストロンチウムによる活性化を検討した．それによると，この時期のひらめ筋や長趾伸筋はともにタイプXに類似した反応を呈した(未発表)．なおこの時期のラットの筋肉は組織化学的ミオシン ATPase 染色上，全てタイプ2Cの反応を呈するという[4]．これらの観察から推論すると，タイプX筋線維の反応は未分化筋線維のそれではないかと考えられる．他方，Duchenne 型の骨格筋は組織化学的にタイプ2C線維を含むことが知られている[5]．タイプ2Cは，いわゆる再生筋線維である可能性が指摘されている[5]．しかし我々はタイプXは組織化学上のタイプ2Cの一部にすぎないのではないかと考えている．何故なら，多量のタイプ2Cが証明される筋標本からでも，時として殆んどタイプX型の反応の筋線維が検出されないからである．Duchenne 型のタイプX線維の pSr 4.5溶液中での相対張力は0.5近辺に分布している(pSr 4.5の中での相対張力は，筋線維分化の指標になりうると考えられる)．またタイプX筋線維の中には，直径が60 μm と大きなものもある．このような諸事実から，Duchenne 型のある種の筋線維では，筋蛋白の分化が，非常に遅延あるいは停止している可能性が推定される．

収縮系のカルシウムやストロンチウム感受性は，調節蛋白としてのトロポニンにより規定されるといわれる．分化や再生途上のトロポニンの化学的性状に関してはまだ知見が乏しいようだ．今後この分野での追求が望まれる．

結　　論

Duchenne 型ジストロフィーやその他の神経筋疾患の生検筋よりスキンドファイバーを作製し，収縮系や筋小胞体の機能につき分析した．Duchenne 型ではストロンチウムによる活性化のパターンが，タイプ1とタイプ2筋線維の中間を呈するものが多数観察された．この群では，筋径はやや細く，最大張力の値は低下していた．出生直後の動物の骨格筋でのデーターから推論すると，この中間型の筋線維は分化の遅延したもの，あるいは不完全な再生線維の可能性が考慮された．

文　　献

1) Takagi, A., Yonemoto, K., Sugita, H.: Single skinned human muscle fibers: Activation by calcium and strontium, Neurology 28 : 497, 1978.

2) Wood, D. S., Sorenson, M. M., Eastwood, A. B. et al.: Duchenne dystrophy: Abnormal generation of tension and Ca regulation in single skinned fibers, Neurology 28 : 447, 1978.

3) Kerrick, W. G. L., Secrist, D., Coby, R., Lucas, S.: Development of difference between red and white muscles in sensitivity to Ca on the rabbit from embryo to adult, Nature 260 : 440, 1976.

4) 埜中征哉, Chou, S. M. : Werdnig-Hoffmann 病罹患筋の組織化学的検討. 臨床神経学 18 : 491, 1978.

5) Brooke, M. H., Kaiser, K. K.: The use and abuse of muscle histochemistry, Ann New York Acad Sci. 228 : 121, 1974.

30）筋ジストロフィー症の単一筋線維筋電図（第2報）

西谷　裕*

研究協力者　小西哲郎*　野口貞子*

目　的

個々の単一筋線維の活動電位を捕捉できる単一筋線維筋電図針を用いて各種筋ジストロフィー症での筋線維由来のjitter現象をより詳細に分析する事を試みた．昨年度は同一pairの筋線維の反射間隔（筋収縮の強弱）と互いの棘波間距離との関連を検討し，長い棘波間距離を示すpairのjitter現象は反射間隔と密接な関係にあり，反射間隔が短くなる（筋収縮が強くなる）と棘波間距離は短縮することを報告した．これは遅れて活動電位が出現する筋線維では筋線維伝導時間が反射間隔に依存するvelocity recovery function (VRF)が大きいためと予想された．そこで今年度は多極型単一筋線維筋電図針を用いて，棘波間距離の変動と同時にpairの各々の筋線維の筋線維伝導時間の変動も観察し，筋ジストロフィー症での筋収縮の強さと両者との関連を検討した．

方法と対象

各種筋ジストロフィー症の一側総指伸筋で不均一な随意的収縮下で多極型単一筋線維筋電図針(多極針）を用いて単一筋線維由来の活動電位を観察した．多極針は図1のように約25μの直径を有する電極が3個と6個が約200μの間隔で対立して針の横に埋め込まれた約0.65mmの太さを持つ筋電図針である．対立する互いの電極間距離は図の如く計測されている．多極針を筋線維の走行に垂直に近い穿刺で総指伸筋に穿入させる．まず一方の列の一つの電極（例えば電極No 8）でpairを捕捉し，このpairと相同的な活動電位を他方の列の電極（電極No 1～6）より電極選択器により適宜選び，最も近似した波形の得られる電極を捜す．即ちこの対立した2つの電極に平行に筋線維が走行するような状態を選ぶ．この2つの対立した電極が筋線維の走行に平行に位置すれば2つの電極由来の同一pairの活動電位は針のわずかな浅深運動で波形の振幅が同じような変動を示すので確認できる．

対立した2つの電極が筋線維の走行に平行に位置すると，図2Bのように相同的な2つの活動電位が2つの電極の電極間距離に相応した波形のずれをもって出現する．2つの電極より得られる波形は，互いのsweepの基線を一致させ(図2A）先行する筋線維の活動電位でtrigger させて早いsweep speedで観察する（図2B）．互いの筋線維の伝導速度(propagation velocity)はE_1とE_2の電極間距離を互いの活動電位のずれ(PV_1, PV_2)で徐した値となる．正確な伝導速度の測定には電極が筋線維に一番近接した位置（活動電位の振幅がmaximumになる位置）になるようにしなければならないが，今回はpairの互いの筋線維の伝導時間の変動を検討するので若干不正確な伝導速度が得られている．

互いの筋線維の筋線維伝導時間のわずかな変動を観察するために，互いに早いsweep speed（40 μ/cm）で検索できるようにdual sweep methodを用い2channelのdata recorder(TEAC R-410)に収録された波形を1/5のspeedで再生して分析を行った．

＊国立療養所宇多野病院神経内科

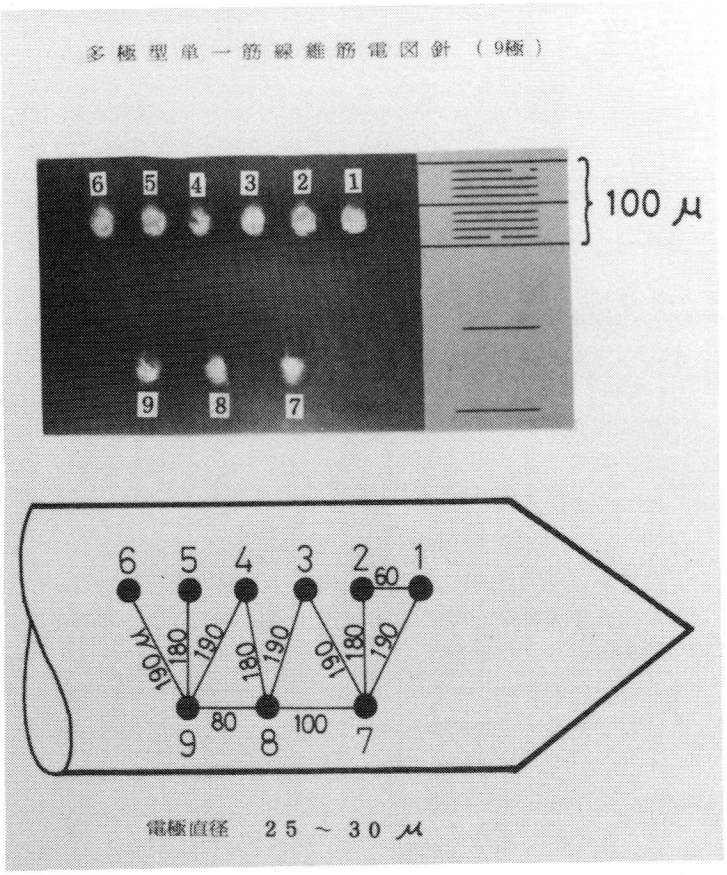


図 1

結　　果

分析方法を具体的な例で示す．Duchenne 型筋ジストロフィー症(18歳男性)の総指伸筋より得られた1つのpairの棘波間距離 (interpotential interval:IPI) と 1st component 及び 2nd component の筋線維伝導時間をそれぞれ PV_1, PV_2 として横軸にプロットする．図 3 は筋収縮の強弱を変えながら下方から上方へ連続的に記録した時の同一 pair の IPI, PV_1, PV_2 をプロットしたものである．この pair の IPI の変動は図中の右半分のプロットでわかるように，直前に出現した同一 pair との時間的間隔と密接な関連を示し，直前の pair からの時間が長いと（筋収縮が弱くなると）IPI は長くなり，逆に筋収縮が強く直前の pair からの時間が短いと IPI は短縮する．同程度の筋収縮で反射間隔がほぼ一定でも IPI は短縮傾向を示す．図 3 の左側にプロットしてある各々の筋線維の伝導時間 (PV_1, PV_2) も IPI と同様な延長・短縮傾向を示し，この変動は PV_2（2nd component の筋線維伝導時間）においてより著明であった．次に同一 pair での IPI, PV_1, PV_2 の分析方法を変えて任意の記録部位より直前に出現した同一 pair からの時間（反射間隔 interdischarge interval : IDI）を縦軸にとり IPI, PV_1, PV_2 の変動をみる(図 4). このようにすると図 3 で認められた直前に出現した同一 pair からの時間との関係がより明らかとなり，直前に出現した同一 pair からの時間が短い (IDI が小さくなる) と，IPI, PV_1, PV_2 は共に短

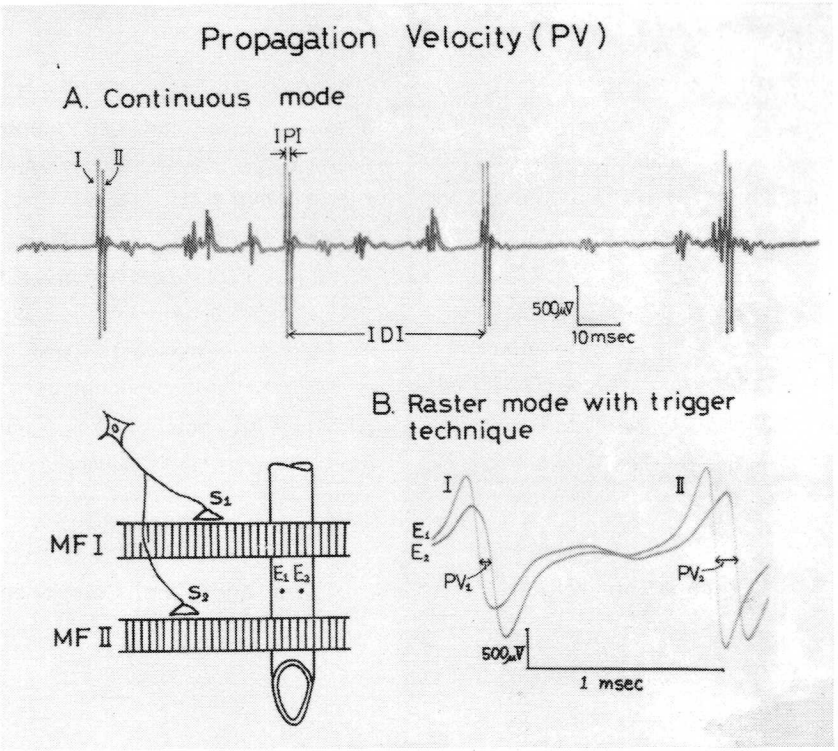

Propagation Velocity (PV)
A. Continuous mode
I
II
IPI
IDI
500μV
10msec
B. Raster mode with trigger technique
S1
S2
MF I
MF II
E1 E2
I
II
E1
E2
PV1
PV2
500μV
1 msec

図 2

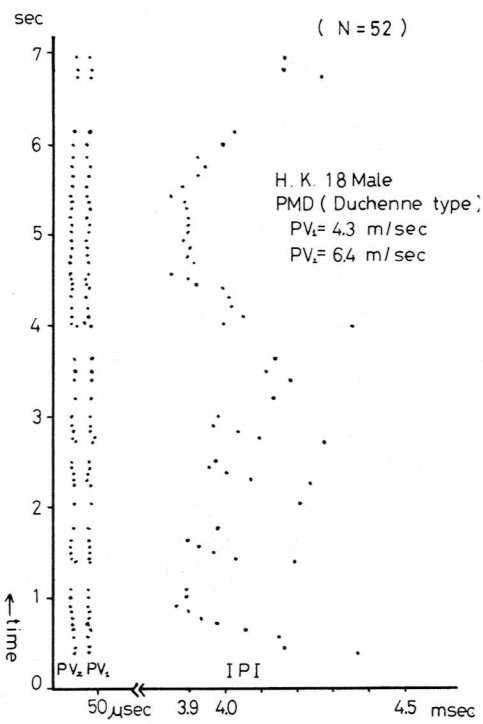

sec
(N = 52)
H. K. 18 Male
PMD (Duchenne type)
PV1= 4.3 m/sec
PV2= 6.4 m/sec
time
PV2 PV1
IPI
50μsec
3.9
4.0
4.5
msec

図 3

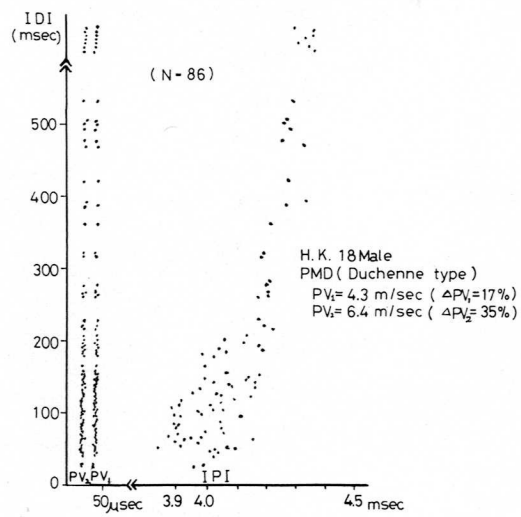

IDI
(msec)
(N = 86)
H. K. 18 Male
PMD (Duchenne type)
PV1= 4.3 m/sec (ΔPV1=17%)
PV2= 6.4 m/sec (ΔPV2= 35%)
PV2 PV1
IPI
50μsec
3.9
4.0
4.5 msec

図 4

縮を示し，IPI は IDI が200 m sec 以内（筋収縮が１秒間５発以上の強い収縮）では IPI の変動の巾が大きくなる．IPI の変動は IDI が小さくなるにつれて扇状の広がりを示す．PV_1，PV_2 の変動の程度を示すために，IDI が500 m sec 以上の時のそれぞれの伝導時間に対して，IDI が充分小さい時の伝導時間の短縮を短縮率として ΔPV（%表示）で表わした．この pair での ΔPV_1 及び ΔPV_2 はそれぞれ17%と35%で，遅れて出現する 2 nd component の短縮率が先行する 1 st component のそれを上まわり，IDI が短くなるとそれだけ 2 nd component の伝導速度が早くなって結果として２つの筋線維の棘波間距離が短くなると考えられる．

図４の方法に従って各種筋ジストロフィー症より得られた pair での分析結果をまとめたのが図５である．それぞれの 1 st component を横軸の０の位置にとり横軸は 2 nd component までの平均棘波間距離を示す．縦軸にそれぞれの筋線維の伝導速度を計算して，同一 pair は実線で結んである．（　）内にそれぞれの筋線維の ΔPV を%で示した．この 5つの pair でのそれぞれの筋線維伝導速度は２～６m/sec で，2 nd component の方が先行する 1 st component より遅い傾向にある．ΔPV は先述の pair を除き他の pair では 1 st component の方が大きい傾向を示した．

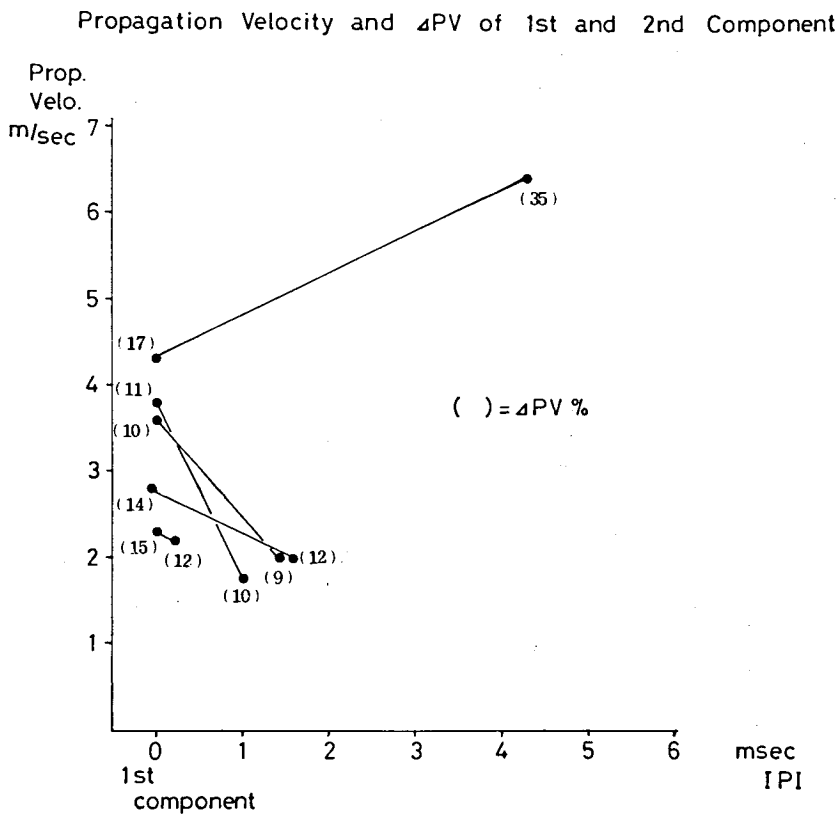


図５

考　　察

Velocity recovery function (VRF) はStålberg が同一の単一筋線維の伝導速度が直前に興奮してからの時間と密接な関係にある事を，同一の筋線維の間隔を変えた電気刺激により見出した現象である[1]．興奮直後は筋線維の refractory phase のため刺激が来ても興奮は起こらないが約 50 msec に peak をもって10 msec ～ 1000 msec にわたり伝導速度が速くなる現象である．このことは電気刺激によらず随意的収縮の強さを変えてもみられ，正常筋でも16%の筋線維に明らかな VRF が認められ，筋ジストロフィー症では VRF の著明な筋線維が増加し約50%にも及ぶ[2]．この VRF の成因は不明であるが筋線維膜の一つの特性を表わす指標としてとらえられているが，筋ジストロフィー症で著明になることは，筋ジストロフィー症の T system の形態上の異常を考えると興味ある現象である．一方同一 pair の棘波間距離が時間的経過で変動する現象が jitter 現象であるが，神経筋接合部の transmission time の variability 由来の junctional jitter の他に互いの筋線維の VRF の程度の差による VRF 由来の jitter (myogenic jitter) が筋ジストロフィー症で大きく関与する事が予想される．昨年度は各種筋ジストロフィー症でこの myogenic jitter を示す pair が多い事を示し，特に late component との間では著明であった[3]．VRF の大きさを示す一つの指標として ΔPV をそれぞれの筋線維で検索したが，今回は1つのpair を除き他は 1 st component の方が ΔPV が大きい傾向を示し予想とは反する結果が得られた．その理由としては① PV の測定には筋収縮の強弱による記録電極のわずかな位置のずれが PV 測定に大きく影響し，真の PV の変動が把握できにくい，②神経筋接合部（筋腹中央部）より記録電極までには数 cm の筋線維があるが，そのうちわずか200 μ の長さの筋線維の状態をみているにすぎないため，残りの筋線維の状態が把握できていない，③ ΔPV を算出するのに用手的解析法では限界がある，などが考えられた．

総指伸筋における筋線維伝導速度は Stålberg によれば平均3.5m/sec で[2]，我々の計測とほぼ同一であり，筋線維伝導速度の測定方法は我々の多極針で充分であると考える．又，2 nd componet の伝導速度が 1 st component に比べて遅い傾向にあることも一致しており，形態的に細い筋線維又は筋線維膜に障害のある (T system の異常が強い？) 筋線維が 2 nd component として出現すると思われる．

文　　献

1) Eric Stålberg : Propagation velocity in human muscle fibers in situ. Acta Physiologica Scandinavica, 70[Suppl. 287] : 1—112, 1966.

2) Eric Stålberg : Electrogenesis in human dystrophic muscle in "Pathogenesis of human muscular dystrophies", Excerpta Medica., Amsterdam, 1977, p 570—587.

3) 西谷　裕，小西哲郎，他：筋ジストロフィー症の単一筋線維筋電図，筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究，第二班（三好班）昭和53年度報告書，1979，p.134—138.

31）哺乳動物の骨格筋に対する E-C Uncoupling

栗　原　照　幸*

はじめに

骨格筋の活動する状態を微小電極法によって細胞内記録する際に最も困難なことは筋活動電位に伴って起る筋肉の収縮のために筋細胞の同一部位に微小電極を保持し切れないことである．膜電位や微小終板電位は静止時に記録できるが，神経反復刺激によって神経筋伝達の状況を連続記録したり，ミオトニーの記録等は筋肉の活動中に記録しなければ，十分解明できない問題があり，そのような筋細胞膜における変化を捕えるために Excitation-Contraction (E-C) Uncoupling（興奮収縮連関阻止）は重要であり，カエルでは Eisenberg ら[1]によりこの方法は考えられているが，ここでは特にヒトの筋病変へ適応できる可能性を考えて，哺乳動物の骨格筋について行った結果を述べる．神経筋伝達に障害を与えず，又膜電位の低下もさせずに筋収縮を阻止し，筋活動時の生理学的変化を微小電極により連続記録できるような方法の解明が本研究の目的である．

方　　法

対象は体重150—250g のウィスター系ラットを用いた．横隔膜－神経標本[2]をつくり，標本は常時95% O_2 と 5 % CO_2の混合ガスを溶液中に通じて酸素化した．筋細胞内記録は，ガラス管微小電極を自作し，抵抗 5 ～15megohm のものを選んで用いた．E-C Uncoupling については Dantrolene sodium[3]の筋収縮阻止能力を種々の濃度で計測するため等尺性張力を計り，高張グリセロールについては Eisenberg[4]がカエルに用いた 400 mM/L の濃度でラットに試みた．400mM のグリセロールを 1 ℓ の哺乳動物用リンガー液に溶解し，標本を60分浸し，次に等張の Washing Solution に移す時 osmotic shock で t-system の選択的破壊が起ることを目的としたが，Washing Solution には 5 mM の Ca と Mg を哺乳動物用リンガー液に加えることによって膜電位の低下を防いだ[4]．Dantrolene と高張グリセロールの筋収縮阻止能力を夫々検討した後に，両者の作用を総合して利用すると目的に合う結果が得られるか否かについて更に検索した．又 E-C Uncoupling を行った上で神経反復刺激を行い，微小電極を同一部位に保持できるか否か，又膜電位や微小終板電位に本法が悪影響を与えないか否か，対照筋群と比較した．

結　　果

1）Dantrolene sodium の効果

図 1 に示すように Tyrode 液のみに標本を浸した対照筋では初めの等尺性張力を 100 %とすると40分後にも 100 %で張力は減少しない．これに対して Dantrolene を 0.1mg/L, 0.5mg/L, 5.0 mg/L, 30mg/L の濃度で Tyrode 液中に加えた夫々の実験結果をまとめると，Dantrolene の濃度に応じて濃いものほど等尺性張力は減少し，薬の効果は15～20分後に最大となりそれ以後は同じ程度の筋収縮阻止が続く．薬の作用前の状態に比し，濃度30mg/L の実験でも80%の張力を取り除くのが限度で，完全に筋収縮を阻止することはできなかった．また Dantrolene sodium は水に難溶性で長時間攪拌器を用いても60mg/L 以上は Tyrode 液に溶解させることは困難であった．

2）高張グリセロールと Washing Solution の効果

400mM/L の高張グリセロール溶液に標本を60分間，次に Washing Solution に20分間酸素化しながら等尺性張力を経時的に計測してみるとこの方法により98%の張力を取り除くことができるが 2 %の筋収縮は残り，この程度の筋収縮でも微小

* 宮崎医科大学第三内科

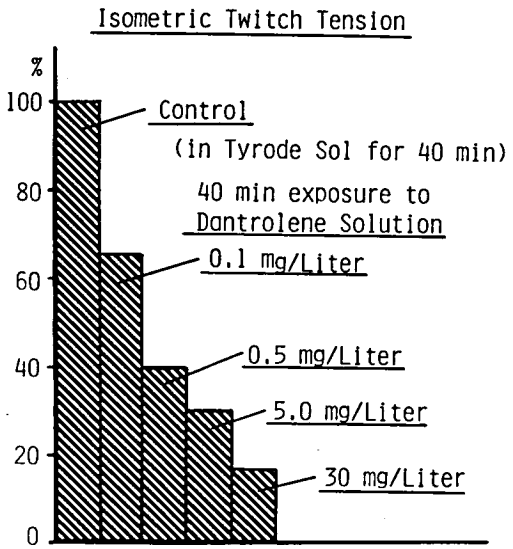


図1　濃度の異る溶液における等尺性張力
対照筋と種々の濃度で Dantrolene を Tyrode 液に加えた溶液に筋標本を浸して40分後の等尺性張力を示す．Dantrolene の濃度に応じて等尺性張力は減少するが最も濃い 30 mg/L の溶液でも，80%の張力を取り除く程度で，完全に筋収縮を阻止することはできない．

電極を機械的に動かし得るので不完全である．カエルではこの方法で十分な筋収縮阻止ができるが，哺乳動物の骨格筋ではこの方法のみでは不完全であることが明らかとなった．

3）高張グリセロールと Washing Solution に加えて Dantrolene sodium の作用を追加した方法[5)6)]

以上1），2）で述べたように Dantrolene のみでも又グリセロールのみでも不完全であるから，更に完全な E-C Uncoupling を行うためまず2）の方法で98%の等尺性張力を除いておいてから Dantrolene を 5 mg/L の濃度で Tyrode 液中に溶解した淡黄色の溶液に浸し本薬剤が最も効果を現わす20分後に等尺性張力を計測すると99.7%の収縮は阻止された．残りの0.3%の筋収縮力は等尺性張力としては記録できるが顕微鏡下でも筋収縮は神経刺激をしても認められずこの方法では完全に E-C Uncoupling を行うことができた．

4）本法による E-C Uncoupling の膜電位に対する影響

以上のように3）で記載した方法では種々の溶液に長時間筋肉標本を浸すが，この間酸素化を続けて膜電位を保持するよう努めている．薬剤が膜電位に悪影響を及ぼさないか否か検討するため対照筋細胞100個，Dantrolene 溶液で濃度 5 mg/Lと60mg/L に筋標本を浸した時の膜電位を筋細胞50個より夫々測定し，更に400mM Glycerol, Washing Solution, 5 mg/L の Dantrolene 溶液に3）の方法で浸した筋細胞50個より膜電位を測定して図2に示すと，対照で－83.8mV, Dantrolene 溶

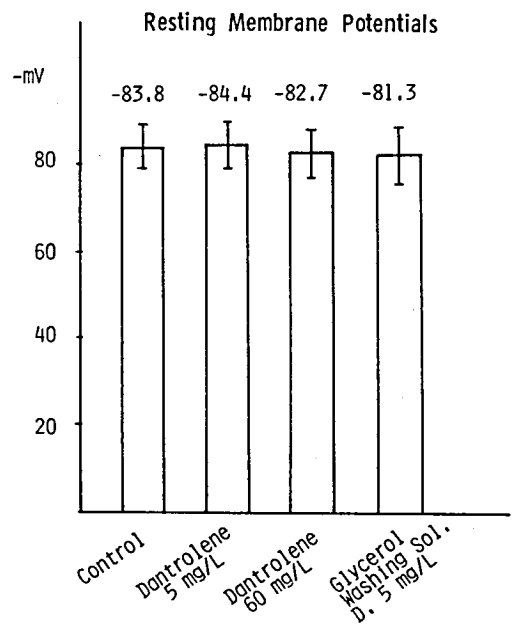


図2　静止膜電位の比較
対照筋細胞 100 個，Dantrolene 溶液 5 mg/L と 60 mg/L に筋標本を浸した時の膜電位，及びグリセロール，Washing Solution, Dantrolene 5 mg/L の溶液に夫々60分，20分，20分間筋標本を浸した時の膜電位を夫々50個より計測し，平均値を棒グラフで示し，標準偏差を縦の棒で夫々示した．
対照筋に比し，Dantrolene も又 E-C Uncoupling をした標本も膜電位に有意差を認めなかった．

液では−84.4mV (5mg/L), −82.7mV (60mg/L) と対照筋に比して統計的有意差なく，又400mM Glycerol, Washing Solution, 5mg/L Dantrolene 溶液に浸して E-C Uncoupling を作った標本でも −81.3mV と対照筋に比し有意な膜電位の変化は起らなかった ($p<0.05$).

5）本法による E-C Uncoupling の mepp に対する影響

神経筋伝達に関しては，重要な指標である mepp に対して quantal size に本法が何ら悪影響を与えないことを確認するため10ヶ所の終板部より夫々100個ずつ mepp を記録し，quantal size を計算し図3に結果をまとめた．対照筋群では平均値として0.52mV，5％Dantrolene 溶液では0.49mV，400mM Glycerol, Washing Solution, 5mg/L Dantrolene 溶液に浸して E-C Uncoupling を行った標本でも0.63mV で統計的に対照筋群に比し有意差を認めなかった．又 mepp の頻度についても対照筋群で0.76〜2.73回/秒，E-C Uncoupling を行った標本では0.90〜3.75回/秒と有意差を認めなかった．

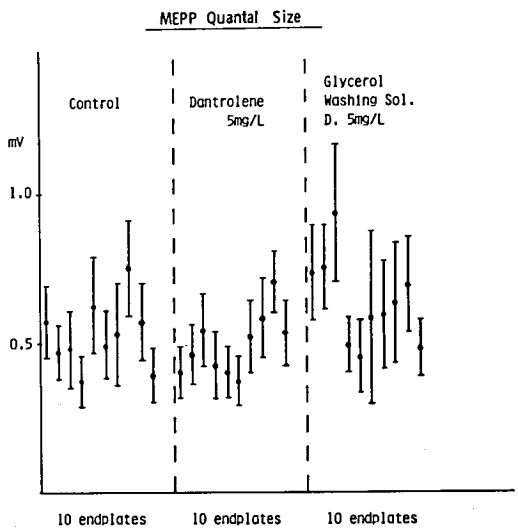


図3　微小終板電位（mepp）の素量（quantal size）の比較
対照筋群，Dantrolene 5mg/L 溶液，及びグリセロール，Washing Solution,Dantrolene 5mg/L 溶液に夫々60分，20分，20分浸して E-C Uncoupling をした標本の mepp を10の異る終板部位より100個ずつ記録して素量と標準偏差を示したもの．
対照筋群の mepp に比して，Dantrolene 単独でも，又グリセロール等で E-C Uncoupling をした後でも mepp の素量には有意差はない．

6）本法による E-C Uncoupling によって筋収縮を阻止し細胞内連続記録を実地に行った結果

上記の方法で行った E-C Uncoupling が筋活動時において筋収縮をほぼ完全に阻止し，微小電極を同一部位に保持して連続記録を可能とするか否かを実地に行ってみたところ，顕微鏡下で神経終板部位の筋膜に微小電極を挿入し，毎秒20回の神経刺激を連続し，筋活動電位を12,000回以上も続けて記録することに成功した．神経反復刺激を20〜30Hz で続けると終板電位が漸減して，活動電位を生ずるには閾値以下となった終板電位 subthreshold epp が認められる．この間の連続記録を図4に示した．

神経刺激中に筋活動電位を高増幅で記録すると筋活動電位の出現している最中にも図5のように mepp が記録でき，終板部に微小電極を保持できていることが明らかとなった．

考　　察

現在まで，筋肉の静止時における生理学的現象は膜電位，mepp の電位差及び1秒間の頻度等を記録することにより観察され，又筋収縮に関しては transducer を応用して記録され数学的にも精細な分析がなされている．筋活動時においては筋活動電位を1個記録することは E-C Uncoupling をしなくても可能であるが第1回目の筋活動電位出現に続く筋収縮のため2個以上の筋活動電位を細胞内記録することはほとんど不可能である．これを可能とする方法は，筋肉の収縮と共に動く微小電極を用いるか，又は筋肉の収縮を筋細胞膜より末梢で完全に阻止するかのどちらかの方法で行う以外にはない．本論文では後者の方法を哺乳動物の骨格筋に適応できる形で開発することを目的とし，結果で述べたようにその目的を達成したと考

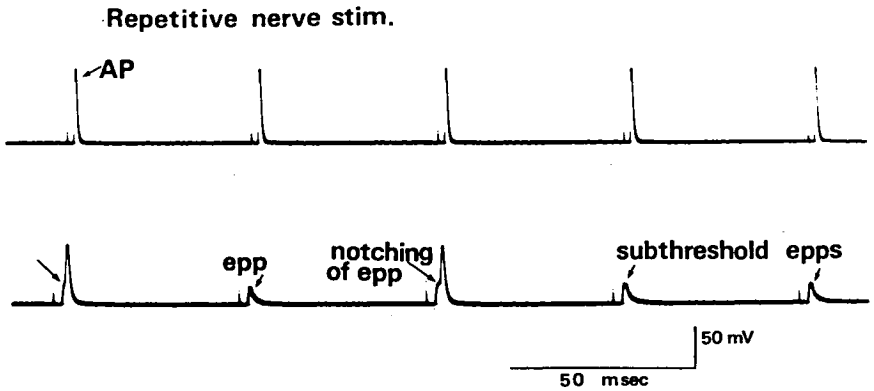


図4　神経反復刺激時における筋活動電位の連続記録
E-C Uncoupling を行った後に，神経終板部位の筋膜に微小電極を挿入し，神経反復刺激を行って筋活動電位を連続記録したもの．神経刺激は 20 Hz．
上段は，神経刺激開始時の活動電位．
下段は，神経刺激を12,000回以上続けた後 epp が次第に減少し，閾値以下となって来た状態で，従来1～2個しか筋活動電位を記録できないのに比し，本法によって E-C Uncoupling をすれば筋活動時に連続記録が，可能であることを示す．

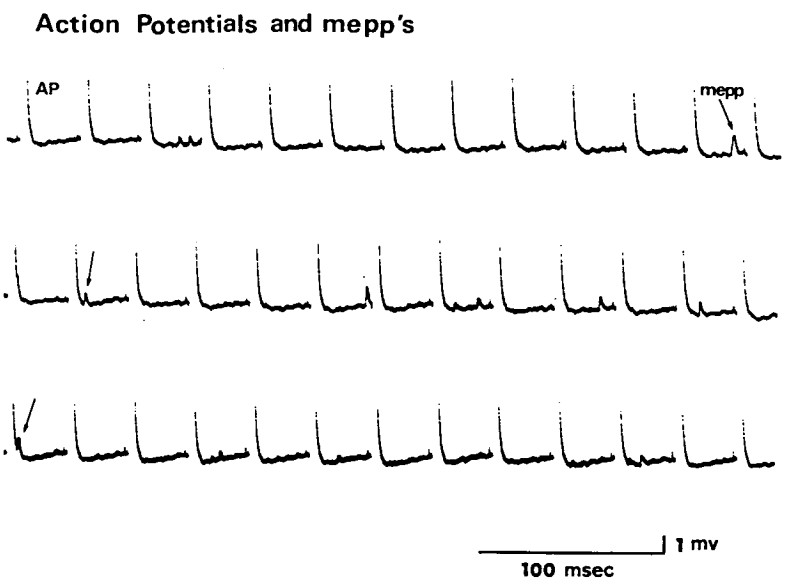


図5　神経反復刺激中の筋活動電位と mepp の高増幅記録
神経刺激は，30Hz．
E-C Uncoupling を行った上で，終板部位に微小電極を挿入して，筋活動電位の出現している最中にも mepp が記録でき，終板部に微小電極を保持できていることが明らかである．上図には mepp が13個あるが，代表的なもの3つに矢印を附した．

えられる.

