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55年度研究報告書

昭和56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55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1昨年度に発足し，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して参り，本年が第3年目で最終年度であります。

本報告書に集録された成果は，いずれも水準の高いものでありますが，とくに，これを過去2年の成果につみ重ねてみるとき大きな意味をもちます。この期間に筋ジストロフィー症の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。本研究班の班員，並びに共同研究者各位の絶大な努力に，班長として心からの敬意を表します。

本研究班は組織の上ではこれで終了致しますが，班員個々の研究は中断することなく続けられることと思います。研究は，この病気に苦しむ人々のために，社会的並びに学問的に私達に課せられた責務であるからであります。

本研究班を活動の場として，これまで多数の研究者が研究の意欲をかきたてて参りました。来年度も引続いて新しい研究班組織が実現されるよう努力し，また，関係各位の御援助を願うものであります。

本研究の推進に賜った，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盡力，御支援そして御理解に深く感謝致します。

昭和56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の研究……15

a）筋ジストロフィーチキン……17

Ⅱ．筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病態生理……57

a）遺　伝……59

b）臨　床……66

c）形　態……91

d）生　理……151

e）赤血球など……167

f）生化・代謝など……200

昭和55年度研究班機構図及名簿……251

分　担　研　究　報　告

目　　次

I．筋ジストロフィーチキンの研究

1）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 ……17
九州大学医学部脳研神経内科　黒　岩　義五郎

2）ジストロフィーチキン後広背筋の計測 ……20
鳥取大学医学部脳研神経病理　中　村　晴　臣

3）筋ジストロフィー鶏骨格筋の組織学的研究
——αW線維における横管系の増殖性変化と空胞出現の意義—— ……24
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部　埜　中　征　哉

4）ジストロフィーチキンにおける activated satellite cell について（II）
——電顕ラジオオートグラフィーによる観察——……30
信州大学医学部第三内科　小　口　喜三夫

5）ジストロフィーチキン筋細胞膜のフリーズ・フラクチャーによる観察 ……34
長崎大学医学部第一内科　高　守　正　治

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(2)
——アセチルコリンエステレース及びカテコラミン染色
による検討—— ……38
東京医科歯科大学医学部神経内科　塚　越　　廣

7）正常鶏筋，および筋ジストロフィー鶏筋に対する
フィロポディアの運動様式について ……44
筑波大学臨床医学系神経内科　中　西　孝　雄

8）筋ジスチキンの骨格筋脂質（第二報）……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

9）ジストロフィー鶏骨格筋中の中性脂肪に関する研究 ……52
東邦大学医学部第四内科　木　下　真　男

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
——Duchenne 型ジストロフィー症について—— …… 59
鹿児島大学医学部衛生　古　庄　敏　行

11) 顔面肩甲上腕型脊髄性筋萎縮症
——臨床的，遺伝学的検討—— …… 63
東京医科歯科大学医学部神経内科　古　川　哲　雄

12) Familial oculocranioskeletal neuromuscular disease with abnormal muscle mitochondria の follow up study …… 66
宮崎医科大学第三内科　荒　木　淑　郎

13) 筋緊張性ジストロフィー症の脳の CT-SCAN 所見の検討 …… 72
京都大学医学部第二内科　井　村　裕　夫

14) FSH 型筋萎縮症の特殊例の1症例について …… 76
愛媛大学保健管理センター　植　田　啓　嗣

15) Centronuclear Myopathy 10代発症遠位型の1例 …… 81
神戸大学医学部第三内科　高　橋　桂　一

16) 著明な心伝導障害と関節拘縮を呈した非定型ミオパチー
—— Emery-Dreifuss 症候群との異同—— …… 85
東京医科歯科大学医学部神経内科　塚　越　　廣

17) いわゆる distal myopathy の筋病変について …… 91
東京大学医学部脳研神経内科　豊　倉　康　夫

18) 生検筋に rimmed vacuoles を持ち，遠位筋萎縮を示す二症例
——電顕的検討—— …… 97
国立療養所宇多野病院神経内科　西　谷　　裕

19) Distal myopathy と lysosome …… 103
新潟大学脳研究所神経内科　福　原　信　義

20) Tubulomembranous myopathy …… 107
新潟大学脳研究所神経内科　福　原　信　義

21) Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) 培養筋細胞の
フリーズフラクチャーによる検討 …… 112
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

22) Duchenne ジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験……114
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

23) 実験的ミトコンドリア・ミオパチーの形態学的研究 ……119
宮崎医科大学第三内科　荒　木　淑　郎

24) ミトコンドリア・ミオパチーの臨床的・電子顕微鏡的研究……124
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　　猛

25) 不動性筋萎縮の病態に関する基礎的研究……128
東邦大学医学部第四内科　木　下　真　男

26) 筋ジストロフィーの筋病変に関する検討
——各病型における筋線維病変と血管間質病変
についての知見補遺—— ……132
虎の門病院神経内科　田　辺　　等

27) 神経筋疾患と骨関節異常との合併・共存病態に関する検討……136
虎の門病院神経内科　田　辺　　等

28) 慢性脊髄性筋萎縮症の臨床病理学的研究
——筋生検所見の半定量化の試み—— ……142
虎の門病院神経内科　田　辺　　等

29) Motor neuron disease の筋生検組織化学的検討
—— Oil red O 染色所見について—— ……147
大阪医科大学第一内科　茂　在　敏　司

30) 筋ジストロフィー症の単一筋線維筋電図（第3報）……151
国立療養所宇多野病院神経内科　西　谷　　裕

31) ヒトの外肋間筋を用いた実験的ミオトニーの研究……156
宮崎医科大学第三内科　栗　原　照　幸

32) カルシウム・イオノフォア（A23187）処理筋の収縮弛緩に
関する研究
——ヒト・ジストロフィー筋との比較検討—— ……161
長崎大学医学部第一内科　高　守　正　治

33) デュシャンヌ型筋ジストロフィー症赤血球膜のフォスファチジル
イノシトール代謝 ……167
神戸大学医学部第三内科　高　橋　桂　一

34) 筋ジストロフィー症患者赤血球膜のレクチン結合……171
東京都立神経病院神経内科　宇尾野　公　義

35) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の赤血球
カルシウム・フラックス（第2報） …… 176
信州大学医学部第三内科　庄　司　進　一

36) 筋ジストロフィー症患者の赤血球のＡＴＰとカルシュウム含量 …… 179
国立武蔵療養所神経センター　吉　田　瑞　子

37) 筋緊張性ジストロフィー症および Duchenne dystrophy 症の
赤血球膜の ATPase, adenylate kinase などについて …… 183
九州工業大学保健管理センター　馬　渡　志　郎

38) 緊張性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について …… 187
九州大学医学部脳研神経内科　黒　岩　義五郎

39) 福山型先天性筋ジストロフィー症の血清と髄液における
免疫グロブリンと immune complex …… 190
新潟大学脳研究所神経内科　近藤　喜代太郎

40) ヒト胎盤からの神経成長促進因子の分離 …… 193
京都大学薬学部生物化学　林　　恭　三

41) 先天性ミオパチーとトリプトファン代謝異常 …… 200
徳島大学医学部第一内科　八木田　正　聖

42) 筋クレアチナーゼに関する二，三の問題 …… 205
徳島大学医学部栄養化学　名　取　靖　郎

43) 筋ジストロフィー症骨格筋におけるクレアチン代謝の異常 …… 207
徳島大学医学部第一内科　三　好　和　夫

44) Thyrotoxic Myopathy の Creatinuria の成因について …… 210
愛媛大学保健管理センター　植　田　啓　嗣

45) ミオグロビン尿症の病態生化学的研究 …… 215
自治医科大学神経内科　宮　武　　正

46) ラジオイムノアッセイによる人ミオグロビンの turnover …… 220
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

47) 筋ジストロフィー鶏における筋ガングリオシドの研究——続報—— …… 225
自治医科大学神経内科　宮　武　　正

48) Ophthalmoplegia plus 症候群，及び実験的ミトコンドリア
ミオパチーにおける筋肉内ＧＯＴアイソザイムについて …… 229
大阪大学医学部第二内科　垂　井　清一郎

49) Duchenne 型筋ジストロフィーの単一筋線維：
収縮蛋白の分析 …… 233
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部　高　木　昭　夫

50) 実験的 serotonin myopathy における病理学的ならびに
筋構造蛋白質の検討 …… 239
名古屋大学医学部第一内科　飯　田　光　男

51) Ca プロテアーゼによる骨格筋の崩壊
——Ca イオノフォア（A23187）の効果—— …… 243
東京大学医学部脳研神経内科　杉　田　秀　夫

52) カテプシンHによる筋原線維構成蛋白質の分解様式 …… 247
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

Ⅰ．筋ジストロフィーチキンの研究

a）筋ジストロフィーチキン

1) 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

前回，dystrophy chicken の形態学的初期変化として，ふ化後1週間目に白筋である PLD 筋に DPNH diformazan granule 数の増加，及び fiber size distribution の広がりが生じはじめ，3週間目で著明となることを報告した[1]．今回，freeze-fracture EM にて，白筋である浅胸筋の形質膜上の caveolae のふ化後早期の経時的変化を観察した．

方　法

実験動物は，dystrophy chicken (line 413) と control chicken (line 412) を使用した．ふ化後，1日目，1週間目，3週間目の白筋である浅胸筋 (superficial pectoral muscle) を2.5% glutaraldehyde で固定後，25% glycerine で処理し，真空蒸着装置を用い，液体窒素で約−115°C，1×10^{-6}Torr 以下の真空下で割断し，白金パラジウム，カーボンで蒸着し，ブリーチで処理，水洗後，透過型電顕を用いて観察した．検索方法としては，形質膜上の caveolae の形，大きさ，分布を観察すると共に，拡大率約2.6万倍の freeze-fracture replica の写真に1 cm 間隔の透明の方眼紙を重ね合わせて，計測すべき筋線維の面積を出し，その面積内に含まれる caveolae 数を算出して，caveolar density を計算した．集計面積の決定には，ふ化後1日目の control 筋の replica にて500μm^2迄の面積の増加に対する caveolar density の変化を出し，100μm^2以上では，変動の少ない事を確認して，今回は200μm^2を total sampling area とした．

結　果

図1の如く，ふ化後1日目の caveolar density は，control で11.27/μm^2，dystrophy で7.76/μm^2と，dystrophy で低値を認めると共に，caveolae の形，大きさ，配列に不規則

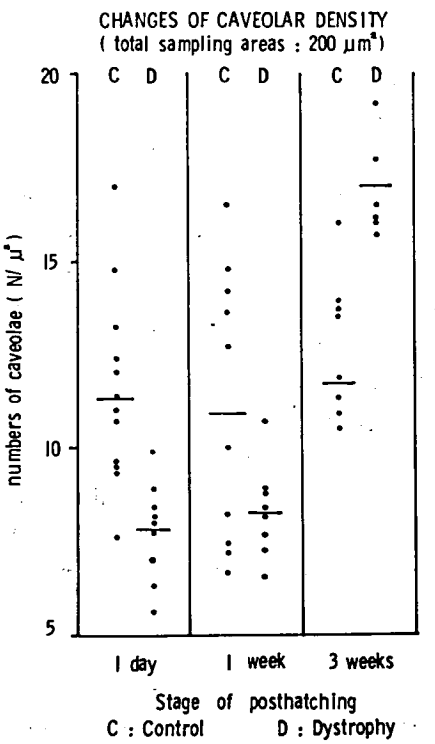


図1

＊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

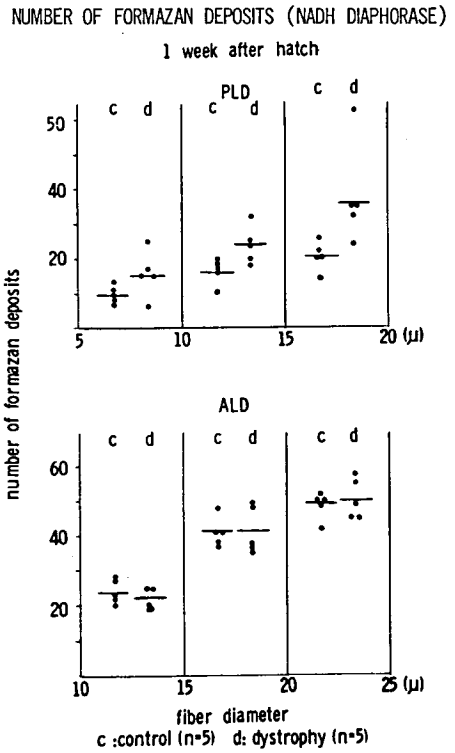


図2

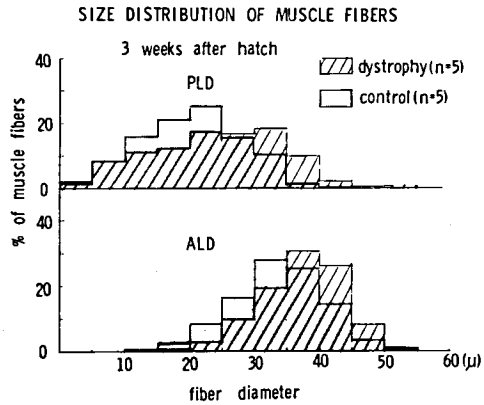


図3

性を認めた．又，ふ化後，1週間目では control で10.90/μ^2，dystrophy で8.24/μ^2と1日目と比較すると，control で軽度減少，dystrophy で軽度増加を認めたが，著変はみられなかった．しかし，分布は dystrophy でより規則性に乏しかった．ふ化後，3週間目では，dystrophy で17.01/μm^2，control で11.68/μm^2と caveolar density は，1日目，1週間目と比較して増加を示すと共に分布の局在性に乏しく又，同時期の control と比較しても，増加を示した．一方，control は，ふ化後，その平均値に著変を認めなかったが，ふ化後，1週間目において，caveolar density が約14/μm^2のものと，8/μm^2のものとの2群に分けられる傾向を認めた．

考　　察

Freeze-fracture EM でみられる筋形質膜上の caveolae は，その本態は明らかではないが，T システムの開口部，又は，pinocytotic vesicle 等の可能性が考えられている[2]．今回の caveolae の観察から，ふ化後，1日目の dystrophy chicken 筋における caveolar density の低値及び形と分布の変化は，前回報告したふ化後1週間目の PLD 筋における DPNH diformazan granule 数の増加（図2）より早期変化で，又3週間目の caveolae 数の増加は，fiber size distribution（図3）の広がりが著明となる時期と対応しており，これらの早期変化の相互関係及び dystrophic process との因果関係の究明が今後必要である．今回の私達の caveolar density の平均値は，Brian R ら[3]の報告と少し異なっており，方法論の比較も必要と考えられる．又1週間目の control 筋に於て，caveolar density が2群に分かれる傾向を示した事は，fiber type による差異[4]の可能性もあり，今後，fiber type 毎による caveolar density の変化を検討する事も必要と考えられる．

文　　献

1) 黒岩義五郎，石本進士，後藤幾生，大田典也：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．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54年度研究報告書，1980，p.22.

2) 吉岡三恵子，北条博厚，奥田六郎，西占　貢：

フリーズ・エッチング法による骨格筋の筋膜表面構造の観察．小児科紀要，22：1，1976.

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

4) Shafiq, S. A., Leung, B. & Schutta, H. S. : A Freeze-Fracture study of fiber types in normal human muscle. J. Neurol. Sci., 42 : 129, 1979.

2）ジストロフィーチキン後広背筋の計測

中　村　晴　臣*

研究協力者　小　谷　真　美*　高　田　邦　安*　今　岡　健　次*

ジストロフィーチキン（Dy チキン）の後広背筋（PLD）は良く知られた罹患筋の一つであり（黒岩ら[1]，1979；埜中ら[2]，1980），赤筋である前広背筋（ALD）とは一見して著しい対比を示し，研究材料として種々の利点を有するので，今後の研究の基礎資料を得ることを目的とし，その総線維数，筋線維直径，病変筋線維出現頻度を測定し，非罹患筋であるALDや，明らかな臨床症状を示す浅胸筋，上腕二頭筋と比較検討した．

方　法

ふ化後3週，5週，8週目のDyチキン及び対照（line 412）各3羽ずつを用い，深麻酔下で左側のPLDとALDを摘出したほか，ふ化後16週目のDyチキン6羽，対照9羽のPLDを摘出し，生食水に浸したガーゼの間に約10分間放置して筋収縮を除去したのち，筋腹中央の横断切片を4％ paraformaldehyde にて固定し，パラフィン切片によるH・E染色及びアザン染色標本を作製した．筋線維数の計測にあたっては，アザン染色標本の100～250倍写真を組合せて作った筋横断面の合成像について，その総線維数を数えた．筋線維直径は，at random に撮影した200～500倍写真上にて，各動物とも約500本の筋線維を画像解析装置を用いて計測し，統計的検討を行った．

他方，ふ化後5，12，19，26および33日目に，Dyチキンと対照それぞれ3羽ずつを用い，その浅胸筋，上腕二頭筋並びに腓腹筋を摘出し，筋収縮を除いたのちにクリオスタットを用いて10μの横断切片を作製した．そのH・E染色標本の670倍光顕写真を用い，at random に300本の筋線維直径を測定し，統計的検討を加え，PLDの成績と比較した．

結　果

Dyチキン3週目のPLD総線維数は約9,800本で，ALD総線維数（約3,700本）の約2.5倍に相当するが，対照との間に有意差をみない（**表1**）．5週，8週と発育が進むに従い，総線維数は減少傾向を示すが，個体差が少なくなく，対照に比し明らかな減少はない．しかし，ふ化後16週目では（約7,100本），対照（約12,700本）に対し明らかに総線維数が少ない（$p<0.005$）．Dyチキン ALDの総線維数は，ふ化後3，5，8週目で夫々3,772.0±712.5，3,410.3±506.8，3,356.0±140.6であり，ほぼ一定の値を示し，それぞれの対照値4,582.7±640.1，4,276.7±789.8，3,478.7±165.4との間に有意差をみない．

筋線維直径に関しては，各時期の平均値は**表2**の如くで，発育と共に次第に増大するが，8週目まではDyチキンと対照チキンとの間に有意差はみられず，16週目でDyチキンは約42μに達し，対照（約30μ）に比し明らかな線維直径平均値の増大がみられた（$p<0.01$）．Dyチキン ALDの線維直径平均値は，

表1　Number of muscle fibers in PLD

Age (weeks)	Control	Dystrophic	P
3	11,797.0 ± 1,098.7 (n=3)	9,825.0 ± 1,984.1 (n=3)	NS
5	10,496.7 ± 616.9 (n=3)	8,042.0 ± 6,112.4 (n=3)	NS
8	9,483.3 ± 2,736.9 (n=3)	6,194.0 ± 1,186.6 (n=3)	NS
16	12,742.8 ± 1,965.4 (n=9)	7,164.8 ± 2,465.8 (n=6)	<0.005

＊鳥取大学医学部脳研究施設神経病理

表2　Average diameter of muscle fibers in PLD

Age (weeks)	Control	Dystrophic	P
3	11.23 ± 1.68 (n=3)	13.16 ± 1.79 (n=3)	NS
5	16.03 ± 2.16 (n=3)	17.50 ± 1.97 (n=3)	NS
8	19.53 ± 1.07 (n=3)	20.70 ± 2.10 (n=3)	NS
16	30.46 ± 3.69 (n=9)	42.00 ± 4.27 (n=6)	<0.001

PLDと同様，ふ化後8週目までは対照との間に差をみない．

これに反し，明らかな臨床症状を示すDyチキン浅胸部では，ふ化後12日目以降，対照より線維直径の平均値が大きくなる傾向を示し，特に12日目及び26日目では有意の高値を認めた．同様に，Dyチキン上腕二頭筋の直径平均値も，12日目以降33日目まで，いずれの時期においても対照より有意に大であった（図1）．

筋線維直径の分布をみるため，各動物のPLDあるいはALD約500本についての直径実測値を4μ間隔に区分し，これを筋線維100本当りの分布数に換算し，各群3羽ずつ計300本についての分布数を用いてmegahistogramを作製した．但し16週目のPLDにおいては，実測値を10μ間隔に区分し，Dyチキン6羽，対照9羽の分布数合計を夫々1/2，1/3に換算して使用した（図2）．これによれば，DyチキンPLDではふ化後3週目で対照に比較して大径線維が少なからず認められ，5週目，8週目では大径線維の増加のほか，小径線維も多く認められた．更に16週目では60μ以上の大径線維も多数みられた．ALDの線維直径分布は，ふ化後8週目まで対照と大差はなかった．

浅胸筋，上腕二頭筋，腓腹筋では，各動物につき300本ずつの線維直径を4㎜間隔にて測定し，各群3羽計900本の測定値に基づいてmegahistogramを作製した（Imaoka[3]，1979）．その結果，Dyチキンの浅胸筋，上腕二頭筋では，ふ化後12日目ですでに対照よりも直径の大きい筋線維が多くみられ，19日目以降では多数の大径線維のほか，小径線維も多く認められた（図3）．

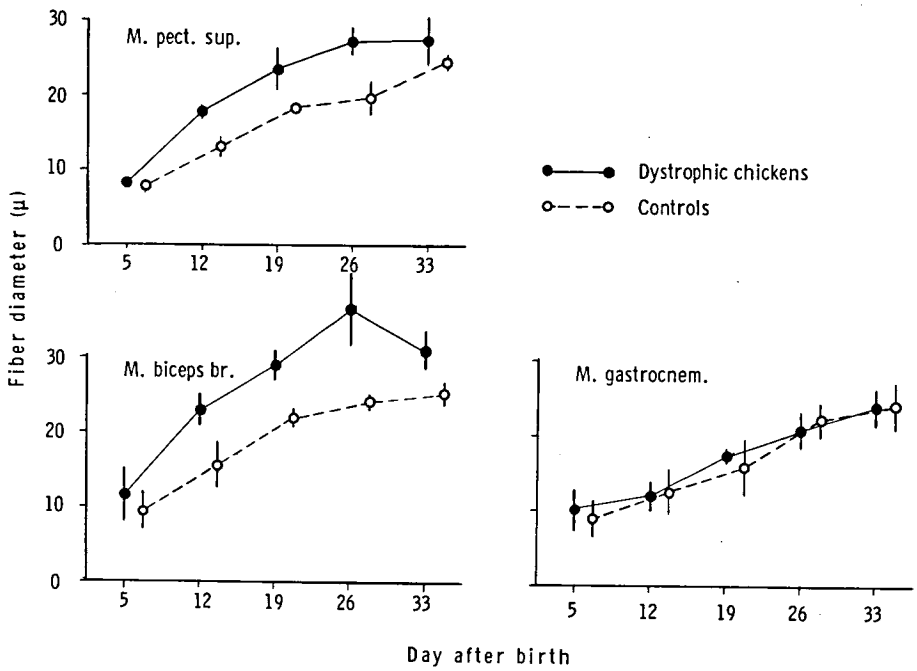


図1　Average diameter of muscle fibers in the pectoralis superficialis, biceps brachii and gastrocnemius muscle.

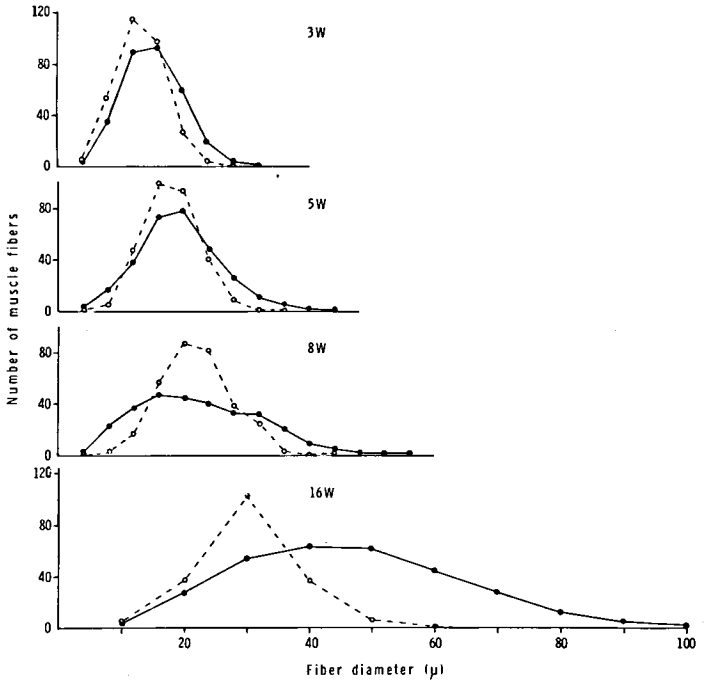


図 2　Megahistograms of fiber diameter in PLD.
Muscle diameters are distributed widely in dystrophics (solid line) comparing with controls (brocken line).

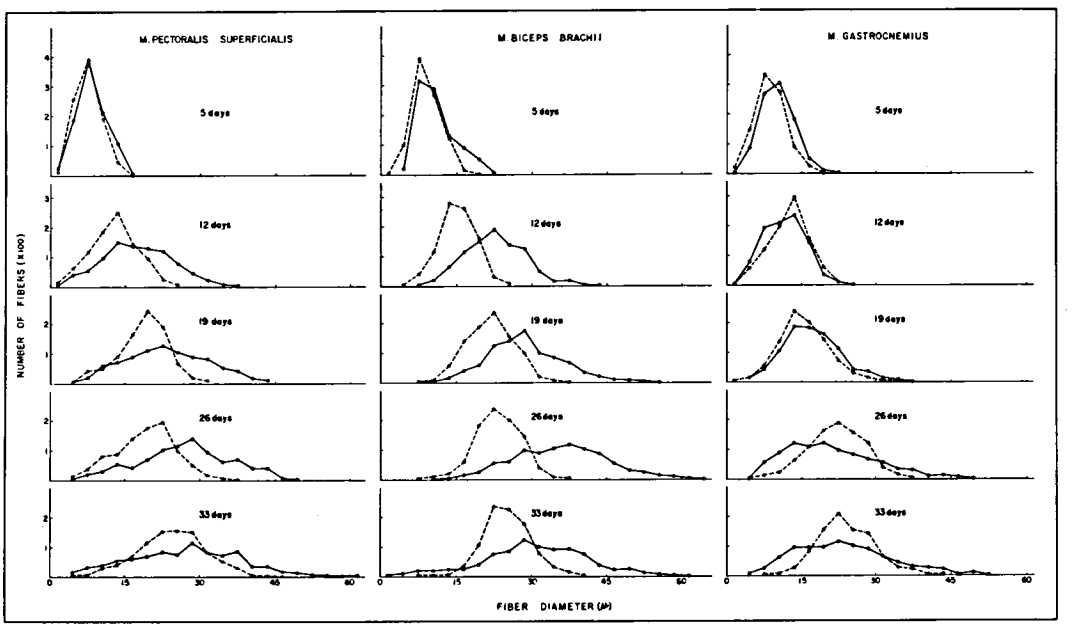


図 3　Megahistograms of fiber diameters in the pectoralis superficialis, biceps brachii and gastrocnemius muscle.
The muscle diameters of dystrophics (solid line) are distributed widely from the early stages in the former two muscles.

Dy チキン PLD では vacuolization, floccular degeneration, myophagia などの病変が認められるので，その出現頻度を知るべく，各動物の筋横断標本上にみられる病変筋線維数を数え，これを総線維数に対する百分率で算出した．その結果，3週，5週，8週目の病変筋出現率は夫々0.25±0.17%，1.22±0.75%，1.33±0.83%であり，16週目においては4.10±1.14%と増加したが，いずれも個体差が大きい．

考　　案

Dy チキンの罹患筋，特に浅胸筋や PLD は肉眼的肥大が著しいのみならず，個々の筋線維直径が著しく大きくなるものが少なくない．この筋線維肥大の成因としては，胞体内 microorganella の増加と，myoblast の付加的癒合による肥大とが考えられるが，Dy チキンにおいて activated satellite cell の著しい増加 (Yorita[4], 1979) が認められる点からすれば，肥大原因として myoblast の付加的融合が最も考え易い．PLD の総線維数が，変性の著しいふ化後8週目においてもなお，対照と差がないことは，活発な筋線維の再生とその融合に基づくものと想像される．

Dy チキン PLD の線維直径平均値の著しい増加は，他の罹患筋である浅胸筋や上腕二頭筋に比較して，はるかに遅延する結果がえられた．PLD で大径線維の出現もまた，上記の2筋に比べ，遅いようである．従って，発育期の同一時期で比較すれば，PLD の障害程度は浅胸筋や上腕二頭筋のそれよりも弱いといえよう．ふ化後8週目の Dy チキン PLD に認められた8 μ 以下の小径線維には，変性筋線維も再生筋線維も含まれていると想像されるが，今後の研究にまたねばならない．

ジストロフィー筋の変化は，一般に節性の変性と考えられるため，筋束横断面の変化をみて，変性の程度を判断することは無理であり，今回は PLD の変性程度を他の罹患筋のそれと比較することは出来なかった．今後，連続切片あるいは縦断面の検索により，節性の状態を明瞭にする必要があろう．

総　　括

Dy チキン PLD を計測した結果

1．総線維数はふ化後3週目にて約9,800本であり，ALD のそれの約2.5倍に相当するが，対照との間に有意差はない．以後5週，8週目とも減少傾向を示すが，ふ化後16週目にて対照に比し有意の減少を示した．

2．筋線維直径の平均値は，ふ化後8週目までは対照との間に差はなく，16週目で有意の増大を示した．また線維直径の分布からみれば，3週目から大径線維がみられ，5週，8週目では小径線維の増加もみられた．これらの結果を他の罹患筋と比較すると，発育期にあっては PLD の罹患程度は浅胸筋，上腕二頭筋よりも弱いと判断された．

文　　献

1) 黒岩義五郎，石本進士，後藤幾生，ほか：筋ジストロフィーチキンの発達過程における形態学的観察．筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究(第二班)，昭和53年度研究報告書，1979，p.21.

2) 埜中征哉，杉田秀夫：筋ジストロフィー鶏と人筋ジストロフィー症との対比—形態学的所見を中心に—．最新医学，35：907，1980.

3) Imaoka, K.: Morphometric and histochemical observation in developing muscles of dystrophic chickens. Yonago Acta medica., 23：106，1979.

4) Yorita, T.: Satellite cell and muscle regeneration in chicken muscular dystrophy. Yonago Acta medica., 23：63，1979.

3）筋ジストロフィー鶏骨格筋の組織学的研究
——αW線維における横管系の増殖性変化と空胞出現の意義——

埜中征哉*

研究協力者　岡田理美*

はじめに

筋ジストロフィー鶏の主病理所見はヒト筋ジストロフィーと同じく，筋線維の変性，壊死，それに続く再生の像である．ただヒト筋ジストロフィーと異なり，白筋が選択的に侵されること，筋線維内にしばしば空胞を認めること，過収縮線維（opaque 線維）がほとんど存在しないこと，Ca 染色陽性線維が存在しないことなどより，筋変性壊死の過程がヒトと鶏では異なるのではないかと考えられている[1)2)]．

さらに白筋では筋線維の分化の遅れが示唆されていて，筋ジストロフィー鶏では未分化なαR線維というαW線維へ転換する以前の線維が数多く存在すること[2)3)]はその一つの実証である．また筋線維内に存在する空胞は，ほとんど成熟型のαW線維に限ってみられ，この空胞は筋変性に関して何か大きな役割を果している可能性が示唆されている．我々は筋ジストロフィー鶏における空胞の意義について，筋線維タイプとの関連のもとで電子顕微鏡的に検討したので報告する．

対象・方法

対象としたのは孵化後2～4月の筋ジストロフィー鶏（line 413）とその対照鶏（line 412）である．白筋である浅胸筋（pectoralis superficialis）と後広背筋（posterior latissimus dorsi）をその検索の対象としたが，今回はαRとαW線維を明確に区別し易い後広背筋につき検討した．電子顕微鏡写真は全て後広背筋からのものである．

鶏骨格筋に存在する3種の筋線維（赤筋であるβR，白筋であるαR，αW）の個々の筋線維タイプと電子顕微鏡的特徴を検索するため次の方法で組織化学的所見と電子顕微鏡的所見を対比させた．採取した筋は直に relaxing solution（5mM EGTA, 4mM ATP, 4mM $MgSO_4$, 130mM K-methan sulfonate, 20mM Tris, 20mM maleate）（pH 6.8，イオン強度0.21M）内にて1本の筋線維をときほぐし，1本の筋線維はさらに2分割し，片方は鶏肝の小片の上におき凍結し，10μ厚さの横断切片を得た．切片には hematoxylin and eosin, NADH-TR, ATPase, PAS 染色を行い筋線維タイプを決定した．2分割した筋線維の残り半分はカコジレート Na 緩衝2.8%グルタール液にて固定，さらにランタナム加 OsO_4 液で1時間固定，アルコール脱水を行い，電子顕微鏡的に検索した．

後広背筋の一部は採取した直後に小切し，ブロックとして，同じくカコジレート Na 緩衝2.8%グルタール液にて固定，さらにランタナム加 s-collidine 緩衝2％ OsO_4 で一昼夜後固定，脱水，エポン包埋，電子顕微鏡観察を行った．

* 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

結　　果

(1)筋線維タイプの電子顕微鏡的特徴（図１）

a．浅胸筋

成鶏浅胸筋（正常対照）は98％以上が単一のαR線維よりなることは知られている．そのαW線維はＴ管がＺ線の高さを走っており，Ｚ線の幅は500～600Åと狭かった．

b．後広背筋

成鶏後広背筋（孵化後４月の正常対照）ではαR線維が21.2％でその残りがαW線維であり，βR（赤筋）はごく少数であった[2]．組織化学的にαW線維と決定された線維は横管がA-I結合部にあり，Ｚ帯幅は600-800Åであった．組織化学的には同じαW線維でも，浅胸筋と後広背筋のαW線維は電子顕微鏡的に大きく異なった．αR線維も横管がA-I結合上にあるが，Ｚ帯が800-1000ÅとαWより幅広いため両者は電子顕微鏡的に区別できた．またαR線維のミトコンドリアは大型のものが多く，２μ径を越えるものがしばしばであるが，αW線維では小型で２μを越えるものはみられなかった．

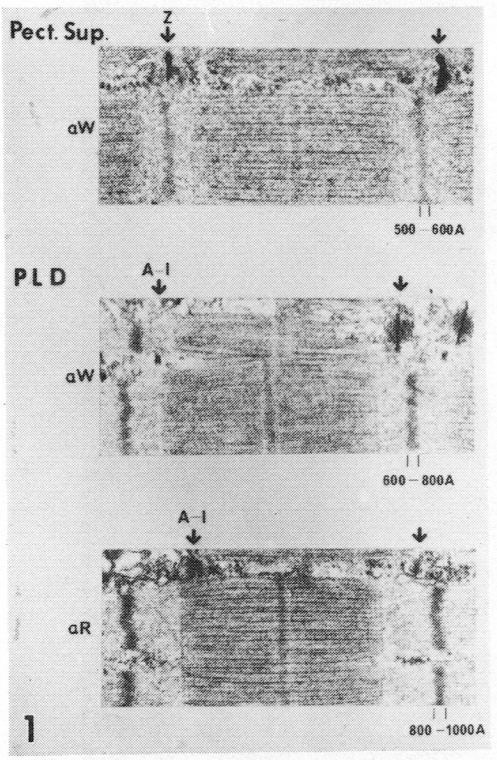


図１　浅胸筋（Pect. Sup.）のαW線維，後広背筋（PLD）のαW，αR線維の電子顕微鏡的特徴．説明本文．

赤筋（βR線維）はＺ帯の幅がさらに広く，1000Åを越えた．また横管は非常に不規則に走っており，白筋のような規則性はないが，大体A-I結合上に存在する傾向にあった．

(2)筋ジストロフィー鶏にみられる横管の異常

ランタナムを固定の時使用すると，それは横管系に入り，横管の異常を見出し易いといわれている．筋ジストロフィー鶏にみられる大きな変化は，横管の増殖性変化であった．

筋膜直下のcaveolaeは数を増し，しばしば蜂巣状構造（honeycomb structure）を形成していた．横管はその走行が不規則のものが増加し，縦走するものが多くみられ，横管そのものも数珠状になるなど形状の変化をみた．このような横管の異常はαW線維に限られており，αR線維はよく保たれていた（図２）．ただαR線維ではミトコンドリアは増加し，巨大化している傾向がみられた．

蜂巣状に増殖したcaveolae，横管は次に互に融合し，次第に大きな空胞となっていくと思われた（図３）．すなわち筋細胞内の空胞はこのような横管系の増殖性変化を初期基盤として起っていると考えられた．巨大化した空胞は，少量の膜状のもの，あるいは細い顆粒ないし線維状のものを入れていることもあるが，完全に何も入れていないことが多かった（多分固定，脱水で内容物が失われたため）．巨大空胞も筋膜下のcaveolaeと互に連結していたことから，それは横管系由来で筋細胞外と連絡していることがわかった（図４）．光学顕微鏡的に壊死に陥りつつある線維にはしばしば空胞が存在することから，この空胞は筋線維の変性・壊死と大きく関連していると思われた．電子顕微鏡的にも，空胞の膜の一部欠損，その近縁部のmyofilamentの走行異常，Ｚ帯の消失などmyofibrilの変性所見を

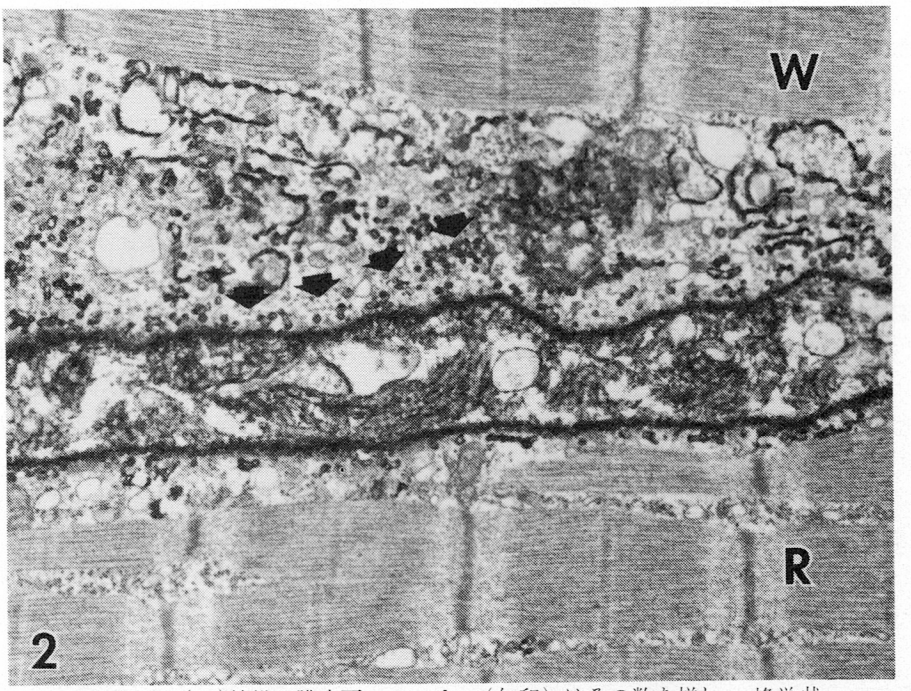


図2　αW(W)線維の膜直下のcaveolae（矢印）はその数を増し，蜂巣状となっている．横管は縦走するものが多く，それも数珠状となっている．αR(R)線維では横管系の異常はない．×20,000

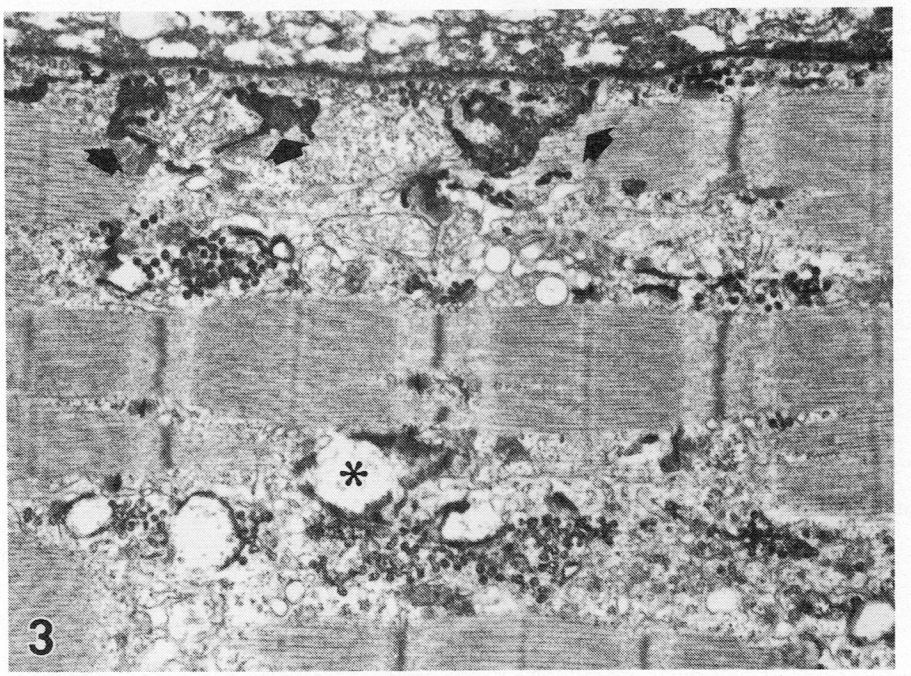


図3　Caveolaeは蜂巣状となり互に融合して次第に空胞を作りつつある（矢印）．かなり大きな空胞（星印）壁にもランタナムが存在し，これが横管由来であることを示している．×20,000

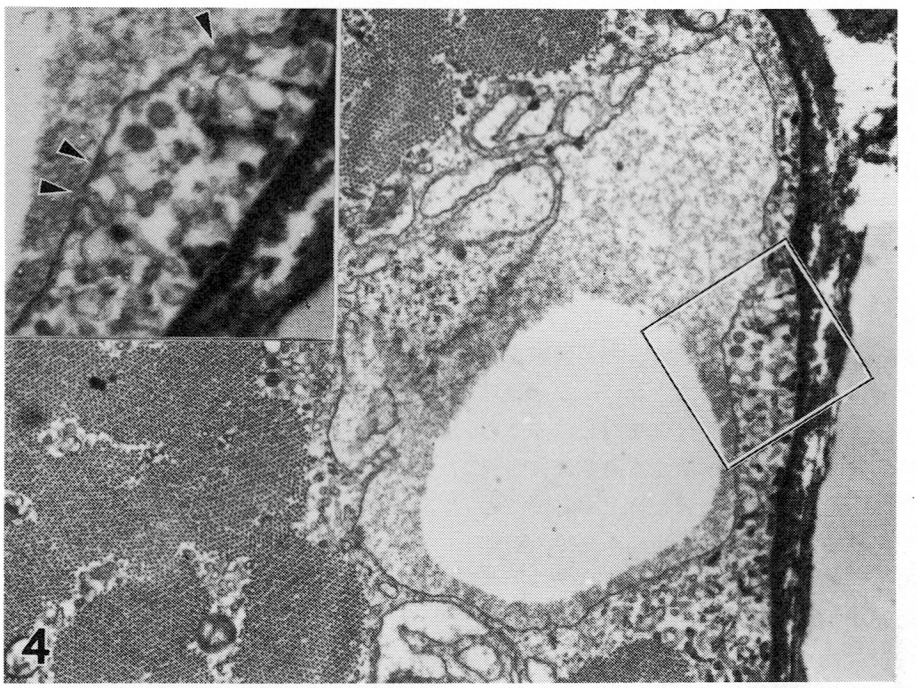


図4　筋膜下にある大きな空胞の壁はcaveolaeと明らかに連結（挿入部矢頭）していて，空胞が細胞外と交通していることを裏づけている．×20,000，×40,000（挿入）

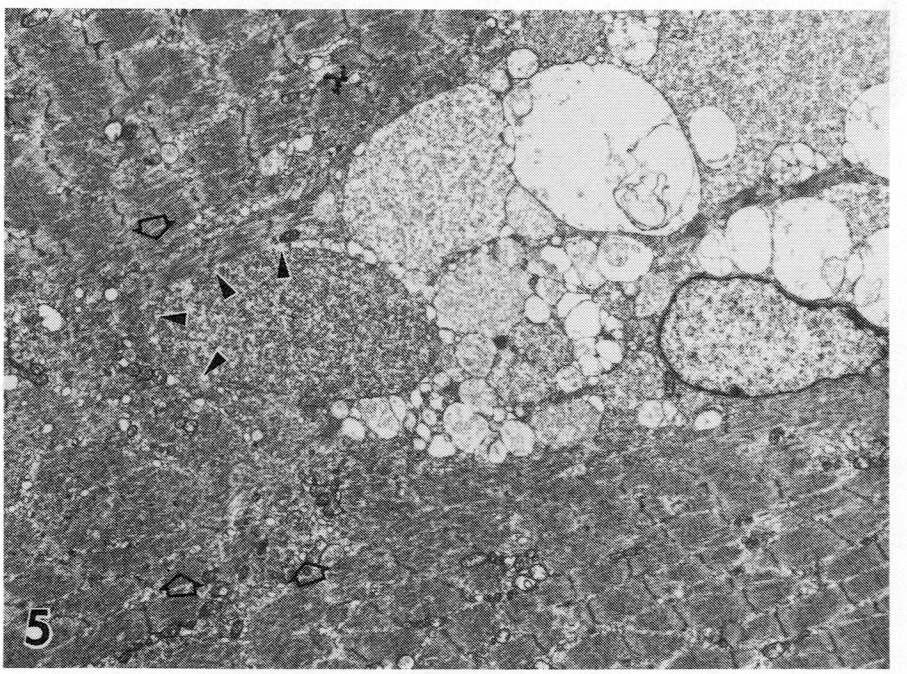


図5　空胞の一部は明らかに膜が欠損（矢頭）しており，その近辺のmyofibrilはZ帯の消失や走行の乱れ（矢印）を示す．×6,000

得た（図5）.

次に電子顕微鏡でみられるのは，完全に壊死に陥った筋線維でこれには多数の貪食細胞を入れていた．このような終末的所見からは空胞と筋変性の関連はもはや推定され得なかった．再生線維の存在も電子顕微鏡的所見より確かめられた．

考　　察

筋ジストロフィー鶏の骨格筋の変性過程はまだ充分に明らかにされていない．なぜ白筋のみが侵されるのか，またなぜ同じ白筋でも浅胸筋，後広背筋，下肢筋では侵され方が異なるのか，そのような問題を解決する試みとして今回は筋線維タイプと病変の発現の関連性を追求して実験を行った．

組織化学的には鶏の白筋は αR と αW の2種の筋線維に分けられている[2)3)]．前者はNADH-TR や SDH 染色などでやや大型の diformazan 顆粒をもち PAS 陽性物質に乏しく，phosphorylase 活性の低いことで特徴づけられるが，ATPase 染色では αR と αW 線維は区別できない．αR 線維は発育過程における αW 線維の前段階の線維といわれ，浅胸筋では孵化当時 αR 線維であったものが2～3週令までに αW 線維へと変換する．後広背筋ではその変換は遅れ成鶏でも20%内外の αR 線維が存在し，下肢筋では白筋の約半数は αR 線維である．光学顕微鏡では同じ線維タイプでも，浅胸筋と後広背筋では電子顕微鏡的に構造上かなり異なっていることが明らかとなった．

筋ジストロフィー鶏では，この αR 線維が αW 線維へと変換してから筋ジストロフィーとしての筋変性・壊死の所見が出現するのではないかといわれている[3)4)]．今回の実験からは初期変化として出現する横管系の異常は αW 線維に限られていることが電子顕微鏡的にも確かめられた．αR 線維は mitochondria の数の増加と巨大化が目立つ所見であった．

αW 線維にみられる横管系の異常とは主としてその増殖性変化である．筋膜下に配列する caveolae を含め横管は盛んに蜂巣状構造（honeycomb structure）を作り，新しい横管の形成とともに，蜂巣構造物は融合して一つの空胞となる．空胞は単に融合によるだけでなく，多分何らかの機序により次第にその大きさを増し，数ミクロンあるいは10ミクロン径を越えるような巨大なものに到ると考えられる．この空胞は膜でかこまれていて，筋形質とは自由に交通はしていない．空胞が膜直下の caveolae と連絡している図4はこの空胞が細胞外と交通していることを物語っている．これら空胞が横管系由来であろうことは，tracer を使った研究や freeze fracture 法による研究によっても確かめられている[5)6)]．

空胞は筋細胞外腔と交通していることから，細胞外液で満たされていると思われる[6)]．もし空胞の膜の一部が欠損でもすれば，外液が細胞内に流入することになる．外液には Ca^{++} が高濃度に含まれているので，細胞内の Ca 依存性中性プロテアーゼ（CANP）のような酵素が高 Ca 濃度下で活性化され，Z 帯の消化にはじまる myofibril の崩壊をひき起すと考えられる．部分的な筋の崩壊はついで大きな壊死部を作り，そこには貪食細胞が侵入して清掃が行われ，さらに筋再生へとつながるのであろう．

文　　献

1) Mendell, J.R., Higgins, R., Sahenk, Z., et al.: Relevance of genetic animal models of muscular dystrophy to human muscular dystrophies. Ann. N. Y. Acad. Sci., 317：409, 1979.

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，3：259, 1979.

3) Ashmore, C.R. & Doerr, L.: Postnatal development of fiber types in normal and dystrophic skeletal muscle of the chick. Exp. Neurol., 30 : 431, 1971.
4) Beringer, T.: Sterologic analysis of normal and dystrophic avian αW fibers. Exp. Neurol., 61 : 380, 1978.
5) Malouf, N. N. & Sommer, J. R.: Chicken dystrophy. The geometry of the transverse tubules. Am. J. Pathol., 84 : 299, 1976.
6) Libelius, R., Jirmanova, I., Lundquist, I., et al.: T-tubule endocytosis in dystrophic chicken muscle and its relation to muscle fiber degeneration. Acta Neuropathol. (Berl.), 48 : 31, 1979.

4）ジストロフィーチキンにおけるactivated satellite cellについて(II)
——電顕ラジオオートグラフィーによる観察——

小　口　喜三夫*

研究協力者　永　田　哲　士**

昭和54年度の本班会議で ^{3}H-thymidine（^{3}H-TdR）の光顕ラジオオートグラフィーの研究から，^{3}H-TdRを取り込む(DNAが合成されているS期の細胞であることを示す) satellite cell，すなわちactivated satellite cellがジストロフィーチキンふ化後21日目の大胸筋の表在筋において正常コントロールより増加していることを報告[1]した．今回は電顕ラジオオートグラフィーによりactivated satellite cellの微細構造を検索することを目的とした．

方　　法

材料はジストロフィーチキン（dy-チキン），line 413とコントロールチキン（cont-チキン），line 412のふ化後1日目と21日目の各々2羽ずつ合計8羽の大胸筋を用いた^{3}H-TdRを6時間毎に4回，50～67μCi/gbwを腹腔内に注射した．最終注射6時間後に屠殺し，直ちに大胸筋を採取，カコジル酸緩衝3％グルタールアルデヒドで20分間固定，カコジル酸緩衝液中にて24時間洗滌後1％オスミウム酸で1時間30分後固定を行い，アルコールとプロピレンオキサイドで脱水処置後，epon-aralditeに包埋した．厚さ500～800Åの超薄切片を作製し，wire-loop法[2]によりSakuraNR-H_2を適用し，60～90日間4℃の冷蔵庫内で露出した．Gold-latensificationにより増感しphenidon現像液で現像し定着を行った後クエン酸鉛（Reynolds）にて染色した．日立HS・9型電顕で観察した．

結　　果

dy-チキンおよびcont-チキン共にgold-latensification-phenidon現像により^{3}H-TdRが取り込まれた核には，球形の銀粒子の標識が観察された．銀粒子の最大飛程は約1 μmであった．^{3}H-TdRにより標識された核の形態は，球形のものから楕円形(図1)まであり，核膜の凹凸のみられるものもあった(図2)．核内のheterochromatinの量は多いものから，比較的少ないものまで種々であり，また染色体に標識された核分裂の状態のものも観察された(図3)．^{3}H-TdR標識核の細胞質の形態は，細胞質の少ないもの(図1)から，細胞質が多くpolysomes，粗面小胞体，mitochondriaが認められるものまで観察された（図2）．Activated satellite cellの細胞質と筋細胞との間の形態は，両者の形質膜で境されているものが殆どであったが（図1），一部のactivated satellite cellで筋細胞の形質膜とsatellite cellの形質膜間隙が狭まり，格子様構造の形態を示すものが観察された（図3，挿入図矢印）．dy-チキンとcont-チキンにおけるactivated satellite cellの微細構造上の形態的変化の差は認められなかった．

＊信州大学医学部第三内科
＊＊信州大学医学部第一解剖

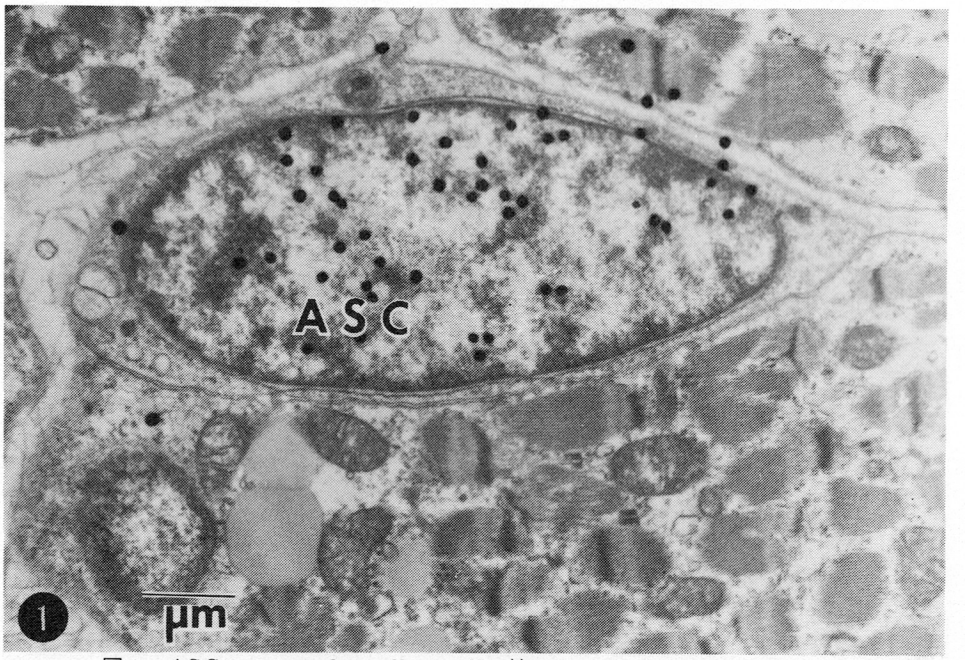


図1　ASC：activated satellite cellの核.
基底膜を共有し，筋細胞とは形質膜で境されている．核上に銀粒子の標識がみられる．

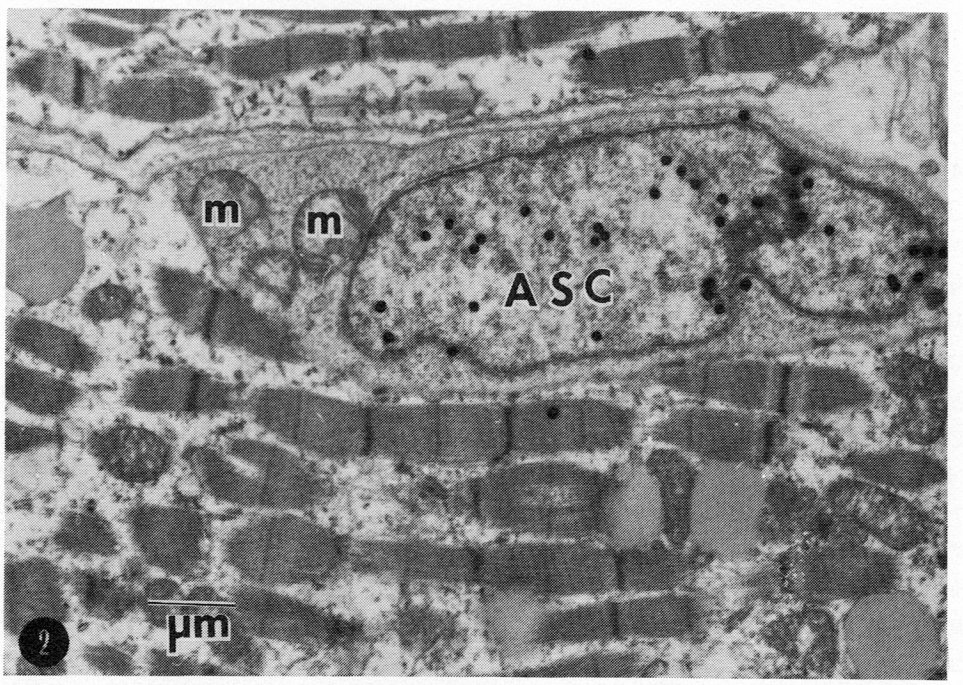


図2　ASC：activated satellite cellの核．m：ミトコンドリア．
核上に銀粒子の標識がみられる．核膜に凹凸がみられ，細胞内にミトコンドリア（m）が認められる．

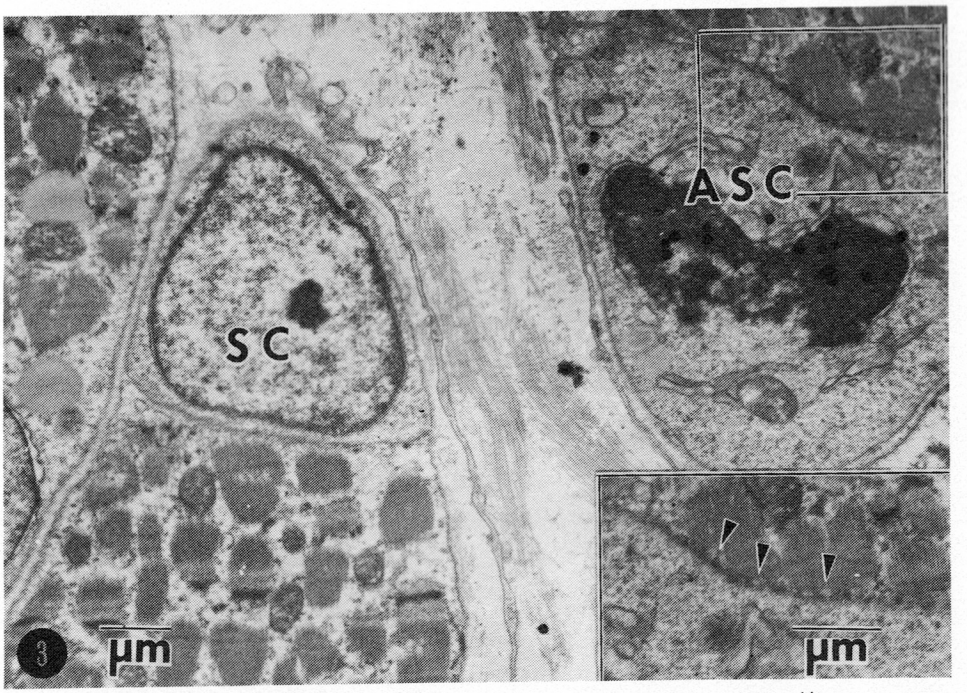


図3　ASC：activated satellite cellの核．SC：satellite cellの核．ASCは核分裂を示している．染色体上に銀粒子の標識がみられる．挿入図の矢印に示す如く，筋細胞の形質膜と activated satellite cell の形質膜が接着し格子様構造が認められる．

考　　察

Moss ら[4]は生後17日のラットを使用して，^{3}H-TdR を25～60μCi/gbw を投与し，投与後1時間から72時間後に屠殺し，その腓骨筋を使用して電顕ラジオオートグラフィーを行い^{3}H-TdR 注射後1時間で基底膜内の核の約3％が標識され，これらは総て satellite cell であったと報告している．彼等は注射後24時間では^{3}H-TdR で標識された筋核が小数出現し，48時間では増加，72時間では satellite cell より多くなっており，satellite cell はラットの成長と共に分裂し，myoblast としての機能を持つと結論した．さらに Moss ら[5]は同様の実験から，satellite cell は DNA 合成能を持つこと，^{3}H-TdR 投与後1時間と24時間の標識された核数を比較すると24時間後では2倍になっていることから satellite cell が分裂することを確認し，分裂後に satellite cell は筋細胞に取り込まれ筋核となることを証明した．

今回の我々の電顕ラジオオートグラフィーの結果は，6時間毎に4回^{3}H-TdR を腹腔内に注射し最初の注射から24時間後屠殺し，dy-チキンおよび cont-チキンの大胸筋を検索したが，筋核に^{3}H-TdR が取り込まれたことは観察し得た限りではなかった．^{3}H-TdR で標識された activated satellite cell の核の heterochromatin の分布や量には特別な特徴は見出されなかった．^{3}H-TdR を取り込んだ時期は細胞周期のS期に相当すると考えられるが，小数の核では組織を採取した時期にM期に移行していたと思われ，核分裂の像（図3）も観察された．その所見は Moss ら[5]が指摘した分裂を示すものに相当すると考えられる．

Activated satellite cell の形質膜と筋細胞

の形質膜の形態に注目すると，多くの場合両者の形質膜に変化を認めず，両者の形質膜間隙は約300Åであったが，一部に図3に示す如く両者の間隙が接近あるいは接着し格子様構造が認められたことは，activated satellite cellが筋細胞への取り込みを示す所見と考えられる．この格子様構造はS期，M期のactivated satellite cellに認められた．又activated satellite cellの細胞質内細胞小器官，すなわち，polysome，粗面小胞体，Golgi装置，mitochondria等の形態および増減とその格子様構造との間に特別の関係は認められなかった．

結　　語

1）静止状態のsatellite cellとactivate satellite cellの鑑別は電顕でも不可能であるが，電顕ラジオオートグラフィーによりactivated satellite cellの同定は容易にできた．

2）activated satellite cellが筋細胞に取り込まれる所見が得られた．

文　　献

1）小口喜三夫，永田哲士：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―．厚生省「筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究」昭和54年度研究報告書，1980，p.37.

2）Yoshida,K., Murata, F., et al : A modified wire-loop method for quantitative electron microscopic radioautography. Histochemistory, 57 : 93, 1978.

3）村田長芳，永田哲士：LIGOP法：電顕ラジオオートグラフィーの新しい現像法の経験．医学のあゆみ，113 : 896, 1980.

4）Moss F. P. & Leblond C. P. : Nature of dividing neuclei in skeletal muscle of growing rats. J. Cell Boil., 44 : 459, 1970.

5）Moss F. P. & Leblond C. P. : Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. Anat. Rec., 170 : 421, 1971.

5）ジストロフィーチキン筋細胞膜のフリーズ・フラクチャーによる観察

高　守　正　治*

研究協力者　吉　村　俊　朗*　辻　畑　光　宏*

近年，筋ジストロフィー症で赤血球[1]や筋細胞の膜異常[2]が注目されている．そこで，dystrophy chickenの胎生期から孵卵開始後30日目までを対象にし，筋細胞膜内のparticleの減少がどの時期に認められるのかを，Freeze-Fracture法で検討してみた．

方　法

Dystrophy chickenとcontrol chickenの孵卵開始後，10日（dystrophy 3羽，control 3羽），20日（dystrophy 3羽，control 2羽），30日（dystrophy 1羽，control 1羽）のそれぞれの大胸筋を用いた．筋線維の横断の凍結切片をつくり，HE染色したものを，光学顕微鏡400倍で，筋線維の直径を測定し，Histogramを作成した．Freeze-Fracture用標本は，3％グルタールアルデヒドで，4時間固定後，徐々に30％グリセリンまでに濃度をあげ，4℃で1晩保存後，簡易形フリーズ・エッチング装置を用いて−103℃，1～3×10^{-6}Torrの条件下で割断し，白金パナジウムで蒸着し，レプリカ膜を作製した．最終倍率189,000倍で，3 cm×3 cmのparticleの数を数え，caveolaeは，同じ拡大率で，15cm×15cmの面積のcaveolaeの数を求めた．particleとcaveolaeは，それぞれ1 μm^2当りの密度を計算して求めた．particleはおおよそ，5～20μm大の数を数えた．孵卵開始後10日目の大胸筋は，3％グルタールアルデヒドで，4時間固定ののち，2％オスミウム酸で後固定し，酢酸ウラニールで染色後，エポン包埋した．超薄切片を作製し，酢酸鉛で染色し観察した．

結　果

孵卵開始後10日目の大胸筋では，図1に示すように，HE染色で胞体が染まらない核のみの細胞と，Eosinに染まる胞体をもつ細胞との2種類の細胞で構成されている．電子顕微鏡でみると，大部分が核でしめられ，胞体の少ない細胞と胞体があるものでは，myofilamentの出現が認められる．HE染色で核のみにみえたものは，myoblast，胞体を有するものはmyocyteもしくはmyotubeに相当するものである．この時期の筋細胞の直径は，胞体のあるmyocyteの直径を測った．

表1に示すように，孵卵開始10日目では，

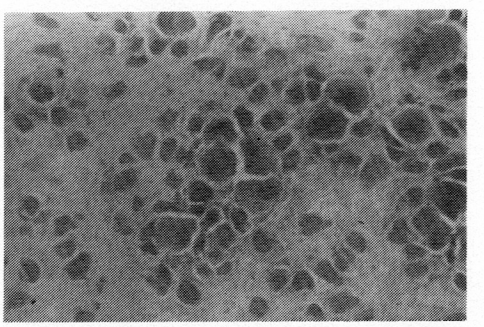


図1　孵卵開始後10日目のdystrophy群の大胸筋のHE染色．胞体が染まらない核のみの細胞（myoblast）と胞体を有する細胞（myocyteもしくはmyotube）が混在している．（700倍）

＊長崎大学医学部第一内科

表1　筋細胞の平均直径（／μm）

	10days	20days	30days
Control	9.2±3.1 n＝135	5.0±1.8* n＝317	5.3±1.6* n＝104
Dystrophy	9.3±2.7 n＝148	5.9±1.9* n＝445	7.4±2.9* n＝228

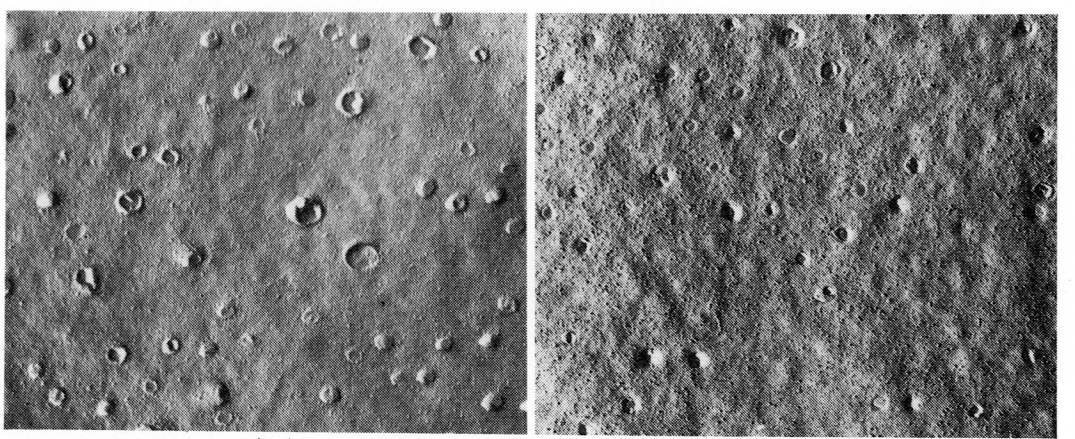
* Significantly different（p ＜0.001）

control 群と dystrophy 群ともに9.2μm と9.3μm で有意差は認められなかった．孵卵開始20日目になると，control 群5.0μm に対し，dystrophy 群は，5.9μm と筋直径が大きくなっている．孵卵開始30日目では，control 群5.3μm に対し，dystrophy 群は，7.4μm と筋細胞の肥大が認められた．

図2には，孵卵開始30日目の dystrophy 群のP面とE面を示す．この写真で認められるような particle と caveolae の数を数えた．表2にその結果を示す．孵卵開始10日目は，E面の particle は，control 群200/μm²，dystrophy 群160/μm²，P面では control 群370/μm²，dystrophy 群360/μm²と，control 群と dystrophy 群の間に統計的に有意差を認めなかった．孵卵開始後20日目になると，E面の particle は control 群で，650/μm²，dystrophy 群で540/μm²と減少し，P面も同様に control 群870/μm²，dystrophy 群740/μm²と減少を示した．孵卵開始30日目では，E面の particle 密度は，control 群で970/μm²，dystrophy 群で670/μm²と減少し，さらにP面でも，control 群1440/μm²，dystrophy 群1,100/μm²と dystrophy 群で particle 密度の減少が認められた．

さらに，particle の密度はP面とE面で比べてみると，孵卵開始10日，20日，30日でいずれも，P面に多く，E面の particle 密度は，P面の particle 密度の平均6割に相当する．particle の密度は孵卵開始後，10日，20日，30日と成長とともに増加していく．

Caveolae の密度は，孵卵開始後10日目で，E面では control 群で3.0±3.5/μm²，dystrophy 群で1.0±1.0/μm²，P面では，control 群で3.0±2.0/μm²，dystrophy 群2.0±1.7/μm²と有意差はなく，孵卵開始20日目でもE面は，control 群6.9±6.0/μm²，dystrophy 群7.2±5.3/μm²，P面では control 群7.2±5.2/μm²に対し，dystrophy 群6.9±4.4/μm²で統計的な有意差は生じなかった．さらに孵卵開始30日目では，E面で control 群21.8±11.7/μm²，dystrophy 群15.7±7.0/μm²，P面で control 14.9 ± 9.2/ μm²，dystrophy 13.0 ± 7.6/ μm² といずれの時期にも，cave-



（a）　（b）

図2　孵卵開始30日目の dystrophy 群のE面(a)とP面(b)　（36,750倍）

表2　Particle density（実測値）

	E face（／μm²）		P face（／μm²）	
	Control	Dystrophy	Control	Dystrophy
10 days	200±130 n ＝74	160± 90 n ＝62	370±170 n ＝85	360±140 n ＝87
20 days	650±250 n ＝83	540±280* n ＝81	870±220 n ＝86	740±300** n ＝106
30 days	970±280 n ＝49	670±200** n ＝45	1440±260 n ＝38	1100±320** n ＝51

* Significantly different（$p<0.01$）
** Significantly different（$p<0.001$）

olaeの密度には，有意差は生じなかった．しかし，孵卵開始後，成長とともにcaveolaeの密度は増加している．

考　　按

Freeze-Fracture 法は，細胞を凍結割断して割断面に出現した構造に重金属で陰影をつけ，薄い炭素の被膜とともに観察し，細胞膜内部構造をみようとする方法である[3]．細胞凍結試料中の膜は，自然の状態において最も抵抗の弱い連続的な層（脂質二重層）にそってへき開され，細胞膜の内面が割断面上に露出されることになる[4]．そこで，dystrophy chicken の大胸筋筋細胞膜において，particle（膜内粒子）と caveolae の変化をみる方法として，Freeze-Fracture 法は利用できる．現在までに，この方法によって，particle の密度に差があったとする報告[5]がある．ところが，particle の密度は報告書により様々で，dystrophy 群が，control 群に比べ増加しているとの報告も減少しているとする報告もある．その原因として，一つは凍結割断から，重金属で陰影をつけるまでの間の artifact の関与も考えられる．また，Freeze-Fracture 法は，あくまでも影の観察であり，どのような状態の細胞の細胞膜かも問題となる．表1で示したように，dystrophy 群は，control 群に比べ，筋細胞直径は孵卵開始20日目で1.2倍，30日目で1.4倍になっている．筋線維を幾何図形の円柱にたとえると，筋細胞表面積は筋細胞の直径に比例することになる．単に筋線維が肥大したために，particle の密度が減少してみえると考えれば，dystrophy 群の particle 密度をその筋直径の比，1.2と1.4で補正することができる．表3にその補正値を示す．20日目のE面は，dystrophy 群は，630/μm²となり，control 群の650/μm²とその差はなくなる．またP面も dystrophy 群は860/μm²となり control 群870/μm²と差はなくなる．

30日目のE面においても，dystrophy 群は910/μm²となり，control 群970/μm²と有意差がなくなり，P面では dystrophy 群が1490/μm²となり，control 群1440/μm²と有意差がなくなる．

表3　Particle density（補正値）

	E face（／μm²）		P face（／μm²）	
	Control	Dystrophy	Control	Dystrophy
20days	650±250	630±330	870±220	860±350
30days	970±280	910±270	1440±260	1490±460

Caveolaeについても，同様のことが成立するはずである．孵卵開始20日目のE面は，dystrophy群で8.2±6.3/μm^2となり，control 6.9±6.0/μm^2との差は生じないし，P面も同様にdystrophy群8.1±5.2/μm^2，control群7.2±5.2/μm^2となり，有意差は生じない．孵卵開始30日目ではE面でdystrophy群22.0±9.9/μm^2，control群は21.8±11.7/μm^2，P面はdystrophy群18.7±10.0/μm^2，control群14.9±9.2/μm^2となり，dystrophy群とcontrol群との間にいずれも統計的に有意差を生じない．これは，caveolaeも，189000倍の最終倍率で，15cm×15cmの面積のcaveolaeの数を算出し，しかも，その対象となった数が少ないことが統計的に有意差が生じなかった原因と考えられ，広い面積で，もっと多くの症例を検討すれば，caveolaeに関しても，particleと同様の結論になる可能性も否定できない．

問題点として，長さも変化する筋線維を円柱として仮定したうえでの計算であることがあげられる．さらに，対象とした大胸筋の筋直径は**表1**に示すように，5～9 μmと小さく400倍の倍率での測定はより多くの誤差が生じやすいことと，対象となったchickenの数がそれぞれ1羽から3羽と数が少ない点などが考えられる．

Particleの密度が筋直径で補正されることで統計的に有意差がなくなった．このことは，筋細胞膜内のparticleの密度の減少が，筋ジストロフィー症での筋肥大にともなって生じた変化である可能性を示唆することになる．しかし，対象となった筋細胞は20日と30日の2種類のみで，偶然に，数字が一致しただけかもしれず，今後さらに検討を要する問題である．

まとめ

(1) Dystrophy群の筋細胞膜内particleの密度の減少が，孵卵開始20日で認められた．

(2) 筋細胞内particleの密度とcaveolaeの密度は，chickenの発育とともに多くなっていく．

(3) 筋線維直径の差は孵卵開始20日頃より生じている．

文献

1) Wakayama, Y., et al: Alteration in erythrocyte membrane structure in Duchenne muscular dystrophy. Ann. Neurol., 4：253, 1978.

2) Schotland, D.L.,et al: Application of the freeze fracture technique to the study of human neuromuscular disease. Muscle & Nerve, 3：21, 1980.

3) Koehler, J. K.,: Advanced techniques in biological electron microscopy. Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1973, p.67.

4) Branton, D.,: Fracture faces of frozen membranes. Proc. N. A. S., 55：1048, 1966.

5) Brian, R., et al.: Freeze-Fracture study of muscle plasmalemma dystrophic chickens. Muscle & Nerve, 2：191, 1979.

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(2)
——アセチルコリンエステレース及びカテコラミン染色による検討——

塚越　廣*

研究協力者　小林高義**　栢沼勝彦**
半田康延***　志水義房***

昨年の班会議で，骨格筋を単独培養した場合は，筋ジストロフィー(以下筋ジスと略す)筋は正常筋に比し早く変性崩壊すること．交感神経節の単独培養では，筋ジス，正常との間に差を認めないこと．さらに，筋と交感神経節を併置培養した場合は，筋は単独培養より長期間維持されること．しかし，筋ジス筋では正常ならび筋ジス交感神経節のいずれの併置培養でも，正常筋単独培養に比し早く変性崩壊することなどを報告し，交感神経は骨格筋に対し trophic effect をもってはいるが，筋ジス筋の変性は筋自身の問題が大きいことを指摘した[1]．今回は，筋と交感神経の相互関係をみるために，筋腹に存在する acetylcholinesterase (以下 AChE と略) 活性の微細な構造をみる目的で，AChE 染色ルベアン酸増強法を適用すると共に合わせて catecholamine (以下 CA と略す) 染色を行い，CA 含有細胞，CA 陽性線維との関係を検索した．

実験方法

正常及び筋ジス鶏胚11日目 (Line412及び413)の大胸筋を実体顕微鏡下に無菌的に取り出し，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日目の正常及び筋ジス鶏胚から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，併置培養する場合には，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培養，ならびに相互に併置して培養する組み合わせを以下の如く作成した．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，Eagle's MEM with Hanks' salts80%，馬血清 15%，Embryo juice (鶏胚9日目) 5%，penicillin G200u/ml (glucose 5 g/l 含有，$NaHCO_3$ で pH 調整) を使用し，週3回培養液を交換した．倒立位相差顕微鏡で経時的観察を行い，同時に Bodian 鍍銀染色，AChE 染色として，Karnovsky-Roots 変法 (buffer pH5.0) を用いた．さらに AChE 活性の微細な構造をみる目的で，反応産物の拡散防止のための寒天による被覆と，copper ferrocyanide をルベアン酸により黒化させるルベアン酸増強法 (中村，1979) を行った．また CA 染色として，FGS 法及び glyoxylic acid 法 (Furness & Costa, 1975) を行った．

＊東京医科歯科大学医学部神経内科
＊＊信州大学医学部第三内科
＊＊＊信州大学医学部第二解剖

実験結果

表1に，交感神経の培養骨格筋に対する影響に関する実験のまとめを示した．

筋単独培養では，explant より筋細胞が放射状に伸び出していくのに対し，併置培養では，いずれの組み合わせでも両 explant 間に筋細胞が密に走り，その間に神経線維が走る bridge が形成される．以下主としてこの bridge 部における AChE 及び CA 染色所見について述べる．

〔AChE 染色〕

いかなる組み合わせでも，培養1～2週頃に，Karnovsky-Roots 変法による AChE 染色で，bridge 部の筋腹に数 μm～十数 μm の点状あるいは線状の AChE 活性を認める（図1-A）．一方，ルベアン酸増強法では，Karnovsky-Roots 変法に比べ，より鮮明に AChE 活性が抽出される．この方法では，図1-B～Eの如く，三日月状あるいは核をとりまいて半円状の AChE 活性が認められた．培養3～4週には，この AChE 活性部位は，更に筋の explant 内及び explant より放射状に伸び出している筋細胞の筋腹にも multiple に認められた．しかし，筋ジス筋と交感神経節の併置培養では約4週以降より筋細胞が変性崩壊を示し始め，AChE 活性部位の拡散が認められたが，正常筋の併置培養では，6週以降でも維持された．

〔CA 染色〕

FGS 法では，正常，筋ジス交感神経節培養のいずれの場合でも，explant 内の大型神経細胞及び遊走した小型神経細胞の胞体内に CA 陽性の螢光を発する顆粒を認めたが，交感神経線維には，はっきりした螢光を認めなかった．一方 glyoxylic acid 法では，大型神経細胞及び小型神経細胞の胞体内に螢光を認める（図2-A，C）と共に，explant より放射状，網目状に伸び出している交感神経線維に CA 陽性の螢光を認めた（図2-B）．一方，筋と交感神経節の併置培養では，両 explant の bridge 部で，一部に筋細胞に沿って，螢光を発する神経線維が認められる（図2-D）のみで，Bodian 鍍銀染色で，多くの密に走る神経線維が存在する（図2-E）にもかかわらず CA 染色で螢光を発する線維は極めて少数であった．このような現象は，筋と交感神経のいずれの組み合せでも同様であった．

表1　交感神経の培養骨格筋に対する影響

組み合わせ	培養所見	AChE染色	catecholamine 染色	
			交感神経細胞	交感神経線維
A正常大胸筋のみ	5週頃より変性	(−)		
B筋ジス大胸筋のみ	3週頃より変性	(−)		
C正常交感神経節のみ	6週以上維持	(−)	(+)	放射状，網目状に(+)
D筋ジス交感神経節のみ	〃	(−)	(+)	〃 (+)
E正常大胸筋＋正常交感神経節	〃	(+) multiple	(+)	一部の神経線維に(+)
F正常大胸筋＋筋ジス交感神経節	〃	(+) 〃	(+)	〃 (+)
G筋ジス大胸筋＋正常交感神経節	筋は4週以降変性	(+) 〃	(+)	〃 (+)
H筋ジス大胸筋＋筋ジス交感神経節	〃	(+) 〃	(+)	〃 (+)

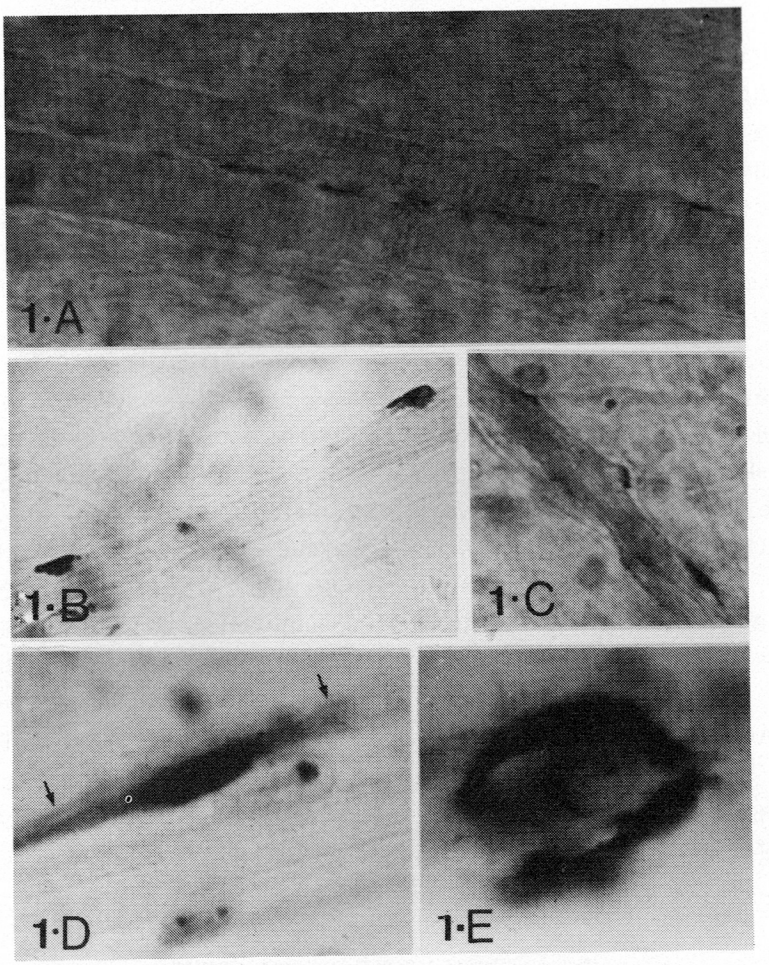


図1　AChE染色顕微鏡写真

A．正常筋21日目，正常交感神経節19日目併置培養．横紋形成した筋の筋腹にmultipleにAChE活性を認める．AChE染色（Karnovsky-Roots変法）．×640

B．ジストロフィー筋14日目，ジストロフィー交感神経節12日目併置培養．

C．ジストロフィー筋14日目，正常交感神経節12日目併置培養．

D, E．正常筋7日目，正常交感神経節5日目併置培養．

B～E　AChE活性が，三日月状あるいは，核をとりまくようにして半円状に筋腹上に認められる（矢印は交感神経線維束を示す）．B, C×640，D, E×1,600

AChE染色（ルベアン酸増強法，中村）

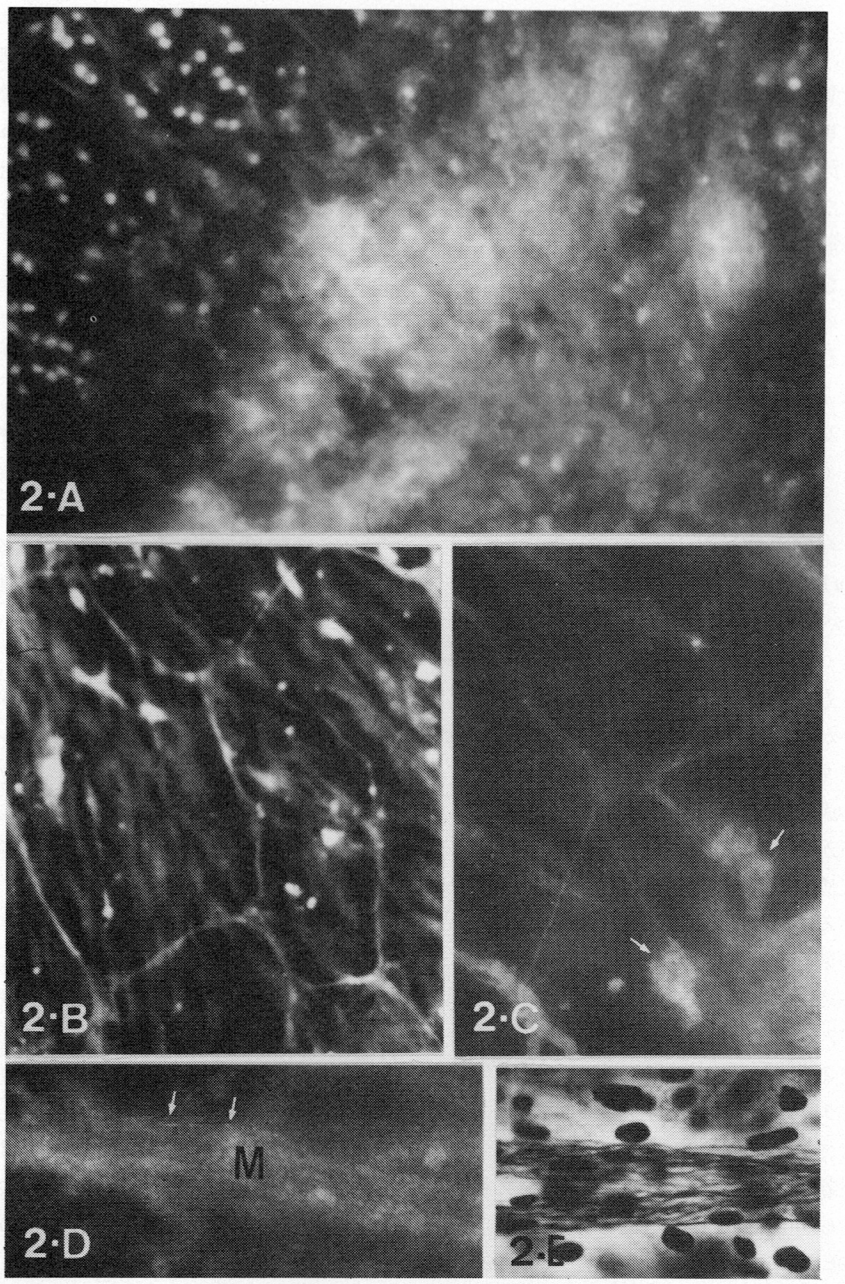


図2　カテコラミン染色螢光顕微鏡写真

A～C　ジストロフィー交感神経節単独培養13日目．　A．explant内の交感神経細胞の胞体に，カテコラミン陽性の螢光を認める．×150　B．explantより放射状，網目状に伸び出している交感神経線維に，カテコラミン陽性の螢光を認める．×150　C．explantより遊走した小型神経細胞（矢印↓）の胞体内に，カテコラミン陽性の螢光を認める．×300　D．ジストロフィー筋17日目，正常交感神経節15日目併置培養．筋細胞（M）に平行に走っている交感神経線維の一部に，カテコラミン陽性の螢光を認める（矢印）．×340　E．ジストロフィー筋30日目，正常交感神経節28日目併置培養．Dに比し，鍍銀染色で多数の交感神経線維が，筋細胞に沿って併走している．×270
A～D　カテコラミン染色（glyoxylic acid法，Furnes & Costa）　E．Bodian鍍銀染色

考　　察

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によって，単独培養した場合に比べて長期に維持され，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 な影響のあることを示した．更にその筋腹上にはボタン状あるいは数珠状の膨みをもった神経終末が認められ，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，組織化学的に交感神経が骨格筋に対し cholinergic の終末を持つことを示した[2]．

一方，今回の筋ジス（Line413）及び正常鶏胚（Line412）の骨格筋と交感神経節の併置培養では，いずれの組み合わせでも AChE 活性を筋腹に multiple に認め，その活性部位の形態，数とも組み合わせ間に明らかな相違は認められなかった．このことは，交感神経は筋ジス，正常骨格筋に同じ様な cholinergic の終末を形成している可能性を示している．それにもかかわらず筋ジス筋が早く崩壊することは，交感神経が筋の維持に何らかの役割を果しているものの，筋ジス筋の変性，崩壊は筋自身の要因が大きいと考えられる．

ところで，Main ら[3]は，交感神経節の培養において，ほぼ完全に非神経性細胞が取り除かれている環境下では，ほとんどの交感神経細胞はアドレナリン作動性ニューロンになると報告している．一方 Patterson ら[4]は，分離培養した新生ラット交感神経細胞に，交感神経節より取り出した非神経性細胞（それ自身に ACh 産生能はない）を加えると交感神経細胞の CA 産生蓄積に対する効果はほとんど認められないが，ACh 産生を著しく亢進させることを報告した．更に，培養液中にラット心筋の conditioned medium（以下 CM と略）を加えると，choline から ACh への産生が，その CM 濃度に比例して増加し，反対に，norepinephrine の産生，蓄積は減少することを示した．また CM を加えても交感神経細胞数には変化がなく，神経細胞の蛋白，脂質成分にも変化が認められないことから，神経細胞の一部（sympathetic cholinergic neuron）が選択的に残存あるいは分化，成長したのではなく，個々の神経細胞が CM の影響により ACh 産生細胞へ転換したと考えた．さらに彼らは，ラットの血管，心筋，骨格筋，胎児線維芽細胞，ラット L_8骨格筋株細胞の CM によって，交感神経細胞培養液中の ACh/CA 比が著しく上昇することを認めている[5]．また，Furshpan ら[6]は，ラット交感神経細胞と心筋の microculture で，電気生理学的に抑制性（ACh 分泌細胞），興奮性（CA 分泌細胞），抑制性→興奮性（ACh＋CA 分泌細胞）の三種のニューロンのあることを認めた．さらに，Reichardt ら[7]及び Nurse[8]は，交感神経細胞と心筋あるいは骨格筋を microculture した場合は，80～90％の神経細胞がコリン作動性となるが，交感神経単独培養では，コリン作動性のものは 0％であったと報告している．以上の実験結果より考えると，培養下においては，ある種の非神経性細胞の存在，あるいはそれらによる CM によって，交感神経細胞における神経伝達物質の生成に，可塑性（plasticity）が生ずるものと思われる．

我々の実験における筋と交感神経節の併置培養において，両 explant 間に形成される bridge 部に，多くの AChE 活性部位が認められ cholinergic fiber が多数存在していることを示していた．このことは，adult において sympathetic cholinergic neuron となる神経細胞が，培養骨格筋に対し，cholinergic な終末を形成した可能性も考えられる．しかし，bridge 部に多くの神経線維が存在するにもかかわらず，CA 陽性線維が極めて少数であったこと，及び，先に述べた如く，培養下では幼若な交感神経細胞が，その環境により，transmitter の産生に plasticity のある事実などから，交感神経が骨格筋の影響を受けて，コリン作動性となった可能性が強いことが推

察された.

