厚生省「神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー症の臨床,病態と成因に関する研究

杉田班

昭和60年度研究報告書

昭和61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臨床，病態と成因に関する研究」班が発足して第２年度の研究報告書を作成する運びとなりました．デュシャンヌ型筋ジストロフィー症の研究は遺伝子工学的手法を用いその遺伝子座の局在の解明に近づきつつあり，今後遺伝子異常が直接どの様に疾患と係わっているかが問題となりましょう．この意味でも筋ジストロフィー症の病態の究明と治療法の開発は今後も本研究班の最重要課題になると思います．

本年度の研究成果はこの報告書に示されてあります様に筋ジストロフィー症並びに関連疾患に関する優れた報告がなされており，国際的にもこの方面の研究者に寄与する処が大きいと思います．班員の皆様の御努力に心から敬意を表しますと共に今後一層の発展を班長として期待したいと存じます．

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，引きつづいての御支援をお願い致します．

昭和60年12月

〈班長〉 杉　田　秀　夫

目　　次

昭和60年度総括研究報告…… 7

昭和60年度総合班会議研究報告抄録…… 13

分担研究報告…… 25

Ⅰ．モデル動物・実験的ミオパチー…… 33

Ⅱ．遺　伝…… 77

Ⅲ．臨床・臨床病理…… 97

Ⅳ．再生・Glycerol Kinase 欠損・赤血球…… 149

Ⅴ．遠位型ミオパチー…… 187

Ⅵ．ミトコンドリアミオパチー…… 203

Ⅶ．CK・エネルギー代謝・蛋白代謝…… 273

昭和60年度研究班名簿…… 335

昭和60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60年度（第2年度）の報告書である．この報告書には昭和60年12月7日(土)，8日(日)の両日に開催された当研究班の班会議席上で行われた報告をまとめた59編の論文が集録されている，また昭和60年8月1日(木)に行われた当研究班のワークショップ「ミトコンドリアミオパチーをめぐって」の抄録及び昭和61年1月19日(日)に行われた「筋ジストロフィー症」総合班会議における当研究班の報告の抄録も掲載してある．

〔研究方針〕

当研究班の研究は従来より班員各自の独創且つ自由発想を基盤として来た．筋ジストロフィー症の様に原因不明の疾患の解決には特にこの点は尊重されねばならない．しかし，班研究の意義を考慮し，研究の能率化をはかるため，プロジェクト研究として特定のテーマを掲げて集中的に研究を行った．

本研究は内容的に次の7つに分類され，各項目に属する発表演題数は下記の通りである．

Ⅰモデル動物の実験的ミオパチー7，Ⅱ遺伝4，Ⅲ臨床・臨床病理11，Ⅳ再生・Glycerol kinase欠損・赤血球8，Ⅴ遠位型ミオパチー3，Ⅵミトコンドリアミオパチー14，Ⅶ CK・エネルギー代謝・蛋白代謝12.

個々の研究はそれぞれ本症の研究を進めて行く上で重要な意義を持っているが，この中から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）モデル動物

モデル動物は従来よりヒト筋ジストロフィー症との対比において病態の一面を明らかにする上で意義があったが，今回X染色体劣性筋萎縮症mdxマウスが英国より輸入され，生理・形態・生化学的に検討された．種々の点でデュシャンヌ型筋ジストロフィー症(DMD)に類似するが再生がほぼ完全に行われる点でDMDとは著しく異なっている．この点でも有用なモデルである．

2）臨床，遺伝及び遺伝子工学的アプローチ

過去1年間にX染色体・常染色体相互転座による女児DMD 3例が見出された．X染色体の切断部位は全てp21であり，従来の報告に一致した．

又，先天性副腎低形成を伴う複合Glycerol kinase欠損症の男児例が発見され，染色体分析の結果p21付近の部分欠失が認められ，同様の欠失は母親にも認められた．此等の症例はDMD遺伝子座位決定の為に極めて重要な意義を持っている．

DMDのマーカーRFLPの単離の試みは第一年度に引き続き行われており，当面DMD遺伝子の近傍にあるOTC遺伝子を単離して，ヒトOTC遺伝子中のユニークなDNA断片を使ってRFLPの検出を行っている．

3）筋の変性と再性，新技術の開発

骨格筋の変性と再生の問題は本症の病態の中心課題であり変性に関しては骨格筋の崩壊機構はかなり明らかになって来たと言える．

しかし現象論的には原発性の変化が骨格筋にどの様に表現されているが依然として明らかではない．この問題を解決すべく多くの新しい研究技術が開発された．骨格筋のCTによる検討はすでに定着し，NMRによる分析，或いは超音波顕微鏡及び筋電図なども行われつつある．

それ以外に酵素蛋白の免疫電顕，筋蛋白のモノクローン抗体など数多い．又今年度はヒト筋肉細胞のクローン化も試みられつつあり，新しいstrategyとなろう．

一方，再生に関する研究も変性機構と平行して行われて来たが，今後再生の異常は再生筋自身に問題があるのか，或いは内部環境か，或いは両者によるのか重要な研究テーマとなろう．

B．関連疾患

1）Rimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチー（プロジェクト研究）

酵素抗体法によりrimmed vacuole周辺にリソゾーム酵素の存在が確認され本症におけるリソゾーム酵素の病態生理学的意義が明らかになった．また本症のモデルと考えられる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あるESTを10mg/kg/日経口投与する事により治療出来る事が明らかとなり，今後DMRV治療への道が開かれたと考えられる．

2）ミトコンドリアミオパチー（プロジェクト研究）

8月1日“ミトコンドリアミオパチー”というテーマでワークショップが開かれた．ミトコンドリアミオパチー，或いはミトコンドリア脳，筋症の臨床像の多様性，またこれと

関連してミトコンドリア酵素，特に電子伝達系酵素異常の病態生理的意義，及びその遺伝学的背景，又検索方法論の開発などに関して多くの発表がなされた．当班では昭和61年度本邦における症例を集積しその病態生理学的解析及びCoenzyme Qなどによる治療を系統的に行う予定である．

昭和60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

本邦におけるX染色体の異常を伴ったDMD

杉田秀夫*, 富　英明*, 里吉栄二郎*,
斎藤深美子**, 石原傳幸***, 後藤　順****,
柿沼宏明****, 中野今治****
国立武蔵療養所神経センター*, 東京医科歯科大学**,
国立療養所東埼玉病院***, 国立療養所下志津病院****

デュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は伴性劣性の遺伝子性疾患である.本症の発症原因を究明し, 更に胎児診断, 遺伝相談等を実施する為には, その遺伝子座位や遺伝子産物の解明は不可欠である.

最近の染色体分染法の進歩による高精度染色体分染法によってもDMD男児染色体の異常は認められていない. しかし近年女児DMD患者においてX染色体と常染色体の相互転座を見出した報告や, 又X染色体の部分欠失によるDMDを含めた複合疾患を示す男児例の存在する事が明らかになっている. 此等の症例はDMD遺伝子座の解明の為に極めて重要なstrategyである. 前者の例としてはToronto のWortonによって検索されている46, Xt(X：21)(p21：p12)の相互転座例, 後者の例としてはBostonのKunkelらによって研究されているXp21の部分欠失によるDMD, retinitis pigmentosa, chronic granulomatous diseaseを伴う症例がある.

そこで本邦における相互転座による女児DMD症例, 及びX染色体の部分欠失によるDMDを含めた複合Glycerol kinase欠損例について報告し若干の考察を加えたい.

1）X染色体, 常染色体相互転座

X染色体と常染色体との間の相互の均衡転座を示した所謂X染色体のnon randomな不活性化による女性DMDは1977年Greensteinらにより記載され, その後現在迄に欧米で約10例が報告されている.

本邦では1984年楢崎らの報告が最初であり, 我々が経験した3例を含め現在迄に5例の報告がある. 図1は国立武蔵療養所の11歳女児例でX染色体p21と5番常染色体q13間の均衡転座を示している. 本邦及び欧米に於いて報告された症例に共通するのは次の点である.

①転座に関与するX染色体の切断点は常にp21バンドである.

②転座に関与する常染色体は様々であり一定しない.

③正常なX染色体が選択的に不活性化されている.

以上の事からDMDの遺伝子座位はp21付近にありこの部位を切断点とする相互転座が起る事によってその座位上の遺伝子が突然変異, 或いは欠失を生じ, 同時に正常染色体が選択的に不活性化する事によりDMDが発現すると考えられる.

2）家族性のXp21欠失によるGlycerol kinase (GK)欠損症

症例は国立療養所下志津病院にて経過観察中の10歳男児である. 本例は臨床的にGK欠損症, DMD, 先天性副腎低形成(CAH), および精神発達遅延を伴っている. 高精度分染法による染色体分析によると, X染色体p21部位のギムザで濃染するバンドが小さい事が明らかになった(図2). この事から患児においてはXp21.1～Xp21.3の間で欠失が存在すると考えられる. 更に両親及び兄の染色体分析の結果, 父親及び兄の染色体構成は正常であったが母親の一方の染色体で患児と同様の短

腕の部分欠失が認められた．尚母親のGK活性は正常の1/2であった．

DMD遺伝子座に関しては転座症例などの結果から考えてXp21上にある事が明らかになっており，またGK欠損症やCAHもまたX連鎖性の疾患であるから此等疾患の主因となる遺伝子はDMDの遺伝子と同様にp21上に座位する事が示唆された．

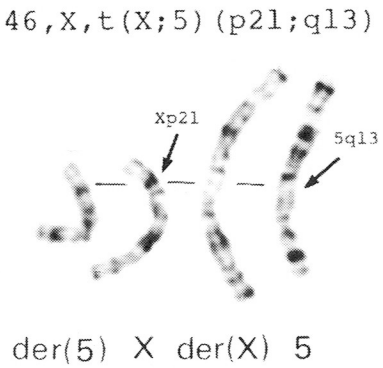


図1．X染色体p21と5番常染色体q13の相互転座

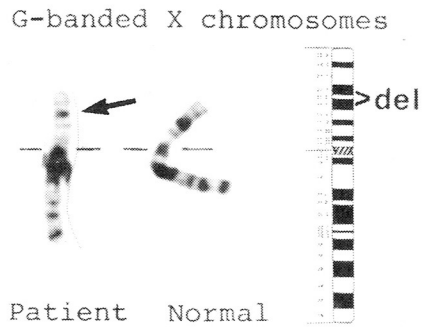


図2．X染色体p21の部分欠失

ミトコンドリアミオパチー
1．組　織　化　学

埜　中　征　哉
（国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部）

①　ミトコンドリアミオパチーの形態学的特徴

ミトコンドリア異常は形態学的には ragged-red fiber (RRF)に代表される．RRF は Gomori トリクローム変法で最もよく染出され，筋鞘膜下に集積したミトコンドリアが赤染し，少しボロボロした感じとなるので RRF の名称が与えられた．この RRF そのものには疾患特異性はなく筋ジストロフィー，多発性筋炎その他多くの疾患で見い出されている．また逆にミトコンドリア酵素異常が生化学的に証明された例でも RRF を認めないことも少なくない．すなわち RRF はミトコンドリア異常症を推定させる重要な所見ではあるが，それがないからといって否定的な材料とはならない．自験例での RRF 出現率は以下の通りである．

Pyruvate dehydrogenase complex deficiency	4／7*	(57%)
NADH-CoQ reductase deficiency	3／4	(75%)
Cytochrome c oxidase deficiency		
fatal infantile form	1／1	(100%)
benign infantile	2／2	(100%)
encephalomyopathic	4／8	(50%)
partial deficiency	7／8	(88%)
Total	21／30	(70%)

＊文献例5例を含む

②　Cytochrome c oxidase (CCO)欠損

1．乳児致死型　fatal infantile form

生後まもなく，あるいは乳児期早期に筋力，筋緊張低下で発症し，意識障害，高乳酸血症を伴って1歳未満で死亡する．筋線維は細く，筋原線維の形成悪く，多くの RRF を認める(文献的には1例のみ RRF を認めていない)．脂肪滴も増加する．CCO 染色，抗ヒト CCO 抗体染色で筋線維は全く染色されないが，筋紡錘の錘内線維や線維芽細胞には活性がみられる．培養線維芽細胞にも活性が存在する．筋線維は培養系でも増殖悪く，CCO 活性はみられない．生化学的には多くの例で cytochrome aa_3(CCO)のみならず cytochrome b, carnitine が欠損している．

2．乳児良性型　benign infantile form

乳児期にフロッピーインファントであった例で症状は次第に改善することがある．乳児期には RRF を多く認め，CCO 活性は低いが，症状が改善することと平行して RRF は減り CCO 活性も上昇する．

3．脳筋型　encephalomyopathic form

症例は最も多い．臨床的にはLeigh脳症，MELAなどの診断が下されている．中枢神経系症状の退行，高乳酸血症があれば本症を疑い筋生検の適応となる．RRFの出現頻度は自験例8例中4例(50%)にしかすぎない．CCO染色と生化学的な値はかなりよく相関している．

4．部分欠損　partial deficiency

最も問題になっているのがこの部分欠損である．部分欠損とは多くの筋線維にはCCO活性はあるのに，散在性に酵素欠損した線維をみるものである．生化学的にCCO活性低下を認めるものもあるが多くは正常域にある．部分欠損を認めた症例は以下の如くである．

Chron, prog, external ophthalmoplegia (CPEO)	4*
NADH-CoQ reductase 欠損症	1
CCO 欠損症	
脳筋型(娘)の母親	1
乳児良性型の回復例	1
MELA(ミトコンドリア酵素は正常)	1
計	8

＊1例のみ生化学的にCCO活性低下(正常の20%)

部分欠損は多因的ではあるが，CCO欠損症の母性遺伝をとるその母親や，良性の回復例，生化学的にCCO活性低下した症例も含まれている．すなわち部分欠損は単に二次的な結果でなく重要な意味が含まれている例もあるので，組織化学的染色の必要性を強調したい．

ミトコンドリアミオパチー：電子伝達系酵素異常の免疫組織化学的研究

佐　藤　　猛
（順天堂大学医学部脳神経内科）

〔目的〕

ミトコンドリア(Mit.)脳筋症では，最近 cytochrome c oxidase (CCO)をはじめとして電子伝達系を構成する種々の酵素欠損例が報告されている．CCO および complex IIIの抗体を用いて，剖検例のパラフィン切片から酵素蛋白を検出する方法を確立した．この方法により 3 例の CCO 欠損例を見出した．

次に免疫電顕により Mit. 内膜における CCO 蛋白の局在を観察する方法を検討したので報告する．

〔症例〕

症例 1：Leigh 症候群(都立清瀬小児病院，初鹿野　浩)，症例 2：Mit. 脳筋症(国立神経センター，向山昌邦)，症例 3，4：Leigh 症候群姉妹例(鳥取大，中村晴臣)，症例 5：Leigh 症候群(岡山大，林　一彦)，症例 6：Leigh 症候群(北大，中村仁志夫)．

〔方法〕

①抗体：CCO 抗体は東工大理学部化学福森義宏博士から分与を受けた．さらに牛心筋から CCO を精製，家兎に免疫して作製，complex IIIは名古屋大生化学小沢高将教授より分与．②免疫組織化学：大脳，小脳，肝，腎，心筋，骨格筋のパラフィン切片は脱パラ後，0.1% Triton X-100処理後，抗血清(1000倍稀釈)を反応させ，avidin-biotin complex 法にて呈色させた．③免疫電顕：生検筋をグルタールアルデヒド固定後，10% DMSO 処理し，凍結切片を作成した．この切片に抗体を反応させ，ABC 法にて呈色させた．オスミウム酸固定後エポン包埋し，超薄切片は無染色にて電顕観察した．

〔結果〕

症例 2 では骨格筋の CCO が欠損していたが，筋紡錘では陽性に反応，症例 3 では肝細胞で CCO が欠損，症例 5 では大脳，小脳，肝，腎，心筋すべてにおいて CCO が欠損していた．これら 3 例いずれも complex IIIは正常に検出された．

免疫電顕では正常形態を示す Mit. の外膜と内膜との間隙，およびクリステ膜は CCO 抗体により陽性に染色された．巨大 Mit. では増殖したクリステは染色されなかった．

Reducible cytochrom b 欠損を示した mitochondrial encephalomyopathy の一例

中川正法，今隈　満，
山野　隆，納　光弘
（鹿児島大学第三内科）

いわゆる“mitochondrial myopathy”において，その一部は電子伝達系の異常によることが知られている．今回，われわれは，mitochondrial encephalomyopathy に，reducible cytochrome b 欠損を伴なった一例を経験したので報告する．

〔症例〕

M.K. 15歳男子，身長143cm，体重31.5kg，家族歴：母親に軽度難聴あり．既往歴：12歳時に扁桃摘出．

現病歴：満期安産，処女歩行1歳4カ月，幼小児期より知能発達および身体発育遅延があり，また運動時易疲労性を自覚している．昭和60年9月15日，部落の運動会に出場し2，3回全力疾走をしている．翌日，起床時より頭痛を訴え，夕刻より嘔吐および全身けいれん発作を頻発し，発作重積状態になったため緊急入院．

〔入院時現症〕

血圧158/90，意識レベル：111-200，瞳孔：左右差（－），対光反射（＋），項部硬直（－），チアノーゼ（－），呼吸音：両側湿性，ラ音（＋），心音：収縮期雑音（＋），胸部X線像：肺紋理の増強（＋），血液ガス分析にて，pH7.11，pCO_2 40.9，pO_2 104.3，BE-16.2と著明な代謝性アシドーシスを示した．CT 所見に異常なし．脳波上，速波を基礎とし時にデルター波の混入を認めた．

入院後経過：アシドーシスの補正により，意識はすみやかに回復し入院2日目には歩行可能となる．回復後所見として，知能低下（100－7＝？），眼球運動：正常，両側軽度眼瞼下垂，感音性難聴，全身性軽度筋力低下を認めた．知覚障害なし．二次性徴を認めない．脳波所見では，全誘導にてシーター波を基礎波とし，時に鋭波を含むデルター波の群発を認めた．心胸郭比：56%，心電図にて，左脚ブロックを認め，心エコーにて肥大型心筋症と診断された．

〔検査所見〕

赤血球：$369\times10^4/mm^3$，白血球：14900/mm^3，Hb：11.1g/dl，Ht：32%，GOT 37，GPT 26，LDH 338，CK 77，BUN 12.6，クレアチニン1.0，血糖109mg/dl．PSP テスト：正常．血液中乳酸20.6（9-16）mg/dl，ピルビン酸0.98（0.36-0.59）mg/dl，髄液中乳酸49.1（8.3-17.5）mg/dl，ピルビン酸1.27（0.62-1.20）mg/dl と高値を示した．

自転車エルゴメーターによる15分間運動負荷テストでは，血中乳酸が負荷開始後15分値で，45.6（7.7-12.0）mg/dl と著明な上昇を認めた．

〔筋病理所見〕

左上腕二頭筋にて筋生検を行なった．光顕所見では，軽度の変性線維を認め，Gomori-trichrome染色にて“ragged-red fiber”を認めた．Type2c fiber の atrophy と type 1 fiber における lipid 含有量の増加を認めた．電顕所見では，paracrystalline inclusion body は認めなかったが，筋細胞膜下に巨大化した mitochondria が集積し，その中に膜様構造や dense body を認めた．

〔筋肉生化学〕

生検筋400mg より Bookelman らの方法にて，mitochondria を分離し電子伝達系酵素および cytochrome 含量を測定した．Succinate および KCN による還元一酸化差スペクトルにて，561 nm，431nm における cytochrome b の peak の出現がなく，Antimycin A による還元一酸化差スペクトルでも，cytochrome b の peak を認めなかった．Cytochrome cc_1 含量は，2774 (615±258) p mol/mg と増加し，aa_3 は413 (550±167) p mol/mg と正常範囲であった．還元剤である sodium dithionate にて還元した場合には，正常対照の40%の cytochrome b が検出された．しかし，reducible cytochrome b 含量が低下しているにもかかわらず，cytochrome b-c_1 complex を介する NADH-cytochrome c reductase (rotenone sensitive)，succinate-cytochrome c reductase 活性は，それぞれ0.576 (0.201+0.098) u mol/mg/min，0.592 (0.321+0.118) u mol/mg/min とやや高値であった．NADH-dehydrogenase, cytochrome c oxidase および citrate synthase 活性は，いずれも正常範囲であった．以上より，本症例は，in vitro における測定上，電子伝達系酵素活性低下を示さない reducible cytochrome b 欠損症と考えられた．

〔考察〕

reducible cytochrome b 欠損をともなった mitochondrial myopathy は，現在まで6例の報告があるのみであるが，運動時易疲労性，筋力低下，高乳酸ピルビン酸血症が共通する症状としてみられ，眼瞼下垂や眼球運動障害を示す例も報告されている．本症例のように中枢神経障害を示した例として，Spiro の父子例，Morgan-Hughes ら (1982) の報告があるが，小脳失調，ミオクローヌス等の症状をともなっている点が本症例と異なる．また，本症例の生化学的特徴として，cytochrome b-c_1 complex を介する各電子伝達系酵素活性の低下がなかった点があるが，このことは，in vivo において何らかの代償機構が働いている可能性を示唆していると思われる．しかし，ATP 産生能との関係やこれらの酵素活性の Antimycin A 感受性について今回は不明であり，さらに詳細な検討が必要と考える．今後，免疫学的検討および培養細胞を用いた検索を行ない病態の解明につとめたい．

ミトコンドリア酸化的リン酸化系酵素群のサブユニットの異常に対する検索法の確立

小 澤 高 将, 錦 見 盛 光, 田 中 雅 嗣
(名古屋大学医学部生化学第二講座)

ミトコンドリア (Mt)・ミオパチーは幅広い疾患群を包括している．その診断・治療法の開発にあたっては正確な病態の把握および一次的な病因の解明が必須である．Mt の酸化的リン酸化系酵素群は最近の膜固有蛋白質の単離精製技術の発展によりその構造の解明がすすんでいる．本研究はこれを基礎としてミオパチーにおける Mt 酵素系の異常をポリペプチドレベルで解明し，これまでの酵素学的ならびに分光学的分析法では捉え得なかった病因を分子レベルでさぐり治療方針の確立に寄与しようとするものである．

Mt における酵素異常の検索法としては少量の生検試料を用いて，Mt に存在する数多くの複合酵素系のそれぞれのサブユニットの量および分子量の異常を特異的に検出しうることが必須条件である．また同時に複合酵素系に属さないポリペプチドの異常をも捉えるために，非特異的ではあるが分離同定能の高い方法を併用する必要がある．このために我々は容易に大量の試料の得られるウシ心筋 Mt を酵素精製の材料として用い，従来から行われてきた胆汁酸存在下における塩析に加えて，疎水結合クロマトグラフィーおよびアフィニティクロマトグラフィーにより各複合酵素を高度に精製した．また複合酵素をカオトロピックイオンにより解離させ電子伝達系を構成するポリペプチドすなわち，鉄イオン蛋白質，ユビキノン結合蛋白質，チトクロム b，チトクロム c_1 などを単離精製した．これらに対する特異抗体を作製したところ，抗ウシ酵素抗体はヒトの酵素蛋白質と良好な交差反応を示し免疫化学的検出法および免疫沈殿法による酵素蛋白質の異常の検索に有力な手段を提供した．

1．ウエスタンブロット——免疫化学的検出法

生検筋より単離した Mt の蛋白質を SDS・尿素により処理し，指数関数的濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離し，これを Durapore filter にブロットし，これと特異抗体と反応させ，抗原抗体複合体をペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ法により検出し，電気泳動的移動度および発色の程度から酵素蛋白質の分子量および含量の異常の有無を検討した．その結果電子伝達複合体 I，III，IVおよび F_1-ATPase においてそれぞれ，4，5，18および2種のサブユニットを特異的に検出しえた．さらにチトクロム c オキシダーゼ欠損症の患者では複合体IVのサブユニットIV，V，VI，VIIの量が著しく減少していることを見い出した．

2．免疫沈殿——銀染色法

Mt の蛋白質を界面活性剤を用いて可溶化し，酵素に対する特異抗体を加え，形成された免疫複合体をプロテイン A-セファロースに結合させ，非特異的吸着物を洗浄除去した後 SDS 電気泳動を行い，銀染色法により微量の酵素蛋白質を検出した．本法によりウエスタンブロット法では直接検出できない疎水性の高いポリペプチドの異常を追求することが可能である．チトクロム c オキシダーゼ欠損症の患者では他のサブユニットに比してサブユニット II の量の著しい減少が見い出された．

3．高分解能一次元電気泳動——銀染色法

Mtの蛋白質全体をSDS･尿素で処理した後，大型の指数関数濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い，銀染色によりポリペプチドを検出し，同時に泳動された精製酵素標品のサブユニットの移動度との比較により同定を行った．ウシ心筋酵素のサブユニットの分子量はヒトのそれとほぼ一致し標準蛋白質として利用できた．この方法は免疫化学的検出法，免疫沈殿法では検出できない未知の蛋白質の異常を捉えることができるものである．あるチトロクロムcオキシダーゼ欠損症の患者では本酵素の欠落に加えて，少なくとも他の6種のポリペプチドの量の著しい減少が見い出された．

Mt・ミオパチーにおける酵素活性欠損の原因を明らかにし，その治療方針を確立するためには，どの酵素のどのサブユニットが欠損しているか，またどのポリペプチドの減少を随伴しているかを個々の症例において明らかにし，分子レベルでの欠損と臨床像の相関をたどる必要がある．こうした研究の成果として，単に酵素サブユニットによる疾患群の分類にとどまらず，ヒトの呼吸系酵素遺伝子のクローニング，Mt遺伝子の発現制御，Mtへの蛋白の輸送機構などの基礎的研究の発展とともに，基礎・臨床のより一層の研究協力が期待される．

分 担 研 究 報 告

目　　次

I．モデル動物・実験的ミオパチー

1) mdx マウス骨格筋の経時的変化 ……35
九州大学医学部脳研神経内科　後　藤　幾　生

2) mdx マウス骨格筋に対する神経切断の影響 ……39
鳥取大学医学部脳研神経病理　中　村　晴　臣

3) mdx マウスの電気生理学的研究：
膜電位及び筋細胞内 Ca の計測 ……44
宮崎医科大学第三内科　栗　原　照　幸

4) mdx マウス骨格筋におけるリソゾームチオールプロテアーゼ活性と
その局在について……51
東京医科歯科大学医学部神経内科　塚　越　　廣

5) Local Tetanus による実験的ミオパチーに関する研究 ……57
東京都立神経病院　田　辺　　等

6) Vincristine, Vinblastine, Colchicine によるラット骨格筋の
形態学的変化に関する研究
——ライソゾーム系を含んで——……63
大阪医科大学第一内科　茂　在　敏　司

7) 筋ジストロフィー鶏胚の交感神経節における蛋白質合成能の
特異性についての研究（第2報）
——加齢にともなう変化について——……69
東京都神経科学総合研究所神経生化学　堀　　眞一郎

II．遺　　伝

8) ドシャンヌ型筋ジストロフィー症の遺伝分析
I．女性ドシャンヌ型筋ジストロフィー症の染色体分析……79
杏林大学保健学部　古　庄　敏　行

9) 本邦におけるX染色体
——常染色体転座を伴った女性 Duchenne 型筋ジストロフィー ……84
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部　杉　田　秀　夫

10) SV40遺伝子導入によるヒト骨格筋細胞株樹立の試み …… 88
自治医科大学小児科　桃　井　真里子

11) 筋ジストロフィー症遺伝子のマーカーとなるDNA断片の単離…… 92
東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部　鈴　木　紘　一

III. 臨床・臨床病理

12) 常染色体劣性遠位型筋ジストロフィー（三好）における骨格筋障害様式：CTによる検討 …… 99
筑波大学臨床医学系神経内科　中　西　孝　雄

13) 神経筋疾患におけるUltrasound imaging
——超音波顕微鏡およびEMG-guided biopsy needleの臨床応用—— 103
北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門　田　代　邦　雄

14) いわゆるrigid spine syndromeの臨床像と予後 ……109
九州大学医学部脳研神経内科　後　藤　幾　生

15) Sarcotubular myopathyの一例 ……111
大阪医科大学第一内科　茂　在　敏　司

16) 遠位性筋萎縮を示す多発性筋炎の5症例……115
国立療養所宇多野病院臨床研究部神経内科　斎　田　孝　彦

17) 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
——II. Freeze fracture法による膜内粒子密度の検討—— ……119
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

18) 筋病変の検討における免疫組織化学の応用について
——ミオグロビンおよび免疫グロブリンに関する方法論を中心として——
……123
東京都立神経病院　田　辺　　等

19) DMD筋におけるミオグロビン局在の変化
——免疫電顕による検討——……130
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

20) Emery-Dreifuss型筋萎縮症の剖検所見 ……134
国立療養所筑後病院　馬　渡　志　郎

21) 筋緊張性ジストロフィーの筋病理……140
虎の門病院神経内科　高　木　昭　夫

22) 筋緊張性ジストロフィーにおけるカルシウム代謝異常に関する研究……145
東邦大学医学部第四内科　木　下　眞　男

Ⅳ．再生・Glycerol Kinase 欠損・赤血球

23) 実験的再生筋における筋芽細胞増殖促進因子について……151
東北大学医学部脳研神経内科　高　瀬　貞　夫

24) 筋再生に関する実験的研究
——腱切断と筋壊死後の再生について——……156
金沢大学医学部神経内科　福　原　信　義

25) ジストロフィー筋の再生と種々の萎縮筋中の遊離アミノ酸の変動……162
帝京大学医学部第一内科　寺　尾　寿　夫

26) Duchenne 筋ジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験
——再生筋組織の Cathepsin B 活性について—— ……166
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

27) Glycerol kinase 欠損症：
1．自験1例を含めての臨床像の検討……170
国立療養所下志津病院神経内科　中　野　今　治

28) Glycerol kinase 欠損症：
2．家族性の Xp21欠失，および X 染色体の不活性化について……175
国立療養所下志津病院神経内科　中　野　今　治

29) Glycerol Kinase 欠損を伴う筋ジストロフィー症
赤血球リン脂質について……179
国立武蔵療養所神経センター　吉　田　瑞　子

30) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜 spectrin の分析……183
国立療養所筑後病院　馬　渡　志　郎

Ⅴ．遠位型ミオパチー

31) 遠位型ミオパチーにおける神経筋接合部の電顕的，形態計測的研究……189
金沢大学医学部神経内科　福　原　信　義

32) Rimmed vacuole を伴う筋疾患におけるリソゾームカテプシン群の
局在と意義……193
徳島大学医学部酵素化学　木　南　英　紀

33) 実験的クロロキンミオパチーに対する EST の治療効果 ……197
国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部　杉　田　秀　夫

VI. ミトコンドリアミオパチー

34) 網膜色素変性，難聴を伴う lipid storage myopathy の1例 ……205
大阪大学医学部第二内科　垂　井　清一郎

35) 末梢神経障害を伴った家族性ミトコンドリア・ミオパチーの1例……210
筑波大学臨床医学系神経内科　中　西　孝　雄

36) 痙攣，乳酸上昇，反復性低吸収域を示し MELAS を疑った1例 ……214
自治医科大学神経内科　水　野　美　邦

37) 筋ミトコンドリア異常の形態学的研究……217
東邦大学医学部第四内科　木　下　真　男

38) ミトコンドリア脳筋症の一剖検例……221
宮崎医科大学第三内科　栗　原　照　幸

39) Cytochrome c oxidase 欠損症の病理学的検討……227
国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部　埜　中　征　哉

40) Succinate——Co Q reductase (Complex II) 活性低下を認めた mitochondrial encephalomyopathy ……233
東京医科歯科大学神経内科　塚　越　　廣

41) Reducible cytochrome b 欠損を示した mitochondrial encephalomyopathy の一例 ……238
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

42) MELAS の一症例の生化学的検討 ……243
新潟大学脳研究所神経内科　宮　武　　正

43) アフィニティークロマトグラフィーによる人心筋，骨格筋よりのチトクロームCオキシダーゼの精製とサブユニットの比較……248
徳島大学医学部第一内科　川　井　尚　臣

44) ミトコンドリアミオパチー生検筋および皮膚線維芽細胞の電子伝達系酵素活性……253
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　　猛

45) ミトコンドリアミオパチー：電子伝達系酵素の抗体を用いた免疫組織学的研究……258
順天堂大学医学部脳神経内科　佐　藤　　猛

46) 筋型チトクロムC酸化酵素欠損症におけるミトコンドリア電子伝達系酵素蛋白質の異常……262
名古屋大学医学部生化学第二講座　小　澤　高　将

47) ミトコンドリア脳筋症の成因に関する遺伝子の解析（第Ⅰ報）……268
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

Ⅶ. CK・エネルギー代謝・蛋白代謝

48) Duchenne 型筋ジストロフィーにおける
血清 CK isoenzymes について
——高感度 enzyme immunoassay 法による検討——……275
名古屋大学医学部神経内科　杉　村　公　也

49) ジストロフィー筋（in vitro）よりの creatine kinase の遊離 ……279
虎ノ門病院神経内科　高　木　昭　夫

50) 骨格筋における Ca^{++} paradox について……283
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

51) 骨格筋細胞内の elemental composition
特にカルシウムイオンの動きについて……289
東海大学医学部生理学教室　吉　岡　利　忠

52) ラット赤筋・白筋の glucose uptake に影響を及ぼす諸因子 ……295
信州大学医学部第三内科　庄　司　進　一

53) 発育期鶏骨格筋 phosphofructokinase に関する研究 ……300
自治医科大学神経内科　水　野　美　邦

54) 生体におけるクレアチンの代謝経路：
人（健常並びに DMD）及びラット腸管内容物における
クレアチン分解活性と菌種類……305
冲中記念成人病研究所　紫　芝　良　昌

55) 糖原病Ⅶ型における高尿酸血症の成因
——筋運動による尿酸産生の亢進——……311
大阪大学医学部第二内科　垂　井　清一郎

56) 収縮の燐核磁気共鳴による研究……315
大分医科大学生理　山　田　和　廣

57) Duchenne 型筋ジストロフィーの筋変性壊死機構
——opaque 線維の役割を中心に——（第2報）……319
熊本大学医学部第一内科　荒　木　淑　郎

58) Nemaline myopathy の筋構造蛋白……325
国立長野病院　小　口　喜三夫

59) ネマリン・ミオパチーの筋構造蛋白のモノクロナル抗体による解析……330
東京大学医学部脳研神経内科　萬　年　　徹

Ⅰ．モデル動物・実験的ミオパチー

1) mdxマウス骨格筋の経時的変化

後藤幾生*

研究協力者　山田　猛*　石本進士*　北口哲雄*

目　的

mdx マウスは進行性筋ジストロフィー症のモデル動物とされているが[1]，筋変性の後，筋再生が速やかにおこり，臨床的にも進行性でないという点でヒト筋ジストロフィー症とは異なった特徴を有している。私どもは mdx マウス骨格筋について，経時的に形態学的観察を行い，その筋変性と再生について検討した．

材料と方法

mdx マウスと正常対照マウス（C57BL/10 ScSn）の雄を用い，ヒラメ筋と腓腹筋外側部について調べた．生後10日目より56日目まで，経時的に各群3匹ずつを用いた．組織化学染色として ATPase（pH4.0, 4.3, 4.6, 10.0），NADH-TR, methyl-green-pyronin 染色を行った．fiber type を ATPase 染色により，type I, II A, II B, II C と分類した[2]．各 fiber type の筋線維径と割合を経時的に測定した．また再生線維の指標として pyronin 陽性線維の割合を検討した．

結　果

1．mdx マウスの骨格筋の組織学的所見：生後18日目までは腓腹筋，ヒラメ筋とも対照マウスに比して差違は認められなかった．生後21日目に両筋とも筋線維の変性，壊死が認められた（図1）．28日目以後には両筋において中心核を有する小径線維群が認められ，再生線維と考えられた．56日目にも両筋において筋変性，壊死が認められたが，間質結合織の増加は軽度であった．

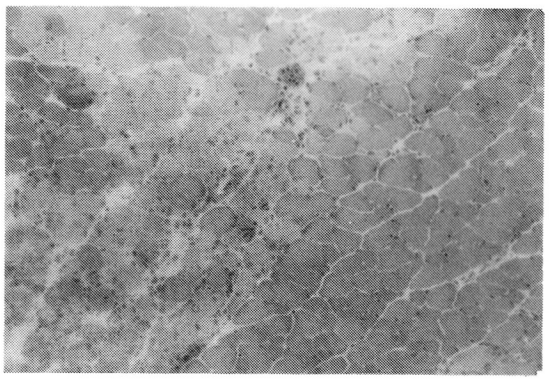


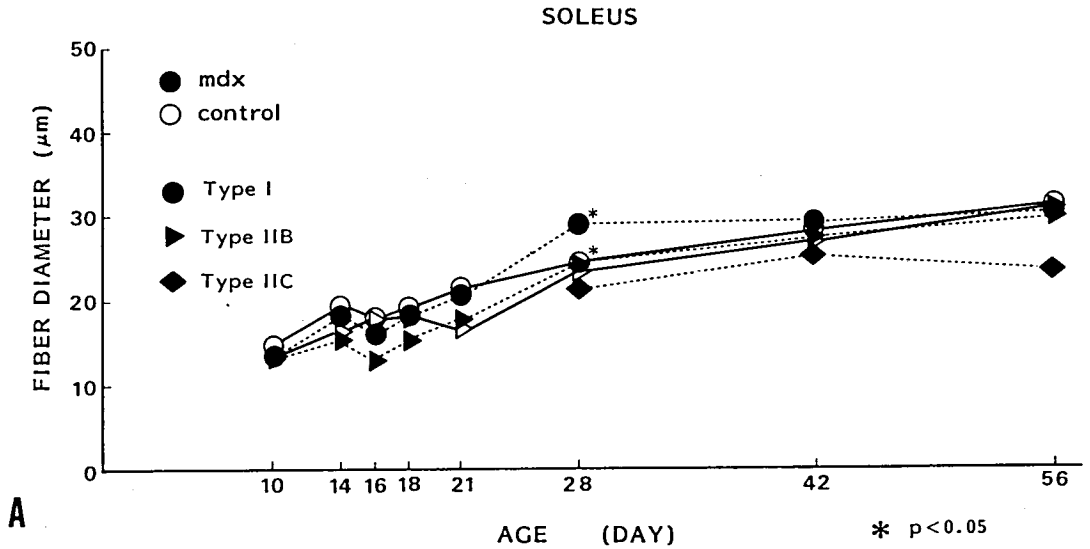
図1　生後21日目の mdx マウスの腓腹筋．筋線維変性，壊死を多数認める．HE 染色，×100

2．筋線維径の経時的変化：対照マウス，mdx マウスのヒラメ筋（図2 A），腓腹筋（図2 B）において，各 fiber type の平均筋線維径とも経時的に増大した．生後28日目に mdx マウスのヒラメ筋の type I fiber，腓腹筋の type II A, II B fiber が対照より有意に大きかった以外は，有意差を認めなかった．しかし mdx マウスにおいて再生線維がみられた28日目以後は，筋線維径のバラツキが対照より大きかった．

3．fiber type の割合の経時的変化：ヒラメ筋（図3 A）では，生後21日目までは mdx，対照マウスの間に差違を認めないが，mdx マウスでは28, 42日目に type I fiber の減少，56日目に type II B fiber の減少が認められた．しかし中心核のない筋線維についてみると，fiber type の割合は対照との間に有意差を認めなかった．また28日目以後に多数の type II C fiber が認められた．

腓腹筋（図3 B）では，生後21日目までは mdx，対照マウスの間に差違を認めないが，mdx マウス

*九州大学医学部脳研神経内科



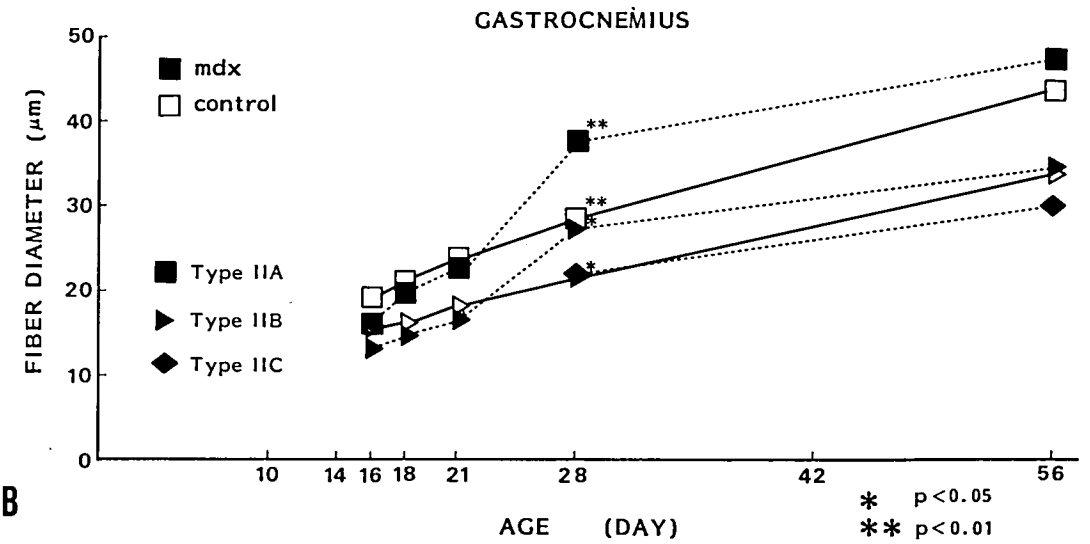


図2　A：ヒラメ筋の筋線維径の経時的変化.
B：腓腹筋の筋線維径の経時的変化.

では28日目以後に type II A fiber の減少，type II C fiber の増加が認められた.

type II C fiber は対照マウスのヒラメ筋，腓腹筋ではごく少数しか認められなかった.

4．pyronin 陽性筋線維：pyronin 陽性筋線維は，mdx マウスのヒラメ筋，腓腹筋において28日目以後に認められた．pyronin 陽性筋線維は中心核を有する小径の type II C，II B fiber であった.

考　　察

mdx マウスのヒラメ筋と腓腹筋において，生後21日目頃に筋変性，壊死がみられ，28日目以後に再生線維の出現が認められた．これは Bulfield[1]，

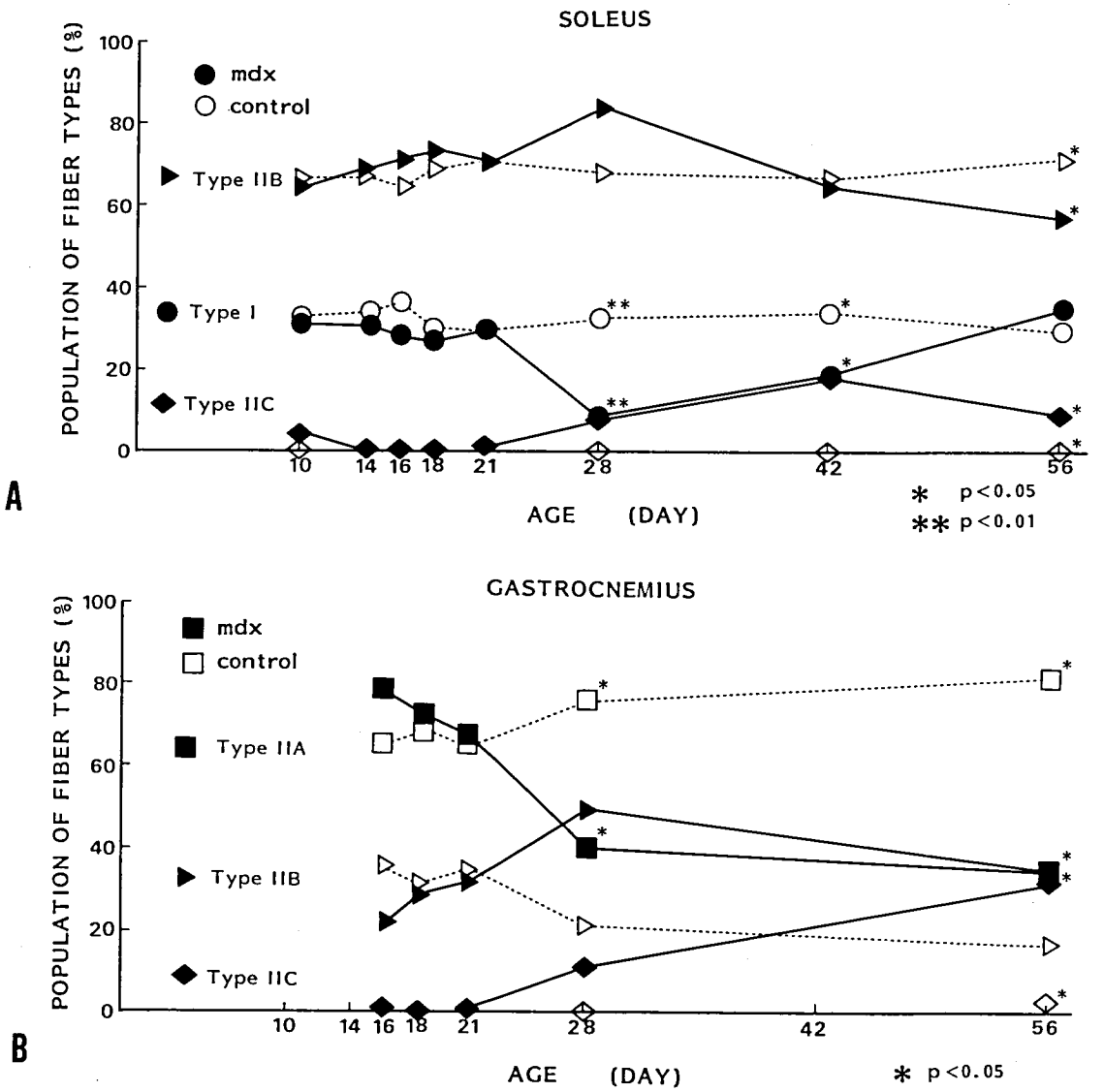


図3　A：ヒラメ筋の fiber type の割合の経時的変化.
B：腓腹筋の fiber type の割合の経時的変化.

Dangain[3] の報告と一致する.

fiber type の割合の観察で，mdx マウスにおいて再生早期と考えられる28日目に，ヒラメ筋で type I fiber の減少，腓腹筋で type II A fiber の減少が認められたが，中心核のない成熟した筋線維についてみると，fiber type の割合は対照との間に有意差を認めなかった．即ち type I fiber や type II A fiber の減少は各 fiber type の選択的障害というよりも，再生早期の再生線維（type II C，II B fiber）の一時的増加による結果と考えられた.

mdx マウスの28日目以後にみられた筋再生を反映していると考えられる pyronin 陽性筋線維は[4]，ATPase 染色との対比で小径の type II C および II B fiber であった．このことより mdx マウスの筋再生能は活発であること，再生過程におい

て比較的早期に type II C および type II B fiber への分化がおこることが推定される。

文　献

1) Bulfield G, Siller WG et al : X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 1189, 1984.

2) Brooke MH, Kaiser KK : Muscle fiber types : how many and what kind? Arch. Neurol. 23 : 369, 1970.

3) Dangain J, Vrbova G : Muscle development in mdx mutant mice. Muscle & Nerve 7 : 700, 1984.

4) Neerunjun JS, Dubowitz V : Concomitance of basophilia, ribonucleic acid and acid phosphatase activity in regenerating muscle fibers. J. Neurol. Sci. 33 : 95, 1977.

2) mdxマウス骨格筋に対する神経切断の影響

中 村 晴 臣*

研究協力者　高 田 邦 安* 加 藤 信 介* 本 田 誠 四 郎*

伴性劣性遺伝筋ジストロフィーマウス（mdxマウス）については，その発見以来種々の検索がおこなわれている（1-3）．この動物では広範な筋変性が起こる半面，筋再生も活発に行なわれ，筋萎縮や筋力低下は殆ど見られない．同じく遺伝性の筋ジストロフィーマウスであるdyマウスでは，筋変性・萎縮は進行性で，同時に末梢神経に髄鞘形成異常，シュワン細胞基底膜の局所的欠損などの形態異常を伴うことが知られている．我々はmdxマウスの末梢神経には明らかな形態異常がないことを昨年の班会議で報告した(4)．今回は末梢神経による筋支配が，mdxマウス骨格筋の変性・再生にいかなる影響を与えているかを検討するため，末梢神経（坐骨神経）の切断後に下腿骨格筋におこる変化を形態学的に検索した．

材料と方法

エーテル麻酔下に生後21日目のmdxマウスの右大腿部で皮膚切開し，坐骨神経を約8mm切除，皮膚をクリップ縫合した．反対側は放置．対照としてC57BL/10マウスにも同様手術を施行．マウスは手術後1，2，4，6，12，15週の各時点で各2匹屠殺し，手術側，反対側の両腓腹筋をドライアイス冷却アセトンで凍結，クリオスタット10 μm切片に各種染色（H & E，NADH-TR，ATPase，Gomori trichrome変法，ほか）を施し，光顕観察およびNikon Cosmozone 98を用いて筋線維直径を計測した．また長指伸筋，ヒラメ筋は2.5%グルタールアルデヒド固定，ランタナム染色の後，脱水，エポン包埋，超薄切，ウラン鉛二重染色を施し，電顕観察を行なった．

＊鳥取大学医学部脳研神経病理

結　果

対照マウスの非切断側腓腹筋は1，2，4週とすすむにつれ，筋線維の平均直径が増加する（図1）が，中心核を持つ筋線維はいずれも1%以下だった．腓腹筋はATPase染色では大部分タイプ2線維から成るが，NADH-TR染色ではoxydative，glycolyticの2種に分化し，それぞれII ox，II glyと呼ばれる．両者は大体モザイク状分布を示すが，II oxは腓腹筋内でもヒラメ筋に近い部分により多い．神経切断側では切断後1，2，4週で筋線維直径の増大が見られず，6，12

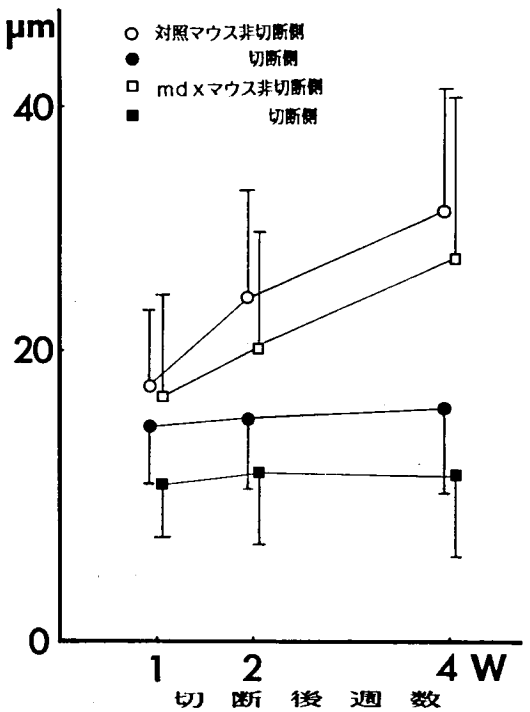


図1　坐骨神経切断1，2，4週後の腓腹筋筋線維の平均直径．

週では，小径線維の群集化と大径線維の漸増を認めた．中心核を持つ筋線維の数は切断1，2週後では非切断側と同じく1％以下だが，4週では小径線維を中心に16.5％と増加し，6週以後では大径線維にも中心核をもつものが認められた．切断側の小径線維はNADH-TR染色上，II ox，II glyの区別が不明瞭で，活性の比較的高い線維が殆どを占めた．

神経切断1，2，4週後のmdxマウスの神経非切断側では随所に盛んな筋線維の壊死，貪食像があり（図2 A），中心核を持つやや直径の細い筋線維が比較的集合して見いだされた．これらの小径線維はNADH-TR染色上の活性はやや高くII oxに近いが，その他の筋線維ではII ox，II glyの両者はおおむねモザイク状に分布していた．しかし週を追うごとに筋線維の平均直径値は増加し（図1），中心核を持つ線維の直径も増大した．

mdxマウスの神経切断側では切断1週後，中心核の有無に関係なく殆どすべての筋線維が直径の減少をしめし，非切断側と対照的に筋線維の壊死，貪食像は殆ど消失していた（図2 B）．切断後2，4週と進むにつれ，小径線維が増加，更に6，12週では神経再支配を受け直径を回復した筋線維が一部存在した．NADH-TRでは小径線維はやはりII ox，II glyの区別不明瞭で，全体にやや活性が高かった．中心核を持つ筋線維は切断後1，2，4週でそれぞれ計測した筋線維の25.7, 15.5, 34.3％を占め，非切断側（37.6，22.0，50.3％）に比べやや少なかった．6週までの切断側では壊死，貪食像は見いだせなかったが，12週では少数の筋線維に変性・壊死が認められた．

15週のmdxマウス神経切断側は，筋腹径が反

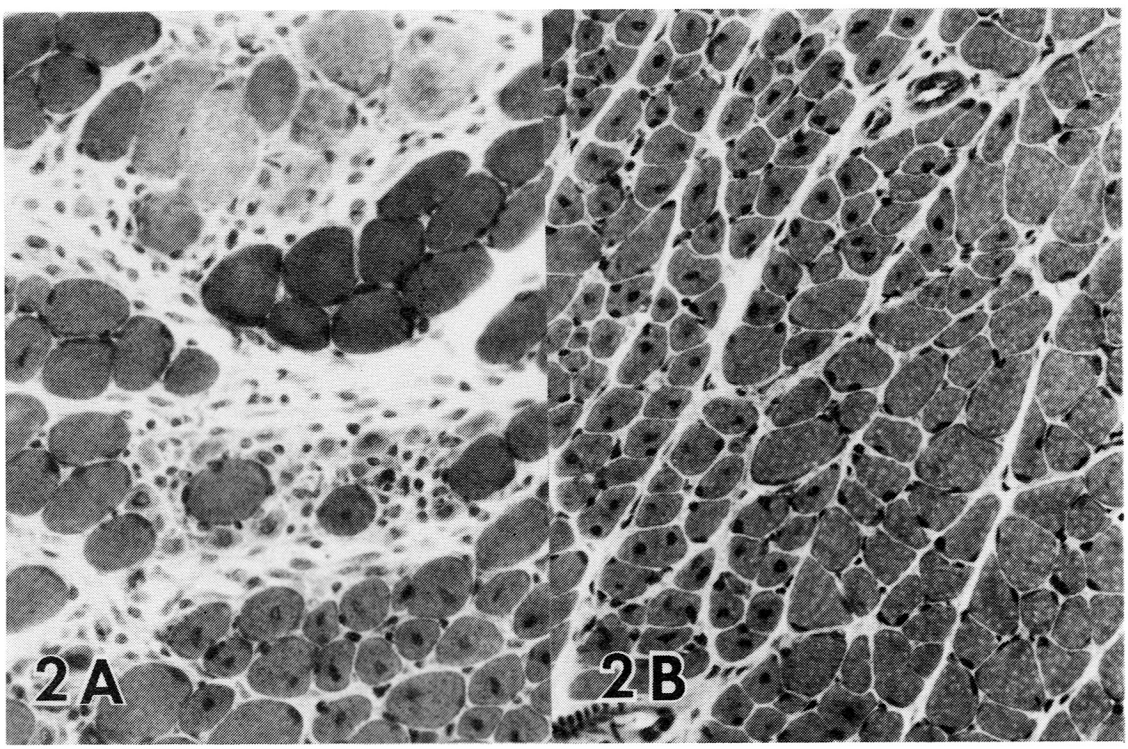


図2　A：神経切断後1週のmdxマウス非切断側腓腹筋．壊死線維の集団と貪食像を見る（H & E, ×240）．
B：同じ動物の切断側腓腹筋．筋線維は全体に小径化し，壊死，貪食像は認められない（H & E, ×240）．

対側の約7割に回復し，神経再支配がほぼ完成していた．筋線維の平均直径は切断側と変わらず，非切断側同様に活発な壊死，貪食像が見られた（図3）．NADH-TR染色でもII ox，II glyの区別が明らかとなり，しかも両者は各々群集化し神経再支配を裏付けた．

ヒラメ筋，長指伸筋においても神経切断後1週以降，明らかな壊死線維を見いだせず，ほぼ腓腹筋と同じ結果であった．電顕的に2週および12週のmdxマウス，対照マウスの非切断側，切断側ごとの所見を比較したものを**表1**に示した．活性化された筋衛星細胞は，mdxマウスで神経切断の有無にかかわらず多数観察された（**図4**）ほか，対照マウスの神経切断側でも観察された．

考　　察

mdxマウスは生後10ないし15日目まではどの筋にも殆ど変性を認めないが，これ以後は筋線維の広範な壊死と貪食，活発な再生が，筋線維のタイプ別にかかわりなく起こる．前脛骨筋では，筋変性の極期が生後3～4週にあるとされ，張力，筋重量の減少，半弛緩時間の延長がこの時期に最も著しい(2)．中心核を持つ線維はmdxマウスの骨格筋で高頻度に見いだされ，ヒラメ筋，長指伸筋では生後30日を越えた時期から急に増加し，60日で半数以上が，120日では殆どが中心核を持つとされる(3)．これらの中心核を持つ線維は群集する傾向があり，一旦変性に陥り再生した筋線維と見做される．再生筋が再度変性しうるにしても，再生は活発かつ完全に行なわれるため，一定時期を

図3　切断15週後のmdxマウス切断側腓腹筋．大部分の筋線維は直径を回復，非切断側と変わらない壊死，貪食像を認める（H & E，×120）．

表1　ヒラメ筋，長指伸筋における変化

	mdxマウス	対照マウス
切断後2週		
非切断側		
成熟線維	＋＋	＋＋
小径線維	＋＋	－
変性線維	＋＋	－
筋衛星細胞	＋＋	±
切断側		
成熟線維	＋	＋
小径線維	＋＋	＋＋
変性線維	－	－
筋衛星細胞	＋＋	＋＋
切断後12週		
非切断側		
成熟線維	＋＋	＋＋
小径線維	＋	－
変性線維	＋	－
筋衛星細胞	±	－
切断側		
成熟線維	＋	＋
小径線維	＋＋	＋＋
変性線維	±	－
筋衛星細胞	＋＋	＋＋

（－，認めない；±，ごく少数；＋，しばしば，＋＋，多数）．

図4　切断2週後のmdxマウス切断側ヒラメ筋．myotubeが形成されている（×7,500）．

過ぎると筋力はほぼ正常化し，マウスの寿命は正常動物と殆ど変わらない．腓腹筋やヒラメ筋の変性は前脛骨筋よりもやや遅れる(2)が，広範な筋変性と，引き続いて起こる活発な再生は共通している．

今回の実験では，坐骨神経を切断した後1週以降，mdxマウスの下腿骨格筋では上に述べたような筋線維のmassiveな壊死，貪食像が殆ど認められなかった．即ち筋変性が阻止された．これはKarpatiらが除神経したジストロフィーハムスターで認めた所見(5)と類似の結果で，筋変性が引き起こされるためには筋線維は神経支配を受けている必要があることを示した．勿論，神経支配を離れた骨格筋は収縮能を喪失し，直径が減少するためその機能は全く発揮できない．

Karpatiらは，除神経によって筋変性を阻止できるのは，1）筋の活動に必須のエネルギー源の供給，取り込み，細胞内での利用過程の障害があり，ATPの産生が不足する，2）筋内血流調節障害のため活動時に十分な血液供給がされない，などジストロフィー筋に特有の異常が活動性を失った筋では起こり得ないため，あるいは，3）ジストロフィー筋の分子レベルの異常は，非活動時には潜在性で，筋線維が機械的または電気的に活動したとき顕在化（例えば形質膜の欠損がおこる）するため，さらに，4）筋の壊死は筋線維の構造的，生化学的特性が一定レベル以上の成熟段階にあるものに限って起こるが，除神経された筋線維は成熟段階を外れるためであるなどの可能性を挙げ，そのうち，4）の仮説が最もよく実験結果を説明できるとしている．

筋線維の成熟分化に神経支配が不可欠なことは既に生理学的，筋組織化学的に証明され，今回の実験でも坐骨神経切断後1週の腓腹筋で既にNADH-TR染色でII ox，II glyの区別が不明瞭化し，同時に筋線維の壊死が阻止されていた．6週後からは一部の筋線維に神経再支配が認められ，15週後の再支配がほぼ完成し，NADH-TR染色でのタイプ群集化の像を伴った時点では活発な筋線維壊死が起こった．この2つの事実は神経支配，ひいては筋線維の分化・成熟が筋の壊死変性に必須であることを裏付けた実験結果と言える．今回は切断1週後以降の変化を検討したが，1週後にはすでに筋線維は明らかに“脱分化”状態にあり，壊死も阻止されていた点は興味深いので，今後初期変化を詳しく検討したい．また，mdxと対照マウスの間では，神経切断側も非切断側も，その直径の増減がほぼ平行に推移した．つまり，除神経によって惹起された筋線維萎縮はmdxマウスと対照マウスとの間で差がないので，前者がとくに除神経によって不利な影響を受けたとは考えられない．言い換えれば，神経支配の筋線維に対するtrophicな効果はmdx，対照マウスの間で殆ど差がないと思われる．のみならず，電顕像で筋衛星細胞の活性化はmdxの切断，非切断側，さらに対照マウスの切断側で観察され，除神経は衛星細胞の活性化を促すものと判断された．これらの各群の間に差があるか否か，定量的解析を含め今後さ

らに検討する予定である.

結　　論

坐骨神経を切断したmdxマウス下腿筋では，切断後1週以降，筋線維の壊死，貪食像を殆ど認めなかった．神経再支配が完成した切断後15週の筋では活発な筋線維壊死，貪食像が観察された．

筋線維の変性が惹起されるためには筋は神経支配を受け，筋線維が一定レベル以上の成熟段階にあること，あるいは自発的筋収縮能を保持することが必要と考えられる．

筋衛星細胞はmdxの筋変性による他，mdxおよび対照マウスの両者で除神経によっても，活性化されることが観察された．

文　　献

1）Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore K : X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA 81 : 1189, 1984.

2）Dangain J, Vrbova G : Muscle development in MDX mutant mice. Muscle Nerve 7 : 700, 1984.

3）杉田秀夫，田辺雄三，埜中征哉，江崎孝三郎，野村達次：III-1．筋ジストロフィー症モデル動物の開発　mdxマウス骨格筋の病理学的研究，厚生省神経疾患研究委託費，筋ジストロフィー症動物の開発・供給に関する研究，野村班，昭和59年度班会議報告書，pp. 13-31，1985.

4）中村晴臣，田中順一，高田邦安：mdxマウスの坐骨神経所見，厚生省神経疾患研究委託費，筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究，杉田班，昭和59年度班会議報告書，pp. 39-41，1985.

5）Karpati G, Carpenter S, Prescott S : Prevention of skeletal muscle fiber necrosis in hamster dystrophy. Muscle Nerve 5 : 369, 1982.

3) mdxマウスの電気生理学的研究：膜電位及び筋細胞内Caの計測

栗原照幸*

研究協力者　田中政幸*　塩屋敬一*
山村善教*　松倉　茂*

目　的

mdx マウスは X-chromosome-linked muscular dystrophy の動物モデルとして現在まで筋病理学的研究がなされて来た[1,2,3]．生後5日までは変化なく，10日目になると壊死線維が集塊を成して認められる．20日目では壊死線維と再生線維が認められ，20日～60日で再生線維に入れ替わり，120日では中心核線維がほとんど1回は壊死に陥って再生したことを示す形態学的結果が報告されている．今回 mdx マウスを用い，対照としては C57BL/10マウスを用いて，筋細胞内記録を行った．膜電位，及び Ca イオン電極を用いた筋細胞内 Ca activity を計測したので形態学的所見と合わせて報告する．

方　法

実験動物中央研究所より提供された3対の mdx マウスを繁殖させ，実験には生後9日目，23日目，102日目，125日目，229日目，255日目，270日目の mdx マウスを用いた．対照としては C57 BL/10マウスを用いた．膜電位は3M の KCl を満たしたガラス管微小電極を用いて計測した．筋細胞内 Ca イオン activity は微小管 Ca イオン電極を自作して，wpi FD-223エレクトロメーターによって計測した．Ca イオン電極の作成方法は，ガラス管微小電極の先端300μm にシリコンを入れ，200°C で60分加熱して微小管ガラス電極の先端にシリコンを凝着させてから，0.1M $CaCl_2$ を微小管ガラス電極に満し，更に先端100～150μm の高さまで顕微鏡下で液体 Ca イオン交換樹脂を毛管現象を利用して満した．イオン交換樹脂が入りにくいときにはガラス電極の上端から陰圧をかけて，微小電極の先端に100～150μm イオン交換樹脂が入るように操作した．各々の Ca イオン電極は一本ずつ titration curve をつくり，標準 Ca 溶液は**表1**のように10^{-8}M～10^{-1}M の濃度の溶液を作成し，Tris-maleate 20mM を加え，Tris buffer で pH を6.80に調整し，各標準溶液中には Ca の他，筋細胞内溶液の組成に近づけ，イオン強度を一定にするため155mM の KCl と12mM の NaCl を加えた．蒸留水にも10^{-5}M 程度の Ca を混じているので10^{-8}～10^{-5}M の Ca 標準溶液を作成するためには EGTA と $CaSO_4$ を**表1**のように混合して作成する以外によい方法はない．

Ca イオン電極を各標準溶液に浸して，Ca 濃度と，electrometer の読みが，$\gamma=0.991$～$\gamma=0.997$ とよく相関するものを実験に用いた．

以上のような電気生理学的検索には横隔膜筋を主に用い，前脛骨筋についても一部計測した．これと平行して筋組織学的検査と，心腔内採血により血清 CK を測定した．

結　果

1）膜電位（RMP）

対照の C57BL/10マウスの横隔膜筋の膜電位は**表2**のように平均値は－80.1±2.9（S.D.）から－86.3±3.6（S.D.）mV である．前脛骨筋では－78.7±2.6mV である．

生後9日目の mdx マウスでは膜電位は平均－84.2±3.5mV と正常で，23日目の mdx マウス

＊宮崎医科大学第三内科

表1　Caイオン電極のtitration curveを作成するために用いる標準溶液の組成.

No.	free Ca	40.0 mM EGTA	20.0 mM EGTA 20.6 mM $CaSO_4$	KCl	NaCl	Tris-maleate	pH
①	$1x10^{-8}$	* 24.8 ml	* 0.4 ml	155 mM	12 mM	20 mM	6.80
②	$1x10^{-7}$	* 23.1 ml	* 3.8 ml	155 mM	12 mM	20 mM	6.80
③	$1x10^{-6}$	* 13.8 ml	* 22.3 ml	155 mM	12 mM	20 mM	6.80
④	$1x10^{-5}$	* 3.3 ml	* 43.5 ml	155 mM	12 mM	20 mM	6.80
⑤	** $1x10^{-4}$	0	0	155 mM	12 mM	20 mM	6.80
⑥	** $1x10^{-3}$	0	0	155 mM	12 mM	20 mM	6.80
⑦	** $1x10^{-2}$	0	0	155 mM	12 mM	20 mM	6.80
⑧	** $1x10^{-1}$	0	0	155 mM	12 mM	20 mM	6.80

* イオン強度　0.187,　$Kapp_{Ca-EGTA} = 8.51x10^5$　にて計算。

計算式：　$[EGTA]total = ([Ca]total - [Ca]free) \frac{1+Kapp \cdot [Ca]free}{Kapp \cdot [Ca]free}$

** $1x10^{-1}$ M $CaCl_2$　溶液より10倍希釈にて各々作製。

表2　C57BL/10マウス（コントロール）と mdx マウスの膜電位，細胞内 Ca，血清 CK.

C57BL/10マウス（コントロール）

生後日数	性別	対象筋	RMP	筋細胞内 Ca	CK (IU/L)
223日	F	横隔膜 前脛骨筋	−80.1±2.9mV (N=30) −78.7±2.6 (N=22)		
239日	F	横隔膜	−85.7±3.1 (N=60)	2.34×10^{-6} M (平均) (N=28) (3.53×10^{-7}～3.38×10^{-5} M)	
267日	F	横隔膜	−86.3±3.6 (N=60)	2.40×10^{-6} M (平均) (N=29) (1.03×10^{-7}～2.63×10^{-5} M)	60

mdxマウス

生後日数	性別	対象筋	RMP	細胞内 Ca	CK (IU/L)
9日	M	横隔膜	−84.2±3.5mV (N=31)	1.00×10^{-4} M (N=21) (3.54×10^{-5}～2.93×10^{-4} M)	1,090
23日	F	横隔膜 前脛骨筋	−86.1±4.5mV (N=80) −84.1±4.6mV (N=96)	1.51×10^{-4} M (N=34) (1.58×10^{-5}～4.03×10^{-3} M) 7.76×10^{-4} M (N=6) (4.22×10^{-5}～9.09×10^{-4} M)	13,940
102日	M	横隔膜	−71.9±6.4mV (N=50)		
125日	M	横隔膜	−69.1±7.8mV (N=52)		
229日	M	横隔膜	−71.6±8.7mV (N=100)	1.51×10^{-4} M (N=43) (6.18×10^{-6}～3.16×10^{-3} M)	5,420
255日	M	横隔膜	−69.7±10.1mV (N=62)	3.39×10^{-4} M (N=12) (2.04×10^{-6}～3.70×10^{-3} M)	11,580
270日	M	横隔膜	−75.9±8.5mV (N=63)		

では平均−86.1±4.5mV とやはり正常であった．

生後102日，125日，229日，255日，270日の mdx マウスでは膜電位は低下し，夫々−71.9, −69.1, −71.6, −69.7, −75.9mV と平均値も低く，S.D.も6.4〜10.1mV とばらつきが大きく，正常な膜電位と−50〜−60mV に至るほど明らかに低下した筋細胞が混在している．

2）筋細胞内 Ca イオン activity

図1に C57BL/10のコントロールマウス（下図）と mdx マウス（上図）の筋細胞内 Ca イオン activity を Ca イオン電極によって実測した結果を示す．

コントロールマウスでは2匹のマウスを用いて合計57本の筋線維で計測した．最も低い値は 1.03×10^{-7}M で，平均値は 2.34×10^{-6}M（N＝28）と 2.40×10^{-6}M（N＝29）であった．

mdx マウスの筋細胞内 Ca は生後9日目（壊死が始まる時期）のマウスで 1.00×10^{-4}M（N＝21）と高く，生後23日目（壊死と再生筋の混在の時期）では，横隔膜筋で 1.51×10^{-4}M（N＝34）とやはり高く，前脛骨筋でも 7.76×10^{-4}M（N＝6）と高かった．生後229日，255日目（再生筋がほとんどの時期）の mdx マウスでは，夫々 1.51×10^{-4}M（N＝43），3.39×10^{-4}（N＝12）と高値を示した．mdx マウスでは合計116本の筋線維で筋細胞内 Ca activity を測定し低い値は 2.40×10^{-6}M が一本あり，平均は 10^{-4}M オーダーで，高い値は 10^{-3}M 以上が15本認められた．10^{-3}M オーダーの濃度なら Ca 染色をすれば染色されるレベルの筋細胞が116本中15本存在する．

3）血清 CK

心腔内採血によって検査した血清 CK は，表2に示したようにコントロールでは，60 IU/L と正常であるが，mdx マウスでは9日目でも 1,090IU/L

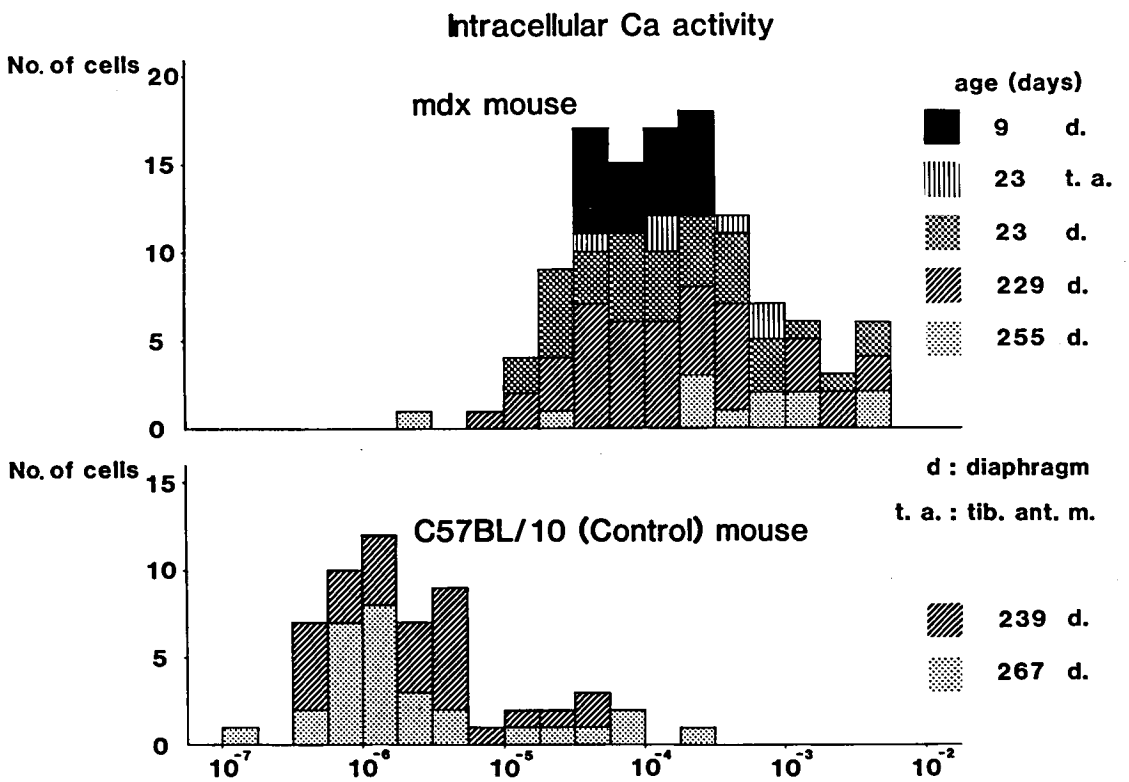


図1　C57BL/10マウス（下図）と mdx マウス（上図）の筋細胞内 Ca イオン activity．Ca イオン電極によって実測した値を示す．

とすでに高値で，23日目では最も高く13,940IU/Lに及ぶ．その後も生後229日目（再生筋がほとんどの時期）では5,420IU/L，255日目では11,500IU/Lと高値を示している．

4）mdxマウスにみられるmyotonia様発火

図2にmdxマウス9日目の横隔膜筋で観察されたミオトニー様のrepetitive dischargeを示す．膜電位を測定する目的で微小管ガラス電極が筋細胞内へ挿入された際に活動電位が次々と起り，一つの活動電位が出た後に脱分極しながら，次の活動電位をくり返し発火させている．これはinsertion myotoniaの筋細胞内記録に酷似している．mdxマウスでは9日目以外の標本でも反復する発火が認められたが，コントロールマウスにはこのような発火は認められなかった．

5）筋組織学的検索

電気生理学的検索と平行して行った筋組織学的検査を図3にまとめて示す．

図3Aはコントロールマウス267日目の横隔膜筋HE染色で正常の像を示す．mdxマウス9日目の横隔膜HE染色では，所々に壊死線維を認める（図3B）．mdxマウス生後23日目の横隔膜HE染色では血管拡張と細胞浸潤がみられ，focalに壊死線維を認め（図3C），NADH染色では，再生線維の集族のみられるところで，筋線維構築の乱れが認められた．mdxマウス102日目の横隔膜筋HE染色標本では筋線維の大小不同があり，大多数の線維は中心核を有する再生線維である（図

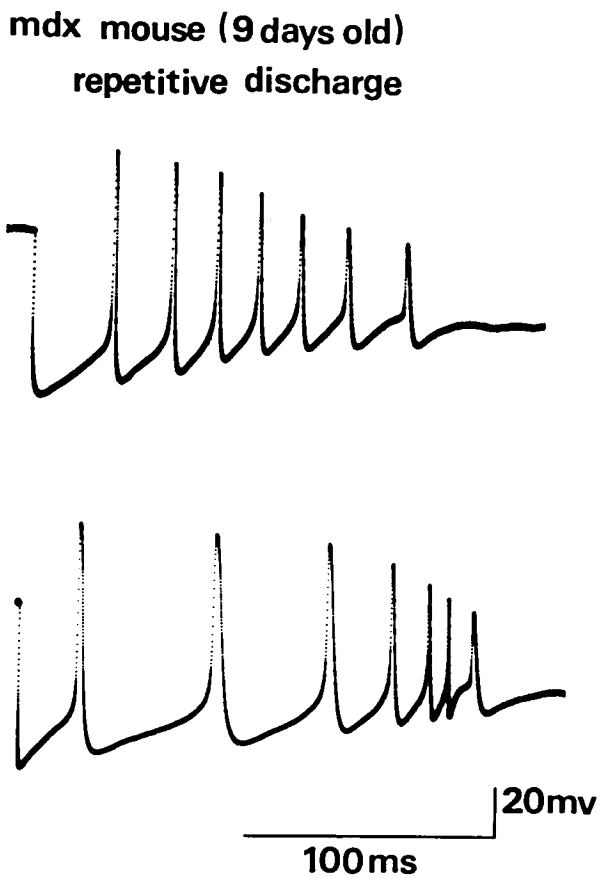


図2　生後9日目のmdxマウスの横隔膜筋で記録されたミオトニー様の反復発火．微小電極が筋細胞内へ入った刺激で反復する活動電位の発火が認められた．

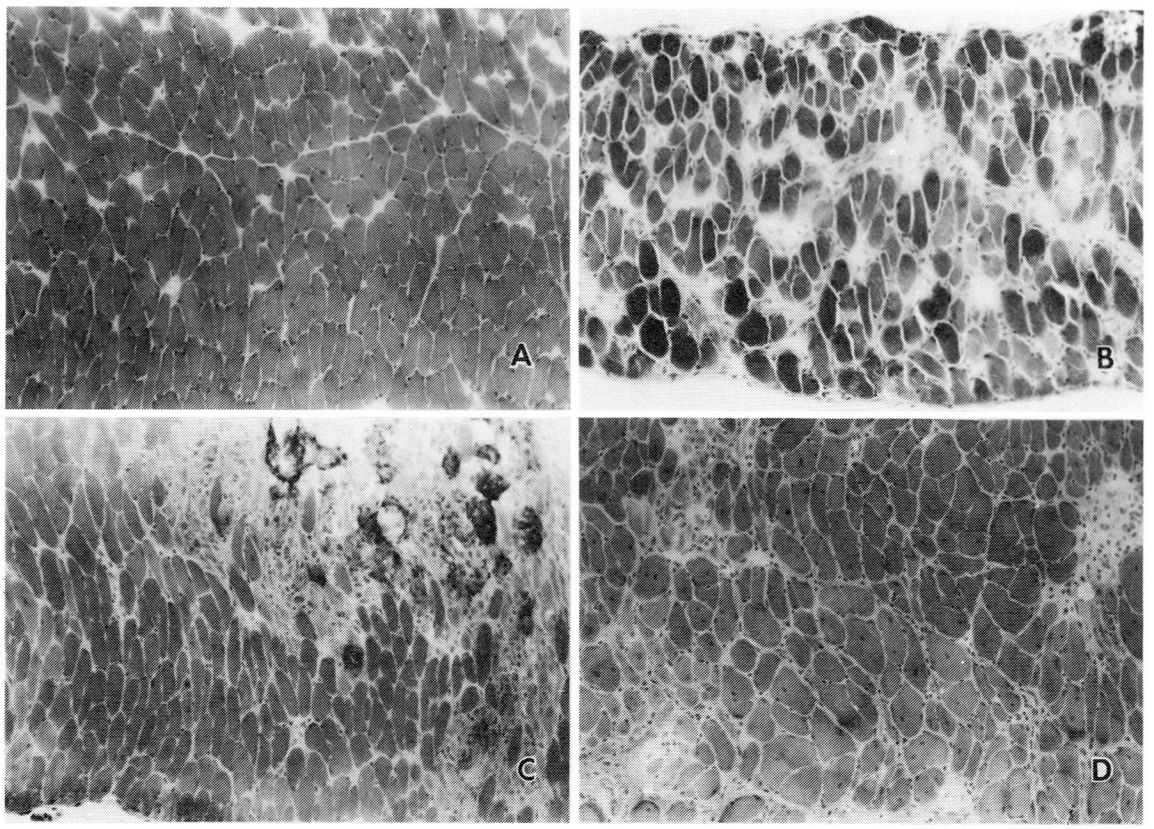


図3　A．コントロールマウス267日目の横隔膜筋 HE 染色で正常の像を示す（×115）．
B．mdx マウス生後 9 日目の横隔膜筋 HE 染色で，所々に壊死線維を認める（×115）．
C．mdx マウス生後23日目の HE 染色で，右上に血管の拡張と，細胞浸潤及び壊死線維を認める（×115）．
D．mdx マウス生後102日目の HE 染色で，筋線維の大小不同があり，大多数の線維は中心核を有する再生線維である．一部に壊死線維を認める（×115）．

3 D)．生後102日目の前脛骨筋についても横隔膜と同様に，中心核線維がほとんどを占め一部壊死線維を認める．

以上のように mdx マウスでは 9 日目の横隔膜ですでに壊死が認められ，電気生理学的にはすでに筋細胞内 Ca は10^{-4}M level と高値を示していて，CK も1,090 IU/L と高いので生後 9 日目ではすでに変化が起っている．その後は活発な再生が形態学的に認められている点は以前の報告と同様である．

考　　察

mdx マウスは生後一定の時期に筋壊死と活発な再生を来す X-chromosome-linked muscular dystrophy のモデルとして電気生理学的にも興味ある知見を得た．生後 9 日目，23日目までは膜電位は正常であるが，筋細胞内 Ca イオン activity は平均値でみるとコントロールの10^{-6}M に比し，その100倍の10^{-4}M オーダーに増加している．Busch らは，10^{-4}M 以上の Ca イオン濃度では Z 帯が融解することを家兎の骨格筋で示している[4]．そして CK も 9 日目ではすでに高値を示している

ので，筋壊死は起っていると考えられ，又形態学的にも壊死線維を認めている．膜電位は正常に保たれていながら，筋細胞内 Ca はすでに高値で，筋細胞膜の大きな破壊はないものの，Ca が細胞外（10^{-3}M レベル）から筋細胞内へ移動して増加したのか，又は細胞内成分のミトコンドリア，小胞体からの Ca 遊離や細胞膜の結合 Ca が遊離された可能性があり，本研究の方法論だけではそのどちらであるか結論を下すことはできない．本研究で重要な点は今まで報告がなかった mdx の筋細胞内 Ca を実測し，それが10^{-4}M オーダーであることを明らかにしたこと，及びこのレベルの Ca 濃度で筋壊死も又筋再生も起っていることからこれを基に更に酵素学的研究を発展させて行くことが，筋細胞内 Ca 増加の原因及びそれが引き起す筋崩壊の機序を明らかにするために必要なことである．

mdx マウス生後 9 日目の筋標本でミオトニー様の repetitive discharge を見出したことは，やはり筋細胞膜の異常があることを示唆する点で興味深い．ミオトニーの発生機序は筋細胞膜の Cl イオン透過性が低下していることであると Bryant らにより報告され，又著者ら[5]も低 Cl 溶液によってミオトニーが起ることを実験的に示しているが，mdx マウスでも今後 Cl イオンに対する膜の透過性が低下していないか否か検討する必要がある．mdx マウス生後 9 日目では膜電位は正常であるが，形態学的には筋壊死がすでに起っていて，筋細胞内 Ca も10^{-4}M と高くなっているので，筋細胞膜の大きな断裂はないにもかかわらず，筋細胞膜の異常があって Ca チャンネルに変化を来したり，Cl イオン透過性にも変化を来している可能性がある．筋細胞内外の K，Cl の測定は夫々のイオン電極によって実測可能であるので，今後更に Ca イオン以外の電解質についても検討を加えて行きたい．

結　　語

1．mdx マウスの膜電位は生後 9 日，23日目では正常であるが，それ以後はコントロール（−85 mV）に比し，平均で−70mV まで低下する．

2．mdx マウスの筋細胞内 Ca は，生後 9 日目，23日目，229日目，255日目のどの時期でも $1.0\sim3.4\times10^{-4}$M と増加（range：$2.04\times10^{-6}\sim3.70\times10^{-3}$）する．
対照マウスの筋細胞内 Ca は平均$2.3\sim2.4\times10^{-6}$M（range：$1.03\times10^{-7}\sim3.38\times10^{-5}$M）である．

3．対照マウスの CK は60 IU/L と正常であるが，mdx マウスの CK は1,090〜13,940 IU/L と著増を認めた．

4．形態学的には生後 9 日目の横隔膜筋で壊死像が出現しており，この時期では膜電位の低下はないが筋細胞内 Ca は10^{-4}M に増加していた．10^{-4}M オーダーの Ca 濃度は Z 帯が融解する濃度である．

文　　献

1）Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A.L., et al: X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 1189, 1984.

2）Dangain, J. & Vrbova, G.: Muscle development in mdx mutant mice. Muscle Nerve, 7: 700, 1984.

3）杉田秀夫，田辺雄三，埜中征哉，ほか：mdx マウス骨格筋の病理学的研究．厚生省神経疾患研究委託費，筋ジストロフィー症動物の開発・供給に関する研究．野村班　昭和59年度研究報告書，1985，p13.

4）Busch, W.A., Stromer, M.H., Goll, D.E., et al: Ca^{2+} -specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle. J. Cell Biol., 52: 367, 1972.

5）Kurihara, T., Tanaka, M. & Shioya K.: Myotonia induced by low chloride solution: Intracellular studies by Cl liquid ion exchanger microelectrode. Folia Psychiatr. Neurol. Jpn., 38: 481, 1984.

4) Mdxマウス骨格筋におけるリソゾームチオールプロテアーゼ活性とその局在について

塚越　廣*

研究協力者　佐野元規*　和田義明*　古谷明子*
松永高志*　木南英紀**　勝沼信彦**
伊井邦夫***

Mdxマウスは1984年Bulfieldら[1]によりmutant miceのスクリーニング中に血清CPKが高値を示すことから発見確立された，新しい筋ジストロフィーモデル動物である．遺伝解析の結果，ジストロフィーハムスター[2]，dyマウス[3]などのこれまでのモデル動物と異なり，X-linked recessiveの遺伝形式をとり，Duchenne型筋ジストロフィーにより近いモデル動物と考えられる．

今回我々は，mdxマウス骨格筋において細胞内蛋白分解に重要な役割を果すとされているリソゾームチオールプロテアーゼについて生化学的並びに免疫組織学的に検討し，筋崩壊における役割について明らかにしたので報告する．

方　法

動物はC57BL/10Sc-mdxマウス並びにその対照系であるC57BL/10Scマウスを使用した．生後10日，4週，6週，8週の各時点で両者5匹ずつの骨格筋について検討した．骨格筋としては前脛骨筋，腓腹筋を選び右側の筋肉をホモジナイズしてCPK活性を測定し，次に遠沈後上清について，リソゾームチオールプロテアーゼであるcathepsin B & L, cathepsin B, cathepsin H及びcathepsin D活性，並びにその他の各種リソゾーム酵素活性を測定した．内在性チオールプロテアーゼインヒビターはBANA (benzoyl-arginyl naphthylamide) を基質とした時のPapainの酵素活性に対する抑制の程度で，木南らの方法[4]により測定した．

左側の筋肉は1部を凍結切片として，各種組織化学的染色を行ない，残りはPLP固定して凍結切片を作成し，免疫組織化学的にcathepsin B, H, thiol protease inhibitor (TPI) の各抗体で染色した．方法としてはラット肝より精製したcathepsin B, H, TPIを抗原としてウサギに免疫し抗血清を得た．次に抗血清から硫安分画，DEAE-セルロースクロマトグラフィーの各ステップを経てIgGをとり，ペプシン消化して得た$F(ab')_2$を用いて，石川らの方法[5]によりマレイミドでperoxidaseと結合させてconjugateを作成した．すなわちペルオキシダーゼ標識Fab'抗体により直接法で免疫組織学的検索を行なった．Counterstainはヘマトキシリンで行なった．

結　果

1）生化学所見

Mdxマウス群骨格筋では生後4週，8週で正常対照群に比較してCPK活性が有意に低下し，筋構造蛋白も同様に有意の減少を示した（表1）．

リソゾームチオールプロテアーゼについては，cathepsin B & LはmdxマウスB群では，前脛骨筋・腓腹筋ともに生後10日目の時点ですでに有意の上昇を認め，4週，6週，8週では著明な上昇を示した（図1）．Cathepsin B, Hについても同様にmdxマウス群で生後4週，8週で著明な上昇を認め（図2），チオールプロテアーゼインヒビターは前脛骨筋では正常対照群13.5±7.6, mdx

＊東京医科歯科大学神経内科
＊＊徳島大学医学部酵素研
＊＊＊徳島大学医学部第1病理

群120.3±66.7，腓腹筋では正常対照群18.2±2.7，mdx 群92.3±15.0（mU/min/mg protein）であり，mdx マウス群で両筋とも有意の上昇を示した．

他のリソゾーム酵素活性についても同様で，acid phosphatase 以外のすべての測定した酵素活性の上昇を認めた（表２）．生後10日目の時点での β-glucuronidase 活性は，前脛骨筋では正常対照群22.6±1.1，mdx 群159.5±15.3，腓腹筋では正常対照群57.6±9.9，mdx 群210.9±16.2と，両筋とも mdx マウス群で有意の上昇を認めた．

２）組織学的所見

前脛骨筋では生後10日目にはすでに筋壊死及びマクロファージの浸潤を認め，４週以降には再生線維も認められた．腓腹筋では４週以降は壊死・再生像は前脛骨筋と同様であるが，生後10日目の時点では検索した範囲で明らかな壊死はなかった．

生後４週の mdx マウス前脛骨筋の免疫組織学的検討では cathepsin B はマクロファージに一致して強く陽性に染色された（図３）．Cathepsin H，TPI も同様にマクロファージに一致して染色された．

考　　案

Mdx マウス骨格筋の壊死は前脛骨筋では生後10日目前後に発症し[6]，腓腹筋はより遅れて発症

表１

CPK activity in skeletal muscle

	tibialis anterior (n=5)		gastrocnemius (n=5)	
	control	MDX	control	MDX
4 W	22.1 ± 5.6	11.4 ± 3.5*	20.6 ± 2.5	13.4 ± 1.6*
8 W	23.3 ± 1.0	12.9 ± 0.6*	27.3 ± 6.5	14.8 ± 0.4*

unit/mg protein

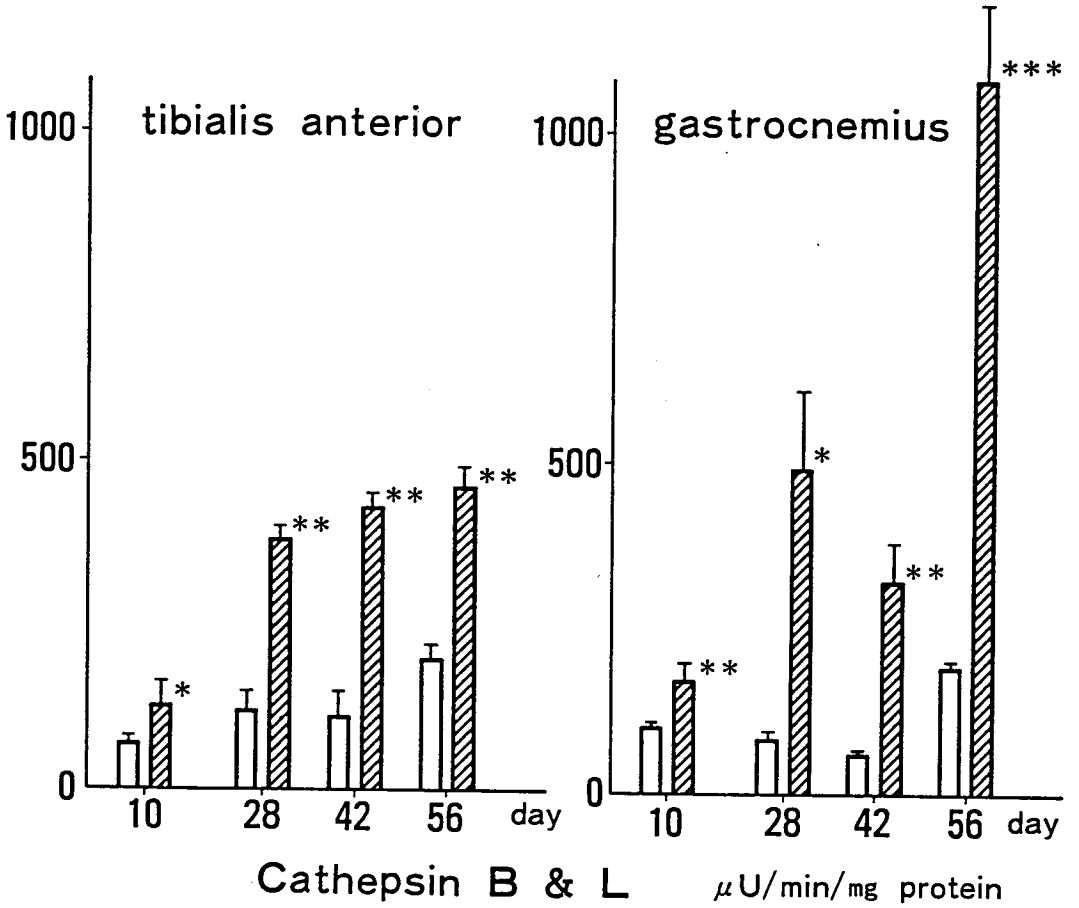
structural protein in skeletal muscle

	tibialis anterior (n=5)		gastrocnemius (n=5)	
	control	MDX	control	MDX
4 W	1.75 ± 0.06	1.45 ± 0.13*	4.37 ± 0.69	2.66 ± 1.10*
8 W	2.87 ± 0.74	1.66 ± 0.08*	6.36 ± 0.29	4.47 ± 1.32*

mg/muscle

* $p < 0.05$

Mean ± SD



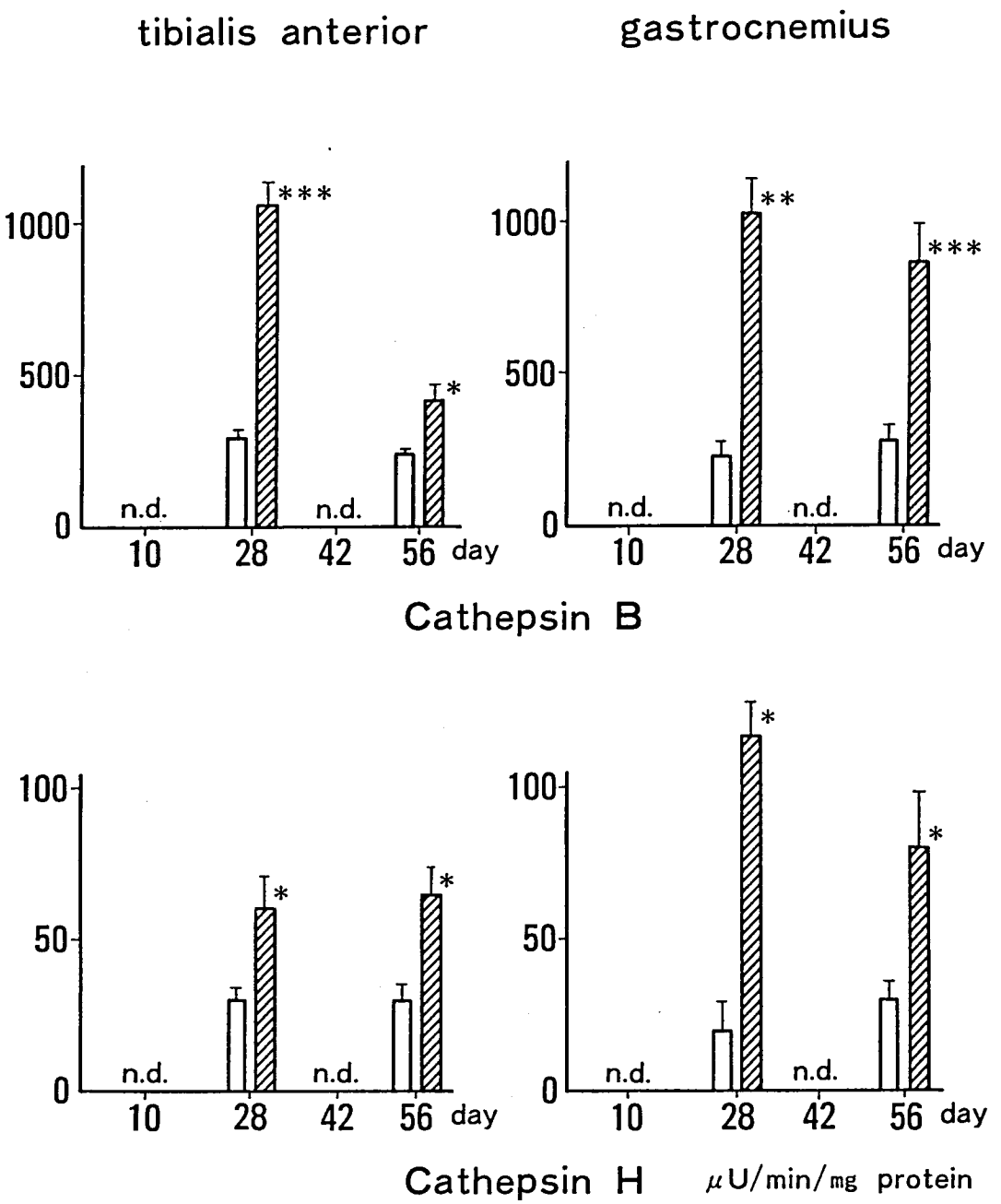
* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

図1

するとされている[7]．今回の結果でも前脛骨筋に関しては生後10日目の時点で組織学的に壊死を確認でき，リソゾームチオールプロテアーゼ活性も有意に上昇して，筋崩壊がはじまっていると考えられた．一方腓腹筋においては生後10日目の時点で検索した範囲では壊死は確認できなかったが，cathepsin B & L 活性はすでに有意の上昇を示し，すでに筋壊死が腓腹筋のどこかに起きているものと推定された．マクロファージの筋組織内への浸潤を鋭敏に示すと考えられる β-glucuronidase 活性は，生後10日目の時点で前脛骨筋のみならず腓腹筋でもすでに有意の上昇を示し，筋壊死とマクロファージの貪食の可能性を示唆した．

Mdx マウス骨格筋において筋細胞の壊死後のリソゾームチオールプロテアーゼの局在は，主としてマクロファージに一致しており，筋細胞自体にはほとんど存在しない．筋細胞壊死後の筋蛋白分解の主役は筋組織外より侵入してくるマクロファージと考えられる．この所見はジストロフィーハムスター[8]及び plasmocid による実験的ミオパチー[9]における筋壊死の際の筋蛋白の分解機序と同様であり，Duchenne 型筋ジストロフィーをはじめとする壊死性ミオパチーに共通する所見であろう．

今後，生後10日目以前の筋細胞の壊死が明らかになる以前の筋細胞自体のリソゾームチオールプ



* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

図2

表2

various lysosomal enzyme activities in skeletal muscle I

		tibialis anterior(n=5) control	tibialis anterior(n=5) M D X	gastrocnemius(n=5) control	gastrocnemius(n=5) M D X
cathepsin D	4 W	2.94 ± 1.60	44.3 ± 17.1*	4.91 ± 1.86	32.9 ± 9.8*
	6 W	11.6 ± 6.4	46.3 ± 5.2*	13.8 ± 4.6	32.9 ± 4.1*
	8 W	n.d.	n.d.	18.5 ± 3.9	49.2 ± 10.9*
α-glucosidase	4 W	109 ± 20	300 ± 34*	108 ± 27	328 ± 55***
	6 W	130 ± 57	289 ± 49*	111 ± 18	220 ± 39*
	8 W	93 ± 8	304 ± 25***	152 ± 38	265 ± 17**
α-galactosidase	4 W	123 ± 15	468 ± 86*	87.6±4.1	578 ± 175**
	6 W	133 ± 31	434 ± 51*	85.6±15.8	449 ± 56*
	8 W	76.4±27.5	306 ± 36**	80.1±2.5	472 ± 128**
β-glucuronidase	4 W	161 ± 30	831 ± 85***	83.6±7.5	1076±226***
	6 W	110 ± 18	634 ± 29***	97.2±15.4	891 ± 68***
	8 W	93.4±29.1	384 ± 38***	104 ± 10	879 ± 85***

cathepsin D : arbitrary unit

others : pmole/min/mg protein

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.005

Mean ± SD

Various lysosomal enzyme activities in skeletal muscle II

		tibialis anterior(n=5) control	tibialis anterior(n=5) M D X	gastrocnemius(n=5) control	gastrocnemius(n=5) M D X
α-mannosidase	4 W	357 ± 25	907 ± 118*	263 ± 50	1385 ± 204**
	6 W	311 ± 30	1404 ± 293*	347 ± 61	1759 ± 109***
	8 W	292 ± 34	846 ± 46***	392 ± 55	1119 ± 142***
β-glucosidase	4 W	323 ± 31	718 ± 78*	355 ± 31	1291 ± 243*
	6 W	298 ± 35	851 ± 74*	370 ± 50	954 ± 96*
	8 W	462 ± 60	811 ± 56**	618 ± 67	943 ± 28***
β-galactosidase	4 W	236 ± 40	977 ± 103***	140 ± 18	1029 ± 93***
	6 W	272 ± 49	1186 ± 183*	112 ± 7	1229 ± 139**
	8 W	185 ± 41	514 ± 60**	195 ± 28	671 ± 46***
acid phosphatase	4 W	1.14±0.14	1.32±0.26	1.17±0.29	1.55±0.19
	6 W	n.d	n.d	n.d	n.d
	8 W	1.38±0.25	1.40±0.29	1.50±0.08	1.67±0.31

acid phosphatase : arbitrary unit

others : pmole/min/mg protein

Mean ± SD

*p <0.05 **p< 0.01 ***p < 0.005

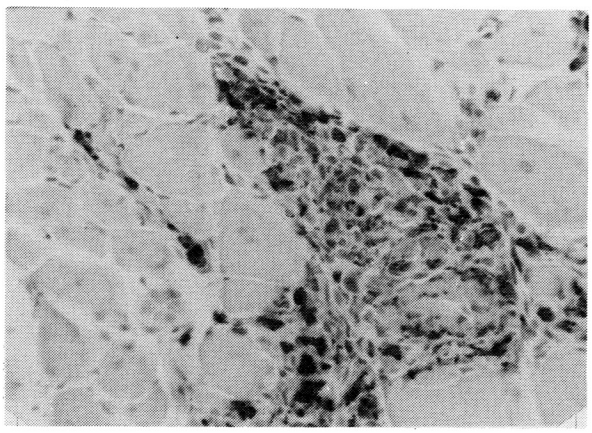


図3

ロテアーゼの役割について明らかにする必要があろう.