カエルではEisenbergら[4]により高張グリセロールと等張のWashing Solutionによって十分なE-C Uncouplingができるが哺乳動物の骨格筋では上述のように98%の等尺性張力を阻止する程度で完全ではなく，これにDantrolene溶液を用いて更に残りの2%の張力をできるだけ取り除くように努めたところ99.7%の筋収縮を阻止しほぼ完全に微小電極記録を可能とした.

本法は膜電位，mepp には影響を及ぼさないことが結果において示したように明らかになったので，神経筋伝達及び筋細胞膜の活動時における連続記録が可能となり，筋肉病学への応用としては重症筋無力症，筋無力症様症候群，ミオトニーを来す疾患群をはじめ，近年筋ジストロフィー症においても筋細胞膜の異常が注目されていることから後者への微小電極法による研究の一助となり得るのではないかと考える.

まとめ

筋肉が反復活動している際にも微小電極法による細胞内連続記録を可能とするために，哺乳動物の骨格筋において高張グリセロール溶液，Washing Solution及びDantroleneを用いてE-C Uncouplingを行い等尺性張力の99.7%を阻止することが可能となり，単一筋細胞内連続記録が行えるようになった．本法は膜電位やmeppには影響を及ぼさずに筋収縮を阻止するので，特に筋活動時における筋細胞膜の生理的及び病態の研究に役立つと考えられる.

謝　辞：御校閲をいただいた宮崎医科大学第三内科・荒木淑郎教授に感謝致します.

文　献

1) Eisenberg, R. S. & Gage, P. W. : Frog skeletal muscle fibers : Changes in electrical properties after disruption of transverse tubular system. Science, 158 : 1700, 1967.

2) Krnjevic, K. & Miledi, R. : Adrenaline and failure of neuromuscular transmission. Nature, 180 : 814, 1957.

3) Heald, D. E. & Matsumoto, Y. : The effect of dantrolene sodium on striated muscle. Pharmacology, 13 : 264, 1971.

4) Eisenberg, R. S., Howell, J. N. & Vaughan, P. C. : The maintenance of resting potentials in glycerol-treated muscle fibers. J. Physiol., 215 : 95, 1971.

5) Kurihara, T. & Brooks, J. E. : Excitation-Contraction Uncoupling: The effect of hyperosmolar glycerol solution and dantrolene sodium on mammalian muscle in vitro. Arch. Neurol., 32 : 92, 1975.

6) Kurihara, T., Araki, S. & Shirabe, T. : Electron microscopic studies of the T-system: The effects of hyperosmolar glycerol and dantrolene sodium on mammalian muscles. Folia Psychiatr. Neurol. Jpn., 30 : 179, 1976.

32）微小電極法によるミオトニーの研究

栗　原　照　幸*

はじめに

ミオトニーでは筋肉のpercussionやneedle insertion等の機械的刺激でmyotonic burstが起りやすい原因を明らかにする目的で，ラットの横隔膜—神経標本を用いて微小電極法により実験を行った．今回は以下に述べる4点を明らかにする目的で検索した．

(1)対照筋においてaction potential(AP)を生じる終板電位(epp)の閾値を実測すること．

(2)化学薬品によって作成した実験的ミオトニーにおいて，myotonic burstを細胞内記録して筋活動電位の分析をすること．

(3)ミオトニー標本にみられる筋活動電位の初期に認められるinitial depolarizationを記録して計測すること．

(4) Myotonic microoscillationの電位差を測定し，筋活動電位に移行するものの閾値を実測すること．以上4点を明らかにしてミオトニー標本が対照筋標本に比して筋活動電位の発火閾値が低下しているか否か検討することが本論文の主な研究目的である．

方　法

対象はウィスター系ラットで体重150～250gのものを用い，左横隔膜とそれに附着する左横隔神経をできるだけ長く取り出すため，エーテル麻酔下で開胸，開腹して標本をとり，直ちに95% O_2，5% CO_2を通じて持続的に酸素化しながらTyrode液中に標本を入れ，顕微鏡下でdissectionを行い，微小電極法による記録のできる形に整えた．標本は筋線維の全長にわたって筋腹に傷害を与えないようにとり，傷害電流によって膜電位の低下が起らないよう細心の注意を払って取り扱った．

ガラス管微小電極は直径1.5mmのガラス管中にglass fiberを2本入れてから加熱して作成し，先端は0.5μ，電気抵抗5～15megohmのものを選んで用いた．ガラス管内には3M KClを満たした．

筋活動時の細胞内記録は，前論文で述べた方法でE-C Uncouplingを行い，筋収縮を阻止してから行った．

ミオトニーはアントラセン－9－カルボン酸をTyrode液中に10^{-4} M/Lの濃度で用い，drug-induced myotonicを作成した[1),2)]．

ミオトニー標本に対する対照筋群の発火閾値を実測することはd-tubocurarine等の薬物の影響をうけない状態で行おうと試みたため，E-C Uncouplingを用いて10ヶ所の終板部位に微小電極を挿入して神経反復刺激を30 Hzで行いsubthresholdとなったeppを各々100個ずつ実測した．

結　果

(1)対照筋群における終板電位の閾値

E-C Uncouplingをした上で終板部位に微小電極を保持し神経反復刺激中の筋活動電位を連続記録すると図1の様にeppが閾値以上の時には上図のようにeppは活動電位に隠れて認められない．哺乳動物ではeppから筋活動電位への移行が速く，カエルの骨格筋のようにeppによるnotchingが認められない．神経反復刺激を続けeppが漸減して筋活動電位を生じるには閾値以下となるとeppのみ残って活動電位は生じないため，subthreshold となった瞬間のeppを記録でき，これを実測して電位差を100個の計測から平均値を求め，実験を10回行って10個の異なる終板部位での記録を集計した．これを表1にまとめると，大きなものでsubthreshold eppは24.45mV，小さなもので11.14 mV，総平均は16.22mVであった．

＊宮崎医科大学第三内科

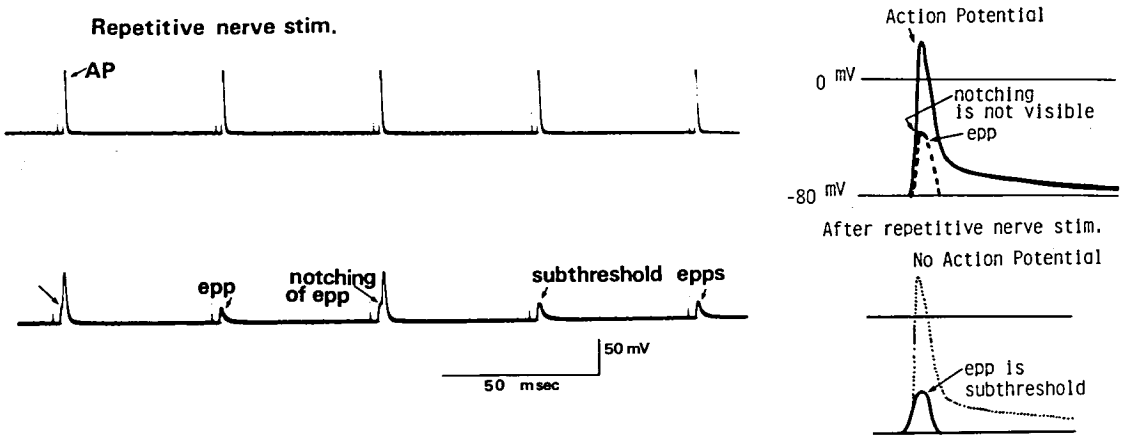


図1　神経反復刺激による筋活動電位の連続記録.
E-C Uncouplingを行った上で，終板部位より，神経反復刺激（20 Hz）中の筋活動電位を連続記録したもので，上図は刺激開始時，下図は12,000回以上神経刺激をした後に epp が閾値以下となった状態を記録できた．右側に epp と action potential との関係を模式図を用いて説明した．

Subthreshold Epps

No.	epps ± S.D. (mv)
1.	24.45 ± 2.44
2.	22.67 ± 1.67
3.	20.79 ± 0.62
4.	15.79 ± 3.16
5.	15.74 ± 0.31
6.	14.88 ± 1.48
7.	12.55 ± 1.41
8.	12.18 ± 1.72
9.	11.97 ± 1.36
10.	11.14 ± 2.04
mean	16.22 mv (Range: 24.45-11.14)

表1　筋活動電位の閾値.
対照筋群における筋活動電位の閾値を実測するため，10ヶ所の異なる終板部位からそれぞれ100個ずつ epp を測定し，平均値と標準偏差を表にまとめた．
神経反復刺激（20～30 Hz）を続けて閾値以下となった瞬間の epp を計測した．

Initial depolarization of myotonic fibers

1.	3.65 ± 0.22 (S.D.) mV
2.	5.61 ± 0.75
3.	6.00 ± 0.60
4.	6.57 ± 0.30
5.	6.59 ± 0.60
6.	7.65 ± 0.48
7.	7.68 ± 0.51
mean	6.25 ± 1.38 (S.D.) mV

(Range: 3.65--7.68 mV)

表2　Myotonic burst 時の initial depolarization.
Myotonic burst において図2に示した活動電位を生じる前の脱分極を7回の実験で実測し，平均値と標準偏差をまとめて表示する．

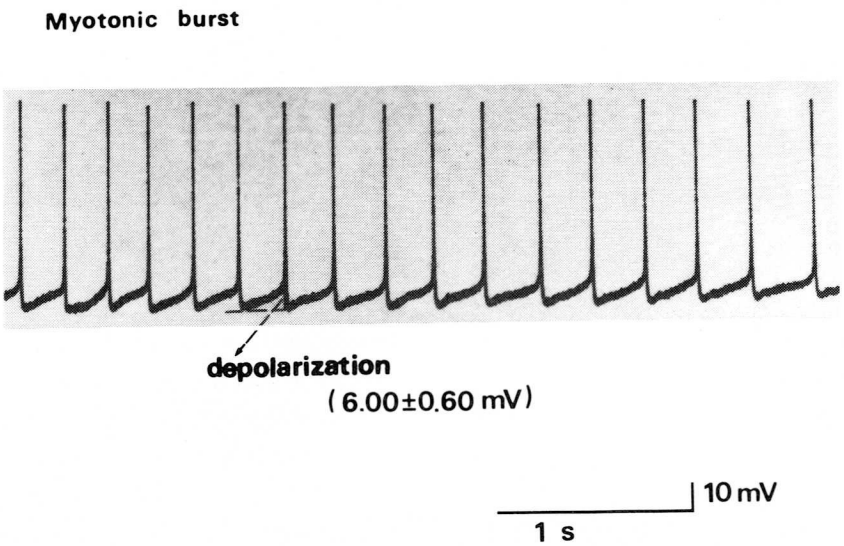


図2　Myotonic burst の微小電極による細胞内記録.
E-C Uncoupling をした上でミオトニーを作成し，myotonic burst を細胞内に微小電極を挿入してオシロペーパーに連続記録したもの.
ミオトニーでは，活動電位の始まりの部分に脱分極が認められ，これを実測することができた.

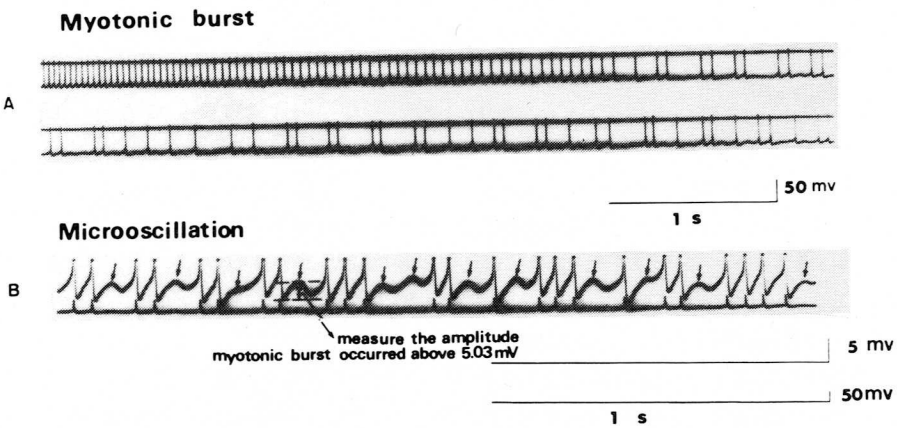


図3　Myotonic burst と microoscillation の記録.
E-C Uncoupling後，myotonic burst を細胞内記録すると，筋収縮が阻止してあるにもかかわらず，基線の動揺が認められたので（A），更に詳細に観察するため B に dual oscilloscope で上に高増幅，下に低増幅で同時に myotonic burst を記録したところ高増幅記録で明らかに microoscillation をみた．この電位差を測定すると 5.03±0.28 mV 以上の microoscillation があると筋活動電位の発火を認めた.

(2)Myotonic burst に認められる initial depolarization の実測

E-C Uncoupling をした上でミオトニーをアントラセン-9-カルボン酸で作成し，myotonic burst をオシロペーパーに細胞内連続記録をした結果，図2に示すようにミオトニーで認められる活動電位の形は図1上図と異なり(対照筋と対比のこと)，初めに脱分極があって活動電位に移行している．そこでこの脱分極の電位差を実測することが可能であった．表2に結果をまとめると，7回の実験結果より，initial depolarization の電位差は3.65 mV から 7.68mV，総平均 6.25mV の depolarization に引き続いて筋活動電位が起っていることが明らかになった．

(3) Myotonic microoscillation からの発火閾値の実測

Myotonic burst を図3に低増幅（上図）で記録したところ基線の oscillation が認められ，更に詳細に検討するため高増幅（下図）をして記録したところ microoscillation が明らかに認められ，その振幅を計測すると 5.03±0.28mV 以上では引き続いて myotonia の発火を認めた．Microoscillation に伴って筋活動電位が生じていない時の振幅は 3.46±0.42mV であった．

考　　察

ミオトニーではわずかの機械的刺激で筋活動電位の連続発火が起るが，その原因として発火閾値が低下しているであろうことは想像できるが実測するとなると多くの難問が残っている．第一に正常筋において発火閾値は何mV であるかという点に関しても，これを哺乳動物の骨格筋で計測することは容易ではない[3]．しかしまずその測定を行わなければ，ミオトニーにおいて発火閾値が正常筋群に比して下っているかどうかは比較できない．そこでまず対照筋群においてE-C Uncoupling を行い神経反復刺激によって終板部からの細胞内連続記録を行いepp が漸減して閾値以下となった瞬間の epp の値を正常筋群における発火閾値とした．神経終板によってその閾値の違いがあるので，10ケ所の終板部位で計測を行った．ミオトニー標本では，微小電極を挿入すると insertion myotonia が起り，myotonic burst に伴って膜電位も低下するので，対照群のように終板部位での神経反復刺激による記録は技術的に安定した結果を得ることは不可能であった．しかし幸いなことに myotonic burst には活動電位の生じる前に脱分極が認められ E-C Uncoupling を行った上で burst を連続記録することによって，initial depolarization を多数計測することができ，ミオトニー標本の発火閾値を実測することが可能となった．

Myotonic burst を高増幅記録をして microoscillation が記録できたので更にこの電位差を計測し，上述の方法とは別の現象からミオトニー標本の発火閾値を検索し対比したところ5.03±0.28mV 以上の microoscillation があるときにはミオトニーの発火が起っており，これも対照筋群の閾値である11.14～24.45 mV と比し低下していることが明らかとなった．

本研究で実験的に作成したミオトニーは，アントラセン-9-カルボン酸によってラットの骨格筋に in vitro でつくったものであるが，この薬品は筋細胞膜におけるクロールイオンに対する透過性を減少させる作用がある[4]．Lipicky 等[5]の研究でヒトのミオトニーにおいてもクロールイオンに対する透過性が減少していることが明らかにされ，ミオトニーは筋細胞膜の異常で起ることに関しては両者とも近似しているが，全く同じであると断言することはできない．本報告は，ミオトニーに伴う種々の現象を研究する方法論の一つを動物モデルにおいてまず確立し，更にヒトのミオトニーへ検索を進めて行く上で一助となると考えられる．

ま と め

1．ラットの横隔膜—神経標本に，アントラセン-9-カルボン酸を用いて実験的ミオトニーを作成した．

2．Myotonic burst の細胞内連続記録は，E-C Uncoupling をして筋収縮を阻止することによって可能とした．

3．対照筋群では 11.14～24.45mV の脱分極が，筋活動電位の発火閾値となる．

4．ミオトニー標本では筋活動電位の形が対照筋群と異なり，筋活動電位の始まりの部分に脱分極が認められ，その振幅を実測すると，3.65～7.68 mV が発火閾値となっている．

5．Myotonic microoscillation についても，5.03±0.28mV 以上では引き続き発火を認めている．

6．ミオトニー標本では initial depolarization から計測しても，myotonic microoscillation より計測しても約4～8 mV の脱分極があれば筋活動電位を生じることから，対照筋群の11～24 mV の閾値に比し有意に発火閾値が低下しており，わずかな脱分極で筋肉の発火が起りやすい状態にあることが明らかとなった．

謝辞：御校閲をいただいた宮崎医科大学第三内科，荒木淑郎教授に感謝致します．

文　献

1）栗原照幸：ミオトニーの発生機序に関する電気生理学的研究．臨床神経，18：332，1978．

2）Kurihara, T.：Experimental Myotonia. Folia Pschiatr. Neurol. Jpn., 31：1977.

3）Kurihara, T. & Brooks, J. E.：The mechanism of neuromuscular fatigue: A study of mammalian muscle using excitation-contraction uncoupling. Arch. Neurol., 32：168, 1975.

4）Bryant, S. H. & Morales-Aguilera, A.：Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibers and the action of monocarboxylic aromatic acids. J. Physiol., 219：367, 1971.

5）Lipicky, R. J., Bryant, S. H. et al.：Cable parameters, sodium, potassium, chloride, and water content, and isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. J. Clin. Invest., 50：2091, 1971.

33）実験的 excessive $[Ca^{++}]_i$-induced myopathy に関する研究

高　守　正　治*

研究協力者　辻　畑　光　宏*　迫　竜　二*

目　的

筋ジストロフィー症について，筋細胞膜Ca^{++}透過性変化[1),2)]，Ca^{++}に反応する細胞機構の変化[3)]，筋小胞体Ca^{++}結合の異常[4)]などによる細胞内Ca^{++}の病因的役割が問題とされ，本病の比較的早期から病理組織学的に壊死像や過剰収縮筋線維が見出されることや[5),6)]，蛋白分解酵素活性上昇，遊離[7)]が証明されている事実は，これを示唆している．人工的に細胞内Ca^{++}レベルを高め筋細胞変性を招来しうる薬理学的因子としては，カフェイン[8)]やA 23187[9)]が知られている．本研究は *in vitro* で骨格筋にカフェインと反復電気刺激を与えて細胞内Ca^{++}濃度を高めた病的状態をつくり，これを生理，薬理学的に検討して，ジストロフィー筋病態との関連を調べた．

方　法

雄ウイスター系ラット（150—200g）から，pentobarbital 麻酔下で横隔膜神経筋標本を取り出し，正常リンゲル液（95%O_2＋5%CO_2，33℃）灌流下で容器に固定した．静止膜電位は無作意的穿刺で筋線維20本以上の平均を求めた．微小終板電位（MEPP）は顕微鏡下で神経終末の確認を行ないながら探し，電位の rise time が0.6 msec 以下のものだけを採取した．終板電位（EPP）は，灌流液内に d-tubocurarine を加えて神経刺激による筋収縮を妨げて記録した．quantum size は EPP 振幅の分散を EPP 振幅の平均で除して求めた（各 EPP 振幅には，MEPP の非直線的加算のための補正を行った）．クラーレ感受性は，単一誘発 EPP 振幅を1.5～3.5mV の間に維持するに要するクラーレ濃度をもって表現した．薬理学的指標には，Ouabain 1.7×10^{-4} M，Epinephrine 5 μg/ml，Theophylline 2 mM，Insulin（monocomponent；Novo）0.5i.u./ml を用いた．薬理学的ミオパチーは，Duncan & Smith の方法[8)]を修飾し，30分間 8 mM カフェイン灌流とともに，2 Hz 反復電気刺激を与え[10)]，細胞内 free Ca^{++}濃度増加を期待して作製した．

結　果

1）正常横隔膜筋静止膜電位の薬理学的因子に対する反応を，各薬剤灌流開始20分目から35分目までの間の記録平均を，灌流前記録平均と対比して調べた．Ouabain に対しては，10 mV の静止電位脱分極を示した．Epinephrine に対しては，5 mV の過分極を示し，これは phosphodiesterase inhibitor（Theophylline）添加により，さらに 4 mV 過分極化した．一方，Ouabain は，Epinephrine の過分極作用を阻止した（図1左上段）．静止電位の安定した単一筋線維について薬剤の影響をみると，微小終板電位 MEPP は，Epinephrine 灌流，さらにこれに Theophylline 添加によって，静止電位過分極化にともない振幅増大を示し，同時に放電頻度の増加も観察された（図1右）．Insulin に対しては，5 mV の静止膜電位過分極化がみられた．ところが Ouabain 灌流で前処置したのちこれに Insulin を添加すると逆に 4 mV の脱分極が観察された（図1左下）．

2）2 Hz 反復電気刺激と 8 mM カフェイン灌流で処理した横隔膜筋について電気生理学的分析を行った．静止膜電位は処理前に比べて 3 mV 脱

* 長崎大学医学部第一内科

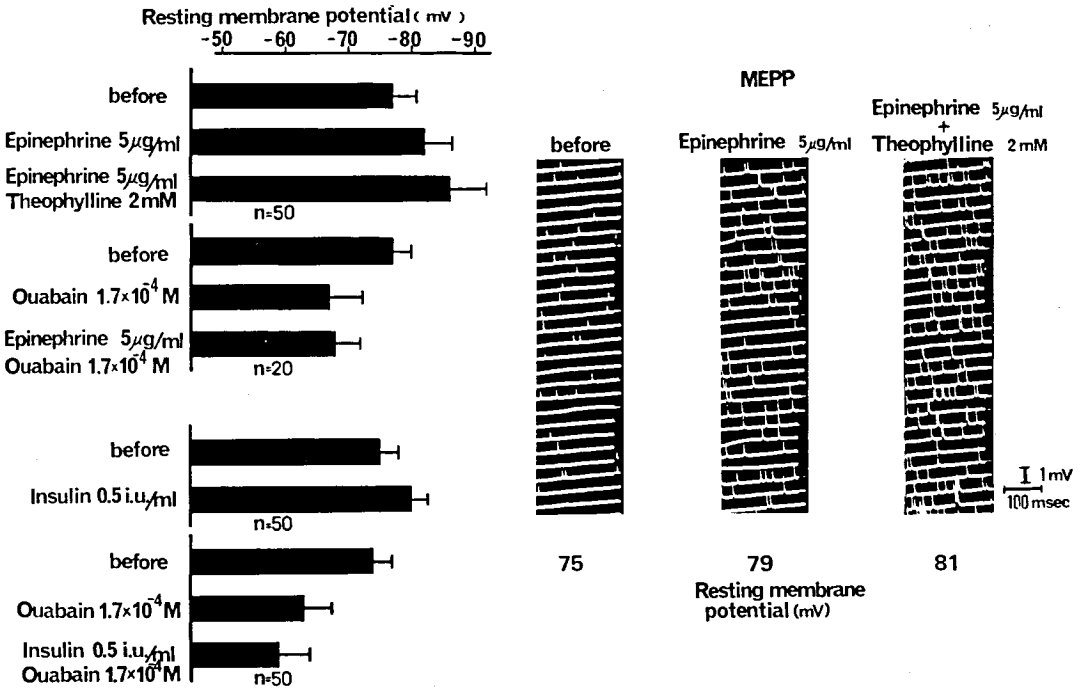
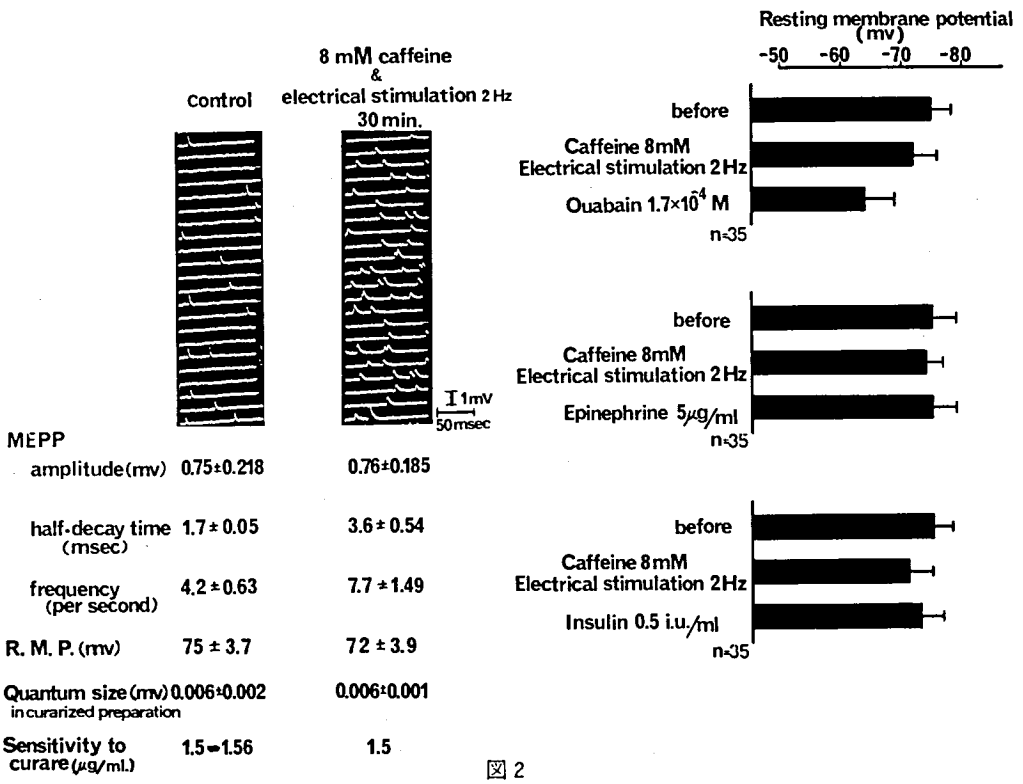


図 1



MEPP	Control	8 mM caffeine & electrical stimulation 2 Hz 30 min.
amplitude (mv)	0.75±0.218	0.76±0.185
half-decay time (msec)	1.7 ± 0.05	3.6 ± 0.54
frequency (per second)	4.2 ± 0.63	7.7 ± 1.49
R. M. P. (mv)	75 ± 3.7	72 ± 3.9
Quantum size (mv) in curarized preparation	0.006±0.002	0.006±0.001
Sensitivity to curare (μg/ml.)	1.5 ~ 1.56	1.5

図 2

分極を示し，MEPPは振幅には有意の変化をみとめなかったが，減衰時間（half-decay time)の異常延長が観察された．放電頻度の増加も伴っていたが，quantum sizeは正常筋と比べ有意差をみとめなかった．クラーレ感受性も正常範囲内であった（図2左)．

同様の処理筋について薬理学的検討を行った．Ouabainには正常の脱分極反応を示し，一方，Epinephrine, Insulinに対する過分極反応は欠如ないし減弱していた（図2右)．

考　　案

本研究の薬理学的実験的ミオパチーは，カフェインによるCa^{++}-induced release of Ca^{++} from sarcoplasmic reticulum促進[11]と，電気刺激による depolarization-induced release of Ca^{++} from sarcoplasmic reticulumの組み合せによって，細胞内free Ca^{++}レベルを高め，high Ca^{++}による蛋白分解酵素の活性促進[12]，遊離[13]によると思われる筋細胞変化を期待して作製したものである．病理組織学的立場からは，すでにこの実験系について検討が加えられており，筋小胞体の膨化，Z-linesの不明瞭化，ミトコンドリアは膨化からcontractedの状態となり，やがてmyofilament degradationに至るという[8),9]．本研究はこれを電気生理，薬理学的見地から検討し，ジストロフィー筋との類似性を考察したものである．

カフェイン，反復電気刺激で処理した筋で，電気生理学的にわれわれがみとめた軽度の静止膜電位脱分極，MEPPの正常振幅とクラーレに対する正常感受性から推定されるアセチルコリン受容体の非侵襲などは，Duchenne型ジストロフィー筋でもみとめられている[14]．MEPP減衰時間延長は，ジストロフィーチキン筋でも報告されている現象で[15]，われわれの処理筋で同時に調べたアセチルコリンquantum sizeは正常であったから，synaptic cleftの形態やアセチルコリンエステラーゼ活性に異常が来ていないものと仮定すれば，膜ion channel open timeの異常を反映しているものと考えられる[16),17]．処理筋で同時に記録したMEPP放電頻度増加は，カフェインのpresynaptic effect[18]による附加的所見と推察される．

(Na^+-K^+)-activated ATPaseブロッカーであるOuabain[19]に対するわれわれの処理筋静止膜電位の正常な脱分極反応は，ジストロフィー筋でも報告され，denervated muscleと異る重要な薬理学的特性の一つとされている[20]．

筋細胞膜の薬理学的性質を調べる手段として用いたEpinephrineについて，われわれはすでに，presynapticにはα受容体を介しアセチルコリンquantal releaseを促してMEPP放電頻度を高め，postsynapticにはβ受容体を介しMEPP振幅増大を伴う静止膜電位過分極作用があることを示唆して来た[21),22]．後者は，cyclic AMPを介してtransport enzymeに作用し，Na^+-K^+能動輸送に関与する結果であるとされている[23]．われわれの正常横隔膜筋を用いた電気生理学的実験も，Epinephrineに対する静止膜電位過分極化反応が，Theophylline-potentiated, Ouabain-suppressiveであることを示し，これを確認した．カフェイン，反復電気刺激処理筋では，このEpinephrineに対するpostsynaptic反応が欠如しており，上述した対Epinephrine反応で表現されるNa^+能動輸送機構が障害されていることが示唆される．

InsulinもNa^+-K^+能動輸送に関与する因子とされるが，OuabainはInsulinによるNa^+ efflux の少なくとも一部とK^+ influxをブロックするが，Ouabain存在下ではInsulinはむしろNa^+ influxを促進する（一定レベルのATPの存在または外液K^+低濃度を必須条件とする）[24]．われわれの正常横隔膜筋を用いた実験結果は，Insulinが静止膜電位を過分極化し，Ouabain存在下では逆に脱分極化することを示し，これと矛盾しない．カフェイン，反復電気刺激処理筋は，この対Insulin反応低下を示し，対Epinephrine反応とは異なる形で表現されるNa^+能動輸送系障害の存在が示唆された．

結　　語

人工的に細胞内free Ca^{++}レベルを高めることを期待してカフェインと反復電気刺激を与えて作製した実験的ミオパチーは，①細胞膜静止電位脱分

極，②微小終板電位減衰時間延長，③Ouabainに対する正常反応性，を示し，ジストロフィー筋と類似ないし関連する所見を得た．また，Ouabain反応性だけでは明らかにし得ない膜異常を，Na^+能動輸送に関与するEpinephrine，Insulinを用い，これらに対する膜電位の反応欠如によって明らかにした．

文　献

1) Engel, W. K. : Integrative histochemical approach to the defect of Duchenne muscular dystrophy. In "Pathogenesis of human muscular dystrophies," (edited by Rowland, L. P.), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 1977, p.277.

2) Engel, A. G., Mokri, B., Jerusalem, F., et al. : Ultrastructural clues in Duchenne dystrophy. In "Pathogenesis of human muscular dystrophies." (edited by Rowland, L. P.), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 1977, p.310.

3) Dise, C. A., Goodman, D. B. P., Lake, W. C., et al. : Enhanced sensitivity to calcium in Duchenne muscular dystrophy. Biochem. Biophys. Res. Commu., 79 : 1286, 1977.

4) Samaha, F. J. : Sarcotubular system in the muscular dystrophies. In "Pathogenesis of human muscular dystrophies," (edited by Rowland, L. P.), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 1977, p.633.

5) Carpenter, S. & Karpati, G. : Duchenne muscular dystrophy: plasma membrane loss initiates muscle cell necrosis unless it is repaired. Brain, 102 : 147, 1979.

6) Cullen, M. J. & Fultorpe, J. J. : Stages in fibre breakdown in Duchenne muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 24 : 179, 1975.

7) Kar, N. C. & Pearson, C. M. : Muscular dystrophy and activation of proteinases. Muscle & Nerve, 1 : 308, 1978.

8) Duncan, C. J. & Smith, J. L. : The action of caffeine in promoting ultrastructural damage in frog skeletal muscle fibers. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 305 : 159, 1978.

9) Publicover, S. J., Duncan, C. J. & Smith, J. L. : The use of A 23187 to demonstrate the role of intracellular calcium in causing ultrastructural damage in mammalian muscle. J. Neuropath. Exp. Neurol., 37 : 544, 1978.

10) Duncan, C. J. : Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: A strategy for controlling the dystrophic condition. Experientia, 34 : 1531, 1978.

11) Endo, M. : Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol., Rev., 57 : 71, 1977.

12) Reville, W. J., Goll, D. E., Stomer, M. H., et al.: A Ca^{++}-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover-subcellular localization of the protease in porcine skeletal muscle. J. Cell Biol., 70 : 1, 1976.

13) McGowan, E. B., Shafiq, S. A. & Stracher, A. : Delayed degradation of dystrophic and normal muscle cell cultures treated with pepstatin, leupeptin, and antipain. Exp. Neurol., 50 : 649, 1976.

14) Sakakibara, H., Engel, A. G. & Lambert, E. H. : Duchenne dystrophy: Ultrastructural localization of the acetylcholine receptor and intracellular microelectrode studies of neuromuscular transmission. Neurology (Minneap.), 27 : 741, 1977.

15) Albuquerque, E. X. & Warnick, J. E. : Electrophysiological observations in normal and dystrophic chicken muscles. Science, 172 : 1260, 1971.

16) Magleby, K. L. & Terrar, D. A.: Factors affecting the time course of decay of end-plate currents: A possible cooperative action of acetylcholine on receptors at the frog neuromuscular junction. J. Physiol., 244 : 467, 1975.

17) Cully-Candy, S. G., Miledi, R. & Trautmann, A. : End-plate currents and acetylcholine noise at normal and myasthenic human end-plates. J. Physiol., 287 : 247, 1979.

18) Elmqvist, D. & Feldman, D. S. : Calcium dependence of spontaneous acetylcholine release at mammalian motor nerve terminals. J. Physiol., 181 : 487, 1965.

19) Schatzmann, A. J. : Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembrane. Helv. physiol. Acta, 11 : 346, 1953.

20) McArdle, J. J. & Albuquerqure, E. X. : Effects of ouabain on denervated and dystrophic muscles of the mouse. Exp. Neurol., 47 : 353, 1975.

21) Takamori, M., Ishii, N. & Mori, M. : The role of cyclic 3′, 5′-adenosine monophosphate in neuromuscular transmission. Arch. Neurol., 29 : 420, 1973.

22) Kuba, K. : Effects of catecholamine on the neuromuscular junction in the rat diaphragm. J. Physiol., 211 : 551, 1970.

23) Clausen, T. & Flatman, J. A. : The effect of catecholamines on Na -K transport and membrane potential in rat soleus muscle. J. Physiol., 270 : 383, 1977.

24) Clausen, T. & Kohn, P. G. : The effect of insulin on the transport of sodium and potassium in the rat soleus muscle. J. Physiol., 265 : 19, 1977.

