厚生省「神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究

三好班

昭和58年度研究報告書

昭和59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発症機序に関する臨床的研究」班として，昭和58年度の研究報告書を作成する運びとなりました．

当研究班としては本年は一昨年，昨年につづいて第3年目であります．研究は各自の独創的で自由な発想に基づき，しかし，研究の共通目的を失わぬように心掛けて行っています．また，班研究の意義を活かすためにいくつかのプロジェクト研究を設定してきました．

本年度の研究成果はこの報告書に示されていますが，いずれも学問的価値の高いものであり，今後の研究に格段の進展を期待させるとともに，直ちに内外の本症の研究者や医師達に大きく寄与するものと思います．班員各位の不断の努力に班長として心からの敬意を表します．

筋ジストロフィー症は，人間の生命活動の象徴ともいうべき全身の筋の萎縮をもたらす疾患であり，幼い人々を原因の知れぬままに冒し，生命を失わせるものであること，そして，この病気の解決が近年の科学・技術の進歩によって漸く現実化しつつある段階にあることを思えば，私達は本症の研究を中断することはできません．

報告書の作成に当っては，本年度もその提出時期を58年の12月と致しました．本年度の研究はなおつづけられているところ，班員各位の御協力に謝意を申し述べます．

本研究班に賜った，厚生省当局，国立神経センター，そして日本筋ジストロフィー協会の深い御理解と多大の御援助に深く感謝し，引きつづいての御支援をお願い致します．

昭和58年12月

〈班長〉　三　好　和　夫

目　　次

昭和58年度総括研究報告…… 7

昭和58年度総合班会議研究報告抄録……15

分担研究報告……25

Ⅰ．実験動物……33

Ⅱ．筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病理・病態……59

　a）遺伝・臨床……61

　b）形態・培養……96

　c）リンパ球・赤血球など……128

　d）生　理……158

Ⅲ．遠位型ミオパチー……177

Ⅳ．ミトコンドリアミオパチー……199

Ⅴ．筋ジストロフィー症の生化学・代謝など……223

昭和58年度ワークショップ抄録……285

昭和58年度研究班名簿……305

昭和58年度

総括研究報告

総括研究報告

班長　三　好　和　夫

〔はじめに〕

本研究報告書は，「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」研究班の第3年度の報告書である．前2回の報告書と併せて対をなしている．

この報告書には，本年（昭58年）12月3日(土)，4日(日)の両日に開催した当研究班の班会議席上で行われた報告をまとめた54編の論文が集録されている．またこれに加えて，本年8月3日(水)に行った当研究班のワークショップ「筋変性の自己崩壊機序：Rimmed vacuole をめぐって」の抄録，並びに明年（昭59年）1月に開催予定の「筋ジストロフィー症」総合班会議における当研究班報告の抄録を掲載してある．

〔研究方針〕

当研究班での研究は，各班員のこの問題に関する独創的で，自由な発想によることを基調としている．しかし，当班の研究目的を見失うことのないように，常に各自の研究の性格を明確にしてゆくことに努め，また班としての研究の意義を活かすために，プロジェクト研究として特定のテーマを掲げて集中研究を行ってきた．

研究性格の3段階：

筋ジストロフィー症のように未だ原因不明の疾患の研究には，研究員各自の研究の性格が十分に意識されていることが必要である．すなわち，1）症例の症状，所見の把握と解析からの新しい疾患，病型の発見と確立，2）筋の変性，崩壊と再生の病態の確立，3）本症遺伝子の表現としての蛋白質，酵素の異常の発見である．

これらは，本症の病因究明に対して，それぞれ，1）現象論的，2）実態論的，3）本質論的研究，といえるが，大切なことは，これら各段階の研究が別個に成立するのではなく，現象を通して実態が，実態を通して本質が明らかにされることであると思う．

プロジェクト研究：

プロジェクト研究は当班の研究発展の中からの芽生えと国際的研究レベルでいわゆる先端分野の所に焦点を合せてとりあげた．

今期においては，1）筋の崩壊と再生（初年度から），2）いわゆる遠位型ミオパチー（2年度から），3）筋ジストロフィー症の分類学（3年度から次期に向けて），そして，4）いわゆるミトコンドリアミオパチー（同上）である．

〔本年度の研究報告〕

集録した論文54編の内訳は，用いられた研究資料や研究方法の面からは，本報告書での配列のごとく，I 実験動物 5，II 遺伝，臨床と病理，病態，a）遺伝，臨床 7，b）形態，培養 8，c）リンパ球，赤血球など 8，d）生理 4，III 遠位型ミオパチー 4，IV ミトコンドリアミオパチー 5，V 生化学，代謝など 13，となっている．

また，内容的には大凡，I 新しい症例，特異な症例と分類学 8，II 筋の変性崩壊と再生，a）筋の変性，崩壊 16，b）筋の再生 6，III 本症における特異な異常，成因の探究 9，IV 新しい研究手技 10，V 遠位型とリソゾーム 4，VI ミトコンドリアミオパチー 6（これに米国学者 DiMauro 教授の招待講演が加わる），VII その他 4，である．

〔研究成果の要約〕

各個の研究はそれぞれ独自の意義をもっており，類型的な要約が困難であることがむしろ特徴であるが，項目別にのべる．

I　新しい症例，特異な症例，そして本症の分類学

本症の分類を「分類学」として推進する基本構想が示された．古い時代の病状分類に対して，病状に準據しながら病態を織込み，病因を指向しての分類である．臨床から基本的研究への立場を明確にしたものである．

新しい症例，病型は，毎年加えられているが，本年度もいくつかが報告された．当班員の発見した LDH-M 欠損症の第 2 家系，特異な先天性ミオパチー，Myoadenylate deaminase 欠損疑，Phosphorylase b kinase 欠損とその ATP 治療効果，などである．また，全身骨格筋の CT 所見による本症の病期分類が示され，完成されれば実際臨床上に寄与するところが大きい．

II　筋の変性，崩壊と再生

a）筋の変性，崩壊：

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）を代表とする筋ジストロフィー症における筋の変性，崩壊の実態が，当研究班今期で次のごとく具体的に組立てられた．

まず，何らかの転機により表面膜が障害され，細胞外 Ca の流入により CANP が活性化

され限定分解が行われ，Z帯の消化，α-アクチニンの遊離が起って筋原線維のdisassemblyが生じる．ついで，リソゾームカテプシン群による非限定分解が進行し，この際マクロファージ由来のカテプシン，肥満細胞由来のセリンプロテアーゼも関与する．この間，筋から血清中に遊離酵素や筋構成成分が逸脱する．

本年度もこの全過程に新しい知見が加えられた．例えば，筋膜の超微細構造の所見，薬剤使用によるモデル実験，変性筋線維のopaque fiberとそれに至る各段階の形態変化と蛋白成分解析，などである．また，蛋白分解酵素の内因性inhibitorについての知見が進められ，別に，逸脱酵素CKとMbの流出が定量的に本症の崩壊筋量として比較して示された．

b）筋の再生：

DMD筋の再生筋には未分化ないし脱分化の特徴がみられることが当班のこれまでの詳細な研究で明らかにされている．今回も種々の知見が動物と症例において加えられた．すなわち，satellite cellの動員と活性化，再生線維の特徴が示された．中で，ハムスタージストロフィー筋では，筋力低下の少ないことが再生筋における結合織の増生のないことで説明されたことなど興味深い．また，少しく意味が異なるが，各種のミオパチー筋にみられるリンパ球浸潤のT-cell，B-cell subpopulationの差が明らかにされたことは新知見である．

III　本症における特異な異常や成因の探求

本症の成因を直接にねらって，それぞれ独特の着想に基づいて，異常な蛋白質，酵素の探究が続けられている．今期でも，筋クレアチンの分解酵素と能動輸送の特性，麻酔剤に対する特殊反応の機序，筋膜の特殊抗原，過酸素関連酵素，その他各種の筋内酵素，各代謝系酵素の研究である．

本質的研究というべきものであり，容易ではないが，この種の研究が活発に行われることが望まれる．

IV　新技術の開発

当研究班では，研究遂行のための現在の国際レベルの研究技術を保持しており，また，常に自ら新しい技術の開発を行っている．このことは専門的研究班として大きな財産ということができる．

それらは，組織，細胞の超微細観察，酵素構造蛋白質成分の分析，また，単離筋線維での研究，組織・細胞培養，細胞クローニング，ヌードマウスへの移植，モノクローン抗体の作製，それらを用いてのRIA，EIAと染色技術，その他である．

また，臨床例や生体を対象とした，新しい筋のCT解析，^{31}P-NMR研究などがある．

V　遠位型と vacuole ないし lysosome（プロジェクト研究）

この領域において当班のあげた成果は，国外に例をみない極めて目覚しいものである．まず，遺伝・臨床型として，古典的な Welander 型の他に，新しく，筋ジストロフィー症型と vacuole を有する各型の存在を確立した．後者には debrancher 酵素低下例も含まれる．そして，vacuole 形成を lysosome 変化を対象とした筋崩壊の一つのパターン「リソゾム型変性」としてとらえ，これを超微細形態と蛋白分解酵素の両面から裏付けた．

これに関しては，本年8月にワークショップを，基礎専門研究者を交えて開いた（本報告書並びに明春，専門誌「神経内科」に掲載予定の論文参照）．

本年度の研究班会議でも，神経系性筋萎縮にみられる vacuole，リソゾム諸酵素の系統的研究，また，クロロキンによって vacuole ミオパチーのモデル動物が作成されるなど成果を加えた．

VI　ミトコンドリアミオパチー（プロジェクト研究）

リソゾムと同じく，エネルギー産生源としての organella，ミトコンドリアに焦点を合せた集中研究で，次年度へ向けて取り上げた．本症の中の Ocular，Oculopharyngeal 型と，いわゆるミトコンドリアミオパチーの各種の相互関係が，分類学的に，また成因的に明らかにされる要がある．

本年度もすぐに数題の研究が集まり，また米国からミトコンドリア関連酵素の異常症の一つ carnitine palmytyl transferase 欠損症の発見者である DiMauro 教授を招待して講演と討議への参加をえた．

本報告書にみるように，症例としては，各種のミトコンドリアミオパチー，Kearns-Sayre 症候群，ミトコンドリア脳脊髄症，高乳酸血症，運動時 CK 上昇例，それらにおけるミトコンドリア機能の酵素化学，また，皮膚線維芽細胞における研究，など，ミトコンドリアに関する症例，形態と機能に関する必要な研究項目が出揃ったといってもよい．

〔研究の将来の見通し〕

当研究班は，「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」の目的に沿って，本症病者の病状，病態の解明に関して着実に成果をあげてきた．この成果は将来とも確実に積重ねられてゆくものと思う．そして，この中から今後，本症の成因の発見がなされることに大きな期待が抱かれる．

研究班として，各期ごとに掲げたプロジェクト研究は，いずれも現在の本症研究の最も活発な研究分野に焦点を合せたものであり，その成果が誤りなく実っていることが判る．

なお，今後について付言すれば，遺伝子性疾患である本症に関しては，本報告書の分類学の論文でのべたごとく，近年の遺伝子クローニングと遺伝子工学技術の発展から，染色体上における疾患遺伝子マップの作製が進められる段階に入った．当研究班としても，臨床研究者として，その必要な部分を担当すべきであると考える．

〔おわりに〕

当研究班は，筋ジストロフィー症の成因臨床研究班として，基礎班，動物飼育班，そして疫学・臨床班，養護班と相ともに活動を行い成果をあげてきた．

発足以来，若干の年月が経過したが，当初の研究レベルに較べて格段の進展をみせるに至った．当初はそれ程多数ではなかった本症の研究者についても，なお十分といえないまでも，すでにここで育ち巣立ったものは少なくない．

筋ジストロフィー症が人の生命活動の象徴ともいうべき筋の萎縮であり，また幼い人々を理由不明のまま冒して命を失わしめる疾患であること，そして，その解決の現実化が近年の分子生物学や遺伝子化学の進歩によって望まれる段階にあることを思えば，私達は本症の研究を中断することはできない．

本研究報告書は，当研究班の本年度のものであるが，筋ジストロフィー症に関する内外の研究者や医師達の今後の研究と臨床に大きな影響を及ぼすものと思う．

(12—25, 1983)

昭和58年度厚生省神経疾患研究委託費

「筋ジストロフィー症」総合班会議

筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究

研究報告抄録

筋ジストロフィー症の分類学；病状，病態そして成因的分類への進展

三　好　和　夫
（冲中記念成人病研究所）

筋ジストロフィー症の分類は，はじめは病状，ついで病態に基づき，現在は窮極の成因追求のもとに行われている．このように成因の究明を目指して行われる分類を私は分類学と呼びたい．その中で刻々に提示される分類が本症の日常臨床の指針，基準となっている．

〔本症分類学の進展〕

最近の分類（表参照）では，病状に準拠しながら，すでに知られた疾患の病態が十分に組み込まれている．表では，神経原性のものを省き，筋原性のミオパチーをあげて筋ジストロフィー症としてある．さらに著者らの分類では，ミオパチーと筋ジストロフィー症を分ける試みがなされている．

〔筋ジストロフィー症の特徴〕

本症の特徴としての，遺伝性，進行性，筋力低下，筋変性は現象的なものといえよう．筋変性をとりあげ，組織所見で myogenic と dystrophic を識別し，血清で CK 活性値の上昇を重視することを提唱したい．

〔症状の幅と体細胞のモザイク性〕

ホモ型で発症する劣性型に対して，ヘテロ型の発病者（例えば FSH 型）では症状に幅がみられる．DMD 女性保因者に適用される Lyon 説に対して体細胞のモザイク性が考えられないか．著者らは前に骨髄細胞の成熟段階における還元分裂の事実を発表しているが，考慮に入れて考えてみたい．この場合には，体細胞の成熟，分化という別の問題が持ち込まれる．

〔合併症状に対しての isozyme 的理解〕

多彩な症状を呈する病型の理解として，例えば DMD に伴う知能障害では，筋にある本症の原因酵素の isozyme が脳にあり，両者に共通した subunit の異常がこれらを起すと説明したい．この考え方は，福山型の脳障害にも当てはまり，また，ミオパチーにおける筋原性と神経原性変化の混在にも有用と思う．

〔遺伝型を異にする類縁の病型〕

LDH の subunit H と M の遺伝子は別であり，11，12番の染色体に別れてある．もし DMD の原因酵素が subunit からなりX染色体と体染色体に別れてあれば，X染色体性遺伝型の DMD に対して，類似の症状を呈し体染色体性遺伝型の別の病型があってよい．異なった遺伝型を示し，多種類の病型からなる筋ジストロフィー症の分類において考慮されてよい．

〔Organella からみた分類〕

遠位型とリソゾーム変化，Ocular，Oculopharyngeal 型とミトコンドリアミオパチー，いずれ

も，Organella 変化の有無，それぞれに含まれる原因解決ずみの疾患（Storage disease，Carnitine palmytyl transferase 欠損など）から，実態そして原因的分類に期待がもたれる．

〔染色体上の疾患遺伝子の分類〕

DMD 遺伝子の座位は最近，X染色体短腕 Xp_{21} と知られた．近年の遺伝子クローニングと遺伝子工学技術により，DNA 構成から蛋白質，酵素の同定が可能になった．まず，染色体上の異常遺伝子のマップすなわち分類を問題にし，当研究班の役割についてふれたい．

〔動物筋ジストロフィー症〕

動物にもX染色体性の筋ジストロフィー症が見出された．これまでの各種を含めて，分類学的にそれぞれ動物の遺伝・臨床型とみる観点が必要と思う．

〔おわりに〕

分類学は成因解明を目指す総括的研究といえる．本症の分類学の現状と今後の展望をのべた．

表1　筋ジストロフィー症の分類
（Walton ら，1981）

(a) *X-linked muscular dystrophies*
- Severe (Duchenne)
- Benign (Becker)
- ? Benign with early contractures (Dreifuss)
- Scapuloperoneal
- ? Hereditary myopathy confined to females

(b) *Autosomal recessive muscular dystrophies*
- Scapulohumeral ('Limb-girdle')
- ? 'Quadriceps myopathy'
- Autosomal recessive muscular dystrophy in childhood
- Congenital muscular dystrophies

(c) *Autosomal dominant muscular dystrophies*
- Facioscapulohumeral
- Scapuloperoneal
- Late-onset proximal
- Distal (adult-onset)
- Distal (infantile-onset)
- Ocular
- Oculopharyngeal

表2　筋ジストロフィー症の分類
（著者ら，1980）

1. Autosomal dominant muscular dystrophies
   - Facioscapulohumeral type
   - Distal myopathy (Welander type)
2. Autosomal recessive muscular dystrophies
   - Limb-girdle type
   - Malignant limb-girdle type
   - Autosomal recessive distal muscular dystrophy
   - Congenital muscular dystrophy
3. X-linked recessive muscular dystrophies
   - Duchenne type
   - Benign Duchenne type (Becker type)
4. Myopathies
   - Ocular myopathy
   - Oculopharyngeal myopathy
   - Oculopharyngodistal myopathy
   - Others

ミトコンドリア異常を伴う神経筋疾患
1）臨床・形態

福　原　信　義
（金沢大学医学部神経内科）

骨格筋ミトコンドリアの形態異常は，いわゆるミトコンドリア・ミオパチーといわれるもののほかに，種々の神経筋疾患でみられ，また，実験的にも虚血でも作れるので，特異性を欠き，一部，外眼筋麻痺を伴う筋疾患におけるほかは，骨格筋の病因を反映しているものとは必ずしも考えられない傾向があった．当三好班では，種々の臨床症状を示すミトコンドリア・ミオパチーの症例報告をつみ重ねるかたわら，本年は DiMauro 教授を迎え，いわゆるミトコンドリア・ミオパチーについての特別講演をしていただいた．

ミトコンドリア・ミオパチーは狭義には眼筋・骨格筋の症状のみで，他の症状がなく，先天性ミオパチー，または進行性筋ジストロフィー症に似るものをさすが，広義には，眼筋・骨格筋の症状のほか，中枢神経症状など多彩な症状を示す神経筋疾患の部分症状（筋症状）をいう．

骨格筋のミトコンドリア異常は，組織化学的には，ragged-red fiber として，電顕的には，ミトコンドリアの数の増加，大きさの異常（巨大なもの，管状に長いもの），形の異常（クリスタの増加，環状，峰窩状のもの，結晶様封入体，球状封入体）などがみられるが，ragged-red fiber の出現頻度とミトコンドリアの形態異常の程度には，疾患群の違いや臨床症状の強さとは必ずしも相関しない．DiMauro ら（1983）によって報告された cytochrome C oxidase 欠乏によるミトコンドリア・ミオパチーの症例は骨格筋の組織化学的・電顕的異常と酸素欠乏の程度が年齢とともに軽快しており，注目される．

狭義のミトコンドリア・ミオパチーの筋萎縮・筋力低下の分布としては，それぞれ，眼筋型・肢体型・遠位型・顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーに似た分布をしているものがあり，強い易疲労性を特徴としているものもあり，血中乳酸，ピルビン酸の上昇しているものが多い．

Cytochrome C oxidase 欠乏によるミトコンドリア・ミオパチーには，強い筋力低下，乳酸アシドーシスを生ずるが，De Toni-Fanconi-Debre 症候群を伴い 4 か月以内に死亡する悪性型（van Biervlielt ら，1977）と De Toni-Fanconi-Debre 症候群を伴わず，次第に軽快する良性型（DiMauro ら，1983）のあることが報告されている．

筋症状以外に広範な症状を伴うもので単一疾患として確立されてきたものには，

1）Kearns-Sayre（-Shy）症候群（KSS）：

三主徴（外眼筋麻痺，網膜色素変性，心伝導障害）のうち 3 症状をもつ65症例と，2 症状のみをもつ57症例とで分析すると，三主徴以外の症状頻度はほぼ同じであり，これらは単一の疾患と考えられる．

2）Hackett-Tarlow 症候群（HTS）：

家族発症が多く，成長障害，難聴，痙攣を主症状としている．

3）Ragged-red fiber を伴うミオクローヌスてんかん（MERRF）：

ミオクローヌスてんかん，ミトコンドリア・ミオパチー，小脳失調を主症状とする．

	KSS(65定型例)	MERRF(15例)	HTS(10例)
家族歴	10.8%	46.7%	60%
発症年齢	小児期～49歳	小児期～42歳	2～8歳
外眼筋麻痺	100 %	6.7%	30%
網膜色素変性	100	13.3	20
心伝導障害	100	0	20
ミオクローヌス	1.5	100	0
全身痙攣	10.8	73.3	60
知能異常	44.6	80	40
小脳失調	63.1	93.3	40
筋力低下	64.6	93.3	90
視神経萎縮	7.7	50	20
難聴	55.4	35.7	80
低身長	63.1	20	100

ミトコンドリア局在酵素の異常に関する研究の進歩

垂　井　清一郎
(大阪大学医学部第二内科)

ミトコンドリアにはTCAサイクル，酸化的リン酸化，脂肪酸のβ酸化などに関係した諸酵素が局在しており，エネルギー代謝において重要な役割を担っている．なかでもマトリックスを中心に存在するTCAサイクル関連諸酵素と，内膜に局在する電子伝達系は生体エネルギーの重要な供給源である．

近年ミトコンドリア局在酵素の異常による代謝障害が多数報告されているが，生検標本を用いたミトコンドリア機能の生化学的解析には色々な技術的問題があり，ミトコンドリア機能障害が想定されていながら未だ生化学的に異常部位の決定されていない症例が多数存在している．

本講演では，ミトコンドリアのエネルギー代謝（特に酸化的リン酸化）に関連した諸酵素の異常の解析を中心とした研究の現状を紹介し，私共が行っているKearns-Sayre症候群の骨格筋ミトコンドリア内膜電子伝達系の解析結果につき報告する．

ミトコンドリアにおけるATP産生は次のようにして行われる．解糖系によりブドウ糖から生成したピルビン酸はミトコンドリアに取り込まれアセチルC_0AとなりTCAサイクルに入る．TCAサイクルでは脱水素反応や脱炭酸反応によりNADHや還元型フラビンが作られ，これがミトコンドリア内膜電子伝達系を介して最終的に酸素を還元し，水を形成する．この過程でミトコンドリア内膜内外に水素イオンの濃度勾配が作られ，これがATP合成のエネルギー源となる(酸化的リン酸化の化学浸透説)．

ミトコンドリア内膜の電子伝達系は，フラビン蛋白，チトクロム，鉄・イオウ中心，ユビキノン（coenzyme Q）などで構成されており，酵素複合体Ⅰ～Ⅳに分割，精製されている（図参照）．図の複合体Ⅴはオリゴマイシン感受性ATPaseである．

ミトコンドリア内膜電子伝達系は組織より単離したミトコンドリア分画の酸素消費能とチトクロム含量を測定することにより解析されてきた．酵素消費能の解析により，ミトコンドリアの呼吸調節能の欠如（Luft病），NADH-coenzyme Q reductase欠損症などが発見された．

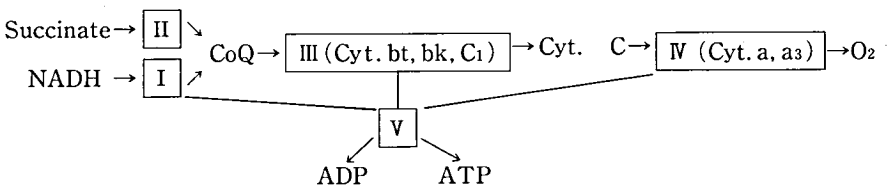
ミトコンドリア内膜のチトクロムは，a，a_3，b_K，b_T，c，c_1の少なくとも6種類存在することが知られている．チトクロムの分析は差スペクトル法によって行われ，$a+a_3$，b_K+b_T，$c+c_1$の3群に分割して測定することが可能である．

Morgan-Hughes等，DiMauro等はこれらの方法を駆使して，チトクロムaa_3（Cytochrome Oxidase）欠損症，チトクロムb欠損症，チトクロムc欠損症など，種々の疾患単位を報告して来た．しかし，これらの分析を行うには多量（数グラム）の生検組織が必要であり，容易に行い得るものではなかった．

最近私共は，ミトコンドリアの呼吸機能の解析にかわるものとして，ミトコンドリア内膜電子伝達系複合体活性の測定を行っている．

この方法では100mg程度の生検標本で充分であり，電子伝達系異常の発見，欠損部位の決定に有用である．又，ユビキノンは重要な電子伝達系構成成分であるが，これまでミトコンドリア異常症における解析の報告が見られなかった．私共は高速液体クロマトグラフィーによりユビキノンを測定し，ミトコンドリア異常症の病態解析を行っている．その結果，Kearns-Sayre症候群の骨格筋ミトコンドリアでは，内膜の電子伝達系活性，ユビキノン含量ともに低下していることを見出した．

（附図）　ミトコンドリア内膜電子伝達系複合体



I ; NADH-CoQ reductase, II ; Succinate-CoQ reductase,
III ; $CoQH_2$-cytochrome C reductase, IV ; Cytochrome oxidase,
V ; Oligomycine sensitive ATPase, CoQ ; Ubiquinone,
Cyt.; cytochrome.

ミトコンドリア異常を伴う神経・筋疾患線維芽細胞を用いた酵素学的診断法

佐藤　猛，安野　みどり，山本　剛司
（順天堂大学医学部脳神経内科）

【目的】

高乳酸，高ピルビン酸血症を呈するLeigh脳症や，ミトコンドリア（Mit.）脳・筋症では，骨格筋内に異常Mit.の集積が認められる．ピルビン酸の蓄積は①ピルビン酸の酸化障害，②糖新生系の障害，③その他，Mit.障害などで起る．近年，pyruvate dehydrogenase complex（PDH）や，Mit.内酸化還元酵素の異常が報告されている．これら多種にわたる諸酵素活性を測定する際，生検筋では量的な制約，あるいは対照材料と同時に測定することが困難なことから，皮膚線維芽細胞を用い，これらの酵素活性の測定法を検討した．

【症例】

症例1：11歳女児・身体発達遅延，脳神経麻痺，視神経萎縮，小脳症状，病的反射，呼吸麻痺，けいれんを認めた．血中乳酸，ピルビン酸，アラニンが高値を示した．高脂肪食により改善した．
症例2・3：Mit.脳・筋症の患者と母親（山本，別府，椿：第85回神経学会関東地方会．1983，5月発表）．

【方法】

(1) 生検皮膚線維芽細胞をEagle MEM＋8％FCSにて培養，5～7継代培養したものを用いた．Trypsin＋EDTAで剝離後Hepes buffer（＋mannitol, ATP, EDTA, ME）にて浮遊，proteaseを作用させた後，ホモジネートし，遠心後Mit.分画を得た（Stumpf，1981）．培養瓶（175cm^2）当り0.05～0.15mgMit.蛋白が得られた．なおMit.分画法はVero細胞を用いて確立した．

(2) 線維芽細胞のホモジネートを凍結・融解したものを用いた．PDH complex：Blassら（1970）の方法を一部改変した．反応系に1－^{14}C－pyruvateを加え，発生した$^{14}CO_2$を液シンにて測定した．PDH phosphatase活性：Robinson（1975）の方法にて行った．ATPにてPDHを不活性化した後，Ca^{++}，Mg^{++}による再活性値を測定した．Lipoamide dehydrogenase（LAD，E3）：Koike（1970）の方法によった．

(3) Mit.分画を凍結・融解後，二波長分光光度計にて，25°C，550nmで次のMit.酵素を測定した．cytochrome-c-oxidase（Sekuzu，1965），succinate cytochrome-c-reductase（SCR）（King，1967），NADH-cytochrome-c-reductase（Gian Luigi Sottocasa，1967）の活性を測定した．さらにVero細胞のMit.分画について，液体窒素温度における酸化還元の差スペクトラムよりcytochrome spectraを測定した．なおMit.分画の一部は電顕にて観察した．

【結果】

(1) 症例1の線維芽細胞のPDH complex活性が低値を示したが，血小板と生検筋の活性値は正常範囲にあった．PDH phosphatase，およびLADは正常であった．

(2) Vero 細胞より得た Mit.分画は電顕にて Mit.の集積を確認した．cytochrome spectra では c は546nm，b は560nm，a は602nm で吸収極大を得た．さらに Mit.酸化還元酵素活性値と蛋白量との相関性を確かめた．

cytochrome-c-oxidase 活性値は正常であった．SCR は正常対照10.9±2.6n mol/min/mg に比し，症例 2 では4.9±0.3と低下が認められた．

【考察・結論】

まだ対照例数が少ないため，上記の測定結果の意義については現段階では保留する．症例 1 については他の PDH complex 構成酵素や糖新生系酵素も測定しなければならない．症例 2 についてはさらに他の Mit.酸化還元酵素活性の検討も問題となる．今回は皮膚線維芽細胞により，これらの酵素活性の測定法を主に報告し，日常診断に応用し得ることを示した．

分 担 研 究 報 告

目　　次

I．実験動物

1）筋ジストロフィーハムスター骨格筋の再生……35
国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部　埜　中　征　哉

2）筋ジストロフィーチキン骨格筋の修復能（続報）……39
鳥取大学医学部脳研神経病理　中　村　晴　臣

3）培養下における正常及び筋ジストロフィーチキンの
T-system の微細構造……44
東京医科歯科大学医学部神経内科　塚　越　　廣

4）モノクローナル抗体を用いた筋ジストロフィー症
発症機序の研究……50
国立静岡病院　宇尾野　公　義

5）ジストロフィー鶏発症早期における活性酸素関連諸酵素の
異常について（第3報）……53
自治医科大学神経内科　水　野　美　邦

II．筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病理・病態

6）筋ジストロフィー症の分類学：病状，病態，
そして成因的分類への進展……61
冲中記念成人病研究所　三　好　和　夫

7）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——……66
杏林大学保健学部疫学　古　庄　敏　行

8）骨格筋ＣＴスキャンによる進行性筋ジストロフィー症の
下腿部仮性肥大の検討……71
東京大学医学部脳研神経内科　豊　倉　康　夫

9）Duchenne 型筋ジストロフィー症が疑われる女性例……76
筑波大学臨床医学系神経内科　中　西　孝　雄

10) 運動によって誘発される高 CK 血症
——3 症例の検討—— …… 80
浜松医科大学第一内科　西　村　嘉　郎

11) 筋線維の発育分化遅延を主病変とする先天性ミオパチー
(congenital myopathy without specific features) の重症例 …… 85
宮崎医科大学第三内科　栗　原　照　幸

12) Myoadenylate deaminase 欠損症を疑われた 1 例
——筋痙攣を主徴とする診断困難な症例の提示および問題点—— …… 90
虎の門病院神経内科　田　辺　　等

13) Duchenne 筋ジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験
——再生筋直径の定量的検討(続報) —— …… 96
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

14) 神経筋疾患における筋衛星細胞および筋核の定量的検討 …… 101
九州大学医学部脳研神経内科　黒　岩　義五郎

15) 筋再生に関する研究
——衛星細胞活性化因子の検討—— …… 103
信州大学医学部第三内科　小　口　喜三夫

16) 筋緊張性ジストロフィーにおける Satellite cell の電顕的研究 …… 106
大阪医科大学第一内科　茂　在　敏　司

17) 筋ジストロフィー骨格筋における delta lesion の検討 …… 111
東北大学医学部脳研神経内科　高　瀬　貞　夫

18) Duchenne 筋ジストロフィー症生検筋細胞膜の Orthogonal array subunit particle について
——Freeze fracture 法による検討—— …… 116
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

19) 筋疾患における fiber type disproportion の
発現機序に関する研究 …… 121
東邦大学医学部第四内科　木　下　真　男

20) 培養神経筋組織成長に対する ganglioside および
抗 ganglioside 抗体の作用 …… 124
国立療養所宇多野病院臨床研究部　斎　田　孝　彦

21) 緊張性筋ジストロフィー症の末梢血リンパ球 subsets
——monoclonal 抗体と fluorocytometer による解析—— …… 128
九州大学医学部脳研神経内科　後　藤　幾　生

22) モノクローナル抗体による生検筋内浸潤リンパ球の解析……131
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　　猛

23) 糖原病II型にみられる空胞化リンパ球の超微形態……137
大阪大学医学部第二内科　垂　井　清一郎

24) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜の研究……141
九州大学医学部脳研神経内科　黒　岩　義五郎

25) Duchenne 型筋ジストロフィー症患者の赤血球膜
主要ポリペプチドの電気泳動による分析……144
神戸市立中央市民病院小児科　吉　岡　三恵子

26) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜のリン脂質構成……147
国立療養所筑後病院　馬　渡　志　郎

27) 筋強直性ジストロフィー症の赤血球膜と血漿の脂質の比較検討……151
東邦大学医学部第四内科　木　下　真　男

28) Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球の
ホスファチジン酸について……155
国立武蔵療養所神経センター　吉　田　瑞　子

29) マーカインによる急性筋融解の機序……158
国立武蔵療養所神経センター　高　木　昭　夫

30) Duchenne 型筋ジストロフィーの筋小胞体機能,
とくに Ca 遊離について……162
国立武蔵療養所神経センター　高　木　昭　夫

31) A23187-induced myopathy におけるカルモデュリン,
プロスタグランジンの役割に関する生理学的検討　第2報……166
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

32) ミオトニーの発生機序に関する研究：
低 Cl 溶液とミオトニー……172
宮崎医科大学第三内科　栗　原　照　幸

III. 遠位型ミオパチー

33) “Rimmed vacuole 型 distal myopathy” と “rimmed vacuole を
伴う緩徐進行性神経原性筋萎縮症群” との比較検討……179
虎の門病院神経内科　田　辺　　等

34) 筋生検所見よりみた遠位型ミオパチーと遠位型筋ジストロフィーの
比較検討……186
金沢大学医学部神経内科　福　原　信　義

35) Distal myopathy の臨床的，形態学的検討と
lysosome 酵素活性 …… 190
東京医科歯科大学医学部神経内科　塚　越　　廣

36) 実験的クロロキンミオパチー
——Rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーとの関連—— …… 195
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部　杉　田　秀　夫

IV. ミトコンドリアミオパチー

37) パラコートによる筋ミトコンドリアの障害…… 201
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　　猛

38) Kearns-Sayre 症候群の骨格筋ミトコンドリア
電子伝達系の解析…… 206
大阪大学医学部第二内科　垂　井　清一郎

39) ミトコンドリア異常を伴う進行性外眼筋麻痺の 2 例
——病像の多様性を中心に——…… 210
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

40) 高乳酸血症を伴った mitochondrial encephalomyopathy
の一例…… 215
九州大学医学部脳研神経内科　後　藤　幾　生

41) ミトコンドリア・ミオパチーにおける皮膚線維芽細胞の
① Pyruvate dehydrogenase complex ② Cytochrome c oxidase,
Succinate-cytochrome c reductase 活性 …… 219
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　　猛

V. 筋ジストロフィー症の生化学・代謝など

42) 筋病変とミオグロビンの局在
——ミオグロビン染色法の検討——…… 225
熊本大学保健管理センター　出　田　　透

43) ヒト骨格筋における enolase isozyme の局在について
——免疫組織化学的検討——…… 228
名古屋大学医学部第一内科　杉　村　公　也

44) ヒト筋型 Carbonic anhydrase III (CA-III)
——ELISA 系の確立と神経筋疾患への臨床応用について—— …… 232
北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門　田　代　邦　雄

45) 血清酵素と creatine kinase …… 237
愛媛大学保健管理センター　植　田　啓　嗣

46) Duchenne 型筋ジストロフィー症におけるミオグロビンと
クレアチンキナーゼの流出の特徴…… 242
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

47) 各種萎縮筋モデルにおける glucose uptake …… 247
信州大学医学部第三内科　庄　司　進　一

48) Myotonic dystrophy にみられる糖代謝異常の
発生機序に関して…… 253
京都大学医学部第二内科　井　村　裕　夫

49) 筋におけるクレアチン代謝：骨格筋のクレアチン輸送の特性…… 257
冲中記念成人病研究所　三　好　和　夫

50) Duchenne 型筋ジストロフィー症における opaque fiber の
筋構造蛋白に関する研究（第２報）…… 261
熊本大学医学部第一内科　荒　木　淑　郎

51) Nemaline myopathy の筋構成蛋白について…… 266
信州大学医学部第三内科　小　口　喜三夫

52) 筋タンパクの崩壊とリソゾームチオール性プロテアーゼ…… 271
徳島大学医学部酵素研酵素化学　木　南　英　紀

53) ^{31}P-NMR による実験的糖原病の研究 …… 275
新潟大学脳研究所神経内科　宮　武　　正

54) Phosphorylase b kinase deficiency myopathy の
ATP による治療 …… 281
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

Ⅰ. 実 験 動 物

1）筋ジストロフィーハムスター骨格筋の再生

埜　中　征　哉*

研究協力者　　寺　澤　健二郎*　岡　田　理　美*

進行性筋ジストロフィーの骨格筋の主病変は筋線維の変性，壊死である．筋線維は壊死に続いて再生するが，それは進行性筋ジストロフィーでも例外ではない．筋ジストロフィーでは活発な再生があるのに臨床症状は名の如く“進行性”であり止ることを知らない．もし筋の再生が壊死を代償しているならば症状の進行はないはずである．進行性筋ジストロフィーには再生があっても症状が進行するのは再生が十分でなくまた不完全だからと考えられている．

多くの筋ジストロフィー動物モデルの中で筋ジストロフィーハムスターは骨格筋の筋力低下がほとんどなく，非進行性である．しかし病理学的にはヒト筋ジストロフィー，特にDuchenne型筋ジストロフィー（DMD）と較べても決して少なくない壊死線維を認める．多数の壊死線維が同じように存在しても，ヒトでは常に進行するのにハムスターではなぜ進行しないのか，その答えの鍵は再生にあると考えられる．筋ジストロフィーハムスターの再生を知ることはきわめて重要であり，ヒト筋ジストロフィー筋の再生と比較することにより，筋ジストロフィー筋がどのようにして進行していくかその病態生理を知ることになる．

筋ジストロフィーハムスター骨格筋の再生を研究していくにはまず健常のハムスター骨格筋が壊死した後どのように再生していくか，その組織学的，組織化学的変化を経時的にみていく必要がある．再生をみるためにはまず筋線維を壊死させねばならないが，従来使用されていた加熱，冷却，挫滅など物理的な方法は筋線維のみでなく，血管，神経など支持組織まで破壊する．そのために再生線維は均等でなく再現性がない．今回は筋線維のみを選択的に壊す塩酸ブピバカイン（マーカイン）[1]を使用した．

*国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部

対象・方法

1)正常対照ハムスターにおける骨格筋の再生

対照ハムスターとして生後4月のBIO F1B（雄）を使用した．

筋を壊死させるため生食に融解した0.25%塩酸ブピバカインを右前脛骨筋（白筋）と右ヒラメ筋（赤筋）内に直接0.5mlずつ注射し，反対側の筋は対照とした．注射後24時間，4，7，10，15，30日目に同筋をとり出し，液体窒素で冷却したイソペンタン中で固定し，連続凍結切片を作製した．切片にはhematoxylin and eosin（HE），Gomori trichrome変法，NADH-TR，PAS，oil red O，酸フォスファターゼ，ATPase（routine，pH4.5，4.3），acridine orange（AO），acetylcholinesterase（AchE），nonspecific esterase（NSE）染色を行なった．

上記各時期に5匹ずつ（計30匹）の筋の中にみられた再生筋線維の組織化学的特徴を明らかにし，次に各筋中の再生線維100～200本の直径を計測した．対照筋（非処理筋）の直径は無差別に10匹選び，各筋で200本の筋線維の直径を計測した．

2)筋ジストロフィーハムスター骨格筋の再生

筋ジストロフィーハムスター（BIO 14.6）は実研動物中央研究所の御厚意で入手した．生後2週（3匹），4週（3匹），2月，4月，6月，12月（各5匹ずつ）の長指伸筋，前脛骨筋（白筋），ヒラメ筋（赤筋）について前述した1)と同様の方法で切片を作製し，同じ染色を行なった．壊死，再生線維の頻度は個体差が大きく今回は統計的処理するまでの匹数が不足したので直径計測は行なわなか

った．

結　　果

1)正常ハムスター骨格筋

塩酸ブピバカインを注射した筋は赤筋も白筋も広汎な壊死に陥り，48時間後には強い貪食反応を認め，その組織像はラット骨格筋の壊死の時と同じであった[1]．注射後4日目になると再生線維としての形態をかなり整えるようになるが，まだ貪食細胞も残っていて胞体の輪廓ははっきりしていなかった．7日目になると中心核をもち，塩基好性の再生線維としての形態を整えはじめ，それは大きな群をなして存在するので一見して再生線維と同定できた(図1)．組織化学的にはATPase染色でタイプ2C反応を示し，AOで強い橙色の蛍光を発し，NSE，AchE染色で胞体内にも活性が存在した．

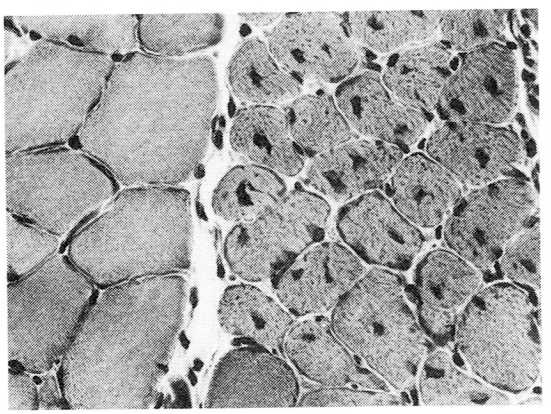


図1　塩酸ブピバカイン注射後7日目の前脛骨筋．中心核をもつ再生線維が右半分に，壊死を逃れた筋線維が左半分に存在する．HE染色，×350

7日目以後再生線維は急速にその径を増し，10日目にはAO, AchE, NSEでの同定は困難であった．ATPase染色でみると未分化なタイプ2C線維から白筋では分化したタイプ2A，2B線維へと15日目までに，赤筋では分化したタイプ1，2A線維へと30日目までにほぼ転換を完了していた．胞体の塩基好性は10～15日で次第に失われていったが，中心核は30日目にもほとんど全ての再生線維に残り，ハムスターの再生筋では中心核はそのよい指標となるように思われた．再生線維の組織化学的所見は図2にまとめた．

再生線維の直径を計測してみると赤筋では壊死より1月目でもまだ壊死前の径に戻っていないが，白筋である前脛骨筋では受傷後15日目には対照と同じ直径となり30日目ではやや肥大気味になる．神経と血管が侵されず，筋線維のみ破壊されると筋線維タイプおよびその直径分布が元に戻るのは白筋が早く約15日，赤筋では約30日必要であることが分った（図3）．

2)筋ジストロフィーハムスター骨格筋

筋ジストロフィーハムスター（BIO 14.6）骨格筋は生後2週目までは壊死や中心核線維はみられず一見正常にみえた．また筋線維の大小不同もみられなかった（図4）．

4週目には強い筋線維の壊死，再生，中心核をもった線維が白筋，赤筋内両方に増加し，壊死は

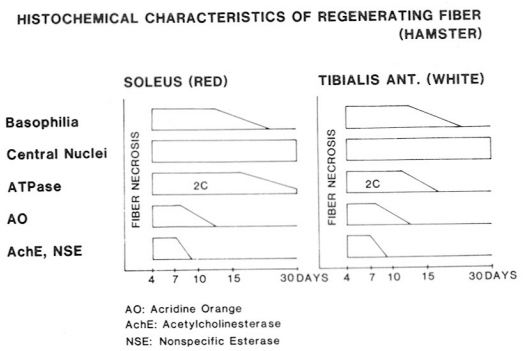


図2　塩酸ブピバカイン注射後の再生線維の組織化学的特徴．

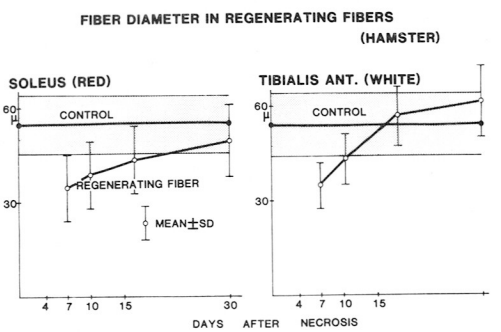


図3　塩酸ブピバカイン注射後の再生線維の直径

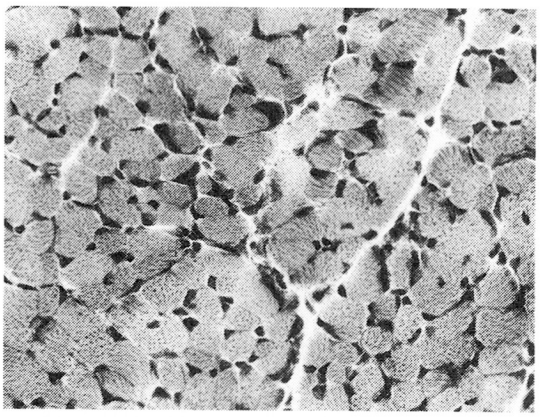


図4　生後2週目の筋ジストロフィーハムスターの骨格筋．壊死線維や再生線維はなく，中心核線維もない．HE 染色，×350.

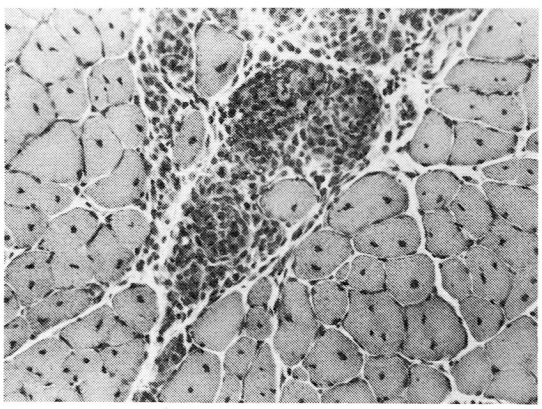


図5　生後4月目の筋ジストロフィーハムスターの骨格筋．全ての筋線維は中心核をもち，また強い貪食反応を示す壊死線維が群をなして存在する．HE 染色，×180.

2～4週の間に出発していることが分った．4週目の骨格筋をみると中心核線維は個体によるバラツキはあるが20～50%の筋に存在した．すなわち生後2～4週の間に多い筋では約半数の筋線維が一度壊死に陥ったことになる．

壊死線維は数本，時には数百本が群をなし，強い貪食反応を伴っていた．生後4月もするとほとんど全ての筋線維は中心核をもち，その中心核をもっている線維が再び壊死に陥っている所見が得られた（図5）．

再生線維の早期（15日以内）にみられるタイプ2C 反応は生後1月以降はどの筋にもみられ，中心核線維の存在とあわせて考えると筋ジストロフィーハムスターには活発な再生があることが示された．6月，12月の筋をみても壊死線維，再生線維が群をなして存在する像には変化なかった．また特異なことは骨格筋にはほとんど結合織の増加，脂肪織の置換を認めないことであった．

考　　察

筋ジストロフィーハムスターは1962年 Bio-Research Institute の Homburger らにより見出されたものである[2]．本動物は骨格筋の症状はあまりないが，心筋が強く侵されることが特徴で本邦では BIO14.6と UMX7.1の2系統が入手できるが，後者の方により強い心筋障害をみる．骨格筋は病理学的には強い壊死像を示すが臨床的には症状は軽く非進行性である．生後2週目にはほとんど皆無の壊死，再生が2～4週目より起り始めること，非常に活発な再生があり（中心核線維の増加），壊死を十分代償することが一つの特徴である．

ハムスターの骨格筋の再生を知る指標は中心核の存在である．さらに再生の初期は ATPase 染色でタイプ2C の反応をとることから，ヒト DMD の時と同じく ATPase 染色が再生線維の同定には最も優れていると思われる[3]．筋ジストロフィーハムスターでは生後4月目に中心核線維も変性している像をみることは，壊死→再生→壊死をくり返している証拠である．しかし筋ジストロフィーハムスターの骨格筋では非常に完璧な再生が行われていると考えねばならないのは臨床的な筋力低下がないからである．

ヒト DMD では不完全な再生がなぜ筋ジストロフィーハムスターでは完全なのか，その要因はまだ明らかにされていない．両者の病理像を比べてみて最も大きな違いはハムスターでは病変が群をなして存在すること，間質の反応（結合織の増生）がないことである．前者は再生をあまり左右する因子として考えられないので，結合織の増生が再生を遅らせる要因かも知れない．事実 DMD の線維化の強い筋では血管が減少しているという報告がある[4]．結合織の増生，それによる小血管の二次

的減少，再生線維への血流の減少，再生の遅れ，そして結果的には病状の進行という過程がヒトDMDではあり，ハムスターではそれがないと考えられる．

文　献

1) Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H. & Sugita, H.: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride(Marcaine). Acta Neuropathol. (Berl.), 60: 167, 1983.

2) Homburger, F.: Myopathy of hamster dystrophy: History and morphologic aspects. Ann. N. Y. Acad. Sci., 317: 2, 1979.

3) Nonaka, I., Takagi, A. & Sugita, H.: The significance of type 2C muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve, 4: 326 1981.

4) Lipton, B. H.: Skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. In Muscle Regeneration, Raven Press, New York, 1979, pp. 31-40.

2）筋ジストロフィーチキン骨格筋の修復能（続報）

中村晴臣*

研究協力者　金藤大三*　高田邦安*　田中順一*

ジストロフィー筋（Dy筋）の機能を規定するものは，筋線維の変性と再生のバランスであると考えられ，変性機序の解明のほかに，Dy筋の再生能が論じられるようになった．骨格筋線維の再生が衛星細胞の増殖，分化によるものであり，そのpotential cellが局所組織の構成々分に由来することは，Reznik[1]の筋損傷実験からも知られている．Dyチキンの筋変性に伴って，著明な核小体と明るく大きな核をもった好塩基性筋線維，所謂，筋再生像がみられることは組織学的に明らかであるが，再生されたDy筋線維が示す経時的変化については，殆ど知られていない．

前年度では再生されたDy筋線維に，分化の遅延のみられることを報告したが，本研究においては検索例を増して，受傷後1週目以降の筋線維の変化を経時的に追究し，再生された幼若筋線維の特性，形態的変化などを電顕並びに組織化学的に検討する．

方　法

ふ化後3週目のDyチキン（line 413），対照チキン（line 412）各群夫々15羽を用いた．無菌的に両側の後広背筋を露出し，ドライアイス・アセトン混合液にて冷却した幅5 mm，厚さ1 mmの金属板を，筋腹中央部に2分間圧着してcold injuryを加えたのち皮膚創を縫合した．術後1～5週目まで毎週，経時的に各群3羽ずつの後広背筋を深麻酔下にて摘出した．但し，術後4，5週目においては，実験群，対照群とも2羽，4羽ずつを検索した．なお，本研究では筋腹の受傷中央部を選んで検索し，検索部位の一定化に努めた．

*鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設神経病理

標本の作製に当っては，右側後広背筋からは10 μmのcryostat切片を作製し，hematoxylin-eosin, modified Gomori trichrome, PAS, NADH tetrazolium reductase（NADH-TR）およびATPase（pH10.3）染色を施し，光顕的観察を行った．左側後広背筋は電顕的検索のため，細切片をスリガラス板上に伸展固定し，0.1Mカコジール酸緩衝液加2.5% glutaraldehyde（pH7.3）で2時間固定後，1晩上記緩衝液にて洗滌し，lanthanum染色（Revel & Karnovsky法）を施し，aceton系列にて脱水し，Epok 812に包埋した．超薄切片には酢酸ウラン，鉛塩の重染色を行い，電顕検索に供した．

筋線維直径の測定にあたっては，NADH-TRおよびPAS染色標本からat randomに250倍写真を作製し，各動物当り300～500本の筋線維について，画像解析装置（Summagraphic）を用いて5 μm間隔で計測し，Studentのt-testによって統計的検討を加えた．

筋線維直径の分布をみるため，各動物毎に計測した約300～500本の筋線維の直径値の分布を，各動物100本当りの分布数に換算し，各週3羽ずつ合計300本についての分布数を算出し，これによってmegahistogramを作製した．但し，受傷後4週及び5週目においては，夫々2羽，4羽の分布数合計を3/2，3/4に換算して使用した．

αR線維とαW線維の区別は，主としてNADH-TR染色によった．即ち両者は共にATPase染色で濃染するが，NADH-TR染色では，αR線維は大型のdiformasan顆粒を多数含み，PAS染色には淡染する．αW線維はdiformasan顆粒がより微細で，かつ粗に分布し，PAS染色にはやや濃染する（Ashmore及びDoerr[4]）．

結　　果

1. 再生筋の組織学的所見

受傷後1週目には，光顕上，myotube の胞体はやや好塩基性を減じ，横紋の明らかな小径幼若線維が発達している．筋組織の横断面でみると，直径の大小不同が目立ち，特に Dy 筋では対照筋よりも強いようにみられた．電顕的にみると，幼若筋線維の筋原線維はより密に発達し，活性化した衛星細胞や筋芽細胞が取り囲んでいる．これらの所見では，Dy 筋と対照筋に著明な差異はないが，衛星細胞，筋芽細胞の数は Dy 筋にやや多いようにみられた．

受傷後2週及び3週目では，横紋の良く発達した小径線維が次第に増加し，線維直径も増大してくるが，対照筋に較べ Dy 筋の直径の大小不同が目立つようになる．中心核も Dy 筋にやや多くみられる．電顕的には筋核の heterochromatin が増加し，また，mitochondria の多い線維とその乏しい線維とが区別出来るようになる．明らかな変性線維は見出しえない．

受傷後4週目には，Dy 筋で筋線維の大小不同，中心核の増加，空胞を有する筋線維の散在などがみられ，myophagia を伴う壊死線維も少数認められた．5週目には空胞を有する線維や壊死線維が増加するほか，脂肪組織の浸潤も認められた（図1）．塩基性の胞体をもつ幼若な小径線維もみられた．Dy 筋の電顕像では多数の空胞を有する線維がみられ，しばしば活性化した衛星細胞を伴っている．筋核は比較的 chromatin に乏しく明るいことが多いが，時には electron density の高い核を有する変性線維もみられた．胞体の微細構造が消失した壊死線維も認められる．また明瞭な核小体をもち明るい大型の核を連ねる幼若線維が，5週目の Dy 筋に再び認められた．

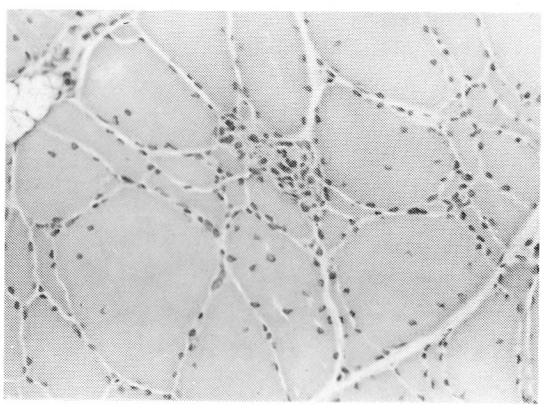


図1　受傷後5週目の Dy チキン後広背筋
筋線維の大小不同，筋鞘核の増加，myophagia，間質の増加と脂肪浸潤をみる．H-E 染色　×220.

2．再生筋の組織化学的所見

術後1週目では，Dy 筋，対照筋ともにすべての再生筋は αR 線維であった．2週以後対照筋では急速に αW 線維が増加し，5週目では大部分の線維が αW 線維に変換していた．これに反し，Dy 筋では αW 線維の増加は遅く，5週目でもなお多数の αR 線維がみられた．術後1～5週目の αW 線維出現率を示すと，**表1**の如くである．即ち，対照筋では3週目以降，αW 線維が筋線維の約80%を占めほぼ一定の値を示すが，他方 Dy 筋の αW 線維出現率は，成育につれて次第に増加するとはいえ，5週目においてもなお筋線維の約43%を占めるにすぎず，対照筋との間に明らかな差異が認められた．

3．再生筋の線維直径の変化

受傷1週目以降の再生筋について検討した．再生筋全体でみると，対照筋の直径は経過と共に次第に増大している．この対照に比し Dy 筋の平均

表1　αW 線維の出現率

受傷後日数(週)	動物数	対照(%)	Dy (%)	P
1	3	0	0	–
2	3	63.0 ± 10.9	2.4 ± 3.0	<0.05
3	3	84.0 ± 2.6	37.9 ± 4.6	<0.001
4	2	80.5 ± 2.9	25.9 ± 5.9	NS
5	4	80.9 ± 5.8	43.7 ± 7.2	<0.001

数値は平均値±標準偏差．
Dy：ジストロフィー筋．
P：対照・Dy 間の有意差の検定．NS：有意差なし．

表2　線維直径の平均値

受傷後日数(週)	対照(μm)	Dy(μm)	P
αR-Fibers			
1	23.2±6.2 (1007)	20.6±7.0 (668)	<0.001
2	24.0±6.4 (558)	21.6±5.8 (1473)	<0.001
3	22.5±6.8 (247)	30.6±10.4 (980)	<0.001
4	24.1±8.2 (200)	35.9±13.1 (786)	<0.001
5	24.5±7.0 (448)	30.0±14.2 (1151)	<0.001
αW-Fibers			
1	0	0	–
2	29.5±8.9 (949)	29.8±7.9 (36)	NS
3	29.1±8.2 (1297)	27.7±9.9 (599)	<0.01
4	29.1±8.2 (819)	26.1±8.6 (274)	<0.001
5	32.0±9.2 (1917)	19.7±9.8 (900)	<0.001
Whole fibers			
1	23.2±6.2 (1007)	20.6±7.0 (668)	<0.001
2	26.0±7.5 (1507)	22.2±5.9 (1509)	<0.001
3	28.5±8.4 (1544)	29.4±10.4 (1579)	<0.01
4	28.4±8.6 (1019)	33.8±13.5 (1060)	<0.001
5	31.0±9.2 (2365)	26.6±12.9 (2051)	<0.001

数値は平均値±標準偏差．( ) 内は測定線維数を示す．
Dy：ジストロフィー筋．
P：対照・Dy 間の有意差の検定．NS：有意差なし．

直径は，1週及び2週目では小さく，3週及び4週目では急速に対照より大きくなり，更に5週目では再び直径の減少を示した(表2)．筋線維を構成する αR 線維と αW 線維について，平均直径の変化を検討すると(図2)，受傷後3～5週目の対照筋直径は，その約80%を占める αW 線維の直径変動に比較的平行して増大している．これに反し，Dy 筋の過半数を占める αR 線維は3週，4週目において急速に平均直径が増大し，5週目で減少している．更に αW 線維は対照筋とは逆に，2週以後次第に平均直径が減少，特に5週目の減少が著しい．

筋線維直径の分布をみるに，受傷3週以降の Dy 筋の平均直径の標準偏差は，再生筋全体においても，また αR 線維においても対照筋より高値を示し，筋直径の大小不同の著しいことが想像される（表2）．αW 線維における直径標準偏差値は，対照に比し大差をみない．

直径分布の変化は，megahistogram により更に明瞭である（図3）．即ち Dy 筋にあっては受傷4週以降，特に60μm 以上の大径線維が少なからず認められるほかに，5週目では15μm 以下の小径線維が増加している．

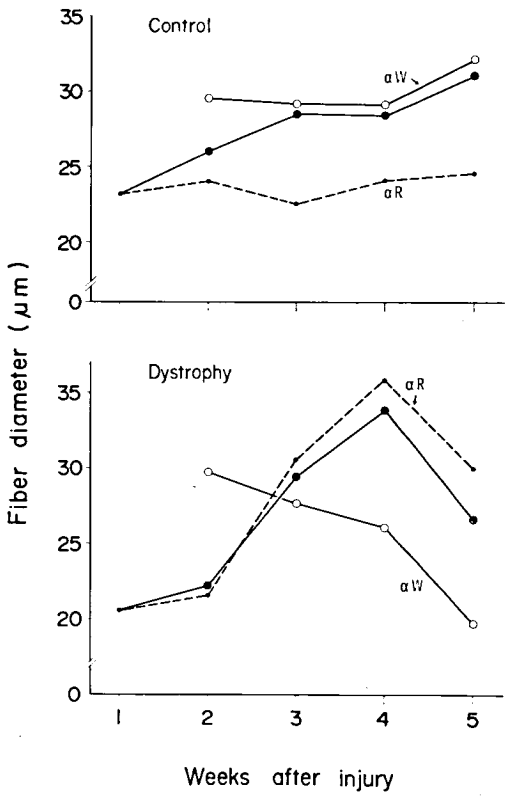


図2　再生筋線維直径平均値の変動
表2に基づく．
黒丸実線：筋線維全体；黒丸破線：αR 線維；白丸実線：αW 線維

考　　察

筋線維に傷害を加える実験方法としては，筋の挫滅，冷却（Price ら[2]），麻酔薬注入（Jirmanová 及び Thesleff[3]）などが代表的なものである．本実験に使用した cold injury は，筋肉内の神経，血管，衛星細胞などを傷害する欠点をもってはいるが，基底膜は比較的良く保存されるといわれる（Price ら[2]）．また傷害の強さと傷害部位さえ一定にすれば，再生筋線維を同定し易い方法である．

後広背筋は浅胸筋や上腕二頭筋に比し，ジスト

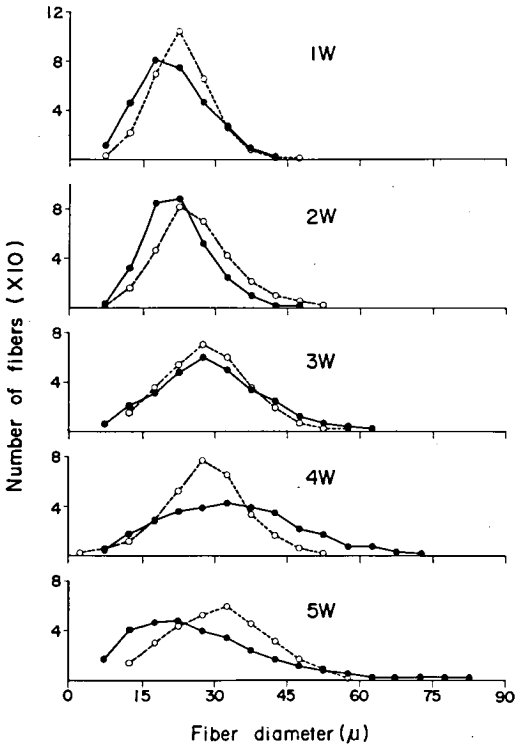


図3　再生筋線維の直径 megahistograms
黒丸実線：Dy チキン；白丸破線：対照チキン

ロフィーとしての病変はやや軽度であるが，筋が細長く，容積も小さく，傷害部位を一定にし易く，また cold injury により筋腹の横断面全体を容易に傷害でき，実験に好都合である．

チキンの骨格筋は，ATPase および NADH-TR 染色を応用して，αR，αW 及び βR の3種類の筋線維タイプに分類される（Ashmore 及び Doerr[4]）．対照チキンとして使用した line 412の白筋は αR 線維と αW 線維とからなり，ふ化後急速に αR 線維から αW 線維への変換が進む．例えばふ化後4ヶ月の後広背筋では，αW 線維が78.2%を占め，αR 線維は21.8%である（Nonaka 及び Nakamura[5]）．このことは，本実験において受傷3週目以降，対照再生筋の αW 線維が約80%を占める点とよく一致する．これに反し，Dy チキンの後広背筋ではその変換が遅れ，ふ化後4ヶ月目でもなお67.2%にすぎない（Nonaka 及び Nakamura[5]）．かかる Dy チキン白筋における筋線維タイプ変換の遅延は本実験の再生筋線維にも認められ，受傷後2週以降の αW 線維出現率は低く，対照に比し明らかに異常である．かかる事実は，Dy チキン再生筋に分化の遅延があると理解しえよう．

Dy チキンの再生筋にあっては，受傷後2週目以降急速に直径平均値が増大するが，5週目では逆に対照よりも低値をとる．かかる直径値の変動が αR 線維の変動によく一致するのは，αR 線維が線維構成の過半数を占めることに基づくであろうが，同時に Dy チキン再生筋の αW 線維の特異性にも原因すると思われる．即ち，Dy チキンの αW 線維は2週以後経過と共に直径平均値が減じる．Dy チキンの変性は αW 線維に出現すること（Nonaka 及び Sugita[6]）を考慮すれば，αW 線維直径の減少は筋線維変性と無関係ではありえない．特に受傷後4～5週目に変性が認められることを考え合せると，5週目における筋平均直径の減少は，線維の変性，壊死に伴って出現する小径幼若線維の存在によるものと思われる．それは5週目にみられた直径分布の様子からも理解出来よう．Dy 筋の αR 線維においても対照と異なり，急速な直径の増大とその大小不同がみられ，特異な所見を示した．

総　　括

Dy チキン（line 413）の後広背筋に cold injury を加え，受傷後5週目まで経時的に再生筋線維の形態を追究し，対照と比較検討した結果は次の通りである．

1．受傷後1週目には病巣は幼若筋線維で満たされるが，対照よりも筋線維直径は小さく，より多くの myogenic cell を伴っていた．

2．受傷1週目の再生筋は，対照同様すべて αR 線維より成るが，2週以後 αR 線維から αW 線維への変換は遅れ，5週目においても αW 線維発現率は約43%の低値であった．

3．受傷後3週目以後の再生筋には大小不同が著明になり，肥大線維を伴い，4～5週目には筋線維の変性と壊死，脂肪浸潤，新たな幼若筋線維

が出現し，5週目の筋直径平均値は減少した．

4．Dy 筋再生線維では，対照と異なり αR 線維の直径平均値が一過性に増大するが，αW 線維の直径平均値は経過と共に減少した．

結　論

Dy チキンの白筋では，受傷後早期に対照とほぼ同程度に活発な筋再生が認められるが，2週以後は再生筋の分化が遅延し，次第に Dy 筋特有の変性と壊死が散在性に生じ，新たな幼若筋線維の出現，筋線維直径の減少を来す．

文　献

1) Reznik, M.: Satellite cells, myoblasts, and skeletal muscle regeneration. In "Regeneration of Striated Muscle, and Myogenesis", (ed. by Mauro, A., Shafiq, S. A. and Milhorat, A. T.), Excerpta Medica, Amsterdam, 1970, pp. 133-156.
2) Price, H. M., Howes, E. L. Jr. and Blumberg, J. M.: Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers injured by cold. I. The acute degenerative changes. Lab. Invest., 13: 1264-1278, 1964.
3) Jirmanová, I. and Thesleff, S.: Ultrastructural study of experimental muscle degeneration and regeneration in the adult rat. Z. Zellforsch., 131: 77-97, 1972.
4) Ashmore, C. R. and Doerr, L.: Postnatal development of fiber types in normal and dystrophic skeletal muscle of the chick. Exp. Neurol., 30: 431-446, 1971.
5) Nonaka,I. and Nakamura,H.: Muscle differentiation and regeneration in chicken muscular dystrophy. In "Muscular Dystrophy", (ed. by Ebashi,S.), University of Tokyo Press, Tokyo, 1982, pp. 63-77.
6) Nonaka,I. and Sugita,H.: Intracytoplasmic vacuoles in αW fibers of dystrophic chicken muscle—probable early pathologic event initiates massive fiber necrosis. Acta Neuropathol., 55: 173-181, 1981.

3）培養下における正常及び筋ジストロフィーチキンのT-systemの微細構造

塚越　廣*

研究協力者　小林高義*　松永高志*
松本容秋*　古川哲雄*

はじめに

筋ジストロフィー症（筋ジスと略）の病因としてT-systemなどの筋内膜系の変化が最近注目され，Oguchiら[1)2)]は，Duchenne型筋ジストロフィー症でT-systemの走行異常，分布異常，管径変動増加，honey comb structureとT-systemの連続性，T-systemとsarcoplasmic reticulum (SR) のanastomosisなどを報告している．しかし，これらの変化が筋ジス筋の発生期より存在する異常なのか，変性の初期像なのか，あるいは再生筋における発達中の内膜系の像をみているのかは未解決の問題であった．一方，筋ジス鶏では，Scalesら[3)]がGolgi変法を使用した立体視により，T-systemをらせん状に取り巻くSRの異常構造を報告し，Kiddら[4)]はT-systemのballooning, swellingを報告している．今回我々は，正常及び筋ジス筋の発生，分化段階のT-systemの異常の有無をみる目的で細胞培養法を使用し，検討を行ったので報告する．

材料及び方法

正常(line 412)及び筋ジス(line 413)鶏胚11～13日目大胸筋を使用．実体顕微鏡下で各々の大胸筋を切り取りリナルディーニ液へ入れ結合組織を除去．まな板の上で0.5mm³以下に細切後，0.25%トリプシン液へ入れ，37℃で7～8分incubateした．その後ピペッティングを行ない，750～1000 rpm，2分間遠心後トリプシン液を除去し，リナルディーニ液で洗浄，ピペッティング，遠心操作を3回行い，最後に培養液を入れ，トリプシンの活性を停止させた．浮遊細胞培養液をピペッティング，遠心操作を行ない，上清を除去後，新しく培養液を6 cc位加え，充分ピペッティング後，レンズクリーニング用のシリコンフィルターを通し，大型シャーレに静置させ，30分間37℃でincubateし，線維芽細胞を減らし，筋芽細胞の比率を多くした(Yaffeの方法)．ニグロシンを使用し，生きている細胞を数え，2×10^4cell/cm²（8×10^4cell/cover slip）になるように細胞数を調整し，コラーゲン塗布カバースリップ上で培養を行った．培養液の組成は，Eagle's MEM with Hanks' salt 80%，馬血清15%，EE 5%，glucose 6 g/l，penicillin G 100u/ml（$NaHCO_3$でpHを調整）．週2回培養液を交換，経時的に位相差顕微鏡で観察すると同時に，3日ごとに各々をJenner-Giemsa染色し，更に電顕標本を作成した．電顕標本は，cover slipをそのまま0.1M PBS buffer（pH7.2）で3回洗浄し，2.5% glutaraldehydeで15分間固定．PBS bufferで充分洗浄後，cover slipより組織をコラーゲンと共にはがし，0.1M s-collidine bufferで洗浄後，2%オスミウム酸，2%硝酸ランタン中に入れ，バイブレーターで30分攪拌し，その後シリーズアルコールで迅速に脱水し，epon-aralditeへ包埋した．厚切り切片は無染色のまま日立H-800を使用し，200KVで観察し，超薄切片は酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色後100 KVで観察を行った．

結果

光顕所見：両者の筋芽細胞は，培養2～3日目

*東京医科歯科大学医学部神経内科

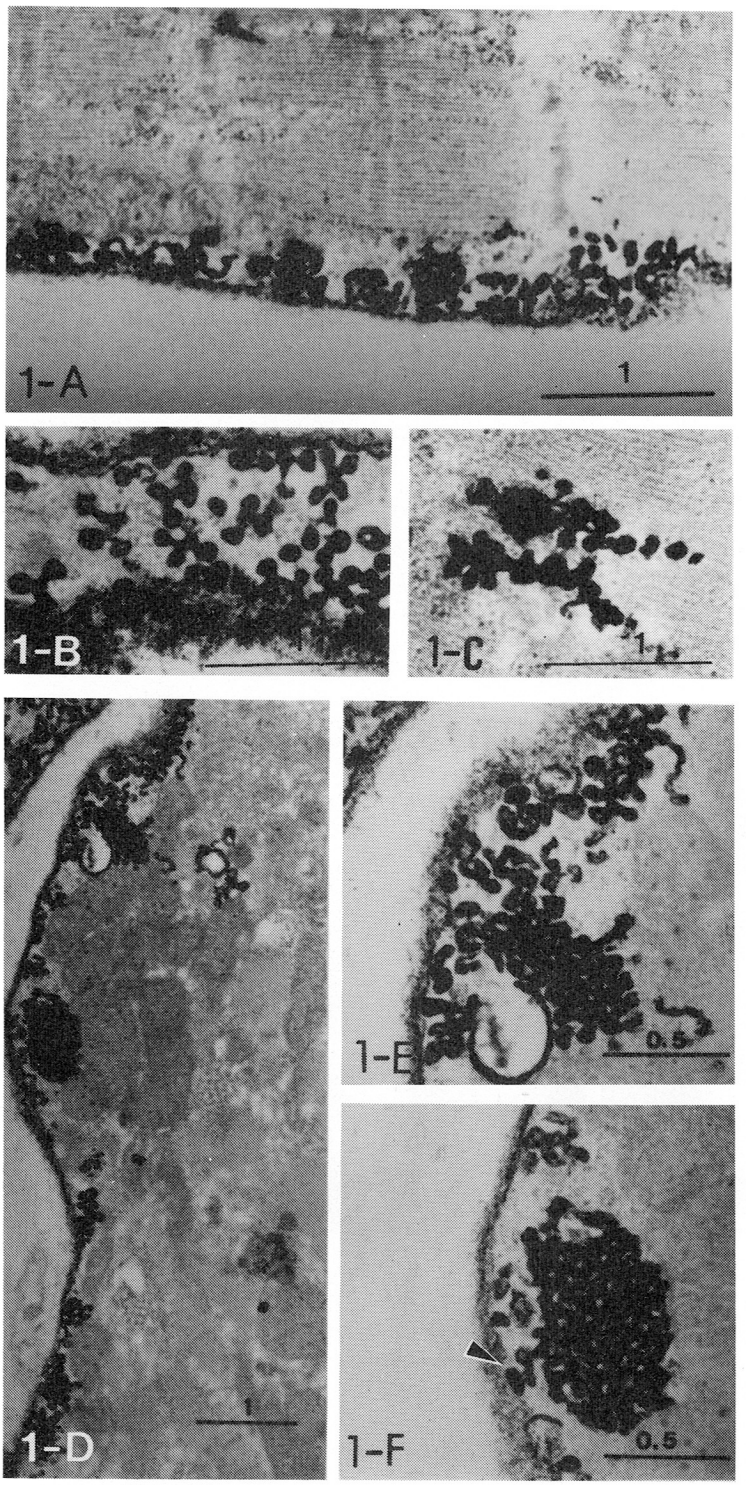


図1 Electron micrographs of T-system tubules in cultured normal chick skeletal muscle.

A : Many caveola are observed beneath the plasmalemma, and some of them open to the cell surface.

B : Multilobed inpackings of the plasmalemma.

C : Numerous multilobed inpackings appear as elongated & tubular forms.

D : Honey comb like structures beneath the plasmalemma.

E, F : High power views of Fig. 1-D. T-system tubules of the honey comb like structure are connected with caveola which open to the cell surface (arrowhead).

Uranyl acetate-lead citrate stainnig. Bar=1μm (A, B, C, D), bar=0.5μm (E, F).

には融合し合胞体細胞から筋管細胞となり，1週間以内に横紋形成を始め，自発収縮を認め，9～12日には成熟した筋細胞になるが，培養2～3週位まで両者に明らかな差を認めなかった．

電顕所見：正常，筋ジスとも細胞膜に沿ってランタンが付着し，細胞膜表面から陥入した多数のcaveolaを認めた（図1-A，図3）．また，それらのcaveolaがジグザグ状に数珠状に融合し（図1-B），また管状構造をつくっている像が観察された（図1-C）．また，いわゆるhoney comb structureは培養の比較的初期から観察され，長期培養でもよく発達した網状構造が認められた（図1-D，E，F；図2-A，B；図4-A，D）．これらは，高圧電顕での観察より，管状構造物と連続し（図4），またcaveola及び，細胞膜とも連続している像も観察された（図1-F）．高圧電顕での観察では，横紋形成をした成熟した骨格筋でも，多くのhoney comb structureと，それに連続するコイル状にまきながら長く伸びたT-systemが，不規則に走行して観察されるが（図4-A），長期培養では，筋の長軸方向に配列するT-systemと，A-I junctionを中心として横走するT-systemが多く認められた（図2）．これらのT-systemの発達に筋ジス筋と正常筋との間に質的な相違は認められなかった．しかし，培養2～3週の筋ジス筋では，図4の如く長管状に伸びているT-systemあるいは，honey comb structureに連続するT-systemの所々が膨化している像が観察された．また，図5の如く空胞内にランタンが入り，管状の筋内膜系と思われる構造物を有する空胞も観察された．一方，変性に陥入っている筋細胞の細胞膜より直接細胞内にランタンの入り込んだ像は観察されなかった．

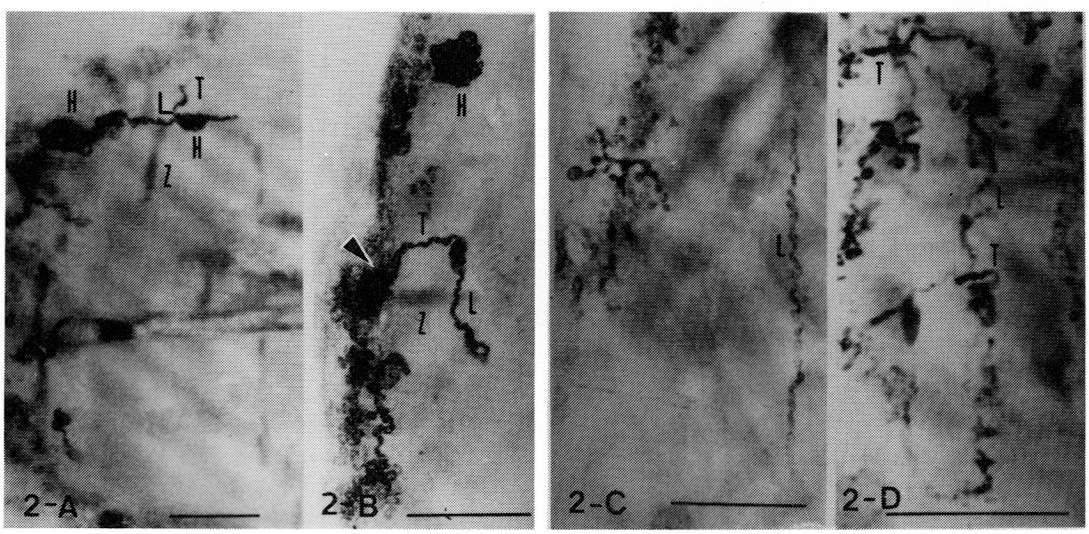


図2　High-voltage (200 KV) electron micrographs of T-system tubules in cultured normal chick skeletal muscle.
In unstained about 1μm thick sections, there were longitudinal tubules (L) and transeverse tubules (T) at A-I junction. A T-system opens to the cell surface (2-B; arrowhead). Honey comb like structures are often observed (2-A, B; H). Z=Z band. Bar=1μm. 51 day culture.

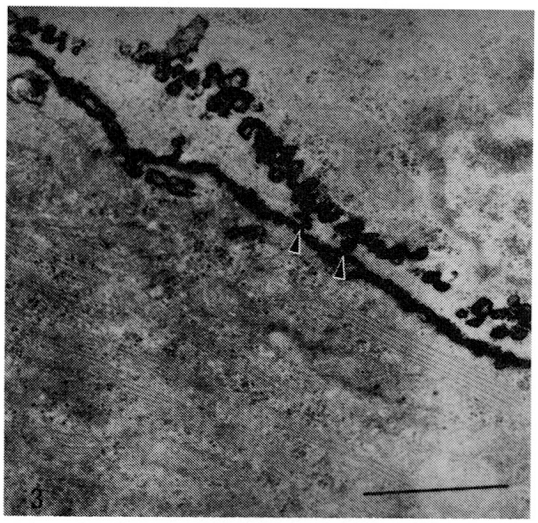


図3　An electron micrograph of T-system tubules in cultured dystrophic chick skeletal muscle.

Many caveola are observed beneath the plasmalemma. Some of them open to the cell surface (arrowheads). Some caveola are irregular in shape and enlarged. Bar＝1μm. Uranyl acetate-lead citrate staining. 20 day culture.

考　　察

Ishikawaは[5]，鶏胚骨格筋の細胞培養で，フェリチンを標識としてT-systemの形成過程を検討し，T-systemはcaveolaから発達し，精巧なnet workが形成される（いわゆるhoney comb structure）ことを報告した．我々の今回の実験においてもcaveolaにランタンが侵入し，そのcaveolaがいくつかジグザグ状に連なった像，管状のT-systemとcaveolaとの連続した所見も観察された．honey comb structureと細胞膜との連続，caveolaとの連続，管状構造との連続も観察され，Ishikawaの報告と同様の結果であった．いわゆるhoney comb structure及び管状に伸びたT-systemの斜走，縦走する像は，横紋形成した成熟した正常，筋ジス両者の骨格筋に認められることから，T-systemの発生，分化の過程の現象であり，Duchenne型筋ジス生検筋でみられたhoney comb structure，T-systemの乱れを有する筋線維は，再生筋の可能性が強いと考えられる．

一方，筋ジス鶏のT-systemの異常として，Kiddら[4]は，通常の超薄切片により，triadのT-systemを観察し，正常に比しT-systemが拡大し，swelling, ballooningの認められることを報告した．今回，高圧電顕により観察された培養筋ジス骨格筋のT-systemの一部の膨化は，これらの所見を支持するものと思われる．一方，Scalesら[3]は，Golgi染色を改良し，長時間$K_2Cr_2O_7$及び$AgNO_3$に組織を浸けておくことで，銀がT-system及びSRにも入り込むことを報告している．一般的には，フェリチン，ランタンなどはT-systemに入るが，SRには入らず，T-systemとSRとは生理的に交通はないと考えられている．しかし，Yasumura[6]，Scalesら[3]が試みた方法によって，正常筋でもT-systemのみならずSRにも外部からの粒子が入り込むことが明らかにされた[6]．このことはある条件下において正常筋でもT-systemとSRが交通性を持ち得ることを示しており，このようなanastomosisが病的筋肉にとって特徴的な所見でない可能性を示唆している．どのような条件でT-systemとSRが交通しやすくなるのか，あるいは筋ジス筋が正常筋に比べてより交通しやすいのかなどの解明は今後の問題と考えられる．

また，今回使用したランタンによる方法では，全く同じ条件で行っても全くランタンがT-systemに入らない場合，ランタンがT-system内に入った筋においても同一筋肉中で全くランタンが入っていないT-systemが存在するなどの所見が認められた．これらのことは，Scalesらが行ったGolgi変法においても認められている．細胞膜と連続して外界と交通しているはずのT-systemに対するランタンや銀粒子の入り方の違いが，単なる技術的問題か，何らかのT-systemの構造からくる生理的問題があるのかも今後検討されねばならない問題と考えられる．

今後更に技術的検討を行い，経時的定量的に正常及び筋ジス鶏骨格筋のT-system及びSRの異常の有無を明らかにしていく予定である．

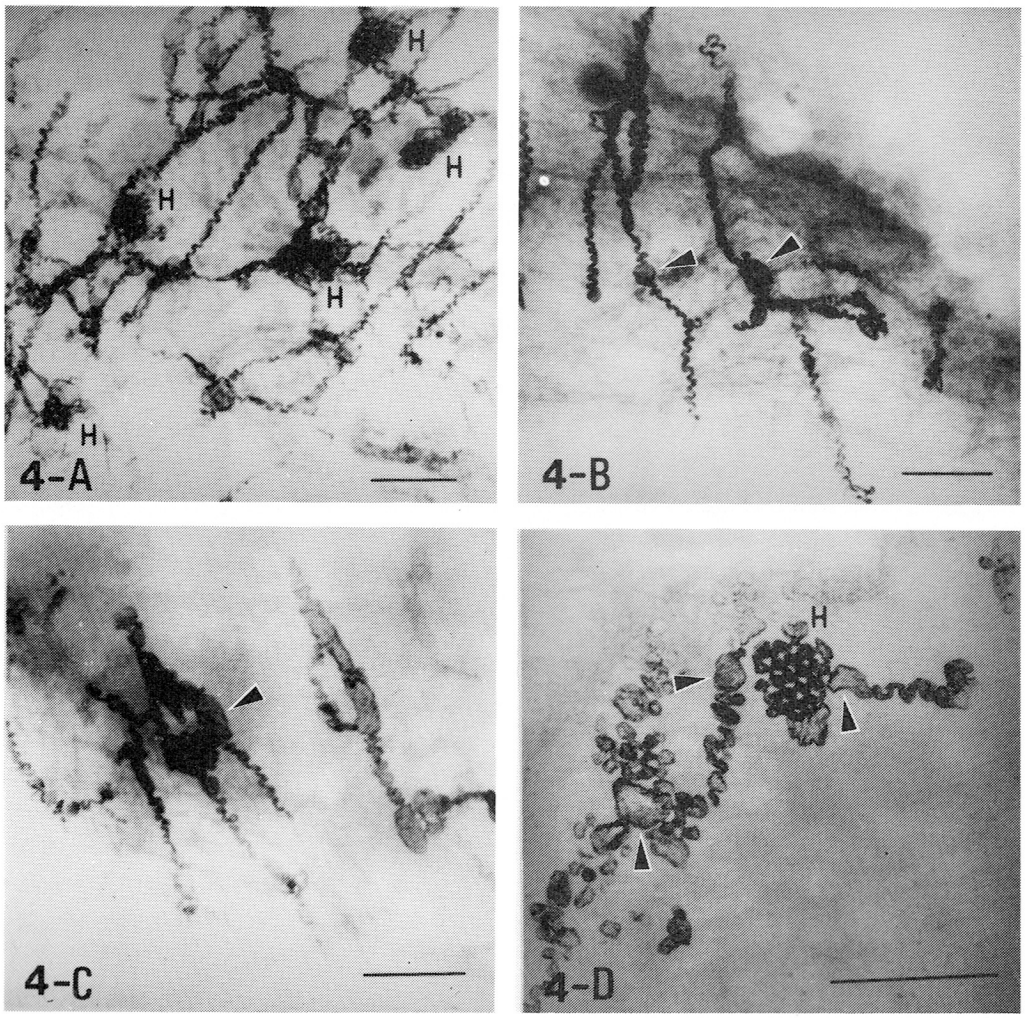


図4　High-voltage (200 KV) electron micrographs of T-system tubules in cultured dystrophic skeletal muscle.
A : Many honey comb like structures (H) were observed. These are connected with elongated tubules each other.
B : T-system tubules are sometimes ballooning (arrowheads).
C, D : T-system tubules are often swelling and irregular in shape (arrowheads). Unstained about 1 μm thick sections. Bar=1μm. 20 day culture.

図5　An electron micrograph of vacuoles in cultured dystrophic chick skeletal muscle.
A vacuole invaded by lantanum contains tubular structure (T). Uranyl acetate-lead citrate staining. Bar=1μm. 20 day culture.

結　　論

正常及び筋ジス鶏胚培養骨格筋の発生，分化に伴うT-systemの発達に質的相違は観察されなかったが，T-systemのswelling, ballooningは筋ジス筋に多い傾向を認めた．

謝辞：T-systemの電顕所見について御教示いただいた信州大学医学部第3内科，小口喜三夫助教授に深謝いたします．

文　　献

1) Oguchi, K. & Tsukagoshi, H: An electron microscopic study of the T-system in progressive muscular dystrophy (Duchenne) using lanthanum. J. Neurol. Sci., **44**: 161, 1980.
2) Oguchi, K. Yanagisawa, N. & Tsukagoshi, H.: The structure of the T-system in human muscular dystrophy. A high-voltage electron microscopic study. J. Neurol. Sci., **57**: 333, 1982.
3) Scales, D.J. & Yasumura, T.: I. Stereoscopic views of a dystrophic sarcotubular system: selective enhancement by a modified Golgi stain. J. Ultrastructure Res., **78**: 193, 1982.
4) Kidd, P.M. & Yasumura, T.: T-system abnormalities in differentiating skeletal fibers of dystrophic chickens. Muscle & Nerve, **5**: 471, 1982.
5) Ishikawa, H.: Formation of elaborate network of T-system tubues in cultured skeletal muscle with special reference to T-system formation. J. Cell Biol., **38**: 51, 1968.
6) Yasumura, T. & Scales, D.J.: II. The three-dimensional rearrangement of mammalian sarcoplasmic reticulum after contraction. J. Ultrastracture Res., **81**: 27. 1982.

4) モノクローナル抗体を用いた筋ジストロフィー症発症機序の研究

宇尾野　公　義*

研究協力者　　黒　田　洋一郎**　高　元　喜代美***

目　　的

モノクローナル抗体[1]の利用は，医学生物学の分野で最近盛んになってきているが，その利点の1つに良いスクリーニング法があれば，抗原を精製せずに，すなわち目的の抗原が未知であっても，その抗原に対する特異抗体が得られることがある[2]．

Duchenne型筋ジストロフィー症は遺伝性疾患であるので，筋ジストロフィー症（筋ジス）遺伝子と対照正常遺伝子の遺伝子産物の差が発症の有無を決定していると考えられる．そこでさまざまな遺伝子産物に対するモノクローナル抗体の中から，筋ジストロフィー症に相関した抗原性の差を示すものを選択すれば，筋ジス遺伝子由来の遺伝子産物が抗原性をもつ限りその中に筋ジス特異モノクローナル抗体が含まれるはずである．

図1のように，モデル動物でも，筋ジストロフィー鶏（line 413）は単一の不完全優性筋ジス遺伝子をもち，対照正常鶏（line 412）は対立正常遺伝子を持っている[3]．これらの遺伝子は発生分化の過程で発現し，筋ジス遺伝子由来の遺伝子産物はおそらく他の遺伝子産物と2次的，3次的な影響を引き起しながら筋ジスを発症させ，一方，対立正常遺伝子は正常な筋肉をつくっていく，と思われる．

筋ジストロフィー症の発症の部位と分子機序は不明であるが，筋細胞膜の何らかの異常によるとの推定が多い．昨年度，我々が報告したように，筋ジス鶏培養筋細胞からのCPKの遊離が，細胞の破壊による非特異的なものでなかった[4]ことも筋ジス細胞膜の異常を示唆している．

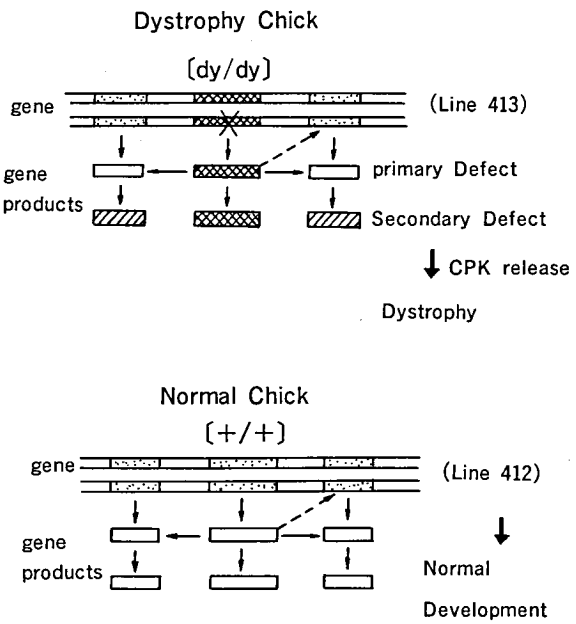


図1　　Primary Defect

そこで筋ジス鶏と対照正常鶏のそれぞれの筋膜の間で抗原性の差を示すモノクローナル抗体をスクリーニングすることが考えられるが，line 413, 412の鶏の間では，筋ジス遺伝子以外の遺伝子もいくつか異なっていることが知られている[5]．したがって，予備実験をかねてまず筋ジス鶏（line 413），対照正常鶏（line 412）の筋膜画分の間に，どのくらい抗原性の差があるかをモノクローナル抗体を使って調べてみた．

＊国立静岡病院
＊＊東京都神経科学総合研究所神経生化学
＊＊＊都立神経病院神経内科

方　法

1．免疫法とハイブリドーマの選択

筋ジス鶏（line 413），対照正常鶏（line 412）の孵化直後の胸筋から Barchi らの方法[6]に従って筋膜画分を調製した．この筋膜画分をそれぞれ蛋白量で200μg ずつ，BALB/c マウスに2週間隔で3回免疫した．最終免疫の4日後にマウスから脾臓細胞をとり，ポリエチレングリコールの存在下でミエローマ細胞（NS-1）と融合させ，ハイブリドーマを HAT 法で選択した．

2．ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）

96穴プレートの well の底に5 μg 蛋白の筋ジス鶏，及び対照正常鶏の筋膜画分を結合させた ELISA プレートを用い，各ハイブリドーマの培養上清液をアッセイした[2]．第1段では，筋ジス筋膜画分で免疫したマウス由来のハイブリドーマは筋ジス筋膜画分 ELISA プレートを用いる，というようにホモの系で，免疫した抗原に対する抗体を産生しているハイブリドーマを選択した．第2段では，第1段でそれぞれの筋膜画分に対する抗体産生が確認されたハイブリドーマの培養上清液を，筋ジス筋膜画分，対照正常筋膜画分のそれぞれの ELISA プレートを用いてアッセイし，両者の反応性の差を，一定条件下のフェニレンジアミン発色の OD 値の差で測定した．

3．クローニングと抗体の大量調製

筋ジスと対照正常筋膜画分で抗原性の差を示すハイブリドーマのクローニングを試みた．限界希釈法を用い，クローニングは2回以上行った．クローン化されたハイブリドーマを BALB/c マウスの腹腔内に注入して数週間増殖させ，蓄積したモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得た．

結　果

1．ハイブリドーマのスクリーニング

免疫マウスから採血し，血清中の抗体価が一番高いマウスの脾臓細胞を用いたハイブリドーマのスクリーニングの結果を表1に示す．第1段のテストで，それぞれ陽性度の高いハイブリドーマは，筋ジス筋膜画分に対する抗体を産生するもの192 well 中42well，対照正常筋膜画分に対する抗体を産生するもの192well 中51well とかなり高率に見つかり，免疫が良好なことを示していた．

表1　Screening of specific monoclonal antibodies against muscle membrane of dystrophic chick

Spleen cell immunized with	1st Test No. of positive well	2nd Test No. of positive well
Dystrophy membrane	Dys-M ELISA (+++, ++) 42/192	Dys-M ELISA / Nor-M ELISA >3 2/42
Normal membrane	Nor-M ELISA (+++, ++) 51/192	Nor-M ELISA / Dys-M ELISA >3 1/51

これらの陽性ハイブリドーマの上清を，第2段テストとして，筋ジス，対照正常の筋膜画分を結合させた ELISA プレートでアッセイし，両者の OD 値の比が3以上のものを抗原性の差が有意であるものとした．筋ジス筋膜画分に対して抗原性が高い well は42well 中2 well，対照正常筋膜画分に対して抗原性の高い well は51well 中1 well 存在した．

2．モノクローナル抗体の作製

OD 値の比が2以上のものを含めてホモの ELISA 系のみを使って試みにクローニングを行ったところ，最終的に7個のクローンがとれた（表2）．これらを腹水中で増殖させ，抗体を大量に得た．これらを希釈し2種の ELISA プレートを使って抗原性の差を見た．ELISA 陽性となる最大希釈度を ELISA titre とすると，筋ジス筋膜画分と

表2　Monoclonal antibodies against chick muscle membrane fraction

Clone	Immunogen Chick	ELISA titre of ascite Normal-M ELISA	ELISA titre of ascite Dystrophy-M ELISA
MCH-1	Normal	× 5000	× 2500
MCH-2a	Normal	× 40000	× 10000
-2b	Normal	× 160000	× 160000
MCH-3	Dystrophy	× 2500	× 1250
MCH-4a	Normal	× 640	× 640
-4b	Normal	× 5000	× 10000
MCH-5	Dystrophy	× 640	× 640

対照正常筋膜画分 ELISA titre 値の差は最も大きなもので4倍であった.

考　　察

Line 413と line 412の筋膜画分の間で抗原性の差を示すモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの出現率は，どちらの筋膜で免疫した場合も約2～5％とかなり高率であった．この原因としては，①筋ジス遺伝子の発現が孵化以前にかなり早く起っており，2次，3次的影響がすでに筋膜に及んでいる，②line 413と line 412の間の遺伝子背景はかなり異なっており，筋ジス遺伝子以外の遺伝子が，筋膜画分にも発現して差を生じている，ことなどが考えられる．今回の予備実験の結果ではそのどちらかは明確にできないが，もともと line 413，line 412は近交系を base にしたものでなく，遺伝子背景についての考慮はなしに継代されてきたものなので②の可能性はかなり高いと考えられる．

最近，line 413，line 412のこの欠点を補うため，近交系鶏 GSN-2に line 413の筋ジス遺伝子を cross—inter cross 法で導入した GSN-2/am が開発されつつある．今後，これらの鶏を使って②の可能性を少なくすることにより，さらに筋ジス特異モノクローナル抗体の検索を検討中である．

今回は孵化直後の筋膜画分を抗原として用いたが，抗原の種類，抗原をとり出す発生段階については原理的には制限がない．ただ，抗原が粗であればあるほど，発生段階が筋ジス遺伝子発現後遅くなればなるほど，筋ジス遺伝子産物に対するモノクローナル抗体がとれる確率は相対的に低くなることは自明である．また試験的に行ったクローン化の実験は，当然のことながら，抗原性の差を目安にクローン化を行う必要性を示している．

文　　献

1) Köhler, G. & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells screening antibodies of predefined specificity. Nature, 256: 495—497, 1975.
2) 小林和夫，黒田洋一郎：細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体(1)—ELISA を用いた一次スクリーニング．神経化学，21：378—380, 1982.
3) Wilson, B. W., Randall, W. R., Patterson, G. T. & Entrikin, R. K.: Major physiologic and histochemical characterics of inherited dystrophy of the chicken. Ann. N. Y. Acad. Sci., 317: 224—246, 1979.
4) 宇尾野公義，黒田洋一郎，高元喜代美：ジストロフィー鶏・培養筋細胞からの CPK の遊離．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」，三好班，昭和57年度研究報告書，1983，pp75—77.
5) 水谷　誠：筋ジストロフィー鶏413とコントロール鶏412の遺伝的背景の差異と congenic strain の必要性．厚生省「筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究」，野村班，昭和55年度研究報告書，1981.
6) Barchi, R. L., Bonilla, E. & Wong M.: Isolation and characterization of muscle membranes using surface-specific labels. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74: 34—38, 1977.

5) ジストロフィー鶏発症早期における活性酸素関連諸酵素の異常について(第3報)

水 野 美 邦*

研究協力者　大 田 恵 子*

筋ジストロフィー症の発症機序は，可成明らかにされてきてはいるが，筋細胞の変性機序はまだ不明の点が少なくない．我々は細胞の変性過程に細胞毒性の強い活性酸素の関与があるのではないかと考えて，これ迄に，形態学的変化をまだ殆ど生じていない幼若ジストロフィー鶏をモデルとして，活性酸素の代謝に関連した諸酵素活性を対照鶏と比較検討し，それら諸酵素活性がジストロフィー鶏において有意に上昇している事を発表した[1]．これら諸酵素の関係を模式的に図示すると，図1の如くになり互いに関連を持った酵素系である．これらの酵素系が全て上昇している事は，活性酸素の代謝回転の亢進を示唆するが，それを証明するにはまだ幾つかの過程が必要で，ひとつは glutathione reductase により NADPH が消費されるのでこれを補う酵素系の活性が上昇していなければならない．これは主に pentose monophosphate shunt 中の glucose 6-phosphate dehydrogenase（以下 G6PDH と略）と 6-phosphogluconate dehydrogenase（以下6PGDH と略）によって成される．そこで今回はこの両酵素活性をまず検討した．次に，活性酸素は SH 酵素を阻害しやすいので SH 酵素でしかも，解糖素の重要な酵素である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase（以下 GA3PDH と略）活性を検討した．次に superoxide anion（O_2^-）と過酸化水素の反応で生ずる hydroxyl radical（OH・）や singlet oxygen $^1O_2$は，脂質の過酸化を生じて種々の膜系の障害を生ずる事が知られており，脂質の過酸化の程度は，組織の thiobarbituric acid-reactive products（以下 TBA-RP と略）を測定する事により推定できるので，それを検討した．これらの報告が目的である．

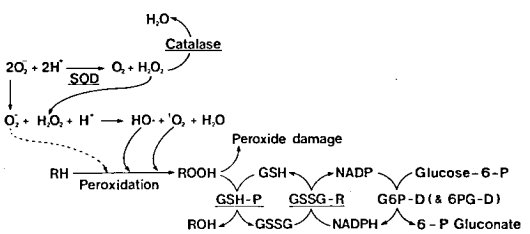


図1　活性酸素関連諸酵素の関係模式図
SOD: Superoxide dismutase, GSH-P: Glutathione peroxidase, GSSGR: Glutathione reductase, G6P-D: Glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6PG-D: 6-phosphogluconate dehydrogenase.

方　法

New Hampshire 系ジストロフィー鶏（line 413）とその対照（line412）の受精卵を入手，孵化後，1週，2週，4週，4ヶ月の時点で断頭屠殺，浅胸筋をとり出し，その一部を測定に用いた．

G6PDH および 6PGDH 活性は King ら[2]の方法を一部改変して行った．即ち筋肉約400mg を，10倍量の0.6mM に NADP を含む0.14M KCl pH7.6にて Dounce 型ホモジェナイザーによりホモジェナイズした．KCl 溶液の pH は，0.14M $NaHCO_3$にて7.6に調整した．ホモジェネートを，ガーゼ及び木綿布でこした後，4℃にて100,000g 60分遠心，上清を得，その200λ を酵素源とした．

この酵素源には，G6PDH，6PGDH 両酵素が存在し，どちらも NADPH の生成による吸光度の

＊自治医科大学神経内科

変化で見る為に，基質として最初G6-P，6-PG両者を含むものを測定し，次いで6-PGのみで測定して6PGDH活性を求め，最初の両者の活性から6PGDH活性を差し引いたものをG6PDH活性と考えた．尚参考としてG6Pのみを基質とした測定を行ったがこの場合，G6Pから生じた6P-Gは引き続き6PGDHにより還元されるので，G6PDH活性の約2倍程度の値がでてくるものと考えられる．

GA3PDH活性はWang and Alaupovic[3]の方法を一部改変して測定した．即ち浅胸筋約200mgを，10倍量の127mMにNaClと2mMにEDTAを含む10mM Na-phosphate buffer pH7.4にてDounce型ホモジェナイザーを使用してホモジェナイズし上記の如く沪過した後，4℃にて100,000gに60分遠心して上清を得た．この上清を最初ホモジェナイズに用いたと同様の緩衝液にて10倍に希釈し，次にこれを更に50mM tris buffer pH8.6（EDTAを1mMに含む）にて100倍に希釈し，その100λを測定に用いた．

反応は50m M tris buffer pH8.6中にて行い，EDTA-Na_2 1 mM, sodium arsenate 50mM, cystein-HCl 3.3mM NAD 1 mM, glyceraldehyde 3-phosphate 1 mMを含む，反応は，37℃にて行い，基質を添加した所を基点として，340nmの吸光度の変化を自記記録計に記録し，そのinitial velocityから酵素活性を求めた．

TBA-RPの測定は，筋肉を19倍量の生理食塩水にてホモジェナイズし，そのホモジェネート50λを用いて，Tanizawaら[4]の方法により，malon dialdehydeをスタンダードとして螢光測定した．

蛋白はLowryら[5]の方法により牛血清アルブミンをスタンダードとして測定した．

結果はstudentの“t”testにより検定した．

結　　果

100,000g上清の蛋白濃度は前回報告[1]と同様，ジストロフィー鶏の方が対照鶏より有意に低かったので，結果は，蛋白当りの比活性と湿重量当りの総活性と両方で計算して比較した．用いた組織量と，生成NADPH又はNADH量との関係は図2に示す如く，G6PDH，6PGDH，何れもよい直線性を示し，GA3PDHについても同様であった．GA3PDH活性は，G6PDHや6PGDH活性に比して蛋白当りでも，湿重量当りでも1000倍以上の活性があり，充分希釈して測定する必要があった．

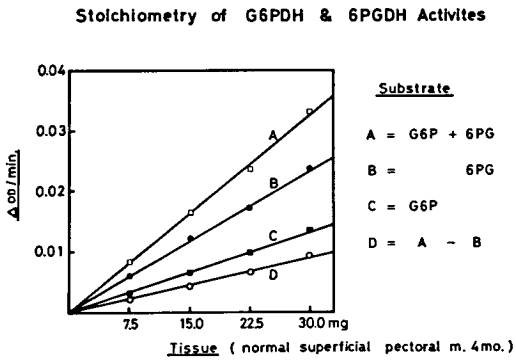


図2　組織量とG6P dehydrogenase，6-phosphogluconate dehydrogenase活性の関係
縦軸は，NADPH増加による340nmの吸光度変化を示す．

G6PDHと6PGDH活性の比較では，対照でもジストロフィー鶏でも，2倍から7倍の差で6PGDH活性の方が高く，pentose monophosphate shuntの律速酵素としては，G6PDHが重要である事が示唆された．

TBA-RPに関しても組織量と螢光強度の間によい直線性が得られた．

次に，週齢を追ってのG6PDH，6PGDH活性の推移を図3に示す．図3は蛋白当りの比活性で現わした場合であるが，湿重量当りの総活性でもほぼ同様の所見が得られた．G6PDHと6PGDHを合せた活性および6PGDH活性は孵化1週後より，どの測定時点でも，ジストロフィー鶏の方が著明に高く，大部分0.1%以下の危険率で有意であった．計算により求めたG6PDH活性は比活性でみると，1週齢，4週齢，4ヶ月齢では，ジストロフィー鶏の方が有意に高かった．4週齢でも平均値では約2倍高かったが，個体差が大きく，有意には至らなかった($p<0.1$)．G6Pのみを基質とした時は，計算で得られたG6PDH活性の約2倍前後の値が得られているが，何れの時点でもジス

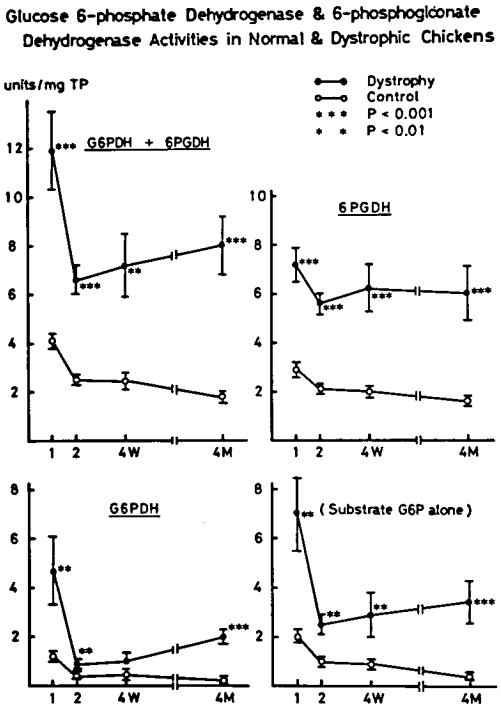


図 3　G6P dehydrogenase,6- phosphogluconate dehydrogenase 活性の成長に伴う変化
●—●dystrophy, o-o control, W＝weeks M＝months, 1 unit＝n mole NADPH formed/min.