まとめ

1）Mdx マウス骨格筋において生後10日目の時点でリソゾームチオールプロテアーゼ活性の上昇が見られた. β-glucuronidase 活性も生後10日目ですでに有意に上昇していた.

2）Mdx マウス骨格筋の壊死後のリソゾームチオールプロテアーゼの局在はマクロファージに一致していた.

文献

1）Bulfield, G., Siller, W.G., Wight P.A.L. and Moore, K.J.: X-linked chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**: 1189, 1984.

2）Homburger, F., Baker, J.R., Nixon, C.W. and Whitney, R.: Primary generalized polymyopathy and cardiac necrosis in an inbred line of Syrian hamsters. Med. Exp., **6**: 339, 1962.

3）Michelson, A.M., Russell, E.S. and Harmani P.J.: Dystrophia Muscularis: A hereditary primary myopathy in the house mouse.Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **41**: 1079, 1955.

4）Kominami, E., Wakamatsu, N. and Katsunuma, N.: Purification and characterization of thiol protease inhibitor from rat liver. J. Biol. Chem., **257**: 14648, 1982.

5）Ishikawa, E., Yoshitake, S. and Imagawa, M.: Preparation of monomenic Fab′-horse radish peroxidase conjugate using thiol groups in the hinge and its evaluation in enzyme immunohistochemical staining. Ann. N.Y. Acad. Sci.: **420**, 74, 1983.

6）杉田秀夫，田辺雄三，埜中征哉，江崎孝三郎，野村達次：筋ジストロフィー症モデル動物の開発 mdx マウス骨格筋の病理学的研究，厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の開発・供給に関する研究」班，昭和59年研究報告書 p13，1985.

7）Dangain, J. and Vrbova, G.: Muscle development in mdx mutant mice. Muscle & Nerve, **7**: 700, 1984.

8）Kominami, E., Bando, Y., II., K., Hizawa, K. and Katunuma, N.: Increases in cathepsin B and L and thiol protease inhibitor in muscle of dystrophic hamsters. Their localization in invading phagocytes. J. Biochem. ab: 1841, 1984.

9）Ishiura, S., Nonaka, I., Nakase, H., Tada, A. and Sugita, H.: Two-step mechanism of myofibrillar protein degradation in acute plasmocid-induced muscle necrosis. Biochim. Biophys. Acta. **798**: 333, 1984.

5) Local Tetanus による実験的ミオパチーに関する研究

田 辺　　等*

研究協力者　水 野 美 彦**　Chou, S.M.***

はじめに

Tetanus toxin をラットの腓腹筋に1回筋注すると，2日後より足関節の持続的底屈（local tetanus）が生じ（図1-a），約4週間持続した後徐々に正常に復する．この local tetanus の発症機序としては，toxin が retrograde axoplasmic flow に沿って末梢神経内を上行し脊髄に到達し，脊髄の抑制性ニューロン（inhibitory neurone）の作用を抑制することにより，α-neurone の持続的興奮を引起すことによるとされている[1]．1980年 Chou ら[2] は local tetanus におけるヒラメ筋（SOL）の組織学的検索について報告しているが，それによると注射後5～7日目には，いわゆる mini-core と呼ばれる構築異常が出現し，2週間前後には core/targetoid fibers（CFs）がタイプ1線維の全てに出現する（図1-b）．これは3週間目になると，いわゆる central dark fiber（図1-c）へと変化し，4週間目には正常に復する．このような構築異常を来す機序としては，SOL が短縮位で固定されることが主因であり，それに基づく筋線維の変性・再生過程でこれらの構築異常が来ると考えられた．そこで今回我々は CFs の発生を予防する目的で local tetanus に陥入ったラットの足関節を背屈位に固定し SOL を伸展させることを試みた．その結果 CFs の発生は予防されたが，一方で全く予期しない変化が出現し，且つその変化は筋ジストロフィー症（PMD）あるいは myotonic dystrophy（MD）の筋病変の成立機序を考える上で示唆に富むものであったので，ここに報告し，本モデルの意義について検討を加えた．

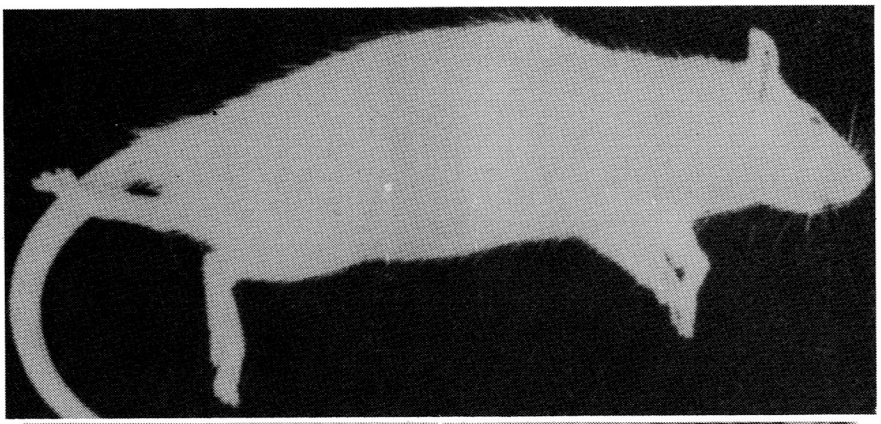
＊東京都立神経病院
＊＊同・神経小児科
＊＊＊ Cleveland Clinic, Neuropathology

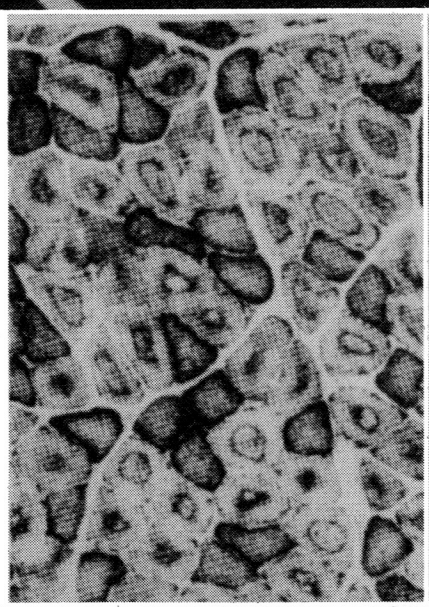
対象および方法

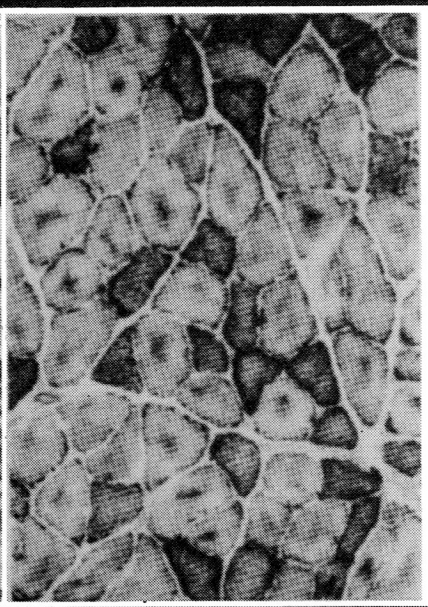
実験対象として47匹の SD 系雄白ネズミ（体重150g 前後）を使用，tetanus toxin40～100ng を生食0.4ml に溶解し，右腓腹筋に1回筋注した．Local tetanus が出現した時点で右足関節を背屈位にギプス固定し，SOL を伸展位で固定した（図1-d）．処置後1，2，3，4，5，7，10，14，21日目に Nembutal 40mg/kg による麻酔下に両側 SOL，EDL を採取した後，開胸し心臓穿刺により採血し血清 CK の測定を行なった．採取筋は湿重量測定後光顕用，電顕用に処理し検索した．ラットの一部は無処置及び local tetanus のみを施した群とし，血清 CK の対照とした．

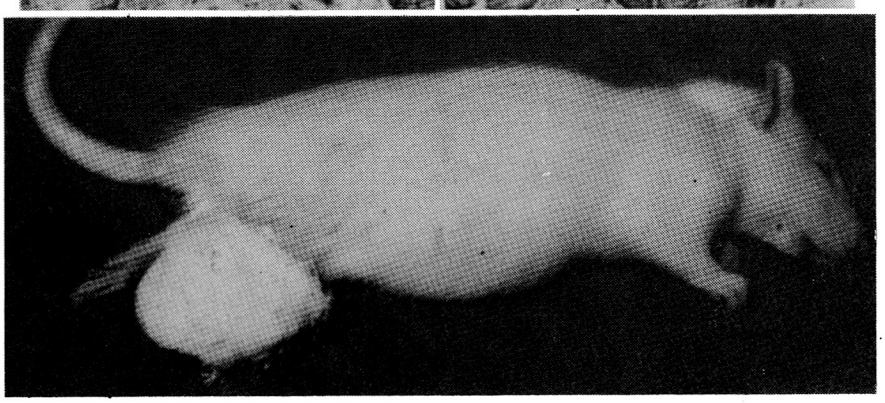
結　　果

足関節の底屈は toxin の量が40～50ng と少量の場合は2日後に出現したが，100ng と大量になると翌日に出現した．SOL の組織学的検索では図2に示すように処置後翌日より phagocytosis を伴なった segmental degeneration を示す線維が散在性に出現するようになり，これは3日目にかけ数が増加した（図2-a）．間質の結合織も徐々に増加を示し，phagocytes の浸潤が増強した．残存線維は対側の対照に比べて若干直径が増加を示した．図2-b は3日目の組織像で最も変化の強かった例であるが，殆んどの線維が変性脱落し，その部分には既に basophilic に染まる myoblast ないし myocyte が多数出現した．5日目以降になると再生が進み諸所に中心核を有する myotube が小群集を形成してきた（図2-c）．縦切り標本でみる



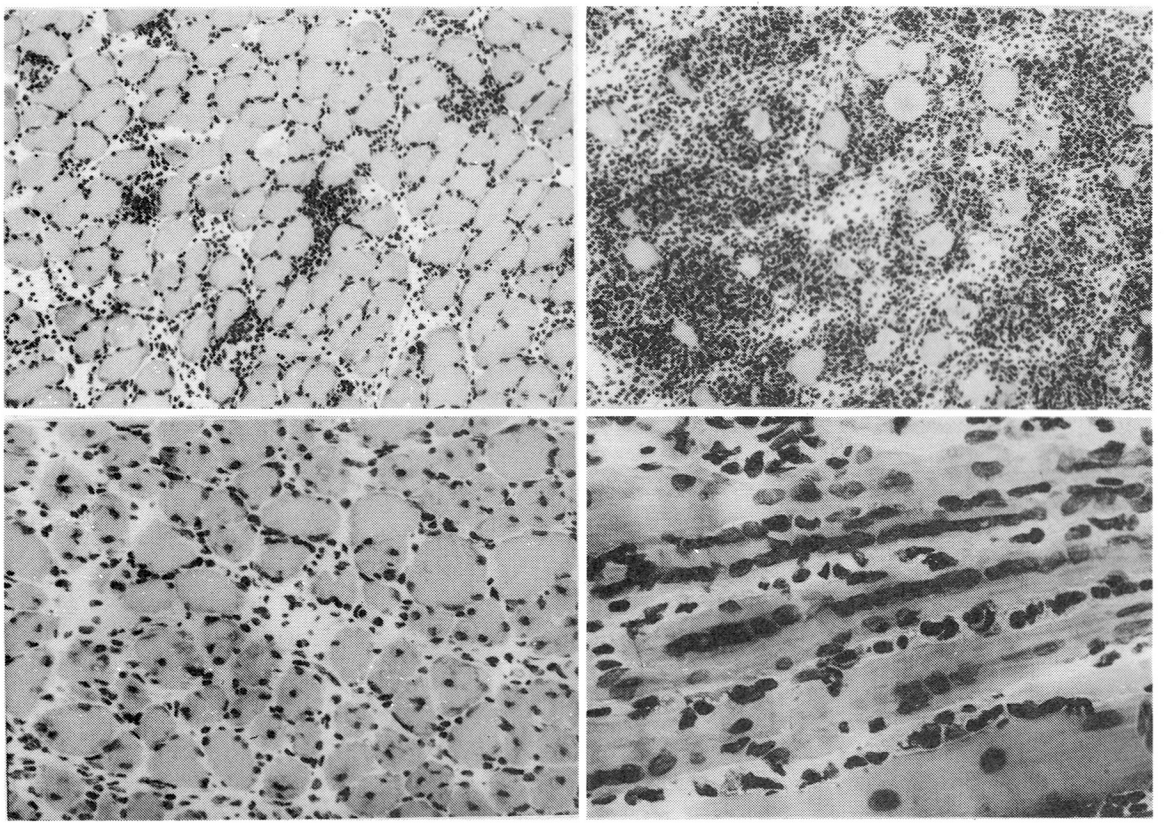






a	
b	c
d	

図1　a. local tetanus rat　b. core/targetoid fibers (sol.), NADH-TR, 340×　c. central dark fibers (sol.), NADH-TR, 340×　d. local tetanus × immobilization rat (sol., stretched)



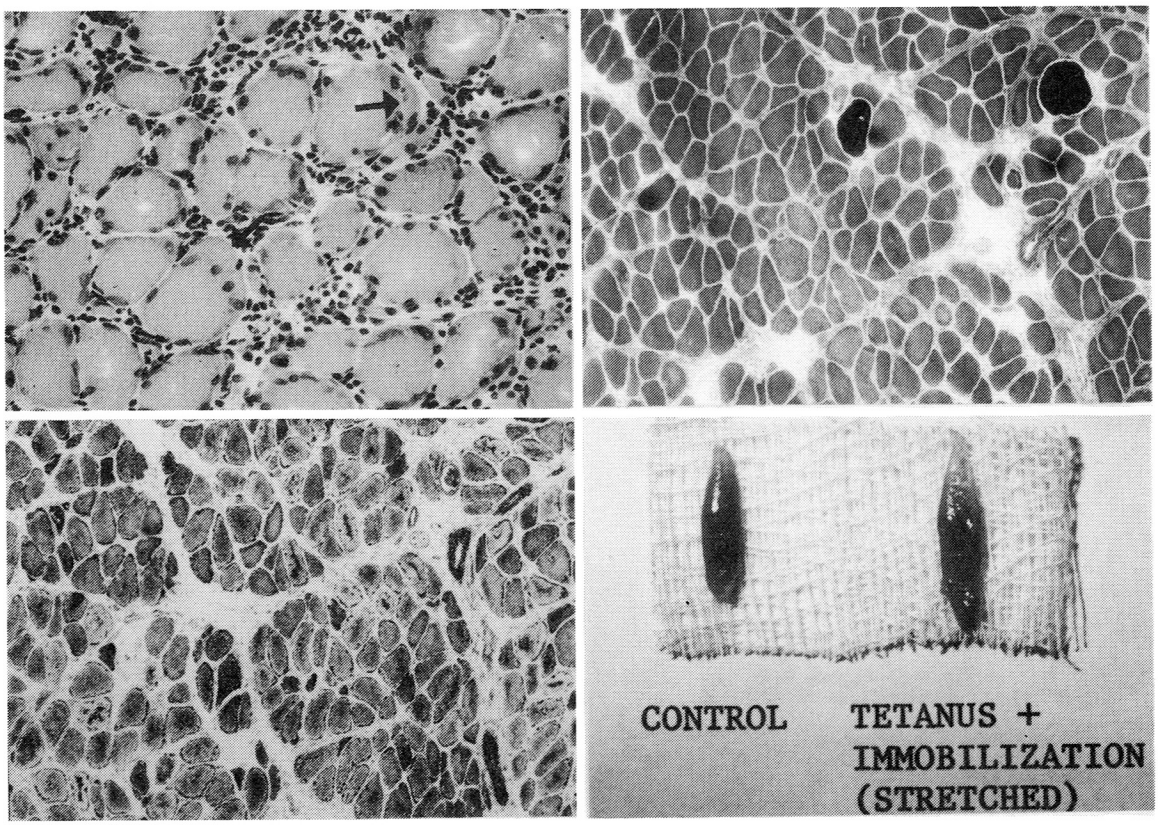
a	b
c	d

図2　a．HE 340×，b．HE 340×，c．HE 340×，
d．central nuclear chain, HE, 1360×

と central nuclear chain を示しており，myotube であることが分る（図2-d）．一方，再生の進行と併行して sarcoplasmic mass が HE 染色で筋線維周辺の basophilic ring として出現し，次第に mass を増した（図3-a）．2週間以後になると筋線維の大小不同，間質結合織の増殖，散在する opaque fiber，変性線維，そして再生線維の小群集などが見られるようになる（図3-b）．NADH 染色でみると CFs の出現はほぼ抑制され，一方 central dark fiber が散在性に認められた（図3-c）．初期の変性期の SOL を対側の対照と比較すると図3-d に示す如く，大きさが増し，色調も白っぽくなり硬度も増加を示した．湿重量を対照と比べると表1に示す如く変性期では対照より平均約20％の増加を示し，再生期では平均約5％の減少を示した．一方，血清 CK 値は表1に示す如く，無処置のラットでも高値を示し，local tetanus のみの群および本モデル群ではいずれも対照よりは若干高値を示したが有意な差は認められなかった．猶，EDL には組織学的に異常所見を認めなかった．

考　　察

今回のモデルの筋病変をまとめると，処置後3～5日頃迄は segmental degeneration から始まる筋線維の変性壊死が活発に見られる時期（変性



a	b
c	d

図3　a．sarcoplasmic mass（↓），HE，680×　b．Gomori trichrome，340×　c．central dark fiber，NADH-TR，340×　d．soleus muscle（肉眼所見）

表1　SOLの湿重量及び血清CK値

	湿重量（実験群／対照群）	血清CK *
変性期	120±38(g)	1109±420
再生期	95±17(g)	1069±377

* 無処置対照群 924±231
Local tetanus群 1063±125

期）であり，5～7日目頃からは活発な再生が進行する時期（再生期）である．2週間を過ぎると激しい変性・再生は見られなくなる一方，筋線維の大小不同，間質結合織の増殖，散在する変性像，再生像など，慢性の変性期となる．これらの所見をPMDおよびMDの病理所見と比較したものを**表2**に示す．変性像としてのsegmental degeneration, opaque fiber，間質結合織の増殖，phagocytosisなどの所見はPMDに特徴的な所見であり，更に再生像としての再生線維の小群集はDuchenne型PMDにおいても初期にはよく見られる所見である．且つ，**表1**に示す如く変性期のSOLが重量も大きく，色調も白っぽく硬度も増していることを考え合わせると，これらの所見は本モデルが仮性肥大型PMDの病変モデルと成り得ることを示している．このような変化を来す機序として考えられることは，local tetanusによ

表2　SOL筋病理所見の比較

病理所見	PMD	MD	本モデル
変性像			
Segmental degeneration	+	±	+
Opaque fiber	+	±	+
Phagocytosis	+	±	+
Connective tissue Proliferation	+	+	+
再生像			
Grouped regeneration	+	+	+
Central nuclear chain	−	+	+
Dark centered fiber	−	+	+
Sarcoplasmic mass	−	+	+

って強い収縮状態におかれた筋線維が伸展位に固定されることにより筋肉が強い伸展刺戟を受け，当然のことながら筋膜も強く伸展されることになる．その結果膜の透過性が亢進しCaイオン等の流入を伴なって筋変性へと進んだことが考えられる．その意味でも膜障害説が唱えられているDuchenne型PMDの筋病変発症機序と共通するところがあると考えられる．Stauberらはラットの SOLに電気的にtetanus刺戟を与えつつ，足関節を反復性に背屈するという方法で3日後にDuchenne型PMD類似の筋病変を作成したことを報告しているが，この場合も原理的には本モデルと同一の機序が考えられる．従来のPMDの動物モデルとしては阻血性のもの，Bupivacaineやplasmocid等の薬物性のものなどがあるが，本モデルの場合Tetanus toxinは腓腹筋に注射しており，SOLについては直接筋膜に対する浸襲は示さず生理的な要因によって病変が形成されている点に意義があると考えられる．

ところで血清CK値が全く無処置のコントロールラットでも高値を示し，処置群local tetanus群と比べて余り差を認めない点は奇異であるが，これは恐らくラットを殺す際の麻酔薬による筋痙攣のために上昇を示したと思われる．この点は今後方法論を検討する必要があると思われた．

一方，CFsの予防という観点からNADH染色で検索した結果では，CFsが出現し易い2週間前後の時期において図3-cに示す如くCFsは殆んど出現しておらず，僅かにcentral dark fiberが散在する程度であった．2週間以前の時期においてもCFsは殆んど認められず，結局短縮位での固定がCFsの発生に重要な意義を有していることが分った．一方，central dark fiberは2日目で既に一部の線維に出現しており，その中には数本のCFsも混じっていた．この部分はSOL筋全体としてみた場合周辺部に局在していた．SOLは紡錘形の筋肉であるため，周辺部は中心部に比べて伸展による影響が少ないためと考えられた．しかしながら経過が長くなると図3-cに見られる如く中央部にもcentral dark fiberは出現してくる．即ちこの時期には再生線維が発達して来ており，もはや伸展刺戟は当初よりは軽減しているわけであり，そのような状況下ではcentral dark fiberが形成されるものと思われた．

一方，sarcoplasmic massは再生期に出現し徐々に発達してくることが分ったが，これはlocal tetanusのみでもCFsからcentral dark fiberに移行する時期に出現してくることが分っており，再生過程の一現象と考えられた．Local tetanusも本モデルもimmobilizationという点で共通の生理学的基盤を有しており，それが誘因となっている可能性が考えられた．

ところで表2において再生像としてのcentral dark fiber, central nuclear chain, sarcoplasmic massなどの所見はMDにおいてよく見られる所見であるが，MDも本モデルも弛緩障害プラス筋への伸展刺戟という点で共通点を有しており，その意味では本モデルはMDの筋病変の成立機序を考える上でも有用なモデルと考えられた．

即ち，本モデルは初期の変性所見の成立という点では仮性肥大型のPMDのモデルと成り得る性質を有する一方，動物モデルであるが故に活発な再生が生じ，その再生過程の現象という点ではMDの病理モデルということが出来る．このモデルを使用することにより，これら病変の予防・治療へ応用することが可能であり有用なモデルと考えられた．

結　　論

1．Local tetanus rat に足関節の背屈位固定を併用することにより，ヒラメ筋において，筋ジストロフィー症および myotonic dystrophy 類似の筋病変を作成し得た．

2．発症機序としては筋膜の過伸張による膜の透過性の亢進が考えられた．

3．Myotonic dystrophy に見られる筋病変は筋線維の弛緩障害に伸展刺戟が加わった結果としての変性に伴なう再生過程の現象である可能性が示唆された．

4．本モデルは筋ジストロフィー症，および myotonic dystrophy の筋病変の発症機序を考察し，更に予防・治療を考慮する上で有用なモデルと考えられた．

文　　献

1）Brooks, V.B. et al : The action of tetanus toxin on the inhibition of motoneurones. J. Physiol. 135 : 655-672, 1957.

2）Chou, S.M. et al : The "core" myofibers induced by local tetanus and tenotomy in rats. J. Neuropath. Exp. Neurol., 40 : 300, 1981.

3）Stauber, W.T. et al : An injury model for Duchenne muscular dystrophy. Neurology, 34 : 160, 1984.

6) Vincristine, Vinblastine, Colchicineによるラット骨格筋の形態学的変化に関する研究
── ライソゾーム系を含んで ──

茂 在 敏 司*

研究協力者　小 西 慎 吾*　増 井 義 一*　竹 中 正 純*

Vincristine sulfate (VCR), Vinblastine sulfate (VLB) および colchicine (CLH) は，いずれも microtubules を破壊する作用を持つことが知られている．またこれらの薬剤が骨格筋障害をひき起すことは，本班会議での我々の報告[1)2)]を含めてすでに知られているが，その機序は今だ不明であり，今回リソゾーム系を含めさらに詳細な形態学的検討を加えたので報告する．

対象・方法

ウイスター系ラット，オス，100～200g を使用，VCR 0.4mg/kg/day 1～2 日間，VLB1～4mg/kg/day 1～2 日間，CLH2mg/kg/day 1 日，そして対照動物として生食水1ml/day 2 日間をそれぞれ腹腔内に注射し，注射終了後24時間目に，薬剤投与ラットでは筋力低下を確認して，ペントバルビタール麻酔下で腓腹筋を生検し，①通常の電顕的検索の他次のごとき電顕的検索を行った．②Revel-Karnovsky 法[3)4)]によりランタンをトレーサーとして T-system の形態的検索，③Gomori 法[5)]により acid-phosphatase 活性をマーカーとしてリソゾーム系の検索をおこない，活性に対する対照試験は，筋を採取した同じ動物の肝，同時に検索しえた myotonic dystrophy 患者の生検筋についておこない，活性阻害試験は10mM NaF を使用した．さらに④Tice-Engel の方法[6)]により，sarcoplasmic reticulum (SR) の Mg^{++} dependent ATPase 活性の検索をおこない，対照試験として，2×10^{-5}M P-chloromercuribenzoate (PCMB) にて阻害試験を行った．

*大阪医科大学第一内科

結　　果

1．通常の電顕的観察所見：**写真 1** に示すごとく三薬剤投与群のいずれも，筋原線維間，筋鞘膜下にいわゆる membranous body と空胞が一体となった異常構造が出現し，これらの注目すべき共通所見は，次のごとくであった．①いずれも空胞を伴う著明な異構造の出現にもかかわらず，まれに認められる壊死線維内に浸潤した phagocyte 内を除いて，debris あるいは residual body といった autophagocytosis の終末的産物はほとんど認められず，exocytosis 像も認められなかった．②まれに認められる壊死線維を除いて，筋原線維の構築はよく保たれていた．③これらの異常構造の出現に伴い SR の正常構築は認められなくなり，筋鞘核の近くでは Golygi's apparatus と思われる構造の破綻，空胞化が認められた．(**写真 1，c-1**)④mitochondria は，一部のものに，明らかな空胞，membranous body の出現をみない所でもその限界膜の肥厚，electron density の増強，破綻が認められ，membranous body 化傾向を暗示するような像も認められた．(**写真 1，a-2, b-1, c-3**) T-system に関しては，後にランタンを使用した電顕的観察のところでのべるとして，次に membranous body の構造を詳細に観察してみると，多くのもので，その層状構造にはさまれて筋形質とほぼ同じ electron density の内容物をもつ空隙と，まったく何も含まない空隙がほぼ交互に存在し，内容物をもつ空隙は，内外のものが所々で交通し迷路状となり何も含まない空隙は細長い

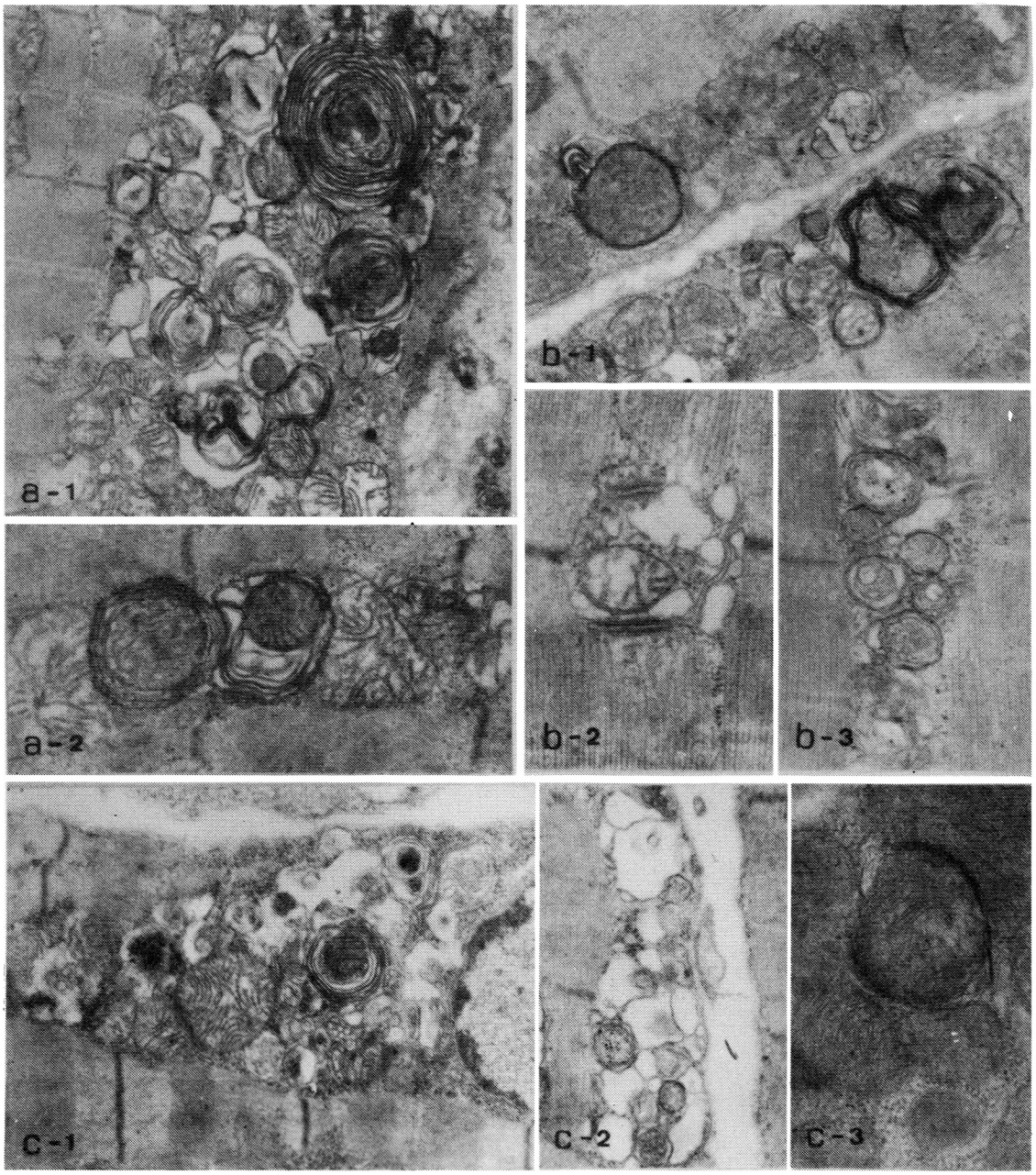


写真 1　通常電顕像（Uranyl acetate and lead citrate staining, 100KV）

a．VCR 注射ラット　1.×13552　2.×20020

b．VLB 注射ラット　1.×19712　2.×25102　3.×19250

c．CLH 注射ラット　1.×13860　2.×14476　3.×31262

sac を形成していた. membranous body の周辺部で隣接して観察される空胞の限界膜は，層構造と同じ一連のもので空胞にはさまれる筋形質はそのまま membranous body の迷路状構造の空隙と連続し，空胞の空は細長い sac の空隙と本質的に一致するものであった.（**写真 2**）

2．ランタンを tracer として使用した T-system の観察所見：membranous body の一部のものが T-system と連続して層状構造の一部がランタンで trace されていた.（**写真 3**）

3．Acid phosphatase 活性の電顕的観察所見：三薬剤投与群では，いずれも空胞，membranous body の出現にもかかわらず明らかなリン酸鉛の沈着は認められなかった.（**写真 4 -a, b, c, d**）対照試験の myotonic dystrophy 症例の生検筋では，一部にではあるが，myelin figure の出現部位に一

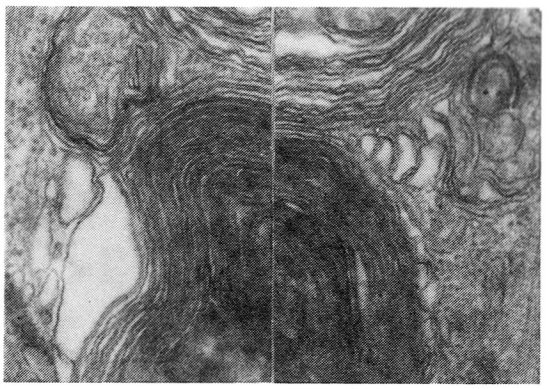
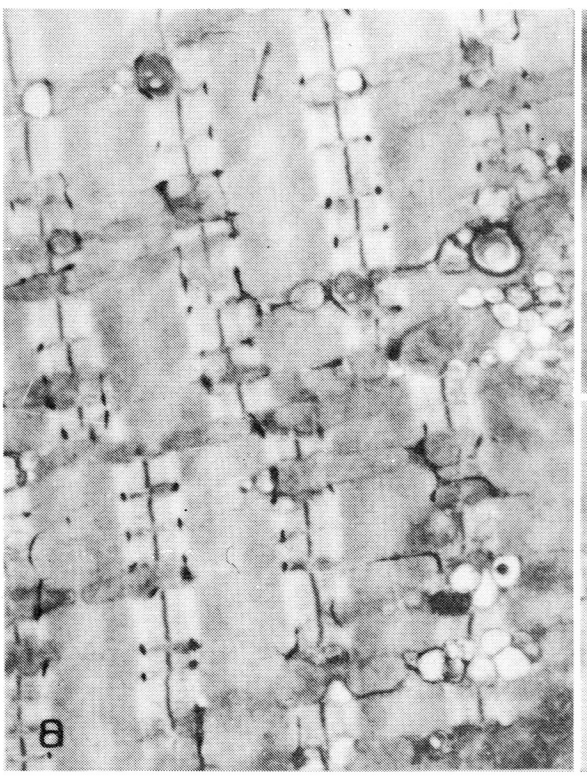


写真 2　VCR 注射ラットの membranous body の強拡大像.（uranyl acetate and lead citrate staining, 100KV）×46200



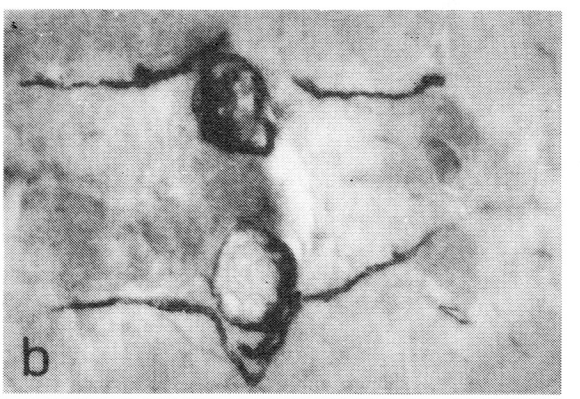


写真 3　VLB 注射ラットのランタンを tracer とした T-system の電顕像（ブルー干渉色切片，uranyl acetate and lead citrate staining, 200KV）
a．×7497　b．×30870　c．×19551

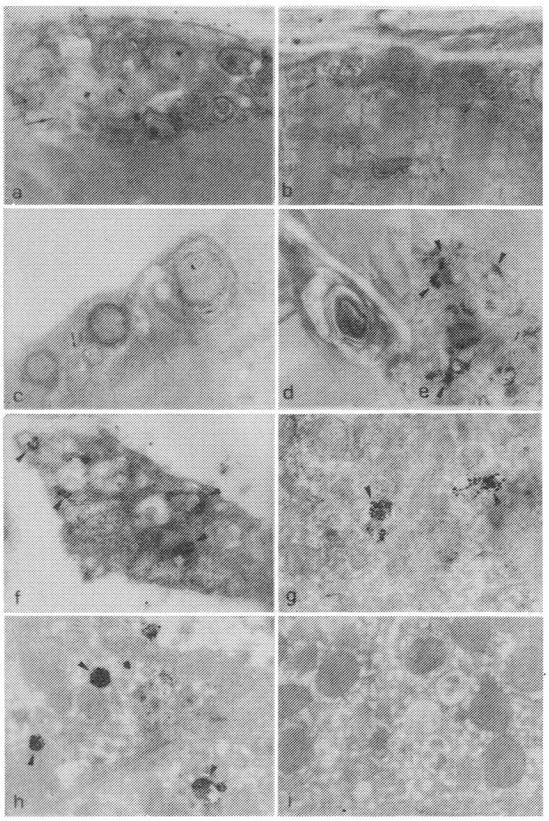


写真 4　acid phosphatase 活性の電顕像 (single uranyl acetate staining, 100 KV)
a．VCR 注射ラット×11770
b．VLB 注射ラット×2354
c．VLB 注射ラット×5992
d．CLH 注射ラット×5992
e．myotonic dystrophy 症例の生検筋×10700
f．筋組織内の fibroblast×10058
g．VCR 注射ラットの肝×4708
h．生食水注射ラットの肝×3852
i．生食水注射ラットの肝の NaF による阻害試験×5564

致して明らかなリン酸鉛の沈着が認められ（**写真 4 -e**），筋組織内の fibroblast，薬剤投与ラットの肝，生食水投与ラットの肝では，いずれも骨格筋のごとき異常構造は認められず，リソゾームに一致してリン酸鉛の沈着が認められた．（**写真 4 -f, g, h**）阻害剤として，NaF を使用したものではリン酸鉛の沈着は認められなかった（**写真 4 -i**）．また生食水投与ラットの骨格筋では，リン酸鉛の沈着はほとんど認められなかった．

4．Mg^{++}-dependent ATPase 活性の電顕的観察所見：生食水投与ラットのみならず，薬剤投与ラットにおいても構造的に異常のない SR の特に triad 部に明らかなリン酸鉛の沈着が認められたが，薬剤投与ラットで，SR が空胞化あるいは membranous body 化しかかっているところではリン酸鉛の沈着が不明瞭化していた（**写真 5 -a, b**）．PCMB による阻害試験では，SR にリン酸鉛の沈着は認められなかった．（**写真 5 -c**）

考　　案

VCR，VLB および CLH はいずれも骨格筋に電顕的に membranous body と空胞を出現させることがすでに知られ，これらは薬剤の直接作用と考えられている[1)2)]．これらの薬剤により出現する membranous body と空胞は，いずれも筋原線維の構築は良く保たれたまま筋原線維間，筋鞘膜下に一体となって出現し，membranous body の層構造と空胞の限界膜は基本的に同じものであり，三薬剤により形成される異常構造は同質のものであると考えられた．さらに membranous body の層構造にはさまれた迷路状の空隙は筋形質と連続しており，これらのことは，この異常構造が筋形質中の概存の膜構造の構築の異常より形成されたものであることを示している．筋線維内の膜構造の主座をしめるのは SR であり，空胞および membranous body の形態からも，これら異常構造の起原の主座は，Golgi's apparatus を含む SR 系と考えられるが，mitochondria も一部のものに限界膜の異常を認め，ランタンを使用した T-system の検索から T-system も一部で membranous body の形成に関与していると考えられた．しかし，mitochondria と T-system の異常は一部限られた範囲のものであり，SR の変化に伴う 2 次的な異常である可能性は否定できないが，mitochondria に関しては，空胞および membranous body の出現をみない部位でもその限界膜の異常が認められ，一次的にその異常が起って

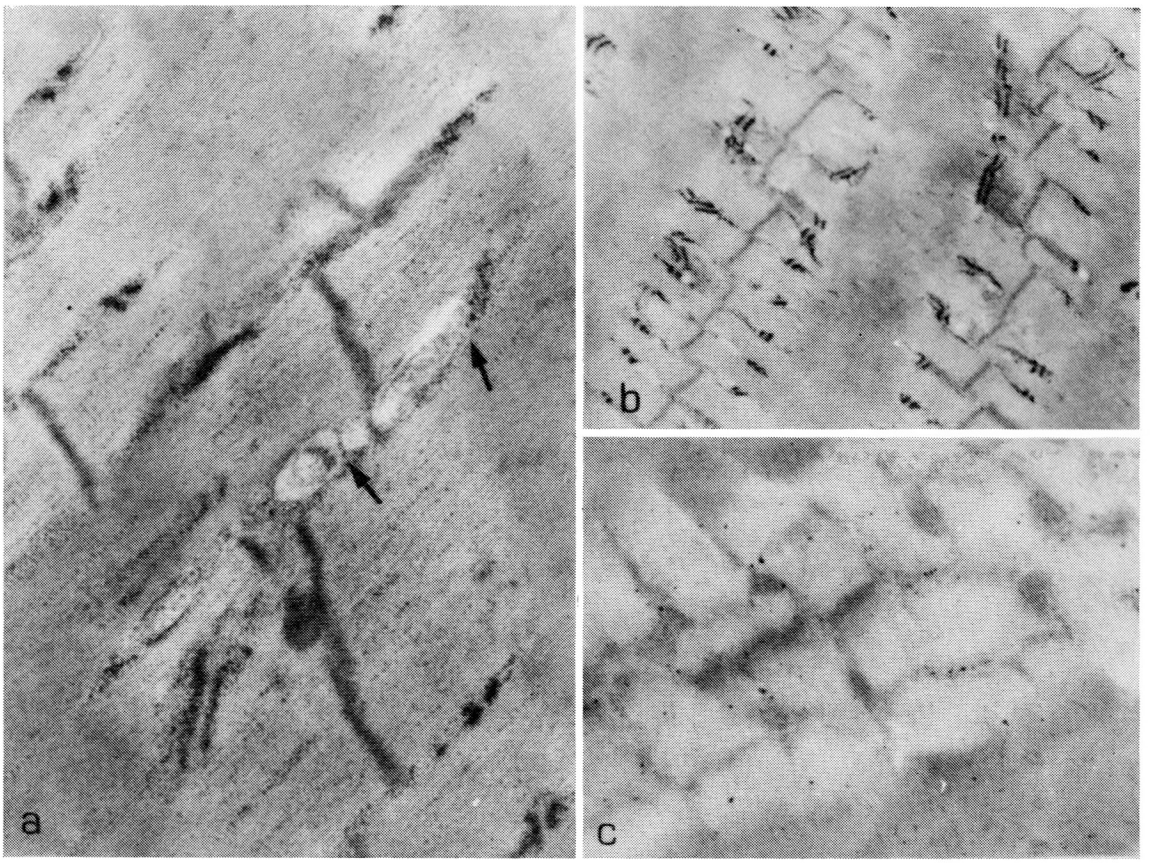


写真 5　Mg-dependent ATPase 活性の電顕像
a．CLH 注射ラット×24750
リン酸鉛の沈着が不明瞭化している（←）　(uranyl acetate and lead citrate staining, 100KV)
b．生食水注射ラット×10065（single uranyl acetate staining, 100KV）
c．生食水注射ラットにおける，PCMB による阻害試験×16500（single uranyl acetate staining, 100KV）

いると考えるのが妥当であろう．

一般に正常の骨格筋では acid phosphatase 活性は，ほとんど認められないとされ，今回のラットでの検索でも同様の結果であったが，MacDonald と Engel[7] は，多数の autophagic vacuole の出現する chloroquine myopathy で著明な acid phesphatase 活性の出現を指摘しており骨格筋でも特に autophagic vacuole の出現する場合にはリソゾーム系の活性化に伴い acid phosphatase 活性が出現するものと考えられる．VCR，VLB および CLH による筋障害は，空胞を伴う著明な異常構造の出現にもかかわらず，autophagocytosis の終末的産物および exocytosis 像さらには acid phosphatace 活性もほとんど認められないのは，非常に特異な所見であり，これら三薬剤による筋障害がリソゾーム系の活性化を欠くものであることを示していると考えられる．acid phosphatase 活性の欠如は，一次リソゾームの形成に関与するとされる Golgi's apparatus の破綻で説明されるかもしれないが，リソゾーム酵素は，Golgi's apparatus そのもので産生されるわけではなく一次リソゾームの形成前の段階にも問題が

ある可能性は否定出来ない．一方また，リソゾーム酵素は，acid phosphatase 以外にカテプシン等種々の酵素があり，今後これらの酵素についても確認が必要であろう．さらに，Golg's apparatus を含む SR 系を中心とした広範かつ特異な膜構築の異常は，一般にいわれているリソゾーム系の作動機序を考えると，酵素活性の欠除のみならず，膜系の動的な機能も同時に障害あるいは変調をきたしていると考えるのが妥当であろう．

これら三薬剤の最もよく知られた共通作用は microtubules の破壊であるが，一般に成熟骨格筋線維内には形態学的に microtubules の明らかな構造は認められないとされており，今回の我々の検索でも（結果に記載していないが）同様の結果であり，三薬剤のいかなる作用により共通した骨格筋障害が出現するのか明らかでない．しかし，いずれも同質のリソゾーム系異常を伴う膜構築異常であることを考えると，筋線維内の microtubules の存在を完全には否定しえないのではないかと思われる．

薬剤投与ラットで筋原線維の構築がよく保たれているにもかかわらず筋力低下が出現するのは，今回示した Triad 部における Mg^{++}-dependent ATPase 活性の所見を含め，Markand et al[8]，小口ら[9]も CLH 投与ラットで指適しているように sarcotubular system の障害で説明できるものと考えられる．

結　　論

1．VCR，VLB および CLH により骨格筋にひきおこされる形態学的変化は同質のものであり，筋鞘膜下および筋原線維間の SR を中心とした pre-existing membrane の構築の異常に，リソゾーム系の障害が重なり合って形成された，特異なものであると考えられた．

2．三薬剤投与ラットにひき起される筋力低下は，sarcotubular system の障害が大きな役割を演じていると考えられた．

文　　献

1）茂在敏司，小西慎吾，他：中毒性筋障害とその形態学的研究—vincristine sulfate によるラット骨格筋障害の形態学的検討—，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52年度研究報告書，1978，pp167-173.

2）茂在敏司，小西慎吾，他：実験的ミオパチー（II）—Vinblastine, colchicine によるラット骨格筋の形態学的変化，厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究，第二班（三好班）昭和54年度研究報告書，1980，pp133-138.

3）Revel, J.P. and Karnovsky, M.J.: Hexagonal array of subunits in intercellar junctions of the mouse heart and liver. J. Cell Biol., 33: C7, 1967.

4）Oguchi, K. and Tsukagoshi, H.: An electron-microscopic study of the T-system in progressive muscular dystrophy (Duchenne) using lanthanum. J. Neurol. Sci., 44: 161, 1980.

5）Gomori, G: An improved histochemical technic for acid phosphatase. Stain technol., 25: 81, 1950.

6）Tice, L.W. and Engel, A.G.: Cytochemistry of phosphatases of the sarcoplasmic reticulum. II. In situ localization of the MG-dependent enzyme. J. Cell Biol., 31: 489, 1966.

7）MacDonald, R.D. and Engel, A.G.: Experimental chloroquine myopathy. J. Neuropath. Exp. Neurol., 29: 479, 1970.

8）Markand, O.N. and D'Agostino, A.N.: Ultrastructural changes in skeletal muscle induced by colchicine. Arch. neurol., 24: 72, 1971.

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

7) 筋ジストロフィー鶏胚の交感神経節における蛋白質合成能の特異性についての研究（第2報）
── 加齢にともなう変化について ──

堀　眞一郎*

研究協力者　杉浦弘子*　大谷幸子*

はじめに

遺伝的素因による筋ジストロフィーの発症の機序を解明する有力な手段の一つは発症前あるいは発症初期における異常を検索することである．私達は筋ジストロフィー鶏（以下筋ジス鶏と略す.），筋ジストロフィーマウスを用いて，胎生期及び幼若期における生化学的異常の検出を試みている．

先に，私達は筋ジス鶏の交感神経節は神経成長因子（以下NGFと略す.）に対する反応性が，正常対照鶏に比べ，より早い時期に低下すること[1]，蛋白質合成能が正常対照鶏と相違していること[2]を報告した．今回は，蛋白質合成能における相違を更にくわしく検討するため，胎生期あるいは幼若期の交感神経節について，比較検討した．

実験方法

交感神経節の調整　ニューハンプシャー種の筋ジス鶏（413系）及び同種の正常鶏（412系）の受精卵を孵卵し，孵卵開始15日胚，孵化後1日齢及び26日齢のヒヨコを使用した．交感神経節としては第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個の神経節を摘出し使用した．

〔^{3}H〕-Leucineによる蛋白質の標識　摘出した神経節の培養及び生合成蛋白質の〔^{3}H〕標識は，L-〔4, 5-^{3}H〕-leucine（5mci/ml）の添加量を2倍量の10μlとし，標識効率を上げ，培養時間を17時間と短縮したほかは昨年と同様の方法によった[2]．培養後，神経節は〔^{3}H〕-leucineを含まない培養液で3回すばやく洗浄した後，二次元電気泳動を行うまで，−80℃に凍結保存した．^{3}H標識されたペプチドは5M urea-1M thiourea-0.5% β-mercaptoethanol-0.01M Na-pyrophosphateを含んだ液で可溶化した後，二次元電気泳動により分離した．

二次元電気泳動　平林[3]による方法で行った．泳動後の分析をより容易にするために，等電点電気泳動に際しては，昨年使用したものより，太く長い内径2.6mm，長さ180mmのガラス管を使用し，昨年と同様の組成の液をそれぞれ昨年と同じ割合で注入し，一夜4℃に静置し，ゲル化した後，アルカリ側に上記の如くurea処理した試料を40μlのせた．泳動は低温室（7〜8℃）中で定電圧500Vにて24時間行った．泳動後，ゲルを充分に太いガラス管に入れ，10% TCA-5% sulfosalicylic acid液を還流し固定した．分離された蛋白質のパターンを確認した後，純水で15〜30分還流洗浄し，SDS（1%）-polyacrylamide（4-17%, W/V, gradient）平板ゲル（195（W）×130（H）mm）にのせ，0.025M Tris-0.192M glycine-0.1% SDS液を使用し，初め約1時間，30mAで泳動（試料に添加したBromphenol blueがstacking gelを通過し，分離ゲルに入るのをまって）し，50mAに電流を上げ，更に3.5-4時間泳動した．泳動後の染色，脱色は昨年と同様に行った．脱色後，ゲルをAmplify（Amersham社製）に30分間浸した後，乾燥し，X線フィルムに密着し，フルオログラフィーにより，^{3}H標識されたペプチドの位置を検出観察した．

＊東京都神経科学総合研究所神経生化学

結果及び考察

孵卵15日胚の交感神経節における蛋白質合成能

図1は孵卵15日胚の筋ジス鶏と正常対照鶏の神経節において，NGF無添加(以下，NGF(−)と略す）で生合成された蛋白質を分離したものである．濃いスポットについては，筋ジス鶏と正常対照鶏の間で，位置の違いは認められなかったが，筋ジス鶏ではpI 7.1，MW34K；pI 7.4，MW33.5Kの2つのスポットが正常対照鶏に比べ濃く現れ，正常対照鶏ではpI 7.35，MW34Kのスポットが筋ジス鶏に比べ濃かった．その他のスポットについては筋ジス鶏と正常対照鶏の間に，有意の差は認められなかった．培養液中にNGFを添加（以下，NGF(+)と略す）することにより，正常対照鶏で濃く出現したスポットが筋ジス鶏でも濃くなり，筋ジス鶏で濃く出現した2つのスポットは淡い方向に変化し，両者の間の差は更に少なくなった．孵卵15日胚では出現するスポットの位置に，筋ジス鶏と正常対照鶏との間に差が認められないことから，蛋白質の生合成に質的差がないことを示唆しているが，蛋白質の生合成の量的な差は既に認められた．

孵化後1日齢の交感神経節における蛋白質合成能

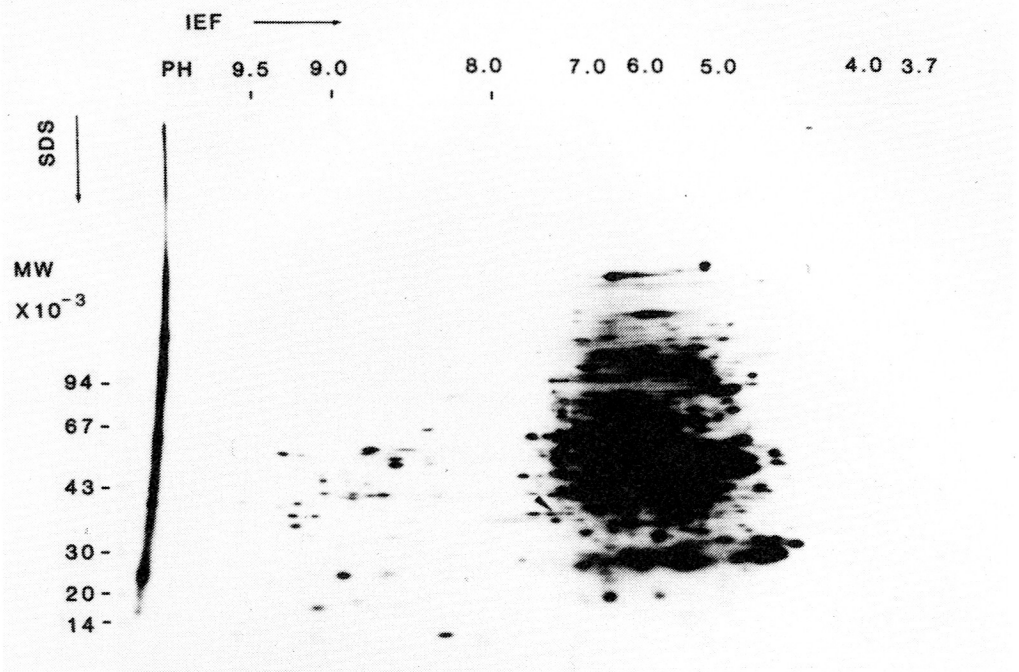
図2は孵化後1日齢の筋ジス鶏と正常対照鶏の神経節において，NGF(−)で生合成された蛋白質を分離したものである．pI 4.8，MW96K；pI 4.8，MW52.5K；pI 4.46，MW50K；pI 4.5，MW57K；pI 6.8，MW35Kの各スポットは正常対照鶏ではNGF(−)でも出現したが，筋ジス鶏では認められなかった．NGF(+)にすると，正常対照鶏及び筋ジス鶏共に出現した．pI 4.7，MW92K；pI 4.99，MW52K；pI 5.3，MW28K；pI 7.28，MW32.5Kの各スポットは筋ジス鶏ではNGF(−)でも出現したが，正常対照鶏では出現しなかった．しかし，pI 4.7，MW92Kのスポットは NGF(+)にすると正常対照鶏でも出現した．pI 4.99，MW52Kのスポットは正常対照鶏ではNGF(+)にすると出現したが，筋ジス鶏ではNGF(+)にすると逆に消失した．pI 7.28，MW32.5Kのスポットは筋ジス鶏にのみ認められた．pI 5.3，MW28Kのスポットは筋ジス鶏でNGF(−)のときにのみ出現した．筋ジス鶏に特異的に出現あるいは消失するスポット及びNGF(+)で生合成能の変化するスポットの意味については今後の研究をまたねばならないが，筋ジス鶏と正常鶏の間に，孵化時既に蛋白質合成能における質的差があること，及び，蛋白質合成能でみたNGFに対する応答性においても両者の間に質的差があることを示唆している．

孵化後26日齢の交感神経節における蛋白質合成能

図3は孵化後26日齢の筋ジス鶏と正常対照鶏の神経節において，NGF(−)で生合成された蛋白質を分離したものである．図中白枠で囲った部分は別枠に示した．pI 5.6，MW150K；pI 7.2，MW77Kの各スポットは正常対照鶏において，NGF(−)で出現したが，NGF(+)では消失した．pI 6.5，MW79K；pI 6.8，MW101K；pI 6.8，MW46K；pI 7.2，MW49K；pI 7.2，MW86K；pI 7.2，MW77K；pI 7.5，MW44Kの各スポットは筋ジス鶏において，NGF(−)では認められなかったが，NGF(+)では出現した．pI 3.7，MW180K；pI 4.7，MW92K；pI 8.7，MW60Kの各スポットは正常鶏のNGF(+)及び（−）で出現し，筋ジス鶏では認めなかった．pI 6.4，MW25K；pI 6.7，MW110K；pI 6.9，MW93K；pI 6.9，MW43K；pI 7.2，MW80K；pI 7.2，MW45K；pI 7.4，MW41Kの各スポットは筋ジス鶏において，NGF(−)で認められたが，NGF(+)では消失した．pI 8.4，MW57Kのスポットは筋ジス鶏でのみ出現した．孵化後26日齢では，筋ジス鶏と正常対照鶏の間の差は，15日胚，孵化直後に比べ更に明瞭となり，NGFによって変化せず，正常鶏あるいは筋ジス鶏にのみ認められるスポットと，NGFにより消失，出現し，正常鶏と筋ジス鶏の間の差がなくなるスポットがあった．蛋白質合成能でみたNGFに対する応答性においても両者の間で質的に異なっていることが更に明らかになった．又，正常鶏と筋ジス鶏の間で差の認められるスポットが発育の時期により異なっているが，これらの差が，発育過程の遅延あるいは促進によるものか否かを検索するため，15日胚と孵化後26日齢との間で，スポットの現れ方

Synthesized Protein in Sympathetic Ganglion (NGF (-))

A) Control Embryo (line412), 15 days Incubation



B) Dystrophic Embryo (line 413), 15 days Incubation

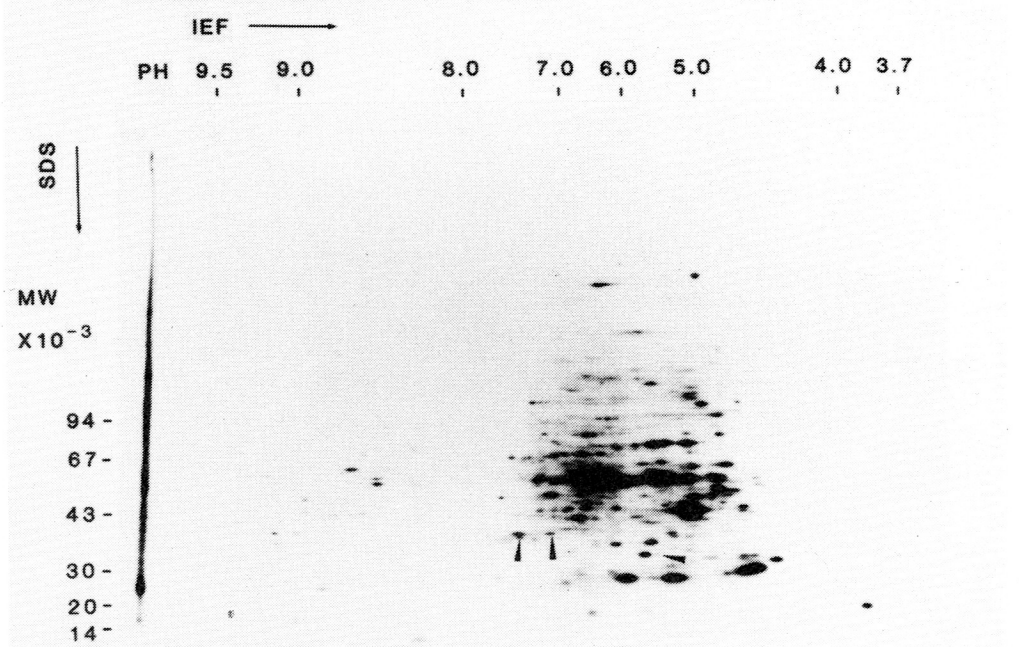


図 1

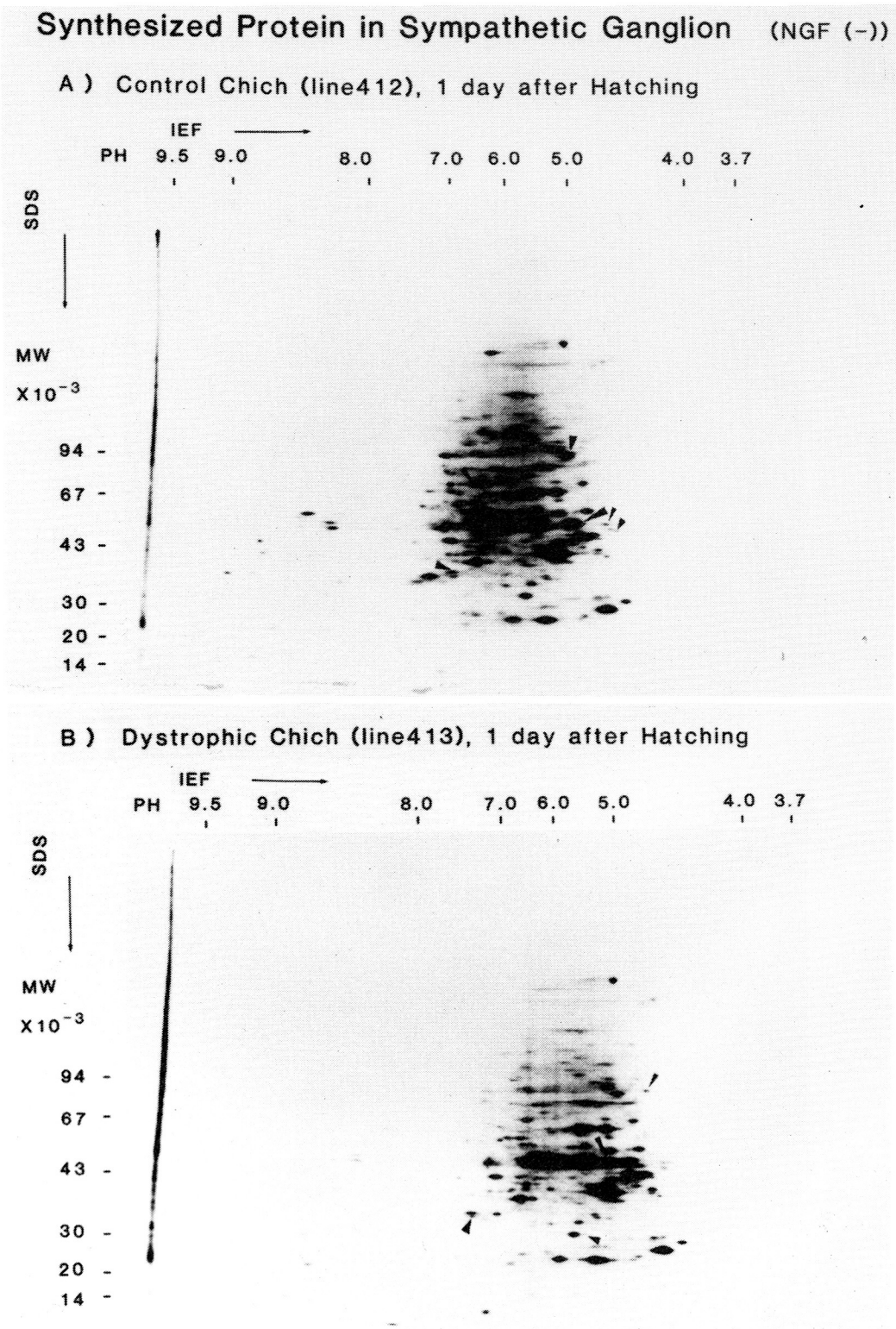

Synthesized Protein in Sympathetic Ganglion (NGF (-))
A) Control Chich (line412), 1 day after Hatching
IEF
PH 9.5 9.0 8.0 7.0 6.0 5.0 4.0 3.7
SDS
MW
X10-3
94
67
43
30
20
14
B) Dystrophic Chich (line413), 1 day after Hatching
IEF
PH 9.5 9.0 8.0 7.0 6.0 5.0 4.0 3.7
SDS
MW
X10-3
94
67
43
30
20
14

図 2

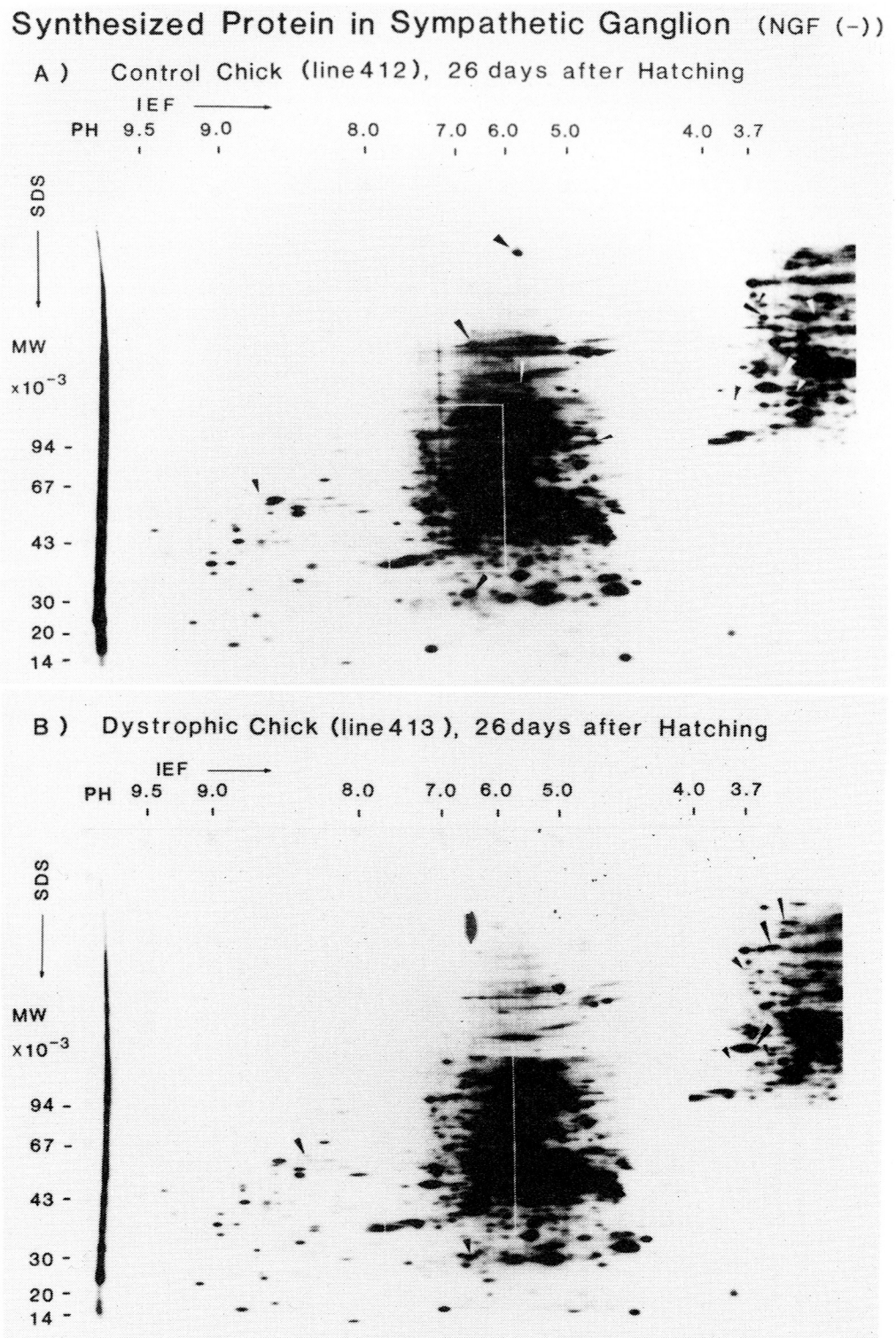

Synthesized Protein in Sympathetic Ganglion (NGF (-))
A) Control Chick (line412), 26 days after Hatching
IEF
PH 9.5 9.0 8.0 7.0 6.0 5.0 4.0 3.7
SDS
MW
x10⁻³
94
67
43
30
20
14
B) Dystrophic Chick (line413), 26days after Hatching
IEF
PH 9.5 9.0 8.0 7.0 6.0 5.0 4.0 3.7
SDS
MW
x10⁻³
94
67
43
30
20
14

図3

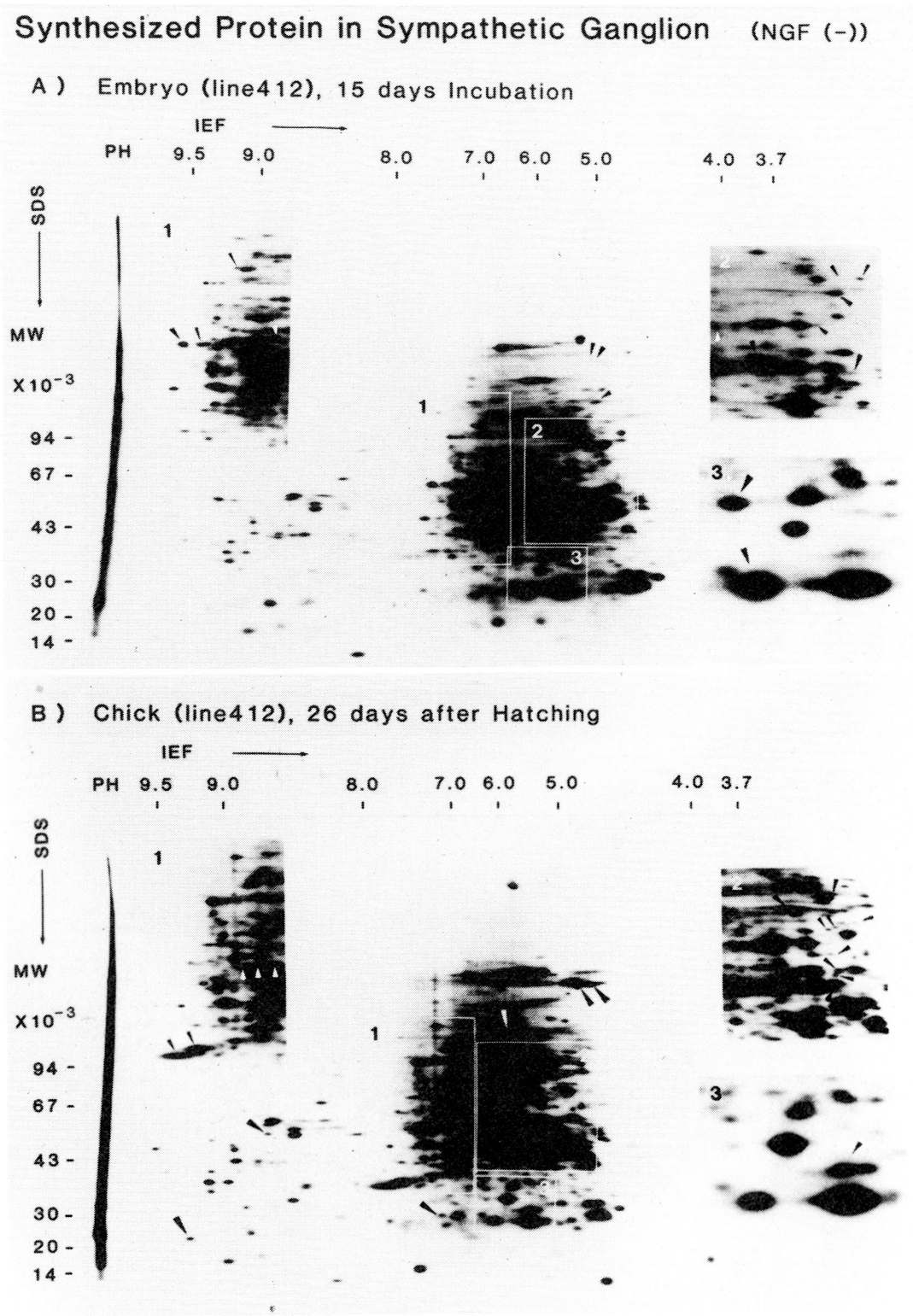
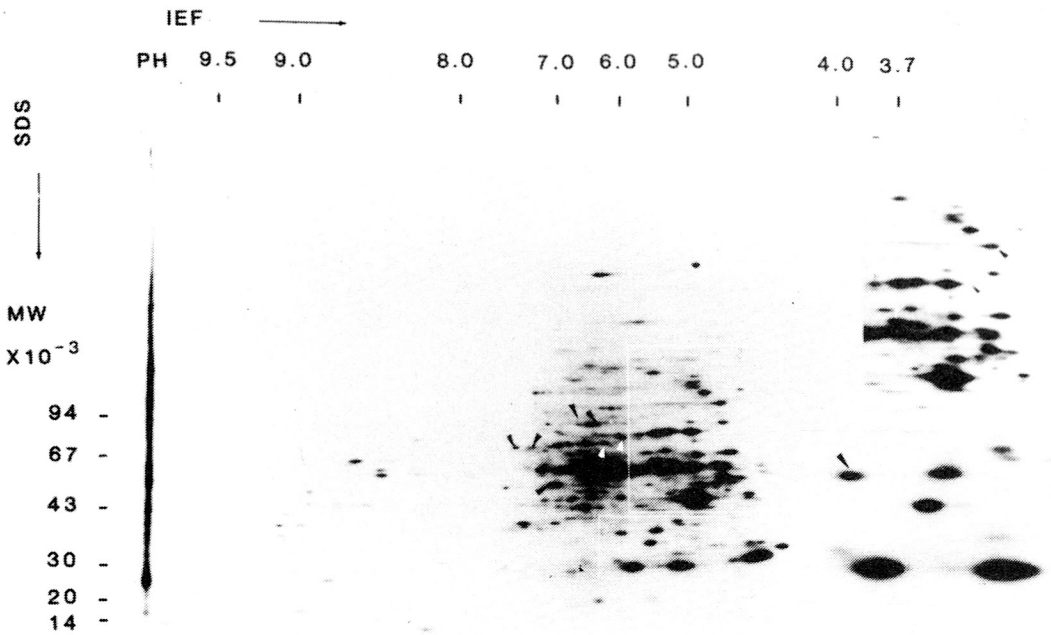

Synthesized Protein in Sympathetic Ganglion (NGF (-))
A) Embryo (line412), 15 days Incubation
IEF
PH 9.5 9.0 8.0 7.0 6.0 5.0 4.0 3.7
SDS
MW
X10⁻³
94 -
67 -
43 -
30 -
20 -
14 -
1
2
3
B) Chick (line412), 26 days after Hatching
IEF
PH 9.5 9.0 8.0 7.0 6.0 5.0 4.0 3.7
SDS
MW
X10⁻³
94 -
67 -
43 -
30 -
20 -
14 -
1
3

図 4

Synthesized Protein in Sympathetic Ganglion (NGF (-))

A) Embryo (line413), 15 days Incubation



B) Chick (line413), 26 days after Hatching

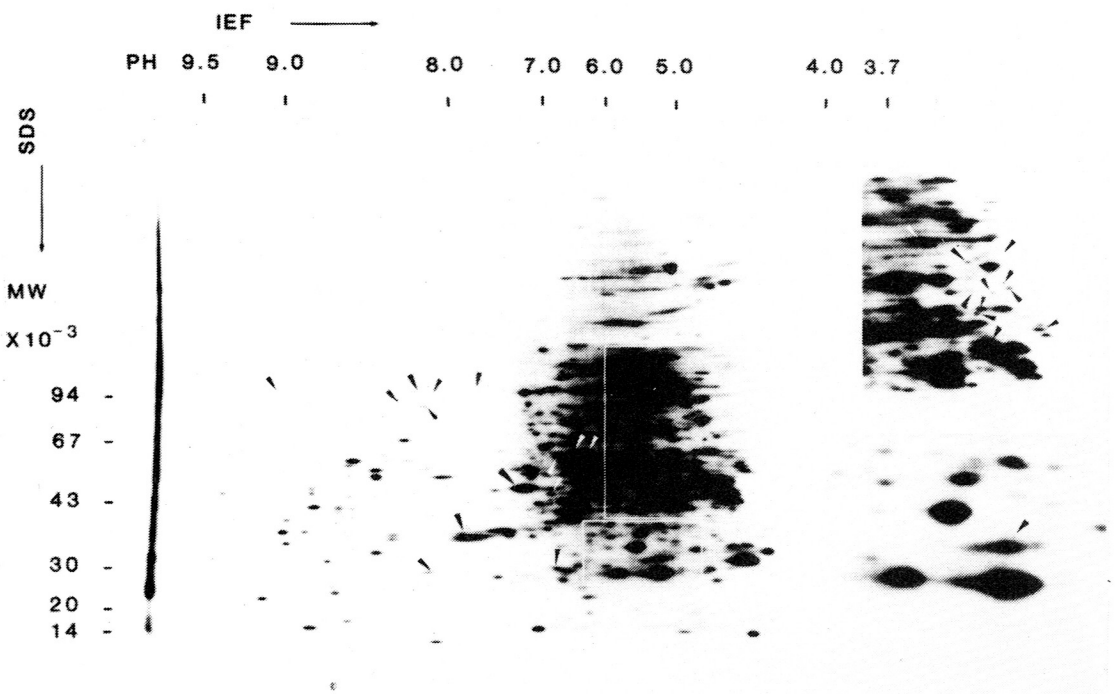


図 5

を比べてみた．

15日胚と孵化後26日齢の神経節における蛋白質合成能の比較

図4及び図5は，それぞれ正常鶏及び筋ジス鶏について，15日胚と孵化後26日齢の蛋白質合成能の差を示した．15日胚と孵化後26日齢の間で差の認められたスポットの内，pI 4.85, MW90.3K；pI 4.89, MW216K；pI 4.94, MW224K；pI 5.6, MW58K；pI 6.1, MW74K；pI 6.36, MW70.5Kの各スポットは15日胚に出現したが，孵化後26日齢では認められなかった．これらの内，pI 6.1, MW74K；pI 6.36, MW70.5Kの各スポットは孵化後1日齢でも認められた．pI 4.77, MW81K；pI 4.93, MW64.6K；pI 4.94, MW77K；pI 5.33, MW85.5K；pI 5.55, MW125K；pI 6.38, MW63K；pI 6.6, MW63K；pI 6.8, MW25.6K；pI 6.85, MW61.9K；pI 8.63, MW52Kの各スポットは孵化後26日齢では認められたが，15日胚では認められなかった．これらの内，pI 4.94, MW77K；pI 4.77, MW81K；pI 6.8, MW25.6K；pI 8.63, MW52Kの各スポットは孵化後1日齢で既に認められた．なお，これらのスポットは正常鶏と筋ジス鶏の間，及びNGF(＋)と(－)の間では差を認めなかった．即ち，正常鶏及び筋ジス鶏の発育過程に伴って消失あるいは出現する両者に共通の蛋白質であることを示している．更に，これらのスポットのいずれもが，発育の各々の段階で筋ジス鶏と正常対照鶏との比較に際して差を認めたスポットとは異なっていた．このことは，筋ジス鶏と正常対照鶏の間の蛋白質合成能の差は神経節の発育の遅延あるいは早熟のような発育速度の違いによるものではなく両者の間には，遺伝子あるいは遺伝子発現の段階で質的な差があることを示唆している．

ま と め

1．筋ジス鶏の交感神経節の蛋白質合成能の加齢に伴う変化及びNGFに対する応答性について，正常対照鶏との間で比較検討した．

2．筋ジス鶏と正常対照鶏の間の蛋白質合成能の差は孵化後1日齢において既に認められたが，孵化後より加齢と共に明瞭になることが示唆された．NGFは両者の差を少なくする方向に作用した．

3．NGFは交感神経節の蛋白質合成能を促進するが，NGFにより変化をうける蛋白質が発育の時期によって異なっていることが明らかになった．

4．筋ジス鶏と正常鶏の間の蛋白質合成能の差は神経節の発育過程の遅延あるいは早熟によるものではなく，両者の間の差は遺伝子あるいは遺伝子発現における差に起因することが示唆された．

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）堀眞一郎，杉浦弘子，大谷幸子，椿忠雄：筋ジストロフィー鶏胚の交感神経節における蛋白質合成能の特異性についての研究（第一報）．「筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究」 昭和59年度研究報告書，1985，p. 267.

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

II. 遺　　伝

8) ドシャンヌ型筋ジストロフィー症の遺伝分析
I．女性ドシャンヌ型筋ジストロフィー症の染色体分析

古　庄　敏　行*

研究協力者　岸　　邦　和*　納　　光　弘**
福　永　秀　敏***　井　形　昭　弘**

はじめに

DMDは伴性劣性遺伝を示す疾患であるが，頻度が著しく低いため，女性DMDはほとんど確認されない．しかし，1977年Greensteinら[1]がX染色体一常染色体転座を伴ったDMDの女児例を報告して以来，欧米で約10例，日本で5例の報告がみられる．

著者らもこの点を詳細に検討するため，女性DMD 3例について高精度分染法によって染色体分析を試みたので，報告する．

方法と結果

1．家系調査：DMDと診断された女性3例について家系調査を行ったところ，図1に示す如く，両親はいずれも正常（非DMD）で，近親婚(いとこ婚)は2/3＝0.6667±0.2721で鹿児島集団のいとこ婚率0.0808±0.0274に比べて著しく高いが，調査例数が少ないためか両群間の差は統計的有意水準に達しなかった（$\chi^2=0.0079$，d.f.＝1，$0.90<p<0.95$）．

つぎに，X染色体上の遺伝子は男ではヘミ接合であるから近親婚の影響を受けない．女は2個のX染色体をもっているので，近親婚によってホモ接合性が高まる．近交係数（F：いとこ婚の亜型と伴性遺伝子の近交係数）も女についてのみ求めることができる．ただし，いとこ婚の組合せによってつぎの4つの亜型に分ける．

夫の父と妻の父とが同胞　MM型 F＝0

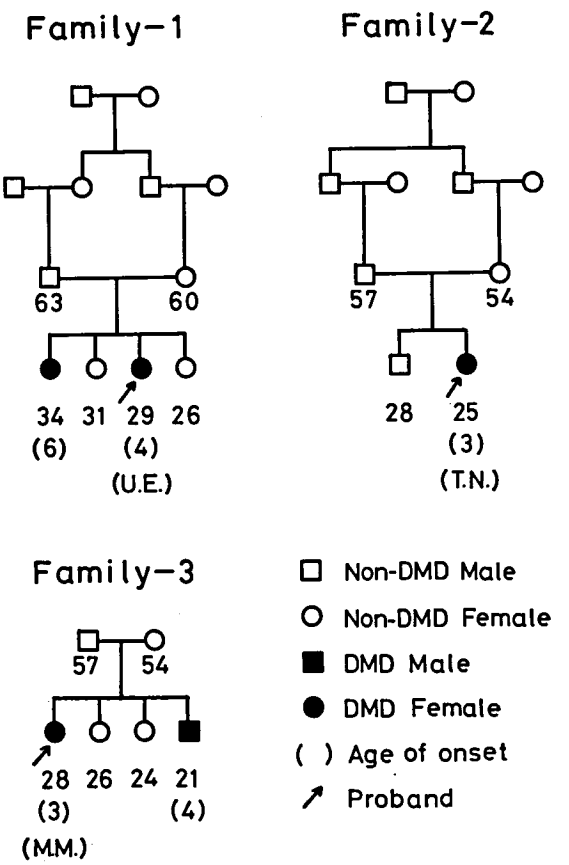


図1　Pedigree of the family. Arrow indicates the propositus.

夫の父と妻の母とが同胞　MF型　F＝0
夫の母と妻の父とが同胞　FM型　F＝1/8
夫の母と妻の母とが同胞　FF型　F＝3/16

日本人集団におけるいとこ婚の亜型別頻度は，

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

MM型で0.1989±0.0234，MF型で0.1934±0.0235，FM型で0.2833±0.0222，FF型で0.3244±0.0215である．伴性遺伝子の近交係数に関与するFM型とFF型は，いとこ結婚のうち0.6077±0.0164であり，したがって本資料との間に有意な差はみられない．

2．染色体分析：Ikeuchi et al.（1979）[2]によって開発された方法を用い，女性DMD 3例について高精度染色体分染法（約850バンド）による核型分析を試みたが，いずれも染色体異常はみられなかった．そのうち1例（Family-1, U.E.）を示すと，図2の如くである．

考　　察

DMDは家系調査から(1)両親はともに正常である(2)ほとんど男児のみに出現することから，伴性劣性遺伝型とされていた．ところが，Greenstein et al.（1977）[1]がX染色体一常染色体（第11番）転座を伴ったDMDの女児例を報告して以来，欧米で約10例，日本でも5例の報告がある．

X染色体一常染色体転座を伴ったDMDを遺伝学的に解明することは，遺伝子分析に貢献するところ大と思われる．著者らもこれらの点を考慮し，女性DMD 3例について染色体分析を試みたが，いずれも染色体異常はみられなかった．しかし，染色体異常（X染色体一常染色体転座）がみられないから女性DMDの存在を否定することにはならないが，問題点もないとはいえない．すなわち，女児にDMDが出現するには父は必ずDMDであることが期待される．しかし，本資料の3家系はいずれも両親は正常（非DMD）である．

ここで，DMDが不規則な遺伝をする要因につ

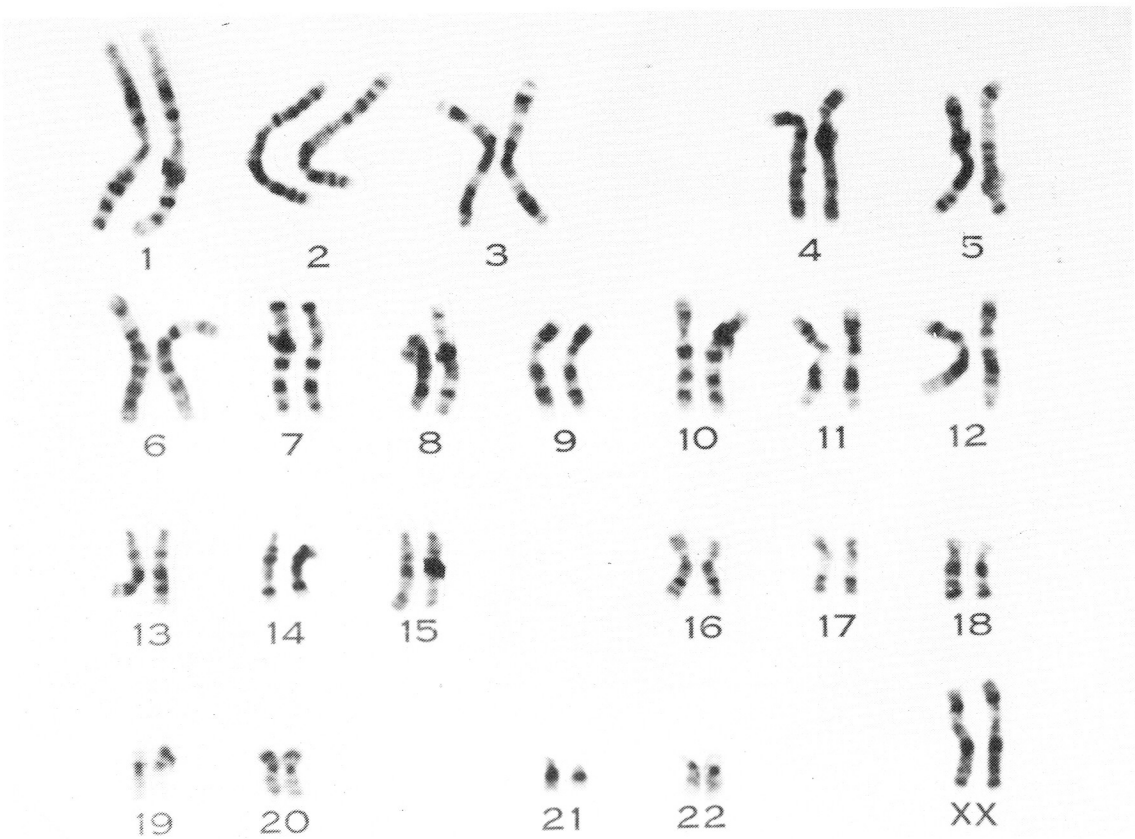


図2　High-resolution banded karyotypes of patient（Family-1, U.E.）.

いて若干考察を試みたい．

1．不完全浸透：男性DMDの49家系調査資料から，吉丸ら(1984)[3]はDMDの分離比（Ps）を推定し，浸透度（ν）を$\nu=0.2093/0.5=0.4186$と得ている．DMDの遺伝子を有しながらDMDを発現しない率は約60%を占める．

これが事実であれば，本資料3家系の父はいずれも遺伝子型はDMDの遺伝子を有しながら，不完全浸透（$1-\nu$）によって表現型は正常（非DMD），母はヘテロ接合，と仮定すれば説明がつかないではない．

なお，本資料の女性DMDの分離比は$P_s=1/5=0.2\pm0.1789$となり，浸透度は$\nu=0.2/0.5=0.4$と推定され，νは男性DMD家系，女性DMD家系ともほぼ等しい推定値が得られる．このような考えが許されるなら，本資料の両親の遺伝子型は，母がヘテロ接合，父はヘミ接合の状態でDMD遺伝子を有するが表現型は正常（非DMD）であると仮定すれば，女性DMD出現の遺伝的機構も説明される．

2．突然変異：DMDの突然変異率（μ）（/locus/generation）については，Yasuda et al.(1980)[4]は$\mu=6.3\times10^{-5}$と推定し，他方，吉丸ら(1984)[3]はνを考慮したμの推定法を考案し，$\mu=(1.9\sim2.2)\times10^{-4}$を得ている．

もし，女性DMDが突然変異に由来するならば，両親ともに正常であるから，父に突然変異（μ）が起こり，母はヘテロ接合と考えられる．この場合の組合せの頻度は，$4.6\times10^{-8}\sim1.61\times10^{-7}$と推定され，その子（女）にDMDが出現するのは，この推定値の半分以下と考えられる．一般集団の女性DMDの頻度からみれば極めて低く，女性DMDの出現を突然変異だけでは考えられない．

3．X染色体不活性化の非機会性：X染色体一常染色体転座を伴った女性DMDのX染色体の不活性化について，楢崎ら(1985)[5]は外国の文献も含め，正常X染色体が不活性化された割合は0.80～1.00とまとめている．

ヘテロ接合体の女性DMDの発症機序を，Emery (1963)[6]，Sugita and Tyler (1963)[7]らはlyonisationの概念で説明している．この考えによると，DMDの女性保因者の体細胞は正常な細胞とDMD遺伝子を有する細胞からなるモザイクであり，異常な細胞の割合が増えるほどDMDとしての臨床像が明瞭化することになる．

DMDと同様に伴性劣性遺伝病であるFabry病は，α-ガラクトシダーゼA（GLA）欠損により発症するが，Fabry病の家系におけるGLA活性の調査（Ropers et al., 1977)[8]では，保因者である女性の中には，正常者の約50%のGLA活性を示す例ばかりでなく，患者と同程度の活性しか有しないものまで分布しており，GLA低活性を示す例では患者と類似の皮膚・血管障害が観察されている．Ropersら[8]は，これらの保因者では，正常なGLA遺伝子をもつX染色体が非機会的に不活性化されることにより，多くの組織で異常なGLAが発現した可能性を示唆している．

本来保因者であるべきDMDヘテロ接合体女性においてX染色体の不活性化が非機会的におこり，DMD遺伝子を有するX染色体が活性をもつ細胞の割合が多くなれば，この保因者にDMDが発症することが考えられ，本研究で用いた家系にみられる女性患者の発症を説明することが可能である．さらに，これらの女性患者での症状の軽重も同様に説明しうる．

4．遺伝的異質性：DMDと診断された個体で，遺伝性が確実であっても，それを支配する遺伝子がまったく別となっている場合も多い．DMDのほとんどは伴性劣性遺伝子に支配されるであろうが，DMD類似疾患も含まれる可能性がないとはいえない．Miyoshi et al. (1974)[9]によると，常染色体性劣性型は悪性肢帯型と呼んでドシャンヌと区別している．

伴性劣性遺伝形質では，男の頻度（Q_M）と女の頻度Q_F）の関係は$Q_M{}^2=Q_F$で与えられる．例えば浸透率100%の血液型についてみると，男のXq(−)の頻度は$Q_M=0.3058\pm0.0276$，女のXq(−)の頻度は$Q_F=0.1116\pm0.0199$で，$Q_M{}^2$（$=0.0774\sim0.1112$）≒Q_F（$=0.0917\sim0.1315$）となり，伴性劣性遺伝の仮説によく適合する．

男性DMDの頻度は，Yasuda et al. (1980)[4]は1/5000，吉丸ら（1984）は1/6531と報告してい

る．したがって，$Q_M{}^2=(0.000153\sim0.0002)^2=Q_F=(2.34\sim4)\times10^{-8}$ が期待される．すなわち，1億人中2～4人の女性DMDの出現が期待される．これから，日本人集団では女性が約5000万人余であるから，1～2人の女性DMDが存在することが考えられる．しかし，著者らの染色体異常を伴わない女性DMDがすでに4人存在し，またMoser & Emery (1974)[10]によれば女性DMDの頻度は $Q_F=1/100000$ と推定している．本資料の女性DMDの頻度は $Q_F=1.087\times10^{-5}$ で，伴性劣性遺伝を仮定した女性DMDの出現頻度に比べ著しく高く，したがって，伴性劣性遺伝の仮説に適合しない．これらの結果は，DMDと診断されるほとんどは伴性劣性遺伝型であろうが，その本態を異にする遺伝的異質性の存在が示唆される．

著者らは，家系調査や一般集団の頻度から，従性遺伝型を提唱する．

いま対立遺伝子 D^1，D^2 を仮定し，D^1D^1 は男女とも正常，D^2D^2 は男女ともDMD（あるいはDMD類似）であり，ヘテロの D^1D^2 は男ではDMD（あるいはDMD類似）になるが女では正常である．つまりDMD（あるいはDMD類似）遺伝子 D^2 は，男で優性，女で劣性になる．

ここで，D^1 遺伝子頻度をp，D^2 遺伝子頻度をq（=1-p）とすれば，従性遺伝仮説への適合性は，

〔$p=\sqrt{\text{Non-DMD（あるいはDMD類似）男の頻度}}$〕＋

〔$q=\sqrt{\text{DMD（あるいはDMD類似）女の頻度}}$〕＝1

から判定する．上式に代入すると，

〔$p=\sqrt{0.9998\sim0.999847}$〕＋〔$q=\sqrt{0.0000108}$〕

は

〔$p=0.999899\sim0.999923$〕＋〔$q=0.003286$〕

$=1.003185\sim1.003209$

が得られ，$p+q\fallingdotseq1$ になり従性遺伝の仮定にほぼ適合する．ここで得られた1.003185～1.003209と1との差が，伴性劣性遺伝型その他の型による効果と思われる．厳密には（女性DMDの頻度）×（X染色体一常染色体転座を有しない個体数／染色体分析を試みた個体数）を，上式のDMD（あるいはDMD類似）女の頻度として用いれば，男性DMDのうち従性遺伝型のDMDの頻度も推定される．

つぎに，本資料の女性DMD（あるいはDMD類似）が従性遺伝的であるという証拠は，すでに述べた近親婚調査からもいえる．すなわち，本調査資料ではいとこ婚は0.6667±0.2721で一般集団（鹿児島県）の0.0808±0.0274より高い．しかし，男性DMDを有する49家系では（吉丸ら，1984）0.0204±0.0202で，むしろ一般集団のそれより低い．この事実も，DMDあるいはDMD類似疾患の一部は従性遺伝型を示唆する．

5．臨床的異質性：疾患の診断は遺伝子レベルではなく，病像によって判断される．いわゆる表現型である．

遺伝子型を等しくするすべての個体が，全く同じ程度に形質を現わすとは限らない．形質の表現の程度には差があるので，これを表現度という．表現度は形質の量的変異をさすが，質的にも広い変異がみられ，これを特殊性という．このような病像の変異の幅は，例えば，DMDを等しくもつ個体でも，数万に達する他の座位の遺伝子（遺伝的背景）との作用と広い意味の環境条件がこれらの中間過程を修飾し，その結果として病像に幅がみられる．X染色体一常染色体転座の女性DMDも，広義のDMDの一種の亜型といえよう．

また，現時点でDMDあるいはDMD類似疾患を遺伝的異質性として分類できないものも含まれている可能性もある．しかし，いずれにしても病像分布が重なり合っているので，臨床的病像のみで遺伝的異質性を分析することは困難である．したがって，DMDあるいはDMD類似疾患について，遺伝子型一臨床的病像型の関係を解明する必要があろう．

文　献

1）Greenstein, R.M., et al.: An X/autosome translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy (DMD): Evidence for DMD gene localization. Ped. Res., 511: 457, 1977.