結　　語

1．正常及び筋ジス筋と交感神経節の併置培養で，いずれの組み合わせでも AChE 活性部位を筋腹上に multiple に認めた.

2．正常，筋ジス交感神経節単独培養では，交感神経細胞，線維とも CA 陽性を示した.

3．筋と交感神経節の併置培養では，いずれの組み合わせでも，両 explant 間に形成される bridge 部では，多数の神経線維が存在するにもかかわらず CA 陽性を示す線維は極めて少数であり，交感神経が骨格筋の影響を受けコリン作動性に転換したことが推察された.

文　　献

1) 塚越廣，小林高義，栢沼勝彦，ほか：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．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，1980, p.41.

2) 小林高義：培養鶏胚骨格筋に対する交感神経の影響に関する実験的研究．信州医誌，28：620，1980.

3) Main, R.E. & Patterson, P.H.: Primary culture of dissociated sympathetic neurons. I. Establishment of long-term growth in culture and studies of differentiated properties. J. Cell. Biol., 59：329，1973.

4) Patterson, P.H. & Chun, L.L.Y.: The influence of nonneuronal cells on catecholamine and acetylcholine synthesis and accumulation in cultures of dissociated sympathetic neurons. Proc. Nat. Acad.Sci. USA, 71：3607，1974.

5) Patterson, P.H. & Chun, L.L.Y.: The induction of acetylcholine synthesis in primary culture of dissociated rat sympathetic neurons. I. Effects of conditioned medium. Dev. Biol., 56：263，1977.

6) Furshpan, E.J.,Macleish, P.H.,& O'Lague, P.H., et al: Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microculture：evidence for cholinergic, adrenergic and dual function neurons. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73：4225，1976.

7) Reichardt, L.F. & Patterson, P.H.: Neurotransmitter synthesis and uptake by individual rat sympathetic neurons developing in microculture. Nature, 270：147，1977.

8) Nurse,C.A.: The formation of cholinergic synapses between dissociated rat sympathetic neurons and skeletal myotubes in cell culture. PhD thesis Harvard Univ. Cambridge, 1977, p.124.

7）正常鶏筋，および筋ジストロフィー鶏筋に対するフィロポディアの運動様式について

中　西　孝　雄*

研究協力者　荒　崎　圭　介*

従来，進行性筋ジストロフィー症の場合，生化学的に血清CPKの上昇があり，電気生理学的に静止膜電位の脱分極化，膜興奮時の外向きK^+流持続時間短縮などが示され，形態学的にも膜内粒子密度の減少が凍結割断法により認められるなど，筋細胞膜の異常を示唆するデータが多く報告されている．

一方，ニューロン成長端から生じるフィロポディア（糸状足）は，接触により目的物を識別し得ると考えられている[1)2)]．そこで本研究では，フィロポディアの運動様式を観察する事により，筋ジストロフィー鶏筋の細胞膜異常が，発育の何時の時点で識別され得るかを明らかにする事を目的とした．

方　　法

正常鶏筋を対照とし，培養5日目と2週以後の筋ジス鶏筋各々5例に対する，正常鶏脊髄前角運動ニューロン成長端・フィロポディアの運動様式を観察した．

1）筋分散培養法

正常鶏および筋ジス鶏11—12日胚(stage37-38)より浅胸筋を摘出．0.25% trypsinにて30分処理後，筋用液体培地（Eagle's MEM: 鶏胚extract:子牛血清＝8：1：1）にて解離し，コラーゲン塗布ディッシュに播種．37℃，5％CO_2，95% air，飽和水蒸気の諸条件下で3時間インキュベーション．Ca, Mg-freeリナルディニ液で洗い，0.05% trypsinにて15分室温処理した後，浮遊細胞をコラーゲン塗布ディッシュに播種し，2時間上記条件下にてインキュベーション．さらに上清のみを別のコラーゲン塗布ディッシュにとり，5日から3週間培養を続行した．この際，最終培養細胞密度を1万/ml前後に調整したが，これは筋細胞の密集発育を阻止し，フィロポディアを観察しやすくするためである．

2）脊髄前角運動ニューロン分散培養法

Masukoら(1979)[3)]の方法に従い，正常鶏60—66時間胚(stage17)より脊髄腹側半分を摘出．これを10μM cytosine arabinoside (ara-c)[4)]を含む神経用液体培地（Eagle's MEM：鶏胚extract：子牛血清＝8：0.5：1.5）の中で24時間偏心旋回培養（37℃，70 rpm）．0.25% trypsinにてニューロン浮遊液をつくり，その細胞密度を6—8万/mlに調整．筋培養ディッシュ中に直接ニューロン浮遊液を播種．筋と同条件下で2時間インキュベートし，ニューロンのディッシュ底への定着を確認した後，debrisを多く含む培養液を新たな培養液と交換した．その後直ちに位相差顕微鏡，微速度撮影装置により，筋に対するフィロポディアの運動様式を，1つのニューロンあたり3時間，追跡・観察・記録した．撮影終了後，一部のディッシュは1—2週間培養を続けニューロンの形態変化を観察し，一部はFEA液（フォルマリン5％，酢酸5％，アルコール90%）にて固定し，Bodian染色を施し，運動ニューロンを確認した．

結　　果

正常筋，筋ジス筋とも，培養1—3日目に

* 筑波大学臨床医学系神経内科

は単核・紡錘形の筋原細胞を認め，5—7日目で筋管細胞形成が始まり，1週間前後を経て自発性収縮が見られた．

一方，分散培養されたニューロンは直径10—15μで大部分は双極細胞であった．

フィロポディアは，ニューロン成長端から数本ないし十数本出て，絶えず伸長収縮をくり返した．長さは最大5—10μであった．このフィロポディア運動は，ニューロン分散培養開始後1—2日以内にもっとも顕著に認めら

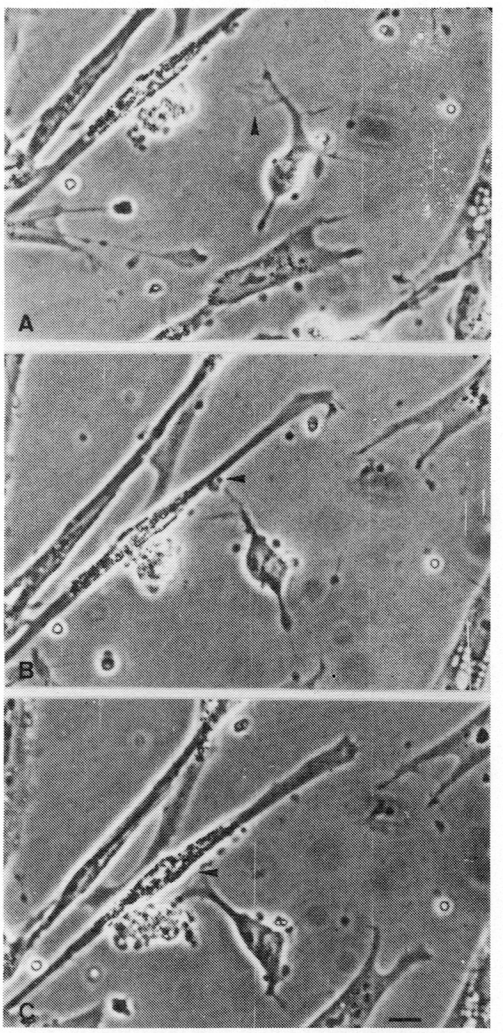


図1　培養5日目正常筋に対する運動ニューロン・フィロポディアの形態変化．
Aは波動膜（矢印）が生じた時，Bはフィロポディア先端（矢印）が筋表面に接した時，Cはフィロポディアの固着が認められた時の，各々16ミリフィルムの1コマである．A→Bは約50分，B→Cは約1時間の経過であった．Cの横線は10μを示す．

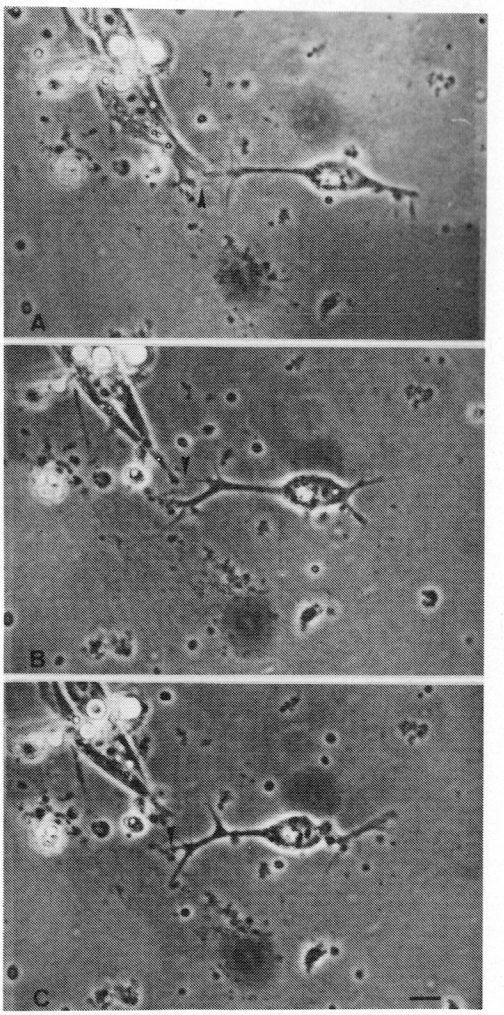


図2　培養18日目筋ジス筋に対する運動ニューロン・フィロポディアの形態変化．
Aは波動膜（矢印）が筋表面に接触した時，B，Cはフィロポディア（矢印）が筋から離反していく時の各々16ミリフィルムの1コマである．A→B→Cは約1時間の経過であった．Cの横線は10μを示す．

れた．又，成長端にはフィロポディア以外に，扇状に広がった波動膜がしばしば認められた．

1）正常筋に対するフィロポディアの運動様式

培養5日目と2週以後の正常鶏筋の場合には，筋表面に接触したニューロン成長端は接触後約1時間以内に筋細胞上に固着し，フィロポディアの突出が停止する傾向が各々5例中4例に見られた(図1)．しかし，残り各々1例では，接触後1時間以内に，フィロポディア・成長端の筋よりの離反を認めた．

2）筋ジス筋に対するフィロポディアの運動様式

培養5日目の場合，5例中3例では正常筋と同じ過程を経て成長端は筋表面上に固着した．しかし，残り2例においては，成長端は筋上に固着することなく，フィロポディアは筋へ接触後1時間以上筋表面を触診し続けた．

一方，培養2週以後の場合には，5例中4例に筋とフィロポディアの接触がありながら一度接触した成長端が離反する現象が観察された(図2)．しかし，残りの1例では2時間の観察において，成長端は筋表面に固定したまま全く離れず，細胞体のわずかな運動のみが認められた．

考　　察

Stage17の鶏胚脊髄において，分化ニューロンは運動ニューロン以外にも，後角，および前角と後角の境界領域にかなり存在すると考えられ[6)7)8)]，この部分を完全に切除する事は技術的に困難であるが，Masukoら[3)]の方法を用いて脊髄前角を採取した場合，得られたニューロンの約90%は運動ニューロンであると考えられている．さらに，この方法により得られたニューロンと骨格筋との間には，コリン作動性シナプスが形成される事が電気生理学的に確認されている[5)]．そこで本研究では，正常鶏筋を対照とし，数多くの例について検索するよう試みた．

培養5日目の正常筋，筋ジス筋に対するフィロポディアの運動様式では，前者の5例中4例，後者の5例中3例において，特記すべき差違は認められなかった．したがって，培養5日目筋ジス筋の細胞膜異常は，存在するとしても，フィロポディアでは認識され得ないと考えられる．

培養5日目筋ジス筋5例中の残り2例に見られたフィロポディアの運動様式は，正常とは異なり，接触後1時間以上経過しても固着がおきない型であり，正常筋への固着および変性の進行した筋ジス筋からの離反との中間的性格を具えていると考えられる．この事は，2例の筋ジス筋の変性進行度が，形態的に，これを除く培養5日目筋ジス筋3例と培養2週以後の筋ジス筋との中間程度であった事と合致するものである．しかし，両者の相関については今後なお検討する必要があると考えている．

培養2週以後の筋ジス筋に対するフィロポディアの運動異常は，5例中4例に見られたが，この様に変性が進行したと考えられる筋ジス筋において，離反現象が高頻度にみられたことは，離反現象の出現頻度が筋の変性の進行度と平行して増大することを示唆する所見であると考えられる．もしフィロポディアが“probing chemical touch system”[9)]であり，表面構造の認識機構であるとすれば，その運動様式異常である離反現象の出現確率は，筋ジス筋表面構造（基底膜＋細胞膜）の異常を反映するものと考えられる．そして，前述した様に筋細胞膜の異常に関して多くの肯定的データが存在する以上，離反現象の出現頻度は，筋細胞膜の異常を間接的に示していると考えることも可能である．しかし，この点に関しては今後例数を重ねて検討する必要があると考えている．

結　　論

正常鶏筋を対照とし，培養中の筋ジス鶏筋に対する脊髄運動ニューロン・フィロポディアの運動様式を解析する事により，筋ジス鶏

筋の細胞膜異常が発育の何時の時点で識別され得るかを検索した.

1）正常鶏筋の場合，培養5日目と2週以後とも各々5例中4例に，ニューロン成長端が筋表面に接触後約1時間以内に固着する傾向が見られた.

2）筋ジス鶏筋の場合には，培養5日目の5例中3例に正常鶏筋と同様の現象が見られた．しかし，培養2週以後のものでは，5例中4例に一度接触したフィロポディアが離反する現象が認められた.

以上の所見はフィロポディアに識別され得る筋ジス筋の細胞膜異常が，培養2週以後に出現する事を示唆すると考えられる．しかし結論するには今後さらに多数例について観察，検討を重ねる必要があると考えている.

稿を終えるにあたり，御懇篤な御指導をいただいた中井準之助教授に深く感謝いたします.

文　献

1) Nakai, J., Kawasaki, Y.: Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture. I. The reaction of the growth cone to various obstractions. Z. Zellforsch. 51：108, 1959.

2) Nakai, J.: The mechanism determining the course of the spinal motor nerve to the myotome(会) Dev. Growth. Differ., 17：309, 1975.

3) Masuko, S., Kuromi, H., Shimada, Y.: Isolation and culture of motoneurons from embryonic chicken spinal cords. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76：3537, 1979.

4) 増子貞彦，嶋田裕：薬剤による細胞分離法. 組織培養，6：317, 1980.

5) 増子貞彦，嶋田裕：運動神経細胞の分離と筋細胞との培養(会)　日本組織培養学会第48回研究会プログラム・講演抄録集，1979, p.20.

6) Langman, J., Haden, C.C.: Formation and migration of neuroblasts in the spinal cord of the chick embryo. J. Comp. Neurol., 138：419, 1970.

7) Kanemitsu, A.: Cytoarchitecture de la moelle épinière chez le poulet envisagée au point de vue du développement. Proc. Japan Acad., 46：77, 1970.

8) Kanemitsu, A.: Etude quantitative de la neurogénèse dans la moelle épinière chez le poulet par l'autoradiographie. Proc. Japan Acad., 48：758, 1972.

9) Sperry, R.W.: Organogenesis (R.L. DeHaan. and H. Ursprung, ed.), Holt, Rinehart and Winston, New York. 1965.

8）筋ジスチキンの骨格筋脂質（第二報）

高　木　昭　夫*

研究協力者　村　上　博　彦*

はじめに

我々は筋ジストロフィー鶏を疾患モデルとして，筋ジストロフィー症における脂質異常の本態を追求している．先に，筋ジストロフィー成鶏では，リン脂質，コレステロール，中性脂肪とも有意な増加を認めた．又，鶏胚期の筋の脂質組成では対照と筋ジスの間に差異の認められないことから，成鶏での変化は二次的現象である可能性が大きいことを報告した[1]．

今回はリン脂質，トリグリセリドの脂酸構成の分析を行ない，鶏胚期，幼若鶏及び成鶏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（line413,筋ジス鶏）と正常対照鶏（line412,対照鶏）の浅胸筋を分析に用いた．20日目鶏胚，幼若期（孵化後５日目，７日目，14日目，21日目）及び成鶏期（４ヶ月齢）より浅胸筋を摘出した．

脂質の分析はFolchの方法により脂質を抽出し，薄層クロマトグラフィーにより，リン脂質，トリグリセリドの分離を行なった．薄層クロマトの展開溶媒は，石油エーテル—エーテル—酢酸（80：20：１）を用い，スポットの検出は0.05％ローダミン６Ｇをスプレー後，紫外線下で観察する方法で行なった．次に，各スポットを分画採取し，塩酸・メタノール法にて脂肪酸メチルエステルを作製し，脂酸構成分析に用いた．脂肪酸分析は，島津ガスクロマトグラフGC－７Ａ型を用い，10％DEGS－Chromosorb W（60～80メッシュ），ガラスカラム2m×３mm，N_2 50ml/分，カラム温度190℃の条件で行なった．各脂肪酸の同定は，標準試料との比較により行なったが，一部は相対保持値より同定した．

結　果

１．成鶏骨格筋の脂酸構成（図１，２）

成鶏リン脂質の脂肪酸構成を図１に示した．筋ジス成鶏では14：０（ミリスチン酸），16：０ aldehyde（パルミトアルデヒド），16：０（パルミチン酸），18：１（オレイン酸）の低下と，18：０ aldehyde（ステアロアルデヒド），18：０（ステアリン酸），18：２（リノール酸）の増加を認めた．オレイン酸は対照鶏19.46±1.68％，筋ジス鶏14.84±1.61％と著減し，ステアリン酸は対照鶏15.35±1.96％，筋ジス鶏20.98±2.37％と著増していた．これらの変化は危険率１％で統計学的に有意であった．

筋ジス成鶏のトリグリセリドの脂酸構成に関しては（図２），16：０（パルミチン酸），16：１（パルミトレン酸），18：１（オレイン酸）が低下を示し，18：０（ステアリン酸），18：２（リノール酸）が増加を示した．リノール酸は対照鶏16.94±3.39％に対し，筋ジス鶏24.09±5.36％と著明な増加を認めた．また，構成比率が少なくグラフには示さなかったが，20：４（アラキドン酸）が筋ジス成鶏で増加傾向を示した．

２．幼若鶏骨格筋の脂酸構成（図３，４）

孵化後21日目までの幼鶏の浅胸筋を分析し，これを「幼若鶏」としてまとめた．

＊国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

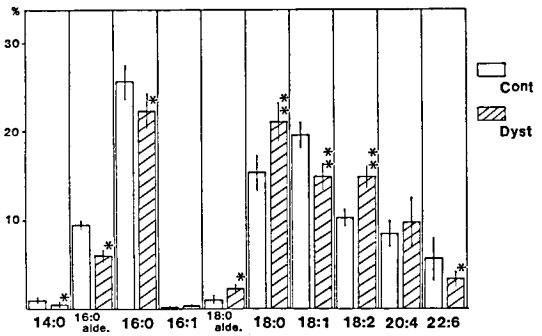


図1　成鶏浅胸筋のリン脂質脂酸構成．筋ジスN＝10，対照N＝10．Mean ± S.D.を図示した．＊p＜0.05，＊＊p＜0.01．各々脂酸の省略は文中を参照．

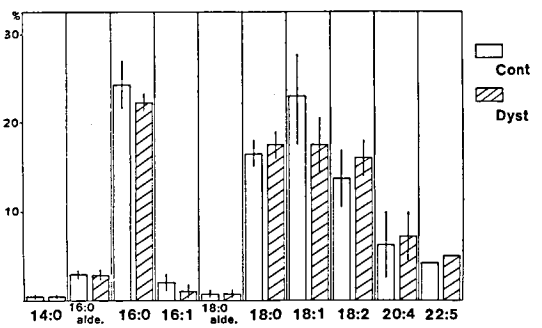


図3　幼若鶏浅胸筋のリン脂質脂酸構成．筋ジスN＝4，対照N＝4．いずれの脂酸に関しても有意差は認められない．

リン脂質の脂酸構成では(図3)，オレイン酸は対照鶏23.0±5.8%，筋ジス鶏17.5±3.1%と筋ジス鶏で低下する傾向を示したが，統計学的に有意差は認められなかった．

トリグリセリドの脂酸構成において（図4)，筋ジス鶏でオレイン酸の低下傾向(対照鶏40.8±3.8%，筋ジス鶏36.3±3.9%）を認めたが，統計学的に有意な差はなかった．その他の脂酸に関しては両者間で差を認めなかった．

3．脂酸構成の成長に伴う変化（図5）

次に，リン脂質とトリグリセリドの主要な構成脂酸について，成長に伴う変化を検討した．幼若鶏と対照成鶏のデータの比較から，

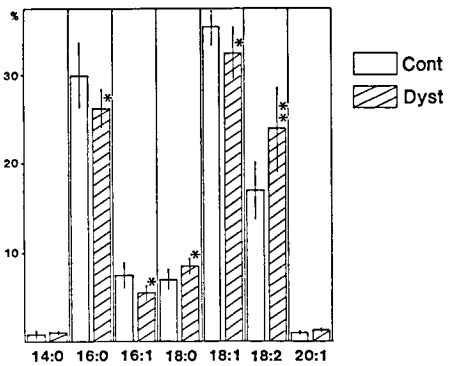


図2　成鶏浅胸筋のトリグリセリド脂酸構成．筋ジスN＝10，対照N＝10．その他の記号は図1と同じ．

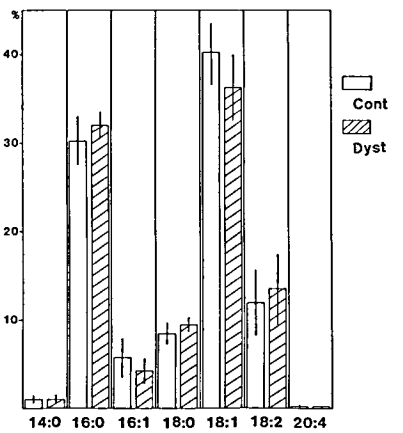


図4　幼若鶏浅胸筋のトリグリセリド脂酸構成．筋ジスN＝4，対照N＝4．いずれの脂酸に関しても有意差は認められない．

成長に伴う変動を推定した．この変動はほぼリン脂質と中性脂肪に共通しており，増加するものとして，14：0，16：0，16：1，18：1がある．また，減少するものとして18：0，20：4がある．この成長変化を筋ジスの変化と比較した．成長に伴い増加する脂肪酸は，筋ジス成鶏では減少を示している．また，18：0や20：4のごとく，成長で減少するものは，筋ジスでは増加している．しかし，唯一の例外がトリグリセリドのリノール酸（18：2）の変化にみられる．ここでは，幼若鶏から成鶏へ増加してゆくにもかかわらず，筋ジス成

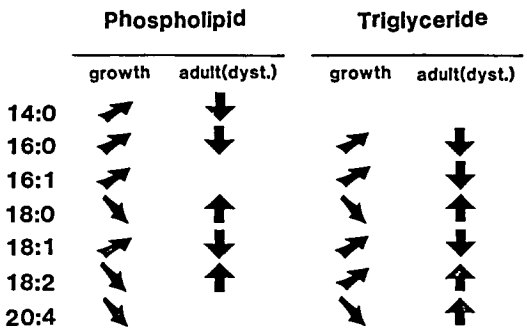


図5　リン脂質とトリグリセリドの主要な構成脂酸につき，成長に伴う変化を比較した．成長に伴って増加する脂酸は（14：0，16：0，16：1，18：1），筋ジス成鶏では減少している．また成長で減少する脂酸は（18：0，20：4），筋ジスで増加している．

鶏では増加を示している．

考　　察

筋ジストロフィー鶏を用いた骨格筋脂質の脂酸構成に関する報告はほとんど見られない．Jordan ら[2]は，ニューハンプシャー種の筋ジス鶏（line413 ではない）骨格筋の遊離脂肪酸，トリグリセリドの脂酸構成を調べ，有意差はなかったが，ミリスチン酸，パルミトレン酸，オレイン酸，リノール酸の増加とパルミチン酸の減少傾向を報告している．これはおおむね我々が報告した結果と同様の傾向を示している．また，Hsu ら[3]は筋小胞体を用い，ミリスチン酸，パルミチン酸の増加とオレイン酸の減少を示している．リン脂質の脂酸構成に関しては，調べ得た限りまだ報告が見られない．今回の成鶏に関する検討では，リン脂質とトリグリセリドのいずれにおいても，その脂酸構成に筋ジス鶏と対照鶏の間に有意差が認められた．

一方，ヒト Duchenne 型筋ジストロフィー症骨格筋の脂酸構成に関しては，須藤ら[4]は，リン脂質ではパルミトレン酸，オレイン酸の増加とパルミチン酸，ステアリン酸及びリノール酸の減少を認めている．これらはパルミチン酸の減少を除いて，ヒト Duchenne 型筋ジストロフィー症と筋ジストロフィー鶏では逆の変化を示している．また，トリグリセリドの脂酸構成はヒトでは有意な差は見られなかったとされている．しかし，今回の筋ジス鶏におけるトリグリセリド脂酸構成には明らかな差が認められており，興味ある事実と考えられる．ヒト Duchenne 型筋ジストロフィー骨格筋レシチンの脂酸構成では，ミリスチン酸，パルミチン酸，オレイン酸，アラキドン酸の増加とリノール酸の減少が認められた[5]．これも筋ジス鶏のリン脂質脂酸構成とは逆の傾向を示していた．

幼若鶏の脂酸構成には，筋ジスと対照の間に有意な差は認められなかった．この事実は筋ジス鶏の病因として，原発的な脂酸代謝異常の可能性を除外するものであろう．脂酸構成の異常は，筋ジス病変の進行に伴う続発的現象と理解される．

対照の幼若鶏と成鶏の比較から脂酸構成の成長に伴う変動を推定した．この経時変化の観点から見ると，筋ジス成鶏での変化の大部分は幼若型として説明できる結果が得られた．ヒト骨格筋に関して，Bruce ら[6]がレシチン脂酸構成を胎生期から成人（16，27，53歳）までの経年変化を報告した．ヒトのレシチン脂酸構成では，パルミチン酸，オレイン酸，アラキドン酸が経時的に減少し，ステアリン酸，リノール酸が経時的に増加している．ヒトのレシチン脂酸構成に関する2つの報告を比較すると，ヒトにおいても経時的に増加するものは筋ジスでは減少したままであり，またその逆の傾向も認められる．

この様に，ヒトとニワトリの骨格筋脂酸構成に関して，筋ジスの際の変化の大部分が幼若型として解釈できるであろう．この事実は筋ジストロフィーの病態研究の上で興味深いものである．

結　　論

1）筋ジス成鶏において，リン脂質及びトリグリセリドの脂酸構成に対照成鶏との間に有意な差が認められた．

2）鶏胚期，幼若鶏では筋ジスと対照の間に有意な差は見られなかった．

3）筋ジスにおける変化の大部分は幼若型として説明できるものであった．

文　　献

1) 高木昭夫，村上博彦，石浦章一：鶏ジストロフィー筋における糖及び脂質代謝．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54年度研究報告書．1980, p.48.

2) Jordan,J.P.,Kratzer,F.H. & Zarghami,N. S.: Lipid composition of pectoral muscles of chickens with inherited muscular dystrophy. Proc. Soc. Exp. Bioch. Med., 138：733, 1971.

3) Hsu, Q.-S. & Kaldor,G.: Studies on the lipid composition of the fragmented sarcoplasmic reticulum of normal and dystrophic chickens. Proc. Soc. Exp. Bioch. Med., 116：243, 1964.

4) 須藤正克，黒田敏彦，白井朋包：進行性筋ジストロフィーの分画脂質の脂肪酸組成について．臨床病理，14：535, 1966.

5) 高木昭夫：進行性筋ジストロフィー症の脂質化学的研究．臨床神経，7：665, 1967.

6) Bruce, A. & Svennerholm,L.: Skeletal muscle lipids. 1. Changes in fatty acid composition of lecithin in man during growth. Biochim. Biophys. Acta., 239：393, 1971.

9） ジストロフィー鶏骨格筋中の中性脂肪に関する研究

木 下 真 男*

研究協力者　内 野 裕 子*　荒 木　洋*　若 田 宣 雄*

筋疾患と脂質の関係は古くより知られ，多くの研究がなされてきた．その一つは，膜系の機能に関与する燐脂質に関してであり，他の一つは，エネルギー源として重要な中性脂肪に関してである．

疾患としては，最近，脂質蓄積性ミオパチーが報告され，いくつかの欠損酵素も証明されているが，古くから脂質代謝との関連が注目されているのは筋ジストロフィー症である．

今回，我々は厚生省ジストロフィー症研究班より供与されたNew Hampshire chickenの浅胸筋及び皮下脂肪組織について，中性脂肪を分析し，若干の知見を得たので報告する．

材料と方法

実験材料：生後16～18ヶ月の筋ジストロフィー鶏（New Hampshire chicken : line413）8羽，対照鶏（line412）8羽，計16羽を断血屠殺し，浅胸筋を摂取し，結合織，脂肪組織，筋膜などを除去したのち，−70℃のフリーザーで保存し，また，ジストロフィー鶏4羽及び対照鶏4羽の皮下脂肪組織を採取し，直ちに実験に供した．

実験方法：浅胸筋は対照鶏で100mg前後，ジストロフィー鶏で40mg前後，皮下脂肪組織で30mg前後をホモジュネートし，Folchの方法にて，総脂質を抽出した[1]．中性脂肪の分画は薄層クロマトグラフィーにより行なった．各分画の脂酸構成はガスクロマトグラフィーにより行なった．

＊東邦大学医学部第四内科

結　　果

1．筋中脂肪

(1)中性脂肪分画

TGは，図1，表1に示した様に対照0.24±0.13mg/100mg wt，ジストロフィー鶏1.94±0.93mg/100mg wtで約8倍，$p<0.001$で有意な増加が認められた．DGでも図1，表1に示した様に対照0.02±0.01mg/100mg wt，ジストロフィー鶏0.08±0.04mg/100mg wtと約4倍，$p<0.01$で有意な増加がみられた．Monoglycerideは微量のため測定を断念した．

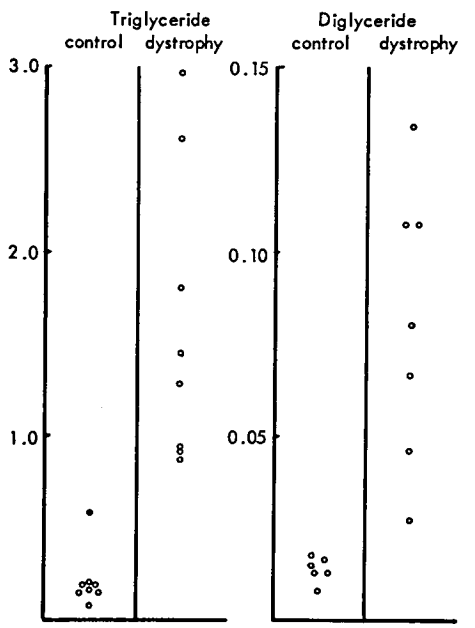


図1　浅胸筋のトリグリセライド，ジグリセライドの含有量

（単位mg/100mg湿重量）

表1　浅胸筋，皮下脂肪組織のトリグリセライド，ジグリセライド含有量
（単位mg/100mg湿重量）

	superficial pectoral muscle		adipose tissue	
	control	dystrophy	control	dystrophy
TG	0.24±0.13	1.94±0.93	14.82±3.74	14.76±3.59
DG	0.02±0.01	0.08±0.04	0.13±0.07	0.16±0.08

(2)各分画の脂酸構成

TGの脂酸構成は表2に示したが，その主要構成成分はC16パルミチン酸，C18ステアリン酸，C18：1オレイン酸，C18：2リノール酸で全体の脂肪酸の90%近くを占め，ジストロフィー鶏ではこれらの主要成分にのみ変化が認められた．すなわち，ジストロフィー鶏の脂酸構成では対照と比べC16パルミチン酸で減少($p<0.05$)，C18ステアリン酸で増加($p<0.001$)，C18：1オレイン酸で減少($p<0.02$)，C18：2リノール酸で増加($p<0.05$)，を示した．DGの脂酸構成は，C16パルミチン酸，C18ステアリン酸，C22：2ドコサディエノン酸，C24：2テトラコサディエノン酸などで，全体の80～90%を占め，主要構成成分をなしていたが，対照とは差がみられなかった．

2．皮下脂肪組織

(1)中性脂肪分画

TGは表1に示したが，ジストロフィー鶏14.76±3.59mg/100mg wt，対照鶏14.82±3.74mg/100mg wt,DGは，ジストロフィー鶏0.16±0.08mg/100mg wt，対照鶏0.13±0.08mg/100mg wtと差はみられない．対照鶏骨格筋と比べるとTGで約60倍，DGで約7倍の含有量であった．

(2)各分画の脂酸構成

TGの脂酸構成は表2に示したが，ジストロフィー鶏，対照鶏共に同じ様な構成成分が認められたが，C16パルミチン酸にのみ対照

表2　トリグリセライドの脂酸構成(%)

	superficial pectoral muscle		adipose tissue	
	control	dystrophy	control	dystrophy
C14	1.5±0.3	1.1±0.2	1.2±0.1	1.0±0.0
C14:1			0.3±0.1	0.2±0.1
C16	27.3±2.3	22.4±5.1*	21.1±3.6	17.9±0.4*
C16:1	4.0±0.6	4.2±0.3	5.0±2.8	4.0±2.9
C18	8.1±0.9	13.8±0.9***	10.8±3.5	10.3±3.6
C18:1	35.1±4.7	29.0±3.1**	34.1±4.7	34.5±3.3
C18:2	14.2±1.9	20.2±6.9*	23.6±4.2	23.7±3.1
C18:3	1.0±0.2	2.3±1.5	2.5±1.8	2.4±1.3
C20	4.0±2.2	0.4±0.3	4.0±0.1	4.9±0.1
C20:2	0.2±0.1	0.5±0.3	0.4±0.4	1.1±1.0
C20:4	1.9±1.5	0.7±0.6	0.4±0.3	0.5±0.5
C20:6			1.1±1.3	1.4±0.2
C22	0.2	0.5±0.1		
C22:1			0.4±0.6	0.5±0.5
C22:2	2.3	1.1±0.5		
C22:4	0.4±0.1			
C24	3.2±3.0	0.8±0.7	1.4±1.5	0.7±0.7
C24:2	2.2±1.9	4.3±4.2	0.1±0.1	0.4±0.6

* $P<0.05$　** $P<0.02$　*** $P<0.001$

と比べ低下が認められた．その主要構成成分は骨格筋と同様であるが，個々の脂肪酸の含まれる比率は，対照と比べるとC16パルミチン酸で低下しC18：2リノール酸で増加していた．ジストロフィー鶏骨格筋と比べるとC18：1オレイン酸が増加していた．DGの脂酸構成は，ジストロフィー鶏，対照鶏共大きな違いはないが，骨格筋のものとは異なり，C18：1オレイン酸，C18：2リノール酸の増加が著明で，C22：2ドコサディエノン酸は認められなかった．

考　　案

人の筋ジストロフィー症で罹患筋に脂肪が増加している事実は古くから知られている．特にDuchenne型では下肢の仮性肥大も認められ筋線維自体の肥大と共に脂肪組織の増加を伴っている．これらの事実は，病因に関連するのか，障害の結果であるのか，議論のあるところで脂質の測定は筋の種々の病的状態を理解するうえで有用であり多くの研究がなされてきた．

文献的には人筋ジストロフィー症ではKunze[2]が，実験動物ではOwenら[3]，またJordanら[4]が報告をしている．すでに人ジストロフィー症だけでなく実験的ジストロフィー症においても骨格筋の中性脂肪，特にTGの増加が認められており，我々の実験においてもTG，DGで増加がみられた．しかしながら，ここで問題となる点が2つある．1つは組織化学的あるいは電子顕微鏡的に中性脂肪の増加が認められる部位は，筋線維内ではなく間質脂肪組織及び皮下脂肪組織である．従って我々もできうる限り結合織，脂肪組織を除去したが，当然これら筋細胞外の脂質がある程度混入していることは否定できない．もう1点は今回測定した脂質中には膜系の中性脂肪も含まれていることで，もし採取材料中の筋線維量がジストロフィー症と対照とで異なるとすれば膜系の相対量も異なり，そのため結果に及ぼす影響も異なってくると思われる．文献的には膜系の脂質は家兎sarcoplasmic reticulum (SR) ではphospholipid (PL) が90%，残りの10%が中性脂肪であり[5]，ラットのsarcolemma (SL) ではPLと中性脂肪はほぼ等量で，SRとミトコンドリアではPL80%，中性脂肪20%であり[6]，筋全体としてはサルでPLに比べ中性脂肪は3～10倍多いと言われている[7]．これらの事実から考えれば膜系の中性脂肪は比較的少なく，測定結果は筋全体の中性脂肪を反映しているように思われる．

脂肪蓄積の原因についての報告としては，PenningtonらはDuchenne型の進行例で死亡時，3ヶ所の筋肉を摂取し，TGの脂酸構成について検討した．3ヶ所の筋肉は筋線維のほとんどが脂肪組織に置き換えられてしまっており，その脂酸構成はすでに報告されている正常人の皮下脂肪組織のものとほとんど変わりなかったと報告している[8]．Mitchellらは，ジストロフィー鶏line UCD309で筋中に増加する脂質の大部分はTGで，筋肉の中央部で長軸に沿って多く存在し，末梢では少なくなり，脂肪の浸潤は筋線維の破壊の指標になるのではないかと考えている．更にこれらの事実から脂質蓄積の原因として血管性あるいは神経性の因子は考えにくいと考察している[9]．

そこで我々も中性脂肪のTG，DGについて，その脂酸構成を測定し，TGで対照と比べ変化を認めた．現在までに報告された中性脂肪の脂酸構成を測定したデータは比較的少なく，須藤らはDuchenne型ジストロフィー症の大腿四頭筋及び腓腹筋でパルミチン酸，パルミトオレイン酸，ステアリン酸，オレイン酸，リノール酸を測定し，同年齢の対照と比べ有意差を認めていない[10]．ジストロフィー鶏ではJordanらはTGの脂酸構成で対照鶏と比べ，変化を認めなかったと報告している[3]．我々の結果とJordanらの結果に差が生じた理由は明らかではないが，彼らは15年以上前におこなったデータで，我々のジストロ

フィー鶏とはlineが異なったのかも知れないし，彼らは生後36週の鶏を使用したが，我々は16～18ヶ月のものを使用した点，あるいは飼料の差などにあるのかも知れない．

TGの脂酸構成の変化が如何なる機序によるか不明であるが，ひとつにはジストロフィー鶏でTGが著増を示すことに関係があると考えられる．もしPenningtonらが言う様に筋組織がほとんど脂肪組織に置き換えられてしまっていれば，ジストロフィー鶏骨格筋のTGの脂酸構成と皮下脂肪組織のそれが同一であることが推定されるが，少なくとも筋線維が残っている組織では差が出てくることが，当然考えられる．

この点を解明するために，我々はジストロフィー鶏骨格筋が最も高度に障害された部位のみを取り出すことを試みたが，現在のところ良い方法はみつからなかった．そこで，筋線維が破壊され脂肪組織に置き換えられた状態と皮下脂肪組織が全く同じ状態であるとは，断定はできないが，一つの方法として，皮下脂肪組織の中性脂肪を検討してみた．

皮下脂肪組織のTGは骨格筋と比べ著明に増加しているものの，対照鶏，ジストロフィー鶏には差がみられず，その脂酸構成でも，著明な差はみられなかった．すなわち，正常と病的状態の皮下脂肪組織は，同じ様な脂酸構成を示した．これはジストロフィー鶏には特別な脂質代謝の異常のないことの一つの証拠と考えることができる．また，骨格筋と皮下脂肪のTGの主要構成成分を比べてみると，図2に示す様にC16パルミチン酸，C18：2リノール酸は，ジストロフィー鶏骨格筋では，対照鶏骨格筋と皮下脂肪の中間にある．C18ステアリン酸，C18：1オレイン酸では，対照鶏とジストロフィー鶏骨格筋よりも，ジストロフィー鶏骨格筋と皮下脂肪組織の方がより近似した値を示している．

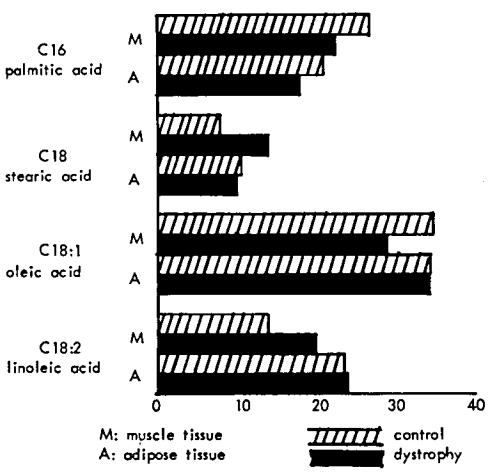


図2　浅胸筋，皮下脂肪組織のトリグリセライドの主要構成脂肪酸(%)

以上の点から考えると，対照鶏骨格筋より障害の進んだジストロフィー鶏骨格筋の脂酸構成の方が，皮下脂肪のものに近い値を示している．従って，今回の実験結果からみれば，ジストロフィー鶏の骨格筋に中性脂肪が増大するのは，脂質代謝の異常が関与するものではなく，むしろ，障害の結果と考える方が妥当と思われた．

DGについても同様な検索を試みたが，TGに比べ微量なため，筋の量を増してみたが薄層クロマトグラフィー上，TGと重複してしまうため，今後，別な方法を用いて検討することとし，考察はさしひかえる．

文　献

1) Folch,J.,Lees.M.,et al.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J.Biol.Chem., 226: 497, 1957.

2) Kunze,D. & Olthoff,D.: Der Lipid gehalt Menschlicher Skelettmuskulatur bei Primären und Sekundäre myopathien. Clin.Chem.Acta,29: 455, 1970.

3) Owens,K. & Hughes,B.P.: Lipids of dystrophic and normal mouse muscle: whole tissue and particulate frations.J. Lipid Res.,11: 486, 1970.

4) Jordan.J.P.,Kratzer,F.H.,et al.: Lipid composition of the pectoral muscles of

chickens with inherited muscular dystrophy.Proc.Soc.Exp.Biol. & Med.,116 : 243, 1964.

5) Waku,K.,Uda,Y.,et al. : lipid composition in rabbit sarcoplasmic reticulum and occurrens of alkyl etherphospholipids.J. Biochem.,69 : 483, 1971.

6) Fiehn,W. & Peter,J.B. : Lipids and fatty acids of sarcolemma,sarcoplasmic reticulum,and mitochondria from rat skeletal muscle.J.Biol.,Chem.,246 : 5617, 1971.

7) Masaro,E.J.,Rowell,L.B.,et al. : Skeletal muscle lipids. Biochem. Biophys. Acta, 84 : 493, 1964.

8) Pennington,R.J.,Park,D.C., et al. : The fatty acid composition of infiltrating fat in muscle from a case of muscular dystrophy. Clin. Chem. Acta, 13 : 397, 1966.

9) Mitchell,D.J. & Julian,M. : Variation of fat distribution in pectoral muscles of chickens with hereditary muscular dystrophy.Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,137 : 68, 1971.

10) 須藤正克，黒田敏彦，ほか：進行性筋ジストロフィーの分画脂質の脂肪酸組成について．臨床病理，14：535，1966.

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・代謝など

10) 筋萎縮性疾患の遺伝分析
——Duchenne 型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*** 中 島 八 良****川 井 尚 臣*****
三 好 和 夫*****

Duchenne 型ジストロフィー症 (DMD) の遺伝機構の解明と DMD, Xg^a血液型, 色盲の X -連関遺伝の解析を行なうため, 鹿児島地区と徳島地区を対象に調査を計画し, 本年度は鹿児島地区の一部について調査を行なったのでその結果を報告する.

資　料

DMD を発端者として, 鹿児島資料(約50家系), 徳島資料 (約40家系) を対象に家系調査, 家系全員について Xg^a血液型, 色盲について検査を行なうが, 本年度は鹿児島資料のうち48家系についての家系調査, このうち10家系について Xg^a血液型, 色盲について検査を行なった. 未検査の分については来年度検査を行なう予定である.

調査結果

A. X-連関遺伝について

鹿児島資料のうち DMD, Xg^a血液型, 色盲について調査・検査を完了したのは図1に示した如く10家系である.

尚, 鹿児島資料のうち上記の検査を行なった頻度は表1に示す如く, 父は19%, 母は21%, 子供については Xg^a血液型は32%, 色盲は32%である. このうち, Xg^a (+) は80.0±6.3%, Xg^a (−) は20.0±6.3%, 色盲は男女とも0%である. 調査, 検査資料が少ないので X-連関遺伝の検定は現時点では不可能であり, これらの分析は来年度すべての資料について検査が完了した時に, 分析を試みる予定である.

B. DMD 家系の近親婚調査

48家系のうち, いとこ婚4.17%, またいとこ婚2.08%, みいとこ婚2.08%, その他の近親婚4.17%で, 合計すると12.5±4.77%となり, 一般集団のそれに比べて高い. このことは本症が劣性遺伝型であることを示している. また, 本症が男児のみに出現していることを考えると伴性劣性型と思われる.

C. DMD の分離比の検定

分離比の検定法は, 資料の集め方, 家系の捕捉法 (ascertinment) によって違ってくる. 本資料はすべて単独確認 (single ascertinment) である. すなわち, 発端者 (proband) が子供で, しかもただ1人の発端者しかない. したがってどの DMD 患児も捕捉される確率は極めて小さく, DMD 患児の多い家系ほどつかまりやすいか, 同一家系が2人の発端者によって独立に2回見出されることはないとみなされる. このような場合の分離比 (P) とその分散 (Vp) の推定は Fisher (1934) によって次の式が与えられている.

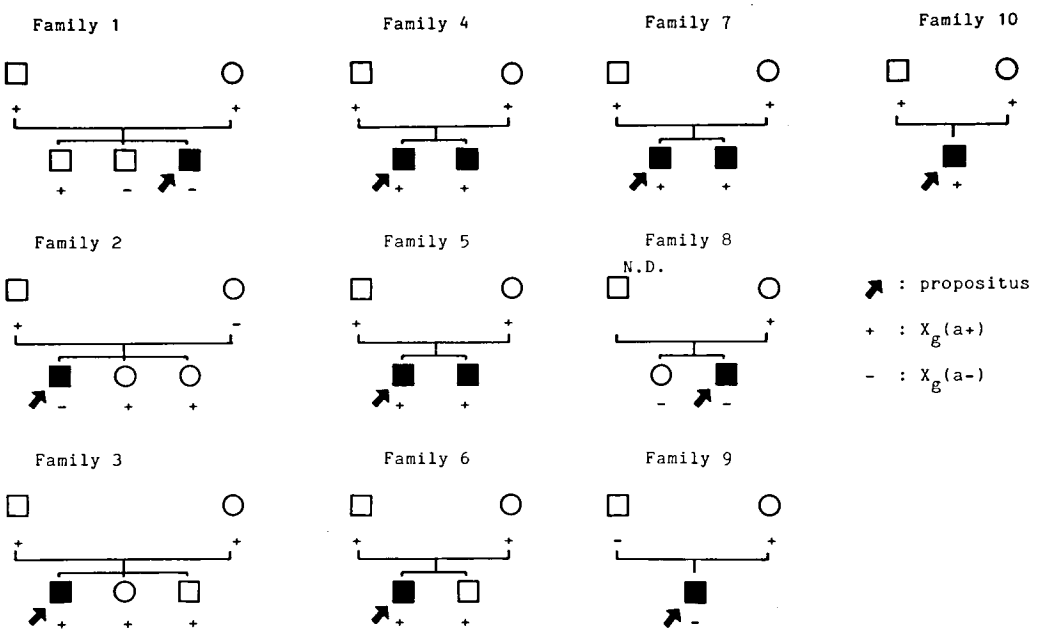
* 鹿児島大学医学部衛生
** 国立療養所南九州病院神経内科
*** 鹿児島大学医学部第三内科
**** 東京医科歯科大学医学部法医
***** 徳島大学医学部第一内科

$$P=\frac{R-N}{T-N}$$

$$V_P=\frac{(T-R)(R-N)}{(T-N)^3}$$

式中，Rは調査された同胞群の中の患児の総数，Nは同胞群の数，Tは同胞群に含まれる子供総数である．

上式を用いて鹿児島資料の男児の資料を用いて分析したところ下記の如き結果が得られた．



図Ⅰ 家系別，DMD，Xg^a血液型および色盲の検査成績

表Ⅰ 1980年度におけるDMDの血液型（Xg^a），色盲検査結果

DMD数 / 同胞数	1	2	3	同胞群数	同胞総数	DMD数	検査済 Xg^a血液型	検査済 色盲	父 Xg^a血液型	父 色盲	母 Xg^a血液型	母 色盲
1	5			5	5	5	3	3 (60.0)	2	2 (40.0)	2	2 (40.0)
2	12	5		17	34	22	17 (50.0)	18 (52.9)	4	4 (23.5)	5	5 (31.3)
3	11	3		14	42	17	17	17 (40.5)	3	3 (23.1)	3	3 (21.4)
4	4	2		6	24	8	3	3 (12.5)				
5	2	1		3	15	4	2	2 (13.3)				
6	1		1	2	12	4	2	2 (16.7)				
7	1			1	7	1						
合計				48	139 男：85	61 61	44 (31.7)	45 (32.4)	9	9 (19.1)	10	10 (21.3)

（　）：%

$$P=\frac{61-48}{85-48}=\frac{13}{37}=0.3514$$

$$\sigma_P=\sqrt{\frac{(85-61)(61-48)}{(85-48)^3}}=\sqrt{\frac{312}{50653}}=0.0785$$

ここに得られた分離比の推定値（0.3514）とその期待値（0.5）との差は誤差（0.0785）の1.9倍であり，統計的有意水準（5％）に達しない．したがって，本症は伴性劣性遺伝仮説に適合する．

考　　察

本症がX-連関劣性遺伝であることは，近親婚率が12.5±4.77％で一般集団に比べて著しく高いこと，DMD患児が男児のみにみられ，分離比がX-連関劣性遺伝の仮説に適合することからも理解される．しかしながら，すでに述べた如く，推定された分離比と期待値の差は統計的に有意水準に達しなかったとはいえ，推定された分離比の方が低い事も事実である．これには，調査例数が少ないことも影響しているかもしれないが，次の事も考慮する必要があろう．

A．確認の問題

本資料ではすでに述べた如く，単独確認である．一般に疾患の種類が確認の程度に大きく影響する．一人が受診して治療効果がないとわかれば同一家系の中の他の患児は来院しない場合があるので単独確認になりやすい．しかし，DMDの家系がすべて単独確認とはいえない．これはあくまで本資料の場合である．また，確認を左右するのはDMDの捕捉法の手段によっても異なるであろう．例えば，外見のみに診断した場合，あるいは特殊な検査も含めて診断した場合によって当然確認は異なってくる．

確認には，(1)完全確認(complete ascertinment)，(2)打切り確認（truncate ascertinment)，(3)多重確認(multiple ascertinment)，(4)単独確認があり，それに応じた分離比の推定法が考案されている．

DMDの確認はおそらく単独確認か多重確認と思われる．多重確認の場合の分離比は，Morton（1959）によって考案されているが，単純には発端者が2人いる場合にはその家系を2回数えて上式を用いて推定すればよく，強いて確認の確率を推定する必要もない．

B．DMD遺伝子の淘汰の問題

分離比はメンデルの法則に従うと3：1とか1：1に分離する．これはエンドウ豆やショウジョウバエの正常形質を用いた場合である．

ところが，DMDのような疾患の場合，往々にして淘汰の影響をうけやすい．本症の分離比の推定値が期待値より低いのはおそらく淘汰の影響ではないかとも考えられる．

淘汰には受精前淘汰，胎児期淘汰，出生後の淘汰などがある．この点については今後更に検討する予定である．

要　　約

X-連関遺伝の検討するため，鹿児島資料48家系64人についてDMD，Xg^a血液型，色盲について調査したが，資料分析は来年度すべての資料について検査が完了した時点で行なうので，本回は調査結果のみを報告する．

つぎはDMDの伴性劣性遺伝の仮説への適合性について分析したところ，(1)近親婚率が12.5±4.77％で一般集団のそれに比べ著しく高い．(2)分離比は伴性劣性遺伝の仮説に適合する．このことからDMDは伴性劣性遺伝形質と思われるが，分離比が期待値に比べ低いことの要因として，確認の問題，淘汰の問題などについて考察を試みた．

文　　献

1) ALAN,E.H.EMERY : Genetic linkage between the loci for colour blindness and Duchenne type muscular dystrophy. J. med. Genet., 3 : 92, 1966.

2) FISHER,R.A. : The effect of methods of ascertinment upon the estimation of frequencies. Ann. Eugen., 8 : 255, 1938.

3) BLYTH, HELEN, CARTER, C.O., DUBOWITZ, V., EMERY, A.E.H., GAVIN, JUNE, JOHNSTON, H.A., McKUSICK, V.A., RACE, R.R., SANGER, RUTH and TIPPETT PATRICIA : Duchenne's muscular dystrophy and Xg blood groups : a search for linkage. J. med. Genet., 2 : 157, 1965.

4) ZATZ, MAYANA., ITSKAN, SUELI B., SANGER, RUTH., FROTAPESSOA, O. and SALDANHA, P.H.:New linkage data for the X-linked types of muscular dystrophy and G6 PD variants, colour blindness,and Xg blood groups. J. med. Genet., 11 : 321, 1974.

11) 顔面肩甲上腕型脊髄性筋萎縮症
——臨床的，遺伝学的検討——

古　川　哲　雄*

顔面肩甲上腕型（FSH 型）筋ジストロフィー症に以た筋萎縮分布を示しながら，神経原性変化を呈する疾患については，著者らは Kugelberg-Welander 病の特殊型として報告し（1966, 1969）[1)2)]，同様の疾患は Fenichel ら（1967）[3)]によっても記載された．その後，本疾患に関しては数家系の報告があるのみである[4)]．

本研究では，新しく経験した7家系11例について，その臨床的，遺伝的問題点を，FSH 型筋ジストロフィー症と対比して検討した．

7家系の家系図は図1に示す通りである．11症例の年齢，性，発症年齢，初発症状，診察時の主要症状，血清 CPK 値，筋電図，筋生検，心電図所見は表1にまとめた．

発症年齢は7歳より49歳にわたり，この分布は FSH 型筋ジストロフィー症のそれと一致する．筋萎縮分布も同様である．

Kazakov ら[5)]は，FSH 型筋ジストロフィー症200例について詳しく検討し，2つの異なった家系があると記載している．1つは facio-scapulo-humero-peroneal type (jump type)，他は facio-scapulo-humero-peroneal-femorogluteal type (non-jump type) である．この2型は，FSH 型脊髄性筋萎縮症でも認められ，特に P-Family にみられるように

表 I

FAMILY	AGE	SEX	ONSET	INITIAL SYMPTOMS	MAIN FEATURES	CPK	EMG	BIOPSY	ECG
P-									
IV-4	19	M	11	shoulder weakness	facioscapulo-girdle atrophy	258	N+M	rt quad fem, rt gastroc M+N	RBBB
IV-2	27	M	9	shoulder weakness	facioscapulo-girdle-peroneal atrophy	72	N+M		RBBB
III-2	52	F	16	trouble running & holding up arms	milder than her children Gowers(+)	75	N		normal
III-5	43	M	25	shoulder weakness	scapuloperoneal atrophy	222	M		RBBB
T-									
II-1	50	F	13	difficulty in lifting arms	facioscapuloperoneal atrophy hip girdle mildly affected	128	N		
C-									
III-4	29	F	21	shoulder weakness	face slightly affected. scapula alata. no weakness in legs	161	N+(M)	lt deltoid, lt quad fem not significant	normal
S-									
II-3	66	M	19	winging scapula	(facio)scapulo-girdle-peroneal atrophy	119	N+(M)		incomplete RBBB
M-									
II-4	42	M	31	weakness & atrophy of rt pectoral muscle	facial weakness. rt pectoral weakness. rt deltoid pseudo-hypertrophy	63	N+M	rt deltoid, lt quad fem not specific	sinus bradycardia (57)
W-									
II-3	56	F	49	tiredness in walking & climbing up stairs	(facio)scapulo-girdle atrophy Gowers(++)	163	N	lt quad fem N	sinus bradycardia (54)
III-8	33	M	31	shoulder weakness	(facio)scapular atrophy	106	N		
H-									
III-5	57	M	7	facial weakness gen prox weakness	facioscapulo-girdle atrophy complicated by L1 cord lesion	34	N+M		high T wave

( ) indicates slight or minimal in main features and EMG. CPK: normal<100. N means neurogenic. M means myogenic.

*東京医科歯科大学医学部神経内科

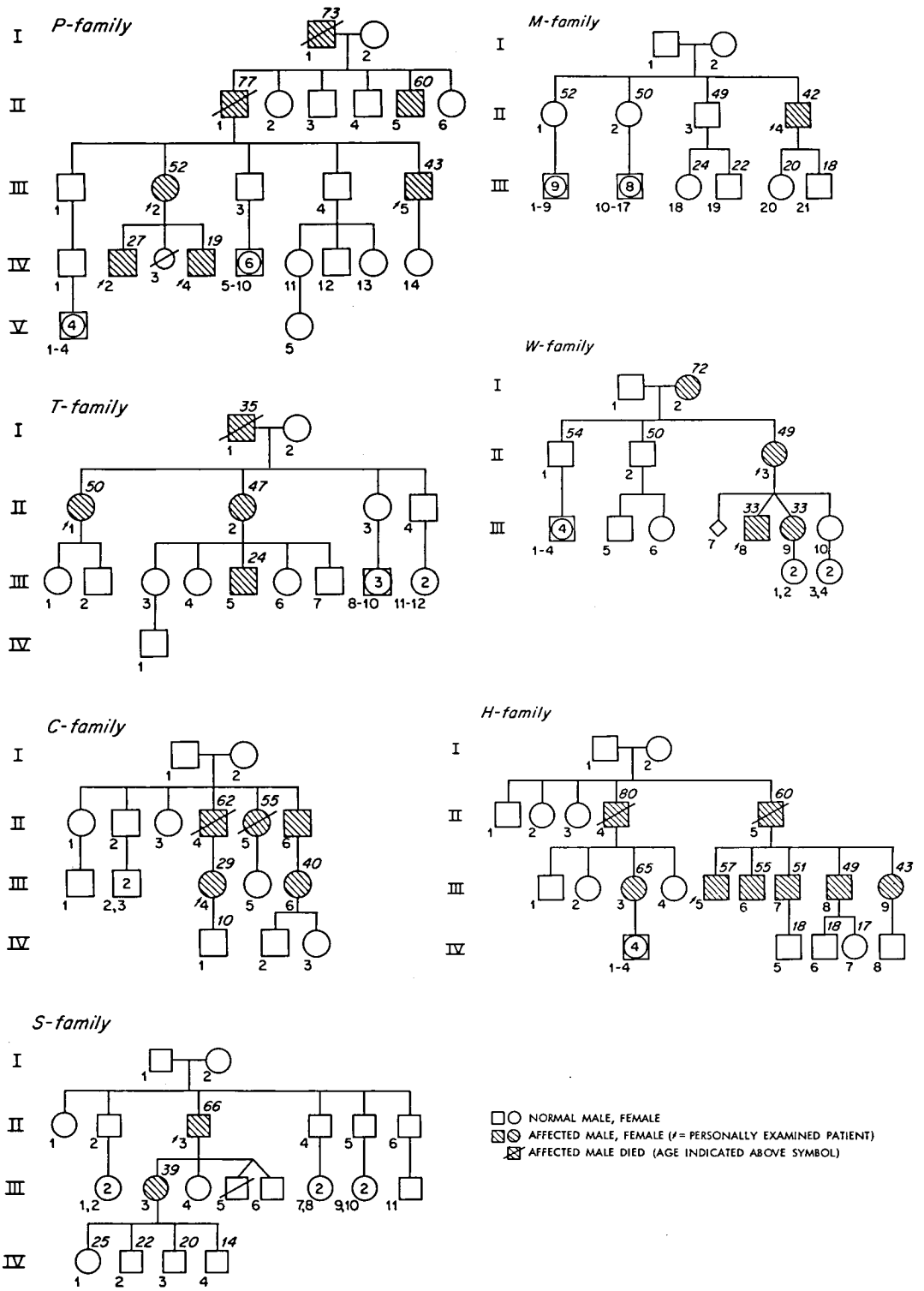

P-family
M-family
T-family
W-family
C-family
H-family
S-family
NORMAL MALE, FEMALE
AFFECTED MALE, FEMALE (/ = PERSONALLY EXAMINED PATIENT)
AFFECTED MALE DIED (AGE INDICATED ABOVE SYMBOL)

図 1

同一家系に両型が共存することが少なくない．典型的な両型が同胞に発症した家系については，別に報告した[6]．この両型は別の疾患ではなく，同一遺伝子の異なった表現型と云うべきであろう．

心電図では，多くの例に異常を認めた（表1参照）．FSH 型筋ジストロフィー症では心電図変化がまれであるとされているが，この点で本症はやや異なる．しかし，Emery-Dreifuss 病にみられるような高度の変化は認めなかった．

遺伝形式は図1の家系図にみるように常染色体性優性で，skipping を認めなかった．

結　　論

1．FSH 型脊髄性筋萎縮症は，常染色体性優性遺伝をし，Kugelberg-Welander 病，Emery-Dreifuss 病とも異なった独立疾患である．

2．Kazakov の jump type，non-jump type は，本症でも認められるが，これは同一遺伝子の表現型の違いであると考えられる．

3．本症では，FSH 型筋ジストロフィー症に比べ，心電図変化を認めることが多い．

文　　献

1) 古川哲雄，塚越廣，杉田秀夫，ほか：Kugelberg-Welander 病に関する臨床的および遺伝学的考察．臨床神経，6：148，1966．

2) Furukawa, T., Tsukagoshi, H., Sugita, H., et al:Neurogenic muscular atrophy simulating facioscapulohumeral muscular dystrophy, with particular reference to the heterogeneity of Kugelberg-Welander disease. J. Neurol. Sci., 9：389, 1969.

3) Fenichel, G. M., Emery, E. S. & Hunt, P.：Neurogenic atrophy simulating facioscapulohumeral dystrophy. Arch. Neurol., 17：257, 1967.

4) Furukawa, T. & Toyokura, Y.：Chronic spinal muscular atrophy of facioscapulohumeral type. J. Med. Genet., 13：285, 1976.

5) Kazakov, V. M., Bogorodinsky, D. K., Znoyko, Z. V., et al：The facioscapulo-limb (or the facioscapulohumeral) type of muscular dystrophy. Clinical and genetic study of 200 cases. Eur. Neurol., 11：236, 1974.

6) 古川哲雄：顔面肩甲上腕型筋萎縮症にみられる臨床的異種性．神経内科，11：595，1979．

12) Familial oculocranioskeletal neuromuscular disease with abnormal muscle mitochondria の follow up study

荒　木　淑　郎*

研究協力者　矢　崎　一　雄*　山　村　善　教*

はじめに

進行性外眼筋麻痺をはじめとする多彩な神経筋症状を呈し，ミトコンドリア異常を伴う疾患は従来種々の名称で報告されているが，病因が解明されていないため，相互の異同や疾患概念の位置づけについては不明の点が多い．1974年，田村ら[1]は，このような疾患が同胞4名に発症した例を，Familial oculocranioskeletal neuromuscular disease with abnormal muscle mitochondria という名称で報告したが，最近我々はそのうちの1名を7年後に再検査する機会を得たので，この間の臨床的経過を明らかにするとともに，文献上みられる類似症例と比較し，この疾患の位置づけについて再検討したので報告する．

症　例

34歳女性．独身．無職．

主訴：眼瞼下垂，眼球運動障害，嚥下困難，難聴．

現病歴：イトコ婚の両親の第5子として正常満期産にて出生．小学校の頃から動作が鈍く，学業成績も不良であった．中学校卒業後，1～2年洋裁店に勤務ののち自宅にて洋裁を営んでいたが18歳頃眼瞼下垂が現れ，20歳頃には眼球運動障害が明らかとなり，24歳頃には軽度の嚥下困難，鼻声，難聴が出現した．27歳の時(1973年)，以上の症状の精査のため九大神経内科に入院した．この時，長兄も同時に入院精査をうけて兄妹とも同一の疾患であることが確認されている．また28歳で溺死した長姉も病歴及び写真から同じ疾患であったことが推定され，第3姉は眼球運動障害のみを有することが確認されている．これらの所見は既に田村らにより報告されている[1]．退院後，患者は外来通院を中断したが，上記症状は徐々に進行し，最近では難聴と言語不明瞭のため，身近な人以外との会話は困難であった．しかし，自宅では家事や軽度の農作業を行い，普通食を摂取し，時には1～2km離れた商店まで自転車で買い物に行くこともあったという．1980年8月，難聴を訴えて宮崎市の耳鼻科医を受診した際，眼球運動障害の精査を勧められ，宮崎医大第3内科に紹介され入院した．

既往歴：特記すべき事はない．

家族歴：上記の如く，同胞5名のうち長姉，長兄，第3姉に同様の疾患があったと思われるが，長姉は既に死亡し，長兄も田村らの検索の後，1975年に嚥下性肺炎を思わせる症状で34歳にて死亡している．第3姉は現在36歳で日常生活に支障なく暮らしており，嚥下障害，構音障害，難聴などはないというが，今回は本人の協力が得られず検索していない．調査しえた限りでは，父母(イトコ婚)，祖父母の世代には同様の症状を呈した人はいない．

入院時現症：身長147cm，体重29kgと小柄でるいそうが目立つ．12歳，27歳，34歳時の全身像を図1に示す．一般内科的には著変はない．神経学的には，知能低下が認められ，(WAIS，言語性65，動作性68，全IQ65)，眼底には異常所見はない．眼瞼下垂があり，眼

＊宮崎医科大学第三内科

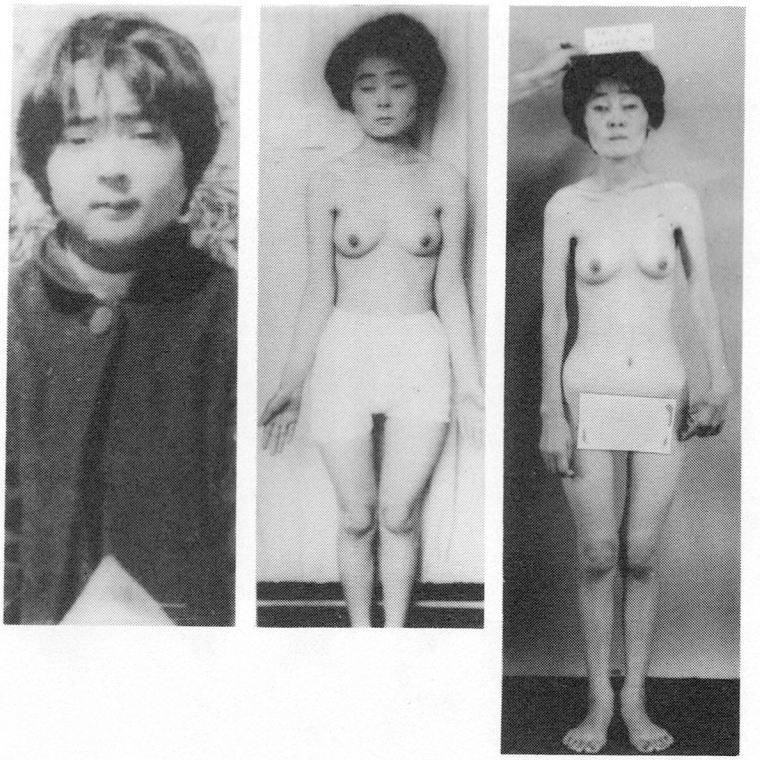


図1　12歳，27歳（田村らの検索時）及び34歳（今回の入院時）の全身像．

球運動も高度に障害され両眼ともわずかに外転しうる以外は動かない．一方対光反射と近見反応は保たれている．ミオパチー顔貌を呈し，側頭筋は萎縮している．咽頭の動きは悪く嚥下困難と微弱鼻声が認められ，発語はきわめて不明瞭である．感音性難聴が認められる．舌の萎縮や fasciculation はない．頸部挙上は不能で，胸鎖乳突筋をはじめ，頸部の筋萎縮が著明である．四肢では筋萎縮と筋力低下は上肢帯筋に最も強い．軽度の Gowers 徴候がみられるが歩行はほぼ正常である．Fasciculation はなく，myotonia 現象もみられない．腱反射は全般に低下している．小脳症状や感覚障害はみとめられない．

検査所見：検血，検尿には異常を認めない．血液化学：総蛋白6.8g/dl，アルブミン4.0g/dl，GOT 17 U/L，GPT 4 U/L，LDH 313 U/L，CPK 70 U/L（正常5—120），アルドラーゼ1.0U/L，他肝腎機能，血清脂質，電解質等は正常である．髄液検査では，初圧75 mmH_2O，水様透明，細胞数1/3（リンパ球），蛋白50mg/dl，糖48mg/dl である．心電図は伝導障害なく正常である．脳波では6～7 Hz の θ 波の混在を認める．テンシロン試験は陰性である．運動神経伝導速度は四肢では正常であるが，顔面神経では latency3.4 msec で軽度の遅延が認められた．反復刺激による waning や waxing はみられなかった．

針筋電図は，右胸鎖乳突筋，右三角筋，左上腕二頭筋では低振幅で持続の短い motor unit と十分な干渉波形が得られ，筋原性変化が主体であるが，一部に安静時放電がみられた．右上腕三頭筋，右拇指球筋ではこれらの所見に加えて高振幅の motor unit が混在し，motor unit の数も軽度減少していた．右大腿四頭筋では，安静時放電はないが，高振幅，多相性で持続の長い motor unit が主体となり，最大振幅5 mV の giant action potential

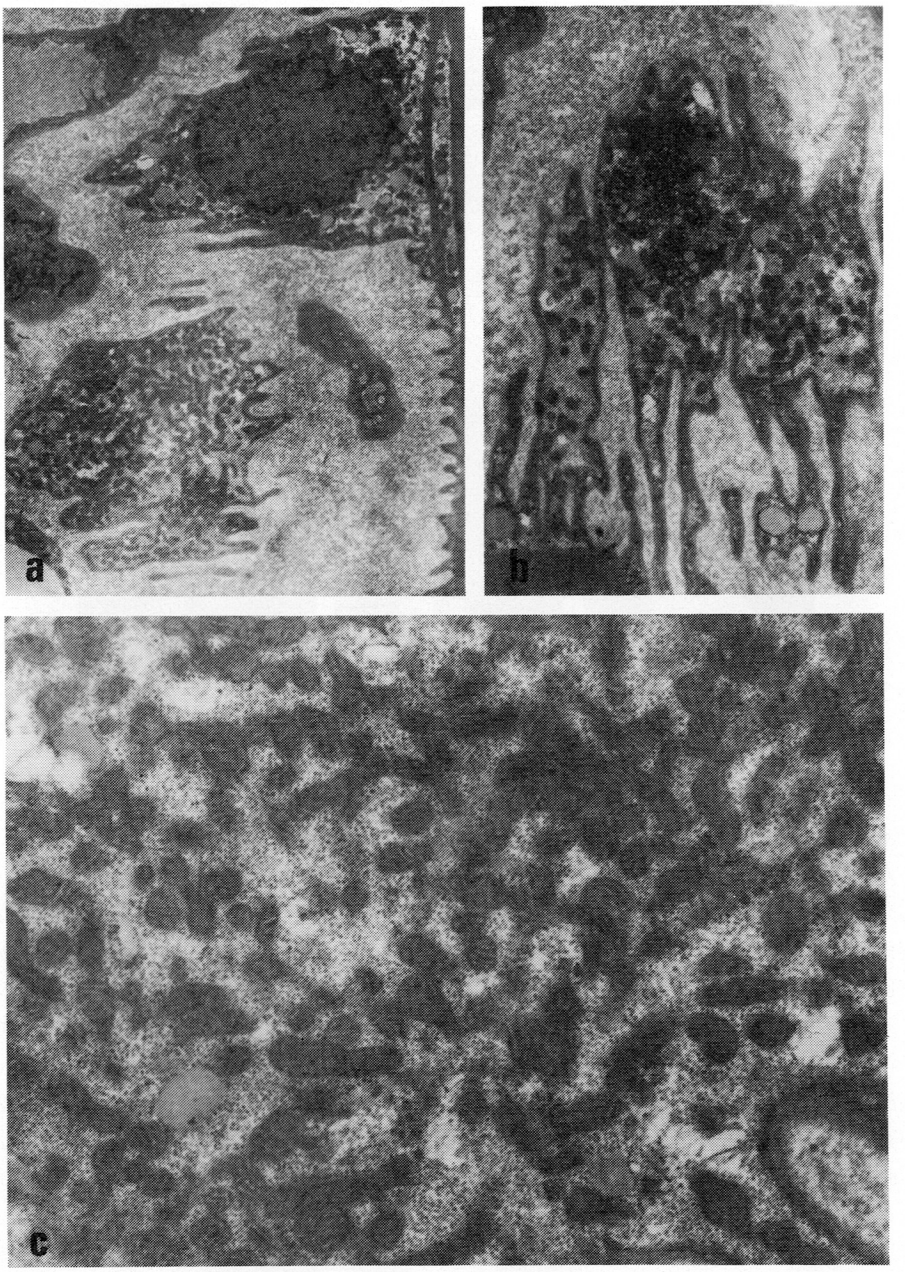


図2　a　plasma membraneに囲まれた島状の著明なミトコンドリアの集積を示す．4000倍．

b　突出したplasma membraneの内部にミトコンドリアの集積と脂質の増加が認められる．6000倍．

c　aでみられる島状のミトコンドリアの集積した部分の拡大像．大部分のミトコンドリアは正常大で，クリステの形態も正常であり，結晶様封入体は見出し得なかった．20,000倍．

が出現，干渉波形も十分でなく，神経原性変化が主体であった．

筋生検所見：左大腿四頭筋で施行した．光顕では，筋線維の軽度の大小不同が認められるが，萎縮線維の多くは angular fiber であった．顆粒様変化を示す筋線維が散在性にみられ，これらには小空胞や筋鞘下の clear space がみられた．中心核が37%の筋線維にみられた．結合織は中等度増加し，特に perimysium に著明であった．一部に細胞浸潤も認められた．Gomori-trichrome 変法による染色では，H.E. で顆粒様変化をみた筋線維に一致して ragged red fiber と思われる線維を認めるが赤染物質は比較的少量であった．DPNH 染色では ragged red fiber と考えられた線維の筋鞘下に濃染する部位を認め，moth-eaten fiber も存在した．

電顕では，特に筋鞘下に著明なミトコンドリアの異常集積像を認め，グリコーゲン，脂肪滴の増加も認められた．しかし異常増加したミトコンドリアは大きさも形態も正常と思われるものが多数を占め，明らかな結晶様封入体は認められなかった（図 2.a，b，c，）．

CT（GE 社 CTT で施行）では対称性の白質の広汎な low density area を認め，この部の CT number は25.4で有意の低値であった（図 3）．

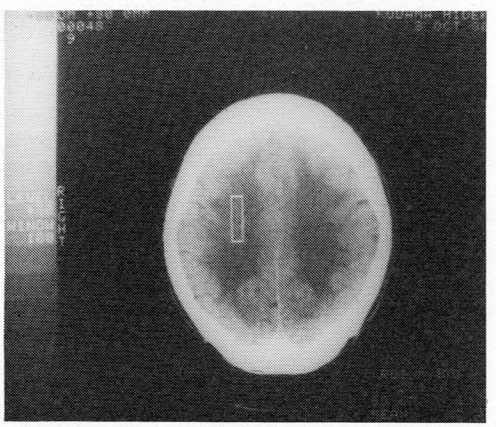


図 3　CT所見，白質の対称性の low density area を示す．（GE社 CT/Tで施行）

考　　察

今回の所見を1973年の田村らの所見と比較して**表 1** に示す．本症例の基本的な病像は27歳の検索時にほぼ完成されており，その後 7 年間の進行は比較的軽度であったと思われるが，知能低下と難聴は進行したと思われる．また**図 1** に示した如く，全般的な筋萎縮もわずかであるが進行している．新たに脳波異常がみいだされている．筋電図では，7 年前に右上腕二頭筋で筋原性変化のみがみられたのに対し，今回は部位により筋原性変化が主体の筋と神経原性変化主体の筋があり，筋生検所見にも**表 1** に示すような違いがみられた．生検所見の違いが時期の違いによるのか部位の差によるのかの判断には慎重を要する．新たに CT の異常がみいだされている．

次に，1976年 Berenberg ら[2] がまとめた35例の Kearns-Sayre 症候群と本例を比較してみる（**表 2**）．本症例は Kearns-Sayre 症候群の 3 主徴とされる症状のうち，網膜色素変性

表 1　田村らの報告と 7 年後のfollow upの所見の比較

	1973年（田村ら）	1980年（著者ら）
年　齢	27	34
筋力低下 及び 筋萎縮	外眼筋；高度 顔面筋 球麻痺 頸筋・近位筋 } 中等度 遠位筋　；　軽度	同　左 独歩可 普通食摂取可 日常生活に介助不要 会話困難
知能低下 感音性難聴 小脳症状 網膜色素変性	記載なし 軽　度 （－） （－）	IQ 65（WAIS） 右20 dB，左30 dB （－） （－）
E C G E E G 髄液蛋白 CPK，LDH	伝導障害（－） 正　常 75 mg/dl 正　常	伝導障害（－） 5～6 Hzθ波混入 50 mg/dl 正　常
N C V	記載なし	顔面神経：遅延 四　肢　：正常
E M G	rt. biceps 筋原性変化 （持続の短い低電位 NMU，正常干渉波形）	rt. deltoid，lt. biceps rt. sternocleidomastoid： 筋原性変化主体 rt. triceps. rt. thenar 筋原性変化＋高電位NMU 干渉波形やや減少 rt. quadriceps 神経原性変化主体
筋生検 筋線維大小不同 中心核増加 顆粒様変化 結合織増加 angular fiber ragged red fiber ミトコンドリア増加 〃　形態	Lt. biceps 軽度 （－） （＋） （＋） （－） （＋） （＋） 異常	Lt. quadriceps 軽度 （＋） （＋） （＋） （＋） 少ない （＋） 正常
C T	施行せず	白質の diffuse low density

表2　Kearns-Sayre症候群との比較

	Kearns−Sayre	本家系
発症年齢	出生時〜20歳	18〜20歳
家族発症	(−)	(+)
外眼筋麻痺	(+)	(+)
網膜色素異常	(+)	(−)
心伝導障害	(+)	(−)
球麻痺	(+)〜(−)	(+)
四肢筋萎縮	(+)〜(−)	(+)
知能低下	(+)〜(−)	(+)
難聴	(+)〜(−)	(+)
小脳症状	(+)〜(−)	(−)
CT異常	?	(+)
髄液蛋白	59〜235mg/dl	50〜75mg/dl
ミトコンドリア異常	(+)	(+)

と心伝導障害を欠いているが，他の症状のspectrumは比較的よく似ている．Berenbergらは，35例の中には3主徴をそろえた例の家族性発症はみられなかったと述べている[2]が，5例には一部の症状の家族内発症を，1例には血族結婚を認めており，3主徴を満たさぬ類似例には家族性発症を示す例があることを記載している．

本症例の如き病像を呈する疾患の家族性発症を明確にとらえた報告は田村らの原報告が最初であったが，その後川崎ら[3]，Leshnerら[4]，岡本ら[5]，Schnitzlerら[6]，加知ら[7]，の報告が文献上みられる．岡本らと加知らの例は発端者以外は1症状のみの不全型と思われ，発端者以外の詳細な検討はされていないが，本症例と同様のCT異常を示している点が注目される．川崎らの症例はKearns-Shy症候群として報告されているが，心伝導障害を欠いている．一方Leshnerらの報告例はKearns-Sayre症候群の3主徴を具えた患者が常染色体性優性遺伝を思わせる形で家族性に出現している．これら5報告にみられる症例は，症状のspectrum，遺伝形式，浸透率等に微妙な違いがあり，すべてを同一の疾患と断定することはできないが，Kearns-Sayre症候群類似の症状が家族性に出現している点で本例とともに興味が持たれる．

Ophthalmoplegia plusという概念を提唱するにあたってDrachmanが指摘した如く[8]，原因不明で多彩な症状を示す疾患を分類する場合，何をもって各症例の区別と連関を論ずるのかが問題となる．Kearns-Sayre症候群のcriteriaの妥当性や本症例の如き類似症例の位置づけを明確にするためには，今後更に病因論的な研究が必要と思われる．

まとめ

①1974年田村潔らの報告したFamilial oculocranioskeltal neuromuscular disease with abnormal muscle mitochondriaの1症例を7年後に再検した．

②症状の進行は7年間で比較的軽度であり，特に主要病変は27歳の時点でほぼ完成していたと思われる．今回の検索で新たにみいだされた以前と異なる所見をあげると，㋑筋電図で部位により筋原性変化主体の筋と神経原性変化主体の筋があったこと，㋺筋生検で以前の所見に加えて，angular fiberの存在，中心核の増加がみられ，ragged red fiberはむしろ少なく，電顕的にはほぼ正常形態のミトコンドリアの異常集積を認めたこと，㋩CTで白質の広汎なlow density areaを認めたこと，等である．

③文献上，本症例に類似した疾患が家族性に発症した報告がいくつかみられるが，これらの疾患概念上の位置づけには未だ不明の点が多く，今後の症例集積と病因の解明が必要である．

［謝辞］：本症例の12歳及び27歳時の貴重な写真を御提供いただいた，九州労災病院神経内科，田村潔先生に感謝いたします．

文献

1) Tamura, K., Santa, T., & Kuroiwa, Y.: Familial oculocranioskeletal neuromuscular disease with abnormal muscle mitochondria. Brain, 97：665, 1974.

2) Berenberg, R.A., Pellock, J.M., DiMauro, S., et al. : Lumping or splitting ? "Ophthalmoplegia-plus" or Kearns-Sayre syndrome? Ann. Neurol., 1 : 37, 1977.
3) 川崎研一，木下真男，里吉営二郎，ほか：Kearns-Shy 症候群の 2 例．日内会誌，64：19，1975.
4) Leshner, R.T., Spector, R.H., Seybold, M., et al. : Progressive external ophtalmoplegia (POE) with ragged red fibers : An intrafamilial study. Neurology (Minneap.), 28 : 364, 1978.
5) 岡本俊子，向山昌邦，飯田光男，ほか：広汎な CT 異常像，駆血運動負荷試験異常を呈し難聴を伴った ocular myopathy 症例．臨床神経，18：557，1978.
6) Schnitzler, E.R., & Robertson, W.C.Jr. : Familial Kearns-Sayre syndrome. Neurology (Minneap.), 29 : 1172, 1979.
7) 加知輝彦，加藤寿雄，小原博享：CT 上広汎な白質の low density を呈した ophthalmoplegia plus の 1 例(会)．臨床神経，20：54，1980.
8) Drachman, D.A. : Ophthalmoplegia plus. The neurodegenerative disorders associated with progressive external ophthalmoplegia. Arch Neurol.,18 : 654, 1968.