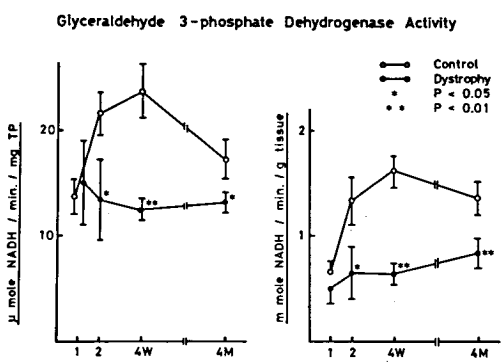


図 4　Glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase 活性の成長に伴う変化
●—● dystrophy,　o—o control,　W＝weeks,　M＝months

トロフィー鶏の方に有意に高い．

次に GA3PDH の結果を図4に示したが，1週齢では両群に有意差はないが，対照では2週目に活性が著明に上昇するのに対し，ジストロフィー鶏ではこの活性上昇が見られず有意に低いままにとどまる．上清分画の蛋白がジストロフィーの方が低かった為，湿重量当りの総活性で比較した時の方が両者の差は大きく，最も差が開いたのは，4週齢でジストロフィーの活性は対照の約40%に低下していた．

TBA-RP の結果は図5に示すが，やはり2週齢以後，ジストロフィー群で有意に増加していた．

考　　察

ジストロフィー鶏における G6PDH，6PGDH の活性の有意な上昇は，昨年迄に報告した所見即

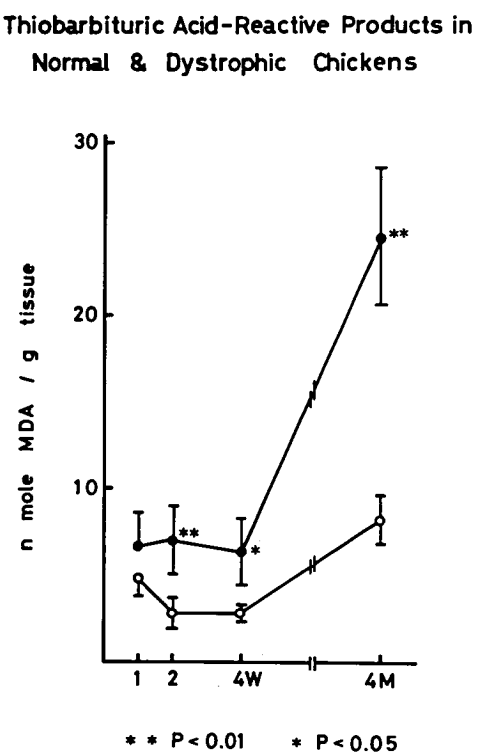


図5　Thiobarbituric acid-reactive products levels の成長に伴う変化
●—● dystrophy,　o—o control,　W＝weeks,　M＝months

ち，superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase 活性の上昇から予想された所見であり，ジストロフィー鶏における活性酸素の代謝回転亢進を支持する所見と考えられる．即ち，G6PDH，6PGDH，活性の上昇は，glutathione reductase により消費される NADPH を補給する意義がある．

筋肉における pentose monophosphate pathway の活性は非常に低いとされているようであり，実際解糖系の酵素である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase に比較すると1000分の1以下の活性であった．しかし生後1週の時点で筋組織を検討してみたが，脂肪細胞や macrophosphage は殆ど認められず筋肉内にも低いながら活性は存在すると思われる．そして活性の高さは大体 glutathione reductase, glutathione peroxidase のオーダーと一致するものである．

一方 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase は無機燐を高エネルギー燐酸結合にかえる解糖系の重要な酵素であるが，本酵素は sulfhydryl グループを活性基として持ち，活性酸素により極めて不活化を受けやすい[6]．対照鶏では生後1週目と2週目の間に本酵素活性の著明な上昇があるのに対し，ジストロフィー鶏においてはその上昇がなく低いままにとどまり，4週目では対照の約半分に活性が減少している．ジストロフィー鶏筋では解糖系酵素活性は一般に低いので，これはその表現のひとつであるかも知れないが，活性酸素の関与も示唆される所見と考える．

次に TBA-RP レベルは，脂質の過酸化の際生ずる malondialdehyde レベルを主に反映すると考えられているが，ジストロフィー鶏ではこれが生後2週目より，2～3倍に増加している．脂質の過酸化は主に superoxide anion と過酸化水素の反応によって生ずる hydroxyl padical（・HO）と一重項酸素により促進されるとされており，やはり活性酸素の生成増大を示す所見と考えられる．細胞の膜成分を構成する脂質の過酸化は，それら膜機能の機能障害を生ずる事が知られており，例えば，形質膜の過酸化は，カルシウムイオンなどの透過性亢進を来す事が知られており[7]，lysosome においては水解酵素の放出を来し[8]，ミトコンドリアにおいては，やはり，カルシウムイオンなどの透過性を増すと同時に，ミトコンドリア内の NAD の遊出を招き，呼吸酵素の活性低下を示す事が知られている[9]．従って活性酸素の生成増大，脂質過酸化現象は，筋ジストロフィーの第一義的な異常ではないとしても，ジストロフィーについて，報告されている病態生化学を可成よく説明しうるものであり，ジストロフィーの発症機序解明の為の研究として今後更に検討を加えたいと考えている．

ま と め

ジストロフィー鶏残胸筋を用い，孵化後，1週，2週，4週，4ヵ月の時点で glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)，6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH)，glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GA3PDH) 活性および thiobarbituric acid-reactive products (TBA-RP) level を測定した．G6PDH および 6PGDH 活性は生後1週目よりジストロフィー鶏において有意の活性上昇が見られ，GA3PDH 活性は生後2週目より，有意の活性低下が見られた．TBA-RP level は生後2週目より有意の上昇を示した．これらの所見は，昨年迄のデータと合せて，ジストロフィー鶏においては，発症早期より，活性酸素の生成が増加している事を示す所見と結論した．この様な病態がジストロフィー症の発症とどう係り合っているかについて考察を加えた．

文　　献

1) 水野美邦：筋ジストロフィー症の発症機序に関する研究—ジストロフィー鶏発症早期における活性酸素関連諸酵素の異常について—．神経進歩，28：1984 (in press).

2) King, D.B., King, C.R., & Jacaruso, R.B.: Avian muscular dystrophy: Thyroidal influence on pectoralis muscle growth and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Life Sci., 28: 577—585, 1981.

3) Wang, C.-S. & Alaupovic, P.: Glyceralde-

hyde 3 - phosphate dehydrogenase from human erythrocyte membranes. Kinetic mechanism and competitive substrate inhibition by glyceraldehyde 3 -phosphate. Arch. Biochem. Biophys., 205 : 136—145, 1980.

4) Tanizawa, H., Sazuka, Y. & Takino, Y. : Micro-determination of lipoperoxide in the mouse myocardium by thiobarbituric acid fluorometry. Chem. Pharm. Bull., 29 : 2910—2914, 1981.

5) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265—275, 1951.

6) Patnode, R., Bartle, E., Hill, E.J., LeQuire, V. & Park, J.H. : Enzymological studies on hereditary avian muscular dystrophy. J. Biol. Chem., 251 : 4468—4475, 1976.

7) Tappel, A.L. : Lipid peroxidation damage to cell components. Fed. Proc., 32 : 1870—1873, 1973.

8) Fong, K.-L., McCay, P.B., Poyer, J.L., Keel, B.B. & Misra, H. :Evidence that peroxidation of lysosomal membrane is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. J. Biol. Chem., 248 : 7792—7797, 1973.

9) Nylen, E.G. & Wrogmann, K. : Mitochondrial calcium content and oxidative phosphorylation in heart and skeletal muscle of dystrophic mice. Exp. Neurol., 80 : 69—80, 1083.

II．筋ジストロフィー症の遺伝・臨床と病理・病態

a）遺伝・臨床

b）形態・培養

c）リンパ球・赤血球など

d）生　　理

6）筋ジストロフィー症の分類学：病状，病態，そして成因的分類への進展

三　好　和　夫*

はじめに

疾患の研究において，分類はそのはじまりであり，また，終りである．筋ジストロフィー症においても分類は，本症の存在が知られた時点から試みられ，それぞれの時代において行われ，現在もつづけられている．そして，この分類は，はじめは病状，ついで，これに病態が加えられて行われ，窮極の成因に基づく分類が追求されている．このように，成因の究明を目指して行われる分類を私は分類学と呼びたい．分類学はさらに，成因が何故そして如何に起るかの法則を知ろうとするものである．

本症の分類を分類学として推進することはまさに，本症についての成因と発症機序の解明を目的とする総括的研究に他ならない．本文で私は，本症の分類学のこれまでの経過と現状を概観し，窮極の分類への進展に対する見通しをのべたい．現在，本症の研究が，現象，実態を通して漸く，本質的な領域に入り込みつつあると思われるからである．

さらに一言つけ加えておきたいことは，分類の刻々の提示は，本症研究者のその時々の意見調整であるばかりでなく，これが本症の日常の臨床の指針，基準として欠くことのできないものであることである．

古い時代の分類

古い時代の分類[1]，例えばErb(1871)，Bing (1926) のものでは，infantile Form, juvenile Form, また hypertrophische Form, atrophische Form, そして，腰帯型，肩帯型など，分類は発病年齢や病状によって行われている．そして，Erb の juvenile Form のごとく，その都度の新しい病型がつけ加えられている．また，Becker (1940) の分類では，X染色体劣性，常染色体優性，同劣性に分けられている．これは，本症が現在の理解における分子生物学的異常に基づく疾患であることに対しては，やはり遺伝型という現象による分類であるが，しかし一方では本文の終りにのべる染色体上における遺伝子分類に繋がりをもっている．

最近の分類

最近の Walton ら (1981)[2] と著者ら (1980)[3] の分類を表1，2にかかげた．

古い時代のものに較べて，病型の変遷と増加がみられる．しかし，最も重要な特徴は，これらの分類では，病状に準據しながら，これまでに積重ねられてきた本症の病態に関する知見が十分に織

表1　筋ジストロフィー症の分類(Walton ら, 1981)

(a) *X-linked muscular dystrophies*
- Severe (Duchenne)
- Benign (Becker)
- ? Benign with early contractures (Dreifuss)
- Scapuloperoneal
- ? Hereditary myopathy confined to females

(b) *Autosomal recessive muscular dystrophies*
- Scapulohumeral ('Limb-girdle')
- ? 'Quadriceps myopathy'
- Autosomal recessive muscular dystrophy in childhood
- Congenital muscular dystrophies

(c) *Autosomal dominant muscular dystrophies*
- Facioscapulohumeral
- Scapuloperoneal
- Late-onset proximal
- Distal (adult-onset)
- Distal (infantile-onset)
- Ocular
- Oculopharyngeal

*沖中記念成人病研究所

表2　筋ジストロフィー症の分類（著者ら，1980）

1．Autosomal dominant muscular dystrophies
　Facioscapulohumeral type
　Distal myopathy (Welander type)
2．Autosomal recessive muscular dystrophies
　Limb-girdle type
　Malignant limb-girdle type
　Autosomal recessive distal muscular dystrophy
　Congenital muscular dystrophy
3．X-linked recessive muscular dystrophies
　Duchenne type
　Benign Duchenne type (Becker type)
4．Myopathies
　Ocular myopathy
　Oculopharyngeal myopathy
　Oculopharyngodistal myopathy
　Others

り込まれていることである．

両分類についていえば，ともに神経原性の筋萎縮を省いて筋原性のものに限り，これを筋ジストロフィー症の分類としてある．さらに著者らの分類では，筋ジストロフィー症とミオパチーを分ける試みがなされている．分類された個々の病型に関して両分類で若干の相違がみられるが，いずれも当研究班[5]でとりあげられているものであり，取捨選択は今後の見解の調整にまちたい．

以下，両分類表に基づいて総括的並びに個々の病型に関して著者の見解をのべる．

筋ジストロフィー症の特異性

ミオパチーの中で，筋ジストロフィー症の特徴としては一般に，1．遺伝性，2．筋力低下，3．進行性，そして4．筋の変性があげられる．現象的分類といえる．これらの内，筋の変性をとりあげ，とくに組織所見と筋崩壊についてのべる．

組織所見：組織所見については，現在一般には，ミオパチーも筋ジストロフィー症もともにmyogenic changeと表現される．しかし一方では，ミオパチーでは変性に加えて種々の代謝物，構造変性物の存在や各種organelleの異常がみられるのに対して，筋ジストロフィー症では，そのような所見はなく，ただ変性，そしてそれに対する反応所見があるのみであることが知られている．

私は，この消極的な筋ジストロフィー症の特徴をまず定着させ，例えば筋組織所見についても，これをmyogenicから識別してdystrophicと表現することを提唱したい．そして今後，より積極的な特徴の確認を計りたいと思う．

筋崩壊と再生：筋ジストロフィー症の筋崩壊の過程と再生は，現在きわめて詳細に明らかにされてきた[5]．疾患分類の上から私は，その過程でみられる血清CK活性値（逸脱酵素の代表として）の上昇[4]の意義を強調したい．本症の分類学に対して，血清CK活性値の果してきた大きな役割は測り知れない．今後はその上昇程度も区別して考えられてよい．古い病型や分類にはこの成績がみられない．血清CK値の上昇は，筋崩壊の急性と重篤さの度を示すものと思われるが，しかし，上昇度の少ないものではその筋ジストロフィー性について，さらに検討する意味があるものと思う．

Duchenne型（DMD），その他．複合症状の成因レベルでの理解

DMDについて，病型の問題点の1つとしてこれに伴う知能低下をとりあげたい．この事実の解釈として，DMDにおいて筋の崩壊の原因である例えば酵素には2つ以上のsubunitがあり，その一つが脳中にある類縁の酵素のsubunitと共通であるとの推定である．このような場合には成因レベルでDMDで脳障害が起ってよい．このことは，PFK欠損症である垂井病において，赤血球内のPFKが筋型subunitと肝型subunitからなるため溶血がみられる事実からも類推できる．

このような解釈は，脳変化のはるかに顕著な福山型にも当てはまるものと思う．また，ミオパチー筋において，神経原性と筋原性の変化の共存する場合にも，これを両者の因果関係によって理解するのと別に考慮されてよい考え方と思う．

常染色体劣性型．近親婚からの病者

この遺伝型を示すものは原則的に近親婚から生れる病者のみをしらべることによって識別することができる．著者らが前に，青年腰帯型（1944）

や悪性肢帯型（1966）を分けたのはこの方法によったものである[3]．

表1，2において，著者ら分類中のmalignant limb-girdle型（悪性肢帯型）はWaltonらのautosomal recessive muscular dystrophy in childhoodに該当するが，limb-girdle型については，著者らは本邦に多い青年腰帯型を考え，Waltonらはscapulohumeral型を示し，異なっている．今後の意見調整を計りたい．

常染色体優性型．発病，病状の幅

ホモ因子型で発病する劣性型の病者に比してヘテロ因子型で発病する優性型の病者では，一般に，病状に幅があるものと思う．本症のFSH型についてもこのことがいえる．

DMD遺伝子に関してヘテロ型である女性保因者における病状の幅はX染色体の片方の不活性化で説明されている．体染色体においても何等か類似のことが考えられないか．私達[6]は前から体細胞（骨髄球）の成熟段階における還元分裂の事実（**図1**参照）を指摘しているが，これを筋細胞核にもおし広げて，その成熟分化の問題とともに，この辺のことを考えることは興味深い．

遠位型筋ジストロフィー症とvacuoleを伴う遠位型ミオパチー

遠位型として，著者らの分類では，distal myopathy（Welander type）（myopathyとするかdystrophyとするか今後の問題と思う）とautosomal recessive distal muscular dystrophy（著者ら）が入れてある．遠位型には，この他に，rimmed vacuoleないしvacuoleを伴うミオパチーがあり，その中にもautosomal dominant, autosomal recessiveのものがある．これらはそれぞれ，遺伝・臨床型として整理された上で分類に入れるべき段階にあると思う．

当研究班[5]としては，研究プロジェクトの一つとしてvacuoleを伴う遠位型ミオパチーをとりあげてきた．本年8月にはそのワークショップも行った．これはlysosomeの変化としてのvacuole形成と，それに関連ある蛋白分解酵素を含めた筋崩壊の一つのパターンに焦点を合せた一連の集中研究である．すなわち，筋崩壊に関する病態研究であるが，その中で同じく遠位型であっても，vacuoleのない筋ジストロフィー症型とvacuoleを特徴に有する型との異同を鮮明に浮き上らせた．筋崩壊の病態研究と分類学とを緊密に結びつけた研究成果といえる．

Ocular，Oculopharyngeal型などとミトコンドリアミオパチー

筋ジストロフィー症の分類中にみられるOcular，Oculopharyngeal型にはミトコンドリアの形態変化があり，いわゆるミトコンドリアミオパチーとの関係が明らかにされる要がある．後者はミトコンドリアの機能の異常によって総括され，また，関連してcarnitine，carnitine palmityl transferaseの欠損症のごとく成因のつきとめられているものがあり，うる所が大きい．

当研究班[5]では，ミトコンドリアないしミトコンドリアミオパチーの集中研究を新しく来年度以降の研究プロジェクトの一つに定めた．上述の

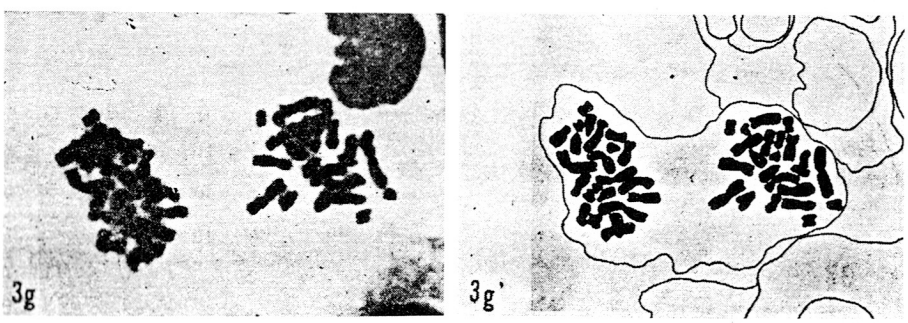


図1　人骨髄細胞の還元分裂像（著者ら）

vacuole 形成，lysosome 研究の場合と同じく病態研究であるが，そこから病型の識別，分類を行おうとするものである．ミトコンドリアの形態，機能の実態についてなお詳にされていない DMD など，いわゆる純粋の筋ジストロフィー症との関係も明らかにされてゆくものと思われる．

遺伝型を異にする類縁の病型．成因の解明されているミオパチーからの知見．

解糖系酵素，脂質代謝系酵素，核酸代謝系酵素など，成因としての異常酵素の決められているミオパチーの存在と，それらについての知見は筋ジストロフィー症の分類学に役立つところが少なくない．

ここにはその1例として，遺伝型を異にする類縁の病型ということについて LDH 欠損症を例にあげてのべる．LDH-B(H)欠損症（北村ら）に対して LDH-A(M)欠損症（西村ら）[5] が発見されているが，前者ではみるべき病状を欠き，後者は特異なミオパチーである．指摘したいことは，LDH の2つの subunit を支配する遺伝子が異なり，それぞれ11，12番の染色体上に別れてある[7] ことである．

このことは興味深く，例えば DMD の原因酵素が多量体であり，一つの subunit の遺伝子が X 染色体上にあり，他の遺伝子が体染色体上にある場合には，それぞれの異常は遺伝型の異なる類似の病型として表現される．そして，X 染色体性遺伝のものが現在の DMD であり，体染色体性のものには，悪性肢帯型，その他が考えられる．異なった遺伝型を示し，いくつかの類似の病型からなっている筋ジストロフィー症においてはこのようなことが考慮されてよいと私は考えている．

染色体上の異常遺伝子の座位と分類

DMD の異常遺伝子の染色体上の座位はつい最近，X 染色体短腕の Xp_{21} あるいはその近くであることが突きとめられた[8]（図2参照）．Becker 型の遺伝子もこれに近接してあるいは allelic にあるという．これは一方では本症病者と女性保因者における染色体異常や既知の異常（疾患）遺伝子と

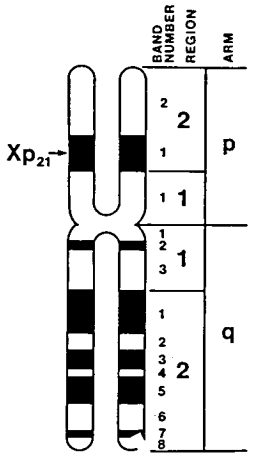


図2　X 染色体のダイアグラム（Roses, A.D.らの図）（Xp_{21} の部に DMD 遺伝子の変位の起る "hot spot" があるらしい）

の相関研究，そして他方，近年急速に進歩した遺伝子操作（工学）[7,8] の諸技術によって定められている．

遺伝子座位のより正確な決定がなされ，その遺伝子の DNA 構成が決められれば，それから逆にその表現ないし産物である異常蛋白質，酵素を同定することができる．

もちろん，該当する蛋白質の不明である遺伝子の精密な座位決定は容易ではない．私はまず，疾患分類学上の新しい領域の開拓を問題にしたい．その意味は，現実的な疾患とは別に，染色体上における異常遺伝子の分類学がすでにはじまっているということである．いずれ，染色体上における相当詳細な遺伝子マップが作製されることと思われる．

しかし，疾患，すなわち筋ジストロフィー症についても，疾患の本体は異常蛋白質ないし酵素であり，その解明は，遺伝子からの解読とともに疾患の症状や病態における特異性の発見からえられるものと私は思う．両者は相まって本症の真の原因究明に進むべきものであろう．

動物における筋ジストロフィー症

動物にも最近，X 染色体劣性の筋ジストロフィ

一症が発見された．私達は現在相当多数の疾患動物をもつに至ったが，その活用についても２つの観点があると思う．一つは必要な実験に疾患モデルとして使用することであり，他の一つはこれらを分類学的に動物における本症のそれぞれの遺伝・臨床型としてみることである．

おわりに

筋ジストロフィー症の分類を分類学として受けとめ，それは本症の成因解明を目指す総括的研究に他ならないことをのべた．現在の分類について，総体的と個々の問題点をとりあげ，今後の本症の本質的分類への展望をのべた．

文　献

1) 豊倉康夫，他：筋ジストロフィー症の分類．厚生省「筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究」(沖中班)昭和50年度研究報告書，1976，pp.19—22．

2) Walton, J.N., Gardner-Medwin, D.: Progressive muscular dystrophy and the myotonic disorders. Disorders of voluntary muscle, (ed. Walton, J.N.), Churchill & Livingstone, 1981, pp.481—524

3) 三好和夫，川井尚臣，岩朝　勝：進行性筋ジストロフィー症，ミオパチー・ニューロパチー，(織田敏次他編) 永井書店，1983，pp.137—158．

4) Ebashi, S., Toyokura. Y., Momoi, H., Sugita, H.: High creative phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy. J. Biochem., 46: 103—104, 1959.

5) 厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」(三好班)昭和56，57，58年度報告書，1982，1983，1984．

6) Miyoshi, K., Kono, H.: Reduction divisions in human bone marrow cells at different stages of maturation. Tokushima J. of Exper. Med., 7: 196—209, 1960.

7) McKusick, V.A.: The last twenty years: An overview of advances in medical genetics. Prog. Clin. Biol. & Res., 45: 127—144, 1981.

8) Roses, A.D., et al.: Recombinant DNA strategies in genetic neurological diseases. Muscle & Nerve, 6: 339—355, 1983.

7）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　中 里 興 文**　中 島 洋 明***　金 久 禎 秀***
納　光 弘***　井 形 昭 弘***　川 平　稔****
中 嶋 八 良*****　吉 丸 博 志*

1980年以来，Duchenne 型ジストロフィー症（DMD）の遺伝機構の解明と，DMD，X_g^a血液型，色盲の X-連鎖遺伝の解析を行うため，南九州地区を対象に調査を行ったので，その結果を報告する．

資　料

鹿児島地区の DMD の家系は35家系（このうち1家系は宮崎県在住者であり，したがって鹿児島県内では34家系），沖縄地区のそれは14家系である．これらの家系について，DMD，X_g^a血液型および色盲について調査および検査を行った．

調査結果

A．X-連鎖遺伝調査について

DMD，X_g^a血液型，色盲についての49家系について調査を行った結果を家系図で示すと図1の如くである．

これを用いて調査成績を整理すると，表1の如く，X_g^a血液型の検査については，約83%が完了し，色盲の検査については，約92%が完了した．

性別，DMD の有無別に，X_g^a血液型および色盲（色弱も含む）の頻度は，表2の如くである．色盲の頻度は非常に低く，したがって DMD と色盲との X-連鎖遺伝の検定を行うことは不可能である．

B．DMD 家系の近親婚調査について

49家系のうち，いとこ婚1家系，またいとこ婚2家系，みいとこ婚1家系，その他の近親婚1家系で，合計すると10.20±4.33%である（表3）．今泉ら[1]の報告をもとにして鹿児島県内一般集団の近親婚率を求めると，14.14±3.50%となる（表3）．DMD 家系の近親婚率が一般集団に比べて高いという傾向は全く見られない．このことや本症が男児のみに出現していることを考えると，本症の遺伝様式は，従来考えられてきたように，伴性劣性型と考えられる．

分　析

A．DMD の分離比の推定

DMD 家系において，母親が DMD 遺伝子についてヘテロ接合ならば，男児における DMD の分離比の期待値は0.5である．家系の捕捉法（ascertainment）が単独確認（single ascertainment）である場合，分離比（P）とその分散（V_P）は次の式で推定される（Fisher[2]）．

$$P=\frac{R-N}{T-N}=\frac{59-50}{93-50}=0.2093$$

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

$$=\frac{(93-59)(59-50)}{(93-50)^3}=0.003733$$

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 は同胞群の中の子供の総数である．本研究の場合，R，N，T は男児についてのみ計数を行う．本資料においては，ほとんどの家系は単

＊杏林大学保健学部疫学
＊＊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
＊＊＊＊国立療養所沖縄病院神経内科
＊＊＊＊＊東京医科歯科大学医学部法医学

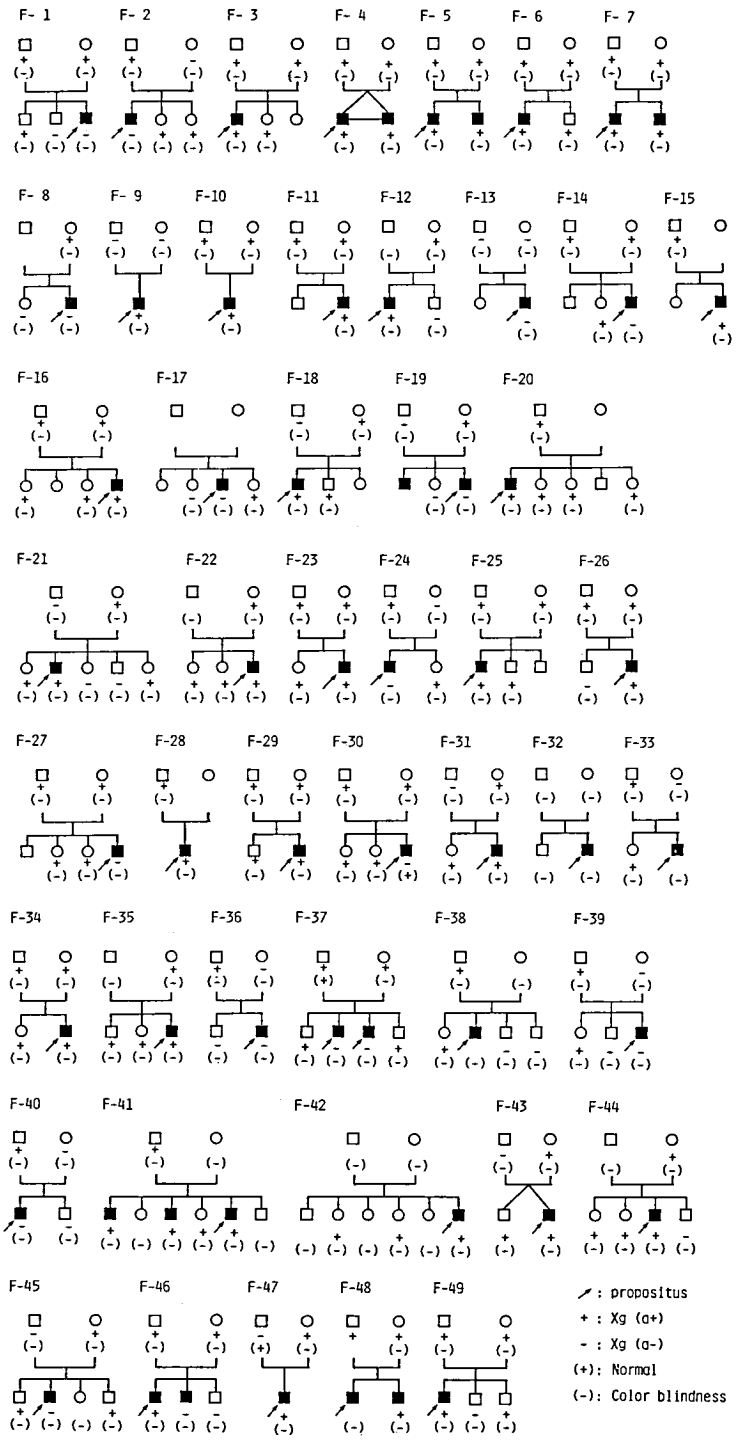


図1　家系別，DMD，X_g^a血液型および色盲

表1　DMDを発端者とした家族についての血液型(X_g^a)，色盲検査結果（1980～1983）

DMD数 / 同胞数	1	2	3	同胞群数	同胞総数	DMD数	検査済 X_g^a血液型	検査済 色盲	父 X_g^a血液型	父 色盲	母 X_g^a血液型	母 色盲
1	4			4	4	4	4 (100)	4	4 (100)	4	3 (75.0)	3
2	17	4		21	42	25	35 (83.3)	39 (92.9)	18 (85.7)	19 (90.5)	19 (90.5)	20 (95.2)
3	11	2		13	39	15	34 (87.2)	34	11 (84.6)	13 (100)	13 (100)	13
4	6	1		7	28	8	23 (82.1)	25 (89.3)	5 (71.4)	6 (85.7)	5 (71.4)	6 (85.7)
5	2			2	10	2	9 (90.0)	9	2 (100)	2	1 (50.0)	1
6	1		1	2	12	4	7 (58.3)	12 (100)	1 (50.0)	2 (100)		2 (100)
合計				49 男：90	135	58 58	112 (83.0)	123 (91.1)	41 (83.7)	46 (93.9)	41 (83.7)	45 (91.8)

( ):%

表2　DMDを発端者とした家系についての血液型(X_g^a)および色盲の頻度

		X_g^a 血液型 +	X_g^a 血液型 −	色盲 +	色盲 −
親	父（非DMD）	32 (78.0)	9 (22.0)	2 (4.3)	44 (95.7)
親	母（非DMD）	33 (80.5)	8 (19.5)	0 (0)	45 (100)
同胞	男（非DMD）	11 (47.8)	12 (52.2)	0 (0)	27 (100)
同胞	男（DMD）	36 (67.9)	17 (32.1)	1 (1.8)	56 (98.2)
同胞	女（非DMD）	31 (88.6)	4 (11.4)	0 (0)	39 (100)

( ) : %

表3　DMD家系および鹿児島地区一般集団における近親婚

近親関係	DMD家系 本資料		鹿児島集団 今泉ら（1975）	
いとこ	1	(6.12±3.42)	8	(12.37±3.34)
いとこ半			2	
またいとこ	2		2	
みいとこ	1	(10.20±4.33)		(14.14±3.50)
遠い親せき	1		2	
他人	44		85	
計	49		99	

( ):%

独確認によるものであるが，二重確認によるものが1家系あり，また一卵性双生児が1家系あるので，R＝59，N＝50，T＝93である．推定値(0.2093)と期待値(0.5)との差は，標準誤差(σ_P＝0.0611)の4.8倍となり，0.1%水準で有意である．したがって，DMDが完全浸透であれば，単純伴性劣性遺伝の仮説に適合しない．

B．DMDの浸透度の推定

分離比の期待値と推定値のずれより，浸透度(ν)はつぎの如く推定される．

$$\nu=\frac{0.2093}{0.5}=0.4186$$

C．DMDとX_g^a血液型との連鎖の検定

母親が両形質の対立遺伝子について二重ヘテロ接合であると考えられ，かつ男児が2人以上存在する家系は，9家系であった．これを用いて，対数得点法（lod score method）の原理に従い連鎖の検定を行った．

DMDが不完全浸透の形質であるから，浸透度(ν)を考慮してMorton[3]の式を修正した次の式を用いて，各家系のZ得点を計算する．

$$Z_l=\log\frac{(1-\theta_1\nu)^a(1-\nu+\theta_1\nu)^b(\theta_1\nu)^c\{(1-\theta_1)\nu\}^d+(1-\nu+\theta_1\nu)^a(1-\theta_1\nu)^b\{(1-\theta_1)\nu\}^c}{2\left(1-\frac{\nu}{2}\right)^{a+b}\times\left(\frac{\nu}{2}\right)^{c+d}(\theta_1\nu)^d}$$

ここで，a，b，c，dは，各家系内での〔正常，Xg(a＋)〕，〔正常，Xg(a－)〕，〔DMD，Xg(a+)〕，〔DMD，Xg(a－)〕の男児の数である．また，家系の集め方（確認法）が完全確認（complete selection）ではなく，DMDに関しての不定確認（arbitrary selection）となっているので，Z得点に補正を要する．これも，浸透度(ν)を考慮して，Morton[3]の考え方をもとにして，次の式を考案した．

$$e_l=\log\frac{\left\{1-\left(\frac{1}{2}\right)^s\right\}\times(2-\nu)^{s_1}\nu^{s_2}}{-\frac{1}{2}(1-\nu+\theta_1\nu)^{s_1}\{(1-\theta_1\nu\}^{s_2}\frac{(2-\nu)^{s_1}\nu^{s_2}}{-\frac{1}{2}(1-\theta_1\nu)^{s_1}(\theta_1\nu)^{s_2}}}$$

すなわち，Z_l+e_lが各家系のZ得点となる．ここで，s_1，s_2は各家系内での正常男児，DMD男児の

数であり，$s=s_1+s_2$ である．

本資料における θ_i と Z 得点の合計 $(\Sigma(Z_i+e_i))$ との関係が，図2に示されている．

$\nu=0.4186$の場合，組換価（θ）は約0.16である確率が最も高いが，0.5との差は統計的に有意ではない．

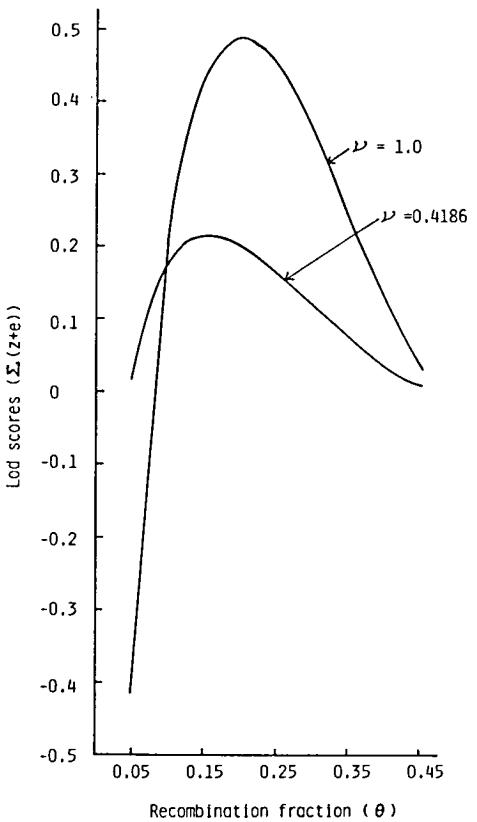


図2　DMD と X_g^a血液型との連鎖の検定

D．DMD の突然変異率の推定

淘汰と突然変異との平衡から突然変異率を推定する，いわゆる間接法の原理に従った．DMD 患者自身にかかる淘汰に加えて，浸透度および DMD 遺伝子を保有している正常個体の比較増殖率をも考慮して，次の推定式を考案した．

$$\mu \cong \frac{1}{3}x^*\nu(1-f_A)+\frac{1}{3}x^*(1-\nu)(1-f_B)+\frac{2}{3}x^*(1-f_C)$$

$$x^*=\frac{x}{\nu}$$

ここで，μ は世代あたりの突然変異率，x^*は集団中の DMD 遺伝子の頻度，x は男の中での DMD 患者の頻度，f_Aは DMD 患者の男の比較増殖率，f_Bは DMD 遺伝子をもつ正常な男の比較増殖率，f_Cは DMD 遺伝子をヘテロ接合状態でもつ女の比較増殖率である．

鹿児島県内の DMD 男児はほとんど全て捕捉されているものとみなして，昭和55年の国勢調査に基づく昭和57年の鹿児島県内の男性の推定人口を用い，$x=1.545\times10^{-4}$が推定された．f_Aはほとんど1と考えられる．f_B，f_Cは DMD 家系における様々な負担による平均子供数の減少に起因するものと思われる．子供が少なくとも1人いる夫婦の生存子供数の全国平均は，厚生省の第8次出産力調査[4]によって求められる．鹿児島県では一般に子供数が多いと思われるので，全国平均に標準偏差の2倍ないし3倍を上のせしたものを鹿児島県の一般集団の平均生存子供数とした．さらに母親の年齢をも考慮して，$f_B=f_C=0.553$（全国平均＋2×標準偏差の場合），および $f_B=f_C=0.462$（全国平均＋3×標準偏差の場合）を得た．これは女児の数を比較したものである．これより，突然変異率は次の如く推定される．

$$\mu=1.935\times10^{-4}\sim2.224\times10^{-4}$$

（／locus／generation）

E．父年齢，母年齢，出生順位の効果

出生時の父年齢，母年齢および出生順位と DMD の発生頻度（男児の中での DMD の割合）との関係も調べたが，いずれも有意な相関を見出すことはできなかった．

考　　察

DMD が伴性劣性型の遺伝をすることは確実であると思われるが，分離比の推定値は期待値から大きくずれ，単純伴性劣性の仮説はそのままではあてはまらないことが示された．

浸透度を0.4186と推定したが，これが定義どおりのものを意味するかどうかは注意深く検討しなくてはならない．すなわち，(1) DMD 遺伝子をもつ男児の発症前淘汰，(2)母親からの配偶子における突然変異，(3) DMD 男児が生まれたら次の子の出産を制限する，(4) DMD の遺伝子座が複数存在

すること，などがあれば，たとえ完全浸透であっても分離比の推定値は0.5より小さくなる.(1)については，死産などあれば出生間隔が長くなることなどが予想されるが，DMD家系と全国平均(文献4による）とでほとんど差はみられなかった．(2)については，親族の中にDMD患者がいるかどうかで判断することもあるが，遺伝性であっても親族の中に見つからない可能性も高く，確実な判断はできない.(3)については，DMD家系の末子におけるDMD男児，正常男児，正常女児の割合と，末子以外におけるそれらの割合との間には，統計的に有意な差が見られた．すなわち，末子がDMD男児であることが多い．(4)については，判断の根拠はないが，このような可能性はあまりないと思われる．このように真の浸透度は$\nu=0.4186$より高いと考えられるが，ふたごの研究[5]などから完全浸透を示す疾患も一般に存在せず，したがってDMDの真の浸透度も1.0より低いのではないかと思われる．

X染色体短腕先端近くのX_g^a血液型座位とDMDとの間の組換価は，統計的に有意ではないが，約0.16である確率が最も高く，X_g^a血液型座位からあまり遠くない部位に座位していると思われる．図2には$\nu=1.0$の場合も示されているが，この時は組換価は約0.20と推定される．組換価の推定値は浸透度の影響をあまり強く受けないようである．

突然変異率の推定では，比較増殖率f_Bやf_CはDMD遺伝子についてヘテロ接合の全女性の平均子供数に基づいて推定すべきであるが，ここではそのうちDMDの子供を持っている女性（DMD家系の母親）のみの子供数から推定している．したがって，f_B，f_Cは実際より過小推定であり，突然変異率はやや過大推定であると思われる．

ま と め

DMDとX_g^a血液型座位との間の組換価を推定し，統計的に有意ではないが，$\theta=0.16\sim0.20$という値が得られた．DMDの突然変異率は1.935×10^{-4}ないし2.224×10^{-4}と推定された．

文 献

1) Imaizumi, Y., Shinozaki, N. and Aoki, H.: Inbreeding in Japan: Results of a nation-wide study. Jap. J. Human Genet., 20: 91-108, 1975.
2) Fisher, R.A.: The effect of methods of ascertainment upon the estimation of frequencies. Ann. Eugen., 6: 13-25, 1934.
3) Morton, N.E.: Sequential tests for the detection of linkage. Am. J. Human Genet., 7: 277-318, 1955.
4) 厚生省人口問題研究所：昭和57年第8次出産力調査（結婚と出産力に関する全国調査）—第I報告書—日本人の結婚と出産．人口問題研究所実地調査報告資料，1983.
5) 井上英二：多因子病とふたごの研究．小児医学，11(5)，1978.

8）骨格筋 CT スキャンによる進行性筋ジストロフィー症の下腿部仮性肥大の検討

豊 倉 康 夫*

研究協力者　川 井　充**　本 吉 慶 史**　国 本 雅 也**
中 野 今 治**　桑 田 隆 志**

筋の仮性肥大は，筋の体積の増加が筋線維以外の成分（結合組織と脂肪）によってもたらされることを示し，進行性筋ジストロフィー症（以下 PMD と略）の重要な臨床的特徴である．仮性肥大の有無は典型的な場合をのぞき，多分に主観的に判断せざるを得ないが，その判断の際念頭においているのは次の3点であろう．①筋力に対して voluminous であること，②かたいこと，③ true hypertrophy と異なる特徴的な形をしていること．実際の診断の場面ではこれらのすべてがそろわなくても仮性肥大と判定しており，このことばによって示される病態は疾患によりまた同一疾患でも病期により異なっている可能性がある．本稿では仮性肥大を呈した3つのタイプの PMD――福山型先天性筋ジストロフィー症（以下 FCMD と略），Duchenne 型筋ジストロフィー症（以下 DMD と略），Becker 型筋ジストロフィー症（以下 BMD と略）――各1例について下腿筋と体幹筋を中心に骨格筋 CT を呈示し，仮性肥大という語の示す病態について考察を加えてみたい．なお CT は下腿では最大径の部分，体幹では第3腰椎椎体の高さでスキャンを行っている．

症　例

症例1　12歳男，FCMD.

家族歴：血族結婚なく家系内に筋疾患なし．

既往歴：生後間もなくより排便なく，巨大結腸症と診断された．

現病歴：2歳頸定，3歳つかまり立ち，4歳つたい歩き．独歩不能のまま9歳で立つことが不能となる．現在四這い可能だが通常はいざりで移動している．calf muscles に仮性肥大を認めるが，尖足はない．1歳ころ全身痙攣の episode あるが，現在は抗痙攣剤は服用していない．IQ, 鈴木ビネー 21.

骨格筋 CT（図1）：下腿筋では，ヒラメ筋腓腹筋ともに体積はよく保たれているが，殆ど脂肪と考えられる低吸収領域でおきかえられている．これに対して anterior, lateral および deep posterior compartment の筋群には萎縮は認められるが，脂肪化は軽度ないし中等度である．腹筋はほぼ正常．傍脊柱筋には軽度の萎縮と脂肪化を認めるのみである．

症例2　12歳男，DMD.

家族歴：母の男性同胞2人が DMD.

既往歴：特記すべきことなし．

現病歴：処女歩行11ヵ月．4歳ころびやすいことに気付く．5歳 DMD の診断をうける．現在，手すりを使ってかろうじて階段上昇可能である．著明な calf muscles の仮性肥大，尖足を認め，歩行は動揺性である．

骨格筋 CT（図2）：下腿筋では，anterior および lateral compartment の筋の萎縮を認めるが，ヒラメ筋，腓腹筋は voluminous で，縞状の低吸収領域を認める（streaked pattern）．傍脊柱筋は最内側を残して脂肪で置換されている．

症例3　18歳男　BMD.

家族歴：血族結婚なし．家系内に筋疾患なし．

既往歴：特記すべきことなし．

＊東京大学医学部脳研神経内科
＊＊国立療養所下志津病院

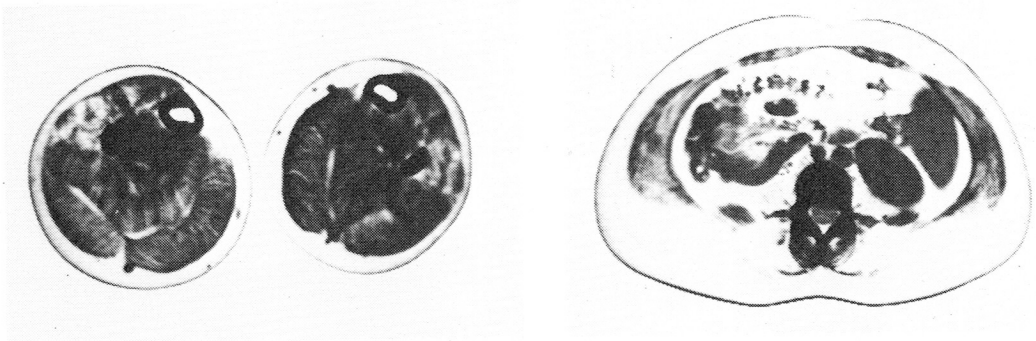


図1　症例1の骨格筋 CT スキャン
（左）下腿最大径部　（右）第3腰椎椎体レベル

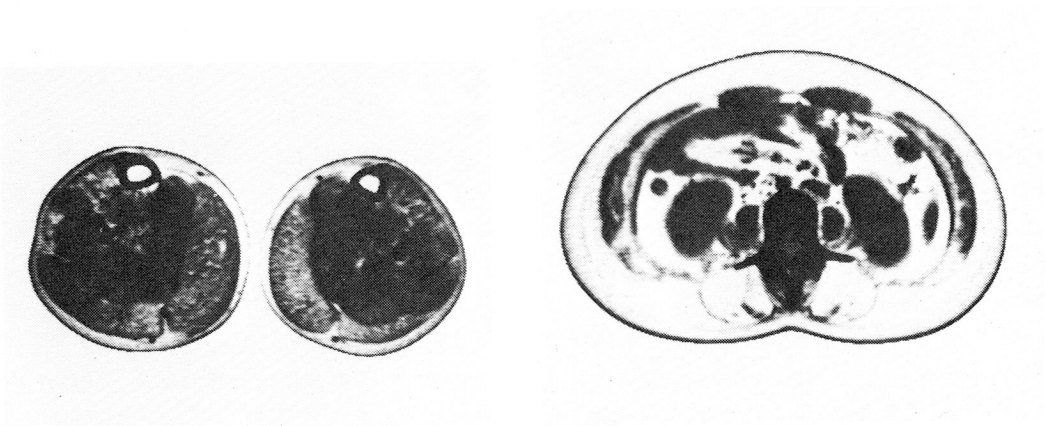


図2　症例2の骨格筋 CT スキャン
（左）下腿最大径部　（右）第3腰椎椎体レベル

現病歴：11歳ころからころびやすくなった．

14歳ころ階段をのぼるのが不自由．16歳，歩行時かかとが床につかない．17歳までひざに手をあてて立ちあがれた．現在，ものにつかまって立ちあがれる．動揺性歩行．尖足，著明な calf muscles の仮性肥大．

骨格筋 CT（図3）：下腿筋は voluminous である．ヒラメ筋の density は比較的よく保たれており，症例2と同様 streaked pattern を認める．腓腹筋は大小の玉石をしきつめたようにみえ（cobblestone pattern），同じようなpatternはanterior および deep posterior compartment の筋群にも認められる．体幹筋では，側腹筋群に cobblestone pattern を認める．傍脊柱筋は殆ど脂肪で置換されている．甲状軟骨の高さでスキャンを行うと，後頸筋群の一部に cobblestone pattern, streaked pattern が認められる．また大腿中央部のスライスでは，縫工筋，薄筋が円形化し，むしろ体積が増加しているのに対し，大腿四頭筋および大腿屈筋群では脂肪化が強い selectivity pattern をとっている．縫工筋，薄筋および半腿様筋，半膜様筋の一部，大腿直筋の一部に cobblestone pattern を認める．

図3　症例3の骨格筋CTスキャン
（左上）下腿最大径部　（右上）第3腰椎椎体レベル
（左下）大腿中央部　（右下）甲状軟骨レベル

考　　察

福山ら[1]によれば，DMDの下腿の仮性肥大は，歩行可能な時期にはほぼ100％に認められるが，歩行不能となると徐々にその頻度を減じ，障害度8になると50％程度になるという．さらにわれわれは，下腿の典型的な仮性肥大は尖足を呈してくる障害度3の症例に多く，かつ歩行可能な期間の長い症例，下肢機能のよい症例ほど著明であるという印象をもっている．

BMDでは長期間歩行が可能であり，著明な下腿の仮性肥大を呈する．これに対してFCMDの下腿の仮性肥大は，ふくらはぎ全体が緊満しているがBMDやDMDのそれほどかたくはなく，また下腿近位1/2に大きな膨隆をつくることがない点で，DMDやBMDにみられる典型的な仮性肥大とは異なっている．FCMDでは，内反足はしばしばみられるが，尖足を呈することは少ないこともDMDやBMDとの大きな相違点である．

これらの事実は，一口に仮性肥大といっても，FCMDとDMDでは，その実態が異なっていること，DMDにおいては，病初期すなわちはじめて異常に気付かれたころと，尖足になりながら何とか歩行しているころと，坐位がとれなくなったころとでは，その内容が違うことを示唆している．また典型的な下腿の仮性肥大は歩行と密接な関係を有すると考えられる．

さて，われわれは多数例のDMDの骨格筋CT像を検討し，病的変化の強さによってこれを5段階に分類し報告した[2]．この5段階の分類は，体幹下肢機能にもとづく上田による機能的障害度分類[3]と極めてよい相関を示した．

CT上の変化の最も軽い段階A 1は，障害度1～2に対応する．この時期のcalf muscleはCT上voluminousであるが，正常のそれと大きな違いはない．これまでも，DMDの初期の下腿筋の体積の増加は仮性肥大ではなく真の肥大であるという考えがあり[4]，このCT所見はこれを裏付けるものと考えることもできる．しかし，この時期に腓腹筋の生検を行うと，間質結合織の増加が軽度ながら認められるので，この時期のcalf muscleの体積の増加が，おもに個々の筋線維の肥大によるものか，間質結合織の増加によるものかは今後検討を要する問題である．

次に，最も典型的な仮性肥大が認められる障害度3の時期は，CTによる病期分類ではほぼA 2に対応している．この時期のcalf muscleには，

脂肪と考えられる低吸収領域と，筋線維および結合織よりなると考えられる高吸収領域が混在するパターンをとっている．O'Doherty ら[5]は，骨格筋 CT における仮性肥大の所見を 2 つに分けているが，この所見は彼らのいう pattern 2 (patchy replacement) に対応するものである．

障害度 7 以降の患者もその半数以上は，下腿の仮性肥大を示す[1]が，彼らは CT による病期分類では A 5 に分類されている．この時期の下腿筋の CT 像は，腓腹筋，ヒラメ筋とも殆ど脂肪と考えられる低吸収領域に置換されており，O'Doherty ら[5]による pattern 1 (diffuse replacement) に対応する所見である．

以上をふまえて，症例 2 を考えてみたい．症例 2 は DMD としては例外といえるほど下肢機能がよく保たれており，著明な下腿の仮性肥大を認める症例である．この症例の CT 所見で注目されるのは次の 2 点である．① DMD では通常 calf muscle の病的変化は傍脊柱筋の病的変化とほぼ平行して進む[2]が，本症例では傍脊柱筋に比して下腿筋の変化が軽い．② calf muscle は高吸収領域と低吸収領域が縞状に配列する streaked pattern をとっている．

この 2 点は長期間歩行可能であり，やはり著明な仮性肥大を呈した BMD の症例 3 にも認められた．さらに症例 3 では streaked pattern に加えて，多数の小さな円形の高吸収領域があたかも玉石をしきつめたように配列した cobblestone pattern も認められた．cobblestone pattern, streaked pattern は下腿のみならず，大腿，腹筋，後頸筋にも認められた．

Cobblestone pattern や streaked pattern がいかなる組織学的所見に対応するかについては，現在のところ明らかではない．このような pattern は腓腹筋，ヒラメ筋，薄筋，半腱様筋，半膜様筋，大腿直筋など，機能がよく保たれ仮性肥大や代償性肥大をしばしば呈する筋に認められることから，脂肪組織の中に再生した筋線維がグループを作って存在している状態であると想像される．

これに対して，ひとり歩きをしたことのない症例 3 (FCMD) の骨格筋 CT 所見では傍脊柱筋がよく保たれているのに，腓腹筋とヒラメ筋はすっかり脂肪と考えられる低吸収領域で置換されている点が注目される．これは長期間歩行していた症例 1 や，下肢機能のよい症例 2 と対照的な所見である．

一般に PMD では，ある筋の機能が失われてくると，これを補うためにつぎの 2 つのメカニズムが働く．①筋力低下のため筋の一定の緊張により関節を一定の位置に固定できなくなると，関節を extreme position にロックして関節を一定の位置に保とうとする．このため異常な姿勢が生じる．②病変の進行がより軽い筋が一時代償的に肥大し，失われた機能を代償する．その最もよい例は，DMD のある時期に大腿部に出現する共働筋の代償性肥大[2]である．通常，大腿屈筋群の中では大腿二頭筋が早期に萎縮脂肪化し，半腱様筋半膜様筋がこの機能を一時代行する．さらに半腱様筋半膜様筋が脂肪化すると，腓腹筋がこの機能を代行する．内転筋群の中では薄筋が，大腿四頭筋の中では大腿直筋がよりおそくまで保たれ肥大しながら機能する．代償的に肥大するのは共働筋に限らない．本稿のテーマである calf muscle もその 1 例である．DMD では早期に腰帯部の筋力低下がおこり，このため股関節を過伸展位にロックして立位を保持している．必然的に腰椎前彎がおこり股関節は重心の前方に，上体は重心の後方に移動する．重心は足の着地面のより前方へ移動するため，calf muscle は常に正常人以上に働かなければならない．従って，少なくとも歩行可能な時期の DMD の calf muscle の肥大は，代償性肥大といえよう．このような筋の肥大は，筋肉労働者やスポーツマンにみられる真の肥大と異なり，病的過程が内在しており，常に筋の崩壊と再生がくりかえされ，次第に結合織と脂肪で置換されていくのである．このような点で，BMD や DMD の下腿部仮性肥大は，歩行する期間のない FCMD のそれと異なった病態であるといえよう．

文　献

1) 福山幸夫，高柳哲也ら：機能障害の進展過程と臨床評価の基準化，厚生省神経疾患研究委託費，

筋ジストロフィー症の疫学，臨床および治療に関する研究・昭和57年度報告書，1983，P．25
2）斎藤敏郎，川井　充ら：骨格筋CT所見にもとづくDuchenne型筋ジストロフィー症の病期分類．厚生省神経疾患研究委託費，筋ジストロフィー症の疫学，臨床および治療に関する研究・昭和58年度報告書，1984，in press.
3）上田敏：進行性筋ジストロフィー症のリハビリテーション．理学療法と作業療法，2：14，1968.
4）木下真男：筋ジストロフィー症の臨床．神経内科，3：107，1975.
5）O'Doherty DS, Schellinger D et al.: Computed tomographic patterns of pseudohypertrophic muscular dystrophy: preliminary results. J. comput. assist. tomography, 1: 482, 1977.

9）Duchenne 型筋ジストロフィー症が疑われる女性例

中　西　孝　雄*

研究協力者　小　松　義　成*　井　上　節　子*
金　澤　一　郎*　葛　原　茂　樹**

Duchenne 型筋ジストロフィー症（以下 DMD と略す）は，伴性劣性遺伝型式をとり，男子にのみ発症し，女性には発症しないものとされていたが，女性 carrier においても，血清 CPK の上昇，腓腹筋の仮性肥大，筋電図や筋生検において myopathy の所見等がみられることはよくしられている[1]．しかし，Emery[2]の報告以来，臨床的に明らかな myopathy を呈する DMD の女性 carrier の発症例の報告があいつぎ，わが国においても，古川ら[3]の発表以後，この点に注目した報告が既に12例認められている．

今回，われわれは，DMD の manifested carrier と考えられる女性例を，われわれの第２例目として経験したので報告する．

症　　例

症例：39歳女性．出生，発育，成長，処女歩行は正常．既往歴では，10年前，左手関節部腱鞘炎に罹患，以来同部より末梢の筋力低下あり．1983年10月６日，子宮筋腫手術．

現病歴：６歳頃から走行が遅くなり，12歳頃から走行不能，懸垂不能．15歳頃から登はん性起立，20歳頃から階段を昇る際手すりにつかまるようになった．36歳頃から立位で踵が地面につかなくなり，普通の歩行でも他人についていけなくなった．1983年10月19日，精査のため当科に入院した．

家族歴：母方の家系図を図１に示した．本例の祖父母は叔父一姪関係にあり，極めて濃厚な近親婚である．３人の伯父（叔父）と弟は，全例死亡しており，かつ診療録で確認はできなかったが，

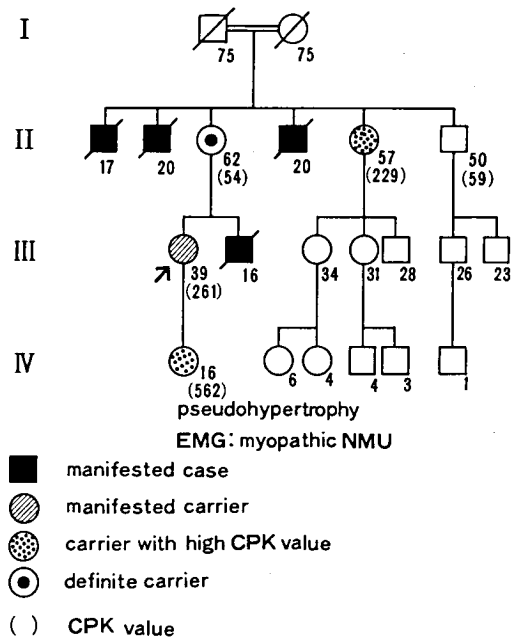


図１　家系図

家族からの情報によれば，全例ほぼ均一に，４，５歳頃から動作緩慢，６歳頃から動揺性歩行，８歳から登はん性起立，10歳から12歳で臥床生活となり，それぞれ，16歳から20歳で死亡した．

本例の母親は神経学的に異常なく，CPK も54と正常であった．父母間に近親婚はなく，父親も神経学的に異常なく，CPK も正常で，myopathy の家族歴はない．本例の16歳の娘は，筋力低下や筋萎縮は認められなかったが，両側腓腹筋に軽度の仮性肥大を認め，CPK は562と高値を示し，筋電図では，上下肢近位筋で myopathy の所見が得られた．57歳の叔母は，神経学的に異常は認められなかったが，CPK は229と高値を示した．50歳の叔父

＊筑波大学臨床医学系神経内科
＊＊東京都養育院附属病院神経内科

は，神経学的に異常なく，CPK も59と正常であった．本例の夫，すなわち16歳の娘の父親は，神経学的に異常なく，CPK も正常で，myopathy の家族歴はない．

現症：（図２）身長143cm，体重42kg，脈拍正常，その他一般身体所見に異常なし．

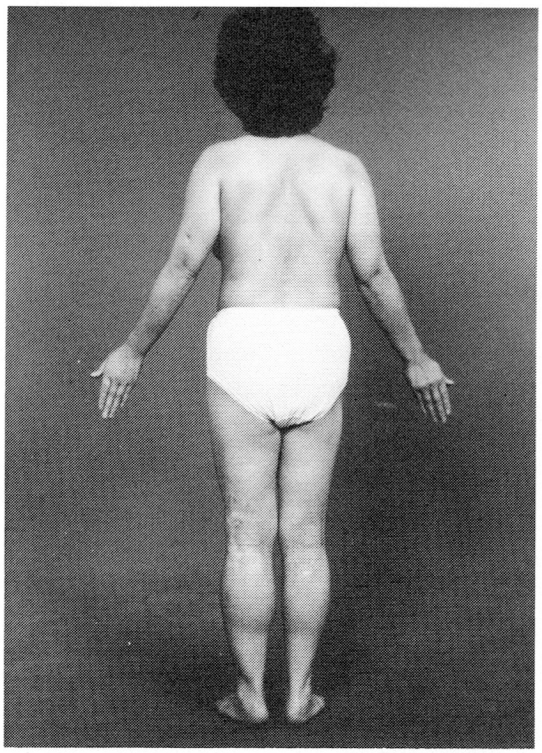


図２　全身像．右側優位の臀部から大腿にかけての筋萎縮，両側腓腹筋の仮性肥大を認める．又，両側踵が挙上している．

神経学的所見：意識・高次機能・脳神経領域に異常なし．運動系；頸部の筋力は正常．上下肢とも近位で 4^{-}／５，遠位で 4^{+}～5^{-}／５程度の近位部優位の筋力低下を認め，両側臀部から大腿部にかけて右側優位に中等度の筋萎縮が認められ，両側腓腹筋に仮性肥大が著明である．両側アキレス腱は拘縮しており，深部反射は ATR を除いて消失，病的反射は認めない．動揺性歩行と登はん性起立を認める．感覚系，自律神経系に異常なく，小脳症状も認められない．

検査所見：血算・尿一般；正常．生化学；CPK は209～261mU／ml（正常５～30）と高値を示し，CPK アイソザイムは MM 型．LDH は444～698U（50～400）と軽度上昇．アルドラーゼは４～５U（３～10）と正常．血清ミオグロビンは68ng／ml（24以下）と上昇．心電図は正常．

筋電図では，上肢近位筋で low amplitude, short duration, polyphasic の myopathic NMU を認めた．

左大腿四頭筋の筋生検（図３）では，筋線維の大小不同，中心核の増加，fiber necrosis，間質の増加，fiber splitting などの myopathy の所見が得られた．

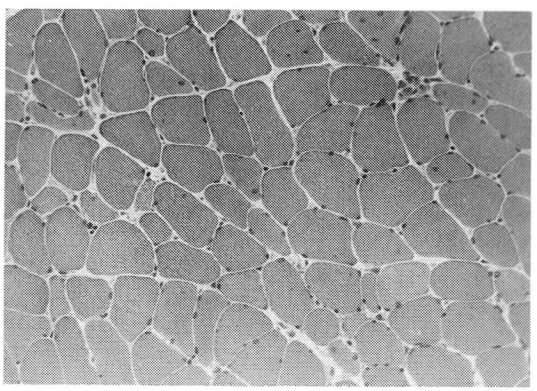


図３　左大腿四頭筋生検．染色 H.E. ×100，筋線維の大小不同，中心核の増加，fiber necrosis，間質の増加を認める．

考　　察

本症例は６歳発症の39歳の女性で，近位筋の筋力低下，筋萎縮，著明な仮性肥大があり，CPK の上昇，筋電図と筋生検の上で myopathy の所見があり，臨床的には DMD が女性に発症した稀な症例と考えられる．

遺伝型式については，本家系の男性発症者の全例が DMD を疑わせる臨床経過をとってはいるが，現時点で診療録の上での確認はできなかったため，家系図の上から考察してみる．

まず第１世代に叔父―姪という近親婚があるため，常染色体性劣性遺伝が疑われるが，第３世代の本例に発症をみるためには，本例の父親が，又，第４世代の本例の娘に異常が発現するためには，その父親，すなわち本例の夫が，それぞれ２人共

劣性因子の保因者であることが必要であり，2度にわたり劣性因子の保因者同志が結婚し，しかもHomoが誕生するという確率は極めて低いといわなければならず，否定的である．

次に，通常の常染色体性優性遺伝型式の可能性については，本例の母親に全く異常が認められないこと，又，男女で症状の発現が極端に違いすぎる点などから考えにくいと思われる．そして，この症状の男女差については，男女で表現型の異なる優性遺伝，すなわちX染色体限性遺伝型式が介在しているとすれば理論的には説明可能であるが，現在のところ，疾患としてこの型式をとるものは知られておらず，従って常染色体性優性遺伝型式も否定的である．

最後に，伴性劣性遺伝型式を考えてみた場合，男性発症者の臨床経過がほぼ均一で，16歳から20歳までに死亡しており，典型的なDMDの形をとっていること，これに対して女性は，本例のように明らかな臨床症状を呈するものから，56歳の叔母や16歳の娘のように，検査上でのみcarrierを疑わせる所見を呈するもの，更に，本例の母親のように全く正常なものまで，表現型がheterogenousであることは非常に特徴的である．ここにLyonization仮説[4]を導入すれば，本家系の遺伝型式は伴性劣性遺伝型式と考えて何ら矛盾しないと考えられる．

従って，本例は，臨床的にも遺伝的にもDMDのmanifested carrierであると考えられる．

さて，DMDの女性発症例の報告は，1964年のEmery[2]の報告以来，Lyonization仮説[4]の導入とあいまって注目を集めているが，わが国においても，古川ら[3]の報告以来，有馬ら[5]，三好ら[6]，迫ら[7]，岩本ら[8]，中西ら[9]，舘ら[10]，Yoshioka[11]など，これまでにわれわれの調べ得た範囲内で12例の報告が認められている．

DMDの女性発症例は，一般に発症がおそく，症状が軽く，経過年数が長いと考えられるが，本症例もほぼこのグループの臨床的特徴に合致していると考えられる．

ま と め

DMDが女性に発症したと考えられる稀な症例を，われわれの経験した2例目として報告した．6歳発症，39歳の女性で，臨床的には近位筋の筋力低下，筋萎縮，腓腹筋の仮性肥大を認め，筋電図，筋生検でmyopathyの所見を呈し，遺伝的には，家族内に臨床症状が互いに類似し，20歳までに死亡した男性4例の他，臨床症状は明らかではないが検査上carrierと考えられる女性3例があり，Lyonization仮説により，伴性劣性遺伝型式をとっていると考えられた．従って本症例はDuchenne型筋ジストロフィー症のmanifested carrierであると考えられた．

文 献

1) 杉田秀夫：酵素学的（Creatine phosphokinase, Aldolase）に見た神経筋疾患の臨床的ならびに実験的研究 〔1〕臨床的研究（進行性筋ジストロフィー症を中心として）．精神神経誌，62：106，1960.

2) Emery, E. A. H.: Clinical manifestations in two carriers of Duchenne muscular dystrophy. Lancet: 1126, 1963.

3) 古川哲雄ら：Duchenne型筋ジストロフィー症の女性保因者に関する遺伝学的考察．臨床神経，5：628，1965.

4) Lyon, M. F.: Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.). Nature, 190; 372, 1961.

5) 有馬正高ら：伴性劣性型Duchenne型進行性筋異栄養症の家系にみられた女子発症例．臨床神経，5：296，1965.

6) 三好和夫ら：進行性筋ジストロフィ症Duchenne型女性Carrierにおける骨格筋Myoglobin亜分画の異常．人類遺伝誌，13：150，1968.

7) 迫 龍二ら：若年女性の筋ジストロフィー症5家系6名の遺伝的・臨床的考察．臨床神経，18：462，1978.

8) 岩本奈津ら：母および娘の保因者にmyopathy，母に筋鞘核内封入体を認めたDuchenne型筋ジ

ストロフィー症の一家系．臨床神経，19：112，1979.

9) 中西孝雄ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症の母子発症例．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，pp. 76—79.

10) 舘　延忠ら：女性 Duchenne 型筋ジストロフィー症を含む一家系について．臨床小児医学，29：365，1981.

11) Yoshioka, M. : Clinically manifesting carriers in Duchenne muscular dystrophy. Clinical Genetics, 20 : 6 , 1981.

10）運動によって誘発される高 CK 血症
――3症例の検討――

西　村　嘉　郎*

研究協力者　宮　嶋　裕　明*　金　子　貴　子*
前　川　真　人**　須　藤　加代子**

血清 creatine kinase（CK）値が安静時に正常でありながら，日常生活行動で一過性に上昇を示すのは通常の神経筋疾患でよく見られる現象とは言い難い．これまで報告されている骨格筋エネルギー代謝異常疾患とりわけいくつかの解糖系酵素欠損症や脂質代謝系酵素疾患はこの代表的なものとして考えられる[1]．これらの疾患では rhabdomyolysis は決して臨床的に同一条件下で誘発されるのではない．このような症例を観察するときそれぞれがどのような条件下で最も顕著に血清 CK 値上昇を呈するかを検討することは，鍵となる酵素異常の検索と同様に意義あることと考えられる．

我々は最近 screening によって乳酸脱水素酵素（LDH）M subunit 欠損症[2]の第2家系を発見したが（表1），昨年本研究班で報告した軽度持続的運動負荷により発症する myopathy と，また最近経験した異常 mitochondria を有する脊髄癆患者の3症例について発症条件を比較検討したので報告する．

表1　LDH-M subunit 欠損症患者の発見は赤血球内本酵素 subunit 比をスクリーニングして行われた．この表にみられる頻度から本症家系の出現率は人口約百万人に1家系と考えられる．

Frequency of Lactate Dehydrogenase Subunits Deficiencies

Population	Numbers of Screening	M(or A) Hetero	Subunit Homo	H(or B) Hetero	Subunit Homo
Hamamatsu	2157	4 (0.185%)	1 (0.046%)	3 (0.139%)	0
Shizuoka	1619	3 (0.185%)	0	3 (0.185%)	0
Total	3776	7 (0.185%)	1 (0.026%)	6 (0.159%)	0

＊浜松医科大学第一内科
＊＊浜松医科大学検査部

症　　例

1．LDH-M subunit 欠損症第2家系

20歳女性，会社員．生後3ヶ月股関節脱臼のためギブス装着し15ヶ月ではずして処女歩行を開始した．幼児期は競走はやや遅いが水泳は得意であった．9歳短距離走10m で四肢の有痛性筋硬直が出現した．14歳頃より水泳自由型20m 以上は困難となった．赤色尿は自覚しなかった．神経学的には四肢骨格筋の発育はやや不良で筋萎縮は無いと考えられるが近位筋は軽度筋力低下が見られた．血液学的検査その他では特記すべき異常は認められない．家族歴では両親が近親結婚でともにヘテロ接合であることが赤血球中の LDH の H/M subunit 比から確認された．同胞3人中2人がホモ接合である（図1）．姉の腹直筋生検像を図2に示す．対照例と比べて myopathy の存在が示唆された．

2．Carnitine 治療反応性 myopathy[3]

32歳男性，工員．小学生の頃よりゆっくり走っても1,000m 程度で大腿部に緊張感があり筋痛増強すると共に歩行不可能となった．神経学的には筋萎縮が上肢帯に極軽度認められた．深部反射は低下又は消失．家族歴に近親結婚はないが同胞4人中長・次兄にも歩行時の下肢筋痛，深部反射低下および高 CK 血症がある．長兄には下肢帯に明らかな筋萎縮がみられ3人とも仮性肥大を伴う．非進行性である．

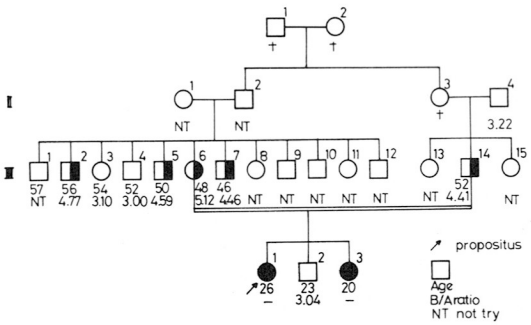


図1　LDH-M subunit 欠損症第2家系の家系図

両親はいとこ結婚．数字上段は年齢，下段は赤血球中のH-およびM-subunit比を示す．この比はヘテロ群では平均4.67，正常者で平均3.09と有意の差を示している．

3．Mitochondria 異常を伴った脊髄癆

63歳男性，画家．20代で戦時梅毒に罹患．30歳代より鶏足歩行，下肢の電撃痛出現した．40歳頃より下腿筋萎縮もみられ，深部知覚障害による失調性歩行となった．家族歴には特記すべきことはない．神経学的には瞳孔左右不同，対光反射消失．両下腿の著しい筋萎縮と深部反射消失．Abadie徴候，Romberg徴候陽性．両下肢発汗減少．検査所見では血清・髄液ともTPHA(++)．血清CK値は2,343 IU/1(外来)，入院安静後87(正常値100以下)．IsozymeはMM型．筋電図検査は下肢に神経原性変化を認めた．大腿四頭筋生検では萎縮小径線維の小グループが散見されたが大部分の筋線維はよく保たれていた．Trichrome染色(Gomori)ではいわゆる"ragged red fiber"は認められなかった．しかしEPON包埋切片toluidine blue染色で筋鞘膜下に濃染する帯を有する線維が認められ，電顕で典型的な結晶様封入体を有するmitochondrial myopathy[4]の所見が得られた(図3)．

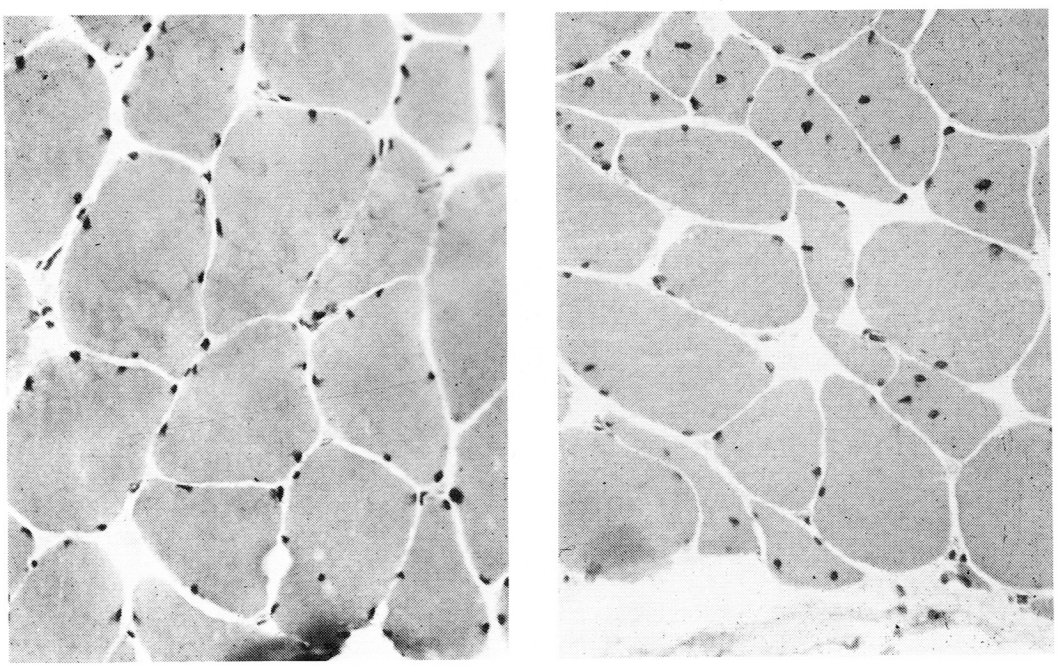


図2　左は正常対照，右はLDH-M subunit 欠損患者の腹直筋である．患者では筋線維の大小不同，中心核の増加が著しく，myopathyを示唆している．

運動負荷試験，方法と結果

(1)前腕虚血試験

症例1は運動負荷中より筋硬直が始まり運動持続困難となった．終了後より6時間後にもまだ前腕の硬直感は残っていた．CK値は前値88，後値(10時間後) 460と上昇を示した．静脈血中のLactateは2,880μmol/lと正常下限を示したがPyruvateは470μmol/lと対照に比べて異常高値を示した．症例2では充分余裕をもって運動を完了した．血清CK値は前値112，後値119とほとんど変動しなかった．症例3では終了後前腕にしびれ感があり数時間持続した．CK値は変動せず．乳酸・ピルビン酸は症例2，3とも正常に増加した．

(2) 好気性軽度運動負荷

症例1，2では秒速2m前後の速歩を約1,000m行った．症例1では正常者とほぼ同質の疲労感があったが，症例2では約500mより大腿筋硬直を自覚し始め速度を一定に保つことが困難となり，終了時には頸背部・四肢諸筋群に筋硬直を自覚し，特に下肢は筋痛を伴い歩行不能となった．血清CK値は症例1ではほとんど不変であったが，症例2では図4に示す如く10時間後には7,018と高値を示した．

症例3は脊髄癆のため3点歩行をしているが，病棟内を15分間可能な限り早く歩行させた．動悸・発汗は高度であったが以後3ヶ日間の追跡で血清CK値は変化がみられなかった．その後下肢を地に降ろした状態で斜懸垂を前後3回運動量を変えて試みた．斜懸垂は1分，2分又は3分継続し5分間休憩を1単位とし3単位行った．最も激しい運動負荷では終了時両側前腕に筋痛を生じ，手背にしびれ感を自覚した．軽度の場合はほとん

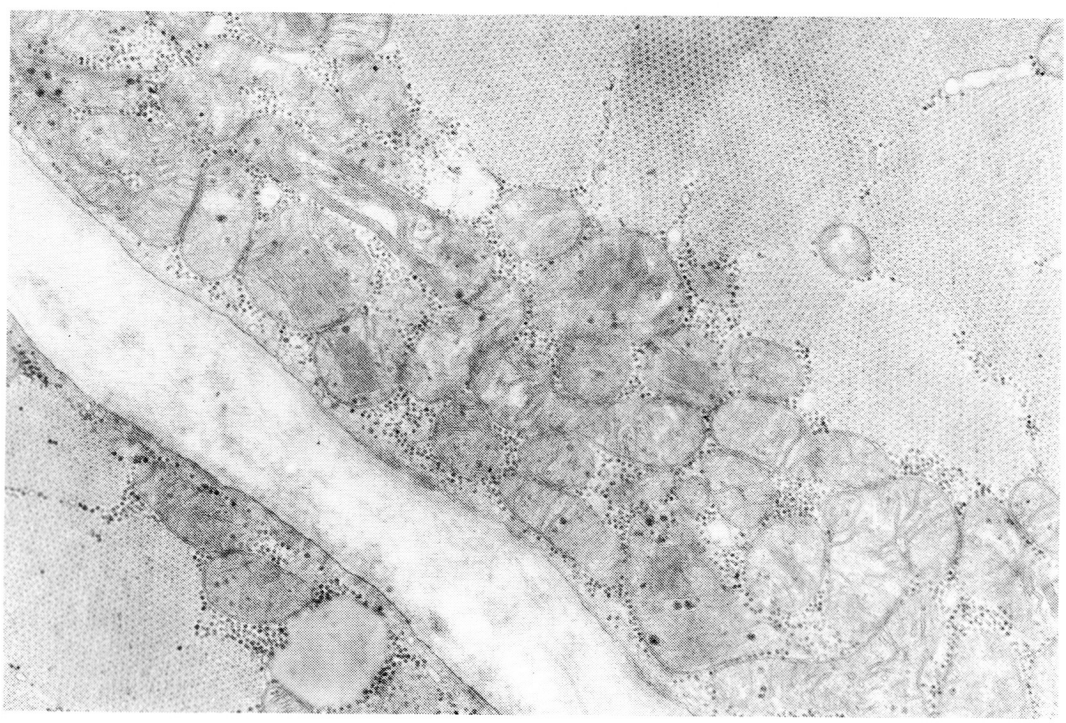


図3　症例3大腿四頭筋生検電顕像．筋鞘膜下に高度なmitochondriaの集積を認めた．筋原線維間のものも含めてmitochondriaは巨大化し，その中にいわゆる結晶様封入体を認める．また基質内には電子密度の高い大小の顆粒状封入体も認める．(×13,000)

ど軽い疲労感のみで短時間に回復した．図4に示した血清CK値の変動は(1)から(3)へと運動負荷量の増加と反比例して最も軽度の運動負荷で最も高度に血清CK値が上昇した(8,833)．

静脈血乳酸値は最も激しい運動負荷時に最大値を示した．症例3の運動負荷時の見逃すことの出来ないもう1つの重大な点は，運動負荷後にみられる血清CK値上昇の時期の遅延であって，いずれの運動負荷時においてもほぼ同一の時間的経過をとった点で，負荷後24時間後より上昇は極めてゆっくり始まり，約48時間後に極値となったことである．

考　　案

3症例は一過性高CK血症の原因精査のため入院したが，入院安静により血清CK値が正常化した時点で重視したことは，高CK値の再現性の問題である．症例1では水泳・短距離疾走等の開始直後まもなく出現するという病歴は，McArdle病に典型的にみられる周知のもので，前腕虚血下運動負荷試験で容易に再現された．症例2でも小中学校での遠足等の経験から容易に高CK血症を呈する運動条件を選択することが出来た．患者は肉体労働者であり筋骨格系の発育状況から判断して約1,000mを正常人の速歩並の速度で走ることは高度の運動負荷とは考えられず，またこの範囲の運動で有痛性筋硬直を呈することは充分に病的意義づけが可能と思われる．しかし症例3では画家であり高CK血症出現直前数日間にわたる生活行動を調べても誘因となる行動は確認できなかった．今回の上肢への軽度運動負荷は逆に患者の日常生活に投射すると合致すると思われるのは上腕挙上姿勢で大作の油絵を描いたということであった．

さて様々な運動強度における骨格筋運動エネルギー源は糖質と脂質が主としてあげられている．運動強度は個々人の最大酸素消費量(VOmax)で表現するのが客観的評価と思われるが，VOmax 90%以上の運動，特にその開始後数分間

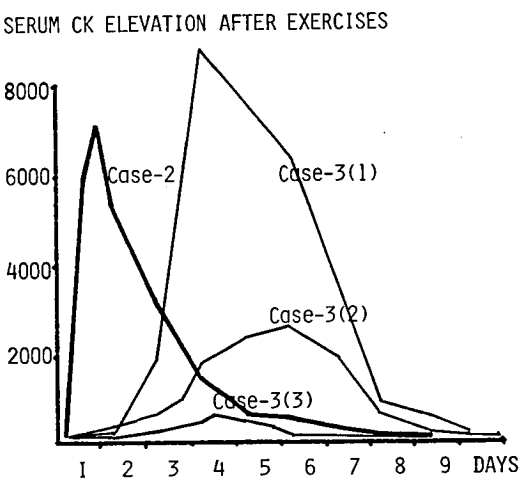


図4　種々の運動負荷による血清CK値の上昇．症例2では2.5 m/secで1200mを走らせたもの．この直後に下肢の有痛性筋硬直が出現した．症例3は上肢の運動負荷(斜懸垂)を試みた．(1)～(3)は運動量の差を表わすが，運動量は(1)が最も軽いもので，血清CK値の上昇は運動量と完全に反比例した．症例3のもう一つの特徴は運動負荷から血清CK値上昇開始および極値までの遅延である．なお症例2および症例3に行った運動負荷では正常対照者ではいずれも血清CK値の上昇は認められなかった．

ではエネルギー代謝は骨格筋内の嫌気性解糖によっている．LDH-Msubunit 欠損がこの嫌気性解糖に及ぼす病的過程について生化学的検討は既に第1家系において報告した．しかし代謝経路の異常について解明されているが臨床像の全てを説明できるとは言えない．ATP 産生障害と CK の漏出の間にどのような事件の関連を考えるか．第1家系の同胞でもホモ接合の男性に発端者と同様の myoglobin 尿をみているが，女性では自覚していないことは第2家系の2人の女性の場合と合致している．症例1でも前腕虚血試験による前腕筋群硬直は典型的ではあり得なかった．本家系では近位筋筋力低下，組織所見とも今後検討し第1家系との表現型の異同の原因を明らかにする必要がある．

症例2，3では前腕虚血試験の検査値はほぼ同様で正常と考えられるが，臨床的には異なっており症例3では充分遂行できたがしびれ感をはっきりと自覚した．

さて症例2，3について行った誘発試験を検討してみると，両者とも VOmax 60%程度で異常値を呈しているが，臨床的には極めて対称的で症例2では有痛性筋硬直を呈したが，症例3では一時疲労を感じたに止まった．症例2は軽又は中等度の運動を継続して始めて発症することからもエネルギー源として脂質の関与を考えたい．運動直前の高糖質食の摂取で症状軽減しなかったこと，絶食試験後に誘発され易かったこと，carnitine 服用によって臨床症状の改善が明らかだったこと等がその根拠である．

症例2で運動が直接の原因であるが，症例3にみられた運動負荷から遅延してみられた高 CK 血症はどのように解釈すべきであろうか．この点について問題となるのは異常 mitochondria の存在である．脊髄癆筋の mitochondria 異常の報告はなく，本症例の上肢筋群は疾患の影響をほとんど受けていない．また神経学的所見等から狭義の mitochondria myopathy と考えてよいと思われ TCA cycle・電子伝達系の酸化的リン酸化における代謝異常を示唆していると思われる．本症例では運動時 ATP 枯渇を生じたと考えられず，運動完了後充分遅れて CK 上昇を示したことは，何らかの代謝障害からの回復過程での不完全性に原因を求めるべきであろうか．現在我々は mitochondria 電子伝達系について生化学的検索を行っている．

筋細胞における解糖系または脂質系の代謝障害と臨床症状発現との関連は，ほとんどが ATP 産生障害の点で停止している．これは臨床症状発現機序の全てを説明しているとは思われない．とくに mitochondria myopathy についてはエネルギー代謝異常に由来する筋肉系の臨床症状発現様式の把握も不充分である．これらの目的から高 CK 血症発現の臨床側の条件の検討は重要な意義を持つものであると考えられる．

文　献

1) Engel AG: Metabolic and endocrine myopathies. in Disorders of voluntary muscle, ed by Walton J. Chrchill Livingstone, N. Y. 1981, p.664
2) Nishimura Y, Honda N et al: Lactate dehydrogenase A subunit deficiency. in Isozymes, Current Topics in Biological and Medical Research, ed by Rattazzi MC et al, vol ll, Medical and other applocations, Alan R Liss, N. Y. 1983, p.51
3) 西村嘉郎：軽度かつ持続的な運動により筋硬直を呈する家族性ミオパチー．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」(三好班) 昭和57年度研究報告書，1983，p.109
4) 福原信義：ミトコンドリア・ミオパチー．神経進歩，25：1320，1981

11）筋線維の発育分化遅延を主病変とする先天性ミオパチー（congenital myopathy without specific features）の重症例

栗原照幸*

研究協力者　山村善教*　竹井　学**　埜中征哉***
早川国男**　鶴田和仁*

我々は先天性ミオパチーの1例を経験したが，その臨床症状並びに筋組織所見からcongenital myopathy without specific featuresの重症例と考えられたので，疾病分類上の位置付けにつき検討を加え報告する．

症例

患者：生後51日の男児．

主訴：呼吸不全，全身の筋緊張低下．

家族歴：神経筋疾患の者はいない．両親は健康だがいとこ結婚であり，本児はその第2子として出生した．

現病歴：妊娠中順調に経過し患児の胎動は5ヶ月目からみられたが，第1子に比較すると弱かった．昭和57年7月29日満期産だが骨盤位と児頭骨盤不適合の疑いの為帝王切開にて出生した．羊水は1400mlと多く体重は3295gであった．Apgar scoreは3点で直ちに蘇生術を受け気管内挿管をされ人工呼吸器を接続された．自発呼吸は非常に浅く不規則であった．疼痛などの刺激に対し四肢・顔面をわずかに動かすのみであった．その後自発呼吸が消失し自発運動も微弱である為floppy infantの原因疾患の鑑別を目的として当科に紹介され，昭和57年9月16日筋生検を行なった．

現症：体重3885g．経鼻挿管され人工呼吸器に接続されている．顔は細長く，表情に乏しくミオパチー顔貌を呈し高口蓋もみられた．黄疸，貧血なく心・肺に著変なく肝・脾腫も認めなかった．両側に停留睾丸を認めた．神経学的には脳神経系ではミオパチー顔貌を呈しているが，眼球運動に明らかな制限はなく眼振もみられなかった．対光反射は迅速で，舌萎縮，線維束性攣縮はみられなかった．瞬目と口唇のわずかな動きがみられるが頸部の筋肉の収縮はみられなかった．運動系では疼痛刺激に際し両足趾を動かす程度であり近位筋の動きは全く認められなかった．明らかな筋萎縮はみられず線維束性攣縮もみられなかった．四肢筋はすべて低緊張状態であるが四肢の関節には拘縮がみられ，肘関節は90°以上の屈曲は不能で，両側尖足位を呈していた．深部腱反射はすべて消失し病的反射，原始反射共に認めなかった（図1）．

検査所見：検尿は正常．末梢血は出生時に白血球数が22,800/mm³と軽度の増多がみられた以外は正常で，その後白血球数も正常化した．血液生化学では血清GPT 47IU/l(正常0～27)，CK 239 IU/l（正常5～120），aldolase 5.1IU/l（正常0.5～3.1）と高値を示し，CKのアイソザイムはMM型が100%であった．血糖，尿素窒素，電解質は正常でGuthrie法による先天性代謝異常症のスクリーニングテストも陰性であった．CRPは出生時3＋であったがその後陰性化した．髄液は正常であった．心電図は正常で，脳波は左側頭誘導に軽度徐波が目立つ以外には著変を認めなかった．頭部CTスキャンでは軽度の大脳皮質の萎縮がみ

＊宮崎医科大学第三内科
＊＊宮崎医科大学小児科
＊＊＊国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部

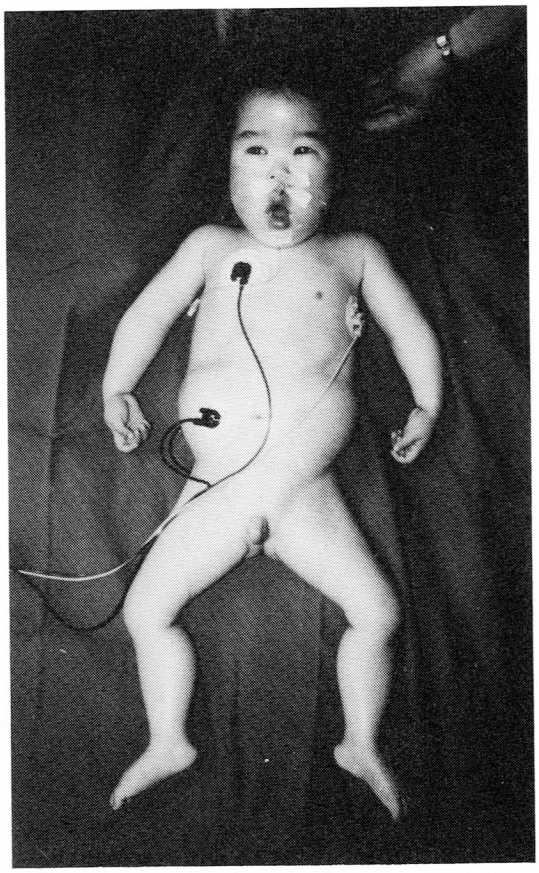


図1　患児の全身像

られた．筋電図では活動電位が得られなかった．

筋生検所見：生後51日目に右外側広筋から採取し，直ちに凍結後連続切片を作成しHE染色並びに各種の組織化学的染色を行ない，一部は電顕用に処理した．

HE染色では，筋線維の基本構築はやや乱れているが間質の結合織の明らかな増加は認めず，ほとんどの筋線維は円形で大小不同が著しく数μから30μの間に分布していた．核は一般に大きく濃染し，しばしば明瞭な核小体をもち中心核も約5％と軽度増加していた．時に塩基好性小顆粒状物質を入れる線維が散在し，また胞体自身が塩基好性で小径の未熟な感じの線維もみられた．壊死線維や炎症細胞浸潤並びに群集萎縮はみられなかった（図2A）．Gomori trichrome変法染色では赤～赤紫色に染まる桿状に近い物質を入れる線維が約5％みられたが，明らかなネマリン小体といえるものではなかった．NADH-TR染色では筋線維タイプの分別が悪く，多くの線維でintermyofibrillar networkが乱れており特に比較的大径の線維にその傾向が強く，また，強い活性を示す線維も散在していた（図2B）．ATPase染色ではタイプ2線維が約90％を占め，タイプ2A線維は56.4％とやや増加していた．特記すべきことは未分化なタイプ2C線維が20.8％と増加していたことであった（図2C，D，3）．NADH-TR染色でみられたやや大型のintermyofibrillar networkの乱れた線維の多くはタイプ2C線維であり，このような未熟な感じのする線維はacid phosphatase活性が軽度高く，nonspecific esteraseでも時に高い活性を示した．PAS染色でむらのある線維がみられたがphosphorylase染色では著変を認めずoil red O染色では脂肪の増加はみられなかった．

電顕では比較的変化に乏しい筋線維に混じて筋原線維の形成が悪くband structureの形成が不明瞭な筋線維が多くみられたことが最も特記すべき所見であった（図4）．Z帯の異常，時に桿状様構造をみる筋線維も散在した（図5）．ミトコンドリアの分布の乱れもみられたが結晶様封入体は認めなかった．

考　　案

本症例はいとこ結婚の健康な両親の間に出生したfloppy infantであり，その発症は胎動が弱かったことから胎生期と考えられる．臨床的にミオパチー顔貌，高口蓋，停留睾丸，全身の筋緊張の低下と著明な筋力低下及び四肢の関節拘縮，深部腱反射消失などが認められ，血清CK値を始めとする筋由来の酵素の軽度上昇がみられた．生検筋の組織像は筋線維の大小不同や筋構築異常などの筋原性変化を呈しながらも間質の増生や壊死もしくは再生線維に乏しく，タイプ2線維優位がみられ，特に未分化なタイプ2C線維の増加がみられたことと少量の桿状様小体がみられた点に特徴がある．

本症例ではfloppy infantを呈する疾患について鑑別が必要であるが，臨床症状並びに筋組織像

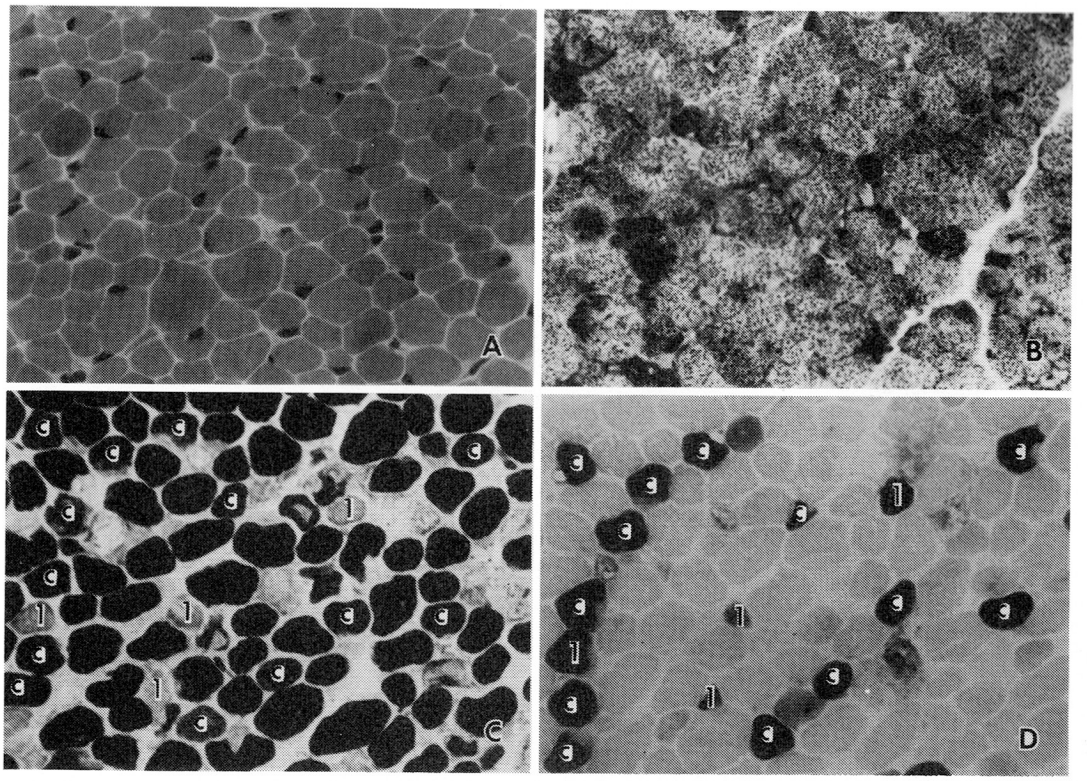


図2　生後51日目に右外側広筋より生検
A　筋線維の大小不同を認めるが間質の増生や壊死線維はみられない．HE 染色．×400．
B　筋線維タイプの分別は困難で，intermyofibrillar network は乱れを呈する．NADH-TR 染色．×375．
C　タイプ2線維優位がみられる．routine ATPase 染色．×460．
D　タイプ2C線維（C）の増加がみられる．タイプ1線維（1）は少数である．ATPase 染色（preincubation pH 4.3）．×460．

からは Ulrich 型筋ジストロフィー症，Prader-Willi 症候群，Werdnig-Hoffmann 病は否定され，congenital dystrophia myotonica も母親が正常であり否定し得る．また，重症型や福山型の先天性筋ジストロフィー症は早期から CK 高値，筋の壊死，結合織の増生がみられる[1]ので合致しない．やはり，いわゆる先天性非進行性ミオパチーが最も鑑別すべき疾患と考えられるが，以下に本症例の筋組織像の特徴を従来の報告と比較検討し，その位置付けを試みる．

まず，先天性ミオパチーや進行性筋ジストロフィー症ではタイプ1線維優位がみられることが多い[2]が，本症例ではタイプ2線維優位がみられた．これは神経原性変化[2]というよりも胎生期の18～28週の筋肉はタイプ2線維優位を示し[3]，その多くはタイプ2C線維であるとの報告もあり[4]，ミオパチーとして説明可能と考える．すなわち，本症例の筋肉の発達が未熟であることを示唆していると考えられる．

次にタイプ2C線維についてであるが，この筋線維は各種の神経筋疾患においてその存在が確認されており[5)~9)]，筋疾患に特異的なものではなく，

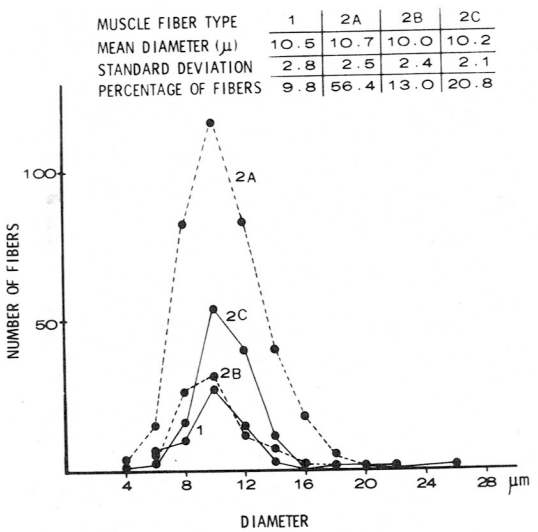


図3　筋線維タイプ別ヒストグラム

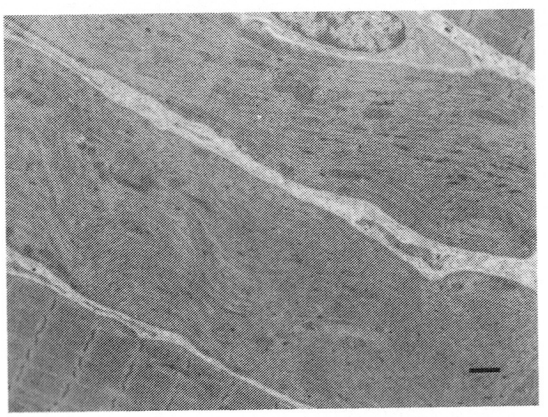


図4　生検筋の電顕像．筋原線維の形成が悪く band structure の乱れが著明な筋線維がみられる．ウラン—鉛染色．×6,600.

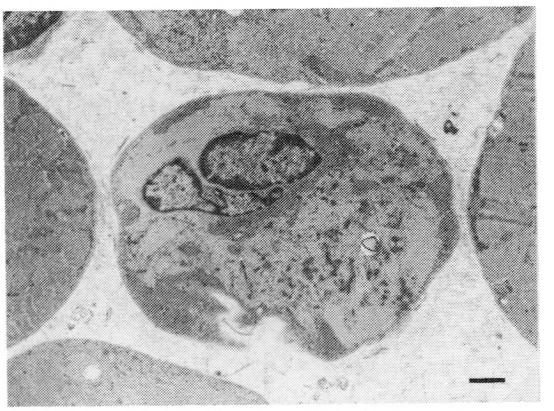


図5　生検筋の電顕像．筋原線維の形成が悪く，不整形の rod-like body も少量みられる．ウラン—鉛染色．×7,750.

未分化な筋線維[5)6)9)]，再生筋線維[7)]，筋変性の初期像[8)]などと考えられ，また，神経再支配を示す[8)]ともいわれている．本症例では壊死・再生の存在はみられず，神経原性変化も否定的である．ゆえに本症例の多くのタイプ２Ｃ線維は未分化な筋線維であると考えられる．正常児で生下時にタイプ２Ｃ線維の占める割合は５％未満であり，比較的重症の先天性ミオパチーや congenital hypotonia においてその比率が高い傾向がみられ[5)6)9)]，埜中らは未分化なタイプ２Ｃ線維の比率と重症度との相関関係を推察しており[5)9)]，我々の症例でも同様の傾向を示していると考える．

電顕所見で多くの筋線維に band structure がみられなかったのは，一度完成したものが変性したというより形成不全とみなすのが妥当であると考えられた．このような形成不全は先天性ミオパチーの重症型に多く認められ[9)]，筋線維の中心部に限局したものが central core 病と思われる．myofibril の形成不全も筋の未熟性を反映する重要な所見と考えられる．

さて，本症例の位置付けであるが，筋組織像からは各種の先天性非進行性ミオパチーの中でも特に鑑別を要する疾患としては nemaline myopathy があげられる．しかしそれらの多くは60％以上の筋線維に rod がみられ，少ないものでも30％の筋線維にみられるといわれており，本例では約５％の線維にネマリン小体に近い構造を認めたのみであり，nemaline myopathy との診断を下しえず，非特異的所見と考えた．しかしながら１回のみの筋生検では rod が見出されない症例もあり[10)]，完全に nemaline myopathy を否定する為には繰り返して筋生検を行なう必要があり，今後の課題である．以上述べてきたように本症例は未解決の

点もいくつかあるが，現在までに得られている検査所見から従来の報告に類似点を求めるとすれば，Dubowitz のいう minimal change myopathy[11]，もしくは benign congenital myopathy without specific features[1)5)] があげられる．しかし minimal change myopathy と呼ぶには組織化学的染色で強い変化がみられており不適切と考えられ，また benign とも言えない．本症例では従来の各種の congenital myopathy の特徴的な所見がみられず，筋肉の未熟性のみが極だった所見であり，これがその重症度と相関していると考えると，congenital myopathy without specific features の重症型として位置付けることが可能である．

本症例の如き症例の報告は我々が検索した限り未だ数少なく，あえて以上のように疾患の位置付けを試みたが，これが一疾患単位をなすか否かについては今後の症例の積み重ねが必要と考える．

文　献

1) Nonaka I, Chou SM: Congenital muscular dystrophy. in Handbook of Clinical Neurology, ed by Vinken PJ, Bruyn GW, vol 41, Diseases of Muscle Part II, North-Holland Pub Co, Amsterdam 1979, p 27
2) Dubowitz V, Brooke MH: Muscle biopsy, A modern approach Saunders, London 1973, p 82
3) Dubowitz V: Histochemical aspect of muscle disease. in Disorders of voluntary muscle, ed by Walton J, 4th ed, Churchill Livingston, New York 1981, p 272
4) Farkas-Bargeton E, Diebler MF et al: Etude de la maturation histochimique, quantitative et ultrastructurale du muscle foetal humain. J Neurol Sci 31: 245, 1977
5) Nonaka I, Nakamura Y et al: Congenital myopathy without specific features (Minimal change myopathy). Neuropediatrics (in Press)
6) Farkas-Bargeton E, Aicardi J et al: Delay in the maturation of muscle fibers in infants with congenital hypotonia. J Neurol Sci 39: 17, 1978
7) Nonaka I, Takagi A et al: The significance of type 2 C muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. Muscle & Nerve 4: 326, 1981
8) Johnson MA, Kucukyalcin DK: Patterns of abnormal histochemical fibre type differentiation in human muscle biopsies. J Neurol Sci 37: 159, 1978
9) Nonaka I, Tojo M et al: Fetal muscle characteristics in nemaline myopathy. Neuropediatrics 14: 47, 1983
10) Nienhuis AW, Coleman RF et al: Nemaline myopathy, A histopathologic and histochemical study. Am J Clin Pathol 48: 1, 1967
11) Dubowitz V: Muscle disorders in childhood. Saunders, London 1978, p 106

12）Myoadenylate deaminase 欠損症を疑われた1例
——筋痙攣を主徴とする診断困難な症例の提示および問題点——

田　辺　　等*

研究協力者　小　島　　進*　内　潟　雅　信*　磯　崎　英　治*
仁　科　甫　啓**　小　島　　司**　北　村　元　仕**

筋痙攣を主症状とする代謝性筋疾患としては，McArdle 病, Phosphofruktokinase 欠損症などの糖原病，Carnitine palmityl transferase 欠損症等が知られているが，1978年 Fishbein ら[1]が Myoadenylate deaminase（以下 MADA）欠損症を報告して以来，欧米で37例，日本でも最近樋口ら[2]が組織化学的に証明した2例の報告があり，注目されている．

今回，我々は臨床所見，阻血下前腕運動試験では MADA 欠損症に合致し，組織化学的にも MADA 活性が対照に比し低下を示したが，生検筋の生化学的検査ではその欠損を立証することができなかった症例を経験したので，種々の問題点を整理し報告する．

症　　例

患者：43歳，女性．主婦．

家族歴：父(70歳にて肺癌で死亡)，母，弟の3人に本人と同様の筋痙攣の episodes があるが，現時点での検索は充分でない．近親婚（－）．

既往歴：23歳，肺結核．35歳，十二指腸潰瘍．

現病歴：中，高校時代頃より，運動会・遠足などの激しい労作の後に腓腹部のこむら返り様症状と大腿部が固くなり動かなくなる事に気付いていた．

3～4年前からは軽労作にても同様の症状が出現し，重い物を持つと両上腕が固く動かなくなるという症状も加わったため，当科受診し精査目的の入院となった．

入院時現症：一般身体所見には特記すべきことなし．神経学的所見では，両上腕と頸部屈筋群とに軽度筋力低下（MMT≒4）を認める他，上腕二頭筋に叩打による mounding 現象様筋膨隆を認めた．

検査所見：CK66～184mIU/ml（正常100以下）と正常から軽度上昇を示す他は，甲状腺機能，糖負荷試験，Ca，P，K，Mg 等の電解質にも異常を認めなかった．又，赤血球酵素は PFK, adenylate deaminase を含め正常で，解糖中間体及びアデニンヌクレオチドも正常であった．

筋電図では，上肢近位筋に軽度筋原性変化の混在を認めたが，誘発筋電図，末梢神経伝導速度には異常を認めなかった．

阻血下前腕運動試験は垂井，嶺尾ら[3]の方法に準じて施行した．図1に示す如く lactate 上昇はやや低目であったが正常範囲．しかし NH_3 の上昇は認められなかった．

筋生検は左上腕二頭筋にて施行（図2参照）．HE 染色にて軽度大小不同を示す他は，PAS, Phosphorylase, DPNH－TR, ATPase(pH9.4, 4.3)，Trichrome, SDH，等に異常を認めなかった．

MADA 染色は Fishbein ら[4]の方法により行なったが，原法では必ずしも染色性が良くなく，基礎的検討を加えた後 pH を7.0(原法6.1)，KCl を0.1mM（原法0.2mM）に一部改変し行なった．図3に示す如く本例は左側の対照に比し活性低下が疑われた．しかし，対照群の間にもある程度の活

＊虎の門病院神経内科
＊＊虎の門病院臨床化学科

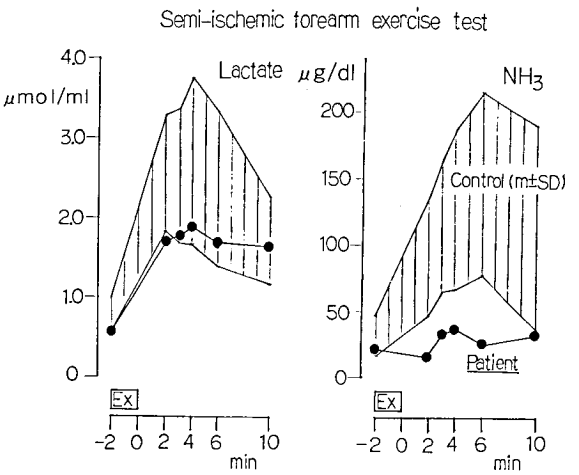


図1　左側の lactate 上昇は正常範囲だが右側の NH_3 上昇は認められなかった.

性像の差が認められた.

生検筋の生化学的検討は Sabina ら[5] の方法に準じて施行したが，表1の如く MADA 活性値，Km，Vmax，ATP によるアロステリック効果のいずれにも対照群との間に差を示さなかった.

考　　案

本症例は阻血下前腕運動試験において NH_3 の上昇が認められず，かつ lactate の上昇も悪かったため，NH_3 と lactate の頂値と前値の差をとり両者の関係を検討したところ，図4に示す如く対照群では両者の間に相関係数0.984と有意の相関がみられた．しかし，本例においては，NH_3 産生が lactate 産生に対する予測値51±33μg/dl に比し11μg/dl と有意に低下している事が判明した（$P<0.05$）．なおこの両者が相関を示すことは，筋内において NH_3 が Phosphofruktokinase を介し glycolysis 促進しているという報告と矛盾せず，すでに Fishbein ら[1] もこの関係を指摘している．一方，垂井，嶺尾ら[2] によれば糖原病V・VII型では NH_3 が lactate に比し過剰反応を示すと指摘している.