2）Ikeuchi, T. and Sasaki, M.: Accumulation of

early mitotic cells in ethidium bromide-treated human lymphocyte cultures. Proc. Jap. Acad., 55: 15-18, 1979.

3) 吉丸博志ほか：筋萎縮性疾患の遺伝分析—Duchenne 型筋ジストロフィー症について—. 杏林医誌, 15：181-189, 1984.

4) Yasuda, N. and Kondo, K.: No sex difference in mutation rates of Duchenne muscular dystrophy. J. Med. Genet., 17: 106-111, 1980.

5) 楢崎修ほか：X 染色体—常染色体転座を伴った Duchenne 型筋ジストロフィーの女児例. 臨床神経学, 25：432-436, 1985.

6) Emery, A.E.H.: Clinical manifestation in two carriers of Duchenne muscular dystrophy. Lancet, May 25: 1126, 1963.

7) Sugita, H. and Tyler, F.H.: Pathogenesis of muscular dystrophy. Trans. Ass. Am. Physicians, 76: 231-243, 1963.

8) Ropers, H. -H., et al.: Evidence for preferential X-chromosome inactivation in a family with Fabry Disease. Am. J. Hum. Genet., 29: 361-370, 1977.

9) Miyoshi, K., et al.: Genetico-clinical types of progressive muscular dystrophy with special reference to "malignant limb-girdle type" Jap. J. Hum. Genet., 19: 39-42, 1974.

10) Moser, H. and Emery, E.H.: The manifesting carrier in Duchenne-type muscular dystrophy. Clin. Genet. 5:271-284, 1974.

9) 本邦におけるX染色体－常染色体転座を伴った女性Duchenne型筋ジストロフィー

杉田秀夫*

研究協力者　斉藤深美子**　石原伝幸***
富英明*　里吉栄二郎*

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）は伴性遺伝の遺伝疾患であるが女性発症者は決して稀ではない．従来より女性のDMDの発症の説明としては

①ホモ接合体の女性，② Turner症候群，③ヘテロ接合体の発症

の3つが考えられるが，①の可能性は男性患者5万人に1人，②の可能性は一般人口1,000万人に1人の比率と推測され，極めてまれである．しかしMoser, Emery[1]によるとmanifesting carrierはcarrierの8％と想定され，女性DMDの頻度は人口10万人に1人となりヘテロ接合体の形で発症していると考えると決して左程稀とは言い難い．勿論DMDの中には常染色体劣性遺伝形式をとる女性例の報告もありこの意味では三好の[2]提唱した悪性肢帯型との鑑別も問題となろう．

さて女性ヘテロ接合体の発症機序はLyonization，即ち2つのX染色体のrandom inactivationにより説明されており，当然女性発症者は男性に比し軽症である．しかしLyonizationがrandomに起らずnon random inactivationが起った場合にはDMD遺伝子を有するX染色体のみが選択的に活性化されるわけで，この場合には男性と同様の臨床像を呈する様になるはずである．

この様なnon random inactivationが起る可能性はBerg, Conte[3]が報告した様にX染色体の1個に構造異常がありこの染色体が選択的に不活性化される場合ともう1つは本研究の主題であるX染色体と常染色体との間に相互に均衡転座がある場合である．この様な症例は1977年Greensteinら[4]によって記載されて以来欧米では約10例の報告がある．本邦では楢崎ら[5]の報告が最初である．我々は最近3例の相互転座例を経験したので報告し合わせて文献的考察を加えてみたいと思う．

検索方法

女性筋ジストロフィー発症者及びその家族から無菌的にヘパリン採血して得たリンパ球を培養して染色体標本を得，G分染法，高精度分染法，及びR分染法により，染色体異常の有無，切断点の検索を行った．後期複製X染色体の検索はbromodeoxyuridine（Brdu）法を用いて行った．

結　果

①臨床症状

Case 1：国立武蔵療養所入院の11歳女児弧発例である．四肢近位部優位の筋萎縮，筋力低下があり下腿の仮性肥大が認められる．Gowers徴候陽性であるが手すりにつかまって階段の昇降が可能である．血清クレアチンキナーゼ（CK）活性は935U/lと上昇している．

Case 2：国立東埼玉療養所入院中の16歳女児孤発例である．四肢近位部に著しい筋萎縮が認められ下腿に仮性肥大を認める．12歳より独立歩行不能となり現在車椅子生活を続けている．血清CK活性は3,368U/lである．

Case 3：国立東埼玉療養所入院中の24歳女性

＊国立武蔵療養所神経センター
＊＊東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞遺伝部門
＊＊＊国立療養所東埼玉病院

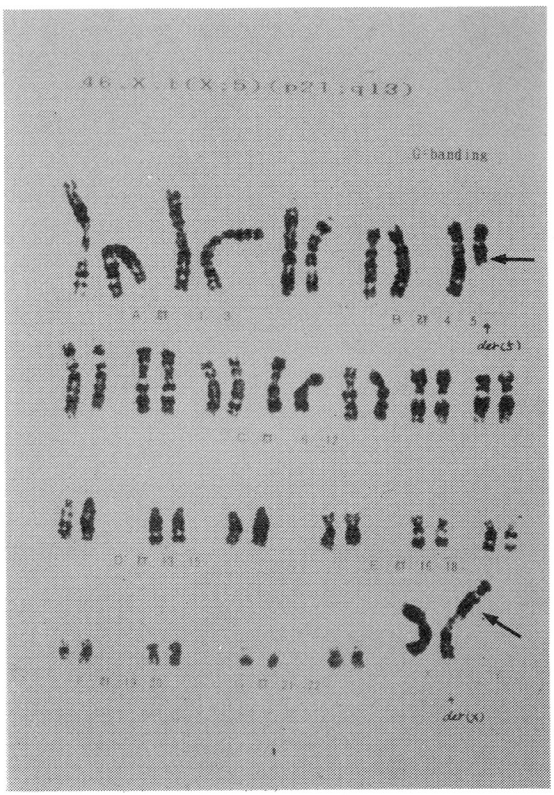


図1 a
Case Ⅰの染色体 Karyotype
X 染色体と 5 番目の常染色体の相互転座である.

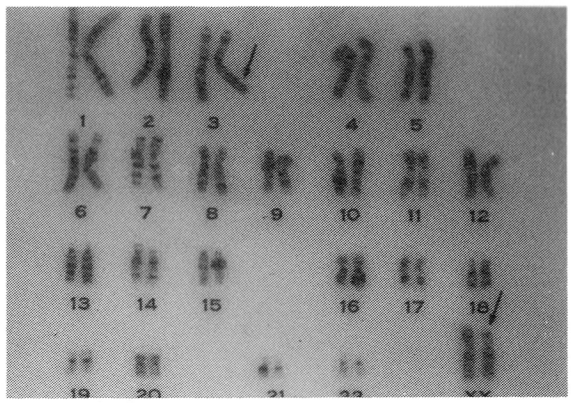


図1 b
Case 2 の染色体 Karyotype
X 染色体と 3 番目の常染色体の相互転座.

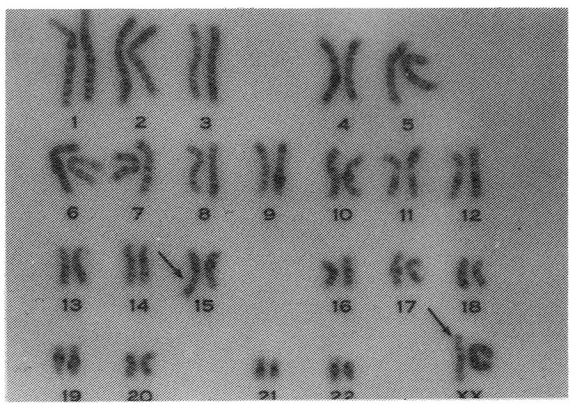


図1 c
Case 3 の染色体 Karyotype
X 染色体と15番目の常染色体の相互転座

孤発例である. 14歳より独立歩行不能となり現在 bed patient であり時々人口呼吸器を使用中である. 血清 CK 活性は115U/l である.

②染色体 karyotype (図1, a, b, c 参照)

Case 1は46, Xt (X ; 5)(p 21 ; q13) と X 染色体 p21と 8 番常染色体 q13間の均衡転座である.

Brdu 法による染色体分析では70個全てで正常 X 染色体が後期複製を示している.

Case 2 は46, Xt (X ; 3)(p 21 ; q27 or 28) であり X 染色体 p21と 3 番常染色体の q27 or 28 間の均衡転座である.

Case 3 は46, Xt (X ; 15)(p 21 ; q26) であり X 染色体 p21と15番常染色体 q26間の均衡転座である.

考察および結語

我々の 3 症例を含め本邦において 5 例[5)6)] の相互転座例が報告されており, 更に欧米に於ける症例も合わせ図 2 に一括して示してある.

現在迄に報告されている症例に共通点は次の様なものである.

①転座に関与する X 染色体の breakpoint は常に p21 band である.

②転座に関与する常染色体は様々であり一定し

DMD/Translocation Cases

Reference	Exchange points X	Exchange points A	De novo transl.	Late-replicating normal X	Probability mother carrier
Lindenbaum et al. (1979)	p2107 p1106	1p3400	Yes	75/75	<0.01
Canki et al. (1979)	p21	3q13	Yes	54/58	High
Greenstein et al. (1977, 1980)	p2105	11q13	Yes	Non-random	Low
Jacobs et al. (1981)	p21	5q35	Yes	576/586	Low
Zatz et al. (1981)	p21	6q21	Yes(?)	55/56	<0.06
Nielsen et al. (1983)	p21	11q23	Yes	Yes	Low
MacLeod et al. (1983)	p21	2q36	Yes	?	?
Emanuel et al. (1983)	p21	9q22	Yes	84/86	Low
Nielsen et al. (1984)	p21	9p21	Yes	24/24	Low
Verellen et al. (1978, 1984)	p21.2	21p1209	Yes	93/99	<0.06
Narazaki et al. (1985)	p21.1	8q24.3	Yes	12/15	Low
Saito. (Yokohama, 1985)	p21.1	4q26	Yes	104/104	Low
Case 1. (Musashi, 1985)	p21	5q13	Yes	70/70	Low
Case 2. (Higashi-Saitama, 1985)	p21	3q27or28	?	?	?
Case 3. (Higashi-Saitama, 1985)	p21	15q26	?	?	?

図2　DMD/Translocation Cases

ない.

③正常なX染色体が選択的に不活性化されている.

以上の事から，DMDの遺伝子座位はp21附近にあり，この部位を切断点とする相互転座が起こる事によってその座位上の遺伝子が突然変異，或いは欠失を生じ，同時に正常染色体が選択的に不活性化する事によりDMDが発現すると考えられる.

相互転座により発症した女性DMDは本邦楢崎例，我々のCase 1，3に観察される様に症状は男児DMDに比し軽症である印象をうける.

その理由として

1）正常X染色体の不活性化が100%でなく1部はrandom inactivationをうけている.

2）DMDとalleic diseaseと考えられるBecker型筋ジストロフィー（BMD）に罹患している.

などが考慮される．1）の可能性としては楢崎らの例では後期複製正常X染色体は80%でありnonrandom inactivationが不完全である為に保因者にみられる様に症状が軽い事が説明されよう.

2）の可能性についてはVerellen-Dumoulinら[7]の報告した症例は20歳女性例で46，Xt（X；21)（p21.2；p1209）とX染色体と21番目の常染色体の相互転座であるが独立歩行可能である．本例はDMDとalleicなBMD症例が考え易い.

我々のCase 1は11歳でありながら未だ階段の昇降可能でありGowers signが陽性ではあるが男児DMDに比し経過は良好である.

本例は検索した70個の染色体は全て正常染色体は後期複製を示しているのでnonrandom inactivationは100%行われていると思われる.

この様な臨床症状とのdiscrepancyは染色体を

検索する細胞の違い，つまり検索した細胞はリンパ球であるが障害されているのは筋細胞であるから，リンパ球では100% nonrandom inactivationをうけていても筋細胞では100%ではない可能性があるであろうか．今後症例の蓄積が必要であろう．

女性筋ジストロフィー症例について染色体の検索を行う事は症例の検索のみでなく遺伝子座位決定の有力な手がかりとなるからである．

DMD遺伝子座決定のstrategyとしては

1）転座症例を用いる[7]．　2）X染色体libraryよりDMDと密に連けいするprobeを探しだす[8]．　3）DMD遺伝子を含むp21附近のdeletionのある症例を用いる[9]，などが考えられている．

1）に関してはVerellenらの症例はXp21と21番目の常染色体短腕p12のrRNA遺伝子群の間で転座が起こっている事が証明され，rRNA遺伝子probeを用いて転座部位を同定する事によりDMD遺伝子座の決定に近づきつつある．

DMDの様に細胞レベルでの代謝異常が判明していない疾患では，雑種クローンを用いて遺伝子地図を作成することは出来ないのでこの様な転座染色体を持つ症例の発見が重要である．

文　献

1）Moser H, Emery AEH: The manifesting carrier in Duchenne muscular dystrophy. Clin Genet 5: 271, 1974.

2）三好和夫，多田嘉明，中野益弘，川井尚臣：進行性筋ジストロフィー症の悪性肢帯型 malignant limb-girdle type, この型の存在と本症分類上における意義．厚生省進行性筋ジストロフィー症研究班業績集，2：39，1974.

3）Berg B O, Conte F: Duchenne muscular dystrophy in a female with a structurally abnormal X-chromosome. Neurology (Minneap) 24: 356, 1974.

4）Greenstein RM, Reardon MP, Chan TS: An X/autosome translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy (DMD): Evidence for DMD gene localization. Pediatr Res 511: 457, 1977.

5）楢崎修，花井敏男，植木洋子，満留昭久：X染色体一常染色体転座を伴ったDuchenne型筋ジストロフィーの女児例．臨床神経，25：432，1985.

6）Saito F, Tonomura A, Kimura S, Misugi N, Sugita H: High-resolution banding study of an X/4 translocation in a female with Duchenne muscular dystrophy. Hum Genet: in press.

7）Verellen-Dumoulin Ch, Freund M, De Meyer R, Laterre Ch, Thompson MW, Markovic VD, Worton RG: Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving XP21 and non-random inactivation of the normal X chromosome. Hum Genet 67; 115, 1984.

8）Daies KE, Pearson PL, Harper PS, Murray JM, Obrien TO, Sarfarazi M, Williamson R: Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. Nucl Acid Res 8: 2303, 1983.

9）Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti C-A, Aldridge J, Fischbeck KH, Barlett R, Pericak-Vance, MA, Roses AD, Kunkel LM: Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. Nature 316: 842, 1985.

10) SV40遺伝子導入によるヒト骨格筋細胞株樹立の試み

桃　井　真里子*

研究協力者　中三川　晃　利*　桃　井　　隆**

遺伝性・変性筋疾患の病態解明，又は，筋の一次的変異形質の検出などには，生検筋は微量，かつ二次的変化，結合織の混在，などの理由から充分な材料を提供し得ない．骨格筋の形質を保持した安定培養系がのぞましいが，ヒト骨格筋細胞の安定継代培養系は樹立されていない．殊に患者生検筋からの初代培養細胞は，継代と共に線維芽細胞優位となり易く，筋細胞のみの均一培養系樹立法を確立することは，変異遺伝子や変異形質の検索に必須である．ヒト培養細胞のクローン化の一手段として，EB ヴィールスや SV40ヴィールスなどによる形質転換（トランスフォーメーション）法がある．然るに前者は細胞形質の安定性に欠き，安定継代しえぬことが多い．後者に対してはヒト細胞は semipermissive である為に，形質転換を生じ得るが安定でなく，かつ cell lysis を生じ得る欠点がある．実際，1983年，Miranda らにより SV40によるヒト骨格筋細胞のクローン化が報告されたが[1]，特有の分化形質である多核細胞化は，形質転換細胞には出現せず，筋細胞由来である証拠に欠け，かつクローンの内いくつかは crisis，即ち cell lysis を生じた．本研究では，これらの問題点を解決する為に，ヴィールス DNA の複製起始部を欠損した mutant SV40（origin-defective SV40）[2] の DNA，即ち，DNA の自己複製は生じ得ぬが，host cell を形質転換しうる DNA を，直接ヒト細胞に導入することによる，導入細胞の無限増殖細胞化（immortalization）を試み，ヒト骨格筋細胞の樹立に成功した．

＊自治医科大学小児科
＊＊国立武蔵神経センター第五部

方　　法

初代細胞培養：材料は7ヵ月のネマリン・ミオパチー児の上腕二頭筋からの生検筋を用いた．トリプシン，コラゲナーゼ処理後，遊離細胞を Ham F12（10% FCS）にて37℃，5％ CO_2 で培養した．約3週間後，0.25%トリプシンで処理後，ディッシュ中に40分静置することにより，線維芽細胞を除去し，上記条件で培養し，トランスフェクションの24時間前に replate した．

トランスフェクション：Origin-defective（Ori（−）と略）SV40・DNA は Gluzman[2] らによるものを東大医科研山口宣夫教授より供与された．エタノール沈殿後定量し，10μg/60mm dish 当りの DNA をリン酸カルシウム・DNA 共沈殿法[3] にて加え，細胞と共に8時間インキュベート後，DMSO で洗浄し，更にトリプシン処理後60mm dish にて培養した．2～3週間後に観察されるフォーカスを24穴ミクロプレートに移し，フォーカス形成細胞，即ち，形質転換した細胞をクローン化した．

T 抗原の検出：フォーカス形成細胞が SV40の T 抗原を表現していること，即ち，SV40・T 抗原による形質転換細胞であることを確認する為に免疫沈降法にて T 抗原を検出した．細胞をリン酸除去培地にて培養後100μCi^{32}P（60mm dish）にて2時間ラベル後，細胞を融解し，抗 T 抗原血清と反応させ，更に Protein A-Sepharose と反応させた．免疫沈降させたものを12% SDS ポリアクリルアミド・ゲルにて泳動し，オートラジオグラフィーを行なった．

分化誘導：クローン化された細胞は通常は Ham F12（10% FCS）で培養した．分化誘導の試みとして，2％ FCS，10%馬血清，0.2% DMSO，無

血清培地[4]にて1～2週間培養し，筋細胞の特有の分化形態である多核細胞，Myotubeの出現を観察した．

結　　果

トランスフェクション：表1に示す様に，フォーカス形成率はほぼ一定しており，再現性よくDNA導入が行なわれることを示している．クローン化された細胞の約1/3は比較的小型で紡錘形をしており，細胞は線状に並ぶ傾向があった（図1）．多核細胞は一部に観察されたが数は少なく（数個／60mm dish）融合した細胞内の核の数も2～3個のものがほとんどであった．

2/3は比較的大型の不定形細胞であり，多極の扁平な形態を持ち，線状の配列は示さず，多核細胞も認めなかった（図2）．前者はその形態と多核化から，Myoblast由来のクローン，後者はFibroblast由来クローンと考えられた．両者共に多層に増殖するフォーカスを形成し，継代後もフォーカス形成能は維持されていた（図3）．

T抗原：図4に示す様に3クローンについてT抗原を検索した．1A5，119はMyoblast型クローン，2C4はFibroblast型クローンであり，いずれにもlarge T抗原（94K）が検出され，同時に微量のp53（53kペプチド）が検出された．前者はSV40による形質転換に必須のSV40由来DNAによるペプチドであり，p53はSV40T抗原によるトランスフォーム細胞に特有に表現され，かつlarge T抗原と共に免疫沈降されるペプチドである．以上から，これらはSV40T抗原によってトランスフォームされたクローンであることが確認された．

分化誘導：DMSO，2％FCS，10％Horse serum，では多核細胞は増加しなかった．無血清培地[4]では数日後には多核細胞は増加し，10日後にはMyotube形成が観察された（図5）．細胞増殖

表1　Efficiency of transfection

Exp.	Transfected DNA (ug/dish)	Number of foci/dish	Total number of foci
1	10	12	24
2	10	15	46
3	8	13	38

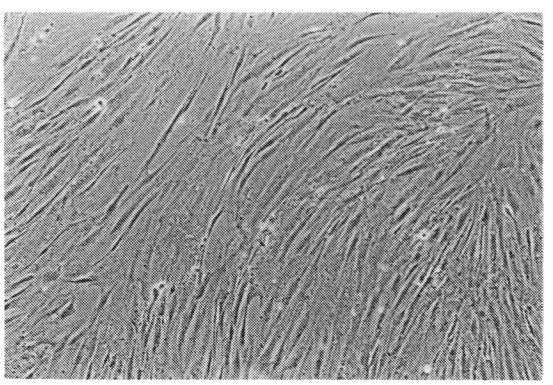


図2　Transformed fibroblasts. Cells were less uniform than myoblasts, and mostly flat and multipolar.（×200）

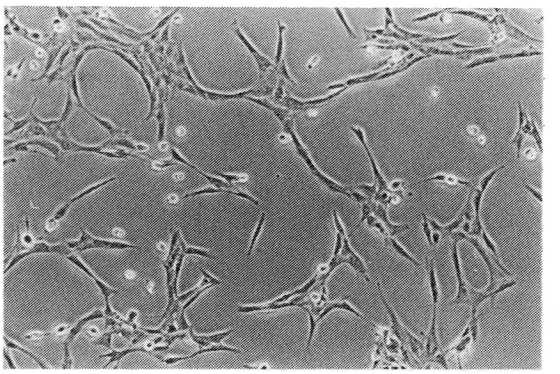


図1　Transformed myoblasts in Ham F12 supplemented with 10% FCS.（×100）

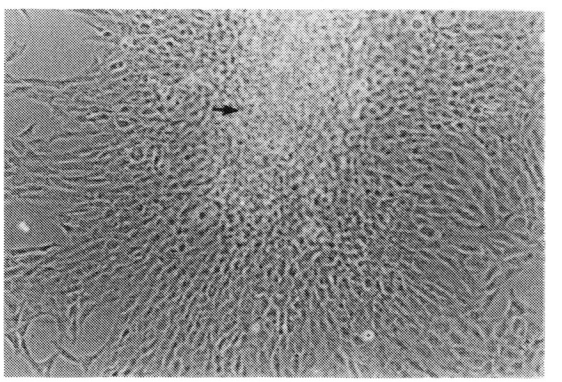


図3　Transformed myoblasts forming a focus. An arrow shows multilayered cell growth of transformed cells.（×100）

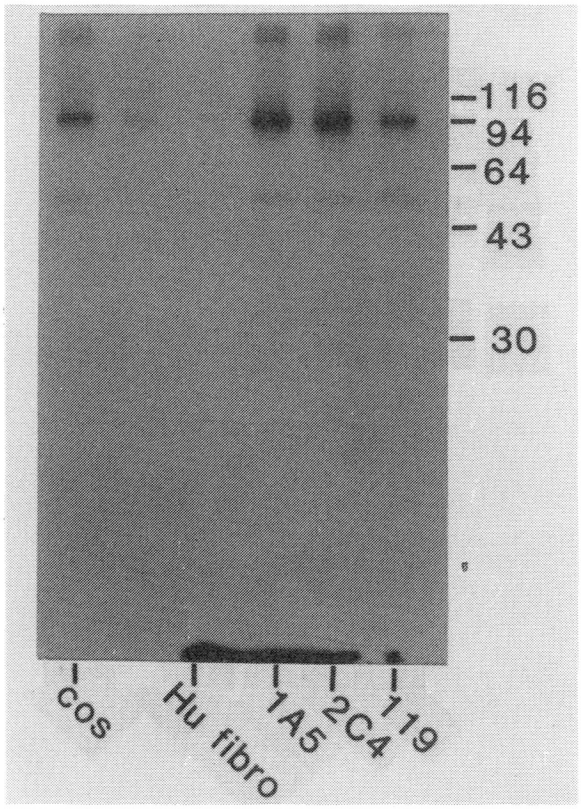


図4　Expression of T antigen in transformed cells. Phosphorylated T antigen (Mr 94K) was detected in cos cells (positive control), and three cloned cell lines (1A5, 2C4, 119). Hu fibro represents normal human fibroblasts which was examined as a negative control.

は抑制され，フォーカス周辺にMyotube形成が著明であった．この段階では横紋は観察されなかった．

結　　論

ヒト細胞の培養はlimited life spanを有する，単一の培養系確立が困難である，などの点に問題点があり，ことに筋細胞は，常に線維芽細胞の混入が問題となる為，クローン化の方法の確立が望まれていた．我々はSV40mutantの遺伝子導入法を用いて，ヒト骨格筋細胞の安定無限増殖系の確立に成功した．トランスフォームされた細胞は，

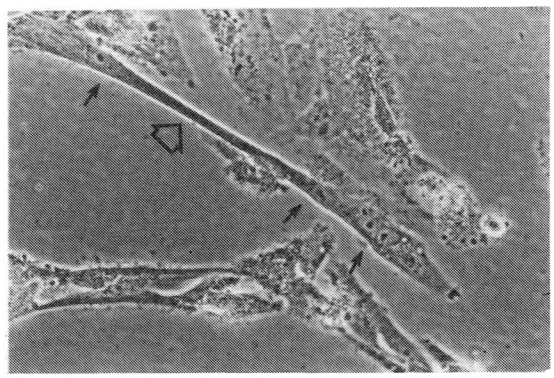


図5　A multinucleated cell of transformed myoblast. Transformed muscle cell line, 119, was cultured in serum-free medium for 5 days. A large and white arrow shows myotube formation, and small and black arrows show multiple nuclei at the both ends of the fused cell. (×400)

増殖率の良いフォーカス形成能を示し，均一の細胞を大量に得ることを可能とし，遺伝子などの細胞の基本的（分化に依存しない）性状の生化学的分析の材料として最適であると考えられた．又，培養条件の変更により，多核細胞化など，骨格筋の分化形質が一定程度まで表現され得ることが示され，筋細胞特有の種々の分化形質の表現に関する検索にも，適した系であると考えられる．ネマリン・ミオパチーにおける筋細胞の一次的異常の検索を，これらクローンを用いて進めると共に，ジストロフィー症をはじめとする他のミオパチー筋にも本方法を適応し，クローン化を進めている．

SV 40を御供与下さいました東京大学医科学研究所山口宣夫教授，細胞培養につき貴重な御教示を頂きました国立武蔵療養所神経センター杉田秀夫部長，小沢鉄二郎部長に深謝致します。

文　　献

1）Miranda, A.F., Babiss, L.E. and Fischer, P.B.: Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 6581-6585, 1983.
2）Gluzman, Y., Sambrook, J.F. and Frisque, R.J.: Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3898-3902,

1980.
3) Parker, B.A. and Stark, G.R.: J. Virol. 31: 360-369, 1979.
4) Nakamigawa, T., Momoi, T. and Momoi, M.Y. (in prep).

11) 筋ジストロフィー症遺伝子のマーカーとなるDNA断片の単離

鈴 木 紘 一*

研究協力者　大 野 茂 男*　秋 田 朗 子*

はじめに

筋ジストロフィー症（DMD）の遺伝子を単離する試みは，特に最近米国を中心として著しく進展し[1~3]，DMD遺伝子が同定され，その構造が決まる日も間近いと思われる．筋ジストロフィー症の遺伝子を単離するには，（i）DMD遺伝子の近傍にある遺伝子からのウオーキング，（ii）欠失によるDMD患者のDNAを利用する方法，（iii）転座によるDMD患者のDNAを利用する方法，などが考えられる．（ii）は日本では症例がなく，（iii）は我国で4例報告があるが，いずれも転座したさきの染色体の構造がよく解明されていないので，転座もすぐにDMD遺伝子の解析に応用できない．そこで，我々は（i）の方法を使ってDMD遺伝子のマーカーとなるDNAの多型性（RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism）を検出するプローブの単離を当面の目標とした．

DMD遺伝子の近傍にはオルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）とグリセロールキナーゼの遺伝子が存在する．グリセロールキナーゼの遺伝子はOTCよりDMD遺伝子に近いとの結果もあるが，OTCはDMDと確実に相関しているので[4]，OTC遺伝子を単離し，OTC遺伝子あるいはOTC遺伝子の近傍のDNA断片の中からRFLPを検出するプローブを見い出すことを試みた．

方法および結果

1．ヒトOTC遺伝子の単離

ラットOTCのcDNA（熊本大医学部森正敬教授より恵与）をプローブとしてT. Maniatisのヒト染色体DNAバンク（約50個のCharon 4Aファージクローン）をスクリーニングし，3種類のファージクローンT8，T9，T13をえた．これは図1に示すように，全長約17.5Kbの領域をカバーし，これから8種類のEcoRI断片（c-j）がえられた．この8種の断片のうちcは反復配列を含んでいたが，cから反復配列の部分が除去できなかったので，以下の実験にはc以外の断片をプローブに用いた．

2．OTC断片がX染色体由来であることの確認

48XXXX lymphoblast（GM1416）のDNAと46XYのリンパ球のDNAをEcoRIで消化し，アガロースゲル電気泳動でDNA断片を分離した．OTCからえられた断片をプローブとして，ハイブリダイゼーションを行い図2の結果をえた．OTCの断片d，e，fで検出されるバンドは，4Xの方が1Xに比べ明らかに濃く，OTCからえられた断片がX染色体由来であることが示された．図に示した以外の他のOTCの断片についても同様な結果がえられている．

3．RFLPの検出

正常女性のリンパ球のDNAを種々の制限酵素で切断し，電気泳動で分離し，OTC断片でRFLPを検出した．主な結果を図3にまとめた．図3は5～8人のヒトリンパ球のDNAをBgl II，Taq I，Hind III，Msp Iで切断し，OTC断片d，e，fで検出したものである．どの場合にも1～2本のバンドが見られ，個体による差，即ち，DNAの多型性は見られなかった．図示した以外の断片をプローブにした場合や，Eco RI，Bgl I，Bam

＊東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部

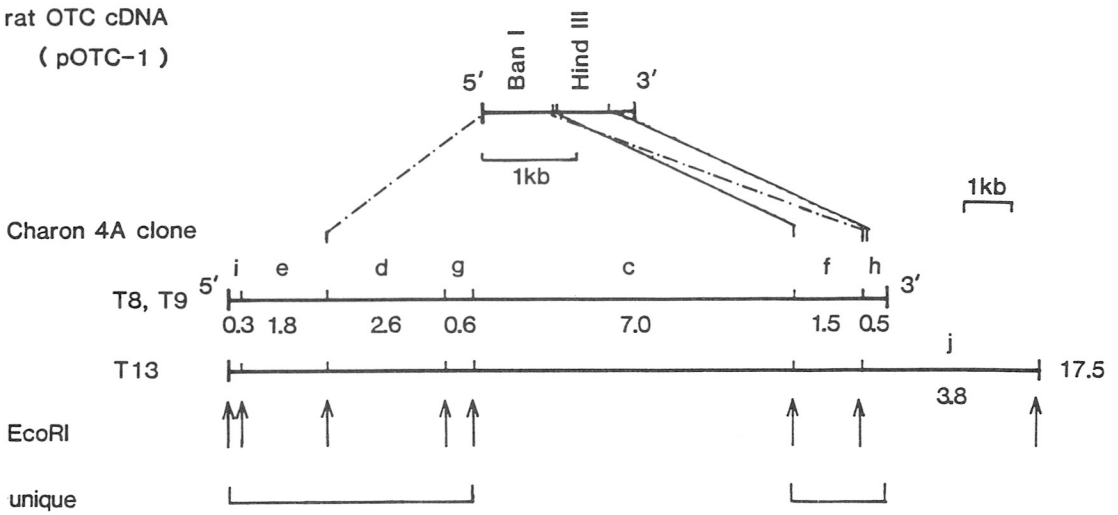


図1　ヒトオルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）の染色体DNA断片

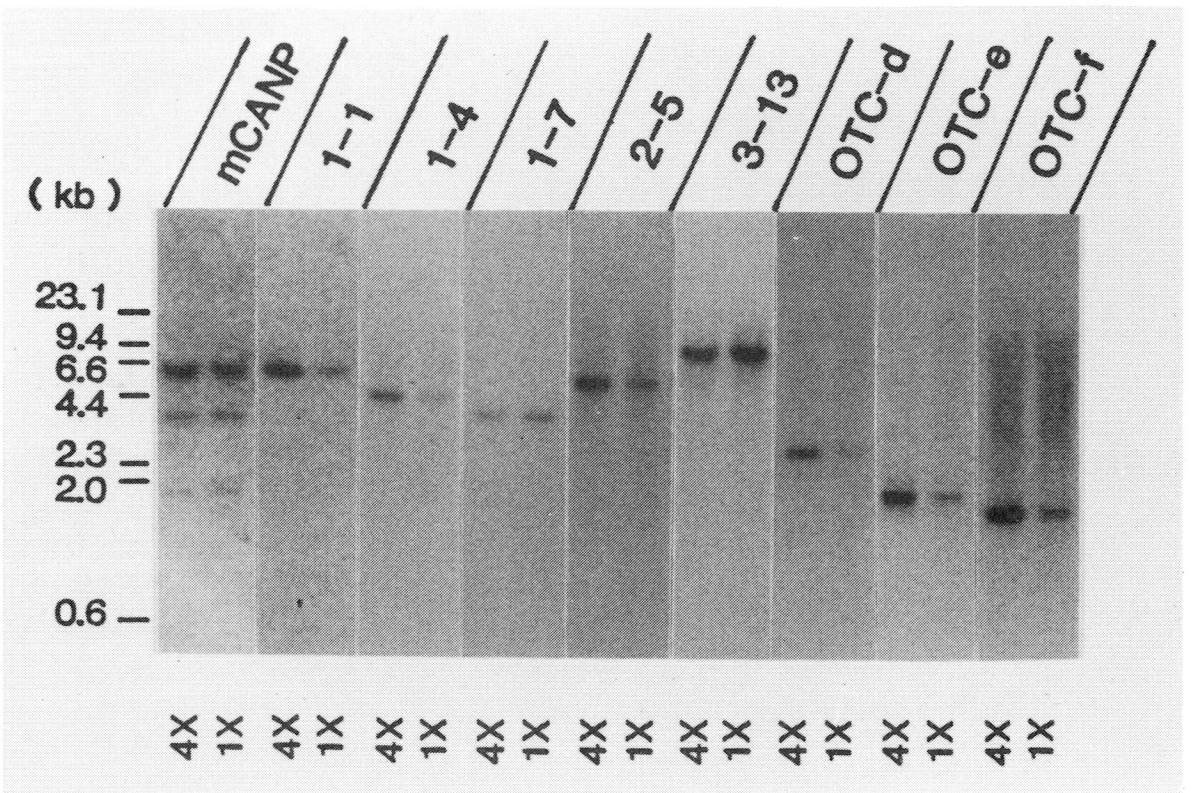


図2　OTCのDNA断片（OTC-d, e, f）とX染色体DNAバンク由来のDNA断片（1-1，1-4，1-7，2-5，3-13）がX染色体上にあるか否かの検定
4X：48XXXXの全DNAのEcoRI消化物
X：46XYのDNAのEcoRI消化物

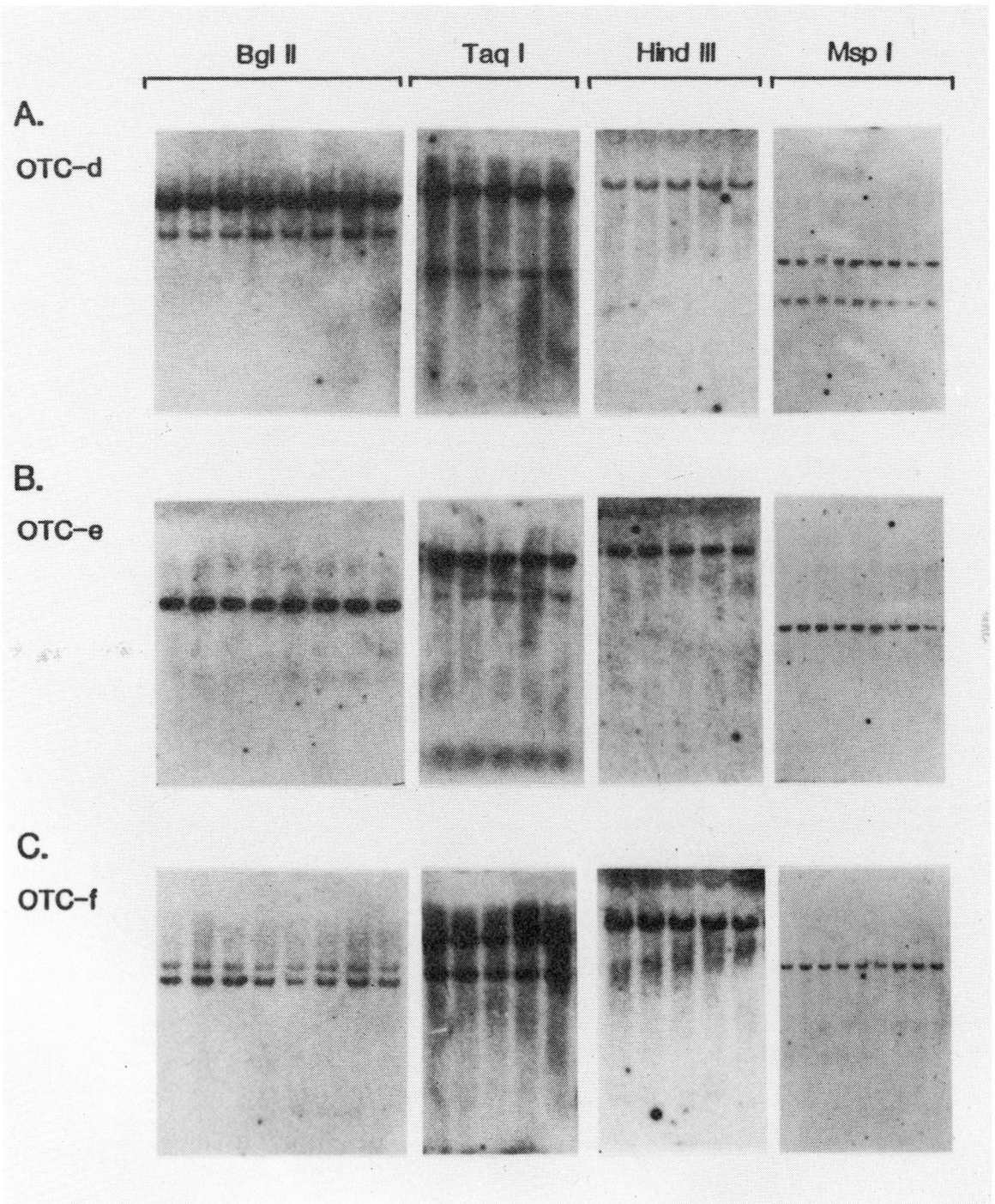


図3　OTC DNA 断片をプローブとした RFLP の検定

HI, Hae IIIなどで切断したものについても多型性はみられなかった．さらに引続き他の制限酵素を使って多型性を検出している．

4．OTC遺伝子からのウオーキングの試み

OTC遺伝子からDMD遺伝子に向ってウオーキングをすることは当面の目標ではないが，現在えられているOTC断片では多型性が検出できなかったので，さらにOTCの遺伝子あるいはその近傍のDNA断片をうることを目標にスクリーニングを行った．

1.では，ラットOTCのcDNAをプローブに用いたが，今回は既にえられたヒトOTC遺伝子の両端の断片，f，i（図1）をプローブにしてスクリーニングを行った．今までManiatisのDNAライブラリー（約125万個），JapaneseDNAライブラリー（約80万個），Xクロモソーム DNAライブラリー（約50万個）をスクリーニングしたが，今までえられている断片以外の新しいクローンはえられなかった．種々の理由が考えられるが，これらのライブラリーには目的の断片が含まれていないものと考え，現在48XXXXのDNAライブラリーを作製してスクリーニングを行っている．

5．X染色体DNAライブラリーからえたDNA断片

昨年X染色体のDNAバンクからとったプローブでRFLPを検出したことを報告したが，これらがX染色体に由来する断片であるか否かを検討した．図2に示すように，RFLPを検出した5種の断片のうち3種類（1-1，1-4，2-5）はX染色体由来で，他の2種（1-7，3-13）はX染色体由来ではなかった．図2の左端はコントロールに用いたCANPで，X染色体にはないことがわかる．DMDに関しては，X染色体由来の3個のRFLPを検討すればよいが，このX染色体由来のRFLPプローブについては，今のところこの時点でストップしている．OTC由来のRFLPプローブがとれた時点で，これらを合せて検査したいと考えている．

X染色体からはこの他にもユニークな配列の断片（7個）がえられているので，これからRFLPを探すことが可能である．また，同じライブラリーからさらにユニークな配列やRFLPプローブを探すこともできるので，さらに検討を続けるつもりである．

考　　察

1985年7月にX染色体の欠失を伴うDMD患者のDNAから欠失部分のDNAを単離する方法が報告された[1]．さらに8月には，この方法でえられたDNA断片を使ったDMD locusの分析結果が報告された[2]．一方カナダのグループは転座に伴うDMDの症例を1984年6月に報告し，これを利用してDMD locusにせまりつつある[3]．今や両グループがDMD locusを解明するのは時間の問題と考えられる．

一方，1984年11月にはOTC遺伝子がDMD遺伝子の近傍にあり，DMD遺伝子のマーカーになることが報告された．我々は，これらに従ってOTC遺伝子を使ったRFLPの研究を1985年1月からはじめた．当初はOTCからDMDに向けてwalkingすることも計画したが，DMD遺伝子の研究が上述のように急速に進んでいることから，当面は実用になりうるDMD用のRFLPプローブを単離することを目標にしている．

現在残念ながらOTCのRFLPをまだ検出していないが，目下鋭意探索を続け，一刻も早く実用に供しうるプローブを開発したいと考えている．調べる試料の数を増せばRFLPを検出するのは容易であろうが，こうして見出されるRFLPは出現頻度が低く，実用的でないとの考えから，試料の数は比較的少数（5～10人）に限定して探している．

米国等の最近の進歩からすれば，OTCをもとにしたRFLPプローブは，もはや必ずしもよいプローブとは言えない．しかし，米国のプローブが必ずしも自由に使えるわけではないので，自由に使える日本独自のプローブの開発が必須である．DMD遺伝子が明らかになっても，直ちにDMD症の病因の解明にはつながらないであろう．DMD症の病因の解明には種々の症例を調べ，遺伝子レベルの研究と比較することが今後もっとも重要であり，このためにはプローブの開発が急務である．

最近日本でも，中野，後藤，斉藤らによってX染色体の欠失によるDMDの症例が報告されたが，この症例はプローブを開発するための格好の材料となる可能性がある．

文　献

1) Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Middlesworth, W., Ochs, H.D. & Latt, S.A. : Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. Proc. Natl. Acad. Sci., 82 : 4778-4782, 1985.

2) Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Middlesworth, W., Colletti, C.-A., Aldridge, J., Fischbeck, K.H., Bartlett, R., Pericak - Vance, M.A., Roses, A.D. & Kunkel, L.M. : Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. Nature, 316 : 842-845, 1985.

3) Worton, R.G., Duff, C., Sylvester, J.E., Schmickel, R.D. & Willard, H.F. : Duchenne muscular dystrophy in volving translocation of the dmd gene next to ribosomal RNA genes. Science, 224 : 1447-1449, 1984.

4) Lindgren, V., Martinville, B.D., 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.

III．臨床・臨床病理

12) 常染色体劣性遠位型筋ジストロフィー(三好)における骨格筋障害様式：CTによる検討

中 西 孝 雄*

研究協力者　水 澤 英 洋*　小 林 史 枝**

はじめに

常染色体劣性遠位型筋ジストロフィー（三好）は，若い成人に発症し下肢筋を主に障害する遠位型ミオパチーで，血清CKの中等度～高度の上昇と筋線維の壊死・再生を中心とするジストロフィー様の組織所見を呈するものとして，本邦ではよく知られている．本症の筋障害様式については，すでに下腿屈筋群が障害されやすいことが有名であるが，下腿筋以外での筋障害の分布や共同筋群の中での個々の筋の障害についてはまだ充分には検討されていない．我々は，本症の5症例についてCTを用いより詳細な骨格筋障害様式を検索し，特徴ある所見を得たので報告する．

症例および方法

症例は，表1に示すように男2例，女3例の計5例であった．症例1～3は，両親がはとこ婚で同胞10名中の3名であり，症例4，5も両親に血族結婚を認め常染色体劣性遺伝に合致していた．

表1　症例のまとめ

症　例	1	2	3	4	5
年　齢(歳)・性	45・女	33・女	31・男	30・男	30・女
家族歴	両親はとこ婚・全員同胞			祖父が叔父・姪	両親いとこ婚
発症　年齢(歳)	36	33	31	18	20
症状	階段上昇困難		走行能力低下	走行能力低下	階段上昇困難
筋力低下・筋萎縮					
頸　屈／伸	$5^-/5$	5 /5	5 /5	$5^-/5$	5 /5
上肢	$5^-\sim4^+$	5	5	$5\sim4$	$5^-\sim4^-$
握力(右,左〔kg〕)	(15,10)	(18,16)	(36,35)	(15,20)	(14,15)
腰帯　屈／伸	$2^+/2^+$	$5^-/5$	$5^-/5^-$	$2^+/2$	$2^-/3$
内／外	$2^+/4$	$4^+/5^-$	$5^-/5$	$1\ /4$	$2^-/3^+$
大腿　屈／伸	$2\ /2$	$4\ /4^-$	$5^-/4^+$	$2\ /2^+$	$2^-/1$
下腿　屈／伸	$2^-/4^-$	$4^-/5^-$	$4^-/5^-$	$3^-/3$	$2^+/3^-$
足趾　屈／伸	$3^-/3$	$4^-/5^-$	$4^-/5^-$	$3^-/3$	$3\ /4^-$
つま先立ち	不能	不能	不能	不能	不能
仮性肥大	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
CK(正常値 mU/ml)	671(<60)	1202(<60)	1826(<60)	10000(24-170)	3069(5~30)

＊筑波大学臨床医学系神経内科
＊＊土浦協同病院内科

いずれも18～36歳で，階段上昇困難や走るのが遅くなったなどの下肢筋力の低下で発症し，早期につま先立ち不能となった．

徒手筋力テストの結果はMRCスケールで表1に示してある．それによれば筋力低下の特徴として，これまで言われている，①下腿では後面の屈筋群が前面の伸筋群より高度に障害されている，ということのほかに，②症例1，4の進行例では軽度ではあるが頸部の前屈が障害されている，③股関節での屈曲・伸展はほぼ同程度に障害されているが，内転・外転は明らかに内転が強く障害されている，④大腿の屈筋・伸筋はほぼ同程度ないしやや伸筋が強く障害されていることなどが認められた．また症例1では，下腿後面に著明な仮性肥大を認めた．

筋障害の全般的重症度は，症例1が最も強くほとんど独歩不能，症例2は本年になって階段を昇るのに困難を自覚し，症例3は医師に指摘されてはじめて，「そう言われれば走るのが遅くなった」という程度であった．症例4，5は，やや程度は軽いがほぼ症例1に近い状態であった．

血清CKは，10～30倍と中等度～高度に上昇し，症例2，4，5においては，EMGで典型的なmyopathic pattern，筋生検で筋線維壊死を主体とするジストロフィー様の所見を認めた．以上の臨床症状，検査所見より症例1～5はいずれも典型的な常染色体劣性遠位型筋ジストロフィーと診断された．

CTは，頸部は甲状軟骨のレベル，体幹は第3腰椎のレベルでそれぞれ1横断面，臀部は肛径靱帯中央と恥骨結合のレベルで2横断面，大腿は近位，中央，遠位，下腿は近位，最大径レベル，遠位の

各レベルでそれぞれ3横断面の撮影を行った．筋障害は筋横断面積の減少（萎縮）とlow density〔LD〕(脂肪化)を指標にして判定した．なお上肢については，筋力低下が軽いこと，骨によるアーチファクトが生じやすく必ずしも正確な評価ができないことなどから今回は検討の対象とはしなかった．

結　　果

頸部では，症例1で胸鎖乳突筋や後頸部の諸筋が障害されていた．ただし，前屈筋力の低下していた症例4を含め，ほかの症例では明らかな異常は見られなかった．

体幹では，固有背筋が全例で障害されていた．軽症の症例2，3では外側の腸肋筋にごく軽度のLDを認めるのみであったが，症例1，4，5では内側の背最長筋も中等度～高度に障害されていた．さらに症例1では，大腰筋がよく保たれているのに対して，腰方形筋が高度に障害され，腹直筋や内腹斜筋も軽度に障害されていた（図1）．

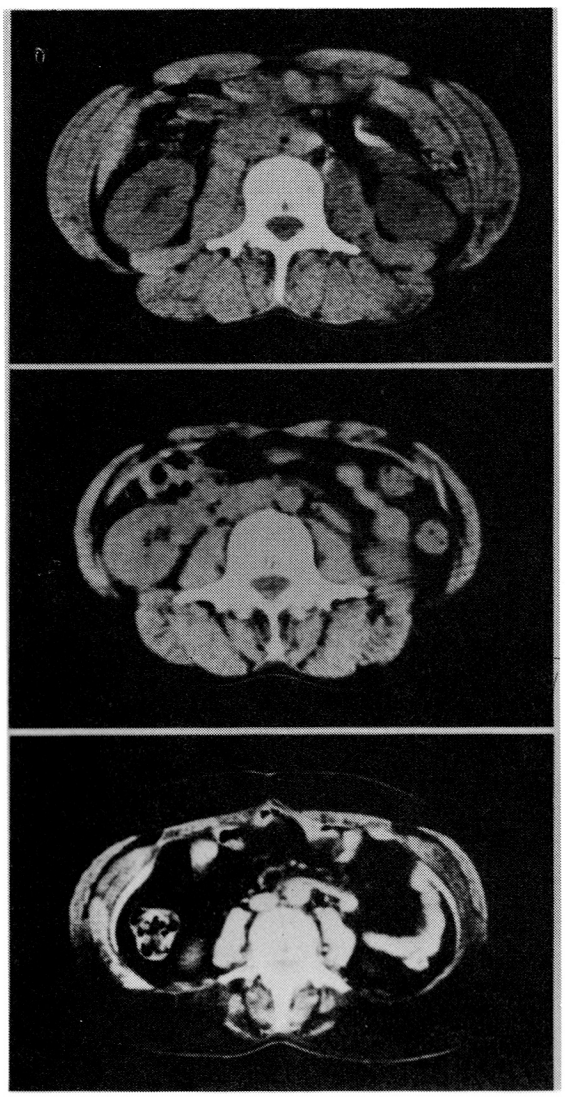


図1　第3腰椎レベルでの体幹部CT

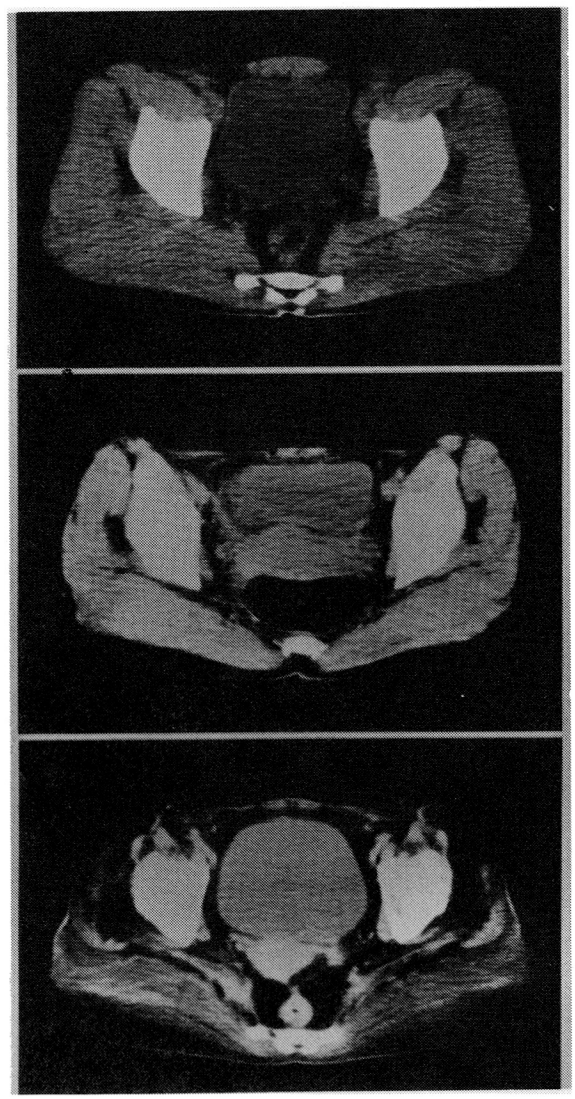


図2　肖径靱帯中央レベルでの臀部CT

臀部では，症例2，3は小臀筋の一部に限局性のLDを呈するのみであったが，症例1，4，5は小臀筋＞中臀筋＞大臀筋の順に強く障害されており，大腿筋膜張筋も高度の変化を示した（図2）．

大腿では，全例で明らかな変化が認められ，筋群として比較した場合，大腿四頭筋も屈筋群や内転筋群と同程度に障害されていた．大腿四頭筋の中では大腿直筋が比較的よく保たれており，ほかの3筋はほぼ同程度に障害されていた．症例2～5では，屈筋群・内転筋群の一部が肥大しhigh density（HD）となる所見を認めた．とくに縫工筋，薄筋によく見られるが，長内転筋，大腿二頭筋，半膜様筋，半腱様筋にも認められた．症例1は，非常に高度に脂肪化しており肥大は明らかではないが，一部にHDの傾向が残存していた（図3）．

下腿では，全例で顕著な変化が認められ，前脛骨筋，趾伸筋，腓骨筋はよく保たれ，ヒラメ筋，腓腹筋が高度に障害されていた．症例1，4，5では，伸筋群にも変化が及んでおり，とくに症例1では腓骨筋もほとんど脂肪化していた（図4）．

考　　察

CT所見をまとめると以下のようになる：①下腿では，屈筋群が高度に障害されるが，伸筋群はよく保たれる．これは筋力テストの結果と一致するが，それから予想されるよりはるかに大きな対比を示し，進行例から軽症例に至るまで一目瞭然である．②大腿では，大腿四頭筋も屈筋群・内転筋群と同様に高度に障害される．③縫工筋，薄筋，長内転筋，大腿二頭筋，半膜様筋，半腱様筋，あるいは大腿直筋の一部分または全体が肥大しHD

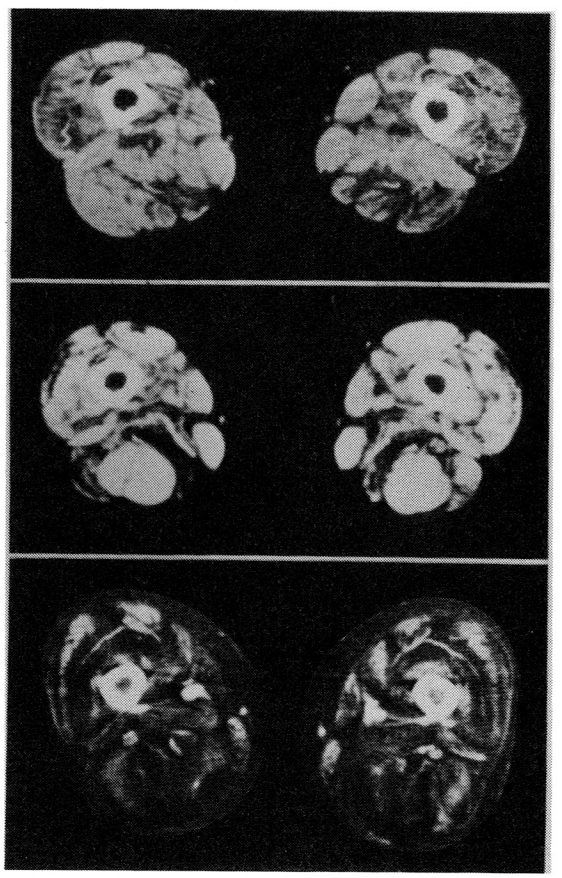


図3　大腿中央レベルでのCT

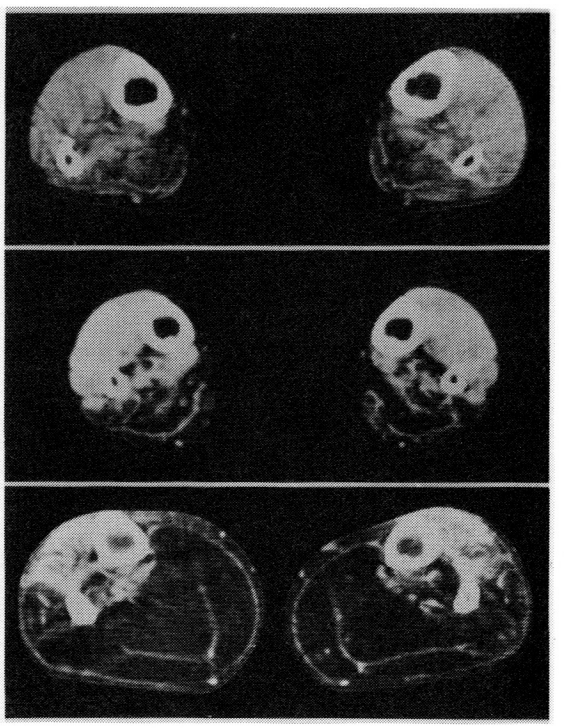


図4　下腿最大径レベルでのCT
上から順に症例3（軽症），症例2（中症），症例1（重症）とならんでいる．
説明は本文参照．

を示す．これは病期が進むとLDに変ってゆくが，これらの筋のdensityは末期まで保たれやすい．④臀部では，小臀筋の限局性のLDが軽症例でも認められた．重症例ではさらに中臀筋，大臀筋へと障害が進展する．⑤体幹では，固有背筋が外側から内側へと障害されやすい．進行すると腹壁の筋や腰方形筋も侵されるが，大腰筋はよく保たれる．⑥頸部の筋は，進行例では障害されうる．

今回検索した症例は5例と少ないが，程度の差はあるものの全例きわめて類似した所見を呈し，また文献上De Visserの弧発例3例の報告でも同様の所見が得られていることから，これらは本症に特徴的な所見と思われる．しかも症例3で明らかなように，筋力低下が軽度で患者の訴えがほとんどない時期でも，CT上明瞭にこの特徴的所見が認められており，CTは本症の診断上きわめて有用であると思われる．とくに，本症と同様に若年成人に発症し，下肢遠位筋が主に障害されるrimmed vacuole型遠位型ミオパチーとの鑑別上重要である．すなわち，後者は，下腿では伸筋群が強く障害され，大腿では屈筋群・内転筋群は侵されても大腿四頭筋はよく保たれ，さらに大腿での特定の筋の肥大やHDは認められず，下肢に関しては本症と全く異なるCT所見を呈するからである．

最後に，所見③については，代償性肥大と考えられておりDuchenne型，Becker型あるいは肢帯型筋ジストロフィーでよく認められている．これらの疾患と本症とに共通するものとしてはほかに，筋線維の壊死・再生を主体とするジストロフィー様の筋変性過程があり，CT上の代償性肥大所見と何らかの関係を有している可能性があると思われる．

まとめ

1）常染色体劣性遠位型筋ジストロフィー（三好）5例について骨格筋CTにより検索した．

2）CTにて特徴的な筋障害様式が認められた．すなわち，下腿では著明に屈筋優位に障害され，大腿では伸筋・屈筋群・内転筋群ともに障害されるとともに縫工筋，薄筋，長内転筋，大腿二頭筋，半膜様筋，半腱様筋，大腿直筋に肥大とhigh densityが認められた，などである．

3）筋力低下が顕著となる前にCT上明らかに特徴的所見が認められ，CTは本症の診断上きわめて有用であると思われた．

文献

1）Miyoshi K, Iwasa M, Kawai H: Autosomal recessive distal muscular distrophy: a new genetico-clinical entity of progressive muscular dystrophy. In Ebashi S (ed): Muscular dystrophy. Tokyo, Tokyo University Press, 1982, pp471-483.

2）De Visser M: Computed tomographic findings of skeletal musculature in sporadic distal myopathy with early adult onset. J Neurol Sci, 59: 331-339, 1983.

3）Bulke JAL, Baert AL: Clinical and radiological aspects of myopathies. CT scanning・EMG・Radioisotopes. Springer-Verlag, Berlin, 1982.

4）水澤英洋，栗田正，後藤順ほか：Rimmed vacuole型distal myopathyにおける筋障害様式の臨床的研究（会）．臨床神経24：1355, 1984.

5）川井充，国本雅也，本吉慶史ほか：Duchenne型筋ジストロフィー症の骨格筋CT所見とこれにもとづく病期分類．臨床神経25：578-590, 1985.

13) 神経筋疾患におけるUltrasound imaging
—超音波顕微鏡およびEMG-guided biopsy needleの臨床応用—

田 代 邦 雄*

研究協力者　松 浦　亨*　北 川 まゆみ*
森 若 文 雄*　島　功 二*

目　的

神経筋疾患の新たな画像診断法として，B-mode超音波画像（以下UI）が有用であることを既に報告してきた[1)2)3)]．しかし一方UIによって表示される画像情報は組織における隣接した媒体間に音響インピーダンスの差が存在する場合これらの差を反映する相対的表示法であるために[2)]UIを用いた組織診断が可能であるか否かについては依然問題が残されている[4)]．今回われわれはUI上の異常所見が組織レベルでのどのような変化に対応して発現するのかその機序を明らかにするため超音波顕微鏡（Scanned acoustic microscope；以下SAM）を用いて検討した．

さらにUI上異常を呈する組織における電気生理学的所見と組織学ならびに組織化学的所見間の有機的解析を実現すべくEMG guided biopsy needleの開発を試み，その臨床応用を行なって有意な結果をえた[6)]のであわせて報告する．

I　超音波顕微鏡による各組織超音波吸収度の検討

方　法

多発性筋炎(急性および慢性期)Werdnig-Hoffmann病，筋萎縮性側索硬化症，脊髄性進行性筋萎縮症などの症例から得られた生検筋で，生検直後isopentaneを媒体として液体窒素中で急速凍結し，その後20μに調整した横断切片を試料とし，水を超音波媒体とした反射型超音波顕微鏡(Nikon/HONDA AMS3400)をもちいてこれら切片中の各組織の超音波吸収度の測定とその分布を観察したのち同一あるいは連続切片にHE染色，一部は他の日常的組織化学染色をおこなって両者を対比することにより検討した．SAMの供用周波数は220MHz，一部は110MHzでありCRT上に8階調のグレースケールで表示し，その画像をフィルムにおさめた．SAMには2個の対門トランスデューサーを用いた透過型と単一トランスデューサーで送信および受信の双方を兼ねる反射型があるが今回は後者を使用した[5)]．

結　果

SAMの音響レンズ焦点深度はステージを上下することにより可変である．焦点深度を試料表面に設定すると組織断面の収縮による曲面形成のため位相差が生じ断面に等高線状に干渉線が出現するため，観察にあたっては表面の曲率の影響を除外できる程度まで焦点深度を内部に設定すること，およびステージグラスが可能なかぎり均一な平面であることが必要であった．固定法は軽く風乾する程度で十分であったがエタノール固定をおこなうと各部の超音波吸収度の大小関係は保たれたままでコントラストが強調される画像が得られた．ただし実際にUIで観察される事象は未固定の状態の組織における超音波の挙動であるため，固定はおもに風乾のみで行ないできるだけ現実に近似させた．

図1AにSPMA症例より得られた生検筋のSAM像を示す．下段の曲線は上段に表示される

＊北海道大学医学部脳神経外科神経内科部門

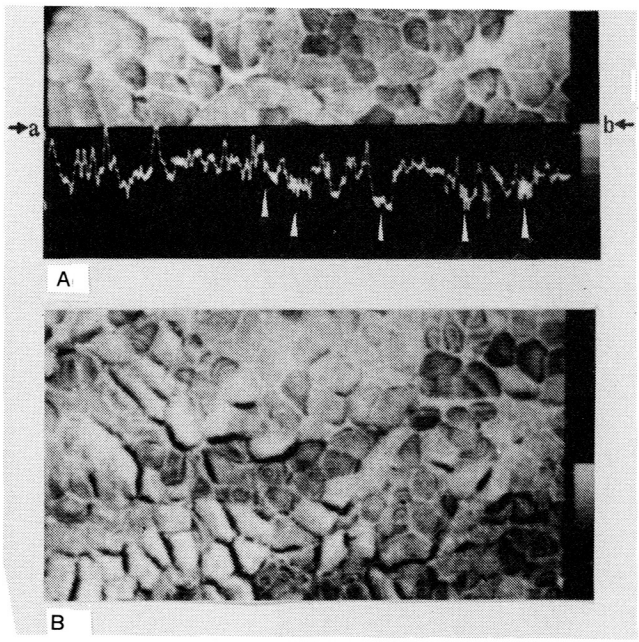


図1　SPMA 症例の生検筋 SAM 像．220 MHz．1A：a-b 間の X 軸スキャンによって得られた超音波吸収曲線を下段に示す．曲線上超音波吸収度の大きい部分（矢印）が上段二次元画像の明度の低い筋細胞に対応している．1B：音響レンズの焦点深度を試料表面にあわせると表面の曲率によって等高線状の干渉縞があらわれる．（グレースケール32階調）

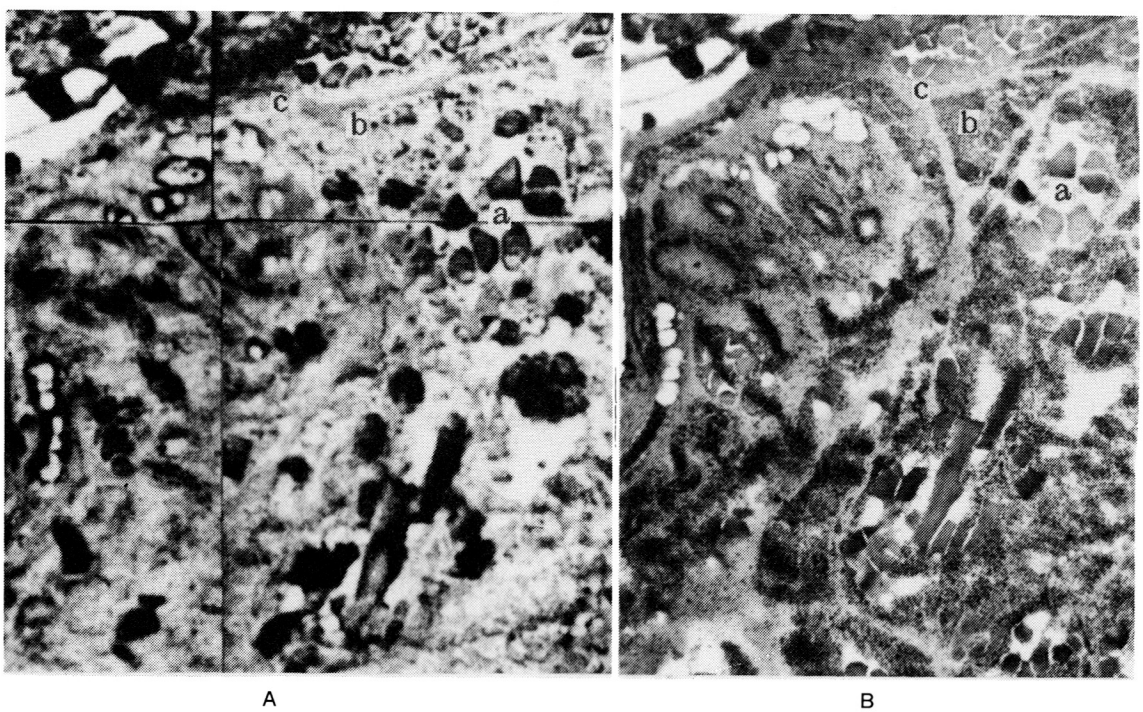
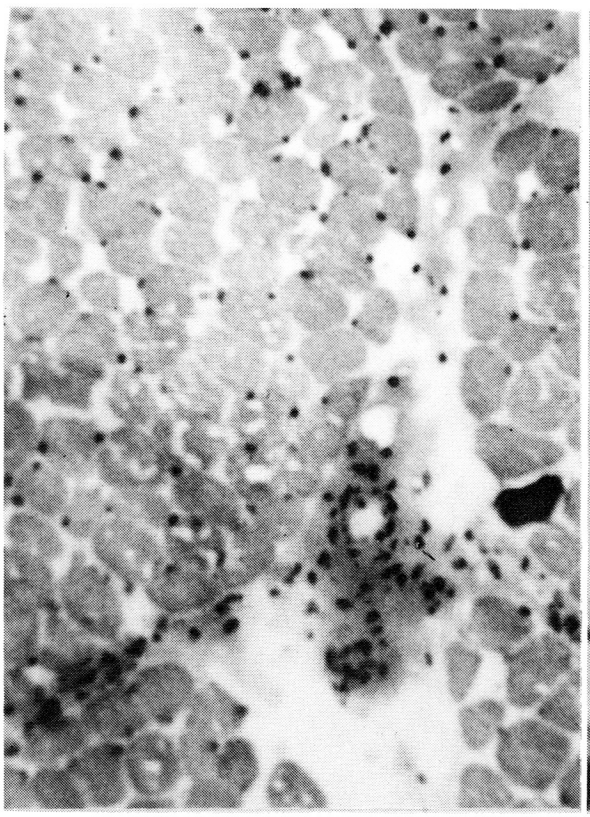


図2　Werdnig-Hoffmann 病．　2A：SAM（220MHz），2B：HE（×100）．残存する筋細胞群(a)，萎縮した筋細胞群(b)，器質化した結合組織(c)．

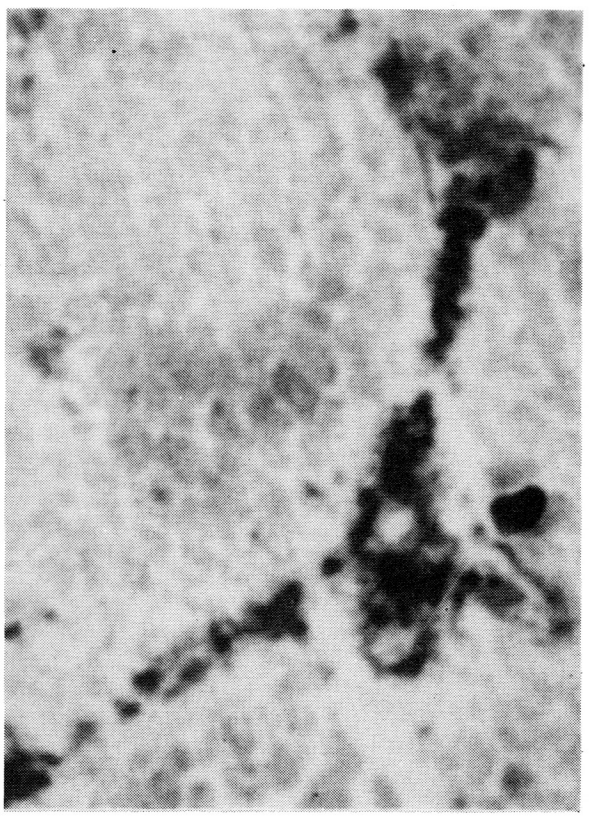
組織像のa-b間をX軸スキャンして得られた超音波吸収度を示し，その値は右に表示されたグレースケールに対応している．スケールの明度が高いほど超音波の吸収が少ないすなわち反射率が大きいことを表わしており最上部はステージグラスによる吸収値にて補正されている．このX軸方向のスキャンをさらにY軸方向にもおこなうことによって上段に示す二次元画像が構成される．下段の曲線上超音波吸収値の大きな部分（矢印）はa-b上の超音波吸収度の大きな細胞を反映しているのがわかる．図1Bは試料表面に焦点深度をあわせた画像であり，等高線状の干渉縞が認められる．

Werdnig-Hoffmann病の症例におけるSAM像とmechanical scan後の同一切片HE染色像を図2 ABに示す．HE像にはmechanical scanによる細部の粗鬆化が認められるがおおまかな構築を対比できる．残存する筋線維群は中等度の超音波吸収度で表示され(a)島状に群化して存在し，萎縮におちいった筋細胞群はSAM所見上は，より超音波吸収度の高い灰色の部分として描出される(b)．また，残存する筋細胞群を取り囲むようにして厚く増生した器質化された結合組織はSAMにおいては非常に低い吸収度，ことばをかえれば高い反射（白）をもって示され，この条件下ではガラス面の反射との間で判然と区別がつかないほどである(c)．このような慢性の神経原性変化を呈する他の症例についても同様の結果を得た．

筋原性変化，ことに急性期の多発性筋炎では図



A　HE（×100）

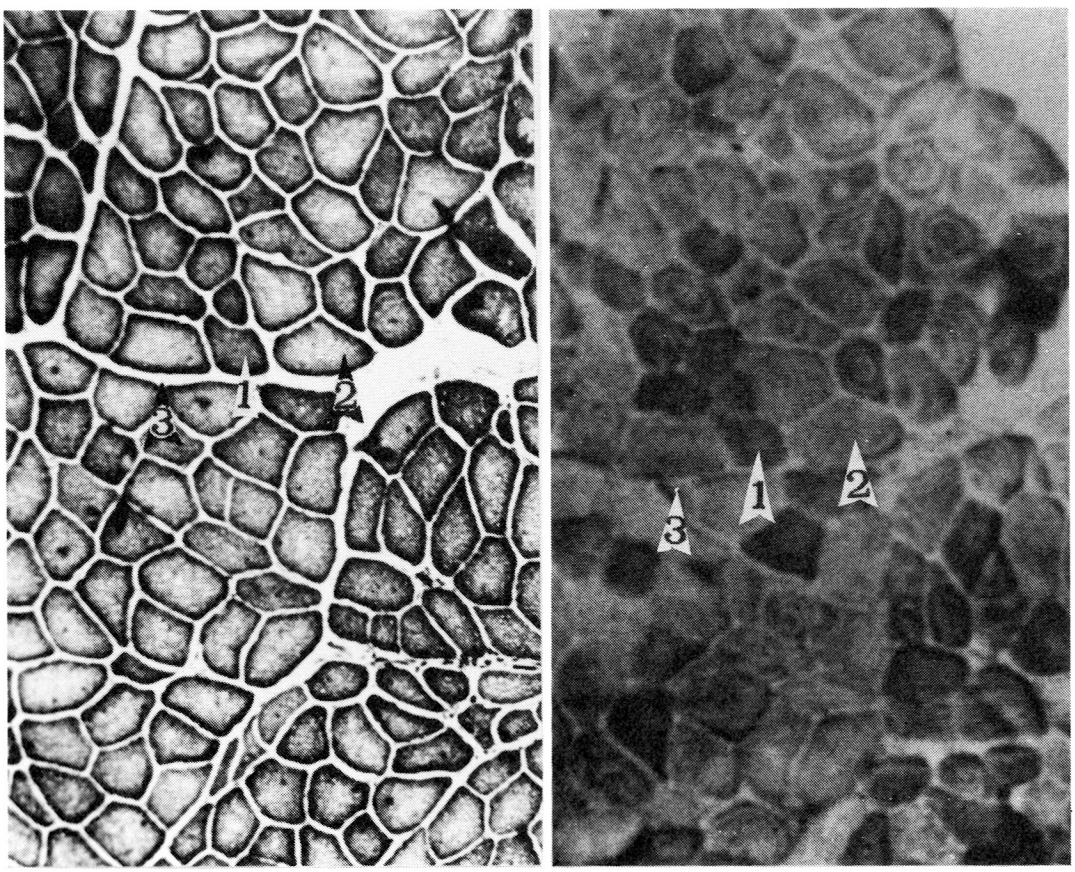


B　SAM.

図3　急性期多発性筋炎．　3A：HE（×100）血管周囲により優勢な結合組織の増生と軽度の細胞浸潤を認める．　3B：SAM（110MHz），同部では高い超音波吸収度を示す（黒）．

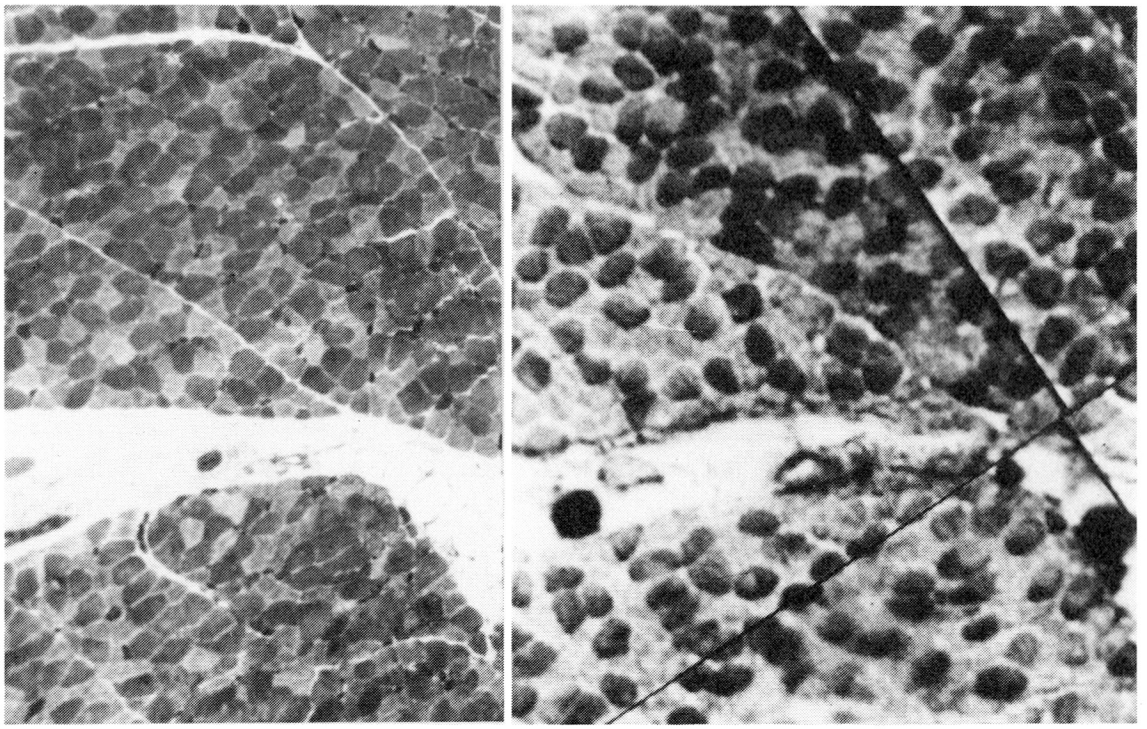
3に提示するように血管周囲を中心としてまだ器質化されていない浮腫ないしは蛋白漏出を思わせる高い超音波吸収度を呈する結合組織の変化が微細な筋膜間に及んでいるのが確認された．その詳細については別途報告する[3]．

ついで筋細胞自体について検討した結果を示す．図4は脊髄性進行性筋萎縮症の症例よりえたNADH-TR（4A），および同部のSAM像（4B）である．NADH-TR染色によって濃染するtype I fibers（矢印1）はSAMにおいても高吸収度を示しtype II fibers（矢印2）に比較してやや低い明度で表示される．また正常構築をたもつ結合組織（矢印3）はいずれの筋細胞よりも低い超音波吸収度を呈するが，慢性に増生し器質化した結合組織のそれに比較するとやや吸収の程度は大きい．図5は慢性期に移行した多発性筋炎の組織所見である．さきに述べた急性期多発性筋炎の所見に比較すると，高い超音波吸収度を呈する結合組織の変化はむしろめだたなくなり器質化が進んだことが示唆される．一方筋細胞自体に関していえば，前述の例と同様にNADH-TRによって濃染するtype I fibersはSAM上高吸収度の細胞として，またtype II fibersはより明るい細胞として描出され細胞の径の減少などの萎縮性変化の存在する場合においてもその特徴に明らかな変化を認めなかった．



A　　B

図4　SPMA．4A：NADH-TR（×100），4B：SAM（220MHz）type I fiber（矢印1），type II fiber（矢印2），および正常結合組織（矢印3）を示す．



A　　B

図5　慢性期多発性筋炎．　5A：NADH-TR（×100），5B：SAM（220MHz）．この両者においてtype I fiberおよびtype II fiberはよく相関している．

以上の結果は以下のようにまとめられる．すなわち(A)超音波吸収度は急性炎症をともなういまだ器質化されない結合組織増生部＞＞筋細胞＞正常構築をたもつ結合組織＞慢性に進行した器質化をともなった結合組織増生部の順に大きい．特に急性期多発性筋炎の結合組織においては著明な超音波吸収度の増大が認められる．(B)神経原性変化においてはほぼ均一な低超音波吸収度を示す結合組織に取り囲まれるように正常構築をたもつ筋細胞群がいわば島状をなして分布する．(C)筋細胞間ではtype I fibersの超音波吸収度はtype II fibersのそれに比して大きかった．

考察および結論

B-mode UI像は隣接する媒体間に固有音響インピーダンスの差異が存在する場合にそれらの境界部分において生じた超音波の反射波を画面上に再構成することによって表示される．したがってUIによってえられる画像情報，とくに輝度は相対量であり，このことがUIをもちいた場合の組織診断（tissue characterization）を論ずるうえでの問題点であった．この問題はUIによる画像を解釈するうえで基礎をなすものであるが今回のわれわれのSAMをもちいた検討では従来の巨視的あるいはin vitroでの報告と同様に結合組織と筋組織間に明らかな固有インピーダンスギャップの存在することが示された．この事実は両者の境界部分において超音波の反射散乱を生じ，特に重層した結合組織からなる筋膜はその内部においてもインピーダンスギャップが存在するために正常であってもUI上，像として同定される．一方筋細胞においてはtype I fibersとtype II fibersとの間で軽度の固有音響インピーダンスの差異を認めるものの人においては通常これら筋線維はコンパ

クトなモザイク配列をとるために，軽度のechogenicityを呈するのみであると考えられる．神経原性変化では組織レベルでは脱神経状態となり群化萎縮におちいった筋線維群をおきかえるように慢性の強い器質化した結合組織の増生を生ずるが残存する線維群ならびに神経再支配をうけてfiber type groupingを呈する線維群はむしろ結合組織のカプセルに取り囲まれるように均一に集ぞくして存在するためその内部でのインピーダンスギャップは少なく，この結果はUI像において筋線維群と増生した結合組織の間での層状構造の形成として反映されるものと思われる．さらに多発性筋炎では，とくに筋膜近傍を主座として生じた非常に高い超音波吸収度を示す炎症にともなう結合組織の変化がより細部の筋線維間筋膜にも波及するため筋線維との間に微細なecho signalを発生しその結果び慢性のechogenicityの上昇および筋膜像の同定不良を引き起こすと考えられるが，散在する変性線維自体のインピーダンス変化もまた関与する可能性がある．

以上述べたごとく各疾患の組織における音響インピーダンスの分布はかなり特徴的であり，それらは組織学的所見とよく対応するといえる．組織学的な変化にはある程度の疾患特異性があり，また病期に応じてその所見も変化するものであるからUI所見によって神経筋疾患の病型および病期の診断をおこなうことは十分に可能となるであろう．

II　EMG-guided biopsy needleの開発

UI上異常を呈した組織の的確なsamplingと同部での電気生理学的所見を関連させて検討する目的でEMG-guided biopsy needleを試作し臨床応用を行なった．その詳細は別途報告する[6]．Sampling部のドリフトはほぼ無視することができsampling errorもなく，さらに改良をくわえることによって将来的には単一筋線維レベルの解析への発展が期待される．

文　献

1）田代邦雄，松浦　亨，長沼睦雄ほか：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-：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，1985，p. 90.

2）田代邦雄，松浦　亨：骨格筋の超音波診断とその応用：厚生省〔神経疾患研究委託費〕筋ジストロフィー症の疫学，病態及び治療開発に関する研究，西谷班昭和60年度ワークショップ，1985（印刷中）.

3）松浦　亨，田代邦雄，土井静樹ら：筋疾患の超音波画像診断と超音波顕微鏡による検討，神経内科（投稿中）.

4）竹内康人（(社) 日本電子機械工業会編）：組織診断，医用超音波ハンドブック，コロナ社，東京，1985，p. 255.

5）中鉢憲賢：超音波顕微鏡の進歩，応用物理，47：76，1978.

6）松浦　亨，田代邦雄，山田義男：EMG-guided Needle Biopsy Method—神経筋疾患診断のあらたな方法論—，医学のあゆみ，136：451，1986.

14) いわゆるrigid spine syndromeの臨床像と予後

後 藤 幾 生*

研究協力者　石 本 進 士* 山 田　猛* 北 口 哲 雄*

はじめに

Rigid spine syndrome（RSS）は，脊柱の屈曲制限と関節の可動制限（とくに肘関節の伸展）を特徴とする比較的良性の稀な筋疾患である[1]．私達は以前に本症と考えられる3症例を報告し，臨床経過の異なる症例の存在を示唆した[2]．今回，臨床上Emery-Dreifuss muscular dystrophy（EDMD）と考えられる1例を経験し，RSSとEDMDの臨床像，予後，筋病理について比較検討を加えた．

症例の比較

RSSの3例とEDMDの1例の臨床経過および検査所見をまとめると，全て発症年齢は6歳，男性で症例4のEDMDのみ家族性（兄に同疾患）で他は孤発例である．筋萎縮と脱力はRSSの内，症例1は軽度，他の2症例は著明であった．経過も症例1は良好で，発症後19年後の現在もほとんど症状の進行なく全く正常の社会活動を営んでいるが他のRSSは，脊柱・関節運動制限・筋萎縮・脱力共に進行し，症例2は18歳時，症例3は15歳の時に突然死した．EDMDの症例4もしだいに症状は進行し，29歳時心ペースメーカーを装着している．血清CK値はEDMDは正常範囲，RSSはいずれも中等度の上昇を示した．心電図はEDMDは完全房室blockを示したが，RSSは症例2，3で経過中洞性頻脈を認めたのみで，いずれも心伝導障害は認めなかった．

筋病理所見（図1）

RSSの3症例の筋病理の詳細は以前に本会議にて報告[2]した．各症例毎の比較では，筋変性の程度はRSSの内，症例1はごく軽度なのに対して，症例2，3は著明，症例4のEDMDは軽度であった．筋線維の大小不同も，症例1は軽度，症例2，3は著明で，症例4は中等度であった．特に症例2，3は，多数のcytoplasmic bodyを認め，一部間質に炎症性細胞浸潤，空胞変性を認めた．筋fiber typeの異常に関しては，RSSの内，症例2，3に軽度のtype groupingの傾向を認めたのみで明らかな異常を認めなかった．一方EDMDではtype 1 fiber predominanceを認めた．

考　察

RSSは遺伝歴や心伝導障害のないことでEDMDとは一応区別されている[3]．しかしRSSの中にも心異常を合併するもの，また家族性のものも報告されており，必ずしもその区別は明らかでない症例もある[4]．今回のRSSとEDMDと思われる症例の検討より，いわゆるrigid spine症状とミオパチーを呈する疾患群で，心伝導障害，遺伝性などの有無で，RSSとEDMDとは区別しうるのではないかと考えられる．しかしこのRSSの中には，予後不良な型（症例2，3）と予後良好な型（症例1）があり，この区別は，臨床上，筋脱力，萎縮の程度，筋病理所見での筋変性の程度とも各々対応していると考えられる．今後両群の症例の蓄積が必要と考えられる．

文　献

1）Dubowitz, V.: Some unusual neuromuscular disorders. in Walton JN, Canal N, Scarlato G. (eds) Muscle diseases. Proceeding of an International Congress (May 19-21, 1969,

＊九州大学医学部脳研神経内科

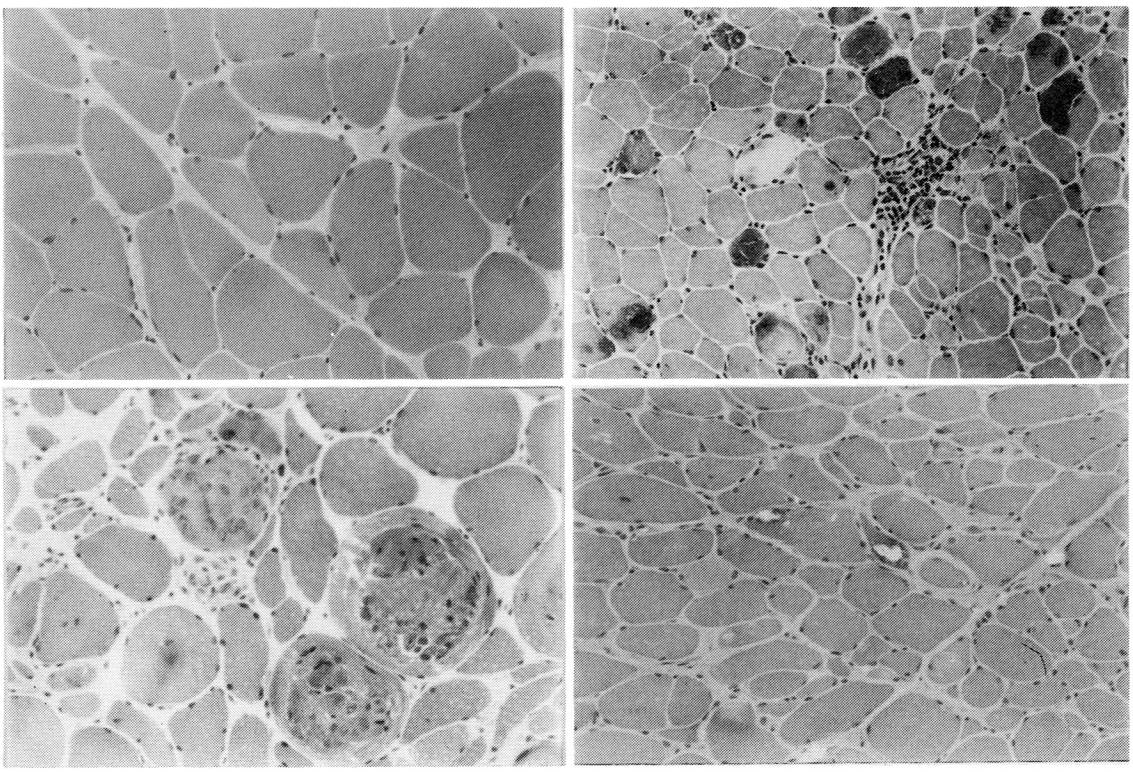


図1　左上：症例1　RSS　H&E染色　×150
右上：症例2　RSS　H&E染色　×150
左下：症例3　RSS　H&E染色　×150
右下：症例4　EDMD　H&E染色　×150

表1

Case	1	2	3	4
Age	25	18	15	30
Sex	male	male	male	male
Age of onset(years)	6	6	6	6
Diagnosis	RSS	RSS	RSS	EDMD
Family history	-	-	-	+
Progression of symptoms	-	+ (death)	+ (death)	+
Muscle weakness and atrophy	+	+++	+++	+++
CK elevation	++	++	++	++
Muscle histology				
fiber size variability	+	+++	+++	++
increased internal nuclei	±	+	+++	±
necrotic fibers	±	+++	+++	+
increased connective tissue	±	+～++	+++	++
ECG (A-V blocks)	-	-	-	+

RSS: the rigid spine syndrome
EDMD: Emery-Dreifuss muscular dystrophy
very mild ±; mild +; moderate ++; severe +++

Milan). Excerpta Medica, Amsterdam, 1970, 568-573).

2) 黒岩義五郎，福井律子，石本進士，後藤幾生：Rigid spine syndrome の臨床型について．厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究」三好班，昭和57年度研究報告書，1982，pp. 107-108.

3) Rowland L.P., Fetell M., Olarte M., Hays A., Singh N., & Wanat F.E.: Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Ann. Neurol. **5**: 111-117, 1979.

4) Fenichel G.M., Yi Chul Sul., Kilroy A.W., Blouin R.: An autosomal-dominant dystrophy with humeropelvic distribution and cardiomyopathy. Neurology (NY) **32**: 1399-1401, 1982.

15) Sarcotubular myopathyの一例

茂 在 敏 司*

研究協力者　阪 本 京 子** 岩 越 美 恵** 美 濃　真**
小 西 慎 吾* 河 村　宏*

緒　言

Jerusalalem ら[1]は，1973年，先天性非進行性ミオパチーの同胞例で，組織化学的および電顕的にSarcotubular system に由来する Vacuole の形成を認める疾患を Sarcotubular myopathy として報告した．以後，現在までに同症例の報告は一例もない．

今回我々は，同様所見を呈する一孤発症を経験したので報告する．

症　例

症例：N. Y.　6歳　女児

主訴：走るのが遅い

家族歴：患児は3人姉妹の2番目で，姉妹は健常．両親は血族結婚ではないが，愛媛県八幡浜市穴井の同村の出身であり，両家とも3世代に逆のぼり筋力低下を示した者はない．

既往歴：特記すべきこと無し

現病歴：満期，正常分娩にて出生．生下時体重3460g であった．定頸4ヵ月，つかまり立ち12ヵ月，独歩1歳4ヵ月であったが，2歳過ぎ頃，何かにつかまらないと立ち上がれない，ころびやすいことに気付かれ，3歳を過ぎても手すりを持たないと階段を昇降出来ず，歩くのも遅いため，某院にて検査を受けたが異常は認めなかった．しかし，その後も他児に比し，常に走るのが遅く，6歳になっても片足立ち，スキップが出来ず，階段の昇降も時間がかかっており，小学校入学に際し，共同生活が送れるかどうか心配し，外来受診となる．

入院時現症：身長108.4cm，体重18.6kg，体格はやややせ型で，顔貌はやや表情に乏しく，肩甲骨下の筋は軽度萎縮し，両側腓腹筋は軽度仮性肥大を認めた．(図1)．胸部所見には異常を認めず，肝脾腫も触知しなかった．皮膚にはリンパ節の腫大なく，発疹発赤等も認めなかった．神経学的には，深部膝蓋腱反射の消失を認める以外には他の深部反射に異常なく，病的反射もなく，知覚は正常であった．筋力は，軽度の左右差はあったが，MMT は全身性に4～4＋程度で，中でも近位筋群により低下の傾向がみられた．

検査所見では，血液一般検査，検尿は異常なく，血液生化学は，CPK88U/L, CPK isoenzyme：BB 2％MB 3％MM93％ Alb 2％，Aldolase5.6 U/L，GOT36mU/ml，GPT23mU/ml，LDH304 mU/ml，ALP153mU/ml，Na140.0mEq/L，K3.6 mEq/L，Cl103.0mEq/L，$HCO_3$25.8mEq/L であった．血清クレアチン1.22mg/dl，血清クレアチニン0.5mg/dl，尿クレアチン401.6mg/day，尿クレアチニン413.1mg/day，又，CRP 0，RA(－) LE テスト，抗 DNA 抗体，Total ANA いずれも陰性であった．その他，レントゲン心電図に異常なく，眼底，視野，平衡機能のいずれも正常，脳波正常，心理テストは IQ92であった．

筋電図は，近位筋，遠位筋共に弱～中等度収縮期に low voltage，short duration の NMU がやや多く，筋原性に近いパターンであった．

運動神経伝導速度は，l-peroneal N. 54.5m/s，γ-radial N 58.3m/s であった．

〔筋生検光顕所見〕　大腿四頭筋の筋生検で，トリクローム染色ゴモリー変法，HE 染色では，筋

＊大阪医科大学第一内科
＊＊大阪医科大学小児科

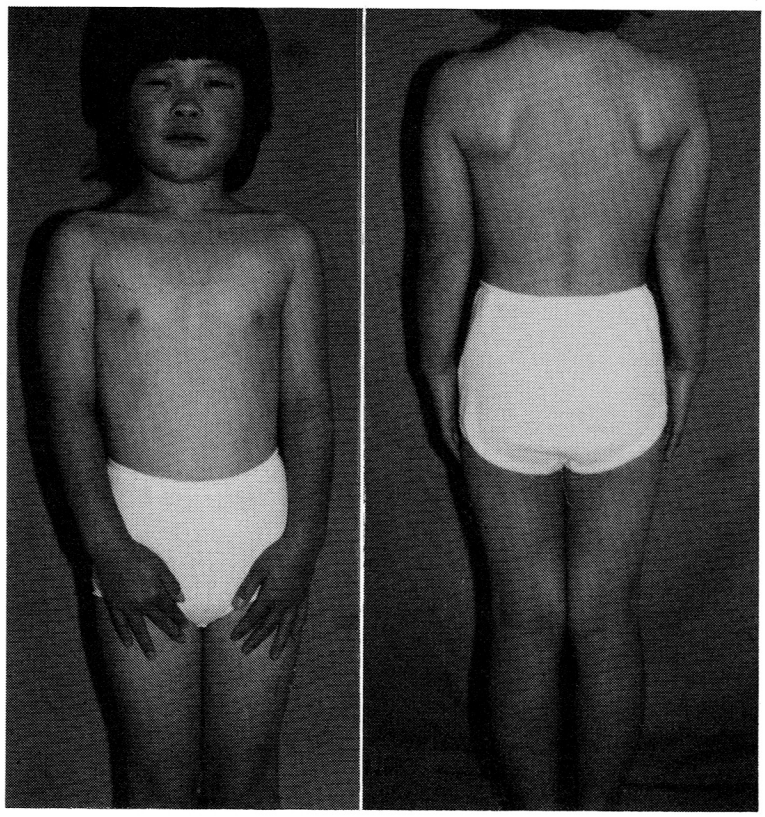


図1　患者全身像
肩甲骨下の筋萎縮，両側腓腹筋の軽度仮性肥大を認める．

線維の大小不同とともに，多数の小空胞を有する筋線維が，散在性に認められ，preincubation, pH9.4のATPase染色標本では，空胞はtype II線維優位に認められた(図2)．ちなみに，type Iは6％強，type IIは17％に空胞を認めた．なお，acid phosphatase, PAS, alcian blue, cresyl violet, oil red O, Sudan black B, いずれの染色においても，空胞内に陽性物質は認められなかった．

〔筋生検電顕所見〕電顕的には，筋原線維間に種々の大きさの多数の空胞が集属し，その限界膜が所々で不明瞭化し，一部は融合している（図3）．

さらに強拡大でみると，空胞出現の比較的軽い所で微細な顆粒様物質を含む．cisternの拡大したSRと思われる構造が，空胞と混在して認められ，空胞にはさまれて，T-tubeと思われる構造が観察された（図4-a）．

またある所では，明らかにtriadの形態を残し，SRの空胞化傾向が認められた（図4-b）．

なお，ミトコンドリアの形態はよく保たれ空胞形成の特に著明な一部を除いて，筋原線維の構築も全般的によく保たれていた．以上のことより，空胞はsarcotubular system特にSRに由来すると考えられた．

考　　察

本症例は，幼児期に気付かれた非進行性の近位筋優位の筋力低下を呈し，血清筋原性酵素の上昇を示さず，筋電図は，軽度の筋原性パターンを示す先天性非進行性ミオパチーと考えられる症例であり，さらに組織学的にtype II線維優位にSRに由来すると思われる空胞を認めるvacuolar

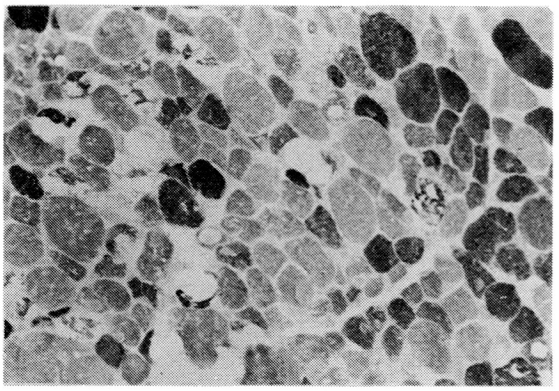


図2　ATPase染色（preincubation pH9.4）×200, type 2 fiber優位に空胞が認められる.