13) 筋緊張性ジストロフィー症の脳のCT－SCAN所見の検討

井 村 裕 夫*

研究協力者　大 井 長 和*　太 田　光*　立 岡 良 久*
西 谷　裕**　今 井 輝 国***

はじめに

筋緊張性ジストロフィー症（以下MD）は，筋力低下，ミオトニー，白内障や内分泌機能障害なども示す．さらに，知能低下，滑動性眼球運動異常，脳波異常，視床ニューロン内の封入体の存在やlight-near dissociationは，中枢神経系病変の存在を示唆している．著者らは，昨年の本研究班々会議にてMD患者は，赤外線電子瞳孔計による検索にて直接対光反射の最大縮瞳速度の著明な低下とlight-near dissociationを認めることを報告した．しかし，この責任病巣と想定される中脳は，CT-SCANでは異常所見を示さなかった．今回は本症における中枢神経系とりわけ天幕上の変化をCT-SCANを用いて検討した．

対照と方法

対照はMD群11名（30～39歳男4名，40～49歳男3名，50～59歳男3名，40～49歳女1名）と対照群31名（30～39歳男5名，40～49歳男5名，50～59歳男6名，30～39歳女4名，40～49歳女3名，50～59歳女8名）であった．非器質性疾患患者を対照とした．使用したCT機器は，EMI1010とDELTA50 FSの2機種で，スライス面は原則的にCM-lineに15°の角度で行なった．前者の撮影条件は，スライス幅10mm，MATRIX160×160，走査時間1分または4分であり，後者の撮影条件は，スライス幅8 mm，MATRIX256×256，走査時間18秒であった．得られたCTの計測部位として，最大前角間距離（A），最大第三脳室幅（B），最大頭蓋円径（C），最大側脳室体部間距離（E）および半球間裂を選び，透明なメジャーを用いて測定した．これらから，anterior horn index (A/C)，cella media index (E/C) とIII rd ventricle index (B/C)を計算して，%表示とし天幕上の脳室系の評価のパラメーターとした．半球間裂は少しでも開大を示すものを陽性とし，陽性の発現率を計算した．

結　果

Anterior horn indexは30～39歳男MD群30.9±3.0 ($p<0.05$)，対照群25.5±2.3，40～49歳男MD群30.6±4.7，対照群25.9±3.0，40～49歳女MD28.2，対照群26.6±1.1，50～59歳男MD群31.4±2.3($p<0.05$)，対照群26.5±1.2を示した（図1）．値はいずれも%表示で，M±SEを表わし，以下の図でも同様である．30歳台の男と50歳台の男のMD群のanterior horn indexは対照群に比較して有意に大きく，前角の萎縮を示唆した．Cella media indexは30～39歳男MD群24.3±3.4，対照群18.8±3.8，40～49歳男MD群30.8±4.6 ($p<0.05$)，対照群21.5±2.7，40～49歳女MD25.6，対照群22.6±2.4，50～59歳男

＊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
＊＊＊大阪北野病院神経内科

MD群29.4±3.8（p<0.05），対照群21.1±2.2であった（図2）．Cella media indexは，40歳台と50歳台の男のMD群では対照群に比して有意に大であった．III rd ventricle indexは，30～39歳男MD群4.8±1.7（p<0.05），対照群2.5±0.5，40～49歳男MD群5.7±2.4(p<0.05)，対照群2.6±0.5，40～49歳女M D3.9，対照群2.3±0.9，50～59歳男MD群6.6±1.7（p<0.05），対照群3.1±1.0を示した（図3）．III rd ventricle indexは，30歳台，40歳台，50歳台といずれの年齢層でも対照群に比して大きかった．図4に40歳台のMD患者の第3脳室を含んだスライス面で撮影したCTと対照者のそれを示した．半球間裂の開大の発現率を表1にかかげた．対照群に比較してMD群では，半球間裂の開大している症例が多い傾向を認めた．

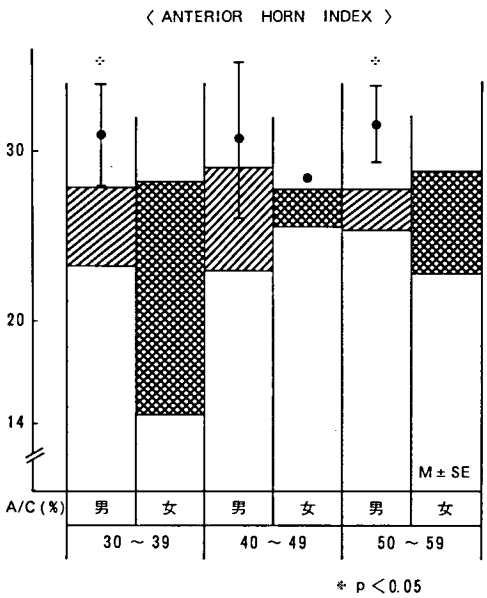


図1　陰影をした範囲は対照群の値を示す．30歳代男と50歳代男で有意差を示す．

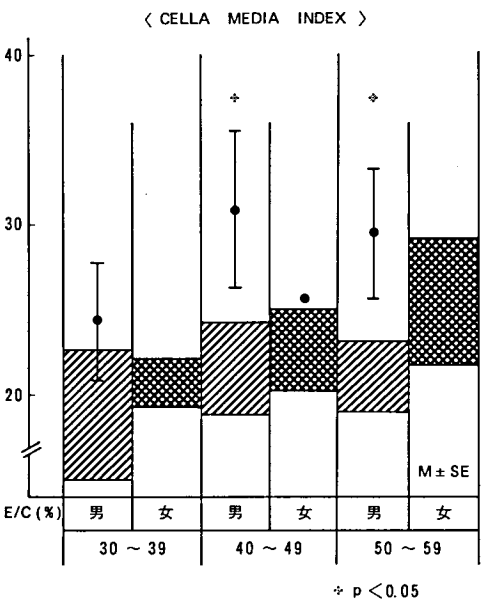


図2　40歳代男と50歳代男で有意に大きいことを示す．

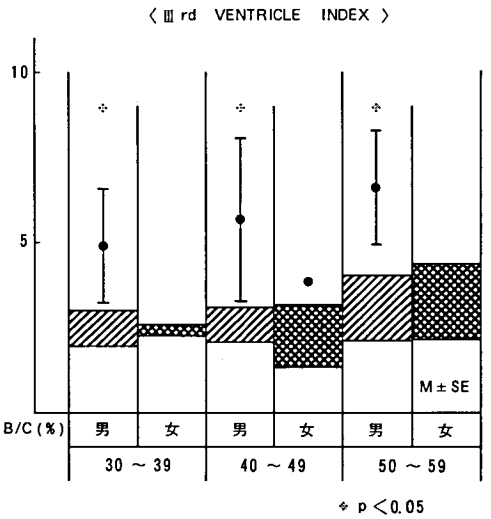


図3　各年齢層の男のindexは対照群に比して有意に大きい．

表1　半球間裂は，MD群では年齢に比しても開大傾向を示す．

〈 半　球　間　裂 〉

	30 ～ 39		40 ～ 49		50 ～ 59	
	男	女	男	女	男	女
患者群	2 / 4 (50 %)		1 / 3 (33 %)	0 / 1 (0 %)	2 / 3 (67 %)	
対照群	1 / 5 (20 %)	0 / 4 (0 %)	1 / 5 (20 %)	1 / 3 (33 %)	3 / 6 (50 %)	4 / 8 (50 %)

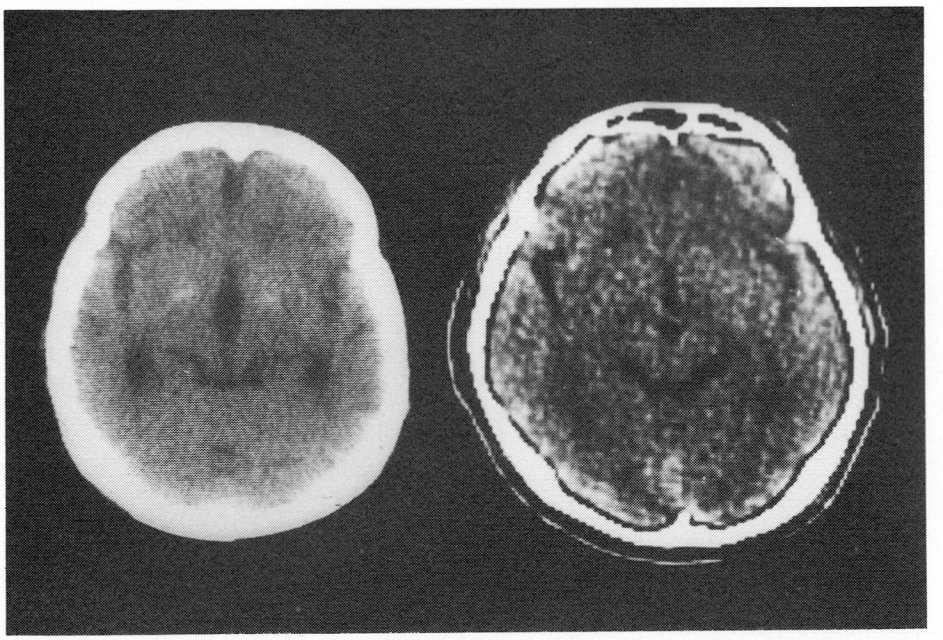


図4　40歳代男の1例のCT-SCANを示す．右が対照者，左がMD患者で第三脳室の拡大と基底核の石灰化をMD患者で認める．

考　　察

従来から，筋緊張性ジストロフィー症患者では，種々の神経内分泌学的異常[1]が報告されている．これらの異常のなかで，コルチゾールの日内リズムの異常，インシュリン負荷試験時のコルチゾールの低反応や糖負荷試験における反応性低血糖に対するHGHの無反応は，間脳病変に基因すると考えられている．そこで，CTにより天幕上の変化を検討した．著者らが，脳室系の変化のパラメーターとして用いたanterior horn index, cella media index, III rd ventricle index[2]は，いずれも各計測値を最大頭蓋内径で処理をしている．この時に問題となるのは，本症に比較的高頻度に認められる頭蓋骨のhyperostotic change[3]である．この変化の要因として，HGHの分泌異常が想定されている．最大頭蓋内径は，近似的に最大大脳横径に対応すると考えられるので，計測に容易な頭蓋内径を使用した．

半球間裂は，本症群で30歳台から対照群に比して開大傾向にあり，anterior horn indexも有意に大であることは，前頭葉の萎縮がこの年齢層から発現することを想定させた．また，いずれの年齢層でもIII rd ventricle indexが対照に比して有意に大であり，このことは間脳の萎縮を示唆した．本症における神経放射線学的異常として，気脳写による検査所見から第三脳室の拡大と側脳室体部の拡大が著明な所見として報告[4]されており，著者らの結果とも一致する．このことは，本症における神経内分泌学的異常の形態的表現とも考えられるが，第三脳室の拡大はもとより本症に特異的な所見ではない．また，CTの所見のみから脳萎縮の有無を結論することは困難であるが，第三脳室の拡大は間脳の萎縮を示唆する所見といえよう．CTにおける第三脳室の拡大の程度と間脳機能異常の対応を検討することが必要である．罹患年数と脳室拡大の相関は今回の分析では明確に認められなかったが，従来の報告[5]では有意の相関をもつとされている．この点についても，以後の観察に

より検討が必要と思われる.

文　　献

1)高井恒夫，高橋桂一，井村裕夫，ほか：内分泌学的に精査した筋緊張性ジストロフィー症の一例．最新医学，31：1014，1976.

2) Haug, G.: Age and sex dependence of the size of normal ventricles on computed tomography. Neuroradiology, 14: 201, 1977.

3) Chiro, G.D. & Gaughey, J.E., Skull changes in eighteen cases of dystrophia myotonica. Acta. Radiol., 54: 22, 1960.

4) Refsum, S., Engest, A. & Lönnum, A.: Pneumoencephalographic changes in dystrophia myotonica. Acta Psychiatr. Scand. (Suppl. 137), 34: 98, 1959.

5) Refsum, S., Lönnum, A., Sjaastad, O., et. al.: Dystrophia myotonia. Neurology (Minneap.), 17: 345, 1967.

14) ＦＳＨ型筋萎縮症の特殊例の１症例について

植　田　啓　嗣*

研究協力者　畑　中　良　夫*　野　島　元　雄**　井　上　正　史**

はじめに

進行性に筋萎縮を来たす疾患は，神経原性と筋原性に大別され，前者は遠位筋，後者は近位筋の障害が主であるとされながらも，発症年齢，筋萎縮の分布，進行度，遺伝様式をもとに，それぞれの点で両者の類似性や相違性が議論されながら，そこに統一的見解を作るべく努力が積み重ねられてきた[1)2)]．

顔面・肩甲・上膊部に筋萎縮を来たす症例に対してもそれは例外ではない．顔面・肩甲・大腿型，顔面・肩甲・下腿型，顔面筋罹患を伴わない肩甲・下腿型などの亜型が指摘され，その成因も一致をみている訳ではない．

私共は，顔面・肩甲・上膊型の一亜型とみなすべき特異な症例を経験したので，ここで報告したい．

症　例

症例：30歳の男性，無職．

主訴：上肢挙上困難と歩行障害．

家族歴：血族結婚㈠，兄弟３人のうち，兄も跛をひいているとのことであるが，遠方に住んでいるので詳細は明らかではない．

既往歴：特記すべきことなし．

現病歴：15歳頃より，物を高く挙げられなくなり，徐々に上肢の挙上が困難となった．17歳頃から早く走れなくなり，同時に両側足関節の背屈運動が困難となった．次いで登攀性起立，動揺性歩行が現われた．29歳頃には，よく転ぶようになり，また右手首の背屈運動にも障害を来たし，顔面筋の萎縮も出現したため，精査入院となった．

入院時所見

全身的一般所見：特別の異常を認めない．

神経学的所見：瞳孔，眼球運動は正常であるが，左右の目を完全に閉じることは出来ず，また口はなんとか閉じられるが口笛を吹くことが出来ない．しかし舌挺出は直で，舌の萎縮，線維束性攣縮は認められない．以上脳神経領域では眼球運動や舌や嚥下障害もなく，顔面筋にのみで障害が認められた．

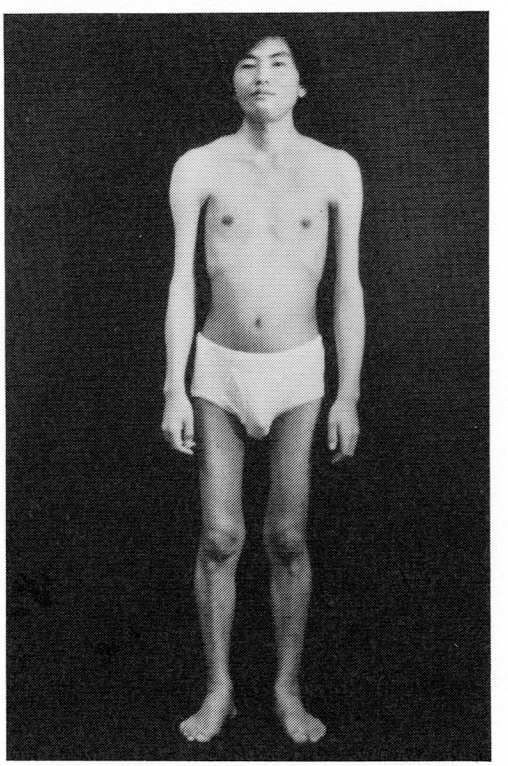


図１　全身像

＊愛媛大学保健管理センター

＊＊愛媛大学医学部整形外科

上肢挙上は両側とも肩の高さまでしか挙げられず，肘関節の屈曲，伸展並びに右手関節の伸展力に低下が認められたが，握力は左右とも30kg以上とほぼ正常であった．

歩行は動揺性で，登攀性起立を行ない，且つつま先立ちができない．しかし，踵立ちは可能であった．

筋の萎縮は顔面，肩甲，上腕部，前腕部伸展側，それに腰帯部，前脛骨部に認められた（図1）．つまり筋萎縮は前脛骨部を別にすると上下肢とも近位筋が著明であった．

萎縮筋での筋線維束性攣縮は認められない．深部腱反射は上下肢で減弱しているが，表在性並びに深部知覚には異常は認められず，運動失調，不随意運動，関節拘縮なども認めない．

検査成績（表）：末梢血一般及び検尿に異常を認めない．血沈値は1時間4 mm，2時間16 mm．CRP，RA，抗核抗体，梅毒反応などの血清学的検査は全て正常で，肝機能検査，血清電解質にも異常は認められない．

血清酵素はCPK値154u（正常＜70u），Aldolase値3.1u（正常＜2.2u）で軽度上昇しており，尿化学でもクレアチンが610mg/dayと軽度上昇していた．

表　検査成績

Urinalysis , Hemogram	: normal range
E.S.R.	: 4 mm/h, 16 mm/2h
Chest X-ray , E.C.G.	: normal
Liver function	: normal range
Thyroid hormon	: T_4 6.4 ug% , T_3 132 ng/100ml
Blood chemistry	: Na 141mEq/L, Cl 105mEq/L,K 4.8 mEq/L, Pi 4.9mg/dl, Uric acid 4.8mg/dl, Urea-N 20mg/dl, Cholesterol 143mg/dl, Creatine 0.9mg/dl, Creatinine 0.7mg/dl
Serology	: C.R.P. (-),R.A.(-),A.N.A.(-),Wa-R(-)
Urine chemistry	: Creatine 610mg/day Creatinine 620mg/day
Serum enzyme	: L.D.H. 87u, C.P.K. 154u, aldolase 3.1u
C.S.F.	: normal
Cervical-lumbal spine X-ray	: normal

甲状線機能検査では$T_4$6.4μg/dl（5～13.7），$T_3$132μg/dl（90～170）でいずれも正常域値を示していた．

胸部，頸椎，腰椎のX線所見や心電図にも異常は認められない．

筋電図：右上腕二頭筋と右腓腹筋の筋電図（図2）であるが，前者でshort duration, low voltage傾向の混入を認めるが，minimal contractionで，1～3 m voltの比較的高振幅のNMUが主となっている．後者ではgiant spikeを混入し，全体に高振幅波型を示したが，unitの減少は認められなかった．全体的として神経原性とみなすべき所見と考える．

なお運動神経伝導速度は右尺骨神経が53 m/sec，右脛骨神経が52m/secと，ともに正常域値を示した．

筋生検所見：前脛骨筋では萎縮が著明なので，肉眼的に萎縮の認められない右腓腹筋で筋生検を行ない，ホルマリン固定によるHE染色，新鮮凍結切片によるHE染色，Gomori trichrome染色，pH9.4でのATPase染色をそれぞれ行なった．

図3は新鮮凍結切片のHE染色，及びATPase染色である．前者では基本構築がよく保持され，散在性の変性を認めるのみであった．後者でもタイプI，タイプII線維はモザイク

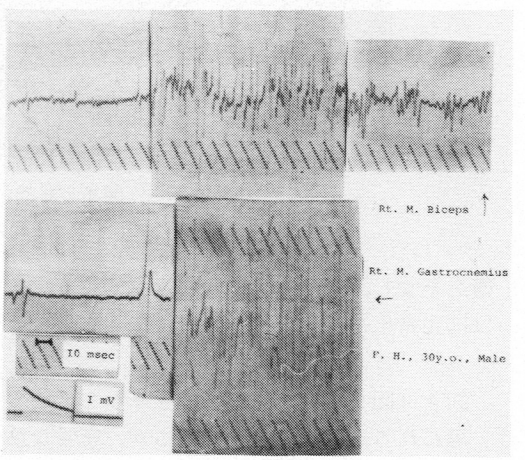


図2　筋電図

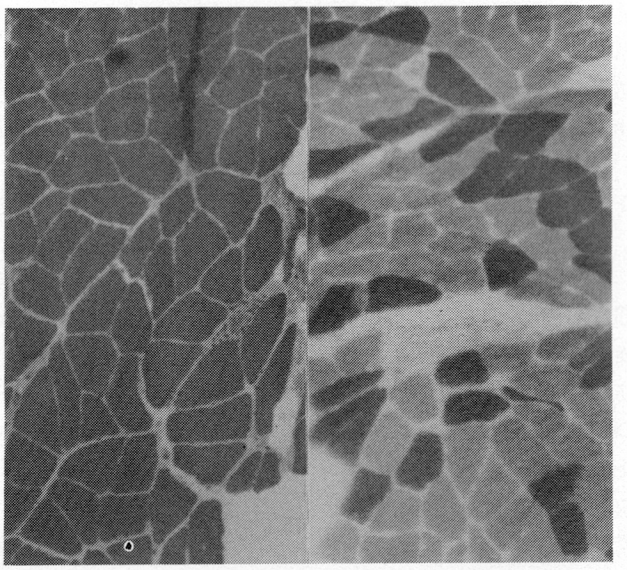


図3　腓腹筋．新鮮凍結切片　×100
左：HE染色　右：ATPase染色

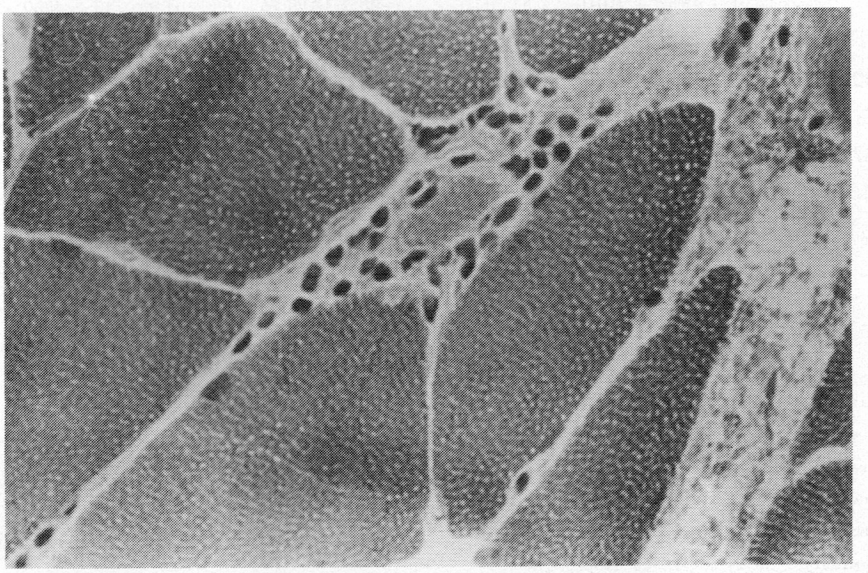


図4　腓腹筋．新鮮凍結切片
HE染色　×400

構造をなし，type groupingは認められず，ほぼ正常に近い組織像を示しているものと考える．

図4は図3で散在性に変性を来たしていると思われる部分の強拡大であるが，正常な筋線維のなかに，いわゆるfloccular changeを来たした線維が認められ，一部にphagocytosisを混じていた．

考　　察

本症例の特徴をまとめてみると，①発症が15歳であること，②進行が遅いこと，③血清

酵素値が軽度上昇していること，④筋萎縮型が特異的で，上肢では近位筋，下肢では遠位筋の障害が優位であるが，顔面筋の萎縮も伴っていること，特にその筋侵襲の過程はまず上肢で近位部から遠位部へ，次いで下肢で遠位部から近位部へと進み，発症10年以後には顔面筋にも及んでいる．そして脳神経領域では，眼球，舌，嚥下などの運動は総べて正常で，障害は顔面筋にのみ限局していること，⑤筋電図所見で high amplitude が目につくものの，short duration, low voltage も混入し，また放電数も減少はほとんどみられず，typical な denervation pattern を示していないこと，⑥筋生検所見で floccular change を認めることなどが挙げられる．

顔面・肩甲・上膊型の良性経過をたどる筋萎縮症は，下肢に萎縮を伴わない筋ジストロフィー症，Kugelberg-Welander 病，慢性限局性多発性筋炎，顔面筋罹患を伴わず，下肢に萎縮を伴う scapulo-peroneal atrophy, Emery-Dreifuss 病[3] などが報告されている．

このうち，多発性筋炎に関しては，本症例には寛解の認められないこと，皮膚発赤や筋痛を一度も認めていないこと，血沈，CRP, RA，抗核抗体などが頻回の検査で常に陰性であり，筋生検所見でも炎症所見を伴っていないことなどから否定されよう．

また Emery-Dreifuss 病としては，関節拘縮，心伝導系の障害を認めず，且つ顔面筋障害を伴う点でまた態度を異にしている．

しかし，筋電図，筋生検では，いずれも神経原性所見が強いが，筋原性変化も混在させている．且つその経過は，15歳発症で現在の年齢が29歳と極めて長い．血清 CPK 値にも軽度ではあるが上昇がみられる．したがって neuropathy よりの myopathy, つまり広義の Kugelberg-Welander 病（症候群）とみなすべき疾患であると考える．

慢性の脊髄性筋萎縮症（SPMA）は，良性経過をたどる Hoffmann 病と Kugelberg-Welander 病を結びつけ，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型の3亜型に分類している[4]．

一方，そこに見出されてくる筋萎縮型も，筋電図，筋生検で神経原性所見が確認される症例を整理すると，筋ジストロフィー症の病型分類と同様，肢帯型，顔面・肩甲・上膊型，末梢型，眼筋・咽頭筋型の4亜型に分類し得ると古川らは述べている[5]．

ところで，そのなかの顔面・肩甲・上膊型の筋萎縮型であるが，大腿部に萎縮を伴うもの伴わないもの，下腿部に萎縮を伴うもの伴わないもの，顔面筋の罹患を伴うもの伴わないものなどがみられ，さらに細亜型に分類しうる可能性があるだろう．

しかし本症例は，発症部位は上肢の近位部であるが，その後筋萎縮は，下肢の遠位部に現われて近位部へ，そして顔面筋に，さらに前腕伸展筋へと広がりを示した．これからみると，上記の報告例はある時点の筋萎縮型が捕えられているにすぎず，その後の時間の経過で，類似の筋萎縮型をとるものとも想定されよう．

したがって，何故発症がその部位から始まるのかという問題は残るとしても，現在の時点では，一応類症例として把握しておくのが妥当であるものと考える．

ま と め

① 15歳で，上肢挙上の障害で発症し，筋萎縮が上肢では近位部から遠位部へ，下肢では遠位部から近位部へと緩徐に進行し，発症14年後には顔面筋にも及び，兄も類症者である可能性のある男子症例を報告した．そして血清酵素は軽度上昇し，神経原性，筋原性変化を混入した筋電図・筋生検所見を示していた．

② この種の症例は，剖検例の少ない現在，更にきめ細かく診ていく必要性があるものと考える．

文　献

1) Walton, J. N. : Disorders of Voluntary Muscle. 3rd Edition, Churchill, London, 1974, p. 870.

2) 古川哲雄：脊髄性進行性筋萎縮症の分類と Kugelberg-Welander 病．神経内科，12：319，1980.

3) Rowland, L. P., Fetell, M., Olarte, M., et al. : Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Ann. Neurol., 5 : 111, 1979.

4) 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 : 203, 1971.

5) Furukawa, T., Tsukagoshi, H., Sugita, H., et al. : Neurogenic muscular atrophy simulating facioscapulohumeral muscular dystrophy, with particular reference to the heterogeneity of Kugelberg-Welander disease. J. Neurol. Sci., 9 : 389, 1969.

15） Centronuclear Myopathy 10代発症遠位型の１例

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

centronuclear myopathy と myotubular myopathy は，同じカテゴリーに一応分類されているが，個々の症例の臨床像のみをみてもかなりの拡がりがみられる．ここでは，最近我々が経験した10代に発症し眼筋の罹患が明らかでない遠位型萎縮を示した centronuclear myopathy の１例を示し，考察を行なう．

症　例

症例：27歳男

主訴：上下肢特に左下肢の筋力低下．

現症歴：12歳で左足関節背屈困難出現．走行は遅かった．16歳で階段昇降困難となり，漸次増強，20歳で懸垂運動不能に気付く．23歳で全身の筋脱力を訴えた．複視，嚥下困難には気付いていない．

家族歴，既往歴：特記すべきものなし．

現症：意識，知能，見当識いずれも正常．図１の如く顔貌はやや myopathic な印象を与えるが顔面筋，外眼筋の脱力はみられなかった．脳神経異常なし．下腿及び前腕の中等度の筋萎縮を認めた．左足関節の軽度の拘縮があった．徒手筋力テストで前腕筋群は概ね３，握力右12kg，左15kg，他，前脛骨筋は右４＋，左４－で，遠位筋に優位の筋脱力と萎縮がみられた．他の部位は筋力４＋と軽度の脱力がみられたが萎縮は明らかでなかった．腱反射は下肢で消失し，上肢で減弱していた．脳神経，協調運動，知覚の異常を認めなかった．

検査所見：末梢血，肝機能，血清蛋白及びその分画，甲状腺機能，血清電解質，血糖はいずれも異常なし．免疫反応正常．血清CPK43 IU で正常．血清クレアチン1.0，クレアチニン1.0mg/dl で前者はやや高値．尿クレアチンは145mg/日で増加，尿クレアチニン

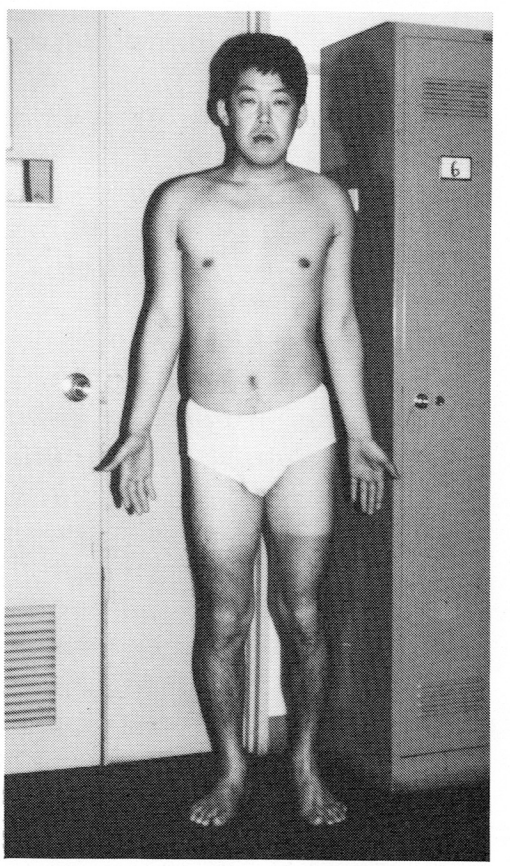


図１　症例の全身像

＊神戸大学医学部第三内科

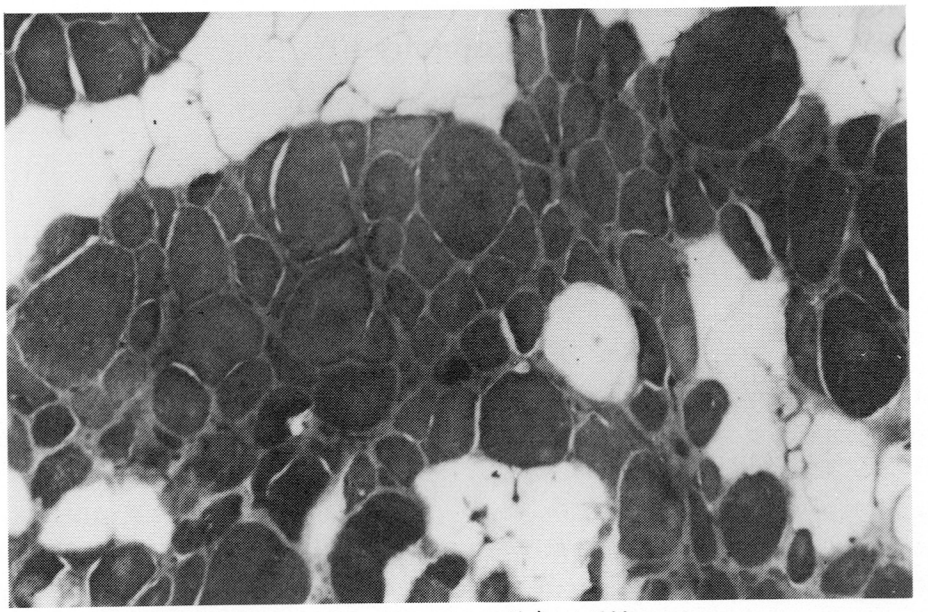


図2　Trichrome染色　×200

は417mg/日と減少していた．前腕阻血運動試験は正常．

筋電図：左前脛骨筋で安静時にfibrillation voltageがみられた．他の筋萎縮部位ではshort duration, low voltageなどの筋原性変化がみられた．運動神経伝達速度は正常（左腓骨神経51.8m/sec）．Electrooculogram正常．

生検所見：右前脛骨筋で行なった．

図2はtrichrome染色で線維の大小不同がみられ，中心部に赤味を帯びて染る核がみられる．中心核は大径小径の両線維にみられた．他に脂肪変性が明らかである．**図3**は縦断のHE染色である．線維の中心に連珠状に並ぶ核がみられ，核と核の間は筋原線維が欠如している．この中心核は小径の線維に多い傾向はあるが，最下方にある大径の線維にも中心核はみられる．中央の大径線維にはこの切片では中心核がみられず，断面でも同様の線維がみられた．**図4**はNADH染色で萎縮線維が濃く染るもの多い．一部に活性の低いものもみられる．大径の肥大した線維では周辺に活性がみられるが，先に示したtrichrome染色ではragged red fiberの像はみられなかった．**図5**に示すようにATPase染色

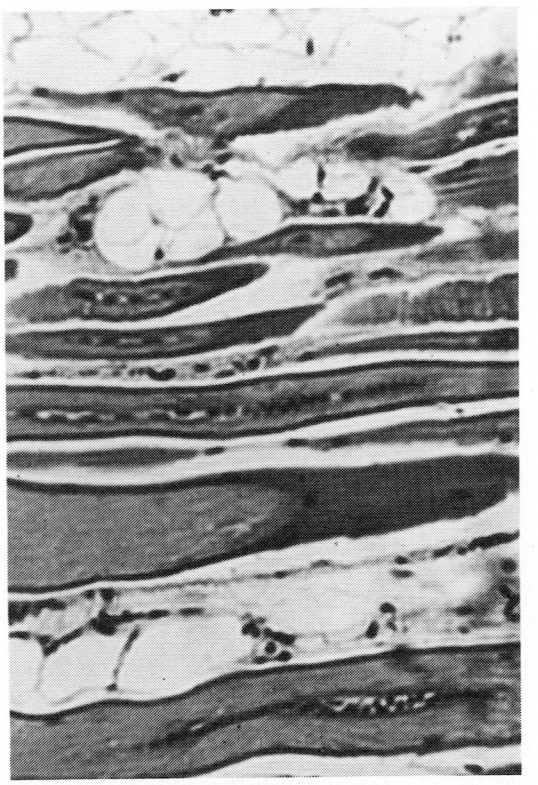


図3　HE染色　×200

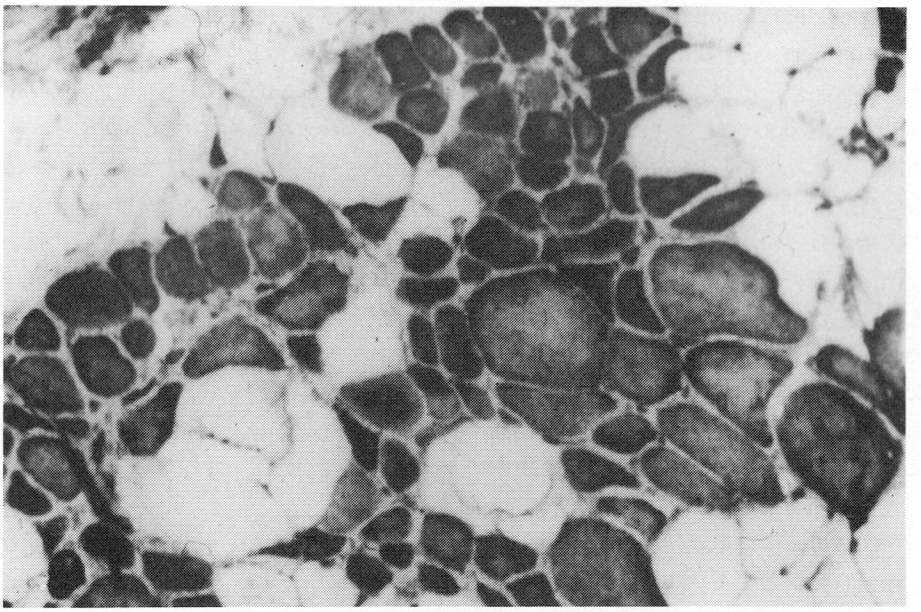


図4　NADH染色　×200

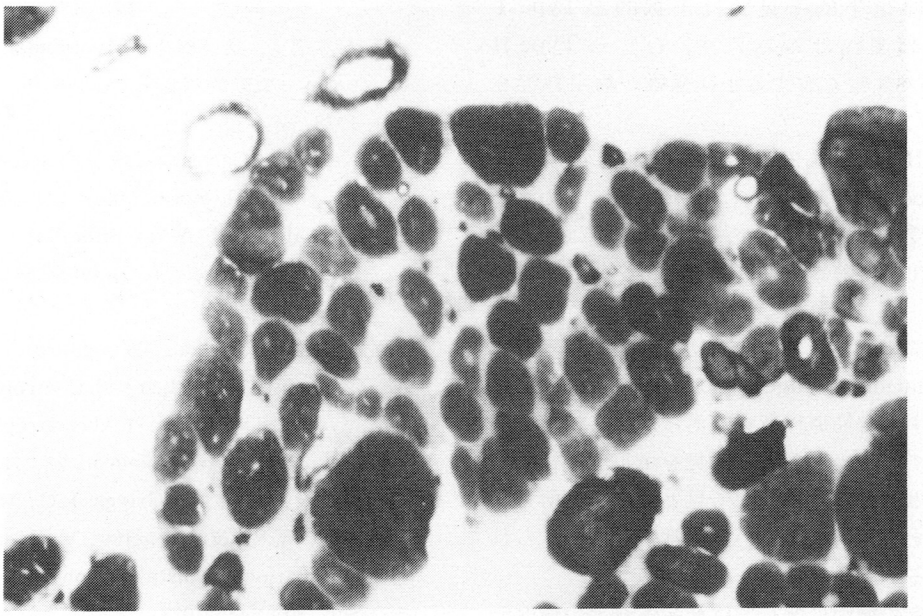


図5　ATPase（pH9.4）染色　×200

（pH9.4）で線維の中心部の活性の欠如がみられた．pH4.3でのATPase染色（図略）では小径線維の約半数が活性低下を示した．このことから小径線維はType IとType IIの性格をもったものが混在していることが判る．電顕では（図略）ミトコンドリアの変形以外，その構造異常や核周辺の集合はみられなかった．

考　　察

筋線維の中央に核が存在し，管腔構造を示すミオパチーはmyotubular myopathy，ある

いは centronuclear myopathy とよばれる．類似のものに peri-centronuclear myopathy とよばれるものや，組織化学的所見を加えて，Type I fiber hypotrophy または atrophy を付した報告がみられる[1]．

臨床症状は，いわゆる floppy infant が多く四肢の萎縮，脱力に加えて眼瞼下垂，外眼筋麻痺，顔面筋脱力を伴うものが多い．若年乃至成人発症例は稀で，そのうち本症のような眼筋の罹患を欠くものは Karpati らの症例[2]，Bethlem らの症例[3] と Moxley らの報告[4] のみである．Karpati らの報告例は四肢の近位筋群に萎縮があり本症の如く遠位筋の萎縮を示し，且つ眼筋罹患の明らかでない Moxley の症例（20歳男）では電顕所見で核の周辺に著明な顆粒状物質とミトコンドリアの集合がみられたが，本症例ではみられなかった．

組織化学的所見では選択的な Type I fiber の萎縮はみられず，むしろ Type II fiber の性格を有する小径線維が約半数混在した．

Bethlem らも27歳の女性で40％の線維が中心核を有し，それらには Type I，Type II の性度が認められたが，多くの線維は中等度の酸化還元酵素活性を示した例を報告している[6]．

筋電図所見では症状の初発した右脛骨筋に fibrillation voltage がみられたが，他の部位ではすべて筋原性所見であった．これ迄の報告例では大半が筋原性所見を示し，神経原性所見単独または筋原性所見と神経原性所見の混在するもの，あるいは正常のものがみられている．

本症の病因に関しては筋発生途上の機能的神経支配の異常が最も考えられるが myotubular な所見は必ずしも myotube と同一のものとは言いがたく，LDH の isozyme pattern も myotube とは相違することより，胎生筋の発育停止とは考えにくく Bethlem らは Centronuclear myopathy とよんでいる[5]．Munsat らも internal nuclei は非特異的所見であり，胎児型ミオグロビンが証明されないことなどより筋発生途上の停止説には反対して myotube とせず centronuclear myopathy なる称び方を優先させている[6]．

いずれにしても，はじめに述べたように myotube あるいは central nuclei を示す症例は臨床的にも variation にとみ，個々の症例の形態学及び生化学特に構造蛋白の詳細な検討を行い，成因にアプローチすることが重要と考えられる．

遠位筋萎縮を示し，眼筋罹患の明確でない，しかも電顕所見も従来の報告と異なる稀な症例を報告した．

本研究は昭和55年度厚生省神経疾患研究委託費 No80-02-27によって行なわれた．深謝する．

文　献

1) 石本進士，後藤幾生：Myotubular myopathy—文献的解説—．神経内科，8：413，1978．
2) Karpati,., Carpenter, S. & Nelson, R. F. : Type I muscle fibre atrophy and central nuclei. A rare familial neuromuscular disease. J. Neurol. Sci., 10：489，1970．
3) Bethlem, J., van Wijngaarden, G.K., Mumenthaler, M.,et al.:Centronuclear myopathy with type I fiber atrophy and "myotubes". Arch. Neurol., 23：70，1970．
4) Moxley, R.T., III, Griggs, R.C., Markesbery, W.R., & Vangelfer, V.: Metabolic implications of distal atrophy. J. Neurol. Sci., 39：247，1978．
5) Bethlem, J., Meijer, A.E.F.H., Schellens, J.P.M., et al.: Centronuclear myopathy. Europ. Neurol., 1：325，1968．
6) Munsat, T.L., Thompson, L.R. & Coleman, R.F.: Centronuclear("Myotubular") myopathy. Arch. Neurol., 20：120，1969．

16) 著明な心伝導障害と関節拘縮を呈した非定型ミオパチー
——Emery-Dreifuss症候群との異同——

塚越　廣*

研究協力者　栢沼勝彦**　小口喜三夫**
柳沢信夫**　関口守衛***

遺伝性・変性性神経筋疾患に心病変を伴うことは古くから知られているが，その病因，病態は不明で，神経病学者，循環器病学者の各々の視点から注目されてきた[1]．著者らは分類不明の非定型ミオパチー (atypical myopathy)の女性例で，著明な心拡大と心伝導路障害を呈し，心カテーテル検査で三尖弁閉鎖不全を，心筋生検で心筋疾患を認めた症例を経験したので報告する．

症例：E．M．27歳，女性

主訴：歩行障害，動悸，浮腫．

現病歴：歩行開始1歳3ヶ月．3歳頃から動揺性歩行，登攀性起立がみられ，5歳頃やせに気づかれた．10歳頃腰をつき出す歩行となり，15歳顔面のやせが認められ緩徐に進行性であった．22歳動悸，浮腫が出現し某院入院．著明な心拡大と心電図異常を指摘され24歳信大第3内科入院．退院後，25歳 Adams-Stokes 発作が出現し permanent pacemaker を挿入．27歳心臓死した．なお詳細は不明だが小児期からの関節拘縮が推定される．

既往歴：特記すべきものなし．初潮は17歳で月経はある．

家族歴：血族結婚はない．父60歳，56歳頃から労作時呼吸困難，動悸，浮腫が出現．血圧正常．心胸廓比67%の心拡大があり，心電図は完全右脚ブロックで心室性期外収縮の散発がみられ，負荷心電図で有意なST低下を認め虚血性心疾患と診断．筋萎縮なく筋電図，CKは正常．母57歳，心胸廓比63%の心拡大，高血圧，心電図上左室肥大を認めた．CK27U（正常値0～25U）．筋萎縮なく筋電図正常．同胞（兄，弟）2人あり健康．

入院時現症（24歳）：身長150cm，体重38kg，高アーチ口蓋がある．脈は毎分45，不整で，著明な心濁音界の拡大があり，I音の減弱とII音の亢進，胸骨左縁に広汎に2～3度/6度の収縮期雑音及び gallop rhythm を聴取．頸静脈怒張，肝腫大，下腿浮腫など右心不全症状を認めた．神経学的には肘関節，股関節，膝関節に筋性屈曲拘縮があり，頸部前屈制限，胸椎直線化，扁平胸，腰椎前弯の増強がみられた．顔面，体幹に軽度ないし中等度，上肢は近位優位，下肢はびまん性に中等度から高度の筋萎縮を認め（図1）筋力は四肢近位筋優位に中等度低下し動揺性歩行，登攀性起立を示した．翼状肩甲があり仮性肥大はなかった．四肢腱反射はすべて消失し病的反射，筋線維束攣縮，感覚障害はなかった．WAISでIQは言語性60，動作性90，総合70．精神状態及び脳波は正常であった．

検査所見：CKは22歳時38U（正常値0～25）と軽度上昇，入院時はCK127 IU（30～230），アルドラーゼ0.8mU/ml

＊東京医科歯科大学医学部神経内科
＊＊信州大学医学部第三内科
＊＊＊東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所内科

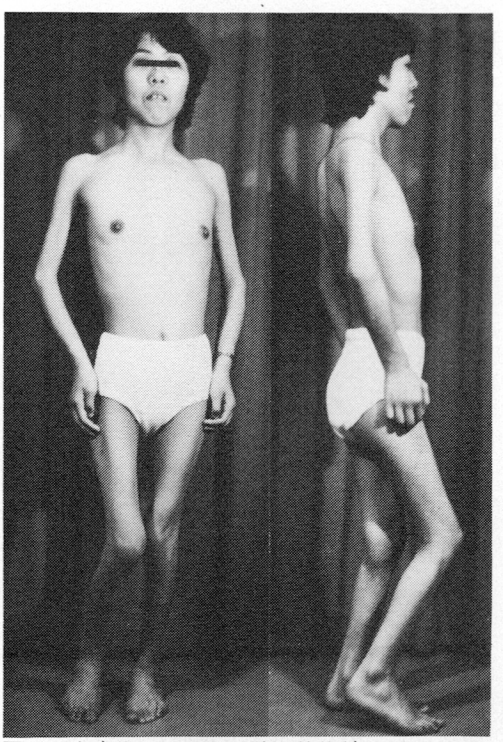


図1　全身像．肘，股，膝関節拘縮と顔面，近位優位の上肢，びまん性の下肢筋萎縮を示す．

(0.5～3.1)，血清クレアチン0.91mg/dl (0.35～0.93)，尿中クレアチン排泄0.14g/day (0～0.2)，GOT21KU，LDH140 IU と正常で，その他の血液，尿化学検査，髄液等すべて正常だった．

筋電図では unit 数はほぼ正常で上下肢筋で低振幅，短持続時間の myogenic pattern が認められた．

左上腕二頭筋生検（図2）では筋束の基本構築は比較的保たれているが，筋線維直径の大小不同，円形萎縮，中心核，間質結合織，脂肪織の増加などミオパチー様変化を認めた．炎症性細胞浸潤はなかった．NADH－TR 染色で interfibrillar network の乱れがあり，ATPase 染色では type Ⅰ predominance を示した．異常物質沈着，特異な構造異常を示す筋線維はなかった．

胸部X線検査（図3）で，心陰影は心胸廓比67％と球状に拡大．著明な肺血管影の増強はなかった．

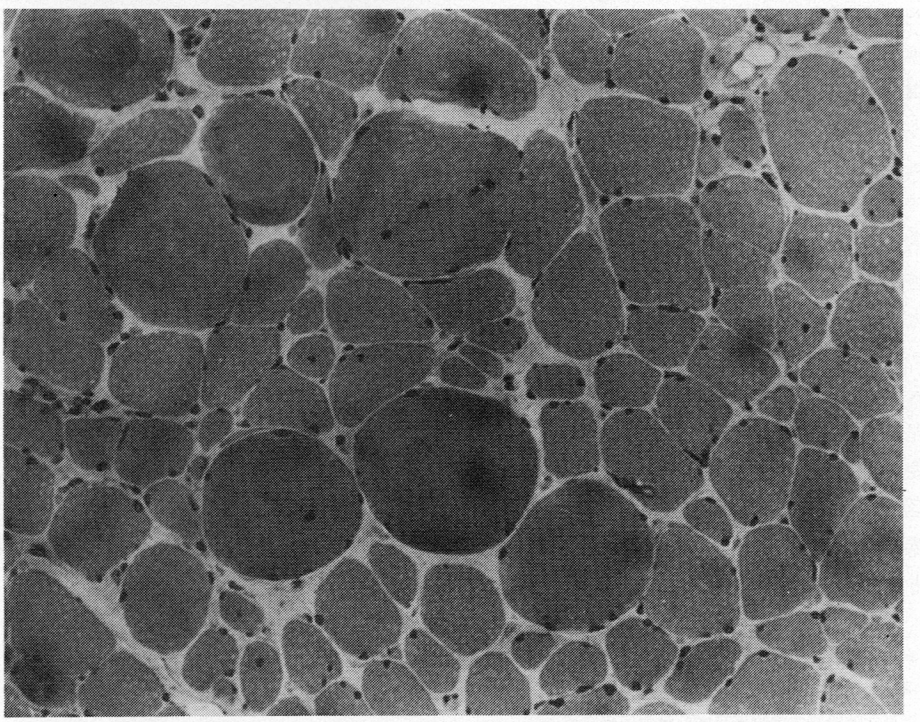


図2　上腕二頭筋生検．H＆E．×200　筋線維の大小不同．円形萎縮，間質結合織の増加などミオパチー様変化を示す．

心電図（図４）は毎分300の心房粗動，完全房室ブロック，完全左脚ブロックのQRS波形を呈する毎分43の心室固有調律でQRS時間は0.14秒．時に多源性心室性期外収縮の散

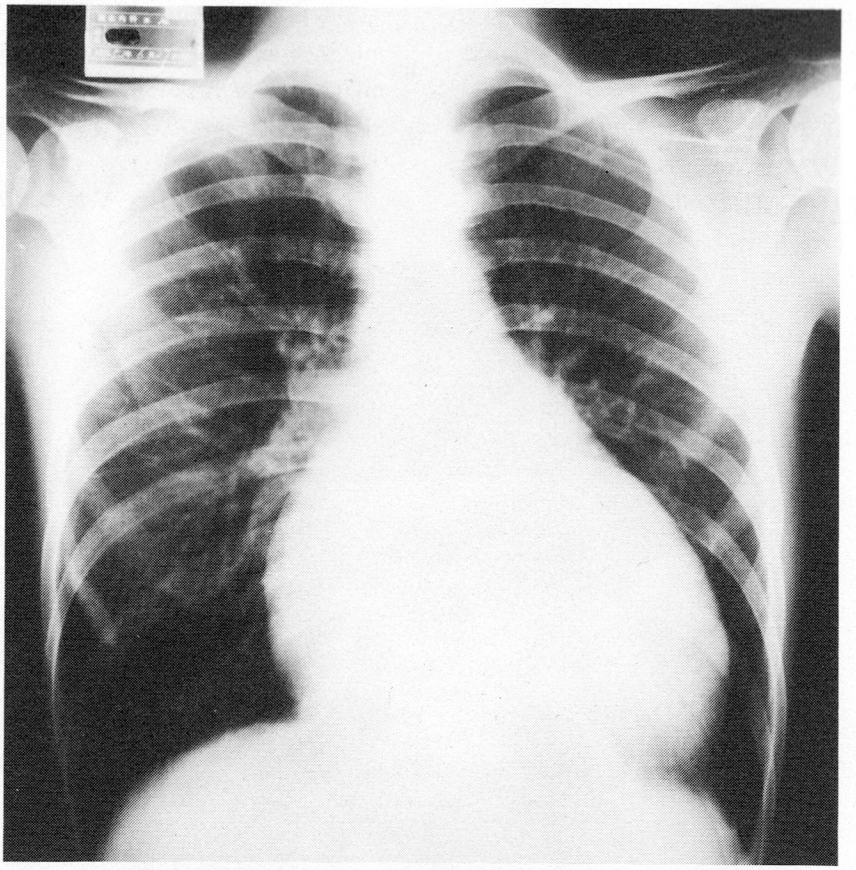


図３　胸部Ｘ線写真　　心胸廓比67％の球状心拡大を示す．

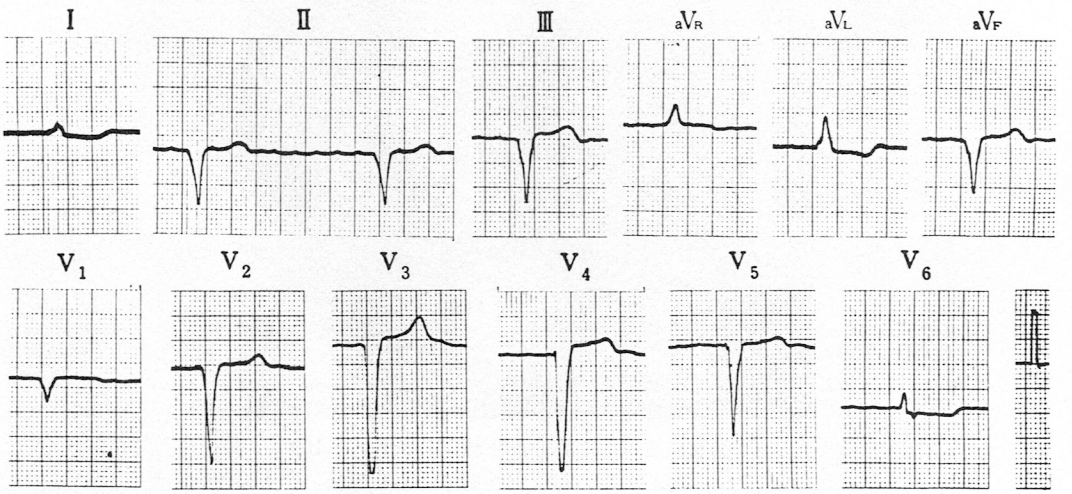


図４　心電図，完全房室ブロック，心房粗動，左脚ブロック波形を呈する心室固有調律を示す．

発がみられた．ベクトル心電図では，心室固有調律のために心室の変化を読むのは困難であったが，そのQRSベクトルは前方，側方，下方成分にかけ，全体に不整とdistorsionが強く，著しい心室内伝導障害を示した．

心臓超音波検査では，三尖弁後退速度は56 mm/secとやや低下し，拡張期に心房粗動によると思われる低調なfluttering を認めた．三尖弁の明らかな石灰化はなかった．僧帽弁後退速度88mm/sec，左室拡張期径49.2mm，左室収縮期径33.8mm，左室拡張末期容積119 ml，左室収縮末期容積39ml，一回拍出量81 ml/回，左室駆出率67.6%で僧帽弁，左心腔の計測，大動脈弁に明らかな異常は認めなかった．

心機図は，頸静脈波でV波の増大を，頸動

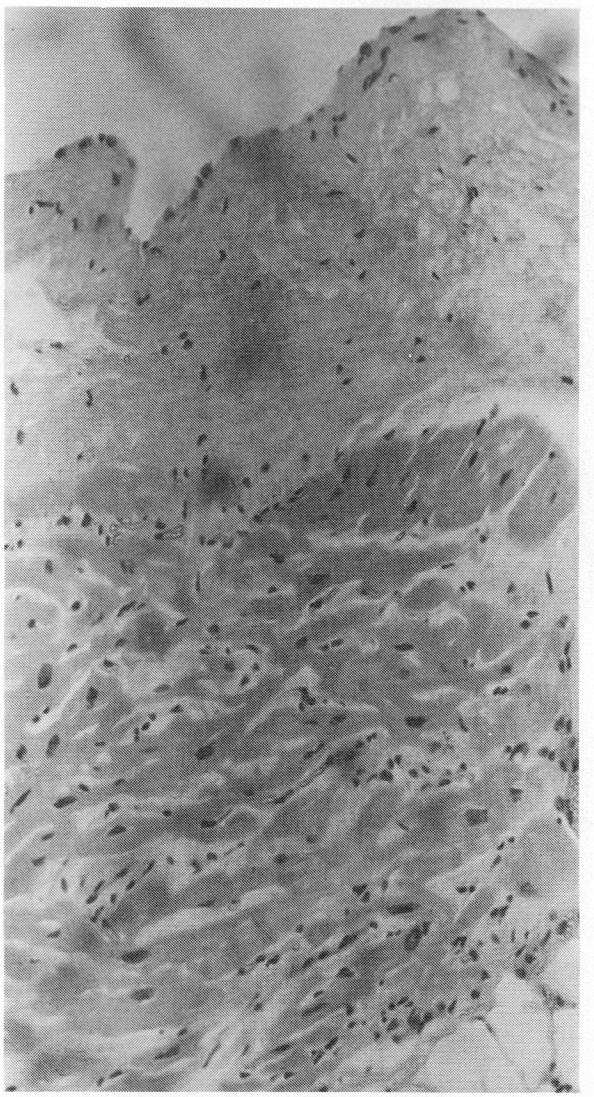


図5　右室心内膜心筋生検．H＆E．×100
心内膜の線維弾性肥厚，心筋線維の肥大，配列の乱れ，間質の線維化など，心筋疾患の組織像を呈する．

脈波で著明な dicrotic wave を認めた．

右心カテーテル検査では，右房圧曲線でV波の増大（ventricularization）が認められ，右心室造影で中等度の右房への造影剤の逆流と著明な右房，右室の拡大を認めた．また右室心尖部に造影剤の遺残があり右室の asynergy が疑われた．

心内膜心筋生検は，カテーテル式生検法で右室から採取．光顕（図5）では心内膜に軽度の線維弾性肥厚があり，心筋細胞は横径が15～18μ（正常10.7±2.0μ）と肥大し，配列の乱れが強く，樹枝状分枝，断裂が目立ち，間質に高度の線維化を認めた．筋形質に特異的所見はないが，一般に glycogen の沈着が増大し，一部の心筋細胞に好塩基性変性物質の沈着を認め，contraction band も散見された．核は chromatin に富み多形性を示し，変形が目立った．電顕では比較的正常構造を保持したものと変性の強い心筋細胞とが混在していたが，後者では筋原線維の疎しょう化，高電子密度のZ帯の増生を示すところが目立ち，そこに glycogen の沈着増量が認められた．なお一部の細胞においては高度の mitochondria の変性像や sarcoplasmic reticulum の拡大，増加像を認めた．

考　　察

本例は，臨床所見，筋電図，筋生検はミオパチーの所見を示し，女性，孤発例で早期からの関節拘縮が目立ち，仮性肥大がなく，CPK は一時期軽度上昇していた．

従って進行性筋ジストロフィー症（以下DMP と略）との鑑別が問題となったが，他のミオパチーは，ほぼ否定的であった．DMP 中，Duchenne 型，Becker 型，肢帯型，悪性肢帯型（三好）[2]，顔面肩甲上腕型，cardiopathic muscular dystrophy (Norris)[3] としては atypical な点が目立ち分類は不能であった．

心異常に関しては，心電図で高度の心伝導路障害を，心筋生検で心筋の非特異的変性像を認め，ミオパチーに伴う続発性心筋疾患 secondary myocardial disease と考えられた．しかし本例では，僧帽弁及び左心系の異常は極く軽度で，三尖弁閉鎖不全単独（isolated tricuspid regurgitation；以下 TR と略）が前景にたっている点が特異で，文献上，筋疾患特に Duchenne 型 DMP に伴い，僧帽弁閉鎖不全をみる報告[4] は散見されるが TR は極めて稀である．その mechanism は不明であるが，心筋変性による三尖弁支持組織の機能不全が推定された．

以上より，本例は高度の心伝導路障害，TR を伴う続発性心筋疾患を合併した分類不明の非定型ミオパチーと考えられたが，Emery - Dreifuss 症候群にその臨床型が類似しており，その異同につき検討する．

1961年，Dreifuss と Hogan は8人の男性に発症し，X染色体性遺伝で良性経過をとる DMP の家系を記載し，1966年，Emery と Dreifuss[5]は同一の家系を再び記載し，早期からの関節拘縮と心異常所見があり，仮性肥大がないことを Duchenne 型，Becker 型との鑑別点として強調し，発症者がほぼ同一の臨床像を示すことと合わせ，良性X染色体性 DMP の明らかな一型と考えた．文献上では1902年，Cestan と LeJonne[6]の報告以来本症と推定される症例が散見され，我国でも Mawatari ら[7]，栗山ら[8] の報告が本症にほぼ一致する．さらに心臓病学者により稀な心伝導路障害である persistent atrial paralysis と顔面肩甲上腕型 DMP との合併例がいくつか報告され，その中に Emery - Dreifuss 症候群と推定される例が散見される．

1979年，Rowland ら[9]は従来の報告を総括し，その特徴として5項目，すなわち1)X染色体劣性遺伝，2)小児期からの肘関節及び頸部の拘縮，3)上腕下腿型を呈する筋力低下，4)非常に緩徐に進行するミオパチー，5)末期に恒久的心房停止に至る心伝導路障害をあげ，筋電図，筋生検所見からは myopathic，neurogenic 及び両者の混在がみられるが，臨床

所見の同一性を強調し明らかなDMPの一型として“Emery - Dreifuss”型としている．

本例ではミオパチー，心異常所見ともEmery - Dreifuss症候群の臨床的特徴をほぼ有するが，atypicalな所見として股関節，膝関節の拘縮が目立ち，アキレス腱の短縮は目立たない点，下肢筋の萎縮は遠位優位でなくびまん性である点，及びTRの合併があげられる．また本例は女性で，Turner症候群ではない点が問題で，従来の報告はX染色体家系あるいは男性孤発例で，明らかな女性の報告はなく，この点で本例をEmery - Dreifuss症候群とするには疑問があり，TRの合併と合わせ別の疾患と考えている．

しかし本例の遺伝に関しては，両親の心拡大が変性性心筋疾患の可能性を否定できず，また本症候群の不全型で，心異常所見のみを示す例もあり，母はCKが正常上限であることと合わせ，母がcarrierか，または父が不全型で本例もcarrierである可能性は残ると思われる．

まとめ　著明な心伝導路障害と三尖弁閉鎖不全を呈し，心筋生検で心筋疾患を疑わせる病変が得られた非定型ミオパチーの女性，孤発例を報告し，臨床型の類似するEmery - Dreifuss症候群との異同を中心にその病態を考察した．

文　献

1) Perloff, J.K., DE Leon, A.C. & O' Doherty, D.: The cardiomyopathy of progressive muscular dystrophy. Circulation, 33: 625, 1966.

2) 三好和夫，多田嘉明，中野益弘，ほか：進行性筋ジストロフィー症の悪性肢帯型 malignant limb - girdle type. この型の存在と本症分類上における意義．厚生省進行性筋ジストロフィー症研究班業績集(II)，1979, p. 39.

3) Norris, F. H., Moss, A. J. & Yu, P. N.: On the possibility that a type of human muscular dystrophy commences in myocardium. Ann. N. Y. Acad. Sci., 138: 342, 1966.

4) Perloff, J.K., Roberts, W.C., DE Leon, A. C., et al.: The distinctive electrocardiogram of Duchenne's progressive muscular dystrophy. Am.J.Med., 42: 179, 1967.

5) Emery, A.E.H. & Dreifuss, F.E.: Unusual type of benign X - linked muscular dystrophy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 29: 338, 1966.

6) Cestan, R. & LeJonne: Une myopathie avec retractions familiales. Nouv. Iconogr. Salpêtrière, 15: 38, 1902.

7) Mawatari, S. & Katayama, K.: Scapuloperoneal muscular atrophy with cardiopathy. An X - linked recessive trait. Arch. Neurol., 28: 55, 1973.

8) 栗山勝，大内穣，梅崎博敏，ほか：関節拘縮と心障害を伴った肩甲下腿型筋萎縮症の1例．臨床神経，17: 575, 1977.

9) Rowland, L.P., Fetell, M., Olarte, M., et al.: Emery - Dreifuss muscular dystrophy. Ann. Neurol., 5: 111, 1979.

17) いわゆるdistal myopathyの筋病変について

豊 倉 康 夫*

研究協力者　栗 崎 博 司** 高 津 成 美*

Distal myopathyは，Welanderによって独立した疾患として確立されたものであるが，その後に報告されているものは，遺伝形式や発症年齢などWelanderの報告[1]とは異なっているものも多くみられる．今回検索した対象もほとんどが孤発例であり，発症年齢も10～20歳代のものであるが，臨床的には遠位筋優位の筋萎縮，筋力低下というdistal myopathyの特徴をもっている．このような臨床的にdistal myopathyと診断される症例が筋病変上どのような特徴をもつかを明らかにするため，生検筋の検討を行なった．

対象・方法

対象は表1に示すように，東大神経内科において臨床的にdistal myopathyと診断された9症例の生検筋13筋である．年齢は23～37歳で，男子2例，女子7例である．生検部位は，左大腿四頭筋，腓腹筋又は上腕二頭筋である．1例のみ常染色体劣性遺伝を示す家族歴がある．

生検筋は，一部で液体窒素で凍結，残りをSusa固定および2.5% glutaraldehyde，2% formaldehyde，0.1M cacodylate bufferで固定した．凍結切片は，H&E，modified Gomori trichrome，NADH-TR，PAS，Oil Red OおよびATPase (pH9.6，4.6，4.3) 染色を行い，また，一部 (B736，B740) ではacid phosphatase染色を行った．Susa固定標本よりparaffin切片を作製，glutaraldehyde固定後Epon包埋した標本より電顕による観察を行った．

表1　対象

Distal myopathy症例

症例	年令	性	生検部位	
M.K.	30	F	B444	M.Quad.
			B445	M.GCM
K.S.	27	F	B446	M.GCM
S.S.	37	M	B457	M.GCM
S.Y.	34	F	B500	M.Quad.
			B501	M.GCM
J.M.	23	F	B537	M.Quad.
K.F.	27	F	B590	M.Quad.
			B591	M.GCM
M.M.	25	F	B596	M.Quad.
K.W.	29	F	B736	M.Bicep.
			B737	M.Quad.
M.K.	26	M	B740	M.Bicep.

M.Quad.＝M.quadriceps femoris
M.GCM＝M.gastrocnemius
M.Bicep.＝M.biceps brachii

結　果

検索した筋全例で，dystrophy様変化が認められた．変化の程度は，軽度のものからほとんど脂肪組織に置き換えられている高度のものまであるが，大腿四頭筋と腓腹筋の2筋を検索した症例では，遠位筋である腓腹筋に強い変化を認めた．

非特異的なdystrophy様変化のうち，全例で認められたものはfiber splittingおよび

＊東京大学医学部脳研神経内科
＊＊国立療養所東京病院神経内科

fiber necrosis である．また，中心核もほとんどの症例で認められた．Macrophage による phagocytosis も多くの症例で認められ，これらの細胞は，acid phosphatase 染色を行った症例では acid phosphatase 活性を有することが示された．Pyknotic cell clumps もほとんどで認められ，症例によっては目立つものもある．一方，例数は少ないが，ring fiber が多数認められたものがあり，細胞浸潤を認めた症例も2例あった．細胞浸潤が認められた症例ではステロイド療法を試みたが，無効であった．

これらの dystrophy 様筋変化に対し，他の dystrophy ではみられず distal myopathy に特徴的にみられた変化は，筋細胞内 vacuole と NADH - TR に超濃染する萎縮線維である（図1・A，B）．

Vacuole（空胞）：Vacuole は程度の差はあるが，全例で認められた．Vacuole は辺縁にあるものも，中心にあるものもあり，大きさも様々である．空胞の辺縁は，H&E 染色では basophilic に染色され，Gomori trichrome 染色で赤染する．大きな空胞では，中心はむしろ amorphous で pale な物質によって満たされている．NADH - TR 活性はもたず，PAS，Oil Red O でも陰性である．ATPase 染色では，type 1，type 2 fiber 両方に認められる．

電顕では（図2・A，B），vacuole は一重膜によって囲まれているものもあるが，特に大きなものでは膜を有さない．内容は，myeloid bodies といわれる膜様構造物が6例で認められた．Myeloid bodies が認められなかった1例は，ほとんどが脂肪組織のため電顕による検索が不可能なものであるが，残る2例は，vacuole が少数しか認められなかった症例である．空胞の内容は，他に，空胞化した mitochondria，honey - comb structure，filamentous materials，sarcoplasmic materials が認められた．空胞の中心は amorphous で，electron lucent な物質により満たされているものもある．空胞の周辺は T-tubulus に続いている部分もある．

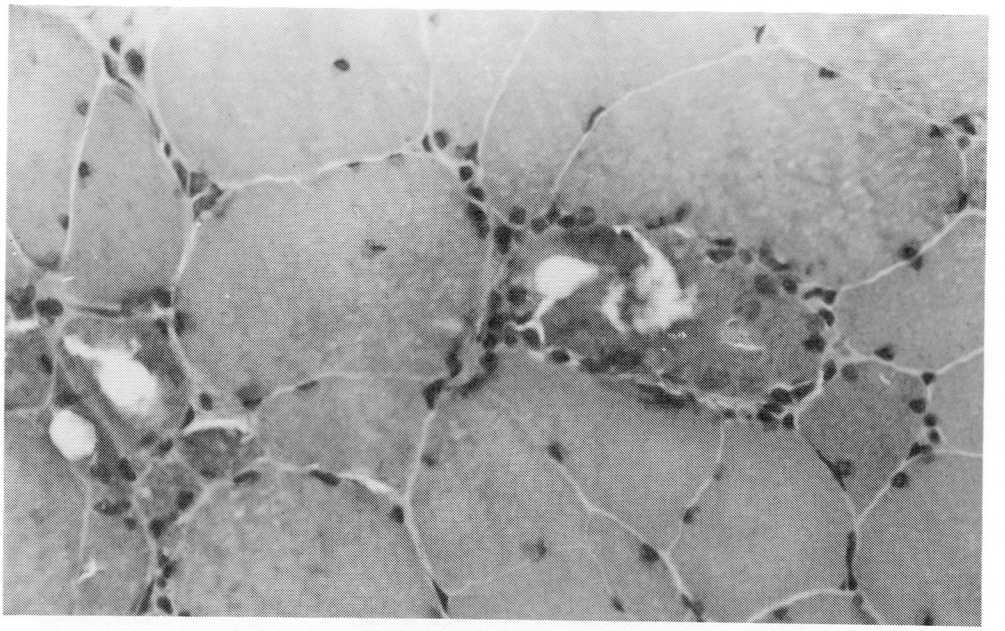
NADH - TR 超濃染線維：全例で，NADH - TR 染色により type 1 fiber より濃染する，small angulated fibers 様の萎縮線維が認められた．これらの萎縮線維の中には，空胞を有するものが多数認められる．また，大きな筋線維に fiber splitting と思われるように接している萎縮線維も認められる．Distal myopathy では，他の denervation を示す所見がないこととともに，以上の所見から，NADH - TR に濃染する萎縮線維は denervation によるものではなく，distal myopathy における筋の変性の一過程を示すものと考えられる．

以上に示したように，distal myopathy では vacuole および NADH - TR 濃染線維という，他の dystrophy にはみられない特徴的な所見が認められた．

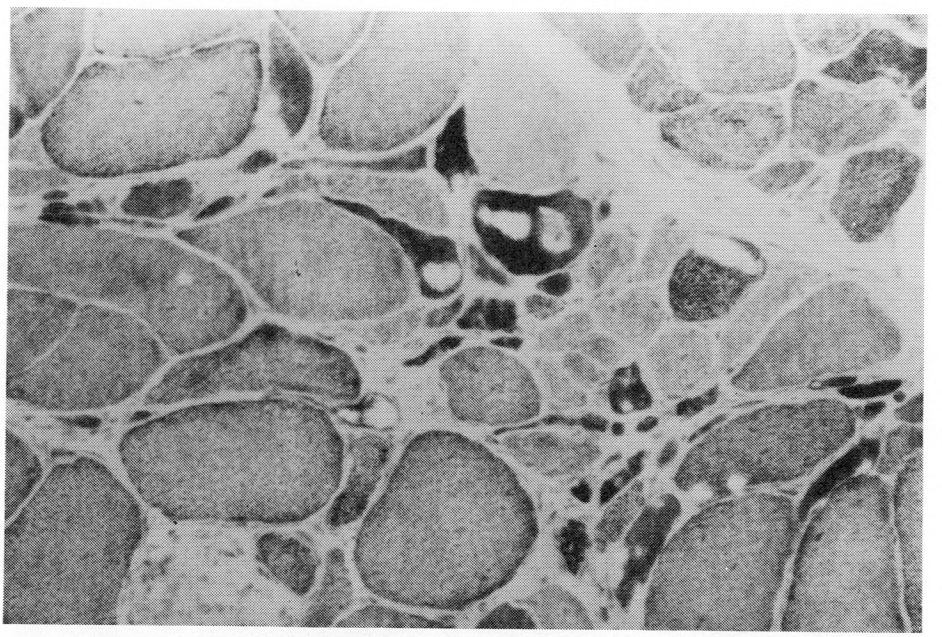
考　　察

Distal myopathy の筋病変に関する検討は，すでに，Welander の最初の報告[1] にもみられるが，主な変化は dystrophy 様変化であるとしている．また，Welander の記載した家系を含む Welander 型 distal myopathy の筋病変の組織化学的な検討を行った Edström[2] は，dystrophy 様の変化のほかに，type 1 fiber atrophy が特徴的であると考えている．Welander の報告の中には，vacuole を有する症例もあるが，Edström の検索では，vacuole は認められていない．また，我が国において，三好らが報告[3] している autosomal recessive distal myopathy でも，筋病変は dystrophy 様変化のみであり，vacuole は認められていない．

これらに対して，筋病変で vacuole が特徴的に認められるとする報告もみられるが，これらの vacuole を有する型の distal myopathy の，組織化学的および電顕的検索を行ったのは Markesbery[4] である．Markesbery らの報告による筋病変は，fiber necrosis,



図Ⅰ　A　Distal myopathyにみられるvacuole．辺縁はH＆Eでbasophilicに染色する．筋の大小不同，中心核，fiber splittingもみられる．（H＆E染色　×860）



図Ⅰ　B　NADH-TR超濃染線維．Vacuoleを有するものが多い．Fiber splittingにより分離しているようなものもある．（NADH-TR染色　×430）

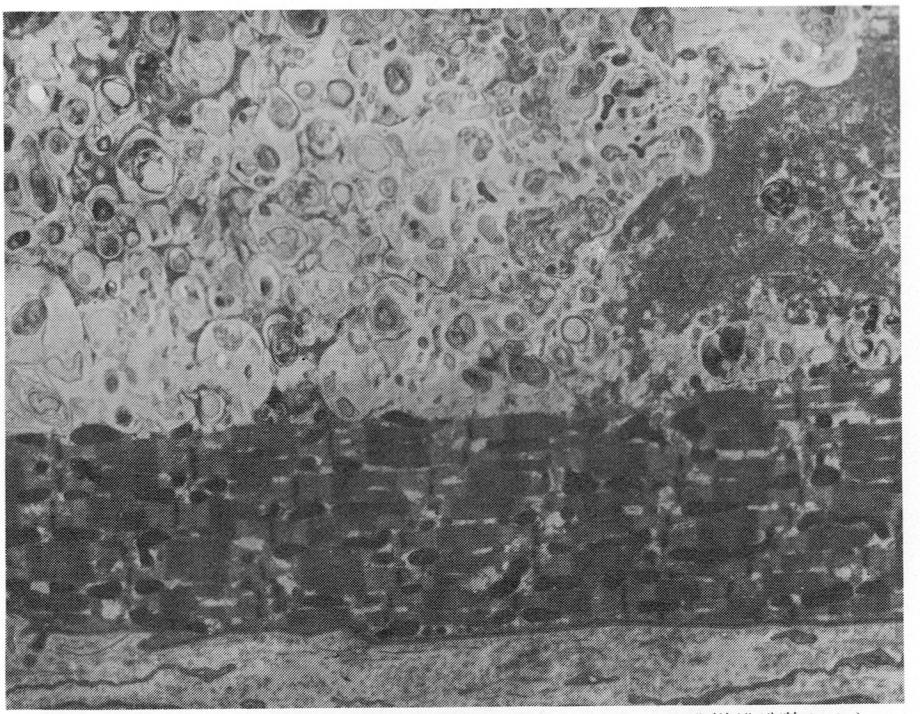


図2　A　Vacuole，myeloid bodies，変性したmitochondria，膜様構造物がみられる．図右には，filamentous bodyがみられる．(電顕　×12,000)

図2　B　図左には，変性したT-tubulusとSR．図右，核の上方には，granular sarcoplasmic bodyがみられる．(電顕　×30,000)

phagocytosis, central nuclei および fiber splitting などの dystrophy 様変化に加えて，多数の vacuole が認められる点である．一方電顕による観察では多数の myeloid bodies が認められ，vacuole は，あるものは膜を有し，内容は変性した mitochondria や他の変性産物であり，これらは autophagic vacuole であると考えている．同様の所見は春原ら[5]によっても示されている．

今回我々が検索した症例は，筋病変上は vacuole が比較的少なく，電顕では myeloid bodies を確認できなかった 2 例を除き，すべての症例が，dystrophy 様変化に加えて，vacuole および NADH - TR 濃染萎縮線維を有している（図 3）．Distal myopathy にみられる vacuole は，我々の症例も含めて acid phosphatase 活性を有し，その内容が変性産物である点から，autophagic vacuole であると考えられる．一方，NADH - TR 濃染線維は他の vacuolar myopathy でもみられ，Engel[6] によれば，このような線維ができる機序としては，変性産物の exocytosis の一種であることが考えられるという．我々の症例においても，このような萎縮線維の中には vacuole を含むものが多い点，および，fiber splitting によって分離したような所見が多くみられる点は，Engel の考えを支持しているように思われる．このように，vacuole を有する distal myopathy は，筋変性の機序からも他の dystrophy とは異なっている可能性がある．

今回の検索から，臨床的に distal myopathy と診断されるものの中には，筋病変の上から，vacuole と，NADH - TR 濃染線維を有する一群が存在することは確かであるが，この一群が，distal myopathy の中でどのような位置を占めるのかは，明らかではない．

我々の症例の中でも，vacuole が著明でない症例が 2 例あり，従来の報告も，全例に vacuole を認めるわけではない．先にのべたように Edström による Welander 型 distal myopathy の筋病変の検索では，vacuole は

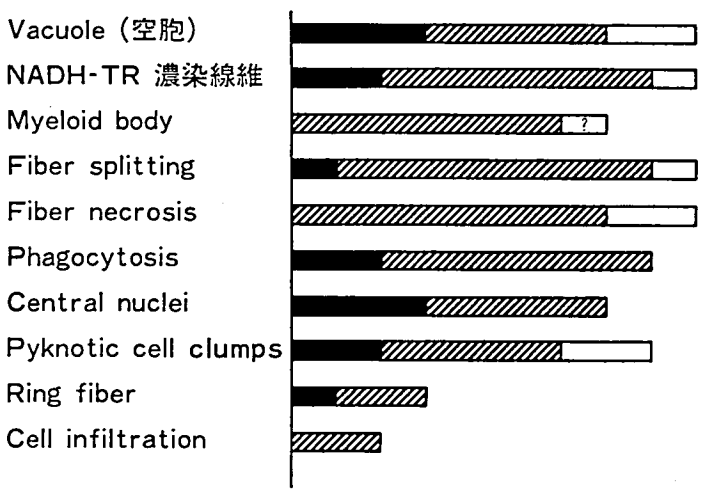


図 3　Distal myopathy 筋病変

認められておらず，また，三好らによって報告されている劣性遺伝形式のものはvacuoleを有しない．しかし，Welander[1]の報告している症例の中にはvacuoleを有するものもある．また，同じSwedenで，優性遺伝形式のdistal myopathyとしてEdströmら[7]によって報告されている症例は，vacuole, myeloid bodies, sarcoplasmic bodiesおよびintermediate-sized (skeletin) filamentsの増加を認め，我々の症例と同様の筋病変を示す．Edströmらは，この疾患をWelander型とは別の型のdistal myopathyとしてとらえているが，筋にvacuoleを有するWelanderの症例との異同が問題となろう．さらに，筋病変上は同様の所見を示し，臨床的にも遠位筋優位の症状を示すことのある疾患が，Carpenterら[8]により，inclusion body myositisとして報告されており，このような疾患との関連も問題となってくる．

以上のべたようにdistal myopathyは，Welanderによって臨床的な特徴から確立されたものであるが，その中には，筋病変上からも特徴的な一群がある．これらの一群は，遺伝形式や，臨床経過上は，必ずしも同一ではなく，また，従来，発症年齢，経過などから同一とされている中にも，筋病変上はvacuoleを有するものと有していないものとがあり，vacuoleを有するdistal myopathyがどのような位置にあるのかは，明らかではない．今後，むしろ，臨床的な特徴と，筋病変の関連を明らかにしていくことが必要であろう．

文　献

1) Welander, L.: Myopathia distalis tarda hereditaria. Acta Med. Scand., 141〔Suppl. 265〕: 1, 1951.
2) Edström, L.: Histochemical and histopathological changes in skeletal muscle in late-onset hereditary distal myopathy (Welander). J. Neurol. Sci., 26: 147, 1975.
3) 三好和夫：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，14：963，1974.
4) Markesbery, W.R., Griggs, R.C. & Herr, B.: Distal myopathy: Electron microscopic and histochemical studies. Neurology (Minneap.), 27: 727, 1977.
5) 春原経彦，埜中征哉，村上博彦，ほか：Rimmed vacuole, myeloid bodyを伴う家族性遠位型ミオパチー(会)．第21回日本神経学会プログラム/抄録，1980，京都，p. 45.
6) Engel, A.G.: Vacuolar myopathies: Multiple etiologies and sequential structural studies. In *Striated muscles*, (edited by Pearson, C.M. & Mostofi, F. K.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1973, p. 301.
7) Edström, L., Thornell, L.-E. & Eriksson, A.: A new type of hereditary distal myopathy with characterstic sarcoplasmic bodies and intermediate (skeletin) filaments. J. Neurol. Sci., 47: 171, 1980.
8) Carpenter, S., Karpati, G., Heller, I., et al.: Inclusion body myositis: A distinct variey of idiopathic inflammatory myopathy. Neurology (Minneap.), 28: 8, 1978.

18) 生検筋にrimmed vacuolesを持ち，遠位筋萎縮を示す二症例——電顕的検討——

西谷　裕*

研究協力者　斉田恭子*　小西哲郎*　久野彰子*

主として遠位筋群の萎縮を主要所見とするdistal myopathyといわれる筋疾患群の中で，生検筋線維に'rimmed vacuoles'と呼ばれる空胞様変性を示す疾患が多数報告されている[1)~5),8)]．その多くは若年成人発症で家族性又は孤発性に発症し，比較的緩徐に進行する．これらは，遺伝形式，臨床所見，検査成績等に多少の相違はあるが，一つの症候群とも考えられる．これら報告例の筋線維内に観察されている空胞又は空胞様変性は，種々の神経又は筋原性疾患でも筋の主要病変と併存して散見され，autophasic vacuolesといわれるものと同一の所見を示す[8)]．故にこの所見そのものは非特異的なものではないかと考えられている．ただしこの空胞様変性は，前述のdistal myopathyにおいては筋肉の主要病変をなしているという点で大きな違いがみられる．

我々は，遠位筋萎縮を示す二症例の生検筋において，筋病変の初期像を電子顕微鏡を用いて観察し，特に空胞様変性の生成過程について検討した．

症例1は，27歳女性で，19歳頃より下肢筋力低下を自覚し，足首が動きにくく，階段の昇降が困難であった．約3年後に上肢筋力の低下を自覚し，特に物をぶら下げる事に困難を覚えた．以後四肢の筋力低下は徐々に進行している．理学的所見としては，中等度の肥満の他は特記すべきものはなかった．神経学的には，知能正常，脳神経系は異常なし．触診で上下肢末梢筋のvolumeの減少がみられた．筋力は上肢では，近位筋及び末梢筋共に中等度に低下し，やや屈筋群が強く侵されていた．下肢では特に下腿筋群の筋力低下が著しかった．筋圧痛，myotonic reactionはみられなかった．深部腱反射は減弱又は消失していたが，知覚は正常であった．歩行は鶏歩状で動揺性であったが，小脳性失調症状は認められなかった．検査所見では，炎症所見なく，血清CPKは正常値を示す事が多いが，時に軽度上昇する事もあった．自己抗体は陰性で，筋電図では筋力低下の強い筋群で，short duration, low amplitudeの傾向が強く，筋原性所見を示した．末梢神経伝導速度は上下肢で正常．又検索しえた両親及び姉妹の臨床的検査，CPK及び筋電図は正常であった．筋力低下の軽度な上腕二頭筋で生検を行った．HE染色では筋一次束の破壊は軽度であるが，筋線維の大小不同を中等度に認め，中にangular fibersを散見した．細胞浸潤の像はなかったが，小径化した筋線維を中心に約10%の筋線維の中央又は筋膜下に直径約10ないし30μmの空胞様変性を認めた．この空胞はHE染色ではその一部のものは塩基性物質でふちどられ，その殆どが内に好塩基性物質を含有していた．pH9.4でのATPase染色では，生検筋はType I predominanceを示した．空胞様変性はNADH染色，ATPase染色，Oil Red O染色に染まらず，時にPAS染色にその一部が淡染した．エポン包埋1μmトルイジンブルー染色では，空胞内にan-

*国立療養所宇多野病院神経内科

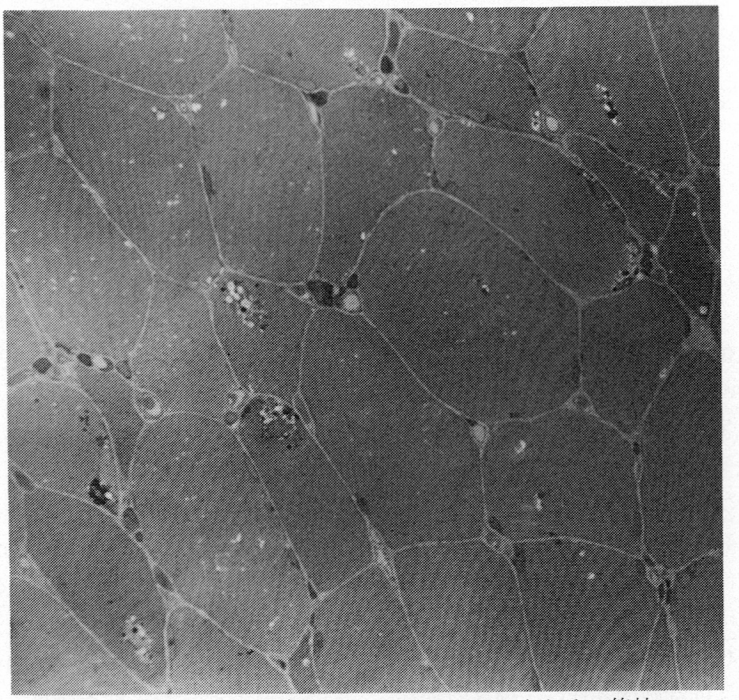


図1　筋線維の大小不同, angular fibersがみられる．筋核周辺，筋膜下及び筋線維内に限局して小空胞及び顆粒状物質が存在している．一見正常にみえる筋線維に散在性に拡大したＳＲと思われる小空胞が存在している．エポン包埋１μm標本，トルイジン・ブルー染色．

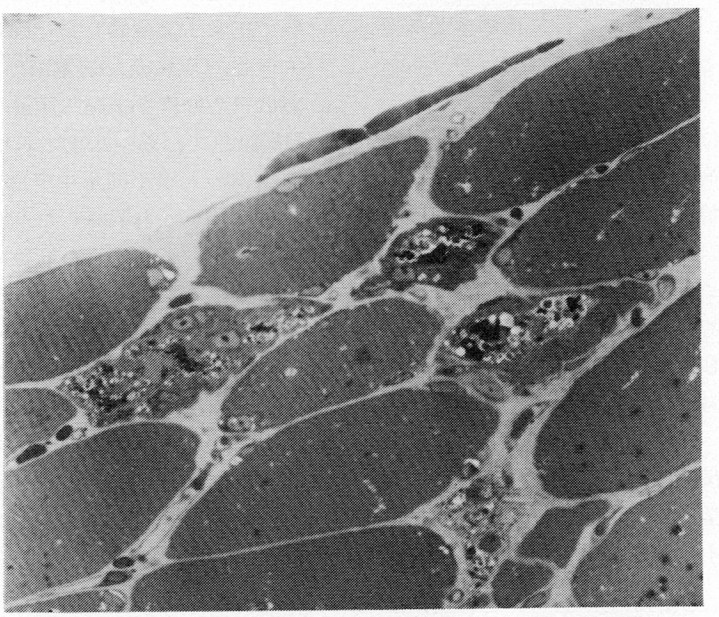


図2　小径化した筋線維には，非常に発達し塊状をなす顆粒及び小空胞物質の混在がみられる．

tophasic vacuoles を思わせる顆粒状ないし膜状の構造物がみられた(図1，図2)．空胞変性を持たない筋線維で，初期病変を電顕的に観察すると，筋原線維やミトコンドリア，サルコメアには異常がみられなかったが，sarcoplasmic reticulum (SR) と思われるものの拡大が所々に認められた (図3)．小さな myelin figure 様変性を示すいわゆる初期の空胞と思われる変化の周辺の筋線維は，病変の軽い筋束においては，その myofibrils や filaments に配列の乱れはなかった．明確な比較的大きな空胞様変性を示す筋線維では，ミトコンドリア又はライソゾームであったと思われる限界膜にかこまれたものの内部に膜様構造物及びグリコーゲン顆粒の蓄積がみられた．光顕で高度に発達した myelin figures やグリコーゲン顆粒を含む膜状構造物がみられた．これらの空胞様変性をもつ筋線維のいくつかは，筋原線維の配列の乱れを伴っていた．

症状2は，66歳の男性で，主訴は歩行困難．家族歴には特記すべきものはなく，血族結婚もみられない．既応歴として，18歳頃に，数回発熱を伴う膝及び足関節痛が反復した．44歳頃より高血圧症がある．65歳時に左胸膜炎に罹患した．現病歴としては，61歳頃より時々両側膝関節の脱力と転倒を来たすようになり，軽度の嚥下困難が出現した．63歳頃より階段の昇降が困難となり，握力も低下した．65歳頃より物につまづき易く，上肢挙上困難も出現した．理学的所見では，血圧は160/100，脈拍80整，皮膚には紅斑を認めず，又関節の変形はなかった．神経学的には，眼球運動は正常であり，軟口蓋の動きが中等度に減少していた．他には特に脳神経系に異常は認められなかった．歩行は鶏歩性，動揺性で杖を必要とした．Gower's sign は陽性．上腕及び両上，下肢遠位部の筋萎縮は著明で，筋力は両

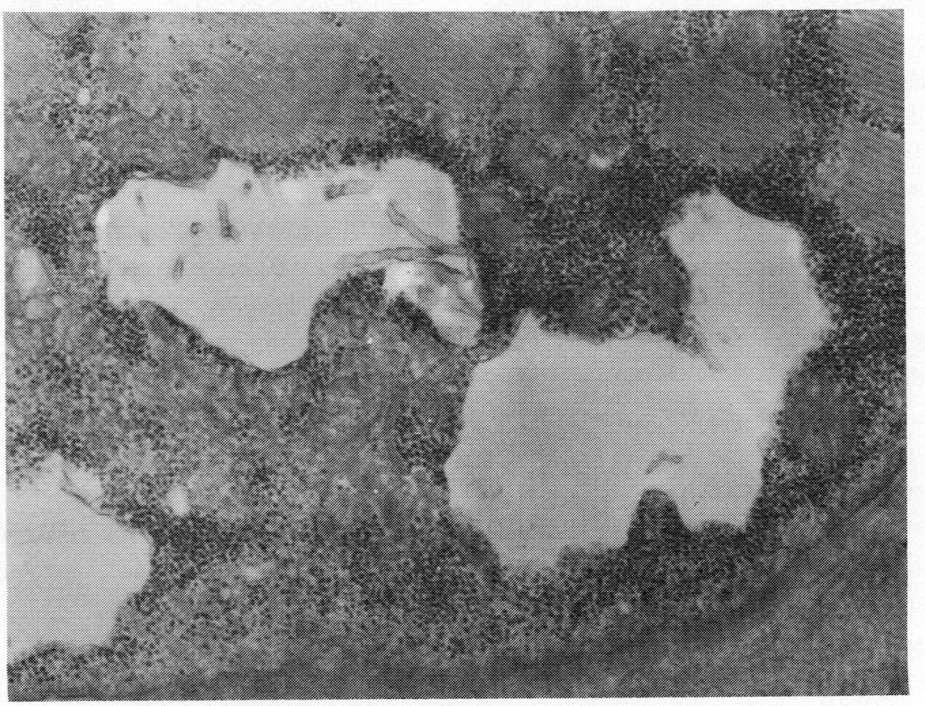


図3　筋膜下原形質内にグリコーゲン顆粒の蓄積と空胞がみられる．空胞内には管状・膜状の構造物が存在している．電子顕微鏡標本．

手指，前腕筋群及び両下腿，足部筋群にて高度に低下又は消失，頸部屈筋群は軽度に低下，軀幹筋は中等度，近位筋群は軽度ないし中等度に低下していた．四肢の深部腱反射は消失していた．知覚は正常で，小脳症状もなかった．検査成績では，赤沈(2時間値)100，CPKは380から100前後を変動（正常値は80迄）し，血清クレアチニンが1.9と高値を示す他は，CRP，RA，自己抗体等は正常であった．心電図では左室肥大を示し，胸部X線ではCTRは0.62であった．筋電図は筋原性変化を示し，末梢神経伝導速度は正常であった．過去2回の生検筋パラフィン包埋標本では，常に中等度の細胞浸潤が認められており，多発性筋炎の診断の下にステロイド及びメソトレキセートにて治療が行われ，CPK値の改善がみられたが，副作用が発現して中止されている．第3回目の筋生検は筋力低下の軟度な僧帽筋から行われた．凍結標本HE染色では，筋一次束の軽度の破壊の他，筋束内に組織球を中心とした細胞浸潤が中等度に認められ，筋間質小静脈周辺にも単核細胞の浸潤がみられた．筋線維の大小不同が中等度に存在し，中にヒアリン変性，phagocytosis，再生等の所見を示す筋線維が軽頻度に見られた．筋線維の約10%に大小様々の空胞を認め，筋膜下，中央部あるいは筋核の両側に，エポン包埋1 μm標本で，トルイジン・ブルーに濃染する構造物を認めた．ATPase染色(pH9.4)ではType I predominanceを示した．電顕的には，トルイジン・ブルー濃染物質は，myelin figuresであり(図4，図5)，未発達の膜状構造物内にはグリコーゲン顆粒の沈着がみられた．これらの変性の周辺では，筋原線維の配列の乱れはみられなかったが，ミトコンドリア及びT-systemには時に配列の乱れがみられた(図5)．又初期筋病変としてSRと思われるものの拡大と，その内外部へのグリコーゲン顆粒の蓄積，及び単純な管状，膜状構造物の出現がみられた．

以上，臨床型の異なる遠位筋萎縮を主症状とするミオパチー症例において，生検筋を検索しrimmed vacuolesの初期と思われる病変を電顕的に追求した．症例1は，孤発性に発症した若年成人型distal myopathyと考えられる．症例2は，oculopharyngo-distal myopathy[6]で，ocularな病変のないものとも考えられるが，筋生検所見や外眼筋症状のない点等よりdistal dominantなpolymyositisと考えた方が良いと思われる症例である．この症例はCarpenterらがinclusion body myositisとして報告しているものと類似している[7]．症例1では，空胞変性即ちrimmed vacuolesが筋病変の主要変化であった．病例2は，中等度の炎症性変化に空胞変性が伴っていた．両者筋共にType I predominanceを示した．空胞は，antophagic vacuolesと考えられ，最近福原らによりlysosomal enzymesの研究がなされ，lysosomesの異常が示唆されている[8]．今回我々は筋力低下の少ない筋を生検し，電顕を用いて特に空胞変性の初期的生成過程を検索した結果，初期的変化と考えられるものとして，1)周辺のmyofibrilsの配列は正常であるが，筋線維内のmitochondria及びT-systemの配列に乱れがみられる．2)SRと思われるものの軽度の拡大とその内外部へのグリコーゲン顆粒の蓄積，及び管状・膜状構造物の出現がみられた．軽度のSRの拡大そのものは多くの筋疾患でも随伴所見としてしばしばみとめられているが，この異常がdistal myopathyの筋病変のpathogenesisに関係するものかどうか，又ERの延長としてのlysosomesの異常と関係があるか不明である．

従来よりdistal myopathyの筋生検においても，Type predominance，angular fibers等の出現は報告されているが[1)~5)]，これが何らかの末梢神経機能の異常を示唆し，筋内での空胞形成と関係があるのか，あるいは筋病変が主としてdistalを強く侵すことと関係があるのかは今のところ不明である．

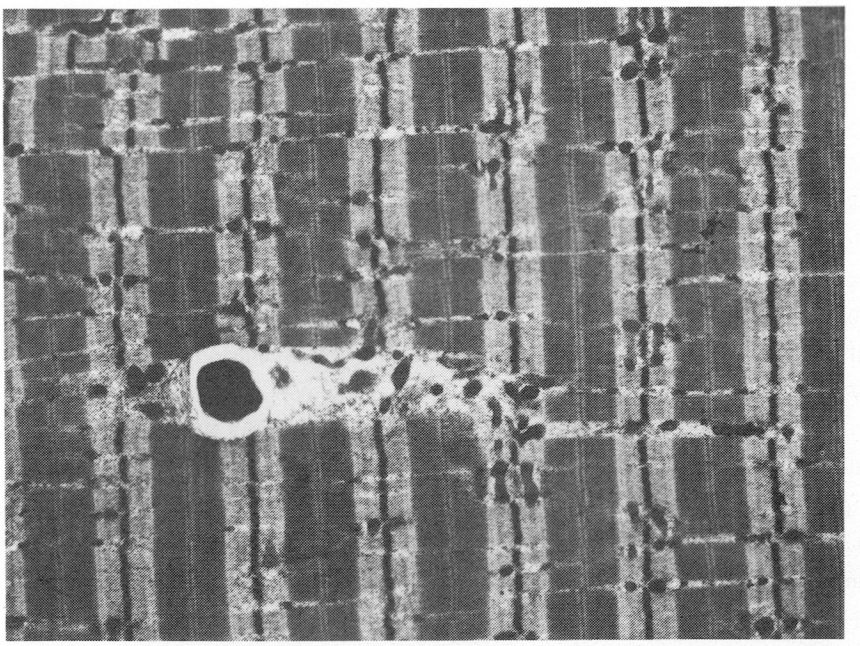


図4　電子密度の濃いmyeloid bodyが筋原線維間にみられる．周囲の myofibrils 等の配列に異常はみられないがミトコンドリアの配列に軽度の異常がある．

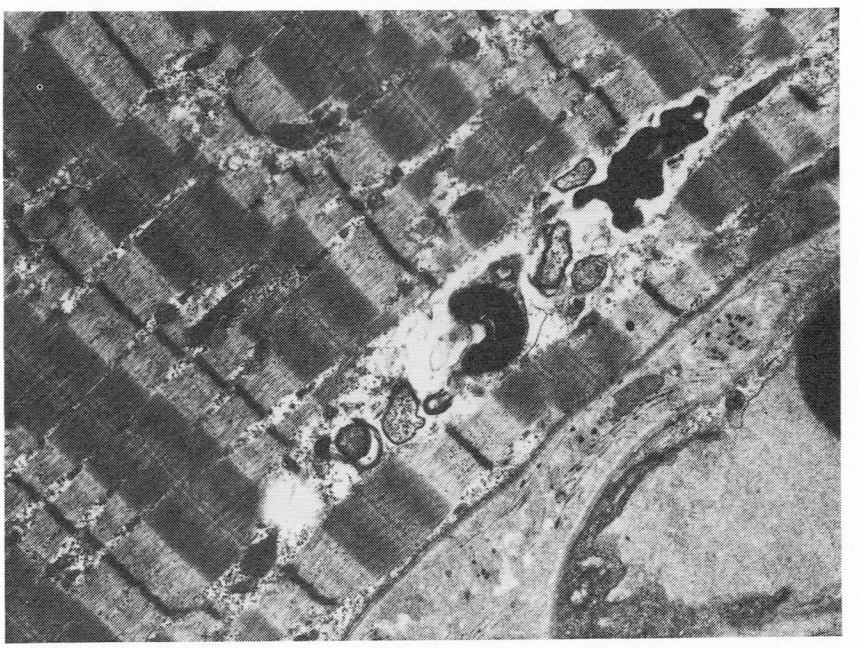


図5　更に発達したいわゆる空胞の電顕像で，myelin figures や内部にグリコーゲン顆粒等をもつ膜状構造物がみられる．全体をつつむような限界膜はない．

文　献

1) 佐々木清博，森浩郎，高橋和郎，中村晴臣：Distal Myopathy—4症例の検討—．臨床神経，9：627，1969.