さて，筋内 NH_3 の発生機構は

$$AMP \xrightarrow{MADA} IMP + NH_3$$

の反応により主に発生するとされている[6]．産生された IMP はその後 purine nucleotide cycle により

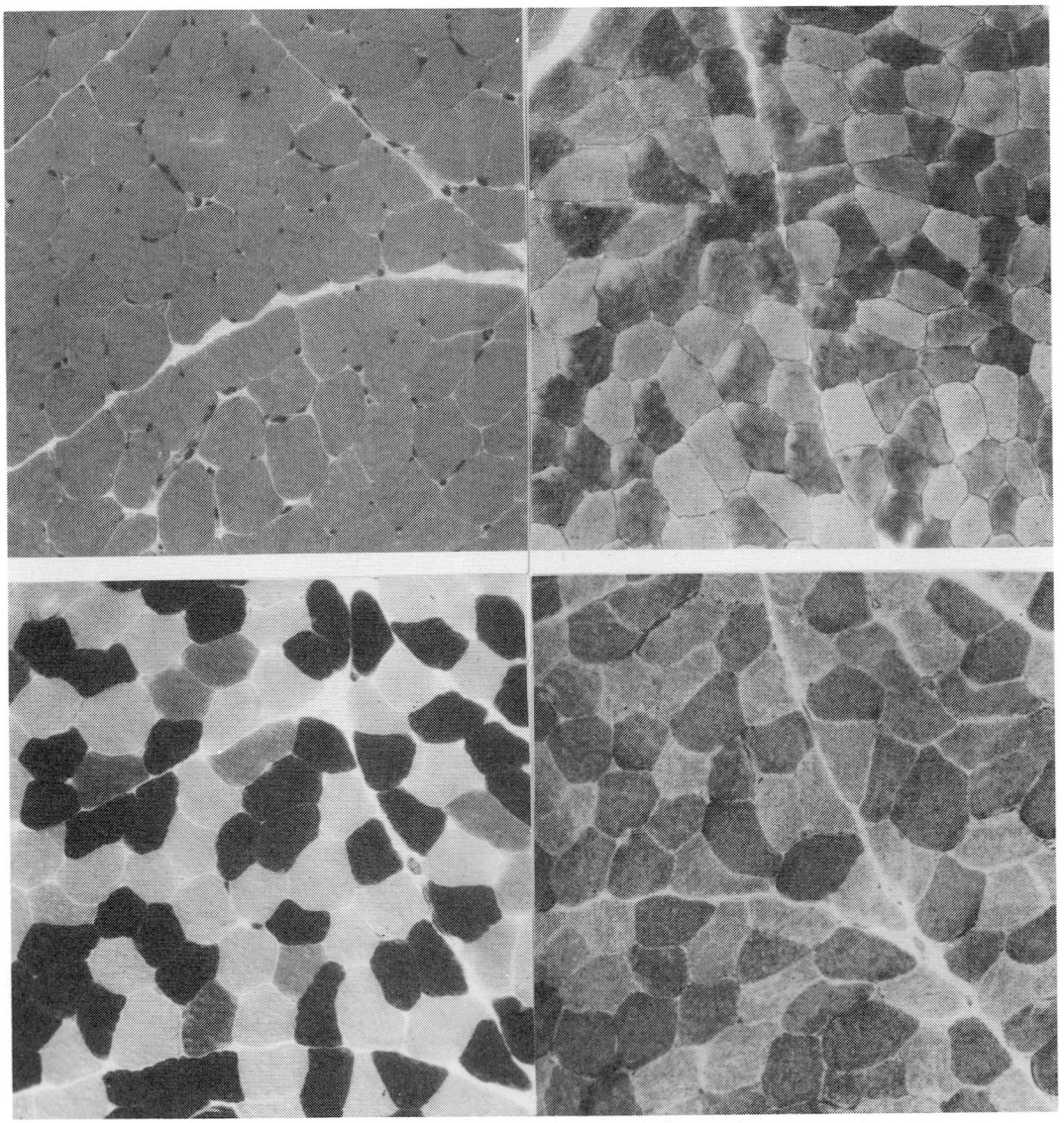
$$IMP + GTP + aspartate \xrightarrow{adenylosuccinate\ synthetase} adenylosuccinate + GDP + Pi$$

$$adenylosuccinate \xrightarrow{adenylosuccinase} AMP + fumarate$$

の反応を示す．生じた NH_3 が先に述べた機構により解糖系を，fumarate が TCA cycle 回転を，各々促進，又，ATP/ADP 比を保持し energy charge を維持するとされている.

したがって本症例の NH_3 産生低下は上記 purine nucleotide cycle の第一段階，すなわち MADA 活性低下によるものが疑われたが生検筋による検索では本酵素活性は正常であった．この *in vivo* と *in vitro* の成績の解離を示す理由としては①生化学的検索の方法論上の問題，② *in vivo* における MADA の調節機構の問題（例えば，*in vivo* における inhibitor の存在など）を考えねばならないが，①は本例では直接 IMP 濃度も測定しており，MADA が介する反応の2つの産生物を測定確認しているため考え難い．②に関しては，特に inhibitor について Shumate ら[7] と Dimauro ら[8] は筋内には存在しないとしているが，Fishbein ら[9] は serum 及び plasma に存在するとしており，今後の検討が必要と思われた.

一方，一般に筋痙攣を呈する疾患としては先に述べた糖原病V型及びVII型，Carnitine palmityl transferase 欠損症の他に，里吉病，Stiffman 症候群，慢性アルコール中毒，妊娠，脱水，尿毒症，甲状腺機能低下症，Na 欠乏，低 Mg 血症，partly denervated muscle などが知られている．本例では現時点での検索が不充分なため Carnitine palmityl transferase 欠損症は否定できない．又，他に該当する疾患がないため，いわゆる ordinary cramp も否定し得ない．しかし，この2疾患に関しても本例のような NH_3 の動態を示すとの報告はない．従って未知の代謝異常に基づく筋痙攣である可能性は否定し得ず，今後の検討を要すると



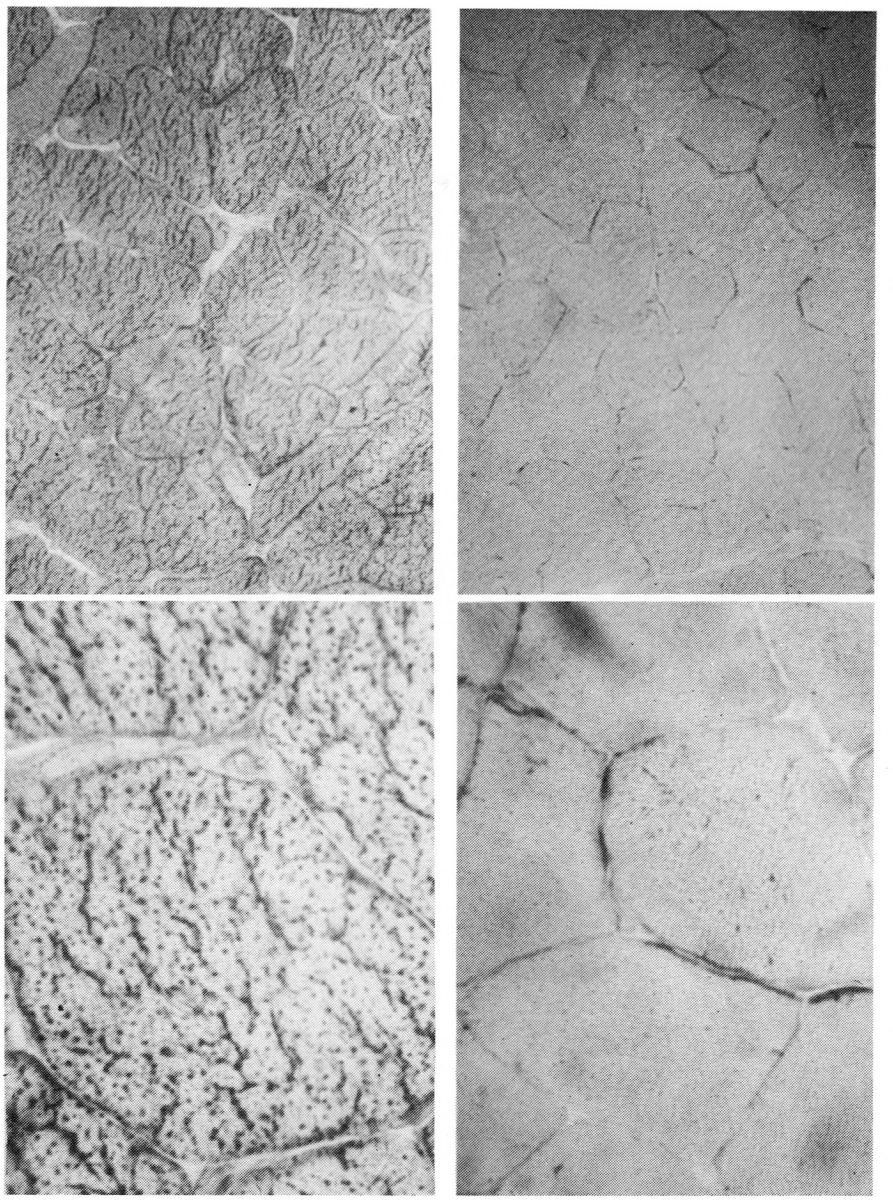
a	b
c	d

図2　筋生検所見

a）HE 染色，100×　b）Phosphorylase 活性像，100×

c）myosin ATPase（pH9.4）活性像，100×

d）DPNH-TR 活性像．〔説明は本文参照〕



a	b
c	d

図3　筋生検所見．myoadenylate deaminase 染色．
a）control，100×
b）本例，100×
c）control，400×
d）本例，400×
左側の control に比し右側の本例は活性像に差を認める．〔本文参照〕

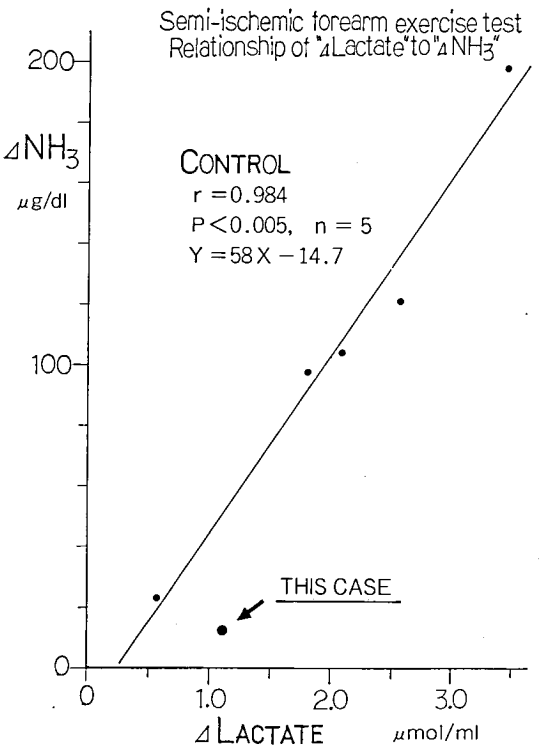


図4　阻血下前腕運動試験において ΔNH_3 と Δlactate は正の相関を示す．しかし，本例では ΔNH_3 が Δlactate に比し明らかに低下している．〔本文参照〕

表1　説明は本文参照

	This case	Control
阻血下前腕運動試験		
Lactate (peak/before)	2.9	2.6～6.1
s-NH3 (peak/before)	1.7↓	3.2～7.4
ΔpH	−0.06	−0.11～−0.19
Myoadenylate deaminase 活性値 (μmol/m/g prot.)	85	87, 87, 89
Km (ATP 0 mmol/l)	1.85	2.13, 1.69, 2.02
(ATP 1 mmol/l)	0.78	0.86, 0.86, 0.86
Vmax (μmol/m/g prot)	588	625, 620, 590

思われた．

なお，本例では組織化学において MADA 活性が対照群に比し低下しているようにみえたが，生化学的には差がなく本酵素の活性像から酵素活性を半定量的に推測することは困難と思われた．

結　語

1) 筋痙攣を主徴とする43歳女性例を報告した．
2) 阻血下前腕運動試験では lactate 上昇は正常範囲であったが，NH_3 の上昇は認められなかった．
3) MADA の組織化学的方法論についても再検討を加え，なお問題の残る事を示した．
4) 生化学的に MADA の活性低下は示されなかった．
5) 本例の鑑別診断及び病態に関する問題点につき考案した．

文　献

1) Fishbein, W. N., Armbrustmacher, V. W. & Griffin, J. L.: Myoadenylate deaminase deficiency : a new disease of muscle. Science, 200 : 545, 1978.
2) 樋口逸郎，納　光弘，川平　稔，ほか：生検筋の組織化学により診断された myoadenylate deaminase 欠損症の 2 症例．神経内科，19：488，1983.
3) 垂井清一郎，嶺尾郁夫，清水孝郎，ほか：筋糖原病の病態分析—新しいスクリーニング指標物質について．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究，三好班，昭和57年度研究報告書，1983，pp.206～209.
4) Fishbein, W. N., Griffin, J. L. & Armbrustmacher, V. W.: Stain for skeletal muscle adenylate deaminase. an effective tetrazolium stain for frozen biopsy specimens. Arch. Pathol. Lab. Med., 104 : 462, 1980.
5) Sabina, R. L., Swain, J. L., Patten, B. M., et al.: Distruption of purine nucleotide cycle. a potential explanation for muscle dysfunction

in myoadenylate deaminase deficiency. J. Clin. Invest., 66: 1419, 1980.

6) Lowenstein, J. M. & Goodman, M. N.: The purine nucleotide cycle in skeletal muscle. Fed. Proc., 37: 2310, 1978.

7) Shumate, J. B., Katnik, R., Ruoz, M., et al.: Myoadenylate deaminase deficiency. Muscle Nerve, 2 : 213, 1979.

8) Dimauro, S., Miranda, A. F., Hays, A. P., et al.: Myoadenylate deaminase deficiency: muscle biopsy and muscle culture in a patient with gout. J. Neurol. Sci., 47: 191, 1980.

9) Fishbein, W. N., Davis, J. I., Nagarajan, K., et al.: Specific serum/plasma inhibitor of muscle adenylate deaminase. IRCS Med. Sci., 9 : 178. 1981.

13）Duchenne 筋ジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験
——再生筋直径の定量的検討（続報）——

若　山　吉　弘*

研究協力者　大　生　定　義*　熊　谷　俊　幸**

はじめに

Duchenne 筋ジストロフィー症（以下 DMD）における筋の再生が正常か否かに関する問題はまだ不明な点が多く，結論を得るに至っていない．我々はこの問題を検討するため DMD 生検筋をヌードマウスの皮下に移植し，経時的にその再生筋を形態学的立場より正常筋組織からの再生筋と比較検討してきた．すなわち DMD 筋の移植片からの再生筋は正常筋からの再生筋と何ら形態的には異ならず，どちらも移植4週後迄には横紋が形成され，周辺核をもつ再生筋線維が形成された．しかし再生筋の直径が移植2週以降 DMD では細い傾向がみられたので，定量的に測定し，統計的に解析したところ，移植1週後では有意差はみられなかったが，移植2週以降は統計的に有意に DMD 再生筋が細かった．これらの結果はすでに発表ずみ[1]であるが，この研究では正常筋を得た整形外科手術患者の年齢がほとんど10歳代で DMD より年齢が高く，正確に age match の生検筋を得ることは困難であった．従って昨年度と今年度は age match した正常対照生検筋を得るように努め，本年度に新たに正常対照3例，DMD 1例より生検筋を得ることが出来たのでその結果を報告する．

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，ここへ組織化学的に正常な DMD 症例と age match した整形外科手術患者7例（年齢は2歳1例，5歳2例，7歳2例，8歳2例）と DMD 患者9例（年齢は2歳1例，3歳2例，4歳1例，5歳1例，6歳1例，7歳2例，13歳1例）からの生検筋を小さく細切（約2×5 mm）したものを周囲の筋に直接触れない様に挿入し縫合した．

移植片は，移植1，2，3，4週後にそれぞれ正常対照筋と DMD 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．移植片は通常血管新生により赤く，線維組織の被膜により覆われ周囲の組織からは容易に識別可能であった．

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 を避けるためにおこなった．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織を除去し，小さな block に細切した．この標本を固定脱水後プラスチックに包埋した．1/2μ の厚切り切片はトルイジンブルー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．

再生筋細胞直径の定量的検討はそれぞれの症例で20個以上のプラスチックに包埋した標本の1/2μ の厚切り切片をトルイジンブルー染色し，その再生筋線維の横断標本を at random に最終倍率400倍で光顕写真にとり測定した．

結　　果

ヌードマウスへの生検筋の移植片の移植後1

＊昭和大学藤が丘病院神経内科
＊＊愛知県コロニー中央病院小児神経科

表 1　Mean diameters (μm) of cross sectioned myotubes and myoblasts after 1-4 weeks of transplantation

Case	Age	Sex	Normal or DMD	1 Week	2 Weeks	3 Weeks	4 Weeks
1	5	M	Normal	14.1±4.6 (n=310)	19.2±6.3 (n=201)	18.1±7.4 (n=212)	13.9±5.0 (n=191)
2	5	F	Normal	13.1±3.7 (n=310)	18.1±6.0 (n=274)	18.2±6.2 (n=290)	16.5±6.9 (n=270)
3	8	M	Normal	11.8±4.2 (n=220)	18.4±7.2 (n=297)	16.8±5.9 (n=310)	14.8±5.6 (n=102)
4	2	F	Normal	13.9±4.1 (n=201)	14.5±4.1 (n=233)	17.4±4.1 (n=166)	17.3±4.9 (n=225)
5	7	F	Normal	11.3±3.3 (n=81)	16.1±5.5 (n=244)	19.4±7.8 (n=207)	15.2±4.2 (n=110)
6	8	M	Normal	14.0±3.9 (n=207)	19.9±7.0 (n=115)	17.5±4.2 (n=53)	
7	7	F	Normal	13.8±4.6 (n=117)	21.4±7.1 (n=224)	20.2±7.5 (n=55)	
8	6	M	DMD	14.4±4.2 (n=112)	15.8±5.0 (n=187)	17.0±6.1 (n=96)	14.6±4.6 (n=114)
9	3	M	DMD	11.9±4.6 (n=46)	12.8±3.5 (n=121)	14.7±4.0 (n=226)	13.4±3.9 (n=63)
10	7	M	DMD	13.1±4.7 (n=64)	16.5±6.8 (n=51)	20.8±7.5 (n=54)	19.1±8.1 (n=62)
11	4	M	DMD	11.6±4.6 (n=55)	16.0±5.3 (n=45)	14.7±5.4 (n=50)	15.7±5.5 (n=72)
12	5	M	DMD	16.8±5.2 (n=50)	15.2±5.6 (n=75)	18.0±6.0 (n=77)	20.3±7.9 (n=73)
13	3	M	DMD	13.2±4.2 (n=210)	13.6±4.4 (n=310)	12.9±4.4 (n=233)	
14	2	M	DMD	12.6±4.0 (n=345)	17.5±5.1 (n=360)	17.1±6.3 (n=115)	
15	7	M	DMD				15.5±6.1 (n=144)
16	13	M	DMD				14.5±5.5 (n=141)

M : Male　F : Female　DMD : Duchenne muscular dystrophy

a : Mean diameter (μm)±standard deviation

b : Number of myotubes and myoblasts examined

～4週迄の光顕，電顕所見についてはすでに報告ずみであり[1]，光顕，電顕的には移植後1～4週迄の標本において形態的には正常対照筋移植片と明らかな差はなく，またDMD筋移植片からの再生筋細胞の細胞膜にはDMD生検筋線維にみられるような細胞膜の部分的消失は認められなかった．

さてDMD筋移植片の再生筋細胞は正常対照筋移植片の再生筋細胞より細い傾向がみられた．そこでそれぞれの症例につき再生筋細胞の直径を測定し，その結果をそれぞれの症例においてmean diameter ± standard deviation（μm）で表示すると表1のようになる．大部分の症例で移植2・3週後までは再生筋細胞の直径は増加し，その後減少する傾向がみられた．

次に正常対照群とDMD群の移植後1，2，3，4週目の標本の再生筋細胞の直径分布のヒストグラムを作製すると図1A，1B，1C，1Dのようになり，移植1週後では特に両者の差は明らかでなかったが，2週，3週ではDMD再生筋細胞の直径分布のヒストグラムは明らかに正常対照に

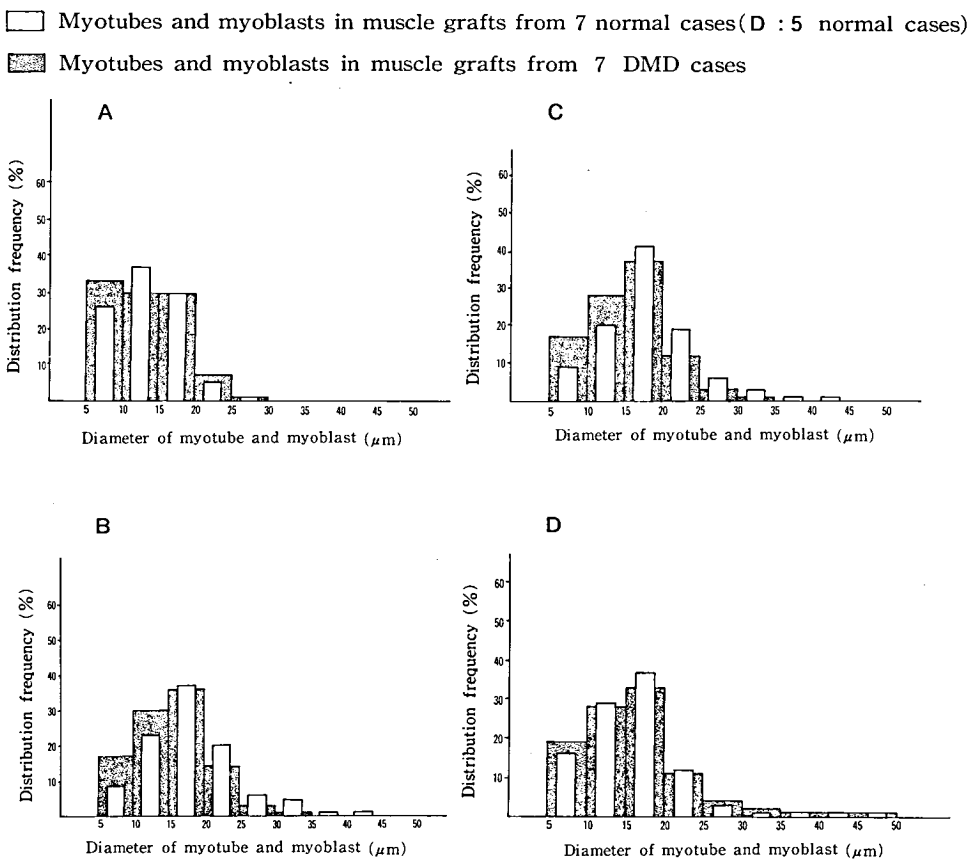


図1　A　Distribution frequency of myotube and myoblast diameter after 1 week of transplantation
B　Distribution frequency of myotube and myoblast diameter after 2 weeks of transplantation
C　Distribution frequency of myotube and myoblast diameter after 3 weeks of transplantation
D　Distribution frequency of myotube and myoblast diameter after 4 weeks of transplantation

表2　Group mean diameters(μm)of cross sectioned myotubes and myoblasts in both normal and DMD muscle grafts at different stages of transplantation

	1 Week	2 Weeks	3 Weeks	4 Weeks
Normal	13.1±0.4[a*] (n=7)[b]	18.2±0.9[a**] (n=7)[b]	18.2±0.5[a***] (n=7)[b]	15.5±0.6[a****] (n=5)[b]
DMD	13.4±0.7[a*] (n=7)[b]	15.3±0.6[a**] (n=7)[b]	16.5±1.0[a***] (n=7)[b]	16.2±1.0[a****] (n=7)[b]

DMD : Duchenne muscular dystrophy

a : Group mean diameter (μm)±standard error of the mean

b : Number of cases

* P>0.5　** P<0.02　*** P>0.1　**** P>0.5

比し太い側で低くなっており，移植4週後に再び両者のヒストグラムはほぼ一致していた．

またDMD群と正常対照群にみられる再生筋細胞直径の差が統計的に有意かどうかを検討するため，両群につき再生筋細胞直径のgroup mean diameter ± standard error of the mean (μm)を求めると移植後1，2，3，4週目では正常対照筋移植片でそれぞれ13.1±0.4 (S.E.)，18.2±0.9，18.2±0.5，15.5±0.6であり，DMD筋移植片のそれは，それぞれ13.4±0.7，15.3±0.6，16.5±1.0，16.2±1.0であり(表2)，移植後2週目においてのみ統計的に有意(P<0.02)にDMD再生筋の直径が細く，移植後3週目ではDMD再生筋の直径が直径分布のヒストグラムなどでやや細い傾向にみられたが，統計的に有意な差ではなかった．

考　察

本症の病因として筋細胞膜異常が唱えられ[2]，本症生検筋線維の初期変化いわゆるδ-lesionを示す部分では電顕的に筋細胞膜の部分的消失がみられており，このような変化は本症のpreclinical stageより観察されている[3]．しかしこのようなδ-lesionやその部分をおおう筋細胞膜の部分的消失は今迄の我々の実験モデルを利用して得られた再生筋細胞には認められなかった．むしろ横管よりなるhoney comb構造などが再生早期より認められ，DMD再生筋では活発なmembrane biogenesisが存在することが確かめられた．

次に再生筋細胞の直径がDMDで細いという事実は興味ある所見である．このことはDMD生検筋に結合織が多いことによる二次的変化ともとれるが，正常対照筋移植片でも移植2週後にはDMD筋移植片と同程度の線維芽細胞など結合織細胞の増殖をみる[1]ので，このような変化はDMD再生筋自体の特性による一次的な変化と考えたい．その原因は不明であるが，筋細胞内での蛋白質[4)5)6)]を含めた物質代謝のDMD及び正常再生筋における違いが存在することが推測される．

最近J. R. Mendellら[6]はlysosomal enzymeでacidic endopeptidaseの1つであるcathepsin DのDMD生検筋細胞内における分布を電顕酵素抗体法により検討し，とくにcathepsin Dは再生筋細胞に増加しており，lysosome様器官やlysosome外の部位に存在していることを報告している．このように再生筋細胞内では種々の物質

代謝がdynamicにおこなわれており，今後，acid phosphatase，各種proteaseなどのlysosomal及びnon lysosomal enzymeの再生筋細胞内での活性局在について検討をする必要があるものと考えられる．また，DMD筋移植片における筋の再生能を，DMD筋移植組織片の一定面積における再生筋線維数あるいは植えつけたDMD筋線維1本当たりの再生筋線維数など各種のparameterを用いることにより検討する必要があるものと考えられる．

文　献

1) Wakayama, Y. & Ohbu, S.: Light-and electronmicroscopic studies of transplanted human dystrophic muscles to nude mice. J. Neurol. Sci., 55: 59—77, 1982.
2) 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—1120, 1975.
3) Wakayama, Y., Bonilla, E. & Schotland, D. L.: Muscle plasma membrane abnormalities in infants with Duchenne muscular dystrophy. Neurology (Cleveland), 33: 1368—1370, 1983.
4) 杉田秀夫，中瀬浩史，石浦章一：Plasmocidによる実験的ミオパチーの筋蛋白分解機構——筋ジストロフィー症との関連——．筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究（三好班），昭和57年度研究報告書，1983，p198—201．
5) 木南英紀，勝沼信彦：筋タンパクの崩壊とリソゾームチオール性プロテアーゼ．筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究（三好班），昭和57年度研究報告書，1983，p195—197．
6) Whitaker, J. N., Bertorini, T. E. & Mendell, J. R.: Immunocytochemical studies of cathepsin D in human skeletal muscle. Ann. Neurol., 13: 133—142, 1983.

14）神経筋疾患における筋衛星細胞および筋核の定量的検討

黒　岩　義五郎*

研究協力者　石　本　進　士*　後　藤　幾　生*

目　的

進行性筋ジストロフィー症では，筋再生の stem cell と考えられる satellite cell（SC）が著明に増加している[1]にもかかわらず筋変性過程は進行する．従ってこれら増加した SC の機能の検討が必要である．昨年度，Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD），多発性筋炎（PM），対照群の SC を電顕にて定量的に検討し，DMD は PM と比較して SC の活性化の程度が少ない事を示唆する所見を得た．今回，緊張性筋ジストロフィー症，筋萎縮性側索硬化症の症例を加え，昨年度に引き続き SC の形態学的定量的検討と，それらの疾患の筋核の検討を加え，進行性筋ジストロフィー症の筋再生能について総合的に検討した．

対　象

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）5 例，多発性筋炎（PM）5 例，緊張性筋ジストロフィー症（MyD）5 例，筋萎縮性側索硬化症（ALS）3 例及び正常対照群（Control）7 例について検討した．

方　法

昨年同様，NEC-PC-8001画像解析装置にて，各症例毎に10個以上の SC の電顕写真を撮り，SC の cytoplasm，nucleus，mitochondria 各々の面積，cytoplasm の全細胞体（cytoplasm ＋ nucleus）に対する面積比，mitochondria の cytoplasm に対する面積比，mitochondria 数について定量的分析を行なった．又，simple counting 法[2]にて，上記神経筋疾患及び正常対照群における筋鞘下核の euchromatin の全 chromatin に対する面積の割合を算出し，以前に報告した SC の chromatin の面積の割合と合わせて検討した．

結　果

別表の如く，SC に関しては，PM は対照群と比較して細胞体の面積，mitochondria 数及び nucleus の短径に，ALS は mitochondria の面積の割合に有意の増加を認めた．又筋核の euchromatin の面積の割合は ALS, DMD, PM で有意の増加を認めた．一方 DMD，MyD では SC の各項目で，対照群と比較して有意な差異は認められなかった．

考　察

昨年度報告した如く，多発性筋炎の SC は数の増加のみならず，cytoplasm，mitochondria 数，又核の大きさも増大し，その機能は活発と考えられ，臨床的には経過が良好な事，筋病理学的に筋再生能が盛んである事と対応する所見と考えられた．一方，DMD は対照群と比較して SC 数は増加し，cytoplasm，核の径，mitochondria 数の増加傾向を認めるが，有意差を得る迄には至らず，DMD の SC の機能亢進の程度は PM とくらべて少ないと考えられた．又，MyD も SC 数の増加にもかかわらず，cytoplasm，核，mitochondria 等では対照群と明らかな差異を認めず，SC の機能は，PM，DMD よりもさらに活性化の程度が少ないと考えられた．一方，ALS は SC 数の増加は認めないが，mitochondria の面積の cytoplasm に対する面積の割合の増加を認めた事より，又

＊九州大学医学部脳研神経内科

Morphometry of satellite cell and myonucleus

	SC								SCN	MN
	cyto (um^2)	N (um^2)	cyto(%) / N+cyto	No. of mito	mito (um^2)	mito / cyto (%)	N (L) (um)	N (S) (um)	euchromatin %	euchromatin %
Control (n=7)	5.78 ±1.44	6.82 ±1.27	46.34 ±5.30	2.57 ±0.85	0.188 ±0.101	3.28 ±1.59	4.67 ±0.85	1.77 ±0.28	50.71 ±4.67	70.12 ±1.72
ALS (n=3)	5.36 ±0.84	5.94 ±0.60	49.22 ±4.70	3.77 ±0.86	0.352 ±0.153	6.27* ±1.71	3.98 ±0.41	1.73 ±0.11	55.82 ±4.61	75.24* ±5.10
MyD (n=5)	5.97 ±1.79	6.96 ±1.84	46.92 ±3.58	3.22 ±0.67	0.286 ±0.083	4.59 ±1.07	4.84 ±0.94	1.76 ±0.36	47.36 ±8.45	68.56 ±1.70
DMD (n=5)	6.85 ±0.85	8.08 ±1.82	46.33 ±2.67	3.15 ±1.00	0.162 ±0.062	2.44 ±1.01	5.14 ±0.73	1.99 ±0.12	54.38 ±1.86	75.15*** ±3.04
PM (n=5)	8.21* ±1.78	8.25 ±1.24	48.82 ±6.12	4.77* ±2.38	0.257 ±0.090	2.73 ±0.50	4.63 ±0.62	2.29* ±0.33	61.44** ±7.57	78.55**** ±4.30

SC: Satellite cell
SCN: Satellite cell nucleus
MN: Myonucleus

cyto: cytoplasm
N : nucleus
mito: mitochondria
L : diameter of long axis
S : diameter of short axis

Mean ± SD
Student t-test:
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$, **** $p<0.001$

Ontell らは脱神経による SC の活性化を報告しており[3] ALS のこの変化は脱神経による影響の可能性も考えられる．又，今回の筋核の euchromatin の全 chromatin の面積に対する割合の検索より，対照群と比較して，PM, ALS, DMD で有意の増加を認めた．これはすでに報告した SC 核の euchromatin の面積の割合の増加と対応している．核の euchromatin の割合は，細胞機能の活性化で増加すると考えられており[4]，この euchromatin の割合の検索からは，PM, ALS, DMD は SC のみならず，筋線維自体にも機能亢進状態を認めると考えられる．ただし，前述した如く，今回の SC の細胞体及びその小器官の検討より，PM と比較すると，DMD, MyD 及び ALS の SC は互いに質的には異なるが，何らかの機能亢進の阻害がある可能性が示唆された．又，筋核の検討より，SC の機能は残存する筋線維の機能状態を反映しているとも考えられ，今後，SC と筋線維の相互作用の検討も必要である．

文　献

1）黒岩義五郎，石本進士，後藤幾生：筋疾患における satellite cell の検討．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」(三好班)，昭和56年度研究報告書，1982，p.95.

2) A. D. Hally: A counting method for measuring the volumes of tissue components in microscopical sections. Quart. J. Micr. Sci., 105: 503—517, 1964.

3) M. Ontell: Muscle satellite cell: A validated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following denervation. Anat. Rec., 178: 211—228, 1974.

4) Derenzini, M. and Bonetti, E.: Cycloheximide-induced ultrastructural changes in hepatocyte nuclei in partially hepatectomized rats. Virchows Arch. B cell Path., 19: 115—125, 1975.

15）筋再生に関する研究—衛星細胞活性化因子の検討—

小　口　喜三夫*

研究協力者　中　台　　昭*　柳　沢　信　夫*

目　　的

筋衛星細胞が如何にして活性化され，筋細胞へ分化を開始するかは筋再生の研究に重要な課題である．私達は本年度も昨年度にひき続き^{3}H-thymidineを使用しラジオオートグラフィーにより，神経切断，血流遮断，自律神経ブロック（reserpine投与）の影響について比較検討したので報告する．

対象・方法

生後15日のddy系雄マウス各々10匹について右後脚の坐骨神経切断，右後脚を近位部で手術縫合糸で血流遮断（30分間），共に左後脚はコントロールとした．Reserpine 1.25mg/kgの腹腔内注射を行った．これらの処置24時間後からそれぞれに^{3}H-thymidine 30～50μCi/bwgを4回に分け，6時間毎に腹腔内注射した．最終注射6時間後，すなわち実験開始48時間後に後脚のgastrocnemiusを採取，5％グルタールアルデヒドで固定．カコジレート緩衝液中にて24時間以上洗滌後1％オスミウム酸で1時間再固定．シリーズアルコールとプロピレンオキシドで脱水，epon-aralditeに包埋．厚さ1 μmの標本を作製しdipping法[1]によりSAKURA NRM$_2$を塗布．4℃の冷蔵庫内で3～4週間露出．SDX-1で現像，ハイポで定着．トルイジンブルーで淡く染色後各標本を油浸レンズで観察．標本中の総ての^{3}H-thymidineでラベルされた衛星細胞核，筋核を算出し，標本の面積を画像解析装置で測定．1 mm^{2}の単位面積のラベルされた核数をlabeling indexとした．神経切断群は

$$\frac{\text{1視野中のラベルされた衛星細胞・筋細胞核}}{\text{1視野中に観察された総ての核数}}\times 100$$

結　　果

神経切断群のlabeling indexは1.36±0.3，コントロール0.28±0.06[2]，血流遮断群，reserpine投与群はそれぞれ20.30±9.26，1.09±0.2，コントロールは7.60±3.94であった．神経切断群，血流遮断群で衛星細胞核・筋細胞核への^{3}H-thymidineの取り込みが増加（図1，図2），reserpine投与群で低下傾向を認めた．組織学的には血流遮断群で出血，筋細胞壊死，phagocytosisが認められたが，他群では正常であった．

考　　察

実験的小血管の塞栓による筋の変化は，Hathawayら[3]によると局所性のグループ壊死，局所性グループ再生，散在性の筋線維壊死と再生，中心核の増加，結合織の増加などがみられ，筋ジストロフィー症に近い所見である．これらの所見のうち再生が認められることに注目して血流遮断により筋衛星細胞が活性化されるか否かについて検討したが，本実験では，一部に筋線維壊死，phagocytosisが認められ，筋束全体に散在性の筋衛星細胞の活性化が観察された．血流遮断の結果として種々の影響が考えられるが，hypoxiaは最も重要なもののひとつで，筋衛星細胞の活性化に重要な役割を演じていると考えられる．

Reserpineの大量投与[4]は薬理作用として自律神経終末からnoradrenalineを放出させ，非可逆的変化を起こさせて自律神経をブロックするが，

＊信州大学医学部第三内科

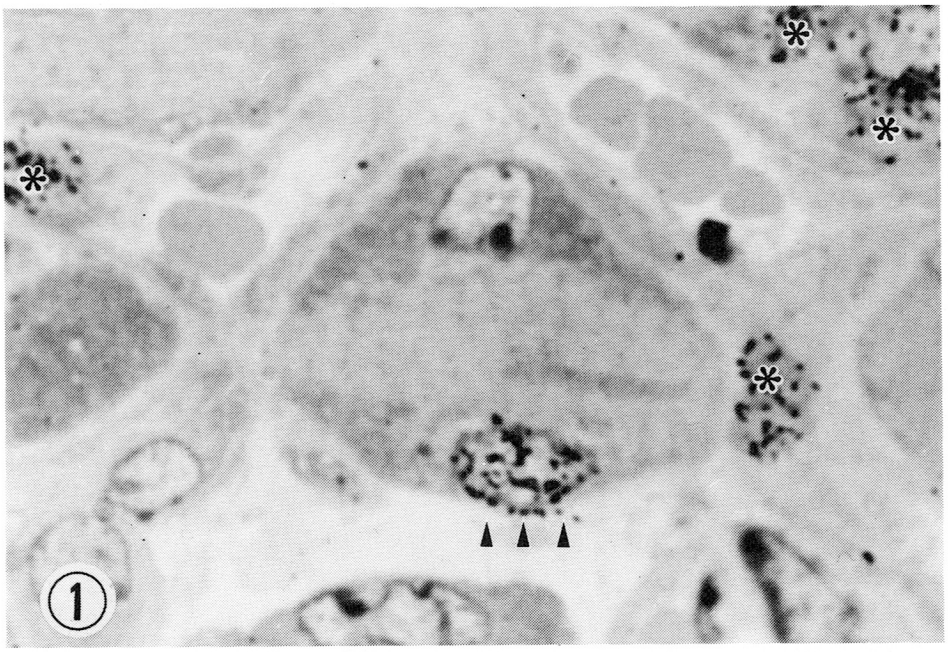


図 1　血流遮断群　矢頭は^{3}H-thymidine 取り込みの筋核.
＊は^{3}H-thymidine 取り込みの血管内皮細胞核. ×1,000.

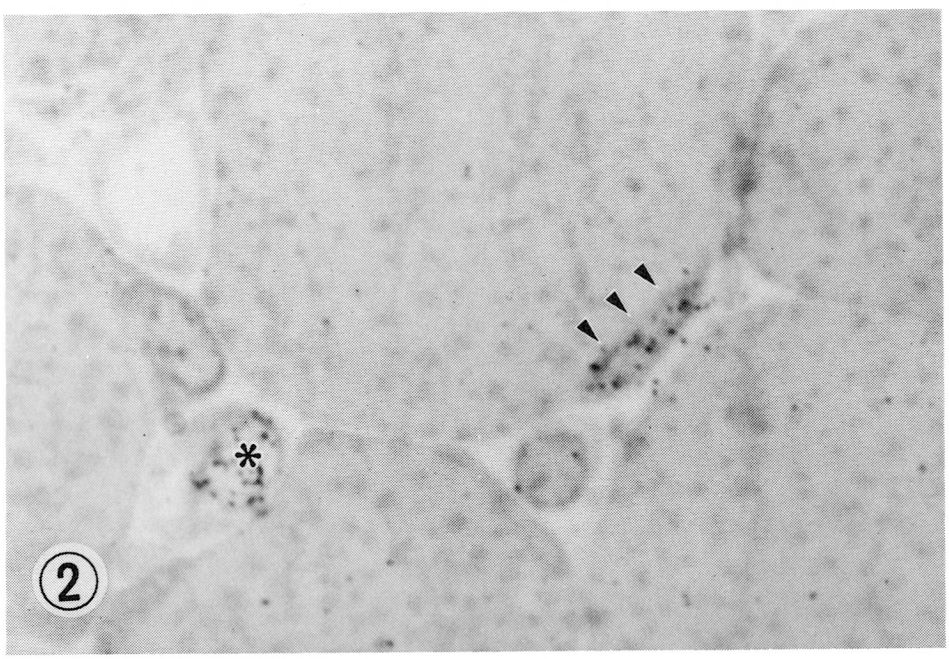


図 2　血流遮断群　矢頭は^{3}H-thymidine 取り込みの衛生細胞核.
＊は fibroblast. ×1,000.

本実験では reserpine 1.25mg/kg を使用し，投与後24時～48時間を経ているので，自律神経の作用は完全にブロックされていると考えられる．この時点で筋衛星細胞の活性化の低下傾向が認められたことは，筋衛星細胞の活性化には自律神経支配が必要なことを示唆するものである．一方神経切断群においても自律神経はブロックされるが，ブロック作用は緩徐であり，切断後48時間では神経終末からの noradrenaline は放出が続いており，活性化を促進している可能性もあり，今後実験をかさね，検討する予定である．

ま と め

マウスにおいて坐骨神経切断，血流遮断，reserpine 投与を行い，48時間後の筋衛星細胞の活性化を^{3}H-thymidine を用いたラジオオートグラフィーで検討した．神経切断群，血流遮断群で筋衛星細胞の活性化がみられ，reserpine 投与群で活性化の低下傾向がみられた．

文　　献

1) 永田哲士，柴田　治，名和橙黄雄：ラジオオートグラフ多量作製のための簡便法．解剖学雑誌，42：162，1967．

2) 小口喜三夫，羽生憲直，柳沢信夫：神経切断による筋衛星細胞の活性化について．筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究（三好班），昭和57年度報告書，1983，p.44．

3) Hathaway, P.W., Engel, K.W. and Zellweger, H.: Experimental myopathy after microarterial embolization. Arch. Neurol., 22: 365, 1970.

4) Banks, P., Kapeller, K. and Mayor, D.: The effects of iproniazid and reserpine on the accumulation of granular vesicles and noradrenaline in constricted adrenergic nerves. Br. J. Phamac. Chemother, 37: 10, 1969.

16）筋緊張性ジストロフィーにおけるSatellite cellの電顕的研究

茂在敏司*

研究協力者　河村　宏*　小西慎吾*　増井義一*
竹中正純*　篠田恵一*

Satellite cellは，1961年Mauro[1]により，カエルの骨格筋で筋線維のbasement membraneとplasma membraneの間にはさまれた細胞として発見された．以来，多くの主として実験的研究がなされ，筋再生及び肥大化現象に重要な役割を演じていると考えられている．各種筋疾患において，satellite cellが増加することは，すでに当班会議において，黒岩ら[2]が報告している．今回我々は，進行性筋萎縮疾患の病態解明に関連して，myotonic dystrophyにおけるsatellite cellの増加がいかなる筋線維に由来するかを検討した．

対　象

21歳（case K. N.），50歳（case K. I.），54歳（case S. H.）の男性myotonic dystrophy 3名の生検筋組織について検討した．被検筋は1例が大腿四頭筋，他の2例が上腕二頭筋で，筋力はいずれもMMTで4^+程度であった．

方　法

通常の手技にて筋生検を施行．2.5%グルタールアルデハイドと1%オスミウム酸にて2重固定後エポン包埋した．約1μのエポン包埋横断面切片をトルイジンブルーにて染色，100倍の光顕写真を作製し，同光顕切片に連続する超薄切片より電顕的にsatellite cell及びsubsarcolemmal nucleiを観察し，光顕写真の対応する筋線維上にプロット，筋線維短径とsatellite cellとの関係をhistometricalに検討した．又，同時にsatellite cellのtotal subsarcolemmal nucleiに対する割合（以下% satellite cell nucleiと略す）を算出した．一方，エポン包埋横断面及び縦断面切片にてsatellite cellとparent fiberの構造異常について検討した．

結　果

3例の% satellite cell nuclei及び光顕，電顕による筋線維異常の有無を表1に示した．% satellite cell nucleiはcase K. N.で6.5%，case K. I.で10.9%，case S. H.で11.6%であった．健常者コントロールについては，今回我々は検討していないため，若山[3]ら及び黒岩らのデータを参照した．

エポン包埋トルイジンブルー染色標本の光顕観察では，case K. N.の筋線維には著変をみなかった（図1a）．又，case K. I.では一部に変性線維（図1b）を，case S. H.では一部に壊死線維（図

表1　Quantitative analysis of satellite cell populations in myotonic dystrophy

	age	muscle	% S.C.N.	abnormality in L.M.	abnormality in E.M.
Case K.N.	54	q.f.	6.5	−	+
Case K.I.	50	biceps.b.	10.9	+	+
Case S.H.	21	biceps.b.	11.6	+ (necrotic fiber +)	+
normal control					
Wakayama et.al. 1979 (4cases)	12～15	q.f.	4.14～4.67		
Kuroiwa et.al. 1981			4.32±1.29 (Mean±SD)		

% S.C.N.: satellite cell nuclei / (subsarcolemmal nuclei + satellite cell nuclei) ×100
L.M.　: light microscopy
E.M.　: electron microscopy

*大阪医科大学第一内科

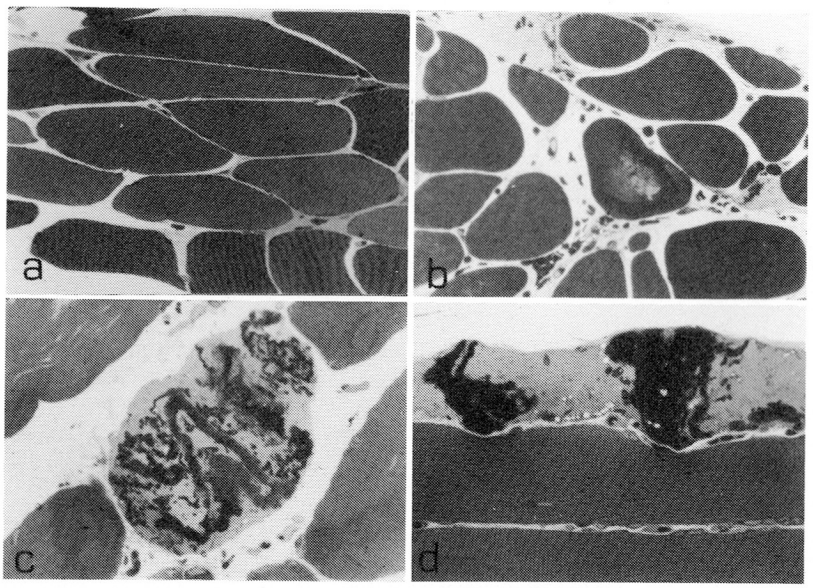


図1　エポン包埋トルイジンブルー染色　×200
a：case K. N.　明らかな変性を示す線維を認めない.
b：case K. I.　少数ではあるが明らかに変性した線維を認める.
c：case S. H.　少数の壊死線維を認める.
d：case S. H.　縦断面.

1 c）を認めたが，大多数の線維には著変をみなかった．電顕による観察では，光顕にて一見正常と思われた線維の多数に種々の構造異常を認めた．たとえば図2 aにみられる筋鞘膜下に筋原線維構築の破綻，ゴルジ装置と隣接して一次ライソゾームと思われる dence body の出現，myelin figure の出現等が認められた．図2 bは case S. H. の大多数をしめる光顕レベルでは明らかな異常を認めない筋線維の電顕像であるが，下方の筋鞘膜下に myelin figure と vacuole の出現を認め，上方の線維には活性化した satellite cell（粗面小胞体，ミトコンドリア等の増生，筋原線維様フィラメント構造の出現をみる）が認められた．satellite cell のほとんどは，これらの光顕では明らかな異常がなく電顕で軽度の構造異常をみる線維に認められるものであった．case S. H. に認められる壊死線維にも少数ながら satellite cell は観察されるが，cytoplasma 成分の減少（図2 c），小空胞の出現（図2 d）等の著明な変性像を呈し，satellite cell，parent fiber 双方の plasma membrane が不明瞭化していた．また一部のこのような変性した satellite cell にも myofilament 様の構造物も認められた（図2 e，f）．

図3は筋線維短径別に satellite cell 数及び筋線維数をあらわしたヒストグラムである．case K. N. では筋線維は短径40μ をピークとして分布し，10μ 以下の萎縮線維は8％にみられた．case K. I. でも筋線維は40μ をピークとして分布，10μ 以下の線維は18％，case S. H. では，筋線維は30μ をピークとして分布，10μ 以下の線維は4％であったが，70μ 以上の肥大線維も少数みられた．3例とも10μ 以下の線維には，myoblast と思われる線維は存在するも，形態学的に satellite cell と同定できるものは認められなかった．10μ 以上の線維においては，satellite cell は全般に分布し，特定の線維径に分布するものではなかった．ただ case S. H. の70μ 以上の肥大筋線維には高頻度に分布していた．

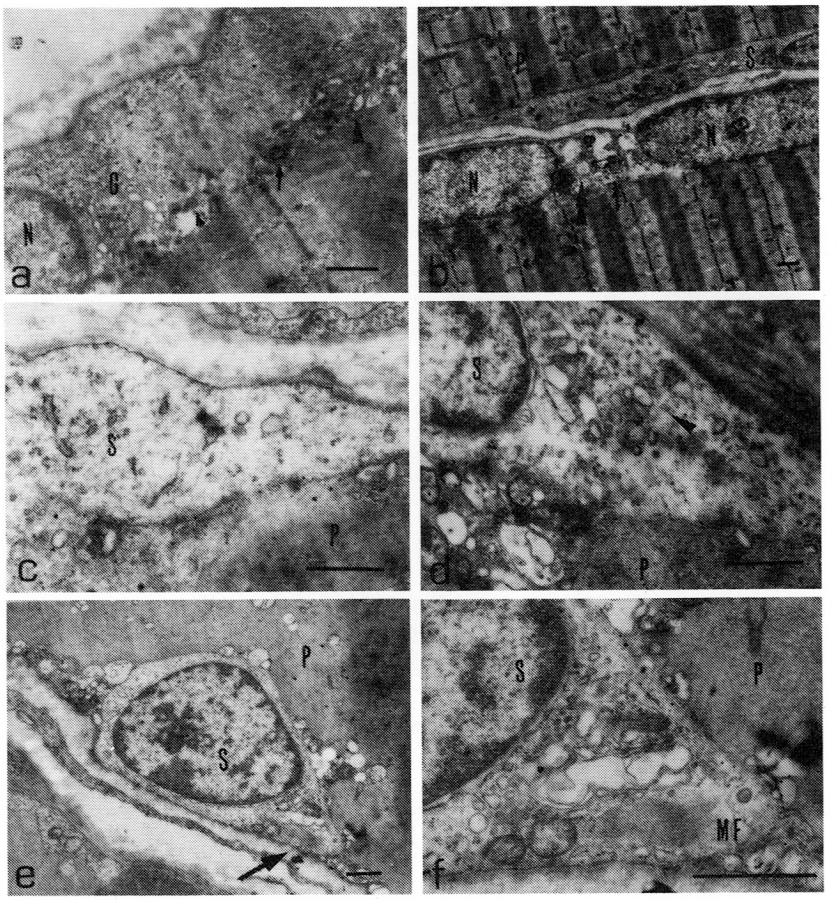


図2　a：case K. N. 光顕で一見正常と思われた線維．
筋鞘膜下に筋原線維構築の破綻，ゴルジ装置に隣接して一次ライソゾームと思われる dence body の出現，myelin figure の出現，小空胞の出現を認める．

b：case S. H. 下の線維に myelin figure，空胞をみる．上の線維に活性化した satellite cell を認める．

c：case S. H. 壊死線維にみられた satellite cell．cytoplasma 成分の減少が認められる．

d：同上　小空胞の出現をみるものもある．

e：同上　myofilament 様の構造物も認められる．

f：e の拡大像

N：subsarcolemmal nuclei

S：satellite cell

P：parent fiber

▲：一次ライソゾームと思われる dence body

↑：myelin figure

▲：小空胞

↑：空胞

↑：myofilament 様構造物

MF：myofilament 様構造物

G：ゴルジ装置

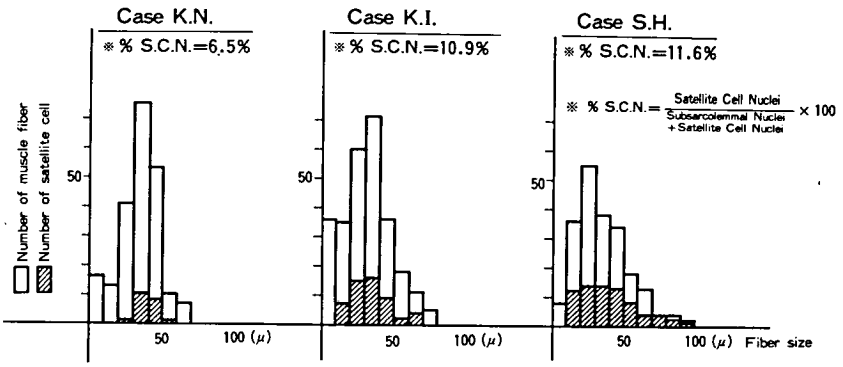


図3

考　　案

今回我々の検索したMyotonic dystrophy患者の生検筋組織における%satellite cell nucleiは6.5～11.6%と黒岩らの報告とほぼ一致した増加を示した．いずれの症例でもsatellite cellは短径10μ以上の筋線維に全般的に分布し，特定の線維径に分布するものではなかった．ただcase S. H.には，短径70μ以上の肥大線維の出現が認められ，これらの線維にはsatellite cellが高頻度に認められることにより，myotonic dystrophyにおけるsatellite cellの増生には線維の肥大化現象も一部関連する可能性が示唆された．

一方，筋線維の構造異常とsatellite cellの関係については，光顕で明らかな異常を認めないcase K. N.では%satellite cell nucleiが6.5%と正常の上限ないし軽度高値を示すが，少数ではあるが高度の変性線維を認めるcase K. I., case S. H.の%satellite cell nucleiは10.9%，11.6%と明らかな高値を示す傾向がうかがえた．しかし，観察されたsatellite cellの大多数は，光顕では異常なく，電顕的構造異常を有するのみの程度の線維に存在するものであり，壊死線維自身のsatellite cellは多くなく，みられるものは高度変性を示していた．以上のことより，myotonic dystrophyにおけるsatellite cellの増加の主座は，電顕的にのみ軽度異常を呈する筋線維にあるが，高度変性線維の存在がsatellite cell増加と関連をもつ可能性も示唆された．変性したsatellite cellの中には，myofilament様構造を有するものもあることより，ある程度活性化した後，変性におちいった可能性が推測された．このようなparent fiberとsatellite cell両者に起る変性がmyotonic dystrophyに特有なものなのか，他の疾患においても認められる現象であるのかについては，今後さらに症例数及び疾患範囲を広げ検討したい．

結　　論

①myotonic dystrophyの%satellite cell nucleiは高値を示した．

②satellite cellは短径10μ以上の線維全般に略均等に分布したが，肥大線維が存在する場合には，その線維に高頻度に認められた．

③より強い変性線維の存在する場合にsatellite cell増加の強い傾向がうかがえた．

④観察されたsatellite cellの大多数は，電顕的にのみ見られる構造異常を有する軽度の変性にとどまる筋線維に存在するものであった．

⑤高度変性線維にもsatellite cellは少数認められたが，satellite cell自身も変性していた．

文　　献

1) Mauro, A.: Satellite cell of skeletal muscle fibers. J. Biophys. Biochem., 9 : 493—495
2) 黒岩義五郎，石本進士，後藤幾生；筋疾患におけるsatellite cellの検討．厚生省「筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究」(三好班) 昭和56年度研究報告書，1982，pp.95—96.
3) Wakayama, Y., Schotland, D. L., Bonilla,

E. & Orecchio, E. : Quantitative ultrastructural study of muscle satellite cells in Duchenne dystrophy. Neurology (Minneap.), 29 : 401—407, 1979.

17）筋ジストロフィー骨格筋における delta lesionの検討

高　瀬　貞　夫*

研究協力者　小　林　和　夫*　小　暮　久　也*

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー症（以下DMDと略）における赤血球膜異常，筋細胞膜異常が報告されている．特に形態的には病初期の筋細胞膜下病変が注目されている[1]．今回我々はDMD及びその他の神経筋疾患において筋細胞膜下の楔状病変，いわゆるdelta lesionの定量的検索及び電顕的検索を行ない，opaque fiber，再生線維との関連について検討したので報告する．

対象及び方法

検索対象は罹病期間4年以内のDMD 7例，肢帯型筋ジストロフィー症3例，多発性筋炎6例，筋萎縮性側索硬化症4例の計20例である．

生検筋は2％glutal aldehyde，1％四酸化オスミニウムで固定，エポン包埋し，トルイジンブルー染色標本を作製した．約300～1000個の筋線維の中から，図2-A，Bに示すような細胞膜側を底辺とし，細胞質側の辺縁が筋原線維の過収縮で囲まれた筋細胞膜下病変，いわゆるdelta lesionを有する筋線維，及びopaque fiberを数え，筋線維に対する割合を算出した．さらにdelta lesionはopaque fiberにみられるもの（図2-A）とnon opaque fiberにみられるもの（図2-B）とに分類して算出し，電顕的にも検索した．尚人工的にできたopaque fiber，delta lesionをなるべく除くため，標本周辺部の一層の筋線維群を検索対象から除外した．再生線維については，56年度本班会議で報告したごとく，凍結切片のmethyl green pyronine染色標本を用い，RNA増加筋線維を数えた．

＊東北大学医学部脳研神経内科

結　果

(1) delta lesionを有する線維，opaque fiber，再生線維の定量的検索．

delta lesionを有する筋線維（表1）はDMDで3.11±2.15％に出現し，有意に増加（その他の神経筋疾患と比較し，P＜0.001）しているが，多発性筋炎では1例でわずかに出現（0.07±0.16％），肢帯型筋ジストロフィー症，筋萎縮性側索硬化症では出現しなかった．opaque fiberについても

表1　種々の神経筋疾患におけるdelta lesionを有する線維，opaque fiber，再生線維の定量

case	age, sex	fibers with delta lesions	opaque fibers	regenerated fibers
Duchenne Dystrophy				
1	2.17 M	1.97%	4.44%	1.72%
2	3.83 M	0.37	0.53	-
3	4.92 M	6.47	5.07	0.39
4	5.33 M	5.11	3.63	1.76
5	6.08 M	1.45	1.55	2.63
6	6.75 M	3.82	1.55	2.04
7	11.17 M	2.55	1.82	1.09
		3.11±2.15*	2.66±1.71*	1.60±0.78
Limbgirdle Dystrophy				
1	20 F	0	0	2.23
2	24 F	0	0	1.66
3	30 F	0	0	0.11
				1.33±1.10
Polymyositis				
1	21 M	0	0	0.26
2	21 M	0	0.26	1.67
3	40 M	0	0	0
4	49 F	0.40	0.20	4.70
5	53 F	0	0	1.31
6	57 M	0	0	1.24
		0.07±0.16	0.08±0.12	1.53±1.68
ALS				
1	33 M	0	0	0
2	36 M	0	0	0
3	61 M	0	0	0
4	67 M	0	0	0

*; p<0.001, p values are based on comparison between duchenne dystrophy and other neuromuscular disorders

DMDで2.66±1.71%と有意に増加（その他の神経筋疾患と比較し，P＜0.001)しているが，多発性筋炎では2例でわずかに出現（0.08±0.12%)，肢帯型筋ジストロフィー症，筋萎縮性側索硬化症では出現しなかった．再生筋線維については，DMDで1.60±0.78%，肢帯型筋ジストロフィー症で1.33±1.10%，多発性筋炎で1.53±1.68と増加していたが筋萎縮性側索硬化症では出現しなかった．

delta lesionを有する線維数とopaque fiber数の相関をみると(図1)，相関係数r＝0.696，y＝0.56x＋0.93の関係がみられた．回帰直線より最も離れている症例は最年少で罹病期間も最も短い

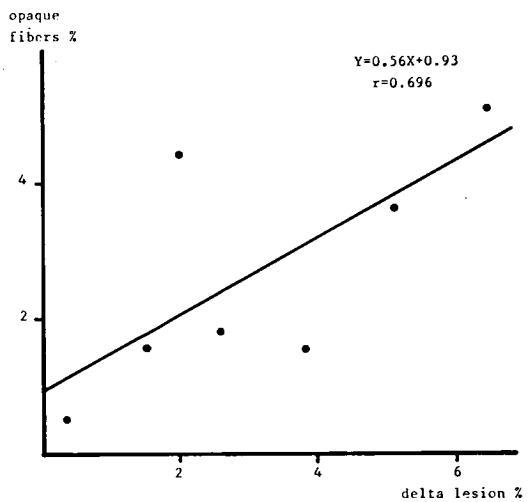


図1　DMDにおけるdelta lesionを有する線維数とopaque fiber数との相関

症例（症例1）であり，症例1を除くと相関係数はr＝0.930であった．又delta lesionを有する筋線維数と再生線維数との間には負の相関（y＝−3.01x＋2.50，r＝−0.74）がみられた．

DMDにおいて，delta lesionがopaque fiberにみられる場合とnon opaque fiberにみられる場合を比較すると（表2)，non opaque fiberにみられる場合（70.6±9.1%）はopaque fiberにみられる場合(29.4±9.1%)より有意(P＜0.001)に増加していた．

表2　DMDにおけるdelta lesionを有するopaque fiberと，delta lesionを有するnon opaque fiberとの比較

	opaque fibers with delta lesions	non opaque fibers with delta lesions
case 1	37.6 %	62.4 %
2	40.5	59.5
3	36.9	63.1
4	29.0	71.0
5	14.5	85.5
6	18.8	81.2
7	28.6	71.4
mean+SD	29.4±9.1*	70.6±9.1*

*;P<0.001

(2) delta lesionの形態学的検討

光顕的にはDMDのdelta lesionは，筋線維横断切片で1本の筋線維に1～数個みられ，局所的な筋原線維の過収縮を伴う（図2-A，B)．delta lesionが1本の筋線維に多数みられ(図2-C)，局所的な筋原線維の過収縮が互いにつながり合って，opaque fiberに移行してゆくと考えられる所見もみられる（図2-D)．筋線維縦断切片（図2-E）では，時にdelta lesion辺縁の筋原線維の過収縮部に接して過伸展部をみとめる．

電顕的には形質膜は正常の場合，基底板下にosmophilicにみられる（図3-B)．光顕的には判別できない軽度に変性したDMD筋線維では，形質膜の部分的な破壊消失がみられる．光顕で認められたdelta lesion部では変性した筋原線維，空胞，ミトコンドリア，グリコーゲン顆粒，脂肪滴の増加を認め，辺縁は過収縮状態の筋原線維で囲まれている(図3-A)．delta lesionの辺縁部の形質膜は部分的な破壊消失を認め（図3-C)，delta lesion中央部の形質膜はまったく消失していた．しかし基底板は残存していた（図3-D)．opaque fiberにおける形質膜は完全に消失し，基底板は残存していた．

考　　察

DMD骨格筋におけるopaque fiberの出現は古くから記載されているが，人工的にも容易に出現しやすくあまり注目されなかった．しかし近年

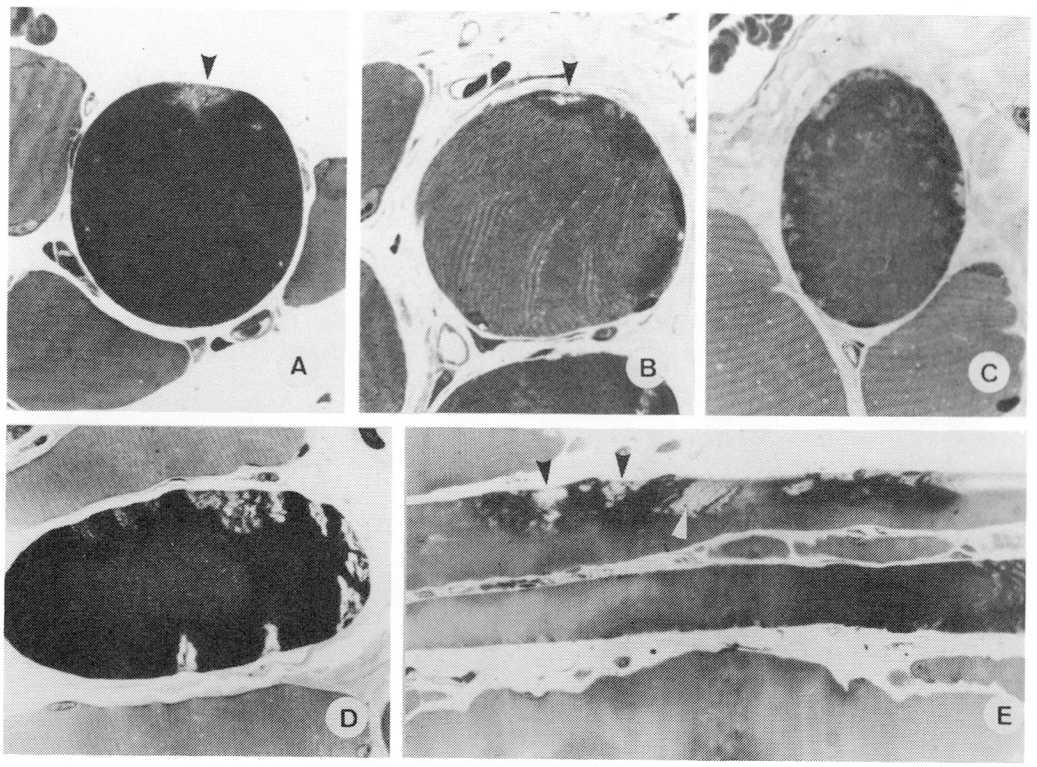


図2　DMD 骨格筋の光顕写真（トルイジンブルー染色）
delta lesion は opaque fiber に伴う場合（A，×400），non opaque fiber に伴う場合（B，×400）があり，時に筋細胞膜下に多発したり（C，×400），opaque fiber への移行像と考えられる所見もみられる（D，×400）．筋線維縦断像（E，×200）では delta lesion（黒矢印）の周囲に筋原線維の過収縮と過伸展（白矢印）がみられる．

opaque fiber はその他の神経筋疾患に比較し，DMD で著増している事が明らかにされ[2]，たとえ opaque fiber が人工産物としても DMD では opaque fiber ができやすい病態であると考えられている．従って人工的所見を考慮に入れつつ opaque fiber の成因をさぐる事は DMD の本質解明に意義ある事と考えられる．本研究では人工的にできた opaque fiber，delta lesion を除くため標本周辺部の一層の筋線維群を検索対象から除外し，DMD 及びその他の神経筋疾患の生検材料をすべて同じ方法で固定，包埋し比較検討した．

その結果 opaque fiber は DMD の全例で増加しており，平均2.7%の筋線維にみられた．その他の神経筋疾患ではほとんど出現せず，DMD で明らかな有意（$P<0.001$）の増加がみられた．Bodensteiner ら[2]も DMD できわだった増加（4.3%，$P<0.001$）を指摘している．opaque fiber は筋細胞質内のカルシウムの増加，筋原線維の過収縮状態，calcium activated neutral protease の活性化が証明されており，筋崩解過程の進行した所見と考えられている．opaque fiber の初期像としては局所的な筋細胞膜下病変，いわゆる delta lesion が注目されている．そこで DMD における delta lesion を有する線維について検討を行なった．その結果，DMD で3.1%の筋線維に出現しており，Mokri らの報告（4.2%）と近似してい

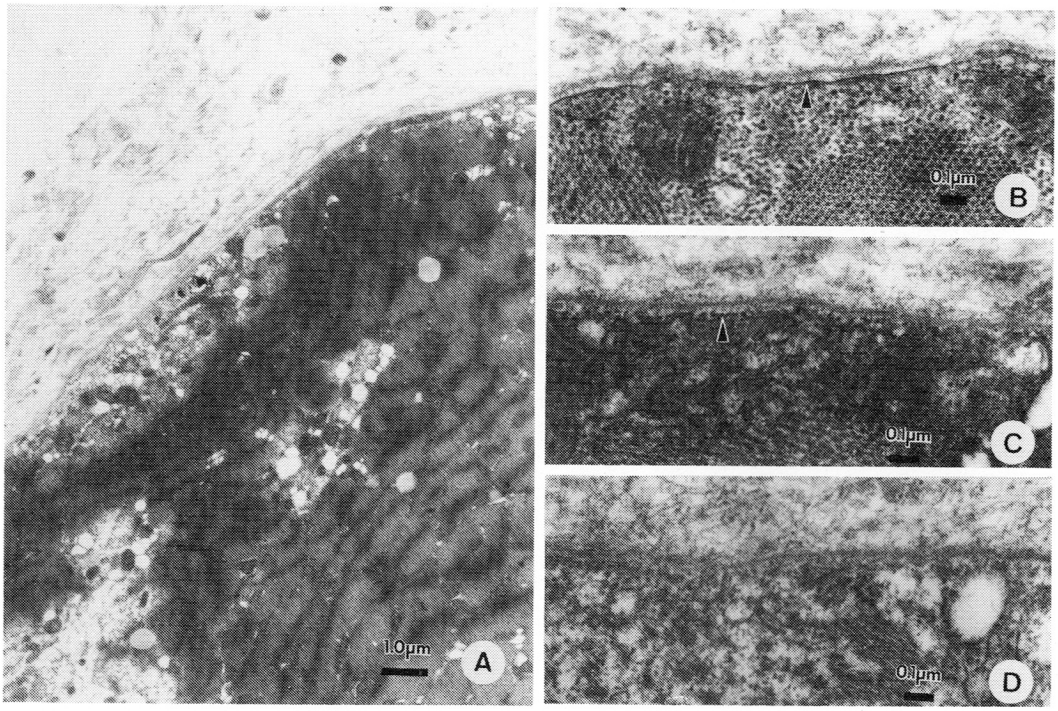


図3　DMD 骨格筋の電顕写真
delta lesion 部では変性した筋原線維，空胞，ミトコンドリア等がみられ，周囲に筋原線維の過収縮がみられる（A，×4,000）．変性の少ない筋線維の形質膜（B，矢印，×25,000）に比較して，delta lesion 辺縁部での形質膜の部分的な破壊消失（C，矢印，×30,000），delta lesion 中央部での形質膜の完全な消失がみられ，基底板だけ残存している（D，×30,000）．

た[1]．我々はその他の神経筋疾患においても検討したが，delta lesion はほとんどみられず，DMD では opaque fiber と同様に，有意に増加（P＜0.001）している事がわかった．

さらに今回の検索により DMD において，① delta lesion を有する線維と opaque fiber 数との相関より，delta lesion は opaque fiber 形成と密接に関連する病変であると考えられた事，② delta lesion は opaque fiber にみられる場合より，non opaque fiber にみられる場合がきわめて多い事，③形態的に delta lesion における局所的筋原線維の過収縮がしだいにひろがり，opaque fiber との移行像とも考えられる所見のある事，④ delta lesion 部に一致した形質膜の破壊消失がみられる事等が明らかになり，delta lesion は opaque fiber の初期病変であり，形質膜の障害に基づく病変であることが示唆された．

Bodensteiner らは DMD 骨格筋のカルシウム染色標本より，opaque fiber のみならず，non necrotic fiber の筋細胞膜下にカルシウム沈着が delta 状，環状に認められた事を報告し，筋細胞膜の異常透過性を指摘している[2]．Mokri らは peroxidase 水溶液にひたした DMD 骨格筋標本において，delta lesion 部から細胞内への peroxidase の流入を確認している[1]．Pestronk らは実験的に細胞膜を障害する物質（lysolecithin, deoxycholate, triton X 等）を筋肉内投与し，delta lesion が作製できる事を報告している[3]．これら

の研究結果からもDMDにおけるdelta lesionは形質膜の障害による初期病変である事がしだいに確かめられつつある．今後さらにDMD骨格筋における形質膜の形態的，機能的異常を明らかにする事が重要であろう．

ま と め

DMD骨格筋においては

① delta lesionを有する線維は3.11±2.15%，opaque fiberは2.66±1.71%にみられたが，その他の神経筋疾患ではほとんど出現しなかった．

② delta lesionを有する線維はopaque fiber数と$y=0.56x+0.93$，$r=0.696$の相関がみられ，opaque fiberの形成と密接に関連する病変と考えられた．

③ delta lesionはopaque fiberにみられる場合（29.4±9.1%）より，non opaque fiberにみられる場合（70.6±9.1%）の方が有意に増加しており，DMDの初期病変である事が示唆された．

④ delta lesionの電顕的検索では，delta lesion部の形質膜の破壊消失が高率にみられ，且つ辺縁部の筋原線維の過収縮が認められた．

以上の結果よりDMDにおけるdelta lesionは，変性初期病変であり形質膜に本質的異常があると考えられた．

文 献

1) Mokri, B. & Engel, A. G.: Duchenne dystrophy. Electron-microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma menbrane of the muscle fiber. Neurology (Minneap.), 25: 1111, 1975.

2) Bodensteiner, J. B. & Engel A. G.: Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies. A study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. Neurology (Minneap.), 28: 439, 1978.

3) Pestronk, A., Parhad, I. M., et al.: Membrane myopathy, Morphological similarities to Duchenne muscular dystrophy. Muscle & Nerve, 5: 209, 1982.

18) Duchenne 筋ジストロフィー症生検筋細胞膜の Orthogonal array subunit particle について
——Freeze fracture 法による検討——

若 山 吉 弘*

研究協力者　岡 安 裕 之* 渋 谷 誠 二* 熊 谷 俊 幸**

はじめに

Duchenne 筋ジストロフィー症（以下 DMD）における筋線維崩壊過程において，筋細胞膜異常が注目され種々の生化学的，形態学的根拠が示されてきている．とくに筋細胞膜の形態異常については Mokri & Engel[1] の電顕による筋細胞のいわゆる δ-lesion 部をおおう筋細胞膜の部分的消失の報告以来，多くの追試がなされ，このような変化は preclinical stage[2] から見られることが報告されている．更に lectin による電顕細胞化学的方法[3] や freeze fracture 法を用いて筋細胞膜内面やその表面構造の変化が報告されてきている．とくに freeze fracture 法は生物細胞膜構造を観察するのに適しており，−110〜−120℃，4〜6×10^{-7}Torr 程度の高真空下で試料を凍結割断すると，細胞膜はその hydrophobic interior より割断される．Schotland ら[4] はこの方法を用いて DMD 生検筋細胞膜内面を観察し，膜内粒子と P 面に存在する直径約6nm の粒子が結晶様に集合している orthogonal array の1μm^2 当たりの分布密度の統計的に有意な減少を報告した．このような変化のなかでもとりわけ orthogonal array の1μm^2 当たりの分布密度の減少は著明で，他の膜内粒子の正常対照筋細胞膜内粒子との分布密度の差よりその減少は著しい．このことは臨床的により症状が mild な顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーでは他の膜内粒子の分布密度では正常対照と比べ統計的に有意差がないのに，orthogonal array だけは正常対照に比し減少していたとの報告からも支持される．そこで我々はこの細胞膜の cytoplasmic half にのみ存在し，今迄に報告のない orthogonal array subunit density に注目して orthogonal array の形態よりその機能状態を推定するためにこの実験をおこなった．

材料と方法

DMD6例の大腿四頭筋及び6例の少年（整形外科手術例）の組織化学的に正常な大腿四頭筋の生検筋を at rest length で U 型筋鉗子にはさみ，2.5％ glutaraldehyde 溶液（0.1M phosphate buffer pH7.4）で即ちに固定した．標本の一部を実体顕微鏡下で細切し，10, 20, 30％と上昇系列の glycerin 水溶液で浸軟した．凍結は液体窒素中で瞬時に行ない，Eiko FD II freeze fracture machine で −120℃，4〜6×10^{-7}Torr にて electron beam gun と quartz crystal thin film monitor を用い，膜圧を一定にして白金と carbon を蒸着し replica 膜を作製した．筋標本のついた replica 膜は市販の塩素系漂白剤で筋標本のみ消化し，replica 膜を蒸留水で2度洗浄し，grid にすくい，日立 H600電顕にて加速電圧75kV で観察した．

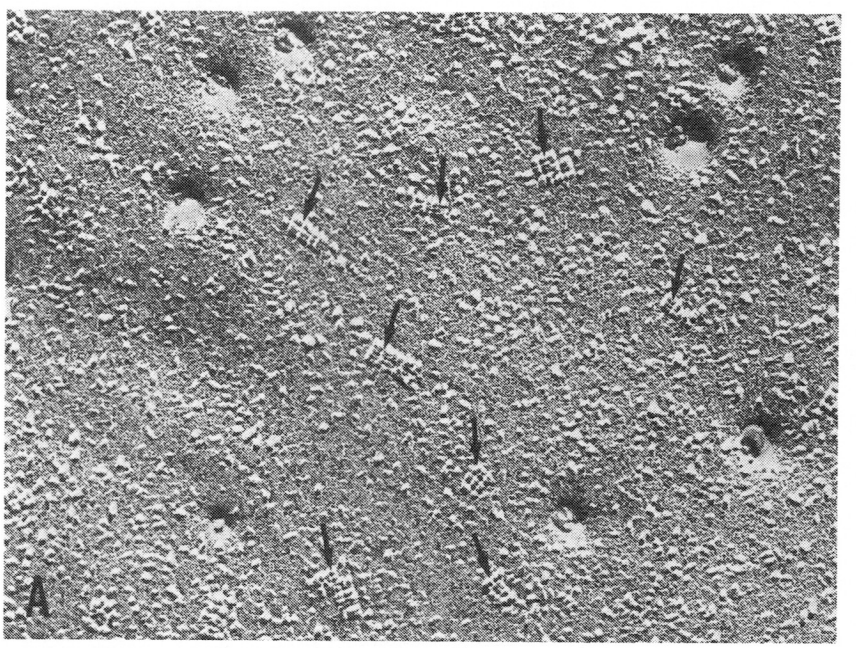
replica 膜は次の基準にあうもののみ写真に撮影した．すなわち1）細胞外空間が smooth であるもの，2）細胞膜に存在する膜内粒子の直径が小さいものから大きいものまでまちまちであること，3）細胞膜の back ground がきめ細かく，また P 面，E 面とも pit が明確に存在するものである．

＊昭和大学藤が丘病院神経内科
＊＊愛知県コロニー中央病院小児神経科

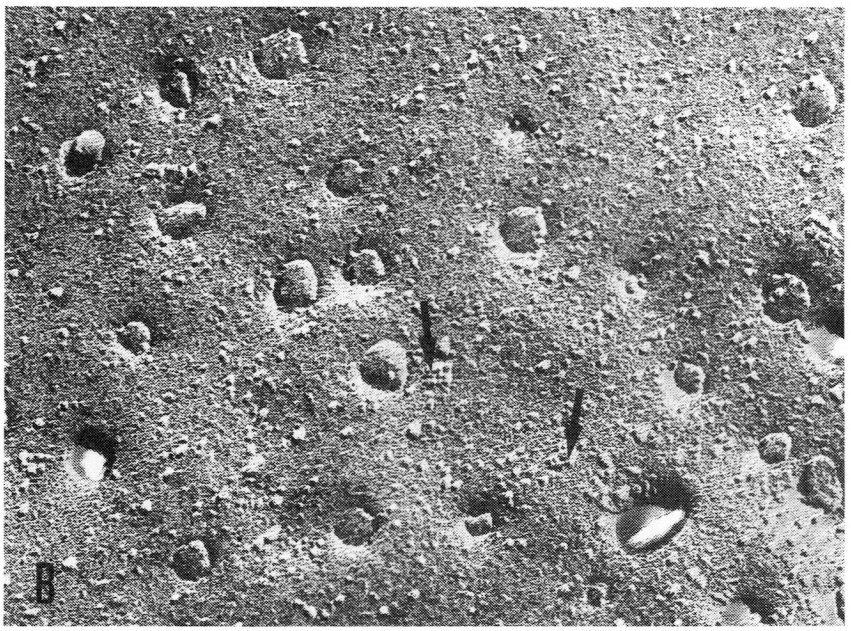
Orthogonal array とその subunit particle の密度は DMD 群か正常対照群かがわからない状態で16万倍に引き伸ばした print 上で行なった．Orthogonal array は P 面では直径6nm の粒子が4個以上結晶状に集合したもの，E 面では6nm の pit が4個以上結晶状に集合したものとして同定した．各症例につき5P 面，5E 面の1～1.85μm^2に分布する orthogonal array 及びその pits より，1μm^2当たりの orthogonal array 密度を計算し，またすべての print に存在するすべての orthogonal array 及び pit につき subunit particle 及び subunit pit を算出し，これらの値より1個の orthogonal array 当たりの subunit particle の密度を計算した．この場合とくに P 面では subunit particle の算出がしばしば難しいことがあるが，E 面では pit と pit の間隔が約6nm であることから pit の直径は約6nm と考えられ，P 面での subunit particle の直径は約6nm と考え，6nm 間隔の mark のついた定規で P 面の subunit particle の密度を算出した．

結　　果

正常（**写真A**）と DMD（**写真B**）の筋細胞膜 P 面の高倍の写真にはいろいろな直径の膜内粒子と orthogonal array が存在し，DMD では膜内粒子と orthogonal array が少ない．更に orthogonal array subunit particle も DMD で減少しているのが観察される（**写真B**）．1μm^2当たりの orthogonal array の分布密度は正常では group median density が8.84〔mid range（25%—75%）3.46—15.29〕，DMD では0〔mid range 0—2.24〕で DMD で有意に orthogonal array が減少していた（$P<0.001$ Wilcoxon rank sum test（**表1**，**図1**）．また1個当たりの orthogonal array の subunit particle の group mean density が正常で21.4±0.8（S.E.）であるのに対して，DMD では



写真A　正常対照生検筋細胞膜の P 面を生す．膜内粒子の直径は小さいものから大きいものまであり，その他に矢印のような orthogonal array が多数存在する．
（original magnification ×160,000）



写真B Duchenne 筋ジストロフィー症生検筋細胞膜のP面を示す．膜内粒子と orthogonal array の分布密度は正常対照より少なく，また個々の orthogonal array の subunit particle の数も少ない．尚 caveolae の正常対照に比しての増加もみられる．(original magnification×160,000)

表 1 Orthogonal array density per square micron in the muscle plasma membrane of normal and Duchenne muscular dystrophy (DMD)

	Median	Midrange (25% to 75%)
Normal(6)	8.84*	3.46 - 15.29
DMD(6)	0*	0 - 2.24

* P<0.001 (Wilcoxon rank sum test)
Number in brackets represent number of cases in each group

15.2± .1で有意にDMDで1個当たりの orthogonal array における subunit particle の密度が減少していた (P<0.01 two tailed t test) (**表2，図2**).

考　　察

orthogonal array は種々の臓器の細胞膜の cytoplasmic half (P面) にのみ存在する特殊な装置である．これは次のような臓器の細胞膜に存在する．すなわち小腸の上皮細胞，脳の astroglia，骨格筋，心筋，腎臓の collecting tubule の明細胞，気道上皮細胞，発育途上の脊髄神経節の衛星細胞，自律神経節の衛星細胞，胃壁細胞等々多くの臓器細胞膜に存在する．

一方この装置の機能は不明であり，単一の機能を有するのか，幾つかの機能を有するものなのかは明らかではない．この装置はヒトの生検筋では type I fiber でやや少ない傾向はみられるものの，type II fiber との1μm^2当たりの分布密度の差はそれ程大きなものではない．しかし rat では type II fiber には多くみられるが，type I fiber にはほとんどみられないと言われており，従ってこの装置が筋細胞膜の electrical stimuli の伝達装置

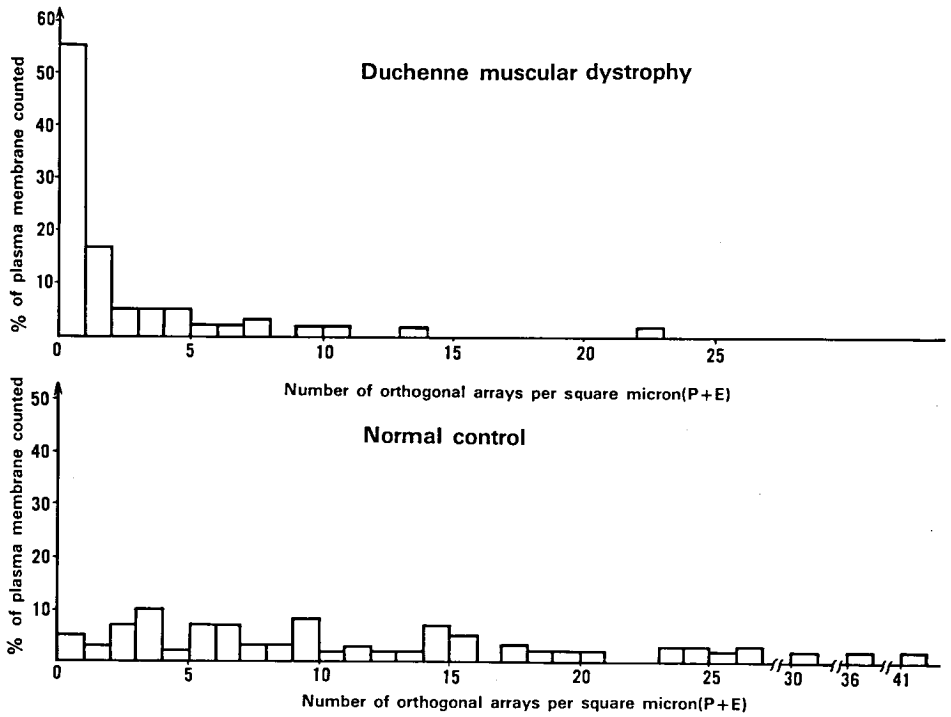


図1　Distribution frequency of orthogonal arrays per square micron

表2　Subunit particle number per one orthogonal array in the muscle plasma membrane of normal and Duchenne muscular dystrophy (DMD)

Normal	DMD
20.5 ± 3.6[a]	13.3 ± 4.0[a]
20.7 ± 2.3	16.5 ± 6.4
19.4 ± 3.3	15.0 ± 2.5
20.2 ± 4.9	17.8 ± 4.0
22.8 ± 4.5	11.0 ± 1.4
24.8 ± 5.5	17.3 ± 0.5
21.4 ± 0.8[b*]	15.2 ± 1.1[b*]

a: Mean ±standard deviation of subunit particle number per one orthogonal array in each case.

b: Group mean ± standard error of the mean in each group.

* P<0.01 (two tailed t test)

という提唱は当たらないのではないかと考えられる．現在提唱されているこの装置の機能としてはmembrane permeability に関係した機能，イオン等の membrane transport，osmotic pressure の調節，上皮細胞の活動の伝達，cell-to-cell communication，細胞間接着，などが挙げられている．またこの機能が臓器により異なる可能性もある．例えば脳の astroglia では虚血により orthogonal array が消失することが報告されているが[5]，骨格筋では消失しないからである[6]．このようにこの装置の機能についてはまだほとんど明らかではない．この orthogonal array の1μm^2当たりの密度が DMD で減少していることは Schotland らにより報告されているが，その subunit particle の1個当たりの orthogonal array における密度の減少の報告はこれが初めてである．従っ

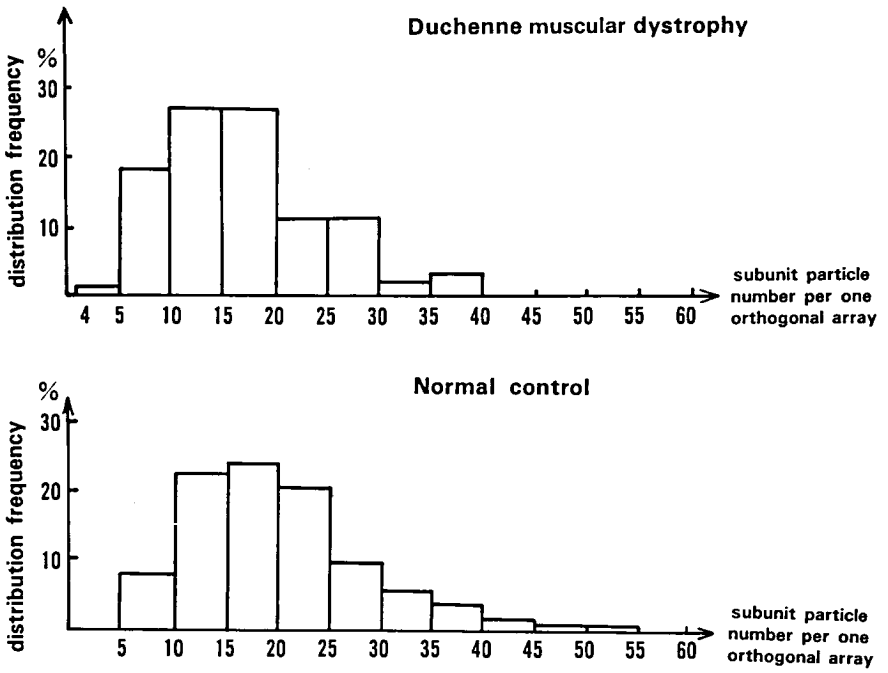


図2　Distribution frequency of subunit particle number per one orthogonal array

てDMD筋細胞膜のorthogonal arrayの機能障害とりわけ機能低下が示唆されたが，今後このようなorthogonal array subunit particle densityの低下を生ずる様な病態の検討が，この装置の機能の解明，ひいてはDMD骨格筋の崩壊過程の詳細を明らかにする鍵になるのではないかと考えられる．

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—1120, 1975.

2) Wakayama, Y., Bonilla, E. & Schotland, D.L.: Muscle plasma membrane abnormalities in infants with Duchenne muscular dystrophy. Neurology (Cleveland), 33: 1368—1370, 1983.

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—123, 1978.

4) Schotland, D.L., Bonilla, E. & Wakayama, Y.: Freeze fracture studies of muscle plasma membrane in human muscular dystrophy. Acta Neuropathol. (Berl.), 54: 189—197, 1981.

5) Landis, D.M.D. & Reese, T.S.: Astrocyte membrane structure: Changes after circulatory arrest. J. Cell Biol., 88: 660—663, 1981.

6) Wakayama, Y., Okayasu, H. & Kumagai, T.: Quantitative freeze—fracture electron microscopic study of muscle plasma membrane of experimental ischemic myopathy. J. Cell Biol., 97: 467a, 1983.

19）筋疾患におけるfiber type disproportionの発現機序に関する研究

木下真男*

研究協力者　山田信興*　岩崎泰雄*
馬場繁二*　仁科牧子*

筋疾患の中には，筋線維タイプの数的不均衡が存在するものがあることはよく知られており，fiber type disproportionと呼ばれている．その中には，type 1 fiber predominanceが見られる場合とtype 2 fiber predominanceが見られる場合とがあり，疾患によってそのどちらか一方を示す傾向がある．こうしたfiber type disproportionがどのような機序で生じるのか，またそれぞれの疾患の本態とどのような関係を有するのかは，筋疾患の発現機序を解明する上で重要な問題と思われるが，これに関する詳細な報告は乏しい．この点について研究をすすめるため，筋疾患患者の生検筋標本について，組織化学的検索を加え，各疾患での比較，同一症例での異なった筋での比較，経時的比較，臨床症状の重症度との比較，同一疾患の世代間での比較などを試みた．

方　法

対象とした疾患は，congenital myopathyのnemalin myopathy, central core disease, myotubular myopathy, familial type 1 fiber atrophy (Dubowitzらのいうcongenital fiber type disproportion) とmyotonic dystrophyで，さらにそれらと対比するために神経原性筋萎縮の所見も検討した．また，一部Dubowitzの写真も引用した[1]．

Fiber type predominanceの定義はDubowitzのそれに従い，type 1 predominanceはtype 1線維が全線維の55%以上を占める場合で，type 2 predominanceはtype 2線維が全体の80%以上を占める場合とした[2]．

結　果

検索したcongenital myopathyの症例に関しては，後述するようにfiber type disproportionが検出された．

Nemalin myopathy[3]では，筋線維の大小不同があり，横断面上明らかに二峰性の分布が見られた．組織化学的染色にて大径線維はすべてtype 2線維であり，その間にtype 1の小径線維のグループが認められ，選択的type 1 fiber atrophyを呈していた（図1）．Histogramで見るとこのtypeと線維の大きさの関係は明瞭に確かめられ，大きいtype 2線維は，平均直径が120μで，小さいtype 1線維は平均直径40μであり，その構成はややtype 1の方が多かった．そして，全体的にはtype 1 predominanceを示していた．しかし，筋によってはtype 2線維のみから成るように見える標本で，大径のtype 2線維の間に著しく萎縮したtype 1線維が多数存在する像も散見した．

Familial type 1 fiber atrophy[4]では，その構造上の変化は軽微であるが，type 1線維の径の減少と，type 2線維の径の増加が見られ，全体としてはtype 1 predominanceであった（図2）．本疾患における世代間の比較を行った．11歳の子供の生検筋でのHistogramでは，30μといった小径のtype 1線維が増加し，type 2線維の直径は平均100μで，その比率は2対1であった．一方，母親のHistogramでは，type 1線維の平均直径は30μで，type 2線維のそれは140μで，子供に比べると

*東邦大学医学部第四内科

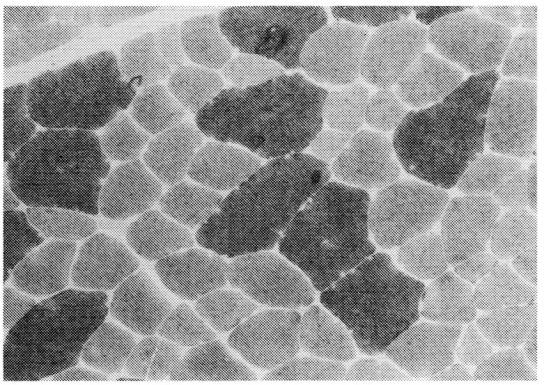


図1　Nemalin myopathy
Type 1 線維の萎縮とともに type 1 predominance を示している.

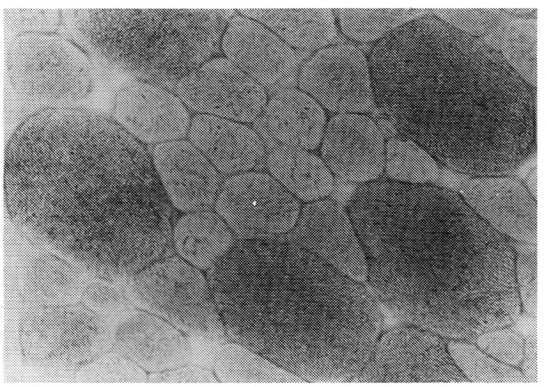


図2　Familial type 1 fiber atrophy
Type 1 線維の萎縮, type 2 線維の径の増加とともに type 1 predominance が認められる.

選択的 type 1 fiber atrophy の傾向が顕著に現われている. そして全体として type 1 predominance の様相が強まっていることが確認された.

同様のことは, central core disease でも見られる.[1] Dubowitz の症例の 4 歳時の所見では, その特徴的所見である core は, type 1 線維に僅かに見られるが, type 1 predominance はなく 1 対 2 の比率はほぼ 1 対 1 であった. しかし, 同一症例の12年後の生検筋標本では, 明らかに type 1 predominance の傾向が見られ, ほぼ全線維が type 1 を呈していた.

Myotubular myopathy[5] では, type 1 線維の萎縮が見られるが, 年齢と共に fiber type disproportion が進行する傾向が見られた.

一方, myotonic dystrophy では, 組織学的には小径線維のグループ化, 大径線維の数的変化, 線維構造の変化などが見られ, 組織化学的には type 1, 2 線維の大きさの相違が著明になる傾向が確かめられた. すなわち, type 1 線維はほとんどすべて小径化しており, type 2 線維は大径のものが多かった. 全体としては, type 2 predominance を示しており, またこれと共に広範な type grouping を示す例も多かった (図3). この傾向は, 特

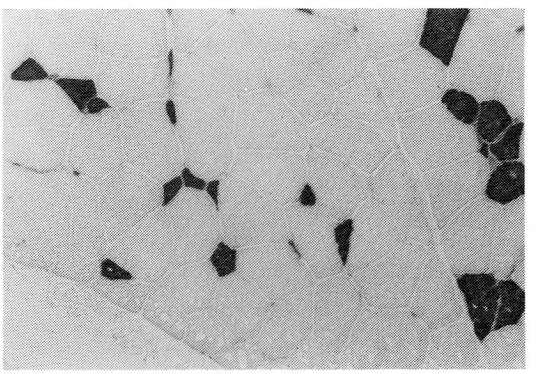


図3　Myotonic dystrophy
Congenital myopathy と反対に選択的 type 1 線維の萎縮とともに type 2 predominance を示している.

に臨床症状が著しい部位の筋で強く見られ, 胸鎖乳突筋ではほとんどの線維が type 2 線維で占められていた (図4).

神経原性筋萎縮の場合では, type 1 線維の萎縮を示す例では概して type 2 predominance を示すことが多かった. また逆に, type 2 線維の萎縮を示す例では type 1 predominance を示していた. さらに, type grouping を伴う例も見られた.

考　　案

Congenital myopathy では, 一般に fiber type distribution はすでに先天的に定まっていると考えられてきた. Dubowitz の congenital fiber type disproportion がその概念の代表で, 先天的な大径

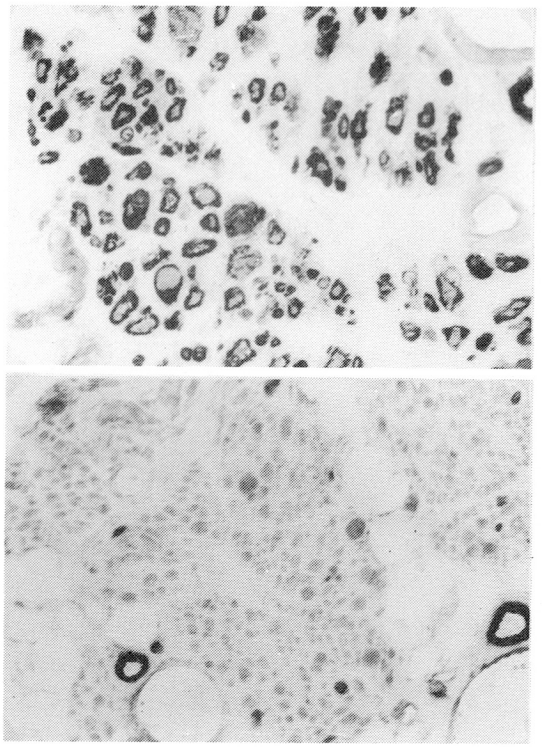


図4　Myotonic dystrophy
臨床症状の著しい部位の筋（sternocleidomastoid muscle）ではほとんどの線維がtype 2で占められている．

のtype 2線維と小径のtype 1線維の存在，及びtype 1 predominanceの存在とされている．しかし，これらの疾患ではtype 2線維にtype 1線維の性質が見られることが確認されており，また今回呈示したfamilial type 1 fiber atrophyの母子例やcentral core diseaseの12年後の所見で見られたような，経時的なtype 1 predominanceの増強傾向や筋によってそのdisproportionの度合が異なったりすることを考えると，それらのtype 2線維が次第にtype 1線維に転換し，その結果としてtype 1 predominanceが生じるのであって，決して最初からtype 1線維とtype 2線維の比率が定まっているのではないと考える方が妥当である．すなわち，congenital myopathyはその臨床像は非進行性であっても，その病態は決してそうではなく，経過と共に変化しつつあるものであると見なすべきである．

一方，myotonic dystrophyでは，type 1線維の選択的萎縮，消失の結果として，全体的にはtype 2 predominanceが生じるように考えられている．選択的type 1線維の萎縮は多くのcongenital myopathyではtype 1 predominanceの傾向が強いことを考えると，それらは異なった機序によるものであることが推定された．

神経原性筋萎縮では，一定の傾向は得られなかったが，denervationによるどちらか一方のtypeの線維の萎縮により，他方のtypeのpredominanceが見られる場合や，除神経後のcollateral sproutingやtrophic influenceの結果としてfiber typeのpredominanceが生じることも考えられた．

結　　語

筋疾患におけるfiber type disproportionは，congenitalなdisproportion，一方のtypeから他方への転換の結果生じる場合，一方のtypeの萎縮，消失により生じる場合，reinnervationにより一方のtypeから他方へと変化する場合など，いくつかの異なった発現機序によって生じることを指摘した．

文　　献

1) Walton, S.J.: Disorders of Voluntary Muscle. Churchill Livingstone, 278—279, 1981.
2) Dubowitz, V. and Brooke, M.H.: Muscle Biopsy: A Modern Approach, Saunders: London, 82, 1973.
3) 木下真男，里吉営二郎他：ネマリン小体をともなうタイプI筋線維萎縮症．臨床神経学，14：4，353—360，1974.
4) Kinoshita, M., Satoyoshi, E. and Kumagai, M.: Familial Type 1 Fiber Atrophy: J. Neurol. Sci., 25: 11—17, 1975.
5) 木下真男，川崎研一他：Myotubular（Centronuclear）Myopathy．神経研究の進歩，20：1，48—58，1976.

20）培養神経筋組織成長に対するganglioside および抗ganglioside 抗体の作用

斎田孝彦*

研究協力者　大石京子*　中嶋三智子*　川西健登*

Ganglioside は sialoglycolipid であり，その oligosaccharide 部はほとんどの動物細胞で細胞膜外側に位置している．そのシアル酸が細胞膜や basal lamina の糖蛋白とともに筋細胞-細胞間の認識・情報伝達や相互作用に，ひいては筋細胞の分化に関与している可能性が考えられる．分化した横紋筋を除神経すると，ganglioside も sialoglycoprotein も増加し，後者は神経再支配によって元に復する．さらに異なった神経支配を持つ白筋および赤筋は，sialoglycoprotein や結合シアル酸を離断する neuraminidase の量に差のあることも知られている．Inestrosa 等は除神経前後のラット横隔膜筋の神経終板および非終板部の gangliosides と糖蛋白およびそれらと結合したシアル酸を定量した．正常では，それらは終板・非終板部に均一に分布している．sialoglycoprotein は除神経1～8日後で急速に先ず終板で増加し，8～10日後に遅れて非終板部でも増加をみる．gangliosides は終板，非終板で同時に増加する．その結果全シアル酸量は8日後にはピークに達し，16日後でも同様の値を示すと報告している．この様な ganglioside や sialoglycoprotein の筋膜での分布に対する神経支配の影響には，おそらく複数の神経因子が関与していると思われる．

Obata, Oide 等はかつて globoside の培養液への添加によって神経筋培養中の，自発性 end plate potential (e. p. p. s.) を発する筋管細胞の割合が高まるのを観察した．昨年度我々は本研究班で種々の糖脂質のうち牛脳由来の混合 ganglioside は50μM の濃度で鶏胚脊髄筋培養において，その筋表面における ACh-E 活性分布の限局化を促進することを明らかにした．こうした結果は ACh-E 活性分布が神経筋接合の新形成とその成熟に伴って，接合部近くへと急速に限局されるというこれ迄の知見と併せ考えると，ganglioside が50μM 濃度では神経筋接合の新形成に対し促進的に作用していることを示唆している．ganglioside 添加5日，8日，10日目では有意の陽性染色限局作用を示したことは，この神経接合新形成に対する促進効果がかなり早い時期に働いていることを示唆していると言える．

本年度はさらに神経筋接合形成のどの時期に作用しているのか，またどの ganglioside が有効であるかを知るため，より純粋な標品を用いた研究や抗 ganglioside 抗血清等を用いた研究を行った．

材料と方法

昨年度の報告と同様に11～12日目の White Leghorn 鶏胚大胸筋を0.2% collagenase で処理して得た筋芽細胞を，予め自家抽出にて得たラット尾コラージェンを coat した Aclar film のプラスチック皿上に5×10^4 cell/cm^{2}撒布した．このプラスチック皿に通常のファルコンプラスチック皿の中に入れ，37℃，95%加湿，$CO_2$5%の条件下で培養した．2日後に7～8日目の鶏胚脊髄の横断切片を1個ずつ加え培養を続けた．培養液はヒト臍胎血清20%，鶏胚抽出液10%，Earle の MEM 70%，glucose 6mg/ml 組成のものを用いた．牛脳より抽出した混合および G_{M1} ganglioside を50μM 濃度添加した．

ACh-E 染色は糖脂質添加後8日目に Karnovsky の変法により行った．脊髄培養開始後5日目よ

*国立療養所宇多野病院臨床研究部

り筋管細胞上にKarnovsky染色陽性部分の拡がりがみられ，次第に限局化していくが，個々の培養により陽性染色の限局化はかなりのバラツキを示すので，バラツキによる影響を減ずるため，陽性染色限局化の進んでいるものより，1培養当り10ヶずつ選んで陽性染色の最大径を測定した．

後根神経節は14～15日目のマウス胎仔および第9日の鶏胚より採取し，神経筋と同じシステムで同様の培養液を用いる方法と，Earle MEMに1～100ng/mlのNerve Growth Factor (NGF)を添加した培養液を用いる方法とを用いた．培養初期からの培養液へのganglioside および抗ganglioside抗体の添加がsproutingに与える影響を，24，28時間後の観察で，神経突起の長さと密度を考慮して0～5の段階のneuritic growth indexで表現する事により検索した．

抗ganglioside抗体は家兎に5mgのganglioside，5mgのmethylated bovine serum albumin，5mgのmycobacterium tuberculosis H37Ra，1mlのincomplete Fraund's adjuvant，1mlのPBSのエマルジオンを背部に筋注して得た．

抗ganglioside抗体価の測定はganglioside，H^3-コレステロールを含むリポソームを用いるradio-immuno-precipitation (RIP)法，ganglioside を含むリポソームの凝集反応測定法，ganglioside を含むリポソームの内側にとり込まれた放射性Rbが，補体依存性のリポソーム膜lysisにより放出されるのを測定する方法とを用いた．抗ganglioside抗体のaffinity purificationには，先に我々が発表した特異方法によりganglioside を含むリポソームと抗血清とを反応させ，結合した抗体をNaIによりeluateして得た．

結　　果

牛脳混合ganglioside 50μM添加神経筋培養では，培養8日目でACh-E陽性染色最大径の平均が10.2±2.4μmと対照群に比し有意の短縮を示した．この混合gangliosideはG_{M1}29%，G_{D1a}41%G_{D1b}14.7%，G_{T1b}14.4%，その他のminor gangliosidesが0.9%含まれている．混合ganglioside添加群と比較する為，その中に含まれているG_{M1} gangliosideと同じ15μMのG_{M1}を添加した培養では，10.4±2.1μmとほぼ同じ程度の短縮を示した（表1）．

表1　Effect of gangliosides and anti-ganglioside antibodies on cord-muscle cultures*

Treatment	Length of Ach-E activity
None (control)	14.4 ± 1.6
Gangliosides, 50μM	10.2 ± 2.4**
G_{M1}, 15μM	10.4 ± 2.1**
Anti-gangliosides, 20μg/ml	none
Anti-G_{M1}, 20μg/ml	none

(Mean ± SEM)

* Cultured for 8 days
** $P < 0.01$

affinity purifiedの抗ganglioside抗体20μg/mlを神経筋培養に添加すると，脊髄培養組織からの神経突起のsproutingが短くまばらで，当然神経筋接合の形成が見られず，従ってACh-E陽性反応の限局化もみられない．抗ganglioside血清投与による軸索成長の阻害は，脊髄前根のみに限られず，付着する後根神経筋細胞の軸索の成長も全くみられず，神経細胞軸索成長に対する一般的な作用であることをうかがわせた（表1）．

通常培養液を用いたマウス後根神経節培養に混合ganglioside及びG_{M1} gangliosideを加えると，いずれの場合もneuritic growth indexの増加が認められた（図1）．その効果は軸索sproutingの数の増加と，成長した軸索の長さの増加として現われる．affinity purified抗G_{M1} ganglioside抗体を同培養に加えるとその濃度に応じて軸索の成長は抑制され（図2），濃度がさらに上がると線維芽細胞の成長・増殖も抑制される．

NGF1～100μg/mlと種々の濃度のaffinity purified抗G_{M1} ganglioside抗体を含むEarle MEMにて鶏胚脊髄神経節を培養すると，抗G_{M1}抗体の濃度に応じたNGFによる軸索成長の抑制がみられた．早期におけるこの抑制は10ng/mlの

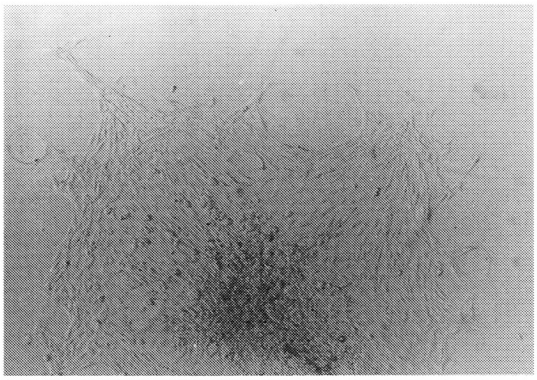


図1

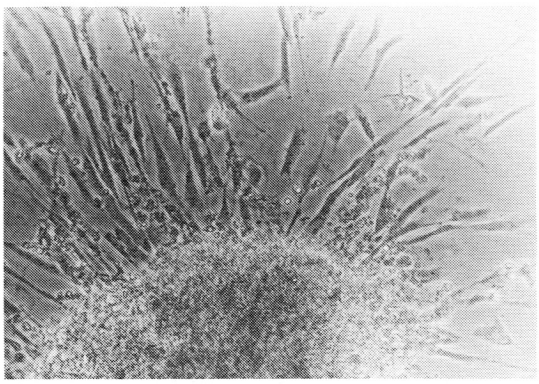


図2

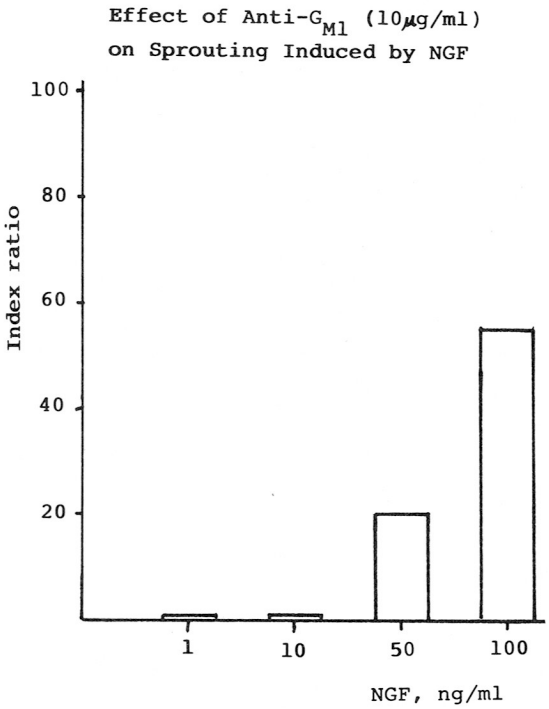


図3

抗体添加の場合，不可逆的な抗体の毒性によるのではなく，48時間後には一定の成長の進展をみる．逆に抗体の濃度を10μg/ml と一定に保ち，NGF を1～100ng/ml と変えた場合，濃度を上げることによって抗 G_{M1}抗体の抑制効果は打ち消される（図3）．

この G_{M1}抗体の軸索成長抑制抗体の機序を検討するため10^5個ずつの dissociate した後根神経筋細胞を microtiter plate に附着させ，培養された細胞に対する G_{M1}抗体の結合の度合いをラベルした第2抗体を用いて測定すると，抗 G_{M1}抗体は神経細胞と直接結合した．

考　　察

昨年度我々が報告した，牛脳混合 ganglioside による培養神経筋接合形成の促進作用は主として G_{M1} ganglioside にあることが示された．一方，抗 G_{M1} ganglioside 抗体の添加によって神経筋接合形成が阻害されるのみでなく，脊髄及び後根神経節培養からの神経突起の sprouting も抑制されることが示された．このことは ganglioside の神経筋接合形成促進作用は，終板に作用したりあるいは筋細胞に作用することによって接合形成そのものに直接的に働くよりも，運動神経軸索の成長促進を介する効果であると思われる．

合成培養液に NGF と affinity purified 抗 G_{M1} ganglioside 抗体とを添加する実験で，両者が神経突起 sprouting に対し競合的に働くこと，また G_{M1}抗体が培養神経細胞へ結合することが示されたことから，細胞膜上の G_{M1}の存在が NGF の神経細胞への取り込みに何らかの関係を有することを示唆していると思える．*in vitro* ^{125}I ラベルした NGF に G_{M1}が直接結合することが観察されていることもそうした可能性を支持している．神経筋培養に対して globoside や ganglioside を添加することで，神経筋接合形成が促進されることを

Obata 等や我々が先に報告したが，その機序は主として神経細胞膜上の G_{M1} の密度を高めることを介して，NGF の神経細胞への取り込みを促進したことによる結果であったと考えられる．筋細胞の増殖分化に対する glycolipid の関与の可能性の検討は，今後の新たなアプローチによらねばならない．

文　献

1) Inestrosa, N.C., Fernandez, H.L.: Gangliosides and sialoglycoproteins in normal and denervated rat diaphragm muscle. Muscle & Nerve, **5**: 33—38, 1982.

