厚生省「神経疾患研究委託費」

# 筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究

杉田班

昭和59年度研究報告書

昭和60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」班は，過去3年間多くの研究成果を挙げ，昭和58年度をもって終了しました．そして昭和59年度より新しく「筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究」班として発足致しました．当研究班は過去10数年間一貫して筋ジストロフィー症の病因，発症機序の解明を目指し，現象論，実態論的研究の蓄積を経てようやく本質論的アプローチの段階に入りつつあるように思います．

筋ジストロフィー症のように原因不明の疾患の研究にあたっては既成の概念にとらわれない独創的なアイディアが要求されると思います．この報告書の中にも自由な発想に基づいた示唆に富む学問的価値の高い成果が発表されており，今後の研究が大いに期待されます．班員各位の不断の御努力に心から敬意を表します．筋ジストロフィー症の研究の道は極めて嶮しいと思います．しかし病床に横たわる患者さんを思う時，私どもは一時といえども研究を中断することはできません．

本研究班に賜った厚生省当局，国立武蔵療養所神経センター，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，ひきつづき御支援をお願い致します．

昭和59年12月

〈班長〉　杉　田　秀　夫

# 目　　次

昭和59年度総括研究報告…… 7

昭和59年度総合班会議研究報告抄録…… 13

分担研究報告…… 25

Ⅰ．臨床・臨床病理…… 33

Ⅱ．組織化学・微細形態…… 85

Ⅲ．膜，カルシウム，Creatine Kinase…… 127

Ⅳ．エネルギー代謝，他…… 181

Ⅴ．遺伝子…… 241

Ⅵ．筋再生…… 247

Ⅶ．蛋白代謝…… 265

昭和59年度研究班名簿…… 289

昭和59年度

# 総括研究報告

# 総括研究報告

班長　杉　田　秀　夫

〔はじめに〕

本研究報告書は「筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究」班の昭和59年度（初年度）の報告書である．

本研究班の目的は筋ジストロフィー症の成因の解明を当面の目標としつつ，終局的には治療法の確立と本症の根絶を願っている．

この報告書には昭和59年12月１日(土)，２日(日)の両日に開催された班会議に於て報告された論文が集録されている．

〔研究成果の要約〕

本年度発表された報告の中から２，３のトピックについて述べる．

**A．筋ジストロフィー症**

**１）新技術の開発**

未知の分野の開拓に新しい方法論は必須である．最近注目されている画像解析法を用いた臨床研究が報告されている．即ちCT，超音波，NMR画像などでありこれらの機器を用いた本症の経時的変化が確立されるであろう．

組織化学的にはcarbonic anhydrase III (CA-III)，muscle specific enolase (MSE) などによる新しいfiber type識別法が発表された．又，本症羅患筋に浸潤するリンパ球の表面マーカーによるsubpopulationの解析とその病因論的意義が論じられている．

その他放射性同位元素を用いたクレアチン代謝の研究，モノクロナール抗体を用いた核内non-histone蛋白の局在と染色体との関連などの研究が報告された．

**２）筋の変性と再生**

この問題は本症の病態の中核をなすものである．変性を考える上で形質膜は重要な課題であるが，この方面の研究は極めて難しい．

形質膜特異的リガンドを用いた新しい形質膜画分分離法が報告され今後の発展が期待される．

### 3）遺伝子工学的アプローチ

本年より開始されたDMD遺伝子単離の試みは当研究班の柱の一つであり本質論的研究といえる．

DMD遺伝子の単離又はそれと密接にlinkageしているprobeを見つける事により当面保因者発見及び胎児診断を目標としている．すでにヒトX染色体よりいくつかのprobeが単離されており近い将来linkage研究が行なわれるであろう．

### 4）モデル動物に関する研究

従来常染色体劣性遺伝形式を持つハムスター，マウス，ニワトリジストロフィーが研究対象となったが今回DMDと同じ遺伝形式をとるmdxマウスが我国に導入され形態，生理，生化学的に検索されるであろう．

## B．関連疾患

### 1）Distal myopathy (rimmed vacuole型)

Rimmed vacuole型distal myopathyは本研究班が過去精力的に行って来たプロジェクト研究の1つであり，lysosome酵素の病因的意義が研究されてきた．今年度rimmed vacuoleの周辺にカテプシンB，Hなどの酵素が酵素抗体法により実際に存在する事が明らかとなりlysosome酵素が筋蛋白分解に直接的に関与している事がより明白となった．実験的クロロキンミオパチーでも同様の所見が得られ両者は共通の筋蛋白分解機構を有するものと思われる．(E-64-d)

又，クロロキンミオパチーはチオールプロテアーゼ阻害剤で発症が阻止される事がわかりこの事はrimmed vacuole型distal myopathyの治療に結びつく可能性を示している．

### 2）Mitochondrial myopathy

本症も当研究班の研究プロジェクトの1つである．

本邦に於けるmitochondrial myopathyの臨床像の特徴，診断法，Coenzyme$Q_{10}$などによる治療など多方面の発表があり本年8月1日当研究班に於いて基礎専門家を交えてworkshopを行なう予定である．

### 〔研究の将来の見通し〕

当研究班は筋ジストロフィー症の臨症，病態の解明に着実な成果をあげた．筋ジストロフィー症に関する今後解決すべき問題点として2つの事が挙げられよう．

①筋の再生

本症の罹患筋では活発な再生が行なわれているが再生に関しては未解決な点が多い．例

えば再生のポテンシーは正常であるが内部環境が悪い為に変性を上回るに充分な再生ができないのか，再生筋自身正常と異なると理解すべきであろうか，再生を促進するにはどうしたらよいかなど解明すべき多くの課題を有している．

②遺伝子工学的アプローチ

我国は欧米に比しこの問題はやや立遅れてはいるが今後発展すべき重要課題である．最近 ornithine transcarbamylase の遺伝子がDMD遺伝子と隣接している事が明らかとなったのでlinkage研究は急速に進歩するであろう．Linkage研究を実施する際重要なのはDMDの正確な家系図である．臨床にたずさわっている班員各自がもう一度患者の家族歴を調査し正確な家系図を作成し保持しておくことが当面極めて重要であると思われる．

昭和59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臨床，病態と成因に関する研究

# 研究報告抄録

# Rimmed Vacuole 型 Distal Myopathy とリソゾーム

木 南 英 紀
(徳島大学医学部酵素研酵素化学)

【目的】

Rimmed vacuole 型 Distal myopathy は，常染色体劣性遺伝で，本邦において詳細に検討されてきた．近年，この特異なミオパチーにおけるリソゾームの異常が示唆され，筋線維の変性とリソゾームのプロテアーゼとの関連が着目されつつある．

リソゾームに含まれるプロテアーゼの中でも，いわゆるチオール性カテプシン群（カテプシン B, H 及び L）は強いタンパク分解活性（筋構造タンパクの分解も含め）を有し，細胞内タンパク質の分解において主要な役割を担っていることが明らかになっている．Muscular dystrophy と異なり Distal myopathy は phagocytes の浸潤を伴わないのが特徴であり，Rimmed vacuole そのものがチオール性カテプシン群を含むかどうかの検査は本症において，リソゾームの異常を伴うか否か，又，筋萎縮との関連を調べる上でも基本的な課題と思われる．

我々はこのような Distal myopathy の病態を明らかにするため，カテプシン B, H の筋組織における局在を免疫学的に検討した．合わせてチオール性カテプシン群に対する内在性阻害タンパクの局在についても調べた．

【材料と方法】

国立神経センターで保存されている Distal myopathy 1例の筋生検標本について組織学的検査（HE, Gomori-Trichrome 染色）並びに免疫組織学的検査を行った．ヒトカテプシン B 及び H の精製は唐渡ら及び Kirschke らのラットカテプシン B 及び H の精製法を修飾して行った．凍結肝を用いるため，リソゾーム膜が破れ，細胞質に存在する内在性インヒビターと複合体を形成している．そこで肝ホモジネートを pH4.5で37℃，防腐剤の存在下で incubate し，インヒビターを破壊後，その遠心上清を出発材料として精製した．DEAE-cellulose でカテプシン B, H を分離し，その後カテプシン B は CM-セルローズ，アフィゲル501を，カテプシン H は ConA-セファローズ，ハイドロキシアパタイトを行い，それぞれ均一な標本を得た。一方，カテプシン B, H, L などのチオールプロテアーゼに対する細胞内チオールプロテアーゼインヒビター（TPI）3種の中，皮膚，消化管上皮などの上皮性起源の細胞に多量に存在する TPI-$\alpha$ をヒト皮膚上皮を出発材料としてラット TPI-$\alpha$ と全く同じ方法で精製し均一なタンパク標品を得た．100$\mu$g のプロテアーゼ及び TPI-$\alpha$ を家兎皮内に2週間毎に3回注射し，最終注射3～4週間後に採血した．いずれの抗体もそれぞれの抗原に特異的であることは免疫拡散二重法及び Western blotting で確認した．硫安分画，DEAE-セルロースクロマトグラフィーのステップを経て得た IgG をペプシン消化し，F(ab′) を得た．ペルオキシダーゼ標識 Fab′の調整は石川らの方法に従った．免疫組織化学方法は今川らの方法を若干修飾して行った．

ホルマリン固定凍結切片の内在性ペルオキシダーゼを $H_2O_2$ でブロックし，対照血清で処理後切片を先に調製したペルオキシダーゼ標識抗体と反応させ，3, 3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride で染色した．後染色はヘマトキシリンで行った．

【結果】

患者疾患筋片を Hematoxylin-Eosin 染色及び Gomori-Trichrome 法で染色したところ，筋線維の大小不同，間質の増加，中心核の増加などの筋病変と共に，内容に塩基好性物質をもついわゆる Rimmed vacuole が観察された．そこで抗カテプシン B-Fab′-ペルオキシダーゼ複合体を用いて，切片を直接法で免疫組織学染色を行った．筋肉にみられる Rimmed vacuole が強く濃染されており筋細胞そのものは background レベルの染色しかみられない．低倍率で見ると小さなものから大きな vacuole までほとんどすべての Rimmed vacuole はカテプシン B 陽性であった．抗カテプシン-Fab′-ペルオキシダーゼ複合体を用いた検査結果も同様であり Rimmed vacuole が強く染色されている．一方 TPI-$\alpha$-Fab′-ペルオキシダーゼ複合体を用いての染色結果では筋細胞 Rimmed vacuole いずれも陰性であった．

【考察】

ラットの各種組織におけるカテプシン B，H 及び TPI-$\alpha$，$\beta$ のレベルをペルオキシダーゼ標識抗体を用いてサンドイッチ法で測定した結果では，骨格筋におけるカテプシン B 及び H の含量は極めて弱く，腎臓の約10分の 1 及び27分の 1 であった．又，正常な骨格筋細胞は抗カテプシン B あるいは H 抗体で殆ど染色されず，わずかな浸潤細胞が染色されるのみであった．ヒトにおける本症例においてもカテプシン，TPI いずれも骨格筋のサイトプラズムは background レベルの染色であり，Rimmed vacuole のみが抗カテプシン B 抗体及び抗カテプシン H 抗体によって濃染された．この結果は Rimmed vacuole が，リソゾーム由来であることを強く示唆している．塚越らは，Distal myopathy でカテプシン B & L 活性を含む多くのリソゾーム酵素活性の上昇を認めており，Rimmed vacuole が active な lysosome であり，本症の筋変性が vacuole 内で進行している可能性も考えられる．しかし，活性なプロテアーゼをもつ非常に大きな Rimmed vacuole の成因は何であろうか．肝臓では，autophagic vacuole の形成と退縮は極めて速く，約10分の半減期で代謝回転しており，そのことは活発なタンパク分解を反映している．従ってリソゾームのチオール性カテプシンを阻害すると vacuoles 中のタンパク分解が抑制され，非常に多数の又，互いに癒合した大きな vacuoles が形成される．しかし，本症ではカテプシン活性が抑制されているという証拠はない．Rimmed vacuole の成因とチオール性カテプシンとの関係は興味ある今後の課題と思われる．今回の報告は一症例のみの検討であり，今後，多くの症例について検索を重ねると共に，Rimmed vacuole 中の内容物及びカテプシン群を電子顕微鏡及び免疫電子顕微鏡的に追求して，Rimmed vacuole と筋線維変性との関連を追求する必要があると思われる．

# クロロキンミオパチーとリソゾーム酵素

杉田秀夫，佐野元規，石浦章一
（国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部）

リソゾームには，細胞内蛋白質をアミノ酸にまで非限定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存在し，その中でもチオールプロテアーゼが蛋白分解の主役とされている．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が，筋細胞においては正常状態ではリソゾームの発達が乏しいとされている．

病的な場合，例えばデュシャンヌ型筋ジストロフィー及び塩酸ブピバカインによる実験的ミオパチーにおいては，筋細胞それ自身よりも浸潤してくるマクロファージのリソゾームが主役となり筋蛋白分解が完了することが想定されている．一方 Rimmed vacuole (RV) を伴う distal myopathy においてはマクロファージの浸潤は例外的で，筋細胞内に多数の autophagic vacuole (autophagosome と autolysosome の総称) の出現があり，autophagy の亢進状態が想定されている．

細胞質や細胞小器官が膜によって包み込まれ形成された autophagosome はリソゾームと融合して autolysosome に変換され，この中で取り込まれた物質の分解が行なわれている．これら一連の生物学的現象は autophagy と呼ばれている．autophagy の制御機構あるいは生理的意義については，従来不明な点が多く，最近になってようやく，細胞内蛋白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．アミノ酸欠乏やグルカゴンによって誘起される細胞内蛋白質の分解亢進は autophagy によることが明らかになってきた．RV を伴う distal myopathy は，筋細胞における autophagy の亢進状態と理解することが可能であろう．

我々は RV を伴う distal myopathy のモデルとして，クロロキンをラット腹腔内に連日長期間投与することにより RV を伴うミオパチーを作成し，autophagy の亢進状態をつくり出し生化学的に検討を加えたので報告する．

クロロキンを長期間投与すると筋細胞及び肝細胞に autophagosome の出現が多数観察され，筋肉のホモジェネートでは正常コントロールに比較してカテプシン B 及びカテプシン B & L が著明に上昇していた．肝細胞を subcellular fractionation して各分画のリソゾーム・チオールプロテアーゼ活性を測定するとリソゾーム-ミトコンドリア分画 (LMfr) で正常コントロールと比較して著明な上昇があり，中でもカテプシン B の上昇が著明であった．LMfr から Percoll による密度勾配法でリソゾームを分離すると正常のリソゾームよりも比重の軽いところにカテプシン B & L の活性の peak があり，しかも正常よりも上昇していた．この fraction は電顕的に autophagosome よりなる事が確認された．すなわち autophagosome は酸性加水分解酵素をもち autolysosome であると判定された．

次に大熊らの方法により fluorescein-isothiocyanate dextran (FITC-dextran) を用いてリソゾーム内の pH を測定した．FITC-dextran の螢光強度が pH により大幅に変化することを利用してあらかじめ FITC-dextran を取り込ませたリソゾーム内の pH を測定した．

クロロキン長期投与により pH には上昇が見られず，正常コントロールと差がなかった．

クロロキンは細胞内での作用部位として，リソゾーム内で塩基 (base) として働き pH を上昇さ

せるといわれてきた．しかし長期投与の結果では pH には変化がなく，クロロキン長期投与により出現する autolysosome はクロロキンの pH 上昇効果に抵抗性であるといえよう．

従って筋細胞内でも，多数の autolysosome 内で活性が上昇したカテプシン B をはじめとするチオールプロテアーゼにより蛋白分解が充分行なわれているものと考えられる．Autolysosome がどのような機序で induction されてくるかは不明であるが，RV を伴う distal myopathy においても autophagic vacuole は筋萎縮に関与しているものと考えられる．

現在我々はチオールプロテアーゼインヒビターである E-64-d によりクロロキンミオパチーの発症及び進行が抑えられるか否かを検討中である．

# 1 表面膜

若山吉弘
(昭和大学藤が丘病院神経内科)

江橋・杉田ら (J Biochem 46：103, 1959) により発見された進行性筋ジストロフィー症患者血清CK値の高値, Sibley と Lehninger (J Natl Cancer Inst 9：303, 1949) により偶然発見され, Dreyfus ら (J Clin Invest 33：794, 1954) により確立された本症における血清 aldolase 値の上昇などより本症では何らかの leaky muscle plasma membrane が存在する可能性が示唆され, 馬渡・高木ら (Arch Neurol 30：96, 1974) により Duchenne muscular dystrophy (DMD) の筋細胞膜の adenyl cyclase 活性の epinephrine や sodium fluoride に対する反応も正常筋とは異なることが報告されていたが, 形態学的に筋表面膜の異常を証明したのは Mokri と Engel (Neurology 25：1111, 1975) の DMD 生検筋細胞膜についての報告が最初である. 彼等は DMD 生検筋の glutar aldehyde, $OsO_4$ 2 重固定 epon 包埋標本の厚切り切片を位相差顕微鏡で観察すると筋線維の表面に底辺を置き多くは楔状をした筋原繊維の疎しょう化した部分がみられ, これを $\delta$-lesion と呼んだ. この部の電顕的観察では筋線維の基底膜は保たれているものの筋細胞膜の部分的消失とその内部の微細構造の変化を見出しこのような変化は本症生検筋線維変性の初期変化であろうと考えた. 彼等は同時に電顕細胞化学的研究にて筋細胞膜の欠損部分を通じて $\delta$-lesion への peroxidase の流入を証明した. Bradley と Fulthorpe (Neurology 28：670, 1978) は peroxidase より拡散しやすい染色剤 Procion yellow が DMD 生検筋では対照筋に比し明らかに多くの筋線維に入ったことから DMD では sarcolemma に何らかの異常のあることを示唆した. DMD 生検筋細胞膜の部分的消失は Carpenter と Karpati (Brain 102：147, 1979) や埜中・杉田 (神経進歩24：718, 1980) も報告しており, またこのような変化は preclinical DMD 生検筋でも認められている (Wakayama Y et al, Neurology 33：1368, 1983). 次に DMD 生検筋細胞膜の残存部分ないし透過電顕的に正常と思われる部分の structural integrity が正常かどうかが問題となる. Bonilla ら (Ann Neurol 4：117, 1978) は筋細胞膜表面に sugar residue として出ている concanavalin A の receptor の分布を電顕細胞化学的に検討し DMD では対照筋に比しこの分布が不規則であることを示した. これは Dubowitz 一派の Capaldi ら (J Neurol Sci 63：129, 1984) により確認された. さて Branton (Proc Natl Acad Sci USA 55：1048, 1966) により開発された freeze fracture 法は細胞膜内部の分子構築を観察するのに最適の手技である. 細胞膜は $-110$℃, 真空度 $4 \sim 6 \times 10^{-7}$Torr の条件で割るとその疎水性の内面で裂け細胞質側 (P 面) と細胞外腔側 (E 面) の 2 葉の断面が出来る. Schotland ら (Science 196：1005, 1977) は 8 例の DMD 生検筋で 6 例の対照筋に比し筋細胞膜内粒子の明らかな減少を報告したが, Ketelsen (Recent Advances in Myology, Excerpta Medica, 1975, pp446-454) は 1 例の筋ジストロフィー症で膜内粒子の増加を報告し, 吉岡ら (J Electron Microsc 26：103, 1977) も 1 例の DMD で対照より膜内粒子の増加を報告したので, Schotland ら (Acta Neuropathol 54：189, 1981) は更に詳しく DMD 7 例, myotonic dystrophy 5 例, facioscapulohumeral (FSH) dystrophy 5 例の生検筋細胞膜構築を研究した. DMD では P 面, E 面とも有意の膜内粒子及び orthogonal array の減少を認め, FSH では orthogonal array の減少のみ認め, myotonic

dystrophy では異常はみられなかった．Ketelsen (Muscular Dystrophy Research Advances and New Trends, Excerpta Medica, 1980, pp79-87)は 2 例の DMD で追試し Schotland らの所見を確認し加えて caveolae 密度の増加を報告した．

Bonilla ら（Am J Pathol 104：167, 1981）も 6 例の DMD と 5 例の対照で caveolae 密度の有意の増加を認め Fischbeck ら（Ann Neurol 13：532, 1983）は DMD 生検筋細胞膜の cholesterol 含量の増加を，また若山ら（Neurology 35：1313, 1984）は DMD 生検筋で orthogonal array 密度の減少とその subunit particle 密度の減少を報告した．納ら（Neurology 31：972, 1981）は DMD 培養再生筋で対照との間に膜内粒子の有意の差を認めておらず，今後は 1)DMD 生検筋のどの筋線維成熟段階で異常が出現するか 2)DMD 生検筋にみられる所見は DMD に特異的かどうか 3)実験的に DMD 生検筋にみられる所見が作製可能かどうかなどを検討することにより，この筋細胞膜異常の本症の病態に及ぼす影響のより正確な把握が可能となるものと考えられる．

# Duchenne型筋ジストロフィー症（DMD）生検筋における膜異常の問題点—表面膜とNK細胞

佐藤　猛*，荒畑喜一*，A.G. Engel**
（順天堂大学脳神経内科*，Mayo Clinic**）

【目的】

Mokri B, Engel AGら（1975, Neurol, 25：1111）は，DMDの初期病変としてnon-necrotic muscle fiberに筋形質膜欠損のあることを見出し，その重要性を報告した．その後Carpenter S, Karpati Gら（1979, Brain, 102：147）は，筋形質膜の微小欠損が修復されずに放置された場合，当該筋は壊死に陥ることを指摘している．これらDMDにおける膜異常説の生化学的側面は，杉田・石浦（1980, 神経進歩, 24：821）などにより明らかにされて来た．

一方，Natural Killer（NK）細胞は，何らかの異常細胞，たとえば腫瘍細胞，ウイルス感染細胞，血液幹細胞や胎児線維芽細胞の一部に対して，これを早期に認識し破壊する能力を持つことで知られている．最近このNK細胞による標的細胞破壊機序として，Tubular complexによる微小孔（5～16nm）の形成が注目されている（Podack ERら：1983, Nature, 302：442）．Fidzianska Aら（1984, Neurol, 34：295）は，ヒト胎児DMDと考えられた症例を電顕的に観察したところ，Killer cellの浸潤による筋障害過程の存在する可能性を示唆する，興味深い所見を得て報告している．さらにジストロフィー・マウス（C57BL/6J）による動物実験では，ジストロフィー・マウスの各種リンパ組織NK活性が，対照群に比較して明らかに高いことが報告されており（Semple JWら：1984, Clinical Immunol Immunopath, 33：144），とくに生後8～10週目で胸腺萎縮と強い筋崩壊のあらわれる時期に一致して，最も高いNK活性が見られたことは注目される．

われわれは，これまでヒト・リンパ球に対する各種のモノクローナル抗体を用いて，各種のミオパチー骨格筋中に出現する浸潤単核細胞の解析を行なって来た（Arahata K, Engel AG：1984, Ann Neurol, 16：193）．そして58年度の本研究班において，DMD筋（non-necrotic）中に出現する浸潤単核細胞は主として$T8^+T$細胞（cytotoxic/supressor）及びマクロファージからなること，さらに少数ながらNK細胞マーカーとされるLeu 7抗原陽性細胞の混在することを報告した．実験的には，NK細胞が一つの標的を破壊するには一個で十分であるし，NK細胞はリサイクリングして，次なる標的細胞破壊に関与することが知られているのでたとえ量的に少なくとも，その病因的な意義は看過し難いと考えられる．その意味からも，DMDにおけるNK細胞の役割を解明してゆくことは，本疾患の発症機構の一端を知るうえで，きわめて重要であると思われる．今回われわれは，その第一歩として，DMD筋内に出現するNK細胞の定量的解析を進めて来たのでここに報告する．

【対照】

DMD 8 例の生検骨格筋.

【方法】

各々の生検筋に含まれる筋線維総数，浸潤細胞総数と，そのサブセット別，部位別出現頻度を定量した．Leu 7, Leu 11（NK 細胞マーカー）及び Leu 4（T 細胞マーカー）による免疫染色は，直接又は間接螢光抗体法にて実施．壊死筋線維はトリクローム染色及び $C5_b$-9 complement membrane attack complex (MAC) にて同定．マクロファージは酸性フォスファターゼ強陽性，Mo-1抗原陽性細胞として同定した．いずれも2$\mu$ 連続凍結切片を用いた．

【結果】

8 例の筋線維総数は34,151本（1714～7357：$\bar{x}$=4269)．壊死筋線維比率は1.55%（0.25～3.46)．非壊死筋線維のうち直接細胞浸潤を受けているものは0.28%（0.05～0.80）であった．Endomysium に出現した Leu $4^+$，Leu $7^+$，Leu $7^+4^-$，Leu $11^+$ 及び Leu $11^+4^-$ 細胞数は，それぞれ筋線維1000本あたり73±25，15±10，2±1，0.7±1.0，1.0±1.0（SD）であった．

【考察】

われわれの結果からは，最も強力な NK 活性を有するとされる Leu $11^+7^-4^-$ phenotype は少なかったこと．逆に弱い NK 活性を示す Leu $7^+11^-4^+$ phenotype が，より優位であることが示された．このことは DMD 筋障害過程における NK 細胞の関与が，多発性筋炎における抗原特異的 T 細胞のそれとは異なることを示唆する．今後これらの preliminary なデータをさらに整理する必要性が残されているとともに，質的な解析の手段として，免疫電顕的検索を考えており，現在準備中である．

# 筋小胞体機能

高　木　昭　夫
(国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部，虎の門病院神経内科)

筋小胞体（SR）はミクロゾームに相当する筋細胞内部膜である．カルシウムイオン（Ca）をSR内腔に摂取し，筋を弛緩状態にする．また表面膜興奮にともなってCaを放出し筋収縮の引金となる．このようにSRは興奮・収縮連関の中心的役割を担っている．デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の膜異常仮説あるいはCaによる筋障害説の立場から，1967年から本症のSR機能が注目されだした．しかしDMDのSR異常に関してまだ定説には到達していない．近年骨格筋SRのCa遊離異常として，悪性高熱症（MH）が注目されている．MHではCa誘発性Ca遊離が活性化されやすいといわれる．DMDにも悪性高熱の併発が報告された．この視点からもDMDのSR機能を検討した．

## 1.　分離筋小胞体（FSR）

筋ホモジェネートから超遠心法を応用してSR分画が調製される．FSR標本を使用してDMDにおけるCa摂取能の低下が相次いで報告された．SR膜組成の分析では，定性的異常はない．量的にはレシチン含量の低下やCa-ATPase蛋白の減少が指摘された．病的筋材料から得られるFSRの純度が問題となろう．上述の変化はSR膜以外の膜成分の混入により説明可能であろう．事実筋ジス動物モデルを使用して，比較的高純度のFSRで分析が行なわれた．この場合にはSR機能障害は少ないとされた．

## 2.　スキンドファイバー法

DMDの生検筋より単一筋線維を分離してその機能が分析された．まず収縮系に関してCa濃度と発生張力の関係を調べた．低濃度のCaによる張力発生はDMDで有意に増加していた．SRのCa摂取能はカフェイン拘縮の大きさを指標にして比較した．この指標は同年齢対照との比較で差をみとめなかった．このように収縮力の保持された筋線維においてSRのCa摂取能は正常と考えられた．

## 3.　Ca遊離の問題

正常筋の興奮・収縮連関においてCa遊離がどのように調節されているかはまだ知られていない．実験的にはCa遊離をきたす数種の機序が知られている．我々はカフェインによるCa遊離あるいはCa誘発性Ca遊離をDMDスキンドファイバーを使用して分析した．カフェインによるCa遊離はDMDで亢進していると推定された．しかしATPを除去した条件下ではCa誘発性Ca遊離の亢進は認められなかった．カフェイン拘縮の異常亢進はMH回復者で観察される現象である．DMD患者にときとしてMHが併発する事実を支持している．DMDでもCa誘発性Ca遊離の異常を推定しているがまだ確実ではない．

1つの問題はCa遊離異常のDMD病因上の意義であろう．30%のDMD症例にはカフェイン拘

縮の異常は観察されない．疾患特異性の低いことを考慮すると，筋変性に伴う2次的現象と考えられる．ただ変性早期に出現する可能性が大きく，その発生機序は興味深い．筋変性の進展における役割も重要と思われる．

# 分 担 研 究 報 告

# 目　　次

## I．臨床・臨床病理

1) 先天性多発性関節拘縮症の病因に関する病理学的研究……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) mdx マウスの坐骨神経所見 ……39
鳥取大学医学部脳研神経病理　中　村　晴　臣

3) DMD の脊髄前角——ALS の最近の知見を踏まえての再検討 ……42
国立療養所下志津病院神経内科　中　野　今　治

4) (1)諸種神経筋疾患における筋病変の各論的特性と
臨床的意義について……47
——1340例の検討結果——
東京都立神経病院　田　辺　　等

4) (2) Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーの１例……55
東京都立神経病院　田　辺　　等

5) (1)特異な先天性ミオパチーの１例……60
東邦大学医学部第四内科　木　下　真　男

5) (2)筋緊張性ジストロフィー症のカルシウム代謝異常に関する研究……63
東邦大学医学部第四内科　木　下　真　男

6) Oculopharyngeal muscular dystrophy の筋病変
——rimmed vaculoe 型 distal myopathy との比較検討 ……67
筑波大学臨床医学系神経内科　中　西　孝　雄

7) (1) Duchenne 型筋ジストロフィー症の脳 NMR 画像の分析 ……71
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

7) (2) Duchenne 型筋ジストロフィー症（DM）の骨格筋の超音波，
X線-CT，NMR（MRI）画像に関する研究，ならびに
その carrier detection への応用 ……74
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

7) (3) Duchenne 型筋ジストロフィー症の臨床細胞遺伝学的研究 ……79
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

8) Duchenne 型筋ジストロフィー症における交感神経機能異常について
——心電図所見から——……82
国立療養所筑後病院　馬　渡　志　郎

## II. 組織化学・微細形態

9) (1)凍結乾燥切片を用いた微量定量組織化学
——CA-IIIの筋線維レベルでの定量化の試み——　……87
北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門　田　代　邦　雄

9) (2)神経筋疾患における Ultrasound imaging
——CT 所見および筋生検所見との関連について——……90
北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門　田　代　邦　雄

10) 骨格筋パラフィン包埋切片での muscle specific enolase および carbonic anhydrase III 染色による fiber type 識別の試み　……96
名古屋大学医学部第一内科　杉　村　公　也

11) (1)筋ジストロフィーチキンの形態学的初期変化：
酵素組織化学的検討……99
九州大学医学部脳研神経内科　後　藤　幾　生

11) (2) Kearns-Sayre-Shy 症候群の検討
——末梢神経障害を伴った症例——……104
九州大学医学部脳研神経内科　後　藤　幾　生

12) 培養下における正常及び筋ジストロフィー鶏の T-system の微細構造
——タンニン酸染色による検討——……109
東京医科歯科大学医学部神経内科　塚　越　　廣

13) (1) Becker 型筋ジストロフィーにおける神経筋接合部の電顕的観察 ….113
金沢大学医学部神経内科　福　原　信　義

13) (2) Cytoplasmic body myopathy の臨床的，病理学的研究　……117
金沢大学医学部神経内科　福　原　信　義

14) 福山型先天性筋ジストロフィー症の筋細胞膜の変化について
——I. Freeze fracture 法による caveolae 密度の検討——　……122
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

## III. 膜，カルシウム，Creatine Kinase

15) Toxin-アフィニティーによる骨格筋形質膜の分離法 ……129
自治医科大学小児科　桃　井　真里子

16) インタクト赤血球からのPPI抽出分離法と
筋ジストロフィー症赤血球への応用……133
国立武蔵療養所神経センター　吉　田　瑞　子

17) Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）の筋小胞体機能
（続報）……137
国立武蔵療養所神経センター　高　木　昭　夫

18) (1) Kearns-Shy症候群と類似した臨床症状を呈した
神経原性筋萎縮症の1例……142
宮崎医科大学第三内科　栗　原　照　幸

18) (2) Caイオン電極による筋細胞内外のCa濃度の測定：
マーカイン急性筋融解への応用……147
宮崎医科大学第三内科　栗　原　照　幸

19) 筋肉酵素の漏出機構（白鼠を用いて）……152
愛媛大学保健管理センター　植　田　啓　嗣

20) 各種ミオパチー，心筋梗塞および健常人の運動負荷における
ミオグロビン（Mb）とクレアチンキナーゼ（CK）の血中への
流出パターン……157
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

21) (1)カルモデュリン免疫ラットの神経筋に関する研究……164
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

21) (2)組織培養法による受容体蛋白代謝回転とプロテアーゼ，
プロスタグランジンに関する研究……170
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

21) (3)筋ミトコンドリア異常を伴う2種の特異な
筋病態について……174
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

## IV. エネルギー代謝他

22) (1)ジストロフィー鶏発育早期における活性酸素関連諸酵素
および解糖系酵素の異常について……183
自治医科大学神経内科　水　野　美　邦

22) (2)ワゴスチグミンによる agonist induced myopathy の
形態的研究……189
自治医科大学神経内科　水　野　美　邦

23) (1)固定・筋ジストロフィーの筋の glucose uptake ……192
信州大学医学部第三内科　庄　司　進　一

23) (2) Nemaline myopathy の筋構造蛋白 ……197
信州大学医学部第三内科　庄　司　進　一

24) 筋収縮のエナージェティクス
——燐 NMR 法による筋ジストロフィー症病態の研究—— ……203
大分医科大学生理　山　田　和　廣

25) ミトコンドリアミオパチーの生化学的研究：scanning organ
spectrophotometer による白血球電子伝達系の検討……208
新潟大学脳研究所神経内科　宮　武　　正

26) 生体内におけるクレアチンの代謝経路：$^{14}$C-クレアチン腹腔内
注射（ラット）にみられる尿中への$^{14}$C-尿素の排出……213
冲中記念成人病研究所　紫　芝　良　昌

27) (1)ミトコンドリア・ミオパチー：酵素学的診断法の確立……218
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　　猛

27) (2) Duchenne 型筋ジストロフィー症（D.D.）生検筋における
KINK 細胞の定量的解析 ……222
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　　猛

28) (1)筋糖原病の病態分析
——糖原病VII型における高尿酸血症の成因——……226
大阪大学医学部第二内科　垂　井　清一郎

28) (2) Kearns-Sayre 症候群における coenzyme $Q_{10}$ 代謝と
coenzyme $Q_{10}$ 療法の検討……230
大阪大学医学部第二内科　垂　井　清一郎

29) 核内 non-histone 蛋白の局在と染色体との関連
1）アクチン様蛋白の検討……237
東京大学医学部脳研神経内科　萬　年　　徹

V．遺伝子

30) 筋ジストロフィー症遺伝子の単離の試み……243
東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部　鈴　木　紘　一

VI．筋再生

31) ジストロフィーハムスターと正常ハムスター間の筋の交換移植
についての研究（第3報）および mdx マウスの骨格筋のヌード
マウスへの移植についての研究……249
帝京大学医学部第一内科　寺　尾　寿　夫

32) 筋疾患における myosatellite cell の研究 ……253
大阪医科大学第一内科　茂　在　敏　司

33) 実験的再生筋における筋芽細胞増殖因子の研究……258
東北大学医学部脳研脳神経内科　高　瀬　貞　夫

34) 筋衛星細胞活性因子の検討……262
国立長野病院　小　口　喜三夫

VII．蛋白代謝

35) 筋ジストロフィー鶏胚の交感神経筋における蛋白質合成能の
特異性についての研究（第一報）……267
東京都神経科学総合研究所神経生化学　堀　　眞一郎

36) Rimmed Vacuole を伴う Distal Myopathy における
カテプシンB及びHの局在……271
徳島大学医学部酵素研酵素化学　木　南　英　紀

37) 白血球放出因子による筋崩壊機構の研究……275
国立療養所宇多野病院臨床研究部　斎　田　孝　彦

38) 実験的クロロキンミオパチー
――autolysosome の形態学的・生化学的検討―― ……278
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部　杉　田　秀　夫

39) Duchenne 型筋ジストロフィー症の筋変性壊死機構
に関する形態並びに生化学的検討……283
熊本大学医学部第一内科　荒　木　淑　郎

# Ⅰ．臨床・臨床病理

# 1）先天性多発性関節拘縮症の病因に関する病理学的研究

埜中征哉*

研究協力者　内田智子*　岡田理美*

先天性多発性関節拘縮症（arthrogryposis multiplex congenita）（以下AMCと略す）は数多くの原因により惹起される症候群である．関節拘縮といっても関節そのものには異常なく，その周囲の筋に何らかの原因があると考えられている．筋あるいは中枢神経系の病理所見よりAMCは神経原性と筋原性に二大別されている．神経原性ではWerdnig-Hoffmann病との，筋原性では先天性筋ジストロフィーとの異同が問題となることがある．

我々は既知の神経筋疾患を除く12例の特発性AMCの骨格筋を組織化学的に検索し，病因がどこにあるか推察した．さらに総腓骨神経が先天的に欠損し，ためにその支配筋が萎縮し，内反足をみるperoneal muscular atrophy（pma）マウスの病理学的検討をも行い，ヒトAMCとの対比を試みた．

## 対象・方法

### 1）ヒトAMC

生後3月から15歳までの12例で，平均5.7歳，男性4，女性8名であった．何れの症例も3個所以上に関節拘縮があり，左右対称性であった．検索した筋は主に手術の時得られたものであるが，一部は診断のために生検した．大腿四頭筋4，上腕二頭筋4，腓腹筋3，その他1の筋に各種組織化学的染色を行い，ATPase染色により，タイプ1，2A，2B，2C線維を分け，その直径を計測した．

### 2）pmaマウス

pmaマウスは常染色体劣性遺伝をとり，ホモとホモからホモが得られる．内反足を示す生後2月のpmaマウス5匹にネンブタールで麻酔した後，左心室より1.5%グルタール液で潅流固定し，腰髄3～5のレベルで脊髄，脊髄前根をとり出し，さらに大腿骨頭よりやや中枢の部で坐骨神経をとり出した．$O_sO_4$で後固定後エポンに包埋し，1 $\mu$切片にトルイジンブルー染色を行い，最終倍率1000倍の写真を作成し，有髄神経数とその直径分布をみて病因がどこにあるか追求した．対照としては生後2月の同種（CAS）マウス5匹を使用し同様の方法で検索した．

## 結　果

### 1）ヒトAMC

今回使用した筋はいずれもタイプ1，2A，2B線維が約1/3ずつモザイク状に分布することで知られている．今回の組織化学的検索で1例（非特異的なタイプ2B線維萎縮のみ）を除き全ての症例に異常を認めた．最も重症の7月女児例ではWerdnig-Hoffmann病にみられるような群萎縮を認めた（図1）．この例以外では異常の大半は筋線維タイプの分布異常であった．

タイプ2線維の完全欠損が15歳男性の大腿四頭筋で認められた（図2）．この例では同筋の筋力低下が中等度に認められたが筋線維そのものはむしろ肥大気味（80.6±8.1$\mu$）であった．タイプ1線維が55%以上とタイプ1線維優位（多くはタイプ1線維の群化を伴っていた）が4例，タイプ2線維優位1例であった（図3）．未分化なタイプ2C線維の増加は4例に認められた．

以上12例の組織学的，組織化学的所見をまとめ

*国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部

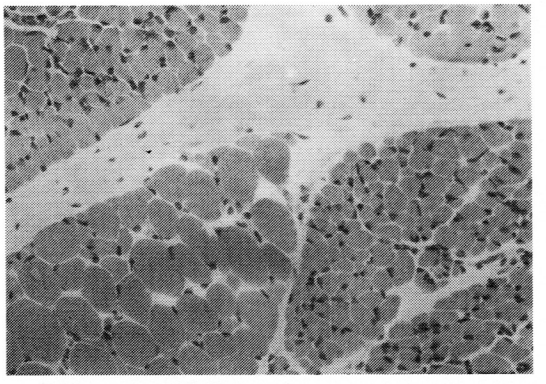


図1　小径線維が群をなして存在し，いわゆる large group atrophy の像を呈する．3月男，大腿直筋，H&E，×150．

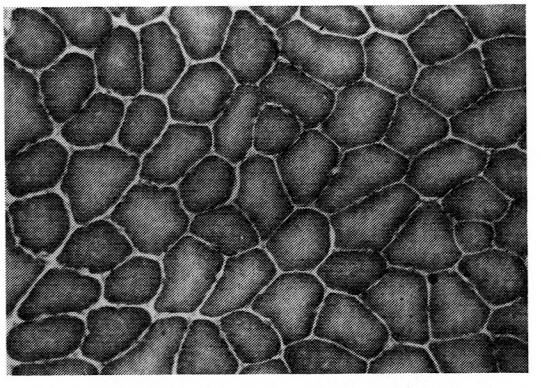


図2　筋線維は大小不同を示し，多くは80μ径とやや肥大気味である．全ての筋線維は酸化酵素反応活性高く，タイプ1線維である．15歳男，大腿直筋，NADH-TR，×100．

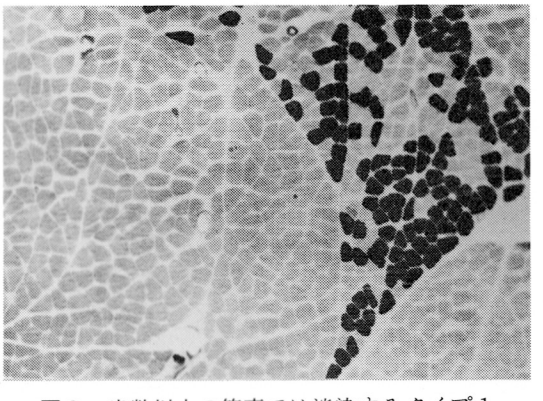


図3　半数以上の筋束では淡染するタイプ1線維優位と群化（fiber type grouping）を示す．8歳女，大腿直筋，×200．

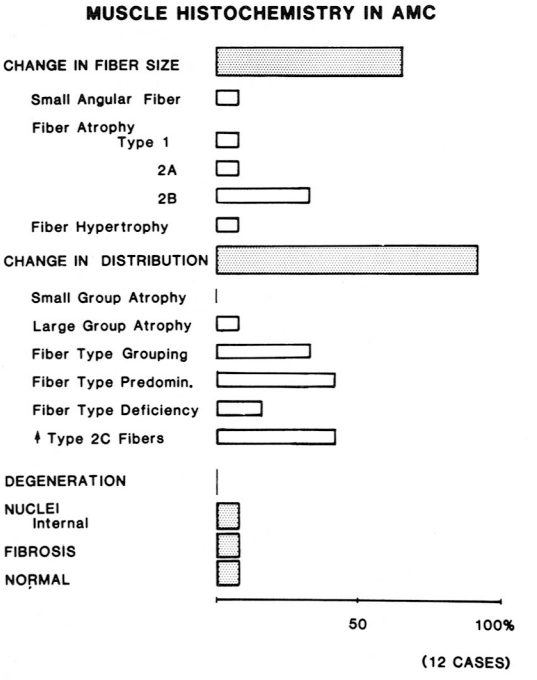



図4　AMC 罹患筋の組織化学的所見．

たのが図4である．

2)　pma マウス

今回使用した pma マウス全例で総腓骨神経は肉眼的にも欠損し，前脛骨筋，長指伸筋などその支配下の筋は全て細く，強い神経原性萎縮を示していた．また筋線維と筋線維の間には結合織の増生も著しかった．これらの筋をアセチルコリンエステラーゼ（AChE）染色したが活性は全くなく，神経終板の存在は確かめられなかった．

Epon 包埋切片でみると脊髄前角細胞に異常なく，前根の有髄，無髄神経の形態や分布にも異常は認められなかった（**表1**）．

## 考　　察

今回我々が対象とした AMC の患者は既知の神経筋疾患（先天性ミオパチーや筋ジストロフィー，Werdnig-Hoffmann 病など）を除いた特発性の患者である．全員生下時より多くの関節に強い拘縮があり，その状態そのものは非進行性であった．これらの患者では筋力低下がみられることが多く，

表1　有髄神経総数およびその平均直径(±S.D.)

| | pmaマウス | | | 対　照 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N* | 総　数 | 直径(μ) | N* | 総　数 | 直径(μ) |
| 脊髄前根 | | | | | | |
| 第3腰髄 | 5 | 680± 79 | 6.7 ±0.7 | 5 | 702± 84 | 6.8±0.6 |
| 第4腰髄 | 5 | 723±128 | 5.9 ±0.8 | 5 | 706±138 | 6.2±1.0 |
| 第5腰髄 | 5 | 590± 94 | 5.2 ±0.8 | 5 | 578±120 | 5.4±0.5 |
| 坐骨神経 | 5 | 4030±190 | 4.8 ±0.5 | 5 | 4102±438 | 4.9±0.9 |

N*：検査対象匹数

約5例に明らかな四肢筋力低下があった.

AMCの病理学的検索ではDrachmanら[2]が報告したように前角細胞の異常に起因するとの所見が多くみられている. しかし実際に筋生検すると臨床症状の重篤さに比較してほとんど所見がみられないことが多い[1]. これは多分, ある特定の筋群が強く萎縮し, 生検するような筋は比較的よく保たれているからであろう. 神経原性のAMCではある特定の筋グループが選択的に侵されるとはいっても, 系統的な異常であるはずなので, 一見正常にみえる生検筋にも組織化学的染色など詳しい検索で何らかの所見が得られるのは当然である. 今回の我々の検索の結果は筋線維タイプの分布の異常であった. 筋線維のタイプは支配する神経によって左右されることを考えると, この分布の異常は神経の支配の異常を反映することになる. 神経の異常はどこに一次的なものがあるのかその部位は不明であるが, 今回のように群萎縮などの所見に乏しく, 筋線維タイプの分布の異常ということを考慮すると, 前角細胞よりもっと末梢のレベルでの異常が推定される[3].

遺伝性のpmaマウスでは総腓骨神経の完全欠損により, それに支配されるべき筋線維が萎縮結合織化して, ために内反足をみたものである[4]. 脊髄前根, 坐骨神経まで対照と同じく全く差がないことをみると, 総腓骨神経へと行くべき神経束が他の神経内へと迷入したと考えざるを得ない. 今の所, どの神経へ迷入したのか全く不明であるが, 腓腹神経が正常のそれよりやや太くみえるので, そのような神経へと迷入した可能性が強い[5].

pmaマウスの組織学的結果から, 今一度ヒトAMCにふり返って考えると, 特発性AMCの中には神経の走行異常(分枝異常など)によるものがかなり含まれているのではないかと考えられ, 神経原性AMCの一病因をなしていると推定される.

神経側に異常があるため走行異常がくるのが, 筋側に異常があるためか, 今後の研究にまたねばならない.

## まとめ

1. ヒト特発性AMCの多くは広い意味での神経原性筋変化によるものである.
2. 筋線維タイプの分布異常, タイプ2C線維の増加は発達途上筋への神経支配の異常を反映していた.
3. pmaマウスの結果とあわせて考えるとAMCは前角細胞の異常と限らず, もっと末梢の神経異常(分枝異常など)でも起こりうることが示唆された.

## 文　献


1) Dubowitz, V. & Brooke, M.H.: Muscle Biopsy. A Modern Approach. Saunders, London, 1973.
2) Drachman, D.B. & Banker, B.Q.: Arthrogryposis multiplex congenita. Case due to diseases of anterior horn cells. Arch. Neurol., 5: 77-93, 1961.
3) Swinyard, C.A.: Concepts of multiple congenital contractures (arthrogryposis) in man and animals. Teratology, 25: 247-258, 1982.

4) 江崎孝三郎，安田幸雄，中村昌広，小野啓郎：遺伝性前・外側下腿筋萎縮マウス．実験動物，30：151-155，1981．
5) 埜中征哉，豊福照子，多田愛子：pma マウスの病因に関する病理組織学的研究．文部省科学研究費補助金総合研究 A．新たに発見された二つの神経・筋異常マウスの成因の解析と疾患モデルとしての評価，昭和55～57年度研究成果報告書，1983，pp. 29-39．

# 2）mdx マウスの坐骨神経所見

中　村　晴　臣*

研究協力者　田　中　順　一*　高　田　邦　安*

X 染色体性劣性遺伝を示す mutant mouse (gene symbol, mdx) は，その遺伝形式，筋原性と考えられる筋組織病変，進行性の筋変性などから，筋ジストロフィー症，特に Duchenne 型あるいは Becker 型のモデル動物となりうると考えられた (Bulfield et al[1])．筋病変の特徴は，変性や再生線維が群をなして出現する傾向があることのほか，全般的に筋線維の再生が著明で，かつ間質結合織の増生が少ないことなどである．従って他のモデル動物と比較すると，ジストロフィーモルモットの筋病変に類似しているといえよう．他方，dy マウスは mdx マウスよりもヒト筋ジストロフィー症に類似の筋組織変化を示すが，末梢神経，特に脊髄神経根に著しい dysmyelination が認められる (Bradley & Jenkison[2]；Okada et al.[3])ため，筋病変成立に神経性因子の関与が考えられている．mdx マウスでは cholinestrase 染色でみる限り，神経終末は正常であるとされている (Bulfield et al[1]) が，その他の末梢神経系は全く検索されていない．本報告では mdx マウスの坐骨神経系を検索し，その筋病変成立に対する神経性因子の関与の有無を知ることを目的とした．

## 方　法

生後 7 週 (3 匹) 及び 5 カ月 (2 匹) の mdx マウスと，対照として生後 7 週の C57BL／6J (＋／＋) 及び C57BL／10N (＋／Y) マウス夫々 2 匹を使用した．Pentobarbital sodium 麻酔下に，左心室より生食水灌流後，カコジル酸緩衝液加 paraformaldehyde, glutaraldehyde 混合液 (pH7.3) にて灌流固定し，腰髄，その脊髄神経根と後根神経節，坐骨結節上部及び下部の坐骨神経幹，下腿屈筋内神経などを摘出し，1％四酸化オスミウムにて後固定ののち，型の如く epoxy resin に包埋して光顕並びに電顕的検索に供した．無髄軸索直径の測定は，at random に撮影した10,000倍電顕写真上で，500～600本の軸索について行った．

## 結　果

1　7 週目の mdx マウスにおいては，腰髄の前角細胞，前根，後根神経節，坐骨神経幹及び筋内神経で，対照マウスに比較して，明らかな異常は認められなかった．特に dy マウスにみられる如き amyelination, dysmyelination はみられなかった．坐骨神経幹について述べれば，後述の如き abnormally combined nerve を除き，有髄線維は良く保たれていた．無髄線維においても，各軸索は Schwann 細胞々体突起によく取り巻かれていた (図 1)．dy マウスにみる如き軸索変性はなかった．無髄軸索直径の平均値及び分布も，対照群との間に差異はなかった (表 1)．Schwann

表 1　Diameter of unmyelinated axons in 7-week-old mdx mouse.

| animals | posterior root of lumbar spinal cord | proximal portion of sciatic nerve |
|---|---|---|
| C 1 | 0.32±0.18(580) | 0.43±0.14(575) |
| C 3 | 0.32±0.11(548) | 0.43±0.14(520) |
| D 1 | 0.42±0.23(551)* | 0.43±0.15(608) |

C: controls, D: mdx mouse
Values are mean ± standard deviation(μ).
Number of axons examined is in parentheses.
* Significant difference comparing with controls by t-test ($p<0.005$)

* 鳥取大学医学部脳研神経病理

細胞々体はリボゾーム，小胞体，Golgi 装置，ミトコンドリアなどに富み，$\pi$ 顆粒もみられたほか，vesicle に富む．基底膜はよく発達し，dy マウスにみる如き基底膜の欠如する所見はなかった．

2　腰髄後根に関しては，5例中4例までは異常を認めなかったが，生後7週の1例で後根の一部に限局して，比較的明瞭な無髄神経野がみられた（図3）．即ち種々の大きさの軸索が集団をなし，全体は Schwann 細胞々体で取り囲まれていた．各軸索間には Schwann 細胞々体が侵入するが，軸索膜が互に相接する部位も少なくない．この後根における無髄軸索の直径平均値は0.42$\mu$±

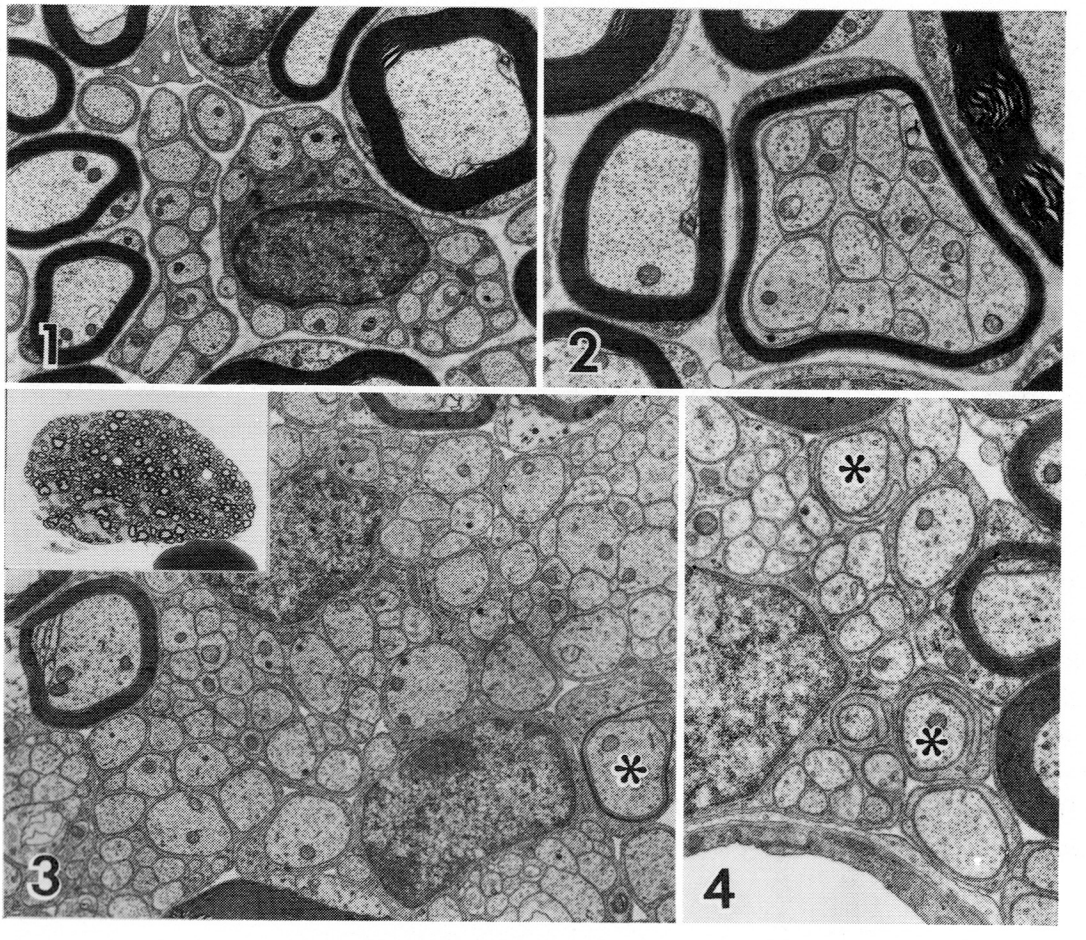



図1，2　Cross-sections from the proximal portion of the sciatic nerve of a 7-week-old mdx mouse, showing well-developed unmyelinated nerve bundles (Fig. 1) and an abnormally combined myelinated and unmyelinated nerve (Fig. 2). Magnification : ×7,000 and ×10,000, respectively.

図3，4　Cross-sections from a lumbar posterior root of a 7-week-old mdx mouse. The root contains a few pale areas (insert, ×220), consisting of abundant unmyelinated axons. Axonlemmas appose each other without invasion of Schwann cell cytoplasm in some place and a hypomyelinated axon (asterisk) is observed (Fig. 3, ×8,000). Axons with long mesaxons (asterisks) are also noted in the surroundings (Fig. 4, ×12,000).

0.23μで，対照後根のそれ（0.32μ±0.18μ及び0.32μ±0.11μ）より大きい（p<0.005）（表1）．最大直径は1.8μで，大部分の軸索は1.4μ以下であった．無髄神経野の辺縁部では，長いmesaxonで取り巻かれた比較的大きな軸索がみられた（図4）．また軸索直径に比し異常に薄い髄鞘をもった線維も少数みられた（図3）．しかしdyマウスにみる如き，Schwann細胞基底膜の欠損乃至不完全さは認められなかった．

他の7週目mdxマウスや対照マウスの腰髄後根では，無髄神経束は極めて小さい．しかし，すべての無髄軸索がSchwann細胞々体で取り巻かれるわけではなく，軸索膜が互に接する部位も少なからずみられた．また長いmesaxonで取り巻かれた無髄軸索や，hypomyelinationを示す有髄線維も，少数認められた．他方，5カ月のmdxマウス後根では，大部分の無髄軸索はSchwann細胞々体で相互に分離されているし，hypomyelinationを示す線維もみられなかった．

3　7週目のmdxマウスの坐骨神経結節上部において，異常結合した有髄及び無髄神経（abnormally combined nerve）が1ケ認められた．即ち数本の軸索集団が薄い髄鞘層で取り巻かれた線維で，軸索間にはSchwann細胞々体が侵入している部分もある（図2）．しかし，同様のcombined nerveが対照マウスの後根に1ケ認められた．

4　その他，dyマウスにみる如き変性に陥った無髄軸索や，蜂巣状のSchwann cell-axon networkはみられなかった．

## 考　　察

7週のmdxマウス後根にみられた無髄神経野は，極めて限局された部位の変化である．一般にマウスの無髄軸索の直径は1.5μ以下であるが，dyマウスの無髄神経野では直径が6μにも及ぶ軸索がみられ，明らかに有髄線維になるべき軸索と考えられる．mdxマウスでは最大1.8μの軸索で，小径有髄線維の直径に相当するものと思われる．無髄神経野の辺縁部にみられたhypomyelinationは，程度の差はあれ対照マウスの後根にも認められる．従って無髄神経野は髄鞘形成の未熟に基づくものであろう．更に5カ月のmdxマウス後根では，殆んどすべての無髄軸索がSchwann細胞々体に取り巻かれている点を考慮すれば，上述の7週mdxマウスの無髄神経野は，髄鞘形成の未熟乃至遅延に基づくものといえよう．

7週目のmdxマウスにみられたabnormally combined nerve（Okada et al[4]）は，dyマウス坐骨神経にて対照より高頻度にみられた所見であり，dysmyelinationの1つと考えられる．しかしmdxマウスでは対照にもみられるほか，出現頻度も高くなく，直ちに異常所見とはいい難い．

本実験においては，坐骨神経系に軸索の変性はみられず，筋病変成立への神経性因子の関与はないものと考えられる．

## 結　　論

生後7週のmdxマウスの坐骨神経系には，腰髄後根の一部分に限局した未熟な無髄神経野や，軽度の髄鞘異形成をみるも，対照に比して明らかな異常所見は認められない．

## 文　　献


1) Bulfield G, Siller WG et al : X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse (animal model). Proc Natl Acad Sci USA 81 : 1189, 1984.
2) Bradley WG, Jenkison M : Abnormalities of peripheral nerves in murine muscular dystrophy. J Neurol Sci 18 : 227, 1973.
3) Okada E, Mizuhira V et al : Dysmyelination in the sciatic nerves of dystrophic mice. J Neurol Sci 28 : 505, 1976.
4) Okada E, Mizuhira V et al : Abnormally combined myelinated and unmyelinated nerves in dystrophic mice. J Neurol Sci 33 : 243, 1977.

# 3）DMDの脊髄前角——ALSの最近の知見を踏まえての再検討

中　野　今　治*

1981年，Appelは筋萎縮性側索硬化症（以下ALSと略す）に対し，従来の通念である神経原説に対し，全く逆に筋原説を提唱した[1]．彼によると，下位運動ニューロンを維持するためには骨格筋由来のneurotrophic hormoneが必要であり，ALSではこのホルモンが欠乏するために下位運動ニューロンの消失が起こるとされている（図1）．

進行したDuchenne型筋ジストロフィー症（以下DMDと略す）では筋線維は高度に消失し，脂肪や結合織に置換され，neurotrophic hormoneも著名に減少していることが予想される．したがって，Appelの仮説が正しければ，DMDの脊髄前角にも変化が生ずるものと思われる．

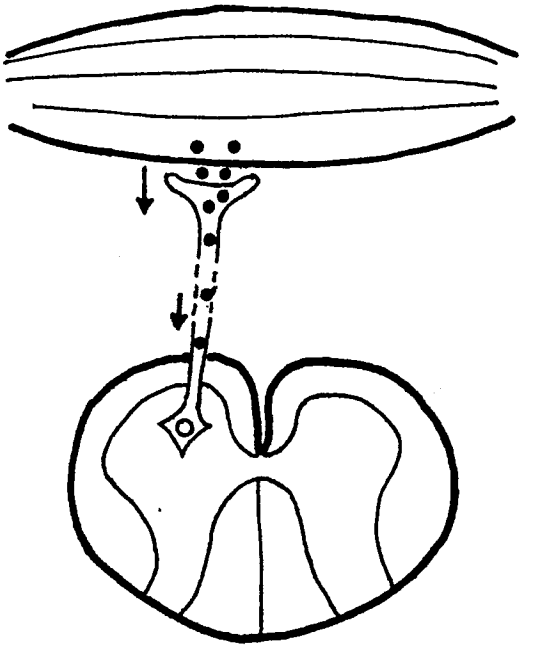


図1　Appelの仮説の模式図．筋細胞から分泌されたneurotrophic hormone（黒丸）が神経終末より取り込まれている．

一方，運動ニューロン疾患であるALSでは，これまで脊髄前角が詳細に検索されてきた．その結果，最近になってBunina小体[2]，spheroid[3),4)]などの新知見が注目されるようになり，ALSの前角病理の概念が大きく変わった．

DMDでは現在最も有力な筋原説の他に，神経原説が唱えられてきたが，脊髄前角には病理学的には明らかな変化はないとされている[5]．しかし，これらの観察は上記のALSにおける新知見以前のものであり，これらの知見に基づいてのDMD脊髄前角の詳細な観察はまだなされていない．

そこで，今回このような視点からDMD脊髄前角を検索し，若干の知見を得たので報告する．

## 症例および方法

症例は1979年から1984年までに国立療養所下志津病院で死亡，剖検されたDMD16例である．年齢は13から24歳，平均18.9歳で全員男性である．対照として中枢神経あるいは末梢神経の原発性病変を有さない19例を使用した．年齢は16歳から29歳，平均23.2歳で男12例，女6例，不明1例である．

ホルマリン固定，パラフィン包埋標本にて頸髄，胸髄，腰髄の前角を観察した．染色はHEが主体で，一部では鍍銀，KB，PTAH染色も使用した．

一般にspheroidと呼ばれるものには，1）最近ALSで注目されている10nm neurofilamentが不規則に集積したもの（図2 A，B）と，2）neuroaxonal dystrophyで代表されるaxon terminal近傍が膨隆したもの（図2 C，D）の2種がある．前者は主として軸索近位部の腫大と考えられており，HE染色では均質な淡青桃色にそまるが，注意

＊国立療養所下志津病院神経内科

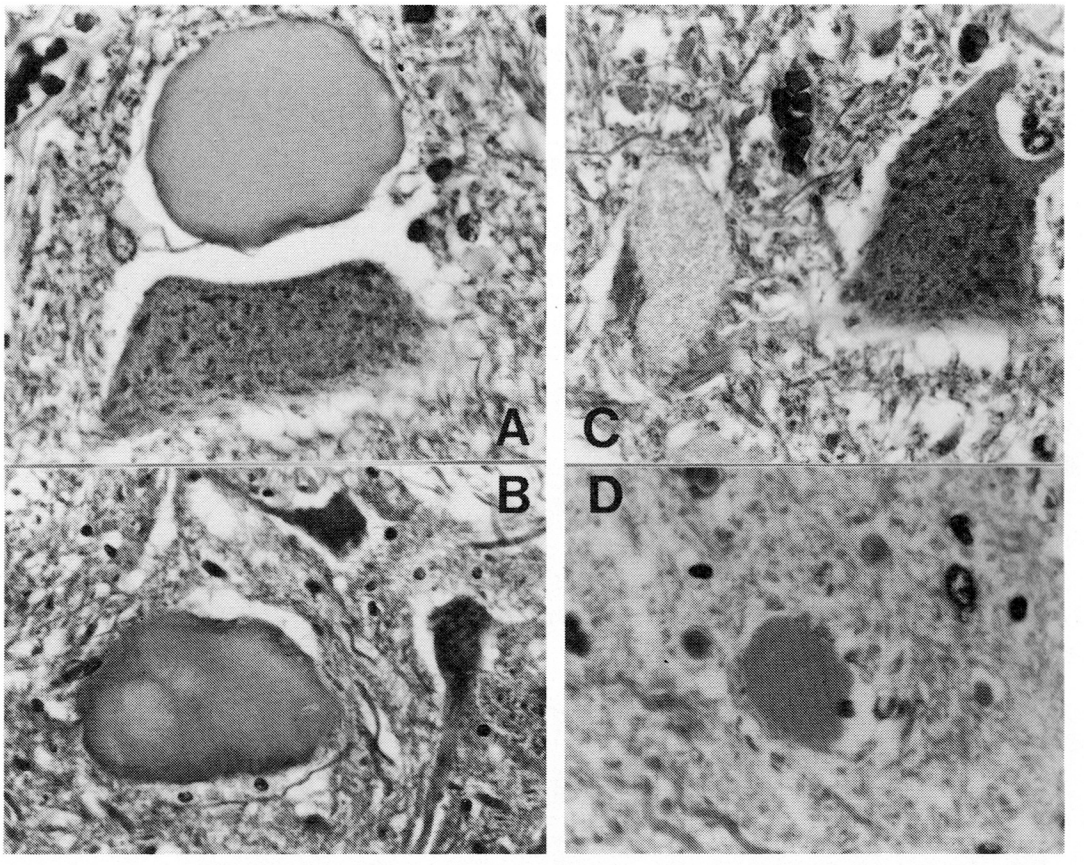



図2　DMD 例に見られた spheroid. A, B：ALS 型 spheroid, 内部はほぼ均質だが，注意深く観察すると繊細な線維状配列が認められる．C, D：非 ALS 型 spheroids, C では細かい顆粒状の内部構造を示し，D では均質に染まっている．HE 染色．A, C, D：×400, B：×200.

深く観察するとその内部に不規則にうねる繊細な線維状配列が認められる．これに対し，後者の内部構造は様々の程度に好酸性を示す細顆粒状物質か強い好酸性を呈する均質な物質より成っている．本稿では便宜上，前者を ALS 型 spheroid, 後者を非 ALS 型 spheroid と呼ぶことにする．なお，ALS 型，非 ALS 型 spheroid ともその大きさに幅があるが，観察の都合上短径20ミクロン以上のものに限って検索した．

## 結　　果

今回検索した限りでは DMD 前角大型運動ニューロンの明らかな消失は認められなかった．しかし，数例において，前角のニューロピルが粗薄になりエオジン好性の胞体が明らかに認められる星型グリヤがしばしば観察された．

一方，spheroid は ALS 型および非 ALS 型 spheroid のいずれも稀ならず見られた．そこで，それの認められた症例数を DMD と対照例とで比較してみた．ALS 型 spheroid は DMD では16例中11例［69%］に，対照例では19例中 7 例［37%］に見られ，DMD で有意に多く認められた（$P<0.05$）．非 ALS 型 spheroid は DMD では16例中

13例［81%］に，対照例では19例中6例［32%］に見られ，これも有意差を示した（P<0.002）．しかし，いずれも1例当たりの数は少なく，せいぜい3～4個であった．

少数ではあったが，DMD例で記載すべき所見として以下の様な変化が見られた．

1）ニューロンの胞体内に集積したneurofilament（図3 A）．ALSにおけるneurofilamentの蓄積部位は軸索近位部が多いが，時に胞体内にも同様の貯溜の存することが認められている[4]．

2）大型の運動ニューロン内にある比較的大きい空胞．その内部に不規則な顆粒を含んでいる（図3 B）．これはALSの脊髄前角大型運動ニューロン，とくに変性の明らかなニューロンの胞体内に観察されるものと良く似ている．

3）胸髄前角に見られた変性ニューロン（図3 C）．Nissl小体が全く認められなくなっており均質に淡く桃色に染まった細胞質を示している．

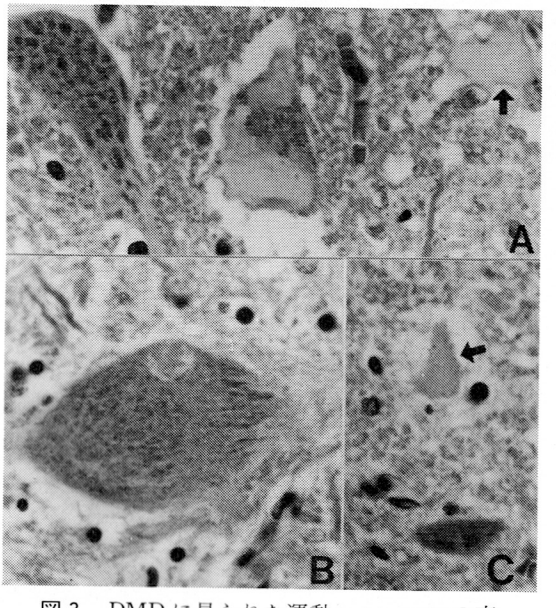



図3　DMDに見られた運動ニューロンの変化．A：胞体内へのneurofilamentの蓄積．図の右上にはALS型spheroid（矢印）が見られる．B：胞体内の空胞．内部に不規則な顆粒状物質が含まれている．C：変性した運動ニューロン（矢印）．Nissl小体は消失し，胞体は均質に染まっている．HE染色．×400．

4）非ALS型spheroid内に観察されたBunina小体類似の封入体（図4）．前角大型ニューロン内の好酸性封入体はいくつかの疾患で報告

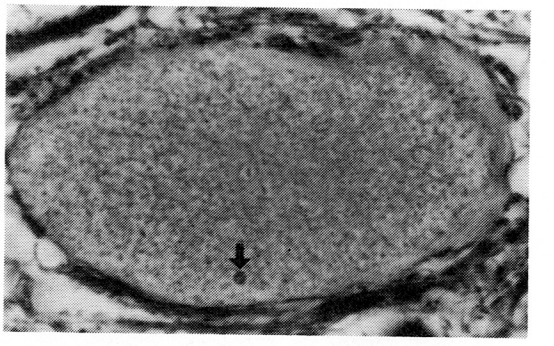


図4　DMDの非ALS型spheroidの内部に認められたBunina小体類似の封入体（矢印）．HE染色．×1000．

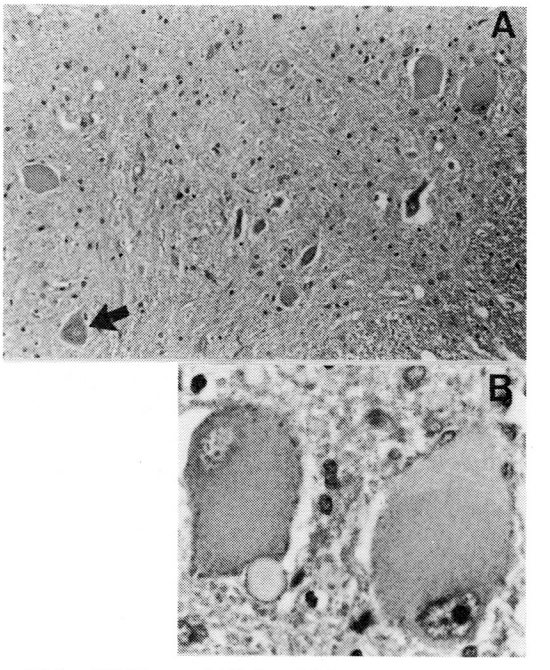



図5　DMDの一側前角の運動ニューロンに見られたcentral chromatolysis．A：Chromatolytic neuronは正常ニューロン（矢印）に比較して丸く腫大している．B：Aの強拡大．核は偏在し，リポフスチンも一方に押しやられて軸索損傷による逆行変性と区別出来ない像を呈している．HE染色．A：×100，B：×400．

されているが，Bunina 小体は古典型 ALS でのみ確認されている．今回，前角運動ニューロンの胞体内には DMD 例あるいは対照例のいずれにおいても Bunina 小体を見出すことはできなかった．

5) DMD の一例において見られた胸髄前角運動ニューロンの chromatolysis (図 5 A)．正常ニューロン (矢印) と比較すると chromatolytic neuron は円形に腫大している．強拡大で見るとこのことはより明瞭で胞体は丸く膨化して核は偏在し，Nissl 小体はほとんど認められず，リポフスチンは胞体の一側に押しやられている (図 5 B)．このように，ここに見られた像は一般に軸索損傷に対する再生像と考えられている逆行変性像と区別出来ない．Chromatolysis が一側性であることから，その原因として外傷などの局在要因が考えられる．

## 考　　察

DMD 前角には spheroid を初めとしていくつかの変化が見られた．しかし，いずれの所見も ALS を含め他の疾患にも認められるものであり，DMD 特有の病変ではなく，非特異的な神経の変性過程を示すものと思われる．

Heyck ら，Tomlinson らは DMD 前角に萎縮したニューロンを見出し，筋細胞の消失に伴う二次的な変化と考えている[6),7)]．

今回，観察した前角大型ニューロンの諸変化が彼らの言うように筋線維という target を失ったことに起因しているかどうかは明らかでない．しかし，このニューロンは正常の target を失った後でも逆行変性と区別出来ない像を呈する．すなわち，target は無くとも損傷された軸索を修復しようとする反応は維持されているものと思われる．

ALS 型 spheroid は前角運動ニューロンの軸索近位部に10nm neurofilament が蓄積したものであり，ALS で多発することから本疾患における前角運動ニューロンの変性と密接に関係しているものと考えられている．

DMD 例では ALS 型 spheroid を前角に有する症例が対照例より有意に多いことから，前者の脊髄前角運動ニューロンにはある程度の変性が生じているものとおもわれる．しかしながら，ALS 型 spheroid の出現が骨格筋の消失と関連があるかどうかという点に関しては今後の検索に待たねばならない．

今回の観察では DMD 前角運動ニューロンの消失は明らかではなかった．Tomlinson らは DMD 脊髄前角ニューロンの morphometry を行い大型ニューロンは減少していないと報告している[7)]．一方，Kawamura らは下肢切断後長期生存した正常例で，切断肢に対応する髄節の脊髄前角運動ニューロンの morphometry を行った結果，大型ニューロンの消失を認めている[8)]．しかし，この二つの報告は相対立するものではない．何故なら，後者のニューロンはその軸索が切断されているのに対し前者にはそのようなことは無く障害の機構が異なると思われるからである．

今回の観察結果は Appel の仮説を支持するものではないが，さりとて反証と成るものでもない．著者が検索した DMD 例では前角運動ニューロンの消失に到るには筋組織が消失してからの生存期間が充分でなかったことも考えられるからである．今後，通常の人工呼吸器や体外式人工呼吸器の使用が増えるものと思われるが，それにより DMD 患者の寿命が大幅に伸びた時，長期に亘って target を失ったニューロンがどのような反応を示すか興味ある問題である．そして，その時にこそ Appel の仮説の真偽が問われるものと思われる．

## 結　　論

1) DMD の脊髄前角には spheroid を初め幾つかの変化がみられた．

2) 前角のニューロン消失は明らかではないが，spheroid とくに ALS 型 spheroid を有する症例が対照より多いことから，そこにはある程度の変性が生じているものとおもわれる．

貴重な対照例の標本を提供して下さった東京大学医学部病理，長嶋和郎先生に感謝致します．

## 文　　献

1) Appel SH : A unifying hypothesis for the

cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism, and Alzheimer disease. Ann. Neurol., 10 : 499, 1981.

2) Bunina TL : Intracellular inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis. (Russian) . Zh. Nevropatol. Psikhiatr. (Korsakov J. Neuropathol. Psychiatry), 62 : 1293, 1962.

3) Carpenter S : Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. Neurology (Minneap.), 18 : 841, 1968.

4) Hirano H, Donnenfeld H, Sasaki S, Nakano I : Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 43 : 461, 1984.

5) Adams RD, Denny-Brown D, Pearson CM : Diseases of muscle, a study in pathology. Hoeber, New York, 1962.

6) Heyck H, Laudahn G : Die progressivdystrophischen Myopathien. Berlin, Springer Verlag, 1969.

7) Tomlinson BE, Walton JN, Irving D : Spinal cord limb motor neurones in muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 22 : 305, 1974.

8) Kawamura Y, Dyck PJ : Permanent axotomy by amputation results in loss of motor neurons in man. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 40 : 658, 1981.

# 4)－(1) 諸種神経筋疾患における筋病変の各論的特性と臨床的意義について
## ——1340例の検討結果——

田辺　等*

研究協力者　小島　進**　内潟雅信**　野沢胤美**
松原四郎***　宮本和人****　小田雅也*****
椿　忠雄*

### はじめに

筋ジストロフィーをはじめ諸種神経筋疾患の病型・病態診断，重症度・予後の判定，治療効果の検討等に際し，筋病変の解析（適応の吟味・方法論の習熟を条件とした筋生検による）は日常診療上極めて有用である．一般に臨床検査の特異性を論ずるに当っては、それぞれが総合判定のための補助手段であるという認識が前提となる．しかし多数の case study としての情報が蓄積され，mass study としての総論的知見が日常診療に応用されている現在，改めて各論的に，1例診断に貢献し得る所見特異性を再評価・再抽出し，その臨床的意義を更に明確にすることも重要な課題と考えられる．今回我々はこの点に着目し，表題の内容について検討，若干の知見を得たので報告する．

### 対象および方法

各種神経筋疾患1340例（1970年7月～1984年9月虎の門病院，1984年10月以降東京都立神経病院各自験例；男708，女632；3～68歳），1633検体を対象とした．疾患・病型の内訳・例数は，筋萎縮性側索硬化症（ALS）［狭義の脊髄性進行性筋萎縮症（SPMA）を含む］78，Werdnig-Hoffmann 病（WH）14，Kugelberg-Welander 病（KW）31，Charcot-Marie-Tooth 病（CMT）14，他の運動ニューロン疾患22；進行性筋ジストロフィー（PMD）群54［Duchenne（DMD）型13，Becker（BMD）型4，肢帯（LG）型17，顔面肩甲上腕（FSH）型6，先天型（CMD）——福山型11，その他3］，筋緊張性ジストロフィー（MD）56，諸種先天性ミオパチー24，Kearns-Sayre 症候群2，rimmed vacuole 型 distal myopathy 4；Guillain-Barré 症候群（GBS）10，acute radiculoneuropathy12，polyneuropathy～polyneuritis，multiple mononeuropathy～multiple mononeuritis 114；多発性筋炎（症候群）216，sarcoidosis15，内分泌性ミオパチー38［糖尿病性 amyotrophy13，甲状腺機能亢進症に伴うミオパチー3，甲状腺機能低下症に伴うミオパチー～Hoffmann 症候群15，Cushing 症候群に伴うミオパチー～steroid myopathy 7］，周期性四肢麻痺4，重症筋無力症22，若年一側上肢筋萎縮症4，一側下肢筋萎縮症9，脊髄空洞症2，頚椎症24；その他575であった．

以上の症例の臨床病態より最も適切と考えられた部位において施行した筋生検につき，routine battery による組織学的・組織化学的（以上全例）・電顕的（324例）検索を行った．また，その所見を以下の要素分類（既報告）にしたがって再検討した：1)筋線維の大小関係・形状・分布［病変主座の motor unit 内局在との関係］（図1），2)筋 fiber type 異常（表1，図2），3)筋線維構築異常（表2），4)再生現象（表3），5)炎症性所見，6)その他の所見［筋核，筋終板，筋内神経，血管・

＊東京都立神経病院（前・虎の門病院神経内科）
＊＊虎の門病院神経内科
＊＊＊金沢大学医学部神経内科
＊＊＊＊東京都立神経病院神経内科
＊＊＊＊＊東京都立神経病院検査科（病理）

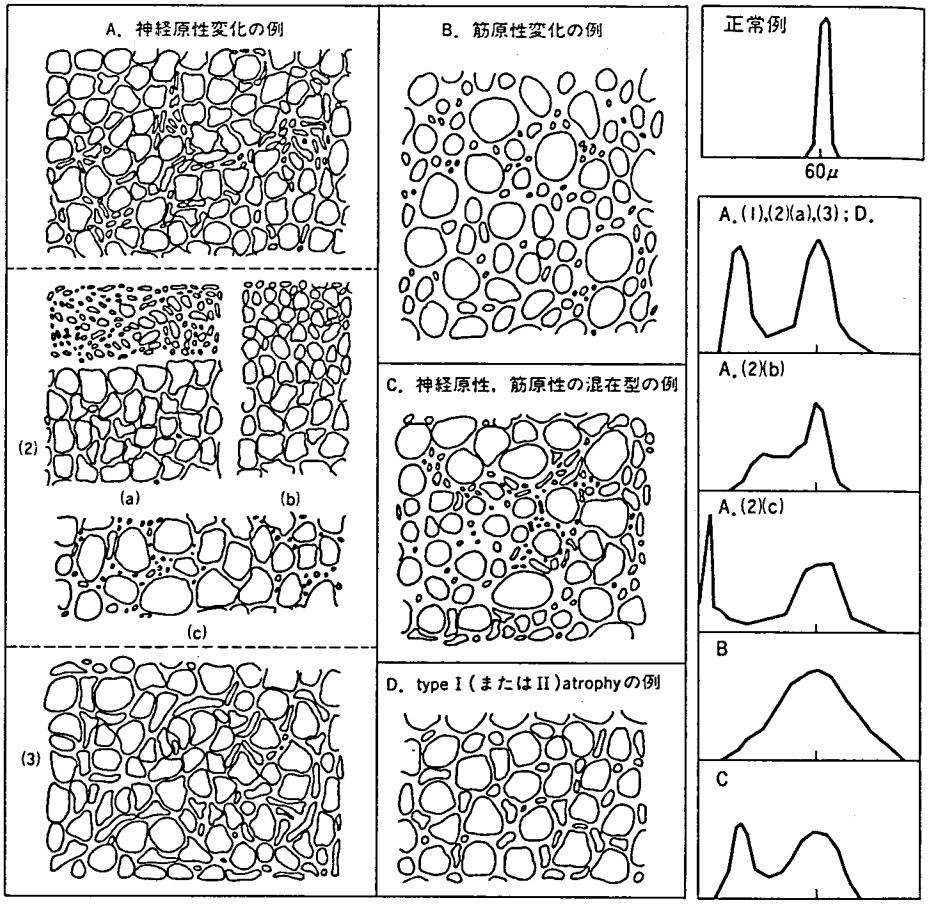



図1　筋線維大小不同の基本的パターンおよび histogram の模型的例示.

A. 神経原性病態（群集萎縮；histogram で2峯型）

(1)　"小群集萎縮の多発"（萎縮角化線維2～3個ないし数個程度の群集が，ほぼ均等に散在する．進行すると一部が癒合して一見大群集萎縮に類似するようにみえるところもあるが，本質的には他部に小群集萎縮の基本が観察される．とくに ALS・SPMA では，この小群集萎縮の形は経過中よく保たれている．また萎縮線維の mitochondria の酵素濃縮現象が明らかである）：通常前角細胞障害の場合にみられる．

(2)　"大群集萎縮"・"なだらかな移行性"・"極度の萎縮線維"：通常前根障害の場合にみられる．

(a)　"大群集萎縮"（初期より，筋小束単位程度の大きさの群集萎縮がみられる．本質は萎縮の程度よりもその群をなす萎縮線維数の数の大きいことにある）

(b)　"なだらかな移行性"（大群集萎縮に近いが程度が軽く，かつ小束毎に明らかな区画に乏しい移行を示す）

(c)　"極度の萎縮線維"の散在・群集（初期像よりやや開大した間質中に，一見核のみと誤認されるような，あるいは細胞質部のわずかに付着しているようなごく細い萎縮線維より

（図1説明つづき）

なるが，周辺を詳細に観察することにより確実に萎縮線維であることがわかる，やや軽度の萎縮筋線維との移行性が見出される）

(3) “小角化線維の散在・一部群集”（初期像よりモザイク状に軽度～中等度の小角化線維が散在することがむしろ特徴で，進行するにしたがって小群集～大群集へ移行する）：通常末梢神経障害の場合にみられる．

B．筋原性病態（散在性萎縮；histogram で鏡像型）
横断面が円形化を示す萎縮・正常大・肥大線維の散在，endomysium の開大，中心核などの複合所見．

C．神経原性・筋原性の混在病態
前記A・Bの性格が共存してみられる場合を指すが，一般にA(3)では筋原性病態がみかけ上混在している場合が多い．

D．fiber type atrophy
type IまたはIIの選択的な萎縮（ときには他の一方の肥大を伴うことがある）で，type I atrophy with or without type II（II a or II b）hypertrophy；type II（II a or II b）atrophy with or without type I hypertrophy のように表現し得る．

表1　fiber type に関する筋病変

A．非選択的変化 sameness property
B．選択的変化 differentness property
　1）単系統性異常 dysproportion
　　(i) type I ／ (ii) pype II ｝｛① 萎縮 atrophy ② 肥大 hypertrophy ③ 構築異常 structural change
　2）分布異常 abnormal distribution
　　(i) type I ／ (ii) type II ｝｛① 群集 grouping ② 群集萎縮 grouped atrophy ③ 混在率増加 predominance
C．分別異常 abnormal discrimination
　1）再生過程 regenerating process
　2）分化障害 disturbance of differentiation

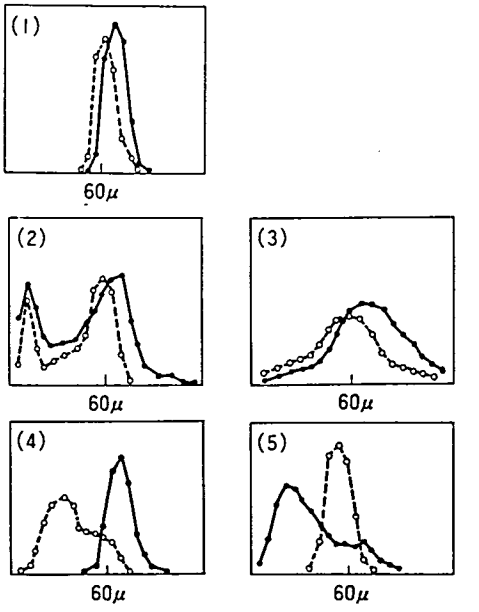



図2　筋 fiber type 別 histogram の例示．myosin ATPase 活性像（アルカリ側，pH10.3）による．実線：type II，点線：type I．(1)正常像，(2)神経原性変化（2峯性）の例，(3)筋原性変化（鏡像型）の例，(4) type I atrophy，(5) type II atrophy．

表2　主要な筋線維構築異常

1）一般病理学的変化
① 横紋構築の断裂，消失
② basophilic fiber
③ 壊死 (necrosis・myolysis)
④ phagocytosis
⑤ split fiber
⑥ opaque fiber (contraction knot)
⑦ 空胞化，空胞変性
⑧ 硝子様変性
⑨ 脂肪変性
⑩ eosinophilic body, basophilic mass

2）組織化学により強調される重要所見
① ring fiber・snake coil
② sarcoplasmic mass (peripheral, central)
③ target fiber・targetoid fiber
④ moth eaten fiber・mitochondria 酵素の筋鞘下部活性増強・筋原線維間 network の乱れ
⑤ ミトコンドリア酵素濃縮現象(とくに神経原性萎縮線維)
⑥ lipid storage (deposit)
⑦ glycogen storage (deposit)
⑧ MLG (mitochondria-lipid-glycogen) complex
⑨ rimmed vacuole
⑩ cytoplasmic body

3）個々の先天性ミオパチーの特徴として報告された主要所見
① central core, multicore, minicore [—— disease]
② myotube [myotubular, centronuclear, pericentronuclear myopathy]
③ nemaline (rod) myopathy
④ ragged red fiber [KEARNS-SHY (KEARNS-SAYRE) syndrome・ophthalmoplegia plus]
⑤ reducing body [—— myopathy]
⑥ lysis of miofibriles [myopathy with ——]
⑦ finger print body [—— myopathy]
⑧ sarcotubular alteration [sarcotubular myopathy]
⑨ focal loss of cross striation [familial ——]
⑩ cap [—— myopathy]

間質系の変化，その他．次に，各要素の組合せの特徴と疾患・病型・病態に関する最終確定診断と対比考察し，また吟味のため盲検診断テストを併用した．

表3　再生現象に関する着目筋病変

| | 筋　病　変 |
|---|---|
| A. 従来のいわゆる'再生現象' | 中心核，basophilic fiber，小胞体拡大，sarcotube，Golgi 装置・ribosome・衛星細胞などの増生 (組合せ) |
| B. fiber type 異常 | ①fiber type 分別異常 〔D→R(過程)〕<br>②fiber type grouping 〔D→R(終了)〕<br>③fiber type grouped atrophy 〔D→R→D〕 |
| C. 筋線維中心部病変 | a. target (targetoid) fiber　前根障害・末梢神経障害(とくに高率) |
| | b. ①中心部dense area (高活性) central mass 状 myotube 状<br>②中心部clear area 〔とくに中心核周辺〕(低活性) |

D＝denervation R＝re-innervation

## 結　果

上記の帰納法的検討により，種々の疾患・病型群における筋病変の各論的特異性の程度に関し，以下の諸段階を提示し，その根拠を指摘し得た(図3)．

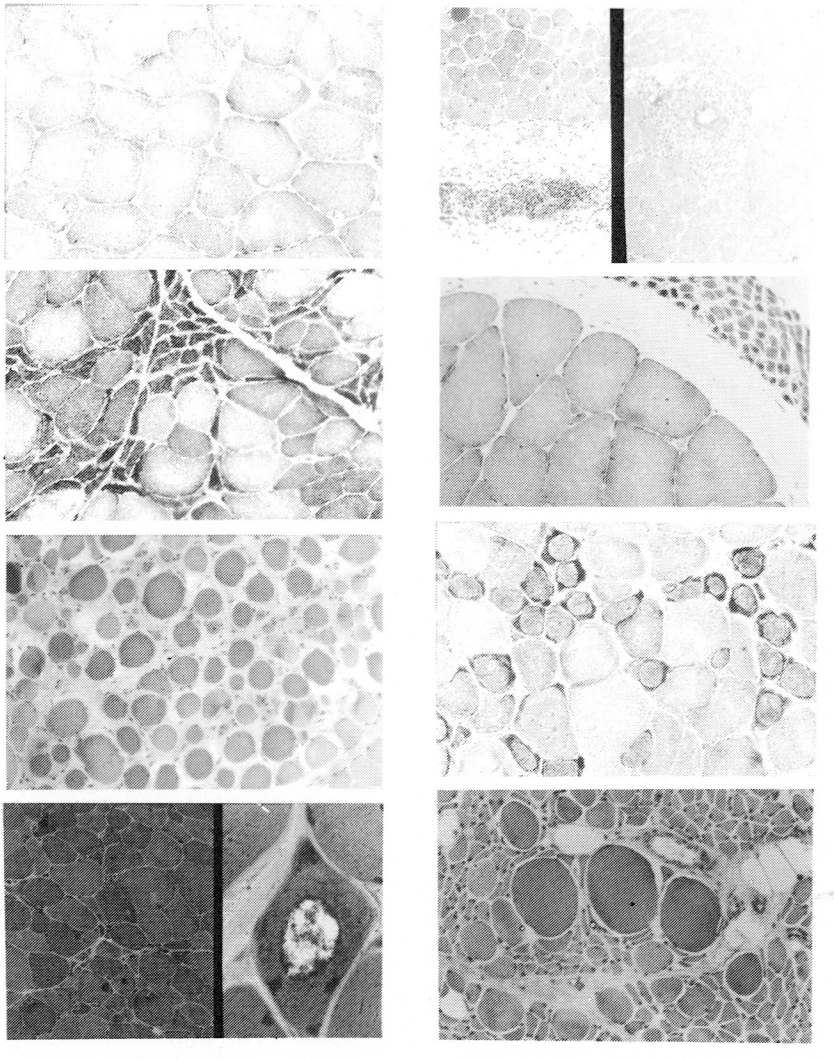
**A群**：構築異常・組織化学的所見などが本質的な特異性を有する場合．

1)筋病変の特徴が疾患・病型名とされているもの：central core disease, nemaline myopathy, myotubular (centronuclear, pericentronuclear) myopathy など．ただし，これらの構築異常が筋病変全体として主体をなしていること，他の胎生期構築の遺残や fiber type の未分化・異常分化等の所見を伴っていることなどが重要である．

2)酵素欠損症・蓄積疾患など：筋組織化学的方法が確立されている場合 (McArdle 病における phosphorylase 欠損の証明など) に限り，且つ電顕的・分析化学的方法の併用により，その微細構築上の局在，定量性などが重要な所見として付加される．糖原病一般，amyloidosis, lipidosis などの場合にも特異性の高い方法論の存在を条件にこの位置にランクされ得る．

**B群**：一般病理学的診断が疾患・病型診断となり得る場合．

1)多発性筋炎：①血管間質系病変 (滲出性炎としての要素，すなわち滲出・浮腫・リンパ球を主



| | |
|---|---|
| ① | ② |
| ③ | ④ |
| ⑤ | ⑥ |
| ⑦ | ⑧ |

**図 3**　筋病変の例示（本文参照）：①A群，1) central core disease, NADH・TR, 200×；②B群，1) 多発性筋炎，［左］myolysis と血管間質へのリンパ球浸潤，［右］血管炎型；HE，40×；③C群，1) ALS，NADH・TR，100×；④C群，2) WH，NADH・TR，100×；⑤C群，3) Duchenne 型筋ジストロフィー，trichrome 変法，100×；⑥C群，5) 筋緊張性ジストロフィー，NADH・TR，100×；⑦C群，6) rimmed vacuole 型 distal myopathy, trichrome 変法，［左］100×，［右］400×；⑧D群，1) Kugelberg-Welander 病，HE，100×.

体とする細胞浸潤・膠原線維増生などの全部または一部)，および②筋線維病変 (myolysis を主体とし，再生現象を含む) の要素につき，それぞれの程度に関する評価が可能である．

2) sarcoidosis：非乾酪性で，giant cell を含む類上皮肉芽腫の証明．部位によってはリンパ球浸潤のみを認めることもあり，また筋束外，末梢神経 (腓腹神経生検) に証明されることもある．

3) 悪性腫瘍細胞の筋束内浸潤 (lymphosarcomatosis の場合など，一見多発性筋炎様所見を呈し得るが，個々の細胞の病理学的同定により鑑別可能である．

**C 群**：近縁病型との鑑別が問題となることはあるが，ほぼ単独に強く疑える場合 (盲検診断上概して90%以上の特異性をもつと考えられる)．

1) ALS (連続する概念としての成人・散発型の狭義の SPMA を含む)：小角化線維小群集の多発，萎縮線維のミトコンドリア酵素活性の濃縮現象，非萎縮線維の肥大・横断面円形化・中心核，fiber type sameness property を主体とする (fiber type grouping, target fiber の出現等も観察はされ得るが極めて稀)．

2) WH：大群集萎縮，筋線維微細構築とくに intermyofibrillar network における胎生期特性の一部遺残 (目の粗い太い構造)，fiber type の分別異常 (未分化性，および一部再生現象の可能性あり)，その他中心核，間質の脂肪織浸潤等を特徴とする．

3) Duchenne 型筋ジストロフィー：筋ジストロフィー一般の特徴に加え，とくに間質 (endomysium・perimysium・epimysium とも) の結合組織増生，再生現象，opaque fiber, histogram 上萎縮・正常大・肥大線維よりなる典型的な mirror image (spectrum) 型，時に小規模なリンパ球浸潤，また fiber type predominance や fiber type deficiency (とくに2B) を示す．

4) 福山型筋ジストロフィー：Duchenne 型とは共通点も多いが，筋線維径が全体として減少 (年齢に比しても，正常大・肥大線維に乏しい)，結合組織増生に比し脂肪浸潤がより著明であること，intermyofibrillar network の胎生期構造遺残性 (WH の場合と類似) などが更に特徴的である．

5) 筋緊張性ジストロフィー：筋原性変化を背景とし，中心核 (とくに鎖状核)，筋鞘核増加，筋原線維走行異常，ring fiber, sarcoplasmic mass, type I atrophy 等を特徴とする．

6) rimmed vacuole 型 distal myopathy：多数の rimmed vacuole が存在し，それが筋小束ごとに出現率の差を示し，type I fiber に好発する．背景病態としては筋原性変化のみならず神経原性変化も混在する．下肢遠位筋に特徴的にある．

7) Kearns-Sayre 症候群：筋線維大小不同を背景に多数の典型的な ragged red fiber が認められる．時に type II (a, b) atrophy, type II b deficiency などを認める．

**D 群**：特徴的所見が指摘され得るが，尚鑑別を充分要するもの．

1) Kugelberg-Welander 病，Kennedy-Alter-Sung 病：神経原性変化のうち，大群集萎縮・極度萎縮線維の散在群集 (pyknotic nuclear clump を含む)，小角化線維の散在等 (いわゆる前根・末梢神経障害型の所見) が主体であり，小角化線維小群集の多発 (前角細胞障害型の所見) には比較的乏しい．また筋原性変化の混在も明らかで，motor unit 内病態局在の多様性を示している．また著明な肥大線維，split fiber, multiple internal nuclei も特徴的であり，時に fiber type grouping が認められる．

2) Charcot-Marie-Tooth 病：遠性型筋萎縮・末梢神経障害の特徴を有するものの，筋病変自体は，一般の neuropathy の場合よりむしろ Kugelberg-Welander 型に類似し，motor unit 内病態局在の多様性を示している．小角化線維の散在型の要素，fiber type grouping (分別異常を含む)，筋線維中心部病変は Kugelberg-Welander 病の場合よりむしろ著明である．

3) Becker 型・肢帯型・顔面肩甲上腕型・三好型各筋ジストロフィーは，筋ジストロフィー一般の所見特異性は共診に認められるが，相互の鑑別は筋病変のみでは容易ではない．これらの諸型はともに再生現象，split fiber の出現を高率に示す．Becker 型では pyknotic nuclear clump ないし極

度の萎縮線維の散在・群集など一部に神経原性要素の加味が特徴として指摘される．三好型は病変の程度としてDuchenne型と類似し，また遠位型筋萎縮を示してはいるがrimmed vacuoleは認められない．

4) polyneuropathies, multiple mononeuritis：小角化線維の散在，進展とともに一部群集を示し，target (targetoid) fiber, fiber type grouping, fiber type分別異常 (re-innervationの過程)，その他筋線維中心部病変の種々相 (central dens area, central clear areaなど) も観察される．

5) Guillain-Barré症候群：基本的に神経原性変化を示すが，その主体は極度の萎縮線維の散在・群集 (pyknotic nuclear clumpを含む)，筋小束ごとの平均直径の差，萎縮・正常大・肥大線維群間のなだらかな移行性である (前根障害型の特徴の一部)．小角化線維小群集の多発の型や大群集萎縮の型は殆どみられない．また筋線維横断面円形化中心核，筋線維の浮腫状膨化，endomysium～perimysiumの浮腫状開大を示す．小角化線維の散在の型，fiber type grouping, fiber type分別異常，target (targetoid) fiber，他の筋線維中心部病変もしばしば認められる．

**E群**：筋病変の特徴は指摘されてはいるが，その特異性が個別診断上高くないもの．

1) 諸種内分泌性ミオパチー，2) 重症筋無力症，3) 周期性四肢麻痺，4) その他，があげられるが，自験例既報告，一般文献報告例の如くであるため内訳根據は省略する．

**F群**：神経筋病態の加味 (移行性・類縁性の問題を含む)．

1) 種々の脊髄小脳変性症，家族性痙性対麻痺など，2) Parkinson症候群・他の錐体外路疾患，3) Shy-Drager症候群，4) ultisystem atrophy，進行性核上性麻痺，5) Fisher症候群，6) その他に於ける神経筋病態などがあげられるが，これらには，各疾患自体の筋病変の特徴が存在するというよりも，むしろ，上記各群の一部の病態 (とくに変性疾患における) が加味されている．その類縁性の解析の上で筋病変の特徴づけが重要である．

## 考察およびまとめ

以上，我々は表題の如き検討をおこない，筋病変の各論的特異性に関する帰納法的な位置づけをおこない，若干の知見を得た．

1) 諸種神経筋疾患1340例の筋病変を，確定診断と対比して，病変の特異性に関するgrading (A～E) を示した．その臨床的意義として，①筋線維の大小関係pattern等より，motor unit内病態主座の局在，②筋線維構築異常より筋自体に現われた直接的間接的な病態の推定，③筋fiber type異常より，denervation, re-innervationの問題やfiber type別代謝異常，神経因子の関与，発生・発達に関する因子の検討，④再生現象，⑤炎症所見，⑥その他を指摘した．

2) そのgrading中，A・B群は一般に特異性が認知されているが，本報告ではとくにC・D群に含めた諸疾患を中心に，その特異的所見の実用性と臨床的意義を「結果」記載中に含めた．また，E・F群に関しても，今後の病因・病態に資し得る所見が含まれているが，とくにF群については，他の既存の疾患における筋病変との類縁性の解析により，その群の諸疾患の多系統病態の解明に貢献し得るものと考えられる．

## 文　献


1) Dubowits, V. and Brooke, M.H.：“Muscle biopsy：A modern approach”, Saunders, London, Philadelphia, Tronto, 1973.
2) 宇尾野公義，木下眞男：“筋病理アトラス”．医学書院，1972.
3) 田辺　等：アトラス「神経筋疾患の臨床」．脳と神経，26：6，138，274，406，518，630，746，854，950，1046，1146，1974；27：6，130，250，1975.
4) 田辺　等：筋生検．綜合臨床，24：845，1975.
5) 田辺　等：筋生検．“神経学”第2巻，冲中重雄監，南江堂，1976，p.369.
6) 田辺　等：筋生検による神経筋疾患の診断．“内科セミナー，PN 1，神経学的診断法”織田敏次他・編，永井書店，1979，p.261.
7) 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.

8) Matsubara, S. and Tanabe, H. : Hereditary distal myopathy with filamentous inclusions. Acta Neurol. Scandinav., 65 : 363—368, 1982.