34）甲状腺機能低下症にみられる mounding 現象の問題点

豊倉康夫*

研究協力者　杉田秀夫*　水澤英洋*　高木昭夫**
高津成美*　作田　学*　清水輝夫*
中瀬浩史*

目　的

Mounding 現象は，myoedema とも呼ばれ，筋を叩打したときに生ずる持続的局所収縮であり甲状腺機能低下症あるいは結核，悪液質などの消耗性疾患で出現するといわれているが，健常人にも認められるものである．1846年 Schiff が動物の死筋を直接叩打したときに持続的な局所収縮を認め idiomuskuläre Wulstbildung（idiomuscular contraction, 特異性筋隆起）と呼んで以来，人間の筋でも生ずること（Bennet, B., 1846），赤筋あるいは遅筋で生じやすいこと（Rösner, A., 1900）正常筋でも生ずること（Auerbach, 1900）などが明らかにされてきた[1]その後特異性筋隆起には活動電流がなく，電気刺激による単収縮とはお互いに影響しあわないこと[2]や，cocaine などで麻酔した筋にても特異性筋隆起は出現すること[3]などが明らかになり，また臨床面でも mounding 現象は電気的活動をともなわず（electrically silent），随意収縮とは影響しあわないことが注目されてきた[4),5)]．

われわれは，このような mounding 現象の筋収縮機構が，action potential を伴う普通の筋収縮とどのように異なるのか，また甲状腺機能低下症において何ゆえに mounding 現象が発現しやすいのか明らかにすることを試みた．

＊東京大学医学部脳研神経内科
＊＊国立武蔵療養所神経センター

方　法

まず mounding 現象を容易に生ぜしめ得る，Hoffmann 症候群の症例にて電気生理学的ならびに上腕二頭筋および腓腹筋の生検により，組織学的，生化学的，生理学的検索を行った．

次に KCl-Ringer, Dantrolene Na, Brij 58 の各溶液で興奮収縮連関を種々の段階でブロックしたラットのヒラメ筋（soleus），長指伸筋（EDL）における mounding 現象を調べ，transverse tubule（T- tubule），筋小胞体（SR）の関与を検討した．

Hoffmann 症候群についての検索

症例（東大神内A 24260-79）は，65歳男子で約2年前寒さに弱くなり，その後徐々に毛髪の疎化，体重増加，動作緩慢化，筋の硬化腫脹，筋痛，精神症状などが出現し更に後頭部の鈍痛，硬直および腫脹が進行し首が前に垂れて持ち上がらなくなったため入院となった．顔貌は表情に乏しく，意識は清明なるも精神的にはやや不安定で怒りやすく返答は時に的を得ない．体毛は疎で皮膚は乾燥し肥厚している．四肢筋には軽い筋力低下と，著明な肥大，硬直を認め，口唇や舌も同様の傾向を示した．動作は緩慢で，言語は不明瞭，深部腱反射は全て減弱しており弛緩の遅れははっきりしない．著明な mounding 現象は認めたが myotonia 様の現象はなかった．検査では，甲状腺機能低下（^{131}I-T_3RSU 19.9%，T_4＜1.0μg/dl, T_3＜25μg/dl, TSH 251μU/ml）および筋障害（CPK 5502 IU/l 正

常[24-170]）が明らかであり Hoffmann 症候群と診断された．

(1) 通常の同心型針電極によるEMGにては，刺入活動がやや増加しているがafter discharge はなく，安静時はsilent である．随意収縮時，わずかに short duration, polyphasic NMU を混入するがほぼ正常に近い．打腱槌にて上腕二頭筋においてmounding 現象を生じさせると，叩打部(〝隆起〟部)では，初期の筋全体の攣縮に相当すると思われる棘波と〝隆起〟(mounding)に相当すると思われる大きな振れが記録されるが，後者にはいわゆる action potential は認められない．また叩打部より少し離れたところ(非〝隆起〟部)では棘波のみ記録され，この場合の mounding 現象は非伝播性で局所的な現象であることを示している(図1)．

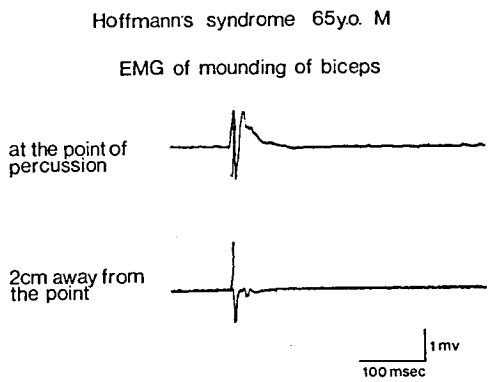


図1

(2) 上腕二頭筋，腓腹筋の組織学的検索では，平均直径約50 μと小径化した円形の筋線維が目立ち，組織化学的には type I fibers が約50%とやや増加している．小径化しているにもかかわらず splitting がみられ，大小不動，中心核，空胞変性，虫喰い像，opaque fiber，ヒアリン化線維，間質の増加など非特異的なミオパチーの所見もみられる．

(3) 生検筋の SDS ゲル電気泳動では，myosin, actinin, troponin 等の各構造蛋白の組成には著変を認めないが，myosin の L_2 鎖において赤筋に相当する分画が明らかに大きく，type I fibers の増加が示唆された．

(4) 生検筋の skinned fiber 法による SR の Ca-uptake index は，type I fibers では，6本の被検筋線維全てで，type II fibers でも，4本の被検筋線維のうち2本で低下していた（図2）．

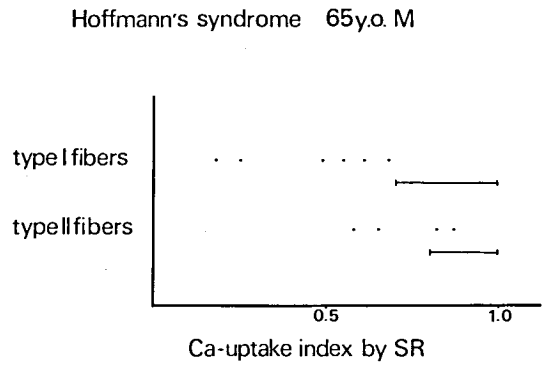


図2

ラットの soleus, EDL における検索

成熟した雄あるいは雌のラット（体重約 150g）の soleus, EDL をとり出し，張力トランスデューサー（日本光電 FD ピックアップ SB 17H）に固定し，落下槌で直接叩打したときの mounding 現象を張力曲線としてレクチコーダーで記録した．

(1) Mounding 現象は fast white である EDL よりも slow intermediate である soleus の方でより出現しやすい．

(2) Krebs-Ringer 液の NaCl を全て KCl で置換した KCl-Ringer 液（$[K^+] = 122.7$ mM/l)に浸漬し，100 V，1 msec の矩形波にて電気刺激しても単収縮が生じないことを確認し，表面膜を完全に脱分極した状態でも mounding 現象は充分に発現する．

(3) Dantrolene-Na は T-tubule と SR との連結をブロックすることで知られているが，充分高濃度(40μg/ml)の Dantrolene Na 溶液に，電気刺激による単収縮がほとんど生じなくなるまで浸漬した後でも，mounding 現象は容易に発現する(図3)．

(4) 強力な surfactant である Brij 58を用いて SR を含めた内部膜系の全てを破壊すると，電気刺激による単収縮はもちろん mounding 現象も全く生じない．

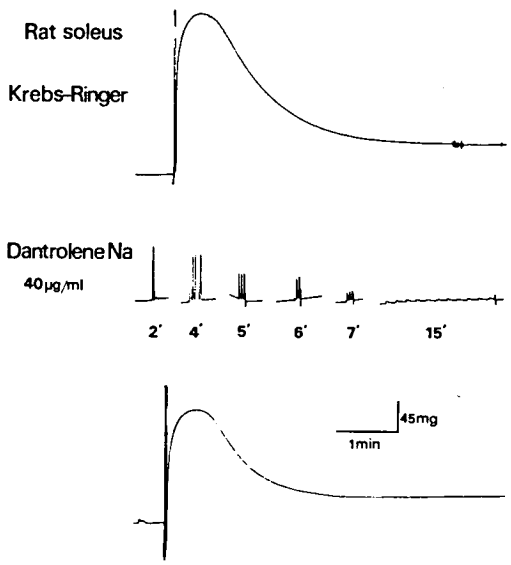


図3

考　　察

はじめに述べたように，mounding 現象はそのきわめて印象的な収縮の形態や電気的に "silent" であるなどの特徴から，多くの臨床家の興味をひいてきた．また基礎の方面でも，麻酔筋でも生じ，単収縮とは競合せず，乳酸消費もほとんどないなど，きわめて特異な筋収縮であるとされてきた．このような諸結果からは，表面膜の関与しないであろうことは推定できるが，内部膜系は関与する興奮収縮系の現象であるのか，膜系は一切関与しない収縮系のみの現象なのかは，不明である．われわれの今回の実験はこの点を明らかにしたといえる．すなわち mounding 現象の出現には SR が関与しており，叩打により SR が直接刺激され Ca 遊離が生じている可能性が大きい．また白筋より赤筋で mounding 現象が出現しやすいことを再確認したが，その原因として type I fiber と type II fiber との種々の差異のうち，SR の差異による寄与が大きいと思われる．更に Hoffmann 症候群で mounding 現象が観察しやすいことには，SR による遊離された Ca^{2+} の re-uptake の低下が寄与していると思われる．

文　　献

1）名取禮二：筋生理学．丸善，東京，1951，p.131．
2）名取禮二：特異性筋隆起ニ就テノ研究(5)，筋隆起部ノ興奮傳導性並ニ筋隆起ノ組織像ニ就テ．日生理誌，6：16，1941．
3）西谷喜助，高橋達彌：特異性筋隆起ニ就テノ研究(3)，麻酔筋ニ於ケル特異性筋隆起ノ生起ト其勢力消費ニ就テ．日生理誌，3：293，1938．
4）Denny-Brown, D. & Pennybacker, J. B. : Fibrillation and fasciculation in voluntary muscle. Brain, 61：311，1938．
5）Salick, A. I. & Pearson, C. M. : Electrical silence of myoedema. Neurology, 17：899，1967．

35）アルミナバッチ法とアセチル化を組合わせたラジオイムノアッセイによるデュシャンヌ型筋ジストロフィーの赤血球膜アデニレートサイクレースの測定

高　橋　桂　一*

研究協力者　難　波　紀久子*　高　尾　　尚*　藤　田　拓　男*

目　　的

昨年度，Duchenne 型筋ジストロフィー(DMP)の保因者の赤血球膜の adenylate cyclase 活性(AC）の基礎値が対照に比し高いことを報告した[1]．その方法は ^{14}C-ATP を基質として，テオフィリン，cold cAMP の存在下に AC を測定し，生成した ^{14}C-cAMP をアルミナカラムとギ酸型の Dowex-1 カラムで分離するものであった．その後，テオフィリンが基礎値に対して抑制効果をもつことが判ったので，end product inhibition も受けない条件も考慮し，phosphodiesterase（PDE）抑制の目的で塩酸パパベリンを用い，cold ATP から生成した cAMP を radioimmunoassay（RIA）にて測定する方法で Duchenne 型筋ジストロフィー患者の赤血球膜 AC を測定した結果をここに報告する．

方　　法

今回の測定条件は ATP 1 mM, $MgCl_2$ 10 mM, クレアチンリン酸20 mM, クレアチンキナーゼ100 u/ml, 塩酸パパベリン0.25 mM, トリス塩酸緩衝液40 mM（pH 7.4), 赤血球膜300～600 μg 蛋白で30分37℃でインキュベート後100℃にて3分間煮沸して反応を止め，遠沈上清100μl に 5 μl のトリエチルアミンと無水酢酸混液（2：1）を急速に混じ，その上に乾燥アルミナ200 mg を入れ，更に395μl の50mM 酢酸緩衝液（pH 6.2)を加え Vortex にかける．遠沈後上清100μl を用い通常の RIA と同様に扱った．即ち同酢酸緩衝液にて適宜稀釈した ^{125}I ラベルの succinyl cAMP tyrosine methylester 100 μl と cAMP の稀釈抗血清100 μl を 4 °C で1夜インキュベートし，0.5 ml の1％牛γグロブリンを加えた後，1 ml の20％ polyethylene glycol を加え Vortex にかけ遠沈（4 °C）し沈渣をγ-カウンターにて計測した．

結　　果

図1に ^{14}C-ATP を基質に用いる前回の方法におけるテオフィリンの影響を示す．

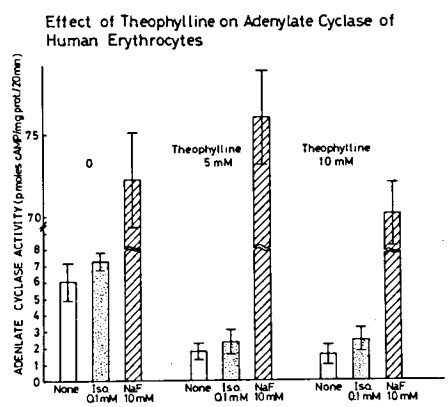


図1　赤血球膜アデニレートサイクレースに及ぼすテオフィリンの影響

＊神戸大学医学部第三内科

NaF 存在下での活性は cold cAMP 1 mM，テオフィリン 5 mM の条件で最も高く，これは前回この条件を選んだ1つの理由でもあった．しかしDMP 保因者では基礎値が問題となったのでテオフィリンの濃度を検討してみると基礎値やイソプロテレノール存在下での活性値に対しては 5 mM のテオフィリンでも抑制がみられ，10mM のテオフィリンではその上 NaF 存在下の活性値も5mM に比し抑制がみられた．従って基礎値を測定する目的ではテオフィリンを用いない方がよいと思われた．ヒト赤血球ゴーストには cAMP 結合能が高く，PDE 活性も高い．PDE の抑制の目的で塩酸パパベリンを用いることにし，end product inhibition の少ない条件（cold cAMPを除いた条件）でヒト赤血球膜の如く低い AC 活性値を測定するには 2，3 の工夫が必要であった．即ち ATP より生成した微量の cAMP を検出するためには極めて高感度の且つ特異性の高い測定法が必要である．図 2 に今回我々の用いた cAMP の抗血清（最終稀釈濃度12万倍）のアセチル化ヌクレオチドの displacement curve を示す．アセチル ADP，AMP，ATP の高濃度は succinyl cAMP tyrosine methylester-^{125}I と置換し，例えば10^{-3}M のアセチル ATP は 5×10^{-9}M のアセチル cAMPと見かけ上同じ値を呈する如きである．従って基質に10^{-3}M の ATP を用いていることもあり cAMP

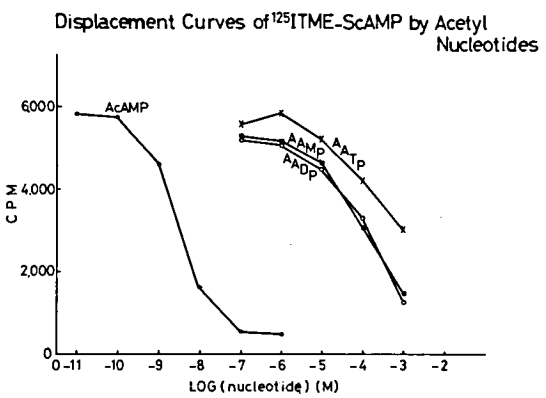


図 2　RIA におけるアセチルヌクレオチドの交叉反応

以外のヌクレオチドを予め除く必要がある．そのため上述したアルミナバッチ法を開発した．図 3 はこの基礎となった0.5×2.0cm のアルミナカラム（約300mg）による ^{3}H-acetyl cAMP と ^{14}C-acetyl ATP の溶出パターンで acetyl cAMP がカラムに吸着されず acetyl ATP は極めて強くアルミナに吸着され，0.2M のNa_2PO_4 ではじめて溶出されることを示している．

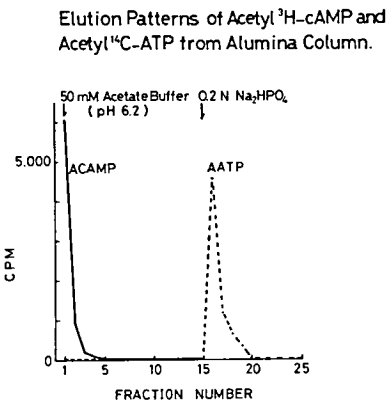


図 3　アルミナカラム（0.5×2.0 cm）のアセチル cAMP とアセチル ATP の溶出パターン

図 4 は方法で述べたバッチ法における乾燥アルミナの量を検討した結果を示す．^{3}H-cAMP 及び ^{14}C-ATP を上述の方法に従ってアセチル化しバッチ法での遠沈上清に回収される各々の放射能をアルミナ量に対してプロットした．150mg から 300mg の間で acetyl ATP のアルミナへの98.8%以上の吸着と，一定の acetyl cAMP の回収が得られることが判る．acetyl ^{3}H-cAMP はこのアルミナ量の間で84%前後の回収が得られた．通常 100μl のサンプルに200mg の乾燥アルミナを用いることにした．

表 I には前回報告の方法[1]に従って調整した DMP の赤血球膜の AC とジストロフィー以外の患者の赤血球膜の AC をここに示した方法で測定した結果である．DMP の赤血球膜 AC の基礎値，イソプロテレノール（0.1mM），EGTA（2 mM），イソプロテレノールと EGTA（0.1m 及び 2 mM），

表 I　Adenylate cyclase activities of erythrocytes in patients with Duchenne muscular dystrophy

	Basal	Isoproterenol (0.1 mM)	EGTA (2 mM)	Isoproterenol(0.1 mM) +EGTA(2 mM)	NaF (10 mM)
DMP	0.437 ± 0.172* (7)**	0.643 ± 0.206 (5)	0.588 ± 0.187 (5)	0.593 ± 0.214 (6)	27.220 ± 4.289 (7)
Non-DMP	0.227 ± 0.074 (7)	0.237 ± 0.067 (7)	0.195 ± 0.052 (6)	0.284 ± 0.062 (6)	17.194 ± 5.914 (7)
Student-t	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

*:mean ± S.E., pmole cAMP / mg protein / 30 min.
**:numbers of assayed samples.

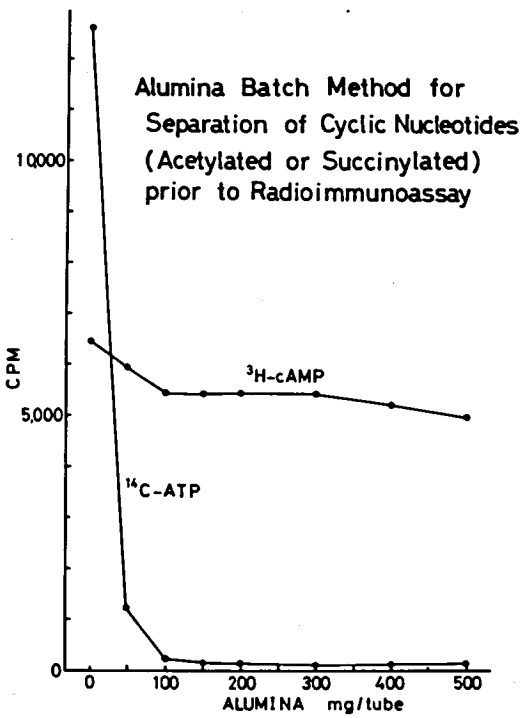


図 4　アセチル化とアルミナバッチ法を組合わせた方法での回収率とアルミナ量の関係

NaF（10mM）のいずれも平均値では対照よりも高かった．しかし基礎値及び NaF 存在下では推計学的に有意差はなかった．イソプロテレノール，EGTA それぞれ単独では DMP と対照の間に推計学的に有意差がみられた．

考　　察

この RIA において抗体をつくる際，抗原に succinyl cAMP とアルブミンを結合させて用いるため，出来る抗体は succinyl 基の構造を含めたものに対して産生される．検体をアセチル化すると succinyl 基との構造共通性より抗体に対する親和性を約100倍に高めることが出来る，アルミナバッチ法と併用することで極めて特異性の高い，高感度の測定法を確立することが出来た．これを用いて DMP と対照群の赤血球膜 AC を測定した結果は上述の如くである．今回の方法で測定した AC は前回の値（保因者3.14±0.43，対照1.49±0.44 pmole/mg 蛋白/20分に比し，約10分の 1 で低く，原因として PDE 抑制が不充分である可能性が考えられる．傾向としては DMP で基礎値が高く，推計学的に有意差がみられたイソプロテレノール，EGTA 存在下での AC 活性も，DMP での基礎値の高い傾向と関連すると思われた．最近 Wacholtz らは〔α-^{32}P〕ATP を基質に用い 1 mM cAMP の存在下で37℃ 2 時間のインキュベーションで

ACを測定しDMP及び保因者において赤血球ACの基礎活性が高いことを報告した[2]. 保因者に関しては前回の方法で得た我々のデータと一致するが, 今回の方法ではここに示した如くDMP患者では基礎値に関しては有意差が出なかった. FischerらはDMPと対照のACの間に差を認めなかったと報告している[3]. MawatariらはDMPの赤血球膜ACは他の疾患や正常成人よりその基礎値は高く, エピネフリンによる活性化はDMPで低いことを報告している[4]. 前回及び今回の我々の結果では正常人の赤血球のACの少なくともイソプロテレノールによる活性化は明確でなかった. Rasmussenらはヒト赤血球膜ACのホルモン感受性の存在を疑っている[5]. 各報告者により測定法が異なっており, 今回我々の方法も上述の如き問題点がある. ヒト赤血球のACの研究の歴史は測定法の困難さを物語っている. 再現性の点では前回報告の方法が優れており, 感度の点でもほぼ満足すべきものであった. この方法でDMPの赤血球ACを更に検討する予定である.

結　　論

アルミナバッチ法とアセチル化を組合わせたRIAを開発し, ヒト赤血球膜AC測定に応用した. DMPの赤血球膜ACは基礎値及びNaF存在下では対照との間に有意差がなかったが, イソプロテレノールあるいはEGTA存在下ではDMPのACは有意に高かった. 測定条件と方法の確立とDMP筋と赤血球膜に共通の病変が存在するか否かの問題は未だ解決されていない.

文　　献

1) 高橋桂一ほか：デュシャンヌ型ジストロフィー症保因者の赤血球アデニレートサイクレース活性及び測定における新しい試み. 筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究（三好班）昭和53年度研究報告書.

2) Wacholtz, M. C., Raible, D. G., Jackowski, S., et al. : Adenylate cyclase and ATPase activities in red cell membranes of patients and genetic carriers of Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta, 96 : 255, 1979.

3) Fischer, S., Tortolero, M., Piau, J.-P. et al. : Protein kinase and adenylate cyclase of erythrocyte membrane from patients with Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta, 88 : 437, 1978.

4) Mawatari, S., Schonberg, M. & Olarte, M.: Biochemical abnormalities of erythrocyte membrane in Duchenne dystrophy. Arch. Neurol., 33 : 489, 1976.

5) Rasmussen, H., Lake, W. & Allen, J.: The effect of catecholamines and prostaglandins upon hunan and rat erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta, 411 : 63, 1975.

36）Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜の Na＋K ATPase

馬　渡　志　郎*

研究協力者　伊規須　英　輝**　黒　岩　義五郎**

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）の赤血球については，種々の異常の報告があるが，ウアバインが DMD 赤血球膜の ATPase 活性を増加させるという報告は異常の中でも最も顕著な現象であろう[1),2)]．しかし，これに対して異論[3)-6)]や反論[7),8)]も少なくない．これらの多くの報告において，赤血球膜の調製における方法や条件は必ずしも同じではない．本研究は，赤血球膜の調製の方法の差異によって DMD 赤血球膜の Na＋K ATPase が対照と異なってくるかもしれないという仮定のもとに，いくつかの異なった調製法を試み，ATPase を測定した．

対象および方法

DMD 患者および対照群（脳性麻痺患者）は，同じ施設に入院中の同年代男子で，採血は常に同日の同時刻ごろ行い，赤血球膜の調製および ATPase の測定も，常に対照と同時に行った．本研究における ATPase 測定条件も次の如く統一した．反応液の構成は50mM Tris-HCl(pH7.4)，2mM ATP，1mM $MgCl_2$，100mM NaCl，15mM KCl，赤血球膜300～400μg，ウアバインを使用した場合は常に0.1mM であった．37℃，30分間反応させ，ATPase によって遊離した Pi は Taussky らの方法で測定した．

試みた方法あるいは条件：方法①；抗凝血剤としてヘパリンを用いた場合で，血清と buffy coat を除き，その後赤血球は3回生食水で洗い，その度に buffy coat を除いた後，10mM Tris-HCl (pH7.4)で溶血させ，膜を同液で4回遠沈(25,000 g)によって洗浄した．方法②；抗凝血剤として EDTA を用い，上記と同様に，血清と buffy coat を除き，さらに3回洗浄後，2mM Tris-HCl(pH7.4)で溶血し，膜は2mM Tris-buffer に0.02 mM EDTA を加えた液で4回洗浄（25,000g）した．その間2回 Teflon-Pestle のホモジナイザーで homogenize した．この方法は Brown らの方法とほとんど同じである．方法③；方法②で調製した膜に10倍容の0.1mM EDTA(pH8.0)を加え，37℃ 20分間 incubate した後39,000×g，30分間遠沈して得た膜．方法④；白血球と血清の混入の影響をみるために，DMD 患者のみを対象として，EDTA 採血後，血清と buffy coats を一回除いた後．各々を2つに等分し，一方はそのまま2mM Tris-HCl (pH7.4)で溶血し，2mM Tris-HCl＋0.02mM EDTA 液で膜を4回洗浄し，洗浄毎に homogenization を行った（Membrane A）．他方はその後さらに3回赤血球を洗い，その度に buffy coats を除いた後，Membrane A と同様に溶血および膜の洗浄を行ったが，homogenization は行わなかった（Membrane B）．方法⑤；方法②で調製した膜を，一部は－85℃に，一部は－10℃に8ケ月保存した膜で ATPase を測定した．

結　　果

方法①のヘパリン採血の場合も（表1），方法②の EDTA で採血し，EDTA を含んだ液で膜を洗浄および homogenization を行った場合も（表2），MgATPase，Na^+＋K^+ ATPase の活性および

＊九州工業大学保健管理センター

＊＊九州大学医学部脳研神経内科

表1　方法①の結果　Control

ATPase	DMD (n=5)	Control (n=5)
Mg	0.119±0.018	0.135±0.021
Mg+Na+K	0.185±0.052	0.197±0.031
Mg+Na+K+Ouabain	0.107±0.103	0.115±0.018
Ouabainによる抑制（%）	−39.8±12.2	−41.1±8.3

ATPase：μ moles Pi/mg・protein/hr

表2　方法②の結果

ATPase	DMD (n=5)	Control (n=5)
Mg	0.125±0.012	0.127±0.014
Mg+Na+K	0.213±0.024	0.215±0.015
Mg+Na+K+Ouabain	0.123±0.009	0.128±0.016
Ouabainによる抑制（%）	−41.7±6.6	−40.4±5.9

ATPase：μ moles Pi/mg・protein/hr

ウアバインに対する反応はDMDと対照群で全く有意の差はなかった．

方法③においては，SDS-polyacrylamide gel電気泳動パターンにおける，Band Ⅰ，Ⅱおよび Ⅳが選択的に殆ど除去されていた．しかし，DMDと対照とでは電気泳動パターンに明らかな差はなかった．この方法における膜のATPase活性およびウアバインに対する反応性ともにDMDと対照群との間に差を認めなかった（表3）．方法④は白血球および血清混入の影響を検討したものである．Membrane AとBの間でSDS-polyacrylamide gel電気泳動パターンにおいて明らかな差があった（Membrane AでBandの数が増加していた）．Membrane A（白血球混入）とBともにNa^{+}+K^{+} ATPase のウアバインに対する反応に有意の差はなかった（表4）．

方法⑤の結果は，−15℃に長期保存した場合，ATPaseのウアバインに対する抑制率は，−85℃に保存した場合に比べて著しく低下していた．しかし，いずれの保存においてもDMDと対照との間に有意の差を認めなかった（表5）．

表3　方法③の結果

ATPase	DMD (n=7)	Control (n=7)
Mg	0.105±0.022	0.112±0.028
Mg+Na+K	0.174±0.025	0.167±0.036
Mg+Na+K+Ouabain	0.125±5.0	0.130±0.029
Ouabainによる抑制（%）	−28.4±5.0	−22.5±3.4

ATPase：μ moles Pi/mg・protein/hr

表4　方法④の結果（%）

DMD	Membrane A	Membrane B
1	−31.1	−30.0
2	−26.6	−29.4
3	−46.0	−39.0
4	−17.6	−23.2
5	−38.5	−34.4
6	−28.6	−43.4
平均±S.D.	−31.4±9.8	−33.5±7.3

※ Results：% inhibition of Na+K ATPase by 0.1 mM Ouabain

表5　膜の保存温度の影響※

−85℃ 8ヶ月		−10℃ 8ヶ月	
DMD	Control	DMD	Control
−43.4	−31.9	−17.2	−17.1
−32.8	−47.3	−14.2	−20.1
−37.1	−41.2	− 5.9	− 8.0
−47.8	−38.1	−24.8	− 0.5
−47.6	−43.2	− 3.0	−19.4
平均−41.7	−40.4	−13.2	−13.0

※ % inhibition of Na+K ATPase by 0.1 mM Ouabain

考　察

DMD赤血球膜Na+K ATPaseについては，現在まで，1）ウアバインによって活性が増加する[1),2)]．2）ウアバインによる抑制率が低い[3),4)]．3）Na+K ATPase自体の活性が低い[5),6)]，という3種類の異常が報告されている．最初のBrownらの報告において[1)]，Na^{+}+K^{+} ATPase 反応液

中の Na^+ および K^+ の濃度が一般的に用いられてる濃度ではなかった点と42℃で反応を行っている点が注目されたが，その後一般的に用いられている Na^+ と K^+ の濃度の反応液でも，37℃の反応においても異常の報告がなされている[2)-5)]．したがって，種々の異った結果が報告されている原因は，反応液の構成よりも，ATPase 測定に至るまでの赤血球膜調製の方法や条件が各報告において一致していないことにあるかも知れない．私共は，この点を追求する目的で，通常の赤血球膜調製において起こり得ると思われるいくつかの条件や方法について，対照の条件を厳しく整え，さらに ATPase 測定条件も一定にして検討したが，Na+K ATPase 活性自体にも，ウアバインに対する反応も対照との差を認めなかった．これらの結果から DMD 赤血球膜の Na+K ATPase およびウアバインに対する反応性には，元来異常がないのではないかと推察される．DMD 赤血球膜の Na+K ATPase のウアバインに対する反応の異常は DMD の血清のある成分によって誘発されるのではないかとの意見がある[2),4)]．それが事実だとしても，それは膜の異常によるものではないと思われる．

文　献

1) Brown H.D., Chattopadhyay S.K., Patel A.B.: Erythrocyte abnormality in human myopathy. Science, 157 : 1577, 1967.

2) Peter J.B., Worsfold M, Pearson C.M. : Erythrocyte ghost ATPase in Duchenne dystrophy. J. Lab. Clin. Med., 74 : 103, 1969.

3) Mawatari S., Schonberg M., Olarte M.: Biochemical abnormalities of erythrocyte membranes in Duchenne muscular dystrophy: Adenosine triphosphatase and adenyl cyclase. Arch. Neurol., 33 : 489, 1976.

4) Siddiqui P.Q.R., Pennington R.J.T. : Effect of ouabain upon erythrocyte membrane adenosine triphosphatase in Duchenne muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 34 : 365, 1977.

5) Niebroj-Dobosz I.: Erythrocyte ghosts (Na+K) ATPase activity in Duchenne's dystrophy and myotonia. J. Neurol., 214 : 61, 1976.

6) Souwein G., Bernard J.C., Lasne Y., et al. : The sodium pump of erythrocytes from patients with Duchenne muscular dystrophy. J. Neurol., 217 : 287, 1978.

7) Klassen G.A., Blostein R. : Adenosine triphosphatase and myopathy. Science., 163 : 492, 1969.

8) Hodson A., Pleasure D. : Erythrocyte cation-activated adenosine triphosphatase in Duchenne muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 32 : 361, .1977.