2) Obata, K., Oide, M.: Effects of glycolipids on *in vitro* development of neuromuscular junction. Nature, **266**: 369—371, 1977.

3) Saida, T. et al.: Experimental allergic neuritis induced by sensitization with galactocerebroside. Science, **204**: 1103—1106, 1979.

21）緊張性筋ジストロフィー症の末梢血リンパ球 subsets
—monoclonal抗体と fluorocytometer による解析—

後　藤　幾　生*

研究協力者　町　　ミ　チ*　糸　山　泰　人*
黒　岩　義五郎*　岩　下　　宏**

目　　的

緊張性筋ジストロフィー症(MyD)は，血清 IgG の低値や遅延型皮膚過敏反応の異常などの免疫系の異常が知られている．一方，内分泌・循環器系を含む諸器官の異常がみられ，進行性筋ジストロフィー症のように，全身の膜表面の異常も指摘され，リンパ球でもその形態[1]，機能異常[2]が報告されている．我々はこれらの見地より，リンパ球表面抗原に対する monoclonal 抗体と，fluorocytometer を用いてリンパ球 subsets の解析を行なったので報告する．

対象および方法

対象は MyD 患者10名(男7名，女3名，平均年齢42歳）で，罹病期間は13年から28年（平均21年），歩行可能な者 (Mild) 4名，自力歩行困難で歩行器又は車椅子を要する者（moderate）6名であった（表１）．健康成人13名（男7名，女6名，平均年齢38歳）を対照群とした．

表１　Clinical features of myotonic muscular dystrophy

No.	Age	Sex	Onset	Duration	Severity	Serum IgG (N:1109-1726 mg/dl)
1	55	M	40 yo	15 y	Mod.	730
2	53	M	23	30	Mod.	1,100
3	34	F	20	14	Mild	1,250
4	32	F	19	13	Mild	890
5	40	M	21	19	Mod.	1,440
6	41	F	13	28	Mild	1,190
7	38	M	14	24	Mod.	1,310
8	36	M	15	19	Mild	n.t.
9	49	M	25	24	Mod.	n.t.
10	38	M	14	24	Mod.	n.t.

n.t. not tested

＊九州大学医学部脳研神経内科
＊＊国立療養所筑後病院

リンパ球 subsets の検討に用いた monoclonal 抗体は，Ortho 社の OKT 3 (all T cell)，OKT 4 (helper/inducer T cell)，OKT 8 (suppressor/cytotoxic T cell)，OKIa 1 (B, null cell)，Coulter Immunology 社の CCB_1 (B cell)，Becton Dickinson 社の Leu 7 (NK/K cell) である．ヘパリン加静脈血を Ficoll-Hypaque 法で単核球を分離，洗浄し5×10^6/ml に細胞数を調整する．細胞浮遊液200μl と各 monoclonal 抗体5μl を30分4℃で反応させた後，洗浄し，二次抗体として FITC-conjugated anti-mouse IgG (Tago 社) でラベルした．検索は fluorocytometer である Coulter Electronics 社の EPICS Ⅳを用いた．二次抗体のみを加えた検体を negative control とし，これ以上の螢光強度をもつ細胞を陽性細胞とした．各検体でリンパ球分画の細胞を3,000又は5,000個数の陽性率を出すと同時に，その螢光強度のパターン，陽性細胞の peak の螢光強度を調べた．パターンは，NEC PC 9801にて加算した．

結　　果

MyD 患者群の末梢血の各 subsets の陽性率を表２に示す．T cell 系，B cell 系には有意差はなかったが，Leu 7 陽性細胞は MyD 群で51.8%と有意に高かった($p<0.01$)．MyD 群末梢血の Leu 7 の加算パターンを図１に示すが，対照群の末梢血 Leu 7 と比較してその加算パターン及び螢光強度の peak には差を認めなかった．T cell 系の

表2　Lymphocyte subsets

	MyD(n=10)	Control(n=13)
OKT3	64.4±10.4%	69.2±6.3%
OKT4	54.8±10.2	53.9±10.0
OKT8	37.4±9.7	39.2±5.5
OKIa1	19.1±4.4	19.1±3.9
CCB1	11.0±4.0	8.1±3.2
Leu7	51.8±9.8 *	28.4±9.7
T4/T8	1.59±0.66	1.40±0.34

*p<0.01

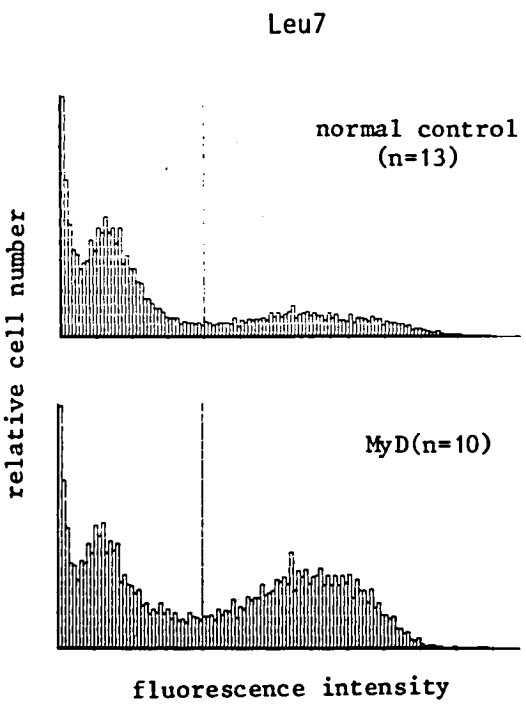


図1　上段に正常対照群，下段にMyD群のLeu 7加算パターンを示す．
縦軸：比較的細胞数
横軸：螢光強度（相対的log単位）

OKT 8は陽性率では対照群に差を認めなかったが，加算パターンでは陽性細胞の二峰性のpeakのうち，より強い螢光強度の細胞（右のpeak）が相対的に減少していた（図2）．

MyD群の10例中7例でIgGをはじめとする免疫グロブリン値を測定し得たが，それらの値と各

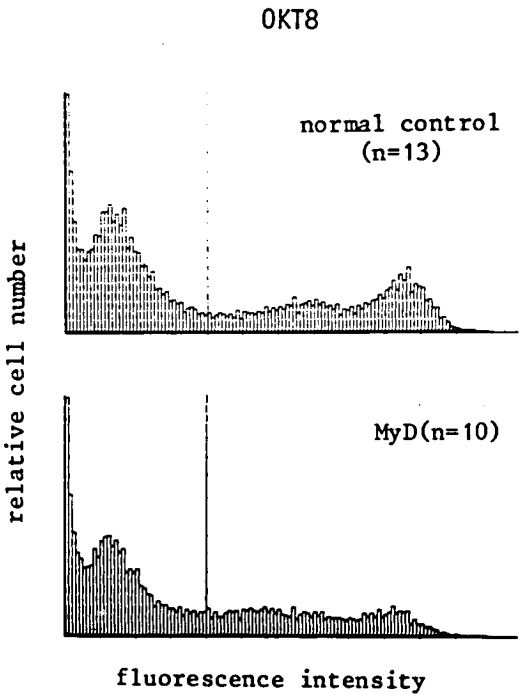


図2

subsetsとの間に有意の相関を認めなかった．

考　　按

近年MyDの免疫異常を，リンパ球表面抗原に対するmonoclonal抗体を用いて検討しようとする試みが行われてきている．松原らは，OKT 8の増加とLeu 7の減少を報告したが[3]，他の報告をみると，特に大きなT cell系の異常はないようである[4)5)]．宇川らは，少数例でLeu 7が有意に増加したが，一定の傾向はないとした[6]．我々は，fluorocytometerを用いて，各リンパ球subsetsの陽性率及び螢光強度パターンにてより客観的にリンパ球表面マーカーの分析を試み，その結果，Leu 7陽性細胞率の増加を認めた．Leu 7陽性細胞はnatural killer，killer活性を持つ細胞の表面抗原といわれ，NK活性は，アトピー性皮膚炎，慢性肝炎，移植片対宿主反応で亢進することが知られている．今回，NK活性を合せて検討していないが，検索したMyD患者に上記疾患の合併は認めていない．Leu 7陽性細胞の増加が，免疫学的異常を

反映するものか，表面膜抗原の異常を示すのか，現在の段階では不明である．尚OKT 8のパターンの分析についても，今後，検討する予定である．

文　献

1) A. Hiraoka, T. Kitami, M. Takahashi, et al.: Lymphocyte abnormality in human myotonic dystrophy and experimental drug-induced myotonia. Neurology (NY), 32: 138—42, 1982.
2) D.I. Grove, S.J. O'Callahan, T.O. Burston, et al.: Immunological function in dystrophia myotonica. Br. Med. J., 3: 81—3, 1973.
3) 納　光弘，松原博史，中島洋明，井形昭弘：Myotonic dystrophyのリンパ球に関する検討．免疫性神経疾患に関する研究，昭和57年度報告書，1983，p.282—5.
4) 錫村明生，山田英雄：筋緊張性ジストロフィーの免疫．第23回日本神経学会総会，抄録．
5) 斎田孝彦，井本敬二，斎田恭子，藤竹純子，西谷　裕：免疫性神経疾患の末梢血，髄液，胸腺におけるリンパ球サブセットの動態—モノクローナル抗体を用いた解析—．第23回日本神経学会総会，抄録．
6) 宇川義一，作田　学，四宮範明，楠　進，井上聖啓，松木一雅：筋緊張性ジストロフィー症のリンパ球機能．第23回日本神経学会総会，抄録．

22）モノクローナル抗体による生検筋内浸潤リンパ球の解析

佐藤　猛*

研究協力者　荒畑喜一*　Andrew G. Engel**

はじめに

ヒト生検骨格筋内のリンパ球を主体とした単核細胞浸潤は，多発性筋炎・皮膚筋炎・封入体筋炎などの炎症性筋疾患のみならず，重症筋無力症・代謝性ミオパチーや筋ジストロフィー症でも見られる場合がある．今日の知見によれば，これらの浸潤細胞にはT-cellの各種サブセットとともに，細胞障害作用・貪食作用や抗原提示に関与するマクロファージ，また抗体産生にたずさわるB-cell，さらにK/NK cellの存在が考えられるが，その詳細は未だ明らかでない．

近年各種の細胞表面抗原に対する特異的なモノクローナル抗体が開発され，これによって形態的には同一でも機能的に異なる細胞を識別する事がある程度可能となった．われわれは主としてリンパ球表面抗原に対するいくつかのモノクローナル抗体を用い（表1），これらの浸潤細胞サブセットについて解析を試み，興味ある結果を得ているのでその一部を報告する[2)~7)]．

表1　The surface antigens that will be localized, their specificity, the Ig subclasses and the commercial sources of the Mo-Abs.

S-Antigen	Specificity	Ig-subclass	Source of Mo-Ab.
Lyt 3	All peripheral T cells	IgG2b	New Engl. Nuc.
T4	Helper T cells	IgG2b IgG1	Ortho Diagnostic Coulter Immunol.
T8	Supressor/cytotoxic T cells	IgG2 IgG1	Ortho Diagnostic Coulter Immunol.
B1	All peripheral B cells	IgG2a	Coulter Immunol.
M1	Most macrophages; some null cells	IgG2b	Ortho Diagnostic
Ia	Macrophages, B cells some activated T cells	IgG2b	New Engl. Nuc.
Leu 7	K/NK cells; some suppressor/cytotoxic T cells	IgM	Becton Dickinson

*順天堂大学医学部脳神経内科
**Dept. of Neurol., Mayo Clinic, U. S. A.

対象と方法[2)4)]

75例の生検筋（正常9，炎症性筋炎56，ドゥシャンジストロフィー10）について検索した．方法はアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法による．簡単に記すと，生検筋凍結切片を補体不活化正常ウマ血清・AB型ヒト血清で前処理した後，モノクローナル抗体（0.1—4γ）を反応させ，次いでアフィニィティー精製ビオチン化抗マウス・ウマIgG（7γ・VECTOR），アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ試薬（VECTOR），DAB/H_2O_2の順で反応させた．コントロール切片には各一次抗体と同じ免疫グロブリンサブクラスのマウスミエローマ蛋白を同一濃度でこれと置換し，以下同様の操作を行なった．マクロファージはI_a^+であるとともに酸性フォスファターゼ（Naphthol AS-BI phosphate法）に強陽性であることから他の細胞と識別し，組織の全体像をとらえるためにはトリクローム染色を施した．免疫電顕的検索も同様の手技で実施した．

結　　果

正常筋での浸潤細胞出現はきわめて稀であった．いずれの疾患でも壊死筋線維内にはI_a^+マクロファージが多数見られた．一方非壊死筋線維とその周辺の浸潤細胞中には，I_a^+, T_4^+, T_8^+ のリンパ球が混在した．特に注目された所見は，多発性筋炎・封入体筋炎において多数のT_8^+ T-cellが非壊死筋線維周囲とその内部へ浸潤していた事である（表2・図1）．さらにそれらの約30～50%はI_a^+であり従ってactivateされている事が確認された[6)]．またこれらのT-cellにともなってマクロファージの浸潤もしばしば観察された（図1-G）．ところが皮膚筋炎ではこれらと異なり，細胞浸潤は主として血管周囲性であり，そのサブセットはB-cell及びT_4^+ T-cell優位像を示し，T_8^+ T-cellは少数が散在するにすぎなかった（表2・図2）．

このことは皮膚筋炎が血管病変を呈する疾患である[1)]ことを考えあわせて興味深い．強皮症の筋病変は主として筋周膜への細胞浸潤を見，T_8^+ T-cell

表2

	単核細胞浸潤の分布				主な細胞浸潤部位における単核細胞サブセットの出現頻度						
	筋周膜	血管周囲	筋内膜	筋線維（非壊死）	T_3	B	Mø	T_8	T_4	I_a	NK※
多発性筋炎	+	++	+++	+++	+++	±	+	+++	+	++	±
封入体筋炎	±	±	+++	+++	+++	-	+	+++	+	++	±
皮膚筋炎	++	+++	+	±	++	+++	+	+	++	+++	±
強皮症	+++	++	±	-	+++	±	++	+++	+	++	±
ドゥシャン・ジストロフィー	±	±	+	+	+++	-	++	+++	+	++	±

#　－：無し　　±：稀に見る　　＋：軽度　　＋＋：中等度　　＋＋＋：高度

※　ここでは$Leu\,7^+ T_8^- T_4^-$のパターンを示した細胞をNKとした．

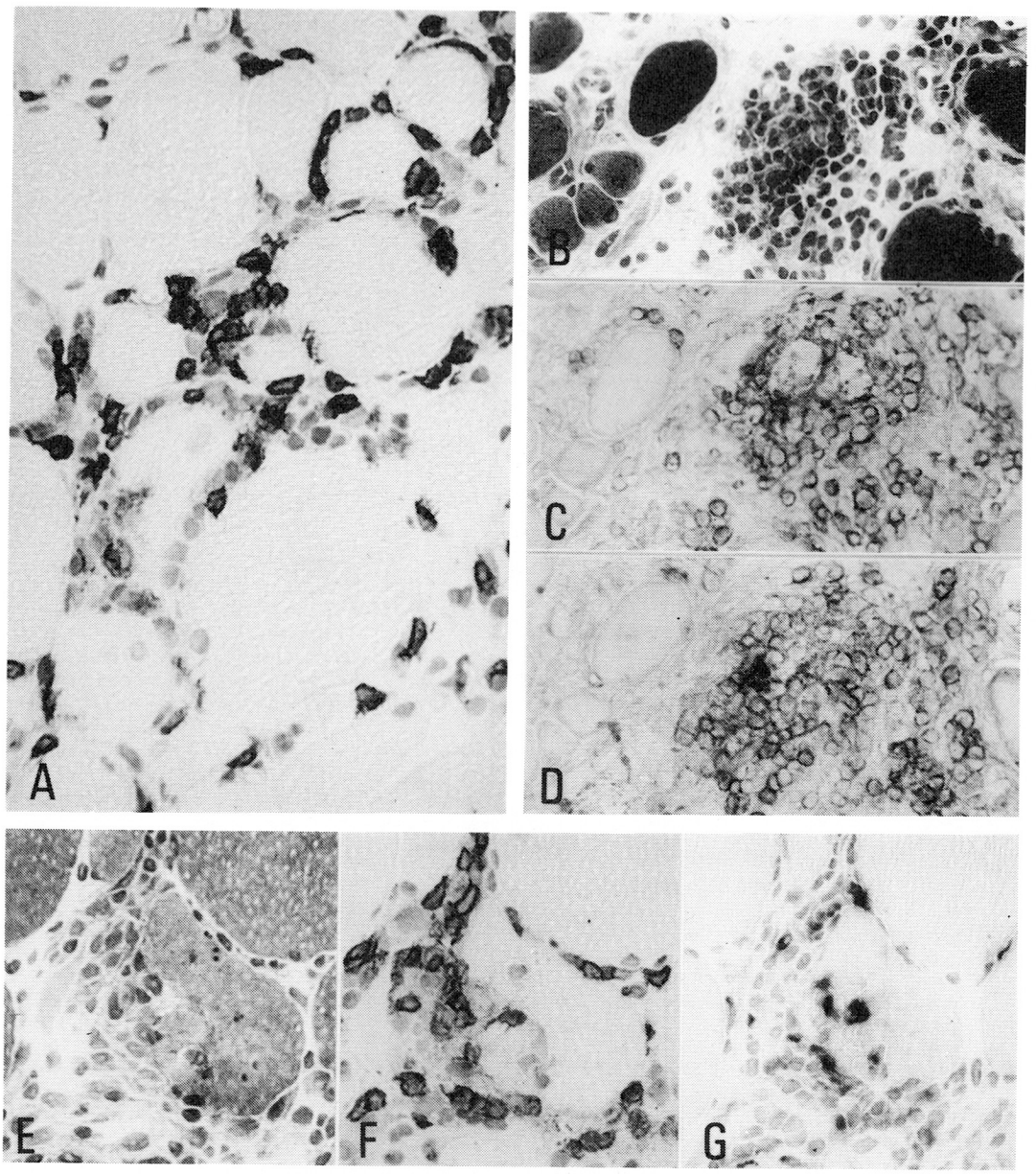


図1　多発性筋炎では筋周膜に多数の T_8^+ T-cell 浸潤が認められ（A：×400），さらに高度の浸潤巣（B：×300トリクローム染色）でも Lyt3$^+$ T-cell（C：×300）優位像を見，そのほとんどが T_8^+T-cell（D：×300）である．
封入体筋炎（E・F・G：×400）でも浸潤細胞には多数の T_8^+ T-cell(F)を見，同時に酸性フォスファターゼ強陽性のマクロファージ浸潤をともなっている(G)．
（いずれも Methyl Green による核染色施行）

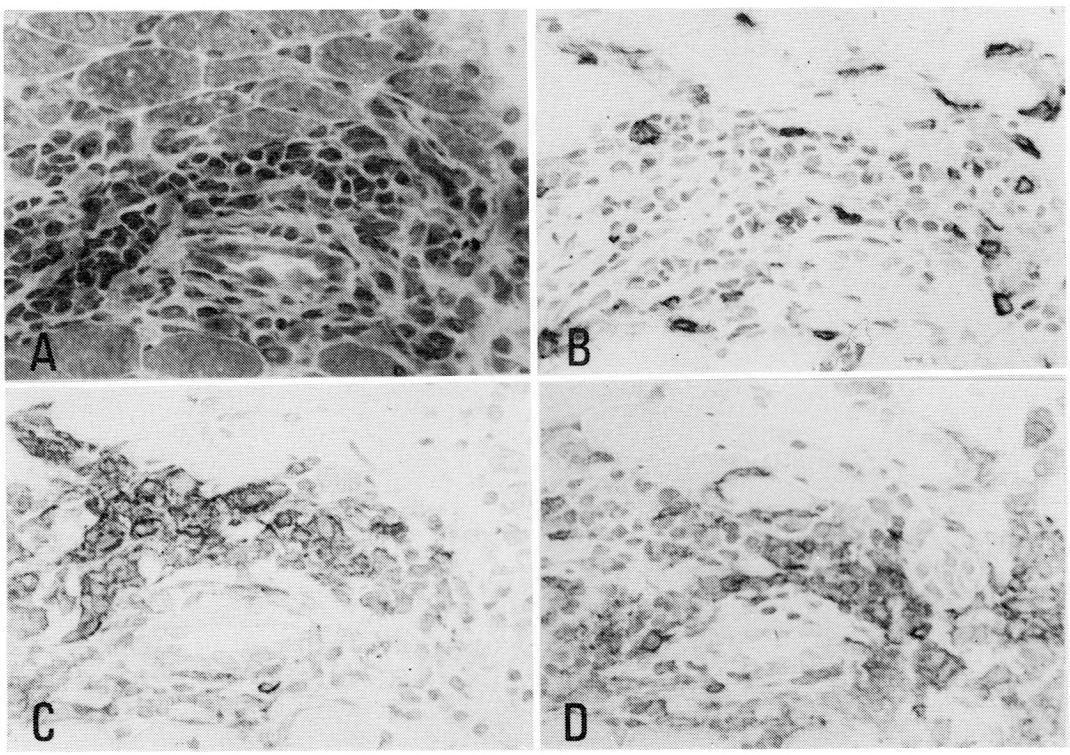


図2　皮膚筋炎の細胞浸潤は主として血管周囲性である（A：×360トリクローム染色）．
T_8^+T-cellは少数散在するにすぎないが（B：×360），多数のB_1^+B-cell（C：×360）と中等量のT_4^+T-cell（D：×360）を認める．
（いずれもMethyl Greenによる核染色施行）

とマクロファージが主体でありB-cellは稀であった（**表2**）．ドゥシャンジストロフィーは遺伝性の筋疾患であるが，全例にT_8^+ T-cellの散在が証明され（**図3-A**），さらに多数例で非壊死筋線維の周囲をこれらの細胞が取り囲み，一部浸潤する像が確認された（**表2**，**図3-B**）．

考　　察

一般に免疫学的プロセスによる組織障害過程は単一でなく，幾通りかに分けて考えられているが，とくに筋炎と関連して知られているものとして(1)筋組織抗原に対する特異的抗体の存在[8)9)10)]，(2)筋周膜静脈壁へのC_3，I_gの沈着や[11)]，血中Immune Complexの存在[12)]，および(3)細胞性免疫機序による筋障害[13)14)]などである．このうちわれわれの結果から，少なくとも多発性筋炎・封入体筋炎にはT_8^+ T-cellとマクロファージによる筋線維障害過程の存在することが示された．また皮膚筋炎ではB-cellとT_4^+ T-cell優位の像から局所的に体液性免疫過程が介在する可能性を示した．即ち封入体筋炎・多発性筋炎と皮膚筋炎とでは骨格筋障害の病態機序に差異のあることが推定された．

ドゥシャンジストロフィーでのT_8^+T-cellの出現と筋線維への浸潤は興味深い所見であり，その

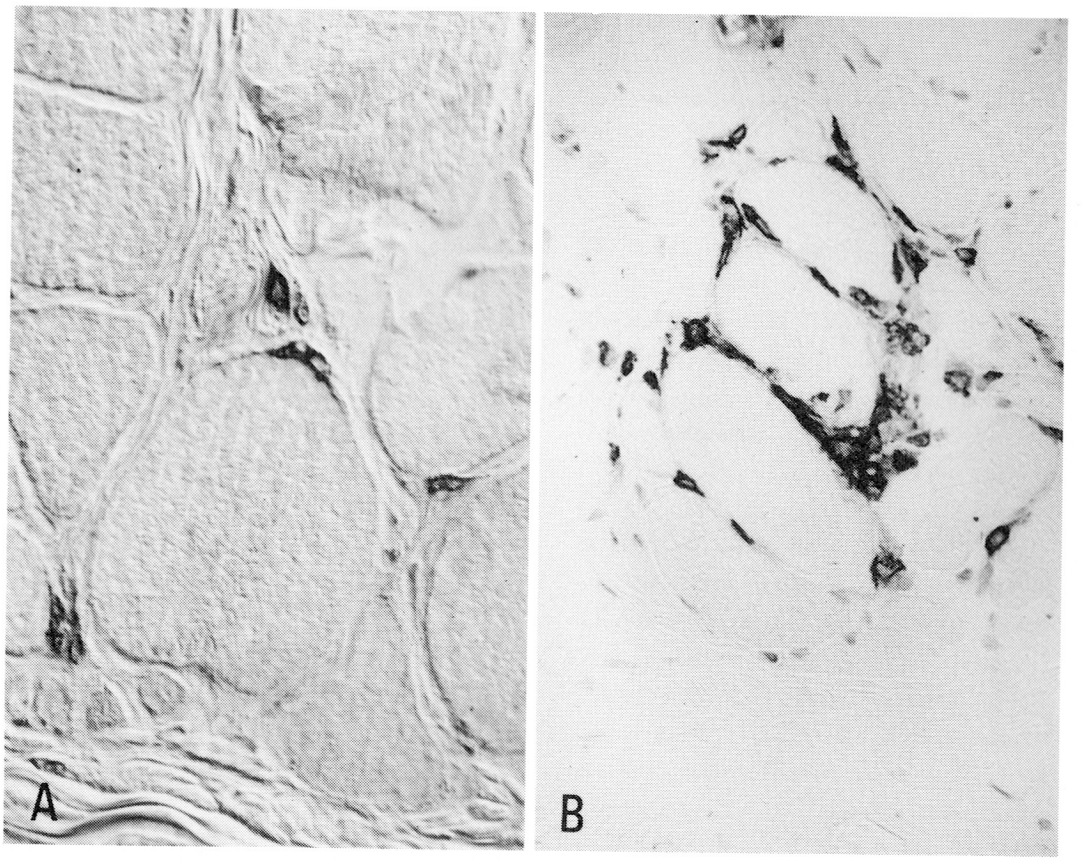


図3　ドゥシャンジストロフィーでは全例で T_8^+ T-cell の散在，時に筋形質膜とのコンタクトを認める（A：×600）．さらにこれが非壊死筋線維の周囲を取り囲み一部浸潤する所見も見られる（B：×400）．

意義について現在更に検索中である．

おわりに

モノクローナル抗体による免疫性筋疾患およびその他の筋疾患での浸潤細胞サブセットの解析は，ようやくそのスタート台に立ったところである．今後なお解決すべき課題は免疫組織化学的方法論の改良を始め幾多残されている．またモノクローナル抗体は単に特定の抗原に対する特異抗体であり，これがその抗体によって標識された細胞の機能と必ずしもイコールでは無いという事は銘記する必要がある．われわれは便宜的にこれらを同一に扱っているが，今後それらの違いについて，あるいは共通性について更に多面的な解析を加えつつ，より本質的な骨格筋線維の障害機構へのアプローチを試みて行きたい．

文　献

1) 佐藤　猛：多発性筋炎．小児神経学の進歩，第12集：67，1983．
2) Arahata K & Engel AG: Monoclonal antibody analysis of the mononuclear cell in the muscle biopsy. Ann. Neurol., 12 : 79, 1982.
3) Arahata K & Engel AG: Monoclonal antibody analysis of the mononuclear cell in the muscle biopsy. Fifth International Con-

gress on Neuromuscular Diseases. Marseilles, Sep. 12-18, 1982.

4) Engel AG, Arahata K, et al: Mechanisms of muscle fiber destruction. in Proceedings of the Fifth International Congress on Neuromuscular Diseases. Raven Press, in press.

5) Arahata K & Engel AG: Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I. Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. Submitted to Ann Neurol in press.

6) Engel AG & Arahata K: Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. II. Characterization of the autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. submitted to Ann Neurol in press.

7) Arahata K & Engel AG: Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. III. Immunoelectron microscopic aspects of cell mediated muscle fiber injury. To be submitted to Ann Neurol.

8) Nishikai M & Homma M: Anti-myoglobin antibody in polymyositis. Lancet, 2: 1205, 1972

9) Nishikai M & Reichlin M: Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis. Characterization of the Jo-1 antibody system. Arthritis Rheum, 23: 881, 1980

10) Mathews MB & Bernstein RM: Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. Nature, 304: 177, 1983

11) Whitaker JN & Engel WK: Vascular deposits of immunoglobulin and compliment in idopathic inflammatory myopathy. N Engl J Med, 286: 333, 1972

12) Behan WM, et al: Detection of immune complexes in polymyositis. Acta Neurol Scandinav, 65: 320, 1982

13) Currie S, et al : Immunological aspects of polymyositis. The in vitro activity of lymphocytes on incubation with muscle antigen and with muscle cultures. Q J Med, 60: 63, 1971

14) Johnson RL, et al: Lymphotoxin formation by lymphocytes and muscle in polymyositis. J Clin Invest, 51: 2435, 1972

23）糖原病II型にみられる空胞化リンパ球の超微形態

垂　井　清一郎*

研究協力者　金　山　良　男*　河　野　典　夫*
嶺　尾　郁　夫*　高　橋　光　雄*

糖原病II型（Pompe 病）は，ライソゾーム内の水解酵素 α-1, 4-glucosidase（acid maltase）の活性低下に基づく先天性代謝異常疾患であり，その病変は全身におよび，ほとんど全ての組織のライソゾームにグリコーゲンが蓄積する．臨床症状として，筋脱力，筋萎縮などの筋症状を呈することから，ミオパチーやジストロフィーとの鑑別が必要となるが，本症では末梢血にもその病態を反映するグリコーゲンを含んだ空胞を持つリンパ球が出現するので，その観察により他の筋疾患との鑑別は極めて容易となる[1]．今回，成人型 Pompe 病患者の白血球形態を観察した結果，リンパ球特有の顆粒である parallel tubular array（PTA）および clustered dense body（CDB）にグリコーゲンの蓄積することを認めたので，若干の考察を加え報告する．

症　例

症例は29歳女性で，家族歴に血族結婚はなく，既往歴にも特記すべきことはない．約2年前から徐々に下肢筋，次いで呼吸筋の筋力低下，萎縮を来した．心肥大はなく心電図にも異常は認めなかった．筋電図は筋原性変化を示した．耐糖能，グルカゴン，エピネフリン負荷試験における血糖反応，阻血下前腕運動負荷試験における乳酸，ピルビン酸反応はいずれも正常であった．筋生検標本について，筋グリコーゲンの増加，筋 α-glucosidase の活性低下（表1）を確認し，Pompe 病と診断した．

＊大阪大学医学部第二内科

表1　筋 α-glucosidase 活性とグリコーゲン含量．

patient：S.Y. 29y.o. female

α-glucosidase Activities in Muscle

substrate	α-glucosidase activity (mU/g muscle) acid (pH 4.5)	neutral (pH 6.5)
maltose	2.7 (49.6 ± 2.4)	36.3 (24.4 ± 3.1)
glycogen	7.5 (43 ± 16)	153 (71 ± 41)
MUαG	0.67* (7.29 ± 1.57)	11.7 (9.15 ± 1.41)

*pH: 4.0

Glycogen concentration: 35.9 mg/g. w. t. (11.9 ± 1.5)
control values (mean ± SD)

なお筋組織の電顕像においても，膜に囲まれたグリコーゲン顆粒の存在，および筋線維間のグリコーゲンの増量など，本症に特徴的な所見を認めた．

方法ならびに結果

患者より得たヘパリン加末梢血を遠沈し，白血球層を3% glutaraldehyde 次いで，1% OsO_4にて固定し，型の如く Epon 包埋し電顕観察した．

1．患者末梢血液光顕像

末梢白血球数は8,200/cmm で分類は，好中球65.0%，好酸球0.5%，好塩基球0.5%，単球7.0%，リンパ球27.0%と正常範囲であったが，リンパ球の41%に空胞を認めた（図1）．空胞の細胞内分布は，リンパ球形態により異なっており，小リンパ球（図1 a）では細胞の一端に集合するのに

対し，大リンパ球（図１ｂ）では細胞質内に散在し，その一部はアズール顆粒を伴っていた．PAS反応も同様の分布を示し(図１ｃ，１ｄ)，またこれらのPAS陽性顆粒は，アミラーゼ消化試験で消失することから，グリコーゲンであることが示された．

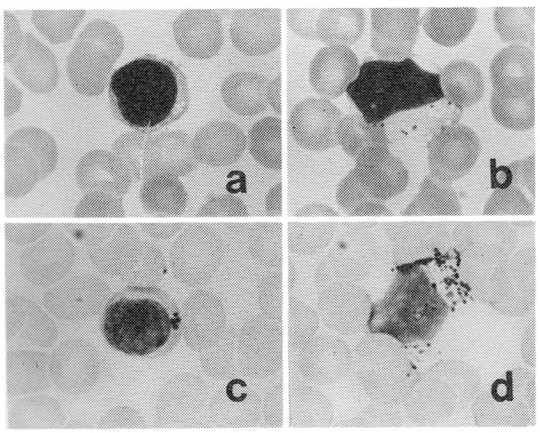


図１　リンパ球ギムザ染色（a，b）とPAS染色（c，d）．

一方，好中球，好酸球，好塩基球，単球，血小板には，ギムザ染色所見，PAS反応所見とも異常は認めなかった．

２．患者血球の電顕所見

リンパ球にみられる細胞質内顆粒のほとんどに，グリコーゲンの蓄積を認めた．小リンパ球(図２)では，グリコーゲンの充満した顆粒が集合しており，これはclustered dense body（CDB）と呼ばれる顆粒にグリコーゲンの蓄積したものと考えられた．一方，大リンパ球（図３）では，グリコーゲンを含んだ顆粒が散在し，その一部には管状構造物が密集した内容物が見られたので(図４)，これらの散在した顆粒は，parallel tubular array（PTA）と呼ばれる細胞内小器官にグリコーゲンが蓄積したものと考えられた．グリコーゲンの充満したPTA, CDBは直径0.4～0.8μmで，正常人にみられる本来の直径0.2～0.4μmより大型化していた．またPTA，CDBの本来の内容とグリコーゲンとは互いに混在することなく存在していた．リンパ球の細胞質内にはグリコーゲンの増量は認

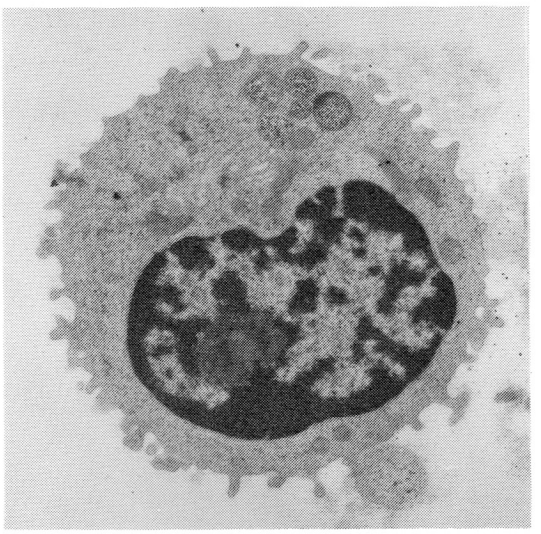


図２　グリコーゲンの充満したCDB．

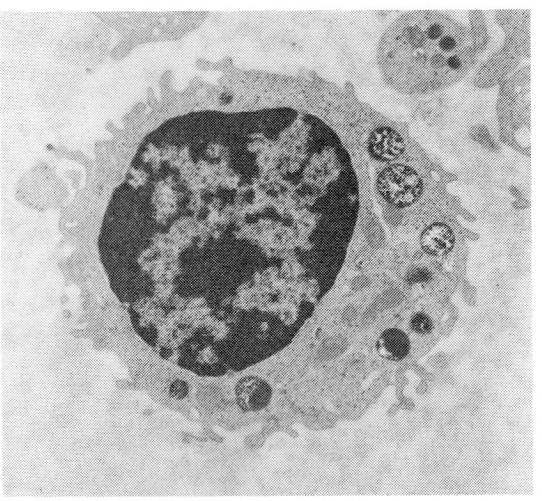


図３　グリコーゲンを含んだPTA．

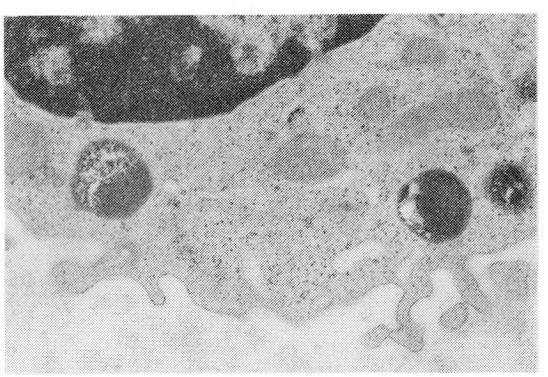


図４　図３の強拡大．

められなかった．また，好中球，単球，血小板には，リンパ球にみられるようなグリコーゲンを含んだ大型化した顆粒は認められず，好中球，血小板の細胞質内グリコーゲンの量，分布も正常であった．

考　　案

Pompe 病における空胞化リンパ球の出現は，既に infantile form[1]，childhood form[2] の各病型について記載されているが，今回初めて adult form にも確認され，いずれの病型にも見出し得ると考えられる．光顕下にグリコーゲンを含んだリンパ球を，電顕下にグリコーゲンの蓄積した顆粒を見出すことは，本症の診断上極めて有力な所見であると考える．

Pompe 病のリンパ球空胞が集合して出現する傾向のあることは既に指摘されていた[1]が，我々は空胞の集合像の他に，細胞質内に散在する空胞を持つリンパ球の存在を認めた．また電顕下でも，顆粒の集合した CDB，および細胞質に散在する PTA とにグリコーゲンの蓄積を認め，これらは各々，光顕でみられた空胞の集合像，散在像とに対応する所見と考えられる．ところで，本症にみられるグリコーゲンを含んだ空胞，顆粒はリンパ球内のライソゾームの所在を示す一種のマーカーとみなすことができる．正常人リンパ球のライソゾーム酵素の組織化学染色（酸性フォスファターゼ，β-グルクロニダーゼ，非特異性エステラーゼなど）でも，いわゆる“dot”状反応と“scattered”反応とが認められることは既に知られている．これまで，如何なる organella がこれらの組織化学所見に対応するか必ずしも明らかではなかったが，今回の観察により正常リンパ球の“dot”反応は CDB，“scattered”反応は PTA に由来することが示唆された．

CDB および PTA は，リンパ球にのみ見出される特有の organella で，しかも特定のリンパ球サブセットに分布する．すなわち，CDB は正常 Tμ 細胞，PTA は Tγ 細胞および third population cell（共にいわゆる large granular lymphocyte の形態を持つ）に見られるところから[3]，各サブセットの持つ機能とも密接な関連があると推測される．しかし，これまでその機能のみならず，その本態についてもほとんど知られていなかった．本症でグリコーゲンの蓄積が見られた事は，これら CDB，PTA が共にライソゾーム由来の構造物である事を示唆する．

Pompe 病では，全身の臓器，組織のライソゾームにグリコーゲンが蓄積するにもかかわらず，臨床症状は，ほぼ心筋，骨格筋の筋症状に限って出現し，他の機能異常が問題となることはほとんどない．筋症状の出現機序は，グリコーゲンの蓄積したライソゾームが機械的な破壊を受け，ライソゾーム内の各種の水解酵素が逸脱することによるとされている．しかし，本症には，臨床症状，発症年齢，予後の異なる3種の病型が区別されること，すなわち生後早期に発症し重症で予後不良な infantile form，本例のような比較的軽症の adult form，中間的な childhood form が存在することは，筋症状の発症機序を，ライソゾーム内 acid maltase 活性低下という単一の代謝異常のみでは説明し難いことを示しており，軽症型では何らかの代償機転が働いていることも想定されている[5]．

血液細胞においても，本症では，好中球の acid maltase 活性も欠損している[5]にもかかわらず，グリコーゲン蓄積を認めるのはリンパ球のみである．その理由として，好中球では元来，細胞質内に局在する neutral maltase の活性が高く[6]，acid maltase が欠損しても neutral maltase 活性は残存するため[5][7]，これにより acid maltase の活性低下を代償する可能性がある．しかし単球では，リンパ球以上に acid maltase の比活性が高い[6]にもかかわらず，本酵素の欠損に際しても，本例にみられるようにグリコーゲンの蓄積は認められない．したがって，好中球，単球では，acid maltase 欠損の影響が出現し難いといった可能性，あるいは，グリコーゲン蓄積を来した好中球や単球は，速やかに流血中から排除，処理されるなどの可能性も考慮する必要があろう．

ライソゾーム内の acid maltase 自体の生理的な意義についても不明の点が多く[8]，筋症状の発症機序と共に今後に多くの問題を残している．血

球はライソゾームを保有した有核細胞であり，反復して容易に得ることができるので，今後のPompe病の診断あるいは病態の解明に重要な知見を提供しうるものと考える．

結　語

リンパ球の形態学的分析は，Pompe病の診断，病態解析に有用であること，またこのような特殊な病態の検索によって，正常細胞の細胞構築をも明らかにし得ることを示した．

謝　辞

本研究の機会を与えていただいた，今井忠彦先生ほか市立神戸中央市民病院神経内科の諸先生に深謝いたします．

文　献

1) D.V.v. Bassewitz, et al.: Vacuolated lymphocytes in type II glycogenosis—A diagnostic approach? Eur. J.Pediatr., 127: 1—7, 1977.
2) H. Pralle, et al.: Plasmazelleinschlusse bei Mangel an sauer Maltase (Glycogenose Typ II). Klin. Wschr., 52: 653—654, 1974.
3) Y. Kanayama, et al.: Ultrastructure of normal human T cell subpopulations. Acta Haematol., 70: 220—228, 1983.
4) S. Shanske and S. DiMauro: Late-onset acid maltase deficiency. J.Neurolog. Sci., 50: 57—62, 1981.
5) C. Angelini, et al.: Comparative study of acid maltase deficiency. Arch. Neurol., 26: 344—349, 1972.
6) S. Nakagawa, et al.: Studies on the activities and properties of lysosomal hydrolases in fractionated population of human peripheral blood cells. Clin. Chim. Acta., 101: 33—44, 1980.
7) N. Taniguchi, et al.: Choice of lymphocytes for the diagnosis of Pompe's disease and the carrier state. Clin. Chim. Acta., 89: 293—299, 1978.
8) R. Geddes and G.C. Stratton: The influence of lysosomes on glycogen metabolism. Biochem. J., 163: 193—200, 1977.

24）Duchenne 型筋ジストロフィー症 赤血球膜の研究

黒岩義五郎*

研究協力者　小林卓郎*　後藤幾生*　岩下　宏**

はじめに

1967年 Brown ら[1] が Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球膜 Na^+-K^+ATPase の異常を指摘して以来，様々な赤血球膜の異常が報告されてきた．一方，それに対し全く異常がないという報告も数多く見られる．我々も現在までに赤血球膜リン脂質構成[2]，ATP[3]，acetylcholinesterase[4] などの検討を加えて来たが，いずれも Duchenne 型筋ジストロフィー症と正常コントロールの赤血球膜との間に有意の差は見出せなかった．

一般に筋ジストロフィー症では血清中に筋肉より筋肉内成分が漏出していることは明らかになっているが，その機構は解明されていない．一つの仮説は delta lesion より漏れ出るという説と筋膜そのものが leaky になっているという説がある．後者の仮説に基づき，我々は Duchenne 型赤血球膜が Creatine Kinase（CK）など筋肉内酵素が漏出しやすい状態であるか検討を加えた．又，同時に赤血球内 Lactate Dehydrogenase（LDH）や，Hemoglobin（Hb）の漏出に差があるかどうか検討を加えた．

方　法

対象は Duchenne 型筋ジストロフィー症 6 例（9—13歳，平均11歳，CK400～2,500U/dl）およびコントロールとして健康男子 2 例および，脳性小児麻痺 4 例（9～25歳，平均18歳，CK 0～24U/dl）を用いた．ヘパリン加血（10ml）を 4 ℃下で 3 回150mM 生食水で洗浄し，血漿，白血球などをとりのぞいたのちウサギ骨格筋精製 CK（38mU/l）を Humphreys ら[5] の方法で赤血球内にとりこませた．その後 4 回 10mM Tris-HCl 緩衝液（pH7.4），1 mM DTT，154mM NaCl（301 mOsm/l）にて洗浄し，赤血球が10%になるように 10mM $CaCl_2$，140mM NaCl，1mM DTT，10 mM Tris-HCl（pH7.4）（Ca^{++}-system）にて37℃ incubate した．Ca^{++}-free system としては洗浄用緩衝液を用いそのまま incubate した．赤血球内にとりこまれた CK，および LDH，Hb は再び赤血球を溶血させて測定した．赤血球内よりの漏出は，0，1，2，3，4 時間後600 g 5 分で遠心し，その上清中の CK, LDH, Hb を CK, LDH は UV 法で，Hb は Cyanmethemoglobin 法で測定した．

結　果

1．CK のとりこみ

表 1 に CK のとりこみ，溶血により遊出した LDH, Hb の再とりこみを表わした．CK は緩衝液中の約10%がとりこまれた．Duchenne 型筋ジストロフィー症とコントロールにはいずれも差は認められない．

2．CK，LDH，Hb の漏出試験

図 1，2，3 に CK, LDH, Hb のとりこまれた

表 1　Enzymes and Hb in resealed RBC

	CPK (mU/50 μl)	LDH (mU/50 μl)	Hb (μg/50 μl)
DMD	808 ± 136 (603-900)	337 ± 51 (290-430)	1031 ± 110 (896-1165)
CONTROL	771 ± 150 (603-986)	291 ± 134 (250-440)	1128 ± 171 (986-1344)

1U：1 μmol/min/room temperature

＊九州大学医学部脳研神経内科
＊＊国立療養所筑後病院

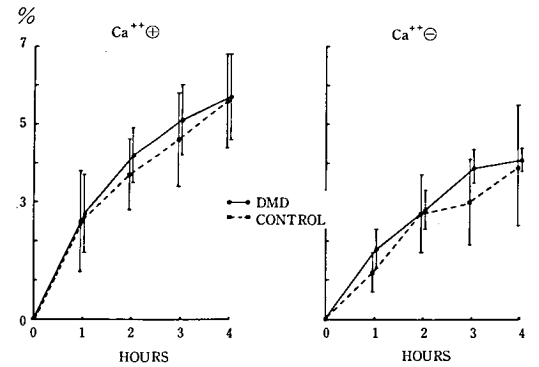


図1　Creatine kinase release from resealed RBC

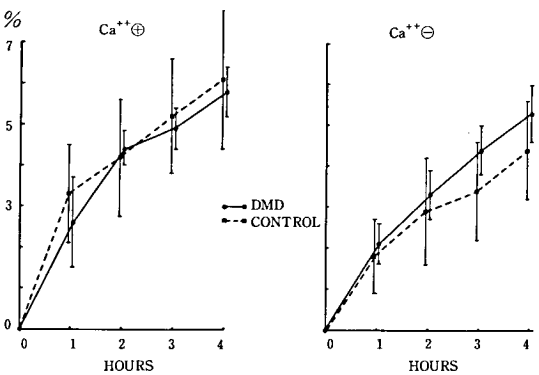


図2　Lactate dehydrogenase release from resealed RBC

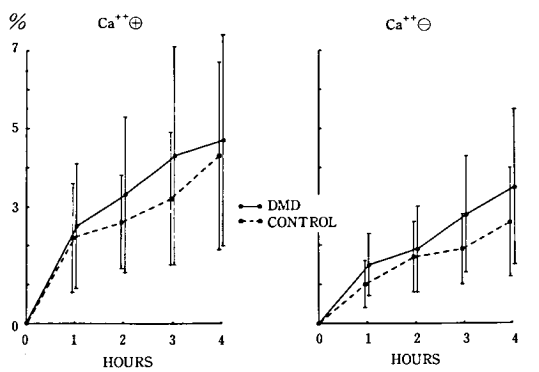


図3　Hemoglobin release from resealed RBC

量に対する漏出した量を百分率で表わした．いずれも時間に相関して細胞外への漏出が見られた．Ca^{++}-system と Ca^{++}-free system を比較するといずれの蛋白も Ca^{++}-system の方が漏出が著明であった．全体に Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜の方が比較的多くの CK, LDH, Hb の漏出が見られるが，有意の差ではなかった．

考　　察

従来の Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜の研究は赤血球膜の構造，膜酵素，膜脆弱性など様々な分野で報告されているが，赤血球膜に異常を認めた場合でも筋ジストロフィー症の病因と直接関連があるかどうか不明のことが多い．今回の我々の研究は赤血球膜と筋膜が同一の遺伝的原因により異常があるという仮説の上で，CK, LDH, Hb が赤血球内より膜を通して漏出する状態を検討したものである．また，Yoshida ら[6] は Ca^{++}存在下では Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球の変形が著明におこることを報告しており，Ca^{++}存在下と非存在下で CK などの漏出も比較した．しかしながら今回の実験では Ca^{++}存在下でも非存在下でも Duchenne型筋ジストロフィー症とコントロールの間で差は見られなかった．この結果よりそのまま Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜での CK などの漏出に異常がないとは結論し難く，今後(1)長時間 incubate し CK などの漏出を検討すること及び(2)低分子物質の赤血球膜を通しての動態を検討する予定である．

文　　献

1) Brown, H.D., Chattpadhyay, S.K. and Patel, A.B.: Erythrocyte abnormality in human myopathy. Science, 157: 1577—1578, 1967.
2) Kobayashi, T., Mawatari, S. and Kuroiwa, Y.: Lipids and proteins of erythrocyte membrane in Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta, 85: 259-266, 1978.
3) Igisu, H., Mawatari, S. and Kuroiwa, Y.: Erythrocyte ATP in Duchenne dystrophy: Effects of ouabain and propranolol. Neurology (Minneap.), 29: 992-995, 1979.
4) Igisu, H., Mawatari, S., Kuroiwa, Y. and Miyoshino, S.: Erythrocyte acetylcholinester-

ase in Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta, 105: 241-247, 1980.

5) Humphreys, J.D. and Ihler, G.: Enhanced stability of erythrocyte-entrapped glucocerebrosidase activity. J. Lab. Clin. Med., 96: 682-692, 1980.

6) Yoshida, M., Ando, K. and Satoyoshi, E.: Abnormalities of erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. Ann. Neurol., 13: 649-653, 1983.

25）Duchenne型筋ジストロフィー症患者の赤血球膜主要ポリペプチドの電気泳動による分析

吉　岡　三恵子*

緒　　言

Duchenne型筋ジストロフィー症（以下DMDと略す）の病因は不明であるが，筋線維の細胞膜は病因との関連において現在最も注目されている．これまで細胞表面膜に存在する多数の蛋白質を二次元ゲル電気泳動で分離する試みは幾つかなされて来たが，transmembrane proteinを多く含む表面膜蛋白質の全成分を，分離条件を異にする2種類の泳動条件下において，終始可溶性に保ちながら良い分離パターンを得ている泳動系は余り多くない．我々は表面膜蛋白質の全成分に関して，比較的良い分離パターンが得られるImada and Sueokaの記載した方法[1]を用いて，これまでラットの骨格筋のcell line L6について，筋の発達に伴う表面膜蛋白の変化を調べてきた．更にL6の変異株であるM3Aの表面膜蛋白をL6と比較して検討し，種々の差異を見出した[2]．今年度は人骨格筋の培養細胞について，表面膜蛋白の分析を行う予定であったが，昨年より続けている骨格筋のprimary cultureにおいて，骨格筋を線維芽細胞等を含まぬ純粋なcell lineとして培養するには至らず，生化学的分析は行い得なかった．しかし，一般に遺伝的疾患の生化学的異常は，症状に直接関係する組織のみでなく，他の組織の細胞にも現われうる可能性があることから，今回は患者の赤血球膜について，主要ポリペプチドを二次元ゲルによって分析した．

対象及び方法

DMDの10歳の男児及び対照として健康な10歳男児より，約25mlの静脈血をヘパリン採血し，Dodge等の原理[3]に基づき，Steck等[4]の方法に従ってghostsを作成した．即ち，25mlの血液に0.2M EDTA 1 mlを加えた後，同容量の0.15M sodium phosphate（pH 8）－0.15M NaClで希釈した．これを4℃の冷却下で10,000g，10分間遠沈し，上清と“buffy coat”を取り除いた．沈渣の細胞は5 mM sodium phosphate（pH 8）－0.15 M NaClで三度洗滌し，1.0—1.2mlの細胞を40mlの冷却した5 mM sodium phosphate（pH 8）と混合した．これを100,000g（4℃）で30分間超遠沈し，上清の赤い溶液をとり除き，更に不透明の“buttons”を捨て去ってghostsを得た．このghostsをlysis buffer（pH7.2）（10mM sodium phosphate, 2% SDS, 10% glyceol, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2mM EDTA, 1 mM N-ethylmaleimide, 1 mM iodoacetamideを含む）に溶解し，遠沈によって不溶解部分を取り除いた．

我々の用いた二次元ゲル[1]では，第一次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）を，9 M尿素，0.1% SDS及び0.3% Triton X-100を含む円柱ゲルで行い，第二次元PAGEをスラブゲルを用いて，Laemmliの系で行うものである．SDSを第一次元及び第二次元PAGEに用いているので，非イオン性界面活性剤では分子分散を起こしにくい蛋白質を多く含む表面膜標本の二次元分析に適していると考えられる．ゲルの染色は0.1% Coomassie blueによって行った．

結　　果

正常赤血球のghostsの蛋白を通常のLaemmli系の一次元ゲルで分析し，得られたbandsをFairbanks等[5]の報告に従って同定した（図1）．即ち，Band Ⅰ及びⅡはそれぞれ分子量24万及び22万のspectrinと同定され，Band Ⅲはゲルの中

＊神戸市立中央市民病院小児科

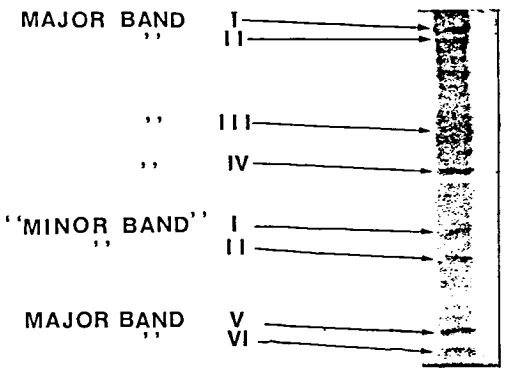


図1　正常赤血球膜の一次元ゲル電気泳動図

央に幅広い帯として表われ，分子量約9万の糖蛋白といわれている．この下には Band IV(分子量約7万7千)が認められている．この Band IVの下には "minor bands" と呼ばれる二つの蛋白が認められるが，Fairbanks の命名法ではまだ名付けられていない．Band Vは分子量約4万5千で，赤血球の actin 又は actin 様作用を持つ蛋白と同定され，Band VIは最下方に認められる分子量約3万6千の低分子蛋白である．

一方，二次元ゲルによる分析では，先ず，正常の赤血球膜については，一次元ゲルで一本の Band にみえる Band II が2個以上の spot として出現している（図2）．又，Band IVが二次元ゲルでは4.1及び4.2という二つの spot に分離していた．DMD の赤血球膜については，図3に示すように，Band II は分離せず，Fairbanks 等の Band VIに相当すると考えられる№8の蛋白が8.1及び8.2という二つの蛋白に分離し，№7と№8の spot の間に "minor spot" が認められた．

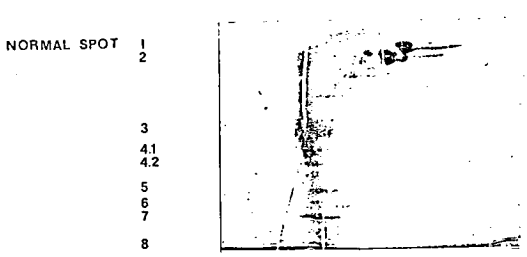


図2　正常赤血球膜の二次元ゲル電気泳動図

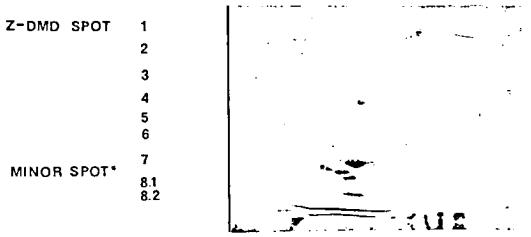


図3　DMD 患者赤血球膜の二次元ゲル電気泳動図

考　　察

DMD の患者赤血球膜の生化学的及び形態学的異常については，これまで多くの報告がなされている．Rose 等[6]は，Band II (spectrin) を純粋にとり出した上，これを等電点電気泳動法で更に分析すると，Band II を構成する蛋白は数個に分れ，DMD 患者ではこの中のある蛋白に，特に強い燐酸化がみられることを報告している．我々の用いた二次元ゲルにおいては，正常人の赤血球膜では Band II が数個の spot に分れ，Band II の異質性を示していたが，DMD 患者の赤血球ではこうしたことは認められなかった．更に，Rose 等[6]は Band II の燐酸化のパターンは，同一家系内の患者の間では類似しているが，家系が異なるとパターンに差があることを報告し，これは DMD の生化学的異質性を示すのではないかと考察している．我々の今回の検討は一例についてのみで，結論としては何もいえないが，今後症例を増して検討していく必要があると考えられる．

赤血球膜の形態学的な観察としては，Wakayama 等[7]が DMD の患者赤血球膜をフリーズ・フラクチュア法で調べ，細胞膜の P 及び E の両面において，膜内粒子が正常人に比し，減少していることを報告している．この赤血球膜にみられる変化の意義として，彼等は次のような考察を述べている．即ち，Yu 及び Branton[8]が Band IIIのポリペプチドとレシチンから膜内粒子を再構築している実験から考え，Band IIIポリペプチドか膜の脂質の変化が，DMD にみられる膜内粒子の減少をひき起したのではないかと述べている．

我々が今回，DMDの赤血球膜で認めたBand VIなどに相当する低分子蛋白の変化については，これを意味づける報告はみあたらないが，DMDの赤血球膜の変化には，先程も述べたように，家系的な異質性も報告されていることから，今後，症例を増して，その病的意義を考えたい．

文　献

1) Imada, M. & Sueoka,N.: A two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of mammalian cell surface proteins. Biochim. Biophys. Acta, 625: 179—192, 1980.

2) Yoshioka, M. & Sueoka, N.: Cell surface proteins of rat myoblasts.Exp. Cell Res., 146: 219—223, 1983.

3) Dodge, J.T., Mitchell, C. & Hanahan, D.J.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys., 100: 119—130, 1963.

4) Steck, T., Weinstein, R.S., Straus, J.H. & Wallach, D.F.H.: Inside-out red cell membrane vesicles: preparation and purification. Science, 168: 255—257, 1970.

5) Fairbanks, G, Steck, T.L. & Wallach, D.F.H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, 10: 2606—2617, 1971.

6) Roses, A.D., Herbstreith, B., Metcalf, B. & Appel, S.H.: Increased phosphorylated components of erythrocyte membrane spectrin band II with reference to Duchenne muscular dystrophy.J. Neurol. Sci., 30: 167—178, 1976.

7) Wakayama, Y., Hodson, A., Pleasure, D., Bonilla, E. & Schotland, D.L.: Alteration in erythrocyte membrane structure in Duchenne muscular dystrophy. Ann. Neurol., 4:253—256, 1978.

8) Yu, J. & Branton, D.: Reconstitution of intramembrane particles in recombinants of erythrocyte protein Band 3 and lipid: Effects of spectrin-actin association. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 73: 3891—3895, 1976.

26) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜のリン脂質構成

馬　渡　志　郎*

研究協力者　安　徳　恭　演*

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症(以下 DMD)の赤血球膜のリン脂質構成についても，他の DMD の赤血球に関する報告と同様に異論がある．私共も薄層クロマトグラフィーを用いて各リン脂質を分画し，その分画をかき取ってリンを定量する方法で DMD 群と対照群を比較して相対比などを算出し，DMD と対照で有意差がないことを報告している[1]．

ところで，人の赤血球膜においても，膜におけるリン脂質の構成は二重構造になっていて，外側と内側(細胞質側)では構成が異なることが知られている．今回，私共は DMD 赤血球膜リン脂質の二重構成の異常の有無を検討するために phospholipase A_2を赤血球に作用させ，高速液体クロマトグラフィーを用いて分析してみた．

対象および方法

表1に示した如く，DMD 患者7人と同年齢群で同性の DMD 以外の筋萎縮症患者7人を対象とした．いずれの患者も同一施設の同一病棟に六ケ月以上入院中で，食餌も同じであった．採血はすべての患者より同日の同時刻に行い，以後の操作や測定も同時あるいは DMD と対照を交互に行った．ヘパリン採血後，赤血球を分離し，生食水で4回洗浄後，NaCl，KCl，$MgSO_4$，$CaCl_2$，$NaHPO_4$，glucose，Tris-HCl を含んだ等張液に Ht で約30%になるように浮遊した．そして，①上記の洗浄赤血球をそのまま，②これに24単位の phospholipase A_2(bee venom)を加えて37℃，2時間おいたもの，③ Ca^{++}-ionophoreA-23187(2 μM)を37℃，1時間作用させたもの，④ Ca^{++}-ionophore を③の如く作用させた後で②の如く phospholipase A_2を作用させたものの4種類の赤血球を得て，それぞれ生食水で1回洗浄してから，Folch らの方法で脂質を抽出した．クロロホルム層を乾固してメタノールに再溶解後，高速液体クロマトグラフィーで各リン脂質に分け，分光光度計の210nm でモニターして各リン脂質の相対比を測定した．高速液クロによる分析と相対比の計算はすべて機器で自動的に行った．さらに前記の③の如く Ca^{++}-ionophore を作用させた前と後でヘマトクリット機器を用いて赤血球の体積(cell volume)の変化を測定した．

結　　果

図1に洗浄赤血球(未処理)と，それを phospholipase A_2処理した赤血球のリン脂質のクロマトグラムの例（同一人物）を示した．Phosholipase A_2処理によって phosphatidylcholine (PC) は著減しており，phosphatidylethanolamine(PE)と phosphatidylserine(PS)の変化は少ないことが明らかである．Sphingomyelin (SM) は phospholipase A_2の基質ではないので phospholipase A_2による変化はないものとして，SM の量を基に PC と PE の分解率を計算すると，DMD では PC 68.0±1.8%，PE 2.7±3.8%であった．対照では PC 70.9±4.3%，PE 4.0±11.3%であった．これらの結果は PC は主に膜の外表面側に存在し，PE は主に膜の内側（細胞質側）に存在していることを確かめたものと考えられる．DMD 群と対照群を比較すると，PC 分解率は統計の上では有意差

*国立療養所筑後病院

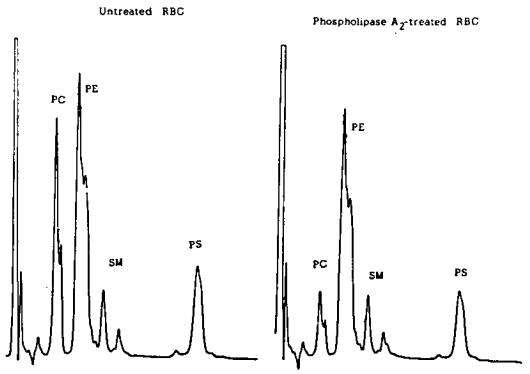


図 1

はなかった．表 1，表 2 は各対象の結果を DMD 群と対照群に分けて集計したものである．Ca^{++}-ionophore を作用させた赤血球のリン脂質全体の相対比は，未処理の赤血球のそれと殆んど変化していなかった．しかし，Ca^{++}-ionophore を作用させた赤血球に phospholipase A_2を作用させると，未処理の赤血球に phospholipase A_2を作用させたものとは異なっていた．DMD 群と対照群との間には phospholipase A_2処理すると DMD で PC が多く，PE が少ない傾向が認められた（表 2，3）．これを明らかにするために各症例の PE/PC の比を集計して DMD と対照を比較すると，未処理の赤血球においても Ca^{++}-ionophore を作用させた赤血球においても，phospholipase A_2処理後の赤血球では DMD で有意に低値であった（表 4）．

Ca^{++}-ionophore を作用させると赤血球の体積は減少した．減少率は DMD で有意に高かった．(DMD-28.1±2.6%，対照24.6±2.1%，$p<0,02$)

考　　案

人の赤血球膜におけるリン脂質は膜の細胞の細胞外表面側と細胞質側では非対称的な分布をしていることはよく知られている．ミツバチ毒（bee venom）からの phospholipase A_2は赤血球の外側から一定時間作用させると細胞膜の外表面に存在しているグリセロリン脂質を溶血を起さないで分解する[2]．したがって，phospholipase A_2を作用させた後で，膜のリン脂質を抽出してその構成の

表 1　List of patients used in the present study

Patients	Sex	Age	Clinical diagnosis	Serum CK(mU)*
1	M	11	DMD	471
2	M	15	DMD	411
3	M	10	DMD	1144
4	M	13	DMD	237
5	M	14	DMD	279
6	M	10	DMD	492
7	M	9	DMD	414
8	M	14	Neurogenic muscular atrophy	31
9	M	7	Congenital muscular atrophy	96
10	M	8	Neurogenic muscular atrophy	29
11	M	10	Neurogenic muscular atrophy	49
12	M	12	Neurogenic myopathy atrophy	189
13	M	11	Congenital myopathy	90
14	M	9	Congenital myopathy	269

*Normal ranges of serum CK; <50mU

表 2　Phospholipid composition of erythrocytes (%)

	Untreated erytrocytes		Phospholipase A_2 treated erythrocytes	
	DMD (n = 7)	Control (n = 7)	DMD (n = 7)	Control (n = 7)
PC	21.2±1.0	21.1±1.7	8.5±0.8	7.5±0.8
PE	47.3±1.4	48.0±1.2	57.8±2.5	57.7±4.6
SM	9.8±0.3	9.6±0.6	12.2±1.2	12.3±1.5
PS	21.3±1.9	20.8±3.8	20.8±3.8	21.7±5.6

表 3　Phospholipid composition of erythrocytes (%)

	Ca-ionophore treated erythrocytes		Ca-ionophore & PL-A_2* treated erythrocytes	
	DMD (n = 7)	Control (n = 7)	DMD (n = 6)	Control (n = 6)
PC	21.1±1.1	21.8±3.1	7.4±0.5	6.9±0.4
PE	47.6±1.9	48.9±1.2	48.5±3.1	49.5±1.9
SM	10.2±0.8	10.0±1.1	15.7±0.9	14.9±1.1
PS	20.7±2.2	18.7±4.9	28.1±2.7	27.8±1.1

*PL-A_2; phospholipase A_2

表4　Ratio of PC to PE in erythrocytes(PE/PC)

	DMD	Control	t-test
Untreated erythrocytes	2.23±0.12	2.29±0.18	NS*
PL-A_2 treated erythrocytes	6.70±0.37	7.53±0.81	$p<0.02$
Ca-ionophore treated erythrocytes	2.26±0.12	2.27±0.27	NS
Ca-ionophore and PL-A_2 treated erythrocytes	6.62±0.49	7.21±0.29	$p<0.02$

*NS; not significant

変化をみると，膜の外表面側に存在するグリセロリン脂質の変化をみることになる．私共は，phospholipase A_2を作用させて脂質を抽出後，高速液体クロマトグラフィーでリン脂質を分画し，210 nmでモニターしたクロマトグラムの構成比を機器で自動的に計算するという組み合わせで行ってみた．このような方法の組み合わせはまだ報告がない．抽出したリン脂質を薄層クロマトグラフィーで各リン脂質を分けて，それからかき取ってそのリンの量を測定するという従来の方法よりも，操作や手順が簡単であり人為的誤差が少なく，感度も高いように思われる．私共の結果も，人赤血球のグリセロリン脂質の中でPCが主に外表面側に存在し，PEとPSは主に膜の内側に存在していることを確認したものと思われる．

ところで，DMDの赤血球膜のリン脂質の構成については，正常者の赤血球膜と比べてKunzeら[3]はSMが多かったと，Kolofoutisら[4]はPCが少なくSMが多かったと報告している．しかし，その後の報告[1)5)]では異常なかったとするものが多い．今回の私共の結果はDMDとその他の筋萎縮症群を比較したものであるが，未処理の赤血球では統計的に明らかな有意差はなかった．しかしphospholipase A_2を作用させた後ではPE/PCの比が有意にDMDで小さかった(表4)．このことは，DMDの赤血球膜では膜の外側でPCが少ないかまたはPEが多いことを示している．しかしながら，これには次のようないくつかのことを念頭におく必要があるように思われる．1つはphospholipase A_2を作用させるのに37℃で2時間incubateしたことから，この2時間の間にリン脂質（特にPC）の膜の内側から外側（あるいは逆方向も）の移動があり，それがDMDで少なかったことを示している可能性も考えられる．実際にCa^{++}-ionophoreを1時間作用させた後でphospholipase A_2を作用させた赤血球では，単にphospholipase A_2を作用させた赤血球とリン脂質構成に明らかな差異があり，ある条件下では膜の内側と外側とのリン脂質の移動が短時間に行われ得ることを示している(表2，3)．もう1つは，リン脂質を210nm領域の紫外線でモニターする場合は吸収の大部分はその脂肪酸構成の二重結合によると考えられていることである．現に，私共の結果もリンの定量によって出したリン脂質の相対比と比較して[1)4)]，不飽和脂肪酸を多く有するPEやPSの量（%）が多い．したがって今回の結果は，phospholipase A_2によって作用を受けたリン脂質の脂肪酸構成の差異を反映している可能性も考えられる．

今回の私共の研究は，DMD群と対照群との間に年齢，性，食餌内容に相異がなく，採血，赤血球の保存，操作，種々の測定も同時あるいは交互に行った．結果はDMDの赤血球膜のリン脂質構成あるいは代謝に他の筋萎縮症と異なるところがあることを示している．

文　献

1) Kobayashi, T., Mawatari, S., Kuroiwa, Y.: Lipids and proteins of erythrocyte membranes in Duchenne muscular dystrophy. Clin.Chim. Acta., 85: 259-266, 1978

2) Zwaal, R.F.A., Roelfsen, B., et al.: Organization of phospholipids in human red cell membranes as detected by the action of various purified phopholipases. Biochim. Biophys. Acta., 406: 83-96, 1975

3) Kunze, D., Reichmann, G., et al.: Erythrocytenlipides bei progressiver muskeldystrophies. Clin. Chim. Acta., 43: 85-87, 1973

4) Kalofoutis, A., Juliien, G., et al.: Erythrocyte phospholipids in Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta., 74: 85-87, 1977

5) Plishker G.A., Appel, S.H.: Red blood cell alterations in muscular dystrophy; the Role of lipids. Muscle Nerve, 3 : 70-81, 1980

27）筋強直性ジストロフィー症の赤血球膜と血漿の脂質の比較検討

木　下　真　男*

研究協力者　若　田　宜　雄*　荒　木　　洋*
河　村　裕　子*　小　林　雅　子*

はじめに

筋強直性ジストロフィー症（以下 Myotonia）は血清中の脂質，特にコレステロールやトリグリセライド，β-リポ蛋白などが上昇する症例があることが知られている．この点より脂質代謝系の異常の有無について，多くの報告がある．そこで我々は，赤血球膜及び血漿について脂質を検討してみた．

対象及び方法

Myotonia14人，年齢30～50歳，平均39.75歳，対照20人，年齢25～54歳，平均38.18歳を対象とした．早朝空腹時に，8cc ヘパリン採血し遠沈し血漿を分離した．血球成分は，生食で3回洗浄し，buffy coat を除去した後，10mM Tris 塩酸バッファーを用い，20,000g40分で4回超遠沈し，淡赤色の赤血球膜を得た．それぞれ赤血球膜，血漿について，総蛋白は Lowry 法にて比色定量した．総脂質は Folch らの方法にて抽出し，窒素下にて乾固させ，一昼夜真空状態におき，乾燥重量として微量直示天秤で定量した．また総燐脂質は Bartlett 法にて比色定量した．各燐脂質の分画は薄層クロマトグラフィーにて分離し，比色した．各燐脂質の脂酸構成はガスクロマトグラフィーにて行なった．スフィンゴミエリンのメチレーションは，塩酸メタノールで反応後，石油エーテルで脂肪酸メチルエステルを抽出する方法で行なった．

＊東邦大学医学部第四内科

結　　果

総蛋白は，赤血球膜で Myotonia16.85±1.68 mg/dl whole blood，対照15.91±3.20，血漿で Myotonia6.50±0.68mg/dl，対照7.21±0.39で有意差は認められなかった．総脂質は，赤血球膜で Myotonia107.53±22.30mg/dl whole blood，対照，95.10±29.75，血漿で Myotonia5.82±1.42 mg/ml，対照4.94±0.68で Myotonia において増加がみられたが，有意差は認められなかった．総燐脂質は，赤血球膜で Myotonia32.63±8.49μ mol P/mg protein（ただし全血1cc 中の赤血球膜に含まれる蛋白量に対して），対照30.54±6.23，血漿で Myotonia2.18±0.49μ mol P，対照1.92±0.24であり，Myotonia に増加がみられたが有意差は認められなかった（表1）．

表1　赤血球膜及び血漿の脂質

	Erythrocyte		Plasma	
	Normal	Myotonia	Normal	Myotonia
Protein	15.91± 3.20 (mg/dl whole blood)	16.85± 1.68	7.21±0.39 (g/dl)	6.50±0.68
Total lipid	95.10±29.75 (mg/dl whole blood)	107.53±22.30	4.94±0.68 (mg/ml)	5.82±1.45
Total phospholipid	30.54± 6.23 (μ mol P/mg protein)	32.63± 8.49	1.92±0.24 (μ mol P)	2.18±0.49

個々の燐脂質の割合は，赤血球膜でスフィンゴミエリン，フォスファタジルコリン，フォスファタジルエタノラミンが主要成分であり，フォスファタジルセリンとイノシトールにおいて，Myotonia7.69±5.60%，対照1.59±1.98% と Myotonia に増加がみられた．血漿では，フォスファタジルコリンが，70%前後と主要成分であり有意差はみられなかった（表2）．

各燐脂質の脂酸構成では，血漿リゾフォスファ

表2　個々の燐脂質の割合

	Erythrocyte		Plasma	
	Normal	Myotonia	Normal	Myotonia
Lyso P.choline			5.50±1.73	5.55±1.95
Sphingomyelin	26.63±2.76	25.20±3.73	16.15±2.76	19.00±3.56
P.choline	27.81±2.28	27.85±3.44	72.25±4.28	69.31±4.83
P.inositol & serine	1.59±1.98	7.69±5.60	2.31±0.41	2.70±0.77
P.ethanolamine	44.40±1.72	38.45±7.77	4.15±1.05	3.36±1.35

P：Phosphatidyl

タジルコリンで，主要構成成分は，C16，C18，C26：2であったが有意差は認められなかった．スフィンゴミエリンは，赤血球膜で主要構成成分は，C16，C24，C24：1であり，血漿で主要構成成分は，C16，C22，C24，C24：1であった．いずれも有意差は認められなかった（表3）．

フォスファタジルコリンは，赤血球膜及び血漿で主要構成成分は，C16，C18，C18：1，C18：2であり有意差は認められなかった（表4）．

フォスファタジルセリンとイノシトールは，赤血球膜で主要構成成分は，C16，C18，C20：4であり血漿の主要構成成分は，C16，C18，C22：2，C24，C26：2であり，有意差は認められなかった．

フォスファタジルエタノラミンは，赤血球膜で主要構成成分は，C16，C18，C18：1，C20：4であり，血漿でC16，C18であり，血漿のC26においてMyotoniaに有意な低下を認めた（表5）．

考　　案

筋強直性ジストロフィー症において脂質の異常があるのではないかとの指摘は古くからなされて

表3　スフィンゴミエリンの脂酸構成

	Erythrocyte		Plasma	
	Normal	Myotonia	Normal	Myotonia
C14		0.61±0.16	1.00±0.41	0.90±0.31
C16	27.11±3.00	24.91±3.50	31.37±2.77	27.50±5.07
:1			0.74±0.22	
C18	5.16±1.85	6.42±1.44	7.29±1.81	8.53±1.79
:1			1.63±0.59	1.00±0.54
:2			1.86±0.44	3.08±2.07
C20	1.68±0.47	1.97±1.10	4.23±1.23	4.47±1.40
:4	1.12±0.44	0.99±0.21	4.04±0.77	3.53±1.42
C22	9.74±1.70	7.47±1.35	12.29±1.48	12.25±1.95
C24	24.24±2.59	23.64±4.69	11.32±2.51	11.52±3.69
:1	22.35±2.54	24.69±4.29	21.59±3.24	22.10±5.56
:2	2.39±1.23	3.17±0.84	1.53±0.79	2.63±0.81
:6			0.96±0.18	
C26	0.34±0.13	0.90±0.39		0.74±0.41
:2	2.65±2.04	1.46±0.58	2.75±1.12	1.86±2.12
:4				1.75±2.56

表4　フォスファタジルコリンの脂酸構成

	Erythrocyte		Plasma	
	Normal	Myotonia	Normal	Myotonia
C14			0.18±0.14	
:1			0.46±0.16	
C16	43.69±3.88	44.93±2.15	40.84±3.17	41.13±2.38
:1		0.76±0.38	0.40±0.14	0.88±0.29
C18	12.48±1.63	11.59±1.27	14.75±6.78	16.10±1.88
:1	14.58±1.77	16.98±3.13	10.62±1.36	12.22±1.66
:2	13.45±2.11	11.75±1.36	16.48±3.06	15.46±2.14
:3	0.31±0.12	0.39±0.11	0.31±0.11	0.39±0.18
C20				
:2	0.37±0.23			0.49±0.29
:4	2.09±0.71	1.75±0.68	2.99±1.25	2.62±1.16
:6			1.62±2.14	
C22	0.73±0.34	1.14±0.60	0.99±0.58	1.45±0.24
:1				
:2	2.60±1.44		2.43±1.55	3.12±1.04
:4	0.76±0.29		0.68±0.58	
:6	3.35±1.52		2.28±1.32	2.18±1.08
C24	2.11±1.90	2.88±1.20	2.07±1.50	2.98±0.83
:1	0.83±0.38			
:2	1.95±1.50	2.61±2.47	1.04±0.52	1.38±0.86
:4	1.42±0.86	1.65±0.79	1.86±1.22	
C26	0.93±0.43	1.10±0.69	0.78±0.33	0.81±0.52
:1				2.30±0.53
:2	3.23±2.24	1.99±1.65	2.08±1.21	1.21±0.72
:4	0.80±0.46	1.03±0.57	1.20±1.06	

表5　フォスファタジルエタノラミンの脂酸構成

	Erythrocyte		Plasma	
	Normal	Myotonia	Normal	Myotonia
C14	1.72±1.47			2.50±1.54
:1	3.02±0.66	3.68±0.59		2.10±1.02
C16	16.20±2.21	19.49±3.25	32.34±9.40	33.28±10.73
:1	6.24±0.99	6.57±1.70	4.23±2.21	4.95±1.18
C18	21.77±0.86	17.25±4.56	11.15±2.85	12.26±2.05
:1	12.70±1.47	13.40±0.85	2.04±1.10	2.56±1.49
:2	3.73±0.75	3.73±0.74	4.67±1.88	3.74±1.68
:3	0.44±0.09	0.51±0.14		
C20:2	0.32±0.24			
:4	14.42±1.51	13.35±1.65	5.66±2.45	4.49±2.97
C22	0.85±0.67	0.75±0.27	0.82±0.76	
:2	2.40±0.65	3.88±0.98	7.94±2.51	9.79±2.13
:4	4.44±1.63	2.07±0.95	2.98±2.68	1.82±1.36
:6	8.57±1.66	8.64±1.20	4.08±4.18	2.11±2.49
C24	3.19±1.39	3.61±1.46	2.54±0.96	
:1		1.60±0.88		
:2	2.13±0.41	0.47±1.34	1.41±0.73	
:4			4.49±2.98	5.76±2.31
:6	0.80±0.93		2.90±1.47	3.93±2.07
C26	2.58±1.24	2.62±0.48	9.08±5.33	1.02±0.28*
:2	2.37±1.56	1.53±0.86	11.79±2.72	7.48±2.70
:4	0.58±0.61		4.14±2.88	2.65±1.62

* $P<0.01$

いるが，これが疾患の原因に関係するのか，結果によるものかは依然として不明である．これらの点から赤血球膜及び血漿について脂質の研究が多くなされている．しかしながら，赤血球膜の燐脂質の異常の有無については報告者により意見の分かれるところである．また，赤血球膜と血漿の脂

質を比較検討したデータは本邦ではみられていない．そこで我々は赤血球膜と血漿の脂質を比較検討してみた．

赤血球膜の総蛋白，総脂質，総燐脂質の質量についての報告は少なく，その単位は packed cell 当たり，または総脂質，総燐脂質では，蛋白当たりなど種々の報告がある．我々は全血8cc より膜を採取した由であるが，個体差により血球数・ヘマトクリット値が異なるため，一応総蛋白・総脂質は dl 全血当たりとし，総燐脂質は1cc 全血中の赤血球膜に含まれる蛋白当たりとした．これにより誤差はかなり相殺されると思われるが，従来の報告との比較は，それぞれの単位に合せておこなった．

赤血球膜の総脂質は，Thomas ら[1]は不変を報告し，我々のデータは増加傾向をみたが，有意差は認められなかった．血漿において Andiman ら[2]は増加を認め，Thomas は不変を認めた．我々のデータは，不変であり，量的に Thomas とほぼ一致をみた．総燐脂質は，赤血球膜において二重構造のため，機能的に重要であり，大西ら[3]は，総脂質の70％強を報告している．我々のデータも，多少のバラツキはあるが割合という点では一致していた．量的には，燐脂質は実際に測定することが出来ず，蛋白量当たりの算出になってしまうが，従来の報告と大差なく，また Myotonia との比較では有意差は認められなかった．

次に，各燐脂質の割合では，赤血球膜は，Thomas, McLaughlin[4]，馬渡ら[5]の報告があり，我々のデータと比較すると，いずれもフォスファタジルエタノラミンが多く，フォスファタジルセリンとイノシトールが少ない．また馬渡らと比較すると，スフィンゴミエリンにかなりの違いがみられた．Myotonia との比較ではフォスファタジルセリンとイノシトールが Myotonia において有意に増加していたが，量的にも少なく，標準偏差も大きいため，さらに検討が必要と思われた．燐脂質の分布は，大西らの報告にも示されている様に，赤血球膜の表側と裏側では，かなりの変化があり，操作上の手技により影響がある可能性も否定できない．また血漿と比較すると，燐脂質の構成成分の割合にかなりの差がみられ，相関関係は認められなかった．

各燐脂質の脂酸構成については，Ruitenbeek[6]，馬渡らの報告がみられる．リゾフォスファタジルコリンの血漿では，Ruitenbeek は，C14の増加を報告しているが，我々のデータでは有意差は認められていない．スフィンゴミエリンの赤血球膜で，Ruitenbeek は，C20：2 で増加，馬渡らは不変を報告した．我々のデータも，不変であり，全体像としても馬渡らと一致していた．血漿では，Ruitenbeek と比較すると脂酸構成全体においてもかなりの違いがあり長鎖脂肪酸が少ない点は，メチレーションの違いがあると思われた．フォスファタジルコリンは，赤血球膜で馬渡らは，C18の低下，C18：1 の増加を，Ruitenbeek は C18：2 の増加を報告した．我々のデータは馬渡らと同じ傾向を示したが有意差はみられなかった．血漿は，Ruitenbeek らの認めた様な有意差はみられなかった．フォスファタジルセリンとイノシトールでは，いずれの報告もフォスファタジルセリンについてであり，比較は難しい．我々の薄層クロマトグラフィーによる展開は，始め中性脂肪を除去し，次に各燐脂質を分離させるものであり，従来の二次元展開とは異なり，フォスファタジルセリンとイノシトールが分離されないこともあり，一応両者を同時に採取してある．しかしながら，フォスファタジルイノシトールの含量がかなり微量でフォスファタジルセリンを代表させ得るものと考えている．赤血球膜では，Ruitenbeek は C16の低下，馬渡らは不変を報告した．我々も不変であったが，両者共に全体像としてはかなり違いがあった．血漿においても有意な差は認められなかった．フォスファタジルエタノラミンは，赤血球膜で，馬渡らは C16，C18：1 の増加，C18の低下を認めたが，我々のデータでは，Ruitenbeek 同様不変であった．血漿では，我々は，C26の有意な低下を認めた．しかしながら血漿フォスファタジルエタノラミンは微量であり，さらに C26は極長鎖脂肪酸でもあるため判断については今後の検討が必要と思われた．燐脂質の割合は，赤血球膜，血漿でかなり差がみられるが，脂酸構成は各燐脂質につい

て赤血球膜，血漿で同じ傾向を示していた．また Myotonia と対照においては大きな差は認められなかった．

赤血球は，寿命が120日であり，他の組織に比して代謝が早く，赤血球膜は血漿などの影響が大と思われた．また McLaughlin らの報告でも示されている様に，年齢，性，食餌などの影響が大きい．さらに，検体の取り扱い，操作上の手技，再現性など種々の問題がある．我々は，再現性について，少数ながら検討しており，大きな変動はない様である．

今回，一応 Age-matching はさせたが，性，食餌など，また疾患コントロールなどについて今後，更に検討する予定である．

結　　語

筋強直性ジストロフィー症と正常対照者の赤血球膜及び血漿の脂質を測定した．両者には大きな差は認めなかった．一方個々の燐脂質の割合は，赤血球膜と血漿では全く相関がなかったが，個々の燐脂質の脂酸構成は比較的類似していることが明らかとなった．

文　　献

1) Thomas, N.S.T. & Harper, P.S.: Myotomic dystrophy: Studies on the lipid composition and metabolism of erythrocytes and skin fibroblasts. Clin. Chim. Acta, 83: 13—23, 1978.

2) Andiman, R.M., Peter, J.B. & Dhopeshwarhar, G.: Myotonic dystrophy and myotonia congenita: ATPase and lipid composition of erythrocyte membranes and serm lipids with special reference to desmosterol. Neurology (Minneap.), 24: 352—354, 1974.

3) 大西俊一，黒田和道：赤血球膜脂質の存在状態．生体の科学，31：205，1980.

4) McLaughlin, J. & Engel, W.K.: Lipid composition of erythrocytes. Arch. Neurol., 36：351—354, 1979.

5) 馬渡志郎，安徳恭演：Myotonic dystrophy における赤血球膜脂質構成．厚生省，「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床研究」（三好班），昭和57年度研究報告書，1983，p. 149～152.

6) Ruitenbeek, W.: The fatty acid composition of various lipid fractions isolated from erythrocytes and blood plasma of patients with Duchenne and congenital myotonic muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta, 89: 99—110, 1978.

28）Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球のホスファチジン酸について

吉　田　瑞　子*

研究協力者　　安　藤　一　也*

進行性筋ジストロフィー症の筋細胞内に，カルシュウム（Ca）が多量に存在する原因は，筋細胞のカルシュウム調節機構に，異常があるのではないかと考えられる．

一方細胞が外界から刺激を受けたとき，細胞内の Ca^{2+} レベルが上昇する．これは Ca^{2+} が，細胞外から内へ流入したり，また細胞内の Ca^{2+} プールから放出されるためである．この Ca^{2+} 流入[1] 或いは Ca^{2+} 放出[2] は，膜に存在するイノシトールリン脂質の代謝回転（図１）に関与していると云われている．

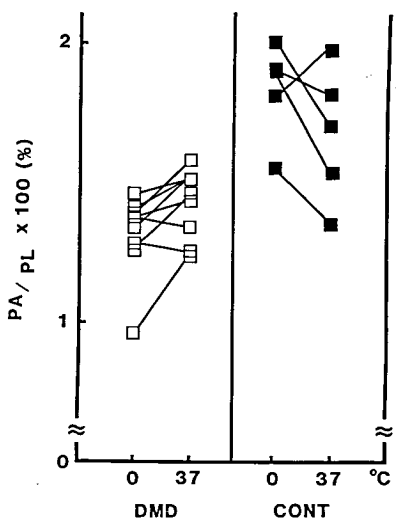


図１　イノシトールリン脂質の代謝回路

私達は進行性筋ジストロフィー症の膜異常の原因は，このイノシトールリン脂質代謝にあるのではないかと考えた．

まず Duchenne 型筋ジストロフィー症患者（DMD）の赤血球を用い，その形態や Ca 含量等を Ca^{2+} 存在下，非存在下で健常者のそれと比較検討した[3]．その結果 DMD の赤血球は，Ca^{2+} 存在下で膜異常が顕著に現れることが明らかになった．昨年度は DMD と健常者赤血球の diphosphoinositide（DPI）と triphosphoinositide（TPI）量の温度依存性を比較検討した結果，DMD の TPI 代謝に異常がある傾向を得た．TPI 代謝に異常があるならば，その代謝産物，すなわち phosphatidic acid（PA），1，2-diacylglycerol（DG）や inositol trisphosphate（ITP）などに異常が現れるはずである．

本年度は Ca^{2+}-channel と考えられる PA[4] について，DMD と健常者の赤血球を用いて，その温度依存性を比較検討した．

対象と方法

赤血球は DMD 患者9名（19～22歳）と年齢層が一致した健康男子対照者5名（19～22歳）の新鮮ヘパリン血より得た．血漿分離後，赤血球を Ca^{2+} とグルコースを含むリン酸緩衝食塩水（PBSD(+)）で３回洗浄し，43～45%ヘマトクリット値の赤血球浮遊液とし，PA 抽出及び形態観察用試料とした．PA 抽出と形態観察は，0℃と37℃で３時間浮置した後行なった．

リン脂質抽出：赤血球浮遊液の15倍量のクロロホルム：メタノール＝２：１で，赤血球から脂質を抽出し，0.9% NaCl で抽出液を洗浄（上層からの脂質回収を一回行った），下層をさらに theoretical upper phase で洗浄後乾固した．脂質をクロ

＊国立武蔵療養所神経センター

ロホルムに溶解し，ケイ酸カラムを通して，中性脂質を除去し，メタノールでリン脂質を溶出した．リン脂質メタノール溶液を乾固し，一定量のクロロホルムに溶解して，全リン脂質量測定のため一定量を採取した．残る全量をPA測定用の試料とした．

PAの検出：PAの分画及び検出は，二次元展開薄層クロマトグラフ法で行なった．薄層板はメルク社のシリカゲル60（厚さ0.5mm）を用いた．一次元展開はクロロホルム：メタノール：28%アンモニア水＝65：35：5.5組成の溶媒で行ない，二次元展開はクロロホルム：アセトン：メタノール：酢酸：水＝100：40：30：20：12の溶媒で行なった．一次元展開後，薄層板を乾燥窒素気流中で，1時間乾燥して二次元展開を行なった．PA及び他のリン脂質の検出はヨード蒸気中で発色させた．

全リン脂質とPAの定量：全リン脂質と，薄層板のPAスポットをかきとり，シリカゲルごと試験管に入れたPAは，リン定量により測定した[5]．リン定量は，70%過塩素酸を試料に加え，160℃で2時間，加熱分解を行ない，それを冷却後，水とFiske-Subbarow還元試薬を加えて，7分沸騰水浴中で加熱発色させ，急冷し，820mμで比色した．シリカゲルが混入している試料は，遠心し上清を比色した．

赤血球の全リン脂質中に，1.5～2%しか含まれていないPA量を比較検討するために，薄層クロマトグラフ法とリン定量を用いた理由は，測定誤差が小さく，1.5μg-P前後のPA量の測定，比較，検討に使用出来ると判断した．すなわち一定量（2μg-P）の標準物質PAを試料と共に展開し，かきとり，リン定量を行なった結果，そのPA量の測定標準誤差は約1.2%であった．

形態観察：1%-glutaraldehyde-リン酸緩衝食塩水で固定し，光学顕微鏡で観察した．

結果と考察

赤血球の脂質を抽出した時点，0℃と37℃で3時間浮置したときのDMD患者とその対照者の赤血球形態は，両者共にbiconcaveの形をしていた．すなわち両者共，形態的には正常状態の赤血球より脂質を抽出し検討した．

図2はDMD患者（9名）とその対照者（5名）の赤血球のPA含量の温度依存性を示す．それぞれの赤血球を0℃と37℃で3時間浮置した後のPA含量で，その値は赤血球の全リン脂質量に対する割合で示した．図から分るように，健康男子対照者5名中4名のPA含量は，0℃から37℃に浮置すると減少する傾向を示した．それに反しDMD患者9名中7名のPA含量は増加する傾向を示した．これは昨年度報告した赤血球のTPI含量の結果に呼応する．すなわち赤血球を0℃から37℃に3時間浮置したとき，健康男子対照者のTPI含量は増加し，PA含量が減少したのに対し，DMD患者ではTPI含量が減少し，PA含量が増加する傾向を示した．

また0℃におけるDMD患者のPA含量は，対照者のそれに比べ少ない傾向を示した．

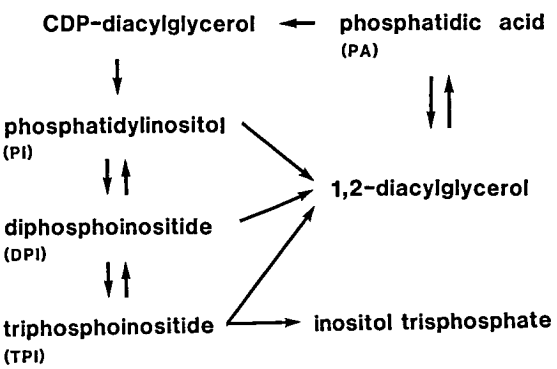


図2　Duchenne型筋ジストロフィー症（DMD）9名と健康男子対照者（cont）5名の赤血球のPA含量の温度依存性
PA：ホスファチジン酸，PL：ホスホリピッド（赤血球の全リン脂質）
縦軸は赤血球の全リン脂質に対するPAの割合で示す．

昨年度と今年度にわたりDMD患者の赤血球のpolyphosphoinositide（PPI：TPI，DPI）とその代謝産物のひとつであるPAの含量の温度依存性を調べた結果，健康対照者のそれとは異なる傾向を示した．すなわちイノシトールリン脂質代謝に異常があることが示唆された．

今後上に述べた結果をより確実にし，DMD 患者の細胞膜異常の原因を明らかにするための，イノシトールリン脂質代謝，特に TPI 代謝に関与する酵素を検索して行く予定である．

ま と め

① DMD 患者の赤血球の0℃における PA 含量は，健康対照者のそれより少ない傾向を示した．

②赤血球を0℃から37℃で3時間浮置したとき，DMD 患者の PA 量は増加し，対照者のそれは減少する傾向を示した．

文 献

1) Michell, R.H.: Inositol Phospholipids and Cell Surface Receptor Function. Biochim. Biophy. Act., **415**: 81—147, 1975.
2) Hesketh, R.: Inositol trisphosphate: link or liability? Nature, **306**: 16—17, 1983.
3) Streb, H., Irvine, R.F., et al.: Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-trisphosphate. Nature, **306**: 67—69, 1983.
4) Yoshida, M. Ando, K. Satoyoshi, E.: Abnormalities of Erythrocytes in Duchenne Muscular Dystrophy. Ann. Neurol., **13**: 649—653, 1983.
5) Serhan, C.N., Fridovich, J., Goetzl, E.J., et al.: Leukotriene B_4 and Phosphatidic Acid Are Calcium Ionophores. J.Biol. Chem., **257**: 4746—4752, 1982.
6) Marinetti, G.V.: Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides. J. Lipid Res., **3**: 1—20, 1962.

29）マーカインによる急性筋融解の機序

高　木　昭　夫*

研究協力者　猪　飼　哲　夫*　米　本　恭　三*
埜　中　征　哉*　杉　田　秀　夫*

はじめに

局所麻酔薬の筋肉内注射により，筋線維の壊死とその後の急速な筋再生が出現することが知られている[1)4)]．

今回，長時間作用型局麻剤である塩酸ブピバカイン（マーカイン）の効果を，筋線維束およびスキンドファイバーを用いて検討した．その結果にもとづいて筋壊死をおこす機序について考察した．

方　法

体重約150 g の雄ウィスター系ラットの長趾伸筋（EDL，重量60～100mg）を 3 cc の酸素化（95 % O_2－5 % CO_2）した Krebs-Ringer 液を含む小容器中に一端の腱を固定，他方の腱をトランスジューサーに固定して張力測定を行った．実験は室温にて行い，Krebs-Ringer 液の pH はマーカインを溶解するために6.80に調整した．また，溶液中の creatine kinase（CK）活性を測定する時には，Krebs-Ringer 液に albumin (5mg/dl) を添加した．

筋破壊の一指標として，外液中に漏出した CK 活性を30分ごとに 3 時間測定した．その後，筋肉内に残存した CK 活性も測定した．

2 時間マーカインと incubate した筋肉を凍結固定した後，凍結切片に HE および NADH 染色を行った．また電顕によって微細構造を観察した．

一方，スキンドファイバーによる実験には，体重約300 g の雄ウィスター系ラットの長趾伸筋（EDL）およびひらめ筋（SOL）を使用した．実験は室温にて行い，使用した溶液は pH6.80に調整した．ただし，Ca 誘発性 Ca 遊離の実験は pH7.00 で行った．

マーカインの収縮系および筋小胞体に対する作用の実験は，既報[6)]の如く行い，Ca 誘発性 Ca 遊離の実験は，遠藤らの方法[2)]にて行った．

結　果

① Krebs-Ringer 液にマーカインを添加すると筋拘縮が発生し時間と共に増大した．また，マーカイン濃度を増加させると拘縮の程度も増大したが，マーカイン10mM では約 1 時間でピークに達し，その後わずかに下降した（図 1）．

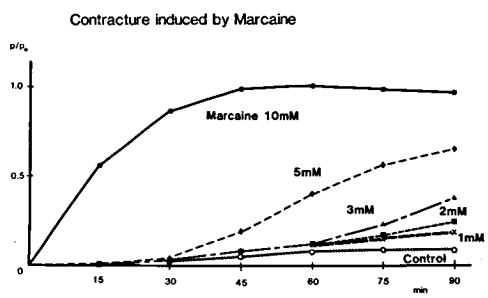


図 1　マーカインによる筋拘縮．
Krebs-Ringer 液にマーカインを添加すると筋拘縮が発生し時間と共に増大した．また，マーカイン濃度を増加させると拘縮の程度も増大したが，マーカイン10 mM（実線黒丸）では約 1 時間でピークに達し，その後わずかに下降した．

② Ca-free の Krebs-Ringer 液では筋拘縮の程度は減少した．Ca-free の状態で procaine 5 mM を添加すると，筋拘縮は著明に減少した．

③マーカインが存在しない場合でも，ごく少量の

*国立武蔵療養所神経センター

CK漏出はあったが，漏出速度は約90分で一定となった．マーカイン10mMにより多量のCKが漏出するのが確認された．Ca-freeの状態ではCK漏出は減少し，さらに5mM procaineを添加した場合，CK漏出は著明に減少した．しかし，悪性高熱の治療薬であるdantroleneや狭心症の治療薬でCa拮抗剤であるverapamil，およびMgイオンでは，外液に漏出するCKを抑制することはできなかった（図2）．

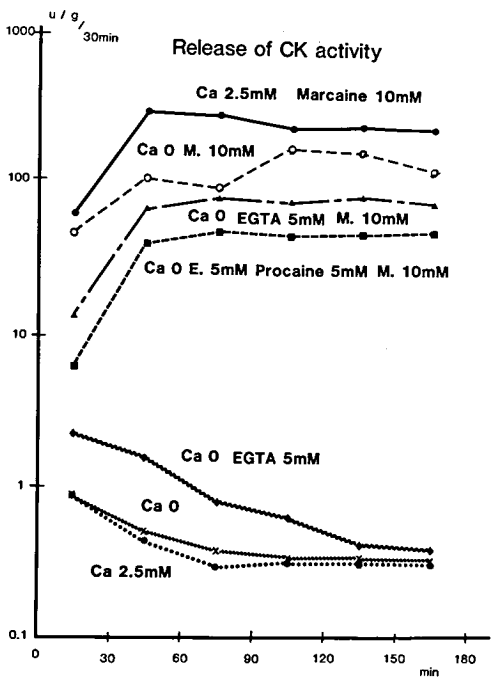


図2　マーカインによるCK漏出．
　マーカインが存在しない場合（点線黒丸）でも，ごく少量のCK漏出はあったが，漏出速度は約90分で一定となった．マーカイン10mM（実線黒丸）により多量のCKが漏出するのが確認された．Ca-freeの状態（破線三角）ではCK漏出は減少し，さらに5mM procaineを添加した場合（破線四角），CK漏出は著明に減少した．

④3時間に漏出したCK量は，マーカインが存在しない場合，筋肉内に存在する全CK量の0.1%であった．これに対し，マーカイン10mMにより，47.6%と大量のCKが漏出していた．外液のCaを除去し，EGTA 5 mMを添加すると，16.1%と減少した．さらに5mM procaineを添加すると，8.0%と著明に減少した．

⑤マーカイン10mMを含んだKrebs-Ringer液に2時間incubateしたひらめ筋は，形態学的に浮腫や過収縮のため断裂した筋線維が観察された．電顕では，筋節の短縮，ミオフィラメント配列の変化，Z-lineの不鮮明化が観察された．

⑥マーカイン5 mMにより，筋収縮系は修飾されCa感受性を増大させる傾向を呈した．長趾伸筋では，Caイオンが10^{-6}，2×10^{-6} Mの時対照に比べ相対張力は大きくなったが，最大張力は逆に小さくなった．ひらめ筋も3×10^{-7}～3×10^{-6} MのCaイオンでは相対張力は大きくなったが，最大張力の低下は認められなかった．

⑦筋小胞体にCa摂取を行わせた後，G-0.1溶液中で，筋拘縮の発生の有無を検討したところ，マーカイン濃度が10mM以上になると，拘縮が発生した．これはマーカインが，筋小胞体からCaを遊離させたことを示唆した．この拘縮は，5 mM procaineにより部分的に抑制され，6mM Mgイオンにより完全に抑制された．

⑧マーカイン濃度が5 mM以上になると，筋小胞体のCa摂取量は減少したが，長趾伸筋の方がひらめ筋より摂取量の減少は著明であった．この摂取量の減少に対し，procaineやMgイオンは何ら影響を示さなかった．この結果により，マーカインによるCa摂取量の低下は，小胞体からのCa遊離による見かけ上の低下ではないと推論された（図3）．

⑨G-5溶液中でマーカインが存在しない場合でも，時間と共に筋小胞体膜よりCa漏出はおこるが，わずかであった．マーカイン5 mMによりCa漏出は増加し，15mMではさらに増大した．しかし，この漏出はprocaineやMgイオンにより影響されなかった（図4）．

⑩マーカインは，筋小胞体のCa誘発性Ca遊離を促進させた．5 mMマーカインは，Caの最大遊離速度（Vmax）を増大させ，Ca感受性を増大させた．Ca誘発性Ca遊離を50%活性化するのに必要なCaイオン濃度を，対照の10^{-6} Mからマーカイ

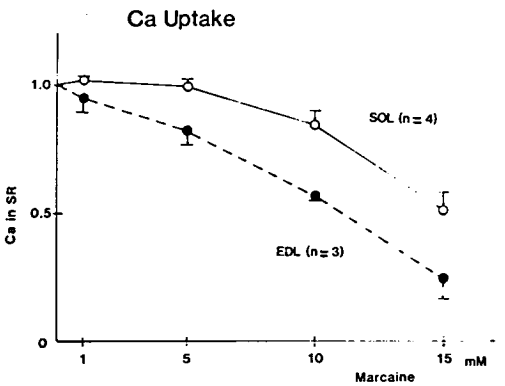


図3　Ca 摂取に対するマーカインの作用.
　マーカイン濃度が 5 mM 以上になると，筋小胞体の Ca 摂取量は減少したが，長趾伸筋（破線黒丸）の方がひらめ筋（実線白丸）より摂取量の減少は著明であった.

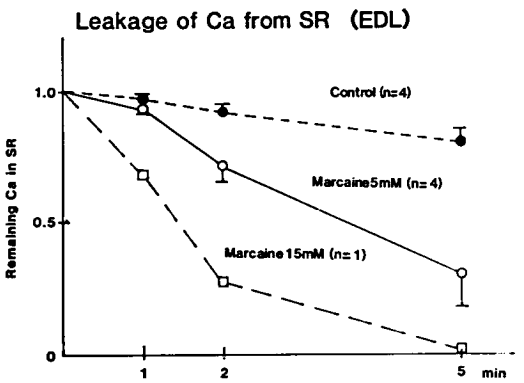


図4　マーカインによる Ca 漏出.
　G-5 溶液中でマーカインが存在しない場合（破線黒丸）でも，時間と共に筋小胞体膜より Ca 漏出はおこるが，わずかであった．マーカイン 5 mM（実線白丸）により Ca 漏出は増加し，15mM（破線四角）ではさらに増大した.

ン 5 mM は，4.5×10^{-7} M と下げた（図5）.

なお，15mM 以下のマーカインのスキンドファイバーに対する作用は，すべて可逆的であった.

考　　察

局麻剤であるマーカインの筋注により，筋線維壊

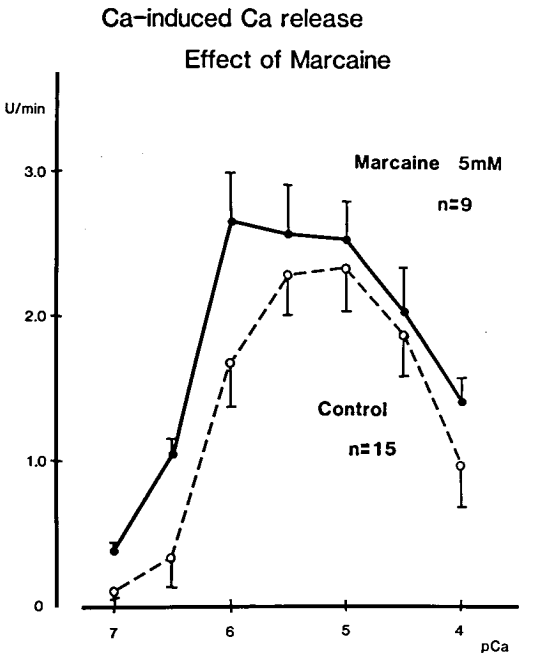


図5　Ca 誘発性 Ca 遊離に対するマーカインの作用.
　マーカインは，筋小胞体の Ca 誘発性 Ca 遊離を促進させた．5 mM マーカイン（実線黒丸）は，Ca の最大遊離速度（Vmax）を増大させ，Ca 感受性を増大させた.