# 4)－(2) Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーの1例

田辺　等*

研究協力者　小島　進** 内潟雅信** 松井孝道**
井田雅祥** 磯崎英治** 立花新太郎***
河端正也*** 名取徳彦****

## はじめに

Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー症は，1979年の Rowland ら[1]の報告以来，最近再度注目されている．しかし，rigid spine syndrome との異同など種々の問題点が指摘されている．今回，我々は本症の一孤発例を経験したので報告する．

## 症　例

**患者**：19歳，男性．

**主訴**：筋萎縮，筋力低下の再精査目的．

**家族歴**：神経筋疾患なし．近親婚なし．

**既往歴**：特記すべきことなし．

**現病歴**：妊娠・分娩経過には異常なし．1歳頃，斜頸と言われたが詳細は不明である．処女歩行は1歳2ヶ月で正常であった．3歳頃より歩行時の易転倒傾向が出現し，4歳時には某医大を受診し進行性筋ジストロフィー症と診断された．6歳頃には頭が後方へひかれる感じが出現した．11歳時に国立療養所西多賀病院を受診．上肢近位筋の筋萎縮と筋力低下，及び翼状肩甲を認めたが下肢の筋萎縮は明らかではなかった．また，頚部前屈不能で，肘と足関節の拘縮を認めた．検査所見では CK130（正常値0～19）で筋生検（前脛骨筋）は筋原性変化であった．胸部X線上 CTR は44%であったが，心電図所見は不明であった．以上の所見より非定型的な筋ジストロフィーと診断された．その後，ほとんど症状は変化しなかったが，18歳頃より著しい脊柱変形のために，独立歩行不能となり歩行器を作製した．昭和59年1月，再精査希望で虎の門病院へ入院となった。

**入院時現症**：一般身体所見．身長計測不能．体重35kg．血圧130/70mmHg．脈拍60/分．その他，心，肺，腹部に異常を認めない．

**神経学的所見**（図1）：1)前頚部，肩甲上腕下腿に強い筋萎縮と筋力低下．2)頚部はほぼ最大伸展位に固定しており，脊柱の前屈制限と肘関節の屈曲拘縮および足関節の尖足拘縮を認めた．3)深部腱反射は ATR は保たれていたが、他は消失．

**検査所見**：CK360mIU/ml（MM96 MB4%；正常100以下），ALP10.7K. A. U.（肝±骨2＋；正常2.8～8.4）．胸部X線上は CTR54%と心肥大を示し，通常の心電図では Sinus arrythmia, PAC, PVC, を認めた．そこで，ホルター心電図を施行したところ，上記所見に加え，AV dissociation, aberrant conduction, PAT with blok などの所見を得た．心エコーでは僧帽弁前尖の軽度逸脱を認めるのみで，大概正常であった．肺機能では肺活量1.93$l$（48%）と拘束性障害を示したが血液ガス上は正常．

筋電図では，図2に示すように筋萎縮の強い部に一致して軽度筋原性変化を認めた．末梢神経伝導速度は正常であった

**筋組織学的，組織化学的所見**：筋生検は上腕二頭筋，傍脊柱筋で施行した．その後にアキレス腱延長術時に腓腹筋を，頚椎変形矯正術時に頤舌筋をそれぞれ検索する機会を得た．なお，本症例はこの2回の整形外科的手術で著明な日常生活動作の改善をみている．採取された筋はただちに凍結

＊東京都立神経病院（前・虎の門病院神経内科）
＊＊虎の門病院神経内科
＊＊＊虎の門病院整形外科
＊＊＊＊国立療養所西多賀病院神経内科

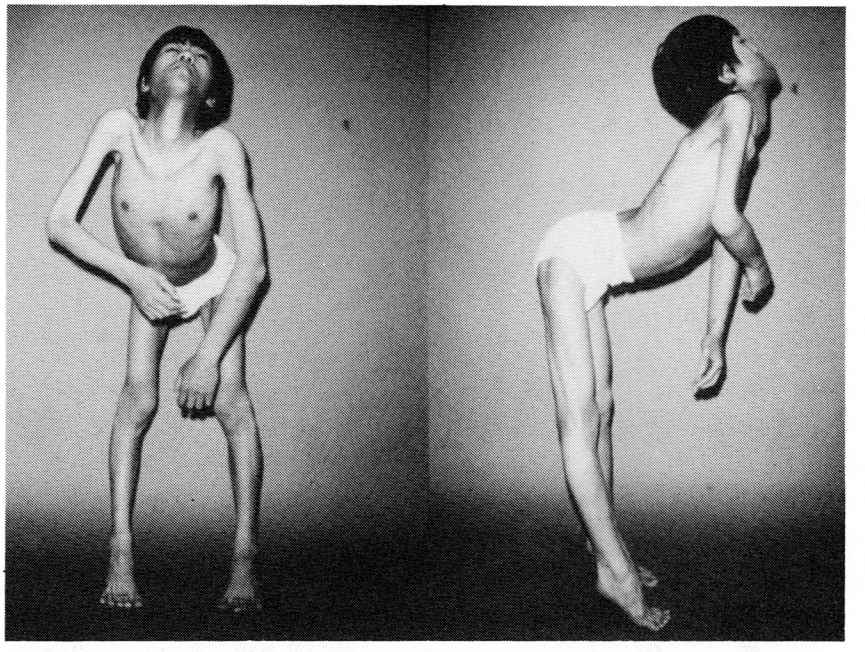


図1　患者全身像．特異な筋萎縮と関節拘縮を示す．

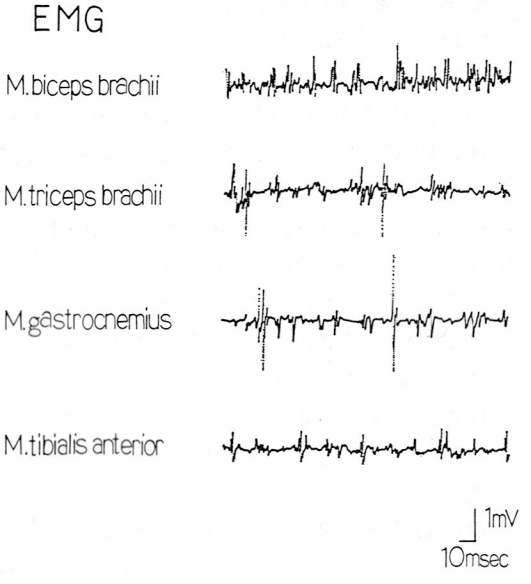



図2　筋電図．萎縮の強い筋に一致して軽度筋原性変化を認める．

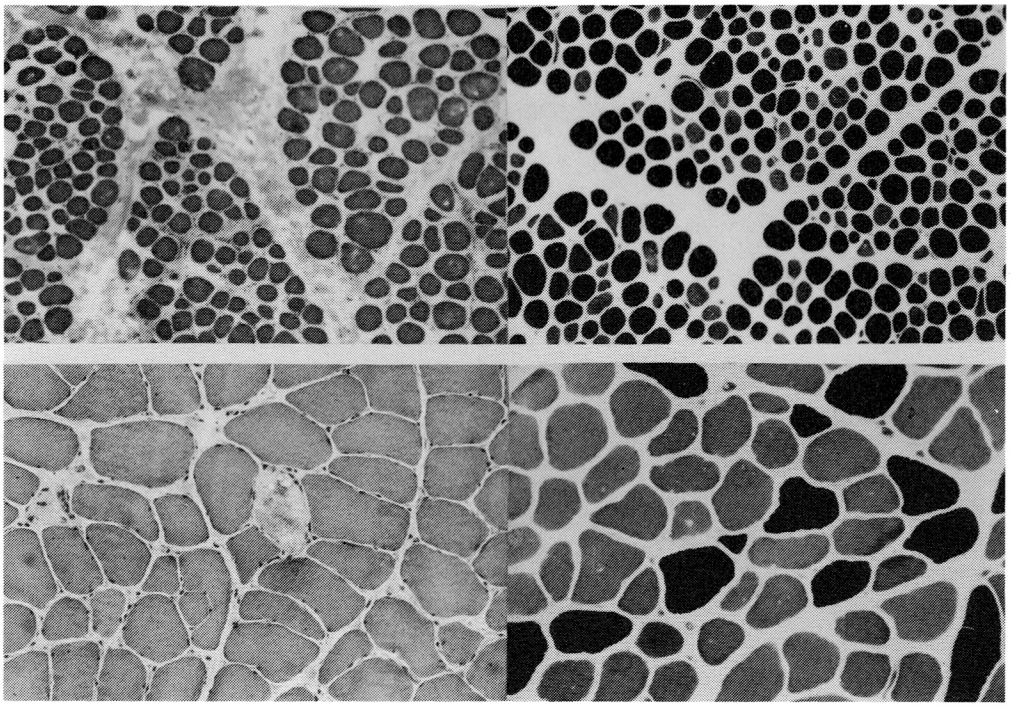
され連続切片を作製，hematoxylin and eosin (HE)，modified Gomori trichrome，PAS，Azan，NADH-TR，SDH，aldolase，phosphorylase，ATP (routine，pH4.6，4.2)，などの染色を行なった．

上腕二頭筋（図3-a，b）では，筋線維の大小不同，円形化，endomysium と perimysium の拡大および fibrosis を認め，組織化学的には type 1 fiber atrophy を認めた．

傍脊柱筋（図3-c，d）では，予想に反し変化は軽度で大小不同像の他 myolysis や fiber splitting を認めた．なお組織化学的には type 1 predominance を示していた．

腓腹筋では筋線維の比較的保たれている線維束の他に図4-a に示すように，脂肪変性 ring fiber，sarcoplasmic mass のような所見を認める部が混在していたが，fiber type の異常はあまり目立たなかった（図4-b）．

頤舌筋（図4-c，d）は，4筋のなかで変化が一番強く，著明な大小不同，中心核，opaque fiber，phagocytosis，間質の拡大などを示していたが，上



| a | b |
|---|---|
| c | d |

図3　筋生検像
a）上腕二頭筋．HE 染色 ×40
b）同．ATPase 活性像（pH10.2）
c）傍脊柱筋．HE 染色 ×100
d）同．ATPase 活性像（pH9.4）

腕二頭筋とは異なり逆に type 2 fiber atrophy を示していた．

以上を要約すると，4筋の筋生検像は質的には同一で筋原性変化が主体でありその程度が異なると言えた．また図5に4筋の histogram を示すが，全ての筋において type 1，type 2 共に小径化がみられたが，特に上腕二頭筋では type 1 atrophy を，傍脊柱筋では type 1 predominance を，また頤舌筋では type 2 fiber atrophy を，それぞれ認め fiber type の異常は一定していなかった．

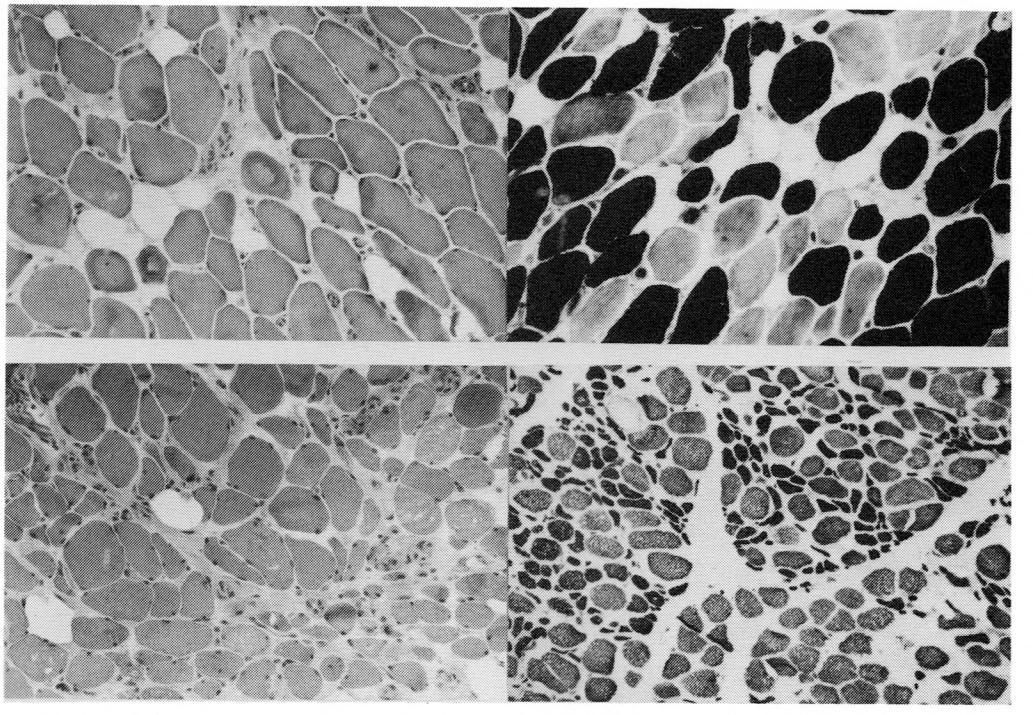
電顕は上腕二頭筋と傍脊柱筋で施行したが軽度筋原線維の粗鬆化と筋細胞膜下の軽度のミトコンドリアの集合がみられるのみであった．

## 考　　案

本症例は，①孤発例ではあるが男性であり，②頚部，肘部の拘縮が早期より認められ，③筋萎縮の分布が肩甲・上腕・下腿の分布をとり，④進行は緩徐で，⑤心電図上洞機能不全が疑われることより Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーと診断した．

本症は，Emery と Dreifuss による報告[2]によりその存在と特殊性が明確にされ，以後同様の症例が蓄積されている．1979年 Rowland らは，上記の本例でもみられた5つの点を強調し，Emery Dreifuss muscular dystrophy と呼ぶことを提案している．

本邦例で，この5項目を満足する症例の報告は，Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーとして報告された3例[3)4)5)]の他に，Scapuloperoneal muscular atrophy with cardiomyopathy として報告された4家系9人[6)~9)]がみられる．これらの例での



| a | b |
|---|---|
| c | d |

図4　筋生検像
a）腓腹筋．HE 染色 ×100
b）同．ATPase 活性像（pH10.7）
c）頤舌筋．HE 染色 ×100
d）同．ATPase 活性像（pH10.3）

筋電図，筋生検所見は本例と栗山ら[5]の例を除いては，全て神経原性変化もしくは神経原性と筋原性変化の混在のいずれかの所見である．すなわち，本邦例筋原性変化とされた本症は少ない．

組織化学的には，Hoplcins ら[10]，荒木ら[4]は，type 1 fiber atrophy を，Rowland ら[1]は type 2 B deficiency と報告しているが Mawatari ら[6]と栗山ら[9]は type 1 と type 2 は同等の萎縮をみたとしている．本例では先に述べたように各筋で fiber type の異常は異なり，本疾患における fiber type の異常は本質的なものではないと思われた．

解剖例では1982年に工藤ら[3]が脊髄の詳細な検討を行ない前角細胞の脱落，gliosis などを認めたと報告しているが，1974年の Takahashi ら[7]の例では脊髄に異常を認めず筋原性変化が主体であるとしている．Rowland ら[1]や古川[11]は，古典的な神経原性，筋原性の立場にとらわれず，一つの臨床的特徴より本症をとらえる立場をとっている．

本症は，心伝導異常を伴い突然死をきたすという点において臨床的に非常に重要であるが，rigid spine syndrome との異同も含め，今後十分な症例の蓄積と検討が必要と思われた．

## ま と め

Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーの19歳孤発例を報告した．計 4 筋の筋組織学的及び組織化学的検討を加えた．4 筋共に筋原性変化が主体であったが，fiber type の異常は上腕二頭筋では type 1 atrophy，傍脊柱筋では type 1 predominance，頤舌筋では type 2 atrophy と一定しなかった．筋病理と本症の位置づけを中心に考察を加えた．

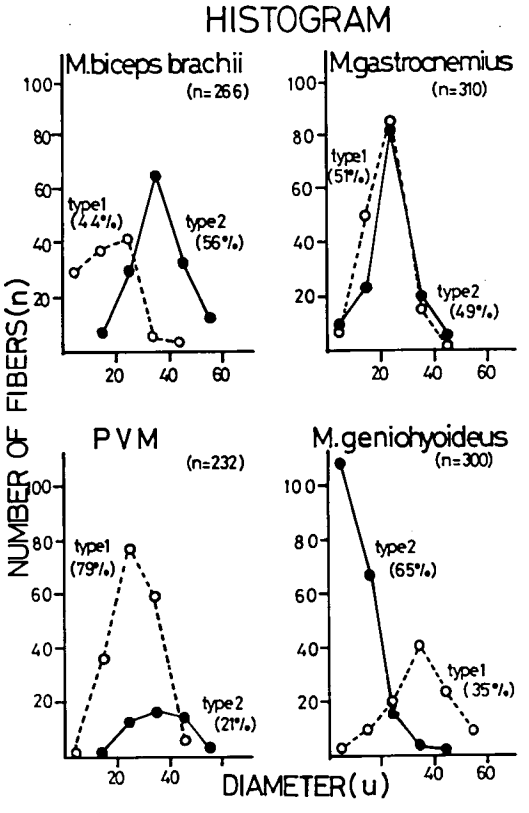



図5　Histogram. 全ての筋において，type 1，type 2 共に小径化をみるが，上腕二頭筋では type 1 atrophy を，傍脊柱筋では type 1 predominance を，頤舌筋では type 2 atrophy をそれぞれ示した.

## 文　献


1) Rowland, L.P., et al：Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Ann. Neurol., 5：111—117, 1979.

2) Emery A.E.H & Dreifuss F.E.：Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 29：338—342, 1966.

3) 工藤英昭ら：Emery-Dreifuss 型筋萎縮症（性染色体劣性遺伝，心筋症を伴う肩甲下腿型筋萎縮症）における脊髄病変. 脳と発達，14：363—369，1982.

4) 荒木淑郎ら：Emery - Dreifuss muscular dystrophy の一例. 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，pp97—102.

5) 栗山勝ら：Emery-Dreifuss 型筋萎縮症の 1 家系. 神経内科，20：61—63，1984.

6) Mawatari, S. & Katayama, K.：Scapuloperoneal muscular atrophy with cardiopathy. An X linked recessive trait. Arch. Neurol., 28：55—59，1973.

7) Takahashi, K., et al：Scapuloneuroneal dystrophy associated with neurogenic change. J. Neurol. Sci., 23：575—583，1974.

8) 早原敏之ら：脊柱可動性低下と心電図異常を伴う神経原性肩甲下腿型筋萎縮症の 1 例. 神経内科，1：545—551，1974.

9) 栗山勝ら：関節拘縮と心障害を伴った肩甲下腿型筋萎縮症の 1 例. 臨床神経，17：575—581，1977.

10) Hopkins, L.C., et al：Emery-Dreifuss humeroneuroneal muscular dystroply：an X linked myopathy with unusual contracturer and brady-cardia. Ann. Neurol., 10：230—237, 1981.

11) 古川哲雄：伴性遺伝性筋ジストロフィー. 星和書店，東京，1983，pp70—75.

# 5)－(1)　特異な先天性ミオパチーの1例

木　下　真　男*

研究協力者　藤　岡　俊　樹*　山　田　信　興*　馬　場　繁　二*
仁　科　牧　子*　松　尾　宣　武**　沖　　永　明**

## はじめに

先天性ミオパチーの中には，Central core 病や Myotubular myopathy などの，筋線維中心部にのみに，異常な組織学的所見を有するものがあり，これらの他にも疾患特異性はないが，Target fiber，Targetoid fiber のような変化も知られている．我々は，上記のような所見とはいずれとも異なった変化を筋線維中心部に有する症例を経験し，若干の示唆を得たので報告した．

## 症　例

4歳．女児

主訴：全身筋緊張低下

家族歴：両親双方のいとこに1人ずつ，LCC あり．神経筋疾患は認めず．血族結婚なし．

既往歴：生後3カ月検診で LCC を指摘され，Riemenbügel 整復をうけるが整復されず，8カ月時に全麻下で関節形成術をうけている．

現病歴：出生時より全身の筋緊張低下に気づかれていた．定頸5カ月，独りすわり12カ月，つかまり立ちは2歳4カ月，独り立ちは2歳8カ月，独り歩きは3歳頃にそれぞれ可能となっている．その後も運動発達は，徐々に進歩しているが，全身の筋緊張低下と運動発達のおくれは明らかだったため，筋疾患を疑われて当科受診した．出生時から体重増加不良もみとめられていたが，3歳時には，体重は12.6kg，身長は90.5cm と，標準範囲内に Catch up した．

入院時現症：独り歩きは10m，独り立ちは10分程度可能である．顔貌は異常なく，全身の筋緊張低下及び深部腱反射の低下，筋力低下が著明．運動失調，知覚障害，筋強直症，筋線維束性れん縮認めず．関節拘縮なし．助詞を使用した3語文を話し理解力は良好であり，精神発達は正常．

検査所見：血清 CPK 13 IU/L．Aldolase 1.6 IU，他の一般，生化学的検査は異常なし．脳波，眼底，異常なし．髄液は細胞1/3，蛋白9mg/dl，糖61mg/dl と著変なく，骨髄像では，泡沫細胞はみられず，直腸粘膜生検異常なし．筋電図では，四肢近位筋優位に Small amplitude short duration の myogenic pattern がみられ Peroneal nerve MCV は54.5m/s であった．骨レントゲンは，骨盤の低形成，トルコ鞍の拡大傾向がみられ，肋骨の椎骨附着部周辺が不整で細少化し，第1，第2腰椎の椎体前後径が短縮傾向にあった．

大腿四頭筋生検：ATPase 染色では，すべてが Type I 線維であり（図1，2）横断面では，筋線維の大小不同と Endomysium の結合組織増加が著明であった．そして個々の筋線維中心に酵素活性を欠く部分がみられ，連続切片ではこの病変は筋線維の全長にわたって存在するのではなく正常な筋組織内に巣状に分布していた（図3）．筋線維径の分布も筋原性パターンであり平均直径は24.93±8.03μm であった．電顕では，筋線維中心部に明瞭な基底膜と細胞膜により囲まれる線維芽細胞様の，間質由来と思われる細胞が一個存在しその周囲には，わずかに膠原線維も存在していた（図4）．その周囲は筋線維の基底膜，細胞膜が明瞭にとりかこんでおり，一部に Dense zone と細胞膜の陥入像がみとめられた．そして，筋線維中心の，間質と，筋線維周囲の Endomysium の間質が，一部で連絡している像もみられた．

＊東邦大学医学部第四内科
＊＊東京都立清瀬小児病院

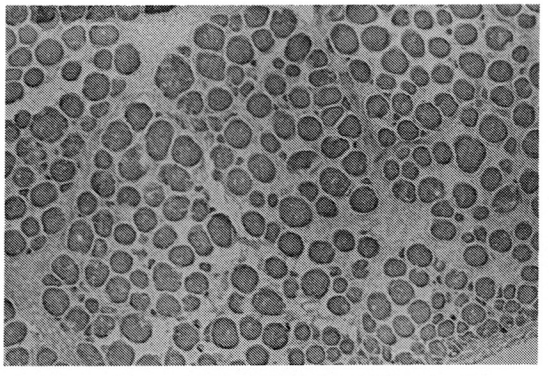


図1　大腿四頭筋生検（横断面）
ATPase 染色 pH 9.4

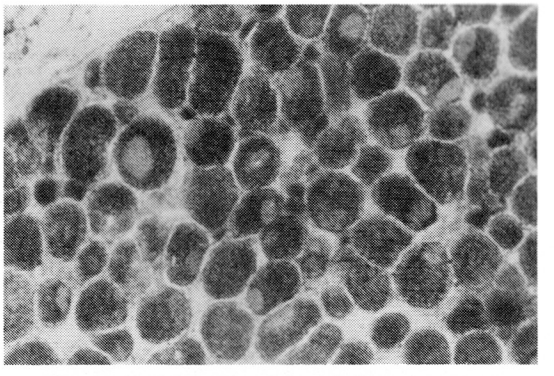


図3　大腿四頭筋生検（横断面）
NADH 染色

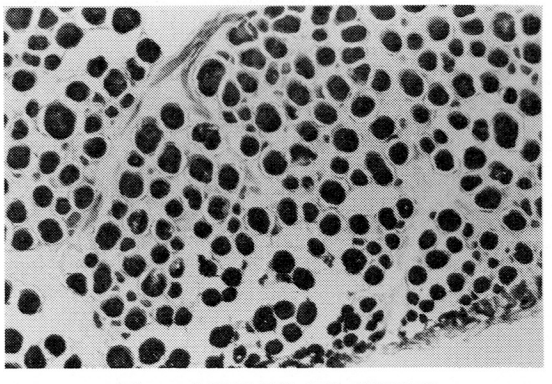


図2　大腿四頭筋生検（横断面）
ATPase 染色 pH4.3

図4　大腿四頭筋生検　電顕像 ×3,500

## 考　　按

今回，我々は，筋緊張低下を主症状として光顕及び電顕により，筋線維中心部にのみ異常を見出された症例を経験し，報告した．本症例は，生下時より発症した筋力低下，筋緊張低下等の症状が非進行性であり，組織学的に Type I 線維の優位を示したことから，congenital myopathy の一型と考えられた．

光顕では，筋線維の中心部に病変がみとめられ，連続切片による観察で，その病変は筋線維の全長に連続して分布しない点が特徴的である．従来より，筋線維の中心部に異常をきたす疾患として，Central core 病，Myotubular myopathy，Target fiber, Targetoid fiber が知られているが，Central core 病では酵素活性が欠損する Core の部分には筋原線維が証明されることにより，Myotubular myopathy は，筋線維中心部に中心核を有し，これが筋線維の長軸方向に連続することにより，また Target fiber，Targetoid fiber は神経原性変化で認められ，特徴的な2層又は3層の構造を有することから，それぞれ，本例とは異なるものと考えられる．また電顕的所見は，筋原線維の破壊等，現在病変が活動性を有していることを思わせる所見はなく，症状も非進行性であること等から，以前に生じた何らかの Subfiber focal necrosis からの再生過程において，周囲からの間質組織が陥入した結果と考えられる．これは Åström らも報告しているように従来より知られているが比較的稀である．また，この陥入した間質と筋線維との間で，筋腱接合部様の構造がみられるが，生検部位

が筋膜であること，及び連続切片上で正常の線維があらわれることから，正常の筋腱接合部とは異なるものと考えられる．いままでに報告された間質の筋線維中心部への陥入例において，このような所見のみられた例は見当らず，本例において特異的な何らかの機構が存在することを思わせるものである．筋線維再生の中途での過誤である可能性もあるが，一方で，筋そのものの発生異常による可能性も充分に考えられる．必ずしも疾患特異性を持つ変化とはかぎらないが，今後，先天性ミオパチーの筋組織を検討するうえで，注意すべき所見と思われる．

## ま と め

1）筋緊張低下を主症状とし，光顕及び電顕により，筋線維中心部に異常をきたした一例を報告した．

2）筋線維中心部に斑状に点在する病巣は間質由来の組織により成り立ち，Endomysium の間質との間で，連絡がみられた．

3）以前生じた何らかの形の Subfocal な筋破壊に対する反応と思われたが，筋腱接合部様の構造もみられ，今後の筋病理学的検索に際して注意すべき所見と思われた．

## 文 献


1) 木下真男，川崎研一：Myotubular (Centronuclear) myopathy. 神経進歩，20：48-58, 1976.

2) Kinoshita, M., and Cadman, T.E.：Myotubular myopathy. Arch. Neurol., 18：265-271, 1968.

3) Satoyoshi, E., and Kinoshita, M.：A case with muscle fibers with central abnormalities：A variant of myotubular myopathy. Clinical studies in Myology：140-146, 1971. (Amst.)

4) Walton, J.,：Disorder of Voluntary muscle. 4th ed. (Churchill Livingstone)

5) Åström, K.E., Adams, R.D：The pathologic reactions of skeletal muscle fibre. In Handbook of Clinical Neurology.：Disease of Muscle, Eds S.P. Ringel & H.L. Klawans. (American Elsevier：New York)

# 5)－(2) 筋緊張性ジストロフィー症のカルシウム代謝異常に関する研究

木 下 真 男*

研究協力者 大 島 久 二* 斉 藤 栄 造* 勝 島 聡一郎*

カルシウムは，筋収縮のメカニズムに関連した重要な電解質成分である．一方，筋緊張性ジストロフィー症に，種々の内分泌代謝異常の合併することが報告されており，さらにhyperostosis等の骨病変の存在することも知られている．しかし，本疾患におけるカルシウム代謝の異常の有無について詳細に検討した成績はほとんどない．今回我々は，筋緊張性ジストロフィー症患者に経口カルシウム負荷試験を行い，本疾患におけるカルシウム代謝及びカルシウム代謝調節に重要である副甲状腺機能の異常の有無を明らかにすることを目的とした．

## 対　　象

筋緊張性ジストロフィー症患者（以下MDと略す）3例を対象とした．男性1例，女性2例であり，平均年齢は38歳であった．対照として，筋萎縮性側索硬化症患者（以下ALSと略す）1例（男性，年齢46歳），正常人3例（全例男性，平均年齢30歳）について検討した．なおMDのうち1例，ALS例は長期間臥床例であった．

## 方　　法

Broadus[1]らの方法を一部改変した鈴木[2]の方法により行った．検査前3日間はカルシウム700mg，リン1200mg，NaCl 5gの一定食とした．一晩禁食後，朝7時30分に19ゲージ翼状針を留置し，8時より1時間尿を連続2回採取した．午前10時に乳酸カルシウム6.2g（Ca800mg）と一定食（Ca200mg，IP200mg，NaCl 1 g）を投与し，カルシウムとして総量1gを経口負荷した．その後2時間尿を2回連続採取した．又各採尿の中間点で採血した．腸管からのカルシウム吸収の指標として，カルシウム負荷3時間後の血清カルシウム値の前値からの増加量，及びカルシウム負荷2～4時間後の尿中カルシウム排泄の前値からの増加量を求め，各々Calcemic Response，Calciuric Responseとした．副甲状腺ホルモンの生物学的活性としてすぐれた指標とされる腎原性サイクリックAMP（cAMP）は，Broadus[1]らの方法に準じ糸球体濾過量で補正し，血清カルシウム値はPayne[3]らの方法を用い血清アルブミン値で補正した．又副甲状腺ホルモン（iPTH）はC末端のRadioimmuno Assayで測定した．

## 成　　績

### 1）カルシウム負荷前の検査所見

カルシウム負荷前の各2回の血液及び尿の検査所見の平均値を図1に示した．血清カルシウム値は，正常人で9.37±0.12mg／dl（Mean±SD），ALSでは10.35mg／dlであった．MDでは10.42±0.49mg／dlと正常人に比べ高い傾向を認め，うち1例では11.1mg／dlと正常域を越え高値であった．血清リン値は，ALSで4.3mg／dlと正常上限であったが，MDでは1例で2.5mg／dlと低値であった．空腹時尿中カルシウム排泄量は，正常人では0.11±0.02mg／100mlGFであったが，ALSでは0.335mg／100mlGFと高値であった．MDでは1例は正常であったが，他の2例で各々0.301，0.179mg／100mlGFと高値を示した．一方iPTHは正常人で1.7±0.10ng／ml，ALSで0.7ng／ml，MDで0.36±0.20ng／mlで

＊東邦大学医学部第四内科

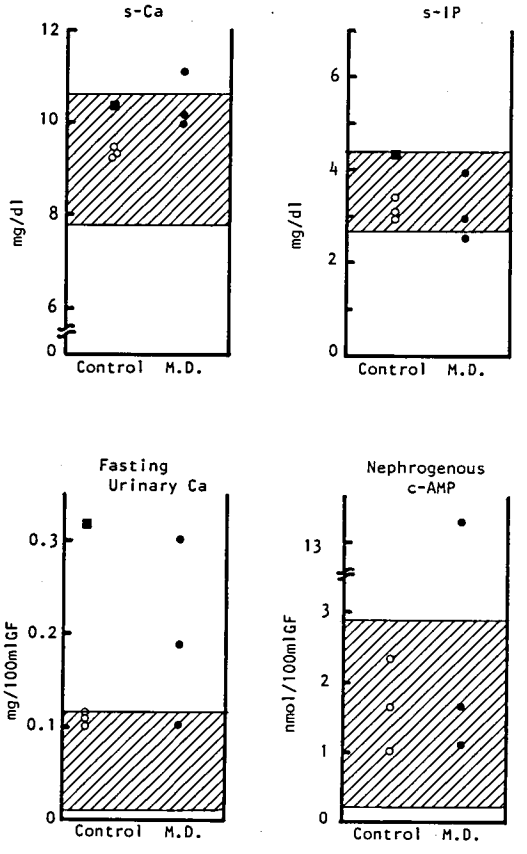



図1　空腹時（カルシウム負荷前）の検査所見
○正常人
■ A.L.S.
● M.D.
斜線：本院正常域又は鈴木[2]の正常域

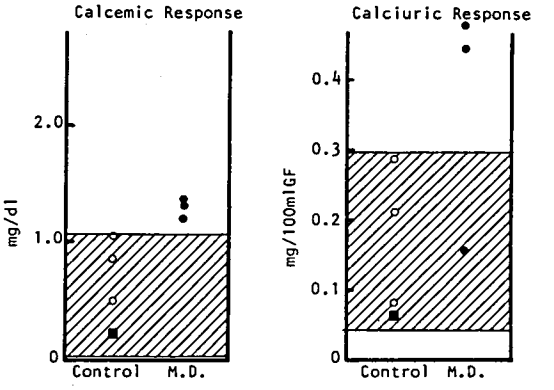



図2　経口カルシウム負荷後のCalcemic Response及びCalciuric Response
○正常人
■ A.L.S.
● M.D.
斜線：鈴木[2]の正常域

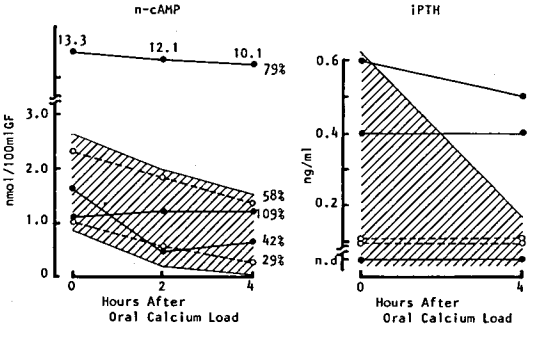



図3　経口カルシウム負荷後の腎原性cAMP（n-cAMP）及びiPTHの変化
○正常人
● M.D.
斜線：正常域

あり，全例正常域であった．副甲状腺ホルモンの生物活性の指標とされる腎原性cAMP値については，MD 1例で13.3n mole／100mlGFと著明な高値を示した以外，正常域にあった．

**2）カルシウム負荷後の検査所見**

カルシウム1g経口負荷後のCalcemic Responseは，正常人では0.82±0.25mg／dlであった．ALSでは0.25mg／dlと正常域であった（図2）．これに対してMDでは1.28±0.06mg／dlであり，全例正常域を越えて高値であった．Calciuric Responseは，ALSでは正常域であったが，MDでは3例中2例で0.475，0.441mg／100mlGFと高値を示した．

カルシウム1g負荷後の副甲状腺機能の抑制について図3に示した．カルシウム負荷4時間後，腎原性cAMP値は，正常人2例でそれぞれ58%，29%と良好な抑制を認めた．MDでは1例で腎原性cAMPは，負荷後42%に減少したが，他の2例では109%，79%と抑制は不十分であった．iPTHについては，MD 2例でカルシウム負荷後抑制は不十分であった．

表1に，各個人別に経口カルシウム負荷試験に

表1　経口カルシウム負荷試験の成績

| | Case | sCa | sIP | %TRP | Urinary Calcium | iPTH | n-cAMP | After Oral Ca Load: Calcemic Response | Calciuric Response | Response of n-cAMP or iPTH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Myotonic Dystrophy | 1 | ↑ | ↓ | ↓ | ↑ | — | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ |
| | 2 | — | — | ↓ | ↑ | — | — | ↑ | ↑ | ↓ |
| | 3 | — | — | — | — | — | — | ↑ | — | ↓ |
| Control A.L.S. | 4 | — | — | ↓ | ↑ | — | — | — | — | n.d. |
| Normals | 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 7 | — | — | — | — | n.d. | n.d. | — | — | n.d. |

n.d. : not done

おける成績を示した．MD の Case 1は，血清カルシウム値高値，血清無機リン値低値，% TRP は低値，尿中カルシウム排泄量は増加していた．さらに腎原性 cAMP は高値を示し，腸管カルシウム吸収の指標である Calcemic Response, Calciuric Response は高値，血清カルシウム値の上昇に伴う iPTH 及び腎原性 cAMP の抑制は低下していた．なお本例では手術は未施行であるが，非侵襲的検査では副甲状腺腫の存在は明らかでなかった．MD 3 例全例で Calcemic Response は高値であり，カルシウム負荷後の腎原性 cAMP 又は iPTH の抑制が低下していた．一方 ALS では% TRP は低下し，尿中カルシウム排泄は高値を示したが，他の検査所見には異常を認めなかった．なお，Case 3 ではカルシウム負荷後の検査所見のみ異常を認めた．正常人では全例各種検査所見は正常域にあった．

## 考　　按

カルシウム・リン制限食後の空腹時の検査所見は，腸管からのカルシウム吸収に影響されないものと考えられている[1]．今回の検討では，MD で空腹時血清カルシウム値，及び尿中カルシウム排泄量が多い傾向を認めた．したがって，MD では骨吸収が多くそれによる高カルシウム血症の結果，高カルシウム尿症を呈していることが示唆された．しかし，長期間臥床している ALS 患者でも血清カルシウム値は比較的高く，尿中カルシウム排泄量も高値であり，不用性骨萎縮の場合の検査成績と一致していることより[4]，高カルシウム血症及び高カルシウム尿症は現段階では必ずしも MD に特異的な異常所見とはいえないものと考えられた．しかし副甲状腺ホルモンの生物活性のよい指標とされている腎原性 cAMP が MD で 1 例高値を示したことは，基礎値においても MD に特異的な副甲状腺機能の異常の存在する可能性もあり，今後の検討が必要であろう．

腸管からのカルシウム吸収を検索する手段として，カルシウム同位元素を用いたカルシウムバランス study[5] があるが，手技が煩雑であった．Broadus[1] らは，経口的にカルシウムを負荷し，血清カルシウム及び尿中カルシウム排泄の変化を観察し，腸管からのカルシウム吸収のよい指標であることを報告している．さらにこれらは，血清 1, 25 $(OH)_2$ ビタミン D 値とよく相関することも知られている[2]．MD では 3 例全例カルシウム負荷後の血清カルシウム値の上昇，すなわち Calcemic Response が高値であった．さらに Calciuric Response も 3 例中 2 例で高値であった．したがって，MD では腸管からのカルシウム吸収が亢進していることが示唆された．ALS では Calcemic Response, Calciuric Response は正常範囲内であり，MD におけるカルシウム吸収の亢進は，単なる不用性骨萎縮に伴うものではなく，MD に特異

的である可能性が示された．又，これまでに腸管からのカルシウム吸収は1, 25 $(OH)_2$ ビタミンDとよく相関することが知られている．MDにおけるビタミンD代謝産物に関する検討はこれまで十分でなく，腸管からのカルシウム吸収とビタミンD代謝産物との関連について，今後詳細に検討されるべき点と考えられる．

カルシウム負荷後の副甲状腺機能の抑制は，副甲状腺機能亢進症患者において低下していることが報告され，カルシウムによる副甲状腺機能のRegulationの状態を知る上で重要な指標と考えられている．MDでは，カルシウム負荷後3例全例で，血清副甲状腺ホルモンあるいは腎原性cAMPのどちらかの抑制が不十分であり，カルシウムによる副甲状腺機能のRegulationに異常のある可能性が示された．

以上の成績より，MDでは骨からのカルシウムの遊離及び腸管からのカルシウム吸収の両者が増加していることが示唆された．実際の骨においてこれら両者のバランスが保たれているのか否かは，今回の検討では明らかでなかった．しかし，MDにおける骨のhyperostosisの成因についていまだその詳細は不明であり[6]，腸管からのカルシウム吸収の増加は，このhyperostosisの成因を考える上で興味深い成績と考えられた．

MDのCase 1については，諸検査の成績は原発性副甲状腺機能亢進症のそれと類似していた．実際にMDと副甲状腺腫あるいは過形成の合併も近年報告されている[7]．本例では非侵襲的検索のかぎり，明らかな副甲状腺腫瘍の存在は見出せなかった．手術は未施行であり，小腺腫あるいは過形成を完全には否定できないが，他のMD 2例でも同様のカルシウム代謝異常を認めたことより，単なる原発性副甲状腺機能亢進症の合併でなく，MDではそれと類似した病態の存在する可能性が考えられる．しかし今回，対象患者は3例であり，MDにおけるカルシウム代謝異常の詳細な検索には，さらに症例数を増やして検討する必要があると考えられた．さらにMDのCase 3ではカルシウム負荷後にのみ異常所見を認め，MDにおけるカルシウム代謝異常の検討には，基礎値のみならず負荷試験等を含めた詳細な検索が重要であると考えられた．

## ま と め

MD 3例に経口カルシウム負荷試験を施行した．その結果カルシウム負荷時の腸管からのカルシウム吸収が増加し，血清カルシウムの上昇に伴う副甲状腺機能の抑制が低下していた．したがって，MDでは副甲状腺機能を含めたカルシウム代謝異常の存在することが示唆された．

## 文 献


1) Broadus A.E., Mahaffey J.E., Bartter F.C., and Heer R.M.：Nephrogenous cyclic adenosine monophosphate as a parathyroid function test. J. Clin. Invest. 60：771, 1977.
2) 鈴木康夫：糖質コルチコイド誘発骨粗鬆症の発症機序並びに治療に関する研究　日内分泌会誌, 59：919, 1983.
3) Payne R.B., Little A.J., Williams R.B., and Milner J.R.：Interpretation of serum calcium in patients with abnormal serum proteins. Br. Med. J. 4：643, 1973.
4) 藤田拓男：骨粗鬆症．鉱質病，南江堂，東京，1980.
5) Avioli L.V.：A new oral isotopic test of calcium absorption. J. Clin. Invest. 44：128, 1965.
6) Ischerwood I. and Mawdsley C.：Familial aspects of radiologic change in dystrophia myotonica. Acta Radiologica. 1：110, 1963.
7) 原田俊一，井原康夫，池田恭治，松本俊夫，尾形悦郎：筋緊張性ジストロフィー症における原発性副甲状腺機能亢進症の合併日内分泌会誌, 60：1059, 1984.

# 6）Oculopharyngeal muscular diptrophyの筋病変
## ——rimmed vacuole型distal myopathyとの比較検討——

中　西　孝　雄*

研究協力者　水　澤　英　洋*　内　藤　　寛*　金　澤　一　郎*

### はじめに

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD；Victorら，1962年）は，1973年のDubowitzの報告以来，筋線維にrimmed vacuole (RV）を伴うミオパチーとして知られている．しかし，本邦ではOPMDの報告はまれでその筋障害についてはまだ充分検討されていない．我々は，OPMDの1例を検索しRV型distal myopathy (DM）との比較検討を行った．

### 症　例

**患者**：H.M. 41歳，男性（筑大神内119099-9）

**主訴**：腰部・両下肢の筋力低下，両側眼瞼下垂，嚥下困難，構音障害．

**家族歴**：父と息子に軽い眼瞼下垂とCKの軽度上昇を，娘にはCKの軽度上昇のみを認めた．2名の同胞（弟と妹）は未検である．

**既往歴**：31歳のとき胃潰瘍にて内服治療を受けた．

**現病歴**：25歳ころ鼻声と顔面の表情に乏しいことに気づかれ，31歳のとき眼瞼下垂と眼球運動制限も指摘された．39歳ころから腰が重く下肢がはる感じを覚え，100m位歩行すると疲れのため休息を要するようになった．約半年前から，手摺なしでは階段を昇ることが困難となってきたため当科入院となった．

**入院時現症**：身長165cm，体重41.5kg，血圧108/68mmHg，脈拍75/分（整）で，一般理学的所見には特に異常を認めなかった．

**神経学的所見**：意識清明で精神・知能は正常であった．脳神経領域では両側の眼瞼下垂を認め，眼球運動も全方向（上方＞左方＞右方＞下方）に制限されていた．しかし，複視はほとんど訴えなかった．瞳孔，眼底は正常であった．眼輪筋，口輪筋，側頭筋，咬筋に軽度の筋力低下と筋萎縮がありミオパチー顔貌を呈していた．鼻声の目立つ構音障害と嚥下障害があり，咽頭反射の低下とわずかな舌の萎縮を認めた．頸部では胸鎖乳突筋，僧帽筋も軽度に障害されていた．四肢では，上肢（近位$4^+$，遠位$5^-$），下肢（近位$4^-$，遠位$5^-$）ともわずかに左側優位に筋力低下，筋萎縮を認めたがGowers徴候はなかった．ミオトニアや筋線維束攣縮を認めず，屈筋と伸筋の差も明らかではなかった．深部反射は全般的に低下しており，病的反射は認めなかった．感覚系，協調運動および自律神経系には異常はなかった．

**検査所見**：血液；WBC 8300/mm³，RBC 335×10⁴/mm³，Hb 10.6g/dl，Ht 30.3%，Plat. 240,000/mm³，creatine 1.4mg/dl，creatinine 0.4 mg/dl，CK 174～305mU/ml（正常 5～50），LDH333～419U（正常50～400），その他の生化学検査，前腕阻血下運動負荷試験，甲状腺機能，副腎機能は全て正常であった．尿；潜血（＋），PSP，Fishberg試験は正常であったが，経静脈腎盂造影にて重複腎盂，重複尿管を認めた．胸部X線，心電図，髄液，脳波，脳CTは全て正常であった．筋電図；顔面，頸部，四肢近位部にて筋原性パターンを認めた．骨格筋CT；殿部では小殿筋，中殿筋よりも大殿筋の方がより低吸収値を示した．大腿では，内転筋，二頭筋が低吸収値を示したが，大腿四頭筋はほとんど正常で薄筋もよく保たれていた．大腿では前脛骨筋，腓骨筋に比べ

＊筑波大学臨床医学系神経内科

後脛骨筋，ひらめ筋が低吸収値であったが，腓腹筋はむしろよく保たれていた．

**筋生検（左大腿四頭筋）**：肥大した大径線維と萎縮した小径線維により著明な大小不同を呈した．小径線維は非常に小さな（tiny）線維を多く含み，ときに小角化状であり，少数ではあるが集簇する傾向を認めた．萎縮線維にはときにRVを認め，タイプ2線維にもあったがタイプ1線維に多く存在した．Pyknotic nuclear clumpがかなり見られ，中心核，fiber splittingも散見された．酸化酵素の染色では，ときに濃染する萎縮線維と筋鞘膜下にわずかに濃染する線維を認めたが，虫喰い像などの顕著なintermyofibrillar networkの乱れはなかった．Ragged red fiberも認められなかった．ATPase染色ではタイプ1線維11%，タイプ2 A線維67%，タイプ2 B線維21%，タイプ2 C線維1%とタイプ2 A線維優位を認めたが，明らかなtype groupingはなかった．間質の線維化は，萎縮線維が集簇した所ではやや目立ったが全体的には軽度であった（図1）．

電顕では，RVに対応してミエリン様小体や線維状構造物などさまざまの崩壊産物を含むautophagic vacuoleを認めたが，核内封入体は見られなかった（図3）．ときどき筋鞘膜下に大きなミトコンドリアが集簇していたが，各々の構造の異常は明らかではなかった．ただし，一ヶ所でのみ結晶様封入体を有する異常ミトコンドリアが認めら

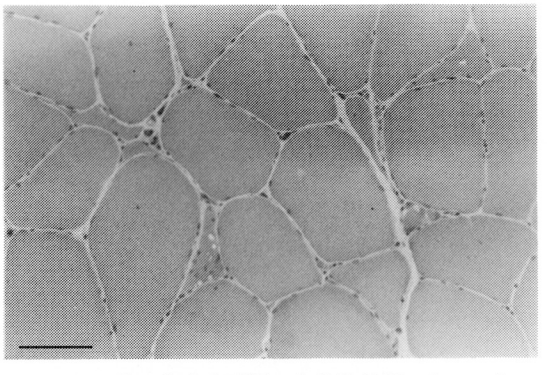


図1　著明な大小不同，小角化線維，rimmed vacuole, pyknotic nuclear clump，中心核，fibersplittingなどを認める（HE染色，スケールは100μ）．

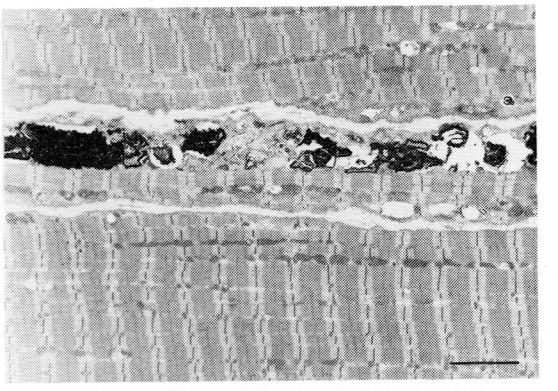


図3　ミエリン様小体やさまざまの崩壊産物を含むautophagic vacuoleを認める．それに接する筋原線維は比較的よく保たれている（スケールは5 μ）．

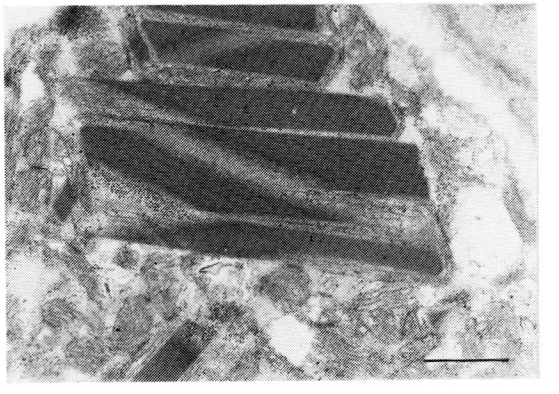


図4　結晶様封入体をもつ異常ミトコンドリア（スケールは1 μ）．

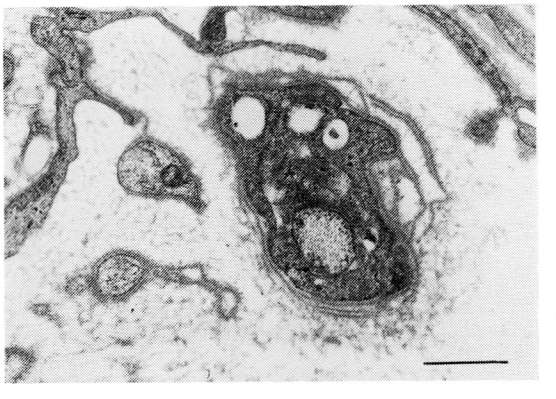


図5　生検筋々内神経．左の2本の軸索はSchwann細胞を欠いている．右の軸索は，部分的に数層の髄鞘を残すのみであり，Schwann細胞も変性し基底膜の重複が見られる（スケールは1μ）．

れた（図4）．筋内神経線維には，髄鞘の崩壊，Schwann 細胞を欠いた軸索，Schwann 細胞の変性・基底膜の重複などさまざまな変性所見が見られた（図5）．

## 考　　察

本例は，発症年齢は若いが優性遺伝を示す家族歴，特徴的な筋障害分布および RV を伴う筋生検所見から OPMD と考えられる．本例で示されたように OPMD の筋組織像の特徴は，RV に加え小角化線維や pyknotic nuclear clump などの一見神経障害を思わせる所見である．この所見は，図2に示すように本邦に多いいわゆる RV 型 DM の筋組織所見とよく似ている．ここで注意しなければならないのは，被検筋の種類により所見が異なるということである．図2は典型的な RV 型 DM の筋生検所見であるが，RV が多くミオパチー様の変化の明らかな下腿筋に比べ，あまり侵されていない大腿筋では大小不同，ごくわずかの小角化線維および RV を認めるのみである．同様に OPMD でも外眼筋や咽頭筋など障害の強い筋では，筋線維の変性と間質の結合織の増生が著しく前述の特徴が明らかでないため，単に“dystrophic”と記載されている場合が多い．

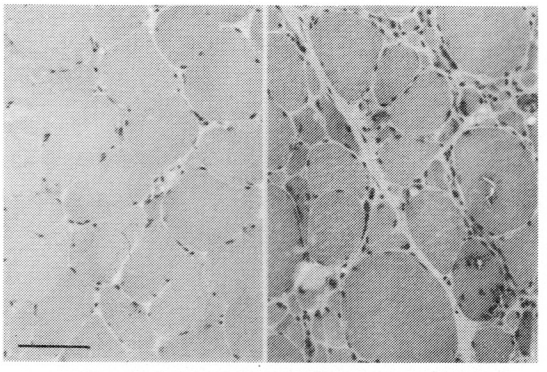


図2　Rimmed vacuole 型 distal myopathy の筋生検所見．左の大腿四頭筋では大小不同のほか小角化線維，rimmed vacuole を散見する程度であるが，右の前脛骨筋では筋線維の円形化，間質の増生などミオパチー様変化が進行している（HE 染色，スケールは100$\mu$）．

以上のことより，OPMD と RV 型 DM とは遺伝様式や筋障害の分布が全く異なる別々の疾患ではあるが，筋組織像については，進行の度合，被検筋の種類により多少の違いはあるものの，その本質的な所見はよく似ていると思われる．これは筋電図所見についても同様で，両者とも筋原性パターンが主であるが神経原性パターンを認めることも少なくないことが知られている．したがって，このような筋病変を呈する病態をまとめて rimmed vacuolar myopathy あるいは rimmed vacuolar disease と呼ぶことができる．

この rimmed vacuolar myopathy の特徴のひとつである神経障害を思わせる所見の発現機序についてはまだよくわかっていない．本例では明らかな筋内神経の変性が認められており，筋線維の変性が比較的軽いことから，神経障害は二次的なものというより一次的病変の可能性の方が大きい．OPMD ではこれまでに6剖検例が報告されており，5例までは神経系に異常はなかったとされている．しかし，最近 Probst らは計測などにより詳細に検討し軽度ではあるが確実に distal axonopathy を認め，中枢でも運動ニューロンの数は保たれていたが変性所見があったと報告している．また，Schmitt と Krause は，OPMD に近縁な疾患として知られる oculopharyngodistal myopathy の一剖検例にて運動ニューロンの変性を認めている．本邦では立石らにより，17歳ころ四肢近位部の筋力低下，筋萎縮で発症，のち構音障害，嚥下障害も伴い30歳で呼吸不全のため死亡した rimmed vacuolar myopathy と考えられる男子の一剖検例が報告されている．この例でも，それのみでは筋病変を説明することは困難であるとされた軽度の運動ニューロンの減少と変性があり，さらに神経細胞核にも筋鞘核に見られたものと同様の直細管状の封入体が認められている．

したがって，筋組織像，筋電図所見および剖検所見を考えあわせると，rimmed vacuolar myopathy の主体はミオパチーであるが，通常の意味の運動ニューロン疾患やニューロパチーではないごく軽度の神経系の障害をも伴っているという可能性が高い．

## ま と め

1．Oculopharyngeal muscular dystrophy と考えられる41歳男性例を報告した．

2．筋組織像は，rimmed vacuole のほか小角化線維など一見神経障害を思わせる所見であり，rimmed vacuole 型 distal myopathy とよく似ていた．

3．これらの病態は rimmed vacuolar myopathy とまとめて呼ぶことができる．その主体はミオパチーであるが，軽度ながら神経障害も伴っていると思われる．

## 文 献


1) Rebeiz, J.J., Caulfield, J.B. & Adams, R.D.：Oculopharyngeal dystrophy. A presenescent myopathy. A clinico-patholoic study. In Progress in neuro-ophthalmology (edited by Brunette, J.R. & Barbeau, A.), Excerpta Medica, Amsterdam, 1969, Vol. 2, p. 12-31.

2) Dubowitz, V. & Brooke, M.H.：Muscle biopsy. A modern approach. W.B. Saunders, London, 1973, p. 231-241.

3) Schmitt, H.P. & Krause, K.H.：An autopsy study of a familial oculophalyngeal muscular dystrophy (OPMD) with distal spread and neurogenic involvement. Muscle Nerve, **4**：296-306, 1981.

4) Little, B.W. & Perl, D.P.：Oculopharyngeal muscular dystrophy. An autopsied case from the French-Canadian kindred. J. Neurol. Sci., **53**：145-158, 1982.

5) Probst, A., Tackmann, W., Stoeckli, H.R. et al.：Evidence for a chronic axonal atrophy in oculopharyngeal "muscular dustrophy". Acta Neuropathol. (Berl.), **57**：209-216, 1982.

6) Tateishi, J. Nagara, H., Ohta, M. et al.：Intranuclear inclusions in muscle, nervous tissue, and adrenal gland. Acta Neuropathol. (Berl.), **63**：24-32, 1984.

# 7)－(1) Duchenne 型筋ジストロフィー症の脳 NMR 画像の分析

納　光弘*

研究協力者　岡田明彦** 杜若陽祐** 山元國光**
藤元登四郎** 朝倉哲彦* 福永秀敏***
井形昭弘*

## はじめに

Duchenne muscular dystrophy (DMD)に於ては，知能障害などの中枢神経障害が指摘されているが，X 線 CT 像では確定的な異常はみられていない．さて最近，NMR-CT が X 線 CT で見出し得ない異常を検出し得る場合が知られており，我々も mitochondrial myopathy などのミオパチーで NMR 画像の異常を見出している．これまで，我々の知る限りでは，DMD の脳の NMR 画像の検索はなされておらず，本研究はその異常の有無を明らかにする事を目的として行なった．

## 対象と使用機器

症例 4 歳から10歳までの 7 例の DMD と 7 歳から14歳までの正常者 7 例（男 4 例，女 3 例）の頭部 NMR-CT 像について比較検討した．

検索に使用した NMR-CT は旭 Mark-JNMR-CT で静磁場強度0.1Tesla（常伝導），共鳴周波数は4.5MHz，収集データ数は128×128matrix，又は256×256matrix で spin warp 法を用いて飽和回復像（Saturation Recovery 像，SR 像），反復回転像（Inversion Recovery 像，IR 像）及び $T_1$ 計算画像（$T_1$ 像）の 3 種類の画像を得る事が出来る．パルス系列は $180^\circ \underline{Td} 90 \underline{Td} 90^\circ$ により SR 像，$T_1$ 像を得，$180^\circ \underline{Td} 90^\circ$ により IR 像を得ている．繰り返し時間 Tr は100msec から500msec（可変），待ち時間 Td は50msec から600msec（可変）である．slice 面は横断面，矢状面，冠状面を自由に得る事が出来，横断面の slice-line は OM-line に平行で，slice 幅は10mm である．猶，$T_1$ 像で得られる $T_1$ 値は 1 data 5×5pixell（約 4 $mm^2$）の $T_1$ 値の平均値で，その SD は殆んどが10%以下と再現性の高いものである．又，今回の収集 matrix は全て128×128で施行し，SR 像及び $T_1$ 像の Tr は1000msec，Td は200msec，IR 像の Tr は1000msec，Td は300msec で統一した．

## 結　果

**写真 1** は上段が10歳男子の正常者代表例の NMR-CT 像で，下段は 8 歳男子 DMD 代表例の NMR-CT 像である．画像の種類は左端から SR 像，$T_1$ 像，IR 像である．

画像上 DMD の全ての症例で，プロトン密度信号強度，$T_1$ 値には特に異常は認められておらず，**表 1** に示してある様に脳内各部位の $T_1$ 値の比較も正常者群と有意差は認められていない．

## 考　按

筋ジストロフィー症の頭部 X 線 CT の所見として，先天性筋ジストロフィー症で皮質性萎縮や脳室の拡大，白質のびまん性の低吸収場がみられるという報告[1)2)3)]や筋緊張性ジストロフィー症で前頭葉の萎縮と間脳の萎縮などの報告[4)5)]が散見されるが，DMD の X 線 CT 上の知見は少なく，報告[3)6)]では脳萎縮が認められるとされている．

今回我々は NMR-CT が X 線 CT と異なり，プロトン密度，緩和時間，血流分布要素など，それ

＊鹿児島大学医学部
＊＊藤元病院
＊＊＊国立療養所南九州病院

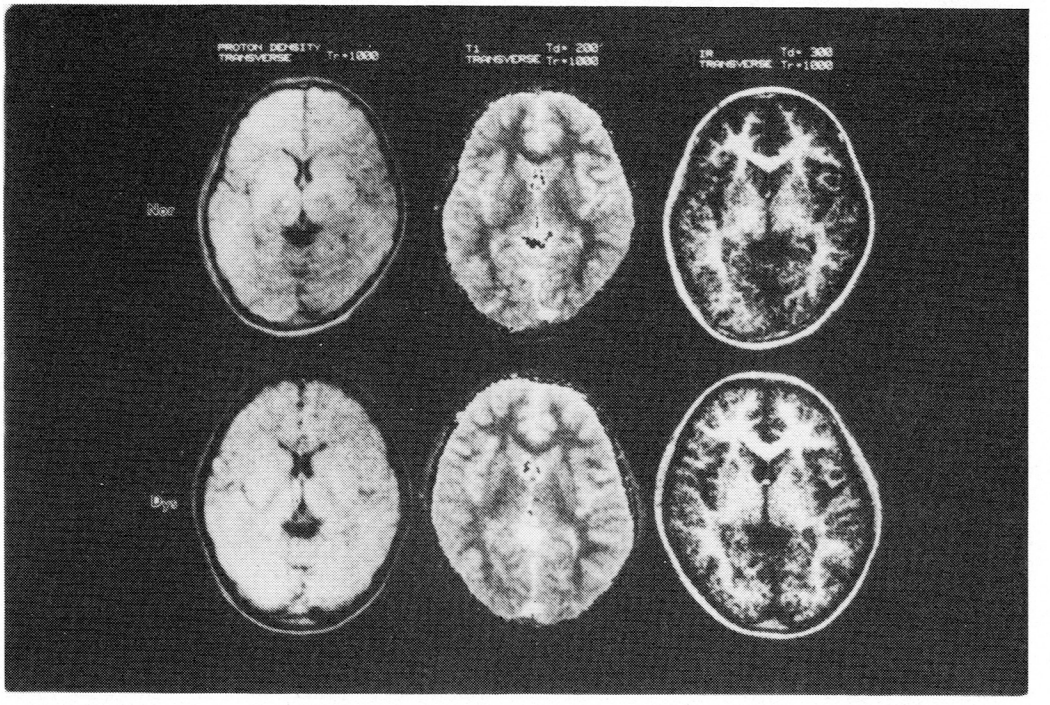



写真 1

表 1

**脳内各部位の $T_1$ 値(μsec)**

| | 尾状核 | | 被殻 | | 視床 | | 内包 | | 前頭葉皮質 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | L | R | L | R | L | R | L | R | L | R |
| Dystrophy | | | | | | | | | | |
| M | 401 | 407 | 383 | 369 | 350 | 347 | 302 | 294 | 412 | 405 |
| SD | 13.4 | 20.4 | 18.5 | 27.7 | 19.0 | 20.0 | 12.2 | 11.7 | 22.9 | 22.2 |
| Normal | | | | | | | | | | |
| M | 396 | 397 | 378 | 370 | 349 | 349 | 308 | 295 | 407 | 417 |
| SD | 21.0 | 21.1 | 21.3 | 15.6 | 28.1 | 22.0 | 20.1 | 20.2 | 8.99 | 23.3 |
| 評価 | N. S. | | N. S. | | N. S. | | N. S. | | N. S. | |
| | 側頭葉皮質 | | 後頭葉皮質 | | 前頭葉白質 | | 側頭葉白質 | | 後頭葉白質 | |
| | L | R | L | R | L | R | L | R | L | R |
| Dystrophy | | | | | | | | | | |
| M | 419 | 419 | 267 | 277 | 286 | 288 | 294 | 299 | 218 | 212 |
| SD | 19.2 | 37.6 | 183 | 190 | 11.0 | 10.0 | 21.3 | 19.4 | 149 | 146 |
| Normal | | | | | | | | | | |
| M | 413 | 419 | 336 | 322 | 280 | 281 | 288 | 285 | 256 | 243 |
| SD | 24.0 | 30.9 | 149 | 143 | 5.50 | 11.8 | 18.8 | 15.1 | 114 | 108 |
| 評価 | N. S. | | N. S. | | N. S. | | N. S. | | N. S. | |

M:平均　SD:標準偏差　N. S. :有意差なし

から得られる情報が多く，又，それらの情報には *in vivo* での組織の生化学的側面を含蓄している点に注目し検索を行なったわけである．更にこれまでの筋ジストロフィー症のNMR-CTの報告は殆んどが，筋自体及び赤血球を対象としたもので[7)8)]，臨床的に頭部の検索をした報告は我々が調べた限りではなく，今回，本研究の結果画像上及び $T_1$ 値の検索でも脳内の異常は認められなかったことは，極めて重要な意義をもつものといえよう．

## 文　献


1) 丸山博，福山幸夫ら：先天型進行性筋ジストロフィー症の中枢神経異常に関する神経放射学的検討．筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究（冲中班）昭和51年度研究報告書，1977，pp116—118.

2) 向山昌邦，祖父江逸郎ら：福山型先天性筋ジストロフィー症のCT像と脳剖検所見．筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究（冲中班）昭和52年度研究報告書，1978，pp227—230.

3) 西谷裕，板垣泰子ら：先天型筋ジストロフィー症の中枢神経系障害について．筋ジストロフィー症の臨床病態および疫学的研究（祖父江班）昭和53年度研究成果報告書，1979，pp232—234.

4) 大井長和，井村裕夫ら：筋緊張性ジストロフィー症の脳のCT—SCAN所見の検討．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55年度研究報告書，1981，pp72—75.

5) 小島進，田辺等ら：筋緊張性ジストロフィー症における脳CT・脳波・WAISを中心とした臨床的研究．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，pp103—106.

6) 岡元宏，安武敏明ら：筋ジストロフィー症のCT像および髄液蛋白について．筋ジストロフィー症の臨床病態および疫学的研究（祖父江班）昭和55年度研究成果報告書，1981，pp183—189.

7) Ashley DL, Goldstein JH : In vitro erythrocyte water transport in Duchenne muscular dystrophy : an NMR investigation. Neurology 33 : p1206—1209, 1983.

8) Newman RJ, Bore PJ, et al : Nuclear magnetic resonance studies of forearm muscle in Ducuenne dystrophy. Br Med J 284 : p1072－1074, 1982.

# 7)－(2) Duchenne型筋ジストロフィー症(DMD)の骨格筋の超音波，X線-CT，NMR(MRI)画像に関する研究，ならびにそのcarrier detectionへの応用

納　光弘*

研究協力者　岡田明彦** 杜若陽祐** 山元國光**
藤元登四郎** 朝倉哲彦* 福永秀敏***
音瀬廣章* 井形昭弘*

## I) DMDならびにcarrier骨格筋のMagnetic Resonance Imaging (MIR)によるspin-lattice relaxation ($T_1$) timeの検討

Changら(1981)[1]はnuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopyでdystrophy chickenのpectralis muscleにおけるwater protonのspin-lattice relaxation ($T_1$) timeとspin-spin relaxation ($T_2$) timeが有意に上昇していることを見出している．しかし，DMD患者の骨格筋における$T_1$或いは$T_2$ timeに関する報告はこれまで全くなされていない．最近，magnetic resonance imaging (MRI)により非侵襲的に$T_1$timeの測定が可能となったので，我々はDMD患者ならびにcarrierの骨格筋で，はじめての$T_1$timeの検索を行った．

〔方法〕4～14歳のDMD患児8名，6～14歳の正常対照男児8名，9～37歳のpossible或いはdefinite carrier女性8名，ならびに8～38歳の正常対照女性8名の計32名を対象に，左右両側大腿四頭筋中央部横断面の$T_1$計測画像($T_1$像)を得た．使用した機種は旭Mark-JNMR-CTで，静磁場強度0.1Tesla(常伝導)，共鳴周波数は4.5MHz，収集データ一数は256×256matrixで$T_1$像を得，これから1 data 10×10pixell (約16mm²)の$T_1$timeの平均値とSDを得た．尚，$T_1$time測定の際にカーソルはm. vastus lat.を中心とした部位におき，その左右の平均値をその個人の大腿四頭筋の$T_1$timeとした．

〔結果〕図1に示すような明瞭な$T_1$像が32名全員から得られた．正常対照男児，正常対照女性ならびにcarrierの全員に於て$T_1$像では視覚上の明らかな差異を認めなかったが，DMD患児に於ては視覚上の明らかな異常が認められた．すなわち，9歳以下の比較的若い年齢のDMD 6名では骨格筋部でdensityの増加を認め，10歳以上の比較的高年齢のDMD 2名では骨格筋部でdensityのpatchyな減少を認めた．このことは，$T_1$time実測値でも図2に示すように同様の結果が得られた．すなわち，正常対照男児の大腿四頭筋の$T_1$timeは，9歳以下の比較的若年群(5名)で244～279 (平均±SD；268.4±15.2) msecであり，10歳以上の比較的高年齢群(3名)で257～288 (平均±SD；268.7±16.9) msecと年齢による差は認められなかった．ところが，DMD患者では年齢による差が著明であり，9歳以下の6例全例で$T_1$timeは310～326 (平均±SD；313.2±8.3) msecと9歳以下

＊鹿児島大学医学部
＊＊藤元病院
＊＊＊国立療養所南九州病院

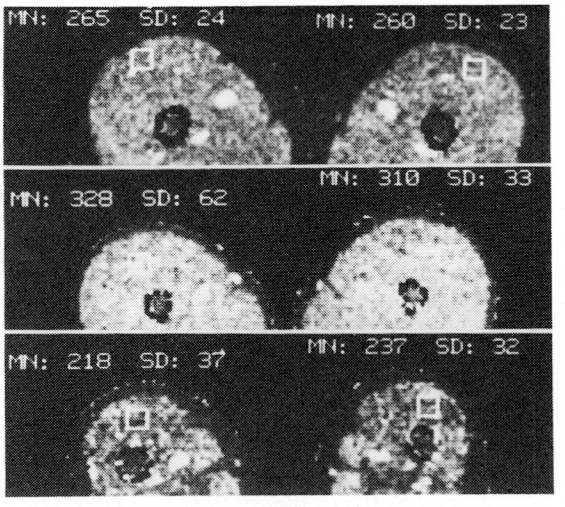



図1　両側大腿四頭筋中央部横断面における $T_1$ 像．上段が正常対照8歳男子(F.K.)，中段がDMD 6歳患児(U.S.)，下段がDMD10歳患児(S.T.) MNがカーソル内の $T_1$time の平均値を示し，SDはその標準偏差を示す．左右のMN値の平均値をその個人の大腿四頭筋の $T_1$time として使用した．

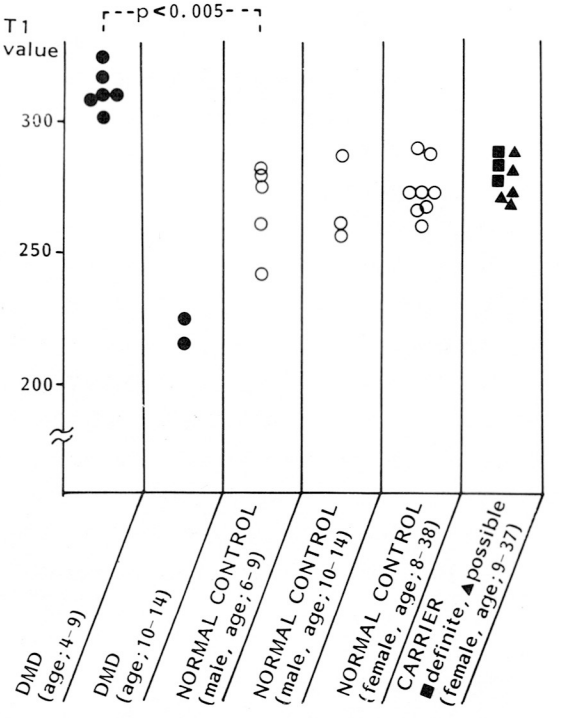



図2　比較的若年DMD群，比較的高年齢DMD群carrier群，ならびにそれぞれの群に対するnormal control群における大腿四頭筋 $T_1$time ($T_1$ value)．単位はmsec.

の正常対照の $T_1$time の範囲を越えており，有意の上昇 ($P<0.005$) を示した．これに反し10歳以上のDMDに於ては $T_1$time は219と228msec と2例ともに10歳以上の正常対照の $T_1$time の範囲を下回って，有意の減少 ($P<0.002$) を示した．carrier女性8名の $T_1$time は262～289 (平均±SD；277±9.6) msec で正常対照女性8名の $T_1$time の262～290 (274.8±9.9) msec に比し有意の差を認めなかった．しかし，definite carrier の3名の $T_1$time は284±6.2msec で正常対照女性8名とわずかに有意差 ($0.1<P<0.2$) を認めた．

〔**考案**〕正常対照の皮下脂肪の $T_1$ 値の平均は約170msec と筋肉の $T_1$ 値に比らべかなり低値をとることを考えると，10歳以上の進行したDMD患児の骨格筋の $T_1$値が有意の低下を示したことは，筋肉組織の脂肪変性の結果として理解することも可能と思われる．では，9歳以下の比較的若い年齢のDMDの骨格筋で $T_1$ 値の有意の上昇をみたことはどの様に説明すべきであろうか．可能性としては，DMD骨格筋では組織の自由水の増加が何らかの原因で起こっているのか，又は，骨格筋蛋白のcomposition又はconformation stateの変化が存在しているのかをあげることが出来るが[1]，いずれにしても，この様な $T_1$ 値の有意の上昇がむしろ病初期の患児グループに認められたということは，本疾患のprimaryな病態の反映である可能性を残すだけに重要な結果と考える．また，definite carrier群が対照女性群に比しわずかとはいえ有意差を認めたことも同じ意味で重要かもしれない．なお，carrier detectionには，現時点ではMRIは明らかな有用性を見出すには至らな

かった．

### II）DMD ならびに carrier 骨格筋の X 線－CT による CT 値の検討

4～14歳 DMD 患児 6 例，6～14歳正常対照男児 6 例，9～37歳 carrier 女性 7 例，ならびに 8～38歳正常対照女性 9 例の計28名を対象に，体部 X 線 CT にて大腿四頭筋中央部の横断像を得て，m, vastus lat. を中心とする部位の CT 値の各人の左右の平均値を算出し，プロットしたものが図 3 である．正常対照男児の CT 値は55～60（58±1.7）と狭い範囲に存在していたが，DMD 患児のそれは，全例で32～49（40.2±8.4）と低値を示し，有意の減少（P<0.005）を示した．また，carrier 群は41～67（53.4±7.3）で，正常対照女性群の49～65（57.8±4.8）に比しわずかながら有意の減少傾向（0.1<P<0.2）を認めた．正常対照の範囲より低値をとった 1 例は，血清 CK レベルが正常な possible carrier であった点，注目に値する．

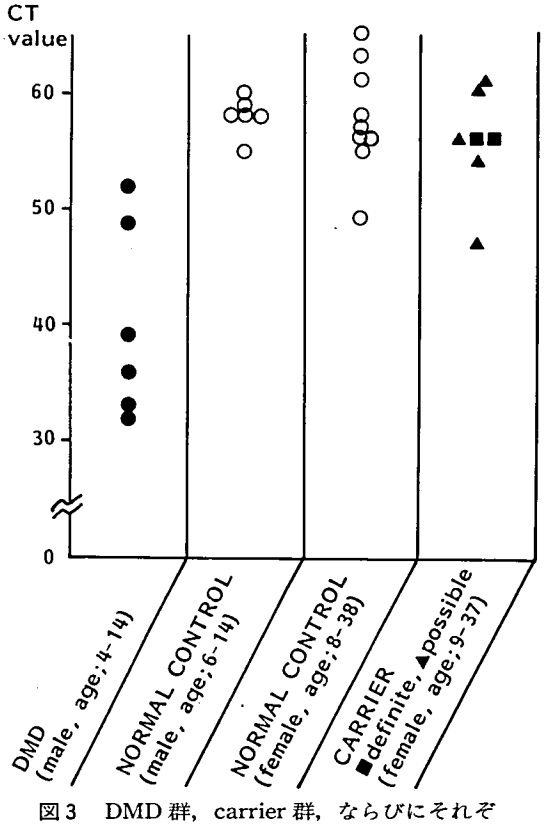



図 3　DMD 群，carrier 群，ならびにそれぞれの群に対する正常対照群における大腿四頭筋 CT 値．

### III）超音波画像による DMD ならびに carrier の骨格筋の検討

筋病変の検索に超音波をはじめて導入したのは Heckmatt ら（1980）[2] であるが，これが DMD の carrier detection に極めて有用であるとの Rott ら（1982）[3] の報告以来，これに対する賛否の論争が Lancet 誌上で展開されている[4~7]．我々は，これに関する追試を行うと同時に，主成分分析による客観的得点表示による分析を試みた．

〔方法〕4～14歳の DMD 患児 8 名，6～14歳の正常対照男児 5 名，9～37歳の carrier 女性10名，ならびに 8～38歳の正常対照女性 9 名の計32名を対象にして，右大腿四頭筋中央部の横断面の超音波画像を得た．使用した機種は linear 電子操作型超音波診断装置（ALOKA256）で，周波数3.5MHz，gain 5，撮影1.5×など全ての条件を一定にして白黒ポラロイドフィルムに撮影記録を行った．

〔結果〕図 4 左図に示すように，正常対照に於ては表面より皮下組織，大腿四頭筋，筋膜，大腿四頭筋，そして大腿骨が明瞭に観察された．これらの ecogenicity の強さは大腿骨＞筋膜＞皮下組織＞大腿四頭筋の順であった．これに対し，DMD 患児の場合，いずれも，1）大腿四頭筋の ecogenicity の増加（Q），2）大腿骨の ecogenicity の低下（B），3）Fascia の不鮮明化（F），ならびに 4）画面全体の反射像の繊細化（S）の傾向が明確に認められた．これら数量化表示するためにそれぞれ 4 段階に分けて表示した．すなわち Q, B, F はその ecogenicity が最もつよいものを 4 点とし，極めて弱いものを 1 点とし，その中間を 2 段階

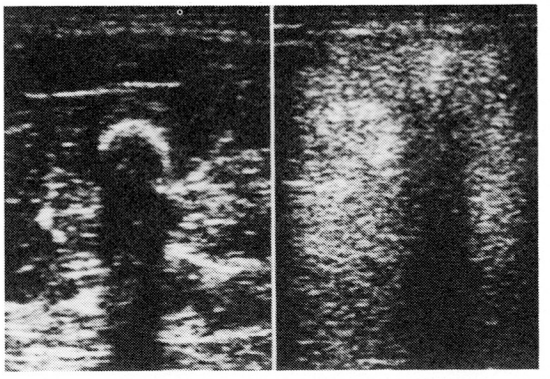


図4　大腿四頭筋中央部横断面の超音波画像．左図は正常対照11歳男子（H.H.）のもので，皮下組織，四頭筋，筋膜，四頭筋，そして大腿骨が観察される．右図はDMD10歳男子（S.T.）のもので，四頭筋のecogenicityの増加と大腿骨のecogenicityの低下，fascia像の不明瞭化，ならびに画面全体の繊細化がみられる．

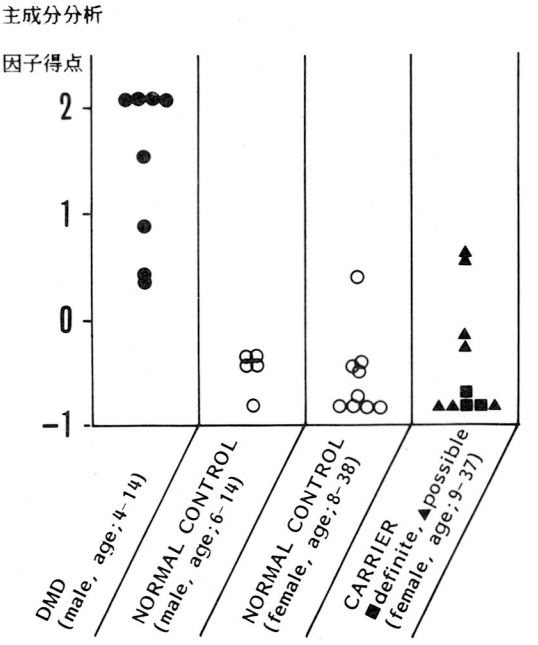



図5　超音波画像の主成分分析による各群の因子得点．

に分けてそれぞれ3点と2点をつけた．Sに関しては，繊細化のもっともつよいものを4点とし，正常を1点とし，その中間を2段階にわけそれぞれ3点，2点とした．これらの配点は，blindにするために，予備知識をもたない第3者にやってもらった．Q/B，F，ならびにSの3つのパラメーターは互いに強い相関が認められたため，三つのパラメーターをまとめて一つのベクトルとして主成分として抽出した．その主成分に対して各症例毎に因子得点を算出し，各群ごとにプロットすると図5の様になり，DMD患児は全例正の得点となり正常対照男子は全例負の得点となった．正常対照女性で1例だけ正の得点を示した．carrierの中で2例が対照女性より高い得点を示したが，このうちの1例の血清CK値は正常であった．

〔考案〕我々の結果から考えると，DMDのcarrier detectionにおける役割は，Rottらの主張する程には有用ではない．Rottらは充分な正常対照をとらず，また条件設定も厳密ではないために，我々のデーターとやや差が出たものと考える．しかしながら，possible carrierの中で明らかな異常を示した2例のうち，1例は血清CK値が正常であり，やはり超音波もcarrier detectionではそれなりの有用性があるといえる．

## 文　献


1) Chang DC, Misra LK, Beall PT, Fanguy RC, Hazlewood CF. Nuclear magnetic resonance study of muscle water protons in muscular dystrophy of chickens. J Cell Physiol 107：139-145, 1981.

2) Heckmatt JZ, Dubowitz V, Leeman S. Detection of pathological change in dystrophic muscle with B-scan ultrasound imaging. Lancet i：1289, 1980.

3) Rott HD, Mulz D. Muskeldystrophie Duchenne：Konduktorinnenerfassung mit Ultraschall. Dtsch Med Wschr 107：1678-1681, 1982.

4) Rott HD, Santellani M, Rödl W, Nebel G. Duchenne Muscular Dystrophy : carrier detection by ultrasound and computerized tomography. Lancet ii : 1199, 1983.
5) Heckmatt JZ, Dubowitz V. Detecting the Duchenne carrier by ultrasound and computerized tomography. Lancet ii : 1364, 1983.
6) Rott HD, Santellani M, Breimesser FH. Duchenne muscular dystrophy : carrier detection by ultrasound and computerized tomography Lancet i : 111, 1984.
7) Steinbicker V, von Rohden L, Krebs P, Szibor R. Duchenne muscular dystrophy ; carrier detection by ultrasound. Lancet i : 1463, 1984.

# 7)－(3) Duchenne 型筋ジストロフィー症の臨床細胞遺伝学的研究

納　光弘*

研究協力者　岸　邦和**　古庄敏行**　佐野雄二*
福永秀敏***　井形昭弘*

## 諸　言

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) は X 染色体連関の劣性遺伝病であるがその発症機序は明らかではない．一般に遺伝性疾患の原因は遺伝子の変異によると考えられているが，染色体の構造異常を有する症例も報告されており，それらの場合，患者は光学顕微鏡で検出しうる染色体の転座や欠失を有している．DMD 患者においても，女子患者の一部に X 染色体-常染色体相互転座例が見出されており[1),2)]，他に染色体構造異常に由来する症例の存在が予想されているが未だ発見されていない[2)]．DMD 患者の中に相互転座以外の染色体構造異常を有する症例が存在するか否かは興味ある問題である．

近年，染色体高精度分染技術の進歩[3)]により，染色体異常の検出をより詳細に行なうことができるようになった．そこで本研究では，DMD 患者の中に染色体の構造異常を有する症例が検出できるか否かを検討するため，患者の X 染色体の高精度分染パターンを正常男子のものと比較した．ヒト遺伝子地図作成の国際会議[4)]において，DMD の遺伝子座が X 染色体短腕 p21と決定されているので，本研究では p21近傍に特に着目して分染像の検討を行なった．

## 方　法

患者：8歳～12歳の男子の Duchenne 型筋ジストロフィー症患者7名を選んだ．患者の概略を表1に示す．

対照：24～36歳の健康男子3名を対照とした．

細胞の培養および固定：牛胎児血清を10%，フィトヘマグルチニンを2%含む合成培養液 RPMI1640に末梢血を5～10容量%混合し，37°C で72時間培養した．培養終了の2時間前に臭化エチジウム（最終濃度：5～7.5μg/ml）を，1時間前にコルセミド（最終濃度：0.05μg/ml）を加えた．培養終了後0.075M 塩化カリウム溶液で20～25分間低張処理した後，カルノア液（メタノール：酢酸＝3：1）で固定した．蒸気乾燥法により染色体標本を作成した．

分染方法：スライドグラス上の染色体標本を約30%の過酸化水素水溶液で5～10分処理したのち蒸留水で洗浄した．乾燥後0.25%トリプシン溶液で7～12秒処理し，牛血清を含むハンクス液でトリプシン作用を停止したのち，5%ギムザ液 (pH6.4) で10分間染色した．

分染像の解析：高精度分染像の解析に用いる分裂

表1　Clinical features of DMD patients examined.

| Patients | age | ADL by Ueda's grades |
|---|---|---|
| K.N. | 9 | 2 |
| T.Y. | 9 | 5 |
| T.I. | 10 | 2 |
| Y.K. | 10 | 2 |
| A.N. | 11 | 2 |
| T.F. | 11 | 3 |
| K.K. | 12 | 5 |

＊鹿児島大学医学部第三内科
＊＊杏林大学保健学部疫学教室
＊＊＊国立療養所南九州病院

前期又は前中期の染色体は，伸展の度合に細胞間の変異があり，そのため分染像も細胞ごとに若干の差異がある．従って1細胞のみでの判定では必ずしも正確な染色体診断はできない．そこで1名につき2個以上の高精度分染像を示すX染色体を観察し，それらの分染像をISCN (1981)[5]の標準分染像と比較して染色体異常の有無を判定した．

## 結果および考察

正常対照のX染色体の高精度分染像を図1に，DMD患者のX染色体の高精度分染像を図2および図3に示す．図1-3にはISCN (1981) による標準分染像をあわせて示した．半数体染色体あたりの標準分染像のバンド数は，左より約400，約550および約850である．今回得られた高精度分染像のバンド数は，ISCN (1981) の約850バンドよりも多く，半数体染色体あたりに換算すると約1000バンドと考えられる．高精度分染像は細胞間で若干の差異がみられることがあるので，1人あたり2本以上のX染色体について，X染色体短腕p21近傍に着目して分染像を詳細に検討したところ，正常対照とDMD患者の間に差異は認められなかった．

一般に遺伝性疾患の原因として，変異遺伝子による場合と染色体異常による場合が考えられているので，DMD患者においても染色体異常を有する症例が存在する可能性があり，この点を高精度分染法を用いて検討したが発見できなかった．

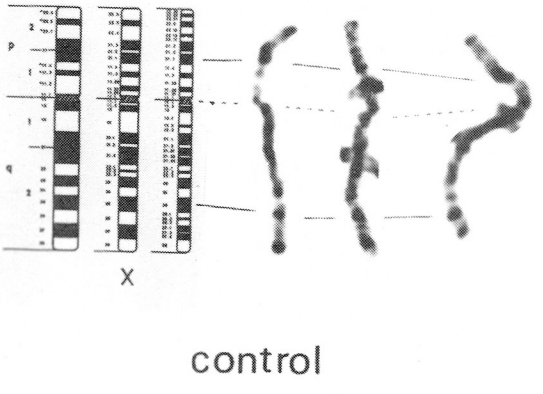



図1　High resolution banding patterns of X chromosomes from normal controls. Diagram on the left side is a schematic presentation of X chromosome from ISCN (1981).

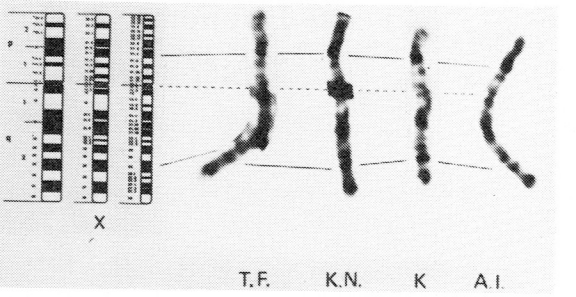



図2　High resolution banding patterns of X chromosomes from DMD patients. Diagram on the left side is a schematic presentation of X chromosome from ISCN (1981).

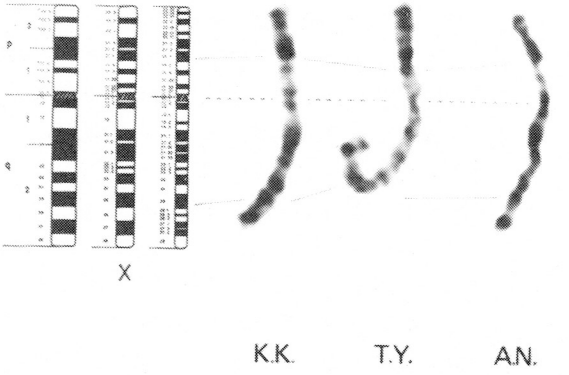



図3　High resolution banding patterns of X chromosomes from DMD patients. Diagram on the left side is a schematic presentation of X chromosome from ISCN (1981).

## 文　献

1) Lindenbaum, R.H., Clarke, G., patel, C., Moncrieff, ane Hughes, J. T.：Muscular dystrophy in an X；1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm. J. Med. Genet. 16：389-392, 1979.

2) Jacobs, P. A., Hunt, P. A., Mayer, M. and Bart, R. D. : Duchenne muscular dystrphy (DMD) in a female with an X/autosome translocation : Further evidence that the DMD locus is at Xp21. Am. J. Human Genet. 33 : 513-518, 1981.
3) IKeuchi, T. and Sasaki M. : Accumulation of early mitotic cells in ethidium bromide-treated human lymphocyte cultures. proc. Jpn. Acad. 55 : 15-18, 1979.
4) Report of the committee on the genetic constitution of the X and Y chromosome, Cytogenet. Cell Genet. 37 : 176-204, 1984.
5) An International system for Human Cytogenetic Nomenclature-High Resolution Banding (1981) , Cytogenet. Cell Genet. 31 : 1-32, 1981.

# 8）Duchenne 型筋ジストロフィー症における交感神経機能異常について
## ——心電図所見から——

馬　渡　志　郎*

研究協力者　丸　山　　徹**　藤　野　武　彦**
福　岡　義　輔**　塚　本　浩　介*

### はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）は骨格筋だけでなく心筋の変性を来たすことは良く知られており，したがって種々の心電図異常が報告されている．しかしながら，DMD の心電図における T 波異常に関する報告は少なく，特に"notched T 波"についての報告はまだ見ない．私共はこの DMD における notched T 波について検討した．

### 対象と方法

対象は 8 歳から21歳までの DMD 患者30名と，正常な同年齢層の男子500名（8 歳～22歳）であった．DMD 患者は明らかな心不全や呼吸器感染症のある者，及び心血管作動薬を服用している者は除いた．正常対照群においても心電図，心エコー断層法（UCG）及び胸写所見から器質的な心疾患の存在が疑われた者は除外した．

"Notched T 波"は標準12誘導の心電図における胸部誘導のいずれか 1 つ以上において，T 波下行脚に明瞭な切痕とそれに続く notch を有し，かつ notch の頂点は基線の上方に位置する時に陽性とした（図 1）．

### 結　　果

Notched T 波は，DMD 群においても対照群においても，右胸部誘導（$V_1$，$V_2$，$V_3$）に認められた．Notched T 波は DMD 群では50%に，正常対

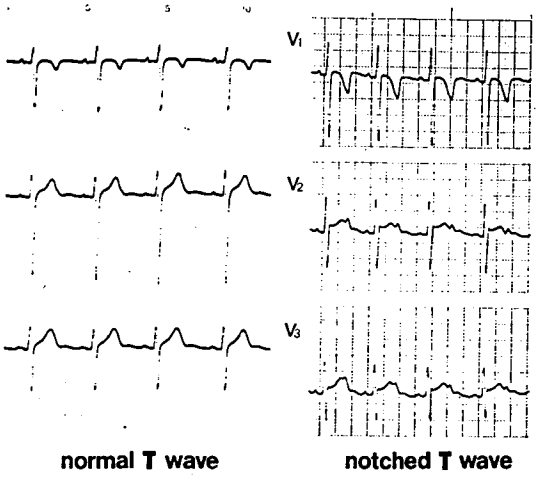



図 1　心電図胸部誘導における，左は正常対照者の正常心電図，右は DMD 患者の notched T 波（$V_2$，$V_3$）の例．

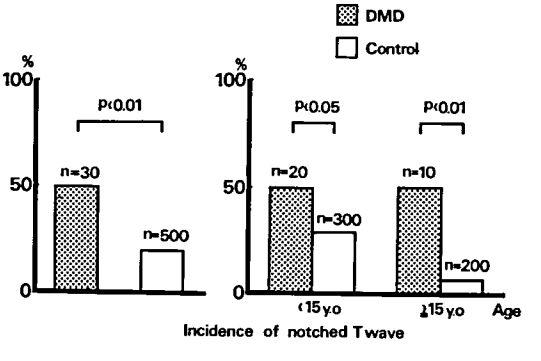



図 2　DMD 群と正常対照群（control）における notched T 波の陽性率．

＊国立療養所筑後病院
＊＊九州大学医学部第一内科

照群では20%に認められ，DMD群で有意に（P<0.01）高率であった（図2）．しかも正常対照群におけるnotched T波陽性率は年齢の増加と共に減少したが，DMDでは年齢増加による減少傾向は認めなかった（図2）．

DMD患者におけるnotched T波陽性群と陰性群を比較すると，①notched T波陽性の心電図では，心拍数の増大傾向，及び心拍数補正のQT時間（$QT_c$）の延長傾向が認められた（図3），②心エコー断層法によって，DMDで高頻度に認められる左室後壁運動異常（LVPW asynergy）及び僧帽弁逸脱（MV prolapse）の頻度は，notched T波の有無で差異はなかった（図4），③DMDの心電図の特徴的所見として従来より指摘されている$V_1$誘導におけるR／S比の増大，及び心エコーMモード法による右心負荷の指標としての右室径（RVD）は共に，notched T波の頻度との相関は認めなかった（図5）．

## 考　　察

心電図におけるnotched T波は心室における再分極（repolarization）過程の不均一化によることが明らかにされている[1]．この再分極過程の不均一化をもたらす原因あるいは機構は，大きく2つに分けられると考えられる．1つは器質的あるいは形態的な心臓の異常によって再分極過程に部分的遅延を来たす場合であり，例えば心筋の虚血や肥大[1]あるいは小児の先天性心疾患などである．他の1つは心臓の交感神経系の機能異常による再分極過程の不均一化であり[2]，例えば脳血管障害などである．

健康な若年男子における心電図上のnotched T波は，これを有する者に心拍数が多いことや，β-blockerの投与で消失することなどより，交感神経機能の亢進によるものであることは既に指摘されている[3]．

DMDにおいては，心筋の変性や胸郭の変形を有する者が多いので，心エコー断層法や心電図による器質的あるいは形態的異常を示唆するいくつかの所見とnotched T波との関連を検討したが，いずれの所見もnotched T波の有無で有意差を

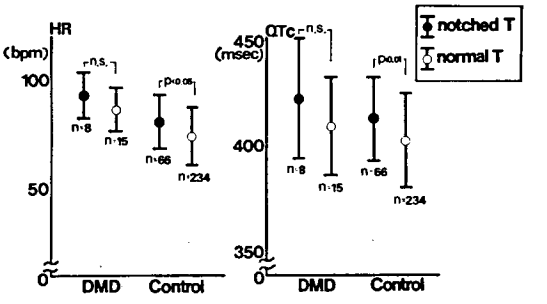



図3　DMDおよび正常対照群におけるnotched T波の有無と心拍数（HR）および$QT$間隔（$QT_c$）との比較．

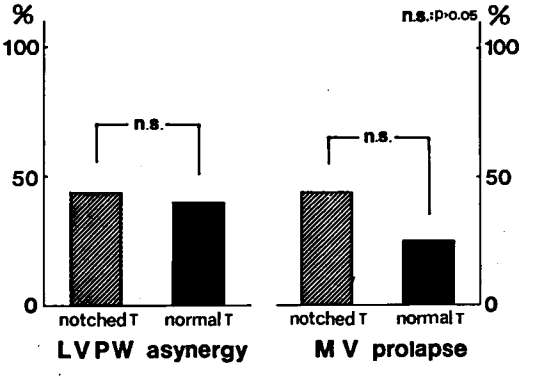



図4　DMDにおけるnotched T波の有無と左室後壁運動異常（LVPW asynergy）および僧帽弁逸脱との関係．ns＝有意差なし（p>0.05）．

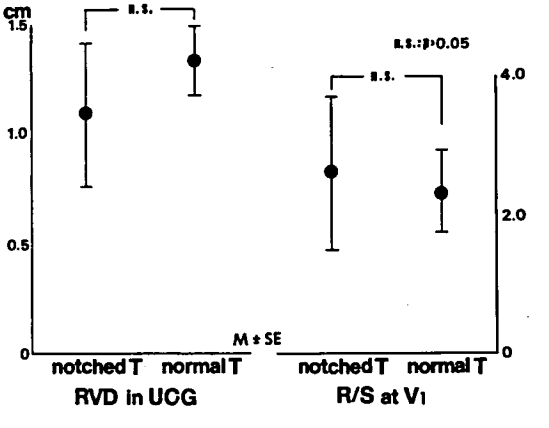



図5　DMDにおけるnotched T波と右室径（RVD）および心電図$V_1$におけるR/S比との関係．

認めなかった（図4，5）．一方DMDのnotched T波陽性者では心拍数の増加傾向と$QT_c$の延長傾向が認められた（図3）．心拍数は交感神経の機能亢進で増大することは周知の事実であり，$QT_c$も心臓交感神経の部分的あるいは相対的機能亢進によって延長することは知られている[4]．したがってDMDの心電図におけるnotched T波の成因は，心臓の器質的あるいは形態的変化に伴うものというより，心臓における交感神経系の機能亢進によって心室再分極過程の不均一化を来たしていることによると考えられる．

以前よりDMDにおいては，その病態あるいは病因として自律神経系，あるいはカテコラミン代謝の異常を指摘する報告は少なくない[5]．私共の結果は，DMDの患者では心電図所見でも自律神経系の機能的異常を有するものが高率に存在することを示している．このことはDMDの病態を考える上で重要なことと考えられる．

## ま と め

DMD患者30名と，同性同年齢の正常対照群500名に心電図，心エコー断層法などの検査を行った．心電図におけるnotched T波は，DMDで有意に高率に認められた．DMDにおけるnotched T波の成因として，心臓の器質的あるいは形態的変化によるものではなく，自律神経系の機能異常（交感神経系の機能亢進）によるものと考えられた．

## 文 献


1) Watanabe Y, Toda H, Nishimura M：Clinical electrocardiographic studies of bifid T waves. Br. Heart J. 52：207, 1984.
2) Szentivanyi M, Pace JB, Wechsler JS, Randall WC：Locarized myocardial responses to stimulation of cardiac sympathetic nerves. Cir. Res. 21：691, 1967.
3) Atterhög JH, Ekelund JG：Significance of primary T wave aberrations in the electrocardiogram of asymptomatic young men, III. Systolic time intervals and autonomic tone. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 40：795, 1980.
4) Browne KF, Zipes DP, Heger JJ, Prystowsky EN：Influence of the autonomic nervous system on the Q-T interval in man. Am. J. Cardiol. 50：1099, 1982.
5) Rowland, LP, Layzer, RB：X-linked recessive muscular dystrophy, in Handbook of Clinical Neurology, ed by Vinken PJ, Bruyn GW, Vol 40, North-Holland Pub Co. Amsterdam 1979, p. 349-414.

# II. 組織化学・微細形態

# 9)－(1) 凍結乾燥切片を用いた微量定量組織化学
## ——CA-IIIの筋線維レベルでの定量化の試み——

田 代 邦 雄*

研究協力者 島 功 二** 菊 地 誠 志*

### はじめに

我々は，ヒト筋型炭酸脱水素酵素（CA-III）の精製，特異抗体の作成およびRIA系，ELISA系の確立をし，本酵素が各種臓器中，骨格筋に特異的に多く存在し，しかも神経筋疾患患者血清中に上昇することから，新しい筋疾患のマーカーになりうることを報告してきた[1),2)]．特に従来の筋疾患マーカーであるCPKが，Type II fiberに多く存在するのと比べ，CA-IIIが酵素抗体法にてType I fiberに主として存在することが証明されたことは[3)]，種々の神経疾患のfiber type別の異常でCA-IIIがCPKとは異なった動きを示すことも考えられ，神経筋疾患診断上特殊な位置を占めうることも期待できよう．ただ，この点に関しての詳細な検討のためには，fiber type別のCA-IIIの量比の検索が重要である．今回は，この点を明らかにする目的で，凍結乾燥切片を用いた微量定量組織化学的方法で筋線維レベルでの定量化を試みたので報告する．

### 材料と方法

ヒト生検筋を用いNelsonらの方法[4)]で20μの凍結乾燥切片を作成した．単一筋線維レベルの検討に先だち，今回はfiber type groupingのある生検筋標本を使用した（図1）．凍結乾燥切片は偏光顕微鏡下でfiber typeの分別は容易であり，fiber type groupingの部分をType I groupとType II groupが同一の大きさの切片（約10～20個の筋線維の集団）となるよう実体顕微鏡下で切り出した（図2）．切り出し作業は，乾燥した無風の室内で全て手製の道具を用いて行った（図3）．切片の重量は，Lowryのquartz fiber balance法[5)]にて計測した．Calibration curveの作製には，quinine-HCLの種々の大きさの結晶を，quartz fiber先端にのせ，その“たわみ”をマイクロメーター付きの実体顕微鏡で測定後，0.02N硫酸に溶解してその螢光強度をHITACHI 650-10 S fluorescence spectrophotometerにて測定した．この方法での測定感度は，0.12μg／divisionであった．図4に，quartz fiber balanceの模式図を示した．重量測定後の切片はPBSに適宜溶解後，既に報告したマイクロプレートを固相としてperoxidaseを標識酵素とするサンドイッチELISA系[6)]にてCA-IIIを定量し，1gm dry weight当たりのCA-III量を求め，それよりfiber type別の量比を求めた．切片切り出しは，計4回施行しその後の測定に供した．

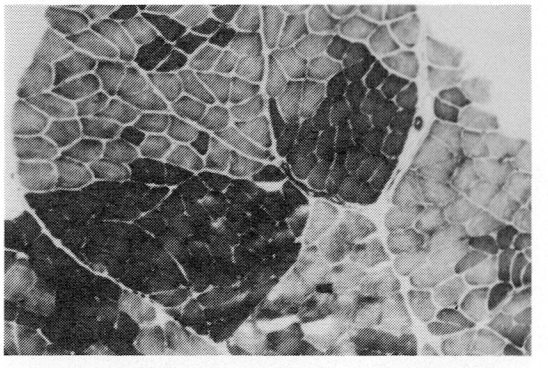


図1 今回の微量定量組織化学的方法に用いたfiber type groupingを示す生検筋標本NADH-TR，×40

＊北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門
＊＊国立療養所札幌南病院神経内科

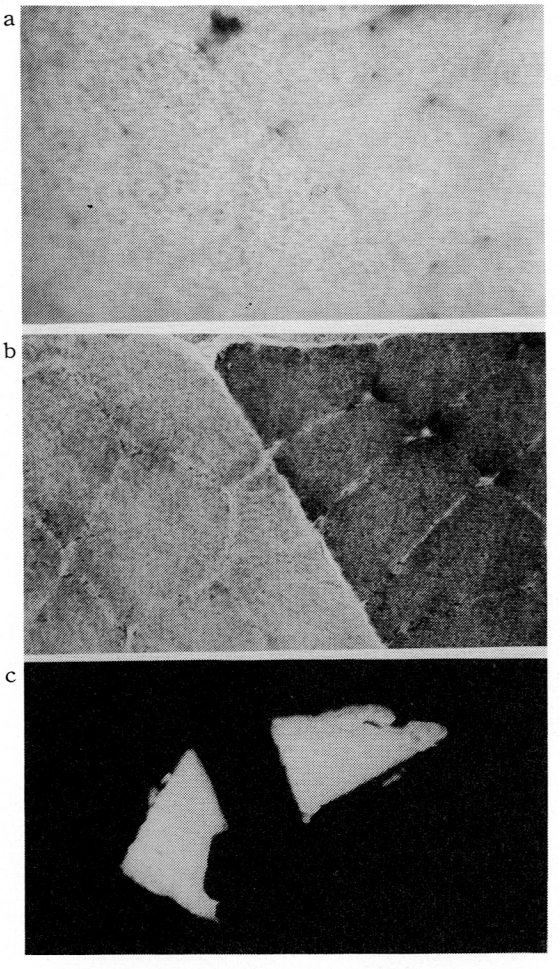



図2　凍結乾燥切片
a．偏光顕微鏡で見た凍結乾燥切片，fiber type の識別が可能である．（×200）
b．a の連続切片の NADH-TR 染色，（×200）
c．切り出した凍結乾燥切片，右上が type I group，左下が type II group の切片を示す．（×40）

表1　両 fiber type group 別のCA-III含有量の比較

| | 例　数 | 平均重量（μ g） | CA-111含有量（mg/gm.dry wt.） |
|---|---|---|---|
| Type I fiber群 | n＝4 | 0.7（0.5～1.1） | 3.35 |
| Type II fiber群 | n＝4 | 0.7（0.5～1.1） | 1.01 |

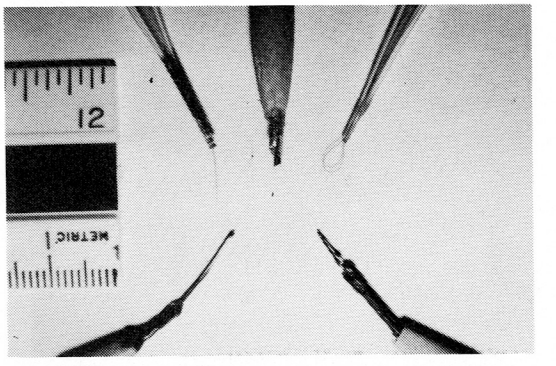



図3　切り出し作業に用いた手製の道具を示す．

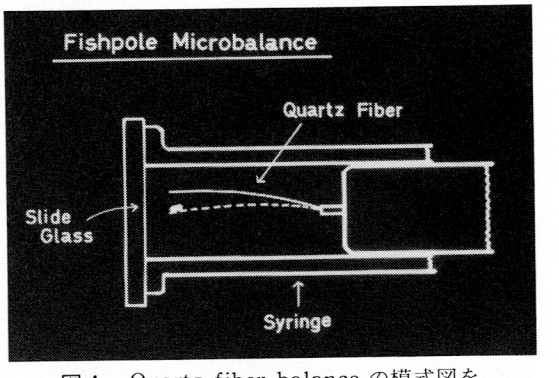



図4　Quartz fiber balance の模式図を示す．

## 結　　果

Fiber type group 別の切片切り出しは，実体顕微鏡に偏光板を付けると fiber type の識別が出来るため10～20個の筋線維を含む大きさで充分に可能であった．切片の重量は，平均0.7μg（0.49～1.1）であり，肉眼的に見て同一の大きさと思われたものは計量した結果もほぼ同一の重さであった．表1にCA-IIIの定量結果を示したが，Type 1 fiber 群は，Type II fiber 群に比して，平均3倍以上（2.5～4.2倍）CA-III量が多かった．この結果は，酵素抗体法にてのCA-IIIの主たる局在が Type I fiber であることや，Moynihan[7] の rat soleus，EDL での生化学的データや，また，Holmes[8] の chicken skeletal muscle でのそれとも矛盾しないと考えられた．

## 考　　察

CA-IIIは，分子量28,000とCPKに比して小さく，骨格筋の可溶性分画に特異的に多く存在し，しかも心筋に非常に少なく，他のI型，II型アイソザイムと抗原性を異にすることから筋疾患のマーカー酵素として利点が多いと考えられたため，その臨床応用につき検討し報告してきた[1),2)]．その結果，CA-IIIはCPKと同程度に筋疾患の診断に使用しうることが明らかとなってきた．また，CA-IIIが赤筋に多いという種々の動物でのデータを考慮してヒト骨格筋，生検筋標本に酵素抗体法を施行してみたところ実際にType I fiber（赤筋）に多いことが判明したので[3)]，試みに，Type I fiber異常がその初期病理像とされるmyotonic dystrophyの患者血清中CA-IIIをCPKと比較してみた．その結果は既に報告した如く，予備的なデータではあるが，CA-IIIがCPKより，より鋭敏にType I fiber異常を血中に反映する可能性を示唆するものであった．この点に関して更に詳細に吟味していくためには，fiber type別のCA-IIIの量比を具体的な値として知っておくことも必要と思われた．ヒト骨格筋のホモジネートをこの目的で使用することは，ヒト骨格筋がType I，II fiberのモザイクをなす混合筋であることから不可能である．これに対して，凍結乾燥切片を用いた微量定量組織化学的方法であれば検索可能であると考え今回の検討の運びとなった．その結果CA-IIIは，Type II fiber群に比してType I fiber群に3倍強に多いことが明らかとなった．これは，酵素抗体法でのデータよりみて当然予想されたことではあった．しかし，Type II fiber群にも，CA-IIIが，1mg／gm dry weightとType I fiber群に比し少ないが無視できない量存在することが判明した．これは，酵素抗体法では，既存の固定法を施行してもある程度の抗原の流出が避けられないため生じた差異によるものと推測された．今回のこれらのデータは検体数が少なく神経原性の異常筋を使用しており，あくまでも予備的なものであり，今後は単一筋線維レベルでのCA-IIIの定量を行う予定である．これらに加えて，CA-IIIがCPKより，より鋭敏にType I fiber異常を反映しうるかどうかを検討していくためには，CPKのfiber type別量比，骨格筋全体のfiber typeの比率，ならびに両酵素の血中逸脱の鋭敏度と血中半減期などを考慮していかなければならない．いずれにせよ，CA-IIIをCPKと比較検討しながらその臨床応用を追求していくことは価値あることと思われる．

## 文　　献


1) 島　功二，田代邦雄，他：ヒト筋型carbonic anhydraseアイソザイムIII（CA-III）のradioimmunoassay（第一報）．臨床神経，23：892，1983.