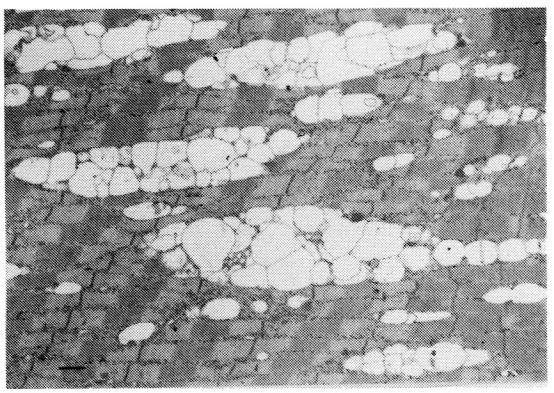


図3　空胞を認める筋線維の電顕像（uranyl acetate and lead citrate staining）筋原線維間に種々の大きさの空胞が多数集属して認められる.

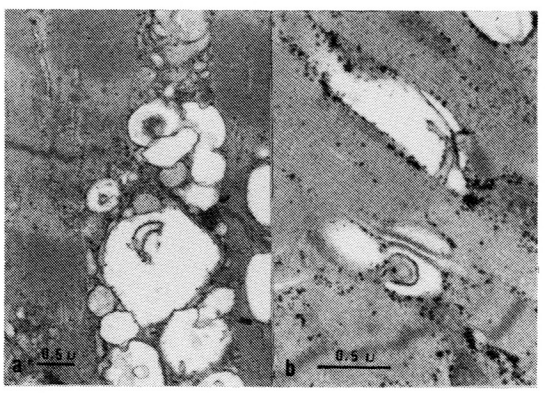


図4　空胞出現の比較的軽い部位の電顕像.

myopathy例である.

一般的にvacuolar myopathy[2)3)4)]における筋線維内の空胞変性自体は，特異的な変化ではなく，従ってvacuolar myopathyを呈するものには種々の疾患が含まれており，文献的にはsteroid myopathy[3)]，polymyositis[3)]，periodic paralysis[5)6)]，systemic lupus erythematosis[4)]，chloroquine myopathy[2)6)]，sarcotubular myopathy[1)]，distal myopathy[3)7)]，paroxysmal myoglobinuria[3)]，glycogen storage disease[3)]，steatorrhea[8)]などが挙げられる．そのうち，空胞の内容物，限界膜の性質，sarcotubular systemとの関係より，特に鑑別を要するものとして，chloroquine myopathy, distal myopathy, steroid myopathy, periodic paralysis, sarcotubular myopathyが挙げられる.

Chloroquine myopathyのvacuoleは内容にmyelin body等の変性物質を含み，autophagic vacuoleの形態を呈し，本症例には，chloroquine投薬の既往もない．distal myopathyもautophagic vacuoleの形態を示し，本症例のvacuoleとは全く異なる．steroid myopathyは，type II fiber内にvacuoleを認めるが，同時に異常ミトコンドリアなども混在し，又副腎皮質ホルモン投与の既往もなく，臨床像からも否定できる．周期性四肢麻痺のvacuoleは，SR由来ではあるが，電解質正常であり，臨床像が全く異なっている.

残るsarcotubular myopathyは，Jerusalemらにより報告されたもので，幼児期に発症し，非進行性の筋力低下を示し，筋原性酵素は，弟は正常で，兄はCPK360U/L（正常71U/L以下）と増加していた．筋電図は，弟は正常，兄は筋原性変化を認めた．又筋生検所見で，多数の大小不同のvacuoleの出現がみられ，それはtype II fiber優位に認められ，さらに電顕的にvacuoleがSR associated ATPase活性などにより，SR由来であり，空胞内は特殊染色で陰性であった.

本症例は，彼らの報告と比較してみると（**表1**），臨床像において，幼児期発症の非進行性の筋力低下である点，検査所見において，筋原性酵素が高くなく，筋電図で筋原性変化を示す点，筋生

表1　Sarcotubular Myopathy と本症例における臨床像，検査所見の対比．

	Sarcotubular Myopathy (Jerusalem ら)	本　症　例
家族内発症	2同胞男子	(−)
血族結婚	(+)	(−)
発症時期（独歩月齢）	兄　14M，弟　18M	16M
経過	非進行性	非進行性
筋力低下部位	兄：下肢近位筋,前脛骨筋頸部屈筋 弟：四肢近位筋，顔面筋頸部屈筋	全身性，特に近位筋優位
CPK	兄：軽度上昇 弟：正常	正常
EMG	兄：筋原性 弟：正常	筋原性（±）
筋生検所見	筋線維間の空胞変性 (Type II fiberに優位)	筋線維間の空胞変性 (Type II fiberに優位)
空砲内特殊染色	陰性	陰性
空胞の由来	SR	SR
他のOrganellaeの変化	(−)	(−)

検所見像において SR 由来の vacuole を認める点が一致することから，本症例を sarcotubular myopathy と診断した．ただ，今回の我々の報告例は孤発である点が異なるが，両親が非常に小さな同村の出身である点を考えれば，常染色体性劣性の可能性は否定できない．

本症の病因は，不明である．現在，筋収縮機構の生理や化学[9]に関しては解明されつつあるがまだ不明な点が多い．なかでも SR に関しては，Ca のとりこみや放出が知られているが，詳細な機能については不明である．本症の病因，病態の解明は，正常の筋収縮機構を考える上でも興味深いものと思われ，今後の症例の集積が望まれる．

文　献

1）Jerusalem, F., Engel, A.G., Gomez, M.R.: sarcotubular. myopathy, Neurology 23: 897-906, 1973.

2）小口喜三夫，S.H. Chou：バキュオラーミオパチー―コルヒチンによる実験的 segmental vacuolar myopathy について，神経進歩，20：59-67，1976.

3）WALTON: Disorders of voluntary muscle, 4 th ed. 1981.

4）Remcastle, N.B., Humphrey, J.G.: Vacuolar myopathy. Clinical. histochemical, and microscopic study. Arch. Neurol., 12: 570-582, 1965.

5）Engel, A.G.: Evolution and content of vacuoles in primary hypokalenic paralysis, Mayo Clin Proc., 45: 774-814, 1970.

6）Engel, A.G.: Electron microscopic observations in primary hypokalenic and thyrotoxic periodic paralysis, Mayo Clin. Proc., 41: 797-808, 1966.

7）三好正常，三田哲司，大田典也，荒木淑郎：筋線維に著明な空胞変性および桿状体（Rod-like Body）をみとめた孤発性 Distal myopathy の一例．臨床神経，10：111-120，1970.

8）Coërs, C., Telerman-Toppel, N., Cremer, M.: Regressive vacuolar myopathy in steatorrhea. Electrophysiological and histological study. Arch. Neurol., 24: 217-227, 1971.

9）遠藤実：特集「筋小胞体研究の進歩によせて」生体の科学，32：478-502，1981.

16) 遠位性筋萎縮を示す多発性筋炎の5症例

斎田孝彦*

研究協力者　斎田恭子*　久野貞子*
小牟礼修*　岩村京子*

一般に多発筋炎は亜急性に発症し近位筋を侵す特徴がある．最近私達は緩徐進行性で，かつ主として遠位筋を優位に侵す多発筋炎を経験したので報告する．

症例1のJH（表1）は，49歳の男性で3年前より時々膝がガクンとなる等の両下肢の筋力低下に気づいていた．約1年前より階段が昇りにくくなり，又両手でボタンが止めにくい，字が書けない，タオルがしぼれない等の症状が出現してきた．特に皮膚に異常は認めなかった．筋力は両側手指・手首，両側下腿筋群，上腕二頭筋，大腿四頭筋で著明な萎縮と低下を認めた．Gower's Signは陽性，かかと立ち，つま先立ちは不能．CKは826と中等度上昇し，他に血中のIgG高値，CH50の低下，抗SS-A抗体陽性であり，シェーグレン症候群の存在が疑われた．針筋電図はmyopathic pat-

表1

	性	年齢	経過年数	部位	CK	その他の所見	ステロイド反応性	転帰
JH	M	49	3	手，上腕二頭筋 下腿，大腿四頭筋	826 (<230)	IgG4200 CH5012 SS－A抗体1本×256	不明 (精神異常)	突然死
SN	M	80	1.5	足，下腿，腰帯	204 (<80)	結腸癌	軽度あり	癌死
TO	M	66	5	手，足，下腿 大腿四頭筋 上腕二頭筋	380 (<80)	高血圧症 心不全 ESR100	軽度あり	軽度悪化
YM	M	37	0.5	足，下腿，手 上腕二頭筋	740 (<80)	EB・IgG×320 RAHA×160	良好	治癒状態
AN	M	17	1.7	足，下腿，手 腰帯	1690 (<260)	なし	軽度あり	不変
KH	F	27	8	足，下腿，手 腰帯，上腕	125 (<80)	なし	なし	悪化
MT	M	24	6	足，下腿，腰帯 上腕	690 (<230)	なし	使用せず	悪化

＊国立療養所宇多野病院臨床研究部神経内科

tern に neurogenic の要素を混存していた．筋生検では，筋一次束は中等度に破壊され，内鞘内に強い単核細胞を中心とした細胞浸潤があった．筋線維大小不同，断裂，核内方転位及び rimmed vacuoles がみられた．鞘内に血管増生があり細動脈中心性に炎症細胞浸潤があった．又まれに好酸性封入体が細胞質内にみられた．ATPase 染色 pH9.4では，Ⅰ・Ⅱ型ともに小径化していた．

症例２の SN（**表１**）は，80歳男性で１年前よりカバンが重くて持てなくなり，やがて階段が昇りにくくなり来院した．診察では，握力6kg で鶏歩歩行著明で，足指，手指の著明な筋力低下と軽度の腰帯筋群の低下がみられた．CK 値は中等度に上昇していた．筋生検では，筋一次束の中等度の破壊と血管の増生，血管周囲への細胞浸潤，筋線維の断裂，核内方転位，Rimmed vacuoles がみられた（**図１**，**図２**）．再生線維も散見された．

症例３の T.O（**表１**）は，66歳男性で約５年前より膝の脱力，階段昇降困難，握力低下，つまづき易い等の症状が出現し，徐々に進行した．手指・足・下腿・肩甲・腰帯筋群の筋力低下と萎縮がみられた．CK は軽度上昇し，筋電図は筋原性変化を示していた．合併症として赤沈の上昇，高血圧症と心不全があった．筋生検では筋線維の大小不同と筋内鞘での強い単核細胞を中心とした細胞浸潤があった．萎縮した筋線維には rimmed-vacuoles がみられ筋線維の断裂，核内方転移も認められた．エポン包埋切片で autophagic vacuoles と思われるものが多数認められ，電顕像で，membranous body がみられた．

症例４の Y.M（**表１**）は，37歳の男性で約半年前に感冒様症状があり，その後徐々に手指の伸展不能，重い物が持てない，カメラのシャッターが押せないという症状があり，次第に階段昇降困難が出現した．診察ではかかと歩き，つま先歩きが不能又は拙劣で手指，前腕及び下腿筋群の筋力低下と萎縮があった．握力は7kg であった．CK は中等度上昇し，EB ウイルス抗体価が×320，RA 陽性であった．筋生検では，著明な筋束の破壊と細胞浸潤，筋線維の小円形化がみられた．細胞浸潤は小血管周囲に著明な傾向があった（**図３**）．多く

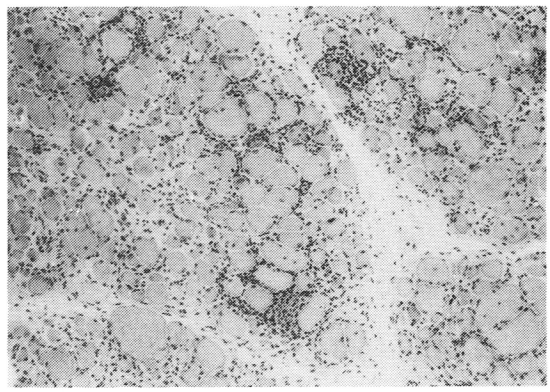


図１　症例 SN の筋生検像，筋束の破壊，筋鞘内への細胞浸潤，筋線維の大小不同，断裂と筋核内方転位がみられる．HE 染色　×160

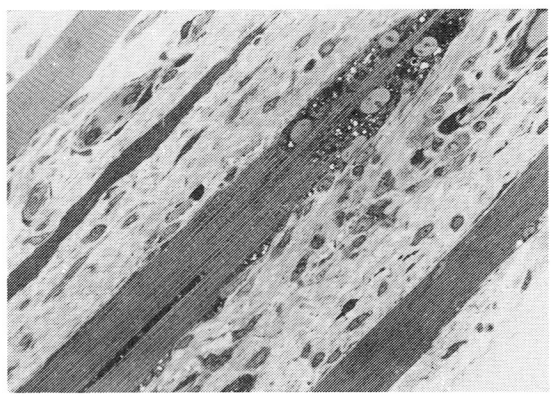


図２　症例 SN のエポン包埋切片．筋線維内に autophagic vacules が多数みられる．トルイジン・ブルー染色　×160

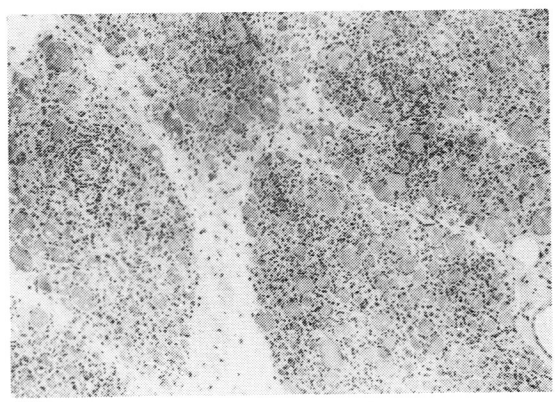


図３　症例 YM の筋生検像．筋鞘内へ著明な細胞浸潤，細動脈周囲炎，筋線維の小円形化と多数の rimmed vacuoles を認める．HE 染色×160

の筋線維には autophagic vacuoles がみられた．同一筋の少し離れた所からの生検では，筋線維の萎縮，断裂が認められた．間接蛍光抗体法にて IgG を染めると筋線維周囲と間質に散在性に陽性反応がみられたが IgA は negative だった．C_3 の染色では血管内壁及び間質がうすく染色された．

症例5の A.N（表1）は，17歳男性で約1年前より剣道をする時につま先立ちが出来ない事に気付いた．又最近では握力の低下と字が書きにくいと言っている．診察では手指及び前腕，下腿筋群の筋力低下，特に下腿筋の萎縮があった．CK は中等度に上昇していた．筋生検では，筋束内小血管周囲に細胞浸潤がみられ，筋線維の大小不同，断裂，著明な Rimmed-vacuoles の存在，核内方転位がみられた．以上の筋生検所見をまとめると（表2）各症例ともに共通して筋束内への細胞浸潤，細動脈炎を思わせる血管周囲への細胞浸潤，筋線維の小円形化，筋束周辺の筋線維の萎縮，Rimmed vacuoles の存在，核内方転移，筋線維の断裂がみられた．細胞浸潤と細動脈炎を思わせる以外の所見は下二段に示した Rimmed vacuoles を伴う clistal myopathy の所見と比較的共通している．

これらの遠位型優位を示す慢性多発筋炎に対しての，副腎皮質ホルモンによる治療の反応性をみると，細胞浸潤の顕著であった一例のみが，著効を示し治癒状態に入っている．症例1の J.H はプレドニン40mg 開始一週間後，精神異常を来たし突然死しているが，他院の症例で詳細はわからない．症例2は，筋症状は軽度の改善がみられたが癌死している．症例3及び5は，不変又は軽度の悪化がみられている．鑑別診断としては，Inclusion body myositis 及び rimmed vacuoles を伴う distal myopathy が考えられる．Inclusion body myositis も緩徐進行性で，男性に多く，又遠位筋を優位に侵す傾向があり，今回の5例の中の第一例と二例が，非常によく似ている．これは電顕的に18nm の filamentous mass を核内又は細胞質内にみつける事が，今の所，診断基準となっているので今後検索の予定である．Distal myopathy とは炎症細胞浸潤が殆どみられない事

表2　筋生検所見

	細胞浸潤	細動脈炎	小径線維	小円形線維	筋束周辺萎縮	RV	中心核	好酸性封入体	筋線維断裂
J. H.	++	+	+	+	+	++	+	+	±
S. N.	+++	+	+	+	+	++	++	−	+
T. O.	++	±	+	+	+	++	+	+	+
Y. M.	+++	+	−	++	+	+	+	−	−
A. N.	++	+	+	+	+	++	++	−	+
K. H.	±	−	+	+	+	++	+	+	+
M. T.	−	−	+	−	−	++	++	−	+

から区別されるが，症例5がこれに類似している．遠位型筋萎縮を示す多発筋炎の特徴をまとめると，①緩徐進行性，②男性に多い，③下腿屈筋群，手指，前腕，大腕四頭筋，上腕二頭筋が侵され易い，④CKは軽度ないし中等度上昇，⑤生検では筋線維の孤在性小円形化，rimmed vacuolesの存在，核内方転移，筋線維断裂がある．炎症は，間質細動脈とその周囲に強く，perifascicular atophyを示す傾向がある，⑥副腎皮質ホルモンに反応しにくい，⑦膠原病的要素，癌等が合併しうる，という事になる．遠位型筋炎の多くはInclusion body myositesと考えられるが，この中に症例4の様なステロイド反応性のものが存在する事，更にdistal myopathyと臨床的に区別出来ない症例5等がある事等，そのpathophysiologyには違いがみられる．etiologyとしては，やはり免疫異常が考えられるが，慢性である点及びステロイド反応性の悪い点で他の筋炎と区別される．又遠位筋優位性は，細動脈炎の存在やperifascicular atrophyの傾向のある所から，筋内末梢神経枝の障害の可能性も考えられる．

文　献

1）K. Hollinrake: Polymyositis presenting as distal muscle weakness. A case report J Neurol Sci 8: 479-484, 1969.

2）佐々木清博，森治郎，高橋和郎，中村晴臣：Distal myopathy—4症例の検討—臨床神経 9：627-637, 1969.

3）S Carpenter, G Karpati, I Heller and A Eisen: Inclusion body myositis: A distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy. Neurology 28: 8-17, 1978.

4）BJ Van Kasteren: Polymyositis presenting with chronic progressive distal muscular weakness. J Neurol Sci 41: 307-310, 1979.

5）RG Miller, NK Blank, RB Layzer: Sporadic distal myopathy with early adult onset. Ann Neurol 5: 220-227, 1979.

17) 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

——II. Freeze fracture 法による膜内粒子密度の検討——

若 山 吉 弘*

研究協力者　熊 谷 俊 幸** 渋 谷 誠 二*

はじめに

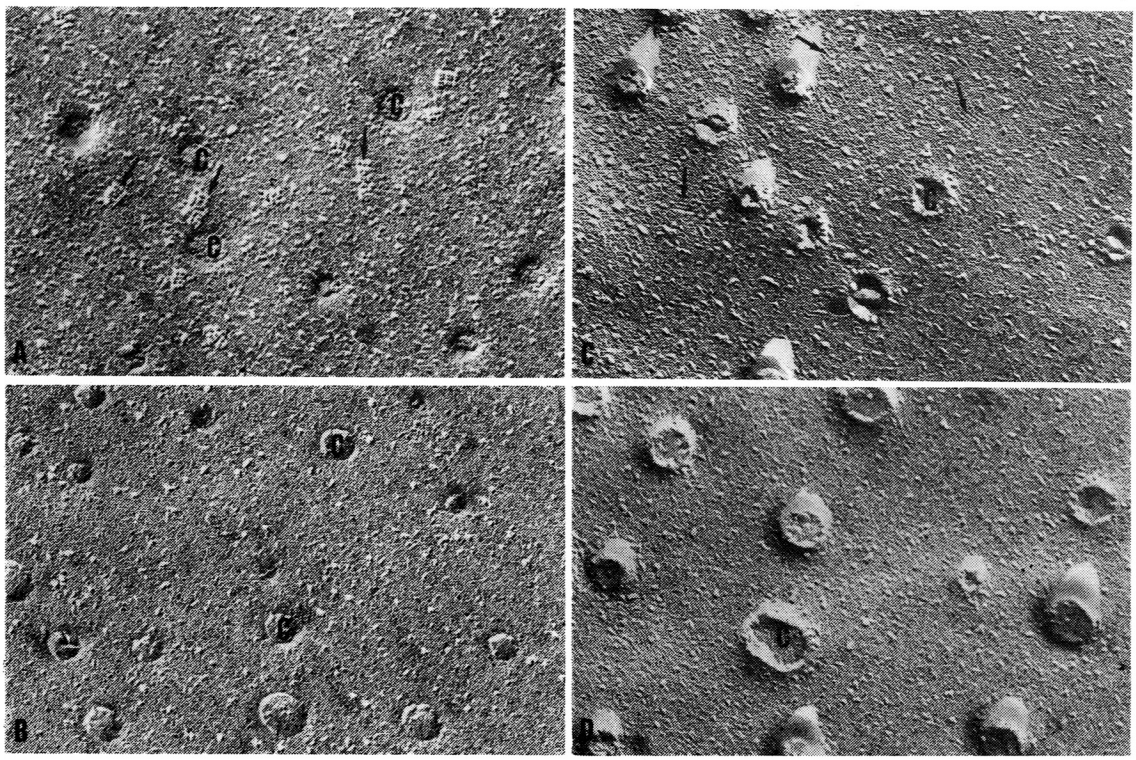
筋ジストロフィー症における骨格筋線維の変性の初期過程において筋細胞膜異常のはたす役割が注目され，この異常のために筋細胞膜を通じ細胞外液中の多量のCaイオンが流入し，これによりCANP等各種プロテアーゼが活性化され筋細胞の変性が進むと考えられている．我々は今迄この筋ジストロフィー症における筋細胞膜異常に着目し，細胞膜内部の微細構造を観察可能な凍結割断法を用いてDuchenne型，顔面肩甲上腕型，肢帯型，myotonic dystrophyの生検筋の細胞膜構築を検討してきた．とくにDuchenne型では明らかな変化がみられ，orthogonal arrayは著減し，array以外の膜内粒子の減少やcaveolaeの増加傾向がみられている．このような変化は上記以外の型の筋ジストロフィー症ではみられず，その特異性を更に検討するため，昨年度より本邦に比較的多い福山型先天性筋ジストロフィー症（以下FCMD）生検筋細胞膜の微細構造を検討しているが，本年度は膜内粒子密度を中心に検討した．

材料と方法

FCMD 6例の大腿四頭筋生検筋と整形外科手術例幼小児の大腿四頭筋生検筋のうち組織化学的に正常なもの6例を対象とした．採取筋は化学固定による収縮を避けるためU型筋鉗子にはさみ，即ちに2.5%グルタールアルデヒド溶液で2時間固定した．また生検筋の一部は液体窒素にて冷却したイソペンタン中で急速凍結し，クリオスタット切片を作製し，組織化学的検索用としてHE, Gomori-trichrome, DPNH, ATPase (pH9.4, 4.6, 4.3) 染色をおこなった．透過電顕標本はU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取り出し昨年度の報告書[1]に記載した通りの方法で標本作製した．凍結割断標本は同じく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，10%，20%，30%グリ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．その後標本はEiko FD II A凍結割断装置にて−120℃，真空度2～4×10^{-7}Torrのもとで割断し，即ちに電子銃にて水晶発振子で膜圧を一定にしながらプラチナとカーボンを蒸着し，レプリカ膜を作製した．レプリカ膜に付着する筋組織は市販の塩素系漂白剤にて消化し，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おこない，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のきめが細かく，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1μm^2当りの膜内粒子密度とorthogonal

＊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



FCMD と正常対照生検筋細胞膜のレプリカ像．A は正常 P 面，B は FCMD の P 面，C は正常 E 面，D は FCMD の E 面．FCMD の P 面では正常 P 面に比し orthogonal array（A の矢印）が著減し，array 以外の膜内粒子の減少もみられる．FCMD の E 面では正常 E 面に比し orthogonal array pits（C の矢印）の著減がみられるが，膜内粒子密度の正常 E 面との差は P 面程ではない．C：Caveolae，原倍率×160,000　縮少率　49%
A，B，C，D

array 密度の検討は最終倍率160,000倍で印画紙に焼付けたもののなかから，それぞれの症例につき at random に異なる筋細胞膜の 5 P 面，5 E 面を盲目的に抽出した．これら計12症例からの計120枚の筋細胞膜の写真をすべて code l，FCMD と正常対照生検筋細胞膜とをすべて混ぜ合わせ，どちらかわからない状態で膜内粒子密度と orthogonal array 密度を算出し，すべて算出し終った段階で，decoding してその結果を両群間で統計的に処理し比較検討した．尚膜内粒子は0.25μm^2 当りに分布するものの密度から，また orthogonal array は 1 -1.85μm^2 の領域に分布するものの密度からそれぞれ1μm^2 当りの密度を算出した．

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見られる間質結合織の増加は DMD と本症を区別する筋生検所見上での大きな相違点である．ATPase 染色（pH9.4）では 6 例の正常筋組織では type 1 fiber が46.9%，type 2 fiber が53.1%であり，6 例の FCMD 生検筋では type 1 fiber が49.6%，type 2 fiber が50.4%であった．また preincubation の pH が4.6，4.3のものを含めた詳細な検討は正常対照筋では 4 例，FCMD 生検筋では 3 例でおこなった．4 例の正常

筋組織では type 1 fiber が45.2%，type2A fiber が28.8%，type2B fiber が26.0%であった．これに対し3例の FCMD 生検筋では type 1 fiber が48.0%，type2A fiber が23.6%，type2B fiber が9.8%，type2C fiber が19.2%であった．尚エポン包埋標本の電顕所見については昨年度の報告書[1]に記載したので省略する．

さて次に凍結割断法にて筋細胞膜内面構造を観察してみると，低倍では細胞質側の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 AI-junction を含むI帯に多い傾向がみられた．更に倍率を上げてみると個々の膜内粒子やその pits がみられ，P面ではE面より膜内粒子密度は明らかに多くその直径はまちまちであった．そのほか特徴的な構造物としてP面には直径60～70Åの粒子からなる orthogonal array, square array, rectilineal array などと呼ばれる結晶様構造物があり，E面にはその pits が観察された．膜内粒子は比較的均一に分布しており，正常対照生検筋ではその group mean±standard error of the mean が1μm^2 当たり1897±96であり，orthogonal array subunit particle を含めると2595±119であった．一方E面では膜内粒子密度は885±40（SE）であった．他方 FCMD 生検筋ではP面にて個々の膜内粒子密度は1420±73（SE）（$P<0.01$, two tailed t test），orthogonal array subunit particle を含めると1448±77（SE）（$P<0.001$）でありE面では725±52（SE）（$P<0.05$）であった．次に orthogonal array の1μm^2 当りの group median density は正常対照筋では13.52で mid-range が6.46から19.83（25%～75%）であるのに対し，FCMD 生検筋細胞膜ではこれらがそれぞれ0.54，0から1.10（$P<0.001$ Wilcoxon rank sum test）であった．

考　　察

FCMD は DMD と異なり生直後より筋緊張低下，筋力低下，関節拘縮，精神発達遅延，けいれん発作などの中枢神経症状がみられ，骨格筋には間質結合織の著しい増加がみられるが，筋線維自体の変化は dystrophic な変化を示し，この筋細胞膜と DMD のそれとの間に何か共通の所見があれば，このような変化は筋ジス筋に共通の所見であり，病因との関係において興味ある所見と考えられる．

昨年度からの我々の FCMD 生検筋細胞膜変化の検索では DMD との共通点はP面における orthogonal array とE面におけるその pits の著減，それに array 以外の膜内粒子のP面E面における減少である．ここで変化の一番著しかった orthogonal array は骨格筋細胞以外にも種々の細胞にみられるが，その機能は現時点では不明である．しかし脳の astroglia や腎の尿細管細胞などに多いことを考えれば，ion やそれ以外の物質の channel になっている可能性が大きいのではないかと考えられる．この orthogonal array の減少は anoxia[2] や bupivacaine[3] などによる実験的 myopathy では生じにくく筋ジス筋の大きな特徴である．また array 以外の膜内粒子密度は DMD では減少していないという報告[4] もみられるが，この報告では DMD 4例，正常対照4例と症例数が少ないこともその1因かもしれない．我々の今迄の FCMD での結果は Schotland ら[5] の DMD の結果と同様に，array 以外の膜内粒子の減少もみられた．このような array 以外の膜内粒子の減少は再生筋細胞膜ではみられず[6]，FCMD 筋細胞膜の異常をうかがわせるが，本症生検筋にも ATPase 染色でみられるように多数の再生筋があり，今迄に得られた結果の意味するところを今後更に検討してゆきたい．

文　　献

1）若山吉弘，熊谷俊幸，渋谷誠二：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．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，1985，pp122-126.

2）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.

3) Wakayama Y, Shibuya S : Quantitative freeze fracture electron microscopic analysis of muscle plasma membrane of bupivacaine induced myopathy. J Neurol Sci, 72 : 31-42, 1986.

4) Peluchetti D, Mora M, Protti A, Cornelio F : Freeze-fracture analysis of the muscle fiber plasma membrane in Duchenne dystrophy. Neurology 35, 928-930, 1985.

5) Schotland DL, Bonilla E, Wakayama Y : Freeze fracture studies of muscle plasma membrane in human muscular dystrophy. Acta Neuropathol. 54, 189-197, 1981.

6) 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 and Sons, 1982 : pp489-501.

18) 筋病変の検討における免疫組織化学の応用について
── ミオグロビンおよび免疫グロブリンに関する方法論を中心として ──

田　辺　　等*

研究協力者　横　山　絵里子**　宮　本　和　人**　長　嶋　淑　子**
水　野　美　彦***　小　田　雅　也****

目　　的

筋ジストロフィーを含む諸種神経疾患の病態解明の一環として，我々は昨年度の本班会議で1,340例の筋病変をroutine batteryにより再検討した結果と，その各論的特性，臨床的意義について報告した．今回は更に筋線維の壊死，再生，phagocytosisなどの機構解明の手段として，1970年にSternbergerらが開発した免疫組織化学染色であるPAP法，すなわちperoxydase-antiperoxydase法によるミオグロビン染色，免疫グロブリン染色の追加的応用を試み，HE染色，Unna-Pappenheim染色，その他の組織化学染色所見との比較検討を加えた．

対象，及び方法

対象として，諸種神経筋疾患の筋生検標本より，多発性筋炎7例，Duchenne型筋ジストロフィー3例，低カリウム性ミオパチーなどの代謝性ミオパチー3例，rimmed vacuole型遠位型ミオパチー2例，封入体筋炎1例，及び末梢神経障害5例，運動ニューロン疾患4例その他8例などを含む計33例を用いた．

染色は非標識酵素抗体法であるPAP法により，DAKO社PAP KIT systemを用いて行なった．染色に当たっては第一次抗体であるウサギ抗ヒトミオグロビン抗体が，ヒト骨格筋組織のミオグロビンに対して抗体特異性を示していることを確認するために，Ouchterlony法による検索を行なった．

生検骨格筋は10%ホルマリン固定後，パラフィン包埋し，5 μの連続切片作成する．脱パラフィン処理後，3%過酸化水素水で内因性のオキシダーゼをブロックし，ブタ血清で洗浄した後，第1次抗体としてウサギ抗ヒトミオグロビン抗体や，抗ヒトリゾチーム，抗ヒト免疫グロブリン抗体（IgG，IgA，IgM，light chainのlamda, kappa）を作用させた．次いで第2次抗体としてブタ抗ウサギ免疫グロブリン抗体を，さらに標識抗体としてPAP complexを作用させ，最終的には第一次抗体をHRPでラベルした形で過酸化水素水とamino-ethylcarbazoleで呈色させて光顕で観察した．コントロールとして各1次抗体を非免疫ウサギ血清に置換し，以下同様の反応を行なった．

結　　果

Ouchterlony法では，抗ミオグロビン抗体とミオグロビン，および抗ミオグロビンとhuman muscle homogenateとの間にはいずれも1本の沈降線がみられ，2つの沈降線の癒合を認めたが，抗ミオグロビン抗体とヒト血清の反応系には沈降線は見られなかった（図1）．また，ミオグロビン，muscle homogenateの希釈系列の反応では32倍まで沈降線が認められており，計算上ヒト骨格筋に対しては16-32倍希釈の抗体が最も適切と考えられた．

ミオグロビン染色：　他染色の病理所見との比

＊東京都立神経病院
＊＊同・神経内科
＊＊＊同・神経小児科
＊＊＊＊同・検査科・病理

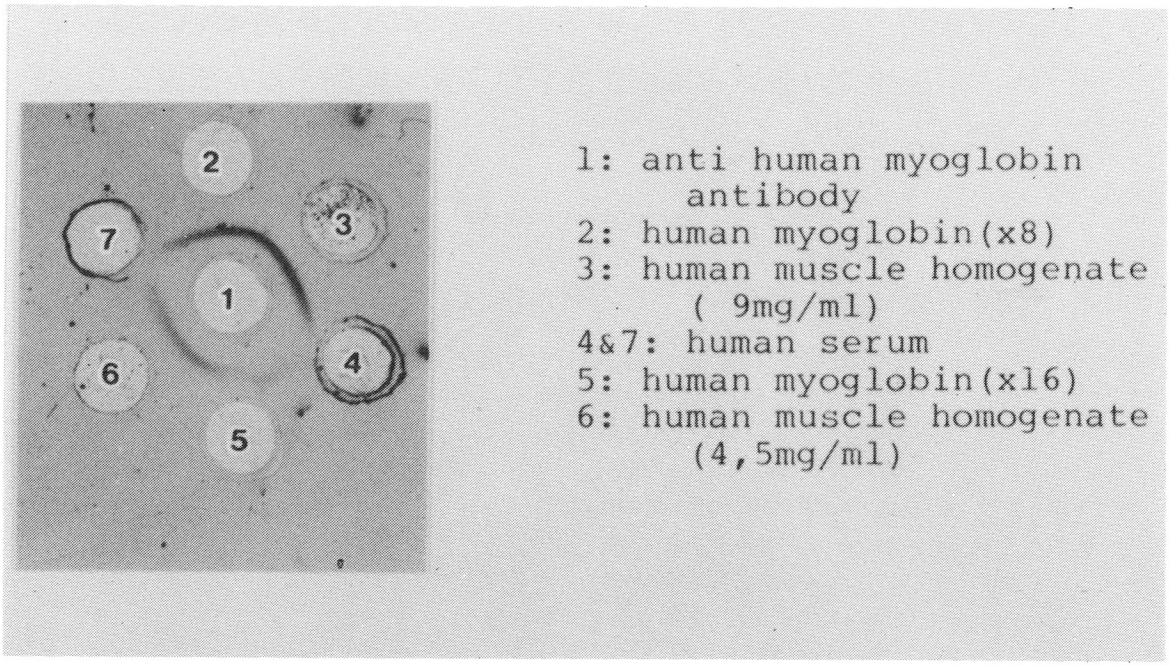


図1　Ouchterlony 法による検討結果

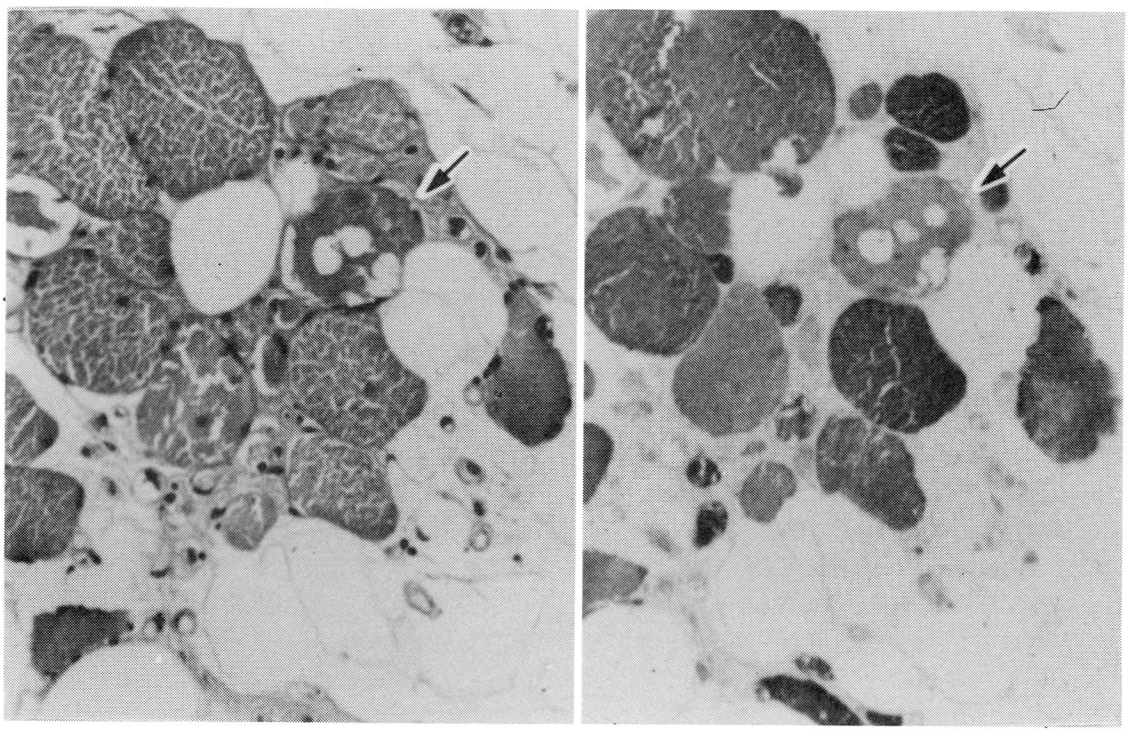


図2　Rimmed vacuole 型 distal myopathy：（左）HE，（右）myoglobin，矢印は rimmed vacuole を有する線維を示す

較

ミオグロビン染色では，反応性は縦断面，横断面とも主に筋線維にほぼ均一に見られ，微細構築として横紋構造，myofibril も比較的明瞭だが，間質の反応は陰性であった．コントロールの反応も陰性であった．

個々の筋線維の染色性にはばらつきがあり，ある種の checker board pattern を呈している場合も見られたが，fiber type に関しては連続断片の myosin ATPase の所見と比較する事ができず，fiber type での染色性の差異と断定する事は困難であった．

萎縮性変化の場合は，極度の萎縮線維でも反応性は保たれており，むしろ濃縮傾向を示す様な所見もみられたが，ミオグロビン反応性と萎縮の程度に一定の傾向は認められなかった．

rimmed vacuole 型 distal myopathy の症例では，本症で rimmed vacuole を持つ線維でも，反応性が比較的良く保たれていた．trichrom 変法では，rim に濃染を認めるが，ミオグロビン染色では特異的な所見はみられなかった（図２）．

HE でみられる basophilic fiber は，Unna-Pappenheim 法ではピロニン好性の染色性を示すが，ミオグロビンの反応性はむしろ乏しい傾向に有った（図３ A）．

HE や trichrom 変法で円形に腫大し均一に濃染する opaque fiber は，筋線維は横断面では均一に，縦断面ではこぶ状に反応性が低下しており，内部構築も不明瞭であった．

壊死筋線維のミオグロビン反応性は病変の程度や同一筋線維内の局所性にもばらつきがあった．完全な myolysis では反応性に乏しいが，筋線維の微細構築が不明瞭となり，HE で均一に濃染する所見を呈していてもミオグロビン反応性は保たれ，むしろ高い反応性を示す場合もあり，myolysis の種々相における差異が示唆された（図３ B）．

Ring fiber では，PAS,NADH-TR で反応性に乏しい Ring 部でもミオグロビン反応性の低下はなく，微細構築も明らかであった（図４ A）．

Target fiber では，target の中心部で高い反応性を示すものや，中心部の反応性が乏しくその周囲で高いものなどが認められた．

Sarcoplasmic mass は高いミオグロビン反応性を示していた。NADH-TR では subsarco-lemmal hyperactivity 程度の所見としか認められない場合でも，本法では mass の所見が強調される傾向にあった（図４ B）．

免疫グロブリン染色及びリゾチーム染色：

封入体筋炎ら多発性筋炎の症例では，浸潤細胞の中にリゾチーム陽性細胞の macrophage B cell と思われる IgG 陽性細胞，light chain 陽性細胞が認められたが，頻度としては，数%以下であった．リゾチーム陽性細胞と phagocytosis の局在的な関連性は認められなかった．

IgM，ラムダ型高ガンマグロブリン血症を伴う malignant lymphoma の症例では，筋層内へ多数浸潤している腫瘍細胞の中に，IgM，IgG，light chain のラムダ，カッパに陽性の細胞が認められ，特にラムダでの陽性細胞が多く見られた（図５）．

考　　察

ミオグロビンを中心とした免疫組織化学染色では，間葉系腫瘍の中から筋肉由来の腫瘍を鑑別した片岡らの報告や[1)2)]，rhabdomyolysis による筋，臓器障害の組織学的検索を行なった長嶋らの報告があり，筋病変自体への応用は本邦では徳島大学の三好・川合ら[3)]，檜沢・香川ら[4)]，熊本大学の出田ら[5)]などが系統的に行なっている．

ミオグロビンは骨格筋における酸素貯蔵系としての機能を有しているとされる。PAP 法によるミオグロビン染色と fiber type の関連について，type I fiber でミオグロビン染色性が強い可能性を示す報告はあるが，連続切片による myosin ATPase 所見との比較は行なわれておらず，まだ確定的な結論には至っていない．我々も fiber type での染色性の差異は指摘し得なかった．筋線維壊死においてのミオグロビン漏出のメカニズムは未だ不明であるが，ミオグロビン染色では反応性に種々相がみられた．また，basophilic fiber では Unna-Pappemheim 法との比較から，RNA の出現に遅れてミオグロビンが出現する事が推察さ

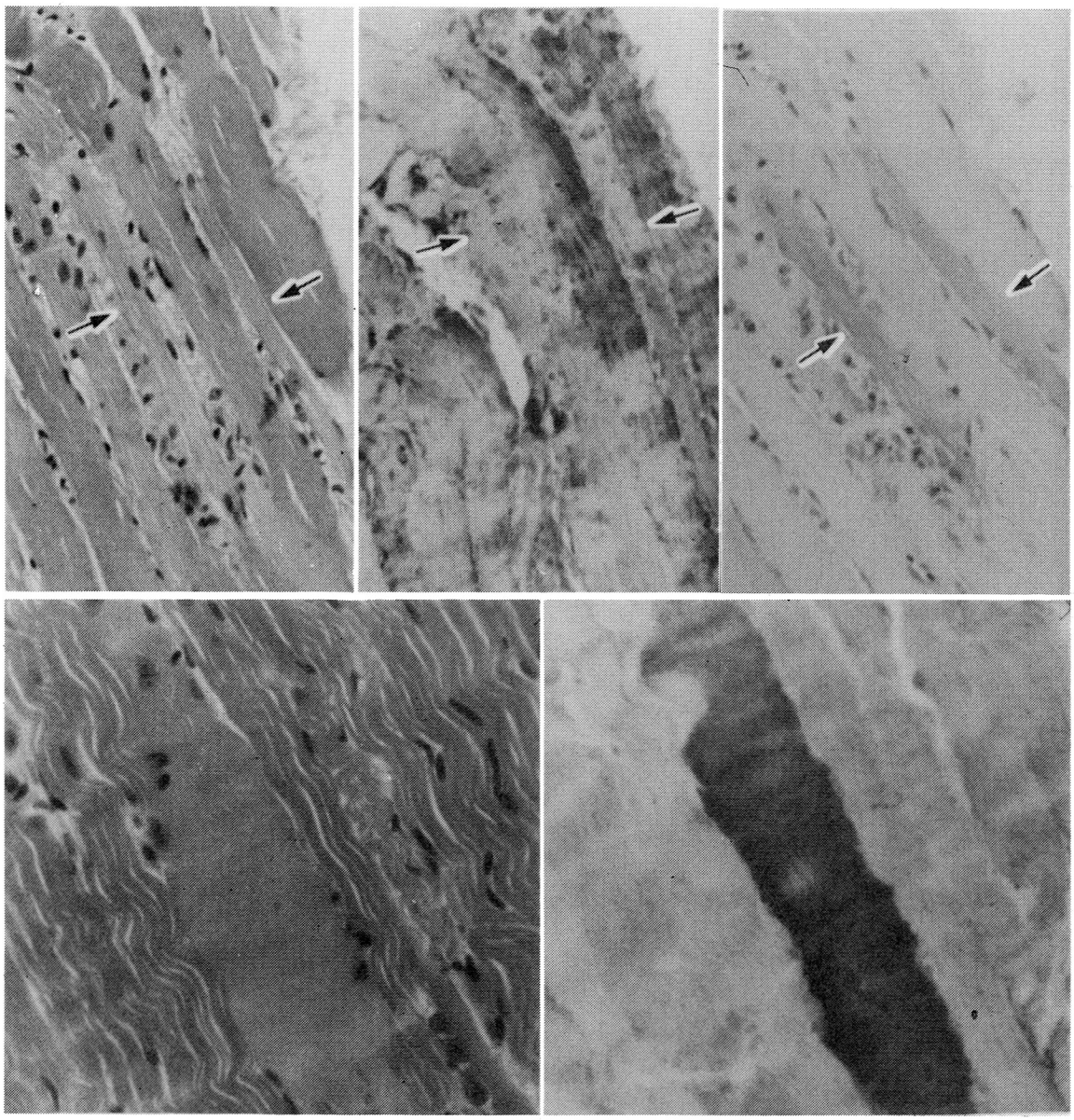
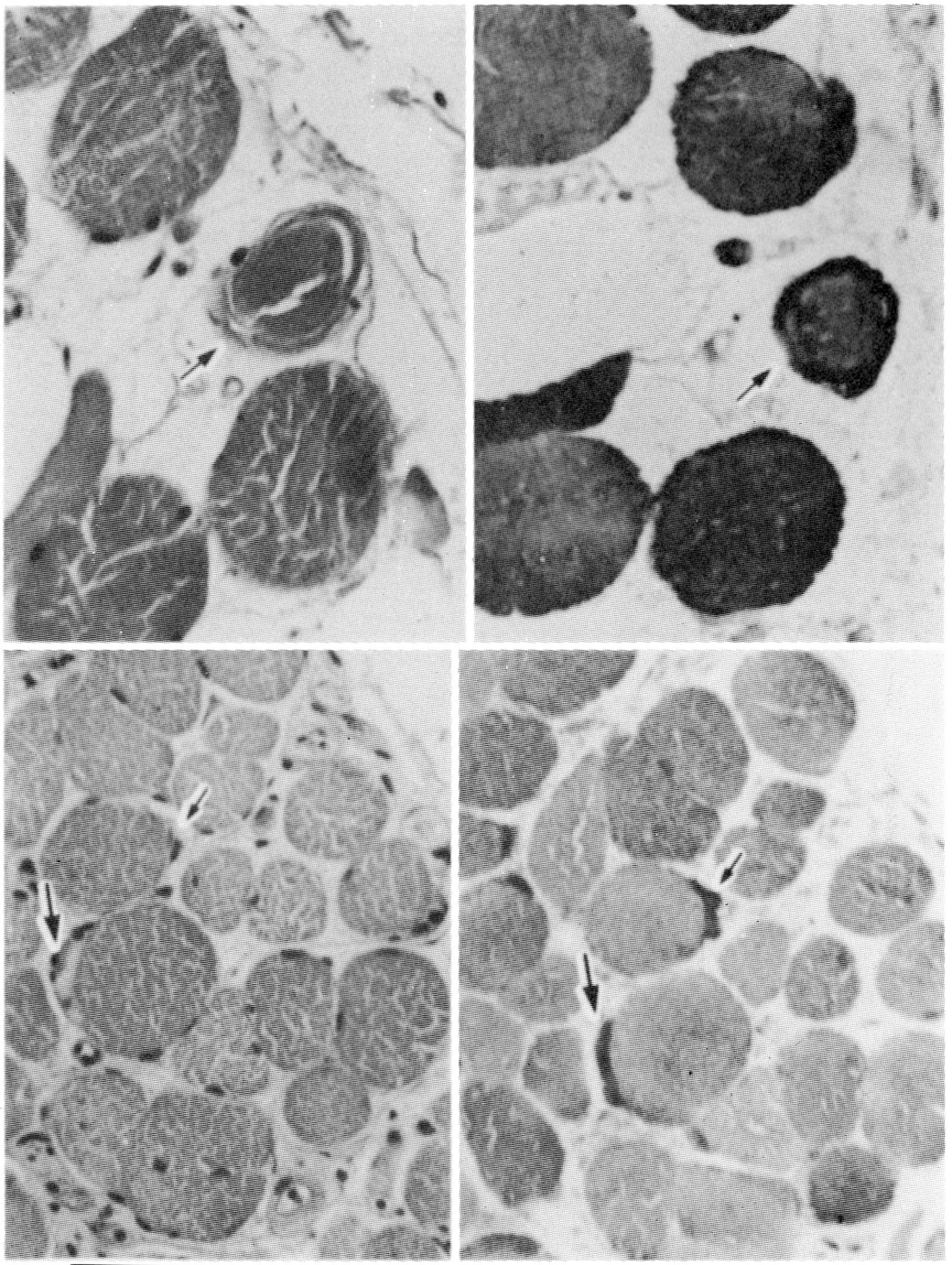


図3　a. basophilic fiber(矢印)：　① HE, ② myoglobin, ③ Unna-Pappenheim 法
b. myolytic fiber（それぞれの中央斜に走る太い線維）：① HE, ② myoglobin

a ①	a ②	a ③
b ①	b ②	



a ①	a ①
b ①	b ①

図4　a．ring fiber（矢印）：　① HE，② myoglobin
b．sarcoplasmic mass（矢印）：　① HE，② myoglobin

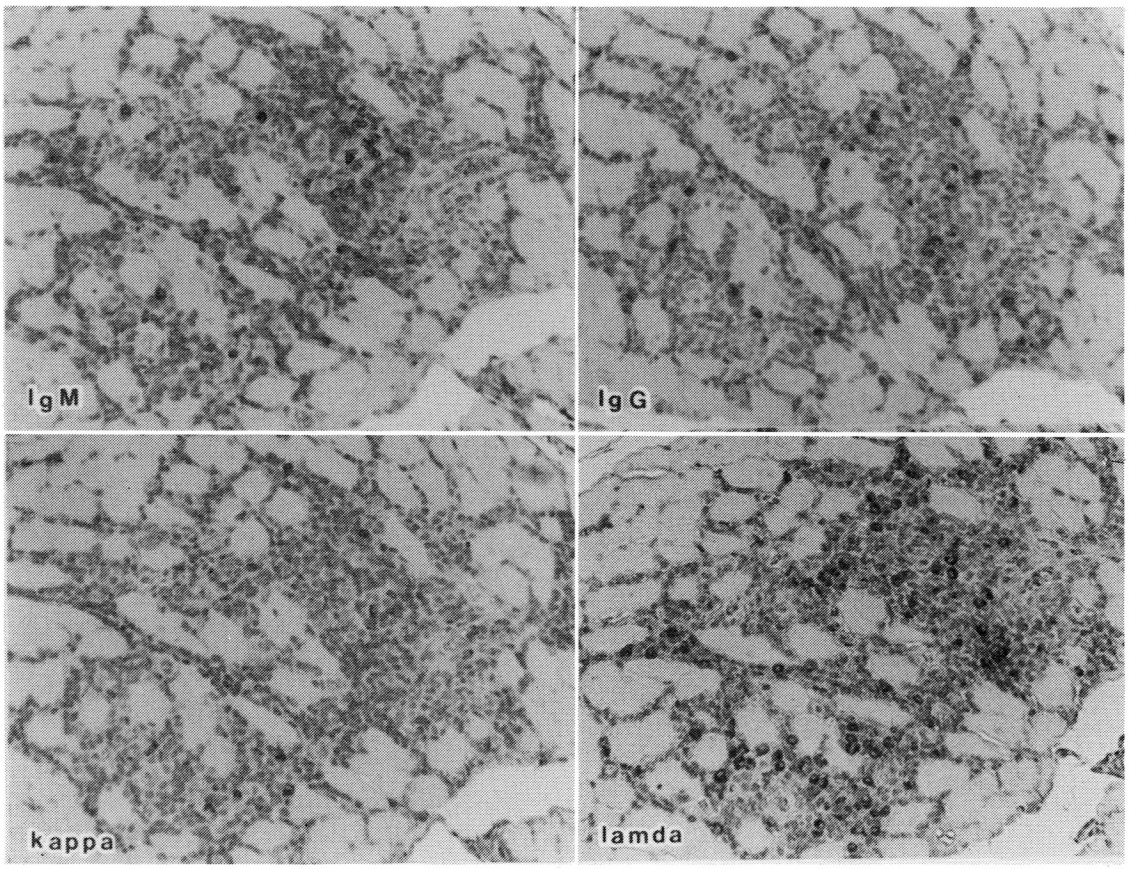


図5　IgM，ラムダ型高ガンマグロブリン血症を伴う malignant lymphoma．筋層内の多数の腫瘍細胞の中に陽性細胞が認められ，特にラムダ多い．

れた．

今回我々は酵素抗体法である PAP 法の方法論を検討し，従来の染色法による筋病変の病理所見に本法の所見を応用的に追加し得る事を見いだした．特にミオグロビン染色では，筋の崩壊現症に伴って様々な興味深い所見がみられ，従来の酵素活性系染色と，貯蔵系であるミオグロビン染色の対比によって，筋線維の壊死，再生現症の種々相の評価が可能となると思われる．

ミオグロビンに関しては正常筋線維での局在，fiber type における差異，筋の壊死，再生に伴う動態などの問題が，また，リゾチーム，免疫グロブリンに関しては，浸潤細胞と phagocytosis などの筋病変との関連性の問題などが未解決だが，今後クリオスタットを含む他の染色法と PAP 法の所見の比較検討により，これらの機構解明にさらに近づくことが期待される．

ま と め

1．諸種神経筋疾患における筋病変の routine battery による検索に，免疫組織化学反応である PAP 法の追加的応用を試みた．

2．Ouchterlony 法による検索から，PAP 法における抗ヒトミオグロビン抗体の特異性が示された．

3．他の染色法における一般形態学上の大小関係，構築異常，浸潤細胞などに関する既知の所見と比較検討を行ない，本法が有用である事が示さ

れた.

文　献

1) 片岡秀夫, 笹原正清： 膀胱の胎児性横紋筋肉腫—ミオグロビン免疫組織化学的検索. 臨床病理 37： 399-403, 1984

2) Noriko Kagawa, Tosiaki Sano, Hiroshi Inaba, et al : Immunohistochemistory of myoglobin in rhabdomyosarcomas. Acta Pathol. Jpn. 33 : 515-522, 1983

3) 三好和夫, 中野益弘, 川井尚臣： ミオグロビンと筋疾患. 筋肉病学. 南江堂, 東京, 1976

4) Noriko Kagawa, Kazuo Hizawa : Immunohistochemical study of myoglobin in neuromuscular diseases. Muscle & Nerve 8 : 9-6, 1985

5) 出田透, 植川和利, 上野洋ら： 筋病変とミオグロビンの局在一酵素抗体法による観察. 筋ジストロフィーの臨床, 病態と成因に関する研究. 昭和58年度研究報告書： 171-173, 1984

19) DMD筋におけるミオグロビン局在の変化
── 免疫電顕による検討 ──

川 井 尚 臣*

研究協力者　西 野　洋* 西 田 善 彦* 筒 井 芳 彦*
乾　俊 夫* 増 田 健二郎* 斎 藤 史 郎*
三 好 和 夫**

はじめに

ミオグロビンは主として，骨格筋，心筋に存在し，酸素の運搬に重要な働きを演じているとされている．臨床的には，各種の筋崩壊時に容易に血中に逸脱し，増加して認められる[1]．私たちは，先に，螢光抗体法を用いて人ミオグロビンの局在を正常筋ならびにDMD筋において報告している[2]が，今回は，ペルオキシダーゼを標識酵素とした酵素抗体直接法によって，光顕ならびに電顕的に，正常筋及びDMD筋におけるミオグロビンの局在を検索したので報告する．

対象と方法

酵素抗体直接法に必要な抗体のFab'分画とペルオキシダーゼ（HRP）の結合物の作成は，石川らにより開発されたマレイミド法[3]によった．自家製の抗人ミオグロビン家兎血清より，通常の方法によってFab'分画を作成し，一方，西洋ワサビペルオキシダーゼと4-カルボキシヘキシルメチル-マレイミドを反応させてマレイミド化HRPを作成し，この両者を4℃，20時間incubationして抗人ミオグロビンFab'-HRP結合物を得た．正常家兎血清からも同様の方法でFab'-HRP結合物を作成した．

酵素抗体法：　冷却Zamboni液中で18時間固定した生検筋を，液体窒素中で新鮮凍結し，クリオスタットで8 μの切片を作成し，アルブミン塗布スライド上に回収した．切片をPBS-NRS（1％正常家兎血清を含む0.05M燐酸緩衝液，pH7.4）10分3回，3％過酸化水素水7分，PBS-NRS10分3回，Fab'-HRP 9時間，PBS-NRS10分3回，0.01％過酸化水素水を含む0.05％DAB（ジアミノベンジジン）溶液5分，PBS-NRS10分3回，2％オスミウム酸30分，PBS10分3回，の順に反応させ，アセトン系列で脱水した後，エポン包埋した．超薄切片は85nmで連続的に作成し，無染色で，電顕にて観察した．光顕観察用のスライドは，DAB溶液で反応させた後，アセトン系列で脱水しキシレンに封入した．

結　　果

1　正常筋

光顕的に，抗人ミオグロビンFab'-HRPを反応させた切片では，すべての筋線維が横紋状に染色された（図1）．正常家兎血清より作成したFab'-HRPを反応させた対照の切片は，全く染色されなかった．電顕的に，ミオグロビンはI帯全体が瀰漫性に染色され（図2），ミトコンドリアの外膜や筋小胞体，Z線もまた染色された．A帯は染色されなかった．筋核，筋原線維間も染色されなかった．

2　DMD筋

光顕的に，ミオグロビンの染色性は，各筋線維によって異なっており，小径の線維で濃染されるものから，大径のopaque線維と思われるもので，ほとんど全く染色されないものまで，ばらつきが認められた（図3）．Opaque線維でも，細胞内に

＊徳島大学医学部第一内科
＊＊冲中記念成人病研究所

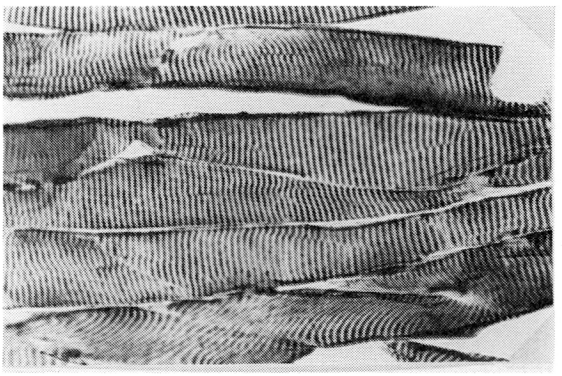


図1　免疫組織化学によるミオグロビン染色．正常筋の光顕写真．100倍．

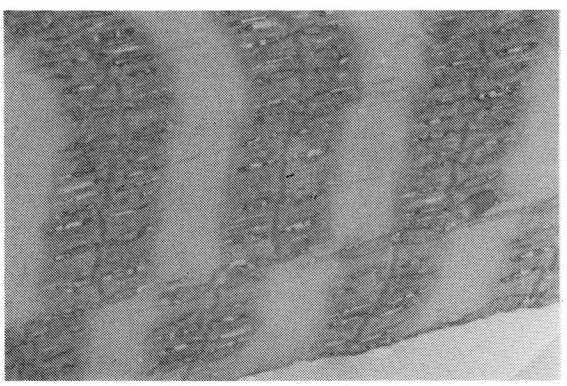


図2　免疫組織化学によるミオグロビン染色．正常筋の電顕写真．4000倍．

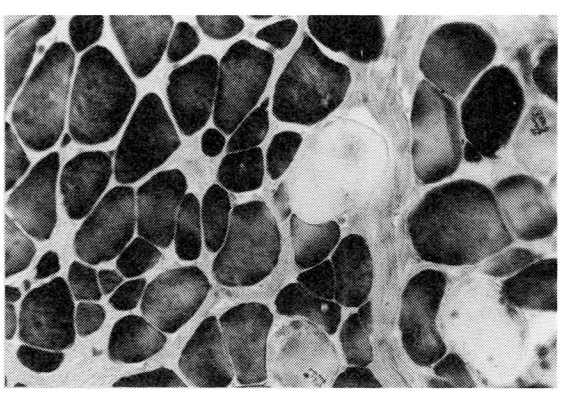


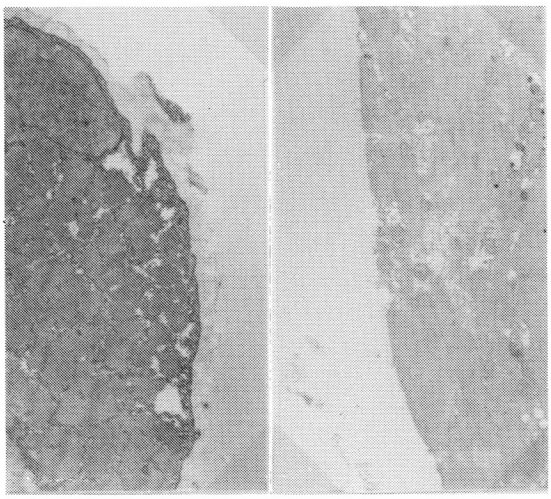
図3　免疫組織化学によるミオグロビン染色．DMD筋の光顕写真．100倍．

一部染色性の残存した部分も見られた．電顕的に，opaque線維は，ミオグロビンの染色性はI帯，A帯共に全く認められず，Z線に相当する部分も染色されなかった（図4 a，b）．しかし，opaque線維でもミトコンドリアや筋小胞体等の膜成分が集合して残存した部分では，それらの膜成分は若干染色されていた（図4 c）．比較的intactな線維では，ミオグロビンは一定の局在を示さず，I帯，A帯ともにdiffuseに染色されてみえた（図4 b）．光顕的に濃染された小径の線維は，電顕で見ると，横断面では，やはりI帯，A帯ともにdiffuseに染色されていたが，詳細に観察すると，Z線の周囲，すなわち，I帯に相当する部分が若干よく染色されていた（図5）．

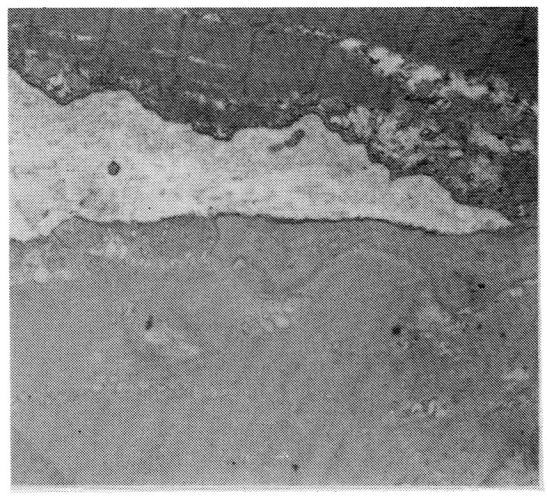
考　　案

ミオグロビンの局在については，私たちは先に，螢光抗体法を用いてI帯に局在することを報告している[2]．一方，Goldfischerは[4]電顕組織化学でA帯に局在すると報告している．今回私たちは，免疫電顕法を用いて，人の正常筋では，ミオグロビンが骨格筋のI帯に局在することを明らかにし，加えてミトコンドリアの外膜も濃染されることを示した．このことは，ミオグロビンが筋細胞内で酸素の運搬に重要な役割を担っていることを示唆しているものと考えられる．

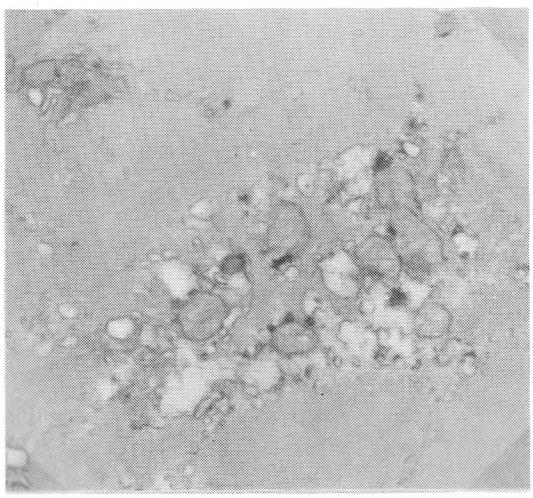
DMD筋では，各筋線維によって染色性が異なっていた．特にopaque線維では，染色性が全く消失していたが，これは，筋細胞膜の断裂，ならびに，ひき続いて生じた筋細胞の過収縮によってミオグロビンが細胞外へ流出したためと考えられる．軽度ながら変性を示す線維では，ミオグロビンがI帯，A帯ともdiffuseに染色される傾向があったが，筋細胞内においてミオグロビンの局在を維持する何らかの機構が障害されたためと考えられる．また小径の筋線維で，細胞内の構築が良く保たれている（再生筋細胞と考えられるが）ものでは，ミオグロビンはよく染色されていたが，I帯に局在する傾向が見られた．以上，DMD筋におけるミオグロビンの細胞内局在の変化は，筋線維の変性及び再生過程を鋭敏に反映しているものと考えら



A



B



C

図4　免疫組織化学によるミオグロビン染色．DMD 筋の電顕写真．
A）横断切片．intact の筋線維（左）と opaque 線維（右）．4000倍．
B）縦断切片．軽度変性線維（上）と opaque 線維（下）．6000倍．
C）opaque 線維内で染色性が軽度残存した部分．10000倍．

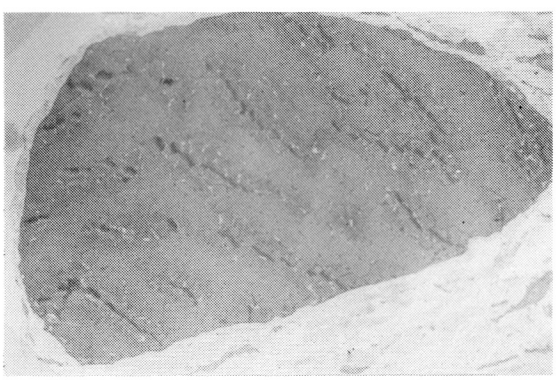


図5　免疫組織化学によるミオグロビン．DMD 筋で，小径の再生線維と考えられる筋細胞の横断面．3000倍．

れる.

文　献

1) Miyoshi, K., Saito, S., Kawai,H., Kondo,A., Iwasa,M., Hayashi,T., and Yagita, M: Radioimmunoassay for human myoglobin: methods and results in patients with skeletal muscle or myocardial disorders. J. Lab. Clin. Med. 92: 341, 1978

2) 三好和夫，川井尚臣，日下香苗，林郁郎，伊勢浩，岩朝勝，佐々木尚子：螢光抗体法による人骨格筋中ミオグロビンと筋型クレアチンキナーゼの局在．厚生省「筋ジストロフィー症の病因に関する研究」班．昭和51年度研究報告書，151-152.

3) Ishikawa,E., Yoshitake.S., Imagawa,M., and Sumiyoshi, A.: Preparation of monomeric Fab′-horseradish peroxidase conjugate using thiol groups in the hinge and its evaluation in enzyme immunoassay and immunohistochemical staining comparing with other methods. Ann. N.Y. Acad. Sci. 420: 74-89, 1983

4) Goldfischer, S.: The cytochemical localization of myoglobin in striated muscles of man and walrus. J. Cell Biol. 34: 398-403, 1967

20) Emery-Dreifuss型筋萎縮症の剖検所見

馬　渡　志　郎*

研究協力者　原　　英　夫*　長　柄　　均**
近　藤　　晃**　岩　下　　宏*

はじめに

今回，我々は，50歳の男性で臨床的にEmery-Dreifuss型筋ジストロフィーと診断され，突然の心停止のため死亡した1例を経験し，病理学的に筋肉，脊髄について検討を行なったので，若干の考察を加えて報告する．

症例　50歳　男性

現病歴：　出生・発育は正常．小児の頃より走るのが遅かった．12歳頃より，両側肘関節運動制限，下肢の脱力が出現．以後，四肢筋肉の萎縮，肘関節拘縮，頚部運動制限が進行．22歳の時アキレス腱延長術を受けた．23歳の時，某医より心電図異常を指摘された．34歳時に胸痛発作が起こった．38歳から起立不能となり，以後車椅子を使用．50歳時，突然の心停止のため死亡．

家族歴：　1人息子で，他は異母兄弟．家族内に神経筋疾患は，見られない．

入院時現症：　身長155cm，体重36.3kg．血圧130/80mmHg，脈拍46/分，不整．聴診上，心尖部でLev III°の収縮期雑音を聴取した．神経学的には，知能正常．脳神経系では，眼輪・口輪筋の軽度の脱力がある．頚部，胸背部の運令制限，特に前屈制限がある．筋萎縮は，肩甲上腕下腿に著明であった．肘，膝，足関節の拘縮があり，下肢は内反尖足を呈した．深部反射は，全て消失していた．

検査所見（表1）血液生化学では，CPK，LDH，GOT，GPT，全て正常であった．筋電図では，右大腿四頭筋で，低振幅，短持続時間の筋原性変化を認め，左第一背側骨間筋では，安静時軽度のfibrillation, positive sharp waveがみられ，随意収縮にて高振幅電位がみられた．神経伝導速度は正常．胸部X線では，CTR72%と著明な心拡大がみられた．心電図は，P波が消失し，右軸偏位，junctional rhythmを認めた．His束心電図では，A波を認めず，右心房の興奮性の消失があり心房停止の状態で，His束がpace makerとなっていた．

表1　Laboratory data

1. Serum chemistry :	CPK	21 IU (<28)
	LDH	297 CW-U (<400)
	GOT	14 KU
	GPT	14 KU
2. EMG :	Myogenic + Neurogenic pattern	
	NCV : normal	
3. Chest X-p :	CTR 72 %	
4. ECG :	P wave (-)	
	Right axis deviation	
	Junctional rhythm	

病理所見

1　心臓

両心房の著明な拡張が認められた．特に右心房壁は，極端に菲薄化しており，洞結節部位も肉眼的に判明し難い程，菲薄化していた．心筋の線維化の分布は，心室中隔後方から左心室後壁に強く限局性に認められた．心筋細胞浸潤については，線維化のある辺縁部に，円型細胞の浸潤が散在性に認められた．

2　筋組織学的所見（図1）

＊国立療養所筑後病院
＊＊九州大学医学部脳研神経病理

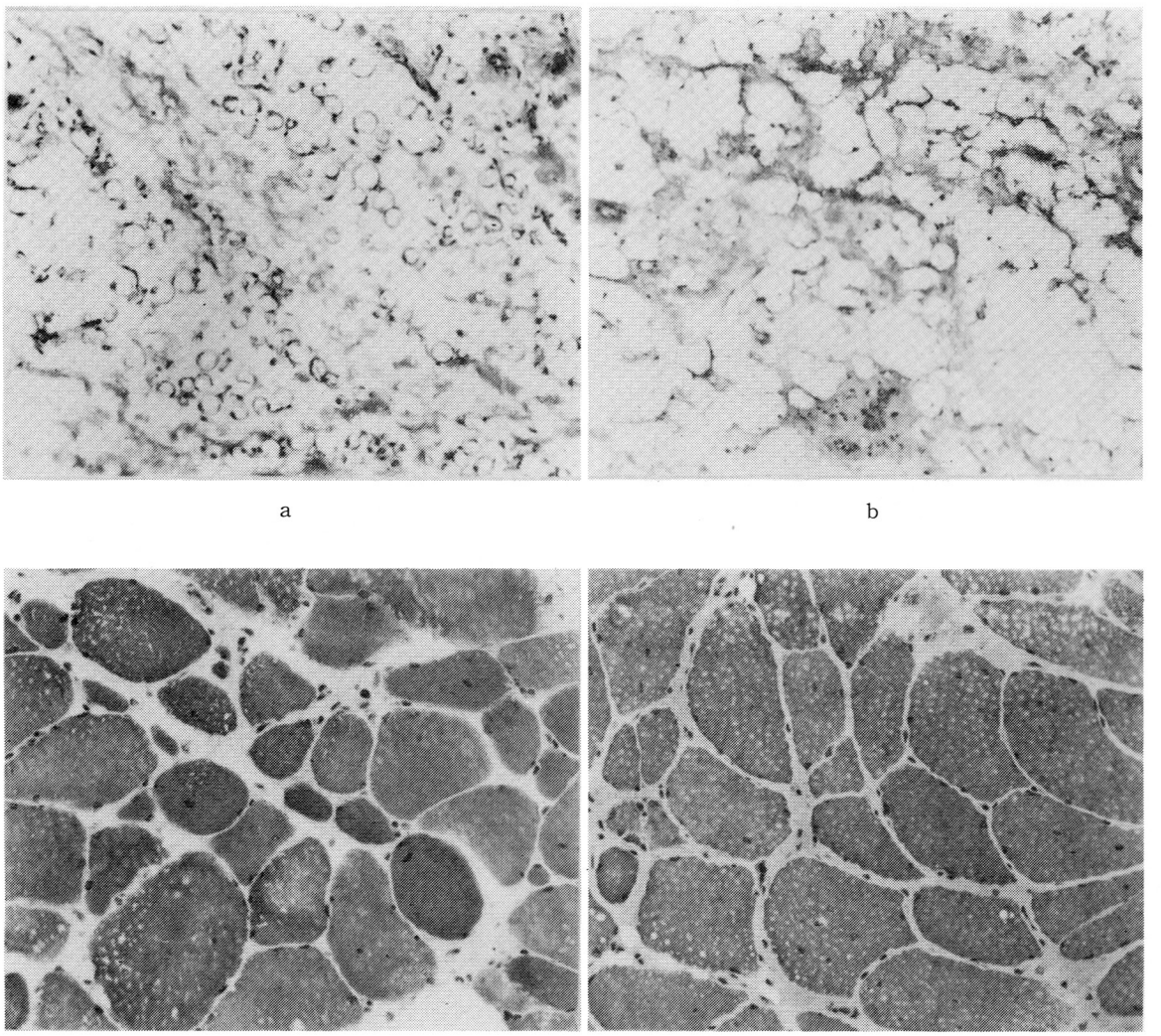


図1　筋組織像
a）僧帽筋　HE 染色　×96
b）上腕三頭筋　HE 染色　×96
c）大腿四頭筋　HE 染色　×96
d）長母指伸筋　HE 染色　×96

僧帽筋，上腕三頭筋では，殆んど筋線維が消失し，脂肪組織に置換され，endomysial connective tissue が増加していた．大腿四頭筋，長母指伸筋，舌骨筋は，筋構築は比較的良く保たれていたが，筋線維の大小不同，中心核の増加，fiber splitting, endomysial connective tissue の増加など，筋原性変化が認められた．

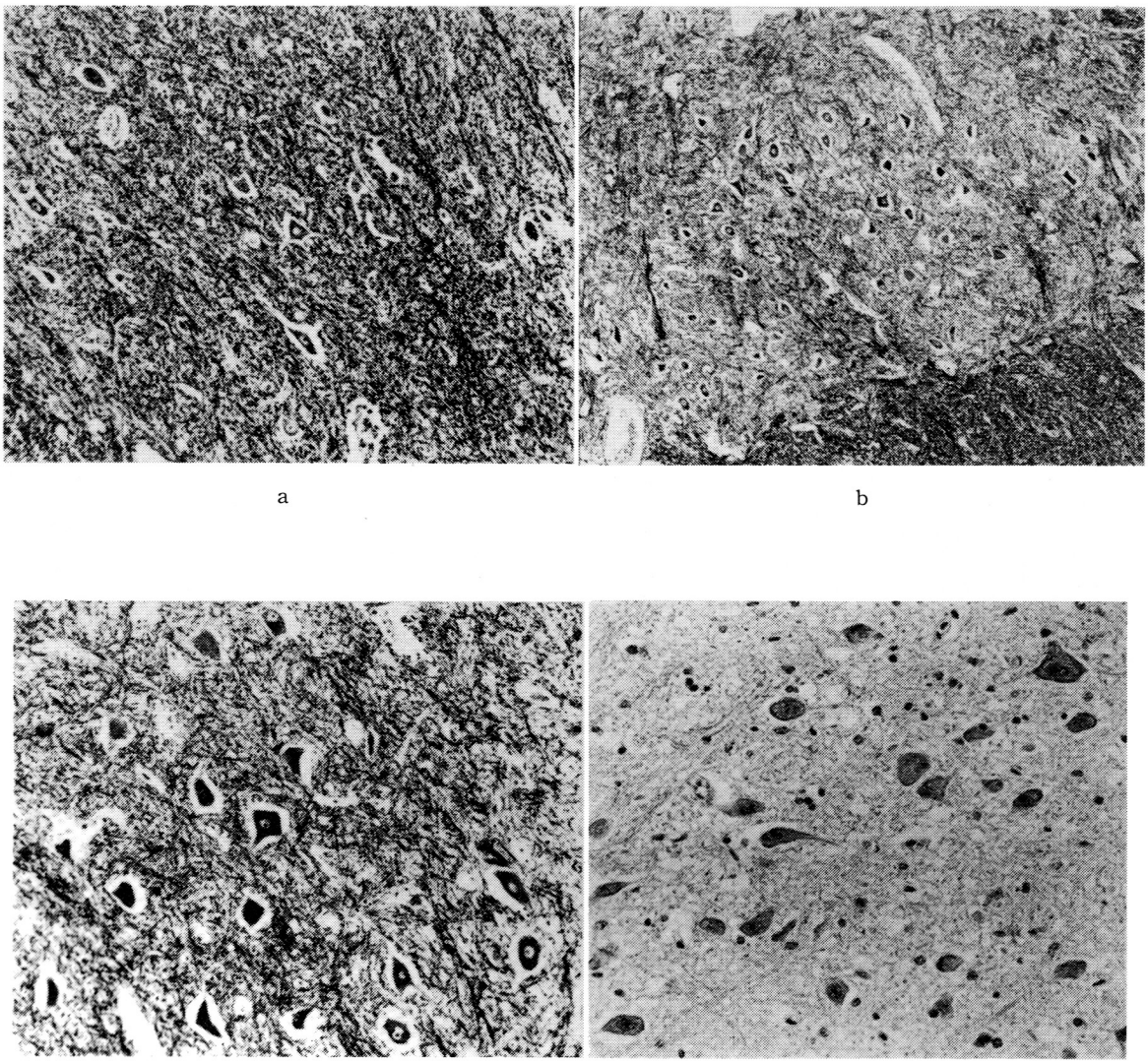
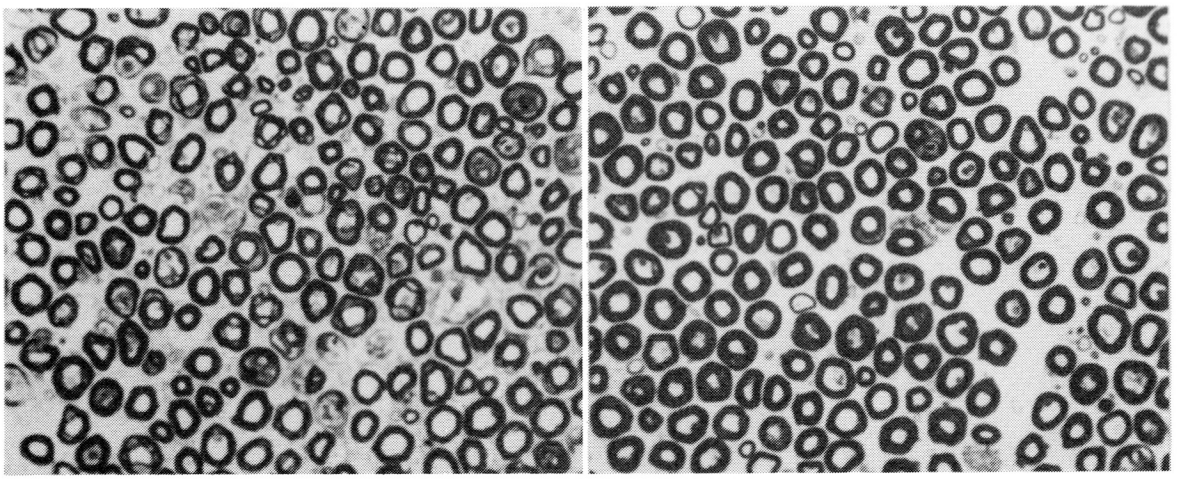
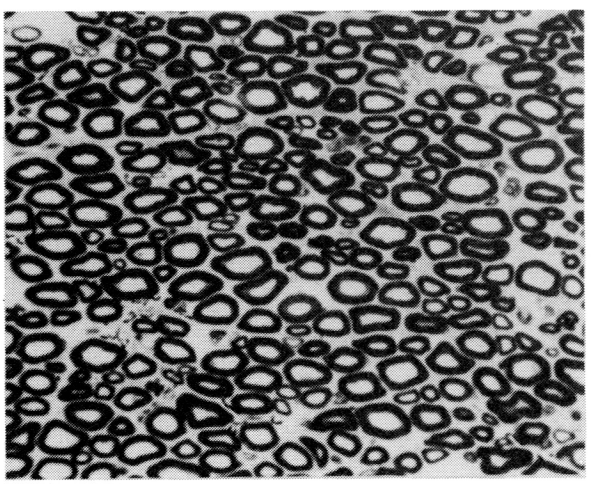


図 2　脊髄前角細胞，舌下神経核
a）C_8 レベル　×95
b）L_5 レベル　×39
c）L_5 レベル　×95
d）舌下神経核



a　　b



c

図3　有髄神経線維
a）C_8 脊髄前根　×440
b）L_5 脊髄前根　×440
c）舌下神経　×440

3　脊髄前角細胞（図２）

C_4，C_7，C_8，L_5の脊髄前角細胞について検索したが，変性脱落や萎縮像はなく，正常所見を示した．また gliosis や spheroid も認められなかった．延髄の舌下神経核においても，変性脱落はなく，正常であった．

4　脊髄前根及び舌下神経の有髄神経線維（図３）

舌下神経，C_8，L_5レベルの有髄神経線維について検索したが，数の減少はなく，形態的にも異常なかった．Morphometry を行なったが，（図４）正常コントロールと有意差はなかった．

その他，大脳，小脳，脳幹部等の中枢神経系は，全て正常であった．

考　　察

本症における筋萎縮について，その本態が dystrophy か，神経原性なのか，またこの疾患は，単一なものか否か，議論の分かれるところである．本邦で，Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーまたは Scapuloperoneal muscular atrophy もしくは dystrophy として報告された症例のうち，筋電図，筋生検所見で，栗山ら[6]，田辺ら[7]の例を除いて，全て神経原性もしくは，神経原性と筋原性の混在のいずれかが認められたとしている．一方，Rowland[1] や Thomas[2] は，筋生検で large grouped atrophy がみられないことや，腓腹筋萎

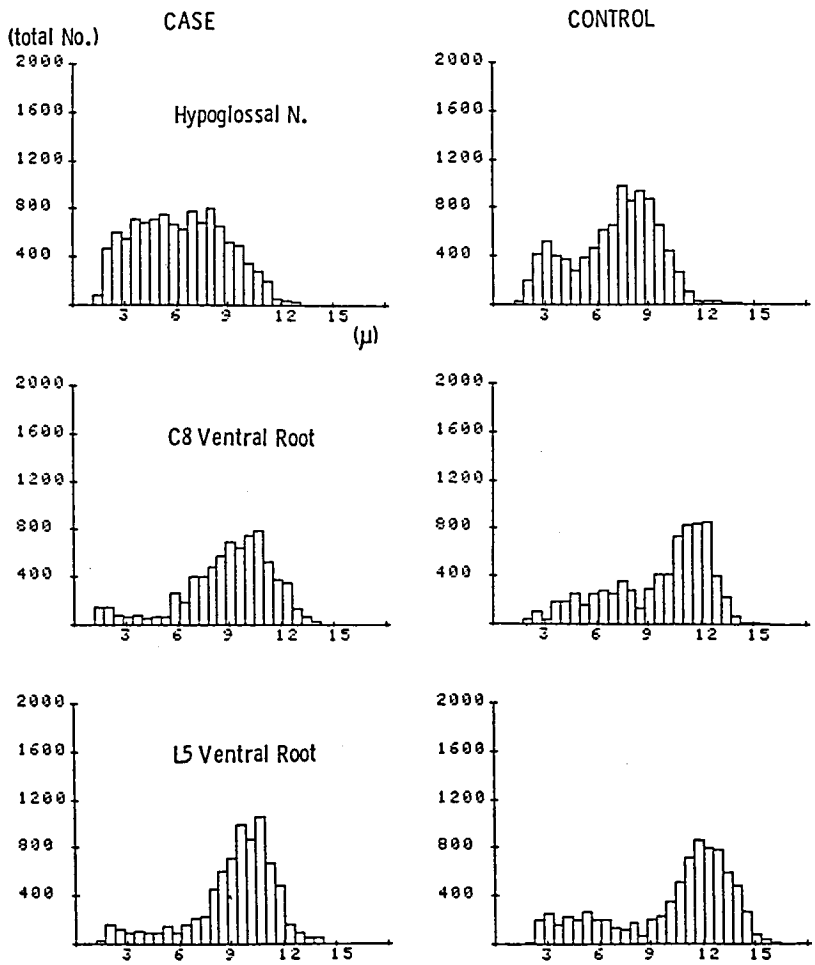


図４　Morphometric Evaluation of Myelinated Fibers

縮が著明であるにもかかわらず，坐骨神経は正常であったことより，myopathy であると主張している．

本症の脊髄について病理学的に詳細に検索を行なった報告は，これまで3例しかない．Takahashi[3]，Dubowitz[4]は，明白な脊髄病変はなかったと報告している．一方，工藤ら[5]は，14歳の男子剖検例で，5～7頚髄，4～5腰髄，1仙髄内の前角細胞の変性脱落や gliosis を認め，spheroid の出現も認めたと報告している．我々の症例については，頚髄，腰髄レベルの脊髄前角細胞および脊髄前根の有髄神経線維について検索を行なったが，異常は認められなかった．一方，筋組織は，いわゆる筋原性変化を示しており，本症の病態として muscular dystrophy が考えられた．

本症は，性染色体劣性遺伝，肩甲上腕下腿型筋萎縮，早期よりの頚，肘，足の関節拘縮，心伝導系障害など特徴のある臨床症候を示す比較的稀な疾患であるが，これまで報告された脊髄の病理学的検索の結果から考察すると，単一の疾患としては考えにくいようにも思われる．本症には，いわゆる SPMA と dystrophy の2つの型があるようにもみえる．

Rowland[1]や古川[8]は，現在一般に用いられている神経原性，筋原性という区別にとらわれず，1つの臨床的特徴より本症をとらえることを唱えている．いずれにしろ，今後さらに，Emery-Dreifuss 型筋萎縮症の脊髄の詳細な検索の蓄積が望まれる．

ま と め

Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーの1剖検例を報告した．筋組織では，筋原性変化が主体で，脊髄前角細胞および脊髄前根有髄神経線維には，異常は認められなかった．脊髄病変の検索と本症の位置づけを中心に考察を加えた．

文 献

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

2）Thomas, P.K., Calne, D.B., et al: X-linked scapuloperoneal syndrome. J.Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 35: 208-215, 1972

3）Takahashi, K., et al: Scapuloperoneal dystrophy associated with neurogenic change. J. Neurol. Sci., 23: 575-583, 1974.

4）Dubowitz, U., Brooke, M.H., et al: Muscle Biopsy: A modern approach. Philadelphia, Saunders, 1973, p. 368-371.

5）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.

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

7）田辺等ら： Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーの1例．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，1985. pp55-59.

8）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.

21) 筋緊張性ジストロフィーの筋病理

高木昭夫*

研究協力者　小島　進*　磯崎英治*
井田雅祥*　田辺　等**

はじめに

筋緊張性ジストロフィー（以下MD）の筋組織化学については多くの報告があり[1)~5)]，通常はタイプ1萎縮とタイプ2肥大が指摘されている．しかし，その分布異常（主にgroupingとpredominance）に関しては議論がある．例えば，fiber type groupingに関して，Dubowitzら[2)]，Casanovas[3)]はMDにおいてはみられないとしているが，木下[5)]は40%の症例にみられたと報告している．またpredominanceに関しては，Dubowitzら[2)]は1/5にtype 1 predominanceを認めたとしているが木下[5)]は著しい場合は標本全体がタイプ2線維でほぼ占められていたとしている．

今回，我々はこれらの相違点につき再検討すると共に，年齢，筋力などの臨床所見との関連についても検討した．MDにおいて多数例における筋病理の定量的解析の報告は少なく，本症の病態を考える上でも重要と思われ報告する．

対象および方法

対象は1970年より1985年の16年間に当院で筋生検を施行した51家系59例70検体のうち，解析可能な42検体（34家系37例；　腓骨筋18，腓腹筋8，大腿四頭筋7，上腕二頭筋7，母指対立筋2）である．fiber typeの解析はATPase活性像で行ない，1検体につき最低200本以上の線維の最大短径を計測し[6)]，全検体のヒストグラムを作製した．

タイプ1，2の平均直径，タイプ1線維の占める割合（% type 1）と共に，groupingの一指標として，同一タイプの線維によって囲まれている線維"enclosed fiber"の数をヒストグラムを作製した同一の写真上で計測した．このenclosed fiberの概念はJennekensら[7)]によって導入され，Johnsonら[8)]により，筋線維が6角形であるとの仮定のもとその理論的期待値は

$$NP^7 \pm 2 \times \sqrt{NP^7\ (1-P^6)}$$

N：　計測した線維数，P：　ある線維がある fiber typeである確率

と算出できるとされている．

すなわち，enclosed fiberの数は，その線維の比率に依存するため，この理論的期待値と比較して，異常・正常の判定を行なった．

結　果

1）タイプ1，2線維の平均直径，比率及び臨床所見との対比

各筋におけるタイプ1，2の平均直径及びタイプ1線維の占める割合を図1，2に示す．斜線は，Johnsonら[8)]，Polgarら[9)]による17～30歳の6例の突然死男子の解剖例の検討における正常域（m±2 SD）である．異なる年齢，性の者を比較するのは不適当ではあるが，正常者としての広範な検討は他になされておらず，本研究においても対照正常域として用いた．

なおMD例の各筋における構成は，上腕二頭筋は男6，女1例で年齢40±10歳（m±SD），大腿四頭筋は男5，女2例，年齢37±10歳，腓骨筋は男11，女7例，年齢34±12歳，腓腹筋は男4，女4例，年齢33±12歳である．この他に拇指対立筋があるが男2例のみで年齢は34と11歳で，図示はしていない．% type 1は90，87%，タイプ1線維の

＊虎の門病院神経内科
＊＊東京都立神経病院

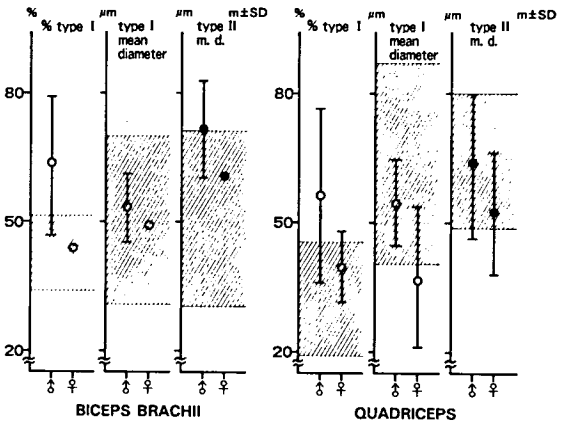


図1　上腕二頭筋，大腿四頭筋におけるタイプ1の%，タイプ1，2の平均直径

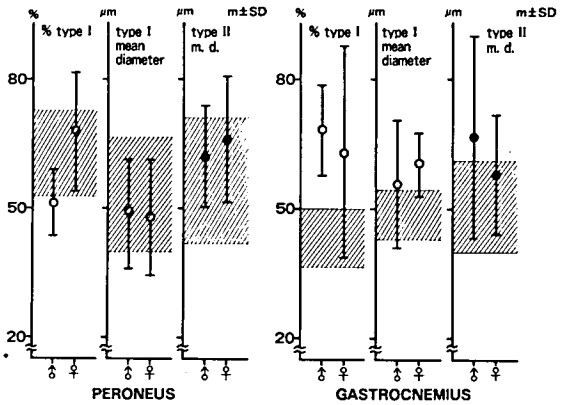


図2　腓骨筋，腓腹筋におけるタイプ1の%，タイプ1，2の平均直径

平均直径は49，44μ，タイプ2は61，62μであった．

図1は近位筋，図2は遠位筋を示す．腓腹筋の女性例群の他は全てタイプ1＜2の関係が成り立つが，その平均直径の絶対値としては正常域にあるものが多かった．又タイプ1優位を認めるものが多く，＋2 SD以上の優位を示したのは50%，逆にタイプ2優位は17%に認められた．

図3は，筋力，年齢との関連をみたもので一番検体の多い腓骨筋での検討結果である．筋力低下と共に筋線維の小径化がみられるが腓骨筋ではタイプ2線維の平均直径との間に相関がみられた．

年齢との検討ではタイプ1線維の平均直径としては，むしろ40歳台までは大となる傾向がみられた．一方，タイプ2線維では20歳台以降は小径化の傾向がみられた．

図4はタイプ1線維の占める割合と筋力，年齢との関連をみたものである．各々の筋において筋力低下と共に% type 1が大となる傾向を認めた．又，年齢との間にも加齢と共に% type 1は大となる傾向があった．

2）"enclosed fiber"に関する検討．

最初に通常の視認法における type grouping の有無の判定との関連をみた．図5に示すように enclosed fiber の数の異常との間には有意の関連がみられ，本法は type grouping の良い数量的指

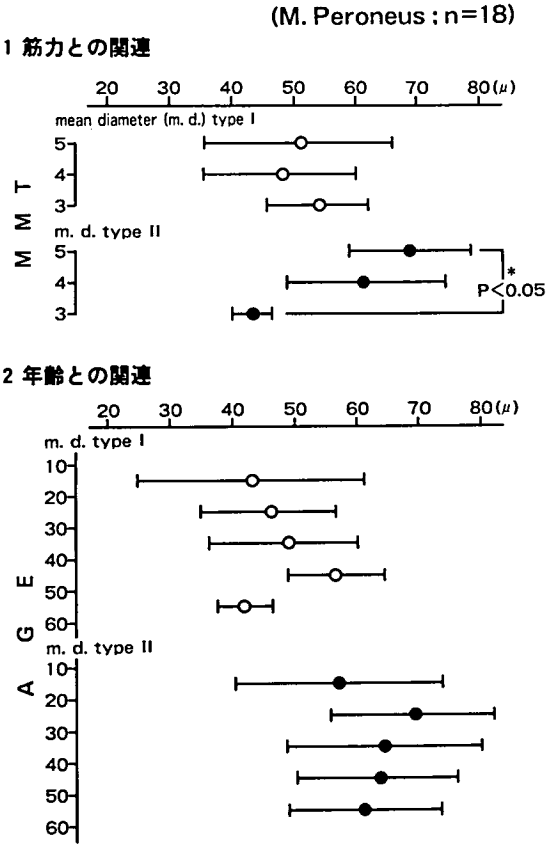


図3　タイプ1，2の平均直径と筋力(MMT)，年齢との関連．腓骨筋(n=18)における結果．

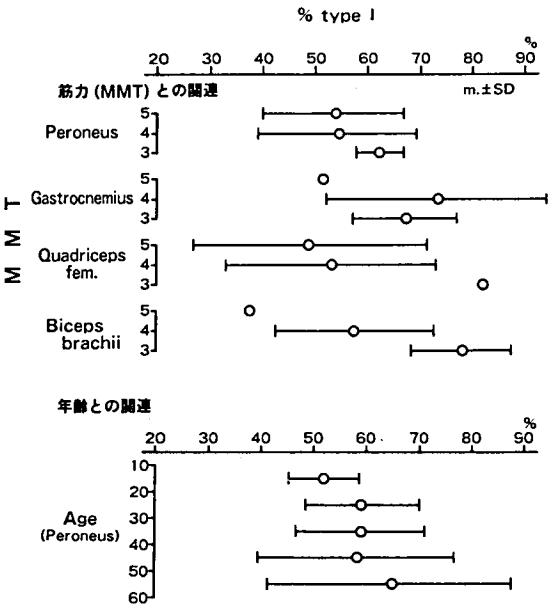


図4　% type 1 と筋力，年齢との関連筋力低下，加齢に伴い% type 1 が大となる傾向を示す．

1 視認法による Grouping の有無との相関

		enclosed f		
		↑ 異常	→ 正常	
Grouping	+	8	3	11
	−	6	25	31
		14	28	42

Fisher 直接確率法　P=0.002

2 被検筋による異常出現率

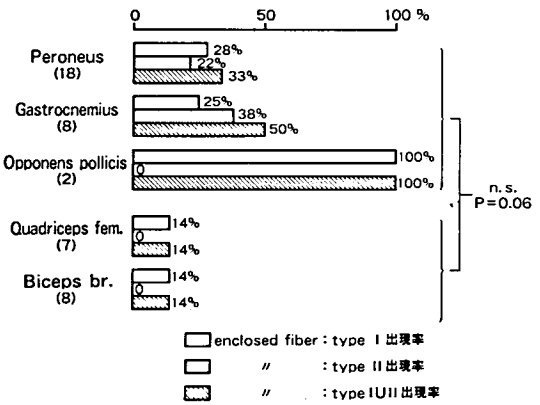
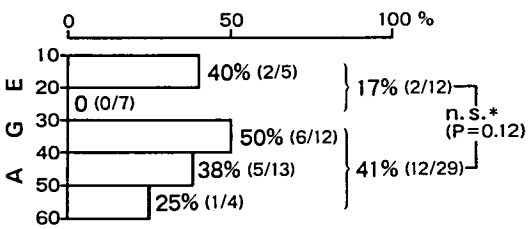
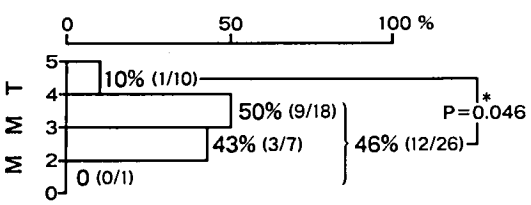


図5　"Enclosed fiber"に関する検討．視認法の grouping の有無との間に有意の相関を認める．被検筋における差では遠位筋に多い傾向がある．

3 年齢との関連



4 筋力との関連



＊Fisher 直接確率法

図6　"Enclosed fiber"の異常出現率．高齢者程，異常出現が高い傾向があるが有意ではない．筋力では低下した筋に有意に異常出現率が高い．

標になることが確認された．

次に被検筋による異常出現率をみたが，図5に示すように遠位筋に多い傾向があったが統計学的には有意とは言えなかった．

年齢，筋力との関連では図6に示すように高齢者及び筋力低下のみられる筋に多い傾向があったが，前者は統計学的に有意ではなかった．

次に筋生検の被検筋と同一の対側筋の筋電図における神経原性変化の有無と enclosed fiber の数の異常の有無との関連をみたが，両者の間に相関はなかった．また，ヒストグラム上，同一タイプ線維内における2峰性分布の有無と enclosed fiber の数の異常の有無との間にも関連はみられなかった．

考　　察

今回の我々の検討結果をまとめると，MD では従来いわれているタイプ2より1の方が小径であるという事実を，上腕二頭筋，大腿四頭筋，腓腹筋，腓骨筋および拇指対立筋で確認した．また，これらの筋でタイプ1優位の存在を明らかにした。腓骨筋では加齢とともにタイプ1の平均直径は増加して肥大化の傾向があり，同時にタイプ1優位となる傾向があった．fiber type grouping に関しては，enclosed fiber の計測の方法を用いて検討すると，全検査筋の約33%にみられ，遠位筋に，また筋力の低下している筋に多い傾向があった．しかし，必ずしも筋電図所見における神経原性変化やヒストグラム上の2峰性分布との間には相関を認めなかった．

MD において末梢神経障害を伴うことは古くから知られている[10)~13)]．もともと筋原性変化のあるところに神経原性変化が加わった時に筋電図上，典型的な神経原性変化はみられない可能性のあること[13)]，またヒストグラム上2峰性分布を示す時の小径線維群の一部分には fiber splitting 由来のものがある可能性のあること[5)]などから，enclosed fiber の数の異常と筋電図所見やヒストグラム上の2峰性分布などの所見の間に相関がみられないからといって，本症でみられる enclosed fiber の数の異常を reinnervation のためではないとはすぐには結論できない．

一方，Jennekens ら[7)]は enclosed fiber の数の異常，すなわち mosaic pattern の消失する可能性を reinnervation 以外に3つあげている．すなわち，①筋線維の発育途上のタイプ分化における異常(例えば，ある種の先天性ミオパチーなど)，②1つのタイプから他のタイプへの転換，③1つのタイプの線維が病的過程により選択的に消失する可能性，もしくはある病的過程がタイプ分化を阻害する可能性，の3つである．

本研究からは，②，③の2つの可能性は，reinnervation と共に否定できない．MD には甲状腺ホルモン異常をはじめとする内分泌異常，ミオトニアという特異な筋収縮パターン，筋力低下に基づく運動量減少，などの種々の要因があり，これらもあわせて解析していく必要があろう．

また，なぜタイプ1萎縮を主徴とする初期変化から病期の進行と共にタイプ1優位およびタイプ2のみならず1にも肥大線維が出現するのかに関しても今後の検討が必要と思われた．

ま　と　め

MD37例42検体の fiber type の定量的解析を行い以下の結果を得た．

(1) 上腕二頭筋，大腿四頭筋，腓腹筋，腓骨筋および拇指対立筋でタイプ1優位を認め，タイプ1線維はタイプ2線維に比し小径であった．

(2) 腓骨筋では，加齢と共にタイプ1線維の平均直径は増加し，タイプ1優位の傾向もやや強くなった．

(3) fiber type grouping の判定に“enclosed fiber”の概念の導入は有効と推論された．

(4) MD でみられた筋分化と筋タイプ分布異常の成因につき若干の考察を加えた．

文　　献

1) Brooke MH, Engel WK: The histologic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 3. Myotonias, myasthenia gravis and hypokalaemic periodic paralysis. Neurology (Minneapolis) 19: 469, 1969.