死とその再生がおきることが知られており[1)4)]，この現象は動物を使用しての筋再生実験にも応用されている．しかし，マーカインによる筋線維壊死の機序は充分に説明されていない.

マーカイン以外の他の局麻剤（lidocaine など），quinine や imipramine も筋拘縮をおこしたり，筋破壊をきたすことが知られている[3)5)].

今回のスキンドファイバーの実験により，マーカインは筋小胞体や筋収縮系に種々な効果をもたらすことが確認された．1）収縮系に対し Ca 感受性を増加させた．2）筋小胞体の Ca 摂取を抑制した．3）筋小胞体から Ca 漏出を増加させた．4）筋小胞体の Ca 誘発性 Ca 遊離を促進させた．これらの作用のいくつかは，他の局麻剤において報告されている[7)].

今回の実験から，マーカインは細胞内の Ca イ

オン濃度の調節を障害して，急性筋融解を発生させるものと推定した．すなわち，マーカインは，二つの経路により細胞内Caイオン濃度を増加させたのであろう．第1に，マーカインは筋表面膜を障害して，細胞外Caを流入させる．このことは，Caを除去しEGTAを添加した溶液中で，マーカインによる筋拘縮の程度が減少したことにより示唆される．第2に，マーカインが筋小胞体に対し，Ca遊離や漏出を増加させることである．これは，procaineにより筋拘縮やCK漏出が抑制されたことより示唆される．

この細胞内Caイオン濃度の増加により，過収縮が生じ，機械的急性筋融解をおこすと推定した．また，細胞内Caイオン濃度の増加がエネルギー代謝などを障害して筋融解をおこすことも可能であろう．

しかし，はたしてこの作用のみかどうかは断定できない．すなわち，何か別の機序で細胞機能を直接障害して，筋壊死を生じさせることも考えておく必要があると思う．

今回の実験より，マーカインは筋表面膜と筋小胞体に作用を及ぼすことが明瞭となった．しかし，細胞外から表面膜を通してのCa流入が，筋拘縮や筋融解の発生に，より大きな役割をはたしていると考えられる．なぜなら，細胞外液にはより多量のCaイオンが存在し，これのみでも完全な筋破壊に進展すると考えられる．筋壊死の成因における筋小胞体からのCaイオンの役割は，今後の実験の課題であろう．

結　　論

(1)マーカインによる筋壊死に際して，外液のCaイオンは筋破壊を加速させている．(2)マーカインは筋小胞体よりCa漏出や遊離を亢進させる．この作用が，筋壊死のトリガーとなる可能性が考慮された．

文　　献

1) Benoit PW, Belt WD: Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine (Marcaine). J Anat, 107: 547-556, 1970

2) Endo M, Yagi S et al: Changes in the Ca-induced Ca release mechanism in the sarcoplasmic reticulum of the muscle from a patient with malignant hyperthermia. Biomed Res, 4: 83-92, 1983

3) Isaacson A, Yamaji K et al: Quinine contractures and Ca^{45} movements of frog sartorius muscles as affected by pH. J Pharmacol Exp Therap, 171: 26-31, 1969

4) Nonaka I, Takagi A et al: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). Acta Neuropathol, 60: 167-174, 1983

5) Suarez-Kurtz G: Physiological correlates of the imipramine-induced release of creatine kinase from frog skeletal muscle. Biophys J, 25: 121a,1979

6) Takagi A: Chlorpromazine and skeletal muscle: A study of skinned single fibers of the guinea pig. Exp Neurol, 73: 477-486, 1981

7) Yagi S, Endo M: Effect of dibucaine on skinned skeletal muscle fibers. An example of multiple actions of a drug on a single subcellular structure. Biomed Res, 1: 269-272, 1980

30) Duchenne 型筋ジストロフィーの筋小胞体機能，とくに Ca 遊離について

高 木 昭 夫*

研究協力者　猪 飼 哲 夫*　春 原 経 彦*
杉 田 秀 夫*　石 原 伝 幸*

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）のスキンドファイバーを使用して，収縮系や筋小胞体の機能を分析している．まず収縮系に関する知見を若干補足する．次いで筋小胞体機能，ことに Ca 誘発性 Ca 遊離につき分析を行なった．これらの結果に基づき，DMD の病因，とくに筋変性との関連につき考察した．

対象および方法

6 名の DMD 患児(年齢 1 ～ 9 歳)，13名の他種の神経筋疾患，1 例の悪性高熱症例を対象とした．筋生検は通常上腕二頭筋で行なわれた．スキンドファイバーを使用する実験は既報の如く行なった[1]．収縮系の実験には Brij 58処理したスキンドファイバーを使用した．Ca 誘発性 Ca 遊離の分析にはサポニン処理による化学的スキンドファイバーを使用した．実験の手順は図示した（図 3）[2]．

結　　果

1) DMD 筋線維における収縮系の Ca による活性化（図 1，2）

タイプ 1 筋線維では，DMD と対照のいずれでも 3×10^{-7}M Ca^{2+} (pCa6.5) の溶液中で張力発生が開始した．3×10^{-5}M Ca^{2+}により最大張力(Po)を発生した．10^{-6}Mあるいは 2×10^{-6}M Ca^{2+}溶液中では，DMD で相対張力は有意に減少していた．他の Ca^{2+}溶液中では両者間に差を認めなかった．タイプ 2 筋線維においては，3×10^{-7}Mおよび 10^{-6}M Ca^{2+}により DMD はより大きな張力を発生した．他の Ca 溶液中での相対張力には差はみとめられなかった．このように DMD の筋線維は 3×10^{-7}M～3×10^{-6}M Ca^{2+}による活性化はわずかではあるが有意に対照と相違していた．

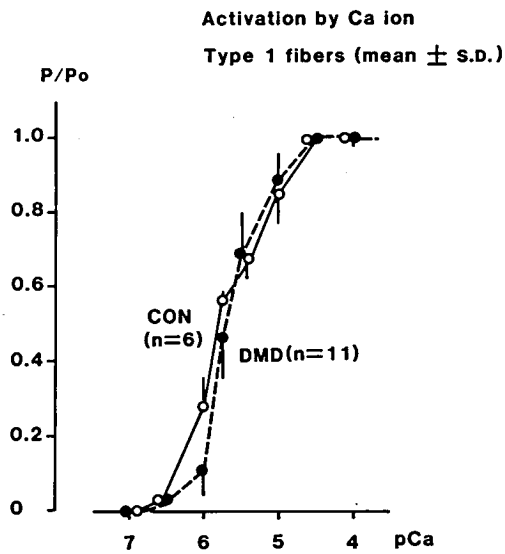


図 1　スキンドファイバー標本を使用して，タイプ 1 筋線維の各種濃度の Ca^{2+}による活性化を検討した．横軸：Ca^{2+}濃度，pCa＝−log〔Ca^{2+}〕，縦軸：相対張力(P/Po)，Po は pCa4.5により発生する最大張力．DMD（黒丸-破線）では，pCa6と pCa5.7の相対張力は成人対照（白丸-実線）より有意に低下していた．

2) Ca 誘発性 Ca 遊離（図 3，4）

Ca 誘発性 Ca 遊離の機序の分析は，筋小胞体に一定条件下で Ca^{2+} を負荷した後に，ATP および Mg^{2+} 濃度 0 の条件で行なわれた[2]．代表的症例の

＊国立武蔵療養所神経センター

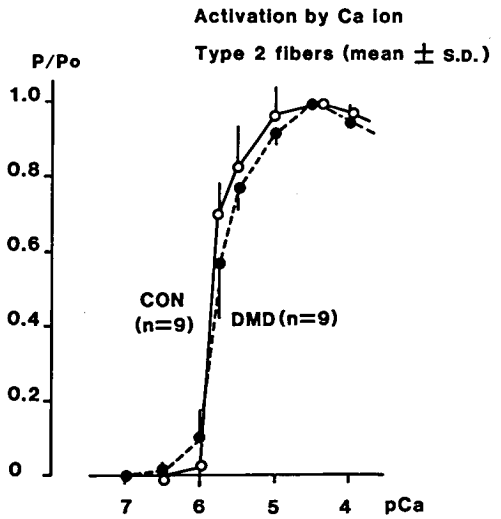


図2　タイプ2筋線維につき，図1と同様な検討を行なった．DMDではpCa6.5とpCa6.0で対照より大きな相対張力を発生した．

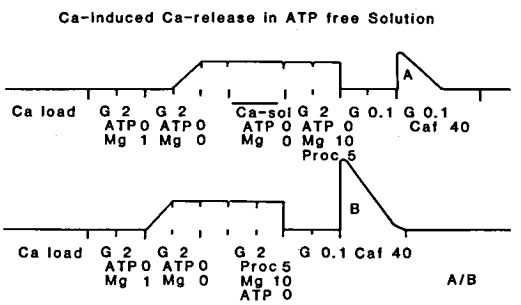


図3　Ca誘発性Ca遊離の実験手順．筋小胞体のCa負荷はpCa6.5溶液(pH7.0)で1分間行なわせた．その後ATP 0，次いでATP 0，Mg 0の弛緩溶液(G2)で洗浄して，rigor状態とした．この状態で各種濃度のCa溶液(Ca sol)に5～15秒間接触させて，Ca遊離を発生させた．その後，ATP 0，Mg 10mM，procaine-5 mMの溶液でCa遊離を停止させた．ATPを含む溶液（G 0.1）で洗浄後，カフェイン拘縮をおこさせた（A）．同様の操作にて，Ca solによる操作のみをはぶいた場合のカフェイン拘縮の大きさ（B）を測定した．（A）と（B）の頂点張力の比較からCa誘発性Ca遊離速度を計算した．Ca遊離速度は1分間に筋小胞体中のCa^{2+}が全て放出される場合を1とした．

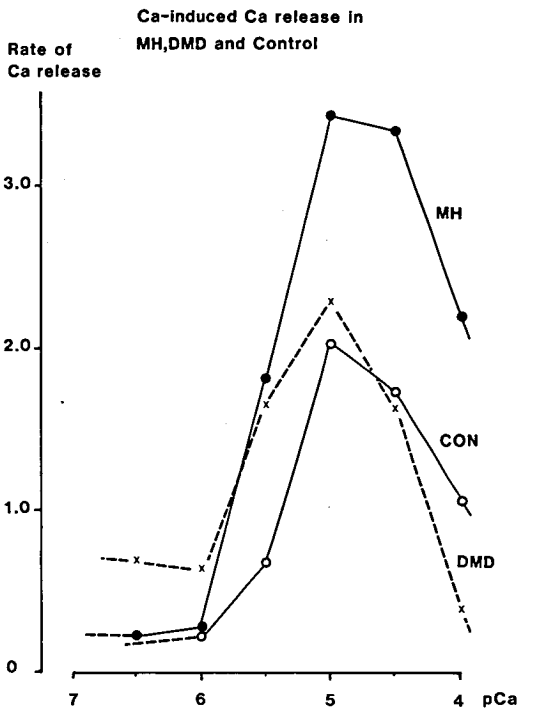


図4．MH（症例A，表1），DMD（症例B-3）および対照（症例C-13）につき，Ca誘発性Ca遊離のCa遊離速度(min^{-1})を呈示した．横軸：Ca^{2+}濃度，縦軸：Ca遊離速度(min^{-1})．数値はMH（n＝9）DMD（n＝5），CON（n＝5）の平均値を表示した．DMDではCa親和性はMHを同一であるが，Ca遊離速度は低値であった．

実験結果を図4に呈示した．正常対照では3×10^{-6}M Ca^{2+}になるとCa遊離が発生し，10^{-5}Mで最大速度（Vmax）を呈した．DMDの1例では，3×10^{-7}Mあるいは10^{-6}M Ca^{2+}のもとでのCa漏出は対照より増加していた．3×10^{-6}M Ca^{2+}によるCa遊離速度は対照より増加していた．悪性高熱(MH)においてはCa遊離は10^{-6}M Ca^{2+}で開始し，10^{-5}Mで最大速度を呈した．各種のCa^{2+}濃度によるCa遊離速度はMHで著明に増大していた．

各種の疾患におけるCa誘発性Ca遊離の比較には，Ca遊離の最大速度(Vmax，min^{-1})およびVmaxの50%活性化に必要なCa濃度（Km）の2

つを指標とした(表1)．正常対照となる症例が少ないため，これらの指標の正常域を今回は呈示できなかった．それ故MH回復例と同域に分布する

表1　DMD，MHおよび疾患対照においてCa誘発性Ca遊離の50%活性化に要するCa濃度（Km, pCa）と最大遊離速度（Vmax, min^{-1}）を測定した（Mean ± S.D., N: number of fibers examined）．

	(年齢，性)	Km(in pCa)	Vmax(min^{-1})	(N)
A．MH	(39，F)	5.53±0.19	3.50±0.23	(9)
B．DMD				
case 1．	(1，M)	5.36±0.09	2.35±0.41	(4)
2．	(9，M)	5.38±0.19	2.88±0.58	(6)
3．	(7，M)	5.53±0.14*	2.56±0.48	(5)
4．	(10，M)	5.29±0.06	2.72±0.50	(5)
5．	(9，M)	5.42±0.23*	2.16±0.98	(8)
6．	(10，M)	5.33±0.37	0.93±0.68	(8)
C．疾患対照				
case 1．	(5，M)	5.26±0.22	2.30±0.13	(4)
2．	(25，M)	5.41±0.08*	2.96±1.30	(5)
3．	(65，M)	5.39±0.08	1.92±0.54	(4)
4．	(6，M)	5.19±0.26	1.99±0.71	(4)
5．	(55，M)	5.30±0.15	1.67±1.29	(5)
6．	(52，M)	5.50±0.10*	2.41±0.72	(6)
7．	(15，M)	5.33±0.08	2.88±0.65	(3)
8．	(7，F)	5.53±0.19*	3.30±0.31*	(4)
9．	(8，F)	5.70，5.75*	1.72，3.24*	(2)
10．	(54，F)	5.34±0.08	2.08±1.50	(4)
11．	(12，M)	5.55±0.75*	2.76±0.70	(3)
12．	(1，M)	5.69±0.09*	3.00±0.80*	(4)
13．	(13，M)	5.34±0.06	2.04±0.68	(5)

疾患対照うちわけ（1.Becker type ?，2.myopathy, unclassified，3.collagen vascular disease，4.Becker type ?，5.neuropathy，6.muscular dystrophy, unclassified，7.serum CK increase，8.Kugelberg-Welander病，9.central core病，10 Polyneuritis，11.muscular dystrophy, unclassified，12.normal ?．13.chorea
＊異常と推定された症例（文中参照）．

数値を呈した症例をCa遊離の異常と推定した．DMDではCase 3とCase 5でKmのCa濃度は低下していた（pCaとしては増加）．しかしVmaxの高値を呈する症例はみとめられなかった．疾患対照では，Kugelberg-Welander病，Central core病，正常（？）幼児の症例において，KmとVmaxともに異常であった．Km値のみの異常として，筋ジストロフィー（分類不能）の3症例があった．

考　　案

1）DMDの筋収縮系について

WoodらはDMDのスキンドファイバーを使用して，Ca^{2+}と相対張力の関係を記載した[3]．この関係はDMDと対照の間で差がなかった．しかし彼等は筋線維タイプごとの比較は行なわなかった．Endoらは筋ジストロフィーマウスの筋線維には3×10^{-7}M Ca^{2+}中でより大きな張力を発生するものがあることを観察した[4]．また，筋ジストロフィー鶏ではこの関係の異常をみとめていない[4]．今回，DMDのスキンドファイバーはCa感受性がわずかではあるが有意に相違していた．しかし変化の方向はDMDのタイプ1（赤筋）線維は，低Ca濃度域の感受性低下を示しより白筋的であった．またDMDのタイプ2（白筋）線維は低濃度域でCa感受性は亢進し赤筋化の傾向を呈した．すなわちCa感受性の異常は筋分化の異常に基づく可能性を示唆した．この解釈は以前に記載したSrイオン感受性から中間的反応を呈する筋線維がDMDで増加している事実と合致するものである[1]．DMDの骨格筋では筋細胞分化の異常，たとえば分化の遅延や停止が存在することを強く示唆するものである．この現象の成因については不明な点が多いが，DMDの病態上は重要な問題であろう．

2）Ca誘発性Ca遊離

DMDの発症機序，とくにどうして筋細胞変性や壊死が発生するかは未解決である．筋変性におけるCa説，すなわち細胞内Ca濃度の調節異常により筋変性が生ずることは，悪性高熱の際あるいは1～2の実験的筋障害モデルで実証されつつある．今回は筋小胞体におけるCa誘発性Ca遊離の機序に焦点をあてた．Ca誘発性Ca遊離は悪性高熱の回復者において亢進していることが報告された[2]．またDMDの一部の症例において，悪性高熱症類似の反応が記載されている[6]．今回のシリーズでは，6例中2例のDMDでCa親和性の異常が推定された．しかしCa遊離速度の亢進はないようであった．疾患対照のうちでは，Kugelberg-

Welander 病，Central core 病，筋ジストロフィー（未分類）などで，Ca 誘発性 Ca 遊離の異常亢進がみとめられた．このように Ca 誘発性 Ca 遊離の亢進は，DMD を含む 2 ～ 3 の筋疾患に非特異的現象であった．カフェイン拘縮試験の結果と同様な傾向を呈している[6]．Ca 誘発性 Ca 遊離の機序の亢進が疾患特異性なく，更に同一疾病においても一部の症例でのみ観察されるのは注目すべき点であろう．おそらく筋変性（あるいは再生）の一時期において，かような反応を呈しやすくなると推定される．Ca 誘発性 Ca 遊離は筋小胞体の Ca^{2+}-gated cation channel を介するものと考えられている[7]．しかしその分子レベルでの機序，発達や分化上の経過あるいは本機序の生理的意義についての知識は乏しい．今後の進展ののぞまれる領域である．

今回対象とした DMD 症例は10歳前後の進行した時期のものが多かった．筋変性や壊死が旺盛な時期は 5 歳以前と考えられる．事実，悪性高熱症を合併した症例は全て 6 歳以前であった．このような観点から，病初期の筋における Ca 遊離を分析する必要があると思われる．Ca 誘発性 Ca 遊離の亢進が DMD の筋変性の成因として作用する可能性の有無はまだ推論の域をでない．しかし薬剤などの外因がない状態でも，細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節異常を発生させ，筋障害の原因となりうると考えている．

結　　論

(1) DMD のスキンドファイバーでは pCa6.5あるいは pCa6.0における張力発生の程度は対照と相違していた．これは DMD 筋線維の分化異常を反映する現象と考えられた．

(2) 筋小胞体の Ca 誘発性 Ca 遊離につき，DMD, MH，疾患対照で比較した．本機序の Ca^{2+} 親和性は少数例の DMD で亢進していた．しかしこの異常は疾患特異性のない現象であった．この異常と筋変性の成因の関連を考察した．

文　　献

1) Takagi A, Nonaka I: Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve, 4 10-15, 1981
2) Endo M, Yagi S et al : Changes in Ca-induced Ca release mechanism in the sarcoplasmic reticulum of the muscle from a patient with malignant hyperthermia, Biomed Res, 4 : 83-92, 1983
3) Wood DS, Sorenson MM et al: Duchenne dystrophy. Neurology (Minneap), 28: 447-457, 1978
4) Endo M, Kitazawa T et al: Functional changes in skeletal muscle of the dystrophic mouse and chicken. in Muscular Dystrophy (Ehashi S and Ozawa E, eds), Japan Sci Soc Press, Tokyo, 1983 pp185-192
5) 高木昭夫：スキンドファイバー法による筋ジストロフィー病態の研究．神経進歩，24：756-764，1980
6) Takagi A, Sunohara N et al: Malignant hyperthermia and related neuromuscular diseases. Muscle Nerve, 6 : 510-514, 1983
7) Yamamoto N, Kasai M: Mechanism and function of the Ca^{2+}-gated cation channel in sarcoplasmic vesicles. J. Biochem, 92: 485-496, 1982

31) A 23187-induced myopathy におけるカルモデュリン，プロスタグランジンの役割に関する生理学的検討 第2報

高　守　正　治*

研究協力者　駒　井　清　暢*　坂　戸　俊　一*
松　原　四　郎*　井　手　芳　彦*

目　的

前報でカルシウム・イオノフォア A23187による生理学的な筋収縮張力の低下は protease inhibitor である Leupeptin で阻止されるとともに，Aspirin, Indomethacin などプロスタグランジン (PG) synthesis inhibitors によっても有意な阻止を受けること，また PGE_2 自体の処理によっても定量的な差こそあれ A23187同様の筋張力低下がもたらされ，これが Leupeptin で有意な阻止を受けることを明らかにし，筋細胞内過剰フリー・カルシウム (Ca^{++}) による筋細胞崩壊の機序の中に，autacoid としてのプロスタグランジンが介在する可能性を論じた[1]．本報では，骨格筋内でのアラキドン酸カスケードで PGE_2 産生に先行する Ca^{++}-activated phospholipase A_2 の役割を確認すること，nonlysosomal Ca^{++}-activated protease と lysosomal protease のこの系における作用差を生理学的に調べるとともに，ゲル電気泳動により諸薬剤による筋構造蛋白の変動，とくにその初期変化を観察して，Ca^{++}-PGE_2 系の筋壊死機序がどのようなステップを踏んで成立するかを明らかにすること，以上の2点の検討を行った (図1参照)．

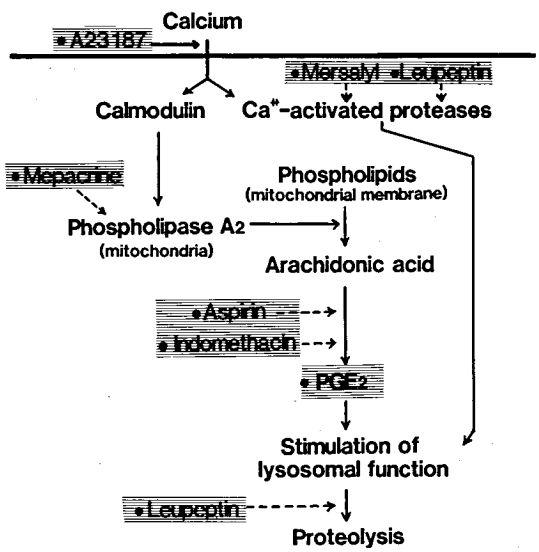


図1　骨格筋内アラキドン酸カスケードと Ca^{++}-induced cell necrosis：非ライソゾーム，ライソゾーム由来プロテアーゼの2ルートとプロスタグランジン E_2 の位置付け．陰影内は，各ステップに作用する薬剤 (→) とその阻害剤 (--►)．

方　法

ウイスター系雄ラットから横隔膜筋をとり出し，その切除片 (乾燥重量16～29mg) をガス負荷 (O_2：CO_2＝95：5) 中のリンゲル液 (37℃) で灌流しつつ，等尺性筋張力計に最大単収縮力が得られる静止時張力でセット，inhomogeneous activation を避けるために白金板電極で被検筋の全長を同時刺激し，また筋内神経刺激による神経筋伝達の修飾を避けるため，灌流液には6μg/ml の d-Tubocurarine chloride を添加した．強縮張力は

＊金沢大学医学部神経内科

166Hz 反復刺激（150ヶ）により誘発した．リンゲル液構成は122mM NaCl, 4.7mM KCl, 15.5mM $NaHCO_3$, 1.2mM $MgCl_2$, 1.2mM KH_2PO_4, 2.6mM $CaCl_2$, 11.5mM glucose である．A23187は1mg/ml の割合でエタノールで溶解，リンゲル液で最終濃度を10μg/ml とした．

薬理学的処理は，前報による諸薬剤処理件数をさらに追加するとともに，図2○印に示す実験を行った．すなわち，phospholipase A_2 inhibitor である Mepacrine[2]（5×10^{-6} M），Ca^{++}-activated protease inhibitor である Mersalyl[3]（200 μM），または lysosomal protease inhibitor でもある Leupeptin[4]（3×10^{-5} M）の処理に引続き，各薬剤とともに A23187（10μg/ml）または PGE_2（2.8×10^{-6} M）で処理，A23187または PGE_2単独処理による張力低下度と，これら阻害剤添加の場合の張力低下度とを比較した（図2参照）．処理前を100として各処理後の張力を％であらわした．筋構造蛋白の変動の観察は，各処理筋の SDS ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動によった．

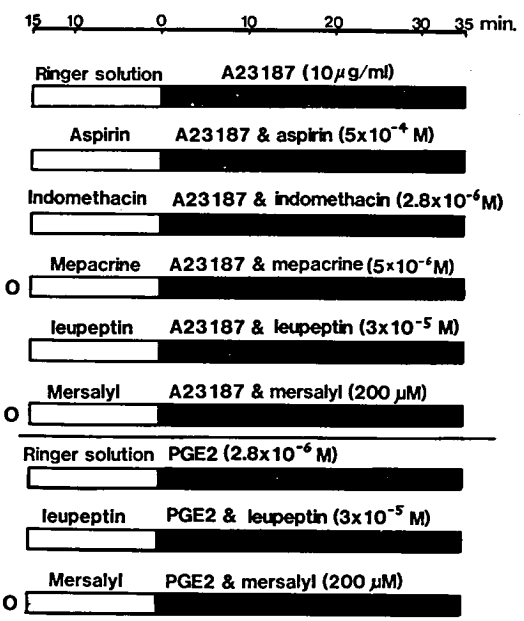


図2　薬理学的実験プログラム．

結　　果

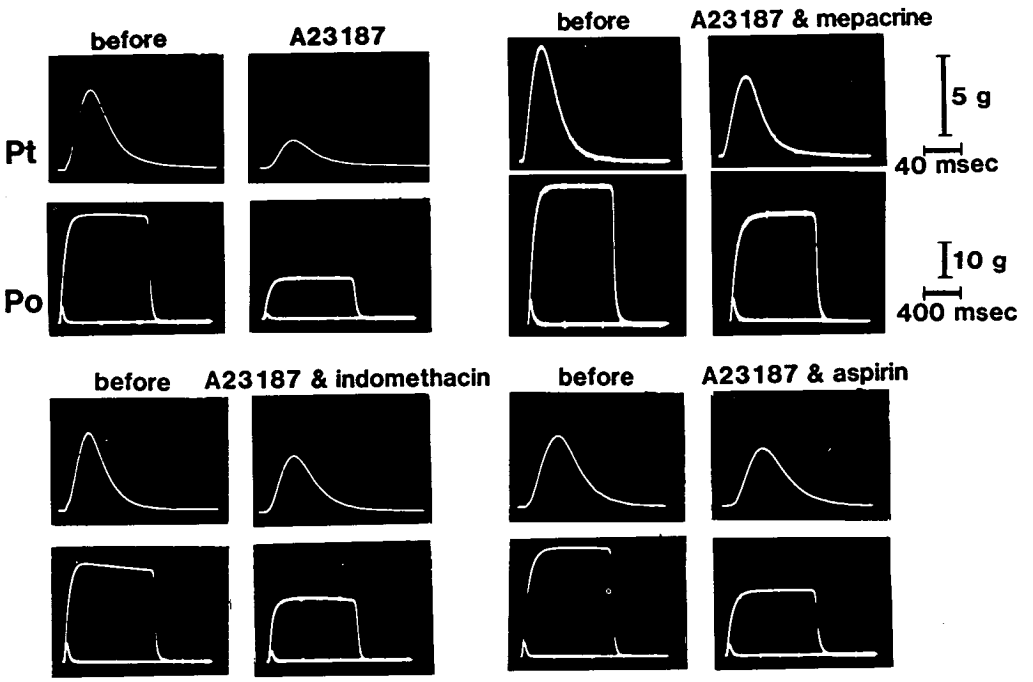
単収縮力（Pt），強縮力（Po）を指標とした生理学的分析では，A23187による著明な張力低下（Pt, 38±9.1%, n=7；Po, 34±8.1%, n=7）に対して，Mepacrine 添加処理は，前報の Indomethacin（Pt, 65±8.6%, n=6；Po, 57±9.8%, n=6），Aspirin（Pt, 66±6.6%, n=8；Po, 65±5.3%, n=8）同様，有意な（$p<0.001$）阻止効果を示した（Pt, 76±4.8%, n=7；Po, 75±5.5%, n=7）（図3）．

次に，lysosomal および non-lysosomal Ca^{++}-activated proteases 両者の inhibitor となる Leupeptin と，non-lysosomal Ca^{++}-activated protease inhibitor である Mersalyl の，A23187処理および PGE_2処理張力低下作用に対する阻止効果をみると，まず A23187-induced depression に対する Leupeptin 添加処理の著明な効果（Pt, 78±7.7%, n=6；Po, 73±7.7%, n=6）（$p<0.001$）に比べ，Mersalyl 添加処理は有意な効果をもたらさなかった（Pt, 47±3.6%, n=7；Po, 43±5.5%, n=7）（NS）（図4）．同様に，PGE_2-induced depression（Pt, 56±14.1%, n=10；Po, 51±13.4%, n=10）に対しても，Leupeptin 効果（Pt, 85±6.4%, n=4；Po, 85±8.9%, n=4）（Pt, $0.005<p<0.01$；Po, $0.001<p<0.005$）に比べて，有意な Mersalyl 効果（Pt, 60±11.8%, n=6；Po, 61±14.8%, n=6）は得られなかった（NS）（図5）．

構造蛋白の電気泳動でみると，リンゲル液のみの処理のコントロールと比べるとき，PGE_2処理の初期変化は，A23187処理の場合同様，α-actinin および myosin heavy chain の減少と分解産物を思わせるバンドの出現で，Leupeptin 添加処理はこれを有意に阻止した（図6）．

考　　察

Mepacrine 添加処理を用いた実験結果は，A23187による筋細胞内過剰フリー・カルシウムから筋壊死に至る機序で，アラキドン酸カスケードにおける骨格筋内 Ca^{++}-activated phospholipase A_2[5] の意義を確認した（図1，図3）．



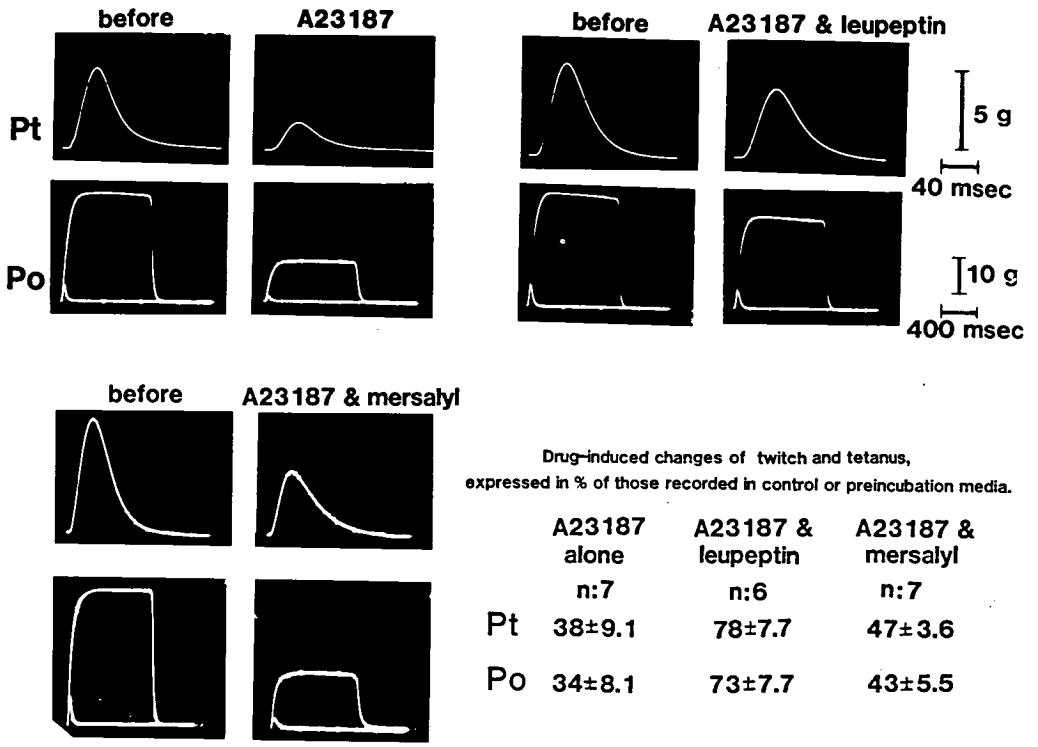
Drug-induced changs of twitch and tetanus,
expressed in % of those recorded in control or preincubation media.

	A23187 alone n:7	A23187 & mepacrine n:7	A23187 & indomethacin n:6	A23187 & aspirin n:8
Pt	38±9.1	76±4.8	65±8.6	66±6.6
Po	34±8.1	75±5.5	57±9.8	65±5.3

図3　A23187(10μg/ml)単独処理による単収縮(Pt)，強縮力(Po)の著明な低下が，Indomethacin (2.8×10^{-6} M)，Aspirin (5×10^{-4} M)同様，Mepacrine(5×10^{-6} M) (Phospholipase A_2 inhibitor) による前・添加処理で，有意に阻止されることを示す（ラット横隔膜筋，37℃）.

筋張力低下度を指標として推察する筋細胞崩壊に対する Mersalyl と Leupeptin の，阻止効果の差（図4，5）をみると，前者には後者ほどの有意な作用は見出せず，Ca^{++}-PGE_2系のターゲットが lysosomal proteases にあるように思われた．しかし，電気泳動で筋構造蛋白の変動をみると，PGE_2処理は A23187処理同様，α-actinin および myosin heavy chain 減少を初期変化としてもたらした（図6）．この結果が，早期 Z-band 崩壊の反映[6]とすれば，Ca^{++}-PGE_2系のターゲットには，少なくともその初期の段階で non-lysosomal Ca^{++}-activated protease が含まれることを示唆し，Goldberg らの，本系ではこの protease の介在を要しないとする考え[7]とは相容れないものであった．

われわれの実験事実に対する解釈には，筋小胞体 Ca^{++}出納にかかわるアラキドン酸カスケードの関与が挙げられる．その1つは，Ca^{++}-activated phospholipase A_2の筋小胞体 Ca^{++}-uptake 阻止作用であり[8]，その2は，アラキドン酸，オレイン



Drug-induced changes of twitch and tetanus, expressed in % of those recorded in control or preincubation media.

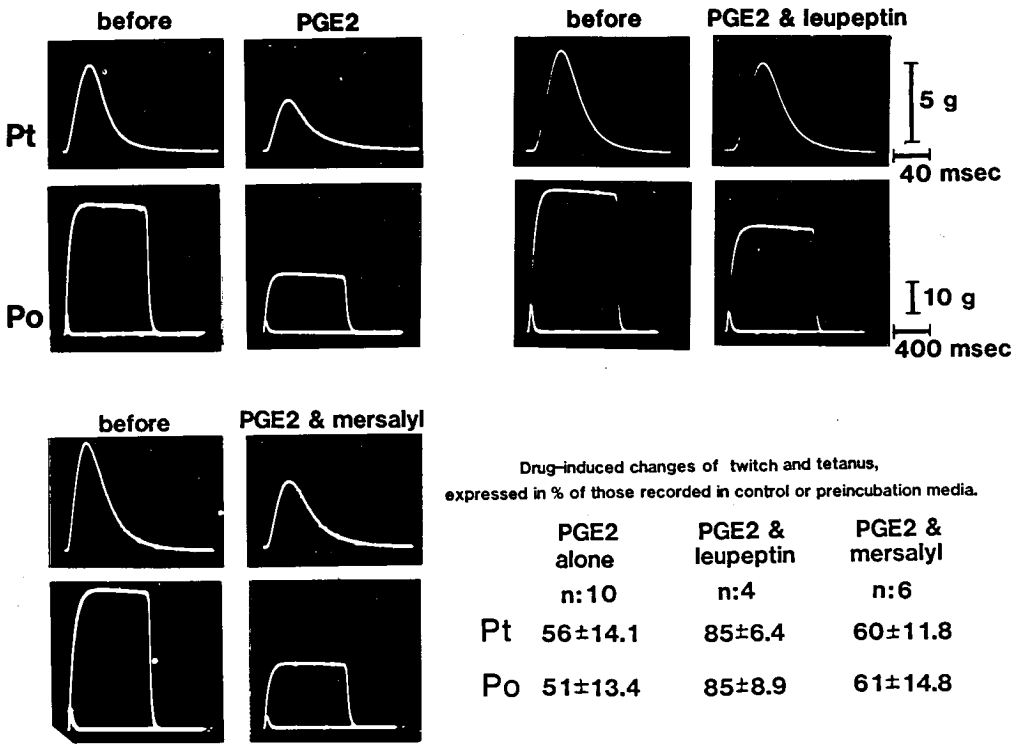
	A23187 alone	A23187 & leupeptin	A23187 & mersalyl
	n:7	n:6	n:7
Pt	38±9.1	78±7.7	47±3.6
Po	34±8.1	73±7.7	43±5.5

図4　A23187(10μg/ml)単独処理による単収縮(Pt)，強縮力(Po)の著明な低下は，Leupeptin（3×10^{-5} M）の場合に比べ，Mersalyl（200μM）（non-lysosomal, Ca^{++}-activated protease に対する inhibitor）の前・添加処理では有意な阻止を受けないことを示す（ラット横隔膜筋，37℃）．

酸，リノール酸の順でつよいといわれるこれら不飽和脂肪酸による筋小胞体 Ca^{++}-uptake 阻止，Ca^{++}-release 促進の作用である（ただし，PGE_2 自体についての本作用の有無の確認はない）[9]．また，細胞内に過剰の PG が存在すれば，細胞外液からの Ca^{++}流入が促されるという事実もある[10]．これらの機序による筋細胞内フリー・カルシウムの増加は，non-lysosomal Ca^{++}-activated protease 活性化の引金としての役割を果し得るであろう．電気生理学的手法とともに電気泳動法で証明した Leupeptin の PGE_2による筋崩壊に対する阻止作用も，その機序がここに求められて矛盾はない．

結　　語

進行性筋ジストロフィー症の病因を求めて，その一機序として注目されている膜・カルシウム理論の中で，プロスタグランジン E_2の位置付けを評価し，本系の介在因子として Ca^{++}-activated phospholipase A_2の役割を明らかにした．次に，筋壊死機序にかかわる Ca^{++}-PGE_2系のターゲットには，少なくともその初期の段階で，non-lysosomal Ca^{++}-activated protease が含まれることを明らかにし，この実験事実の解釈の一つとして，phospholipase A_2，PG が筋細胞内にフリー・カルシウムの過剰状態を招来しうる薬理作用を考察した．



Drug-induced changes of twitch and tetanus, expressed in % of those recorded in control or preincubation media.

	PGE2 alone	PGE2 & leupeptin	PGE2 & mersalyl
	n:10	n:4	n:6
Pt	56±14.1	85±6.4	60±11.8
Po	51±13.4	85±8.9	61±14.8

図5　図4のA23187処理筋に対する場合と同様，PGE_2（2.8×10^{-6} M）単独処理による張力（Pt，Po）低下は，Leupeptinでは有意な影響を受けるが，Mersalylでは受けないことを示す（ラット横隔膜筋，37℃）．

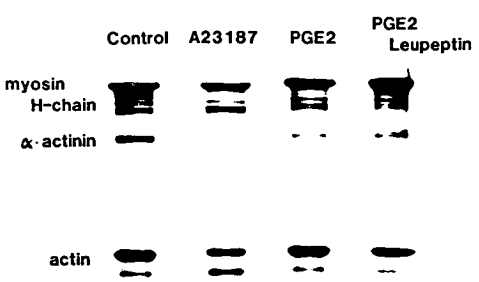


図6　生理学的実験同様，各薬剤で処理を受けたラット横隔膜筋の，SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による構造蛋白変動の観察．PGE_2処理筋はA23187処理筋同様，定量的差はあるが，α-actininとmyosin heavy chainの減少と，分解産物を思わせるバンドの出現を示す．この変化はLeupeptin添加処理で抑えられる．

文　献

1) Takamori, M., Komai, K., Nitta, N., and Itouji, K.: Role of prostaglandin E_2 in contractile abnormality induced by calcium ionophore, A23187. Neurology (Cleveland), 34: 91-94, 1984.

2) Winocour, P.D., Kinlough-Rathbone, R.L., and Mustard, J.F.: Effect of the phospholipase A_2 inhibitor mepacrine on aggregation of washed rabbit platelets. Fed. Proc., 38: 1271—1273, 1980.

3) Gerard, K.W., and Schneider, D.L.: Protein turnover in muscle: Inhibition of the calcium activated proteinase by mersalyl without inhibition of the rate of protein degradation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 94: 1353—

1361, 1980.

4) Libby, P., and Goldberg, A.L.: Leupeptin, a protease inhibitor, decreases protein degradation in normal and diseased muscles. Science, 199: 534—536, 1978.

5) Billah, M.M., Lapetina, E.G., and Cuatrecasas, P.: PhospholipaseA_2 and phospholipase C activities of platelets. Differential substrate specificity, Ca^{++} requirement, pH dependence, and cellular localization. J. Biol. Chem., 255: 10227—10231, 1980.

6) Reddy, M.K., Etlinger, J.D., Rabinowitz, M., Fishman, D. A., and Zak, R.: Removal of Z-lines and α-actinin from isolated myofibrils by a calcium-activated neutral protease. J. Biol. Chem. 250: 4278—4284, 1975.

7) Rodemann, H.P., Waxman, L., and Goldberg, A.L.: The stimulation of protein breakdown in muscle by Ca^{++} is mediated by prostaglandin E_2 and does not require the calcium-activated protease. J. Biol. Chem., 257: 8716—8723, 1982.

8) Howard, B.D.: Perodate increases the sensitivity of sarcoplasmic reticulum to phospholipase A_2. Biochem. Biophys. Res. Commun., 104: 1175—1181, 1982.

9) Cheah, A.M.: Effect of long chain unsaturated fatty acids on the calcium transport of sarcoplasmic reticulum. Biochem. Biophys. Acta, 648: 113—119, 1981.

10) Horrobin, D.F., Morgan, R,O., Karmali, R.A., Ally, A.I., Manku, M.S., Karmazyn, M., and Cunnane, S.C.: Thymic changes in muscular dystrophy and evidence for an abnormality related to prostaglandin synthesis or action. Ann. N. Y. Acad. Sci.,317: 534—547, 1979.

32）ミオトニーの発生機序に関する研究：低 Cl 溶液とミオトニー

栗 原 照 幸*

研究協力者　田 中 政 幸*　塩 屋 敬 一*

目　的

筋緊張症はヒトのミオトニー疾患，ヤギの遺伝性ミオトニー，アントラセン-9-カルボン酸による実験的ミオトニーに関する研究から，その生理学的異常の本態は筋細胞膜のクロールイオンに対する透過性減少にあることが Lipicky 及び Bryant らにより報告されている[1)2)3)]．

今回は筋細胞外液の Cl^- 濃度がミオトニーの発生にどのように関与するか，微小管ガラス電極の先端に液体の Cl イオン交換樹脂を充塡してイオン電極[4)5)6)]を作製し，筋細胞内外の Cl activity を計測し，Cl イオンとミオトニーの関係を検討したので報告する．

方　法

体重200～250g のウィスター系 SPF ラットの横隔膜標本を用いて実験を行った．低 Cl 溶液によるミオトニーを作製するために，溶液はタイローズ液の組成を一部変更し，NaCl の代りに59.6 mM の Na_2SO_4 を用い，KCl の代りに5mM の KH_2PO_4 を用いた．

膜電位は従来通り3M の KCl を入れた微小管ガラス電極を用いて計測し，Cl イオン濃度を筋細胞内外で計測するためには Cl の liquid ion-exchanger を，ガラス電極の先端をシリコンコーティングした上で300μm の高さになるよう顕微鏡下で充塡し，イオン交換樹脂の上には0.5mM KCl を満たしたイオン電極を用いた．イオン電極の先端は5μm 以下で筋細胞内の Cl^- 濃度も計測できる大きさである．Cl イオン電極は WPI FD-223 Dual/Differential Electrometer に接属し，イオン濃度を電位変化として計測した．

筋細胞内の Cl イオン activity を計測するためには Cl イオン電極を細胞内に入れ全電位を計測してから，膜電位（RMP）を全電位から減算して求めた．RMP は筋細胞内へ KCl 電極を入れて別に計測した．

実験中は横隔膜標本に95% O_2 と5% CO_2 の混合ガスを溶液中に通じて酸素化し，温度は20.8℃の液温で行い，筋肉標本を入れた chamber には，サーミスターを用いて持続的に温度を計測した．

結　果

筋細胞外液の Cl イオン濃度がどこまで下るとミオトニーが起るかを明らかにするために，タイローズ液（Cl 濃度：147mEq/L）と低 Cl 液を種々の割合で混合して，表 1 のように種々の濃度で Cl^- の濃度を低下させて実験を行ったところ，147,

表 1　筋細胞外 Cl^- 濃度の低下によるミオトニーの誘発と膜電位

No.	タイローズ液 / タイローズ液＋低Cl溶液 ×100	細胞外の Cl^- $[Cl]_o$ mEq/L	ミオトニーの誘発(+)or(−)	静止膜電位 RMP±SDmV
1	100 %	147	(−)	−86.6±3.5
2	60.0	85	(−)	−82.0±3.4
3	57.5	82	(+)	−83.0±3.4
4	55.0	80	(+)	−81.0±3.1
5	50.0	76	(+)	−80.4±2.9
6	30.0	47	(+)	−80.5±3.0
7	20.0	29	(+)	−69.5±7.7
8	0	0	(+)	−68.7±8.4

タイローズ液と低 Cl 液を種々の割合で混合して，細胞外液の Cl^- 濃度を変化させたところ，Cl^- 濃度が82mEq/L 以下になるとミオトニーが誘発される．

* 宮崎医科大学第三内科

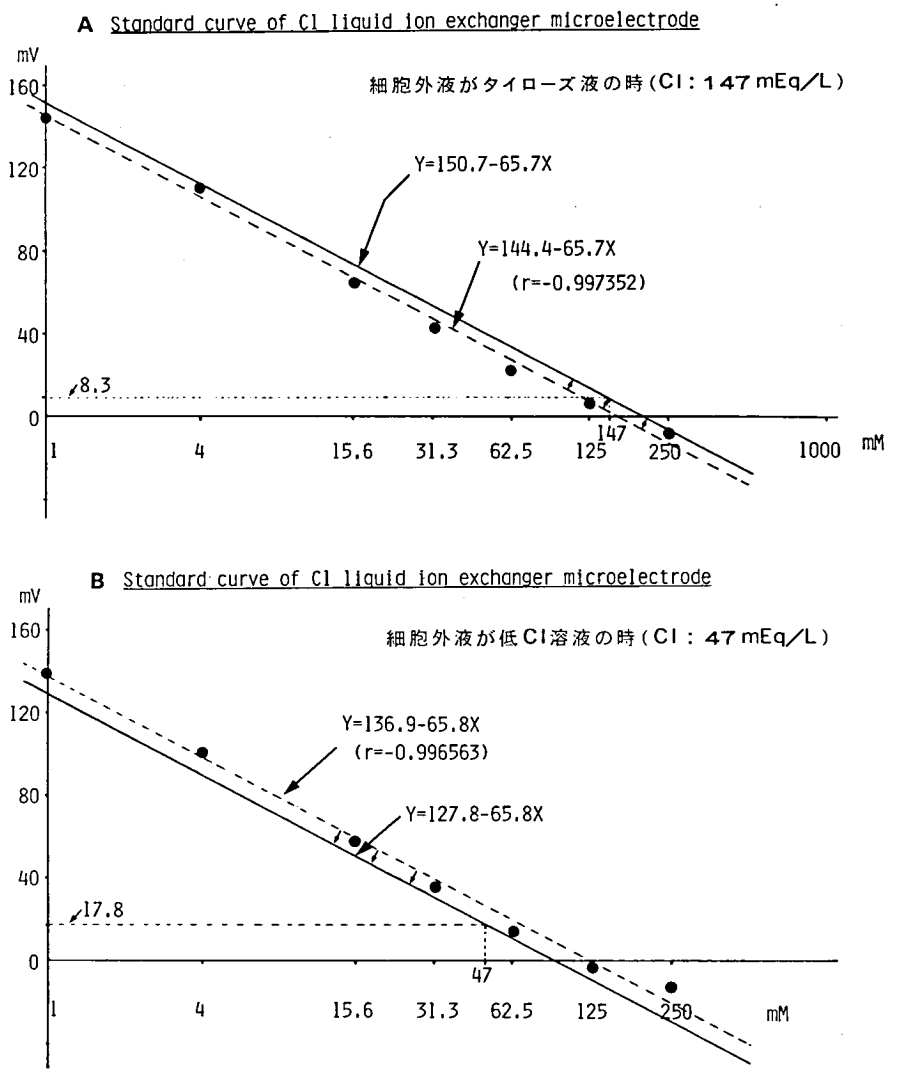


図1A，B　液体イオン交換樹脂を入れたClイオン電極をKClの標準溶液7種の中に入れ，電位をElectrometerで計測して標準曲線を作製した．Aはタイローズ液，Bは低Cl溶液（47mEq/L）を細胞外液として用いた際の標準曲線．

85mEq/Lではミオトニーは起らないが，細胞外液のCl^-濃度が82，80，76，47，29，0 mEq/Lの際にはミオトニーがKCl電極の筋細胞内刺入時に起った．膜電位はタイローズ液中では−86.6±3.5（1S.D.）mV，82mEq/Lの低Cl溶液でミオトニーが起った際は−83.0±3.4mVと膜電位の低下がない状態でもミオトニーは起っている．細胞外液のCl^-濃度を0 mEq/Lとすると膜電位は−68.7±8.4mVと低下する．

次にCl^-濃度を計測する際には，あらかじめKCl溶液1，4，15.6，31.3，62.5，125，250mMの標準溶液を作製しておき，図1の様な片対数グラ

フに Cl^-濃度（横軸）とそのCl^-イオン電極による Electrometer の読み（縦軸）を黒丸の様にグラフに示し，各イオン電極一本一本について点線で示した様な標準曲線を作製する．

Cl^-濃度の対数を X とし，イオン電極による電位の読みを Y とすると，図 1 A の電極では Y＝144.4－65.7X という回帰方程式が求められ，Cl^-濃度とイオン電極による電位（mV）の読みは r＝0.997とよく相関する．

細胞外液がタイローズ液の時はCl^-濃度は147 mEq/L なので，点線のグラフを実線のグラフのように平行移動する．更に筋細胞内のCl^-濃度をこの標準曲線を用いて求める．その際膜電位を減算する必要があり，膜電位は別に KCl 電極を筋細胞内へ刺入して計測する．表 2 にタイローズ液中に筋標本が浸されている時の筋細胞内外の Cl activity を計測するための実験データーを示す．表の左から膜電位，中央段は筋細胞内へイオン電極を挿入した時の電位の計測値(E)，右の段は細胞外液中のイオン電極の読み(Eo)である．

表 2　タイローズ液(対照)中の RMP 及び筋細胞内外 Cl activity

	RMP mV	E mV	E_o mV
	－80	－0.6	8.7
	－88	－3.8	8.4
	－90	－2.2	8.7
	－88	－4.8	8.4
	－84	－2.8	8.6
	－86	－3.1	8.8
	－88	－5.8	8.9
	－90	－2.3	7.3
	－90	－2.3	7.8
	－80	－6.8	8.1
	－86	－5.6	8.2
	－92	－6.1	8.4
	－88	－3.1	8.3
	－86	－2.3	8.3
	－84	－2.5	8.2
	－84		8.2
	－88		8.2
	－86		
	－92		
	－82		
MN	－86.8	－3.6	8.3
SD	3.5	1.8	0.4

$$E_{Cl} = E - RMP$$
$$= (-3.6) - (-86.6)$$
$$= 83.0\,mV$$

回帰方程式

$$Y = 150.7 - 65.7 \log x$$
$$\log x = \frac{150.7 - (83)}{65.7}$$
$$= 1.03$$
$$x = 10.8$$

$$\underline{a^i{}_{Cl} = 10.8\ mEq/L}$$

筋細胞内の Cl activity

膜電位と Cl イオン電極による筋細胞内外の Cl activity の計測（細胞外液がタイローズ液の場合）．

以上のデーターをCl^-イオン電極の標準曲線に当てはめて，筋細胞内外のCl^-濃度を求める訳である．グラフから読むより回帰方程式に値を代入した方が正確であるから，表 2 右の計算を行い，細胞外液がコントロールのタイローズ液の際は，筋細胞内 Cl activity が10.8mEq/L となる．

次にミオトニーが起る低 Cl 溶液での筋細胞内外のCl^- activity を計測するが，これもコントロールと同様に行い図 1 B のイオン電極について標準曲線をつくり，表 3 のようにミオトニーが生じた47mEq/L の低 Cl 溶液に筋標本を浸した際の細胞内Cl^-濃度を求めると，これは表 3 の実験データーに基づき RMP は－80.5±3.0mV，筋細胞内のイオン電極の読み平均4.7±3.5mV，イオン電極の回帰方程式 Y＝127.8－65.8X から計算して，筋細胞内の Cl activity は4.44mEq/L となる．

以上の結果を用いて，Cl conductance (g_{Cl}) を計算するため表 4 の計算式を用いる．膜電位 (Em) と，筋細胞内外の Cl 濃度（〔Cl〕i，〔Cl〕o）を実験結果に基づいて表 4 の計算式に代入した．タイローズ液における g_{Cl} に対する低 Cl 溶液における g_{Cl}の比で表わすと表 4 のように29.5%となる．つまり低 Cl 溶液でミオトニーが起っている時の g_{Cl}はコントロールのタイローズ液における g_{Cl}に比し，29.5%に低下している．

考　　察

ミオトニーのあるヤギの肋間筋や，ヒトの先天性筋緊張症の肋間筋では筋細胞膜の膜抵抗が夫々5600Ωsqcm，5700Ωsqcm と高く（正常では1900，2600Ωsqcm），これはミオトニーのある筋肉では

表3　タイローズ液150ml＋低Cl溶液350ml中のRMP及び筋細胞内外Cl activity

	RMP mV	E mV	E_0 mV
	−76	14.1	19.8
	−80	9.0	18.5
	−82	4.0	18.2
	−82	0.1	18.3
	−82	1.4	18.0
	−80	3.4	17.9
	−80	2.8	17.8
	−84	7.9	17.9
	−84	3.6	17.7
	−76	6.8	17.3
	−82	3.5	17.4
	−74	4.0	17.4
	−82	1.0	17.4
	−82	6.0	17.2
	−84	2.1	17.2
	−84	6.0	17.3
	−80		
	−76		
	−82		
	−78		
MN	−80.5	4.7	17.8
SD	3.0	3.5	0.7

$E_{Cl} = E - RMP$
$= (4.7) - (-80.5)$
$= 85.2\,mV$

回帰方程式

$Y = 127.8 - 65.8 \log x$

$\log x = \dfrac{127.8 - 85.2}{65.8}$

$= 0.64$

$x = 4.44$

$a^i_{Cl} = 4.44\ mEq/L$

筋細胞内のCl activity

膜電位とClイオン電極による筋細胞内外のCl activityの計測
(細胞外液が47mEq/Lの低Cl溶液の場合).

Clイオンのconductanceが低下しているためと考えられている．筋細胞膜の静止時におけるconductanceの70%近くはClイオンのconductanceによるものであり，Clイオンは重要な役割を果していることになる．実験的には，筋細胞膜のg_{Cl}をコントロールの30%に下げるとミオトニーが起ると言われており[7]，数学的理論からはBarchiによ

表4　Cl Conductance (g_{Cl}) の計算

対照とのg_{Cl}の比を求める．

constant field theory によるg_{Cl}

$$g_{Cl} = -\frac{EmF^2}{RT} P_{Cl} \frac{[Cl]i - [Cl]o\, e^{-EmF/RT}}{e^{-EmF/RT} - 1} \Big/ (Em - E_{Cl})$$

低Cl溶液によるミオトニー標本の　膜電位

$[Cl]i \fallingdotseq a^i_{Cl} = 4.44$ (mEq/L)
$[Cl]o \fallingdotseq a^o_{Cl} = 47.0$ (mEq/L)　RMP(Em)=80.5±3.0mV

$E_{Cl} = 0.0253 \times \ln(4.44/47.0) = -59.7$ mV

タイローズ液中の筋細胞内外のCl activity　膜電位

$[Cl]i \fallingdotseq a^i_{Cl} = 10.8$ (mEq/L)
$[Cl]o \fallingdotseq a^o_{Cl} = 147.0$ (mEq/L)　RMP(Em)=86.6±3.5mV

$E_{Cl} = 0.0253 \times \ln(10.8/147) = -66.1$ mV

これらの値を代入して

$$g_{Cl}(\text{低クロール}) / g_{Cl}(\text{タイローズ}) = \frac{80.5 \times (4.4 - 47 \times 24) \times (30.6 - 1) \times}{86.6 \times (10.8 - 147 \times 30.6) \times (24 - 1) \times}$$

$$\frac{(-86.6 - (-66.1))}{(-80.5 - (-59.7))}$$

$= 29.5\%$

低Cl溶液(47mEq/L)によるミオトニー標本のg_{Cl}とタイローズ液中の筋標本(コントロール)のg_{Cl}の比の計算．液温20.8℃．
イオン電極により筋細胞内外のCl activityを実測して，その値を方程式に代入して求めた．

り，g_{Cl}が正常値の0.3mmho/sqcmからその1/3の値である0.1mmho/sqcm又はそれ以下になると，1回起った筋活動電位の後，反復して活動電位の発火が起ると述べている．今回の私共の実験では，低Cl溶液を細胞外液とすると82mEq/L以下のCl濃度ならそれだけで筋標本に対してミオトニーを誘発させることと，筋細胞内外のCl^-濃度を生きたままの標本でイオン電極によって計測したところ，コントロールでは筋細胞内で10.79mEq/L，ミオトニーが生じた47mEq/Lの低Cl溶液中では筋細胞内Cl activityは4.44mEq/Lという値が得られ，g_{Cl}もcontrolの29.5%に低下していることが明らかとなった．実験的にClイオンのミオトニー誘発に関する重要な役割を示すことができた．

今回微小管ガラス電極内に液体のイオン交換樹脂を充填して筋細胞内のClイオン濃度を計測したが，本法によりCl^-，K^+，Ca^{++}の交換樹脂を用いれば，他の筋疾患にも応用ができる実験法とな

り得る.

結　　語

①低 Cl 溶液の Cl 濃度を種々変化させて検討したところ，筋細胞外の Cl^-濃度が82mEq/L 以下になれば，それのみでミオトニーが生じる.
②膜電位の低下がなくても細胞外液の Cl^-濃度低下のみでミオトニーを誘発し得る.
③筋細胞内外の Cl activity を微小管イオン電極で測定し，それから Cl conductance (g_{Cl}) を計算すると g_{Cl}は細胞外の Cl^-濃度に大きく影響され，ミオトニーの生じている標本では g_{Cl}が30%以下に低下し，そのためミオトニーを誘発していると考えられる.

謝　　辞

イオン電極の作製に当って宮崎医科大学耳鼻科小宗静男先生の御指導に深謝します。

文　　献

1) Lipicky, R.J., Bryant, S.H. & Salmon, J.H.: Cable parameters, sodium, potassium, chloride, and water content, and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. J. Clin. Invest., 50 : 2091, 1971.
2) Lipicky, R.J. & Bryant, S.H.: Sodium, potassium, and chloride fluxes in intercostal muscle from normal goats and goats with hereditary myotonia. J. General Physiol., 50 : 89, 1966.
3) Bryant, S.H. & Morales-Aguilera, A.: Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. J. Physiol., 219 : 367, 1971.
4) Cornwall, M.C., Peterson, D.F., Kunze, D.L., et al.: Intracellular potassium and chloride activities measured with liquid ion-exchanger microelectrodes. Brain Res., 23 : 433, 1970.
5) Kunze, D.L. & Brown, A.M.: Internal potassium and chloride activities and the effects of acetylcholine on identifiable aplysia neurones. Nature New Biol., 229 : 229, 1971.
6) 森園哲夫，松元一郎，Sellick，P.M.，ほか：Liquid ion-exchanger による内耳液カリウムイオンの測定法．耳鼻と臨床，20：128，1974.
7) Barchi, R.L.: Myotonia. An evaluation of the chloride hypothesis. Arch. Neurol., 32 : 175, 1975.

III. 遠位型ミオパチー

33) "Rimmed vacuole 型 distal myopathy" と "rimmed vacuole を伴う緩徐進行性神経原性筋萎縮症群" との比較検討

田辺　等*

研究協力者　内潟雅信*　小島　進*　松井孝道*
磯崎英治*　塩沢瞭一*　野沢胤美*
山本温子*　松原四郎**

はじめに

Distal myopathies については，最近むしろ本邦において詳細に検討され，とくに筋ジストロフィーとしてのいわゆる三好型と，"rimmed vacuole 型 distal myopathy" との本質的な相違も明らかにされている[1),2)]．

また rimmed vacuole 自体についても，①その性状・本態の面からは autophagic vacuole としての特徴，filamentous inclusion や lysosome に関する知見が蓄積されているが，②臨床的な面からは，疾患・病型特異性の問題，神経原性要素との関連など，なお多くの課題が残されている[1)]．今回我々は主として②の臨床的立場から，"rimmed vacuole 型 distal myopathy" と，"rimmed vacuole を伴う緩徐進行性神経原性筋萎縮症群" との比較検討を行ない，distal myopathies の本態・成因につき示唆に富む知見を得たので報告する．

症例および方法

適応を検討した上で筋生検を行なった自験入院精査神経筋疾患1275例（1970～）中43例（47検体）に rimmed vacuole を認めており，その内訳は次のごとくである〔( )内は各群母集団例数〕：

* distal myopathy	2(2)
** 緩徐進行性神経原性筋萎縮症	15(46)
筋緊張性ジストロフィー	4(40)
筋ジストロフィー・肢帯型	1(17)
筋ジストロフィー・顔面肩甲上腕型	1(6)
多発性筋炎	5(191)
諸種ニューロパチー	4(50)
その他	11(923)

これらのうち，今回はとくに緩徐進行性神経原性筋萎縮症群15例（** 印）に着目し，これと rimmed vacuole 型 distal myopathy 自験2例（* 印）および他報告例とを比較検討した[1),3)~5)]．各症例における遺伝子性・臨床症状および経過・他検査所見等と，筋病変とを対比し考察を加えた．筋病変については，とくに生検部位との関係（とくに下肢遠位部と他部）との対比，神経原性病変との関連などに関しとくに留意した．筋病変の検索には routine battery による組織学的・組織化学的方法，およびグルタール・オスミウム二重固定による電顕的方法を併用した．なお一部の症例に腓腹神経生検を併せ行ない，routine battery により検索した．

結　果

Rimmed vacuole を認めた15例の母集団としてここに取上げた46例の "緩徐進行性神経原性筋萎縮症"（前記 ** 印）は，結果的に44例が成人例で，Kugelberg-Welander 病および類縁疾患を含

* 虎の門病院神経内科
** 現・金沢大学医学部神経内科

表1　緩徐進行性神経原性筋萎縮症群46例
（1970年～：10～59歳：男28，女18）

病型（筋萎縮分布による）	例数	年齢	性別 男	性別 女	家族歴 家系(例)〔推定遺伝形式〕	Rimmed vacuole 出現例数（下肢遠位）
近位群	29	10～54	18	11	6 (9) 〔常劣〕4 (6) 〔常優〕2 (3)	6 (4)
顔面肩甲上腕群	4	26～59	2	2	3 (4) 〔常劣〕1 (2) 〔常優〕2 (2)	0
球脊髄群	4	42～51	4	0	1 (3) 〔常劣〕	1 (1)
遠位群	7	22～43	2	5	4 (5) 〔常劣〕	6 (6)
肩甲下腿群	2	40，48	2	0	0	2 (2)
計	46	10～59	28	18	14 (21) 〔常劣〕10 (16) 〔常優〕4 (5)	15 (13)

み，下位運動ニューロンと筋以外の明らかな神経系の障害を示さず，しばしば遺伝子性を有する病態として捉えられる．これらの総括的呼称の試みのいくつかのうち，Meadows らの chronic spinal muscular atrophy（CSMA）に準じた表現と，筋萎縮分布による亜型分類が，本検討の便宜上最も適当であった[4]（表1）．表中，病型としては近位群・顔面肩甲上腕群・球脊髄群・遠位群・肩甲下腿群の5群に分類したが，近位群の大部分は成人型 Kugelberg-Welander 病と表現し得る病態を，また遠位群は“遠位型 Kugelberg-Welander 病”とも“pure motor 型 Charcot-Marie-Tooth 病”とも表現し得る病態を示している．46例中10歳の2例以外はすべて成人例．男女比は約3：2，また21例が10家系に分布する遺伝性を示し，常染色体性劣性遺伝が10家系に，優性遺伝が4家系に推定された．Rimmed vacuole は46例中15例に，うち13例は下肢遠位筋に認められた．病型別では遠位群にとくに高率且つ著明に出現し，また本報告の目的からも以下この6例に着目して，distal myopathy 群と対比する．

これら筋萎縮分布による病型群のうち，図1に一部を例示した（a：近位群・Kugelberg-Welander 病，b：肩甲下腿群，cおよびd：遠位群，e：rimmed vacuole 型 distal myopathy）．一般に神経原性近位群とくに Kugelberg-Welander 病では，近位部の筋萎縮以外に下腿遠位にも，もう一つのアクセントをもつ筋萎縮・筋力低下を認めることが意外に多いことに気付かれている．また神経原性遠位群と rimmed vacuole 型 distal myopathy とは筋萎縮分布の所見上極めて類似し，外見上の鑑別は困難である．

次に表2に，上述の緩徐進行性神経原性筋萎縮症・遠位群のうち rimmed vacuole を認めた6例（表の左側），および rimmed vacuole 型 distal myopathy 群3例（表の右側）を一括して示した．後者3例中筋生検は2例のみに施行している．先ず，神経原性遠位群6例のうち，3家系4例に常染色体性劣性遺伝と考えられる家族性発症を認める．男2，女4例で，5例は20歳台に発症している．全例下肢とくに下腿に著明な筋萎縮を示し，血清 CPK は4例に軽度上昇を認めている．筋電図では全例に神経原性変化を示すが，近位型とくに Kugelberg-Welander 病にしばしばみられるような筋原性変化の混在は殆んど認められなかった．末梢神経伝導速度（NCV）は施行5例中3例に軽微な低下を認めたに過ぎない．筋病変については後述する．4例に施行した腓腹神経生検所見では，subclinical に軽度の髄鞘・軸索変性を認める程度であった．表の右側に示した rimmed vacuole 型 distal myopathy の3例中2例は同一家系同胞（姉・弟）発症である．発症年齢は神経原性群と大差なく，また下腿に著明な筋萎縮を認めるが，進行は前者に比してやや速く，血清 CPK 上昇もより著明であった．筋電図は筋原性変化が主体であったが，一部に（とくに第3例）に神経原性変化の混在を示しており，従来の他報告例でも指摘されている通りである．末梢神経伝導速度は施行した2例でやはり subclinical に腓腹神経のみに軽度の低下を認めた．施行した2例の筋生検所見については後述する．腓腹神経生検では施行した2例に subclinical の軽微な髄鞘・軸索変性を認める程度であった．

以下筋病変について，とくに rimmed vacuole の性状と出現状況，および背景をなす特徴的所見に着目して提示する．記載の便宜上，A群：“rimmed vacuole を伴う緩徐進行性神経原性筋萎縮症”（15例），B群：“rimmed vacuole 型 distal

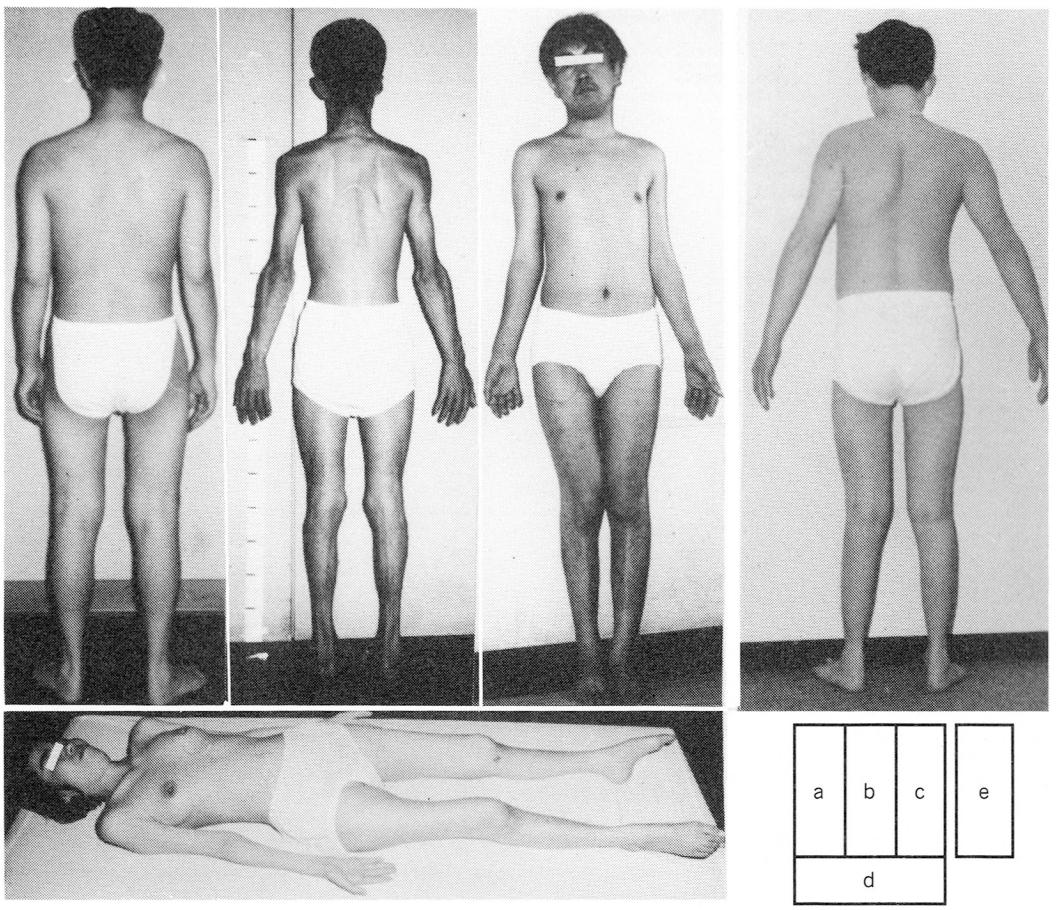


図1　〔症例全身像例示〕a～dは緩徐進行性神経原性筋萎縮症群，a．近位群（Kugelberg-Welander 病），48歳男；b．肩甲下腿群，48歳男；c．遠位群・第6例，29歳男；d．遠位群・第2例，34歳女；e．rimmed vacuole 型 distal myopathy・第1例，25歳男．

myopathy”（3例，うち筋生検2例）とし，得られた結果を列挙する（図2・3）．すなわち，1）A群15例中 rimmed vacuole は下肢遠位筋に高率（73%）に認められ，とくに遠位群7例中6例（いずれも下肢遠位筋）にみられた．2）A・B群とも，典型的な rimmed vacuole の所見には（光顕・電顕的検索とも）差を認めないが，B群では非典型的 rimmed vacuole（空胞を認めない顆粒状 myelin 物質蓄積，または筋線維内の大型の mass 状構造，あるいは myelin 物質蓄積を伴わない小空胞の集塊など）の混在も目立つ．3）A・B群とも rimmed vacuole は中等度萎縮（とくに type I）線維に出現し易い．4）rimmed vacuole はA群では群集萎縮部（とくに筋小束単位の大群集萎縮部）に高率に認められ，B群でも（一部群集萎縮を伴うことが多いがその部位では）群集萎縮部に高率に認められる．さらにB群で群集萎縮を認めない部位でも，筋小束ごとの差を示して出現する傾向がある．5）A群には再生現象（筋線維の classical ないわゆる再生現象や fiber type grouping などをも含め）が認められ易いがB群についてはその所見に乏しい．

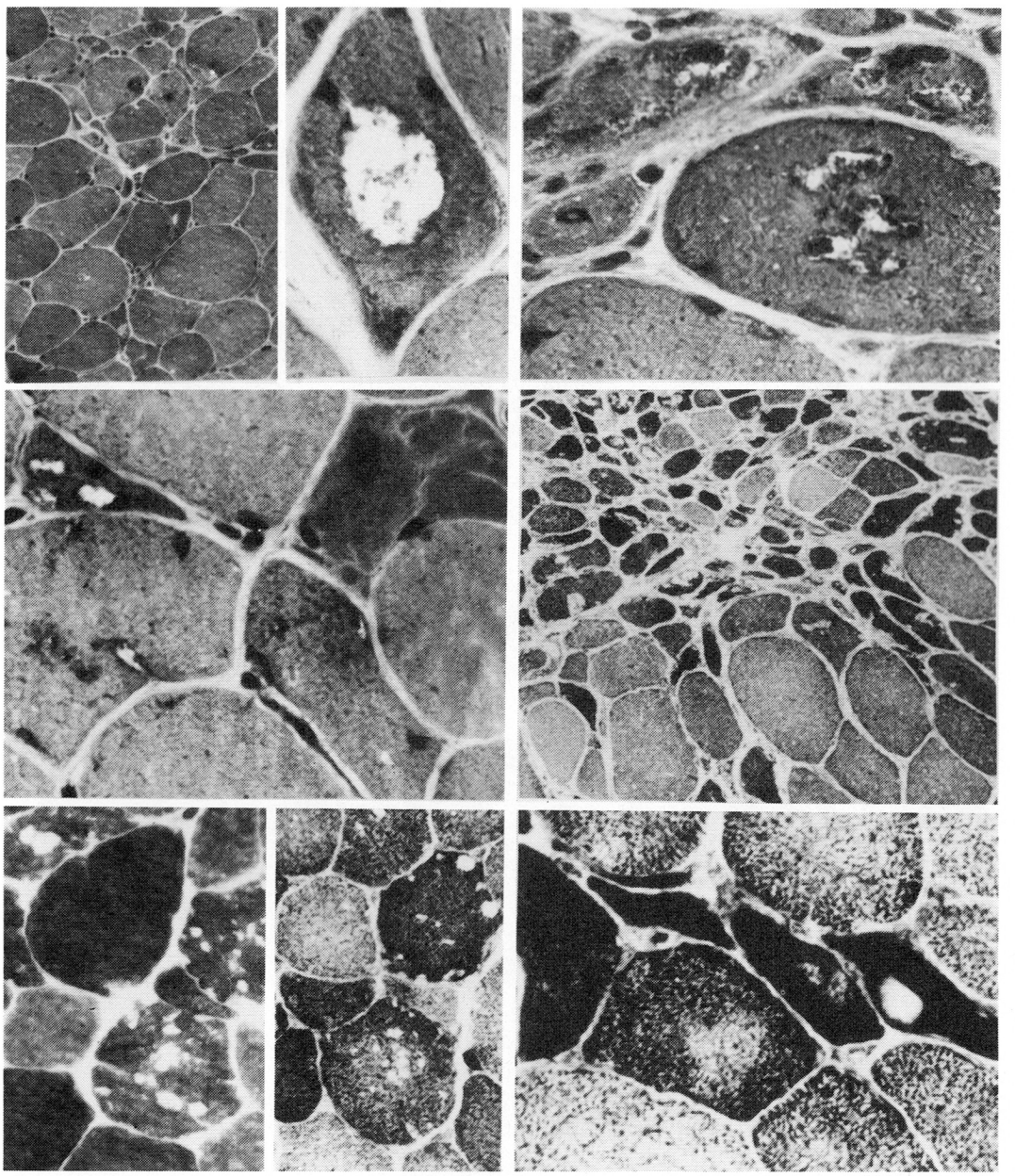
表2　Rimmed vacuole を伴う遠位型筋萎縮2群の比較

	"Rimmed vacuole を伴う緩徐進行性神経原性筋萎縮症群"						"Rimmed vacuole 型 distal myopathy 群"		
症例 No.	1	2	3	4	5	6	1	2	3
家族歴	＋ 〈血族結婚〉同胞発症	－	－	＋ 同胞（男2）	＋ 〈血族結婚〉同胞（姉弟）		＋ 〈血族結婚〉同胞（姉弟）		－
性別	女	女	女	男	女	男	男	女	男
初診時年齢	30	43	22	26	28	29	25	30	17
発症年齢	28	26	21	25	25	10	22	24	10
筋萎縮	遠位型（上肢≪下肢）						遠位型（上肢＜下肢）		
経過	緩徐進行性（distal myopathy よりやや遅い）						緩徐進行性		
血清 CPK	95	70	155↑	209↑	106↑	265↑	690↑↑	447↑↑	820↑↑
筋電図	神経原性変化						筋原性変化（一部軽度の神経原性変化）		
NCV N. tib. ant. (44～52)	／	80	40↓	52	50	46	46	／	48
NCV N. sularis (53～63)	／	50↓	／	66	52↓	55	52↓	／	39↓
筋生検 (M. peroneus)	群集萎縮（諸種），一部 fiber type grouping rimmed vacuole						(No. 1・3) 散在性萎縮（一部群集） rimmed vacuole		
腓腹神経生検	(No. 1・2・4・5) 軽微の髄鞘・軸索変性						(No. 1・3) 軽微の髄鞘・軸索変性		

考　察

本研究は，はじめに記したように，distal myopathies の病型や，rimmed vacuole 一般の他疾患における出現状況について，主として臨床的観点から検討することを目的とした．

いわゆる"distal myopathies"と現在総括的に表現されている病態には，歴史的にも極めて多数の報告例や，疾患・病型の命名に関する文献が蓄積されている[2]．これらのうち，最近本邦では比較的多くの報告例がみられることから，常染色体性劣性遺伝型筋ジストロフィーとしてのいわゆる三好型と，rimmed vacuole 型 distal myopathy の両者がとくに注目を集め，それぞれの特徴的病態や相互の本質的な差異についての論議が活発に行われている．両者はともに若年発症で，下肢遠位にはじまり，四肢主体の遠位型緩徐進行性筋萎縮を主症状とする点に共通性がみられ，また後者についても遺伝子性を認めた家系例も知られている．前者が筋ジストロフィーであり後者が非ジストロフィー性ミオパチーであることには，ほぼ一致した見解が得られているが，後者の特徴病態の1つに，筋病変中の rimmed vacuole の高率出現があげられる．この rimmed vacuole と本症との関係が強調されたため，他疾患における rimmed vacuole の出現に関する従来の知見と比較対比させている研究報告に乏しい．福原ら[2]，著者ら[1),3),4)]も既にこの非特異的出現には言及しているが，今回の著者らの報告は，単なる非特異性を指摘したものではなく，rimmed vacuole 型 distal myopathy および緩徐進行性神経原性筋萎縮症群では，その他の疾患群よりも，その出現頻度や rimmed vacuole そのものの典型性や規模において，より特異性が高いことを示したものである．とくに，この中の神経原性遠位群と，rimmed vacuole 型 distal myopathy との間には，神経原性変化の差異が原則的には存在するものの，筋萎縮分布・緩徐進行性・rimmed vacuole 出現・一部の遺伝性などの点で共通するところが多い[3),4)]．一方 rim-



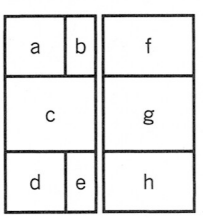
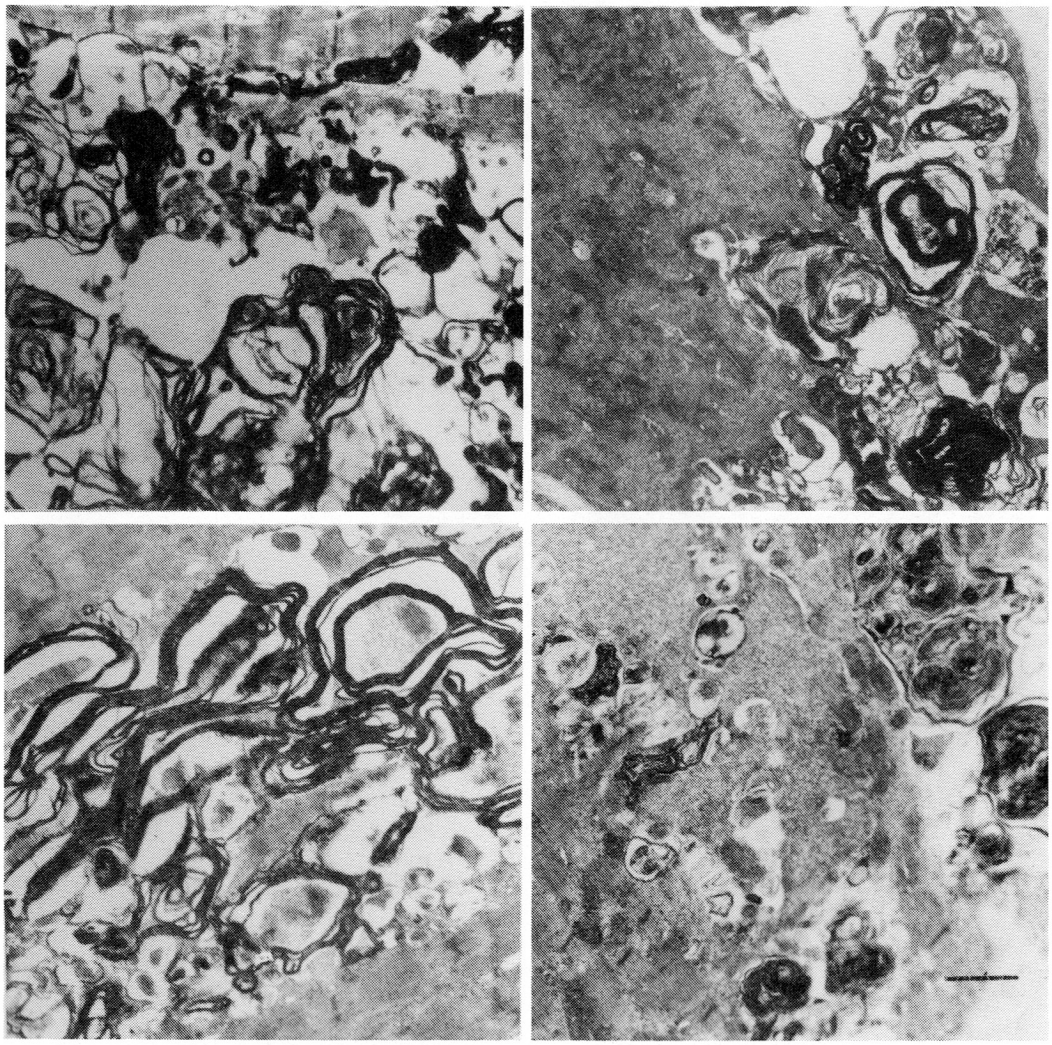


図2　〔筋病変光顕所見例示〕a～e は rimmed vacuole 型 distal myopathy（第1例，腓骨筋），a．trichrome 変法，100×；b．同400×，典型的 rimmed vacuole；c．HE，400×，非典型所見（本文参照）；d．myosin ATPase，200×；e．DPNH-TR，200×（d．e．ともに type I 線維に rimmed vacuole が目立つ）．f～h は緩徐進行性神経原性筋萎縮症・遠位群（第4例，腓骨筋），f．trichrome 変法，400×；g．DPNH-TR，100×，大群集萎縮部の rimmed vacuole；h．同400×，濃縮現象と rimmed vacuole．



a	b
c	d

図3　〔筋病変電顕像例示〕myelin figure, lipid body, filamentous inclusion 等を主体とする所見（rimmed vacuole 部）．a～cは緩徐進行性神経原性筋萎縮症．a., b．近位群（大腿四頭筋）；c．遠位群（第2例，腓骨筋）；d．rimmed vacuole 型 distal myopathy（第1例，腓骨筋）．いずれも3200×．

med vacuole 型 distal myopathy の側からみても，多くの症例で，筋電図上の神経原性変化の混在，筋生検所見上の群集萎縮の好発，rimmed vacuole の筋束毎の出現率差などが知られている[1),2),5)]．以上より，rimmed vacuole の出現には神経性因子の関与が強く示唆され，下肢遠位部に好発する点から長い運動ニューロンの障害との関係，また経過の長い（緩徐進行性）病態との関係についても併せて示唆に富む知見が得られた．また神経原性遠位群の側からの“rimmed vacuole 型”の呼称，さらに distal myopathy 群との spectrum 的位置づけの問題など，今後検討考察を重ねるべき内容も残されている．

ま と め

主として臨床的観点から，distal myopathiesの一型である“rimmed vacuole 型 distal myopathy”3例と，“rimmed vacuole を伴う緩徐進行性神経原性筋萎縮症群”15例との比較検討を行なった．その結果，① rimmed vacuole 自体は一般的に特異的所見ではないが，上記2群については，その出現頻度や rimmed vacuole そのものの典型性や規模において，より特異性が高いこと，②特に神経原性遠位群と rimmed vacuole 型 distal myopathy とは，原則的な神経原性・筋原性の差異はあるものの，極めて類似性の高い病態が混在していること（spectrum の可能性），③ rimmed vacuole の成因には神経性因子（とくに長い運動 neuron）の関与と長期（緩徐進行性）の経過との関係が重要であることを示した．

文 献

1) 田辺 等，内潟雅信，小島 進，松井孝道，野沢胤美，松原四郎：筋病変における rimmed vacuole ないしはその類似所見について．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」三好班，昭和57年度研究報告書，1983，pp. 231—236.

2) 豊倉康夫，三好和夫(編)：Distal myopathy，外国における文献（1902—1981. 12）；日本における症例報告，その他（1951—1981. 12）．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」三好班，昭和56年度研究報告書，1982，pp. 243—249.

3) a．田辺 等，松原四郎，内潟雅信，野沢胤美：知覚障害を伴わない緩徐進行性遠位型筋萎縮症について．厚生省「筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究」三好班，昭和54年度研究報告書，1980，pp. 81—84.

   b．松原四郎，金坂明美，内潟雅信，野沢胤美，田辺 等，原 満：知覚障害を伴わない緩徐進行性遠位型神経原性筋萎縮について．神経内科，**13**：222—227，1980.

4) a．松原四郎：慢性脊髄性筋萎縮症の臨床病理学的研究．金沢大十全医学会雑誌，**90**：676—695，1981.

   b．Matsubara, S. and Tanabe, H.: A clinicopathological study of chronic hereditary motor neuropathy. Acta Neuropathol. (Berl.), **61**: 43—51, 1983.

5) Matsubara, S. and Tanabe, H.: Hereditary distal myopathy with filamentous inclusions. Acta Neurol. Scandinav., **65**: 363—368, 1982.

34）筋生検所見よりみた遠位型ミオパチーと遠位型筋ジストロフィーの比較検討

福 原 信 義*

研究協力者　熊 本 俊 秀** 松 原 四 郎* 高 守 正 治*

はじめに

Rimmed vacuole（RV）を有する遠位型ミオパチー（DM）[1)2)3)]と三好型の遠位型筋ジストロフィー（DD）[4)]は，ともに常染色体劣性遺伝で，下肢遠位部の筋力低下を初発症状とするが，DDでは下肢屈筋の方の障害が強く，つま先き立ちができない[4)]のに対し，DMではむしろ前脛骨筋の筋萎縮の方が強く[5)]，両者は臨床的にやや異なる[5)6)]とされている．しかし，臨床経過に伴い近位筋の方にも筋力低下は拡がり，両疾患は区別しがたくなってくる．これまで，DMの筋病理については種々論じられてきたが，DDの筋病理についてはほとんど検討されていない．我々は，DDの4例（5筋）とDMの8例（8筋）について比較検討したので報告する．

症　例

用いた症例は表1のごとく，DDは21—38歳，DMは25—48歳で，経過はDD5—13年，DM3—17年とあまり違いはないが，血清CK値は，DMでは正常か軽度増加であるのに対し，DDでは著明に増加していた．代表的症例を記すと，

症例1：28歳女

家族歴：両親が従兄妹婚，他に同病者はみられない．

現病歴：14歳より歩行障害が出現．階段がのぼりにくくなる．21歳時，新潟大学神経内科入院．

入院時所見（1973．1．12）：脳神経系に異常なく，筋力は上肢で正常，下肢では軽度低下し，筋萎縮もみられるが，特に両側腓腹筋に萎縮がはっきりしており，つま先き立ちができない．深部反射：消失，病的反射（－），感覚障害（－），協同運動障害（－），髄液：正常，末梢神経伝導速度：正常，筋電図：ミオパチー，血清CK：522U（正常＜20），筋生検：左大腿四頭筋にて施行，経過：その後の10年間で，筋力低下，筋萎縮は非常にゆっくりと進行し，両側上肢遠位部にも軽度の筋力低下，筋萎縮が出現，下肢では立ち上りが困難となり，杖歩行となっている．

症例12：32歳男

家族歴：両親はまた従兄妹婚で，妹（症例5）も同疾患．

現病歴：3年前より右足関節の力がなくなり，1年前より左足関節の力が低下した．2—3年前より両手の筋萎縮に気づいている．1982年12月20日，白根健生病院神経内科受診．

初診時現症：脳神経系に異常なし，筋力は前腕屈筋，小手筋で軽度低下，下腿伸筋，大腿屈筋で中等度に低下，両側手背骨間筋，前脛骨筋，腓腹筋に中等度，前腕屈筋，大腿屈筋に軽度の筋萎縮がみられる．線維束攣縮（－），深部反射：膝蓋腱反射は正常だが，他はすべて消失，病的反射（－），感覚障害（－），協同運動障害（－），末梢神経伝導速度：正常，筋電図：主体はミオパチーだが，ややlong durationのNMUが混在，血清CK：368 mU/ml（正常＜270），筋生検：左腓腹筋で施行．

方　法

通常の手技にて筋生検を行い，電顕用に2.5%グルタールアルデヒドと1%オスミュウム酸で二重固定を行い，アラルダイトに包埋したが，一部はイソペンタン中で直ちに凍結し，凍結切片につい

＊金沢大学医学部神経内科
＊＊熊本大学医学部第一内科

表1　症例のまとめ

Case	Age	Sex	Muscle biopsied	Duration of Weakness	Serum CK
Distal Muscular Dystrophy					
1	21	F	Q	7	522(N;< 20), 4,830 (N;< 150)
2	20	F	Q, G	5	22,400 (N; <150)
3	38	F	B	9	134(N;< 20)
4	30	M	G	13	7,220 (N;< 150)
Distal Myopathy					
5	29	F	Q	3	340 (N;< 80)
6	35	F	Q	5	41 (N;< 80)
7	32	M	Q	6	216 (N;< 80)
8	25	M	Q	3	161 (N;< 80)
9	48	F	T	17	143 (N;< 60)
10	25	M	T	2	342 (N;< 60)
11	47	F	Q	15	161 (N;< 150)
12	32	M	G	3	368 (N;< 270)

Q : quadriceps femoris ; B : biceps brachii ; T : tibialis anterior ;
G : gastrocnemius ; N : normal

て，Gomori trichrome 染色，HE，PAS，NADH-TR，ATPase，酸性フォスファターゼ染色などを行った．また，凍結切片を Pearl & Little[7] の方法により acridine orange 染色標本の螢光顕微鏡による観察も行った．

結　　果

1）凍結切片の組織学的検討

表2のごとく，凍結切片では，RV は，DM の全例にみられたが，DD ではみられず，酸性フォスファターゼ陽性顆粒をもつ線維も DM で3.0—25.4%の頻度でみられるのに対し，DD ではみられなかった．Opaque fiber は，DD の4/5で1.5—9.8%の線維にみられたが，DM では1/8で0.2%の線維にみられたのみであった．貪食細胞の侵入した壊死線維は DD で3/5，DM では1/8の筋肉でみられ，間質の線維化は，DD で5/5，DM で5/8の筋肉に，小角化線維は DD で0/5，DM で6/8の筋肉にみられた．DM では同一の筋肉でも，しばしば，RV が多数みられ，筋線維の大小不同が著明で，線維化が強い部分と，筋線維の大小不同もなく，RV が全くみられない部分があった．

表2　組織学的所見（I）

Case	Muscle	Rimmed Vacuoles	Acid-P Positive Fibers	Opaque Fibers
1	Q	−	−	+ 1.6%
2	Q	−	−	+ 1.5
	G	−	−	+ 9.8
3	B	−	−	−
4	G	−	−	+ 8.7
5	Q	+	+ 3.3%	−
6	Q	+	+ 8.5	−
7	Q	+	+ 8.5	−
8	Q	+	+22.0	−
9	T	+	+ 6.3	−
10	T	+	+25.4	−
11	Q	+	+ 3.0	−
12	G	+	+10.9	+ 0.2

ATPase 染色による計測分析は，症例4では変化が強すぎ結論が出せなかったが，それ以外の症例では，線維タイプ優位は DD の3/4（I，1筋；

II，2筋)，DMの4/8（I，2筋；II，2筋）の筋肉に，線維タイプ群化（**表3**）は，DDの2/4（I，II a各1筋)，DMの7/8（I，6筋；II a，II b各1筋)の筋肉にみられた．タイプI線維肥大はDDの2/4，DMの5/8の筋肉に，タイプII線維肥大は，DDの3/4，DMの6/8の筋肉に，タイプI線維萎縮はDDの2/4，DMの5/8の筋肉に，タイプII線維萎縮はDDの4/4，DMの4/8の筋肉にあり，両疾患で差は認められなかった．タイプII c線維の出現率（**表3**）は，DDで1.0—4.3%，DMで0—6.3%であった．acridine orange染色により生ずる

表3　組織学的所見（II）

Case	Muscle	Fiber Type Grouping	AO Positive Fibers	Type II C Fibers
1	Q	−	+ 1.0%	+ 4.3%
2	Q	−	+17.1	+ 1.5
	G	+	+ 2.9	+ 1.0
3	B	+	+ 5.4	+ 1.9
4	G		−	−
5	Q	+	+ 2.0	−
6	Q	−	−	+ 1.2
7	Q	+	+ 4.2	+ 1.7
8	Q	+	+11.2	+ 6.3
9	T	+	+11.0	+ 3.9
10	T	+	+21.9	+ 2.3
11	Q	+	+ 6.4	+ 1.7
12	G	+	+ 4.3	+ 1.5

AO：acridine orange

acridine orange-RNA complexは，DDの0—17.1%，DMの0—21.9%の線維で陽性であった（**表3**）．このacridine orangeで陽性に染まる線維は，連続切片のHE染色と比較してみると，HEで塩基性に染まり，再生筋と考えられるものもあるが，大部分は再生中の線維ではなさそうであった．RVを有する線維は，RNA陽性のものと陰性のものとがみられた．DMでみられる小角化線維はacridine orangeにより一般に淡いオレンジ色螢光を発し，正常筋線維とは区別できた．

2）アラルダイト包埋，1μm切片の光顕的検討

各症例で30個以上のブロックについてトルイジン・ブルー染色を行い，検討した．DMでは，大小さまざまの自己貪食胞が多数みられたが，DDでは全くみられなかった．

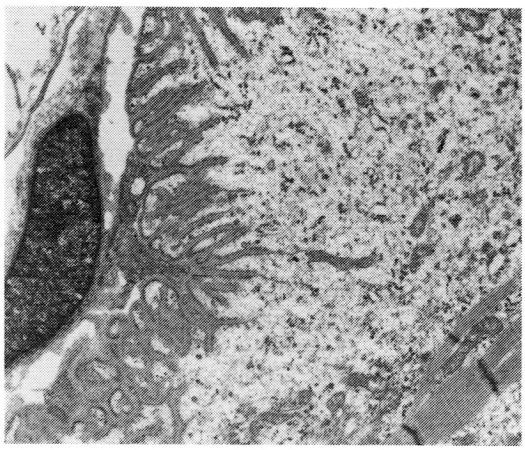


図1　症例2．大腿四頭筋．×7,400

図2　症例2．大腿四頭筋．×5,800

3）神経筋接合部の電顕的観察

DDの一部（症例2，症例3）で神経筋接合部が観察できた．Synaptic cleftおよびpostsynapticの部分には著変はなかったが，神経終末が萎縮しているもの（**図1**），著明に腫大しているもの（**図2**）がみられた．

考　　察

DMにおけるRVの出現，酸性フォスファターゼ陽性顆粒の出現は，我国で多くみられるDMに特徴的なもので，DMの病因を追求する上で重要な所見と考えられている[3]．今回，我々の研究でこのRVと酸性フォスファターゼ陽性顆粒は，DD

では全くみられなかったが，DMの筋肉でもRVの認められない部位，強い脂肪変性，間質の線維化を示す部位があり，果してRVがDMとDDの両者の本質的な違いなのか，それとも単なる量的な違いなのではないのかという疑問がおきる．しかし，単なる量的な違いなら，凍結切片より細かく，所見のつかめるアラルダイト包埋切片で小さな貪食胞がみられるはずであるが，そのような所見は全くなく，RVの出現は両疾患を決定的に区別する所見と考えられた．それ以外のopaque fiber，筋線維壊死などの所見は症例によるばらつきはあるものの，どちらの疾患にもみられ，必ずしも鑑別に役立たないと思われる．

次に，DMでの線維タイプ群化は，この疾患に神経原性の要素を示唆する[5]ものとして注目されていたが，DDにおいてもDMほどは大きなものではないが，やはり線維タイプ群化のみられることは注目される．両疾患のRNA陽性線維，タイプII c線維の頻度には大きな差はなかったが，acridine orange染色でRNAによるオレンジ色の螢光を出しうるものには，再生筋，肥大しつつある筋，脱神経線維などがあげられている[8]．Acridine orange陽性線維の頻度がタイプII c線維の頻度より大きく，両疾患ともfiber-splittingは高頻度にみられたが，acridine orange陽性の線維が特に肥大しているという訳でもなく，これらの陽性線維の多くは，脱神経に関係しているものと考えられた．電顕的観察でみられた神経終末の変化もこのことを支持すると考えられる．

結　　論

1）RVはDMとDDを鑑別する最も特徴的な所見であるが，同一筋組織でも部位によりその出現率は非常に異なり，生検組織が小さい時には，DMとDDとの鑑別に注意を要する．

2）DM，DDとも線維タイプ群化，acridine orangeに対する態度等よりみて，神経原性の要素をかなり有すると思われる．

3）DDの神経筋接合部では，神経終末の萎縮や腫大が電顕的に観察された．

文　　献

1) Kratz, R. & Brooke, M.H.: Distal myopathy. In Handbook of Clinical Neurology (edited by Vinken, P.J. & Bruyn, G.W.), North Holland, Amsterdam, 1979, Vol. 40 (Diseases of Muscle, Part I), p.471.

2) Nonaka, I., Sunohara, N., Ishiura, S., et al.: Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation. J. Neurol. Sci., 51: 145, 1981.

3) Kumamoto, T., Fukuhara, N., Nagashima, M., et al.: Distal myopathy. Histochemical and ultrastructural studies. Arch. Neurol., 39: 367, 1982.

4) 三好和夫，岩朝　勝，川井尚臣ら：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.

5) 中西孝雄，葛原茂樹：遠位型ミオパチーの5例—筋萎縮の分布とその筋病変について．厚生省「神経筋疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究，三好班，昭和56年度研究報告書，1982，p.97.

6) 水沢英洋，中野今治，井上聖啓ら：筋線維に高度の空胞変性を伴ったdistal myopathyの一病型．神経内科，12：40，1980.

7) Pearl, D.P. & Little, B.W.: Acridine orange-nucleic acid fluorescence. Its use in routine diagnostic muscle biopsies. Arch. Neurol., 37: 641, 1980.

8) Miike, T., Tamari, H., Ohtani, Y., et al.: A fluorescent microscopy study of biopsied muscles from infantile neuromuscular disorders. Acta Neuropathol. (Berl.), 59: 48, 1983.

35）Distal myopathy の臨床的，形態学的検討と lysosome 酵素活性

塚越　廣*

研究協力者　松本容秋*　佐野元規**
石浦章一**　杉田秀夫**

はじめに

Distal myopathy は，Welander によって確立された疾患概念であるが，近年，筋組織内に rimmed vacuole のみられる特異なミオパチーが注目され，多数の報告がある[1)2)]．また，最近，福原らにより，この特異なミオパチーにおける lysosomal enzymes の研究がなされ，lysosome の異常が示唆されている[3)]．

我々は，このような distal myopathy の病態を明らかにするため，臨床像，筋病理所見を検討し，さらに lysosome 酵素活性を測定した．

材料及び方法

対象は，当科で経験した distal myopathy 3 例で，その臨床症状，経過などを検討し，筋生検にて，組織学的及び組織化学的検査（HE, Gomori-Trichrome, NADH, ATPase, PAS 染色）を施行．又，電顕的に，2.5%グルタールアルデヒド，2%オスミウム酸の二重固定により，1 検体につき 3 個以上の電顕材料を検討した．

Lysosome 酵素活性については，distal myopathy 3 例の他，対照として正常人 6 例，神経原性筋萎縮 3 例，多発筋炎 2 例，Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）1 例につき，6 種類（α-glucosidase, α-galactosidase, acid phosphatase, catepsin D, catepsin B & L, β-glucronidase）の酵素比活性を測定．

Catepsin D は，Barret の方法，catepsin B & L は，Suc-Tyr-Met-Naphthylamide（徳島大学勝沼教授の御好意による）を基質とした Barret の方法にて測定した．

結　果

（症例 1）23歳，女性．主訴は歩行困難と手の脱力．家族歴では両親が従兄妹婚．現病歴では，18歳，下肢遠位筋の脱力で発症．19歳，左手の脱力が出現し，徐々に進行．23歳，当科へ入院．罹病期間は 5 年．

現症では，下肢遠位部に高度，上肢遠位部に軽度の筋萎縮を認め，深部反射は，アキレス腱反射消失以外は正常．線維束攣縮は認めない．

検査所見では，CK399U/1（正常＜170）と軽度上昇．筋電図では，上下肢近位遠位筋で筋原性変化を認めた．

（症例 2）33歳．男性．主訴は手の脱力と歩行困難．家族歴は特記すべき事なく，現病歴では，30歳，手と下肢遠位部の脱力で発症．脱力は徐々に進行し，33歳，当科へ入院．罹病期間は 3 年．

現症では，胸鎖乳突筋に高度，上下肢遠位部に中等度，上腕に軽度の筋萎縮を認める．深部反射は，上肢で消失，膝蓋腱反射低下，アキレス腱反射消失．線維束攣縮は認めない．検査所見では，CK968U/1と中等度上昇．筋電図では，上下肢遠位筋で筋原性変化を認めた．

（症例 3）43歳，男性．主訴は歩行困難．家族歴では，兄妹に同様の筋疾患を認める．現病歴では，20歳，手の脱力で発症．29歳，下肢遠位筋の脱力．37歳，下肢近位筋の脱力が出現して，徐々に進行し，43歳，当科へ入院．罹病期間は23年．

現症では，上下肢遠位部に高度，上腕に中等度，

＊東京医科歯科大学医学部神経内科
＊＊国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

腰帯筋に軽度の筋萎縮を認める．深部反射は，上肢で消失，膝蓋腱反射低下，アキレス腱反射消失，線維束攣縮は認めない．検査所見では，CK581U/1と中等度上昇，筋電図では，上下肢近位遠位筋に筋原性変化を認めた．

〈筋病理所見〉

全例で，筋線維の大小不同，間質の増加，中心核の増加などの筋原性変化に加えて，small angulated fiber が散在し，神経原性変化も混在していた（図１ａ，ｂ）．特に，症例３では，small group atrophy を形成していた．また，全例で，塩基好性の顆粒で縁取られ，内容に塩基好性物質をもつ，いわゆる rimmed vacuole を認めた（図２ａ）．

症例１では，Gomori-Trichrome で，赤紫色の顆粒状に染まった，ragged red fiber を認めた（図２ｂ）．

なお，PAS 染色では，空胞内は染色されなかった．

〈電顕所見〉

全例で，rimmed vacuole に対応して，myeloid body を含む，autophagic vacuole を認めた（図３ａ）．

症例１では，一部の筋鞘下及び空胞周辺に，cristaの増加した巨大なミトコンドリアの異常集積

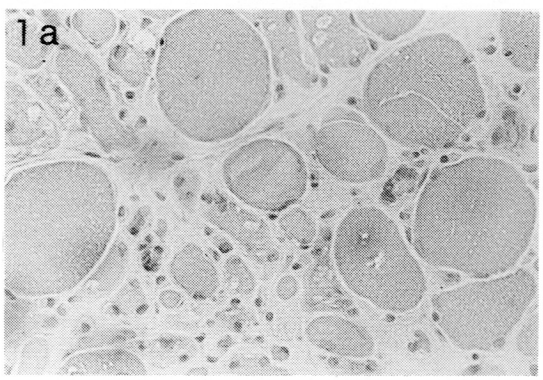
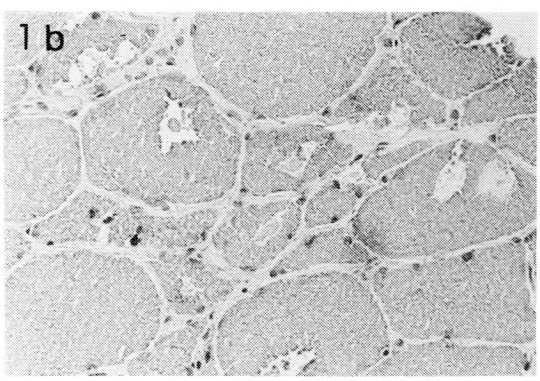
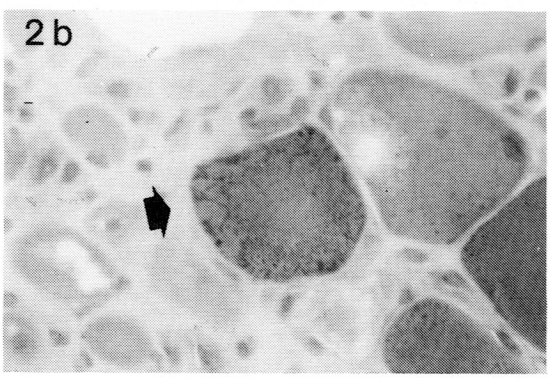


図１　１ａ：ＨＥ染色，×200．筋線維大小不同，間質の増加などの筋原性変化を認める．（症例１）

図２　２ａ：HE 染色，×400．筋線維中央部に rimmed vacuole を認める．（症例１）



１ｂ：ＨＥ染色，×400．筋線維内に空胞形成を認め，中央部の small angulated fiber は small group を形成している．（症例３）



２ｂ：Gomori-Trichrome 染色，×400．赤紫色の顆粒状に染まった ragged red fiber（矢印）を認める．（症例１）

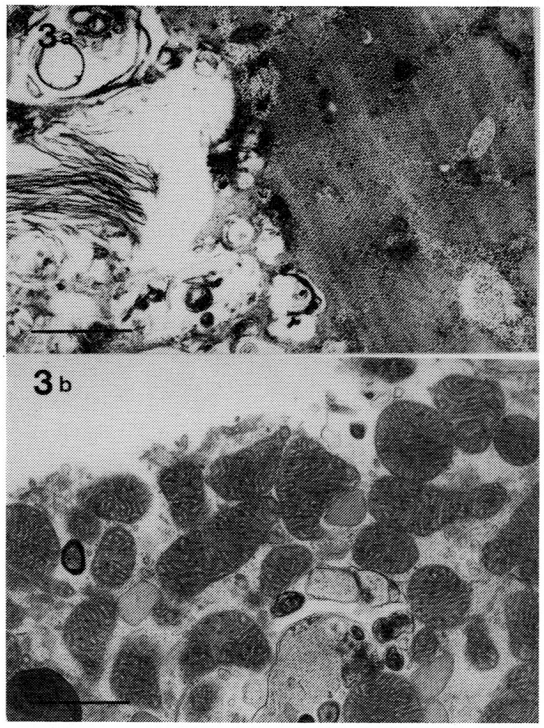


図3　3 a：Myelin figure structure を含んだ autophagic vacuole.（症例2）
3 b：crista の増加した巨大なミトコンドリアの集積像.（症例1）
bar＝1 μm

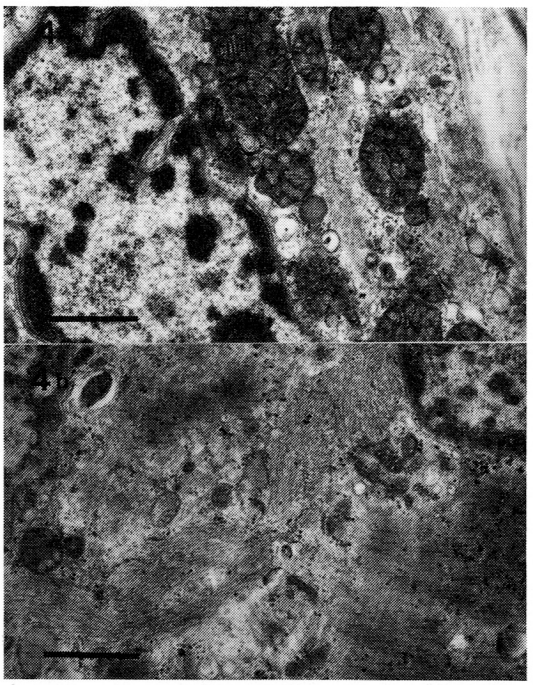


図4　4 a：筋線維変性のある部位では，変性したミトコンドリアを認める.（症例1）
4 b：筋線維変性像が激しく，myofilament は崩壊している.（症例1）
bar＝1 μm

像を認めた．結晶様封入体は認めなかった．異常ミトコンドリアは，主として，萎縮筋線維で多く認められたが，一見筋線維が保たれている所でも少量認められた(図3 b)．症例1では，筋線維変性像が，3例中最も強く，これに対して，症例3では，筋線維変性像は軽微であった（図4 a，b）．

なお，検索した範囲内では，Filamentous inclusion, Tubulomembranous inclusion は認めなかった．

〈lysosome 酵素活性〉（表1）

症例1では，6種類すべての酵素活性の上昇を認め，症例2では，α-galactosidase, acid phosphatase, catepsin D, β-glucronidase の上昇を，症例3では，β-glucronidase の上昇を認めた．3例中では，症例1が高い活性値を示し，症例3が低い活性値を示した．これに対して，神経原性筋萎縮では，有意な上昇を認めなかった．多発筋炎では，1例で，α-glucosidase, α-galactosidase, catepsin D, catepsin B & L の上昇を，他の1例でも α-galactosidase, catepsin B & L の上昇を認めたが，第1例の方が活性値が高かった．DMD では，α-galactosidase, catepsin B & L の上昇を認めた．

多発筋炎，DMD での上昇パターンは，distal myopathy とは異なるパターンを示した．

また，筋病理所見と比較検討すると，distal myopathy，多発筋炎とも，筋線維変性の強い例で，活性値が高い傾向を認めた．

臨床所見と筋病理所見との比較検討では，重症度，罹病期間と病理所見とは，必ずしも相関しなかった．

表1　Lysosome 酵素活性

Enzyme U mg protein		α-glucosidase	α-galactosidase	acid phosphatase	catepsin D	catepsin B&L	β-glucronidase
Normal		0.264 ±0.018	0.0513 ±0.020	0.0558 ±0.0139	0.175 ±0.068	1.95 ±0.68	0.538 ±0.204
Distal myopathy	1	0.597 (↑)	0.114 (↑)	0.100 (↑)	0.517 (↑)	4.72 (↑)	3.19 (↑)
	2	0.389	0.0976(↑)	0.103 (↑)	0.351 (↑)	1.52	3.39 (↑)
	3	0.241	0.0322	0.0749	0.276	1.21	1.04 (↑)
Neurogenic muscular atrophy		0.180 ±0.069	0.0324 ±0.0026	0.0529 ±0.0069	0.223 ±0.015	2.46 ±0.58	0.687 ±0.123
polymyositis	1	0.594 (↑)	0.240 (↑)	0.0821	0.500 (↑)	13.6 (↑)	0.521
	2	0.296	0.130 (↑)	0.0675	0.266	4.28 (↑)	0.275
DMD		0.392	0.098 (↑)	0.0516	0.220	7.30 (↑)	0.589

考　　察

自験例は，いずれも四肢遠位部の脱力で発症し，緩徐進行性で，診断時点において，遠位筋優位の筋萎縮を呈しており，CK は軽度から中等度の上昇，筋電図では筋原性変化を示し，筋病理所見で，rimmed vacuole, 筋原性変化と神経原性変化の混在を認め，従来報告されている rimmed vacuole を伴った distal myopathy と共通した臨床病理像を呈した．

症例1の筋病理所見で認められた ragged red fiber と rimmed vacuole との共存例は，極めてまれで，検索した範囲では，中西らの1例の報告をみるのみである[4]．しかし，中西らの報告では，電顕的にミトコンドリア異常は認めておらず，本例のようにミトコンドリアの形態異常を認めたという報告はない．この場合のミトコンドリア異常については，primary か，secondary かが問題となるが，萎縮筋線維に比較的多く認めたことから，secondary の可能性があると思われる．いずれにせよ，さらに症例を集積して検討する必要が有ると思われる．

また，最近，distal myopathy において，lysosome 系の異常が指摘されており，本例でも3例とも lysosome 酵素活性上昇を認め，多発筋炎，DMD とは異なる上昇パターンを示した事や，組織学的に，macrophage の浸潤をほとんど認めない事から判断すると，本症における筋変性過程は，主として筋細胞自体の lysosome 系を通じて進行するのではないかと思われる．

従来，筋病理所見と，lysosome 酵素活性との相関関係について検討を加えた報告はないが，本例では，筋線維変性の強い例で，活性値が高い傾向を認め，酵素活性値が，病変の強さを反映する可能性が示唆された．今後，こういう観点から，症例を検討していく必要が有ると思われる．

結　　論

1．Distal myopathy 3例の臨床所見と，筋病理所見とは，必ずしも相関しなかった。
2．Distal myopathy 1例で，ragged red fiber を認め，電顕でこれに対応して，巨大なミトコンドリアの集積像を認めた．
3．3例とも lysosome 酵素活性の上昇を認め，筋線維変性の強い例で，活性値が高い傾向を認めた．

4．多発筋炎，DMDでも，lysosome酵素活性の上昇を認めたが，distal myopathyとは異なる上昇パターンを示した．

文　献

1) 水沢英洋，中野今治ら：筋線維に高度の空胞変性を伴ったdistal myopathyの一病型．神経内科，12：40，1980.