2) Shima, K.：Human muscle carbonic anhydrase III (CA-III)-Purification, immunohistochemical localization in the human skeletal muscle and its clinical application to the neuromuscular diseases. 北海道医学雑誌，59：98，1984.

3) Shima, K., Tashiro, K., et al：Carbonic anhydrase III immunohistochemical localization in human skeletal muscle. Acta Neuropathol., 59：237, 1983.

4) Nelson, J.S., Tashiro, K.：The analysis of skeletal muscle by quantitative histochemical techniques. J. Neuropath. Exp. Neurol., 32：371, 1973.

5) Lowry, O.H.：A quartz fiber balance., J. Biol. Chem., 140：183, 1941.

6) Hibi, N., Shima, K., et al：Development of a highly sensitive enzyme immunoassay for serum carbonic anhydrase-III., J. Neurol. Sci., 65：333, 1984.

7) Moynihan, J.B.：Carbonic anhydrase activity in mammalian skeletal and cardiac muscle., Biochem. J., 168：567, 1977.

8) Holmes, R. S.：Purification, molecular properties and ontogeny of carbonic anhydrase isozymes., Eur. J. Biochem., 78：51 1, 1977.

# 9)－(2) 神経筋疾患における ultrasound imaging
## ——CT 所見および筋生検所見との関連について——

田 代 邦 雄*

研究協力者　松 浦　亨*　長 沼 睦 雄*　島　功 二**

### はじめに

超音波画像 ultrasound imaging (以下 UI) は種々の疾患の検索に広く応用されているが，その神経筋疾患への応用は Dubowitz ら[1] により試みられているとはいえ，未だ多くの知見を得るに至っていない．今回，我々は正常者及び神経筋疾患症例に於いて UI を施行し，CT 及び筋生検所見との関連を検討し，更に UI をガイドとした needle biopsy の有用性を確認したので報告する．

### 対象及び方法

対象は神経筋疾患35例，正常コントロール3例である．UI は，Sector 方式が分解能の点で劣るため，リニアプローブを用いた B mode 像の横断及び縦断により，周波数帯域は筋の描出にすぐれた 2.5～5MHz，及び脂肪域の描出にすぐれた5～10 MHz の帯域の双方を満足させるため 5 MHz を用いた[2),3)]．焦点は combination mode とし，gain はおおむね45dB，near gain 27dB，far gain 2.5 dB である．所見の検討は同一条件下で同一フィルム上に健常者及び症例の同一部位を同時記録する方法をとった．CT はシーメンス社製 Somatom II 及び日立 CTW 3～40による頸部から下腿迄の10レベルの横断像を用い mean density の計測及び形態学的変化の特徴について検討した．Needle biopsy には，超音波の特性により diffracted signal の大きい2.0mm$\phi$[4)] の Travenol 社 Tru-Cut biopsy needle を用い，UI をガイドとして目的部位を採取後 HE, Modified Gomori-Trichrome，及び NADH-TR 染色にて検討した．

### 結　果

これらの症例について得られた画像のうち数例を呈示する．正常大腿上方1/3の横断像（図1）では，右に示す CT 像の如く各筋束はおおむね 45～60HU の均一な像として得られる．同図左はこの断面で伸側より見た大腿四頭筋である．浅層より皮下組織(a)，大腿直筋(b)，内側広筋(c)，大腿骨(d)がよく同定され，音響インピーダンスギャップの高い部分で超音波は反射散乱されるため筋膜及び脂肪組織の存在が明瞭に描出される．骨は高音響インピーダンスを持つため超音波の進行方向へ acoustic shadow を掃いた半月状の高輝度反射像として示される．筋束内では，CT で描出されなかった筋膜及び脂肪組織が，横断像では点状の，縦断像では線状の反射として認められ，筋束全体の echogenesity には各筋群により軽度の差異を認めた．図2は，発症より20年を経過した PMD の42歳女性例，大腿上部1/3の横断像である．中央に示す様に CT 上は大腿四頭筋の著明な萎縮と heterogenous な X 線吸収値の低下を認め，二頭筋は一部モザイク状に spare されている．同部を矢印方向から見た UI では，皮下脂肪の増生，筋束の萎縮，筋束間組織の増生を示唆する散在性小点状反射像の増加を認める他，筋組織自体の echogenesity の全体的上昇を認める．大腿骨の反射像は減弱し，acoustic shadow も正常例に比し不鮮明である．二頭筋部で施行した生検では脂肪組織及び結合織の著明な増生を確認した．図3は，6年を経過した著明な深部覚障害と軽度の筋脱力を伴い筋電図上神経原性変化を認めた32歳女性例

＊北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門
＊＊国立療養所札幌南病院神経内科

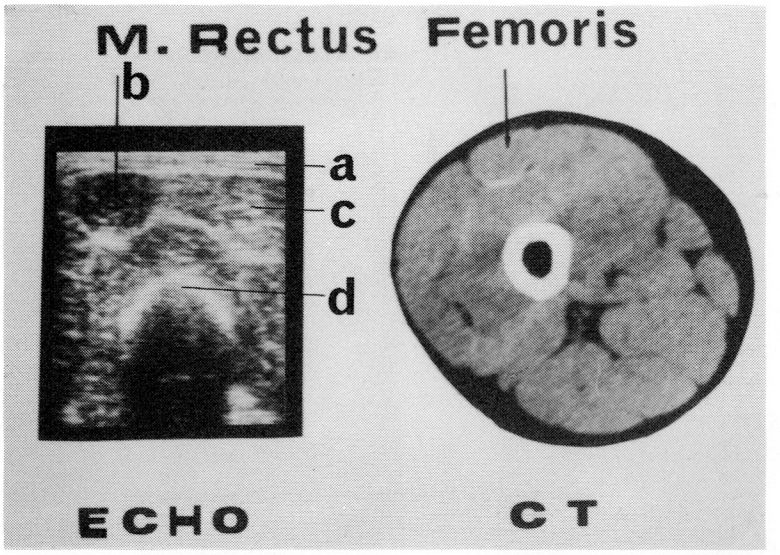



図 1

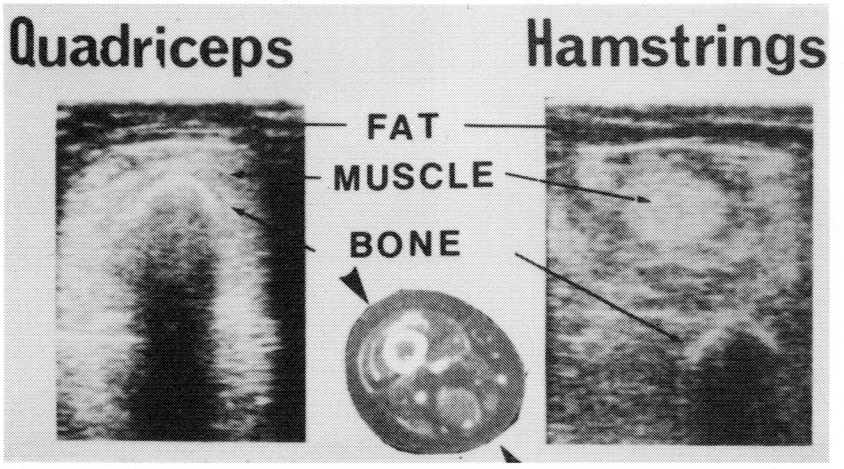
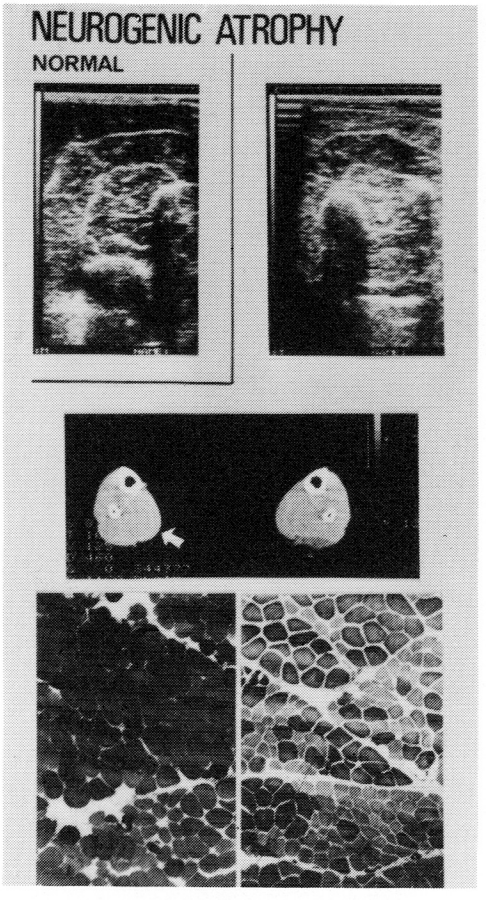



図 2

である．下腿横断像（図 3 A）は中段に示す如く CT 上 mean density 及び形態共に正常所見を呈するが屈側方向（矢印）より見た UI では，ひらめ筋はおおむね正常像を呈するものの，腓腹筋及び後脛骨筋は散在性小点状反射の増大を示し，同部の開放筋生検では軽度の筋束間組織の増生と共に fiber type grouping の所見を認めた．大腿四頭筋（図 3 B）では，muscle volume の減少が明らかで，横断像の散在性小点状反射は縦断像では線状の反射として認められる．発症後 4 年をへた，空胞を伴う遠位型ミオパチーの34歳女性例（図 4）では，下段に示す如く CT 上特異な部位選択的及び筋束内の虫くい状変化の所見を呈するが，大腿四頭筋部の X 線吸収度は60.6HU と正常で形態学的にも明らかな変化を認めない．しかし，同症例の UI 所見は上段に示す如く，正常例に比し散在性小点状反射の増大及び筋組織全体の echogenesity の上昇を示し，骨の反射は著明に減弱している．縦断像でも著明な全体的 echogenesity の上昇を示し，CT 所見との間に大




A

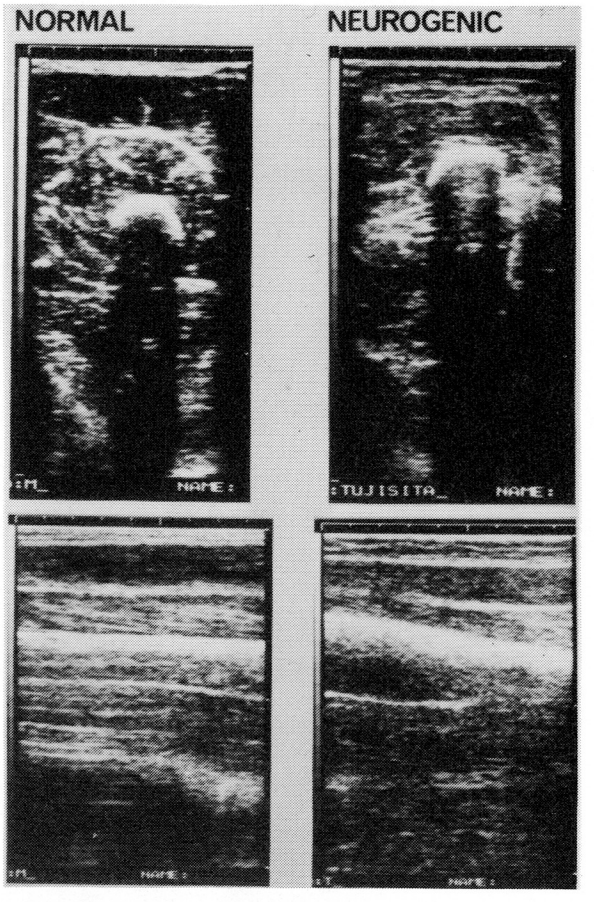



図3（A，B）

B

きな解離を認めた．

この様な症例に対し，先に述べた如くUIガイド下にneedle biopsyを施行した．図5Aは正常大腿四頭筋でのneedle biopsyの様子を示している．穿刺前の像より組織採取部位を決定し，局所麻酔後1mm程度の小皮切を加え，UIにて筋線維の走行方向を確認した上で生検針を刺入する．左に示す如く，生検針の先端位置を確認した上で組織採取を行うが，一度のsamplingで米粒大以上の組織採取が可能である．この例では筋膜をはさんで採取が行われ，UI所見と標本の肉眼所見はよく一致することを確認した．この様な方法で実際の症例を検索した．SPMA男性例（図5B）では，CT上筋群選択性に乏しいびまん性の筋萎縮と筋束間の拡大による網の目状変化を呈し，UI上散在性小点状反射像の増大と骨反射の減弱を認める．矢印方向よりUIガイド下に施行したneedle biopsyのHE像では，group atrophyを伴った神経原性変化を認めた．所謂K-W病女性例（図5C）のCT所見は，全体的な筋束の萎縮及び網の目状変化と共に軽度の筋束内虫くい状変化を認め，UIでは散在性小点状反射の増大及び骨反射像の減弱等の所見の他，筋組織全体のechogenesity上昇の所見が認められ，同部で施行したneedle biopsy上group atrophyを示す神経原性変化及び中心核の増生を主体とする筋原性変化の混在する所見を得た．

## 考察及び結論

CTの神経筋疾患への適用は1977年頃より報告

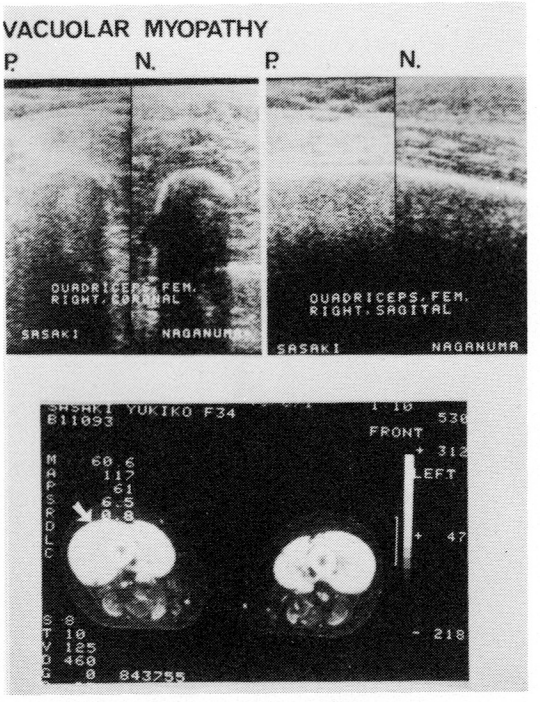



図 4

され種々の所見を得ている．今回の我々の検討でも正常筋のX線吸収度は諸家の報告の如く，おおむね45～60HU内に存在し，筋束は，ほぼ均一に描出された．神経筋疾患例では，比較的早期の段階では筋束内の虫くい状変化の出現と，異常を呈する筋群の選択性が筋原性筋疾患に特徴的であり，逆に筋束間の離開に伴うと思われる網の目状変化がびまん性に認められる点が神経原性筋疾患の特徴と思われた．筋CTは，この様に深部筋の検索を含め疾患特異性の検討，筋生検部位の決定に有用であるが，一方，論理的に描出される情報はピクセル内の平均化されたX線吸収度に依存するため，低吸収値（脂肪組織，脂肪変性など）と，比較的高吸収値（結合組織等）の混在する例では，みかけ上の正常所見を呈すると考えられる．一方，UIで得られる情報は，組織の音響インピーダンスの差に基づくため，より微細な組織学的変化を反映し，CT上異常を見ない早期の段階や仮性肥大の状態でも特徴的変化所見を得ることが出来る．今回の検討で得られたUIの変化としては以下が挙げられる．即ち，① fastial reflex の増大，②筋束間組織の増生によると思われる散在性小点状反射像の増加，③直下の骨反射像の減弱ないし消失，④筋組織自体の変化に由来すると考えられる背景の echogenesity の上昇，等の所見で，特に初期の段階では①②は神経原性変化に，④は筋原性変化により強く対応すると考えられた．

UIをガイドとした needle biopsy は，従来の blind biopsy に比較すると sampling error の割合を大きくさげることが出来，数カ所の所見の対比や，経時的観察にも有用であり，又，UI自体が簡便であるため外来的検査手段としても意味あるものと思われ報告した．

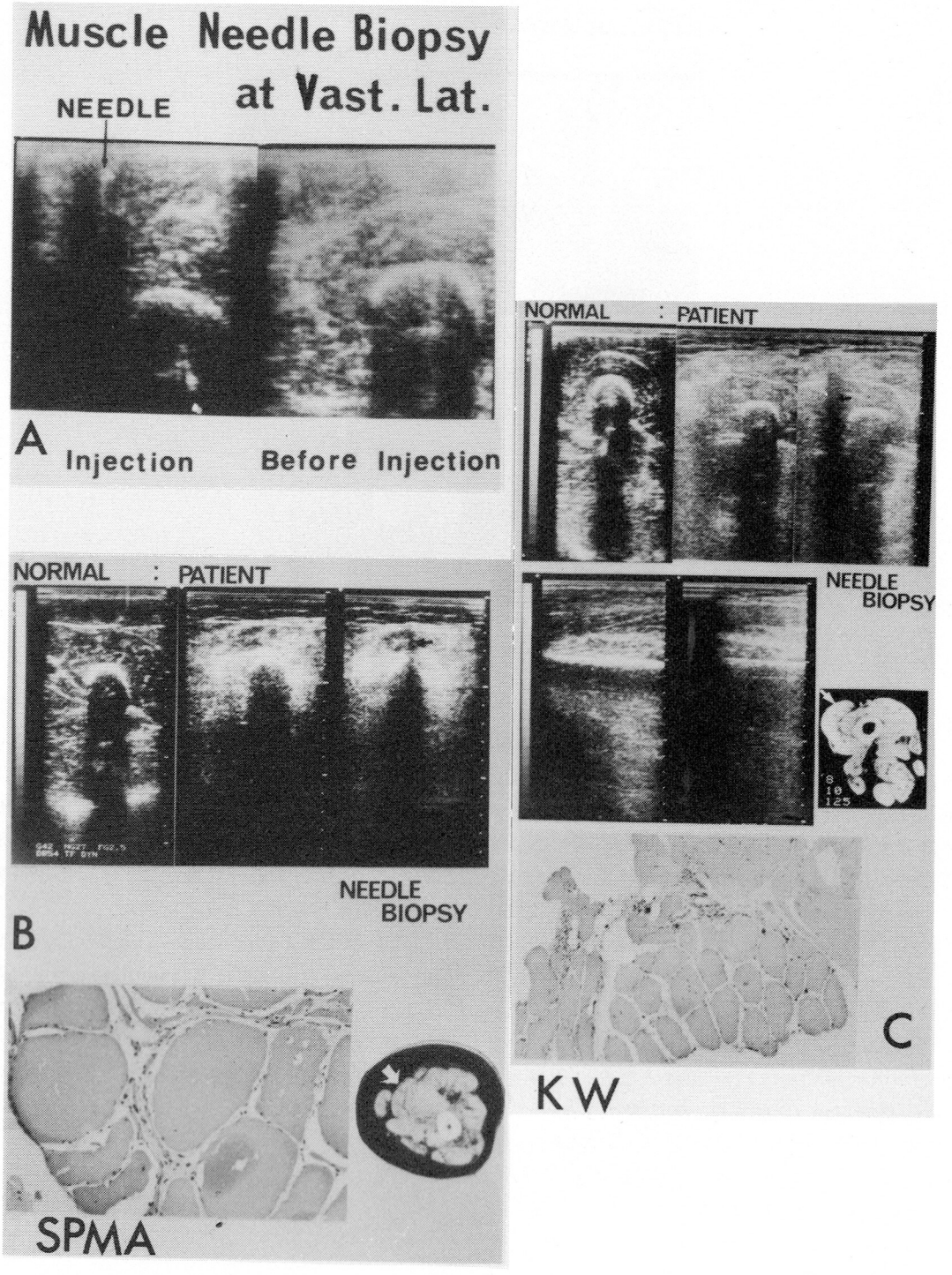

Muscle Needle Biopsy
at Vast. Lat.
NEEDLE
A
Injection
Before Injection
NORMAL : PATIENT
NEEDLE
BIOPSY
B
NORMAL : PATIENT
NEEDLE
BIOPSY
C
KW
SPMA

図 5

## 文　　献


1) Dubowitz, V. : Investigation of neuromuscular disorders. Journal of the Royal College of Qhysicians of London, 17 : 134, 1983.

2) Ikai, M., Fukunaga, T. : Calculation of muscle strength per unit cross-sectional area of human muscle by means of ultrasonic measurement. Int. Z. Angew. Physiol. einschl. Arbeitsphysiol., 26 : 21, 1968.

3) 猪飼道夫：超音波の人類学への応用．超音波医学，医学書院，東京，1973, p. 544.

4) Hjelmroth. HiE, : Puncture needles and ultrasonic wave propagation in ultrasonically guided puncture. Ultrasonically guided puncture technique, Munksgaard, Copen hagen, 1980, p. 25.

# 10）骨格筋パラフィン包埋切片での muscle specific enolase および carbonic anhydrase III染色による fiber type 識別の試み

杉村公也*

研究協力者　衣斐　達*　古閑　寛*
杢野謙次*　松岡幸彦*
灰本　元**　名倉　宏**
加藤兼房***　佐橋　功****

## はじめに

従来の酵素組織化学染色では，ホルマリン固定パラフィン包埋骨格筋標本の場合は酵素活性が失活し，酵素活性を利用した染色が困難であった．しかし，免疫組織化学の発展により，パラフィン包埋標本においても，抗原性が保持されていれば酵素の局在が証明できるようになった．そこで我々は carbonic anhydrase III (CA III) および muscle specific enolase (MSE) が骨格筋に特異的に局在し[1),2)]，しかも前者が type 1 fiber に[3)]，後者が type 2 fiber に優位に局在する[4)]ことにより，パラフィン包埋剖検骨格筋標本で酵素抗体法を用い CA III および MSE を染色し fiber type の識別を試みた．

## 対象および方法

対象として剖検腸腰筋20筋を用いた．剖検筋の原疾患は，癌10例，白血病4例，肝硬変2例，脳腫瘍，脳出血，悪性リンパ腫，神経芽細胞腫，Duchenne 型筋ジストロフィー各1例であった．死亡時年齢は3歳～77歳，死後標本採取までの経過時間は2～31時間であった．

剖検骨格筋は緩衝ホルマリンで固定し，2～8週間後にパラフィン包埋を行い，4$\mu$m 厚の連続切片を作成した．

染色は間接法による酵素抗体法で行った．一次抗体として，ヒト剖検腸腰筋より精製した CA III および MSE を家兎に免疫して作成した血清を用い，2％牛血清アルブミン含有 PBS にて200倍に希釈して用いた．本血清は CA III, MSE に対し特異的で，他のアイソザイムと交叉反応を示さなかった．また対照として一次抗体に替え正常家兎血清を用いた．二次抗体として peroxidase 標識山羊抗家兎免疫グロブリンの F (ab)$_2$ 分画を，2％ BSA 含有 PBS にて80倍希釈して用いた．

各切片は脱パラフィン後，内在性 peroxidase を不活化させるために過沃素酸5mM 水溶液にて15分間インキュベート後，PBS で洗滌し，一次抗体を60分間室温でインキュベートした．さらに PBS で洗滌後，二次抗体で60分間室温でインキュベートし，PBS で洗滌し，内在性 peroxidase を不活化させるためにさらに10mM アゾ化ナトリウムを添加した，10mM 過酸化水素含有20mg％ DAB にて発色させ，水洗，脱水，透徹，封入後，鏡検に用いた．

## 結　果

CA III, MSE 染色ともパラフィン包埋骨格筋切片では checkerboard pattern を示し，連続切片で比較すると，一部筋線維を除いて相反的に染色さ

＊名古屋大学医学部第一内科
＊＊名古屋大学病態制御研究施設生体防御研究部門
＊＊＊愛知県コロニー生化学
＊＊＊＊愛知医科大学第四内科

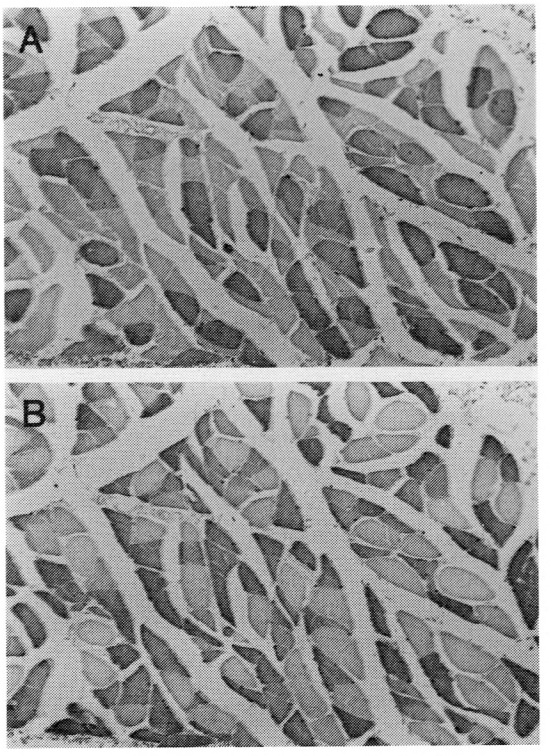



図 1　間接法による CA III (A)，MSE (B) 染色．Type 1 fiber が CA III で，type 2 fiber が MSE で染色され checker-board pattern を示している．70歳，女，肝硬変，死後経過時間 4 時間（×180）．

れており，パラフィン切片においても CA III は type 1 fiber に，MSE は type 2 fiber に染色されると考えられた（図 1）．

ホルマリン固定時間による染色性の差は明確ではなかったが，固定までの死後経過時間による比較では短時間のもの程 fiber type の識別が良く，CA III は 5 時間，MSE は10時間以内のものが fiber type の識別が可能であった．

なおほとんどの症例で原疾患によると考えられる廃用性萎縮としての type 2 fiber atrophy が見られた．

## 考　　察

Enolase は解糖系酵素であり，免疫学的に異なる $\alpha$, $\beta$, $\gamma$ の 3 種類の subunit から成る分子量約10万の dimer である[2),5)]．そのうち $\beta\beta$ および $\alpha\beta$-enolase は心筋，骨格筋に特異的に局在し，muscle specific enolase (MSE) と呼ばれている[6)]．前年度我々が報告したように骨格筋新鮮凍結切片では嫌気性解糖系が優位な type 2 fiber に優位に局在している[4)]．

一方 carbonic anhydrase は $CO_2$ の hydration に関与し，I，II，III の 3 種類のアイソザイムから成り，分子量は約 3 万である．そのうち CA III は骨格筋に特異的に局在し[1)]，新鮮凍結切片では好気的エネルギー産生系が優位な type 1 fiber に優位に局在している[3)]．

骨格筋標本の病理学診断上，組織化学的染色による fiber type の識別は有用であり，従来は新鮮凍結切片において ATPase 染色や NADH-TR 染色により行われていたが，パラフィン切片では困難であった．しかし免疫組織化学の発展により，パラフィン切片においても抗原性が保持されていれば，fiber type 特異性の有る酵素を免疫組織化学的に染色することによって fiber type の識別が可能になった．我々は CA III が type 1 fiber に，MSE が type 2 fiber に優位に局在することを利用し，酵素抗体法により fiber type の識別をホルマリン固定パラフィン包理標本で行った．剖検標本では死後時間が短い程 fiber type の識別が良く，CA III は 5 時間以内，MSE は10時間以内のもので識別可能であった．

本法を用いることにより，剖検その他の際に新鮮凍結標本の得られなかった骨格筋標本や，Hb 抗原陽性者などの感染因子を持った患者で新鮮凍結標本の検索が危険を伴う場合等に，ホルマリン固定パラフィン包埋標本での fiber type の識別が可能であり，縦断切片での fiber type の識別も可能となり，臨床診断上有用と考えた．

## 結　　語

ホルマリン固定パラフィン包埋剖検骨格筋標本において，酵素抗体法を用い CA III および MSE 染色を行い fiber type の識別を試みた．CA III では死後 5 時間以内，MSE では死後10時間以内の

標本で fiber type の識別が可能であった．新鮮凍結標本の得られなかった骨格筋パラフィン包埋標本においても，本法を用いることにより fiber type の識別が可能となり臨床診断上有用と考えた．

## 文　献


1) Carter, N., Jeffery, S., et al. : Characterization of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle. Biochem. Genet., 17 : 837-854, 1979.
2) Rider, C.C., Taylor, C.B. : Enolase isoenzymes in rat tissues. Electrophoretic, chromatographic and kinetic properties. Biochim. Biophys. Acta, 365 : 285-300, 1974.
3) Shima, K., Tashiro, K., et al. : Carbonic anhydrase III immunohistochemical localization in human skeletal muscle. Acta Neuropathol. (Berl), 59 : 237-239, 1983.
4) Ibi, T., Sahashi, K., et al. : Immunohistochemical demonstration of β-enolase in human skeletal muscle. Muscle Nerve, 6 : 661-663, 1983.
5) Fletcher, L., Rider, C.C., et al. : Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolases. Biochim. Biophys. Acta, 452 : 245-252, 1976.
6) Mokuno, K., Riku, S., et al. : Serum muscle-specific enolase in progressive muscular dystrophy and other neuromuscular diseases. J. Neurol. Sci., 63 : 345-352, 1984.

# 11)－(1) 筋ジストロフィーチキンの形態学的初期変化：酵素組織化学的検討

後 藤 幾 生*

研究協力者 石 本 進 士 鈴 木 聡
北 口 哲 雄 黒 岩 義五郎

筋ジストロフィーチキン（Dyチキン）の筋病変は，赤筋より白筋に生じやすいと報告されている[1]．しかしその変化が，いかなる時期に，かつ，いかなる変化を生じるかについて，経時的に正常チキンと対比した各種酵素組織化学染色による詳細な検討は少ない．今回，Dyチキン骨格筋の形態学的初期変化を検討するため，各種酵素組織化学的および電顕による検索を行った．

## 材 料

Dyチキン（line 413）と正常対照チキン（line 412）を用い，赤筋である前広背筋（anterior latissimus dorsi muscle：ALD）と白筋である後広背筋（posterior latissimus dorsi muscle：PLD）を経時的に各々3羽ずつを用いた．

## 方 法

鶏胚期第19日目よりふ化後6週目までのALDとPLD各々の各種酵素活性を組織化学的に半定量的に検討した．すなわち顕微鏡下の低倍率で酵素活性の認められないものを(－)，非常に弱く認められるものを(±)，軽度のものを(＋)，中等度のものを(＋＋)，強い活性を示すものを(＋＋＋)と表記した．その際，ふ化後1日目までは明らかな筋線維型は認めず，それ以後の時期でも酵素の種類により筋線維型分化の明瞭でないものが多数存在したため，その活性の強さの判定は個々の筋線維型に着目せず，低倍率の顕微鏡下で筋組織標本全体の酵素活性の強さで判定した．染色法としてPearseの方法[2]に従ってreduced nicotinamide－adenine dinucleotide tetrazolium reductase（NADH-TR），reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate－tetrazolium reductase（NADPH－TR），malate dehydrogenase（MDH），succinate dehydrogenase（SDH），$\alpha$－glycerophosphate dehydrogenase（$\alpha$－GPD），glucose－6－phosphate dehydrogenase（G－6 PD），glutamate dehydrogenase（GLD），$\beta$-hydroxybutyrate dehydrogenase（$\beta$-HBD），lactate dehydrogenase（LDH），cytochrome oxidase, ubiquinone, phosphorylaseの染色を行った．またnon-NAD-linked $\alpha$-GPDとして電子受容体にmenadioneを用いた．$\alpha$－GPD（vk3）およびLDHのisoenzymeのH typeを区別するため，ureaを付加した（LDH（urea））．酵素反応のincubation timeはNADH-TRで30分，その他は60分とした．また電顕的定量的検索[3]のため，ふ化後3週目の正常チキン，Dyチキン各々のPLDの電顕写真（×10,000）を無作為に20枚以上とり，ミトコンドリアのvolume density，surface densityおよび数をNEC-PC-8001にて計測した．その際，筋鞘下1 $\mu$m以内のミトコンドリア，および，type 2（$\alpha$w）線維の選択のため，筋鞘下に著明なミトコンドリアの集積を認めるtype 1（$\alpha$R）線維と思われるものは対象より除外した．

## 結 果

A．筋線維の諸酵素活性の経時的観察：

1．正常チキンおよびDyチキンにおける諸酵素活性のALDとPLDの経時的比較．

＊九州大学医学部脳研神経内科

正常チキンおよびDyチキンともに，NADH-TR，NADPH-TR，SDH，LDH，LDH (urea)，β-HBDは鶏胚期第19日からふ化後1週目にかけてALDにPLDより強い酵素活性を認めた．MDHは正常チキンではふ化後1週目と3週目にALDにPLDより強い活性を認めたが，Dyチキンではその差異は明らかではなかった。逆にα-GPD (vk3) はふ化後1週目より，phosphorylaseはふ化後3週目より正常チキン，DyチキンともにPLDにより強い活性を認めた．正常チキン，Dyチキンともにubiquinone，cytochrome oxidase，α-GPD (NAD)，GLD，G-6PDはALDとPLDの間に明らかな活性の差を認めなかった．しかしDyチキンでのNADH-TR，NADPH-TR，SDH，LDHのALDとPLDの間での活性の差は，正常チキンのALDとPLDの差よりもふ化後1週目以後少なくなった（表1，2）．

2．正常チキンとDyチキンALDの諸酵素活性の経時的推移および両者の比較

正常およびDyチキンのALDでは，cytochrome oxidase，α-GPD (NAD)，α-GPD (vk3)，LDH，GLD，G-6PDは鶏胚期第19日よりふ化後6週目まで，両群に酵素活性の明らかな変化を認めなかった．またLDH (urea) はふ化後1週目より両群ともに活性の低下を認めた．NADH-TR，NADPH-TR，SDH，MDH，ubiquinone，phosphorylase，β-HBDは両群ともにふ化1日目および1週目に種々の程度の活性の増加を示した．以上のごとく，Dyチキンと正常チキンの比較では，この期間中，両者に明らかな酵素活性の差を認めなかった（表1）．

3．正常チキンとDyチキンPLDの諸酵素活性の経時的推移および両者の比較．

正常チキン，Dyチキンともに，cytochrome oxidase，LDH，GLD，G-6PD，β-HBDは鶏胚期第19日目よりふ化後6週目まで，明らかな活性の変化を認めなかった．また両者ともに，ふ化後活性の増加を示したものは，ubiquinone，α-GPD (NAD)，α-GPD (vk3)，phosphorylaseで，特にphosphorylaseは3週目に著増した．LDH (urea) はふ化後1週目に活性は両者ともに減弱した．NADH-TR，SDH，MDHは正常チキンでふ化後ほぼ同じ活性を持続するが，DyチキンではNADH-TR，SDHは1週目より，MDHは3週目より活性が増加した．NADPH-TRでは1週目より正常チキン，Dyチキンともに活性が増加するが，Dyチキンでは3週目よりその増加の程度はより著明であった．以上の結果，DyチキンではNADH-TR，SDHはふ化後1週目より，NADPH-TR，MDHはふ化後3週目よりDyチキンにより強い酵素活性を示すようになった（表2）．

B．電顕的定量的検討：

ふ化後3週目のPLDのstereological analysisでは，ミトコンドリアのvolume density (cu.μcomp / 100 cu. μ fiber) は，正常チキン2.21±0.53に対して，Dyチキンでは3.66±0.31であり，surface density (sq. μ comp. /100 cu. μ fiber) は，正常チキンの5.36±1.47に対してDyチキンでは10.39±0.10，ミトコンドリア数 (N／100 sq μ) は正常チキン0.34±0.11に対してDyチキン0.83±0.03といずれもDyチキンで増加を認めた．

## 考　　察

A．正常チキン

正常チキン筋の鶏胚後期よりふ化後初期の各種酵素活性の推移の検討では，鶏胚期第19日目はALDとPLDの活性の差異は明らかには認めなかった．赤筋としてのALDと白筋としてのPLDの差異は，ALDではふ化後より1週目にNADHTR，NADPH-TR，SDHなどのミトコンドリア酸化酵素が増加したこと，PLDで1週目にLDH (urea) の活性が著減し3週目にphosphorylaseが著増したことより両者の差異がより明らかになったといえる．特にPLDで3週目にanerobic glycolysisに属するphosphorylaseが著増したことはPLDの白筋としての特質がこの時期に備わったものといえる．

B．Dyチキン

Dyチキンの赤筋であるALDは，ふ化後6週目までは正常チキンと比較して全く変化を認めず，これは赤筋は白筋より筋病変が生じにくいという

表1 Variation with age of semiquantitative grading of various enzyme activities in histochemistry of ALD.

| | | E19 | P1 | 1 W | 3 W | 6 W |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NADH-TR | C | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | D | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| NADPH-TR | C | − | − ~ ± | +++ | +++ | +++ |
| | D | − | − ~ ± | +++ | +++ | +++ |
| SDH | C | + | + ~ ++ | ++ | ++ | ++ |
| | D | + | + ~ ++ | ++ | ++ | ++ |
| MDH | C | + | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ | ++ |
| | D | + | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ | ++ |
| Ubiquinone | C | + | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ |
| | D | + | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ |
| Cyt. Ox | C | ± | ± | ± | ± | ± |
| | D | ± | ± | ± | ± | ± |
| α-GPD (NAD) | C | − ~ ± | − ~ ± | ± | ± | ± |
| | D | − ~ ± | − ~ ± | ± | ± | ± |
| α-GPD ($VK_3$) | C | + | ± ~ + | + | + | + |
| | D | + | ± ~ + | + | + | + |
| LDH | C | ++ ~ +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | D | ++ ~ +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| LDH (urea) | C | ++ ~ +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| | D | ++ ~ +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| PhosphoR | C | − | ± | ± | ± | ± |
| | D | − | ± | ± | ± | ± |
| GLD | C | ± | + | + | + | + |
| | D | ± | + | + | + | + |
| G-6PD | C | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± |
| | D | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± |
| β-HBD | C | + | + | + ~ ++ | ++ | ++ |
| | D | + | + | + ~ ++ | ++ | ++ |

A graded system (− to +++) documented the strength of enzyme activity in control (C) and dystrophic (D) chickens.

−:absent, ±:very weak, + to +++: present, mild to strong activity.

E19: 19 day in incubation periods, P1: 1 day after hatching

表2 Variation with age of semiquantitative grading of various enzyme activities in histochemistry of PLD.

| | | E19 | P1 | 1 W | 3 W | 6 W |
|---|---|---|---|---|---|---|
| * NADH-TR | C | ± | + | ± ~ + | + | ± ~ + |
| | D | ± | + | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ |
| * NADPH-TR | C | − | − ~ ± | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ |
| | D | − | − ~ ± | + ~ ++ | ++ | ++ ~ +++ |
| * SDH | C | ± | ± ~ + | ± ~ + | ± ~ + | ± ~ + |
| | D | ± | ± ~ + | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ |
| * MDH | C | + | + ~ ++ | + | + | ++ |
| | D | + | + ~ ++ | + | + ~ ++ | ++ ~ +++ |
| Ubiquinone | C | + | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ | ++ |
| | D | + | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ | ++ |
| Cyt.Ox | C | − ~ ± | ± | ± | ± | ± |
| | D | − ~ ± | ± | ± | ± | ± |
| α-GPD (NAD). | C | − ~ ± | − ~ ± | + | + | + |
| | D | − ~ ± | − ~ ± | + | + | + |
| α-GPD ($VK_3$) | C | ± | ± ~ + | + ~ ++ | ++ | ++ |
| | D | ± | ± ~ + | + ~ ++ | ++ | ++ |
| LDH | C | + ~ ++ | ++ | + ~ ++ | + ~ ++ | + ~ ++ |
| | D | + ~ ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| LDH (urea) | C | ++ | ++ | ± | ± | ± |
| | D | ++ | ++ | ± | ± | ± |
| PhosphoR | C | − | ± | ± | ++ ~ +++ | ++ ~ +++ |
| | D | − | ± | ± | ++ ~ +++ | ++ ~ +++ |
| GLD | C | − ~ ± | ± ~ + | ± | ± | ± |
| | D | − ~ ± | ± ~ + | ± | ± | ± |
| G-6PD | C | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± |
| | D | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± | − ~ ± |
| ß-HBD | C | ± | ± | ± | ± | ± |
| | D | ± | ± | ± | ± | ± |

A graded system ( − to +++ ) documented the strength of enzyme activity in control (C) and dystrophic(D) chickens.

− : absent, ± : very week, + to +++ : present, mild tc strong activity.

E19: 19 days in incubation periods, P1: 1 day after hatching

* Discernible difference of enzyme activities between control and dystrophic chickens.

報告[1]と一致している．しかし白筋であるPLDは，鶏胚期19日目よりふ化後1日目までは，明らかな酵素活性の差異は認めなかったが，1週目以後より3週目にかけて，NADH-TR，NADPH-TR, SDH, MDHなどのミトコンドリア酸化酵素活性の増加を認めた．しかし他の酵素群には明らかな差異を認めなかった．このミトコンドリア酸化酵素活性の増加は，この時期には明らかな筋病変が生じていない事より，Dyチキン筋の初期変化と考えられる．これは電顕的定量的検索でも，ミトコンドリアのvolume density, surface density，および数の増加を認めたこと，およびPLDのwhite fiberのNADH-TR，formazan顆粒数の増加をふ化後1週目以後に認めたこと等[4]より，これらミトコンドリア酸化酵素活性の増加は，筋変性に至る以前に，ミトコンドリアの増加を示唆しているとも考えられる．

## 文　献


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

2) Pearse, A. G. E.：Standard method for bound enzymes. In histochemistry：theoretical and applied. vol. 2, 3rd ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 1324-1344, 1972.

3) Eisenberg, B. R., Kuda, A. M.：Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. J. ultrastructural Research 51：176-187, 1975.

4) 石本進士，後藤幾生，大田典也，黒岩義五郎：筋ジストロフィーチキンの発達過程における形態学的初期変化．筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究(三好班)，昭和54年度研究報告書，1980，pp. 22～26.

# 11)－(2) Kearns-Sayre-Shy 症候群の検討
## ——末梢神経障害を伴った症例——

後藤幾生*

研究協力者　古谷博和*　北口哲雄*　石本進士*
本村　暁*　黒岩義五郎*

### はじめに

いわゆる mitochondrial myopathy は症状が骨格筋に限られる狭義の mitochondrial myopathy と Kearns - Sayre - Shy 症候群（以下 KSS），ophthalmoplegia plus, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes（以下 MELAS）[1] 等の中枢神経を含む全身に多彩な症状を呈するもの（mitochondrial encephalomyopathy）[2] に大別されている．今回，私達は進行性外眼筋麻痺，心伝導障害，感音性難聴，視神経・網膜萎縮，頭部 CT 上の異常，筋生検でのミトコンドリア異常などの所見に加え，髄液中の乳酸上昇，神経生検で著明な大径有髄線維密度の低下を認めた KSS の一例を経験したので文献的考察を加え検討した．

症例：45歳，男性

主訴：眼瞼下垂，難聴

現病歴：出生時，幼児期の発育に異常なく，学業成績は中程度．20歳の頃より徐々に眼瞼下垂が出現．30歳頃より労作時の全身倦怠感，下痢がひどくなり43歳より左側，45歳より右側の難聴および視力低下を自覚するようになったため，当科入院となった．

家族歴（図１）：両親がいとこ結婚．母親（III—２）が von Recklinghausen 病．発端者の同胞では三男（IV—３）が27歳より消化器症状で発症し，多発性小腸憩室，高度栄養障害を伴ったポリニューロパチーで６年の経過で死亡している[3]．しかしながら短腓骨筋標本に行った変法 Gomori-Trichrome 染色では ragged-red fiber は認められなかった．また四男（IV—４）は生来低身長で，胃潰瘍の術後，高度栄養障害のため１年の経過で22歳で死亡している．

入院時現症：身長163cm，体重44kg．軽度のるいそうを認めた．血圧148/94mmHg，脈拍88/分整．心雑音は聴取せず，腹部で腸音の亢進を認めた．

神経学的所見：知能正常．視力は右0.7，左0.1．眼底では両側視神経，網膜の萎縮が認められたが色素沈着は見られなかった．中等度の眼瞼下垂，全方向への高度の眼球運動障害あり．聴力は両側で高音域優位に低下．軽度の鼻声，嚥下障害および眼輪筋，口輪筋，胸鎖乳突筋，肩甲筋，大殿筋，四肢近位筋に中等度から高度の筋萎縮，筋力低下を認めた．深部腱反射は低下．Gowers 徴候陰性．小脳症状，感覚異常は認めなかった．

検査所見：入院時，末梢血，一般血液生化学，尿検査，血液ガス分析，血中乳酸・ピルビン酸に異常なく，心電図では２枝ブロックを呈していた．小腸造影で多発性憩室症が認められた．髄液検査では圧，細胞数は正常．蛋白は85mg/dl，乳酸は34.7mg/dl と上昇．脳波は軽度異常で，全誘導に散発性に徐波の混入を認めた．頭部 CTscan では，白質内にびまん性に低吸収域が見られた（図２）．運動神経伝導速度は右脛骨筋で20m/sec と低下．右腓腹神経の知覚神経伝導速度検査では，活動電位が誘発不能．針筋電図検査では，筋原性変化と神経原性変化の混在を呈していた．聴覚性

＊九州大学医学部脳研神経内科

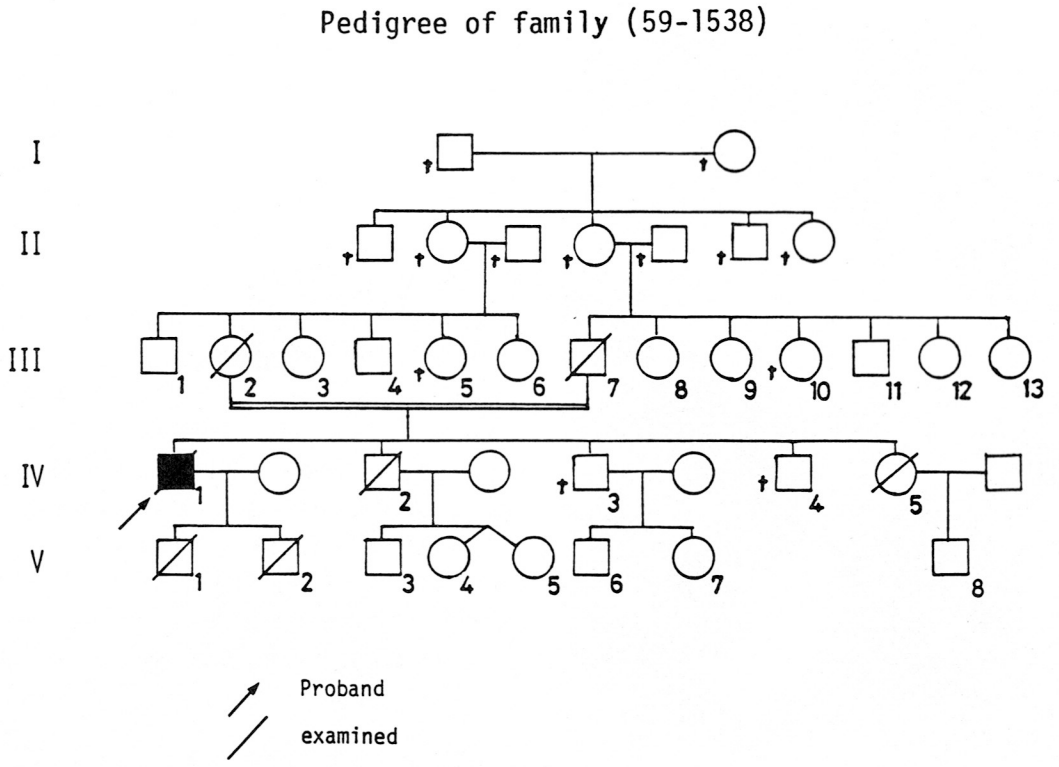



図1　家系図

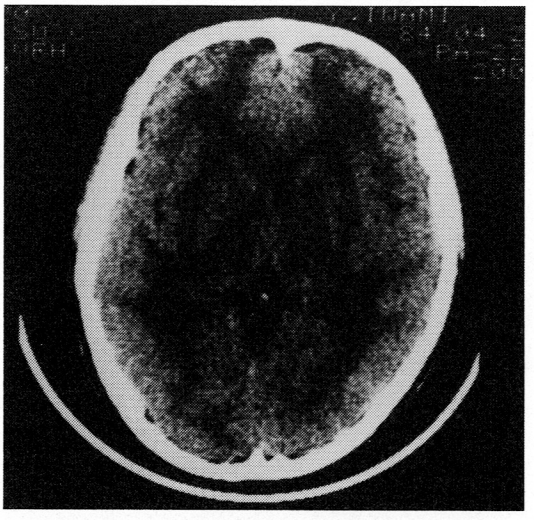


図2　頭部CT scan

脳幹誘発電位検査はⅠ，Ⅴ波間の頂点潜時の延長を認め，正中神経刺激による短潜時体性感覚誘発電位検査では，$N_9$ 波は記録不能．視覚誘発電位検査では $P_{100}$ 波の潜時が遅延していた．

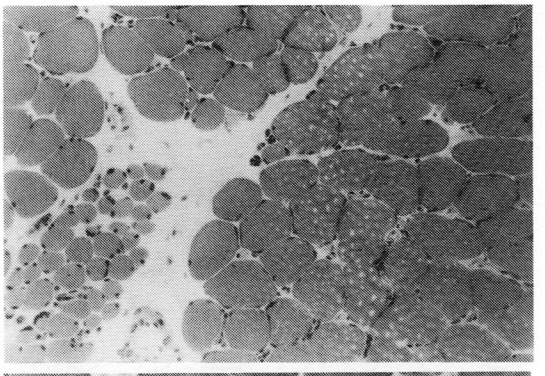
糖新生，分解代謝の検索のため，阻血下運動負荷試験，グルコース，グリセロール，グルカゴン，フルクトースの負荷試験を行ったが異常を認めなかった．

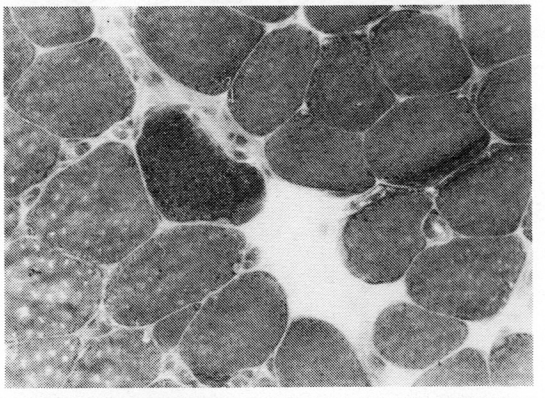
筋病理所見では，短腓骨筋のHE染色で筋線維の大小不同，局所的炎症細胞の集合，group atrophyが認められ，modified trichrome染色では筋鞘下に多数のragged-red fiberを，同部の電顕による観察では，異常封入体を有した大小不同の異常ミトコンドリアの集積が見られた（図3 A）．腓腹神経のエポン包埋トルイジンブルー染色では，大径有髄線維の減少および軸索に比して薄い髄鞘が多く見られ，組織定量分析では，大径有髄線維1,038/mm²（正常4,503），小径有髄線維5,189/mm²（正常5,726）と大径有髄線維の著明な減少を認めた（図3 B）．無髄線維密度は正常であった．

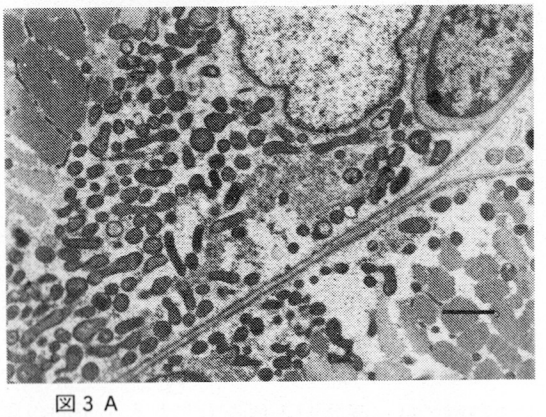
## 考　　案

本症例は進行性外眼筋麻痺，心伝導障害，難聴，視神経・網膜萎縮，髄液中蛋白上昇，頭部CT上の異常，筋生検下異常ミトコンドリアが確認されKSSと診断した．本症例では髄液中の乳酸上昇，神経生検での大径有髄線維の著明な減少を認めた点が特徴的と考えられた．

KSSのCT所見については，これまでに基底核の石灰化，白質病変，皮質の萎縮などが報告されている[4]が，剖検例で海綿状変性を認める事，enhance効果の無い事などより，本症例に見られた白質の低吸収域は海綿状変性を反映していると考えられる．また，mitochondrial encephalomyopathyにおける髄液中の乳酸，ピルビン酸が上昇しているとの報告がある[5]．このうちKSS例では本例と同様，血中乳酸およびピルビン酸は正常であるが，髄液の乳酸およびピルビン酸が上昇しており，頭部CTにも異常が認められていることより，







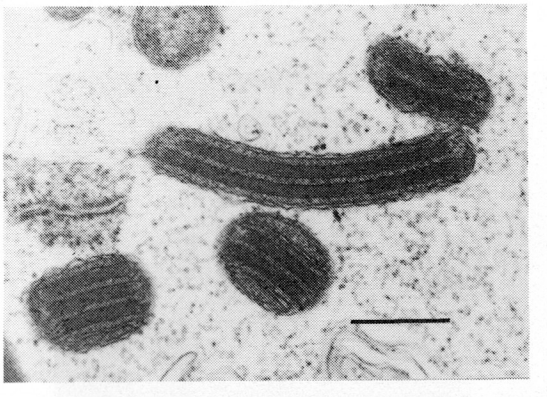


図3A

上段：HE染色（×200）
中段：modified trichrome染色（×200）
下段：電顕にてミトコンドリア内にparacrystaline封入体を示す．
（barは1μmを示す）

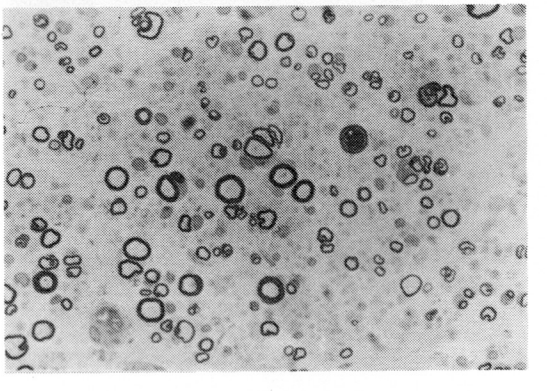


図3B　腓腹神経のエポン包埋トルイジンブルー染色（×400）
大径有髄線維の減少と軸索に比して薄い髄鞘を有する線維を示す．

髄液の乳酸およびピルビン酸の上昇は中枢神経病変の反映である可能性が考えられる（表1）.

mitochondrial myopathy に於ける末梢神経障害の所見は稀なものではなく，Egger ら[6] は13例中4例にニューロパチーの症状を認めたとし，松原ら[7] は32例のミトコンドリア異常を呈した chronic progressive external ophthalmoplegia のうち，13例に筋電図上神経原性変化を認めたと報告している．しかしながら，神経筋生検，剖検における異常の報告では脱髄所見，脱髄および髄鞘再生所見が殆んどであり，本症例のような神経線維の組織定量分析での異常の報告は，Peyronnard ら[8] の一例にすぎない．彼らの報告と本症例を比較すると，筋電図，末梢神経伝導速度検査の

表1　髄液中，乳酸，ピルビン酸の上昇を呈した mitochondrial encephalomyopathy

| | Suehara et al.('83) | Kuriyama et al.('83) | Gohda et al.('84) | Kuriyama et al.('84) | Furuya et al.('84) |
|---|---|---|---|---|---|
| Diag. | MELAS | MELAS | MELAS | KSS | KSS |
| Age, Sex | 48y,F | 14y,F | 14y,F | 43y,F | 45y,M |
| CT scan | low density (multiple) | cerebral atrophy | low density (occipital) | calcification (basal ganglia) | low density (diffuse) |
| EEG | slow burst | spike & wave | spike & wave | slow burst | sporadic theta |
| Serum (mg/dl) | | | | | |
| lactate (4 - 16) | 16.5 | 38.9 | 46.2 | 6.72 | 12.1 |
| pyruvate (0.3 - 0.9) | 1.01 | 0.97 | 0.82 | 0.56 | 0.90 |
| CSF (mg/dl) | | | | | |
| lactate (10 - 16) | 27.8 | 42.9 | 76.3 | 27.0 | 34.7 |
| pyruvate (0.6 - 0.9) | 1.47 | 1.41 | 3.09 | 1.29 | 0.76 |

表2　neuropathy を呈した mitochondrial encephalomyopathy

| | Peyronnard et al.('79) | Furuya et al.('84) |
|---|---|---|
| Diag. | Ophthalmoplegia plus | KSS |
| Age, Sex | 37y, M | 45y, M |
| EMG | BSAP neurogenic pattern | BSAP neurogenic pattern |
| Motor conduction velocity (m/sec) | Ulnar n. 25.3 | Ulnar n. 27.0 |
| Sensory conduction velocity (m/sec) | not evoked | not evoked |
| Myelinated fiber density | decreased | decreased |
| Unmyelinated fiber | normal | normal |
| Onion bulb | + | - |

所見は一致しており，神経生検では，彼らの症例では onion bulb を認めた点が異なるが，大径有髄線維密度の減少が著明であった点は共通している（表2）．これがシュワン細胞の異常に起因するものか，軸索自体の異常に起因するものであるかは現在の所不明であるが，ミトコンドリアの機能不全が軸索変性や hypomyelination を起こした可能性も考えられる．

以上，びまん性大脳白質病変が示唆されるうえに，末梢神経障害を伴った KSS の一例を報告した．末梢神経障害や中枢病変については今後 MELAS や他の mitochondrial myopathy と対比して検討する必要があると考えられる．

## 文　献


1) Pavlakis SG, Phillips PC et al：Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes：A distinctive clinical syndrome. Ann. Neurol., **16**：481, 1984.
2) Fukuhara N, Tokiguchi S et al：Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (Mitochondrial abnormalities). Disease entity or a syndrome? Light and electronmicroscopic studies of two cases and review of literature. J. Neurol. Sci. **47**：117, 1980.
3) 洪秀樹，田中明他：多発性小腸憩室，脂肪性肝硬変および胃切除（B II 法）後の高度栄養障害に伴った重症 polyneuropathy の1例．日内会誌，**67**(8)：86, 1978.
4) Seigel RS, Seeger JF et al：Computed tomography in oculocraniosomatic disease (Kearns-Sayre syndrome). Radiology, **130**：159, 1979.
5) Kuriyama M, Suehara M et al：High CSF lactate and pyruvate content in Kearns-Sayre syndrome. Neurology (Cleveland), **34**：253, 1984.
6) Egger J, Lake BD et al：Mitochondrial cytopathy. A multisystem disorder with ragged red fibers on muscle biopsy. Arch. Dis. Child., **56**：741, 1981.
7) 松原四郎，安田厚子他：Oculocraniosomatic neuromuscular disease with "ragged-red" fiber の1例．臨床神経，**24**：221, 1984.
8) Peyronnard JM, Charron L et al：Neuropathy and mitochondrial myopathy. Ann. Neurol., **7**：262, 1980.

# 12）培養下における正常及び筋ジストロフィー鶏のT-sytmの微細構造
## ——タンニン酸染色による検討——

塚越　廣*

研究協力者　松永高志*　松本容秋*
小林高義*　古川哲雄*

### はじめに

筋ジストロフィー症（以下筋ジスと略す）における筋内膜系の異常については，硝酸ランタンを用いたOguchiらの報告[1),2)]，Golgi変法によるScalesらの報告[3)]があり，本症の病因に関与する重要な初期変化とされている．しかしながら，これらの方法は恒常的にT-systemを染色するとは限らず，また，発生段階を初期から観察した報告もない．我々はT-system，sarcoplasmic reticulum（SRと略す）を発生・分化の段階を追って経時的かつ恒常的に観察する目的で，タンニン酸染色を用い鶏胚筋分離培養を行い検討した．

### 材料及び方法

正常及び筋ジス鶏胚（line 412, 413）11～13日目大胸筋を使用，実体顕微鏡下で筋を採取しRinaldini液中で細切．0.25% trypsin液中で37℃ 8分間incubate後，ピペッティング，750～1,000rpm 2分間の遠心分離，Rinaldini液洗浄を3回反復し，最後に培養液をいれtrypsinの活性を停止させピペッティング，もう一度遠心分離を行った．上清を除去し充分ピペッティング後，レンズクリーニング用シリコンペーパーを通し大型シャーレに静置，37℃30分間incubate，Yaffeの方法により筋芽細胞の比率を増加させ，$2\times10^4$cell/cm$^2$に細胞数を調整，コラーゲン塗布カバースリップ上で分離培養を行った．培養液の組成は，Eagle's MEM with Hanks's salts 80%，horse serum 15%，embryo extract 5%，glucose 6g/l，penicillin G 200U/mlとした．経時的に位相差顕微鏡及びJenner-Giemsa染色標本の光顕的観察を行うとともに電顕標本を作成した．電顕標本はBonilla[4)]の方法に従い，2.5% glutaraldehyde，8%タンニン酸混合溶液中で30分間固定，PBS buffer（pH7.2）で洗浄後1%オスミウム酸処理し，series alcoholで脱水，Epon-aralditeへ包埋した．標本は厚切り切片無染色とし，日立H-800を使用し200KVで観察した．

### 結果

光顕所見：正常，筋ジス鶏筋とも6日目には横紋を形成し自発収縮をみとめた．培養30日目以後筋ジス鶏筋で筋線維径にややばらつきが観察されたが，経時的観察において，空胞形成，異常分枝，筋線維断裂などの変性所見には，培養5週まで両者に明らかな差はなく，それ以後ともに変性に陥った．

電顕所見：両者とも6日目以後タンニン酸により染色されたT-systemが観察された．

正常鶏筋：培養初期から，細胞表面に多数のcaveolaがみとめられ，caveolaと連続するコイル状のT-systemも観察された（図1）．T-systemは主に筋原線維の走向と直交するように横走するが（図2—A），一部縦走するT-systemもあり（図2—B），管径はやや不規則になっていた．正常鶏筋ではSRはほとんど観察されなかった．

筋ジス鶏筋：正常鶏筋と同様に，caveolaと連

*東京医科歯科大学医学部神経内科

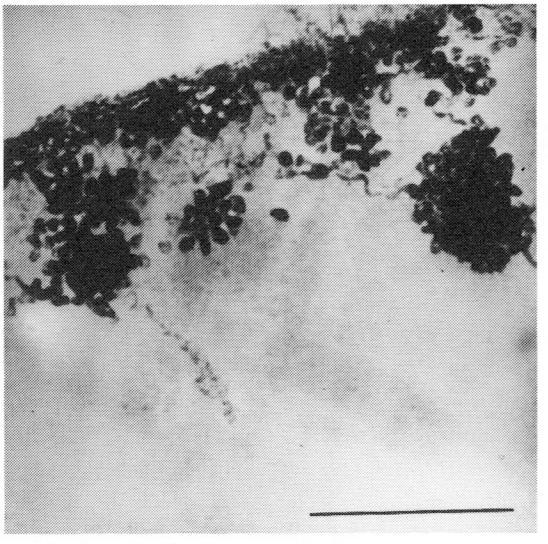


図1　正常鶏筋培養6日目電顕像
細胞表面の多数のcaveolaとそれに連続するコイル状のT-systemがみとめられる．
200KV　無染色
Bar＝1 μm

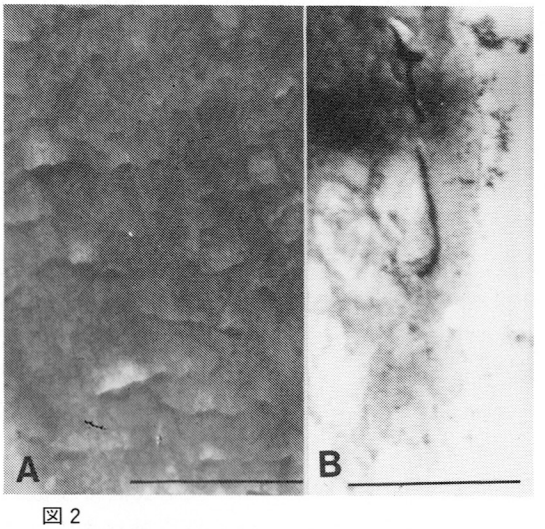



図2
A　正常鶏筋培養6日目電顕像
筋原線維の走向にほぼ直行して横走するT-systemがみとめられる．管径はやや不規則である．
B　正常鶏筋培養18日目電顕像
縦走及び横走するT-systemがみとめられる．管径はほぼ一様である．
200KV　無染色
Bar＝1 μm

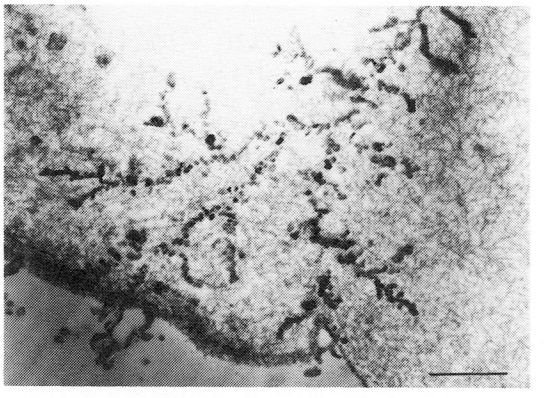


図3　筋ジス鶏筋培養12日目電顕像
細胞表面のcaveolaとそれに連続しているT-systemが観察される．
200KV　無染色
Bar＝1 μm

続するT-systemが観察された（図3）．T-systemは横走・縦走し格子状の構造をつくるが（図4－A），その一部に膨化した像がみとめられた．この膨化は，他のT-systemと電子密度のほぼ等しいものと（図4－B▶），それよりも大きく，電子密度のより高い膨化（図4－B▷）との2種がみとめられ，後者はその立体的観察によりjunctional SRと考えられた．培養中～後期においても，電子密度の高いjunctional SR（図5－A▷）が観察され，またtriadのT-system（図5－B▶）と並行して不規則な走向をとるSR（図5－B▷）が観察された．

筋内膜構造を内部に有する空胞は培養後期に正常，筋ジス鶏筋両者にみとめられた．

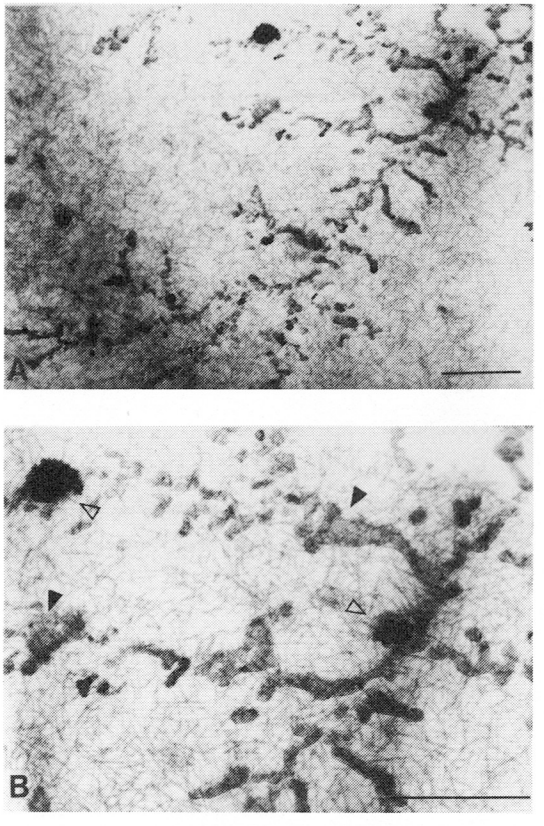



図4　筋ジス鶏筋培養12日目電顕像
A　縦走・横走し格子状をなすT-systemに部分的膨化がみとめられる．
B　Aの強拡大像．部分的膨化は，他のT-systemと電子密度のほぼ等しいもの（▶）と，大きく電子密度のより高いもの（▷）との2者があり，後者はjunctional SRと考えられた．
200KV　無染色
Bar＝1 μm

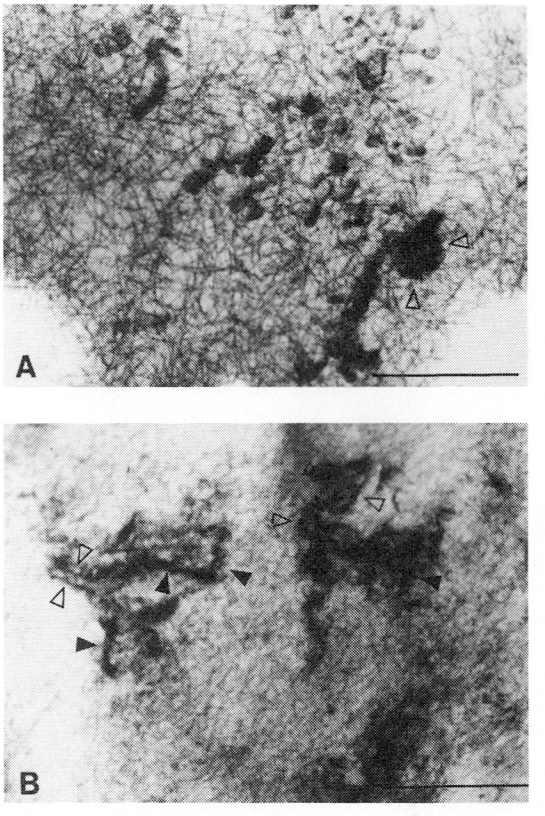



図5　筋ジス鶏筋培養24日目電顕像
A　T-systemと連続した電子密度の高い膨化（▷）がみとめられ，junctional SRと考えられた．
B　triadのT-system（▶）と並行して不規則な走向をとるSR（▷）が観察される．
200KV　無染色
Bar＝1 μm

## 考　　察

タンニン酸はgallic acid，ellagic acidなどのフェノールカルボン酸ポリマーと糖，配糖体が結合した構造を有し，その立体構造により多種多様なタンニン酸が存在するが，いずれも数多くのhydroxy基をもち金属，蛋白，糖などに強い結合性を示す[5]．電顕標本のタンニン酸染色の機序は，詳細は不明だが，膜表面のglycoproteinとタンニン酸が結合し電子密度を高めるためと考えられ，水平ら[6]がmicrotubulesを染色して以来，肝組織，腎糸球体，小胞体など種々の組織に応用されている．筋組織T-systemのタンニン酸染色はBonillaらが生検筋で報告しているが，発生・分化の段階を観察してはいない．我々の観察では，T-systemが横紋が形成される6日目から染色され，caveolaとの連続性を確認された．培養初期から正常，筋ジス鶏筋両者に横走及び縦走するT-systemがみとめられたが，培養中期以後では走向の

乱れ，部分的膨化は筋ジス鶏筋に多く観察された．T-system のこのような異常は Duchenne 型筋ジストロフィー症でも観察されるが，一方，培養初期の正常筋や，bupivacaine hydrochloride により損傷を与えた筋の観察[7]でも同様な変化がみとめられることから，再生・成熟過程における T-system の変化と考えられる．

SR については，従来正常筋では T-system との交通はないとされており，Oguchi らは，硝酸ランタンにより筋ジス筋のみで SR が染色されることから，T-system と SR の交通を病的所見とした．一方，Scales らは Golgi 変法を用い，正常筋でも SR が染色されると報告している．我々の実験では，正常鶏筋では SR はほとんど染色されなかったが，筋ジス鶏筋では膨化した電子密度の高い SR が観察された．これは，筋ジス筋の内膜系の異常として T-system と SR の交通が生じたものなのか，あるいは，筋ジス筋において膜表面の glycoprotein が変性しタンニン酸との結合性が高まった結果なのかは，今回の実験からは結論できない．しかし，筋ジス鶏筋において，T-system 及び SR の intramembranous particle density に異常が出現することが Crowe ら[8]，Baskin ら[9]により報告されており，筋ジス筋では T-system のみならず SR の形態的・機能的異常が存在し，この両者が ATP-ase を介する筋収縮過程の障害の原因となっていることが推測される．今回の方法では SR の全貌を観察することはできなかったが，これは SR の構造によるものか，あるいはタンニン酸濃度，pH など手技的問題かを検討し，本法に改良を加えるとともに，他の染色法との電顕像の比較，組織化学の応用などを組合わせて，今後更に筋ジス筋の T-system, SR の構造を検討していく予定である．

## 結　　論

1．タンニン酸染色により，T-system が経時的・恒常的に観察された．

2．培養の比較的初期から，正常・筋ジス鶏筋両者に T-system の部分的膨化，走向の異常をみとめたが，培養中期以後ではこの変化は筋ジス筋に多く観察された．

3．膨化した junctional SR が筋ジス筋で観察された．

## 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. Ultrastr. Res., 78 : 193, 1982.

4) Bonilla, E. : Staining of transverse tubular system of skeletal muscle by tannic acid-glutaraldehyde fixation. J. Ultrastr. Res., 58 : 162, 1977.

5) 西岡五夫：タンニンに関する最近の研究．薬学雑誌，103 : 125, 1983.

6) Mizuhira, V. & Futaesaku, Y. Proc. Elec. Micro. Soc. Amer., 29 : 494, 1971.

7) Miike, T. Nonaka, I. et al : Behavior of sarcotubular system formation in experimentally induced regeneration of muscle fibers. J. Neurol Sci., 65 : 193, 1984.

8) Crowe, L.M. & Baskin, R.J. : Freeze-fracture of intact sarcotubular membranes. J. Ultrastr. Res., 62 : 147, 1978.

9) Baskin, R.J. & Kawamoto, R. : Stereological analysis of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum isolated from normal and dystrophic skeletal muscle. Biochi et Biophy Acta, 771 : 109, 1984.

# 13)－(1) Becker 型筋ジストロフィーにおける神経筋接合部の電顕的観察

福 原 信 義*

研究協力者　椿　忠 雄** 高 守 正 治*

## はじめに

Becker & Kiener (1955)[1] により伴性劣性遺伝の進行性筋ジストロフィー (DMP) の良性型が、それまでの Duchenne 型 DMP とは別の疾患単位として報告されたが，彼らの報告が単に臨床経過の違いにのみ基づいていたため，はたして Becker 型 DMP が Duchenne 型 DMP と本質的に異なるものかどうかは議論のあるところである．一方，Goebel ら[2] が，Becker[3] の報告したオリジナルの家系で，筋電図，筋生検により筋原性所見に加えて神経原性変化がみられることを報告してからは特に問題となっている．

我々は，既に，DMP の神経筋接合部 (NMJ) には筋病変による二次的変化とは考えられない異常がみられる[4] ことを報告しているが，今回，Becker 型 DMP の生検筋について，あらためて線維タイプ別に NMJ の異常を検討したので報告する．

## 対象と方法

**症例：**

**症例 1**　14歳男性．5歳で発症，現在歩行がやや動揺性ではあるが，走ることもでき，Gowers 徴候は認められない．仮性肥大(+)，血清 CK562—1471U/ml (正常＜20)．母方叔父も35歳より歩行障害があり，血清 CK28.

**症例 2**　15歳男性．9歳時，歩行の異常と走るのが遅いということで発症．現在動揺性歩行で階段の昇降が困難．仮性肥大(+)．血清 CK340—783 U/ml．母方祖父も9歳より歩行障害が始まり，64歳で死亡．母の血清 CK42U/ml.

**症例 3**　13歳男性．13歳になり歩容の異常に気づかれる．近位筋が軽度萎縮し，仮性肥大(+)．血清 CK1840—2420U/ml.

3症例とも筋電図ではミオパチーの定型的所見を示した．

**生検筋の処理：**筋生検は局所麻酔下で上腕二頭筋よりなされ，通常の如く，凍結切片について各種染色を行った．一方，電顕標本は筋生検用痕子に固定したまま2.5%グルタールアルデヒド (pH7.4) で2時間固定後，神経筋接合部を中心として切り出し[5]，1%オスミュウム酸で2時間後固定後，araldite に包埋，光顕，電顕で観察した．形態計測したものは，全て正確に筋線維が縦断された標本を用いた．対照としては，手術時に採取された非神経疾患患者 (9～24歳) の肋間筋を用いた．

**筋線維タイプの判定：**筋線維タイプの判断は，Sjöström ら (1982)[6][7], Saltis & Mendell (1974)[8] の研究をもとにして，Z 帯の中が100nm 以上で，M 帯の幅が広く，M 線が5本確認できるものをタイプ I, Z 帯幅が100nm 以下で，M 帯の狭いものをタイプ II として扱った．

## 結　　果

**1)　組織学的，組織化学的所見：**

筋線維径の大小不同，間質の軽度の線維化，ごく少数の opaque fiber などがみられたが，中心核はまれであった．症例3では少数の再生線維，fiber-splitting がみられ，症例2，3ではタイプ線維の小群化もみられた．症例1では，タイプ II 線維優位 (76.7%) であった．

＊金沢大学医学部神経内科
＊＊都立神経病院

2) 電顕所見：

1．筋線維の変化：NMJの観察を中心におき，光顕では全く異常の認められない部分を選んで電顕的観察を行った（図1）ため，Z帯のstreamingなどがわずかにみられたのみであり，後述のNMJの観察を行った筋線維では，ほとんど異常はみられなかった．

2．筋肉内神経の変化：上述のように正常にみえる筋線維の近くの有髄神経，無髄神経には，しばしばneurofilamentの配列の乱れ，グリコーゲン顆粒の増加，ミエリン像などの異常がみられた．髄鞘の異常は認められなかった．

3．NMJの変化：Becker型DMPでは，3症例の25ブロックからの105個のNMJが観察され，対照では31個のNMJが観察された．Becker型DMPでは同一筋線維に4～5個の軸索終末部がNMJを形成しているのが，しばしばみられた（図2）が，多くのNMJではsole-plateが著明に拡大し（図3），secondary synaptic clefts（SCC）の数が減少し，長さも短小化していたが，幅は正常と思われた．また，Schwann細胞の突起または膠原線維が軸索終末部と後シナップス膜の間に介入しているのはしばしばみられたが，軸索終末部自体の変性所見は軽度であった．写真上，primary synaptic cleftsに連続して観察されるSSCの数（表1）は，対照のタイプI線維では平均9.13±4.01，タイプII線維では平均7.07±3.86で，両者に有意差はなかった．一方，Becker型DMPではタイプI線維では4.71±2.55，タイプII線維では7.40±4.64であり，Becker型DMPのタイプI線維は，そのタイプII線維および対照に比べ，SSCの数は有意に（$P<0.001$）少なかった．

## 考　　察

本研究で用いた症例は，伴性劣性遺伝形式（症例1，2），特徴的な臨床像，血清CKの増加，筋電図所見などより，Becker型DMPであることは明らかである．Becker型の遺伝子の座位はXp21（短腕）[9]，であるのに，Duchenne型のそれは色盲とのlinkageより長腕にある[10)11)]と考えられていたが，近年やはり短腕にあると報告され[12]，こ

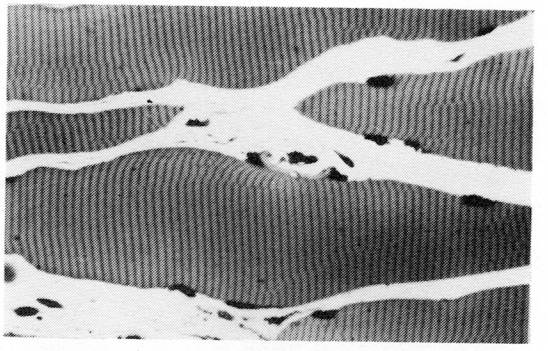


図1　アラルダイト包埋，トルイジン・ブルー染色．×420

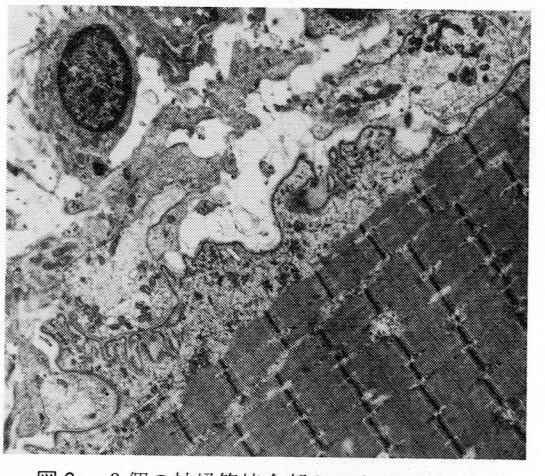


図2　3個の神経筋接合部がみられるが，2個はSSCのない単純な形である．×4,500

図3　Sole-plateが拡大し，SSCのない極めて単純な形の神経筋接合部．Schwann細胞の突起が軸索終末部と後シナップス膜の間に入りこんでいる．×7,500

表1　Mean numbers of the secondary synaptic clefts

| | Type I Fiber and Type II Fiber | Type I Fiber | Type II Fiber | Comparison between Type I and Type II Fibers |
|---|---|---|---|---|
| Control | 8.13 ± 4.01 ( n=31 ) | 9.13 ± 4.01 ( n=16 ) | 7.07 ± 3.86 ( n= 15) | NS |
| Becker's Muscular Dystrophy | 6.87 ± 4.82 ( n=105 ) | 4.71 ± 2.55 ( n=35 ) | 7.40 ± 4.64 ( n=70 ) | P < 0.001 |
| Comparison between Control and Becker's Muscular Dystrophy | P < 0.02 | P < 0.001 | NS | |

の面からは混乱している．しかし，筋病理学の立場からはBecker型とDuchenne型とでは非常に異なり，Becker型の病因には神経原性の因子がかなり関係しているのではないかとされている．すなわち，Becker型では，群集萎縮，pyknotic nuclear clump，小角化線維など，通常，脱神経とされる所見が非常にしばしばみられる一方，Duchenne型で多くみられるopaque fiber，貪食細胞の浸潤はまれとされている[13)14)]．Becker型DMPのNMJの変化は，これまでのDuchenne型DMPで報告された所見[15)16)]に極めて類似している．Duchenne型DMPにおけるNMJの変化は筋病変による二次的な変化であるとする考えもあるが，我々の症例では，筋力低下は臨床的に非常に軽く，観察部位も光学顕微鏡的に正常と思われる筋線維のNMJを選んでいるため，廃用性または筋病変による二次的な変化とは考えられない．SSCの幅の拡大がないことより，重症筋無力症のNMJとも異なる[17)]．また，筋ジストロフィーの研究では，得られた所見がジストロフィー病変とは直接関係のない，単なる再生所見をみているのではないかということが常に問題であったが，タイプI線維の方が変化が大きいことから，単なる再生による所見でもないと考えられる．Becker型DMPでみられるNMJの変化は，ネマリン・ミオパチーでの変化[18)]に極めて類似していることから，ネマリン・ミオパチー同様，筋の未熟性が問題となると思われる．従って，Becker型DMPの発症機序において，神経-筋の相互関係が重要な役割をなしていると考えられる．

## ま と め

Becker型DMPでは，タイプI筋線維のNMJで，SSCの短小化，数の減少がみられ，その発症機序において，神経-筋の相互関係が重要な役割をなしていると考えられる．

## 文　献


1) Becker, P. E. & Kiener, F. : Eine neue X-chromosomale Muskeldystrophie. Arch. Psychiatr. Nervenkr., 193 : 427, 1955.
2) Goebel, H. H., Prange, H., Gullota, F. et al. : Becker's X-linked muscular dystrophy. Histological, enzyme-histochemical, and ultrastructural studies of two cases, originally reported by Becker. Acta Neuropathol. (Berl.), 46 : 69, 1979.
3) Becker, P. E. : Two new families of benign sex-linked recessive muscular dystrophy. Rev. Can. Biol., 21 : 551, 1962.

4) 福原信義，湯浅竜彦，鈴木正博ら：進行性筋ジストロフィー症の神経筋接合部の微細変化について．臨床神経，16：981，1976.

5) Fukuhara, N., Takamori, N., Gutmann, L., et al. : Eaton - Lambert syndrome. Ultrastructural study of the motor endplates. Arch. Neurol., 27 : 67, 1972.

6) Sjöström, M., Ängquist, K. -A., Bylund, A. -C., et al : Morphometric analysis of human muscle fiber types. Muscle Nerve, 5 : 538, 1982.

7) Sjöström, M., Kidman, S., Larsén, K.H., et al. : Z-and M-band appearance in different histochemically defined types of human skeletal muscle fibers. J. Histochem. Cytochem., 30 : 1, 1982.

8) Saltis, L. M. & Mendell, J. R. : The fine structural differences in human muscle fiber types based on peroxidatic activity. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 33 : 632, 1974.

9) Jacobs, P. A., Hunt, P. A., Mayer, M., et al. : Duchenne muscular dystrophy (PMD) in a family with an x/autosome translocation. Further evidence that the DMD locus in at Xp21. Am. J. Hum. Gent., 33 : 513, 1981.

10) Emery, E. A. H., Smith, C. A. B. & Sanger, R. : The linkage relations of the loci for benign (Becker type) x - borne muscular dystrophy, colour blindness and Xg blood. Ann. Hum, Genet., 32 : 261, 1969.

11) Zatz, M., ltskan, S. B., Sanger, R., et al. : New linkage data for the x-linked types of muscular dystrophy and G6 P-D variants colour blindness and Xg blood groups. J. Med. Genet., 11 : 321, 1974

12) Kingstom, H. M., Thomas, N. S. T., Pearson, P. L., et al. : Genetic linkage between Becker muscular dystrophy and a polymorphic DNA sequence on the short arm of the x chromosome. J. Med. Genet., 20 : 255, 1983.

13) Bradley W. G., Jones, M. Z., Mussini, J. -M., et al. : Becker-type muscular dystrophy. Muscle Nerve, 1 : 111, 1978.

14) ten Heuten, R. & De Visser, M. : Histopathologic findings in Becker-type muscular dystrophy. Arch. Neurol., 41 : 729 1984.

15) Jerusalem, F., Engel, A. G. & Gomez, M. R. : Duchenne dystrophy. II. Morphometric study of motor end-plate fine structure. Brain, 97 : 115, 1974.

16) Harriman, D. G. F. : A comparison of the fine structure of motor end-plates in Duchenne dystrophy and in human neurogenic diseases. J. Neurol. Sci., 28 : 233, 1976.

17) Engel; A. G. & Santa, T. : Histometric analysis of the ultrastructure of the neuromuscular junction in myasthenia gravis and in the myasthenic syndrome. Ann. N. Y. Acad. Sci., 183 : 46, 1971.

18) Fukuhara, N., Yuasa, T., Tsubaki, T., et al. : Nemaline myopathy : histological, histochemical and ultrastructural studies. Acta Neuropathol. (Berl.), 42 : 33, 1978.

# 13)－(2) Cytoplamic body myopathy の臨床的，病理学的研究

福　原　信　義*

研究協力者　井　上　雄　吉**　吉　村　菜穂子**

Cytoplasmic body (CB) は，1962年 King Engel[1] によって最初に報告された封入体で，種々の神経筋疾患で時々認めるが，その成因についてはまだ明らかではない．Cytoplasmic body myopathy (CBM) は，このような封入体が多数出現して骨格筋の病理変化の主体をなしているものであるが，今までにその報告は非常に少ない．

今回我々は，成人発症で呼吸筋障害による肺胞換気不全を呈した CBM の1例を経験したので，本症の臨床的，病理学的特徴について文献的考察を加えて報告する．

## 症　例

患者：42歳，女性．

主訴：呼吸困難，頭痛，意識消失．

家族歴：両親が血族結婚であり，兄も56歳で呼吸筋障害による肺胞換気不全のため死亡しているが，その骨格筋にも多数の CB を認めており，本例と同一の疾患の可能性が考えられる．

既往歴：38歳時肝障害と蛋白尿を指摘されている．妊娠や分娩時に異常なし．

現病歴：生来健康であったが，25歳頃より歩行障害が出現し徐々に階段を昇ったり，走ったりすることが困難になった．36歳頃より朝起床時に頭痛を感ずるようになり，38歳の昭和56年4月下旬頃より夜間の呼吸困難が出現した．5月には，日中にも呼吸困難を感ずるようになり，意識も傾眠傾向となり，精査のため当科外来を受診したが，診察を待っている間に急に意識消失を来たして緊急入院した．

入院時所見：血圧100/74mmHg，脈拍102/分整，体温36.4℃．昏睡状態で，自発呼吸なし．瞳孔は縮瞳し，対光反射正常．眼底にうっ血乳頭を認めた．眼球は正中位で，人形の目現象陽性．項部硬直なし．深部反射や腹壁反射は消失し，病的反射は陰性であった．

動脈血ガス分析は，pH7.0，$PaO_2$54.9mmHg，$PaCO_2$153mmHg と著明な呼吸性アシドーシスを示していた．人工呼吸により意識は徐々に改善したが，人工呼吸を中止すると呼吸は微弱で $PaO_2$ と $PaCO_2$ の逆転が容易に起った．血液検査で軽度の肝機能障害と Cl の低下を認めたが，CPK は91 IU と正常であった．

意識清明後の神経所見では，知能や脳神経系に異常なし．四肢や体幹の筋肉は全体に萎縮性で，特に下肢の大腿部と下腿部，上肢遠位部に著明で，lumbar lordosis を認めた（図1）．筋力は，下肢近位部，特に大腿外転筋群で2と著明に低下していたが，その他の筋力は比較的よく保たれていた．線維束攣縮や仮性肥大は認めず，Gowers 徴候陽性で，動揺性歩行を呈し，深部反射は下顎反射以

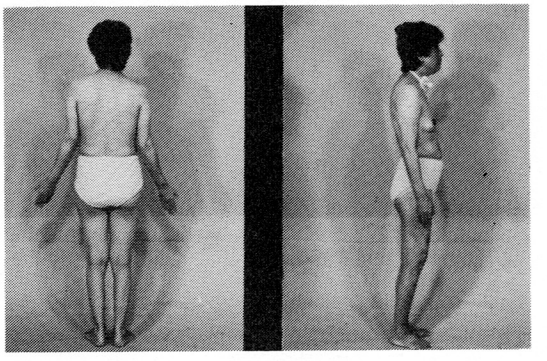


図1　患者全身像

＊金沢大学医学部神経内科
＊＊富山医科薬科大学第二内科

外は消失していた.

入院後検査所見：胸部写真での深吸気と深呼気時の横隔膜の位置は殆んど変化なく，呼吸機能も％VC50.6％，1秒率93％と拘束パターンを示した.経皮的横隔神経刺激試験では,潜時は左右各々8.8, 9.2msecと正常であったが,振幅は両側ともに200$\mu$Vと低下し，刺激閾値も増加していた.筋電図は，全体にmyopathic patternを示したが，一部の筋ではpolyphasic long durationのNMUの混入を認めた.末梢神経伝導速度は，脛骨神経のMCVが39.2m/secと軽度低下していたが，その他では正常であった.髄液検査では圧が270 mm$H_2O$と上昇していたが，蛋白や細胞数は正常で，頭部CTスキャン，テンシロン試験，前腕部筋阻血運動試験などにも異常は認めなかった.

筋生検は，両側大腿直筋と肋間筋で施行したが，その所見はほぼ同様であり，ここでは右大腿直筋生検の所見について述べる.HE染色（図2 a）では，筋線維の大小不同，中心核の増加，少数の小角化線維などがみられ，特徴的所見として赤紫色の異常構造物を有する線維を散在性に多数認めた.しかし，opaque fiberやbasophilic fiber，炎症細胞浸潤，線維化などの所見は認めなかった.Modified Gomori trichrome染色（図2 b）でも，うすく赤紫色に染まる異常構造物がみられ，その周辺部には赤色の封入体を多数認めた.PAS染色では，異常構造物は染色されずに虫喰い状にぬけてみえた.NADH染色では，異常はtype 1 fiberのみにみられ，異常構造物は染まらずに明るくぬけてみえ，またroutine ATPase染色ではfiber type predominanceやtype groupingの所見は認めなかった.

電顕（図3）では，electron-denseな楕円形またはamorhousな封入体が，subsarcolemmal regionやintermyofibrillar spaceに多数みられ，その周囲に方向不定性に走行するthin filamentを認めた.このような構造の周囲では，ミトコンドリアや他の細胞内小器官は殆んどみられず，隣接するmyofibrilではZ-band streamingが散見されたが，そのsarcomeric patternは比較的よく保持されていた.封入体の内部は，顆粒状構造物とthin filamentから成り，格子状構造は認めなかった.以上の封入体の所見は，従来報告されているCBの所見に一致すると思われた.また,顕著ではないがtubulo-reticular structureも散見され，さらにそれらがhoney-comb structureを形成している像も認めた.

以上の所見より,本例をCBMと診断した.凍結筋切片の一部を，WeberとOsbornの方法でSDSpolyacrylamideゲル電気泳動を行ったが,筋蛋白の組成に特に異常はみられなかった.入院後約3年半経過を観察しているが，下肢帯の筋力低下は徐々に進行しており，また夜間に時々レスピレーターの介助を必要とする状態が続いている.

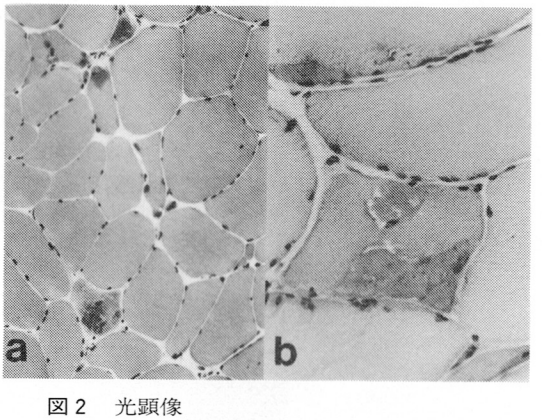



図2　光顕像
a．HE染色　×85
b．Gomori trichrome染色　×170

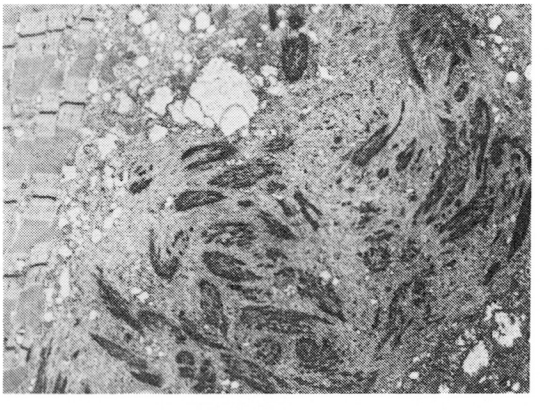


図3　電顕像　×3,600

CPKは，160～200IUとやや増加傾向にある．

## 考　　察

CBMは，我々の調べた範囲では1970年のNakashimaら[2]の報告以後現在までに表1に示す9報告21例が記載されている[2)~10)]．その臨床像をまとめると，常染色体優性遺伝の家族例15例，孤発例6例であり，男女比は3対2とやや男性に多い．発症年齢は1～53歳と様々で，20歳以後の成人発症例が9例(43%)みられる．筋力低下は，一般に四肢近位筋，特に下肢帯に優位であるが，稀に遠位筋優位の症例も報告されている[2),7)]．また，顔面筋や胸鎖乳突筋も各々24%，40%の頻度で侵される場合がある．本例の様に呼吸筋麻痺を呈した症例も5例(24%)認め，Kinoshitaら[3)]，Jerusalemら[6)]，Patelら[10)]は，発病初期より呼吸筋障害の著明な症例を報告しており注目される．心筋障害や骨格異常も稀に報告されている．CPKは，一般に正常～軽度上昇を示し，筋電図は通常筋原性変化を示すが，稀に神経原性変化や両者の混在を示すこともあるようである．経過は一般に緩徐で予後良好であるが，呼吸筋麻痺を早期から呈するものは予後不良である．

形態的所見のまとめを表2に示す．全例に共通した特徴は多数のCBの出現であり，組織化学的にこの封入体は，Edströnら[7)]の症例を除く全例においてtype 1 fiberにのみ出現している．また，小角化線維やgroup atrophyなどの神経原性変化を認めることもあるが，再生線維や炎症細胞の浸潤などを全く認めない点は特徴的で注目される．電顕では，CBのほか，filamentous bodyやtubuloreticular structureなどもしばしば認め，また10nmのintermediate filamentの増加やZ-bandの異常も報告されている．以上の様なCBMの臨床的，形態的特徴は，我々の症例の所見とよく一致していると思われる．本例の場合，同胞にも同様の所見を認めており，また両親が血族結婚であることから常染色体劣性遺伝型式をとっている可能性もあり興味深い．

本症の成因を考える上で，CBの起源の解明が重要である．今までの報告では，Z-band由来，変性したmyofibril由来，intermediate filament由来とするものなど様々であるが，Edströmら[7)]の意見はこの点に関して注目すべき点がある．彼ら

表1　Clinical features in cytoplasmic body myopathy

| | Nakashima et al. (1970) | Kinoshita et al. (1975) | Clark et al. (1978) | Goebel et al. (1978) | Jerusalem et al. (1979) | Edström et al. (1980) | Goebel et al. (1981) | Wolburg et al. (1982) | Patel et al. (1983) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Family history | - | - | +(AD) (3) | +(AD) (5) | - | +(AD) (4) | - | - (2) | +(AD) (3) |
| Age | 53 | 22 | late life | 9-52 | 22 | 54-58 | 15 | 32 | 14-55 |
| Sex | M | F | M & F | M & F (4) (1) | F | M & F (3) (1) | F | M & F (1) (1) | M & F (2) (1) |
| Age at onset | 53 | 16 | mean 53 | 1-31 | childhood | 39-43 | early infancy | infancy | infancy -childfood |
| Muscle weakness | | | | | | | | | |
| face | - | + | - | +(2) | - | - | + | +(1) | +(1) |
| sternomastoid | + | + | - | - | + | +(2) | NR | + | +(2) |
| extremeties | D>P | P>D | P>D | P>D | P>D | D>P | P>D | P≒D | P>D |
| respiratory | NR | + | - | - | + | +(1) | - | - | +(2) |
| cardiac | NR | - | - | - | NR | NR | - | +(1) | +(1) |
| others | | | | | | pseudo-hypertrophy | | scoliosis | scoliosis |
| Tendon refleses | absent | absent | decreased | decreased | N | NR | decreased | NR | decreased or N |
| CPK | ↑ | N | N or ↑ | N or ↑ | N | ↑↑ | ↑ | N or ↑ | ↑ or N |
| EMG | Neuro | Myo | Myo | Neuro or Myo | Neuro | Myo | Myo | Myo | Myo |
| NCV | N | NR | NR | NR | ↓ | N | NR | NR | N(2) |
| Cardiorespiratory failure | - | + | - | - | + | +(1) | - | NR | +(2) |
| course | benign | malignant | benign | benign | malignant | semi-malignant | benign | NR | malignant |

NR: not recorded, N: normal, ↑:slightly elevated, ↑↑:moderately elevated

表2　Morphological findings in cytoplasmic body myopathy

| | Nakashima et al. (1970) | Kinoshita et al. (1975) | Clark et al. (1978) | Goebel et al. (1978) | Jerusalem et al. (1979) | Edström et al. (1980) | Goebel et al. (1981) | Wolburg et al. (1982) | Patel et al. (1983) | Present case |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fiber diameter variation | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Internal nuclei | * | inc. | * | inc. | inc. | inc. | inc. | inc. | inc. | inc. |
| Regeneration | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inflamatory cell infiltration | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Small angular fiber | - | - | - | + | - | - | + | * | - | + |
| Group atrophy | - | - | - | + | + | - | - | + | - | ± |
| Fiber predominance or grouping | * | * | - | 1 | - | - | 1 | * | - | - |
| Z-band change | + | * | * | + | + | + | * | + | + | + |
| Filamentous body | + | * | * | - | - | + | + | + | + | - |
| Tubuloreticular structure | + | * | * | + | - | + | + | - | - | + |
| Cytoplasmic body & fiber type | * | * | 1 | 1 | 1 | 1 & 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |

+: present, -: absent, *: not recorded

は，電顕にて intermediate filament が増加していること，抗 desmin 抗体で CB が陽性に染まること，および SDS-ゲル電気泳動で分子量55,000の desmin の増加を認めたことより，CB の形成に desmin が重要な関係があると述べている．この説は，intermediate filament から成る平滑筋細胞の dark body が CB と形態的に類似していることからも興味が持たれる．本例では SDS-ゲル電気泳動では特定の蛋白の増加を認めなかったが，この方法では myofibrillar protein のみでなく可溶性成分の混入している可能性もあり，今後ミクロ2次元電気泳動法や免疫組織化学的手法を用いての検討が必要と考えている．

## ま と め

CB の出現を主たる形態的特徴とする今までの症例は，臨床的にも病理学的にも類似性が大きく，CBM は一つの疾患単位として注目してよいと思われる．

## 文　献


1) Engel, W. K. : The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. Neurology (Minneap.), 12 : 778-794, 1962.

2) Nakashima, N., Tamura, Z., Okamoto, S., et al. : Inclusion bodies in human neuromuscular disorder. Arch. Neurol., 22 : 270-278, 1970.

3) Kinoshita, M., Satoyoshi, E. & Suzuki, Y. : Atypical myopathy with myofibrillar aggregates. Arch. Neurol., 32 : 417-420, 1975.

4) Clark, J. R., D'agostins, A. N., Wilson, J., et al. : Autosomal dominant myofibrillar inclusion body myopathy : clinical, histologic, histochemical, and ultrastructural characteristics. Neurology (Minneap.), 28 : 399, 1978.

5) Goebel, H. H., Muller, J., Gillen, H. W., et al. : Autosomal dominant "spheroid body myopathy". Muscle & Nerve, 1 : 14-26, 1978.

6) Jerusalem, F., Ludin, H., Bischoff, A., et al. : Cytoplasmic body neuromyopathy presenting as respiratory failure and weight loss. J. Neurol. Sci., 41 : 1-9, 1979.

7) Edström, L., Thornell, L. E. & Eriksson, A. : A new type of hereditary distal myopathy with characteristic sarcoplasmic bodies and intermediate (skeletin) filaments. J. Neurol. Sci., 47 : 171-190, 1980.

8) Goebel, H. H., Schloon, H. & Lenard, H. G., :

Congenital myopathy with cytoplasmic bodies. Neuropediatrics, 12 : 166-180, 1981.

9) Wolburg, H., Schlote, W., Langohr, H. D., et al. : Slowly progressive congenital myopathy with cytoplasmic bodies : report of two cases and a review of the literature. Clin. Neuropathol., 1 : 55-66, 1982.

10) Patel, H., Berry, K., MacLeod, P., et al. : Cytoplasmic body myopathy : report on a family and review of the literature. J. Neurol. Sci., 60 : 281-292, 1983.