2) 三好正堂，三田哲司，大田典也，荒木淑郎：筋線維に著明な空胞変性および桿状体(Rodlike Body)をみとめた孤発性Distal Myopathyの1例．臨床神経，10：111，1970.

3) 山田　透，鹿井禎三，内野　誠，岡嶋　透，赤塚　護：Distal Myopathy—2家系4症例の検討—．臨床神経，13：579，1973.

4) William,R.M.,Robert,C.G.&Barbara,H.: Distal myopathy—Electron microscopic and histochemical studies—. Neurology (Minneap.), 27：727，1977.

5) 三好和夫，岩朝　勝，川井尚臣，佐々木尚子，日下香苗，八木田正聖，日浅光春，多田嘉明；常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症——わが国にとくに見られる新しい末梢型筋ジストロフィー症——．日本臨牀，35：40，1977.

6) Satoyoshi,E.&Kinoshita,M.: Oculopharyngodistal Myopathy.—Report of Four Families—. Arch Neurol., 34：89，1977.

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

8) Fukuhara,N.,Kumamoto,T.& Tsubaki,T.: Rimmed vacuoles. Acta Neuropathol. (Berl.), 51：229，1980.

19) Distal myopathy と lysosome

福 原 信 義*

研究協力者　熊 本 俊 秀*

近年，細胞内および細胞外の蛋白質分解や細胞膜の代謝回転に，ライソゾームおよびそのシステムが重要な役割を演じ，さらに，細胞傷害や変性にも関係が深いことが示唆されている[1)2)]．

今回，我々は，遠位型ミオパチーを中心に各種筋ジストロフィー症とライソゾーム・システムとの関係を，変性の面から明らかにすることを目的として，形態学的立場から検討したので報告する．

検索対象および方法

検索対象は，進行性筋ジストロフィー症15例，うち Duchenne 型 7 例，Becker 型 2 例，顔面肩甲上腕型 3 例，遠位型ミオパチー 3 例，および筋緊張性筋ジストロフィー症 2 例の計17例である．各々の症例は，いずれも典型的な臨床像を示した．遠位型ミオパチー 3 例のうち，2 例が familial case（M. T.，32歳，男：J. T.，25歳，男），1 例が sporadic case（S. N.，36歳，女）である．Familial case は，両親はいとこ結婚で，全く異常ないが，同胞 5 人中姉を含め 3 人が同類疾患である．3 例の発症年令は，それぞれ M. T.，26歳，J. T.，23歳，S. N.，30歳である．臨床的に筋力低下および筋萎縮は，いずれも四肢遠位部優位にみられ，下肢遠位筋より発症し，上肢に及んでいる．深部腱反射は，低下ないし消失しているが，知覚障害はなく，また，線維束攣縮，仮性肥大，ミオトニアを認めない．CPK，GOT，GPT で軽度上昇を認めた他は，検尿，検便，検血，一般血液生化学に異常はない．また，末梢神経伝導速度は正常で，一般筋電図では，いずれも典型的な筋原性変化を認めたが，J. T. 例の被験筋の一部で slightly long duration (12 msec) and high amplitude (8 mv) potentials がみられた．Fibrillation および fasciculation voltage，また，myotonic discharge はみられない．

方法は，各々の症例の大腿直筋または上腕二頭筋より得られた生検筋の一部で凍結標本を作成し，光顕および一般組織化学的検索を行なうと共に，一部で電顕的観察を行なった．また，ライソゾームの marker enzyme である acid phosphatase (ACPase) 染色を Barka and Anderson (1962)[3)]の方法で行ない，ライソゾームの態度を組織化学的に観察した．

結　　果

光顕および一般組織化学的検索では，Duchenne 型，Becker 型，顔面肩甲上腕型および筋緊張性筋ジストロフィー症で，概ね従来より報告されている各々の疾患に特有の筋病理像を示した．

遠位型ミオパチーの 3 例では，程度の差はあるがほぼ同様の所見で，筋線維の大小不同，一部に散在性の small angulated fiber，とくに J. T. 例では，一部の fasciculus に large groups of small round fiber (of myogenic origin suspectively) を認めた．また，中心核の増加，ghost-like appearance を呈した simple necrosis，fiber-splitting がしばしば見られた．貪食細胞は殆どなく，炎症性反応は見られない．ATPase 染色では，type grou-

*新潟大学脳研究所神経内科

表 I　Frequency (%) of rimmed vacuoles and acid phosphatase (ACTase) positive fibers

materials	No.of cases	Rimmed Vacuoles mean±SD (min.-max.) (%)	ACPase positive fibers mean±SD (min.-max.) (%)
Progressive muscular dystrophy (except for distal myopathy)	12	0	0.01±0.14 (0-0.3)
Duchenne type	7	0	0.13±0.16 (0-0.3)
Becker type	2	0	0
FSH type	3	0	0.08±0.15 (0-0.3)
Distal myopathy	3	5.10±8.05 (0.4-14.4)	15.60±7.00 (8.5-22.5)
Myotonic dystrophy	2	0	4.65±0.49 (4.6-5.0)

pingはなく，type Iおよびtype II線維の分布比率に異常はない．

全例にみられた最も目立つ特異な所見は，多数のrimmed vacuole[4) 5)]を認めたことである．このvacuoleは，Gomori trichrome染色で赤紫色に，H・E染色ではbasophilicに濃染するmaterialsを有し，small fiberのみならずnormal sizeの線維の辺縁あるいは深部に認められた．また，type I線維優位に両型の線維にみられ，vacuoleを有する線維はしばしば萎縮し，DPNHに濃染した．Vacuoleは電顕的にはlimited membraneをもったmembranous lamellar structureおよびheterogenous materialsより成りautophageと思われた．VacuoleはACPase染色で，大多数は陰性だが稀に辺縁で活性を示すものがみられ，以上のことから，このrimmed vacuoleの多くはautophagic vacuoleで，一部がsecondary lysosomeであると考えられた．

次に，各疾患別のrimmed vacuoleおよびACPase陽性線維の出現頻度を**表1**に示した．各筋とも約400本の筋線維について，その出現率を求めた．

Duchenne型，Becker型，顔面肩甲上腕型の進行性筋ジストロフィー症では，いずれもrimmed vacuoleを全く認めず，ACPase活性は，多数の貪食細胞にみられたが，筋線維内には平均0.1%と，ほとんどみられなかった．筋緊張性筋ジストロフィー症でも，rimmed vacuoleは認められない．ACPase陽性線維は，平均4.65±0.49%に認められたが，いわゆる正常構造を呈した線維にはほとんどみられず，多くは萎縮線維や異常線維内の，とくに中心核の周辺や筋線維内の貪食細胞に活性を認めた．遠位型ミオパチーでは，全例に多数のrimmed vacuoleおよびACPase陽性線維を認めた．その出現頻度は，それぞれ平均5.10±8.05%および15.60±7.00%と他疾患に比べ明らかに高率であった．また，ACPase活性は，筋線維内に顆粒状に認められ，異常線維のみならず正常構造を呈した線維にも多数みられた．

考　　察

1950年代初期，de Duveらにより発見されたライソゾームは，細胞内・外物質の消化・分解に重要な役割を演じ，その機能は，現在では図1に示すようなライソゾーム・システムとして理解されている[1)]．こと細胞内蛋白や細胞膜の代謝回転については，老化あるいは何らかのpathological stressによりfocal cytoplasmic degradationがおこると，変性した細胞膜あるいは細胞内小器官などの細胞成分を入れたautophagic vacuoleが形成され，同時にGolgi体由来のprimary lysosomeが多数誘導され，これらが癒合しsecondary lysosomeを形成する．これによりautopha-

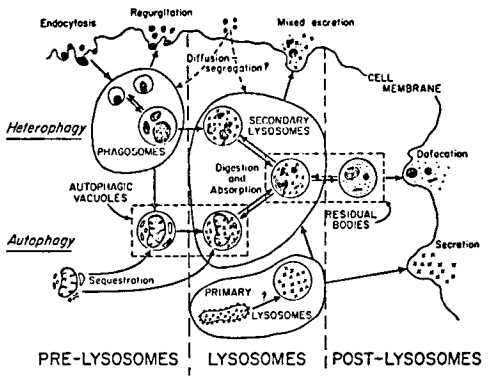


図1　ライソゾーム・システムの動態と機能（文献1)より）

gic vacuole 内の変性した細胞成分が primary lysosome 内の hydrolase (protease) により消化・分解され，処理される．従って，このシステムに何らかの異常がおこると，消化・分解機構障害による autophagic vacuole の過剰形成，未分解産物のライソゾーム内蓄積，また，ライソゾーム膜の破壊あるいは透過性亢進による lysosomal hydrolase の細胞質内への漏出などにより，種々の細胞傷害を起こすと言われている[1) 2) 6)]．

遠位型ミオパチーでは，貪食細胞はほとんどなく，他の疾患と異なり，多数の rimmed vacuole および ACPase 陽性線維を認めた．このことは，とりもなおさず autophagic vacuole および primary lysosome の異常な増加を意味し，本症における変性プロセスが主にライソゾーム・システム中心に行なわれることを示唆する．さらに，こうした事実からは，本症において，autophagic vacuole の形成を増加させる何らかの細胞傷害機構が著しく亢進していることや，autophagic vacuole と primary lysosome との癒合の障害やライソゾーム内の hydrolase 活性の低下などによる消化・分解機能の障害など―ライソゾーム・システムの何らかの異常がある可能性が推定される．

勿論，rimmed vacuole は Kugelberg-Welander 病[5)] や oculopharyngeal dystrophy 等にもみられ，決して遠位型ミオパチーに特異的な所見ではないが，変性プロセスという点では，1つのパターンを成し得，多数の貪食細胞を認め，rimmed vacuole および ACPase 陽性線維をほとんど認めない他の進行性筋ジストロフィー症とは異なる変性プロセスをとるものと思われた．

筋ジストロフィー症をはじめ各種ミオパチーの変性過程におけるライソゾーム・システムの動態とその意義を明らかにすることは，種々のプロテアーゼの研究とともに，変性プロセス，さらに pathogenesis を考える上で極めて重要なことと思われる．

ま と め

1）遠位型ミオパチーでは，多数の rimmed vacuole と共に ACPase 陽性線維の増加を認めた．

2）筋緊張性筋ジストロフィー症では，rimmed vacuole はみられないが，主に変性した線維で ACPase 活性を認めた．

3）他の進行性筋ジストロフィー症では，rimmed vacuole および ACPase 陽性線維を共に認めない．

4）以上より，遠位型ミオパチーにおける変性プロセスがライソゾーム・システム中心に行なわれ，且つ，その系に何らかの異常があることが推定された．また，ライソゾーム・システムの態度でみる限り，他の進行性筋ジストロフィー症とはその変性プロセスにおいて異なる疾患であると思われた．

文　献

1) de Duve, C. & Wattiaux, R.: Functions of lysosomes. Ann. Rev. Physiol., 28: 435, 1966.
2) Pitt, D.: Lysosomes and Cell Function. Longman, London, 1975.
3) Barka, T. & Anderson, P. J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as

coupler. J. Histochem. Cytochem., 10 : 741, 1962.

4) Dubowitz, V. & Brooke, M. H. : Muscle Biopsy—A Modern Approach. Saunders, London, 1973, p.233.

5) Fukuhara, N., Kumamoto, T., et al. : Rimmed vacuoles. Acta Neuropathol. (Berl.), 51 : 229, 1980.

6) 岩政輝男，濱田哲夫：ライソゾーム—生理機能と病理．学際企画，東京，1980，p.5.

20) Tubulomembranous myopathy

福 原 信 義*

研究協力者　熊 本 俊 秀*　平 原 弘 雄*　椿　忠 雄*,**

はじめに

筋肉の組織化学，電顕的研究の進歩により，種々の先天性ミオパチーの存在が明らかにされてきたが，我々は今までに全く報告のない特異な構造物を有する筋疾患[1]を経験したので，その封入体の微細構造を中心として述べ，その病態生理について論じてみたい．

症　例

症例：19歳男性

家族歴：両親は従兄妹半結婚であり，父親の兄弟に乳幼児死亡者が数名いるが，類似の疾患はみられない．

既往歴：幼児期に麻疹，水痘，耳下腺炎にかかったが，後遺症なく治癒している．

現病歴：妊娠・出産は正常．Floppyではなかった．生来，運動能力は劣っており，学校でも走るのが一番遅かったが，両親も運動が苦手であったので，あまり気にかけられなかったという．15歳より，走るのが特に遅くなり，歩行も疲れやすく，よたよたするようになった．16歳時，新潟大学神経内科に入院した．

入院時現症：一般理学的所見は正常．知能は正常．眼底，視力，視野は正常．Convergence strabismusがみられるが，眼球運動に制限はない．顔面は軽いミオパチー様顔貌で，頸部の筋力は軽度低下していたが，構語障害，嚥下障害はみられない．軽度の腰椎前彎があり，四肢は近位筋と下腿のふくらはぎに軽度の筋萎縮がみられた．深部反射はアキレス腱反射以外すべて低下．共同運動と感覚の障害はない．

検査所見：一般検査はほとんど正常であったが，CPK47～1236と軽度上昇．

運動および感覚**神経伝導速度**（右尺骨神経，正中神経，脛骨神経，腓腹神経）は正常，ただ，運動神経刺戟による誘発筋電位は，それぞれ1.7mV，3.3mV，0.33mVと低下していた．

筋電図：左大腿四頭筋で，活動電位の数がやや少なくなり，低電位のものにまじり，やや高電位のものがみられるが，他の筋はすべてshort duration, low voltage (300～500 μV)，polyphasic potentialsであり，ミオパチーと考えられた．

後に述べるように，筋生検所見から，lysosomal enzymeの障害が疑われたため，末梢血リンパ球や皮膚の電顕的検索がなされたが，特に異常はみられなかった．白血球のarylsulfataseA, B, α-& β-galactosidase, α-glucosidase, N-acetyl-β-D-glucosaminidaseなども正常であった．

臨床経過：Prednisolone (60mg/day) が試みられたが全く効果なく，顔面・四肢の筋萎縮はその後も進行し，特に大腿・下腿筋にはっきりしてき，深部反射は全く消失した．Gowers徴候も陽性で，歩行に杖を必要とするようになっている．

筋生検所見

筋生検は16歳の入院時に，左大腿四頭筋で行い，凍結切片は，通常の染色，組織化学の

＊新潟大学脳研究所神経内科

＊＊東京都立神経病院

ほか，acid phosphatase 染色（Barka & Anderson, 1963）や alcian blue（pH2.6）染色も行った．電顕標本は，2.5% glutaraldehyde と 1% osmium tetroxide で固定し，araldite に包埋した．超薄切片は，uranyl acetate と lead citrate の二重染色を行った．

光顕所見：筋線維の大小不同が著明で，中心核が増加し，fiber-splitting，多数の rimmed vacuoles[2) 3)] がみられたが，細胞浸潤や perifascicular atrophy はみられなかった．Nemaline-rod, ragged-red fiber などの異常もみられなかった．PAS 染色でもグリコーゲンの異常蓄積はなく，oil red O, Sudan black B 染色でも異常はなかったが，多くの線維で alcian blue に陽性に染まる 1 ～ 2 個の顆粒がみられた．Acid phosphatase は62.1%の線維で陽性に染まった．Adenosine triphosphatase 染色で38.6%が type I 線維で，その atrophy factor は162と萎縮していた．アラルダイト包埋標本の toluidine blue 染色では，40～50%の線維に，淡青色に染まる2.5×10 μm までの大きさの封入体が筋線維の中にみられた．

電顕所見：光顕の rimmed vacuoles に相当する電顕所見[3)] の autophagic vacuoles の所見がみられたが，最も特徴的な変化は，アラルダイト包埋でみられた封入体に一致してみられる tubulomembranous structures（TMS）（図 1）とも言うべき構造物であった．TMS は，8.5～ 9 nm の周期のやや彎曲した層状構造をなしており，切片の方向により管状構造をなして観察された（I 型封入体）．TMS の中心部の電子密度はしばしば低下し，あたかも染色液がぬぐい去られたごとくに見えた．多くの TMS は密につまっていることが多かったが，ときにまばらでグリコーゲン顆粒と混在しており，周囲を膜により囲まれているものもあったが，その膜はしばしば断裂していた．この TMS のほか，出現頻度は少ないが，3 ～ 6 nm 径の filaments よりなる curvofilamentous な物質（II 型封入体）（図 2），単一膜で囲まれた微細顆粒状物質（III型封入体）などがみられた．このIII型封入体のまわりには不規則にカーブした管状構造物がみられることが多く，またIII型封入体より I 型封入体へあたかも移行しているか

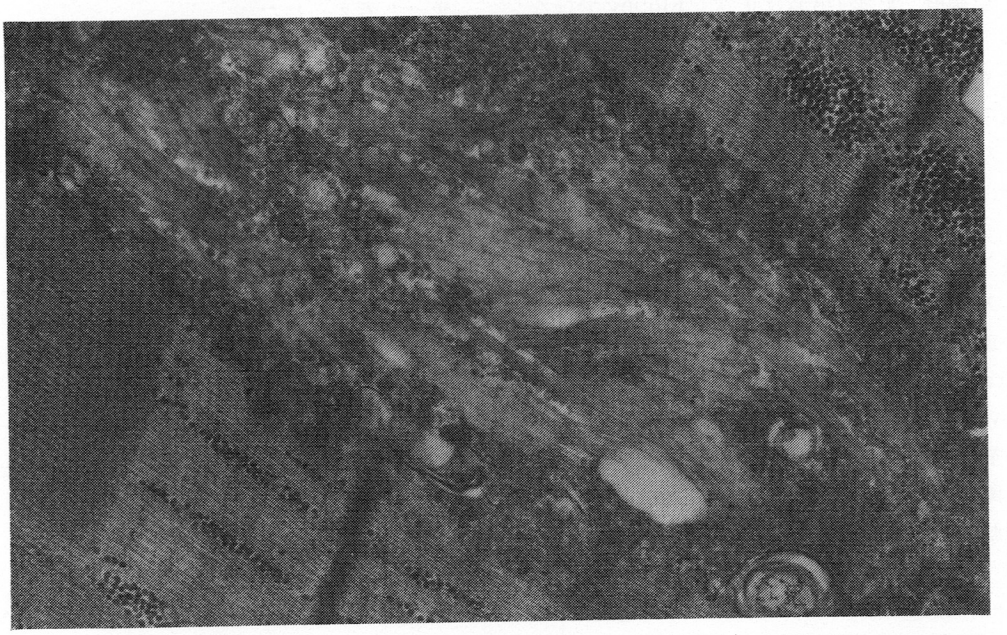


図 1　Tubulomembranous structures（TMS，I 型封入体）．×29,000

のように見えるところ（図3）があった．また，膜につつまれたglycogen顆粒の集積がまれにみられたが，lipofuscinはほとんどみられなかった．このような構造物の出現のほか，それらの筋線維自体にはほとんど変化はなかった．

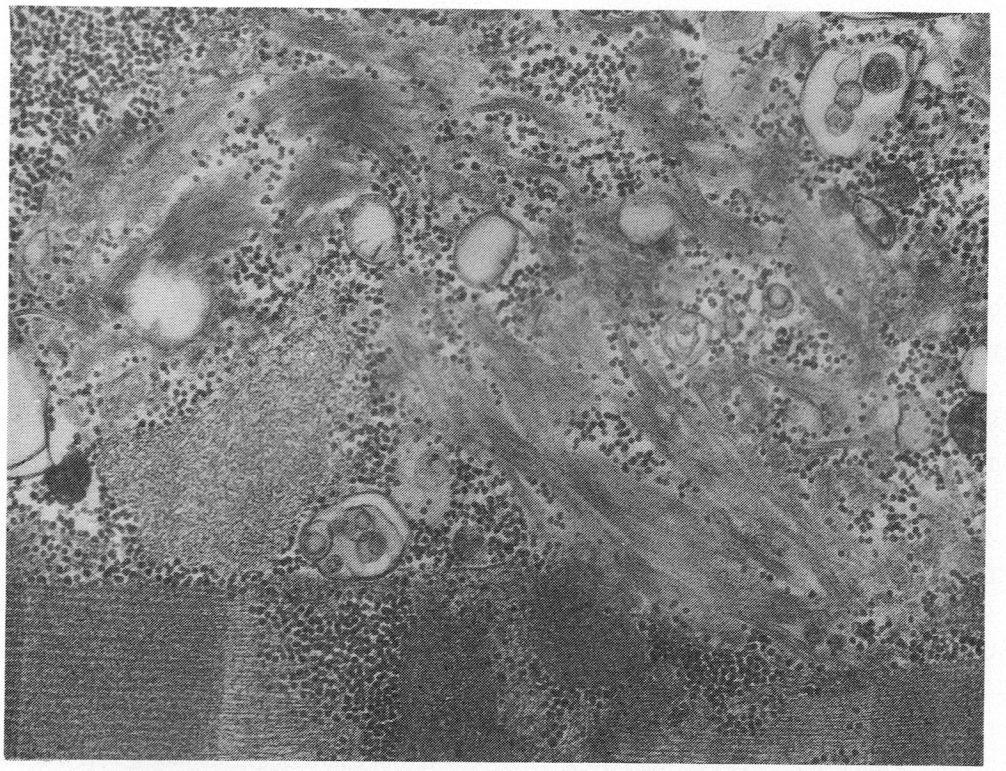


図2　まばらなtubulomembranous structuresに近接してcurvifilamentous masses（II型封入体がみられる）．×39,000

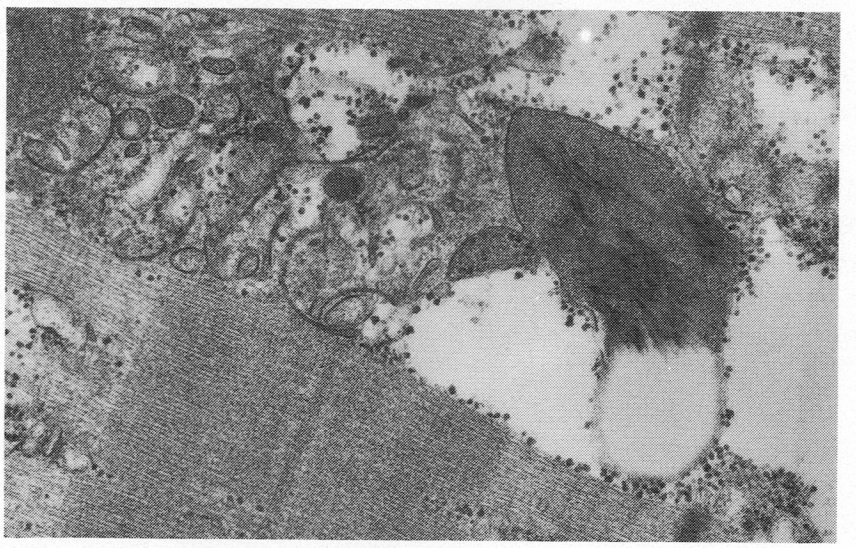


図3　一部，I型封入体（TMS）より移行しつつあるIII型封入体．×43,000

考　　察

本症例の筋障害の型は，CPK，筋電図，末梢神経伝導速度などより，ミオパチーと考えられ，肢体型筋ジストロフィー症に類似しているが，肢体型筋ジストロフィー症では，顔面筋の障害は通常なく，病気の進行が本症例ほど早くない点が異なっていた．Acid phosphataseの活性が著明に亢進している点，膜に囲まれたglycogen顆粒の出現は，II型糖原病（acid maltase deficiency）[4) 5)]に類似していた．しかし，glycogenの異常蓄積は，組織化学的にも，電顕的にもみられず，今までの糖原病の報告例でも本症のようなTMSを伴ったものはない．

易疲労性という点は，本症例の臨床的特徴の1つであり，ミトコンドリア性筋疾患でしばしばみられるものであるが，ミトコンドリアの異常はみられなかった．

TMSを今まで報告されている構造物のどれかに強いて類似をもとめるとすれば，Fabry病の封入体にやや似ているが，Fabry病の封入体の層構造の周期性は4.5～5.5nm[6)]であり，また，白血球のα-galactosidaseは正常であり，Fabry病としての臨床症状は全くみられておらず，Fabry病とは考えられない．

本症のII型封入体は，ceroid-lipofuscinosisのときのcurvilineal profile[7)]にやや似るが臨床症状は全く異なる．また，通常の型のlipofuscinもみられていない．III型封入体類似の構造物としては，Fardeauら[8)]が1978年に，優性遺伝のミオパチーでdense granulofilamentous massesと記載しているものにやや似ている．しかし，彼らの症例には，我々の症例の中心的所見であるTMSはみられていない．

以上のように，この症例でみられた異常構造物は，lysosomal enzymeのブロックにより生じてきたと推定されるが，その形態，層状構造の周期において，今まで報告されたどの疾患の封入体とも全く異なっており，その形態から"tubulomembranous myopathy"として，今後，症例を集め，その原因を追求すべきものと思われる．

ま と め

筋生検において，今まで全く報告のないtubulomembranous structuresともいうべき周期8.5～9 nmのやや彎曲した層状構造物のみられるミオパチーについて報告した．Lysosomal enzymeの障害で生じてきていると推定されたが，詳しい原因は不明であり，"tubulomembranous myopathy"という新しい疾患単位として症例を集め，原因を追求すべきであると思われた．

文　　献

1) Fukuhara, N., Kumamoto, T., Hirahara, H., et al.: A new myopathy with tubulomembranous inclusions. J. Neurol. Sci., 50: 98, 1981.
2) Dubowitz, V. & Brooke, M. H.: Muscle biopsy——A modern approach. Saunders, London, 1973.
3) Fukuhara, N., Kumamoto, T. & Tsubaki, T.: Rimmed vacuoles. Acta Neuropathol. (Berl.), 51: 229, 1980.
4) Engel, A. G., Gomez, M. E., Seybold, M. E., et al.: The spectrum and diagnosis of acid maltase deficiency. Neurology (Minneap.), 23: 95, 1973.
5) Schotland, D. L.: Ultrastructure of muscle in glycogen storage disease. In "The striated muscle," (edited by Pearson, C. M. & Mostofi, F. K.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1973, p. 410.
6) Fukuhara, N., Suzuki, M., Fujita, N., et al.: Fabry's disease. On the mechanism of the peripheral nerve involvement. Acta Neuropathol. (Berl.), 33: 9, 1975.
7) Goebel, H. H., Zeman, W. & Pilz, H.:

Significance of muscle biopsies in neuronal ceroid lipofuscinosis. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 38 : 985, 1975.

8) Fardeau, M., Godet - Guillain, J., Tome, F. M. S., et al : Une nouvelle affection musculaire familiale, definie par l'accumulation intra-sarco-plasmique d'un materiel granulo-filamentaire dense en microscopie electronique. Rev. Neurol. (Paris), 134 : 411, 1978.

21) Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)培養筋細胞のフリーズフラクチャーによる検討

納　光弘*

研究協力者　中里興文*　井形昭弘*　Andrew G.Engel**

目的

DMDにおいてはnon-necrotic muscle fiberにおいても筋鞘膜に断裂が認められることより，この膜病変がDMDの病因として一次的な役割をもつ可能性が指摘されている[1)2)]．又，DMD筋線維の膜の外表面の電顕組織化学的検索により，concanavalin Aに対するreceptor siteの局所的な減少も報告された[3)]．さらに最近，DMDにおいて筋鞘膜と赤血球膜のIntramembranous particles (IMP)値の減少が報告された[4)5)]．このIMP値の変化が病因にとって一次的なものであるかを幼若細胞である培養筋細胞により検討することを目的として本研究を行った．

方法

DMD 6例と正常対照6例の生検筋をWitkowski法[6)]によりprimary cultureし，Pauli法[7)]によりフリーズフラクチャーを行った．Myotube或いはmononuclear cellを選択的に電顕で観察するために光顕と電顕（レプリカ）の完全な対比を行うための方法を案出した．計202のmyotubeと220のmononuclear cellのPF及び計133のmyotubeと146のmononuclear cellのEFがblind法で分析された．又，正常対照及びDMDの両資料を同時にフラクチャーしたレプリカに関してmyotubeのPFにおけるIMP各1000個の直径のヒストグラムを作成した．

結果

IMP値は表1に示す．DMDにおいても正常対照においてもmyotubeはmononuclear cellに比しPFのIMP値は有意に高値を示した．このことより，我々の行った光顕と電顕の対比の必要性が改めて確認された．しか

表1　Numerical density of intramembranous particles per square micrometer

Fracture Face	Cell Type	Source	Group Mean ± SD*
P face	Myotube	Duchenne	1646 ± 124
		Control	1631 ± 106
	Mononuclear	Duchenne	1486 ± 127
		Control	1299 ± 237
E face	Myotube	Duchenne	746 ± 48
		Control	738 ± 84
	Mononuclear	Duchenne	782 ± 42
		Control	740 ± 75

* Group means are based on mean values observed in 6 subjects.

＊鹿児島大学医学部第三内科

＊＊Mayo Clinic, Department of Neurology

しながら，DMD 及び正常対照の両者の間には，myotube の PF, mononuclear cell の PF, myotube の EF，あるいは mononuclear の EF のいずれにおいても有意の差を認めなかった．又，DMD と正常対照 myotube の PF の IMP のヒストグラムは identical であった．Caveole, gap junction, tight junction, nude spot，及び hot spot も DMD と正常対照の間で量的質的差異を認めなかった．

結　　語

本研究は，DMD の培養筋細胞においてはフリーズフラクチャーされた筋鞘膜に形態学的異常のなかったことを示している．従って，筋生検に認められた IMP 値の異常[4] は筋分化のもっと後の段階でおこってきたものであるのか，或いは培養細胞にはおこってこない様な二次的な機序によるものかのどちらかによるものと考えられる．

もしも，我々がこの研究の結果 IMP 値の減少をみることが出来たのなら，これは DMD の病因にとって一次的なものと結論したであろう．残念ながら，我々のデーターは negative data となった．しかし，このことは，Mokri ら[1] の提唱した DMD の病因における膜の異常の重要性を減じさせることを意味するものではない．これら，DMD 生検筋に認められた膜異常に関しては，IMP 値の減少や orthogonal particle arrays の減少がどの段階でどの様な原因で発生してきたかということも含めて，今後追求されねばならない問題である．

文　　献

1) 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 (Minneap.), 25: 1111, 1975.

2) Schmallbruch, H.: Segmental breakdown and defects of the plasmalemma in diseased human muscle. Acta Neuropathol (Berl.), 33: 129, 1975.

3) Bonilla, E., Schotland, D. L., & Wakayama, Y.: Duchenne dystrophy: focal alterations in the distribution of concanavalin A binding sites at the muscle cell surface. Ann. Neurol., 4: 117, 1978.

4) Schotland, D. L., Bonilla, E., & Wakayama, Y.: Application of the freeze-fracture technique to the study of human neuromuscular disease. Muscle & Nerve, 3: 21, 1980.

5) 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.

6) Witkowski, J. A., Durbridge, M., & Dubowitz, V.: Growth of human muscle in tissue culture. An improved technique. In Vitro, 12: 98, 1976.

7) Pauli, B. U., Weinstein, R. S., Soble, L. W., & Alroy, J.: Freeze-fracture of monolayer cultures. J. Cell Biol., 72: 763, 1977.

22) Duchenneジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験

若　山　吉　弘*

筋ジストロフィー症における筋再生の問題は本症の治療，予後に関して重要な課題でありながらまだ解決されてはいない．従来の筋再生の研究は方法論的に大別して3つに分類される．1つは生検筋を光顕，電顕的に検討するもの，この方法では再生筋と萎縮筋との鑑別が電顕レベルでは，しばしば困難なことがある．もう1つは生検筋を組織培養し，これを組織細胞学的に検討するもの，3つ目は先天的に胸腺を欠除するヌードマウスを用いて生検筋の異種移植後の再生筋を検討するものである．このうち生検筋の組織培養法によって再生筋を得ることはむつかしく，特に正常対照筋より再生筋を得ることは非常にむつかしい．この原因として種々のfactorが考えられようが，その1つにmyogenic stem cellといわれるmuscle satellite cellが正常対照筋にて数が少なく，しかもinactiveであることが考えられる[1)2)]．これに対してヌードマウスは先天的に胸腺を欠き，リンパ球のうちT細胞が少なく，従って異種動物よりの組織を移植されても拒絶反応がない．本実験の目的は正常対照筋とジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの異種移植により，その再生筋の形態学的差異を検索することにより本症の筋再生の問題を検討することにある．

材料と方法

ヌードマウスをネンブタールにて麻酔し，2つの小さな切開を左右の背部に加えた．ここへ組織学的に正常な整形外科手術患者5例，Duchenneジストロフィー患者7例からの生検筋を小さく細切（約2×5 mm）したものを挿入し縫合した．

移植片は移植後1，2，3，4週目でそれぞれ正常対照筋とジストロフィー筋からの再生筋の形態学的比較をした．まずヌードマウスをエーテル麻酔後屠殺し背部の皮膚を切開した．移植片は通常線維組織で被覆されているので，容易に同定可能であった．

移植片のついた皮膚をピンで伸ばし，2.5%グルタールアルデヒドをここへ注ぎ約10分間固定した．これは移植片における再生筋線維のcontraction artifactを避けるために行った．その後移植片をヌードマウスの皮膚から除去し，まわりに付着している結合組織を除去し，小さなblockに細切した．この標本を2.5%グルタールアルデヒドにて更に1時間固定後，0.1Mリン酸緩衝液で洗浄後2%オスミウム酸にて1時間後固定し，アルコールとプロピレンオキサイドにて脱水後プラスチックに包埋した．thick sectionはトルイジン青にて染色後光顕にて検索した．また超薄切片をウラニールと鉛で2重染色後電顕にて観察した．

結　　果

裸眼的には正常筋及びジストロフィー筋の移植筋組織はヌードマウスの皮下組織の中で1～2週間後には移植片のなかの血管新生のために赤くはっきりと識別できた．時に神経線維もこのなかへ入っているのが認められた．このような移植片は時とともに小さくなっていくように思われた．移植片の割面は周辺部

＊昭和大学藤が丘病院神経内科

がより赤く密で中央部はやや白っぽく疎であった.

光顕的には正常筋の移植片にて1週間後には移植片の周辺部で核小体をもち明るい核のある myotube を認めた.他方移植片の中央部は核が消失し硝子様筋原線維をもつ変性筋線維が存在し，その周辺部にはいくつかの紡錘形細胞が随伴していた．2，3週後には myotube の生育があり，それらのいくらかには胞体内に空胞を有するものもみられた．4週後には周辺核と横紋をもつ筋線維や，横紋形成と中心核をもつもの，更に横紋のみられない myotube などが認められた.これに対しジストロフィー筋の移植では，光顕的に移植後1週目に myoblast, myotube の形成がみられ，2週目にはその生長がみられた.

電顕的には正常筋の移植片にて1週後には筋核や筋細胞膜がなく，筋原線維が硝子様化し Z line がなく，mitochondria は膨化し，その matrix には amorphous な電子密度の高い物質の存在する変性筋線維がみられた．しかしこのような変性筋線維にも基底膜はしっかりと保存され，その内側には単核ないし多核の細胞が存在した．単核細胞は細胞の形態などから pseudopodia や粗面小胞体をもち著明な貪食空胞をもつものと，著明な free ribosome, polysome, 粗面小胞体，滑面小胞体やグリコーゲン顆粒の集簇をもつものに大別され，後者は myoblast に変化していく細胞と考えられた．また両者の混合型とも考えられる細胞が存在した.この段階で myoblast や myotube は何層かの基底膜により被われており，また最外層の基底膜はひだの形成をみることが多い．最内層の基底膜の内側には複数の myoblast, myotube が compact に存在し，その細胞突起は互いに絡み合っているところがしばしば観察された．一方これらの細胞の胞体内には actin, myosin filaments, Z line materials, microtubules, intermediate sized filaments などがいろいろな方向に走り，豊富な ribosome や polysome がみられ，またその一部は発生途上の myofilaments に沿って存在していた．2週後には myotube には部分的に横紋形成がみられ，そのうちのいくらかには leptomere がみられた.すなわち約50nm の太さの Z line material に似た electron density をもつ物質が約150nm 間隔で周期的に並び非常に細い filaments がこれらを垂直に結びつける様に走る構造物である．この leptomere は通常 subsarcolemmalarea にみられた.また myotube には dyads や triads が多くなり，グリコーゲン顆粒や脂肪滴の間に mitochondria の集簇がみられ，またグリコーゲン顆粒の集簇には membrane material が存在するものもみられた．3週後には myofilaments は更に密に存在し，dyads や triads も更にしばしば観察された.peripheral coupling は subsarcolemmal region に位置し，他の subsarcolemmal vesicle とはその内部に微細な顆粒状物質を有し，細胞膜との間に junctional feet がみられることから鑑別された．この形態は sarcoplasmic reticulum と transverse tubules との間でみられる interior coupling と同じであった.この段階では leptomere は myotube の subsarcolemmal region と同様に胞体の内部にも存在した．4週後には周辺核と AIHM 帯をもつ横紋などを有する再生筋線維が観察されたが transverse tubules は縦走する部分もみられた.まれに myotube に嚢状に拡大したそのなかに微細顆粒状物質をもつ sarcoplasmic reticulum がみられ，これが transverse tubules と junctional contact を作っていたりもしていた[3].

これに対しジストロフィー筋の移植片では，myoblast, myotube において1週後2週後とも定性的にはその細胞小器官などを含め形態的に正常筋の移植片におけるそれらとの間に大きな差異は認められず（図1－3）leptomere も2週後の myotube には認められたが(図3A，3B)，ただ2週後の myotube のなかにはまれに transverse tubules 由来と思

以下の写真はすべてDuchenneジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植片にみられた所見で，図1，2A，2Bは移植1週後，図3A,3B，4は移植2週後にみられたものである．

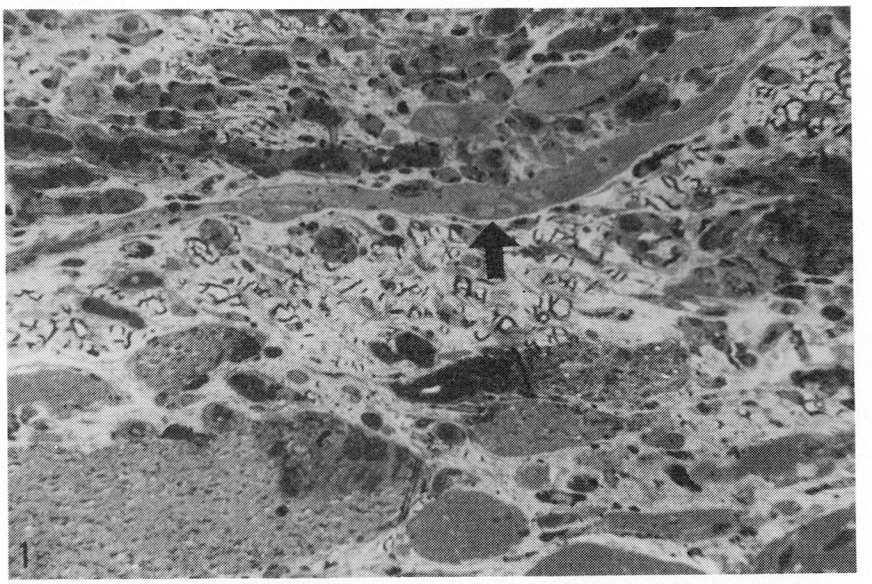
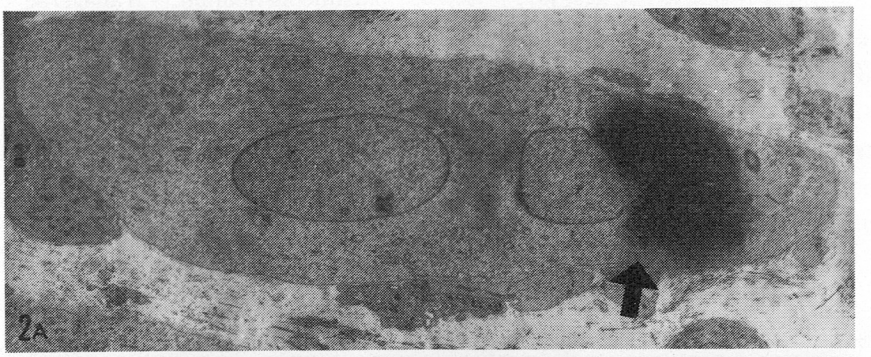


図1　光顕写真上方にはregenerating myotube（矢印）がみられ下方にはdegenerating muscle fiberがみられる．トルイジン青染色×750



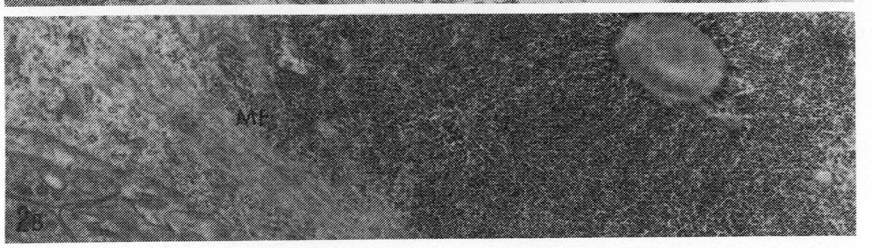


図2A 電顕写真には大きなグリコーゲン顆粒の集簇がみられるmyotubeが存在し，その矢印の部分を拡大すると図2Bとなり，ここには筋原線維（MF），グリコーゲン顆粒，脂肪滴などがみられる．
図2A×4,400　図2B×13,700

われるtangleが密なmyofilamentsの間に存在するのが観察された(図4)．またジストロフィー筋の移植片にみられるmyoblast, myotubeなどmyogenic cellの細胞膜は透

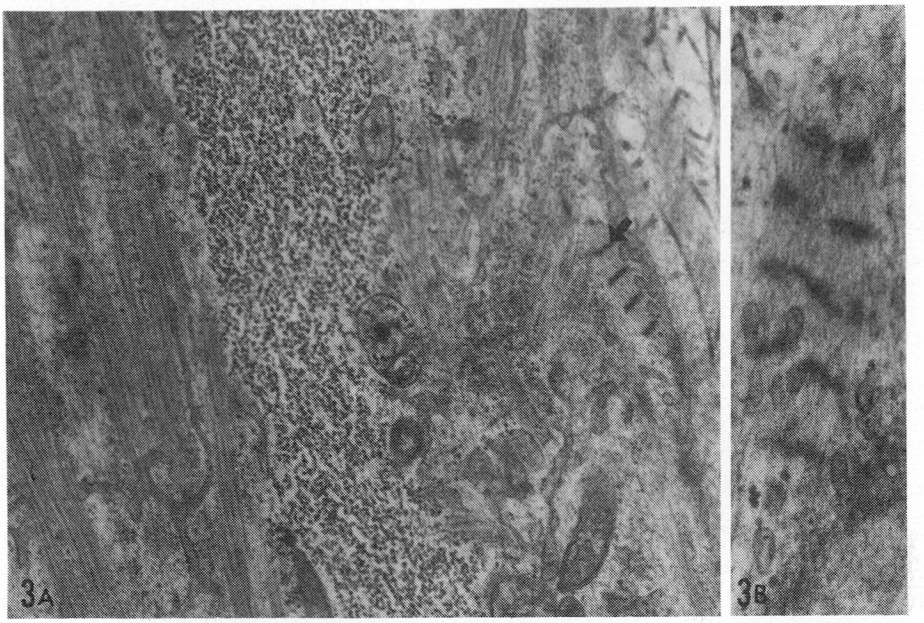


図3A 電顕写真はmyotubeの一部で，その胞体内にはsubsar colemmal areaにleptomere（矢印）や，部分的に横紋形成のある筋原線維，それにグリコーゲン顆粒の集簇などがみられる．×31,200
図3B Leptomereを高倍率で示す．×64,000

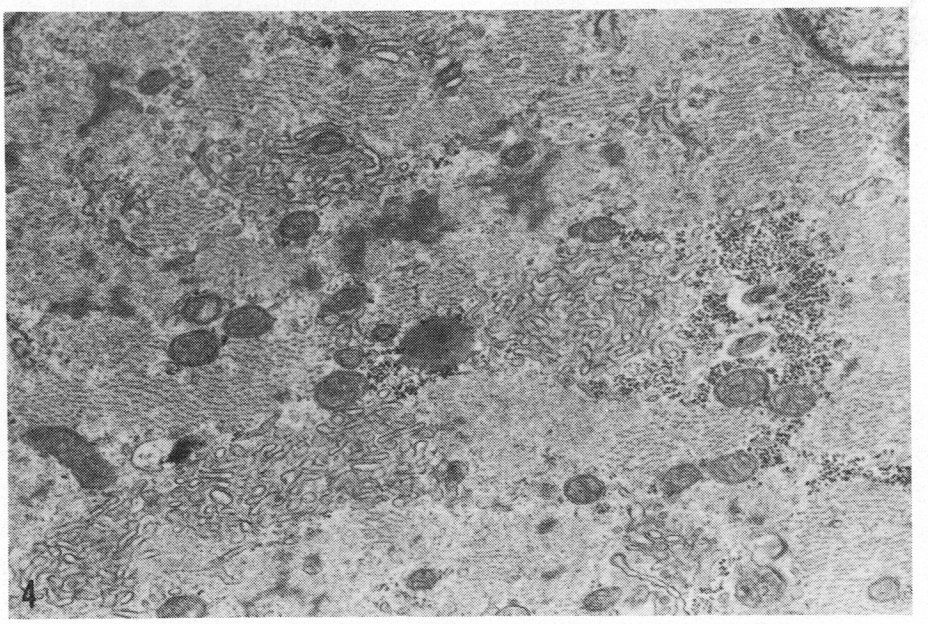


図4 Myotubeと思われる細胞の胞体内にt－tubule由来と思われる多数のtangleが見られる．×64,000

過電顕的には正常であった．以上よりDuchenneジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験では移植後2週間迄には正常対照との間に定性的には大きな形態学的差異を認めることは困難であった．

考　　察

筋ジストロフィー症生検筋にみられる活発な筋再生現象が正常か否かは重要な課題でありながら，現在まだ一定の結論には至っていない．Mastagliaらは本症患者とpolymyositis患者の生検筋及び臨床症状との対比のもとに後者では臨床的に筋力がほぼ完全なまでに回復した後，生検された筋細胞が完全に正常な細胞構築を示したことより筋再生はcompleteであり[4]，本症では生検筋に活発な筋再生がみられるにもかかわらず臨床的に筋力が回復しないことから本症での筋再生はabortiveであると結論づけた[5]．そしてこの原因として本症再生筋では組織化学的にsuccinic dehydrogenase活性が低く，電顕的にはmitochondriaの数が少ないためであろうと推測した．また筆者も本症生検筋では電顕的に筋再生のstem cellと考えられるstellite cellが定量的に増加しており[1]，この増加は本症患者の臨床症状が急速に悪化するintermediate stageに最も著しく，また細胞形態もactivateされていることから[2]，本症におけるこのような活発な筋再生活動が臨床的な筋力回復に結びつかず，本症の筋再生はineffectiveであろうと推測した．しかしここにみられる様にsatellite cellから形成された本症再生筋には透過電顕的に，移植2週間後迄には正常対照筋のそれと比べ有意な変化がみられなかったことより，本症の筋再生が不完全な原因として，筋線維壊死と筋再生との間には何らかのnegative balanceが存在するのか，あるいはmyotubeの更に分化した時点（移植3，4週後あるいはそれ以後）から変性が始まるためなのかなど種々の要因が考えられた．筋線維壊死に関してはmuscle plasma membraneの変性が初期変化として重要であることが指摘されており[6)7)]，本研究を通じ，今後本症生検筋の移植後3—4週目の移植片における再生筋を中心として，その細胞膜の構築をも含めた詳細な形態学的検討が必要であろうと思われた．

文　　献

1) Wakayama, Y. : Electron microscopic study on the satellite cell in the muscle of Duchenne muscular dystrophy. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 35 : 532, 1976.
2) Wakayama, Y., Schotland, D. L., Bonilla, E. & Orecchio, E. : Quantitative ultrastructural study of muscle satellite cells in Duchenne dystrophy. Neurology (Minneap.), 29 : 401, 1979.
3) Wakayama, Y., Schotland, D. L. & Bonilla, E. : Transplantation of human skeletal muscle to nude mice: A sequential morphologic study. Neurology (Minneap.), 30 : 740, 1980.
4) Mastaglia, F. L. & Kakulas, B. A. : A histological and histochemical study of skeletal muscle regeneration in polymyositis. J. Neurol. Sci., 10 : 471, 1970.
5) Mastaglia, F. L. & Kakulas, B. A. : Regeneration in Duchenne muscular dystrophy : A histological and histochemical study. Brain, 92 : 809, 1969.
6) 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 (Minneap.), 25 : 1111, 1975.
7) Schotland, D. L., Bonilla, E. & Wakayama, Y. : Application of the freeze-fracture technique to the study of human neuromuscular diseases. Muscle & Nerve, 3 : 21, 1980.

23) 実験的ミトコンドリア・ミオパチーの形態学的研究

荒 木 淑 郎*

研究協力者　山 村 善 教*　加 藤 栄 一*

目　的

ミトコンドリア・ミオパチーとは「ミトコンドリアの異常(集積像，巨大化，cristae の配列異常，結晶様封入体の存在など）が筋病変の主要所見であるミオパチー」として理解されているが，成因については充分明らかにされていない．しかし，ミトコンドリア・ミオパチーを呈する若干の症例で生化学的にミトコンドリアの酸化的燐酸化の loose coupling が証明されている．

実験的には筋肉を阻血状態にすること[1]や，酸化的燐酸化の uncoupler である 2,4-dinitrophenol (以下 DNP) を動注すること[2)3)]により形態学的にミトコンドリア・ミオパチーにみられるものと類似のミトコンドリアの異常が確認されている．

我々は，DNP を動注することにより実験的にミトコンドリア・ミオパチーと類似の形態学的変化が出現することを確認した上で，従来試みられていない DNP の筋注法を試み，本法によっても動注法と同様の形態学的変化が出現することを確かめたので報告する．

方　法

体重250～300g の Sprague-Dawley 系雄ラット12匹をもちい，次の3群にわけて比較検討した．第1群はネンブタール麻酔下に開腹し，1側の腸骨動脈を結紮し腹大動脈へカニュレーションを行い，pH6.5の DNP15mg を3～5分かけて動注し，注入開始後15分，30分，45分，60分後に両側大腿筋の生検を行った．腸骨動脈を結紮していない側の生検筋を動注群とし，結紮した側の筋肉を第2群(対照群）とした．第3群（筋注群）ではネンブタール麻酔下に，大腿筋に DNP15mg を筋注し15分，45分，60分後に注射部位を避けて大腿筋を生検もしくは necropsy を行った．生検筋は2分割し，それぞれ組織化学的並びに電顕的検索の為に処理した．組織化学的検索では生検筋を直ちに凍結し厚さ約10μ の切片を作製し HE 染色，Gomori tricrome 変法，NADH 染色を行って光顕にて観察した．電顕的検索の目的には生検筋を2.5%グルターールアルデヒドで固定後，1% OsO_4 で固定し型の如くエポン包埋を行い超薄切片を作製し観察した．

結　果

HE 染色標本ではいずれにも著変を認めなかった．Gomori trichrome 変法染色では DNP 動注群において，動注後15分より ragged red fiber（以下 RRF）の出現を認め，動注後30分の生検筋に最も著明な RRF がみられた（図1 b)．筋注群では筋注後45～60分間位で全身の筋肉が硬直し死亡したが，その直後の necropsy にて採取した筋肉に著明な RRF を認めた(図1 c)．対照群では1例に明らかな RRF を認めたがそれ以外では明らかな RRF はみられず，一部の筋線維に軽度の赤染物質の増加がみられたのみであった（図1 a)．

RRF の出現率を経時的に観察すると図2

*宮崎医科大学医学部第三内科

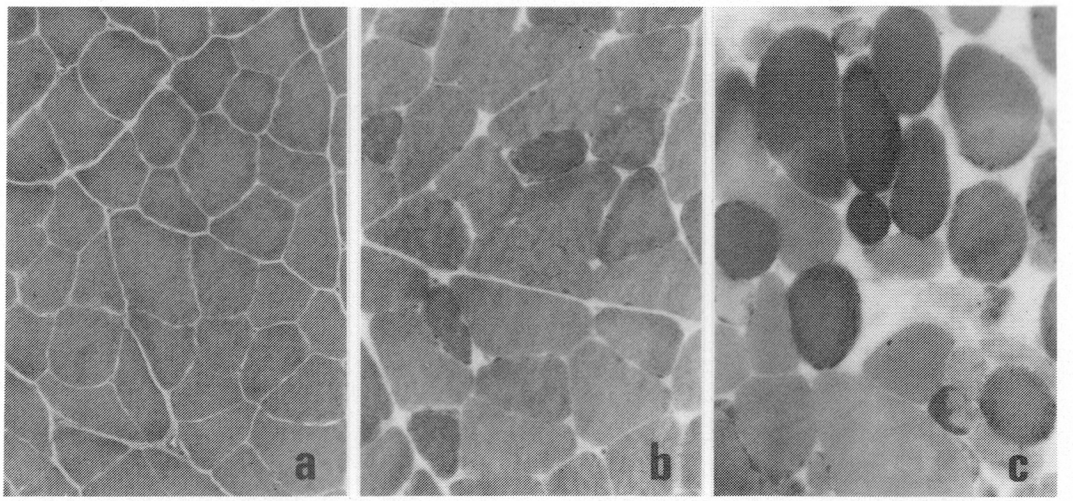


図1　Gomori trichrome 変法　　a．対照群　150×　b．動注群　150×　c．筋注群　150×

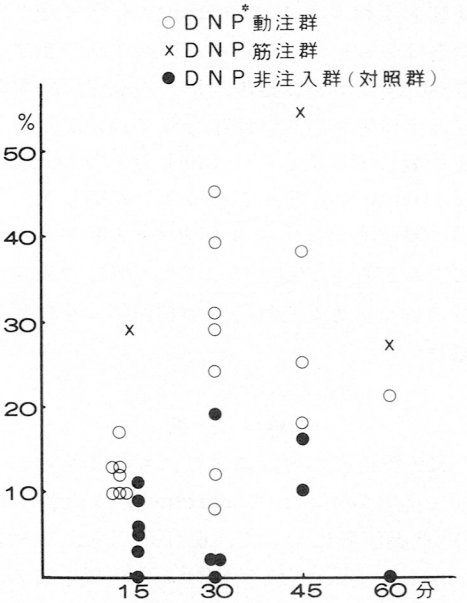


図2　Ragged red fiber 出現率の経時的変化
＊DNP：2,4－dinitrophenol

に示す如くDNP動注群では，動注後15分で10～17%（平均12.1%），30分では8～45%（平均26.9%），45分では18～35%（27.0%），60分では21%であった．筋注群では15分後29%，45分後54%，60分後27%であった．対照群では明らかなRRFがみられた1例のみが15分9%，30分19%，45分16%と高値を示したが，他は0～10%（平均4.4%）と低値であった．

NADH染色では動注群・筋注群共にGomori trichrome変法染色にてRRFを呈した筋線維に一致して強染色性を示し，これは特に筋鞘下において顕著であった（図3 b, c）．これらのNADHに強染する筋線維はtype 1 fiberと考えられた．対照群ではRRFを著明に認めた1例を除き強染色性は呈さなかった（図3 a）．

電顕による観察では対照群にはミトコンドリアの異常は認めなかった（図4）．動注群の筋肉では筋鞘下並びに筋線維間に著明なミトコンドリアの集積像がみられ，巨大化，cristaeの配列異常などもみられたが結晶様封入体は見出せなかった（図5）．筋注群でも動注群と同様の変化がみられた．

考　　案

1959年Ernsterら[4]が代謝亢進症候を呈する患者の生検筋にミトコンドリアの異常集積や巨大化，結晶様封入体などを見出して以来，骨格筋のミトコンドリアの異常を伴なう疾患について数多くの臨床報告がoculocraniosomatic neuromuscular disease with ragged red fiber, ocular myopathy, Kearns-Shy症候群，ophthalmoplegia plus,

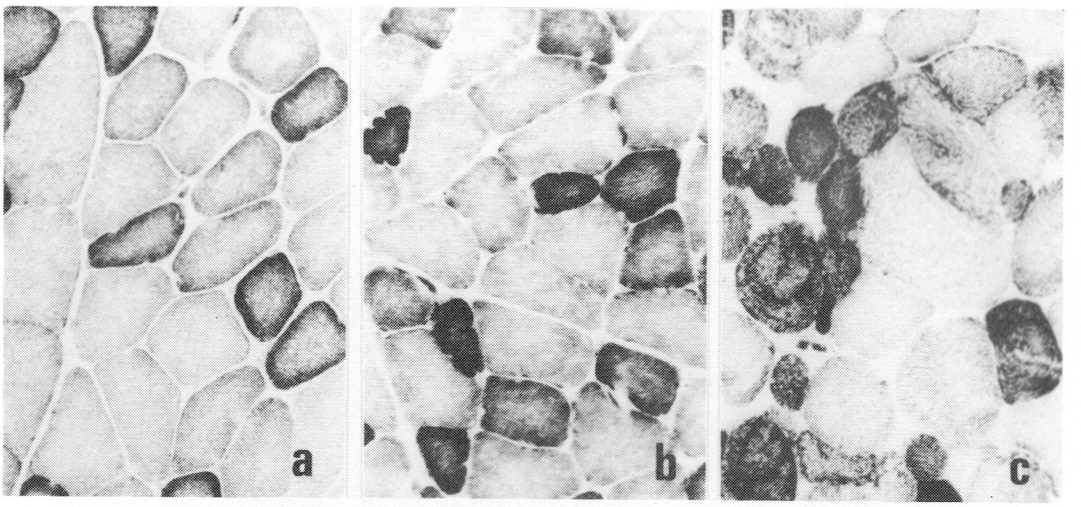


図3　NADH染色　　a．対照群　150×　b．動注群　150×　c．筋注群　150×

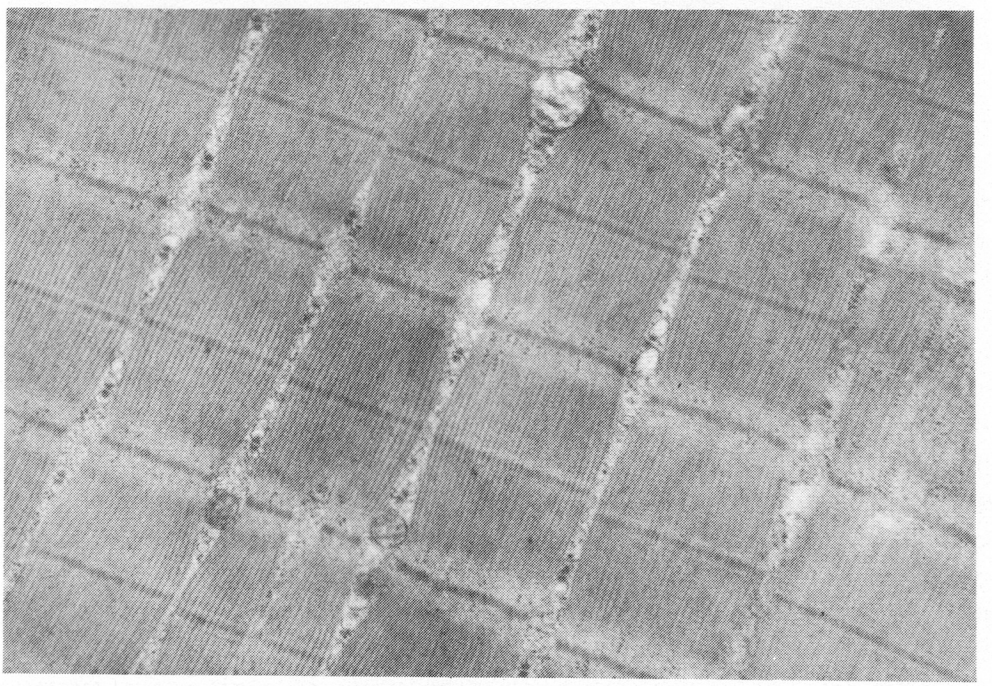


図4　対照群　18,000×

mitochondria-lipid-glycogen disease, その他種々の名称の下になされているが，それらの病因については充分明らかにされておらず，現在までの報告のいくつかにNADH-CoQ reductaseやcytochrome b,cなどの活性低下・消失が証明されているに過ぎない．

ミトコンドリア・ミオパチーの病因の解明を目的に実験モデルを作成する試みがいくつかなされている．1974年にはKarpatiら[1]がラットの腹大動脈を結紮することにより阻血状態にした筋肉において，1975年にはMelmedら[2]がDNPをラットの腹大動脈に

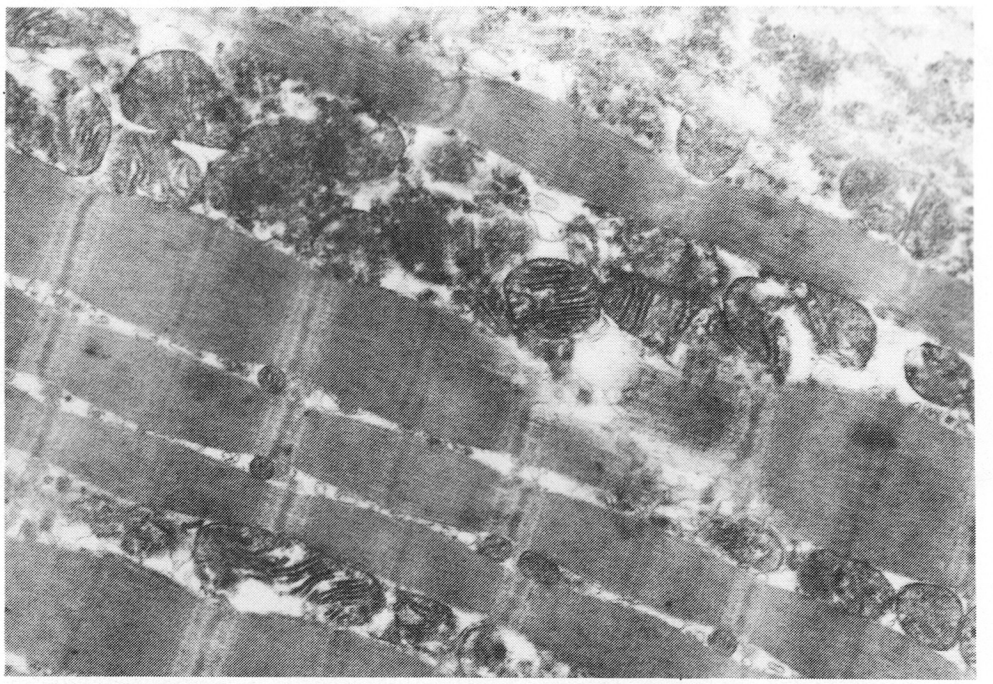


図5　動注群　18,000×

60～180分かけて持続動注することによってミトコンドリア・ミオパチーと光顕的・電顕的に類似の病変の作成に成功している．その後，1979年 Heffner ら[5]が直接大腿部をゴムバンドで結紮することにより，また，Sahgal ら[3]は DNP の腹大動脈への one shot 動注によりミトコンドリア・ミオパチー類似の病変を作成している．更に1979年佐藤ら[6]は阻血状態におく前に筋肉の支配神経を切断することにより阻血の影響が増強されることを観察している．

我々は，まず Melmed ら，Sahgal らの方法に従って DNP を one shot で動注を行いミトコンドリア・ミオパチーの作成を試みたが，光顕上，動注後15分で RRF が出現し，動注後30分には平均26.9%の出現率を示した．電顕的にも動注群の生検筋に従来の報告に一致するミトコンドリアの異常所見が得られ，形態学的にはミトコンドリア・ミオパチーと呼べるものが作成されることを確認した．対照群の1例に RRF がみられた点については対照群が阻血状態におかれていること，対照筋への DNP の混入の可能性が原因として考えられる．

次に我々は，DNP の動注が技術的に困難であり，しかも，長期間同一実験対象を生存させることが困難な為に DNP の反復投与が不可能に近く，慢性の投与効果が観察できないこと，DNP 腹腔内投与では筋肉にミトコンドリアの変化がみられないと報告されている[2)3)]ことなどから，より簡便な方法として筋注法を試み，動注法と同じくミトコンドリアの異常が出現することを確認した．

現在までに報告されているミトコンドリア・ミオパチーの実験モデルは形態学的には臨床報告例の筋所見に近似しているが，臨床症状の上からはいわゆるミオパチーといえるものではなく，より臨床例に近い実験モデルの作成が望まれる．その点でミトコンドリア・ミオパチーが全て単一の病態で説明できるとは思えないが，ミトコンドリアの酸化的燐酸化の loose coupling が若干の臨床例で

証明され，cytochrome 系の異常等が明らかにされつつあることから，DNP の様な uncoupler を実験動物に投与することにより臨床症状の上からもミトコンドリア・ミオパチーと類似の所見が得られる可能性があると考える．しかし，DNP は効果が一過性であり恒久的な形態学的変化は 1 回のみの投与では得られていない[2)3)]．そこで我々は先に述べた理由から筋注法を試み，形態学的には動注法と同様の変化が出現することを確認したが，今後，DNP の少量反復投与を筋注法で行い臨床的にも形態学的にもよりミトコンドリア・ミオパチーの臨床例に近い実験モデルの作成を試み，その成因につき検討したいと考える．

結　　語

DNP 動注並びに筋注により形態学的にミトコンドリア・ミオパチーに類似する光顕並びに電顕所見が得られたが，筋注でもミトコンドリアの異常を来たすことは DNP の慢性投与実験を可能にすると考える．

謝辞：電顕技術につきご助言を頂いた宮崎医科大学第 1 解剖学教室・年森清隆先生に感謝致します．

文　　献

1) Karpati, G., Carpenter, S., Melmed, C. & Eisen, A. A. : Experimental ischemic myopathy. J. Neurol. Sci., 23 : 129, 1974.
2) Melmed, C., Karpati, G. & Carpenter, S. : Experimental mitochondrial myopathy produced by in vivo uncoupling of oxidative phosphorylation. J. Neurol. Sci., 26 : 305, 1975.
3) Sahgal, V., Subramani, V., Hughes, R., Shah, A. & Singh, H. : On the pathogenesis of mitochondrial myopathies. An experimental study. Acta Neuropathol. (Berl.), 46 : 177, 1979.
4) Ernster, L., Ikkos, D. & Luft, R. : Enzymatic activities of human skeletal muscle mitochondria. A tool in clinical metabolic research. Nature, 184 : 1851, 1959.
5) Heffner, R. R. & Barron, S. A. : The early effect of ischemia upon skeletal muscle mitochondria. J. Neurol. Sci., 38 : 295, 1978.
6) 佐藤　猛，西　克典：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．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54年度研究報告書，1980, p. 143.

24) ミトコンドリア・ミオパチーの臨床的・電子顕微鏡的研究

佐藤　猛*

研究協力者　安野　みどり*　西　克典*

骨格筋のミトコンドリア (Mt) 異常を有する症例は，Luft らによる代謝亢進症状を示す症例で，巨大 Mt の報告がなされて以来，ocular myopathy をはじめとして，種々の臨床例がある．臨床像が多彩であるのと同様に，Mt 異常の程度も，主病変と思われるものから随伴的と思われるものまで種々で，更に筋病変のみでなく，他臓器にも同様の Mt 異常の見出される症例もある．Mt 異常のみられた自験例5例を中心に，その臨床的特徴と，Mt 結晶様封入体の微細構造を解析し，さらに検討中である Mt の呼吸活性測定法につき報告する．

症　例

症例1（眼筋型）　J.M., 48歳，女

家族歴・既往歴：特記すべきことなし．

現病歴：33歳頃より右眼瞼下垂，46歳頃には左側にも出現．

現症：両側眼瞼下垂と眼球運動制限のみで，頸部・四肢には異常を認めない．

検査：CPK29 IU., Creatine 1.2mg/dl，テンシロン試験は陰性，筋電図は上眼瞼挙筋に軽度筋原性変化．

症例2（眼筋型＋軽度全身型）　M.O., 46歳，女

家族歴：第1及び第2児は生後数日で死亡したが，詳細不明．

既往歴：30歳で第3児出産後，両側眼瞼浮腫状となり，徐々に眼瞼下垂も加わる．33歳で甲状腺腫の摘出術うけるも症状漸次進行性．

現症：両側眼瞼下垂と眼球運動制限，顔面・頸部・上肢帯に軽い筋力低下．眼底正常．

検査：脳波は slowα に4−7 c/sθ 混入し，基礎律動は dysrhythmic．筋電図は上肢帯に軽度筋原性変化．CPK30〜170 IU（正常30以下）と変動，Creatine 1.4mg/dl，GOT14U，GPT12U, Al－P5.5U,LDH540U, TTT11.3, ZTT16.1, CCF(±)で慢性肝炎の所見を認めた．甲状腺機能・BMR には異常なし．

症例3（Kearns-Sayre 症候群）　M.N., 39歳，男

家族歴・既往歴：特記すべきことなし．

現病歴：幼少時より軽い眼瞼下垂あり，思春期頃より増強．運動は元来不得手で，30歳頃より前額部禿・軽度視力低下出現（眼鏡で矯正不可）．31歳東邦大で上記診断受ける．

現症：両側眼瞼下垂と眼球運動制限．頸部・四肢遠位部の軽度筋萎縮と筋力低下．指鼻試験の terminal に軽い動揺．

検査：脳波は low voltage で α 波出現悪く，基礎律動は dysrhythmic．髄液蛋白101 mg/dl と上昇．CT で基底核の石灰化と，大脳・小脳の軽度萎縮，眼底に choreoretinal degeneration,軽度知能低下(WAIS75)．軽度難聴，筋電図では筋原性変化．ECG は正常，CPK45 IU，Creatine 1.3mg/dl，GOT43U，GPT50U，Chol－T337mg/dl，Chol－E264 mg/dl，Beta－L4.1mm,総脂質1065mg/dl,リン脂質312mg/dl，中性脂肪234mg/dl，と脂質系の軽度上昇を認めた．肝生検では小葉構造は比較的よく保たれているが，肝細胞は脂肪

*順天堂大学医学部脳神経内科

変性を示していた.

症例4 (Humeroperoneal muscular atrophy)　S.E., 48歳, 男

家族歴：養子のため不明.

既往歴：37歳頃より胃潰瘍あり48歳で手術.

現病歴：幼少時よりやせ型で, 走るの遅く, 懸垂は1～2回程度. 27歳ECGでA-V block指摘され, 37歳頃より動悸・呼吸困難出現し, 四肢の筋力低下も進行. 41歳心拡大みられ, 48歳Pacemaker装着さる. 意識消失発作(－).

現症：全身のやせが目立つが, 上腕・下肢遠位部に優位な筋力低下・筋萎縮あり, 頸部・脊椎の前屈制限を認める. 眼症状(－).

検査：ECGでcomplete A-V block, 筋電図では筋原性変化に軽度神経原性変化の混入. CPK54 IU., Creatine 1.1mg/dl.

症例5 (Quadriceps myopathy)　T.N., 31歳, 男

家族歴・既往歴：特記すべきことなし.

現病歴：幼少時より走るのが遅く, 18歳頃階段昇降やジャンプが困難となり, 19歳頃より大腿部のやせに気づく.

現症：Quadricepsに限局した筋萎縮・筋力低下のみで, 他の筋肉は正常. 眼症状(－).

検査：筋電図は筋原性変化で, CPK490IU, と高値, GOT45U, GPT61U, LDH720U, Creatine 1.1mg/dl と軽度上昇, ESR11/26, CRP(－), RAtest(－), LEtest(－).

結果・考察

筋組織化学所見　症例2, 3の三角筋, および症例1, 2では眼瞼挙上形成術時に採取した外眼筋と前頭筋を検索した. 三角筋では2例ともに散在性にragged-red fiberが20～30%に認められ, Type II atrophyを伴っていた. 外眼筋・前頭筋は筋線維の萎縮が高度で, 間質の膠原線維と脂肪が著増していた. PASではragged-red fiberに一致して軽度陽性所見あり, Sudan IIIでも散在性に陽性所見を認めた.

症例4ははじめに施行した上腕二頭筋生検では, 筋線維が萎縮・消失しており, 間質の膠原線維だけだったため, Pacemaker装着手術時に採取した大胸筋を検索した. 散在性にragged-red fiberを認めたが極めて軽度で, 萎縮線維はややType IIに目立ち, 筋原性変化が主体であった.

症例5は大腿四頭筋を検索し, 大小不同を示す筋線維の間に, 著明に萎縮変性した筋線維が散在性にみられ, 同部では間質の膠原線維の増加が目立った. 萎縮線維は軽度Type Iに目立ち, ragged-red fiberも散見された. 炎症所見なく, 脂肪染色も異常を認めなかった.

5例全てに後述のように, ragged-red fiberに, 巨大・変形したMtや結晶様封入体を認めたが, その程度は症例1, 2, 3で著明であった. 症例1, 2, 3では眼筋型ミオパチーが共通した基本病像であり, 四肢筋障害から, さらに中枢神経系異常, 網膜色素変性などを伴う, いわゆるKearns-Sayre症候群へと連続した症候群と考えられた. 症例2, 3では軽度の肝機能障害を伴っており, 症例3の肝生検電顕所見（図1）で筋病変と同様の結晶様封入体が認められ, 従来の報告でも指摘されているように, 骨格筋だけでなく全身の代謝障害があり, Mt異常が重要な役割をしていると考えた.

症例4はいわゆるHumeroperoneal muscular atrophyにA-V block, あるいはcardiomyopathyを伴う症例として報告されたものと同一であり, 報告者によりEmery-Dreifuss症候群, Scapulo-peroneal dystrophy等と名付けられ, またMt異常を伴う症例も報告されている. 10数例の報告例では, 筋原性変化と神経原性変化の混在が指摘され, 常染色体劣性の遺伝形式をとるものが多く, 最近注目されてきた症候群である.

症例5はいわゆる大腿四頭筋ミオパチーで, 本疾患群には筋ジストロフィー症, 多発性筋炎, 神経原性萎縮症等が含まれている. 症例

図1　症例3の肝内ミトコンドリアの結晶様封入体(×50,000)

5は炎症所見は見出されなかったが，念のためステロイドで治療中である．

症例4，5共に，Mt異常は随伴的なものかもしれないが，未だ報告が少ないので，今後症例を重ねて検討する必要がある．

電子顕微鏡所見　異常Mtは，巨大化し複雑に発達したcristaeが充満したもの，渦巻状のもの，帯状に変形したもの等多彩である．

結晶様封入体はcristae内部で膜に平行に4層配列をなすもの，円柱状のもの，粗大顆粒状のもの等いろいろで，円柱状のものは，細長く伸展したMtの内腔をほぼ満たし，長軸方向に伸び，長さは一定しない．

4層配列をなす封入体は最もよくみられ，この立体構造につき詳細に検討してみた．ChouやKarpatiの報告[1)2)]にみられるように，この封入体は3つの面をもち，軽いカーブを有した直方体をなすと考えた．長軸・側面・垂直断面よりみた写真を提示する（**図2・A・B・C**）．長軸・垂直断面をみると，4層の線状のものが1 Unitをなし，1～数Unitが平行配列している．

垂直断面をさらによくみると，4層は第1と2，第3と4の2つのsubunitにわけられ，各2層の間には40～60Åのdensityの高い物が，150～200Å毎に配列し，その間に細い線状の物がみられ，これらでsubunitが構成されている．

他の垂直断面では第2と3，第1と4との層が同方向に，前者と後者は反対方向にジグザグ状に屈曲してみえ，前述のdensityが高く，Karpatiがblockと呼んだものは，互いに逆方向に屈曲をくり返した2層の突出部の重なりに相当すると思われた．垂直断面と類似の構造が長軸方向でもみられ，各subunitの間には連絡もみられることから，この直方体は，3次元方向に組み合わさったフィラメントで構成されていると考えた．

Mt異常は種々な状況で出現し，Mt異常が1次的なものでも，他の原因より生ずる随伴的異常に相当する2次的なものでも，Mtの

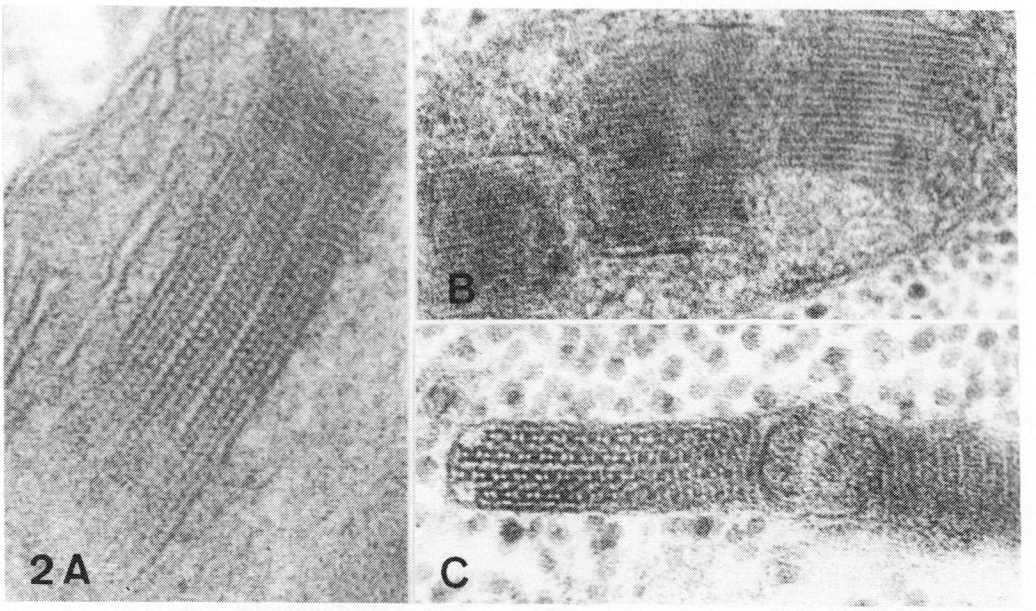


図2　4層配列よりなる結晶様封入体
A：長軸方向(×160,000)，B：側面像(×120,000)
C：垂直断面(×150,000)

反応は同じ態度をとると考えられる．

Mt 異常を生ずる背景には代謝異常の存在が考えられ，その手がかりとして，Mt の機能異常を検索し，NADH oxidase 減少，cytochrome 系の異常，phosphorylation の異常等が報告されている．Mt 異常出現の機序解明を目的に，Rat muscle から Mt を分画し，その呼吸活性につき測定法の検討を開始した．Makinen & Lee の方法[3] に基づき Mt を分画し，Succinate や Pyruvate や Malate を基質とし，ADP 添加による呼吸調節を中心に検討中であるが，正常 Mt 分画方法に多くの問題があり，今後さらに検討を重ねる予定である．

文　献

1) Chou, S.M.: 'Megaconial' mitochondria observed in a case of chronic polymyositis. Acta Neuropathol.(Berl.), 12：68, 1969.

2) Karpati, G., Carpenter, S., Larbrisseau, A. & Lafontaine, R：The Kearns - Shy syndrome. J.Neurol. Sci., 19：133, 1973.

3) Makinen, M.W. & Lee, C.P.: Biochemical studies of skeletal muscle mitochondria: I.Microanalysis of cytochrome content, oxidative and phosphorylative activities of mammalian skeletal muscle mitochondria. Arch. Biochem. Biophysiol., 126：75, 1968.

4) Land, J.M. & Clark, J.B.: Mitochondrial myopathies. Biochem. Trans., 7：231, 1979.

5) 三田哲司：Mitochondrial myopathy. 神経内科，8：320，1978.