2) Dubowitz V, Brooke MH : Muscle biopsy : a modern approach. W B Saunders, Philadelphia 1973, p213.
3) Casanova G, Jerusalem F : Myopathology of myotonic dystrophy. a morphometric study. Acta Neuropathol (Berl) 45 : 231, 1979
4) 木下真男，里吉営二郎ほか： 筋緊張性ジストロフィー症の筋病理学的研究．臨床神経14：653, 1974
5) 木下真男： シンポジウムⅠ： 筋緊張性ジストロフィー症，4，筋緊張性ジストロフィー症の筋病理，臨床神経23： 1078, 1983
6) Dubowitz V, Brooke MH : Muscle biopsy ; a modern approach. W B Saunders, Philadelphia 1973, p98
7) Jennekens FGI, Tomlinson BE et al : Data on the distribution of fibre types in five human limb muscles ; an autopsy study. J Neurol Sci 14 : 245, 1971
8) Johnson MA, Polgar J et al : Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles ; an autopsy study. J Neurol Sci 18 : 111, 1973
9) Polgar J. Johnson MA et al : Data on fibre size in thirty-six human muscles ; an autopsy study. J Neurol Sci 19 : 307, 1973
10) Ziegler DK, Rogoff J : Rare variant of myotonia atrophia ; clinical and electromyographic study in a family. Brain 79 : 349, 1956
11) Kalyanaraman K, Smith BH et al : Evidence for neuropathy in myotonic dystrophy. Bull Los Angeles Neurol Soc 38 : 188, 1973
12) Olson ND, Jou MF et al : Peripheral neuropathy in myotonic dystrophy. Arch Neurol 35 : 741, 1978
13) Panayiotopoulos CP, Scarpalezos S : Dystrophia myotonica ; peripheral nerve involvement and pathogenetic implications. J Neurol Sci 27 : 1, 1976

22) 筋緊張性ジストロフィーにおける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*　吉田ひとみ*

筋緊張性ジストロフィー症(MD)は遺伝性の多臓器疾患であり，種々の内分泌代謝異常を伴う．しかし，hyperostosis等の骨病変が存在するにもかかわらず，本症におけるカルシウム(Ca)代謝に関する詳細な報告はほとんどない．我々は前回本研究班において，本症に副甲状腺機能異常の存在する可能性を示した[1]．そこで今回，MD患者にCa代謝試験を行ない，本疾患におけるCa代謝異常，特にCa吸収及びビタミンD代謝異常の有無を明らかにすることを目的とした．

対象並びに方法

MD10例(平均年齢42歳)，MD以外の神経筋疾患患者(非MD；　脊髄小脳変性症4例，パーキンソン病3例，筋萎縮性側索硬化症3例，重症筋無力症1例；　平均年齢48歳)，正常人9例(平均年齢38歳)を対象とし，Broadusら[2]の方法を一部改変し経口Ca負荷試験を行なった．すなわち，検査前3日間Ca700mg，リン1200mg，食塩5 g/日の一定食とし，一晩絶食後，Caとして総量1 g経口負荷前の2時間尿，負荷2～4時間後の尿を採取し，各中間点で採血した．1,25 (OH)$_2$ビタミンD_3 (1,25 (OH)$_2$ D_3)は高速液体クロマトグラフィー後RRAにより，又24, 25 (OH)$_2D_3$, 25 OHD_3はRIAにより測定した．

成　績

①Ca負荷前の検査所見：　血清Ca値はMD9.8±0.5mg/dl (M±SD)，非MD9.5±0.4，正常人9.4±0.5と有意差を認めなかった．血清無機リン値も3群間で差を認めなかった．1,25 (OH)$_2D_3$値は正常人21.8±7.0pg/ml，非MD21.8±12.0と差がなかったが，MDでは38.0±11.8と両者に比し有意に(P<0.01)高かった(図1)．一方，24, 25 (OH)$_2D_3$, 25OHD_3は，MD，非MD，正常人間で有意の差を認めなかった(図2)．空腹時尿中Ca排泄量は，MDでは

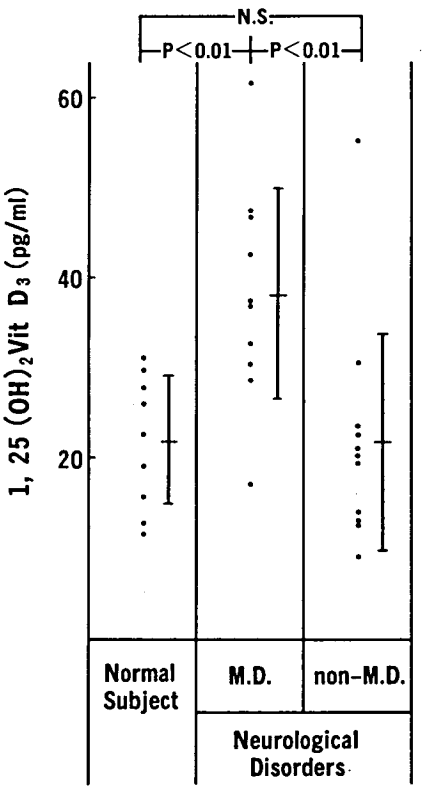


図1　血清1,25 (OH) $_2D_3$濃度
I：M±SD

*東邦大学第四内科

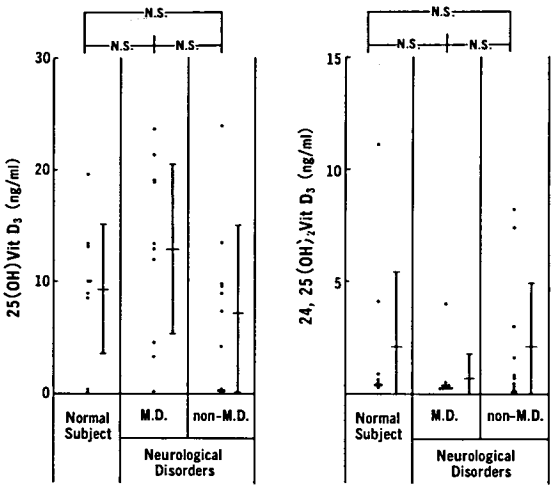


図2　血清25OHD$_3$及び24, 25 (OH) $_2$D$_3$ 濃度

I : M±SD

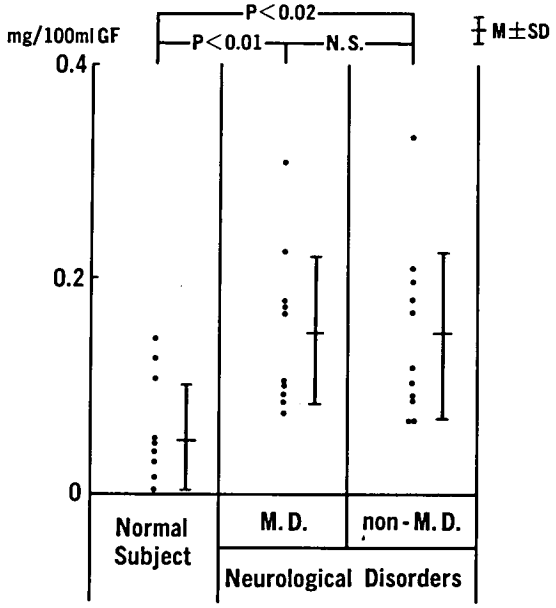


図3　早朝空腹時尿中カルシウム排泄量

0.151±0.069mg/100mlGF, 非MDでは0.147±0.077と各々正常人の0.064±0.048に比し有意に(P<0.02)高値であった(図3). ② Ca負荷後の検査所見: Ca負荷後の血清Ca増加量(calcemic response)は, MDでは1.1±0.2mg/dlと, 非MD, 正常人の0.5±0.3, 0.7±0.3に比し有意に(P<0.02)高かった(図4). Ca負荷後の尿中Ca排泄増加量(calciuric response)も, MDでは平均0.245±0.110mg/100mlGFと, 非MD, 正常人の0.108±0.074, 0.126±0.075に比し有意に(P<0.02)高値であった(図4). 1,25 (OH) $_2$D$_3$とcalcemic response P<0.02, 及びcalciuric response (P<0.05)との間には各々有意の正相関を認めた.

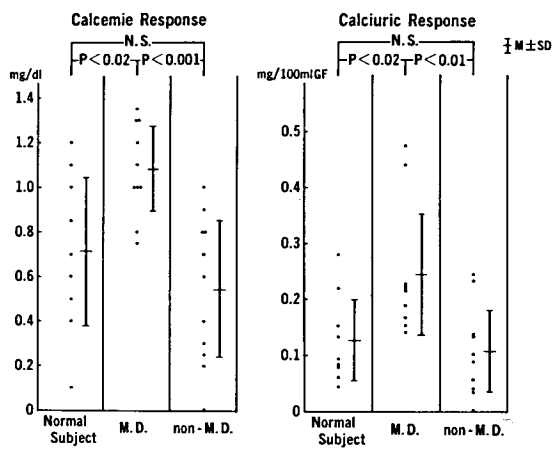


図4　Ca負荷後のCalcemic Response及びCalciuric Response

考　　按

MDにおけるCa代謝に関しては詳細な検討はほとんどなく, Kuhnら[3]の報告では血清Ca値に異常を認めなかった. 近年原田ら[4]はMDに副甲状腺機能亢進症を合併した2例を報告した. 又, Konagayaら[5]はMDに副甲状腺ホルモン負荷試験を施行し, 腎の反応性の異常を示唆した. しかしながら, 本症におけるCa代謝及びビタミンD代謝異常の詳細については, いまだ明らかになっていない.

今回の成績より, MDではCa負荷後のcalcemic response, 及びcalciuric responseは高値を示し, 腸管からのCa吸収が亢進しているものと考えられた. さらに血清1,25 (OH)$_2$D$_3$も増加し, calcemic response又はcalciuric responseとの

間には正の相関が認められた．このことから，MDでは血清1,25 $(OH)_2D_3$ の増加が，腸管からのCa吸収亢進の原因となっているものと考えられた．我々は前回本研究班で，MDでは副甲状腺ホルモンの生物活性の指標である腎原性cAMPが高値を示し，副甲状腺機能亢進状態にあることを示唆した[1]．副甲状腺ホルモンは，腎における1 α 水酸化酵素の活性を亢進させ，25OHD_3 から1,25 $(OH)_2D_3$への転換を促進させることが知られている．したがって，今回25OHD_3 はMDで正常であったことより，MDにおける1,25$(OH)_2D_3$ が増加していた原因として，1 α 水酸化酵素の活性亢進が予測される．

MD，非MDともに空腹時尿中Ca排泄量が正常人に比し増加していたが，MDでは副甲状腺機能亢進状態に伴う骨吸収の増加によるものと考えられる．一方非MDは長期臥床例の多かったこと及び腸管からのCa吸収，ビタミンD代謝産物は正常域であり副甲状腺機能の亢進は考えにくく，廃用性骨萎縮に伴う変化と考えられた．

結　　語

MDでは正常人，非MDに比し1,25 $(OH)_2D_3$ が高値を示し，腸管Ca吸収が増加していた．さらにMDでは尿中Ca排泄量が多く，骨吸収が亢進しているものと考えられた．以上の成績よりMDではCa吸収及びビタミンD代謝異常が存在するものと考えられた．

文　　献

1）木下真男，大島久二，斉藤栄造，勝島聡一郎：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．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年度報告書，1984，p63.

2）Broadus A.E., Mahaffy J.E., Bartter F.C., and Heer R.M.: Nephrogenous cyclic adenosine monophosphate as a parathyroid function test. J.Clin. Invest. 60：771，1977.

3）Kuhn E.: Endocrinologishe Unterschu bei myotonisher Dystrophie. Endokrinologie, 41：307，1961.

4）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.

5）Konagaya Y., Konagaya M., Mano Y., Takayanagi T., and Tomita A.: Evaluation of renal parathyroid hormone receptor function in myotonic dystrophy. J. Neurol. Sci. 70：339，1985.

IV. 再生・Glycerol Kinase 欠損・赤血球

23) 実験的再生筋における筋芽細胞増殖促進因子について

高 瀬 貞 夫*

研究協力者　小 林 和 夫*　鈴 木 博 義*　関 沢　剛*

はじめに

筋損傷時にみられる筋再生は損傷筋筋線維より，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．そこで我々は筋に損傷を加えた後に損傷部の筋を経時的に採取し，採取筋のホモジナイズ液を培養液に加え，培養筋芽細胞の増殖態度について検討した．その結果損傷筋ホモジナイズ上清液中に培養筋芽細胞を著明に増殖させる因子，即ち筋芽細胞増殖促進因子（MPF）の存在を確認したので報告する．

材料と方法

(1) 筋芽細胞の培養

培養細胞として，ラット由来の筋芽細胞L 6（Flow Laboratories Inc.）を用い，15mm径のプラスチックマルチウエルに4～6×10^4個/dishの細胞濃度で培養した．培養液（ダルベッコMEMに牛胎児血清；　1％，ペニシリン；　10単位/ml，ストレプトマイシン；　10μg/mlを加えたもの）で24時間培養し，その後種々の濃度の筋ホモジナイズ上清液（SMH）を添加した培養液（ダルベッコMEMに牛胎児血清；　0.25％，ペニシリン；　2.5単位/ml，ストレプトマイシン；　2.5μg/mlを加えたもの）に取りかえた．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，37～38°Cでおこなった．

(2) 培養筋芽細胞における増殖性の測定

培養細胞数の測定は，培養細胞の増殖曲線[1]（59年本班会議報告）より，SMHを添加し4日後又は連日行なった．測定法は培養細胞を0.25％トリプシン処理にて細胞浮遊液を作製し，血球計算盤にて測定し細胞数（×10^4個/dish）を算出した．各値は3検体の平均をもって表わした．

(3) 筋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菌的に露出し，約5 mmの横切開を5～6回加えた後縫合，その後1，6，12時間，1，2，3，7日後に損傷部筋を採取した．採取筋を細切し25w％になるようにダルベッコMEMを加え筋をホモジナイズした．さらに凍結融解を3回くり返した後に，18000×gにて30分間遠心し，上清を0.45μフィルターで沪過したものを筋ホモジナイズ上清液（SMH）として用いた．対照（sham operated control）として皮膚切開を行ない，筋に損傷を加えないものを用いた．

結　　果

(1) 筋切創を加えた後に，経時的に採取した損傷部筋の筋芽細胞増殖性

筋に切創を加えた後に経時的に採取した損傷筋SMHを培養液に加え，培養4日目の筋芽細胞数を算出すると，（図1，表1），損傷後1時間のSMHでは，非損傷筋と比べ増殖は目立たない．しかし損傷後6時間でのSMHでは増殖は明らかとなり（3.1％損傷筋；　19.3±0.5，3.1％非損傷筋；　4.3±1.5）損傷12時間後の筋では最も著しく増加した（3.1％損傷筋；　31.2±4.4，3.1％非損傷筋；　4.3±1.5）．損傷3日以後の損傷筋

＊東北大学医学部脳研神経内科

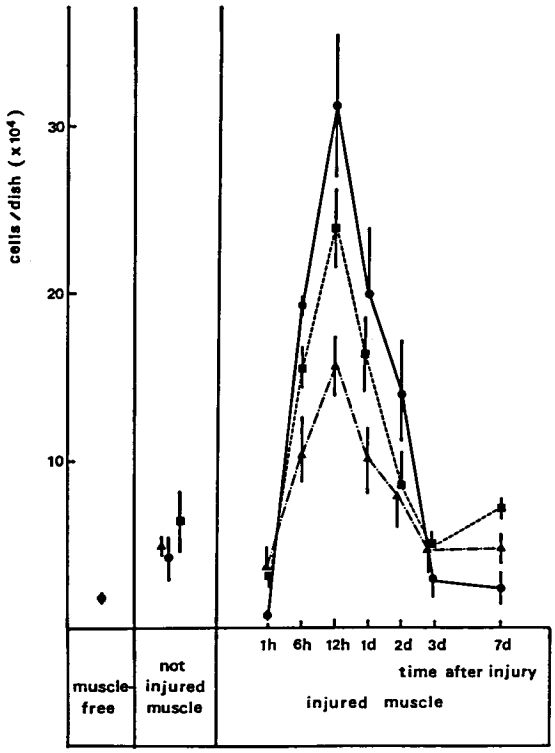


図1　経時的に採取した損傷筋および非損傷筋の筋芽細胞増殖性．種々の濃度の筋ホモジナイズ上清液(3.1%；●——●，1.6%；■-----■，0.8%；▲---▲）を添加し，4日間培養後筋芽細胞数を算出した．

表1　経時的に採取した損傷筋および非損傷筋の筋芽細胞増殖性．

HM(%)	myoblast proliferation (cells x10⁴/dish)								
	injured muscle time after injury							muscle-free	not injured muscle
	1h	6h	12h	1d	2d	3d	7d		
3.1%	0.7 ±0.2	19.3 ±0.5	31.2 ±4.4	20.0 ±3.9	14.2 ±1.5	2.8 ±1.1	2.3 ±1.2	-	4.3 ±1.5
1.6%	2.8 ±0.2	15.7 ±1.3	23.9 ±2.4	16.3 ±2.2	8.5 ±2.1	4.9 ±0.9	7.2 ±0.7	-	6.3 ±1.8
0.8%	3.7 ±1.2	10.8 ±1.0	15.7 ±1.8	10.0 ±2.0	7.9 ±1.9	5.7 ±1.4	4.7 ±0.9	-	4.9 ±0.6
0%	-	-	-	-	-	-	-	1.8 ±0.4	-

HM;homogenized muscle, h;hour, d;day

SMH では，非損傷筋のそれとの差異はみられなくなる．種々の濃度(0.8%, 1.6%, 3.1%)で SMH を加え，筋芽細胞の増殖をみたが同様の分布であった．

3.1%損傷筋 SMH 添加による経時的な筋芽細胞増殖性について，対照（sham control）と比較した(図２)．損傷筋では損傷12時間後で最も著しく増加し（22.3±1.4，対照； 4.8±0.2)，再現性のある結果が得られた．一方対照は筋採取までの期間による明らかな増減はみられなかった．

(2) 筋ホモジナイズ上清液の濃度と筋芽細胞増殖性

損傷12時間後の SMH を種々の濃度で培養液に加え，筋芽細胞の増殖を検討した(図３)．損傷筋では添加濃度に比例して筋芽細胞が増殖し，添加濃度が3.1～6.2%において細胞数は一定～軽度減少傾向となる．一方対照（sham control）では添加濃度に関係なく細胞は増加しなかった．

(3) 筋ホモジナイズ上清液の筋芽細胞増殖性における経時的変化

損傷12時間後の1.6% SMH を添加し，その後培養液をとりかえることなしに連続培養し，その間連日，７日間細胞数を測定した(図４)．培養24時間後では損傷筋は sham control と差はみられない．しかし培養２～６日後では細胞数は control に比し有意に増加した．培養７日後では細胞数は減少し，対照との差も少なくなる．これは培養期間の長期化と，細胞数の増加により，培養液の栄養が不充分になったためと考えられた．

(4) 非損傷筋の筋芽細胞増殖性

種々の濃度における非損傷筋（皮膚，筋ともに損傷を加えないもの）の筋芽細胞増殖性をみると（図１，表１)，3.1% SMH で4.3±1.5，1.6% SMH で6.3±1.8，0.8% SMH で4.9±0.6であっ

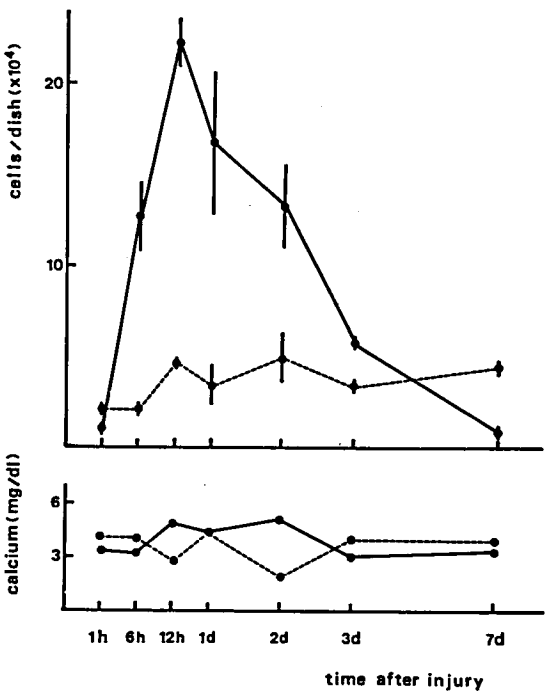


図２　経時的に採取した損傷筋の筋芽細胞増殖性およびカルシウム濃度．3.1%筋ホモジナイズ上清液を添加し，４日間培養後筋芽細胞数を算出した．●——●；損傷筋，●------●；sham operated control.

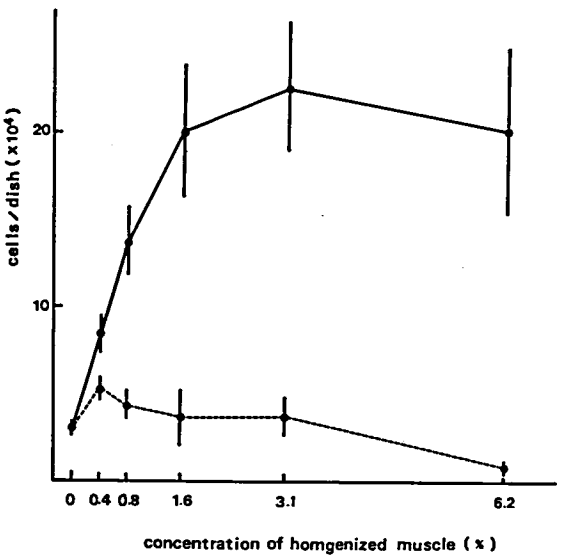


図３　種々の濃度の筋ホモジナイズ上清液における筋芽細胞の増殖性．損傷12時間後の筋ホモジナイズ上清液を添加し，４日間培養後筋芽細胞数を算出した．●——●；損傷筋，●------●；sham operated control.

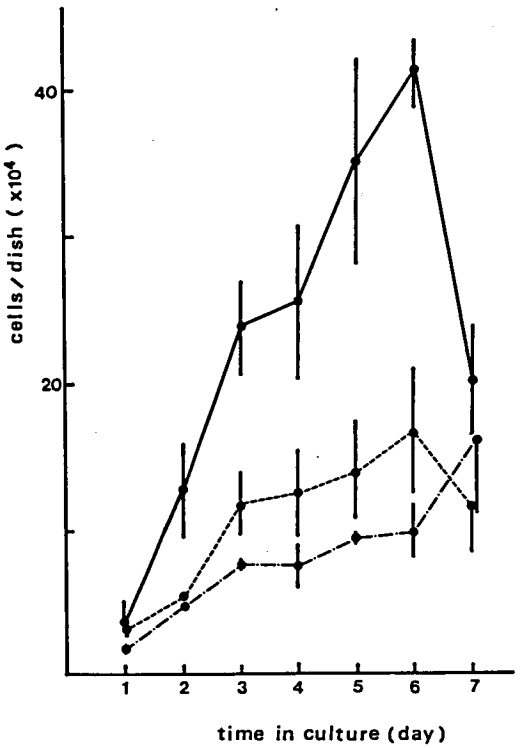


図4　筋ホモジナイズ上清液の筋芽細胞増殖性における経時的変化．損傷12時間後の1.6%筋ホモジナイズ上清液を添加し，連日筋芽細胞数を算出した．●——● ；損傷筋，●------● ；sham operated control，●——● ；筋非添加群．

た．一方筋組織を加えない群は1.8±0.4であり，非損傷筋群は軽度ながら有意に増加していた．

sham control 群と筋を添加しない群を比較すると，sham control は培養3～6日目で筋非添加群に比し，筋芽細胞の有意の増加をみとめた（図4）．

(5)　損傷筋のカルシウム濃度と筋芽細胞増殖性

経時的に採取した損傷筋 SMH (25%) のカルシウム濃度を OCPC 法にて測定したところ，対照（sham control）との差はみられなかった（図2）．損傷筋の筋芽細胞増殖に対応するカルシウム濃度の増加もみられず，カルシウム濃度は損傷から採取までの期間に関係せずほぼ一定していた（3.0～5.1mg/dl）．

考　　察

近年，筋芽細胞の増殖促進作用をもつ物質として，ソマトメジン類（somatomedin A, C, multiplication-stimulating activity）[2]，牛下垂体及び脳からの fibroblast growth factor，トランスフェリンが明らかにされた．又筋芽細胞の融合を促進する物質として，インスリン，リノレン酸，オレイン酸塩が知られてきた．しかしながら筋の損傷過程において，どのような物質が再生を引きおこすかは未だ不明である．

Engel は筋の変性再生過程において，組織化学的見地から変性と再生の性質を同時に示す筋線維が出現する事より，変性を引きおこすとされているカルシウムが，同時に再生の引き金になるであろうと推定している[3]．しかし本実験においては，損傷筋中のカルシウム濃度と筋芽細胞の増殖との関連性はみられなかった．

筋の損傷再生過程の病理組織学的変化について，我々の結果[4]（57年度本班会議報告）では，損傷5時間後より多核白血球が出現，損傷12時間後にマクロファージを含む単核球の細胞浸潤がみられる．24時間後には myoblast と思われる細胞が出現し，3～5日後には RNA 染色にて強陽性を示す再生線維が出現してくる．今回の実験では，すでに損傷6時間後の筋組織中に，筋芽細胞を著しく増加させる物質（筋芽細胞増殖促進因子；　MPF）が出現し，損傷12時間後に MPF の活性が最も増強する．組織学的に再生線維が出現する損傷3日後には，MPF の活性は非損傷筋と同程度に低下してしまう事がわかった．

又損傷筋における筋芽細胞の増殖は，非損傷筋の4.6～7.3倍（損傷12時間後筋の場合）と著明であった．一方非損傷筋群の筋芽細胞の増殖は筋を添加しない群に比し，軽度ながら有意に増加していた（図1，4）．これらの事より非損傷筋にも軽度の筋芽細胞増殖促進作用が存在しており，MPF は筋の損傷にともない損傷筋あるいは他の組織から一層著明に産生されるのであろうと考えられた．

今後さらに MPF の物理，化学的性質について検討してゆきたい．

ま と め

筋損傷後経時的に採取した筋のホモジナイズ上清液（SMH）を作製し，SMHにおける培養筋芽細胞の増殖促解作用について検討した．

(1) 損傷12時間後のSMHは，筋芽細胞の増殖を最も著しく（23.3±1.4，対照； 4.8±0.2）促進し，損傷3日以後には非損傷筋との差は目立たなくなる．

(2) 損傷筋SMHの濃度に依存して筋芽細胞の増殖が促進された．

(3) 非損傷筋SMHにも軽度ながら筋芽細胞増殖作用をみとめた．

(4) 損傷筋中のカルシウム濃度と筋芽細胞の増殖との相関性はみられなかった．

以上より受傷後6時間から3日以内の筋組織中に筋芽細胞増殖促進因子の存在する事が明らかにされた．

文 献

1）高瀬貞夫，小林和夫，ほか； 実験的再生筋における筋芽細胞増殖因子の研究，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，1985，p258.

2）Ewton, D.Z. and Florini, J,R. : Relative effects of the somatomedins, multiplication-stimulating activity, and growth hormone on myoblasts and myotubes in culture. Endocrinology, 106 : 577-583, 1980.

3）Engel, W.K. : Muscle Fiber Regeneration in Human Neuromuscular Disease, in Muscle Regeneration, edited by A. Mauro et al., Raven Press, New York, 1979, p285.

4）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，p48.

24) 筋再生に関する実験的研究
腱切断と筋壊死後の再生について

福 原 信 義*

研究協力者　新 田 永 俊*　高 守 正 治*

はじめに

骨格筋の腱切断後，4～5日目よりcore-targetoid fiberの出現することが知られ，その発生機序として切断後の筋壊死，再生現象が関与する[1]とされているものの，詳細は不明である．一方，骨格筋に選択的に毒性を示す塩酸bupivacaineで筋肉を処理すると，筋のよい再生像をつくりうる[2)3)]．今回，変性及び再生筋の同定に有用なacridine orange染色[4]を中心に，腱切断後の筋線維と塩酸bupivacaineによる壊死後の筋線維を経時的に比較検討したところ，両者には異なった再生の機序が作用していると考えられたので報告する．

方　法

ハロセン麻酔下にWistar系ラット（体重200g）の1側長趾伸筋（E.D.L.），ヒラメ筋（Soleus）を露出し，0.5%塩酸bupivacaine 0.5mlを27G注射器で直接筋肉内に注入した．対照として対側に生食0.5mlを同じように注入した．処置後1週ごとに8週までE.D.L.Soleusを取り出し，ドライアイスにて冷却したアセトンで直ちに凍結させクリオスタットで10μmの切片を作製した．

腱切断群では同じくラットの1側アキレス腱を露出しその遠位部を約2 mm切除し，十分筋が収縮したことを確かめた．対側筋を対照として処置後4，7，11，14，21日目の下腿三頭筋を取り出し同様にして凍結切片を作製した．各々の切片にhematoxylin and eosin (H.E.), modified Gomori trichrome, NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR), periodic acid schiff (PAS) ,adenosine triphosphatase (ATPase) pH9.4, 4.6, 4.2, acridine orange染色[4]を行ない光顕的に観察した．

筋再生のパラメーターとしてbasophilia，中心核，fiber splitting, type 2C fiber，筋線維直径，acridine orange陽性線維に注目し，筋線維200本中，各々の所見を認める筋線維数を数えた．acridine orange染色ではRNAの存在を示すオレンジの色素を殆ど認めないものを(－)，筋線維周囲にのみ認めるものを(＋)，周囲から内部にまで入りこんでいるものを(＋＋)筋線維全体に認められるものを(＋＋)として半定量的に検討した．

結　果

1．塩酸bupivacaine処置群

処置後1週目のE.D.L.ではbasophilia，筋の大小不同，中心核，細胞浸潤が認められ，筋線維の変性・再生が著明で（図1），NADH-TR染色ではfiber typeの判別が困難であった．ATPase染色ではtype 2C fiberがE.D.L.で40%，Soleusで70%を占めていた．Acridine orange染色では筋直径が小さく線維全体がオレンジに染まる(＋＋＋)のものが多く，一部では正常と思われる線維も残存していた（図2）．

このような変化はSoleusにも認められ，時間の経過とともに変化は軽微となりbasophilia，type 2C fiberは2週まで，acridine orange陽性線維は3～4週まで存在し，中心核，fiber splittingはほぼ全経過を通じて8週まで認められた．SoleusではE.D.L.よりも再生過程が若干遅れる傾向にあった（図3）．

*金沢大学医学部神経内科

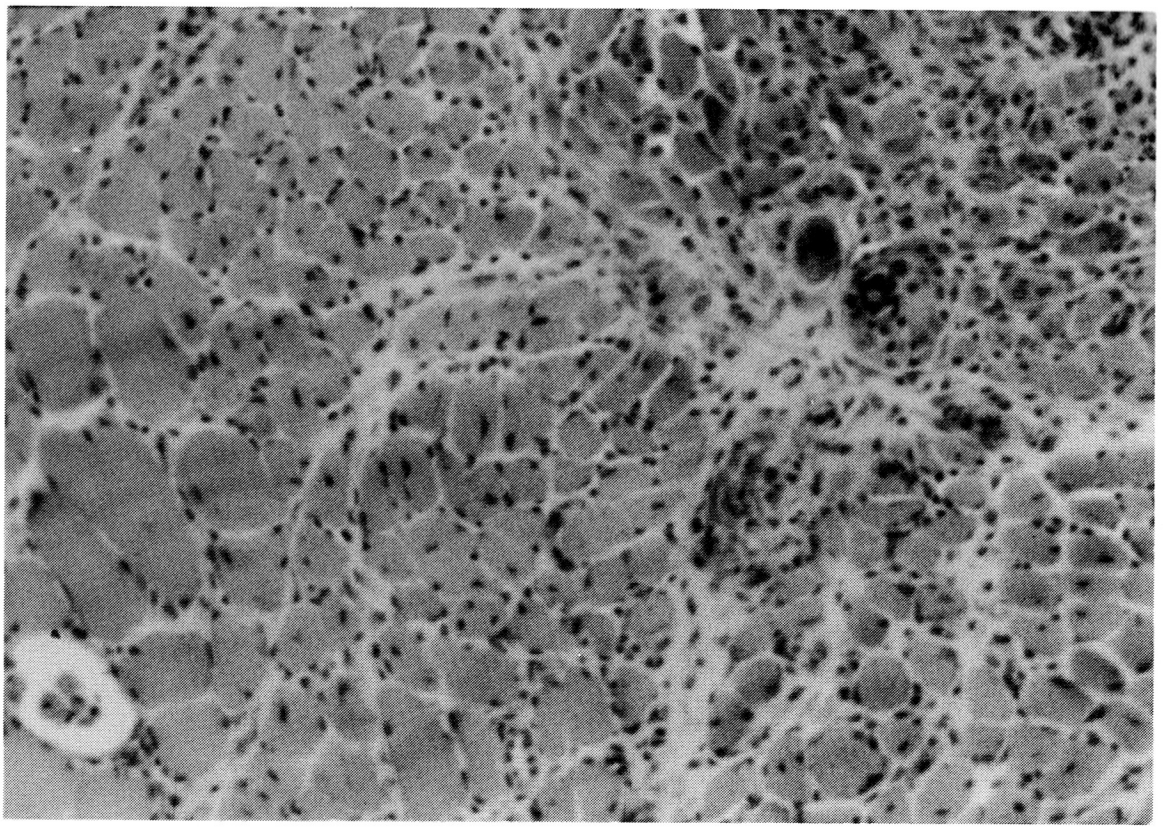


図 1　Cross section of the E.D.L. muscle 1 week after bupivacaine treatment.
In this section, phagocytosis, cell infiltration, and fiber size variation can be seen. Some muscle fiber nuclei are located centrally. Hematoxyline and eosin stbin. ×50

図 2　Cross section of the E.D.L. muscle 1 week after bupivacaine treatment.
Many small muscle fibers have strong orange fluorescence throughout the cytoplasm and yellow-green central nuclei.
Acridine orange stain. ×56

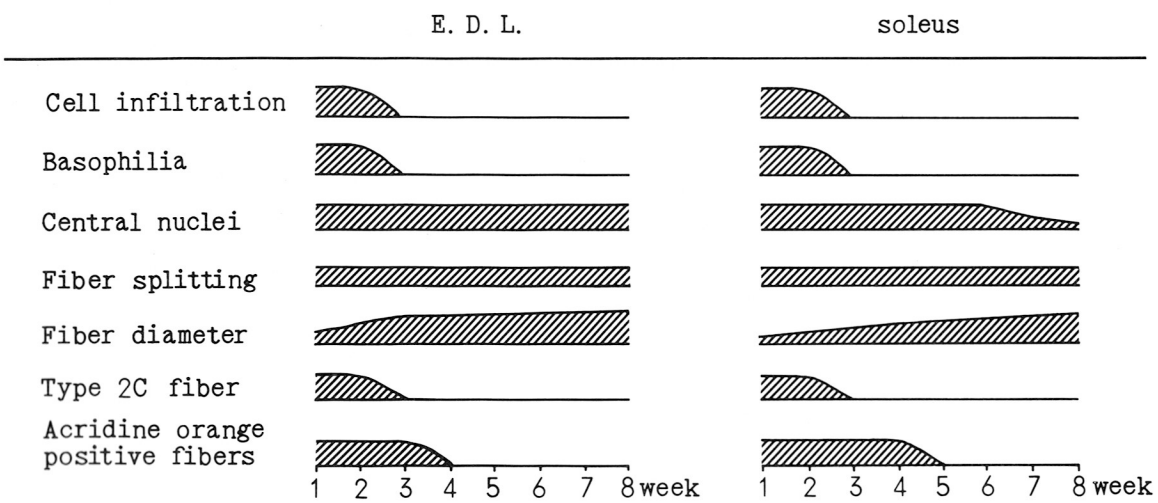


図 3　Histochemical changes in E.D.L. and soleus muscle after bupivacaine treatment.

対照側ではbasophilia，筋の大小不同，fiber splittingは認めず，中心核は1％以下で，type 2 C fiberは約6％に認められた．acridine orange染色ではSoleusで（＋＋＋）0％，（＋＋）12％，（＋）70％，（－）18％，E.D.L.では（＋＋＋）0％，（＋＋）8％，（＋）30％，（－）62％となりSoleusでやや強い染色性を示した．

2．腱切断群

処置後4日目ですでにNADH-TR染色に染まらないリボン状あるいは境界不鮮明な円形の部分を持つ筋線維が出現し，この部分はPAS，ATPase染色にも染まらず，moth-eaten fiberおよびtargetoid fiberと考えられた（図4）．一方acridine orange染色では一部にリボン状の螢光が見えるものの，殆どの筋線維では対照との染色性の違いは見い出せなかった（図4）．このほか細胞浸潤や筋の大小不同，中心核も認められたが，いずれも塩酸bupivacaine処置群に比して変化は少なく，処置後11日以内に対照と大差なくなった（図5）．

対照側ではmoth-eaten fiberおよびtargetoid fiberは認められず，acridine orange染色では塩酸bupivacaine処置群の対照側と同じ染色性を示した．

考　　察

今回の塩酸bupivacaine処置後にみられた筋再生現象は今までの報告[5]とほぼ一致している．acridine orangeはDNAと結合してyellow-greenの螢光を発し，RNAと結合してorangeの

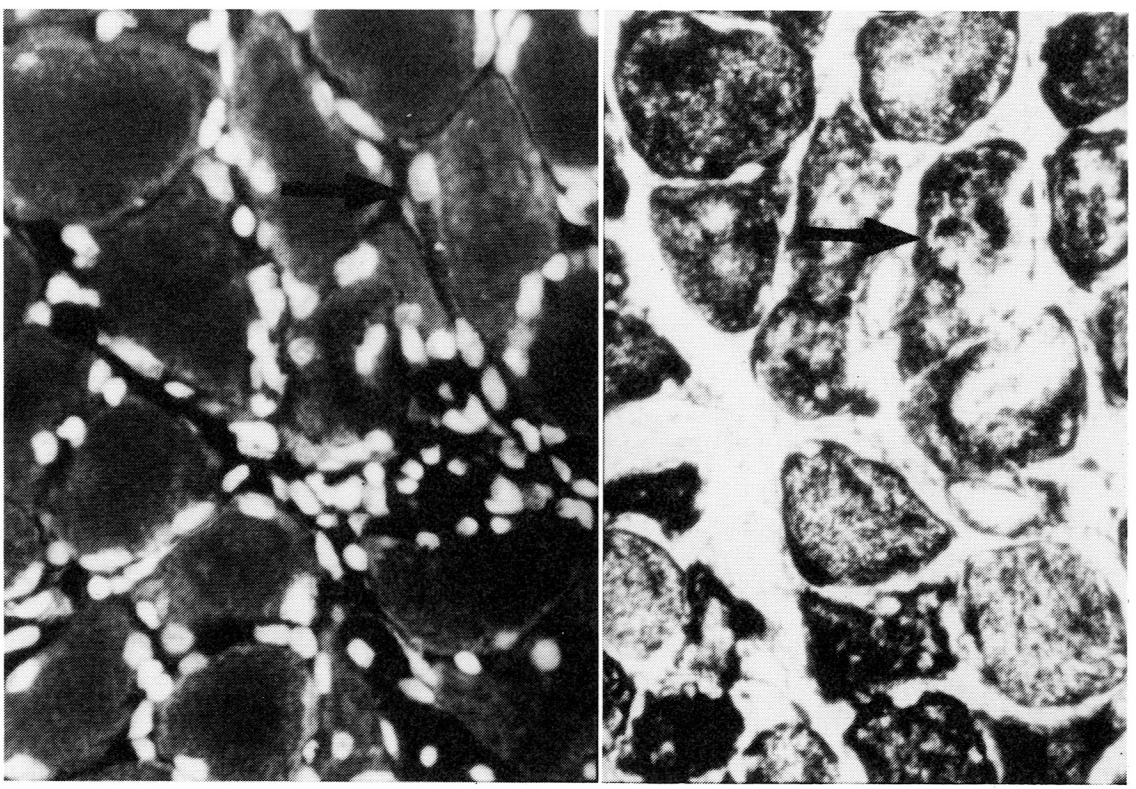


図4　Serial cross section of the soleus muscle 4 days after tenotomy.
Right : Moth-eaten (arrow) and targetoid fibers. NADH-TR stain. ×88
Left : Some fibers are stained positively (arrow) ,but most of others are not. Acridine orange stain. ×110

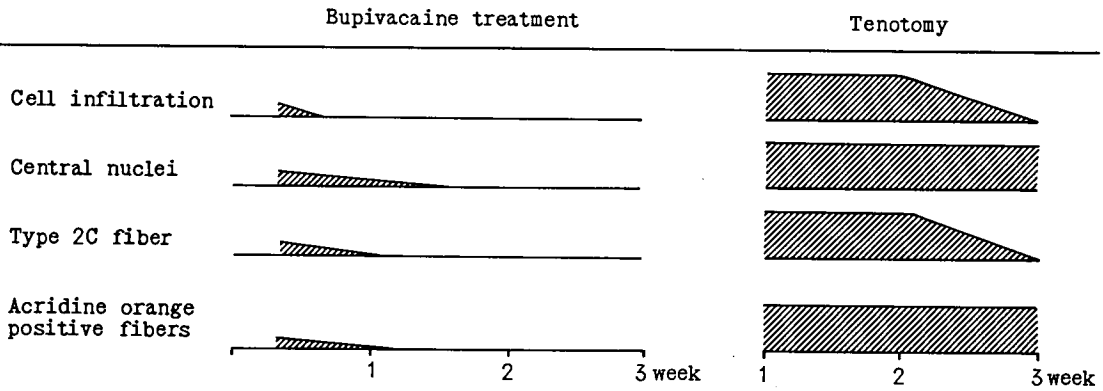


図5　Histochemical changes in soleus muscle in bupivacaine treatment and tenotomy.

螢光を発することから，この染色により未熟，変性，再生筋線維の同定が容易となる[4]．我々の半定量的検討では従来までの1週目よりも長く変化が認められ，筋再生現象を見るには中心核の存在と並んでacridine orange陽性線維の存在がよい指標になると考えられた．

塩酸bupivacaineは選択的に筋線維細胞膜[6]および筋小胞体[7]を障害することからCaイオンを介した筋線維壊死がおきてくる[8]と推定されているが，同様の細胞膜の変化は腱切断後の筋線維にも認められており[9][10]，壊死後筋線維の周辺部より筋原線維の再生が生ずる[11]ため形態学的にcore-targetoid fiberが生ずると考えられる．今回，塩酸bupivacaine処置群に比して腱切断後の再生筋では各々のパラメーターの変化が軽く，特にacridine orange染色では再生に伴なう変化を認めなかったことより，両者の筋再生には異なった機序（例えばsatellite cellの増殖を介さない筋線維構成蛋白の再構築など）が考えられる．

結　論

1．WistarラットのE.D.L. Soleusを用い，腱切断後と塩酸bupivacaine処置後の筋再生現象を，acridine orange染色を中心に経時的に比較検討した．

2．塩酸bupivacaine処置筋においてacridine orange陽性線維は中心核と並んで再生のよい指標となった．

3．腱切断後の筋線維変化は塩酸bupivacaine処置筋よりも軽く，core-targetoid fiberはacridine orange染色で染まらなかった．

4．両者の筋再生には異なった機序が働いていると考えられた．

文　献

1）Baker, J.H., Hall-Craggs, E.C.B.: Recovery from central core degeneration of the tenotomized rat soleus muscle. Muscle & Nerve, 3: 151-159, 1980.

2）Sokoll, M.D., Sonesson, B., Thesleff, S.: Denervation changes produced in an innervated skeletal muscle by long-continued treatment with a local anesthetic. Europ. J. Pharmacol., 4: 179-187, 1968.

3）Benoit, P.W., Belt, W.D.: Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine (Marcaine). J.Anat., 107: 547-556, 1970.

4）Perl, D.P., Little, B.W.: Acridine orange-nucleic acid fluorescence: its use in routine diagnostic muscle biopsies. Arch. Neurol., 37: 641-644, 1980.

5）埜中征哉，小林繁一，岡田理美：骨格筋の再生に関する組織化学的研究．厚生省神経疾患研究委託費（三好班），昭和56年度研究報告書，15-19，1982.

6) Jirmanová, I., Thesleff, S.: Ultrastructural study of experimental muscle degeneration and regeneration in the adult rat. Z. Zellforsch., 131 : 77-97, 1972.

7) 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.

8) Hall-Craggs, E.C.B.: Early ultrastructural changes in skeletal muscle exposed to the local anesthetic bupivacaine (Marcaine). Br. J. Exp. Path., 61 : 139-149, 1980.

9) Baker, J.H., Baldwin, K,M.: Changes in membrane structure following tenotomy of the rat soleus muscle. Muscle & Nerve, 5 : 222-225, 1982.

10) Wróblewski, R., Edström, L.: Changes in elemental composition of single muscle fibers following tenotomy of the rat soleus muscle. Muscle & Nerve, 6 : 490-496, 1983.

11) Baker, J.H.: Segmental necrosis in tenotomized muscle fibers, Muscle & Nerve. 6 : 29-39, 1983.

25) ジストロフィー筋の再生と種々の萎縮筋中の遊離アミノ酸の変動

寺 尾 寿 夫*

研究協力者　高 津 成 美* 平 口 峰 子*
加 藤 洋 司* 永 井 由紀子*

はじめに

骨格筋の移植後に起こる筋の再生がジストロフィー筋と正常筋で如何に異なるかを明らかにすることは，ジストロフィー症の成因を解明する上にも，また治療上にも重要と考えられる．我々は昨年ジストロフィーハムスターと正常ハムスターの間に骨格筋の交換移植を行い，それぞれの筋がhostを交換した場合再生がどの様に変化するかを報告した[1]．またジストロフィーマウスの長指伸筋（EDL）をヌードマウスに移植してその再生についてのpreliminaryの報告を行った．今回はまずこの問題に関して動物数を増して研究を続けた結果を報告する．またこれとは別に筋の崩壊時または筋の発育，再生時に筋中の遊離アミノ酸が如何に変化するかを調べたのでその結果についても述べる．

○ジストロフィーマウス（mdxマウス）のEDLのヌードマウスへの移植

方　法

筋の移植法は生後2ヶ月目のmdxマウスのEDLを取り出し，これをやはり生後約2ヶ月のヌードマウスの一側のEDLを取り去った場所にはめ込む形で移植した．同一ヌードマウスの他側下肢には同様にコントロールマウス（C57BL/10cs）のEDLを移植した．この際graftのEDLの近位端は単に固定したが遠位端はヌードマウスのEDLの残存する腱に縫合した．

ヌードマウスは移植後1，2，4，6ヶ月後にsacrificeしてgraftを取り出し直ちに横断凍結切片を作製してH-E染色後，再生筋線維の数，直径を測定し，また直径のvariability coefficientを計算した．これらの測定にはKontronを使用した．なお再生筋は摘出後上下の2部分に分けその各々についての測定を行い平均を求めた．またvariability coefficientは次の式によって計算した．

$$\text{variability coefficient}=\frac{\text{standard deviation}\times 1000}{\text{mean fiber diameter}}$$

結果および考察

1）再生筋線維の数

図1は移植後1，2，4，6ヶ月のすべての再生筋中の再生筋線維の数を示したものである．これにみる如く1ヶ月から4ヶ月までの期間で再生筋線維の数は，mdxのEDLの再生筋の方がコントロールの再生筋中の数よりも常に多かった．但し4ヶ月目には両者はかなり接近し，また6ヶ月

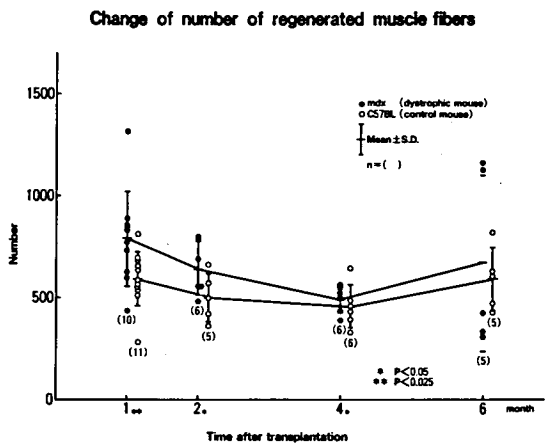


図1

*帝京大学第一内科

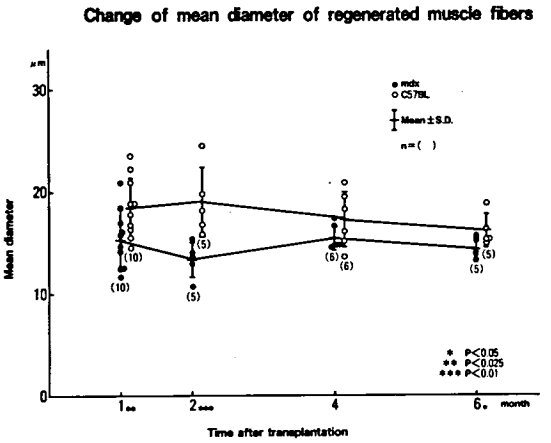


図 2

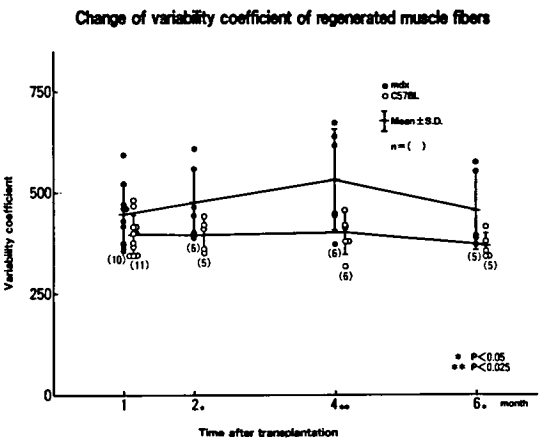


図 3

目では mdx マウスの値はばらつきが多く有意差はなかった.

2）再生筋線維の直径

再生筋線維の直径は図 2 に示す如く mdx の再生筋が有意に小さかった.

3）再生筋線維の直径の変動係数 variability coefficient (V.C.)

再生筋線維の直径のばらつきを示す変動係数は図 3 の様に移植後 6 ヶ月までの全期間に亘って mdx の再生筋が大きかった.

なお，個々のヌードマウス毎に mdx と C57BL の EDL の再生筋線維の数，直径，変動係数の比を mdx/C57BL で求めてみると，数の比は 1 より大きく，直径の比は 1 より小さく，また変動係数の比は 1 より大きかった.

以上の特徴は移植後のジストロフィーの EDL も同様に有しており，その特徴は再生後の筋にも受けつがれていることが明らかとなった.

○筋変性時および筋再生時の筋肉内遊離アミノ酸の変化

骨格筋は他の組織とは異った独特の遊離アミノ酸プールを有しており，taurine, glutamine, glycine, alanine, carnosine が含量の多い方から 5 種類のアミノ酸である．これはヒトでも大体同じである．我々は筋の種々の原因による崩壊時および発育再生時につき検討した.

方　法

動物はネンブタール麻酔後，心より瀉血して sacrifice し，直ちに筋を取り出し homogenize し，過塩素酸にて除蛋白した．この除蛋白沪液につき日立アミノ酸自動分析機によりアミノ酸濃度を測定した.

結　果

1）種々の筋萎縮時の遊離アミノ酸の変化

(1)ジストロフィーハムスター B10 14.6

B10 14.6とコントロールハムスターの Quardriceps で遊離アミノ酸を比べるとその差は大体以下の 4 つに要約できる.

(a)ジストロフィー筋では glycine 減少が著明.

(b)同様に β-alanine の減少が著しい．なお β-alanine は筋中に多い dipeptide である anserine や carnosine の構成成分である.

(c) glutamic acid が増加する.

(d) taurine が有意に増加する.

taurine は筋中にもっとも多く含まれるニンヒドリン陽性物質である.

(2)ジストロフィーハムスター UM-X7.1.

B10 14.6と同一の変化がみられるが，この場合は glutamic acid の増加ではなく glutamine が有意に増加していた.

(3) mdx マウス

生後 2 ヶ月の mdx マウスの Quadriceps の遊離アミノ酸を C57BL/10cs のそれと比較すると，

ジストロフィーハムスター B10 14.6にみられる特徴と同様の傾向がみられた．

次に人工的に作った筋萎縮について述べる．

(4)クロロキンミオパチー

クロロキン25mg/kg を毎日ハムスターの腹腔内に2週間注射した後に Quadriceps 中の遊離アミノ酸の変化を調べてみるとこの場合も taurine が増加し glycine が減少する点は同様であるが，glutamic acid, glutamine の増加はジストロフィー筋より遙に著明であり，また β-alanine, anserine, carnosine 系には有意な変化はみられなかった．これはジストロフィー動物と違い，クロロキンミオパチーでは筋崩壊の過程が急速なのも一因と考えられる．

(5) VitamineE 欠乏動物

V.E 欠乏が骨格筋の変性をきたすことはよく知られている．図4はラットに V.E 欠乏食を与え，2ヶ月目の Quadriceps のアミノ酸の変化を示す．これではジストロフィー動物やクロロキンミオパチーとはやや異った変化がみられた．即ち taurine が著しく高く，glycine の減少は殆んどないが，threonine, serine, asparagine の減少は著明であった．また β-alanine, carnosine が著しく減少し，さらに glutamic acid と glutamine が減少していた．但しまだ例数が充分でなく更に動物数をふやして検討中である．

2）筋肉の成長又は再生時のアミノ酸の変化．筋が正常発育，又は再生する時にはどの様な変化が起こるかを検討した．

(1) 筋の成長

図5は C57BL/10cs の生後1週，2週，3週目の Quadriceps 中の各アミノ酸の変動を示したものである．図中の横線は adult の値を示している．これに示す様に筋中の多くのアミノ酸は生後まもなくは非常に高く，発育と共に adult の値に近づく．これらの大部分のアミノ酸とは逆に taurine, anserine, carnosine の値は始めは著しく低いが，3週目には adult の値に追いつく．

同様の変化を mdx マウスの幼仔の Quadriceps で測定してみると，予想に反して C57BL との間に差がみられなかったが，生後の taurine の上昇は遅れている．

(2)筋再生

ラットの EDL に塩酸ブピバカインを筋注し，その再生時の遊離アミノ酸の変化を測定してみた．この場合は均一な多量の再生筋を得ることが難しいが，注射後1週目では高値を示すものが多く，時間と共にコントロールに近づく傾向がみられた．

考　察

骨格筋中の遊離アミノ酸は独特なパターンを示すにも拘らず，これらの筋肉中での働きは殆んどわかっていない．この中 anserine と carnosine については，ミオシン ATPase の活性化[2] または乳酸の蓄積による pH の低下を防ぐ緩衝作用が注目されている[3]．

しかし，更に含量の多い taurine などについてはその機能は不明である[4]．taurine は中枢神経

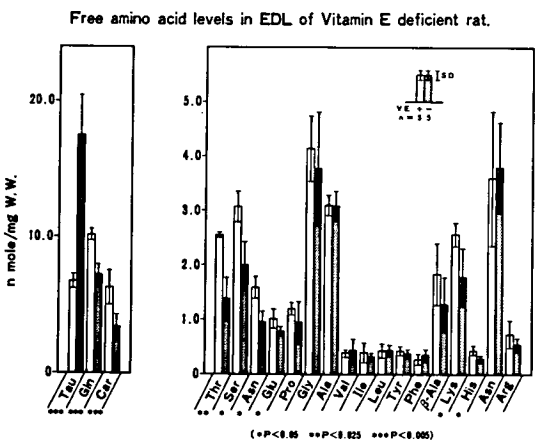


図4

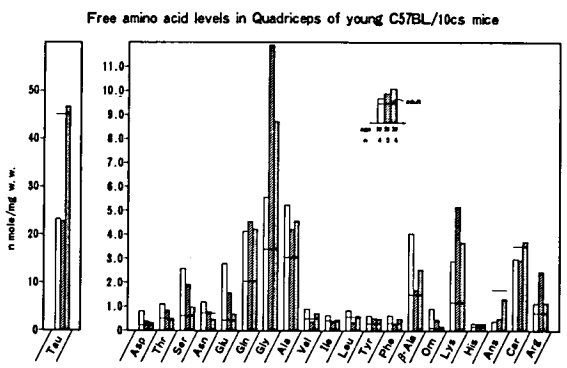


図5

系，網膜，心筋，血小板などに多く分布するが，大部分は骨格筋中に含まれるという極めて偏った生体間の分布を示しており，また neuro-transmitter としての働きを示唆する報告もみられる[5]．

これらのニンヒドリン陽性物質は筋の崩壊，生長，再生と密接に関連して変動しており，その機能と共に筋再生に及ぼす影響についてさらに研究を進めている．

結　　語

1）ジストロフィーマウスの骨格筋（EDL）をヌードマウスに移植し，その再生をコントロールマウス（C57BL/10cs）と比較し次の結果を得た．

(1) 再生筋線維の数：　mdx＞C57BL

(2) 再生筋線維の直径：　mdx＜C57BL

(3) 再生筋線維の直径の変動係数：　mdx＞C57BL

(4) 以上より再生筋は移植前の original の筋の性質を再生後も保っていると考えられる．

2）種々の筋変性時および筋の生長または再生時の骨格筋中遊離アミノ酸の変化を測定し次の結果を得た．

(1) ジストロフィーハムスター（B10 14.6, UM-X7.1）では glycine, βalanine は減少し，taurine, glutamic acid, glutamine は増加していた．mdx マウスの骨格筋でも同様な傾向がみられた．

(2) クロロキン・ミオパチーでも glycine は減少し，taurine, glutamic acid, glutamine は増加したが，β-alanine, anserine, carnosine は変化がなかった．

(3) V，E 欠乏動物では taurine が著増し，β-alanine, carnosine, glutamic acid, glutamine, threonine, serine などが減少した．

(4) 発育時のマウスでは taurine, carnosine, anserine が低値を示し，生長と共に増加した．その他の多くのアミノ酸は生後1～2週では高値を示すが，3週では減少し，adult の値に近づいた．

(5) 塩酸ブヒバカイン注射後の再生筋では glycine, β-alanine, carnosine, glutamine など初期に高いものが多く，時間と共に正常値に近づいた．

文　　献

1）寺尾寿夫，高津成美，平口峰子：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，筋ジストロフィー症の臨床，病態と成因に関する研究，厚生省班会議杉田班，昭和59年度研究報告書，昭和60年，p.249.

2）Avena, R.M. & Bowen, W.J.: Effect of carnosine and anserine on muscle adenosine triphosphatase, J. Biol. Chem., 224：1600, 1969.

3）Davey, C.L.: The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle, Arch. Biophys., 89：303, 1960.

4）Gelder, N.V.: What does taurine do? Taurine in nutrition and neurology, Plenum Press, New York, 1982, p.447

5）Davison, A.N. and Kaczmarek, L.K.: Taurinea possible neurotransmitter?, Nature, 234：107, 1971.

26) Duchenne筋ジストロフィー症生検筋のヌードマウスへの移植実験
── 再生筋組織のCathepsin B活性について ──

若 山 吉 弘*

研究協力者　武 田　　篤** 三 杉 信 子***
三 宅 捷 太**** 石 原 伝 幸*****

筋の再生が正常か否かはDuchenne筋ジストロフィー症（DMD）において重要な課題であり多方面から検討され論じられてきた[1]．本症の病因の1つは筋タンパク質の異常分解亢進の可能性がありプロテアーゼとの関連が提唱されている[2)3)]．また，昨年度までの光顕電顕的検索からは，筋の再生が活発であるにもかかわらず，筋の再生と臨床的な筋力改善とが対応しないので再生はineffectiveであり，このことは筋細胞内の代謝と密接に関係していることが推測された[4]．

そこで本年度は，ヌードマウスに移植したDMD再生筋を用いて，筋タンパク質の代謝に関与していると考えられているリソゾーム系酵素（特にカテプシンB&H）活性の移植再生に伴う変化について，正常対照再生筋のものと比較検討した．

材料と方法

ヌードマウスをネンブタールで麻酔後，背部の左右に小さな切開を加え，少年のDMD患者の大腿四頭筋6例，組織化学的に正常な整形外科手術例からの大腿四頭筋8例を周囲の筋に直接触れないよう挿入し縫い合せた．そして，移植後1，2，3，4週目で取り出し形態学的な検索と酵素活性

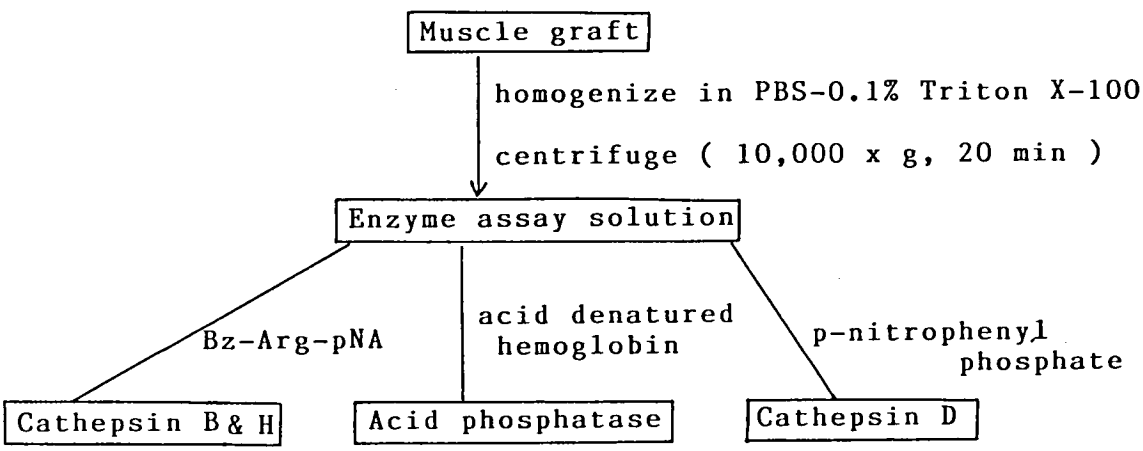


図1　Preparation of enzyme solution and method of enzyme assay

＊昭和大学藤が丘病院神経内科
＊＊昭和大学藤が丘病院臨床病理科
＊＊＊神奈川県立こども医療センター整形外科
＊＊＊＊神奈川県立こども医療センター神経内科
＊＊＊＊＊国立東埼玉病院内科

測定用の標本とした．

再生筋から粗酵素溶液の調製とそれを用いた酵素活性測定は図1に示した如く行った．再生筋片にPBS-0.1% TritonX-100溶液を加え，グラスホモジナイザーでホモジナイズし，10,000×g，20分の遠心分離後の上清を粗酵素溶液とした．リソゾーム系酵素活性は，カテプシンB&HにはBz-Arg-Naphthylamide，カテプシンDには酸変性ヘモグロビンを基質としてBarrettらの方法[5]を反応容量と時間を改良して測定した．酸性フォスファターゼはp-nitrophenyl phosphateを基質としてIgarashiらの方法[6]で測定した．

結　　果

移植再生に伴う再生筋の形態学的検索として，移植後1週と2週後のDMD及び対照再生筋の細胞直径を光顕的に定量した結果を表1に示す．正常対照再生筋の細胞直径は，1週後の13.7±1.4μmから2週後で18.7±2.8μmに，同様にDMD再生筋のそれも13.4±0.8μmから15.6±0.7μmと太くなっていた．そして，1週後では両再生筋の細胞直径には有意な差はなかったが，移植2週後になるとDMD再生筋の細胞直径が対照再生筋のものと比較して有意に細かった．

移植後の異なった段階での再生筋のリソゾーム系酵素活性の変化を図2に示す．対照再生筋のリソゾーム系酵素は，移植再生に伴って経時的にタンパク量当りで示した活性が増加していた．また，検体重量当りで示した酵素活性も同様の傾向であった．

形態学的に移植DMD再生筋の細胞直径が対照再生筋のものと比較して有意に細い2週後の再生筋の酵素活性を比較した結果を表2に示す．カテプシンB&H活性は，対照再生筋と比較して筋組織重量当りで示した活性には差はなかったが，ホモジネート上清のタンパク量当りで示した活性ではDMD再生筋の方が約1.5倍高かった．また，同じリソゾーム系酵素であるカテプシンDと酸性フォスファターゼ活性は，カテプシンB&H程ではないが，やはり同様の傾向を示した．

考　　察

筋ジストロフィー症における筋の再生が正常であるかどうかは本症の病因，治療，予後に関して重要な課題でありながらまだ一定の結論が得られていない．本実験でヌードマウスに移植したDMD再生筋の細胞直径が対照再生筋と同様に移植2週後に1週後より太くなっていることから，経時的にDMD筋も再生していることは明らかである．この事実は，細胞内代謝に密接に関係して

表1　Group mean diameters (μm) of cross-sectionated myotubes and myoblasts in both normal and DMD muscle grafts at different stages of transplantation

	1 week	2 weeks
Normal	$13.7 \pm 1.4^{a*}$ (n=6)$_b$	$18.7 \pm 2.8^{a**}$ (n=6)$_b$
DMD	$13.4 \pm 0.8^{a*}$ (n=6)$_b$	$15.6 \pm 0.7^{a**}$ (n=6)$_b$

DMD : Dchenne muscular dystrophy.
a : Group mean diameter (μm) ± standard error of the mean.
b : Number of cases.
* $p > 0.1$, ** $p < 0.05$

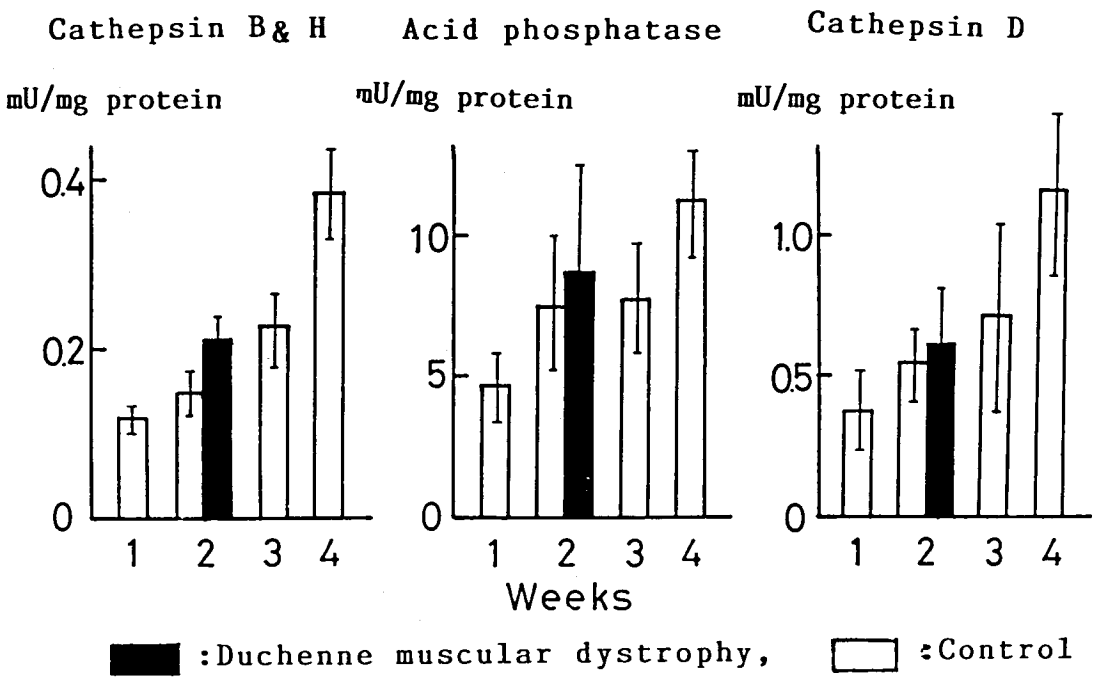


図2 Changes in activities of lysosomal emzymes in normal and dystrophic muscle grafts

表2 Lysosomal enzyme activities in normal and dystrophic muscle grafts after two weeks of transplantation

Enzyme	sample(N)	Activity	
		mU/mg protein	mU/g tisssue
Cathepsin B & H			
	Normal (8)	0.14 ± 0.05	11.3 ± 4.9
	DMD (6)	0.21 ± 0.07	10.5 ± 3.5
	DMD/Normal	1.50	0.93
Acid phosphatase			
	Normal (8)	7.4 ± 2.7	607 ± 220
	DMD (6)	8.7 ± 3.6	603 ± 225
	DMD/Normal	1.17	0.99
Cathepsin D			
	Normal (8)	0.55 ± 0.20	36.9 ± 14.5
	DMD (6)	0.61 ± 0.14	33.3 ± 5.9
	DMD/Normal	1.11	0.90

DMD : Duchenne muscular dystrophy Mean ± S.D.

いると考えられているリソゾーム系酵素の活性が移植再生に伴って経時的に増加していた結果からも確証された．

病的状態にある筋組織のリソゾーム系酵素活性の上昇は，外から浸潤したマクロファージ（Mφ）性細胞に由来することが強く示唆されている[7),8)]．しかし，本実験での形態学的検索では両再生筋に存在する浸潤したMφ性細胞は少なくその存在量には差がなかったことから，DMD及び対照生検筋の移植再生に伴うリソゾーム系酵素活性の増加は筋細胞内リソゾーム系オルガネラの増加によるものと考えられる．

移植再生筋の細胞直径に有意な差のあった移植2週後に，カテプシンB&H活性のホモジネート上清のタンパク量当りで示した値がDMD再生筋の方で対照再生筋の1.5倍高く特異的な活性上昇の傾向を示した．しかし，他のリソゾーム系酵素の活性変化を見ると，DMD及び対照再生筋の間では移植再生に伴うリソゾーム系酵素活性変化には本質的な差異はないと考えられる．従って，両再生筋のリソゾーム系酵素活性の比較結果は，DMD再生筋ではある種の筋タンパク質の可溶性成分の減少やその質的変化がある可能性を示唆しているのかもしれない．

リソゾーム系酵素の活性測定溶液として再生筋ホモジネートを用いることは，特にリソゾームチオール性プロテアーゼに特異的な内在性インヒビターの存在を考慮しなければならない[9)]．今後これらを考慮し，免疫組織化学的手法等も組み入れ，さらに詳細に検討を行う必要がある．

文　献

1）若山吉弘：筋ジストロフィー症における筋の再生について．神経進歩，24：729-739，1980．

2）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．

3）杉田秀夫，中瀬浩史，石浦章一：　plasmocidによる実験的ミオパチーの筋蛋白分解機構――筋ジストロフィー症との関連――．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，198-201，1983．

4）Wakayama, Y. & Ohbu, S.: Light- and electronmicroscopic studies of transplanted human dystrophic muscles to nude mice. J. Neurol. Sci., 55：59-77, 1982.

5）Barrett, A.J.: Cathepsin B and other thiol proteinases. Cathepsin D and other carboxyl proteinases. in "Proteinases in mammalian cells and tissues" (Barrett, A.J.ed.) North-Holland Publishing Co. 181-208, 209-248, 1979.

6）Igarashi, H. & Hollander, V.P.: Acid phosphatase from rat liver. Purification, crystalization, and properties. J.Biol. Chem. 243：　6084-6089, 1968.

7）Kar, N.C. & Pearson, C.M.: Muscular dystrophy and activation of proteinases. Muscle Nerve 1：　308-313, 1979.

8）Kominami, E., Bando, Y., Ii, K., Hizawa, K. & Katunuma, N.: Increases in cathepsin B and L and thiol proteinase inhibitor in muscle of dystrophic hamsters. Their Iocalization in invading phagocyte. J. Biochem. (Tokyo), 96：　1841-1848, 1984.

9）Spanier, A.M. & Bird, J.W.C.: Endogenous cathepsin B inhibitor activity in normal and myopathic red and white skeltal muscle. Muscle & Nerve 5：　313-320, 1982.

27) Glycerol kinase 欠損症：1. 自験1例を含めての臨床像の検討

中野今治*

研究協力者　後藤　順*　柿沼宏明**　中村文子**
斎藤深美子***　村山繁雄****

Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）の遺伝子座位はX染色体短腕中央部Xp21に位置することが明らかにされている．このXp21に染色体欠失を認め，いずれも伴性劣性遺伝疾患である先天性副腎低形成（CAH）と glycerol kinase（GK）欠損を合併したと考えられる筋ジストロフィー症男児について報告し，その臨床像について文献例と合わせ検討する．

症　例

10歳男児．

家族歴： 母親中等度精薄．

現病歴： 生後9ヵ月，未頸定主訴に当院受診し，筋緊張低下型脳性麻痺と診断された．頸定は1歳，1歳9ヵ月で発語があり，独歩は5歳2ヵ月で可能となった．

4歳頃，皮膚色素沈着が出現し，6歳1ヵ月，急性副腎不全による嘔吐，発熱，痙攣を呈した．精査の結果，副腎皮質機能不全と筋ジストロフィー症の合併と診断され，以後副腎皮質ホルモンの補充療法を施行している[14]．

1984年，血中，尿中グリセロールの異常高値がみいだされた．

現症： 身長120cm（−2.5SD）．体重20.8kg（−2.0SD）．現在皮膚粘膜の色素沈着は認めない．神経学的には，痙攣発作が年に1回程度あり，言語知能発達は1.5〜2歳レベル．腓腹筋の軽度仮性肥大，四肢近位筋優位の筋萎縮・筋力低下があり，翼状肩甲，登攀性起立，動揺性歩行を認める．腱反射はアキレス腱を除き著明に低下ないし消失している．

主要検査所見： (1)副腎皮質機能（6歳治療前）；Cortisol 11.7μg/dl（6.0−24.0）．ACTH 580pg/ml（<100）．ACTH 負荷試験無反応．Aldosterone< 5 ng/dl（臥位10.9−62.7）．Plasma renin activity>104.7ng/ml/hr（0.5−2.0）．副腎シンチ描出されず．

(2) Glycerol 代謝：血清 glycerol 29.1mg/dl（<2.0）．尿 GC-MS 分析 glycerol 異常ピーク．白血球 GK 活性4.6pmol/10^6 cells/hr（114−125）．母親白血球 GK 活性61pmol/10^6 cells/hr．

(3) 神経学的検査；脳波δ波バースト．CK11253U/l（24−195）．筋電図筋原性変化．筋生検（三角筋，腓腹筋）で，間質の増加，筋線維の大小不同，多数の opaque fiber，中心核の増加，再生線維など dystrophic change を認めた．

(4)染色体分析（G分染法）；46，Ydel（X），Xp21に小欠失を認める．母親も同様の欠失X染色体を有し，正常X染色体との heterozygote であった．

考　察

本例では多彩な臨床像，即ち，(1)身体精神運動発達の遅滞，(2)副腎皮質機能不全，(3) GK 欠損，(4)筋ジストロフィー症を呈し，X染色体短腕Xp21に小欠失が認められた．

この多彩な臨床像を説明するのに，まず GK 欠損による代謝異常によって全体を説明できないか

＊国立療養所下志津病院神経内科
＊＊同小児科
＊＊＊東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞遺伝
＊＊＊＊東京大学医学部脳研究施設神経内科

との可能性が考えられよう．Glycerol kinase (ATP : glycerol phosphotransferase. EC2. 7. 1. 30)は glycerol を glycerol 3-phosphate にリン酸化する酵素で，その欠損により細胞内のエネルギー代謝の異常や細胞膜などの膜の障害をきたす可能性が考えられ，その結果，副腎や筋肉などに異常を生ずることが考えられる．しかし，まったく無症候である GK 欠損が報告[1)~3)]されており，

表1　Glycerol Kinase (GK)欠損，先天性副腎低形成，筋ジストロフィー症

家系	症例	グリセロール代謝			偽(*高脂血症・TG血症)	副腎(低形成)不全	成長発達		筋症状			その他				染色体分析		剖検	報告
		高グリセロール血症	グリセロール尿	GK欠損			発育遅滞	精神運動発達遅滞	CK高値	筋電図[1)]	筋病理変化[2)]	痙性	骨粗鬆症	脳萎縮	OTC欠損	欠失	母親		
I. 無症候GK欠損																			
1.	70y M	+	+	+	+	−													1
	M	+	+																
	21y M	+	+	+															
2.	38y M	+	+	+	+														2
3.	76y M	+	+	+	+														3
II. 嘔吐，アシドーシス，意識障害発作を伴うGK欠損																			
4.	8y M		+	+	+	−	−		−		−								4
5.	11y M	+	+	+		−	−		−										5
III. GK欠損と先天性副腎低形成等との合併																			
6.	21d +M					+												+	6, 7
	2y +M					+													
	26m +M					+	+											+	
	28d +M					+												+	
	5y M	+	+	+		+	+	+	−							Xp21.2	hetero.		
	3½y M	+	+	+		+	−	+	−							Xp21.2	hetero.		
7.	6y M	+	+	+	+	+	+	+	+		M	+	+						8, 9
	33m +M	+	+	+	+	+	+	+	+		M	+	+					+	
8.	7½m+F	+	+	+		+	+	+										+	6, 7
	1⅝y M	+	+	+		+	+	+	+							Xp21.1-Xp21.3	hetero.		
9.	5y +M					+?			+		D								10, 7
	4y M	+	+	+		+	+		+		D	+				Xp21.1-Xp21.3	hetero.		
10.	5w +M					+												+	11, 12
	9y M	+	+	+		+	+	+	+	M	D	−	+						
	5.5y M	+	+	+		+	+	+	+	M	D	−	+			Xp21			
11.	4y M	+	+	+	+	+	+	+	+	P	M								13
12.	10y M	+	+	+	−	+	+	+	+	M	D	−		±		Xp21	hetero.		14, 15
13.	9m M	+				+			+	M									16
14.	36h +M		+			+									+	Xp21	hetero.	+	17, 18
IV. 先天性副腎低形成と筋ジストロフィー/ミオパチーとの合併																			
15.	3⅝y+M					+	+	+	+	M	D							+	19
	1 7/12y+M					+	+	+	+	M	D							+	
16.	11m +M					+													20
	12h +M					+												+	
	2 5/12y+M				+	+		+	+	L	−							+	
17.	4y +M					+				+									21
	3 5/12y+M					+			+		D							+	
18.	4y M								+										22
	1 10/12y+M				+	+	+	+	+		M			+				+	

1) M, myogenic ; P, polyphasic ; L, low amplitude.
2) M, myopathic ; D, dystrophic

必ずしもGK欠損によって上記のような障害が生じるとは限らない．GK欠損では，本来臨床的に問題となる障害を起こさない可能性も考えられる．ただし，異なる臨床像を呈するいくつかのGK欠損の対立遺伝子が存在することも考えられる．

さて，本例ではDMD遺伝子座位のあるX染色体短腕Xp21に小欠失が認められている．GK，CAHの遺伝子座位は明らかにされていないが，これらもXp21内にあり，GK，CAH，DMD遺伝子座位を含む領域の染色体欠失により3症を合併したとすれば，本例の多彩な臨床像を理解できる．即ち，本例の多彩な臨床像は，基本的に先に述べたようなGK欠損による代謝異常によるのではなく，染色体欠失により異なる3疾患が合併したことによると考えたほうが理解しやすいと思われる．

以上の点に関し，GK欠損症の報告例を中心に臨床像を検討する．本例を含むGK欠損症の報告例[1)~18)]と，GK欠損については不明であるが臨床像が本例と類似した症例[19)~22)]とを表1にまとめた．

GK欠損は本例を含め12家系17例[1)~15)]で確認され，GK欠損と考えられるものが3家系3例[1),16),17),18)]あり，計14家系20例報告されている．X染色体のnonrandom inactivationにより発症したと考えられる女児1例（家系8）[6)]を除きすべて男性である．臨床像より3群に大別され，無症候の第1群（3家系5例）[1)~3)]，副腎不全などを伴わず嘔吐，アシドーシス，意識障害発作を呈する第2群（2家系2例）[4),5)]と本例（家系12）を含む第3群（9家系13例）[6)~18)]に分けられる．第3群は全例副腎不全を伴い，剖検例ではcytomegalic typeの副腎低形成が報告されている[9),11)]．2家系（家系6，14）を除き，さらに筋症状を伴っている[6)~16)]．報告により筋ジストロフィーないしミオパチーとしているが，いずれも著明なCK高値，共通した筋病理変化などがみられ，同一の筋病変を呈しているものと考えられる．家系6はGK欠損とCAHのみの合併[6),7)]家系14はGK欠損，CAHとornithine transcarbamylase（OTC）欠損の合併である[17),18)]．著明な精神運動発達遅滞が第3群のほとんどの症例で報告されている．

GK欠損については不明で，いずれも剖検例であるが，精神運動発達遅滞を呈し，CAHに筋症状を合併した男児例が4家系5例（家系15～18）報告されている[19)~22)]．GK欠損以外の点については第3群の筋症状を合併するものと酷似している．さらに家系16では高脂血症[20)]，家系18ではhypertriglyceridemiaの合併[22)]があり，いずれもpseudohypertriglyceridemiaである可能性も考えられ，GK欠損の可能性が示唆される．これらの症例は第3群に含まれるべき症例とも考えられ注目される．

第3群9家系13例のうち本例以外にも5家系6例で，Xp21に染色体欠失が認められ[7),12),17),18)]，うち5例では遺伝性である[7),18)]ことが示されている．本例と同様にDMDないしDMD様の筋症状を伴うものが3例[7),12)]あり，筋症状を伴わずGK欠損とCAHのみのものが2例[7)]，他の1例は，GK欠損とCAHにOTC欠損を合併した症例[17),18)]である．OTC遺伝子座位はDMD遺伝子座位と連鎖し[23)]，ともにXp21に位置する[24)]ことと，上記症例とを考えあわせると，先に本例について述べた如く，GK，CAH両遺伝子座位ともXp21に存在し，本例をはじめ第3群の症例でみられた筋症状はDMD遺伝子を含む領域の染色体の欠失により発症したと考えるのが妥当である．

以上よりGK欠損の第3群はXp21内の染色体欠失によりGK欠損，CAH，DMD等を合併する遺伝性の染色体異常症候群のひとつと考えられる．以上の点を含め，分子遺伝学的検討などを今後進めていく必要があろう．

文　献

1）Rose, C.I., Haines, D.S.M.: Familial hyperglycerolemia. J. Clin. Invest. 61: 163-170, 1978.

2）Pometta, D., Suenram, A., von der Weid, N., Joliat, J.: Glycerokinase deficiency (abstract). Eur. J. Clin. Invest. 11: A145, 1981.

3）Goussault, Y., Turpin, E., Neel, D., Dreux, C.,

Chanu, B., Bakir, R., Rouffy, J.: 'Pseudohypertriglyceridemia' caused by hyperglycerolemia due to congenital enzyme deficiency. Clin. Chim. Acta 123: 269-274, 1982.

4) Ginns, E.I., Barranger, J.A., McClean, S.W., Sliva, C., Young, R., Schaefer, E., Goodman, S.I., McCabe, E.R.B: A juvenile form of glycerol kinase deficiency with episodic vomiting, acidemia, and stupor. J.Pediatr. 104: 736-739, 1984.

5) Eriksson, A., Lindstedt, S., Ransnäs, L., von Wendt, L.: Deficiency of glycerol kinase (EC2. 7. 1. 30). Clin. Chem. 29: 718-722, 1983.

6) Bartley, J.A., Miller, D.K., Hayford, J.T., McCabe, E.R.B.: Concordance of X-linked glycerol kinase deficiency with X-linked congenital adrenal hypoplasia. Lancet 2: 733-736, 1982.

7) Bartley, J., Patil, S., Ghoshal, R., Hofker, M.H., van Ommen, G.J.B., Pearson, P.L.: X-linked glycerol kinase and X-linked adrenal hypoplasia maps at Xp21 (abstract). Am. J. Hum. Genet. 37 (Suppl) : A143, 1985.

8) McCabe, E.R.B., Fennessey, P.V., Guggenheim, M.A., Miles, B.S., Bullen, W.W., Sceats, D,J., Goodman, S.I.: Human glycerol kinase deficiency with hyperglycerolemia and glyceroluria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78: 1327-1333, 1977.

9) Guggenheim, M.A., McCabe, E.R.B., Roig, M., Goodman, S.I., Lum, G.M., Bullen, W.W., Ringel, S.P.: Glycerol kinase deficiency with neuromuscular, skeletal, and adrenal abnormalities. Ann. Neurol. 7: 441-449, 1980.

10) McCabe, E.R.B.: Human glycerol kinase deficiency: An inborn error of compartmental metabolism. Biochem Med. 30: 215-230, 1983.

11) Renier, W.O., Nabben, F.A.E., Hustinx, T.W.J., Veerkamp, J.H., Otten, B.J., ter Laak, H.J., ter Haar, B.G.A., Gabreels, F.J.M.: Congenital adrenal hypoplasia, progressive muscular dystrophy, and severe mental retardation, in association with glycerol kinase deficiency, in male sibs. Clin. Genet. 24: 243-251, 1983.

12) Wieringa, B., Hustinx, Th., Scheres, J., Renier, W., ter Haar, B.: Complex glycerol kinase deficiency syndrome explained as X-chromosomal deletion. Clin. Genet. 27: 522, 1985.

13) 吉本雅昭，高柳俊光，永吉智子，馬場常嘉，辻芳郎，犬童康弘，松田一郎： 副腎不全，非特異性ミオパチー，精神運動発達遅滞を伴うグリセロールキナーゼ欠損症(本邦初報告例)，日児誌89： 1297-1302，1985.

14) 中村文子，高柳直子，関根邦夫，渡辺博子，木内信二，西牟田敏之，斎藤敏郎，村山繁雄，露崎俊明： 筋ジストロフィー症を合併したアジソン病の1例，ホと臨床32 (Suppl)： 206-209，1984.

15) Saito, F., Goto, J., Kakinuma, H., Nakamura, F., Murayama, S., Nakano, I., Tonomura, A.: Inherited Xp21 deletion in a boy with complex glycerol kinase deficiency syndrome, Clin. Genet (in press).

16) 豊田茂樹，樋笠桂子，真鍋正博，磯部健一，伊藤進，山川毅，大西鐘寿： 新生児期に診断しえた先天性副腎低形成の1男児例——超音波断層法を用いて——第19回日本小児内分泌学会 (1985，東京) 抄録 p113.

17) Hammond J., Howard, N.J., Brookwell, R., Purvis-Smith, S., Wilcken, B., Hoogenraad, N.: Proposed assignment of loci for X-linked adrenal hypoplasia and glycerol kinase genes. Lancet 1: 54, 1985.

18) Old, J.M., Briand, P.L., Purvis- Smith, S., Howard, N,J., Wilcken, B., Hammond, J., Pearson, P., Cathelineau, L., Williamson, R., Davies, K.E.: Prenatal exclusion of ornithine

transcarbamylase deficiency by direct gene analysis. Lancet 1： 73-75, 1985.

19) v. Petrykowski, W., Beckmann, R., Böhm, N., Ketelsen, U.P., Popers, H.H., Sauer, M.: Adrenal insufficiency, myopathic hypotonia, severe psychomotor retardation, failure to thrive, constipation and bladder ectasia in 2 brothers: adrenomyodystrophy, Helv. Paediat. Acta 37： 387-400, 1982.

20) 田苗綾子，森川征彦，清水興一： 剖検結果からみた臨床検査のすすめ方（最終回）——家族性先天性副腎低形成の1兄弟例——小児科診療 43： 222-227, 1980.

21) 豊福照子，長藤洋，渡辺毅敏： 先天性副腎低形成を伴ったDuchenne型筋ジストロフィー症の一剖検例. 第22回日本小児神経学会総会（1980）抄録 p119.

22) 矢野公一，印鑰史衛，室野晃一，坂田宏，田口哲夫，奥野晃正，箭原修： 先天性副腎低形成・筋緊張低下を伴うミオパチー・精神運動発達遅滞・高脂血症を主徴とする症例——独立疾患である可能性について（予報）——ホと臨床 31（Suppl）： 127-130, 1983.

23) Davies, K.E., Briand, P., Ionasescu, V., Ionasescu, G., Williamson, R., Brown, C., Cavard, C., Cathelineau, L.: Gene for OTC: characterisation and linkage to Duchenne muscular dystrophy. Nucl. Acids Res. 13： 155-165, 1985.

24) Lindgren, V., de 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.

28) Glycerol kinase 欠損症：2. 家族性のXp21欠失，およびX染色体の不活性化について

中　野　今　治*

研究協力者　斎　藤　深美子**　柿　沼　宏　明***　後　藤　　順****

目　的

遺伝性疾患の発症の原因究明の基礎的研究として，その遺伝子座位を決定することは重要な意味があると考えられる．現在までに，さまざまな遺伝性疾患について，家系調査をもとにlinkage map(連鎖地図)が作られているが，chromosome map（染色体地図）については，遺伝子レベルの疾患ということでほとんど手がかりがなく，その決定が遅れていた．

最近，これらの遺伝性疾患のうちあるものは，細胞遺伝学的手法によって発見された染色体の構造異常での切断点をもとにして，その遺伝子座位決定に関する探究がなされるようになってきた．例えば，Duchenne型筋ジストロフィー症については，女性患者にみられたX染色体を含む様々な相互転座がきっかけとなり，その共通の切断部位Xp21に，その疾患に関連する遺伝子座位があると考えられるに至っている（Verellen Ch.ら，1984参照)[1]．またこの転座の切断点に関して，細胞遺伝学的にさらに詳細に検討した報告もある[2]．

一方，染色体レベルの欠失を基礎にしたdeletion mappingも有力な遺伝子座位決定の手段である．この研究から，linkage mapはchromosome mapをほぼ反映していることがわかり，劣性遺伝子の発見や，染色体セグメント内の遺伝子のmapが様々な生物で行なわれてきた．ヒトにおいては，臨床的に異常のある人の細胞遺伝学的解析で発見された常染色体欠失によってmapされた酵素は沢山あるが，X染色体連鎖性の酵素については，オルニチン・トランスカルバミラーゼ[3]等で，ごく少ない．理由としては，まず女性で，X染色体の部分欠失が存在した場合，通常は構造的に異常なXが選択的に不活性化するために，遺伝子発現上，欠失の効果が現われないのでdeletion mappingが不可能になってしまうためである．また，男性でのXの部分欠失を持つ例があれば非常に有用であるが，ほとんど報告がなく，大部分は致死的であると考えられる．

今回，我々は，複合型のグリセロール・キナーゼ欠損症をもつ男児で，細胞遺伝学的検索により，Xの短腕の一部に微小な欠失のみられた例を発見し，さらに，その母親が部分欠失のあるX染色体を持つ保因者であることを見い出したので，ここに報告する．家族性のX染色体部分欠失例は今までに報告がなく，第一例である[4]．

対象および方法

A．対象

複合型グリセロール・キナーゼ（GK）欠損症つまり，GK欠損症，Duchenne型筋ジストロフィー症（DMD），先天性副腎低形成（CAH）および精神発達遅延を併う10歳の男児が患者で，その両親および同胞（兄）も検査の対象とした．

B．方法

上記4人から静脈血をヘパリン採血し，PHA添加後，48時間から72時間培養した後，染色体標本を作製し，通常のG分染法および高精度分染法を用いて細胞遺伝学的検索を行なった．

尚，G分染法は，Seabright[5]の原法の改良法を用い，また，高精度分染法（high-resolution

＊国立療養所下志津病院神経内科
＊＊東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞遺伝部門
＊＊＊国立療養所下志津病院小児科
＊＊＊＊国立療養所下志津病院神経内科

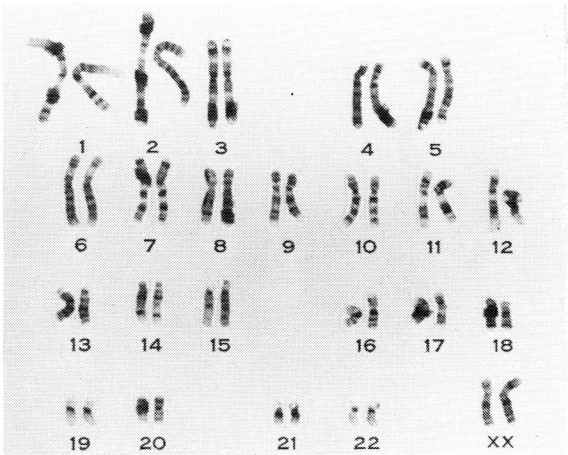


図1　GK 欠損症患児と正常対照例の X 染色および正常 X 染色体のシェーマ．横線は着糸点（centromere）を示す．

chromosome banding technique）は Ikeuchi ら[6]による臭化エチジウム処理法を用いた．

結　　果

リンパ球染色体標本での G 分染法による分析の結果，患児は X 染色体の短腕がやや短いことが判明した．そこで高精度分染法によりさらに詳細に調べたところ，X の短腕（P）の21という部位のギムザで濃染するバンドが小さいことがわかった．このことから，患児においては，Xp21.1から Xp21.3の間で欠失が存在すると考えられる（図1）．その他に X 染色体での逆位あるいはより複雑な染色体再構成が存在する証拠はみつからなかった．

また，両親および兄における染色体分析の結果，父親および兄の染色体構成は正常であったが，母親の一方の X 染色体で，患児と同様の短腕の部分

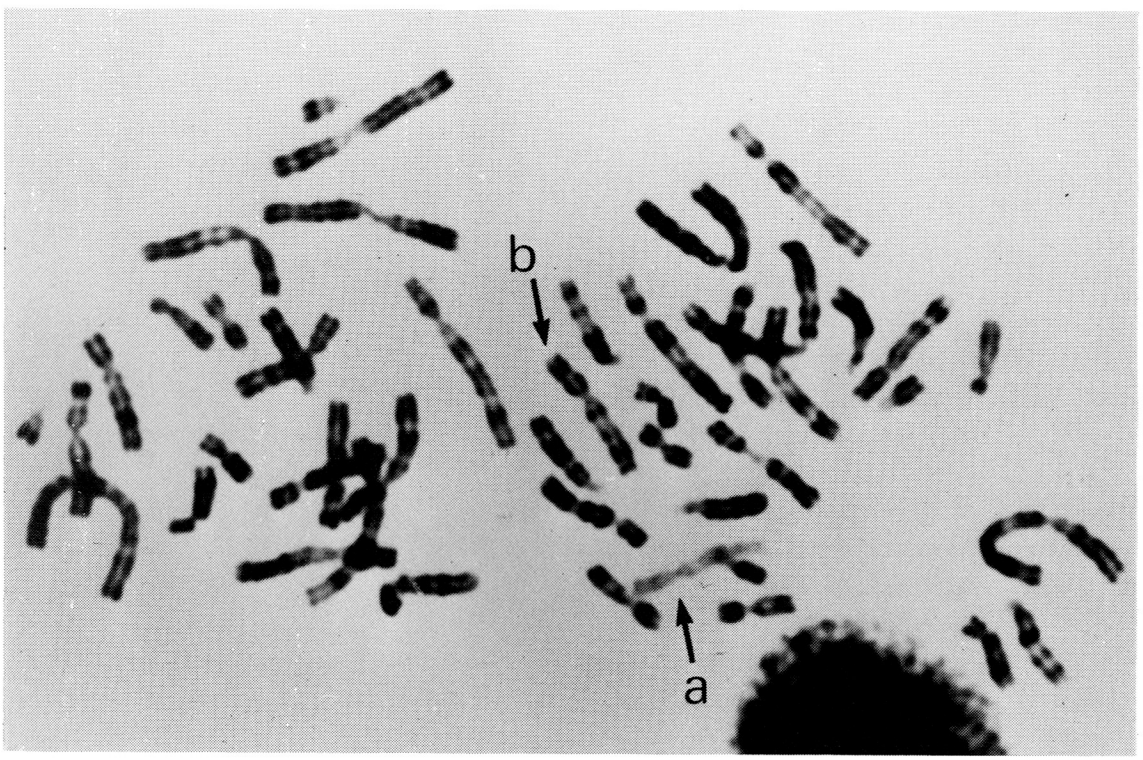


図2　GK 欠損症患児の母親の染色体．片方の X 染色体で短腕の部分欠失が見られる．

欠失が，観察したすべての細胞でみられた（図2）．

尚，母親のGK活性値は正常の1/2のレベルであった．

考　　察

今回の細胞遺伝学的研究により，複合型GK欠損症の患児のX染色体の短腕のp21バンドに微小な部分欠失が存在することが見出され，患児に合併するいくつかの遺伝性疾患とこの欠失との間の関連性が示唆された．

同様の知見が，今年になってWieringaら[7]によって報告されている．彼らは，以前，染色体構成を調べて正常と判定した複合型GK欠損症の男児（臨床的にはほぼ我々のケースと同様）の染色体を再検査したところ，我々の患児での結果と同様に，Xp21バンドの一部に小さな欠失を見出している．欠失したと思われる染色体断片が他の部分に転位した可能性も考えられるので，彼らは，Xp21付近から分離した754プローブを用いて分子生物学的な検索も行なっている．各種の制限酵素Pst I，Bgl IIあるいはEcoR Iで切った患者あるいは正常者のDNA断片とこのプローブでhybridizationを行なうと，正常人の場合はhybridizeしたが，患者の場合は，hybridizeしないという結果を得て，分子生物学的にもXp21付近に欠失があることが示された．これらのことから，患者の複合型GK欠損症は，Xp21の部分欠失によるものだろうと結論している．

我々の患児に合併する症状のうち，DMDの遺伝子に関しては，最近の細胞遺伝学的あるいは分子生物学的研究成果によってXp21上にあることが示されている．また一方のGK欠損症やCAHもまたX連鎖性の疾患であることから，Wieringaらの結果ともあわせて考えると，これらの疾患の主因となる遺伝子は，同じX連鎖性の疾患であるDMDの遺伝子と同様にXp21上に座位することが示唆されよう．

他方，母親がこの部分欠失のあるX染色体の保因者であることが示された．通常，女性におけるX連鎖性劣性の遺伝性疾患を考える場合，X染色体の不活性化の問題を考慮しなければならないが，正常核型を持つ場合は，どちらか一方のXがランダムに不活性化すると考えられる．これに対して，今回の母親の様に，不均衡型のXの構造異常をもつ場合は，異常なXが不活性化することが知られている．もしそうであるならば，この母親のGK活性値は正常レベルになるはずであるが，実際には正常の1/2となって矛盾が生じる．この母親では，正常なXと部分欠失のあるXとがランダムに不活性化すると仮定すれば，このGK活性値と不活性化パターンとの関係は説明できる．現在，細胞周期のlate SからG_2期に，DNA前駆物質チミジンの類似体であるBrdUを細胞に処理することにより，X染色体の後期複製パターンを調べて，Xの不活性化についての検索を進めている（図3）．

前述のような仮定は例外的なものであるが，実際の現象としては，今までに1例，Franckeら[3]の報告があるのみである．彼らの女性患者は，OTC欠損症の保因者で，その他に2つの遺伝性疾患の保因者でもある．興味あることに，この患者のX染色体の欠失部位はXp21付近で，我々の複合型GK欠損症における欠失部位とかなり類似している．これらの疾患との連鎖関係は，今後の欠失部位の分子生物学的研究により判明するであろうし，それらの疾患の遺伝子本体の検索がさらに進展し

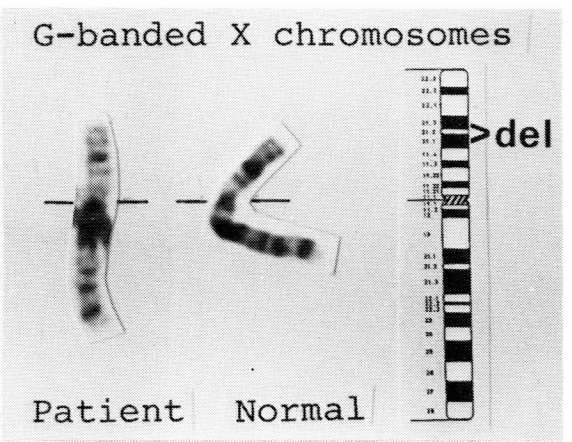


図3　女性の細胞における後期複製パターン．
aは不活性化X，bは活性化Xを示す．

てゆくであろう.