# 14）福山型先天性筋ジストロフィー症の筋細胞膜の変化について——I.Freeze fracture 法による caveolae 密度の検討

若 山 吉 弘*

研究協力者　熊 谷 俊 幸** 渋 谷 誠 二*

## はじめに

筋ジストロフィー症の病因として筋細胞膜異常が注目され，本症では異常な筋細胞膜を通して多量に細胞内に流入したCaイオンによりCANP等各種プロテアーゼが活性化され筋細胞変性が進むと考えられている．そこで我々は今迄この筋ジストロフィー症における筋細胞膜異常に注目し，Duchenne型筋ジストロフィー症（以下DMDと略す）をはじめ各種筋ジストロフィー症でその筋細胞膜の内部構築をfreeze-fracture法を用いて検討してきたが，DMDでみられるような筋細胞膜の変化は顔面肩甲上腕型やmyotonic dystrophyではみられず，DMDに特異的な変化のように思われた．そこで今回は本邦に比較的多く，また本邦の臨床研究者により確立された福山型筋ジストロフィー症（以下FCMDと略す）の筋細胞膜の変化をDMDと比較検討し，DMDの筋細胞膜の変化の特異性を検討する目的で本年度は特に筋細胞膜のcaveolae密度を中心に研究した．

## 材料と方法

FCMD 6例，組織化学的に正常な大腿四頭筋をもつ整形外科手術例6例よりの大腿四頭筋生検筋をU字型筋鉗子にはさみ直ちに4°Cに冷却した2.5%グルタールアルデヒド水溶液中で2時間固定した．また生検筋の一部は組織化学的検索用としてH・E, Gomori trichrome, DPNH, ATPase (pH 9.4, 4.6, 4.3) 染色を行った．電顕標本はU字型筋鉗子にはさみグルタールアルデヒド固定標本の一部を取り出し，細切し，2%オスミウム酸水溶液で2時間後固定し，エチルアルコールの上昇系列とプロピレンオキサイドにて脱水しエポンに包埋した．1 μの厚切り切片をトルイジンブルーにて染色し光顕にて観察，希望の部位を残じてトレミングしてから薄切，Ur. Pbの2重染色後，電顕にて観察した．またfreeze-fracture法のための標本としてU字型筋鉗子にはさみグルタールアルデヒド固定した標本の一部を細切し，10%，20%，30%グルセリン水溶液中で，それぞれ筋組織を室温で30分浸軟したものを用いた．浸軟後直ちに液体窒素にて凍結し，Eiko FD II凍結割断装置に装着した．真空度2.5— 4 ×$10^{-7}$ Torrで−120℃にて割断し直ちに電子銃にてプラチナとカーボンを蒸着し，レプリカ膜を作製した．レプリカ膜の厚さは水晶発振子により監視し一定にした．筋組織の付着したレプリカ膜は市販の塩素系漂白剤にて筋組織を消化し，蒸留水にて3回洗浄後，グリッドにすくい電顕にて観察し写真を撮影した．この場合筋線維の同定は1)低倍にてsarcomereの外観がみえるもの，2)連続する内部構造に筋原線維がみえるもの，3)細胞膜にorthogonal arrayやそのpitsが存在するものなどで行い，またレプリカ膜の良否は1)細胞外空間がなめらかであるもの，2)筋細胞膜内粒子に大小不同が明らかであり，back ground textureがきめ細かく，かつ3)膜内粒子やorthogonal arrayのpitsがはっきり同定できるものなどで決めた．

次にcaveolaeは正常筋線維ではsarcomereのA-I junctionを含んだI帯に多く，A帯には比較的少ないので，sarcomere全体が視野に入るよう

＊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

比較的低倍の写真を用いるため，最終倍率40,000倍で焼付けた．このなかから正常対照群およびFCMD群のそれぞれ1例につき5P面，5E面をat randomに取り出し，1枚のP面ないしE面の写真からsarcomere全体が入るよう少なくとも10$\mu m^2$以上29.6$\mu m^2$まで（平均約20$\mu m^2$）のareaに分布するすべてのcaveolaeからその密度を算出した．正常対照群60枚，FCMD群60枚のcaveolae密度から両群間の有意差を統計的に検討した．

## 結　　果

FCMD生検筋の光顕的検索では筋線維の大小不同，変性，再生筋線維やPhagocytosisの存在，内在核の存在，著明な間質結合織の増生がみられ，とくに発症早期からみられる間質結合織の増加はDMDと本症とを区別する筋生検所見上での大きな相違点である．エポン包埋の厚切り切片では変性筋線維でも変性の程度が軽いものでは筋線維の表面に底辺を置く楔形をしたいわゆる$\delta$-lesionがみられるが（図1）通常の凍結切片のHEやGomori-trichrome染色標本ではこのような$\delta$-lesionはみられない．これには多分切片の厚さが関係しているものと思われる．このような$\delta$-lesionをもつ筋線維を電顕的に観察してみると図2にみられるように筋原線維は疎しょう化し，mitochondriaの膨化，sarcotubular systemの拡張よりなる空胞形成や，secondary lysosomeなどがみられ，特に注目されるのは筋線維の基底膜は残存しているものの，原形質膜が断裂しているのが観察される．

さて次に凍結割断法にて筋細胞膜内面構造を観

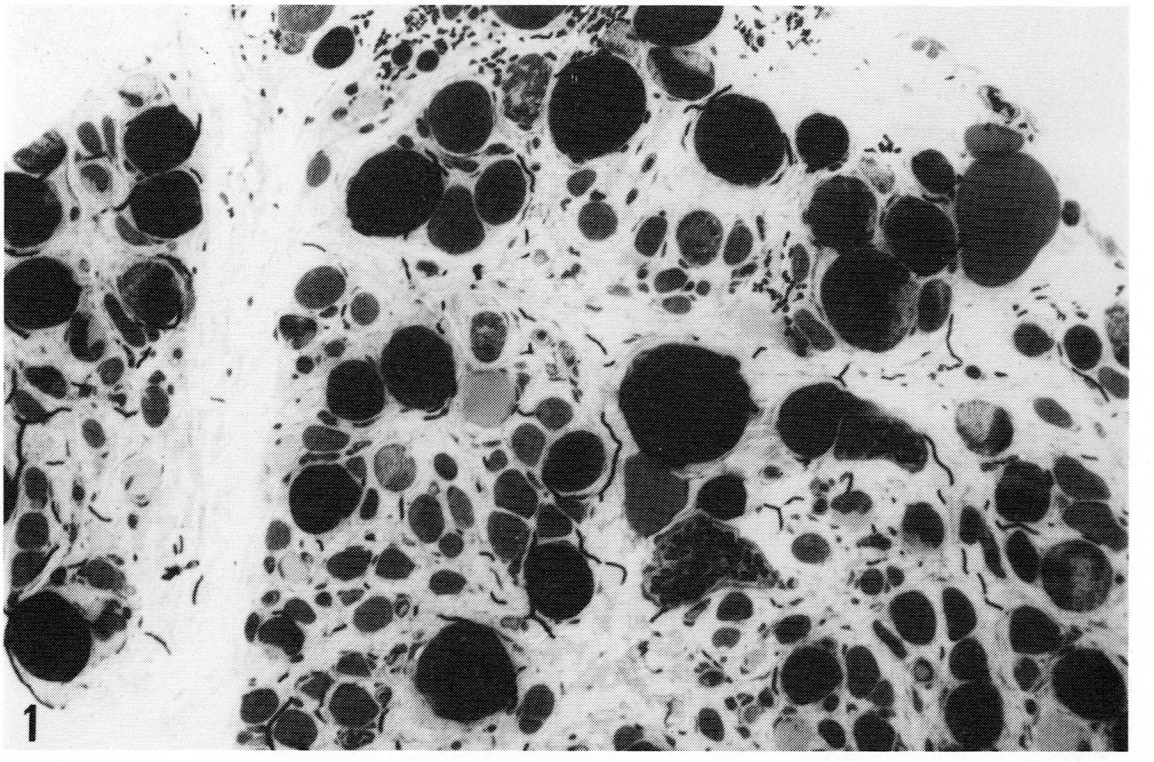



図1　FCMD生検筋のグルタールアルデヒド・オスミウム酸2重固定，エポン包埋標本の厚切り切片の光顕写真，筋線維の著明な大小不同，円形化，トルイジン青に濃く染まる変性筋線維と筋原線維が疎しょう化し，細胞表面に底辺を置くいわゆる$\delta$-lesionなどがみられる．（×250）

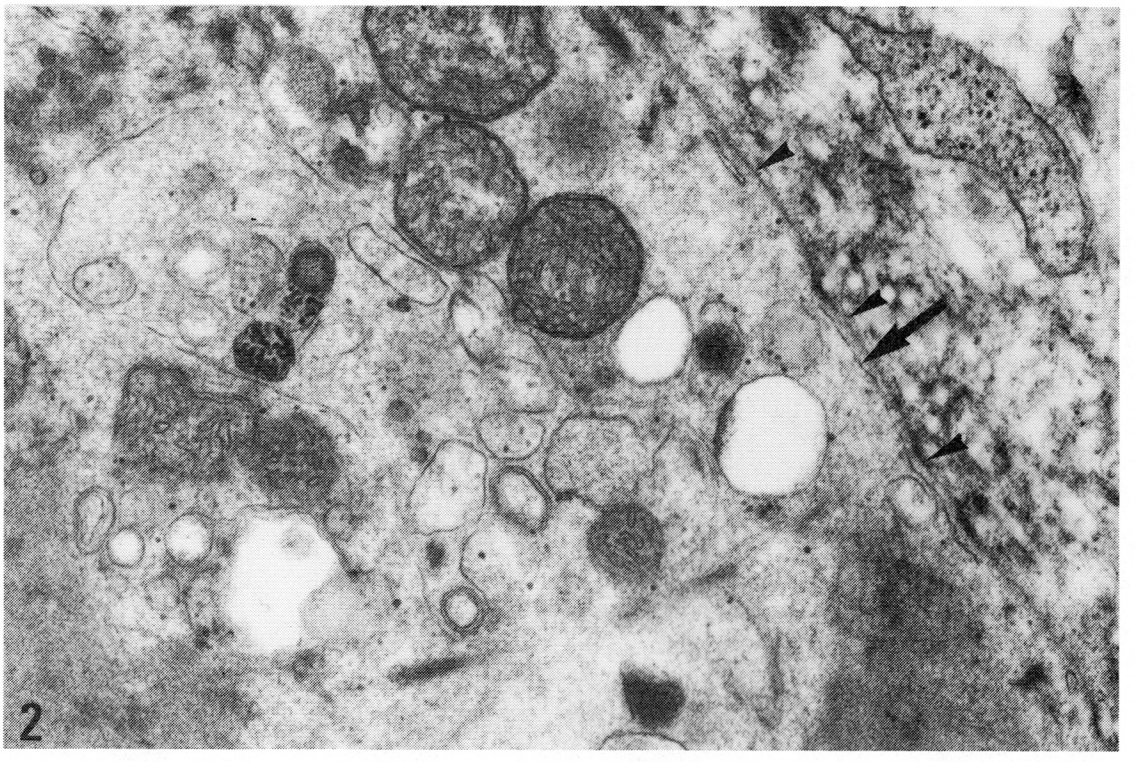



図2　FCMD生検筋の変性筋線維像．基底膜（矢尻）はよく保たれているが，筋細胞膜（矢印）は断裂している．筋細胞の内部では筋原線維は疎しょう化し，sarcotubular systemの拡張による空胞形成やelectron dense bodiesなどlysosomeの存在がみられる．（×35,000）

察してみると，まず細胞質側のP面と細胞外腔側のE面ともにcaveolaeがみられ，P面ではcaveolaeの辺縁がsmoothであり，E面では辺縁がやや隆起している．このようなcaveolaeはヒトも含め脊椎動物ではA-I junctionを含むI帯に多いが，このような傾向は本研究でも対照群，FCMD群ともにあるように思われた．ここでcaveolae密度はgroup mean±standard error of the meanが正常群で18.11±1.59，FCMD群で19.25±1.18であり，両群間で統計的に有意差はみられなかった（P>0.5，表1）．

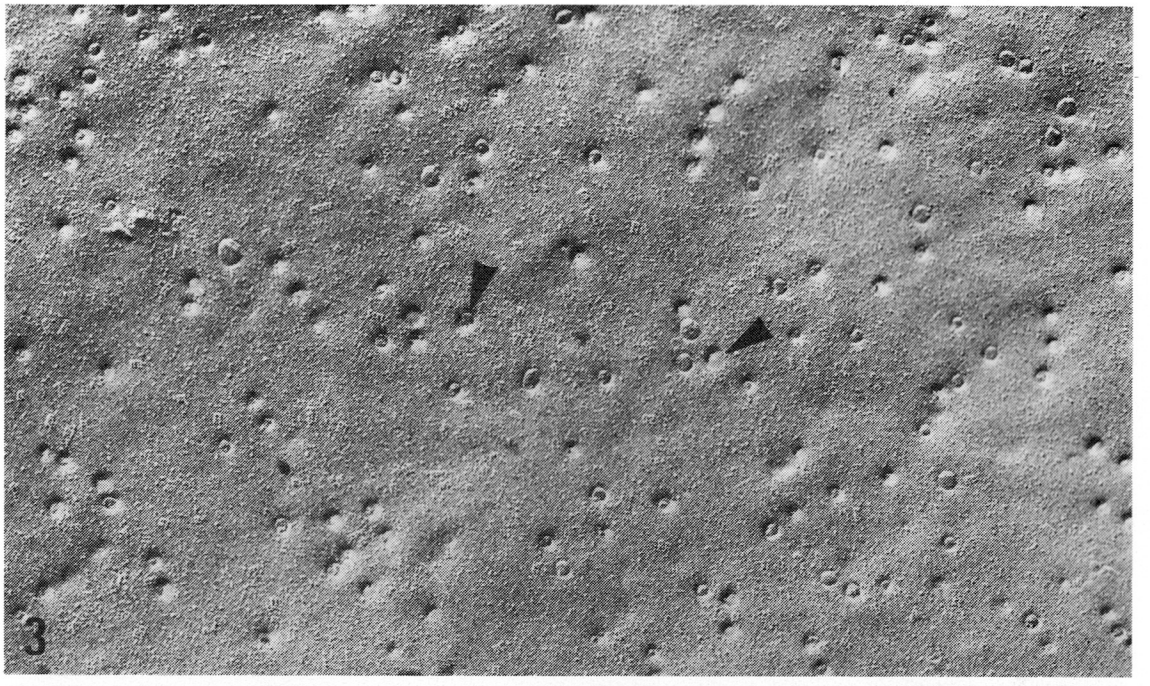
表1　Caveolae density per square micron in muscle plasma membrane of normal and Fukuyama type congenital muscular dystrophy（FCMD）

| FCMD | Normal |
|---|---|
| 19.76 ± 6.23[a] | 18.35 ± 5.19[a] |
| 16.42 ± 7.36 | 15.25 ± 3.23 |
| 19.77 ± 5.88 | 18.17 ± 3.74 |
| 15.55 ± 5.59 | 21.32 ± 2.91 |
| 23.44 ± 5.31 | 23.11 ± 7.48 |
| 20.54 ± 8.01 | 12.46 ± 1.67 |
| 19.25 ± 1.18[b*] | 18.11 ± 1.59[b*] |

a: Mean ± standard deviation for each case
b: Group mean ± standard error of the mean
* P>0.5(two tailed t test)

## 考　　察

FCMDは生直後より筋緊張低下や筋力低下，関節拘縮，mental retardation，けいれん発作がみられ，生検筋は筋線維径の大小不同，変性再生像やphagocytosis，それにDMDと異なり病初期より著明な間質結合織の増加がみられる．しかし光顕や従来の透過電顕による観察では筋線維そのも



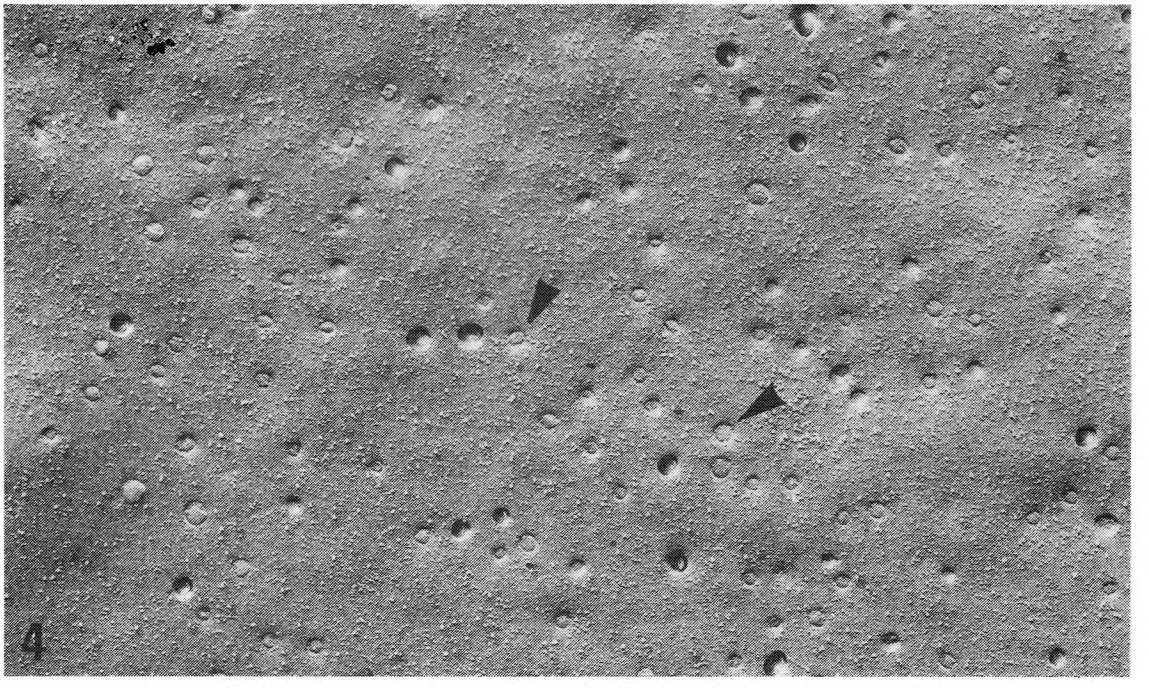




図3，4　Freeze fracture 標本の電顕写真で，図3は正常対照P面，図4はFCMDのP面を示す．両図ともcaveolaeは矢尻で示されるが，両者に明らかな分布密度の差はみられない．（×40,000）

のの変性様式はDMDのそれと変わらなかった．従ってこのような筋線維の変化を来たす筋細胞膜の内部構造を解析し，その変化をDMDのそれと比較検討する手始めとして本年度はcaveolae密度について検索した．

caveolaeの生理学的役割については充分解明されてはいないが，現在3つの考えがある．

1)membrane reservoirとしての役割で，これは元来，平滑筋について伸展状態で働くものと考えられたが，骨格筋では当てはまらないとされている．

2)横管系の一部としてのcaveolae．横管は筋細胞膜表面のcaveolae様構造より形成されるので，脊椎動物では横管の開口部はA-I junctionであり，ヒトの筋細胞膜ではA-I junctionも含めI帯部にcaveolaeが多い．

3)pinocytotic vesicleとしてのcaveolae．筋細胞は筋細胞膜とともにそのpinocytotic activityにより細胞外腔と活発な物質交換をおこなっている．

本研究ではFCMD群では正常対照群に比し統計的に有意なcaveolae密度の差はみられなかった．DMDについては我々自身ではcaveolae密度の検討をおこなってはいないが，3つの研究にてcaveolae密度の増加が報告されている[1)2)3)]．もしこれが確かであると仮定すれば，FCMD筋ではDMD筋と何らかのpathophysiologicな差が存在するのかもしれない．例えば培養ヒト骨格筋ではcaveolaeが非常に少ないと報告されている[4)]し，また虚血筋線維でもcaveolae密度は減少傾向が出てくる[5)]ので，FCMD筋には再生筋線維や変性筋線維の密度がDMD筋のそれとは異なる可能性もある．今後DMD筋のcaveolae密度の検討をし，FCMD筋のそれとの詳細な検討をおこないたい．また来年度にはこの続きとしてorthogonal arrayをも含めた膜内粒子の分布様式やその分布密度の解析へと進んでゆきたい．

## 文　献


1) Ketelsen UP：Quantitative freeze fracture studies of human skeletal muscle cell membranes under normal and pathological conditions. In Angelini C, Danieli GA, Fontanari D, eds. Muscular dystrophy research advances and new trends. Amsterdam：Excerpta Medica, 1980, p 79-87.

2) Bonilla E, Fischbeck K, Schotland DL：Freeze fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. Am J Pathol, 104：167-173, 1981.

3) Mora M, Protti A, Cornelio F, Peluchetti D：freeze fracture contribution to the membrane theory of Duchenne muscular dystrophy. Ital J Neurol Sci Suppl 3：97-102, 1984.

4) Osame M, Engel AG, Rebouche CJ, Scott RE：Freeze-fracture electron microscopic study of cultured muscle cells in Duchenne dystrophy. In：Schotland DL ed. Disorders of the motor unit. New York：John. Wiley & Sons, 1982, p 489-501.

5) Wakayama Y, Okayasu H, Kumagai T：Quantitative freeze-fracture electron microscopic study of muscle plasma membrane of experimental anoxic myopathy. J Neurol Sci 63, 411-421, 1984.

# III. 膜，カルシウム，Creatine Kinase

# 15) Toxin-アフィニティーによる骨格筋形質膜の分離法

桃　井　真里子*

研究協力者　太　田　敏　子**　鴨　下　重　彦*

筋ジストロフィー症の成因・病態における膜異常説は近年注目されており，細胞内の筋小胞体膜系に関しては広く検討されているが，形質膜は細胞内膜系に比して著しく少量であり，分離が困難であることから生化学的情報が少ない．形質膜は筋細胞の分化，機能に極めて重要な役割を持ち，ジストロフィー筋においても形質膜酵素の活性の変化など，一次的異常を示唆する報告もある．本研究では従来の非特異的分離法に代わるものとして，筋形質膜に存在するアセチルコリン・リセプター（AChR）に対するアフィニティーによる形質膜分離を検討した．固定相として *naja naja siamensis* α-neurotoxin をリガンドとし，担体として agarose と polystylene culture dish の2つを用い，各々による膜分離を比較検討した．

## 方　法

**粗膜画分の分離**　ラット後肢筋より図1の方法にて骨格筋粗膜画分を分離[1]．ppt 4 を Buffer C に再浮遊し，更にアフィニティー分離に供した．

**Toxin-アフィニティーによる膜分離**　*naja naja siamensis* α-neurotoxin (Sigma) を CNBr-活性化 Sepharose-6MB にカップリングさせ，0.1 mgToxin／ml ゲルとした．粗膜画分（蛋白量47.4 mg）を5mlToxin-agarose と 4 ℃，24h 反応後，カラムに充填し，buffer C で洗浄後，1M Carbamylcholine にて溶出し，177,000×g，50分間遠心し，沈渣を回収膜画分とした．Dish 法[2]では，培養用 polystylene dish（内径5ml，Lux 社）を担体とした．PBS に溶解した Toxin (1mg/ml) を3ml 加え，4 ℃，24h インキュベート後，溶液を除き，PBS にて2回静かに洗浄し，更に3％ BSA3ml を加え 4 ℃，12h 反応したものを用いた．対照として3％ BSA とのみ反応させた Dish を用いた．Toxin-coated dish 内に粗膜画分（蛋白量9.48mg/ml）を加え，4 ℃，24h インキュベート後　溶液を除去し，PBS にて軽く2回洗浄後，1M Carbamylcholine 3ml を加え 4 ℃，5～6 h インキュベートし，溶液を回収後，177,000×g，50分間遠心し，沈渣を回収膜画分とした．

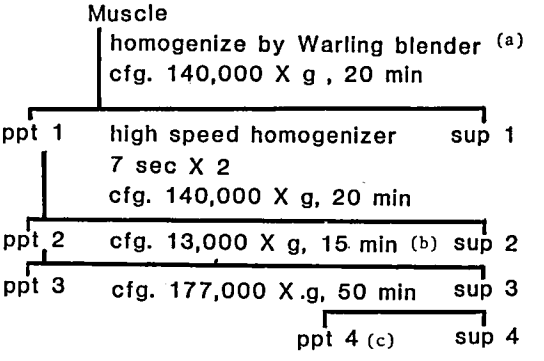



図1　ラット後肢筋からの粗膜画分の調整
(a)　Buffer A：0.3MKCl, 0.25M ショ糖，25mM ピロリン酸ナトリウム，10 mM トリス-マレイン酸，1mM ジチオスレイトール (pH7.5).
(b)　Buffer B：0.25M ショ糖，10mM トリス-マレイン酸，1mM ジチオスレイトール (pH7.5).
(c)　Buffer C：10mM トリス-マレイン酸，1mMATP (pH7.5). ppt 4 を粗膜画分とした．

**形質膜マーカーの測定**　形質膜マーカーとして Ouabain-sensitive $Na^+/K^+$ATPase，AChR 活性

＊自治医科大学小児科
＊＊自治医科大学生物

を用い，混入成分の指標としてOuabain-insensitive $Na^+/K^+$ATPaseを用いた．$Na^+/K^+$ATPase 活性はPostらの方法[3]により，0.4 mM Ouabainにより抑制される活性を，総活性から引いたものをOuabain-insensitive活性とした．AChR活性は，$^{125}$I-Bungarotoxin結合活性として測定した．膜画分を$^{125}$I-Bungarotoxin (excess) と室温1h反応後，DEAEセルロース・フィルター上で非結合$^{125}$I-toxinを除き，フィルターをσ-カウンターで測定．1 M Carbamylcholineと室温1hプレインキュベートしたものをバックグラウンドとした．

**SDS-ポリアクリルアミド電気泳動**　各サンプルを2％SDS，5％2-メルカプトエタノール中にて100℃，3分間ボイル後，10％SDS-ポリアクリルアミドゲル上にて100V，6h泳動[4]し，Coomassie brilliant blue R-250にて染色した．

**蛋白定量**　蛋白量はLowry法[5]により，BSAをスタンダードとした．

## 結　　果

**アフィニティーによる形質膜分離**　図2に示す様に，Toxin-coated dishには$10^{-15}$～$10^{-12}$ molesのAChRの約70％が結合し，一方，対照のBSA-dishへのAChR活性の吸着はみられなかった．従ってDish上に固定されたToxinは結合活性を保持した状態で固定されていると考えられた．Toxin-agarose上での膜分画の結果を表1に示す．AChR活性は約70％Toxin-agaroseに結合したが，1M Carbamylcholineによる溶出活性は1.5％であり，$Na^+/K^+$ ATPase活性，蛋白量共に感度以下であり，結合した形質膜はagaroseカラム内に留り，解離されなかった．一方，表2に示す様に，Toxin-coated dish上には，約77％のAChR活性が結合し，42.6％が1M Carbamylcholineにて遊離し，回収された．Ouabain-sensitive $Na^+/K^+$ ATPase活性は6％回収され，Ouabain-insensitive $Na^+/K^+$ ATPase活性は検出されなかった．AChR比活性は89倍増加し，Ouabain-sensitive $Na^+/K^+$ ATPase比活性は12倍の増加を示した．形質膜の内，AChRを含まず$Na^+/K^+$ ATPaseのみの膜片はToxin-coated dishに結合せず回収されなかった事を示している．従って，膜細片の大きさと形質膜回収率は密

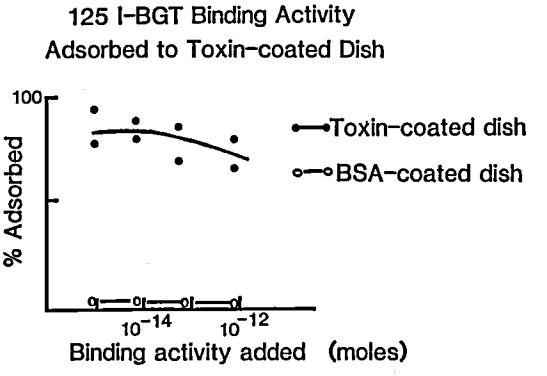



図2　Toxin-coated dishへのAChRの結合
電気器官より精製したAChR ($10^{-15}$～$10^{-12}$moles) をToxin-coated dishと4℃，24h反応後，非結合上清のAChR活性を測定し，結合AChRの％を求めた．

表1　Preparation of muscle membrane by Toxin-Sepharose 6MB

| Fraction | Protein (mg/ml) | Protein (total mg) | $Na^+/K^+$ ATPase (μmol Pi/mg prot/h) ouab-sen | ouab-insen | (μmol Pi/h) ouab-sen | ouab-insen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Applied | 9.48 | 47.4 | 1.78 | 0.517 | 84.0 | 24.5 |
| Unbound | 8.37 | 41.8 | 1.81 | 0.580 | 75.6 | 24.2 |
| 1 M Carbachol | – | – | – | – | – | – |

| | $^{125}$I-BGT binding (pmol/mg prot) | (total pmol) |
|---|---|---|
| Applied | 0.0114(X1) | 0.540 (100%) |
| Unbound | 0.0039 | 0.166 (30.8%) |
| 1 M Carbachol | – | 0.008 (1.5%) |

表2　Preparation of muscle membrane by Toxin-coated dish

| Fraction | Protein (mg/ml) | Protein (total mg) | $Na^+/K^+$ ATPase (μmol Pi/mg prot/h) ouab-sen | ouab-insen | (μmol Pi/h) ouab-sen | ouab-insen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Applied | 9.48 | 9.48 | 1.78 | 0.517 | 16.8 | 4.9 |
| Unbound | 9.02 | 9.02 | 1.64 | 0.588 | 14.8 | 5.3 |
| 1 M Carbachol | 0.671 | 0.046 | 21.5 | – | 0.989 | – |

| | $^{125}$I-BGT binding (pmol/mg prot) | (total pmol) |
|---|---|---|
| Applied | 0.0114 (X1) | 0.118 (100%) |
| Unbound | 0.00276 | 0.0249 (23%) |
| 1 M Carbachol | 1.01 (X89) | 0.0460 (42.6%) |

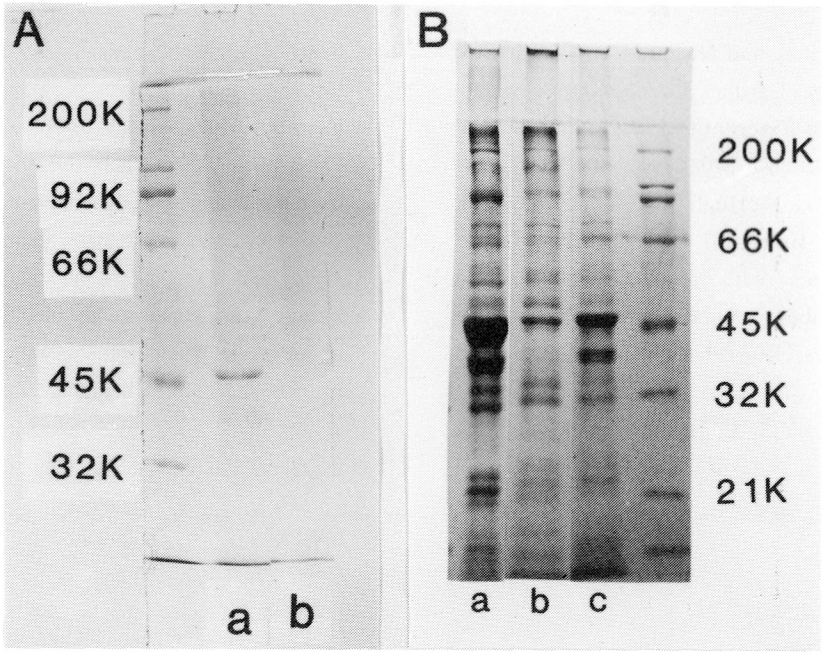



図3　SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
(A)　対照 dish への非特異的結合蛋白.
(B)　Toxin-coated dish への結合，非結合画分.

接に関係すると考えられる．high-speed homogenizer による細切を7秒間，3回行うと，AChR 活性の回収率は35%と著変なかったが，$Na^+/K^+$ ATPase は6%から3.7%と減少し，7秒間，7回では，後者は検出しえなかった．

**SDS—ポリアクリルアミドゲル**　図3に対照 dish から1M carbamylcholine により回収された画分の10%ゲル上での分析を示す．uncoated dish からは45K の蛋白が検出された（A—a）．uncoated dish 底に非特異的に吸着した actin の非特異的遊離と考えられる．BSA-coated dish からは染色しうるバンドは検出されず，coated dish 上への非特異的吸着は無視しうると考えられた（A-b）．Toxin-coated dish への非結合画分は結合画分に比して45K が多く38K39K の2バンドは非結合画分にのみ認められた(B)結合画分の各蛋白の同定は今後検討の予定であるが，形質膜マーカーの比活性の増大，及び Ouabain-insensitive $Na^+/K^+$ ATPase 活性との比較からは，形質膜が高濃度に分画されていることが推定される．

## 結　　論

筋形質膜画分は，Toxin-coated polystylene dish による AChR に対するアフィニティーを利用することにより，より単純な方法にて分画された．AChR は成熟筋細胞膜上では主にシナプス後膜に cluster を形成していることから，膜細片作成の条件が収率に大きく影響し，$Na^+/K^+$ ATPase の収率は AChR 収率に比して低かったが，AChR が cluster を形成しない培養筋細胞などにおいては収率はより高いことが推定される．又，他の形質膜上に特異的に表現されている分子，例えば Fucose を含むオリゴ糖，トランスフェリンリセプター，等によるアフィニティーを利用しての形質膜分離にも応用しうると考えられる．培養細胞，生検筋などの微量サンプルの形質膜分離には，特異的結合を利用する本法が殊に有用であろうと思われ，今後，収率の増加を目的とした条件の検討を更に行い，ジストロフィー筋の形質膜分離，生化学的検討を行う予定である．

## 文　　献


1) Philipson, K.D. and Nishimoto, A.Y. : Efflux of $Ca^{2+}$ from Cardiac Sarcolemmal Vesicles-Influence of External $Ca^{2+}$ and $Na^{+}$., J. Biol. Chem., 256 : 3698-3702, 1981.

2) Mage, M.G., McHugh, L.L. and Rothstein, T.L. : J. Immunol. Methods Mouse Lymphocytes with and without surface immunoglobuin : preparative scale separation in polystylene tissue culture dishes coated with specificically purified anti-immunoglobulin., J. Immunol. Methods, 15 : 47-56, 1977.

3) Post, R.L. and Sen, A.K. : Sodium and Potassium-stimulated ATPase. : Methods Enzymol., 10 : 762-768, 1967.

4) Laemmli, U.K. : Cleavage of Structural protens during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4., Nature (Lond.), 227 : 680-685, 1970.

5) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. et al. : Protein Measurement with folin phenol reagent. ; J. Biol. Chem., 193 : 265-275, 1951.

# 16）インタクト赤血球からのPPI抽出分離法と筋ジストロフィー症赤血球への応用

吉田瑞子*

研究協力者　安藤一也*

## 目的

私達は筋ジストロフィー症の細胞膜異常は，細胞膜の刺激応答に関与する$Ca^{2+}$調節機構，即ちイノシトールリン脂質代謝にあると考えている．そこで筋細胞のモデルとして赤血球を用いて，イノシトールリン脂質の検索を行うが，今だにintact赤血球からポリホスホイノシタイド（PPI：diphosphoinositide；DPI，triphosphoinositide；TPI）の抽出方法がなく，ghostより抽出されている．というのは血色素をPPIより分離出来ないためである．しかしイノシトールリン脂質系の代謝回転は非常に早く，その含量を調べるには，いち早く酵素活性を失活させねばならない．ghostを調整する間に，PPIは代謝すると考えられる．そこで私達はintact赤血球よりPPI抽出を試み，得られた方法をDnchenne型筋ジストロフィー症（DMD）の赤血球に応用した．

## 方法

**赤血球の調整**：赤血球は18～23歳の健康男子（8名）と同年齢のDMD患者（10名）の新鮮ヘパリン血より得た．その赤血球を$Ca^{2+}$（0.9mM）を含むリン酸緩衝食塩水で3回洗浄し，43～45%ヘマトクリット値の浮遊液とした．処理は総て0℃で行った．

**PPIの抽出**：はじめにPPI以外のリン脂質抽出を行った．1.5ml赤血球浮遊液に，4倍量の$CHCl_3$：MeOH＝2：1（60$\mu$mol Ca/g cells[1]を含む）を加え，撹拌後20分間放置した。次いで，C：M＝1：1になるように，$CHCl_3$を加え撹拌し，一晩4℃に放置後遠心によりsupernatantとresidueに分離した．そのresidueを6.7倍量のC：M＝2：1で2回洗浄抽出した．supernatantを総て合わせ，総リン脂質定量の試料とし，residueはPPI抽出の試料とした．

茶黒色のresidueに，6.7倍量の0.25%濃塩酸を含むC：M＝2：1を加え，撹拌後遠心（2,750×g，20分，0℃～4℃）を行い，supernatantを得た．次いでresidueに6.7倍量の同一酸性C：M＝2：1を加え，撹拌を数回行いながら一時間放置後，同一条件で遠心しsupernatantを得た．さらに3.4倍量の同一溶媒をresidueに加え，同様に処理しsupernatantを得，前2回の抽出液と合わせた．

全抽出液をその1/5倍量のIN-HClで洗浄し，上層とbuffy coatを除去し，下層を得た．その下層を，その2/3量のC：M：IN-HCl＝3：48：47で2回洗浄した．洗浄した下層に，その組成がC：M＝2：1になるようMeOHを加え，MeOHで稀釈した$NH_4OH$でpH7.6～7.8に調整した．pH調整はpHメーターで検出し，pH試験紙も併用した．

中和したPPI抽出液に，その1/5量の1.5M KClを加え，良く撹拌後2層分配した下層を得た．上層にはその2倍量の$CHCl_3$を加え，撹拌し，その下層を前回の下層に加えた．その下層を$N_2$気流中で蒸発乾固し，C：M：$H_2O$＝75：25：2で溶解した．不溶物は遠心（4,400×g，20分，0℃～4℃）により除去し，再び$N_2$気流中で蒸発乾固した後，50$\mu$lのC：M：$H_2O$＝75：25：2で溶解し，薄層クロマトグラフィーの試料とした．総ての操作は明記した以外0℃で行った．

*国立武蔵療養所神経センター

**PPI の分離**：PPI 分離はシリカゲル60薄層板を用いて，二次元展開法で行った．シリカゲル60薄層板は，メルク社の HPTLC を１％しゅう酸カリウムの MeOH：$H_2O$＝２：３の溶液に漬け，しゅう酸カリウムを含ませ，110℃で１時間乾燥したものを使用した．

赤黒色で不溶物も含む PPI 溶液を**写真１ A** の様に，TLC 上にプロットし，C：M：28% $NH_4OH$＝65：35：５で一次元展開を行った．トップまで展開した薄層板を取り出し，$N_2$気流中で20分間乾燥後再び一次展開を行った（**写真１ B**）．色素を一次元展開方向に移動させるため“展開―乾燥”を繰返した．色素が原点より充分離れた後，１時間 $N_2$気流中で乾燥し，二次元展開を行った．二次元展開液は $CHCl_3$：$(CH_3)_2CO$：$CH_3OH$：$CH_3COOH$：$H_2O$＝40：17：15：12：８を用いた．

**DPI，TPI の検出と定量**：DPI と TPI の検出はヨード蒸気中で行った．定量は Bartett 法[2] を改良した方法でリン定量を行った．薄層板より DPI, TPI のスポットをかき取り，それを70%過塩素酸で灰化した後，Fiske-Subbarow 還元試薬，５％モリブデン酸アンモニウムと水を加え，７分間沸騰水浴中で加熱発色させた．冷却後820mμ で比色した．

## 結果と討論

**PPI 抽出と分離**：0.25%を含む C：M＝２：１を residue に加え攪拌すると赤茶色の血色素が溶出して来た．PPI と血色素は分離することは不可

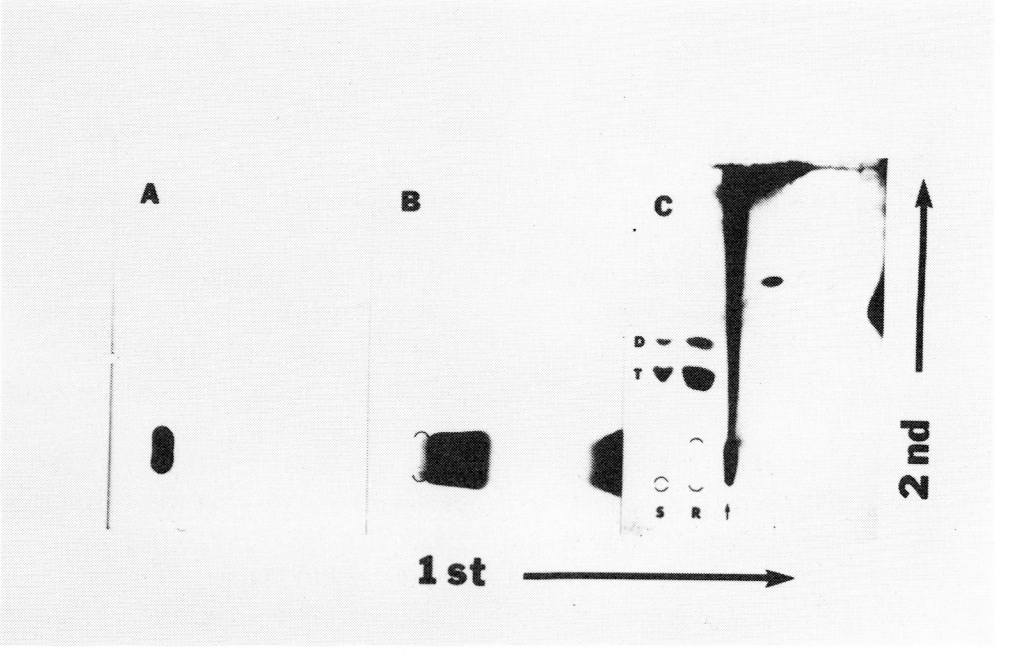



**写真１**
intact 赤血球の PPI 分離の TLC パターン
A）赤血球の PPI 抽出液をプロットした原点
B）２回目の一次元展開で，血色素がわずか原点より移動
C）５回の一次元展開で，血色素が原点より充分離れ（矢印），２次元展開で分離した DPI (D) と TPI (T)
しゅう酸カリウムを含むシリカゲル60（メルク社 HPTLC）を使用．R：赤血球，S：牛脳から抽出した標準物質．検出は30% Ammonium Bisulphate.

能という報告より，この血色素がresidueから総て溶出した状態で，PPI抽出完了とした．この抽出液をIN-HClで洗浄後，C：M：1N-HClで2回洗浄した．一般にbrain等からのPPI抽出液は1N-HClで洗浄した後，最後にC：M：0.01N-HClで洗浄している．我々も赤血球から抽出したPPI溶液に応用したが，PPIの約半量が上層に移動し使用出来なかった．

中和したPPI抽出液を1.5M KClで洗浄した時，2層分配するが，buffy coatは出現せず，色素の一部が上層に移動した．最近1.5M-KClの代りに0.15M KClでも良いことが明らかとなった．KClで洗浄後，蒸発乾固しC：M：$H_2O$＝75：25：2で再び溶解したとき不溶物が出現した．この不溶物をアルカリ性C：M＝2：1に溶解し，薄層クロマトグラフ法でPPIの含量を調べた．その結果PPIは検出されなかった．

最終的にPPI分離は，シリカゲル60TLCを用いて，C：M：28% Am＝65：35：5の展開溶液で，一次元展開を数回繰返すことによって，PPIより血色素を除去することに成功した．1回目の展開では，ほとんどの血色素が原点に残った．2回目の展開で**写真1 B**の如く，血色素は原点より離れ，4～5回の一次元展開で血色素は充分原点より離れた．C：A：M：Ac：$H_2O$＝40：17：15：12：8の二次元展開液で，**写真1 C**の如く，DPI，TPIのスポットが得られた．

このDPIとTPI量に対する一次元展開繰返しの影響を，牛脳から抽出したDPIとTPIの標準物質を用いて調べた．その結果**表1**に示すように，1～6回の一次元展開の繰返しは，DPIとTPI量になんの影響も与えなかった．

**正常者とDMDのintact赤血球のDPIとTPI量**：正常健康男子のintact赤血球のDPIとT-PI量は，赤血球の総リン脂質に対して0.44±0.05%と1.20±0.09%であった（**表2**）．Michell[3]がghostから抽出分離したDPIとTPI量に比較し，DPIは約60%に減少し，TPIは300%に増加した．これはintact赤血球状で酵素活性を失活し，抽出したのでTPIの分解を防ぐことが出来たと考えられる．

表1　DPIとTPI（牛脳）標準物質に対する繰返し一次元展開の影響

| number | DPI P μg | TPI P μg |
|---|---|---|
| 1 | 0.34<br>0.34 | 1.08<br>1.12 |
| 2 | 0.34<br>0.33 | 1.11<br>1.09 |
| 4 | 0.33<br>0.33 | 1.10<br>1.08 |
| 6 | 0.32<br>0.32 | 1.08<br>1.08 |

DMD赤血球のDPIとTPI量は，赤血球の総リン脂質に対しそれぞれ0.29±0.02%と1.00±0.05%であった．DPIは対照者のそれに比べ約66%に減少，TPIも約83%に減少している．これはDMD赤血球のイノシトール代謝系に何らかの異常があることを示している．今後刺激に対する赤血球のイノシトール代謝を調べ膜異常の原因究明を行う．

## まとめ

1) intact赤血球からPPI抽出分離に成功した．

2) DMD赤血球のDPIとTPI量は，対照者のそれに比べ減少していた．

## 文献

1) Hauser, G. & Eichberg, J：Improved conditions for the preservation and extraction of polyphosphoinositides. Biochim. Biophy. Act.,

表2　赤血球のDPIとTPI量
総リン脂質に対するDPIとTPI含量の割合（%，mean±S. E.）

| | | DPI % | TPI % |
|---|---|---|---|
| human erythrocyte ghost | | 0.75 | 0.4 |
| control | (n = 8) | 0.44 ± 0.05 | 1.20 ± 0.09 |
| D M D | (n = 10) | 0.29 ± 0.02 | 1.00 ± 0.05 |

326：201-209, 1973.
2) Bartlett, G. R.：Phosphorus Assay in Column Chromatography. J. Biol Chem., 234：466-468, 1959.
3) Allan, G & Michell, R. H.：A calcium-activated polyphosphoinositide phosphodiesterase in the plasma membrane of human and rabbit erythrocyte. Biochim. Biophy. Act., 508：277-286, 1978.

# 17) Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)の筋小胞体機能（続報）

高　木　昭　夫*

研究協力者　荒　木　　誠*　藤　田　武　久*
石　原　伝　幸*　杉　田　秀　夫*

筋小胞体の主要な生理的機能は細胞内カルシウムイオン (Ca) 濃度の調節である．デュシェヌ型筋ジストロフィー (DMD) の筋小胞体に機能障害が存在するか，あるいはそれが病因に関与するか否かを検討している．筋小胞体機能として Ca 摂取と Ca 遊離が大別される．我々は昨年度 Ca 遊離の異常を示唆する結果を報告した[1]．本年度はまず Ca 遊離異常が強く疑われる悪性高熱感受性ブタの場合を紹介し，その筋病変を検討した．次いで Ca 遊離機構の成長や分化に伴う変化をラット骨格筋で検討した．第3に DMD におけるカフェインによる Ca 遊離と Ca 誘発性 Ca 遊離とを対比して，その異常につき考察を加えた．

## 方　　法

悪性高熱感受性 (MHS) ブタの薄筋の一部を生検により採取し実験に使用した[2]．ラット（約300gm，雄）の長趾伸筋 (EDL) とひらめ筋 (SOL) を使用した．ヒト生検筋は10例の悪性高熱ないし悪性高熱のうたがわれた症例，7例の DMD 症例より得られた．対照として外科手術に際して小筋片の提供をうけた．ヒト生検筋は主に上腕二頭筋である．

カフェイン拘縮の実験はスキンドファイバー法を応用した（図1）．一定条件下で筋小胞体に Ca 摂取を行わせた後で，G-0.1溶液中で各種濃度カフェインにより拘縮を発生させ，濃度張力曲線を作製した．その上で拘縮を発生させる閾濃度，最大拘縮の50%に要するカフェイン濃度を比較した．

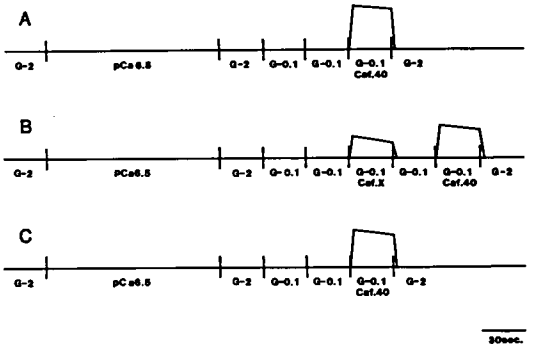



図1　カフェイン拘縮テストの方法．まずスキンドファイバーを $3\times10^{-7}$ MCa を含む溶液に2分間接触させて，筋小胞体に Ca を負荷した．次いで G-0.1溶液中にて各種濃度のカフェインによる拘縮を発生させた(B)．そのカフェイン拘縮の peak tension を40mM カフェイン (caf40) のもの (A と C) と比較して，濃度張力曲線を作製した．

Ca 誘発性 Ca 遊離は遠藤らの方法にならって，ATP を含まない溶液中で分析した[1]．骨格筋の形態学的検索は従来の記載に従った[2]．

## 結　　果

### (1) MHS ブタ

MHS ブタのスキンドファイバーは対照に比して，低濃度カフェインによりより大きな拘縮を発生した（図2）．拘縮の閾値は MHS ブタでは，1.1±0.7mM カフェイン (n=10, mean±S. D.) であり，対照では5.2±2.7 (n=9) であった．また最大の50%に要するカフェイン濃度は MHS ブ

＊国立武蔵療養所神経センター

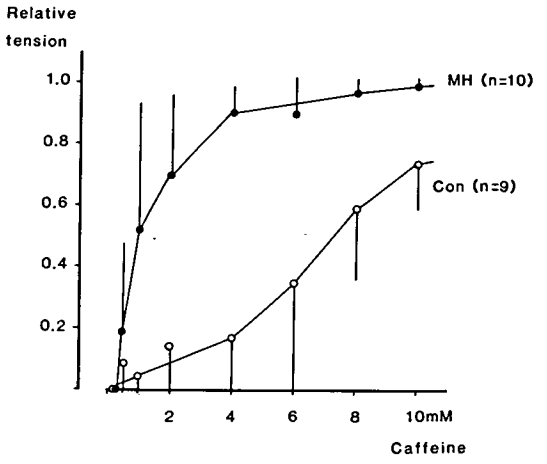



図2　MHS (MH) と対照 (CON) ブタにおけるカフェイン拘縮の比較．MHS ブタでは低濃度カフェインにより著明な拘縮を発生した．

タで1.1±7.0mM (n=10)，対照ブタで6.6±2.8 mM (n=9) であった．いずれの指標に関しても p<0.001で有意差と判定された．骨格筋の形態上の比較を行うとき，MHS ブタには肥大筋線維の存在がみとめられた（図3）．肥大化はタイプ1，2 A と 2 B のいずれにおいても存在した．筋線維タイプの分布には両者で差異はなかった．タイプ2 B 線維は76～78%を占め，その平均直径は MHS ブタ，62±21μm，対照ブタ56±17μm (p<0.005) であった．壊死・再生筋線維は観察されず，筋の微細構造の変化は認められていない．

**(2)　ラット骨格筋における Ca 遊離の分化**

ラットの SOL と EDL を使用してカフェイン拘縮のタイプ1およびタイプ2線維の差違を比較した．タイプ1では0.5～1mM カフェインで拘縮を呈する線維が少数あった．しかし多数のものでは2mM で拘縮が開始し，8mM で最大拘縮を呈した．濃度と張力関係は両者間で差をみとめなかった．閾値の平均は2.0±1.4mM (SOL, n=6)，1.8±0.5mM (EDL, n=5) であった．50%拘縮に要するカフェイン濃度は2.4±1.4mM (SOL)，2.2±0.6mM (EDL) であった．

Ca 誘発性 Ca 遊離をラットの SOL と EDL で比較した（図4）．Ca 親和性は EDL の方がより大きいようであった．すなわち $Km=3.4\times10^{-6}M$ (SOL, n=8) $Km=7.4\times10^{-7}M$ (EDL, n=7) であり p<0.001の危険率で有意差をみとめた．Ca 遊離の最大速度は2.6±0.5$min^{-1}$ (SOL, n=7)，2.9±0.8$min^{-1}$ (EDL, n=7) であった．EDL における Ca 誘発性 Ca 遊離を生後10日目と成熟後の間で比較した．Ca 親和性に関して生後10日目のものは $Km=2.2\times10^{-6}M$ であり，成熟ラットより低いことが判明した．$10^{-5}M$ 以上の Ca のもとでは，Ca 遊離速度は成熟ラットと同等ないしそれ以上であった．

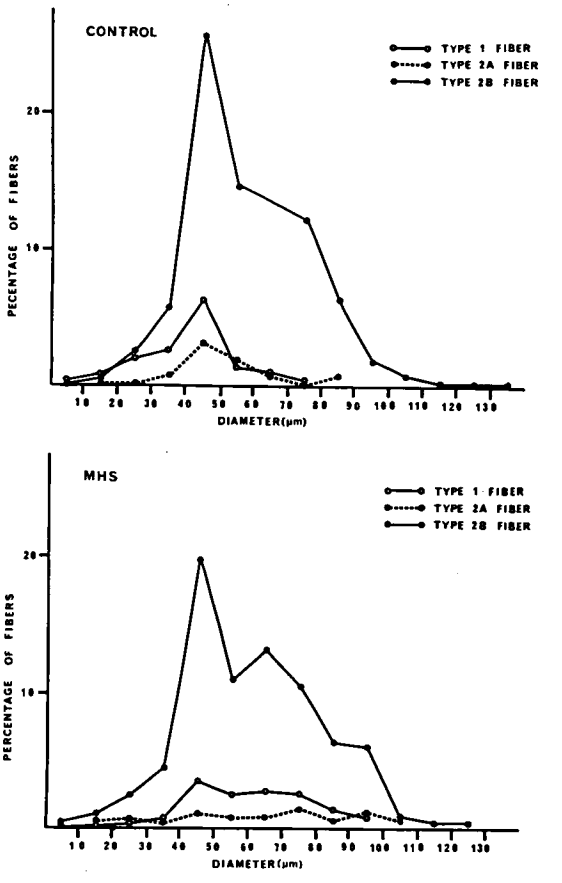



図3　MHS と対照 (control) ブタの筋直径分布の比較．MHS では筋直径の大小不同が著明であり，大径の筋線維が全ての筋線維タイプにおいて観察された．

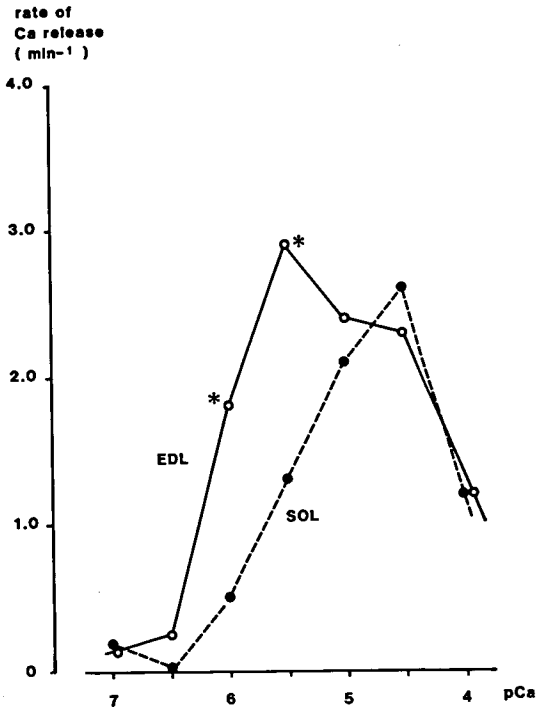



図4　ラット赤筋(SOL)と白筋(EDL)におけるCa誘発性Ca遊離の比較．横軸：Ca誘発の刺激としたCa濃度．縦軸：Ca遊離速度．白筋の方が，より低濃度Caによりca遊離が誘発された．＊は$P \leq 0.1$で有意差をみとめた．

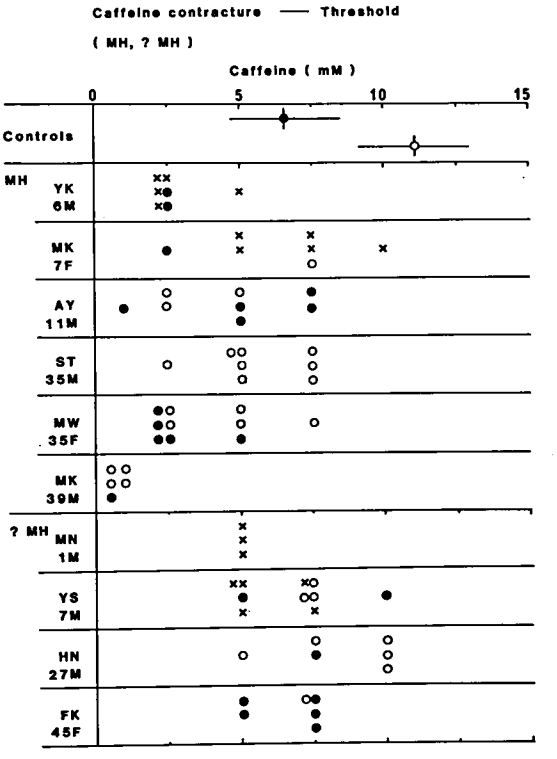



図5　ヒトMH症例およびMH疑診例(?MH)におけるカフェイン拘縮の閾値．黒丸：タイプ1線維，白丸：タイプ2線維，×印：筋線維束．MH症例では低閾値の筋線維が多く存在している．

### (3) 悪性高熱およびDMDのCa遊離

典型的悪性高熱より回復した症例では，カフェイン拘縮の閾値は低下していた(図5)．悪性高熱の不全型や疑診症例においては，タイプ2線維の閾値は低下傾向である．タイプ1や筋線維束では境界値ないし正常域であった．ちなみにヒト対照では，ラットの場合と異なりタイプ1の閾値はタイプ2より有意に低下していた．

DMDでは2～3本の筋線維束を使用した場合が多かった．7例中の6症例においてカフェイン閾値の低下をみとめた(図6)．この閾値低下の程度はMH典型例とほぼ同等であった．

Ca誘発性Ca遊離についての典型的結果を図7に示した．対照では$10^{-6}$～$3 \times 10^{-6}$Mにて Ca遊離が開始し，$10^{-5}$Mにて最大遊離速度を呈した．MH症例の白筋では$10^{-6}$Mで既に著明なCa遊離があり，$3 \times 10^{-6}$Mで最大速度に達した．Ca遊離最大速度はMHで$5.1 \pm 1.2 min^{-1}$ (type 2，n=3)，対照$3.0 \pm 0.9$ (type 2，n=5)と増加していた．DMD症例ではCa親和性は対照と同一であった．しかし遊離速度は最大値が$1.7 \pm 1.3$ (type 2，n=4)とむしろ低値であった．type 1や筋線維束に関しても同一傾向であった．DMDでカフェイン感受性の亢進した症例においても，Ca誘発性Ca遊離の亢進は観察されなかった．

## 考　　察

### (1) MHSブタの筋異常

MHSブタは養豚業において，豚ストレス症候群(porcine stress syndrome)やむれ肉(pale,

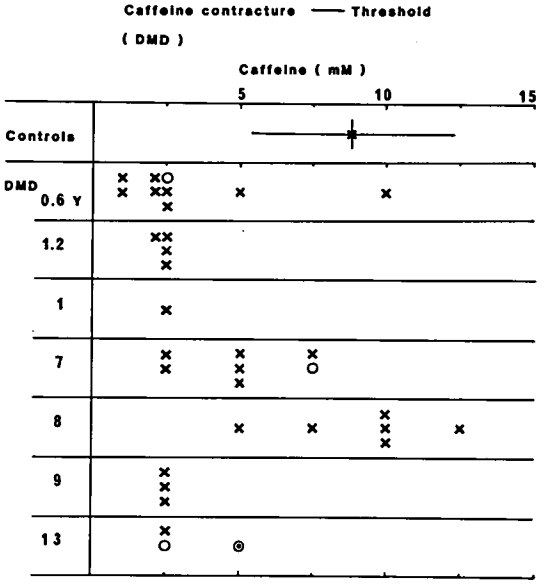



図6　DMD 症例におけるカフェイン拘縮閾値．対照例は筋線維束の値 (n=27, mean±S.D.) を示した．8 歳 (8 Y) の症例以外では閾値は低下していると判定された．

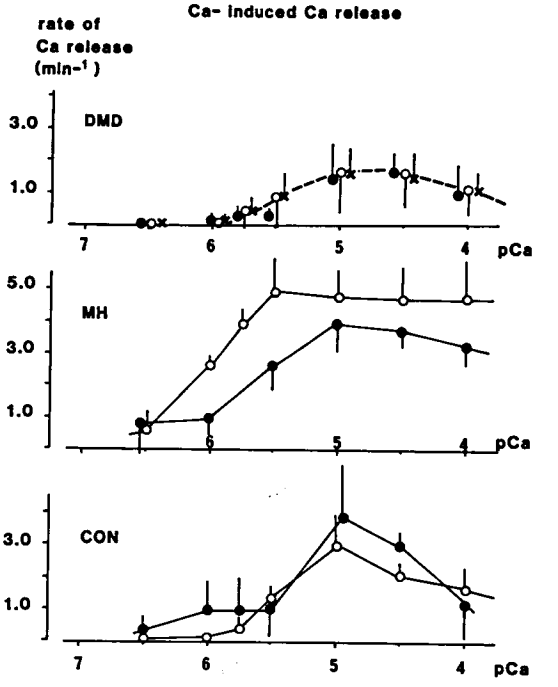



図7　DMD, MH と対照 (CON) における Ca 誘発性 Ca 遊離の比較．白丸：タイプ2，黒丸：タイプ1線維．その他は図4に同じである．

soft, exudative pork) との関連で問題となっている[2]．この3種の症候は全く同一のものではないかもしれないが，共通する骨格筋異常が存在するものと推定されている．MHS ブタはストレスやある種の薬剤に暴露されなければ，正常状態にあると想像される．今回のカフェイン感受性の亢進の証明，あるいは従来の分離小胞体で使用した報告[3]から判断して，筋小胞体からの Ca 遊離の異常亢進の存在が確実である．筋収縮系や小胞体の Ca 摂取には異常はないと推定される[2]．すなわち Ca 遊離異常がかなり原発的な病的過程と考えられる．興味深い点は形態学的異常として筋肥大傾向のみが観察されることであろう．壊死や再生現象はなく，筋分化も正常と判断された．微細構造にも異常は観察されていない．このような状態において，ストレスや麻酔薬に対する抵抗が低下している事実は注目されよう．

### (2) Ca 遊離機能の分化

筋小胞体機能は筋線維タイプにより特徴的な差違が知られている[4]．カフェイン拘縮や Ca 誘発性 Ca 遊離を筋線維タイプごとに比較した．ラットとヒトについて検討したが，動物種による違いが大きいことが指摘される．まずカフェイン拘縮 (0.1mM EGTA を含む溶液中) に関して，ヒトではタイプ1はタイプ2より感受性が高い (図5)．ラットの SOL (タイプ1) と EDL (タイプ2) の間には差違は認められなかった．Ca 誘発性 Ca 遊離に関して，ラットのタイプ2の Ca 親和性はタイプ1より大きい．またタイプ2の Ca 親和性は成長後に増加することが判明した．

ラットとヒトに共通して，Ca 誘発性 Ca 遊離の Ca 依存性は赤筋 (タイプ1) でより大きい傾向を認めた．これはタイプ1筋小胞体の Ca 容量がより小さい事実と関係するのかもしれない[4]．MH や DMD で観察される Ca 遊離の異常亢進の原因として，筋の分化異常や未熟性の関与の可能性は少ないと推定された．

### (3) DMD の Ca 遊離異常

前回の報告と併せると11/14 (79%) の DMD 症例においてカフェイン感受性の亢進をみとめた[5]. 異常の程度は MH 典型例と同じであり, DMD にときとして MH 類似の麻酔副作用が出現したという報告に合致している[5]. カフェイン感受性亢進の主要な原因は筋小胞体に由来すると推定している. カフェインは筋小胞体の Ca 誘発性 Ca 遊離の機序を活性化して Ca 遊離を発生させるとされている[6]. 今回, ATP-濃度 0 の状態, すなわち Ca 再摂取の生じない条件下で Ca 誘発性 Ca 遊離を直接的に測定した[1]. この条件下では DMD で検索した 4 例の全てで Ca 遊離速度は対照よりむしろ低値であった. ちなみに MH 症例の 1 部でも Ca 誘発性 Ca 遊離は正常との結果を得た. ATP OmM の条件下では Ca 誘発性 Ca 遊離は生じにくいため, このような結果を得たとも考えられる. DMD 骨格筋のカフェイン感受性亢進は早期に出現する異常と考えられる. すなわち収縮系機能や筋小胞体 Ca 摂取能がほぼ正常な時期に既に観察されている. 今後の問題として, DMD のカフェイン感受性亢進は Ca 遊離異常に由来することをより直接的に証明する必要があろう. 第 2 に DMD の筋変性との因果関係を追求することであろう.

## ま と め

(1) MHS ブタの筋小胞体で Ca 遊離の異常亢進が観察された. この現象は MHS ブタの筋肥大やストレス耐性の低下と関連していると推定した.

(2) 約80%の DMD 症例においてカフェインによる筋小胞体からの Ca 遊離亢進が認められた. これは MH 症例の異常と同程度であり, DMD で MH 類似症候が出現する事実を裏付けている.

(3) カフェイン感受性亢進は DMD の早期の病態と推定された. その出現機序や筋変性上の意義は今後解決されねばならない.

## 文 献


1) 高木昭夫, 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の筋小胞体機能, とくに Ca 遊離について. 厚生省神経疾患研究委託費 (三好班). 昭和58年度研究報告書, 1984, pp 162-165.

2) Araki M, Takagi A, Fujita T, Matsubara T：Porcine malignant hyperthermia：caffeine contracture of single skinned muscle fibers. Biomed Res, (in press)

3) Nelson TE：Dantrolene does not block calcium pulse-induced calcium release from a putative calcium channel in sarcoplasmic reticulum from malignant hyperthermia and normal pig muscle. FEBS Lett, 167：123-126, 1984.

4) 高木昭夫：筋線維の生理, 生化学とその病態, 脳と神経, 34：929-938, 1982.

5) Takagi A, Sunohara N, Ishihara T et al：Malignant hyperthermia and related neuromuscular diseases. Muscle Nerve, 6：510-514, 1983.

6) Endo M：Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol Rev, 57：71-108, 1977.

# 18)－(1) Kearns-Shy 症候群と類似した臨床症状を呈した神経原性筋萎縮症の1例

栗　原　照　幸*

研究協力者　岸　雅　彦*　山　村　善　教*
栗　林　忠　信*　鶴　田　和　仁*

我々は近位筋優位の筋萎縮，外眼筋麻痺，知能低下，難聴，末梢神経障害，性腺機能低下，頭部CT異常などのKearns-Shy症候群において見られる症状を多数合併するが，筋生検所見は神経原性変化を呈しミトコンドリア異常を認めなかった1例を経験した．このような症例は稀であり，わずかに迫ら[1]の症例に類似点を見出すのみであるので報告する．

症例：39歳男性，未婚．

主訴：歩行障害，知能低下，難聴．

現病歴：低体重にて出生したが発育は正常であった．昭和38年，18歳頃より原因不明の難聴，知能低下，性格の変化が出現し，昭和41年，21歳時に精神分裂病の診断にて精神病院に入院した．入院後，食事量に関係なくやせが進行，昭和58年頃より歩行に異常が見られる様になり，昭和59年8月に約1週間の原因不明の意識障害がみられ，その後歩行不能となった．この為昭和59年9月当科入院となった．

既往歴：特記すべき事はない．

家族歴：血族結婚，遺伝歴はない．

入院時現症：理学的所見では，身長160cm体重28kgで著明なやせを認め，女性型恥毛，睾丸萎縮，小児様陰茎を認める以外に著変はない（図1）．神経学的所見では意識は清明だが，高度の知能低下を認める．眼瞼下垂，顔面・側頭筋の萎縮を認め，ミオパチー顔貌を呈している．眼底所見にて視神経萎縮・macular dystrophyを認めるが，網膜色素変性は認めない．眼球運動は下転は中等度，他方向へは高度の制限が見られる．両側に高度の神経性難聴を認める．文章をしゃべる事は不能だが，単語を発することは不明瞭ながらも可能である．嚥下障害は認めず舌萎縮・線維束攣縮は認めない．中等～高度の近位筋優位の四肢肢帯筋の萎縮・筋力低下を認める．協調運動障害，不随意運動などは認めない．つたい歩きは可能だが，

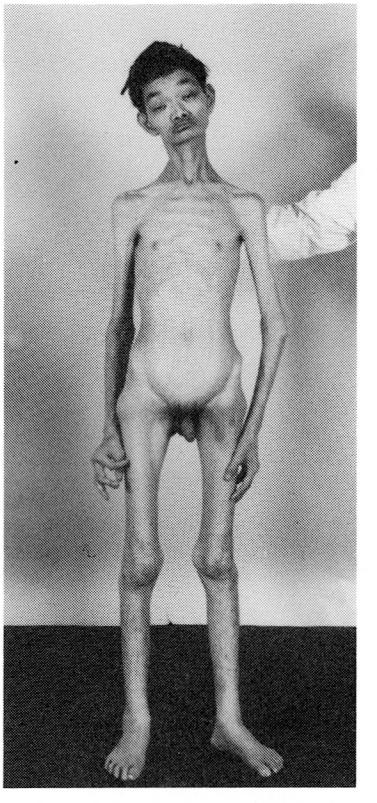


図1　患者の全身像．著明なやせ，ミオパチー顔貌を呈している．

＊宮崎医科大学第三内科

しゃがみ立ちは不能である．感覚系は疎通性が悪く検査不能であるが，痛みには反応する．深部腱反射は消失しており，病的反射は認めない．

検査所見：検尿は正常で，末梢血は WBC 3300, RBC 359×$10^4$, Hb 11.3g/dl と軽度貧血を認めるも末血像は正常である．生化学検査は入院時 GOT 35 IU/L（正常値 0-38），GPT 23 IU/L（0-30），LDH 820 IU/L（160-365），ALP 10.9 K.A.（1.6-10.0），CK 378 IU/L（5-120）（MM type 100%），ALD 2.6 IU/L（0.5-3.1），creatine 1.2 mg/dl（0.2-1.0），myoglobin 26 ng/ml（<60）で筋肉由来酵素の上昇が見られる．蛋白分画・リポ蛋白分画は正常である．血清学検査にも異常はなく，抗アセチルコリン受容体抗体は陰性である．血清銅66μg/dl, ceruloplasmin 26mg/dl であり，血液ガス分析は正常である．凝固系に異常はない．尿生化学検査にて creatine は190mg/day と増加している．髄液検査は蛋白44mg/dl と正常上限で，他は正常である．

内分泌学検査は，75g OGTT 正常，$T_3$1.1ng/ml,. $T_4$9.2μg/dl, TSH 2.6μU/ml, PTH 1.1ng/ml と正常で，rapid ACTH 負荷試験による cortisol, aldosterone は正常，尿中17-KS 2.8mg/day, 尿中17-OHCS 4.5 mg/day, LH 100.1 mIU/ml（2-32）↑，FSH 105.1 mIU/ml（4-42）↑，LH-RH 負荷試験による LH, FSH は過敏反応，尿中 $E_1$・$E_2$・$E_3$ 正常，尿中 testosterone 22.3μg/day（24.0-118.6）↓．以上より hypergonadotropic hypogonadism と診断した．アミノ酸分析は正常，染色体は正常の46XY である．基礎代謝率は－17%，テンシロン試験は陰性である．

心電図・胸写に異常なし．四肢筋の筋電図検査では，denervation potential があり，NMU の数が減少し，giant potential を認めた．これらは筋電図上神経原性変化である．myotonic discharge は見られない．反復刺激にても，waning や waxing は認めない．運動神経伝導速度は左尺骨神経47.0m/sec，左正中神経44.3m/sec，左腓骨神経26.8m/sec，左脛骨神経30.6m/sec と特に下肢にて遅延している．感覚神経伝導速度は腓腹神経にて誘発電位は得られなかった．体性感覚誘発電位

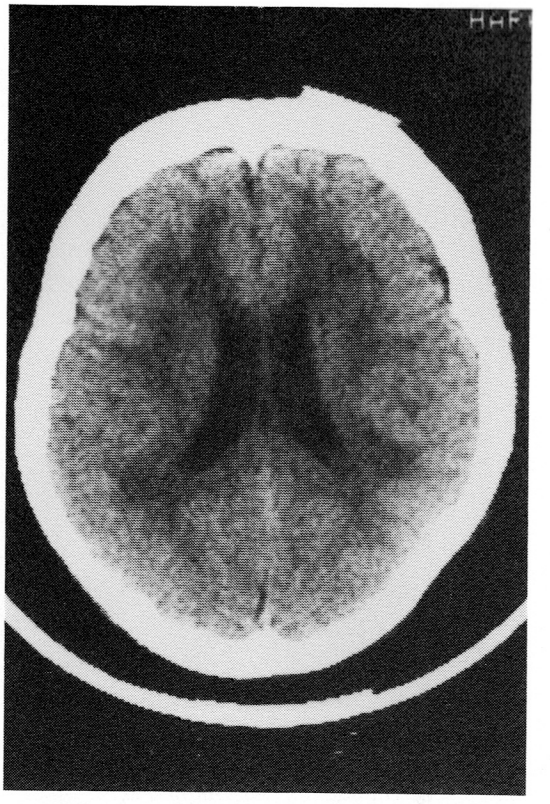


図2　頭部 CT スキャン．白質に一致するびまん性の低吸収域を認める．

にて $N_9$ 潜時は12.2msec と著明に延長し，中枢伝導時間は7.0msec と軽度の延長を認める．脳波検査にて低電位及び，びまん性の徐波の出現を認める．頭部 CT スキャンにて図2の如く白質に一致したびまん性の低吸収域を認めるが，基底核の石灰化は認めない．

筋生検は右外側広筋と右短腓骨筋を行なった．右外側広筋の HE 染色標本で group atrophy, small angulated fiber, pyknotic nuclear clump がみられ，中心核も軽度増加しているが，壊死線維や再生像，炎症細胞浸潤などはみられない．Gomori-trichrome 変法染色にて ragged-red fiber は見られない．NADH-TR 染色にて small dark angulated fiber が見られ，moth-eaten fiber も散見される．routine ATPase 染色にて fiber type grouping を呈し，type 2 fiber は92%と優位である（図3　A, B, C）．

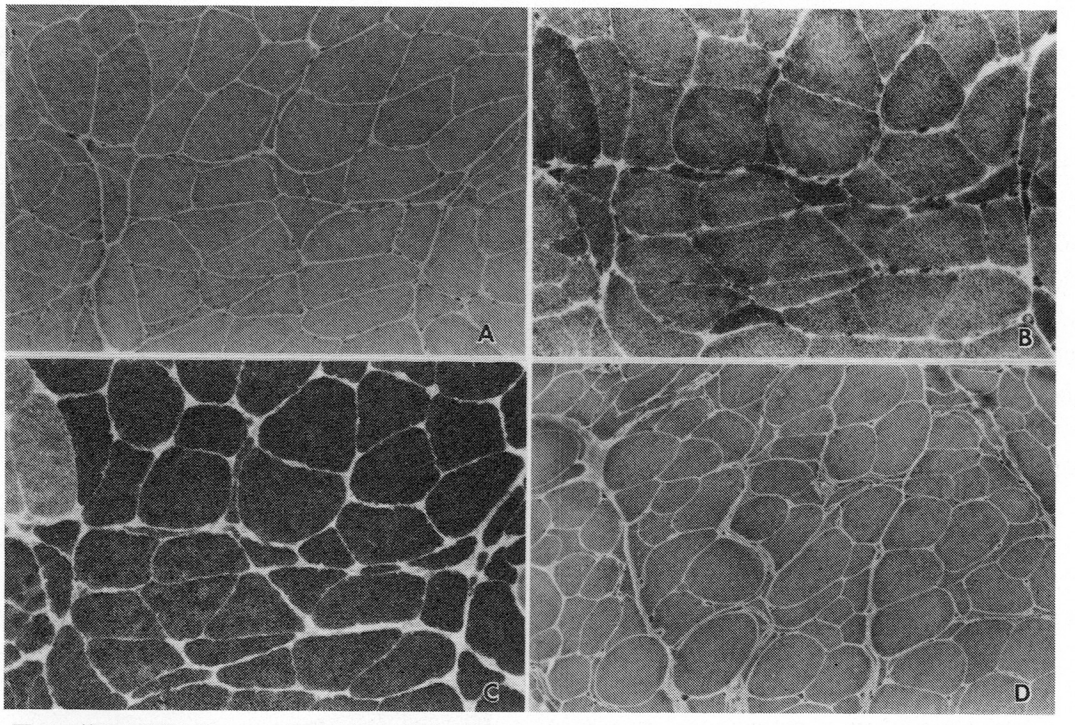



図3　筋生検組織像．A～Cは右外側広筋，Dは右短腓骨筋．
A．HE染色，125×，group atrophy, small angulated fiber, pyknotic nuclear clumpを認め，中心核も軽度増加している．
B．NADH-TR染色，125×，small dark angulated fiberが見られる．
C．routine ATPase染色，125×，type groupingが見られる．
D．HE染色，125×，group atrophy, small angulated fiber, pyknotic nuclear clumpを認め，中心核も軽度増加している．

右短腓骨筋でも右外側広筋とほぼ同様の所見が見られた（図3　D）．電顕像にてミトコンドリアの異常は認めない．右腓腹神経のtoluidine blue染色標本にて有髄線維の減少が見られるが，onion bulb formation．アミロイド及び異染性物質の沈着はみられない．図4は有髄神経のヒストグラムであるが，総数6265本/mm² と中等度の減少を示し，一峰性の分布を呈し，特に大径線維の減少が目だつ．

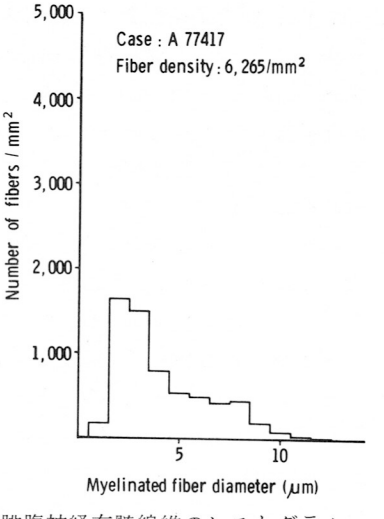



図4　右腓腹神経有髄線維のヒストグラム．一峰性分布を呈し，特に大径線維の減少が目立つ．

## 考　　案

本症例の臨床像をまとめると　1）若年発症　2）孤発例　3）近位筋優位の神経原性筋萎縮　4）外眼筋麻痺　5）知能低下　6）神経性難聴　7）末梢神経障害　8）睾丸萎縮（hypergonadotropic hypogonadism）となる．当症例の外眼筋麻痺は慢性進行性外眼筋麻痺（chronic progressive external ophthalmoplegia 以下 CPEO）と呼ばれるものに相当すると思われる．ところでこの様に外眼筋麻痺に多彩な症状を合併するものとして，Kearns-Shy 症候群が知られており，当症例で見られた合併症は，すべて Kearns-Shy 症候群に合併しうるものである．しかし Kearns-Shy 症候群はミトコンドリア異常が見られる事がその疾患の特徴であり，本症例は2回の筋生検にて慢性神経原性筋萎縮症に合致する所見を呈しミトコンドリア異常を見出せなかった事から Kearns-Shy 症候群とは異なる疾患とおもわれる．

CPEO と筋原性筋萎縮症の合併例は多数あるが，本症例の様に神経原性筋萎縮症を伴ったものは比較的まれで，松永ら[2]，葛原ら[3]，池田ら[4]によって報告されている．又，CPEO に hypogonadism を伴うもの[5]，polyneuropathy を伴うもの[6]，さらに本症例の CPEO 以外の症状を部分的に合併した症例は幾つか報告されている．しかし，これらの報告例の中には本症例に見られた様な多彩な合併症を同時に呈したものは数少なく我々の調べ得た範囲ではわずかに迫らの報告[1]が見られるに過ぎない．彼らの症例は，表1に示す如く初発年齢は40歳であるが孤発例で，進行性外眼筋麻痺，神経性聾，神経原性筋萎縮，hypergonadotropic hypogonadism を伴っている．この症例もミトコンドリア異常を伴わず神経・性腺系の障害によると思われる症状を多数合併し，本症例と酷似している．迫らの症例では本症より知能障害は軽度で，頭部 CT 上での白質の低吸収域は認められていないが，その他は本症例と同様の症状，所見を呈し1疾患単位となる可能性がある．

## 結　　語

症候学的に Kearns-Shy 症候群と多くの共通

表1　類似疾患との比較．

| 症　例 | 当　症　例 | 迫らの症例 | Kearns-Shy症候群 |
|---|---|---|---|
| 初発年齢 | 18 歳 | 40 歳 | 20歳以下 |
| 家族歴 | − | − | 多くは − |
| 四肢近位筋群の萎縮 | + | + | + |
| 眼球運動障害 | + | + | + |
| 知能低下 | + | + | + |
| 神経性難聴 | + | + | + |
| 末梢神経障害 | + | − | + |
| 小脳性失調症 | − | − | + |
| 網膜色素変性 | − | − | + |
| 性腺機能低下 | + | + | + |
| 心電図異常 | − | 不完全右脚block | + |
| CSF protein | ほぼ正常 | 正　常 | 上　昇 |
| CT 所見 | 白質に一致したびまん性低吸収域 | 記載なし | 深部白質のびまん性低吸収域 |
| 筋生検 mitochondria 形態異常 | − | − | + |
| 神経原性変化 | + | + | + or − |

点を有しながら，ミトコンドリアの異常を認めない神経原性筋萎縮症の一例を報告した．類似症例の報告は極めて稀である．

## 文　献


1) 迫　龍二ら：進行性外眼筋麻痺，神経性聾，神経原性筋萎縮，hypergonadotropic hypogonadism を伴う一症例．臨床神経　21：304，1981．

2) 松永宗雄ら：外眼筋・咽頭筋麻痺を伴った神経原性筋萎縮症の1家系．臨床神経　12：171，1972．

3) 葛原茂樹ら：進行性の外眼筋・咽頭筋麻痺，全身性筋萎縮を主徴とし，四肢筋の神経原性萎縮と錐体路徴候を伴った1症例．神経内科　3：265，1975．

4) 池田修一ら：筋原性および神経原性筋萎縮を伴う慢性進行性外眼筋麻痺の1家系．神経内科　12：447，1980．

5) Lundberg, P. O. ：Ocular myopathy with hypogonadism. Acta Neurol Scand. 38：142, 1962.

6) Stephens, J. et al ：On familial ataxia, neural amyotrophy, and their association with progressive external ophthalmoplegia. Brain 81：56, 1958.

# 18)－(2) Caイオン電極による筋細胞内外のCa濃度の測定：マーカイン急性筋融解への応用

栗原照幸*

研究協力者　田中政幸*　塩屋敬一*　山村善教*

## 目的

筋ジストロフィー症では筋肉の再生より崩壊がより強く起こっているために筋原線維の減少が進行性に生じていると考えられ，筋崩壊の発生機序を明らかにすることは重要であるが人が対象のため研究を進めにくい点も多い．近年急性筋融解の実験モデルとして塩酸ブピバカイン（マーカイン）が取り上げられ，形態学的，生化学的研究が行われている[1)2)3)]．筋崩壊の最初の段階には筋肉構造蛋白質の特異的分解にCa依存性中性プロテアーゼが働いていると考えられ[4)]，Caイオンの濃度を筋細胞内外で計測することは必要なことであるが，これも技術的に困難で，現在まで直接的な計測は文献上見当たらない．

今回の実験は以上の事項を考えて，Caイオン交換樹脂を用いた微小管イオン電極を作成し，筋細胞内外のCaイオン濃度を測定することを第一の目的とし，次に塩酸ブピバカインを用いた急性筋融解の機序についても，現在まで細胞内Ca濃度の増加が筋融解に関与していると推定されながらも直接筋細胞内のCa濃度を計測した文献はないので，Caイオン電極を応用してこの点を明らかにすることである．

## 方法

対照はウイスター系SPFラットの横隔膜標本を用い，膜電位は3M KClを満たした微小管ガラス電極によって計測し，塩酸ブピバカインは吉富製薬より提供された原末を5mMの濃度でタイローズ溶液に溶解して急性筋融解の実験に用いた．

筋標本は実験中95% $O_2$と5% $CO_2$の混合ガスを通じて酸素化を続けた．Ca-freeのタイローズ溶液は5mMのEGTAを加えて作成した．

Caイオン交換樹脂を用いたイオン電極は図1に示したように，微小管ガラス電極の先端600$\mu$mまでシリコンに浸し，これを200℃，60分間加熱して，ガラス管の先端内面にシリコンを付着させてから，0.1M $CaCl_2$溶液でガラス電極を満たし，次に電極の上から陰圧をかけて電極の先端200$\mu$mの高さまでCaイオン交換樹脂を顕微鏡下で入れた．この電極の先端の直径は2$\mu$mのものを用い，単一筋細胞へ挿入可能である．各々のイオン電極が作成されると，1本ずつCaの標準溶液6種類（$10^{-1}$ M，$10^{-2}$ M，$10^{-3}$ M，$10^{-4}$ M，$10^{-5}$ M，$10^{-6}$ M）の中に浸して標準曲線を作成した．Ca濃度の対数を横軸にとり，イオン電極を各標準溶液の中に浸した時のエレクトロメーターの読みを縦軸にとると両者はよく相関し，直線的に変化するので，Ca濃度を電位差（mV）として読みとることができる．

## 結果

タイローズ溶液を筋細胞外液として実験に用いているが，このCa濃度は$1.67\times10^{-3}$ Mである．筋細胞内Ca濃度は3本の異なるCaイオン電極で計測したところ，3回の実験の各平均値は$2.64\times10^{-5}$M，$9.88\times10^{-5}$ M，$1.75\times10^{-4}$ Mという結果を得た．

次に急性筋融解の実験を5mMの塩酸ブピバカインを用いて行った．まず膜電位の変化を5分間ずつブピバカインに浸して経過した時間ごとに35分まで追跡すると表1のようにCaが細胞外に存

＊宮崎医科大学第三内科

## Ca ion-exchanger microelectrode

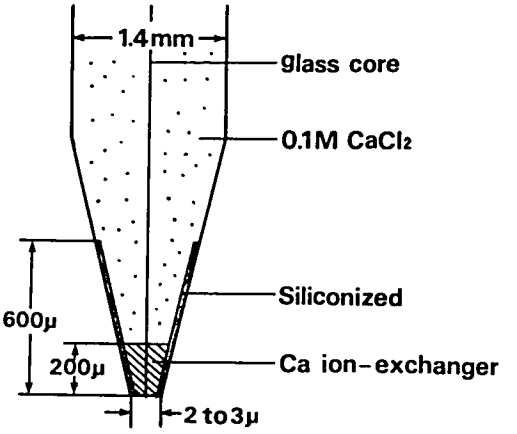



図1　Caイオン交換樹脂を用いた微小管イオン電極

表1　塩酸ブピバカインによる膜電位の変化

ブピバカイン5mMの濃度で細胞外液に加えた際，膜電位を5分間ごとに35分後まで計測したところ，細胞外液中にCaイオンが存在しても，しなくても膜電位はコントロールの−85mVより−62mVに低下するので，膜へのブピバカインの作用はCa濃度とは無関係に起こっていると考えられる．

| | 5mM Bupivacain HCl in Tyrode's Sol. $[Ca^{2+}]_0$ =1.52 mM | | 5mM Bupivacain HCl + 5mM EGTA in $Ca^{2+}$ free Tyrode's Sol. $[Ca^{2+}]_0$ = 0 mM | |
|---|---|---|---|---|
| Time (min) | No. of fibers | RMP (mV) | No. of fibers | RMP (mV) |
| 1 − 5 | 16 | -77.4 ± 3.9 | 45 | -78.0 ± 3.8 |
| 6 − 10 | 15 | -77.4 ± 6.8 | 31 | -64.3 ± 7.4 |
| 11 − 15 | | | 44 | -65.8 ± 5.7 |
| 16 − 20 | 27 | -76.6 ± 6.0 | 15 | -61.9 ± 6.8 |
| 21 − 25 | 21 | -70.2 ± 5.2 | 29 | -64.8 ± 6.7 |
| 26 − 30 | 20 | -65.9 ± 8.1 | 19 | -59.9 ±10.0 |
| 31 − 35 | 27 | -62.7 ± 6.9 | 22 | -62.4 ± 6.5 |
| Control (Tyrode's Solution) | 41 | -85.5 ± 2.6 | 41 | -85.5 ± 2.6 |

在している場合〔表の左〕でも，Caが細胞外に存在していない場合〔表の右〕でもコントロールの−85.5mVから−62.7mV，−62.4mVと夫々急速に低下することが，明らかになった．わずか35分でこのような膜電位の低下がみられ，ブピバカインは急速に筋細胞膜に障害を与えることと，膜への障害は細胞外液のCa濃度には影響されない薬物の直接作用と考えられる．

筋融解の一つの指標として筋肉酵素を計測するために，横隔膜標本0.38gを100ml中の溶液に浸し，95% $O_2$と5% $CO_2$の混合ガスを通じて酸素化しつつ，30分ごとに2時間後まで細胞外液を各回3mlずつ採取してCreatine Kinase (CK) とAldolaseを測定した．図2にこの結果をまとめた．細胞外液がコントロールのタイローズ溶液と，5mMのEGTAを加えてCa濃度が0Mとなっている塩酸ブピバカイン溶液ではCKとAldolaseは有意に上昇せず，Caを含むタイローズ溶液中に5mMの塩酸ブピバカインを含む溶液に筋標本を浸すと△印のグラフで示したようにCKもAldolaseも上昇することが明らかになり，これらの酵素の上昇は，膜電位が急速に低下した初めの30分以内ではみられず，それより遅れて60分，90分，120分後に時間経過と共により著明に上昇している．

筋標本の一部は対照と塩酸ブピバカイン5mMに2時間半浸した筋標本について凍結切片をつくり，組織染色を行って形態学的にも観察したところ，後者では図3に示すように，opaque fiberやempty sarcolemmal tubeといわれる筋変性像を認めた．

次に筋細胞内のCaイオン濃度が，細胞外液がCaを含むタイローズ溶液の時と5mM EGTAを加えてCa-freeの時で異なるか否かを検索した．細胞外液が$1.52\times10^{-3}$ MのCa濃度の際，塩酸ブピバカイン5mMのタイローズ溶液に30分間筋肉標本を浸した際の筋細胞内Ca濃度は$1.47\times10^{-3}$ Mと測定され，細胞内外でのCa濃度の差がほとんどなくなっていた．これに対して5mM EGTAを細胞外液に加えておくと塩酸ブピバカインは前と同様5mMで30分間筋標本を浸しても，表2の

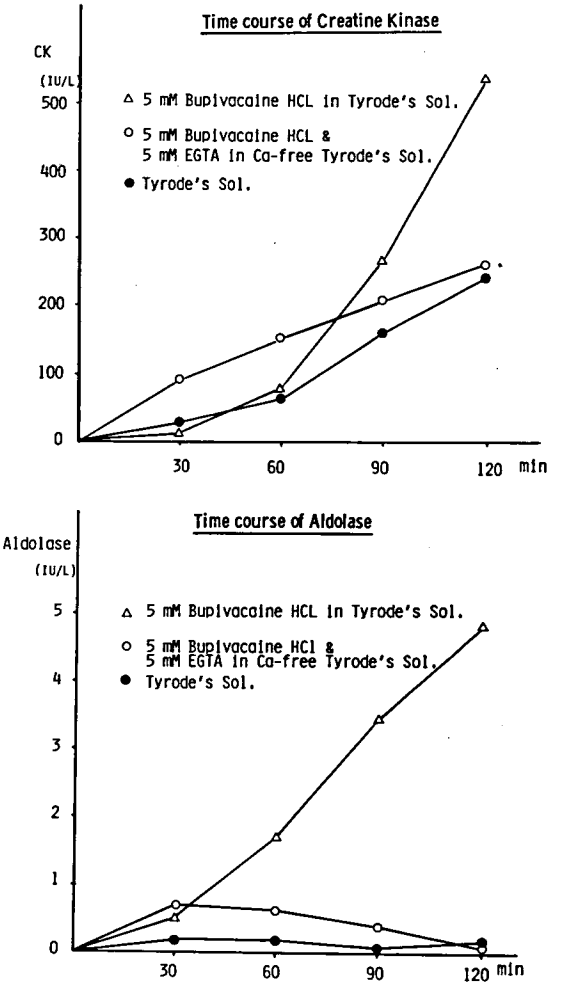



図2　塩酸ブピバカインによる筋肉酵素の漏出．
Caイオンを含まないタイローズ溶液ではCK，Aldolaseは上昇しないが，Caイオンを含むタイローズ溶液では60分，90分，120分後に筋肉酵素が上昇する．

様にイオン電極の読みはCaが0Mの時−52.0±2.0mV，細胞内Caについてもイオン電極の読みは膜電位を減算した後に−49.8mVと0Mに極めて近い値を示した．つまり細胞外液のCa濃度を0Mにした際には，筋細胞内のCa濃度は塩酸ブピバカインを用いても上昇しないということである．又細胞外に通常に存在するmMオーダーのCa

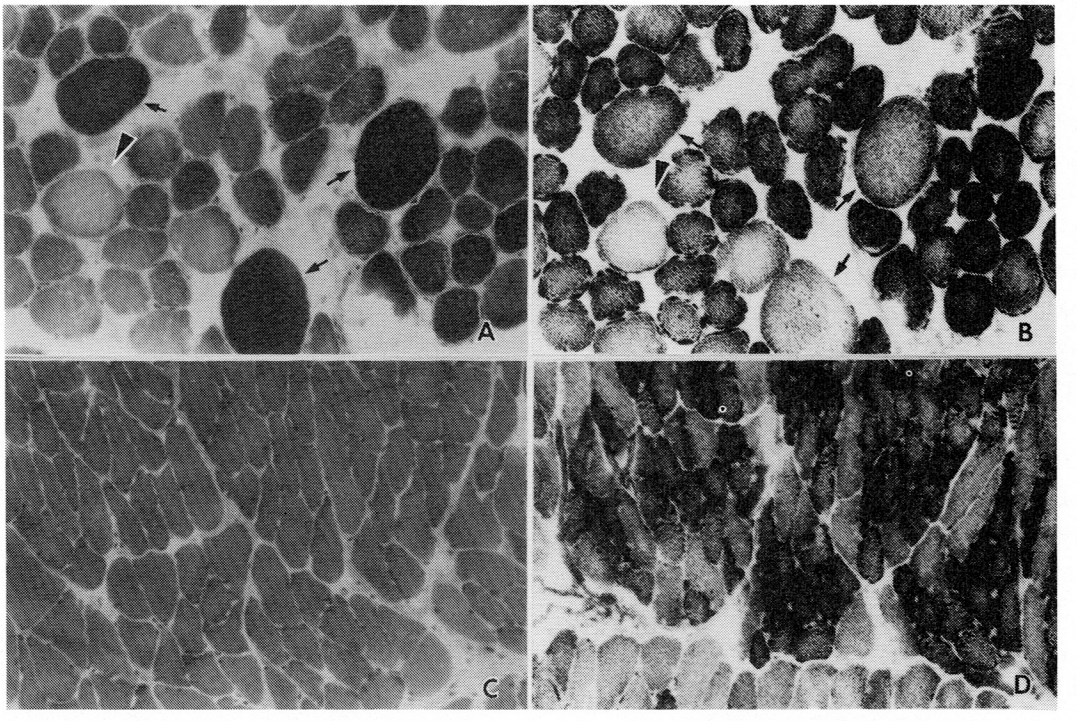



図3　横隔膜凍結切片標本

A．5mM 塩酸ブピバカインに2時間半浸した横隔膜．HE 染色 125×．3本の opaque fiber（↑）と empty sarcolemmal tube（▲）がみられる．

B．Aの連続切片．NADH-TR 染色．

C，D．タイローズ溶液に2時間半浸した対照の横隔膜
C．HE 染色150×．D．NADH-TR 染色150×．いずれも特記すべき変化を認めない．

表2　細胞外 Ca 濃度が0M の時の筋細胞内 Ca 濃度の測定．
細胞外液に EGTA 5mM を加えてCa-free とすると，塩酸ブピバカインを用いても筋細胞内の Ca 濃度は増加しない．

細胞外液が Ca-free の時：

Bupivacaine HCl　5 mM
E G T A　5 mM　in Ca-free Tyrode's Sol.
30分間浸した時の検索

| | Electrometer の読み | Ca濃度 |
|---|---|---|
| 細胞外 Ca | N=16, -52.0 ± 2.0 mV | 0 M |
| 細胞内 Ca | N=15, -113.4 ± 7.3 mV<br>RMP= -63.6 mV<br>-113.4-(-63.6) = -49.8 | 0 Mに近い |

細胞外の Ca 濃度が 0 M のときは Bupivacaine HCl で筋細胞膜が障害されても，Ca は外→内に入らないので増加しない．

は，塩酸ブピバカインが30分間作用すると筋細胞内もmMオーダーのCa濃度に上昇するという結果を得た．

## 考　　按

筋細胞内外のCa濃度の測定，筋肉酵素の上昇，膜電位の変化，筋の組織像等を総合して考察する．急性筋融解の機序を次のように考えると以上の結果をすべて説明し得ると思われる．塩酸ブピバカインはまず初めの30分ほどで膜を急速に障害し，膜電位を－85mVより－62mVにまで低下させる．筋細胞膜内外の電解質や物質の移動が容易に行われるようになると考えられる．そして細胞外のCa濃度は通常mMオーダーである．タイローズ溶液では1.5～1.7mMと測定された．塩酸ブピバカインを30分間作用させると筋細胞内もCaイオン電極で測定したところ1.47mMと上昇する．このレベルではmMオーダーで働く中性プロテアーゼも働き得るので筋原線維に蛋白分解が起こってくると考えられる．そして60分，90分，120分と時間を追ってCKやAldolaseも上昇を認め，形態学的にもopaque fiberやempty sarcolemmal tubeを認めた．細胞外のCa濃度をEGTA 5mMを加えて0Mとしておくと筋肉酵素は上昇しないし，又筋細胞内Ca濃度も上昇しない．このことは，塩酸ブピバカインによって筋細胞膜が連続性を失うか孔が開き，筋細胞外のCa濃度はmMオーダーと高いので，外から中へ入り，細胞内もmMオーダーのCa濃度になり筋融解が起こると考えられる．筋細胞内にはミトコンドリアや筋小胞体にCaは高濃度に含まれ，前者では1.1～2.5mM，後者では16～20mMのCa濃度があるが，筋線維全体の容積からみて，ミトコンドリアは3～5％，筋小胞体は2～4％の容積しかないので，たとえ両者から最大限Caが遊離されても筋細胞内のCa濃度は0.7mMを越えることはないと計算されている[5]．従って今回測定された1.47mMというレベルは，筋細胞外より細胞内へ流入した可能性が高いのである．

塩酸ブピバカインによる急性筋融解は，筋ジストロフィー症にみられる筋変性より急激に起こっており，そのままの結果で疾患と同一視することはできないが，以上に述べた事項は，筋細胞膜の障害が起こってCaイオンの透過性が増せば，元々高い濃度で細胞外液中にあるCaは外と内とが同一の濃度になっただけで筋崩壊が起こり得ることを示唆する．

## 結　　語

Caイオン交換樹脂を用いた微小管イオン電極を自作して筋細胞内外のCaイオン濃度を測定した．塩酸ブピバカイン5mMを用いた急性筋融解の機序を検討したところ，初めに筋細胞膜の障害が起こって，Caイオンが細胞外より細胞内へ流入し，mMオーダーのCa濃度となり，それに引き続いて筋融解が起こり筋肉酵素の漏出が起こり，組織学的にもopaque fiberやempty sarcolemmal tubeを認めた．

## 文　　献


1) Benoit PW, Belt WD：Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). J Anat, 107：547-556, 1970.
2) Hall-Craggs ECB：Early ultrastructural changes in skeletal muscle exposed to the local anaesthetic bupivacaine (Marcaine). Br J Exp Path, 61：139-149, 1980.
3) 猪飼哲夫，高木昭夫，米本恭三：筋小胞体機能に対するマーカインの影響．臨床神経，24：65-71, 1984.
4) 杉田秀夫，石浦章一：筋ジストロフィー症とプロテアーゼ．神経進歩，24：821-830, 1980.
5) Bodensteiner, JB, Engel AG：Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies：A study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. Neurology (New York), 28：439-446, 1978.