37）Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球膜について

植田啓嗣*

研究協力者　畑中良夫*　佐々木重雄*
野島元雄**　Tyler, F.H.***

目的

筋ジストロフィー症の成因は未だ明らかではない．そこでは，神経（自律神経），筋肉，循環器系，体液などの異常説と共に，近時膜異常の存在が，筋組織のみならず全身の組織にもまた認められるとする説が注目されてきた．

そのなかにあって，遊離した組織である赤血球膜の実態は，体液や全身的な膜の異常の有無に決着を与えることになるだろう．しかし Duchenne 型筋ジストロフィー症についてみると，異常が認められたとする報告も多いが，また逆の成績も多い．

そのため，私共は昨年度に引き続き[1]，その成績不一致の機構を解析しながら，Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球膜の異常の有無に検討を加えた．

方法

血液 1 mlをヘパリン tube に注入し，血清並びに白血球層を除いた赤血球の層を，生理食塩水で洗滌し，次いで20mM histidine-imidazole -Tris buffer（pH7.2）を加え，溶血させた．そしてその試料の一部で，freezing-thawing の操作を行った．

Acetylcholine esterase 活性は Ellman 法で，aldolase 活性は Lehninger 法で，Ca-ATPase 活性は，3 mM Tris-ATP，3 mM $MgCl_2$，80mM NaCl, 15mM KCl，0.1mM $CaCl_2$，20mM histidine-imidazole-Tris buffer（pH7.2）に試料を加えて，1.0mlとし，37°C, 1 時間反応させて遊離する p_i を Fiske 法で求めた．

また ouabain の結合能には，non frozen, frozen の溶血試料を，0.2mM EDTA を含む20mM histidine-imidazole-Tris buffer（pH.7.2）で洗滌し，Hb の色の消えた状態で，更に1.25mM $MgCl_2$，40mM NaCl，0.25mM EDTA，20mM Tris-glycylglycine buffer（pH7.4）で洗滌した試料を用いた．そしてその反応は上記 buffer に 2.0 mM ATP, 50muCi（3×10^{-9}M）H^3 ouabain, (0-10^{-4}) M ouabain を加えて，1.0 ml とし，37°C 30分反応させて[2]膜と結合した放射活性を液体scintillation counter で求めた．

洗滌は，懸濁と25000g，20分の遠沈の操作によった．

結果

1）指標としての ouabain の結合能の特性

H^3の ouabain を用いて，赤血球膜の外層に局在するとされる ouabain の結合能を測定した．

10分，20分，30分と37°Cで incubate すると，図1のような曲線（○——○）を描いて膜と結合した．その際反応液中の放射活性値を一定にして放射活性を持たない ouabain を10^{-4}Mの濃度に高めると，結合する放射活性（●——●）は10～20%程度減量する．この量は，反応液中の ATP を除いた場合の減量にほぼ等しい．

＊愛媛大学保健管理センター
＊＊愛媛大学医学部整形外科
＊＊＊ユタ大学内科

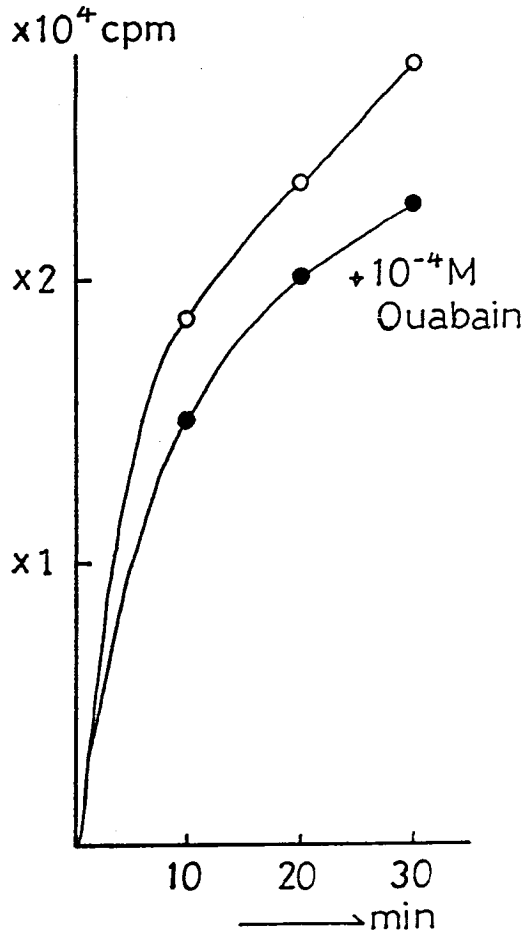


図1　Binding activity of ^{14}C-ouabain on red blood cell membrane

2）指標としての膜酵素の特性

膜に局在が認められている acetylcholine esterase, aldolase, Ca-ATPase の3酵素[3]が膜とどのような親和性を保っているかを検討してみた．

溶血後遠心沈澱させた上清(1)，その沈渣をbufferに懸濁させ遠心沈澱させた上清(2)，更にその沈渣を懸濁させ遠心沈澱させた上清(3)とその沈渣(4)と，4区別に分けて，活性の分布をみると，acetylcholine esteraseでは(4)，次いで(1)に，aldolaseは(1)，次いで(2)に，Ca-ATPaseは(4)に活性が集り，3酵素はそれぞれ特有の分布像を示した（表1）．

表1　Distribution of membrane enzymes (%)

	Acetylcholine esterase	Aldolase	Ca-ATPase
(1) hemolysate supernatant	26 - 30	56 - 66	10
(2) 1st washing fluid	9 - 10	17 - 26	0
(3) 2nd washing fluid	0	3	0
(4) ppt	54 - 58	15	65 - 81

そしてその際，3回の freezing-thawing の操作を加えても，acetylcholine esterase の total の活性値と分布像には大きな変化がみられなかった．また aldolase でも total の活性値に変化はなかったが，分布像では(2)より(1)に，また(3)より(2)の分画に活性が片寄る傾向（但し10%以下）がみられた．

一方，Ca-ATPase では freezing-thawing によって活性値は約10倍に上昇し，そして(4)分画に集中した．

3）Duchenne 型筋ジストロフィー症のouabainの結合能

一定量の放射活性を持つごく微量の ouabain の結合が，どの程度の放射活性を持たないouabainを反応系に更に添加することによって減量するか，この最少濃度を求めたところ，その量は10^{-7}Mであった．そしてこの値には患児・正常児で差異は認められなかった．しかし4°Cのもとで保存すると，患児の試料で，希釈に要する最少濃度が増量し，結合曲線にも変化が認められた(図2，上段)．

一方，freezing-thawing をした試料についても上記の検討を試みたが，希釈に要する最少濃度は患児・正常児で共に増量し，結合曲線でも共に変化が認められた．そしてこの点保存試料についてもまた同様の成績が得られた（図2，下段）．

4）Duchenne 型筋ジストロフィー症と膜酵素

Acetylcholine esterase と aldolase では，活性値（total）並びに分布像は，患児と正常児との間で差異が認められなかった．

一方，Ca-ATPase では，溶血試料，その上清，

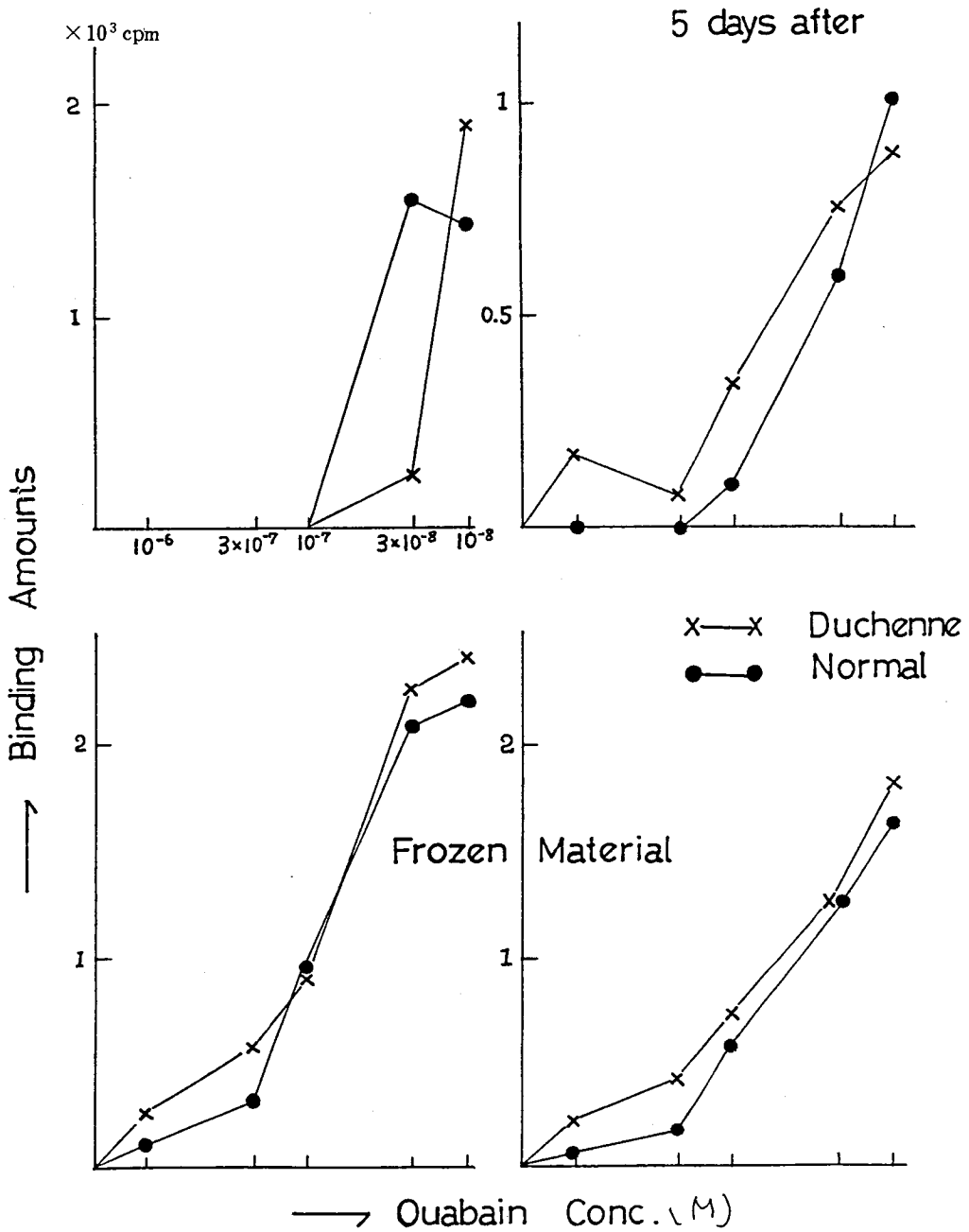


図 2 Binding patterns of ouabain on red blood cell membrane

とその沈渣，並びに上清＋沈渣について，それぞれの活性値を求めたが，溶血試料とその沈渣共，Duchenne 型とその母親が低く，上清＋沈渣の活性値で，Duchenne 型のみが，溶血試料より低い値を示した（表２）．

表２　Total and membrane ATPase activities

Total and Membrane ATPase Activities

No.	age	total	sup	ppt	sup + ppt
1. Normal	48	560	60	480	580
2. FSH	16	540	20	480	580
3. Duchenne	5	380	20	280	320
4. (Mother)	25	340	30	280	360
5. Duchenne	13	380	20	280	320

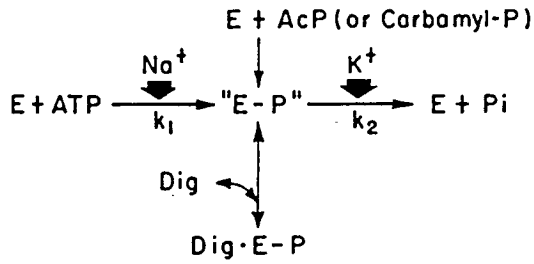
Δ OD_{660}

考　　察

膜の(Na＋K)ATPase は ATP のエネルギーを消費しつつ，Na^+ と K^+ の転送を行っている．つまりこの場合，本酵素蛋白を中心にみると，まず Na が触媒的に作動して酵素(carrier)蛋白体をリン酸化させ，次いで K が脱リン酸化させて(図３)，このリン酸化，脱リン酸化に伴う carrier 蛋白体の３次構造の変化を利用して，Na と K の転送が起こるものと理解されている[4]．この際 ATP の立場から反応系をみると，Na と K の転送に応じて ATP の消費がもたらされるため，(Na＋K)ATPase と呼称されている．

一般に，膜ではこの系以外にもまた色々の機構によって，ATP→ADP＋P の反応は起っている．しかしリン酸化されたこの carrier 蛋白は，ouabain と結合すると，その型で反応が固定される性質をもつ．それ故この性質を利用してこの系の ATPase 活性が求められる．つまり Na/K の濃度の変化に呼応して変動する活性値のうち，ouabain で阻害される部分が（Na＋K）ATPase の活性値とみなされている．

したがって，ouabain の膜への binding も，また側面から，(Na＋K)ATPase の動向を知る貴重な試料を提供する．



Schwartz *et al.*[4]

図３　Cardiac glycoside enzyme complex

いま赤血球で結合能を求めると，hot の ouabain が cold の ouabain で希釈をうける量，それは勿論 ATP を反応系から除外することで減量する量にほぼ均しいが，その量は極めて少なく，その点心筋，脳などの臓器が 100％に近い値で減量を示す成績[4] とは異っている．つまり赤血球膜は試料としては容易に得られるものの，そこでは圧倒的に non specific な binding が多く，この種の実験に適しているものとは言い難い．それだけにまた得られる成績に対しても慎重な態度が要求されるものと考えたい．

Duchenne 型筋ジストロフィー症で求めた成績は，hot の ouabain を希釈するに要する cold ouabain の最少濃度(ouabain の binding の Km 値)は 10^{-7}M で，この点，患児と正常児で差異は無かった．

しかし，試料を保存すると，患児では，結合曲線が変化し，且つ Km 値も増加した．freezing-thawing を加えた試料ではまたその保存試料でも，正常児は患児と同様に結合曲線が変化し，且つ Km 値も増加した．したがってこれらの成績からみると，患児の赤血球膜は容易に変化を受けやすい状態にあるものと考える．

次に膜酵素を指標にした成績であるが，外層に存在するとされる acetylcholine esterase，内層に存在するとされる aldolase では，膜への親和性で両酵素間に多少の差異がみられたが，活性値(total)でも各分画への活性の分画像でも，患児と

正常児の間に差異は認められなかった．この点freezing-thawing を行ってもまた同様の成績が得られた．

しかし，Ca-ATPase 活性は，溶血試料とその沈渣で，正常男子やFSH 型筋ジストロフィー症(小児）より低い値を示した．そしてその上清＋沈渣の活性値が溶血試料の値を上廻っている点で母親とも態度を異にした．

最近私共の成績とは異なり，赤血球膜の Ca-ATPase の活性値が，Duchenne 型で高く，強直性筋ジストロフィー症で低い値をとることが示されている[5]．私共はそれを本活性値が Ca の微妙な濃度に敏感に変動する性質を有しているための違いと考えているが，目下その機構は究明中である．

結　　論

1）正常児の赤血球膜の ouabain の binding の Km は 10^{-7}M であったが，Duchenne 型患児でも同程度の値が得られた．

2）しかし，4°C で保存した膜試料では，患者の Km が増加し，且つ結合曲線にも変化がみられた．

3）膜の外層に存在する acetylcholine esterase と内層に存在する aldolase は，全活性値でも，膜との親和性の点でも，正常児と患児との間で差異は認められなかった．

4）freezing-thawingの操作で活性に上昇がみられた Ca-ATPase の活性値は，溶血試料とその沈渣で正常男子や FSH 型筋ジストロフィー（小児）より低い値を示した．そしてその上清＋沈渣の活性値が溶血試料の値より上廻っている点で母親とも異った態度を示した．

5）1－4の結果から，Duchenne型筋ジストロフィー症にみられる赤血球膜異常は，存在していても，それは微細なものか，あるいは2次的な変化によっているものと考えたい．

文　　献

1）植田啓嗣，畑中良夫，佐々木重雄，野島元雄：赤血球膜Ca-ATPase活性と筋ジストロフィー症，昨年度本研究班報告書

2）Van Winkle, W. B., Allen, J. C. and Schwartz, A. : The nature of the transport ATPase-digitalis complex, rapid binding studies and effects of ligands on the formation and stability of magnesium plus phosphate-induced glycoside-enzyme complex. Arch. Biochem. Biophys., 151 : 85, 1972.

3）Steck, T. L. : The organization of proteins in the human red blood cell membrane. J. Cell Biology, 62 : 1, 1974.

4）Schwartz, A., Lindenmayer, G. E., Allen, J. C. and McCans, J. L. : The nature of the cardiac glycoside enzyme complex, mechanism and kinetics of binding and dissociation using a high activity heart. Ann. New York Acad. Sci., 242 : 577, 1974.

5）Luthra, M. G., Stern, L. Z. and Kim, H. D. : (Ca＋Mg) ATPase of red cells in Duchenne and myotonic dystrophy, effect of soluble cytoplasmic activator. Neurology, 29 : 835, 1979.

38）Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜アセチルコリンエステラーゼ活性についての検討

黒　岩　義五郎*

研究協力者　伊規須　英　輝*　馬　渡　志　郎*　後　藤　幾　生*

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD)の赤血球については，多くの異常の報告がある．しかし，その「異常」の局在部位は明らかでない．更に，これらの報告に対する反論も少なくない．

そこで，我々は，赤血球膜表面に局在することが明らかにされており，かつ，特にヒト赤血球において活性が高いアセチルコリンエステラーゼ（AchE）を用いて，膜の性質について検討した．

対象と方法

対象は全例男子でほぼ同一年令．実験１，２共に DMD 患者は５例，対照として実験１では脳性麻痺患者，実験２では気管支ぜんそく患者各６例より検体を得た．

各実験において，DMD 患者および対照より同一日のほぼ同一時刻に採血し，同時に検体の処理を行なった．

採血時には，EDTA（実験１）又はヘパリン(実験２）を抗凝固剤として用いた．血液は採取後直ちに氷中におき，５時間（実験１）又は２時間(実験２）後より処理を開始した．実験１では，Brown ら[1]の方法により膜標品を得，蛋白濃度が２mg/ml となるように調整し，更に等量の0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）又はそれに２％Triton-X100 を含むものと混じ，最終蛋白濃度が１mg/ml となるようにした．実験２では，赤血球を生食水で２回洗った後，0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）で１回洗い，同緩衝液に再浮遊させ，ヘモグロビン量が4.0g/dl となるよう調整した．これを，ドライアイス・アセトン中で溶血させた．

AchE 活性はほぼ Ellman ら[2]に従って測定した．すなわち，反応液組成は，0.25mM DTNB を含む0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）３ml に，40mM acetylthiocholine iodide を50μl，更に20μl の膜標品又は10μl の溶血させた赤血球を加えたものとした．必要に応じて，５ないし35μl の240mM NaF を加えた(なお，35μl の水又は240mM NaCl を加えても酵素活性の変化は認められなかった)．412nm における吸光度変化を記録計（Beckman-Toshiba U-125M）つきの分光光度計（日立200-20）で観察した．セルホールダーの温度は循環恒温槽（Lauda K２RD）により一定とした．

膜標品の蛋白量は Lowry 法，赤血球浮遊液のヘモグロビンは cyanmethemoglobin 法により測定した．

活性化エネルギーおよび NaF による酵素活性抑制の Hill 係数は下記の式に従ってグラフより求めた．

$$\ln K = -\frac{E}{RT} + a$$

ここで K は反応定数，R は気体定数，T は絶対温度，a は定数，E は活性化エネルギーである．

$$\log V/V_0 - V = \log K_{0.5} - n\log(I)$$

ここで，V，V_0 は各々 NaF 存在，非存在下の反応速度，$K_{0.5}$ は $V/V_0 - V$ が０となる時の NaF 濃度，I は NaF 濃度，n は Hill 係数である．

＊九州大学医学部脳研神経内科

＊＊九州工業大学保健管理センター

結　　果

25°C における AchE 活性について，Triton—X 100含有又は非含有の膜標品，或いは溶血赤血球いずれにおいても DMD と対照検体の間に有意差を認めなかった（表1）．25—43°C における活性化エネルギー（平均±SD）は，DMD で2.40±0.27Cal/mol，対照で2.22±0.11Cal/mol であり，両者間に有意差を認めなかった．

表1　赤血球 Ach E 活性（25°C）

	DMD	対　照
実験1（膜標品）		
例数	5	6
年齢	14.0±5.1	12.7±5.7
活性（U/mg 蛋白）		
Triton-X 100なし	1.96±0.18	2.08±0.17
〃　あり	1.94±0.19	2.12±0.17
実験2（溶血赤血球）		
例数	5	6
年齢	9.4±1.9	10.8±0.3
活性（U/g Hb）	30.2±2.5	30.5±1.6

25°C において，NaF 濃度と AchE 活性の関係をみると，DMD 対照両群共において，S 字状の曲線は得られず，Hill 係数は1であった．$K_{0.5}$ については，膜標品と溶血させた赤血球では異なり，更に膜標品でも Triton—X100の有無により異なった（表2）．しかし，いずれの場合にも DMD と対照の間に有意差は認めなかった。

表2　赤血球 Ach E 活性に対する NaF の影響

	DMD	対　照
実験1		
Hill 係数		
Triton-X 100なし	1.01±0.04	1.00±0.03
〃　あり	1.00±0.04	0.99±0.04
$K_{0.5}$（mM）		
Triton-X100なし	0.97±0.03	0.96±0.02
〃　あり	0.91±0.02	0.91±0.02
実験2		
Hill 係数	0.96±0.03	0.97±0.04
$K_{0.5}$（mM）	0.67±0.04	0.67±0.03

考　　案

Goedde ら[3] は，DMD 赤血球ではフッ素などの抑制剤に対する AchE 活性の反応程度が異常であると報告している．一方，赤血球 AchE 活性のフッ素による抑制に対する Hill 係数はきわめて鋭敏に膜の状態を反映するという．そこで，我々は NaF 濃度を変化させ，それに対する AchE 活性の変化を Hill プロットを行なって検討した．その結果，DMD 対照両群共に Hill 係数は1であり，両群共にアロステリックな抑制は見出されなかった．ただし，$K_{0.5}$ は膜標品と溶血赤血球，又，膜標品でも Triton—X100の有無により異なった．このことは，検体処理法の相違がフッ素による AchE 活性抑制の程度の差を来しうることを示すものと考えられる．

従来の DMD 赤血球に関する研究では，対照の中に成人を含めたものも少なくない．しかし．成人と小児の赤血球は色々の面で異なっている．更に膜標品作成法の相違は膜の性質に大きな相違をもたらすことが報告されている．これらのことが従来の DMD 赤血球についての知見の矛盾の原因とも考えられる[4] ので，今回我々は，(1)性，年令を一致させた対照を用い，(2)患者と対照から同一日のほぼ同一時刻に採血し，(3)両群から得た検体を同時に処理し，同時に酵素活性測定を行ない，更に，(4)膜標品だけでなく溶血させた赤血球についても検討した．

一方，膜酵素の活性化エネルギー，或いは AchE 活性のフッ素による抑制に対する Hill 係数は膜の状態をよく反映するとされている．しかし，我々は，これらについて DMD と対照の間に相違を見出し得なかった．このことは，DMD 赤血球膜の AchE そのもの，或いはその膜内環境に著しい異常はないことを示すものと考えられる．

結　　語

DMD 患者および同性，同一年令の対照から，同時に採血し，同時に膜標品又は溶血赤血球を作製し，AchE 活性測定を行なった．DMD と対照の間に25—43°C における活性エネルギー，或いは25°C における NaF による活性抑制（Hill 係数，

50%抑制に要する NaF 量）について差を認めなかった．この結果は，DMD 赤血球膜の AchE およびその膜内環境に著明な異常はないことを示すものと思われる．

文　献

1）Brown, H. D., Chattopadhyay, S. K. & Patel, A. B. : Erythrocyte abnormality in human myopathy. Science, **157** : 1577, 1967.

2）Ellman, G. L., Courtney, K. D., Anders, V., et al. : A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. **7** : 88, 1961.

3）Goedde, H. W., Benkmann, H. G., Das, P. K., et al. : Activity of creatine kinase isoenzyme MB in serum and red cell acetylcholinesterase variants in patients with Duchenne muscular dystrophy. Klin. Wochenschr., **55** : 215, 1977.

4）Igisu, H., Mawatari, S. & Kuroiwa, Y. : Erythrocyte ATP in Duchenne dystrophy: Effects of ouabain and propranolol. Neurology (Minneap), **29** : 992, 1979.

39）筋ジストロフィー症の細胞膜の物理化学的研究
II 赤血球形態の経時変化及びカルシウムの影響

吉田瑞子*

研究協力者　岩崎祐三*　安藤一也*

私達はDuchenne型筋ジストロフィー症患者の赤血球形態が，正常者のものとまったく差がないことを，すでに報告した．

処で，筋ジストロフィー症患者の赤血球形態に関する今迄の研究報文は，その形態の多くがechinocyte型，或いはstomatocyte型に変形しているというものや，また正常者との差が認められない，などいろいろである．これ等の報文の赤血球の処理方法を調べると，採血方法，赤血球洗滌に使用する緩衝溶液が異なり，赤血球形態観測までの処理方法も異なっている．これ等のことより患者の赤血球は，その処理条件，即ち外部環境条件の影響によって形態変形を生じ易く，何か正常者の赤血球とは違った性質が有るように推測される．

今回私達は，患者の赤血球は実際に外部環境条件の影響を受け易いかどうかを，赤血球形態に注目して，対照者のそれと比較しながら調べた．即ち赤血球を浮遊させる緩衝溶液を2種類撰び，その緩衝溶液中で赤血球がどのように変化するか，6日間に亙って，その経時的変化を走査電子顕微鏡で観察した．

実験方法

緩衝溶液は，保存血に使用するアルスバ溶液とリン酸緩衝食塩水(Ca^{2+}とMg^{2+}を含む場合をPBS (+)，含まない場合をPBS (−) とする）を使用した．その組成は表に示すように，アルスバ溶液には，113.9mMのブドウ糖とCaのキレート剤として働くクエン酸が含まれている．pHは6.0で浸透圧は33/mOsmである．一方PBS (+) には0.9mMのCa^{2+}が含まれ，pHは7.4，浸透圧は281 mOsmである．これ等の緩衝溶液は使用する半日前に調製し，その都度Advanced Osmometer, Model 3Wで浸透圧を測定した．水は脱イオン水をパイレックス容器で2回蒸溜したもので，2度目の蒸溜は使用する直前に行った．

表 Composition of Alsever's solution and phosphate buffer ed saline

Alsever's Solution (pH 6.0　331 mOsm/l)		Phosphate Buffered Saline (pH 7.4　281 mOsm/l)	
	mM		mM
Sodium Citrate	27.2	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	8.09
Citric Acid	2.62	KH_2PO_4	1.47
Dextrose	113.9	NaCl	136.9
NaCl	71.9	KCl	2.68
		$CaCl_2$	0.90
		$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.49

血液はDuchenne型筋ジストロフィー症患者7名，ほぼ同一年齢の正常男子対照者7名よりヘパリン採血した．採血直後5倍量のそれぞれの溶液に分注し，3回洗滌を行った（PBS(−)の場合は4回）．赤血球と溶液は遠沈法（170×g，10分，4℃）で分離した．その後ヘマトクリット値が，10から15%になるように浮遊させ，4℃に保存し毎日攪拌した．

*国立武蔵療養所神経センター

試料標本は24時間毎に，6日間に亙って作成した．赤血球の固定は浮遊に使用したものと同じ溶液で稀釈した，1％ glutaraldehyde を用い，4℃で30分から2時間半行った．

固定液は使用する直前に窒素封入70％ glutaraldehyde を使用して調製した．固定された赤血球を，Ion-Coater (Eiko IB・3) で親水処理を行った plastic cover slip の上にのせ，再蒸溜水で洗滌後，2，2-dimethoxypropan, 次いで100％ Acetone で脱水した．Acetone を Isoamyl acetate に置換後，液体炭酸ガスで置換して，臨界点乾燥を行った（日立-HCP-2）．Ion-coater で Pt-Pd を coating した後日立-S-430 走査電子顕微鏡を用いて，試料台を傾斜して観察，写真撮影を行った．なお傾斜角度は60度とした．電子顕微鏡に用いた試料の一部を固定する直前に，光学顕微鏡でも観察，走査電子顕微鏡との対比を行った．一試料1500個以上の赤血球を数え，赤血球異常形態は，Bessis, M. et al[1] の分類方法に従い，echinocyte I 以上，stomatocyte I 以上の変形を異常形態とした．

結　　果

図1はアルスバ溶液中に患者と対照者それぞれの赤血球を浮遊し，4℃に保存して，6日間に亙って観察した赤血球形態の経時変化を示す．破線が赤血球の stomatocyte 型への変形出現率を示しているが，患者（○印）と対照者（△印）共に，洗滌から48時間迄に約10％の増加を示したが，その後ほぼ一定値を示し，両者間に差が認められなかった．6日目における stomatocyte 型の出現率は非常に低く約20％に過ぎなかった．

また実線で echinocyte 型の出現率を示している．図から判るように患者と対照者の間に，その出現率，経時的変化に差は認められなかった．両者共その出現率は時間と共に僅か増加し，6日目で約10％に過ぎなかった．

アルスバ溶液中に浮遊した患者と対照者赤血球は，その異常形態の出現そして経時的変化に大きな差を示さなかった．

図2は患者と対照者のそれぞれの赤血球を Ca^{2+}

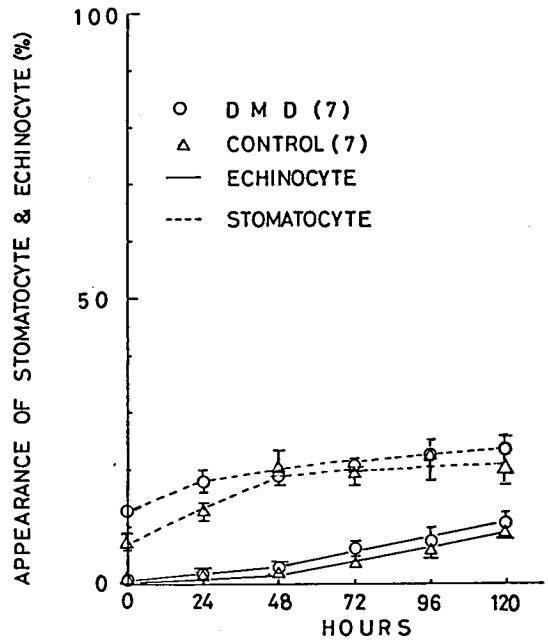


図1　Erythrocyte in Alsever's solution (pH 6.0, 331 mOsm/lit.)

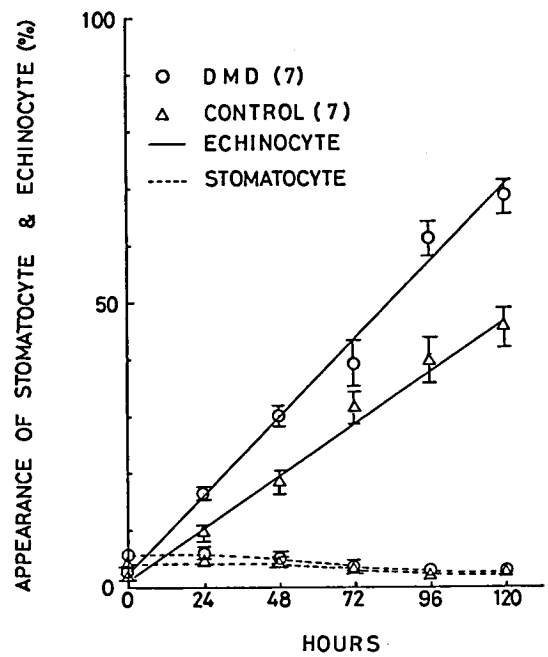


図2　Erythrocyte in PBS (+) (pH 7.4, 281 mOsm/lit.)

と Mg^{2+}を含む PBS(+)に浮遊させ，4℃に保存し，6日間に亙った赤血球形態の経時変化を示す．赤血球の stomatocyte 型の出現率は，両者共数パーセント以下と非常に少なく，経時的に減少した．

一方 echinocyte 型の出現率は，図に見る如く，両者間に大きな差を生じた．両者共，時間と共に echinocyte 型の変形が増加したが，患者の赤血球の方が，より多くの変形出現率を示し，6日目において約70%に達した．

それに比べ対照者は45%に過ぎなかった．

Ca^{2+}が含まれる PBS(+)中に浮遊した患者と対照者赤血球は，echinocyte 型の経時的変化において大きな差を示した．

Ca^{2+}と Mg^{2+}を含む PBS(+)中で多くの echinocyte 型の出現を生じ，さらに経時的変化において患者と対照者の間に大きな差を生じた原因は，Ca イオンによると推測し，次の実験を行った．

患者（3名）の赤血球を，① Ca^{2+}と Mg^{2+}を含む，② Ca^{2+}と Mg^{2+}を含まない，③ Ca^{2+} のみを含まない，それぞれのリン酸緩衝食塩水に浮遊させ，上記の実験と同様に，4℃に6日間保存し，6日目における echinocyte 型の出現率を観察した．その結果，PBS(+)中では，Ca^{2+}が含まれない PBS に比べ，約20数%も多くの echinocyte 型の出現を示した．

考　　察

一般に赤血球内の ATP レベルが，正常な赤血球形態，即ち discocyte 型を保つことに，重要な役割を果していることが知られている．

また赤血球内の ATP 量が減少すると echinocyte 型に変形し，増加すると stomatocyte 型を生ずる要因となることが知られている．

図1で示されるように，アルスバ溶液中で，患者と対照者の赤血球に，echinocyte 型の変形出現率が非常に少なかったことは，アルスバ溶液にブドウ糖が含まれているため，糖代謝系を持つ赤血球は，この溶液中で ATP 産生，消費が可能で，患者と対照者赤血球の多くが，6日間の保存中正常形を保つことができたと考えられる．また患者と対照者の赤血球異常変形出現率に差が認められなかったことは，Igisu, H. et al[2]の Duchenne 型筋ジストロフィー症の患者赤血球の ATP 産生，消費能力は正常者のそれと差がない，との報告と一致すると考えられる．

一方 Ca^{2+}と Mg^{2+}を含む PBS(+)中の患者と対照者の赤血球形態の経時変化は，図2で示されるように，両者共 echinocyte 型が時間と共に増加したが，その出現率に大きな差を生じた．

患者と対照者の赤血球形態に，echinocyte 型が多く出現したことは，赤血球内に Ca が蓄積すると echinocyte 型になると一般に認められていることから，Ca^{2+}が含まれる PBS(+)中で，赤血球内の ATP が消費されると共に，Ca の蓄積が生じたものと考えられる．またこの考えは患者赤血球を用いて，PBS(+)と Ca^{2+}を含まない PBS中での echinocyte 型出現率の結果からも支持される．

対照者赤血球に比べて，経時的に患者の赤血球に多くの echinocyte 型が出現したことは，Grassi, E. et al[3]の結果と一致し，その原因は赤血球内に Ca^{2+}が流入し，蓄積され易かったと考えられる．これは正常者の赤血球に比べ Myotonic Dystrophy 患者の赤血球内に，Ca がより多く蓄積されるという Plishker, G. A. et al[4]の結果と一致する．また Duchenne 型筋ジストロフィー症の一部の筋細胞内に Ca が蓄積しているという Bodensteiner, J. B. et al[5]の報告と類似する現象と考えられる．

ま　と　め

患者の赤血球は外部環境条件の影響を受け易いことが判った．

アルスバ溶液中で，患者の赤血球は対照者のものと同様に正常形態を保つことができた．経時的に観察した赤血球の形態変形の出現率は少なく対照者と差がなかった．

Ca^{2+}を含む PBS(+)中での，患者赤血球の経時的形態変化は，多くの echinocyte 型を生じ，対照者のものと大きな差を示した．

今後この外部環境条件を受け易い原因を，物理化学的手法を用いて調べて行く予定である．この

ことは患者の細胞膜の性質を究明するひとつの手がかりとなると考えられる.

患者の血液を提供下さった，国立療養所東埼玉病院　石原傳幸先生，正常対照者の血液を提供下さった，東京女子医科大学　金子行子先生に感謝する.

文　献

1) Bessis, M., Weed, R. I. & Leblond, P. F. : Red Cell Shape. Springer-Verlag, New York, Heidelberg (1973).

2) Igisu, H., Mawatari, S. & Kuroiwa, Y. : Erythrocyte ATP in Duchenne Dystrophy : Effects of Ouabain and Propranolol. Neurology, 29 : 992, 1979.

3) Grassi, E., Lucci, B., Marchini, C., Ottonello, S., Parma, M., Reggiani, R., Rossi, G. L. & Tagliavini, J. : Deformed Erythrocytes in Muscular Dystrophies. Neurology, 28 : 842, 1978.

4) Plishker, G. A., Gitelman, H. J. & Appel, S. H. : Myotonic Muscular Dystrophy : Altered Calcium Transport in Erythrocytes. Science, 200 : 323, 1978.

5) Bodensteiner, J. B. & Engel, A. G. : Intracellular Calcium Accumulation in Duchenne Dystrophy and other Myopathies : A Study of 567,000 Muscle Fibers in 114 Biopsies. Neurology, 28 : 439, 1978.

40）筋緊張性ジストロフィー症における赤血球膜 Lipid vesicles の異常

近　藤　喜代太郎*

研究協力者　長　野　泰　甫*　Allen D. Roses**

目　的

筋緊張性ジストロフィー症(以下MMDと略す)において,最近,赤血球膜蛋白のりん酸化の異常が指摘され,さらに,電子スピン共鳴法で,膜流動性の増大が報告された.これらの変化は,MMDが,筋肉のみならず,全身性に共通した膜異常を有するという仮説を支持している.しかし,上記の変化を惹起する膜異常の局在は,なお不明であり,その本態も明らかにされていない.そこで,筆者らは,MMDの赤血球膜異常が,膜蛋白,あるいは,膜脂質のいずれに起因するかを知る目的で,ナトリウムの透過性に関する実験を行なったので報告する.

方　法

MMD例（6例）と対照例（6例）から静脈採血により赤血球を得て,Dodgeらの方法で赤血球膜（ゴースト）を作製した.各ゴーストから,Folchらの方法で脂質を抽出し,同時に,低張液を用いてスペクトリン,および,Band 5蛋白を抽出した.上記の脂質を使用して作製したリポゾームに,スペクトリン・Band 5蛋白を混入し,カルシウム存在下と非存在下におけるナトリウムの透過性を検索した.

結　果

カルシウムの存在下では,ナトリウムの取り込みが著しく低下する事実を見い出した.MMD例と対照例において,カルシウムによるナトリウムの取り込み低下を比較すると,前者において,1 mgりん脂質あたり,4148±1195c. p. m.,後者において,6449±877c. p. m.と有意な差（$p<0.005$）を認めた.交叉実験を行なった所,MMD例から得た脂質を用いた時に変化が再現された.

結　語

上記の結果は,MMD例の赤血球膜脂質分画になんらかの異常が存在する可能性を示唆している.

＊新潟大学脳研究所神経内科

＊＊Duke University Medical Center, U.S.A.