文　献

1) Verellen-Dumoulin Ch., Freund M., De Meyer R., Laterre Ch., Frederic J. Thompson M. W., Markovic V. D., and Worton R. G.: Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random inactivation of the normal X chromosome. Hum. Genet., 67 : 115-119, 1984.

2) Saito F., Tonomura A., Kimura S., Misugi N., and Sugita H.: High-resolution banding study of an X/4 translocation in a female with Duchenne muscular dystrophy. Hum. Genet. in press.

3) Francke U.: Random X inactivation resulting in mosaic nullisomy of region Xp21.1-p21.3 associated with heterozygosity for ornitine yranscarbamylase deficiency and for chronic granulomatous disease. Cytogenet. Cell Genet. 38 : 298-307, 1984.

4) Saito F., Goto J., Kakinuma H., Nakamura F., Murayama S., Nakano I., and Tonomura A.: Inherited Xp21 deletion in a boy with complex glycerol kinase deficiency syndrome. Clin. Genet. in press.

5) Seabright M.: A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet, ii : 971, 1971.

6) Ikeuchi T., and Sasaki M.: Accumulation of early mitotic cells in ethidium bromide-treated human lymphocyte cultures. Proc. Jpn. Acad., 55 : 15-18, 1979.

7) Wieringa B., Hustinx Th., Scheres J., Reiner W., and ter Haar B.: Complex glycerol kinase deficiency syndrome explained as X-chromosomal deletion Clin. Genet., 27 : 522-523., 1985.

29) Glycerol Kinase 欠損を伴う筋ジストロフィー症赤血球リン脂質について

吉田瑞子*

研究協力者　後藤　順**　柿沼宏明**　中野今治**
安藤一也*　杉田秀夫*

glycerol kinase 欠損，先天性副腎低形成を伴うDuchenne 型筋ジストロフィー症（GKD-CAH-DMD）患者赤血球のリン脂質について，Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）患者と気管支喘息患者の赤血球を対照に比較検討した．

対象と方法

赤血球は GKD-CAH-DMD 患者（男児，9歳，1名），同年齢層の男児 DMD 患者（5名）と気管支喘息患者（5名）のヘパリン血より得た．気管支喘息患者の赤血球は，筋疾患赤血球の対照として用いた．血漿分離した赤血球は Ca^{2+} とグルコースを含むリン酸緩衝食塩溶液で3回洗滌し，同じ緩衝溶液に43～45% Ht に浮遊した．その浮遊液を2等分し，各々を0℃と37℃に3時間浮置した．

リン脂質の抽出，分離と定量　ホスファチジールエタノールアミン(PE)，ホスファチジールコリン(PC)，ホスファチジールセリン(PS)，スフィンゴミエリン(Sph)，ホスファチジルイノシトール(PI)とホスファチジン酸(PA)の抽出は，試料の4.7倍量のメタノールで赤血球の酵素を失活させた後，クロロホルム(C)：メタノール(M)＝2：1で抽出した．抽出液はその1/5量の0.9% NaCl で洗滌し乾固した．乾固した総脂質は，一定量のC：M＝96：4で溶解し，その1/20量を全リン脂質量測定用，1/10量を PE, PC, PS, Sph 測定用とし，残りを PI と PA 測定用とした．

上記のリン脂質の分離は，二次元展開薄層クロマトグラフ法で行なった．薄層板はメルク社のシリカゲル60(厚さ0.25mm)を用いた．一次元展開はクロロホルム：メタノール：28%アンモニア水＝65：35：5.5組成，二次元展開はクロロホルム：アセトン：メタノール：酢酸：水＝100：40：30：20：12組成の各溶媒で行なった．一次元展開後，薄層板を乾燥窒素気流中で1時間乾燥し，二次元展開に移行した．

ジホスホイノシタイド(DPI)とトリホスホイノシタイド(TPI)の抽出は，赤血球浮遊液にその4.7倍量のメタノール（60μmol Ca/g cells を含む）を加え，酵素活性を失活させた後，DPI, TPI 以外のリン脂質をC：M＝2：1で抽出した．抽出液は総リン脂質測定用とした．一方残査に赤血球浮遊溶液の17倍量の酸性C：M＝2：1（0.25% HCl を含む）を加え DPI と TPI を抽出した．抽出液をその1/5量の1N-HCl で洗滌し，下層をその2/3量のC：M：1N-HCl＝3：48：47で2回洗滌した．洗滌した下層の溶媒組成がC：M＝2：1になるようにメタノールを加え，さらに28%アンモニア水を加え，pH メーターの読みが9.5となるようにした．アルカリ性となった DPI, TPI 抽出液をその1/5量の0.1M KCl で洗滌し，下層を窒素気流中で乾固した．乾固した DPI, TPI にC：M：H_2O＝75：25：2を加え，薄層クロマトグラフの試料とした．

DPI と TPI の分離は，薄層クロマトグラフ法で行なった．その方法は昨年本研究班班会議で報告した方法に従った[1]．

リン脂質の検出は，ヨード蒸気中で行い，各スポットをかき取った．リン脂質の定量は，リン脂

＊国立武蔵療養所神経センター
＊＊国立療養所下志津病院

質をシリカゲルごと70%過塩素酸で170℃，1時間，加熱分解を行い，水，モリブデン酸アンモニュウム液とFiske-Subbarowの還元試薬を加え，7分間沸騰水浴中で加熱発色させ，急冷後シリカゲルを除去し，820μmで比色した．

結果と考察

GKD-CHA-DMD，DMDとcontrolのグループの，0℃と37℃における赤血球のPE，PC，PSとSphの含量を表1に示す．値は全リン脂質に対するモル比で表わしてある．いずれの場合もPEは約28.0%，PCは約27.0%，PSは約12.0%そしてSphは約24.3%前後の値を示した．すなわち，三つのグループ間で，これ等のリン脂質の含量に差異は認められず，また温度の影響も受けなかった．この結果は赤血球のリン脂質の主成分において，DMDとcontrol間に差異はないという報告と一致する[2),3)]．

イノシトール代謝系リン脂質，PI，DPI，TPIとPAはリン脂質中の微量成分であるが，細胞膜の刺激—受容応答およびCa^{2+}代謝に関与し，早い代謝回転を行い，細胞の生命維持に重要な役割を果している．PIがATPよりリン酸化を受けてDPIとなり，さらにリン酸化を受けTPIとなる．次いでこれ等のイノシトールリン脂質が分解して，PAが生産される．GKD-CHA-DMD，DMDとcontrolのイノシトールリン脂質とPAの結果について，図1と2に示す．

PI（図1）：　赤血球を0℃から37℃に3時間浮置するとGKD-CHA-DMD（白丸），DMD（黒丸），control（四角）のPI含量はいずれの場合も増加した．すなわち三つのグループ間で，PI含量の温度変化には差異が認められなかった．

DPI（図1）：　赤血球を0℃から37℃に温度を上昇すると，DPIの含量はいずれのグループにおいても減少した．そこには差異は認められなかった．この結果は昭和57年度の筋ジストロフィー症班会議で報告した結果[4)]と一致する．

TPIとPA（図2）：　一般に正常赤血球のTPIは，赤血球の温度を0℃から37℃にすると，

表1　赤血球の0℃と37℃におけるPE，PC，PSとSphの含量
GKD：　glcerol kinase欠損，先天性副腎低形成を伴うDuchenne型筋ジストロフィー症（本文ではGKD-CHA-DMDと略した）
DMD：　Duchenne型筋ジストロフィー症，control：　気管支喘息症
値は全リン脂質に対するモル比で示した

	°C	PE % mean ± SE	PC % mean ± SE	PS % mean ± SE	Sph % mean ± SE
GKD	0	27.7	27.5	11.6	23.4
	37	27.2	28.2	12.3	23.4
DMD	0	28.2 ± 0.6	27.1 ± 1.0	12.0 ± 0.6	24.8 ± 0.4
	37	28.3 ± 0.9	27.0 ± 1.0	12.1 ± 0.2	24.3 ± 0.4
Cont	0	28.2 ± 0.5	26.3 ± 0.6	11.9 ± 0.7	24.8 ± 0.6
	37	28.3 ± 0.6	26.1 ± 0.8	12.3 ± 0.5	25.0 ± 0.8

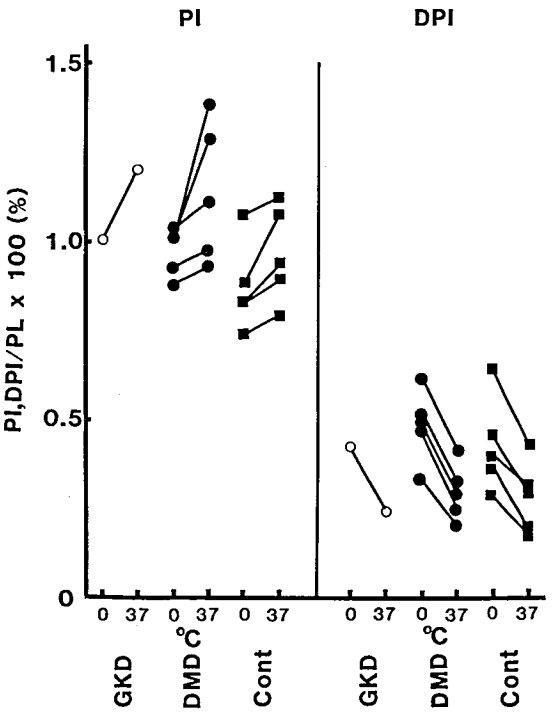


図1　赤血球の0℃と37℃におけるPIとDPI含量
縦軸は総リン脂質に対するモル比を示すGKD, DMD, controlは表説明を参照.

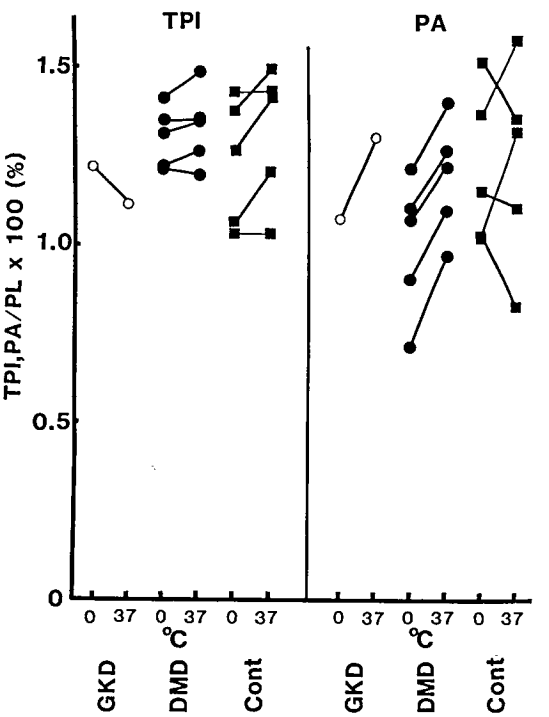


図2　赤血球の0℃と37℃におけるTPIとPA含量
縦軸は総リン脂質に対するモル比を示すGKD, DMD, controlは表説明を参照.

その含量が上昇する．GKD-CHA-DMD（白丸）のTPI含量は，温度が上昇すると逆に減少した．一方PA含量は増加した．DMD（黒丸）のTPI含量は変化がないか，わずか増加した．PA含量は総て増加した．control（四角）の場合は5名中2名のTPI含量が変化なく，PA含量は増加した．この結果はDMD赤血球の挙動と一致する．controlの他3名のTPI含量は，正常赤血球と同様に，温度上昇と共に増加し，PA含量は減少した．

controlの赤血球で，TPIとPA含量の結果が分散したのは，気管支喘息患者の赤血球を使用したためなのか分からない．年齢20歳前後のDMDとcontrolの赤血球のTPIとPA含量の温度変化について，昭和57年度と昭和58年度の筋ジストロフィー症班会議で報告した[4),5)]．その時の結果は，温度が上昇するとDMD赤血球のTPI含量は減少し，PA含量は増加した．一方，control赤血球のTPI含量は増加し，PA含量は減少した．この結果と本年度の結果を考え合わせると，赤血球の温度が0℃から37℃に上昇した時，DMDの赤血球のTPI含量は減少傾向あるいは減少し，PA含量は増加する．一方controlの赤血球のTPIは逆に増加し，PA含量は減少する傾向を示す．GKD-CHA-DMDの赤血球のTPIとPA含量の温度変化はDMDの赤血球の挙動を示した．

ま　と　め

①赤血球リン脂質の主成分（PE, PC, PS, Sph）の含量及びその温度変化は，GKD-CHA-DMD, DMDとcontrol間に差異はなかった．②イノシトールリン脂質のPIとDPI含量の温度変化は，三つのグループ間に差異はなかった．TPIとPA含量の温度変化で，GKD-CHA-DMDとDMD赤血球は，controlと異る挙動を示した．すなわち

TPI と PA が関与する代謝系に異常があることを示唆した．③ GKD-CHA-DMD 赤血球のリン脂質含量に対する温度の影響は，DMD のそれと一致する．

文　　献

1）吉田瑞子ほか：　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，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 p133，1984

2）T. Kobayashi, S. Mawatari and Y. Kuroiwa : Lipids and Proteins of Erythrocyte Membrane in Duchenne Muscular Dystrophy. Clin Chim. Act. 85：259-266（1978）

3）C.L. Koski, F. Jungalwala and E.H. Kolodny : Normality of Erythrocyte Phospholipids in Duchenne Muscular Dystrophy. Clin. Chim. Act. 85：295-298（1978）

4）吉田瑞子ほか：　Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球の polyphosphoinositide の同定，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 p141（1983）

5）吉田瑞子ほか：　Duchenne 型筋ジストロフィー症の赤血球のホスファチジン酸について，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 p155（1984）

30) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜Spectrinの分析

馬　渡　志　郎*

はじめに

Spectrinは赤血球膜において，いわゆる裏打ち構造を構成する蛋白質の1つであり，赤血球膜蛋白質全体の約25%，裏打ち構造を構成する蛋白質（erythrocyte cytoskeleton）の約75%を占めていると考えられている[1),2)]．spectrinはactin, ankyrinなどの他の裏打ち構造構成蛋白質とともに赤血球の形態の維持変化に関わっているだけでなく，その他の種々の膜機能との関係が示唆されている[1)]。例えば膜のリン脂質の非対称的二重構造の維持にも関係があると考えられている．DMDの赤血球膜については，多くの異常の報告があるが，spectrinについてもATPによる燐酸化（phosphorylation）の異常[6)]あるいは低イオン性溶媒による抽出性の低下[3)~5)]，などの報告がある．

この研究では，DMD群と対照群よりspectrinを抽出し，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて，spectrinの精製を試み，それらの各分画のアミノ酸構成などを比較した．

対象と方法

DMD患者6名および同年齢，同性の脳性小児麻痺患者6名より，同日，同時刻に採血し，赤血球膜の作整その他の資料の操作および測定はすべてDMDと対照を交互または同時に行った．赤血球膜は−80℃に保存したものを用いた．粗spectrinの抽出は一定量の赤血球膜を0.1 mMEDTA液で37℃で抽出した．遠沈後，上清は0.45μmのフィルターで濾過した後，蛋白の濃度を測定した．粗spectrinはさらにHPLCによるゲル濾過を行った．HPLCはWaters社製の装置を使用し，ゲル濾過のカラムはProtein pak300×2本(Waters社)，移動相は0.1Mリン酸ナトリウム（pH7.2）+0.2M NaCl，流速は0.5mlまたは0.8ml/分，UV280nmでモニターした．各分画を分取し，限外濾過膜(Amicon社)による脱塩濃縮（ピーク1図2）あるいは透析で脱塩し凍結乾燥（ピーク3～4図1）を行った．各分画の一定量を乾燥後6 N塩酸でN_2下に110℃，22時間加水分解を行った．HPLCによるアミノ酸の分析はフェニルイソチオシアネート（PITC）でラベルした後，Waters社のPICO・TAG法に従って行った．各アミノ酸の同定には標準アミノ酸（Pierce社）を資料と同様にPITCでラベルし，同様にHPLCを行ってそのretention timeより同定した．クロマトグラフィーデータ処理装置(島津RI-B)で面積比を算出し，標準アミノ酸のモル%より資料の各アミノ酸のモル%を算出した．

結　　果

0.1mM EDTAによるspectrin（およびactin）の抽出率は使用した赤血球膜の蛋白質と抽出された蛋白の総量の割合(%)で求めたが，DMD群で16.9±1.9%，対照群で20.1±2.4%でDMDで有意に($P<0.05$)に低値であった．粗spectrin液を4℃に2日保存後にHPLCによるゲル濾過を行った場合は図1の如く4つのピークに分画され，この粗spectrin液をさらに4℃に6日間保存した後，−20℃に凍結保存し，室温で解凍したものをゲル濾過すると図2のように分画された．すなわち，図1と比較してピーク1が増加し，ピーク4が減少していた．いずれのゲル濾過においても各分画の割合はDMD群と対照群で有意差はなかった．アミノ酸組成分析は粗spectrin，図1におけるピーク（4＋3）の分画，および図2におけるピーク1の分画で行った．アミノ酸組成（モル%）は粗spectrin分画とピーク1の分画はほぼ同様であったが，ピーク4のアミノ酸組成はピーク1

*国立療養所筑後病院

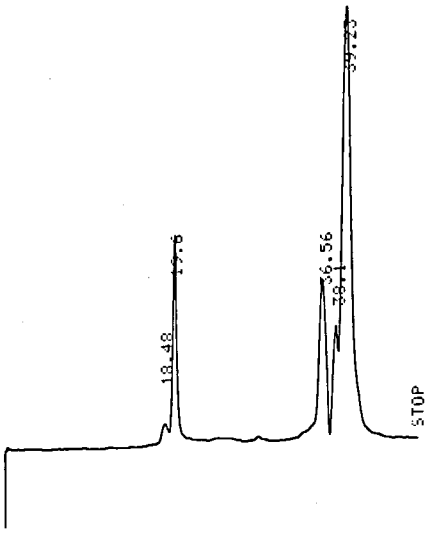


図1　粗 spectrin の HPLC によるゲル濾過クロマトグラム
ピークは左よりピーク1 (19.6)，ピーク2 (36.56)，ピーク3 (38.1) およびピーク4 (39.23) とした．

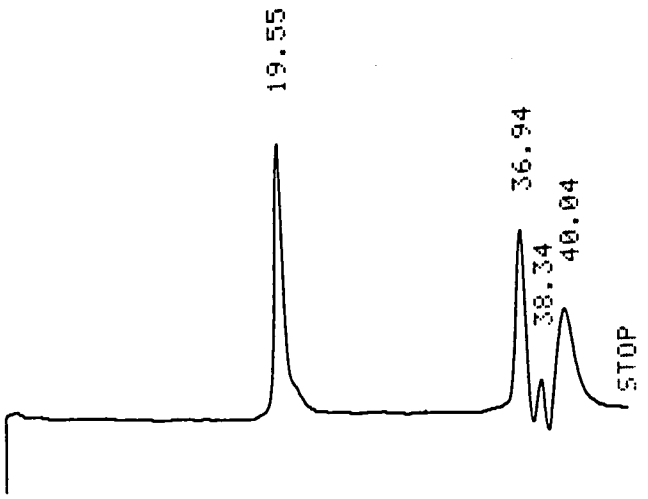


図2　図1と同じ粗 spectrin 液を一定期間保存後（本文参照）に図1と同条件で行ったゲル濾過クロマトグラム
ピークは図と同じく左より1，2，3，4とした．

のそれと明らかに異なっていた（表2，3，4）．しかし，いずれの分画においても DMD と対照群で有意差を認めなかった．

考　　案

DMD 赤血球膜より，水[3] あるいは EDTA 液[4),5)] で spectrin を抽出すると，その抽出率は対照に比較して低下していることはすでに報告されている[3)~5)]．これらの報告のいずれも spectrin 抽出後に残った赤血球膜の SDS-PAGE におけるバンド3に対する spectrin のバンド比をデンシトメーターに算出したものである．この研究では抽出された spectrin（および actin を含む）の量と，使用した赤血球膜の蛋白量より求めたものであるが，DMD で抽出率は有意に低かった．

ゲル濾過による蛋白質の分画は，通常の球状蛋白質であれば蛋白質の分子量に従って溶出が行われ，SDS-PAGE と共に蛋白質の分子量の推定にも応用されているが，spectrin は球状蛋白質でないことと，抽出した spectrin も通常 oligomer として存在しているために，spectrin のゲル濾過に

表1　Amino Acid Composition of EDTA extracts of Erythrocyte Membranes (mole %).

	DMD (n=6)	Control (n=6)
Aspartic acid	10.3 ± 0.8	10.2 ± 0.4
Glutamic acid	17.2 ± 1.3	18.3 ± 1.7
Serine	7.3 ± 0.4	7.6 ± 0.5
Glycine	6.3 ± 1.0	6.3 ± 1.0
Histidine	2.7 ± 0.3	2.6 ± 0.2
Arginine	7.1 ± 0.6	6.8 ± 0.8
Threonine	5.2 ± 0.5	5.3 ± 0.7
Alanine	8.0 ± 0.5	8.0 ± 0.6
Proline	4.4 ± 0.7	4.8 ± 0.3
Tyrosine	3.0 ± 0.3	2.9 ± 0.2
Valine	4.5 ± 0.4	4.3 ± 0.3
Methionine	2.5 ± 1.0	2.6 ± 0.7
Cysteine	-	-
Isoleucine	4.0 ± 0.2	3.6 ± 0.4
Leucine	9.0 ± 0.6	9.1 ± 0.7
Phenylalanine	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.3
Tryptophan	-	-
Lysine	5.9 ± 0.8	5.4 ± 0.4

表2　Amino Acid Composition of Peak 1 of Gel-filtration (mole %).

	DMD (n=5)	Control (n=5)
Asp	8.6 ± 0.9	8.4 ± 0.9
Glu	14.3 ± 1.6	14.9 ± 1.2
Ser	5.9 ± 0.3	6.0 ± 0.2
Gly	6.2 ± 0.4	6.5 ± 0.5
His	5.0 ± 0.6	4.7 ± 0.8
Arg	6.8 ± 0.5	6.6 ± 0.3
Thr	5.4 ± 0.3	5.3 ± 0.2
Ala	9.7 ± 0.2	9.8 ± 0.4
Pro	5.4 ± 0.8	4.8 ± 0.7
Tyr	2.7 ± 0.8	3.0 ± 0.4
Val	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.4
Met	3.2 ± 1.0	2.6 ± 0.5
Cys	-	-
Iso-Leu	2.6 ± 0.3	2.9 ± 0.2
Leu	9.6 ± 0.6	10.2 ± 0.4
Phe	3.5 ± 0.5	3.3 ± 0.4
Try	-	-
Lys	6.5 ± 0.5	6.2 ± 0.6

表3　Amino Acid Composition of Peak 4 (and 3) of Gel-filtration (mole %).

	DMD (n=5)	Cntrol (n=5)
Asp	4.4 ± 0.7	4.6 ± 0.5
Glu	9.7 ± 1.2	9.8 ± 1.5
Ser	12.7 ± 1.2	13.4 ± 2.5
Gly	13.8 ± 1.4	12.4 ± 1.2
His	7.6 ± 2.0	8.2 ± 1.2
Arg	6.0 ± 1.3	5.0 ± 1.4
Thr	4.6 ± 0.5	4.6 ± 0.7
Ala	6.3 ± 0.7	6.7 ± 0.4
Pro	4.8 ± 0.9	4.5 ± 0.8
Tyr	4.1 ± 0.8	3.8 ± 0.7
Val	3.7 ± 0.6	3.7 ± 0.5
Met	2.6 (n=2)	2.3 (n=1)
Cys	-	-
Iso-Leu	3.0 ± 0.4	3.4 ± 0.8
Leu	3.8 ± 0.4	3.3 ± 0.1
Phe	3.5 ± 0.8	3.5 ± 1.3
Try	6.1 ± 1.0	7.5 ± 1.2
Lys	3.4 ± 0.5	3.2 ± 0.5

よる分画は分子量に従っているとは考えにくい．各分画はその oligomer (dimer 以上の) の程度によって分画されている可能性が考えられる．いずれにしろ，本研究において，粗 spectrin 分画とピーク1分画のアミノ酸組成比は，SDS-PAGE 分画より抽出した spectrin のアミノ酸組成比[2] とほぼ一致している．ピーク4（および3）の分画のアミノ酸組成はピーク1のそれと明らかに異なっていた．この理由は当面明らかではない．しかし，いずれの分画においても DMD 群と対照群との間に明らかな有意差は認めなかった．

DMD 赤血球膜における spectrin の抽出性の低下は本研究でも認められたが，その原因については spectrin 自体のアミノ酸組成の異常ではないように見える．

文　献

1) Marchesi V.T.: The red cell membrane skeleton: Recent progress. Blood, 61; 1-11, 1983.

2) Anderson J.M.: Structural studies on human spectrin; Comparison of subunits and fragmentation of native spectrin. J, Biol. Chem., 254; 939-944, 1979.

3) Nagano, Y., Wong. P.,Roses, A.D.:Altered erythrocyte spectrin extractability in Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta. 108; 467-479, 1980.

4) Tsuchiya, Y., Sugita, H., Ishiura, S., Imahori, K.: Spectrin extractability in Duchenne muscular dystrophy and the effect of proteases on erythrocyte ghosts. Clin. Chim. Acta, 109; 285-293, 1981.

5) Gargioni, G., Chiaffoni, G., Bonadonna, G. et al: Spectrin extractability from erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy patients and carriers and in other myopathies. Clin. Chim. Acta, 145; 259-265, 1985.

6) Roses, A.D., Herberstreith, M., Metcalf, B., et al: Increased phosphorylated components of erythrocyte membrane spectrin peak II with reference to Duchenne muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 30; 167-178, 1976.

V．遠位型ミオパチー

30) Duchenne 型筋ジストロフィー症赤血球膜Spectrinの分析

馬　渡　志　郎*

はじめに

Spectrinは赤血球膜において，いわゆる裏打ち構造を構成する蛋白質の1つであり，赤血球膜蛋白質全体の約25%，裏打ち構造を構成する蛋白質（erythrocyte cytoskeleton）の約75%を占めていると考えられている[1),2)]．spectrinはactin, ankyrinなどの他の裏打ち構造構成蛋白質とともに赤血球の形態の維持変化に関わっているだけでなく，その他の種々の膜機能との関係が示唆されている[1)]。例えば膜のリン脂質の非対称的二重構造の維持にも関係があると考えられている．DMDの赤血球膜については，多くの異常の報告があるが，spectrinについてもATPによる燐酸化（phosphorylation）の異常[6)]あるいは低イオン性溶媒による抽出性の低下[3)~5)]，などの報告がある．

この研究では，DMD群と対照群よりspectrinを抽出し，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて，spectrinの精製を試み，それらの各分画のアミノ酸構成などを比較した．

対象と方法

DMD患者6名および同年齢，同性の脳性小児麻痺患者6名より，同日，同時刻に採血し，赤血球膜の作整その他の資料の操作および測定はすべてDMDと対照を交互または同時に行った．赤血球膜は−80℃に保存したものを用いた．粗spectrinの抽出は一定量の赤血球膜を0.1 mMEDTA液で37℃で抽出した．遠沈後，上清は0.45μmのフィルターで濾過した後，蛋白の濃度を測定した．粗spectrinはさらにHPLCによるゲル濾過を行った．HPLCはWaters社製の装置を使用し，ゲル濾過のカラムはProtein pak300×2本(Waters社)，移動相は0.1Mリン酸ナトリウム（pH7.2)+0.2M NaCl，流速は0.5mlまたは0.8ml/分，UV280nmでモニターした．各分画を分取し，限外濾過膜(Amicon社)による脱塩濃縮（ピーク1図2）あるいは透析で脱塩し凍結乾燥（ピーク3～4図1）を行った．各分画の一定量を乾燥後6 N塩酸でN_2下に110℃，22時間加水分解を行った．HPLCによるアミノ酸の分析はフェニルイソチオシアネート（PITC）でラベルした後，Waters社のPICO・TAG法に従って行った．各アミノ酸の同定には標準アミノ酸（Pierce社）を資料と同様にPITCでラベルし，同様にHPLCを行ってそのretention timeより同定した．クロマトグラフィーデータ処理装置(島津RI-B)で面積比を算出し，標準アミノ酸のモル%より資料の各アミノ酸のモル%を算出した．

結　果

0.1mM EDTAによるspectrin（およびactin）の抽出率は使用した赤血球膜の蛋白質と抽出された蛋白の総量の割合(%)で求めたが，DMD群で16.9±1.9%，対照群で20.1±2.4%でDMDで有意に($P<0.05$)に低値であった．粗spectrin液を4℃に2日保存後にHPLCによるゲル濾過を行った場合は図1の如く4つのピークに分画され，この粗spectrin液をさらに4℃に6日間保存した後，−20℃に凍結保存し，室温で解凍したものをゲル濾過すると図2のように分画された．すなわち，図1と比較してピーク1が増加し，ピーク4が減少していた．いずれのゲル濾過においても各分画の割合はDMD群と対照群で有意差はなかった．アミノ酸組成分析は粗spectrin，図1におけるピーク（4＋3）の分画，および図2におけるピーク1の分画で行った．アミノ酸組成（モル%）は粗spectrin分画とピーク1の分画はほぼ同様であったが，ピーク4のアミノ酸組成はピーク1

*国立療養所筑後病院

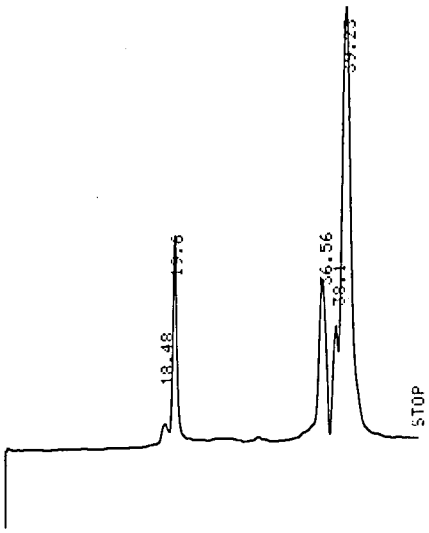


図1　粗 spectrin の HPLC によるゲル濾過クロマトグラム
ピークは左よりピーク1 (19.6)，ピーク2 (36.56)，ピーク3 (38.1) およびピーク4 (39.23) とした．

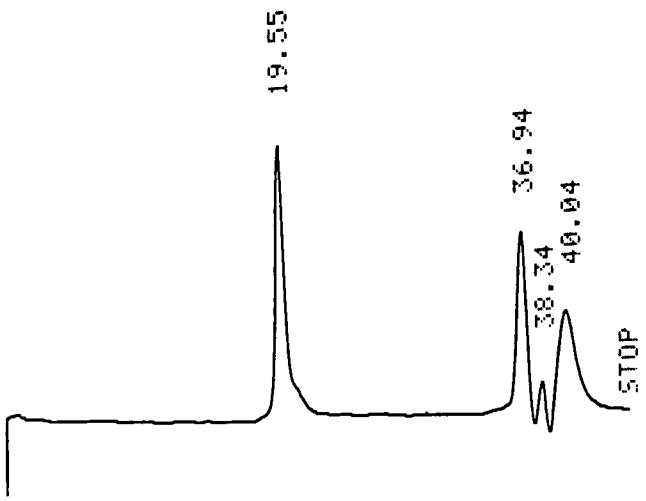


図2　図1と同じ粗 spectrin 液を一定期間保存後（本文参照）に図1と同条件で行ったゲル濾過クロマトグラム
ピークは図と同じく左より1，2，3，4とした．

のそれと明らかに異なっていた（表2，3，4）．しかし，いずれの分画においても DMD と対照群で有意差を認めなかった．

考　　案

DMD 赤血球膜より，水[3] あるいは EDTA 液[4),5)] で spectrin を抽出すると，その抽出率は対照に比較して低下していることはすでに報告されている[3)~5)]．これらの報告のいずれも spectrin 抽出後に残った赤血球膜の SDS-PAGE におけるバンド3に対する spectrin のバンド比をデンシトメーターに算出したものである．この研究では抽出された spectrin（および actin を含む）の量と，使用した赤血球膜の蛋白量より求めたものであるが，DMD で抽出率は有意に低かった．

ゲル濾過による蛋白質の分画は，通常の球状蛋白質であれば蛋白質の分子量に従って溶出が行われ，SDS-PAGE と共に蛋白質の分子量の推定にも応用されているが，spectrin は球状蛋白質でないことと，抽出した spectrin も通常 oligomer として存在しているために，spectrin のゲル濾過に

表1　Amino Acid Composition of EDTA extracts of Erythrocyte Membranes (mole %).

	DMD (n=6)	Control (n=6)
Aspartic acid	10.3 ± 0.8	10.2 ± 0.4
Glutamic acid	17.2 ± 1.3	18.3 ± 1.7
Serine	7.3 ± 0.4	7.6 ± 0.5
Glycine	6.3 ± 1.0	6.3 ± 1.0
Histidine	2.7 ± 0.3	2.6 ± 0.2
Arginine	7.1 ± 0.6	6.8 ± 0.8
Threonine	5.2 ± 0.5	5.3 ± 0.7
Alanine	8.0 ± 0.5	8.0 ± 0.6
Proline	4.4 ± 0.7	4.8 ± 0.3
Tyrosine	3.0 ± 0.3	2.9 ± 0.2
Valine	4.5 ± 0.4	4.3 ± 0.3
Methionine	2.5 ± 1.0	2.6 ± 0.7
Cysteine	-	-
Isoleucine	4.0 ± 0.2	3.6 ± 0.4
Leucine	9.0 ± 0.6	9.1 ± 0.7
Phenylalanine	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.3
Tryptophan	-	-
Lysine	5.9 ± 0.8	5.4 ± 0.4

表2　Amino Acid Composition of Peak 1 of Gel-filtration (mole %).

	DMD (n=5)	Control (n=5)
Asp	8.6 ± 0.9	8.4 ± 0.9
Glu	14.3 ± 1.6	14.9 ± 1.2
Ser	5.9 ± 0.3	6.0 ± 0.2
Gly	6.2 ± 0.4	6.5 ± 0.5
His	5.0 ± 0.6	4.7 ± 0.8
Arg	6.8 ± 0.5	6.6 ± 0.3
Thr	5.4 ± 0.3	5.3 ± 0.2
Ala	9.7 ± 0.2	9.8 ± 0.4
Pro	5.4 ± 0.8	4.8 ± 0.7
Tyr	2.7 ± 0.8	3.0 ± 0.4
Val	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.4
Met	3.2 ± 1.0	2.6 ± 0.5
Cys	-	-
Iso-Leu	2.6 ± 0.3	2.9 ± 0.2
Leu	9.6 ± 0.6	10.2 ± 0.4
Phe	3.5 ± 0.5	3.3 ± 0.4
Try	-	-
Lys	6.5 ± 0.5	6.2 ± 0.6

表3　Amino Acid Composition of Peak 4 (and 3) of Gel-filtration (mole %).

	DMD (n=5)	Cntrol (n=5)
Asp	4.4 ± 0.7	4.6 ± 0.5
Glu	9.7 ± 1.2	9.8 ± 1.5
Ser	12.7 ± 1.2	13.4 ± 2.5
Gly	13.8 ± 1.4	12.4 ± 1.2
His	7.6 ± 2.0	8.2 ± 1.2
Arg	6.0 ± 1.3	5.0 ± 1.4
Thr	4.6 ± 0.5	4.6 ± 0.7
Ala	6.3 ± 0.7	6.7 ± 0.4
Pro	4.8 ± 0.9	4.5 ± 0.8
Tyr	4.1 ± 0.8	3.8 ± 0.7
Val	3.7 ± 0.6	3.7 ± 0.5
Met	2.6 (n=2)	2.3 (n=1)
Cys	-	-
Iso-Leu	3.0 ± 0.4	3.4 ± 0.8
Leu	3.8 ± 0.4	3.3 ± 0.1
Phe	3.5 ± 0.8	3.5 ± 1.3
Try	6.1 ± 1.0	7.5 ± 1.2
Lys	3.4 ± 0.5	3.2 ± 0.5

よる分画は分子量に従っているとは考えにくい．各分画はその oligomer (dimer 以上の) の程度によって分画されている可能性が考えられる．いずれにしろ，本研究において，粗 spectrin 分画とピーク1分画のアミノ酸組成比は，SDS-PAGE 分画より抽出した spectrin のアミノ酸組成比[2] とほぼ一致している．ピーク4（および3）の分画のアミノ酸組成はピーク1のそれと明らかに異なっていた．この理由は当面明らかではない．しかし，いずれの分画においても DMD 群と対照群との間に明らかな有意差は認めなかった．

DMD 赤血球膜における spectrin の抽出性の低下は本研究でも認められたが，その原因については spectrin 自体のアミノ酸組成の異常ではないように見える．

文　献

1) Marchesi V.T.: The red cell membrane skeleton: Recent progress. Blood, 61; 1-11, 1983.

2) Anderson J.M.: Structural studies on human spectrin; Comparison of subunits and fragmentation of native spectrin. J, Biol. Chem., 254; 939-944, 1979.

3) Nagano, Y., Wong. P.,Roses, A.D.:Altered erythrocyte spectrin extractability in Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta. 108; 467-479, 1980.

4) Tsuchiya, Y., Sugita, H., Ishiura, S., Imahori, K.: Spectrin extractability in Duchenne muscular dystrophy and the effect of proteases on erythrocyte ghosts. Clin. Chim. Acta, 109; 285-293, 1981.

5) Gargioni, G., Chiaffoni, G., Bonadonna, G. et al: Spectrin extractability from erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy patients and carriers and in other myopathies. Clin. Chim. Acta, 145; 259-265, 1985.

6) Roses, A.D., Herberstreith, M., Metcalf, B., et al: Increased phosphorylated components of erythrocyte membrane spectrin peak II with reference to Duchenne muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 30; 167-178, 1976.

V．遠位型ミオパチー

31) 遠位型ミオパチーにおける神経筋接合部の電顕的，形態計測的研究

福 原 信 義*

研究協力者　熊 本 俊 秀** 高 守 正 治*

はじめに

我々はすでに rimmed vacuole (RV) を有する遠位型ミオパチー (DMRV) と三好型の遠位型筋ジストロフィー症 (DMM) の筋組織像を比較検討し，両者とも神経原性の要素をかなり有するミオパチーであると結論づけて報告した[1]．その際，少数の神経筋接合部の電顕的観察では，DMRV では神経終末の萎縮しているものがあり，DMM では神経終末の著明に腫大しているもののあることが観察された[1]．今回，多数の神経筋接合部について電顕的に観察し，形態計測分析を行ったので報告する．

症例と方法

症例：分析に用いた症例は表 1 のごとく，DMM は38歳と20歳の女性で，経過は 9 年と 8 年，DMRV は28歳と17歳の男性で，経過は16年と 3 年であり，いずれも臨床像，血清 CK 値からみて典型的な症例である．なお症例 1 と症例 3 には家族歴もみられる．

方法：　通常の手技にて，上腕二頭筋または大腿四頭筋より生検を行い，2.5%グルタールアルデヒドと 1 %オスミュウム酸で二重固定を行い，神経筋接合部を中心として切り出し[2]，アラルダイトに包埋した．できるだけ正確に筋線維の縦断標本を作製し，トルイジンブルー染色により光顕的に観察した．光顕で筋線維には全く異常の認められないものを選んで電顕的観察を行い，形態計測を行った．

形態計測は Engel & Santa (1971) [3] の方法に準じて行った．対照は43歳正常女性の上腕二頭筋と21歳正常男性の大腿四頭筋より採取したものをそれぞれの筋肉の対照として用いた．

表 1　症例のまとめ

Case	Age (yr)	Sex	Duration of Weakness	Biopsied Muscle	Serum CK	
Distal muscular dystrophy (Miyoshi type)						
1	38	F	9 yr.	B	134	(N < 20)
2	20	F	5	Q	22,400	(N < 150)
Distal myopathy with rimmed vacuoles						
3	28	M	16	Q	788	(N < 100)
4	17	M	3	Q	80	(N < 100)
Controls						
	43	F		B		
	21	M		Q		

B : biceps brachii; Q : quadriceps femoris

筋線維タイプの判定は，既報[4] のごとく，Z 帯の巾が100nm 以上で M 帯の巾が広く，M 線が 5 本確認できるものをタイプ I，Z 帯巾が100nm 以下で，M 帯の巾の狭いものをタイプII として扱った．

結　　果

1）presynaptic area (PrA) について (表 2)：DMM では 2 例とも，タイプ I 線維の PrA は有意に大きかった ($P<0.05$, 0.025) が，タイプII 線維では対照との有意差は認められなかった．一方，DMRV では 1 例 (症例 3) でのみタイプII 線維の方で PrA が有意に大きかった ($P<0.05$)．

2）postsynaptic area (PoA) と membrane profile concentration (MPC) について (表 3)：DMM の 2 例は，タイプII 線維の PoA は有意に小さかった ($P<0.005$, 0.01) が，タイプ I 線維

＊金沢大学医学部神経内科
＊＊熊本大学医学部第一内科

では対照との有意差は認められなかった．一方，DMRV では 2 例とも逆にタイプ I 線維の方で PoA が有意に小さく（P<0.005），タイプII線維では有意差は認められなかった．

MPC については，DMM の 1 例ではタイプ I 線維とタイプII線維の両方で他の 1 例ではタイプII線維でのみ MPC が低下していた．DMRV でも同様で 1 例ではタイプ I 線維とタイプII線維の両方で，他の 1 例ではタイプII線維でのみ MPC が低下していた（P<0.005）．

表 2　神経筋接合部の形態計測（1）

	Muscle	Presynaptic Area (μm²) Type I	Type II
Control (43 y. F)	B	3.92 ± 0.74 (n=10)	3.20 ± 0.72 (n=22)
Case 1 (DMM)	B	9.93 ± 2.98* (n=15)	3.21 ± 0.43 (n=11)
Control (21 y. M)	Q	2.22 ± 0.39 (n=16)	2.16 ± 0.36 (n=48)
Case 2 (DMM)	Q	5.34 ± 1.44** (n=12)	3.87 ± 1.07 (n=18)
Case 3 (DMRV)	Q	2.95 ± 0.45 (n=4)	3.12 ± 0.42* (n=43)
Case 4 (DMRV)	Q	2.80 ± 0.51 (n=16)	2.49 ± 0.67 (n=14)

B : biceps brachii; Q : quadriceps femoris
Values indicate Mean ±S.E.
* Significantly different from control values (p < 0.05).
** 〃 (p < 0.025)

考　　察

正常神経筋接合部の計測値については，Engel ら[5] によって肋間筋，短腓骨筋，指伸筋で比較検討され，筋肉の種類が異なると各筋の計測値に有意差のあるものがあるという．上腕二頭筋における正常値は，Tsujihata ら[6]によって報告されているのみであり，彼らの計測値と我々のそれとでは数字上やや異なるが，PrA と PoA については両者に有意差はない．ただ，MPC については6.07±0.07という Tsujihata らの計測値は我々の計測値より有意に大きいがその理由は不明である．しかし，もし Tsujihata らの計測値を対照値として計算すれば症例 2 の MPC は結果で示したよりももっと大きな有意差で小さいことになる．いずれにしても，我々の対照値が PrA, PoA, MPC のいずれもタイプ I 線維とタイプII線維の間で有意差が示されないにもかかわらず，DMM, DMRV ではタイプ線維の一方でのみ変化がみられたことは注

表 3　神経筋接合部の形態計測（2）

	Muscle	Postsynaptic Area per Nerve Terminal (μm²) Tyep I	Type II	Membrane profile Concentration (μm/μm²) Tyep I	Type II
Control (43 y. F)	B	10.73 ± 1.40 (n=12)	11.07 ± 1.48 (n=22)	4.05 ± 0.54 (n=12)	4.94 ± 0.22 (n=22)
Case 1 (DMM)	B	11.07 ± 2.20 (n=15)	5.40 ± 0.61*** (n=11)	4.53 ± 3.30 (n=15)	4.26 ± 0.29* (n=11)
Control (21 y. M)	Q	12.87 ± 1.25 (n=16)	10.82 ± 0.93 (n=48)	5.51 ± 0.27 (n=16)	5.67 ± 0.20 (n=48)
Case 2 (DMM)	Q	11.07 ± 2.17 (n=12)	7.34 ± 1.05** (n=18)	4.57 ± 0.41* (n=12)	4.50 ± 0.39** (n=18)
Case 3 (DMRV)	Q	6.41 ± 1.23*** (n=4)	10.04 ± 1.01 (n=44)	4.78 ± 0.57 (n=4)	4.19 ± 0.25*** (n=44)
Case 4 (DMRV)	Q	7.79 ± 0.84*** (n=16)	14.20 ± 1.88 (n=14)	3.88 ± 0.32*** (n=16)	4.34 ± 0.27*** (n=14)

B : biceps brachii; Q : quadriceps femoris
Values indicate Mean ± S.E.
* Significantly different from control values (p < 0.05)
** 〃 (p < 0.01)
*** 〃 (p < 0.005)

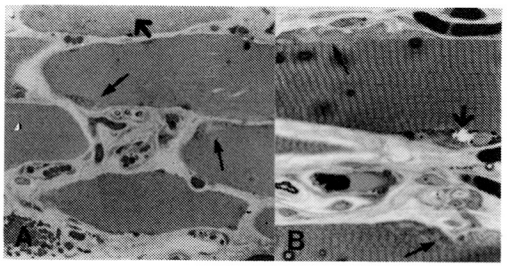


図1　運動終板の光顕像
アラルダイト包埋，トルイジンブルー染色×320
A．三好型遠位型筋ジストロフィー症（症例1）．運動終板（小矢印）の観察される筋線維は正常であるが，近くには変性した筋線維（大矢印）もみられる．B．RV型遠位型ミオパチー（症例4），運動終板（小矢印）のみられる筋線維は一部に自己貪食飽（大矢印）がみられるが，筋線維自体には異常はみられない．

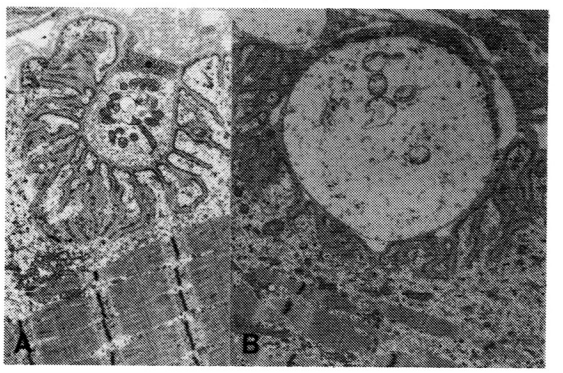


図2　神経筋接合部（上腕二頭筋）の電顕像，×5,500
正常（A）に比べ，三好型筋ジストロフィー症（症例1）（B）では軸索終末部は著明に腫大しており，細胞内小器官も減少している．

目してよいと思われる．大腿四頭筋については未だ正常値の報告はないものの，今までの他の筋における正常値と比較すると，対照値としてほぼ適正な値が得られているものと思われる．

今回の形態計測の結果は，DMM，DMRV ともにほぼ共通して軸索終末の腫大，PoA の減少，synaptic cleft の単純化を示している．タイプ線維の違いは DMM では presynaptic 側はタイプ I に，postsynaptic 側はタイプ II の変化が大きく，DMRV では逆に presynaptic 側はタイプ II に，postsynaptic 側はタイプ I の変化が大きいようであるが，症例数が多くなれば差がなくなる可能性もある．むしろ，個々の症例でタイプ線維による病変の違いのあることに注目したい．筋線維のタイプは脊髄前角細胞の神経支配と密接な関係を有しており，神経筋接合部の変化が筋線維タイプによって異なるということは，DMM と DMRV がその発症機序において神経性因子が関与していることを示すものと思われる．

今回の症例では，筋力低下の比較的軽い近位筋を選んで生検しており，観察部位も光学顕微鏡的に正常と思われる筋線維の神経筋接合部を選んでいるため廃用性または筋病変による二次的変化を示すものとは考えられない．また，4症例ともタイプ II C 線維の頻度は0.6～1.9％と低く，acridine orange 染色でも再生筋はそれほど多く

ないと考えられ，電顕で観察した筋肉もすべて成熟した筋線維であり，再生過程のものとは思われない．

Engel ら[5]は，Welander 型の遠位型ミオパチーにおける大腿四頭筋の神経筋接合部を11個観察し，軸索終末部のみられない"denuded postsynaptic region"が有意に多いことを報告し，神経原性の疾患であることを示唆している．

結　論

DMM 2 例と DMRV の 2 例で神経筋接合部の電顕的形態計測を行い，軸索終末の腫大と PoA の低下を認めた．これらの疾患の発症機序については神経性因子の関与が重要と考えられた．

文　献

1）福原信義，熊本俊秀，松原四郎，高守正治：筋生検所見よりみた遠位型ミオパチーと遠位型筋ジストロフィーの比較検討，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，昭和58年度研究報告書，1984，pp. 186-189.

2）Fukuhara, N., Yuasa, T., Tsubaki, T. et al.: Nemaline myopathy: histological, histochemical and ultrastructural studies. Acta Neuropathol. 42：33-41, 1978.

3）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., 183：46-63, 1971.

4）Fukuhara, N., Suzuki, M.,Tsubaki, T. et al.: Ultrastructural studies on the neuromuscular junctions of Becker's muscular dystrophy. Acta Neuropathol., 66：283-291, 1985.

5）Engel, A.G., Jerusalem, F., Tsujihata, M. et al.: The neuromuscular junction in myopathies. A quantitative ultrastructural study. In Recent advances in myology (Ed. Bradley, W. G., Gardner-Medwin, D. & Walton, J.N.), Excerpta medica, Amsterdam, 1975. p. 132-143.

6）Tsujihata, M., Hazama, R., Yoshimura, T. et al.: The motor end-plate fine ultrastructure and ultrastructural localization of acetylcholine receptors in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle & Nerve, 7：243-249, 1984

32) Rimmed vacuoleを伴う筋疾患におけるリソゾームカテプシン群の局在と意義

木南英紀*

研究協力者　勝沼信彦*　伊井邦雄**　檜澤一夫**
杉田秀雄***　埜中征哉***　塚越廣****
川井充*****

はじめに

Rimmed vacuole (RV)はdistal myopathy, polymyositisなどいろいろな筋疾患にその出現をみるが，autophagic vacuole (AV)としての特徴を有するという証拠が蓄積しつつある．AVはタンパク分解の主要な場であり，特にシステインプロテアーゼ群はタンパク分解の主役とされている．昨年度，我々はRVを伴うdistal myopathyの一症例についてペルオキシダーゼ標識ヒトカテプシンB及びH抗体を用いて，カテプシン群がRVに一致して局在することを免疫組織化学的に示した[1]．今回はさらに数症例について同様の検索を重ね詳細に検討した．

材料と方法

今回用いた筋生検材料の主要な所見を表1にまとめた．いずれもRVを伴うdistal myopathyだが，第4例目だけは臨床診断がはっきりせず，組織診断ではRV型distal myopathyとは直ちに結論づけられない．封入体筋炎や神経原性ミオパチーの可能性を否定できない．ヒトカテプシンB及びHの精製は唐渡[2]及びKirschke[3]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．詳細は昨年度の報告書に譲る．次に精製酵素を用いて特異抗体を作成した．抗ヒトカテプシンB及びH家兎血清よりペプシン消化により$F(ab')_2$を得，カテプシン2種の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識Fab'を石川ら[4]の方法に従って調製した．免疫組織化学法は今川らの方法[5]を修飾した方法[6]でいわゆる直接法である．同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，非免疫血清で処理後，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．

表1　筋生検材料

Case	age	Sex	Diagnosis	CPK
神経センター	27	F	DMRV	104
神経センター	38	M	DMRV	185
東京医科歯科大学	21	F	DMRV	364
Bonn大学	–	–	RV myopathy (neurogenic? IBM?)	–
東大	43	M	RV myopathy	966

結果

昨年度RV型distal myopathy 1例の患者罹患筋切片を抗ヒトカテプシンB及びH-Fab'-ペルオキシダーゼ複合体を用いて免疫組織的染色を行い，RVに一致して顆粒状の染色が観察されることを報告した．本年検索した他の4症例についても同様にRVの大小にかかわらず，多くのVacuoleの内容物はカテプシンB及びHとも陽性であった．代表的なものとして症例5のカテプシンHの局在を図1に示す．中央右寄りの1本の

＊徳島大学医学部酵素化学
＊＊徳島大学医学部病理
＊＊＊国立神経センター武蔵療養所
＊＊＊＊東京医科歯科大学医学部神経内科
＊＊＊＊＊東京大学医学部神経内科

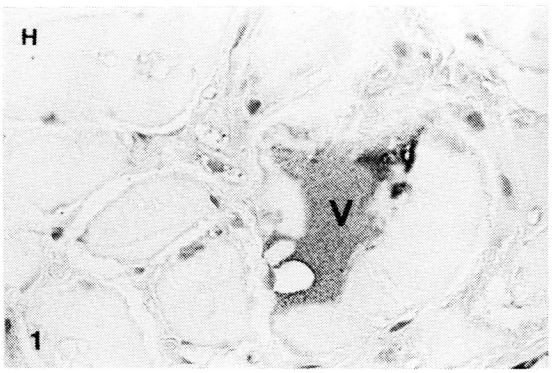


図1　症例5におけるカテプテンHの局在中央右寄りの1本の筋線維内の大きなRimmed vacuole（V）及びその他の筋線維内の小さなRimmed vacuoleに種々の程度に陽性である．

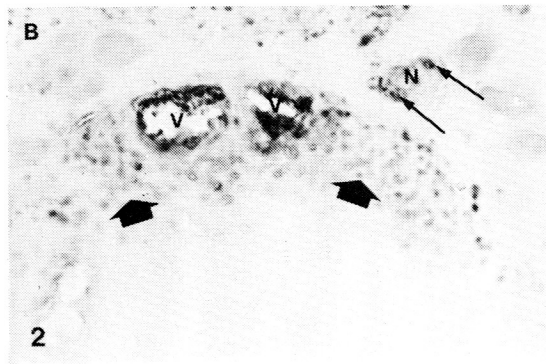


図2　症例1におけるカテプシンBの局在中央に1本の筋線維（横断）の約1/2が示されているが，その筋鞘直下に形成された2個のRimmed vacuole（V）に強陽性である他，筋線維の周辺部の筋鞘直下及び筋原線維間に顆粒状あるいは小空胞状に陽性顆粒が帯状に（太い矢印）みられる．また別の筋線維（右上）では筋核（N）周囲にも強陽性である．（100×5×3.3）

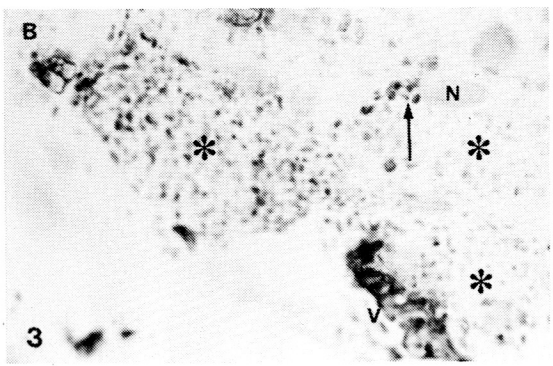


図3　症例1におけるカテプシンBの局在右下の筋線維の筋鞘直下のRimmed vacuole（V）に強陽性であるが，筋原線維間（右下，右上，中央の3本の筋線維の星印）に顆粒状あるいは小空胞状に陽性所見が見られる他，筋核（N）周囲にも強陽性所見がみられる．（100×5×3.3）

筋線維内の大きなRimmed vacuole（V）及びその他の筋線維内の小さなRimmed vacuoleに種々の程度に陽性である．又，症例1及び5ではRVのみならず，筋線維内に強いカテプシン量が増加していることが推察された．即ち，**図2**は症例1におけるカテプシンBの局在を示したもので，中央に1本の筋線維（横断）の約1/2が示されているが，その筋鞘直下に形成された2個のRimmed vacuole（V）に強陽性である他，筋線維の周辺部の筋鞘直下及び筋原線維間に顆粒状あるいは小空胞状に陽性顆粒が帯状に（太い矢印）みられる．また別の筋線維（右上）では筋核（N）周囲にも強陽性である．**図3**は右下の筋線維の筋鞘直下のRimmed vacuole（V）にカテプシンBが強陽性であるが，筋原線維間（右下，右上，中央の3本の筋線維の星印）に顆粒状あるいは小空胞状に陽性所見がみられる他，筋核（N）周囲にも強陽性所見がみられる．**図3**は症例3においても極めてわずかであるが，筋原線維間及び筋鞘下でカテプシンHの顆粒状の染色が観察された．

考　　察

今回の結果はカテプシンB及びHというリソゾームの代表的なシスティンプロテアーゼが本症のRVに局在するという昨年の報告[1]を症例を重ねても確認できることを示した．と同時に筋細胞

内に局所的に，例えば核周囲，筋鞘下，筋原線維間にもカテプシンB及びHの染色性が増加しているという新しい事実を見い出した．正常筋細胞内には同じ方法による免疫組織学的検査ではカテプシンB及びHは全く陰性である．結果から推察すると本症では筋細胞内に局所的に（おそらく障害部）にカテプシン等のリソゾーム酵素を含むAVsが増加し，この中で自己消化が進み，さらに，AVsが集合してRVを形成し，筋線維の変性萎縮へと進行すると考えられる．この筋線維内リソゾームプロテアーゼの増加という現象はDMDの動物モデルであるジストロフィーハムスターやMDXマウス等とは著しく異なっている．ジストロフィー動物の罹患筋ではマクロファージ等の細胞浸潤を伴っているが，我々は免疫組織学的にこれらの浸潤細胞にカテプシンB及びHが局在しており，筋細胞内のプロテアーゼの増加は明確ではないことを示した[7]．さて，浸潤細胞による変性筋タンパクの除去という反応と筋内リソゾーム系の活性化による筋タンパクの分解亢進という2つの筋タンパク分解除去様式の差を生み出す要因は何であろうか？　指摘できることは筋タンパクの分解が急性に起るか慢性的にゆっくり起るかという点と障害の程度・大きさの2点である．筋壊死が急性で広範に起るほど，筋細胞よりも圧倒的にカテプシン活性が強く，処理能力の高いマクロファージの力が必要とされる．一方，障害が局所的で，ゆっくりと進行する場合には，筋内のリソゾーム系の活性化のみで対応できるのではなかろうか？　前者の代表例はジストロフィーモデル動物であり，後者の代表例はRV型distal myopathyである．そう考えれば2つの分解・除去様式が同時にみられる疾患があっても不思議ではない．DMDにおけるカテプシンB及びHの局在を調べた最近の我々の研究では，筋内のカテプシンの増加とカテプシンに富んだマクロファージの筋細胞及び筋線維間への浸潤の双方が同じ標本上で観察される．DMDとジストロフィー動物(ハムスター，MDXマウス)との筋崩壊の進行速度，様式の差を考えれば，十分に納得のできることと思われる．

次の問題はdistal myopathyにおける筋内リソゾームプロテアーゼを増加させるinducer(s)は何かである．とはいっても正常の筋組織におけるタンパク分解の機構も不明であり，筋細胞内の生理的及び病的状態におけるリソゾームの動態を調べることから出発しなければならないだろう．肝臓では，外から（主として食物から）のアミノ酸の供給にタンパク分解速度は大きく依存しており，絶食時には多数のAVsが形成され，摂食時にはその形成は著しく抑制される．生理的には肝臓のように活発なタンパク代謝をしていない骨格筋では肝臓のようなAVs形成の劇的な変化はない．本症において筋細胞内に多数のAVsの形成を誘導する機序は何かを追究することは本症の初期的な病態を知る上で重要である．

謝　辞

貴重な筋生検材料をお送り頂きました宮武正，湯浅龍彦（新潟大・脳研神経内科）及び東儀英夫，野村毅（岩手医大・神経内科）の諸先生方に感謝致します．

文　献

1）木南英紀，勝沼信彦，伊井邦夫，檜澤一夫，杉田秀夫，埜中征哉：　Rimmed vacuoleを伴うdistal myopathyにおけるカテプシンB及びHの局在「筋ジストロフィーの臨床，病態と成因に関する研究（杉田班）」，昭和59年度研究報告書，1985，p271.

2）Towatari, T., Kawabata, Y., and Katunuma, N.: Crystallization and properties of cathepsin B from rat liver. Eur. J. Biochem. 102: 279, 1979.

3）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.

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., Nakazawa, 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) Ii, K., Hizawa, K., Kominami, E., Bando, Y. and Katunuma, N. : Different immunolocalizations of cathepsins B, H and L in the liver. J. Histochem. Cytochem. 33 : 1173, 1985.

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

33) 実験的クロロキンミオパチーに対するESTの治療効果

杉 田 秀 夫*

研究協力者　樋 口 逸 郎* 佐 野 元 規* 石 浦 章 一*
伊 井 邦 雄** 木 南 英 紀*** 勝 沼 信 彦***

実験的クロロキンミオパチーに対する，システインプロテアーゼ阻害剤であるESTの予防効果については，すでにEST約60～90mg/kg/day投与により発症抑制が可能であることが報告されている[1]．今回我々は臨床的に使用可能である少量投与による予防効果及び発症後の治療効果について検討した．また，システインプロテアーゼがクロロキンミオパチーの発症に関与することを証明するため，カテプシンB及びHの抗体を用いて免疫組織化学的に検討した．

方　法

オスのウィスターラット（体重200～250g）52匹を3群に分け，A群41匹にはクロロキン（以下CQ）50mg/kg/dayを連日腹腔内へ投与し，B群6匹にはCQ投与とともに餌に0.025% ESTを混合して投与した．C群5匹は対照としCQの代わりに生食を連日腹腔内へ投与した．8週後まで生存したA群32匹，B群5匹のうち各々9匹，5匹を断頭しひらめ筋について予防効果を検討した．C群5匹とA群の残り23匹は治療実験に移行し，A群は更に4群に分けた．a_1群5匹はCQの投与を続行し，a_2群10匹はCQ投与を続けるとともにESTの投与を開始した．a_3群はCQを中止し自然回復を観察し，a_4群はCQを中止したうえESTを投与した．治療開始後5週まで生存したa_1群4匹，a_2群9匹，a_3群3匹，a_4群4匹，C群4匹のラットを断頭し，ひらめ筋について治療効果を判定した．臨床的に効果を判定するため，まずラットの体重を毎朝測定し各群の体重変動を比較した．また，各ケージ毎の摂食量を毎週計量し，平均EST投与量を計算した．平均EST投与量は約10mg/kg/dayであった．予防実験開始後8週及び治療実験開始後5週にラットを断頭しひらめ筋を採取し，左側は形態学的に検討し，右側は湿重量を測定するとともに生化学的分析を行った．形態学的には10μの凍結切片にルーチンの各種組織学的並びに組織化学的染色を行い比較するとともに，HE染色標本について筋線維を200本ずつ数え，光顕的に空胞の認められる筋線維の頻度を調べ定量的に比較した．生化学的にはひらめ筋の湿重量の10倍量のphosphate buffered saline-0.1% Triton X-100（pH7.4）を加えてホモジナイズし，8000×g，15分の遠沈後上清について既報のごとく各種リソゾーム酵素活性を測定した[2)3)4)]．免疫組織化学的検討は，CQ50mg/kg/dayを1週間腹腔内投与して作成したCQミオパチー発症早期のラットひらめ筋を用いて行なった．カテプシンB及びHはラットの肝臓より精製し[5)]，石川らのマレイミド法[6)]を用いて抗カテプシンB及び抗カテプシンHペルオキシダーゼ標識Fab'を作成した．免疫組織化学報は既法のごとく[7)]直接法にて施行した．

結　果

予防実験における体重変動曲線を図1に示した．CQのみを投与したA群ラットの体重は次第に減少したが，ESTを併用投与したB群では投与当初一時減少するが3週目頃から増加し始め対照であるC群の体重に近づき，8週後A，B群間の平均体重は有意差を示した（$P<0.005$）．また，治療

＊国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部
＊＊徳島大学医学部第一病理
＊＊＊徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門

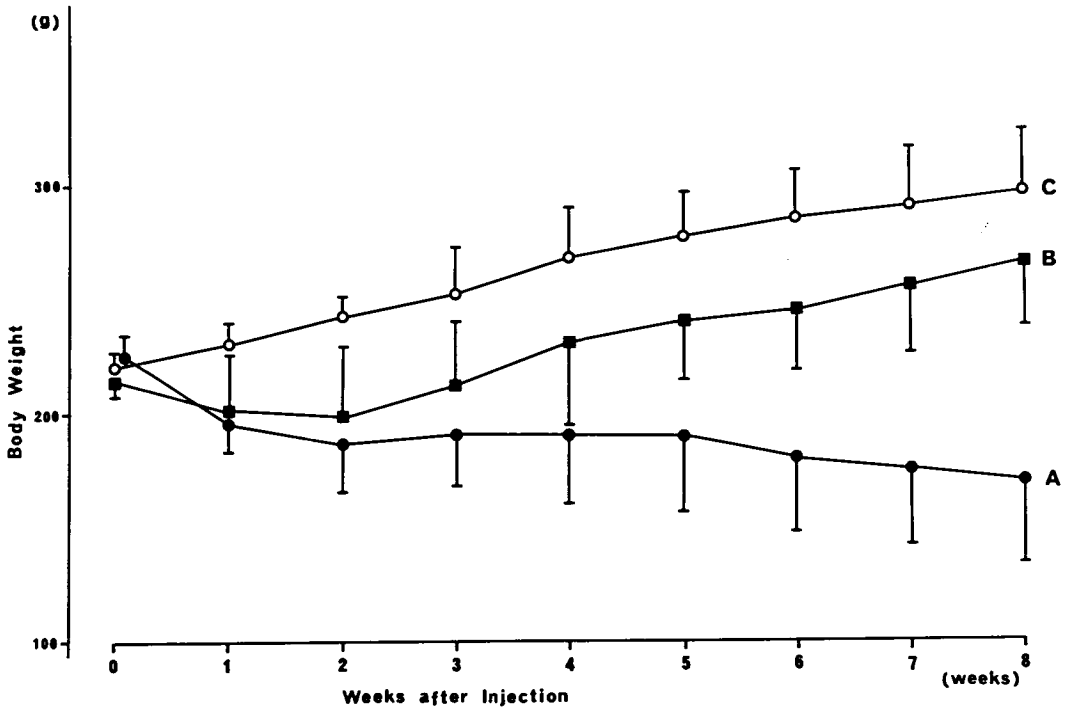


図1　予防実験における体重変動曲線
各点は平均値を示す.

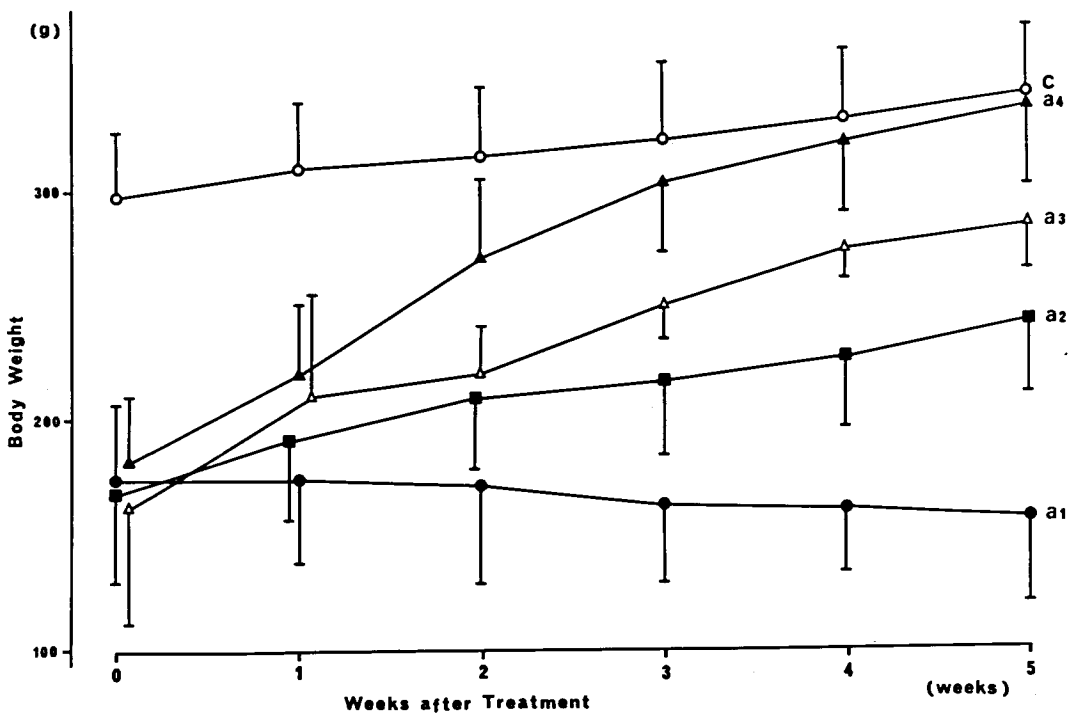


図2　治療実験における体重変動曲線
各点は平均値を示す.

実験における体重変動は図2に示すようにCQのみを続行したa_1群の平均体重はさらに徐々に減少するが，CQとともにESTの投与を開始したa_2群では体重は増加し始め，5週後a_1群とa_2群の体重は有意差を示した（$P<0.005$）．CQ投与を中止したa_3群とa_4群はともに速やかな体重の回復を示し対照群の体重に接近した．ひらめ筋の湿重量は表1に示すようにA群とB群で有意差を認めた（$P<0.005$）．また，治療実験においてもa_1群とa_2群は有意差を示した（$P<0.025$）．形態学的検討では，CQ投与のみを8週間続行したA群のラットには例外なくvacuolar myopathyの発症が認められた（図3 A）．また，acid phosphatase染色で活性が著明に亢進していた．CQとともにESTを併用投与したB群ラットのひらめ筋では，CQミオパチーの発症は著明に抑制されており筋線維径も正常に近いものが多く，acid phosphatase活性も抑制されていた（図3 B）．治療実験においては，CQのみを3ヶ月間投与したa_1群ではA群で認められたvacuolar myopathyはさらに進行していた（図3 C）．CQとともにEST投与を開始したa_2群では治療開始後5週にはCQミオパチーは著明に改善していた（図3 D）．CQ投与を中止したa_3群，a_4群ではミオパチーは軽快し，軽度の筋線維大小不同を認める程度に回復していた．各群ラットのひらめ筋において光顕的に空胞の認められる筋線維の頻度は，A群62.1±8.4%，B群8.3±5.9%，a_1群69.6±5.0%，a_2群13.6±10.9%でありA群とB群及びa_1群とa_2群の間にそれぞれ有意差が認められた（$P<0.005$）．生化学的分析の結果は表1に示すように，CQの長期投与によりA群及びa_1群では各種リソゾーム酵素活性が著明に亢進していた．予防実験でESTを併用投与したB群ではリソゾーム酵素活性の上昇はA群に比べ著明に抑制されていた．治療実験においてもEST投与を開始したa_2群ではa_1群に比べリソゾーム酵素活性は低下していた．免疫組織化学的検討の結果，図4に示すようにCQミオパチー発症早期のラットひらめ筋において，空胞形成の初期と思われる部分がカテプシンBの抗体により陽性に染色された．また，カテプシンHの抗体による染色でも同様の結果が得られた．

表1　リソゾーム酵素活性及びひらめ筋の湿重量に対するESTの効果
酵素活性は上清の蛋白1mgあたりの活性を示す（U/mg）．
1：1 U=0.308nmol/h.　2：1 U=0.154nmol/h.
3：1 U=0.658nmol/h.　4：1 U=ΔA405/30min.

Group (Number)	A (9)	B (5)	a_1 (4)	a_2 (9)	a_3 (3)	a_4 (4)	C (4)
Cathepsin B&L [1]	0.14±0.02	0.04±0.02**	0.25±0.12	0.07±0.03••	0.05±0.01	0.03±0.003	0.03±0.007
Cathepsin H[2]	0.43±0.06	0.20±0.10**	0.35±0.05	0.36±0.08	0.23±0.06	0.19±0.03	0.10±0.003
α-Glucosidase [3]							
pH 4.0	3.54±0.26	2.25±0.54**	3.83±0.87	2.84±0.28••	1.83±0.22	1.83±0.22	1.18±0.10
pH 6.5	3.12±0.29	2.20±0.46*	3.59±0.42	3.01±0.32•	2.66±0.15	2.80±0.16	2.09±0.16
Acid phosphatase[4]	0.22±0.02	0.11±0.02**	0.30±0.06	0.15±0.03••	0.10±0.002	0.10±0.01	0.08±0.07
Protein (mg/ml)	1.73±0.40	3.51±0.41**	1.52±0.26	2.40±0.49••	4.65±0.15	5.31±0.67	7.17±0.65
Wet weight of right soleus muscle (g)	57.6±10.6	116.6±19.1**	69.0±6.8	88.3±13.4•	133.3±10.7	132.8±27.2	164.0±14.4

Mean±S.D.　* $p<0.025$, ** $p<0.01$: group A and B.
• $p<0.025$, •• $p<0.01$: group a_1 and a_2.

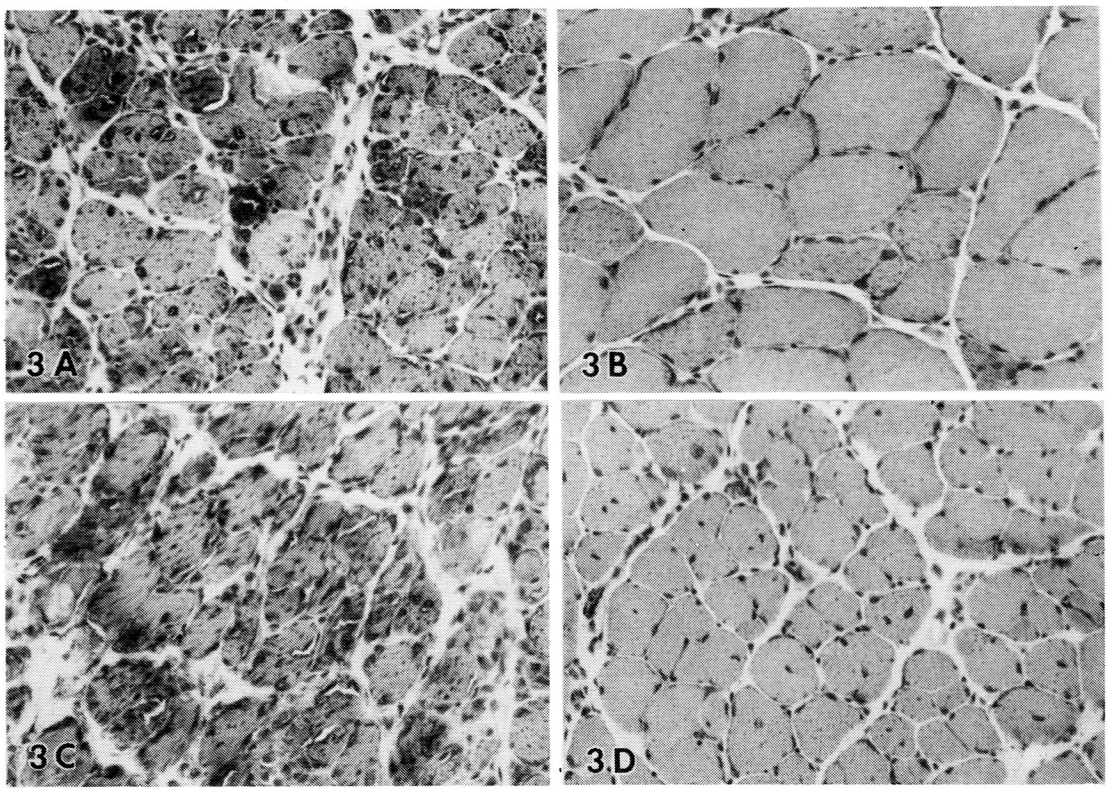


図3　予防及び治療実験終了後のラットひらめ筋のHE染色，×200
A：A群ラット　B：B群ラット
C：a_1群ラット　D：a_2群ラット

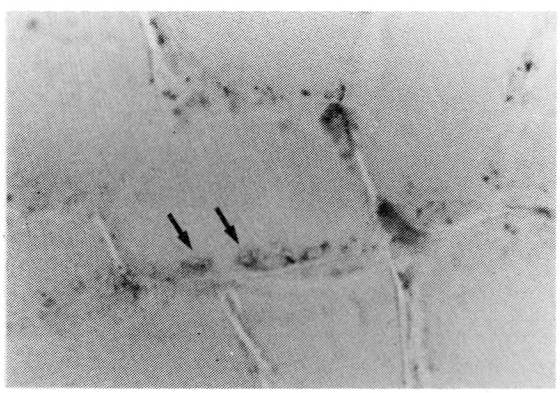


図4　クロロキンミオパチー発症早期のラットひらめ筋のカテプシンB抗体による免疫組織化学的染色，×1036
空胞形成初期と思われる病変部が陽性である（矢印）．

考　　察

ESTはエポキシコハク酸誘導体であり強力なシステインプロテアーゼ阻害剤である．経口投与されたESTは腸管壁から吸収されE-64-Cに変換されるが，E-64-Cは *in vitro* においてシステインプロテアーゼ，特にカテプシンB & Lを著明に抑制することが報告されている[8]．予防実験においてCQとともにESTを併用投与したB群のラットは，臨床的，形態学的，生化学的にミオパチーの発症は著明に抑制されており，EST10 mg/kg/dayという少量投与によってCQミオパチーは充分予防できることが明らかとなった．治療実験においては，CQ50mg/kg/dayを8週間連日腹腔内投与したラットをCQミオパチーとして用いた．この方法によると100%CQミオパチーを

作成しうることがすでに確認されており[9]，今回のA群のラットでも8週後に断頭したものは全例vacuolar myopathyが認められた．ESTの併用投与を開始したa_2群ではCQのみのa_1群と異なり体重が増加し始め5週後には有意差を示し，形態学的にもvacuolar myopathyは著明に改善していた．生化学的にもa_2群では各種のリソゾーム酵素活性は有意に抑制され，特にカテプシンB＆Lの抑制効果が著明であった．これらの実験結果より，EST10mg/kg/dayの経口投与はCQミオパチーの予防効果のみならず，著明な治療効果を示していることは明らかである．カテプシンB及びHの抗体を用いた免疫組織化学的検討にてCQミオパチー発症早期のひらめ筋において，空胞の形成初期と思われる部分が陽性に染色されたことより，これらのシステインプロテアーゼはCQミオパチーのrimmed vacuole形成に一次的に関与しているものと考えられる．したがってESTによるCQミオパチーの予防及び治療効果の発現は，autolysosomeに由来するカテプシンの上昇をESTが抑制することにより筋蛋白分解を抑えるという機序を介するものと想定される．Rimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチーにおいてもCQミオパチーと同様にリソゾーム酵素活性は上昇し且つrimmed vacuoleの周辺がカテプシンB及びHの抗体で染色されることが報告されており[10]，類似の発症機序が関与するものと考えられる．今回の我々の実験でEST10mg/kg/dayという臨床投与が充分可能な少量投与でもCQミオパチーの治療効果が認められたことより，rimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチーのようなautophagic vacuoleの形成を主体とするミオパチーに対してもESTの効果が大いに期待されるものと思われる．

文　献

1）杉田秀夫，佐野元規，石浦章一：実験的クロロキンミオパチーにおけるESTの効果．厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究」昭和59年度研究報告書，1985，p.123.

2）Ishiura S, Nonaka I, Nakase H, Tada A, Sugita H : Two-step mechanism of myofibrillar protein degradation in acute plasmosid-induced muscle necrosis. Biochim Biophys Acta 798 : 333, 1984.

3）Taga EM, Van Etten RL : Human liver acid phosphatases : Purification and properties of a low-molecular-weight isozyme. Arch Biochem Biophys 214 : 505, 1982.

4）De Barsy J, Jacquemin P, Devos P, Hers HG : Rodent and human acid α-glucosidase purification, properties and inhibition by antibodies. Investigation in type II glycogenosis. Eur J Biochem 31 : 156, 1972.

5）Kominami E, Tsukahara T, Bando Y, Katunuma N : Distribution of cathepsin B and H in rat tissues and peripheral blood cells. J Biochem 98 : 87, 1985.

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

7）Kominami E, Bando Y, Ii K, Hizawa K, Katunuma N : Increase in cathepsin B and L and thiol proteinase inhibitor in muscle of dystrophic hamsters. Their localization in invading phagocytes. J Biochem (Tokyo) 96 : 1841, 1984.

8）Barrett AJ, Kembhavi AA, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, Tamai M, Handa K : L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsin B, H and L. Biochem J 201 : 189, 1982.

9）佐野元規：実験的クロロキンミオパチーの生化学的研究—第1報．臨床神経学25：627，1985.

10）Ii K, Hizawa K, Nonaka I, Sugita H, Kominami E, Katunuma N : Abnormal

increases of lysosomal cysteine proteinases in rimmed vacuoles in the skeletal muscle. Am J Pathol (in press).

VI. ミトコンドリアミオパチー

34) 網膜色素変性，難聴を伴う lipid storage myopathy の1例

垂　井　清一郎

研究協力者　曽我文久*　依藤史郎*　上野　聡*
西川嘉郎*　原　保夫*　金山良男*
小笠原三郎*　松沢佑次*　高橋光雄*

はじめに

lipid storage myopathy は骨格筋筋線線内に過剰な triglyceride の蓄積をきたす稀な疾患群である．原因となる脂質代謝障害が明らかになった報告は，1973年 Engel らの muscle carnitine deficiency[1]，DiMauro らの carnitine palmitoyltransferase deficiency[2] があり，最近では，ミトコンドリアの β 酸化系酵素の欠損も報告されている[3)4)]．

今回，我々は，上肢近位筋の筋萎縮と筋力低下に加え，網膜色素変性，難聴を伴った1例を経験し，組織学的分析にて，骨格筋のみならず，白血球，培養皮膚線維芽細胞にも多数の脂肪滴蓄積を認め，生化学的分析にて，長鎖脂肪酸の β 酸化が選択的に障害されていることが明らかになったので報告する．

症　例

患者：47歳，男性（2内84—2763）

主訴：両上腕脱力，筋萎縮

家族歴：両親イトコ婚，類症不明

既往歴：特記すべきことなし

現病歴：42歳頃より右上肢挙上困難が出現し，右上腕上肢帯のやせに気づいた．43歳時糖尿病と診断され，インスリン治療を開始した．45歳頃より左上肢挙上困難，左上腕上肢帯のやせも出現した．同時期より夜盲，難聴に気づいている．下肢の脱力や運動耐性の低下はない．筋痛や赤色尿の既往もない．

入院時現症：一般身体所見．身長162cm，体重46kg，ichthyosis や肝脾腫はない．その他，特に異常を認めない．

神経学的所見：意識清明，知能正常．視野検査では輪状暗点．眼底は網膜色素変性像を示した．聴力検査では中等度両側感音性難聴を認めた．両側上肢近位筋に筋力低下（徒手筋力検査 2～3/5），上腕上肢帯に筋萎縮を認めた．筋線維束性れん縮，知覚障害，小脳症状はいずれも認めなかった．

検査所見：末梢血塗抹標本にて顆粒球，単球を主に，一部リンパ球にも，細胞質内に多数の oil red O 陽性の vacuole を認めた．血清 CK 334U/l（正常130以下），LDH370U/l（正常240以下），GOT 30U/l，GPT 41U/l，その他の肝機能検査，血清リポ蛋白分画は正常範囲．空腹時血糖149mg/dl，尿中 CPR5.1μg/day（正常53.6～130.8）．心電図は正常範囲．24時間絶食後の血中，尿中ケトン体は正常に増加した．エルゴメーター運動負荷（15watt，15min）による lactate，pyruvate は正常反応を示した．髄液検査では，細胞数5/3（多核2，リンパ3），蛋白105mg/dl，糖86mg/dl，Cl128meq/l，Pandy（卅）．筋電図は上下肢とも myogenic pattern を示し，一部 long duration NMU の混入が認められた．末梢神経伝導速度は，右正中神経 MCV 41.7m/sec，SCV 41.4m/sec，右後脛骨神経 MCV36.7m/sec，SCV38.0m/sec と軽度遅延を示した．

筋組織学的所見（左三角筋）：H & E 染色，

＊大阪大学第二内科

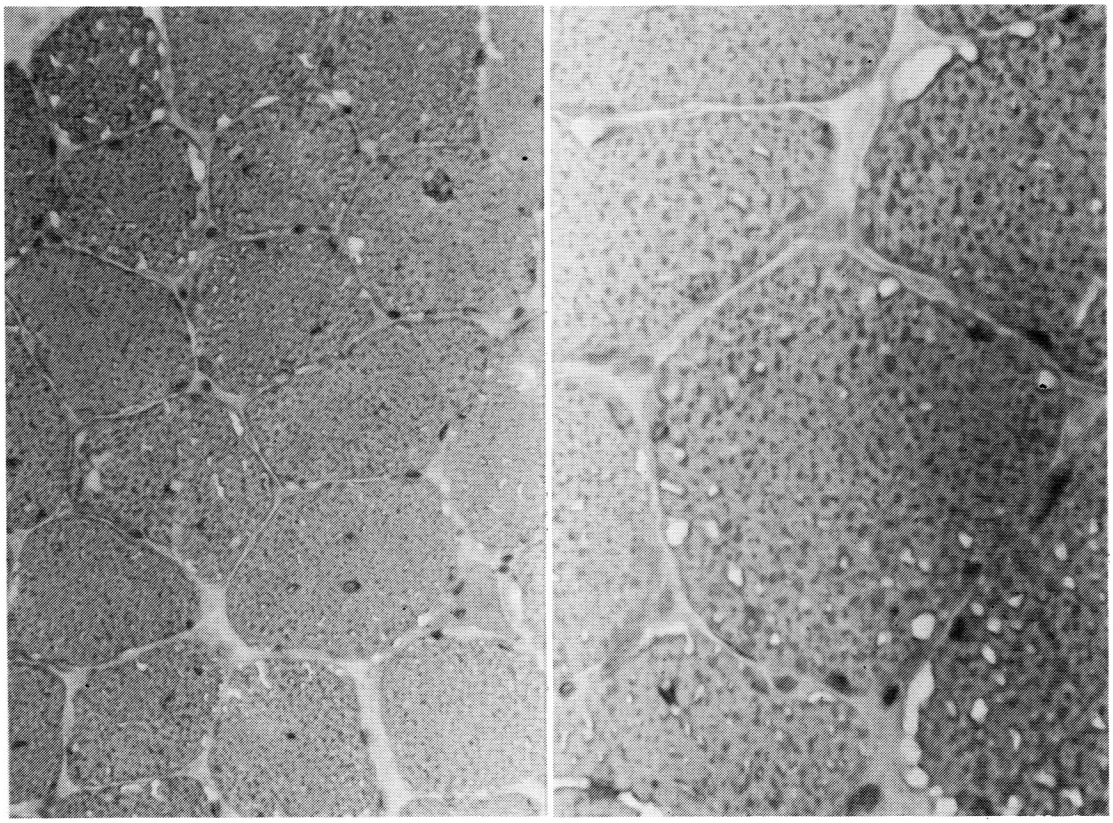


図1　左三角筋光顕像
oil red O染色（200×，400×）多数の脂肪滴，軽度の筋線維大小不同・中心核増加を認める．

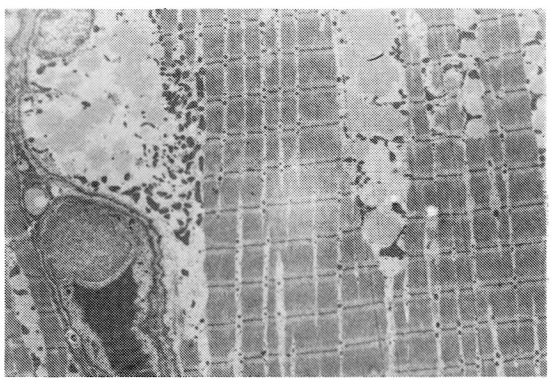


図2　左三角筋電顕像　2,000×
筋鞘膜下及び筋原線維間に多数の脂肪滴の蓄積，その周囲にミトコンドリアの増加を認める．

Gomori trichrome染色では，軽度の筋線維大小不同，中心核増加に加え，筋線維内に多数のvacuoleを認めた．このvacuoleはoil red O染色陽性であり中性脂肪の蓄積と考えられた（図1）．なおragged red fiberは認められなかった．

電顕所見：筋鞘下及び筋原線維間に多数の脂肪滴を認め，一部脂肪滴周囲にミトコンドリアの増加も見られた(図2)．これらの脂肪滴は限界膜を持たず，ミトコンドリアによってとりかこまれている像もみられた．

培養皮膚線維芽細胞組織学的所見：10% FCS添加Eagle MEMにて1週間培養後の皮膚線維芽細胞のoil red O染色標本にて，正常の線維芽細胞には認められない多数の脂肪滴の蓄積を認めた．

脂肪酸代謝の分析

脂肪滴の蓄積により脂肪酸代謝障害が存在すると考えられる骨格筋及び培養皮膚線維芽細胞を用いて，脂肪酸酸化につき分析した．

10% FCS 添加 Eagle MEM にて1週間培養後の皮膚線維芽細胞より，クロロホルム-メタノール（2：1）で脂質を抽出した．薄層クロマトグラフィーにて triglyceride 分画の著増を認め，triglyceride 含量は53.7μmol/10^9cells（コントロール5.6±4.1 mean±S.D. n=5）とコントロールの約10倍の値を示した．筋 carnitine 定量[5]では，free carnitine 3.17nmol/mg（コントロール4.29±0.59），acylcarnitine 2.61nmol/mg（コントロール1.81±0.78），acylcarnitine：free carnitine 比0.82（コントロール0.42）であり，free carnitine の減少傾向，acylcarnitine：free carnitine 比の増加を認めた．血中 carnitine 濃度，筋 carnitine palmitoyltransferase 活性[6]，筋ミトコンドリア内膜電子伝達系酵素活性[7]はコントロールと差を認めなかった（表1）．

培養皮膚線維芽細胞における短鎖及び長鎖脂肪酸酸化能測定は，〔1-^{14}C〕butyrate，〔1-^{14}C〕palmitate をそれぞれ medium に加え，$^{14}CO_2$ 産生量を測定する方法を用いた[8]．butyrate 酸化では

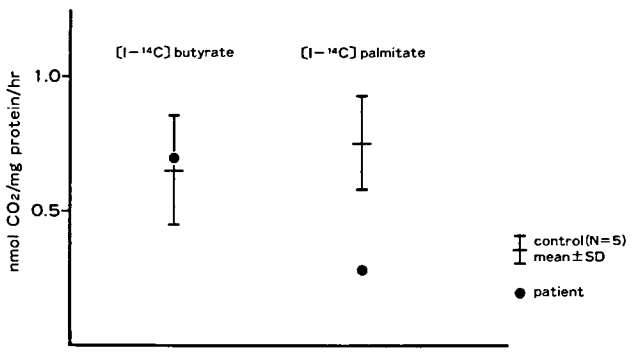


図3　短鎖，長鎖脂肪酸酸化能
本例では〔1-^{14}C〕palmitate の酸化能が有意に低下している．

表1　生化学的データ

	Patient	Control
fibroblast triglyceride content (μmol/10^9 cells)	53.7	5.6±4.1
muscle carnitine (nmol/mg)		
free carnitine	3.17	4.29±0.59
acylcarnitine	2.61	1.81±0.78
acylcarnitine / free carnitine	0.82	0.42
serum carnitine (nmol/ml)	77.5	77.0±10.1
muscle carnitine palmitoyltransferase (nmol/min/g)	18.4	17.6~40.4
muscle mitochondrial enzymes		
cytochrome oxidase (U/g)	2.36	0.9±0.5
succinate-cytochrome c reductase	0.79	0.9±0.3
NADH-cytochrome c reductase	0.31	1.1±0.8 (mean±S.D.)

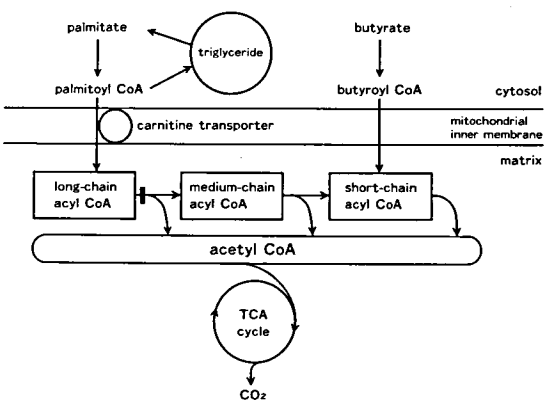


図4　ミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化
本例における代謝障害の部位は図の ⊣ の所と考えられる．

0.69nmol CO_2/mg protein/hr（コントロール0.65±0.21），palmitate酸化では0.28nmol CO_2/mg protein/hr（コントロール0.76±0.18）の値が得られ，長鎖脂肪酸であるpalmitateの酸化はコントロールの約1/3と有意の低下を認めた（図3）.

考　　察

triglycerideの細胞内蓄積の原因としては，脂肪酸酸化及び，それに続くエネルギー代謝障害による二次的なtriglyceride合成の亢進，triglyceride lipase活性低下によるtriglyceride分解低下がある．triglyceride lipase欠損によるlipid storage myopathyの報告はなく，我々はまず脂肪酸酸化について検討を行った．脂肪酸酸化は，長鎖，中鎖，短鎖脂肪酸にそれぞれ特異的な酵素系の存在が知られている．長鎖脂肪酸の一つであるpalmitateはcytosolでpalmitoyl CoAとなり，carnitine transporterを介してミトコンドリア内膜を通過し，matrixで脂肪酸の長さに応じた酵素系によるβ酸化を順番に受け，生じたacetyl CoAはTCA cycleに入るという代謝経路が明らかになっている．本例において〔1-^{14}C〕palmitateを基質にした場合にのみ脂肪酸酸化能が低下していたことは，ミトコンドリアのmatrixでの長鎖脂肪酸に特異的なβ酸化系酵素の活性低下を示していると考えられる（図4）.