2) Nonaka, I., Sunohara, N., et al.: Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar body formation. J. Neurl. Sci., 51: 141, 1981.

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

4) 中西孝雄，尾崎行雄，金澤一郎，出水千二，吉田紀明：Ragged red fiberとvacuolar changeを認めたdistal myopathyの1孤発例．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」（三好班），昭和54年度研究報告書，1979，p.95.

36）実験的クロロキンミオパチー
—Rimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチーとの関連—

杉田秀夫*

研究協力者　佐野元規*　石浦章一*　萩原弘一*

はじめに

従来よりクロロキンを長期投与した臨床例及び動物実験において[1], Rimmed vacuoleを伴うミオパチーが発症することが知られている．このようなクロロキンミオパチーはRimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチーと組織学的に類似しているのみならず，生化学的にもリソゾーム系酵素活性を測定したところ両者に上昇が見られた．そこでクロロキンミオパチーをRimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチーの実験モデルとして生化学的に検討したので報告する．

方法

体重約250gのウィスター系雄ラットの腹腔内にクロロキン2燐酸，pH7.4の溶解液を50mg/kgの割合で連日投与した．40日間以上60日間位まで投与後，ひらめ筋をとり出しまず組織化学，電顕による検索を行なった．次に組織学的にRimmed vacuoleを伴うミオパチーが発症していることを確認した上で生化学的に検討を加えた．

リソゾーム系酵素の測定は，筋組織に10倍量のPBS-0.1% Triton X-100を加え，ガラスホモゲナイザー中でホモゲナイズし，10,000×g，20分の上清を粗酵素液として，カテプシンB&L，カテプシンD，カテプシンH，α-ガラクトシダーゼ，α-グルコシダーゼ，β-グルクロニダーゼ，β-N-アセチルグルコサミニダーゼ，酸フォスファターゼ，アリルサルファターゼを測定した．なお，カテプシンB&Lは徳島大学医学部勝沼教授よりいただいた合成基質であるSuc-Tyr-Met-Naphthylamideを用いてBarettの方法[2]により測定した．

次に筋肉のリソゾームを分離することは極めて困難なので，クロロキンミオパチーを発症しているラットの肝臓を用いて肝細胞のリソゾームを分離してその性質を検討した．肝臓を細胞分画法により核分画，リソゾーム・ミトコンドリア分画，ミクロゾーム分画，残りの上清に分けて，リソゾーム・ミトコンドリア分画をPercollを用いた密度勾配遠心法により，リソゾームの比重及びリソゾームのマーカーエンザイムである酸フォスファターゼの比活性について検討した[3]．

結果

1）形態学的所見

HE染色では筋線維内に好塩基性に染まるRimmed vacuoleが見られた．マクロファージの浸潤は見られなかった．酸フォスファターゼ染色では筋線維内が強く陽性に染まっていた．電顕ではRimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチーで見られるような典型的なmyelin figureが見られた．

2）生化学的所見

a）電気泳動所見

筋構造蛋白の変化はSDS-PAGEでは質的差異は見られなかった．Plasmocidをひらめ筋に筋注したとき見られるα-actininの早期の減少[4]は，クロロキンミオパチーでは見られなかった．

b）リソゾーム系酵素活性

*国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

表1　Various lysosomal enzyme activities in chloroquine myopathy

Enzyme	Enzyme activity(U/mg)		Mean±S.D.
	Chloroquine(n=10)	Control(n=10)	Ch/C
Cathepsin B&L	127.6±27.5	18.4±6.48	6.9
Cathepsin D	0.301±0.08	0.0373±0.0112	8.1
Cathepsin H	0.341±0.038	0.0565±0.0129	6.0
α-Galactosidase	4.24±0.296	0.962±0.154	4.4
α-Glucosidase	7.13±1.73	2.63±0.19	2.7
β-N-acetylglucosaminidase	2.04±0.39	0.551±0.025	3.7
β-Glucuronidase	1.12±0.175	0.345±0.105	3.2
Acid phosphatase	0.592±0.107	0.279±0.074	2.1
Arylsulphatase	0.525±0.232	0.147±0.016	3.6
Non collagen protein	1.25±0.125	2.22±0.599	0.56

測定した9種類のリソゾーム系酵素すべてに比活性の上昇が見られたが，とくにカテプシンB&L，カテプシンD，カテプシンHのリソゾームプロテアーゼに著明な上昇が見られた(**表1**)．Plasmocidの場合と異なり，α-グルコシダーゼ，酸フォスファターゼにも上昇が見られた．Plasmocidの場合はマクロファージ由来のリソゾーム系酵素の上昇が考えられるが，クロロキンミオパチーではマクロファージ由来ではなく，筋細胞由来のリソゾーム系酵素の上昇が考えられる所見であった．

c）Percollによるリソゾームの性質の検討

Percollを用いた密度勾配遠心法の結果は**図1**に示した．ロイペプチン投与1時間後には，古野らの報告[3)5)]のように，酸フォスファターゼ活性のピークで見たリソゾームフラクションは比重の重い方へ移動し，電顕的にもautolysosomeであることが確認されているが，クロロキン長期投与の場合は逆に比重の軽い方へ移動していた．酸フォスファターゼの比活性も正常コントロールに比較して上昇していた．また他のリソゾーム系酵素の比活性も正常コントロールより上昇していた．酸フォスファターゼのピークのフラクションを電顕で調べると，autolysosomeが形成されていることが確認できた（**図2**）．

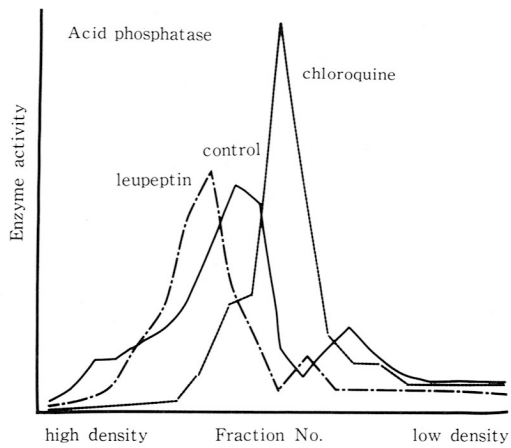


図1

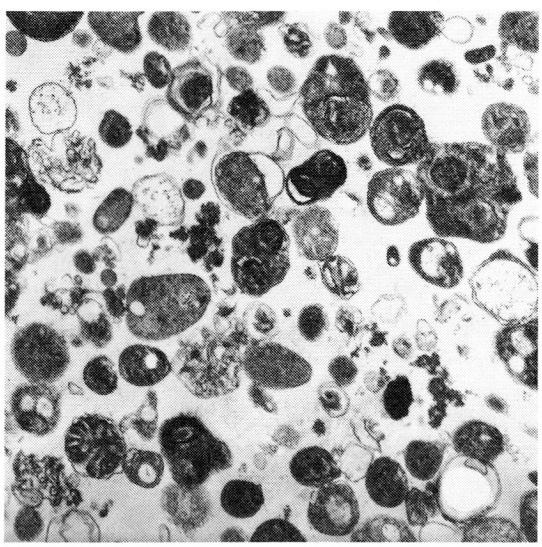


図2

考　　察

クロロキンは従来よりlysosomotropic drugとして知られている．クロロキンはリソゾーム内の

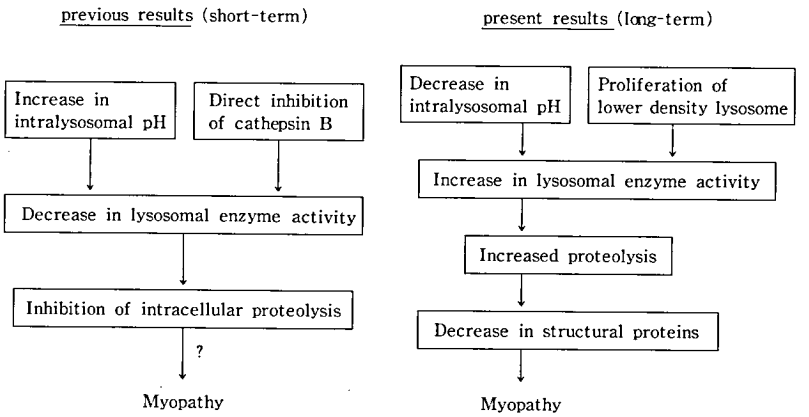


図3　Mechanism of chloroquine myopathy

pH を上昇させるかあるいはカテプシン B を直接抑制することにより，リソゾーム系プロテアーゼ活性を抑制し，細胞内蛋白分解を抑制するとされていた[6)7)]．しかし，これらの結果はクロロキンを線維芽細胞，マクロファージなどの培養細胞に短時間作用させた結果であり，このような生化学的知見とクロロキン長期投与の場合に見られる筋萎縮という形態学的所見とはどのように関連しているのか明らかでなかった．我々が今回行なった結果からは，クロロキン長期投与によりリソゾーム内 pH はむしろ低下し，リソゾーム系酵素活性の高い autolysosome が形成されることにより，細胞内蛋白分解が亢進し，筋萎縮が起こることが示唆された(図3)．クロロキン投与開始後，しばらくはリソゾーム内の pH は上昇し，リソゾーム系酵素活性は抑制されているため，次第にリソゾーム系酵素が induction されてくる．その後長期投与しているうちにおそらくリソゾーム内の pH が低下し，この induction された酵素が働いて細胞内蛋白分解の亢進が起こるものと考えられる．同様のことが Rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーでも起こり，リソゾーム内の環境に変化が起こり，リソゾーム系酵素活性が上昇し，筋蛋白分解が亢進して筋萎縮が起こっていることが考えられる．

文　献

1) MacDonald, R.D., Engel, A.G.: Experimental chloroquine myopathy. J. Neuropathl. Exp. Neurol., 29: 479—499, 1970.
2) Barrett, A.J.: Proteinases in mammalian cells and tissues. North-Holland, 1977, p.181.
3) Furuno, K., Ishikawa, T., Kato, K.: Appearance of autolysosomes in rat liver after leupeptin treatment. J. Biochem., 91: 1485—1494, 1982.
4) Ishiura, S., Sugita, H.: Mechanism of muscle protein degradation in muscular dystrophy. Molecular aspects of neurological disorders. Academic Press, Australia, 1983, p.29.
5) Furuno, K., Ishikawa, T., Kato, K.: Isolation and characterization of autolysosomes which appeared in rat liver after leupeptin treatment. J. Biochem., 91: 1943—1950, 1982.
6) Fedorko, M.E., Hirsch, J.G., Zanvil, A.C.: Autophagic vacuoles produced in vitro. J. Cell Biol., 38: 377—391, 1968.
7) Wibo, M., Poole, B.: Protein degradation in cultured cells. J. Cell Biol., 63: 430—440, 1974.

IV. ミトコンドリアミオパチー

37）パラコートによる筋ミトコンドリアの障害

佐藤　猛*

研究協力者　山本剛司*　安野みどり*

はじめに

パラコート（グラモキソン：1，1′-dimethyl-4，4′-bipyridylium）は，1962年英国で開発された除草剤で，その強い殺草力により広く普及している．しかし，人体に対する毒性も強く，ヒトでのLD_{50}は30～50mg/kgとされている．我が国でも1969年に本剤による死亡第1例が報告された[1]．

毒性作用機序はBusら[2]の仮説が有力である．即ち，動物体内にイオンとして取り込まれたパラコートは組織中で還元されてパラコートフリーラジカルになる．これが酸化されて活性酵素が形成され，さらに過酸化水素，水酸ラジカル，一重項酸素と共に生体膜の障害をきたす，と考えられている．

臓器毒性は，肺[3]，肝[4]，腎[5]などで報告がある．特に肺はパラコートが蓄積しやすく，間質性肺炎や肺線維症をきたすことで知られている．このため近年，実験動物によってこれらの疾患のモデル化が試みられており，パラコートを投与されたラットの肺で肺胞上皮細胞中のミトコンドリアの膨化と基質の粗鬆化を認めた報告がある[6]．

この点に注目して，我々はパラコートをラット骨格筋に直接作用させることで筋線維と筋ミトコンドリアの変性過程を形態的，生化学的に検索した．

方　法

実験①：パラコート純末5mgを0.2mlのPBSに溶解し，250～300grのWister系雄ラットの腓腹筋に筋注した．対照として対側筋を用い，同量のPBSを筋注して1，3，6，15時間後の形態変化を光顕および電顕にて観察した．

実験②：Wister系雄ラット腓腹筋を筋線維を障害しないように筋線維方向に細切し，Chappell-Perry緩衝液（100mM KCl, 50mM Tris-HCl, 1 mM ATP, 5mM $MgCl_2$, 1mM ATP, pH7.4）で8mMとしたパラコート溶液中に25℃で振盪しながらインキュベートした．

緩衝液のみでインキュベートしたものを対照として，それぞれ10，20，40，60分間作用させた後にMakinen and Leeの方法[7]によりミトコンドリア分画を得，以下の方法により電子伝達系の酵素活性および呼吸機能を検索した．

Cytochrome c oxidase活性[8]：75mM $NaHPO_4$-KH_2PO_4（pH 6）に還元型Cytochrome cを加え，これにミトコンドリアを添加して還元型Cytochrome cが酸化される反応を2波長分光光度計（550nm，25℃）にて測定した．

Succinate-cytochrome c reductase活性[9]：100mMリン酸緩衝液（pH7.4），0.3mM EDTA，100μM酸化型Cytochrome cに1 mM KCN，ミトコンドリアを加え，基質としてコハク酸を添加し，酸化型Cytochrome cが還元される反応を2波長分光光度計（550nm，25℃）にて測定した．

呼吸機能：酸素電極（Rank oxygen electrode：Rank Brothers）を用い，25℃にて測定した．反応液として，250mMマニトール，10mMリン酸緩衝液，10mM Tris-HCl，10mM KCl，2mM $MgCl_2$，0.2mM EDTAを用い，基質として45mMコハク酸＋5μMロテノンと15mMピルビン酸＋15mMリンゴ酸を使用した．反応液1.9mlにミトコンドリア浮遊液15～20mg・ミトコンドリア

*順天堂大学医学部脳神経内科

蛋白1ml を100μl と，基質各10μl とを添加し，0.04 MADP10μl を加えてそれによる酸素消費速度の変化を Polarography にて記録した．

結　　果

実験①：光顕レベルでは，パラコート筋注3時間後から perimysium の細胞浸潤が始まり，6時間後になると，筋線維の壊死，endomysium への macrophage の浸潤，さらに ragged-red fiber に類似した筋線維の出現がみられた（図1－b）．

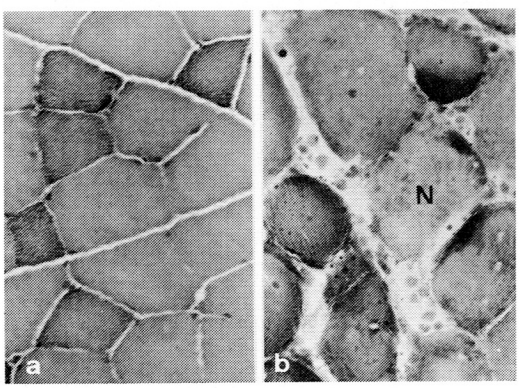


図1　ラット腓腹筋光顕所見
a：正常対照
b：パラコート筋注6時間後 Macrophage の侵入した壊死線維(N)および ragged-red fiber がみられる．
(Modified Gomori-Trichrome 染色 ×320)

電顕では筋注3時間後から少数のミトコンドリアの膨化と，それらの基質の粗鬆化が認められた．しかし筋原線維や筋小胞体は正常像を呈した．筋注15時間後になると，多くの筋線維は壊死をきたすが，その周辺の比較的構造の保たれている線維を電顕にて検索した．筋原線維および筋小胞体は，やはり正常形態をとるが，ミトコンドリアについてはほとんどすべてが基質の粗鬆化を主とする著明な形態変化をきたしていた．

実験②：筋組織としてパラコートを作用させたミトコンドリアの呼吸機能を検索した．図2にピルビン酸を呼吸基質としたときの経時的な呼吸曲線を示す．

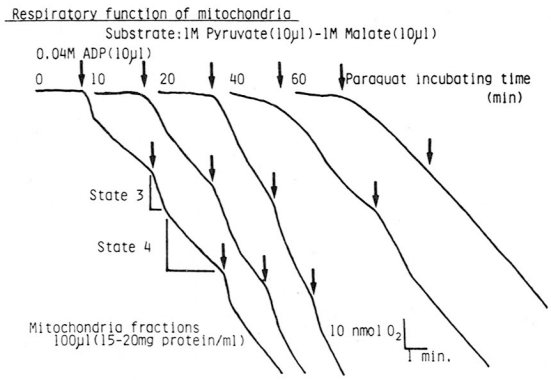


図2　ピルビン酸を基質としたミトコンドリア呼吸曲線
左より正常対照，パラコートインキュベート10，20，40，60分

ミトコンドリアの呼吸のうち state 4 呼吸は酸化的リン酸化に共役しない呼吸である．即ち，電子は電子伝達系を流れ，酸素を消費するが ATP は産生されない．しかし，この状態に ADP を加えると，呼吸の促進，即ち state 3 呼吸が始まる．この呼吸は酸化的リン酸化と共役しており，ADP＋Pi → ATP により ATP が産生される．

呼吸機能の指標としては，ADP/O 比，呼吸調節率（RCR），分時酸素消費量（QO_2）を用いたが各指標の意義を簡単に述べる．

分時酸素消費量は state 3 呼吸と state 4 呼吸それぞれにおける1分間当りの酸素消費量を表わし，各 state における呼吸状態を知ることができる．ラット腓腹筋における我々の正常値は，ピルビン酸が基質の場合 state 3 で141.26±25.26，state 4 で41.43±9.61．コハク酸が基質のときは，state 3 で275.73±94.17，state 4 で113.53±39.85であり，単位はすべて nAtom/mg/ml である．

呼吸調節率は，これら state 3 呼吸の分時酸素消費量と state 4 のそれとの比であり，我々の正常値は，ピルビン酸を基質にしたときが4.03±0.41，コハク酸が基質の場合は2.94±0.44である．

ADP/O 比は，state 3 呼吸の開始に際して用いられた ADP 量とそのとき消費された全酸素量との比であり，酸化的リン酸化の効率を示すもので

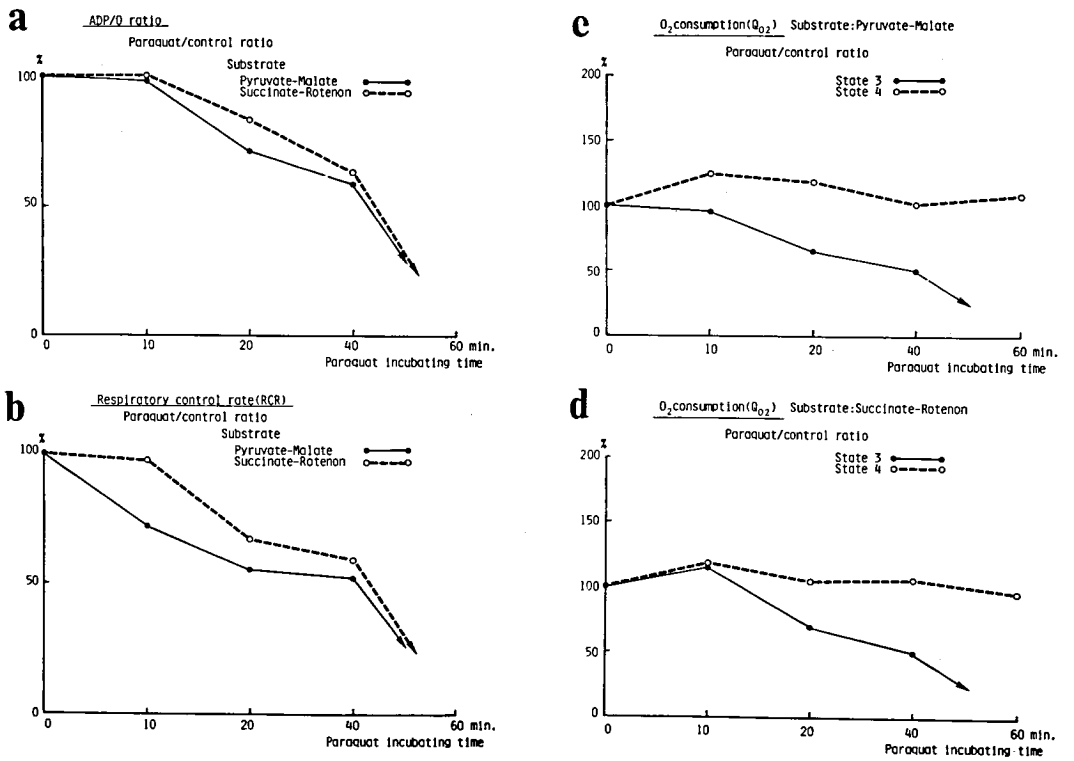


図3　呼吸機能の経時的変化（各時間における正常対照群との比）
a：ADP/O 比
b：呼吸調節率
c：分時酸素消費量（基質：ピルビン酸）
d：分時酸素消費量（基質：コハク酸）

ある．酸化的リン酸化を担う site 数による理論値は，ピルビン酸を基質にした場合が3，コハク酸の場合が2であるが，我々の正常値は，それぞれ 2.92±0.21，2.01±0.22である．単位は μM/μAtom である．

パラコートにインキュベートした群を正常対照群との比として比較すると，ADP/O 比（図3-a），呼吸調節率（図3-b）および state 3呼吸での分時酸素消費量（図3-c，d）はパラコートインキュベート10分後から徐々に低下の傾向を示し，40分後には正常対照群の50～60%まで減少した．さらに60分に達すると state 3呼吸への移行がほとんど見られないようになった．

state 4呼吸（図3-c，d）は，各時間の正常対照群と比較しても著明な変化はなかった．

なお以上の結果は呼吸基質がピルビン酸，コハク酸いずれの場合も同様であった．

ミトコンドリア電子伝達系の酵素として，Cytochrome c oxidase と Succinate-cytochrome c reductase を検索した．ミトコンドリア分画の凍結融解前後で作成した検量線では，両酵素共，凍結融解後に活性上昇を示した（図4-a，b）．

次にパラコートに作用させた群を正常対照との比でみると，インキュベート40分後から，凍結融解を加えない Cytochrome c oxidase 活性の上昇が見られた（図4-c）．Succinate-cytochrome c reductase 活性にはこのような傾向はなかった（図4-d）．なお我々の正常値は Cytochrome c

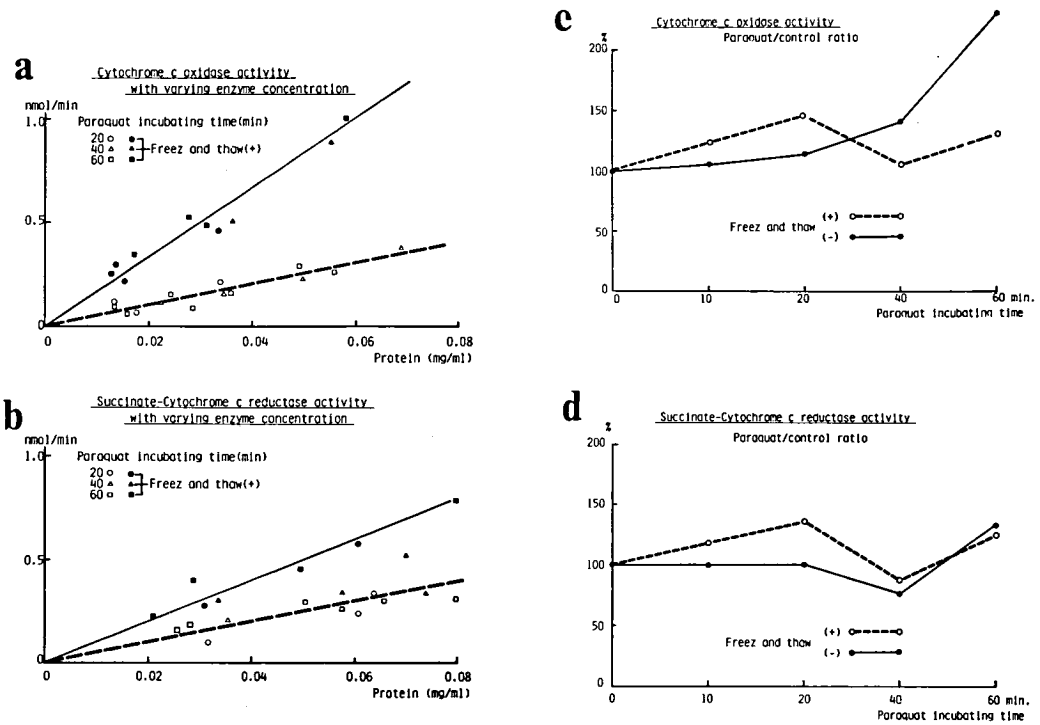


図4　電子伝達系酵素活性

a：Cytochrome c oxidase 活性検量線

b：Succinate-cytochrome c reductase 活性検量線

c：パラコートインキュベート後の Cytochrome c oxidase 活性（正常対照群との比）

d：パラコートインキュベート後の Succinate-cytochrome c reductase 活性（正常対照群との比）

oxidase 活性が35.5±14.0nmol/mg/min, Succinate- cytochrome c reductase 活性が24.4±4.9nmol/mg/ml であった.

考　　按

パラコート筋注による形態変化は，筋線維の壊死と細胞浸潤が前景に立ち，特異的なものとは限定できない．しかし，筋注15時間後でも依然壊死に至らない筋線維内のほとんどすべてのミトコンドリアが形態異常をきたした点からパラコートによる障害が，ミトコンドリアに対して早期に惹起される可能性が考えられる．

このミトコンドリアに対する障害を機能的にみると，インキュベート20分後から明らかとなる ADP/O 比の低下は，添加された一定量の ADP が ATP に変換される際に要する酸素量の増大，つまり酸化的リン酸化の障害を示唆している．同じ頃から始まる state 3 呼吸における分時酸素消費量の減少と，これに伴う呼吸調節率の低下も同様の意義を持つものと考えられる．

電子伝達系の 2 酵素のうち，Cytochrome c oxidase がインキュベート40分後から活性上昇を

きたしたことは，パラコートが直接的にせよ間接的にせよ，凍結融解で通常現われるようなミトコンドリア膜の障害に類似した変化を起こし，電子伝達系が障害されたものと想定される．

さて，以上を総括すると，パラコートは，まず酸化的リン酸化を障害し，続いてミトコンドリア膜の障害に伴う Cytochrome c oxidase 即ち，電子伝達系の障害を惹起することが考えられる．

なお追加実験として，ミトコンドリア分画に直接パラコートを作用させたところ，ADP/O 比および呼吸調節率は実験②と同様の経過をたどった．しかし，分時酸素消費量は state 3 で変化なく，むしろ state 4 で増加する傾向を示した．これは，パラコートがミトコンドリア分画に直接作用する場合と筋組織中のミトコンドリアに作用する場合とで作用機序が相違する可能性を示した．また今後，筋組織中でのミトコンドリア膜障害の原因として，活性酸素の関与を考慮する必要のあることが示唆され，さらにこれによる筋ミトコンドリア障害の実験モデルとなりうることも示唆された．

結　　語

1．パラコートをラット腓腹筋に筋注した．筋線維の壊死ならびに筋ミトコンドリアの膨化，基質の粗鬆化を認めた．

2．筋組織片をパラコート溶液にインキュベートした．20分後より経時的に ADP/O 比，呼吸調節率と state 3 呼吸における分時酸素消費量の低下を認めた．

3．電子伝達系の酵素ではインキュベート40分を経過してから，ミトコンドリア膜の障害によると思われる Cytochrome c oxidase 活性の上昇をみた．

4．以上より，パラコートはまずミトコンドリアの酸化的リン酸化を障害し，次いで電子伝達系にも影響を及ぼすことが示唆された．

文　　献

1) 米山正人，貝沼知男，竹内一郎：新除草剤グラモキソンによる急性中毒死．日本医事新報，№2374：32，1969

2) Bus J.S., Aust S.D., Gibson J.E.: Lipid peroxidation: A possible mechanism for paraquat toxicity. Res. Common. Chem. Path. Pharm., 11: 31, 1975

3) 名取　博，吉田　薫，吉良枝郎：パラコート肺．呼吸と循環，25：409，1977

4) Bullivant C.M.: Accidental poisoning by paraquat-report of two cases in man. Br. Med., 1: 1272, 1966

5) Fisher H.K., Humphris M., Bailis R.: Paraquat poisoning. Recovery from renal and pulmonary damage. Ann. Intern. Med., 75: 731, 1971

6) Witschi H., Kacew S., Hirai K. et al: In vivo oxidation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate by paraquat and diquat. in rat lung. Chem. Biol. Interactions, 19: 43, 1977

7) Makinen M,W., Lee C.P.: Biochemical studies of skeltal muscle mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 126: 75, 1968

8) 瀬屑一郎，折井　豊，大西　権：チトクロムの精製と検定．蛋白質核酸酵素 vol.10，15：1610，1965

9) King T.E.: Preparations of succinate-cytochrome c reductase and the cytochrome b-c, particle, and reconstitution of succinate-cytochrome c reductase. Methods in enzymology vol. 10: 216, 1967 ed. by R.W. Estabrook, Acad. Press, N.Y.

38) Kearns-Sayre 症候群の骨格筋ミトコンドリア電子伝達系の解析

垂 井 清一郎*

研究協力者　依 藤 史 郎*　小笠原 三 郎*　狭 間 敬 憲*
和 田 圭 司*　芳 川 浩 男*　河 野 典 夫*
高 橋 光 雄*　橋 本 重 夫**

はじめに

Kearns-Sayre 症候群をはじめミトコンドリア異常症に対する形態学的ならびに生化学的検討の報告はしばしばみられる[1]が，特に生化学的検討は得られる生検筋の量的な制限及び技術的な制限からいまだ十分とはいえず，多くの疾患で生化学的異常は不明である．そこで我々はより少量の生検筋でミトコンドリア機能異常をスクリーニングできる方法を検討し，ミトコンドリア電子伝達系複合体（図1）の活性を測定することが有用であると考えられたので，Kearns-Sayre 症候群の一例で得られた結果を示し，形態学的所見もあわせて報告する．

〈Components of the respiratory chain in mitochondria〉

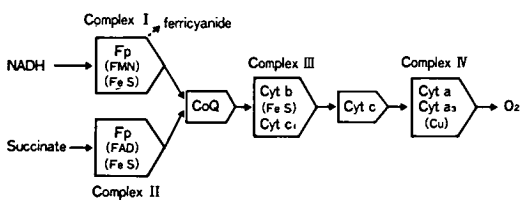


図1　ミトコンドリア内膜電子伝達系．

症　例

18歳男性．コンピューター関係の専門学校の学生である．家族歴は特記すべきことはなく，近親婚も認められていない．生下時及びその後の身体的及び精神的発育には異常がなく，運動能力も特に劣ってはいなかった．しかし，14歳頃より徐々に両側の眼瞼下垂と眼球運動制限が始まり，某院にて重症筋無力症と診断され，抗コリンエステラーゼ剤の投与をうけるも症状に改善がなく放置しており，当科へは18歳時に精査のため入院した．入院時の一般身体所見は，不整脈以外に異常はなく，神経学的には眼瞼下垂及びほぼ完全な眼球運動障害が両側に認められ，眼球は中央で固定していた．自覚的には複視は訴えなかった．眼底では，網脈絡膜変性が認められ両側感音性難聴を伴っていた．四肢の腱反射はやや減弱していたが，その他の神経学的異常所見は認められなかった．検査結果では，心電図で1度の A-V ブロックと完全右脚ブロック，脳波で軽度の全般性徐波化，筋電図で顔面筋に軽度の筋原性変化を認めた．左正中神経伝導速度は正常範囲であった．髄液蛋白は74 mg/dl と軽度上昇していた．血清ピルビン酸は1.4mg/dl（正常：0.6～1.2），乳酸28mg/dl（正常：5～20），アラニン970nmol/ml（正常：374.9±52，mean±S.D.）といずれも上昇しており，一方葉酸は血清で1.5，2.5ng/ml（正常：3～8），髄液で1.5ng/ml（正常：血清値の3～4倍）と低下していた．WAIS では言語性 I.Q. は79，動作性 I.Q. は92，全検査 I.Q. は83であった．

組織学的所見

左大腿四頭筋による生検筋の組織所見は正常で，Gomori trichrome 染色，SDH 染色，NADH-TR 染色にても ragged red fiber は認められなかったが，Seligman らの diaminobenzidine を用いた

＊大阪大学医学部第二内科
＊＊近畿大学医学部第二病理

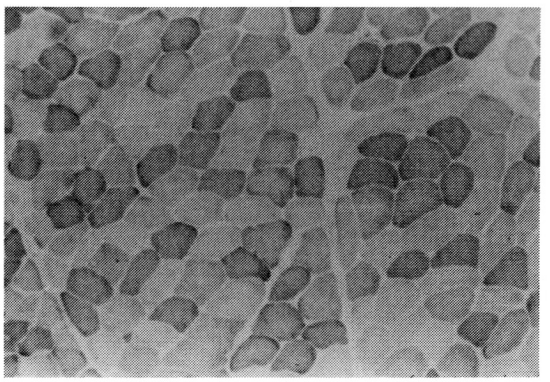


図2　左大腿四頭筋生検組織（cytochrome oxidase 染色×100）．染色性陰性線維を認める．

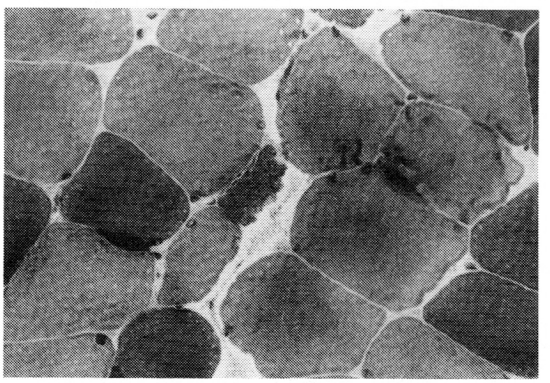


図3　左三角筋生検組織（Gomori's trichrome 変法×400）．ragged red fiber を認める．

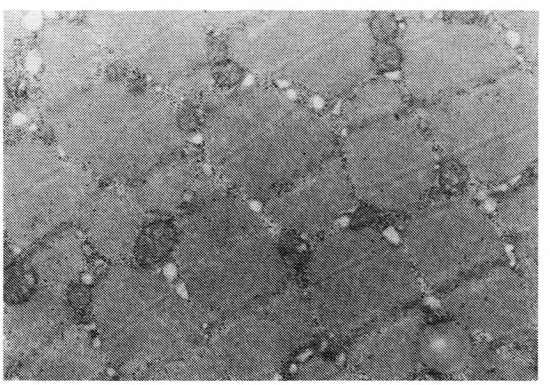


図4　左大腿四頭筋生検での電顕所見（×9000）．

cytochrome oxidase 染色[2]では，染色性が陰性の線維を約2%に認めた（**図2**）．一方左三角筋では大小不同，internal nuclei があり ragged red fiber が約1%の線維に認められた（**図3**）．電顕による大腿四頭筋の検索では，ミトコンドリアの形態異常はみられなかったが，morphometry ではミトコンドリア volume は5.8%（正常：3.4±0.4, mean±S.D.）で軽度増加していた（**図4**）．

生化学的分析

大腿四頭筋より行なった生検筋の一部をドライアイスイソペンタンにて凍結し，−80℃で保存後生化学的測定に供した．約100mg の生検筋に9倍量の150mM KCl＋50mM Tris−Cl 緩衝液（pH7.4）を加えてグラスホモジナイザーでホモジナイズし，1,000×g で15分間遠心した上清を，10,000×g で10分間遠心した沈殿を得ることによりミトコンドリア分画を得た[3]．Lowry 法によるミトコンドリア分画の蛋白量は2714μg/g wet tissue（正常：920±335, mean±S.D.）で増加していた．ミトコンドリア内膜に局在する電子伝達系複合体活性は以下の様にして測定した．即ち上記ミトコンドリア分画を得る途中の1,000×g，4℃で15分間遠心した上清を測定に供した．測定した複合体は NADH - ferricyanide reductase, NADH - menadione reductase（complex I），NADH-cytochrome c reductase（complex I＋III），succinate dehydrogenase, succinate - CoQ reductase（complex II），succinate-cytochrome c reductase（complex II＋III），cytochrome c oxidase（complex IV）の7種類を duplicate で測定した[4)5)]．結果は**表1**に示した様に組織湿重量当りの活性は対照群と同様か又は一部高値を示していたが，ミトコンドリア分画当りでは全体に低下の傾向にあった．ミトコンドリア電子伝達系の component の一つである coenzyme Q_{10}は高速液体クロマトグラフィーにて上記の homogenate の一部を用いて測定した[6]．血清中の coenzyme Q_{10}の値は，0.26μg/ml（正常：0.57±0.15, mean± S.D.）で年齢，性をマッチさせた対照群に比し低下しており，骨格筋ミトコンドリア分画

表1　Kearns-Sayre 症候群におけるミトコンドリア内膜電子伝達系複合体活性.

	Specific Activity			
	U/gram tissue weight		U/mg mitochondrial protein	
	patient	control subjects (N=6)	patient	control subjects (N=6)
NADH-ferricyanide reductase	69	41 ±5.1	25	56 ±39
NADH-menadione reductase (Complex I)	9.0	6.3±2.6	3.3	6.7 ±2.1
NADH-cytochrome c reductase (Complex I, III)	2.4	1.6±0.5	0.87	2.0 ±1.0
Succinate Dehydrogenase	1.4	2.0±0.8	0.53	2.5 ±1.3
Succinate-CoQ reductase (Complex II)	2.3	2.3±1.0	0.84	2.8 ±1.4
Succinate-cytochrome c reductase (Complex II, III)	1.5	1.6±1.4	0.56	0.75±0.4
Cytochrome c oxidase (Complex IV)	1.6	1.3±0.4	0.58	1.54±0.6

(mean±S.D.)

当りでは3.21μg/mg mitochondrial protein（正常：7.19±1.77, mean±S.D.）と低下していた.

考　　察

この症例は，慢性進行性の外眼筋麻痺，心伝導障害，網膜変性を伴いさらには脳波異常，感音性難聴，髄液蛋白増加，血清ピルビン酸，乳酸，アラニンの高値を示しており典型的な Kearns-Sayre 症候群と考えられる．葉酸が血清及び髄液で低値を示し，Allen らの報告[7]と同様の結果であった．生検筋の組織学的検討では左大腿四頭筋の Gomori trichrome 染色，SDH 染色，NADH-TR 染色で ragged red fiber は認められず，三角筋では少数 regged red fiber を認めた．このように1ヶ所の生検筋で組織学的に異常がみられなくても，他の筋では異常を認めることはよく報告されている[8]．一方，Johnson M.A. らは慢性進行性外眼筋麻痺を呈した患者の骨格筋 cytochrome oxidase 染色を行なうと染色されない線維を認め，その数は ragged red fiber の数より多く，形態的なミトコンドリアの変性がおこる前に cytochrome oxidase 活性が低下すると述べている[9]．我々の例でも ragged red fiber を認めなかった大腿四頭筋においても cytochrome oxidase 染色にて，染色性が陰性の線維を認め彼らと同様の結果が得られた．生化学的分析ではミトコンドリア内膜の電子伝達系複合体活性を測定したところ，ミトコンドリア蛋白当りの活性は全体に低下しており，特定の部位だけの選択的な低下は認められなかった．

なお，今回生化学的分析をした生検筋は ragged red fiber を認めなかった大腿四頭筋で行なったものであり，光顕レベルで形態学的異常を認めない筋においても生化学的異常を認めた．Mitsumoto H.らは Kearns-Sayre 症候群においてミトコンドリア蛋白当りの呼吸機能が低下していることを報告している[10]が，我々が得た結果は彼らの報告とよく一致しており，非特異的変性の可能性が考えられた．coenzyme Q_{10}はミトコンドリア電子伝達系の重要な成分であるが，これまでミトコンドリアミオパチーにおける coenzyme Q_{10}の代謝については，全く検討されていなかった．本例では coenzyme Q_{10}量は血清で低値，骨格筋ミトコンドリア分画当りでも低値であり，ミトコンドリアの電子伝達系活性の低下と同じ傾向を示した．現在 coenzyme Q_{10}投与の効果を検討中である．

ま　と　め

1．典型的な Kearns-Sayre 症候群の一例の骨格筋ミトコンドリア機能の生化学的解析を，形態学的検討とあわせて行なった．

2．組織学的には ragged red fiber を認めたがごくわずかであり，全く認められない筋も存在した．しかしその筋でも cytochrome oxidase 染色を行なうと陰性線維を認めた．

3．約100mg の骨格筋を用いてミトコンドリア電子伝達系の各複合体活性と coenzyme Q_{10}量を測定する方法を確立した．この方法は電子伝達系機能異常のスクリーニング法として有用である．

4．この方法で本症例の骨格筋ミトコンドリア内膜電子伝達系の各複合体活性を測定したところ，ミトコンドリア分画当りでは全体に低下傾向を示し，特定部位の選択的低下はみられなかった．

5．ミトコンドリア分画は増加していた．

6．患者血清中及び骨格筋ミトコンドリア分画当りの coenzyme Q_{10}量は低下していた．

文　　献

1) Morgan-Hughes FA: Defects of the energy pathways of skeletal muscle. Adv Neurol, 3: 1—46, 1982.

2) Seligman AM, Karnovsky MJ, Wasserkrug HL, Hanker JS : Non-droplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerising osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). J Cell Biol, 38 : 1—14, 1968.
3) Bookelman H, Trijbels JMF, Sengers RAC, Jansen AJM : Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria isolated from fresh and frozen stored muscle specimens. Biochem Med, 19 : 366—73, 1978.
4) Estabrook RW, Pullman ME : Oxidation and Phosphorylation. In : Colowick SP, Kaplan NO, eds. Methods in Enzymology, vol 10. Academic Press, 1967, 213—50.
5) Fleischer S, Packer L : Biomembranes. In : Colowick SP, Kaplan NO, eds. Methods in Enzymology, vol 53. Academic Press, 1978, 3—54.
6) 阿部皓一，石橋恭子，大前雅彦，河部　靖，勝井五一郎：紫外部吸収検出器付高速液体クロマトグラフィーによる血清及び肝臓中のユビキノンの定量，ビタミン，51 : 111—7，1977.
7) Allen RJ, DiMauro S, Coulter DL, Papadimitriou A, Rothenberg SP : Kearns-Sayre syndrome with reduced plasma and cerebrospinal fluid folate. Ann Neurol, 13 : 679—82, 1983.
8) Berenberg RA, Pellock JM, DiMauro S, et al : Lumping or splitting? "Ophthalmoplegia-plus" or Kearns-Sayre syndrome? Ann Neurol, 1 : 37—54, 1977.
9) Johnson MA, Turnbull DM, Dick DJ, Sherratt HSA : A partial deficiency of cytochrome c oxidase in chronic progressive external ophthalmoplegia. J Neurol Sci, 60 : 31—53, 1983.
10) Mitsumoto H, Aprille JR, Wray SH, Nemni R, Bradley WG : Chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO), clinical, morphologic and biochemical studies. Neurology (Cleveland), 33 : 452—61, 1983.

39）ミトコンドリア異常を伴う進行性外眼筋麻痺の2例
――病像の多様性を中心に――

高　守　正　治*

研究協力者　松　原　四　郎*　糸　氏　　薫*
永　田　美和子*　安　田　厚　子*

Kearns-Shy 症候群（KSS）に代表される mitochondrial myopathy の病像はきわめて多彩である．今回，臨床像および筋病理所見に大きな差のある2例の比較を中心に述べ，考察を試みた．

症　　例

〔**症例1**〕53歳，女性．**主訴**：眼瞼下垂と上肢筋力低下．既往歴：先天性白内障で17歳で両側水晶体摘出術を受けた．14歳の初潮以後順調だった月経が17歳で停止した．**家族歴**：特記事項なし．**現病歴**：過去の写真より30歳頃から眼瞼下垂があったと思われる．49歳頃，発熱で近医に入院したところ上眼瞼腫脹を指摘され，その約1ヶ月後より上肢筋力低下を自覚した．52歳頃より眼瞼下垂を自覚，上肢脱力も増悪したため53歳時当科を受診した．**入院時現症**：一般理学的に異常はないが，子宮発育不全を婦人科的に認める．神経学的には高次機能に異常なく，脳神経領域では両側眼瞼下垂と全方向への著しい眼球運動制限があった．網脈絡膜炎があったが，網膜色素変性はなし．顔面筋の萎縮によりミオパチー様顔貌を呈した．聴覚正常で舌咽頭に著変なし．四肢に筋萎縮，筋力低下があり，上肢で著しかった（**図1-A**）．腱反射は上肢では減弱，下肢では正常で，病的反射なし．感覚および協調運動は正常．検査成績で，血清CK活性は47mU/ml と正常．血中葉酸も4.5ng/ml と正常であった．血中 estrogen は estrone 54.4pg/ml，estradiol 10.4pg/ml，estriol 4pg/ml 以下と低値で，LH-RH test では過反応を示した．十歳代より無月経であることと上記の結果より原発性性腺機能低下症が存在した可能性が考えられた．安静時血中乳酸・ピルビン酸値は正常であったが，Sulaiman ら[1]の方法を参考に自転車 ergometer 上で，脈拍が150/分となることを目やすに40～80 Watts の負荷を30分間継続し，経時的に採血した．患者は2名の正常コントロール，患者と同程度の筋力の1名の神経原性筋萎縮症患者より高い血中乳酸値の増加を示した（**図2**）．ピルビン酸は対照と同様の変化を示した．筋電図ではミオパチーの所見に加え，陽性鋭波，線維性攣縮，線維束性攣縮が観察され，一部で unit 数減少，高電位 NMU を記録した．尺側手根屈筋の生検では，筋線維横径の大小不同，横断面円形化，中心核増加等のミオパチー性変化に加え，一部に小群集をなす小角化線維があった．また7%の線維は多数の小空

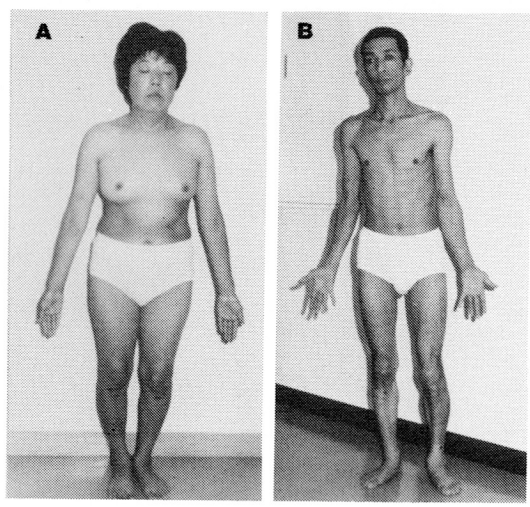


図1　A：症例1，B：症例2

＊金沢大学医学部神経内科

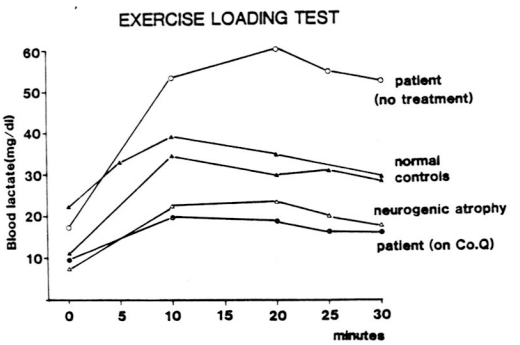


図2　（本文参照）

胞を有し，trichrome 変法では多くの ragged-red fibers を認めた（図3－A）．Sudan black B 染色と PAS 反応はそれぞれ一部の線維で陽性部分を示した．電顕では mitochondria の集積や多数の結晶様封入体が観察された．脂肪を含んでいたと思われる空胞は mitochondria と密接に関連しており，しばしば近傍に glycogen 顆粒の増加を伴った（図3－B）．筋線維はこの他に，収縮蛋白の著明だが非特異的な変性像を示した．

〔**症例2**〕42歳，男性．**主訴**：歩行の不安定．家族歴と既往歴に特記事項なし．**現病歴**：満期産で周産期に異常はなかったが，乳児期より運動と知能の発達が遅延，処女歩行は4歳であった．小中学校の学業成績は悪く，体育では走ることができなかった．近医で眼球運動障害を指摘されたが自覚症状なく放置．成人後も歩行は不安定さを増し，35歳頃から構音障害にも気づいている．**入院時現症**：一般理学的に異常なし．神経学的には推定 IQ 33と知能障害があった．両側視神経萎縮があるが，網膜色素変性はなし．眼球は外斜視位にあり反射性のわずかな動きを除きほぼ全麻痺の状態であった．眼輪筋が軽度に弱い以外，顔面筋，球筋に異常はないが，言語は断綴性であった．四肢・軀幹筋に明らかな萎縮や筋力低下はなし（図1－B）．感覚は正常．四肢の協調運動障害と軀幹の失調を認めるが，Romberg 徴候は陰性であった．小脳性失調が存在すると考えた．検査成績では貧血はないが平均赤血球容積は102.6μm^3とやや大で，血清 CK は65mU/ml と正常，血中葉酸は1.7ng/ml と

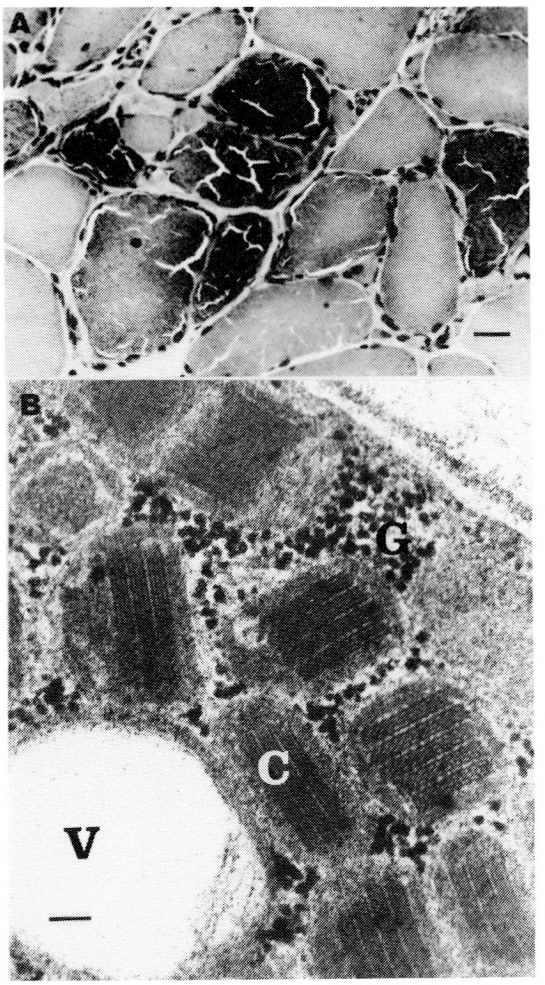


図3　筋生検像（症例1）　A：trichrome 変法（本文参照）（bar＝20μm）
B：glycogen 顆粒（G），結晶様封入体（C），空胞（V）．（bar＝0.1μm）

低値，血中 Vitamin B_{12} は正常であった．髄液に異常なく，葉酸は6.7ng/ml であり，従って plasma/CSF folate ratio は0.25と正常範囲内であった．血中の乳酸・ピルビン酸は正常で，前腕阻血運動負荷試験でも正常であった．また homocystine や methionine を含めて血中・尿中アミノ酸に異常はなかった．脳波には異常なく，頭部 CT は脳幹・小脳の軽度萎縮を示した．筋電図では一部の筋に多相性電位がめだつ以外異常はなかった．

上腕二頭筋の生検では筋線維は全体によく保た

れ，HE染色では明瞭な異常を認めなかった．しかしtrichrome変法では20%の線維で筋鞘下にやや赤紫色に染る狭い部分が観察され（図4-A），NADH-TR活性像でtype I線維の過半数にsub-sarcolemmal hyperactivityを認めた．これらは筋鞘下のmitochondriaの集積を示唆し，変化としては最も軽い段階のragged-red fiberと考えられた．これらの線維はroutine myosin ATPaseではtype I線維であり，PAS反応とSudan black B染色では上記の線維の一部に筋鞘下に弱い反応を示すものがあった．電顕ではmitochondriaの異常な集積があり（図4-B），parking-lot型封入体や長方形でstriationを有する結晶様封入体があった（図4-C）．またこれらの変化を示すmitochondriaに隣接する筋原線維にも明らかな異常はなかった．

考　　察

表に示すように，両例には発症年齢，臨床症状，筋病理像について大きな差があった．両側ともKSSの不全型と考えることは可能であるが，症例1は筋電図や筋生検所見より神経原性変化が筋原性変化に加わっている可能性が考えられるなどOlsonら[2]のoculocraniosomatic neuromuscular disease with "ragged-red" fibersと共通する点が多かった．症例2は中枢神経症状が前景に立ち，外眼筋を除く筋症状に乏しい点はMorgan-Hughesら[3]のmitochondrial encephalomyopathyの報告例（症例1）と類似していた．これら2例に代表されるような病像の差の原因は不明であり，原因となる代謝障害の差や病期の差などが考えられる．mitochondriaとそれを包含する体細胞の関係に注目すると，mitochondriaの変化という点は共通でも，症例1では筋細胞の機能的，形態的障害が著しいのに対し，症例2ではそれが乏しかった．固有の遺伝物質を持ち，しばしば独立した生物にもたとえられるmitochondriaと体細胞の関係を規定する因子の中には，代謝異常の種類，体細胞の種類，病期などが含まれる可能性が考えられ，これらの差が個々の病像の差に反映されていることも考えられる．

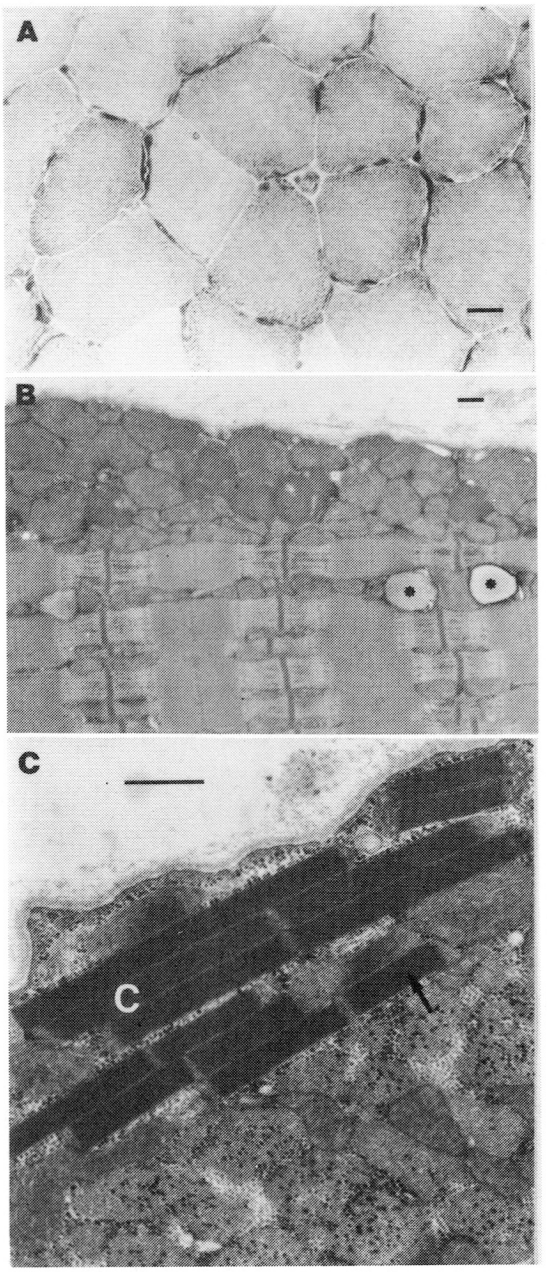


図4　筋生検像（症例2）　A：trichrome変法（本文参照）（bar＝20μm）
B：筋鞘下のmitochondriaの集積と脂質の沈着（＊）を示す．（bar＝0.5μm）
C：長方形の結晶様封入体（C）の一部にはstriation（矢印）が認められる．（bar＝0.5μm）

表　2症例の比較

	CASE 1	CASE 2
age/sex	53/female	42/male
clinical manifestations		
age of onset	30 y.o.	1 y.o.
ophthalmoplegia	+	+
cataract	+	−
optic atrophy	−	+
mental retardation	−	+
muscle atrophy	+	−
ataxia	−	+
hypogonadism	+	−
laboratory data		
folic acid	normal	low
E M G	myopathic change & fibrillations	almost normal
muscle biopsy		
mitochondrial changes	+	+
atrophic fibres	+ (some were angulated)	±
"ragged-red" fibres	+	±
lipid deposit	+	±
glycogen deposit	+	±

症例1では電子伝達系の一次的な障害の可能性とともに，mitochondriaの近傍に蓄積した脂肪酸がendogeneous uncoupling factor[4]として二次的に電子伝達系を阻害している可能性も考え，coenzyme Q_{10}を1日60mg，4週間経口投与したが臨床的には症状の改善は認めなかった．しかしergometerによる運動負荷時の乳酸の上昇は投与前よりも緩やかになる傾向を示した(図2)．症例2ではAllenら[5]の報告した血中葉酸の低値とplasma/CSF folate ratioの逆転を伴ったKSSで，葉酸の投与が有効であった例を参考に，葉酸15mg/日の経口投与を開始している．2ヶ月後の時点で症状にめだった変化は認めていない．以上の治療の可能性についての検討は，単一例で開始した段階であり，現時点では効果についての予見は困難と考えている．

文　献

1) Sulaiman, WR. et al.: Myopathy with mitochondrial inclusion bodies. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 37: 1236, 1974.
2) Olson, W. et al.: Oculocraniosomatic neuromuscular disease with "ragged-red" fibers. Arch. Neurol., 26: 193, 1972.
3) Morgan-Hughes, JA. et al.: Mitochondrial encephalomyopathies. Biochemical studies in two cases revealing defects in the respiratory chain. Brain, 105: 533, 1982.
4) Wojtczak, L. and Lehninger, AL.: Formation and disappearance of an endogeneous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 51:

442, 1961.
5) Allen, RJ. et al.: Kearns-Sayre syndrome with reduced plasma and cerebrospinal fluid folate. Ann. Neurol., 13: 679, 1983.

40）高乳酸血症を伴った mitochondrial encephalomyopathy の一例

後 藤 幾 生*

研究協力者　合 田 周一郎*　石 本 進 士*　大 西 晃 生*
細 川 晋 一**　黒 岩 義五郎*

はじめに

いわゆる mitochondrial myopathy は，症状が骨格筋のみに限られる狭義の mitochondrial myopathy と，骨格筋以外にも中枢神経症状を含む多彩な症状を呈する Kearns-Sayre 症候群に大別できる．これらの疾患は，いずれも筋萎縮，脱力等の骨格筋症状が明らかであり，特に外眼筋麻痺，眼瞼下垂，咽頭筋が障害される等，特徴的な臨床像を呈する．又後者では中枢神経症状の発現は徐々であり，小脳失調症等，変性疾患類似の像を呈する．今回，私達は右片麻痺で発症し，血清，髄液の高乳酸，高ピルビン酸値を認め，筋組織にて典型的 mitochondrial myopathy の所見を呈した症例を経験した．生化学的かつ筋病理学的検索及び文献的考察を加え検討した．

症例：　14歳，女性，中学生

主訴：　右上肢脱力，構語障害，視力障害

現病歴：　妊娠分娩に異常なく，10歳迄の発育は正常．しかし幼児期より走るのが極端に遅かった．11歳時より水泳の際，悪心，頭痛を訴えるようになり，38～39℃の発熱をくり返した．同じ頃より眼が見えにくいと訴え，眼科で求心性視野狭窄を指摘された．その時の頭部 CT scan では異常なかったが，脳波で異常（両側周期性棘徐波群発）を指摘されている．12歳頃より発熱は自然に消退したが，学業成績はしだいに低下した．運動時に気分不良を訴えるようになったが，筋痛や明らかな筋脱力の訴えはなかった．14歳時，2ヶ月間隔をおいて2度の全身けいれん発作出現．本年8月2日より，急に右上肢の脱力，舌のしびれ感，構語障害に気付き，8月18日当科外来を受診した．外来時神経学的には求心性視野狭窄と軽い発語障害以外に異常はなかったが，CT scan で左側頭～頭頂葉に低吸収域あり，造影撮影で同部皮質及び皮質下白質に不規則な増強がみられた．脳波は背景活動の著明な徐波化，左側頭部の不規則徐波と頻発する両側同期性棘徐波群発を認めた．その後，右上下肢の脱力，右上肢の不随意運動発作，失算症状を呈し，8月29日の当科入院当日，全身間代性けいれん発作が2度みられた．

既往歴：　11歳時より求心性視野狭窄

家族歴：　両親健康，血族結婚なく，同胞1名は健康

入院時現症：　身長151cm（－1.0SD），体重38 kg（－1.9SD），皮膚は乾燥し，両側眼瞼はやや腫れぼったく，周囲に発赤を認めた．血圧105/0 mmHg，脈拍100/分整，体温38.4℃，心雑音は聴取せず肝脾腫なし．

神経学的所見：　記銘力低下，保続傾向，軽度の錯語，失書，失算，構成失行を認め，求心性視野狭窄を伴う右同名半盲がみられたが，眼底は正常．眼瞼下垂なく，眼球運動障害も認めなかった．聴力も正常．右上下肢の中等度脱力，右半身で表

＊九州大学医学部脳研神経内科
＊＊九州大学医学部脳研神経生理

在覚，位置覚の低下及び数字抽記の理解の低下が認められた．両側下肢で中等度から高度の深部反射亢進を認めたが，筋トーヌスは正常．小脳症状はみられなかった．入院当初，右上肢の不随意な屈伸運動発作（持続10秒程度）が数回観察された．右片麻痺（顔面筋を除く）以外には対側の上下肢に明らかな筋脱力は認めなかった．

検査所見：　血液検査で白血球数11,200と軽度増加．検尿でケトン体陽性．検便正常．血沈22mm/hour と軽度亢進．血小板機能正常で凝固試験に異常なし．血液生化学検査では CPK 400U/L, LDH 984U/L と上昇し，isozyme はそれぞれ LDH_1, CPK-MB の増加がみられた．血中乳酸46.2～83.7mg/dl，ピルビン酸0.82～1.89mg/dl と高値を示し，髄液でも乳酸76.3mg/dl, ピルビン酸3.09mg/dl と高値を示した．動脈血ガス分析では pH7.378，$Po_2$105.4mmHg，$Pco_2$32.0 mmHg, BE－5.4mEq/l, $Hco_3$18.5mEq/l と軽度の代謝性アシドーシスを示した．胸写，心電図正常．血清学，髄液に異常なし．髄液ビタミン B_1 5 ng/ml，血清ビタミン B_{12} 810ng/ml と正常．基礎代謝は酸素消費量158ml/min（－16%）と軽度低下を示した．又筋生検試料にて測定した pyruvate dehydrogenase complex（PDC），pyruvate decarboxylase, 2-oxoglutarate dehydrogenase complex の活性は正常であった．又軽度の運動負荷（約10分間の歩行及び階段の昇降）にて血中乳酸，ピルビン酸の上昇とそれに伴う代謝性アシドーシスは増悪した（**表1**）．またグルコース，グリセロール，グルカゴン，フラクトース，ガラクトース，アラニンの経口負荷試験，上肢虚血試験の結果から，糖新生，糖分解に明らかな異常はないと考えられた．放射線学的検索では，Brain CT scan で当初左側頭葉から側頭葉にみられた低吸収域は後に消失し，左後頭葉に広範な低吸収域が生じた（**図1**）．脳血管撮影では，左後頭葉に hypervascularity を認めたが，その他の血管に異常は認めなかった．

電気生理学的検索では，脳波は基礎波の著明な徐波化，左側頭部の不規則徐波，両側同期性に頻発する棘徐波群発を認めた（**図2**）．正中神経刺激による体性感覚誘発電位（SEP）では両側に高振幅 SEP と波形の異常（進行性ミオクローヌスてんかんに類似）を認め，左刺激で long-loop reflex の亢進が観察された．筋電図検査では，右上肢筋のみ低振幅多層電位を認めたが，他筋では異常なし．筋病理所見では，H・E 染色にて筋線維の大小不同，結合織の増加と共に，通常より basophilic に染まる筋線維が散在性に認められ，これは，modified trichrome 染色で，ragged red fiber であった．又，NADH-TR は，強活性を示す筋線維が

表1　Exercise Test（NM 831197）

	before exercise	after 10 min exercise 0	after 10 min exercise 90 min
Lactate (mg/dl)	65.5	132.5	90.0
Pyruvate (mg/dl)	1.14	2.80	1.84
HCO_3 (mEq/l)	18.5	11.4	16.5

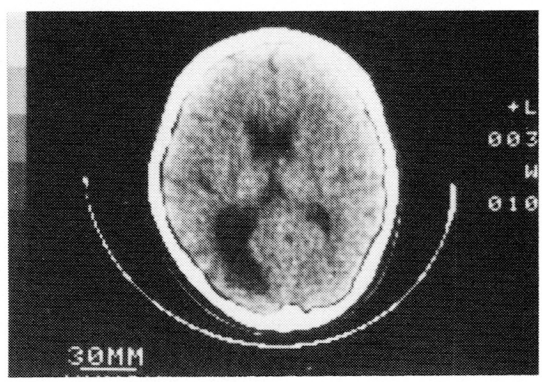


図1　Brain CT scan

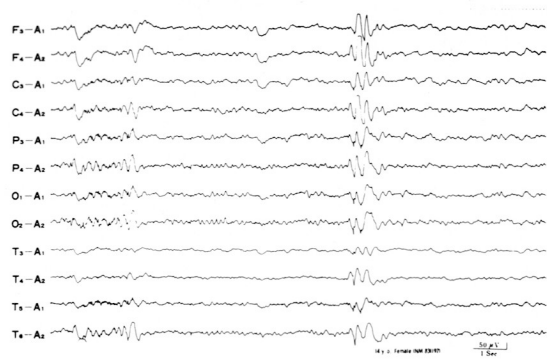


図2　EEG 所見

散在性に認められた(図3)．電顕では，ミトコンドリア数の増加，巨大化，形の変形，paracrystaline 状の封入体等，種々の異常を認め，mitochondrial myopathy の像を呈した（図4）．

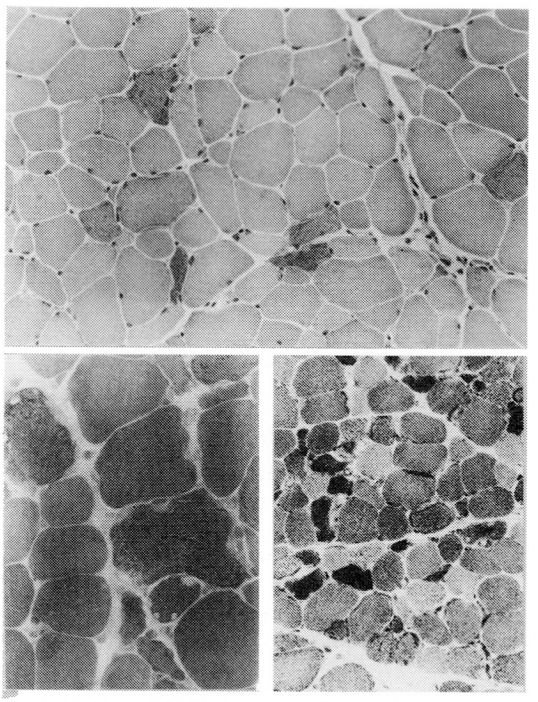


図3　上段：HE 染色（×250）
下段(左)：modified trichrome 染色（×365）
下段(右)：NADH-TR 染色(×185)

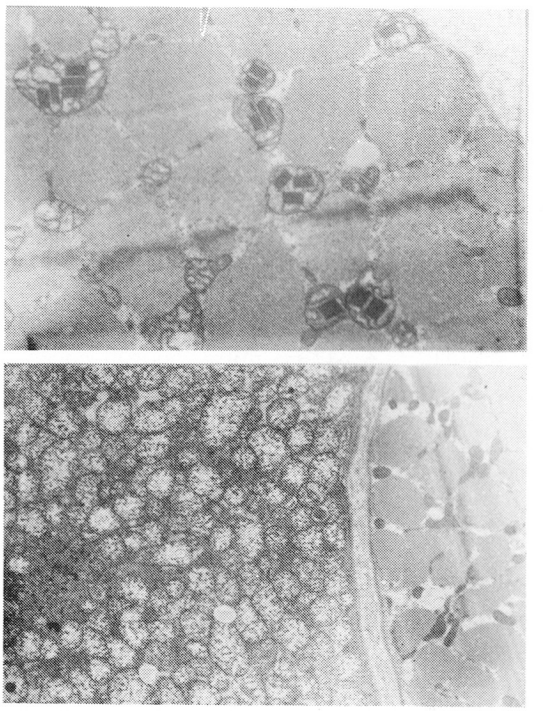


図4　上段：電顕にてミトコンドリア内に paracrystaline 状封入体を示す（×17,250）
下段：巨大ミトコンドリアの集積像を示す（×6,900）

考　　察

本例の特徴は急性の右片麻痺で発症し，高乳酸，高ピルビン酸血症を伴い，筋組織学上，ragged red fiber，電顕にて，paracrystaline 状封入体を含む種々の異常なミトコンドリアの集積など，mitochondrial myopathy の所見を認めた事である．mitochondrial myopathy は，その主症状が，外眼筋，咽頭筋，四肢筋等主に骨格筋に限局するものと，Kearns-Sayre 症候群の如く骨格筋以外にも，小脳，心，網膜等に病変を有し，多彩な症状を呈するものがある．又，福原らは，myoclonus epilepsy に mitochondrial myopathy を合併する例を報告している[1]．しかし，これらの中枢神経症状の発現は，比較的緩徐で，変性疾患に類似した臨床像を呈している．一方，本例の如く，脳血管障害様発作を呈し，比較的，筋症状は軽く，かつ高乳酸，高ピルビン酸血症を呈する mitochondrial myopathy 群がある．Shapira らは，脳と筋肉に症状を呈し，ミトコンドリア機能異常を考えうる疾患を mitochondrial encephalomyopathy と呼んでいる[2]．

本例も，mitochondrial encephalomyopathy に相当するが，筋症状は軽く，中枢神経症状，易疲労性が前景に立っており，従来の報告の中では，familial poliodystrophy に近い[3)4)]．それらの mitochondrial encephalomyopathy の内，代謝異常の原因としてすでに，ミトコンドリア呼吸鎖の酵素の欠損又は低下が明らかになっている例も報告されている[5]．本例は生化学的には，pyruvate

DH complex は正常で，かつその他の種々の負荷試験で，ミトコンドリア呼吸鎖系外の代謝異常の可能性は乏しい．さらに本例の生検筋の酵素組織化学染色では，ubiquinone 染色，SDH 染色，NADH-TR 活性はむしろ亢進し，cytochrome oxidase 染色が対照群と比較して低下している可能性もあり，今後，呼吸鎖の酵素の生化学的検索が必要である．又 Luft 病の如く "loose coupling" の可能性は基礎代謝率，高体温を認めない事等より否定的である．以上，mitochondrial encephalomyopathy の臨床症状は多彩であり，本例の如く，急性発症の中枢神経症状を呈する例に共通の原因，特にミトコンドリア呼吸鎖の酵素異常の有無の検索が必要である．

文　献

1) N. Fukuhara, S. Tokiguchi, K. Shirakawa & T. Tsubaki.: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities) : disease entity or a syndrome? J. Neurol. Sci., 47: 117—133, 1980.
2) Y. Shapira, S. Harel & A. Russell : Mitochondrial encephalomyopathies — A group of neuromuscular disorders with defects in oxidative metabolism. Israel J. Med. Sci., 13: 161—164, 1977.
3) Y. Shapira, S.D. Cederbaum, P.A. Caneilla, D. Nielsen & B.M. Lippe : Familial poliodystrophy, mitochondrial myopathy, and lactate acidemia. Neurology (Minneap.), 25: 614—621, 1975.
4) H. Hart, C. Chang, E.V.D. Perain, J.S. Neerunjun & R. Ayyar : Familial poliodystrophy, mitochondrial myopathy and lactate acidemia. Arch. Neurol., 34: 180—185, 1977.
5) J.A. Morgan-Hughes, P. Darveniza, S.N. Kahn, D.N. Land, R.M. Sherratt, J.M. Land & J.B. Clark : A mitochondrial myopathy characterized by a deficiency in reducible cytochrome b. Brain, 100: 617—640, 1977.

41) ミトコンドリア・ミオパチーにおける皮膚線維芽細胞の① Pyruvate dehydrogenase complex ② Cytochrome c oxidase, Succinate-cytochrome c reductase 活性

佐藤　猛*

研究協力者　安野　みどり*　山本　剛司*

目　的

ミトコンドリア・ミオパチーをきたす疾患としては，Kearns-Sayre (Shy) 症候群，ミトコンドリア脳筋症や先天性高乳酸血症などが知られている．これらの疾患では，骨格筋内の異常ミトコンドリアの集積が共通した所見である．さらに精神身体発達遅延，痙攣発作，小脳症状，難聴などの中枢神経症状が認められる．また高乳酸・高ピルビン酸血症を呈することが多い．

病因としてピルビン酸の酸化，糖新生系やミトコンドリア酸化還元酵素の障害が指摘されている．これらの酵素学的検索には，従来は生検骨格筋や肝が用いられていた．しかし，日常臨床上，骨格筋や肝は組織量や保存条件に制約が多いため，多くの種類の酵素活性を測定することは困難である．そのため，培養した皮膚線維芽細胞を用い，ミトコンドリア異常症の酵素学的診断法の確立を目標として本研究を行った．

症　例

症例1：11歳女児，幼小時より精神身体発育遅延を示し，9歳頃より小脳症状・脳神経障害・乳頭萎縮・痙攣発作・無呼吸発作を反復．乳酸25～177 mg/dl (正常16mg/dl 以下)，ピルビン酸2.0～3.8 mg/dl (正常0.3～0.9mg/dl) と高値を示し，アラニンあるいはグルコース負荷試験で，乳酸・ピルビン酸の異常な上昇を認めた．高脂肪食にて症状は改善した．なお筋生検では Ragged-red fibers (RRF) はみられなかった．

症例2・3：都立神経病院・山本・別府・椿の報告 (1983, 6)[1] した Mitochondria encephalomyopathy の親子例．症例2は29歳男性，29歳右片麻痺・痙攣・無呼吸発作で発症．乳酸39.9mg/dl，ピルビン酸1.1mg/dl (正常0.3～0.6mg/dl) と軽度上昇．筋生検にて RRF を認めた．症例3は症例2の母親で，低身長ではあるが神経学的には異常を認めず，乳酸14.7mg/dl，ピルビン酸0.9mg/dl (正常0.3～0.6mg/dl) で，阻血負荷試験で異常な上昇をみ，筋生検で RRF を認めた．

以上の3症例の皮膚線維芽細胞を用いた．

方　法

1．皮膚線維芽細胞の培養：生検した皮膚小片をプラスチック瓶にて培養した．培養液は Eagle MEM＋8％仔牛血清を用い，5％炭酸ガス培養器中にて培養した．酵素活性の測定には，継代5～7代のものを，トリプシンと EDTA にて剥離後 PBS にて洗滌したものを用いた．

2．血小板・白血球分離法と粗酵素液作成法：血小板，白血球の分離法は Blass (1970)[2] の方法を一部改変して行った．生検筋組織は液体窒素中に保存したものを用いた．分離した細胞の沈渣，あるいは生検筋を Tris/KCl 緩衝液にてホモジネートしたものを粗酵素液とした．蛋白定量は Lowry らの方法にて測定した．

3．Pyruvate dehydrogenase (PDH) Complex

*順天堂大学医学部脳神経内科

測定法：Blass ら (1970) [2]，および戸島 (1980) [3] の方法によった．反応系には 2 mM CoA, 2 mM TPP. 2 mM NAD, 2 mM Sodium [1-^{14}C] pyruvate を用い，粗酵素液を密栓した酵素反応用試験管に加えた．発生した$^{14}CO_2$を phenethyl amine をひたした濾紙に吸着させた．反応後，25%硫酸にて反応を停止，濾紙中の放射活性を液体シンチレーション・カウンターにて測定した．

4．PDH phosphatase 活性：Robinson ら (1975) [4] の方法で行った．Final 0.2mM ATP 添加し，37℃，3 分間 preincubation し，PDH complex を不活性化，1 mM Ca^{2+}，Mg^{2+}を添加，5 分間にて再活性化することにより測定した．

5．Lipoamide dehydrogenase (LAD)：Koike ら (1970) [5] の方法で測定した．反応系には 2 mM NADH, 2mM NAD, 16mM (±)-Lipoamide, 25mM EDTA, を用い，粗酵素液を加えた．340 nm における吸光度の減少を分光光度計で測定した．なお，(±)-Lipoamide は再結晶したものを用いた．

6．ミトコンドリア分画法：Stumpf ら (1981) [6] の方法で行った．175cm^{2}の培養瓶 4 ～ 6 本用いた．剥離した細胞を250mM Mannitol, 2 mM EDTA, 0.3% BSA, 1 mM ATP, 1 mM mercaptoethanol, 10mM Hepes buffer (pH7.4) に浮遊させ，protease (Sigma type VI) (0.2～0.3 mg) を 7 分間作用させた．ホモジネート後，約10倍に稀釈し，冷却遠心 (600g, 8000g× 2 回) にてミトコンドリア分画を得た．0.3M sucrose＋2 mM EDTA (pH7.0) に浮遊し，凍結融解後，酵素活性を測定した．

7．ミトコンドリア内酸化還元酵素活性測定法：ⓐ Cytochrome c oxidase 活性・Sekuzu ら (1965) [7] の方法で行った．75mM Na_2HPO_4-KH_2PO_4 (pH6.0) に還元型 cytochrome c, 15μM 加え，ミトコンドリアを添加し，cytochrome c が酸化される反応を，分光光度計を用い，550nm, 25℃にて測定した．還元型 cytochrome c は，Hydrosulfite で還元した cytochrome c を Sephadex G25カラムを通し，余分な hydrosulfite を除いて作成した．

ⓑ Succinate-cytochrome c reductase 活性・King (1967) [8] の方法で行った．100mM phosphate buffer (pH7.4), 0.3mM EDTA, 100μM cytochrome c (oxidized) に 1 mM KCN・ミトコンドリアを加え，基質として succinate を添加し，cytochrome c が還元される反応を550nm, 25℃にて測定した．

なお，線維芽細胞からのミトコンドリア分画方法確立のために Vero cell を用いた．

8．差スペクトル測定：Vero cell から得られたミトコンドリアに succinate＋KCN を加え，室温で10分間反応させた後，2 波長分光光度計を用い，液体窒素による極低温における酸化還元の差スペクトルを測定した．

結　　果

1．PDH Complex：

表 1 に血小板・白血球・生検筋・線維芽細胞の PDH complex の測定結果を示した．血小板および白血球の活性は対照症例とほぼ同一であった．生検筋組織では対照症例で活性値のばらつきが大きかった．これは種々の筋疾患の生検筋を用いたため，萎縮の程度がさまざまであったためと考えられる．線維芽細胞はまだ測定検体数が少なく，今後確認しなければならないが，対照例が34.1 pmol/min/mg protein に対し，症例 1 は7.9と低値を示した．

しかし線維芽細胞の PDH の不活性化，活性化は症例 1 においても正常であった (図 1)．

線維芽細胞の LAD は正常1.34，症例1.32±0.23nmol/min/mg と差は認められなかった．

表 1　Pyruvate dehydroganase complex 活性

	Pyruvate dehydrogenase complex (pmol/min/mg protein)			
	Platelet	W.B.C	Muscle	Fibroblast
Normal	101.2 ± 39.4 (n = 13)	24.9 ± 8.8 (n = 7)	56.8 ± 40.3 (n = 11)	34.1 (n = 2)
Case 1	91.9 36.1 (n = 4)	35.5	22.8	7.9 (n = 2)
Case 2		33.0		17.7
Case 3		23.6		38.2

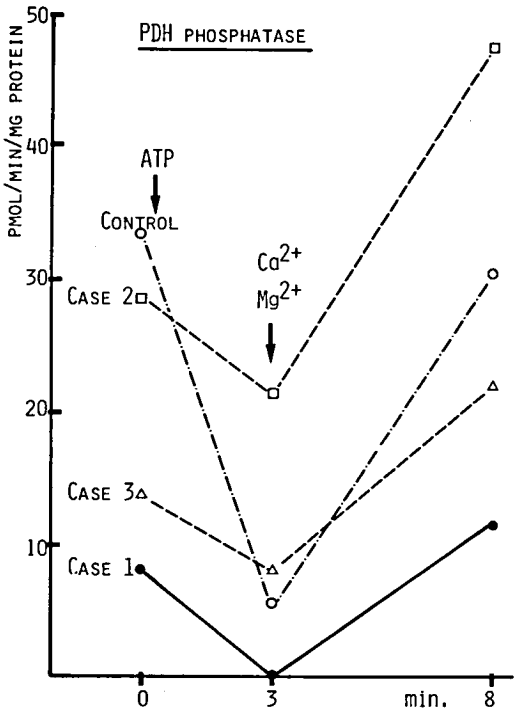
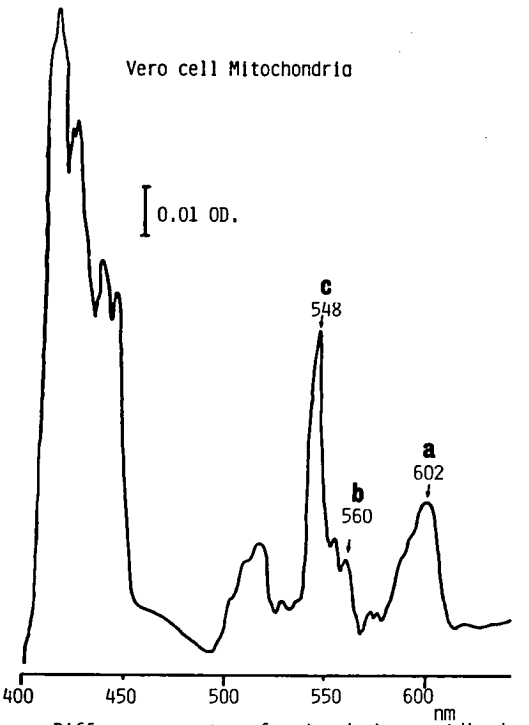


図1　皮膚線維芽細胞のPDH phosphatase活性



Difference spectra of reduced-minus-oxidized cytochromes at temperature of liquid nitrogen.

図2　Vero cellのミトコンドリア分画におけるcytochromeの酸化還元差スペクトル

2．ミトコンドリア内酸化還元酵素：

Vero cellより得たミトコンドリア分画の一部を電顕にて観察し，ミトコンドリアに富む分画であることを確認した．差スペクトルではα-bandにおいて，cytochrome cは548nm，cytochrome bは560nm, cytochrome aは602nmにその吸収極大を得た（図2）．

cytochrome c oxidase・succinate-cytochrome c reductase活性とミトコンドリア蛋白との関係をVero cellで求めたが，0.02～0.08mg・ミトコンドリア蛋白の間で相関性が得られた．

Cytochrome c oxidase活性は，症例1では4.7±1.1，症例2では6.5±2.3，症例3では3.7±0.8，対照症例では8.5±2.7nmol/min/mgであった．

Succinate-cytochrome c reductase活性は，症例1では7.8±1.6，症例2では4.9±0.3，症例3では26.2±5.6，対照症例では10.9±2.6であった．症例2においてやや低値の傾向を示した（表2）．

考　察

高乳酸・高ピルビン酸血症の症例を経験し，これを契機としてミトコンドリア異常症の酵素学的診断法の確立を目標とした．これらの酵素活性の測定を日常臨床的に容易にするために，皮膚線維芽細胞を用いた．まだ対象例数が少ないため，確定診断のためには症例数の追加が必要であるが，予報的結果を得た．

すなわち，症例1では線維芽細胞のPDH complex活性の低下がみられた．血小板・白血球の活性値は正常を示したので，線維芽細胞の活性低下のみで本症例をPDH complex低下症と診断することはまだできない．しかしPDH欠損症の中には臓器による差も知られているので，本症例は

表2　皮膚線維芽細胞のミトコンドリア酸化還元酵素

	Cytochrome-c-oxidase	Succinate-cytochrome-c-reductase
Case 1	4.7 ± 1.1	7.8 ± 1.6
Case 2	6.5 ± 2.3	4.9 ± 0.3 #
Case 3	3.7 ± 0.8	26.2 ± 5.6
Control (n=3)	8.5 ± 2.7	10.9 ± 2.6

nmol/min/mg,protein
Spectrophotometer, 550nm, 25°C

なお追加検討する予定である．

症例1の PDH phosphatase と LAD (E_3) 活性は正常を示したため，PDH complex の活性低下は Pyruvate decarboxylase (E_1) か，lipoate acetyltransferase (E_2) の異常によることが推定される．

次に線維芽細胞からのミトコンドリア分画法を確立し，cytochrome c oxidase と succinate-cytochrome c reductase 活性を測定した．症例2において後者の活性の低下が認められた．本症例の最終診断のためには，NADH-cytochrome c reductase, NADH-CoQ reductase, Succinate dehydrogenase CoQ reductase, CoQ-cytochrome c reductase, Citrate synthase, などのミトコンドリア局在酵素活性の測定も必要である．

以上，皮膚線維芽細胞を用いることにより，ミトコンドリア異常症の酵素学的診断が可能なことを報告した．

結　論

1．高乳酸・高ピルビン酸血症を伴うミトコンドリア異常症3例の皮膚線維芽細胞を用い，ミトコンドリア関連酵素活性の測定を行った．

2．症例1では PDH complex 活性の低下をみた．

3．症例2ではミトコンドリア分画中の succinate-cytochrome c reductase 活性の低下をみた．

4．線維芽細胞よりのミトコンドリア分画法を確立したので，今後さらに他の酵素活性の測定も行う予定である．

文　献

1) 山本剛司，別府宏圀，宇尾野公義，椿　忠雄：経時的に出現する種々の巣症状に CT 像及脳波所見が対応した mitochondrial encephalomyopathy の1例．臨床神経，23：1025，1983.

2) Blass, J.P., Avigan, J. and Uhlendorf, B.W.: A defect in pyruvate decarboxylase in a child with an intermittent movement disorder. J. Clin. Invest., 49：423—432, 1970.

3) 戸島健治：Pyruvate dehydrogenase complex 欠損症の血小板による酵素診断．日児誌，84：469—476，1980.

4) Robinson, B.H. and Sherwood, W.G.: Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: A cause of congenital chronic lactic acidosis in infancy. Pediatr. Res., 9：935, 1975.

5) Koike, M. and Hayakawa, T.: Purification and properties of lipoamide dehydrogenases from pig heart α-keto acid dehydrogenase complexes. Methods in Enzymology, Vol. 18, p. 298—307, 1970, ed. by D.B. McCormick, Acad. Press, N.Y.

6) Stumpf, D.A. and Parks, J.D.: Human mitochondrial electron transport chain: Assay of succinate: Cytochrome c reductase in leukocytes, platelets and cultured fibroblasts. Biochem. Med., 25: 234—238, 1981.

7) 瀬屑一郎，折井　豊，大西　椎：ミトコンドリア実験法1．チトクローム精製と検定．蛋白質核酸酵素，10：1610—1620，1965.

8) King, T.E.：Preparations of succinate-Cytochrome c reductase and the cytochrome b—c_1 particle, and reconstitution of succinate-Cytochrome c reductase. Methods in Enzymology, Vol. 10, p. 216—225, 1967, ed. by R.W. Estabrook, Acad. Press, N.Y.

V．筋ジストロフィー症の生化学・代謝など

42）筋病変とミオグロビンの局在
——ミオグロビン染色法の検討——

出田　透*

研究協力者　植川和利*

近年，各種神経筋疾患における血中ミオグロビン（Mb）の測定が筋肉の崩壊壊死をきたす病態の把握に利用されつつある．我々は，これまでに，臨床的に各種神経疾患と血中Mbについて，実験的には家兎におけるMbの代謝，排泄などMbの動態について検討を加えてきた．今回は前回に引き続き，筋組織内のMbの動態について，酵素組織化学的にMbの局在および疾患別の差異について検討を加えた．今回は，とくに，Mbが水溶性蛋白であることを考慮して，凍結切片標本や，パラフィン切片について固定法をはじめ，Mbの染色性について検討した．

方　法

1．凍結切片の固定

Mbは水溶性蛋白である点を考慮に入れて，凍結切片標本をMb染色前に(1)10%ホルマリン＋3% H_2O_2＋トリス緩衝液(pH7.4)，(2)3%トリクロール酢酸＋3% H_2O_2＋トリス緩衝液（pH7.4）に30分間浸漬し可溶性蛋白（Mb）を固定した．その後，トリス緩衝液で洗浄後，酵素組織化学的にMb染色を施行した．

2．Mb染色法について

(1) Biotin・avidin系を利用した超高感度免疫ペルオキシダーゼ染色法（Vector社製のVectastain ABC kit）とヘキスト社製の抗ヒトMb血清（家兎）を組み合わせてMb染色を施行した．抗ヒトMb血清（家兎）は500倍に希釈して用い，図1に示す手順によりMb染色を施行した．

(2) DAKO社のMb染色用のPAP kitについては，抗ヒトMb血清（家兎）を500倍に希釈して用い，(1)同様に4℃で12時間incubate後，前回の方法に準じてMb染色を施行した．

A　脱パラフィン化（キシレン，アルコール）
B　凍結切片（ホルマリン
　　↓ or トリクロール酸）
0.3%H_2O_2＋メタノール（30分）
↓
緩衝液に浸漬（20分）
↓
希釈した正常ヤギ血清（20分）
↓
一次抗体（抗ヒトMb家兎抗体）（30分～24時間）
↓
緩衝液に洗浄，浸漬（10分）
↓
希釈ビオチン化抗体溶液にincubate（30分）
↓
緩衝液で洗浄，浸漬（10分）
↓
Vectastain ABC試薬中にincubate(30～60分)
↓
緩衝液で洗浄，浸漬（10分）
↓
ペルオシダーゼ基質溶液（5～30分）
↓
水洗
↓
カウンター染色

図1　Vectastain TM ABC法によるMb染色法

(3)パラフィン切片についてはキシレン，メタノールにて脱パラフィン後，前述の(1)，(2)について観察した．

結　果

(1) ABC法およびPAP法で使用するMb抗体は抗ヒトMb家兎抗体を500倍に希釈し，12時間

＊熊本大学保健管理センター

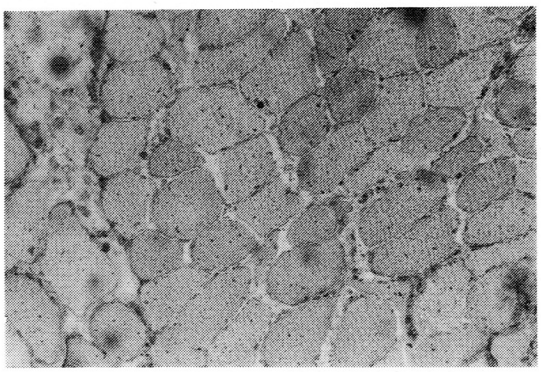


図2　ABC法によるホルマリン前固定後のMb染色

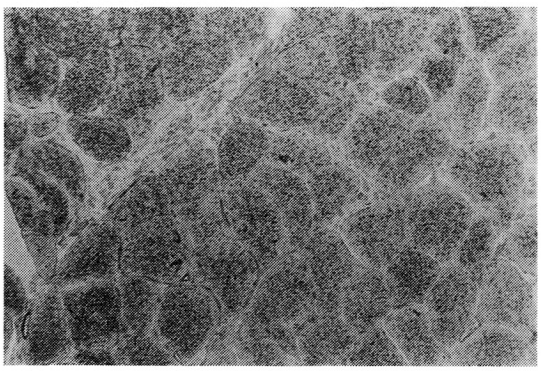


図3　PAP法によるホルマリン前固定後のMb染色

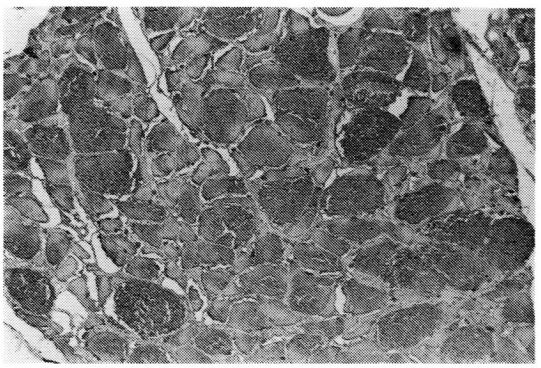


図4　パラフィン切片標本のPAP法によるMb染色

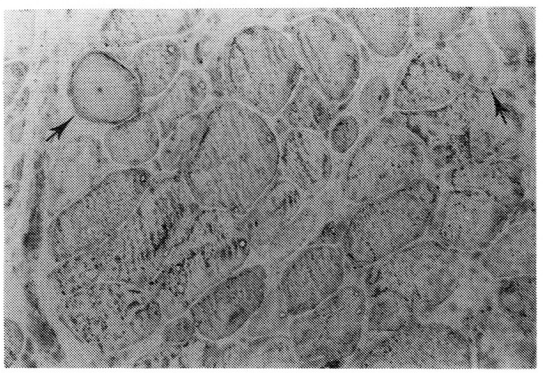


図5　DMP筋のホルマリン前固定後のMb染色（矢印はopaque fiberを示す）

4℃でincubate後，図1に示すような手順により施行した．その結果，凍結切片についてもABC法，PAP法のいずれの方法でもMbは染色されたが，ABC法はPAP法よりさらに微細顆粒の集積像として，筋線維内にびまん性に染色された（図2，3）．パラフィン切片についても同様の染色を試みたが，パラフィン切片ではABC法およびPAP法いずれもさらに鮮明にびまん性に染色された（図4）．

(2)疾患別の染色性の違い

筋ジストロフィー症(2例)，多発性筋炎（3例），motor neuron disease（3例）について，HE染色，トリクロームGomori染色，ATPase染色，NADH染色を施行した．Mb染色ではtype I fiberがtype II fiberに比し濃染した．しかし，両者間の差異はATPase染色におけるほど明瞭には認められなかった．多発性筋炎では細胞浸潤が著明で変性壊死が高度と思われる部位でMb染色性の低下傾向がみられた．motor neuron disease ではatrophic fiberでもMbの染色性は保たれていた．一方，筋ジストロフィー症では，Mb染色性は全般に低下していたが，比較的に染色性が保たれている線維も散在性にみられた．しかし，HE染色，トリクロームGomori染色に濃染するopaque fiberでは，Mbの染色性がとくに低下していた（図5）．

考　　案

水溶性蛋白であるMbをホルマリンやトリクロール酢酸で処理することにより，未処理で行なった前回のMb染色法よりさらに鮮明に染色できることがわかった．ABC法はビオチンとアビジ

ンの結合力を利用した超高感度免疫ペルオキシダーゼ染色法で，染色性の感度はPAP法の8～40倍，低バックグラウンド染色，経済性，incubate時間の短縮などの特徴を有することが知られている．今回は，両酵素抗体法にて，凍結切片標本，パラフィン切片標本について500倍に希釈した抗ヒトMb抗体に12時間incubate後，さらに二次抗体と反応させたのち，発色を試みたが，再現性のあるMb染色を得ることができた．組織化学染色との対比では，Mb染色でもtypeの判別は可能であるが，ATPase染色におけるほど明瞭ではなかった．疾患別の特徴では，motor neuron diseaseの萎縮線維や多発性筋炎の炎症性細胞浸潤の周辺部位でもMb染色性は比較的に保たれていたが，筋ジストロフィー症では全般的にMbの染色性は低下がみられ，HE染色に濃染するopaque fiberではとくにMbの染色性が低下しており，筋ジストロフィー症における高Mb血症の病態及びopaque fiberの意義を考えるうえに重要な所見ではないかと考える．

臨床的に，高Mb血症が筋ジストロフィー症で認められるが，その漏出メカニズムはまだ不明である．これまでのわれわれの実験的研究から，骨格筋でのMbの代謝回転について，トロポミオシンの代謝半減期(22.0日)と比較した結果，Mbは20.5日と計算された．一方，^{3}H標識Mb静注後のMbの動態をみると急速相(20分)と緩徐相(48時間)の2相性の減衰を示しつつ，多量が尿中に観察された．さらに，骨格筋より漏出したMbの骨格筋内への再とり込み・再利用の可能性はみられない．従って筋線維内よりMbの漏出がさかんな筋ジストロフィー症では，筋線維内でのMbの代謝回転が亢進していることが推定される．このことと，opaque fiberの変性過程における染色性の低下は，筋ジストロフィー症のMb代謝の種々相を示唆するものであろう．

結　　論

パラフィン切片および凍結切片を用いて酵素抗体法（PAP法およびABC法）でMb染色を施行した．凍結切片ではホルマリンやトリクロール酢酸で前固定することにより，明瞭なMb染色を得ることができた．Mb染色のみに供するものであればパラフィン固定が適当であり，より明瞭なMb染色を得ることができる．筋ジストロフィー症にみられるopaque fiberではMb染色性の低下が認められた．

本研究は昭和58年度厚生省神経疾患研究委託費No. 83-02により行なわれた．

文　　献

1) 植川和利，ほか：Myoglobin(Mb)の代謝回転，尿中排泄の機序について．日本神経学会総会，1981年5月，東京．
2) 植川和利：神経筋疾患におけるミオグロビン測定の臨床的評価．熊本医学会誌，55：158，1981．
3) Hsu, S., Raine, L., Fanger, H.: A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase methods and an avidin-Biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. American Society of Clinical Pathologists, 75: 734, 1981.
4) 出田透，ほか：筋病変とミオグロビンの局在—酵素抗体法(PAP法)による観察—厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」第二班（三好班），昭和57年度研究報告書，1983，p. 171.
5) 三好和夫，ほか：ミオグロビンと筋疾患並びに心筋疾患．筋の構造と機能．酒井敏夫，遠藤実，杉田秀夫編集，医学書院，東京，1977，pp. 581—594.
6) 荒木淑郎，ほか：Duchenne型筋ジストロフィー症にみられるopaque fiberの筋構造蛋白に関する研究．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」第二班（三好班），昭和57年度研究報告書，1983，p. 202.