# 19）筋肉酵素の漏出機構（白鼠を用いて）

植　田　啓　嗣*

研究協力者　阿　部　千　史*　神　谷　和　恵*

## はじめに

筋漿酵素の漏出機構には，①神経性，②体液性，③膜透過性，④筋肉内代謝障害性に加え，⑤栄養性などの諸因子が関与しているものと想定される．

Duchenne 型では，伴性劣性の遺伝様式をとり，且つ筋漿酵素の漏出が著明にみられる．この場合，DNA の異常が如何なる過程を経て筋漿酵素の漏出と結びついているのか，逆に，酵素漏出が果たして DNA 検索の indicator として用い得られるのか，実験の容易な雄性ラットを用いて検討してみた．

表 1　Diet

1．Solid－basal－diet
　MF (ORIENTAL YEAST CO., LTD)

2．Synthetic－diet (%)

| | 17%pr | 10%pr | 5 %pr |
|---|---|---|---|
| casein | 17.0 | 10.0 | 5.0 |
| dextrin | 4.9 | 11.9 | 16.9 |
| sucrose | 70.0 | 70.0 | 70.0 |
| oil | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| cellulose | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| salt mixture | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| vitamin mixture ($VB_1$ free) | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| choline chloride | 0.1 | 0.1 | 0.1 |

casein : vitamin free
oil　: plant 4，liver 1

愛媛大学保健管理センター

## 方　法

5 週齢の雄性ラット (SD 系) を solid-basal-diet (MF)－オリエンタル酵母製で飼育，その後一部のラットを synthetic-diet (表 1) に切り替え，飼育した．

そして上記のラットを適宜選んで，仰臥位で固定，開腹し，下大静脈から採血して，血清中の creatine kinase 値，並びに pyruvate と lactate の含量を測定した．

Creatine kinase はモノテスト CK-NAC (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，また，pyruvate と lactate はデタミナー PA，デタミナー LA (協和メデックス社製) を用い，Videochem 式自動分析器を使用してそれぞれ測定した．

## 結　果

### A．無処置ラットの血清 creatine Kinase 値 (表 2)

solid-basal-diet で飼育し，各時点で採血，creatine kinase 活性を測定した．そしてその結果を表 2 の左端で示し，( )内にはそれぞれの体重を記載している．

その結果は，最高値が10,553U，最低値が427U で，そしてその平均値は4,288U となり，正常ヒトの上限値が94U であるのと比べると，いずれも高く，且つ個体差が大きい．また，体重別にも並べてみたが，酵素値に一定の規則性は見出せなかった．

そして，採血までの操作が慣れるにつれて，個体差も小さく，且つ活性値は低下した (表 3 →表 4，5)．

表2　Creatine kinase activities and anesthesia

| Free | | Diethyl-ether | | Pentobarbital 50mg/mℓ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1110(138) | | 2580(215) | | 0.5mℓ | 543(190) | |
| 427(247) | | 4148(243) | | | 573(221) | |
| 10370(184) | | 317(184) | (2781) | | 598(214) | |
| 4575(186) | | 945(181) | | | 506(221) | (589) |
| 7991(186) | | 5917(190) | | | 726(210) | |
| 10553(194) | (4288) | | | 1.0mℓ | 1720(181) | |
| 1165(184) | | | | | | |
| 4514(192) | | | | | | |
| 1360(210) | | | | | | |
| 811(212) | | | | | | |

(　) : Body weight
(＿) : Average of creatine kinase

表3　Effects of vitamin $B_1$ free diet (1)

| | Increase ratio of body weight (%) | Creatine kinase (u) | Pyruvate (mg/dℓ) | Lactate (mg/dℓ) |
|---|---|---|---|---|
| Solid basal diet | 132 | 1324 | 1.7 | 77.7 |
| | 123 | 622 | 0.6 | 52.4 |
| | 120 | 939 | 0.5 | 41.7 |
| | 133 | 824 | 0.5 | 46.2 |
| | 120 | 1928 | 1.0 | 62.6 |
| | 126 | 878 | 0.9 | 60.4 |
| | (126) | (1086) | (0.9) | (56.8) |
| Synthetic diet (protein, 17%) ～vitamin $B_1$ free～ | 113 | 1177 | 1.5 | 58.7 |
| | 112 | 939 | 0.2 | 35.4 |
| | 118 | 677 | 1.1 | 43.6 |
| | 126 | 1360 | 0.9 | 34.8 |
| | 117 | 695 | 0.8 | 32.0 |
| | 103 | 1263 | 3.6 | 104.6 |
| | (115) | (1019) | (1.4) | (51.5) |

Initial body weight : 155± 9 g
Duration on the added diet : 5 days
(　) : Average

**B．麻酔下ラットの血清 creatine kinase 値（表2）**

エーテル麻酔下のラット（表2，中央）では，最高値が5,917U，最低値は317U，そしてその平均値は2,781U となり，やはりヒトより高値を示し，個体差も大きく認められたが，概して，無処置のラットより低値を示した．

また，ペントバルビタール麻酔下（表2，右端）のラットでは，50mg/ml 溶液，0.5ml 皮注5分後で，最高値726U，最低値506U，そしてその平均値は589U となり，前記2群より低値を示し，且つ個体差が少なかった．しかし，上記溶液1.0ml 皮注5分後では1,720U を示した．

**C．ビタミン $B_1$ ($VB_1$) 欠乏食投与下ラットの血清 creatine kinase 値**

**1．正常タンパク含量の食餌下では（表3）**

ラットを2群に分け，一群には表1の solid-basal-diet を，他群には表1の synthetic-diet の17%を投与し，5日後の体重変化率（%）と血清の creatine kinase 値，pyruvate 濃度，lactate 濃度を表示した．

この場合，synthetic-diet 投与群—$VB_1$欠乏群（下段）は solid-basal-diet 投与群—control 群（上段）に比べ，$VB_1$free のビタミン混合を使用し，且つ sucrose 含量を15%から70%に増量，その分 dextrin 量を減量して，各栄養素の%を調整し

ている点で違いがある．

その結果は，体重の増加では control 群が126%，欠乏群が115%と欠乏群でやや低下．Creatine kinase 値の平均値は，control 群が1,086U，欠乏群が1,019U と殆んど差はなく，且つ共に個体差が大きかった．一方，pyruvate 値の平均値は control 群が0.9mg/dl，欠乏群が1.4mg/dl で，欠乏群がやや高く，lactate 値では control 群が56.8mg/dl，欠乏群は51.5mg/dl であった．

**2．タンパク含量10%の食餌下では（表4）**

ラットを2群に分け，一群には**表1**の solid-basal-diet を，他群には**表1**の synthetic-diet の10% pr を投与し，6日後の体重変化率（%）と血清の creatine kinase 値，pyruvate 濃度，lactate 濃度を測定した．

この場合，**表3**の食餌内容に比べ，control 群（上段）では同じ，欠乏群では**表3**の組成変化の上に，タンパク含量を17%から10%に減量，その分 dextrin 量を増加して，各栄養素の%を調整した．

その結果は，体重の変化は control 群が143%と増量，一方，欠乏群では94%と著明に減少した．また，creatine kinase 値でも，その平均値は control 群が601U，欠乏群が1,312U と欠乏群で増加し，且つ欠乏群には，最高値が2,684U，最低値が573U と大きな個体差が現われた．また，pyruvate 値の平均値は control 群が0.3mg/dl，欠乏群が0.8mg/dl，lactate 値でも control 群が27.9mg/dl，欠乏群が34.1mg/dl となり，いずれも欠乏群で増加していた．

**3．タンパク含量5%の食餌下では（表5）**

ラットを2群に分け，一群には**表1**の solid-basal-diet を，他群には**表1**の synthetic-diet の5% pr を投与し，5日後の体重変化率（%）と血清の creatine kinase 値，pyruvate 濃度，lactate 濃度を測定した．

この場合，**表3**の食餌内容に比べ，control 群（上段）では同じ，欠乏群では**表3**の組成変化の上に，タンパク含量を17%から5%に減量，その分 dextrin 量を増加して，各栄養素の%を調整した．

その結果は，体重の変化では control 群が142%，欠乏群が92%と，著明な差がみられ，且つ，creatine kinase 値も，その平均値は control 群が885U，欠乏群が2,074U と，欠乏群で増量，また，pyruvate 値の平均値は control 群が0.4mg/dl，欠乏群が1.0mg/dl，lactate 値でも control 群が40.2mg/dl，欠乏群が46.6mg/dl と，いずれも欠乏群で増加していた．

## 考　　案

ラットは実験動物として最もよく利用されている．そのため，酵素漏出の機構を DNA と関係づけて検索を進めていく上にも適当な動物であると考えた．

しかし，DNA にどのような修飾を加えれば，筋

**表4**　Effects of vitamin $B_1$ free diet (11)

| | Increase Ratio of body weight (%) | Creatine Kinase (u) | Pyruvate (mg/dℓ) | Lactate (mg/dℓ) |
|---|---|---|---|---|
| Solid basal diet | 140 | 573 | 0.5 | 35.2 |
| | 139 | 598 | 0.3 | 22.1 |
| | 142 | 506 | 0.3 | 28.5 |
| | 150 | 726 | 0.1 | 25.8 |
| | (143) | (601) | (0.3) | (27.9) |
| Synthetic diet (protein, 10%) ~vitamin $B_1$ free~ | 98 | 2684 | 0.3 | 21.8 |
| | 93 | 573 | 0.4 | 27.4 |
| | 103 | 665 | 0.6 | 35.2 |
| | 88 | 744 | 1.1 | 44.5 |
| | 87 | 1891 | 1.7 | 41.6 |
| | (94) | (1311) | (0.8) | (34.1) |

Initial body weight : 155±15 g
Duration on the added diet : 6 days
(　) : Average

表5　Effects of vitamin $B_1$ free diet (111)

| | Increase Ratio of body weight (%) | Creatine Kinase (u) | Pyruvate (mg/dℓ) | Lactate (mg/dℓ) |
|---|---|---|---|---|
| Solid basal diet | 135 | 1141 | 0.2 | 28.2 |
| | 147 | 817 | 0.7 | 36.9 |
| | 142 | 634 | 0.6 | 63.4 |
| | 143 | 946 | 0.1 | 32.4 |
| | (142) | (885) | (0.4) | (40.2) |
| Synthetic diet (protein, 5%) ~vitamin $B_1$ free~ | 92 | 1000 | 0.7 | 50.5 |
| | 94 | 4209 | 0.5 | 43.9 |
| | 91 | 2050 | 0.3 | 32.7 |
| | 92 | 1037 | 1.4 | 51.7 |
| | 91 | 2074 | 2.0 | 54.1 |
| | (92) | (2074) | (1.0) | (46.6) |

Initial body weight : 144± 5 g
Duration of the added diet : 5 days
(　) : Average

漿酵素の漏出がもたらされるのか，それには，DNA を操作する以前に，どのような注意を払う必要があるのかをまず検討することが必要であろう．

第一に，ラットの尾から確実に採血することが難しい．そのため，ラットを仰臥位で固定し，開腹して，下大静脈から採血した．

そしてその酵素値（**表2**）は当初予想していた値より異常に高く，且つそこに大きな個体差が認められた．この場合，使用しているラットは週令と共に体重が増加している状態にあるので，個体差は週齢によっているのではないかと考え，体重の順序に並べて酵素値を比較してみたが，そこには一定の規則性は見出せなかった．むしろ，不慣れなために，固定にてこずったラットほど高値をとる印象をうけたので，麻酔剤との影響を調べてみた．

その結果は，非麻酔群よりエーテル麻酔群で，エーテル麻酔群よりペントバルビタール麻酔下で低値をとる傾向がみられ，且つ個体差も減少した．その場合，エーテル麻酔下でもなお個体差がみられたり，ペントバルビタール1.0ml 皮注後の値が0.5ml 皮注後より高いのは，麻酔過程の相の違いで透過性に変化がもたらされてくるものと想定される．

なお，**表2**からみると，この操作による基礎値は317～726U とみなされ，ヒト正常値より高値を示しているが，それは開腹時の腹筋侵襲に由来するものかもしれない．

次に，摂取させる食餌との関係をみてみた．既に，Olson ら[1]はビタミンE欠乏家兎で高 creatine kinase 血症がもたらされたと報じているが，私共は男子大学生で高率に高 creatine kinase 血症が見出され，それが運動部所属，外食生活者に多いことから，食事性欠陥一とりわけ $VB_1$欠乏によることを推察してきた[2~4]．

そのため，ラットに $VB_1$欠乏食を投与して，果たして高 creatine kinase 血症がおこるかを調べてみた．この実験では（**表3，4，5**），総べて，ペントバルビタール (50mg/ml) 0.5ml 皮注5分後に，動物を固定し，値を比較している．

ある種の酵素はホロ酵素（アポ酵素—タンパク質＋補酵素—ビタミン類）として作用している．$VB_1$の役割としては，補酵素，とりわけミトコンドリアの膜に局在する pyruvate-decarboxylase の補酵素としての意義が注目される．この場合，代謝上の位置関係を考えると，その欠乏症状を引き起こすためには，①酵素基質を増やすために食餌中の sucrose を増加させる．また，decarboxylase を狙って，②低タンパク食にする．③ $VB_1$ 欠乏食を投与する．更に，代謝回転を速くするために，④運動させることなどが必要なものと考えられるが，①＋③（**表3**），あるいは②のみを満たした条件では，高 creatine kinase 血症は認められなか

ったが，①＋②＋③を満たす条件（表4，5）にすると，高 creatine kinase 血症が現われた．

$VB_1$欠乏食を与えていくと，体重は増加せず，ラットは，過敏になり，固定するのが難しくなるが，麻酔には極めて弱い．そのためこの場合の血清 creatine kinase 値の上昇もある種の神経性因子によっているのかも知れない．

## おわりに

ラットの血清 creatine kinase 値の動向をみたところ，値はヒトより高く，麻酔のあり方，特に麻酔の相によって著明に変動し，したがって，ある種の神経性因子が creatine kinase 漏出に関与していることが想定される．

ラットに高 sucrose，低タンパク，ビタミン $B_1$ 欠乏食を与えると，高 creatine kinase 血症がみられた．このような食事条件は，高 creatine kinase 血症を示した大学生と極めて類似しているものと考えられる．

筋肉酵素の漏出が如何なる過程を経て DNA 異常と結びついているのかを，ラットを用いて検索していくには，今後，上記の2点に考慮を払う必要があるものと考える．

## 文　献


1) Olson, R. E. and Carpenter, P. C. : The regulatory function of vitamin E. Advances in Enzyme Regulation, 5 : 325, 1967.

2) 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.

3) 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. 184-187.

4) 植田啓嗣，畑中良夫，阿部千史，神谷和恵，宮内由美子，久保田道子：血清酵素と creatine kinase．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，1984，p. 237-241.

# 20）各種ミオパチー，心筋梗塞および健常人の運動負荷におけるミオグロビン(Mb)とクレアチンキナーゼ(CK)の血中への流出パターン

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　野　　洋*　西　田　善　彦*
木　村　千代美*　筒　井　芳　彦*　三　好　和　夫**

ミオグロビン(Mb)とクレアチンキナーゼ(CK)は主として骨格筋，心筋に存在し，それぞれ固有の機能を持つものであるが，ともに各種の筋崩壊時に容易に血中へ逸脱し，増加して認められる．これら逸脱蛋白質の血中への流出や，その変動パターンは，それぞれの特徴(分子量についてもMb17,500，CK80,000)に基づいて筋崩壊のあり方を反映しているものと考えられる．

私達はこれまでに，各種筋疾患や心筋疾患について血清Mb値，血清CK活性値を経時的に測定し，それぞれの血中変動パターンを明らかにするとともに，筋崩壊量の推定を行い成績を発表してきた[1]．

今回は，Mb，CKの血中変動パターンより，両蛋白質の各時刻における単位時間当たりの血中への流出量の特徴を明らかにし，各種病態における筋崩壊機序の解明を試みた．

## 対象と方法

対象症例は急性心筋梗塞症例13例[3]（男性11例，女性2例，40歳から74歳），LDH M-subunit欠損症，18歳男性，本例は西村氏らの症例[2]で前腕虚血試験時の血清Mb値測定の依頼をうけたものである．悪性高熱2例[4]，両例とも22歳男性でGOF，サクシニールコリンクロライド(SCC)による麻酔後に発熱，筋硬直，Mb尿をきたしたものである．健常成人5例（全例男性，本学運動部員，21歳から25歳）で14km走の運動負荷を加えた[5]．Duchenne型筋ジストロフィー症3症例（全例男性，7，12，15歳），50分の歩行訓練を行った．

検索例について経時的に採血し，同じ血清についてMb値，CK活性値の測定を行った．

血清Mb値はラジオイムノアッセイ(RIA)（当科開発）[1]により，また血清CK活性値は江橋・杉田法，一部Rosalki法にて測定した[1]．

Mb，CKの各時刻における単位時間当たりの流出量f(t)は次のごとく求めた．血中のMb値またはCK活性値の時間的変動E(t)は，筋から血中への流出速度と，血中からの消失速度の2因子により規定され次式で表わされる．

$$\frac{dE(t)}{dt}=f(t)-kd\cdot E(t)$$
$$f(t)=\frac{dE(t)}{dt}+kd\cdot E(t)$$

ここでkdは血中減衰率であり，各症例について血清Mb値，CK活性値を半対数グラフ上にプロットし，その下行脚の勾配から求めた．

今回はとくにf(t)について述べるが，E(t)及びf(t)曲線を積分してえられる総流出量$\int_0^T f(t)dt=E(T)+kd\int_0^T E(t)dt$の成績については，前回述べた[1]．

## 結　　果

1）急性心筋梗塞症例

図1に急性心筋梗塞13例における，Mbおよび

＊徳島大学医学部第一内科
＊＊沖中記念成人病研究所

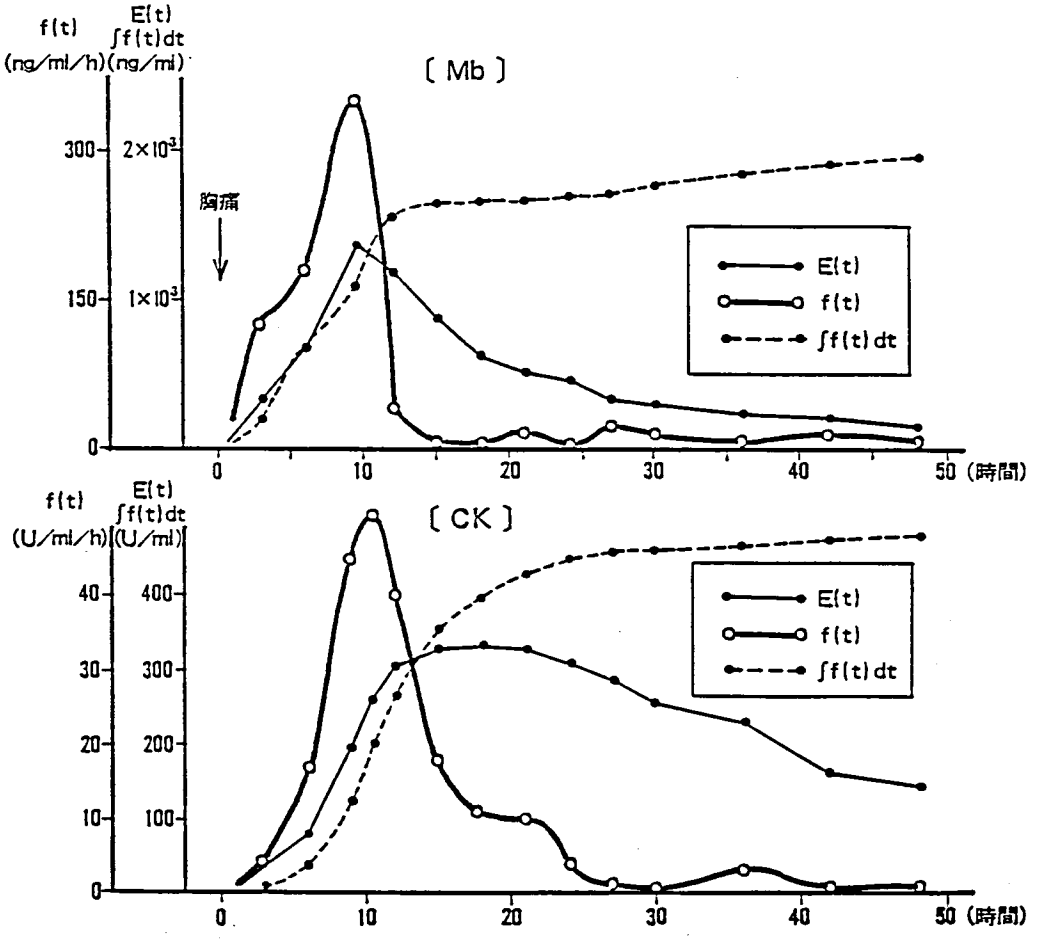



図1　急性心筋梗塞におけるMbおよびCKの流出パターン
E(t)，f(t)および∫f(t)dtの関係

CKの流出パターン（平均値）を，E(t)，f(t)，および∫f(t) dtの経時的変化で示した．

血中実測値の変動E(t)では，Mbは胸痛発作直後より上昇し，9時間で最高値1,400ng/mlに達しその後下降しているのに対し，CKはMbに遅れて上昇し発作後19時間で最高値350U/mlに達している．

これに対して流出f(t)は，Mbでは胸痛発作直後より流出が始まり，3時間で相当量の流出がみられ，その後shoulderをつくり，約9時間後に最高値350ng/ml/hになり，その後急に減少している．CKの流出f(t)はMbより遅れて始まるが，約11時間前後で最高値51U/ml/hとなり，その後も20～25時間までつづいている．すなわちMbの流出は，CKに比して早期より始まり，より早期に停止するが，最高値に達する時間は両者が近接して9ないし11時間であった．

総流出量∫f(t) dtは，Mbでは約12時間後にほぼプラトーとなり，CKでは約24時間まで上昇しその後プラトーになっている．

2）LDH M-subunit欠損症

本例の前腕虚血試験におけるMbおよびCKの流出パターンを図2に示した．

E(t)は，Mbでは試験後2時間で最高値24,000

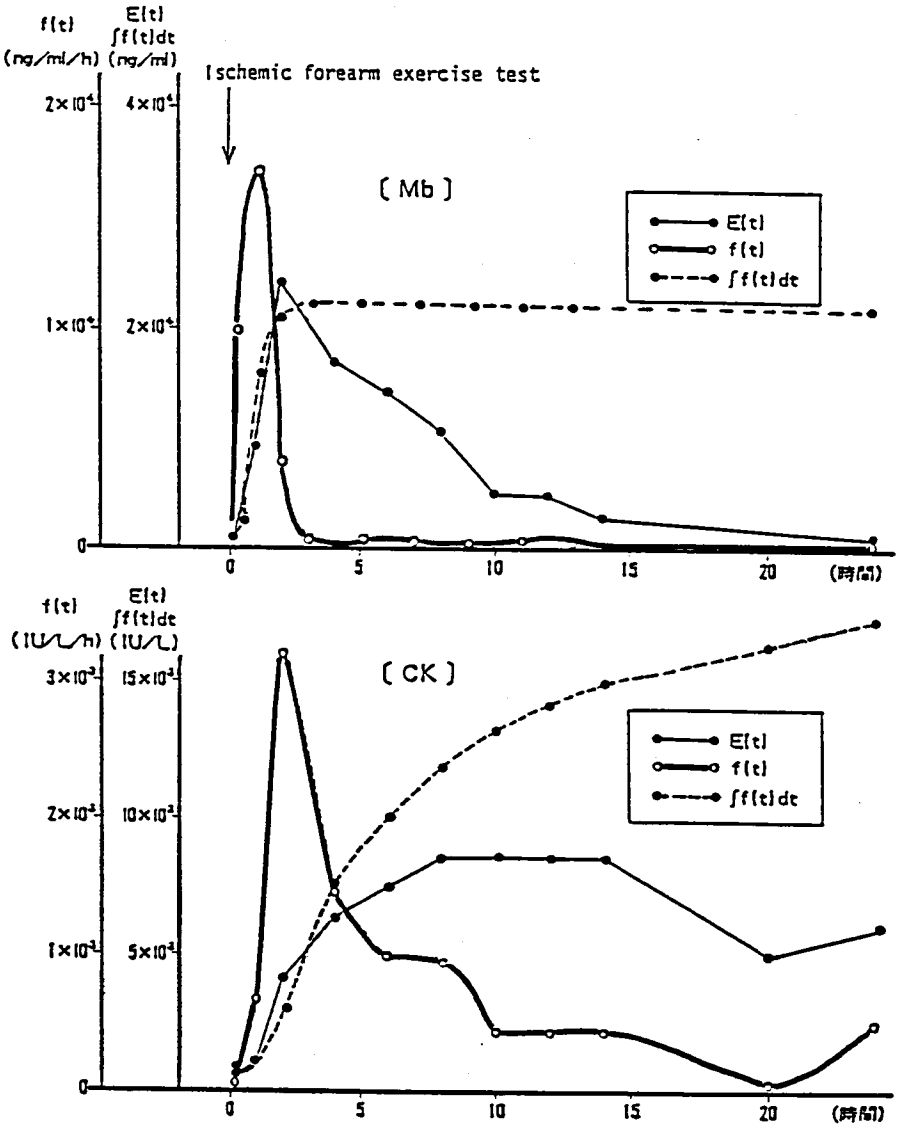



図2　LDH M-subunit 欠損症例における Mb および CK の流出パターン ∫E(t), f(t)および f(t)dt の関係

ng/ml に達し，CK では Mb より遅れて上昇し約8時間後に最高値8,000IU/L に達し，その後の減少も遅延していた．

流出 f(t) は，Mb では前腕虚血試験の直後より始まり，2時間でピーク17,100ng/ml/h に達し以後急速に減少し停止した．CK の流出 f(t) も試験直後より始まり2時間でピーク3,200IU/L/h に達しているが，Mb に比べその後も相当時間にわたり流出がつづいている．

3）悪性高熱

悪性高熱症例1における，Mb および CK の流出パターンを図3に示した．

E(t) は，Mb では，SCC の静脈注射直後より上昇し，1時間後に24,000ng/ml と最高値を示し，

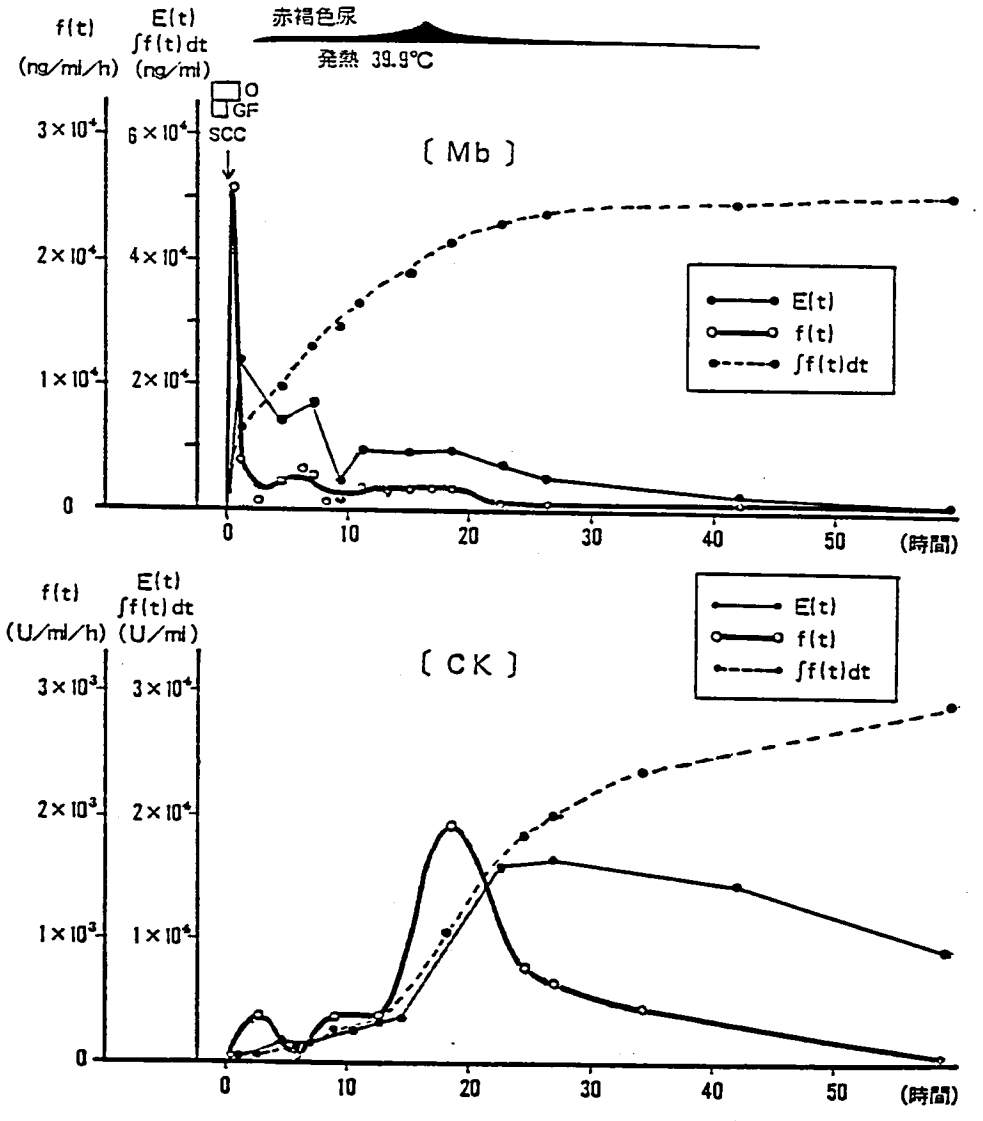



図3　悪性高熱症例における Mb および CK の流出パターン
E(t)，f(t)および∫f(t)dt の関係

CK では，Mb より遅れて徐々に増加して注射後27時間で最高値17,000U/ml となった．

流出 f(t) は，Mb では静脈注射直後より急激に増加し30分後に最高値25,800ng/ml/h に達した後急速に減少した．CK の流出 f(t) は徐々に増加し，Mb よりはるかに遅れて，静脈注射後20時間でピーク2,000U/ml/h に達し，以後も長時間にわたり流出が続いている．すなわち Mb, CK 両者の流出に著明な解離がみられた．

症例 2　における Mb および CK の流出パターンは症例 1 とほぼ同様であった．すなわち，Mb の流出 f(t) は SCC の静脈注射後 2 時間で最高値1,100ng/ml/h に達し，CK の流出は Mb より遅れ静脈注射後30時間で最高値1,100IU/L/h に達した．

4）健常成人

図4(a)に健常成人5例の14km走におけるMb, CKの流出パターンを平均値で示した.

E(t)は, Mbでは運動終了直後に前値の2～4倍(98～225ng/ml)に上昇し, 3～6時間で4～6倍(175～330ng/ml)となり最高値を示し, 24時間でほぼ健常値に復した. CKでは12時間後に3～4倍となり最高値を示した.

流出f(t)は, Mbで運動終了直後の値が最高値となり, その後急速に減少し運動終了12時間後にはほとんど止っている. 一方, CKのf(t)は, 運動終了時に上昇がみられ, 一時, ノッチをつくり, つづいて主要ピークが6～12時間後にみられ, 24時間後には流出が止っている. 終了直後の流出は時期的にMbの流出とほぼ一致し, 個々の例によって大小の幅がみられた.

5) DMD症例

図4(b)に本症代表例として13歳男性の50分歩行訓練時における成績を示した. E(t)は訓練前のMb100ng/ml, CK320U/mlから訓練により, それぞれ850ng/ml, 500U/mlと上昇した.

流出f(t)はMb, CKともに訓練直後にピークをつくる上昇をきたした. この場合の流出量は相当量で, 健常人の運動の場合の約5倍量であった.

6) 各種疾患の総括

図5に, 前述の各種疾患のMb, CKのf(t)曲線のみをとり出し比較して示した. Mb, CKのf(t)曲線は症例により特徴のあるパターンを示し, とくにMb, CKそれぞれのf(t)のピークを示す時間は特徴ある相違を示している.

## 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重要な分野である. 私達は, このことについてMbとCKの両者からの研究を行ってきた.

本報告では, Mb, CKについて各時刻における単位時間当たりの血中への流出量f(t)を算出し,

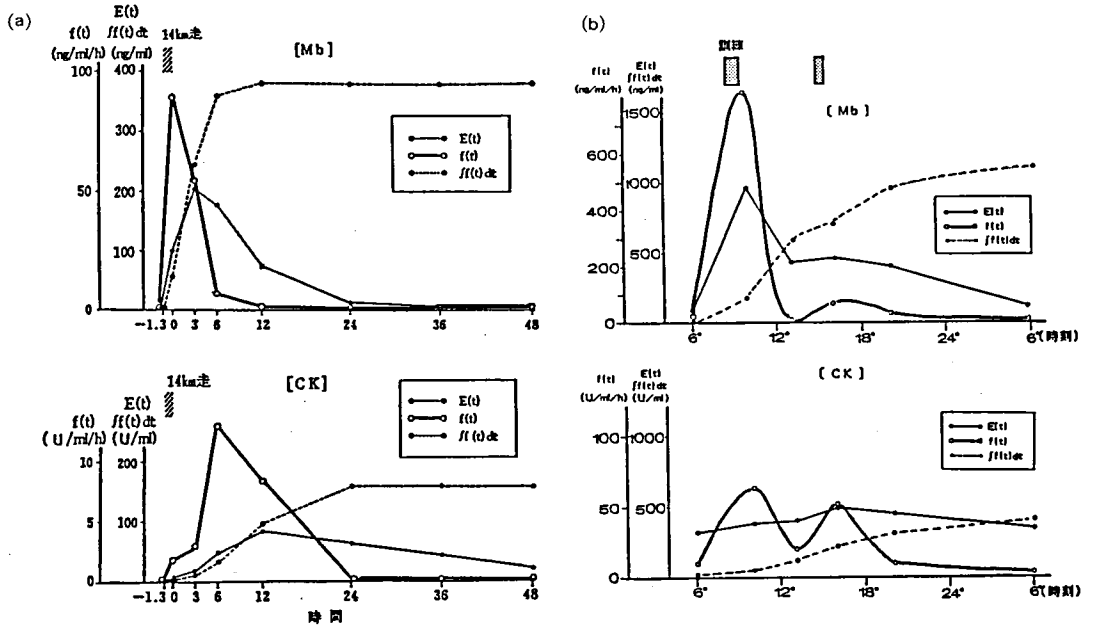



図4 (a) 14km走におけるMbおよびCKの流出パターン
E(t), f(t)および∫f(t)dtの関係
(b) DMDの訓練におけるMbおよびCKの流出パターン
E(t), f(t)および∫f(t)dtの関係

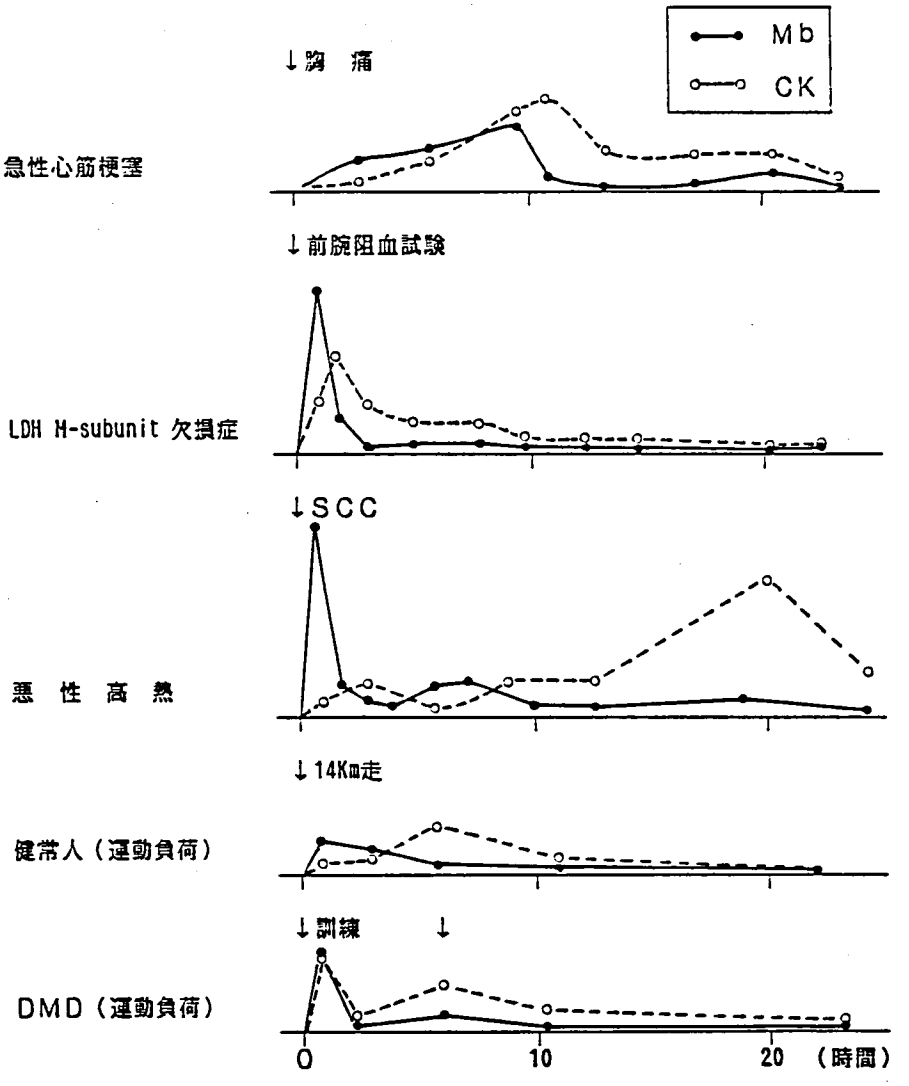



図5　各種筋・心筋疾患における Mb, CK の流出 f(t)パターン

f(t) 曲線を各種疾患で比較し，筋崩壊機序の解明を試みた．ここにとりあげた f(t) パターンは逸脱蛋白質の血中への流出をみるもので，これらが血中から消失する要因を含んでいない．例えば，従来, Mb, CK の血中の変動曲線 E(t) において, Mb の消失が CK のそれより早いために常に血中の最高値に達する時間は Mb が早く CK が遅れる現象とは異なる意味をもっている．さらに f(t) の考察に際して，次のごとく想定した．すなわち，Mb は膜透過性亢進により容易に逸脱し，CK もその時若干の逸脱はあるがその多くは筋線維の崩壊時に逸脱すると考えた．

急性心筋梗塞では，Mb, CK の流出 f(t) はともに胸痛発作後，約10時間で最高になった．本症では血管閉塞により逸脱物が血中に出現できず，遅れて Mb, CK 両者が洗い流し現象によりほぼ同時に出てくると考えられる．従って Mb の初期流出は，心ショックによる全骨格筋からの流出とみ

ることもできる．

LDH M-subunit 欠損症における発症の機序は，骨格筋内の LDH M-subunit の先天的欠損により嫌気性解糖による筋運動エネルギー産生機序に支障が生じ，そのため運動負荷に際して筋障害をきたすものと考えられる．本症では，Mb，CK の f(t) はともに約 2 時間で最高となっており，膜透過性亢進と筋線維崩壊がほぼ同時に起こることを想わせる．

悪性高熱では，Mb，CK 両者の流出に著明な解離がみられた．Mb の流出が30分で最高値に達したのに対し，CK では，はるかに遅れて20時間後にピークを示した．これは，本症例の原因と考えられる SCC には特異な筋膜障害効果がある結果と考えられた．

健常人14km 走では，Mb の流出 f(t) は運動直後にピークとなり，CK は少し遅れて 6 ～12時間でピークとなった．これは生理的状態のものであり流出量は多くはないが，このような相当強度の運動では，やはりまず膜透過性が高まり，続いて一部筋崩壊が起こることが考えられる．

DMD では，すでに安静時より Mb，CK の持続的流出があるので，その流出パターンを知ることは困難である．今回は50分の歩行訓練を加え，直後に Mb，CK ともに相当量の流出のあることを確かめた．DMD では，健常成人に比べ流出が起こり易いと言えるかもしれない．

## おわりに

各種筋・心筋疾患における，Mb，CK の血中への流出パターン f(t) 曲線をもとめ，それぞれの特徴を示した．筋崩壊において，膜透過性亢進の時期には Mb の多くと CK の若干が流出し，筋線維の崩壊時に CK の多くが流出するとする想定に立って，病態によって膜透過性亢進の状態が筋崩壊と解離してみられる場合（悪性高熱），両者が接近あるいはほぼ同時にみられる意味の異なる 2 つの場合（心筋梗塞，LDH M-subunit 欠損），そしてその中間の場合（健常人運動負荷）などのあることを具体的に示した．これらの結果は筋ジストロフィー症の筋崩壊機序の解明に有用である．

## 文　献


1) 川井尚臣，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：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．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，p. 242，1984.

2) Nishimura, Y., Ohyama, K., Honda, N., Ichiyama, A. and Kanno, T. : Myoglobinuria due to LDH M-subunit deficiency : A new hereditary myopathy. Muscular Dystrophy (Ebashi, S. editor), University of Tokyo Press, Tokyo, p. 455, 1982.

3) 三好和夫，川井尚臣，足立克仁，斎藤史郎：心筋梗塞と血清ミオグロビン．循環制御，4：111，1983.

4) 田村克也：各種の筋崩壊時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と推定筋崩壊量．四国医誌，40：666，1984.

5) 増田健二郎：運動とくに各種スポーツにおける血中へのミオグロビンの流出と変動パターン．四国医誌，40：804，984

# 21)－(1) カルモデュリン免疫ラットの神経筋に関する研究

高 守 正 治*

研究協力者 坂 戸 俊 一* 橋 井 美奈子*
松 原 四 郎*

## 目 的

多岐にわたる細胞内情報伝達物質としての$Ca^{++}$に対応するカルモデュリン（CaM）は，発症や病像に$Ca^{++}$の関与が推察されているジストロフィー筋でも測定され論じられているが[1]，筋内の全体量の評価よりも，細胞内の局在とそれに対応する機能に分けて，疾患筋でのそれぞれの位置における本蛋白の機能を調べることも重要であろう．本研究ではCaMで免疫したラットに抗CaM抗体が出現し，神経筋症状が発現する時期を選んで標本を得，in vitroで神経筋シナプス伝達と筋の興奮収縮連関機構を調べた．

## 方 法

**CaMの蟻酸々化処理** ①9.5mlの蟻酸（99%溶液）に0.5mlの30% $H_2O_2$を加え，室温で2時間incubate後，2℃で30分間処理．②牛脳より抽出精製したCaM50mgを1mlの蟻酸に溶解，2℃，30分間処理．③②に①の3mlを加え2℃で150分間反応させたのち，蒸留水で稀釈後，透析膜を通し，CaM2mg/mlの濃度として2℃にて保存した．

**免疫方法と抗体の証明** 8～10週齢の雌ルイス・ラットに1週おき4回，上述の蟻酸々化処理を施したCaM100$\mu$gを等量の完全Freund's adjuvantとともに皮内注射し，最終免疫より9～22日後までの間に，筋無力の臨床症状の発現を確認して屠殺した．抗CaM抗体は，microplate ELISA法で測定した．抗原にはCaM5$\mu$g/mlを，一次抗体にはCaM-免疫ラットの希釈血清（1：4～1：65,536）および対照ラット血清を，二次抗体にはperoxidase標識抗ラットIgGウサギ血清$F(ab)_2$ fractionを，それぞれ用いた．抗体価は呈色した最大希釈倍数をもって表現した結果，CaM-免疫ラットのそれは1：1,024～1：4,096であった．

**電気生理学的検査** 上記のCaM-免疫ラットおよび1週おき4回にわたりadjuvantのみを注射した対照ラットから，横隔膜神経筋標本を得，ガス（$O_2$：$CO_2$＝95：5）負荷Ringer液（122mM NaCl, 4.7mM KCl, 15.5mM $NaHCO_3$, 1.2mM $MgCl_2$, 1.2mM $KH_2PO_4$, 2.6mM $CaCl_2$, 11.5 mM glucose）（37℃）内で実験に供した．神経筋伝達は，微小電極により自発性微小終板電位（MEPP），終板電位（EPP）（クラーレd-TC添加量2$\gamma$/ml：対照で必要な添加量2.5$\gamma$/ml）を指標として調べた．ACh quantum contentは1Hz連続神経刺激による誘発$EPP_s$振幅（11th～60th）の変異係数で表現，Immediately releasable ACh store量は100Hz連続神経刺激による$EPP_s$（1st～3rd）から算出するquantum contentで表現，ACh mobilization rateは100Hz連続神経刺激による$EPP_s$の最後の12発のquantum contentで表現した[2]．筋収縮・弛緩機構の解析には，標本を等尺性筋張力計にセット，白金板電極で筋全長にわたるmassive stimulationで直接刺激（筋内神経刺激を避けるためクラーレd-TC6$\mu$g/mlを潅流液に添加）して，誘発張力曲線を記録，また1次，2次微分回路を通して張力発生の速度，加速度を測定した．最大強縮張力は250Hz反復刺激で誘発

*金沢大学 神経内科

した．得られた張力曲線は，Active state の概念を導入し，“時間要素”・“つよさ要素”に分け解析した（表１）[3]．post-tetanic twitch potentiation は強縮負荷（50Hz，５秒間）10秒後，Caffeine-induced twitch potentiation は Caffeine 3 mM 添加２～５分後，$NO_3^-$ －induced twitch potentiation は Ringer 液構成 NaCl を $NaNO_3$（122mM）に全置換した $NO_3^-$ －Ringer 液で２～５分処理後に誘発した単収縮張力を測定，解析し，各負荷前のそれと対比した変化（%）で表現した．

**電顕的観察**　採取した横隔膜筋を伸展位に保ち，４%パラホルムアルデヒド，2.5%グルタルアルデヒド固定液（0.1M カコジル酸緩衝液）にて２～３時間前固定，緩衝液で洗浄，神経筋接合部を含む小片を切り出して1.5%オスミウム酸（0.1M カコジル酸緩衝液）にて２時間固定後，常法に従いアルコール脱水，エポン812に包埋した．超薄切片を作製し，酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で電子染色後，電顕にて観察した．アセチルコリン受容体（AChR）は，固定，洗浄後，peroxidase ラベルアルファ・ブンガロトキシン（$\alpha$-BuTX）で染色の後，上記同様オスミウム酸固定，アルコール脱水を行い，エポン812包埋，超薄切片を作製して電顕にて観察した．

## 結　　果

CaM で免疫し抗体産生上昇を確認した（ELISA 法で×1,024～×4,096）ラットの横隔膜神経筋標本を用いて調べた神経筋伝達機能では，神経終末での ACh mobilization, immediately releasable store および神経終末からの ACh 量子性遊離（EPP の ACh quantum content）に有意な低下がみとめられ，MEPP の振幅低下もみられた（表２）．しかし，神経筋接合部の形態には異常なく（図1A），シナプス襞上の AChR の分布にも異常は見出せなかったので（図1B），後シナプス膜側の病変はないものと判断され，MEPP 振幅低下は，前シナプス機能異常（quantum size の減少）の反映と判断した．

筋収縮・弛緩機構の検査では，条件負荷を掛けない単・強縮張力とその微分分析から判断される active state properties（表１）に異常な（表3A），post-tetantic twitch potentiation も正常範囲内であった（表3B）．一方，caffeine による twitch

表１　Active state properties

| Function | Abbreviation | Physiological events |
|---|---|---|
| 等尺性単収縮張力 | Pt | 収縮弛緩要素と直列弾性要素の総合表現． |
| 単収縮張力の一次微分ピーク値（最大速度） | dPt/dt | 直列弾性要素を除いた収縮機構の表現。 |
| 活動電位起生時から単収縮張力の一次微分ピーク値までの時間．Duration of active state | T dPt′/dt | ・刺激により筋小胞体から遊離される$Ca^{++}$量．<br>・遊離された$Ca^{++}$が収縮要素によって活用される割合．<br>・Active state decay関与． |
| 単収縮張力発生よりそのピークを経て，½の張力まで弛緩する時間．Active state decay | $^T$1/2R | 筋弛緩の時間経過<br>・Troponinからの$Ca^{++}$removalと筋小胞体の$Ca^{++}$再結合（外的コントロール）<br>・Troponinによる$Ca^{++}$－bindingとMyosinによるATP-bindingの関係（内的コントロール） |
| 単収縮張力の二次微分ピーク値（最大加速度）Active state intensity of shortening | $d^2Pt/dt^2$ | 刺激により筋小胞体から遊離される$Ca^{++}$量．活動電位がE－ coupling を誘起する閾値に関係する． |
| 250/sec.反復刺激による最大強縮力．Active state intensity of load-bearing | PO | actin-myosin cross-bridgesの数とintrinsic strength |
| 最大強縮張力曲線の一次微分ピーク値 | dPo/dt | Force-velosity関係および直列弾性要素． |

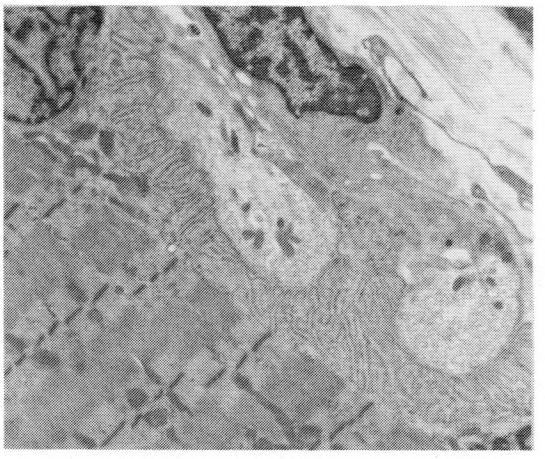


図１Ａ　カルモデュリン免疫ラット横隔膜神経筋の電顕像．×3,650．

Ｂ　同神経筋接合部におけるシナプス襞先端に局在するアセチルコリン受容体．×8,760．

表２　Synaptic function

| | Control rats | CaM-immunized rats |
|---|---|---|
| MEPP amplitude(mV) | 0.75 ± 0.205 n:120 | 0.44 ± 0.204* n:45 |
| frequency(per sec.) | 6.7 ± 2.99 n:120 | 3.2 ± 1.46* n:45 |
| Resting membrane potential(mv) | 75 ± 5.7 n:120 | 76 ± 4.5 n:45 |
| EPP, quantam content at 1 Hz | 280 ± 65 n:45 | 183 ± 80* n:45 |
| Immediately releasable ACh store (quanta) | 1340 ± 450 n:45 | 895 ± 356* n:45 |
| ACh-mobilization rate at 100 Hz(quanta/sec.) | 5230 ± 1750 n:45 | 3240 ± 1236* n:45 |

(Mean ± S.D.)

* significantly different from control (t-test).

potentiation は正常の範囲を越え異常な上昇がみられ（表3C），$NO_3^-$ による twitch potentiation も異常であった（表3D）．これらの異常反応は，active state の“つよさ要素”（$d^2Pt/dt^2$），“時間要素”（TdPt/dt）の正常範囲を超えた増大を伴っていた（表3C，D）．図２に，これらの現象の実際を示している．筋の電顕像では，器質的異常は証明し得なかった（図1A）．

## 考　　按

動物に in vivo で抗 CaM 抗体を産生せしめ発症する神経筋障害を in vitro に調べると，シナプス伝達では ACh の mobilization, store, release という神経終末側の機能異常が主であった（表２）．これは，シナプス一般について，transmitter turnover-synthesis, tubulin kinase activation, presynaptic protein phosphorylation, vesicle-membrane interaction, transmitter release に $Ca^{++}$・CaM 系が関与するという理論[4]に矛盾しない．われわれの実験では，後シナプス側の異常は見出されず（図1A，B），phosphorylation による AChR modulation には $Ca^{++}$・CaM 系が関わるとする Smilowitz らの説[5]には反するが，これに関与するのは $Ca^{++}$・cyclic AMP 系であるとする Palfrey らの説[6]には矛盾しない．

骨格筋内で $Ca^{++}$・CaM 系が関与するプロセスとしては，(1) phosphorylase kinase[7] と，glycogen synthase kinase-２の調節[8]，(2) myosin light chain kinase の調節[9]，(3)筋小胞体 protein kinase（60,000 dalton protein の phosphorylation, dephosphorylation による $Ca^{++}$ release channel

表3　筋張力曲線の生理および薬理学的分析

(A)

Contractile Properties

| | Control rats (n:7) | CaM-immunized rats (n:6) |
|---|---|---|
| Pt(g) | 4.2 ± 0.47 | 4.1 ± 0.68 |
| $d^2Pt/dt^2$(g/msec²) | 0.018 ± 0.0018 | 0.017 ± 0.0023 |
| TdPt/dt (msec) | 14 ± 0.8 | 15 ± 1.0 |
| T1/2R (msec) | 54 ± 3.2 | 56 ± 2.7 |
| Po (g) | 33.6 ± 3.90 | 36.0 ± 5.05 |
| dPo/dt (g/msec) | 0.41 ± 0.005 | 0.40 ± 0.060 |
| muscle weight (dry) (mg) | 17 ± 1.5 | 18 ± 2.8 |

(Mean ± S.D.)

(B)

Posttetanic twitch potentiation (%)
-10seconds after tetanus (50Hz, 5 sec.)-

| | Control rats (n:7) | CaM-immunized rats (n:6) |
|---|---|---|
| Pt | 133 ± 14.6 | 132 ± 13.7 |
| $d^2Pt/dt^2$ | 130 ± 19.4 | 130 ± 18.2 |
| TdPt/dt | 108 ± 6.9 | 110 ± 5.7 |
| T1/2R | 97 ± 3.7 | 98 ± 6.7 |

(Mean ± S.D.)

(C)

Twitch potentiation by Caffeine (3mM) (%)

| | Control rats (n:7) | CaM-immunized rats (n:6) | |
|---|---|---|---|
| Pt | 149 ± 6.6 | 194 ± 9.1 | p<0.001 |
| $d^2Pt/dt^2$ | 133 ± 8.2 | 176 ± 11.8 | p<0.001 |
| TdPt/dt | 114 ± 1.1 | 121 ± 5.2 | 0.01<p<0.005 |
| T1/2R | 110 ± 5.9 | 115 ± 7.7 | n.s. |

(Mean ± S.D.)

(D)

Twitch potentiation by $NO_3^-$-Ringer solution (%)

| | Control rats (n:7) | CaM-immunized rats (n:6) | |
|---|---|---|---|
| Pt | 142 ± 10.0 | 204 ± 42.7 | 0.01<p<0.005 |
| $d^2Pt/dt^2$ | 123 ± 8.2 | 182 ± 35.9 | 0.005<p<0.001 |
| TdPt/dt | 112 ± 1.9 | 115 ± 0.6 | 0.005<p<0.001 |
| T1/2R | 110 ± 3.3 | 111 ± 2.5 | n.s. |

(Mean ± S.D.)

の閉，開）の賦活[10]，が知られている．本研究は(1)について言及することが出来ないが，(2)についてはpost-tetanic twitch potentiation[11]（表3B），張力発生速度[12]（表1），強縮張力plateau維持[13]（図2）の面から，少なくとも生理学的指標でみるかぎりは抗体による異常は証明できなかった．本研究で特に明らかであった事実は，(3)に対する抗CaM抗体の修飾である．すなわち，筋小胞体$Ca^{++}$のCaffeine-induced release[14]，およびT-systemを含む膜に作用しtrigger $Ca^{++}$ release[15]を促して筋小胞体$Ca^{++}$遊離を促進する$NO_3^-$の作用[16]による等尺性単収縮張力増大現象の異常である（表3C, D；図2）．Mac-Lennonら[17]のモデルによれば，筋小胞体の二つのgatesのうちの一つは，$Ca^{++}$・CaM系の影響を受け，phosphorylatedで閉鎖，dephosphorylatedで開放の状態になるとされ，われわれが証明した筋小胞体$Ca^{++}$遊離促進剤に対する過剰反応は，この制御機構に対する抗CaM抗体のmodulationの結果と推察される．

## 結　　語

in vivoレベルで産生された抗CaM抗体によって障害を受ける神経筋機能をin vitroで調べ，シナプス伝達では神経終末でのtransmitterの運搬，貯蔵，遊離機構，骨格筋内では筋小胞体$Ca^{++}$遊離制御機構にあることを証明した．

## 文　　献


1) Klamut HJ, Lin CH, Strickland KP：Calmodulin content and Ca-activated protease activity in dystrophic hamster muscles. Muscle & Nerve 1983；6：436-441.

2) Lambert EH, Lindstrom JM, Lennon VA：End-plate potentials in experimental autoim-

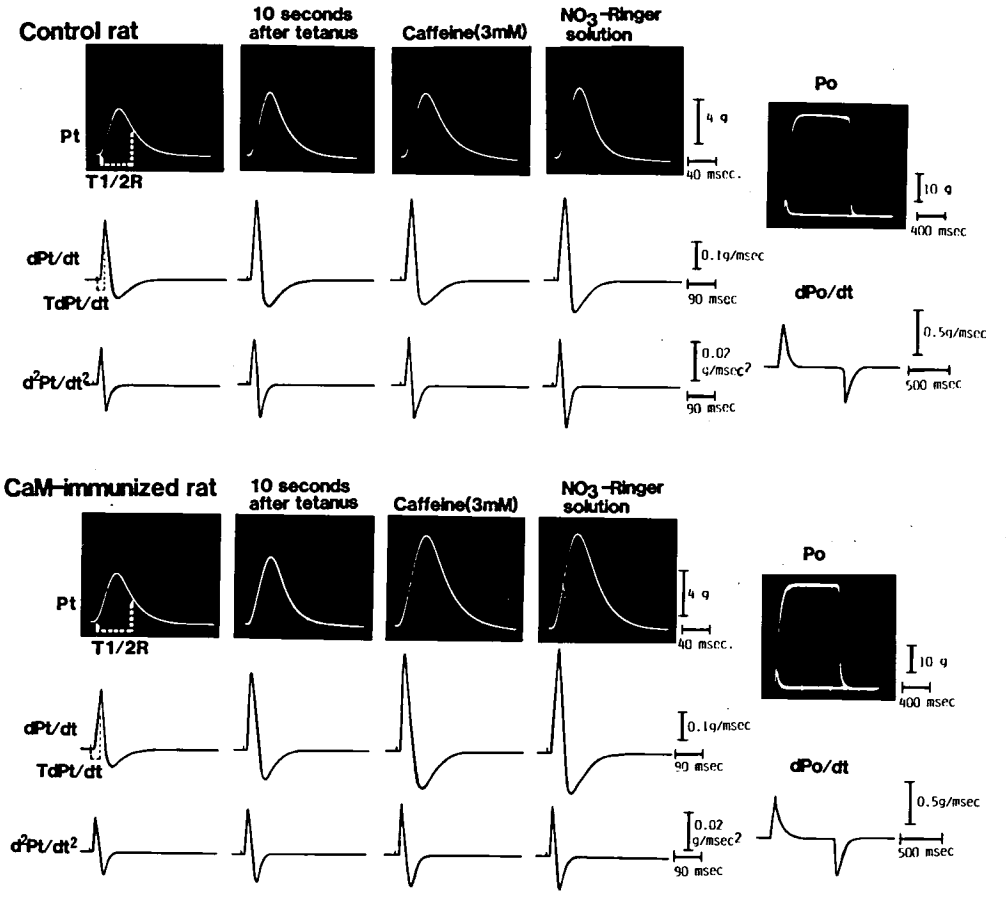



図2　コントロール（上）およびカルモデュリン免疫ラットから得た横隔膜筋の電気生理および薬理学的検討．指標，測定方法，active state の概念にもとづく意義付けについては表1参照．

mune myasthenia gravis in rats. Ann N Y Acad Sci 1976；274：300-318.

3) Takamori M, Mori K, Ide Y, Tsujihata M：Contractile and chemosensitive properties of muscle treated with calcium ionophore A23187. J Neurol Sci 1981；51：207-215.

4) DeLorenzo RJ：The calmodulin hypothesis of neurotransmission. Cell Calcium 1981；2：365-385.

5) Smilowitz H, Hadjian RA, Dwyer J, Feinstein MB：Regulation of acetylcholine receptor phosphorylation and calmodulin. Proc Natl Acad Sci USA 1981；78：4708-4712.

6) Palfrey HC, Rothlein JE, Greengard P：Calmodulin-dependent protein kinase and associated substrates in Torpedo electric organ. J Biol Chem 1983；258：9496-9503.

7) Cohen P, Burchell A, Foulkes JG, Cohen PTW, Vanaman TC, Nairn AC：Identification of the calcium-dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. FEBS Lett 1978；92：

287-293.

8) Embi N, Rylatt DB, Cohen P : Glycogen synthase kinase- 2 ane phosphorylase kinase are the same enzgme. Eur J Biochem 1979 ; 100 : 339-347.

9) Walsh MP : Calmodulin-dependent myosin light chain kinases. Cell Calcium 1981 ; 2 : 333 -352.

10) Campbell KP, MacLennan DH : A calmodulindependent protein kinase system from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Phosphorylation of a 60,000-dalton protein. J Biol Chem 1982 ; 257 : 1238-1246.

11) Manning DR, Stull JT : Myosin light chain phosphorylation and phosphorylase a activity in rat extensor digitorum longus muscle. Biochem Biophys Res Comm 1979 ; 90 : 164 -170.

12) Kushmerick MJ, Crow MT : In Basic Biology of Muscle (Twarog BM, et al, eds.), Raven Press, New York, 1981, pp 159-172.

13) Crow MT, Kushmerick MJ : Myosin light chain phosphorylation in associated with a decrease in the energy cost for contraction in fast twitch mouse muscle. J Biol Chem 1982 ; 257 : 2121-2124.

14) Su JY, Hasselbach W : Caffeine-induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. Pflügers Arch 1984 ; 400 : 14-21.

15) Miyamoto H, Racker E : Mechanism of calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum. J Membr Biol 1982 ; 66 : 193-201.

16) Homma I, Kurihara S, Sakai T : Effect of dantrolene sodium on excitation-contraction coupling of frog toe muscle. Jap J Physiol 1976 ; 26 : 53-61.

17) MacLennan DH, Campbell KP, Takisawa H, Tuana BS : In Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research, Vol. 17 (Greengard P, et al., eds.) Raven Press, New York, 1984, pp 393-401.

# 21)－(2) 組織培養法による受容体蛋白代謝回転とプロテアーゼ，プロスタグランジンに関する研究

高 守 正 治*

研究協力者　糸 氏　薫*　井 手 芳 彦*
安 田 厚 子*

## 目　的

今日まで，筋細胞内構造蛋白の分解機序として，ライソゾームのカテプシン群や，筋細胞サイトプラスム中のカルシウム依存性中性蛋白分解酵素($Ca^{++}$ －activated neutral protease, CANP)，プラスミン系酵素，プロスタグランジン系，ATP依存系などの関与が考えられている．本研究では，アセチルコリン受容体の崩壊過程におけるこれらの系の関与を図1のごとく想定し，その是非を検討するため，各酵素系の阻害剤と，$^{125}$〔I〕-α-bungarotoxin ($^{125}$〔I〕-αBTX)，培養筋細胞を用い，受容体蛋白の代謝について，生化学的に検討した．

## 方　法

**筋細胞初代培養**－白色leg chicken受精後10～13日目のembryoの浅胸筋を用い，初代培養を行った．浅胸筋を無菌的に取り出し，充分にミンチした後，0.3%のトリプシン液で単細胞に分離した．細胞を培養液にsuspendし，ゼラチンでコートしたプラスチックディッシュに移し，37℃，5％$CO_2$下で1晩培養した後，0.03%トリプシン液で細胞を剥離して集め，コーティング未処理のディッシュで37℃，5％$CO_2$下で30分培養し，ディッシュ底面に付着しているfibroblastと付着していないmyoblastを分けた．myoblastのみを集めて，培養液に再びsuspendした後，ゼラチンでコートしたディッシュに移し，37℃，5％$CO_2$下で培養を行った．プラスチックディッシュは6ml，3ml入りのものいずれかを用い，細胞濃度は，約$1\times10^5$ cell/cm$^2$とした．培養液として，グルタミン入りEagle MEM中に，ストレプトマイシン・ペニシリン混合液を1％加えたものに，①15％ウマ血清＋5％chicken embryo extract ②20％ウシ胎児血清のいずれかを添加したものを用いた．

**受容体崩壊速度測定**－4nM$^{125}$〔I〕-αBTX入り培養液で，培養後4～6日目の培養細胞を90分間培養し，アセチルコリン受容体をラベルした後，free toxinを洗浄し，各薬剤を加えた培養液で，37℃，5％$CO_2$下で培養を継続した．一定時間毎に培養液を除去し，そのradioactivityをcountし，新しく，同じ薬剤入りの培養液と交換した．最後に培養液を除いた後，残った細胞をRubber policemanを使ってEagle MEMで洗浄しながら集め，そのradioactivityをcountし，それまでの培養液中のcountを加算してtotal countとした．各ディッシュ毎に，各時間における細胞内残存countのtotal countに対する％を算出し，その平均と標準偏差値を片対数グラフ上にプロットした．

## 結　果

①アセチルコリン受容体の崩壊速度は，培養液内にchicken embryo extractを加えた時，薬剤無添加ではhalf life-time (T1/2) 約35時間で，片対数グラフ上ほぼ直線を示した．これに対し，ライソゾーム系酵素，CANP，プラスミン系酵素すべての阻害剤であるロイペプチン添加培養液中では，推定T1/2は約2倍に延長した．実験はロイペプチン10, 20, 40, 80μMでおこなったが，延長効果は薬剤濃度に相関し，40μMでほぼpeakを示した（図2；培養後40時間で対照との有意差P<

＊金沢大学神経内科

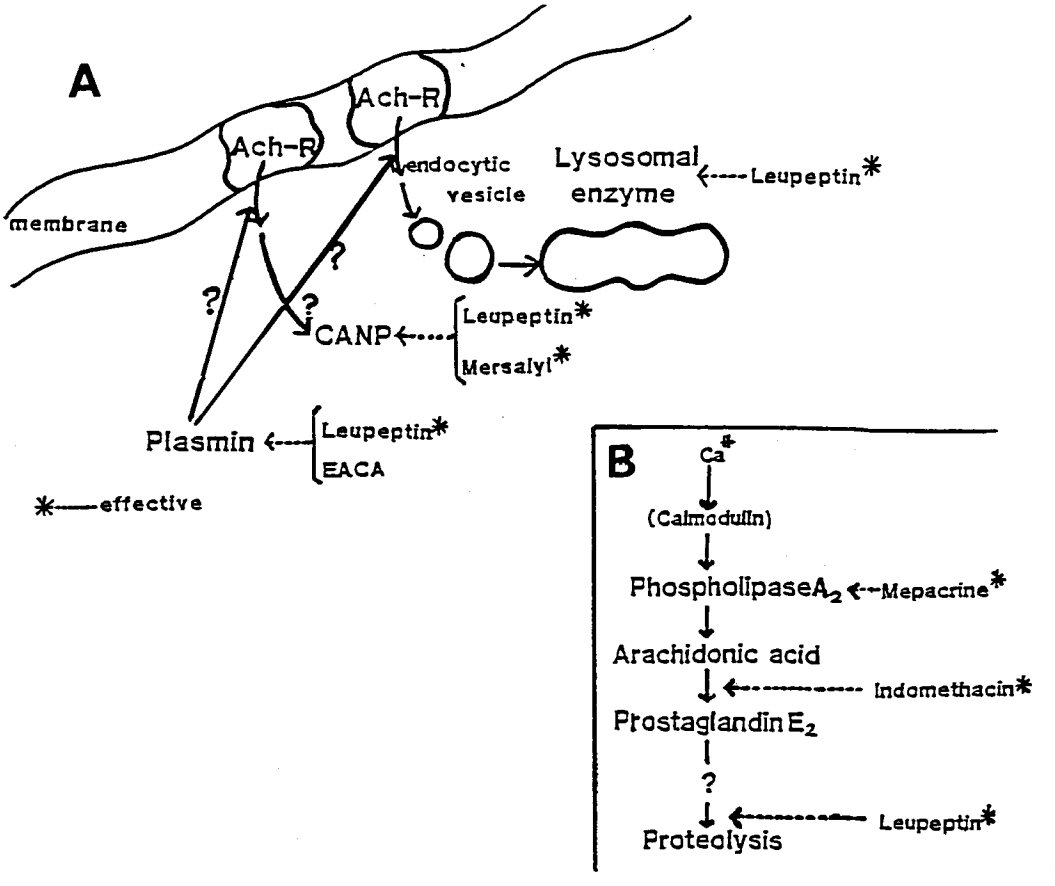



図1　アセチルコリン受容体崩壊過程の想定
A：ライソゾーム，プラスミン，CANP系
B：アラキドン酸カスケード
←---：本実験で用いた酵素阻害剤
＊：本実験で有効であった酵素阻害剤

0.001，n＝6）．

②対照としてembryo extract無添加ウシ胎児血清入り培養液で培養したところ，薬剤無添加では，受容体崩壊速度はT1/2が約16時間で，片対数グラフ上，やはり，ほぼ直線を示す結果を得た．この条件下で，培養液中に抗プラスミン剤ε-amino caproic acid（EACA）を加えたところ，その添加濃度20, 40, 100, 200μMすべてについて影響はなかった（図3；本図ではEACA200μMのみを示す）．CANP阻害剤メルサリルを添加すると20, 40μMでは有意差を認めなかったが，80μMでロイペプチンより弱い，しかし有意な抑制効果をみた（図3；培養後40時間で対照との有意差P<0.001，n＝6）．150，200μMについても実験を行ったが，細胞は変性または死滅し，効果を言及することはできなかった．

③筋細胞内構造蛋白崩壊について提唱されている，Caイオンを介したアラキドン酸カスケードの図1Bのような関与を，受容体崩壊についても想定し，検討した．その結果，フォスフォリパーゼ$A_2$阻害剤メパクリンでは40μMで，プロスタグランジンサイクロオキシゲナーゼ阻害剤インドメサシ

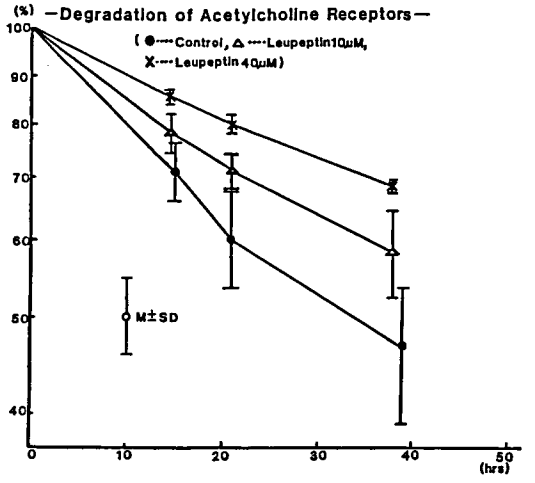



図2　アセチルコリン受容体崩壊に対する
ロイペプチンの効果
n (dish number) = 6

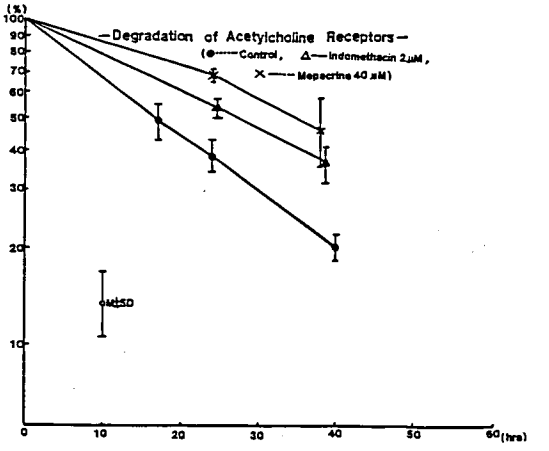



図4　アセチルコリン受容体崩壊に対する
インドメサシン，メパクリンの効果
n (dish number) = 6

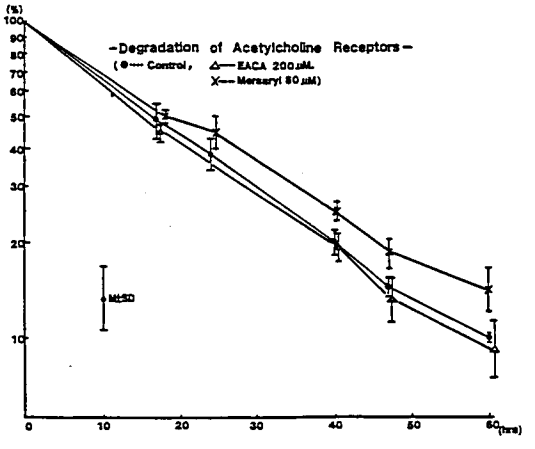



図3　アセチルコリン受容体崩壊に対する
EACA，メルサリルの効果
n (dish number) = 6

ンでは 2 μM で，各々最も強い抑制効果を示した．その効果は T1/2を約 2 倍に延長させ，ロイペプチンの効果に匹敵するものであった（図 4 ；培養後40時間で対照との有意差はメパクリンで $P<0.001$，n= 6 ；インドメサシンで $P<0.001$，n= 6 ）．

## 考　　按

アセチルコリン受容体蛋白（AchR）の崩壊には，ライソゾーム系が主役を演ずるとされ[1]，培養筋細胞の受容体蛋白代謝に対する本系酵素阻害剤添加の実験によっても，合成過程には影響することなく，崩壊過程が修飾を受ける事実が明らかにされている[2]．受精鶏卵から得た骨格筋細胞培養を用いたわれわれの実験でも，ロイペプチンによる受容体崩壊の life-time 延長を認め（図 2 ），このことを実証した．ロイペプチンはプラスミン系にも関与する酵素阻害剤であり，受容体の代謝回転や細胞内陥入（internalization）には，本系が関与するという報告もある[3)4)]．しかし，抗プラスミン剤 EACA を用いたわれわれの実験では，これを支持する証左は得られなかった（図 3 ）．CANP，プロスタグランジン系の筋細胞内構造蛋白崩壊への関与については，いくつかの報告[5)~8)]があるが，膜蛋白についての明確な検討はなされていない．われわれは AchR 崩壊過程に対するこれらの影響を調べたところ，メルサリルの効果によって CANP の若干の関与を（図 3 ），またメパクリン，インドメサシンの効果によって，フォスフォリパーゼ $A_2$，プロスタグランジン系の関連性を証明することができた（図 4 ）．しかし，前者について

は，CANP を賦活するに必要な細胞内 $Ca^{++}$ のソースをどこに求めるべきかの問題があり，後者については，筋細胞内構造蛋白に対する $E_2$ のようには，膜蛋白の代謝に影響するプロスタグランジンの種類を本実験結果だけでは特定できない．

## 結　　語

骨格筋の組織培養法を用い，諸種酵素阻害剤の培養液中添加によるアセチルコリン受容体蛋白の代謝回転を，アイソトープで定量し検討した．ライソゾーム系が受容体崩壊に主役を演ずることを明らかにしたが，プラスミン系関与の確証は得られなかった．さらに，CANP 系の若干の関与と，プロスタグランジン系の関連性を示唆する結果を得た．

## 文　　献


1) Devreotes PN, Fambrough DM : Turnover of acetylcholine receptors in skeletal muscle. Cold Spring Harber Symp Quart Biol 1976 ; 40 : 237-251.
2) Libby P, Bursztajn S, Godberg AL : Degradation of the acetylcholine receptor in cultured muscle cells : Selective inhibitors and the fate of undegradated receptors. Cell 1980 ; 19 : 481-491.
3) Hatzfeld J, Miskin R, Reich E : Acetylcholine receptor : Effects of proteolysis on receptor metabolism. J Cell Biol 1982 ; 92 : 176-182.
4) Romstedt K, Beach RL, Festoff BW : Acetylcholine receptor turnover in clonal muscle cells : Role of plasmin and effects of protease inhibitors. Muscle & Nerve 1983 ; 6 : 283-290.
5) Reddy MK, Etlinger JD, Rabinowitz M, Fischman DA, Zak R : Removal of Z-lines and $\alpha$-actinin from isolated myofibrils by a calcium-activated neutral protease. J Biol Chem 1975 ; 250 : 4278-4284.
6) Kameyama T, Etlinger JD : Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degradation in muscle. Nature (Lond) 1979 ; 279 : 344-346.
7) Rodeman HP, Waxman L, Goldberg AL : The stimulation of protein degradation in muscle by $Ca^{2+}$ is mediated by prostaglandin $E_2$ and does not require the calcium-activated protease. J Biol Chem 1982 ; 257 : 8716-8723.
8) Takamori M, Komai K, Nitta N, Itouji K : Role of prostaglandin $E_2$ in contractile abnormality induced by calcium ionophore, A23187. Neurology (Cleveland) 1984 ; 34 : 91-94.

# 21)－(3) 筋ミトコンドリア異常を伴う2種の特異な筋病態について

高　守　正　治*

研究協力者　　松　原　四　郎*

いわゆる mitochondrial myopathy の臨床像の多様性について既に多くの報告があるが，本研究では筋病理像の多様性に注目し，その例として mixed nemaline-mitochondrial“myopathy” の範疇に入る2例を提示する．また多くの筋病変に伴って出現し，mitochondria の変化がみられる病理像の1つである lobulated fibre について，慢性非対称性脊髄性筋萎縮症の1例を中心に検討する．

〔**症例1**〕17歳，男（**図1－A**）5歳時下肢にはじまった筋力低下が四肢に拡大し緩徐に進行した．家族歴，既往歴に特記事項なし．現症では顔面，頚部，四肢筋の中等度の萎縮と筋力低下をみる．上肢で遠位，下肢で近位筋が比較的障害が強い．腓腹筋の仮性肥大をみる．登攀性起立あり．平地では独歩可能だが著しく動揺性．アキレス腱反射を除き腱反射は減弱．病的反射，知覚や共同運動障害なし．弾性軟なび慢性甲状腺腫が認められる．検査成績では血清 CK531IU/L，アルドラーゼ 11.9IU/L，尿酸10.1mg/dl，血中乳酸21.2mg/dl，ピルビン酸1.3mg/dl といずれも増加．$T_3$，$T_4$その

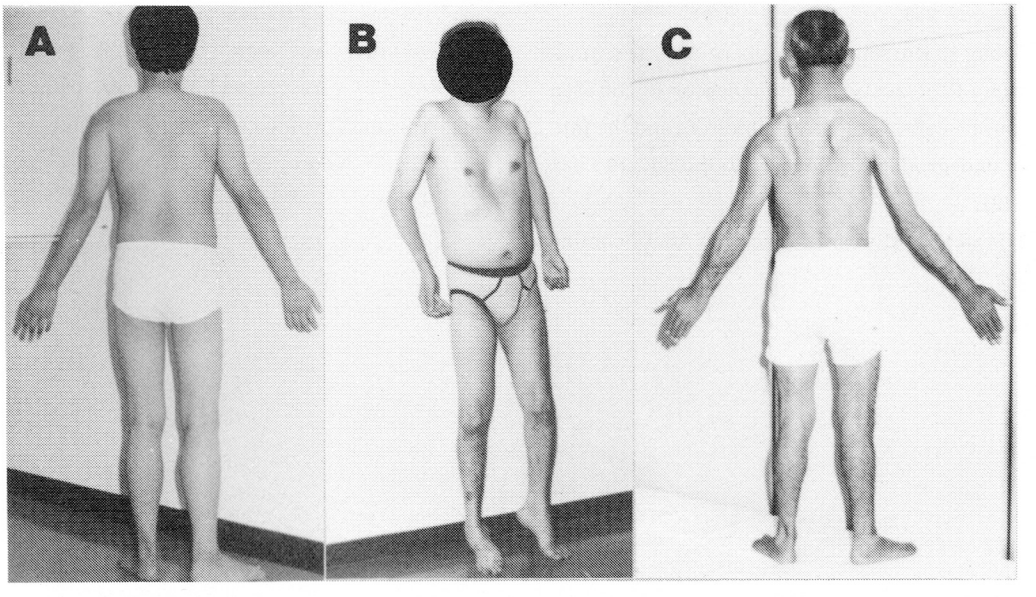



図1　A：症例1
B：症例2
C：症例3

＊金沢大学神経内科

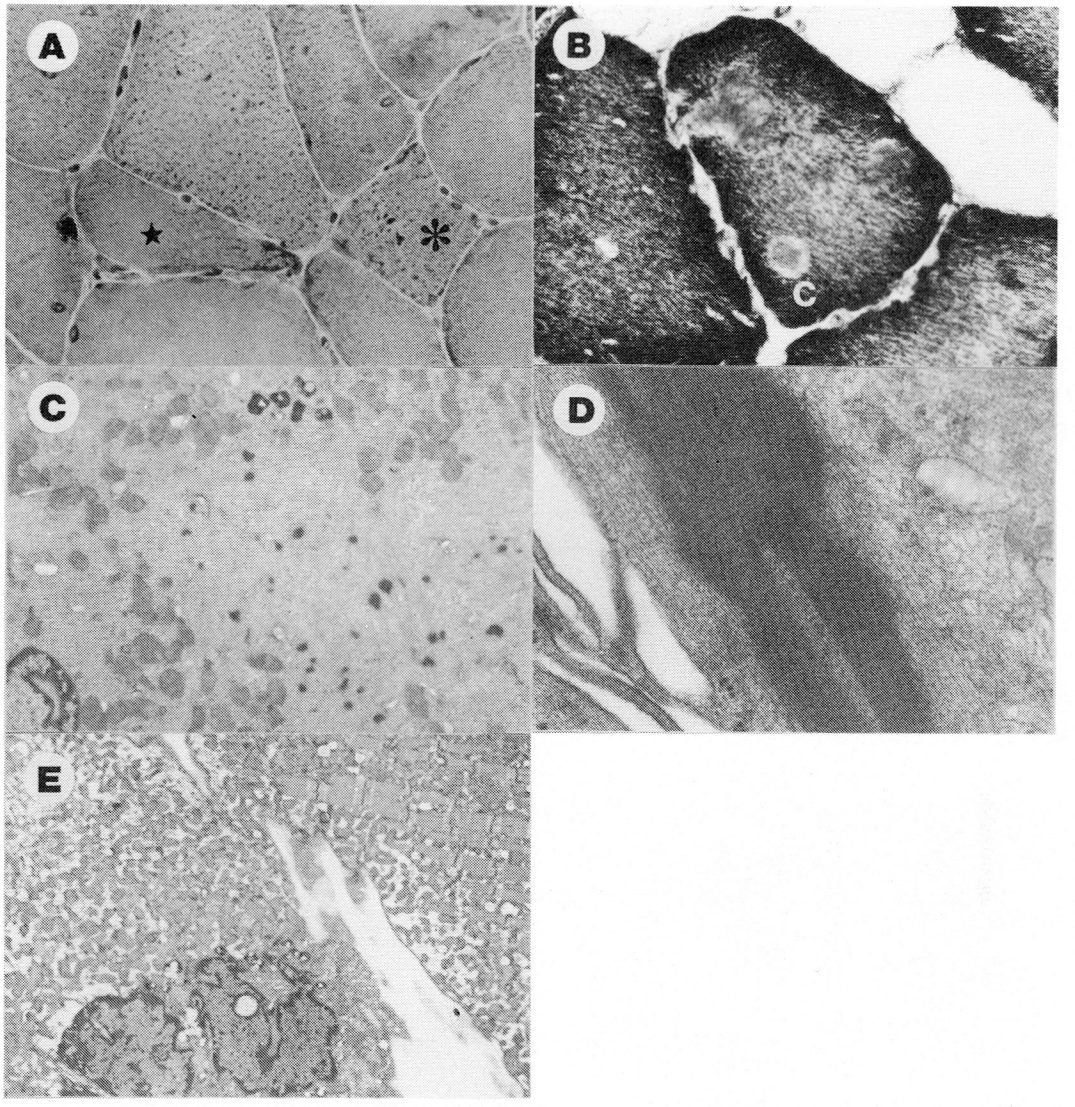



図2　症例1　A：筋鞘下に赤紫色に染まる部分を有する線維（星印）とネマリン小体を有する線維（＊印）を示す．trichrome 変法

B：NADH-TR 活性像で筋鞘下の高活性と multi core (C)を認める

C：ネマリン小体とミトコンドリア

D：ネマリン小体

E：ミトコンドリアの集積

他の甲状腺機能は総て正常であった．筋電図は筋原性変化を示した．大腿四頭筋生検では，筋線維横断面の円形化，横径の大小不同，中心核の増加の筋原性変化が認められ，trichrome 変法では（図２－Ａ），筋鞘下に赤紫色に染まる局面をみ，また多数のネマリン小体を観察した．NADH-TR 活性像では（図２－Ｂ），筋鞘下高活性がめだち，また一部の線維に multi-core が認められた．myosin ATPase 活性像では type Ⅰ fibre predominance がみられた．電顕では非特異的な変性像に加え多数のネマリン小体（図２－Ｃ，Ｄ）が観察され，これらを取り囲むようにして（図２－Ｃ），あるいは筋鞘下に密に集積して（図２－Ｅ）ミトコンドリアが増加していた．三川の方法[1]にもとづく筋構造蛋白のマイクロ２次元電気泳動（図３）では，２次元目を同一平坂上で泳動した正常筋と比較し，アクチンの band はほぼ同じ強さであったが，デスミンと思われる band の増加と，ミオシンの light chain，とくに fast component の減少が示唆された．

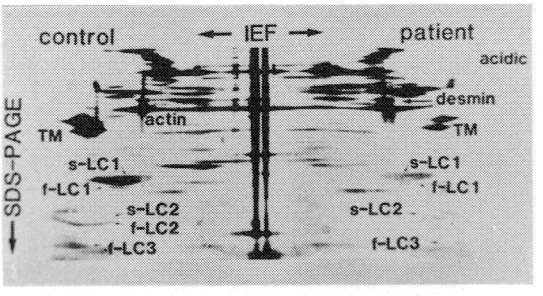



図３　症例１マイクロ２次元電気泳動

〔**症例２**〕30歳，男（図１－Ｂ）．７歳頃より歩行が不安定となり，両側アキレス腱短縮を指摘された．以降緩徐に四肢筋力低下が進行した．家族歴，既往歴に特記事項なし．現症では四肢，軀幹に筋萎縮をみ，上肢より下肢に，また上肢では遠位部，下肢では近位部に著しく，アキレス腱短縮を伴った．腱反射は減弱し，膝蓋腱反射は消失していた．病的反射，知覚および共同運動障害，筋痛，筋強直現象を認めなかった．検査成績では CK 活性，乳酸を含めて異常なく，筋電図は筋原性変化を示した．大腿四頭筋生検では筋線維横断面円形化，横径大小不同，中心核増加のミオパチー性変化に加え，split fibre, ring fibre が高頻度に存在した．trichrome 変法（図４－Ａ）では多数の ragged red fibre がみられ，一部の線維にネマリン小体を

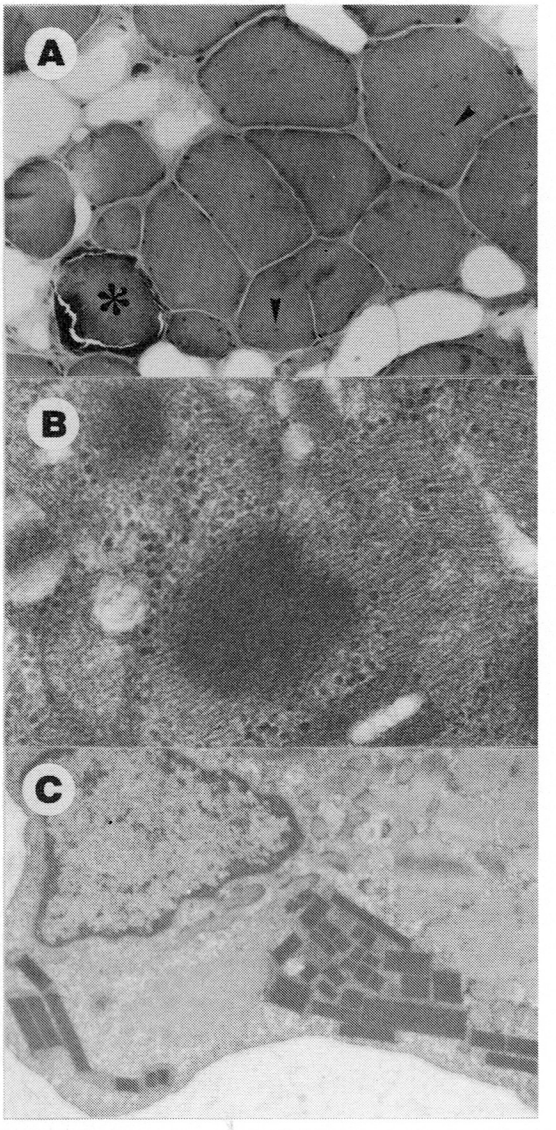



図４　症例２　Ａ：ragged-red fibre（＊印）．ネマリン小体（矢印）．trichrome 変法
Ｂ：ネマリン小体
Ｃ：ミトコンドリア内の結晶様封入体

認めた．電顕では多数の線維に ring fibre その他の myofibril の走行異常が観察され，一部 striation を示すネマリン小体が散見された（図４－B）．主に筋鞘下にミトコンドリアの数の増加がみられ，その内部には頻繁に結晶様封入体（図４－C）を伴っていた．

症例１，２はミトコンドリア異常とネマリン小体の併存をみるという意味で mixed nemaline-mitochondrial "myopathy"（Kornfeld[2]）の範疇に入れることができよう．症例１の病理像は multi-core の存在など Korn feld の例に一致する点が多い．この core の部分はミトコンドリアで囲まれるネマリン小体の集簇（図２－C）に対応すると推定される．本例では甲状腺腫大を認めたが，甲状腺機能その他の検査データ上異常なく，筋病変の原因である可能性は少ないと思われた．佐藤ら[3]は甲状腺腫大を伴う Kearns-Shy 症候群の症例を報告している．ミトコンドリア異常とネマリン小体が認められた症例は本邦の福永ら[4]の報告例を含め過去に７例が記載されているが，それらの臨床像は一定しない．症例１では，最近ネマリンミオパチーで報告されている[5]筋構造蛋白の異常に類似の変化が２次元電気泳動で明らかになる一方で，ミトコンドリアミオパチーで一般的な血中乳酸，ピルビン酸の増加を示すなど，形態学的ばかりでなく生化学的に両疾患の要素を有している．症例２は結晶様封入体の存在，比較的に低いネマリン小体の頻度などより，ミトコンドリアミオパチーにより近い病態が考えられるものの，ring fibre, split fibre の高頻度であることがめだった特徴といえる．ネマリン小体，異常ミトコンドリア共に type Ⅰ線維に発生しやすく，両病変の発生機序に fibre type が関連する何らかの共通部分があり，これが両者の共存の背景にある可能性が考えられる．

〔症例３〕60歳，男（図１－C）．10歳頃から腕を挙上，外転すると肩甲骨が異常に突出することに気づいていた．20歳頃より右上肢および肩甲帯の筋萎縮，筋力低下が出現，緩徐に進行した．58歳より下肢とくに右側が弱いことを自覚．家族歴，既往歴に特記事項なし．現症では右上肢，肩甲帯に高度の筋萎縮を認め，軽度の萎縮と筋力低下を左上肢，右下肢と顔面筋にみるなど，全体に症状が右に著しかった．萎縮した筋に線維束性攣縮が観察された．腱反射の減弱があったが，病的反射，知覚および共同運動障害，球症状はなかった．血清 CK 活性を含め血液生化学的検査は総て正常．筋電図は fibrillation および fasciculation potential，随意収縮時の giant action potential を示し，脱神経の所見であった．末梢神経伝導速度，頭部 CT 像，脊髄造影で異常を認めなかった．大腿四頭筋生検では大小種々の規模の群集萎縮があり，萎縮線維の一部は角化線維で神経原性萎縮を示す所見であった．萎縮線維中角化のめだたないものの多くは，lobulated fibre で，NADH-TR 活性像で筋鞘を底辺とし筋線維内部に向かう頂点を有する三角形の強染部を持ち（図５－A），trichrome 変法で同部は赤染色を呈した．lobulated fibre は type Ⅰ 線維（図５－B）で，しばしば fibre type grouping を形成していた．この三角形の部分は電顕（図５－C）は，横断面でも縦断層でも多く三角形を呈するミトコンドリアと，脂肪と思われる高電子密度の構造を密に含む区域に対応すると考えられた．ミトコンドリアの一部にはしばしば結晶様封入体（図５－D）が観察された．

本例の臨床像は Harding ら[6]の chronic asymmetric spinal muscular atrophy によく一致する．lobulated fibre は Bethlem ら[7]が顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーや肢帯型症候群で記載したのをはじめ数多くの筋疾患の病理所見の一部として言及されている．その病理学的意味や発生機序は未だ不明確である．従来はミオパチーでの記載が多いが，自験例では本例以外に対称性成人型慢性脊髄性筋萎縮症[8]や rimmed vacuole を伴ういわゆる遠位型ミオパチーでも同様の変化を観察している．これは本病変が筋原性，神経原性を問わず広い範囲の疾患で出現することを示しているが，その多くが比較的緩慢な経過の疾患である．殆んど常に type Ⅰ 線維にみとめられ fibre type grouping がしばしば同時に観察されることは，疾患の分類上の神経原性，筋原性の区別とは別に，本病変の発生に何らかの神経由来の要素が関与す

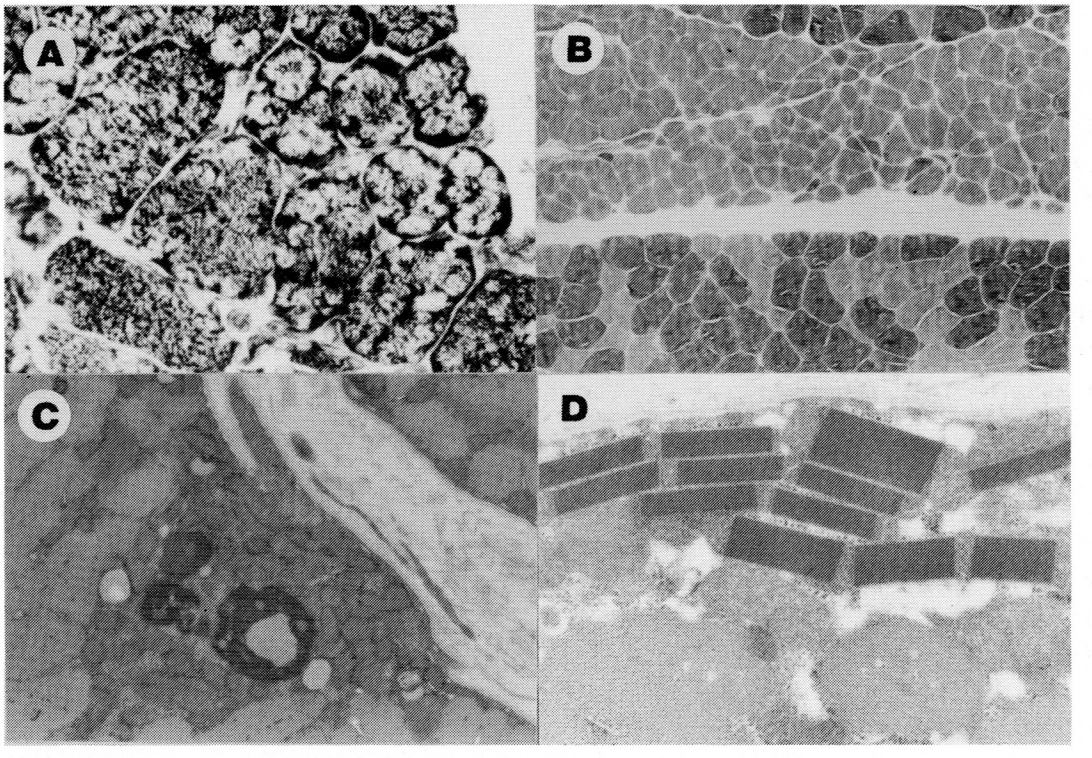



図5　症例3　A：lobulated fibres. NADH-TR 活性像
B：type I fibre grouping と group atrophy を示す. myosin ATP ase 活性像 (pH9.4)
C：三角形の部位に集積したミトコンドリアと lipid body
D：ミトコンドリア内結晶様封入体

る可能性を示唆していると思われる.

## ま と め

1. mixed nemaline-mitochondrial "myopathy" の病理像を呈した2症例を報告し，若干の考察を加えた.

2. chronic asymmetric spinal muscular atrophy の1例を報告するとともに，同例で観察した lobulated fibre の病理学的検討を行った. 本病変はミオパチーばかりでなく主に緩徐進行性の多様な筋疾患で認められた.

## 文　献

1) 三川隆：手軽なマイクロ2次元電気泳動と高感度蛋白染色法. 微量蛋白分析のために，生体の科学，32：74-78，1981.

2) Kornfeld, M.：Mixed nemaline-mitochondrial "myopathy".Acta Neuropathol. (Berl.), 51：185-189，1980.

3) 佐藤武史ほか：内分泌異常を伴う Kearns-Shy 症候群の1例（会），臨床神経，19：68，1979.

4) 福永秀敏ほか：眼筋麻痺とミトコンドリアの異常を伴ったネマリンミオパチーの1例，臨床神経，18：35-43，1978.

5) 小口喜三夫，武田伸一ほか：Nemaline myopathy の筋構成蛋白について，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，（班長，三好和夫）昭和58年度報告書，pp 266-270，1984.

6) Harding, A. E. et al.：Chronic asymmetrical

spinal muscular atrophy, J. Neurol. Sci., 59 : 69-83, 1983.

7) Bethlem, J. et al. : The incidence of lobulated fibres in the facioscapulohumeral type of muscular dystrophy and limb - girdle syndrome, J. Neurol. Sci., 18 : 351-358, 1973.

8) Matsubara, S. and Tanabe, H. : A clinico-pathological study of chronic hereditary motor neuropathy, Acta Neuropathol. (Berl.), 61 : 43-51, 1983.

# IV. エネルギー代謝，他

# 22)－(1) ジストロフィー鶏発育早期における活性酸素関連諸酵素および解糖系酵素の異常について

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に関して，我々は，筋細胞の変性過程に活性酸素による障害が関与しているのではないかと考え，ジストロフィー鶏をモデルとして検討をすすめてきた。これまでに活性酸素関連酵素であるsuperoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) 及び脂質過酸化の指標となるTBA反応物質がジストロフィー鶏において有意に上昇していることを示し[1)2)]，また解糖系酵素である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GA3PDH) は有意に低下していることを示した[2)]．今回はこれらの変化が孵化後何日目より出現するかを検討する目的で孵化後8日目までのジストロフィー鶏及び対照鶏についてこれらの酵素とTBA反応物質の測定を行なった．さらに今回は解糖系の重要な酵素である phosphofructokinase 及び lactate dehydrogenase (LDH) の測定もあわせて行ない対照鶏と比較した．測定した諸酵素を図示したものが図1であり，活性酸素関連酵素はglucose-6-phosphateのところで解糖系と関連している．

## 方　　法

対象動物はNew Hampshire系ジストロフィー鶏 (line 413) とその対照鶏 (line 412) で受精卵を入手，孵化後2日，4日，6日，8日目に各々4羽を断頭屠殺しその浅胸筋を材料として用いた．なお2日目のみ検体が小さいため深胸筋もあわせて用いた．

筋肉に10倍量の0.14M KCl pH7.4を加えてDounce型ホモジェナイザーにてホモジェナイズし，4℃ 100,000g 60分遠心後の上清にてsuperoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, G6PDH, 6PGDH, GA3PDH, LDH を測定し，4℃ 700g 10分遠心後の上清にてcatalase を，7000g 5分遠心後の上清にてphosphofructokinase を測定した．TBA の測定には600g 5分遠心後の上清を用いた．superoxide dismutaseは，Misra & Fridovich[3)]の方法，catalaseはCohenら[4)]の方法，glutathione peroxidase及びglutathione reductaseはPaglia & Valentine[5)]の方法とその応用によった．G6PDH と6PGDHはKingsら[6)]の方法を一部改変して用い，TBA反応物質はTanizawaら[7)]の方法により，malondialdehydeをスタンダードとして測定した．GA3PDH はWang & Alaupovic[8)]の方法，LDH はShonk & Boxer[9)]の方法，phosphofructokinaseはOpie & Newsholme[10)]の方法をそれぞれ一部改変して用いた．蛋白はLowry ら[11)]の方法により測定した．

## 結　　果

蛋白濃度は，100,000g，7,000g，700g，の上清において8日目のみジストロフィー鶏より対照鶏のほうが有意に高く，600gの上清では6日目のみ対照鶏のほうが有意に高かったが，その他では有意差は認められなかった．各酵素は蛋白1mgあたりの比活性で示し，TBA反応物質は湿重量1gあたりで示した．

活性酸素関連酵素活性の測定結果を図2，3に

＊自治医科大学神経内科

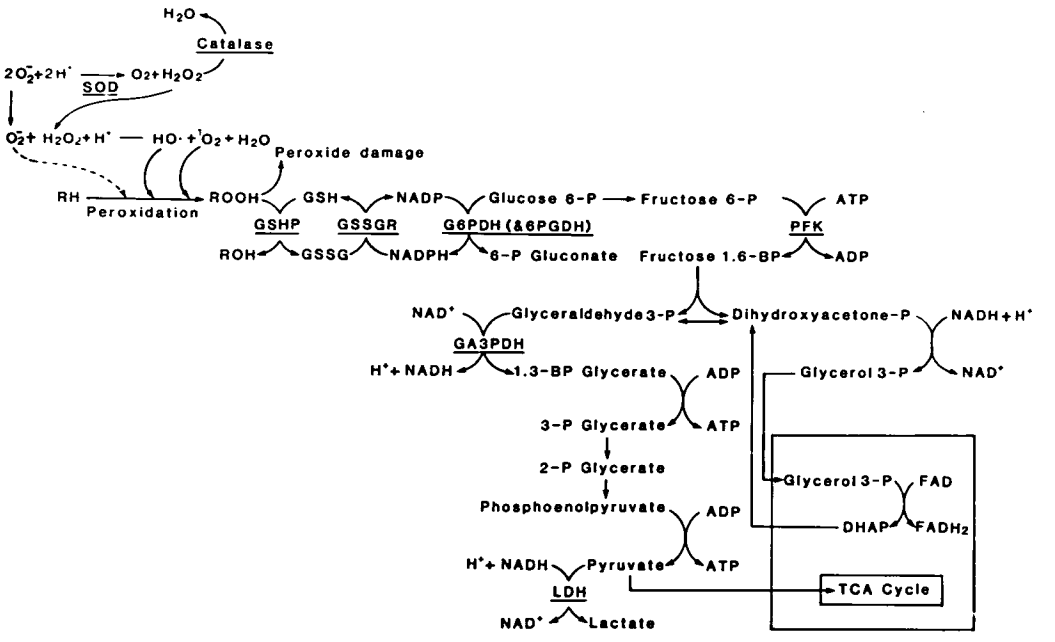



図1　今回測定した活性酸素関連諸酵素及び解糖系酵素の関係を示す
SOD：superoxide dismutase
GSHP：glutathione peroxidase
GSSGR：glutathione reductase
G6PDH：glucose 6-phosphate dehydrogenase
6PGDH：6-phosphogluconate dehydrogenase
PFK：phosphofructokinase
GA3PDH：glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
LDH：lactate dehydrogenase

示すが，superoxide dismutase は Cu-Zn，Mn ともに孵化後8日目に dystrophy において有意な上昇が認められた．catalase は control，dystrophy ともに孵化後日数とともに急速に低下するが，4日目より control に比し dystrophy で有意な高値が認められた．glutathione peroxidase も孵化後低下を示すが，6日目より dystrophy のほうで有意な高値が認められ，glutathione reductase は孵化後4日目と8日目で dystrophy のほうが有意に高値であった．また G6PDH は孵化後4日目より，6PGDH は孵化後6日目より dystrophy のほうが有意に高値となった．

TBA 反応物質については，孵化後8日目まででは有意差は認められなかった（図4）．

次に解糖系酵素活性の測定結果を図5に示す．GA3PDH，LDH はともに孵化後日数とともに急速な上昇を示すが，両者とも6日目より control に比し dystrophy で有意な低値が認められた．一方 phosphofructokinase は今回の測定では孵化後6日目と8日目で control よりも dystrophy のほうが有意に高値であった．

## 考　　察

今回の測定により，昨年度までに示したジストロフィー鶏における活性酸素関連酵素活性の上昇の多くは，孵化後4—6日目より出現することが明らかとなった．この結果は，ジストロフィー鶏の発育の非常に早い時期より活性酸素の代謝回転

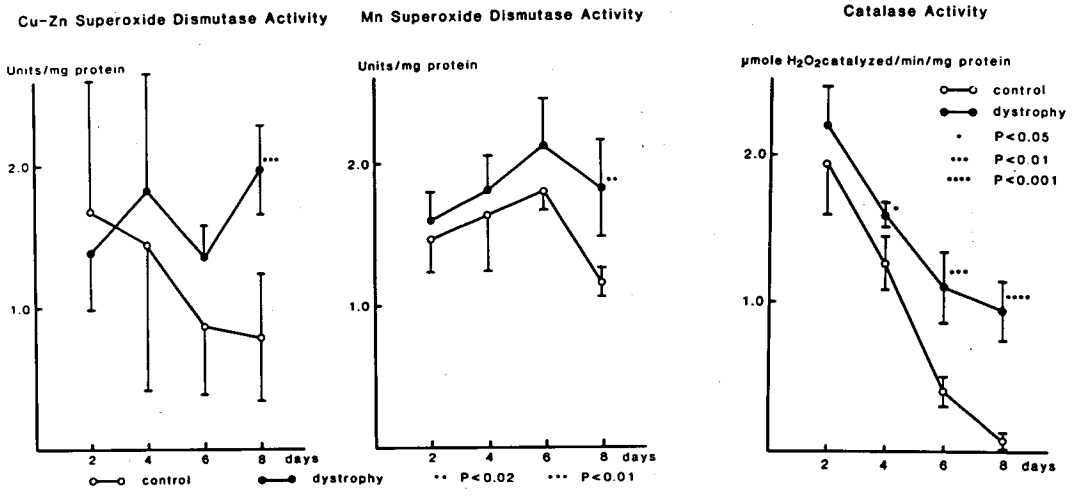



図2　横軸は孵化後の日数，縦軸は蛋白1mgあたりの酵素活性を示す
mean±SD (n=4)
superoxide dismutase：
1 unit＝epinephrine の酸化を50%抑制する酵素活性

の亢進が出現することを示すものと考えられる．TBA反応物質に関しては，昨年度，ジストロフィー鶏において孵化後2週目より有意に増加することを示したが，この結果とあわせ，ジストロフィー鶏におけるTBA反応物質の上昇は，活性酸素関連酵素活性の上昇よりやや遅れ，孵化後10—14日目ころより出現するものと考えられる．これに関しては，ジストロフィー鶏における活性酸素の生成上昇が，孵化後初期には活性酸素関連酵素活性の上昇による代謝回転の亢進によって代償され表面にあらわれないが，その後活性酸素の生成上昇がさらに進行すると，代謝回転の亢進にて代償され得ず出現してくるという説明が可能である．

解糖系の酵素に関しては，昨年GA3PDHの活性がジストロフィー鶏において有意に低値であることを示したが，対照鶏においてみられる孵化後の急速な酵素活性の上昇がジストロフィー鶏においても一応認められるものの軽度であり，孵化後6日目より有意に低値となることが，今回明らかとなった．今回あらたに測定したLDHにおいても同様の傾向が認められた．

一方phosphofructokinaseは，LDHと同様今回初めて検討した酵素であるが，我々の予想に反し，孵化後6日目，8日目でジストロフィー鶏のほうが対照鶏よりも有意に高い活性をもつという結果が得られた．この結果に関しては，さらに検討が必要と考えられるが，phosphofructokinaseは解糖系全体の律速段階を形成する重要な酵素であり，この結果の通りであれば，ジストロフィー鶏の発育早期に解糖系の亢進が存在する可能性が考えられる．この解糖系の亢進によって生成されるNADHが，分子状酸素の一電子還元を促進することにより活性酸素生成亢進の一因となっている可能性もあり興味深い．筋肉内のphosphofructokinaseは，発育早期に成熟とともに消失するisozymeをもつことが他の動物で報告されており[12)13)]，今回の測定に関しても，isozymeや，cold lability など生化学的性質の関与が考えられ，今後この点についてさらに検討を加え，また成熟とともにジストロフィー鶏と対照鶏で本酵素活性がどのように変動するかについても追って行きたいと考えている．

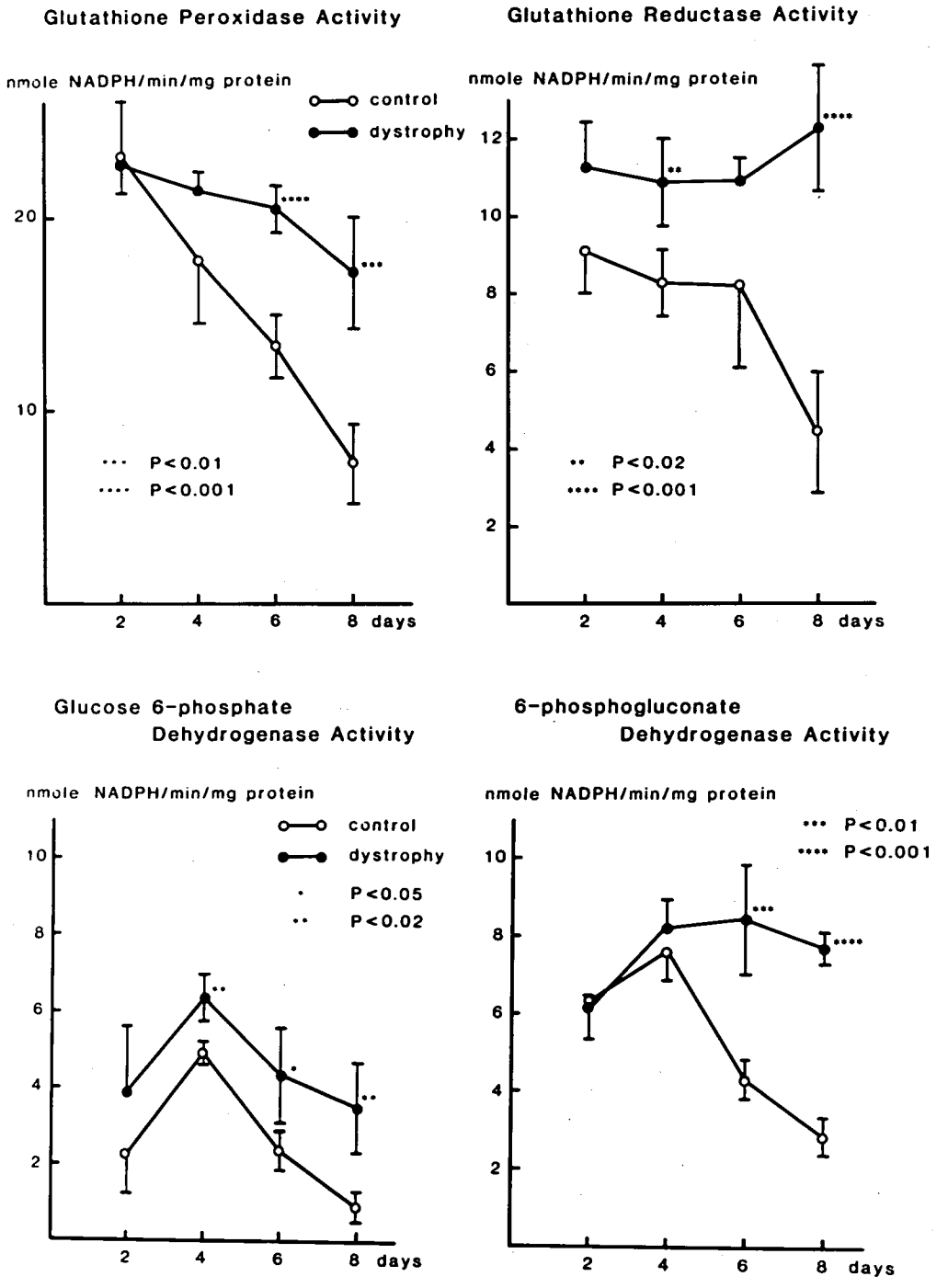



図3　横軸は孵化後の日数，縦軸は蛋白1mg あたりの酵素活性を示す
mean±SD (n= 4 )

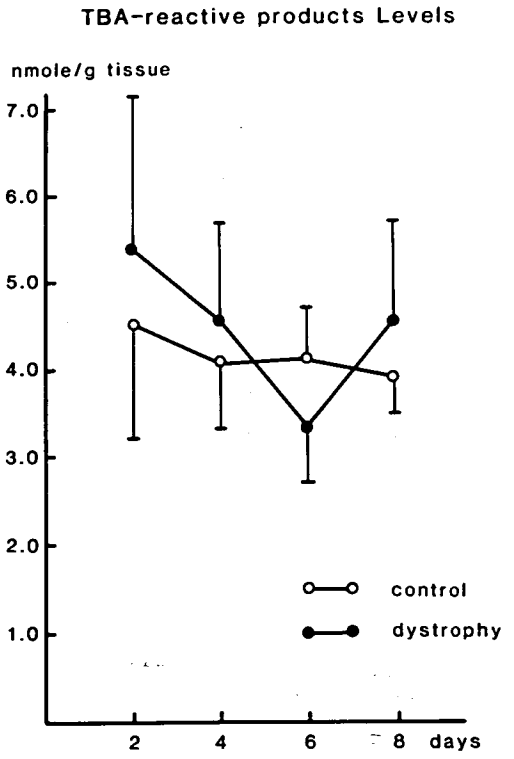



図4　横軸は孵化後の日数，縦軸は湿重量1gあたりのTBA反応物質量を示す
mean±SD (n＝4)

## ま と め

ジストロフィー鶏における活性酸素関連酵素および解糖系酵素の異常が孵化後何日目より出現するかを検討する目的で，孵化後2日，4日，6日，8日目のジストロフィー鶏及びその対照鶏において，活性酸素関連酵素であるsuperoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, G6PDH, 6PGDH 活性及びTBA反応物質，解糖系酵素であるGA3PDH, LDH, phosphofructokinase 活性の測定を行なった．活性酸素関連酵素の多くでは孵化後4—6日目よりジストロフィー鶏において有意な高値が認められた．TBA反応物質は孵化後8日目まででではジストロフィー鶏と対照鶏の間で有意差はなかった．解糖系酵素のうちGA3PDHとLDHは孵化後6日目よりジストロフィー鶏において有意な低値が認められたが，phosphofructokinaseでは逆に6日目より有意な高値が認められた．

## 文　　献

1) Mizuno, Y. : Changes in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activities and thiobar-

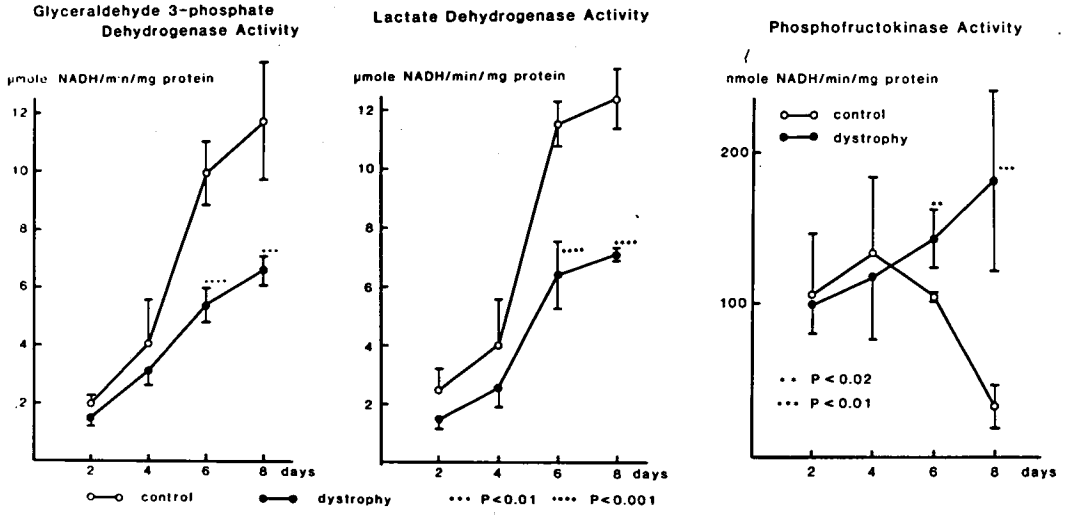



図5　横軸は孵化後の日数，縦軸は蛋白1mgあたりの酵素活性を示す
mean±SD (n＝4)

bituric acid-reactive products levels in early stages of development in dystrophic chickens. Exp. Neurol., 84 : 58-73,1984.