25) 不動性筋萎縮の病態に関する基礎的研究

木　下　真　男*

研究協力者　水　谷　一　裕**　横　田　昌　幸**　茂手木　三　男**

目　的

骨格筋の不動性筋萎縮の病態を明らかにすべく動物実験を行ない，組織学的並びに組織化学的に検索を行なった．

方　法

成熟雄家兎の未処置群を対照とし，全身麻酔下にギプス包帯固定を行ない，膝及び足関節の最大固定肢位が屈曲―背屈のものをI群，屈曲―底屈のものをII群，伸展―背屈のものをIII群とした．標本は前脛骨筋及び腓腹筋より採取し凍結切片を作製し，ATPase染色pH9.4を中心に種々の組織化学的検索を行なった．尚，筋の緊張状態は三栄測器のひずみ歪み計を用いて計測し，Type別筋線維の筋径のHistogramはATPase染色pH 9.4標本により作成した．

結　果

ATPase染色pH9.4にて対照の前脛骨筋[1]，腓腹筋[2]ではともに三種類の筋線維が認められ，Type II線維数が優位であった．SDH染色との比較にてATPase染色pH9.4で淡染する線維はSDH染色で瀰漫性に微小顆粒状に染色性がみられ，ATPase染色pH9.4にて中等度に染まる線維はSDH染色でsubsarcolemmalに粗大顆粒状に染色性がみられ，更にATPase染色pH9.4にて濃染する線維はSDH染色で明らかな染色性がみられなかった[3]．従ってATPase染色pH9.4とSDH染色との相互関係でType IとType II B線維とは染色上reciprocalであるが，両染色にともに染色性がみられるType II A線維が存在することが確認された．更にType別筋線維の筋径のHistogramを作成すると前脛骨筋[1]，腓腹筋[2]に明らかな相違はなくほぼ一峰性であった．次にATPase染色pH9.4とphosphorylase染色との関係についてみると，原則としてparallelであるが，phosphorylase染色ではType II線維のsubtype別識別は困難であった[2]．一方，SDH染色とLDH染色，更にNADH.TR染色との染色関係に明らかな相違はみられなかった．尚，酸phosphatase染色ではperimysiaの小血管周囲にわずかに染色性がみられ，筋線維には明らかでなかった．以上を前提として成熟家兎の片側下肢に全身麻酔下にギプス包帯固定を施し，追週的に組織化学的に検索したところ，I群固定肢位での前脛骨筋は固定後4週でSDH染色にて染色性を有する筋線維に大小不同がみられ，ATPase染色pH9.4（図1）にて中等度に染まる筋線維に筋径の径小化が著明であり，つまりType II A線維の径小化が確認された．固定後8週に到り，ATPase染色pH9.4[4]によるType II線維のsubtype別識別は困難となり，H.E.[4]染色にて中心核，筋鞘核はともに増加し，散在性に径小化する筋線維がみられた．更にlysosome系の酸phosphatase染色での染色性は固定後3週頃でendomysiaにもみられ，固定後6週頃でperimysiaにも増強し，固定後9週頃では著明となることが知られた．同様にI群固定肢位での腓腹筋について検索すると，固定後3

＊東邦大学医学部第四内科
＊＊東邦大学医学部整形外科

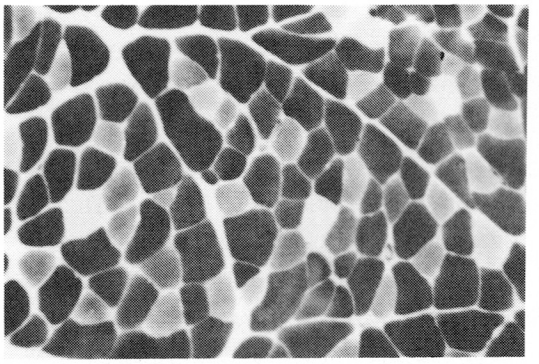


図1

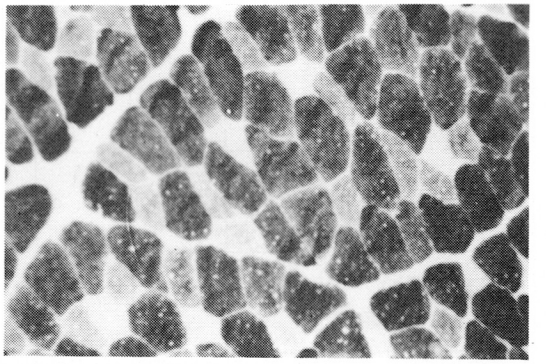


図2

週でSDH染色に染色性を有する筋線維は全て径小化し，ATPase染色pH9.4（図2）によりType I及びType II A線維の径小化が確認された．尚，SDH染色では固定後4～6週より全般的に染色性が低下した．次にI群固定肢位におけるType別筋線維の筋径のHistogramを作成すると前脛骨筋では固定後4週頃でType II A線維の径小化が認められたが（図3），腓腹筋では固定後3週頃でType II A及びType I線維の径小化が確認された（図4）．更に各骨格筋におけるType別筋線維の選択的変化の相違と固定肢位における筋緊張状態との関係を明らかにすべくII群及びIII群肢位での筋緊張状態について，腓腹筋を中心に三栄測器のひずみ歪み計を用いて比較検討したところ，腓腹筋の緊張状態はII群ではI群より弱く，III群ではI群より強いことが知られた．以上を踏まえてATPase染色pH9.4を中心に組織化学的検索を行ったところ，弱緊張のII群固定肢位では固定後2週でType II A及びType I線維の径小化が認められたが[2]，強緊張のIII群固定肢位では固定後3週でType II A線維の径小化が認められ，Type I線維は円形を呈し，径小化は著明でなかった[2]．以上のII群及びIII群固定肢位における腓腹筋でのType別筋線維のHistogramを作成すると，弱緊張肢位固定群では固定後2週でType II A及びType I線維の径小化がみられたが[2]，強緊張肢位固定群では固定後4週でType II A線維の径小化が確認された[2]．同様に強緊張肢位固定における前脛骨筋について検索すると，固定後2週で筋腹部遠位端は白色を呈し，弾力性に乏しく腫瘤状に腫脹していた．組織学的には多数の筋鞘核及び中心核がみられ，組織化学的には表層にてType別筋線維の識別が困難な径小化する筋線維がみられ，深層との境界部にはATPase染色pH9.4[2]及びSDH[2]染色にて筋線維の中央部に円形で異常な染色性を示す筋線維が多数認められた．連続切片を両

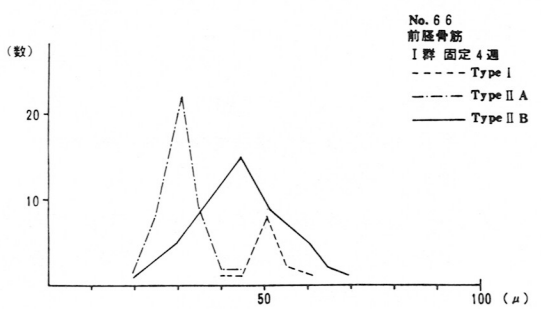


図3

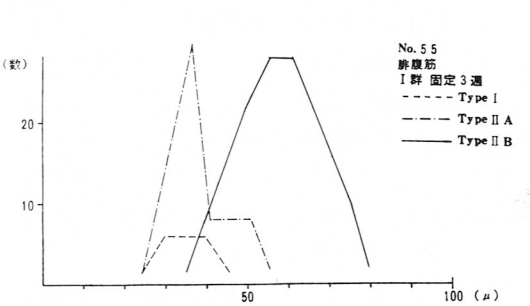


図4

表1　成熟家兎Type別筋線維数（%）

Type / 5例 前脛骨筋	I	IIA	IIB
対　照	7.9	34.7	57.4
2～4週間 ギプス包帯固定群	9.1	34.3	56.6

染色で比較すると筋線維中央部における染色性の異常なる部位は必ずしも一致しなかった．尚，対照群でのType別筋線維数%は前脛骨筋でみるとType I 7.9, II A34.7, II B57.4%であり，処置群におけるこれらの割合の変化は固定後4週までは明らかでなかった（表1）．

考　　按

Fiber type別筋線維数の割合についてHerbison G.J.,et al.[6]はratにギプス包帯固定を施し，足底筋では変化がなかったが，ヒラメ筋ではType II線維数が増加する一方，Type I線維数が減少するをみたと報告している．著者の実験では2～4週間ギプス包帯固定後の前脛骨筋でType別筋線維数%は対照群との間に明らかな差がみられなかった．不動性筋萎縮におけるfiber typeの選択性について加藤[5]は家兎にギプス包帯固定を施し，Sudan Black B染色を施し，白筋線維に早期に著明な萎縮をみたと報告している．Herbison G.J.,et al.[6]はratにギプス包帯固定を施し，myosin ATPase染色にて足底筋ではType II線維の，又ヒラメ筋ではType I，II線維に選択的萎縮を認めたと報告している．我々の実験では伸筋と屈筋により，又種々の固定肢位により筋萎縮の様態に相違がみられたが，Type II A線維の選択的径小化が共通してみられたことより，家兎でのギプス包帯固定による不動性筋萎縮はType II A線維が主体をなすものと推察される．次に固定時における筋緊張状態との関係について，加藤[5]は家兎でギプス包帯固定後の腓腹筋及びヒラメ筋について検索し，筋を緊張位に固定した場合は弛緩位の固定より萎縮の発生が軽度で，その進展は緩慢であることを認め，更に緊張位に固定した際には固定後7日目に筋線維は肥大し，円形を呈し，その間に細小な筋線維を認めたと報告している．更にEngel W.K., et al.[7]は猫にアキレス腱切腱術を施し，腓腹筋，ヒラメ筋を検索したところ，術後1～2週でType I線維の萎縮と時に肥大せるType II線維を認めたと報告している．我々の家兎，腓腹筋を用いた実験で，弱緊張肢位固定群では固定後2週でType II A及びType I線維の径小化が明らかであったが，強緊張肢位固定群では固定後4週でType II A線維の選択的径小化がみられ，Type I線維の径小化は著明でなく，円形を呈していた．従ってType I線維の変化は少なからず筋緊張状態と関係があり，固定による不動性筋萎縮は拮抗筋を適度の緊張状態におくことによりある程度予防されるものと考えられる．しかし各骨格筋について，Ferguson A.B.,et al.[8]は家兎の下肢に種々の肢位でギプス包帯固定を施し，追週的に湿重量を前脛骨筋と腓腹筋とで比較し，前脛骨筋の緊張肢位固定群では初期に著しい増加をみたが，同様の結果を腓腹筋では得られなかったと報告している．我々も前脛骨筋と腓腹筋が緊張肢位固定後に各々異なった結果を示したことより，家兎の前脛骨筋と腓腹筋は基本的に異なった特性を有しているものと考えられる．

文　　献

1) 水谷一裕，ほか：家兎骨格筋の組織化学的検索．日整会誌，54-10：236，1980.
2) 水谷一裕，ほか：ギプス包帯固定による筋萎縮に関する実験的研究．中部整災誌，23-1：201，1980.
3) 水谷一裕，ほか：ギプス包帯固定による筋

の実験的研究．日整会誌，52-10：1455，1978．
4) 水谷一裕，ほか：最近経験した Myotonic Dystrophy の一症例．中部整災誌，23-3：794，1980．
5) 加藤延幸：実験的筋萎縮の組織学的研究．中部整災誌，6-3：738，1963．
6) Herbison G.J., et al : Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. Arch. Phys. Med. Rehabil., 59：301, 1978.
7) Engel W.K., et al : Histochemical studies of denervated or tenotomized cat muscle. Ann.N.Y.Acad.Sci.,138：160, 1966.
8) Ferguson A.B. et al : A study of disuse atrophy of skeletal muscle. J.Bone and Joint Surg.,39-A-3：583, 1957.

26) 筋ジストロフィーの筋病変に関する検討
——各病型における筋線維病変と血管間質病変についての知見補遺——

田辺　等*

研究協力者　内潟雅信**　松原四郎**
野沢胤美**　原　満***

目　的

我々は本班研究の形態学分担の立場から，筋ジストロフィーの筋病変そのものを，各臨床病型間の差異に着目して検討している[1)~4)]．その一部はすでに本班会議に発表したが[1),2)]，今回は最近の知見補遺を加え，また前回までの所見を総合的に再検討した結果をまとめて報告する．

対象および方法

前回までの対象について検討標本数を増し，定量的操作を工夫して再検索した．対象は虎の門病院における自験例(1970年以降，368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から本検討に適する標本の得られた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（筋強直性）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amyotrophy10，正常所見を呈した4例についても同様に検索した．

筋生検部位は全例四肢近位筋で，組織学的・組織化学的検討を主とし，一部電顕所見とも対比した．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及び組織化学的方法（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．

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)HE染色像を中心に施行した．計測法については前報に示した方法をそのまま用いた[1)]．

結　果

1）全体像（組織学的・組織化学的所見）

前記各病型ごとの筋病変につき，組織学的・組織化学的・電顕的所見とともに全体的に検討・提示し，共通点（筋原性変化——散在性萎縮・肥大線維，横断面円形化，中心核，endomysiumの開大など——及び諸種構築異常)，および各病型における特徴(以下の項に示す）について考察した．

2）Megahistogramについて

＊虎の門病院神経内科，冲中記念成人病研究所
＊＊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

前報以後も標本数を重ねて検討した結果，各病型間に比較的特徴的な差異を認めた．すなわち，各病型とも，baseの広いミオパチー型を示しながらも，① Duchenne型は55μをpeakとしたほぼ典型的なspectrum patternを示し，②肢帯型では肥大線維が相対比率上目立ち，③顔面肩甲上腕型では萎縮線維が相対比率上目立ち，④先天型では左方推移がとくに著明であった．またfiber type別histogramでは，一部にtype Ⅰ，type Ⅱ atrophyを示す症例も認められたが全体としてはmegahistgram上のdifferentness propertyを示すには至らなかった．

3）筋線維構築異常の種々相

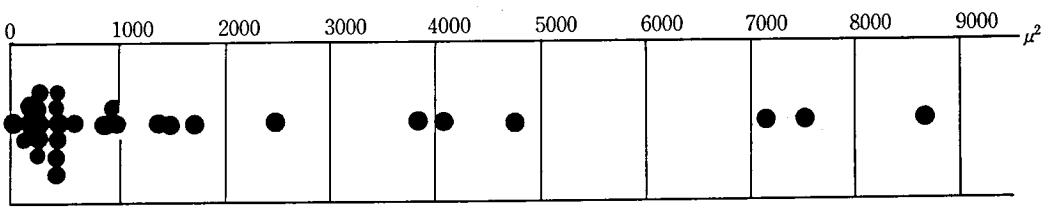
各病型とも，筋線維構築の上では共通点が多いが，1）肢帯型・顔面肩甲上腕型には，反応性変化（小円形細胞浸潤・phogocytosis, 局所的滲出・浮腫，中心核・nuclear budなど），splitting, moth-eaten様変化，mitochondria異常，ring fiberなど多彩な病変が他型に比し高率に認められ，また，2）先天型では，myotubeやcentral coreなどの筋線維中心部性病変は見出し得なかったが，粗なnetworkなど胎生期所見の一部残存，fiber typeの分別困難な部分の多いことなど，未分化性がみられた．

4）筋線維と間質との半定量的検討

筋組織標本における筋線維部分と間質部分（膠原線維部分および脂肪部分）との比率を，半定量的に（前回報告した写真・トレース・面積計算法により）検索した[1]．標本数を増して再検討した結果でも，ほぼ同様の結果となった．このうち，筋線維部分と膠原線維部分（血管・神経・筋紡錘部分を除く）全体に対する筋線維部分の比率は，正常約94％；Duchenne型約52％，Becker型約72％，肢帯型約64％，顔面肩甲上腕型約73％，先天型約46％；筋緊張性ジストロフィー約65％；先天性ミオパチー約77％，筋萎縮性側索硬化症約68％，多発性筋炎約70％，糖尿病性neuropathy・amyotrophy約78％であった．以上の3，5筋ジストロフィー群では先天型とDuchenne型において膠原線維部分の比率が特に高いが，前者では，筋線維部分・膠原線維部分と脂肪線維部分とを併せたものに対する筋線維部分の比率は約34％，後者のそれは約40％と，それぞれ著しく低下した数字となる．なお脂組織比率は他疾患（筋ジストロフィー他病型及び対照群）のそれに比し約2倍程度となっている．

5）血管肥厚病及び内腔面積の半定量的検討

前報で，筋組織標本における血管の肥厚度を1/R（1＝血管壁の厚さ，R＝外縁の半径）で示し[1]，各病型・対照群を比較し，且つ同一母集団の年齢別分布を対比した．前述のfibrosisの強いDuchenne型・肢帯型・先天型などでは，年齢分布上低年齢層にあるにも拘わら



〔29個の例（Duchenne型筋ジストロフィー）〕

総面積計：27955 μ^2

平　　均：　945

図1　筋組織内血管内腔横断面積（短径により計算）の1標本内分布
——単位症例における算出根拠・例示——

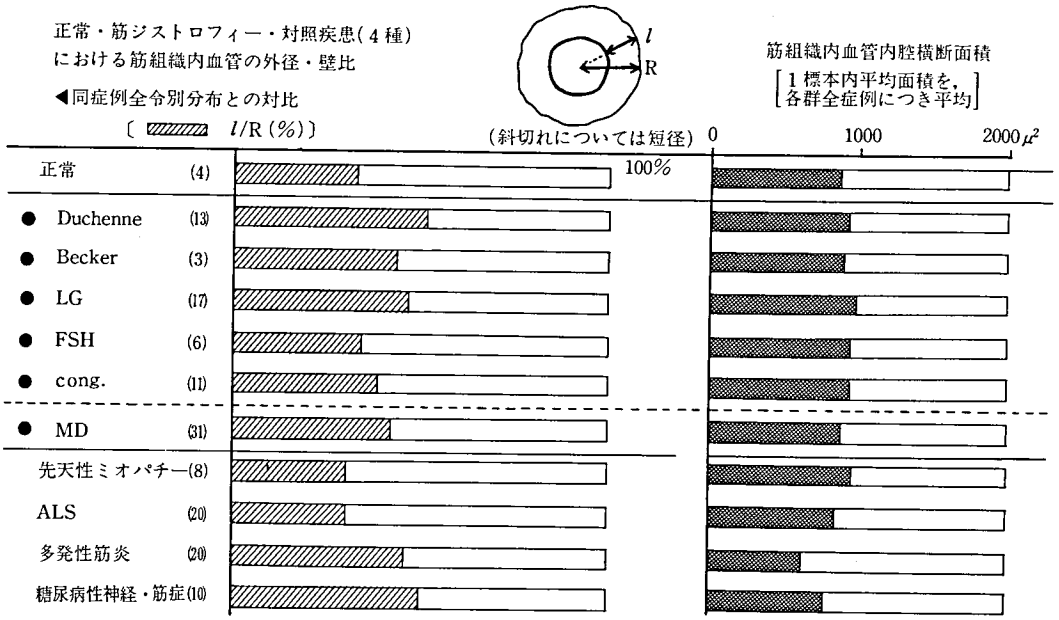


図2　血管肥厚度(左)および内腔横断面積(右)についての検討

ず壁の肥厚傾向を示した.

然し筋内の血流の問題は，このような血管壁の相対的肥厚度のみからでは判断しにくいので，今回は全標本につき，血管内腔の広さそのものの測定を平行して検討した．図1はDuchenne型の1枚の標本中の血管の内腔横断面積（短径により補正計算）の分布を例示したものである（写真撮影･方眼紙法）．かなりのばらつきはあるが便宜上その平均値（ここでは945μ^2）を求め，同様の操作を重ねた各病型対照疾患の平均値を図2・右に示し，肥厚度（図2・左）と対比した．その結果，肥厚度の差に比し，内腔面積の平均値自体には明らかな病型・疾患上の差異を認めなかった．この点は，肥厚度の高い病型では，Duchenne型のように内腔の大きさのバラツキが他型に比して多いことや，外縁までの血管全体の太さが増加しているものが多いことなども含めて説明すべき内容と考えられる．

考察・結語

以上より，筋ジストロフィーの病型別筋病変に関して，①総合所見，② histogram，③筋線維構築，④間質，⑤血管などに着目すると，単一所見個々には非特異的要素を有しながらも総合的にはかなりの特徴的差異が認められる[5]．また一方では，臨床型としての筋ジストロフィー各病型，とくにDuchenne型[6]や先天（福山）型など疾患単位に近い位置づけのなされ得る病型や，肢帯型のように尚その点に問題を残す病型について，上記の着目点の上で何らかの相違を示すか否かについても，所見解析上重要な点である[5].本検討の結果では，Duchenne型･先天（福山）型についてはそれぞれ他型とかなりの相異点が示されていることは注目に値する．しかしながら，これらの差異を以て直ちに本症の成因そのものと関連づけて論議するには尚慎重を要する．

本症の筋病変において，各病型ごとに示された若干の特徴は，二次的な病変であるにせよ，また本質的な病態と二次的な病態との循環によって生じたものであるにせよ，次のいくつかの点は病態検討・成因追究上示唆に富む知見と考える[5)6)]．すなわち，反応性所見･

再生現象，虚血性病態，筋線維構築異常の種々相の中での選択性，神経原性因子の関与を示唆する所見などがその例であり，臨床症状，経過，遺伝学的な genotype・phenotype の対比など臨床的検討とも併せて今後さらに吟味を重ねてゆくべき問題と考えられる．

文　献

1) 田辺等，内潟雅信，松原四郎，野沢胤美，原満：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——．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，p.111，1980.

2) 田辺等，野沢胤美，内潟雅信，塩沢瞭一，原満：筋ジストロフィーの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，p.97，1979.

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

4) 田辺等：筋生検．総合臨牀，24：845，1975.

5) Dubowitz,V. & Brooke,M.H.: Muscle biopsy: A modern approach. Saunders, London, Philadelphia, Toronto, p.168, 1973.

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

27) 神経筋疾患と骨関節異常との合併・共存病態に関する検討

田　辺　　等*

研究協力者　内　潟　雅　信**　松　原　四　郎**
野　沢　胤　美**　熊　野　　潔***

目　　的

神経筋疾患 (NMD) には，筋強直性ジストロフィー症や Kearns-Shy 症候群の如く多系統性障害を示す場合が稀ではない．そのうち，骨関節異常特に脊柱側彎 (SC) は NMD の二次的病態として強調されることが多いが，共存病態として位置づける面も考慮する必要がある．今回，SC を中心にこれらの点について検討を加えたので報告する．

対象・方法

諸種 NMD のうち，入院精査例中の900例および集団・居宅検診例中の350例を対象として，神経学的診察のほか，SC，脊柱の異常前後彎，高口蓋，咬合不全，凹足・内反足などの骨関節異常に着目し，必要に応じ L 線検査を施行し，入院精査例については適応を考慮した筋生検とも対比した．

結　　果

症例の概要

A 入院精査例　SC は進行性筋ジストロフィー症 (DMP) の中では FSH 型 (83%) や先天型 (73%) に多く，そのほかでは central core 病 (100%；3/3例)，他の先天性ミオパチー (66%)，Werdnig-Hoffmann 病 (WH) (80%) に高率に認められた．異常前後彎は DMP の諸型 (約80%) および先天性ミオパチー (66%) によく認められた．高口蓋もこれらの病型に多く，凹足・内反足は当然のことながら Charcot-Marie-Tooth 病に多く，その75% に観察された．

B 集団・居宅検診例　SC は Duchenne 型 DMP (50%)，先天型 DMP (38%)，WH (60%) に多かった．異常前後彎も前記の病型に多く，Duchenne 型 DMP の46%，先天型 DMP の40%，WH の40% に認めた．高口蓋は Duchenne 型 DMP (29%)，先天型 DMP (38%) に比較的多く認められた．

NMD と SC の共存例 (表 1)　入院精査例の中で，NMD と SC が共存すると考えられる31例について検討した．いわゆる特発性 SC で，筋萎縮・筋力低下を呈した21例のうち，筋生検その他の検索より，表の如く central core 病 3 例，multicore 病 1 例および特異的変化に乏しいミオパチー16例が抽出された．残る 1 例は central core 病例の妹で，臨床的に軽度のミオパチーが疑われたにも拘わらず，筋生検では明らかな変化が認められなかった．症候性 SC 中，Marfan 症候群 (3 例)，Ehlers-Danlos 症候群 (1 例)，von Recklinghausen 病 (1 例) および脊髄空洞症 (1 例) 例は，特異的変化に乏しいミオパチー性所見を示した．なお，特発性 SC の全例および症候性 SC の 6 例はいずれも整形外科入院例もしくはその紹介例である．

＊虎の門病院神経内科，冲中記念成人病研究所
＊＊虎の門病院神経内科
＊＊＊東京大学医学部整形外科（元虎の門病院整形外科）

表1　神経筋疾患と脊柱側彎の共存する症例（31例）

◀特発性側彎症(21)→
- Central core病(3)
- Multicore病(1)
- 非特異的先天性ミオパチー(16)
- 組織学的正常(1)**

◀症候性側彎症(10)

Marfan症候群	(3)*	非特異的先天性ミオパチーを伴う
Ehlers－Danlos症候群	(1)*	非特異的先天性ミオパチーを伴う
vou Recklinghausen病	(1)*	非特異的先天性ミオパチーを伴う
脊髄空洞症	(1)*	非特異的先天性ミオパチーを伴う
AMC類似	(1)	
Rigid spine症候群	(2)	
CMT	(1)	

＊整形外科入院例またはその紹介例

＊＊Central core病例の妹

神経筋病態とSCとの関連に関する作業仮設（表2）　以上の検討から，作業仮設として表の如き模式図を想定した．即ち，①神経筋病態が一次的で，SCが二次的と考えられる例，②多系統性障害による共存病態と考えられる両者および③SCとこれに続発する神経筋病態の3群である．以下，②の共存関係にあると推定される実例の一部を例示する．

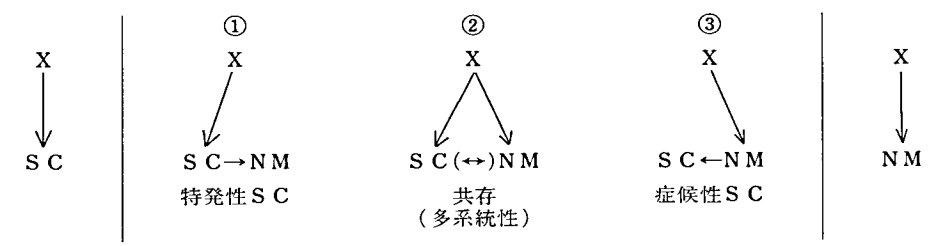
代表的症例の小括

症例1（図1）：14歳女（central core病例）[1]．本例の妹（13歳）は姉よりも強度のSCを有していたが，明らかな筋病変は認められなかった．即ち，ミオパチーは必ずしもSC進行の要因とはならないことを意味し，central core病の遺伝要因とSCの遺伝要因が互いに独立していること（多系統性の共存病態）を示唆する症例である．

症例2（図2）：34歳女[2]．骨関節異常（SCを含む），筋萎縮のほか，先天性白内障，Adie症候群，筋強直症状など種々の異常を伴っていたため，ミオパチーの位置づけに苦慮したが，多彩な合併症状の成因として，先天性要因が推定されることから，これらに共存した特異な先天性ミオパチーと考えられた症例である．

症例3（図3）：16歳男．Rigid spine症候

表2　側彎症（SC）と神経筋病態（NM）との関係（模式図）
（X：原因・中間病態）



◀発症時期に先天性・後天性の別
◀遺伝性・孤発性の別
} それぞれ考慮

群と考えられる症例で，特有な脊柱の前屈制限に加え，SC も認められた．さらに，軽度の近位筋優位の筋萎縮・筋力低下も認められ，筋生検にて，一部に小角化線維の混在するミオパチー性変化が示された．本例も骨関節異常と筋病変は互いに共存関係にあると考えられる．

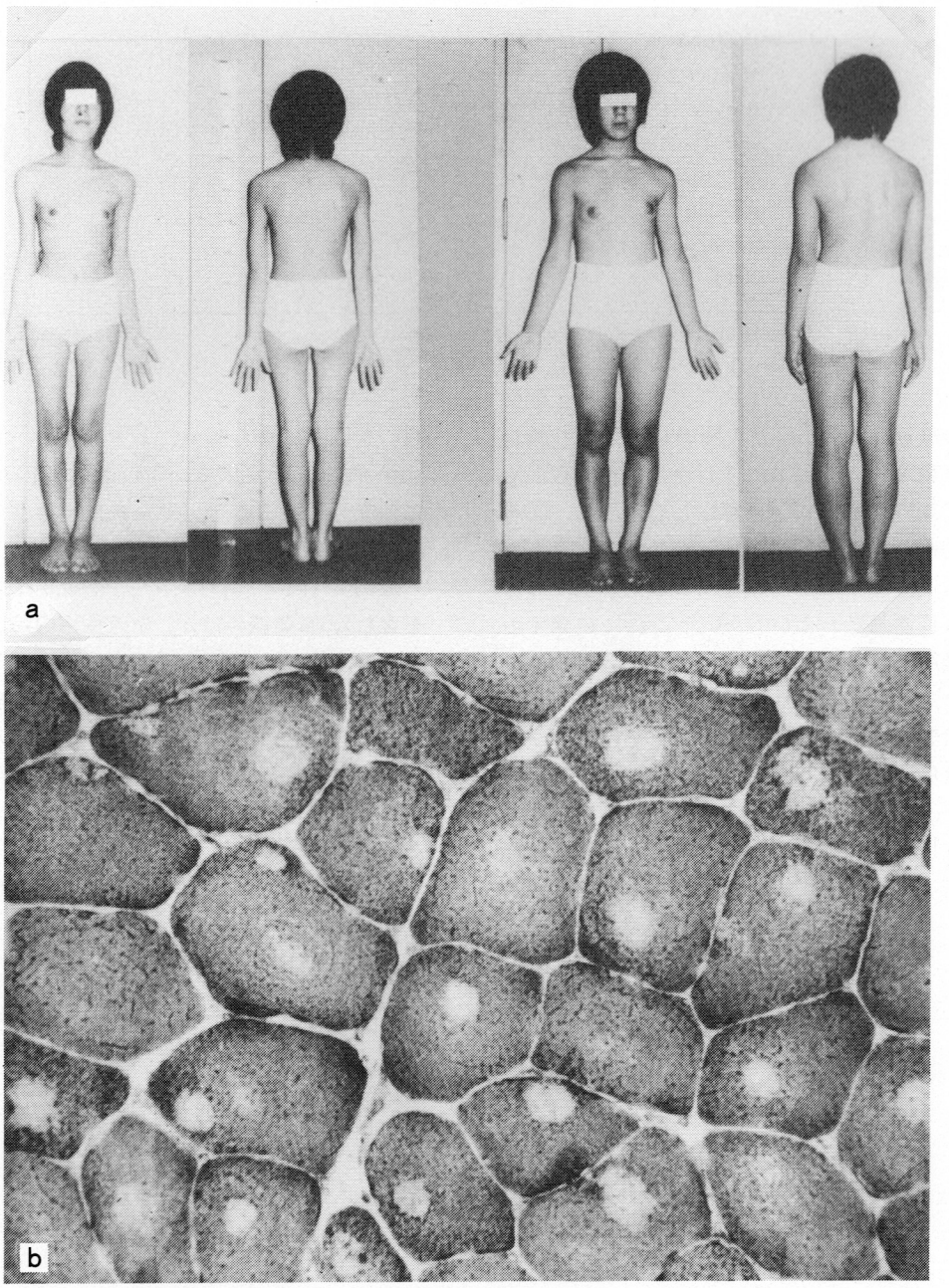


図1　症例1　a：姉妹の全身像（姉：左，妹：右）
b：Central core を示す（姉）．上腕三頭筋．DPNH-TR　×100

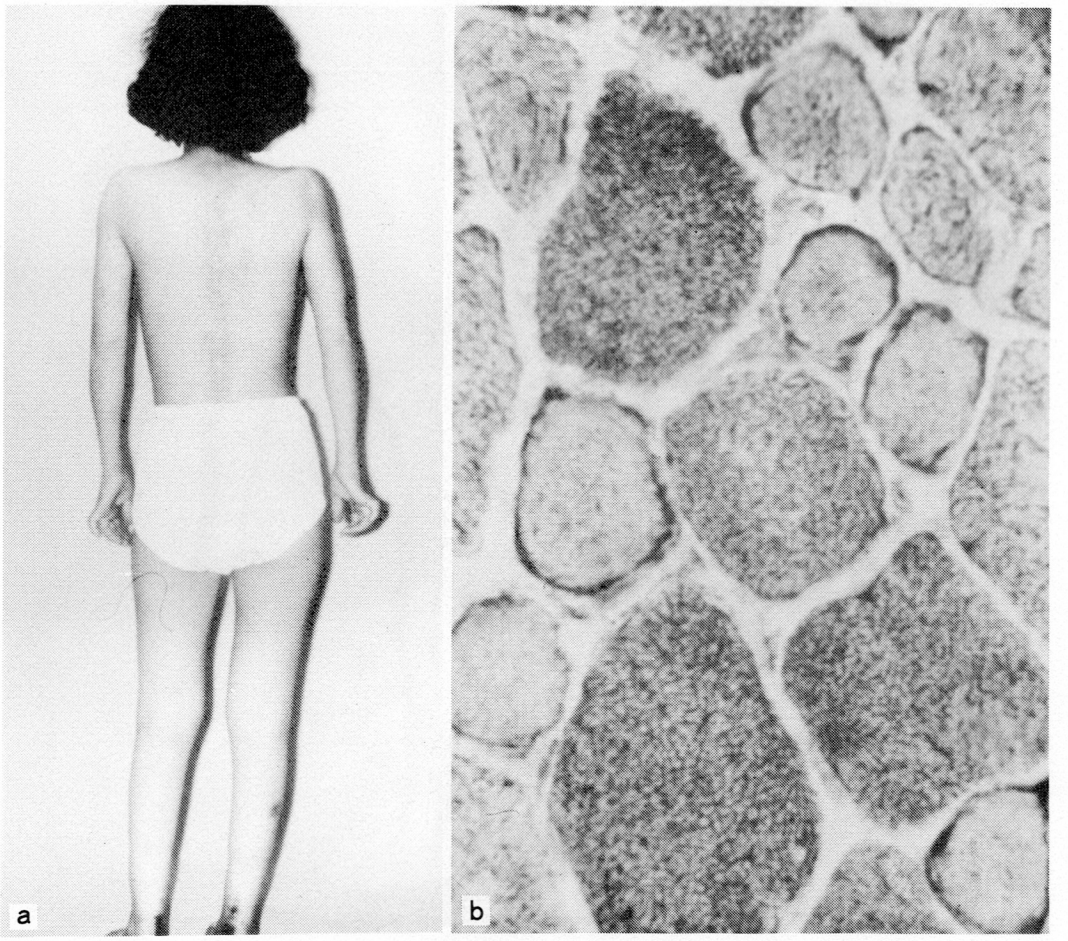


図2　症例2　a：全身像，b：腓骨筋生検像．Ringed fiber を示す．
DPNH-TR　×400

考　　察

NMD と骨関節異常の合併・共存はここに示したように決して少なくはない．本シリーズで，骨関節異常の頻度が集団・居宅検診例より入院精査例に高いのは後者に重症の症例が多かったためと推測される．

SC については，NMD を伴う場合 neuromuscular scoliosis と一般に呼ばれ[3]，なかでも NMD が原因で SC を呈する場合は症候性 SC（作業仮設の①）と表現される[3]．この症候性 SC の成因については，麻痺の為身体の左右の筋トーヌスにアンバランスを生じ，その結果 SC を呈する場合（paralytic scoliosis）[3] と進行した Duchenne 型 DMP などでしばしば認められるように軀幹筋の左右対称性の弱化が原因と考えられる場合（Collapse spine）[4] とが知られている．そのほか，本研究で強調した共存病態としての SC（作業仮設の②）の存在も注目される．このタイプはこれまで特発性 SC として位置づけられることが多く，筋病変の存在に着目されることは少なかったといえる．また，SC が筋病変を伴うか否か（逆もしかり）は，その予後判定・治療の上で極めて重要なことであり，この点からも共存病態としての SC（あるいは NMD）の十分な認識が要求される．

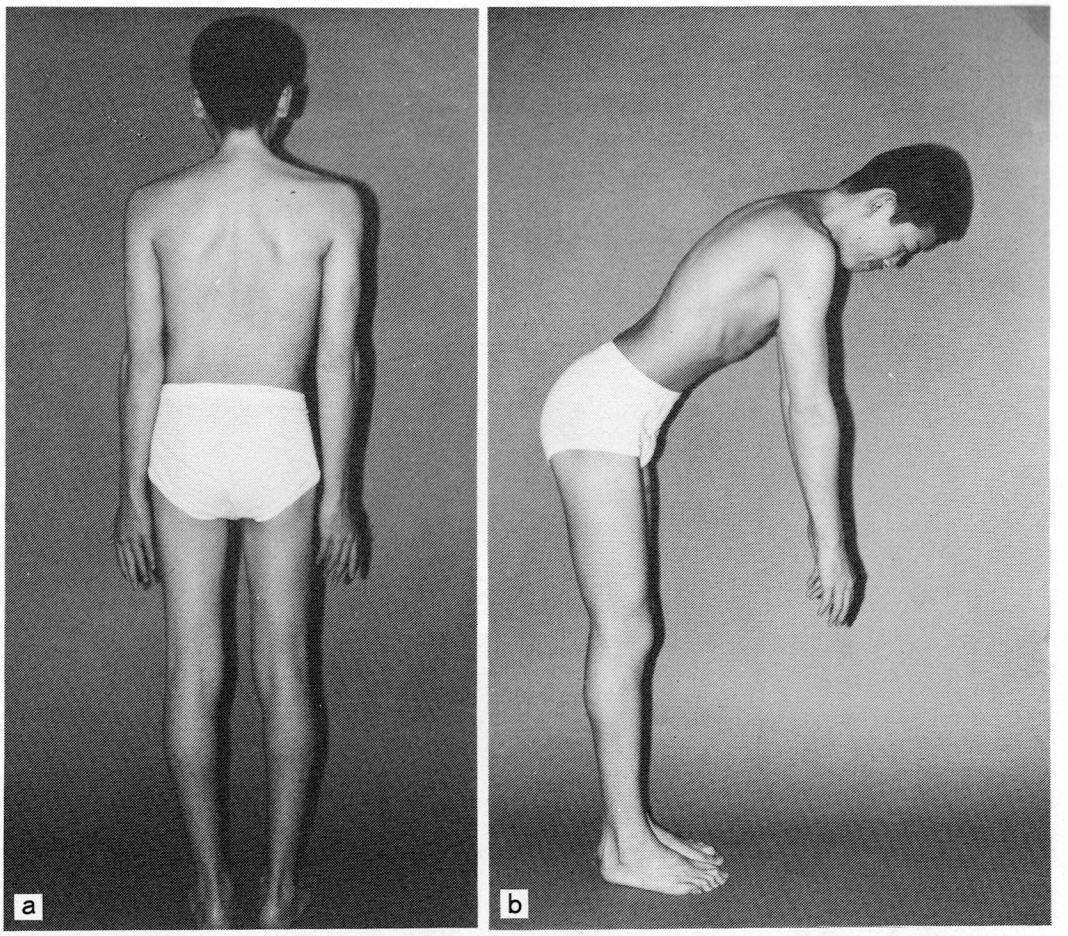


図3　症例3　a：側彎と近位型筋萎縮を示す．
b：特有な前屈制限を示す．

なお，SCに続発する神経筋病態（作業仮設の③）群については，典型的なケースは少ないが，前述の2群の場合でも，その要素（例えば廃田性萎縮）の関与が推定される．

ま と め

1）　骨関節異常は神経筋疾患と合併・共存することが少なくない．

2）　脊柱側彎特に特発性側彎症はしばしばミオパチー性病変（central core 病など）を伴い，また症候性側彎症の一部にも共存とみなされる神経筋病態が存在する．

3）　神経筋病態と脊柱側彎との関連に関する作業仮設を提示した．

4）　神経筋疾患の病態解明・治療（リハビリを含む）には骨関節異常の面からのアプローチも重要である．

文　献

1）田辺等，伊藤喜一，山根清美，田淵保則，野沢胤美，熊野潔：Central core disease：脊柱側彎を伴った2例における臨床的・組織化学的・電顕的検討――本邦第1・2例――．神経進歩，20：458，1976．

2）竹内和男，川田博，大石英俊，内潟雅信，田辺等：多彩な骨関節異常・先天性白内

障・Adie 症候群・筋強直症状等を伴った先天性ミオパチーの1例(会). 臨床神経, 18：443, 1978.
3) 服部孝道：神経内科からみた neuro-muscular scoliosis. 脊柱変形（山田憲吾, 井上駿一編), 医学書院, 東京, 1977, p.78.
4) 山本博司：学童期, 思春期側彎症の病態と成因. 脊柱変形（山田憲吾, 井上駿一編), 医学書院, 東京, 1977, p.43.

28) 慢性脊髄性筋萎縮症の臨床病理学的研究
——筋生検所見の半定量化の試み——

田 辺 等*

研究協力者 松 原 四 郎** 内 潟 雅 信**

はじめに

慢性脊髄性筋萎縮症（CSMA）は緩徐進行性の神経原性筋萎縮を呈し，錐体路症状や知覚障害を伴わず，しばしば遺伝性を示す種々の病態を含む．CSMA の中核をなすのは Chronic proximal (pseudomyopathic) spinal muscular atrophy[1]，すなわち Kugelberg-Welander syndrome (KW) であるが，その他に主として遺伝形式や筋萎縮の分布の差異に基づき多くの病型が報告されている．CSMA の定義および分類に関して Rearce and Harriman[2]，Emery[3]，Furukawa and Toyokura[4]，古川[5]など多くの研究があるが，未だ意見の不一致がある現状である．また近年 Marsden[6] は CSMA を含む更に広い概念である hereditary motor neuropathy を提唱し，新たな分類を示した．このように未だ充分に解明されていない病態解明の一助として，病理学的アプローチは不可欠で，中でも CSMA のように長い経過を辿る疾患では，筋生検を主とする臨床病理学的解析にたよるところが大きい．KW における筋病変についてはすでに近藤[2] と Mastaglia and Walton[8] の詳細な研究があり，いわゆる筋原性変化が，神経原性変化に加わっていることが，一部定量的分析の結果も加味して報告されている．著者らは[9] 従来，KW を中心に CSMA の筋生検所見を検討し，いわゆる筋原性変化の強さや群集萎縮の規模に症例間で大きな差のあることを指摘してきたが，今回この点につき半定量的方法を加えて再検討し，この結果を基礎に若干の考察を加えた．

症例と方法

検索の対象となった CSMA32例は，近位型筋萎縮を示した20例（P），顔面肩甲上腕型筋萎縮を示した3例(FSH)，近位部筋萎縮に加えて球症状を示したいわゆる球脊髄型[10]の2例(BS)，遠位型筋萎縮を示した5例[11](D)および神経原性要素を有する肩甲下腿症候群2例(SP)を含んだ．Pは男12例，女8例，年齢は10～47歳，FSHは男1例，女2例で年齢は26～29歳，BSは男2例で41歳と42歳，Dは男2例と女3例で22～43歳，SPは男2例で40歳と48歳であった．比較例として，筋萎縮性側索硬化症（ALS）5例，筋萎縮を呈した頸椎症（CS）4例，および Charcot-Marie-Tooth 病（CMT）4例の筋生検像を CSMA と同様の方法で解析した．なお ALS は男5例，女1例で26～54歳，CS は男4例で45～73歳，CMTは男4例で16～49歳であった．

種々の算定の対象となったのは凍結切片より作製した筋線維横断像の HE 染色標本および pH9.4で preincubate した myosin ATPase 活性像で，標本上の距離の測定には ocular micrometer を主に使用し，一部の例で写真撮影を併用した．先ず各例で HE 染色標本上で500線維以上につき，そのうち短径（長軸と直角に交わる線上で最も大きな巾を有する部位で測定）40μm 以下の線維を便宜上萎縮線維と判定し，その数と全体に占める

＊虎の門病院神経内科，冲中記念成人病研究所
＊＊虎の門病院神経内科

割合（萎縮率）を算出した．次に，種々のいわゆる筋原性変化の頻度を推定する目的で，中心核，nuclear clump，空胞の各々を有する線維および split fibre を数え，それらが全線維中に占める割合を算出した．中心核はその多寡に拘らず，それを有する線維を1と数えた．Nuclear clump は同一線維内で3個以上の核が隣接して存在したとき1と数えた．Split fibre は分離途上の線維のみを1と数え，すでに分離しているが split fibre と推定されるものは数えなかった．次に群集萎縮の規模を推定するため，1群集を形成する萎縮線維数の平均を群集規模として算出した．即ち前記の基準に従って萎縮線維を数えるのと並行して，萎縮線維間の距離が40μm 以下の場合に，それらの線維が同一の群集に属すると判定する方法で，群集数を数えた．この際，孤立した萎縮線維も1群とした．群集規模は$\frac{\text{萎縮線維数}}{\text{群集数}}$で計算した．更に，各筋の萎縮の程度の差が群集規模に与える影響を補正する試みとして大群集化指数すなわち$\frac{\text{群集規模}-1}{\text{萎縮率（\%）}}$を各例で算出した．Fibre type については type I，II線維のそれぞれの割合を全体で算定するとともに，前述の基準で選別された萎縮線維についても，正常の type I fibre に相当する ATPase 活性を示すものと type II 相当の活性のものが区別できる場合に各々の割合を算定した．

結　　果

萎縮率は CSMA で3.9～89.5%で，単純平均では31%，Fisher の逆正弦変換を用いた百分率の平均値では29%であった．ALS では単純平均で28%，逆正弦変換を行うと32%，CS では単純平均56%，変換を行うと57%，CMT では単純平均で34%，変換を行うと33%であった．以下便宜上単純平均のみを記する．すなわち萎縮率は CS でやや高いが他は近似した値を示し，各群のデータの比較に大きな支障はないものと考えられた．

中心核の出現頻度（図1白抜きの円は単純平均をあらわす）は CSMA では0.7から53.8%，平均16.0%，ALS では平均2.3%，CS では3.4%，CMT では22.4%であった．CSMA と ALS および CSMA と CS を比較するといずれも CSMA が有意に高かった（F検定，危険率0.05以下）．また CSMA と ALS の両群の分散を比較すると CSMA の分散は ALS のそれに比して有意に大きかった（F検定，危険率0.05以下）．CSMA の各病型で比較すると，各群の平均値は，SP，BS，D，P，FSH の順で高いが，P を除き被検患者数が少なく，大体の傾向を知るにとどまった．Nuclear clump の発生頻度は CSMA で2.9%，ALS では0.1%，CS で1.3%，CMT では2.5%と CSMA と CMT で高かった．CSMA は ALS よりも有意に高かった．CSMA の5病型間でめだった差はなかった．空胞は（図2），CSMA では平均2.8%の線維に存在したのに対し，ALS と CS では各々0.3%，0.4%と低く，CMT では2.4%で，CSMA と CMT で高い傾向を示した．CSMA の病型間ではバラつきが大きく，BS が0%であったのに比し，D は12.9%と高かった．Split fibre は CSMA では平均1.0%に存在した一方，ALS と CS では各々0.2%，0.1%と低頻度で，CMT では2.2%と高い頻度を示した．CSMA の各病型間では FSH で0%であった以外，他の群ではめだった特徴はみられなかった．以上のようにいわゆる筋原性変化はいずれも CSMA と ALS で高く，ALS と CS で低かった．また一部の所見は CSMA で大きな分散

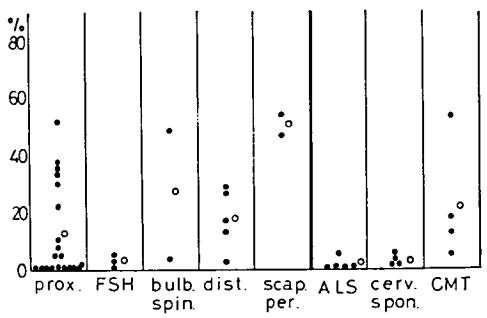


図1　中心核の頻度（白抜き円は各群の平均）

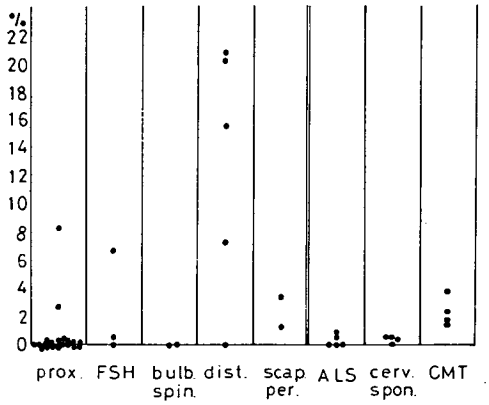


図2　空胞変性の頻度

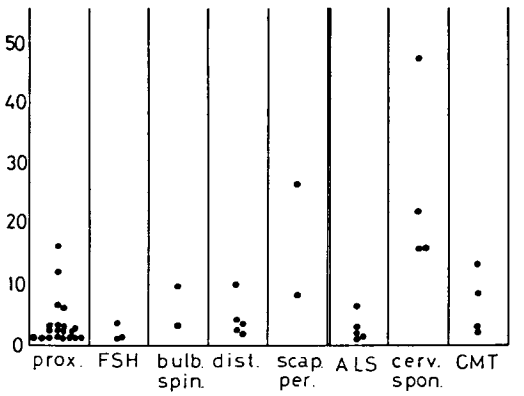


図3　群集規模

を示す傾向を有した．

群集規模を疾患毎に比較すると（図3），CSMAでは平均4.7，ALSでは2.8，CSで25.3，CMTで7.1であった．大群集化指数に変換して，各例の萎縮率の差異の補正を試みると(図4)，群集規模であらわれた傾向は一層著しくなった．即ち，CSMAでは0.099，ALSで0.055，CSで0.408，CMTで0.153で，ALSではCSに比して有意に低く，またCSMAに比しても有意に低かった．CSMAはALSに比して有意に大きな分散を有した．

Fibre typeの比率に関しては疾患別，病型別に明らかな特徴は見出せなかった．最も症例数の多いCSMAのPについて，全線維と萎縮線維について図示してみると(図5)，全線維のfibre typeの比率ではほぼ均等なバラつきがみられ，一部にtype IまたはIIのpre-dominanceが存在することを示した．萎縮線維のうち区別可能なmyosin ATPase活性を示すものは限られており，全線維のデータ

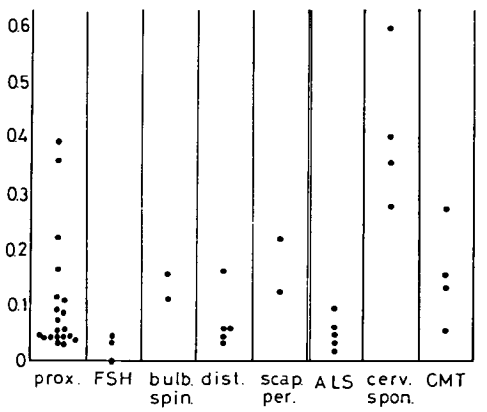


図4　大群集化指数

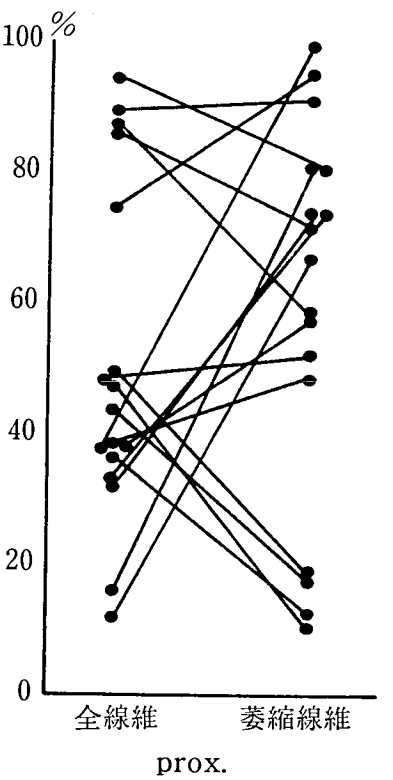


図5　Type I fibreの比較（CSMAのP群の各例）

と比較することにはやや無理があるが，やはり全線維と同様の大きなバラつきを示し，type I ないし type II atrophy を示す症例も一部にあることをあらわした．個々の症例につき全線維と萎縮線維の fibre type の割合を直線で結ぶと，その線の方向は無秩序で一定の傾向を示さなかった．

考　　察

CSMA では ALS や CS に比して中心核等のいわゆる筋原性変化が高頻度であった．これは近藤[7]や Mastaglia and Walton[8]の報告と基本的に一致する．例えば中心核の頻度は近藤[7]によれば KW で12.49%であり，本シリーズの CSMA の P では12.8%とよく一致する．この筋原性変化の機序は不明であるが，可能性の1つには長期の経過による二次的変化が考えられる．著者ら[9]は KW の25例を筋生検上の筋原性変化の多寡により，少ないものから多いものの順に I，II，III群にわけた．これらにつき平均罹病期間を算出すると I，II，III 群それぞれ8.6，15.5，13.3年で必ずしも明瞭な関係はみられなかった．著者ら[10]は Motor unit 内の病変の局在の違いにより，末梢神経障害で筋原性変化がみられるなど，筋生検像に差があることを観察している．CSMA で筋原性変化の出現頻度や大群集化指数に大きなバラつきが存在することは，症例あるいは病型により病態が異なる可能性を示唆している．病型を比較すると D と SP では筋原性変化が強い傾向があり，臨床像を勘案すると D と SP は比較的 CMT に近い病態であることが考えられる．このような所見より，CSMA が脊髄前角細胞，前根および末梢神経障害を種々の程度に持つ，全体として1つの spectrum をなす疾患群からなる可能性が考えられよう．

要　　旨

慢性脊髄性筋萎縮症の32例を5群に分け，筋生検像を半定量的に解析し，他疾患との比較を試みた．その結果，同症では神経原性変化に加えていわゆる筋原性変化が加味されていること，筋原性変化の程度や群集萎縮の規模に症例間の差がめだつことが指摘された．これらをもとに同症の病態につき若干の考察を加えた．

文　　献

1) Kugelberg,E.: Chronic proximal (pseudomyopathic) spinal muscular atrophy. Kugelberg-Welander syndrome. In "Handbook of clinical neurology," (edited by Vinken, P.J. & Bruyn, G.W.), North-Holland, Amsterdam, 1975, Vol. 22, p.67.

2) Pearce, J. & Harriman,D.G.F.: Chronic spinal muscular atrophy. J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry, 29：509, 1966.

3) Emery,A.E.H.: The nosology of the spinal muscular atrophies. J. Med. Genetics, 8：481, 1971.

4) Furukawa,T. & Toyokura,Y.: Chronic spinal muscular atrophy of facioscapulohumeral type. J. Med. Genetics, 13：285, 1976.

5) 古川哲雄：脊髄性進行性筋萎縮症の分類と Kugelberg-Welander 病．神経内科，12：319，1980.

6) Marsden, C.D.: Inherited neuronal atrophy and degeneration predominantly of lower motor neurons. In "Peripheral neuropathy," (edited by Dyck,P.J., Thomas,P.K. & Lambert,E.H.), Saunders, Philadelphia, 1975, Vol.2, p. 771.

7) 近藤喜代太郎：神経筋疾患における筋病変の臨床病理学的研究．第2報 Kugelberg-Welander 病とその近縁疾患の筋組織像．臨床神経，5：695，1965.

8) Mastaglia,F.L. & Walton,J.N.: Histological and histochemical changes in skeletal muscle from cases of chronic juvenile

and early adult spinal muscular atrophy (the Kugelberg-Welander syndrome). J. Neurol. Sci., 12：15, 1971.

9) 松原四郎，内潟雅信，野沢胤美，ほか：Kugelberg-Welander 病の臨床病理学的検討.（非定型例を含む主として成人の30例について）.（会）. 第21回日本神経学会総会，京都，1980.

10) 田辺等：筋生検による神経筋疾患の診断. 神経学的診断法，永井書店，大阪・東京，1979，p.260.

29) Motor neuron diseaseの筋生検組織化学的検討
——Oil red O 染色所見について——

茂 在 敏 司*

研究協力者　竹 中 正 純*　小 西 慎 吾*
増 井 義 一*　篠 田 恵 一*

はじめに

前回我々は，Kennedy 病の脊髄および球性筋萎縮症と考えられた，特異な下位運動ニューロン疾患の2家系2症例について報告した．この2例において，心筋，骨格筋，肝の生検を行い，骨格筋，心筋においては筋線維内の脂肪顆粒の沈着の過剰がOil red O 染色あるいは電顕像により認められ，肝においては脂肪変性がみられ，また血清脂質分析では第IV型高脂血症の型がみられたことを報告し，Kennedy 病においては，脂質代謝に関連した何らかの代謝異常の存在の可能性を推測した．今回はこの点について更に検討するため，特に骨格筋のOil red O 染色像に注目し，Lucas[1] により報告された line intercept method を用い，筋線維内脂肪顆粒を数量的に評価検討した．

対　象

症例の経過ならびに臨床症状は表1に示した．Case 1，2は Kennedy 病の筋萎縮症で，遺伝歴を有し，比較的若年に発症し，20年以上の緩徐進行性の経過をしめし，球性および近位性の脊髄性筋萎縮，女性化乳房，脂肪肝

表1　臨床所見のまとめ

Case No	1	2	3	4
Age Sex	39yr M	51yr M	70yr M	59yr F
Familial history	+	+	−	−
Age at onset (years)	19	17	69	57
Initial symptom	finger tremor	finger tremor	weskness of hand	dysarthria
Known duration (years)	20	34	1.5	22
Progression	slow	slow	gradual	gradual
Severity	mild	mild	moderate	severe
Deaths	−	−	−	+
Bulbar signs	±	±	+	+
Muscular atrophy	proximal	proximal	distal	distal
Pyramidal signs	−	−	+	+
Gynecomastia	+	+	−	−
Fatty liver	+	+	−	−
C P K(<80IU)	741	923	113	48

*大阪医科大学第一内科

などの特徴がみられている．CPK は両例とも軽度より中等度の上昇がみられた．Case 3，4 は，ALS で，Case 3 は手の脱力で発症，以来 1 年 6 ヶ月が経過している．理学的には球症状，遠位部筋萎縮，錐体路症状がみられた．Case 4 は死亡例で構音障害にて発症し，約 2 年で死亡し，剖検により ALS と診断された症例である．

方　　法

Kennedy 病 2 例，ALS 2 例に，いずれも大腿四頭筋生検を行い，連続凍結切片を作製し，ATPase および Oil red O 染色を施行，対比観察した．Oil red O 染色標本について，ATPase 染色標本所見を参考に相当した Type I fiber，Type II fiber ごとに at random に各40本，計80本の筋線維を撮影し，1120倍の photographic print を作製した．これを Lucas らにより報告された line intercept method を利用した McKeran の式[2] を用いて計測した．すなわち筋線維 photographic print に細線をひき，その線により切られる脂肪顆粒の数と直径およびその長さにより，筋線維内単位面積当たりの脂肪顆粒の面積C (lipid coverage per unit) は，以下の式により求められる．

$$C = \frac{1}{4}\pi \bar{W}\frac{ml+ms}{Ll+Ls}$$

ここで Ll は，一本の筋線維の長径，Ls は筋線維の短径，ml，ms はそれぞれ，長径短径の line によって切られた脂肪顆粒の数，$\bar{W}$ は，長径および短径によって切られる脂肪顆粒の平均直径を示している．以上の式を用い，個々の筋線維における，単位面積当たりの脂肪顆粒の占める割合を求めた．

結　　果

1) ATPase 染色により作製した，Fiber type ヒストグラム（図 1）では，症例 1 および 2 の Kennedy 病においては，Type 1 fiber，Type 2 fiber とに短径100μ 以上の，著明な肥大筋線維の増加がみられた．

2) 図 2 は症例 1 で，縦軸は一筋線維内の脂肪顆粒の占める割合 percent lipid coverage を，横軸は筋線維の短径をとったものである．Type 1 fiber では，多くの線維は 5 から15% 前後の値を示した．Type 2 では 5 %前後が多く，Type 1 に比較してより低値を示した．また，percent lipid coverage は，肥大線維と非肥大線維の間で差はなかった．図 3 は症例 2 で，Type 1 fiber では，一部10%の高値を示すものもみられるが，多くは 3 ～ 5 %に

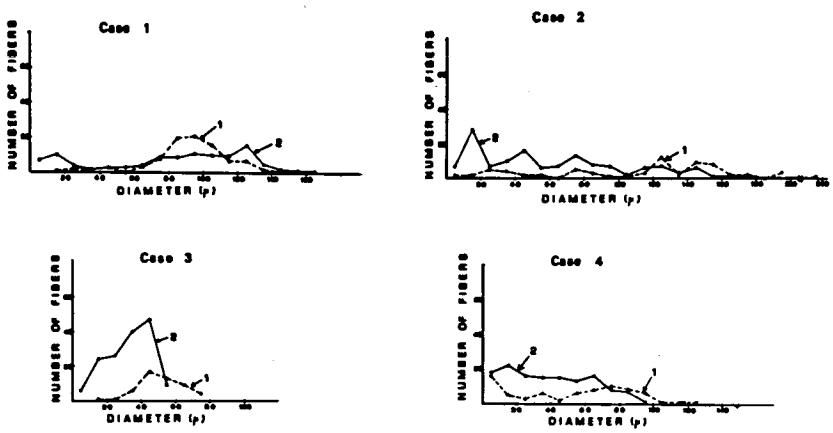


図 1　Histogram of fiber sizes in a muscle biopsy (Quadriceps femoris muscle).
症例 1，2 において短径 100μ 以上の肥大筋線維の増加が注目される．

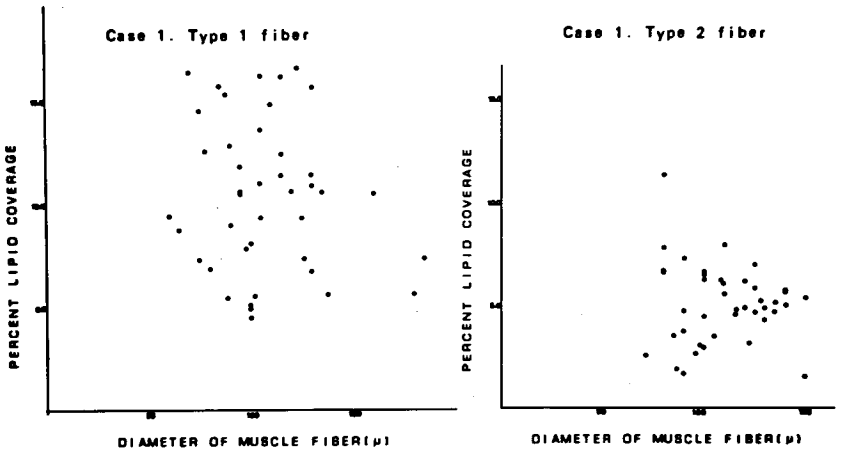


図2　症例1　個々の筋線維のpercent lipid coverageを示す.

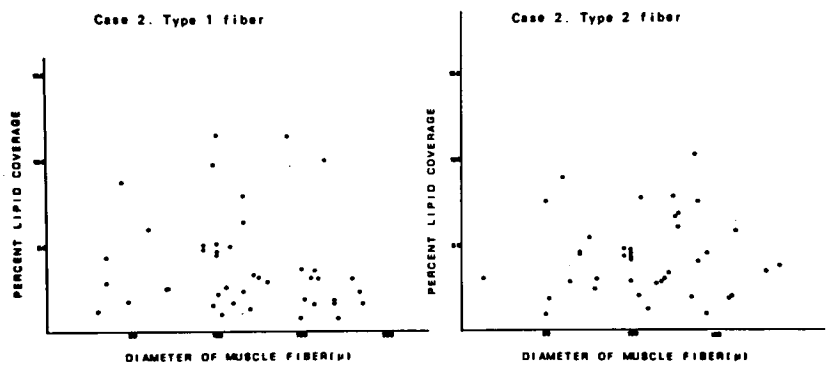


図3　症例2　個々の筋線維のpercent lipid coverageを示す.

分布している. Type 2もほぼ同様の所見であった. 症例2においても, 症例1と同様に, 肥大線維と非肥大線維のあいだにはpercent lipid coverageに差はみられなかった. 症例3および4のALS例でも, 同様の方法により検討したが, 両例共に, Type 1, Type 2のpercent lipid coverageはKennedy病の例に比し, 明らかに低値を示した. 以上の所見を平均値で示すと表2となる.

表2　4症例のMean Percent Lipid Coverage
症例1, 2のKennedy病では, 症例3・4のALS例に比しあきらかに高値を示している.

Case	Type 1	Type 2
1	10.76	5.12
2	3.99	4.64
3	1.35	0.67
4	2.04	1.69

考　案

従来より筋線維内の脂肪は, 筋活動のエネルギー源となる性格上, ミトコンドリアの近傍に局在することが知られ, また筋線維内では, ミトコンドリアの豊富な線維すなわちType 1 fiberにより多く含有されているとされている[3]. しかし病的状態における, 筋線維内の脂肪についての状況についての報告はあまりないようである. Harriman[4]は, 種々の病的状態における筋線維内の脂肪顆粒の沈着について検討しているが, そのうちMotor neuron diseaseについては13例について検討

している．その成績によれば，13例のうち10例においてType 1およびType 2線維のどちらかに，ある程度の脂肪顆粒の沈着を認めたという．これに対し，我々の報告したKennedy病では，Type 1，2両線維に著明な脂肪顆粒の沈着を認めた．またHarrimanは量的計測を行っていない．我々は，ALSにおいても，Type 1，2のほぼ両線維に軽度の沈着を認めたが，Kennedy例に比すれば，その量は明らかに少なかった．

Kennedy病ではMcKeranが示した中性脂肪蓄積症に比すれば軽度ではあるが，対照としたMotor neuron diseaseに比しはるかに多量の沈着のあることは，この疾患の根底に中性脂肪沈着によって表現される代謝障害の存在するとする我々の推測を支持する所見である．

なお筋線維内の脂肪沈着については，年齢，性，食事の状態などより，variationに富むことが知られており，今後筋線維内の脂肪沈着の生理学的な境界をも含めて，より多くの症例について検討する必要があろう．

文　献

1) Lucas,H.A. & Seber,G.A.F.: Estimating coverage and particle density using the line intercept method. Biometrika, 64: 618, 1977.
2) McKeran,R.O., Royston,J.P., Ward,P., et al.: Two populations of type 1 fibers in striated muscle from a case of neutral lipid storage disease. J. Neurol. Sci., 43: 1, 1979.
3) Price,H.M.: "Disorders of voluntary muscle." 3rd ed., edited by J.N.Walton, London, 1974, p.52.
4) Harriman, D.G.F. & Reed, R.: The incidence of lipid droplets in Human skeletal muscle in neuromuscular disorder: A histochemical, electron-microscopic and freeze-etch study. J. Pathol., 106: 1, 1972.

30) 筋ジストロフィー症の単一筋線維筋電図（第3報）

西谷　裕*

研究協力者　小西哲郎*

目　的

随意的に筋収縮の強弱を変化させた時に観察されるジッターは，筋線維伝導速度回復機能（velocity recovery function：VRF）と密接に関連していることが知られている．今年度はミニコンピューターによる解析方法を確立し，昨年度まで用手的に検索した各種筋原性疾患の他に各種神経原性疾患においても検討を加えた．

方法と対象

単極型単一筋線維筋電図針（Medelec SF-25）を各種神経筋疾患患者の随意的弱収縮下の一側総指伸筋に穿入し，同一神経支配下のpotential pair を trigger 回路及び delay unit を用いて観察する．被験者に随意的にゆっくりと第3指を中心に指の伸展の強さを変えて不均一な筋収縮を行なわせ，同一 pair の波形が変化しないように電極の位置を保って捕捉しながら data recorder（TEAC R410）に同一 pair の活動電位を記録した．解析には他の神経支配下の筋線維の活動電位が trigger level を越えて混入しない良好な記録部位を再生して解析した．解析方法は，シグナルプロセッサー（三栄 7T08）を用いて図1の如く同一 potential pair の互いの活動電位の立ち上りの一定レベル（可変）を横切るポイントをトリッガーポイントにして，活動電位間隔（interpotential interval：IPI）と筋発射間隔（interdischarge interval：IDI）を求める．作図は下段のように横軸に IPI をとり，その IPI の直前の同一 potential pair からの IDI を縦軸にとって連続して出現する100～300個をプロットした．同時にシグナルプロセッサーで mean consecutive difference 値としてジッター値の算出を行った．

Method

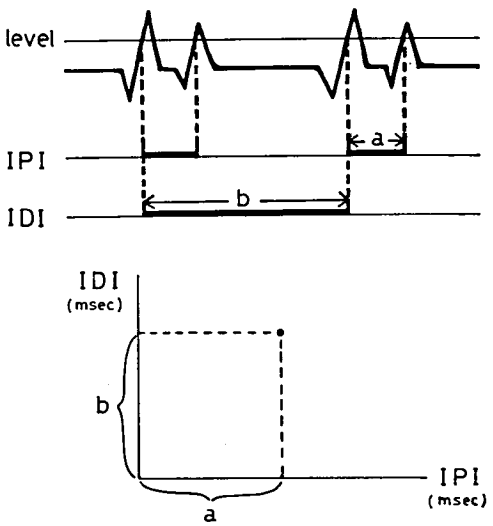


図1

結　果

正常者より得られた正常ジッター値を示す potential pair では IDI が短くなっても IPI がわずかに短縮又は延長の傾向を示すが明らかではなかった（図2）．筋発射間隔が40msec 以下（同一 potential pair の筋収縮が一秒間25回以上）では他の神経支配下の筋活動電位

＊国立療養所宇多野病院神経内科

が混入し，同一 pair が同定不可能となるため解析不能であった．

筋原性疾患（Duchenne 型ジストロフィー症，多発性筋炎）では指の伸展を強くし（筋収縮を強める）IDI が短くなると IPI が短縮傾向を示す potential pair が正常者に比べると頻回に認められた（図 3）．同一 potential pair の活動電位の捕捉が充分強い筋収縮まで可能であった potential pair では IDI が非常に短くなる（10～20msec 以内）と IPI はそれまでとは逆に延長傾向を示した．筋収縮を強めると IPI が延長傾向を示す potential

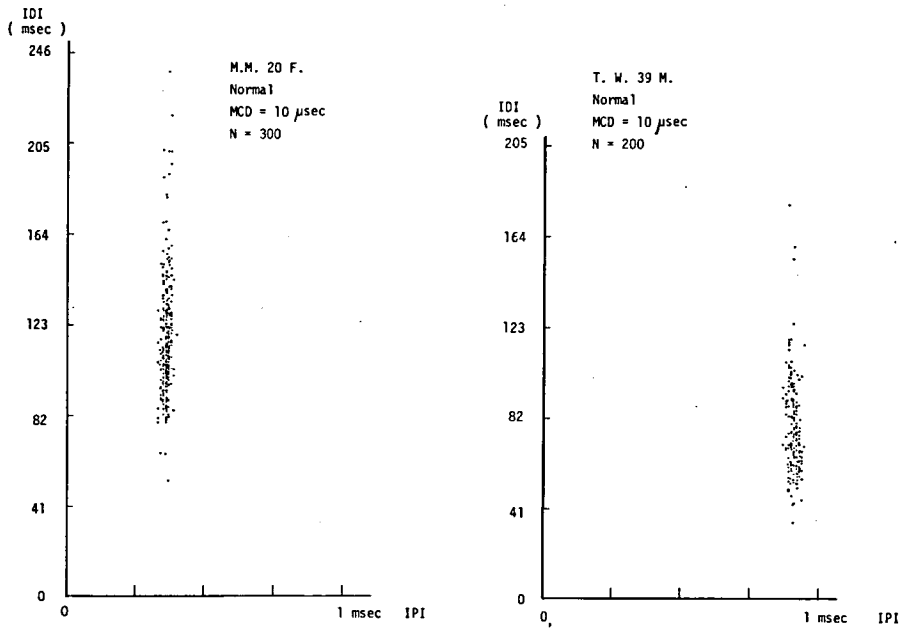


図 2

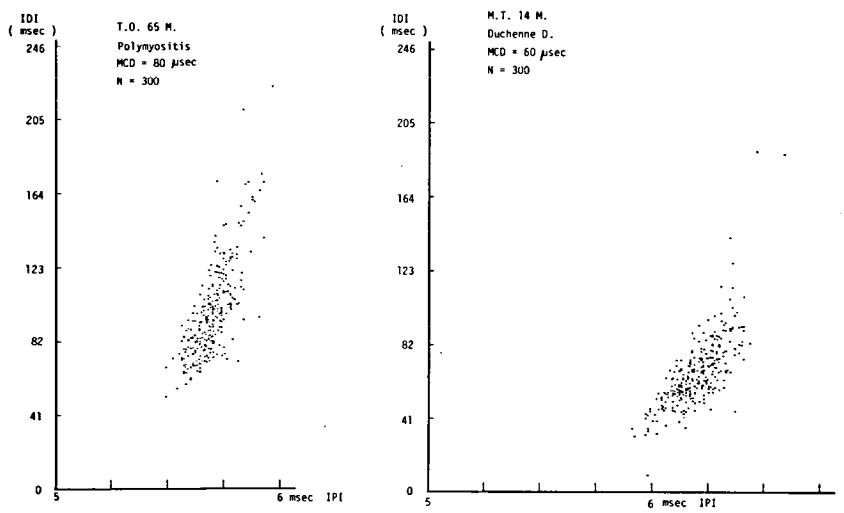


図 3

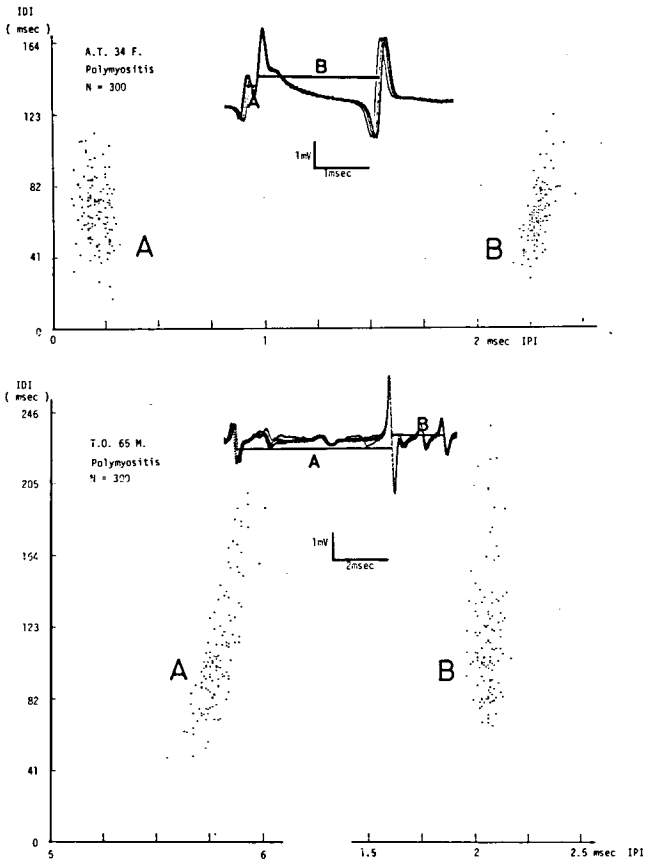

IDI
(msec)
164
123
82
41
0
A.T. 34 F.
Polymyositis
N = 300
A
B
1mV
1msec
0
1
2 msec IPI
IDI
(msec)
246
205
164
123
82
41
0
T.O. 65 M.
Polymyositis
N = 300
A
B
1mV
2msec
5
6
1.5
2
2.5 msec IPI

図 4

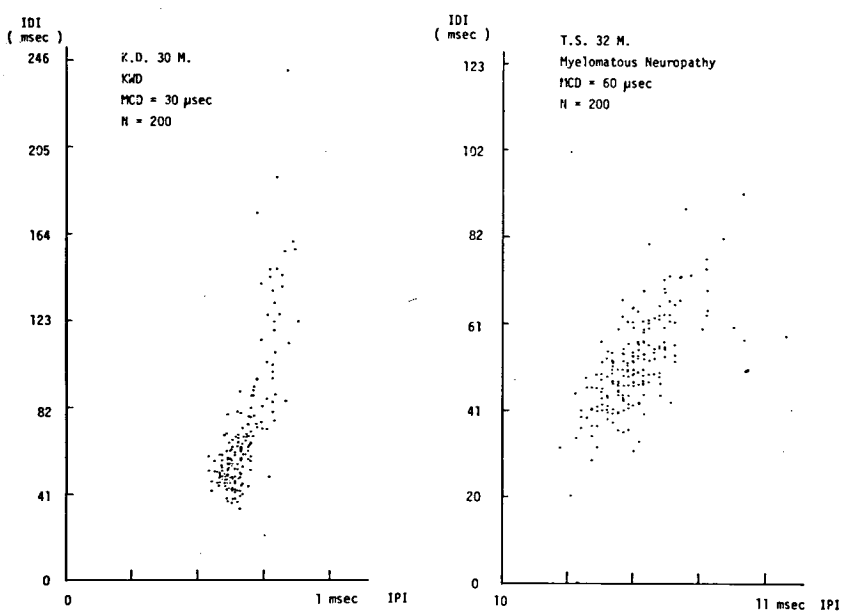

IDI
(msec)
246
205
164
123
82
41
0
K.D. 30 M.
KWD
MCD = 30 μsec
N = 200
0
1 msec IPI
IDI
(msec)
123
102
82
61
41
20
0
T.S. 32 M.
Myelomatous Neuropathy
MCD = 60 μsec
N = 200
10
11 msec IPI

図 5

pairが時に観察されるが，短縮傾向を示すpairに比べると明らかに頻度は少なかった．3つの互いに活動電位間隔の異なるpotential pairの間では活動電位間隔の長いpairで筋収縮が強くなるとIPIの短縮傾向がより顕著であった（図4）．

ジッターの異常の強い重症筋無力症では，神経筋接合部由来のジッターが大きいため筋収縮の強さを変えても作図上明らかな関係がみられないことが多かった．同時に神経原性疾患でジッターの異常が強いpotential pairではIDIとIPIの明らかな関係は見出し難かった．慢性に経過する神経原性疾患で，ジッターの異常がそれ程強くないpotential pairでは筋原性疾患でみられると同様に筋収縮が強くなるとIPIが短縮傾向を示すpairが観察された．特に初期の棘波群から約5 msec以上の遅れを持って孤立的に出現するlate componentにおいて著明であった（図5）．又筋疾患と同様に長い活動電位間隔のpairでIPIの短縮傾向が強かった．

考　　察

同一神経支配下の異なる2つの筋線維由来の活動電位間隔（IPI）の変動（ジッター）には同一神経より分枝した後の互いの神経細枝の伝導時間，神経筋接合部でのインパルスの伝達時間，筋線維の伝導時間の3つのfactorのvariabilityが関与している．正常者や重症筋無力症患者では主に互いの神経筋接合部でのインパルスの伝達時間のvariabilityがジッターに反映される．末梢神経疾患や筋疾患においては神経筋接合部由来のジッター以外に神経細枝や筋線維の伝導時間のvariabilityに由来するジッターの関与が想定されるが，単一筋線維筋電図ではそれらを厳密に区別することは不可能である．

一方，筋線維伝導速度が筋線維の電気刺激間隔を不均一にしたり，随意的に筋収縮の強弱を変化させると伝導速度が直前の興奮からの時間に密接に関連して速くなったり遅くなったりすることが知られている[1]．この筋線維伝導速度の変動は直前の興奮からの間隔が短いと伝導速度が早くなる現象でStålbergによりvelocity recovery function：VRF（筋線維伝導速度回復機能）と名付けられている．筋線維の膜の特性を表わすパラメーターと考えられており，興奮直後では筋線維のrefractory phaseにはいるため刺激がきても活動電位は発生せず，直後は逆に伝導速度が遅い時期がありその後速くなる現象である．このVRFの程度は個々の筋線維で異なり，正常筋線維の約16%に顕著なVRFを示すものがあり，筋ジストロフィー症の筋線維では約50%に増加する[2]．随意的に筋収縮の強弱を変化させ筋発射間隔が不均一な条件下でのIPIの変動には互いの筋線維のVRFが反映されることになる．筋収縮を強くしてIDIが短くなった時にIPIが短縮することは，遅れて活動電位が出現する筋線維のVRFが活動電位が先行する筋線維より顕著であるためと理解される．逆に活動電位が先行する筋線維のVRFが遅れて活動電位が出現する筋線維より大きければ筋収縮が強くなるとIPIは延長する．

長いIPIを持つpotential pairでは筋収縮が強くなるとIPIはすべて短縮傾向を示し，IPIが延長傾向を示すpotential pairはIPIが短いものでしかみられなかった．一方，昨年度我々が報告したように[3]，遅れて活動電位が出現する筋線維の伝導速度は先行する筋線維と比べて遅い傾向にあることより[2]，伝導速度の遅い筋線維のVRFが伝導速度の速い筋線維より著明であることを示唆する．

神経原性疾患においても筋原性疾患と同様に長いIPIを持つpotential pairでは，筋収縮が強くなるとIPIが短縮傾向を示し，また，同一神経支配下の複数の活動電位のおのおのの筋線維で遅い傾向を示すこと[3]より，筋疾患と同様に，伝導速度の遅い筋線維のVRFが伝導速度の速い筋線維より著明であると推論される．即ち，primaryな筋病変がなく，

2次的に筋線維伝導速度が遅くなる（2次的な筋萎縮？）とVRFが著しくなると考えられる．

以上より筋収縮と関連したIPIの変動は，筋原性疾患でよく観察されるが，筋原性に特異的な現象ではなく，2次的な筋病変（筋萎縮？）を示す神経原性疾患においても認められる現象である．その両者に共通する点は，筋線維伝導速度の遅い筋線維のVRFが速い筋線維のVRFより著しいと考えられることである．

問題点としては，筋収縮の変動でみられるIPIの変化はVRFの特徴と似てはいるが，同一神経から分岐した後の互いの神経細枝の病態生理が解明されていない点である．特に神経原性疾患において障害されたり再生した未熟な神経細枝の伝導時間にインパルスの間隔の不均一さがどの程度影響するかが全く不明であり，今後の解明されるべき問題と考えられる．

文　献

1) Stålberg, E.: Propagation velocity in human muscle fibres in situ. Acta Physiol. Scand.,70 〔Suppl.,287〕: 1, 1966.
2) Stålberg,E.: Electrogenesis in human dystrophic muscle. In"Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies",(edited by Rowland, L. P.), Excepta Medica, Amsterdam-Oxford,1977, p.570.
3) 西谷裕，小西哲郎，野口貞子：筋ジストロフィー症の単一筋線維筋電図(第2報)．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，1980，p.157.
4) Stålberg,E., Schwartz, M. S., & Troutelj, J.V.: Single fibre electromyography in various processes affecting the anterior horn cell. J.Neurol.Sci., 24: 403, 1975.

31) ヒトの外肋間筋を用いた実験的ミオトニーの研究

栗原照幸*

研究協力者　田中政幸*　年森清隆**
富田正雄***　柴田紘一郎***

はじめに

骨格筋の活動時において微小電極法により筋細胞内記録をする際には筋活動電位に伴って起る筋肉の収縮を阻止することが必要となる．生理学の領域では Eisenberg ら[1)2)]がカエルの骨格筋について Excitation–Contraction(E–C) Uncoupling を開発し，更に著者ら[3)4)]が，高張グリセロール液，dantrolene 溶液を用いて哺乳動物への E–C Uncoupling を適応できる方法に工夫を加えて来たが，今回は更にヒトの骨格筋標本へ本法を応用して，種々の筋病変を微小電極を用いて電気生理学的に研究する基盤をつくるため，開胸術時に得られたヒトの外肋間筋標本を用いて検討を加えた．今回の実験の主な目的は，(1)ヒトの正常な外肋間筋標本の膜電位を計測すること，(2)ヒトの筋肉標本で E–C Uncoupling を実現させ，微小電極法で記録すると共に，E–C Uncoupling に伴う形態学的変化を電顕的に観察すること，(3)ヒトの外肋間筋標本にアントラセン－9－カルボン酸[5)6)]を用いてミオトニーを作成することである．

対象と方法

対象は全麻下で開胸術を行った筋病変のない2人の患者より，腱から腱まで筋腹に障害なく採取した外肋間筋標本を用いた．ヒトの外肋間筋が採取されるとすぐ95% O_2，5% CO_2の混合ガスを Tyrode 液中に通じて酸素化を続けた．筋細胞内記録はガラス管微小電極を自作し，3 M KCl 溶液を管内に充たして，抵抗5－15megohm のものを選んで用いた．E–C Uncoupling には400mM グリセロール溶液，Washing Solution，5 mg/L の dantrolene 溶液を用いた[3)]．ミオトニーは10^{-4}M/L の濃度で，アントラセン－9－カルボン酸を Tyrode 液に加えて作成した．

結　果

ヒトの外肋間筋標本の膜電位は，各標本より夫々30個の筋細胞内へ微小電極を挿入して記録したところ表1のように，平均値とし

表1　ヒト外肋間筋標本の膜電位
対照筋標本及びアントラセン-9-カルボン酸によって作成したミオトニー標本から記録した膜電位の平均値と標準偏差を示す．夫々の外肋間筋標本より30個ずつの筋細胞から膜電位を計測した．

Specimens	Control		Induced Myotonia	
	RMP	No.of cells examined	RMP	No.of cells examined
1. 62y M	-84.4 mV ±2.9	30	-83.1 mV ±1.6	30
2. 36y F	-81.2 mV ±2.9	30	-81.5 mV ±2.2	30

＊宮崎医科大学第三内科
＊＊宮崎医科大学第一解剖
＊＊＊宮崎医科大学第二外科

て－84.4±2.9(S.D.)mV,及び－81.2±2.9(S.D.)mV という安定した値を得ることができた．次に，E–C Uncoupling をせずにミオトニーをアントラセン－9－カルボン酸を用いて作成した時の膜電位を，夫々の外肋間筋標本より30個ずつの筋細胞より記録すると**表1**のように，－83.1±1.6(S.D.)mV，－81.5±2.2(S.D.)mV と control に比し膜電位の低下を来さずにミオトニーをヒトの外肋間筋標本に作成することができた．

図1 A は E–C Uncoupling せずに myotonic burst を記録したものである．1，2，3は夫々異なる筋細胞からの記録であるが，各々の筋活動電位の発火が起る前に1の細胞では平均9.0mV の脱分極が認められ，2の細胞では平均11.1mV，3の細胞では9.0mV の

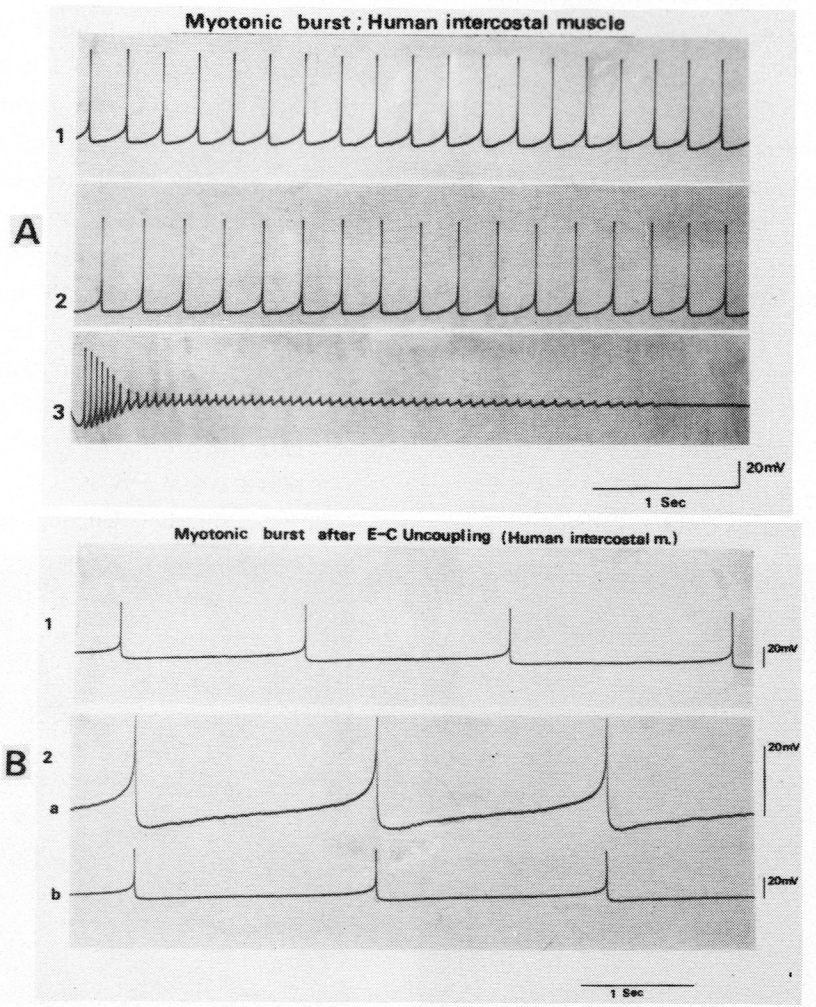


図1　ヒト外肋間筋標本より記録した myotonic burst
Aは，E-C Uncoupling せずにアントラセン-9-カルボン酸でミオトニーを作成して記録したもので，1，2，3は夫々異なる筋細胞からの記録．
Bは，E-C Uncoupling した後にアントラセン-9-カルボン酸でミオトニーを作成して記録したものである．

脱分極が認められた．3では数個の筋活動電位がburstとして認められた後に膜電位の低下を来しながらabortive spikeが連続して出現した後にmyotonic burstが終了している．このような際には，myotonic burstに伴う筋収縮によってinjury currentが流れ膜電位の低下をみた可能性もあるので，次にE–C Uncouplingをした後にmyotonic burstを細胞内記録すると図1Bの様に1ではやはり平均10.0mVの脱分極の後に各々の筋活動電位が出現していることが明らかになった．ここでは筋収縮を阻止してあるので，ここに認められる脱分極は微小電極が単一筋細胞内に入っている時にmyotonic burstが起ることによって生じたinjury currentによるものではないと考えられる．この状況を明らかにするため2のa, bに夫々高増幅，低増幅記録を同時に行って示すと，2のaで明らかなように，myotonic burstが連続して起っている時には，一つの活動電位が生じた後の膜電位は安定して留らずに，次第に脱分極をしてある閾値以上になると又次の活動電位を生じている様子が高増幅記録で明らかになった．

次にヒトの外肋間筋標本において本法によるE–C Uncouplingがいかなる形態学的変化を来すか検討するため，まずE–C Uncouplingをする以前のcontrolの電顕像を示す．図2は0.2μのsemithin sectionの電顕像で，myofibril, myofilament, Z–band等がよく認められる．Myofibrilとmyofibrilとの間隙は他の骨格筋より広い傾向が認められた．次にヒトの外肋間筋に高張グリセロール溶液，Washing Solution, 5 mg/Lのdantrolene溶液でE–C Uncouplingをした後の電顕像を図3に示す．Myofibril, myofilament, Z–band等には変化を来さないで，triadの附近にvesicleを形成してT–systemに変化を来して筋収縮を阻止するものと考えられる．図4はZ–band附近のvesicleを強拡大で示したものであるが，vesicleとT–tubulesへの連続性を示唆する．しかしこのvesicleがtriad附近にできて，T–systemの内のterminal cisternまたは，T–tubules等のどの部分を選択的に破壊するかについては更にtracerを用いて検討する余地が残っている．

以上のようにE–C Uncouplingを行った後

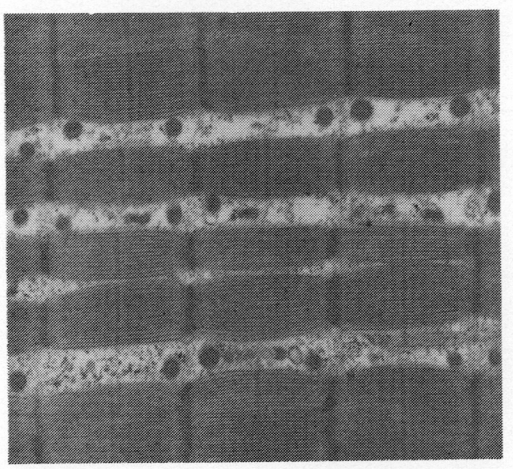


図2　ヒト外肋間筋標本の電顕像
これはE-C Uncouplingをする以前のcontrolで，0.2μのsemithin sectionの電顕像．×12,000.

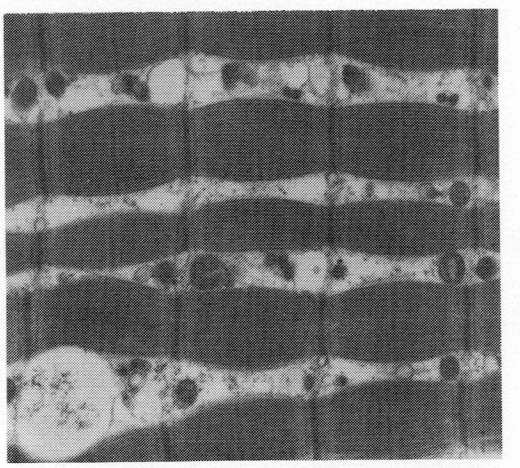


図3　E-C Uncouplingをした後のヒト外肋間筋標本の電顕像
Myofibril, myofilament, Z-band等には変化を来さないで，triadの附近にvesicleを形成して，T-systemに変化を来している．×12,000.