41) ジストロフィー鶏赤血球膜のレクチン結合

宇尾野　公義*

研究協力者　別府宏圜*　中島元夫**
西山文朗***　平野　寛***

進行性筋ジストロフィー症(PMD)をsystemic membrane diseaseとしてとらえる立場から一連の研究を行って来た[1)2)3)]．昨年度はジストロフィー鶏(Dy鶏)3羽，正常対照鶏2羽を用いて，両者の間に赤血球細胞膜表面のConcanavalin A (Con A)結合の差が認められることを報告したが[3)]，今回は実験対象の数を増すとともに，月令・性を厳密にmatchさせ，定量的な検討を加えた．また^{125}I標識Con Aを用いて結合実験を行った．

材料と方法

Dy鶏8羽，正常対照鶏10羽を用い，孵化後1，2，4ヶ月の時点で採血し，赤血球を分離，燐酸緩衝生理食塩水(PBS, pH7.2)にて3回洗滌し，次の実験を行った．(1) Con Aによる赤血球凝集活性の測定，(2) ^{125}I標識Con Aの結合実験，(3)二次元展開標本におけるferritin標識Con A (Fer-Con A)結合の電顕的観察．

(i) Con Aによる凝集活性：

PBSによりCon Aの倍数稀釈系列をマイクロプレート上に作製し，これに等量の被検赤血球の浮遊液(1 vol%)を加えて振盪し，密閉したのち37℃，60分間静置し，凝集活性を判定した．判定は(−)，(+)，(++)，(+++)の四段階で表示し，判別の困難な例はその中間的表示を加えた．(+)を示す最低Con A濃度で凝集活性を表現した．

(ii) ^{125}I標識Con Aによる結合実験：

Con Aをクロラミン T法[4)]により^{125}Iで標識したのち，Kawaguchiら[5)]の方法により結合実験を行った．0.25%のbovine serum albuminを含むPBS (PBS-BSA, 10mM)を作製し，その0.25mℓ中に1×10^{6}個の赤血球と3〜100pmolの^{125}I標識Con Aを加え，4℃60分反応させたのちPBS-BSAにて洗滌し，結合した^{125}IをAlloka auto well systemにて測定した．

(iii) 二次元展開標本におけるFer-Con Aの結合：

Con Aのferritin標識はIrimuraら[6)]の方法に従った．洗滌した赤血球をFer-Con Aと37℃30分間反応させたのち，PBSで洗滌し，等量のPBSにて浮遊液を作製した．この浮遊液を蒸溜水の表面に滴下すると，その一部は滲透圧により破裂し，赤血球膜は表面張力により伸展されて水表面に浮かぶ．支持膜をはったグリッド上にこれらの赤血球膜を拾い，蒸溜水で洗滌したのち，透過電顕で観察した．

結　果

(i) Con Aによる凝集活性：

1ヶ月及び4ヶ月の時点における赤血球のCon A凝集活性を表1に示す．凝集活性はジストロフィー，対照の両群間で多少の重なり合う部分を示すが，全体としては明らかに異なる凝集活性を示した．中央値で表示すると，月令1ヶ月のDy鶏では2^{-4}mg/mℓ，同じ月令の対照鶏では2^{-2}mg/mℓであり，危険率5%以下で有意の差を示した．また月令4ヶ月においても両者の差は同様であり，月令1ヶ月の時点よりもむしろ一層顕著にその違いが認められた．月令2ヶ月におけるCon A凝集

*都立府中病院神経内科
**東京大学薬学部生体異物
***杏林大学医学部解剖

表 I　Titration of agglutinability with Con A

Scores of −, ±, +, ++ and +++ were assigned according to the degree of agglutination. Titers were expressed as the lowest concentration of Con A (2^{2-n} mg/mℓ) to give one plus agglutination.

n			n
14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1	1 Month		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
- - - - ± + + ++ ++ ++ ++ ++ ++ +++	N555	D591	+++ +++ ++ ++ ++ ++ + ± - - - - - -
- - - - ± + + ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++	N550	D590	++ ++ ++ ++ + - - - - - - - - -
- - - - - - - + + + ++ ++ ++ ++	N553	D595	++ ++ ++ + + - - - - - - - - -
- - - - - - - - + ++ ++ ++ +++ +++	N556	D589	++ ++ + + + - - - - - - - - -
- - - - - - - - + ++ ++ ++ ++ ++	N554	D593	+++ +++ ++ + ± - - - - - - - - -
- - - - - - - - + + ++ ++ +++ +++	N549	D596	+++ ++ + ± - - - - - - - - - -
- - - - - - - - + + ++ ++ ++ ++	N551	D592	++ + - - - - - - - - - - - -
- - - - - - - - ± + + ++ ++ +	N552		
- - - - - - - - - + ++ ++ +++ +++	N558		
- - - - - - - - - - + + + ++	N557		

n			n
14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1	4 Month		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
- - - - - - - + ++ ++ ++ +++ +++ +++	N554	D590	++ ++ ++ ++ + ± - - - - - - - -
- - - - - - - + ++ ++ ++ ++ +++ ++	N553	D593	++ ++ ++ + ± - - - - - - - - -
- - - - - - - ± + ++ ++ ++ +++ ++	N552	D589	++ ++ + ± - - - - - - - - - -
- - - - - - - ± + ++ ++ ++ +++ ++	N550	D596	++ ++ + ± - - - - - - - - - -
- - - - - - - - + ++ ++ ++ ++ ++	N556	D595	++ ++ + - - - - - - - - - - -
- - - - - - - - + + ++ ++ +++ ++	N551	D592	++ + ± - - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - + ++ ++ ++ ++	N549		
- - - - - - - - - - + ++ ++ ++	N558		
- - - - - - - - - - - + + ++	N557		

反応は上記の2回の測定条件とは多少異なり赤血球濃度を0.5vol%として行ったため，1，4ヶ月の値と厳密な比較はできなかったが，Dy 鶏と対照との差は同様に顕著であった．

図 I は個々のトリにおいて血球凝集活性がどのように変化するかを検討するために，1ヶ月と4ヶ月における凝集活性を個別に表示したものである．多少の例外はあるにせよ，はじめに低値を示したものはのちにも低値を，高値を示したものはのちにも高値をとる傾向があり，測定値の恒常性が確認された．また，全体としては，加令にともない凝集活性の低下する傾向を示した．

(ii) ^{125}I 標識 Con A による結合実験：

結合した ^{125}I の値は Kawaguchi ら[5] の方法に従って図2のようにプロットした．ここで，[cell]：赤血球濃度，[Con A]：Con A のモル濃度，n：細胞1個あたりに結合した Con A 分子の数，Ka：結

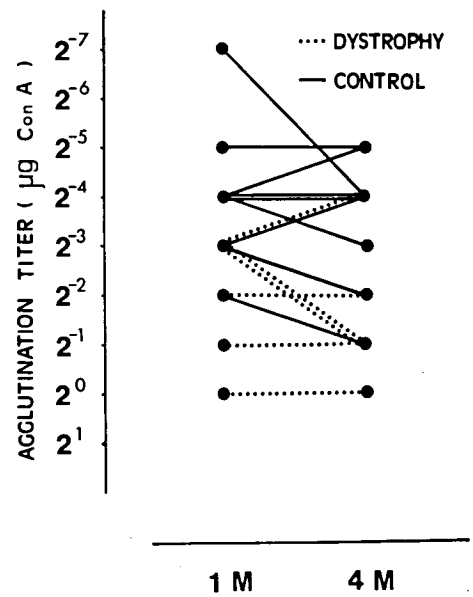


図 I　Relationship between Con A agglutination titer and maturation of chicken.

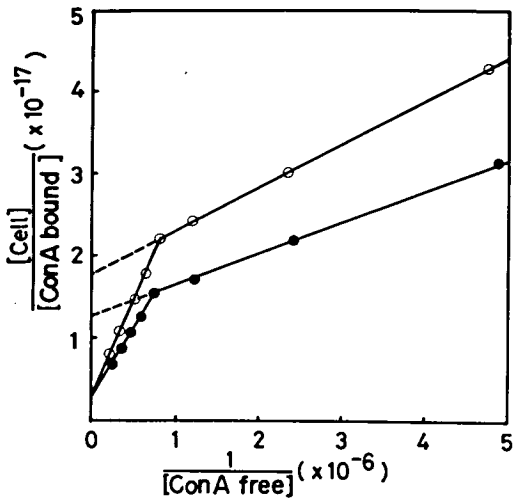


図 2　Binding of ^{125}I-labeled Con A to normal and dystrophic chicken erythrocytes
The binding reactions were performed as described in the text. The data were plotted according to the method of Steck and Wallach with slight modification by Kawaguchi et al. ●, normal chicken erythrocytes; ○, dystrophic chicken erythrocytes. Both normal and dystrophic chickens were about 2 years old.

合定数の間には次のような式が成立する．

$$\frac{[\text{cell}]}{[\text{Con A bound}]}=\frac{1}{\text{Ka}\cdot\text{n}}\cdot\frac{1}{[\text{Con A free}]}+\frac{1}{\text{n}}$$

プロットした点から求められる直線は２相性のパターンをとり，赤血球膜表面には major, minor 二種類の結合部位があることを示している．緩徐な傾斜の直線を外挿して得られる縦軸との交点が，細胞１個あたりの major binding site 数を逆数で表示しており，横軸との交点からその結合定数 (Ka) が算出できる．このようにして得られた細胞１個あたりの major binding site 数(n) と結合定数 (Ka) は表２に示してある．Ka に関しては Dy 鶏と対照との間に差を認めないが，n に関しては Dy 鶏で有意に減少していた．年令２才以上の鶏に関しても，両群の差は同様であったが，Dy 鶏，対照鶏のいずれも年令とともに結合部位数は減少する傾向を示しており，このことは先に述べた凝集試験の結果とも一致する．

表２　Binding of ^{125}I-labeled Con A to normal and dystrophic chicken erythrocytes.

	4 months		2 years	
	Ka	n	Ka	n
Normal	3.5×10^6	5.4×10^6	3.4×10^6	4.8×10^6
Dystrophy	3.5×10^6	4.2×10^6	3.4×10^6	3.5×10^6

Ka, apparent association constant (M^{-1}) for major binding sites.

n, number of major binding sites. Average value of triplicate experiments.

(iii) 二次元展開標本におけるFer-Con Aの結合：

月令４ヶ月における鶏赤血球膜の Fer-Con A結合の透過型電顕写真を図３に示す．中央の弱拡大写真が展開した血球の全体像であり，核の周囲に展開・伸展された細胞膜がひろがっている．左右はその強拡大であり，(A)が正常対照鶏，(B)がDy鶏の所見を示す．後者においては，前者に比し，ferritin 粒子の分布密度が少ないことが一見して明らかである．分布のパターンに関しては，分布密度の低い後者において，不規則性が目立つが，実際に写真上でクラスターの数を数えてみると必ずしもどちらかに優劣をつけることが困難な印象をうける．そこで客観的な判断を得る為に次のような定量化をこころみた．Dy 鶏，対照鶏からそれぞれ３羽ずつを選び，その二次元展開電顕写真からランダムに三視野を選び 100nm×100nm の unit square でこれを区画したのち，300個の unit square 中に含まれる ferritin 粒子を数えヒストグラムを作製した（図４）．unit square あたりの ferritin 粒子数の mean ±S.D. は，Dy 鶏で4.6±3.7, 5.4±4.0, 6.0±3.9であり，対照では8.9±5.0,

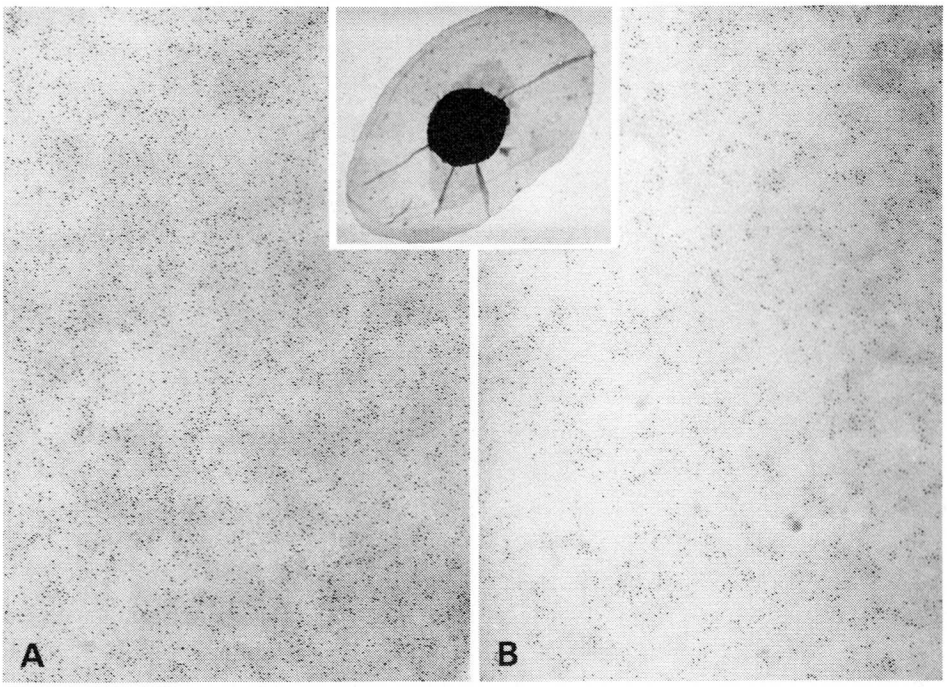


図 3 Electron microscopic photographs of chicken erythrocyte membrane labeled with ferritin-Con A
(A) normal chicken, (B) dystrophic chicken. (×37,000)

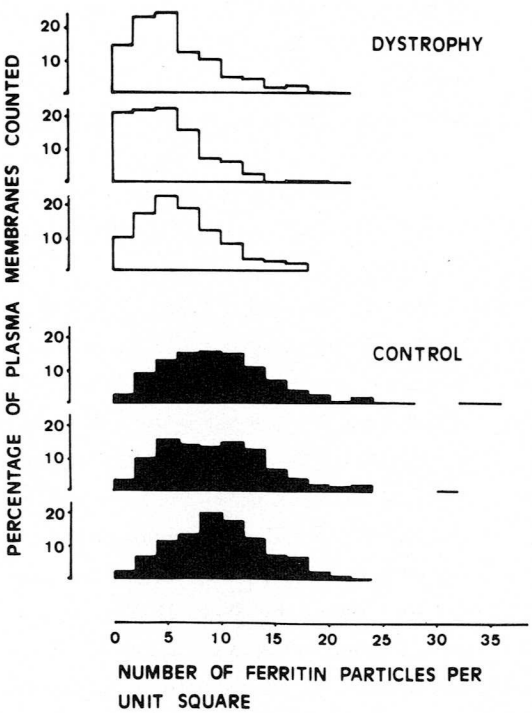


図 4 Distribution frequency of ferritin particle density per unit square in dystrophic versus normal erythrocyte plasma membrane.

9.3±4.3, 9.3±5.3であった．両者の間には $p<0.001$ で有意の差を認めた．一方分布のパターンに関しては，クラスター形成の程度を示す index として Irimura ら[6]によって提唱された $\sigma(k)/\sigma_{random}(k)$ を用いて検討を行ってみた．ここで，$\sigma_{random}(k)$ とは乱数表により作成したランダムな分布パターンから算出した値で，1辺250 kÅの unit square 中に含まれる粒子数の S.D. を意味し，粒子の総数を TN とすると

$$\sigma_{random}(k)=0.029\sqrt{TN/k}$$

なる関係が理論的に成立する．また $\sigma(k)$ は実際の試料電顕写真を1辺250 kÅ の unit square で区切った時に，unit square 中に含まれる粒子数の S.D. である．これを今回のデータにあてはめると $\sigma(k)/\sigma_{random}(k)$ は Dy 鶏で13.3, 13.1, 12.1, 対照では12.8, 10.6, 13.3であり両者ほぼ同じ値を示している．

考　　察

昨年度の報告において我々は，Dy 鶏の赤血球が対照に比し Con A 凝集活性の低下を示し，これが膜面の Con A 結合部位の減少にもとづく可能性を指摘した[3]．ある種のレクチンによる赤血球の凝集性は鶏の雌雄，産卵等の条件により変化することが知られているので[7]，今回の実験は鶏の月令，性を厳密に match させて行ったが，Dy 鶏と正常鶏との間には矢張明らかな差が見られた．また，今回新たに行った ^{125}I 標識 Con A による結合実験でも，Dy 鶏で Con A 結合部位の減少が確認された．Schafiq ら[8]は Dy 鶏を用い，また Wakayama ら[9]はヒト Duchenne 型筋ジストロフィー症を対象として，freeze fracture の観察から，赤血球膜内粒子の密度と分布様式が，ジストロフィーでは正常と異なることを報告している．Ito ら[10]は鶏赤血球膜から Con A レセプターを単離し，これが分子量 100K, 45K, 33K の糖蛋白質であることを示し，更に膜の表面ラベル法を組合わせて解析した結果，これらがいずれも膜貫通蛋白であることを報告している．従って Dy 鶏赤血球における Con A 結合部位の減少を示す今回の実験の結論は，Schafiq ら[8]が観察した膜内粒子の減少と対応する所見と考えられる．freeze fracture による観察では，このほかに，膜内粒子の分布が不均一であることもジストロフィー赤血球の特徴として指摘されている[9)10]．しかしながら Fer-Con A による電顕的観察では，Irimura ら[6]の方法に従って検討した結果，両者間に分布パターンの差は見出し得なかった．これはおそらく Con A の結合によって膜流動性の増加がおこり，これによって膜内粒子の移動，クラスター形成が促され，両者間に本来あった膜内粒子の分布差をマスクしてしまったためであろう．

結　　論

月令，性を match させた Dy 鶏と正常鶏の赤血球を用いて，(i) Con A 凝集活性，(ii) ^{125}I 標識 Con A の結合実験 (iii) 二次元展開標本における Fer-Con A 結合部位の電顕的観察，を行なった．Dy 鶏では Con A 結合部位の減少と，これに伴う Con A 凝集活性の低下が認められた．

文　　献

1) 福永秀敏，堀真一郎，佐橋功，宇尾野公義：Duchenne 型筋ジストロフィー症における血小板セロトニンの生化学的，組織化学的研究——保因者判定への新しい試み．臨床神経学，17：316-321，1977.

2) 宇尾野公義，別府宏圀，八木晧一，山田克浩：ジストロフィーチキンにおける栓球セロトニンの異常．厚生省心身障害研究「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」沖中班，昭和52年度研究報告書，143-146，1978.

3) 宇尾野公義，別府宏圀，八木晧一，平野寛，西山文朗，中島元夫：筋ジストロフィーチキンの赤血球，栓球の細胞化学的研究．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究（三好班）昭和53年度研究報告書，34-39，1979.

4) Hunter, W. M.: Radioimmunoassay. In "Handbook of experimental immunology," 3rd ed. (edited by Weir, D. M.), Blackwell, London, 1978, Vol. 1, 14. 3.

5) Kawaguchi, T., Matsumoto, I. & Osawa,

T.: Studies on competitive binding of lectins to human erythrocytes. Biochemistry, 13 : 3169-3173, 1974.

6) Irimura, T., Nakajima, M., Hirano, H. & Osawa, T.: Distribution of ferritin-conjugated lectins on sialidase-treated membranes of human erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta, 413 : 192-201, 1975.

7) 水谷誠, 梅沢英彦, 倉益茂美：ダイズ PHA により見出されたニホンウズラ赤血球凝集原に関する研究. 日本畜産学会報48 : 227, 1977.

8) Schafiq, S. A., Leung, B. & Schutta, H.S. : Reduced density of intramembrane particles in erythrocytes of dystrophic chickens. J. Neurol. Sci., 30 : 299—302,1976.

9) Wakayama, Y., Hodson, A., Pleasure, D., Bonilla, E. & Schotland, D. L.: Alteration in erythrocyte membrane structure in Duchenne muscular dystrophy. Ann. Neurol., 4 : 253-256, 1978.

10) Ito, Y., Yoshimoto, R., Irimura, T. Setaka, M., Shimizu, H. & Osawa, T.: Concanavalin A-induced increase of membrane fluidity of chicken erythrocytes. J. Biochem. (Tokyo) 86 : 1807—1815, 1979.

42) 筋ジストロフィー症における筋膜脂質に関する研究—続報—

—筋ジストロフィーチキンの筋ガングリオシドについて—

宮武　正[***]

研究協力者　渥美哲至[*]　有賀敏夫[**]　中村京子[**]

筋ジストロフィー症における筋線維崩壊の原因として膜異常の存在を示唆する数多くの研究がなされている.[1] ガングリオシドは膜の脂質二重層の外表面に存在する糖脂質であり，免疫学的抗原，コレラ，テタヌストキシンなどの受容体として機能し，又最近副腎髄質のクロマフィン顆粒の膜にガングリオシドが高濃度に存在することが明らかにされその生理作用との関連が問題となっている.

著者らは，筋ジストロフィー症における膜異常研究[2)3)] の一つとして昨年度[4)] に引きつづき，今回は未だ明らかにされていないチキン筋ガングリオシドの構造解析を行うとともに，筋ジストロフィーチキン筋と対照の差について再検討を行った.

方　法

1．チキン筋組織ガングリオシドの構造解析： チキン前胸筋を用い，クロロホルムメタノール(1：1，容比）および（1：2，容比）により総脂質を抽出し，DEAE Sephadex を行ない neutral lipid と acidic lipid に分け，acidic lipid 分画をアルカリ水解によりガングリオシドを得た．さらに DEAE Sephadex を行なって精製ガングリオシドを得たのち，薄層クロマトグラフィーで個々のガングリオシドに分離し，ガスクロマトグラフィーにより，おのおのの糖組成を同定した.

2．筋ジスチキン筋組織のガングリオシド分析： 材料は対照，筋ジスチキンおよび CNP インヒビター治療[5)] を行った筋ジスチキン，各々7，8，8羽の前胸筋を用いた．筋をホモゲナイズし Ando らの方法[6)] に従って粗ガングリオシドを得，薄層クロマトグラフィーを行ない，個々のガングリオシドを分離し，島津二波長クロマトスキャナーを用いて定量した.

結　果

1．チキン筋組織粗ガングリオシドの DEAE Sephadex による elution pattern は fraction Ⅰ，Ⅱおよび Ⅲに分けられ，Ⅰの薄層クロマトグラフィーを行なったところ3のスポットが検出された．この分画の preparative 薄層クロマトグラフィーを行った．3つの主分画 A，B および C のうち A と B はおのおの薄層クロマトグラフ上 GM_3 および GD_3 ガングリオシドの Rf と一致し，C は既知のガングリオシドとは一致していなかった（図1）．それらのガスクロマトグラフィーによる糖組成を表1に示す．Clostridium perfriugens の Neuraminidace 処理により A と B はいずれも Ceramid dihexoside となった（図2）．しかし C は2つの band よりなり，単一物質でない可能性がでてきたため更に検討を行っている．これらの結果より A は，GM_3 ガングリオシドであり，B は GD_3 ガングリオシドであることが明らかとなった．C は6糖よりなると考えられるが，その構造はさらに解析中である.

＊自治医科大学神経内科

＊＊都立臨床医学総合研究所中間代謝部門

2．筋ジスチキン筋組織ガングリオシド分析結果を表2に示した．筋ジスチキン筋組織ガングリオシドの蛋白あたり，および湿重量あたりの含量は，いずれも対照に比し明らかに増加し，CNPインヒビター治療筋ジスチキンでは，対照に比し増しているが，筋ジスチキンに比べると減少しており，いずれも有意な差を認めた．

筋ジスチキンのガングリオシド分画，GM_3，GD_3 および unknown X のいずれもが増しているが，最も増しているのは GM_3 ガングリオシドであった．CNP インヒビター治療群では，筋ジスチキンに比べ X ガングリオシドの減少が明らかであった．

表1　Sugar composition of isolated gangliosides

	Glc	Gal	NAc-Gal	NAc-NA
A	1.00	0.75		0.96
B	1.00	1.04		1.67
C	1.00	3.05	0.92	1.15

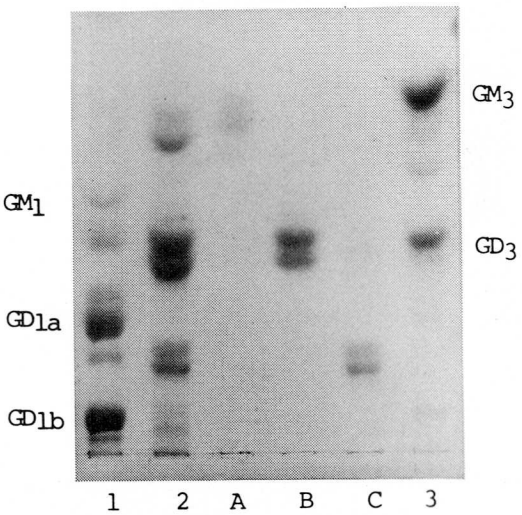


図1　Isolated gangliosides

表2　Gangliosides in chick muscles

	control	dystrophy	treated dystrophy
total sialic acid	n=12	n=7	n=9
μg/g protein	26.0 ± 3.4	75.0 ± 22.5*	50.0 ± 9.7*Δ
μg/g wet weight	6.1 ± 0.7	14.2 ± 3.9*	10.5 ± 1.7*ΔΔ
ganglioside fractions	n=7	n=7	n=3
GM_3 : μg/g protein	6.3 ± 2.6	24.9 ± 13.4*	20.3 ± 5.2*
	(25.2 ± 8.2%)	(31.7 ± 8.1%)	(35.9 ± 7.9%)
GD_3 : μg/g protein	9.5 ± 2.0	22.9 ± 6.0*	27.2 ± 6.7*
	(39.0 ± 6.1%)	(31.1 ± 3.6%)**	(37.2 ± 7.2%)
X : μg/g protein	8.6 ± 1.7	27.2 ± 6.7*	17.0 ± 3.3*ΔΔ
	(35.8 ± 9.8%)	(37.2 ± 7.2%)	(31.5 ± 1.7%)

* : t<0.01,　** : t<0.05　for each sample to control.

Δ : t<0.01,　ΔΔ : t<0.05　for each sample to dystrophy.

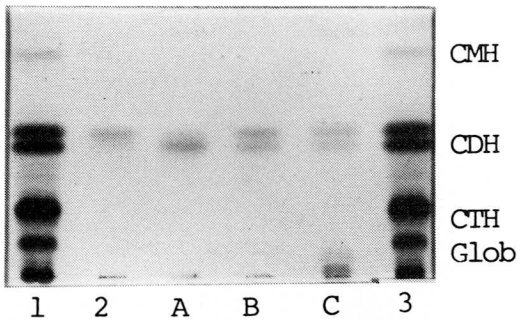


図2　Isolated gangliosides の Neuraminidase 処理

考　　案

チキン筋ガングリオシド含量は，ヒト（Svennerholmら，1972）[7]，ラット，ウサギ，ブタ（Puroら，1960）[8]，ウサギ（Lassagaら，1972）[9]，ネコ，ウサギ，ラット（Maxら，1970）[10] の筋ガングリオシド含量とほぼ一致する．

チキン筋ガングリオシド分画は GM_3，GD_3，X ガングリオシドの3主分画よりなっていた．ヒト筋では GM_3，GM_2，GD_1，GM，ガングリオシドが主であり（Svennerholmら，1972）[7]，ウサギ筋では GM_3，その他2種の構造未決定のガングリオシドからなる（Lassagaら，1972）[9]．また，ネコ，ウサギ，ラットでは hematoside が主分画である（Maxら，1970）[10] と報告されており，現在までの報告では，いずれの種についても GM_3 ガングリオシドが主分画の一つであることは共通するが，その他は，種によってガングリオシドを異にするという興味深い結果がでている．

病的状態の筋組織ガングリオシドについては，ウサギ脱神経筋において GM_3 を主とするガングリオシドの増加（Maxら，1970）[10] および筋ジストロフィーラット筋では逆にガングリオシドの減少が報告され（Maxら，1971）[11]，一方ビタミンE欠乏によるウサギの実験的ジストロフィー症の筋ではガングリオシドが2倍に増加している（Albarracinら，1974）[12] と報告されている．今回のジストロフィーチキン筋では，ガングリオシドが明らかに増加し，特に GM_3 ガングリオシドが増加していた．またプロテアーゼインヒビター治療を行った筋ジストロフィーチキンでは，ガングリオシドが対照に比し増していたが，未治療のジストロフィーチキンに比べると減少し，特にXガングリオシドの減少が認められた．これらガングリオシドの変化は，ジストロフィー筋の膜成分の変化を示すと考えられるが，筋組織における筋線維以外の組織成分の変化の影響を検討する必要がある．

文　　献

1）Rowland, L. P.: Pathogenesis of muscular dystrophies. Arch. Neurol. **33**：315-321, 1976.

2）渥美哲至，宮武正，大林民典ほか：Duchenne 型ジストロフィー症の赤血球の形態および生化学的研究．筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究，冲中班，昭和51年度研究報告書，173頁，1977.

3）吉田充男，渥美哲至，宮武正ほか：筋ジスチキン赤血球膜に関する研究．筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究，冲中班，昭和52年度研究報告書，141頁，1978.

4）宮武正，渥美哲至，前沢政次ほか：筋ジストロフィー症における筋膜脂質に関する研究．筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究（三好班），昭和53年度研究報告書，186頁，1979.

5）杉田秀夫，石浦章一：筋ジストロフィーチキンに対する protease inhibitor（E－64）の効果．筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究（三好班），昭和53年度報告書，45頁，1979.

6）Ando, S., Chang, N. C. and Yu, R.: High performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species. Anal Biochem. **89**：437-450, 1978.

7）Svennerholm, L., Brace, A., Mansson, J., et al.: Sphingolipids of human skeletal muscle. Biochem. Biophys. Acta. **280**：626-636, 1972.

8）Puro, K., Maury, P. and Huttunen, J. K.: Qualitative and quantitative patterns of

gangliosides in extraneural tissues. Biochem. Biophys. Acta. 187 : 230-235, 1969.

9) Lassaga, F. E., I. Albarracin de Lassaga and Caputto, R.: Rabbit muscle gangliosides. J. Lipid Res. 13 : 810-815, 1972.

10) Max, S. R., Nelson, P.G. and Brady, R. O: The effect of denervation on the composition of muscle gangliosides. J. Neurochem. 17 : 1517-1520, 1970.

11) Max, S. R. and Brady, R. O: Alteration of the ganglioside composition of skeletal muscle in murine muscular dystrophy. Nature 233 : 55-56, 1971.

12) Albarracin, I., Lassaga, F. E. and Caputto, R.: Changes of gangliosides and other lipids in skeletal muscle from rabbits with experimental dystrophy. J. Lipid Res. 15 : 89—93, 1974.

43）Duchenne 型筋ジストロフィー症(DMD)における クレアチン代謝異常

I. creatinase および sarcosine dehydrogenase の人骨格筋における存在—— creatine-urea経路の提唱

II. Duchenne 型筋ジストロフィー症骨格筋中の creatinase 異常

三 好 和 夫*

研究協力者　平 良 章*　吉 田 健 三*　宇 賀 茂 敏*
田 村 克 也*　吉 川 学*　金 沢 孝 治*
今 井 幸 三*　日 下 香 苗*　伊 勢 浩*
川 井 尚 臣*　八木田 正 聖*

I. creatinase および sarcosine dehydrogenase の人骨格筋における存在—— creatine-urea 経路の提唱

creatinase（creatine amidinohydrolase, EC 3, 5, 3, 3）は，creatine ⟶ sarcosine＋urea の反応を触媒する酵素であるが，Pseudomonas のみでその存在が報告されている[2),3),4)]．私達は，人骨格筋の creatine 代謝研究の過程で人骨格筋に creatinase 活性が存在することを見出した[1)]．私達は，また，sarcosine ⟶ glycine＋formaldehyde の反応を触媒する sarcosine dehydrogenase（sarcosine : oxygen oxydoreductase, EC 1, 5, 3, 1）の活性が人骨格筋中に存在することをも明らかにした．

本論文では，人骨格筋中にこの2つの酵素活性が認められるとの成績を示し，creatine-urea 経路の存在することをのべる．creatine 消費による creatinase活性の成績は今回新しく加えたものである．

＊徳島大学医学部第一内科

対象と方法

資料は、22—69才（男性及び女性）の6例の非ミオパチー患者から剖検により得た骨格筋（−60°C で凍結保存）である．骨格筋資料は5倍量の生理的食塩水を加えて，Potter-Elvehjem 型 homogenizer で homogenize した．筋 homogenate は，18,000gで30分間遠心分離し，上清を酵素液として用いた．また，この上清を Sephadex G-150 column（2.8×40cm）に apply し，0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.2）で，各8mlのフラクションに分離溶出した．このうち活性の認められたフラクションを集め，酵素液として実験に供した．資料の蛋白量は biuret 法で測定した．

creatinase 活性は，尿素の産生，および creatine の消費によって測定した．尿素の産生でみる方法は，酵素反応を0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.8）中で，30°C，1時間行い，尿素の産生量を diacetylmonoxime—thiosemicarbazide 法で測定した．creatine の消費でみる方法は，酵素反応を0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.2）中で，

37°C, 30分間行い，残った creatine 量を diacetyl α-naphthol 法で測定した．

sarcosine dehydrogenase 活性は，0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）中で，phenazine methosulfate と2,6—dichlorophenolindophenol（DCIP）を用いる Hoskins and Mackenzie[5] の方法で測定した．

結　　果

人骨格筋中の creatinase 活性の存在を，筋抽出液を用いて，creatine からの尿素の生成で確かめた[1]．creatinase 活性はまた，creatine 消費量の測定によっても確かめられた（図1）．

Sephadex G—150のゲル濾過法では，creatinase 活性のピークは溶出液の144mlであり，分子量は約5万と推定された．

反応系中の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液のpHを4.3から9.0まで変化させてえた成績から筋 creatinase の至適 pH は6.2であった．

creatine 濃度を増加させることによって見る creatinase 活性は，hyperbolic curve（図2）を示した．そして基質 creatine に対するKm値は8.0×10^{-5}Mと計算された．

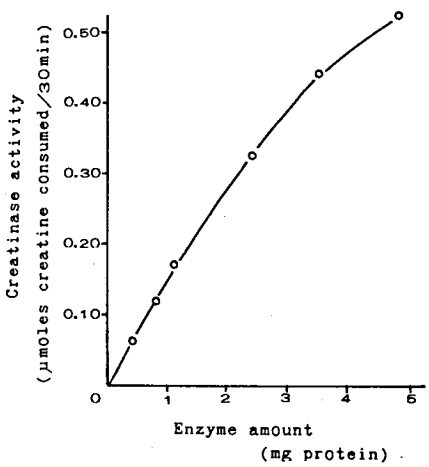


図1　人骨格筋 homogenate 18,000 g 遠沈上清の Sephadex G—150 ゲル濾過物の creatinase 活性
反応液 1.2 ml 中の creatine 濃度 17 mM.

人骨格筋中の sarcosine dehydrogenase 活性の存在は，筋 homogenate 上清を用い，時間に依存した DCIP の吸光度の減少により示された(図3)．

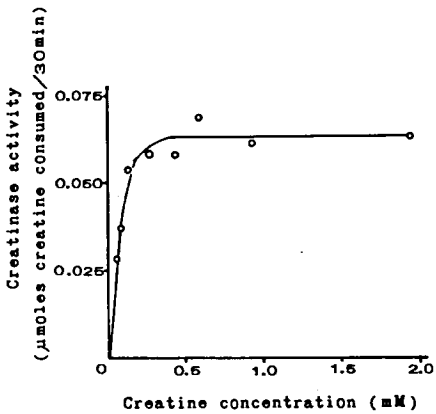


図2　筋 creatinase に対する基質 creatine の飽和曲線
骨格筋 homogenate 18,000 g 遠沈上清の Sephadex G—150 ゲル濾過物（蛋白量0.8 mg），反応液 1.2 ml.