2) Mizuno, Y. : Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activities in early stages of development in dystrophic chickens. J. Neurol. Sci., 1985 (in press).

3) Misra, H. P. and Fridovich, I. : The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 247 : 3170-3175, 1972.

4) Cohen, G., Dembiec, D. and Marcus, J. : Measurement of catalase activity in tissue extracts. Anal. Biochem., 34 : 30-38, 1970.

5) Paglia, D. E. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med., 70 : 158-169, 1967.

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

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

8) Wang, C.-S. and Alaupovic, P. : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte membranes. Kinetic mechanism and competitive substrate inhibition by glyceraldehyde 3-phosphate. Arch. Biochem. Biophys., 205 : 136-145, 1980.

9) Shonk, C. E. and Boxer, G. E. : Enzyme patterns in human tissues. I. Methods for the determination of glycolytic enzymes. Cancer Res., 24 : 709-721, 1964.

10) Opie, L.H. and Newsholme, E.A. : The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. Biochem. J., 103 : 391-399, 1967.

11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265-275, 1951.

12) Thrasher, J.R., Cooper, M.D. and Dunaway, G.A. : Developmental changes in heart and muscle phosphofructokinase isozymes. J. Biol. Chem., 256 : 7844-7848, 1981.

13) Dunaway, G.A. : A review of animal phosphofructokinase isozymes with an emphasis on their physiological role. Mol. Cell. Biochem., 52 : 75-91, 1983.

# 22)－(2) ワゴスチグミンによる agonist induced myopathy の形態的研究

水　野　美　邦*

研究協力者　　金　子　　仁*

筋ジストロフィー症における筋変性機序を検討する為，その1モデルとして，neostigmine による Agonist induced myopathy を作製し，神経筋接合部下の形態的変化を観察した．

## 材料・方法

体重350g ～410g の雄ウィスター系ラットを用いた．体重あたり0.5mg の neostigmine methylsulfate を腹腔内に注入し，30分，60分，120分後にそれぞれネンブタール麻酔下に下腿伸筋を取り出した．直ちに2%グルタールにて同長固定し，オスミウム酸にて後固定し，エポン包埋した．1μm 厚切片は，Toluidine Blue にて染色し，光顕的に観察し，超薄切片は，ウラン・鉛二重染色し，電顕にて観察した．

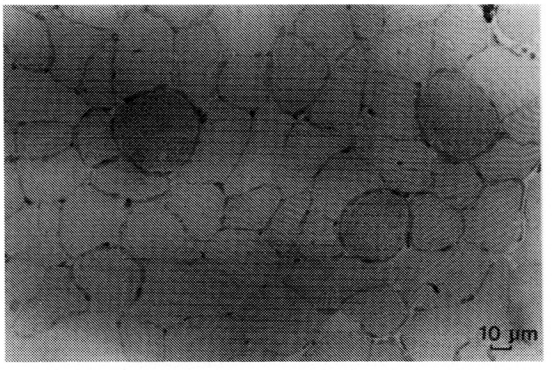



図1　120分の標本で見られた円形濃染する筋線維．

## 結　　果

〈光顕所見〉1μm 厚の横断像では，周囲の筋線維よりやや肥大した円形の濃染する線維が散在性に見られた（図1）．このような筋線維は，正常対照，30分後の標本には見られず，60分にて出現，120分後に更にその数が増加した．同厚の縦断像では，神経筋接合部下の横紋構造の消失と，その周囲の過収縮が見られた（図2）．

〈電顕所見〉30分後の標本では，接合部下のミトコンドリアの膨化がみられたが，神経終末，接合部，および筋線維の微細構造には，特に変化をみなかった（図3）．60分後の標本では，接合部下の筋線維では，Z 帯は消失し一様な横走する細線維のみが見られた．又 Sarcoplasmic reticulum は拡大・空胞化をみた（図4）．ミトコンドリアは，膨化し，クリスタの破壊，空胞化が見られた．神経終末のミトコンドリアの一部も同様な変化がみられた．120分後の標本では，60分の時と同様な変化が

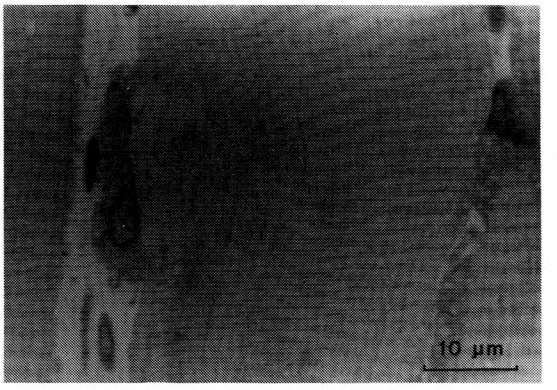



図2　神経筋接合部下の筋線維の横紋構造の消失．周囲の横紋は，変性部に向って集まるように見える．

＊自治医大神経内科

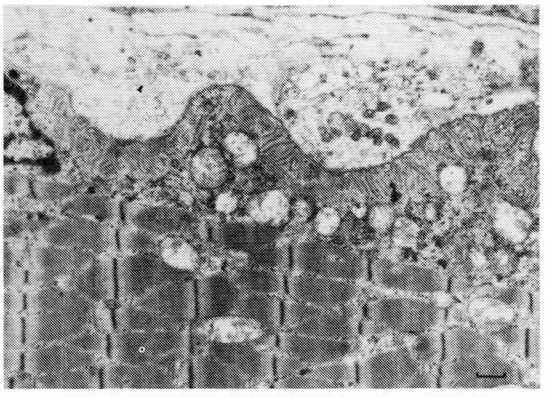


図3　30分の標本の神経・筋接合部．ミトコンドリアの膨化が見られる．

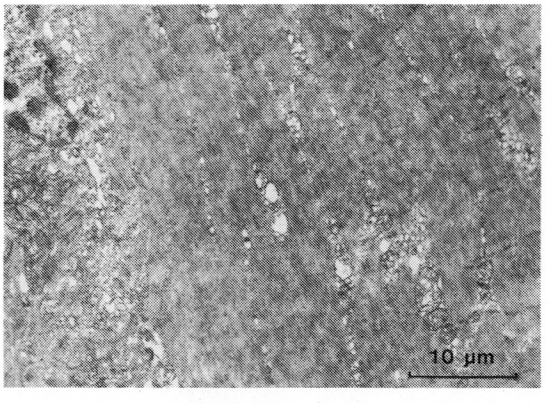



図4　60分の標本で見られた神経・筋接合部下の筋変性．

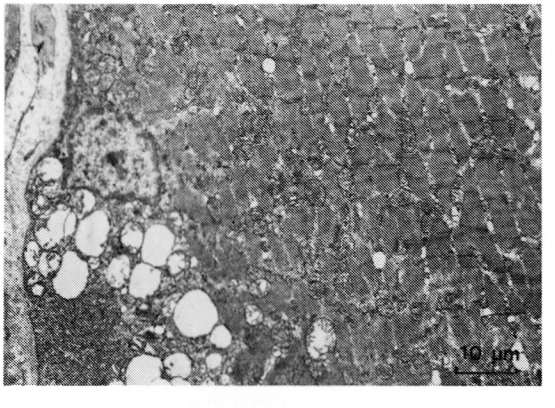



図5　120分の標本の神経・筋接合部，変性部と健常部の境界は比較的明らかである．

観察された（図5）．

## 考　　案

不可逆性のコリンエステラーゼ阻害剤である有機燐化合物で，局所性の筋壊死の発生する事は，Ariéns ら[1] 以来よく知られている．又，可逆性コリンエステラーゼ剤である neostigmine においても，Lytle[2]，Engel ら[3] が，神経筋接合部及び筋線維の変化を観察し，更に，川淵ら[4] は，同剤の連続投与による形態的変化を観察している．neostigmin 1回大量投与による急性変化は，Hudson ら[5] によると，筋線維の過収縮，Z帯の消失，ミトコンドリアの拡大，sarcoplasmic reticulum の空胞化が主体である．今回，我々の行なった実験でも，同様な変化が観察された．時間的経過を見ると，30分でミトコンドリアの膨化，空胞化，60分でZ帯の消失，sarcoplasmic reticulum の変化が生じた．光顕でみられた，円形の濃染線維については，筋線維の過収縮のあらわれと考えられた．

Agonist induced myopathy の発生機序については，Hudson ら[5] は，形態的に神経終末の hyperactivity を認め，脱神経により本症の発生が抑制されることから，抗コリンエステラーゼ剤の直接の影響によるものではないと述べた．又，Leonard ら[6] は，本症が $\alpha$-Bungarotoxin で予防され，又，$Ca^{++}$ free の状態下では発生しないことから，$Ca^{++}$ の関与を考えている．

実験的ミオパチーは，多くのモデルが知られている．neostigmine による，神経筋接合部下の筋変性は，機械的操作や細胞膜を破壊する化学物質などによるものとは異なり生理的な神経伝達物質である acethylcholine の過剰によってひきおこされると考えられる点に特徴がある．又，Z帯の消失が見られる点，Ca の過剰流入による CANP の関与が本症の発生に関与していると推察され，筋ジストロフィー症における筋変性の発症メカニズムに類似していると思われる．

## 文　　献

1) Ariens, A.Th. , Meeter, E. and Van Benthem, R.M.G, : Reversible necrosis at the end-plate

region in striated muscle of the rat poisoned with cholinesterase inhibitors. Experimentia 25 : 57-59, 1969

2) Lytle, R.B. and Wellband, W.A. : Increased synaptic area of neuromuscular junction in neostigmine-treated rats. Anat. Rec. 166 : 339, 1970

3) Engel, A.G. , Lampert, E.H. and Santa, T. : Study of long-term anticholinesterase therapy. Neurol. 23 : 1273-1281, 1973

4) 川淵優, 納光弘, 渡辺進馬, 井形昭弘, 金関毅. : Neostigmine 投与によるラットの神経筋接合部および横紋筋線維の変化. 福岡医誌66(8) : 500-511, 1975

5) Hudson, C,S. , Rash, T.E. , Tiedt, T.N. , Albuquerque, E.X. Neostigmine induced alterations at the mammalian neuromuscular junction. Ultrastructure. J.Pharmacol. Exp. Ther. 205 : 340-356. 1978

6) Leonard, J.P. , Salpeter, M.M. : Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium. J.Cell. Biology. 82 : 811-819, 1979

# 23)－(1) 固定・筋ジストロフィーの筋のglucose uptake

庄　司　進　一*

筋のエネルギー代謝の基質の一つであるglucoseの筋細胞への取り込み (uptake) は，最初の律速段階である．昨年度赤筋と白筋の比較，passive stretch の効果，絶食，脱神経，固定の際の筋 glucose uptake の変化を報告した．今年は固定につきさらにくわしく検討し，固定する際の筋の長さによってsoleus (SOL) ではglucose uptakeの変化の発現に要する時間が異なることを見出した．筋ジストロフィー・モデルのマウスでextensor digitorum longus (EDL) のglucose uptake の増加，SOL の減少がみられ，EDL とSOL のglucose uptake の大きさが逆転していることを見出した．この2点につき報告する．

## 材料と方法

〔実験動物〕

固定の実験には，実験開始時50～70gのWister系メスラットを用いた．

筋ジストロフィー・モデル動物には，C57BL/6 J-dy dy/dy マウスとコントロールマウス (C57 BL/6J-dy ＋/？) の5週齢を用いた．

固定は，エーテル麻酔下に足関節をextensjon と flexion の extreme position にギプスで固定した．

〔glucose uptake 測定〕

Krebs-Henseleit bicarbonate buffer に5mM sodium pyruvate, 0.1mM 又は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．この際ラットの筋では筋を取り出す時の生体内での長さにdouble clip で固定し，passive stretch を加え incubatie した．この条件下でglucose uptake は2時間まで直線性を示した．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 1340 ml 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．

$$\text{distribution ratio} = \frac{\text{muscle の count}}{\text{medium の count}}$$

$$\text{glucose uptake} = (\text{distribution ratio}) - (\text{extracellular space})$$

〔noncollagen protein の測定〕

20倍量の5mM bicarbonate 0.1M NaCl で筋をhomogenate 後，3倍量の0.1N NaOH を加え，38℃，1時間溶解後，上清と当量の10% TCA を加え，沈澱に0.1N NaOH を加え溶解し，Lowryの方法で蛋白を測定した．

## 結　　果

［固定による筋湿重量とnoncollagen protein 量の変化］

図1に示した通りで，A・Bはextreme extension，C・Dはextreme flexion の際の変化で，A・Cは湿重量を，B・Dはnoncollagen protein量を現わしている．縦軸は固定した側のEDLとSOLの対側対照との比をパーセントで示している．横軸は固定の長さを示している．extensionではEDLは伸展された状態で，反対にSOLは短縮した状態で固定される．湿重量もnoncollagen protein 量も共にSOLに強い減少が起きている．一方flexionではEDLは短縮した状態で，反対にSOLは伸展された状態で固定される．この場合は

＊信州大学医学部第三内科

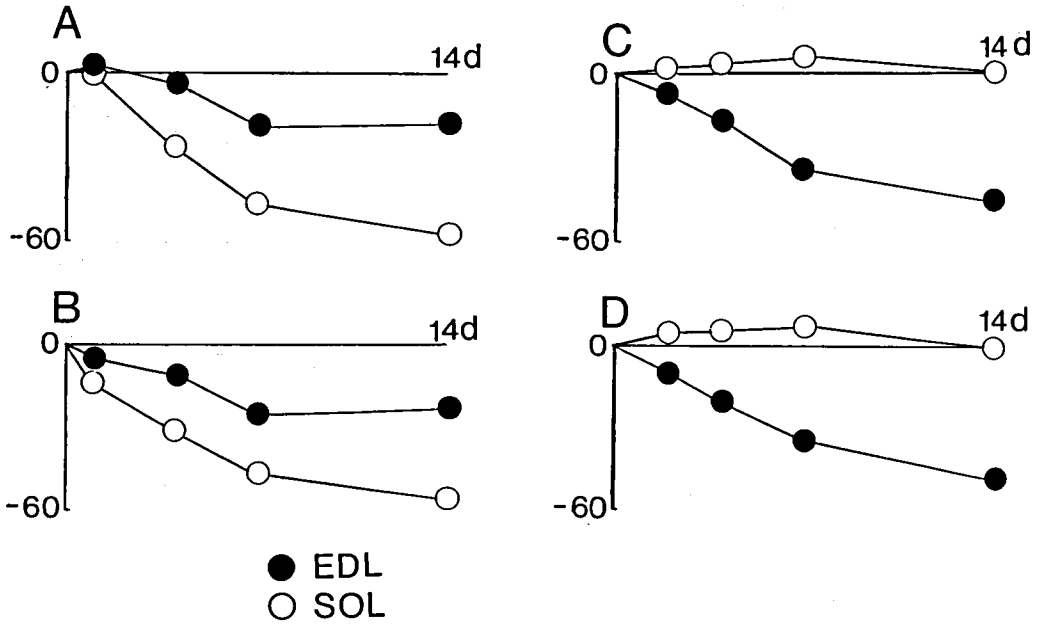



図1　固定後のEDLとSOLの湿重量とNCPの変化
A，B　extended ankle
C，D　flexed ankle
A，C　湿重量の対側対照との比（%）
B，D　NCP量の対側対照との比（%）
mean n＝5～7

EDLの方が湿重量もnoncollagen protein量も共に強く減少し，SOLは2週間ではほとんど変化なし，ないしかえってhypertrophyを軽度示している．

すなわち，両肢位の固定とも，短縮して固定される筋の萎縮が強いことを示している．

〔固定によるglucose uptakeの変化〕

図2Aにextreme extensionで固定した際の1日から14日までのglucose uptakeの変化を示している．固定した側のEDLとSOLのglucose uptakeと対側対照との差をn mole /g ww /hr, 37℃，0.1mMで示した．EDLでは4日目，14日目で有意な上昇が認められた．SOLでは1日目以後有意な減少が認められた．

図2Bにextreme flexionの固定の際の2日から14日までのglucose uptake変化を示している．EDLは4日目以後有意に増加が，SOLは2日と14日に有意な減少が認められた．

すなわち肢位に無関係に，言い換えれば筋が伸展された状態でも短縮した状態でも固定によりEDLのglucose uptakeは増加，SOLは減少の方向に変化した．

図3に24時間までの変化をn mole/g ww/hr, 37℃，1mMで示した．図3Aにextreme extensionの際の変化を示した．EDLはほとんど不変であるが，SOLは6時間以後有意に減少を示した．一方図3Bにextreme flexionの際のglucose uptakeの変化を示した．EDLはほぼ不変であり，SOLは減少を示したが有意に達するのは24時間後であった．

すなわち，SOLの減少はこの筋が短縮した状態で固定された際には速く起こり，伸展した状態で固定された際は遅れた．これに対しEDLは変化が有意に達するのはさらに遅く，両肢位共に4日目で有意に達した（図2）．

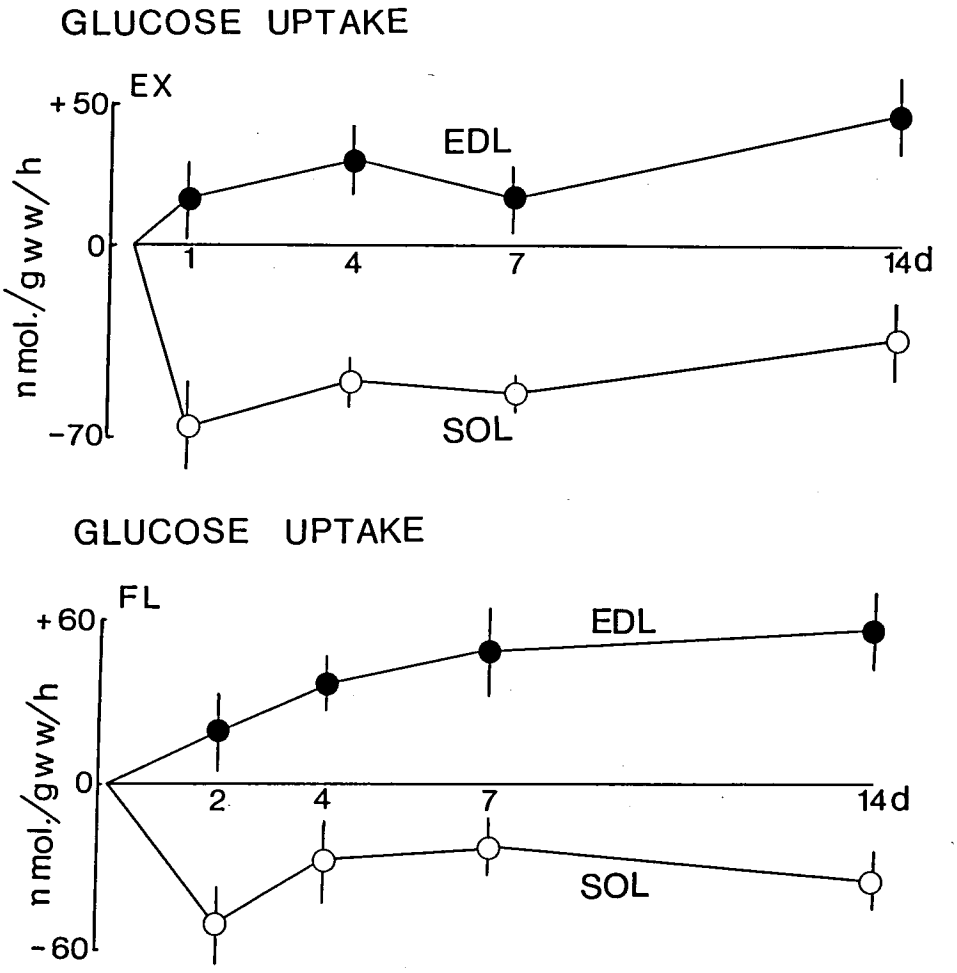



図2　固定後の glucose uptake の変化

A　extended ankle

B　flexed ankle

mean ± SEM　n= 3 ～ 7

単位　nmoles/g wet weight of muscle/hr at 37℃, glucose =0.1mM

〔筋ジストロフィーの筋の glucose uptake〕

図4に示した．Aは筋の湿重量を示す．Bは筋当たりの glucose uptake をn mole/muscle/h, 37℃, 1mM で示す．Cは筋の湿重量当たりの glucose uptake を $\mu$ mole/g ww/h, 37℃, 1mM で示す．筋ジストロフィー・マウスの筋の萎縮がAで示されている．Bで，白筋 EDL より赤筋 SOL の glucose uptake が大であるという関係がマウスでも成立することがコントロール・マウスで示されている．しかし筋ジストロフィーではこれが逆転している．Cでは SOL に関しては筋ジストロフィーで減少，EDL に関しては増加を示した．

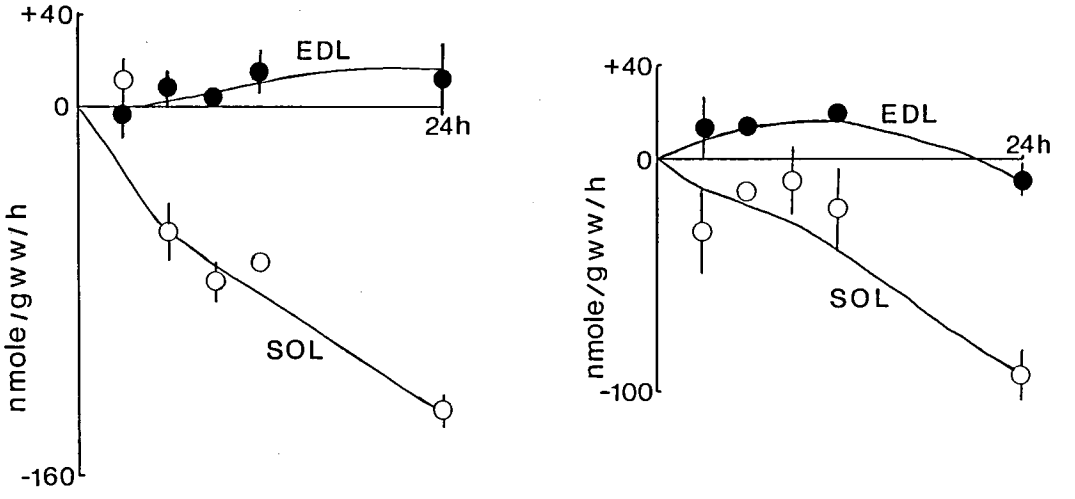



図3　固定後24時間以内の glucose uptake の変化

A　extended ankle

B　flexed ankle

mean ± SEM　n＝2～5

単位　nmoles /g wet weight of muscle /hr at 37℃, glucose ＝1mM

## 考　　案

**固定による筋萎縮**

固定によって起こる筋萎縮は，固定される際の筋の長さにより異なることは従来の報告に一致した．短縮した状態での固定は EDL も SOL も萎縮が強かったが，伸展した際の固定で認められた hypertrophy の傾向は SOL で明確であった．

**固定による筋 glucose uptake の変化**

SOL で減少，EDL で増加が認められた．

固定における glucose uptake の報告は，マウスの SOL で，固定後 3 時間と 8 時間の間に 2-deoxyglucose uptake の insulin に対する反応が減弱したと Nicholson らが報告している[1]．今回の系では insulin は用いていないので，SOL の glucose uptake の低下を insulin に対する response の低下とは考えにくい．固定後10日のラット SOL で glucose の oxidation の低下を Rifenberick らが報告している[2]．これは今回の SOL の glucose uptake の低下と合うデータと考えられる．しかし彼らは白筋の plantaris でも glucose の oxidation が低下していたと報告している[2]．今回の EDL の glucose uptake の増加と SOL の低下は，白筋と赤筋の差が小さくなる脱分化傾向を示し，脱神経と同様の変化の方向である．但し固定では SOL の低下が早く，脱神経では EDL の増加が比較的早く来た．

SOL の glucose uptake の変化が，SOL が短縮して固定された際には早く，伸展して固定された際にはこれより遅いという結果は，固定の際の筋のエネルギー代謝の変化に，筋の固定時の長さが関係することを示している．

**筋ジストロフィーに於ける glucose uptake**

マウスにおいてもラットと同様に赤筋である SOL が，白筋の EDL より glucose uptake が大であることがコントロールマウスで示された．筋ジストロフィー・マウスではこれが逆転しており，EDL が glucose uptake の増加と SOL でその低下が認められた．これは見かけ上脱神経・固定と同様の変化の方向を示しており，生化学的脱分化とも言える変化である．

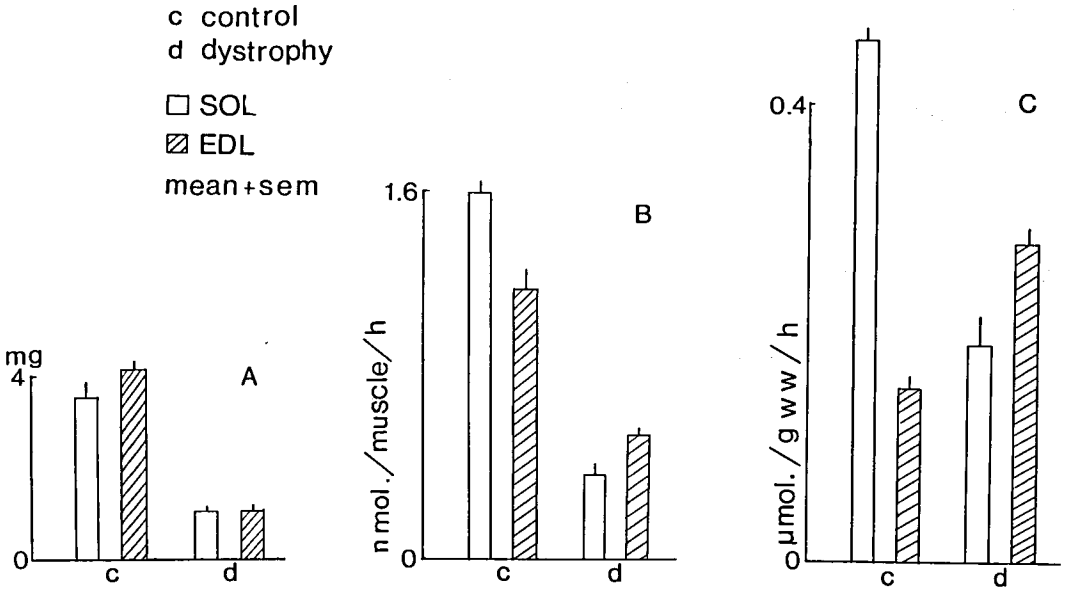



図4　筋ジストロフィー・マウスの筋 glucose uptake

A　筋の湿重量

B, C　筋 glucose uptake

B　単位　nmoles/muscle
/hr at 37℃, glucose ＝1m M

C　単位　μ mole /g wet weight of muscle /hr at 37℃, glucose ＝1mM
n＝10

## 文　献


1) Nicholson WF, Watson PA, Booth FW : Glucose uptake and glycogen synthesis in muscles from immobilized limbs. J.Appl. Physiol. : Respirat Environ Exercise Physiol. 56(2) : 431-435, 1984.

2) Rifenberick DH, Max SR : Substrate utilization by disused rat skeletal muscles. Am.J.Physiol. 226(2) : 295-297, 1974.

# 23)－(2) Nemaline myopathyの筋構造蛋白

庄 司 進 一*

研究協力者　武 田 伸 一*

## はじめに

先天性非進行性ミオパチーは，多くfloppy infantとして発症し，運動発達遅延，small muscle bulk，myopathy様顔貌，骨格異常を示す一連の疾患である．そのうちnemaline myopathyは，筋線維中の杆状構造物(rod)を特徴とし，最も頻度が高い．組織化学的には，type I fiberの優位性を認める事が多く，筋構造蛋白の分析でもmyosinのslow formの優位性[1]が指摘されている．我々は，このnemaline myopathyでuniform type I fiberを呈した症例の生検筋について，myosinのlight chain構成が特異である事を昨年度の班会議で報告した[2]．Nemaline myopathyに特異的な筋蛋白構成が明らかにされる事は，本疾患の病因を考える上だけでなく，他の天元性非進行性ミオパチーとの関連を考えるためにも重要と考えられる．今年度は，臨床的にはnemaline myopathyと診断されるが組織化学的には多様な例を分析し，一部の症例については単一筋線維を分離し，単一筋線維上の蛋白構成についても明らかにしたので報告する．

## 対象と方法

1．症例

表1に示す臨床的並びに組織学的にnemaline myopathyと診断された3例の生検筋を対象とし，凍結標本の10-20μ前後の厚切り切片1～数枚を材料とし，O'Farrellのlysis buffer下で充分にhomogenizeし，－80℃のdeep freezerで保存したものを出発材料とした．

2．電気泳動

表1　症例

| Case | Age | Sex | Part of biopsy | Histochemical finding |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 13 | M | biceps brachii | uniform type I fiber |
| 2* | 5 | M | rectus femoris | type I fiber predominance |
| 3** | 3 | M | rectus femoris | type IIc fiber predominance (96%) |

* 熊本大　三池先生　症例
**神経センター　埜中先生　症例

既に報告した方法に従って，二次元電気泳動を行なった．一次元目は，等電点電気泳動(IEF)，二次元目はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とし，染色はCBBに依った．

3．単一筋線維の分析

症例2については，生検筋の一部の小さな筋束を4mM EDTAを含んだ氷冷下のrelaxing solutionに浸し，暗視野実体顕微鏡下で単一筋線維を分離し，上記の二次元電気泳動を行ない，Oakleyらの方法[3]を一部改変して銀染色法を行なった．記録は，Polaroid MP-4 systemに依った．

## 結　　果

1．Nemaline myopathy筋の二次元電気泳動

図1にtype I fiver predominanceを呈したnemaline筋(症例2)の二次元電気泳動(IEF→SDS－PAGE)を示した．この系では，myosjnのlight chain (LC)，actin, tropomyosin, troponin C及びdesminのspotを明瞭に区別できた．Myosinのlight chainの分析結果は，昨年報告した症例1に一致し，LC 1と2については，slow formが優位で，これにfast formのLC 1と3

*信州大学医学部第三内科

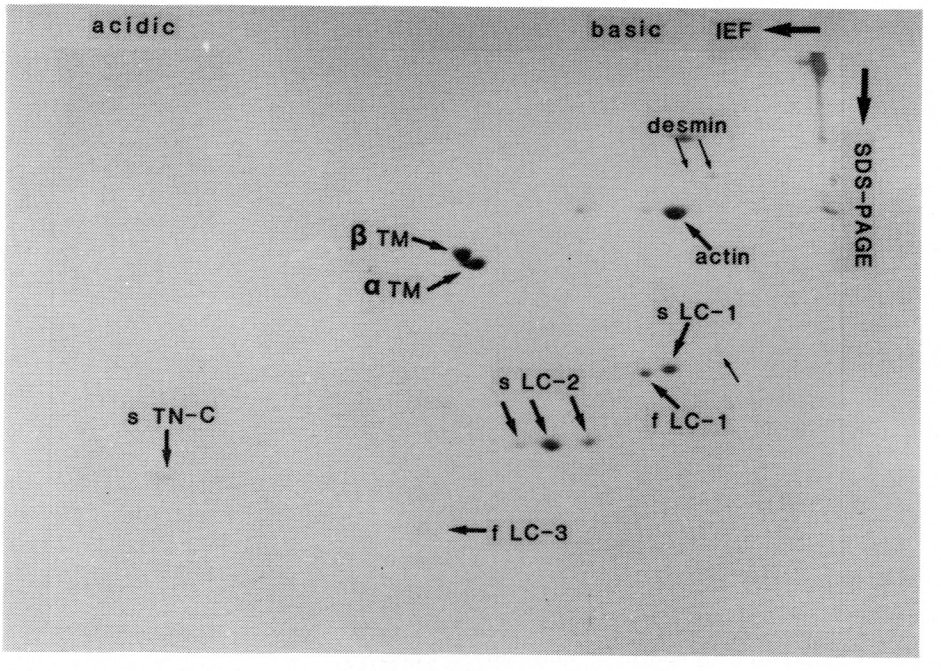



図1　Nemaline myopathy 筋（症例2）の電気泳動像
IEF から SDS-PAGE への二次元像を示す．Myosin の light chain (LC) 1，2，3，actin, tropomyosin (TM), troponin (TN) -C, desmin の各 spot が示されている．s, f はそれぞれ slow form, fast form を表わす．

の混在を認めるが，fast form の LC 2は欠如していた．こうした myosin light chain の pattern は，筋組織の pattern としては，他の疾患では報告されていない．他の筋構造蛋白については，troponin C が slow form のみである事と，desmin の増加が認められた．

2．組織化学的に多様な例の比較

昨年報告した症例1が組織化学的に uniform type I fiber であり，症例2が type I fiber predominance であるのに対し，type II C predominance (96%) を呈した症例3の結果を図2に示した．酸性側蛋白を明瞭に分離している中で，myosin の light chain についてみると，fast form 優位の予想に反し，slow form の優位性を認めた．つまり，slow form の LC 1と2に対し，fast form の LC 1と量は少ないが LC 3の混在を認め，fast form の LC 2は欠如していた．Troponin C が slow form のみであり，desmin が増加している事も一致する点であった．

以上3例の myosin light chain を比較したのが図3である．LC 1と2についての slow form の優位性，fast form の LC2の欠如という意味では共通しているが，fast form の LC 1と3については症例ごとに異なっていた．Fast form の LC 1については，症例2と3に明らかで，13歳の症例1では少ない．逆に fast form のみである LC 3については，症例1と2では明瞭で，3歳である症例3では極めて少ない．これは，症例ごとの差とも考えられるが，LC 3が胎生前期には認められない蛋白である事を考えると，筋の成熟化が続いていると考えられる．LC 1については，筋の slow form への転換を表現しているとも考えられる．

3．単一筋線維の分析

検体量が充分であった症例2については，単一筋線維の分析をする事ができた．約20本の単一筋

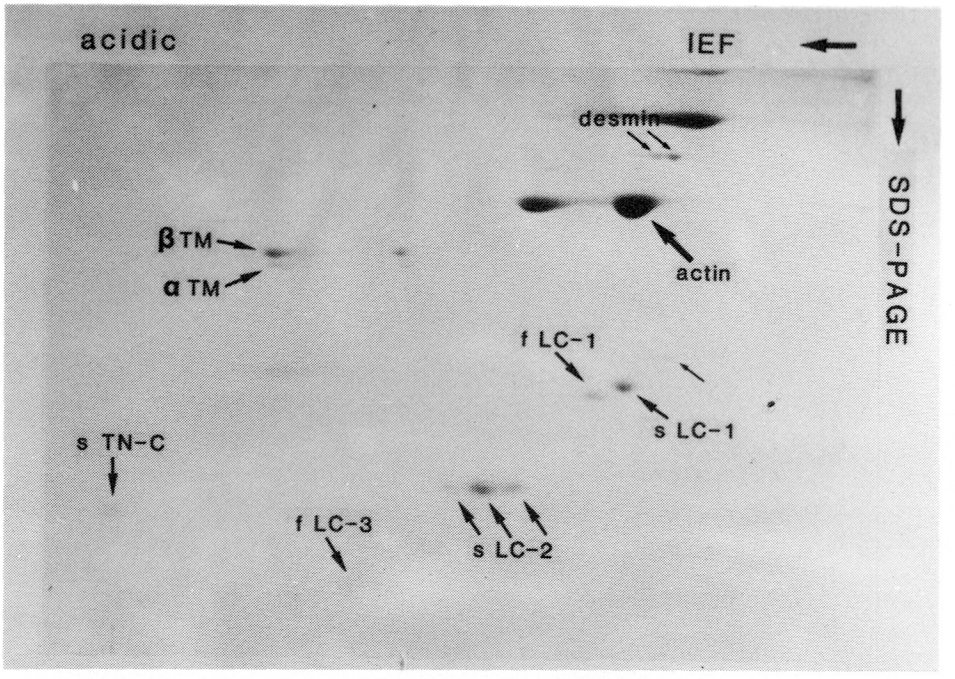



図2　Nemaline myopathy 筋（症例3）の電気泳動像
IEF から SDS-PAGE への二次元像を示す．図中の説明は図1に同じ．

線維の分離が可能で，銀染色法で分析したが，その二次元電気泳動の一例を図4に示す．Myosin の light chain の部分のみを示すが，筋線維の pattern と基本的に一致し，slow form の優位性，fast form の LC 1と3のみの混在を認めた．これは検索した全ての検体に共通する所見であった．Nemaline 筋にみる myosin light chain の特異な構成は，筋線維の組み合わせによるのではなく，一本の筋線維の組成による事が明らかとなった．こうした単一筋線維の myosin light chain の構成は，Duchenne muscular dystrophy 筋の一部[4]，及び denervation 筋[5]で認める事があるとされる．特に denervation との関連については今後の検討が必要である．

## 考　　察

先天性非進行性ミオパチーは，遺伝学的にも，臨床像も共通した点が多く，その診断は組織学的に行なわれる．Nemaline myopathy, central core 病, myotubular myopathy, congenital fiber type disproportion は，組織学的あるいは組織化学的に特有な構造や特徴を有する点により診断されるが，type I fiber の優位は何れの疾患にも共通した所見である．今回，我々が検索の対象とした nemaline myopathy は，先天性非進行性ミオパチーの中で最も頻度の高い疾患であるが，この疾患の筋構造蛋白の特徴を明らかにする事は，疾患群全体の考察の上で重要と考えられる．

もとより，nemaline myopathy については，構造的特徴である nemaline rod に対応する所見として，α-actinin や desmin の増加[6]が指摘されてきた．Fiber type に関連した所見としては，myosin の light chain の slow form の優位性が注目された．今回，我々が明らかにした事は，myosin light chain の特異な構成を共通にする症例が存在する事である．この結果は，既に報告された一次元電気泳動の結果[1]に一致し，幾つかの二次元電気泳動の結果[7]をより詳細にしたと考え

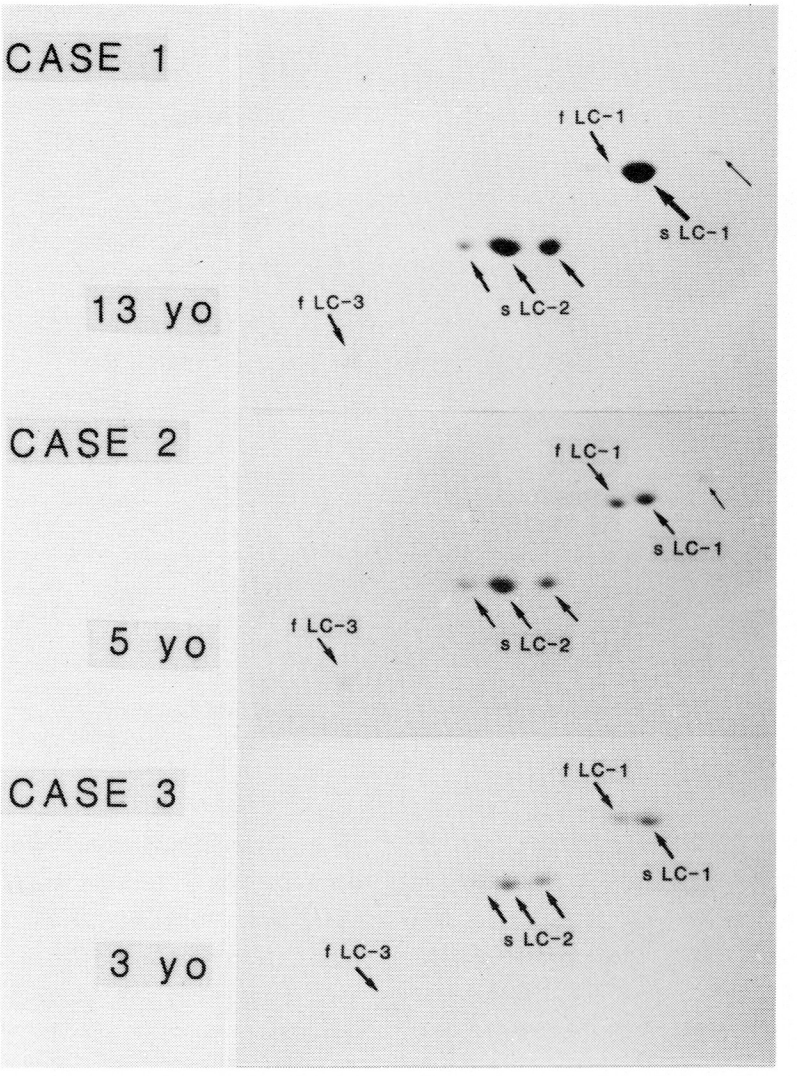



図3　組織化学的に様々な所見を呈した nemaline myopathy 筋の比較
上段から uniform type I fiber を呈した症例1，type I fiber predominance を呈した症例2，type II C fiber predominance を呈した症例3の IEF から SDS-PAGE への二次元像．Myosin light chain の部分のみを示す．

られる．しかも，この結果は，type I，type II と言った組織化学的所見を越えて認められる．少なくとも type I fiber predominance や，type II C predominance のように筋の分化に diffuse に障害が認められる症例では，myosin light chain の pattern は一致していると考えられる．この事は，従来 nemaline myopathy として呼ばれてきた疾患の中に nemaline rod と共に，一様な筋線維の分化の状態と特異な myosin light chain 構成を有する疾患の中核と言うべき症例が数多く存在

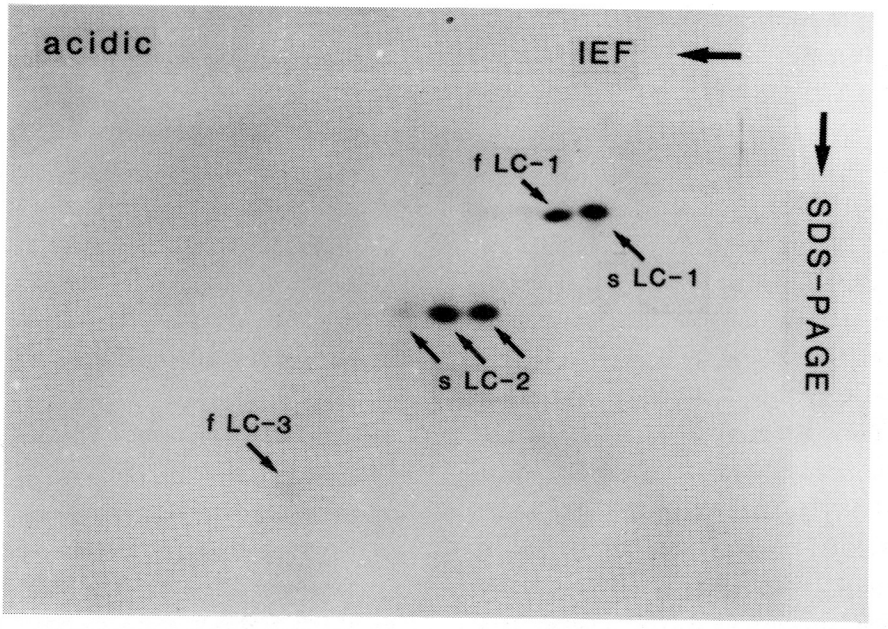



図4　単一筋線維の二次元電気泳動像
症例2の生検筋より分離された単一筋線維の二次元泳動像を銀染色により示した．Myosin の light chain の部分のみが示されている．

する事を示唆する．問題点としては，混在する fast form の LC 1と3に症例ごとの差を認めた点がある．これについては，light chain の foetal form の検索を充分に行ないながら，筋の成熟化，slow form への転換の面から検討する必要がある．

次に本研究が明らかにした事は，nemaline myopathy にみる特異な light chain の原因が，単一筋線維内の蛋白構成にある事である．このような単一筋線維内の構成が dystrophy 筋だけでなく，denervation 筋で見られた事も注目される．Nemaline 筋でも病因として，神経系の要因が疑われるからである．

今後は，まず myosin の light chain 構成が特異である例について，myosin heavy chain の検索を進めることが必要である．Fiber type の決定は heavy chain の先端にある myosin ATP ase の性質に依存するからである．

次に，組織化学的に筋線維の分化が一様でない nemaline myopathy の検索も行なう必要がある．Myosin light chain の分析で，fast form の LC 2の欠如を認めない報告[8]もあり，更に症例を重ねる必要がある．

最後に，nemaline myopathy 以外の先天性非進行性ミオパチーの分析結果が待たれる．同じ type I fiber predominance でも結果が異なる事が期待されるからである．

## おわりに

組織化学的に，uniform type I fiber, type I fiber predominance, type II C fiber predominance を呈した nemaline myopathy の生検筋について二次元電気泳動を用いて検索を行ない，myosin light chain の特異な構成（LC 1，2の slow form の優位性，LC 1，3の fast form の混在，LC 2の fast form の欠如）を明らかにした．一部の症例について，単一筋線維の分析を行ない，全ての fiber で筋組織のパターンと同一の結果を得た．

最後に，貴重な症例を御提供いただきました，

熊本大学医学部小児科三池輝久先生，神経センター微細構造研究部の埜中征哉先生，並びに御援助をいただきました教室の柳沢信夫教授に深謝します。

## 文　献

1) Sreter, F.A., Äström, 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.

2) 小口喜三夫，武田伸一，柳沢信夫，: Nemaline myopathy の筋構造蛋白について，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58年度研究報告書，1984，pp266.

3) Oakley, B.R., Kirsch, D.R. & Morris, N.R. : A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels, Anal, Biochem, 105 : 361, 1980.

4) Takagi, N., Ishiura, S., Nonaka, I. & Sugita, H. : Myosin light chain components in single fibers of Duchenne muscular dystrophy, Muscle Nerve 5 : 399, 1982.

5) Billeter, R., Heizmann, C.W., Howald, H. & Jenny, E. : Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibers. Eur. J. Biochem. 116 : 389, 1981.

6) Sugita, H., Ishiura, S., Nonaka, I., Ohashi, K. & Maruyama, K. : Gel electrophoretic study of nemaline muscle. Proc. Japan Acad., 57B : 59, 1981.

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) 田中恵子，豊島至，福原信義，宮武正：Nemaline myopathy における筋蛋白質の研究，脳神経，36 : 57，1984.

# 24）筋収縮のエナージェティクス
## ——燐NMR法による筋ジストロフィー症病態の研究——

山　田　和　廣*

研究協力者　米　谷　快男児*　田之倉　優*　北　野　敬　明*

### 1．筋収縮のエナージェティクス[1)]

生体におけるエネルギーの転換はすべての生命活動の根幹であり，筋肉の収縮は，生体におけるエネルギー転換過程を代表するものである．筋収縮においては，ATPの化学エネルギーが収縮という力学的エネルギーに転換されるが，クレアチンキナーゼ反応が存在するために，実際に筋収縮によって分解が観測されるものは，ATPではなくして，クレアチン燐酸である．また，これと同時に無機燐酸の増大が観測される．

筋肉の収縮におけるエネルギー転換の研究には，化学的エネルギーの利用と，力学的エネルギーの産生との対応を調べることが必要となる．化学分析法を用いる化学エネルギーの利用（ATPの分解量）の研究は，その方法が破壊的であるために，大きな困難を伴う．したがって燐NMR法はその非破壊的性質のために，化学エネルギー利用の動態を調べる上でたいへん有利な方法である．

一方，力学的エネルギーの産生は，収縮によって筋のなした仕事量と，筋の熱発生量との和として求められる．すなわち，利用された化学的エネルギーがすべて仕事として用いられるのではなくて，その一部は熱として散逸する．筋収縮の効率は最大45%に達する．

収縮におけるエネルギー転換の研究を行なうには，一方では化学的変化（エネルギー利用）の測定が，一方では熱発生および力学的変化（発生張力および短縮距離）の測定がどうしても必要とされるのは，このような理由によるのである．

*大分医科大学生理

### 2．燐NMRによるジストロフィー筋の研究

燐核磁気共鳴（$^{31}$PNMR）により天然に存在する燐のスペクトルを測定し，生きている筋肉やその他の組織を破壊することなくそのまま用いて，細胞内の燐化合物の量およびその変化を知る方法が報告されて数年がたった．この方法は，筋肉においてはさらに生理学的な手法の導入が行なわれ，収縮機構を調べるための生理学的手法の一つとして発展した[2)8)]．また，この方法は骨格筋の他に多くの組織に用いられつつある．

最初にラットの筋肉を用いて燐NMRスペクトルを記録したHoultら（1974）[3)]によって，筋にはATPの3種の燐酸に由来する3つのピーク，クレアチン燐酸のピーク，無機燐酸のピークおよびグルコース-6-燐酸などからなる糖燐酸と同定されるピークが存在することが明らかとなった．

また以上の他に，筋肉でこれまでその存在が全く知られていなかったシグナルが，燐酸ジエステルの周波数領域に存在することが明らかにされた[4)5)]．このシグナルはカエルの筋肉にも存在するが，それに比べヒキガエルの筋肉に特に大きいことが明らかにされている（図1）．このシグナルは，Burtら（1976a）[5)]によってglycerol-3-phosphorylcholineであることが同定された．

このような燐酸ジエステル領域のシグナルについて，特に重要なことは，それがジストロフィー症ニワトリの胸筋にかなり大量に存在する事実である[4)]．後に，Burtら（1976b）[6)]によって，ジストロフィー症ニワトリに存在する燐酸ジエステルは，L-Serine ethanolamine phosphodiesters（SEP）であると同定されている．ジストロフィー症ニワトリの筋にSEPが増す理由は不明であるが，

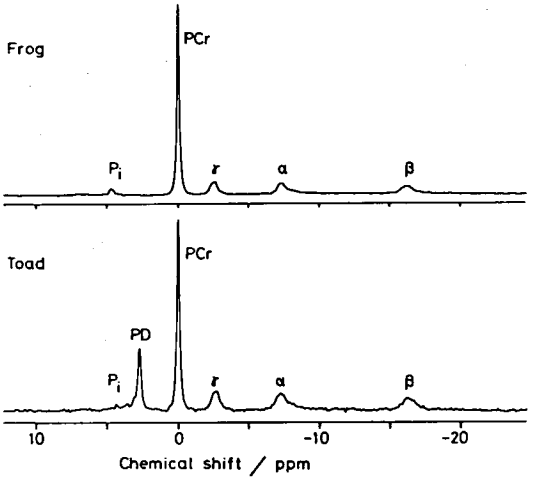



図1　ウシガエル (frog) およびヒキガエル (toad) の縫工筋16本より得た燐NMRスペクトル．ウシガエルの筋については合計352，ヒキガエルについては256のシグナル (FID) を積算した．$\alpha$，$\beta$，$\gamma$；ATPの$\alpha$，$\beta$および$\gamma$-燐酸，PCr；クレアチン燐酸，PD；燐酸ジエステル，Pi；無機燐酸．

SEP代謝異常はジストロフィー筋における成熟過程の異常を示していると思われる．

## 3．ジストロフィー筋収縮のエナージェティクス

カエルの骨格筋に強縮刺激を加えるとき，等尺性張力の発生に伴って熱が産生される（図2）．等尺性収縮にさいしては筋は外部にたいしてほとんど仕事をしないから，熱の産生は収縮のエネルギー利用と一致していると予想される．

Polinski と Rall (1982)[7] は孵化後16～33日のニワトリの広背筋 (PLD) について，正常およびジストロフィー筋の熱産生を調べている．それによると，張力の発生と比べた熱産生には正常筋とジストロフィー筋でほとんど相違がみとめられない．したがって，ジストロフィー筋では，エネルギー利用と，収縮張力発生との間の連結はあまり障害されていない．しかし，刺激を持続するとき，ジストロフィー筋では正常筋のように張力が維持されず低下してしまうので[7]，エネルギー利用の過程のどこかに異常が存在すると考えられる．

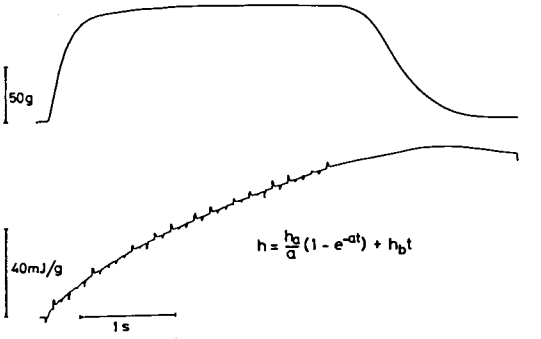



図2　カエルの骨格筋の強縮刺激による張力の発生（上方の記録）と熱発生（下方）．熱発生の記録にみられる鋭い棘状の変化は筋に加えた刺激電流によるアーティファクトである．このような記録から，筋は張力を維持するためにエネルギーを必要とすることがわかる．

## 4．燐NMRによる収縮におけるエネルギー利用の動態[2)8)]

上にのべたように，ジストロフィー筋におけるエネルギー利用と張力発生との間の連結の障害はそれほど著明ではないと思われる．それでは，ジストロフィー筋においてエネルギー産生の過程のどこに障害があるのであろうか．

筋肉におけるエネルギー転換の研究には，力学的エネルギーの産出と，化学的エネルギーの利用の対応を調べることが必要である．化学分析法を用いる化学エネルギーの利用の研究は，この方法が破壊的であるためにたいへんな困難を伴う．$^{31}$PNMRはその非破壊的特性のために，化学エネルギー利用の経時的変化を調べる上でたいへん有利な方法である．

我々は筋収縮におけるエネルギー利用の経過をできるだけよい時間分解能をもって測定する目的で大口径NMR試料管中で，できるだけ大量の筋組織を生理的状態に保ち，$^{31}$PNMRスペクトルのS/Nを向上させる方法を用い，上にのべたような収縮のエネルギー転換の研究を行ってきた．その結果，これまでに収縮によるクレアチン燐酸の消費は収縮の経過中だけに生じているのではなく，その一部は収縮が弛緩した後さらに分解されるこ

と（ATP あるいは PCr の収縮後分解）が明らかとなった．

このように，NMR の測定感度を向上させ，その結果，ATP 利用および回復過程の時間的経過を追求するために，NMR 測定の時間分解能の向上をはかることを目的として，基礎的研究を行なってきた．このようにして，現在では 1 回の NMR 測定すなわちシングルスキャンによって，よい定量性をもったスペクトルが得られるに到っている．この場合，時間分解能はミリ秒のオーダーに達している．

方法の概略をのべると[8]，Bruker WM 200 wb スペクトロメーターを用い，外径25mm 試料管を筋チェンバーとし，約200g のウシガエルからそれぞれ 1 対の縫工筋を摘出し，8 対の縫工筋を 1 回の実験に用いた．6mM Pipes Ringer 液（pH 7），あるいは18mM bicarbonate Ringer 液（5% $CO_2$，95% $O_2$ で飽和，pH 7）を用いて筋チェンバーを灌流した．スペクトル観測には60° RF パルスを照射し，図 3 に示すように外部パルスを用いてスペクトロメータをトリガーして，RF パルスインターバルを正確に 4 秒とした．30～60分おきに筋を刺激し，収縮と同期した NMR シグナル（FID）を積算して S/N の向上をはかった．

図 4 はこのような方法を用いて，カエルの骨格筋を対象として収縮による無機燐酸（Pi）の増加とクレアチン燐酸（PCr）の減少，およびその回復の時間的経過を調べた結果を示している（ウシガエル縫工筋，4℃）．時間零において，短い強縮刺激を加え，筋を 2 秒間持続的に収縮させた．60° RF パルスを 4 秒おきに照射し，8 ヶの NMR シグナル（FID）を積算して測定の単位とし（時間分解能32秒），さらに同じ収縮を16回くり返して，収縮と同期した FID を積算した．その結果収縮の直後から約 4 分間，PCr の減少量は Pi の増加量よりも小さいことが示されている．実線は Pi の回復の経過に最も良く一致する指数関数を示している．PCr の回復過程にも同じ曲線を描いてある．6mM Pipes Ringer 液（5% $CO_2$，95% $O_2$で飽和）で高速灌流を行った（～60ml/min）．また，この図で示

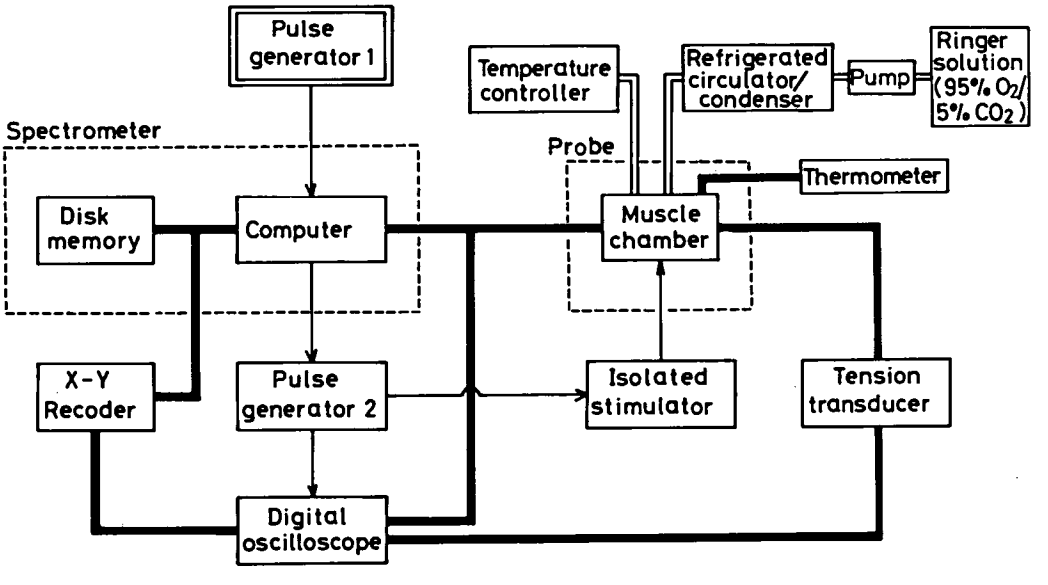



図 3　NMR による筋収縮の研究を行なうためのシステムのブロック・ダイヤグラム．太い実線はデータの移動を，細い実線はパルスによる制御を，また中空の結線は Ringer 液などの移動を示す．スペクトロメータは外部からのパルスで制御する．

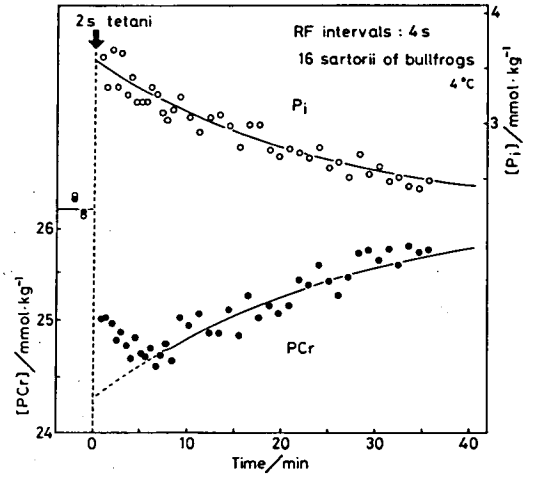



図4　収縮による無機燐酸 (Pi) とクレアチン燐酸 (PCr) の減少，およびその回復の時間経過．ウシガエル縫工筋，4℃．実線は Pi の回復の経過に最も良く一致する指数曲線である．PCr の回復過程にも同じ曲線を描いた．

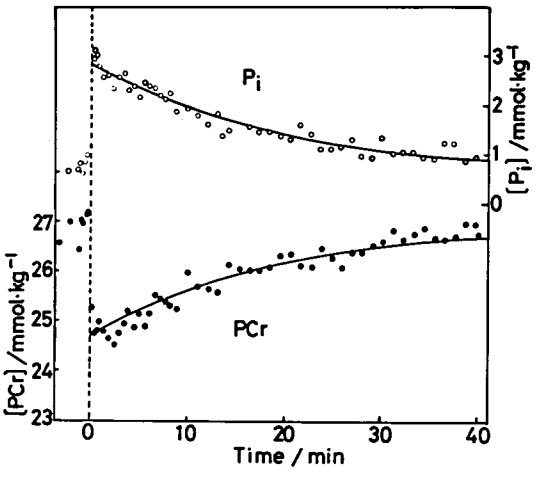



図5　図4に示したと同様の測定を10℃で行った結果，Pi の増大と PCr の減少はよく一致して居り，4℃におけるような両者間の不一致は認められない．

されているように収縮によって利用された ATP は，収縮の弛緩後の回復過程において，酸素を消費することによって元のレベルに回復する．この図に示されている回復過程の時間経過は，低温であるために非常に遅い．

図5は図4と同様の測定を10℃で行った結果を示している．60° RF パルスを4秒おきに照射し，さらに同じ収縮を16回くり返して，収縮と同期した FID を積算した．最も良い時間分解能を必要とするところでは4個のスペクトルについての測定結果を平均した（時間分解能，16秒）．結果は，収縮後のごく短い時間を除くと，Pi の増大と PCr の減少は良く一致して居り，4℃におけるような両者の不一致はみとめられない．実線は Pi の回復の経過に一致する指数曲線．18mM bicarbonate Ringer 液 (5% $CO_2$，95% $O_2$) で灌流した．このように，$^{31}$PNMR によって明らかにされた収縮後の PCr の遅延性の減少の温度依存性から，このような現象が，収縮後の ATP 利用の過程によるものであり（化学的過程），収縮蛋白の関与するメカニズムによることが強く支持される．

## 5．ジストロフィー症病態におけるエネルギー利用および産生障害の研究の見通し

ジストロフィー症において，エネルギー利用および産生の機構のどの過程に障害が生じているのかということについては，上にのべたような研究から，現在までのところ明らかにすることは出来ない．ニワトリ広背筋がカエル縫工筋とその形がよく似ていることから，上にのべた燐 NMR 法を適用することが可能であり，収縮による動的なエネルギー利用経過を観測することができると考えられる．

一方では，エネルギー利用と産生の連結における障害は容易には捕足しがたいものであることが予測されて居るので[7]，細胞内 pH を変化させるなどの負荷を加えることが必要であるかも知れない．そのための基礎的研究が進められているところである[9]．

## 文　献

1) 山田和廣：骨格筋の熱産生，病態生理，3：685-689，1984.
2) Dawson, M.J., Gadian, D.G. and Wilkie, D.R.: Contraction and recovery of living muscles

studied by $^{31}P$ nuclear magnetic resonance. J. Physiol., 267 : 703-735, 1977.

3) Hoult, D.I., Busby, S.J.W., Gadian, D.G., Radda, G.K., Richards, R.E. and Seeley, P.J. : Observation of tissue metabolites using $^{31}P$ nuclear magnetic resonance. Nature, 252 : 285-286, 1974.

4) Burt, C.T., Glonek, T. and Barany, M. : Analysis of phosphate metabolites, the intracellular pH, and the state of adenosine triphosphate in intact muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. J.Biol. Chem. 251 : 2584-2591 1976 a.

5) Burt. C.T., Glonek, T. and Barany, M. : Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance detection of unexpected phosphodiesters in muscle. Biochemistry, 15 : 4850-4853, 1976 b.

6) Chalovich, J.M., Burt, C.T., Cohen, S.M., Glonek, T. and Barany, M. : Identification of an unknown $^{31}P$ nuclear magnetic resonance from dystrophic chicken as L-serine ethanolamine phosphodiester. Archs. Biochem. Biophys., 182 : 683-689, 1977.

7) Polinski, W.J. and Rall, J.A. : Mechanics and energetics of muscle contraction in normal and dystrophic chickens. Am. J. Physiol., 242 : C19-C24, 1982.

8) Yamada, K. and Tanokura, M. : Post-contractile phosphocreatine splitting in muscle as reveated by time-resolved $^{31}P$ nuclear magnetic resonance. Jpn. J. Physiol., 33 : 909-919, 1983.

9) 北野敬明，米谷快男児，田之倉優，山田和廣：筋収縮張力及び熱産生に及ぼす細胞内 pH の効果．第62回日本生理学会大会発表予定．

# 25) ミトコンドリアミオパチーの生化学的研究：scanning organ spectrophotometer による白血球電子伝達系の検討

宮武　正*

研究協力者　西澤正豊*　斎藤敏之**　菅野富夫**

## はじめに

ミトコンドリア異常症においてミトコンドリアの機能異常を生化学的に検索するためには従来，生検により得た骨格筋細胞，または培養皮膚線維芽細胞よりまずミトコンドリアを単離する必要がある．この単離ミトコンドリアを試料として，(1)酸素電極による酸素消費の解析から障害部位を推定する，(2)分光学的に還元酸化差スペクトルを得，これよりシトクローム各成分を定量する，(3)ミトコンドリアに局在する酵素活性を直接測定する，の三つの方法が併用されてきた．その結果，現在までに電子伝達系の障害として，シトクローム b，あるいは $b/aa_3$ の欠損症，cytochrome c oxidase の欠損症（各種の臨床病型をとる），NADH あるいは succinate の oxidation の障害例が明らかにされてきている．

生検筋を用いる場合には得られる試料の量に限度があり，2回以上の生検は仲々困難であることから，分析上量的な制約がある．ミトコンドリアを単離する場合は分離操作の過程で膨化が生じ，intact なミトコンドリアを単離することは技術的に容易でない．またミトコンドリアを細胞体から分離する以上，細胞体との機能的相関は失われ，in situ での機能を観察することはできない．

そこで今回我々はミトコンドリアを単離せず，細胞が intact な状態で，電子伝達系を直接観察するために，立石ライフサイエンス社製の scanning organ spectrophotometer（以下 SOSP）を，試料として容易に得られる白血球に応用したので，その結果を報告する．

## 方　法

白血球はヘパリン加採血した全血10ml より，デキストランにて赤血球を沈降させ，その上清に1分間の低浸透圧ショックをかけ，残存する赤血球を溶血させて分離した．分離後の白血球は測定まで，充分に酸素化したグルコース添加（4.5g/l）リン酸緩衝生食水に suspend して更にこれに酸素を bubble しておき，測定直前に軽く遠心して pellet とした．採血後直ちに分離しない場合には全血のままで氷冷保存した．採血6時間後に分離した白血球でも，また，分離6時間後の白血球でも，採血後直ちに分離した白血球で測定した場合と同様な結果の得られることを確認している．

この白血球 pellet の表面に SOSP の optical fiber 束の先端（probe）を近接させ（図1），一部の fiber 束より試料を波長420nm から620nm までの可視光にて高速度にて scan し，pellet よりの反射光を別の fiber 束を介して photomultiplier に導いた．図の probe に照光用，測光用の fiber 束が1束にまとめられている．

常温にて白血球試料を1秒に1回，波長420nm より620nm まで高速度で scan して得られるスペクトルを16回加算してまず絶対スペクトルを得た．ついで，この絶対スペクトルを reference として，その後30秒毎に経時的に同様にして得られるスペクトルと reference との差を演算させ，差スペクトルとして表示させて，これを経時的にモニター

＊新潟大学脳研究所神経内科
＊＊北海道大学獣医学部生理学

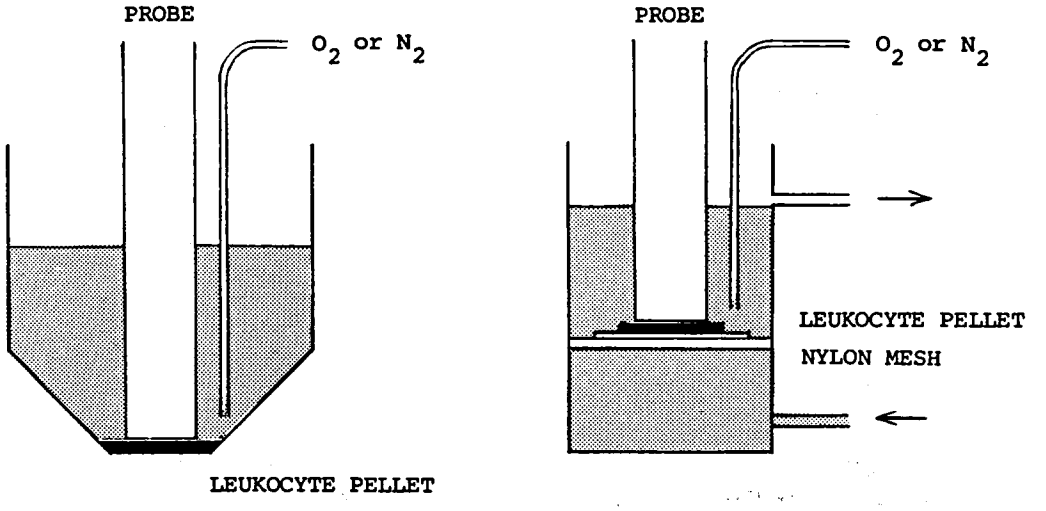



図1　測定装置の模式図

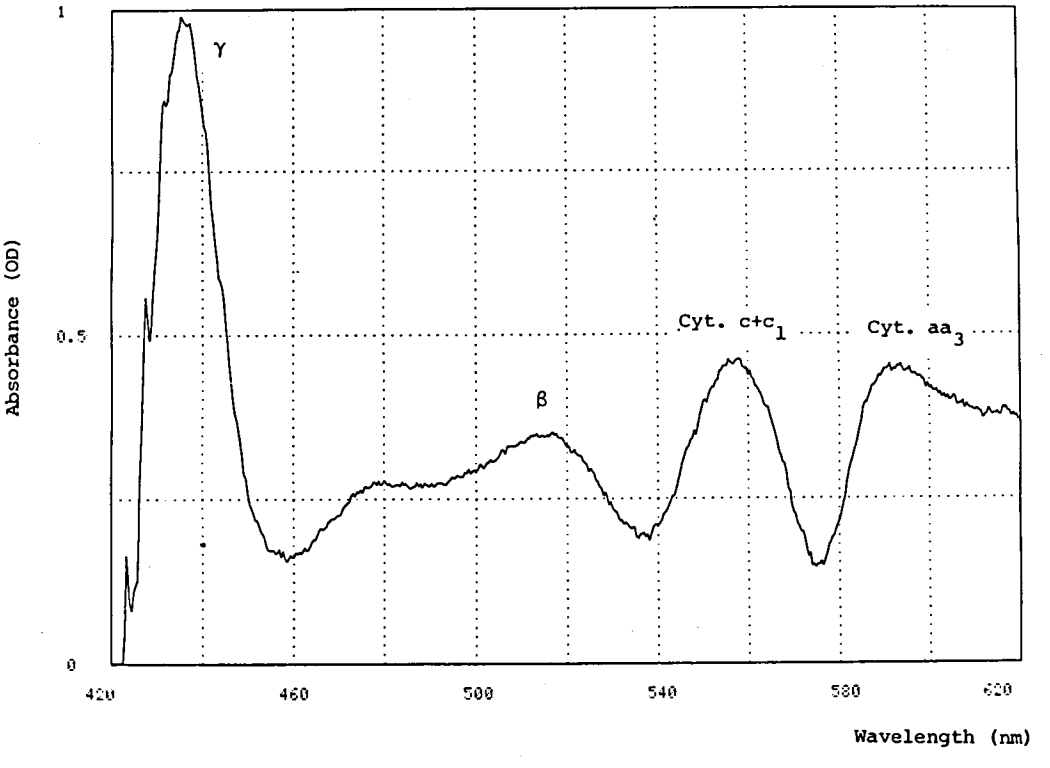



図2　正常白血球への Dithionite 添加10分後の差スペクトル

した．

図1は測定に用いたchamber の模式図で，左図の如く，単に遠心管内にてpellet にprobe をあてて測定する場合と，pellet をnylon mesh にのせて右図の如き自作の灌流装置内にsetし，medium を灌流しながら窒素置換や各種阻害剤に対する反応をみる場合とを目的に応じて使い分けた．

測定はまず灌流装置を用いて，可逆的な反応をみる場合に常用される窒素置換によるanoxia で生ずる還元反応を検討したが，白血球はこの測定条件下ではanoxia に対して抵抗性を示し，還元型のスペクトルは得られなかった．そこで以下は遠心管系を用いて，resting level を10分間観察した後，強力な還元剤であるsodium hydrosulfite (以下Dithionite) を添加し，full reduction の状態として10分後に得られる差スペクトルを分析することとした．

## 結　果

正常白血球のpellet にDithionite を加えて10分後の差スペクトルを図2に示す．還元型シトクロームbによる吸収は$c+c_1$のpeakの肩となり，明瞭なpeakとしては認められていないが，$aa_3$，$c+c_1$，$\beta$帯，$\gamma$帯の還元型シトクロームによる吸収が明らかに認められた．この差スペクトルは立石研究所により発表されているラット肝より単離したミトコンドリア，あるいは灌流肝試料より，窒素置換によるanoxia で得られた還元マイナス酸化の差スペクトル[1]あるいは灌流カエル脳[2]，ラット膵[3]などの記録とよく一致している．

図3にはもう一例の正常白血球でのDithionite還元10分後の差スペクトルを示す．本例では先の例にみられた吸収帯に加えて，470nmに吸収極大

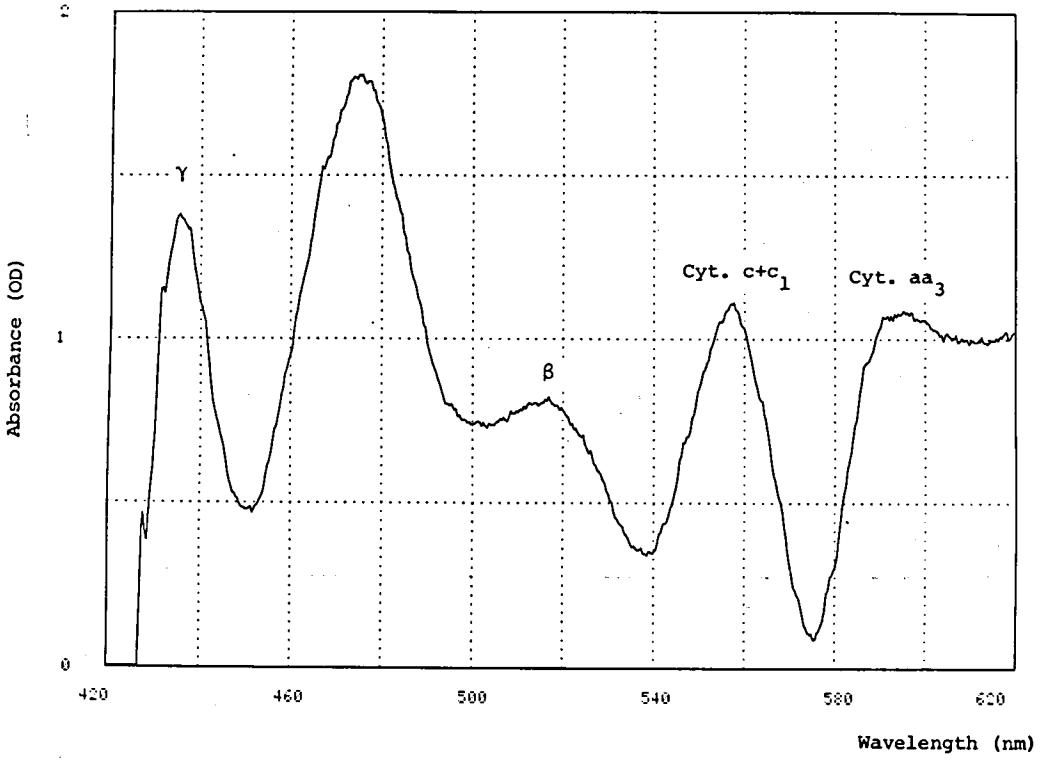



図3　正常白血球へのDithionite 添加10分後の差スペクトル

をもつ大きな peak が認められた．この peak は Dithionite による還元後に $aa_3$，$c+c_1$ の peak よりも遅れて出現してきて，しだいに増大する傾向を示した．SOSP を用いての測定は記載がないが，文献上この peak は白血球に存在する myeloperoxidase の吸収値と一致しているので，ミトコンドリア外の物質に由来するものと思われるが，未だ同定は行なっていない．正常白血球ではこの2型のいずれかが観察された．

30秒毎に得られる差スペクトル上で波長605-575，562-575，550-540nm での吸収値の差を各々シトクローム $aa_3$，b, $c+c_1$ の redox state の示標として経時的にモニターしていくと，図4の如き記録が得られる．これは比較のため，3つの記録を同一の chart に重ねて表示したものである．Dithionite による full reduction 後のそれぞれの二波長での吸収値の差からシトクローム $aa_3$，b，$c+c_1$ の存在量比が算出される．正常白血球6例より得られた各シトクロームの存在量比は $aa_3/c+c_1=1.39\pm0.20$，$b/c+c_1=1.38\pm0.15$（平均±標準偏差）であった．

## 考　　察

白血球には phagocytosis に際して作動する cyanide-insensitive な酸素消費があり，特に NADPH oxidase については詳しい報告があるが，ミトコンドリアについての記載は意外に少ない．古くは水上らにより分光学的にシトクローム a, b, c の存在が確認されており，他組織との間に大きな質的相違は認められていないが，形態的に証明されるようにミトコンドリアの数は少ない．

白血球は好気的条件下でも解糖を行ない，グルコース負荷により呼吸が抑制される Crabtree 効果が認められる．また白血球では TCA サイクルに入るピルビン酸は5％にすぎないとの報告もあり，ミトコンドリアへのエネルギー供給の依存度は低いものとみなされる．これが窒素置換による anoxia に対して抵抗性を示す理由と考えられる．

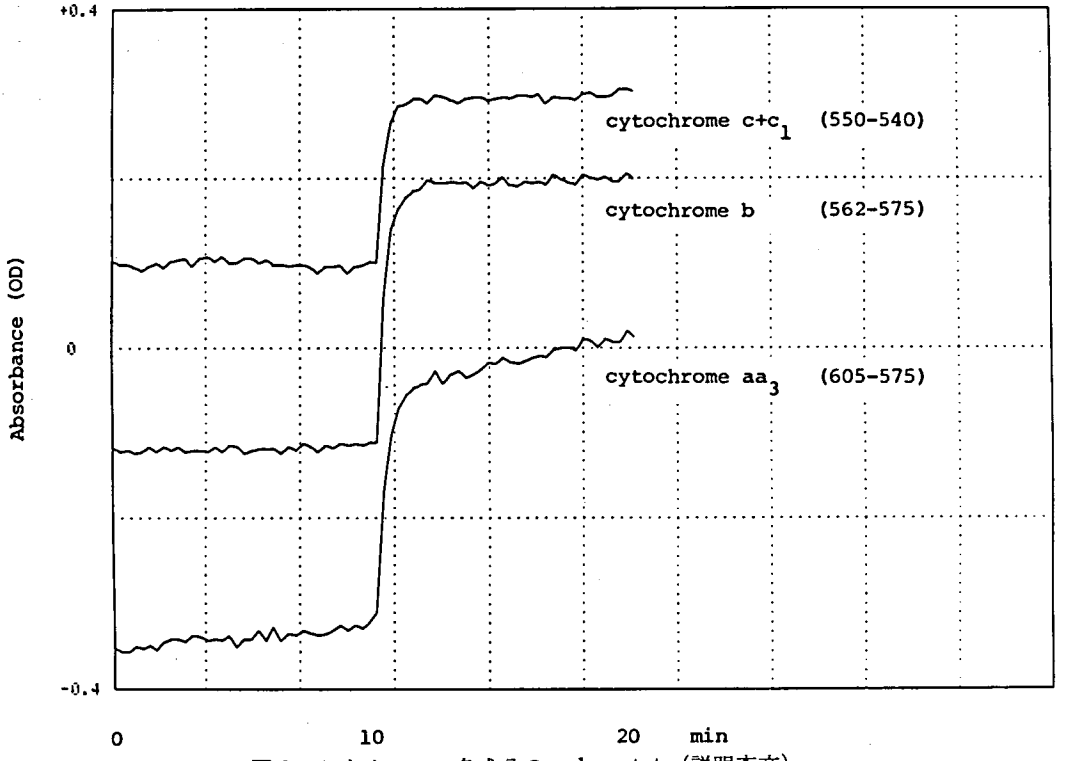



図4　シトクローム各成分の redox state（説明本文）

窒素置換による可逆的な還元反応はピルビン酸の存在下に，モノヨード酢酸にて解糖系を block してはじめて得られた．

今回の SOSP を用いた結果から，白血球より，ミトコンドリアを単離しない in situ の状態で，電子伝達系の redox state が直接観察できることが示された．本法では電子の流れを経時的に追跡できるので，シトクロームの各成分の存在の有無は容易に確認できるばかりでなく，呼吸基質と各部位での阻害剤を併用すれば，電子伝達系の障害部位の推定に有力な情報を提供すると期待される．

今回示した白血球を用いる方法は試料を容易に得られ，再検も容易に行なえる利点があるが，全く同一の方法を培養線維芽細胞に応用することも可能である．本法は電子伝達系の異常を知る screening 法として簡便で，広く臨床応用が可能と思われ，現在実際の症例で検討を重ねている．

## ま と め

1）SOSP により白血球ミトコンドリアの電子伝達系の redox state が，ミトコンドリアを単離しない in situ の状態で直接観察でき，Dithionite による還元－酸化差スペクトルより各シトクロームの存在量比が算出された．

2）本法は容易に得られる白血球を試料として利用でき，電子伝達系に障害を有するミトコンドリア異常症の簡便な screening と障害部位の推定法として広く臨床応用が期待できる．

## 文 献


1) Kobayashi, S., et al. : Scanning spectrophotometry for dynamic study of the organ oxidative metabolism. Biomed. Res., 2 : 390-397, 1981.

2) Kanno, T. and Saito, A. : Marked reduction of the cytochromes induced in a bullfrog brain by perfusing with a calcium-deficient or a high potassium solution. Biomed. Res., 2 : 699-704, 1981.

3) Kanno, T., et al. : Dose-dependent effects of acetylcholine stimulating respiratory chain and secretion of isolated perfused rat pancreas. Biomed. Res., 4 : 175-186, 1983.

# 26) 生体内におけるクレアチンの代謝経路：$^{14}$C-クレアチン腹腔内注射（ラット）にみられる尿中への$^{14}$C-尿素の排出

紫芝良昌*

研究協力者　三好和夫*　清水多恵子*　門脇紀子*
小島　進*　田村克也**

私たちは従来，筋ジストロフィー症の成因をクレアチン代謝の面から追求してきたが[1)2)]，今回その一環として，ラットを用いて行った *in vivo* 実験の成績について述べる．動物，人においては，クレアチンは主として筋中で，クレアチン燐酸あるいはクレアチンから徐々にクレアチニンに転化して尿中に排出し，これが唯一の代謝経路とされている．私たちは，動物筋においても，これと別にクレアチンの分解代謝経路（水解あるいはアミジン基の転移など）のあることを想定して研究を進めてきた．現在では，ある種の pseudomonas からクレアチンの分解酵素のいくつかが分離精製されている（pseudomonas creatinase 他[3)]）．

## 材料と方法

実験はラットを用い，その腹腔内に放射活性クレアチンを注射して，尿中に排出する放射活性のクレアチンと尿素を測定した．

ラットは Wistar 系雄，約200g で，通常飼育（オリエンタル酵母社製 MF）のものと，加えてネオマイシン経口投与（1日10～40mg，実験の前3日から6日間，飲料水に溶解した）を行ったものを用いた．放射性クレアチンは$^{14}$C-(amidine labeled) creatine (New England Nuclear 製，21 $\mu$Ci/1mg) で，その5～20$\mu$Ci をラットの腹腔内に注射した．尿は注射後に屠殺したラットの膀胱より採取したもの，あるいは24時間毎に代謝ケージで採取したものを，濾過した後，その20ml を HPLC（エルマー光学 ERC-8710）を用いて分画し，各分画中の$^{14}$C-放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した．HPLC の条件は，Nucreosil 10SA (10$\mu$m) を8mm×30cm のカラムに充填し，buffer 0.01M, $KH_2PO_4$-$H_3PO_4$, pH 3.70 を mobile phase として用い，25℃，カラムプレッシャー40kg/cm$^2$，2ml/min で分画した．

なお，$^{14}$C-creatine の水解の対照実験を pseudomonas creatinase（東洋紡研究所製[3)]）を用いて行った．

## 成　績

**$^{14}$C-(amidine labeled) creatine 試料：**

非放射性基準物質（クレアチン，尿素，サルコシン）の混合試料を HPLC で分離した結果と実験に用いた$^{14}$C-(amidine labeled) creatine 試料の放射活性分析の成績を対比して図1に示した．

基準物質の分離はよく，また，放射クレアチン試料は99%が$^{14}$C-creatine であり，0.4%と極めてわずかの尿素の放射活性が認められるのみであった．

**Pseudomonas creatinase による尿素の生成：**

$^{14}$C-creatine 試料に pseudomonas creatinase 0.25unit を37℃，60分間作用させた結果を図2に示した．総活性に対し，クレアチン79%，産生された尿素20%がみられる．

＊冲中記念成人病研究所
＊＊徳島大学医学部第一内科

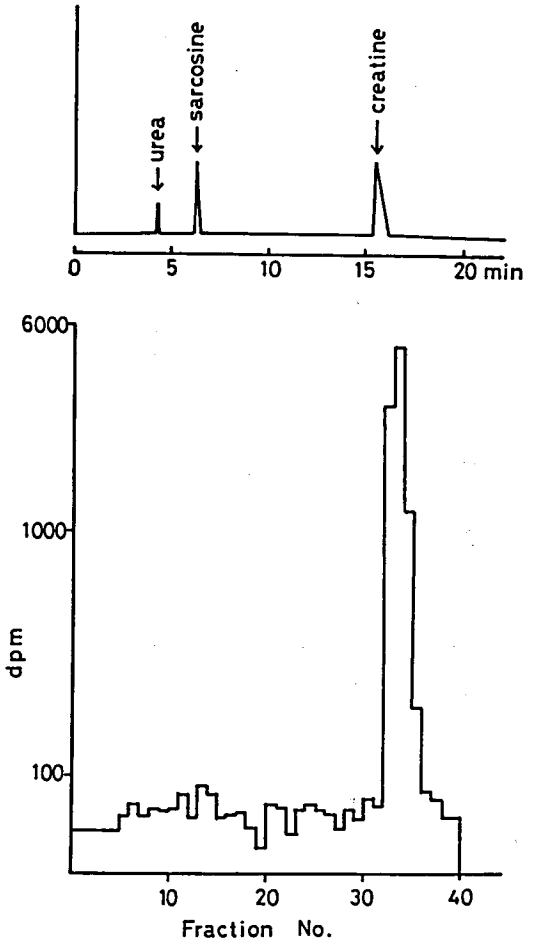



図1　$^{14}$C-creatine (amidine labeled) の放射活性

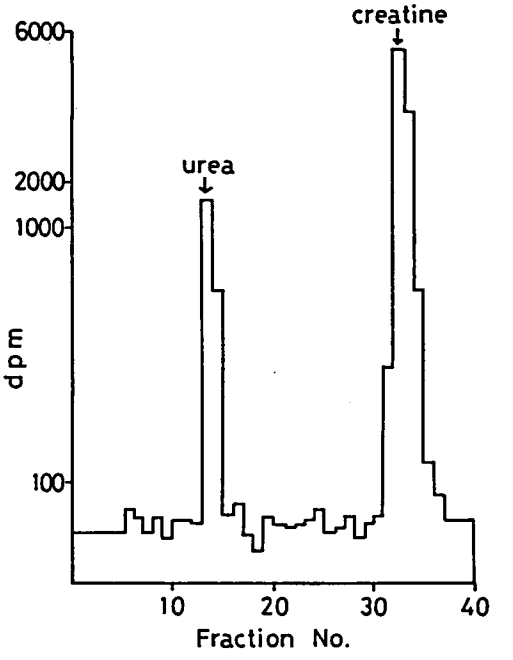



図2　Ps-creatinase による$^{14}$C-creatine から$^{14}$C-urea の生成

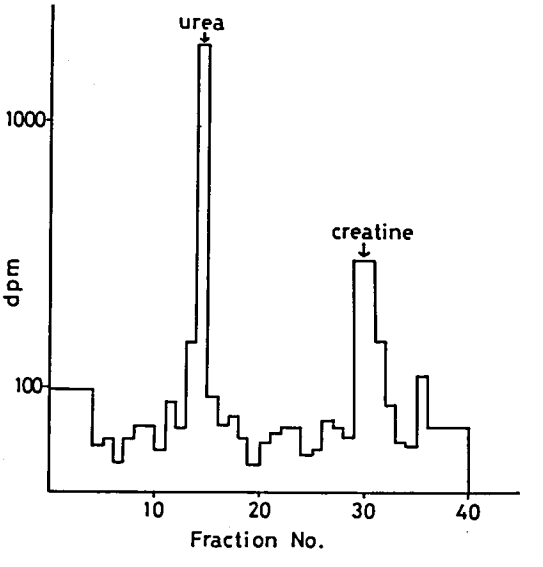



図3　通常飼育ラット尿中$^{14}$C-creatine と$^{14}$C-urea (膀胱内尿)
($^{14}$C-creatine 腹腔内注射後24時間)

**通常飼育ラットの成績：**

通常飼育ラットに$^{14}$C-creatine 20$\mu$Ci を腹腔内に注射し，24時間後に屠殺し，膀胱内尿を採取して検索した成績を図3に示した．

尿中の総活性に対して，クレアチン20%，尿素76%の放射活性が認められた．

同じく通常飼育ラットに$^{14}$C-creatine 20$\mu$Ci を腹腔内注射して採取した0～24時間，24～48時間，48～72時間尿の成績を図4に示した．

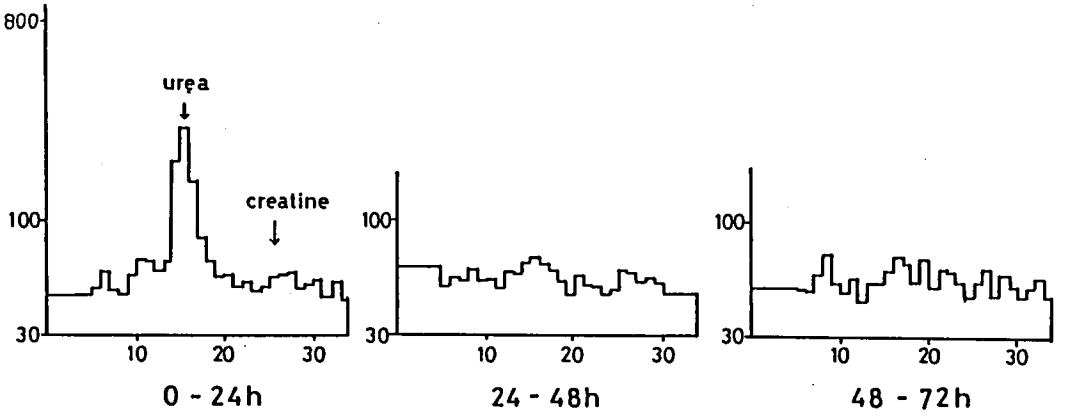
1日尿量16～12ml に対して，1日尿中総放射活性は第1日目で高く，注射量の約3%が排出され，

2日目以降減少した．放射活性の分画では，第1日目で74%が尿素の位置にみられ，クレアチンの活性は4%と僅少であった．2日目以降の尿では，放射活性が低下し，HPLCでの明確な分離は認められなかった．

**ネオマイシン投与ラットの成績：**

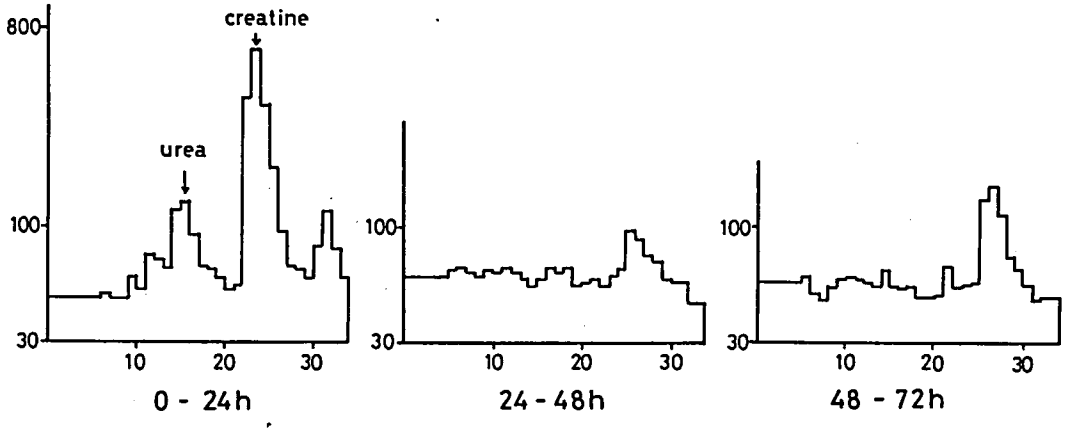
ネオマイシン1日量40mgを実験3日前から実験期間中，経口投与したラットの成績を図5に示した．

1日尿量7～6 mlで，各1日尿中の放射活性は，第1日目最も高く，注射量の約4%が排出さ




| | 0 - 24h | 24 - 48h | 48 - 72h |
|---|---|---|---|
| 尿量 | 16 ml | 13 ml | 12 ml |
| dpm | 1,112,000 | 72,150 | 32,400 |

図4　$^{14}$C-creatine の腹腔内注射後の尿中放射活性（通常飼育ラット）




| | 0 - 24h | 24 - 48h | 48 - 72h |
|---|---|---|---|
| 尿量 | 7 ml | 6 ml | 6 ml |
| dpm | 1,742,300 | 649,800 | 453,300 |

3日間計　2,845,400　（注射量 40,000,000）

図5　$^{14}$C-creatine 腹腔内注射後の尿中放射活性（ネオマイシン経口投与ラット）

れた．2日目以降は減少したが，その程度は通常ラット程ではなかった．

尿中の活性物質は，24時間尿において，多量のクレアチン（71%）と通常ラットの場合よりは減少しているが，明らかな尿素（10%）がみられた．48，72時間尿ではクレアチンのピークをみるが，尿素のピークは明らかでなかった．

ネオマイシン投与ラットの糞便培養成績．通常飼育ラット，ネオマイシン投与ラットの糞便を培養（SS, TCBS, マッコンキー，スキロ，ドリガルスキー，血液培地）した結果は，通常ラットでは多数の E. coli, bacillus 及び enterococcus がみられたのに対し，ネオマイシン投与ラットでは前二者が完全に消失し，enterococcus，同定不能のグラム陽性桿菌がわずかに証明されたのみであった．

## 考　　察

ラットに$^{14}$C-（amidine labeled）creatine を腹腔内に注射して尿中の放射物質をみる実験を行い，まず，通常飼育ラットにおいて24時間尿中に多量の尿素の排出することを確かめ，ついで，併せてネオマイシンの十分量を経口投与したラットにおいて，尿素生成は減少したが，しかし明らかに存在することを認めた．

文献的には，通常飼育動物においてもクレアチンの体内注射ないし経口投与で尿中尿素の排出を確かめたものはみられない．動物，人に多量のクレアチンを投与すると，それが腸内細菌によって破壊されるという考えは古くからあったが[4]，それは腸内クレアチンの消失という現象に基づくものであった．

本実験においては，同じくラットにネオマイシンを経口投与した場合に，尿中尿素は明らかに減少したので，上の尿素の相当量は動物の腸管内において微生物によってクレアチンから生じた尿素が血中に再吸収されて尿中に排出したものと考えられる．しかし，この操作によってもなお残存してみられた尿中の尿素は動物体内で産生されたことを思わせる．投与したネオマイシンの量は，一応十分量（動物，人において，腸管内における尿素の分解を押える量[5]）であり，また，今回の実験ラットでの糞便培養結果でも大部分の微生物が押えられていることが示されている．

もし，ネオマイシンの経口投与によって腸内微生物の関与が除外されているとすれば，上の結果は，動物体内（この場合，骨格筋内が考えやすい）においてはクレアチンからクレアチニンへの緩徐な転化と別に，クレアチンから尿素産生の経路を含む急速な代謝ルートのあることを示唆している．しかし，この点はなお考究してゆきたい．

なお，今回の実験での結果は，腹腔内に約1mgのクレアチンを負荷した状態におけるものである．また，観察期間は注射後数日の短時間であり，長期にわたる緩徐な成績はみていない．

## ま と め

1．ラット（通常飼育）の腹腔内に$^{14}$C-（amidine labeled）creatine（20$\mu$Ci, 約1mg）を注射すると，24時間尿に注射した活性の3～4%の放射活性が排出し，多量の放射性尿素が認められた．この活性尿素はネオマイシン経口投与ラットでは相当量が減少したが，しかしなお明らかな量が認められた．

2．ラット体内では，クレアチンからクレアチニンの緩徐な転化と別に，クレアチンから尿素を生じる，より急速なクレアチンの代謝ルートがあることを思わせる．しかしなお，腸内微生物の関与を検討する必要がある．

## 文　　献


1) 三好和夫，紫芝良昌他：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.

2) 三好和夫，紫芝良昌他：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．同上．昭和58年度研究報告書，1984，p.257.

3) Tsuru, D., Oka, I. and Yoshimoto, T. : Creatinine decomposing enzymes in psuedonomas putida. Agr. Biol. Chem., 40 :

1011, 1976.

4) Twort, F.W. and Mellanby, E. : On creatine-destroying bacilli in the intestine, and their isolation. J. Physiol., 44 : 43, 1912.

5) Dintzis, R.Z. and Hastings, A.B. : The effect of antibiotics on urea breakdown in mice. Proc. Nat. Acad. Sci., 39 : 571, 1953.