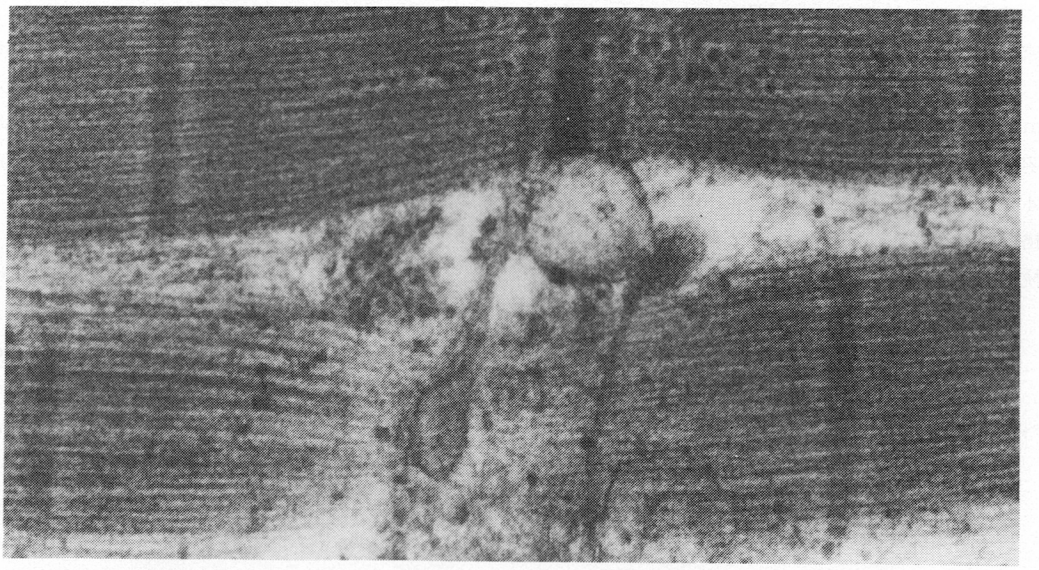


図4　図3の強拡大
Triad附近のvesicleを強拡大で示した電顕像であるが，vesicleとT-tubulesへの連続性を示唆する．×72,000.

にヒトの外肋間筋にミオトニーを誘発させ，15個の筋細胞から膜電位を記録すると，平均−78.5±6.9(S.D.)mVとなり，myotonic burstが起る前の膜電位は比較的安定したものであることが明らかとなった．

考　　察

現在までにEisenberg[1)2)]及び著者ら[3)]によって活動中の骨格筋より単一筋細胞内記録を実現するためにE–C Uncouplingが開発されて来たが，初めはカエルの骨格筋，更に哺乳動物の骨格筋へと段階を追って実現させ，今回ヒトの骨格筋にE–C Uncouplingを行ってミオトニーの細胞内記録を行うことに成功した．又ヒトの外肋間筋標本につき電顕的に本法によるE–C Uncouplingがいかなる変化を来すかについて検討し，これがmyofibril, myofilament, Z–band等には電顕的に変化を生じることなく，triadの附近でvesicleを形成してT–systemに変化を来して筋収縮を阻止することを明らかにした．今回のミオトニー作成はヒトの外肋間筋標本に*in vitro*でアントラセン−9−カルボン酸を用いて誘発させたものであるから，ヒトの疾患にみられるミオトニーといかなる点において類似し，いかなる点で異なるかを更に今後明らかにする余地が残されている．本研究で明らかになったことは，ヒトの骨格筋に著者らの方法によるE–C Uncouplingが応用できることであり，種々の筋病変を微小電極を用いて電気生理学的に研究する際に有用であると考える．

結　　語

1）正常なヒトの外肋間筋標本の膜電位は，30個の筋細胞より測定すると，2人の異なる標本で夫々平均−84.4±2.9(S.D.)mV，−81.2±2.9mVであった．

2）ヒトの外肋間筋標本にミオトニーをアントラセン−9−カルボン酸を用いて*in vitro*で作成することに成功し，ミオトニーを生じても膜電位は正常であるが，myotonic burstが起ると各々の筋活動電位が生じる前に9〜11mVの脱分極が認められた．

3）電顕的にE–C Uncoupling前後で比較検

討すると，本法では triad 附近に vesicle を形成することによって T–system に変化を来し筋収縮を阻止するが，myofibril,myofilament，Z–band 等には影響を与えないことが明らかになった．

4）本法による E–C Uncoupling はヒトの骨格筋に応用でき，筋活動時に細胞内記録を連続して行う際に有用である．

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,B.& Eisenberg,R.S.:Transverse tubular system in glycerol-treated skeletal muscle. Science,160：1243, 1968.
2) Eisenberg,R.S.,Howell,J.N. & Vaughan, P.C.：The maintenance of resting potentials in glycerol-treated muscle fibers.J. Physiol.,215：95, 1971.
3) 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.
4) 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.
5) Bryant,S.H.& Morales-Aguilera,A.: Chloride conductance in normal and myotonic fibers and the action of monocarboxylic aromatic acids. J. Physiol.,219：367, 1971.
6) Kurihara,T.: Experimental myotonia. Folia Psychiatr. Neurol. Jpn., 31：653, 1977.

32) カルシウム・イオノフォア (A 23187) 処理筋の収縮弛緩に関する研究
——ヒト・ジストロフィー筋との比較検討——

高 守 正 治*

研究協力者　井 手 芳 彦*　辻 畑 光 宏*

目　的

筋ジストロフィー症の病因として膜異常説が提唱され，Ca^{++} の病因的役割が問題とされている．外液からの異常な Ca^{++} influx による細胞内 Ca^{++} 濃度の増加は，Ca^{++}-activated neutral proteases 活性上昇や ATP depletion から筋細胞壊死を起しうる[1]．これを人工的に招来しうる因子としてカルシウム・イオノフォア A23187があり[2]．これを用いた薬理学的実験モデルの検討は，筋ジストロフィー症の病態成立研究の上に有意な情報を提供するものと考えられる．われわれは先に，A23187処理筋の膜性質を調べ，静止膜電位脱分極，ウアバイン反応性正常，Na^+能動輸送系異常など，ジストロフィー筋膜類似の所見を得た[3]．本報は，この処理筋の収縮弛緩機構を，生理，薬理学的に調べ，ジストロフィー筋と対比検討することを目的とする．

方　法

ウイスター系雄ラット (260－290g) から横隔膜筋をとり出し，その切除片(湿重量63.7－70.8mg) を，対照群ではエタノール (10μl/ml) を含むリンゲル液中に37℃，60分 (O_2＋

表 I　Active state properties

Abbreviations	Measurements	Functions
Pt	Maximum twitch force	Force generated by contractile component plus series-elastic component
$T_{dPt/dt}$	Time from onset to point of maximum velocity of twitch development	Duration of active state
$T_{1/2R}$	Time from onset to the half-relaxation level of twitch	Decay of active state
d^2Pt/dt^2	Maximum acceleration of twitch development	Active state intensity of shortening
Po	Maximum tetanic force	Active state intensity of load-bearing
dPo/dt	Maximum velocity of tetanus development	Force-velocity relation; rate of formation of cross-bridges; series-elastic component
Pt/Po	Twitch/tetanus ratio	

＊長崎大学医学部第一内科

CO_2：95/5)処理した．被検群では，エタノールで溶解したA23187(1 mg/ml)を含むリンゲル液（A23187の最終濃度は10μg/ml）で同様に処理した．次いで，それぞれの筋を，ガス負荷（O_2+CO_2：95/5）中のリンゲル液内（30℃）で等尺性筋張力計にセット（最大単収縮張力が得られるように静止時張力をセット)し，白金板電極でmassive stimulationを行った．液中クラーレ添加(d-TC, 6 μg/ml)して筋直接刺激とした．筋張力曲線は陰極管オシロスコープ上に記録し，また同時に，一次，二次微分回路を通して，それぞれの曲線をペン書きオシロスコープ上に記録した．最大強縮張力は250Hz反復刺激で誘発した．

筋収縮性は，active stateの概念[4) 5) 6)]にもとづき，〝時間要素〟と〝つよさ要素〟に分けて解析，測定法と意義付けの詳細を**表1**に示している．強縮負荷（50Hz, 5秒間）30秒後誘発の単収縮張力および，isoproterenol HCl（2 μg/ml）5分間浸潤後に誘発する単収縮張力も，それぞれの負荷前誘発のものと対比して分析した．

結　　果

対照群

14筋について検討し，そのactive state propertiesは，単収縮力(Pt；$T_{1/2R}$)，強縮力（Po）およびそれぞれの微分曲線（$T_{dPt/dt}$；d^2Pt/dt^2；dPo/dt）を測定分析して**表2**に示した(実例を図1左に)．7筋で，強縮負荷後誘発の単収縮力変化（post-tetanic change）をみると，負荷前に比べ，張力発生最大加速度（d^2Pt/dt^2）の増大と，時間要素（$T_{dPt/dt}$；$T_{1/2R}$）の延長を伴って増大がみられた(**表3上**)．また7筋について，5分間isoproterenol浸潤後に誘発した単収縮力は，この薬理学的負荷前に比べ，時間要素（$T_{dPt/dt}$；$T_{1/2R}$）の延長を伴って増大し

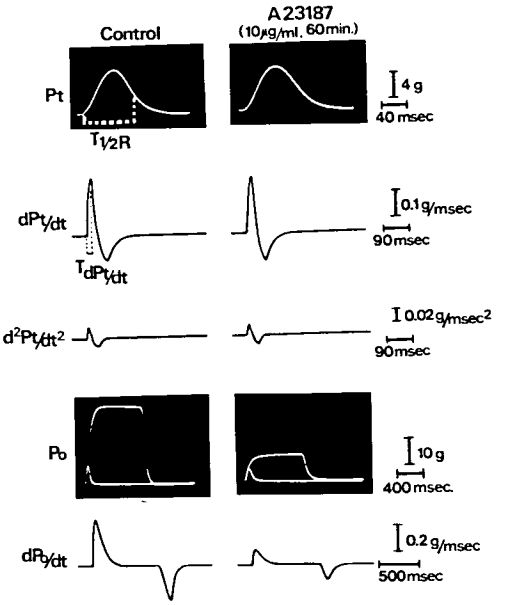


図1　コントロールおよびA23187処理筋の等尺性単収縮．強縮張力とその微分分析

表2　Active state properties of control, and muscle treated wich A23187

	Pt (g)	$T_{dPt/dt}$ (msec)	$T_{1/2R}$ (msec)	d^2Pt/dt^2 (g/msec^2)	Po (g)	dPo/dt (g/msec)	Pt/Po
Control (n=14)	5.7 ± 0.96	16 ± 1.3	70 ± 3.8	0.0157 ± 0.00427	33.1 ± 4.44	0.38 ± 0.035	0.18 ± 0.049
A23187-treated muscle (n=14)	5.1 ± 1.19	19 ± 2.0	76 ± 4.1	0.0132 ± 0.00305	9.0 ± 1.97	0.21 ± 0.044	0.59 ± 0.198

Means ± SD values are indicated; n denotes number of muscles tested.

表3　Post-tetanic change of twitch (%)

	Pt	$T_{dPt/dt}$	$T_{1/2R}$	d^2Pt/dt^2
Control (n=7)	117 ± 4.8	117 ± 9.7	109 ± 4.0	125 ± 5.8
A23187-treated muscle (n=7)	117 ± 9.1	118 ± 8.0	115 ± 5.9	123 ± 4.5

Effects of isoproterenol on twitch (%)

	Pt	$T_{dPt/dt}$	$T_{1/2R}$
Control (n=7)	131 ± 10.4	126 ± 8.9	114 ± 5.7
A23187-treated muscle (n=7)	130 ± 13.1	124 ± 0.9	111 ± 3.4

Means ± SD values are indicated; n denotes number of muscles tested.

た（表3下）.

A23187処理筋群

14筋について同様の解析を行った．対照群に比べ，active state の時間要素（$T_{dPt/dt}$；$T_{1/2R}$）の延長（$p<0.001$）がみられたが，単収縮張力発生加速度（d^2Pt/dt^2），単収縮力（Pt）は正常であった（表2）．強縮力（Po）とその発生速度（dPo/dt）は著明に低下し（$p<0.001$），従って Pt/Po は増加値を示した（表2）．強縮負荷では，その後誘発の単収縮力は，その発生加速度（d^2Pt/dt^2）の正常な上昇を伴って正常な増大を示したが，弛緩時間（$T_{1/2R}$）は異常に延長した（$0.025<p<0.05$）（表3上）. Isoproterenol の影響は，対照群の場合と同様であった（表3下）.

考　　按

Active state の概念は，直列弾性要素に修飾されない真の収縮要素を表現するにあり，本報では，単収縮，強縮張力の微分々析を行い，表1のごとくに解釈を加えた[6)7)8)]．A23187処理筋は，この時間要素（$T_{dPt/dt}$；$T_{1/2R}$）の延長を示した（表2）．$T_{dPt/dt}$ は筋小胞体からのCa^{++} 遊離，および，この Ca^{++} と troponin の reaction rate を反映[5)]（方法上 massive stimulation によって刺激の膜伝達時間の修飾を出来るだけ消去した），$T_{1/2R}$ は troponin からの Ca^{++} removal と筋小胞体による Ca^{++} uptake，および，troponin による Ca^{++} -binding と myosin による ATP -binding の関係が関与している active state decay を表現するものとした[4)5)9)]．この細胞内機構を表現する指標の異常は，ヒト・ジストロフィー筋でも見出している（表4）[7)].

単収縮張力発生の最大加速度（d^2Pt/dt^2）は，興奮収縮連関が始まるに当り，筋小胞体

表4　Comparison of contractile abnormalities between A23187-treated muscle and human dystrophic muscle

Active state properties	A23187-treated muscle	Human dystrophic muscle*
Decrease of Pt	-	+
Prolongation of $T_{dPt/dt}$	+	+
Prolongation of $T_{1/2R}$	+	+
Decrease of d^2Pt/dt^2	-	+
Decrease of Po	+	+
Decrease of dPo/dt	+	+
Alteration of Pt/Po	increased	decreased
Abnormal post-tetanic prolongation of $T_{1/2R}$	+	+
Abnormal sensitivity to catecholamines	-	+

* Data were obtained from the adductor pollicis muscle of 29 human dystrophic patients with no alteration of electrical activity and no overt weakness (Takamori 1975).

から遊離されるCa^{++}量を反映する指標（active stateの〝つよさ要素〟の一つ）として測定したものである[10]．この指標は，A23187処理筋では正常範囲内にあった（表2）が，ヒト・ジストロフィー筋では比較的病初期からこの指標の異常が見出された（表4）[7]．

Actin-myosin crossbridges形成の数と力の表現指標（active stateの〝つよさ要素〟の一つ）として，最大強縮力（Po）を測定したが[5]，これは，A23187処理筋（表2），ヒト・ジストロフィー筋（表4）両者で低下がみられた．また，その発生最大速度（dPo/dt）は，直列弾性要素による修飾がなければ，収縮要素の〝力－速度関係〟を表現するものとして測定したが[11]，これも両者（表2，4）で低下していた．したがって，Pt/Poはactive stateの〝時間要素〟の延長とPoで表現される〝つよさ要素〟の著明な低下によって増加値を示し（表2），ヒト・ジストロフィー筋が低下値を示す（表4）のと対照的である．

強縮負荷後誘発の単収縮張力曲線変化の観察も，Ca^{++}が関与する細胞内収縮弛緩過程を知る上に，色々の情報を提供するものである[12) 13]．本検査で，A23187処理筋（表3上）は，ヒト・ジストロフィー筋（表4）同様，負荷後に，弛緩過程（$T_{1/2R}$）の異常延長を示した．

骨格筋収縮性のカテコールアミンに対する反応性測定も，Ca^{++}が関与する細胞膜/細胞膜下要素の状態を知る上に有意であり，われわれは，ヒト・ジストロフィー筋[7]，実験的除神

経筋[8]でこの異常を見出している．一般に，エピネフリンは fast muscle ではその時間要素を延長して単収縮力を増大せしめ，slow muscle では逆に短縮して低下せしめる[14]．この作用は β 受容体を介し[7]，一部は cAMP-dependent[15]，一部は cAMP-independent[16]の過程があると思われ，われわれは，neurotrophic factor(s)もこの面に一つの影響力をもっていることを証明している[8]．ジストロフィー筋でみられたような β-stimulant に対する反応性異常（**表4**）[7]は，A23187処理筋では見出されなかった（**表3下**）．

A23187処理筋と，ジストロフィー筋の収縮性を比較すると（**表4**），強縮張力の解析で見出される収縮蛋白および activation 過程の少なくとも一部の異常は，両者に共通してみられる所見であった．しかし，単収縮張力解析で得られる諸指標のうち，active state の〝時間要素〟の異常は両者にみられたものの，ジストロフィー筋の比較的病初期から見出される張力発生加速度低下，対カテコールアミン反応異常は，A23187処理筋では見出すことが出来なかった．Pt/Po の変化は，両筋群間で相反する態度であった．カルシウム・イオノフォア（A23187）では，ヒト・ジストロフィー筋の完全な疾患モデルをつくることは出来なかった．

結　　語

筋ジストロフィー症病因としての Ca^{++} 関与，膜異常説にかんがみ，人工的に細胞外から内への Ca^{++} influx をもたらし，筋変性を招来しうるカルシウム・イオノフォア（A23187）で，ラット横隔膜筋を処理し，その収縮弛緩機構を分析（*in vitro*），ヒト・ジストロフィー筋と比較検討した．解析は，active state の概念による等尺性単収縮，強縮張力およびこれらの微分分析にもとづいた．最大強縮力およびその発生速度は，ジストロフィー筋同様低下をみとめた．しかし，単収縮張力分析では，active state の〝時間要素〟の延長はみとめたものの，一般にジストロフィー筋の病初期からみられる張力発生加速度低下，対カテコールアミン反応異常は見出せなかった．Pt/Po 変化の態度は，両者相反するものであった．本処理筋は，筋ジストロフィーの完全な疾患モデルとはなり得ない結果を得た．

文　　献

1) Duncan,C.J.:Role of intracellular calcium in promoting muscle change - A strategy for controlling the dystrophic condition. Experientia(Basel), 34 : 1531, 1978.
2) Grinstein, S. & Erlij, D.:Action of insulin and cell calcium - Effect of ionophore A23187. J.Membr.Biol., 29 : 313, 1976.
3) Takamori, M., Ide,Y. & Tsujihata,M.: Pharmacophysiological study on muscle treated with calcium ionophore A23187. J.Neurol.Sci.,1981 (in press).
4) Sandow,A.: Skeletal muscle. Ann.Rev. Physiol., 32 : 87, 1970.
5) Close, R. I. : Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. Physiol. Rev., 52 : 129, 1972.
6) Takamori,M.,Gutmann,L. & Shane S.R.: Contractile properties of human skeletal muscle - Normal and thyroid disease. Arch. Neurol.(Chicago), 25 : 535, 1971.
7) Takamori,M.:Contractility and supersensitivity to adrenaline in dystrophic muscle. J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry, 38 : 483, 1975.
8) Takamori,M.,Hazama,R. & Tsujihata,M.: Active state properties of denervated and immobilized muscle - Comparison with dystrophic muscle. Neurology(Minneap.), 28:603, 1978.
9) Taylor,S.R.,Preiser,H. & Sandow,A.: Mechanical threshold as a factor in excitation-contraction coupling. J.Gen.

Physiol., 54 : 352, 1969.

10) Hainaut, K. & Desmedt, J. E. : Calcium ionophore A23187 potentiates twitch and intracellular calcium release in single muscle fibers. Nature(London), 252 : 407, 1974.

11) Buller,A.J. & Lewis,D.M.: Further observations on the differentiation of skeletal muscles in the kitten hind limb. J.Physiol. (London), 176 : 355, 1965.

12) Close,R.& Hoh,J.F.Y.:The after-effects of repetitive stimulation on the isometric twitch contraction of rat fast skeletal muscle. J.Physiol.(London),197 : 461, 1968.

13) Hoh,J.F.Y.:Neural regulation of muscle activation. Exp.Neurol., 45 : 241, 1974.

14) Bowman,W.C.,Goldberg,A.A.J. & Raper, C.:A comparison between the effects of a tetanus and the effects of sympathomimetic amines on fast-and slow-contracting mammalian muscles. Brit. J. Pharmacol., 19 : 464, 1962.

15) Bowman,W.C. & Nott,M.W.:Effects of catecholamines, cyclic nucleotides and phosphodiesterase inhibitors on contractions of skeletal muscle in anesthetized cats. Clin. Exp. Pharmacol.Physiol., 1 : 309, 1974.

16) Reddy,N.B.,Oliver,K.L.& Engel,W.K.:Differences in catecholamine-sensitive adenylate cyclase and β-adrenergic receptor binding between fast-twitch and slow-twitch skeletal muscle membranes. Lif. Sci.,24 : 1765, 1979.

33) デュシャンヌ型筋ジストロフィー症赤血球膜のフォスファチジルイノシトール代謝

高 橋 桂 一*

研究協力者　難 波 紀久子*　後 藤 和 子*　春 藤 文 子*
陣 内 研 二*　小 嶺 幸 弘*　藤 田 拓 男*

はじめに

デュシャンヌ型筋ジストロフィー症(DMD)の赤血球膜の異常は，ATPaseをはじめ他の生化学及び形態学的異常が報告されているが，未だそれが一次的なものか，二次的なものか解決されていない．

Diseらは，DMDの赤血球にCa ionophore A23187を作用させるとKのefflux が対照より増加すると報告した[1]．Fisherらの DMDの赤血球の脆弱性の報告[2]と合せ興味がもたれる．DMDの赤血球でechinocyteが生じやすいとする報告がある．これと関連して赤血球のmicrovesiculationにphosphatidyl inositol phosphate (DPI) とphosphatidyl inositol diphosphate (TPI) の分解がCaにより促進されるMichell一派の報告があり[3]，DMDの赤血球膜のphosphatidyl inositol (PI) 代謝の検索が必要と考えた．

方　法

DMDと同年令の正常者及びSPMAを対照として同時操作にて，早朝空腹時にヘパリン採血をし，デキストラン法で赤血球を分離し，0.9% NaClで2回洗滌した後10mMトリス塩酸緩衝液pH7.4，1mM $MgCl_2$，1mM NaClを含む溶液や1mM EDTAを含む溶液で溶血を行ない，あと洗滌を5回行ない膜標品とした．インキュベーションの条件は各成分の検討を行ない最終的に次の条件を採用した．

トリス塩酸緩衝液	20mM　pH7.5
ATP	0.5mM
CTP	0.25mM
$MgCl_2$	20mM
^{3}H-inositol	0.05mM
赤血球膜	100μl(蛋白量約0.1mg)
添加物	

全容量200μlで37℃，30分間インキュベートし，5%トリクロール酢酸で反応を止め，遠沈し，Folch液（クロロホルム：メタノール：濃塩酸＝200：100：1，V/V）で抽出し0.1規定塩酸で分配して，底の層の一部を直接Brayのシンチレーションカクテルに加えるか，あるいはSilica Gel Hの薄層クロマトグラフィーで分析した．用いた溶媒は図2に示す．

結　果

インキュベーションの条件を，$MgCl_2$とNaClを含む上記の緩衝液で調製した赤血球を用い検討した結果を図1に示す．イノシトールは^{3}Hの比活性の関係上反応の立ち上った0.05mMを採用した．CTPは当然反応に必要で0.25mMで最大の取込みがみられた．ATPは0.25mMのCTPの存在下で0.5mMで最大の取込みを示し，濃度が増すと抑制がみられた．Mgは5mMで反応はプラトーに達した．Mnは20mM $MgCl_2$の存在下ではむし

* 神戸大学医学部第三内科

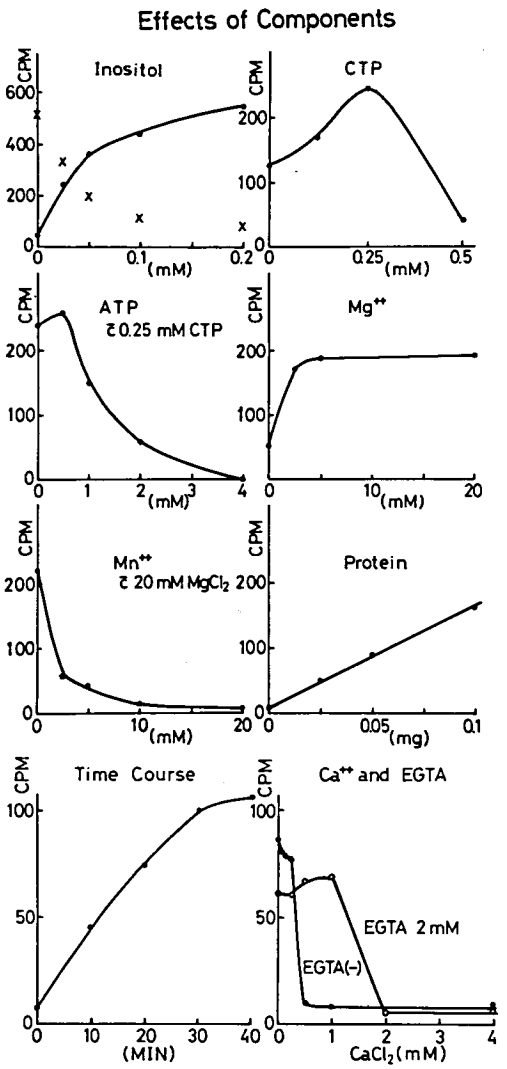


図1　^{3}H-inositolの赤血球膜への取込みに及ぼす各組成の影響(pH=7.5, 37°C)

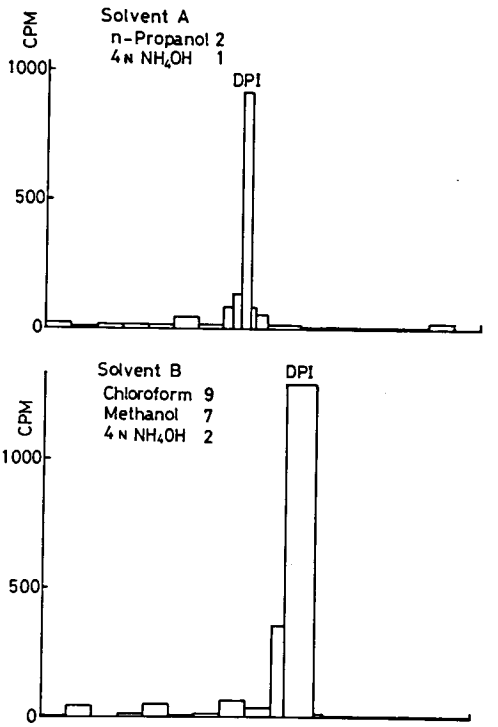


図2　^{3}H-inositolの赤血球膜リン脂質分画への取込みのSilica Gel H薄層クロマトグラフィーによる分析.

ろ抑制的であり反応に加えなかった．蛋白は反応tube当り0.1mg迄直線関係がみられた．反応時間は30分迄，略直線的に取込みの増加がみられた．Caの影響をみると，反応はCaにより抑制され（——），EGTAの存在で（○—○）抑制は解除され，Ca特異性が推定された．

^{3}H-inositolがphosphoinositidesのどの分画に取込まれたかを知るためSilica Gel Hを図2に示すA，Bの二種の溶媒で展開した．図2でみるように殆どがdiphosphoinositideに取り込まれていることが判る．従ってBray液に直接混じて放射能を測定する方法でphosphatidyl inositolのturnoverを知ることが出来る．以下この方法を用いた．

図3には，DMDと脊髄性筋萎縮症患者（SPMA）の赤血球膜への^{3}H-inositolの取込みと，それに及ぼすCaの影響を示した．Ca無添加の場合，SPMAの方が高い取込みがみられた．しかしこの際SPMAの膜標品はより白く，溶血及び洗滌条件が関与すると推測された．そのため溶血及び洗滌に用いる溶液の検討を行った．図4にトリス塩酸緩衝液のみの場合と，前述の$MgCl_2$及びNaClを含む緩衝液の比較と更にEGTA（2 mMの反応液中の最終濃度）の影響を示す．黒点は膜標品の蛋白量をLowry法で測った値を示す．

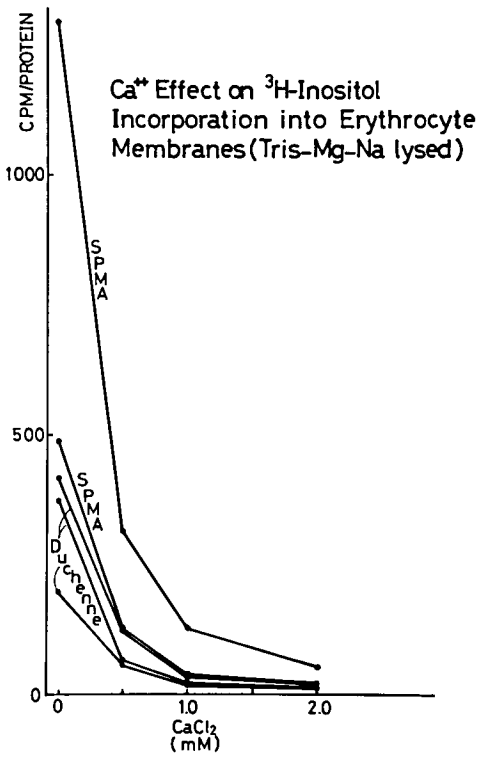


図3　Caの^{3}H-inositolの赤血球膜への取込みに及ぼす影響.

図に示さないが1 mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液pH7.4で溶血及び洗滌を行った場合が最も高い^{3}H-inositolの取込みを示した．従って以下の実験にはこの溶液を用いた．図5にSPMA及び正常男児の赤血球膜とDMDの赤血球膜への^{3}H-inositolの取込みを比較した結果を示す．DMDと対照との間に有意の差を認めなかった．

ちなみに，この実験に用いた同一膜標品で赤血球膜のadenylate cyclase活性を測定したがDMDと対照群の間で，基礎値，エピネフリン存在下，NaF存在下での活性のいずれにおいても差がみられず，エピネフリンによる活性化もみられなかった．これはWacholtzらの報告[4]と相違した．

結　論

以上の実験から，phosphatidyl inositolのturnoverは膜調製やインキュベーションの条件で極めて敏感に変動することが示された．

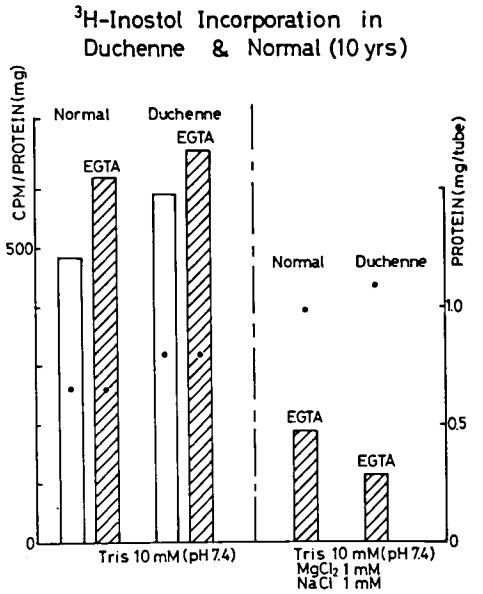


図4　赤血球膜調製に用いる緩衝液組成の^{3}H－inositol取込に及ぼす影響．斜線で示したEGTAはインキュベーション中に加えた．

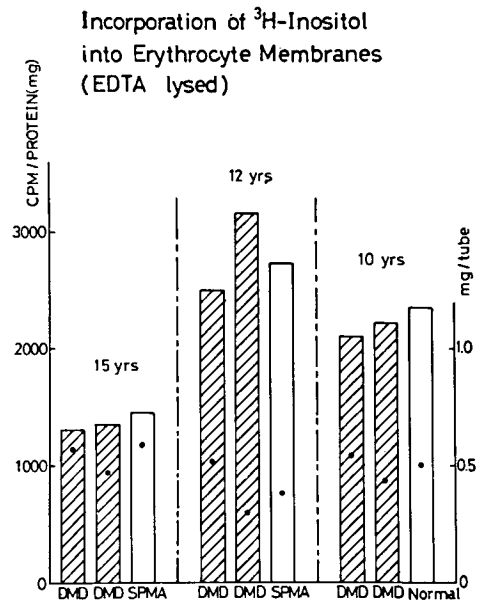


図5　デュシャンヌ型筋ジストロフィー症の赤血球膜phosphatidyl inositol代謝

従って赤血球膜を扱う場合，年令をそろえ，採血や膜調製の条件を対照群と全く同一にして検討することが極めて重要である．

以上の方法では，DMD の赤血球膜の phosphatidyl inositol 代謝は対照群と差がなく，adenylate cyclase にも差がみられず，DMD が赤血球を含む系統的疾患であることを支持出来なかった．赤血球膜の調節因子(calcium dependent regulator protein など）や血漿因子を検討することが，従来報告されたデータの解釈と今後の研究に残された問題と考えられる．

本研究は昭和55年度厚生省神経疾患研究委託費No80－02－27によって行なわれた．深謝する．

文　献

1) Dise,C.A.,Goodman,D.B.P.,Lake,W.C.,et al.:Enhanced sensitivity to calcium in Duchenne muscular dystrophy.Biochem. Biophys.Res.Commun.,79：1288, 1977.

2) Fisher,E.R.,Silvestri,E.,Vester,J.W.,et al.: Increased erythrocyte osmotic fragility in pseudohypertrophic muscular dystrophy. JAMA, 236：955, 1976.

3) Allan,D.& Michell,R.H.:The relationship between Ca^{2+}-mediated polyphosphoinositide phosphodiesterase activity, 1,2-diacylglycerol accumulation,and microvesiculation in erythrocytes.In"-Progress in clinical and biological research",(edited by Lux,S.E.,Marchesi, V. T. & Fox, C. F.), Alan, R. Liss, Inc. New York 1979, Vol. 30, p.523.

4) Wacholtz, M. C., Raible,D.G.,Jachowski, 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.

34) 筋ジストロフィー症患者赤血球膜のレクチン結合

宇尾野　公　義*

研究協力者　別　府　宏　圀*　中　島　元　夫**
西　山　文　朗***　平　野　　寛***

筋ジストロフィー症（Dy）の赤血球膜に関して，これを全身的な膜異常としてとらえようとする観点から，さまざまな検討が行われて来た．我々もまた，昨年度迄の研究によって，ジストロフィー鶏（Dy鶏）の赤血球膜と正常対照のそれとを比較し，Dy鶏においては，(1)コンカナバリンA(Con A)凝集活性の低下があり，(2)フェリチン標識Con A (Fer-Con A)を用いた電顕的観察で，Con A結合が減少しており，(3)^{125}I標識Con Aによる結合実験で，Con Aの主結合部位数が減少していることを示し，その意義について考察を行った[1]．今回は，これを更にヒトDuchenne型筋ジストロフィー症の赤血球に応用し，Fer-Con Aを用い二次元展開膜標本による電顕的観察を行った．

対象と方法

6例のDMD患者(18歳～23歳，平均16歳)および6例の健康者(17歳～19歳，平均18歳)から，予めクエン酸ソーダを添加した注射器にて採血したのち，赤血球を分離し，燐酸緩衝生理食塩水（PBS，pH7.2）にて3回洗滌し，これをFer-Con A（30～60μg Con A/ml）と37℃，30分間反応させた．これを再びPBSで洗滌したのち6×10^8/mlの赤血球浮遊液を作製し，その一滴を蒸溜水表面に滴下した．水面上で破裂，伸展された赤血球膜を，予め支持膜を張ったグリッド上に拾い，2.5%グルタルアルデヒドにて固定し，蒸溜水で洗滌したのち，透過型電顕にて観察した．

結　　果

二次元展開し，Fer-Con Aと反応させた赤血球膜の電顕写真を図1に示す．左が正常者，右がDMD患者である．正常者ではCon A結合部位を示すフェリチン粒子がクラスターをなし，細胞表面全域に亘って密に結合分布しているが，DMD患者ではこれよりも明らかに疎な分布を示し，クラスター形成の程度も少ないように見える．

両者の差を定量的にとらえるため，無作為に選んだ視野を100nm×100nmを単位とする正方形（unit square）で区画し，400個のunit square中に含まれるフェリチン粒子を数え，そのヒストグラムを作製した．1 unit square中に含まれるフェリチン粒子の密度を横軸にとり，縦軸にその出現頻度をとって表示したものが図2であり，正常者及びDMD患者の各1例を示している．正常者では1区画あたり1～3個の密度を示すunit squareが多いのに対し，DMDではフェリチン粒子を全く含まないunit squareが半数近くを占めて最も多い．1 unit squareあたりに結合するフェリチン粒子の平均値を各例について求めて表示したものが図3である．正常者では1.48～4.15，2.18±1.18であるのに対し，DMD患者では1.07～1.63，1.32±0.20であ

＊東京都立神経病院神経内科
＊＊東京大学薬学部生体異物
＊＊＊杏林大学医学部解剖

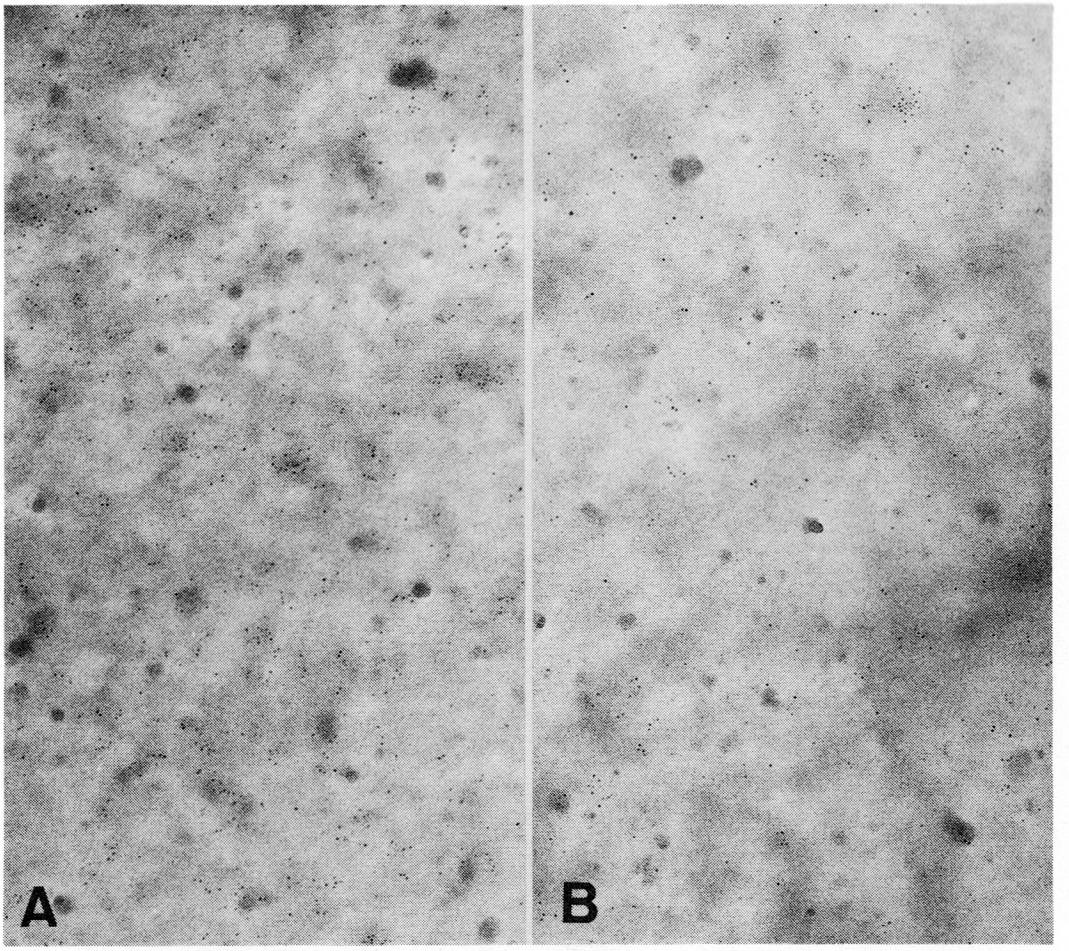


図1　Electron microscopic photographs of erythrocyte membrane labeled with ferritin-Con A.(×70,000)
(A) normal, (B) Duchenne muscular dystrophy

り，両者の差は $p<0.01$ で有意と認められた．

分布密度のみならず，分布様式に関しても正常者とDMD患者との間には差があるように見えるところから，Dy鶏の場合に用いたと同じ手法[2]を用いて分布様式の違いを検討してみた．即ち，クラスター形成の程度を示す指標として，Irimuraら[2]によって提唱された $\sigma(k)/\sigma_{random}(k)$ を各例について算出し，これをDMDと対照とで比較してみた．ここで $\sigma_{random}(k)$ とは乱数表により作製した完全にランダムな分布パターンをもとに算出した標準偏差値であり，一辺250×kÅ（ただしkは1から5迄の整数とする）のunit square中に含まれる粒子数の標準偏差を意味する．また，$\sigma(k)$は検討すべき標本における粒子の分布から算出した値であり，同じく一辺250×kÅのunit square中に含まれる粒子数の標準偏差である．図4に，正常者及びDMD患者各例について算出した $\sigma(4)/\sigma_{random}(4)$ を示す．正常対象では12.5～14.6, 13.7±0.8, DMDでは10.1～13.2, 11.3±1.1であり，後者においてクラスター形成が少ないことを示している（$p<0.01$）．

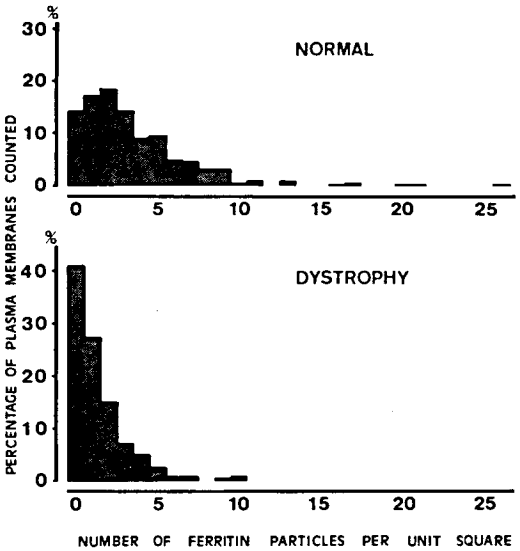


図2 Distribution frequency of ferritin particle density per unit square in dystrophic versus normal erythrocyte plasma membrane.

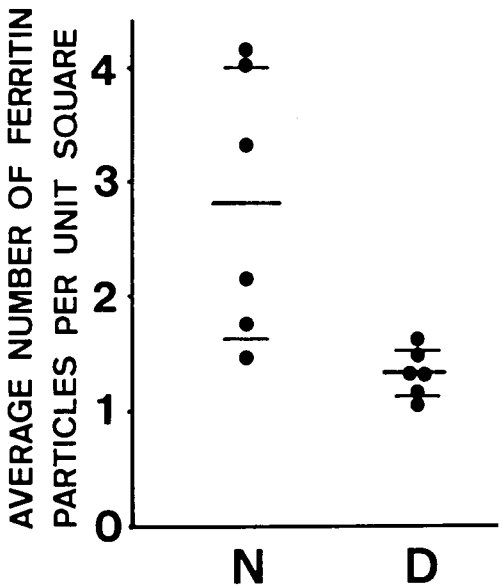


図3 Average number of ferritin particles per unit square in normal(N) and dystrophic(D) erythrocyte plasma membrane.

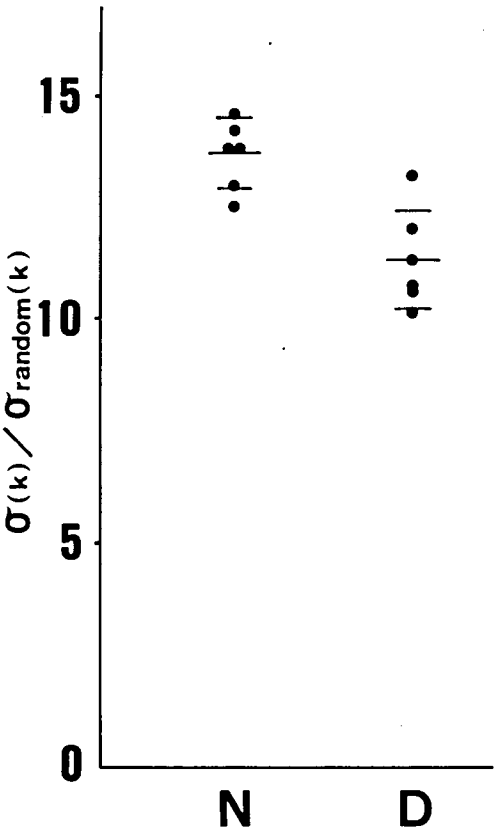


図4 $\sigma(4)/\sigma_{random}(4)$ in normal(N) and dystrophic(D) erythrocyte plasma membrane.

考　　察

ヒト赤血球と鶏赤血球とはSDSゲル電気泳動のパターンからも，その膜組成が互いに酷似していることが知られている[3]．また，赤血球膜の膜内粒子については，Dy鶏，ヒトDMDともに，正常対照と比較して，その数が減少していることが指摘されている[4)5)]．これ迄の我々の実験から，Con A結合部位もまた，ヒト，鶏両者に共通してジストロフィー赤血球膜で減少していることが確認された．ヒト赤血球の場合，Con A結合部位の主な構成要素はband 3蛋白であり，また，band 3蛋白を含む内在性蛋白分子（integral protein）は凍結割断法により観察される膜内粒

子に対応するものである[6]ことを考慮するならば，以上の結果はすべて矛盾なく了解し得る．

DMD赤血球膜において，Con A結合部位の分布が，正常対照群よりもクラスター形成の乏しい点は，Wakayamaら[5]の観察した所見と一見矛盾するようにみえる．即ち，彼らは膜内粒子の分布が，DMD患者においてむしろ不均一であると述べている．このような差異の生じた理由としては，我々の実験の場合，未固定標本にFer-Con Aを作用させていることを考慮すべきであろう．ジストロフィー赤血球膜は正常対照に比し膜流動性が乏しいとする報告がある[7]．Con A結合が，膜の流動性を高め，Con A結合部位の分布をより一層クラスター化するとすれば，Fer-Con Aを反応させた赤血球では正常者の方がDMD患者に比しより顕著なクラスター化を示したとしても当然であろう．従って，たとえ本来の膜内粒子（前段に述べた理由からこれはCon A結合部位に対応する）の分布がDMD患者においてより不均一であったとしても，Con Aと反応させたのちは，正常対照の赤血球膜の方が逆に著明な不均一化（即ちクラスター化）を示すことになろう．この点に関しては前固定して予め膜の流動性を阻止した膜標本にFer-Con Aを反応させて検討することが必要と考える．

更にまた，Nakajimaらは鶏赤血球を用いて，Con Aが膜燐脂質のメチル化を促すことを示し，Con A結合によってもたらされる膜の流動性増加がメチルトランスフェラーゼ阻害剤によって阻止されることを報告している[8]．これらの事実は，Con A受容体が膜流動性の変化に関与し，その結果膜酵素活性の調節にも寄与している可能性を示唆する．

Con A結合部位の減少を直ちに筋ジストロフィー症の直接的原因乃至結果と見做す根拠は未だ欠くが，以上の点を総合して考えるならば，本疾患において指摘されて来た様々な細胞膜レベルの異常にこれが関連しており，疾患の発現にもまた重要な役割をはたしていることが考えられる．

結　論

ヒトDuchenne型筋ジストロフィー症(DMD)患者および，これとほぼ年齢を対応させた健康正常者各6例を用い，その赤血球膜のCon A結合に関して検討を行った．DMD患者赤血球ではCon A結合部位が有意に減少しており，その意義について考察した．

文　献

1) 宇尾野公義，別府宏圀，中島元夫，西山文朗，平野寛：ジストロフィー鶏赤血球膜のレクチン結合．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，1980，P.200.
2) 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, 1975.
3) Jackson, R. C.: The exterior surface of the chicken erythrocyte. J. Biol. Chem., 250 : 617, 1975.
4) Shafiq, S. A., Leung, B. & Schutta, H. S.: Reduced density of intramembrane particles in erythrocytes of dystrophic chickens. J. Neurol. Sci., 30 : 299, 1976.
5) Wakayama, Y., Hodson, A., Pleasure, D., Bonilla, E. & Schotland, D. L.: Alteration in erythrocyte membrane structure in Duchenne muscular dystrophy. Ann. Neurol., 14 : 253, 1978.
6) Pinto da silva, P., Branton, D. & Douglas, S. A.: Localization of Con A antigen sites on human erythrocytes ghosts. Nature, 232 : 194, 1971.
7) Sha'afi, R. I., Rodan, S. B., Hintz, R. L.,

Fernandez, S. M. & Rodan, G. A. : Abnormalities in membrane microviscosity and ion transport in genetic muscular dystrophy. Nature, 254 : 525, 1975.

8) Nakajima, M., Tamura, E., Irimura, T., Toyoshima, S., Hirano, H. & Osawa, T. : Mechanism of the concanavalin A induced changes of membrane fluidity of chicken erythrocytes. J. Biochem.(Tokyo), 88 : 665, 1981.

35) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の赤血球カルシウム・フラックス（第2報）

庄　司　進　一*

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症(DMD)の病因は未だ未明であるが，最近の研究では筋ばかりではなく赤血球も含め広く膜の異常があることを示唆するものがある．

形態的，血液学的，生化学的に DMD の赤血球の異常が報告されている．それらの中でも異常形態の増加，変形能の低下，ウアバインによる〔Na^+，K^+〕- ATPase の活性抑制の低下，K^+ イフラックスの増加等の報告は，赤血球にカルシウムが蓄積した場合と同様な変化であることから DMD の赤血球にカルシウムが蓄積している可能性を示唆していると考えられる．

DMD の赤血球に関しての報告のほとんどが異説が報告されていたり，1施設のみの報告だったりであるが，ただ1つの例外として〔Ca^{2+}，Mg^{2+}〕- ATPase 又は Ca - ATPase が DMD の赤血球膜で活性増加しているという報告は3施設からあり全て一致している．この酵素は赤血球内からカルシウムを汲み出すポンプ作用があると考えられている．

さらに，DMD の筋線維でカルシウム濃度が上昇しているとの報告もあり，これが膜異常と筋壊死の間の重要なステップである可能性が考えられている．

もし細胞内カルシウム濃度が異常に増加しているとすれば，これはインフラックス（流入）の増加又はイフラックス（汲み出し）の減少又はその組合せで来ると考えられる．困難な細胞内カルシウム濃度の測定のかわりに，本研究では細胞外，赤血球膜，赤血球内の各分画間のカルシウムの動きをアイソトープをラベルしたカルシウムを用いて測定した．

第1報ではトリ・クロル酢酸（TCA）上清を用い ^{45}Ca の細胞液と細胞膜への流入を Ca - ATPase の特異的阻害剤であるランタナムの有無で測定した．今回は TCA を用いず，蛋白と結合したカルシウムも測定した．

材料及び方法

患者の年齢は8歳から19歳である．診断は普通用いられている診断基準で行われた．同年齢の男児で神経・筋疾患や血液疾患のない者を対照として用いた．患児又は両親より研究への協力の同意を得た．

実験は，対になる試料を朝食前の同日，ほぼ同時刻に同一人が同一な手技で採取した．ヘパリン加静脈血は直ちに0℃で保存され実験に移された．

赤血球は5溶以上の氷冷した0.16M NaCl で3回洗浄し，各遠心毎に白血球層を取り除いた．全ての操作は4℃で行った．

アイソトープ

$^{45}CaCl_2$（17.6mCi/mgCa）は日本アイソトープ協会より得た．99%の純度で，保存は－20℃で行った．

新鮮赤血球のカルシウム・インフラックス

洗浄した赤血球を2から5溶のインキュベーション・メディウムに入れ37℃，3時間のインキュベーションを振盪下で行った．メディウムは2.5mM $CaCl_2$，$^{45}CaCl_2$，250 μM$LaCl_3$，0.16M NaCl である．$LaCl_3$は Ca - ATPase の特異的阻害剤として加えた．こ

*信州大学医学部第三内科

のインキュベーション時間が直線性の保たれる最長の時間であった．$LaCl_3$ の濃度はインフラックスが最大になる濃度で，これ以上は溶血や凝結が生じた．

アリコートを取り10,000g 1分の遠心をmicrofugeで行い，赤血球とメディウムを分離した．赤血球は1 mM EGTAを含む0.16 M NaClで1回洗浄後2回0.16M NaClで洗浄した．この条件は赤血球膜外面に吸着しているカルシウムを取り除くのに充分であった．

洗浄後の赤血球は0.1%サポニン溶液を1 ml加えて溶血させ，17,000g 30分の遠心で細胞液と膜を分離した．膜分画はさらに20mMリン酸バッファー(pH7.5)で2回洗浄を繰返し膜分画とした．

カルシウム・インフラックスの測定には，細胞液分画のアリコートの放射活性を内部標準法を用いてヘモグロビンの色によるクエンチングを克服して行った．膜分画はソルエン350を0.4ml用い完全に可溶化して放射活性を測定して行った．

放射活性の測定にはトルエン1,000ml，トリトンX-100 500ml，POP 4 g，POPOP 0.1gのシンチレーション溶液を用い液体シンチレーションカウンターで行った．

インキュベーション後にヘマトクリットを測定し溶血前の赤血球の容積を求めた．膜分画の乾燥重量は膜分画のreference baseに用いた．

全ての測定はtriplicateで行った．

ATP欠乏赤血球のカルシウム・インフラックス

ATP欠乏赤血球は洗浄赤血球を4℃7日間保存して得た．この実験では $LaCl_3$ はインキュベーション・メディウムより除いた．他の操作は新鮮赤血球の場合と同じに行った．

統　計

Student't テストを用いた．

結　果

結果は**表1**に示した．$LaCl_3$ を用いない場合の新鮮赤血球のインフラックスは細胞液及び膜分画でDMD及び対照共にnegligibleであった．ATP欠乏赤血球では新鮮赤血球で $LaCl_3$ を用いた場合に比べて，膜分画へのカルシウム・インフラックスが増加していた．しかし細胞液分画ではこの関係が逆で，ATP欠乏赤血球の方が減少していた．どの実験においてもDMDと対照との間に有意差は認められなかった．

表1　DMDと同年齢男児対照の赤血球カルシウム・インフラックス

Calcium Influx of Fresh Erythrocytes	
In the cytosol fraction	
DMD (12)	67 ± 7 μmoles/l cell
Control (12)	69 ± 10
In the membrane fraction	
DMD (12)	12.2 ± 1.6 μmoles/mg dry weight of membrane
Control (12)	12.6 ± 1.2
Calcium Influx of Energy-Depleted Erythrocytes	
In the cytosol fraction	
DMD (12)	8.1 ± 0.8 μmoles/l cell
Control (12)	7.9 ± 0.8
In the membrane fraction	
DMD (12)	172 ± 27 μmoles/mg dry weight of membrane
Control (12)	184 ± 25

（　）内患者数を示す．
データは平均±標準偏差を示す．
DMDと対照で有意差は認められない．

考　案

本研究でDMDの赤血球のカルシウム・インフラックスは37℃3時間のインキュベーションで対照と差がないことが示された．Plisker ら[1]はDMDのカルシウム・アプテイクを原子吸光法で測定し正常であったと報告している．彼らと本研究では色々と異なる条件がある．例えばカルシウム濃度は40mMと2.5mMで，彼らはCa-ATPaseの阻害剤は用いていない．彼らのデータは34.2μmoles/liter/hrであったが，これは本研究の細胞液

分画へのインフラックスのデータ67μmoles/liter/3 hr と同じオーダーである．

結　　論

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症（DMD）の赤血球のカルシウム・フラックスを測定した．インフラックスはランタナムを Ca - ATPase の特異的阻害剤として用い測定した．DMD と同年齢男児の対照との間に細胞液と膜分画へのインフラックスで有意な差は認められなかった．カルシウム・インフラックスを ATP 欠乏赤血球を用い，Ca - ATPase の特異的阻害剤を用いずに測定した．再び DMD と対照との間に有意な差は認められなかった．しかし ATP 欠乏の場合は新鮮な場合と比べ，膜分画へのインフラックスが増加し，細胞液分画へのインフラックスは減少していた．

文　　献

1) Plishker, G. A. & Appel, S. H. : Red blood cell alterations in muscular dystrophy : The role of lipids. Muscle & Nerve, 3 : 70, 1980.
2) Shoji,S. : Calcium flux of erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. J Neurol Sci, in press.

36) 筋ジストロフィー症患者の赤血球のATPとカルシュウム含量

吉田瑞子*

研究協力者　安藤一也*

目的

筋ジストロフィー症患者の筋細胞内には，Caが多く存在することが知られている．本研究はその原因を究明することを究極の目的とする．昨年度，Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) の赤血球形態は，血漿中およびcitric acidとdextroseが入っている緩衝液中に，赤血球が浮遊している場合は，正常対照者との差がなかったが，Caが存在しかつATP合成が不可能な緩衝液(Phosphate Buffered Saline: PBS(+) pH7.4) 中に浮遊した場合には，異常形態(echinocyte)が多く存在した．ただその原因は不明であった．

赤血球がechinocyteに変形する原因は色々あるが，そのうちCaが赤血球内に蓄積する場合と，赤血球内のATPが枯渇する場合がある．

今回はCa^{2+}が存在する緩衝液に，赤血球内のATPが枯渇しないようにdextroseを加えて，DMD患者の赤血球をincubateし，その赤血球のCa含量およびATP含量を調べ変形の原因を究明した．

実験方法

Ca^{2+}とMg^{2+}が存在するPBS(+)にdextroseを5 mM加えたものを緩衝液 (PBSD(+)pH7.4)として使用した．組成は表1に示す．DMD患者と同年齢の健康男子よりヘパリン採血した．採血後0℃に保存し，3時間後に血漿を分離，赤血球を上記緩衝液で3回洗滌した．この赤血球をPBSD(+)中でHematocrit10～15%にして，4℃で3日間保存した．この赤血球浮遊液を約45%のHematocritに戻し，赤血球の全Ca量およびATP量を測定した．なおATP量の測定は，同一試料で赤血球洗滌直後およびCa^{2+}-freeのPBSD(−)で処理した場合も行った．

Caの測定方法；永木等[1]およびVetter[2]等に従い，Trapped Plasmaを測定して，赤血球のCa量に対し外液のCaの影響を除去する方法を用いた．Trapped Plasmaはindocyanine green (ICG)を用いて，血漿とPBSD

表1 Phosphate buffered saline containing dextrose

(pH7.4　281 mOsm/1)

	mM
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	8.09
KH_2PO_4	1.47
NaCl	134.4
KCl	2.68
$CaCl_2$	0.90
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.49
Dextrose	5.00

*国立武蔵療養所神経センター

(+)に浮遊した赤血球のPacked Cells中の値を測定した.

Ca量は原子吸光法(島津原子吸光光度計AA−640−13)を用いて測定した.その試料はTrapped Plasma(PBSD(+)中の)を測定した試料と同時に遠心(半径19cmの遠心機で4℃,3500rpm,10分)して得た外液(上清)およびpacked cellsを,湿式法(硝酸−硫酸)で処理して得た.使用した試薬は金属分析用,溶媒はパイレックス再蒸溜水,器具はテフロン,ポリエチレン,パイレックス製を用い,使用前に酸で処理した.

ATPの測定;酵素法[3]を利用したATP-test (Boehringer Co)を用いて測定した.0.6N過塩素酸で除蛋白を行い,10分後遠心し,上清を0〜4℃に保ち,24時間以内にATP測定を完了した.

Hemoglobin (Hb)の測定;赤血球のATP含量をHbに対して表わすために,azide-methemoglobin法[4]を利用したヘモキット−S(日本商事)により測定した.

総ての測定に使用した緩衝液,測定用試薬は使用直前に調製した.試料は特に記さない限り0〜4℃で処理した.

結　　果

Trapped Plasma;赤血球のCa含量を測定するために,赤血球のPacked Cellsの間隙に入ったTrapped Plasmaの量を測定して,外液のCa^{2+}量の影響を除去した.このTrapped PlasmaはDMD患者と対照者の赤血球の間に差は認められなかった.しかし血漿中にある赤血球のPacked CellsのTrapped Plasmaは,患者と対照者共に約5.6%であったのに対して,PBSD(+)中の赤血球Packed Cellsは患者が約8.8%,対照者が約9.4%と血漿中に比較して高い値を示した.PBSD(+)でのTrapped Plasmaが高い値を示したのは,洗滌直後の場合も,3日間incubateした後も同じであった.赤血球の大きさは,ICGが含まれている血漿とPBSD(+)中で差はなく,また患者と対照者の間にも差がなかった.いずれの場合も正常形態を示していた.そこでPBSD(+)で洗滌した赤血球表面に対してICGの影響が変ったと考えられ,我々は赤血球のCa含量を算出するために,血漿中で測定したTrapped Plasma値を使用した.

赤血球のCa含量;図1はDMD患者7名(平均19.3歳)と正常健康男子(平均19.7歳)の赤血球を5 mM dextroseと0.9mMのCaが入っているPBSD(+)で3回洗滌後,同じ緩衝液に浮遊し,4℃で3日間保存した赤血球のCa含量を示す.この結果によると患者赤血球の全Ca量は対照者の約2.5倍と高い値を示した.この時の赤血球のATP含量は,後に示すように枯渇していなかった.

赤血球のATP含量;図2はDMD患者10名(平均16.4歳)と正常健康男子14名(平均16.8歳)の赤血球ATP含量を示す.左側が緩衝液(PBSD(+)とPBSD(−))で洗滌した直後,右側が洗滌後,同じ緩衝液に浮遊し,4℃で3日間保存した赤血球ATP含量である.赤血球をPBSD(+)で洗浄した直後のDMD

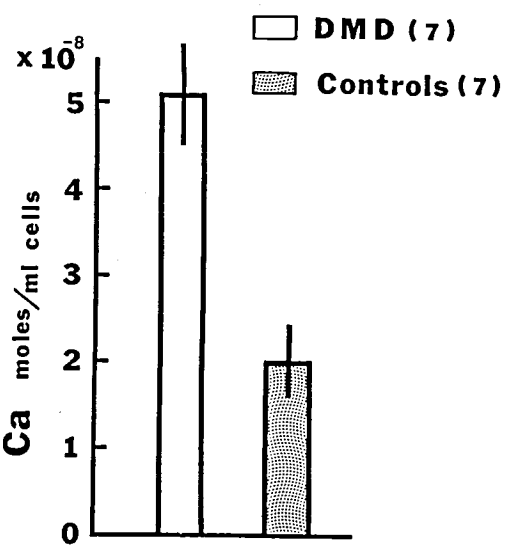


図1　Ca contents of erythrocytes after 3 days preservation in PBSD(+)

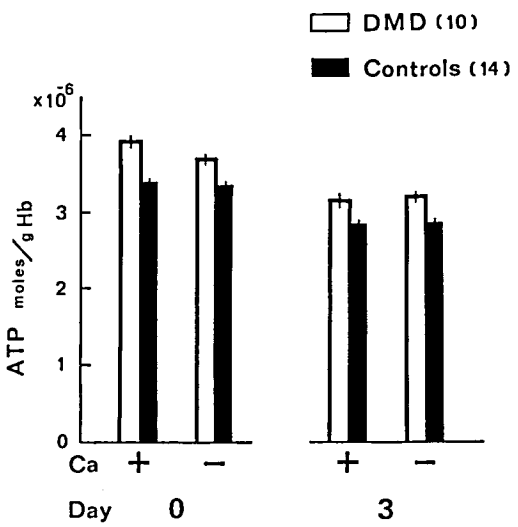


図2 Effect of Ca on the ATP-level of erythrocytes

患者赤血球のATP含量は，対照者のそれに比べて約15%高かった．4℃で3日間保存した後と約12%と高い値を示した．Ca-freeのPBSD(−)で赤血球を洗滌した直後と4℃で3日間保存した場合でも，ATP含量は患者の赤血球の方が高い傾向（約10%）を示した．

考　　察

赤血球をCa^{2+}を含み，ATP合成が不可能(dextrose-free)なPBS(+)中に4℃で，120時間浮遊した場合，DMD患者の赤血球の形態は，対照者のそれに比べて約25%も多くechinocyteに変形したことを先に触れた．しかしその原因が患者の赤血球にCaが蓄積し易くてechinocyteに変形したのか，赤血球内のATPが枯渇し易くてechinocyteになり易かったのか不明であった．そこで今回の実験結果から明らかなように，赤血球のATPが枯渇しない状態で(図2)，4℃で3日間保存された患者赤血球に，対照者のそれに比べCaが約2.5倍も多く蓄積されていたこと(図1)から，その原因はPBS(+)中で赤血球にCaが蓄積し易く，赤血球内のATPが枯渇すると共にechinocyte形になったと考えられる．

また4℃で保存された赤血球は(Ca^{2+} + Mg^{2+})−ATPase activityが低下している状態である．その状態で患者の赤血球にCaが蓄積され易いということは，対照者の赤血球に比べ，Caが外液より内部に入り易い状態になっているのではないかと考えられる．DMD患者赤血球の(Ca^{2+} + Mg^{2+})−ATPase activityが対照者に比べ高いという報告[5]は，上の結果を支持するものである．

DMD患者赤血球のATP含量は，赤血球をPBSD(+)で洗滌直後に測定した場合，対照者のそれに比べて約15%高く，同じ緩衝液中に浮遊し，4℃で3日間保存した場合，Ca-freeのPBSD(−)に浮遊させた場合も10〜12%高かった．これ等の結果はDanon等[6]の結果と一致する．ATP含量が高いというひとつの理由は，DMD患者赤血球のCaが対照者のそれに比べて高いためであろう．それは赤血球内ATPが細胞内Caの緩衝効果を持っているためである．

昨年度と今年度の結果より，DMD患者赤血球にも異常が存在すると考えられる．今回の結果で患者の赤血球は，4℃で処理した場合，赤血球にCaが蓄積され易いことが明らかになった．今後患者の赤血球にCaが何故に蓄積され易いのか原因を究明して行く予定である．

ま と め

1)4℃中で3日間，PBSD(+)中でincubateしたDMD患者赤血球のCa含量は，対照者のそれに比べ約2.5倍高かった．

2)DMD患者赤血球のATP含量は，対照者のそれに比べ4℃においてPBSD(+)で洗滌した直後は約15%高く，4℃で3日間，PBSD(+)中でincubateした場合約12%高かった．

3)PBS(+)中の患者赤血球の形態がechinocyteになり易かった原因は，1)によりCaの蓄積によることが明らかになった．

患者の血液を提供下さった，国立療養所東埼玉病院　石原伝幸先生，正常対照者の血液を提供下さった，東京女子医科大学　金子行子先生そして八王子血液センターに感謝する．また懇切な意見を賜りました，京都薬科大学藤井達三先生に感謝する．

文　献

1) 永木譲治：赤血球内ナトリウム，カリウム測定の基礎的検討とその臨床的意義．臨床病理，24：89，1976.

2) Vettore, L., Falezza, G., et al: A new method for the determination of sodium and potassium in human red blood cells, using indocyanine green as a marker for trapped plasma. Clinica. Chimica Acta., 55：345, 1974.

3) Jaworek, D., Gruber, W., et al: Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York Vol. 4 1974.

4) Vanzetti, G.: An azide-methemoglobin method for hemoglobin determination in blood. J. Lab. Clin. Med., 67：116, 1966.

5) Ruitenbeek, W.: Membrane-bound enzymes of erythrocytes in human muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 41：71, 1979.

6) Danon, M. J., Marshall, W. E., et al: Erythrocyte metabolism in muscular dystrophy. Arch. Neurol., 35：592;1978.

37) 筋緊張性ジストロフィー症および Duchenne dystrophy症の赤血球膜のATPase, adenylate kinase などについて

馬 渡 志 郎*

研究協力者 安 徳 恭 演*** 伊規須 英 輝**
後 藤 幾 生** 黒 岩 義五郎**

はじめに

Myotonic dystrophy 症においても Duchenne dystrophy と同じように，赤血球あるいは赤血球膜の異常の報告がある．特に ATPase[1)~5)],protein kinase[6) 7)],adenine の ATP や ADP への取り込み[8) 9)] など ATP や ADP と直接関連した異常の報告も少なくない．したがって，私共は myotonic dystrophy 症患者の赤血球膜の ATPase, adenylate kinase などを測定した．さらに血漿の adenylate kinase や creatine kinase も測定した．同じ方法で Duchenne dystrophy 患者についても検討した．

対象および方法

同一施設に入院中の myotonic dystrophy 患者（5人）と，同年齢層の肺結核患者（6人）を対象として，同日の同時刻ごろ採血し，赤血球膜の調製，酵素の測定などすべて同時に行った．Duchenne dystrophy 症患者（5人）についても同様にして同年齢男子群（脳性麻痺患者）と比較した．ヘパリン採血し，血漿および buffy coat を除いた後，赤血球は8.5% NaCl 液で3回洗浄し，10mM Tris - HCl (pH7.4) で溶血後，同液で4回膜を洗い白色の赤血球膜を得た．血漿および赤血球膜は－35℃に保存した．

Total ATPase の測定は50mM Tris - HCl (pH7.4)，5 mM $MgCl_2$, 100mM NaCl, 15 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM PEP, 0.25 mM NADH, pyruvate kinase, LDH, 赤血球膜（300～400μg）を含んだ反応液を37℃で反応させ，NADH の変化を340nm で記録計で記録した．Ouabain に反応する ATPase ($Na^+ + K^+$ －ATPase とする)は，上記の反応液に0.1mM ouabain を加えて測定した．Adenylate kinase (ATP + AMP → 2 ADP) は，上記の ouabain を含んだ反応液に，さらに 1mM AMP を加えて活性を測定し，この活性値より ouabain 存在下の ATPase 活性値を差引いた．Adenylate kinase の上記と逆反応（2 ADP → ATP＋AMP）の活性値は，100mM Tris - acetate (pH7.0), 10mM Mg - acetate, 20mM glucose, 1 mM ADP, 0.6mM NADP, hexokinase, glucose－6－phosphate dehydrogenase, および赤血球膜（300～400μg）を含んだ反応液を37℃で NADP の変化を340nm で記録した．Adenylate kinase の反応は，この酵素の specific inhibitor である P^1, P^5, －Di (adeno-

＊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
＊＊＊国立赤坂療養所神経内科

sine−5')pentaphosphate, (Ap5A) を10μM 加えると完全に block され，反応が adenylate kinase であることを確かめた．血漿の adenylate kinase も同様にして測定した．血漿の creatine kinase (CPK) は adenylate kinase (2 ADP → ATP+AMP) の反応液に 30mM phosphocreatine (pH7.0), 5 mM AMP, 10μM Ap5A および20mM N-acetylcysteine を加えて37℃で反応させ340nm で記録した．血漿の pyruvate kinase はベーリンガー・マンハイム社の測定キット (PK-uV テスト) を使用した．

結　　果

Myotonic dystrophy 症の赤血球膜の total ATPase, 0.1mM ouabain によって抑制される ATPase, および adenylate kinase の活性はいずれも対照群と有意差は認められなかった (表1)．血漿中の adenylate kinase は creatine kinase と同じように myotonic dystrophy で軽度に増加している症例があったが，増加していない症例の方が多かった (表2)．また creatine kinase の値と adenylate kinase の値に相関はなかった．

表1　Myotonic dystrophy症および対照の赤血球膜の酵素活性値

	Control(n=6)	Myotonic(n=5)
Total ATPase	9.9± 2.6	9.4± 2.3
(Na+K)−ATPase	2.8± 0.8	2.7± 0.7
Adenylate kinase	———	———
ATP+AMP→2ADP	39.1± 8.8	41.1±16.0
2ADP→ATP+AMP	26.8± 4.7	28.2± 9.1

酵素活性：mμ moles/min/mg protein (at 37℃)

表2　Myotonic dystrophy症および対照の血漿の酵素活性値

	Control(n=6)	Myotonic(n=5)
Creatine kinase	11.6± 5.4	37.0±27.5
Adenylate kinase	42.5± 9.1	89.8±29.2※

酵素活性：mμ moles/min/ml of plasma (at 37℃)
※$p<0.05$

Duchenne dystrophy 症の赤血球膜では，ATPase の活性に対照群と差はなく，0.1mM ouabain によっても対照群と等しく抑制されていた (表3)．Duchenne dystrophy 症の血漿の adenylate kinase は対照群より高値を示す症例もあったが，平均値として統計学的有意差(t−test)は認めなかった．また creatine kinase の活性値と adenylate kinase の活性値との間に全く相関関係は認められなかった(表4)．血漿の creatine kinase と pyruvate kinase は密接な相関を示した．

表3　Duchenne dystrophy症および対照の赤血球膜の酵素活性値

	Control(n=5)	Duchenne(n=5)
Total ATPase	10.9± 2.3	11.2± 1.2
(Na+K)ATPase	2.0± 0.5	2.3± 0.7
Adenylate kinase	———	———
(2ADP→ATP+AMP)	27.7± 4.9	25.7± 6.2

酵素活性：mμ moles/min/mg protein (at 37℃)

表4　Duchenne dystrophy症および対照の血漿中の adenylate kinase と creatine kinase の活性値

	CPK	AK
Duchenne		
case 1)	1871.6	70.0
case 2)	68.6	227.6
case 3)	1166.7	70.1
case 4)	2722.4	115.0
case 5)	425.4	98.0
	1250.7±1076.3	116.2±65.2※
Control(n=6)	31.4± 7.3	64.5±36.0

酵素活性：mμ moles/min/ ml of plasma (at 37℃)
※not significantly different from control values.

考　　察

Myotonic dystrophy 症の赤血球膜の Na+K−ATPase に関して，Brown ら[1] の結

果では0.1mM ouabainによって活性が増加している．Dobosz[2]は正常対照と比べて0.1 mM ouabainによる抑制が少ないと報告している．さらに最近，Mishraら[3]はMg-ATPaseには差はないが1 mM ouabainによって抑制されるATPase（すなわちNa+K−ATPase）は対照群より高いと報告している．私共の結果は，Mg-ATPaseにも，0.1 mM ouabainによって抑制されるATPaseにも対照群と差を認めなかった．このような，それぞれ異なった結果の原因は不明である．Mishraら[3]は1 mM ouabainを用いている．私共の経験からは，赤血球膜の酵素活性の比較の上では，膜の調製法の差異よりも，膜の調製や酵素活性の測定を対照群と同時に行うことの方が重要ではないかと考えられる．私共は，myotonic dystrophy患者群と同一施設に入院中の同年齢対照群から，同日の同時刻ごろ採血し，赤血球膜の調製や酵素活性の測定もすべて同時に行った．他の報告が，このような条件を整えて行われたか否かは明記されていない．赤血球膜の，adenylate kinaseは私共の結果ではNa+K−ATPaseよりも10倍以上高い活性が得られた．赤血球においてadenylate kinaseは膜結合性（membrane−bound）の酵素とは必ずしも考えられていない．しかし，私共の使用した膜は白色であり，少なくともヘモグロビンは完全に除かれた膜である．この赤血球膜を0.1mM EDTAでさらに洗浄すると（spectrinは著減し，actinは殆ど除かれるが）adenylate kinaseの活性も約2分の1になった．したがってadenylate kinaseは比較的looseに膜結合していることは事実であると思われ，膜の調製法によってspecific activityは異なって来ると考えられる．しかし，myotonic dystrophy症と対照との間には有意差はなかった．Myotonic dystrophy症の血漿ではadenylate kinaseの活性が対照と比べて，やや高いと思われる症例があったが，対照群と差がない症例の方が多く，診断的価値はないように思われる．

Duchenne dystrophy症の赤血球膜のATPaseについても異論が多いが，今回のcoupled enzyme assayによるADPの生成の測定法においても対照群と差は認められず，0.1 mM ouabainによって等しく抑制された．これは遊離した無機燐（Pi）の測定法による私共の結果[10]と一致していた．Duchenne dystrophyの血漿中のadenylate kinaseの値は，対照群よりやや高いと思われる症例もあったが，平均値として有意差はなかった．さらにCPKの値とadenylate kinaseの値の間に全く相関は認められず，血漿のCPKとpyruvate kinaseの値が密接に相関していたのと対照的であった．これらのことは，Duchenne dystrophy症における病態を考える上で考慮に価するものではないかと思われる．

文　献

1) Brown, H.D., Chattopadhyay, S.K., et al.: Erythrocyte abnormality in human myopathy. Science, 157：1577, 1967.
2) Dobosz, I.N.,: Erythrocyte ghost(Na+K) ATPase activity in Duchenne's dystrophy and myotonia. J. Neurol., 214：61, 1976.
3) Mishra, S.K., Hobson, M. & Desaih, D.: Erythrocyte membrane abnormalities in human myotonic dystrophy. J. Neurol. Sci., 46：333, 1980.
4) Ruitenbeek, W.: Membrane-bound enzyme of erythrocytes in human muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 41：71, 1979.
5) Luthra, M.G., Stern, L.Z., & Kim, D.H.: (Ca^{++}+Mg^{++})-ATPase of red cells in Duchenne and myotonic dystrophy. Neurology (Minneap.), 29：835, 1979.
6) Roses, A.D., & Appel, S.H.：Protein kinase activity in erythrocyte ghosts of patients with myotonic dystrophy. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 70：1855,

1973.
7) Vickers, J.D., McComas, A.J. & Rathbone, M.P. : Myotonic muscual dystrophy: Abnormal temperature response of membrane phosphorylation in erythrocyte membranes. Neurology(Minneap.), 29 : 791, 1979.
8) Solomons, C.C., Ringel, S.P., et al.: Abnormal adenine metabolism of erythrocytes in Duchenne and myotonic dystrophy. Nature, 268 : 55, 1977.
9) Muller, M.M., Kuzmits, R., et al.: Purine metabolism of erythrocytes in myotonic dystrophy. J. Neurol., 223 : 59, 1980.
10) Mawatari, S., Igisu, H., Kuroiwa, Y., et al.: Na and K ATPase of erythrocyte membranes in Duchenne muscular dystrophy. Neurology(Minneap.), in press.

38) 緊張性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について

黒　岩　義五郎*

研究協力者　伊規須　英　輝*　安　徳　恭　演***
馬　渡　志　郎**　後　藤　幾　生*

はじめに

緊張性筋ジストロフィー症 (MyD) においては，種々の赤血球膜の異常が報告されている．しかし，膜のどこに異常があるのか必ずしも明らかでなく，又，報告された異常のほとんどすべてに対して反論がある．

今回，我々はアセチルコリンエステラーゼ (AchE) を指標として，MyD における赤血球膜の性質を検討した．AchE を指標として用いたのは本酵素が次のような特徴をもつためである．すなわち，(1) AchE は赤血球において膜のみに存在する．このため ghost だけでなく，hemolysate のままでも活性測定が可能である．(2)しかも，膜の外側に局在することが確立されている．(3)特にヒト赤血球において活性が高い．

対象と方法

MyD 患者および対照は全例同一施設に 6 カ月以上入院中で，MyD 患者と年齢，性を一致させた軽症の肺結核患者を対照とした．実験 1 (hemolysate に関する検討) と実験 2 (ghost に関する検討) はそれぞれ別日に行ったが，各実験においては，MyD 患者と対照から同一日のほぼ同一時刻に採血し，同時に検体処理を行った．

採血はヘパリン入り真空採血管を用いて行った．血液は採血後ただちに氷中に置き，2 時間後より処理を開始した．実験 1 では，血漿と buffy coat を除いた後，赤血球を生理食塩水で 2 回，0.1M リン酸緩衝液，pH7.4で 1 回洗い，ヘモグロビン濃度が 4 g/dl となるよう同緩衝液中に赤血球を浮遊させ，−80℃に保存した．なお，この検体は使用に際し解凍すると完全な溶血が認められた．実験 2 では，血漿と buffy coat を除いた後，赤血球を生理食塩水で 3 回洗い，10容の10mM tris-HCl, pH7.4で溶血させ，20,000g で20分間遠心し，膜を得た．この膜をさらに同緩衝液で 5 回洗い，ghost を得，−30℃に保存し，1 週間以内に使用した．使用前日に解凍し，10mM tris-HCl, pH7.4で蛋白濃度を 2 mg/ml となるように調整し，氷中に一晩おいた．

AchE 活性は既報[1] のように，Ellman ら[2] の方法にほぼ従って行った．ただし，今回は ghost の使用量は10μl とした．AchE 活性測定においても，MyD と対照を同時に測定した．Arrhenius plot, NaF による活性抑制についての Hill plot は既報[1] の如く行い，各例のグラフより，transition temperature, 活性化エネルギー，Hill 係数，$K_{0.5}$ (活性の50%抑制に要する NaF 量) を求めた．

結　　果

実験 1 (hemolysate) においては 7 から41℃，実験 2 (ghost) においては25から41℃の範囲で AchE 活性を測定したが，この温度範囲で，実験 1，2 いずれにおいても，MyD

＊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
＊＊＊国立赤坂療養所神経内科

表1　赤血球AchEのtransition temperature（Tc）と活性化エネルギー（平均±SD）

	患　者	対　照
実験1(hemolysate)		
N	6(男4, 女2)	6(男4, 女2)
年令	47.0±11.4	47.5±10.5
Tc(℃)	23.0± 2.2	24.4± 1.5
活性化エネルギー (cal/mol)		
Tc以下	5.02±0.47	4.70±0.23
Tc以上	2.43±0.26	2.34±0.20
実験2(ghost)		
N	5(男4, 女1)	5(男4, 女1)
年令	40.0± 9.7	40.8±12.1
活性化エネルギー (25−41℃)	2.19±0.22	2.24±0.44

と対照の間に活性値の有意な差を認めなかった．実験1において，Arrhenius plotにおけるtransition temperature (Tc) およびTcの上又は下の温度域における活性化エネルギーについてMyDと対照の間に差を認めなかった．実験2でも，MyDと対照間に活性化エネルギーに有意差を見出し得なかった（表1）．13, 25, 37℃におけるNaFの影響についてみると，いずれの温度においても，MyD，対照共にdose-response curveはhyperbolicで，Hill係数はほぼ1であった．ただし，$K_{0.5}$は各温度間で明らかに異なった．しかし，MyDと対照の間に差を認めなかった（表2）．

考　　案

MyDの赤血球膜に関しては，流動性，脂質構成，ATPase, protein kinaseなどについての異常が報告されている．しかし，その「異常」の内容は必ずしも一致しておらず，異常そのものを認めなかったとの報告もある．これらの成績の不一致の原因は明らかでない．しかし，赤血球膜標品作製法のちがいによって膜の性質が大きく異なること[3]，年齢[4]，食餌[5]などが赤血球の性質に影響を及ぼすことなどが示されており，これらが上記の矛盾をもたらした可能性も考えられる．

表2　赤血球AchEに及ぼすNaFの影響（平均±SD）

		患　者	対　照
N		6(男4, 女2)	6(男4, 女2)
年令		47.0±11.4	47.5±10.5
13℃	Hill係数	0.93±0.08	1.04±0.15
	$K_{0.5}$	0.28±0.03	0.29±0.05
25℃	Hill係数	0.98±0.06	1.02±0.05
	$K_{0.5}$	0.81±0.07	0.81±0.07
37℃	Hill係数	0.96±0.11	1.04±0.07
	$K_{0.5}$	2.15±0.25	2.09±0.15

そこで，我々は，同一施設に長期間入院しているMyD患者と，性・年齢をマッチさせた対照患者から同一日のほぼ同一時刻に検体を採取し，同時に検体の処理を行った．さらに，ghostだけでなくhemolysateについても検討した（hemolysateはghostに比較すると，はるかに簡単な操作で得ることができ，従って，標品作製操作に起因する膜の性質の差が小さいと考えられる）．

その結果，かなり広い温度範囲におけるAchE活性について，ghost, hemolysateいずれにおいても，MyDと対照の間に有意差を認めなかった．また，transition temperature (Tc)，活性化エネルギー，更にNaFに対する反応についてもMyDと対照間に差を見出し得なかった．Arrhenius plotにおけるTcの意義は必ずしも明確ではないが，酵素周囲の脂質の相転移に影響されると考えられている．また，活性化エネルギー，AchEのNaFに対する反応（特にHill係数）も膜の性質を反映するものと考えられている．

これらのことから，今回の我々の成績は，MyDの赤血球膜において，少なくともAchE

又はその環境に著しい異常はないことを示すものと考えられる。

文　献

1) Igisu, H., Mawatari, S., Kuroiwa, Y., et al.: Erythrocyte acetylcholinesterase in Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta, 105 : 241, 1980.
2) Ellman, G.L., Courtney, K.D., Anders, V., et al.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., 7 : 88, 1961.
3) Hanahan, D.J. & Ekholm, J.E.: The expression of optimum ATPase activities in human erythrocytes: A comparison of different lytic procedures. Arch. Biochem. Biophys., 187 : 170, 1978.
4) Igisu, H., Mawatari, S. & Kuroiwa, Y.: Erythrocyte ATP in Duchenne dystrophy: Effects of ouabain and propranolol. Neurology (Minneap.), 29 : 992, 1979.
5) Farquhar, J.W. & Ahrens, E.H.: Effects of dietary fats on human erythrocyte fatty acid patterns. J. Clin. Invest., 42 : 675, 1963.