脂肪酸酸化障害のために，ミトコンドリア内でacyl CoAが増加すると，種々の酵素活性が阻害され，細胞が障害を受けることが最近明らかになっている[9]．acyl CoAはcarnitineと結合しacylcarnitineの形でミトコンドリア内膜を通過する．ミトコンドリア内に異常にacyl CoAが増加した場合，carnitineはacyl CoAと結合し無害なacylcarnitineとし，ミトコンドリア外へ運び出すという“buffering function”を果たすといわれている[9]．その作用により二次的に細胞内free carnitineの減少，acylcarnitine：free carnitine比の増加，及びacylcarnitineの尿中排泄量の増加をきたすが，本例での筋carnitineのデータはこれに合致しており，細胞内でのacyl CoAが増加した状態であることが示唆される．carnitineのbuffering functionによる効果を期待し，D,L-carnitine 10g/day経口投与を行い，約1か月で筋力の軽度改善を認めた．現在，脂肪酸酸化低下によるacyl CoA増加を軽減する目的で，1日10g以下の脂肪制限食及び1日30gのmediumchain triglyceride dietの食事療法を施行し，経過観察中である．

なお，本例がミトコンドリア内膜電子伝達系の障害により二次的にtriglycerideの蓄積をきたしたもの[10]ではないことは，運動負荷試験，生化学的分析データより明らかである．

ミトコンドリア内β酸化系酵素異常によるlipid storage myopathyは，短鎖脂肪酸脱水素酵素欠損症[4]，中鎖脂肪酸脱水素酵素欠損症[3]の報告があるが，臨床像は本例とは異なっている．長鎖脂肪酸酸化障害については，1980年Angeliniらにより multisystem triglyceride storage disorder with impaired long-chain fatty acid oxidationとして報告されているものがある[11]．この例は，congenital ichthyosis，肝脾腫，白血球空胞を伴うlipid storage myopathyの症例で，培養皮膚線維芽細胞の長鎖脂肪酸酸化はコントロールの約1/2に低下していたとしている．本例は網膜色素変性と難聴を伴い，一方ichthyosisや肝脾腫を伴わない点でAngeliniらの報告とは異なっており，同様の報告は検索した範囲では認められなかった．

ま　と　め

1）網膜色素変性，難聴を伴ったlipid storage myopathyの1例を報告した．

2）骨格筋のみならず，白血球，培養皮膚線維芽細胞にも多数の脂肪滴を認めた．

3）骨格筋のacylcarnitine：free carnitine比の増加を認めた．

4）培養皮膚線維芽細胞において，コントロールの約10倍のtriglycerideの蓄積がみられ，長鎖脂肪酸酸化能は約1/3に低下していた．

文　　献

1）Engel, A.G. et al.: Carnitine deficiency of

human skeletal muscle with associated lipid storage myopathy : a new syndrome. Science 179 : 899-902, 1973.

2) Di Mauro, S. et al.: Muscle carnitine palmityltransferase deficiency and myoglobinuria. Science 182 : 929-931, 1973.

3) Rhead, W.J. et al: Dicarboxylic aciduria: deficient [1-^{14}C]octanoate oxidation and medium-chain acyl CoA dehydrogenase in fibroblasts. Science 221 : 73-75, 1983.

4) Turnbull, D.M. et al: Short-chain acyl Co A dehydrogenase deficiency associated with a lipid storage myopathy and secondary carnitine deficiency. N Engl J Med 8 : 1232-1236, 1984.

5) McGarry, J.D. et al.: An improved and simplified radioisotope assay for the determination of free and esterified carnitine. J Lipid Res 17 : 272-281, 1976.

6) Bieber, L.L. et al: A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. Anal Biochem. 50 : 509-518, 1972.

7) S. Yorifuji et al: Decreased activities of mitochondrial inner membrane electron transport system in patients with Kearns-Sayre syndrome. J Neurol Sci (in press).

8) Bennett, M.J. et al : Glutaric aciduria type II : biochemical investigation and treatment of a child diagnosed prenatally: J Inher Metab Dis 7 : 57-61, 1984.

9) Stumpf, D.A. et al.: Carnitine deficiency, organic acidemias, and Reye's syndrome. Neurology (NY) 35 : 1041-1045, 1985.

10) Niebrój-Dobosz, I. et al.: Lipid storage myopathy in Kearns-Sayre syndrome. Neurology (NY) 35 : 1582-1586, 1985.

11) Angelini, C. et al.: Multisystem triglyceride storage disorder with impaired long-chain fatty acid oxidation. Ann Neurol 7 : 5-10, 1980.

35) 末梢神経障害を伴った家族性ミトコンドリア・ミオパチーの1例

中 西 孝 雄*

研究協力者　渡 辺 雅 彦*　水 澤 英 洋*　金 澤 一 郎*

はじめに

ミトコンドリアミオパチーには，骨格筋のみを障害する狭義のものの他に，他臓器の障害を伴う広義のものがあり，とくにKearns-Shy Syndrome (KSS), Myoclonus epilepsy with "ragged-red" fibers (MERRF), Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS) がよく知られている．我々は，ragged-red fiber を伴なうミトコンドリアミオパチー，視神経萎縮，肥厚性ニューロパチーを主徴とし，上記いずれの疾患群にも分類しえない兄弟例を経験したので報告する．

症　例

M.F.（筑大神内；129869），46歳，男

主訴：歩行障害，眼瞼下垂，視力低下

既往歴：33歳の時に母指切断

家族歴：両親はいとこ婚で，5名の同胞中長兄にも全く同様の神経筋症状を認めた．

現病歴：18歳のとき，視力低下を主訴に近医を受診，視神経萎縮と言われた．40歳頃より上肢帯ならびに下肢帯の筋力が低下し，44歳のとき，眼瞼下垂，頸部の筋萎縮を指摘され，またその頃より四肢末端に手袋靴下型の感覚障害を自覚するようになった．緩除ながら進行性であるため，46歳のとき，当科に入院となった．

入院時現症：意識は清明で，軽度の知能低下を認めた．脳神経領域では両側の視神経萎縮と視力低下（両側0.1矯正不能），眼瞼下垂，ごく軽度の眼球運動制限があり，顔面，頸部の軽度の筋力低下と筋萎縮，嚥下障害とごく軽度の構音障害も認められた．運動系では，近位筋優位に4/5程度の筋力低下と筋萎縮を認めた．筋トーヌス，深部反射は全般に低下しており，病的反射を認めなかった．感覚系では，手袋靴下型の感覚低下を認め，表在感覚に比べ深部感覚が強く障害されており，Romberg 徴候は陽性であった．頸部および肘窩にて，神経の肥厚が触知された．

検査所見：血算，血清学的検査，一般尿便検査は正常で，胸部XP，心電図，心エコー図にも異常はなかった．血液生化学では CK64mU/ml（正常；5～50），乳酸17.1mg/dl（正常；4～16）と軽度上昇していたが，ピルビン酸は0.84mg/dl（正常；0.3～0.9）と正常であった．

髄液は，水様透明，初圧70mmH_2Oで，細胞数4/3/mm^3，蛋白25mg/dl，葉酸9.3ng/ml（正常；9.3～15.8），などは正常であったが，ピルビン酸1.0mg/dl（正常；0.6～0.9），乳酸16.5mg/dl（正常；10～16）は軽度上昇を示した．頭部CTスキャンでは大脳皮質の軽度の萎縮を認めた．脳波は，9Hz α 波の基礎律動に少量の5Hz θ 波の混入した Borderline EEG であった．

内分泌検査では，血中ACTH，TSH，コルチゾール，T_3，T_4，T_3RSU，および尿中17OHCS，17KSはいずれも正常で，LHRH負荷によるLH，FSHの反応およびTRH負荷に対するTSH，Prolactinの反応とも正常であった．

阻血下運動負荷試験は正常であったが，非阻血下に，エルゴメーターで下肢に対して20Watt，10分間の負荷をした所，著明な高乳酸血症（頂値で82mg/dl），乳酸/ピルビン酸比の著しい上昇（頂値で38）を呈し，好気性代謝障害が示唆された．

＊筑波大学臨床医学系神経内科

ERG は正常で，pattern reversal visual evoked response（VER）では誘発電位が得られず，flash VER ではその振幅が減じており，視覚路の障害が示唆された．

針筋電図検査では，胸鎖乳突筋，僧帽筋，三角筋，上腕二頭筋，上腕三頭筋，大腿四頭筋，大腿

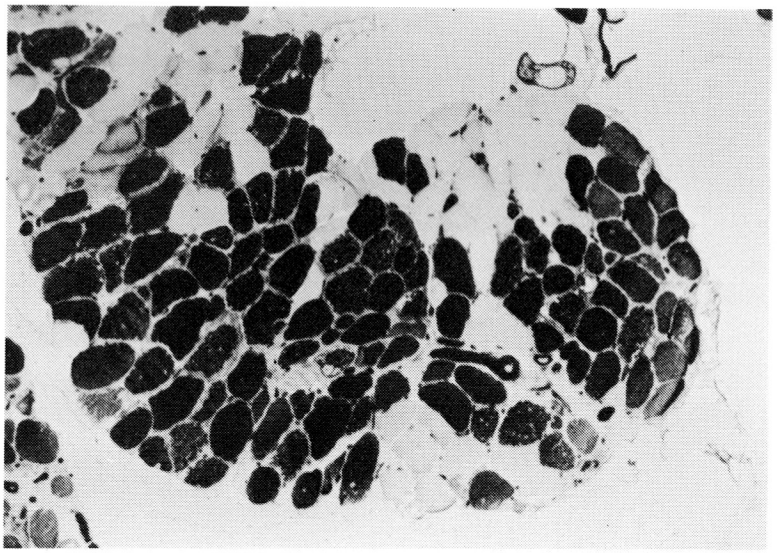


図 1　前脛骨筋の ATPase（pH4.3）染色
Type grouping, Type 1 fiber predominance, small angular fiber を認める．（×20）

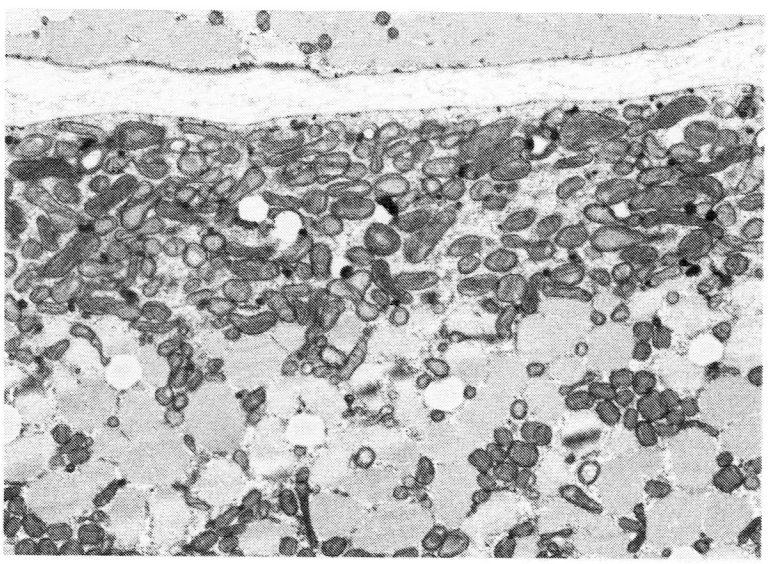


図 2　筋鞘膜下，筋原線維間に結晶様封入体や同心円状クリスタなどを有する異常ミトコンドリアが集簇している．
（×3,300）

二頭筋など近位筋で筋原性変化を示し，第1背側骨間筋，母指内転筋，前脛骨筋，腓腹筋など遠位筋に神経原性変化を認めた．MCV は尺骨神経54 m/sec，腓骨神経41m/sec, SCV は正中神経42m/sec，腓腹神経35m/sec と下肢にて軽度の低下を示した．

前脛骨筋生検所見では，多数の ragged-red fiber，筋線維の大小不同，変性，splitting，中心核の増加，間質の増生などミトコンドリア・ミオパチーの所見が認められた．さらに，grouped atrophy，small angular fiber，type grouping，type 1 fiber predominance，targetoid fiber，pyknotic nuclear clump など脱神経の所見も明らかであった（図1）．Cytochrome C oxidase 染色では，患者の筋線維はいずれもコントロールと比べて全般に染色性が低下しており，Gomori-trichrome 染色と対比すると，ragged-red fiber はほとんど染色されておらず，他の一見正常に見える線維でも酵素活性の低下とともに染色パターンの異常を示した．電顕では筋鞘膜下と筋原線維間に異常ミトコンドリアが集簇し，多くに結晶様封入体や，同心円状などのクリスタの異常を認めた（図2）．

腓腹神経生検では，有髄線維は density；4840/mm², mean diameter±S.D：2.8±1.1μm, range 0.9-6.9μm と，とくに大径線維が減少し，ミエリン菲薄化，onion-bulb 形成，small nerve cluster などを認めた（図3，4）．無髄線維は density：26476/mm², mean diameter±S.D：0.76±0.29μm, range；0.23-1.46μm と小径化しており，Schwann cell の扁平層状化や，collagen pocket，あるいは基底膜のみを残し突起を消失した像などが見られた（図5）．Schwann cell，及び axon の中のミトコンドリアは，やや腫大し数も増加していたが，特徴的な結晶封入体は認められなかった．

生検大腿四頭筋の生化学的検索では，cytochrome C oxidase 活性；438nmol/min/mg mit. prot.（正常；1554±753）と NADH-cytochrome C reductase 活性；619nmol/min/mg mit. prot.（正常；889±507）の軽度の低下が認められ，

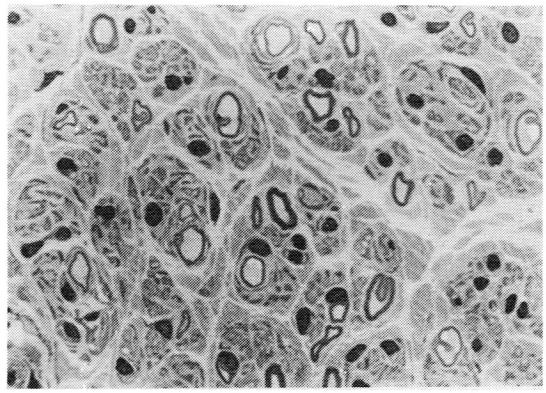


図3　腓腹神経のトルイジンブルー染色
大径有髄線維の減少，ミエリンの菲薄化，onion-bulb 形成，シュワン細胞核の増加などが認められる．（×300）

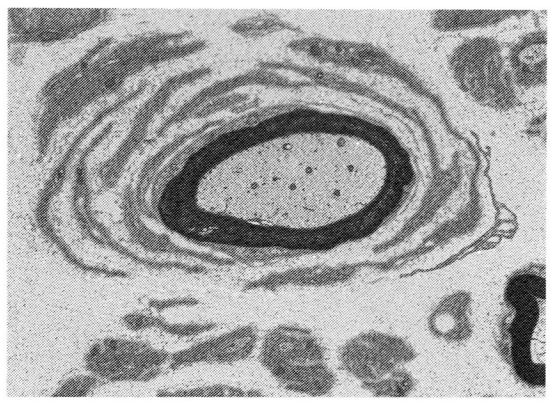


図4　onion-bulb 形成を示す．（×3,300）

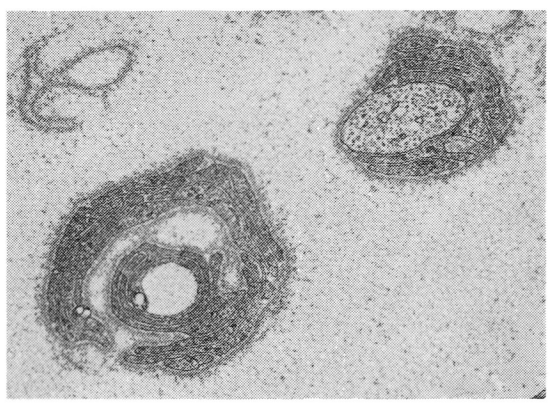


図5　シュワン細胞が扁平層状化し，一部は軸索を欠き，一部は軸索を完全には覆っていない．左上にシュワン細胞を欠き，基底膜のみを残存している像が認められる．（×13,000）

complex 1と complex 4の部分的障害が示唆された．カルニチン含量は正常であった．

考　　案

本例は，18歳頃視神経萎縮で発症し，四肢近位筋優位の筋萎縮と筋力低下，並びに四肢末梢に神経肥厚と手袋靴下型の感覚障害を呈し，組織学的に ragged-red fiber を伴なうミトコンドリア・ミオパチーと，onion-bulb formation を伴なうニューロパチーが確認された．家族歴にて，両親がいとこ婚で同胞に同様の神経筋症状を認め，直系の親属および母方のおじ，甥に類似の症状を認めないことから，常染色体劣性遺伝と考えられる．

ミトコンドリア・ミオパチーの中で，多系統の障害をきたす KSS，MERRF，MELAS などでは，末梢神経障害の合併がすでに報告されている．特に MERRF はかなり高率に末梢神経障害を合併しており，KSS の不全型と思われる Drachman の例では著明な肥厚性ニューロパチーが認められている．

しかし，本例では，KSS や MERRF を思わせる臨床症状は全くなく，障害が骨格筋と末梢神経に比較的限局している．文献上，同様の症例は Peyronnard らの報告を見るのみであるが，さらに本例では，外眼筋麻痺がきわめて軽微で視神経萎縮を伴っており，髄液蛋白も正常である点で，Peyronnard の例とも異なっておりこれまで報告のないものである．また，Drachman および Peyronnard の症例はいずれも孤発例であるが，本例は家族例で兄も全く同様の症状を呈しており，ミオパチーとニューロパチーが偶然の合併ではなく密接に関連していることを示唆するものと思われる．

以上，肥厚性ニューロパチーを伴った家族性ミトコンドリアミオパチーの1例を報告した．本例は(1)家族性で常染色体劣性遺伝が考えられる点，(2)ミオパチー，ニューロパチー，視神経萎縮を主徴としている点が特異であると考えられた．

稿を終るにあたり，生化学的検索をしていただいた名古屋市立大学小児科の小林正紀先生，cytochrome C oxidase 染色をしていただいた国立神経センターの埜中征哉先生に深謝いたします．

文　　献

1) Drachman DA : Ophthalmoplegia Plus. Arch Neurol 18 : 654-674, 1968
2) Peyronnard J-M, Charron L, et al : Neuropathy and Mitochondrial Myopathy, Ann Neuro 17 : 262-268, 1980
3) Shy GM, D.H. Silber berg, et al : A generalized disorder of nervous system, skeletal muscle and heart resembling Refsum's disease and Hurler's syndrome, Am. J Med 42 : 163-168, 1967
4) DiMauro S, et al : Mitochondrial myopathies, Ann Neurol 17 : 521-538, 1985
5) 合田周一郎ら：Mitochondrial encephalomyopathy, MELAS の1例．臨床神経学, 25 : 216-226, 1985
6) Fukuhara N : Myoclunus epilepsy and mitochondrial myopathy. In Scarlato G, Cerri C (ed) : Mitochondrial pothology in muscle diseases. Padua, Piccin Medical Books, 1982, pp87-110.

36) 痙攣，乳酸上昇，反復性低吸収域を示しMELASを疑った一例

水野美邦*

研究協力者　金子　仁*　角田純一*　大田恵子*
小野和則*　吉田充男*

Mitochondrial encephlomyopathyには幾つかの臨床型が知られているが，その症状はかなり多様である[1]．我々は多彩な神経症状と特異なCT所見を示し，筋症状を欠く一例を経験したので報告する．

症　例

患者：19歳，女性．

主訴：意識障害

既往歴：出産時骨盤位．3ヶ月で，斜頸の手術．

家族歴：母親に軽度の知能障害と，感音性難聴，糖尿病，高乳酸血症を認める．患者の妹は点頭てんかんの診断で4歳で死亡しているが，詳細不明．

現病歴：処女歩行は1歳3ヶ月．その後の発達は特に異常はなかった．小学校では，体育が2であったが，他は3から4であった．中学2年14歳時，年に数回両上肢のピクピクした動きがあったが，意識障害は認めなかった．このころより次第に成績が低下した．17歳時，近医より抗痙攣剤の投与を受けた．18歳昭和59年1月全般性痙攣発作が出現，4月痙攣重積状態となり治療を受けた．この時視力低下を訴えたが，20日程で回復した．5月中旬当科初診．神経学的所見，CT-scanに異常なく，脳波所見よりfocal seizure, secondary generalizationと診断，抗痙攣剤の投与を継続した．昭和60年3月四肢のasterixis様不随意運動出現，5月拍動性頭痛，同月下旬より会話内容がとんちんかんと成り次第に会話不能，6月14日呼び掛けに応答しなくなり当科入院．

入院時身体所見では，身長150cm，体重39kgと小柄な女性．胸腹部に異常無い．神経学的には意識状態は錯乱，会話不能．脳神経系では眼底に網膜色素変性なく，眼球運動正常．眼瞼下垂なし．軽い構音障害がある．運動系では，四肢筋萎縮，脱力，麻痺などはなく，歩行可能．明らかな小脳失調はない．深部腱反射は上肢でやや亢進していたが，左右差なし．左にBabinski徴候を認めた．不随意運動は無かった．知覚系，自律神経系には異常無かった．

入院時検査所見では，尿一般，血算，血沈，肝機能，腎機能に異常なく，電解質はCaを含め正常範囲内であった．血中乳酸22.1mg/dlピルビン酸1.26mg/dlと高値を示した．髄液は蛋白が60mg/dlとやや上昇していたが細胞数は正常．髄液中の乳酸は35.5mg/dl，ピルビン酸1.22mg/dlと上昇していた．脳波は多巣性の棘波と全般性徐波を認めた．心電図は，W.P.W. type Aを示した．神経伝導速度，針筋電図ともに正常範囲であった．CTでは，両側前頭葉，右側頭頂葉，左側頭頂葉に軽度のmass effectを伴った低吸収領域が見られたが(図1)，脳血管撮影には異常をみとめなかった．以上の結果よりMitochondrial encephlomyopathyを疑い次ぎの検査を行った（表1）．75g糖負荷試験は糖尿病型，階段運動負荷，エルゴメーターによる運動負荷では，乳酸，ピルビン酸の著明な上昇を認めた．Ischemic excercise testは正常パターンであった．上腕二頭筋で行った筋生検ではRagged-red fiberは認められず，Arnold[2]らの方法によるcytochrome oxidase染色で染色陰性線維を認めなかった（図2）．

＊自治医科大学神経内科

75g-G T T

	血糖値(mg/dl)	Insulin(μU/ml)
前	91	11
30分	188	59
60分	213	54
120分	169	100

阻血下運動試験　正常反応

エルゴメーター(15Watt 15分)

	乳　酸	ビルビン酸
前	22.8	1.32
直後	39.7	1.33
15分	28.8	1.48
30分	28.5	1.48

運動負荷試験

階段運動

	乳　酸	ビルビン酸
前	20.6	1.26
直後	115	3.06
10分	105	3.38
20分	71.1	2.32

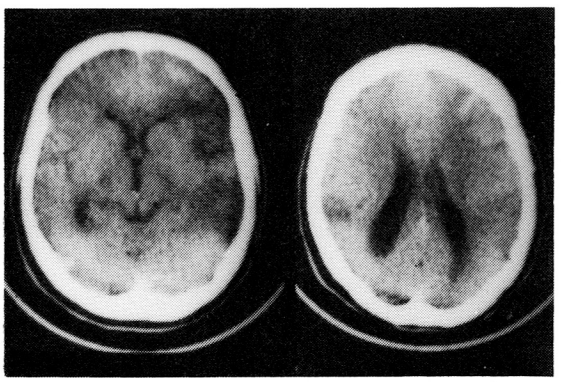


図1　入院時の頭部CT：左右の前頭葉と頭頂葉に低吸収域を見る．

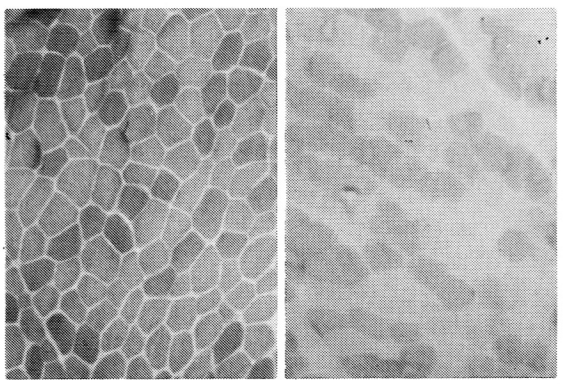


図2　左：Gomori-trichrome 変法×100
右：Cytochrome oxidase 染色×100

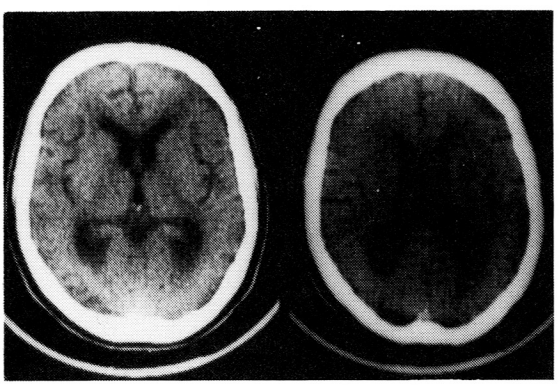


図3　入院2ヶ月後のCT：病巣は皮質に限局する．側脳室は拡大傾向．

図4　入院3ヶ月後増悪時のCT

入院後の経過：抗痙攣剤及びステロイドの投与を行ったが，意識状態はしだいに回復し神経症状では感覚性失語，感音性難聴の存在が明らとなった．入院2ヶ月後のCTでは，病巣は縮小し皮質

図5　入院4ヶ月後の頭部MRI
SE（TR＝2000msec2000/　）

に限局する傾向を示した（図3）が，9月19日意識の低下，おう気おう吐が出現，CT上左側頭葉と右頭頂葉に新たに低吸収域が認められた（図4）．

10月7日に撮影されたMRIでは病変はlong SEで高シグナル，IRで低シグナルの領域として現され，CT-scanより明瞭に病巣の局在を確認することが出来た（図5）．

考　　案

本症例の特徴をまとめると，

①150cm，39kgと小柄な女性

②10代前半に，痙攣発作で発症

③知能低下，意識障害，一過性の視力障害，感音性難聴，意識障害，不随意運動など多彩な神経症状をしめしたが筋症状を欠く．

④血中および髄液中乳酸，ピルビン酸が高値

⑤CT-scanにて，多発性の低吸収領域が反復して出現，これらは皮質に限局する傾向を示した．

⑥患者の母親は軽度の知能低下，糖尿病，感音性難聴，高乳酸血症をみとめ，家族性が考えられる．

などである．

1984年Pavlakis[3]らは，10代で発症，周期性のおう吐，痙攣，血管障害様の発作を特徴とする疾患を報告し，Mitochondrial myopathy, encephalopaty, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) とよんだ．本症は，外眼筋麻ひ，網膜色素変性症，心伝導障害を主徴とするKearns-Sayre症候群やmyoclonusをともなうMERRFとは症状から分けられる．我々の症例は，周期性おう吐をかくが，その他の症状はMELASに良く一致する．筋生検でRagged-red fiberは見いだせなかったが，運動負荷で著明となる高乳酸血症から，ミトコンドリアにおけるエネルギーの代謝障害の存在が推測され，MELASの範ちゅうに属すると考えた．MELASの脳CT-scan像については，巣状の低吸収領域及び基底核の石灰化が知られているが[3]，低吸収領域が時間をおいて異なった場所に出現する例も報告されている[4]．本例でも同様の所見が見られたが，それとともに病変が次第に皮質に限局する傾向をしめした点が特異であった．MELASの剖検例は少ないが，病変は皮質の巣状のspongy degeneration・軟化・融解で，白質や基底核は保たれるとされている．本症例のCT-scan及びMRIの所見はそれと良く一致しており本症の診断上有用と考えられた．

文　　献

1）DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, NaKagawa M, Devivo DC : Mitochondrial myopathies. Ann Neurol 17 : 521-538, 1985.

2）Seligman AM, Karnovsky MJ, Wasserkrug HL, Hanker JS : Non-droplet ultrastractural activity with a polymerising osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). J Cell Biol, 38 : 1-14, 1968.

3）Pavlakis SG, Philips PC, DiMauro S, Devivo DC, Rowland LP : Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes : a distinctive clinical syndrome. Ann Neurol 16 : 481-488, 1984.

4）合田周一郎，石本進士，大西晃生，後藤幾生，黒岩義五郎：Mitochondrial encephalomyopathy : MELAS (Mitochondrial myopathy encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) の1例　臨床神経 25 : 216-226, 1985.

37) 筋ミトコンドリア異常の形態学的研究

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*

はじめに

従来より，主として骨格筋及び中枢神経系内のミトコンドリアの形態異常を主体とし，多彩な症状を呈する種々の疾患が知られており Mitochondrial Myoence phalopathy の名のもとに一疾患群を形成している．これらは，臨床像から個々の疾患に分類されているが，近年になり生化学的検索によって疾患特異的な酵素欠損が明らかにされたものが増えてきている．しかし，それぞれの疾患において出現するミトコンドリアの形態異常にはあまり特異的な差がみられず，その異常形態の発現機序自体も未だ不明な点が多い．

ミトコンドリアの形態異常の中では，特に巨大化が劇的な変化のために古くよりよく知られているが，今回，我々は筋ミトコンドリア形態異常が生ずる機序を解明するために，実験的に巨大ミトコンドリアを作製し，巨大化が完成するまでの早期の形態変化の過程を，組織化学的及び，電顕的に観察した．

方　法

筋阻血，2-4 Dinitrophenol（以下 DNP）投与，Chloramphenicol（以下 CP）投与の3群について検討した．

① 筋阻血群，Wistar 系成熟ラット（雄）を用い，各群3匹ずつから成る8群にわけた．ネンブタール腹腔内麻酔下に，片側の大腿動脈を結紮し，5分，10分，20分，40分，60分，80分，100分，120分後に腓腹筋を生検した．対照としては，同時に対側の腓腹筋を生検した．

② DNP 投与群，各群3匹ずつから成る3群の Wistar 系雄成熟ラットを用い，①と同様に麻酔し，片側の腓腹筋を露出し DNP15mg を注射用蒸留水0.5ml に溶解させたものを筋肉注射した．
5分，10分，15分後に一群ずつ，注射部位より充分にはなれた個所の腓腹筋を生検した．
非筋注群を，同時に生検し，対照とした．

③ CP 投与群，CP125mg を蒸留水1ml に，充分溶解させたものを，金属性ゾンデで，毎日経口投与し，投与開始2日，4日，6日，8日，10日，13日後に，2匹ずつ，ネンブタール麻酔下に，腓腹筋生検を行なった．

①②③ともに，一部は直ちに凍結切片として Gomori-trichrome 変法染色及び NADH-TR 染色を行ない組織化学的検索に供した．また一部は，2.5％グルタールアルデヒド固定後1％オスミウム酸溶液で後固定，0.5％酢酸ウラニール水溶液で染色し，一部を超薄切片とし透過型電顕で，また残りは Eiko TF-1型凍結割断器で割断し日立 HCP-2型臨界点乾燥装置で乾燥したのちに Eiko IB-3型 Ion coter で蒸着し日立 S-430型走査電顕で観察した．

結　果

Gomori-trichrome 変法染色標本にて，Ragged-Red-Fiber（以下 RRF）の出現率（以下 RRF％）を算出し，その経時的変化をみると，阻血群で80分，DNP 投与群で5分後，CP 投与群で8日後に，RRF％が増加していた．（図1）．

NADH 染色で観察すると阻血群では20分後か

＊東邦大学医学部第四内科

ら，筋線維中心での染色性が低下し40分後になると筋鞘下での染色性が増加していた、(図２)DNP投与群では，同様の変化が５分後以降に，CP投与群では４日目以降に出現していた．透過電顕像は，阻血80分後，DNP投与５分後，及びCP投与８日後以降で，筋鞘下への巨大ミトコンドリアの集積が著明となっていた（図３）．またそれ以前では，筋鞘下に集積したミトコンドリアや，筋原線維間に存在し互いに隣接しあったミトコンドリア同志が接し，共通の外膜を有して細い架橋部で連結し，または単一の外膜を有する隔壁でのみ隔てられている所見が得られた．走査電顕によっても，これらと同様の所見が確認された．

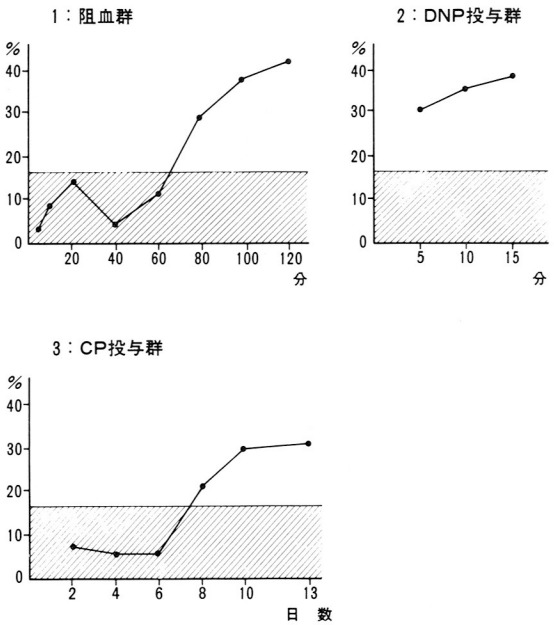
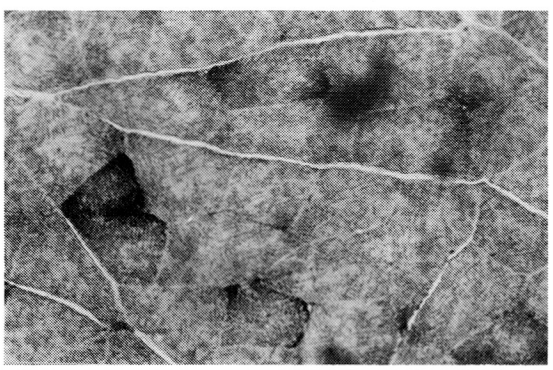


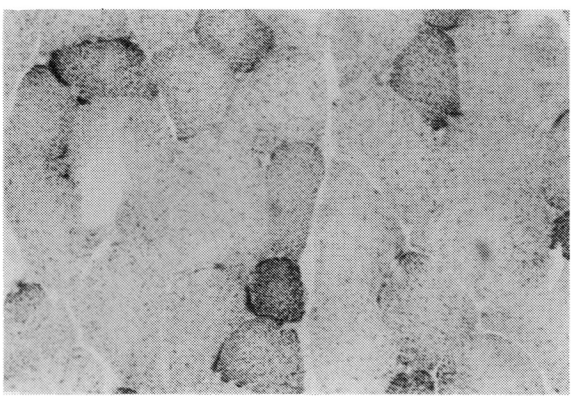
図１　Ragged-red-fiber 出現率の経時的変化
斜線部は，今回我々が用いた対照群の平均±2SD の範囲を示す．

考　　按

従来よりRRF％によって示される筋ミトコンドリア異常の発現には，阻血で120分，DNP投与で15分が必要とされており，CP投与によってラット骨格筋にRRFを作製した報告は，まだみられない．RRFはミトコンドリアの質的あるいは数量的変化によって出現しうるが，今回の実験では，電顕上の所見から，双方の変化が共に生じたことによって，RRFが形成されたと考えられる．そしてそれ以前にNADH活性の分布パターンが変化することから，筋線維中心部のミトコンドリアが筋線維の周辺部，筋鞘下へと移動する可能性が示唆される．ミトコンドリア巨大化の原因には，主として肝における実験から，１)合成の亢進，２)



A.



B.

図２　A：阻血後80分の骨格筋（NADH-TR染色）
B：CP投与６日目（NADH-TR染色）
双方とも，筋線維中心部の染色性が低下し，筋鞘下の活性が高まっている．

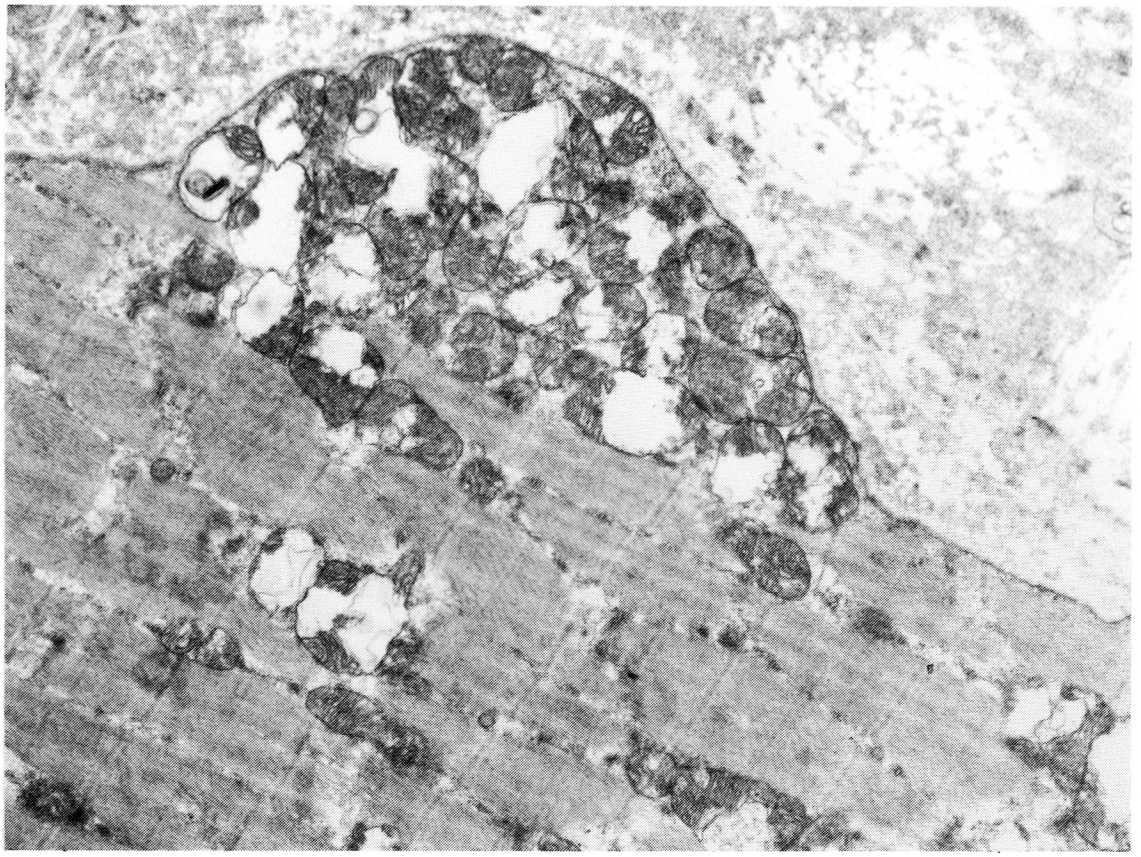


図3　DNP 投与後10分のラット骨格筋，電顕像（×12,000）
筋鞘下に集積したミトコンドリア同志が共通の外膜を有していたり，単一の隔壁によってのみ隔てられている．一部で，このような隔壁が消失しはじめている．

分裂の抑制，3）相互の fusion の3つの機序が考えられる．しかし，今回我々が用いた CP は，ミトコンドリア RNA の translation の阻害作用を有し，ミトコンドリアでの蛋白合成を抑制する方向に働くため，CP 投与によっても巨大ミトコンドリアが生じたことは，その機序としての合成亢進及び分裂抑制の可能性を低くするものである．そして，電顕上，見られたミトコンドリア間の架橋形成や，単一の外膜によってへだてられただけのミトコンドリアの存在は，巨大化が fusion によって生ずることを強く支持するものである．また，薬物によるミトコンドリアの fusion はその薬物の求核反応性が高いほど生じやすいことが示されているが，DNP と CP には，このような作用は存在せず，したがって，ミトコンドリア巨大化は非特異的な変化であり，普遍的な機序の存在を検討する必要があると思われる．

結　　語

1）阻血筋の早期の形態学的変化を検索したところ，阻血80分後から RRF %が増加し，それ以前には筋線維中央部のミトコンドリアが消失し筋鞘膜下に集積がみられた．

2）Chloramphenicol 及び2-4dinitrophenol 投与も同様の効果を有した．

3）ミトコンドリア同志の融合により巨大化が生ずることが示唆された．

4）ミトコンドリア形態異常は多様な原因により

生じ疾患特異性は少ないものと思われた.

文　献

1) 若林隆：ミトコンドリアの病理. 蛋白質, 核酸, 酵素, 27：1306-1324, 1982.

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

3) Albring, M., Radsak, K. & Thoenes, W.: Chloramphenicol - Induced Giant Hepatic Mitochondria. Naturwissenschaften, 62：43-44, 1975.

4) Sahgal, V., Subramani, V., Hughes, R., et al: On the Pathogenesis of mitochondrial myopathies-An experimental study. Acta Neuropathologica (Berl), 46：177-183, 1979.

38) ミトコンドリア脳筋症の一剖検例

栗原照幸*

研究協力者　岸　雅彦*　山村善教*　鶴田和仁*
松倉　茂*　林　透**　栗山　勝***
中川正法***

近年，ミトコンドリア脳筋症としてはmyoclonus epilepsy with ragged red fibers (MERRF), mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS) がそれぞれ臨床的疾患単位として注目を集めている．我々は臨床的にMELASと考えられる一例を経験し，さらに剖検を施行したので報告する．

症　例

患者：29歳，女性．

主訴：意識障害，左上肢痙攣．

家族歴：両親がいとこ結婚．

既往歴：幼少期に熱性痙攣をよく起こした以外に発育，発達に異常なし．

現病歴：昭和48年7月に両下肢筋力低下が出現し，ギランバレー症候群の診断にてステロイドを使用し症状は軽快した．

昭和54年1月に風邪症状の後，再び大腿部の筋力低下，筋肉痛が出現した．筋生検にて多発性筋炎と診断し，ステロイド，免疫抑制剤を使用し症状は軽快した．この頃より糖尿病も出現した．

昭和57年8月に頭痛・吐気を訴え，頻回に四肢・顔面に痙攣を生じ，意識レベルも低下したが，一日にて回復した．この頃より両耳性感音性難聴・視力低下が出現してきた．

昭和58年2月，風邪症状があり，その翌日より発熱，頭痛，意識レベル低下，左方向への眼振，回転性眼振，左半身の不全麻痺・感覚障害，左上肢のミオクローヌス痙攣，左同名半盲が出現したが，約1ヶ月にて左不全麻痺，知能低下を残し回復した．

昭和58年12月にも風邪症状の後，発熱，意識障害，右上肢の痙攣，右方向への眼振，顔面・眼瞼痙攣などが出現したが，しばらくして症状は軽快した．しかし，知能低下はさらに進行した．

昭和59年8月にも意識レベルの低下，左上肢のミオクローヌス痙攣，左方向への眼振が出現し，精査の為当科入院となった．

入院時現症

一般理学的所見：身長150cm，体重36.8kg，血圧106/42mmHg，脈拍84/min整，体温36.5℃．眼瞼結膜の軽度充血，末梢部に浮腫が認められる以外に心・肺・腹部所見に異常を認めなかった．

神経学的所見：意識は昏迷状態で著明な知能低下を認め，数分間持続し頻発する顔面・眼瞼痙攣，左方向への眼振，左共同偏視，及び左上肢のミオクローヌスを認めた．又，左同名半盲，左優位の感音性難聴，四肢肢帯筋のびまん性萎縮を認め，左上下肢の筋力とトーヌスの低下が著明であった．四肢の腱反射は消失しており病的反射は見られなかった．眼球運動障害，構音障害，協調運動障害は認めなかった．感覚検査は不能であったが明瞭な感覚障害は認めなかった．

検査所見

検尿正常．血沈は一時間値85mm，2時間値155mmと亢進していた．末梢血球数，血液像，凝固

＊宮崎医科大学第三内科
＊＊宮崎医科大学第一病理
＊＊＊鹿児島大学第三内科

線溶系，血小板機能には異常を認めなかった．血液ガス分析にても著明なアシドーシスは認めなかった．生化学的検査ではCKは187IU/Lと軽度高値で，耐糖能異常及びII b型高脂血症を認めた．肝腎機能，電解質には異常を認めなかった．血清学的検査ではIgAが軽度高値であった．血中乳酸・ピルビン酸はそれぞれ23.7mg/dl，1.33mg/dlと高値を示したがアミノ酸分析にてアラニンの上昇は見られなかった．髄液検査では蛋白58mg/dl，乳酸値32.72mg/dlと高値を示した．胸写，ECG，心エコー検査には異常を認めなかった．四肢筋電図検査では神経原性変化と筋原性変化が混在し，MCVでは両側のperoneal nerveで遅延が見られた．EEGではびまん性に徐波，棘波の出現を認めた．頭部CT scanでは初期より両側基底核の石灰化を認めた．発作ごとに出現する病側の低吸収域・腫脹，対称性の脳室・脳溝拡大の進行等を認めたが右側後頭葉の低吸収域は検査の毎に認められた(図1)．右内頸動脈造影では右側頭葉のearly venuos filling，拡張したdrainage vein，hypervascularityなどが見られ，これらは脳梗塞後に見られる所見であるが，明らかな血管狭窄，閉塞像は見られなかった(図2)．右外側広筋生検にてHE染色標本では筋線維の大小不同を認め，Gomori-trichrome変法染色にて約10%のragged-red fiberが認められた（図3-A)．NADH-TR染色では，筋線維全体もしくは筋鞘下にHyperactivityを示す線維が認められた（図3-B)．電顕では筋鞘下や筋線維間に大小不同の異常ミトコンドリアの集積像及び脂肪滴・グリコ

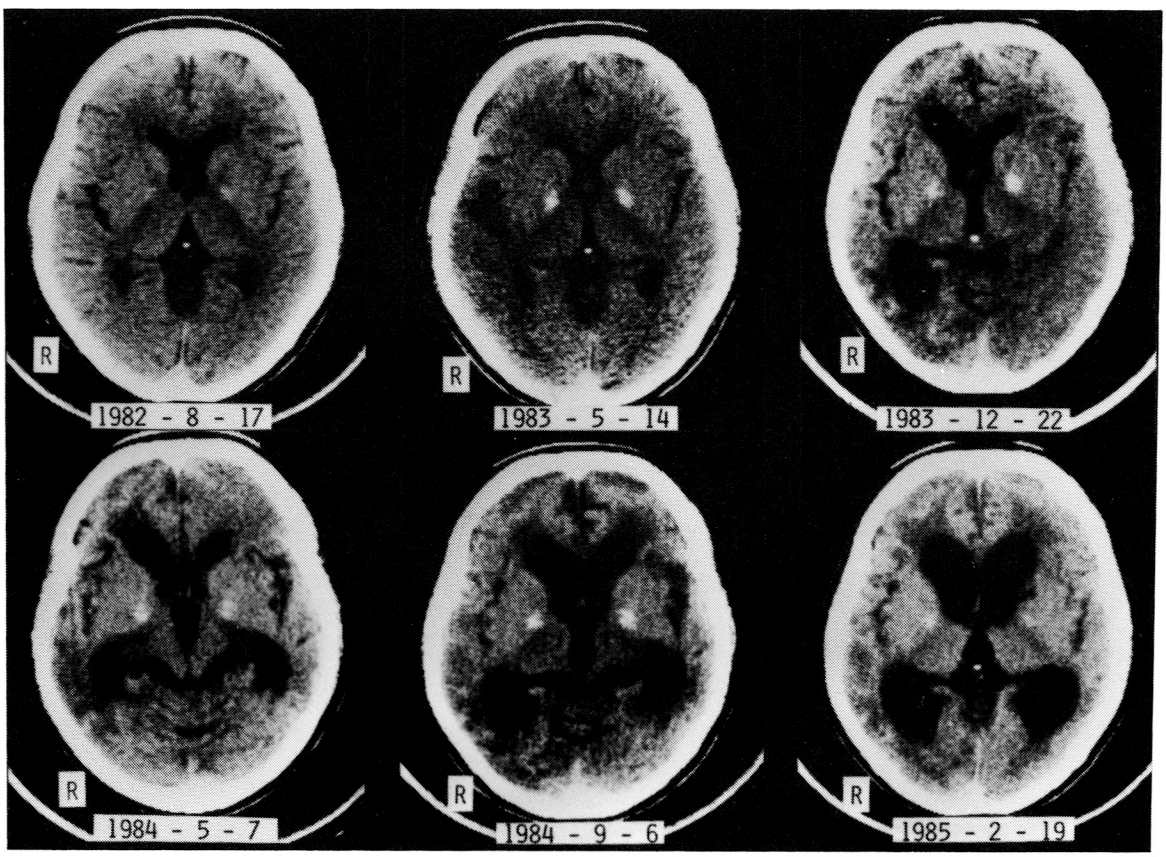


図1　頭部CT像の経過
発作ごとに出現する病側の低吸収域・腫脹，対称性の脳室・脳溝拡大の進行を認める．

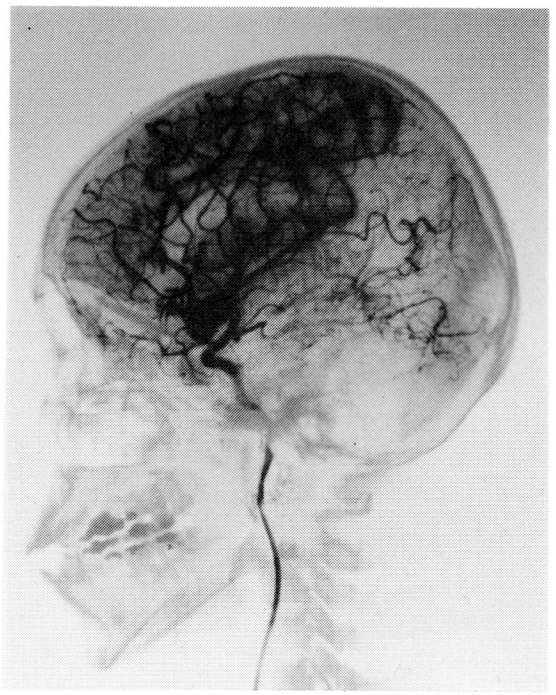


図2　右内頸動脈造影
右側頭葉の early venous filling，拡張した drainage vein，hypervascularity を認める．

ーゲンの蓄積を認めた（図3-C）．

入院後経過

入院後も左上肢のミオクローヌス痙攣，左半身の痙攣などの発作を繰り返し，知能低下，意識障害は階段状に悪化した．発作時には病変側の眼球結膜の充血及び歯肉出血が著明であった．抗痙攣剤も種々のものを使用したが明瞭な効果を呈したものはなかった．昭和59年12月より Ubidecarenone 120mg を開始し，しばらく小康状態を保ったが，昭和60年2月より再び意識障害，右上下肢のミオクローヌス，右方向への眼振等の発作が出現し，akinetic mutism の状態となった．昭和60年3月には肺炎にて死亡した．

病理解剖所見

死亡後約9時間後，病理解剖を行った．脳は9日間にわたる人工呼吸器装着の為に respirator

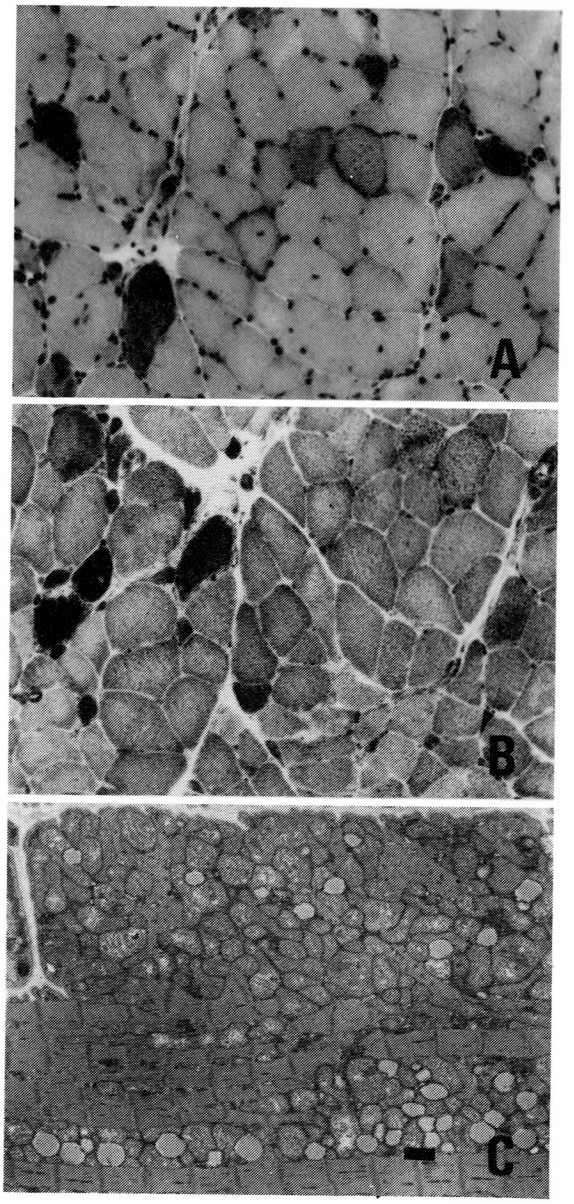


図3　筋生検組織像
A．Gomori-trichrome 変法染色，120×．約10%の ragged-red fiber を認める．
B．NADH-TR 染色，120×．筋線維全体もしくは筋鞘下に hyperactivity を示す線維が見られる．
C．電顕像，3900×．筋鞘下や筋線維間に大小不同の異常ミトコンドリアの集積，脂肪滴・グリコーゲン顆粒の蓄積を認める．

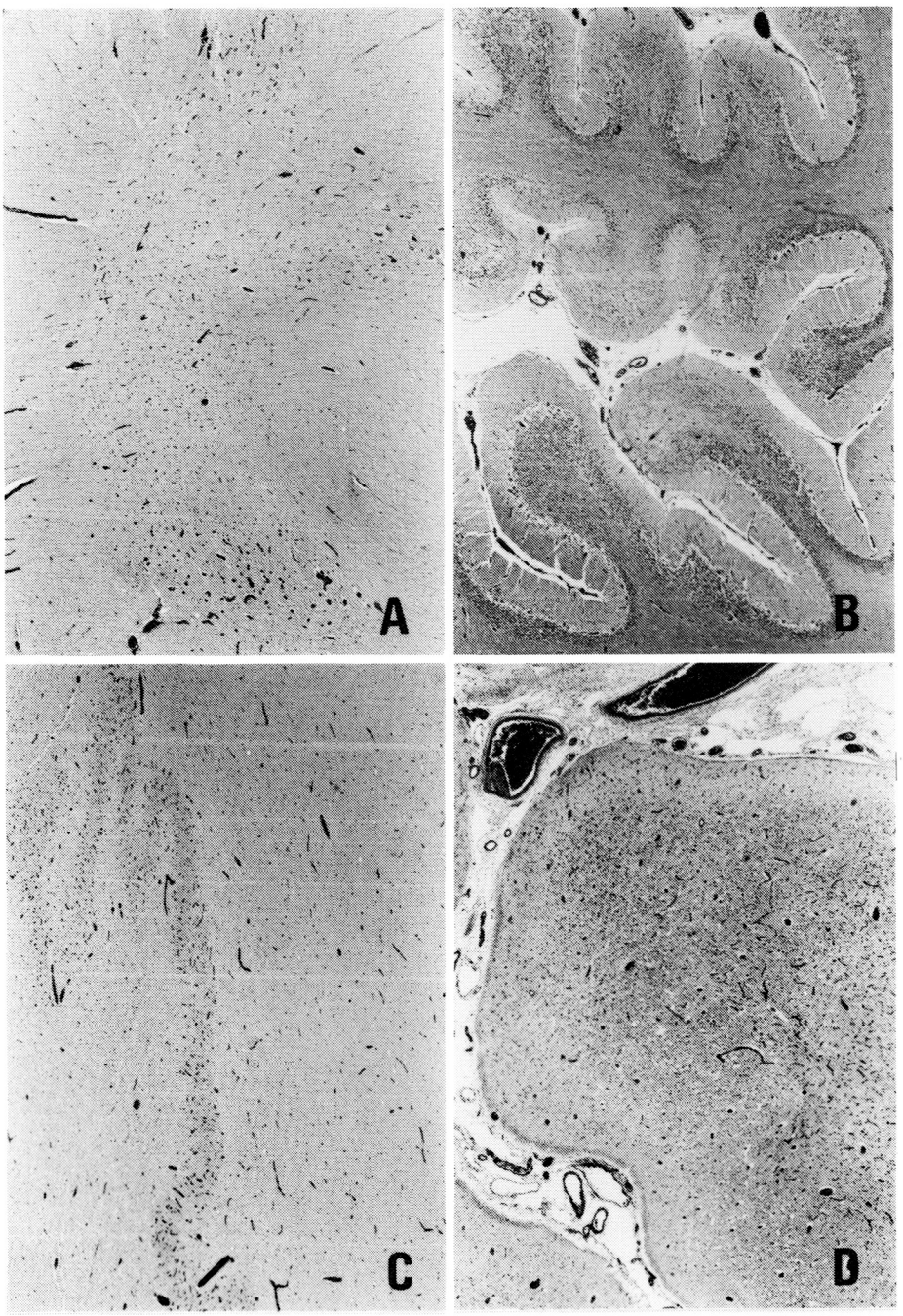


図4　病理組織像

A．胸髄．毛細血管の増殖・拡張，及び後角の神経細胞脱落を認める．

B．小脳．部分的な層状壊死，海綿状態，顆粒細胞脱落を認める．

C．歯状核．著明な毛細血管の増殖・拡張を認めるが，歯状核の神経細胞脱落は認めない．

D．大脳皮質．高度の神経細胞脱落，層状壊死，gliosis，海綿状態，毛細血管の増殖・拡張を認める．

brainの状態となっていた．脳表面の血管は全般的に拡張しており，一部クモ膜下出血も見られた．前額断面では両側脳室の拡大が見られ，皮質は全般的に褐色調が強く，軟化巣が散在しており，一部小出血巣が見られた．組織学的には脊髄では後角の神経細胞脱落が見られた(図4-A)．海馬では錐体細胞は脱落し，層状壊死に陥っていた．小脳では部分的に層状壊死，海線状態に陥った部位が見られた．その他の部位ではプルキニエ細胞は保たれているが，顆粒細胞は全般的に脱落していた(図4-B)．小脳歯状核の神経細胞は保たれ(図4-C)，Holzer染色でもgliosisは認められなかった．基底核では著明な石灰沈着を主に血管壁に認めた．大脳皮質ではほぼ全域にわたって層状壊死，高度の神経細胞脱落，fibrillary astrocytic gliosis，海綿状態，毛細血管増殖が見られ一部では軟化・不全軟化巣が見られた(図4-D)．大脳髄質では神経線維の粗ぞう化が種々の程度に見られ，部分的にmicroglia，foamy macrophageの増殖が見られ，一部で小出血斑が見られた．なお毛細血管増殖は大脳皮質以外の部位でも著明であった．

まとめると，以上の病変は虚血性の変化と毛細血管の増殖が主体で，特に大脳皮質の変化が著明である．小脳，脊髄等にも病変は認められるが，大脳皮質に較べると非常に軽度である．又，病変の局在は肉眼的にも顕微鏡的にも血管支配との関連は全く見られず，血栓形成も見られなかった．その他には，基底核の石灰化が特徴的で，特に血管周囲への石灰沈着が著明であった．

生化学的検索

死亡後2時間後に上腕二頭筋，剖検時に脳，心臓を採取，凍結保存しCytochrome content, mitochondria enzymesの測定を行った．この3臓器に関しては各Cytochromeの比率はほぼ正常と考えられた．酵素活性では死後変化の関与が否定できないがCytochrome C oxidaseが脳では281μmol/min/gram mitochondria (control 209)と，やや高値であるが心臓では676 (control 2290)，上腕二頭筋では268 (control 1270)と比較的特異的に低下しておりCytochrome C oxidase部分欠損の可能性が疑われた．

考　　察

ミトコンドリア脳筋症とはミトコンドリアミオパチーの中でも中枢神経症状が前景に立つものに対し名付けられたもので，ミトコンドリアの障害によって生じるcytopathyと考えられている．その中にはLuft病，Menkes病などの様に代謝障害部位と臨床症状の関係が明瞭なものもあるが，大多数のものは不明である．又その臨床症状も多彩であり，臨床的特徴からKearns-Shy症候群(KSS)，MERRF[1]，MELAS[3]などの疾患単位が提唱されている．

本症例は片麻痺，痙攣，同名半盲などの脳卒中様発作を繰り返し，高乳酸血症や形態学的に筋中のミトコンドリアの異常を認めており，ミオクローヌス痙攣以外はMELASに特徴的な臨床症状と言える．又，病理学的にもMELAS，MERRFに見られる様な血管支配との関連を持たない虚血性変化，毛細血管の増殖を広範に認め，基底核の石灰化も認められる．特に虚血性変化は大脳皮質に著明であり，これはMELASの臨床症状を反映するものと考えられる．

1983年RowlandはMERRFとMELASの鑑別点としてMERRFにおける小脳症状，ミオクローヌス，脊髄病変，位置覚障害，MELASにおける脳卒中様症状をあげている[2]．しかし，脳卒中発作の後にミオクローヌス様痙攣発作を来す事は大脳皮質の刺激性病変から起こりうる事であり，ミオクローヌスや痙攣の有無のみでMELAS，MERRFを区別することはできず，二つの症候群の臨床症状を合わせ持つ症例もいくつか報告されている[3]．組織学的にもMELAS，MERRFは区別をつけがたく[3]，これらの症候群の差異は病変の局在の違いにより生じている．本症例は病理学的にはMELAS，MERRFで障害されうる全ての部位に障害を認めるが，障害の程度がMELASで障害されうる大脳皮質で特に強いことと，脊髄，小脳，小脳歯状核の変化が本症例では乏しいのでMELASと診断した．

本症例ではCytochrome C oxidaseの部分欠損

が疑われたたが，今後生化学的検索及び病理学的検索を含む症例の集積が必要と思われる．

文　献

1) Fukuhara N, Tokiguchi S, et al: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? J. Neurol. Sci., 47: 117, 1980.

2) Rowland LP: Molecular genetics, pseudogenetics, and clinical neurology. NEUROLOGY (Cleveland), 33: 1179, 1983.

3) Pavlakis SG, Phillips PC, et al: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. Ann. Neurol., 16: 481, 1984.

4) DiMauro S, Bonilla E, et al: Mitochondria Myopathies. Ann. Neurol., 17: 521, 1985.

39) Cytochrome c oxidase欠損症の病理学的検討

埜中征哉*

研究協力者　菊池愛子*　萩野谷和裕*　禹　満*
寺澤健二郎*　織茂智之*

Cytochrome c oxidase (CCO) 欠損症は臨床的，病理学的所見から①fatal infantile，②benign infantile，③encephalomyopathic，④miscellaneous (Menkes' disease, Alpers disease など)，⑤Partial deficiency の5型に分けることができる．②，③については先のワークショップで詳しく述べたので，ここでは①，⑤についてその問題点を中心に検討した．

対象，方法

①乳児致死型 (fatal infantile form)

生後1ヵ月目より筋緊張，筋力低下が出現し，高乳酸血症，アシドーシス，de Toni-Fanconi-Debre 症候群，呼吸障害をみて8ヵ月で死亡した女児の生検筋を検索した（症例は金沢医大小児科，沖野先生の御厚意による）．生検筋の一部を組織化学，電子顕微鏡検索のため固定し，また一部筋組織を in vitro で欠陥が再現されうるかどうか検索するため培養系に移した．また線維芽細胞も同時に培養し，欠損酵素の有無を検索した．

②部分欠損 (partial deficiency)

病理診断のため生検された筋には全て CCO 染色を行っているが，その中で CCO 活性が全くない線維が散在する症例を選んだ．またそれらの例では酵素学的にも CCO が欠損しているか否か確認した．

CCO 染色は Novikoff and Goldfischer (1969) の方法に従った．

結　果

①乳児致死型

組織学的，電子顕微鏡的所見：筋線維は全て細く直径は10μ 以下であり脂肪やグリコーゲンが増加していたため，細胞内空胞が多数認められた．Gomori トリクローム変法染色では赤染する ragged-red fiber (RRF) が多数認められた．ただし筋紡錘の紡錘内線維のみよくその形態を保持していた．

CCO 染色，CCO 抗体染色何れでも筋線維は全く染色されていなかったが，紡錘内線維，結合織内の線維芽細胞には活性がみられた（図1）．

電子顕微鏡では大半の線維に大型で複雑なクリステをもつミトコンドリアの集積，脂肪滴の増加を認め，筋原線維は少量しか認められなかった．さらに筋衛星細胞は著明に増加していて，正常対照の約3倍もあった．ただし筋衛星細胞に活動化 (activated) の徴候はなかった．また筋衛星細胞内のミトコンドリアには異常はみられなかった（図2）．

筋培養：生検筋の一部を筋培養したが生検筋内には筋衛星細胞は多かったのに，分裂増殖能はきわめて低く筋管細胞はほとんど形成されなかった（図3）．比較的よく形成された筋管細胞内にも筋原線維はほとんどなく，ミトコンドリアはやや大型化の傾向はあったが，明らかな異常はみられなかった．このミトコンドリアには組織化学的に酵素活性は認められなかった．

②部分欠損症

部分欠損が認められたのは Kearns-Syre 症候群を含めていわゆる chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO) が4名，NADH-

＊国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部

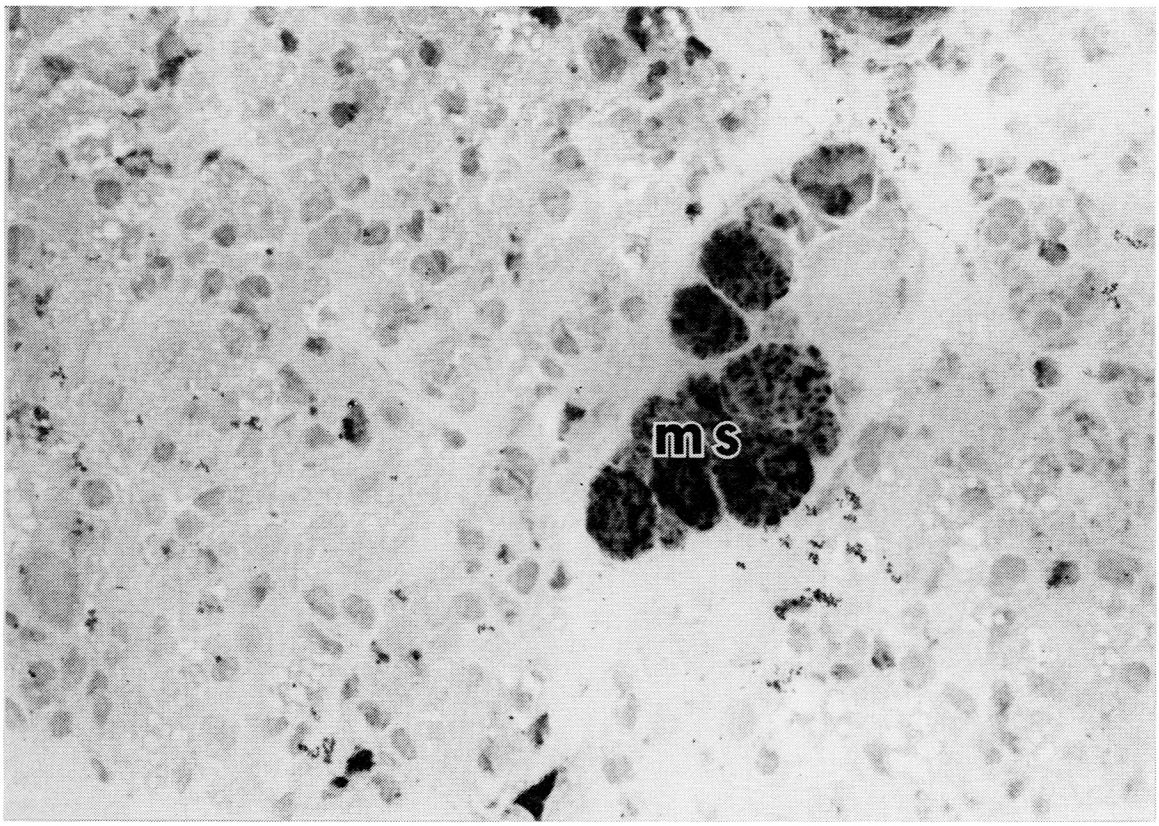


図1　筋紡錘（ms）内の筋線維は形態学的にも正常でCCO活性は正常に保たれている．
Cytochrome c oxidase, ×700.

CoQ reductase欠損1名，CCO欠損症で娘がLeigh脳症様症状をとったその母親，CCO欠損症で乳児良性型の2回目生検筋，生検筋の生化学的分析では異常ないLeigh脳症の計8名であった．

CPEOでは欠損線維の頻度は10%以下で全員数%であった．欠損線維はRRFのことが多かったが，一見正常にみえる線維でもしばしば酵素染色で活性がみられなかった（図4）．欠損している線維はミトコンドリア酵素活性を示すNADH-TR染色では正常か活性高く濃染し，タイプ1線維であることが多かったが，まれにはタイプ2線維であった．生検筋の生化学的分析では図4に示した1名のみCCO活性が正常対照の1/5と低下していたが他は正常値であった．

Leigh脳症類似の症状をとり，組織化学的には広汎なCCO活性低下（生化学的には酵素活性は正常の1/2）をみた娘の母親にmosaic状の部分欠損を認めた．この母は軽度脳波異常と軽度血清乳酸値上昇を認めた以外臨床的には著変なかった．娘は小児期より緩徐に進行する筋力低下，知能低下，発作性脳波異常があり，CTでのlow densityなどよりLeigh脳症が疑われていた．筋生検では多数のRRF，脂肪滴の増加，筋線維の大小不同などの所見を認めた．CCO染色では著明な活性低下があり，RRFでは全く活性を認めなかった．母親にも小数のRRFを認め，これらは全てCCO活性はなかった．RRF以外の線維（主にタイプ1）でも酵素活性が低下していることがまれならず認められた．

次の部分欠損の症例は乳児良性型の改善時であった．患児は生下時間もなくより筋力と筋緊張低下を主症状とした女児例で，生後8ヵ月の時生検

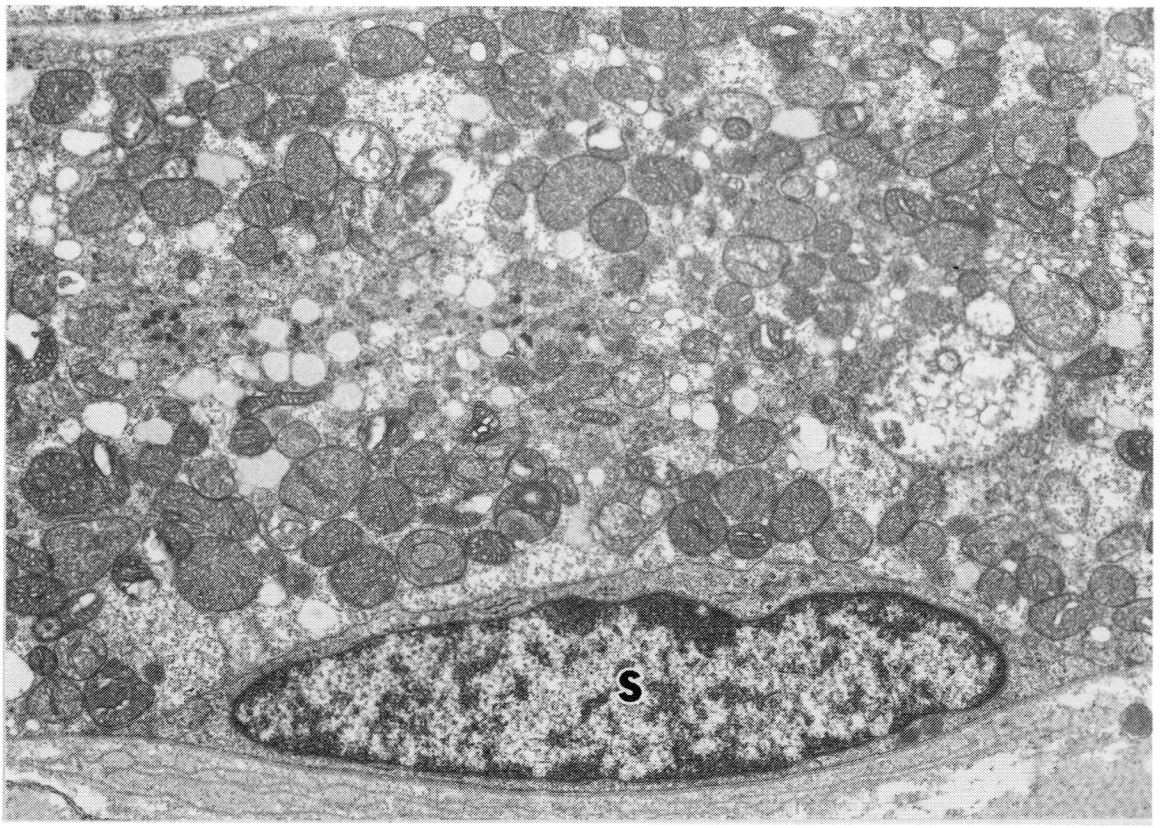


図2　筋衛星細胞（s）は数は増加しているが活動化の所見なく静止状態（quiescent satellite cell）である．筋線維内には筋原線維はほとんどなく異常なミトコンドリアで満たされている．×9,000.

し，この時80～90%の線維はRRFであり脂肪滴の著明な増加と，グリコーゲンの著明な増加があり mitochondria-lipid-glycogen diseaseの診断をうけていた．CCO染色では約1/3の線維にわずかな活性を認めるのみであった（図5 A）．患児は臨床的にも著明に改善し歩行可能となり，知能も正常で若干の筋力低下を残すのみとなった．第2回目生検（4歳5月）では，筋線維はまだ大小不同あり散在性にRRFを認めたが，脂肪とグリコーゲンはほぼ正常量となっていた．CCO活性は一部の筋線維に欠損するのみで大多数の線維に活性をみとめた（図5 B）．

生化学的にNADH-CoQ reductaseの欠損が確かめられた13歳男児例にもCCOの部分欠損が認められた．この例ではCCO欠損線維はRRFに限られていた．逆にRRFでCCOが欠損せず正常ないし，やや低下の線維も存在した．

組織化学的にはCCOの部分欠損が証明されたのにRRFもなく，また生化学的にも（ミトコンドリアを分離し，CO_2産生，NADH-cytochrome c reductase, succinate cytochrome c reductase, cytochrome c oxidase, PDHC測定）全く異常を認めない例が1例存在した．患者は4歳女児で2歳頃から始まる知的退行，けいれん，高乳酸血症を主症状としていた．

考　　察

CCO欠損症は臨床像，病理像から5型に分けられる．中でも1歳未満で死亡する重症型（fatal infantile form）はすでに10例以上の報告がみら

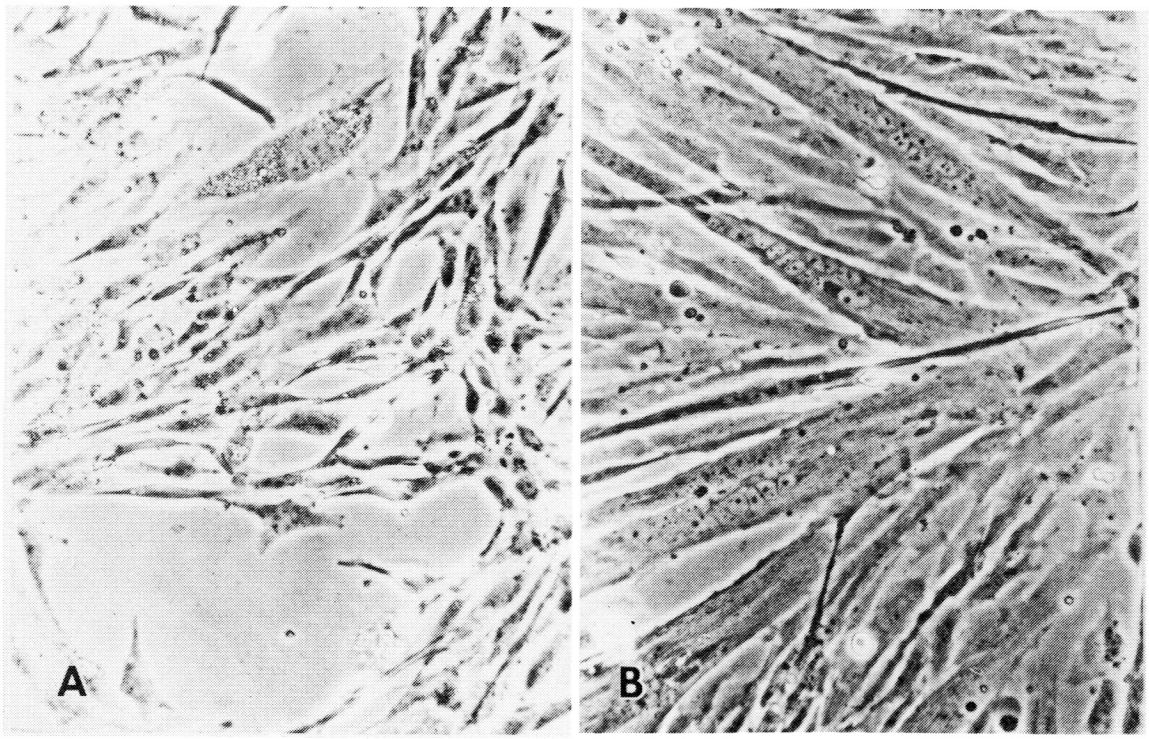


図3　培養筋細胞は筋芽細胞も少なく筋管細胞形成もほとんどない（A）．同年齢の正常対照筋（B）．

れる．重症型ではCCOの抗体染色でも筋線維は陽性に染色されないので酵素蛋白そのものが欠如していると思われる[1),2)]．

本例では筋紡錘内線維や線維芽細胞（組織内，培養細胞とも）にCCO活性がほぼ正常に存在した．このような組織特異性はCCOのsubunitsであるVIaにあるという[3)]．これはnuclear DNAにcodeされるものであるので本例は少なくともnuclear DNAの異常はあったといえる．

CCOの完全欠損が筋組織に与える影響を検討してみた．ミトコンドリアは著明に増加し，多くは大型で複雑なクリステを入れていた．筋原線維は十分に形成されなかったためか量的に少なく配列は乱れていた．筋衛星細胞の形態（ミトコンドリアなど）には異常なかったが細胞数は著明に増加していた．このことは筋の発生の時，筋衛星細胞が筋線維に融合して筋線維の発育に協力しなかったため，すなわち筋の未熟性を反映していると考えられた．一つの基底膜の中に数個の筋線維と衛星細胞を入れる未熟な線維の存在も本症の骨格筋の成熟障害を示唆している．さらに本症例の生検筋を培養したところ，筋再生の時筋芽細胞と同じ働きをする筋衛星細胞は数多かったにもかかわらず，筋芽細胞の分裂増殖，筋管細胞の形成は対照に比較して明らかに劣っていた．このことは本症では筋の発育，分化に大きな欠陥のあることが証明された．この筋線維の発育分化の遅れ，筋衛星細胞による修復欠陥が早期発症と速い進行を説明するものであろう．

部分欠損がCPEOに最も多くみられることは他の報告からみても明らかである[4)~6)]．このような部分欠損は果たして意味のあるものなのか否か検討することを目的で，部分欠損の症例を集めてみた．CPEO以外では母性遺伝をしているCCO欠損の母親や乳児良性型の改善期にもみられたことより，部分欠損は単なる偶然ではなく大きな意

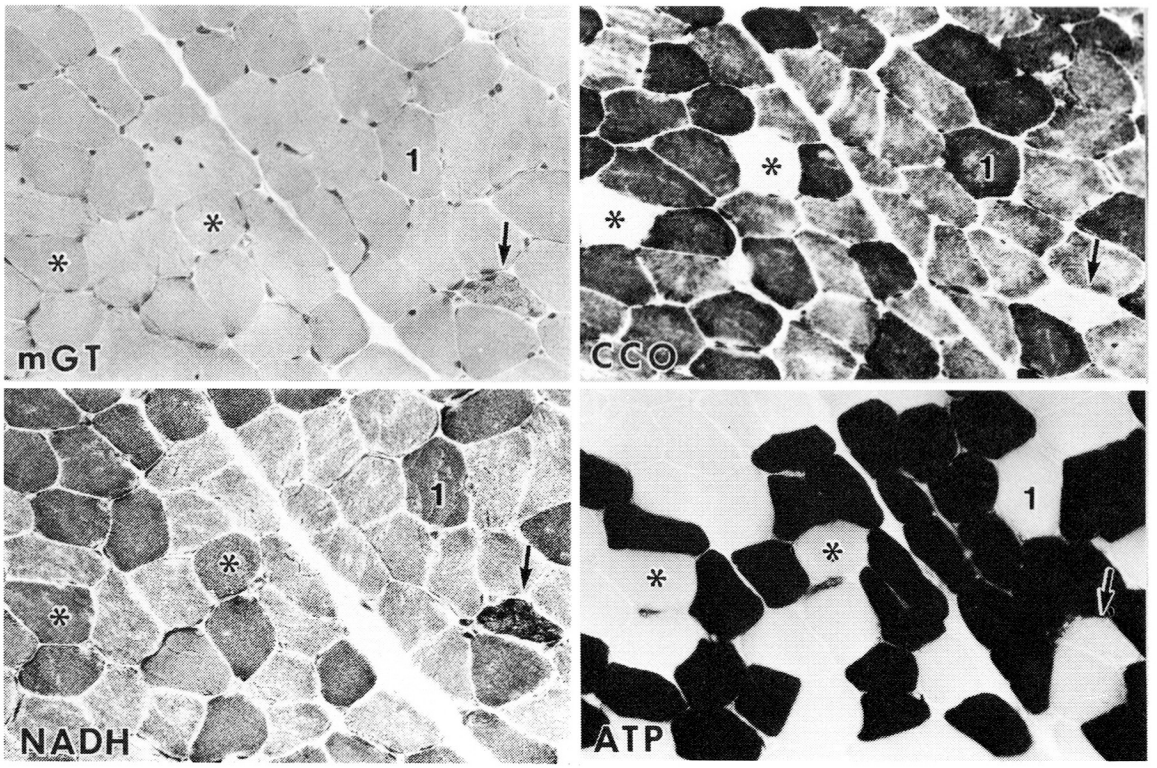


図4　CPEO 患者の生検筋の連続切片．Gomori トリクローム変法（mGT）染色で認められた RRF（矢印）には cytochrome c oxidase（CCO）の活性はないが，ミトコンドリア酵素である NADH の活性は高い．RRF でなく一見正常にみえる線維（星印）でも CCO の活性がないことがある．CCO 活性は本来タイプ 1 (1)線維に活性が高い．星印の線維は routine ATP ase（ATP）でみてタイプ 1 線維で NADH 染色でもタイプ 1 の反応を示すのに CCO に全く活性がないことが重要な意味をもつ．×130.

味をもつものであろう．ただし，NADH-CoQ reductasea 欠損の RRF でも CCO 活性のないものがあったので，RRF が進行しているような例では二次的にも部分欠損がみられうることを示している．

部分欠損は細胞質遺伝をするといわれるミトコンドリアミオパチーでは当然起こりうる現象であろう．このような例では筋をホモジナイズして生化学的にミトコンドリア酵素を測定したのでは正常になるので組織化学的な検索がきわめて重要であることを示している．RRF では二次的に CCO 欠損をみることがあるし，タイプ 2 線維は本来 CCO 酵素が低い．ゆえに RRF でなく，かつタイプ 1 線維であって，ミトコンドリア酵素染色である NADH-TR に活性があるのに CCO 染色で活性が全くみられない時 CCO 欠損として大きな意味をもってくると考えられる．

文　　献

1）Zeviani, M., Nonaka, I., Bonilla, E. et al.: Fatal infantile mitochondrial myopathy and renal dysfunction due to cytochrome c oxidase deficiency ; immunological studies in one patient. Ann. Neurol., 17 : 414-417, 1985.

2）Bresolin, N., Zeviani, M., Bonilla, E., et al.: Fatal infantile cytochrome c oxidase deficiency ; decrease of immunologically detectable enzyme in muscle. Neurology, 35 :

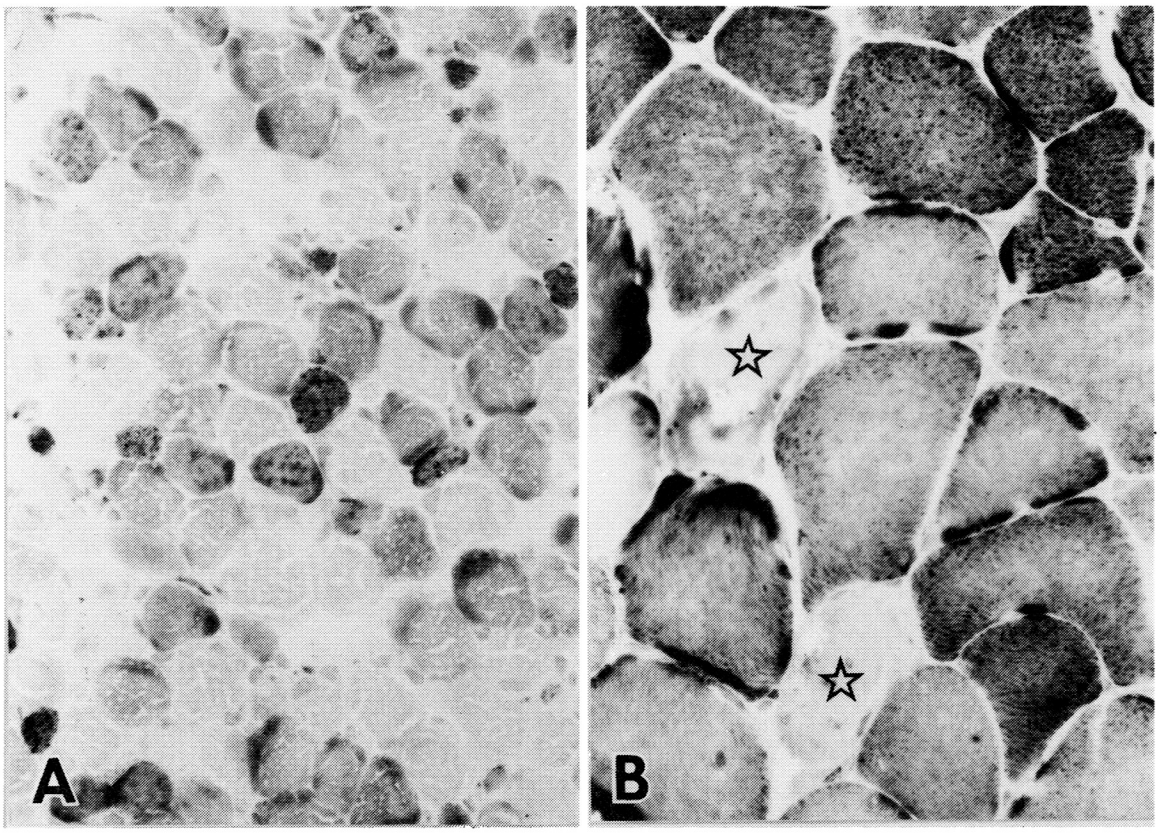


図5　乳児良性型．生後 8 ヵ月目の CCO 染色では活性をもつ線維はごくわずかであった（A）．臨床的にも改善した第 2 回目の生検筋では（B）線維径も増大し，RRF は著明に減少し，ごく一部の線維のみ CCO の活性が著明に低下していた（星印）．A，B：cytochrome c oxidase，×400．

802-812, 1985.

3）Jarausch, J. & Kadenbach, B.: Tissue-specificity in cytoplasmic cytochrome c oxidase polypeptides. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 363 : 1133-1140, 1982.

4）Johnson, M.A., Turnbull, D.M., Dick, D.J. & Sherratt, H.S.A.: A partial deficiency of cytochrome c oxidase in chronic progressive ophthalmoplegia. J. Neurol. Sci., 60 : 31-53, 1983.

5）Turnbull, D.M., Johnson, M.A., Dick, D.J. et al.: Partial cytochrome oxidase deficiency without subsarcolemmal accumulation of mitochondrial in chronic external ophthalmoplegia. J Neurol. Sci., 70 : 93-100, 1985.

6）Müller-Höcker, J., Pongratz, D. & Hübner, G.: Focal deficiency of cytochrome c oxidase in skeletal muscle of patients with progressive external ophthalmoplegia. Cytochemical-fine-structural study. Virchows Arch. Pathol. Anat., 402 : 61-71, 1983.

40) Succinate-Co Q reductase(Complex II)活性低下を認めたmitochodrial encephalomyopathy

塚越　廣*

研究協力者　和田義明*　山本雅彦*　横田　司*
佐野元規*　古川哲雄*　依藤史郎**
巽　千賀夫**

Shapiraら[1]が，1977年に“mitochondrial encephalomyopathy”という概念を導入して以来，多くのmitochondrial encephalomyopathyが報告されている．しかし，これらの中で，mitochondriaの生化学的異常が明らかにされているものは少ない．今回我々は，ミオクローヌス，小脳失調，難聴，痴呆を主症状とし，生検筋に異常形態を示すmitochondriaを認め，生化学的検討により，mitochondria電子伝達系のsuccinate Co Q reductase (complex II) 活性低下を示したmitochondrial encephalomyopathyを経験した．complex IIの部分的障害を示唆する報告はきわめてまれであり貴重な症例と考え報告する．

症　例

患者：73歳，女性．

主訴：歩行時のふらつき，難聴．

家族歴：類症を示すものなし．

既往歴：34歳頃マラリアに罹患．

現病歴：34歳頃マラリアの治療後に，難聴と構音障害に気づいた．これらの症状はその後40年にわたり徐々に悪化した．53歳の時，初めて歩行時のふらつきと足幅を広くしないと立てない事を指摘された．63歳頃，なにかしようとすると手がひどくふるえ，書字も困難となった．70歳の時，近医で小脳失調と脳波異常を指摘された．71歳になり，上肢，頸部，顔面の速い収縮の不随意運動に悩まされるようになった．73歳当科入院．

＊東京医科歯科大学神経内科
＊＊大阪大学第二内科

一般身体所見：身長141cm，体重34kgと短軀．vital signはすべて正常．心尖部に収縮期雑音を聴取した．肝，脾腫，足変形なし．

神経学的所見：意識は清明だが，長谷川式簡易痴呆検査は4点で，記憶，計算障害の強い高度の痴呆を認めた．発音は不明瞭で爆発的であった．眼底は正常で，眼球運動障害なし．両側の高度の感音性難聴を認めた．筋萎縮，筋力低下はなかった．上肢，頸部，顔面に非同期性にミオクローヌスを認めた．起立時の足幅は広く，著明な失調歩行であった．四肢に筋トーヌスの低下と深部腱反射の低下を認めた．両側Babinski徴候は陽性であった．Diadochokinesisは遅く，不規則であった．指-鼻試験，踵-膝試験では企図振戦，dysmetria，decompositionを示した．感覚障害はなく，Romberg徴候は陰性であった．

検査所見

一般血液検査ではLDH258U/l，コレステロール231mg/dl，CPK 272U/l（正常25-170）と軽度上昇していた．心電図は左室肥大を示したが，伝導障害はなかった．頭蓋，脊椎のXPは異常無し．髄液は，蛋白が57mg/dlと増加していた以外は正常であった．頭部CTは二次的な脳室拡大を伴った全般性の脳萎縮を示した．基底核，脳幹に石灰化はなかった．脳波は，6-7Hzのθ波を基礎活動とし，2-3Hzのδ波のburstと全般性鋭波の出現を伴っていた．光刺激による突発活動の出現はなかった．表面筋電図では，持続時間0.08-0.1秒の活動電位が不規則，非同期性に出現，脳波との同

時記録を施行したが，関連性はなかった．Jerk-locked average 法でも同様であった．大脳誘発電位（聴性脳幹反応，体性感覚誘発電位）は正常であった．針筋電図では上腕二頭筋，上腕三頭筋に多相性活動電位を，総指伸筋，尺側手根屈筋，背側第一骨間筋，腓腹筋に高振幅活動電位を認め，神経原性変化を示した．神経伝導速度はすべて正常であった．

筋生検：左大腿四頭筋より生検を施行した．凍結切片では筋線維の大小不同と小径角状線維を認めた．Ragged-red fiber は type Ⅰ線維にみられ，全筋線維の約５％に存在していた（**図１**）．筋鞘膜下に NADH-TR 染色で強い反応を示す筋線維も認めた．間接的 immuno-peroxidase 法を用いた cytochrome c（cyt c）oxidase 染色は全ての筋線維で正常反応を示した．筋線維内に脂肪の増加は認めなかった．

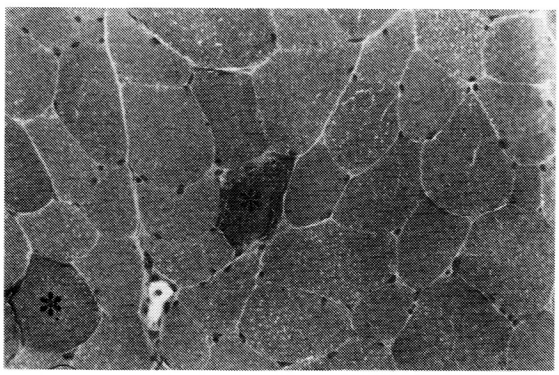


図１　筋生検組織像
Modified Gomori trichrome 染色
ragged-red fiber（＊印）

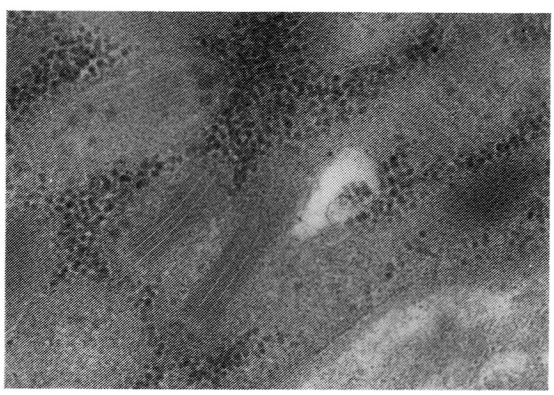


図２　生検筋電顕像
Mitochondria 内に paracrystalline body を認める．

電顕では，筋線維内特に筋鞘膜下に異常な mitochondria の集積を示した．多数の mitochondria 内には paracrystalline body を認め，globular inclusion も散見された．Finger-print 様の巨大 mitochondria もみられた（**図２**）．

乳酸，ピルビン酸：血清乳酸は14.9mg/dl と正常であったが，血清ピルビン酸は1.06mg/dl，髄液乳酸，ピルビン酸は19.8，1.06mg/dl と軽度の上昇を示していた．

前腕虚血負荷試験：患者を早朝空腹時に安静を保たせ，２台の血圧計を上腕と手首に装着し200 mmHg の圧を加えて２分間前腕を虚血状態とした．最初の45秒間に１秒間に１回の割合で15-20 kg の力で手を握らせ負荷とした．静脈血を負荷前と負荷後０，２，５，10，15分に採血し，血清乳酸，ピルビン酸を測定した．血清乳酸は負荷後２分に負荷前の２倍以上に上昇し，15分後には正常化した．血清ピルビン酸は，負荷後２-10分は正常となった．正常範囲内の反応であった（**表１**）．

生化学的検索：生化学的分析は－70℃で保存した生検筋を用いた．約100mg 湿重量の生検筋に 150mM KCl，50mM Tris-Cl 緩衝液（pH7.4）を９倍量加えてグラスホモジナイザーで homogenate し1000×g で15分間遠心した上清を用いて，mitochondria 内膜電子伝達系酵素活性を分光光度計で測定した．Complex Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，succinate dehydrogenase は，Hatefi の方法で，complex Ⅳは Wharton の方法で，complex Ⅱ＋Ⅲは Tisdale の方法で測定した．complex Ⅰ＋Ⅱは antimycin A による阻害下で測定した[2]．結果は**表２**に示す如くであった．Succinate-Co Q

表１　前腕虚血負荷試験

	負荷前	負荷後 0	2	5	10	15分
ピルビン酸	0.94	0.92	0.46	0.50	0.38	0.91mg/dl
乳酸	9.7	14.9	21.0	15.9	12.9	10.2mg/dl

表2　Activities of electron transport system in the mitochondrial inner membrane

	control* (n=12)	patient (U/g.tissue)
NADH-CoQ reductase (complex I)	1.5±0.4	2.1
NADH-Cyt c reductase (complex I+III)	1.4±0.8	0.78
succinate-Co Q reductase (complex II)	2.2±0.5	0.48 ↓
succinate-Cyt c reductase (complex II+III)	0.9±0.3	0.19 ↓
reduced CoQ-Cyt c reductase (complex III)	42±7	21.2
Cyt c oxidase (complex IV)	1.3±0.5	0.26
succinate dehydrogenase	1.6±0.5	1.2

*Control values are mean ± SD.

reductase (complex II) と succinate-cyt c reductase (complex II＋III) は中等度の活性低下を示した．Succinate dehydrogenase や他の酵素活性は正常であり，inhibitor は検出されなかった．これらの結果より complex II の部分的障害が示唆された．

考　察

本例は34歳頃難聴が出現，以後小脳失調，ミオクローヌス，痴呆が加わった．臨床的にはミオパチーはなく，CPK は軽度の上昇を示した．生検筋に mitochondria の形態学的異常と生化学的異常を認めたことより，本例は mitochondrial encephalomyopathy と診断された．

Mitochondrial encephalomyopathy の中で，臨床的特徴を有するものとして Kearns-Sayre 症候群，mitochondrial encephalopathy, myopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS), myoclonus epilepsy with ragged-red fiber (MERRF) がある．本例は眼球運動障害，網膜色素変性症，心伝導障害などがなく Kearns-Sayre 症候群とは異なっていた．Lactic acidosis, stroke-like episode もなく，MELAS とも異なっていた．MERRF とは，発症が遅く難聴で始まり，経過が長く，筋症状のないことが異なっていた．この他の mitochondrial encephalomyopathy として，Alpers 病，Leigh 症候群，Menkes 病などがあるが，いずれも発症年齢，臨床症状，経過が異なっている．このように本例は報告されているいずれの一群とも完全には一致しない．

Mitochondrial encephalomyopathy における mitochondria の生化学的機能異常は，mitochondria 基質の転送障害，mitochondria 基質の利用障害，エネルギー維持，伝達の障害，電子伝達系の障害が報告されている．これらの機能障害と臨床分類の対応はいまだ明らかでない．本例では電子伝達系の complex II (succinate-Co Q reductase) の部分的障害が示された．電子伝達系の障害は，現在まで complex I の障害が6例，

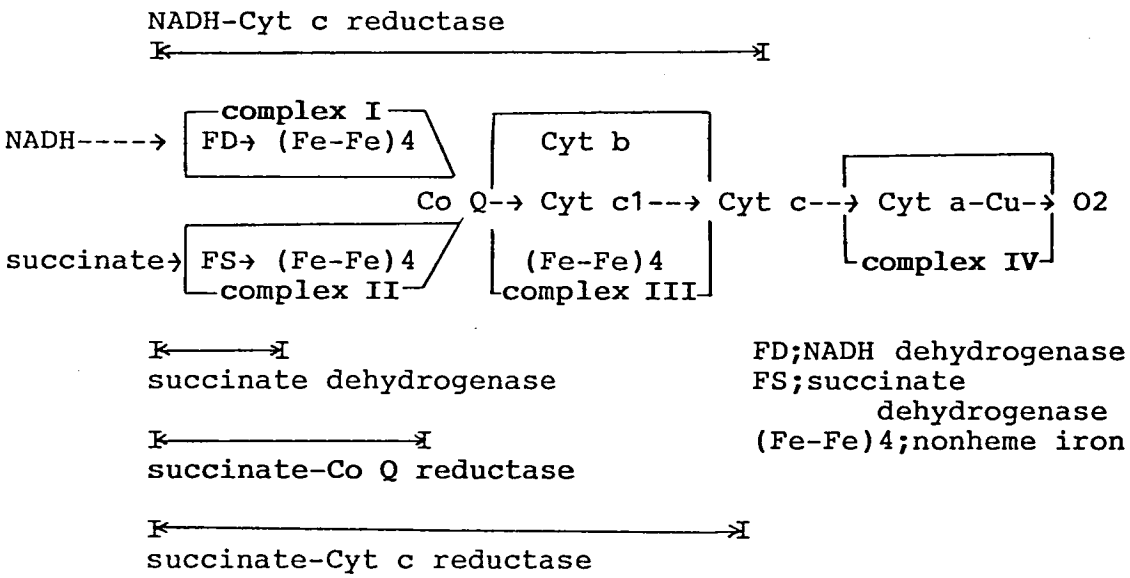


図3　Components of the respiratory chain in mitochondria

complex IIIの障害が8例, complex IVの障害が20例報告されているが, complex IIの障害を直接示す報告はなく，間接的に障害を示唆する報告が数例あるのみである．Riggs ら[3]の mitochondrial encephal myopathy の2同胞例は，両者とも5歳半頃に小脳失調で発症し，後にミオクローヌス，けいれん，知能障害を示したが，難聴，筋力低下は認めなかった．筋生検では，脂肪の蓄積が多かったが，carnitine は正常であった．Sengers ら[4]の症例は，二次的と思われる carnitine 欠乏症を伴った mitochondrial myopathy で，生後1ヵ月より筋力低下が出現し，2歳には著明な筋力低下を示した．4歳時の検査では，lactic acidosis，眼瞼下垂，筋萎縮と筋力低下を認めたが，不随意運動，難聴，失調，知能障害はなかった．以上の3例とも succinate-cyt c reductase 活性の著明な低下を呈したが，NADH-cyt c reductase, succinate dehydrogenase は正常であることより，complex IIの部分的障害が考えられた（図3）．Goldfischer ら[5]の cerebro - hepato - renal syndrome の報告では，脳と肝より抽出した mitochondria に於ける O_2 消費量の測定，脳組織の succinate tetrazorium reductase 活性染色の結果などから complex IIの障害が示唆された．いずれの症例に於いても間接的に complex IIの障害を示すのみで，直接 complex IIの障害を示したのは本例が初めてである．

以上のように同じ complex IIの障害を示す症例でも，臨床症状はかなり異なっている．今後 subunit 単位で障害部位の決定が可能となれば，このような解離を説明しうる本質的解明がなされると思われる．

文　献

1）Shapira Y, Harel S, Russel A : Mitochondrial encephalomyopathies, a group of neuro muscular disorders with defects in oxidative metabolism. Isr J Med Sci 13 : 161-164, 1977.