# 27)－(1) ミトコンドリア・ミオパチー：酵素学的診断法の確立

佐藤　猛*

研究協力者　安野 みどり*　山本 真理*

## 目　的

ミトコンドリア・ミオパチーは外眼筋や四肢筋の萎縮に加え，Kearn-Sayre 症候群や脳血管障害，あるいはミオクローヌスなどの中枢神経障害を伴う症例が知られている．さらに多くの症例は高乳酸，高ピルビン酸血症を呈する．その原因としてピルビン酸の酸化，糖新生系やミトコンドリアの電子伝達系酵素の障害が挙げられている．われわれは生検筋組織および培養皮膚線維芽細胞からミトコンドリアを抽出し，ピルビン酸脱水素酵素複合体（PDH complex）活性，およびミトコンドリア電子伝達系酵素の測定法を検討し，報告した．今年度はさまざまな臨床症状を呈するミトコンドリア異常症についての測定結果を報告する．

## 症　例

**症例1．** 11歳女児（Leigh脳症）．幼小時より精神身体発達遅延があり，3歳時両視神経萎縮，9歳頃から小脳症状，脳神経障害，痙攣発作，呼吸障害などを反復するようになり入院した．血中乳酸25～177mg/dl（正常16mg/dl 以下），ピルビン酸2.0～3.8mg/dl（正常0.3～0.9mg/dl）と高値を呈し，アラニンやグルコース負荷試験で乳酸，ピルビン酸の著明な上昇を認めた．高脂肪食にて一時軽快したが，肺炎を併発して死亡した．都立小児病院（土屋裕，初鹿野浩）での剖検では脳幹，小脳および脊髄灰白質に散在性壊死巣と小血管の増生を認めた．

**症例2．** 40歳女性（Kearn-Sayre 症候群不全型）．15歳から徐々に難聴が出現，27歳から両下肢，次いで上肢筋の脱力と萎縮が進行，さらに両下肢にアテトーゼ様不髄意運動を認めた．血中の乳酸，ピルビン酸の増加があり，筋電図では四肢筋の神経原性変化，腎機能低下，頭部 CT スキャンにて大脳白質のびまん性低吸収域を認めた．筋生検では多数の結晶状封入体を有する異常ミトコンドリアを認めた．

**症例3．** 44歳男性，症例2の兄（Kearns-Sayre 症候群不全症）．外眼筋麻痺，四肢の神経原性筋萎縮と異常ミトコンドリア，難聴，軽度腎機能不全，CT スキャンでの大脳白質びまん性低吸収域など症例2（妹）と全く同様の病像を呈していた．

**症例4．** 29歳男性（ミトコンドリア脳筋症），（山本，別府，椿，臨床神経，1984），四肢筋のミトコンドリア・ミオパチーと脳血管障害様発作を伴い，高乳酸血症がみられた．

**症例5．** 59歳女性，症例4の母．臨床症状は認められなかったが，筋生検にて結晶状ミトコンドリアが多数認められた．

**症例6．** 41歳男性（ゲルマニウム長期服用後にみられた Lipid storage myopathy）．大酒家の上，ゲルマニウム2000mg/日と長期間大量服用していた（常用量の約200倍）．昭和59年2月より食欲低下，筋力低下が生じ，腎不全，四肢末梢のしびれ感が加わったため，当院腎臓内科に入院，腎透析を施行されていた．ミオグロビン尿陽性，肝機能障害も高度であった．筋生検にて多数の脂肪顆粒，グリコーゲン顆粒の蓄積と巨大なミトコンドリアが認められた．9月21日高度の腎不全にて死亡した．

**症例7．** 37歳男性（外眼筋麻痺を伴うミオパチー）．29歳頃から下肢，次いで上肢の脱力に気付い

*順天堂大学医学部脳神経内科

た．36歳頃から眼瞼下垂，眼球運動障害に気付いた．血中乳酸，ピルビン酸の高値と筋生検にてragged red fiber を認めた．

**症例8．** 39歳男性（ミオクローヌスを伴ったミトコンドリア・ミオパチー），（群大・神経内科　矢島，平井）．20歳頃から四肢筋萎縮が進行，四肢のミオクローヌス，難聴，高乳酸，高ピルビン酸血症が認められた．

## 方　法

1．皮膚線維芽細胞の培養：生検皮膚小片をEagle MEM＋8%仔牛血清にて培養，継代4～7代のものを用いた．

2．ミトコンドリア分画法：Stumpf (1981) によった．剥離した線維芽細胞を250mM Mannitol, 2 mM EDTA, 0.3% BSA, 1mM ATP, 1mM ME, 10mM Hepes buffer (pH 7.4) に浮遊，protease を作用させた．ホモジネート後，遠心（600g, 8000 g，2回）にてミトコンドリア分画を得た．0.3M sucrose, 2mM EDTA (pH7.0) に再浮遊，凍結融解後，酵素活性を測定した．

生検筋からのミトコンドリア分画法はMakinen & Lee (1968) の方法によった．ミトコンドリア分画はいずれも電顕で確認した．

3．ミトコンドリア電子伝達系酵素活性：Cytochrome c oxidase (Cyt. c oxd.) は Sekuzu (1965) によった．Succinate cytochrome c reductase は King (1967)，NADH cytochrome c reductase は King (1967)，Succinate dehydrogenase CoQ reductase (Complex II) は Ziegler & Rieske (1967)，Citrate synthase は Morgan-Hughes (1967) によった．

4．PDH complex ：PDH complex は Blass (1970)，戸島 (1980) によった．Sodium〔1-$^{14}$C〕pyruvate を基質に加え，発生した$^{14}CO_2$ を液シンにて測定した．PHD phosphatase は Robinson (1975) により，ATD 添加による不活化，$Ca^{2+}$，$Mg^{2+}$ による活性化をみた．

## 結　果

1．PDH complex

症例1（Leigh 脳症）の培養皮膚線維芽細胞のPDH complex 活性が著明に低下していた（図1）．本例ではATP 添加による不活化，$Mg^{2+}$，$Ca^{2+}$ による活性化は正常であった．すなわちPDH phosphatase は正常であった．また Lipoamide dehydrogenase ($E_3$) 活性も正常であった．

他の5例（症例2，4，5，7，8）の皮膚線維芽細胞の PDH complex 活性は全て正常であった．

2．ミトコンドリア電子伝達系酵素

生検筋は5例（症例2，3，6，7，8）にて測定した（**表1，2**）．症例8のみ Succinate cytochrome c reductase および Complex II が低値

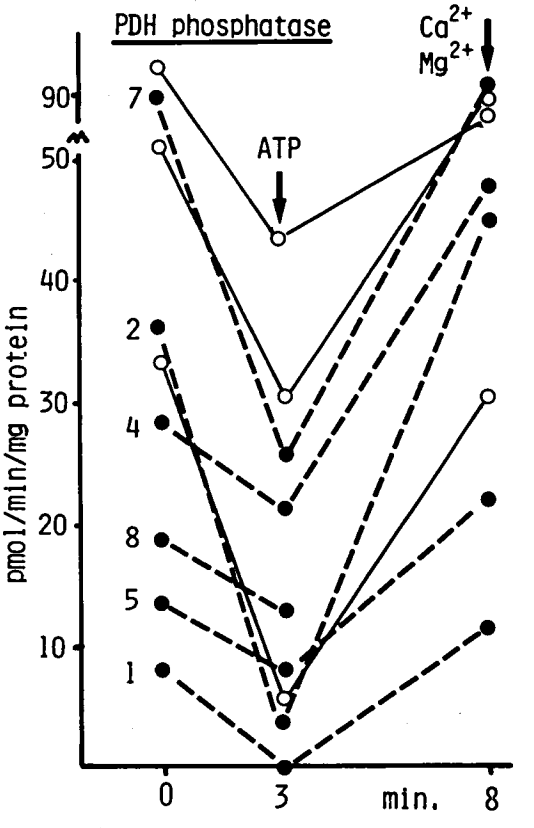



図1　培養皮膚線維芽細胞の PDH complex および PDH phosphatase 活性．

表1　Mit. enzymes in muscles.

| Case | Cyt.c oxd. | Suc.c red. | NADH c red. | Compl. II | Citrate synth. |
|---|---|---|---|---|---|
| 2. | 495 | 326 | 308 | 177 | 387 |
| 3. | 442 | 221 | 422 | 247 | 300 |
| 6. | 243 | 161 | 123 | 131 | 465 |
| 7. | 224 | 202 | 280 | 370 | 579 |
| 8. | 118 | 137 | 642 | 65 | 166 |
| Control (n=12) | 225.0 ±61.5 | 204.8 ±72.9 | 260 ±115.0 | 124.4 ±40.3 | 197.4 ±92.5 |

(μmol/min/mg, mit. Protein)

表2　Mit. enzymes in fibroblasts.

| Case | Cyt.c oxd. | Suc.c red. | NADH c red. | Compl. II | Citrate synth. |
|---|---|---|---|---|---|
| 2. | | 22±2 | 454±9 | 40±4 | 34±2 |
| 4. | 24±3 | 42±5 | 227±10 | | |
| 5. | 25±3 | 69±8 | 665±144 | 34±6 | 78±11 |
| 7. | 23±3 | 31±5 | 738±64 | 20±8 | 52±3 |
| 8. | 23±2 | 33±2 | 453±13 | 12±2* | 77±8 |
| Control | 42.8 ±20.3 (n=10) | 38.5 ±16.5 (10) | 313 ±133 (6) | 27 ±8.9 (4) | 52.8 ±21.5 (4) |

(μmol/min/mg, mit. Protein)

を示した．症例8では皮膚線維芽細胞においてもComplex II が低値を示した．

症例2では培養皮膚線維芽細胞のCyt. c oxd. が2回の測定にても低値を示したが，生検筋では正常であったためその意義は保留した．

## 考　察

ミトコンドリア・ミオパチーの成人例において，最近，NADH CoQ reductase やCytochrome b 欠損例が報告されている．われわれは本症候群の臨床生化学的診断を容易にする目的で，生検筋と皮膚線維芽細胞についてPDH complex とミトコンドリア電子伝達系酵素の測定法を確立し，さまざまな症例について測定した．

その結果，既報のごとくLeigh脳症の1例に皮膚線維芽細胞のPDH complex 活性の低下をみた．PDH phosphatase とLipoamide dehydrogenase ($E_3$) 活性は正常範囲内にあったためPyruvate decarboxylase ($E_1$) かLipoate acetyltransferase ($E_2$) の異常によるのではないかと推定された．

ミトコンドリア電子伝達系酵素については，生検筋500mg，あるいは培養皮膚線維芽細胞において電子伝達系酵素活性の測定が可能であることを報告した．特に線維芽細胞では検索材料の入手が容易なことや，繰り返して測定可能であり，代謝実験が可能などの利点がある．しかし，筋組織よりは酵素活性値が低く，継代培養を重ねたものと初代とは酵素活性値が異なってくる可能性がある．生検筋と対比して，異常な酵素値を確認できるという点で意義が大きいと考えられる．

症例8では生検筋，および培養皮膚線維芽細胞共にComplex II (Succinate CoQ reductase) の低値が認められた．正常対照群での測定値の標準偏差が大きいため，再検が望ましいが，症例8ではComplex II の構成成分であるSuccinate dehydrogenase が他の構成蛋白の欠損の可能性がある．

症例2，3のKearns-Sayre症候群不全型ではPDH complex およびミトコンドリア電子伝達系酵素は正常範囲内にあった．本症候群における高乳酸，高ピルビン酸血症の原因については，さらに他の関連酵素の検索が必要である．

## 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8例について，生検筋および培養皮膚線維芽細胞からミトコンドリアを抽出し，PDH complex および電子伝達系酵素活性を測定した．

2．Leigh 脳症の1例で皮膚線維芽細胞のPDH complex 低値をみた．

3．ミトコンドリア・ミオパチーの1例にて生検筋および皮膚線維芽細胞のミトコンドリア内Complex II活性の低値をみた．

## 文　献

1) 佐藤猛，安野みどり，山本剛司：ミトコンドリア異常症の酵素学的診断．神経内科，21：1984，印刷中．

2) Yamamoto T., Beppu H., and Tsubaki T.：Mitochondrial encephalomyopathy ; Fluctuating symptom and CT. Neurology, 1985, in press.

3) 矢島日出登，他：脳沈異常，乳酸・ピルビン酸の高値を伴った mitochondria myopathy の1例．第91回日本神経学会関東地方会，昭和59年12月1日，東京．

# 27)－(2) Duchenne型筋ジストロフィー症（D.D.）生検筋におけるK/NK細胞の定量的解析

佐藤　猛*

研究協力者　荒畑喜一*　A.G. Engel**

## はじめに

末梢血リンパ球，NK細胞およびそれらのサブセット像が，必ずしも病巣局所や個体全体の免疫能を反映しないことは既に知られている．従って組織レベルでの，これら浸潤細胞の解析は意義深いものと考えられる．そこでわれわれは，これまで免疫組織化学的手段によって主として炎症性筋疾患の浸潤細胞・サブセットの解析を行って来た[1)2)]．

さてD.D.で，その骨格筋中に少量ながら細胞浸潤の認められることは従来より知られているが，その意義については看過されて来た．昨年の本研究班において，われわれは，D.D.でのこれら浸潤細胞が主として$T_8^+$ T細胞（cytotoxic / supressor）及びマクロファージ（MF）から成り，さらに少数ながらNK細胞マーカーとされるLeu 7抗原陽性細胞の混在することを報告した．

今回は，D.D.筋中に出現したこれらNK細胞の役割について，さらに明らかにすることを目的とし，そのサブセット（表1）の定量的解析をすすめてきたのでここに報告する．

## 対象と方法

対象：Duchenne 8例の生検骨格筋

方法：使用されたモノクローナル抗体は，Leu 7, Leu 11（NK細胞マーカー），Leu 4（T細胞マーカー）およびMo-1（MFマーカー）である．これらのマーカーと，それによって標識された単核細胞のNK活性との関連は表1に示す如く考えられている[3)4)]．

表1　D.D. 生検筋内NK細胞の定量化

1. Count all muscle fibers in the biopsy.
2. Count all reactive endomysial cells.

| subpopulations | NK-activity* |
|---|---|
| Leu-$7^+$,$11^-$,$4^+$ | + |
| Leu-$7^+$,$11^+$,$4^-$ | + , ++ |
| Leu-$7^-$,$11^+$,$4^-$ | +++ |

3. Average cell counts/1000 muscle fibers were obtained.

*...ref.(3)(4)

免疫組織化学的方法（光顕）は，2μ連続凍結切片法を用い，ローダミン（R）及びフルオレッセンス（F）標識抗体による，直接または間接螢光抗体法を用いた．これらはR・Leu 7/F・Leu 4, R・Leu 11/F・Leu 4, R・Leu 7/F・Leu 11の順にそれぞれ二重染色された（表2）．さらに必要に応

表2　免疫組織化学的染色

| 2-u serial sections | staining* |
|---|---|
| 1. | Trichrome |
| 2. | R-Leu 7, F-Leu 4 |
| 3. | R-Leu11, F-Leu 4 |
| 4. | R-Leu 7, F-Leu 11 |
| 5. | MAC (peroxidase) |
| 6. | Acid phosphatase |
| 7. | Mo-1 |
| 8. | H&E |

*...R/F indicate direct or indirect immuno staining with Rhodamine or FITC labeled antibody.

*順天堂大学医学部脳神経内科
**Mayo Clinic

じてR・Leu (7+11) を加えた．最終的には，これらのreconstruction を行うことにより[2]，6種類のNK細胞サブセット（Leu $7^+ 11^-$, $7^- 11^+$, $7^+ 11^+$ と，これら各々についてLeu $4^+$ もしくは$4^-$）が同定される．一般組織像の観察には，トリクローム染色，H+E染色を用いた．$C_{5b-9}$ complement membrane attack complex (MAC) により壊死筋線維を同定し非壊死筋線維から区別した[5]（図1）．MFは酸性フォスファターゼ強陽性，$M_0$-1抗原陽性細胞として同定された．コントロール切片には，一次抗体と同一濃度・サブクラスの正常マウス免疫グロブリンを供し，以下同様に処理した．モノクローナル抗体の使用濃度（1～5$\gamma$）は，あらかじめヒト末梢血リンパ球標本とアセトン固定凍結切片を用いて決められた．

NK細胞の定量的解析の手段として――生検筋のEndomysium に出現した全てのサブセットを数え，また筋線維総数も数えて，最後に筋線維1000本あたりの浸潤細胞数として表示した．

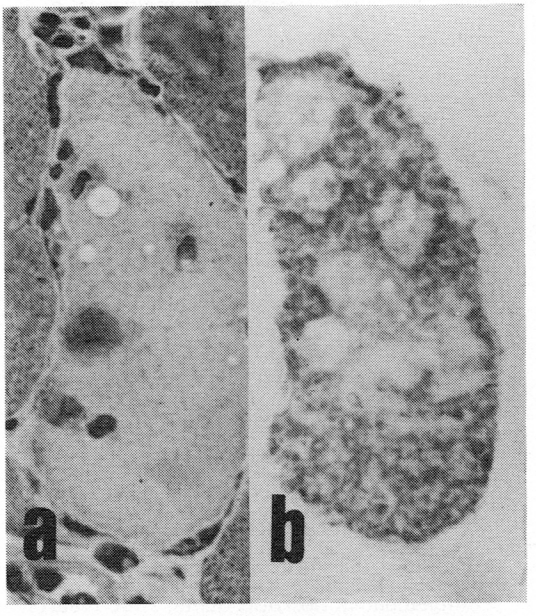



図1　壊死筋線維を除外するために，その同定はトリクローム染色(a)及びMAC[5](b)免疫染色とで行った．(×600)

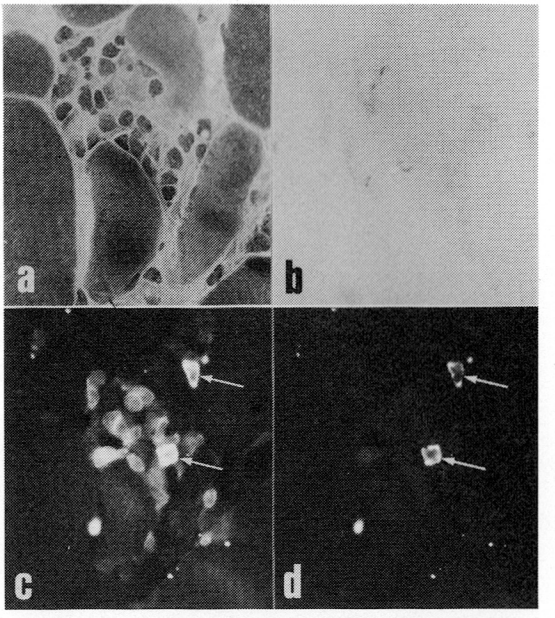



図2　(a)はEndomysiumの浸潤細胞を示す（トリクローム染色）．これらの筋線維は非壊死筋線維であることがMAC陰性(b)から確認される．これらの浸潤細胞の多くはF・Leu $4^+$ であるが，この中の2個（矢印）はR・Leu $7^+$ であった（c，d）．（×300）

## 結　　果

8例の筋線維総数は34,151本（1714～7357；$\bar{x}$ = 4269）．壊死筋線維比率は1.55%（0.25～3.46）であった．非壊死筋線維のうちで，直接細胞浸潤を受けていたものの数は0.28%（0.05～0.80%）であった．Endomysiumに出現したLeu $4^+$，Leu $7^+$，Leu $7^+ 4^-$，Leu $11^+$，Leu $11^+ 4^-$ フェノタイプ数は，それぞれ筋線維1000本あたり73±25，15±10，2±1，0.7±1.0，1.0±1.0であった．さらに詳細については現在なお検討中である．

## 考　　察

Mokri, Engelら[6]は，D.D.の初期病変として，筋形質膜欠損の存在を見出し，その重要性を報告した．その後Carpenter, Karpatiら[7]は筋形質膜の微小欠損が修復されずに放置された場合，当該筋は壊死に陥ることを指摘している．

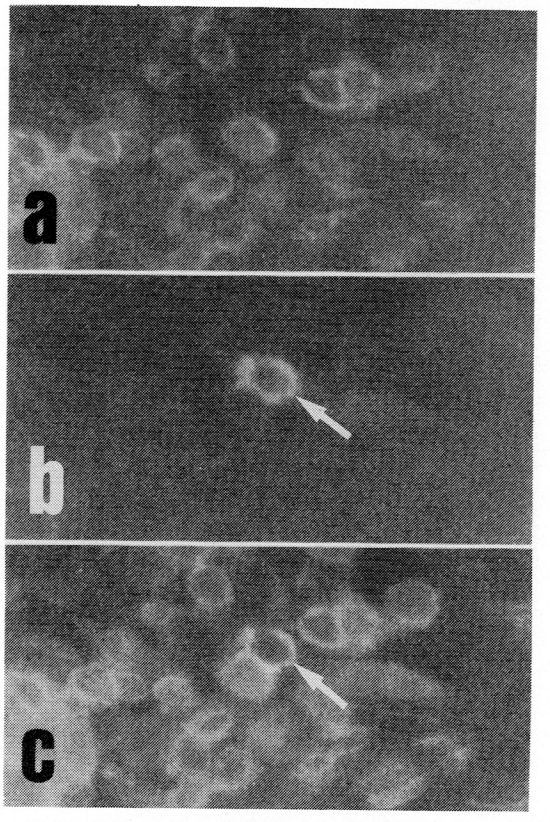



図3　Leu $11^+ 4^-$ 細胞を示す（矢印）．(a)は F・Leu $4^+$ 細胞，(b)は R・Leu $11^+$ 細胞，(c)は a,b 二重露光写真である．（×700）

最近 NK 細胞による標的細胞破壊機序として Tublar complex による微小孔（50, 150 Å）の形成が注目されているが，Fidzianska ら[8]は，ヒト胎児 D.D. と考えられた症例の電顕的観察を行ったところ，Killer cell の浸潤による筋障害過程が存在することを示唆する興味深い結果を報告している．

われわれの結果からは，最も強力な NK 活性を有するとされる Leu $11^+ 7^- 4^-$ フェノタイプは少なく，逆に弱い NK 活性を示す Leu$7^+ 11^- 4^+$ フェノタイプが，より優位なポピュレーションであることが示された．このことは，D.D. 筋障害過程における K/NK 細胞の関与は，多発性筋炎における抗原特異的 T 細胞のそれの様に活発なものではないことを思わせた．とはいえ，実験的には，NK 細胞が一つの標的を破壊するには一個で充分であり，なおかつ NK 細胞は，リサイクリングされて次の標的に向うことから，たとえ量的に少ないとしても，その病因的意義は存在し得る．その意味でも，D.D. に出現する NK 細胞の役割については，さらに詳細な検討を加える必要があるものと考えられた．また T 細胞，MF との相互作用や，各種リンフォカインの役割についても今後考えてみたい．

## 文　献

1) 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. Ann. Neurol., 16 : 193, 1984

2) Engel, AG & Arahata, K : Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. II : Phenotypes of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. Ann. Neurol., 16 : 209, 1984

3) Lanier, LL, Le, AM et al : Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. J. Immunol., 131 : 1789, 1983.

4) Abo, T, Miller, CA et al : Characterization of human granular lymphocyte subpopulation expressing HNK-1 (Leu-7) and Leu-11 antigens in the blood and lymphoid tissues from fetuses, neonates and adults. Eur. J. Immunol., 14 : 616, 1984.

5) Engel, AG & Biesecker, G : Complement activation in muscle fiber necrosis : demonstration of the membrane attack complex of complement in necrotic fibers. Ann. Neurol., 12 : 289, 1982.

6) Mokri, B & Engel, AG : Duchenne dystrophy : Electron microscopic findings

pointing to a basic or early abnormality in plasma membrane of the muscle fiber. Neurol., 25 : 1111, 1975.

7) Carpenter,S & Karpati,G: Duchenne muscular dystrophy. Plasma membrane loss initiates muscle cell necrosis unless it is repaired. Brain, 102 : 147, 1979.

8) Fidzianska, A., Goebel, HH et al : "Killer" cells in Duchenne disease : Ultrastructural study. Neurol., 34 : 295, 1984.

# 28)－(1) 筋糖原病の病態分析――糖原病VII型における高尿酸血症の成因

垂 井 清一郎*

研究協力者 嶺 尾 郁 夫* 河 野 典 夫* 清 水 孝 郎*
原 尚 子* 山 田 祐 也* 高 橋 光 雄*

## はじめに

糖原病VII型（筋・赤血球ホスホフルクトキナーゼ欠損症）は，私共が最初の症例を記載して以来[1]，現在まで18家系23症例が見い出されている．本症は，これまで，1）運動によって出現する筋症状，2）軽度の溶血亢進症状，を主徴とする代謝性ミオパチーとして知られてきた[2),3)]．ところが，最近本症に高率に痛風や高尿酸血症の合併することが明らかにされ，VII型を特徴づける第3の臨床像として注目されている[4),5),6)]．しかし，その成因については検索がなされていない．そこで，私共はVII型に合併する高尿酸血症の発現機作として，本症の主要な罹患臓器である骨格筋の病態代謝に注目し，患者の運動筋におけるプリンヌクレオチドの異化について分析を試みた．

## 方　法

別々の家系に属するVII型患者2名（症例1：44歳男性[1]，症例2：20歳男性[7]）と健常者6名（19—38歳，男性5名，女性1名）を対象とした．VII型患者は，共に高尿酸血症を有し（症例1：14.3 mg/d$l$，症例2：7.4mg/d$l$，正常値2.7—6.0），症例1は尿中への尿酸排泄の亢進が確認されている．

既に報告した方法に従い[8),9)]，部分的阻血下前腕運動試験を行い，運動側の肘静脈より経時的に採血した．採血後，直ちに処理した6％過塩素酸抽出液を，乳酸・イノシン・ヒポキサンチンの測定に，ヘパリン加血漿をアンモニアの測定に供した．乳酸とアンモニアは酵素法，イノシンとヒポキサンチンは高速液体クロマトグラフィー法によって求めた．

## 結　果

VII型患者は，共に前腕運動試験において肘静脈血中の乳酸の増加を認めなかった．これは，骨格筋のホスホフルクトキナーゼ欠損に基づく解糖障害を示す重要な所見である．

乳酸反応が欠如したにもかかわらず，アンモニアは，健常者の5.6—7.9倍に及ぶ過大な増加反応を示した（図1）．

さらに，アンモニアと同様に，イノシンやヒポキサンチンも過大な増加反応を示した（図2，図3）．

## 考　察

本研究では，阻血下前腕運動試験時の血中アンモニアやイノシン，ヒポキサンチンの変動を分析した．これらのメタボライトは，骨格筋におけるプリンヌクレオチドの異化過程に由来するものである（図4）．まず，adenylate deaminase によって，AMP から IMP (inosine 5′-monophosphate) とアンモニアが生ずる．アンモニアは容易に筋細胞膜を通過し静脈血中へ放出される．一方，IMP は細胞内にとどまり，adenylsuccinate を経て再び AMP へ転換するか（プリンヌクレオチドサイクル），あるいはさらにイノシンやヒポキサンチンへと代謝される．イノシンやヒポキサンチン

＊大阪大学医学部第二内科

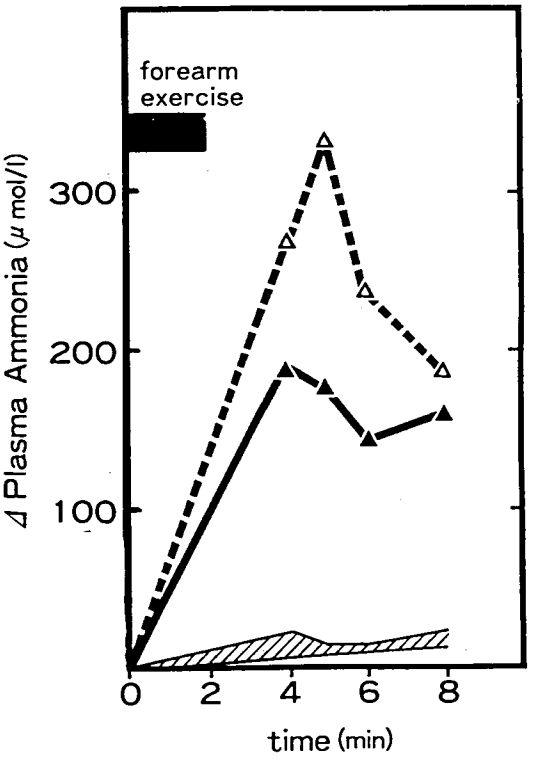



図1　部分的阻血下前腕運動試験における糖原病VII型患者のアンモニア反応
▲—▲：症例1，△---△：症例2
▨：健常者（平均±SE，n＝6）

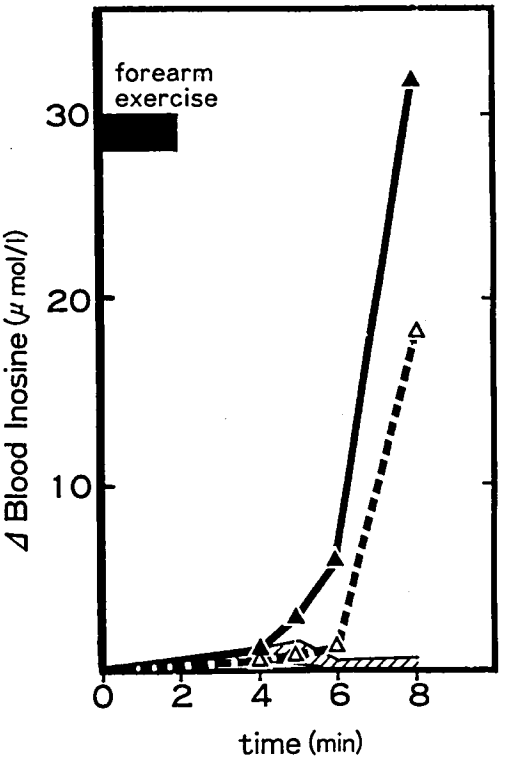



図2　部分的阻血下前腕運動試験における糖原病VII型患者のイノシン反応.

も膜透過性に比較的優れ，アンモニア同様に，静脈血中に現れてくる．なお，骨格筋では xanthine oxidase 活性が極めて弱いため，ヒポキサンチンがプリン体の終末代謝産物と考えられている．

健常人においては，阻血下前腕運動時のアンモニア増加は乳酸増加と正相関（r＝0.91，p＜0.01）することを，私共は既に確認している．つまり，正常の運動筋では解糖代謝とプリンヌクレオチドの異化代謝とが，運動量に応じて促進されると考えられる．ところが，糖原病VII型患者では解糖障害のために筋運動能が低下するにもかかわらず，多量のアンモニアやイノシン，ヒポキサンチンが運動筋から放出されることを，本研究で初めて明かにした（図1，2，3）．つまり，VII型の運動筋では，プリンヌクレオチドの異化が著しく亢進することを示している．

筋運動に伴う骨格筋のプリンヌクレオチドの異化過程の制御については，生理的にも不明な点が少なくない．本代謝過程を律速すると考えられている adenylate deaminase は，アロステリック酵素として，*in vivo* では ATP によって阻害を，ADP や AMP によって活性化を受ける[10]．また，*in vivo* においては，運動筋の IMP の増加は ATP の低下と stoichiometric に変動することが，最近，動物やヒトで明らかにされている[11]．一方，VII型患者の運動筋では，ホスホフルクトキナーゼ欠損による解糖障害のために，ATP 産生は低下し逆に ADP や AMP は増加すると推察される．そこで，基本的にはアデニンヌクレオチドのこれらの変動が，VII型患者の筋プリンヌクレオチドの異化を著しく亢進させると考えられるが，結論は運動中の患者筋の分析によらねばならない．

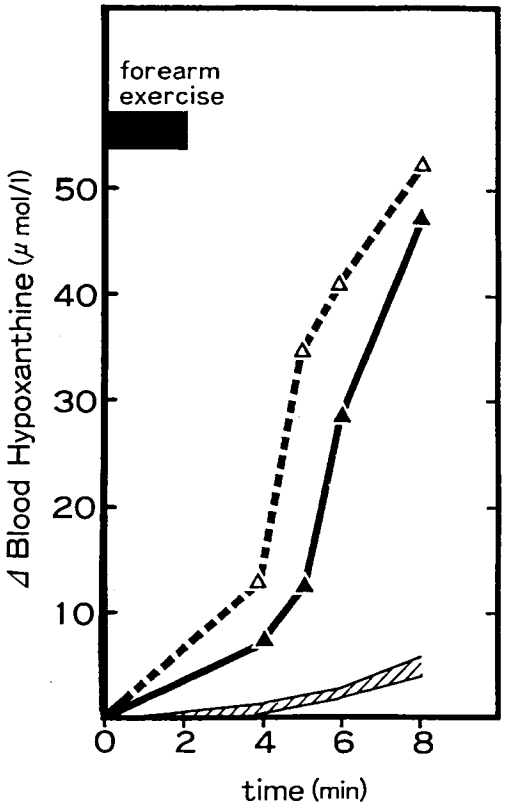



図3　部分的阻血下前腕運動試験における糖原病VII型患者のヒポキサンチン反応.

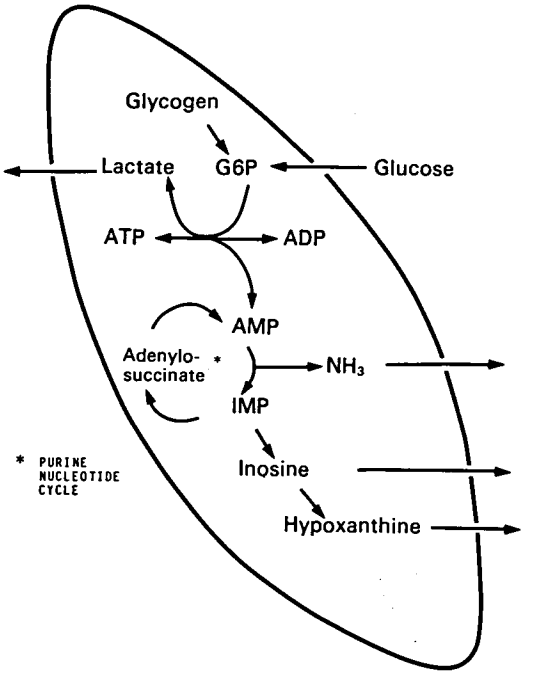



図4　骨格筋におけるプリンヌクレオチドの異化代謝と解糖代謝.

さて，非常に激しい筋運動によって血中尿酸値が生理的に上昇することが古くから知られているが，そのメカニズムとして，Sutton らは筋のプリン体の異化促進を示唆している[12]．私共は糖原病VII型における高尿酸血症の成因についても，この筋原性のメカニズムを想定した．即ち，VII型運動筋から過剰に放出されるイノシンやヒポキサンチンは，主として肝で，尿酸合成を促し，これがVII型に高尿酸血症をもたらすという機構である．既に，Agamanolis の症例[4]や本症例（症例1）において，尿中への尿酸排泄の亢進が確認されており，高尿酸血症は尿酸合成の過剰に基づくことが示されるとともに，私共の仮説とも矛盾しないと思われる．また，本症の高尿酸血症の合併は必ずしも全例に認められるわけでなく，現在男性例に限られている[4),5),6)]．この点も私共の仮説にそえば，次の様に説明し得る．即ち，VII型患者は筋症状の経験から，自らに適した運動量（運動強度）を体得していて，その範囲内で行動するのが通常である．しかし，男性の場合，社会生活上，女性に比べて強い身体活動を強いられる機会が多い．したがって，筋におけるプリンヌクレオチドの異化もさらに増強され，高尿酸血症を示すに至ると考えられる．

高尿酸血症を呈する先天性酵素欠損症として，Lesh-Nyhan 症候群（HGPRT 欠損症）と糖原病I型（グルコース-6-ホスファターゼ・システム欠損症）が，よく知られている．これらの疾患では，肝におけるプリン体の de novo 合成の亢進（hepatic factor）や，腎における尿酸排泄の低下（renal factor）が，発現機作と見なされている．糖原病VII型における高尿酸血症の成因として，私共の提示する筋プリンヌクレオチドの異化亢進（muscular factor）は，高尿酸血症の全く新たな成立機構と考えられる．今後，本症に合併する溶血亢進がどの程度高尿酸血症の成立に関与してい

るかといった問題も含め，さらに詳細な検討が必要と思われる．

## 結　　語

別々の家系に属する糖原病VII型患者2例を対象に，部分的阻血下前腕運動試験を行い，肘静脈血中の運動筋に由来するメタボライトの変動を分析した．その結果，乳酸は増加しなかったが，アンモニアやイノシン，ヒポキサンチンは著しく増加した．以上の成績から，VII型患者の運動筋では，プリンヌクレオチドの異化が著しく亢進していることが示された．したがって，糖原病VII型に合併する高尿酸血症の主因は，尿酸合成の前駆物質であるイノシンやヒポキサンチンが運動筋から多量放出されることにあると考えられ，筋原性高尿酸血症という新しい病態の存在が示唆された．

## 文　　献


1) Tarui, S., G. Okuno, Y. Ikura, T. Tanaka, M. Suda, and M. Nishikawa. Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. A new type of glycogenosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19：517-523 (1965).
2) Tarui, S., I. Mineo, T. Shimizu, and N. Kono. Phosphofructokinase deficiency and related disorders. In Neuromuscular Disease. G. Serratrice, editor. Raven Press, New York. 71-77 (1984).
3) Shimizu, T., N. Kono, I. Mineo, S. Sumi, K. Nonaka, and S. Tarui. Kinetic properties of erythrocyte phosphofructokinase in patients with type VII glycogenosis from two families. Close similarity to liver type phosphofructokinase. J. Inher. Metab. Dis. 7：107-111 (1984).
4) Agamanolis, D., A.D. Askari, S. DiMauro, A. Hays, K. Kumar, M. Lipton, and A. Raynor. Muscle Phosphofructokinase deficiency：two cases with unusual polysaccharide accumulation and immunologically active enzyme protein. Muscle & Nerve. 3：456-467 (1980).
5) Vora, S., M. Davidson, C. Seaman, A.F. Miranda, N.A. Noble, K.R. Tanaka, E.P. Frenkel, and S. DiMauro. Heterogeneity of the molecular lesions in inherited phosphofructokinase deficiency. J. Clin. Invest. 72：1995-2006 (1983).
6) 嶺尾郁夫，河野典夫，清水孝郎，鷲見誠一，松沢佑治，野中共平，垂井清一郎：糖原病VII型に合併する高尿酸血症の成因―運動筋におけるプリンヌクレオチドの分解亢進の関与について．尿酸8：32-37 (1984).
7) Koyama W. Kanayama M. et al. (in preparation)
8) Kono, N., I. Mineo, T. Shimizu, S. Sumi, J. Kang, K. Nonaka, and S. Tarui. Metabolic basis of improved exercise tolerance：Muscle phosphorylase deficiency after glucagon administration. Neurology 34：1471-1476 (1984).
9) Mineo, I., N. Kono, T. Shimizu, S. Sumi, K. Nonaka, and S. Tarui. A comparative study on glucagon effect between McArdle disease and Tarui disease. Muscle & Nerve. 7：552-559 (1984).
10) Wheeler, T.J. and J.M. Lowenstein. Adenylate deaminase from rat muscle：regulation by purine nucleotides and orthophosphate in the presence of 150 mM KCl. J. Biol. Chem. 254：8994-8999 (1979).
11) Sabina, R. L., J.L. Swain, C.W. Olanow, W.G. Bradley, W.N. Fishbein, S. DiMauro, and E.W. Holmes. Myoadenylate deaminase deficiency：functional and metabolic abnormalities associated with disruption of the purine nucleotide cycle. J. Clin. Invest. 73：720-730 (1984).
12) Sutton, J.R., C.J. Toews, G.R. Ward, and I. H. Fox. Purine metabolism during strenuous muscular exercise in man. Metabolism. 29：254-260 (1980).

# 28)－(2) Kearns-Sayre 症候群における coenzyme $Q_{10}$ 代謝と coenzyme $Q_{10}$ 療法の検討

垂 井 清一郎*

研究協力者 小笠原 三 郎* 西 川 嘉 郎* 依 藤 史 郎*
曽 我 文 久* 河 野 典 夫* 高 橋 光 雄*

## はじめに

Kearns-Sayre 症候群は進行性外眼筋麻痺，網膜変性症，心伝導障害を三主徴とする代表的な mitochondrial encephalomyopathy である．本症候群ではしばしば高乳酸血症，血中乳酸（Lac）／ピルビン酸（Pyr）比の上昇が見られ，電子伝達系の異常が想定されていながら原因不明で，治療法も確立されていない．又，coenzyme $Q_{10}$（CoQ）はミトコンドリア（Mt）内膜電子伝達系の重要な構成成分であるが，mitochondrial encephalomyopathy における CoQ 代謝の検討は見られない．私どもは Kearns-Sayre 症候群（KSS）の一例で血清および Mt 分画中 CoQ が低下していることを報告した[1]．又，松原ら[2] Morgan-Hugh ら[3] は mitochondrial encephalomyopathy に CoQ 投与を試み，乳酸代謝が改善されることを報告している．

今回，私どもは KSS の5例につき，CoQ 代謝および CoQ 投与の効果を検討したので報告する．

## 対象および方法

対象とした KSS 5例（男4例，女1例）の臨床像を表1に示した．三主徴を伴う完全型3例，心伝導障害を欠く不全型2例（1例は心房性期外収縮を合併）よりなり，年齢は19歳から40歳で，罹病期間は5年から25年である．全例に Gomori trichrome 染色で ragged red fiber を認めた．神経症状としては全例で感音性難聴が見られた他，症例2で著明な小脳失調を，症例1で軽度の知能低下を認めた．全例で運動負荷により血清 Lac＋Pyr, Lac/Pyr 比の異常上昇を認めた．髄液蛋白は4例で上昇，血清葉酸，髄液中葉酸の低下をそれぞれ2例と4例で認めた．

Mt 内膜電子伝達系活性および CoQ 含量は，昨年度報告の方法で測定した[1]．培養皮膚線維芽細胞における CoQ 合成活性は Faust の方法[4] に準じて以下のように測定した．5～7代継代した細胞をトリプシン，EDTA 処理により浮遊させ，60×50mm の dish に細胞数 $8\times10^4$ 個加え，10%ウシ胎児血清を含む Eagle's MEM 中で培養し，5日目に methionine free の Eagle's MEM（10%ヒト血清含有）に3.3μM L（methyl$^3$-H）methionine（3mci／μmole）を加え，37℃で4時間反応後，反応液を除却し，生理食塩水で洗浄し，その後0.1N NaOH で細胞を溶解させ，CoQ をクロロホルム／メタノール（1：2，V/V）で抽出し，窒素ガス中で乾固し，シリカゲル薄層クロマトグラフィーで展開し，ヨウ素で CoQ 分画を染め出してかき取り，液体シンチレーションカウンターで測定した．CoQ 分画への $^3$H の取り込みから CoQ 合成活性を算出した．

筋組織中の過酸化脂質は TBA 法で測定した[5]．

CoQ 療法は1日120～150mg の CoQ を経口投与することにより行い，臨床症状，運動負荷時の血中 Lac＋Pyr 濃度，Lac/Pyr 比の測定，髄液所見，心電図などにより治療効果を評価した．

＊大阪大学医学部第二内科

表1　Clinical data on patients with Kearns-Sayre syndrome

| Patient No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Age(years) | 19 | 23 | 28 | 40 | 40 |
| Sex | M | M | F | M | M |
| Duration of disease(years) | 5 | 13 | 14 | 16 | 25 |
| Ophthalmoplegia | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| Retinal Degeneration | + | + | + | + | + |
| Limb muscle Weakness | − | + | ++ | − | + |
| ECG at rest | first degree AV-block, CRBBB | WPW-syndrome, CRBBB | APB | CRBBB | normal |
| after exercise | ST-depression, VPB | ST-depression | no change | no change | ST-depression |
| Ragged red fibers | + | + | ++ | + | + |
| Electromyogram | myogenic change | myogenic change | myogenic change | myogenic and neurogenic change | myogenic change |
| CNS symptoms | dementia | cerebeller ataxia | − | − | − |
| CSF total protein (mg/dl, normal<40) | 85 | 253 | 34 | 130 | 44 |
| Electroencephalogram | abnormal | abnormal | abnormal | normal | abnormal |
| Folic acid levels[a] (ng/ml) Serum | 1.8 | 3.2 | 2.1 | 3.7 | 2.9 |
| CSF | 1.7 | 1.3 | 4.2 | 14.2 | 3.3 |
| CSF/Serum ratio | 0.94 | 0.41 | 2.0 | 3.84 | 1.14 |

( a) normal range for serum folic acid,2.6-7.0 ng/ml ; CSF/Serum ratio of folic acid, 3.0-5.0)

表2　Activities of mitochondrial electron transport system and CoQ metabolism in Kearns-Sayre syndrome

| Patient No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Patients | Control(number) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NADH-Cyt C reductase[a] (antimycin A sensitive) | 2.38 | 1.12 | 0.84 | 0.95 | 0.56 | 1.17±0.70 | 1.94±0.91 (12) |
| Succinate dehydrogenase[a] | 1.54 | 3.96 | 2.38 | 1.89 | 2.59 | 2.47±0.92 | 1.71±0.51 (12) |
| Succinate-Cyt C reductase[a] | 1.54 | 1.72 | 0.70 | 0.63 | 0.93 | 1.10±0.49 | 0.74±0.23 (12) |
| Cytochrome Oxidase[a] | 1.68 | 1.03 | 4.20 | 1.26 | 0.19 | 1.67±1.51 | 1.77±0.67 (12) |
| Mt protein concentration (mg/g wet weight) | 14.0 | 8.6 | 14.0 | 6.3 | 18.5 | 12.3 ±4.8** | 5.7 ±1.4 (12) |
| Serum CoQ (μg/ml) | 0.30 | 0.65 | 0.50 | 0.85 | 0.40 | 0.54±0.21 | 1.07±0.17 (12) |
| Muscle CoQ (μg/g wet weight) | 9.0 | 11.0 | 15.0 | 18.0 | 12.5 | 12.9 ±3.7* | 18.8 ±6.1 (6) |
| (μg/mg Mt protein) | 0.64 | 0.79 | 1.69 | 2.8 | 0.68 | 1.31±0.92** | 3.13 ±0.87 (6) |
| fibroblast CoQ (μg/mg protein) | N.D. | 33 | 58 | 68 | N.D. | 53.0±18.0 n.s. | 48.9 ±28.2 (7) |
| fibroblast CoQ Synthesis (p moles/hr/mg protein) | N.D. | 0.52 | 0.51 | 0.48 | N.D. | 0.50±0.02 n.s. | 0.47±0.13 (7) |

( a),μ moles substrate oxidized or reduced/min/g wet weight of muscle;*,0.05<P<0.10;**, P<0.01)

## 結　　果

1) KSS 5例の骨格筋 Mt 内膜電子伝達系活性，CoQ 含量，線維芽細胞の CoQ 合成活性を表2に示した．Mt 分画の蛋白量は5例中4例で増加していたが，筋湿重量あたりの電子伝達系活性は，NADH-Cytochrome C reductase が正常の29%，Cytochrome oxidase 活性が11%に低下していた症例5（罹病期間25年）を除き，ほぼ正常範囲であった．又，Mt 分画の増加にもかかわらず，骨格筋湿重量あたりの CoQ 含量はむしろ低下傾向にあり（0.05<P<0.10），Mt 蛋白量あたりの CoQ 含量は5例の平均で正常の約1/3に低下していたが，症例4では CoQ の低下は見られなかった．線維芽細胞を用いた CoQ 合成活性の測定結果では検討した3例全例で正常域であった．

2) 生検筋中の過酸化脂質量は malon dialdehyde (MDA) 量として 82 ± 21 nmoles／gwet weight (mean±S.D.) で正常対照 (120±55n

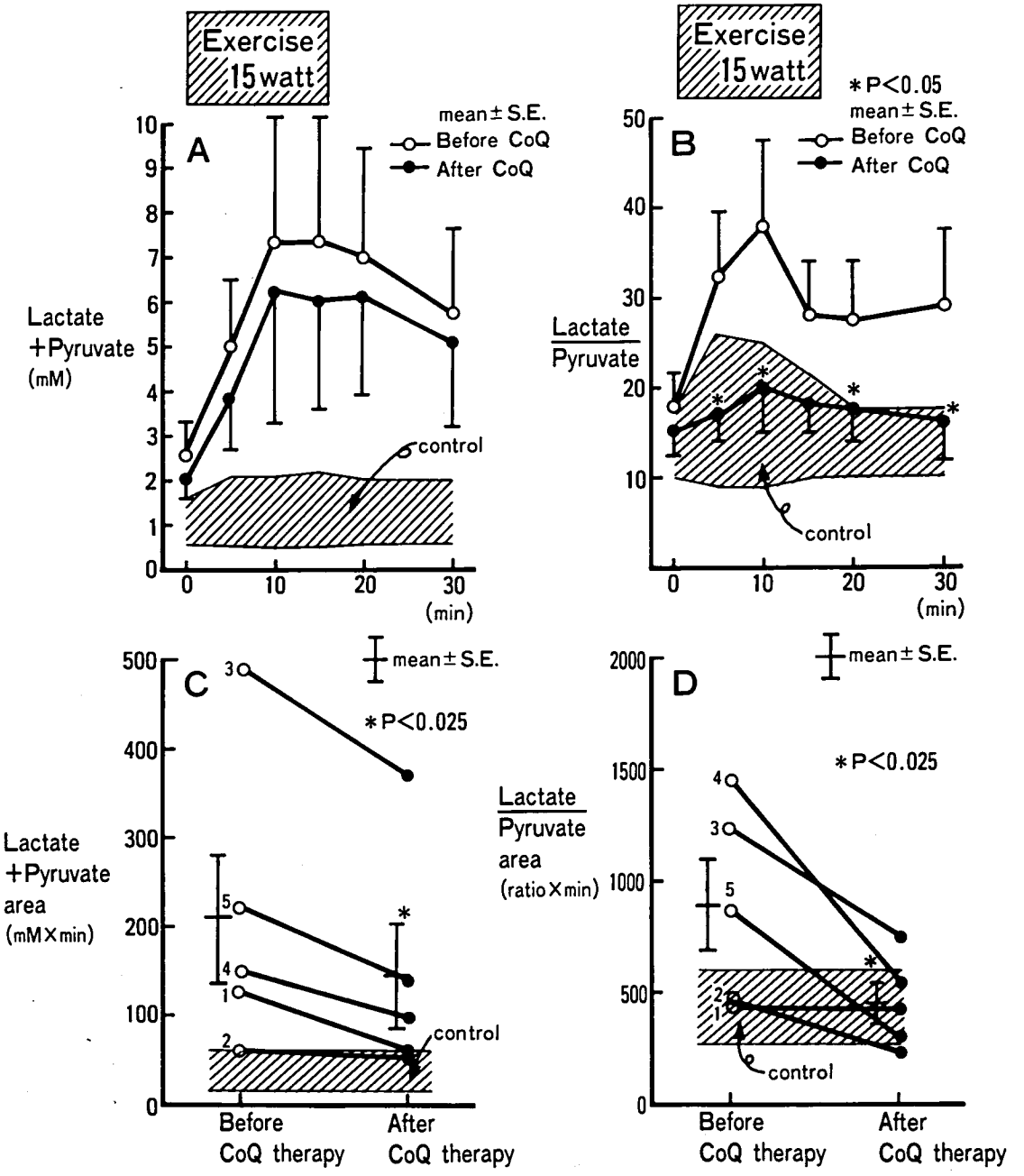
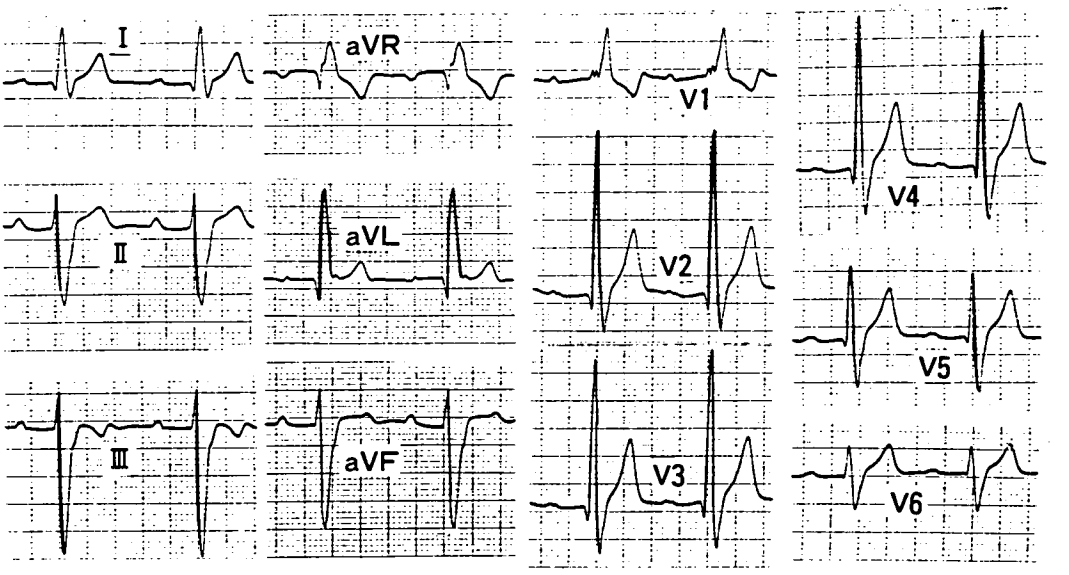



図1　CoQ療法前後における運動負荷時の乳酸，ピルビン酸代謝．A，Bは5例の平均値±S.E.を示す．C，Dは各症例の運動負荷時の乳酸＋ピルビン酸×分，乳酸／ピルビン酸×分の面積を示す．C，Dの open circle の横の番号は症例番号を示す．

A

Before CoQ therapy




After CoQ therapy (One year)

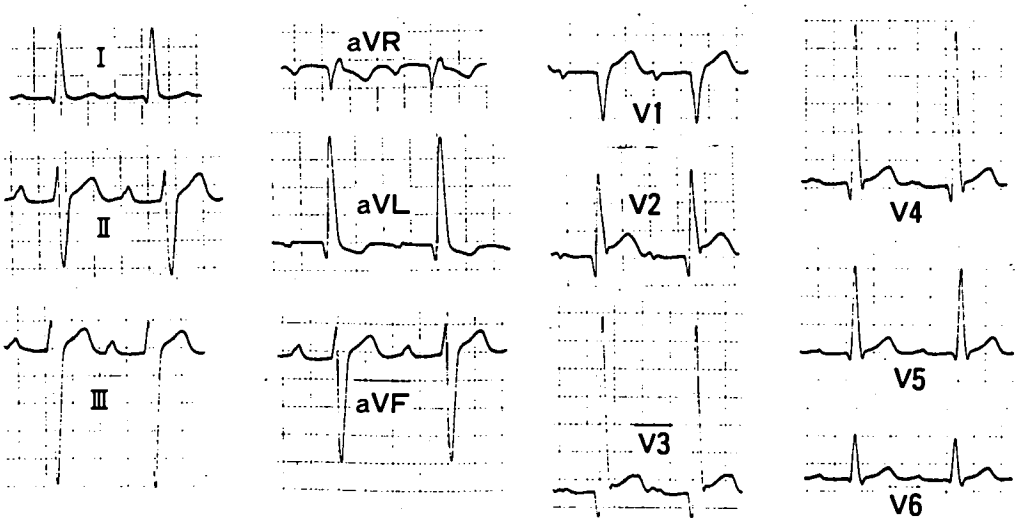



図２Ａ　症例１における心電図変化．CoQ 療法前には明らかな CRBBB と第一度 AV block が見られたが約１年の CoQ 療法後 CRBBB はほぼ消失している．

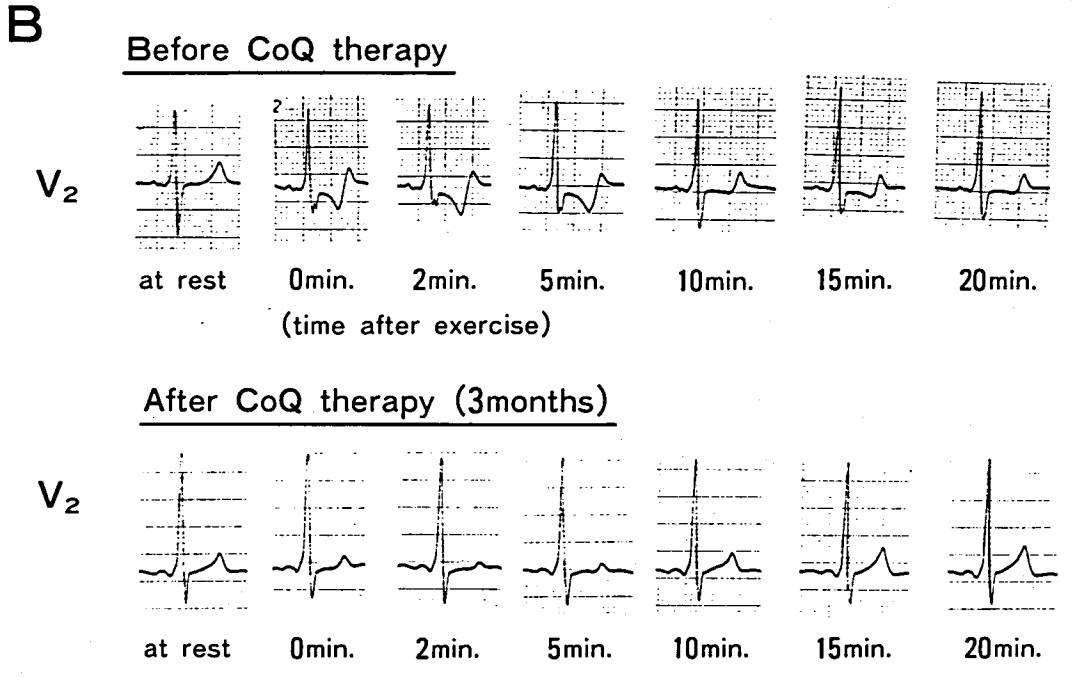



図2B　症例2における運動負荷後のST低下に対するCoQ療法の効果．CoQ療法によりST低下はほぼ消失した．

moles／g wet weight）との間に差がなかった．

3）運動負荷時の血清Lac＋Pyr濃度，Lac／Pyr比の上昇に対するCoQ療法の効果を図1に示した．運動負荷時の血清Lac＋Pyr濃度，Lac／Pyr比の上昇はCoQ投与後徐々に改善し，投与開始数か月で症例1，2は正常化，他の3例も改善を示した．Lac／Pyr比の改善はより著明であった．

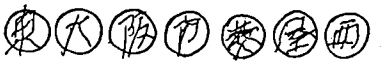
4）CoQ投与の髄液異常に対する効果は総蛋白量，Lac＋Pyr濃度，Lac／Pyr比で検討した．髄液蛋白量はCoQ投与前112±86mg/d$l$（mean±SD，n＝5，正常＜40mg/d$l$）がCoQ投与3～7か月で50±42mg/d$l$と有意な低下（$P<0.05$）を示した．Lac＋Pyr濃度は投与前2.27±0.57mM（mean±S.D.正常＜1.9mM）が投与後2.33±0.42mMと変化が見られなかった．Lac／Pyr比は15.6±3.5から12.3±1.8と軽度ながら有意な低下が認められた（$P<0.05$）．

5）心電図異常に対するCoQ療法の効果を図2に示した．図2AはCoQ投与前PQ intorval 0.28 secと第1度AVブロックを呈し，又完全右脚ブロック（CRBBB）の見られた症例1の心電図変化を示したものである．図に示していないがCoQ投与後3か月でPQ intervalは正常化（0.16 sec）し，その後再びPQ intervalは延長したがQRS complexは次第に正常化し，1年の投与でCRBBBはほぼ消失した．図2BはCoQ投与前WPW症候群とCRBBBを呈し，運動負荷により著明なST低下を見た症例2の負荷心電図所見である．CoQ投与3か月で運動負荷後のST低下は消失している．本例では冠不全を除外するため，心筋シンチグラフィー，冠動脈造影，心筋生検を施行したが冠動脈に狭窄や攣縮は見られず，心筋生検標本の電顕で形態的に正常なMtの著明な増加が見られ，運動負荷時のST低下がMt機能異常によることが示唆されたが，3か月間のCoQ投与により運動負荷時のST低下は消失した．

6）図3に著明な小脳失調の見られた症例2の書字の改善を示す．本例は数年前より徐々に小脳失

## Effects of CoQ therapy on ataxia

Before CoQ therapy



After CoQ therapy (7months)

図3　症例2における書字の改善，7か月のCoQ療法で書字に改善が見られる．

調が出現，歩行障害，構音障害，四肢運動障害を呈した症例である．CoQ投与前本症例は書字に際し右手に左手をそえる必要があり，書字も拙劣であったが7か月のCoQ投与で右手のみで書字可能となり，書字にも改善が見られる．本例では経時的に体性感覚誘発電位を記録しているが正中神経刺激時の$N_{56}$の潜時が75msecから66msecと短縮し，髄液蛋白も253mg/dlから125mg/dlと減少が見られた．

### 考　　察

CoQはMt内膜電子伝達系の重要な構成成分であるがMt異常症におけるCoQ代謝の研究は少い．本研究で私どもはKSSの骨格筋ではMt分画の著明な増加にもかかわらず，CoQ含量はむしろ低下傾向にあり，MtあたりのCoQ含量は著明に減少していることを見出した．CoQはメバロン酸から合成される側鎖と，チロジンから水酸化，methyl化をへて合成されたキノン核よりなるが[6] methyl donerとして$^{3}$H-methionineを用いた実験ではCoQ合成活性は正常で，CoQ合成異常がKSSの原因である可能性は否定的であった．KSSで葉酸代謝異常があることはAllenら[7]により報告されているが，私どもの例で5例中4例に異常が見られた．methionine合成に葉酸が必要であることを考えあわせると，葉酸代謝異常によりCoQ合成が低下している可能性がある．

KSSでは何らかの原因によりMt機能が低下し，それを代償するためMtが増加していると考えられている[8]が，Mtの増加に見合うだけのCoQ合成の増加がないことは明らかである．Schneiderらは[9] submitochondrial particle (SMP)を用いた実験でCoQを含まないphospholipidのliposomeをSMPと融合させると電子伝達系の活性は低下するが，CoQを大量に含むliposomeをSMPと融合させると電子伝達系の活性が上昇することを報告している．このことは他の電子伝達系構成成分の量が変化しなくとも，CoQ濃度が膜内で上昇すると電子伝達系活性が増加することを示すものである．Nakamuraら[10]はCoQを経口投与するとMt内膜に移行することを報告している．KSSの骨格筋において湿重量あたりの電子伝達系活性が正常域にある症例が多いにもかかわらず，運動負荷により血清Lac+Pyr，Lac／Pyr比が異常高値を示すことは*in vivo*の状態でPyr代謝異常，NADH酸化障害が存在することを示すものであり[11]，電子伝達系をさらに賦活することの有効性を裏付けるものである．私どもの検討した症例は5例と少数であるがCoQの大量投与によりPyr代謝および組織中のNADH／NAD比の改善が見られることが明らかとなった．又臨床的にも髄液蛋白の減少，心電図異常の改善を見，一例ではあるが小脳症状の改善が見られた．CoQ療法の有効性を確実に評価するにはさらに長期にわたり，より多数の症例での検討が必要であるが，現時点で最も有効な治療法と考えられる．

## 文　献


1) 垂井清一郎，ほか：Kearns-Sayre 症候群の骨格筋ミトコンドリア電子伝達系の解析．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，昭和58年度報告書，1984, p. 210.

2) Matsubara S, et al.：A case of oculo-craniosomatic neuromuscular disease with "ragged-red" fibers. Clin Neurol (Tokyo) **24**：221-229, 1984.

3) Morgan-Hughes JA, et al.：Mitochondrial myopathies；results of exploratory therapeutic trials. "Biochemical and Clinical Aspects of Coenzyme Q" (Folkers K, Yamamura Y, eds) Vol 4, Elsevier, Amsterdam, 1984, p. 417.

4) Faust JR, et al.：Synthesis of ubiquinone and cholesterol in human fibroblasts：regulation of a branched path way. A.B.B. **192**：86, 1979.

5) Masugi F, et al.：Measurement of thiobarbituric acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecylsulfate and variation of the values affected by vitamin E and drugs. Vitamins (Japan) **51**：21, 1977.

6) Rudney H：The biosynthesis of Coenzyme Q. "Biochemical and Clinical Aspects of Coenzyme Q" (Folkers K, Yamamura Y, eds) Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 1980, p. 189.

7) Allen R, et al.：Kearns-Sayre syndrome with reduced plasma and cerebrospinal fluid folate. Ann Neurol **13**：679, 1983.

8) Mitsumoto H, et al.：Chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO)；Clinical, morphological and biochemical studies. Neurology (Cleveland) **33**：452, 1983.

9) Schneider H, et al.：Lateral diffusion of ubiquinone during electron transfer in phospholipid-and ubiquinone-enriched mitochondrial membranes. J Biol Chem **257**：10789, 1982.

10) Nakamura T, et al.：Transfer of exogenous coenzyme $Q_{10}$ to the inner membrane of heart mitochondria in rats. in Biochemical and Clinical Aspects of Coenzyme Q (Yamamura Y, Folkers K, Ito Y, eds) Vol 2, Elsevier, Amsterdam, 1980, p. 3.

11) Kreisberg RA.：Lactate homeostasis and lactic acidemia. Ann Intern Med **92**：227, 1980.

# 29）核内 non-histone 蛋白の局在と染色体との関連

萬　年　　徹*

研究協力者　清　水　輝　夫*　中　瀬　浩　史*　黒　田　正　明*

筋ジストロフィ症の発症機序は未だ解明されていないが，1) 疾患の原因がX染色体上に存在すること，2) 主として骨格筋に病変があることから，骨格筋に特徴的な過程の障害が疑われ，解糖系代謝経路や筋収縮蛋白が検討されてきた．現在までのところ，これらに原義的な異常を見出しえず，膜とくに形質膜の異常が示唆され研究がなされつつある．しかしながら，膜説を確実に支持する所見は未だなく，別の立場から骨格筋の特徴を追求する必要もあると考える．

私共は，最も研究の遅れている核蛋白質（とくに非ヒストン蛋白質）のうち骨格筋に特徴的な成分を明らかにすることを目的にしている．核非ヒストン蛋白は量的に限られているため，少量でも可能なモノクロナール抗体法を利用し

1) ヒト培養白血球，ヒト骨格筋より核を採取し非ヒストン蛋白質を分離精製する．
2) 2つの核からの非ヒストン蛋白質を電気泳動法により分析する．
3) 同時にモノクロナール抗体 monoclonal Antibody, McAb を作成し，抗原決定を行う．
4) 螢光抗体法により，筋細胞核を特異的に認識する抗体をさがし，その抗原である成分を同定する．
5) 筋細胞核に特徴的な成分の免疫化学的検討を行う．

現在以上の目的に沿って非ヒストン蛋白の分離精製を開始した段階である．初年度は非ヒストン蛋白分画に含まれていると考えられる収縮蛋白，とくにアクチンについて，現在利用可能なアクチンに対する Mc Ab をもちいて，静止核内のアクチン（様）蛋白の存在について検討した．静止核におけるアクチン様蛋白の存在は電顕上7～8 Åのフィラメントからなる桿状体としてラットの蝸牛核やニワトリの交感神経節の神経細胞核で記載されてきた（Feldman and Peters, 1972）．しかし，この繊維がアクチンであるとの確証は未だ示されておらず，又，フィラメント形成しないアクチンが存在するかどうかについては仕事がない．

### アクチンに対するモノクロナール抗体の作成

アクチンは臓器特異性があるが，種特異性に乏しいことから，トリ砂嚢よりアクチン（$\beta$，$\gamma$型）を抽出精製し，Ba 1b／c マウスに免疫，通常の方法によりモノクロナール抗体を調製した（monoclonal antibody, Mc Ab）．

### 抗体の性質

今回の実験には，2種の抗体（Mc Ab 5と Mc Ab 6）を使用し，その反応性を Immunobloting 法と ELISA で検討した．Mc Ab 5はトリ砂嚢のアクチン以外に骨格筋（胸筋）・心筋・大脳のアクチンを認識し，Mc Ab 6はトリ砂嚢・骨格筋（大胸筋）・心筋のアクチンを認識するが，大脳のアクチンは認識しなかった（図1）．

### 螢光抗体法による染色性の検討

トリの砂嚢・心筋・大胸筋・前広背筋・大脳・頸髄・交感神経節より凍結切片を作成し4％ホルマリンで4分間固定後，Mc Ab 次いで FITC-ヤギ抗マウス IgG 抗体を反応させ，螢光顕微鏡観察した．

Mc Ab 5は砂嚢・心室・大胸筋・前広背筋の細

＊東京大学医学部脳研神経内科

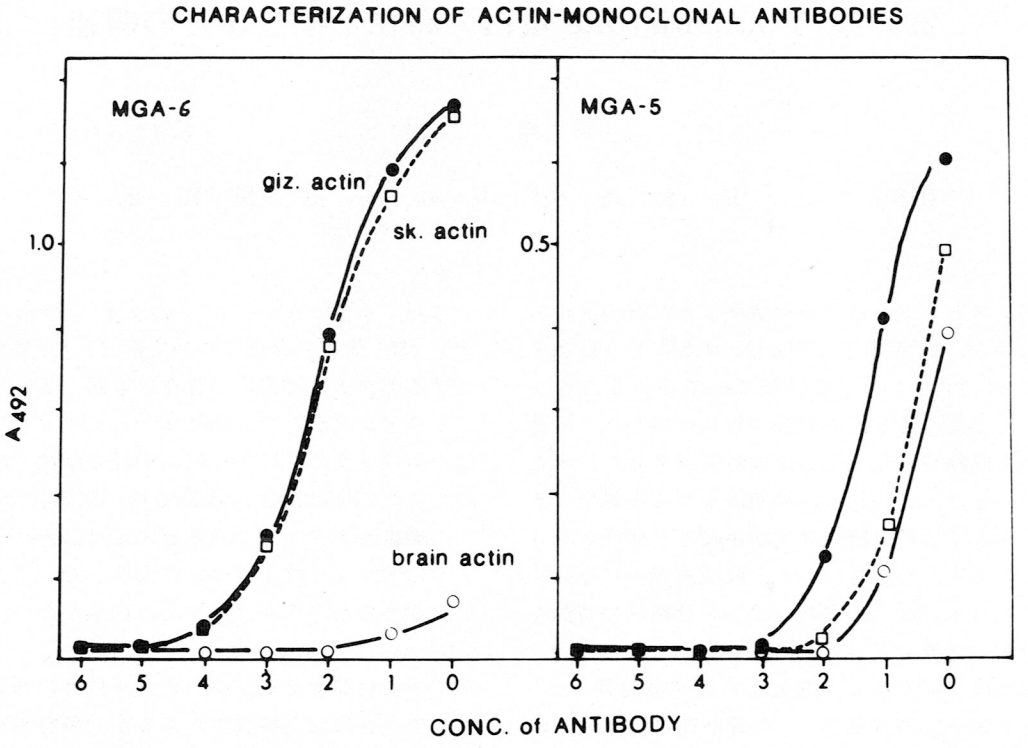



図1　ELISAによる抗アクチン抗体（Mc Ab 5，Mc Ab 6）の反応性.
SK. actin　大胸筋アクチン，giz. actin　砂嚢アクチン，brain actin　大脳アクチン.

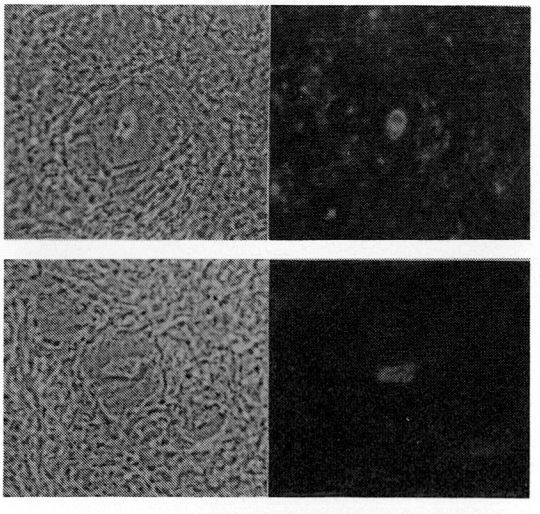


図2　交感神経節神経細胞のMc Ab 5（上）McAb 6（下）の染色性を示す. ×250

胞質を染め，大脳・脊髄の灰白質や大脳神経細胞と脊髄前角細胞の細胞質を染めた．肝細胞の染色性は軽度であった．これらの組織の細胞核の染色性を検討した所，交感神経節においてのみ少数例で細胞核が明瞭に染められた（図2）．その染色パターンは濃淡はあるが，ほぼ核全体が染まっていた．

Mc Ab 6は，砂嚢・心室・大胸筋・前広背筋の細胞質を染めたが，肝細胞質は淡く大脳・脊髄は染めなかった．交感神経節細胞も殆んど染めない．これらの細胞核の染色性をみた所，少数の交感神経節細胞に明瞭に染まる核のあることがわかった．その染色性はMc Ab 5と同様であった．

過去核内アクチン様蛋白は細胞分裂期の紡錘糸に存在すること，蝸牛核や交感神経節の神経細胞

核内に桿状構造体として記載されてきたが，今回我々の実験結果は交感神経細胞核で，フィラメント形成をしないで，monomer あるいは oligomer のアクチンが静止核に存在することを示唆している．

このアクチン様蛋白の染色体との関係を調べる為，自然乾燥法で作成したヒト中期染色体標本上で螢光抗体法を施行した所，染色体そのものを染めてはいなかった．

従ってアクチンが，染色糸や染色体を構成する蛋白ではないと考えられる．

以上の結果から，アクチン様蛋白が monomer あるいは oligomer の状態で静止核に存在することがあるが，形態的に染色体構成蛋白ではない．このアクチン様蛋白の機能は未だ不明であるが今後さらに病的材料を使って核内アクチン様蛋白の分布を追求したい．

## 文　献

1) Feldoman, M.L., and Peters, A. 1972. Intranuclear rods and sheets in rat cochlear nucleus. J. Neurocytol., 1 : 109-127

# V. 遺　伝　子

# 30）筋ジストロフィー症遺伝子の単離の試み

鈴　木　紘　一*

研究協力者　大　野　茂　男*　榎　森　康　文*
今　城　　忍*　川　崎　博　史*

## はじめに

DNAのある部位に変異が生じると，DNAを切断する制限酵素の認識部位の新生や消失がおこり，DNAを制限酵素で切断したときに生じる断片の中に従来と異なる長さの断片ができる．このようなDNA断片の多型性（RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism）の遺伝と遺伝性疾患の遺伝との関係から，遺伝性疾患と関連するRFLPの単離や遺伝子そのものの単離が試みられている[1),2)]．Huntington病と強く関連するRFLPの単離はこのよい例である[3)]．

筋ジストロフィー症（DMD）に関しては，英国のWilliamsonらのグループがこの手法を用いてDMDに関連する2種類のRFLPを単離している．しかしその連鎖や出現頻度はまだ満足のいくものではない[4),5)]．

我々は，DMDと相関性の高いRFLPをとり，さらにこれからDMD遺伝子そのものを単離することを最終の目標として研究をはじめた．

## 方法および結果

### 1．X染色体のDNAバンク

Xテトラソミー患者（48XXXX）のリンパ球の中期の染色体をセルソーターで分画し，X染色体区分をえる．この画分からDNAを抽出し，これをλgt WESに組込んだX染色体のDNAバンクを佐賀医大渡辺武教授，九州大学医学部榊佳之助教授の御厚意によりいただいた[6)]．

### 2．Single Copy DNA Fragmentの単離

DNAバンクを増殖させ，ヒトのtotal genomic DNAをEcoRIで切断したものをプローブにしてプラークハイブリダイゼーションを行った．プローブと強くハイブリダイズするものは反復配列を含むものとして除外し，ハイブリダイズしないファージクローンを選択する操作をくり返し，単一配列のDNAを含むと思われるクローンをえた．実際には，図1に示すように黒く染まるクローンを除外し，黒く染まらないクローン（○印をつけたもの）を単離した．さらに，ベクターであるλファージのEcoRI消化物とハイブリダイズしないDNAを含むクローンを約60個ほどとり出し，以下の実験に用いた．

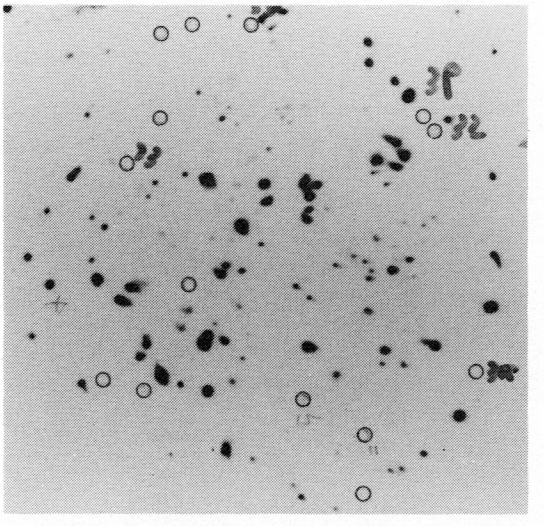


図1　単一配列を含むDNA断片の単離X染色体DNAのEcoR I断片を組込んだλgtWESファージのプラークを，ヒトのtotal DNAのEcoR I断片をプローブとしてハイブリダイズさせたもの．○印を付したプラークを選択した．

＊東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部

### 3．Southern Blot による多型性の検討

上で選択した約60個のクローンからDNAを単離し，これをニックトランスレーションによって$^{32}$Pでラベルした．一方，正常ヒトリンパ球から抽出したDNAを種々の制限酵素で切断し，これをアガロースゲル電気泳動で分離した．分離したDNAをSouthernブロット法でニトロセルロース膜に写した後，$^{32}$PラベルのDNA断片をプローブとして染色した．このうちいくつかの例を図2，図3に示す．

DNAの塩基配列の中でCpGのCはメチル化を受けやすく，このためC→Tの変化が起こりやすい．従って，CpGまたはTpGを認識する酵素を用いると多型性が生じる確率が高くなる．そこで，Taq I，Msp Iを中心にEcoR I，Bgl IIなどを用いて検討した．

図2上段はこれらの制限酵素で切断した正常ヒトDNAをX染色体ライブラリーから単離したDNA断片S25-1とS31で染めたものである．S25をプローブとした場合，すべて単一のバンドが検出されたので，S25が単一な配列を含むことは明らかであるが，調べた3種の制限酵素では多型性は見られなかった．S25についてはさらに多くのヒトDNAを検索するか，制限酵素を変えて検討すれば多型性が検出されるはずである．

S31をプローブにすると（図2下段）smear状のパターンが見られた．この中に多型性を示すもの（左から6番目，矢印の位置）も見出されたが，

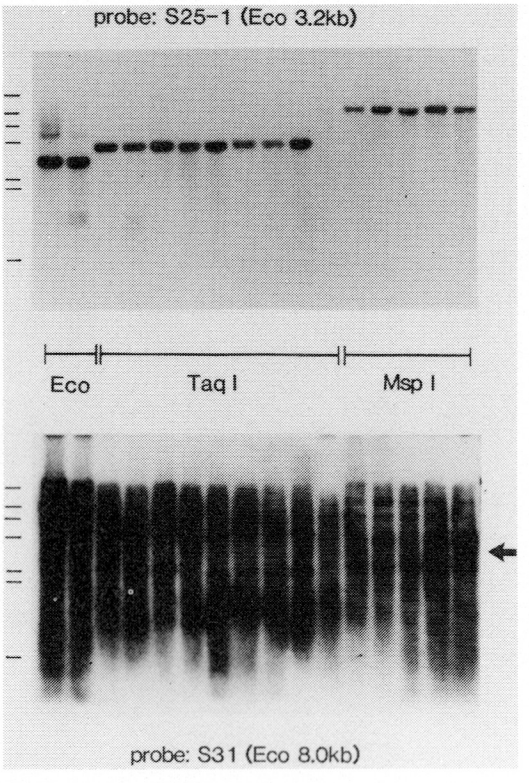



図2　X染色体のDNAライブラリーから単離したDNA断片の多型性の検討(1)．左端の横棒はサイズマーカー，上より順に23.1，9.4，6.55，4.37，2.32，2.0，0.56 kb．右側の矢印は多型性が見られる所を示す．

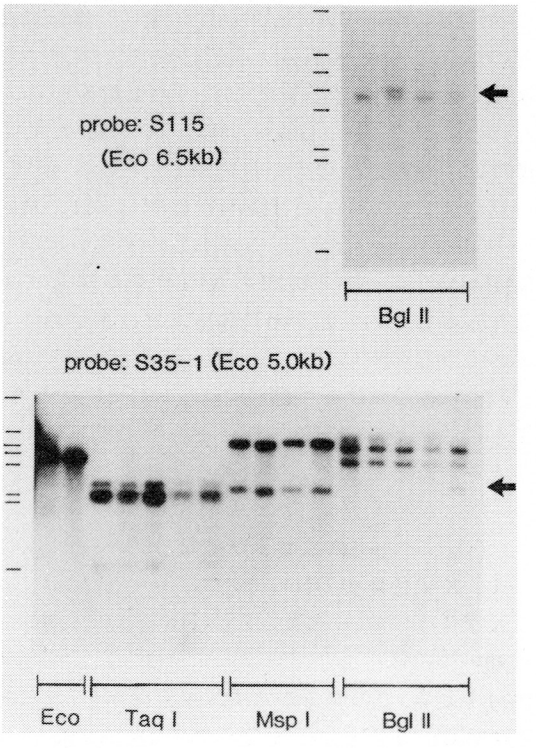



図3　X染色体のDNAライブラリーから単離したDNA断片の多型性の検討(2)．

用いたプローブの中に単一な配列の他に反復配列も含まれているものと判断し，以後の分析から除外した．

図3上段は4種の正常ヒトDNAをBgl IIで切断し，S 115とハイブリダイズさせたものである．左から2番目と4番目のDNAに多型性が見られ，その出現頻度も高そうである．S 35-1をプローブにした図3下段では，2～3本のバンドが検出されたが，このうち右端のBgl IIで切断したものに多型性が見られる．

現在このようにしてX染色体のDNAライブラリーから単一配列を持つDNA断片で，多型を示す断片を集め，多型の出現頻度を検討している．今後は，多型を示す断片のX染色体上での位置を調べ，Xp21に近い断片を選択し，これをプローブとしてDMD患者で家系調査を行う．

## 考　　察

DMD遺伝子の探索法としていくつかの手段が考えられるが，このうちRFLPを用いる方法は最も確実な方法である．Huntington病の場合のようにわずか12個のRFLPを調べただけでCarrier detectionに使えるRFLPを単離した極めて幸運な例もあるが，一般にはDMDのcarrierの検索に使えるようなよいRFLPがどの程度の時間と労力を費やしたら単離できるかを予測することは非常に難しい．しかし，RFLP法では時間と労力をかければ確実に目的に近づいて行けることも事実である．

今まで既知のマーカーでDMDと相関するものは知られていなかったが，最近オルニチントランスカルバミラーゼがXp21.1に位置することが報告された[7]．従って，この遺伝子を出発点として遺伝子を探すことも可能になった．また，トランスロケーションによってリボソームRNAの遺伝子部位にX染色体の一部が移ったためにDMDが発症したと考えられる症例が報告されている[8]．リボソーム遺伝子は数百個の重複した配列からできているので，他の場合に比べ，トランスロケーションの部位の同定が簡単である．我国でも，トランスロケーションによって発症した症例で転座の部位が簡単に同定できるようなものが見出されれば，DMDの遺伝子の同定に極めて有利になる．

我々はRFLPを使う方法以外にも2，3の方法を検討中で，これらの方法を合わせてDMD遺伝子の探索を行いたいと考えている．

## 文　　献


1) Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., & Davis, R.W.：Construction of a genetic map using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Human Genet., 32：314-331, 1980.

2) Aldridge, J., Kunkel, L., Bruns, G., Tantravahi, U., Lalands, M., Brewster, T., Moreau, E., Wilson, M., Bhomley, W., Roderick, T., & Latt, S.A.：A strategy to reveal high frequency RFLPs among the human X chromosome. Am. J. Human. Genet., 36： 546-564, 1984.

3) Gusella, J.F., Tanzi, R.E., Anderson, M.A., Hobbs, W., Gibbons, K., Raschtchian, R., Gillian, T.C., Wallace, M.R., Wexler, N.S., & Conneally, P.M.：DNA markers for nervous system diseases. Science, 225： 1320-1326, 1984.

4) Murray, J.M., Davies, K.E., Harper, P.S., Meredith, L., Mueller, C.R., & Williamson, R.：Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. Nature, 300：69-71, 1982.

5) Davies, K.E., Pearson, P.L., Harper, P.S., Murray, J.M., O'Brien, T., Sarfarazi, M., & Williamson, R.：Linkage analysis of cloned DNA sequence flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. Nucl. Acid Res., 11：2303-2312, 1983.

6) 渡辺　武：医学のあゆみ，128：Flow cytometry法による染色体分離．T-64-T-71, 1984.

7) Lindgren, V., Martinville, B., Horwich, A.L.,

Rosenberg, L.E., & Francke, U. : Human ornithine transcarbamylase locus mapped to band Xp21.1 near the Duchenne muscular dystrophy locus. Science, 226 : 698-700,1984.
8) Worton, R.G., Duff, C., Sylvester, J.E., Schmickel, R.D. & Willard, H.F. : Duchenne muscular dystrophy involving translocation of the DMD gene next to ribosomal RNA genes. Science, 224 : 1447-1449, 1984.

# VI. 筋　再　生

# 31）ジストロフィーハムスターと正常ハムスター間の筋の交換移植についての研究（第3報）およびmdxマウスの骨格筋のヌードマウスへの移植についての研究

寺尾寿夫*

研究協力者　高津成美*　平口峰子*

## はじめに

筋肉の再生がsatellite cellの活性化により起こることは良く知られているが，ジストロフィー筋の再生に関しては多くの研究[1)~5)]にも拘わらず，必ずしも明らかになっていない．我々は筋の移植による再生現象を研究しているが，これによる研究にはいくつかの利点がある．たとえばジストロフィー筋が正常動物内で如何に再生するかだけでなく，逆に正常筋の再生がジストロフィー動物内で受ける影響を知ることが出来る．また長期間の観察も可能である．

近年ヒトでも小筋の移植が行われているが，これらの骨格筋の移植に関しては明らかにすべき点が少なくない．

## 動物および方法

1）ジストロフィーハムスターの骨格筋の交換移植

ジストロフィーハムスターBIO 14.6とコントロールハムスターBIO $F_1$ Bを用い，これらの動物のEDLを互に交換移植した．またBIO 14.6間およびBIO $F_1$ B間のEDLの交換移植も行った．EDLの移植法については既に述べた通りである[6),7)]．この場合graftには軽いtensionを加えて両端を固定した．

2）mdxマウスのEDLのヌードマウスへの移植

ジストロフィーの骨格筋としてmdxマウスのEDL，コントロールとしてC 57 BL／6 JのEDLを，1匹のヌードマウスの左右の下肢に移植した（図1）．この場合，EDLの上端（proximal側）はhostであるヌードマウスのEDL摘除後の空間に固定したが，下端（distal側）の腱となっている

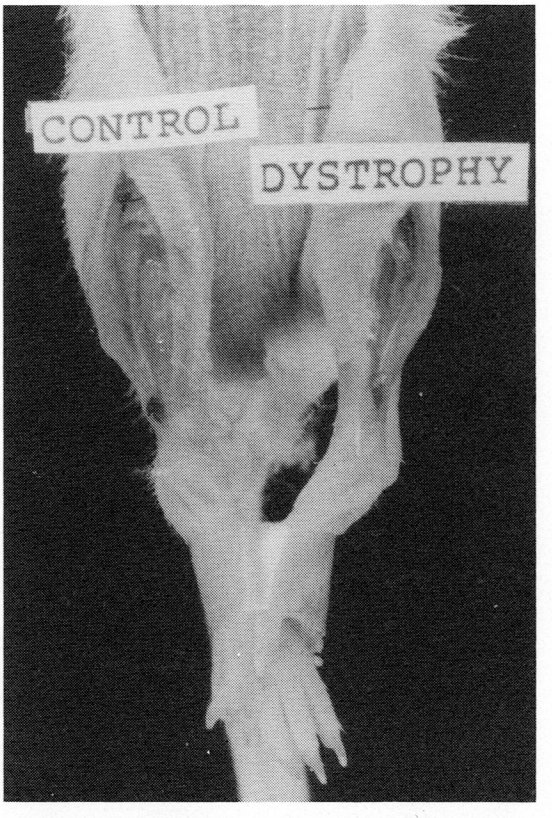



図1　mdxおよびC57 BLのEDLのヌードマウスへの移植

＊帝京大学医学部第一内科

部分はヌードマウスのEDL末端の残存する腱と縫合し，神経の再支配が起こった時に機能が回復できる様に工夫した．

3）これらのハムスターおよびヌードマウスは移植後，種々の時間後sacrificeし，再生筋を取り出し，クリオスタットを用いて組織標本を作製し，H-E染色標本につき再生筋線維の数，直径，直径のバラツキをKontronを用いて計測した．バラツキ（大小不同）は次の計算式によって変動係数variability coefficientとして計算した．

$$\text{variability coefficient} = \frac{\text{standard deviation} \times 1000}{\text{mean fiber diameter}}$$

なお，ジストロフィーハムスターの場合再生筋を上中下の3部分に分け，またジストロフィーマウスの場合は上下の2部分に分けて各部分につき数，直径，変動係数の平均をもってその再生筋の数値とした．

## 結　　果

1）ジストロフィーハムスターの交換移植

(1) 再生筋の数

各組合せの再生筋線維の数を移植後6ケ月でみると，ジストロフィーのEDLをジストロフィーのhostに移植した場合（Dys.→Dys.）がもっとも多く，次いでDys.→Cont.，Cont.→Cont.，Cont.→Dys.の順となった．

この結果をみると，これら4組の交換移植では，hostよりも移植するEDLの性質による所が大きく，EDLがジストロフィーの方がコントロールの場合よりも再生筋線維の数が多かった．

(2) 再生筋の直径

再生筋線維の直径は2ケ月まではかなり急速に，それ以後は緩徐に増加するが4ケ月以後は殆ど変らない．

移植後6ケ月でみると，Cont.→Cont.が30.7±3.8μmでもっとも大きく，Dys.→Cont.も殆ど変らず30.0±3.4μmであり，Dys.→Dys.，Cont.→Dys.はそれぞれ28.1±3.6μm，26.6±5.2μmであった．従って再生筋線維の直径はhostに依存する所が大きく，hostが正常の場合はこれがジストロフィーの場合よりも大きいことが明らかになった．

(3) 再生筋線維直径の変動係数

図2は移植後4ケ月目の各交換移植の変動係数を示したものである．これにみる様にDys.→Dys.の場合が変動係数がもっとも大きく，他の組合せでは差はみられなかった．

しかし6ケ月を経た再生筋では図3の如くCont.→Dys.がもっとも大きく，Cont.→Cont.がもっとも小さかった．

これらの結果をみるとジストロフィーハムスターBIO 14.6とコントロールハムスターBIO $F_1$ Bを用いた4組のEDLの交換移植では，移植後6ケ月までは再生筋線維直径の変動係数には一定の傾向はみられなかったことになる．

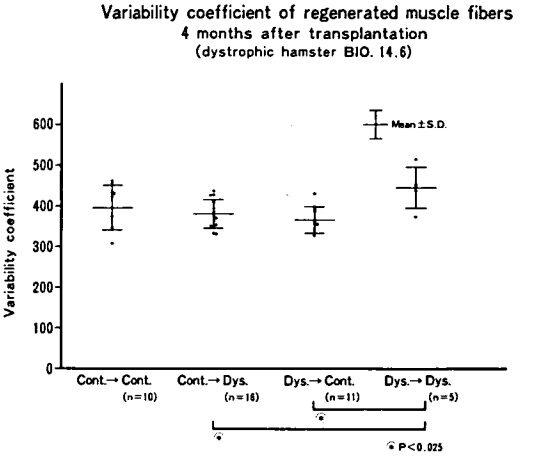



図2

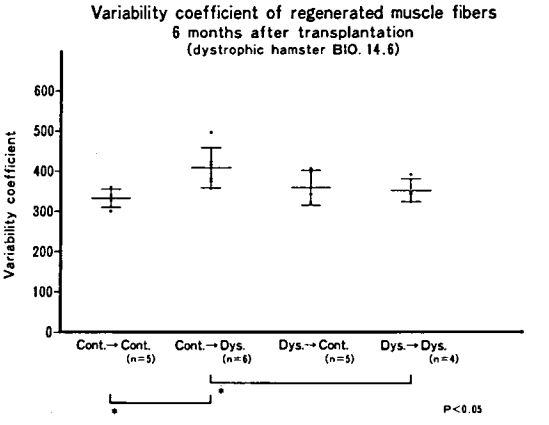



図3

2）mdx および C57 BL／6 J の EDL のヌードマウスへの移植

(1) 再生筋の数

図 4 の左半分は C57 BL，また右半分は mdx の EDL をヌードマウスに移植後 1 ケ月を経たものである．この様に拒絶反応はみられない．

表 1 は移植後 1 ケ月および 2 ケ月目の再生筋線維の数，直径，再生筋線維の直径のバラツキにつきまとめたもので，mdx の EDL の再生筋の数，直径，変動係数を，同じヌードマウスの他側下肢に移植した C57 BL の EDL の再生筋線維の各数値で除した比で示してある．再生筋線維の数の比は移植後 1 ケ月，2 ケ月ともに1.0より大で mdx の移植筋の方が再生筋線維の数が多いことを示している．ただし移植前の EDL そのものの筋線維の数も C57 BL に比し mdx の方が多く，これが再生筋線維の数にも影響を与えていることは否定できない．

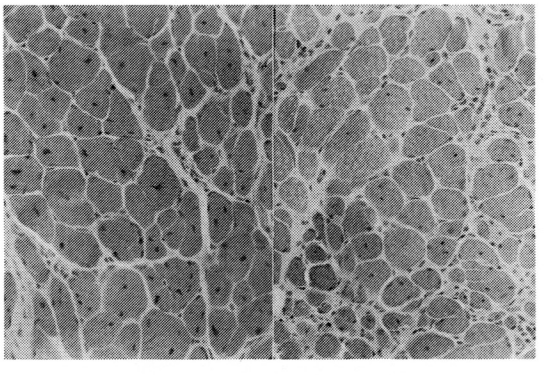


図 4　mdx（右）と C57 BL（左）の EDL のヌードマウス移植後の再生筋線維（移植後 1 ケ月）

表 1
Comparison of number, diameter and variability coefficient of regenerated muscle fibers (MDX／C57BL/6J)

| month after transplantation | number | diameter | variability coefficient |
|---|---|---|---|
| 1 | 1.62 | 0.71 | 1.25 |
| 2 | 1.05 | 0.64 | 1.56 |
| | 1.32 | 0.85 | 1.14 |
| | 1.60 | 0.81 | 1.05 |

(2) 直径

各再生筋を上下の 2 つに分け，各々の組織標本から計1000本の再生筋線維の直径を測定しその平均を，その再生筋中の筋線維の平均直径とした．この平均直径の比率（mdx／C57BL）をみると1.0より常に小さくなく，mdx の EDL の再生筋線維はコントロール側より細いことを示している．

(3) 変動係数

一方，再生筋線維の直経の大小不同を示す変動係数でみると，これはいずれも1.0より大きく，mdx の EDL の再生筋線維は，同じヌードマウス内での C57BL の EDL の再生筋線維は，同じヌードマウス内での C57BL の EDL の再生筋線維よりも直径の大小不同が著しいことを示している．

以上 mdx マウスと C57 BL の EDL のヌードマウスへの移植では，前述のハムスターの骨格筋の交換移植と異なり，host は同一であり，再生筋線維の特徴は移植する EDL の性質をそのまま反映していると考えられ，ジストロフィー側とコントロール側とを直接比較することができる．この実験はまだ移植後 2 ケ月目までの短時間のものであるが，その範囲では mdx マウスの EDL の再生筋はコントロールの同様な再生筋よりも，再生筋線維の数は多いが，直径は小さく，大小不同が強いというジストロフィー筋の特徴を具えている様にみえる．もっともこれに関してはさらに長時間の多数例の観察が必要であろう．

## ま と め

1．ジストロフィーハムスター BIO 14.6とコントロールハムスター BIO $F_1$ B との間，および BIO 14.6同志間，BIO $F_1$ B 同志間に EDL の交換移植を行い次の結果を得た．

a）再生筋線維の数は移植する EDL がジストロフィーの場合にはコントロールの場合より大きくなる．

b）再生筋線維の直径は host がコントロールの場合に，これがジストロフィーの時より大きくなる．

c）変動係数は移植後6ケ月目までは一定の傾向がみられなかった．

2．mdxマウスのEDLとコントロールマウスC57 BL／6 JのEDLを同一のヌードマウスに移植して，その再生筋を移植後2ケ月まで比較し次の結果を得た．

a）再生筋線維の数，変動係数はmdxのEDLの再生筋で大きい．

b）再生筋線維の直径はコントロール（C57 BL）のEDLの再生筋の方が大きい．

## 文　献


1) Jasmin, G. and Bokdawala, F.：Muscle tranrsplantation in normal and dystrophic hamsters. Rev. Can. Biol., 29：197-201, 1970.

2) Neerunjun, J.S. and Dubowitz, V.：Muscle transplantation and regeneration in the dystrophic hamster. Part 1. Histological Studies. J. Neurol. Sci., 23：505-519, 1974.

3) Neerunjun, J.S. and Dubowitz, V.：Muscle transplantation and regeneration in the dystrophic hamster. Part 2. Histochemical studies. ibid, 23：521-536, 1974.

4) Zalewski, A.A.：Survival, reinnervation, and histochemical maturation of skeletal muscle xenografts in the nude mouse. Exp. Neurol., 58：261, 1978.

5) Wakayama Y., Schotland, D.L. and Bonilla, E.：Transplantation of human skeletal muscle to nude mice：A sequential morphologic study. Neurology, 30：740, 1980.

6) 寺尾寿夫他：ジストロフィーハムスターと正常ハムスター間の筋の交換移植についての研究．筋の発生と分化に関する基礎的研究，江橋班昭和57年度研究報告書，p. 9.

7) 寺尾寿夫他：ジストロフィーハムスターと正常ハムスター間の筋の交換移植についての研究（第2報）および再生筋の再移植について．江橋班昭和58年研究報告書，p. 20, 1984.

# 32）筋疾患における myosatellite cell の研究

茂 在 敏 司*

研究協力者　河 村　宏* 小 西 慎 吾* 竹 中 正 純*
篠 田 恵 一* 小松原 千鶴子*

myotonic dystrophy における myosatellite cell についてはすでに昨年度の研究報告書[1]で述べたが，本年度は polymyositis における satellite cell について検討を行った．

対象：63歳，47歳，43歳の女性3名と49歳の男性1名の計4名の polymyositis 患者の大腿四頭筋生検組織について検討した（表1）．被検者の臨床病型は，1958年の Walton & Adams の分類[2]により，女性が全例 type II，男性が type III で臨床的に mixed connective tissue disease と診断された例である．また case K.O.は生検約10日前よりステロイド投与中の症例である．

## 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．①エポン包埋横断面切片より電顕的に mean percentage of satellite cell nuclei (satellite cell 核数÷total subsarcolemmal 核数×100：% SCN と略す）を算出した．②約1μ のエポン包埋トルイジンブルー染色横断面切片より100倍の光顕写真を作製．同光顕切片に連続する超薄切片より電顕的に satellite cell を観察し，subsarcolemmal nuclei と鑑別，光顕写真上にプロットし，筋線維径と satellite cell の分布，性状との関係を histometrical に検討した．③ satellite cell と parent muscle fiber の形態変化に関する検索をも行った．

## 結　果

4例の% SCN 及び筋線維異常の有無を表2に示した．% SCN は case S.T.で19.5，case Y.M. 13.3，case K.O. 9.4，case T.K. 6.1であった．control は38歳，44歳，65歳の明らかな神経筋疾患が認められなかった男性で% SCN は各々4.8，3.3，3.1であった．

光顕的観察での筋線維変性は，case S.T.で最も強く，多くの変性壊死線維と myophagia の出現

表1　対　象

| | AGE (y.o.) | SEX | CLASSIFICATION (Walton & Adam,1958) | MUSCLE | MMT |
|---|---|---|---|---|---|
| POLYMYOSITIS | | | | | |
| 1. case S.T. | 63 | F | type II | q.f. | 3 |
| 2. case Y.M. | 47 | F | type II | q.f. | 4 - |
| 3. case K.O. | 43 | F | type II | q.f. | 4 - |
| 4. case T.K. | 49 | M | type III (MCTD) | q.f. | 4 + |

＊大阪医科大学第1内科

表2　Quantitative analysis of the satellite cell population in polymyositis

| | AGE (y.o.) | SEX | CLASSIFICATION (Walton & Adam,1968) | MUSCLE | MMT | DEGENERATIVE FIBER (L.M.) | %SCN |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| POLYMYOSITIS | | | | | | | |
| 1. case S.T. | 63 | F | type II | q.f. | 3 | +++ | 19.5 |
| 2. case Y.M. | 47 | F | type II | q.f. | 4 - | ++ | 13.3 |
| 3. case K.O. | 43 | F | type II | q.f. | 4 - | + | 9.4 |
| 4. case T.K. | 49 | M | type III (MCTD) | q.f. | 4 + | + (neurogenic atrophy + ) | 6.1 |
| CONTROL | | | | | | | |
| 1. case Y.H. | 38 | M | | gast. | 5 | - | 4.8 |
| 2. case M.O. | 44 | M | | gast. | 5 | - | 3.3 |
| 3. case I.T. | 65 | M | | delt. | 5 | - | 3.1 |
| H.Schmalbruch et al.[4] (8 cases) | 22~35 | — | | q.f. delt. biceps | — | | 2.5~6.4 |
| Y.Wakayama et al.[5] (4 cases) | 12~15 | — | | q.f. | — | | 4.17~4.87 |
| Y.Kuroiwa et al.[6] (5 cases) | — | — | | — | — | | 4.32 ± 1.28 |

F ; Female　M ; Male　L.M. ; Light microscopy
%SCN ; number of satellite cell nuclei / number of total subsarcolemmal nuclei x 100
q.f. ; quadriceps femoris　gast. ; gastrocnemius　delt. ; deltoideus

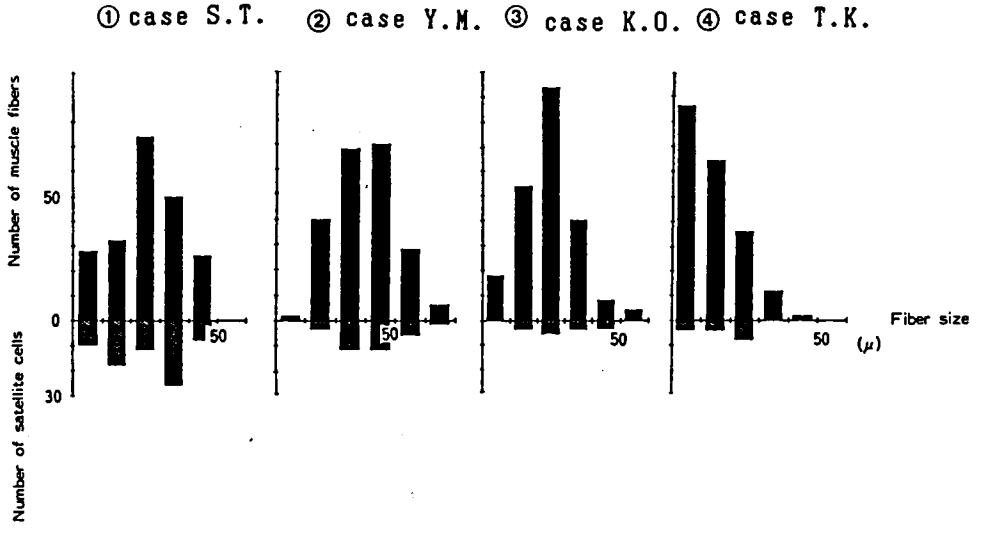



図1　筋線維短径別にみたsatellite cell分布

を認め（**写真1-ⓐ**）case Y.M., case K.O.では比較的軽度で変性線維が散見され（**写真1-ⓑ**）case T.K.では非常に軽く，むしろ angular atrophic fiber よりなる神経原性萎縮がめだった．また変性筋線維が多くみられる症例ほど％ SCN は高値を示した．

satellite cell と筋線維径との関係は**図1**に示した．4症例の全てにおいて，肥大筋線維は認められず，小径線維が比較的多く認められ，satellite cell はそれぞれの径の筋線維に全般的に分布していた．ただし case T.K.には10$\mu$ 前後の神経原性萎縮にもとづく小径線維が非常に多く認められるが satellite cell は非常に少ないものであり，また case S.T.では10$\mu$ 前後の小径線維にも比較的多く satellite cell が認められた．

satellite cell の大多数は，光顕的に著変なく電顕的にのみ構造異常を認める筋線維に観察された．また，壊死には至っていないが光顕的に明らかな変性を示す筋線維では satellite cell は稀にしか認められず，その胞体内構築は比較的良く保たれており，ミトコンドリアの増生，rough endoplasmic reticulum の増生，ゴルジ装置の出現等の活性化像はあまり強くなく，しばしば胞体の一部に突起の形成や satellite cell と parent fiber の間隙の拡大が観察された（**写真2-ⓐ,ⓑ**）．また今回我々が観

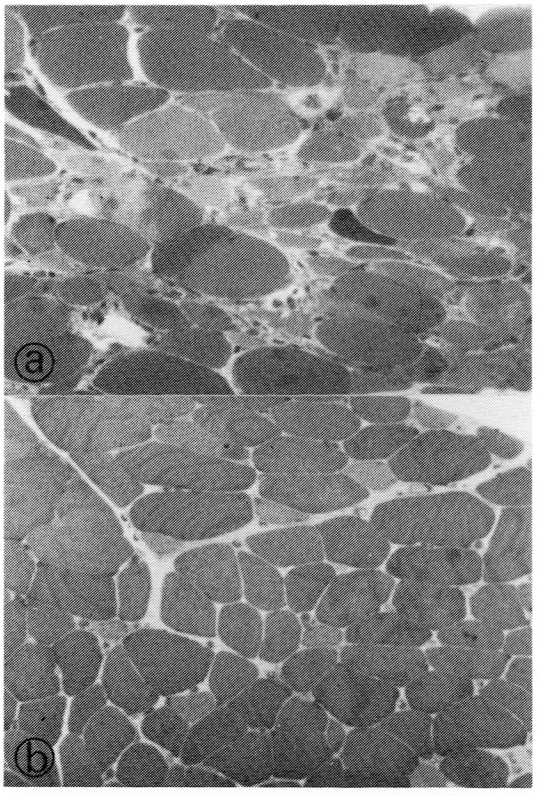



**写真1**　エポン包埋トルイジンブルー染色光顕像（×100）
ⓐ case S.T.　多くの変性筋線維の出現，myophagia を認める．
ⓑ case Y.M.　変性線維が散在して認められる．

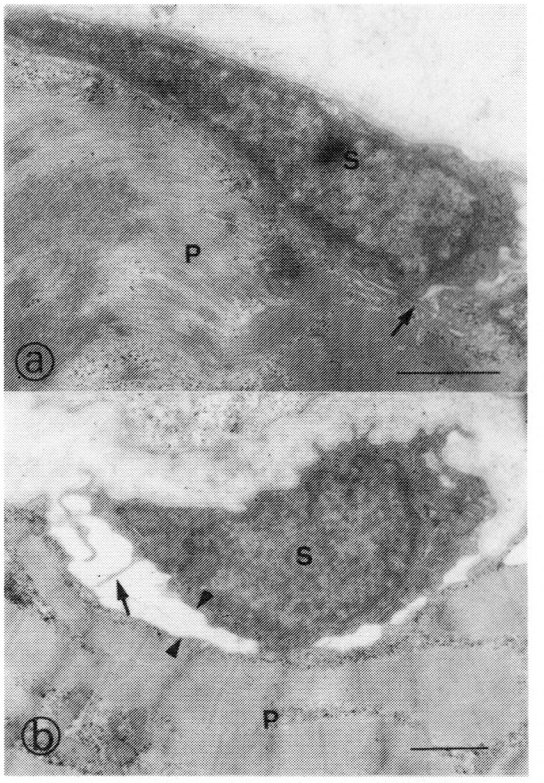



**写真2**　case S.T.の光顕的に変性を示すが壊死に至っていない筋線維の電顕像
ⓐ 筋原線維構築の明らかな破綻，satellite cell の胞体の一部に突起（↑）の形成が認められる．
ⓑ 筋原線維の z-line が不明瞭化し satellite cell には突起の形成（↑）が認められ，parent fiber との間隙の拡大（⧗）を認める．
s：satellite cell
p：parent fiber

察した範囲では壊死線維にはsatellite cellは全く認められなかった.