39) 福山型先天性筋ジストロフィー症の血清と髄液における免疫グロブリンとimmune complex

近藤　喜代太郎*

研究協力者　文田明仙*　豊島　至*
石川和弘*　原口道比古**

はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー症は，単劣性の遺伝性疾患と考えられているが，髄膜炎や脳回の形成異常がほぼ全例に見られることから，胎内感染が成因に関与する可能性が示唆されている．また，本症の血清で免疫グロブリンが高値を示す成績もある．そこで我々は，本症における胎内感染の可能性について，臨床免疫学の立場から，血清，髄液の免疫グロブリンと免疫複合体に関する検討を行ったので報告する．

対象及び方法

6カ月から16歳までの本症14例を対象として，つぎの点を検索した．

1）**血清の免疫グロブリン量**：免疫拡散法で14例のIgG, IgA, IgMを定量した．

2）**血清の免疫複合体**：水谷ら[1]のRaji細胞のC3 receptorを利用したenzyme immunoassay法によって測定した．本反応は，患者血清内の補体が反応に用いられるので，血清は－70℃に保存し，採取後3カ月以内に使用した．

3）**髄液の単クローン性免疫グロブリン**：本症2例，多発性硬化症1例，正常対照者1例の髄液を検索した．髄液をAmicon B-15で5倍に濃縮し，6％ポリアクリルアミドゲルを支持体とした等電点電気泳動を行い，銀染色で蛋白染色した．

結　果

1）**血清の免疫グロブリン量**：各免疫グロブリンの量を表に示し，健康小児における正常値[2]の2 s. d. を超えた異常な高値に＊印を付した．IgGは15歳の1例で，やや高い値を示すのみで，他の全例は正常範囲内であった．IgAは，4歳の例でやや高値，14歳と16歳の各1例で明らかな高値を示したが，乳幼児例では正常であった．IgMは全例で正常範囲に含まれていた．

2）**血清の免疫複合体**：測定結果を表に示し，20μg AHG Eq/ml (AHG : aggregated human IgG) 以下の正常値を超える値に＊印を付した．14例中5例で軽度高値を示した．

3）**髄液の単クローン性の免疫グロブリン**：図に示す如く，多発性硬化症の髄液では，単クローン性の免疫グロブリンが認められたが，本症及び正常対照者の髄液では陰性であった．

考　案

福山型先天性筋ジストロフィー症の成因については，福山の原著[3]で，常染色体劣性遺伝であろうと指摘されている．また瀬川[4]によると，34％の家系に血族結婚がみられ，さらに，大澤[5]は，患者の近交係数が，一般人口のそれに比べて10倍以上であること，及び，近

＊新潟大学脳研究所神経内科
＊＊新潟大学医学部第二内科

表　福山型先天性筋ジストロフィー症の血清免疫グロブリンとimmune complex

	Ig G mg/dl	Ig A mg/dl	Ig M mg/dl	I.C. μg AHG Eq/m
6M	490	27	94	31*
10M	310	28	56	5
15M	520	28	95	17
2Y	860	50	113	18
4Y	760	270*	56	7
5Y	800	210	56	10
6Y	660	180	72	11
13Y	1230	230	133	10
14Y	2260*	210	95	24*
14Y	800	560*	95	16
14Y	1545	280	179	22*
15Y	1545	390	113	1
16Y	920	1100*	95	27*
16Y	1700	450	120	28*

I.C: Immune Complex

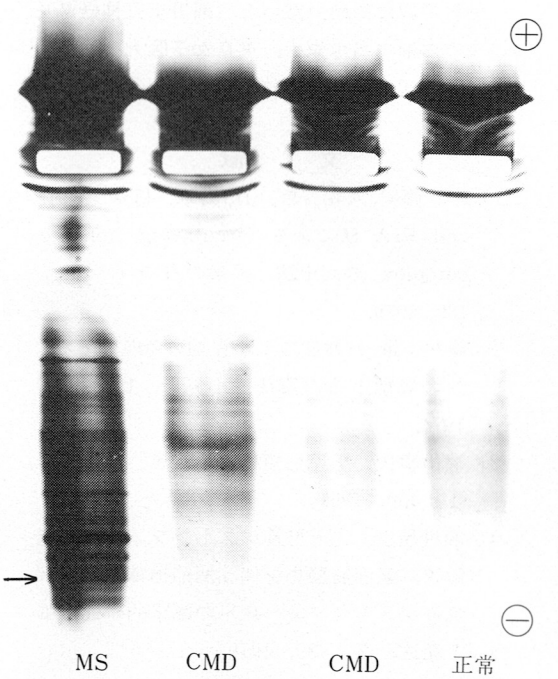


図　髄液の等電点電気泳動
MS　：多発性硬化症
CMD：福山型先天性筋ジストロフィー症
矢印は単クローン性免疫グロブリンを示す．

親婚群と非近親婚群との間に分離比に差はなく，いずれも常染色劣性遺伝の場合の分離比25%に近いことを証明している．これらの事実は，本症が単劣性の遺伝性疾患である事を示す，かなり明確な遺伝分析であると思われる．

しかし，鴨下[6]は本症の中枢神経病理所見で，本症の脳回の形成異常が，先天性cytomegalovirusやtoxoplasma感染による小多脳回に近いこと，及び，脳軟膜の肥厚あるいは細胞浸潤など慢性髄膜炎を思わせる所見がみられることから，本症の成因として，胎内感染の可能性を挙げている．また，三宅ら[7]は，本症の重症例で，中枢神経系と骨格筋に強い炎症性の病理所見を認め，血清IgM, IgGが上昇していたことから，胎内感染の可能性を強調している．

本症では，風疹，herpes simplex, cytomegalovirus, toxoplasma, mycoplasmaの抗体価は上昇しておらず[5)8)]，特定のagentによる感染の証拠は未だ見出されてはいないが，血清IgMが高値とする成績[8)9)]が報告されている．しかし，今回の成績によれば，一部の例でIgG，IgAが高値を示したにすぎず，また，若年例に異常が著しいという成績ではなかった．血清中の免疫複合体に関しても，14例中5例で軽度の高値を示すのみであり，髄液の電気泳動の所見を含めて，これらの方法及び成績からは，本症における慢性持続性感染を示唆する明確な証拠は得られなかった．しかし，胎児期における急性の病原消滅型感染は否定されておらず，本症の成因を胎内感染に求めた場合，新生児及び乳児の早期における免疫学的検索が，今後の課題になると思われる．

試料採取に御助力戴いた，瀬川小児神経クリニックの瀬川昌也先生，東京女子医大小児科の大澤真木子先生に感謝致します．

文　献

1）水谷修紀，八森　啓，山田秀雄，ほか：Raji cell EIA 法による circulating immune complex の測定法．医学のあゆみ，109：189，1979．

2）藤井　肇，臼井朋包：小児期の免疫グロブリンの動態とその臨床．小児科，15：263，1974．

3）福山幸夫：小児科領域の筋疾患．臨床神経，1：409，1961．

4）瀬川昌也：先天型筋ジストロフィー（知能障害，顔面筋罹患を伴う関節拘縮型・先天性筋ジストロフィー症）の臨床的研究．脳と発達，2：439，1970．

5）大澤真木子：先天型進行性筋ジストロフィー症（福山型）の遺伝学的ならびに疫学的研究．東京女子医科大学雑誌，48：112，1978．

6）鴨下重彦：先天型筋ジストロフィー（福山型）の成因．日本臨床，35：3929，1977．

7）三宅捷太，後藤彰子，土田昌宏，ほか：水頭症と後頭部皮膚洞を伴った先天性筋ジストロフィー症の1剖検例．脳と発達，9：212，1977．

8）文田明仙，登木口進：福山型 congenital muscular dystrophy における CT と mycoplasma 感染の可能性について．神経内科，9：49，1978．

9）林　栄治，北野正二郎，鬼塚黎子：DMP 患児における血清免疫グロブリン（IgG, IgA, IgM, IgE）のレベルについて．筋ジストロフィー症の臨床病態および疫学的研究．昭和53年度研究成果報告書・祖父江班々会議抄録，1979，p.210．

40) ヒト胎盤からの神経成長促進因子の分離

林　　恭　三*

研究協力者　古　川　昭　栄**

緒　　言

神経成長促進因子（nerve growth factor, 以下NGFと略す）は交感神経節および知覚神経節神経細胞の分化，成長に必須の因子であり，特に交感神経系神経細胞は胎生期以後も栄養因子としてNGFを必要とする．生理的意義はいまだ不明であるが培養骨格筋細胞がNGF分子を産生するという報告[1]が成されている．

著者らはすでに筋ジストロフィー症マウスの顎下腺[2)3)]，後肢筋肉中[4)5)]のNGF活性およびNGF様免疫交叉活性（NGF-like immunoreactivity, NGF-LI）レベルが正常マウスより低下していることを明らかにした．今回，ヒトの筋ジストロフィー症とNGFの関連性を検討するためヒトNGFの微量定量法の確立を目的として，1)ヒト胎盤よりNGFの分離精製，2)ヒト血清中のNGF分子の存在形態の検討を試みた．

方　　法

ヒト胎盤NGFの分離精製：凍結保存したヒト胎盤を冷生理食塩水でよく洗浄し，充分脱血したのち細断し，さらに冷生理食塩水で洗浄する．冷水中でWaring blenderにより破砕（20% w/v）し，10N NaOHでpH13に調整したのち再破砕する．30,000gで10分間遠心し，上清を酢酸でpH3.8とする．生じる沈でん物を30,000gで30分間遠心して除く．次に上清を4 N NaOHでpH5.0に調整し，30,000gで5分間遠心したのち水に対して一夜透析する．透析後の上清を20,000gで10分間遠心し，順次1)CM 52 cellulose カラム，2)CM52cellulose カラム（再クロマト），3)Sephacryl S-300カラムによるクロマトグラフィーを行った．Sephacryl S-300カラムクロマトグラフィーで得られたNGF活性画分は酸性条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動で解離するサブユニット構造が存在することが判明したのでさらにpH2.3での調製用ディスクゲル電気泳動によりNGF活性をもつサブユニットの分離を行った．

NGF活性の測定法：8日ニワトリ胚知覚神経節（dorsal root ganglia）をニワトリ血漿，トロンビンを含むEagle's MEM medium，NGF試料の等容量medium中で37℃，24時間～72時間培養した．神経節周囲から伸びる神経線維の主として密度を判定基準としてNGF活性を評価した．

マウスβNGF固相ラジオイムノアッセイ（RIA）：ウサギに対して免疫し，調製したマウス顎下腺βNGF抗血清をマウス7S NGF-Sepharose 4Bカラムに通し，Stoeckelらの方法[6]に従ってマウスβNGF特異抗体を精製した．抗体をポリスチレンチューブに被覆し，順次1)NGFを含む試料（24時間インキュベート），2)試料を除き洗浄，3)^{125}I βNGFを加える（18時間インキュベート），4)^{125}I βNGF液を除き洗浄後チューブに残った^{125}I放射活性を測定した．

結果と考察

ヒト胎盤NGFの分離精製：方法で述べた

＊京都大学薬学部生物化学講座

＊＊国立武蔵療養所神経センター

ごとく胎盤からNGFの抽出操作を行ったのち，透析後の遠心上清を0.05M sodium acetate buffer, pH5.0で緩衝化したCM52 cellulose カラムに通し，同じbufferでよくカラムを洗浄したのち0.25M, 1.0M NaClを含む同じbufferで順次stepwiseに溶出した．ほとんどのNGF活性は0.25M NaCl溶出画分に見出されたのでこの画分を圧力透析で濃縮し，0.05M sodium acetate bufferに対して透析した．同じbufferで緩衝化した新たなCM 52 cellulose カラムに透析試料を通し，同bufferでカラムを洗浄後，同緩衝液と1.0 M NaClを含む同緩衝液とによる塩濃度勾配溶出を行った．その結果を図1 Aに示す．斜線部の画分が最も高い希釈度でNGF活性陽性を示したので集めて濃縮し，Sephacryl S-300カラムによるゲル濾過を行った（図1 B)．溶出は0.1M NaClを含む0.05M sodium phosphate buffer pH7.2で行い，斜線部に最も強いNGF活性を認めた．以上3種のカラムクロマトグラフィーによって得られた標品は分子量約160,000のタンパク質であり，pH7.5でのポリアクリルアミドゲル電気泳動でほぼ単一なバンドを示したがpH2.3での同電気泳動ではいくつかのバンドに解離した．そこでpH2.3での電気泳動後ゲルをスライスし，タンパク質を抽出したのちマウスβNGF特異抗体を用いた固相RIA法によりマウスβNGFとの免疫学的交叉活性を調べた．図2にその結果を示すがゲル電気泳動像は上がマウスβNGF，下がヒト胎盤Sephacryl S-300画分である．免疫学的交叉活性はゲル上端とゲル内のバンドとにみられ，ゲル内へ泳動された免疫交叉活性をもつバンドはマウスβNGF様のサブユニットと考えられた．そこでpH2.3での調製用ディスクゲル電気泳動によりサブユニットの分離を行った．溶出パターンは図1 Cに示す．斜線部を圧力透析により濃縮した．この調製用ディスク画分はpH2.3でのポリアクリルアミドゲル電

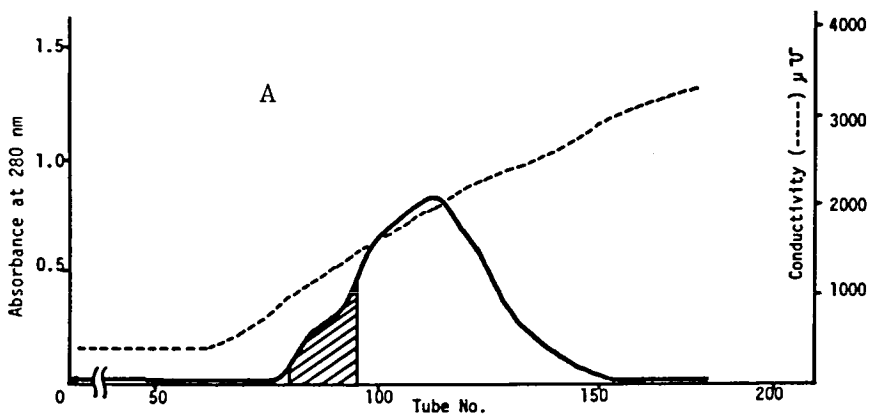


図1 A：Rechromatography of the fraction with NGF activity obtained by CM 52 cellulose chromatography on a colum of CM 52 cellulose. A solution of 650 mg of the fraction with NGF activity obtained by CM 52 cellulose chromatography was applied to a column (2.0×20cm) of CM 52 cellulose equilibrated with 0.05M sodium acetate buffer pH 5.0. The column was eluted by the gradient (———). Fractions of 10ml each were collected at a flow rate of 50ml/hr. The fractions indicated by the shaded area were pooled and concentrated.

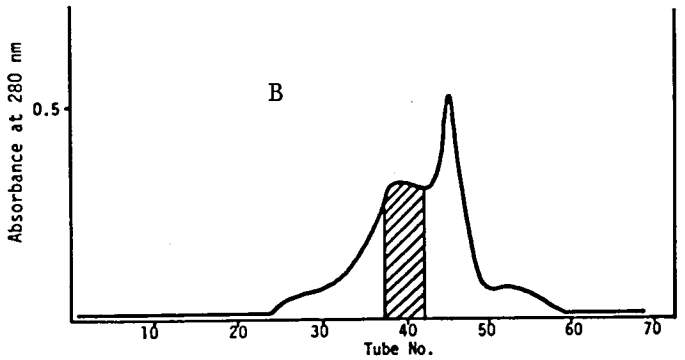


図 I B : Gel filtration of the NGF fraction obtained by CM 52 cellulose re-chromatography on a Sephacryl S-300 column. A solution of the concentrated fraction with NGF activity obtained by CM 52 cellulose was applied to a column (2.5×110cm) of Sephacryl S-300 equilibrated with 0.05M sodium phosphate buffer, pH 7.2 containing 0.1M NaCl and eluted with the same buffer at 20ml/hr. Fractions of 2ml each were collected and the eluate monitored at 280 nm. The fractions represented by the shaded area were pooled and concentrated.

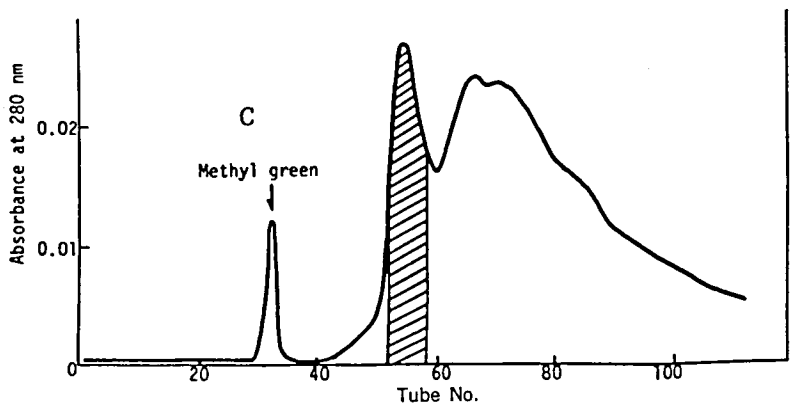


図 I C : Preparative polyacrylamide disc gel electrophoresis of the fraction with NGF activity obtained by Sephacryl S-300 gel filtration. A solution of the concentrated fraction with NGF activity obtained by Sephacryl S-300 gel filtration was applied to the disc gel. Electrophoresis was performed using tris-glycine buffer system at 20mA. Fractions of 10ml each were collected at a flow rate of 100 ml/hr. The fractions indicated by the shaded area were pooled and concentrated.

気泳動で単一バンドを示した．以降この画分をヒト胎盤 NGF と呼ぶ．以上の精製をまとめたのが**表 1** である．

以上のような方法で著者らが得たヒト胎盤

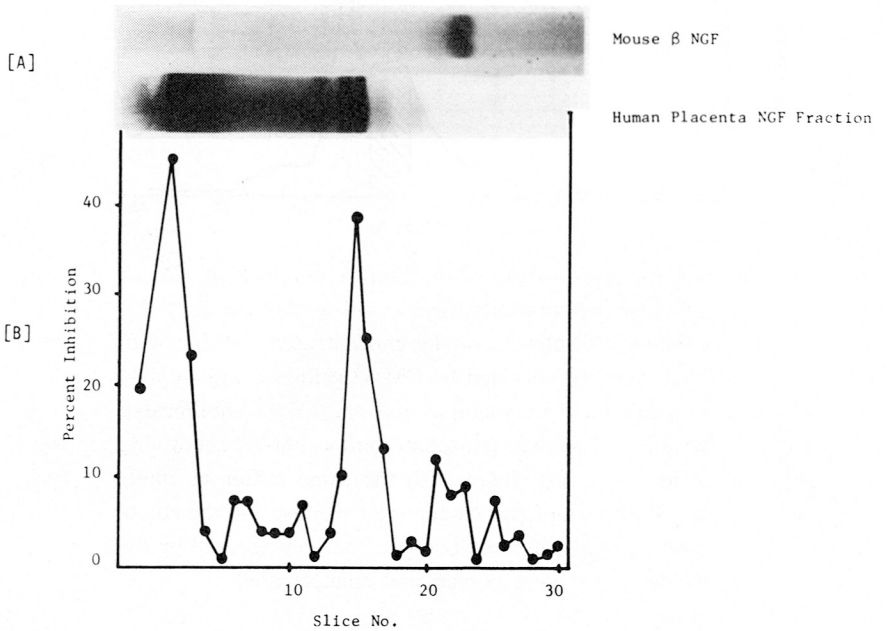


図 2　Distribution of the NGF-like immunoreactivity of the fraction obtained by Sephacryl S-300 gel filtration in the gel after polyacrylamide disc gel electrophoresis at pH 2.3.

表 1　Summary of the purification of human placenta NGF

	Yield (mg protein)	Amount required for maximum response (μg protein/ml)
Supernatant at 30,000g at pH 5.0	2,500	1,000-3,000
First CM52 cellulose fraction	713	60-600
Second CM52 cellulose fraction	49.6	0.05-0.5
Sephacryl S-300 fraction	9.9	0.01-0.3
Preparative disc gel fraction	1.2	0.005-0.01

NGFはいくつかの点でマウス顎下腺βNGFやGoldsteinら[7]が報告したヒト胎盤βNGFとは異なっている．分子量はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で約70,000であり，マウスβNGFの13,500，およびヒト胎盤βNGFの15,000よりはかなり分子量が大きい．また等電点は約pH5.0でありマウスβNGFが塩基性タンパクであることと著しい相違がある．一方，著者らが得た胎盤NGFの生物活性は約10ng/mlで最大の神経線維増生活性を示しマウスβNGFと同程度であったが神経線維の増生密度はマウスβNGFより低かった．

以上の結果より著者らが得た胎盤NGFは①マウスβNGF抗体と部分的に免疫交叉性を示す．②知覚神経節に対し神経線維増生活性が認められる．これらの点でマウスβNGF類似の構造を分子内にもつものと推定しているが，最大の神経線維増生密度がマウスβNGFより低いこと，分子量が大きいことなどから活性型NGFの前駆体である可能性もあると考えている．現在，さらにタンパク化学的検討を加えるとともにウサギに対して免疫し，特異抗体を調製中である．RIA系が確立すればヒト筋ジストロフィー症患者血清中のNGFレベルを測定し，本症とNGFとの関連性を調べる予定である．

ヒト血清中のNGF分子の存在形態：ヒト血清中にはNGF様物質が存在することはすでに神経節培養法で確認されているが微量であるためいまだ正確な濃度，分子量等は不明である．RIA系を開発し，ヒトNGFの定量法を確立するためには血清中のNGF分子の性質を知る必要がある．著者らはマウスβNGFとヒトNGFが部分的に免疫学的交叉性を示すことを利用し，すでに開発したマウスβNGFの固相RIA系を用い，ヒト血清中のNGFがどのような存在形態をもつかを調べた．

最も重要な問題は血清中にα_2 macroglobulinと推定されるNGF結合物質が存在することである．図3に示すようにヒト血清と^{125}Iマウスβ NGFをあらかじめインキュベートしてゲル濾過すると高分子量領域に^{125}I βNGFとは異なる放射活性が溶出される．著者らは^{125}I βNGFを結合する物質が内因性のヒト血中NGF分子を結合してい

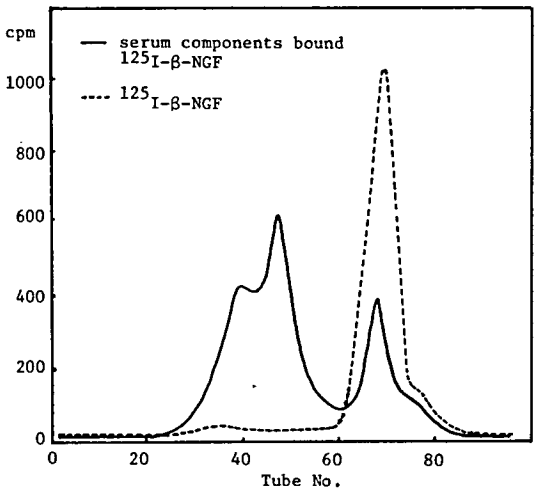
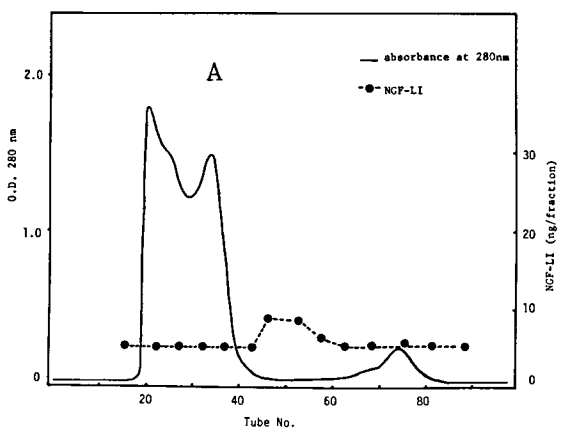


図3 Elution patterns of [^{125}I] β NGF in the presence or absence of human sera on a column of Sepharose CL-6B. Normal human serum (320 μl) was mixed with [^{125}I] β NGF (12,000 cpm) and incubated for several hr at room temperature. The incubation mixture was then applied to a column of Sepharose CL-6B (0.5×105 cm) equilibrated with 0.05M phosphate buffer, pH 6.8, and eluted by the same buffer. In a separate experiment, 400 μl of 0.05M phosphate buffer, pH 6.8, containing 0.5% bovine serum albumin and [^{125}I] β NGF (10,000 cpm) was applied to the same column equilibrated with 0.05M phosphate buffer, pH 6.8. Fractions of 1.2 ml each were collected. Solid line indicates the distribution of radioactivity in the presence of serum and dashed line indicates in the absence of serum.

るかどうかが重要と考え，いくつかの条件を検討した結果，pH10近傍条件下では^{125}I βNGFと高分子量結合物の相互作用が低いことを見出した．そこでヒト血清10mlを0.05 M Tris-HCl buffer pH7.4で緩衝化したSephadex G-150にてゲル濾過し溶出液を25 mlずつ集めて濃縮し，各画分ごとに固相RIAを行った(図4 A)．次に同量のヒト血清を0.05M Tris pH10に対して透析し，同条件に平衡化したSephadex G-150でゲル濾過した．同様に25mlずつ溶出液を濃縮し，固相RIAを行った（図4 B)．図4 Aで示すように中性条件では分子量30,000～50,000の領域にのみ単一ピークがみられたが，図4 Bに示すアルカリ条件下ではこのピークの他に分子量10,000～20,000の新たなピークが出現した．この新たなピークはα_2 macroglobulinと思われるNGF結合物質に結合されていた内因性NGFがアルカリ条件下で解離したものと考えられる．以上のごとくヒト血清NGFはかなりの割合で高分子量結合物質と結合した状態で存在することが強く示唆された．しかも結合状態のNGFは抗体との反応が低下することも示唆された．これらの事実はヒトNGFのRIA系を確立する上できわめて重要な知見と考えられる．



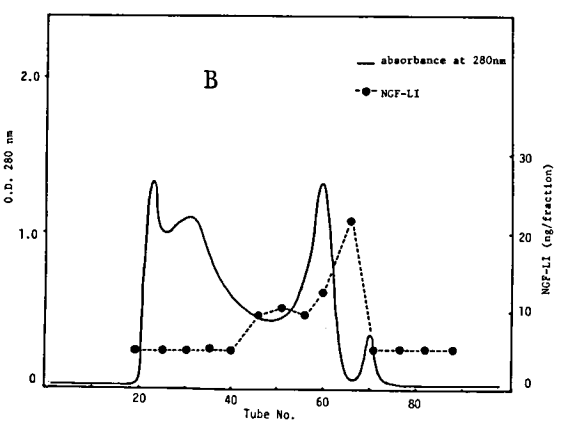


図4 A：Gel filtration of human serum on a column of Sephadex G-150 at neutral condition. Normal human serum (10 ml) was applied to a column of Sephadex G-150 (3.2 × 40 cm) equilibrated with 0.05M Tris-HCl buffer, pH7.4, and monitored at 280 nm (solid line). Fractions of 5 ml each were collected. Eluates (25 ml each) were pooled and concentrated to 1.0 ml by pressure dialysis. The concentrates were measured for the NGF-LI by solid-phase radioimmunoassay system (dashed line).

B：Gel filtration of human serum on a column of Sephadex G-150 at alkaline condition. Normal human serum (10 ml) was applied to a column of Sephadex G-150 (3.2 × 40 cm) equilibrated with 0.05M Tris, pH 10.3, and monitored at 280 nm (solid line). Fractions of 5 ml each were collected. Eluates (25 ml each) was pooled and concentrated to 1.0 ml by pressure dialysis. Each concentrate was measured for the NGF-LI by solid phase radioimmunoassay system (dashed line).

文　献

1) Murphy, R. A., Saide, J. D., Blanchard, M. H. & Young, M.: Molecular Properties of the Nerve Growth Factor Secreted in Mouse Saliva. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 2672, 1977.

2) Furukawa, S., Nishitani, H. & Hayashi, K.: Level of the Nerve Growth Factor Activity in the Submaxillary Glands of Genetically Dystrophic Mouse (C57BL/63). Biochem. Biophys. Res. Commun., 76: 1202, 1977.

3) 古川昭栄，西谷裕，林恭三：筋ジストロフィーマウス顎下腺中の神経成長促進因子（Nerve Growth Factor）の活性レベル．医学のあゆみ，109：143，1979.

4) Furukawa, S., Ohi, T., Imura, H. & Hayashi, K.: Level of Nerve Growth Factor-like Immunoreactivity in the Lower Limb Muscles of Muscular Dystrophic Mice. Biochem. Biophys. Res. Commun., 90: 130, 1979.

5) 古川昭栄，大井長和，井村裕夫，林恭三：ヒト胎盤中の神経成長促進因子（Nerve Growth Factor）様物質の存在．医学のあゆみ，110：594，1979.

6) Stoekel, K., Gagnon, C., Groff, G. & Thoenen, H.: Purification of Nerve Growth Factor Antibodies by Affinity Chromatography. J. Neurochem., 26: 1207, 1976.

7) Goldstein, L. D., Reynolds, C. P. & Perez-Polo, J. R.: Isolation of Human Nerve Growth Factor from Placental Tissue. Neurochem. Res., 3: 175, 1978.

8) Ronne, H., Anundi, H., Rask, L. & Peterson, P. A.: Nerve Growth Factor Binds to Serum Alpha-2-Macroglobulin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 87: 330, 1979.

41) 先天性ミオパチーとトリプトファン代謝異常

八木田　正　聖*

研究協力者　中平晴仁*　詫間通央*　平良　章*
亀山和人*　吉川　学*　吉田健三*
片山京子*　田村克也*　日下香苗*
川井尚臣*　三好和夫*

私たちは，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所見のあることを見出した[1]．その後，これと類縁のいくつかの特殊な先天性ミオパチーにも同経路上のそれぞれ異なった代謝障害所見のあることを知った[2)3)]．本文では，さらに新たに加えた，いわゆる Arthrogryposis multiplex congenita (AMC) と思われる2家系2症例に認めた同代謝異常所見についてのべ，併せて，これまでにえてきた成績を総括してのべる．

対象と方法

対象はいわゆる AMC 2家系2症例とその家系員である．また，種々の神経・筋疾患についても検索した．

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50kg以上は5 g)を経口負荷し，その後の24時間尿中の kynurenic acid (KA) と xanthurnic acid (XA) を Satoh - Price 法によって測定した．

成　　績

1．AMC に認めたトリプトファン代謝異常

1）症　例

症例1． M.T.　17歳　男性

主要所見は，多発性関節拘縮，脊柱側彎，四肢軀幹の筋萎縮と筋力低下．

両親に近親婚なく，家系内に類似症状を呈するものはない．胎生期母親に異常はなかったが，胎動は第36週と遅く，鉗子分娩．生下時，右斜頸，両側股関節脱臼と両膝・両手指関節の拘縮を認めた．処女歩行，3歳．以後，脊柱側彎が出現し，次第に高度となった．

17歳入院時，身長147.5cm，体重33kg．知能正常．高口蓋，翼状指，胸椎部の高度の側彎(Cobb 法で120°)，両側膝関節，手指関節の関節拘縮を認めた．全身性びまん性の筋萎縮と筋力低下を認めた．筋緊張は正常．上肢挙上，起立可能．歩行は跛行を行う．腱反射正常，病的反射なし．知覚障害なし．

CK 活性値9.6単位．筋電図異常所見なし．筋組織像は右腓腹筋生検組織で筋線維の軽度の萎縮と著明なタイプII線維優位を認めた．

症例2　Y.U.　14歳　女性

主要所見は脊柱側彎，多発性関節拘縮，四肢・軀幹筋の筋萎縮と筋力低下．

両親に近親婚なく，家系内に類似疾患なし．胎動正常．満期正常分娩．生後3カ月時，両側股関節脱臼に気付かれた．処女歩行は1歳2カ月．以後，脊柱側彎が出現，増強した．

14歳入院時，身長133.6cm，体重28kg．知能は正常．高口蓋，高度の胸椎右側彎 (Cobb

＊徳島大学医学部第一内科

法70°)，両側肘関節，両側股関節の拘縮，両側に尖足を認め，軀幹，四肢遠位に強い筋萎縮を認めた．上肢挙上は肩の高さまで可能．歩行は跛行を行う．

筋電図は筋原性変化を示した．筋組織像では，広背筋の生検組織像で筋線維の大小不同，間質の増殖，高度の脂肪浸潤を認め，タイプI線維優位とcore様の構築異常を認めた．

2）トリプトファン代謝

両例は尿中アミノ酸パターン正常．

図1，図2に，両例およびそれぞれの家系員のL—トリプトファン経口負荷後の，同代謝産物であるKA，XAの1日尿中排出量を示す．

健常対照におけるKA，XAの排出量はKA2.0～5.0，XA0.7～2.0μmoles/kg/dayであった．

症例1，T家では，病者はKA18.7，XA2.4とKAの著明な排出増加とXAの軽度の排出増加を認めた．このXAの排出増加はビタミンB_6の投与によっても正常化しなかった．また，一見健常なその母にKA10.8，XA1.3とKAの排出増加を認めた．父はKA4.5，XA1.0と正常値であった．

症例2，U家では，病者はKA11.7，XA2.7とやはりKAの排出増加とXAの軽度排出増加を認めた．母（一見健常）は未検索であるが，母方祖母（一見健常）はKA7.4，XA0.9とKAの排出増加を認めた．父（健常）はKA4.5，XA1.3μmoles/kg/dayと正常値であった．

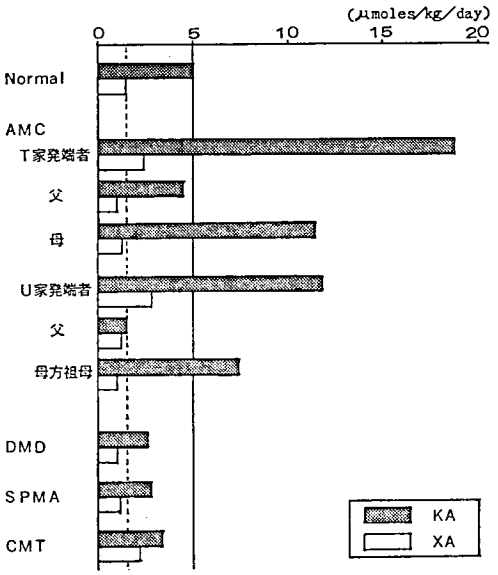
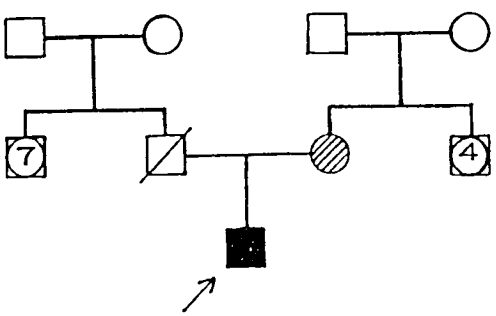


図1　AMCにおけるキヌレン酸（KA）・キサンツレン酸（XA）尿中排出量
（L—トリプトファン100mg／kg負荷）

T．家 家 系 図



U．家 家 系 図

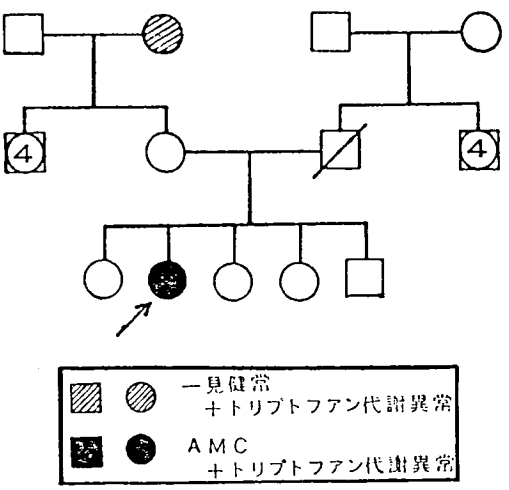


図2　AMCの2家系

3）AMCの総括

いわゆるAMCの症例の中に，L—トリプトファン負荷後，KAの著明な排出増加とXAの軽度増加を認める症例のあることを明らかにした．このKAとXAの排出パターンから，本症では同経路上の3-HAオキシゲナーゼの欠損ないし活性低下が推定される．

2．神経・筋疾患に認めたトリプトファン代謝異常の総括（図3）

(1) ネマリンミオパチー[1) 2) 3)]

本症の5家系の5病者では，トリプトファン負荷後，KA8.0～17.1，XA1.3～2.1とKAのみの著明な増加を認めた．また，5家系ともにそれぞれの母，そして1例では母方祖母においても，同様のKAの排出増加を認めた．父はともに正常値であった．

(2) 先天性筋線維タイプ不釣合[2) 3)]

本症の1家系2症例（息子とその父）において，KA10.0，9.3，XA3.7，2.2とKAの著明な増加とXAの軽度増加を認めた．このXAの増加はビタミンB_6の投与によっても正常化しなかった．

(3) AMC[5)]

前述の如くであるが，本症におけるKA，

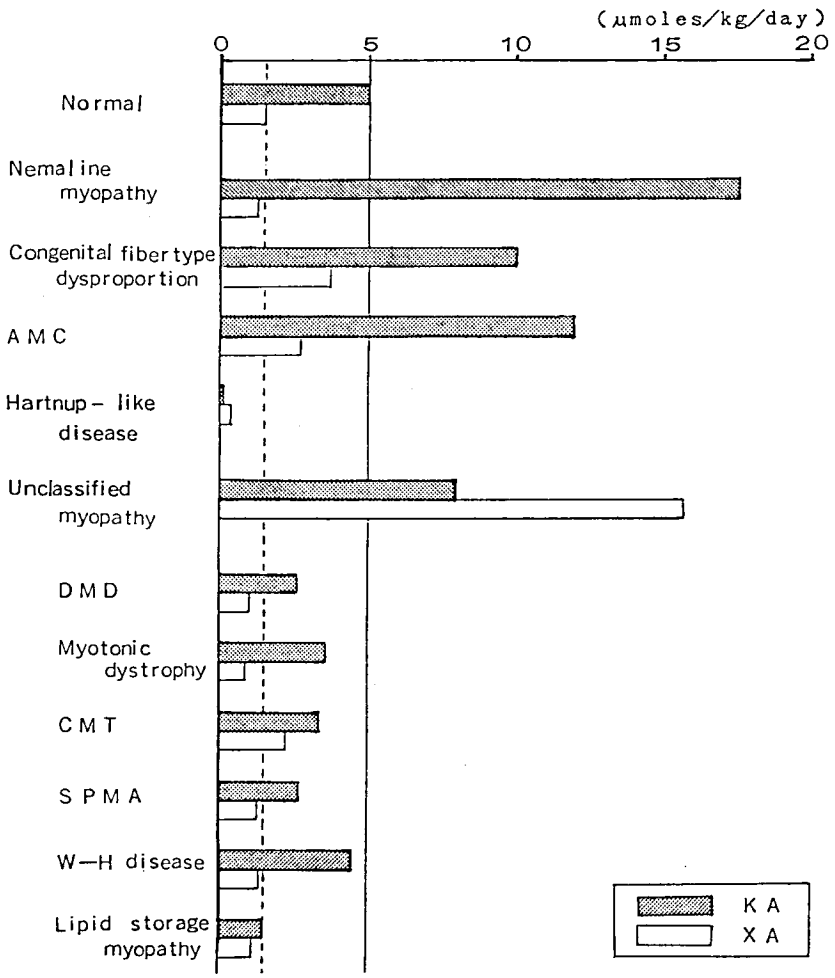


図3　神経・筋疾患におけるKA，XA尿中排出量
（L—トリプトファン100mg／kg負荷）

XA の排出パターンは，上記の先天性筋線維タイプ不釣合の場合とほぼ同じ所見であった．

(4) 所属不詳のミオパチー (type I 筋線維萎縮)[2) 3)]

幼少よりの全身性筋萎縮，筋のこわばり感，頭部挙上障害，高口蓋を認めた56歳男性例．本例では，KA10.7，XA22.8ととくに XA の著しい排出増加をみ，この XA は PALP の大量（300mg/day）投与により減少した．また，同様所見が娘にも認められた．

(5) Hartnup 類似症[2) 3) 4)]

知能障害，増悪と寛解を繰り返す小脳失調症，下肢筋萎縮，側彎症および尖足を認めた兄弟例．本症では，トリプトファン負荷後の KA0.1～1.0, XA0.2～0.7と KA, XA 両者の排出が異常低値であった．なお，両例とも，L—トリプトファンの吸収と尿中排泄は正常であった．また，近親の両親にも同様所見を認めた．

(6) その他の神経・筋疾患

DMD, myotonic dystrophy, CMT, W－H 病, SPMA などの諸疾患には代謝異常所見を認めなかった．

総括と結論

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所見のあることをはじめて明らかにし，発表した[1)]．この成績より出発して，本症と類縁のいくつかの先天性ミオパチーにも，それぞれ若干異なる同経路の代謝異常所見のあることを見出し，発表した[1)~5)]．

本文では，まず，いわゆる AMC 2 家系 2 病者に，L—トリプトファン経口負荷後24時間尿中に KA の著明な排出増加と XA の軽度増加があることを明らかにした．そして，この排出パターンは，すでに発表した congenital fiber type dysproportion における排出パターンと同じであることをのべた．また，両親では，1 例では母に，他の 1 例では母（未検索）の母に KA の著明な排出増加を認めた．

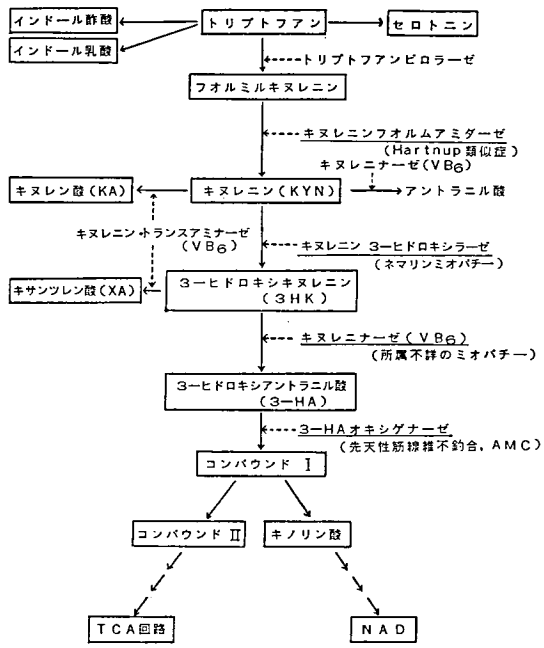


図4　トリプトファン代謝経路

現在までに検索した神経・筋疾患のうち，トリプトファン—キヌレニン経路の異常所見を認めたのは AMC を加え以下の 5 疾患に限られており，同経路上の障害部位を各疾患それぞれの KA，XA の排出パターンより，1．ネマリンミオパチーは Kynurenine－3－Hydroxylase 異常，X 染色体優性遺伝．2．先天性筋線維タイプ不釣合と AMC は 3－HA－oxygenase 異常，常染色体優性．3．所属不詳のミオパチーはキヌレニナーゼのビタミン B_6 依存症．4．Hartnup 類似の症例は formamidase 欠損ないし活性低下症，常染色体劣性，と推定した（図4）．

これらに対して DMD，CMT，W－H 病，SPMA などの諸疾患ではこの経路の代謝異常を思わせる所見は認められなかった．

すなわち，各種の神経・筋疾患のうち，トリプトファン—キヌレニン経路の代謝異常の存在が推定されるのは，現時点では，上記のいわゆる特殊な先天性ミオパチーに限られており，この経路の代謝異常はこれら疾患の本態と何らかの関連があると思われる．

著者らの成績は，これらの先天性ミオパチーに特異な代謝異常の存在が，他に知られているところがない点で貴重である．

文　献

1) 三好和夫，八木田正聖，詫間通央，中平晴仁，ほか：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，難病の発症機構に関する基礎的研究，昭和52年度研究業績，1978，p.241—245.

2) 八木田正聖，平良　章，中平晴仁，詫間通央，三好和夫，ほか：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，1979，p.196—200.

3) 三好和夫，八木田正聖，平良　章，中平晴仁，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.

4) 八木田正聖，平良　章，中平晴仁，吉田健三，三好和夫，ほか：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．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54年度研究報告書，1980，p.218—221.

5) 八木田正聖，中平晴仁，平良　章，三好和夫，ほか：Arthrogryposis multiplex congenita に認めたトリプトファン代謝異常．第25回日本人類遺伝学会総会，昭和55年11月，仙台.

42) 筋クレアチナーゼに関する二，三の問題

名　取　靖　郎*

研究協力者　　韓　　埈　杓*

最近，三好らはヒト筋肉中にクレアチンをザルコシンと尿素に分解するクレアチナーゼが存在することを報告し[1]，さらにDuchenne型筋ジストロフィーにおいては，このクレアチナーゼの反応速度論的性質に変化が起っていることを示唆した[2]．

本研究は三好らの報告を追試し，クレアチナーゼの性質について二，三の検討を加えたものである．

実験材料と実験方法

Non-myopathy患者より剖検時に骨格筋を採取し，5倍量の生理食塩水でポリトロンを用いホモジナイズしたものを18,000×g，30分遠心した上清を生理食塩水で平衡化したSephadex G-150カラム（2.5×50cm）でゲル濾過した．

クレアチナーゼ活性は基質であるクレアチンの減少で測定した．すなわち酵素液と基質とを0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液中，37℃で反応させ，30分後に残存するクレアチンの量をdiacetyl α-naphthol法で測定した．

実験成績

図1にSephadex G-150カラムによるクレアチナーゼ活性の溶出パターンを示した．2つの活性ピークが認められ，ひとつは分子量約50,000，もうひとつは分子量約25,000の位置に溶出した．

各フラクション（8 ml）に最終濃度5％になるようにトリクロロ酢酸を加えた後に遠心し，遠心上清のクレアチン含量を測定したところ，クレアチンはクレアチナーゼを含む高分子画分には見出されず，低分子画分のみに見出された．

考　　察

本実験では三好らの方法に従い，ヒト筋肉中にクレアチナーゼ活性の存在を認めた．しかしながらクレアチナーゼの分子量に関しては三好らの言う50,000のピークの他に分子量25,000のピークが見出された．分子量50,000のピークが25,000の二量体であるか否かは今後の検討が必要である．

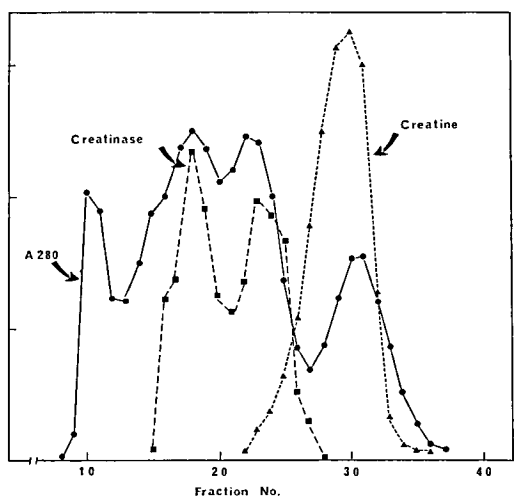


図1　Elution profile of A_{280}-absorbing material (proteins and low-molecular-weight substances), creatinase activity and creatine on Sephadex G-150 column (2.5×50cm) filtration. Eight ml fractions were collected.

＊徳島大学医学部栄養化学

また筋肉中に存在するクレアチンはゲル濾過の結果，低分子画分のみに見出され，筋組織中でたん白質と結合することなく遊離の状態で存在するものと考えられる．

文　献

1) Miyoshi, K., Taira, A., Yoshida, K., Tamura, K. & Uga, S.: Presence of creatinase and sarcosine dehydrogenase in human skeletal muscle — Proposal for creatine-urea pathway. Proc. Japan Acad., 56B : 95, 1980.

2) Miyoshi, K., Taira, A., Yoshida, K., Tamura, K. & Uga, S.: Abnormalities of creatinase in skeletal muscle of patients with Duchenne muscular dystrophy. Proc. Japan Acad., 56B : 99, 1980.

43) 筋ジストロフィー症骨格筋における クレアチン代謝の異常

三 好 和 夫*

研究協力者 平 良 章* 吉 田 健 三* 田 村 克 也*
三 橋 信 次* 宇 賀 茂 敏* 西 野 洋*
片 山 京 子* 今 井 幸 三* 伊 勢 浩*
川 井 尚 臣* 八木田 正 聖*

私たちは，筋ジストロフィー症の病因究明のために，本症におけるクレアチン代謝の異常に着目し，とくに，クレアチン分解経路の研究を行ってきた．

昭和53年度，昭和54年度において私たちは，成人骨格筋中に，creatinase 活性と sarcosine dehydrogenase 活性のあるとの所見から，creatine - glycine (urea) pathway のあることを提唱した．そして Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) では，この代謝経路の中の creatinase 活性の態度が健常成人骨格筋中のそれと異なっているとして報告した．

本年度の報告では，その後の成績として人胎児と PMD の別の型，常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症 (ARDMD) (三好ら，1974) における成績をのべた．なお，本文ではこれまでの creatinase の解釈に実験方法を考慮した若干の巾をもたせた．

対象と方法

対象は，(1)健常成人(非筋疾患患者，22～69歳，男性，女性)，(2)人胎児 (19，32週) および生後5ヶ月乳児，(3) ARDMD 患者(31歳女性，61歳男性) である．(1)～(2)では剖検でえた骨格筋を，(3)では生検筋を資料として実験に用いた．なお，19週胎児筋 homogenate については頭部を除外した残りの部分の homogenate を作成し，骨格筋 homogenate とみなした．

実験には，－60℃で凍結保存した筋から homogenate を作り，これを遠心分離した上清を用いて gel 濾過してえた fraction を資料として使用した．

方法は creatinase 活性を想定し creatine の減少でみる方法によった．すなわち，資料と creatine の反応系で反応前後の creatine 量を diacetyl α - naphthol 法で測定してその差を求めた．

結 果

1．人胎児および新生児筋における成績

図1，32週胎児筋の成績を示した．ゲル濾過 fraction の活性のピークは健常成人と同じ位置に認められ，分子量は，健常成人のそれと同じく約50,000であった．

図2に，これらの fraction collect を用いて，反応速度に対する基質 creatine の濃度効果を示した．

図のごとく，健常成人，胎児，乳児筋のいずれも hyperbolic curve を示した．

用いた筋資料中の蛋白量は健常成人0.8mg，19週胎児筋1.2mg，32週胎児筋1.6mg および5ヶ月乳児筋1.5mg である．すなわち，活性値は19週，32週胎児筋，生後5ヶ月乳児筋と，

＊徳島大学医学部第一内科

低値から次第に増加して成人骨格筋の値に近づいている．

図2右下方には，健常成人筋と19週胎児筋について，基質クレアチンに対する飽和曲線の両逆数プロット（Lineweaver - Burk プロット）を示してある．結果はいずれも直線を呈している．しかし，健常成人骨格筋では Km 値が8.0×10^{-5} M であるのに対して，19週，32週胎児および乳児筋の Km 値はそれぞれ，3.8×10^{-4} M，3.6×10^{-4}M，1.8×10^{-4} M であった．

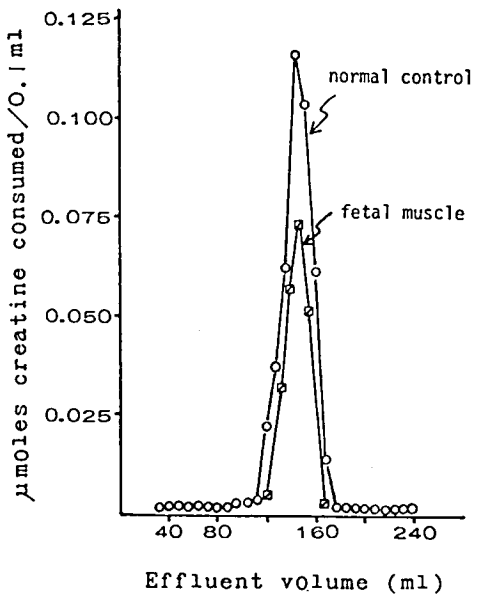


図1　Homogenate gel filtrateの活性（胎児骨格筋）

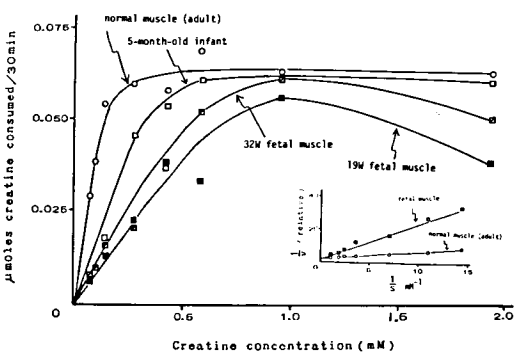


図2　胎児骨格筋中活性に対するcreatineの濃度効果

すなわち，この活性の態度には成人骨格筋型のものに対して胎児型ともいうべきものが存在することを思わせる．生後5ヶ月の乳児では成人型と胎児型が混在しているがごとくである．

2．筋ジストロフィー症 ARDMD における成績

ARDMD 骨格筋では活性は，健常成人，DMD のそれと同じく分子量は約50,000の fraction にみられた．

図3に，その活性に対する基質 creatine の濃度効果の成績を示した．図では健常成人，DMD，ARDMD の成績を併せて示してある．蛋白量は健常対照筋で0.8mg，DMD 筋で0.6 mg，ARDMD 筋0.5mg である．

図において，活性は健常成人筋では Km 値 8.0×10^{-5} M の hyperbolic curve を示すのに対し，DMD 筋，ARDMD 筋では creatine 濃度に対し sigmoidal curve を示し，Vmax の1/2の反応速度を与える creatine 濃度は，DMD3.6×10^{-4} M，ARDMD で1.0×10^{-3} M であった．

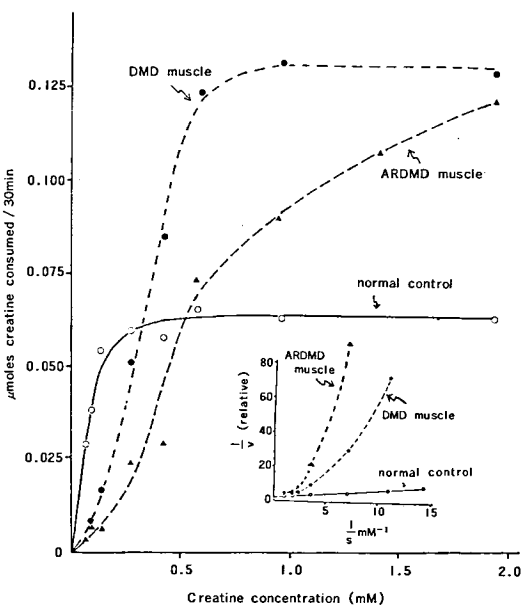


図3　DMD，ARDMD骨格筋中活性に対するcreatineの濃度効果

なお，同じ蛋白量でみると，DMD の Vmax は健常筋のそれの2.7倍，ARDMD では健常筋の 4 倍以上であった．

考察と結論

著者らははじめにのべたように，これまで，人骨格筋中に creatine - glycine (urea) pathway のあることを提唱し，この代謝経路の中で creatinase 活性の態度が DMD 筋では異常であることをのべてきた．そして，さきの報告では，この creatinase 活性の態度が人胎児では胎児型ともいうべき性格を有し，また，筋ジストロフィー症の別の型である ARDMD においては，さらに異なっていることについてのべた．

ただし，筋ジストロフィー症において真に creatinase の異常があるとすることは，本症の成因に関して極めて重要な意味を有するので，これらの成績の解釈には慎重を期したい．

すなわち，著者らの実験が精製酵素ではなく crude な資料によっていること，また，creatine の測定その他に呈色反応を用いていることなどから，これまで creatinase としてきたものは creatinase を含む類縁酵素ないし蛋白質と幅をもたせておきたい．今後さらに実験を重ねて確認した上で詳細をのべたい．

本文では，骨格筋中におけるこの酵素ないし蛋白質について，健常筋では成人型の他に胎児型というべきものがあること，また，筋ジストロフィー症の 2 つの型でそれぞれ異なっていることをのべた．本症の creatine 代謝異常ひいては本症の一次的 pathogenesis に関連することが考えられ興味深い．

本症の原因究明に対して，従来知られていなかった新しい分野に研究の道を開いたものと思う．

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「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，1979，p. 175.
2) 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．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54年度研究報告書，1980，p. 210.
3) Miyoshi, K., Taira, A., Yoshida, K., et al : Abnormalities of creatinase in skeletal muscle of patients with Duchenne muscular dystrophy. Proc. Japan Acad., 56 B : 99, 1980.
4) 三好和夫，岩朝　勝，川井尚臣，ほか：常染色体劣性末梢型筋ジストロフィー症 Autosomal recessive distal muscular dystrophy. わが国に特にみられる新しい末梢型筋ジストロフィー症．日本臨床，35 : 3922, 1977.

44) Thyrotoxic Myopathy の Creatinuria の成因について

植田啓嗣*

研究協力者　畑中良夫*　浜口知昭**
野島元雄**　中田俊士***

甲状腺機能亢進症とともに，特に顕著に筋肉症状を示すものが thyrotoxic myopathy と呼ばれている．

甲状腺機能亢進の各種の徴候とともに，四肢近位部に筋弱力を訴え，男性の中高年者に多く，通常著明な creatinuria を伴うが，血清 CPK 値には上昇はみられない．

ここでその creatinuria の発症機構に検討を加えてみた．

方　法

1．被験動物

白鼠では体重110～130g の Wister 系の雄性白鼠を，家兎では体重 3 kg の雄性白兎を用いた．またマウスには C57BL/6J の雌雄マウスを，更にヒトでは死後10時間目の骨肉腫患者の剖検試料を用いた．被験動物はいずれも断頭屠殺して脱血させ，該当試料を求めた．

2．動物の飼育飼料

上記動物の発育期には，市販の白鼠用並びに家兎用の固形食（オリエンタル酵母株式会社製）を用いた．

また被験動物の条件付けには，casein 20.0%, dextrin 55.9%, sucrose 15.0%, cellulose 1.0%, vitamin mixture 1.0%, salt mixture 4.0%, choline chloride 0.1%, oil 2.0%に水を加えたものを基本食とし，これに該当濃度の creatine を添加した．

3．Triiodothyronine (T_3) の注射

T_3 (Sigma 製)は，0.02% NaOH を含む生理食塩水でアルカリ性にした溶液に溶解させ，更に生理食塩水を附加して，50γ/ml の溶液を作った．そして白鼠の皮下に50γ/100g 体重の割に注入した．また対照群には同濃度の NaOH を含む生理食塩水を同量皮下注射した．

4．測定試料の作製

Creatine kinase (CPK) 活性の測定には10倍容の Tris - HCl buffer 50mM (pH 7.4) を，glycine amidinotransferase (GAT) 活性の測定には10倍容の 1 mM EDTA, 0.15% deoxycholate を含む100mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) を，arginase 活性の測定には20倍容の蒸留水を，また creatine の定量には10倍容の蒸留水をそれぞれ加えて組織を potter homogenizer を用いて磨砕した．そしてその 1×10^4 rpm (8000×g)，10分の遠沈上清を酵素源に使用した．

なお臓器摘出後，酵素活性測定までの操作は総べて 4 ℃に保持した．

5．各種物質の測定

CPK 活性は江橋法[1]で，GAT 活性は Walker 法[2]で，そして creatine 量は Folin 法[3]によった．また arginase 活性は assay 時の buffer を glycine - NaOH (1/80M, pH 9.4) としたほかは，Schimke法[4]を用いて測定した．

＊愛媛大学保健管理センター
＊＊愛媛大学医学部整形外科
＊＊＊大手前病院（大阪）

表1　The relationship between the contents of creatine and the activities of glycine amidinotransferase in tissues

Tissues	Creatine*	Glycine amidinotransferase** (rat)	(rabbit)	(mouse)	(human)
brain	67	0.4	0.5	0.0	0.2
heart	144	0.4	1.3	0.0	0.6
liver	6	0.1	2.6	0.7	1.2
pancreas	35	4.4	2.0	2.1	13.9
kidney	20	4.1	11.7	5.4	24.6
skeletal muscle	409	0.9	1.3	0.0	0.6

＊U：mg/100 w.w.g.
＊＊U：u moles/hr/w.w.g.
Each value is the average of three animals except human being

結　　果

I　各臓器中のcreatine濃度とGAT活性(表1)

白鼠の臓器を，脳，心臓，肝臓，膵臓，腎臓，骨格筋と並べ，そのcreatine含量を測定したところ，creatineは骨格筋，心臓，脳の順に多く含まれていた．そしてこのcreatine含量とCPK活性とは臓器間分布の上で正の相関をとっていた[5]．

しかし，GAT活性を測定してみると，creatine含量やCPK活性の豊富な臓器では活性が低く，逆に乏しい膵臓や腎臓で高い活性が検出された．

このような3者の各臓器への折り込まれ方の上で認められた特徴は，また家兎，マウス，ヒトなどでも認められ，そこには種属差は見出せなかった．

II　腎GAT活性にみられる生理的変動

(1)　腎GAT活性に及ぼす食餌中のcreatineの影響（図1）

市販の固形食で飼育している白鼠を，基本食に変えると，腎臓のGAT活性は急増した．しかし基本食に0.5%の濃度にcreatineを加えると，活性は逆に減少した．そしてまた基本食に転換すると増加した．

この実験には都合33匹の白鼠を使用し，各時点で順次3匹ずつ屠殺して測定している．○印（図1）の値は総べて3匹の平均値である．

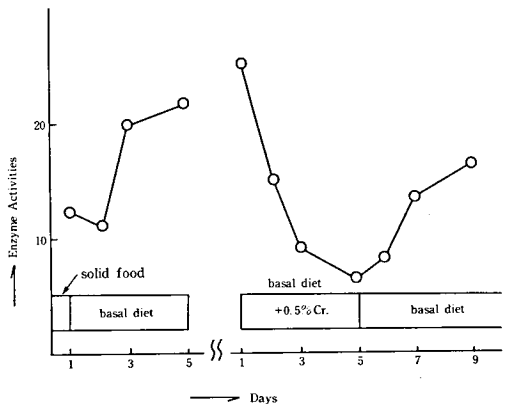


図1　Effects of creatine in the diet on the activities of glycine amidinotransferase of kidney　—rat—
Male rats were fed on the commercial solid foods including meats, afterward, foods were replaced in turn from the solid foods to basal diet, from basal diet to the basal diet including 0.5% of creatine, and again to basal diet. Each value is the average of three animals.
U：u moles/hr/w.w.g.

(2) 絶食時のGAT活性とarginase活性（表2）

白鼠を基本食で飼育して体重110gまで成長させ，次いで水のみを与えて絶食期間を2日，4日と置くと，絶食4日目の体重は70g（64%）に減少した．そしてその間の腎臓のGAT活性と，肝臓並びに腎臓のarginase活性を測定した．

表2 Effects of fasting on the activities of glycine amidinotransferase and arginase —rat—

Days of fasting	Glycine amidino-transferase* (kidney)	Arginase** (kidney)	Arginase** (liver)
0	22.9	0.18	6.0
2	11.9	0.15	5.7
4	3.1	0.26	5.5

＊U：u moles/hr/w.w.g.
＊＊U：X10^2 u moles/hr/w.w.g.
Each value is the average of three animals

その結果は，腎のGAT活性は著明に減少したが，arginase活性では肝臓，腎臓とも大きな変化は認められなかった．また同時に筋蛋白の消耗に由来するであろうcreatinuriaを期待し，尿中のcreatine量を測定してみたが，さしたる増量は見出せなかった．

III T_3投与白鼠の骨格筋CPK活性と腎GAT活性（図2）

白鼠を固形食で3～7日間飼育し，次いで基本食群，0.25% creatine含有食群，0.5%

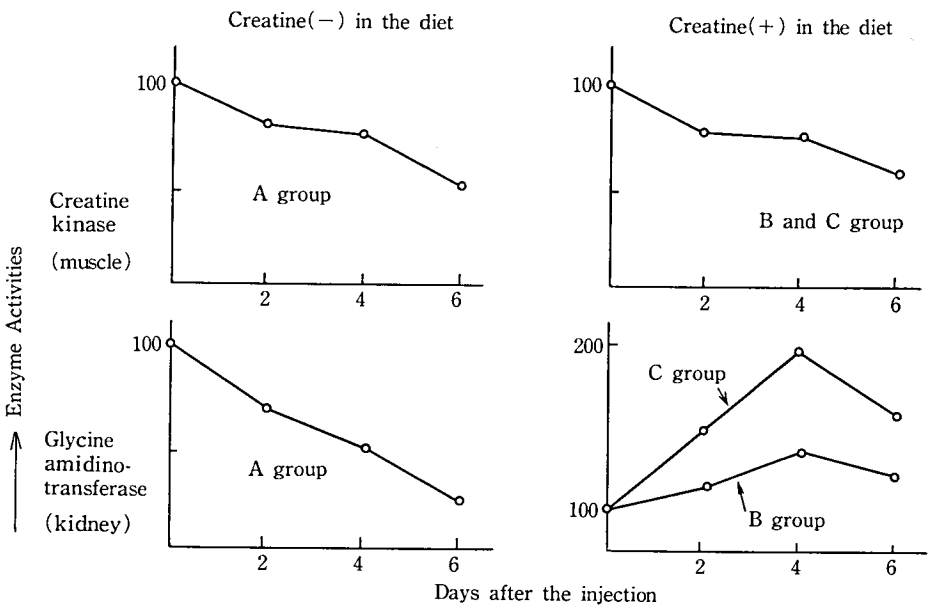


図2 Effects of T_3 on the activities of both the creatine kinase of skeletal muscle and the glycine amidinotransferase of kidney. Male rats were divided into three groups. The rats of A group were fed on basal diet, B group on basal diet including 0.25% of creatine, and C group on basal diet including 0.5% of creatine for about one week. Afterward Fifty gamma of T_3 per 100 g of body weight were subcutaneuosly injected to the rats of each group every day. With the diet described above in each. The levels before the injection were placed as the value of 100. Each circle shows the average of 3-6 animals.

creatine 含有食群の3群に分けて，更に1週間飼育した．このようにして体重が120～150 g となった白鼠に，T_3 (50γ/100g 体重) を連日注射し，その0日目，2日目，4日目，6日目に，それぞれ断頭屠殺した．そして腎 GAT と腓腹筋 CPK 活性を測定した．

その結果は，腓腹筋の CPK 活性は食餌中の creatine の有無に関係なく，T_3投与2日目で約87%，4日目で約85%，そして6日目で約60%と減少した．

しかし腎臓の GAT 活性は，勿論食餌中の creatine の濃度如何で活性値には大きな差異が現われた．この場合，T_3注射開始時点の活性値を100と置いてみると，creatine を含まない基本食投与下では T_3投与2日目で78%，4日目で58%，6日目で26%と漸減したが，creatine 添加食投与群では，0.25%の creatine 添加群の2日目で112%，4日目で143%，6日目で120%と増加し，また0.5%の creatine の添加群でも，その2日目で150%，4日目で約200%，6日目で160%と増量が認められた．

考　　案

通常，成人男子の尿中には creatine は認められない．たとえ creatine の摂取量が増える，つまり多量の肉類を摂取しても creatinuria は起らないものである．しかし thyrotoxic myopathy では肉食を禁じても，尚そこに著明な creatinuria がみられる．そのため，ここでその機構に検討を加えてみることとした．

すなわち，まず白鼠の各臓器について，creatine の濃度と GAT 活性を測定してみた．その結果は，creatine を多く含む臓器では GAT 活性が低く，creatine 含量の低い臓器で GAT 活性が高かった．また creatine 含量と CPK 活性値には正に相関がみられる[5]．そしてこのような関係は家兎やマウスやヒトでもまた認められた．creatine を貯蔵する臓器とそれを生合成する臓器とはいずれの動物でも一致していない．

したがって関係臓器の臓器相関に乱れが起れば，creatinuria がもたらされてくるものと想定される．

ところで creatine（肉類）が経口摂取された場合には，creatine の生合成はどうなるのかであるが，いま白鼠を市販の固形食で飼育し，次いで基本食に転換すると，腎の GAT 活性は漸次増量した．次いで食餌に creatine を添加すると減少し，また creatine を除去すると増加した．市販の固形食で低値を示したのは，固形食の蛋白源に肉類が用いられている為である．creatine は *in vitro* では活性に何らの影響も与えない．したがってこの成績は，最終生成物である creatine が生合成系の初期の段階の GAT に feed back inhibition をかけて，生合成系を抑制するものと理解される．

次いで絶食の状態に置き，腎の GAT 活性の動向を探ってみた．その結果は，絶食4日目で体重は64%に減少し，腎の GAT 活性値にも著明な低下が惹起された．絶食による筋肉の消耗により，筋肉組織より漏出した creatine が腎の GAT に feed back inhibition をかけたものと想定される．

しかしこの場合，GAT の基質である arginine と生成物である ornithine は，また共に urea cycle 中の arginase の基質や生成物になっている（図3）ので，肝と腎の arginase 活性を同時測定してみたが，その値では両臓器とも殆ど変化は認められなかった．つまりこの成績は飢餓下においては直接生命維持に必要な urea cycle 系は保持されているが，必要のない creatine の合成系は簡単に抹殺されることを示している．

ここで白鼠に T_3を投与して実験的な acute thyrotoxic myopathy を作り，筋肉中の CPK 活性と腎の GAT 活性を追跡してみた．

その結果は，筋肉中の CPK 活性は経日的に減少し，腎の GAT 活性もまた低下した．その様相はさきの絶食白鼠と同様で，筋内の CPK が減少し，筋肉内に貯蔵されていた cre-

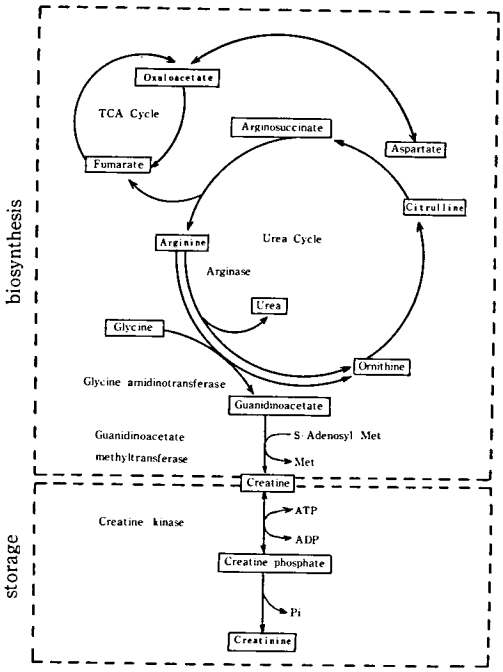


図3　Metabolism of creatine

atineが漏出して，腎の合成系に抑制をかけたものと想定される．類似の見解は，乾燥甲状末を用いて，Fitchらもまた示している[6]．

ところが，前以って食餌中にcreatineを混入させて，腎のGAT活性を低値においた白鼠では，T_3の投与により，腎のGAT活性には逆に上昇がもたらされた．特に食餌内のcreatine含量が高く，T_3投与前のGAT活性が低値を示したもの程，上昇傾向は顕著であった．この場合，筋肉中のCPK活性は，creatineを食餌内に混入させなかった白鼠と同程度の減少を示しており，したがって腎のGAT活性には当然抑制がかけられて然るべきであろう．

thyrotoxic myopathyでは，腎のGATには非合目的な現象が起っている．すなわち肉食してもそこに含まれるcreatineは，吸収された後貯蔵もされず，生合成系に対しては抑制もかけず，そのまま尿中に排泄されるものと想定される．

結　　語

①白鼠，家兎，マウス，ヒトの臓器でみたところ，creatineの合成に与えるGAT活性の高い臓器程，creatineを貯蔵するCPK活性は低く，逆にGAT活性の低い臓器程CPK活性が高かった．このようにcreatineの合成臓器と貯蔵臓器とは異なっているため，これらの関係臓器の臓器相関に乱れが起これば，そこにcreatinuriaがもたらされるものと想定される．

②食餌中にcreatineを添加したり，飢餓状態で筋量が減少すると，腎のGAT活性には容易に低下が認められ，creatineの生合成系に抑制がかかった．

しかしthyroid myopathyでは，筋の貯蔵能が低下しているにもかかわらず，腎のGAT活性は非合目的に反応しており，したがってそのcreatinuriaは，筋肉中のcreatineの貯蔵能の低下と相俟って，合成系の適応障害が一役を担っているものと想定される．

文　　献

1) 江橋節郎：Creatine phosphokinase. 臨床酵素学，朝倉書店，東京，1964，p.356.
2) Walker, J. B.: Studies on the mechanism of action of kidney transamidinase. J. Biol. Chem., 224：57, 1957.
3) Folin, O.: Beitrag zur Chemie des Kreatins und Kreatinins im Harne. Z. Physiol. Chem., 41：223, 1904.
4) Schimke, R. T.: Adaptive Characteristics of urea cycle enzymes in the rat. J. Biol. Chem., 237：459, 1962.
5) 植田啓嗣：ミオパチーとその遺伝，ミオパチーの酵素化学的研究．第17回日本医学会総会学術講演集，IV：1044，1967.
6) Fitch, C. D., Cecilia, H.: Some factors affecting kidney transamidinase activity in rats. J. Biol. Chem., 235：2362, 1960.

45) ミオグロビン尿症の病態生化学的研究

宮武　正*

研究協力者　西澤正豊*　矢作友作*　渥美哲至*

筋エネルギー代謝機構の障害によるミオグロビン尿症でその病態が生化学的に明らかにされているものとしては，筋解糖系に異常のある糖原病V型，VII型，Lactic dehydrogenase (LDH) M型サブユニット欠損症，長鎖脂肪酸のミトコンドリアへの転送機構に異常のあるcarnitine palmityltransferase (CPT) 欠損症が知られている．

最近，我々はこれらのいずれとも異なる新しいタイプのミオグロビン尿症の一例を経験したので，その病態を解明すべく施行した生化学的検討の結果を合わせて報告する．

症　例

症例は20歳の男性で，家族歴，既往歴に特記すべきものはない．5歳頃から強い運動を行なうとその部位の筋肉に腫脹，疼痛，脱力を生じて運動を続けることができなくなり，約1時間の休息によりすみやかに回復する．いわゆるcrampはおきていない．13歳の時，運動後にはじめて“コーラ”様の色素尿が出現した．その後も同様の色素尿が数回みられたが，急性腎不全に至ったことはない．

上記の症状が誘発される場合の特徴としては，(1)中程度の強さの運動を長時間続けるよりも短時間でも強い運動を行なう方が誘発されやすい，(2)季節，気温，湿度によらない，(3)絶食など，食事の状態，内容に関連はない，(4)初回には症状が誘発される程度の強さの運動でもくり返しているうちに出現しにくくなる，(5)マラソンでいわゆるsecond wind様の現象がみられる，などが挙げられる．

体格は中等度で一般身体所見に異常はない．皮膚の創傷がケロイドになりやすい．神経学的所見には異常なく，筋の萎縮，肥大，脱力，自発痛，圧痛を認めない．

検査所見では安静時においてもCPK 356(MM型76%，正常<80 IU/l)，アルドラーゼ5.1と軽度高値を示したが，血算，電解質，肝，腎機能検査は正常で，糖負荷テスト，甲状腺機能も正常であった．血漿トリグリセリド (TG)，遊離脂肪酸 (NEFA) も正常であった．筋電図も正常所見を示した．

階段の昇降を限界まで継続させる運動負荷を加えるとCPK15420(MM型94%)，アルドラーゼ49.1，LDH1986 (LDH_1 9.4，LDH_2 18.9，LDH_3 12.6，LDH_4 5.0，LDH_5 54.1%) と著しい高値を示し，同時に出現した色素尿中にミオグロビンが証明されて，本例がミオグロビン尿症であることが確認された．階段を一階昇る程度の運動でも筋の腫脹，疼痛，脱力は生じないが，CPKは900前後の値まで上昇した．

大腿四頭筋の筋生検像では筋線維の大小不同，少数の壊死線維の散在など，軽度ながら筋原性変化を認めるが，fiber typeとの関連はなく，またグリコーゲン，脂肪顆粒の増加は認められなかった．電顕では正常組織中に少数ながら筋原線維の崩壊像，小胞体の拡大がみられた．

本ミオグロビン尿症の成因は発熱，阻血，薬物，炎症等ではなく，筋エネルギー代謝機構の障害によるものと考えられたので，以下の生化学的検索を行なった．

* 自治医科大学神経内科

方　　法

筋解糖系の障害の有無を検討するため，まず前腕阻血運動試験を施行して静脈乳酸値を測定し，次いで生検筋 homogenate の 10,000×g 遠心の上清分画を用いて常法により，解糖系の諸酵素活性を測定した．対照には手術時に採取した腹直筋を用い，被検筋はいずれも採取後直ちに液体窒素中に入れ，測定まで－80℃に保存した．

脂肪酸の代謝障害の可能性を検討するためにはまず72時間の絶食試験を行ない，血漿 NEFA, TG, 尿ケトン体を時間経過を追って測定し，5名の20歳男子正常者を正常群として比較検討した．

血漿 NEFA の脂肪酸組成の分析は以下のように行なった．血漿 2 ml を凍結乾燥した後クロロホルム－メタノール(2：1，容比)にて全脂質を抽出し，得られた全脂質から n-ヘキサン－エチルエーテル－酢酸(90：10：1，容比）を展開系とする薄層クロマトグラフィーにて NEFA を分離し，ついで2.5%塩酸メタノールにて80℃で10時間メタノリシスを行ない脂肪酸メチルエステルを得た．これを15% DEGS on Gaschrome Q (100—120 mesh) 1.0m, 200℃のカラムに導入し，ガスクロマトグラフィーにより分析した．

CPT 活性は生検筋 homogenate を酵素源として palmitylcarnitine より palmityl CoA の生成をみる Hydroxamate 法と，[^{3}H] —carnitine の palmitylcarnitine への取り込みをみる isotope exchange 法の2つの方法で測定した．筋 carnitine 含量は carnitine acetyltransferase を用いる酵素法により定量した．被検筋は先述したのと同様に採取後直ちに液体窒素中に入れ，測定まで－80℃に保存した．

結　　果

前腕阻血運動試験により筋強直は誘発されず，静脈の乳酸値は図1に示す通り，運動後すみやかに前値の4倍となり，正常の上昇を示した．

解糖系の酵素活性は表1に示す通りで，本例の phosphorylase, phosphoglucomutase 活性は正常値，phosphohexose isomerase,

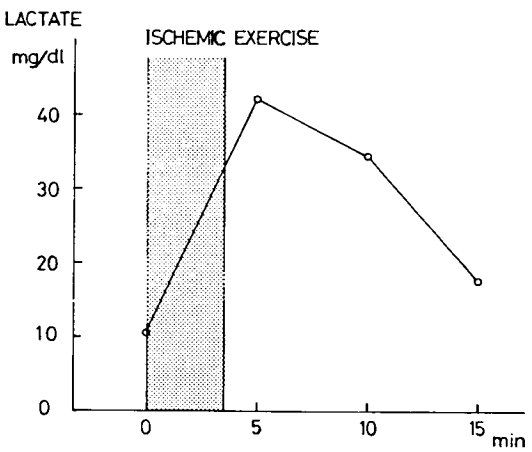


図1　前腕阻血運動試験

表1　解糖系酵素活性

ENZYMES	CONTROLS (NO. OF SUBJECTS)	PATIENT
PHOSPHORYLASE	0.53 ± 0.06 (4)	0.52
PHOSPHOGLUCOMUTASE	0.09 ± 0.04 (3)	0.08
PHOSPHOHEXOSE ISOMERASE	2.51 ± 0.47 (5)	3.31
PHOSPHOFRUCTOKINASE	0.77 ± 0.13 (5)	1.02

Given in micromoles/min/mg of protein ± S.D.

(10000xg supernatant of muscle homogenate)

phosphofructokinase 活性は正常対照よりも軽度高値を示した．

72時間の絶食試験では図2に示す通り，本例のCPKは更に上昇はせず，ミオグロビン尿も誘発されなかった．尿中ケトン体，血漿TGは正常に上昇した．しかし，血漿NEFAの上昇は正常群よりもやや低値であった．

NEFAの脂肪酸組成の絶食による変動を，主要な脂肪酸のみについて正常群と比較して図3に示した．本例では正常群に比べて飽和のC16：0，C18：0の構成比がやや高い傾向に

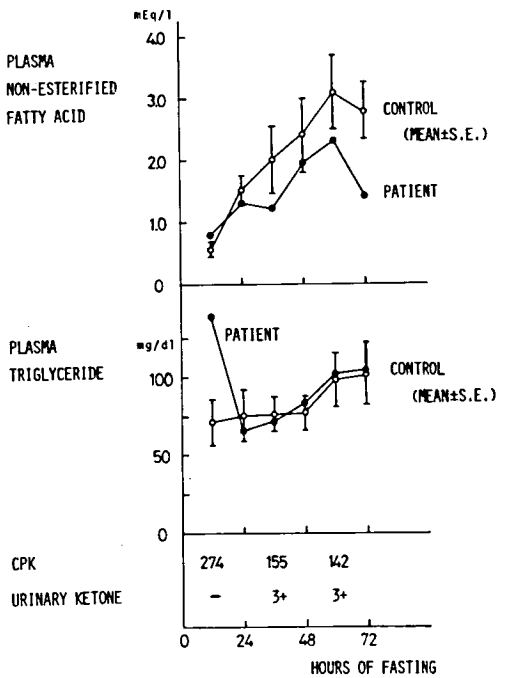


図2　絶食試験

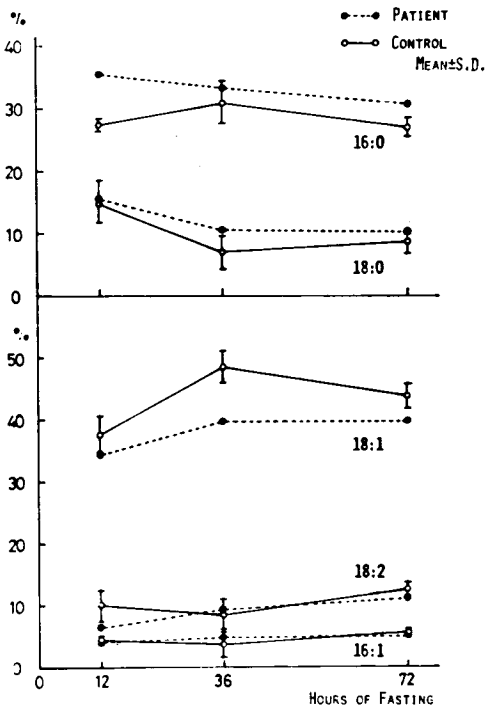


図3　NEFA脂肪酸組成の絶食による変動

表2　CPT活性とcarnitine含量

ACTIVITY OF CARNITINE PALMITOYL TRANSFERASE	CONTROLS (NO.OF SUBJECTS)	PATIENT
MUSCLE HOMOGENATE		
HYDROXAMATE ASSAY *)	1.10 ± 0.88 (5)	1.09 ± 0.17
ISOTOPE EXCHANGE ASSAY **)	3866 ± 1277 (5)	3735
WBC HOMOGENATE		
ISOTOPE EXCHANGE ASSAY ***)	6979 ± 1888 (3)	11067
CARNITINE CONTENT IN MUSCLE ****)	3.08 ± 0.44 (3)	2.88

*) nanomoles of product formed/min/mg of protein ± S.D.
**) cpm of palmitoyl [^{3}H] carnitine/60min/mg of protein ± S.D.
***) cpm of palmitoyl [^{3}H] carnitine/30min/mg of protein ± S.D.
****) micromoles/g of muscle ± S.D.

あり，またC18：1の上昇は正常群よりも明らかに低かった．

CPT活性は表2に示す通りで，2つの方法ともに正常の活性を示した．また本例の白血球CPT活性はやや高値を示した．筋carnitine含量は正常であった．

考　　案

運動時の筋のエネルギー源としてはfiber typeにもよるが，まず貯蔵されたATP，クレアチンリン酸が消費された後，グリコーゲンの分解により，ついで肝より動員されたグルコースから嫌気的解糖系により産生されたATPが用いられる．更に運動を継続すると血中のNEFAを取り込み，ミトコンドリアに転送してβ酸化によりアセチルCoAをつくり，これよりTCA回路，電子伝達系を経て産生されるATPが用いられるようになる．

今回経験した症例は，臨床症状は短時間の強い運動で誘発されること，絶食によっては誘発されないこと，second windがみられることなど，解糖系の代謝障害によるミオグロビン尿症にみられる特徴を多く備えてはいるが，生検筋の組織像にてグリコーゲンの貯留を認めず，また阻血運動試験により乳酸の産生がすみやかに認められることから，解糖系の大きな流れには障害はないものと考えられた．更にKey enzymeであるphosphorylase, phosphofructokinaseを含めて酵素活性を測定した結果でも欠損はなく，ミオグロビン尿症の原因疾患として知られている筋phosphorylase欠損症（糖原病V型）[1]，筋phosphofructokinase欠損症（糖原病VII型）[2]，また最近，西村らにより見出されたLDH M型サブユニット欠損症はいずれも否定された．

次に脂肪酸代謝障害の可能性を考えて，まず絶食によって筋がエネルギー源をNEFAのみに依存する状態をつくり，エネルギー代謝を検討した．本例では72時間もの絶食を行なってもDiMauroの報告するCPT欠損症[3)4)]の症例と異なり，ミオグロビン尿は誘発されず，CPK，TGの著しい上昇もみられなかった．尿中ケトン体も正常に産生されたが，血漿NEFAの動員は正常群よりも低値であった．そこでNEFAの脂肪酸組成を分析したが，CPTの基質となるC16：0，C18：0の組成比は正常群よりもむしろ高値の傾向にあり，C18：1の絶食による増加が本例では対照よりも少なかった．C18：1の筋エネルギー代謝における役割は明らかでなく，この結果の意味は明らかにできなかった．

取り込まれたNEFAがエネルギー源として用いられるためには，まずCoAと結合した後，このアシル化CoAがミトコンドリア内膜の内外側に位置するCPT—carnitine系の働きによりミトコンドリア内へ転送されなければならない．筋carnitine欠損症はその病態は明らかでないが，筋力低下を主徴としてミオグロビン尿を生ずることはなく，実際の測定結果でも本例の筋carnitine含量は正常であった．CPTは脂肪酸の鎖長により基質特異性を異にするcarnitine acyltransferaseのうちで長鎖の脂肪酸を基質とする酵素で，NEFAをエネルギー源として用いる場合には最も重要な役割を演ずる酵素であるが，このCPTの活性も測定の結果本例では正常であった．

以上の結果より，本症例は従来生化学的に酵素異常が明らかにされているミオグロビン尿症のいずれの病型とも異なる新しいタイプのミオグロビン尿症であると結論される．しかしながら，その病態を生化学的に解明するまでには至らなかった．

文　　献

1) McArdle, B.: Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. Clin. Sci., 10：13, 1951.

2) Tarui, S., Okuno, G., Ikura, Y., et al.: Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. A new type of glycogenosis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 19：

517, 1965.

3) DiMauro, S. & DiMauro, P. M. : Muscle carnitine palmityltransferase deficiency and myoglobinuria. Science, 182 : 929, 1973.

4) DiMauro, S. : Metabolic myopathies. In "Handbook of clinical neurology", (edited by Vinken, P. J. & Bruyn, G. W.), North - Holland, Amsterdam, 1979, Vol. 41, p. 175.

46) ラジオイムノアッセイによる人ミオグロビンの turnover

川　井　尚　臣*

研究協力者　岩　朝　　勝*　増　田　健二郎*　今　井　幸　三*
近　藤　　彰*　日　下　香　苗*　西　野　　洋*
三　好　和　夫*

私達は，さきに人ミオグロビン (Mb) のラジオイムノアッセイ (RIA) を開発し，これを用いて各種筋，心筋疾患ならびに各種スポーツ時の血中ないし尿中 Mb 量や，その経時的変動を明らかにしてきた[1)2)]．

今回は，高 Mb 血症を伴う各種臨床例の血中 Mb の半減期についてのべ，加えて，健常人 volunteer ならびに腎，肝，筋疾患患者などに Mb を負荷し血中の半減期 (T1/2) を研究した成績をのべる．これによって人体における Mb の代謝分解過程を明らかにしたい．

対象と方法

対象は当科にて経時的に血中 Mb の検索を行った悪性高熱 5 例，急性心筋梗塞 5 例，LDH - M 型欠損症 1 例，スポーツ (野球，長距離競走) 11例の高 Mb 血症を伴う臨床例であり，これら症例の血中 Mb の T1/2を求めた．また，別に健常人 volunteer 2 例，腎機能不全 4 例，肝硬変 2 例，Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) 2 例，筋緊張性ジストロフィー症 2 例，神経原性筋萎縮症 2 例などに自製の人 Mb を静注 (10mg/60kg) し，経時的 (Mb 静注後 5，10，20，30，40，60分と 2，4，6，12，24時間) に採血し，血中 Mb の測定を行い，血中 Mb の T1/2を算出した．また，同じく尿中 Mb も測定した．なお，Mb の測定は当科開発の RIA (感度 1 ng/ml) を用いた．

成　　績

1) 臨床例における血中 Mb の T1/2

図 1 に各種疾患の代表例の血中 Mb 消失

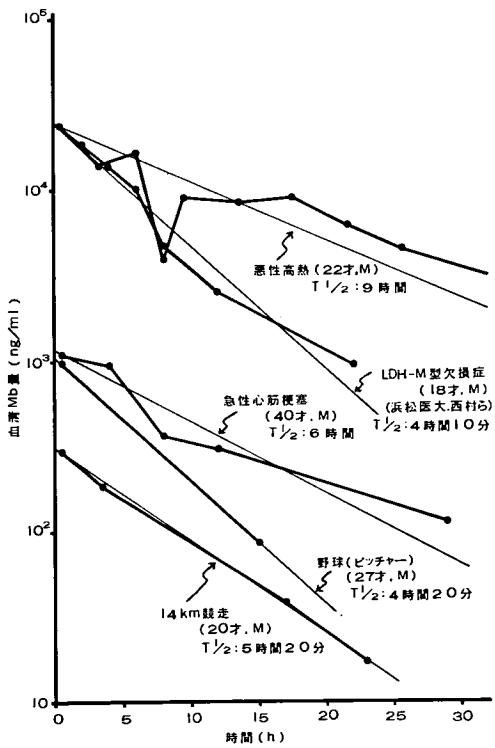


図 1　著明なMb血症を伴う各種疾患および
スポーツにおける血中Mbの消失曲線

*徳島大学医学部第一内科

表1　臨床例ならびにスポーツにおける血中Mbの半減期（T1/2）

検索例	症例No.	T1/2
悪性高熱	1	9時間00分
	2	8時間30分
	3	7時間00分
	4	6 〃 00〃
	5	5 〃 00〃
心筋梗塞	1	9 〃 30〃
	2	8 〃 50〃
	3	6 〃 00〃
	4	5 〃 00〃
	5	4 〃 00〃
LDH－M型欠損症		4 〃 10〃

検索例	症例No.	T1/2
野　　球	1	13時間30分
	2	13 〃 30〃
	3	13 〃 30〃
	4	13 〃 00〃
	5	13 〃 00〃
	6	4 〃 20〃
長距離競走	1	5 〃 30〃
	2	5 〃 30〃
	3	5 〃 20〃
	4	5 〃 10〃
	5	4 〃 40〃

曲線と，それぞれのT1/2を示した．Mb量は対数目盛で示してある．

LDH－M型欠損症（浜松医大，西村らの症例で依頼を受けてMbを測定した．）はischemic forearm exercise testを行ったときの成績であるが，本例では血清Mb値は初め2.4×10^4ng/mlと著しく高値を示した．T1/2は4時間10分である．悪性高熱例でも，血中Mbは初め2.4×10^4ng/mlと高値であり，T1/2は9時間となっている．心筋梗塞例は6時間，さらに，野球，長距離競走ではそれぞれ4時間20分，5時間20分であった．

表1に臨床例ならびにスポーツにおけるT1/2の成績をまとめて示した．すなわち，悪性高熱では，5時間～9時間であり（平均7時間10分），心筋梗塞では4時間～9時間30分（平均6時間40分）であり，LDH－M型欠損症では4時間10分，野球では4時間20分～13時間30分（平均11時間50分），また，長距離競走（14km）では4時間40分～5時間30分（平均5時間10分）であった．このように疾患ないし症例によってT1/2にかなりの幅がみられた．

2）臨床例におけるMbの初期濃度（最高値）とT1/2の相関

臨床例ならびに各種スポーツの血中Mbの初期濃度と半減期との関係をみたが，両者の関係は明らかでなかった．すなわち，悪性高熱のごとくMbの著しく高い（1×10^4～1×10^5 ng/ml）ものもスポーツなどの比較的低い（5×10～1×10^3 ng/ml）ものもT1/2に大差がみられなかった．しかし中には野球あるいは心筋梗塞例でMb値が比較的低く，T1/2の長い例もみられた．

3）Mb負荷による健常人ならびに臨床例のT1/2

(1)健常人volunteerのT1/2

健常人2例のT1/2はそれぞれ3時間30分，3時間20分であった．

健常人1例の血中Mb消失曲線を**図2**に示した．図に示すようにMbの消失曲線は二つのカーブからなり，第1相のT1/2は15分，第2相は3時間20分である．

(2)特殊疾患例のT1/2

腎機能不全4例では3時間30分～5時間であり，2例に延長がみられた．肝硬変2例では5時間，3時間50分と1例に延長がみられた．DMD 2例では8時間20分，6時間10分と共に著明に延長していた．筋緊張性ジストロフィー症2例では3時間55分，3時間10分であり，さらに神経原性筋萎縮症2例では3時間40分，3時間50分であった．

表2に検索例の血中MbのT1/2を一括して示した．

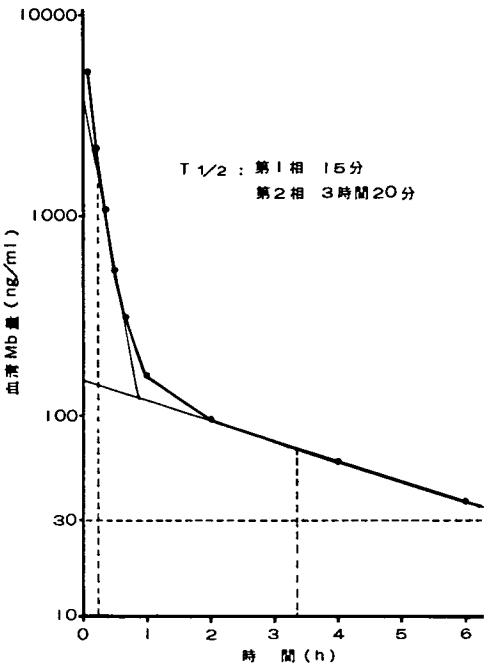


図2　健常人の血中Mb消失曲線（M. I.）

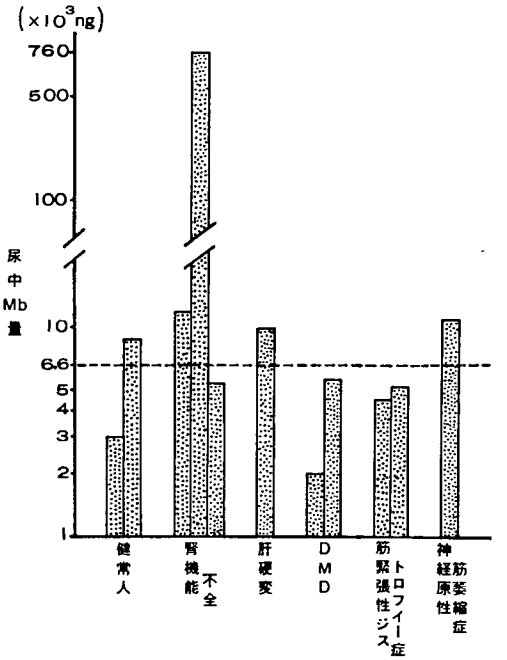


図3　Mb負荷後の尿中排泄Mb量（24時間尿）

表2　血中Mbの半減期（T1/2）

検索例	症例NO	T1/2 第1相	T1/2 第2相
健常人（volunteer）	1	12分	3時間30分
	2	15〃	3〃 20〃
腎機能不全	1	15〃	5〃 00〃
	2	20〃	4〃 25〃
	3	16〃	3〃 55〃
	4	12〃	3〃 30〃
肝硬変	1	15〃	5〃 00〃
	2	15〃	3〃 50〃
Duchenne型	1	14〃	8〃 20〃
	2	11〃	6〃 10〃
筋緊張性ジストロフィー症	1	15〃	3〃 55〃
	2	14〃	3〃 10〃
神経原性筋萎縮症	1	16〃	3〃 40〃
	2	15〃	3〃 50〃

4) Mb負荷後の尿中排泄Mb量

図3にMb負荷後の1日尿中排泄Mb量を棒グラフで示した．なお6.6×10^3 ngの横点線は健常人の1日Mb排泄量の上限である．図に示すごとく腎機能不全の1例を除いてMb10mg/60kg程度の負荷では尿中Mbの増加は殆どみられなかった．

考　察

近年，本邦[1),2)]ならびに欧米において人MbのRIAが開発され，微量のMb測定が可能となり，これを用いて各種心筋疾患，神経・筋疾患，腎疾患などの血中，尿中Mbに関する報告が多数みられるようになってきた．

Mbのturnoverに関する論文としては，Amakoら[3)]の犬におけるものや，Koskeloら[4)]のクジラのMbを健常人に静注した報告があるが，人Mbを用いた人についての成績はSylvén（1978）[5)]の報告があるのみである．彼は^{125}I-Mbを人体に静注し，T1/2を検索し，第2相は3時間20分であり，また，Mbは腎で分解されると述べている．しかし，彼の結論は尿中に標識Mbがみられないとい

うことに基づくもので腎以外の臓器での分解は不明である．

私達は，まず，高Mb血症を伴う各種臨床例の血中MbのT1/2を検索し，ついで人におけるMbの代謝分解臓器をつきとめるため各種疾患症例にMbを負荷（静注）しturnoverを検索した．

高Mb血症を伴う臨床例では，血中MbのT1/2は短いものでは健常人のT1/2，3時間30分前後に近く，これらの例はMbの筋からの流出期間が短いと考えられる．しかし，多くの例では延長がみられ，これは主として筋からのMbの流出が持続的であることや，その他の要因によるものと考えられる．

すなわち，野球の場合はMbの筋からのleakの時間が著しく長いことが考えられ，また，心筋梗塞例では随伴性ショックが長いためかも知れない．

なお，臨床例においてMbの初期濃度（最高値）とT1/2との相関をみたが明らかでなかった．

Mbを負荷した場合，健常人2例のT1/2はそれぞれ3時間20分，3時間30分であり，これらの値はSylvénが^{125}I－Mbを静注してえた成績，3時間20分に近似している．

Mbの分解臓器としては血漿アルブミンなどにおける当教室の成績[6]などより腎，肝などが考えられ，また，筋も考えられるので，これらの臓器の機能不全例のT1/2を検索した．

腎機能不全では，4例中2例に延長例（5時間，4時間25分）がみられたが，これらは延長のない例に比べ腎機能障害が強い例であった．また，肝硬変でも延長例がみられた．

すなわち，人体で，Mbは腎，肝などで分解されることが推定される．

なお，DMD 2例では，両例とも，8時間20分，6時間10分と健常人に比べ著明な延長がみられ，これは筋からのMbのleakの増加によるものと考えられるが，なお筋でも分解されることは否定できない．

また，筋緊張性ジストロフィー症では，免疫グロブリンのturnoverが短縮しているが，今回の検索例ではMbのturnoverの短縮は明らかでなかった．

Mb負荷例の尿中Mb排泄量（1日量）も検索したが，殆ど増加をみなかった．すなわち，人体では，今回用いた10mg/60kg程度の量のMbは殆ど腎，肝，などで代謝分解されるものと考えられるが，加えて筋でも分解されていることも否定できない．Koskeloら[4]，Sylvén[5]は尿中には放射能活性のみ認められ，Mbとしては殆ど捉えられなかったと述べている．今回はまだ検索症例も少なく，今後症例を追加検索し，これら臓器の機能障害度とMbのturnoverとの関係，さらに人体におけるMbの代謝分解過程をより詳細に検索したい．

結　論

1）高Mb血症を伴った臨床例の血中MbのT1/2は短いものでは健常人のそれ（3時間30分前後）に近い値がえられた．しかし，多くの例で延長しており，これは筋からのMbの流出期間の持続や，その他の要因のためと考えられる．

2）Mb負荷（10mg/60kg）時には腎不全，肝障害ではT1/2が延長している例があり，Mbは腎，肝などで分解されることが推定される．なお，DMDでは，主としてMbの筋からのleakによると思われるT1/2の著しい延長があり，神経原性筋萎縮症では延長は明らかではなかった．

文　献

1) Miyoshi, K., Saito, S., Kawai, H., Kondo, A., Iwasa, M., Hayashi, T. and Yagita, M.: Radioimmunoassay for human myoglobin : methods and results in patients with skeletal muscle or myocardial disorders. J. Lab. Clin. Med., 92 : 341—352, 1978.