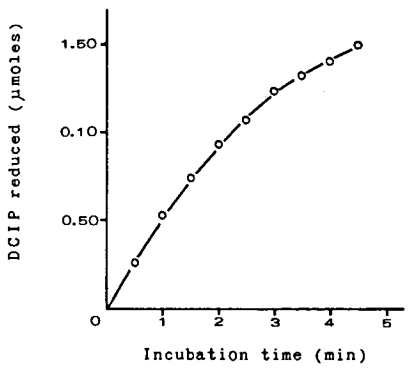


図3　人骨格筋 homogenate の 18,000 g 遠沈上清の sarcosine dehydrogenase 活性
反応液 3 ml 中 sarcosine 10 mM，筋 homogenate の 18,000 g 遠沈上清（蛋白量 16 mg）

考　　察

creatinase は2，3の Pseudomonas で知られているが[2),3),4)]，哺乳動物におけるその存在は，まだ報告されていない．すなわち，creatine と pho-

sphocreatine の筋肉内での代謝の唯一の産生物は，creatinine とされていた．私たちは，人骨格筋中に creatinase が存在することから，人での尿素合成の新しい経路，すなわち，creatine-urea 経路を提唱する．因みに，人骨格筋中での尿素の濃度は，0.4～1.1mg/g wet wt. であるのに対し，肝中尿素は，0.8～0.9mg/g wet wt.（著者ら測定）であった．全体の尿素生成に対する骨格筋と肝との比率は，これからの研究課題である．

creatinase のもう一つの産生物である sarcosine は，私達が人骨格筋で見出した sarcosine dehydrogenase により glycine と formaldehyde に変化するであろう．sarcosine dehydrogenase は哺乳動物の肝ミトコンドリアで見つかっているが，本研究は，骨格筋中におけるその最初の発見である．

Duchenne 型筋ジストロフィー症骨格筋の creatinase の性格異常については，別にのべる[6]．

文　　献

1）三好和夫，平良　章，吉田健三ほか：筋ジストロフィー症におけるクレアチン代謝．厚生省筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究(三好班）昭和53年度研究報告書，1979．p175

2）Akamatsu, S. and Kanai, Y.: Bacterial decomposition of creatine. I. Creatinomutase. Enzymologia, 15：122, 1951.

3）Appleyard, G. and Woods, D. D.: The pathway of creatine catabolism by Pseudomonas ovalis. J. Gen. Microbiol., 14：351, 1956.

4）Yoshimoto, T., Oka, I. and Tsuru., D.: Purification, crystalization and some properties of creatine amidinohydrolase from Pseudomonas putida. J. Biochem., 79：1381, 1976.

5）Hoskins, D. D. and Mackenzie, C. G.: Solubilization and electron transfer flavoprotein requirement of mitochondrial sarcosine dehydrogenase and dimethylglycine dehydrogenase. J. Biol. Chem., 236：177, 1961.

6）三好和夫，平良　章，吉田健三ほか：Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) におけるクレアチン代謝異常 II．Duchenne 型筋ジストロフィー症骨格筋中の creatinase 異常．本報告II．

II．Duchenne 型筋ジストロフィー症骨格筋中の creatinase 異常

筋ジストロフィー症では，尿中 creatinine の減少，高クレアチン血症，クレアチン尿が特異的にみられる．また骨格筋中では一般に creatine 濃度及び phosphocreatine 濃度は減少している．この様な creatine 代謝異常の原因は生化学的にわかっていない．

先に文献[1),2)]において，我々は人骨格筋中に creatinase (creatine amidinohydrolase EC3，5，3，3）が存在する事を明らかにした．本文では，Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) 骨格筋中の creatinase 異常の成績を示す．

対象と方法

骨格筋は，臨床所見及び人類遺伝学的に診断された14才と18才の男性 Duchenne 型筋ジストロフィー症患者の剖検より得た．対照健常筋としては，文献２）と同じ資料を用いた．筋ホモジネートと Sephadex G-150 での fractinaon は文献２）と同様である．creatine 減少による creatinase 活性の測定も文献２）と同様である．

結　　果

DMD 骨格筋ホモジネートの18,000g 遠沈上清を Sephadex G-150濾過にて creatinase 活性を測定した[2)]．DMD 骨格筋 creatinase の分子量は，健常骨格筋とほぼ同じ50,000である．DMD 骨格筋 creatinase の至適 pH も健常筋のそれと同じ (pH6.2) であった．しかし基質 (creatine) 濃度変化による creatinase 活性を測定すると，健常筋と DMD 筋では著しく異なっている．

図１に示す様に，健常骨格筋では，通常の Michaelis-Menten kinetics であり，Km 値は8.0×10^{-5}M であった[2)]．一方 DMD 骨格筋では，クレアチン濃度に対して酵素活性は sigmoid curve を呈

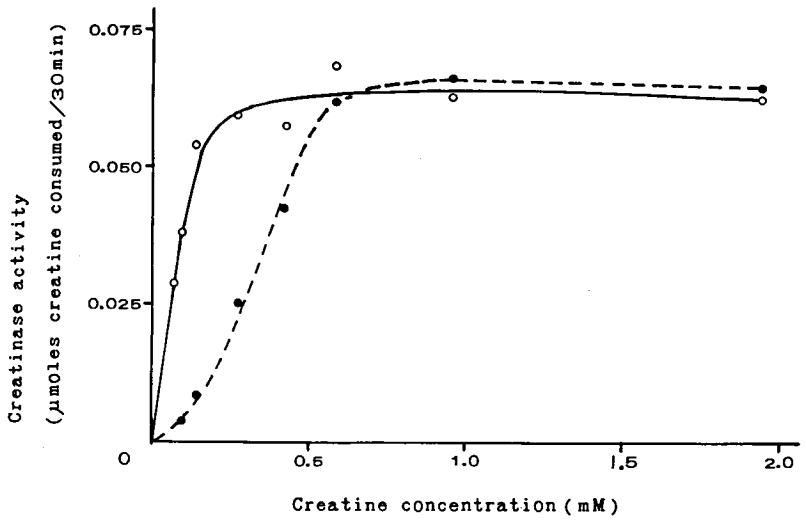


図1—A　筋 creatinase に対する基質 creatine の飽和曲線
健常人骨格筋のゲル濾過物（蛋白量 0.8 mg），DMD 筋（0.3 mg），反応液 1.2 ml.
——○——，健常人骨格筋；--●--，DMD 骨格筋.

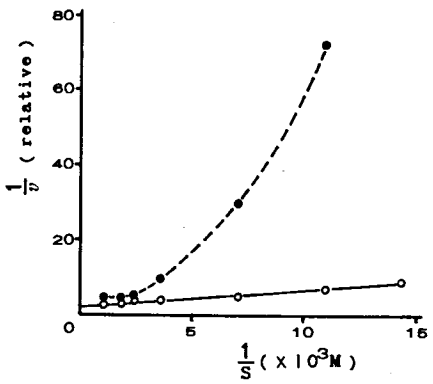


図1—B　図1—Aの Lineweaver-Burk プロット
——○——，健常人骨格筋；--●--，DMD 骨格筋.

し，V max の1/2を与えるクレアチン濃度は，3.6 $\times 10^{-4}$M である．なお同量の酵素資料（ゲル濾過の fraction で酵素活性を持つものをあつめた）における V max は DMD で健常骨格筋creatinaseの2.7倍であった．

考　　察

本研究において，私たちは，DMD 骨格筋 creatinase が健常骨格筋のそれと分子量及び至適 pH は同じであるが，kinetic behavior が著しく異なる事を示した．健常骨格筋 creatinase は基質に対しhyperbolic curve を示し，Km 値8.0$\times 10^{-5}$Mであるが，DMD 骨格筋のそれは sigmoid であり Vmax の1/2を与える creatine 濃度は3.6$\times 10^{-4}$ M である．今回使用した健常骨格筋中の creatine 濃度は約 3 mg/g であり，DMD 骨格筋では0.6 mg/g に減少していた（著者ら測定）．しかしながら DMD 骨格筋中のこの creatine 濃度は，なお今回見出された creatinase を saturate するに十分である．ただし，生体においては，DMD 骨格筋中可溶蛋白質の割合は筋萎縮のため著しく減少しているので本症creatinase活性を健常creatinase活性と安易に比較することはできない．

DMD における高クレアチン血症，クレアチン尿を含むクレアチン代謝異常は，いますぐには説明できないにしても，本文で述べた骨格筋中 creatinase の分子異常が DMD の primary な原因と密接に関係していることが十分に考えられる．

（DMD 骨格筋中の creatinase 活性については，昨年の本研究報告[1]でもふれたが，資料と方法の上から異常性までを明らかにすることができなかった.）

本報告（Ⅰ，Ⅱ）の要旨は別に英文[3,4]（Proc. Japan. Acad., 1980）で発表の予定である.

文　献

1）三好和夫，平良　章，吉田健三ほか：筋ジストロフィー症におけるクレアチン代謝．厚生省筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究（三好班）昭和53年度研究報告書，1979，p175

2）三好和夫，平良　章ほか：Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）におけるクレアチン代謝異常 Ⅰ．creatinase および sarcosine dehydrogenase の人骨格筋における存在——creatine-urea 経路の提唱．本報告Ⅰ．

3）Miyoshi, K., Taira, A., et al : Presence of creatinase and sarcosine dehydrogenase in human skeletal muscle. Proposal for creatine-urea pathway. Proc. Japan Acad. 56 B : 95, 1980.

4）Miyoshi, K., Taira, A., et al : Abnormalities of creatinase in skeletal muscle of patients with Duchenne muscular dystrophy. Proc. Japan Acad. 56 B : 99, 1980.

44）各種神経筋疾患罹患筋のCANP活性

杉田秀夫[*,**]

研究協力者　石浦章一[**]

はじめに

進行性筋ジストロフィー症，特にデュシャンヌ型（DMD）における筋構造蛋白の分解には特徴があり，例えばミオシンH鎖の分解，トロポニン亜分画のうちI，及びC分画の減少と相対的なT分画の残存などである．これらの変化は正常骨格筋に適当な蛋白分解酵素を加え一定時間反応させた後抽出した場合でも同様の変化を再現する事が可能である．従ってDMDにおける筋構造蛋白の分解には幾つかの蛋白分解酵素が段階的に関与すると考えられる．最近DMDの成因として膜系の異常が特に強調され，従ってこの事と合せ考えると蛋白分解の初期過程には細胞外から細胞内へ異常に高濃度のCaが浸入し，このCaイオンによって活性化されるCa依存性中性プロテアーゼ（CANP）が重要な役割を果している事が想定される．この意味で各種神経筋疾患における罹患筋のCANP活性を測定する事は意義のある事と思われる．しかし微量の生検材料を用いCANP活性を測定する方法はまだ確立されていない．本研究の目的はCANP測定法の確立を目ざし且つ各種神経筋疾患について活性を測定する事にある．

結果及び考案

1．各種測定法の検討

文献的には1976年 Kar. Pearson[1] は筋ホモジェネートを酵素源とし，基質としてイエローカゼインを用い37°C，18時間反応させる方法を用いDMD筋に於てコントロール筋の約4倍に増加している事を報告している．この方法はCaイオンによって活性化される酵素活性を測定しており必ずしもCANP活性自身を測定しておらず特異性に乏しく，且つ反応時間が長すぎる欠点がある．

我々は[2] 1978年筋ホモジェネートの上清のpHを一旦4.9に低下させる所謂isoelectric precipitationによりCANPを沈澱させpH7.5にもどしこの溶液を粗CANPとした．基質としてアルカリ変性カゼインを用い30℃30分間反応させ上清を280における吸光度の差で測定する方法を考案しこの方法を用いDMD及びBecker型DMPに於て高値を示す事を報告した．この方法は反応時間が短い利点はあるが材料が量的に少ないと一旦沈澱した後充分に加溶化されない欠点があり従って再現性に乏しく必ずしも満足すべき方法ではない．

1979年 Dayton ら[3] は筋ホモジェネートの上清を硫安分画し0～40%飽和で沈澱する分画を用い，アルカリ変性カゼインを基質とし，ビタミンE欠乏家兎筋肉に於て3.6倍に増加する事を報告している．又同年 Neerunjun, Dubowitz[4] は1,000×gの上清そのものを用い基質として筋原線維を用い25℃，24時間反応させる方法を報告しているがこの方法は反応時間が長すぎるし又基質である筋原線維が常に一定のものを得る事が困難である．

以上今迄に記載された方法は何れも欠点があり理想的方法に程遠いと思われる．

そこで我々はDaytonらの硫安分画法を検討した．

2．硫安分画法の検討

正常ヒト骨格筋ホモジェネートの上清を用い硫安を用い幾つかの分画に分け，各分画についてCANP活性を測定してみると図1に示される様にCANP活性の最も高い分画は40～50%飽和であり

＊東京大学医学部脳研神経内科

＊＊国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

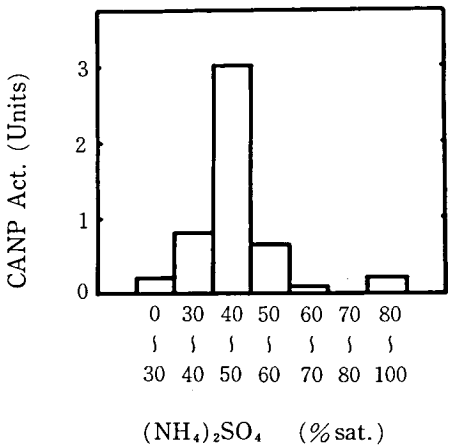


図1　硫安分画による各分画の CANP 活性比較

表1　各種抽出法による CANP 活性の recovery 比較
Recovery of Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) from human skeletal muscle

Treatment	Total CANP Activity (Units)	Recovery (%)
Isoelectric precipitation	2.42	(100)
Ammonium Sulfate (Total)	5.02	208
(40-50%)	3.02	125
DEAE-cellulose	0.68	28

Dayton らの家兎の場合と異なっている．ヒトの場合40～50%分画に全活性の約60%が回収される事がわかった．

そこで我々がすでに行った isoelectric precipitation による活性を100とし40～50%硫安分画による活性の recovery をみると125であり DEAE セルローズカラムを用いた場合28である事がわかった（表1）．即ち硫安分画法は recovery もよく且つ操作も容易であり又再現性も高い事がわかった．

3．新しい CANP 測定法

我々は生検材料に5倍量の20mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 5mM EGTA (pH7.5)を加えてホモジェナイズし上清をとり硫安40～50%飽和で得られる分画を同じ溶液に溶解し1晩透析したものを粗 CANP 溶液とした．基質としてはサクシニール化カゼインを用いβメルカプトエタノール，6mM Caイオン存在下で30℃，30分間反応させ上清を280における吸光度の差で読む方法を考案した．この方法を用いた場合測定可能最低骨格筋量は0.25gであり上清蛋白(mg)を reference base とした場合正常範囲は0.015～0.025である．

4．新しい方法を用いた各種神経筋疾患の CANP 活性

未だ予備段階であるがこの方法を用いた罹患筋の CANP 活性は3例の DMD 罹患筋に於て1.5～4.0倍に増加し，ALS では2例のうち1例は正常値，他はわずかに増加した（図2）．

今後この方法を用い症例数を増して CANP 活性を測定すると共により安定な再現性の高い方法の検索と，良い基質の開発が今後の課題であると考える．

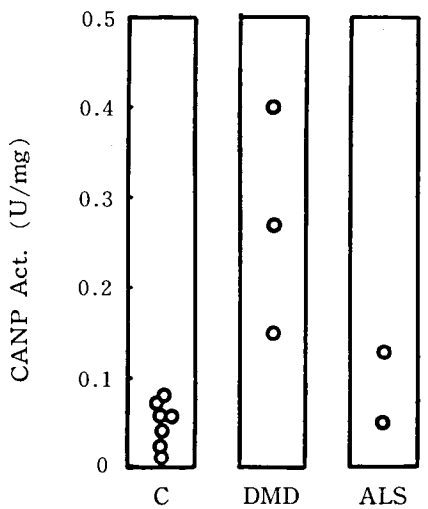


図2　神経筋疾患罹患筋の CANP 活性
DMD：デュシャンヌ型筋ジストロフィー症
ALS：筋萎縮性側索硬化症

文　献

1) Kar, N. C., and Pearson, C. M. : A calcium activated neutral protease in normal and dystrophic human muscle. Clin. Chim. Acta, 73 : 293—297, 1976.

2) Ebashi, S., and Sugita, H. : The role of calcium in physiological and pathological processes of skeletal muscle. In "Current topics in nerve and muscle research", (edited by Aguago, A. J., and Karfati, G.) Excerpta Medica, 1979, p.73.

3) Dayton, W. R., et al. : Elevated levels of a calcium-activated muscular protease in rapidly atrophying muscles from vitamin E-deficient rabbits. Biochem. Biophys. Acta, 584 : 216—230, 1979.

4) Neerunjun, J. S., and Dubowitz, V. : Increased calcium-activated neutral protease activity in muscles of dystrophic hamsters and mice. J. Neurol. Sci., 40:105, 1979.

45）トリプトファン代謝異常を認めた小脳失調症
——キヌレニンフォルムアミダーゼ欠損症と思われる1家系——

八木田　正　聖*

研究協力者　平　良　　章*　中　平　晴　仁*　吉　田　健　三*
吉　川　　学*　田　村　克　也*　詫　間　通　央*
井　口　敬　一*　西　内　　健*　日　下　香　苗*
川　井　尚　臣*　三　好　和　夫*

著者らは，さきに，ネマリンミオパチーにトリプトファン—キヌレニン経路の代謝異常のあることを見出し，発表した[1)2)]．その後，本症と類縁のミオパチーにも同経路にそれぞれ若干異なる代謝異常のあることを認めた[3)4)5)]．本文では，この一連の成績の一部として，同代謝経路上のキヌレニンフォルムアミダーゼ（Kynurenine formamidase）欠損あるいは活性低下症と思われる小脳失調症の一家系の成績をのべる．

対象と方法

対象症例は，幼少より知能低下と増悪寛解を示す小脳失調症の兄弟例とその一見健常な両親であり，これらについてトリプトファン代謝をしらべた．

トリプトファン代謝の検索法は，L-トリプトファン100mg/kg（ただし体重50 kg 以上は 5 g）を経口負荷し，その前と後の各24時間尿中の Kynurenic acid（KA），Xanthurenic acid（XA）を Satoh, Price 法で測定した．同時に，Kynurenine など数種の中間代謝産物を併せて測定した．また，トリプトファン負荷前後のトリプトファンの血中濃度および尿中排出量を日立アミノ酸自動分析器で測定した．なお尿中トリプトファン排出量については，二次元薄層クロマトグラフィーおよびアミノ酸高圧電気泳動法によってもチェックした．

＊徳島大学医学部第一内科

成　　績

1．症例

症例1：Sin.，T.　22歳 M（弟例）

主訴：起立，歩行不能，四肢の筋力低下．

家族歴：兄が同病で，両親に近親婚がある．処女歩行14ヶ月，8歳で徒競争遅く，学業成績下位，15歳で転びやすいのに気付かれ，以後経過はゆるやかであったが，20歳で運動後四肢の脱力と起立不能が起り，一時改善したが21歳で再び起立不能となり，当科入院．体格中等（身長158cm，体重46 kg），皮膚発疹なし．知能低下（IQ 38）．眼振，企図振戦を認め，変換運動，膝趾試験拙劣．腱反射消失．四肢の末梢部の筋萎縮，筋力低下を認め，Romberg sign 陽性，振動覚，位置覚の低下を認めた．アミノ酸尿（－），末梢血液像，血清コレステロール，血中 IgA 量210mg/dl，CK 値12単位，また VB_6，VB_{12} 等いずれも正常値，髄液正常．頭部CT像で小脳萎縮は明らかでなく，筋電図（腓腹筋，前脛骨筋）に神経原性変化（Spike 数の減少）を認め，腓腹筋生検組織像ではいわゆる神経原性変化（small angulated fiber, target fiber）と筋原性変化（moth-eaten fiber）の混在所見を認めた．ネマリンロッドは認めなかった．入院経過中，小脳失調症状と四肢筋力は，特別の治療なしに著明に

改善し，6ヶ月の経過で走ることが可能になった．

症例2：Sin.，M. 25歳（兄例）

弟例と類似の症状，経過であるが，運動機能障害，小脳症状の程度が軽く，走るとつまずく程度で起立，歩行不能に至ったことはない．体格中等度（身長159cm，体重53 kg）IQ 39．眼振（＋），企図振戦（－）．変換運動および膝趾試験拙劣，膝蓋腱反射減弱．下腿筋萎縮を軽微に認めた．検査成績では，アミノ酸尿その他，弟例と同様所見であった．入院中も運動機能に明らかな変動は認めなかった．

父（Sin.，Y. 51歳M）は一見健常であり，運動機能障害および小脳症状はないが，低身長（148 cm）でIQ 66と軽度低値であった．

母（Sin.，E. 50歳F）も一見健常であるが，身長146cm，IQ 64であった．

この父と母は近親である（図1）．

2．トリプトファン代謝の成績

1） KA，XA尿中排出量（図2）

健常人では，負荷前1日排出量はKA，XAともに0.5μmoles/kg/day以下であった．負荷後はKA，XAとも排出が増加して，KA 2.0～5.0，XA 0.7～2.0であった．

これに対し，本症家系（Sin.家）の兄弟病者では，負荷前1日尿中排出量はKA，XAともに0.2～0.3μmoles/kg/day と正常下限の値であったが，負荷後1日尿中排出量は弟病者KA 0.1，XA 0.4，兄病者KA 0.3，XA 0.6μmoles/kg/day と2病者ともに負荷後の排出増加がほとんどみられなかった．

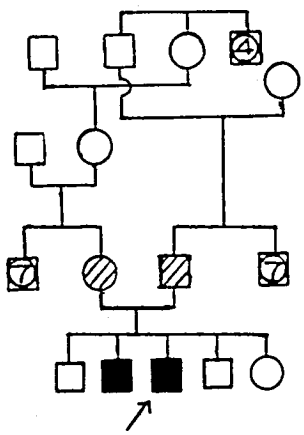
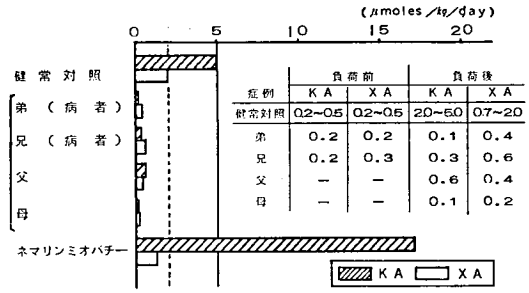


図1 Sin家 家系図
■病者 ▨⊘一見健常，トリプトファン代謝異常あり



症例	負荷前 KA	負荷前 XA	負荷後 KA	負荷後 XA
健常対照	0.2～0.5	0.2～0.5	2.0～5.0	0.7～2.0
弟	0.2	0.2	0.1	0.4
兄	0.2	0.3	0.3	0.6
父	－	－	0.6	0.4
母	－	－	0.1	0.2

図2 キヌレン酸（KA），キサンツレン酸（XA）尿中排出量
（L-トリプトファン100mg/kg経口負荷）

両親（近親）は，負荷後1日尿中排出量，父KA 0.6，XA 0.4，母KA 0.1，XA 0.2μmoles/kg/day でやはり異常低値であった．

なお，図2の棒グラフ最下段に示すネマリンミオパチーでは，負荷後，KAのみ著しい排出増加，XA正常範囲で，両排出量の間に大きな格差がある．

2） トリプトファンの吸収（図3）

健常人では，負荷前血中トリプトファン濃度は1.0～2.0 mg％であり，負荷後2時間8.1～11.8とピークを示し，4時間4.6～7.8，8時間1.5～4.1 mg％と下降した．

2病者および両親では，負荷前1.2～2.9，負荷後2時間7.8～9.2，4時間7.5～9.0，8時間1.2～5.6 mg％と負荷後のL-トリプトファン血中濃度の上昇は健常人レベルにあり，消退の遅延傾向がみられた．

3） トリプトファン尿中排出量（表1）

トリプトファンの1日尿中排出量は，健常対照，負荷前17.2～20.9，負荷後72.4～145.9 mg/day に対し，2病者および両親では，負荷前，後とも

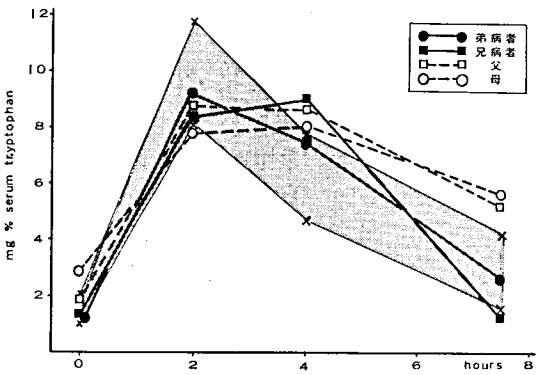


図3　トリプトファン血中濃度の変化
(L—トリプトファン100mg/kg経口負荷)

表1　トリプトファン尿中排出量

(L-トリプトファン 100mg/kg負荷)

症　例	負荷前	負荷後
弟(病者)(Sin.,T.22y)	11.0	59.8
兄(病者)(Sin.,M.25y)	17.7	35.5
父　(Sin.,Y.51y)	19.1	61.4
母　(Sin.,E.50y)	15.3	—
健常対照(3例)	17.2～20.9	72.4～145.9

(mg/day)

に排出の異常増加は認めなかった．アミノ酸の二次元薄層クロマトグラフィーおよび高圧電気泳動法でもトリプトファンの排出増加を認めなかった．

考　察

知能低下，増悪寛解を示す小脳失調症，および四肢末梢の筋萎縮を主徴とする兄弟病者とその一見健常な近親婚の両親に，トリプトファン——キヌレニン経路の代謝異常のあることを明らかにした．

トリプトファン代謝のキヌレニン経路を図4に示し，本症をこの経路の酵素欠損あるいは活性低下症とみなす立場から，推定される障害部位を本図に書きこんである．あわせて，比較のため，すでに報告したネマリンミオパチーの障害部位を記入してある．

本文でのべる兄弟病者とその両親に認めたトリプトファン代謝異常の特徴は，L-トリプトファン

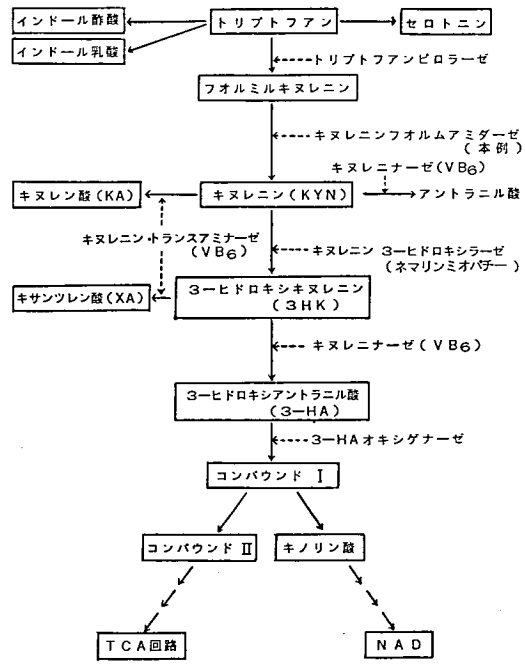


図4　トリプトファン代謝経路

の血中への吸収が正常レベルにあり，トリプトファン尿がなく，しかもKA，XAの尿中排出量が異常低値であることである．別に確かめた尿中インドール酢酸排出量は正常レベルであった．

すなわち，本症では，トリプトファンは，フォルミルキヌレニンまで代謝されるが，これからキヌレニンへの間が障害されていると考えられ，ここに働くキヌレニンフォルムアミダーゼ異常が推定される．

本症は，臨床症状で類似のHartnup病に対してはアミノ酸尿がなく，先天性トリプトファン尿症（多田ら）に対してはトリプトファン尿のないことが異なり，特徴ある新しいトリプトファン代謝異常症と思われる．遺伝型は常染色体劣性と思われる．

しかしながらこの酵素異常が本症の発症にいかに結びついているかは，現時点では不明である．しかし，以上の事実は，この種疾患や他の小脳失調症，また，著者らがさきに，同代謝経路に異常のあることを明らかにしたネマリンミオパチーな

どいくつかのミオパチー[3)4)5)]の本質的解明に意義あるものと思う．

結　　論

1．一見健常な近親婚の両親から生れ，知能低下，増悪と寛解のある小脳失調，および四肢末梢部の筋萎縮を認める兄弟例（25歳，22歳）を示し，この2病者と両親のトリプトファン ── キヌレニン経路の代謝についてしらべた．

2．トリプトファン代謝は，L-トリプトファン100 mg/kg を経口負荷し，その前と後の24時間尿中のKA，XA を測定，あわせてトリプトファンの血中濃度と尿中排出量を測定した．

3．その結果，兄弟2病者および両親はともに，負荷後のKA，XA 両者の尿中排出量の著しい異常低値を認めた．しかし，トリプトファンの血中への吸収，および尿中排出量はともに，正常レベルであった．また，別に確かめたインドール酢酸の尿中排出も正常レベルであった．

4．以上の成績より，本症は，常染色体劣性，トリプトファン ── キヌレニン経路のフォルミルキヌレニンからキヌレニンへの間，酵素異常症とみなす立場からキヌレニンフォルムアミダーゼ異常症と推定した．

文　　献

1）三好和夫，八木田正聖，詫間通央，中平晴仁，原田秀夫，上里隆信，日下香苗，川井尚臣：ネマリン・ミオパチーのトリプトファン代謝．文部省特定研究「難病」班，昭和52年度研究業績，p.241～245，1978.

2）三好和夫，八木田正聖，詫間通央，中平晴仁，原田秀夫，上里隆信，日下香苗，川井尚臣：ネマリン・ミオパチーに認めたトリプトファン代謝異常．臨床神経学，18：842，1978.

3）八木田正聖，平良章，中平晴仁，亀山和人，土肥康伸，詫間通央，日下香苗，川井尚臣，三好和夫：ネマリンミオパチーとその類縁疾患に認めたトリプトファン代謝異常．筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究（三好班）昭和53年度研究報告書，p.196～200，1979.

4）三好和夫，八木田正聖，平良章ほか：トリプトファン代謝異常からみるネマリンミオパチーと類縁ミオパチー．第76回日本内科学会講演会，昭和54年4月，東京．

5）三好和夫，平良章，八木田正聖ほか：トリプトファン代謝異常を認めた小脳失調症の1家系2症例．第24回日本人類遺伝学会，昭和54年11月4日，東京．

46）筋・赤血球 PFK 欠損症に関する最近の知見

垂　井　清一郎*

研究協力者　河　野　典　夫*　桑　島　正　道*　清　水　孝　郎*

はじめに

筋・赤血球ホスホフルクトキナーゼ欠損症（Muscle and erythrocyte phosphofructokinase deficiency ; M-E PFKD と略）は筋糖原病に属する疾患単位であり，糖原病Ⅶ型として位置づけられている．本研究報告では，(1)まず M-E PFKD の自験例に関する最近の知見を1967年以後世界の文献に現れた追加症例の記載と対比し，疾患単位としての特徴について考察を加える．(2)更に骨格筋の症状が M-E PFKD に酷似している糖原病 V 型（McArdle 病）との鑑別診断に関する最近の知見を述べる．(3)先天的な PFKD は比較的珍らしい病態と考えられるが，PFK のアロステリックな性格に基づき，後天的な PFK 活性異常は，後天的な骨格筋および赤血球解糖異常の大きな部分を占めているに違いない．そこで，M-E PFKD の病態が後天的な PFK 活性異常のモデルとなり得ることを示す私共の成績を述べる．

疾患単位としての M-E PFKD の特徴

M-E PFKD は1965年私共[1]が1家系3症例の報告をして以来，アメリカで2家系2症例，フランスで2家系3症例の追加があり，これら8例はまったく同じ疾患単位に属すると考えられる（表1　上段）．すなわち定型的な骨格筋の症状を示すほか，検索された限り，すべて赤血球にも異常が認められた．なお私共は免疫化学的分析によって赤血球 PFK がハイブリッド酵素であり，分子内に筋型 PFK（またはその成分）がハイブリッドとして含まれているという証拠を得た[2]が，PFK 蛋白に関する蛋白化学的研究の進歩はこの考えを裏付ける方向へ進んでいる[3]．図1のサブユニット構造のモデルの中(2)が私共の呈出しているモデルであり，(1)のモデルは私共の赤血球 PFK のカラムクロマトグラフィに関する成績[2]により否定され，(3)の可能性も骨格筋 PFK の今日までの分析結果から否定的である．図1，(2)のモデルにより，以上の世界の諸症例に関する所見はよく説明される．

これらの報告以外に，骨格筋 PFK 活性に顕著な異常がなく赤血球 PFK に明らかな活性低下を認める4症例が記載された（表1，下段）．これらの中，Waterbury[4]例および Kahn[5]例では，酵素異常の結果 PFK 蛋白の不安定化，崩壊亢進をき

表1　PFK deficiency

Reports	Skeletal muscle		Erythrocyte	
	Clinical symptoms	PFK activity(%)	Clinical symptoms	PFK activity(%)
Tarui(1965)				
case 1	+	1	+	30
case 2	+	2	+	48
case 3	+	3	+	42
Layzer(1967)	+	1	+	51
Serratrice (1969)	+	0	/	17
Tobin(1973)	+	6	/	/
Dupond(1977)				
case 1	+	5	+	31
case 2	+	/	+	56
Waterbury (1969)	−	/	+	62
Miwa(1972)	−	/	+	8
Kahn(1975)	−	100	+	61
Tanaka(1977)	±	/	+	reduced

* 大阪大学医学部第二内科

たし，酵素の新生補給の可能な骨格筋では生成増加によりある程度代償され，新生補給の不可能な赤血球においてのみ異常が発現していると看做しうる根拠が示されている．また最後の Tanaka[6] 例においても骨格筋の自覚症状には乏しいが血清 CPK およびアルドラーゼの著増が見出されており，これらはおそらく M-E PFKD の亜型と判断される．ハイブリッド酵素である赤血球 PFK において，1つのサブユニットは筋型であるが，もう1つのサブユニット（図1，(2)）は一応赤血球型と呼ばれている[3]．赤血球型の PFK のみの欠損を確認した症例は未だ見出されていない．

所が最近，先天性筋ジストロフィ症例で筋 PFK 活性の極端な低値を認めたという報告がなされた（Guibaud ら[7]，1978）．この場合は赤血球 PFK に異常がなく，PFK に関する現在までの知見から説明することは困難であり，私共も機会を得て，先天性筋ジストロフィ症の筋 PFK 活性につき検討したい．

糖原病 V 型，VII 型の鑑別診断

私共は，VII 型患者赤血球において PFK 活性が正常対照の30～48%に低下していることを見出したが（表1），VII 型における赤血球 PFK 活性の低下は，米国およびフランスの追加報告においても，赤血球に関する検索が行なわれた限り，表のごとくすべての症例に証明されている．

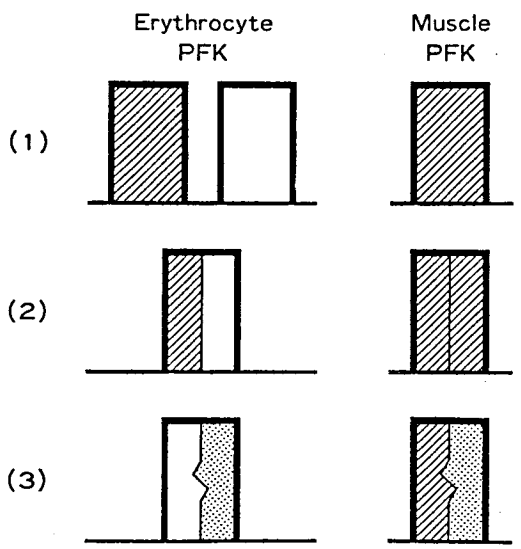
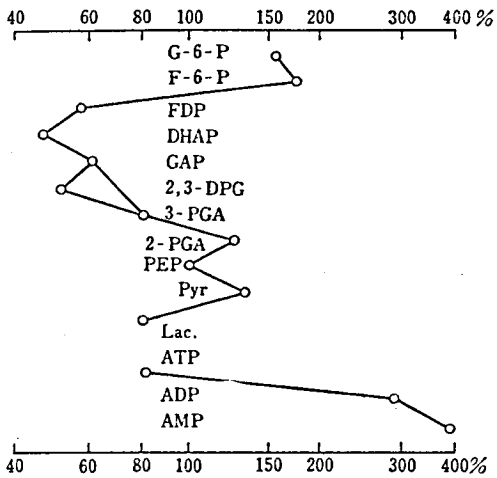