43）ヒト骨格筋におけるエノラーゼアイソザイムの局在について
——免疫組織化学的検討——

杉村公也*

研究協力者　衣斐　達*　古閑　寛*　杢野謙次*
祖父江逸郎*　佐橋　功**　加藤兼房***

はじめに

エノラーゼ(2-phospho-D-glycerate hydrolase, EC 4, 2, 1, 11）は嫌気性解糖系酵素であり，分子量約10万で免疫学的に異なる α, β, γ の3種類のサブユニットから成る二量体である．$\alpha\alpha$ 型は広く各組織に分布し，$\gamma\gamma$ および $\alpha\gamma$ 型は神経系に特異的に分布するとされ，neuron specific enolase（NSE）と呼ばれているが，神経内分泌組織および神経内分泌由来の腫瘍にも存在することが明らかになっている．いっぽう $\beta\beta$ および $\alpha\beta$ 型は骨格筋および心筋に特異的に分布し，muscle specific enolase（MSE）と呼ばれている[1]．我々はこの α, β, γ の各エノラーゼサブユニットについてヒト正常骨格筋での局在について免疫組織化学的に検討した．

方　法

ヒト $\alpha\alpha$ および $\gamma\gamma$ エノラーゼは剖検脳から，$\beta\beta$ エノラーゼは剖検腸腰筋から精製した[2)3)]．精製した各エノラーゼを家兎に免疫し抗血清を作製した．各エノラーゼに対する抗血清はそれぞれのサブユニットに対し特異的であり交差反応は示さなかった．

生検骨格筋はただちにイソペンタンドライアイスで凍結し，クリオスタットにて8μm厚の連続切片を作製し，風乾後，冷アセトンで2分間固定し以下の染色を行なった．

各エノラーゼサブユニットに対する免疫組織化学的染色は，次に示すように，二抗体法，PAP法，Biotin/Avidin法にて行なった．

二抗体法

1．冷PBSにて5分間洗浄
2．2％山羊血清アルブミンにて10分間インキュベート
3．冷PBSにて10分間洗浄
4．PBS希釈家兎抗エノラーゼ血清にて30分間室温でインキュベート
5．冷PBSにて30分間洗浄
6．PBS希釈ペルオキシダーゼ標識山羊抗家兎IgG抗体（あるいはペルオキシダーゼ標識protein A）にて30分間室温でインキュベート
7．冷PBSにて30分間洗浄
8．0.3％過酸化水素含有DABにて30分間インキュベートし発色
9．蒸留水洗浄後，脱水，オイキットで包埋

PAP法（Dako　PAP kit）

1．冷PBSにて5分間洗浄
2．PBS希釈正常豚血清にて20分間室温でインキュベート
3．過剰血清を切片より除去
4．PBS希釈家兎抗エノラーゼ血清にて20分間室温でインキュベート
5．冷PBSにて20分間洗浄
6．PBS希釈豚抗家兎IgG抗体にて20分間室温でインキュベート

＊名古屋大学医学部第一内科
＊＊愛知医科大学第四内科
＊＊＊愛知県コロニー研究所生化学

7．冷 PBS にて20分間洗浄
8．PBS 希釈ペルオキシダーゼ——抗ペルオキシダーゼ家兎 IgG 複合体(PAP)にて20分間室温でインキュベート
9．冷 PBS にて20分間洗浄
10．0.3%過酸化水素含有 AEC にて30分間室温にて発色
11．蒸留水にて洗浄後ゼラチンゼリーで包埋

Biotin/Avidin 法(Vectastain　ABC™ kit)

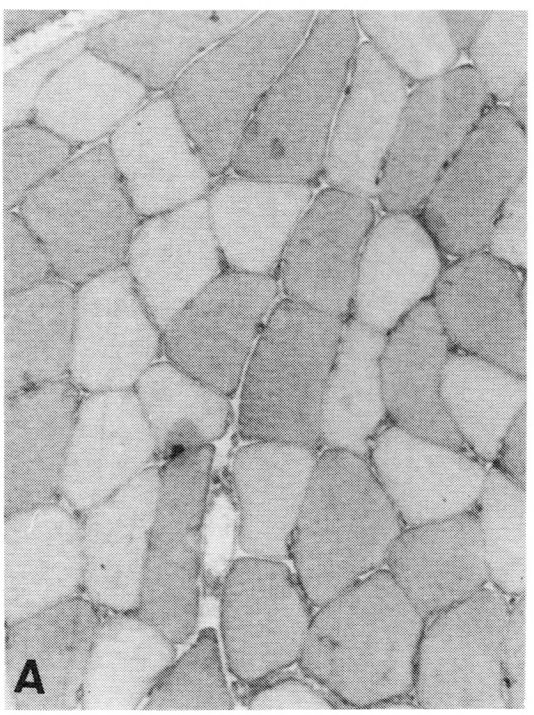
1．冷 PBS にて5分間洗浄
2．PBS 希釈正常山羊血清にて20分間室温でインキュベート
3．過剰血清を切片より除去
4．PBS 希釈家兎抗エノラーゼ血清にて30分間室温でインキュベート
5．冷 PBS にて10分間洗浄
6．PBS 希釈ビオチン化山羊抗家兎 IgG 抗体にて30分間室温でインキュベート
7．冷 PBS にて10分間洗浄
8．PBS 希釈アビジン—ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体にて30分間室温にてインキュベート
9．冷 PBS にて10分間洗浄
10．0.3%過酸化水素含有 AEC にて室温で30分間発色
11．蒸留水で洗浄後ゼラチンゼリーにて包埋

対照試験として以下の項目を行なった．

1．一次抗体を省略
2．一次抗体に代え正常家兎血清を使用
3．一次抗体に代えβエノラーゼで吸収した抗βエノラーゼ血清を使用
4．二次反応試薬を省略
5．発色時過酸化水素の省略

ATPase 染色

連続切片にて Guth & Samaha 法[4] にて myosin ATPase (pH 10.6, 4.5, 4.2) 染色を行なった．



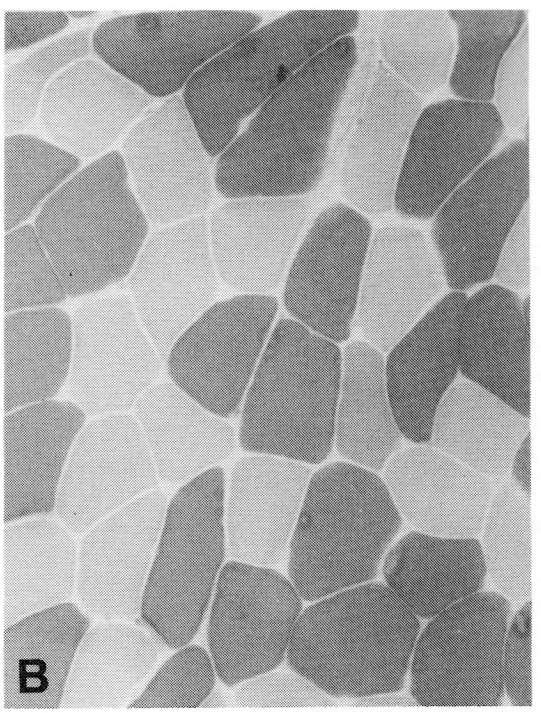


図1 A　βエノラーゼ，二抗体法
B　ATPase (pH 10.6)×250　βエノラーゼは type 2 線維に強く染色される．

結　　果

染色結果を図1～図3に示す．γエノラーゼサブユニットは骨格筋線維にはほとんど染色されず，βサブユニットについては強い反応を示し，αサブユニットについては軽度に反応した．ATPase染色と比較するとβエノラーゼサブユニットおよびαエノラーゼサブユニットはtype 2線維に多く局在し，2A線維と2B線維間に差は見られなかった．二抗体法とPAP法，Biotin/Avidin法と比較したが反応パターンは3者において同様であったが，一次血清の濃度は後2者において低濃度で染色可能であり，筋細胞質内の微細構造もより鮮明であった．

対照試験では一次抗体を省略または正常家兎血清，吸収血清を用い，あるいは二次試薬を省略したものでは反応が見られなかった．

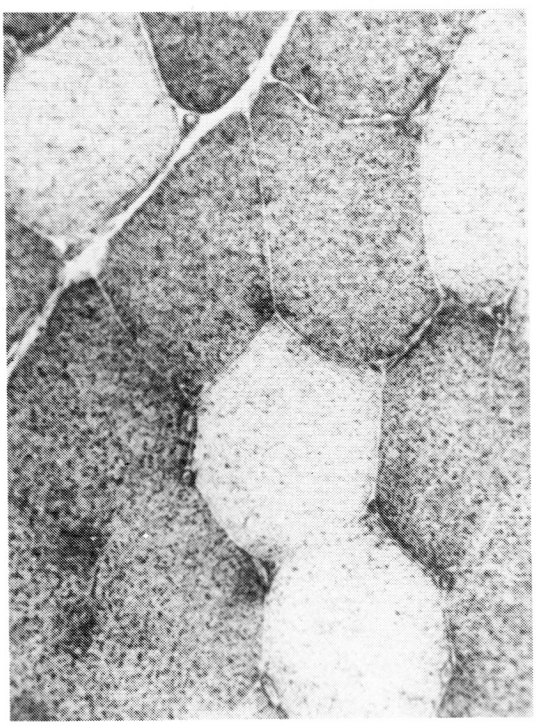


図2　βエノラーゼ，PAP法 ×500　二抗体法と比較し筋細胞質の微細構造が染色される．

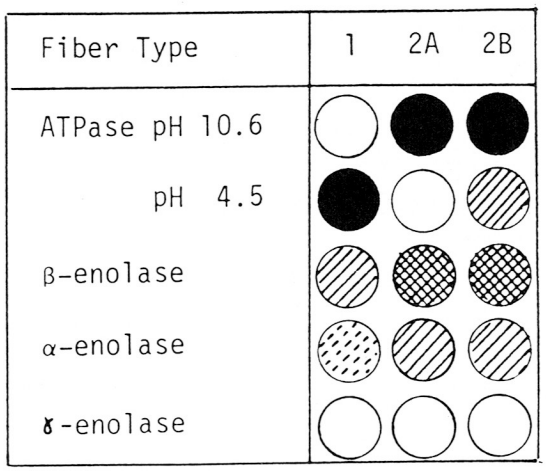


図3　エノラーゼ各サブユニット染色とATPase染色との比較．

考　　察

正常ヒト骨格筋はmyosin ATPase染色によりtype 1線維とtype 2線維に分けられる．Type 1線維は，slow twitch fiberであり好気的エネルギー産生系酵素が優位に存在する．いっぽうtype 2線維はfast twitch fiberであり嫌気的エネルギー産生系酵素が優位に存在する．エノラーゼは嫌気的解糖系酵素であり，我々の免疫組織化学的手法によってもtype 2線維に多く局在することが証明された．またエノラーゼの各サブユニットについても神経系に特異的に存在するγサブユニットは骨格筋にはほとんど局在せず，αサブユニットについてはわずかにtype 2線維優位に染色されたがその反応性は弱く，βサブユニットについては充分な反応が得られかつtype 2線維に強く染色され，βサブユニットが骨格筋に特異的であるということの裏づけとなった．

血中βエノラーゼ値が各種神経筋疾患で測定され，CKと同様に筋疾患のmarkerとなることが示されており[5]，さらに我々の結果よりエノラーゼがtype 2線維優位に局在することよりtype 2線維障害のmarkerとなることが期待された．今後，type 2線維障害を来たす各種神経筋疾患において，βエノラーゼの動態を検討することによって，その成因の解明へと発展させたい．

ま と め

正常ヒト骨格筋において α, β, γ の各エノラーゼサブユニットの局在を免疫組織化学的に検討した.

α および β サブユニット抗体に対し骨格筋線維で反応が見られ, 特に β サブユニット抗体に対する反応がより明らかであった. Fast twitch fiber であり嫌気性解糖系酵素の多い type 2 線維により強い反応を示すことが確認された.

文 献

1) 加藤兼房, 清水温子ら：疾患マーカーとしてのエノラーゼアイソザイム—3種類のサブユニットのヒト各組織での分布. 医学のあゆみ, 126：172—174, 1983.
2) Kato, K., Ishiguro, Y., et al: Distribution of nervous system specific forms of enolase in peripheral tissues. Brain Res., 237: 441—448, 1982.
3) Kato, K., Okagawa, Y., et al: Immunoassay of human muscle enolase subunit in serum: a novel marker antigen for muscle diseases. Clin. Chim. Acta, 131: 75—85, 1983.
4) Guth, L., and Samaha, F.J.: Research Note: Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. Exp. Neurol., 28: 365—367, 1970.
5) 杢野謙次, 陸重雄ら：神経筋疾患における muscle-specific enolase 値の分析—新しい筋障害の指標としての可能性について—. 臨床神経, 23：852—860, 1983.

44）ヒト筋型 Carbonic anhydrase III（CA-III）
——ELISA 系の確立と神経筋疾患への臨床応用について——

田代邦雄*

研究協力者　島　功二*,***　続　佳代**
日比　望**　塚田　裕**

はじめに

最近，筋型 carbonic anhydrase III（CA-III）がヒト骨格筋より精製され[1]，筋肉特異のアイソザイムとして筆者らを含め，その臨床応用が試みられている[2)~6)]．従来の筋疾患マーカーである CK，aldolase が Type II fiber に多いのと比較し，CA-IIIは，骨格筋中，主として Type I fiber に局在することから[7)8)]，CA-IIIが Type I fiber 異常をより良く血中に反映している可能性があり，新たな筋疾患マーカーとして，その臨床データの蓄積が期待されている．血清 CA-III は RIA 系により測定されているが，radioisotope を使用することにより幾つかの問題点が存在する．即ち CA-III標識用の Bolton-Hunter 試薬は高価であり，かつ短い半減期のため標識 CA-III はせいぜい 1～2 ケ月しか使用できず，さらに認可された施設のみでしか測定できないなどの点があげられる．そこで我々は，これらの問題点を克服し，簡便でしかも大量の検体を一度に測定可能な方法として CA-III の ELISA 系を開発したので報告する．

材料と方法

〈CA-IIIの精製と特異抗血清の作製〉剖検時えたヒト腸腰筋よりの CA-III の精製およびその特異抗血清の作製については，既に報告した[6)]．〈CA-III の radioimmunoassay〉Bolton-Hunter 法にて ^{125}I 標識 CA-III を作製し，二抗体法によった[6)]．〈CA-III の enzyme-linked-immunosorbent-assay, ELISA〉(1)免疫吸着体による特異抗体の精製：精製 CA-III 17mg を Porath らの BrCN 法[9)]で，Sepharose 4B，10ml に結合させ CA-III-Sepharose 4B を調製した．このゲルを1.6×5cm のカラムにつめ，20mM Sodium phosphate buffered saline，pH7.2（PBS）で平衡化した．これに抗 CA-III抗血清20ml を流して抗体活性のある分画（以下，特異抗体と略）をカラムに吸着させた．PBS で溶出液の OD_{280} が0.05以下になるまでカラムを良く洗浄後，3 M KSCN で特異抗体を溶出させ，直ちに0.9% NaCl に対して透析を行った．20ml の抗血清より得られた特異抗体の量は約15mg であった．(2)抗 CA-III 特異抗体の peroxidase 標識：Boorsma らの過ヨー素酸法[10)]に従い，特異抗体2mg に対し，peroxidase (POD) 2mg（RZ＝3，P-L Biochemical Co Ltd）を結合させた．POD—抗体結合物の分離は，Sephacryl S-300カラム（1.4×46cm）で行い，活性分画はそれぞれ別々に BSA とチメロサールを最終濃度 1%，0.01%となるように加え 4 ℃に保存した．(3)マイクロプレートへの抗体の吸着：特異抗体を40 μg/ml となるように0.1M $NaHCO_3$ で溶解し，この120μl ずつを96穴マイクロプレート（M129A, Dynatech Lab. Inc.）の各穴へ分注，室温 2 時間放置して抗体をプレートへ吸着させた．0.9% NaCl 200μl で各穴を 1 回洗浄後，0.5% BSA-PBS 150μl を加えて室温 1 時間反応させプレー

＊北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門
＊＊北海道大学医学部第一生化学
＊＊＊国立療養所札幌南病院神経内科

ト上の未反応の活性基をブロックした．0.9% NaCl で1回洗浄後，以下の assay 操作に用いた．

(4) immunoassay の操作：反応は全て室温で行い，洗浄はプレート各穴につき0.9% NaCl 200μl で行った．80μl の50mM Tris-HCl, pH7.5 (0.25 % BSA を含む) を抗体結合プレート各穴に分注しておき，次いで 20μl の CA-IIIスタンダードおよび検体血清 20μl を加えた．4時間放置して血清中の CA-IIIをプレート上へ結合させた（一次反応）．3回洗浄後0.5% BSA-PBS で適宜希釈した POD-抗 CA-III抗体 100μl を各穴に分注し，1晩反応させた(二次反応)．3回洗浄後，基質溶液0.1 ml を加え，POD 活性を測定した．10～30分後(発色程度により)，1N HCl 0.1 ml を加えて反応を停止させ，492nm の吸収を ELISA 用 auto-reader (Titertek Multiscan, Flow Lab, Inc.) で測定した．基質溶液は o-phenylenediamine を0.3 %の濃度となるように希釈緩衝液 (0.1M citric acid-0.2M Na_2HPO_4. pH5.5 containing 0.02% H_2O_2 and 0.01% thiomersalate) に用時溶解して用い測定は全て duplicate で行った．また至適条件の検討を行うとともに，神経筋疾患を主とする各種疾患60検体について CA-IIIを測定し，従来の RIA 系の測定値と比較した．

結　　果

〈ELISA における至適条件の検討〉

(1) マイクロプレートへの抗体の吸着

抗体蛋白を溶解する緩衝液として0.1M Carbonate buffer, pH8.3を用い各種抗体濃度につき検討したが，40μg/ ml の濃度で室温2時間吸着反応をさせると満足すべき結果が得られた．

(2) 一次反応，二次反応における反応時間と温度の影響

一次反応，二次反応における反応時間と温度を色々変えてその影響を検討してみたが，図1に示す如く，共に室温で反応を行い一次反応4時間，二次反応1晩で，最も満足のいく標準曲線が得られた．この条件を以後標準条件としたが，測定結果を早く得る必要があるときには，37℃で反応を行い一次反応1時間，二次反応2時間でも充分測定が可能であった．

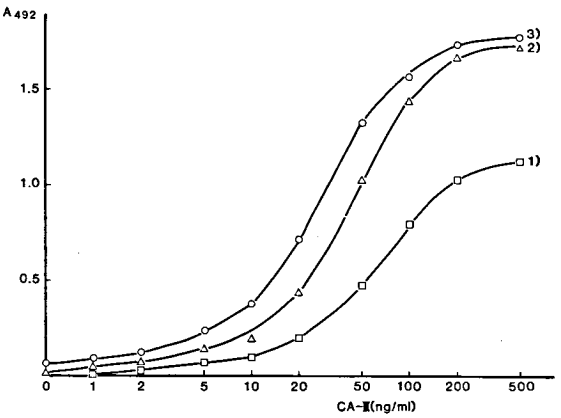


図1　一次反応，二次反応における反応時間と温度の影響，1)は一次反応1時間，二次反応2時間で反応温度37℃の条件下における標準曲線，2)は室温で各々2時間，4時間，3)は室温で各々4時間，1晩のそれを示す．

(3) 検体血清濃度の測定にあたえる影響

血清濃度が高いと，時として assay 系への抑制が認められることがある．従って血清を順次希釈して測定を行った．図2に示す如く血清濃度が50 %以上であると多少抑制効果が生じることがわかったので，検体血清の測定には血清を5倍に希釈

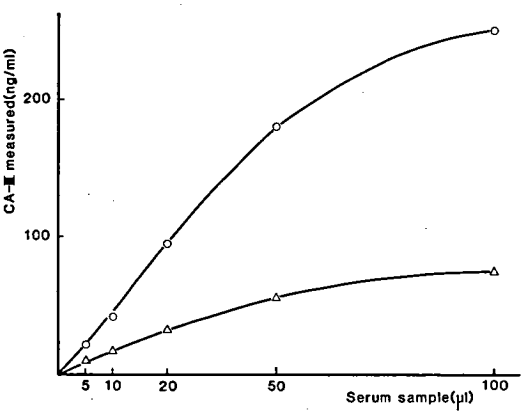


図2　血清濃度と免疫反応抑制効果
サンプル溶液100μl 中，血清50μl 以上(50%以上)では，抑制効果がみられることを示す．

することとした．図3は，以上求めた至適条件下での典型的な標準曲線であるが，2～200ng/mlのCA-IIIが，精度，再現性ともよく測定可能であった．

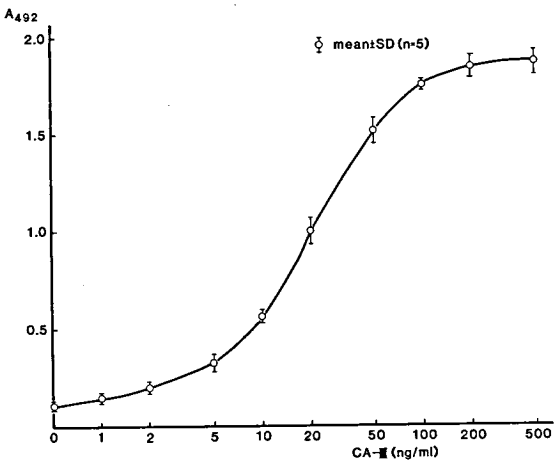


図3　ELISAによるCA-IIIの標準曲線

〈正常成人20例と神経筋疾患を主とする種々患者60例の血清CA-III値測定結果〉

正常成人での血清CA-III値は21.6±10.6ng/ml（平均±SD）であった．また各種疾患患者中，CA-IIIは，種々の筋ジストロフィー，多発性筋炎およびALSの一部で上昇を示した．また注目すべき点としてCK高値を示す2例の急性心筋梗塞例は，正常域にとどまり，CA-IIIがCKなどと比べ，より骨格筋特異のマーカーとなり得ることが強く示唆された（図4）．

〈RIA系との相関について〉

80例の検体血清についてRIAとELISAで，CA-IIIを測定し両者で得られた測定値を比較検討した（図5）．相関係数rは0.92（n=80, p<0.001）であり両者は良い相関関係を示した．

考　　察

最近発見された筋肉特異のcarbonic anhydraseアイソザイムIII型（CA-III）が，新たな筋疾患のマーカーエンザイムとなり得るかどうかを検索する目的で，我々は，まずヒト骨格筋よりCA-IIIを単一蛋白にまで精製し，その特異抗体を作製した．さらにこれを用いた酵素抗体法で，CA-IIIは主として筋組織中Type I fiberに局在することを証明した[7)8)]．またCA-IIIのRIA系を独自に確立し，神経疾患を中心とした各種疾患患者血清のCA-IIIを測定してみたところ，CA-IIIが筋疾患の特異的マーカーとなり得ることが強く示唆された[6)]．筋疾患のマーカーとして従来より用いられているCK, aldolaseがType II fiberに量的に多く存在するのに対し，CA-IIIは，Type I fiberに主として局在することから，CA-IIIがType I fiber異常をより鋭敏に反映する可能性が期待され，この点についての今後の検討が重要と思われた．しかし前述した如くRIA系による血清CA-IIIの測定には幾つかの制約があるため，これを克服し，より広汎な血清CA-III測定を行うことが，今後，CA-IIIの臨床応用において重要なことと思われた．そこで簡便であり一度に大量の検体を短時間にかつ精度も高く測定する方法として，CA-IIIのELISA系を開発した．本法はマイクロプレートを固相とし，ペルオキシダーゼを標識酵素とするサンドイッチELISA系である．測定感度をあげるため抗血清より，CA-III結合免疫吸着カラムを通して抗CA-III抗体を精製し，マイクロプレートへの吸着ならびにペルオキシダーゼ標識に使用した．これにより血清CA-III測定が，RIA系とほぼ同じ感度で測定可能となり，本法とRIA系との相関係数もr=0.92と良く相関した．本法にて60例の神経筋疾患を主とする各種疾患患者血清のCA-IIIを測定し，図4に示す如く，血清CA-IIIが筋疾患特異のマーカーとなることが強く示唆された．特に，CKが高値を示す急性期心筋梗塞例ではCA-III値は正常域にとどまり，CA-IIIがCKより，より骨格筋特異のマーカーとなり得ることが示されたことは重要と思われる．本ELISA系が開発されたことによって，今後，多数例の血清CA-III値測定が各種施設で可能となると思われ，従来の筋疾患マーカーと比較検討しながら，血清CA-III値測定の臨床的意義の追求がなされていくことが期待される．

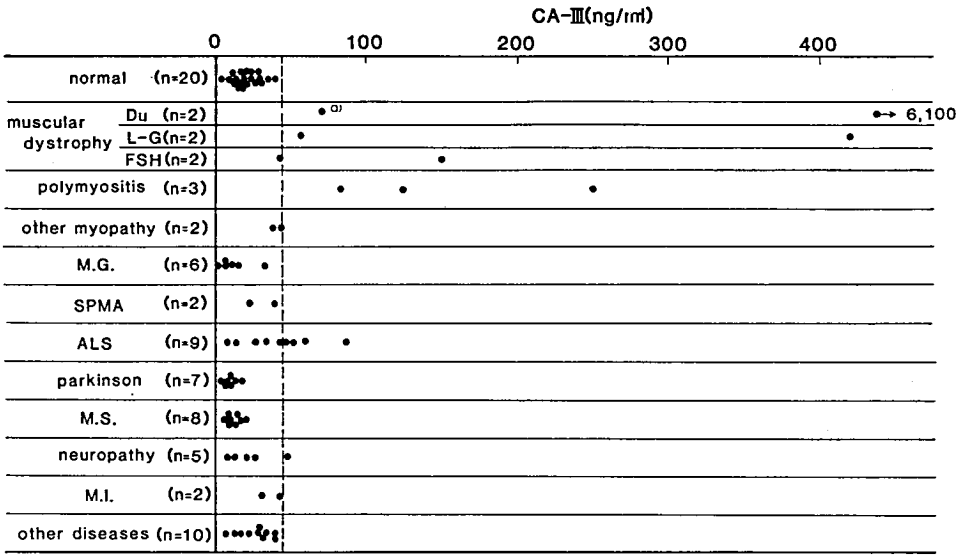


図4　正常人および各種疾患患者の血清 CA-III値
図中，Du は Duchenne，L－G は limb－girdle，FSH は facioscapulohumeral，M.G. は myasthenia gravis，ALS は amyotrophic lateral sclerosis，M.S. は multiple sclerosis，M.I. は myocardial infarction を示す．また SPMA は spinal progressive muscular atrophy を示し，ここでは，発症より10年以上経過し，かつ下位運動ニューロン障害にとどまる症例だけを含めている（KW は含まない）．a)は，Duchenne 型の terminal stage にある患者の血清であることを示す．

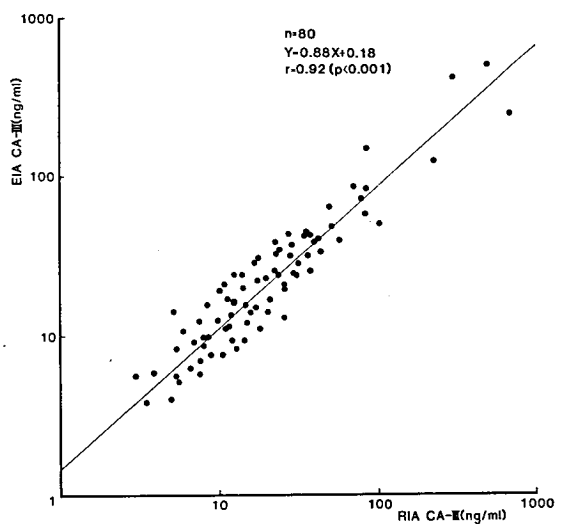


図5　血清 CA-III測定における RIA 系と ELISA 系の相関

結　論

1) CA-IIIの簡便でしかも高感度な ELISA 系を開発した．これにより 2 ～200ng/ ml の CA-III が精度，再現性共によく測定可能であった．血清 CA-III測定における本法と RIA 系との相関は，r＝0.92（n＝80，p＜0.001）と良い相関を示した．

2) 神経疾患を主とする各種疾患患者血清60検体を，本法にて測定し，CA-IIIが筋疾患特異のマーカーとなり得ることが強く示唆された．

3) 今後，各種施設で多数例の血清 CA-III測定を行なうことにより，CA-III値測定の臨床的意義の追求がなされていくことを期待したい．

文　献

1) Carter, N.D., S. Jeffery, A. Shels, Y. Edwards,

T.Tipler and D.A. Hopkinson : Characterization of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle. Biochem. Genet., 17 : 837-854, 1979.

2) Heath, R., S.Jeffery and N.D. Carter : Radioimmunoassay of human carbonic anhydrase III in dystrophic states. Clin. Chim. Acta, 119 : 299-305, 1982b.

3) Carter, N.D., R. Heath, S. Jeffery and C. Rodeck : Fetal plasma carbonic anhydrase III in Duchenne dystrophy. Lancet, i : 39-40, 1982.

4) Heath, R., I. Brown, S. Jeffery and N.D. Carter : Radioimmunoassay of carbonic anhydrase III levels in plasma as an index of tissue damage. Biochem. Soc. Trans., 10 : 109-110, 1982 a.

5) Heath, R. M.S. Schwartz, I. Brown and N.D. Carter : Carbonic anhydrase III in neuromuscular disorders. J. Neurolog. Sci., 59 : 383-388, 1983.

6) 島　功二，田代邦雄，日比　望，他：ヒト筋型carbonic anhydrase アイソザイムIII（CA-III）の radioimmunoassay（第1報）．臨床神経，23：892，1983.

7) Shima, K., K. Tashiro, N. Hibi, Y. Tsukada and H. Hirai : Carbonic anhydrase-III immunohistochemical localization in human skeletal muscle. Acta Neuropathol., 59 : 237-239, 1983a.

8) 田代邦雄，島　功二，日比　望，他：Carbonic anhydrase III（CA-III）の人骨格筋における局在について．筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究，第二班（三好班），昭和57年度研究報告書，1983，p. 126.

9) Porath, J., K. Aspberg, H. Drevin and R. Axen : Preparation of cyanogen bromide activated agarose gels. J. Chromatography, 86 : 53-56, 1973.

10) Boorsma, D.M. and J.D. Streefkerk : Periodate or glutaraldehyde for preparing peroxidase conjugate ?.J. Immunol. Methods, 30 : 245-255, 1979.

45）血清酵素と creatine kinase

植　田　啓　嗣*

研究協力者　畑　中　良　夫*　阿　部　千　史*　神　谷　和　恵*
宮　内　由　美　子*　久　保　田　道　子*

はじめに

さきに，大学生に高率に高 creatine kinase 血症がみられ，それが女子よりも男子に，安静時よりも運動時に，また β-blocker によってより顕著に現れること，そしてこの場合，異常率には，creatine kinase＞aldolase＞GOT＞GPT の傾向が認められたことを報告した[1)2)]．

Duchenne 型血清ではこの点どうなっているのか，あわせて，学生の高 creatine kinase 血症の成因にも更に検討を加えてみた．

方　法

血清酵素値の測定であるが，creatine kinase, LDH, GOT, GPT についてはモノテストを，aldolase については UV テスト（いずれもベーリンガー・マンハイム社製）を用い，Chemtek 式自動分析器を使用して測定した．

また，creatine kinase 並びに LDH のアイソザイムパターンの作製は，セルロース・アセテート膜を用いた電気泳動法によった．

結　果

A．学生の高 creatine kinase 血症の特長について

1．入学年度と血清 creatine kinase 値

4月から6月に至る定期内科検診中，適宜採血し，144名についての酵素値を求めてみた．

これを入学年度別に整理してみると，200u 以上を示した者（正常上限値は94u）は，1回生57名中11名（19.3%），2回生11名中1名（9.1%），3回生11名中1名(9.1%)，4回生54名中5名(9.3%)，5回生以上11名中1名（9.1%）であった．

新入生，とりわけ，そのなかの運動部所属の学生に高値をとる者が多かった．

2．外食回数と血清 creatine kinase 値（図1）

上記142名（無記入者2名を除く）について，外食回数との関係をみてみると，200u 以上の値を示した者は，0回8名中0名(0%)，1回59名中5名（8.5%），2回53名中7名（13.2%），3回22名中7名（31.8%）となった．

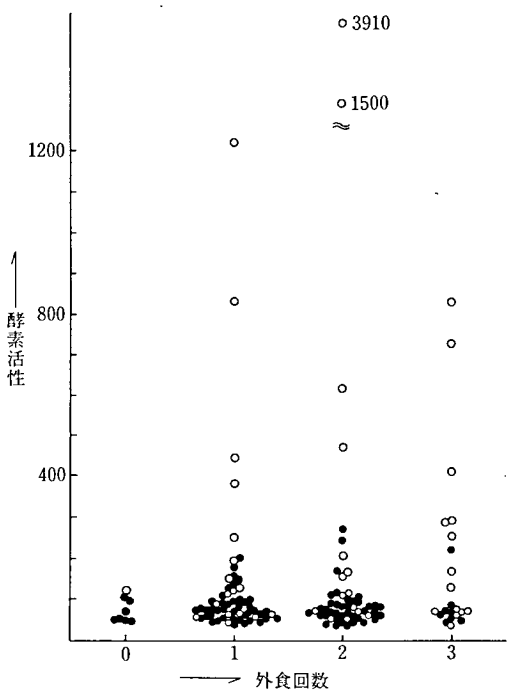


図1　外食回数と血清 creatine kinase 値
○運動部所属
●その他

*愛媛大学保健管理センター

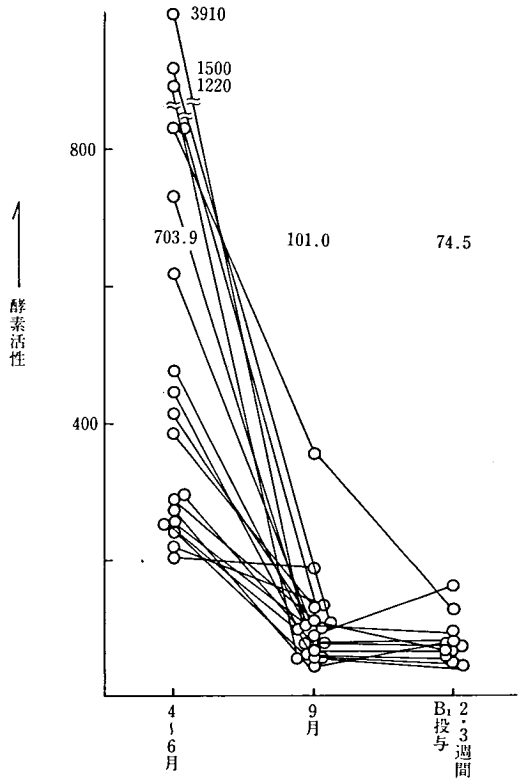
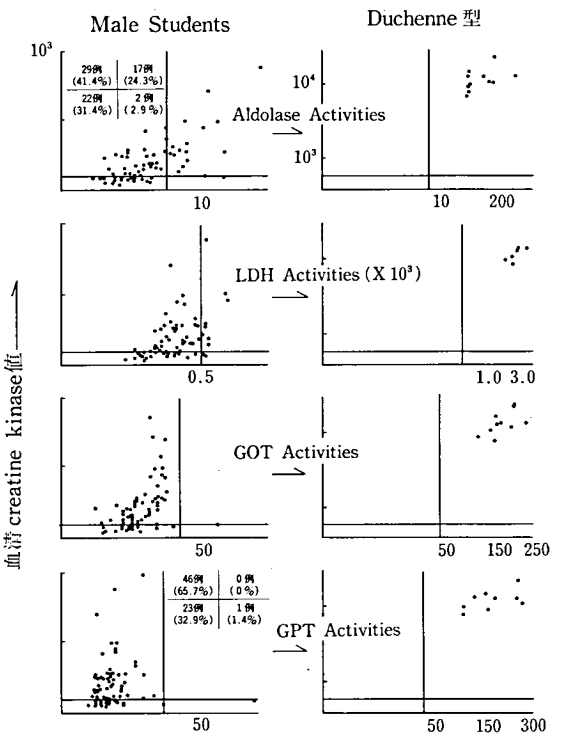


図2　高 creatine kinase 血症の酵素値の時間的推移



students：after exercise
——：それぞれの酵素の正常上限値
右の Duchenne 型には対数目盛を使用している．

図3　血清 creatine kinase 値とその他の血清酵素値

0回，1回と外食回数が多い者ほど，そしてこの場合も，そのなかの運動部所属の学生（図1の白丸印）に高値をとる者が多かった．

3．高 creatine kinase 血症者の追跡調査（図2）

上記144名中，200u 以上を示した者は19名いたが，夏休みを経過した9月の初旬に，なお200u 以上を示していた者は1名，その1名も，fursultiamine 25mg/日，2～3週間の経口投与により200u を下回った．

これを各時期の平均値で表わしてみると，4～6月は703.9u（19名），夏休み後が101.0u（19名），fursultiamine 投与後が74.5u（11名）となった．

B．学生の高 creatine kinase 血症と Duchenne 型血清との対比について

1．血清 creatine kinase 値とその他の血清酵素値（図3）

駅伝マラソン参加を前提に健康診断書を求めに来た男子大学生70名について，まず600m を走らせ，その後10分して採血し，creatine kinase, aldolase, LDH, GOT, そして GPT の5種の酵素値を求めてみた．

血清 creatine kinase では，正常上限値 94u を上回る者は46例，65.7%，一方血清の aldolase では，正常上限値7.6u を上回る者は19例，27.1%，そして両値とも正常上限値を上回った者（図3の成績の右上の区画）は17例，24.3%であった．

また，血清 LDH では，正常上限値500u を上回った者は11例，15.7%，そして creatine kinase とも正常上限値を上回った者は8例，11.9%であった．

一方，血清GOTでは，正常上限値42uを上回る者は1例，1.4%，しかしcreatine kinaseとも上限値を上回った者は1例もなかった．

また，血清GPTでも，正常上限値36uを上回った者は1例，しかしcreatine kinaseとも上限値を上回った者は，GOT同様，1例も認められなかった．

しかし，Duchenne型の6～10例（年齢4～10歳）では，いずれの酵素の活性値も正常上限値を上回っていた．

2．各種血清酵素値の上昇度（表）

上記運動負荷を与えた男子大学生の70名から，血清creatine kinase値が200u以上を示した15名を無作為に抽出し，その同一試料についてのcreatine kinase, aldolase, GOT, GPTの4酵素値をまとめてみた．その結果は，各酵素値の平均値ではcreatine kinase 502u, aldolase 9.9u, GOT 34u, GPT 18uであった．そしてこれを正常上限値との比率で表わしてみると，それぞれ5.3倍，1.3倍，0.8倍，0.5倍の値を示した．

一方，上記Duchenne型の8例では，その平均値はcreatine kinase 14650u, aldolase 143.1u, GOT 157u, GPT 165uであった．そしてこれを正常上限値との比率で表わしてみると，それぞれ155.9倍，18.8倍，3.7倍，4.6倍となり，したがって，どの酵素値が上昇を来し易いかという点では，Duchenne型と学生にみられる高creatine kinase血症とは類似の傾向を示した．

表　各種血清酵素値の平均値と上昇度（　）

	Case	CPK	Aldolase	GOT	GPT
(1) Normal upper		94	7.6	42	36
(2) Students	15	502	9.9	34	18
(2)/(1)		(5.3)	(1.3)	(0.8)	(0.5)
(3) Duchenne (4-10y.o.)	8	14,650	143.1	157	165
(3)/(1)		(155.9)	(18.8)	(3.7)	(4.6)

students：male, after exercise

3．血清のcreatine kinaseとLDHアイソザイムパターン（図4）

症例1　大学生，19歳，上記運動負荷を与え，血清creatine kinase値は1230u，LDHは488uを示した（図4，左上）．

症例2　大学生，22歳，上記運動負荷を与え，血清creatine kinase値は75u，LDHは291uを示した（図4，左下）．

症例3　Duchenne型，8歳，血清creatine kinase値は14200u，LDHは3260uであった（図4，右上）．

症例4　Duchenne型，12歳，血清creatine kinase値は1550u，LDHは1150uであった（図4，右下）．

学生にみられる高creatine kinase血症でも，Duchenne型でも，creatine kinaseのアイソザイムパターンの主体は均しくMM型であった（もっとも高血清creatine kinase値を示した学生のそれはbroardではあった）し，LDHのパターンでも，creatine kinase値が低値をとれば，LDHアイソザイムの特にV(M_4)型のpeakが共に低くなっていた．

考　　案

筋ジストロフィー症(1)，とりわけそのDuchenne型に高creatine kinase血症が認められることが江橋・杉田らによって見出され，既に20年の月日が経過している．そしてその後に，心筋梗塞(2)，粘液水腫(3)，脳・神経系疾患(4)にも高値をとることが指摘された．

しかし(4)の場合には，必ずしも上昇が認められないこともあり，且つ上昇を来たす酵素が脳型ではなく，骨格筋型をとっていることから，何故，脳・神経系の障害時に筋肉から酵素が漏出するのかに疑義がもたれていた．

私どもはこの点を家兎を用いて検討してみたところ[3)4)]，視床下部の交感帯の電気刺激で，またα-stimulator並びにβ-blockerの投与で同値が上昇することから，ある種の交感神経系の興奮が筋肉酵素の漏出の原因になるものと考えた．また，上昇は雌性よりも雄性家兎で起こり易い傾向もみ

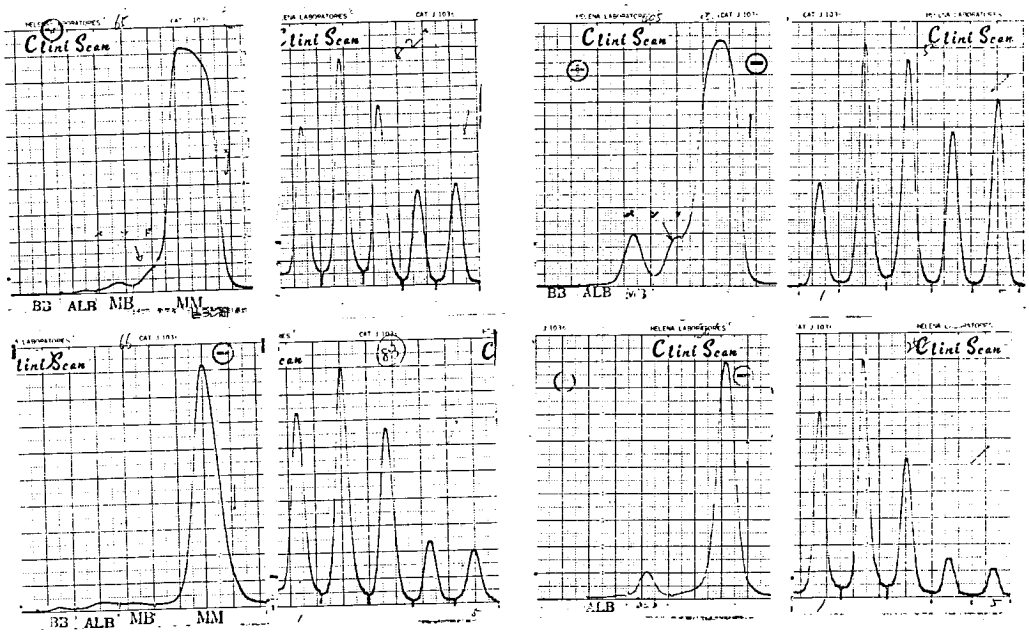


図4　血清 creatine kinase（左）と LDH（右）のアイソザイムパターン

左上：症例1　大学生，19歳　血清 creatine kinase 値　1,230u
左下：症例2　大学生，22歳　血清 creatine kinase 値　75u
右上：症例3　Duchenne 型，8歳　血清 creatine kinase 値 14,200u
右下：症例4　Duchenne 型，12歳　血清 creatine kinase 値　1,550u

られた．

ところで，年齢的には思春期並びに更年期に，女性より男性に，安静時よりは運動後に，また β-blocker 投与によっても起こりやすい，愁訴のない，神経学的にも異常所見の見当たらない高 creatine kinase 血症がみられる[1)2)]．男子大学生では，運動後で78%，安静時に34%が正常域値（94 u）を上回り，これらの知見を前述の家兎の成績に結びつけると，それは自律神経系やホルモン系の障害に起因している印象をうけていた．

しかし，本報告の結果は，1回生の，外食回数の多い，運動部に所属している者に多いこと（図1），そしてそれが夏休みを経過した9月には低値に戻ってくること（図2）を示している．したがって神経性因子によることもさることながら，これには，運動によって酵素の漏出がもたらされる栄養性の筋肉障害もまた無視できないものと考えたい．

当大学では，3～5年前，心肥大を伴う潜在性ビタミン B_1 欠乏症が多数存在していたが，その肥大は現在では殆んど認められなくなっている．しかし，B_1 は pyruvate dehydrogenase complex の一要素としてミトコンドリア膜にも存在しているが，膜の性状やホロ酵素の有り方に疑義がもたれる．

次いで，学生にみられる高 creatine kinase 血症が，血清酵素の動向の上で，Duchenne 型のそれと差異がみられるかを検討してみた．

Creatine kinase, aldolase, LDH, GOT, GPT

の5種の酵素は，いずれもDuchenne型では高値をとる．しかし，学生の高creatine kinase血症では，上記の順序で低値がみられ(図3)，両者には一見差異があるように思われたが，各酵素の正常上限値に対する上昇度を比較してみると，Duchenne型とも類似している傾向が認められた(表)．一方，creatine kinaseとLDHのアイソザイムパターンを比較してみた（図4）が，血清creatine kinase値が高い血清ではV(M_4)型のLDHのpeakが高く，学生の高creatine kinase血症の血清酵素はDuchenne型の初期と極めて類似した様相をとって漏出している印象をうける．

私どもは，LDHのアイソザイム組成は筋肉の種類で異なっている，Duchenne型血清のLDHはその時点で最も強い変化が起こっている筋肉に由来しているので，病勢の進展（M型組成筋がより早く消失）に伴い，血清のLDHもM組成が早期に減少を来たすと報告[5]しているが，図4の成績はそれとも，また本報告書中のCT所見から求められた見解[6]とも矛盾するものではない．

おわりに

4～6月に見出された男子大学生の高creatine kinase血症は，1回生に，外食生活者に，運動部所属者に多く認められたが，夏休みを経過して，殆んど全例正常域値に戻った．

creatine kinase, aldolase, LDH, GOT, GPTの各血清値の上昇度は一様ではなく，Duchenne型のそれと極めて類似していた．またアイソザイムパターンでも，creatine kinaseでは共にMM型が主体，LDHでは血清creatine kinase値が高い程V(M_4)型のpeakも高く，酵素漏出にはDuchenne型の初期と類似した傾向が認められた．

文　献

1) 植田啓嗣，畑中良夫，野田温子，久保田道子，谷垣朋子：筋肉酵素の漏出機構について．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」（三好班）昭和56年度研究報告書，1982，p.191—195.

2) 植田啓嗣，畑中良夫，宮内由美子，阿部千史，久保田道子：筋肉酵素の漏出について．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」（三好班）昭和57年度研究報告書，1983，p.184—186.

3) 植田啓嗣，伊藤友昭，大原俊樹，岸野文一郎，中田俊士，松本謙二，西川光夫：筋ジストロフィー症にみられる筋LDH Isozyme組成異常の意味．医化学シンポジウム，7：161—166，1967.

4) 植田啓嗣，大原俊樹，畑中良夫，西川光夫，塩谷彌兵衛：視床下部の電気刺激後の血清酵素．臨床神経学，17：506—512，1977.

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) 豊倉康夫，川井充，本吉慶史，国本雅也，中野今治，桑田隆志：骨格筋CT所見によるDuchenne型筋ジストロフィー症の病期分類．厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」（三好班）昭和58年度研究報告書．

46) Duchenne 型筋ジストロフィー症における ミオグロビンとクレアチンキナーゼの流出の特徴

川 井 尚 臣*

研究協力者　足 立 克 仁*　増 田 健 二 郎*　乾　俊 夫*
田 村 克 也*　西 田 善 彦*　西 野　洋*
三 好 和 夫**

私達はさきに血清ミオグロビン (Mb) の変動パターンから各種の筋疾患や心筋疾患における筋崩壊量を計算し，その成績を発表してきた[1]．

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) では顕著な血清クレアチンキナーゼ (CK) 活性値の上昇がみられ，とくに初期の幼児で著しい．この程度は筋中の他の酵素や血清 Mb に比して特異的に上昇しているかのごとくみえる．今回はこの点を明らかにするため，DMD の血清 Mb 値と血清 CK 活性値の両者から筋崩壊量を計算し，DMD の成績と心筋梗塞など他の疾患のそれと比較研究した．

対象と方法

対象は DMD (2～25歳) 17例，心筋梗塞13例そして，悪性高熱 1 例，亜悪性高熱 1 例，多発性筋炎 2 例，LDH-M 型欠損症 (西村ら) 1 例であり，また，健常人 (21～46歳) 120例 (男52例，女68例) を対照とした．

Mb はラジオイムノアッセイ[2] (RIA) (当科開発) により，また，血清 CK は江橋法[3]，一部 Rosalki 法[4] にて測定した．

筋崩壊量の計算法は Roberts ら[5] に従って次の式によって行った．

まず，心筋梗塞について

梗塞心筋量 (IS)

$$= (K)\ (BW)\ (Xr)$$

$$K=\frac{DV}{P_x\ (X_N-X_I)}$$

$$Xr=\int_0^T f(t)dt=E(T)+kd\int_0^T E(t)dt$$

但し，XはMbあるいはCK，$f(t)=\frac{dE}{dt}+kd\cdot E$，Mb については$\frac{DV}{P_{Mb}}=0.6\,\ell/kg$，$Mb_N-Mb_I=2.2$ mg/g，CK については $DV=44m\ell/kg$，$P_{CK}=0.15$，$CK_N-CK_I=500$ IU/g をそれぞれ用いた．

また，DMD は次のごとく一日の筋崩壊量 (DS_I) を求めた．すなわち，

$$DS_I=(K)\ (BW)\ (Xr)$$

$$K=\frac{DV}{P_X\cdot X_N}$$

$$Xr=E(T)+kd\cdot 24(h)\cdot\overline{X}$$

但し，$Mb_N=5mg/g$，$CK_N=3,200$ IU/g

BW：体重 (kg)，DV：体重1kg に対する X の拡散分布相 (ℓ/kg)，P_X：流出 X が血中に出現する割合，X_N：正常(心)筋1g 中の含有 X 量，X_I：梗塞心筋1g 中の含有 X 量，kd：X の血中減衰率 (h^{-1})，f(t)：単位時間あたりの流出量，E(t)：発症後の血清 X 値から発症前値を減じた値，T：血清 X 値が前値に復するまでの時間，$\overline{X}$：血清 Mb 値あるいは血清 CK 活性値．江橋法による血清 CK 活性値 (U/mℓ) は3.2倍し IU/mℓに換算して計算に用いた．

結　　果

1) 心筋梗塞症例

＊徳島大学医学部第一内科
＊＊冲中記念成人病研究所

図1は，心筋梗塞13例についての血清Mbと血清CKの経時的変動パターンを平均値で示した．

図のごとく，血清Mbは，胸痛発作直後より上昇し，9時間で最高値1,400ng/mℓに達し，その後下降，48時間以後前値近くになっている．これに対して血清CKは，Mbに遅れて発症後，約20時間で最高値（400U/mℓ）に達し，以後下降している．

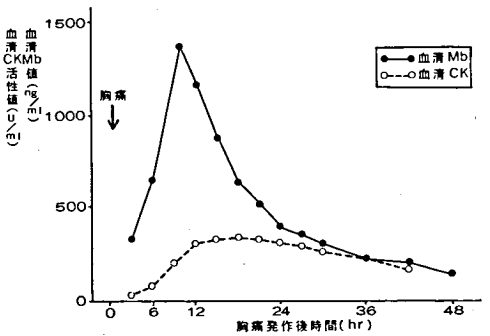


図1　急性心筋梗塞例における血清Mb値ならびに血清CK活性値の経時的変動—13例の平均値—

梗塞量の平均値を，この変動パターンから方法の項で述べた計算式で算出した．この場合，血清Mbの減衰率kdは0.12/h，CKのそれは0.036/hと算出され，これらを用いた．結果は平均値では，血清Mb値からの梗塞量は42gの数値が得られ，血清CK値からのそれは46gの値が得られた．すなわち，MbからのものとCKからのものはほぼ同じレベルの値であった．

心筋梗塞個々の症例での成績を図2にプロットで示した．個々の症例については，それぞれのkd（Mb 0.06～0.18/h，CK 0.016～0.053/h）を用いた．これら症例では，Mbから算出した梗塞量6～105gとCKからのもの3～93gであり両者の間にはr＝0.75の相関がみられた（図2）．

2）DMD症例

DMDの血清Mb値，血清CK活性値の年齢による変動を図3に示した．幼児期では血清Mb値1,000ng/mℓ，血清CK値2,000U/mℓのごとく高く，年齢経過とともに下降し12～15歳以後はほぼ横ばいになっている．

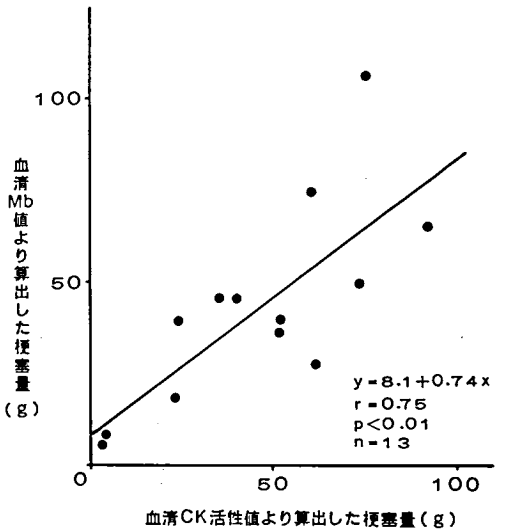


図2　急性心筋梗塞症例における血清Mb値から算出した梗塞量と血清CK活性値より算出した梗塞量との関係

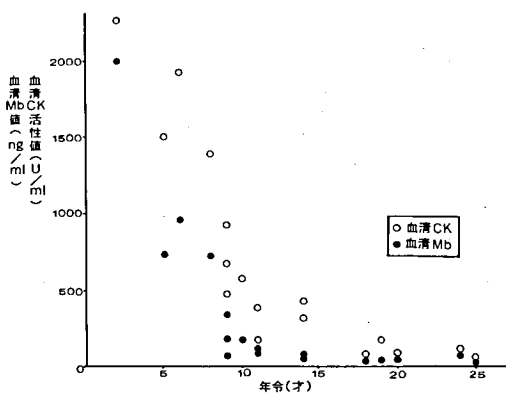


図3　DMD症例の血清Mb値ならびに血清CK活性値の年齢経過

図4にDuchenne型の個々の例の筋崩壊量の成績をプロットで示した．

心筋梗塞の場合と同じ条件で計算した成績である．なお，さきに述べたごとく本症ではMb，CKは筋より持続的に流出しているので1日の筋崩壊量を算出した．

結果は図のごとく，全体については，MbからとCKからとの筋崩壊量の間にr＝0.87の相関がみられる．

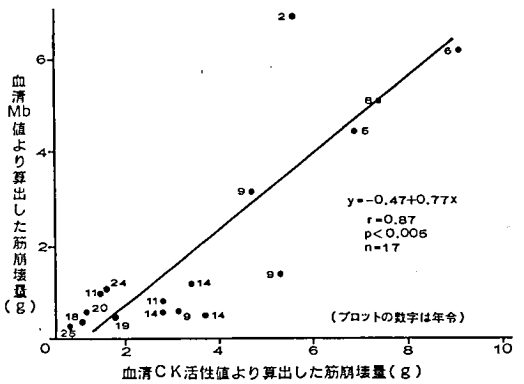


図4　DMD症例における血清Mb値から算出した筋崩壊量と血清CK活性値から算出した筋崩壊量との比較

なお，DMDの筋崩壊1日量は幼児期のもので大きく，例えば10歳以下の量の多いもの（Mbについて2g，CKについて4g以上）5例ではMbからの値3.1～7.0g（平均5.1g），CKからの値4.2～8.6g（平均6.4g）であった．これらに対し，10歳以上の年長者では筋崩壊量の絶体量が少なく，また，数値にばらつきがみられ，Mb，CKの逸脱に関して別の機序が考えられる．

3）DMD以外のミオパチー症例

いずれも症例が少ないが，次の結果が得られた．

悪性高熱の1例（22歳，男）では血清Mbは最高値24,000ng/mℓ，血清CK値も17,000U/mℓと極めて高値を示した．Mbは3日で，またCKは4日で正常値近くまで下降した．肉眼的にMb尿も認められた．筋崩壊量は同様に計算したが，この例ではMb値からのもの360g，CK値からは550gとなった．

亜悪性高熱の1例（22歳，男）での例の血清Mbは最高値2,500ng/mℓ，CK値は9,000 IU/mℓ（Rosalki法）であった．筋崩壊量はMbからは64g，CKからも64gであった．

多発性筋炎の症例1（40歳，女）では血清Mb，血清CK，それぞれ最高値3,700ng/mℓ，1,700U/mℓと上昇がみられ，約3カ月でほぼ正常値に下降した．筋崩壊量は血清Mbからは34g，血清CKからは66gと計算された．症例2（34歳，女）では血清Mb，血清CKの最高値，それぞれ2,000ng/mℓ，1,085U/mℓで，この例の筋崩壊量はそれぞれ16g，33gであった．

LDH-M型欠損症（18歳，男）（浜松医大，西村らの症例）．本例は西村氏らの例で，前腕阻血試験時の血清Mb値測定の依頼を受けて測定した．CK値は同氏らのものである．それぞれの数値から筋崩壊量を計算した．計算は前腕の重さを体重の1/50とし，全身の血中に拡散した濃度をほぼ0として行った．この場合の推定筋崩壊量は，Mbからのもの2.6g，CKからのものは2.2gとなった．

4）健常人

血清Mb値は，男52例，女68例の平均値13.1±6.1ng/mℓであり，血清CK活性値は，男18例，女20例の平均値12.2±4.5U/mℓ（江橋法）であった．これら平均値から上述DMDにおける場合と同様に筋崩壊量を算出した結果，Mb値からのもの0.27g，CK値からのもの0.19gであった．

図5に前述の各種疾患（代表例）の血清Mb値と血清CK値からえた筋崩壊量の成績を同時にプロットした．対数プロットであるが，これでは各種疾患が勾配ほぼ0.9の直線に沿ってみられる．すなわち両者は，ほぼ同じオーダーの値を示していることがわかる．

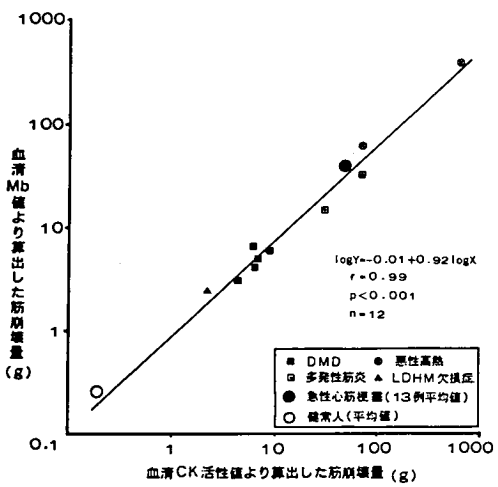


図5　各種の筋，心筋疾患において血清Mb値から算出した筋崩壊量と血清CK活性値から算出した筋崩壊量との関係

考　　察

筋ジストロフィー症の成因と発症機序の解明のために，筋崩壊時における筋中各種成分の血中への逸脱の様相を明らかにすることは一つの重要な分野である．私達は，このことについてCKとMbの両者からの研究を行ってきた．

本報告では，Mb，CKそれぞれの血中流出パターンから筋崩壊量を計算し，比較研究した．この場合DMDでは他の酵素に比べ血清CK活性値が一見極めて高値を示すことから，本症におけるCKの血中流出に関して，何らかの特別な異常が存在するのではないかとの考えを考慮に入れた．

方法としては，まず，心筋梗塞について，CK，Mb両者から筋崩壊量，すなわち梗塞量(IS)を計算し，計算過程における各種の条件を設定し，ついで，これと同じ条件によってDMDの筋崩壊一日量を計算した．

筋崩壊量（梗塞量）の計算はRobertsらに従って本文中に述べた式を用いて行った．

結果は，急性心筋梗塞13例の平均値で，ISはMbからの梗塞量42g，CKからのもの46gと計算され，両者の値は，ほぼ一致していた．なお，これらの成績については別に発表してある[6]．そして，これと同じ条件で計算したDMDの筋崩壊1日量は，10歳までの5例では，Mbからのもの3.1～7.0g，CKからのもの4.2～8.6gであり，同じレベルの数値が得られた．ただし，DMDの場合，年齢の比較的高い症例（14～25歳）は，筋崩壊量は少なくまた，崩壊量の数値にかなりのばらつきがみられた．このことから本症では筋の崩壊のメカニズムが年長例と若年例では異なっていることが考えられた．

なお，DMD以外の2，3のミオパチー，悪性高熱，多発性筋炎，LDH-M型欠損症などについても，1回の発症・経過における筋崩壊量を同様に計算し，症例数は少ないがやはり血清Mbからのものと血清CKからのものが同じレベルであるとの成績をえた．

最後に，同じ式と条件のもとに，健常人の血清Mb平均値13ng/mℓと血清CK平均値12U/mℓから1日筋崩壊量を計算した．結果は，それぞれ0.27g，0.19gとやはり同じレベルの数値がえられた．

筋の崩壊に関しては，心筋梗塞，筋ジストロフィー症，その他各種ミオパチーでは，その成因，筋内成分の逸脱機序などそれぞれに異なることは明らかであるが，CKとMbに関し本文の式に含まれる各種の条件を同一にした場合に，両者から計算した筋崩壊量がほぼ同じレベルであったことは興味深い．

とくにDMDでは最初に触れたように，血清中のCKレベルが一見特異的に高くみえ，そこに何らか特殊な意味が考えられていただけに注目される．

また，以上のことが，健常人についても，ほぼあてはまることも興味深い．健常人におけるCK，Mbの血中存在は，一概に筋よりの逸脱といってよいか否か今後も検討したいが，その流出は，DMDにおけるごとく持続流出であることに意味があると思う．

もちろん，上述の成績に関しては，文中にも述べたように，現時点における，いくつかの設定条件があり，今後の実験データによって修正してゆきたい．しかし，これらの成績に基づいて，さらに各種疾患における筋崩壊機序の共通性と差異を筋組織像や代謝の面を加えて究明してゆきたい．

ま　と　め

DMDの成因と発症機序の究明を目的として，筋崩壊量の特徴をMbとCKの血中流出の面から追究した．まず，急性心筋梗塞の梗塞量をこの両者から計算して同じレベルの値がえられることを確かめ，同じ条件によってDMDの1日筋崩壊量を計算し，やはり同じレベルの結果を得た．このことはその他の2，3のミオパチーについてもえられた．とくに，健常人の血清中のMbとCKからも同じ成績がえられた．Mb，CKの血中流出に関しては，DMDに特別の意味のつけ難いことが示唆された．

文　　献

1) 川井尚臣，足立克仁，今井幸三，乾　俊夫，増田健二郎，藤本浩史，三好和夫：血清ミオグロ

ビンの変動パターンからみた筋・心筋疾患ならびに運動時の筋崩壊量の推定．厚生省・筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究，三好班，昭和57年度研究報告書，1983，p.174

2) Miyoshi, K., Saito, S., Kawai, H., et al.: Radioimmunoassay for human myoglobin: methods and results in patients with skeletal muscle or myocardial disorders. J. Lab. Clin. Med., 92：341, 1978

3) Ebashi, S., Toyokura, Y., Momoi, H. and Sugita, H. : High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy. J. Biochem., 46：103, 1959

4) Rosalki, S.B.: An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. J. Lab. Clin. Med., 69：696, 1967

5) Roberts, R., Henry, P.D. and Sobel, B.E.: An improved basis for enzymatic estimation of infarct size. Circulation, 52：743, 1975

6) 三好和夫，川井尚臣，足立克仁，斉藤史郎：心筋梗塞と血清ミオグロビン．循環制御，4：111, 1983

47）各種萎縮筋モデルにおける glucose uptake

庄　司　進　一*

糖の細胞内への取り込みは，筋での糖質代謝の一つの律速段階と考えられる．それは糖代謝の主要律速酵素活性と glucose uptake がよく平行する[1]ことから言えよう．glucose は嫌気解糖系，クレブス回路系，電子伝達系の主要エネルギー産生系への共通の基質とも言える．以上二つの理由から各種萎縮筋モデルにおけるエネルギー産生系の変化をみる良い指標として glucose uptake が考えられる．

筋を構成する筋線維はタイプによって代謝パターンが異なるが，同じタイプに属する線維でも筋によって代謝パターンが同じかどうか，同じ筋の同じ線維タイプでも萎縮過程で代謝パターンが同じかどうか等不明である．従って萎縮による線維タイプのプロポーションの変化やそれぞれの線維タイプのヒストグラムから代謝パターン，この場合は glucose の利用率を算出することは現段階では難かしい．下腿部にある屈筋と伸筋で赤筋と白筋の代表とも言える soleus と extensor digitorum longus (EDL) の両筋を筋ごと用いて glucose uptake を *in vitro* で測定した．

萎縮筋の測定の前に *in vitro* での passive stretch の影響，赤筋・白筋の比較を行った．萎縮筋モデルとしては絶食，脱神経，固定等を検討した．

材料と方法

【実験動物】 実験開始時50～70g の Wister 系メスラットを用いた．

passive stretch を加える場合は，足関節をそれぞれ flexion と extension の extreme position にし，筋を取り出す時の生体内での length に double clip で固定した．**絶食**は固形試料を与えず，飲水を自由にとらせた．**脱神経**はエーテル麻酔下に大腿骨大転子レベルで座骨神経を5mm 以上切除した．反対側に sham operation を行い対照とした．脱神経が行われると直後よりその側の後肢を引きずった．筋を取り出した後に，脱神経の部位を確認した．**固定**はエーテル麻酔下に足関節を flexion と extension の extreme position にギプス固定した．

【glucose uptake 測定】 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer に5mM sodium pyruvate, 0.1mM 3-0-methyl glucose, 3-0-methyl-[1-^{3}H] glucose を含む medium を95% O_2/5% CO_2 で飽和させ筋を incubate した[2]．37℃30分の incubation 後に筋を取り出し，0℃の0.9% NaCl 溶液中で40分毎に液を換え3回洗浄した．筋は腱を取り除き，湿重量を測定し，Soluene-350で溶解後，酢酸で中和し，triton X-100 660ml-POP 11g-POPOP 0.2g-toluene 1340ml のシンチレーション溶液中で count した．medium の一部も同様に count し distribution ratio を求めた．[U-^{14}C] sucrose を 3-0-methyl-[1-^{3}H] glucose の代わりに用いて，extracellular space を求め blank として glucose uptake の算出に用いた．

$$\text{distribution ratio} = \frac{\text{muscle の count}}{\text{medium の count}}$$

$$\text{glucose uptake} = (\text{distribution ratio}) - (\text{extracellular space})$$

結　　果

passive stretch *in vitro* の影響

表1 A の如く EDL と soleus 両筋で stretched state の方が non-stretched state に比べ有意に glucose uptake が高かった．

EDL と soleus の比較

表1 B の如く soleus が EDL に比べ有意に

*信州大学医学部第三内科

表 1

		Glucose Uptake	N	t	P
A					
EDL	Non-stretched state	11.4 ± 2.0	4	7.34	< 0.005
	Stretched state	20.8 ± 1.8	5		
Soleus	Non-stretched state	16.4 ± 2.0	5	8.23	< 0.005
	Stretched state	24.6 ± 7.4	5		
B					
EDL		16.8 ± 3.2	8	3.30	<0.005
Soleus		26.4 ± 7.2	8		

Glucose Uptake ; n moles / g w w muscle / h at 37°c, 0.1 mM

N ; Number of muscles

t ; Student's t

P ; Probabirity

表 2

		Glucose Uptake	N	t	P
EDL	2 days starvation	13.8 ± 2.6	6	1.71	> 0.10
	Control	11.0 ± 2.4	6		
	4 days starvation	14.0 ± 2.4	6	1.60	> 0.10
	Control	11.8 ± 1.0	10		
Soleus	2 days starvation	16.2 ± 2.6	5	0.71	> 0.25
	Control	18.0 ± 8.4	6		
	4 days starvation	4.4 ± 0.4	6	4.83	< 0.005
	Control	20.6 ± 5.6	6		

glucose uptake が高かった.

絶食

筋の成長による湿重量の増加は有意に減少し 2 日以後 EDL では減少が始まった. 対照と比べた割合では 4 日で EDL が平均−32.6% に対し soleus は−21.7%で有意に EDL の湿重量比は低かった. glucose uptake は表 2 の如く EDL では 4 日まで有意差なく, soleus では 4 日で有意な低下を示した.

脱神経

筋の湿重量は 2 日以後減少を始めたが, 対側対照との比較では, soleus の方が EDL より湿重量比の低下が 4 日以後有意に大きく, 14日後では soleus が平均−58.8%に比べ EDL では−40.0%であった. glucose uptake は表 3 の如く soleus では 7 日まで有意差なく, 14日で有意な低下を示した. EDL では 4 日から14日まで有意な増加を示した.

足関節を flexion で固定

筋の湿重量では EDL が減少していき, soleus は対側に比べ増加傾向が 7 日まで続く. 対側との湿重量比は14日で EDL は平均−45.4%で soleus は−1.2%であった. glucose uptake は表 4 の如

表3

		Glucose Uptake	N	t	P
EDL	1 day denervation	22.2 ± 2.4	3	1.54	>0.10
	Control	19.4 ± 2.0	3		
	2 days denervation	19.6 ± 1.8	4	1.53	>0.10
	Control	16.2 ± 4.0	4		
	4 days denervation	38.8 ± 4.4	4	4.34	<0.01
	Control	24.6 ± 5.0	4		
	7 days denervation	30.6 ± 1.8	4	9.61	< 0.005
	Control	17.0 ± 2.4	4		
	14 days denervation	30.2 ± 3.2	4	7.20	< 0.005
	Control	14.8 ± 3.0	4		
Soleus	1 day denervation	26.2 ± 3.0	2	0.19	> 0.50
	Control	26.8 ± 4.4	3		
	2 days denervation	23.0 ± 5.2	3	1.78	> 0.10
	Control	24.6 ± 4.0	4		
	4 days denervation	41.0 ± 7.2	4	0.64	>0.50
	Control	35.6 ±14.6	4		
	7 days denervation	44.6 ± 6.6	4	0.58	>0.50
	Control	27.0 ± 5.2	4		
	14 days denervation	21.4 ± 2.0	4	3.76	< 0.01
	Control	26.6 ± 1.8	4		

く EDL は 1 日で有意な低下を示し 2 ～14日で有意差なく，soleus では 1， 2，14日で有意な低下を， 4， 7 日でも低下傾向を示した．

足関節を extension で固定

筋の湿重量の対側との比では EDL は 2 日まで増加傾向でその後低下する．soleus は低下が強い．14日では EDL の平均は－17.9% に対し soleus では－57.8%であった．glucose uptake は表 5 の如く EDL では 1 ～14日で有意差なく，soleus は 1， 4， 7 日で有意に低下を示し， 2，14日でも低下傾向を示した．

考　　案

passive stretch *in vitro* で glucose uptake が増加したことは，protein synthesis を増加させたり，breakdown を減少させる等の protein metabolism に対する effects[3] と同時に glucose metabolism に影響があることを示す data である．*in vivo* で stretch されると萎縮を抑制し肥大を示すことがある．これは今回の固定の実験でも示された．

白筋に比べ赤筋の glucose uptake が有意に高いことが初めて示された．これは glucose が解糖系によってピルビン酸になり，それがミトコンドリアでクレブス回路系・電子伝達系の基質として利用される率が赤筋では高いことを示している．

絶食では EDL の萎縮が強く，これは蛋白分解の亢進と蛋白合成の低下が soleus より EDL で強い事[4] から説明されている．glucose uptake は soleus で 4 日後に低下を示したことは，脂肪組織より遊離してくる脂酸等を基質としてミトコンドリアでの好気的エネルギー産生がさかんになり glucose uptake がおさえられると考えられる．このため赤筋ではエネルギー産生の減少が少なく筋

表4

Flexed Ankle

	Glucose Uptake	N	t	P
EDL 1 day immobilization	13.4 ± 4.0	5	2.81	<0.01
Control	19.6 ± 3.0	5		
2 days immobilization	19.0 ± 5.0	6	0.51	>0.50
Control	17.6 ± 4.4	6		
4 days immobilization	19.6 ± 4.4	6	1.02	>0.25
Control	16.8 ± 5.0	6		
7 days immobilization	17.0 ± 5.4	5	0.67	>0.50
Control	15.0 ± 3.8	5		
14 days immobilization	19.0 ± 5.0	6	1.16	>0.25
Control	16.0 ± 4.2	7		
Soleus				
1 day immobilization	18.4 ± 4.8	5	3.48	<0.01
Control	27.6 ± 3.4	5		
2 days immobilization	19.4 ± 5.2	6	2.51	<0.05
Control	29.6 ± 8.4	6		
4 days immobilization	25.0 ± 5.4	6	1.73	>0.10
Control	30.4 ± 5.2	6		
7 days immobilization	20.6 ± 6.6	5	1.30	>0.10
Control	25.2 ± 4.4	5		
14 days immobilization	21.8 ± 5.2	7	2.68	<0.025
Control	29.0 ± 4.8	7		

萎縮の原因となる蛋白代謝も白筋よりはcatabolicな傾向が少なくなると考えられる．

脱神経でEDLのglucose uptakeが増加することは，type II fiberのselective atrophyが来るとの報告[5]より，好気的エネルギー産生系のさかんなfiberが多くなり赤筋に近づくためと考えられる．soleusの筋萎縮が強いことは従来の報告[6]と同じである．これには脱神経直後より足関節がextendされたpositionになり，従ってsoleusはshortened positionであることが関与していると考えられる．固定の実験でも足関節をextendした場合にsoleusの萎縮が強い．しかし後者の固定したsoleusではglucose uptakeは1日より低下し，前者の脱神経のsoleusでは7日までは有意な変化がないとのちがいがある．

固定ではshortened positionの際はstretched positionより萎縮が強いとの従来の報告[7]と同じ結果であった．stretch positionでは肥大傾向が両筋で認められたが，soleusの方が長く続いた．glucose uptakeはsoleusで減少，EDLはflexionの際に1日で減少を認めた他は有意差なしで，筋萎縮や肥大傾向と平行しなかった．これは蛋白代謝の変化とは直接関係なく，glucose代謝が固定によって影響を受けることを示している．soleusのglucose uptakeの減少は，本筋が固定によりtype I fiber (SO)の減少[8]が来て白筋に近づいた事を示していると考えられる．

脱神経と固定で共に白筋と赤筋の差が小さくなる脱分化傾向を示したが，脱神経では白筋のEDLが，固定では赤筋のsoleusがそれぞれ早期の変化を示した点が異なる．

表5

Extended Ankle

	Glucose Uptake	N	t	P
EDL				
1 day immobilization	22.0 ± 2.4	3	1.39	>0.10
Control	19.4 ± 3.6	3		
2 days immobilization	20.0 ± 4.0	5	0.42	>0.50
Control	21.0 ± 3.4	5		
4 days immobilization	20.8 ± 5.4	6	1.52	>0.10
Control	17.2 ± 2.0	6		
7 days immobilization	19.2 ± 5.4	6	0.22	>0.50
Control	20.0 ± 7.0	6		
14 days immobilization	16.6 ± 7.4	7	0.39	>0.50
Control	15.2 ± 5.8	7		
Soleus				
1 day immobilization	15.4 ± 0.8	3	8.94	<0.005
Control	28.6 ± 2.4	3		
2 days immobilization	24.6 ± 5.0	5	1.55	>0.10
Control	30.8 ± 7.6	5		
4 days immobilization	18.2 ± 4.4	6	2.89	<0.025
Control	28.0 ± 6.6	5		
7 days immobilization	17.6 ± 4.2	6	3.74	<0.005
Control	30.4 ± 5.6	6		
14 days immobilization	18.0 ± 6.0	7	2.01	>0.05
Control	24.8 ± 6.0	6		

結　論

rat の EDL と soleus で *in vitro* の glucose uptake 測定を行ない以下の結果を得た.

1. passive stretch *in vitro* で glucose uptake は増加する.
2. EDL と soleus では glucose uptake は soleus で大きい.
3. starvation では 4 日で soleus の glucose uptake が低下する.
4. denervation では EDL の glucose uptake が増加する.
5. immobilization では soleus の glucose uptake が減少する.

文　献

1) Bylund A-C, J. Holm, K. Lundholm and T. Scherstén : Incorporation rate of glucose carbon, palmitate carbon and leucine carbon into metabolites in relation to enzyme activities and RNA levels in human skeletal muscles. Enzyme, 21 : 39-52, 1976.
2) Isaksson, O.G.P., J. Schwartz, J.L. Kostyo and R. Charles : Use of antibodies to modify the effect of growth hormone on sugar transport in rat diaphragm muscle. Endocrinology, 105 : 452-458, 1979.
3) Goldspink, D.F. : The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. J. Physiol., 264 : 267-282,

1977.

4) Goldspink, D.F. : The influence of contractile activity and the nerve supply on muscle size and protein turnover. in "Plasticity of Muscle" Ed. D. Pette. Walter de Gruyter, Berlin, New York 1980, pp. 525-539.

5) Niederle B. and R. Mayr : Course of denervation atrophy in type I and type II fibers of rat extensor digitorum longus muscle. Anat. Embryol., 153 : 9-21, 1978.

6) Herbison, G.J., M.M. Jaweed, and J.F. Ditunno. Muscle atrophy in rats following denervation, casting, inflammation, and tenotomy. Arch, Phys. Med. Rehabil., 60 : 401-404, 1979.

7) Summers, T.B. and H.M. Hines : Effect of immobilization in various positions upon the weight and strength of skeletal muscle. Arch. Phys. Med, 32 : 142-145, 1951.

8) Booth, F.W. and J.R. Kelso : Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. Pflügers Arch., 342 : 231-239, 1973.

48) Myotonic dystrophyにみられる糖代謝異常の発生機序に関して

井 村 裕 夫*

研究協力者　葛 谷 英 嗣* 山 田 和 範*

はじめに

myotonic dystrophyでは，糖代謝異常をしばしば合併することが知られているが，これはインスリン抵抗性によることが推測されている．このインスリン作用発現の障害は，本症にみられるmembrane defectによる可能性があり，本症の病因を追求する一つの研究課題と考えられる．

周知の如く，インスリンは標的細胞の膜に存在するレセプターと結合し，その後いくつかの過程(postreceptor process)を経てはじめて，その作用が発現される．レセプターやpostreceptor processのどこかに異常のある場合，インスリンの作用発現が障害され，インスリン抵抗性の原因となる．今回，われわれはmyotonic dystrophyにみられるインスリン抵抗性の機序を明らかにする目的で，患者の赤血球，および培養皮膚線維芽細胞を用いて，インスリンレセプターおよびブドウ糖輸送機構について検索を行った．

対象・方法

対象は年齢29から56歳まで，6名のmyotonic dystrophyの患者で，男女それぞれ3名ずつである．肥満者はなかった．先ず，75g(一部の例では50g)経口ブドウ糖負荷試験を行い，0，30，60，90，120分に採血して，ブドウ糖とインスリン濃度を測定した．赤血球インスリンレセプターの測定は，われわれが以前報告した方法を用いて行った[1]．ついで，患者の上腕内側部より採取した培養皮膚線維芽細胞を用いて，Olefskyらの方法[2]に準じて2-deoxy-D-glucose uptakeを調べた．すなわち，直径6cmのペトリディッシュに適当数の線維芽細胞をうえ，細胞がconfluentに達して3～4日後にmonolayer cultureのまま実験を行った．細胞はpopulation doubling number 7～20のものを用いた．先ず，細胞を種々の濃度(0～100 ng/mℓ)のインスリンと33℃で60分間preincubateしたのち，^{3}H-2-deoxy-D-glucoseとincubateし(33℃)，5分間で細胞内にとりこまれる^{3}H-2-deoxy-D-glucoseを測定した．なお，同時に^{3}H-L-glucose uptakeも測定して，これをnonspecific uptakeとして，^{3}H-2-deoxy-D-glucose uptakeの値よりさしひいた．2-deoxy-D-glucoseはglucose transport systemによって細胞内にとりこまれ，リン酸化を受けるが，これ以上代謝されないことが知られており，glucose transportの実験によく用いられる．

結果・考察

表1は6名の患者の経口ブドウ糖負荷試験の成績を示す．大部分の例でブドウ糖濃度は2相性となり，日本糖尿病学会の判定基準に従うと，血糖曲線はM.Y., H.H., M.N.の3名は境界型を示し，他の3名は正常型であった．

表2はブドウ糖負荷試験の際の血中インスリン濃度を示す．空腹時インスリン濃度は12.7±2.6 μU/mℓ(mean±SEM)と，ほぼ正常であったが，ブドウ糖負荷後のインスリン濃度は高値で，0，30，60，90，120分におけるインスリン濃度の総和(ΣIRI)は229～654μU/mℓと，全例で正常コントロール(100～200μU/mℓ)より増加していた．こ

*京都大学医学部第二内科

表1　Oral glucose tolerance test
(plasma glucose, mg/dl)

		0	30	60	90	120
M.Y.*	M	75	98	100	90	111
S.O.*	F	90	119	78	126	84
H.H.	M	84	139	175	105	134
M.N.	F	78	181	177	125	69
T.M.	F	95	58	80	98	87
K.K.	M	93	123	56	83	93

(* 50g OGTT)

表2　Oral glucose tolerance test
(serum IRI, μU/ml)

		0	30	60	90	120	ΣIRI
M.Y.*	M	24	108	86	28	102	347
S.O.*	F	11	76	35	84	23	229
H.H.	M	10	160	310	72	102	654
M.N.	F	7	43	96	91	44	281
T.M.	F	16	47	31	41	107	242
K.K.	M	9	198	25	28	29	288

(* 50g OGTT)

のように，これらの患者ではインスリン抵抗性の存在が示唆された．

もし myotonic dystrophy においてインスリン抵抗性があるとすれば，インスリン作用発現機構に何らかの異常がある可能性がある．そこでこの点をさらに検討するため，赤血球インスリンレセプターを測定した．赤血球はいわゆるインスリンの標的細胞とは考えられていないが，脂肪細胞などインスリンの標的細胞のインスリンレセプターと同じ特徴をもつレセプターが赤血球膜に存在していることが知られている．赤血球は患者から入手しやすく，また赤血球のインスリンレセプターは，標的細胞のインスリンレセプターの状態を比較的よく反映しているとされており，インスリンレセプターの解析によく用いられる．また，myotonic dystrophy では赤血球膜の異常が指摘されているので，赤血球インスリンレセプターがどのような状態であるかを調べることは興味がある．図1は^{125}I-インスリンの赤血球への結合曲線を示す．この図からも明らかなように，種々のインスリン濃度下で，^{125}I-インスリンの赤血球への結合は myotonic dystrophy で有意に低下している．そこで，この結合の低下が，レセプターの数の減少によるものか，レセプターのインスリンに対する親和性の低下に基づくものかを明らかにすべく Scatchard 解析を行った．表3にその結果を示すが，myotonic dystrophy では赤血球インスリンレセプターの，細胞当たりの数の減少と，親和性（mean affinity constant）の低下が存在することが明らかにされた．

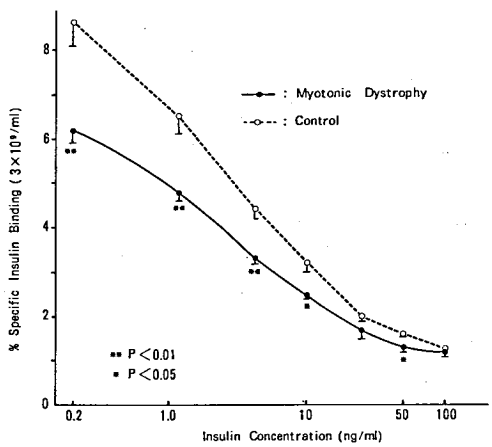


図1　^{125}I-インスリンの赤血球への結合

表3　赤血球インスリンレセプターの数と親和性

	Receptor number (per cell)	Mean affinity constant ($\times 10^8 M^{-1}$)
Myotonic Dystrophy	49	2.7
Control	61	3.3

一般にレセプターは遺伝的因子や体内環境因子によって，その数や親和性が変化することが知られている．環境因子の中で特に重要なのがホルモンによるレセプターの down regulation である．

すなわち，インスリンレセプターの場合，その数は血中インスリン濃度によって調節を受け，高インスリン血症下では down regulation によりレセプター数が減少する．従って，myotonic dystrophy の患者の赤血球インスリンレセプターの変化が，高インスリン血症などの環境因子に基づく二次的なものか，あるいは一次的な異常であるかが問題となってくる．そこで，この点を明らかにすべく，患者の培養皮膚線維芽細胞を用いて実験を行った．

線維芽細胞はインスリンレセプターと glucose transport system を有する．インスリンはレセプターと結合し，glucose transport system によるブドウ糖の取り込みを促進させる．培養線維芽細胞を用いることにより，*in vivo* における種々の因子を取り除いた状態で，インスリンレセプターや glucose transport system を調べることが可能であるとされており，従って，培養線維芽細胞はインスリン作用発現機構の genetic defect の検索に用いられている．**表4**に培養皮膚線維芽細胞の成績を示す．コントロールは年齢30～40歳の健康男子4名より得た線維芽細胞で，合計20回行った実験の平均値を示す．myotonic dystrophy の場合は，症例 H. H.（50歳，男），M. Y.（56歳，男），Y. O.（48歳，女）の3名について行い，それぞれについて2～4回行った実験の平均値を示す．confluent に達した時の dish あたりの細胞数は，正常コントロールで1.40×10^6個であったが，myotonic dystrophy では$0.78\sim0.98\times10^6$個と有意に少なく，myotonic dystrophy では線維芽細胞の growth の低下が示唆された．一方，2-deoxy-D-glucose の uptake は，basal uptake（すなわちインスリン無添加の場合）は，正常コントロールで0.68nmole/10^6cells，myotonic dystrophy で1.27～2.51nmole/10^6cells と，myotonic dystrophy で著しく増加していた．preincubation の際のインスリン濃度を増加していくと，コントロール，myotonic dystrophy の細胞とも，2-deoxy-D-glucose の uptake は増加し，インスリン濃度50～100ng/mℓでほぼ最高値に達した．myotonic dystrophy では basal uptake が高いため，maximal uptake もコントロールに比し高値であったが，basal uptake よりの増加の程度（% increase）であらわすと，コントロールとほぼ同程度の増加であった．インスリンの容量反応曲線で，half maximal uptake をきたすインスリン濃度（ED_{50}）も，コントロールと myotonic dystrophy では差がなかった．以上の成績より，培養線維芽細胞でみる限り，インスリンのレセプターへの結合，及び glucose transport system のインスリンに対する反応性はほぼ正常と考えられ，インスリン抵抗性を説明しうる異常は見出せなかった．従って，インスリン抵抗性の機序として，何らかの異常で高インスリン血症をきたし，このため二次的にインスリンレセプターが減少している可能性，あるいは異常が一部のインスリンの標的細胞にの

表4　培養皮膚線維芽細胞における2-deoxy-D-glucose uptake

Cell line	Cell number (x10^6/dish)	Basal uptake nmol/10^6cells	Maximal uptake nmol/10^6cells	% Increase	ED_{50} (ng/ml)
Control	1.40	0.677	0.893	31.9	3.5
Myotonic Dystrophy					
H.H.	0.78	1.272	1.894	48.9	5.5
M.Y.	0.78	2.508	3.357	33.9	5.0
S.O.	0.98	1.436	2.061	43.5	3.0

み限局されたものであるため，線維芽細胞には異常が存在しない可能性などが考えられる．しかし，myotonic dystrophy ではコントロールに比し，2-deoxy-D-glucose の basal uptake が高いことから，glucose transport system に何らかの異常が存在する可能性は否定できない．また，インスリンレセプター自身の異常についても，インスリンの容量反応曲線がほぼ正常と変らなかったことから，インスリンとの結合の程度はほぼ正常であることが予想されるが，結論を得るにはさらに詳細な検索が必要であろう．今後，euglycemic glucose clamp 法[3] によって，myotonic dystrophy においてインスリン抵抗性の有無，程度およびその特徴を明らかにするとともに，以上の可能性について検討を加えたい．

ま と め

myotonic dystrophy では赤血球のインスリンレセプターの数と親和性の低下が見られた．しかし，培養皮膚線維芽細胞による 2-deoxy-D-glucose uptake のインスリン容量反応曲線には異常がなかった．

御協力いただきました国立療養所宇多野病院西谷裕先生に深謝いたします。

文 献

1) Okamoto, M., et al : Insulin binding to erythrocytes in diabetic patients. Endocrinol. Japon, 28 : 169, 1981
2) Berhanu, P., et al : Effect of insulin and insulin-like agents on the glucose transport system of cultured human fibroblasts. Diabetes, 30 : 523, 1981
3) DeFronzo, R.A., et al : Glucose clamp technique : a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am. J. Physiol., 237 : E214, 1979

49）筋におけるクレアチン代謝：骨格筋のクレアチン輸送の特性

三　好　和　夫*

研究協力者　紫　芝　良　昌*　門　脇　紀　子*　田　村　克　也**

はじめに

人及び高等動物の骨格筋は生理的状態において血漿の約1500倍の高濃度のクレアチンを保持している．この機序は，エネルギー依存性の active transport であることと思われるが，その詳細は不明であり，筋ジストロフィー症筋における異常の有無についても成績はみられない．

私たちは筋ジストロフィー症筋におけるクレアチン代謝の異常に関する研究を行い，とくに代謝経路の研究を進めているが[1]，その過程でこれと関連して上記の骨格筋のクレアチン輸送の実態を知る必要性を感じた．本文においてはこれに関する実験成績を述べる．

骨格筋のクレアチン輸送機序は単純な first order kinetics によるものでなく，細胞外液のクレアチンの濃度の特定の領域において濃度依存性に変化する特性のあることを明らかにしたものである．

試料と方法

試料には7～8週齢のウィスター系雄ラットのひらめ筋を用いた．筋を傷つけることなく取り出し，脂肪や結合織を手早くはさみで除去して計量し，個々の試験管に入れ，種々の濃度のクレアチンを含む Earl's solution 2.5ml 中で37℃，90分間，95% O_2，5% CO_2通気下にインキュベートした．この操作によって medium から筋へのクレアチンの取込みと筋から medium への放出をみ，併せて ouabain による影響を調べた．

筋へのクレアチンの取込み実験は，medium 中に^{14}C-creatine (amidine-labelled, New England Nuclear 社より購入) 0.16μCi を加えて行った．すなわち，インキュベーション終了後のひらめ筋を10秒間新しい Earl's solution 10ml 中につけてよく振とうして洗浄した後，1 ml の蒸留水を加えてガラスホモジナイザーでホモジナイズし，TCA を最終濃度が10%になるように加え，3000回転10分間遠沈してえた上清の^{14}C 活性を計測した．計測は上清20μl を ACS II シンチレーター 3 ml 中に添加してパッカード社製液体シンチレーションカウンターで行った．

筋組織中への^{14}C-creatine の取込みは，筋の放射活性と同様にして測定した medium 中の放射活性の比率，^{14}C-creatine distribution ratio（筋細胞内液相 1 g/medium 1 ml の DPM）で表わした．なお，筋組織の細胞内液相は，ひらめ筋を^{3}H-イヌリン0.1μCi とともに上記と同様の条件でインキュベート及びホモジネートし，^{3}H-イヌリンは細胞外液相のみに分布すると仮定して計算した．えられた結果から，ひらめ筋の細胞外液相は14.0%とした．

筋から medium へのクレアチンの放出は，インキュベーション終了後，取込み実験の場合と同様にひらめ筋をホモジネートし，TCA で沈澱させてえた上清と，やはり同様にしてえた medium の上清中のクレアチン濃度を diacetyl-monoxim 法で測定し，筋から medium 中に放出されたクレアチン量を算出した．

クレアチンの medium から筋への取込み及び筋から medium への放出に及ぼす ouabain の影響の観察は，上記の条件の実験において ouabain (g-strophantidine, Behringerwerke) 10^{-3}M を

＊冲中記念成人病研究所
＊＊徳島大学医学部第一内科

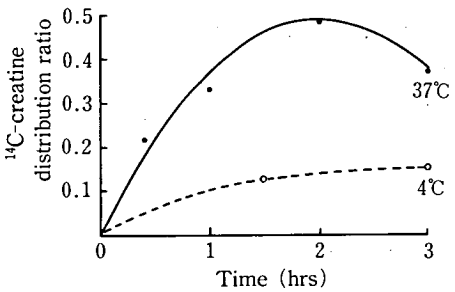


図1　^{14}C-クレアチンの筋への取込みの時間及び温度依存性

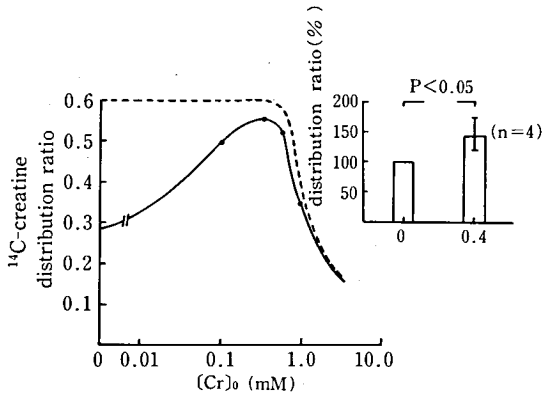


図2　mediumのクレアチン濃度〔Cr〕$_0$の^{14}C-creatine distribution ratioに及ぼす影響（破線はfirst order kineticsに従う場合の理論的な値を示す．実線は定型的な実験例を示す．インセットは反復実験の成績を〔Cr〕$_0$ 0 mM100%として示す）

medium中に加えて行った．

実験成績

Mediumから筋へのクレアチンの取込み：

図1にmediumから筋へのクレアチン取込みの時間経過を示した．温度37℃の実験において^{14}C-クレアチンのdistribution ratioを指標としてみた取込みはインキュベーション時間とともに増加し，120分後に0.4と最大となり，180分後には減少した．この過程は温度依存性で4℃の条件下では0.14と低値を示した．このことから以後の取込み実験ではインキュベーション時間を90分とした．

図2に，mediumのクレアチン濃度と^{14}C-クレアチンdistribution ratioの関係を示した．図のごとく，mediumのクレアチン濃度が0 mMである場合の^{14}C－クレアチンdistribution ratioは0.3であり，クレアチン0.4mM添加したmediumではdistribution ratioは0.56と増加し，これをこえるクレアチン濃度では飽和されて低下している．

mediumのクレアチン濃度0.4mMにおいて^{14}C－クレアチンdistribution ratioが増加することは4回の実験によって確かめられたが，その成績を図2のインセットに示した．この図では，distribution ratioはクレアチン濃度0mMの100に対して，クレアチン濃度0.4mMでは140±31.5となり，推計学的に有意の差であった．

すなわち，クレアチンのactive transportはfirst order kineticsに従うsaturable processではなくmedium中の特定のクレアチン濃度において取込みの変化率が有意に増加する形の取込みを示す．

図3に，クレアチン取込みに対するouabainの影響を示した．クレアチンの濃度0 mMにおいて，^{14}C-クレアチンのdistribution ratioは0.28であるが，ouabain 10^{-3}M存在下では0.56と増加した．この現象も繰り返し実験で確かめられ，クレアチン濃度0mMにおける^{14}C-distribution ratio 100に対して，ouabain添加では146±34.5であり有意な増加であった．mediumの他のクレアチン濃度ではouabainはdistribution ratioの変化を生じなかった．

筋からmediumへのクレアチンの放出：

図4に筋からmediumへのクレアチンの放出の成績を示した．ひらめ筋をクレアチン濃度0 mMのmediumと37℃，90分間インキュベートすると，筋中のクレアチンの21.1%がmedium中に放出されmedium中の濃度は0.18mMとなった．しかし，4℃の条件下ではこの放出量は筋クレアチン量の3.6%であり，37℃に比較して少なく，放出量も温度依存性であることがわかる．

37℃においてクレアチン濃度が0.4mMであるmediumとひらめ筋をインキュベートすると，筋中のクレアチンの16.1%がmedium中に放出さ

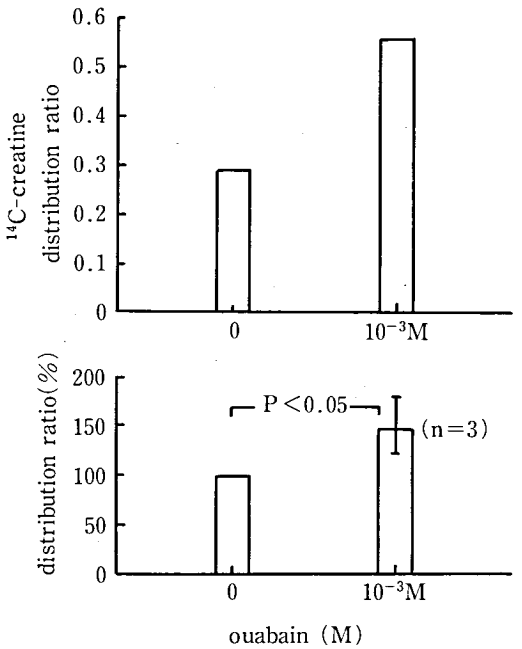


図3　mediumのクレアチン濃度が0の場合の^{14}C-クレアチンの筋への取込みに及ぼすouabainの影響
（上図には定型的な実験例を，下図には反復実験のまとめをouabain 0における値100%として示す）

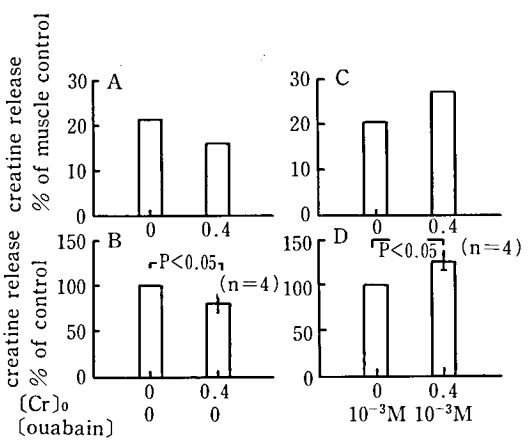


図4　筋からのクレアチン放出に及ぼすmediumのクレアチン濃度及びouabainの影響
（A，Cには定型的な実験例を，B，Dにはそれぞれの反復実験の成績をクレアチン濃度0，またはouabain 0mMの値100%として示す.）

れた.

図4(B)にこの実験を反復した成績を示した．クレアチン濃度0 mMのmediumに筋から放出されるクレアチン量を100とすると，クレアチン濃度0.4mMのmediumに放出される量は77%で有意に少ない.

筋からmediumへのクレアチン放出に対するouabainの影響をみた成績を図4(C)に示した．結果はクレアチン濃度0 mMのmediumへの放出は，ouabainによってほとんど変化しない．しかし，クレアチン濃度0.4mMのmediumへの放出は16.1%からouabainによって27%に増加した．この実験を反復した成績を図4(D)に示した．クレアチン濃度0.4mMの時，筋から放出されるouabainはクレアチン濃度0の時の124%に増加し，推計学的に有意であった.

筋からmediumへのクレアチンの放出も温度依存性のプロセスであり，mediumのクレアチン濃度0.4mMの特定の濃度で少なくなる．そしてouabainによりこれらの特徴が失われる.

考　　察

本実験において，私達はまず，mediumから筋へのクレアチンの取込みがmediumのクレアチン濃度0.4mM附近で明らかに増加する濃度依存性を示すことを明らかにした．このことから筋へのクレアチンの能動輸送は単なるfirst order kineticsに従うsaturable process[3)4)]ではなく，特定のクレアチン濃度の存在下で効率よく筋にクレアチンを取込むことを可能にしている複雑な機構であると考えられる.

クレアチンの筋からmediumへの放出は，非特異的な放出も加わるためか，mediumから筋への取込み量に比較して多い．しかし，今回の実験ではこの放出もmediumのクレアチン濃度依存性に変化し，mediumのクレアチン濃度0.4mM附近で，筋からのクレアチン放出量は0 mMのmediumに対するよりも有意に減少した.

筋のクレアチンの能動輸送は，ある特定の細胞外液のクレアチン濃度下において，筋中の高濃度のクレアチンをできる限り保持しようとする機構

であると考えられる．私達のこの結果は，medium 中のクレアチン濃度 0 ～1.0mM レベルの濃度においてえられたものであるが，この濃度は，人及び高等動物の生理的状態における血中クレアチン濃度が0.02mM であること，そして，人の DMD の血中ではこれが数倍の高濃度に上昇していることと照らし合せて，意味あることかも知れない．

筋のクレアチン輸送のこの特性は，筋の K 輸送，甲状腺のヨード輸送など従来知られている能動輸送[5] にはみられないものである．筋の K 能動輸送や甲状腺のヨード輸送などは，直接に Na の active transport と関連して NaK-ATPase に依存しており，ouabain によってそれらのプロセスが著しく抑制される．これに反してクレアチンの筋への取込みにおいては ouabain はそれを阻止することが全くない．すなわち，Na の active transport はクレアチン能動輸送のエネルギーと直接に link しているものではなく，細胞外液のクレアチン濃度に依存して変化する部分に作用することを推定させる．

筋のクレアチン能動輸送の詳細は，今後クレアチンの分解経路と関連づけて追究し，筋ジストロフィー症筋におけるそれらの異常の有無と様相を明らかにしたい．

おわりに

ラットのひらめ筋実験によって，骨格筋のクレアチン輸送機序は単純な first order kinetics によるものでなく，細胞外液のクレアチン濃度依存性に変化して，筋中クレアチン濃度を保つよう働く特性のあることを明らかにした．筋のクレアチン代謝経路との関係を追究し，筋ジストロフィー症筋についての成績をえたい．

文　献

1) Miyoshi, K., Taira. A., et al: Altered characteristics of creatinase-like activity in skeletal muscles of muscular dystrophies. Muscular Dystrophy (ed. Ebasi, S.),Japan Medical Research Foundation Publication. No.18. University of Tokyo Press, 1982, p199.

2) 三好和夫，紫芝良昌ほか：筋におけるクレアチン代謝，筋ホモジュネートによる 1 —^{14}C 標識クレアチンからの1—^{14}C 標識サルコシンの産生．厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究（三好班），昭和57年度研究報告書，1983，p. 179

3) Fitch, C.D. and Shields, R.P.: Creatine metabolism in skeletal muscle I. creatine movement across muscle membrane. J. Biol. Chem., 241: 3611, 1966.

4) Fitch, C.D., Shields, R.P., Payne, W.F. and Dacus, J.M.: Creatine metabolism in skeletal muscle III. specificity of the creatine entry process. J. Biol. Chem., 243: 2024, 1968.

5) Shishiba, Y., and Solomon, D.H.: Effects of amphotericin B on Thyrordal iodine concentration. Endocrinology, 81: 467, 1967.

50) Duchenne 型筋ジストロフィー症における opaque fiber の筋構造蛋白に関する研究(第2報)

荒 木 淑 郎*

研究協力者　内 野　誠*　吉 田　理*　植 川 和 利*

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) の生検筋には変性・壊死筋線維に混じて，いわゆる "opaque fiber" と呼ばれる H・E 染色，Gomori 染色，あるいは PAS 染色などで濃染する円形のやや肥大した筋線維が高率に認められ，DMD における組織所見の特徴の一つとなっている[1]．この opaque fiber の病的意義については種々論議されてきたが，DMD のみならず各種神経筋疾患，さらには健常人の生検筋にも稀に類似の形態学的特徴をもつ筋線維がみられるところから，一つには筋生検過程や標本作製の過程で生じた人工産物とみなす意見[2]と，もう一つには単なる人工産物ではなく，DMD の筋変性過程における初期変化像としてとらえる意見[3)~6)]が相対立しており，一定の結論がでるまでには至っていない．

我々[7),8)]は1979年以来 DMD 生検筋から single fiber の形で分離した opaque fiber の筋構造蛋白の分析を続けているが，昨年の本班会議で opaque fiber の一部は明らかに筋構造蛋白の変化を有する病的筋線維である可能性があることを報告した．今回は更に検体数を増して，また一部は二次元電気泳動による検索もあわせて行ったので，その結果について報告する．

対象並びに方法

4～25歳の DMD 患者12例について筋生検を行った．生検部位は筋萎縮の高度な部位はさけて，上腕二頭筋，腓腹筋，あるいは前脛骨筋で実施した．生検筋の一部は組織化学的検索に用い，残りを opaque fiber の分離に用いた．すなわち検体は小さな筋束に分けて氷冷の relaxing solution (4 mM ATP, 4mM EGTA, 4mM $MgCl_2$, 0.12M KCl, 20mM ATP, 20mM tris aminomethane, 20mM maleic acid, 50% glycerine, pH6.8) に浸したものを暗視野実体顕微鏡及び偏光顕微鏡下に電顕用ピンセットを用いて opaque fiber 並びに正常横紋構造を有する対照筋線維を分離した．分離した単一筋線維は Laemmli[9] 並びに三川ら[10]の方法に従って，一次元及び二次元電気泳動を行った．

結　果

DMD12症例の生検筋より opaque fiber 58検体，正常対照筋線維35検体を選んで比較検討を行った．偏光顕微鏡下で正常横紋構造を失ない，特有の光輝性を有する opaque fiber としてとらえられる筋線維には，正常対照筋線維と殆んど筋構造蛋白の差がないもの (opaque fiber a) と明らかに差があるもの (opaque fiber b) がみられ，差があるものには myosin heavy chain のみの明らかな減少を示すもの (opaque fiber b_1) から，myosin heavy chain, α-actinin, 55,000 daltons protein (desmin, vimentin) の全般的減少を示すもの (opaque fiber b_2) までいくつかの変性段階のものが含まれていた (図1)．

densitometer による比色定量で各筋構造蛋白の含有量を測定してみると，分離した58本の opaque fiber のうち20本 (34%) は正常対照筋と全く差がない opaque fiber a であり，21本 (36%)

* 熊本大学医学部第一内科

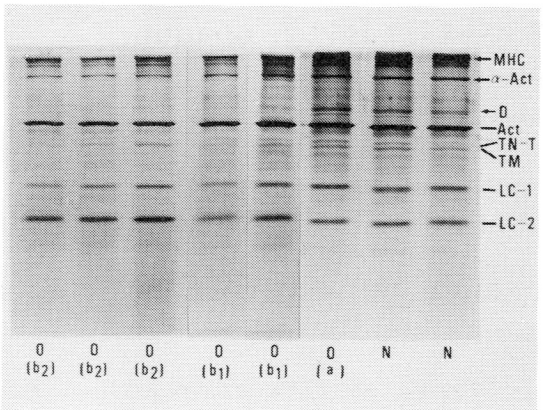


図1　One-dimentional SDS gel electrophoresis of opaque and normal muscle fibers. There is no obvious change in any component of the myofibrillar proteins of the opaque fiber "a" as compared with the controls. However, myosin heavy chain, α-actinin, and 55,000 daltons protein (desmin, vimentin) are clearly reduced in opaque fiber "b_2".
Opaque fiber "b_1" show the intermediate electrophoretogram pattern between opaque fiber "a" and "b_2".
N：control fiber, O：opaque fiber. MHC：myosin heavy chain. α-Act：α-actinin. D：55,000 daltons protein (desmin, vimentin). TN-T：troponin T. TM：tropomyosin. LC-1, LC-2：myosin light chain 1, 2.

は myosin heavy chain の有意な減少を示す opaque fiber b_1 に相当し，17本（29%）は myosin heavy chain, α-actinin, 55,000 daltons protein (desmin, vimentin) の減少を示す opaque fiber b_2 に一致する変化を示した（**表1**）.

また preliminary study であるが，opaque fiber 及び正常対照筋線維の二次元電気泳動を行ってみると，opaque fiber では desmin 及び vimentin に相当すると思われる spot が対照に比較して減少しているのが観察された（**図2**）.

この他 actin には殆んど変化がなく，troponin I, C については対照筋線維でも含有量が少なく，その増減について言及することは困難であった．myosin heavy chain や α-actinin などの減少に伴い myosin light chain 1，2は相対的に増加していた．

考　　察

ヒト骨格筋線維は組織化学的に myosin ATPase 染色により type I fiber（赤筋）と，type II fiber（白筋）に分けられるが，生理学的な特性も，また筋構造蛋白の組成も異なっている[11]．DMD 生検筋を用いた筋構造蛋白の分析は Sugita ら[12),13)]により行われてきたが，いずれも type I, II fiber が混在し，また正常横紋構造を有する筋線維及び種々の変性段階にある筋線維が混在した mass としての変化の分析であり，個々の病的筋線維についての検索はなされておらず，また文献的にも殆んど報告がない．Takagi ら[14)~16)]は DMD 生検筋から単一筋線維を分離し，ストロンチウムイオンに対する感受性の違いから電気生理学的に fiber type を区別し，二次元の電気泳動による筋構造蛋白の分析を行い，DMD においては type I，IIの中間的性質を有する type X と呼ぶ筋線維が高率にみられることを報告した．type X の由来については未分化の再生筋線維であろうと推定している．ただ Takagi らの用いた単一筋線維は無作為に選んだいずれも正常横紋構造を有する筋線維であり，横紋構造の変化を有する病的筋線維についての検索は行われていない．

一方，opaque fiber の電顕的観察では Chou ら[5)]は早期よりの Z-band 及び thin filament の消失を述べており，埜中ら[6)]も Z-band の崩壊を報告している．従って電顕的観察と結びつけて考えると，opaque fiber の筋構造蛋白の分析では Z-band の構成蛋白である α-actinin が減少していることが予想されたが，今回の検索では opaque fiber b_2 において推計学的に有意な α-actinin の減少が認められ，電顕所見とも一致する結果が得られた．また opaque fiber b_2 ではこの他 55,000 daltons protein (desmin, vimentin) も減少しており，desmin が Z-band の周囲を取りかこみ，と

表1　Percentage of myofibrillar proteins in opaque and normal muscle fibers

The myosin heavy chain of opaque fiber "b_1" is significantly decreased. In opaque fiber "b_2", there are a great reduction of myosin heavy chain, α-actinin, and 55,000 daltons protein (desmin, vimentin).

	Number of samples	Myosin H chain	α-Actinin	Desmin + Vimentin	Actin	TN-T + TM	Light chain 1	Light chain 2
Opaque (a)	20	30.6 ± 4.9	8.7 ± 1.9	3.0 ± 1.5	28.9 ± 3.3	7.5 ± 3.0	9.4 ± 2.1	11.9 ± 3.4
Opaque (b_1)	21	18.5 ± 3.5**	9.7 ± 2.7	2.6 ± 1.2	27.7 ± 11.7	8.2 ± 2.5	13.6 ± 3.9	18.3 ± 5.7***
Opaque (b_2)	17	19.1 ± 4.4***	4.8 ± 1.7***	0.6 ± 0.5*	29.6 ± 7.3	7.2 ± 3.0	14.0 ± 4.8	24.3 ± 5.5***
Normal	35	31.6 ± 5.9	8.2 ± 1.8	3.0 ± 1.5	27.5 ± 3.0	9.6 ± 1.9	10.5 ± 2.8	9.5 ± 4.3

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.02$ (Normal vs Opaque b_1, b_2)　　Mean ± S.D.

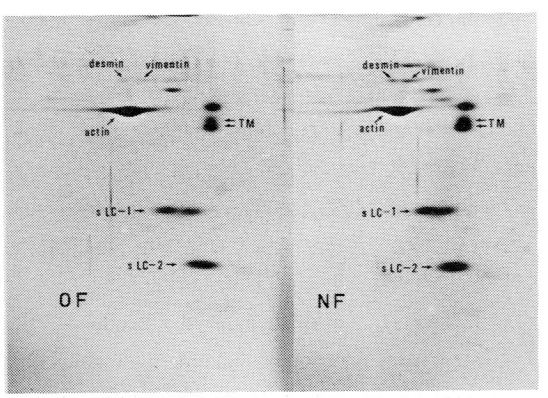


図2　Two-dimentional electrophoresis of opaque and normal muscle fiber. Notice the clear reduction of desmin and vimentin in opaque fiber as compared with control fiber.
NF : control fiber. OF : opaque fiber.