## 考　　案

satellite cellは1961年Mauro[3]により発見され，その後多くの実験的研究より筋の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.

polymyositisでは，%SCNはcontrolに比し高値を示し，satellite cellの増生が存在すると考えられた．これは黒岩らの昭和56年度の当研究班における報告[6]と一致するものであった．このsatellite cellの増生は，変性筋線維が多くみられる症例において%SCNが高値をとることより，変性筋線維の出現がsatellite cellの増生に重要な役割を演じているものと考えられた．検索した4症例では筋線維の肥大化傾向が全く認められなかったが，%SCNは明らかに増加していたことよりこれらpolymyositisにみられたsatellite cellの増生は，筋線維の肥大化と関連するものではないと考えられる.

satellite cellの増生の主座は，光顕的に明らかにみられるような変性の強い筋線維ではなく，電顕的にのみ軽度の構造異常を認める筋線維にあり，また，特定径の筋線維に由来するものでもなかった.これらの所見は,昨年述べたmyotonic dystrophyにみられる傾向とほぼ一致するものであった.

筋線維径とsatellite cellの出現，その性状との関連をみると，case Y.M.，case K.O.や神経原性萎縮がその筋線維変化の中心となっているcaseT.K.では小径筋線維に分布するsatellite cellは少なかった．しかしながら筋線維変性の強いcase S.T.では10$\mu$前後の小径線維が多く認められ，これらの筋線維にも比較的多くのsatellite cellが認められた．このような所見はcase S.T.にみる小径筋線維の多くは非常にactiveな再生筋線維であり，case Y.M.，case K.O.やcase T.K.における小径線維は次第に変性が進行しつつある，あるいは活性が低いものであることを示すものであろう.

検討したpolymyositisでは壊死に至った線維には全くsatellite cellは認められず，変性壊死には至らないが明らかに変性像がみられる線維においてはsatellite cellは突起の形成及びparent fiberとの間隙の拡大を示しており，parent fiberの変性に伴いほとんどのsatellite cellが遊離してしまうことが推測された．一方myotonic dystrophyでは既にのべたごとく壊死線維にもsatellite cellがみられたが，そのsatellite cellはparent fiberと同様に変性していた．この所見は，polymyositisではその病的過程が筋線維のみに存在し，satellite cellにはおよばないのに対しmyotonic dystrophyでは筋線維のみならずsatellite cellにもその病的過程が存在することを示すものかもしれない.

## 結　　語

①検討したpolymyositis全例において，%SCNは増加していた.

②satellite cellの増生は特定径の筋線維と関連するものではなかった.

③%SCNの増加は，変性筋線維の出現頻度の高い筋により強かった.

④明らかな壊死におちいった線維には，satellite cellは認められなかった.

⑤壊死には至らない変性筋線維には，稀にsatellite cellが認められ，その細胞内構築は良く保たれ，胞体はしばしば突起を形成し，parent fiberとの間隙が拡大していた.

## 文　　献


1) 茂在敏司，河村　宏，小西慎吾，竹中正純，増井義一，篠田恵一：筋緊張性ジストロフィーにおけるsatellite cellの電顕的研究．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」(三好班)，昭和58年度報告書，1984，p. 106.

2) Walton, J.N. & Adams, R.D.：Polymyositis. Livingston, Edinburgh, 1958.

3) Mauro, A.：Satellite cell of skeletal muscle fibers. J. Biophys. Biochem, Cytol., 9：493, 1961.

4) Schmalbruch, H. & Hellhammer, U.：The

number of satellite cells in normal human muscle. Anat, Rec., 183 : 279, 1976.

5) Wakayama, Y., Schotland, D.L., Bonilla, E. and Orecchio, E. : Quantitative ultrastructural study of muscle satellite cells in Duchenne dystrophy. Neurol, 29 : 401, 1979.

6) 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.

# 33）実験的再生筋における筋芽細胞増殖因子の研究

高　瀬　貞　夫*

研究協力者　小　林　和　夫*　鈴　木　博　義*　関　沢　　剛*

## はじめに

損傷筋の再生は，除神経しても生じる事，活性化した筋衛星細胞においての形質膜にcaveolaeがしばしば出現する事[1]などより，損傷筋筋線維から衛星細胞へ何らかの情報が伝達され，衛星細胞の分裂増殖がおこると考えられている．しかしながら静止状態にあった衛星細胞を活性化させる細織内の因子については，いまだ明らかにされていない．

そこで我々は本班会議において検討してきた実験的再生筋の結果[2]をもとに，損傷筋における筋再生の活発な時期の筋ホモジナイズ液を使い，培養筋細胞Ｌ６の増殖に及ぼす因子について検討した．

## 材料と方法

(1)培養細胞の増殖性の測定

培養細胞としてラット由来の筋芽細胞Ｌ６(Flow Laboratories Inc.)を用い，15mmプラスチックマルチウェルに種々の濃度（$4\sim5\times10^3$／dish，$4\sim5\times10^4$／dish，$4\sim5\times10^5$／dish）で細胞を培養した．24時間後PBS（－）にて洗滌，1ml／dishの培養液にて培養．０，１，２，３，４日後に0.25%トリプシン処理にて細胞浮遊液を作製，0.5%トリパン青を0.5ml加え，生きた培養細胞のみを血球計算盤にて算出した．

さらに細胞濃度$4\sim5\times10^4$／dishの培養については９日間，24時間毎，同様の方法で細胞数を算出した．各値は４検体の平均から求めた．培養液は90%ダルベッコMEM，10%牛胎児血清及び100単位／mlペニシリン，100μg／mlストマイ混合液を用いた．培養は炭酸ガス培養器を使用，５%$CO_2$，95%空気，飽和水蒸気下で37～38℃で行った．

(2)正常筋及び再生筋のホモジナイズ液の作製

250gウィスター系雄ラットの前脛骨筋を無筋的に露出，約5mmの横切開を５～６回加えた後縫合，３日目の損傷筋を採取した．結合織を除去した後，細切し４倍量の培養液とともにホモジナイズした．2000rpm，15分間遠心し培養液にて40%ホモジナイズ液を作製，その上清を0.45ミクロン

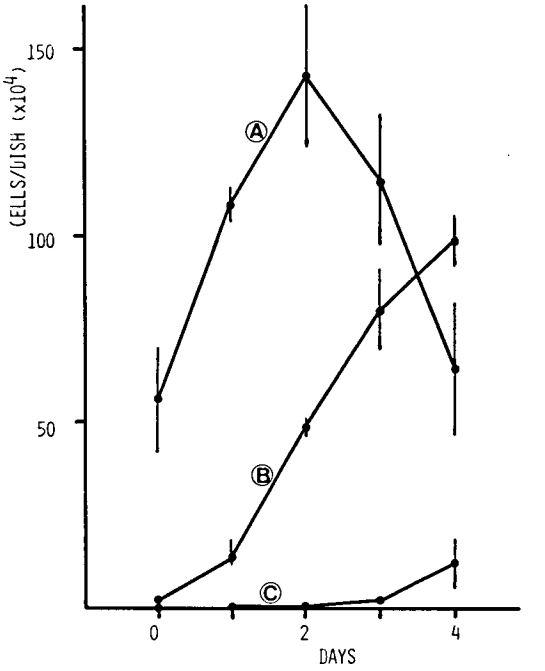



図１　種々の細胞濃度における筋芽細胞Ｌ６の増殖．
Ａ：$4\sim5\times10^5$／dish
Ｂ：$4\sim5\times10^4$／dish
Ｃ：$4\sim5\times10^3$／dish

＊東北大学医学部脳研脳神経内科

フィルター (Gelman Sciences Inc.) に通した．正常筋ホモジナイズ液については，前脛骨筋に損傷を加えず，同様の方法で作製した．

(3)筋芽細胞増殖促進活性の測定

筋芽細胞 L 6 を15mm プラスチックマルチウエルに 4 ～ 5 ×$10^4$ ／dish 培養し，24時間後に PBS (－) で洗滌．培養液を①1.6%，0.16%，0.016%の再生筋ホモジナイズ液，②同様の濃度の正常筋ホモジナイズ液，及び③対照として筋ホモジナイズを添加しない培養液ととりかえた．72時間培養後トリプシン処理後，(1)と同様にして培養細胞数を算出した．

## 結　　果

(1)筋芽細胞 L 6 の増殖性の検討

培養細胞密度が 4 ～ 5 ×$10^5$ ／dish で培養した場合 (図 1 - A)，2 日目で細胞数がピークに達する．4 ～ 5 ×$10^4$ ／dish の場合 (図 1 - B)，2 ～ 3 日に増殖性が著しく，4 日目頃に細胞数がピークに達する (図 2)．4 ～ 5 ×$10^3$ ／dish の場合 (図 1 - C) は，増殖性は極めて遅い．以上の結果より 4 ～ 5 ×$10^4$ ／dish で培養し，培養 3 日目の細胞数において増殖性を検討するのが適当と考えられた．

(2)筋ホモジナイズ液による筋芽細胞増殖促進活性の検討

表 1 のごとく，①正常筋ホモジナイズ液を種々の濃度で添加した場合，培養 3 日目の細胞数は 4.01～6.00×$10^5$ ／dish であり，対照 (5.55±0.95×$10^5$ ／dish) に比し，増殖性において有意の差は認められなかった．又②再生筋ホモジナイズ

表 1　正常筋及び再生筋モホジナイズ液の添加における筋芽細胞 L 6 の増殖．

| | 培養 3日目の細胞数 (×$10^5$ /dish, n=4) |
|---|---|
| 対照 | 5.55 ± 0.95 |
| 正常筋の添加 | |
| 1.6 % | 4.91 ± 0.69 |
| 0.16 % | 4.84 ± 0.83 |
| 0.016 % | 5.27 ± 0.73 |
| 再生筋の添加 | |
| 1.6 % | 5.48 ± 0.73 |
| 0.16 % | 5.62 ± 0.79 |
| 0.016 % | 5.11 ± 0.73 |

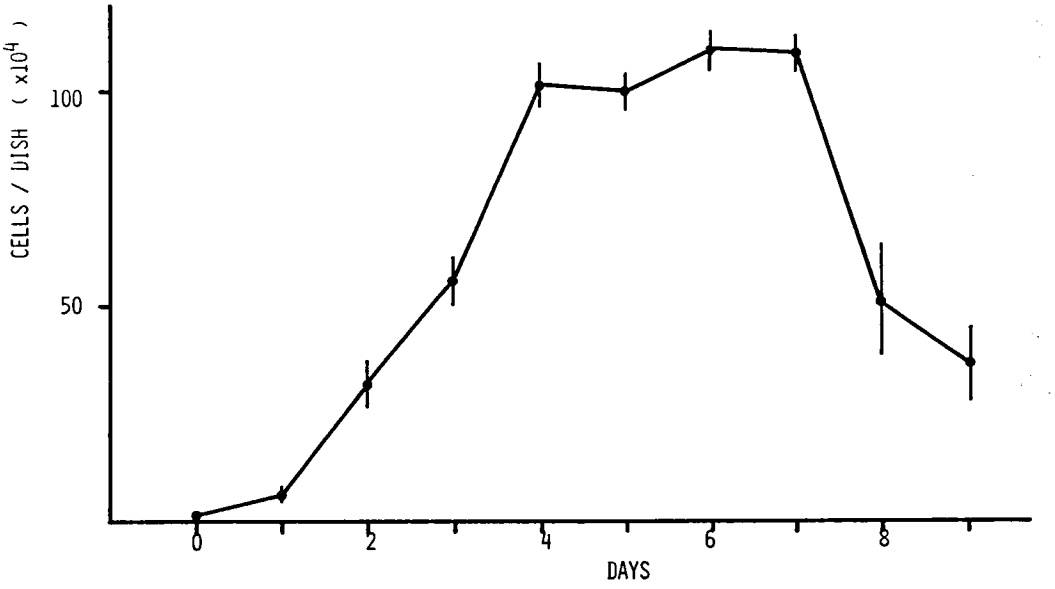



図 2　筋芽細胞 L 6 の増殖．細胞濃度 4 ～ 5 ×$10^4$ ／dish で培養した場合の増殖曲線を示す．

液を種々の濃度で添加した場合の細胞数（4.38～0.41×$10^5$／dish）にも，対照との間に有意差はみられなかった．

## 考　　察

近年，筋芽細胞の増殖因子として，ソマトメジン類（somatomedin A, C, multiplication-stimulating activity）[3]，牛下垂体及び脳からのfibroblast growth factor[4]，トランスフェリン等が明らかにされてきた．又筋細胞の融合を促進するものとしてインスリン，リノレン酸等の不飽和脂肪酸が知られてきた．さらにAllenら[4]はfibroblast growth factor（下垂体由来）は局所の筋芽細胞を増殖させ，ソマトメジンは全身の筋組織の成長に関与するのであろうと考えている．しかしながら再生筋組織中からの筋芽細胞の増殖因子はまだ明らかにされてはいない．

筋芽細胞の増殖促進因子は本実験系においては見出せなかった．その原因として増殖促進因子が培養液で失活される可能性，損傷筋をホモジナイズした時，沈澱側に因子が含まれている可能性なども否定はできないが，ホモジナイズ液の添加濃度の検討も必要と考えられる．

筋芽細胞の増殖促進因子を検索するうえで，筋損傷，再生過程のどの時期の筋肉を採取するかも重要である．我々の実験結果（57年度本班会議報告[2]）から，筋再生過程はラットの前脛骨筋を切断損傷した場合，5時間後より壊死線維の周囲に多核白血球が出現，12時間後にマクロファージを含む単核球の浸潤がみられる．3～5日後に再生筋がRNA染色（メチルグリーン・ピロニン染色）にて強陽性となり（図3），その後しだいに染色性が減少する．したがって今回の実験においては，活発な再生の初期段階である損傷3日目の筋を採取，ホモジナイズ液を作製した．しかし今後さらに再生筋組織の採取時期についても検討すべきであろう．

又，胎生期における筋芽細胞と衛星細胞の増殖性において，相異も指摘されている点より，衛星細胞のクローン培養下での実験系が必要とも考えられた．

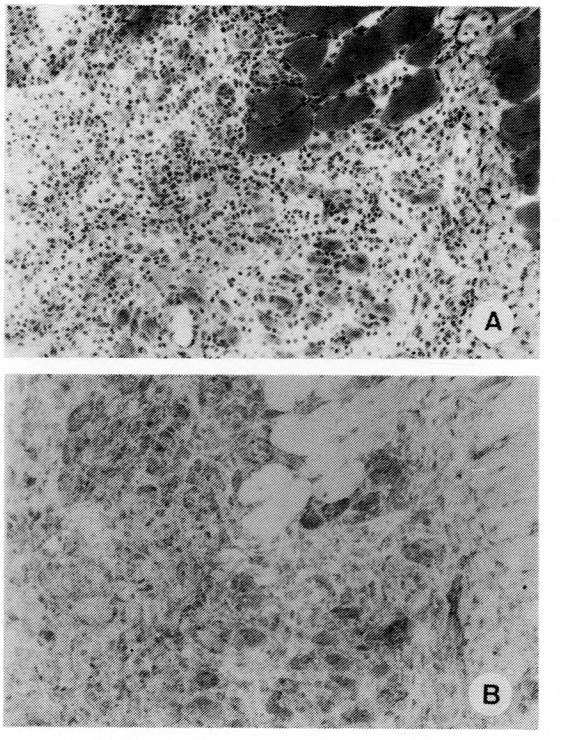



図3　損傷後3日目の再生筋．好塩基性の胞体をもつ多数のmyocyte, myotubeが出現し（A：HE染色，×100），著明なRNAの増加が認められる（B：RNA染色，×100）．

以上のごとく再生筋組織における筋芽細胞増殖促進因子を検討するには，いくつかの問題点はあるが，筋芽細胞増殖因子を明らかにしてゆく事は，変性再生過程や種々の神経筋疾患の病態を解明するうえでも重要であろう．

## ま　と　め

損傷による再生筋のホモジナイズ液を培養液に添加し，培養筋細胞L 6の増殖に及ぼす影響を検討した．その結果再生筋ホモジナイズ液添加群と，対照群（非添加群）との間に有意の差は得られず，本実験系においては再生筋組織中からの筋芽細胞増殖促進因子は明らかにしえなかった．

## 文　献


1) Terävainen, H.：Satellite cells of striated muscle after compression injury so light as not to cause degeneration of muscle fibers. Z. Zellforsch., 103：320-327, 1970.

2) 高瀬貞夫，小林和夫，ほか：実験的再生筋に関する研究．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. 48.

3) Ewton, D.Z. and Florini, J.R.：Relative effects of the somatomedins, multiplication-stimulating activity, and grouth hormon on my oblasts and myotubes in culture. Endocrinology, 106：577-583, 1980.

4) Allen, R.E., Dodson, M.V., et al.：Regulation of skeltal satellite cell proliferation by bovine pituitary fibroblast growth factor. Exp. Cell Res., 152：154-160, 1984.

# 34）筋衛星細胞活性因子の検討

小　口　喜三夫*

## 目　　的

筋衛星細胞の活性化因子として，神経切断，血流遮断，自律神経ブロック剤（reserpine）について $^3$H-thymidine radioautography により検討し報告してきたが，今回はこれらの因子の組合わせによる検討と電顕 radioautography による形態学的観察を加えた．

## 方　　法

生後15日の ddy 系雄マウス各々5匹について reserpine 1.5mg／kg を腹腔内に注射後直ちにエーテル麻酔し右後脚の坐骨神経を切断，同様に reserpine を注射後，右後脚の近位部を手術縫合糸で結紮し血流遮断30分間行った．左後脚はコントロールとした．上述の処置後24時間から各々のマ

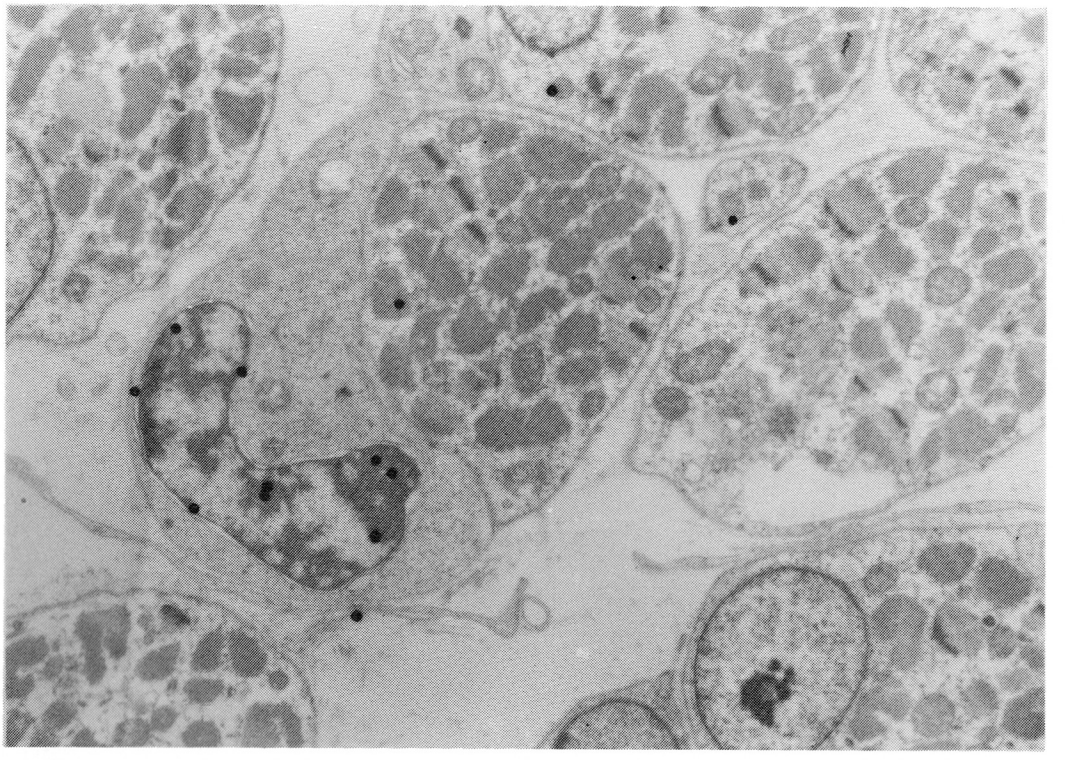


図1　筋衛星細胞は胞体が大きく，ミトコンドリアを認める．核は比較的 euchromatin に富む．$^3$H-thymidine 露光銀粒子が認められる．×9,000

＊国立長野病院

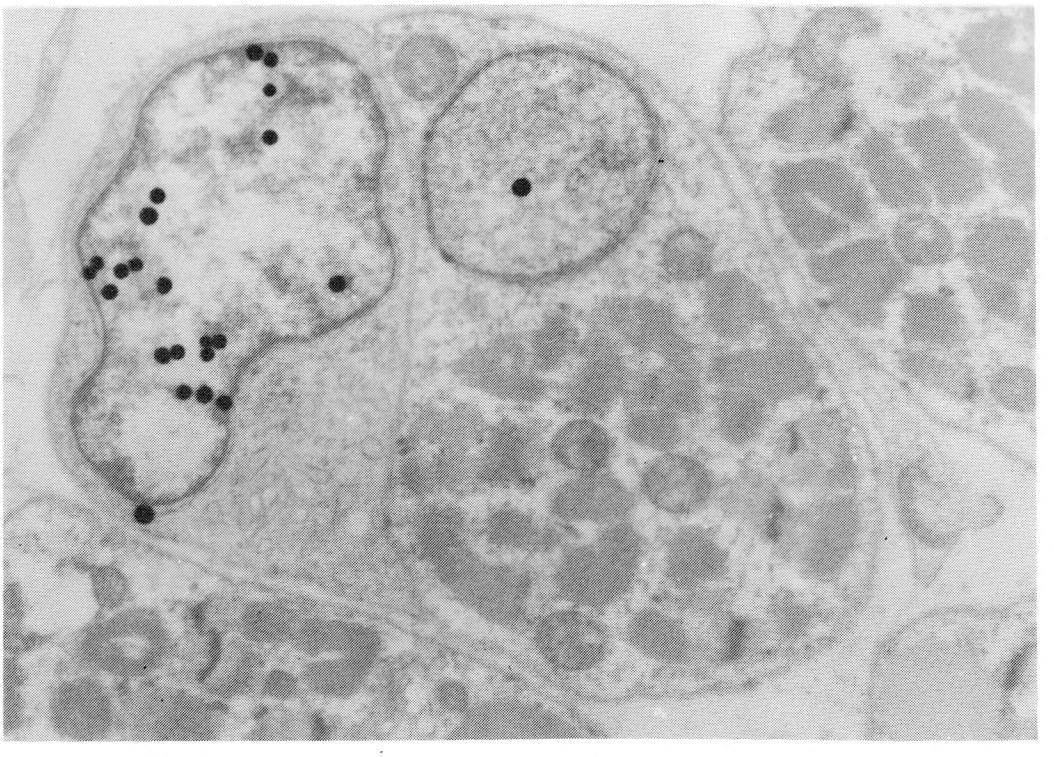


図2　衛星細胞の核は不正形を呈し，euchromatin に富む．$^3$H-thymidine により露光された銀粒子が観察される．筋核は円形．×15,000

ウスに $^3$H-thymidine 30～50$\mu$ci／bwg を4回に分け，6時間毎に腹腔内注射し，実験開始48時間後に後脚の gastrocnemius を採取，3％グルタールアルデヒドで固定，1％オスミウム酸で後固定したのち，脱水，epon-araldite に包埋．厚さ1$\mu$m の標本を作製し dipping 法により SAKURA NRM$_2$ を塗布．4℃の冷蔵庫内で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うすく染色後，各標本を油浸レンズで観察し標本中の $^3$H-thymidine でラベルされた衛星細胞核を算出．標本の面積を画像解析装置で測定．1mm$^2$ の単位面積あたりのラベルされた衛星細胞の核数を labeling index とした．光顕標本の一部は超薄切片とし，SAKUR NRH$_2$ を loop 法により塗布し4～6週間4℃の冷蔵庫内で露出し，gold-latensification により増感し phenidon で現像，定着後 Reynolds で染色，日立 HS-9型電子顕微鏡で観察した．

## 結　　果

Reserpine＋denervation 群の labeling index は2.07, reserpine＋ischemia の labeling index は3.28, control は1.26であった．電子顕微鏡による観察では各群間での形態学的な差は認められなかったが，筋衛星細胞で $^3$H-thymidine を取り込む核（活性衛星細胞）は euchromatin に富む場合が多く，胞体も核に比較して多く microorganelle が多いものが認められた（図1，2）．一方 $^3$H-thymidene を取り込まない衛星細胞核と差がないものも観察された．

## 考　　察

Satellite cell の活性化因子としては，streptozotocin-induced diabetes mellitus, glucocorticoid, growth hormon, mechanical stretch, compression, injury, motor activity や denervation が挙げられている．マウスおよびラットにおける denervation による活性については，形態学的検討，satellite cell の核の増加や radioautography による研究がある．Denervation 後 2 ～ 7 日で satellite cell が増加，長い期間のものでは30日まで増加があったというものまである．若いマウスやラット程 satellite cell の活性があり，adult になると satellite cell の活性はなくなる．加齢とともに satellite cell の活性は減少する．一方栄養障害により satellite cell の活性は減少する．今回の我々の実験では，denervation, ischemia で satellite cell の活性は増加，reserpine 大量投与による自律神経終末の非可逆的変化による自律神経ブロックでは satellite cell の活性が減少するという結果を得た．さらに reserpine＋denervation 群と reserpine＋ischemia 群の間に差が出たが，数を増して検討してゆく．Satellite cell の活性化がどのように行われるか明らかではない現在，これらの実験に電子顕微鏡 radioautography 等により微細構造の面からの観察も加えてゆく予定である．

## 文　　献


1) Ontell, M.：Muscle satellite cells：A validated technique for light microscopic identification and a quantative study of changes in their population following denervation. Anat. Rec., 178：211-228, 1974.
2) McGeachie, J. and Allbrook, D.：Cell proliferation in skeletal muscle following denervation or tenotomy. Cell Tissue Res., 193：259-267, 1978.
3) Snow, M.H.：A quantative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. Anat. Rec., 207：593-604, 1983.
4) Campion, D.R.：The muscle satellite cell：A review. Int. Rev. Cytol., 87：225-251, 1984.

# VII. 蛋白代謝

# 35）筋ジストロフィー鶏胚の交感神経筋における蛋白質合成能の特異性についての研究（第一報）

堀　眞一郎*

研究協力者　杉浦弘子*　大谷幸子*　椿　忠雄**

## 目　的

筋ジストロフィー鶏（ニューハンプシャー種413系）は遺伝的に筋ジストロフィーを発症する実験動物であり，遺伝的筋ジストロフィー症の発症の機序を研究するのに用いられる．筋ジストロフィー鶏における遺伝子異常がいかなる機序で筋ジストロフィーの発症をひきおこすのか未だ不明である．私達は neurite outgrowth を指標として交感神経節の神経成長促進因子（以下 NGF と略す）に対する反応性を検索したところ，筋ジストロフィー鶏では正常対照鶏に比べ，より早期に NGF に対する反応性が低下することをみいだした[1]．この反応性の低下は筋ジストロフィーの発症に先行していた．交感神経節の NGF に対する反応性の低下がはたして遺伝子情報発現のレベルでとらえうるのか否かを検討するため，交感神経節及び後根神経節における蛋白質の生合成の特異性を二次元電気泳動法を用いて検索した．

## 実験方法

### 神経節の調製

ニューハンプシャー種の筋ジストロフィー鶏（413系）及び同種の正常鶏（412系）の受精卵を孵卵し，20日胚を使用した．交感神経節は第6頸椎から第2胸椎にかけて椎骨横突起の間に介在する左右3個ずつ計6個及び膨大した腰部脊椎の腹側左右端に数珠状に連らなる神経節を摘出し，前者を頸部交感神経節，後者を腰部交感神経節として使用した．後根神経節は交感神経節の摘出後，その直ぐ背側に位置する神経節を，交感神経節と同様に頸部後根神経節，腰部後根神経節と区別して使用した．

### 〔$^3$H〕-leucine による蛋白質の標識

摘出した神経節は L-leucine を加えていない BGJb medium（ペニシリン，ストレプトマイシン及びファンギゾン含）を調製し，この medium 0.3 ml に L-〔4，5-$^3$H〕-leucine (5mci／ml) 5$\mu$l (0.2nmoles) を添加した培養液中で95% $O_2$ - 5 % $CO_2$ 下で37℃，24時間培養した．培養後，神経節を冷却した acetone　1 ml で 3 回洗い，5M Urea-1.5M thiourea-0.5% $\beta$-mercaptoethanol 液中に glass homogenizer で懸濁し，遠心後，上清を二次元電気泳動にかけ，可溶化されたペプチドを分離した．

### 二次元電気泳動

O' Farrell 法に平林[2]による改良を加えた方法で行った．内径0.5mm 長さ8.5cm の毛細管に 1 % agarose 液 A，B 及び C（表 1）を順次1.8cm，3.6cm，0.6cm と吸い上げて，一夜 4 ℃に保存しゲル化した後，アルカリ側に上記の如く urea 処理したサンプルを2$\mu$l のせ，まず電圧が350V に上るまで定電流30$\mu$A/tube で流し，次後350V の定電圧として1800V・時間となるまで泳動を 6 ℃の低温室で行った．urea 処理したサンプルにはスポットの位置の相対的指標として，正常鶏の大胸筋を urea 処理して得た可溶分画を泳動の直前に加えた．泳動後，10% TCA- 5 % Sulfosalicylic acid 液に 1 ～ 2 分間浸し，白濁として認められる蛋白質の分離のパターンが良好であることを確認し，純水で30秒～ 1 分間洗った後，二次元目の SDS-polyacrylamide ( 4 -17%，w/v，gradient) slab gel (95(W) ×60(H) mm) 電気泳動にかけた．

＊東京都神経科学総合研究所神経生化学
＊＊東京都立神経病院

表1 Compositions of agarose gels for isoelectric focusing.

| Agarose-urea solution | | | |
|---|---|---|---|
| agarose IEF | 0.04 gm | | |
| sorbitol | 0.48 gm | | |
| water | 2.0 ml | | |
| urea | 1.2 gm | | |
| thiourea | 0.46 gm | | |
| **1% Agarose solution** | **A** | **B** | **C** |
| | acidic | neutral | basic |
| agarose-urea solution | 0.4 ml | 0.6 ml | 0.4 ml |
| Pharmalyte pH 2.5-5 | 40 μl | - | - |
| Pharmalyte pH 3 - 10 | - | 40 μl | - |
| Pharmalyte pH 4 - 6.5 | - | 20 μl | - |
| Pharmalyte pH 8 - 10.5 | - | - | 40 μl |

SDS-polyacrylamide gel電気泳動を40V，10分，次いで，80V，約2時間行った後，0.1% Coomasassie brilliant blue R250-50% TCAで染色固定，7%酢酸-25% methanolで脱色を行った．指標として添加した筋蛋白の分離パターンから，蛋白質相互の分離の良否を判定した．次いで，Enlightningで処理した後，乾燥し，Kodak社製X-ray film (X-Omat AR) に乾燥ゲルを密着させて，−80℃，15日〜20日間放置し，〔$^3$H〕ラベルされた蛋白質をX-ray film上に感光し観察した．

## 結　　果

### 交感神経節における蛋白質合成能

20日鶏胚の交感神経節をL-〔4，5-$^3$H〕-leucineと12時間培養してラベルされる蛋白質は等電点7から4.5及び分子量94,000から30,000の間に主として観察された（図1）．しかし，X-ray filmとの密着時間を長くすることにより，よりアルカリ側，より酸性側及びより高分子量，より低分子量にわたってスポットが観察された．正常対照鶏と筋ジストロフィー鶏の間の蛋白質合成能について比較したところ，生合成の盛んな蛋白質には生合成の欠損という様な大きな差は認められなかったものの，生合成のゆっくりしたものあるいは非常に代謝の速いもの（いずれかを現在のところ判定できないが）において，生合成の欠損あるいは生合成量の量的な差が認められた．即ち，正常対照鶏では図1に矢印で示す様な蛋白質が認められるのに対し，筋ジストロフィー鶏では欠損もしくは低い生合成しか認められなかった．これらの差は頸部交感神経節でも，腰部交感神経節においても一様に認められた．

### 後根神経節における蛋白質合成能

20日鶏胚の後根神経節において，交感神経節と同様に蛋白質生合成能の特異性を検索したところ，生合成の盛んな蛋白質は等電点7から4.5，分子量94,000から30,000の間に観察された（図2）．しかし，X-ray filmとの密着時間をより長くすることにより，他の等電点及び分子量領域にもスポットが認められた．正常対照鶏と筋ジストロフィー鶏の間で比較したところ，生合成の盛んな蛋白質のみならず，生合成のゆっくりしたものあるいは代謝の速いものにおいても，生合成の欠損といった差は今のところ認められなかった．図2は腰部後根神経節での結果であるが，頸部後根神経節でも同様の結果であった．生合成の盛んな蛋白質は比

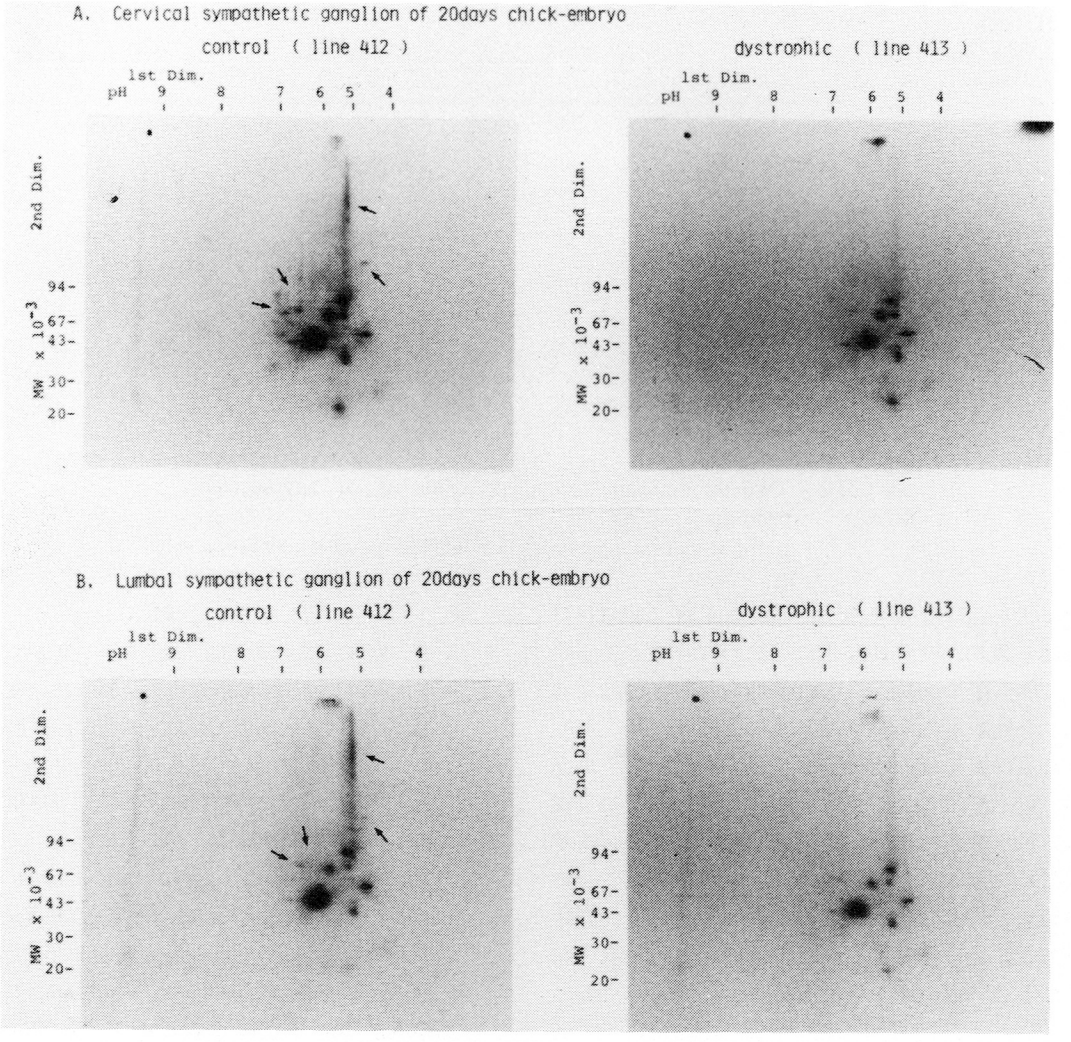



図1　Two-dimentional gel electrophoresis of synthesized proteins.

較的狭い等電点及び分子量の範囲に局在していることから，これらに近い等電点及び分子量の蛋白質については，電気泳動を行う際に，その領域に重点をおいて，拡大して検索する必要がある．交感神経節と後根神経節の間の蛋白質合成能については，生合成の盛んな蛋白質においては共通していた（図1，図2）．しかし，生合成のおそいかあるいは代謝の速い蛋白質においては多くの差を認めた．これらの相違については，更に検索中である．

## 考　　察

筋ジストロフィー鶏の骨格筋自身の異常に関する研究は数多く報告されているが，神経系，殊に交感神経系の異常については不明である．近年，骨格筋への交感神経の直接支配が確かめられ[3),4)]，交感神経の骨格筋に対する役割が注目されている．ここで報告した実験結果は交感神経節の蛋白質合成能が正常対照鶏と筋ジストロフィー鶏とでは異なることを示している．これらの相違と筋ジストロフィー発症の機序との関連については今後の研

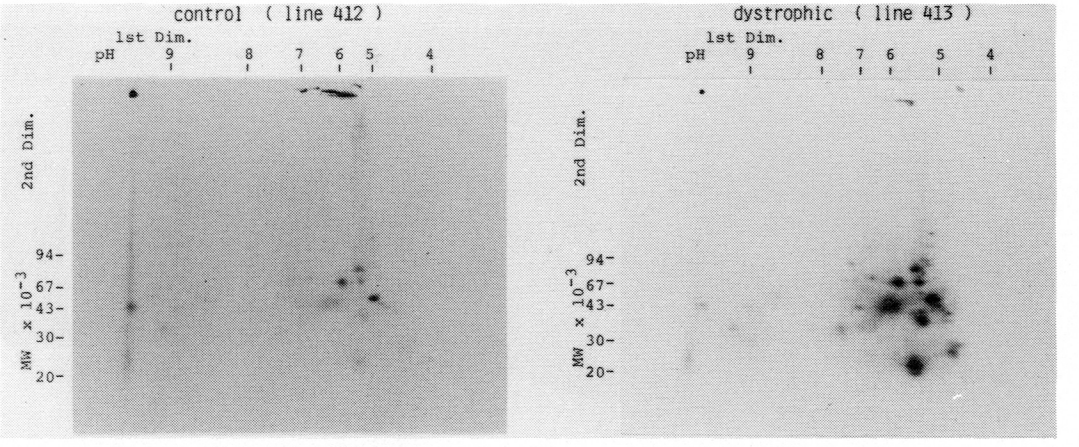



図2　Two-dimentional gel electrophoresis of snythesized proteins.
Lumbal dorsal root ganglion of 20days chick-embryo.

究にまたねばならないが，筋ジストロフィー鶏における異常が交感神経系にも認められることを示唆するものである．ここでは20日鶏胚での結果を示したが，孵化後の交感神経節では鶏胚時と異なった蛋白質合成能のパターンを示していた（未呈示データ）．これは，交感神経節における遺伝子情報発現が個体発生の時期により変化することを示唆しているが，筋ジストロフィー鶏における発症の時期と蛋白質生合成能の特異性の変化を比較検討することによって，発症と遺伝子情報発現の特異性との関連が明らかになるものと考えられる．

## ま　と　め

1．20日鶏胚の交感神経節での蛋白質合成能の特異性において，正常対照鶏と筋ジストロフィー鶏との間に質的差が認められた．それらの差は頸部交感神経節においても腰部交感神経節においても同じであった．

2．生合成の盛んな蛋白質については生合成能に交感神経節と後根神経節の間で質的な差は認められなかったが，生合成のおそい蛋白質あるいは代謝の速い蛋白質については差が認められた．

3．生合成の盛んな蛋白質は等電点及び分子量共に比較的狭い範囲に局在していた．

## 文　　献

1）椿　忠雄，堀　眞一郎，大谷幸子：筋ジストロフィー鶏及び正常鶏の後根神経節及び交感神経節の神経成長促進因子に対する反応性の加齢にともなう変化について．「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年度研究報告書，1984，p. 558.

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

3）Kobayashi, T., Tsukagoshi, H. & Shimizu, Y.：Trophic effects of sympathetic ganglia on normal and dystrophic chicken skeletal muscles in tissue culture. Experiment. Neurol., **77**：241, 1982.

4）Kobayashi, T., Matsumoto, Y., Tsukagoshi, H., Kayanuma, K. & Hori, S.：Fine structure of the synaptic endings between sympathetic axons and skeletal muscle cells and of the varicosities in the bundles of neurites in tissue culture. Experiment. Neurol., **85**：187, 1984.

# 36) Rimmed Vacuole を伴う Distal Myopathy における カテプシンB及びHの局在

木 南 英 紀*

研究協力者　勝 沼 信 彦* 伊 井 邦 雄** 檜 澤 一 夫**
杉 田 秀 夫*** 埜 中 征 哉***

## はじめに

Rimmed Vacuole 型 distal myopathy は常染色体劣性遺伝で，本邦において詳細に検討されてきた．近年，この特異なミオパチーにおけるリソゾームの異常が示唆され，筋線維の変性とリゾソームのプロテアーゼとの関連に着目されつつある．

リソゾームに含まれるプロテアーゼの中でもいわゆるチオール性カテプシン群（カテプシン B, H 及び L）は強いタンパク分解活性（筋構造タンパクの分解も含め）を有し，細胞内タンパク質の分解において主要な役割を荷っていることが明らかになっている．Muscular dystrophy と異なり Distrl myopathy は phagocytes の浸潤を伴わないのが特徴であり，Rimmed vacuoles そのものがチオール性カテプシン群を含むかどうかの検査は本症において，リソゾームの異常を伴うか否か，又筋萎縮との関連を調べる上でも基本的な課題と思われる．

我々はこのような distal myopathy の病態を明らかにするため，カテプシン B, H の筋組織における局在を免疫組織学的に検討した．合わせてチオール性カテプシン群に対する内在性阻害タンパクの局在についても調べた．

## 材料と方法

国立神経センターで保存されている distal myopathy 1例の筋生検標本について組織学的検査（HE, Gomori-Trichrome 染色）並びに免疫組織学的検査を行った．

ヒトカテプシン B 及び H の精製は唐渡ら[1]及び Kirschke ら[2]のラットカテプシン B 及び H の精製法を修飾して行った．凍結肝を用いるため，リソゾーム膜が破れ，細胞質に存在する内在性インヒビターと複合体を形成している．そこで肝ホモジネートを pH4.5で37℃，防腐剤の存在下で incubate し，インヒビターを破壊後，その遠心上清を出発材料として図1の如く精製した．DEAE-cellulose でカテプシン B と H を分離し，その後カテプシン B は CM セルローズ，アフィゲル501を，カテプシン H は ConA-セファローズ，ハイドロオキシアパタイトを行い，それぞれ均一な標品を得た．一方，カテプシン B, H, L などのチオールプロテアーゼに対する細胞内チオールプロテアーゼインヒビター（TPI）3種の中，皮膚，消化管上皮などの上皮性起原の細胞に多量に存在する TPI-$\alpha$ をヒト皮膚上皮を出発材料としてラット TPI-$\alpha$ と全く同じ方法[3]で精製し均一なタンパク標品を得た．100$\mu$g のプロテアーゼ及び TPI-$\alpha$ を家兎皮内に2週間毎に3回注射し，最終注射後3～4週間後に採血した．いずれの抗体もそれぞれの抗原に特異的であることは免疫拡散二重法及び Western blotting で確認した．

硫安分画，DEAE-セルロースクロマトグラフィーのステップを経て得た IgG をペプシン消化し，F (ab′)$_2$ を得た．ペルオキシダーゼ標識 Fab′ の調製は石川らの方法に従った．即ち F (ab′)$_2$ を還元し，ヒンジ部の SH 基を露出させ，一方でマレ

＊徳島大学医学部酵素研
＊＊徳島大学医学部第一病理
＊＊＊国立武蔵療養所神経センター

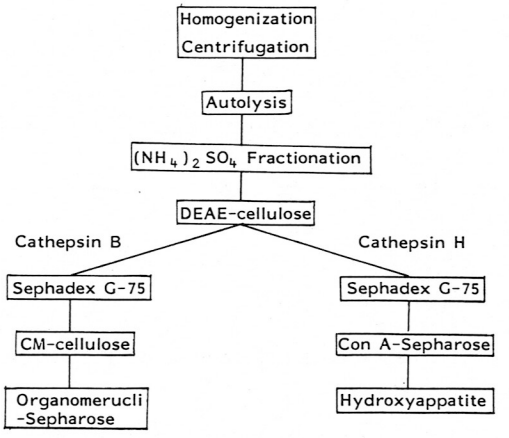



図1　ヒト肝からのカテプシンB及びカテプシンHの精製法

イミド基をペルオキシダーゼに導入し，それら両者を反応させペルオキシダーゼ標識Fab′を調製する方法である．免疫組織化学法は今川らの方法[5]を若干修飾して行った．

ホルマリン固定凍結切片の内在性ペルオキシダーゼを$H_2O_2$でブロックし，対照血清で処理後，切片を先に調製したペルオキシダーゼ標識抗体と反応させ，3,3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride で染色した．後染色はヘマトキシレンで行った．

## 結　　果

患者罹患筋切片をHematoxylin-Eosin染色及びGomori-Trichrome法で染色したところ，筋線維の大小不同，間質の増加，中心核の増加などの筋病変と共に，内容に塩基好性物質をもついわゆるRimmed vacuoleが観察された．そこで抗カテプシンB-Fab′-ペルオキシダーゼ複合体を用いて切片を直接法で免疫組織学的染色を行った結果が図2に示されている．筋肉にみられるRimmed vacuoleが強く濃染されており，筋細胞そのものはbackgroundレベルの染色しかみられない．低倍率でみると，小さなものから大きなvacuoleまで殆んどすべてのRimmed vacuolesはカテプシンB陽性であった．抗カテプシンH Fab′-ペルオキシダーゼ複合体を用いた検査結果も同様でありRimmed vacuoleのみが強く染色されている（図3）．一方抗TPI-$\alpha$ Fab′-ペルオキシダーゼ複合体を用いての染色結果が図4に示されているが，この場合には，筋細胞，Rimmed vacuoleいずれも陰性であった．

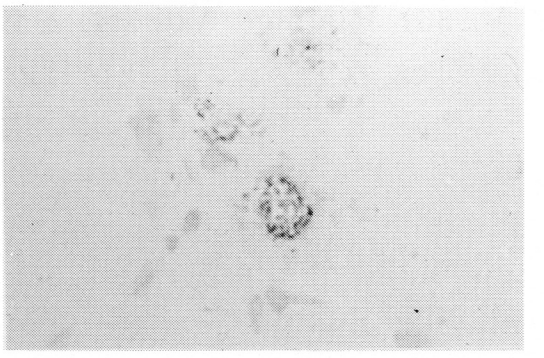


図2　Rimmed vacuole型distal myopathyにおけるカテプシンBの局在．抗ヒトカテプシンB Fab′-ペルオキシダーゼ複合体を用いた免疫組織化学的証明（×800）

## 考　　察

ラットの各種組織におけるカテプシンB，H及びTPI-$\alpha$, $\beta$のレベルをペルオキシダーゼ標識抗体を用いて，サンドウィッチ法で測定した結果では，骨格筋におけるカテプシンB及びHの含量は極めて弱く，腎臓の約1/10及び1/27であった．又，正常な骨格筋細胞は抗カテプシンBあるいはH抗体で殆んど染色されず，わずかな浸潤細胞が染色されるのみであった．ヒトにおける本症例においてもカテプシン，TPIいずれも骨格筋のサイトプラズムはbackgroundレベルの染色であり，Rimmed vacuoleのみが抗カテプシンB抗体及び抗カテプシンH抗体によって濃染された．この結果はRimmed vacuolesが，リソゾーム由来であることを強く示唆している．塚越ら[6]はDistal myopathyでカテプシンB & L活性を含む多くのリソゾーム酵素活性の上昇を認めており，Rimmed vacuoleがactiveなlysosomeであり，本症

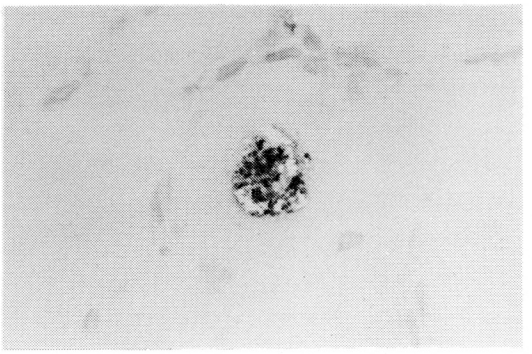


図3　Rimmed vacuole 型 distal myopathy におけるカテプシン H の局在．抗ヒトカテプシン H Fab′-ペルオキシダーゼ複合体を用いた免疫組織化学的証明（×800）

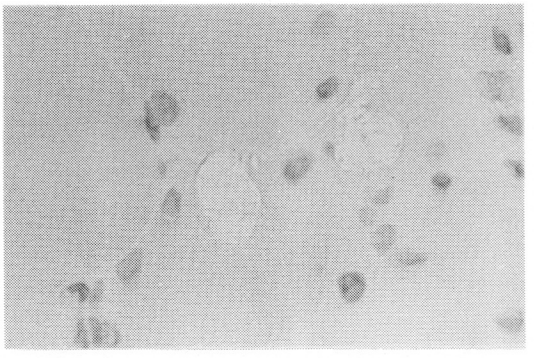


図4　Rimmed vacuole 型 distal myopathy におけるチオールプロテアーゼインヒビター—α（TPI-α）の局在．抗ヒトTPI-α Fab′-ペルオキシダーゼ複合体を用いた免疫組織化学的証明（×800）

の筋変性が vacuoles 内で進行している可能性も考えられる．しかし，活性なプロテアーゼをもつ非常に大きな rimmed vacuoles の成因は何であろうか．肝臓では Antophagie vacuoles の形成と退縮は極めて速く，約10分の半減期で代謝回転しており，そのことは活発なタンパク分解を反映している．従ってリソゾームのチオール性カテプシンを阻害すると vacuoles 中のタンパク分解が抑制され，非常に多数の又，互いにゆ合した大きな vacuoles が形成される[7]．しかし，本症ではカテプシン活性が抑制されているという証拠はない．

Rimmed vacuoles の成因とチオール性カテプシンとの，関係は興味ある今後の課題と思われる．今回の報告は一症例のみの検討であり，今後，多くの症例について検索を重ねると共に，Rimmed vacuole 中の内容物及びカテプシン群を電子顕微鏡及び免疫電子顕微鏡的に追求して，Rimmed vacuole と筋線維変性との関連を追求する必要があると思われる．

## 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) Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P., and Hanson, H.：Cathepsin H：An endoaminopeptidase from rat liver lysosomes. Acta Biol. Med. Germ. **36**：185, 1977.

3) Kominami, E., Bando, Y., Wakamatsu, N. and Katunuma, N.：Different tissue distributions of two types of thiol proteinase inhibitors from rat liver and epidermis. J. Biochem. **96**：1437, 1984.

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 immunohistochemical staining. J. Immunoassay **4**：209, 1983.

5) Imagawa, M., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y., Ishikawa, E., Nitsu, Y., Urushizaki, I., Kanazawa, R., Tachibana, S., Nanazawa, N., and Ogawa, H.：Characteristics and evaluation of antibody-horseradish peroxidase conjugate prepared by using a maleimide compound, glutaraldehyde and periodate. J. Applied Biochemistry **4**：41, 1982.

6) 塚越　廣，松本容秋，佐野元規，石浦章一，杉田秀夫：Distal myopathy の臨床的，形態学的検討と lysosome 酵素活性「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，1984，p. 190.
7) Furuno, K., Ishikawa, T., and Kato, K.: Appearance of autolysosomes in rat liver after leupeptin treatment. J. Biochem. 91: 1485, 1982.

# 37）白血球放出因子による筋崩壊機構の研究

斎田孝彦*

研究協力者　松田修一*　大石京子*
松田享子*　清水公一*

発熱，敗血症，外傷，火傷等に伴って著明は蛋白分解が生じる事が従来より知られていた．Goldberg らは E. coli endotoxin をラットに注射した場合，発熱に伴って骨格筋蛋白の分解が亢進するが，蛋白合成速度には変化のない事を報告している．そうした発熱ラットの骨格筋を *in vitro* で37°C でインキュベートしても蛋白分解の加速状態が持続しているという．またプロスタグランディン $E_2$ 及び $F_{2a}$ とアラキドン酸は骨格筋の蛋白分解を亢進させ，この効果はインドメサジンやチオール・プロテアーゼ阻害剤であるロイペプシンあるいは Ep475によって抑制されることから，おそらくリソゾーム内の蛋白分解を活性化することによるのだろうと推測されている．

一方白血球由来の発熱物質は，視床下部においてアラキドン酸放出を刺激することでプロスタグランディンの合成をもたらし，プロスタグランディン $E_2$ がより直接的に視床下部発熱中枢を刺激して発熱効果をもたらすと考えられている．こうした白血球由来の発熱物質は endogenous pyrogen あるいは leucocytic pyrogen と呼ばれるが，近年マクロファージより分泌されリンパ球T細胞の増殖を誘導する因子として確立されたインターロイキン1（IL-1）とほぼ同一物質ではないかと考えられるようになってきた．本研究では，IL-1あるいは白血球発熱物質が筋組織に与える効果を形態学的に検索する予備実験として，*in vitro* の骨格筋にそれらが直接作用して筋蛋白分解の亢進をもたらすことを示す実験結果を得たので報告する．

＊国立療養所宇多野病院臨床研究部

## 実験方法

ヒト白血球発熱物質はほぼ Dinarello 等の方法に従って作成した．即ちヒト末梢血より Ficoll-Hypaque gradient の変法によって附着性の単球を得，それらを1時間加熱処理した staphylococcus albus により刺激した後24時間インキュベートして培養上澄を得た．実験の一部ではこの培養上澄より発熱物質を分離するため同様に Dinarello 等の方法に従って濃縮の後カラムにかけた．カラムはセファデックス G50ファインを予め0.1％ポリエチレングリコールを含む0.9％食塩で平衡させたものを用い，約15,000dalton のフラクションを得た．この標本を PAG 電気泳動にかけクーマシー・ブリリアント・ブルーで染めると3本のバンドを示す点は Dinarello 等の報告に一致した．しかし彼等が最良の方法としている発熱物質に対する家兎抗血清を作成し，アフィニティークロマトグラフィーにかける方法はとらなかった．また標準的 IL-1 試料として一般的な P388D1株より同様に培養上澄を得，一部は上記の方法に従い精製を試みた．

こうして得た IL-1 標本あるいは白血球発熱物質の IL-1 力価は，それらによる peanuts agglutinin 非凝集性胸腺細胞（PNA－細胞）のレクチン非存在下での増殖誘導能により測定した．発熱物質としての力価は，一般に用いられる家兎に対し1時間後に生じる発熱効果により判定した．

IL-1 あるいは白血球発熱物質の筋組織に対する作用は，幼若ウィスターラットのヒラメ筋及び

長踵指伸筋をGoldbergらの方法によりインキュベートして調べた．Krebs-Ringer bicarbonate pufferに筋中への拡散を亢めるため5mMグルコース，0.1単位/mlのインスリン，血中レベルの5倍のbranchedアミノ酸を投与し，30分間プレインキュベートしたのち，緩衝液で充分透析したIL-1あるいは白血球発熱物質を，多くの場合0.5 rabbit pyrogen dose/mlとして投与し，さらに2～3時間インキュベートした（表1）．

表1　Muscle incubation with IL-1

1. Soleus or extensor digitorum longus muscles were dissected from male Wistar rats (60-80g).
   Contralateral muscles were used for control experiments.
2. Preincubated at 37°C for 30 minutes in 1.5ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 5mM glucose, 0.1 unit/ml of insulin and five times the normal plasma concentration of branched-chain amino acids, and equilibrated with 5% carbon dioxide and 95% oxygen.
3. Incubated with IL-1 (1 to 2 rabbit pyrogen doses per milliliter) for 3 hours.

蛋白分解あるいは合成はインキュベーションの間に1mg湿重量当りの筋組織よりとり込まれた，あるいは筋組織より放出された，nmole単位のチロシン量で表わした．また白血球発熱物質の筋組織蛋白分解亢進の作用機序におけるプロスタグランディンの役割を間接的に知るため，$3\times10^{-6}$ M濃度のインドメサジン投与が蛋白分解亢進に与える影響をみた．

## 結　　果

ヒト白血球由来の白血球発熱物質あるいはIL-1とP388D 1株由来のものを用いた場合を比較すると，ともに筋蛋白分解亢進作用を有していたが，培養上澄で較べた時には後者の方がより活性が低い傾向を示した．dark muscleであるラットヒラメ筋とpale muscleであるラット短踵指伸筋とでは実験結果に有意の差はない．

ラット骨格筋をIL-1あるいは白血球発熱物質で処理すると，蛋白合成は変化しないが，蛋白分解の亢進がみられ，実質の蛋白分解でみるとその差はより著明で，Student paired T testで有意差を示した（表2）．ラベルしたフェニルアラニンのとり込みで筋の蛋白合成をみても，IL-1投与後に変化はない．また筋中のチロシン量も変化していないので筋培養液中のチロシン量の増加は，細胞内アミノ酸プールの単純な漏出の亢まりによるものでないと言える．チロシンは骨格筋中で合成の分解もされないから，IL-2あるいは白血球発熱物質の実質の蓄積は筋細胞蛋白の実質の分解を反映していると言える．

表2　Effect of human leucocytic IL-1 on protein degradation in rat soleus muscle*

| | Protein Synthesis | Protein Degradation | Net Protein Degradation% |
|---|---|---|---|
| | (nmol tyrosine/mg muscle/3 hour) | | |
| with IL-1** | 0.225 ± 0.047 | 0.975 ± 0.144 | 0.750 ± 0.113 |
| without IL-1** | 0.208 ± 0.026 | 0.503 ± 0.048 | 0.295 ± 0.037 |
| Difference | +0.017 ± 0.028 | +0.472 ± 0.136 | +0.455 ± 0.108 |
| | Not significant | (94%) $p<0.01$ | (154%) $p<0.001$ |

* Values are presented as means ± S.E.
** n = 10 muscle samples

表3　Effect of indomethacin on IL-1*-induced protein degradation in rat soleus muscle**

| | Net Protein Degradation | | |
|---|---|---|---|
| | without Indomethacin | With Indomethacin | Inhibition |
| | (nmol tyrosine/mg muscle/3 hour) | | |
| With IL-1 | 0.661 ± 0.125 | 0.261 ± 0.047 | -0.400 ± 0.108 (-61%; $p<0.001$) |
| Without IL-1 | 0.286 ± 0.042 | 0.269 ± 0.053 | not significant |
| Stimulation | 0.357 ± 0.109*** (125%; $p<0.001$) | not significant | |

*　Crude IL-1 from P388D1
**　Values are presented as means ± S.E.
*** n = 6 muscle samples

切り出したラット筋の蛋白分解速度は筋肉の由来するラットの個性差の影響を受けることが予備実験で示されたので，各実験の対照は実験に用いた筋の対側肢より得たものを用いた．

$3\times10^{-6}$ M濃度のインドメサジンを加えた場合上記のIL-1あるいは白血球発熱物質の蛋白分解亢進効果は全く抑制され，それらを投与しない対照群に近い蛋白分解を示した．その抑制率はインドメサジンを加えない場合の－60%であり有意である（表3）．

## 考　　察

IL-1あるいは白血球発熱物質はIL-1としてのT細胞増殖刺激効果と発熱効果でほぼ同一の

共通作用を有しているのみでなく，筋蛋白に対し分解亢進作用を有することが，*in vitro* でのラットの pale muscle および dark muscle を用いた実験で示された．こうした筋蛋白分解亢進作用はインドメサジンの投与で抑制され，白血球発熱物質の発熱中枢への作用がインドメサジンで抑制され抗発熱効果がみられるのと共通の機序の働いていることが示唆された．発熱物質は視床下部でアラキドン酸放出を刺激することでプロスタグランディン $E_2$ 合成を亢め，発熱効果をもたらすと考えられている．我々の実験結果は最近 Baracos 等が報告したものと大略一致し，それを確認したものである．Goldberg 等はアラキドン酸，$PGE_2$ や $F_{2a}$，カルシウムイオノフォア等による筋蛋白分解の加速を報告しており，そうした効果はいずれもリソゾームのプロテアーゼインヒビターにより阻止されたとのことである．そうした結果が事実であるなら，本研究，Goldberg 等の報告を総合すると，蛋白分解と発熱中枢刺激はともにプロスタグランディン合成亢進を介して発現していることが強く示唆されるといいうる．

## 文　　献


1) Baracos, V., Rodemann, H.P., Dinarello, C.A., and Goldberg, A.L.：New Engl. J. med., 308：553—558, 1983.
2) Dinarello, C.A., Renfer, L., and Wolff.：S.M.: proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74：4624-4627, 1977.
3) Goldberg, A.L. martel, S.B., and Kushmerick, M.J.：meth Enzymol., 39；82-94, 1975.
4) Rodemann, H.P. and Goldberg, A.L.： J. Biol, Chem., 257：1632-1638, 1982.

# 38）実験的クロロキンミオパチー
## ——Autolysosomeの形態学的・生化学的検討——

杉田秀夫*

研究協力者　佐野元規*　石浦章一*

昨年より我々はrimmed vacuole (RV) を伴うdistal myopathyのモデルとして実験的にクロロキンミオパチーを作成し，組織学的，生化学的に検討してきた[1]．今回はクロロキン長期投与により出現するautolysosomeの性質について主に生化学的に検討したので報告する．

### 方　法

実験的クロロキンミオパチーの作成方法は昨年同様，雄のウイスター系ラット体重約200gにクロロキン2燐酸を連日投与することにより作成した．60日間以上投与後，ひらめ筋にRVを伴うミオパチーが発症していることを確認したラットを用いて以下の実験を行った．

ラットの肝臓を生理食塩水で充分灌流して，血液成分をできるだけ除いた．肝臓をとり出してPotter-Elvehjem typeのホモジナイザー中で手でmildにホモジナイズして，肝細胞をsubcellular fractionation[2]した．各分画のリソゾームプロテアーゼ活性を測定し，次にリソゾームミトコンドリア分画をPercollによる密度勾配法[3]でリソゾームを分離し，比重及びプロテアーゼ，酸フォスファターゼ活性を検討した．

Percollの比重はPharmacia社の密度カラー

表1　Lysososomal protease activities in liver

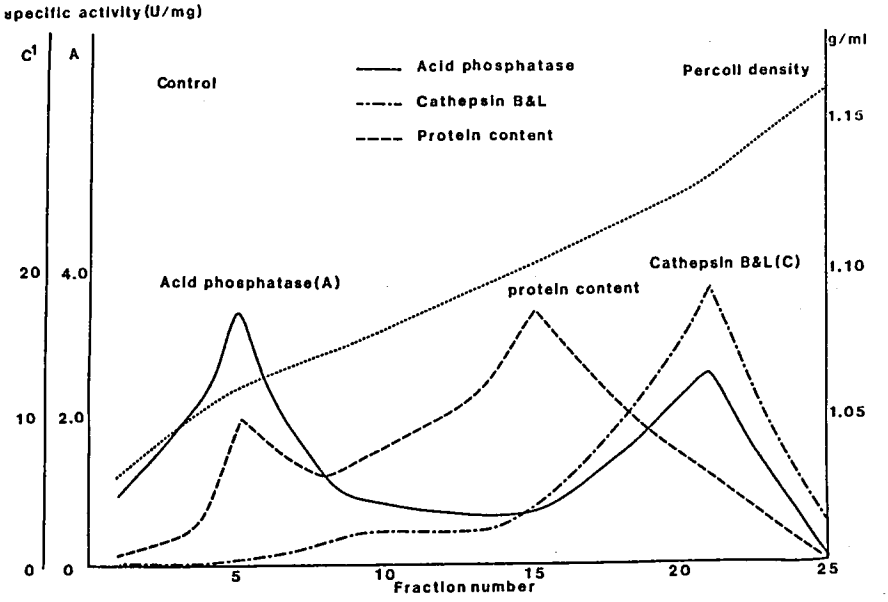
| Enzyme (mU/mg) | Cathepsin B&L | | Cathepsin B | | Cathepsin H | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | control | chloroquine | control | chloroquine | control | chloroquine |
| all homogenate | 0.245±0.032 | 0.365±0.089 | 0.313±0.046 | 0.433±0.115* | 0.382±0.069 | 0.415±0.064 |
| nuclear fraction | 0.427±0.090 | 0.718±0.062** | 0.299±0.145 | 0.323±0.192 | 0.531±0.117 | 0.440±0.088 |
| lysosomal fraction | 0.975±0.364 | 2.40±0.25** | 0.442±0.125 | 1.62±0.79** | 0.698 0.072 | 1.07±0.16** |
| microsomal fraction | 0.200±0.089 | 0.070±0.023 | 0.113±0.064 | 0.046±0.026 | 0.746±0.122 | 0.714±0.098 |
| supernatant | 0.010±0.003 | 0.029±0.011* | 0.013±0.007 | 0.090±0.024** | 0.436±0.110 | 0.582±0.153* |

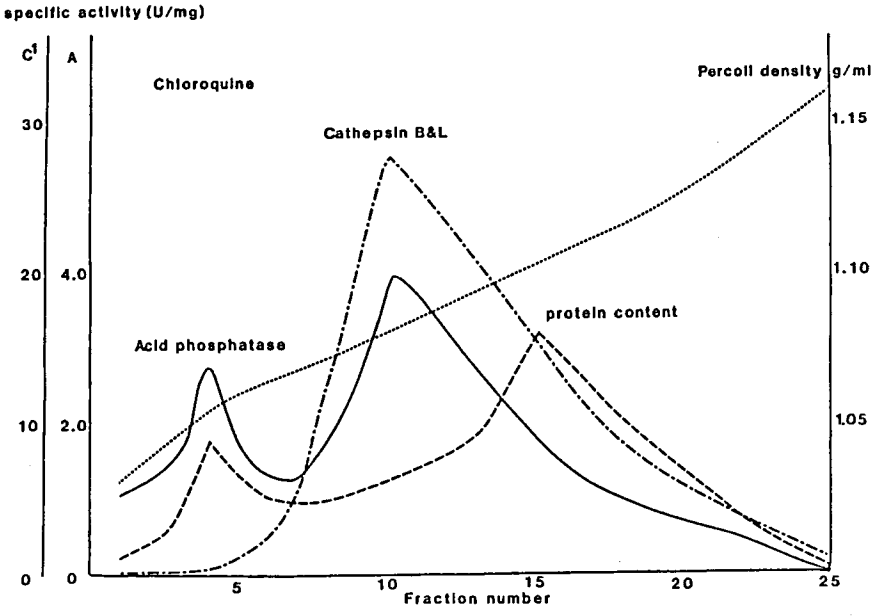
*P < 0.05

**P < 0.01

1U=1micromole/min　　Mean±S.D.

*国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部




1unit=1micromole/min

1:1mU/mg

図1

マーカービーズを使用して定量的に測定した．Cathepsin Bの活性はbenzyloxycarbonyl-arginil-arginine-4-methyl-7-coumarylamide（Z-Arg-Arg-MCA）を基質としてpH6.0, cathepsin B & Lの活性はZ-phe-Arg-MCAを基質としてpH5.5で，cathepsin Hの活性はArg-MCAを用いてpH6.8で測定した[4]．

次にリソゾーム内のpHを大熊らの方法[5),6)]により測定した．fluorescein-dextran（FD）の螢光がpH dependentに大幅に変化することにより，fluoresceinの螢光強度の変化からリソゾーム内のpHを推定した．

ラットの腹腔内にFD-70（fluorescein dextran分子量70,000）を200mg／kgの割合で注射し，12時間後にsacrificeしてsubcellular fractionationによりリソゾームミトコンドリア分画をとり出して測定medium中で螢光強度の変化を測定した．

## 結　　果

肝細胞の各分画におけるリソゾームプロテアーゼ活性では，リソゾームミトコンドリア分画で正常コントロールに比較して有意の上昇が見られた．とくにcathepsin Bに関しては，正常コントロールの約4倍と著明に上昇していた（**表1**）．マイクロゾーム分画を遠沈させた後のsupernatant（細胞質分画）にもやはりクロロキンミオパチー群で上昇が見られたが，これはクロロキンでinductionされたリソゾームがsubcellular fractionの諸操作の段階で壊れやすいためであろう．

### 1）Percollによる密度勾配

Cathepsin B & Lとacid phosphatase活性のpeakが一致しているfractionがリソゾームフラクションと考えられるが，正常コントロール群では比重1.12g/mlにpeakが存在していた．一方クロロキンミオパチー群ではpeakは比重1.06～1.07g/mlと比重の軽い方へ移動していた（図1）．Cathepsin B & Lの活性は正常コントロールに比較して著明に上昇していた．このcathepin B & Lの活性のpeakと一致したfractionを形態学的に観察すると，電子顕微鏡で筋細胞及び肝細胞に見られるようなcytoplasmic debrisをとりこんだ，myelin figure様の構造をしたautophagic vacuoleであった（図2）．これらのautophagic vacuoleには酸性加水分解酵素が存在することよりautolysosomeであると判定される．

### 2）リソゾーム内pH

FD-リソゾームミトコンドリア分画をpH7.0の測定medium中に入れて外液のpHを急速に1 M-tetramethylammonium hydroxideで6.0に変化させたとき直ちに反応して変化する螢光強度をリソゾーム外に放出された螢光量(1)の指標とする．

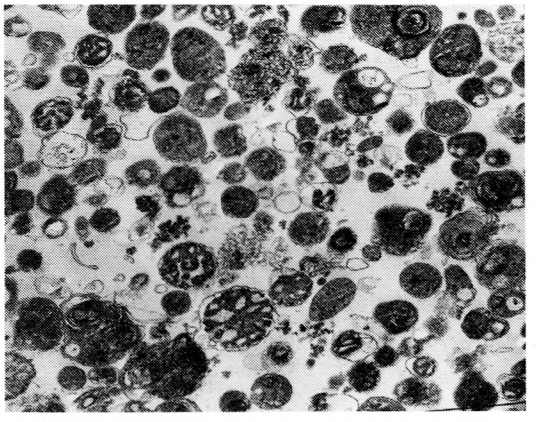


図2

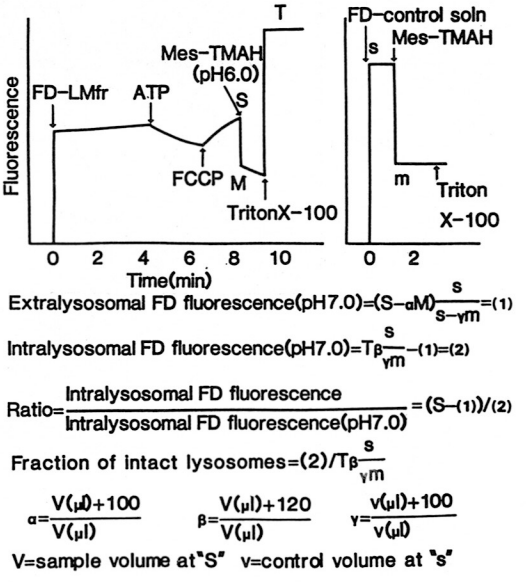


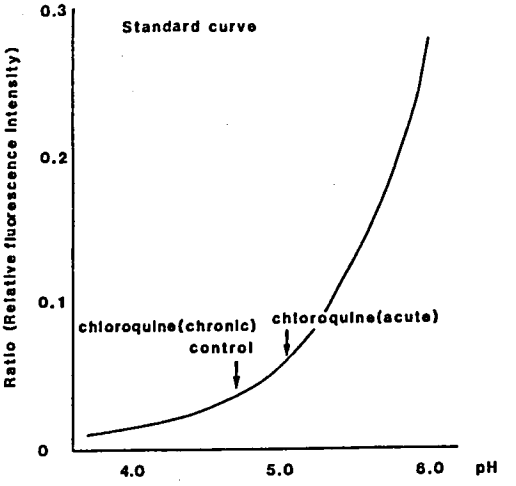

図3

Triton X-100でリソゾームを完全に破壊したとき得られる螢光強度より全FDの螢光量を求め(1)との差からpH 7.0におけるリソゾーム内の螢光量(2)を推定する．次に求めるべきpHにおけるFDの螢光量を実際に観測される螢光強度と(1)との差で求め(2)との比（ratio）からリソゾーム内pHをstandard曲線を用いて推定する（図3）．FDの各pHにおける螢光強度をpH 7.0に対する比（ratio）であらわしたstandard曲線よりpHを測定したところクロロキンミオパチー群では正常コントロール群と差がなく，リソゾーム内pHに上昇が見られなかった．クロロキン50mg／kg 1回のみの注射の場合にはpH 5.04と上昇していた（図4）．

## 考　　案

クロロキン長期投与により筋細胞にはautophagic vacuoleの出現と，筋肉のホモジネートでcathepsin B & Lの著明な上昇，筋構造蛋白の減少が見られた（既報）．肝臓では肝細胞に同様にautophagic vacuoleの出現があり，このautophagic vacuoleには正常のリソゾームよりも高い活性をもつ酸性プロテアーゼが存在していて，autolysosomeであることが確認できた．肝細胞の所見より推定すると筋細胞内のautophagic vacuoleはやはりautolysosomeであると考えられ，高いチオールプロテアーゼ活性をもつものと思われる．

クロロキンは従来よりlysosomotropic drugとしてリソゾーム内pHを上昇するといわれてきた[7]．しかしクロロキンミオパチー群ではリソゾ




| | Ratio | pH |
|---|---|---|
| Control n=5 | 0.037±0.004 | pH 4.71±0.12 |
| Chloroquine(chronic) n=5 | 0.037±0.005 | pH 4.69±0.16 |
| Chloroquine(acute,after 1hr) n=5 | 0.057±0.004* | pH 5.04±0.02* |

* p<0.01

図4

ーム内 pH は変化がなかった．したがって長期投与した場合にはクロロキンの pH 上昇効果に対して resistant な autolysosome が出現するものと思われる．このようなリソゾーム内では酸性プロテアーゼ活性が高く，pH が上昇していないことより蛋白分解を充分行なえる環境にあるのであろう．RV を伴う distal myopathy でも酸性プロテアーゼ活性の高い autolysosome 内で筋蛋白が分解されているものと推定される．

## 文　献


1) 杉田秀夫，佐野元規，石浦章一，荻原弘一：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—．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，1984，p. 195.

2) Appelmans, F., Wattiaux, R. & De Duve C.：Tissue fractionation studies 5：The assocation of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. Biochem. J., 59：438, 1955.

3) Kominami, E., Hashida, S., Khairallah, E.A. et al：Sequestration of cytoplasmic enzymes in an autophagic vacuole-lysosomal system induced by injection of leupeptin. J., Biochem. Chem., 258：6093, 1983.

4) Barrett, A.J.：Fluometric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. Biochem. J., 187：909, 1980.

5) Ohkuma, S. & Poole, B.：Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75：3327, 1978.

6) Ohkuma, S., Moriyama, Y. & Takano, T.：Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79：2758, 1982.

7) De Duve, C., De Barsy, T., Poole, B. et al Commentary lysosomotropic agents. Biochem. Pharm., 23：2495, 1974.

# 39）Duchenne 型筋ジストロフィー症の筋変性壊死機構に関する形態並びに生化学的検討

荒　木　淑　郎*

研究協力者　　内　野　　誠*

## はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）の生検筋中には壊死筋線維（NF）や再生筋線維（RF）に混じて，いわゆる“opaque fiber”（OF）と呼ばれる円形のやや肥大した，HE 染色初め各種組織化学染色で濃染する筋線維が高率に認められ，DMD 筋組織所見の特徴の一つとなっている．我々は昨年の本班会議で，この OF の病的意義について生化学的に検討するため，DMD 生検筋から single fiber の形で分離した OF の筋構造蛋白の分析を行い，OF の一部は明らかに特徴ある筋構造蛋白の変化を有する病的筋線維である可能性が高いことを報告した[1]．

今回は，“壊死前段階”の筋線維としての OF が DMD の比較的病初期より末期にいたる臨床経過でいかなる出現頻度の変動を示すのか，また OF と密接な関連を有する NF 及び RF はいかなる経時変化を示すのかを明らかにするため，幼児期より成人にいたる各年齢の DMD 生検筋について形態学的に検討を加え，また同時に frozen section による筋構造蛋白の経時的変化について検索を行ったので報告する．また前回 single OF の筋構造蛋白分析の際，対照として DMD 生検筋中の正常横紋構造をもつ筋線維を用いたが，今回正常人を対照にして再検討したので，その結果についても述べる．

## 対象と方法

対象は 4 ～24歳の DMD 患者12例で，筋生検は大半は腓腹筋より行った（表 1）．生検筋は組織化

表 1　Percentage of opaque and necrotic muscle fibers in 12 biopsies of Duchenne muscular dystrophy

| Case No. | Age (years) | Biopsied muscle | No. of fibers measured | Opaque fibers (%) | Necrotic fibers (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | Biceps | 439 | 45 (10.3) | 12 (2.7) |
| 2 | 7 | Gastrocnemius | 1306 | 129 (9.9) | 12 (0.9) |
| 3 | 13 | Tibialis ant | 1309 | 37 (2.8) | 6 (0.5) |
| 4 | 15 | Gastrocnemius | 1199 | 153 (12.8) | 4 (0.3) |
| 5 | 16 | Gastrocnemius | 686 | 26 (3.8) | 5 (0.7) |
| 6 | 16 | Gastrocnemius | 454 | 6 (1.3) | 1 (0.2) |
| 7 | 17 | Gastrocnemius | 1198 | 81 (6.8) | 0 ( 0 ) |
| 8 | 17 | Gastrocnemius | 957 | 25 (2.6) | 3 (0.3) |
| 9 | 20 | Gastrocnemius | 1025 | 91 (8.9) | 3 (0.3) |
| 10 | 20 | Gastrocnemius | 212 | 18 (8.5) | 0 ( 0 ) |
| 11 | 24 | Gastrocnemius | 593 | 19 (3.2) | 0 ( 0 ) |
| 12 | 24 | Gastrocnemius | 220 | 8 (3.6) | 0 ( 0 ) |
| | | Total | 9598 | 638 (6.6) | 46 (0.5) |

＊熊本大学医学部第一内科

学染色（HE, Gomori, ATPase 染色）及び acridine orange 染色（螢光顕微鏡用）による形態観察で，各生検筋に含まれる全筋線維数に対する OF, NF, 並びに RF を数えて，それぞれの頻度を百分率で算出した．なお RF の検索にあたっては ATPase 染色（pH 10.2, 4.6, 4.3）による type 2 C 線維並びに acridine orange 染色で筋線維全体が橙色に染色される筋線維を指標に用いた[2),3)]．また組織化学染色に使用したものと series の frozen section を用いて，一次元及び二次元電気泳動による筋構造蛋白の分析を行った．single fiber による筋構造蛋白の分析は既に発表した方法[1)]によって行った．

## 結　　果

DMD 12症例で検索した筋線維総数は9,598本（220～1,309：$\bar{x}$＝800）で，OF 出現頻度は6.6％（1.3～12.8），NF 出現頻度は0.5％（0～2.7）であった（表１）．また再生筋線維は ATPase 染色による type 2C 線維頻度で8.3％（0～11.5），acridine orange 染色陽性線維頻度で6.4％（0～7.0）であった（表２）．OF, NF, 及び RF の出現頻度を経時的に観察すると，OF は症例により変動するが，年齢による増減は明らかでなく，平均6.6％に認められた．NF は４～７歳の若年で高率（0.9～2.7％）にみられたが，年齢が長ずるに従って著しく減少し，17～20歳では0.3～０％となった．一方 RF は ATPase 染色による type 2C 線維頻度及び acridine orange 染色陽性筋線維頻度共に比較的近似した値を示し，17歳頃までは６～12％程度にみられたが，17歳前後から急速に減少し，20歳以降は殆んど認め難くなった（図１）．frozen section による筋構造蛋白の経時的変化については，一次元電気泳動において年齢と共に55,000 dalton protein（desmin）の含量が actin と比較して相対的な増加を示した．その他の成分については一定した変化は認めなかった．また二次元電気泳動でも一次元と同様に frozen section では desmin の spot が比較的明瞭に認められた（図2a, 2 b）．

single OF の分析では，正常対照（12歳男子，26歳男子）との比較再検討で，正常対照群との間に差がないグループ（$OF_a$）が33％，desmin の減少を示すグループ（$OF_{b1}$）が36％，α-actinin 及び desmin の有意な減少を示すグループ（$OF_{b2}$）が31％に認められた（表３）．

## 考　　察

DMD における OF の出現頻度は他の神経・筋疾患に比較して有意に高く[4),5)]，DMD 筋組織所見の特徴の一つとなっている．その病的意義については，筋生検過程や標本作成過程で生じた単なる人工産物とみなす意見や，同じ人工産物にしても筋線維に内在する何らかの脆弱性が基盤にあり，それに機械的外力が加わって生じる“meaningful artifacts”と考える意見[6)]，あるいは DMD の筋変

表２　Percentage of type 2C and AO positive fibers in DMO muscles

| Case No. | Age (years) | ATPase stain | | Acridine Orange stain | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | No. of fibers measured | type 2C (%) | No. of fibers measured | AO positive fibers*) (%) |
| 2 | 7 | 1789 | 133 (7.4) | 1715 | 120 (7.0) |
| 4 | 15 | 416 | 36 (8.9) | 362 | 25 (6.9) |
| 7 | 17 | 470 | 54 (11.5) | 397 | 27 (6.8) |
| 8 | 17 | 355 | 40 (11.3) | 213 | 7 (3.8) |
| 10 | 20 | 60 | 0 ( 0 ) | 48 | 0 ( 0 ) |
| 12 | 24 | 83 | 1 (1.2) | 64 | 0 ( 0 ) |
| Total | | 3173 | 264 (8.3) | 2799 | 179 (6.4) |

*) small fibers with strong bright orange fluorescense.

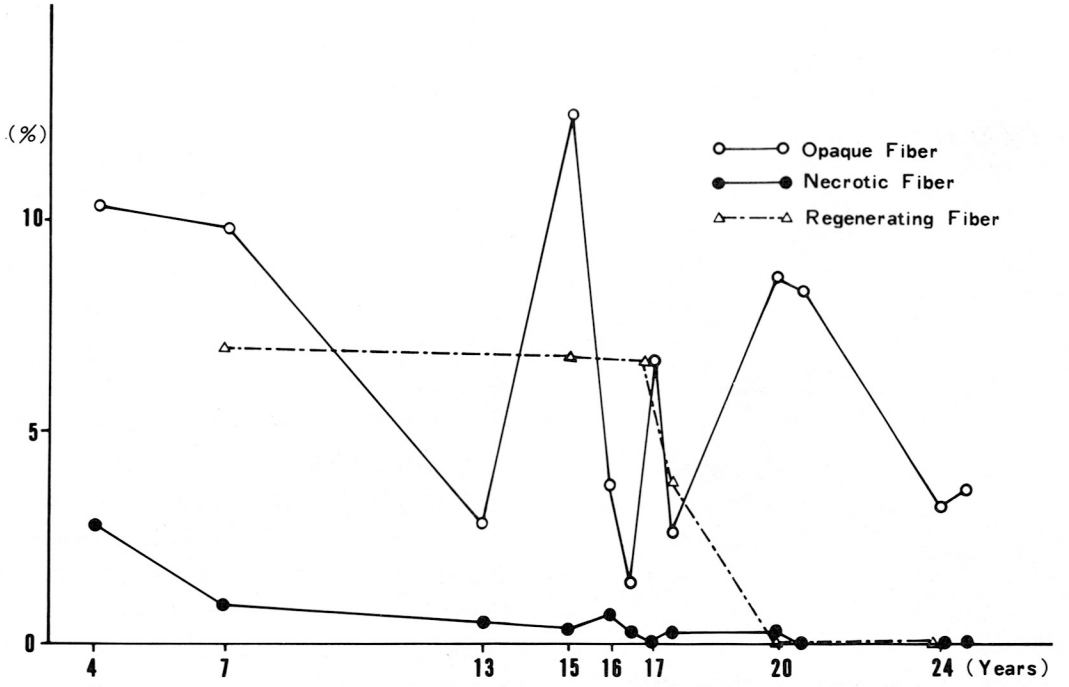



図1 Change of the frequency of opaque, necrotic, and regenerating muscle fibers in DMD muscles by age

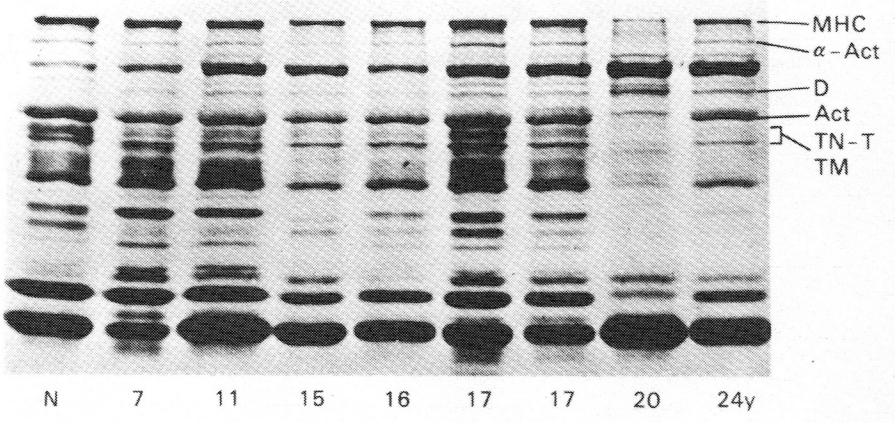



図2 a One-dimensional electrophoresis pattern of the biopsied muscle of Duchenne muscular dystrophy

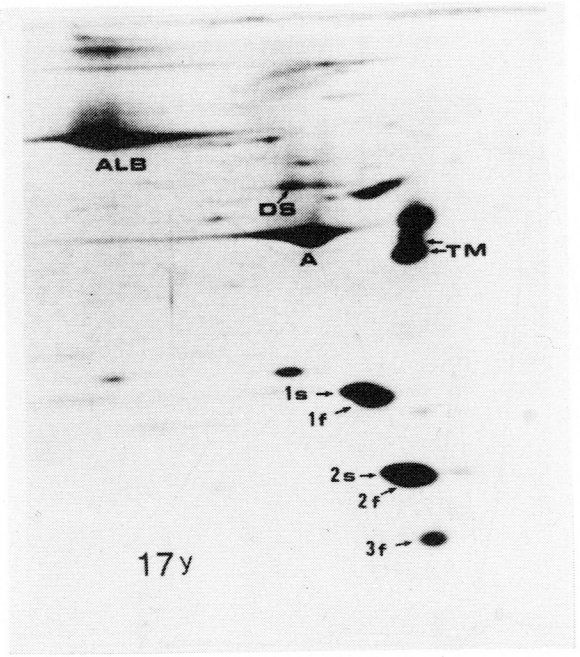



図2b　Two-dimensional electrophoresis pattern of the biopsieb muscles of Duchenne muscular dystrophy

性過程における初期変性像としてとらえる意見[7)~10)]などあり，今日なお一定の結論は得られていない．これまでOFについての研究は主として形態学的手法を用いて行われてきたが，我々はOFの病的意義について生化学的側面から検討するため，single fiberの形で分離したOFの筋構造蛋白の分析を行い，OFの一部は特徴ある筋構造蛋白の変化を示すことを明らかにしてきた[1),11)]．ただ昨年の本班会議では対照としてDMD生検筋中の正常横紋構造を有する筋線維を用いたので，今回新たに正常対照を用いて再検討を行い，基本的には昨年報告した内容と同様の成績を得た．すなわち検索したOFの中に，正常対照と殆んど差がないグループの他に，desminの有意な減少を示すグループ，さらに$\alpha$-actinin及びdesminの有意な減少を示すグループが確認された．この分析結果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を認め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，もう一つは埜中ら[10)]も指摘しているようにDMD生検筋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OFの部分や，壊死に陥ってghost状になった部

表3　Percentage of myofibrillar proteins in opaque and control muscle fibers

| | Number of Samples | Myosin H chain | $\alpha$-Actinin | 55000 dalton protein | Actin | TN-T + TM | Light chain 1 | Light chain 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Opaque (a) | 19 | 17.9±7.6 | 11.0±2.1 | 4.1±1.0 | 28.9±7.2 | 8.2±2.3 | 13.6±4.6 | 16.3±6.7 |
| Opaque ($b_1$) | 21 | 20.9±7.3 | 9.1±1.5 | 1.7±0.6$^{+}$ | 31.7±3.8$^{++}$ | 8.3±3.2 | 11.8±3.0$^{++}$ | 16.5±5.8 |
| Opaque ($b_2$) | 18 | 19.1±5.0 | 4.6±1.7$^{++}$ | 0.8±0.8$^{++}$ | 30.8±7.0 | 7.4±2.8 | 13.3±4.9 | 24.0±6.6 |
| Control I[a] | 37 | 18.9±4.1 | 12.7±3.2 | 4.9±1.3$^{++}$ | 27.0±5.6 | 9.7±2.7 | 12.7±3.2$^{++}$ | 14.8±3.4$^{++}$ |
| Control II[b] | 42 | 15.4±2.3 | 9.4±2.3 | 3.8±1.0 | 23.0±3.8 | 8.8±2.3 | 19.6±2.9 | 20.0±3.9 |

++ $p<0.001$,　+ $p<0.01$ (Control II vs Opaque a, $b_1$, $b_2$, Control I)　Mean±S.D.

[a]Normally striated muscle fibers from Duchenne patients.

[b]Normal controls

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観察され，$OF_a \rightarrow OF_{b1} \rightarrow OF_{b2}$ は一連の変性過程を表わすものとも考えられる．ただsingle fiberでの検索結果と，経時的なOF，NFの出現頻度の推移を合わせて考えると，前者の可能性がより高く，形態学的に同じOFとしてとらえられる筋線維に少なくとも二種類の質的に異なる筋線維が含まれているものと考えられる．いずれにしてもsingle fiberでの検索結果より，OFの一部にみられた$\alpha$-actinin及びdesminの減少はこれらの蛋白がcalcium activated neutral protease (CANP) にsensitiveな蛋白であり，基本的には$Ca^{++}$ ionophore[12]やCANP[13)~18)]も用いた*in vitro*の実験結果と類似した変化であるところから，OFの形成にはCANPに代表されるある種のcalcium dependent proteaseの関与が推定された．

一方，frozen sectionでみられた筋構造蛋白の変化はmassとしての変化で，必ずしも個々の筋線維における筋構造蛋白の変化は反映していない．desminの相対的増加はRFの増加によるものと推定されるが，形態学的にみられるRFの経時変化と必ずしも一致していないので，今後泳動パターン上はdesminと考えられるspotがdesminか否か抗desmin抗体による確認を含めて更に検討が必要である．

これまでDMD生検筋中のNFが病初期に比較的多数観察され，末期では少なくなる傾向にあることは一般的印象としては知られていたが，実際に臨床経過に伴うNFの出現頻度の推移について検討した報告は殆んどなく，またNFと密接な関連を有するOF及びRFについても経時的変化についての検索は殆んど行われていない．今回の調査でNFは若年では比較的高率に出現し，年齢と共に減少して，20歳以降は殆んど認められないという結果が得られた．

NFの減少にもかかわらず，全体の筋線維数は年齢と共に減少し，筋萎縮は確実に進行しており，DMDにおいて筋萎縮が進行する背景には筋線維の変性・壊死に加えて，その他の未知の因子が関与するものと思われる．この点に関してKarpati[6]は次の3つの因子を推定している．1）進行性の結合織増加により，筋線維の“窒息”状態がおこる．2）壊死部を補修するための再生活動が障害される．3）筋再生の反復の結果，著しく筋鞘核が減少し，筋線維の正常な営みができなくなる．

これらの問題はDMDの筋萎縮のメカニズムを考える上で，筋変性・壊死の問題と共に今後検討していかなければならない重要な課題と考えられる．

今回の検索で，経時的にみた場合，OF，NF，RFはそれぞれ特有の経時変化を示し，必ずしも三者が平行した動きを示さなかったが，前述したようにOFには質的に異なる少なくとも二種類の筋線維が含まれている可能性があり，今後人工産物的に出現するOFと“壊死前段階”の病的OFを区別した上で再検討する必要があり，今回の結果は必ずしもOF→NF→RFの筋変性・再生サイクルを否定するものではない．更に症例数を増して臨床経過を含めた筋萎縮進行パターンの特徴について，詳細な検討が必要である．

## ま と め

4～24歳のDMD 12例について，各年齢別のOF，NF，及びRFの出現頻度を検索し，併せてfrozen section及びsingle OFによる筋構造蛋白の分析を行った．生検筋中のOF頻度は年齢による差は明らかではなく，平均6.6%に認められ，NFは若年で高率（0.9～2.7%）にみられたが，年齢が長ずるに従って著しく減少した（0～0.3%）．RFは17歳頃までは6～12%に認められ，それ以降は急速に減少した．frozen sectionによる構造蛋白の分析では，年齢と共にdesmin含量の相対的増加がみられた．single OFによる分析では，33%は対照と差がなく，36%はdesminの減少を，31%は$\alpha$-actinin及びdesminの減少を示した．DMDの筋変性壊死機構におけるOFの役割を中心に文献的考察を行った．

## 文　献


1) 内野　誠，荒木淑郎，吉田　理，植川和利：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）．臨床神経 1985, in press.

2) Miike T, Tamari H, Ohtani Y, Nakamura H, Matsuda I, Miyoshino S：A fluorescent microscopy study of biopsied muscles from infantile neuromuscular disorders. Acta Neuropath (Berl) 59：48-52, 1983.

3) Nonaka I, Takagi A, Sugita H：The significance of type 2C muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve 4：326-333, 1981.

4) Schmalbruch H：Contracture knots in normal and diseased muscle fibers. Brain 96：637-640, 1973.

5) Boxler K, Jerusalem F：Hyperreactive (hyaline, opaque, dark) muscle fibers in Duchenne dystrophy. J Neurol 219：63-72, 1978.

6) Karpati G：A review of the morphologic features and consequences of muscle cell necrosis in Duchenne disease；Clues to the pathogenesis. "International Congress Series 434, Neurology"(ed by Jarger WAH, Bruyn GW et al), Excerpta Medica, Amsterdam, 1978, p. 117-131.

7) Schmalbruch H：Segmental fiber breakdown with defects of the plasmalemma in diseased human muscles. Acta Neuropathol (Berl) 33：129-141, 1975.

8) Cullen MJ, Fulthorpe JJ：Stages in fiber breakdown in Duchenne muscumar dystrophy. An electron-microscopic study. J Neurol Sci 24：179-200, 1975.

9) Chou SM, Miike T, Crosby W, Amato s：Ultrastructure of "Opaque fibers" ($OF_s$) in Duchenne muscular dystrophy (DMD). Neurology (Minneap) 29：594, 1979.

10) 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 24：718-728, 1980.

11) 内野　誠，荒木淑郎，吉田　理，植川和利：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 23：706-710, 1983.

12) Uchino M, Chou SM：Effects of calcium ionophore, A 23187 on murine muscle. Ultrastructural and biochemical study. Proc Japan Acad 56：480-485, 1980.

13) Suzuki A, Nonami Y, Goll DE：Proteins released from myofibrils by CASF ($Ca^{2+}$-activated sarcoplasmic factor) and trypsin. Agric Biol Chem 39：1461-1467, 1975.

14) Sugita H, Ishiura S, Suzuki K, Imahori K：Ca-activated neutral protease and its inhibitars：in vitro effect on intact myofibrils. Muscle Nerve 3：335-339, 1980.

15) 今堀和友：CANP と E-64．神経進歩 24：807-813, 1980.

16) 杉田秀夫，石浦章一：筋ジストロフィー症とプロテアーゼ．神経進歩 24：821-830, 1980.

17) Nelson WJ, Traub P：Properties of a $Ca^{++}$-activated protease specific for the intermediate-sized filament protein vimentin in Ehrlich-ascites tumor cells. Eur J Biochem 116：51—57, 1981.

18) Nelson WJ, Traub P：Proteolysis of vimentin and desmin by the $Ca^{++}$-activated protease specific for these intermediate filament proteins. Mol Cell Biol 3：1146-1156, 1983.

# 昭和59年度研究班名簿

# 昭和59年度　杉田班　名簿

| 区分 | 氏名 | 所属施設名<br>所在地 | 所属における地位 | 連絡の際の電話 |
|---|---|---|---|---|
| 班長 | 杉田秀夫 | 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部<br>〒187　東京都小平市小川東町4-1-1 | 部長 | 0423—41—2711 |
| 幹事 | 垂井清一郎 | 大阪大学医学部第二内科<br>〒553　大阪市福島区福島1-1-50 | 教授 | 06—451—0051 |
| | 寺尾寿夫 | 帝京大学医学部第一内科<br>〒173　東京都板橋区加賀2-11-1 | 教授 | 03—964—1211 |
| | 佐藤猛 | 順天堂大学医学部脳神経内科<br>〒113　東京都文京区本郷2-1-1 | 助教授 | 03—813—3111 |
| 運営幹事 | 高木昭夫 | 虎の門病院神経内科<br>〒105　東京都港区虎の門2-2-2 | 部長 | 03—588—1111<br>(2016) |
| 監事 | 荒木淑郎 | 熊本大学医学部第一内科<br>〒860　熊本市本荘1-1-1 | 教授 | 0963—63—1111 |
| 班員 | 植田啓嗣 | 愛媛大学保健管理センター<br>〒790　松山市道後樋又10-13 | 教授 | 0899—24—7111 |
| | 小口喜三夫 | 国立長野病院<br>〒389-08　長野県更級郡上山田町3200 | 副院長 | 02627—5—1581 |
| | 納光弘 | 鹿児島大学医学部第三内科<br>〒890　鹿児島市宇宿町1208-1 | 助教授 | 0992—64—2211 |
| | 川井尚臣 | 徳島大学医学部第一内科<br>〒770　徳島市蔵本町3—18—15 | 講師 | 0886—31—3111 |
| | 木下真男 | 東邦大学医学部第四内科<br>〒153　東京都目黒区大橋2-17-6 | 教授 | 03—468—1251 |
| | 栗原照幸 | 宮崎医科大学第三内科<br>〒889-16　宮崎県宮崎郡清武町木原5200 | 助教授 | 09858—5—1510 |
| | 後藤幾生 | 九州大学医学部脳神経病研究施設神経内科<br>〒812　福岡市東区馬出3-1-1 | 助教授 | 092—641—1151 |
| | 木南英紀 | 徳島大学医学部附属酵素研究施設<br>酵素化学部門<br>〒770　徳島市蔵本町3-18-15 | 講師 | 0886—31—3111 |
| | 斎田孝彦 | 国立療養所宇多野病院臨床研究部<br>〒616　京都市右京区鳴滝音戸山町8 | 部長 | 075—461—5121 |
| | 紫芝良昌 | 冲中記念成人病研究所<br>〒105　東京都港区虎の門2-2-2 | 主任研究員 | 03—588—1111 |
| | 庄司進一 | 信州大学医学部第三内科<br>〒390　松本市旭3-1-1 | 講師 | 0263—35—4600 |
| | 杉村公也 | 名古屋大学医学部第一内科<br>〒466　名古屋市昭和区鶴舞町65 | 助手 | 052—741—2111 |
| | 鈴木紘一 | 東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部<br>〒113　東京都文京区本駒込3-18-22 | 部長 | 03—823—2101 |

| 区　分 | 氏　名 | 所属施設名<br>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<br>〒980　仙台市星陵町1-1 | 助教授 | 0222—74—1111 |
| | 高守正治 | 金沢大学医学部神経内科<br>〒920　金沢市宝町13-1 | 教授 | 0762—62—8151 |
| | 田代邦雄 | 北海道大学医学部脳神経外科<br>〒060　札幌市北区北14条西5丁目 | 助教授 | 011—711—1161 |
| | 田辺等 | 東京都立神経病院<br>〒183　府中市武蔵台2-6-1 | 副院長 | 0423—23—5111 |
| | 塚越廣 | 東京医科歯科大学医学部神経内科<br>〒113　東京都文京区湯島1-5-45 | 教授 | 03—813—6111 |
| | 中西孝雄 | 筑波大学臨床医学系神経内科<br>〒305　茨城県新治郡桜村天王台1-1-1 | 教授 | 0298—53—3196 |
| | 中村晴臣 | 鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設<br>神経病理部門<br>〒683　米子市西町86番地 | 教授 | 0859—33—1111 |
| | 埜中征哉 | 国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部<br>〒187　東京都小平市小川東町4-1-1 | 部長 | 0423—41—2711 |
| | 福原信義 | 金沢大学医学部神経内科<br>〒920　金沢市宝町13-1 | 助教授 | 0762—62—8151 |
| | 馬渡志郎 | 国立療養所筑後病院神経内科<br>〒833　福岡県筑後市大字蔵数515 | 副院長 | 09425—2—2195 |
| | 萬年徹 | 東京大学医学部脳研究施設神経内科<br>〒113　東京都文京区本郷7-3-1 | 教授 | 03—815—5411 |
| | 水野美邦 | 自治医科大学神経内科<br>〒329-04　栃木県河内郡南河内町<br>大字薬師寺3311-1 | 助教授 | 02854—4—2111 |
| | 宮武正 | 新潟大学脳研究所神経内科<br>〒951　新潟市旭町通一番町757 | 教授 | 0252—23—6161 |
| | 茂在敏司 | 大阪医科大学第一内科<br>〒569　高槻市大学町2-7 | 教授 | 0726—83—1221 |
| | 吉田瑞子 | 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第四部<br>〒187　東京都小平市小川東町4-1-1 | 研究員 | 0423—41—2711 |
| | 若山吉弘 | 昭和大学藤が丘病院神経内科<br>〒227　横浜市緑区藤が丘1-30 | 助教授 | 045—971—1151 |
| 公募班員 | 中野今治 | 国立療養所下志津病院神経内科<br>〒284　四街道市鹿渡934-5 | 医長 | 0434—22—2511 |
| | 堀眞一郎 | 東京都神経科学総合研究所神経生化学<br>〒182　府中市武蔵台2-6 | 副参事研究員 | 0423—25—3881 |
| | 桃井真里子 | 自治医科大学小児科<br>〒329-04　栃木県河内郡南河内町<br>大字薬師寺3311-1 | 講師 | 02854—4—2111 |

| 区　分 | 氏　名 | 所属施設名<br>所在地 | 所属における地位 | 連絡の際の電話 |
|---|---|---|---|---|
| 公募班員 | 山田和廣 | 大分医科大学生理学<br>〒879-56　大分県大分郡挾間町<br>医大ヶ丘1-1506 | 教授 | 0975—49—4411 |
| 顧問 | 三好和夫 | 冲中記念成人病研究所<br>〒105　東京都港区虎の門2-2-2 | 所長 | 03—588—1111 |
| | 黒岩義五郎 | 九州大学医学部脳神経病研究施設神経内科<br>〒812　福岡市東区馬出3-1-1 | 教授 | 092—641—1151 |
| | 豊倉康夫 | 東京都養育院附属病院<br>〒173　東京都板橋区栄町35-2 | 院長 | 03—964—1131 |
| | 宇尾野公義 | 国立静岡病院<br>〒420　静岡市城東町24-1 | 院長 | 0542—45—0101 |