図1　骨格筋および赤血球PFK のサブユニット構造

しかし，この赤血球 PFK 活性の変動は，あくまで最適の条件で測定された標準活性値に基づいた判断であり，患者赤血球において解糖の流れが PFK の段階でブロックされていることの実証には，他の手段も必要である．赤血球における解糖系中間代謝物の測定および赤血球の乳酸形成能の観察はこれにあたる．自験例における赤血球中間代謝物の分析には，6%過クロール酸を入れたプラスチック注射器で駆血帯を用いることなく前肘静脈より等量の血液を採取する方式（Niessner & Beutler 法[8]）を種々検討して危険のないことを確認した末に若干 modification を加えて採用し，作製した検体について分光あるいは蛍光測定を行なった．正常対照を100として PFKD 患者赤血球における中間代謝物の変動をパーセントで表現したのが図2であり，グルコース -6- リン酸(G6P)，フルクトース－6－リン酸（F6P)は増加しているのに対してフルクトース-1，6-ジリン酸（FDP)は逆に著減し，さらに下位の2，3- ビスホスホグリセリン酸（2，3DPG）も50%に減少していた．このことはまさしく PFK のステップで解糖が障害されたことを示しており，また患者赤血球の乳酸形成能にも著しい低下が認められた．その結果，図に明らかなように，ATP は正常対照の80%にとどまり，逆に ADP，AMP は3～4倍に増加した．すなわち本症患者における溶血亢進の機転は，PFK 異常→解糖の障害→ATP 生成低下であることが示されている．

さらに興味深いのは2，3DPG の変動であって3.06mM にまで減少していた．この2，3DPG の減少は患者赤血球浮遊液の酵素解離曲線においても明らかに反映されており，正常対照の P_{50} が23.7mmHg であるのに対し，患者赤血球の P_{50} は18.8mmHg と著明な左方推移を示した．左方推移の大部分は2，3DPG の減少によるものであり，一部分は ATP の減少によるものと考えられる．



G-6-P : glucose-6-phosphate, F-6-P : fructose-6-phosphate, FDP : fructose-1, 6-bisphosphate, DHAP : dihydroxyacetone phosphate, GAP : glyceraldehyde-3-phosphate, 2, 3-DPG : 2, 3-diphosphoglycerate, 3-PGA : 3-phosphoglycerate, 2-PGA : 2-phosphoglycerate, PEP : phosphoenolpyruvate, Pyr. : pyruvate, Lac. : lactate

図2　M-E PFKD における赤血球の解糖系中間代謝物およびアデニンヌクレオタイドの濃度変動

表2　糖原病V型，Ⅶ型の鑑別診断

	V型	Ⅶ型
溶血亢進	−	+
網状赤血球増多	−	++
骨髄の赤芽球系増殖	−	++
赤血球寿命の短縮	−	+
間接ビリルビン上昇	−	±～+
貧血	−	−
筋運動持続中の“second wind”	±	−
血糖上昇による運動耐性の増強	±	−
筋6炭糖モノリン酸	↘	↗↗
筋ホモジネートによる6炭糖モノリン酸の分解	→	↘↘
筋ホスホリラーゼ	↘↘	→
筋 PFK	→	↘↘
筋ピルビン酸キナーゼ	→?	↗
赤血球 PFK	→	↘
赤血球 2, 3-DPG	→?	↘

ホスホリラーゼと PFK はともに骨格筋のグリコーゲン分解の律速酵素であり，したがってそれらの欠損症の場合，骨格筋に関する臨床症状が酷似しているのは当然であろう．Ⅶ型の同定の過程はいわばV型を除外していく過程であった．しかし，上述した赤血球に関する諸所見はV型ではまったく見られないⅦ型の特色であり，この点を骨格として現時点におけるV型とⅦ型の鑑別を示したのが表2である．最近ルーチンでおこなわれている赤血球2，3DPG の測定(または赤血球浮遊液の酸素解離曲線の観察）によっても鑑別診断は前進する．

PFK の後天的な活性異常のモデルとしての M-E PFKD

M-E PFKD の赤血球において2，3DPG が著減するという成績が強く示唆しているのは，赤血球 PFK 活性が2，3DPG 濃度を規定するということであろう．そこで2，3DPG が同様な低下を示す病態について，赤血球解糖系中間代謝物の変動を前章の方法で測定し，M-E PFKD における変動と比較してみた．糖尿病ケトアシドーシスにおいて赤血球の2，3DPG が著減することは40年も前にGuest & Rapoport[9] によって報告されているが，そのメカニズムは必ずしも明らかにされていない．図3に糖尿病ケトアシドーシスの赤血球の所見と M-E PFKD のそれを対比しているが，両者は驚くべき程一致することが認められた．同様な所見は尿毒症性アシドーシス，尿細管性アシドーシス，呼吸性アシドーシスの患者についても得られた．このようなアシドーシスによる PFK 活性阻害のメカニズムとしては，上昇した水素イオンによる PFK 活性のアロステリック阻害に基づいていると判断される．事実これらの後天性の赤血球 PFK 活性の低下は，体液成分の正常化によりたちまち回復し，また赤血球の PFK 活性を溶血標本の標準アッセイによって求めると活性の低下は見出し得ず，活性低下の証明はあくまで中間代謝物の測定によらねばならない．このように M-E PFKD は後天性の PFK 活性異常の病態モデルとしても重要である．

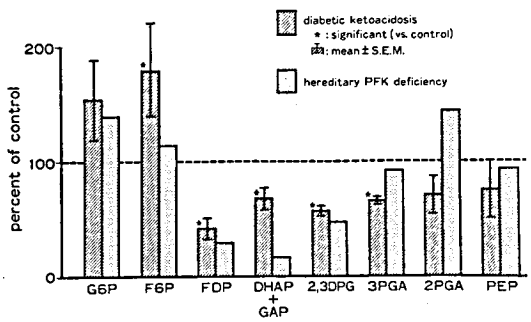


図 3　赤血球の解糖系中間代謝物の濃度変動
—糖尿病ケトアシドーシスと PFKD の比較
（本図では，糖尿病ケトアシドーシスの対照（100%）は正常人であるが，PFKD の対照（100%）は同程度の reticulocytosis を有する赤血球酵素異常を伴わぬ患者である）

文　献

1）Tarui, S., Okuno, G., Ikura, Y., Tanaka, T., Suda, M., Nishikawa, M. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 19 : 517 (1965)

2）Tarui, S., Kono, N., Nasu, T., Nishikawa, M.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 34 : 77 (1969)

3）Karadsheh, N. S., Uyeda, K., Oliver, R. M. : *J.* Biol. Chem., 252 : 3515 (1977)

4）Waterbury, L., Frenkel, E. P. : *Clin, Res.*, 17, 347 (1969) ; Blood, 39 : 415 (1972)

5）Kahn, A., Etiemble, J., Meienhofer, M. C., Bovin, P. : Clin. Chim. Acta, 61 : 415 (1975)

6）Oda, S., Oda, E., Tanaka, K. R. : Clin. Sci., 25 : 344 A (1977)

7）Guibaud, P., Carrier, H., Mathieu, M., Dorche, Cl., Parchoux, B., Béthenod, M., Larbre, F. : Arch. franç. Pédiat., 35 : 1105 (1978)

8）Niessner, H., Beutler, E. : Biochem. Med., 8 : 123 (1973)

9）Guest, G. M., Rapoport, S. : Amer. J. Dis. Child., 58 : 1072 (1939)

47）各種スポーツにおける血中ミオグロビンの変動パターン

川井尚臣*

研究協力者　岩朝勝*　今井幸三*　近藤彰*
虫本光徳*　末広正*　日下香苗*
林正*　三好和夫*

私達は先に，人ミオグロビン（Mb）のラジオイムノアッセイ（RIA）を開発し，各種筋疾患ならびに心筋疾患などの成績を発表してきた[4]．本文では，健常人のスポーツ時の血清Mbの上昇とその変動パターンを示す．いわゆるスポーツ医学に役立てたいが併せて潜在性ミオパチーの発見に資したい．

対象と方法

とり上げたスポーツは，サッカー，野球，長距離（14km）競走，ゴルフ，剣道などである．これらスポーツの前および後に経時的に採血し，血清Mbを測定した．血清Mbの測定は当科開発のラジオイムノアッセイ（感度1 ng/ml，正常値は30ng/ml以下，以下数値はng/ml）によった．

成　績

1．各種スポーツにおける血清Mb

1）サッカー：図1にサッカーの試合による血清Mbの上昇とその経時的変動を示した．当学部のサッカー部員についての成績である．試合時間は約1時間である．図にはポジションの異なる4人の成績を示した．

血清Mb（黒丸実線）は試合終了直後には上昇して最高値を示し，その後漸次下降し，試合開始18時間後にはほぼ前値に復した．最高値はフォワード，ハーフバックでは，それぞれ160，150とかなり上昇しているが，これらに対してフルバック，ゴールキーパーは60，50と低値であった．比較のため血清CK活性値（白丸点線）（正常値25u以下）を示したがMbに遅れて上昇し，その上昇もきわめて軽度であった．

2）野球：野球の試合による血清Mbの成績を図2に示した．当科教室員が2手に分れて行ったintra野球の成績である．図には，ピッチャー，センター，レフト，セカンド，マネージャーなどポジションの異なった5人の成績を示した．試合時間は約2時間である．Mbは試合終了直後に最高値を示し，17～21時間では100以下～正常値近くまで下降した．最高値はピッチャーでは1000と著しく高く，センター180，ついでレフト，マネージャーおよびセカンドの順であった．

野球について，Mbの変動を一般人と当学部の野球選手とで比較した（図3）．一般人は先（図2）に示した教室員である．ピッチャーで一般人の最高値1000に対して選手では240，センターでも一般人180にくらべ選手では70といずれも選手の方が低値であった．

3）長距離（14km）競走：運動量の多いスポーツとしてとりあげた．当学部野球部員5人が14kmを競走した．

血清Mbは上昇し，終了直後ないし6時間で最高値となり以後下降，20時間でほぼ前値に復した．最高値は高い人で，1100，低い人でも300と高値を示した．

なお，Mb値と所要時間あるいは順位との関係

＊徳島大学医学部第一内科

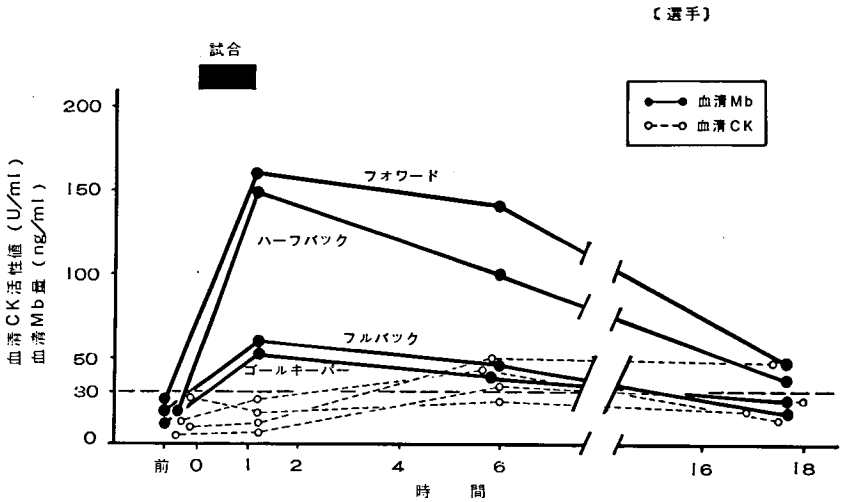


図1　サッカーによる血清ミオグロビン量の変動

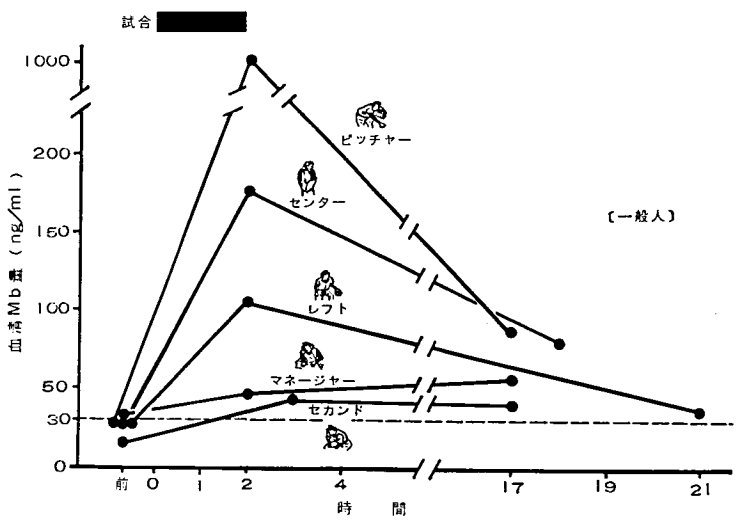


図2　野球による血清ミオグロビン量の変動

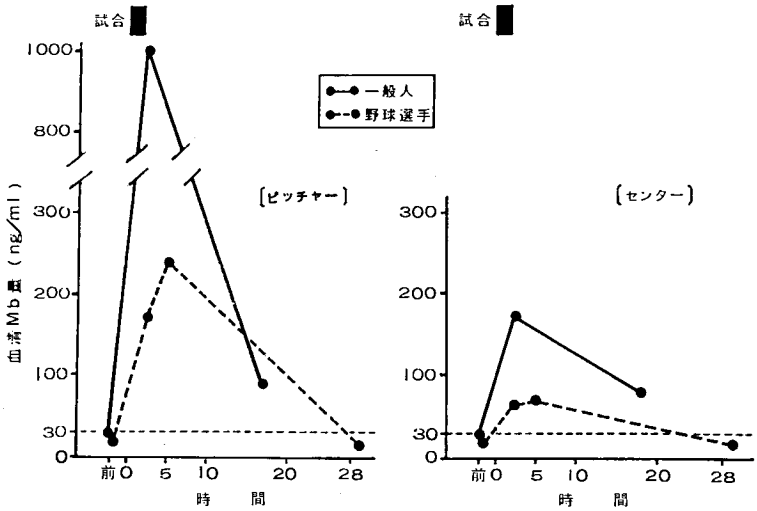


図3　野球による血清ミオグロビン量の変動
――一般人と野球選手との比較――

は明らかでなかった．

4）ゴルフ：運動量の少ないスポーツとして選んだ．6人を検索したが競技後血清Mbの上昇しない人が半数（3人）みられた．Mbの上昇がみられる人の中で高い人でも80程度しか上昇せず，24時間後には正常値に復した．

2．スポーツ別の血清Mbの最高値および経時的変動パターンの比較

図4にスポーツの種類別の血清Mbの最高値を示した．Mbが最も上昇したのは長距離競走で1100～300，つづいて野球（選手），サッカーの順であり，ゴルフでは最も低値であった．

経時的変動パターンでは，Mbは運動終了直後にすでに上昇しており，最高値は終了直後～6時間にみられ，どのスポーツでもほぼ20時間前後で正常値近くにまで下降した．

3．一定の運動を毎日繰返し行った場合の血清Mb

当学部剣道部の7日間の合宿時の4人の成績を図5に示した．図上段に斜線で示した如く毎日ほぼ一定の練習（1日約4時間）を行った．いずれも練習の直後に採血しMbの測定を行ったものである．

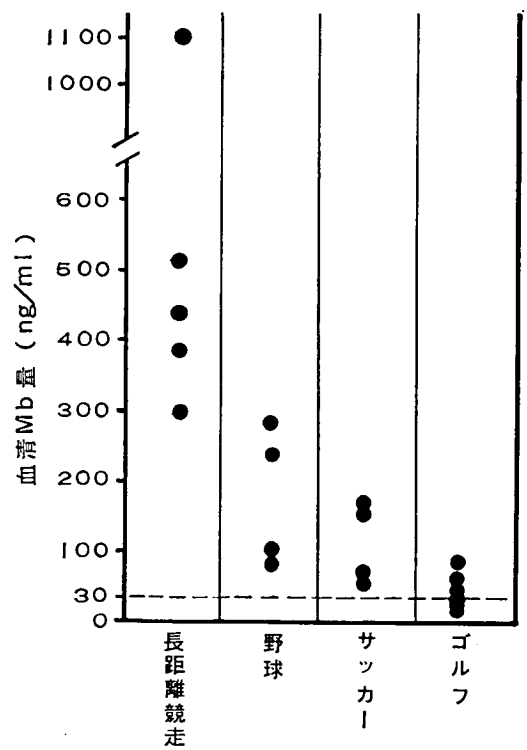


図4　各種スポーツによる血清ミオグロビン量(最高値)

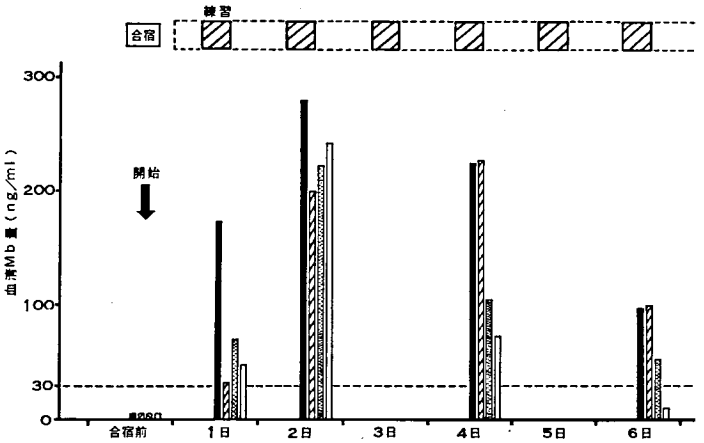


図5　スポーツ(剣道)による血清ミオグロビン量の変動
——合宿時——

合宿開始1日目は図の如く1人は170であったが他の3人は35，40，60と上昇は軽度であった．しかし，2日目の練習後では4人とも200～300と高値を示した．4日目には少し低値となり，6日目にはさらに低くなり正常値～100となった．また，合宿の期間中に試合を行った場合の血清Mbの変動を当学部ラグビー部の部員について検索した．合宿開始後5日目に試合を行ったところ，前日（4日目）の練習後の200が300，150が250，などと上昇を示した．

考　　察

従来より，種々の筋疾患や健常人の激しい運動後などにMb尿をきたすことが知られていた[1),2)]．しかし，血中Mbに関する文献成績は最近まで殆んどみられなかった．これは，血中の微量Mbを特異的に捉える方法がなかったためといってよい．

最近，人Mbの免疫学的な微量測定法が開発され[3),4)]，種々の筋疾患ならびに健常人のスポーツないし運動負荷による血中Mbに関する報告[5),6),7)]もみられるようになった．

Demosら[5)](1974年)は21人の海兵隊の新兵のトレーニング時に補体結合反応（感度0.1～0.3μg/ml）によって血清Mbを測定し，14人に平均0.4μg/mlのMbがみられ，また，トレーニングによって上肢帯筋の筋痛や腫脹をきたし入院した別の11人では平均20.8ng/mlものMbが検出されたと報告している．さらにRitterら[7)](1979年)は16人の新兵が12週間のトレーニングを行った前と後に激しい運動を負荷した際RIA（感度5ng/ml）によって血清Mbを測定し，トレーニング前の運動負荷によるMbが160±81ng/mlであるのに対し，後では76±60ng/mlと，トレーニングによってMbの上昇が軽度になることを指摘している．

本論文では，私達の開発した人MbのRIAを用いて健常人のスポーツによる血清Mbの上昇とその変動パターンの成績を示した．とりあげたスポーツはサッカー，野球，長距離競走，ゴルフ，剣道，ラグビーなどである．

血清Mbはこれらのスポーツによって上昇（1000ng/mlレベルまで）し，運動量の多いと思われるスポーツ（例えば長距離競走）ほど高値を示した．同じスポーツでは（野球など）Mb値はポジションによって異なっており，当然のことながら運動

量の多いと思われるポジションほど高値を示した．また，血清Mbの変動はほぼ一定のパターンを示し，Mbは運動終了直後には上昇しており，終了直後～6時間で最高値となり，その後下降し，24時間で正常値近くになった．

一般人と選手とのMb値の比較では，前者に比べ後者の方が明らかに低値であった．この機序の詳細は不明であるが，スポーツにおけるトレーニングの効果を血清Mbの上昇を指標として捉えることができることがわかる．

また，一定の運動を毎日繰り返し行った場合，運動直後のMb値の変化を示した．1日目のMbは軽度上昇し，2日目に最高値（200～300ng/ml）となり，その後は上昇は漸次軽度になり，6日目には正常値近くになった．Demosら[5]も，補体結合反応によって海兵隊員のトレーニング時の血清Mbを測定し，開始3日目にMbが最高値になり，その後上昇が軽くなっている成績を示している．同じ運動を毎日行っていると，漸次その運動を楽に行えるようになることとMb値の低下との関連が考えられる．

本論文では健常人のスポーツによるMbの成績を述べたが，一見健常であり潜在性のミオパチーを有する人では運動負荷によって健常人に比べ血清Mbの著しい上昇をきたすことが考えられる．前述の成績は，スポーツ医学にはいうまでもなく運動負荷による潜在性ミオパチーの発見に有用であると思う．

結　　論

1）各種スポーツにより血清Mbは上昇し，運動量の多いスポーツほど高値を示す．また，一般人にくらべ選手ではMbの上昇は軽度である．

2）血清Mbはスポーツ終了直後～6時間で最高値となり，24時間でほぼ前値に復する．

3）一定の運動を毎日繰り返す場合には，血清Mbは第2日目位の運動後が最高値となり，その後上昇は漸次軽度になる．

4）スポーツにおける血清Mbの上昇は，スポーツ医学や運動負荷による潜在性のミオパチーの発見に有用であると考える．

文　　献

1）Ono, I. : Studies on myoglobinuria. Tohoku, J. Exp. Med., 57 : 273, 1953.

2）Rowland, L. P., Fahn, S., Hirschberg, E. et al. : Myoglobinuria. Arch. Neurol., 10 : 537, 1964.

3）Stone, M. J., Willerson, J. T., Gomez-Sanchez, C. E. et al. : Radioimmunoassay of myoglobin in human serum. Results in patients with acute myocardial infarction. J. Clin. Invest., 56 : 1334, 1975.

4）Miyoshi, K., Saito, S., Kawai, H. et al. : Radioimmunoassay for human myoglobin : methods and results in patients with skeletal muscle or myocardial disorders. J. Lab. Clin. Med., 92 : 341, 1978.

5）Demos, M. A., Gitin, E. L. and Kagen, L. J. : Exercise myoglobinemia and acute exertional rhabdomyolysis. Arch. Intern. Med., 134 : 669, 1974.

6）岩朝　勝，川井尚臣，三好和夫，他：各種スポーツによる血清ミオグロビンの変動パターン．四国医誌，35 : 119, 1979.

7）Ritter, W. S., Stone, M. J. and Willerson, J. T. : Reduction in exertional myoglobinemia after physical conditioning. Arch. Intern. Med., 139 : 644, 1979.

48）赤筋と白筋に於けるsteroid cytosol receptorとそのnuclear binding

庄　司　進　一*

過剰なグルココルチコイドは，ステロイドミオパチーやクッシング症候群の際に認められる様な筋蛋白の減少を来たす．この作用はステロイドの筋細胞に対する直接作用であるのか，または他の臓器例えば肝臓等を介する二次的作用なのか？骨格筋の細胞液中にステロイドリセプターが存在しているという報告はステロイドの標的組織の一つとして骨格筋が入ることを示している．

一般に白筋が赤筋より強く侵されることは認められている．従って，この白筋と赤筋の間にステロイドの細胞下レベルの機序の上でどのような差異があるのかを知ることは大変興味深いことである．このためratのextensor digitorum longus（白筋）とsoleus（赤筋）を用いsteroid cytosol receptorとその結合体のnuclear bindingを測定した．

材料および方法

ラジオケミカル：〔1（2）-^{3}H〕Cortisol（40 Ci/mmol）と〔1（2）-^{3}H〕dexamethasone（26 and 28Ci/mmol）はThe Radiochemical Centre, Amersham, U.K.より得た．これらのpurityは98％で使用は3ヶ月以内で使用まで液体窒素内に保存した．

動物：メスWisterラット160～180gをBantin and Kingman Ltd., Hull, U.K.より得た．副腎剔出は両側剔出をエーテル麻酔下に行い実験は少なくとも術後7日以後に行った．術後は1％NaClを飲水させた．

筋Cytosolの精製：ratsはcervical dislocationで殺し，extensor digitorum longus（EDL）とsoleus muscleをすみやかに得，ice-cold 0.9％NaClで洗浄後，脂肪・結合織・腱を除いた．ハサミで細く切り，Potter-Elvehjemホモジェナイザーで6倍量の0.01 M Tris-HCl buffer（pHは0°でEDLには8.6，soleusには7.5）に1.0mM EDTAと12 mM thioglycerolを含んだ液でホモジェナイズ（15秒を4回氷冷しながら）した．Beckman Type 50 rotorを用い0°から4°で27,000 gで30分の遠心を行い，その上清を得，pHを7.5 at 0°Cにadjustした．EDLはsoleusより解糖能が大きなため上清を同様なpHにするためにhomogenizing bufferにはよりalkaliな液が必要であった．これはリセプターに対するpHの効果を最小限にするために取られた方法である．上清はpH adjustの前には常に0°Cで7.0から8.0の間にあった．

Cortisol receptorの測定：1 mlのcytosolを3.3×10^{-8}M〔^{3}H〕cortisol with（blank）or without（test）3×10^{-5}M unlabeled cortisolと0°～4°Cで3h incubateした．過剰のunlabeled cortisolはcortisolのnon-specific（low-affinity）bindingに影響するが，specific（high-affinity）bindingには影響を与えない．生物学的に不活性なepicortisolをblankに用いても結果には変化がなかった．

Incubation後，freeとreceptor-bound cortisolとをDEAE-cellulose filter（DE81）のfiltrationで分けた．radioactivityは5 mlのscintillation fluid（250ml Triton X-114, 3g PPO, 5g benzoic acid, made up to 1 liter with xylene）で測定した．Specific activityは少なくとも3回の測定の平均から算出した．

＊信州大学医学部第三内科

蛋白測定：蛋白はLowryの方法によった．non-collagen proteinの測定はmuscle homogenateに9倍量の0.05N NaOH を混和一晩室温に放置後，遠心し上清の蛋白量を測定した．

DNA測定：Burtonの方法によった．

Dexamethasone receptorの測定：0.5mlのcytosolを〔^{3}H〕dexamethasone と0°～4°で一晩incubate, blankには1×10^{-4}M unlabeld dexamethasoneを加えた．

Freeとreceptor-bound dexamethasoneはSephadex G-25 gel filtrationをcold roomで行い分けた．macromolecular fractionsを集め，その1mlのaliqustのradioactivityを10ml scintillation fluid内で測定した．

筋核の精製：ratの背部および四肢の筋よりKuehlの方法で筋核を精製した．但し，Triton X-100は0.5%の代わりに0.05%，Miraclothの代わりにstainless steel mesh（38 μm）を用いた．

Receptor-ステロイドの結合体の核への結合の測定：cytosolを〔^{3}H〕dexamethasone 60nM（final concentration）と0°Cで2h incubate, blankには1000倍のunlabelled dexamethasoneを加えた．筋核のsuspension 50μlを100μlのincubated cytosolに加え0.25M sucrose solution内で20°C 1h incubateまたは記載した時間のincubateをした．

この後，0°Cに10分冷却後800g 5分の遠心で核を得，3mlのice-cold 0.25M sucrose solutionで3回洗浄．洗浄後の核を0.4mlのSoluene 350で室温一晩で溶解，10mlのscintillation fluid内でradioactivity測定．testとblankの差よりspecific bindingを算出．

結　　果

Dexamethasone *in vivo*投与：体重で分けた16ペアーのratsの一群に6日間1mg/kgのdexamethasoneを投与，対照群に生食を投与した．図1の如く体重は有意に減少した．筋の重量はE.D.L.もsoleusも共に減少したが筋のnoncollagen proteinはE.D.L.でのみ有意な減少を示した．

Cortisol receptor：cortisolのcytosol receptorに対するbindingのtime courseはE.D.L.とsoleusで同様なパターンを示し，30分のincubationでmaximumに達し，その後3日間そのlevelを保った．soleusとE.D.L.のcortisolのcytosol receptorは11匹のadrenalectomyを受けたratsで測定した．表1に示した如くcytosol protein当りbinding capacityはsoleusで有意に高かった．5×10^{-5}M unlabeled dexamethasoneまたはbethamethasoneをassay系に加えてもcortisolのbindingは有意に低下を示さなかった（5実験）．

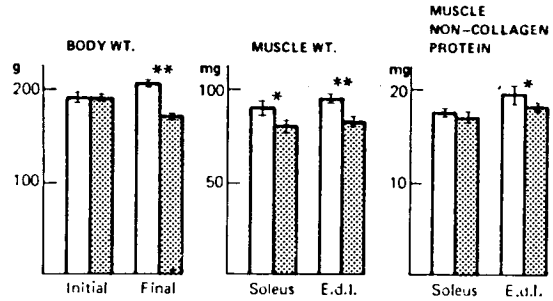


図1　Effect of dexamethasone administration on body and muscle weights and muscle noncollagen protein in rats.
Open bars-control, shaded bars-steroid-treated. Differences were analysed by the paired *t* test: $^*P<0.05$; $^{**}P<0.005$. E.d.l.-extensor digitorum longus muscle.

Dexamethasone receptor：20nMのdexamethasoneで各々1～3匹のadrenalectomyを受けたratsを用いた14回の実験の結果は，表1の如くsoleusで高値であった．色々な濃度で測定（各濃度につき3～4回の測定）しScatchard plotsで解析した（図2）．これよりE.D.L.とsoleusのそれぞれの解離定数は7.13×10^{-9}と5.95×10^{-9}Mでcapacities of the binding site（結合サイト数）はそれぞれ29.6と40.4 fmol/mg cytosol proteinであった．

Homogenizing前の0°C 2hのstorageはbindingに影響を与えなかった．

表 1　Binding of cortisol and dexamethasone by cytosol from extensor digitorum longus and soleus muscles

	EDL	Soleus	P^c
Cortisol binding (11 experiments)			
Muscle wet weight (mg)	121 ± 3[d]	123 ± 5	
Cortisol bound:			
fmol / mg cytosol protein	775 ±53	1033 ±90	<0.025
fmol / mg total noncollagen protein[a]	229 ±15	350 ±30	<0.005
pmol / mg DNA[a]	198 ±13	174 ±15	>0.1
fmol / cell[b]	1.79± 0.12	2.81± 0.25	<0.005
Dexamethasone binding (14 experiments)			
Muscle wet weight (mg)	116 ± 3	112 ± 4	
Dexamethasone bound:			
fmol / mg cytosol protein	30.7 ± 4.5	45.6 ± 6.0	<0.01
fmol / mg total noncollagen protein[a]	9.07± 1.33	15.4 ± 2.0	<0.005
pmol / mg DNA[a]	7.53± 1.10	6.93± 0.91	>0.25
amol / cell[b]	68.2 ±10.0	113 ±14.9	<0.005
Muscle parameters (6 rats)			
Noncollagen protein (mg / g wet weight)	227 ± 1	197 ± 5	<0.025
Cytosol protein (mg / g wet weight)	67.0 ± 1.3	66.4 ± 2.8	>0.5
DNA (μg / g wet weight)	314 ±11	485 ± 7	<0.005
DNA (μg / muscle)	31.7 ± 1.5	48.8 ± 1.8	<0.005

[a] The values for noncollagen protein and DNA used in the calculation were determined in a separate series and are given at the bottom of the table.

[b] Based on estimates of 3500 and 3000 for the total number of fibers in EDL and soleus, respectively.

[c] Using paired *t* test.

[d] Values are mean ± SEM.

proteinases の関与を調べるため，soya bean trypsin inhibitor (50μg/ml)，EGTA (1 mM)，leupeptin (20μg/ml) 等の proteinase inhibitors を加えて homogenize したが binding に有意な変化を認めなかった．

Dexamethasone の blood plasma に対する binding は小 (0.83±0.11 pmol/ml)で，赤血球には binding は認めなかった．

Adrenalectomy を受けた rat への〔^{3}H〕dexamethasone 投与：〔^{3}H〕dexamethasone (10 mg/kg or 25.5 μmol/kg) を腹腔内に投与し，2 時間後に殺し，E. D. L. と soleus と血液を得た．この時間内での dexamethasone から tritium の解離や

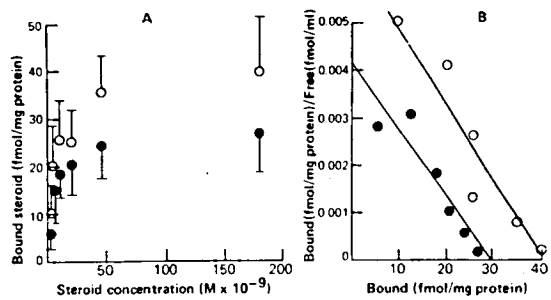


図 2　Dexamethasone binding by cytosol from extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles. A－Bound steroid versus concentration of steroid; B－Scatchard plot of data in A. ○, Soleus; ●, EDL. The standard errors are shown in A.

dexamethasone の代謝が negligible と仮定して，radioactivity から dexamethasone の濃度を測定した．心筋に於てはこの仮定が成立する報告がある．plasma, E.D.L., soleus ではそれぞれ9.8 nmol/mg, 9.7 nmol/g wet weight, 7.9 nmol/g wet weight であった．これはreceptor の binding capacity の約100倍の dexamethasone の濃度であった．

Dexamethasone-receptor 結合体の nuclear binding ：dexamethasone-receptor 結合体の nuclear binding の time course は20°C 60分で maximum に達しその後減少を示した．nuclear binding を二筋で比較するため complex 量を test tube 当り 20 fmol 位に adjust し（表２），筋への結合を測定した．結合は19.9と32.7%でE.D.L. より soleus で結合体当り有意に高く，cytosol protein 当りでも soleus で有意に高かった（表２）．

Test tube 当りの核の DNA 量を30.2～48.8 μg の間で変化させたが二筋共にこの条件下で nuclear acceptor が飽和されていないことが示された（表３）．

表２ Comparison between extensor digitorum longus and soleus muscles: receptor activity and nuclear binding of complex

		Extensor digitorum longus	Soleus	P*
Binding activity of cytosol receptor for dexamethasone fmol / mg cytosol protein	(R)	24.4±6.8**	36.0±7.3	<0.025
Total amount of dexamethasone-receptor complex fmol / tube	(T)	20.8±0.4	19.6±0.9	
Nuclear bound dexamethasone-receptor complex fmol / tube	(B)	4.14±0.72	6.42±0.53	<0.01
Nuclear binding activity of dexamethasone-receptor complex fmol / mg cytosol protein	(A)	4.81±0.80	11.74±0.81	<0.005
B / T(=A / R) (%)		19.9	32.7	

*Probability was calculated using Student's paired 't' analysis.
**Mean ± SEM from six different experiments.

Cytosolを8倍に稀釈した場合，二筋共にnuclear bindingは1/8以下に低下した．

表3 Non-saturability of nuclear acceptor sites

Nuclear DNA (μg/tube)	Nuclear bound complex* (fmol/mg DNA)	
	Extensor digitorum longus	Soleus
30.2	130	183
39.1	101	170
48.8	92	146

*Mean of two different experiments.
Conditions were as described in Methods.

考察と結論

赤筋がcorticosteroidに白筋より抵抗性があることを確認した（図1）．

一方赤筋では白筋よりcorticosteroid receptorsの濃度がcytosol protein当りでもnoncollagen protein当りでも有意に高値であった．この差は赤筋に白筋より多いとされるplasmaのcontaminationでは説明できない．なぜならplasmaのcorticosteroid bindingはmuscle cytosolより低いからである．

さらに筋核へのcomplexのbindingも赤筋由来のreceptorで有意に高値であった．これはcomplex数を一定にするため赤筋の方がより稀釈されたことにより説明されない．なぜなら稀釈によりnuclear bindingは稀釈倍数分の一以上に低下するからである．

本研究の結果はcorticosteroidがcytosol receptorsに結合，corticoid-cytosol receptor complexの核への結合等のstepsが赤筋と白筋のcorticosteroidに対する抵抗性を決めるstepsではないことを示している．

文　献

1）Shoji, S. & Pennington, R. J. T. : Binding of dexamethasone and cortisol to cytosol receptors in rat extensor digitorum longus and soleus muscles. Exp. Neurol., 57 : 342, 1977.