なりあう筋原線維のZ-bandをつなぐ役割をしている骨格蛋白であることを考えると，desminの減少とα-actininの減少が密接な関係があることが推定される．すなわちこれらの筋構造蛋白の変化を最近の膜異常説[17)~20)]に結びつけて考えると，膜異常に伴う細胞内Ca^{++}濃度の上昇を契機にしてcalcium activated neutral protease (CANP)の活性化が生じるが，本来CANPによる分解をうけにくいα-actininが減少するのは，Z-bandをセメント状に固めているdesminがまず分解され，支えを失ってα-actininがZ-bandから遊離するためとも考えられる．いずれにしても共にZ-bandの構成に関係する蛋白が同時に減少しているのは興味深い結果と思われる．

今回の検索で，偏光顕微鏡下の観察では殆んど同じopaque fiberとしてとらえられる筋線維に特に筋構造蛋白に変化がないもの (opaque fiber a)から，電顕所見を裏づけるような明らかな筋構造蛋白の変化を示すもの (opaque fiber b_2)，あるいは両者の中間的変化を示すもの (opaque

fiber b_1）など種々の変性段階のものが認められたが，この点については二通りの解釈が可能である．一つは筋構造蛋白の変化がないものは人工産物的に生じたいわゆる hypercontracted fiber で，筋構造蛋白の変化を示すものは変性過程にある病的筋線維であるとする考えである．もう一つは埜中らも指摘しているように opaque fiber を連続凍結切片で組織化学的に観察した場合，一本の筋線維に opaque fiber の部分や壊死に陥って ghost 状になった部分，あるいは正常の染色性を示す部分と segmental に種々の変性段階のものが認められるところから，筋構造蛋白もそれを反映して殆んど正常に近いものから，特徴ある筋構造蛋白の変化を示すものまで種々の変性段階のものが連続性に観察されるとする考えであり，opaque fiber a → opaque fiber b_1 → opaque fiber b_2 は一連の変性過程を表わしている．

今回の検索を通じて opaque fiber の一部は明らかな筋構造蛋白の変化を有する筋変性過程にある病的筋線維である可能性が高く，今後 IEF-SDS・PAGE のみならず NEpHGE を含めた二次元電気泳動による筋構造蛋白の検索を行ない，正常筋線維が変性・壊死に陥る過程を詳細に検討していく必要がある．

文　献

1) Boxler, K. & Jerusalem, F.：Hyperreactive (hyaline, opaque, dark) muscle fibers in Duchenne dystrophy. A biopsy of 16 dystrophy and 205 other neuromuscular disease cases and controls. J. Neurol., 219：63, 1978.
2) Karpati, G.：A review of the morphologic features and consequences of muscle cell necrosis in Duchenne disease：Clues to the pathogenesis, in International Congress Series 434, Neurology, ed. by Jarger, W.A.H., Bruyn, G.W., et al., Excerpta Medica, Amsterdam 1978, p.117.
3) Schmalbruch, H.：Segmental fiber breakdown with defects of the plasmalemma in diseased human muscles. Acta Neuropathol. (Berl.), 33：129, 1975.
4) Cullen, M.J. & Fulthorpe, J.J.：Stages in fiber breakdown in Duchenne muscular dystrophy. An electron-microscopic study. J. Neurol. Sci.,24：179, 1975.
5) Chou, S.M., Miike, T., et al.：Ultrastructure of "opaque fibers"(OFs) in Duchenne muscular dystrophy (DMD). Neurology (Minneap.), 29：594, 1979.
6) 埜中征哉，杉田秀夫：進行性筋ジストロフィー症の病理—Opaque 線維を中心として—．神経進歩，24：718, 1980.
7) 内野　誠：シンポジウムII；進行性筋ジストロフィー症の成因をめぐって，筋線維変性機構における Ca^{++}の役割について．臨床神経，21：1078, 1981.
8) 内野　誠，荒木淑郎 他：Duchenne 型筋ジストロフィーにおける opaque fiber の筋構造蛋白に関する研究．臨床神経，23：706, 1983.
9) Laemmli, U.K. Cleaveage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227：680, 1970.
10) 三川　隆：手軽なマイクロ2次元電気泳動法と高感度蛋白染色法—微量蛋白分析のために．生体の科学，32：74, 1981.
11) 杉田秀夫，米本恭三：神経支配と筋蛋白．神経進歩，19：805, 1975.
12) 杉田秀夫：ミオパチーと収縮蛋白．第18回日本医学会総会会誌，1971, p.1411.
13) Sugita, H., Katagiri, T., et al.：Studies on the structural proteins in various neuromuscular diseases. in Basic research in myology ed. by Kakulas, B.A., Excerpta Medica, Amsterdam,1973, p.291.
14) Takagi, A., Yonemoto, K., et al.：Single human muscle fibers：Activation by calcium and strontium. Neurology (Minneap.), 28：497, 1978.
15) Takagi, A. & Nonaka, I.：Duchenne muscular dystrophy：Unusual activation of single fibers in vitro. Muscle Nerve, 4：10, 1981.

16) Takagi, A., Ishiura, S., et al. : Myosin light chain components in single muscle fibers of Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve, 5 : 399, 1982.

17) Mokri, B. & Engel, A.G. : Duchenne dystrophy : Electron microscopic findings to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. Neurology (Minneap.), 25 : 1111, 1975.

18) Sugita, H. & Toyokura, Y. : Alteration of troponin subunits in progressive muscular dystrophy (DMD). II. Mechanism of the alteration of troponin subunits in DMD. Proc. Jpn. Acad., 52 : 260, 1976.

19) Schotland D.L., Bonilla, E., et al. : Duchenne dystrophy : Alteration in plasma membrane structure. Science, 196 : 1005, 1977.

20) Carpenter, S. & Karpati, G. : Duchenne muscular dystrophy. plasma membrane loss initiates muscle cell necrosis uncless it is repaired. Brain, 102 : 147, 1979.

51) Nemaline myopathyの筋構成蛋白について

小　口　喜三夫*

研究協力者　武　田　伸　一*　柳　沢　信　夫*

はじめに

Nemaline myopathyは，1963年，Shyら[1]により初めて記載され，臨床的には，多くfloppy infantとして発症し，運動発達遅延，筋萎縮と筋力低下を示し，細長の顔貌と骨格異常を伴う非進行性の先天性ミオパチーとされる．形態学的には，筋線維中の杆状構造物(rod)を特徴とするが，組織化学的にtype I fiberを中心としたfiber typeの異常が知られている．生化学的にも，fiber typeの異常を反映して，筋線維の主要構成蛋白であるmyosinについてslow formの優位性が指摘されている[2]．本研究の目的は，こうした本症の筋線維の性質を，異常構造物であるrodのみに捉われず，myosinを中心とした筋線維構成蛋白の上から，二次元電気泳動を用いて明らかにする事にある．

対象と方法

1．対象筋

上腕二頭筋から採取し，組織化学的にcheck board patternを呈した正常筋，type I fiber groupingを示した疾患対照筋，uniform type I fiberを呈したnemaline myopathy筋の凍結標本の1～数枚の厚切り切片を，クリオスタットで切り出し直後にO'Farrellのlysis buffer下で充分にhomogenizeし，出発材料とした．

2．電気泳動

O'Farrellの原法を小型化したMikawaらの方法[3]に準じて，二種類の二次元電気泳動を行った．一方は，等電点電気泳動(IEF)からSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)への二次元であり，他方は，非平衡pH勾配ゲル電気泳動(NEPHGE)からSDS-PAGEへの二次元である．染色はCBBに依った．

3．ゲル内ペプチドマッピング

二次元ゲル上の一部のスポットを切り出し，Clevelandの方法[4]に従って，Staphylococcus V8 proteaseによるゲル内のペプチドマッピングを行った．染色は銀染色法を用いた．

結　果

1．nemaline myopathy筋の二次元電気泳動像

図1にnemaline筋の二種類の二次元電気泳動像を示した．酸性蛋白を中心としたIEF系では，myosinのlight chains (LC)，actin，tropomyosin，troponin C及びdesminのスポットを判別できた．一方，塩基性蛋白を中心としたNEPHGE系では，creatine kinase，myoglobinなどの可溶性蛋白の他に，troponinのTとIを指摘できた．分子量7万以下の主要構成蛋白については，この2つの系で全て分析する事ができた．

2．nemaline myopathy筋のmyosin light chains

図2にnemaline筋及び疾患対照筋の二次元電気泳動(IEF系)のmyosin LCの部分を示した．下段の疾患対照筋では，高度のtype I fiber groupingを呈したにも拘らず，正常筋と同じパターンで，LC 1　LC 2についてはfast formとslow formの混在型を示し，加えてfast muscleにしか存在しないLC 3を認めた．一方上段のnemaline筋では，slow formのLC 1とLC 2がmain spotで，これにfast formのLC 1とLC 3が少量混在したが，fast formのLC 2は欠如していた．こうしたmyosin LCのパターンは，文献的にも正常筋や他の疾患筋では認められない[5]．

*信州大学医学部第三内科

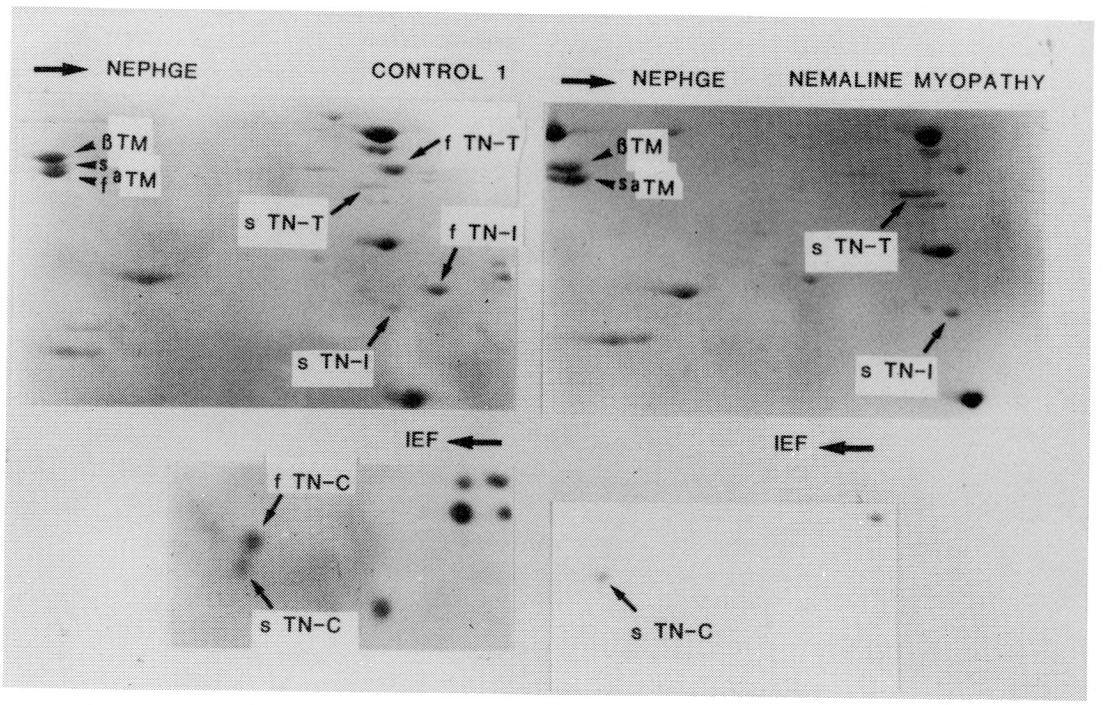


図1　nemaline 筋の二次元電気泳動像
nemaline 筋の IEF による二次元を左側に，NEPHGE による二次元を右側に示す．myosin の light chain (LC) 1，2，3，actin，tropomyosin (TM)，troponin (TN) - T，I，C，desmin，creatine kinase (CK) の各スポットが示されている．s，f はそれぞれ slow form，fast form を表わす．

従来の nemaline 筋の報告と比較すると，抽出した myosin を一次元電気泳動を用いて分析した Sreter ら[2]，杉田ら[6]は，slow form の LC 1 と LC 2 に fast 由来の LC 3 の混在を認め，二次元電気泳動を用いた Volpe ら[7]，Stuhlfauth ら[8]は，fast form の LC 1 の混在を認める場合はあるが，LC 3 については欠如としている．そこで我々のゲルに存在する LC 3 のスポットについて Cleveland の方法により更に検討した．

3．myosin LC 3 のゲル内限定分解

SDS の存在下でも，蛋白を限定分解する事が可能な Staphylococcus V8 protease を用いる事により，myosin LC 3 のゲル内ペプチドマッピングを得た．結果を図3に示したが，正常筋の LC 3 のスポットの分解パターンと，二次元のゲル上正常筋の LC 3 に一致する nemaline 筋のスポットの分解パターンは一致し，少なくとも，等電点，分子量，限定分解の 3 つの基準では，nemaline のスポットは正常筋の LC 3 に一致すると言える．

4．nemaline myopathy 筋の tropomyosin, troponin

myosin 以外の筋線維構成蛋白について，二次元電気泳動を用いて正常筋と nemaline 筋を比較した結果を図4に示した．actin には大きな変化は無かった．tropomyosin については，NEPHGE 系でみると，β 鎖に加えて，正常筋が slow form

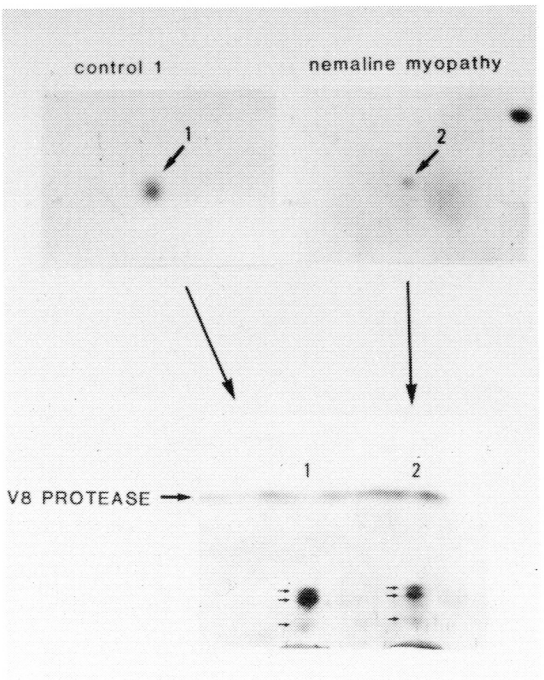


図2　nemaline 筋の myosin light chains
上段に nemaline 筋，下段に type I fiber grouping を呈した疾患対照筋の myosin light chain (LC)　1，2，3を示す．

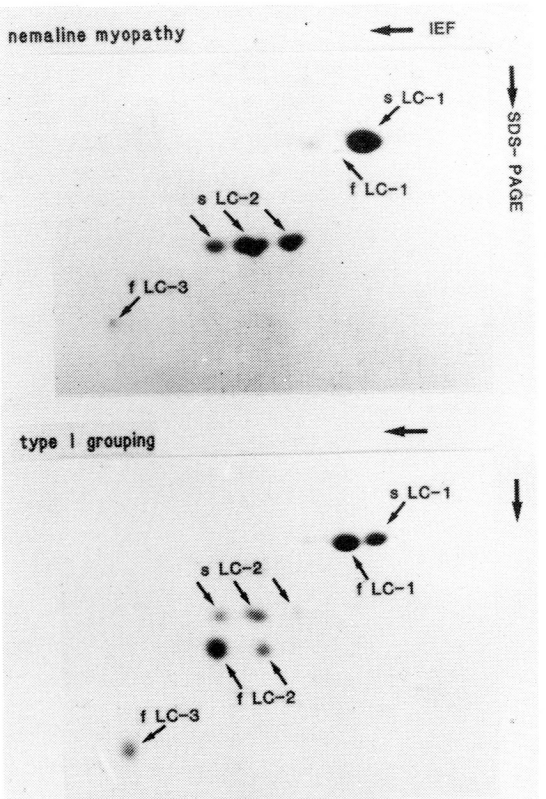


図3　myosin LC 3のペプチドマッピング
上段に示した control 筋(1)及び nemaline 筋(2)の二次元上の myosin LC 3に相当するスポットを，Staphylococcus V8 protease により，ゲル内限定分解したパターンを下段に示す．

と fast form の α 鎖から成るのに対し，nemaline 筋の α 鎖は slow form のみが認められた．troponin についても，塩基性側の troponin T と I，酸性側の C 共に正常筋が fast form と slow form から成るのに対して，nemaline 筋では3つのコンポーネント共に slow form のみが認められた．

考　　察

nemaline myopathy の筋線維構成蛋白については，従来，主要収縮蛋白である myosin の slow form の優位性[2]及び，Z 帯構成蛋白である α-actinin と desmin の増加が報告されていた．

myosin 分子は，その先端に ATPase 活性を有する HC 2個と，LC 4個から成る巨大分子であるが，ATPase 活性が type I つまり slow muscle の性質を示したにも拘らず，LC の中でも ATPase 活性の発現に必要と言われていた LC 1 と LC 3 が hybrid 構造を呈した事は興味深い．今後は myosin の HC についても検討が必要と考えられる．

一方，こうした myosin LC の構成は，既に Sreter[2] が指摘するように，単なる fast muscle と slow muscle の組み合わせからは生じにくいパターンである．LC 3が胎生初期には存在しない事を考えあわせると，nemaline 筋は少なくとも単純な胎生初期筋の残存ではなく，筋の分化過程の障害が予想される．但し，筋分化過程の myosin 分子については，Hoh ら[9] による native gel を使用した新知見が積み重ねられつつあり，ヒト胎生筋の分化が完全に解明されている段階ではない．実験

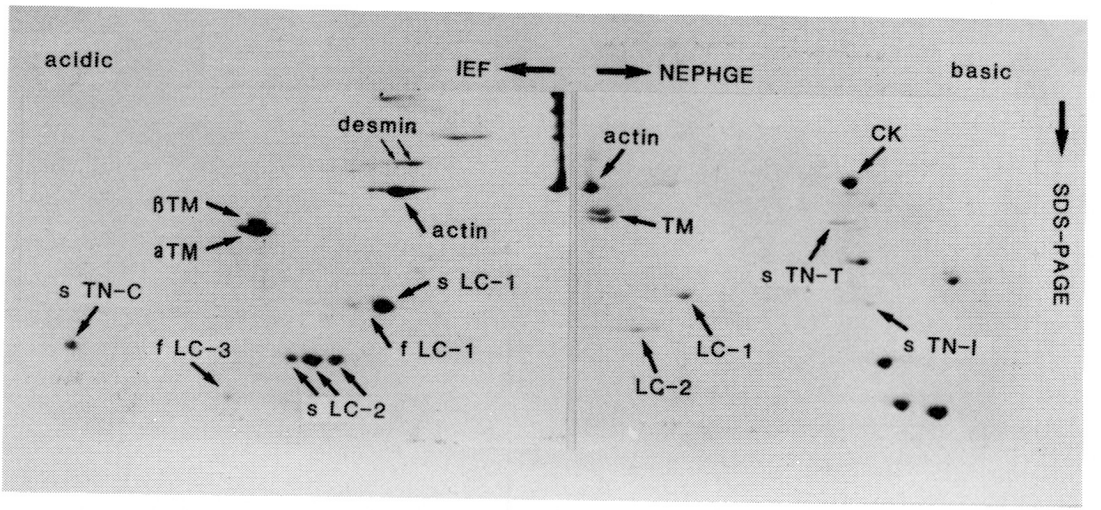


図 4　nemaline 筋の tropomyosin と troponin　control 筋及び nemaline 筋の NEPHGE による二次元を上段に，IEF による二次元を下段に示す．tropomyosin (TM) 及び troponin (TN) の T，I，C の各コンポーネントが示されている．

動物における胎生期筋の研究を進めつつ，時間経過や，複数筋の検討を念頭に置いて症例を増す一方で，single fiber 上での LC の存在様式についても分析する必要がある．

更に nemaline 筋の myosin　LC が他の疾患では見られない特異的な構成である事を考えると，central core disease との合併例や，late onset で亜急性進行性の経過をとる late　onset　rod myopathy ではどのような LC 構成を呈するのか興味深い．

本研究では，こうした myosin LC の分析の他，tropomyosin, troponin の 3 成分がそれぞれ slow form から成る事を明らかにしたが，これは nemaline 筋が全体として slow 化している事を示していると考えられる．

おわりに

nemaline　myopathy 生検筋を二次元電気泳動法を用いて検索し，myosin　LC の hybrid 構成，特に LC3の存在を Staphylococcus V8 protease による限定分解で明らかにした．tropomyosin や troponin 3 成分の上からも nemaline 筋が slow 化している事を示した．

最後に，本研究について貴重な御教示をいただいた国立武蔵療養所神経センターの杉田秀夫先生，当教室の庄司進一先生に深謝します．

文　献

1) Shy, G.M., Engel, W.K., Somers, J.E. & Wanko, T.: Nemaline myopathy. A new congenital myopathy. Brain, **86**: 793, 1963.

2) Sreter, F.A., Åström, K.-E., Romanul, F.C.A., Young, R.R. & Jones, H.R.Jr.: Characteristics of myosin in nemaline myopathy. J. Neurol. Sci., **27**: 99, 1976.

3) Mikawa, T., Takeda, S., Shimizu, T. & Kitaura, T.: Gene expression of myofibrillar proteins in single muscle fibers of adult chicken-Micro two dimensional gel electrophoretic analysis. J. Biochem., **89**: 1951, 1981.

4) Cleveland, D.W., Fisher, S.G., Kirchner, M.W. & Laemmli, U.K.: Peptide mapping by

limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 252: 1102, 1977.

5) Pons, F., Leger, J., Georgesco, M., Bonnel, F. & Leger, J.J.: Myosin light chains in normal and pathological human skeletal muscles. Muscle & Nerve, 6 : 40, 1983.

6) 杉田秀夫，春原経彦，埜中征哉，石浦章一，高木昭夫：ネマリンミオパチーのミオシンについて．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53年度研究業績集．1978，pp. 215—217.

7) Volpe, P., Damiani, E., Margreth, A., Pellegrini, G. & Scarlato, G.: Fast to slow change of myosin in nemaline myopathy: Electrophoretic and immunologic evidence. Neurology (Ny), 32: 37, 1982.

8) Stuhlfauth, I., Jennekens, F.G.I., Willemse, J. & Jockusch, B.M.: Congenital nemaline myopathy. II. Quantitative changes in α-actinin and myosin in skeletal muscle. Muscle & Nerve, 6 : 69, 1983.

9) Hoh, J.F.Y. & Yeoh, G.P.S.: Rabbit skeletal myosin isozymes from fetal, fast-twitch and slow-twitch muscles. Nature, 280: 321, 1979.

52）筋タンパクの崩壊とリソゾームチオール性プロテアーゼ

木 南 英 紀*

研究協力者　勝 沼 信 彦* 板 東 祥 晃* 伊 井 邦 雄**

はじめに

筋ジストロフィー症は骨格筋の壊死を伴う疾患である．我々は壊死性筋崩壊の機序と強い筋タンパクの分解能をもつリソゾームのチオールプロテアーゼ群との関連を追求している．実験モデルとしてジストロフィーハムスター及びプラスモシドによる急性筋崩壊を用いた実験で，これらの罹患筋において，カテプシン B&L 活性の著しい上昇と，チオール性カテプシンの阻害タンパクである内在性インヒビターも平行して上昇していることを昨年報告した．しかし，罹患筋で上昇するカテプシン活性は，筋のリソゾームに由来するというより，浸潤細胞とくにマクロファージに由来することを間接的方法により示唆した．筋壊死における非筋細胞の関与を明確にすべく，カテプシン B と内在性インヒビターの罹患筋における局在をペルオキシダーゼ標識抗体を用いて組織化学的に調べた．同時に，筋及び浸潤細胞中のカテプシン，インヒビターの量を測定した．

材料と方法

ラット肝よりカテプシン B[1]，内在性チオールプロテアーゼインヒビター[2]を，ラット皮膚上皮よりもチオールプロテアーゼインヒビター[3]を精製し，それぞれに対する抗体を作製した．同様にハムスター肝よりもインヒビターを精製し，抗体を作製した．ペルオキシダーゼ標識抗体の調製は石川らの方法[4]に従った．即ち，$F(ab)_2$を調製し，ヒンジ部の SH 基を露出させる一方，ペルオキシダーゼにマレイミド誘導体を導入し，両者を反応させ，ペルオキシダーゼ標識抗体を作製するものである．この標識抗体を用いて，組織学的検査及びサンドイッチ法による抗原の定量を行った．免疫組織化学的染色は 3 %のパラフォルムアルデヒドで固定の後，ペルオキシダーゼ標識抗体と反応させ，ジアミノベンチジンテトラクロライドと過酸化水素で発色させた．

筋ジストロフィーハムスター（UM×7.1系）とその対照動物は 5 週齢のものを使用した．Plasmocid は国立神経センターの杉田先生より供して頂いたものであり，0.5%生食液を直接ラットのひらめ筋に注射した．多核白血球，及びマクロファージはカゼイネイトをラット腹腔内投与後，1 日目，及び 3 日目の腹膜よりそれぞれ採血した液をパコールを用いた密度勾配遠心を 2 回行い，顕微鏡的に95%以上各々の細胞を含む標品を得た．マスト細胞は無処理の腹膜より採取し，パコールの密度勾配遠心により分離した．

結　　果

リソゾームのチオール性プロテアーゼの諸性質に関する詳しい総説[5]はあるので，肝型インヒビターと皮膚型インヒビターの相異について，簡単に説明する．両者共，分子量11,000のシングルペプチドである．アミノ酸組成も極めて類似するが，注目すべきは肝型インヒビターが 2 残基のシスティンを含むのに対し，皮膚型 TPI は全く含まないことである．肝型インヒビターは分子表面の 1 個システィン残基が，複合ジスルフィドを形成したり，S-S 結合をつくり，二量体を形成するとチオ

＊徳島大学医学部酵素研酵素化学
＊＊徳島大学医学部第一病理学

ールプロテアーゼと複合体を形成できず，不活性となる．システィン残基が遊離であると活性であり，システィン残基の修飾による活性調節があるが，皮膚型インヒビターはそのような調節はなく，常に活性型である．両者はチオールプロテアーゼに対する阻害スペクトルにも差がみられ，肝型インヒビターがエクソペプチダーゼ作用をもつ，カテプシンB，Hをも強く阻害するのに対し，皮膚型インヒビターによる阻害は弱い．有用であったのは免疫学的に両者が全く異なることである．酵素抗体法による肝型インヒビターと皮膚型インヒビターの標準曲線をもとめると，前者は0.01～1 ng/tube, 後者は0.001～0.1ng/tubeの間で測定が可能であったが，互いの抗原を全く認識しないことがこの測定法によっても明らかになった．カテプシンBに対しては0.5～50ng/tubeの間で測定可能であった．

そこで，ジストロフィー症罹患筋における非筋細胞の役割りを明らかにする目的で行ったジストロフィーハムスター（UM×7.1系）5週齢の腓腹筋におけるカテプシンB及び肝型インヒビターの局在を免疫組織学的結果を**図1**及び**図2**に示す．**図1**はラットの抗カテプシンB抗体を用いて染色した結果であり，**図2**はハムスターの抗肝型インヒビター抗体を用いて染色した結果である．カテプシンB，肝型インヒビターともに，筋細胞より

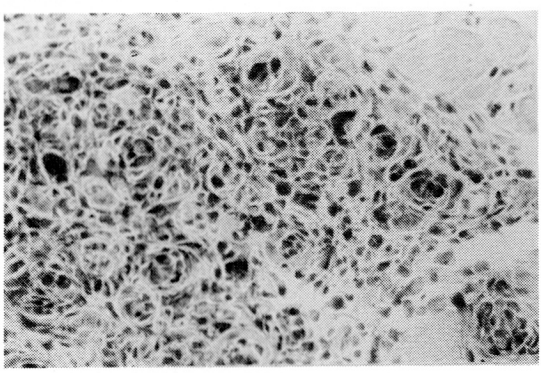


図1　ジストロフィーハムスター腓腹筋病変部におけるカテプシンBの局在．抗カテプシンB抗体を用いたマレイミド直接法による免疫組織化学的証明（×700）

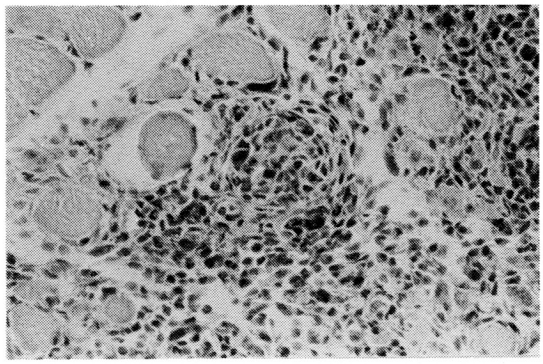


図2　ジストロフィーハムスター腓腹筋病変部におけるTPI-Lの局在．抗TPI-L抗体を用いたマレイミド直接法による免疫組織化学的証明（×700）

も浸潤細胞群が圧倒的に濃染している．筋細胞内に浸潤した，とくに単核の大きな組織球性細胞が強く染まっている．インヒビターは多核白血球と思われる細胞もかなり濃染している．この結果は昨年度の報告を支持するものと思われる．同時に，正常ハムスターの腓腹筋を同じ手法で染色しているが，浸潤細胞はほとんどなく，血管内皮細胞と思われる細胞がわずかに染まっているだけで，やはり筋細胞は殆んど染まっていない．

次にプラスモシドによる急性筋崩壊において免疫組織学的検査とカテプシン，インヒビターの定量を行った．プラスモシド筋症においてもジストロフィーハムスターと同じく，多数の浸潤細胞がみられ，カテプシンB，肝型インヒビター共にそれらの細胞が濃染した．筋ホモジネートのカテプシンB&L活性は昨年の報告のように約6倍の上昇がみられる（**表1**）．酵素抗体法による定量では，カテプシンBが3倍，カテプシンHが2.6倍の増加しかみられず，おそらくカテプシンLの増加が著明なものと想像される．肝型インヒビターは1.4倍増加している．皮膚型インヒビターは正常組織には極めて少ないが，罹患筋では17倍と著しく増加している．次に浸潤細胞におけるカテプシンとインヒビター量を測定した．浸潤細胞の主たるものはマクロファージ（Mϕ）多核白血球，マスト細胞等である．ラット腹膜よりパコール及びフ

表1　プラスモシド罹患筋のカテプシン及び内在性インヒビター量

Treatment	Cathepsin B+L	Cathepsin B	Cathepsin H	TPI-L	TPI-S
	mU/g tissue	μg/g tissue		μg/g tissue	
Control	23±3.1	3.2±0.5	2.3±0.3	2.8±0.4	0.006±0.001
Plasmocid	146±22	10.0±2.3	6.0±0.9	4.0±0.8	0.10±0.02

表2　分離マクロファージ，多核白血球及びマスト細胞における
カテプシンと内在性インヒビターの含有量

Cells	Cathepsin B	Cathepsin H	TPI-L	TPI-S
	μg/mg		μg/mg	ng/mg
Mφ	6.0	2.5	0.22	0.34
PMN	0.17	0.35	0.11	36
Mast cells	0.07	0.07	0.0005	0.02

ィコールパックを用いた密度勾配遠心より95%以上それぞれの細胞を含む標品を得た．カテプシンB，Hの量はMφに圧倒的に多く，マスト細胞には極めて少ない（表2）．肝型インヒビターはMφ，多核白血球の順に多く，マスト細胞は非常に少ない．皮膚型インヒビターは，多核白血球に圧倒的に高かった．従って，罹患筋での強いカテプシン活性の上昇はMφに，インヒビターはMφのみならず，多核白血球にも由来していると考えられる．

考　　察

筋タンパクの崩壊を伴う疾患の中で，筋ジストロフィー症は，リソゾームのチオール性プロテアーゼ，マスト細胞プロテアーゼの活性増加を伴う疾患である．その点ではマーカインやプラスモシドによる急性筋崩壊と共通している．結局，その原因は，間質へ多くの非筋細胞が浸潤してくることにあると考えられる．．表2に示したようにMφが非常に強いカテプシン活性をもち，筋組織はカテプシン量が低いため，ホモジネートでは筋組織と間質細胞群を混合してしまうため，カテプシンB，H及びインヒビターもジストロフィー筋やプラスモシド処理筋で増えたことになる．筋細胞の中へMφなどの浸潤細胞が入っている像が観察され(図1)，おそらく，筋タンパクはこれらの細胞へ取り込まれるか，もしくはプロテアーゼが細胞外へ遊離して分解されるのであろう．肝臓での細胞分画法による結果を応用できるとすれば，Mφでもプロテアーゼはリソゾームにインヒビターは細胞質に存在することになる．もし，筋タンパクがリソゾームに取り込まれて分解されるならば，インヒビターの働く場は殆んどないであろう．一方，局所へリソゾームからプロテアーゼが遊出されるとすれば，インヒビターも遊出され，阻害的な役割りを演じていることも十分考えられる．それらの検討は今後の課題である．

文　　献

1) Towatari, T., Kawabata, Y., and Katunuma,

N. : Crystallization and properties of cathepsin B from rat liver. Eur. J. Biochem., 102 : 279, 1979

2) Kominami, E., Wakamatsu, N., and Katunuma, N. : Purification and characterization of thiol proteinase inhibitor from rat liver. J. Biol. Chem., 257 : 14648, 1982

3) Takeda, A., Kobayashi, S., Samejima, T. : Isolation and characterization of two thiol proteinase inhibitors of low molecular weight from newborn rat epidermis. J. Biochem., 94 : 811, 1983

4) Ishikawa, E., Imagawa, M., Hashida, S., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y., and Ueno, T. : Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochmical staining. J. Immunoassay, 4 : 209, 1983

5) Katunuma, N., and Kominami, E. : Structures and functions of lysosomal thiol proteinases and their endogenous inhibitor. Curr. Top. Cellul. Regul. (B.L. Horekcer and E.R. Stadtman, eds.) vol. 22 : 71, 1983

53) ^{31}P-NMRによる実験的糖原病の研究

宮　武　　正*

研究協力者　桑　原　武　夫*　湯　浅　龍　彦**

はじめに

McArdle病[1]やTarui病[2]を代表とする糖原病の病因として，前者ではphosphorylase[3),4)]の，そして後者ではphosphofructokinaseの欠損[2]によりEmbden-Meyerhof系での円滑な解糖が阻害されるためであることが証明されている．また，臨床症状として，筋電図上electrical silent muscle crampと表現される運動負荷時の有痛性筋拘縮ならびに脱力が引き起こされることが知られている．

Iodoacetateは解糖系酵素であるglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseを選択的に阻害し，これに曝露された骨格筋にいわゆるexercise induced cramping類似の拘縮を生ぜしめることが知られている．また，これをラットの腹腔動脈内に投与し，阻血下にて運動負荷を加えることにより下肢に筋拘縮を生ぜしめ，糖原病類似の状態を作製する[5),6),7)]ことも報告されている．

今回，我々はこの方法により作製した糖原病モデルラットにおいて骨格筋収縮に伴うエネルギー代謝の推移をsurface coil方式のNMRを用い，*in vivo*で観察したので報告する．

材料と方法

方法の詳細はBrumbackら[6]の方法に準じた．材料は体重200gの雄ウイスターラットを用いた．35mg/kgのpentobarbital腹腔内投与により麻酔を行い，pH7.4に調整したsodium iodoacetate (25mg/kg) 溶液200$\mu\ell$を下行大動脈内に投与した．投与後60分にて運動負荷を開始した．

運動負荷は電圧80V，パルス幅0.2m秒，周波数1Hzの矩型波を60秒間坐骨神経に加え，下肢筋を収縮させることによって行った．坐骨神経への電気刺激は，坐骨結節にて坐骨神経を露出させ，電極を直接接触させることによって行った．

運動負荷は鼡径部にて大腿動脈を露出し，これを結紮する群 (ischemic exercise) と，しない群 (non-ischemic exercise) とに分けて行った．コントロールとしてiodoacetateと同量の生理食塩水を腹腔大動脈内に投与した．

^{31}P-NMRの観測はsurface coil方式のJEOL GX270 FT-NMR spectrometer (磁場強度6.3 Tesla) を用いた．surface coil (ϕ=6mm) は下腿屈側面に固定し，^{31}Pの観測周波数として109.14MHzを用いた．90°パルス幅を15μsecとし，pulse repetition time 2秒で64回の積算を行った．

結　　果

図1に安静時に下腿屈側より得られた^{31}P-NMRスペクトルを示す．ピークは6個分離される．高磁場側，すなわち，むかって右側よりβ-ATP，α-ATP (およびβ-ADP)，γ-ATP (およびα-ADP)，Creatinine phosphate (PCr)，無機燐 (Pi)，糖燐 (Sugar-P) である．この安静時正常筋でのSugar-Pのスペクトルの大部分は主にglucose-6-phosphateのピークで占められているとされている．またHMPA (hexamethyl phosphoramide) はexternal standardとしてsurface coilの裏側に毛細管に封入して設置したものであるが，これにより，各ピークの高さ (正確には面積であるが) を補正し，値の変化を基準状態からの変化率として追跡することを意図したためである．

＊新潟大学脳研究所神経内科
＊＊国立小千谷療養所神経内科

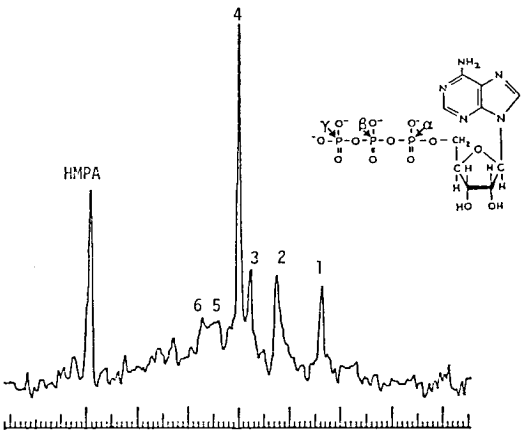


図1　^{31}P-NMR spectrum obtained at 109.19MHz from a live anesthesized male wister rat hind-leg muscle.
1. β-ATP, 2. α-ATP (and β-ADP), 3. γ-ATP (and α-ADP), 4. PCr, 5. Pi, 6. Sugar-P

図2-aにコントロール群で阻血せずに下肢筋に筋収縮を起した場合の ^{31}P-NMR スペクトルの推移を示す．運動負荷により Pi が増加するのが一過性に認められる．個々のピークを安静時よりの変化率で追ってみた結果を図2-bに示す．Pi, Sugar-P の一過性の増加が認められる．PCr は筋収縮により一時的に消費されるのみで，ATP には殆んど変化が認められない．

図3にコントロール群で ischemic exercise をさせた場合の ^{31}P-NMR スペクトル (a) およびその各ピークの推移 (b) を示す．non-ischemic exercise の場合と比較して PCr, ATP の減少傾向がわずかながら目立つ程度である．

図4に iodoacetate 投与群で阻血せずに運動負荷を行った場合の ^{31}P-NMR スペクトル (a) およびその各ピークの推移 (b) を示す．この場合のラット下肢筋の状態はコントロール群と同じで筋拘縮は起こっていないのであるが，Pi および Sugar

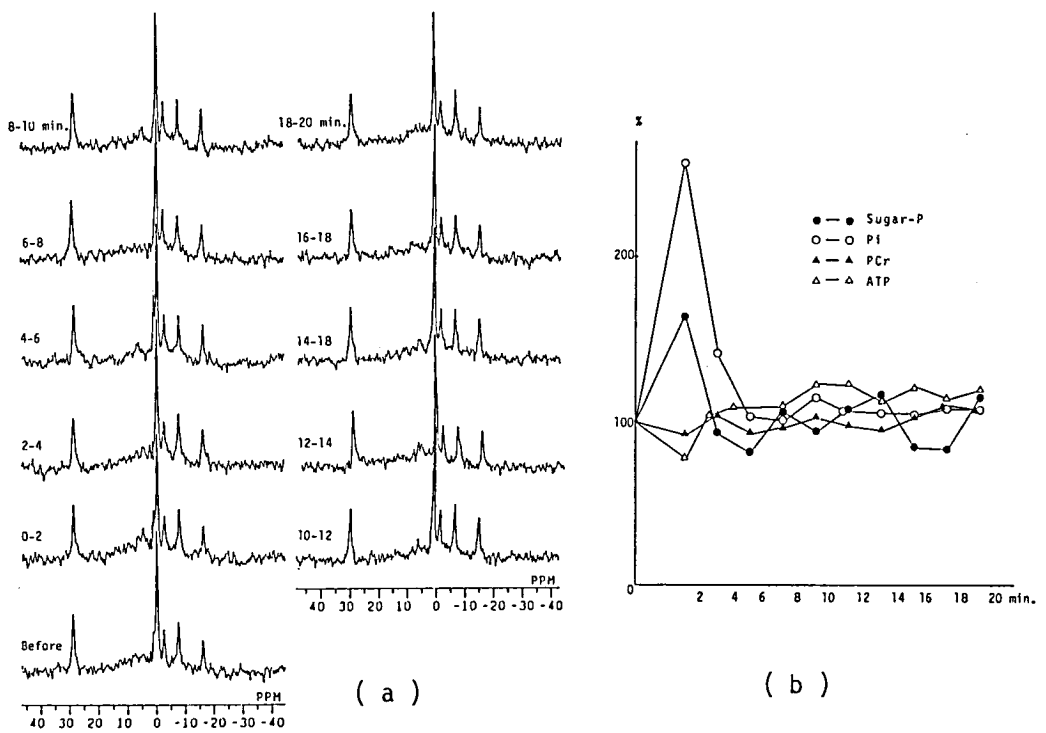


図2　(a) Sequence of ^{31}P-NMR spectra from a non-ischemically exercised control rat hind-leg muscle.
(b) Changes of PCr, ATP, Sugar-P and Pi.

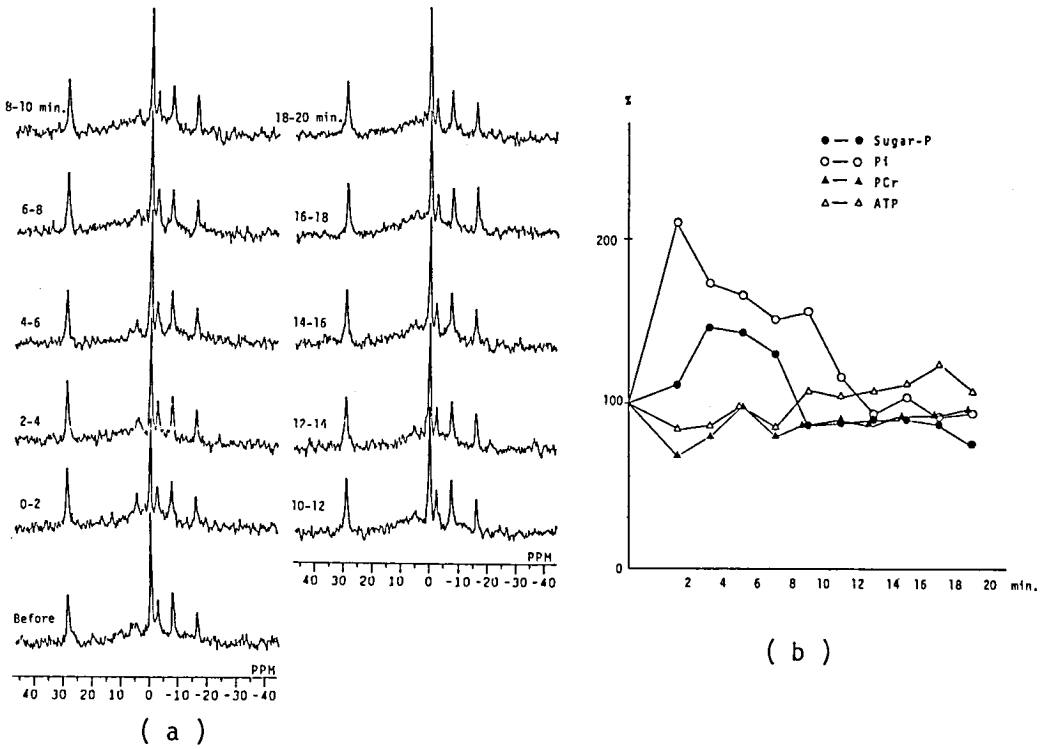


図3　(a) Sequence of ^{31}P-NMR spectra from an ischemically exercised control rat hind-leg muscle.
(b) Changes of PCr, ATP, Sugar-P and Pi.

-P の回復が遅延する傾向が認められる．また，PCr は筋収縮により一時的に消費されるがすみやかに回復し，ATP も同様に消費され，約20分の経過で徐々に回復してくるのが認められる．

図5に iodoacetate 投与群で ischemic exercise を行った場合の ^{31}P-NMR スペクトル (a) および各ピークの推移 (b) を示す．この群では下肢に運動負荷により筋拘縮が生じている．今までの各群と比べ Sugar-P の蓄積が著明に認められ，一方，PCr および ATP が時間の経過にともなって減少してくることが認められ，Pi の chemical shift も低磁場側へ移っており細胞内 pH のアルカリ化が推測される．

考　　案

Sulfhydryl reactive chemical agent である iodoacetate は解糖系酵素である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase を選択的に阻害し，この溶液中に浸した筋肉片での乳酸の産生を阻止する[8]ことが知られており，McArdle がその原著[1]の中で状態の類似性について指摘した如く，筋拘縮を生じることも知られている．

Brumback ら[5),6),7)]は腹腔動脈内に投与したモデルを作製し，生検筋で，電気生理学的かつ組織化学的，生化学的側面から詳細に検討を行っている．彼らは，組織学的に type II B 線維の崩壊が惹起されることを示し，血中 CK レベルの増加，PCr や ATP，乳酸の減少，更に fructose 1,6 diphosphate ならびに glycogen の蓄積を証明しており，このモデルの McArdle 病や Tarui 病との類似について論じている．

一方 ^{31}P-NMR を用いた研究として，人での研

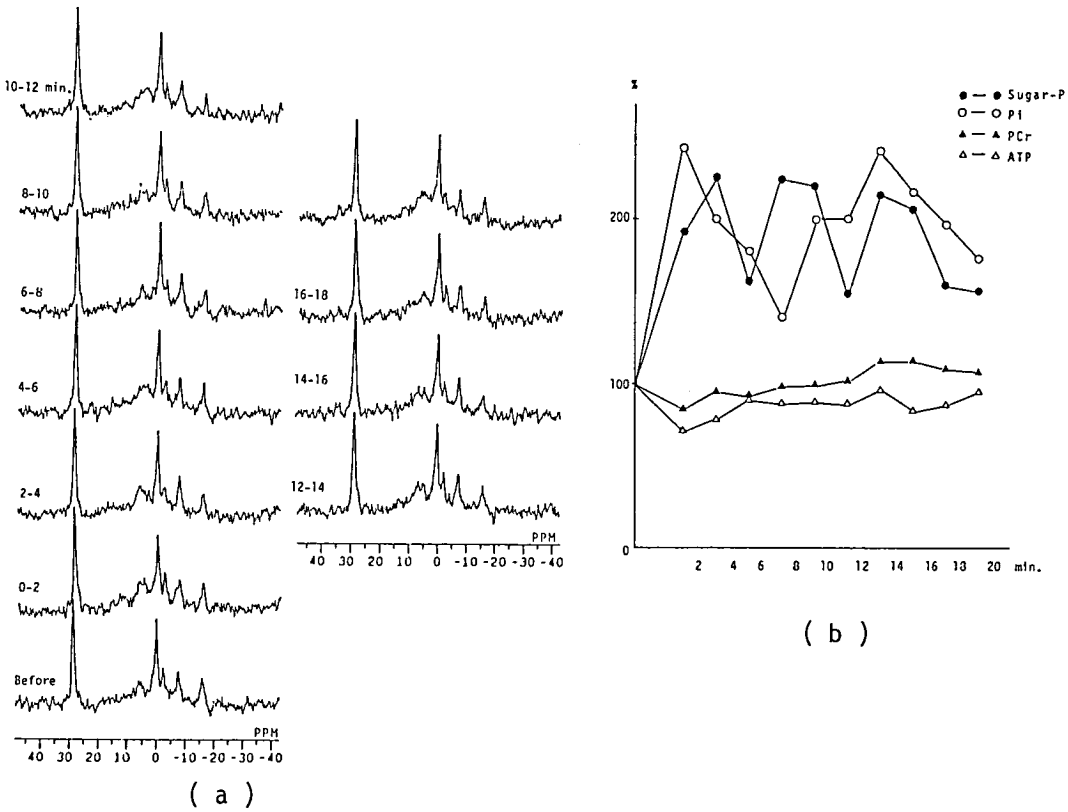


図4 (a) Sequence of ^{31}P-NMR spectra from a non-ischemically exercised iodoacetate administrated rat hind-leg muscle.
(b) Changes of PCr, ATP, Sugar-P and Pi.

究はわずかにTopical magnetic resonance (TMR) を使ったRossら[9]のMcArdle病の例，あるいはChanceら[10]のTarui病での検討が認められるにすぎない．

彼らの報告では，我々の実験と同様，Sugar-Pの蓄積，PCrやATPの減少，細胞内pHのアルカリ化について述べられている．

また，iodoacetate poisoned muscleを使っての^{31}P-NMRの実験は皆無に等しく，わずかにGadianら[11]のカエルの生検筋での *in vitro* での実験が認められるにすぎない．彼らの報告では，我々と同様にSugar-P (Gadianら[11]のperchrolic acid extractによる検討によると，このピークは主にfructose 1,6 diphosphateよりなるとされている）の増加，PCrの減少について述べられているもののATPの動態，細胞内pHについての検討がなされていない．また，これは灌流条件下での実験であり，生理的条件とはかけ離れたものである．

人の場合，周知の如く，臨床症状の発現にかなりのclinical variationが存在し，我々の実験でも個体によりiodoacetateに対する反応性に差があり，人間の場合との類似性が推測された．

Surface coil方式のNMRは既に報告[12]した如く，生体の生化学的情報をその個体を傷つけることなく得ることができるという利点を有しており，各種薬剤への生体の反応を *in vivo* にて観測し得る[12]という利点を有しており，更に従来の生

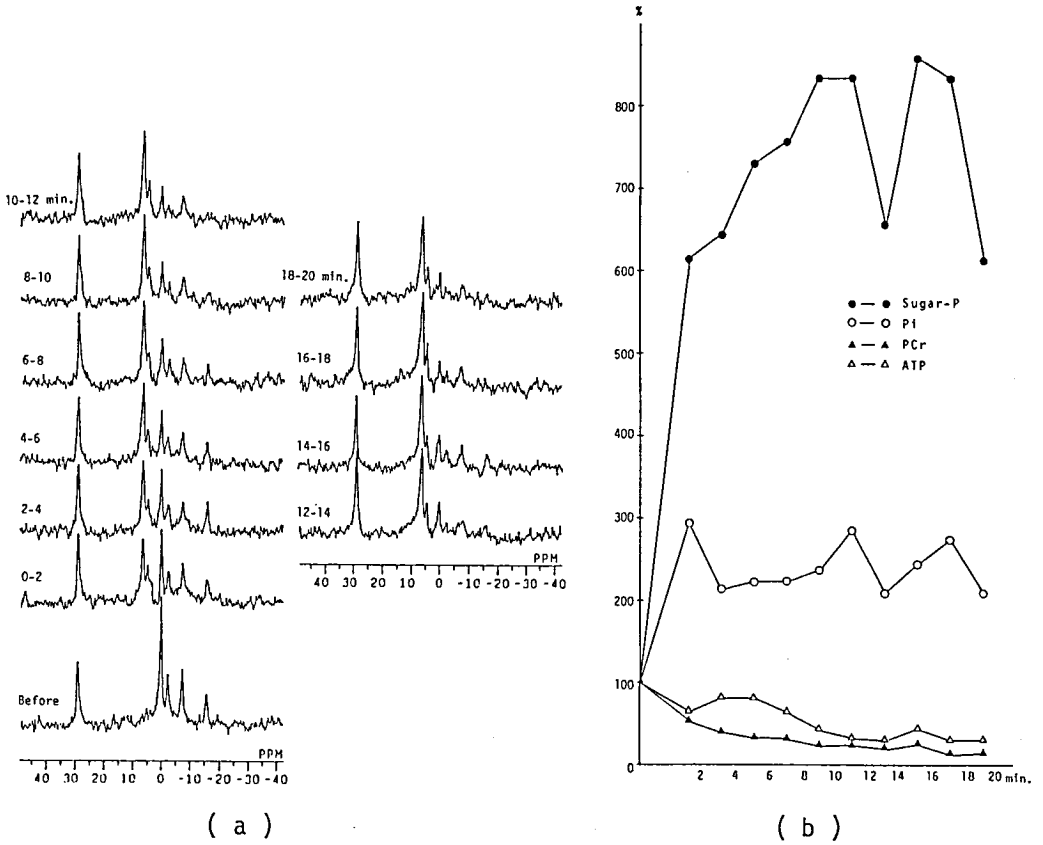


図5　(a) Sequence of ^{31}P-NMR spectra from an ischemically exercised iodoacetate administrated rat hind-leg muscle.
(b) Changes of PCr, ATP, Sugar-P and Pi.

化学的分析手段では殆ど不可能であったATP等の高エネルギー燐酸化合物の生体内でのcompartmentalizationの情報も容易に得られる[13]ことも報告されている。

今回，我々の実験は運動負荷後20分までと短期間の観察に限られてしまったが，このモデルを利用してさらに長時間の観察ならびに^{13}C等の他核種のNMRを利用することにより，筋拘縮の代謝面でのより広範な検討や治療薬開発への糸口が見出し得るものと思われる。

文　献

1) McArdle, B.：Myopathy due to defect in muscle glycogen breakdown. Clin. Sci., 10：13-35, 1951.
2) Tarui, S., Okuma, G., Ikura, Y., Tanaka, T., Suda, M., Nishikawa, M.：Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle—A new type of glycogenosis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 19：517-523, 1965.
3) Mommaerts, W.F.H.M., Illingsworth, B., Pearson, K.M., Guillory, R.J., Seraydarian, K.：A functional disorder of muscle associated with the absence of phosphorylase. Proc. Natl. Acad. Sci., 45：791-797, 1959.
4) Schmid, R., Mahler, R.：Chronic progressive myopathy with myoglobinuria—Demonstration of glycogenolytic defect in the muscle.

J. Clin. Invest., 3 : 2044-2058, 1959.

5) Brumback, R.A., Susag, M.E., Gerst, J.W. : Animal model of human disease : Defective muscle glucose and/or glycogen metabolism. Am. J. Pathol., 101 : 241-244, 1980.

6) Brumback, R.A. : Iodoacetate inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a model of human myophosphorylase deficiency (McArdle's disease) and phosphofructokinase deficiency (Tarui's disease). J. Neurol. Sci., 48 : 383-398, 1980.

7) Brumback, R.A., Gerst, J.W., Knull, H.R. : High energy phosphate depletion in a model of defective muscle glycolysis. Muscle & Nerve, 6 : 52-55, 1983.

8) Cori, G.P., Slein, M.W., Cori, G.F. : Crystalline α-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. J. Biol. Chem., 173 : 605-618, 1948.

9) Ross, B.D., Radda, G.K., Gadian, D.G., Rocker, G., Esiri, M., Falconer-Smith, J. : Examination of a case of suspected McArdle's syndrome by ^{31}P-nuclear magnetic resonance. N. Engl. J. Med., 304 : 1338-1342, 1981.

10) Chance, B., Eleff, S., Bank, W., Leigh, J.S., Warnell, R. : ^{31}P-NMR studies of control of mitochondrial function in phosphofructokinase—deficient human skeletal muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 7714-7718, 1982.

11) Gadian, D.G., Radda, G.K., Richard, R.E., Seeley, P.J. : Biological application of magnetic resonance (ed. R.G. Shulman). Academic Press, New York, 1979, p. 463.

12) 湯浅龍彦，宮武　正，桑原武夫，梅田雅宏，江口恵二：^{31}P 核磁気共鳴法による生きたラットの脳における高エネルギーリン酸化合物(ATP，クレアチンリン酸)の測定—ハロセン麻酔と低酸素状態の影響—．脳神経，35：1089-1095，1983.

13) Gadian, D.G. : Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems. Clarendon Press, Oxford, 1982, p. 39.

54) Phosphorylase b kinase deficiency myopathy のATPによる治療

納　光弘*

研究協力者　岩政輝男**　丸目奈緒美*　山野　隆*
中川正法*　井形昭弘*

はじめに

Phosphorylase b kinase deficiency myopathy (PBKDM) はこれまで9例の報告がみられるが，全て小児例である．このうち6例[1)~3)]においては骨格筋と肝臓に，3例[4)~6)]においては骨格筋のみに本酵素の欠損を認めている．今回我々はPBKDMの初めての成人例で骨格筋のみに障害を認めた症例を報告する．本症例においてadenosine triphosphate (ATP) の経口投与による治療を試みたところ，臨床症状の改善と前腕阻血運動負荷試験における乳酸上昇の正常化をみたので，あわせて報告する．

症　例

17歳女性で高校2年在学中．両親に血縁は認められず，又家系内に同様の症状の者はない．3歳頃までは特に異常に気付かれていないが，3歳頃より下肢に労作後の有痛性筋痙攣が出現するようになった．この発作は長い距離を歩いたり，或いは長距離を走った後の夜中に出現する傾向が強かった．14歳頃より上肢にも出現するようになり，また寒冷によっても誘発されるようになった．発作の頻度ならびに強さは次第に増強し，17歳になった初秋頃より授業で1～2時間以上座位をとるだけでも有痛性筋痙攣がおこり，保健室で休憩をとることが必要となる程になった．神経学的所見は，四肢に軽度のび漫性脱力を認めるのみであった．血清CKおよび尿中ミオグロビンは発作の時のみ軽度上昇を認めた．肝機能検査は全て正常範囲であった．

特殊検査結果

前腕阻血運動負荷試験を2回行ったが，いずれも乳酸の上昇はほとんど認められなかった（図1のbefore treatment）．生検筋肉の組織化学的検索では，筋線維内のグリコーゲンは中等度の増加が認められた（図2）．また，adenosine monophosphate (AMP) を添加して行われる通常のphosphorylase染色では図2の左写真に示すように正常の活性を示し，totalのphosphorylase活性は正常であった．AMPを添加しないで同じ染色を行うと図3の右写真のように全く反応を示さなかった．このことは活性型のphosphorylase aの活

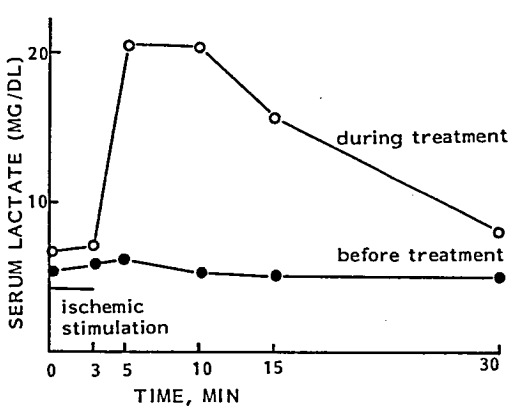


図1　ATP経口投与による治療前ならびに治療中における前腕阻血運動負荷試験の結果

*鹿児島大学医学部第三内科
**熊本大学附属病院病理部

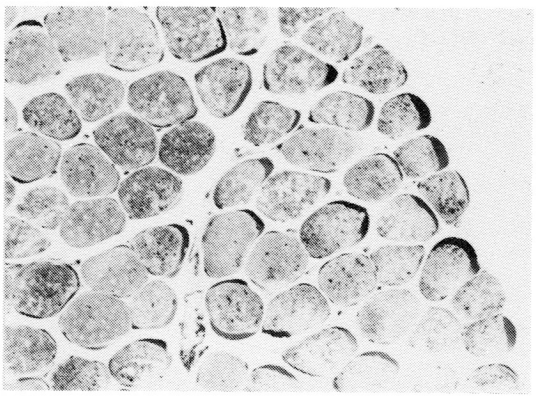


図2　生検筋凍結切片のPAS染色．×160

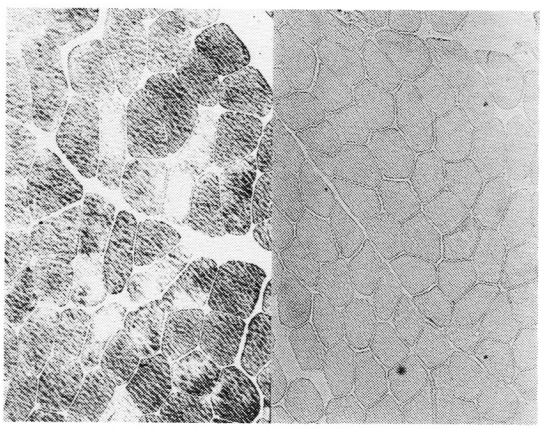


図3　生検筋凍結切片のphosphorylase染色
左図はAMPを添加した通常の染色法でtotalの活性を示し，右図はAMPを添加しない染色法でphosphorylase aの活性を示す

表1　生検筋の生化学的分析結果

		patient	control(n=6)
Glycogen concentration*		26.19	8.09± 3.48
Phosphorylase** a		undetectable	47.7 ±13.2
	a+b(total)	73.14	78.0 ±21.1
Amylo-1, 6-glucosidase***		2.72	1.82± 0.46
α-glucosidase****	pH 4.5	12.86	7.43± 4.63
	pH 7.0	4.30	2.15± 1.24

* mg/g.w.w. of muscle
** u moles/min/g protein
*** PLD as substrate, u moles/mg prot/min
**** 4MUG as substrate, u moles/mg prot/h

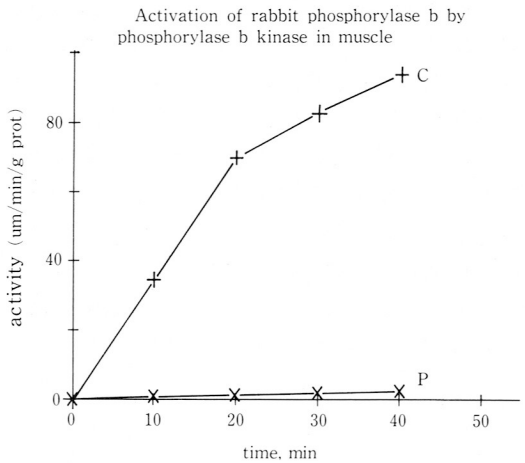


図4　生検筋のphosphorylase b kinase活性
Cは正常対照で　Pは本患者

性がないと考えられ，生検筋の生化学的分析でも**表1**に示すように同じ結果が得られた．すなわち，グリコーゲン含量は中等度の上昇を示し，phosphorylase aの活性は全く認められず，一方，a+bのtotal活性は正常であった．amylo-1, 6-glucosidase，α-glucosidaseなどの他の解糖系酵素は正常値を示した．以上のことより，phosphorylase bからaへの変換の障害と考えられ，Krebsの方法[7]によりphosphorylase b kinase (PBK)活性を測定したところ，**図4**に示すようにPBK活性は殆んど認められなかった．本患者生検筋ホモジネートに，ウサギより純化精製したPBKを添加するとphosphorylase a活性が出現することから，本患者のphosphorylase bは正常でありaに転換され得ることも確認された．又，phosphorylase b kinase kinaseには低下は認められなかった．以上のことより，本患者はPBKDMと診断された．肝臓のPBKは直接測定していないが，肝機能が全く正常であったことから，筋型と考えられる．

ATP 経口投与による治療

上述の様に，PBK は存在しなくても AMP の添加により，不活性型の phosphorylase b はアロステリック効果で活性をもつことから，投与した ATP が体内で AMP に変換され上述の効果を現わすことを期待して，ATP (20mg 錠) 6 錠の分 3 連日投与を行った．治療 2 日目より，有痛性筋痙攣の消失がおこり，高度の労作後のみに軽い発作がおこるだけとなった．この症状の改善のみならず，治療開始後の14日目と60日目の 2 回行った前腕阻血運動負荷試験でも，乳酸は正常の上昇を示した（図 1 の during treatment)．この効果の再現性を確かめるため，一時 ATP 投与を中止したところ，症状は再び以前の状態にほぼ近い状態までもどり，前腕阻血運動負荷試験でも乳酸の上昇は殆んど認められなかった．この後，治療再開でこれらは再び最初の治療時と同じ効果を認めた．

考　　察

この効果の機序が，作業仮説通りに AMP のアロステリック効果によるものかどうかは現在不明であり，その他の機序，例えば ATP が直接 PBK phosphorylase 系のどこかを activate した可能性もある．その作用機序に関しては，今後検討すべき点は多く残されているとはいえ，ATP が本患者に再現性をもって臨床症状及び前腕阻血運動負荷試験の両者に著明な効果をもたらしたという事実は，本疾患の病態並びに治療に重要な方向性を示しているといえよう．

文　　献

1) G. Hug, W.K. Schubert, G. Chuck : Biochem. Biophys. Res. Commun., 40 : 982, 1970.
2) B. Lederer, G. Van De Werve, T. De Barsy, H.G. Hers. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 92 : 169, 1980.
3) N. Bashan, T.C. Iancu, A. Lerner, D. Fraser, R. Potashnic, S.W. Moses : Pediatr. Res., 15 : 299, 1981.
4) M. Strugalska-Cynowska : Folia Histochem. Cytochem (Krakow), 5 : 151, 1967.
5) J.D. Moris, C. Stirling, J.R. Manaligod, L.H. Schliselfeld. Neurology (Ny) , 31 : 1303, 1981.
6) Y. Ohtani, I. Matsuda, T. Iwamasa, H. Tamari, Y. Origuchi, T. Miike. Neurology (Ny) 32 : 833, 1982.
7) E.G. Krebs, in Methods of Enzymology, S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Ed. Academic Press, New York, 1966, Vol. 8, p. 543.

昭和58年度厚生省神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究

ワークショップ抄録

筋変性の自己崩壊機序：Rimmed vacuoleをめぐって

座長　三好和夫(冲中記念成人病研究所)
豊倉康夫(東大医・神経内科)

1）序　　論　　座長　三好和夫
2）Lysosomeと細胞形態　　石川春律(群馬大医・解剖)
3）Lysosomeの発生と分化　　小川和朗・酒井真弘(京都大医・解剖)
4）Autolysosomeと細胞生理　　加藤敬太郎(九州大薬・生理化学)
5）Autolysosome形成条件と細胞内蛋白分解　　勝沼信彦(徳島大医・酵素研)

―――― 基 礎 討 論 ――――

6）筋壊死と蛋白分解酵素　　杉田秀夫(国立武蔵療養所神経センター)
7）筋疾患にみられるvacuole　　福原信義(金沢大医・神経内科)
8）Rimmed vacuoleによる筋崩壊の特異性
　1. 遠位型筋ジストロフィー(三好)とrimmed vacuole(RV)を伴う遠位型ミオパチーの比較を中心として　　埜中征哉(国立武蔵療養所神経センター)
　2. 封入体筋炎とRimmed vacuole　　佐藤　猛(順天堂大医・脳神経内科)
　3. Debrancher deficiencyとRimmed vacuole　　納　光弘(鹿児島大医・第三内科)

筋変性の自己崩壊機序：Rimmed vacuole をめぐって

1）序　　論

（班長）座長　三　好　和　夫
（冲中記念成人病研究所）

表題について，基礎医学研究者と当研究班の幾人かのお話をうかがって，ワークショップを行う．参会者は当研究班員，他の筋ジストロフィー研究班員，そして，その他関心をおもちの研究者約100人である．

はじめに，演者の一人，加藤教授の著書「細胞」―しくみとはたらき―，のまえがきから引用させて頂く．「ライソゾーム（水解小体）という細胞小器官（オルガネラ）の名前は，今から約26年前，1955年に初めて細胞学の分野に導入された比較的耳新しい名称である．この一見，人の健康ないし臨床医学とは，まったく無関係にみえる小器官に関する，地味で基礎的な研究が，後年，偶然に臨床医学とドッキングをし，過去長年の間，原因不明とされていた蓄積症（Storage disease）とよばれている一連の奇病の病因解明に直結した．」

演者の一人，勝沼教授には，このワークショップ編成に多大の御盡力を頂いた．同教授は現在筋ジストロフィー症基礎研究班のメンバーであり，当班とも関連をもって活躍しておられるが，その前にやはり長年，細胞内蛋白分解酵素の先駆者として研究して来られた．

当班は筋ジストロフィー症の研究班であるので，私からは，現実には，このような病気の人々がいるということを，お示ししておきたい．

100余年前に記載された本症の最も代表的な Duchenne 型は，男児で幼時に筋力低下がはじまり，立上るのにも登攀起立を行う，下腿のいわゆる仮性肥大がみられる．ついで歩行もできなくなり，遂には，寝たきり，全身筋の喪失の状態になる．しかし，青年で発症する型もあり，筋萎縮についても顔・肩帯型と腰帯・上腕型などある．

これらでは萎縮する筋は体に近い，いわゆる近位筋であるが，しかし，中には，逆に遠位筋が萎縮する，いわゆる遠位型がある．その中に，今回問題にする空胞ないしリソゾームの異常が特徴として筋線維中にみられる病型がある．これは，上述の Storage disease とはまた別である．

筋中の vacuole は，その他神経原性の筋疾患にもみられるものがあること，また筋ジストロフィー症の Duchenne 型，そして遠位型の筋ジストロフィー症型などいわゆる純粋の筋ジストロフィー症といわれるものでは逆に殆どみられない．これらのことを含めて御考察願いたいと思う．

2）Lysosome と細胞形態

石　川　春　律
（群馬大学医学部解剖学教室）

Lysosome は細胞内消化器官とも呼ばれるオルガネラで，1955年ベルギーの de Duve らによって発見され，命名された．膜からなる袋の中に多くの水解酵素を容れており，その種類は40種以上にも及び，細胞のどの構成成分も分解できるくらいである．別名，水解小体とも呼ばれる．中のほとんどの水解酵素は酸性域に至適 pH を有することが特徴である．

Lysosome の電子顕微鏡でみる形態学的特徴は，(1)一層の膜で限界された袋状の小体で，(2)大きさは大小さまざまで，(3)内容物の見え方も多様で，そして，(4)細胞化学的に同定できることである．Lysosome は直径0.02μm から数 μm までの大きさで，小胞，空胞，顆粒などの形態を示し，内容物も均質，不均質多様である．Lysosome は正しくは細胞化学的に同定しなければならない．酸性 pH で至適活性を示す酸性フォスファターゼなどの水解酵素の存在を証明することによる．

多様な形態を示す lysosome の分類は複雑である．Lysosome は細胞内消化に従事するが，正常では処理すべき物質は膜によって細胞質から隔離された空間，すなわち，lysosome という袋の中で酵素分解されることになる．したがって，lysosome が関与する消化過程を辿ると，大きく 3 つの過程が考えられる．Pre-lysosome，lysosome，および post-lysosome の 3 過程である．Pre-lysosome は消化開始前の食胞（phagosome）を表わし，中に水解酵素は証明されない．食胞には，外から食機能（phagocytosis）や飲機能（pinocytosis）によって取り込まれた異物を容れた heterophagosome と，細胞内の不要物を処理する autophagosome がある．多胞体（multivesicular body）も食胞の一型である．次の過程にあるのが lysosome で，中に水解酵素を含有する．Lysosome には酵素のみが詰まった小胞で，中に被消化物を欠く一次 lysosome と，被消化物を容れ，消化過程にある二次 lysosome が区別される．一次 lysosome は通常球形で，極めて小径のものから，大型の顆粒状のものまで多様である．小径のものにはゴルジ装置領域で有殻小胞（coated vesicle）の形をとるものもある．内容物は細胞によって電子密度は異なるが，いずれも均質に見える．二次 lysosome は一次 lysosome と食胞とが膜融合によってできたもので，水解酵素の存在が証明できる食胞という形をとる．二次 lysosome はいろいろな消化分解段階にあり，多様の形態として観察される．二次 lysosome 相互の融合も起こり，大型化し，また不規則な外形を示すようになる．二次 lysosome は phagolysosome（heterophagolysosome，autophagolysosome）とも呼ばれる．Post-lysosome は水解酵素による消化が終了し，消化されなかった不溶残留物を表わす残余小体（residual body）のことである．細胞は消化が終了すると残留物を放出するが，放出しない場合，この residual body として蓄積してくる．Residual body は電子密度の高い塊に脂質滴が混ざった形態を示し，光学顕微鏡でも黄褐色顆粒として観察され，リポフスチン（lipofuscin）顆粒として知られる．年齢とともに，神経細胞や筋細胞内に lipofuscin 顆粒が増加してくる．

骨格筋細胞における lysosome も上記の図式が基本的には成立する．しかし，筋細胞では目立った異物貪食は認められない．しかし，細胞外からは receptor-mediated endocytosis も行われており，とくに発達過程で重要な現象である．トランスフェリン（transferrin）はこの過程で取り込まれ，

lysosome 系で処理される．実際，細胞表面での coated vesicle 形成が観察できる．筋細胞内では大型の二次 lysosome や residual body が認められるが，これは autophagosome に由来するものと考えられる．多くは細胞表層，とくに核や神経筋接合部付近に見出され，しばしばゴルジ装置との密接な位置関係が認められる．Residual body は典型的な lipofuscin 顆粒の形態をとり，不規則な外形を示す．二次 lysosome の相互融合があったことを示唆している．一次 lysosome はわずかに小型のゴルジ装置近傍に認められる．筋細胞における lysosome の意義，および病態をより良く理解するためには，まず，正常時の一次および二次 lysosome および autophagosome の定量的分析が必要と考えられる．次いで，筋発生・再生および変性時の lysosome の動態を明らかにする必要があろう．

3）Lysosomeの発生，分化

小 川 和 朗，酒 井 真 弘
（京都大学医学部解剖）

細胞内の消化器系（digestive system）であるライソゾーム（lysosome）は形態学的および細胞化学的に大きく2種類に分けることができる．その1は1次ライソゾーム（primary lysosome）と呼ばれ，1層の限界膜に囲まれ，基質はほぼ均一で，中等度の電子密度をもち，比較的小型（0.2～0.5μm）であり，細胞化学的に加水分解酵素を保有しているが，加水分解作用を行っていないものと考えられる．この1次ライソゾームの形成（発生）は，膵外分泌細胞におけるタンパク質性分泌物形成機転と類似した機転によるものであると考えられる．その2は2次ライソゾーム（secondary lysosome）と呼ばれ，内部には細胞内外を起源とするさまざまな物質を含有しており，極めて不均一なもので通常大型（0.5～数μm）であり，内容物の加水分解を行いつつあるものと考えられる．2次ライソゾームはその内容物により，さらに2種類に分けられる．すなわち，細胞外に由来する消化されるべき対象を含有するヘテロファゴライソゾーム（heterophagolysosome）と，消化されるべき対象が細胞内成分由来であるオートファゴライソゾーム（autophagolysosome）である．2次ライソゾームは基本的には異物貪食により形成された異物貪食胞，あるいは自己貪食により形成された自己貪食胞と1次ライソゾームが融合することにより形成されるが，ライソゾームの発生と分化の観点から，異物貪食と自己貪食に伴うライソゾームの変動を，皮下組織球に西洋ワサビ由来のペロキシダーゼ（HRP，ヘムタンパク質）を貪食させた実験から得た結果をもとにして模式図としてまとめると図1のようになる．この図の中で，自己貪食胞形成時に観察されたライソゾームのラッピング機構（lysosomal wrapping mechanism：LWM）に注目し，その制禦機構を皮下組織球を用いた下記の実験より考察した．

(1) LWMとタンパク質合成

タンパク質合成阻害剤であるpuromycin処理した皮下組織球においては，その後のHRP貪食によるLWMの誘起を阻害することが不可能で，これはLWMが新しいタンパク質合成には依存しないことを示している．

(2) LWMとエネルギー

ATPの供給源である解糖の阻害剤（2-deoxyglucose），ないしミトコンドリアの酸化的リン酸化の阻害剤（2-4-dinitrophenolあるいはsodium azide）で，単独あるいは同時に皮下組織球を処理しておくと，卵白アルブミン（OA）の貪食によるLWMの誘起は，同時投与時のみに阻害された．これはLWMの誘起にはATPが必要であることを示している．

(3) LWMと細胞骨格

微細小管の脱重合剤（colchicine，vinblastinあるいはnocodazole）の前処理では，OAによるLWMの誘起を阻害することが不可能で，しかも，これらの単独投与でもLWMが誘起された．一方，微細線維安定剤（phalloidin）あるいは不安定剤（cytochalasin B）の前処理では，LWMの誘起が阻害された．これは，LWMの誘起には，微細小管ではなく無傷の微細線維が必要であることを示している．

(4) LWM と認識機構

ミトコンドリアに特異的に障害を及ぼす paraquat で前処理を行うと，paraquat 単独投与時あるいは，その後 OA を投与した場合でもミトコンドリアを含む LWM が数多く観察された．これは LWM が選択的に貪食すべき物質を認識する能力を有していることを推測させる．

(5) LWM と金・卵白アルブミン複合体（Au-OA）

OA が皮下組織球に貪食される過程と LWM の関係を Au-OA の動態から観察した．LWM は Au-OA が貪食されライソゾーム内に取り込まれる以前にすでに誘起されていた．これは貪食された物質のライソゾームへの直接的効果とみるより，食作用を行う形質膜からの何らかの情報により LWM が誘起される可能性を示唆している．

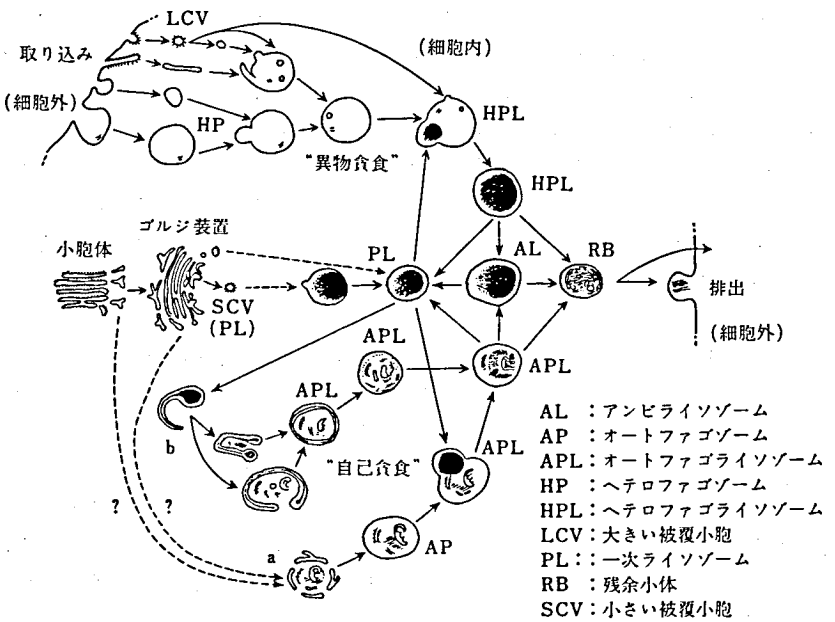


図1　異物貪食，自己貪食に伴うライソゾームの変動
a：オートファゴゾーム形成，ついでライソゾームとの融合．
b：ライソゾームのラッピングによるオートファゴライソゾーム形成．
（小川和朗：細胞，しくみとはたらき，頁．56，朝倉書店，1981）

4）Autolysosome と細胞生理

加　藤　敬太郎
（九州大学薬学部生理化学教室）

リソゾームには，細胞内蛋白質をアミノ酸にまで分解するカテプシンと総称される一群の酸性プロテアーゼが含まれており，リソゾームは細胞内蛋白質の主要な分解の場と考えられている．リソゾームが細胞内蛋白質を分解する機作としては，autophagy が知られているが，autophagy では細胞内小器官を含む一部の細胞成分が膜によって隔離され，形成された autophagosome にリソゾームから酸性加水分解酵素が供給されて分解が行われる．Autophagy に関する報告は1960年以降になって数多く見られ，多くの細胞に普遍的に存在する現象であることが明らかになったが，autophagy の制御機構あるいはその生理的意義については長らく不明であった．最近，細胞内蛋白質分解に関する生化学的研究が活発になり，autophagy の誘起に関する知見が集積されるようになったが，その結果，アミノ酸の欠乏やグルカゴンによって誘起される細胞内蛋白質分解の亢進は，autophagy によることが明らかになってきた．

プロテアーゼ阻害剤は，アミノ酸欠乏あるいはグルカゴンによって亢進される細胞内蛋白質分解が，autophagy によることを明らかにする上で有用な薬物として利用されてきた．リソゾームには主要なエンドプロテアーゼとして，カルボキシプロテアーゼであるカテプシン D とチオールプロテアーゼであるカテプシン B，H および L が含まれており，前者の阻害剤としてペプスタチン，後者の阻害剤としてアンチパイン，キモスタチン，ロイペプチン，E-64などが知られている．これらプロテアーゼ阻害剤を用いた実験から，リソゾームにおける蛋白質分解に果たす各種プロテアーゼの寄与の程度が判別されるようになり，その結果，チオールプロテアーゼであるカテプシン B，H，L は，autophagy による細胞内蛋白質分解に主要な役割を果しているが，カテプシン D の寄与はわずかであるという知見が得られた．チオールプロテアーゼ阻害剤をラット肝実質細胞のリソゾームに取り込ませると，カテプシン B 活性阻害と蛋白質分解阻害の間には相関が認められ，酵素活性が最大に阻害されたとき，蛋白質分解阻害率は55％に達した．この場合，肝細胞を電顕で観察すると，電子密度の高い未消化物質を充満した autophagic vacuole が多数みられる．この autophagic vacuole は酸性ホスファターゼ反応が陽性であり，autolysosome と判定されるが，その内容物には容易に識別可能な細胞内小器官が多数認められる．なお，この autolysosome はたがいに融合し合って巨大化し，これと並行して内容物も次第に分解されてゆく．これらの結果は，チオールプロテアーゼ阻害剤処理細胞では，autophagosome にリソゾームが融合後，蛋白質の分解が阻害されるため，autolysosome が細胞内に長期にわたって残存し蓄積してくることを示し，細胞内蛋白質の分解に autophagy が大きく寄与していることを示している．しかし，蛋白質分解を基質側から眺めると，細胞内蛋白質はそれぞれ固有の半寿命を持ち，heterogeneous な代謝回転を示す．ラット肝では蛋白質の半寿命は短いもので12分，長いものでは15～25日におよぶものが知られている．従って，細胞内蛋白質が主としてリソゾームで分解されると考えるならば，リソゾームが細胞内蛋白質の heterogeneous な代謝回転に寄与する分解機構を見つけ出さなければならない．最近，リソゾームが細胞内蛋白質を直接取り込む microautophagy という機構が考えられ，従来の autophagy は，

macroautophagy と呼ばれて区別されるようになった．Microautophagy では，リソゾームは細胞質中の蛋白質を小規模に取り込んで分解すると考えられているが，この際，蛋白質によって取り込まれる速度が異なるために，蛋白質の代謝回転が異なってくると考えられている．しかし，この機構の研究は緒についたばかりで，なお不明な点が多い．Autophagy の研究では，細胞内蛋白質半寿命の heterogeneity の解明が，今後の重要な課題として残されている．

5）Autolysosome 形成条件と細胞内蛋白分解

勝　沼　信　彦
（徳島大学医学部酵素研究施設）

外来物質のみならず，細胞内小器官に対する Lysosome の食作用は形態学的には良く追求されてきたところである．然し，これ等食胞形成と取り込み，更に食胞内での消化に関するそれらのプロセスと調節の分子レベルでの研究は最近に至るまでほとんどなかった．細胞質局在の可溶性酵素蛋白分解における Lysosome の関与のしかたにつき，我々の研究結果を報告する．

分解すべき蛋白質を取り込んだ Autophagic Vacuole は一次 Lysosome と融合して Protease 群を注入されて二次 Lysosome（Autolysosome）となり，その内で消化がおこなわれる．Leupeptin を与えて部分的に取り込み蛋白の分解を抑制すると，取り込み蛋白の蓄積した大型の Autolysosome が多数出現する．この方法を利用した内容蛋白の Enzyme-immunoassay による分析から，取り込みの条件や Autolysosome 内での分解のプロセスを追求した．図はラット肝オルガネラのパーコールグラディエント分画遠心法による分析像を示している．上図は正常肝であり，軽い粒子で酸 phosphatase の局在しているのが一次 Lysosome である．図下段の Leupeptin 投与肝では重い粒子が著増しており，その中に酸 phosphatase も Cathepsin 群も含有されている．この Autolysosome 内には細胞質に本来局在する酵素である LDH，TAT 及び Aldolase 蛋白が多量に取り込まれている．分離 Autolysosome を抗体液で洗浄しても減少しないので外部に吸着しているものではなく，酵素活性も低下ないしは失っている．更に Cycloheximide(CH) を投与して蛋白合成と Autolysosome 生成を止め，時間的に Autolysosome 内に取り込まれている LDH と Aldolase 量を Enzyme Immuno-Replica 法で定量すると，これ等は30～50分を半減期とする速やかな分解が起こっている事を証明できる．ちなみに細胞質での LDH と Aldolase の半減期は夫々150時間と120時間であるから，Autolysosome 内での分解は非常に速やかであり全く律速に関与していないと考えるべきである．これ等の細胞質蛋白は Lysosome 内で分解されるが，分解の律速ステップは取り込まれる以前のステップに存在することになる．次に Autolysosome を融解させ特定条件で分画遠心をすると，内容物を可溶画分，不溶沈澱画分及び膜画分に分離できる．酸 phosphatase, Arylsulfatase, Cathepsin 等の本来の一次 Lysosome 成分は可溶分画にあり，LDH，TAT, Aldolase, Tryptophan oxygenase, G6P dehydrogenase 等の細胞質から取り込んだ分解されるべき蛋白は全て不溶状態になっている．即ち，極めて易水解性構造になっていることになる．次に GOT (S) と TAT は Dexamethason や高蛋白食で誘導がかかり，細胞質内酵素量が著増する．この場合に Autolysosome に取り込まれている量も平行して上昇しているので Lysosome 経由の分解が主経路であることは明らかであるが，Malic enzyme は細胞質の量がこれで数倍に上昇しても Autolysosome 内量は不変であり，しかも極めて少ない事から，これ等の蛋白群は，Lysosome 経由以外に分解の主経路が存在することを示唆している．細胞内蛋白分解速度と，Autolysosome 生成量とは平行しており，Autolysosome 経由の分解が90%以上であることは多くの意見が一致するところである．勿論 ATP 依存性 Protease の如く明らかに非依存性のものも存在する．Autolysosome の生成は Insulin 投与で減少，Glucagon で増加し，ATP 依存性である．CH 投与で蛋白合成を止め

るとAutophagosomeの形成は停止するが，一次Lysosomeとの融合は止らない．ホルモン等による細胞蛋白分解の変化はAutolysosome形成動態と良く一致している．更に，Lysosome内のProtease群はAcid phosphatase，β-Galactosidase等と独立に誘導的増加を起こし得て，飢餓，サイロキシン，プラシモシッド等で著増をし，再生肝等では減少する．同化亢進や異化亢進とLysosome内Cathepsin群の増減は合目的に一致する動態を示した．

〔参考文献〕

1) 吉野浩二等：生体の科学，34(6)，431，1983
2) 勝沼信彦：生体の科学，34(6)，425，1983
3) Kominami, E. et al: J. Biol. Chem. 258, 6093, 1983
4) Katunuma, N. et al: Curr. Top. Cell Reg. 22, 71, Academic Press. 1983
5) 勝沼信彦：生化学，55(2)，77，1983

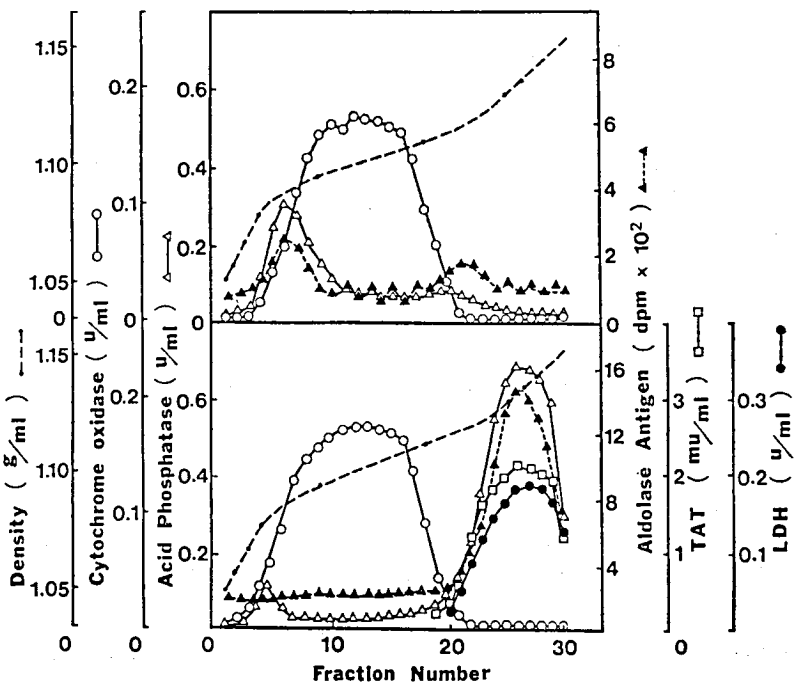


図　Leupeptin投与による肝Autophagosome増加と細胞質酵素タンパク質の取り込み
上図は投与前，下図はLeupeptin腹腔投与1時間後．TATはTyrosine aminotransferase，LDHは乳酸脱水素酵素．

6）筋壊死と蛋白分解酵素

杉　田　秀　夫
（国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部）

筋壊死は生化学的に筋蛋白の分解を意味している．筋壊死の原因は色々あるがここでは進行性筋ジストロフィー症，特に Duchenne 型（DMD）を中心に，筋壊死に関与すると想定される蛋白分解酵素を中心に考えてみたいと思う．

筋細胞内における筋蛋白分解には２つの経路が考えられる．即ちまず非リソゾーム系蛋白分解酵素により部分分解がおこりついでリソゾーム系酵素により分解が完成する系と，リソゾーム系のみにより蛋白分解が完成する系である．

非リソゾーム系酵素の代表は Ca 依存性中性プロテアーゼ（CANP）であり限定分解を行い，リソゾーム系酵素はカテプシン B&L を中心とする酸性側に至適 pH を有する酵素であり非限定分解を行う．

さて筋壊死の際にこの両蛋白分解酵素がどの様な関連を持ちながら関与するか検討した．

DMD における罹患筋を組織学的にみると筋壊死は散在性であり外見上正常にみえる筋線維，変性初期と考えられる“opaque 線維”，hyaline degeneration,更に phagocyte の浸潤に到る各段階をみる事が出来る．この間にどの様な蛋白分解酵素がどの時期に働いているかが問題である．

DMD における筋蛋白分解を考える上で最も重要な事は形質膜の異常である．筋表面膜の異常は本症の遺伝子異常に直結する変化か否かはなお明らかではないが，少なくとも初期的変化と考えられる．そこで筋表面膜を障害する様な筋毒性物質を用い筋壊死を惹起させ筋蛋白分解と蛋白分解酵素との時間的関連をしらべた．

筋形質膜を障害する筋毒性物質として塩酸ブピバカイン（マーカイン）を直接ヒラメ筋内に注射する事により筋壊死を惹起させ形態，生化学的に検索した．

注射３時間後にはトリクローム染色で“opaque 線維”を観察出来，GBHA 法などの Ca 染色により陽性に染まる細胞も確認できる．DMD の場合と本質的に同じである．電顕的には Z 帯の選択的な減少ないし消失が認められた．

障害筋を SDS-PAGE でみると３時間後すでに96K の α-アクチニンの減少がみられる．その後ミオシン重鎖，その他の構造蛋白が減少ないし低分子化合物に分解し，48～72時間でほぼ完全に分解するが43K のアクチンは少なくとも初期は残存している．ブピバカインと一緒に E-64-c を注射すると α-アクチニンの減少はかなり抑制されチオールプロテアーゼの関与を強く示唆している．

次にリソゾーム系酵素特にカテプシン B&L の時間経過を調べてみると，注射６時間迄はコントロールと差はない．従って Z 帯の選択的な分解はリソゾーム系酵素ではなく CANP による事が強く示唆される．カテプシン B&L は12時間後より増加し始め48時間でほぼ peak に達し，以後徐々に低下し筋蛋白の分解とよく一致している．

48時間後の各種リソゾーム酵素活性を**表**に示す．各種のリソゾーム酵素のうち B&L 活性の増加は最も著明でコントロールの約13倍に達した．注目すべき点はカテプシン系酵素活性が一様に増加するのではなく，例えば acid phosphatase 活性はコントロールと変りはなかった．即ち B&L が特

に強い induction をうけている事になる．これらカテプシン系酵素の由来を明らかにする為にカテプシン B 抗体を用い螢光染色を行うと，カテプシン B 抗体は浸潤したマクロファージ（Mφ）にのみ認められた．即ち48時間後の著しい酵素活性の上昇は筋細胞自体のカテプシンではなく細胞外に由来する事を示唆している．この事を更に明らかにすべくブピバカインと共にシクロヘキシイミドを同時に腹腔内に注射すると，Mφ の浸潤は起らず表に示される様にカテプシン B&L 活性は著明に抑制され，又同時に筋蛋白の減量もかなり抑制された．

以上の実験結果より筋細胞表面膜が障害される事により起る筋蛋白分解は 2 段階で起り，初期段階は侵入した Ca イオンにより CANP が活性化され，Z 帯が選択的に分解されその結果筋原線維の disassembly が起る．この事は Mφ の浸潤を誘発し，その後の筋蛋白分解は Mφ 由来のリソゾーム酵素によって行われ，筋蛋白分解の主役はリソゾーム酵素特に B&L によるものと想定される．臨床的にも例えば DMD，多発性筋炎などにおける筋蛋白の分解はこの様な機序によって起る可能性が強い．

Enzymes	Specific Activity (Units/mg)		
	Bupivacaine(B)	Control(C)	B+CHI
Cathepsins B & L	314±16*	24±3	72±14*
Cathepsin D	0.499±0.042*	0.163±0.013	0.205±0.018*
α-glucosidase	1.85±0.19	2.20±0.12	0.64±0.05*
α-galactosidase	3.89±0.36*	1.03±0.08	1.37±0.10*
Acid phosphatase	0.175±0.011	0.174±0.008	0.122±0.009*
Non-collagen protein (mg/soleus)	4.03±0.29*	9.08±0.74	6.87±0.26*

7）筋疾患にみられる vacuole

福　原　信　義
（金沢大学医学部神経内科）

細胞反応を伴わない vacuole は，種々の疾患の骨格筋でみられる（**表1**）が，vacuole の大きさ，形態，vacuole のみられる筋線維タイプ，また電顕で vacuole の周囲の膜の有無，内容物，細胞外との交通の有無などが，それらの鑑別のために重要である．

1）Sarcotubular system の拡大によるもの：

これによる vacuole は共通して，タイプII線維にみられ，SR 由来のものと t-tubles 由来のものとがあり，周期性四肢麻痺や sarcotubular myopathy（Jerusalem et al, 1973）でみられ，実験的には colchicine 中毒でつくることができる（Oguchi & Chou, 1976）．一見，人工産物とみられる小さな vacuole～cleft から，かなり大きな vacuole まで種々の場合があり，vacuole の形態としては，rimmed vacuole に似るが，酸性フォスファターゼ染色に染まらないことで区別できる．また，この sarcotubular system による vacuole は他の小器官をまき込むことはなく，vacuole の内容もほとんど入れておらず，大きな vacuole は小さな vacuole が癒合して大きくなってゆくように思われる．周期性四肢麻痺によるものでは，しばしば t-tubles 由来と思われる network と連続しており，*in vitro* で筋線維のまわりに入れた horseradish peroxidase（HRP）がこの vacuole にとり込まれることにより t-tubules 由来の vacuole であることが証明された（三田，Engel，1974）．一方，SR 由来のものに tubular aggregate があるが，この tubular aggregate はタイプII筋線維に出現し，HE 染色での vacuole の部分は NADH-TR 染色により不規則な顆粒状に濃染することにより，他の vacuole とは鑑別できる．電顕では，直径65nm 前後の管状構造物が多数平行して配列し，一部 SR の lateral sac と思われるものと連続しているように見え，横断面では蜂巣状にみえる．Mg 依存性 ATPase に染まり，*in vitro* での HRP のとり込みはなく，SR 由来であることが証明されている（三田，Engel，1974）．この tubular aggregate は，周期性四肢麻痺で多くみられるほかに，酸素欠乏状態，筋痙攣，薬物中毒など種々の疾患で報告されている．

2）自己貪食胞によるもの：

代表的なものは，II型糖原病（Pompe 病）によるものであるが，HE 染色では，sarcotubular system の拡大によるものと異なり，vacuole の中に好塩基性の顆粒状物質を多数入れており，この内容物はグリコーゲンの蓄積，ライソゾームの異常を反映して PAS 染色，酸性フォスファターゼ染色に強く染まる．電顕では膜に囲まれたグリコーゲン顆粒の集積が特徴であり，酸性 α-glucosidase の低下のためライソゾーム中にとり込まれたグリコーゲンが分解できず，集積し，ついにはライソゾームの膜が破れ，周囲組織が変性していくもののようである．ほかに，自己貪食胞に共通の所見として dense bodies や myelin figures もみられ，vacuole の近くには蜂巣状の t-network がみられることも多い．自己貪食胞は，実験的にはクロロキン中毒によりつくることができる．

1973年，Dubowitz & Brooke によって oculopharyngeal muscular dystrophy に特徴的とされた rimmed vacuole は HE 染色で好塩基性の，Gomori trichrome 染色で赤紫色の線維状物質で囲まれた vacuole であるが，近年，遠位型ミオパチー，debrancher deficiency myopathy，封入体筋

炎などの筋組織の中心的所見として注目されている．電顕では，主に多層性膜状構造物からなり，グリコーゲン顆粒，変性ミトコンドリアなども混在し，vacuole の周囲は膜に囲まれていないことが多い．酸性フォスファターゼ染色で染まるという組織化学的所見とも合わせ，多くは自己貪食胞，一部は二次ライソゾームと考えられている．

3) 蓄積物質によるもの：

ミトコンドリア異常，グリコーゲンや脂肪滴の集積は，染色法によっては染まらず，vacuole としてみえることがある．

表1　Vacuolar Degeneration

1) Dilatation of sarcotubular system	
	Periodic paralysis
	Sarcotubular myopathy (Jerusalem et al,1973)
	Colchicine myopathy (Oguchi & Chou, 1976)
2) Autophagic vacuolation	
	a) Membrane-bound
	Acid maltase deficiency myopathy
	Chloroquine myopathy
	b) Rimmed vacuoles
	Oculopharyngeal muscular dystrophy
	Distal myopathy
	Tubulomembranous myopathy
	Debrancher deficiency myopathy
	Inclusion body myositis
3) Storage vacuoles	
	Mitochondrial vacuolation
	Vacuoles of glycogenic type
	Vacuoles of lipidic type

8)-1 Rimmed vacuole による筋崩壊の特異性；遠位型筋ジストロフィー（三好）と rimmed vacuole（RV）を伴う遠位型ミオパチーの比較を中心として

埜 中 征 哉
（国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部）

RV を伴う遠位型ミオパチー（Distal myopathy with rimmed vacuole formation(DMRV)）は常染色体劣性遺伝による一疾患単位としてほぼ確立されている．本症の筋崩壊の特異性は胞体内に RV を形成することを主病変とし，筋壊死，再生の過程がほとんどみられないことである．この特異性をさらに明確にすることを目的として臨床症状は近似するが，病理像を異にする遠位型筋ジストロフィー（三好型）との比較検討を行った．

対象・方法

DMRV（男1，女3），三好型（男2，女2）を対象とした．DMRV も三好型も15～25歳で階段昇降困難，下肢の筋萎縮で発症していた．臨床的に異なる点は，DMRV は前脛骨筋の障害が最も強く，CK は正常ないし軽度上昇であるのに，三好型では腓腹筋が最も強く侵され，CK は 4,000～10,620と著明な上昇をみたことであった．

上記の症例での生検筋に各種組織化学的染色を行い，筋線維タイプ（1，2A，2B，2C,）の分布と直径計測を行った．また電子顕微鏡的検索により筋衛星細胞の頻度をみた．

結　果

組織学的，組織化学的所見のまとめは**表1**に示した．

三好型が筋の変性・壊死を主病変とするのに DMRV では RV を伴う筋線維の萎縮が主病変であった．さらに両者では筋変性後の再生にも大きな差があった．三好型では再生線維を反映するタイプ2C 線維は15～47.2%であるのに DMRV では5.7～9.8%と少なく，さらに再生の活動性を示す筋衛星細胞は三好型では16.0～18.6%，DMRV では2.3～7.5%であった．

考　察

DMRV の筋崩壊過程は筋ジストロフィーと所見を同じくする三好型に比較し多くの異なる点があった．DMRV では多分局所的な筋線維の崩壊があり，それはライソゾーム酵素の活性を促し自己貪食をみるものと思われた．DMRV で再生の少ないことがかなり急速な進行をみる大きな要因と思われた．

表1 Summary of histological findings

	DIMD	DMRV	DMD
DEGENERATION			
Rimmed vacuoles	-	+	-
Necrosis with phagocytosis	+	±	+
Opaque fibers	+	-	+
REGENERATION			
Basophilia	+	-	+
Alkaline phosphatase-positive fibers	+	±	+
Type 2C fibers on ATPase stain	↑↑↑	↑	↑↑↑
Number of satellite cells	↑↑↑	→~↑	↑↑↑
SMALL FIBERS IN GROUPS	-	+	-
FIBER TYPE INVOLVEMENT	1+2	1+2	1+2
FIBER TYPE PREDOMINANCE IN ADVANCED STAGE	?	1	1

DIMD: distal muscular dystrophy

DMRV: distal myopathy with rimmed vacuole formation

DMD: Duchenne muscular dystrophy

8)-2 封入体筋炎と Rimmed vacuole

佐藤　猛
(順天堂大学医学部脳神経内科)

1．封入体筋炎の概念

筋鞘核内における微小な細管ないしはフィラメント状封入体は，Chou(1968)[1] が慢性多発性筋炎の症例にはじめて見出し，myxovirus 様封入体として報告した．次いで我々は大腿四頭筋のみに萎縮を呈する慢性多発性筋炎に同様の封入体を見出した[2]．Yunis(1971)や Carpenter(1978)は封入体筋炎なる疾患概念を提唱した．すなわち，1）経過が慢性で，進行性である，2）四肢遠位筋群が侵され易い，3）膠原病症状の合併は稀である，4）血清 CPK の上昇は軽度ないし中等度である，5）筋線維中に自家融解空胞がしばしば認められる，6）ステロイド剤は無効例が多いなどを特徴としている．

封入体を有する筋炎ないしはミオパチーの報告例は，現在では60例以上に及んでいる．すなわち，封入体筋炎, neuromyopathy, distal myopathy, quadriceps myopathy, oculopharyngeal dystrophy などさまざまである．非炎症性疾患も含まれていることから核内封入体をウィルスの nucleocapsid とするには問題が多く，むしろ核の特殊な変性産物とする見方が一般的である．

2．Rimmed vacuole

封入体筋炎における特徴のひとつに前述の自家融解空胞がある．この構造はいわゆる rimmed vacuole と全く同一である．電顕でも自家融解空胞と無数の myelin-like figure から成る．結晶状封入体を有するミトコンドリア，T-tube の蜂窩状変性，Cylindrical laminated body などの変性産物もしばしばみられる．

Rimmed vacuole 型 distal myopathy と封入体筋炎とは，後者では細胞浸潤の存在が診断基準となっているが，それ以外では多くの共通点がある．すなわち，1）rimmed vacuole が多く存在するのに筋原線維の構築は保たれている線維がみられる，2）筋鞘核内封入体が見出される，3）筋電図では筋原性変化に加え，神経原性変化を混在することが多いなどである．

我々の経験した distal 型封入体筋炎では，発症初期の筋生検では血管周囲と endomysium に著明な単核球浸潤が認められた．しかるに1年後の筋生検では rimmed vacuole 型の筋線維変性が主体で，細胞浸潤はみられなかった．このように封入体筋炎の慢性期と rimmed vacuole 型 distal myopathy との鑑別は必ずしも容易でないことがあるので封入体筋炎の定義は現時点では筋組織内に細胞浸潤の認められた症例に限るべきである．

さらに封入体筋炎における筋鞘核内封入体は直径130～160 Åの微小細管状ないしフィラメント状をさし，60 Åの細いフィラメントから成る封入体は非特異性が強いことを示した．

文　献

1) Chou S M; Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis. Science, 158 ; 1453-1455, 1967.

2) Sato T, Walter D L, Peters H A, Reese H H, Chou S M : Chronic polymyositis and myxovirus-like inclusions. Arch. Neurol., 24 ; 409-418, 1971.

3) 佐藤　猛：多発性筋炎．小児神経学の進歩，第12集，67-73，1983.

8)-3 Debrancher deficiency と Rimmed vacuole

納　光弘
(鹿児島大学医学部第三内科)

我々は，これまでに Debrancher Deficiency Myopathy(DDM)の4症例を経験したが，その全例に rimmed vacuole の筋病理所見を認めた．症例1（39歳女性）と症例2（32歳男性）は同胞で，文献1)，3)，4)に報告，症例3（32歳女性）は，文献2)，3)に，症例4（34歳男性）は文献2)，3)に報告した．筋萎縮の分布は症例1)～3)は distal dominant で，症例4は proximal dominant であった．筋線維内のグリコーゲン貯留は症例1)～3)で中等度の増加，症例4では高度の増加を認めた．Rimmed vacuole は症例1)～3)では多数認められ，症例4に於ても出現頻度は少ないが光顕，電顕の両者で特徴的な rimmed vacuole が認められた．18～20nm の異常フィラメントの集積は，症例1)～3)に於て筋線維の核内外に認められたが，症例4では典型的なものは確認出来なかった．尚，症例1)と2)に於ては tubulomembranous structure を認めた．また症例1)～4)の全例で，ミトコンドリアに paracrystalline inclusion などの形態異常を認めた．

以上，我々の経験した DDM の4例全例に於て rimmed vacuole を認めたわけであるが，この病態生理に関しては，DDM において筋線維内に貯留した異常に大きな PLD をライソゾームが異常と感知し，反応してとりこみ，変性していった結果 rimmed vacuole の病理像を呈したものと考えている．

一方，rimmed vacuole を有するミオパチーで，debranching enzyme が正常な例も経験しており，この rimmed vacuole をひきおこす原因は DDM のみならず他に幾つかの原因があるものと考えられる．

文　献

1) Osame, M. et al.: Familiar muscle type amylo-1,6-glucosidase deficiency. 4th International Congress on Neuromuscular Diseases, Sept. 1978, in Montreal, Abstract 207
2) 納　光弘，他：Debrancher Deficiency Myopathy —— Inclusion Body Myositis との関連 —. 第23回日本神経学会総会抄録 IIIC-14 (258)
3) Osame, M. et al.: Is "Inclusion Body Myositis" "Debrancher Deficiency Myopathy"? —— The relationship between "Debrancher Deficiency Myopathy" and "Inclusion Body Myositis"——. 5th International Congress on Neuromuscular Diseases, Sept. 1982, in Marseilles, Abstract WE 63
4) 納　光弘，他：Inclusion Body Myositis の筋病理を呈した Debrancher Deficiency Myopathy の同胞例．代謝，19巻10号，1321，1982

昭和58年度研究班名簿

昭和58年度　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	冲中記念成人病研究所 〒105　東京都港区虎の門2-2-2	所長	03—588—1111
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
	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
	荒木淑郎	熊本大学医学部第一内科 〒860　熊本市本荘 1-1-1	教授	0963—63—1111
運営幹事	杉田秀夫	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	部長	0423—41—2711
監事	宇尾野公義	国立静岡病院 〒420　静岡市城東町24-1	院長	0542—45—0101
班員	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
	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
	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微細構造研究部 〒187　東京都小平市小川東町 2620	部長	0423—41—2711
	高守正治	金沢大学医学部神経内科 〒920　金沢市宝町 13-1	教授	0762—62—8151
	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 〒305　茨城県新治郡桜村天王台 1-1-1	教授	0298—53—3196
	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
	馬渡志郎	国立療養所筑後病院神経内科 〒833　福岡県筑後市大字蔵数 515	副院長	09425—2—2195
	宮武正	新潟大学脳研究所神経内科 〒951 新潟市旭町通一番町 757	教授	0252—23—6161
	川井尚臣	徳島大学医学部第一内科 〒770　徳島市蔵本町 3	講師	0886—31—3111

区　分	氏　名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
班　員	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
	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
	杉村公也	名古屋大学医学部第一内科 〒466　名古屋市昭和区鶴舞町 65	助　手	052—741—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
	田辺　等	虎の門病院神経内科 〒105　東京都港区虎の門 2-2-2	部　長	03—588—1111
	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	助教授	0992—64—2211
	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
	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
	斎田孝彦	国立療養所宇多野病院第二神経内科 〒616　京都市右京区鳴滝音戸山町 8	医　長	075—461—5121
	古庄敏行	杏林大学保健学部疫学教室 〒192　東京都八王子市宮下町 476	教　授	0426—91—0011
	木南英紀	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	講　師	0886—31—3111
	福原信義	金沢大学医学部神経内科 〒920　金沢市宝町 13-1	助教授	0762—62—8151
	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
	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
	田代邦雄	北海道大学医学部脳神経外科 〒060　札幌市北区北14条西5丁目	講　師	011—711—1161
	水野美邦	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
	西村嘉郎	浜松医科大学第一内科 〒431-31　浜松市半田町 3600	講　師	0534—35—2261
	後藤幾生	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	助教授	092—641—1151
	出田　透	熊本大学保健管理センター 〒860　熊本市黒髪 2-40-1	教　授	0963—44—2111

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	高　瀬　貞　夫	東北大学医学部脳疾患研究施設脳神経内科 〒980　仙台市星陵町 1-1	助教授	0222—74—1111
	吉　岡　三恵子	神戸市立中央市民病院小児科 〒650　神戸市中央区港島中町 4-6	医　長	078—302—4321
経理事務担当者	古　島　常　男	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 全国療育相談センター内	理　事	03－203－1211