2) 三好和夫，川井尚臣，岩朝　勝，近藤　彰，今井幸三，虫本光徳，八木田正聖：血液・尿化学検査——その数値をどう読むか．ミオグロビン（含・尿中）．日本臨牀（春季増刊号），38：524—534，1980．
3) Amako, T., Koga, J., Kobayashi, A., Urakado, S. and Tokunaga, J.: Experimental investigation of the metabolism of myoglobin. Kyushu J. Med. Sci., 14: 277—287, 1963.
4) Koskelo, P., Kekki, M. and Wager, O.: Kinetic behavior of ^{131}I-labelled myoglobin in human beings. Clin. Chim. Acta, 17: 339—347, 1967.
5) Sylvén, C.: The kinetics of myoglobin in old volunteers and in patients with acute myocardial infarction. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 38: 561—568, 1978.
6) 藤野　旭：血漿アルブミンの分解と腎．腎疾患臨床例についての研究成績．四国医誌，22：150—167，1966．

47) 筋ジストロフィー鶏における筋ガングリオシドの研究 ——続報——

宮　武　　正*

研究協力者　渥　美　哲　至*　有　賀　敏　夫**　中　村　京　子**

ウサギ脱神経筋[1]，ジストロフィー マウス筋[2]，ビタミンE欠乏による実験的ジストロフィーウサギ筋[3]などで，筋組織ガングリオシドに変化のあることが報告されている．又最近，細胞融合に際してガングリオシドに変化のあることも報告されている．

著者らは，昨年まで，鶏筋ガングリオシドにはGM_3，GD_3および未知のガングリオシドが存在し，筋ジストロフィー鶏では，総ガングリオシドの増加，特にGM_3ガングリオシドの増加のあることを報告してきた[4]．又最近，Chien and Hoganにより鶏筋ガングリオシドについて報告がなされた[5]．著者らは前回明らかにし得なかった鶏筋における未知のガングリオシドの構造をさらに詳細に解析し，筋ジス鶏ガングリオシドと対照の差について再検討を行なった．

材料と方法

1　鶏筋組織ガングリオシドの構造解析

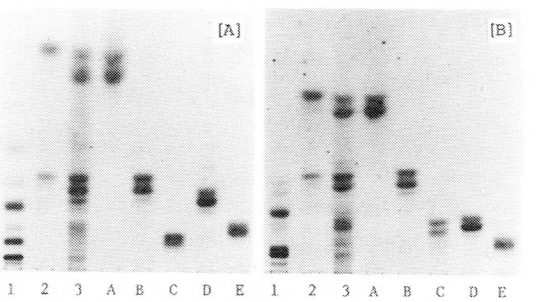
白色レグホン筋30kgを用いて，クロロホルムメタノール（1：1容比）および（1：2容比）により総脂質を抽出し，DEAE Sephadex column chromatographyを行ない，neutral lipidとacidic lipidに分け，acidic lipid分画をアルカリ水解によりガングリオシドを得た．さらにDEAE Sephadex column chromatographyを行なって精製ガングリオシドを得たのち，薄層クロマトグラフィーで個々のガングリオシドに分離し，ガスクロマトグラフィーにより，おのおのの糖組成を同定した．

2　筋ジス鶏筋組織のガングリオシド分析

材料は，筋ジス鶏（line413）10羽および対照鶏（line412）10羽の前胸筋各々3gを用いた．筋をホモゲナイズし，Andoら[6]の方法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2波長クロマトスキャナーを用いて定量した．

結　　果

1　白色レグホン鶏筋30kgより抽出し単離した5ヶのpure gangliocide A, B, C, DおよびEの薄層クロマトグラムは図1の如くである．左は中性溶媒，右はアルカリ溶媒の薄層所見である．各々のガングリオシド



[A] $CHCl_3$:MeOH:0.22%$CaCl_2 \cdot 2H_2O$　55:45:10
[B] $CHCl_3$:MeOH:5M-NH_4OH:2%$CaCl_2$:H_2O　60:40:4:1:4

1 ; Std. Gangliosides of human grey matter
2 ; Std. NA-GM_3 & NA-GD_3
3 ; Total Gangliosides of chicken muscle
A, B, C, D & E ; Isolated Gangliosides from chicken muscle

図1　Isolated gangliosides

＊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

表1　Sugar composition of isolated gangliosides

	A	B	C	D
Glucose	1.00	1.00	1.00	1.00
Galactose	1.03	0.88	1.13	3.06
N-acetylglucosamine	0	0	0	1.93
N-acetylneuraminic acid	1.06	1.87	2.96	1.21

(Molar ratio)

の移動度をみると，AおよびBは，GM_3 および GD_3 ガングリオシドのRfと一致する．C，DおよびEガングリオシドは，いずれも既知のガングリオシドとは一致しないRfを示す．ガスクロマトグラフィーによる各々のガングリオシドの糖組成は，表1の如くであった．Eガングリオシドは微量のため解析できなかった．A，BおよびCガングリオシドのシアリダーゼ処理および，GC-CI-Massによるシアル酸のpermethylation studyの結果，AおよびBガングリオシドの構造はそれぞれ，GM_3 および GD_3 ガングリオシドであり既報と同じであった．Cガングリオシドは NANA-α(2-8)NANAα(2-8)NANA-Gal-Glc-Cer (GT_3) であることが明らかとなった．

Dガングリオシドは，その糖組成および薄層の所見より，Chien, Hoganらにより報告された，鶏筋におけるガングリオシドの一つと一致すると考えられた（表2）．

2　ジストロフィーおよび対照鶏の前胸筋より抽出したガングリオシドの薄層クロマトグラフィーの所見は図2に示すごとくであった．

アルカリ溶媒と中性溶媒の両者の薄層の結果，前述のA，B，C，DおよびEの5つのガングリオシドの他にさらにFおよびGの2ヶのガングリオシドを認めた．Fガングリオシドの Rfは，ヒト赤血球に含まれるシアリルパラグロボシドのRfと一致していた．Gガングリオシドはアルカリ溶媒では，C，Dと重なるが，中性溶媒では分離している．このFとGガングリオシドの構造は，Chien and Hoganにより報告されている構造のうち，Fは sialylparagloboside であり，Gは表の如き構造に対応するものと考えられた（表2）．

これらの各bandを島津2波長クロマトスキャナーで定量し，異なった溶媒による薄層上の各々のbandを計算することにより，A，B，C，D，EおよびFガングリオシドの分画定量を行なった．結果は表3に示す如くであった．

表2　Proposed structure of chicken muscle gangliosides

A (GM_3)	:	NANA-Gal-Glc-Cer
B (GD_3)	:	NANA-NANA-Gal-Glc-Cer
C (GT_3)	:	NANA-NANA-NANA-Gal-Glc-Cer
D	:	NANA-Gal-GlcNA-Gal-GlcNA-Gal-Glc-Cer
F	:	NANA-Gal-GlcNA-Gal-Glc-Cer
G	:	NANA-Gal-GalNA-Gal-Gal-Glc-Cer

表3　Gangliosides in dystrophic chicken and control chicken

Ganglioside	Control (N=10)	Dystrophy (N=10)	Dystrophy/Control
	μg NANA/g protein		
Total	13.5±4.2	48.7±22.5	3.6
A (GM_3)	5.5±1.2	23.1±8.1	4.2
B (GD_3)	2.0±1.1	5.3±3.0	2.7
C (GT_3)	0.3±0.2*	0.6±0.4*	2.0
D	3.7±2.3	16.8±13.6	4.5
E	0.5±0.4	0.6±0.4	1.2
F	0.5±0.2	1.7±0.9	3.4
G	1.1±0.6	0.7±0.8	0.6

* $P < 0.025$

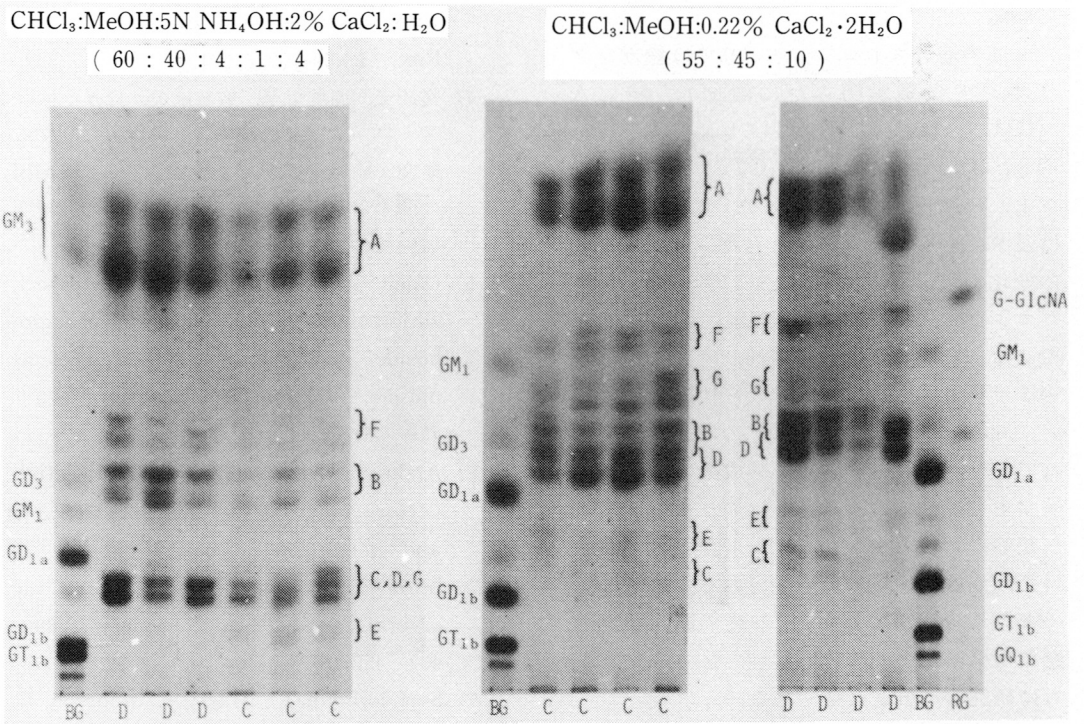


図2　Gangliosides pattern of dystrophic chicken and control chicken

考　　案

鶏筋ガングリオシド含量は，ヒト[7]，ラット[1]，ウサギ[8]，ネコ[1]などの筋ガングリオシド含量とほぼ一致していた．

鶏筋ガングリオシド分画については，前回までGM_3およびGD_3ガングリオシドの存在を報告してきたが，今回の検索により，これらを含め，少なくとも**表2**の如く7つのガングリオシド分画の存在を認めた．これらのうちA（GM_3），B（GD_3），D，FおよびGガングリオシドはChien and Hoganによる報告[5]と一致するものであった．Cガングリオシドは，Yu[9]らによりタラの脳において新しく見出されGT_3と命名されたガングリオシドであり，筋における存在を初めて明らかにした．又，DおよびGガングリオシドは今のところ鶏筋においてのみその存在が知られているガングリオシドであり，興味がもたれる．

鶏筋ガングリオシド分画には，少なくとも7つのガングリオシドが含まれることが明らかとなった．ヒト筋では，GM_3，GM_2，GD_1，およびGM_1ガングリオシドが主であり[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よりなる[8]．またネコおよびラットではGM_3ガングリオシドが主分画である[1]と報告されており，現在までの報告では，いずれの種においても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，その他の分画については，種により異なっている可能性がある．

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[1]，および筋ジストロフィーマウス筋では，逆にGM_3ガングリオシドの減少[2]，さらにビタミンE欠乏によるウサギの実験的ジストロフィー症の筋におけるガングリオシドの増加[3]などが報告され

ている．

今回の筋ジストロフィー鶏筋では総ガングリオシド含量が明らかに増加し，特にA (GM_3)，DおよびFガングリオシドが最も増し，次にB (GD_3)，C (GT_3) ガングリオシドが増加し，EおよびGガングリオシドには差を認めなかった．これらガングリオシドの変化の由来は，現在まで筋におけるガングリオシドの代謝が明らかにされておらず不明であるが，次の2つの可能性が考えられる．第1は筋ジストロフィー鶏の筋組織変化においてsarcotubular structureの増加が指摘されており，これらを含めた膜成分の増加を反映する可能性であり，第2は筋ジストロフィー鶏筋におけるガングリオシド合成の亢進ないし，崩壊の低下の可能性である．病態解明のまたれる筋ジストロフィー症の筋線維壊死発現機構解明の一つのモデルとして，今後さらに研究の進展が必要である．

文　献

1) Max, S. R., Nelson, P. G. & Brady, R. O.: The effect of denervation on the composition of muscle gangliosides. J. Neurochem., 17: 1517—1520, 1970.
2) Max, S. R. & Brady, R. O.: Alteration of the ganglioside composition of skeletal muscle in murine muscular dystrophy. Nature, 233: 55—56, 1971.
3) Albarracin, I., Lassaga, F.E. & Caputto, R.: Changes of gangliosides and other lipids in skeletal muscle from rabbits with experimental dystrophy. J. Lipid Res., 15: 89—93, 1974.
4) 宮武正，渥美哲至，有賀敏夫，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—続報—．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54年度研究報告書，1980，p. 206.
5) Chien, J.L. & Hogan, E.L.: Characterization of two gangliosides of the paraglboside series from chicken skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta, 620: 454—461, 1980.
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) Lassaga, F.E., I. Albarracin de Lassaga and Caputto, R.: Rabbit muscle gangliosides. J. Lipid Res., 13: 810—815, 1972.
9) Yu, R.K. & Ando, S.: Structures of some new complex gangliosides of fish brain in structure and function of gangliosides. (edited by Svenner holm. et al.), Plenum Press, 1979, p. 33—46.

48) Ophthalmoplegia plus症候群，及び実験的ミトコンドリアミオパチーにおける筋肉内GOTアイソザイムについて

垂　井　清一郎*

研究協力者　姜　　進*　小笠原　三　郎*　依　藤　史　朗*
上　野　　聡*　渡　辺　浩　男*　高　橋　光　雄*

外眼筋マヒを主症状とし，これに種々の症状を合併した患者は，これまでKearns-Shy症候群[1]，Ophthalmoplegia plus症候群[2]等，種々の名称の下に報告されてきた．これらの症例は筋肉において形態学的にミトコンドリアの増加，封入体を有するミトコンドリアの出現などが見出されており，ミトコンドリアの異常が本症候群の発症に関係している可能性が示唆されている[3]．しかし本症候群の筋肉のミトコンドリアの生化学的検索は少なく，1977年Berenberg等により3例について呼吸活性が測定されている程度で，組織学的にはSDH,LDH等の脱水素酵素活性の増加が想定されているが，本症候群に特徴的な生化学的変化は明確にされていない．今回われわれは細胞質とミトコンドリアマトックスに異なるアイソザイム(s-GOT，m-GOTと略)が存在するGOTに着目し，本症候群の2例において生検筋中のGOTアイソザイムを分別測定し，その変化を検討した．又，DNP(ジニトロフェノール)の動脈注射，あるいは虚血等の処理により，ラットに実験的ミトコンドリアミオパチーを作製し，その筋肉中のGOTアイソザイムについても検討を加えた．

対象及び方法

症例1　24歳女性，13歳時に眼瞼下垂，及び複視で発症し，以後徐々に顔面，咽頭，頸部，四肢近位に筋力低下が進行した．網膜変性症，神経性難聴が認められ，ECGではSTの低下，心房性期外収縮が認められた．筋生検では，Gomori染色でragged red fiberが多数見られ，電顕で結晶状封入体を有する巨大ミトコンドリアが認められた．脳波はθ波が軽度混入する異常波であった．極く軽度の甲状腺機能亢進症が合併していた．

症例2　24歳女性，19歳時に眼瞼下垂で発症し，顔面，咽頭，四肢遠位の各筋に筋萎縮が進行した．網膜変性が見られ，血清CPK活性は196U/Lと軽度上昇（正常値50U/L以下)．脳波はθ波の軽度混入が見られた．筋生検ではragged red fiberや異常ミトコンドリアは認められなかった．ECG，聴覚検査では異常が見られなかった．

コントロールとして，各種神経・筋疾患7例(多発性筋炎4例，ALS，FSH型及びLG型筋ジストロフィー各1例）から得た筋生検標本を用いた．

実験的ミトコンドリアミオパチーの作製

DNP法[4]：体重150g程度のWistar系雄性ラットを用い，ネンブタール麻酔下に開腹し，右腸骨動脈にカニュレーションして，水酸化ナトリウムでpHを7.4に調製したDNP溶液（3 mg/ml）5 mlを5分間で注入し，30分後に右gastrocnemiusを摘出した．

虚血法[5]：ラットの一側後肢の大腿部をゴ

＊大阪大学医学部第二内科

ムバンドで駆血して虚血状態にし，24時間後に gastrocnemius を摘出したものを用いた．

対象としては30分間虚血状態にした gastrocnemius を用いた。

GOT アイソザイムの分別定量法[6)]

筋肉を20倍量の phosphate buffered saline 中で凍結，融解をくりかえしたのちホモジナイズし，両 GOT アイソザイムを抽出した．酵素活性は10mM Asp,3.3mM α ケトグルタール酸，0.1mM NADH，3 μg MDH を含む 1 ml の0.1M Tris buffer (pH7.4) 中で37℃で反応させ，NADH の340nm の吸収の減少速度で測定した（1 U＝1 μmole/min)．m-GOT と s-GOT の分別定量は，抗 s-GOT 抗体で s-GOT を除去し，残存した m-GOT を測定，別に測定した全 GOT 活性から s-GOT 活性を算出した。

結　　果

1) Ophthalmoplegia plus 症候群の 2 例と，コントロール群の m 及び s-GOT 活性，及び m-GOT の占める比率（% m-GOT）を図 1 に示した．GOT アイソザイムの絶対活性は他の神経・筋疾患と比較して有意な差が見られなかったが，% m-GOT は Ophthalmoplegia plus 症候群の 2 例ではともに35%で，他の神経・筋疾患 7 例の46±7（%）（mean± 2 SD）と比較して有意に低下していた．

2) 実験的ミトコンドリアミオパチーにおける筋肉内 GOT アイソザイムの変化を図 2 に示

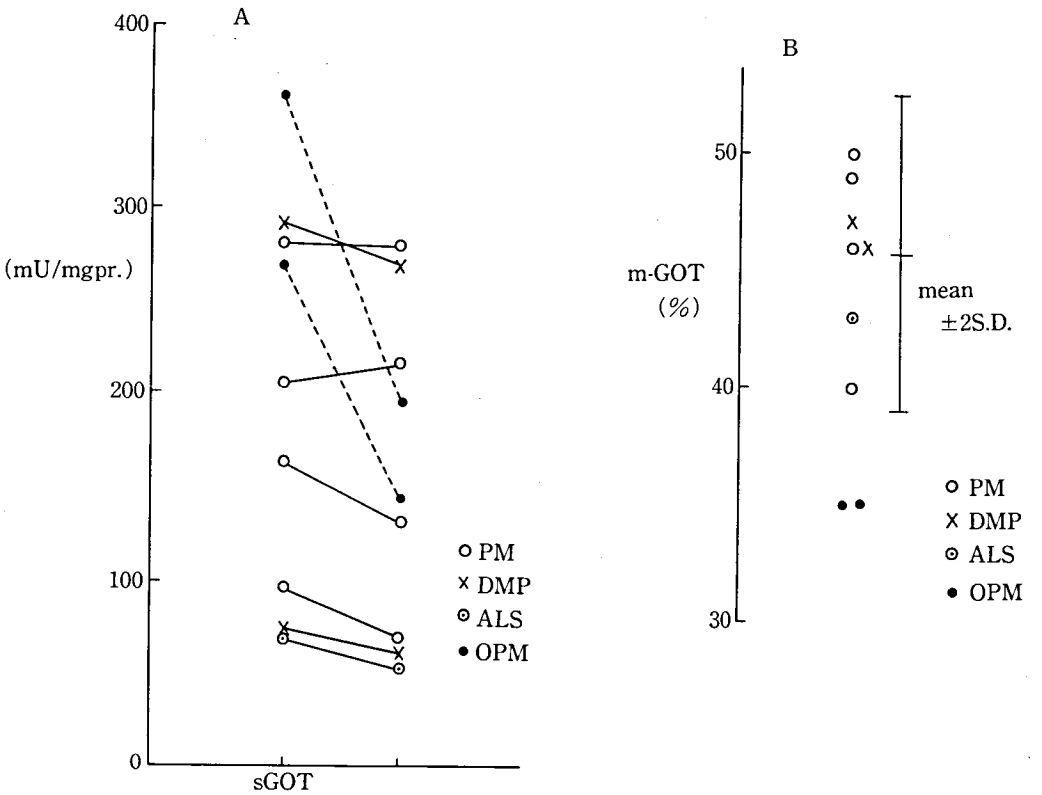


図 1　(A) Ophthalmoplegia plus 症候群 (OPM) の 2 例，及びコントロールの生検筋におけるGOTアイソザイムの絶対活性，及び(B)全GOTに占めるm-GOT の比率（%m-GOT）を示す．（PM：多発性筋炎，ALS：筋萎縮性側索硬化症，DMP：FSH型，及びLG型筋ジストロフィー症）

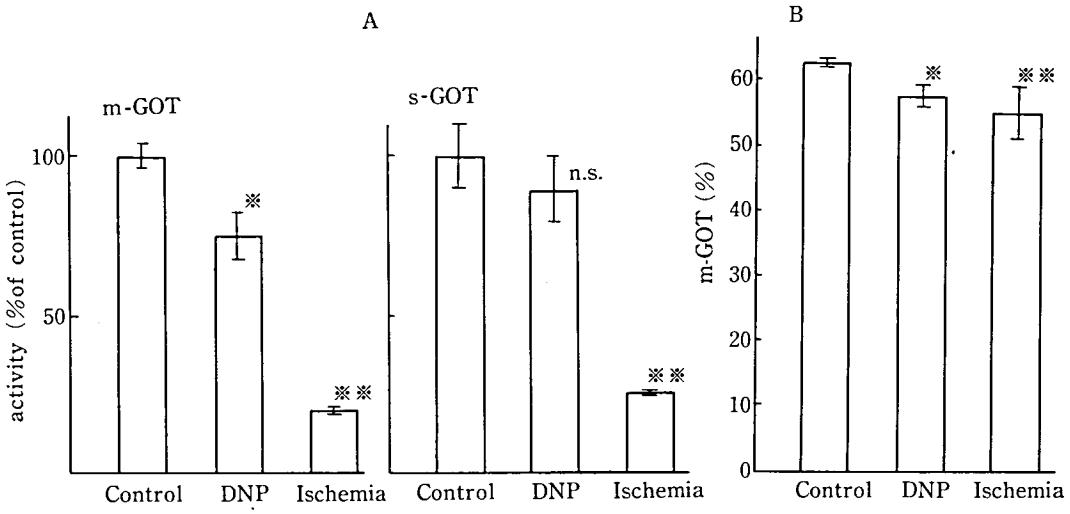


図2 (A)実験的ミトコンドリアミオパチーにおけるGOTアイソザイム活性の変化，及び(B)%m-GOTの変化を示す．各々のヒストグラムは5例の平均±SDを表わす．(※p<0.05, ※※p<0.01)

した。DNP群ではm-GOT活性はコントロール群に比較して75%と有意に低下していたが，s-GOTの減少はそれほど著明ではなかった。虚血群ではm-GOT，s-GOTともに著明に減少したが，%m-GOTはコントロール群よりも有意に減少していた．

考　　案

Ophthalmoplegia plus症候群の筋肉についての生化学的検索はBerenberg等によって報告されている[3]．彼らは，Ophthalmoplegia plus症候群の患者3例の筋肉から得たミトコンドリアの呼吸機能，ATP ase活性を調べ，うち1例で呼吸活性の低下，DNPによるATPase活性の増加率の減少などを見出している．しかし，残る2例では異常が見られず，現在までOphthalmoplegia plus症候群の筋肉に共通した生化学的変化は知られていない．GOTは細胞質とミトコンドリアマトリックスに2種のアイソザイムが存在しており，ミトコンドリアの障害により，GOTアイソザイムのパターンに何らかの変化の生ずる可能性が考えられる．図1に示すように，Ophthalmoplegia plus症候群の2例では，他の神経・筋疾患に比較して，m-GOT，s-GOTともに絶対活性で比較するかぎり，有意な変化は見られなかったが，m-GOTの全GOTに占める比率は減少していた．この変化がミトコンドリアの異常を生じているのか，ミトコンドリアの何らかの障害がm-GOTの変化をもたらすのかを検討するため，ミトコンドリアに形態的異常を生ずることの知られている2つの実験的ミオパチー，すなわちDNPの動注，及び虚血によるミオパチーにおけるGOTアイソザイムについて検討を加えた．DNP群ではm-GOTのみが有意に減少し，s-GOTの減少程度はわずかであった．虚血群においてはm-GOTのみならずs-GOTも著明に減少したが，その減少率はm-GOTの方が著明であった．又，両実験的ミトコンドリアミオパチーでともに%m-GOTの有意な減少が認められた．これらの結果は%m-GOTの減少がミトコンドリアに対する何らかの侵襲により生ずることを示唆するものである．

形態的にミトコンドリア異常が証明されなかった第2例においても同じ変化が認められたことは興味深いが，今後さらに症例を追加して検討する予定である．

結　　論

1) Ophthalmoplegia plus 症候群の2例において筋肉内のGOTアイソザイムを分析した所，m-GOTの全GOTに占める比率（% m-GOT）に低下が見られた．

2) ラットを用いて実験的に作製したミトコンドリアミオパチーでも同じ変化が見られた．このことはOphthalmoplegia plus 症候群における% m-GOTの減少がミトコンドリアの障害により2次的に生じたものであることを示唆するものである．

文　　献

1) Karpati,G.,Carpenter,S.,Larbrisseau,A.et al.: The Kearns-Shy syndrome. A multisystem disease with mitochondrial abnormality demonstrated in skeletal muscle and skin.J.Neurol.Sci.,19 : 133, 1973.

2) Drackman,D.A.: Ophthalmoplegia plus. The neurodegenerative disorders associated with progressive external ophthalmoplegia.Arch.Neurol.,18 : 654, 1968.

3) Berenberg,R.A.,Pellock,J.M.,Dimauro,S.,et al.: Lumping or splitting?"Ophthalmoplegia plus"or Kearns-Shy syndrome?.Ann.Neurol., 1 : 37, 1977.

4) Melmed,C.,Karpati,G.& Carpenter,S.: Experimental mitochondrial myopathy produced by *in vivo* uncoupling of oxidative phosphorylation J.Neurol.Sci., 26 : 305, 1974.

5) Karpati,G.,Carpenter,S.,Melmed,C.,et al.: Experimental ischemic myopathy.J. Neurol.Sci.,23 : 129, 1974.

6) Wada,H.,Teranishi,H.,Kagamiyama,H.,et al.: A simple immunological method for differential determination of serum glutamic-oxaloacetic transaminase isozymes. Medical J.Osaka Univ., 29 : 181, 1978.

49) Duchenne 型筋ジストロフィーの単一筋線維：収縮蛋白の分析

高木昭夫*

研究協力者　石浦章一*　水澤英洋*　助川卓行*
安部和子*　小川敬子*

昨年度の報告では各種の神経筋疾患の生検筋から単一筋線維を作製し，その機能を分析した．Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)の骨格筋には未分化な筋線維（タイプX）が多数存在することを明らかにした．本年は幼若ラットの骨格筋を使用して同様な分析を行い，タイプX型反応の生理学的意義を考察した．またヒトの単一筋線維の収縮蛋白組成を分析して，DMD における筋分化の問題を検討した．

対象と方法

神経筋疾患として，10名の DMD，約20名の各種神経筋疾患を対象とした．幼若ラットとして生後1日目のラットの下肢筋（ひらめ筋と長趾伸筋）を使用した．スキンドファイバー法は既報に従った[1]．剖検時に採取した骨格筋よりミオシンと活性トロポミオシンを調製し，ゲル電気泳動の際の蛋白同定に供した．単一筋線維のゲル電気泳動は三川ら，および石浦らの方法によった[2)3)]．

結　　果

(1) タイプX線維の出現頻度（表1）

表1　タイプX(未分化)筋線維の出現頻度

Duchenne型筋ジストロフィー	34%($^{32}/_{93}$, N=10)
その他の神経筋疾患	
15歳未満	0%($^{0}/_{44}$, N=7)
15歳以上	7%($^{5}/_{74}$, N=9)

*国立武蔵療養所神経センター

骨格筋収縮系のストロンチウム（Sr）感受性から単一線維の筋ファイバータイプを分類した[1]．タイプX型の反応は DMD の34%のファイバーに観察された．小児期の神経筋疾患（筋炎，脊髄性筋萎縮症やネマリンミオパチー）では認められない．成人では筋緊張性ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症などの約7%の筋線維に認められた．

(2) ラット幼若筋の Sr 感受性（図1）

生後1日目ラットのひらめ筋（SOL）と長趾伸筋（EDL）より小筋束（径約100μm）を作製した．EGTA による chemical skinned fiber を作製して[4]，Sr 感受性を分析した．その結果を成熟ラットのタイプ1およびタイプ2線維と比較した．幼若 SOL の Sr 感受性はタイプ1およびタイプ2筋線維の中間的反応を呈した．幼若 EDL では，pSr 5 や pSr4.5の低濃度域ではタイプ2より感受性が高い．しかし pSr 4 以下ではタイプ2と同一であった．このように幼若 SOL の反応はタイプ1とタイプ2の中間にあり，この点では DMD のタイプXのものに類似していた．

(3) ヒト単一筋線維の収縮蛋白の分析

ヒト単一筋線維の筋ファイバータイプをスキンドファイバー法で同定した後で，その収縮蛋白組成を1次元（1 D）あるいは2次元（2 D）ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した．1 D-SDS ゲル電気泳動（図2）によると，タイプ1とタイプ2筋線維では，蛋白組成は明瞭に異なっている．高分子量の方からミオシン H 鎖，α-アクチニン，55,000蛋

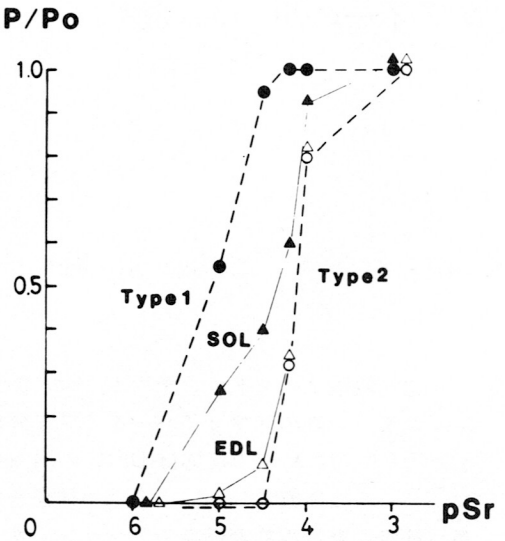


図1　ラット骨格筋のストロンチウム感受性.
Type 1およびType 2：成熟ラットのタイプ1あるいはタイプ2筋線維.
SOL：生後1日目ラットのひらめ筋.
EDL：生後1日目ラットの長趾伸筋.
pSr＝−log [Sr^{2+}]. P/Po：相対張力（Poは最大収縮力）. 生後1日目のひらめ筋のストロンチウム感受性はタイプ1とタイプ2の中間にあった.

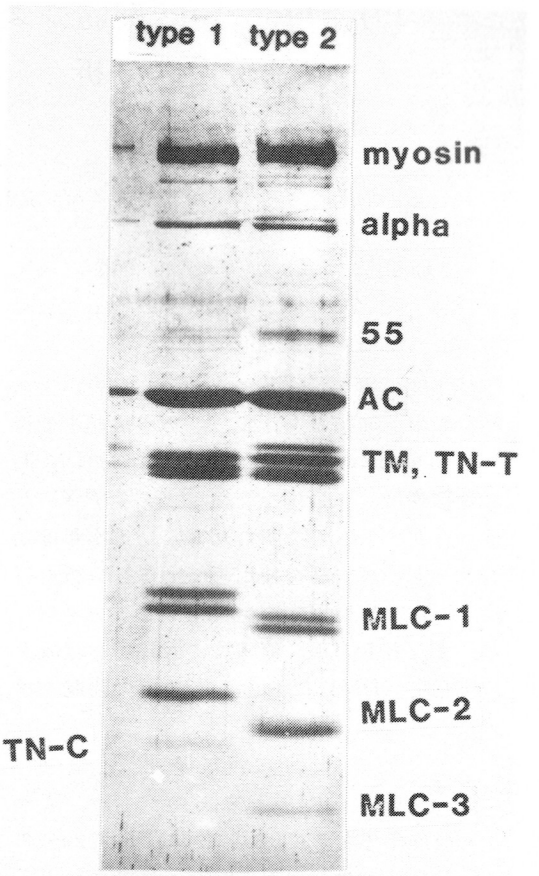


図2　ヒト単一筋線維の1次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動. type 1：slow twitch fiber, type 2＝fast twitch fiber. CBB染色による. myosin：ミオシンL鎖, alpha：α-アクチニン, 55：55,000蛋白, AC：アクチン, TM, TN-T：トロポミオシンとトロポニンT. MLC-1：ミオシンL鎖-1（2本のうちいずれも上方のものがMLC-1と考えている. 分子量はMLC-1s 27,000, MLC-1f 26,000), MLC-2s (m.w. 19,000), MLC-2f(m.w. 18,500), MLC-3 (m.w. 16,000). TN-C：トロポニンCと推定されるもの.

白やアクチンは同定できる. しかしトロポミオシン（TM）とトロポニン-T（TN-T）, ミオシンL鎖-1（MLC-1）とTN-I, MLC-2, TN-CやMLC-3などの確認は1D-ゲルではできない. タイプ2筋線維にのみMLC-3の存在すること, MLC-1やMLC-2の分子量がタイプ1とタイプ2の間で相違することは, 他の哺乳類の骨格筋における知見と同一であった[5].

2D-ゲル電気泳動により, TM, MLC-1, -2, -3の同定が可能であった（図3）. TMにはα鎖やβ鎖と推定されるスポットがタイプ1およびタイプ2の両者に認められた. タイプ1のMLC-1sには3つの亜成分がみとめられた（MLC-1sa, -1sb, -1sc）. うち1ヶはMLC-1fと2D-ゲル上において同一の移動性を示した. MLC-2sとMLC-2fは等電点電気泳動（IEF）により, 2-3の

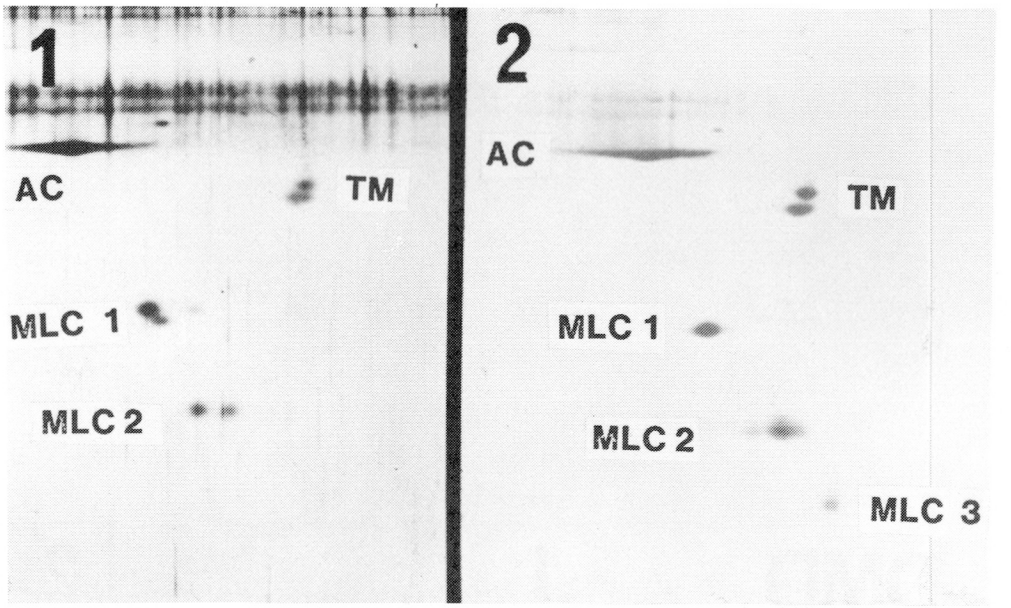


図3　ヒト単一筋線維の2次元ゲル電気泳動．1：タイプ1筋線維，2：タイプ2筋線維，AC：アクチン，TM：トロポミオシン，MLC：ミオシンL鎖．銀染色による．MLC-3はタイプ2にのみ認められる．タイプ1のMLC-1は3のスポットよりなっている．MLC-2は同分子量の複数のスポットに分かれている．これは燐酸化された分子と考えられる．

スポットに分離することがある．これは燐酸化されたミオシンL鎖と推定している．MLC-3f はタイプ2線維に多量に存在した．TN-C と推定されるスポットがこの2D-ゲル電気泳動の系により認められる．この同定と筋ファイバータイプによる差違は検討中である．

(4)　DMD 単一筋線維の蛋白組成（図4と図5）

DMD の生検筋から単一筋細胞を分離した後で，スキンドファイバー法により筋線維タイプを決定した．その後，1D あるいは2D-ゲル電気泳動により収縮蛋白組成を分析した．DMD のタイプ1あるいはタイプ2筋線維において，ミオシンH鎖，アクチン，TM，KLC-1，MLC-2 や MLC-3 のいずれも対照のタイプ1あるいはタイプ2のそれと同一であった．タイプX線維に関して，ミオシンL鎖の構成に重点をおいて比較した．pSr4.5 の溶液中における P/Po が0.3-0.5に分布するもの（タイプ X_2）のミオシンL鎖は対照のタイプ2と同一であった．同様に P/Po が0.5-0.7に分布するもの（タイプ X_1）では，ミオシンL鎖は対照のタイプ1と同一であった．このようにタイプX線維のミオシンL鎖の分化は完全であった．

考　　案

生後1日目ラットのひらめ筋のストロンチウム感受性は分化したタイプ1およびタイプ2筋線維の中間に位置した（図1）．幼若ラットの場合には，筋線維束（約100μm 径）を使用して実験を行った．この時期には筋細胞は組織化学的にタイプ2Cの反応を呈し，筋線維タイプの組成に関しては均一であるといわれる[6]．したがって線維束を使用しての実験

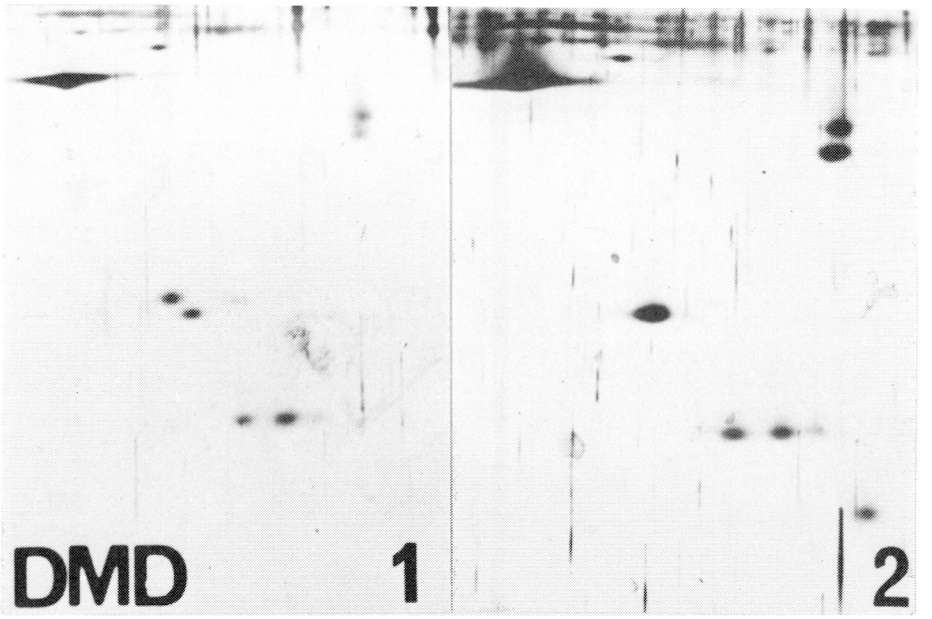


図4　DMDの単一筋線維の2次元ゲル電気泳動．1：タイプ1筋線維，2：タイプ2筋線維．それぞれのスポットの同定は図3に示したものと同じである．DMDにおいてはミオシンL鎖の構成は対照のそれと同一であった．

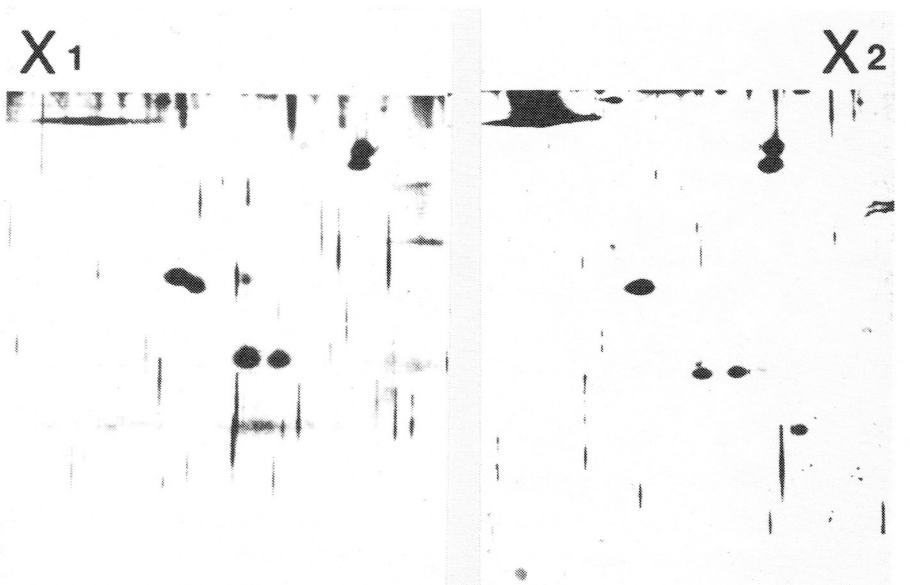


図5　DMDタイプX筋線維の2次元ゲル電気泳動．X_1：タイプX筋線維，ただしP/Po（pSr 4.5における）が0.6のもの．X_2：タイプX筋線維，ただしP/Po（pSr 4.5における）が0.4のもの．各々のスポットの同定は図3と同じである．タイプX筋線維のミオシンL鎖の構成は対照のタイプ1あるいはタイプ2と同一である．

は可能であると判断した．この幼若ひらめ筋のストロンチウムに対する反応はヒトのタイプX線維のものに類似している．それ故タイプX線維が未分化であるとの推論の傍証とした．しかしタイプXと分類されたものの全部あるいは一部が変性した筋細胞である可能性は完全には除外できないだろう．生検筋をグリセリンを含む弛緩溶液（−20℃）に7−10日以上保存すると，一部の筋線維においてカルシウムやストロンチウムの感受性が変化することが知られている[10]．

タイプX筋線維の出現頻度はDMDにおいてのみ高いといえる．これは本症において筋細胞壊死と再生のサイクルが旺盛であることの反映であろう．しかし再生現象が旺盛と推定される他種の神経筋疾患では，タイプXの出現は少ない．このことはDMDでは筋再生が正常に進展しない可能性を示唆するのかもしれない．

鶏や家兎では筋線維タイプによる収縮蛋白の分化の相違がよく知られている[5)7)]．ヒトの場合には骨格筋はタイプ1やタイプ2線維の混合したものであるため，筋蛋白分化の知見はまだ乏しい．近年数ヶ所より報告が散見されるが，一定の結論には到達していない[8)9)]．我々はスキンドファイバー法により筋線維タイプを確認した単一筋線維の蛋白組成を分析した．ミオシンL鎖の構成に関して，ヒトのタイプ1線維はMLC-1sとMLC-2sより成る．タイプ2にはMLC-1f,MLC-2f,MLC-3fが存在した．MLC-1sは更に1sa,1sb,1scの亜成分に分かれた．MLC-1saとMLC-1fは分子量が違い，MLC-2sとMLC-2fも相違している．MLC-1sbとMLC-1fは2D-ゲル上，移動度は一致している．しかしキモトリプシン消化によるペプタイド分析からは，MLC-1sbとMLC-1fは同一組成ではなかった[10]．

DMDにおいて未分化と推定されているタイプX線維のミオシンL鎖は対照のタイプ1あるいはタイプ2と同一の構成であった．このようにミオシンL鎖の分析からはDMDの筋線維に分化の異常は証明されなかった．この所見は1−2の実験的ミオパチーの場合とは著明な対比をなしている．不動性萎縮の際に，ラットひらめ筋では脱分化と再分化が発現する．この際には，同一筋細胞内にタイプ1型とタイプ2型のミオシンL鎖が共存している[10]．また長期に亘る持続刺激の際には筋線維タイプは転換し，その際にも単一筋線維内に両タイプのミオシンが共存するという[11]．

骨格筋収縮系のカルシウムやストロンチウムに対する感受性は，トロポニンの性質により決定される．したがってタイプX型の反応に関連して，トロポニンの分析を行う必要があろう．

結　論

DMDなどの神経筋疾患の生検筋から単一筋線維を分離し，その生理的機能と蛋白組成の対比を行った．収縮系のストロンチウム感受性を検討すると，DMDでは対照には存在しないタイプXと仮称される筋線維が34%存在した．タイプXの反応は未分化筋線維のものに近似している．DMDにのみ多量のタイプX線維が存在する事実は，本症において筋線維の分化の遅滞を推定させるものである．

ヒトの単一筋細胞の蛋白組成は1Dおよび2D-ゲル電気泳動で分析した．タイプ1とタイプ2線維ではミオシンL鎖の構成の相違が確認された．MLC-1sはヒトでは3ヶの亜成分に分かれるのが従来の哺乳類の知見とちがう点であった．DMDのタイプ1あるいはタイプ2線維は対照のそれと同一のミオシンL鎖を呈した．タイプX線維では，対照のタイプ1あるいはタイプ2のどちらかのミオシンL鎖の構成を示した．

文　献

1) Takagi, A., Yonemoto, K., Sugita, H.: Single skinned human muscle fibers. Neurology(Minneap.), 28：497, 1978.

2) Mikawa, T. : J.Biochem (Tokyo). to be published.
3) Ishiura, S. : Exper. Neurology. to be published.
4) 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 (Minneap.),28 : 447, 1978
5) Sarkar, S., Sreter,F.A.,Gergely, J. : Light chains of myosins from white,red and cardiac muscles. Proc. Nat. Acad.Sci. USA.,68 : 946, 1971.
6) 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.
7) Obinata,T.,Masaki, T.,Takano, H. : Types of myosin light chains present during the development of fast skeletal muscle in chick embryo. J.Biochem., 87 : 81, 1980.
8) Libera, L.D., Margreth,D.A.,Mussini,I. et al. : Myosin poly-morphism in human skeletal muscles. Muscle & Nerve, 1 : 280, 1978.
9) Pette, D.Henriksson, J.Emmerich,M. : Myofibrillar protein patterns of single fibers from human muscle. Febs. Lett., 103 : 152, 1979.
10) 高木昭夫, ほか : 未発表.
11) Pette, D.,Schner, U. : Coexistence of fast and slow type myosin light chains in single muscle fibers during transformation as induced by long term stimulation. Febs. Lett., 83 : 128, 1977.

50) 実験的 serotonin myopathy における病理学的ならびに筋構造蛋白質の検討

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*

種々の myopathy における筋肉組織の崩壊機構については未だ不明な点が多い．前回，我々は vasoactive agent である serotonin を rat に投与する事によって myopathy を生ずる事を形態学的および生化学的に確認し報告したが，今回，serotonin myopathy における筋崩壊機構の解析を目的に SDS—ゲル電気泳動による検索を行った．

材料および方法

Myopathy の作製は体重100g 前後の雄 Wistar rat に生食水に溶解したセロトニンを体重1kg 当り10mg 腹腔内投与した．投与は週1回，連続24週間投与した．コントロールとして同年齢の無投与雄 Wistar rat を使用した．

断頭後，氷冷した rat の後肢筋の結合織，脂肪組織を除去して得た筋組織を，0.1M NaCl＋5 mM $NaHCO_3$からなる溶液にてホモゲナイズし，1万 g×20分遠心分離した．得た沈渣を同液にて洗浄し同様に遠心分離する操作を3回繰り返した．以上の操作によって得られた沈渣のタンパク質濃度を Lowry 法にて測定後，SDS—ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った．

電気泳動の条件は池原[1]らの方法に従い概略は以下のようである．

(1)試料—タンパク質可溶化は1％ SDS＋10％ sucrose＋10mM Tris-HCl pH8.0＋1 mM EDTA＋1％ β—メルカプトエタノール＋8 M urea からなる溶液にて1 mg protein/ml の割合で80℃，20分間加熱にて行った．(2)ゲル濃度5.6％のディスクゲルに試料タンパク質を1ゲル当り30μg 添加し，1ゲル当り4 mA で約4時間通電して泳動した．(3)泳動したゲルをクーマジーブルー，イソプロピルアルコール，酢酸からなる染色液にて染色し，10％酢酸にて脱色した．(4)次にデンシトメーターにてゲルのバンドの相対比率を計測した．

結　　果

(1)コントロールにおける泳動パターンの結果は**写真1**の如く明瞭なバンドは13本認められた．それらのバンドのうち推定分子量1万5千以上のバンドは9本で，**写真1**の左からそれぞれ18万5千，15万5千，12万，9万5千，6万8千，5万，3万8千，2万5千，1万5千であった．(2)コントロールにおける分子量1万5千以上のバンドの拡大は**写真2**の如くで，それぞれのバンドの相対比率は22.96％，4.44％，14.07％，2.96％，1.48％，2.96％，10.37％，13.33％，7.4％であった（**表1**）．(3) serotonin myopathy における泳動パターンはコントロールと比べ推定分子量1万5千以上のバンドにおいて明らかな差異が認められた（**写真3**）．(4)コントロールとの差異

＊名古屋大学医学部第一内科
＊＊愛知医科大学第四内科

は(ｉ)分子量18万５千のバンドにみられたバンド幅の拡大と分裂および相対量の増加，(ii)分子量15万５千，12万，９万５千のバンドの量的減少，特に９万５千のバンドの著明な減少，(iii)分子量５万と３万８千のバンドの融合がみられたが両バンドの合計比率は変らなかった．(iv)分子量２万５千のバンドの増量がみられたが，３万８千と１万５千のバンドは減少傾向を示した．(ｖ)分子量１万５千以下のバンドについては量的差異は明らか

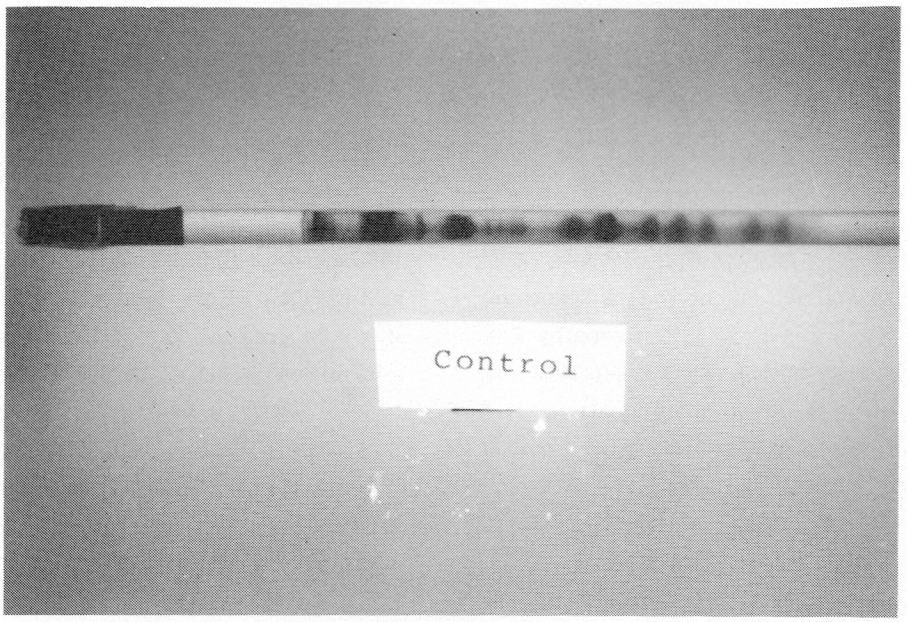


写真１

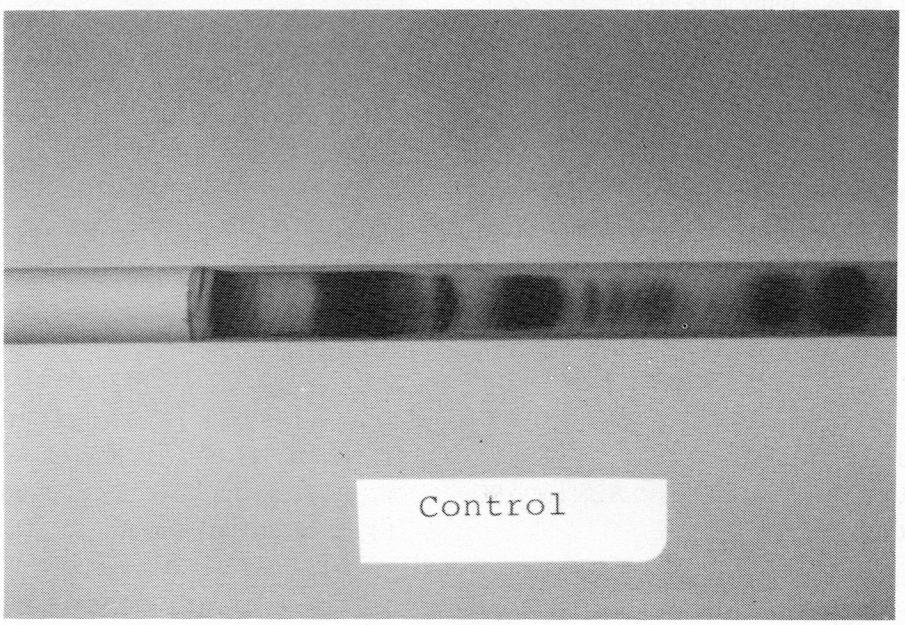


写真２

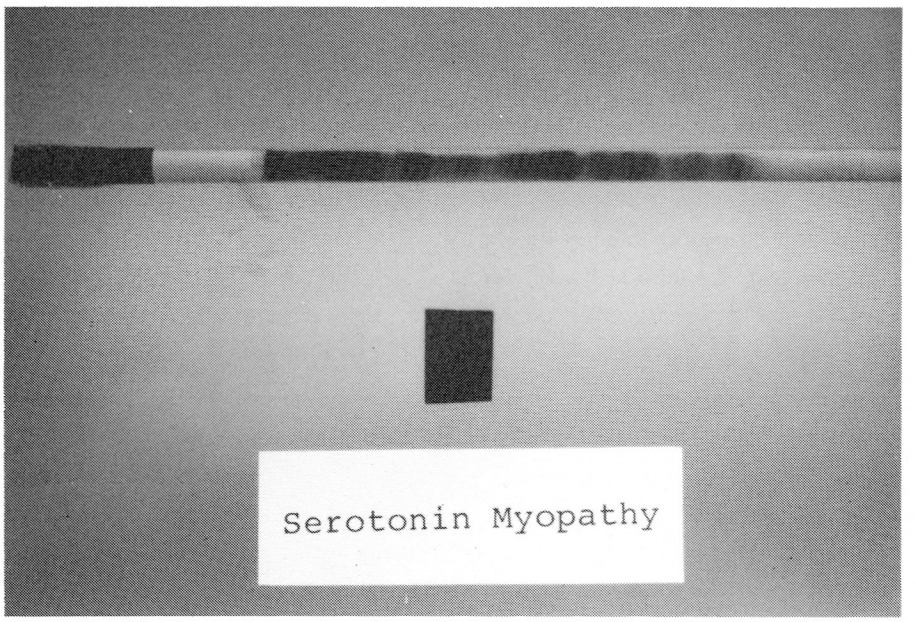


写真 3

表 I

Results (Densitometer)

		Control	Serotonin myopathy
Band	MW × 10^3	(%)	(%)
I	I85	22.96	26.54
2	I55	4.44	2.56
3	I20	I4.07	II.I3
4	95	2.96	0.85
5	68	I.48	4.96
6	50	2.96	
7	38	I0.37	8.93
8	25	I3.33	I8.83
9	I5	7.4	6.33
I0 II I2 I3		20.03	20.87

ではなかった（**表 1**）.

考　　察

今回の我々が SDS - ゲル電気泳動に使用した試料は，バンドの数，各々の推定分子量から判断して，筋構造タンパク質のみならず筋膜成分，筋小胞体成分などを含む種々の成分が含まれているものと推定される.

しかし我々の条件にて作製した serotonin myopathy における筋崩壊の内容として，α - actinin の減少と myosin の heavy chain の変化が強く推測される.

ゲル電気泳動分析によると Duchenne dystrophy の初期変化として，α - actinin の減少と Troponin の変化，即ち Troponin I，C の減少と TroponinT の保存が指摘されており，実験的にはこれら一連の変化は calcium-activated neutral protease の作用に類似していると報告されている[2) 3)]. しかし myosin の heavy chain の変化については Duchenne dystrophy においては病期の後半に認められるとされているが，calcium-activated neutral protease の作用については問題があるとされている[3)].

我々の大まかな分析結果から推測された serotonin myopathy における α-actinin の減少と myosin の heavy chain の変化は myopathy における筋崩壊機構の解析に対し興味ある所見と云える. 今後，更に component

別にみた分析が必要と考える.

文　献

1) 池原征夫, 加藤敬太郎, 中尾真, ほか：生化学実験講座 14 生体膜, 東京化学同人, p.119, 東京, 1977.

2) Reddy,M.K.,Etlinger,J.D.,Rabinowitz,M., et al.: Removal of Z-lines and α-actinin from isolated myofibrils by a calcium-activated neutral protease.J.Biol.Chem., 250：4278, 1975.

3) Sugita,H., Ishiura,S., Suzuki,K.,et al.: Ca-activated neutral protease and its inhibitors: in vitro effect on intact myofibrils. Muscle & Nerve, 3 : 335, 1980.

51) Caプロテアーゼによる骨格筋の崩壊
——Caイオノフォア(A 23187)の効果——

杉田秀夫*,**

研究協力者　石浦章一**　埜中征哉**

はじめに

進行性筋ジストロフィー症は筋萎縮が進行する疾患である．骨格筋の萎縮は即ち筋蛋白特に筋構造蛋白の分解を意味するが，この際各種の蛋白分解酵素が系統的に関与することが想定されている．最近デュシャンヌ型筋ジストロフィー症において注目されているopaque線維，Ca染色陽性線維，或いは電顕的に認められるplasma膜の部分的欠損などの所見から筋蛋白分解の初期段階においては，膜系の障害の為に細胞外より過剰に流入したCaイオンにより，筋細胞内に存在するCa依存性中性プロテアーゼ（CANP）が活性化され作用することが考えられている[1]．この様な仮説の傍証を得る為に我々は *in vitro* に於てintact muscleにCaイオノフォア（A 23187）を用い，過剰のCaを流入させた時どの様な変化が筋蛋白に出現し，又同時にこの作用がCANPの特異的inhibitorであるE-64-cにより抑制されるか否かを検索した．

方法

ウイスター系♂ラットを用い，ヒラメ筋（SOL）及び長趾伸筋（EDL）を両端に腱をつけたまま筋膜を障害しない様に採取した．そしてCaを含まないKrebs-Ringer液にCa^{++} 1 mMを含む溶液とその代りにEGTA 1 mMを加えた溶液を作成し，採取した各筋肉をひたし実験を行った．両溶液にcycloheximide 0.5mMを加え，アミノ酸の再利用をおさえ，更にCaイオノフォア（A 23187）25μMを加えた．

反応時間と遊離蛋白との関係は3時間迄ほぼ直線的であるので，実際の反応時間を3時間，37℃で行った．95% O_2，5% CO_2は3時間の反応時間内では特に結果に影響しないので用いなかった．なお，E-64-c（N-〔N-(L-3-ethoxy-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕-isoamylamine）は，30μMをCaを含む溶液に加え実験に用いた．遊離蛋白はLowry法で測定し，溶液中のCPKはRosalki変法で測定した．SDSゲル電気泳動はLaemmli法に従った．

結果

1．遊離蛋白

骨格筋を *in vitro* で反応させると，Caの存在に無関係に可溶性蛋白が遊離してくるが，量的にはEDLの方がSOLより多い．又Caイオン存在下では，遊離蛋白量は増しSOLで63%，EDLで23%増加した（表1）．この

表1　A 23187存在下で遊離する蛋白量

Effect of calcium on protein release from intact muscle in the presence of A23187 (n=4)

		% of wet weight / h	
Soleus			
	+ EGTA	0.175 ± 0.033	
	+ Ca	0.285 ± 0.023	+63%
EDL			
	+ EGTA	0.223 ± 0.046	
	+ Ca	0.274 ± 0.029	+23%

＊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

際，Ca 存在下，EGTA 存在下に遊離した creatine phosphokinase 活性を測定してみると殆ど差がないことがわかった．このことは，この実験系では可溶性蛋白の遊離には Ca イオンは直接あまり関係はなく，又 Ca イオン存在下で増加した蛋白は構造蛋白に由来することを示唆している．

2．構造蛋白のゲル電気泳動

3時間の反応終了後，骨格筋より従来の方法に従って，α-アクチニンを抽出しその電気泳動パターンをみると，図1に示すように96Kのα-アクチニンのバンドは EDL に於ても SOL に於ても(−)即ち EGTA 存在下に比較して(＋)即ち Ca イオン存在下の方が明らかに減少していることがわかる．しかもその程度は，EDL に於て SOL よりより明瞭で

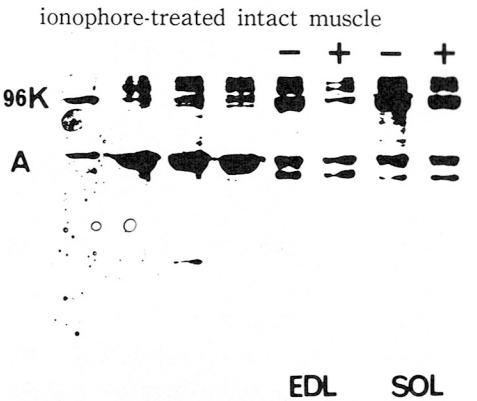


図1　反応後骨格筋に残存するα-アクチニン
96K…α-アクチニン　EDL：長趾伸筋
A …アクチン　SOL：ヒラメ筋
− …EGTA存在下
＋ …Ca存在下

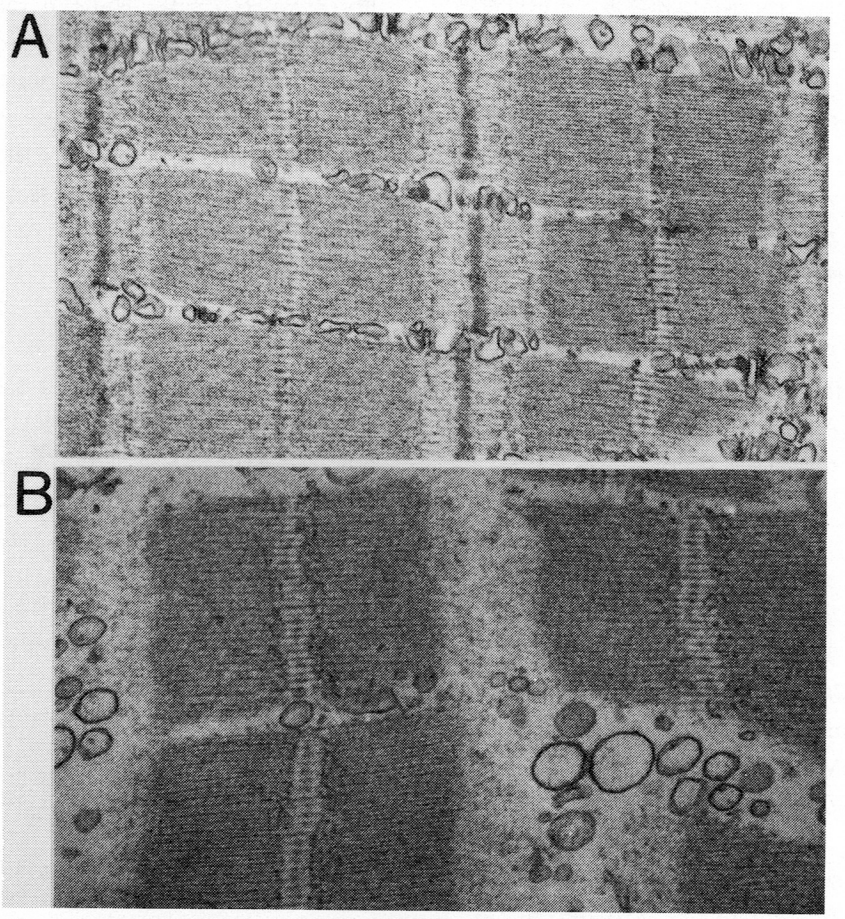


図2　A：EGTA存在下　B：Ca存在下

あった．

この現象はCaイオノフォアの作用により溶液中のCaイオンが筋細胞内に浸入し，その為Z帯よりα-アクチニンが遊離し，筋肉中に残存するα-アクチニンが減少した為と理解できよう．

3．電顕的観察（図2A，B）

3時間反応させた後，骨格筋を電子顕微鏡で観察してみると，EGTA存在下に反応させた場合は筋原線維の走行，形共に正常に保たれ，Z帯も何ら異常を認めなかった（図2A）．しかし，Ca存在下で反応させた場合，Z帯は殆ど消失していた．しかしA帯の中央にあるM線はほぼ正常であった．筋小胞体，ミトコンドリアの膨化が認められた（図2B）．

4．E-64-cの効果

E-64はepoxysuccinateの誘導体であり，CANPの強力なインヒビターである．今回E-64類似化合物であるE-64-cを用い，Caを加えた溶液中に入れて反応を行い，溶液中に遊離してくるα-アクチニンの量を比較してみると，図3が示す様にE（EDL）に於てはCa溶液ではα-アクチニンは遊離してくるが，E-64-cを添加することにより著しく抑制された．

Effect of protease inhibitor on Ca^{2+}-induced release of α-actinin from muscle fiber

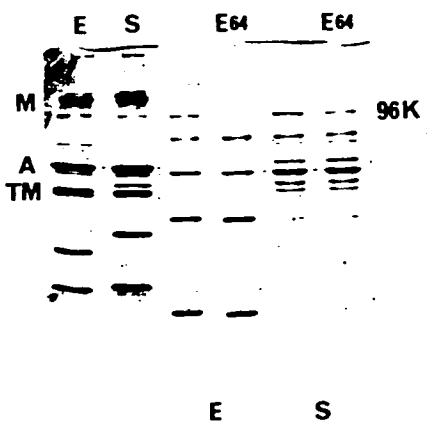


図3　α-アクチニン遊離に対する蛋白分解酵素抑制剤E－64の効果
E：長趾伸筋，M：ミオシンH鎖
S：ヒラメ筋，A：アクチン
TM：トロポミオシン
96K：α-アクチニン
E64…E－64－c

考　　察

*in vitro*でintact muscleを1 mM Caイオン存在下で一定時間反応させると，溶液中にα-アクチニンが遊離し，筋肉中では減少することが明らかとなった．又この際形態的にはZ帯のかなり選択的な消失が確認された．Z帯を構成する蛋白に関しては，なお未解決の点もあるが，α-アクチニンが存在することはすでに確立されている．α-アクチニン自身は蛋白分解酵素に比較的resistantであるが，α-アクチニンをZ帯に固定している蛋白分解酵素に感受性の強い蛋白がまず消化され，その結果α-アクチニンが遊離するものと想像される．

今回の我々の実験はCaイオノフォアを用いることにより，筋細胞内のCaイオン濃度は増加し，筋肉中に存在するCANPは活性化され，その結果Z帯に存在する感受性の高い蛋白質は消化され，α-アクチニンは遊離したと理解できよう．この結果は本質的にUchino, Chou[2]の論文と同じである．

我々は筋原線維にCANPを位相差顕微鏡で直接観察しながら作用させると，急速にZ帯は消失しα-アクチニンが遊離することを免疫学的に確認しており，この結果と良く一致する．

以上の結果が高Caイオンの直接作用ではない事は，CANPインヒビター即ちE-64-cを添加することにより，細胞内に入ったE-64-cは非可逆的にCANPに結合し，α-アクチニンの遊離が抑制されるという今回の実験結果から明らかと思われる．筋原線維を用い

た同様な実験結果を我々はすでに報告しており，又 Kameyama, Etlinger[3]，の leupeptin を用いたデータと本質的に同じである．

生検筋ホモジェネートを酵素源とし，CANP 活性を測定する試みは幾つかなされているが，感度をあげても殆ど測定できず，この理由は内在する所謂内因性インヒビターが存在する為であると説明されている．従ってこのインヒビターが実際 in situ に存在すると例え，Ca イオン濃度が増しても CANP はその蛋白分解作用を発揮できないことになる．しかし，今回の *in vitro* の intact muscle についての実験結果から，筋肉内に存在する CANP は Ca イオン濃度が増すと活性化され，蛋白分解作用を示すことが明らかとなり且つこの作用は E-64-c で抑制されることが確認された．即ち intact な筋肉に於て CANP 活性のあることが間接的に検出可能なことがわかった．以上の実験結果はデュシャンヌ型 DMP における筋蛋白分解機構を解明するにあたってモデルとしても重要な意義を持つものと考える．

今後所謂内因性インヒビターが生体において CANP の活性調節にどの様に関与しているか議論の余地がある様に思われる．

文　献

1）杉田秀夫，石浦章一：筋ジストロフィー症とプロテアーゼ．神経進歩，24：821，1980．

2）Uchino,M. & Chou,S.M.: Effect of Calcium Ionophore, A 23187 on Murine Muscle. Proc. Japan Acad.,56：480, 1980.

3）Kameyama,T. & Etlinger,J.D.: Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degeneration in muscle. Nature, 279：344, 1979.

52) カテプシンHによる筋原線維構成蛋白質の分解様式

真田幸弘*

研究協力者　勝沼信彦*　野田　隆*

はじめに

筋ジストロフィー症の主要症状である筋萎縮という現象について考える際，蛋白分解酵素の異常による筋蛋白崩壊を抜きにしては考えられない．また筋蛋白崩壊の過程には，分解される側の問題（易水解性・修飾等），分解する側の問題（活性化・遊出等）ならびに形態変化等に関する構造上の問題が，複雑に絡みあっている．我々はまず蛋白分解酵素の側から，この筋蛋白崩壊現象を追求してみた．既に我々は筋組織中のマストセル・セリンプロテアーゼならびにカテプシンBによる筋蛋白に対する分解様式を報告してきた[1)6)]．今回は，従来exopeptidaseと考えられてきたカテプシンHによる筋蛋白分解様式とカテプシンBとの協調作用についても検討した．

実験材料及び方法

カテプシンH及びカテプシンB精製法

ラット肝より唐渡らの方法[2)]で精製し，比活性が結晶酵素と同じものを用いた．

筋原線維構成蛋白質の調製

家兎骨格筋を用い，ミオシンはperryらの方法で抽出し，Richardsらの方法で精製したものを用いた．アクチンはMommaertの方法で精製した．トロポニンは江橋ら，トロポミオシンはMueller，α-アクチニンはMasaki and Takaichiの方法で精製した．

易水解性の測定

各筋原線維構成蛋白は10^{-5}M，カテプシンHもしくはカテプシンBは10^{-7}Mとなるように調製し，pH6.0酢酸緩衝液，5 mMメルカプトエタノール，1 mM EDTA存在下で37°Cにおいて反応させ，PCA上清に遊離するアミノ酸・ペプチドの量を螢光測定した。

分解様式の検討

10% SDS-ゲル電気泳動上で分解像を解析した．蛋白量は20μgとした．反応液組成は，上記と同様で，反応の停止にはE-64を用いた．

酵素阻害様式の検討

基質は，BANA BAPAを用い，阻害剤としてE-64を使用した．

結果及び考察

カテプシンB・H・Lの性質の比較

表1に，従来報告されているカテプシンB・H・Lの性質をまとめたが[3)4)5)]，カテプシンHは他の2つのライソゾーム・チオールプロテアーゼに比し，基質特異性，阻害剤に対する態度ともendopeptidaseというよりもむしろ，ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)とよく似たexopeptidaseの性質をもっている．例えば合成基質をよく切るが，高分子蛋白を殆ど切らない．LAPの基質であるLeu-βNAをよく切る．E-64であまり阻害がかからず$Leu\text{-}CH_2Cl$でよく阻害される．しかし，カテプシンHは我々の予備的実験ではチキン筋中にカテプシンBのほぼ1/4量存在し，他のaminopeptidaseとの比較の意味で，筋原線維構成蛋白質の分解像を検討してみた．

*徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門

表1 Comparison of properties of cathepsin B, L and H

	Cathepsin B	Cathepsin L	Cathepsin H
SH dependency	+	+	+
M.W.	29,000	23,000	28,000
pI	4.9 - 5.3	5.8 - 6.1	6.5 - 7.5
Op pH	6.0 (BAPA)	5.0 (Azocasein)	6.5 (BANA)
	6.2 (BANA)		7.2 (Leu-βNA)
Separation (CM)	0.05 M	0.5 M	0.2 M
(DEAE)	0.25 M	–	0.15 M
Substrate specificity			
BAA	2.12	4.10	1.8
BAPA	0.40	0.07	0.006
BANA	2.75	0.06	6.6
BAEE	1.04	0	1.5
Leu-βNA	0	0	6.6
Azocasein	84	1140	117
Histone	43	680	54
G-6-PD (yeast)	0.05	6.68	–
Aldolase (muscle)	11.6	5.9	–
Inhibitors			
E-64	+++	+++	+
Leupeptin	+++	+++	+
Antipain	+++	+++	+
Leu-CH_2Cl	+	+	++

Towatari et al.: Eur. J. Biochem. 102, 279-289 (1978)
: J. Biochem. 84, 659-671 (1979)
Singh, H. and Kalnitsky: J. Biol. Chem. 253, 4319-4326 (1978)
: J. Biol. Chem. 255, 369-374 (1980)
Kirschke et al.: Eur. J. Biochem. 74, 293-301 (1977)
: Acta biol. med. germ. 35, 285-299 (1976)

カテプシンHによるトロポニンの分解

ミオシン・アクチン・α-アクチニン・トロポミオシン・トロポニンについて，検討したが，分解像を呈するのはトロポニンのみであった．図1に示すようにトロポニンTのみ分解され，トロポニンI・トロポニンCは分解されなかった．トロポニンTはカテプシンHによって限定的に分解され，分子量約30,000と13,000の分解産物を生じた．これは，カテプシンBと殆ど同じ分解形式で，トロポニンTのほぼ同じような部位を切断すると考えられる．全く同じ部位を切断するのかどうかを調べるため，以下の実験を行なった．

カテプシンBとの協調作用

カテプシンHは図2に示すように，E-64によって非拮抗的，不可逆（厳密には，pseudo-irreversible）的に阻害され，表2にカテプシ

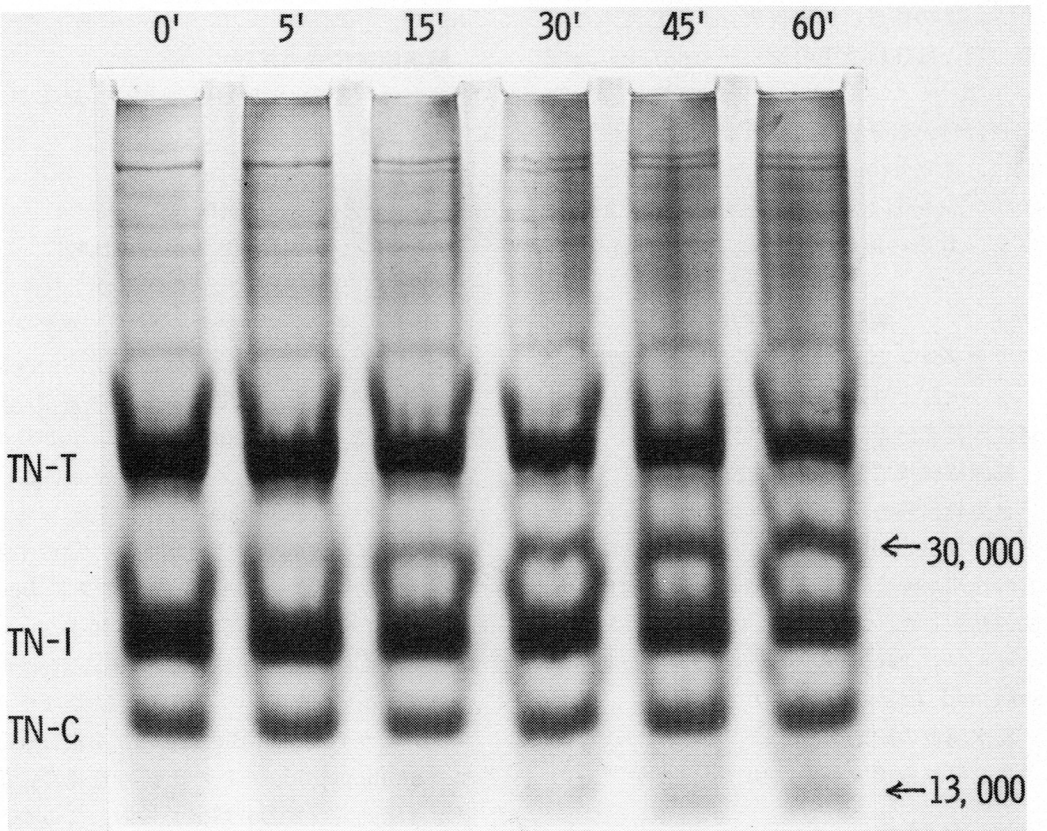


図1 トロポニン分解像

表2　Inhibition of cathepsin B and cathepsin H by E-64 or native inhibitor

	E-64 (DL)	Native inhibitor 100,000 xg sup
	ID_{50} (ng/μg protease)	ID_{50} (μl)
Cathepsin B	34	200
Cathepsin H	4,100	100

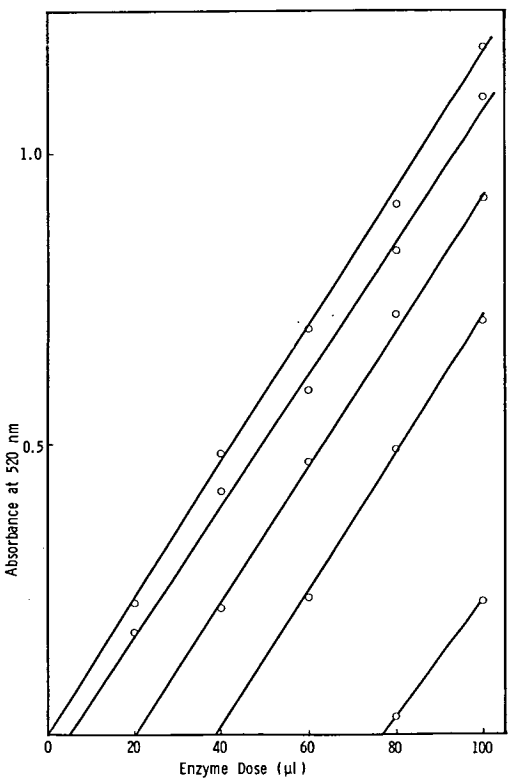


図2　Inhibition mode of E-64 on cathepsin H

ンBと並べて，その活性を50%阻害するのに必要な量を示した．カテプシンHは，カテプシンBの約100倍阻害剤に対する感度が鈍い．この性質を利用して，トロポニンを分解する速度を指標として，カテプシンH・カテプシンB単独・両者を最初から共存させる場合，カテプシンB単独でまず反応を進行させて後にE-64で反応停止した後カテプシンHを加えたものの4通りの条件で，カテプシンHとカテプシンBの協調作用を検討した．図3に示すように，カテプシンB処理後にカテプシンHを加えても，トロポニンは著明に分解亢進を示すわけではなく，カテプシンH単独で加えたものとほぼ同じ傾きをもっている．このことはカテプシンBとカテプシンHのトロポニンT切断部位が同一でなく，またカテプシンBによって切断されたフラグメントをカテプシンHがnativeなトロポニンよりよく切断するわけではないと思われる．またカテプシンBとHを共存させたものが，カテプシンH及びカテプシンB単独を加えたものより，トロポニンをよく分解することから，カテプシンHによるトロポニンの修飾は否定できない．

筋原線維構成蛋白質の易水解性の比較

最後に我々が今まで報告してきたマストセル・セリンプロテアーゼ，カテプシンH，カテプシンBに対する筋蛋白の易水解性を定性的に表3に示す．各プロテアーゼ間では，セリンプロテアーゼが最もよく筋蛋白を分解し，カテプシンBがこれに次ぎ，カテプシンHはトロポニンTのみを分解する．筋蛋白の側からみると，トロポニンTは分解され易く，ミオシン重鎖，トロポニンI，トロポミオシンは2つのプロテアーゼによって分解され，α-アクチニン，トロポニンCはいずれのプロテアーゼによっても分解されない．高分子蛋白の易水解性は，立体構造に大きく左右されるため，これら分解しにくい蛋白質の代謝回転については，アミノペプチダーゼ系を含

表3　Susceptibilities of myofibrillar proteins to proteases

		Cathepsin B	Cathepsin H	Mast Cell Serine Protease
Myosin	H	+++	−	+++
	L	−	−	−
Actin		−	−	+
α-Actinin		−	−	−
Troponin	TN-T	++	++	+++
	TN-I	+	−	+
	TN-C	−	−	−
Tropomyosin		+	±	++
M-Protein				−

めた修飾の問題も含めて考えねばならない。

文　献

1) Sanada, Y., Yasogawa, N. and Katunuma, N. (1978)J. Biochem., 83 : 27-33
2) Towatari, T., Kawabata, Y. and Katunuma, N. (1979)Eur. J. Biochem., 102 : 279-289
3) Singh, H. and Kalnitsky (1978) J. Biol. Chem., 253 : 4319-4326
4) Singh, H. and Kalnitsky (1980) J. Biol. Chem., 255 : 369-374
5) Kirschke, H., Langner, J., Weideranders, B., Ansorge, S. and Bohley, P. (1977) Eur. J. Biochem., 74 : 293-301
6) Noda, T., Isogai, K., Hayashi, H. and Katunuma, N. J. Biochem., 90 : in press.

昭和55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	井　上　　満
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55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55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	虎の門病院冲中記念成人病研究所 〒105 東京都港区赤坂虎の門2－2－2	所長	03－583－6871
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	東京医科歯科大学医学部神経内科 〒113 東京都文京区湯島1－5－45	助教授	03－813－6111
	塚越廣	東京医科歯科大学医学部神経内科 〒113 東京都文京区湯島1－5－45	教授	03－813－6111
	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	助教授	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	東京都立神経病院神経内科 〒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	講　師	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
	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	講　師	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
	名取靖郎	徳島大学医学部栄養化学 〒770 徳島市蔵本町３－18－15	教　授	0886－31－3111
班　員	若山吉弘	昭和大学藤が丘病院神経内科 〒227 横浜市緑区藤が丘１－30	助教授	045－971－1151
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