49) Serotonin myopathyにおける筋膜の生化学的検索

飯田光男*

研究協力者　足立皓岑**　水野恵介*
高柳哲也*　祖父江逸郎*

はじめに

Duchenne muscular dystrophyの病因は未だ不明であり，いくつかの仮説が提唱されている．それらのうちには血管障害説[1]やcatecholamine代謝障害説[2]，あるいは早期における筋膜障害に注目する説[3)4)]やserotonin代謝異常説[5]etc.がある．

そこで我々は血管障害説およびvasoactive agentであるserotonin代謝障害説との関連から，serotonin myopathyを作製しそのmyopathyにおける筋膜の役割を検索する事を目的に（Na^+＋K^+）ATPaseを指標に筋膜の生化学的検索を行った．

材料および方法

材料は体重200g前後の雄Wistar rat 7匹を使用し，myopathyの作製は4匹に5-Hydroxy-tryptamine creatinine sulfateを生食水に溶解して体重1kg当り20mgを腹腔内へ連続5日間投与し3週間後，後肢筋を採取し検索した．myopathyの作製は病理学的検索および歩行異常にて確認した．残り3匹をcontrolとして同様検索した．

筋膜の精製は概略Sulakhe et al[6]の方法に従い(1)断頭後氷冷した筋肉をice cold buffer (0.25M sucrose, 0.5mM EDTA, 0.1M Tris-HCl pH 7.4 at 4°C)にて結合織，脂肪組織を除去し得た筋肉をhomogenateし濾過後，1000×g, 10分間遠沈し(2)沈渣を0.5M LiBr, 0.05mM EGTA, 16mM Tris-HCl pH 8.5 at 4°Cにて洗浄後，10—15時間4°Cにて抽出(3)濾過液を2500×g, 10分間遠沈し上清液を10万×g, 30分間遠沈し得た沈渣を0.6M KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0にて4°C下15分間浮遊させ(4)浮遊液を5000×g, 15分間遠沈し上清液を10万×g, 30分間遠沈した．この操作を3回繰り返して行い得た沈渣を脱イオン水に浮遊させた．タンパク質濃度をLowry[7]法にて測定した．ATPase活性は100mM NaCl, 20mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 4mM Tris-ATP, 1mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7.2 at 42°Cからなるmediumに0.4mM ouabain又は純水を添加して20分間incubationし反応をトリクロル酢酸にて止め遊離した無機リンをFiske-Subbarow法[8]にて測定した．

結　果

(A) 病理学的所見

筋肉病変は図1の如く小病変は比較的focalな分布を示し(2)筋線維は変性像（横紋の消失顆粒状変性，空胞変性，硝子様変性）と壊死像が著明であったが，再生線維もみられた(3)筋核の増生，単核細胞を主体とした細胞浸潤が認められた(4)結合組織，脂肪組織の増生は認められなかった．

(B) 生化学的検索結果

(1)両群のタンパク質収量(μg/g.muscle)は表1の如く，平均値でcontrol群（C群）で84.6±1.5, myopathy群（M群）で66.5±3.7でC群の方に若干収量の多い傾向がみられた．(2) ATPase活性(μg. Pi/μg. protein) は平均値で表2の如く，C群で5.06±0.25, M群で4.78±0.93で両群間には大

＊名古屋大学医学部第一内科
＊＊愛知医科大学第四内科．

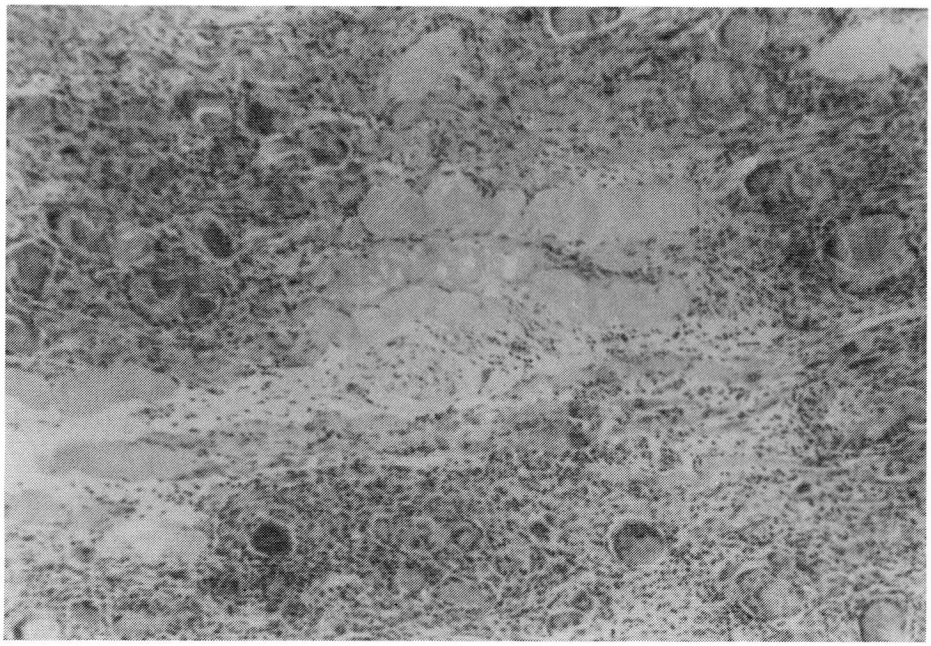


図1　serotonin myopathy rat の後肢筋
H-E, original magnification, × 100

表1　両群における各々のタンパク質収量

RESULTS

YIELD (MICROGRAM / G. MUSCLE)

CONTROL		MYOPATHY	
	1. 85		1. 64
	2. 83		2. 63
	3. 86		3. 68
			4. 71
MEANS ± SE	84.6 ± 1.53		66.5 ± 3.7

きな差異は認められなかった.(3)ouabain に対するATPase 活性の変化は表2の如く，C群では一様に inhibit されたのに対しM群では逆に一様に stimulate され，両群間に明らかな差異がみられた.

表2　両群における各々の ATPase 活性と ouabain に対する反応

RESULTS

($Na^+ + K^+$)ATPase ACTIVITY (MICROGRAM. Pi / μG. PROTEIN / H)

CONTROL	OUABAIN (−)	OUABAIN (+)	CHANGES BY OUABAIN
1.	4.8	3.7	(−)23 %
2.	5.1	3.4	(−)33 %
3.	5.3	4.0	(−)24 %
MEANS ± SE	5.06 ± 0.25		

MYOPATHY	OUABAIN (−)	OUABAIN (+)	CHANGES BY OUABAIN
1.	6.1	9.3	(+) 52%
2.	4.0	6.0	(+) 50%
3.	4.3	5.0	(+) 16%
4.	4.7	6.7	(+) 43%
MEANS ± SE	4.78 ± 0.93		

考　　察

Duchenne muscular dystrophy における筋肉崩壊の病因の一つの仮説として血管障害説があり，その物質的基礎として vasoactive agent である se-

rotonin 代謝障害説がある.

Serotonin myopathy は Munsat, T. et al[9] によると(1) myopathy は Type Ⅰ, ⅡA に選択的にみられ, (2) capillary endothelium に変性が認められ, (3) 48時間後には再生像がみられ, これら一連の所見は ischemia に基づくものであると報告している.

今回の我々の設定した条件によって作られた serotonin myopathy には, 筋肉崩壊と共に筋膜にも障害が存在している可能性が推測された. この検索結果には, ATPase の ouabain による stimulation の mechanism を始めいくつかの問題点があるが, serotonin myopathy における筋膜異常の存在の可能性およびどのような条件下において筋膜障害が生ずるのかといった点を含め, serotonin myopathy における筋肉崩壊過程における筋膜の役割について検索する必要性が推測された.

文　献

1) Duchenne, G. B. : Recherches sur la paralysie musculaive pseudohypertrophique ou paralysie myosclerosique. Arch. Gen. Med. 11 : 5—10, 1868.

2) Wright, T.L., O'Neill J.A., Olson W.H.: Abnormal intrafibrillar monoamines in sex-linked muscular dystrophy. Neurology (Minneapolis), 23 : 510, 1973.

3) Mokri, B., Engel, A. G. : Duchenne dystrophy: Electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. Neurology (Minneapolis), 25 : 1111—1120, 1975.

4) Schotland, D. L., Bonilla, E., Van Meter, M.: Duchenne dystrophy: Alteration in muscle plasma membrane structure. Science, 196 : 1005—1007, 1977.

5) Murphy, D. L., Mendell, J. R., Engel, W. K. : Serotonin and platelet function in Duchenne muscular dystrophy. Arch. Neurol, 28 : 239—242, 1973.

6) Sulakhe, P.V., Fedelesova, M., McNamara, D. B., Dhalla, N. S.: Isolation of skeletal muscle membrane fragments containing active Na^+-K^+ stimulated ATPase : comparison of normal and dystrophic muscle sarcolemma. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 : 793—800, 1971.

7) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol veagent. J. Biol. Chem. 193 : 265—275, 1951.

8) Fiske, C. H., Subbarow, Y. : The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66 : 375—400, 1975.

9) Munsat, T. L., Hudgson, P., Johnson, M. A. : Experimental serotonin myopathy. Neurology. 27 : 772—782, 1977.

50）Compound 48/80の筋蛋白代謝におよぼす影響

真田幸弘*

研究協力者　勝沼信彦*　野田　隆*　遠藤文夫**

はじめに

我々はラット骨格筋組織中の肥満細胞顆粒中に大量に含まれるセリン性プロテアーゼ[1]を精製・結晶化し[2]，その酵素化学的性質[3]，ならびに筋線維[4]や個々の筋構成蛋白質[5]に対する分解能について報告してきた．昨年度には肥満細胞の脱顆粒因子Compound 48/80を投与すると骨格筋中の本プロテアーゼ活性が著明に低下することを報告した[6]．そこで今回は肥満細胞から脱顆粒をおこした後に遊離した本酵素が骨格筋の蛋白質代謝におよぼす影響を筋構成蛋白質のターンオーバー速度を測定することによって検討した．

実験材料および方法

Compound 48/80はSigma Chemical社製，^{3}H-ロイシンはNEN社製，液体シンチレーション計測にはPackard Instrument社製のINSTA-GELを使用した．

Compound 48/80の投与方法は昨年度の報告[6]通りであり，筋構成蛋白質のターンオーバー速度測定はAriasら[7]の2重標識法を応用して行なった．18匹1群のラット9匹にはCompound 48/80投与，第1日目に^{3}H-ロイシン，30μCi/100g体重，を投与し各3匹をCompound 48/80投与後9日目，12日目，15日目に殺し，各分画への取り込みを長期標識とした．残りの9匹は同一条件下で9日目，12日目，15日目に同量の^{3}H-ロイシンを投与し，その6時間後の取り込みを測定し短期標識とした．これら以外に同一条件下での生食投与群も作成し同様の実験を行い対照とした．

骨格筋への取り込みは両側の大腿筋および腓腹筋を使用し筋構成蛋白質分画を調製した後に，0.3 N NaOHに溶解してINSTA-GELを用いて液体シンチレーション計測を行い求めた．ミオシン等の個々の蛋白質の分解速度については上記の筋構成蛋白質分画をさらに1％ sodium dodecyl sulfate(SDS)に溶解し，Sepharose 4 Bのゲルろ過を行った(1％SDS-50mM Na-リン酸緩衝液，pH 7.2を用いた)後に分離した各分画を同様の方法で計測した．

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動はWeber-Osbornの方法[8]を用いて平板法によって行った．

結　果

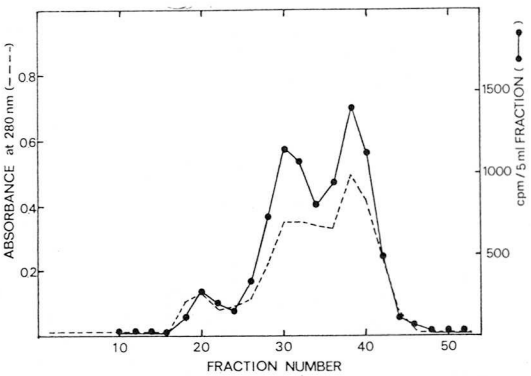
表1にCompound 48/80投与時における筋構成蛋白質および肝総蛋白質のターンオーバー速度の比較を示した．

Compound 48/80投与時には筋構成蛋白質のターンオーバー速度は遅くなっており（この比が大である程ターンオーバー速度が速いと考えられている），15日目には正常のターンオーバー速度に回復していることがわかる．同条件下での肝総蛋白質についてもCompound 48/80投与群で著しく低下しており，その程度は筋構成蛋白質よりも大きい．これらの結果はCompound 48/80を投与することにより細胞内蛋白質のターンオーバー速度が遅くなることを示している．

次にこれらの筋構成蛋白質中のミオシンの半減期を追求するために筋構成蛋白質をSDS存在下

＊徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門

＊＊熊本大学医学部小児科



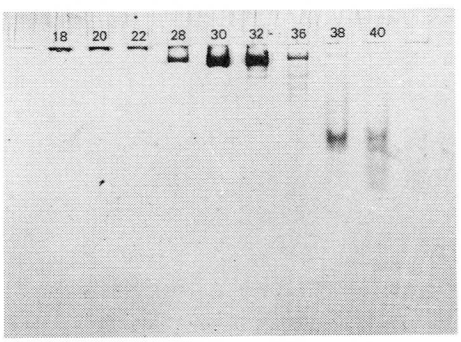


図1　Distribution of ^{3}H radioactivity in rat myofibrillar proteins from SDS-Sepharose 4B column chromatography

表1

"RELATIVE TURNOVER" OF TOTAL PROTEINS FROM RAT MYOFIBRILS AND LIVER

		Ratio of ^{3}H leucine incorporated		
		9th day	12th day	15th day
Muscle	Control	0.58	0.65	0.61
	48/80	0.48	0.59	0.63
Liver	Control	2.01	3.95	4.17
	48/80	1.56	2.91	2.89

でSepharose 4Bのゲルろ過を行った．図1の上図はそのゲルろ過パターンを示したもので，下図は各々の分画をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行ったものである．分画番号28～32はミオシンH鎖であり，特に30番は極めて精製度の高いミオシンH鎖と考えられる．分画番号36～40は主に細いフィラメントの構成蛋白質とミオシンL鎖から成っていることがわかる．対照群で行ったこれらの各分画の長期標識（第1日に^{3}H-ロイシンを投与した群）の9日目，12日目，15日目の取り込み量を図2に示した．図から明らかな様にミオシンH鎖の分解は細いフィラメントの構成蛋白質にくらべて著しく遅く，みかけ上の半減期は約40日，一方，細いフィラメントのそれは約8～12日と計算された．

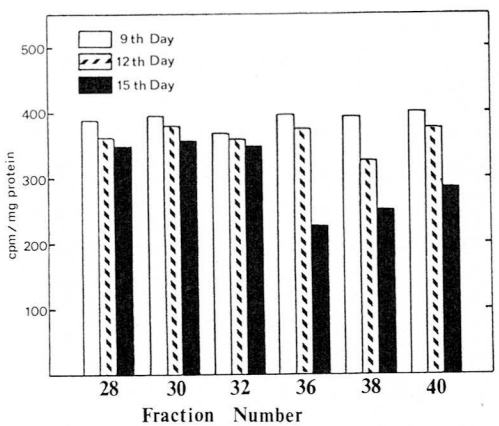


図2　Decay of ^{3}H radioactivity in rat myofibrillar proteins

考　　察

Compound 48/80が骨格筋肥満細胞のセリン性プロテアーゼの比活性，全活性の著しい減少を起こすことを昨年報告している[6]．この活性減少が筋蛋白質の代謝回転速度に影響をおよぼすかどうかそのターンオーバー速度の変化を追求した．Compound 48/80投与群における筋構成蛋白質および肝総蛋白質においてみかけ上のターンオーバー速度の延長が認められた．肥満細胞は肝臓にも数少ないながら存在することはすでに報告されている[9]．一方我々はCompound 48/80投与群のラットの体重増加が認められない事をすでに報告している[6]．この事実からCompound 48/80が筋構成蛋白質および肝総蛋白質の合成速度をも低下させている可能性が充分考えられる．したがって筋構成蛋白質

や肝総蛋白質の代謝回転速度の低下が肥満細胞のセリン性プロテアーゼ活性の減少のみによるかどうかはまだ問題として残っていると考えられる．

SDS-Sepharose 4 B のゲルろ過によって求めた対照群のミオシン H 鎖の半減期は約40日と計算されたが同時に測定した肝総蛋白質の半減期は 4 ～ 5 日であり，この値は報告されている半減期2.5 ～ 3 日[10]，よりも長い．したがってこれらを測定した時期には投与した^{3}H- ロイシンの再利用が当然考えられ上記のミオシン H 鎖の半減期も実際はもっと短かいものと考えられる．しかしながら同条件下で測定した細いフィラメントの構成蛋白質の半減期は著しく短かく，これらはすでに報告されている様に[11]，細いフィラメントの構成蛋白質の半減期がミオシン H 鎖よりも著しく早いという事実と一致している．この方法は少量の材料からミオシン H 鎖の様にかなり精製度の高い標品を簡単に得られることから今後細いフィラメントの構成蛋白質も同様にして分離して各々の代謝回転速度を同時に比較検討しようと考えている．

文　献

1) Woodbury, R. G., Everitt, M., Sanada, Y., et al. : A major serine protease in rat skeletal muscle: Evidence for its mast cell origin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75 : 5311, 1978.

2) Sanada, Y., Yasogawa, N. & Katunuma, N.: Crystallization and amino acid composition of a serine protease from rat skeletal muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82 : 108, 1978.

3) Kobayashi, K., Sanada, Y. & Katunuma, N. : Selective cleavage of peptide bonds by a serine protease from rat skeletal muscle. J. Biochem., 84 : 477, 1978.

4) Sanada, Y., Yasogawa, N. & Katunuma, N. : Effect of a serine protease on isolated myofibrils. J. Biochem., 85 : 481, 1979.

5) Yasogawa, N., Sanada, Y. & Katunuma, N. : Susceptibilities of various myofibrillar proteins to muscle serine protease. J. Biochem., 83 : 1355, 1978.

6) 勝沼信彦：骨格筋組織肥満細胞セリンプロテアーゼ，筋ジストロフィー症の基礎的研究（江橋班）昭和 53 年度研究報告書.

7) Arias, I. M., Doyle, D. & Schimke, R. T. : Studies on the synthesis and degradation of proteins of the endoplasmic reticulum of rat liver. J. Biol. Chem., 244 : 3303, 1969.

8) Weber, K. & Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244 : 4406, 1969.

9) O'steen, W. K. & Hrachovy, J. J. : The distribution of mast cells in mice with hereditary muscular dystrophy. Texas Rept. Biol. Med., 20 : 70, 1962.

10) Schimke, R. T. : The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver. J. Biol. Chem., 239 : 3808, 1964.

11) Koizumi, T. : Turnover rates of structural proteins of rabbit skeletal muscle. J. Biochem., 76 : 431, 1974.

51）膵エキスの作用機序と精製法の現状および筋ジス患者への臨床応用について

高岡善人*

研究協力者　高守正治*　三宅清兵衛*　一瀬允*
石丸忠彦*　渡辺文治*　福田孝昭*
南野直人*　森一毅**　松尾寿之***

目的

27年間抽出を続けてきた著者らの膵臓蛋白同化ホルモン（仮称膵エキス，PXと略）を精製単離してその化学構造を決定する．同時にその生理，薬理作用を究明してPXの作用機序とその臨床応用の基礎を完結する．

方法

ブタ膵臓のアセトン乾燥粉末から従来の方法で抽出して得た粗製PXを家兎による生物学的検定法(PX 1mg/kg静注後の血清カルシウムと尿素窒素の減少率による）で検査する．一定の力価に達したPXの一部分を滅菌後1mgに分注して臨床サンプルとし，残りの大部分は松尾，南野，渡辺らが精製用に使用する．得た微量の精製PXの力価検定には生物学的検定法では間に合わないので，最近開発した胎児皮膚の線維芽細胞による組織培養で^{3}H-uridineのとりこみで判定する．

一方PXの生理作用解明の一手段としてウイスター系ラット横隔膜神経筋標本を用い，細胞内電極法でPX 1mg/ml灌流前後の平均静止膜電位および自発性微小終板電位を観察する．

またこれまで5年以上PXを連用中の進行性筋ジストロフィー（DMP）患者の臨床観察は今までと同じように実施する．その効果判定は

(卅)；病状の悪化が停止または症状が部分的に改善したもの
(十)；病状の悪化が緩徐になったもの
(−)；病状の悪化に変化がみられないもの

とした．

成績

これまでのPX（protease活性0）検定には1mg/kgを家兎に静注していたが，表1に示す如くその半量の0.5mg/kgを静注するとカルシウムの減少率は少なくなるか，または同じであるが，尿素窒素の減少率は著明であった．しかし増量して3mg/kg静注するとカルシウムは著明に減少するが，尿素窒素は逆に著明に上昇した．このためPXの臨床応用には成人にも増量せず小児と同じく一律に1mgを連用してきた．

しかるに南野のえた粗製PX（protease 61.0を含む）は5mg/kg静注しても1mg/kg注射時と比較してカルシウム，尿素窒素とも減少傾向を示し，とくに後者は上昇しなかった．このようなこれまでと異なる粗製PXを精製できることはPXの量産化に直結するものであり，臨床応用にも明るい見通しをえたことになる．

次に臨床用PXを最近ある方法で分画した2検体PBH 2(W)(BioassayでPX注射前値に対するカルシウム減少率95.3±2.2%，尿素窒素減少率103.7±3.4%)，PBH 4(W)(カルシウム減少率88.2±3.4，BUN減少率137.0±16.4)の力価をTissue cultureで検定した．図1の如く，カルシウム因子が強いがBUNを上昇させるPBH 4(W)は

＊長崎大学医学部第一内科
＊＊国立療養所川棚病院
＊＊＊宮崎医科大学第二生化学

表 1　膵エキスの投与量による Bioassay の変化

Lot No.	Protease 活性 (Unit)	家兎数 (羽)	投与量 (mg/kg)	末梢白血球	血清総蛋白	血清Ca	尿素-N	日時
				1.5h 3h 6h	3h 6h	3h 6h	3h 6h	
5400・H	0	5	0.5	% 46 114 235	g% −0.8−0.5	% 96 97	% 96 80	29/VI '70
		5	1.0	33 54 185	−0.8−0.8	98 99	110 108	18/VI '70
		6	3.0	16 38 117	−1.2−1.1	81 87	125 137	22/V '70
791031-135	61.0	7(5)	1.0	1.5h 4.5h 183 306	4.5h −0.8	4.5h ※ 96.3±4.3	4.5h ※ 108.6±6.8	7/XI '79
		7(5)	5.0	49 145	−0.5	92.9±3.3	98.4±6.4	16/XI '79

%：注射前値を100とする　　※：Mean ± SD
家兎数 7(5) とは PX を静注された家兎7羽のうち，最大と最小の変動率を示した2羽を除外することを意味する

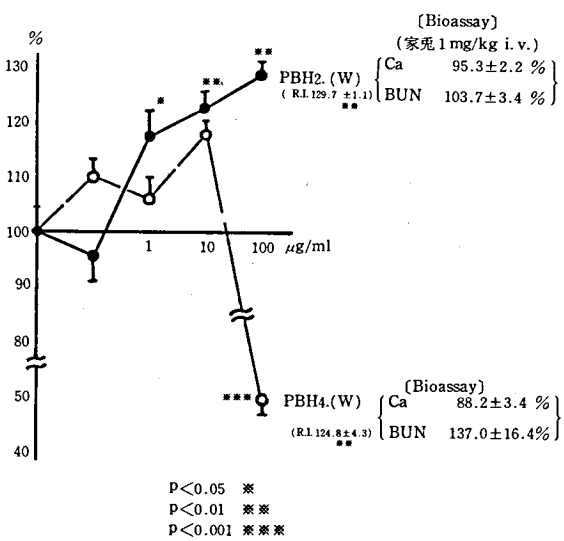


図 1　Effect of PXs on the incorporation of ^{3}H-UR into the Human Fibroblast

100μg/ml で^{3}H-uridine のとりこみが著明に抑制された．この時の control の Regular Insulin (R.I.)の uridineのとりこみは124.8±4.3であった．しかるに PBH 2 (W)の如くカルシウム因子がPBH 4 (W) ほど強くないが (95.3±2.2%)，BUN をほとんど上昇させない分画の uridine のとりこみは RI とほぼ同程度に強かった．以前組織培養に L-cells や Chang's liver cell を使用したことがあるが，この場合にはこれほど忠実に Bioassay と平行しなかった．従ってこの線維芽細胞を用いる組織培養法は Bioassay に代りうる力価検定法であることを示している．微量の検体を検定できるこの組織培養法を用いて最近精製してえた一分画は 0.1 μg/ml で有意に ($p<0.01$) uridine のとりこみを増し，100μg/ml ではさらにこれを増加させた($p<0.001$)．

一方高守は力価の高い PX を使って細胞内微小電極法によって (図 2)，骨格筋細胞膜に対し微小終板電位振幅増大 (0.47±0.10mV→0.84 ± 0.18 mV) を伴った平均静止膜電位過分極 (76± 4.0 mV →79±4.5mV　n=50　$p<0.001$)を認めた．実験はこの意義を解明するためなお続行中である．

表2　PX 5年以上連用の DMP 患者に対する臨床効果

病　型	例数（男, 女）	発症年齢（平均）	PX 開始年齢（平均）	PX 使用期間	効　果(※)		
					⧺	＋	－
	名	才	才	年月　年月	名	名	名
FSH	4（1, 3）	10－19 (14.8)	19－37 (28.0)	6, 9－9, 4	4	0	0
L－G	10（6, 4）	4－27 (14.2)	12－42 (28.4)	5, 11－8, 5	0	7	3
Duchenne	15（15, 0）	1－6 (3.6)	5－17 (10.4)	5, 11－8, 7	2	2	11

(※) 効果　⧺；症状の一部が改善したか，進行が停止に近いもの．
＋；症状の悪化が遅くなったもの．

(S.54.11.)

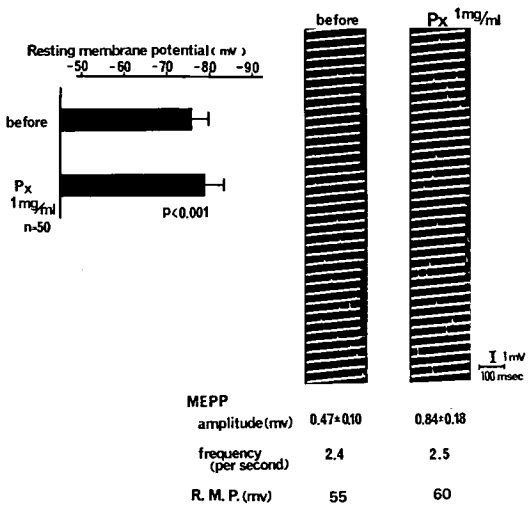


図2　Resting membrane potential (mv)

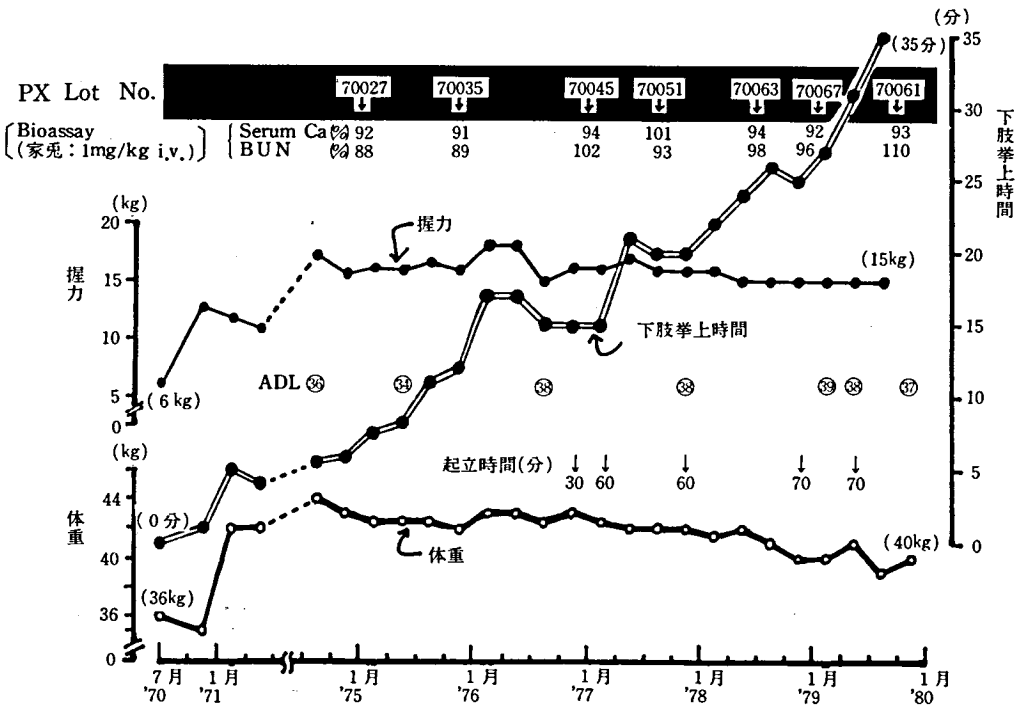
すでに5年以上最高9年4カ月間PXを連用中のDMP患者は29名であり（表2），その臨床効果は昨年とほぼ同じである．効果のないものは脱落する．顔肩上腕筋型4例はすべて(⧺)，肢帯型10例中7例が(＋)，デュセンヌ型15例中2例が(⧺)（24才男性の米国人1を含む），他の2例が(＋)で病状の悪化が緩徐または停止している．毎年報告しているPX第1号患者のFSH型DMPのその後の経過は表3の如くで相変らず良好である．

結　論

0.1μg/mlの単位で^{3}H-uridineのとりこみを検査できる線維芽細胞による組織培養の開発で，PXの力価向上は飛躍的に進展している．このため精製されたPXの純度は現時点でも昨年度の100倍以上に向上し完全単離も近いと考えられる．このPXを用いての電気生理学的研究もようやく軌道にのりつつあり，PXの作用機序の解明も期待できる．

一方DMP患者29名が5年以上PXを連用中でその成績はほぼ昨年と同様であり，良い経過を示す患者がいることも疑えない．

表3　水○明○　46歳女（FSH Dystrophy）　1mg/day



昭和54年度研究班機構図及名簿

厚生省神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー研究班

班　　名	研　　究　　課　　題	班　　長
第　一　班	筋ジストロフィー症の基礎的研究	江　橋　節　郎
第　二　班	筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究	三　好　和　夫
第　三　班	筋ジストロフィー症の臨床病態および疫学的研究	祖父江　逸　郎
第　四　班	筋ジストロフィー症の療護に関する臨床社会学的研究	中　島　敏　夫
第　五　班	筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究	野　村　達　次

昭和54年度第二班（三好班）機構図

班　長

プロジェクト	プロジェクトリーダー
1）遺伝・臨床	黒　岩
2）病態・生理	
a．形態	豊　倉・佐　藤
b．生理	西　谷
c．生化	杉　田
(i) 代謝・酵素・その他	
(ii) プロテアーゼ	
(iii) 膜系など	
3）治療法の開発	三　好
a．プロテアーゼインヒビター	
b．ホルモン	
c．筋成長因子	
d．神経成長因子など	

昭和54年度第二班（三好班）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	三好和夫	徳島大学医学部第一内科 〒770 徳島市蔵本町3－18－15	教授	0886－31－3111
幹事	黒岩義五郎	九州大学医学部脳神経病研究施設神経内科 〒812 福岡市東区馬出3－1－1	教授	092－641－1151
	豊倉康夫	東京大学医学部脳研究施設神経内科 〒113 東京都文京区本郷7－3－1	教授	03－815－5411
	佐藤猛	順天堂大学医学部脳神経内科 〒113 東京都文京区本郷2－1－1	助教授	03－813－3111
	西谷裕	国立療養所宇多野病院神経内科 〒616 京都市右京区鳴滝音戸山町8	副院長	075－461－5121
運営幹事	杉田秀夫	東京大学医学部脳研究施設神経内科 〒113 東京都文京区本郷7－3－1	助教授	03－815－5411
班員	古庄敏行	鹿児島大学医学部衛生学 〒890 鹿児島市宇宿町1208－1	助教授	0992－64－2211
	近藤喜代太郎	新潟大学脳研究所神経内科 〒951 新潟市旭町通一番町754	助教授	0252－23－6161
	古川哲雄	日赤医療センター神経内科 〒150 東京都渋谷区広尾4－1－22	部長	03－400－1311
	塚越廣	信州大学医学部第三内科 〒390 松本市旭3－1－1	教授	0263－35－4600
	木下真男	東邦大学医学部第四内科 〒153 東京都目黒区大橋2－17－6	教授	03－468－1251
	埜中征哉	国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部 〒187 東京都小平市小川東町2620	室長	0423－41－2711
	福原信義	新潟大学脳研究所神経内科 〒951 新潟市旭町通一番町754	助手	0252－23－6161
	小口喜三夫	信州大学医学部第三内科 〒390 松本市旭3－1－1	講師	0263－35－4600
	中村晴臣	鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設神経病理部門 〒683 米子市西町86番地	教授	0859－33－1111
	高守正治	長崎大学医学部第一内科 〒852 長崎市坂本町7－1	助教授	0958－47－2111
	高木昭夫	国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部 〒187 東京都小平市小川東町2620	室長	0423－41－2711
	中西孝雄	筑波大学臨床医学系神経内科 〒300－31 茨城県新治郡桜村大字妻木字天久保	教授	0298－53－3500
	栗原照幸	宮崎医科大学第三内科 〒889－16 宮崎県宮崎郡清武町木原5200	助教授	09858－5－1510
	茂在敏司	大阪医科大学第一内科 〒569 高槻市大学町2－7	教授	0726－83－1221

区　分	氏　名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
班　員	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
	植田啓嗣	愛媛大学保健管理センター 〒790 松山市道後樋又10－13	教授	0899－24－7111
	宇尾野公義	東京都立府中病院神経内科 〒182 東京都府中市武蔵台2－9－2	副院長	0423－23－5111
	庄司進一	信州大学医学部第三内科 〒390 松本市旭３－１－１	講師	0263－35－4600
	八木田正聖	徳島大学医学部第一内科 〒770 徳島市蔵本町3－18－15	助手	0886－31－3111
	川井尚臣	徳島大学医学部第一内科 〒770 徳島市蔵本町3－18－15	講師	0886－31－3111
	馬渡志郎	九州工業大学保健管理センター 〒804 北九州市戸畑区仙水町1－1	助教授	093－871－1931
	高橋桂一	神戸大学医学部第三内科 〒650 神戸市生田区楠町13・14合併地	講師	078－341－7451
	飯田光男	名古屋大学医学部第一内科 〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65	講師	052－741－2111
	荒木淑郎	宮崎医科大学第三内科 〒889－16 宮崎県宮崎郡清武町木原5200	教授	09858－5－1510
	宮武正	自治医科大学神経内科 〒329－04 栃木県河内郡南河内町大字薬師寺3311－1	助教授	02854－4－2111
	吉田瑞子	国立武蔵療養所神経センター疾病研究第四部 〒187 東京都小平市小川東町2620	研究員	0423－41－2711
	高岡善人	長崎大学医学部第一内科 〒852 長崎市坂本町７－１	教授	0958－47－2111
	井村裕夫	京都大学医学部内科第二講座 〒606 京都市左京区聖護院川原町54	教授	075－751－3111
	林恭三	京都大学薬学部生物化学 〒606 京都市左京区吉田下阿達町	助教授	075－751－2111
	真田幸弘	徳島大学医学部附属酵素研究施設 酵素化学部門 〒770 徳島市蔵本町3－18－15	助教授	0886－31－3111
	田辺等	虎の門病院神経内科 〒107 東京都港区赤坂虎の門2－2－2	部長	03－583－6871
	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	講師	0992－64－2211
経理事務担当者	小川秀雄	日本筋ジストロフィー協会 〒162 東京都新宿区西早稲田2－2－8	理事	03－203－1211