2）垂井清一郎，依藤史郎，小笠原三郎ら：ミトコンドリア異常症の病態解析-Kearns-Sayre 症候群-，文部省特定研究「神経難病」班昭和59年度研究業績集，1984，pp301-306.

3）Riggs JE, Schochet SS, Fakadej AV, et al : Mitochondrial encephalomyopathy with decreased succinate-cytochrome c reductase activity, Neurology (Cleveland) 34 : 48-53,

1984.

4) Sengers RC, Fischer JC, Trijbels JM, et al: A mitochondrial myopathy with a defective respiratory chain and carnitine deficiency. Eur J Pediat 140 : 332-337, 1983.

5) Goldfischer S, Moore CL, Jhonson AB, et al: Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome, Science 182 : 62-64, 1973.

41) Reducible cytochrome b 欠損を示した mitochondrial encephalomyopathyの一例

納　光弘*

研究協力者　中川正法*　今隈　満**　山野　隆*

筋線維にミトコンドリアの形態異常を示す疾患群は，一般に“mitochondrial myopathy”，“mitochondrial encephalomyopathy”，最近では，“mitochondrial cytopathy”と呼ばれている[1]．

これらの中には，その臨床的特徴によりすでに疾患単位としての概念が確立しているものもあるが，分類不可能な例も多い．

最近，これらmitochondrial myopathyに対して，ミトコンドリア電子伝達系の面からのアプローチが盛んになっており，異常を呈する症例の報告もなされている[1]．

今回，われわれは，いわゆるmitochondrial encephalomyopathyにreducible cytochrome b欠損を伴なった例をみいだしたので報告する．

症　例

患者：M.K.　15歳，男子（肝医ナ414748U）身長143cm，体重31.5kg.

家族歴：母親に軽度難聴があるが，他に同様の症状を呈する者はいない．

既往歴：12歳時に扁桃摘出．

現病歴：満期安産，処女処行1歳4ヵ月，2～3歳ころより，よく転ぶことがあり，走るのが特に遅かった．小中学校を通じて成績は極端に悪く，身体発育も遅れていた．

昭和60年9月15日，部落の運動会に出場し2～3回全力疾走をしている．翌日，起床時より頭痛を訴え，夕刻より嘔吐および全身けいれん発作を頻発し、発作重積状態となったため鹿児島県肝属郡医師会立病院へ緊急入院となる．

入院時現症：血圧158/90，脈拍90/分整 意識レベルは，III-200と低下していたが，瞳孔に左右差なく対光反射も迅速であった．項部硬直，チアノーゼを認めず，四肢運動麻痺も明らかではなかった．肺聴診にて，両側肺に湿性ラ音を聴取し，胸部X線像では両側肺紋理の増強および心胸郭比60%と心陰影の拡大を認めた．心音では，収縮期雑音があり心電図上左脚ブロックを認めた．血液ガス分析にて，pH7.11，pO_2 104.3，pCO_2 40.9，BE-16.2と著明な代謝性アシドーシスを示した．CT所見に異常なく，脳波上は，速波を基礎波とし時にデルター波の混入を認めた．

入院後経過：アシドーシスの補正により，意識はすみやかに回復し入院2日目には歩行可能となる．回復後所見として，知能低下（100－7＝？）があり，眼球運動に異常を認めないが，両側軽度眼瞼下垂，両側感音性難聴，全身性軽度筋力低下を示した．感覚障害なし．15歳であるが，まだ二次性徴は出現していない．脳波所見では，全誘導にてシーター波を基礎波とし，時に鋭波を含むデルター波の群発を認めた．心機能では，血圧110/60，脈拍60/分整，心胸郭比56%，心エコーにて肥大型心筋症と診断された．

検査所見：入院時，赤血球369万/mm³，白血球14900/mm³，Hb11.1g/dl，Ht32%と貧血傾向および白血球増加を認めたが，入院5日目には，それぞれ正常化した．GOT37，GPT26，LDH338，CK77，BUN12.6，クレアチニン1.0，血糖109mg/dlといずれもほぼ正常範囲であった．尿沈査，PSPテストにて異常を認めなかった．

16時間絶食後の安静時検査にて，血液中乳酸

*鹿児島大学第三内科
**鹿児島県肝属郡医師会立病院内科

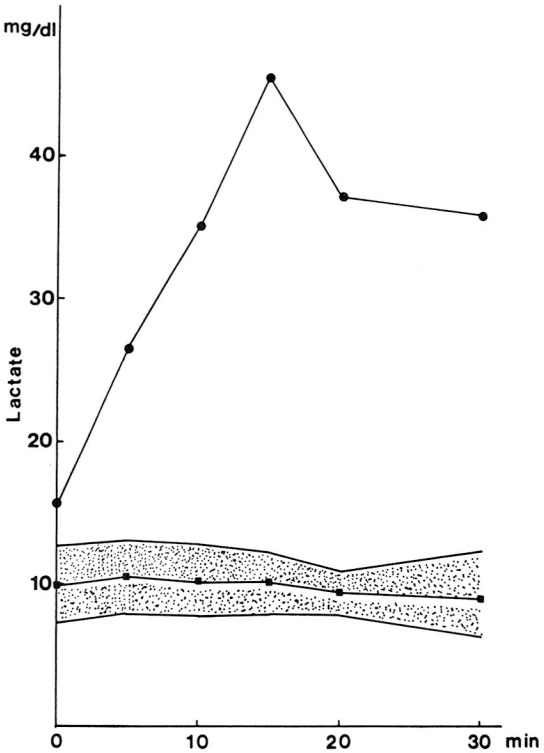


図1　自転車エルゴメーターによる運動負荷テスト（15分間運動負荷）

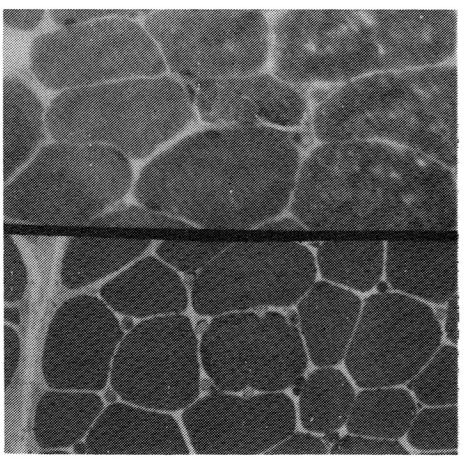


図2　生検筋の光顕所見
上図：凍結切片のGomori-trichrome染色　400×
下図：エポン包埋後切片のトルイジンブルー　染色　400×

20.6（正常範囲 9 -16）mg/dl，ピルビン酸0.98（0.36－0.95）mg/dl，髄液中乳酸49.1（8.3－17.5）mg/dl，ピルビン酸1.27（0.62－1.20）mg/dl といずれも高値を示した．

上記同様に絶食を行なった上で，自転車エルゴメーターによる15分間運動負荷テストを行なった．負荷開始後15分値で，血液中乳酸は，45.6（正常対照7.7－12.0）mg/dl と著明な上昇を認めた（図1）．

以上の臨床症状および検査所見より，mitochondrial encephalomyopathy を疑い，左上腕二頭筋にて筋生検を行なった．

筋病理所見：光顕では軽度の変性線維があり，Gomori-trichrome 染色およびトルイジンブルー染色にて出現頻度は1～2％と低かったが，ragged-red fiber" を認めた（図2）．

Type 2C fiber の萎縮と type 1 fiber における lipid 含量の増加を認めた．電顕では，paracrystalline inculusion body は認めなかったが，筋細胞膜下に巨大化したミトコンドリアが集積し，その中に膜様構造や dense body を認めた（図3）．

筋肉生化学：液体窒素凍結生検筋400mg より，Bookelman らの方法[2]にてミトコンドリアを分離し，電子伝達系酵素活性および cytochrome 含量の測定を行なった．還元一酸化差スペクトルは，Bookelman らの方法により，二波長分光光度計（島津製作所 UV-3000）を用いて記録した．各酵素活性は，一波長分光光度計を用いて恒温セル中における反応を記録することにより測定した．対照群には，臨床的組織化学的にミトコンドリアおよびその他の明らかな代謝異常を認めなかった生検筋を用いた．

Succinate と KCN 添加による還元一酸化差スペクトルにて，561nm および431nm における cytochrome　b の peak の出現がなく，（図4）antimycin A 添加による差スペクトルでも，cytochrome　b の peak を認めなかった．他の cytochrome 含量は，cc_1 は増加を示し，aa_3 は正常範囲であった．還元剤である sodium dithionate にて還元した場合の差スペクトルでは，正常対照の40％の cytochrome b が検出された（表1）．

図3　電顕所見　21000×

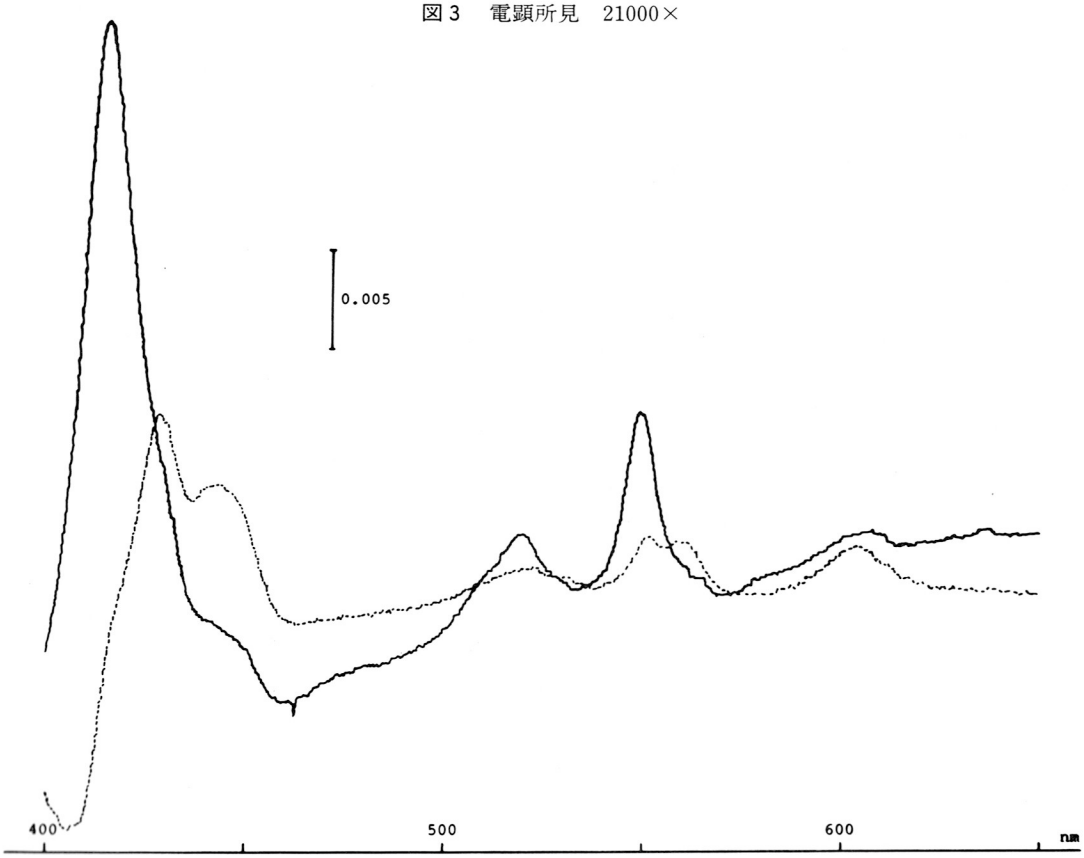


図4　Succinate と KCN の添加による還元一酸化差スペクトル
実線は患者ミトコンドリア，破線は正常対照ミトコンドリアによるスペクトルを示す．

しかし，上記のように，reducible cytochrome b含量が著明に低下しているにもかかわらず，cytochrome b-c_1 complex を介する NADH-cytochrome c reductase (rotenone sensitive), succinate-cytochrome c reductase 活性は，それぞれ，0.576 (正常対照0.201±0.098) μmol/mg/min，0.592 (0.321±0.118) μmol/mg/min といずれもやや高値を示した．

NADH-dehydrogenase, cytochrome c oxidase および citrate synthase 活性は，いずれも正常範囲であった（表2）．

以上より，本症例は，in vitro における測定上，電子伝達系酵素活性低下を示さない reducible cytochrome b 欠損症と考えられた．

表1　cytochrome 含量 (p mol/mg protein)

Reductant	a a_3	b	c c_1
Succinate and KCN	413 (550±167)	− (504±122)	2774 (615±258)
Sodium dithionate	563 (780±223)	346 (867±235)	3509 (812±281)

( ): control values of means±S.D. of 10 differnet experiments.

考　　察

ミトコンドリア電子伝達系の Complex III欠損症は，現在まで8例[1]の報告があるのみであり，reducible cytochrome b 欠損はその内6例に認められている．運動時易疲労性，筋力低下，高乳酸ピルビン酸血症が共通する症状としてみられ，眼

表2　電子伝達系酵素活性 (μ mol/mg protein/min)

ENZYME	PATIENT	CONTROL
NADH-dehydrogenase	3.80	2.11 + 1.58
NADH-cytochrome c reductase		
− rotenone	1.03	0.442 + 0.149
+ rotenone	0.454	0.301 + 0.123
Succinate-cytochrome c reductase	0.592	0.321 + 0.118
Cytochrome c oxidase	1.67	1.58 + 0.800
Citrate synthase	0.499	0.380 + 0.147

Control values are means±S.D. of 10 different experiments.

瞼下垂や眼球運動障害を示す例も報告されている．本症例のように中枢神経障害を示した例として，Spiro らは[3]，46歳と16歳の父子例を，Morgan-Hughes ら[4]は48歳の女性例を報告している．前者の父親は，33歳ごろより歩行障害を自覚し，その後，進行性小脳失調，近位筋優位の筋力低下，腱反射の消失，Babinski 反射の出現，痴呆化傾向が出現している．16歳の息子は，小児期より知能発達障害があり，父親とほぼ同様の症状が出現している．後者の48歳女性例は，教師であったが33歳時より，ミオクローヌス，小脳症状，筋力低下が出現し，48歳時に進行性難聴をきたし．同時期より知能低下，精神障害が出現している．本症例では，小脳症状やミオクロース等を呈しておらず，上記3例の報告例とは臨床症状において，やや異なる点を認める．

他3例は，明らかな中枢神経症状は呈していないが，乳酸アシドーシスと思われる症状があり，運動能低下，筋力低下が主症状である．また，発症年齢も小児期であり，報告時の年齢も17歳[5]，20歳[6]，38歳[7]と比較的本症例と類似している．Kennaway ら[5]の報告例では，complex IIIに対する抗血清を用いた検討にて core proteins, FeS protein および subunit IVの消失があるが，cytochrome c_1 は対照例と差を認めていない．このことは，おそらく，cytochrome b の合成障害ということのみではなく，complex IIIの集合体形成自体が障害されていることを示唆している．

本症例の生化学的特徴として，cytochrome b-c_1 complex を介する各電子伝達系酵素活性の低下が認められなかった点があげられるが，このことは *in vivo* において何らかの代償機構が働いている可能性を示唆していると思われる．しかし，ATP 産生能との関係やこれらの酵素活性の antimycin A に対する感受性については今回検討しておらず，さらに詳細な検討が必要と考える．今後，免疫学的検討および培養細胞を用いた検索を行ない病態の解明につとめたい．

文　献

1) DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., Nakagawa, M., DeVivo, D.C.: Mitochondrial myopathies. Ann. Neurol., 17 : 521, 1985.

2) Bookelman, H., Trijbels, J.M.F., Sengers, R.C.A., Janssen, A.J.M.: Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria isolated fresh and frozen stored muscle specimens. Biochem. Med., 19 : 366, 1978.

3) Spiro, A.J., Moore, C.L., Prineas, J.W., Strasberg, P.M., Rapin, I.: A cytochrome-related inherited disorder of the nervous system and muscle. Arch. Neurol., 23 : 103, 1970.

4) Morgan-Hughes, J.A., Hayes, D.J., Clark, J.B., Landon, D.N., Swash, M., Stark, R.J., Rudge, P. Mitochondrial encephalo-myopathies.-Biochemical studies in two cases revealing defects in the respiratory chain. Brain, 105 : 553, 1982.

5) Kennaway, N.G., Buist, N.R.M., Darley-Usmar, V.M., Papadimitriou, A., DiMauro, S., Kelley, R.I., Capaldi, R.A., Blank, N.K., D'AGostino, A. Lactic acidosis and mitochondrial myopathy associated with deficiency of several components of complex III of the respiratory chain. Pediatr. Res 18 : 991, 1984.

6) Hayes, D.J., Lecky, B.R.F., Landon, D.N., Morgan-Hughes, J.A., Clark, J.B. A new mitochondrial myopathy. - Biochemical studies revealing a deficiency in the cytochrome b-c_1 complex (complex III) of the respiratory chain. Brain, 107 : 1165, 1984.

7) Morgan-Hughes, J.A., Darveniza, P, Kahn, S.N., Landon, D.N., Sherratt, R.M., Land, J.M., Clark, J.B. A mitochondrial myopathy characterized by a deficiency in reducible cytochrome b. Brain, 100 : 617, 1977.

42) MELASの一症例の生化学的検討

宮武　正*

研究協力者　西澤正豊*　田中恵子*　篠沢一樹*
桑原武夫*　佐藤修三*　渥美哲至*

Mitochondrial encephalomyopathy[1]に属する一群の疾患の中で，kearns-Sayer症候群，myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers(以下MERRF)[2], mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes(以下MELAS)[3]は臨床的に独立した疾患単位とみなされるようになってきている．我々はMELASのcategoryに属すると考えられる一症例を経験し，剖検時に採取した心筋より単離したミトコンドリアを生化学的に解析した結果，電子伝達系におけるcomplex Ⅰのdefectを確認したので報告する．

症例報告

症例：16歳女子．

家族歴：母方の叔父に類似の症状がみられ，14歳にて死亡している．

現病歴：吸引分娩にて出産し，軽度の仮死がみられたが，その後の幼児期の精神運動発達には特に異常なかった．

6歳頃より疲れやすく，転倒しやすくなった．特に誘因なく，嘔気，嘔吐，頭痛，発熱を発作性にくり返すようになった．8歳より嘔吐に続き，全身性強直性けいれん発作，ついで，顔面にはじまり，四肢に進展するミオクローヌス発作が出現するようになった．

10歳当科入院時，身長130cm，体重19kgで多毛がみられた．神経学的には知能低下（IQ77）全身性の中等度の筋萎縮，筋力低下を認めた．眼底は正常で，眼球運動障害なく，小脳症状も認められなかった．深部腱反射はアキレス腱を除き消失し，感覚系は正常であった．検査所見ではCPKが軽度上昇し，安静臥床時でも血中乳酸44.3（正常9～16），ピルビン酸2.26mg/dl（正常0.36～0.59）と著明な高値が認められた．髄液は正常で，脳波では基礎波の徐波化と多発性の棘波がみられた．筋生検では約10%にragged-red fiberを認めた．CT上小脳の萎縮，両側淡蒼球の石灰化，側脳室の軽度拡大がみられた．

嘔吐，頭痛に続き意識障害が出現すると深部腱反射はしだいに亢進して足間代もみられBabinski反射も陽性となったが，意識状態の改善とともに数ヶ月で再び深部腱反射はしだいに低下しBabinski反射も消失した．神経性難聴が加わった．

13歳には嘔吐，腹部膨満が生じ，腹部X線所見などから上腸間膜動脈（SMA）の圧迫による十二指腸の通過障害，いわゆるSMA症候群と確認された．嘔吐，意識障害を生じた際のCTにて右後頭葉，側頭葉に限局性の低吸収域が確認されたが(図1)，意識状態の改善した2ヵ月後のCTでは上記の低吸収域は消失していた（図2）．

その後も知能低下は進行性で，CT上も大脳の萎縮が進み，日常生活動作も徐々に退行した．16歳時には肥大型心筋症が確認され，肺炎を契機としてベット上生活となり，全身衰弱，心不全にて死亡した．

以上6歳の発症で，発作性嘔吐，けいれん発作，進行性の痴呆，低身長，難聴，高乳酸血症が認められ，臨床的には明らかな脳卒中様の発作はみられないものの，CT上限局性の低吸収域が一過性に出現したのに対して，小脳失調，企図振戦，動

*新潟大学脳研究所神経内科

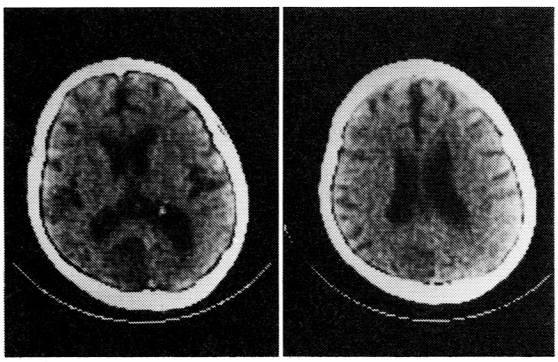


図1　頭部CT像

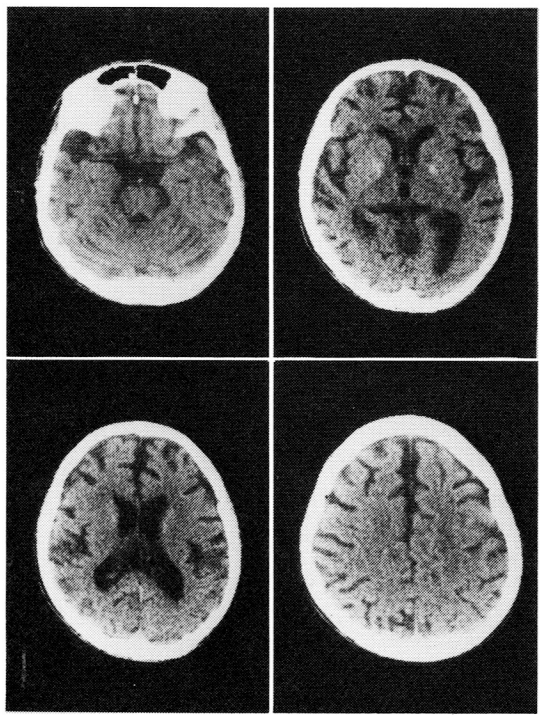


図2　図1の2ヶ月後の頭部CT像

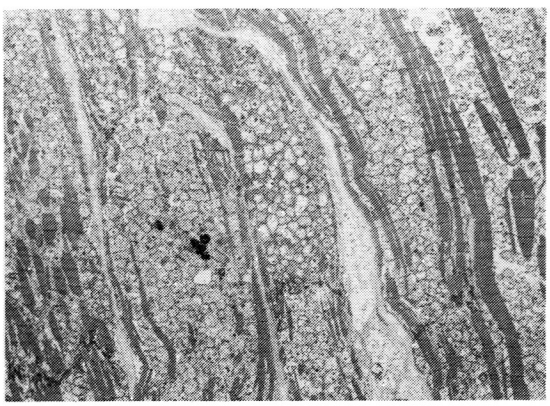


図3　心筋の電顕像（2750倍）

作性ミオクローヌスなどのいわゆるRamsay Hunt症候群の特徴を認めないことから，本症例はMELASに該当すると考えた．

剖検時に得た心筋ではミトコンドリアの著明な増加が認められた（図3）．

生化学的検討

死後2時間で得られた心筋よりBoolemanらの方法[4]に準じてミトコンドリアを単離し，以下の生化学的分析を行なった．

Clark型酸素電極を用いて酸素消費を検討すると，succinateの酸化はほぼ正常に認められたのに対して，NADHにlinkするpyruvate, glutamate, β-hydroxybutyrate(+malate)の酸化はほとんど認められなかった(表1)．これらの基質はそれぞれ異なるcarrierを通過してミトコンドリア内に入るので，その後の電子伝達系でこれらに共通する経路であるNADHからCoenzyme Qまでの部位，すなわちcomplex Iのdefectが推定された．

単離ミトコンドリアにて還元マイナス酸化差スペクトルを記録し，これよりcytochrome各成分を定量すると，本例の心筋ではaa_3 0.41, b 0.81, $c+c_1$ 0.52, 対照ではaa_3 0.39, b 0.59, $c+c_1$ 0.72で，対照に比して$c+c_1$が軽度減少していた．

更に酸素電極の結果を確認するため直接酵素活性を測定すると，malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, citrate synthaseは軽度上昇，cytochrome c oxidaseは軽度低下，succinate-cytochrome c reductaseは正常活性で，rotenone-sensitive NADH-cytochrome c reductaseは対照の23%に低下していた．NADH

表1　ミトコンドリアの呼吸能

RESPIRATORY ACTIVITIES OF ISOLATED HEART MITOCHONDRIA

Substrates	Control State 3 rate	RCR	Patient State 3 rate	RCR
10 mM succinate + Rotenone	102	1.7	74	4.6
5 mM pyruvate + 10 mM malate	71	2.7	6	-
10 mM glutamate + 10 mM malate	100	3.5	9	-
10 mM β-hydroxybutyrate + 10 mM malate	36	4.1	0	-

State 3 rate in nano atoms oxygen/min/mg. mitochondrial protein
RCR: respiratory control ratio

表2　ミトコンドリアの酵素活性

ENZYME ACTIVITIES IN ISOLATED HEART MITOCHONDRIA

	Controls (no.)	Patient
NADH-ferricyanide reductase	3350 ±735 (4)	1920
NADH-menadione reductase	106 ± 69 (4)	48
NADH-cytochrome c reductase		
-rotenone	131 ± 7 (4)	178
rotenone-sensitive	26 ± 5 (4)	6
Succinate-cytochrome c reductase	151 ± 24 (4)	142
Cytochrome c oxidase	501 ± 72 (4)	340
Citrate synthase	559 ± 80 (4)	856
Malate dehydrogenase	870 ± 99 (3)	1280
Glutamate dehydrogenase	100 ± 21 (3)	112

Activities expressed as nanomol substrate used per min per mg mitochondrial protein
Control values ±SD; No. of controls in parentheses

dehydrogenase は ferricyanide, menadione を基質として測定したが，それぞれ対照の約1/2に減少していた（表２）．以上の結果は酸素電極を用いての結果を裏付け，電子伝達系における complex Ⅰの defect が確認された．

考　　案

MERRF の典型例は，福原らの第一例[2] が変性型ミオクローヌスてんかんとされた一群から分離されたことから明らかなように，小脳失調，企図振戦，動作性ミオクローヌスを中核症状としており，これに Friedreich 病様の足変形を伴っている．血中乳酸の上昇も軽度である．従って本症例はこれらの特徴を欠くことから，DiMauro らの分類[1] に従って MELAS に属するものと考えた．

DiMauro らは interictal にミオクローヌスが認められるか否かで MERRF と MELAS を峻別しているが，文献上の記載は action myoclonus であるのか，痙攣の一発作型としての myoclonic seizure であるのか必ずしも明らかでないものがあり，更に脳波や誘発電位との関連性も十分検索されておらず，ミオクローヌスの解釈の相違が MELAS と MERRF の鑑別を困難とする一因となっていると思われる．

最近，地方会などで，臨床的には MERRF と考えられる症例において CT 上一過性の低吸収域が認められたとの報告が数例あり，福原も指摘するように，CT 上の低吸収域の出現の有無は必ずしも DiMauro ら[1] が MELAS と MERRF の鑑別点としたほど絶対的なものではなく，両者の中間の性質をもつ臨床型も存在する．今後はできる限り生化学的に明らかにされた異常部位に従った分類によるべきであろう．

本例で認められた CT 上の低吸収域の成因については未だ推論の域を出ない．従来の剖検例の多くは血管の病変を伴わず，血管分布に一致しない多発性の infarction を認めており，脳局所の代謝障害が想定されている．一方筋内毛細血管に異常が認められることから中枢神経系でも毛細血管における同様な異常が推定されている[5]．本例も今後中枢神経病変を詳細に検索することにより infarction の成因を明らかにしたい．

MELAS における生化学的異常については Monnens らが pyruvate dehydrogenase, cytochrome c oxidase の部分欠損，Pavlakis らが cytochrome c oxidase, succinate-cytochrome c reductase の部分欠損例を報告しているが，いずれも primary の defect とはいい難く，生化学的異常の本態はいまだに明らかにされていない．

今回の我々の結果は MELAS の病型の中に complex Ⅰの defect によるものが存在することを明らかにした．

一方 complex Ⅰの defect を認めた例は文献上５例報告されている．Morgan-Hughes らの26歳女子例（1979），Land らの20歳男子例（1981），Arts らの13歳女子例（1983）はいずれも exercise intolerance と weakness が記載され，筋症状のみで，中枢神経症状は認められていない．最後の例は riboflavin の大量投与に反応している．

Encephalopathy を呈した症例は２例ある．このうち Prick らの３歳男子例（1981）は Alpers 病を思わせる急速に進行する infantile poliodystrophy であり，他の１例は Morgan-Hughes らの46歳男子例（1982）で，dementia，視神経萎縮，眼球運動障害，Babinski 反射，dystonic rigidity が記載されており，いずれも MELAS の臨床像とは明らかに異なっており，従来の complex Ⅰの defect の報告の中には MELAS に属するものはみられない．

同一の酵素異常がいくつかの相異なる臨床病型をとりうるのは cytochrome c oxidase 欠損の場合と同様であるが，その理由は明らかでなく，今後 complex Ⅰの臓器特異性を含めてより詳細な解析が必要である．

ま と め

MELAS と考えられる一症例にて，心筋より単離したミトコンドリアの生化学的解析から電子伝達系における complex Ⅰの defect を確認した．

文　　献

1）DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., et al.:

Mitochondrial myopathies. Ann. Neurol. 17 : 521-538, 1985.

2) Fukuhara, N., Tokiguchi, S., Shirakawa, S., et al.: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities) : disease entity or syndrome? Light and electronmicroscopic studies of two cases and review of the literature. J. Neurol. Sci. 47 : 117-133, 1980.

3) Pavlakis, S.G., Phillips, P.C., DiMauro, S., et al.: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes (MELAS) : a distinctive clinical syndrome. Ann. Neurol. 16 : 481-488, 1984.

4) Bookleman, H., Trijbels, J.M.F., Sengers, R.C.A., et al.: Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria, isolated from fresh and frozen stored muscle specimens. Biochem. Med. 19 : 366-373, 1978.

5) Kobayashi, Y., Miyabayashi, S., Takada, G., et al.: Ultrastructural study of the childhood mitochondrial myopathy syndrome associated with lactic acidosis. Eur. J. Pediatr. 139 : 25-30, 1982.

43) アフィニティークロマトグラフィーによる人心筋，骨格筋よりのチトクロームCオキシダーゼの精製とサブユニットの比較

川　井　尚　臣*

研究協力者　竹　田　勝　則*　増　田　健二郎*
Zeviani, M.**　DiMauro, S.**

はじめに

ミトコンドリア酵素 cytochrome c oxidase (COX) 欠損症は，骨格筋のみの症状を示すもの，或いは，骨格筋と心筋，そして神経系の症状を伴わせて示すものなどがあり[1]，臨床的には heterogeneity を示すことが知られている．しかし，その理由については現在明らかにされていない．私達は，本酵素が組織，或いは臓器によって，性状を異にしているためではないかと考えており，このことを明らかにするため，今回は，人の心筋および骨格筋から COX を精製する方法を創案し，その方法を用いて精製した COX を SDS-PAGE にかけ，COX の各 subunits の易動度を比較検討した．

試料と方法

試料としては剖検時に採取した人の心筋と骨格筋を用いた．対照として，牛の心筋を用いた．はじめに，試料の筋組織を液体窒素にて－70℃に凍結保存しておき，これらの筋（30～100g）より Bockelman の方法[2]によってミトコンドリアを抽出分離し，蛋白量を20mg/ml に調整，0.3mg/mg of protein の deoxycholate にて処理，105,000×g, 15min. にて遠沈し，この沈渣を再度 20mg/mg of protein に調整，これを0.6mg/mg of protein の deoxycholate で処理，再び，105,000×g, 15min. にて遠沈し，上清に同量の2％ Na-cholate を加えて希釈し，これに飽和硫安を加え，20.8％飽和硫安に調整，攪拌した後，同様に遠沈，上清を38％飽和硫安に調整，再び遠沈し粗 COX の沈渣を得た．次いで少量の0.2M Tris-acetate, 0.75％ K-deoxycholate, 0.5％ K-cholate, 1.5M KCl, pH8.0を加え溶解し，Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography (1.5×2.0cm) にかけた．

このようにして得られた COX 分画には，SDS-PAGE で，なお少量の挾雑蛋白が認められるので，これをさらに affinity column chromatography にかけ，最終的に COX を精製した．得られた COX の純度の検定は，差スペクトルおよび SDS-PAGE[3] でおこなった．

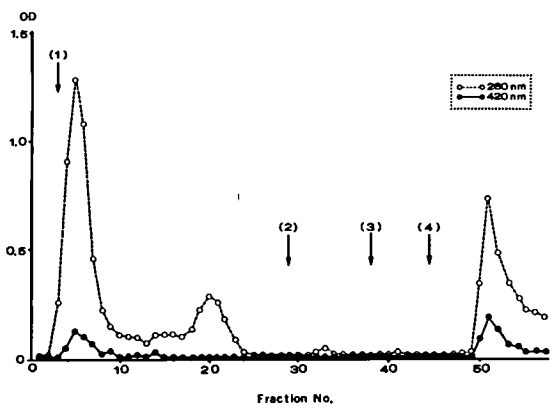


図1　Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatograpy of partially purified cytochrome c oxidase from human skeletal muscle

＊徳島大学医学部第一内科
＊＊米コロンビア大学

結　　果

COX の精製について：図1に Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography の溶出パターンを示した．方法の項で述べたようにして得られた硫安分画の粗 COX 沈渣を前述の溶液で溶解し，カラムに加え，矢印(1)で前記の溶解に用いた緩衝液にて洗浄を開始し，280nm の OD がなくなったところで，(2)，(3)と漸次イオン強度の低い緩衝液で洗浄し，(4)で COX の溶出を行なった．溶出液としては50mM $NaHCO_3$，3％ lauryl-maltoside (Calbiochem) を用いた．カラムは1.5×3.0cm，溶出速度は1ml/3min.とした．

得られた COX 分画は SDS-PAGE で，なお，少量の挾雑蛋白を含んでいたので，この分画を10 mM Tris-cacodilate 緩衝液 pH7.5にて10倍に希釈し，イオン強度を下げ，cytochrome-c-CH Sepharose 4B を用いる affinity column chromatography にかけ，さらに精製した．

図2にその溶出パターンを示す．上段が人心筋，下段は人骨格筋の溶出パターンである．カラムの大きさは，それぞれ1.5×4.0cm，1.0×2.5cm，溶出速度はそれぞれ15ml/h.，8ml/h.である．なお，このアフィニティー・カラムはあらかじめ，5％アスコルビン酸で処理し，cytochrome c を還元して用いた．このカラムに，はじめ COX 試料をかけ，次いで，図の矢印(1)で10mM Tris-cacodilate 緩衝液 pH7.5で洗浄を開始，280nm の OD がなくなった後に，0-200mM の NaCl の gradient をかけ，最終的に COX を溶出した．得られた COX は差スペクトル (reduced-oxidized) で，COX に特徴的とされている605nm と445nm にピークを示した（図3）．この方法による COX の収量は，人心筋100g から，5～6mg，人骨格筋から，ほぼ0.6mg であった．

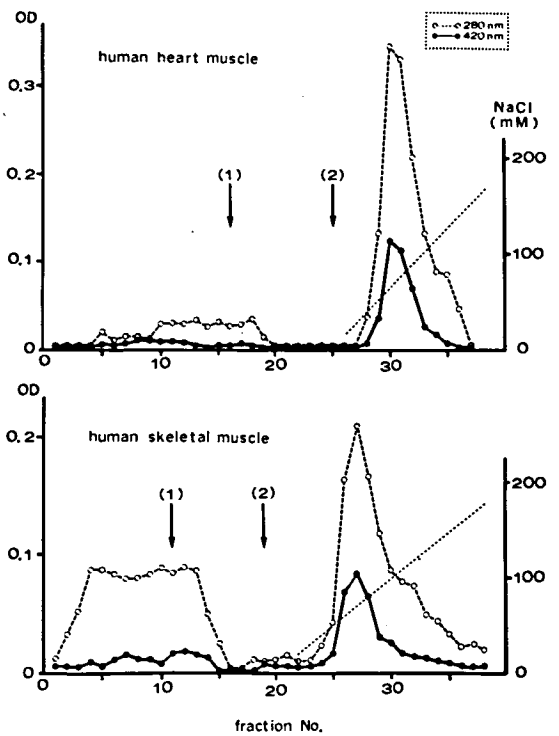


図2　Affinity column chromatography of human cytochrome c oxidase by cytochrome c-CH-Sepharose 4B

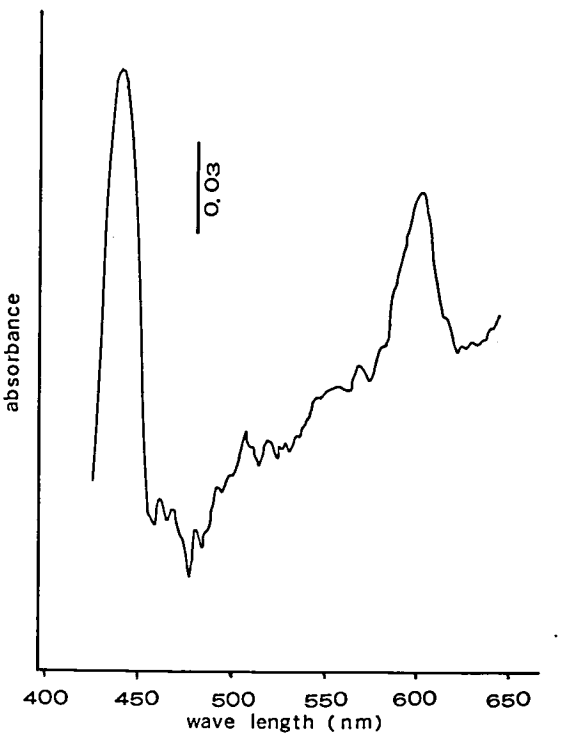


図3　Different spectra of cytochrome c oxidase from human heart muscle (reduced-oxidized)

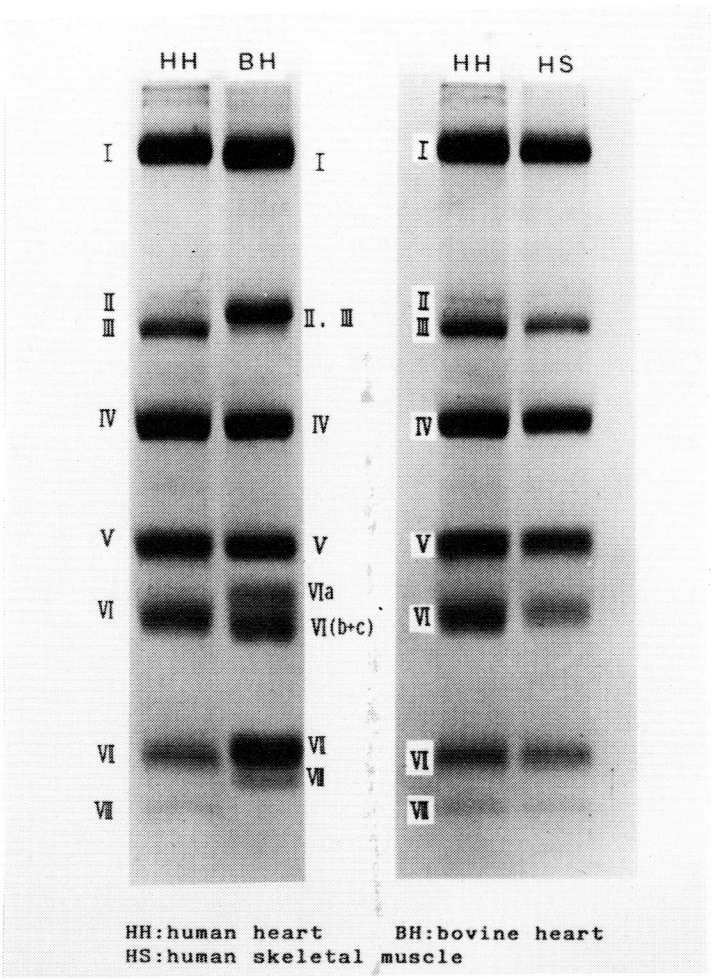


図4　SDS-PAGE of purified cytochrome c oxidase

SDS-PAGE：図4に精製COXのSDS-PAGEのパターンを示した．

図左側より人心筋COX（HH），牛心筋COX（BH），人骨格筋COX（HS）を泳動してあるが，いずれのCOX試料にもsubunits以外のバンドは殆ど認めなかった．すなわち，我々の方法によって極めて高純度のCOXが精製された．

それぞれのCOXは，8～9個のsubunitのバンドに分離した．各subunitsの易動度の比較についてはHHと種族の異なるBHでは，I-IIIのmitochondrial encoded subunitの全てが異なっており，nucleic encoded subunitでは，VI，VII，VIIIの易動度が異なっていた．これに対して，HHとHSではI～VIIIまで，各subunitの易動度はすべて同じであった．

考　　察

我々はCOX欠損症の臨床的heterogeneityに関連して，人におけるCOXの組織（臓器）特異性（tissue specificity）の有無を明らかにしたいと考えているが，本文では，我々の創案したCOXの精製法と人の心筋と骨格筋COXのSDS-PAGEの泳動パターンが同一であった．

従来，人の骨格筋からCOXを精製することは，

極めて困難であったし，人の各組織のCOXをSDS-PAGEで比較検討した報告は見られなかった．

今回，我々の創案したCOXの精製法は，従来のヘパリン法でミトコンドリアの抽出・分離を行い，硫安分画にて得た粗COXを，まず，Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatographyにて精製し，これをさらにaffinity chromatographyによって精製する方法である．

Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatographyについては，我々は始めBisson[4]やOzawaら[5]に準じて粗COXをPhenyl-Sepharose CL-4Bに吸着させ，洗浄後，1％のTriton X-100を含む緩衝液で溶出し，これを10倍に希釈して，cytochrome c affinity columnにかける方法を用いた．しかし，この条件では，人の心筋，骨格筋のCOXは，吸着しなかった．そこで，溶出液を3％lauryl maltosideに置き換えCOXを溶出し，これを希釈して，affinity columnにかけるように工夫し，人のCOXを吸着させることに成功した．

Affinity chromatographyにはcytochrome cの吸着体としてactivated CH-Sepharose 4Bを用いていたが，このSepharoseのligand吸着基は$(CH_2)_5$であり，従来affinity columnに用いられてきたCNBr-activated Sepharoseやactivated thiol-Sepharose 4Bに比べarmが長く，吸着されたligandは可動性が大きいので，酵素とより効果的に反応することができる利点があるとされている[4]．

我々の方法を用いて精製したCOXは，差スペクトルでは605nmと445nmのみにpeakを示し，さらに，SDS-PAGEではCOXのsubunits以外には，明らかなバンドを認めない，などのことから極めて高純度なCOXであると言うことができる．

また，収量は，人心筋からは，100gm当たり約5～6mgとよかったが，同量の骨格筋からは0.6mgと心筋の約1/10であった．これは，人の骨格筋はmitochondria含有量が少ないため，得られるmitochondriaの収量が少ないことや，mitochondria外膜のDOCに対する溶解性が心筋のものより高く，外膜溶解時に内膜も一部溶解され，かなりのCOXが失われてしまうこと等に起因するものと考えられる．

Subunitsの易動度の比較に関しては，人心筋のCOXと牛のものでは，いくつかのsubunitsは易動度を異にしているが，あるものは同じ易動度を示した．SDS-PAGEは主として分子量の違いによって試料蛋白を分離するので，subunit I，II，III，VI a, b, c，VII，VIIIなどは，人と牛とでは，それらの分子の大きさが異なっていることになるが，同時にアミノ酸構成に違いがある事が推定される．

興味あることは，人と牛ではmitochondria encoded subunits（I～III）とnucleic encoded subunits（IV～VIII）の双方に違いがみられることである．これに対して，人の心筋と骨格筋の各subunitの易動度はすべて同じであった．しかし，このことは両COXのsubunit間の蛋白構造が必ずしも同一であることを意味しているわけではなく，更に検討を要する．いずれにせよ，SDS-PAGEのみでは人のCOXの組織特異性を証明することはできなかった．

文献的には，最近，Kadenbachら[6]は動物（豚）の各種臓器のCOXのSDS-PAGEとimmunological な検索で，本酵素に臓器特異性のあることを示している．人においても同様のことが考えられるので，現在，人COXの各subunit間のimmunological な差異の有無について研究をすすめている．

ま と め

1．Affinity column chromatogaphyを用いて，人の心筋，骨格筋より高純度のCOXを精製する方法を確立した．2．人の心筋と骨格筋のCOXのSDS-PAGEによる，各subunitの易動度はすべて同じであったが，この成績はCOXの組織特異性を否定することにはならないので，更に検討をすすめている．

文 献

1）DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M.,

Nakagawa, M. and Devino, D.C.: Mitochondrial myopathies. Ann Neurol 17 : 521-538, 1985.

2) Bockelman, H., Triejebls, J.M.F., Sengers, R.C.A. and Jassen, A.J.M.: Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria, isolated from fresh and frozen stored muscle specimens. Biochem Med 19 : 366-373, 1978.

3) Kadenbach, B., Jarausch, J., Hartmann, R. and Merle, P.: Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. Anal Biochem 129 : 517-521, 1983.

4) Bisson, R.: Purificazione e caratterizzazione di citocromo c ossidasi da dictyostellium discoideum e altre fonti. pp 1-97, 1984.

5) Ozawa, T., Okumura, M. and Yagi, K.: Purification of cytochrome c oxidase by using Sepharose-boud cytochrome c. Biochem Biophys Res Comm 65 : 1102-1107, 1975.

6) Kuhn-Nentwig, L. and Kadenbach, B.: Isolation and properties of cytochrome c oxidase from rat liver and quantification of immunological differences between isozymes from various rat tissues with subunits specific antisera. Eur J Biochem 149 : 147-158, 1985.

44) ミトコンドリア ミオパチー 生検筋および皮膚線維芽細胞の電子伝達系酵素活性

佐藤　猛*

研究協力者　安野 みどり*　山内 恵子*
北　潔**　古島 理江子**

ミトコンドリア異常症の診断には，組織化学，電子顕微鏡による形態変化とともに電子伝達系の酵素活性測定や，電子伝達系の酵素に対する抗体を用いた免疫組織化学も行われつつある．

我々は骨格筋の組織化学，電子顕微鏡での検索とともに，骨格筋と fibroblast のミトコンドリアの酵素活性測定，cytochrome c oxidase に対する抗体を用いた免疫組織化学をとりいれミトコンドリア異常症の診断をおこなってきたので報告する．

方　法

症例：MELAS 4 例[1], Kearns-Sayre 症候群 3 例[2], Mitochondrial myopathy 3 例，Alcoholic myopathy 3 例で検索をおこなった．対照群にはミトコンドリアの形態異常を認めない症例を用いた．

組織化学：HE, Gomori trichrome 変法，NADH, routine ATPase (pH9.4), Sudan Black, cytochrome oxidase 染色を行った．

電子顕微鏡：生検筋の一部は，グルタール固定し電子顕微鏡で検索した．

免疫組織化学：凍結切片に抗 cytochrome c oxidase 抗体を用いてアビジン・ビオチン法で行った．

酵素活性測定：生検筋よりミトコンドリアを分画し，cytochrome c oxidase, succinate cytochrome c reductase, complex II, NADH cytochrome c reductase, citrate synthase の活性を測定した．Fibroblast からもミトコンドリアを分画し cytochrome c oxidase, succinate cytochrome c reductase, complex II の活性を測定した．

抗 cytochrome c oxidase 抗体の作製：牛心筋よりミトコンドリアを分画し Fowler の方法[3] で cytochrome c oxidase を粗精製し，Sephalose CL 4B カラムで精製した．精製 cytochrome c oxidase は SDS 電気泳動で 7 つの subunit からなることを確認し，全 subunit を家兎に 4 回接種し抗体を作成した．抗体価の上昇は，ELISA 法にて検討した．得られた抗体は，免疫に用いた抗原との immunoblotting から subunit IV, V に強い交叉性を有していることが明らかとなった．

結　果

組織化学：MELAS, Kearns-Sayre 症候群，Mitochondrial myopathy の Gomori trichrome 染色では，典型的な ragged red fiber を認めた．Cytochrome oxidase 染色ではモザイク状に分布する無染線維が 7 ～40%の筋線維にみられた．Alcoholic myopathy の症例では，lipid が著明に増加しており，cytochrome oxidase 染色では約 80%の筋線維が無染線維として認められた．Gomori trichrome 染色では ragged red fiber はみられず，淡染や空胞状変化がみられた．

電子顕微鏡：MELAS, Kearns-sayre 症候群，Mitochondrial myopathy の症例では結晶状封入体を有するものや，腫大したミトコンドリアが多数認められた．Alcoholic myopathy では lipid や glycogen の増加とともに，クリステが不明瞭でマ

＊順天堂大学脳神経内科
＊＊順天堂大学寄生虫学

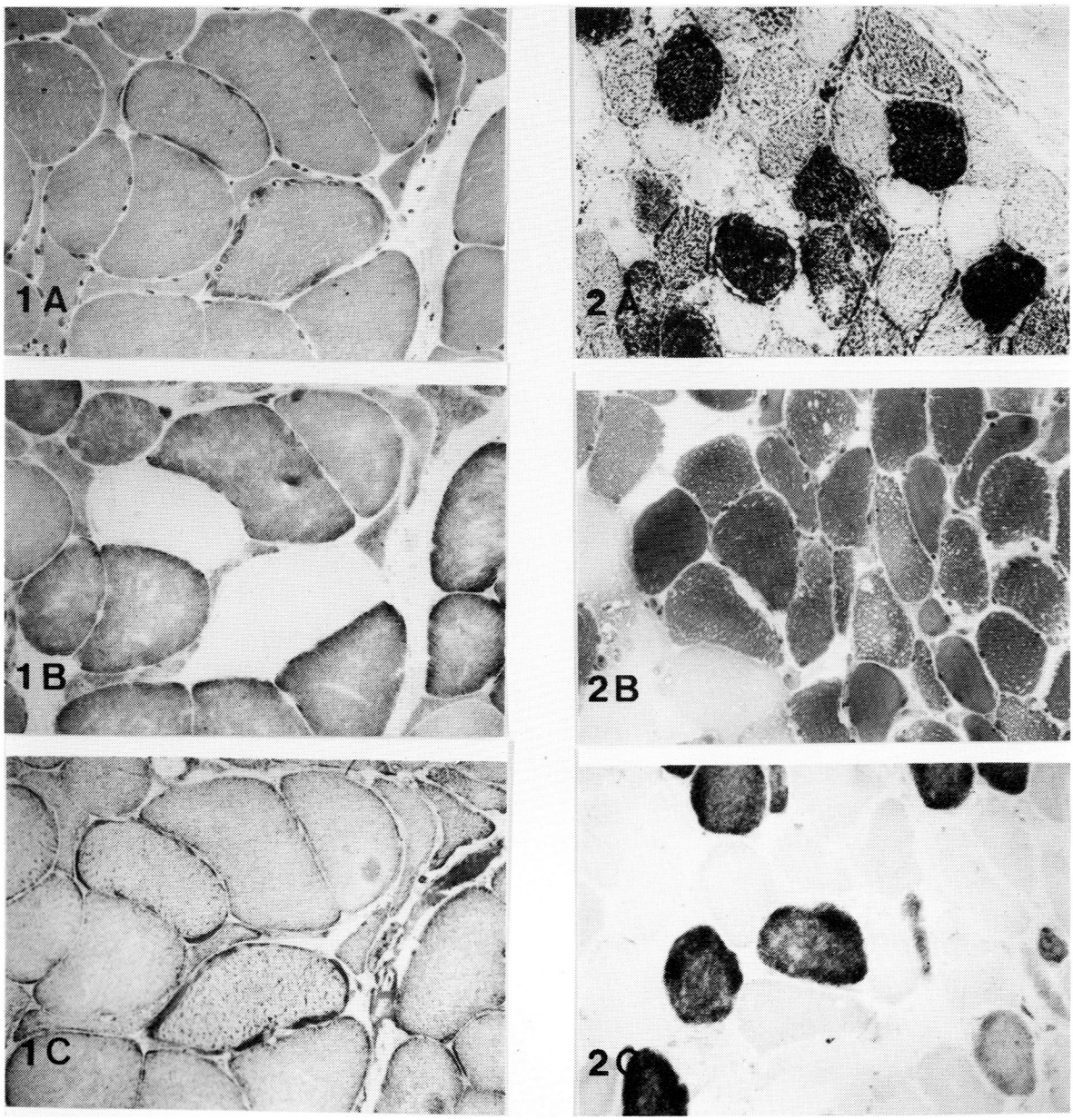


図1　組織化学所見

1　MELASの1症例

A）Gomoritrichrome染色変法

B）Cytochrome oxidase染色

C）抗Cytochrome c oxidase抗体を用いた免疫組織化学

2　Alcoholic myopathyの1症例

A）Sudan Black染色

B）Gomoritrichrome染色変法

C）Cytochrome oxidase染色

トリクスに多数の小顆粒を有したミトコンドリアが増加していた.

免疫組織化学：MELAS, Kearns-Sayre 症候群, Mitochondrial myopathy では cytochrome oxidase 染色で無染であった筋線維は抗 cytochrome c oxidase 抗体で陽性を呈した. Alcoholic myopathy では抗体染色は筋線維により染色性が異なり染色性の著明な低下したものや, 部分的に染色されない筋線維もみられた.

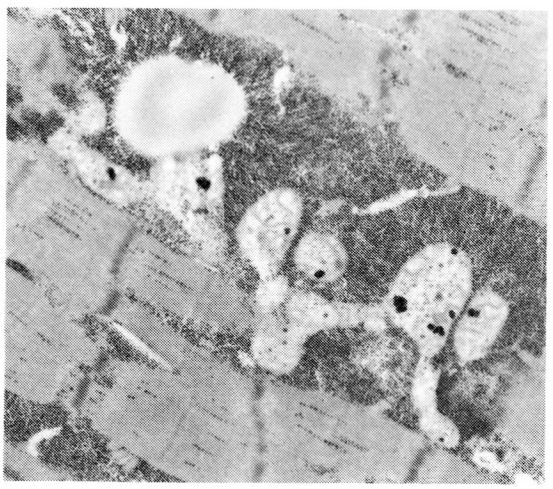


図2　Alcoholic myopathy の生検筋・電子顕微鏡所見

酵素活性測定：骨格筋ミトコンドリアでは, 対照群に比べて MELAS の 1 例, Alcoholic myopathy の 1 例で cytochrome c oxidase 活性が各々約42%, 37%に低下していた. MELAS の 2 例, Alcoholic myopathy の 1 例で succinate cytochrome c reductase が低下していた. Complex II は, MELAS の 2 例, Mitochondrial myopathy の 1 例で軽度低下していた.

皮膚線維芽細胞ミトコンドリアでは, MELAS の 1 例, Kearns-Sayre 症候群の 1 例で cytochrome c oxidase 活性が各々約10%, 20%に低下していた.

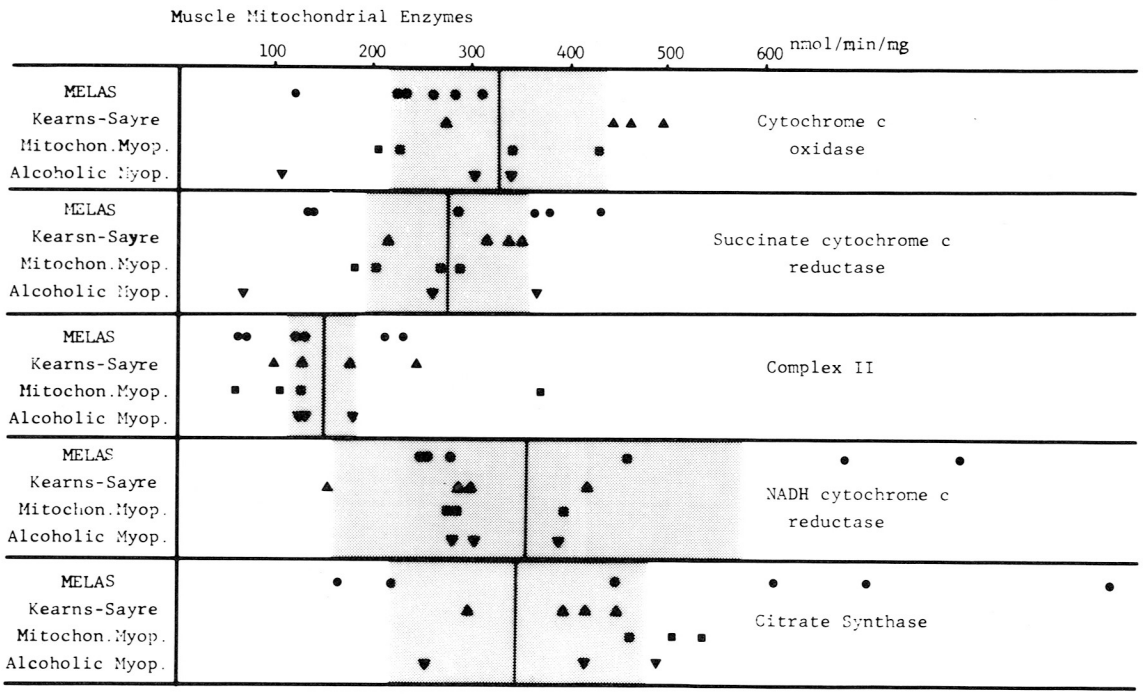


図3　生検筋ミトコンドリアの酵素活性

考　　察

MELAS 4 例，Kearns-Sayre 症候群 3 例 Mitochondrial myopathy 3 例，Alcoholic myopathy 3 例の組織化学，電子顕微鏡，免疫組織化学による検索と，骨格筋ならびに皮膚線維芽細胞のミトコンドリア電子伝達系酵素活性を測定した．

ミトコンドリア異常症の診断で，Gomori trichrome 染色における ragged-red fiber は重要所見である．さらに近年 cytochrome c oxidase 欠損症の報告が増加するにつれて cytochrome oxidase 染色も行われるようになってきた．

Cytochrome oxidase 染色は，DAB が cytochrome c を還元し，これを cytochrome c oxidase が酸化する過程を反映していると考えられている[4]．ミトコンドリア異常症では高率に無染線維が出現し，モザイク状，partial deficiency, focal deficiency とよばれている．ほぼ正常構造を保っている筋線維でも cytochrome oxidase 染色で陰性を呈することがあり，ミトコンドリアの形態変化出現前における活性低下を反映すると考えられている．

Cytochrome oxidase 染色陰性の筋線維は，横断面全体が陰性であり，検索し得た症例では縦断面も陰性を呈していた．筋ジストロフィーや多発性筋炎では，moth eaton 様，葉状変化などを呈するが，我々の検索した症例の中では，MELAS の 1 例で小数の筋線維の中央が陰性で，central core 様の変化がみられたにすぎない．

ミトコンドリアの酵素活性の変化が，1 本の筋線維で同程度に進行するということは，考えにくい．染色に用いる DAB のミトコンドリア内膜への到達や，発色を阻止するような環境の変化が考えられる．

ミトコンドリア異常症の診断に，電子伝達系酵素の抗体を用いた免疫学的手段をとりいれた報告が近年みられている．

Darley-Usmar らは，complex III に対する抗体

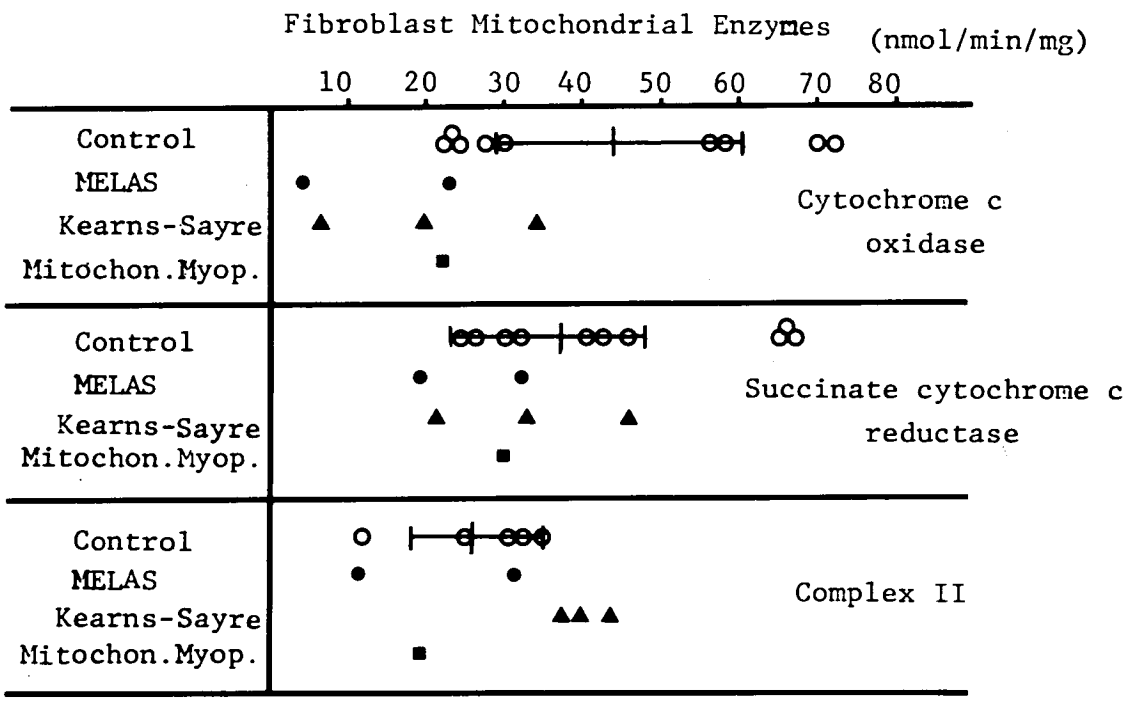


図 4　皮膚線維芽細胞ミトコンドリアの酵素活性

を用い，core protein，nFeS protein，subunit IV の減少していることを明らかにした．

田中らは，cytochrome c oxidase に対する抗体を用い fatal infantile mitochondrial myopathy の症例で subunit V，VIIの欠損を明らかにした．

DiMauro[5] は，infantile mitochondrial myopathy の症例に cytochrome c oxidase の抗体を用い，benign form には酵素蛋白が存在し，fatal form には欠損していることを明らかにした．

我々は抗 cytochrome c oxidase 抗体を用いて免疫組織化学的に検索を行ったが，今回用いたミトコンドリア異常症では，酵素蛋白の欠損または減少は見出せなかった．しかし Alcoholic myopathy では同酵素蛋白の部分的欠損を示す所見が得られた．

Subunit の障害を検討するためには，immunoblotting 法や，各 subunit に対するモノクローナル抗体を用いる方法などが必要となる．

各種抗体やモノクローナル抗体を用いて酵素蛋白の subunit の障害を検討することは，将来，核由来，またはミトコンドリア由来の DNA，すなわち遺伝子レベルで本症の病因を解明する糸口になる．

生検筋，皮膚線維芽細胞，肝臓，腎臓，心臓などの組織にミトコンドリアの各種抗体を用い，免疫組織化学法で簡便に酵素蛋白の有無を検討することが可能となれば，臨床診断に役立つと考える．

Alcoholic myopathy では，ミトコンドリアの oxidation や，ATPase の障害の報告や，ミトコンドリアの腫大，変形の報告も知られている．今回の症例では，lipid の大量の蓄積がありミトコンドリアの変化は二次的なものと考えられる．しかし cytochrome oxidase 染色で約80%の無染線維が存在し，cytochrome c oxidase と succinate cytochrome c reductase の活性が低下していたことは興味深い．また，ミトコンドリアのクリステが減少しており，特異な形態異常がみられたことは，ミトコンドリア異常症の病因を解明する際参考になる変化と考えられた．

文　献

1）荒木弘毅，安野みどり，佐藤猛，ほか：高乳酸，高ピルビン酸血症を伴った mitochondrial encephalo-myopathy の一例（第94回日本神経学会関東地方会）

2）関公一，金沢章，吉野英夫，ほか：高乳酸血症，難聴，腎機能障害を伴った mitochondrial neuromyopathy の兄妹例．臨床神経学，25：231，1985.

3）Fowler, L.R., Richardson, S.H. & Hatefi, Y.: A rapid method for the preparation of highly purified cytochrome oxidase. Biochem. Biophys. Acta, 64：170, 1962.

4）Seligman, A.M., Karnovsky, M.J. & Wasserkrung, H.L.: Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diab inobenzidine (DAB). J. Cell. Biol. 38：1, 1968.

5）DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., et. al: Mitochondrial myopathy. Ann Neurol. 17：521, 1985.

45) ミトコンドリア ミオパチー：電子伝達系酵素の抗体を用いた免疫組織学的研究

佐藤　猛*

研究協力者　安野 みどり*　荒畑 喜一*　中村 眞二**
向山 昌邦***　福森 義宏****　小澤 高将*****

近年，ミトコンドリアの電子伝達系（呼吸鎖）についての基礎研究の進展に伴い，微量の生検筋から酵素活性の測定が可能となった．これによって多くの酵素欠損例が見出されている．われわれは生化学測定だけでなく，電子伝達系酵素の抗体を作成し，免疫組織化学的にミトコンドリア内膜における局在を証明する方法を確立し[1]，1例の剖検例において骨格筋内のcytochrome c oxidase酵素蛋白欠損例を見出したので報告する．

方　法

剖検例はLeigh症候群（都立清瀬小児病院）[2]，ミトコンドリア脳筋症（国立武蔵療養所神経センター）[3]，および脊髄小脳変性症（OPCA）の各1例を検索した．

Leigh症候群の1例は12歳女児で，発症は3歳，視神経萎縮，脳神経麻痺，小脳症状，深部腱反射亢進などを呈した．培養皮膚線維芽細胞でpyruvate dehydrogenase complex活性が著明に低下していた．剖検では小脳，脳幹被蓋，脊髄灰白質，大脳後頭葉に散在性壊死巣を認めた[2]．

ミトコンドリア脳筋症の1例は21歳男性で，14歳時ミオクローヌスで発症している．剖検では大脳，視床，小脳に層状ないし散在性軟化巣が認められている．なお生検筋ではragged-red fiberがみられている[3]．

抗体：cytochrome c oxidaseの抗体は東京工大理学部生化学・福森義宏博士から分与されたもの，およびわれわれが作製した抗体を用いた．牛心筋ミトコンドリアからcytochrome c oxidaseを精製，家兎に免疫して作製した．

complex IIIに対する抗体は名古屋大学医学部第二生化学・小沢高将教授から分与された．

免疫組織化学：1）パラフィン切片は0.1% Triton X-100，ないし0.5%サポニンで5分間処理，2）0.3% H_2O_2 メタノール液にて，30分間反応させ内因性ペルオキシダーゼをブロック，3）1%ヒトAB型血清，1%山羊血清，2% BSAにて非特異反応をブロック，4）一次抗体（抗cytochrome c oxidase抗体，あるいは抗complex III抗体）1000倍稀釈液にて2時間反応，5）ビオチン化抗兎IgG血清（200倍）にて40分，6）アビジン・ビオチン複合体にて40分，7）0.05% DABと0.01% H_2O_2 にて10分，8）ヘマトキシリンにて核染，9）脱水，封入した．

結　果

心筋，骨格筋，肝，腎，中枢神経系（小脳と脳幹，大脳）について検索した．いずれの組織でもミトコンドリアの豊富な細胞に一致して強い陽性反応がみられた．

心筋では心筋細胞や血管壁の平滑筋に顆粒状に強い陽性反応がみられ，対照血清ではまったく反応しなかった（図1）．骨格筋では新鮮生検筋の凍結切片とパラフィン切片との反応は類似していた．筋鞘下あるいは筋原線維のA-I junction部に顆粒状のミトコンドリアに一致して陽性反応が認められた．

＊順天堂大学医学部脳神経内科
＊＊順天堂大学医学部共同病理
＊＊＊国立武蔵療養所神経センター
＊＊＊＊東京工大理学部化学
＊＊＊＊＊名古屋大学医学部第二生化学

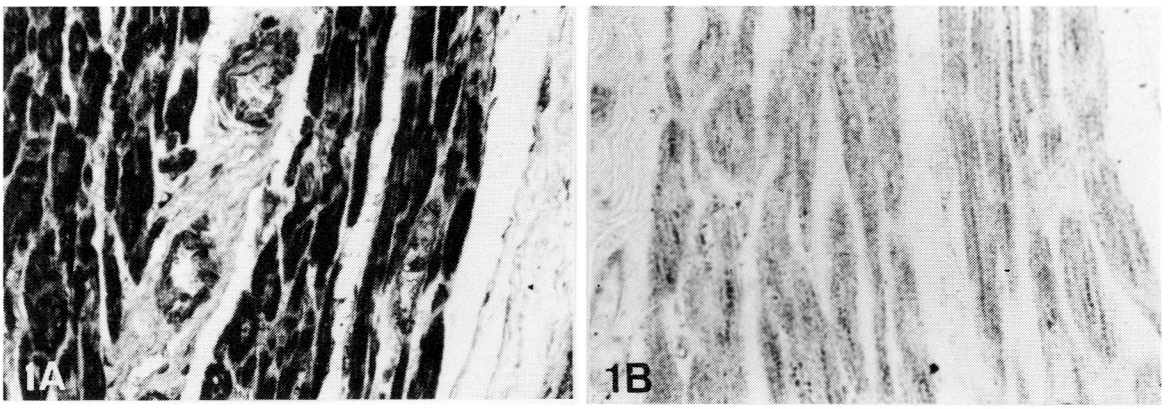


図1　cytochrome c oxidase の免疫組織化学
心筋内のミトコンドリア内膜内の酵素局在を示す（1A；抗血清，1B；対照血清，×66）.

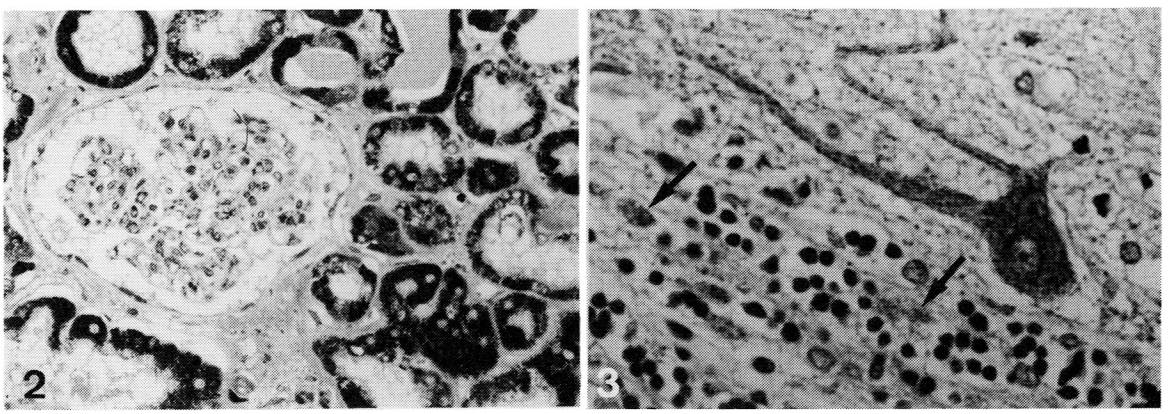


図2，3　cytochrome c oxidase の免疫組織化学
腎尿細管の上皮細胞のミトコンドリア（図2，×66），および小脳のプルキンエ細胞内のものが陽性．苔状線維のシナプス終末（矢印）も陽性（図3，×132）.

肝細胞はミトコンドリアに富んでいるが，これに一致して強い陽性反応を呈した．腎では近位および遠位尿細管の細胞が強陽性であった（図2）.

小脳ではプルキンエ細胞の胞体や樹状突起内のミトコンドリアが陽性であった．顆粒細胞層ではミトコンドリアの集積像が認められ，これは苔状線維の終末に一致していた（図3）．脳幹では種々の神経細胞核，さらに歯状核の神経細胞なども多数のミトコンドリアが陽性であった.

cytochrome c oxidase 抗体，および complex III抗体による染色性は同一であった．さらにサポニン処理と Triton X-100処理による染色性の比較では，後者の方がミトコンドリアが鮮明な顆粒状に染色されていた.

Leigh 症候群の1例では，cytochrome c oxidase 抗体および complex III抗体いずれに対しても，すべての組織のミトコンドリアは染色された．すなわち本例ではこれら2種類の電子伝達系の酵素蛋白は正常に反応しており，欠損はしていなかった.

一方，ミトコンドリア脳筋症の1例では骨格筋において cytochrome c oxidase 抗体に対する反応が陰性であった．小脳では皮質に限局性壊死巣や広汎なプルキンエ細胞や顆粒細胞の脱落を認め

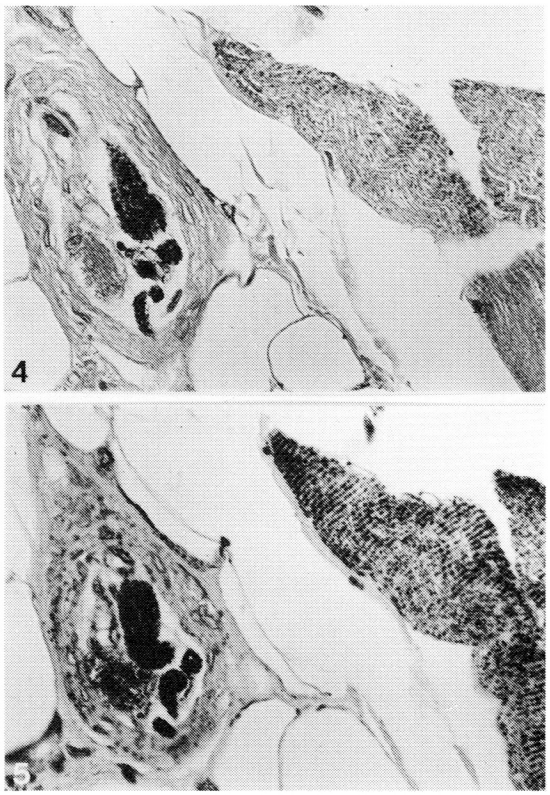


図4，5　ミトコンドリア脳筋症の骨格筋と筋紡錘
cytochrome c oxidaseは骨格筋では欠損，筋紡錘では陽性（図4），complex IIIは両者とも陽性（図5）（×132）．

たが，残存細胞ではミトコンドリアのcytochrome c oxidaseやcomplex IIIの酵素蛋白はいずれも正常に検出された．肝臓や腎臓の細胞も同様に正常反応を呈した．心筋でも同様に2種類の抗体に対する反応が陽性の心筋線維が多かったが，若干反応の弱い線維も混在していた（図4）．

骨格筋ではcytochrome c oxidase抗体に対しては少数の筋線維以外ほとんどすべての筋線維は陰性であった．しかるに筋紡錘内の線維だけは陽性であった（図5）．complex IIIに対する抗体では筋紡錘内および外の筋線維はすべて強陽性であった（図6）．complex IIIに対する反応が陽性であったことから，ミトコンドリア内膜の蛋白は，ホルマリン固定やパラフィン包埋の影響を受けずに抗原性が保持されており，cytochrome c oxidaseの酵素蛋白だけが欠損しているものと考えられる．

考　　察

ミトコンドリア ミオパチーにおけるミトコンドリアの電子伝達系を構成する酵素活性の障害については，最近報告があいつぎ，複合体I，II，III，IVそれぞれについての欠損例が報告されている．われわれはこれまでに病理学的な報告がされているミトコンドリア脳筋症の剖検例について，電子伝達系の酵素蛋白の局在を免疫組織学的に観察する方法を確立した．この方法によりパラフィン包埋組織から電子伝達系の酵素欠損の有無を知ることが可能である．

Bedettiら（1985）[4]もわれわれの方法と同様にパラフィン切片からミトコンドリア内膜におけるcytochrome c oxidaseの局在を観察する方法を報告している．鼻腔内のoncocyteのようにミトコンドリアに富む腫瘍細胞の診断に有用であるとしている．

われわれは脱パラフィン後，切片内へ抗体の浸透を容易にするため，切片をサポニンあるいはTriton X-100処理をして比較してみた．ミトコンドリア内への抗体の浸透性はサポニンよりTriton X-100の方が優れているという報告がある[5]．われわれのパラフィン切片での比較でもTriton X-100処理の方が免疫組織化学的反応性はやや優れていた．

次に方法上問題となることは，ホルマリン固定やパラフィン包埋，あるいは脱パラフィンの際，ミトコンドリアの内膜が人工的に破壊され，免疫的反応性が消失する可能性についてである．この問題を解決するため，われわれはミトコンドリア内膜に局在するcytochrome c oxidaseとcomplex IIIの2種類の酵素に対する抗体を用いた．いずれかの抗体に対して明瞭な免疫反応が認められる場合，同時に染色した他の抗体に対してのみ反応が弱ければ，その抗体に対応する酵素蛋白の欠損があると考えた．

このような免疫組織学的方法で検索した結果，

ミトコンドリア脳筋症の1例において骨格筋でのみ cytochrome c oxidase が欠損していることを見出した．同一切片において骨格筋の線維では cytochrome c oxidase が欠損しているにもかかわらず，筋紡錘内の線維では陽性に反応していた．Zebiani ら(1985)[6] はミトコンドリア ミオパチーの乳児例の生検筋を cytochrome c oxidase の抗体による免疫組織化学で検索した結果，われわれの所見と同様に筋線維では陰性，筋紡錘内線維では陽性であったと報告している．なぜこのような違いが存在するのかは cytochrome c oxidase 酵素のサブユニットや胎児型，成人型の存在など今後に大きな問題を提起している．

文　献

1）佐藤猛，安野みどり，中村眞二，他：ミトコンドリア ミオパチー：チトクローム c 酸化酵素と複合体IIIの局在に関する免疫組織化学的研究，神経内科，1986（印刷中）．

2）佐藤猛，安野みどり，森秀生，他：皮膚線維芽細胞の pyruvate dehydrogenase complex 活性低値を示した Leigh 脳症の1剖検例．第26回日本神経病理学会，岡山，1985年5月9日．

3）向山昌邦，埜中征哉，春原経彦，他：Acanthocytosis を伴った mitochondrial encephalomyopathy の1剖検例．神経病理学会誌，5：275，1984．

4）Goldenthal, K.L., Hedman, K., Chen, J.W., et al.: Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins. J. Histochem. Cytochem., 33：813, 1985.

5）Bedetti, C.D.: Immunocytochemical demonstration of cytochrome c oxidase with an immunoperoxidase method: A specific stain for mitochondria in formalin-fixed and paraffin-embedded human tissue. J. Histochem. Cytochem., 33：446, 1985.

6）Zeviani, M., Nonaka, I., Bonilla, E., et al.: Fatal infantile mitochondrial myopathy due to cytochrome c oxidase deficiency: immunological studies in a new patient. Ann. Neurol., 17：414, 1985.

46) 筋型チトクロム*c*酸化酵素欠損症におけるミトコンドリア電子伝達系酵素蛋白質の異常

小 澤 高 将*

研究協力者　錦 見 盛 光*　田 中 雅 嗣*
宮 林 重 明**　多 田 啓 也**

はじめに

我々は既に全身型cytochrome *c* oxidase (CCO) 欠損症の乳児の骨格筋において本酵素のsubunit (SU) の量が著明に減少していることを報告している．今回我々は筋に限局したCCO欠損症と考えられる小児の骨格筋において，ミトコンドリア酸化的リン酸化系の主な酵素複合体に対する特異的抗体を用いたimmunoblot法ならびに免疫沈殿法および高分解能一次元電気泳動法により，酸化的リン酸化酵素群のSUの異常について検索した．その結果，CCOの7つのSUの著しい減少，特にSU IIの完全欠損に加え，complex IおよびIIIの主なSUの量の減少およびいくつかの未同定のポリペプチドの欠損を見い出したので報告する．

症　例

患者は6歳男児．周産期に異常なく，頸定4ヶ月，座位9ヶ月，処女歩行1歳3ヶ月とほぼ正常．歩行を嫌い，3歳頃より運動能力の遅れが目立ち，易疲労感を訴え，走行，自力階段歩行は不能で，身体発育の遅れも目立った．高乳酸血症，筋萎縮を認め，運動負荷にて著明な乳酸の上昇を認めた．グルコース負荷では乳酸の上昇を認めず，ケトン食負荷では乳酸の高値とケトーシスを示し，ジカルボン酸尿を認めた．メチレンブルーの静注では有意な乳酸の低下を示した．筋生検標品の組織化学的染色ではragged-red fiber，脂肪の沈着を認め，CCO染色ではほぼ活性を認めなかった．IQ 77(田中-Binet)，頭部X線CT，NMR-CTに特変なく，検尿でFanconi症候群を認めず，NH_4Cl負荷でも異常は示さなかった．生検筋でCCO活性の著明な低下を認めたが，肝，線維芽細胞，白血球での活性は正常であり，線維芽細胞でのピルビン酸関連酵素も正常であった．以上よりこの症例は筋に限局したCCO欠損症であると考えられる．

方　法

CCO, ubiquinol - cytochrome *c* reductase (complex III)，NADH - ubiquinone reductase (complex I) およびF_1-ATPaseはウシ心筋ミトコンドリアより，既報に従って単離精製し，これらに対する特異抗体をウサギにおいて作製した．ミトコンドリア蛋白質を6M尿素を含んだ19.2-9.6%指数関数濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いたSDSスラブ電気泳動により分離し，電気泳動的にDurapore filter (GVHP, Millipore) にブロットし，上記特異抗体との結合をペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ複合体 (PAP) を用いて免疫化学的に検出した．免疫沈殿法によるSUの異常の検索にはミトコンドリア蛋白質を5% Triton X-100で可溶化後，特異抗体を加え，protein A-Sepharoseに抗原抗体複合体を結合させ，これをSDSゲル電気泳動で分離した後，銀染色により検出する方法を用いた．またDNA塩基配列決定用の大型のスラブ電気泳動装置を用いて高分解能一次元電気泳動を行い銀染色によりミトコンドリア蛋白質の分析を行った．

*名古屋大学医学部生化学第二講座
**東北大学医学部小児科

結　　果

1．酸化的リン酸化系酵素の活性

rotenone-sensitive NADH-cytochrome *c* reductase の活性は対照の約40%に低下していた．succinate-cytochrome *c* reductase 活性は66%に低下していたのに対し，succinate dehydrogenase 活性は対照の83%と低下は軽度であった．CCO 活性は正常の平均の約3%に低下していたのに対し，F_1-ATPase 活性はほぼ正常であった．また CCO 残存活性酵素での熱安定性試験に異常はなかった．

2．チトクロムの吸収スペクトル

図1に示したように正常者の骨格筋ミトコンドリアと比較して，患者のミトコンドリア(B)ではチトクロム aa_3 のピークが α，γ 両吸収帯に認められない．このスペクトルからチトクロム含量を計算した結果，チトクロム aa_3 は正常の0.48 nmol/mg protein に対し，<0.02と4%以下に低下し，チトクロム *b* および $c+c_1$ も正常の0.54および0.63に対し，0.31および0.36とそれぞれ57%に低下していることが示された．

3．CCO の SU の免疫化学的検出

図2に抗 CCO 抗体を用いた immunoblot 法により患者ミトコンドリアにおける免疫反応性物質の含量および分子量を分析した結果を示した．精製 CCO（lane 5）およびウシ心筋ミトコンドリア（lane 6）では本酵素の7本の SU のうちIV，V，VI，VIIが明確に，IIはかろうじて検出された．正常骨格筋ミトコンドリア（lane 7）では SU IV，

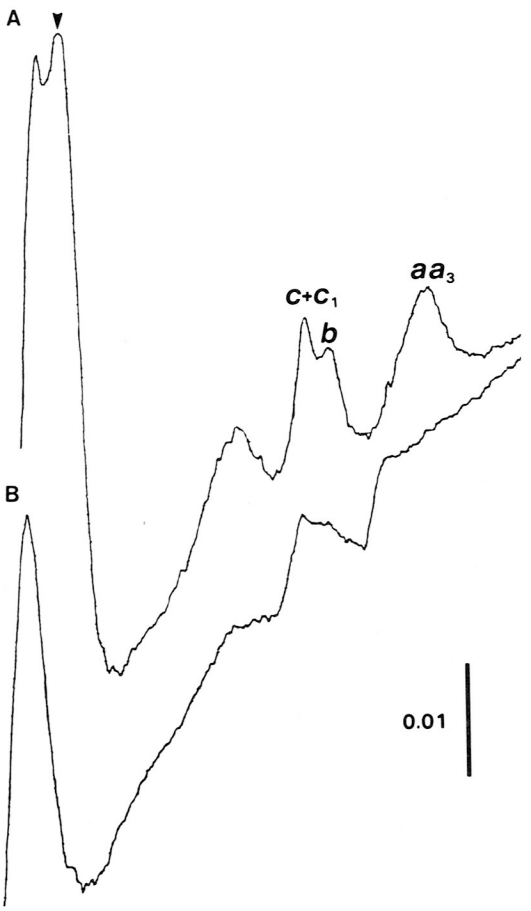


図1　ミトコンドリア　チトクロムのスペクトル

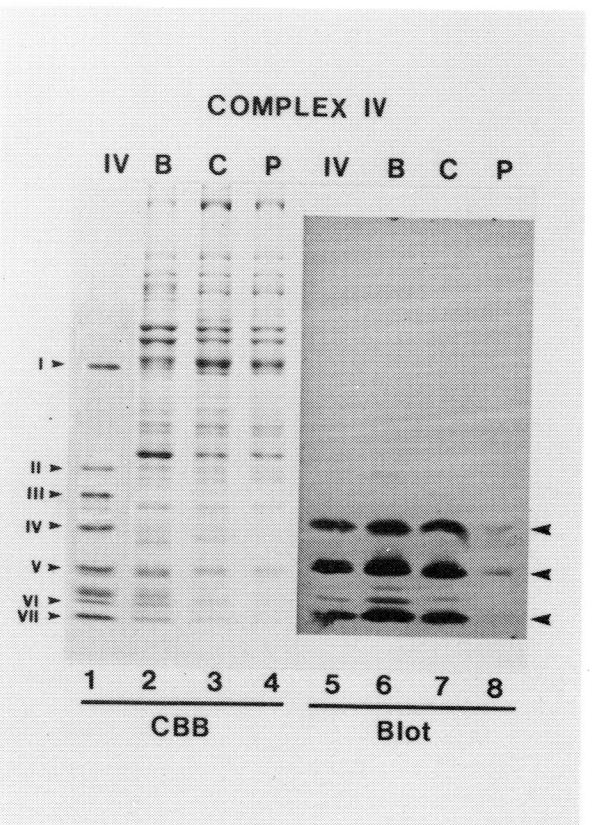


図2　Immunoblotting によるチトクロム *c* オキシダーゼのサブユニッの分析

V，VIIが検出しえたのに対して，患者骨格筋ミトコンドリア（lane 8）ではいずれのSUも著しく減少していた．しかしながらそれらの泳動位置は正常と一致し，分子量の異常は認めなかった．ピーク面積から計算するとSU IV, V, VIIの量はそれぞれ正常の13，5，2％に低下しており，その減少の程度は活性値およびチトクロム aa_3 含量の減少に比してやや軽度ないし同程度であった．

4．Complex I の SU の分析

図3A に抗 complex I 抗体を用いた immunoblot の結果を示した．精製された complex I（lane 1）およびウシ心筋ミトコンドリア（lane 2）では約20本のポリペプチドが検出されている．正常骨格筋ミトコンドリア（lane 3）と患者ミトコンドリア（lane 4）を比較するとピーク面積の総和は患者では正常の47％に低下していた．矢印の先で示したバンドの濃度は著しい減少を示し，SU の欠損を示唆した．しかし発色が蛋白量に関してS字状の挙動を示すため最終的結論には，更に検討が必要である．

5．Complex III の SU の分析

図3B に抗 complex III抗体を用いた immunoblot の結果を示した．lane 1～4は，それぞれ精製 complex III，ウシ心筋ミトコンドリア，正常骨格筋ミトコンドリア，患者ミトコンドリアであり，サブユニット1，2はコア蛋白質，3はチトクロム b，4はチトクロム c_1，5は鉄イオウ蛋白質，6はユビキノン結合蛋白質である．ブロッティングに用いる蛋白量を変えて検出されるバンドのピーク面積を検討した結果，complex IIIの SU の総量が正常の約75％に低下していることが明らかになった．これは還元剤によって還元しうるチトク

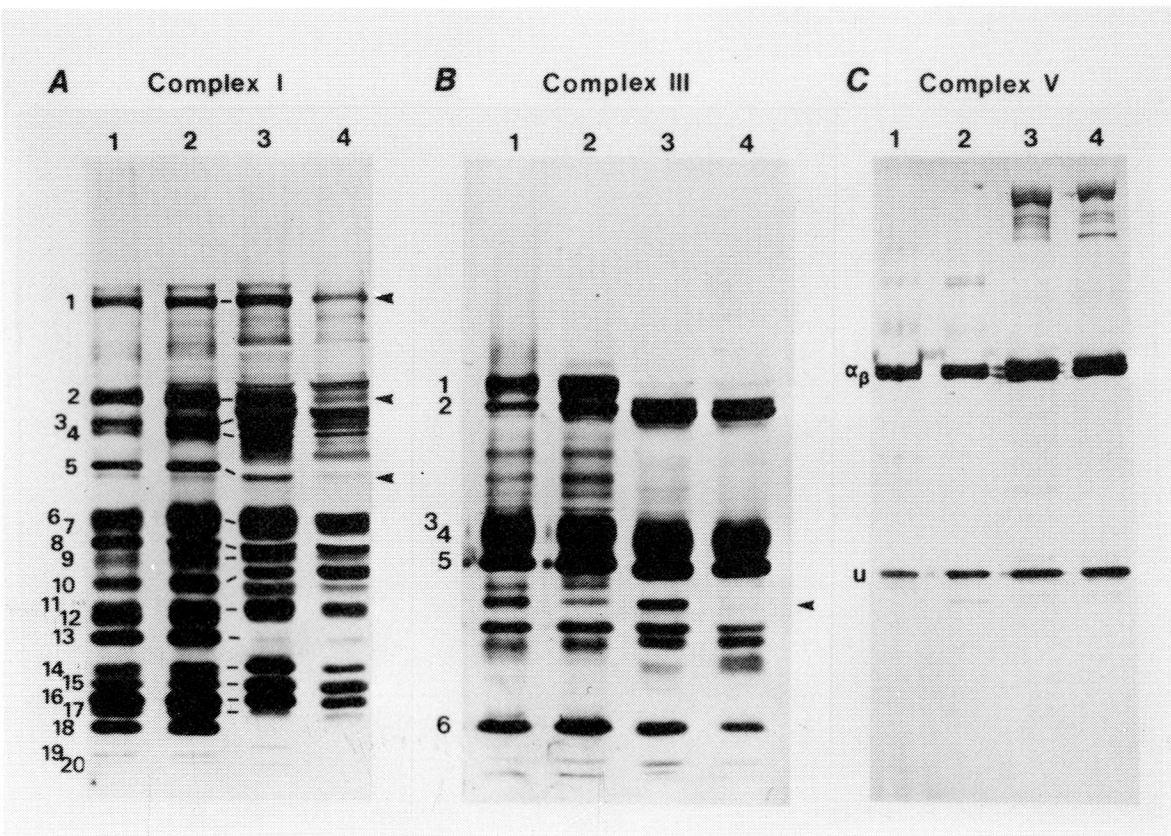


図3　Immunoblotting による complex I，III，Vのサブユニットの分析

ロム b の減少の程度にほぼ一致している．また抗体の結合で検出される minor 成分のうち，矢印の先で示したバンドが患者ミトコンドリアにおいて明らかに欠落していることが注目された．

6．F_1-ATPase の SU の分析

図3C に抗 F_1-ATPase 抗体を用いた immunoblot の結果を示した．精製 F_1-ATPase (lane 1)，ウシ心筋ミトコンドリア (lane 2)，正常骨格筋ミトコンドリア (lane 3)，患者ミトコンドリア (lane 4) のいずれでも α，β SU および未同定ポリペプチド (u) を検出しえたが，患者骨格筋ミトコンドリアにおいてもそれらの含量は正常と変わらず，F_1-ATPase 活性についての結果と一致した．

7．免疫沈殿法による CCO の SU の検索

protein A-Sepharose を用いた免疫沈殿法により CCO の Western blotting 法では検出できない

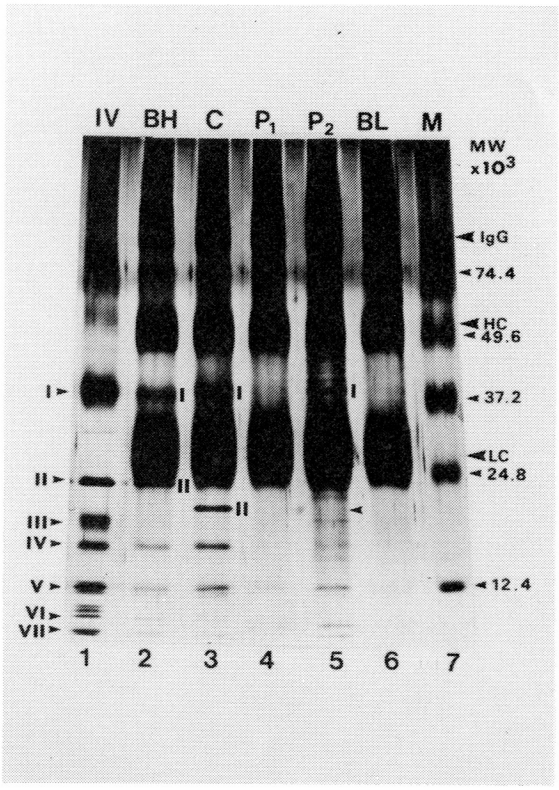


図4　免疫沈殿法によるチトクロム c オキシダーゼのサブユニットの分析

SU の分析を行った(図4)．CCO の SU I および II はウシ (lane 2) とヒト (lane 3) では異なった移動度を示した．SU III はこの界面活性剤の濃度では他の SU から解離しやすいため検出は困難であった．患者ミトコンドリアでは正常と同じ蛋白量を用いた場合には SU V がかろうじて検出されたのみである (lane 4)．蛋白量を増して分析を行うと，SU I，IV，V，VI，VII は検出しえたが，SU II に対応する位置には蛋白のバンドは認めなかった (lane 5)．

8．高分解能一次元ゲル電気泳動によるミトコンドリア蛋白質の分析

大型のスラブゲルを用い電気泳動を行った後，銀染色によりミトコンドリア蛋白質を検出し，精製酵素標品の SU の移動度と比較し同定を行った(図5)．その結果，患者ミトコンドリア(lane 1) では正常のそれ (lane 2) に比し CCO の SU IV，V，VI に対応するバンドが著しく減少しているのが確認され，SU II，III に対応する位置にも染色の減少が認められ，CCO の SU の量の全般的低下が明らかになった．また未同定のポリペプチドの減少も見られ，1つのバンド (*) の増加も気づかれた．

考察とまとめ

本研究により，ミトコンドリア酸化的リン酸化を担う複合酵素系の主要な部分について，免疫化学的検出法ならびに免疫沈殿法によってそれらの SU の異常を特異的に解析する方法および高分解能一次元スラブゲル電気泳動法による異常蛋白質の広範な検索方法が確立された．

筋型 CCO 欠損症の患者骨格筋ミトコンドリアにおいて，本酵素の SU が全般に減少しさらに SU II が特に著しく減少していることが明らかになった．SU II はヘム a および銅の結合部位を形成し CCO の電子伝達およびそれに伴うエネルギー転換において重要な役割を演じている．CCO の SU II はミトコンドリアの DNA によってコードされているが，その異常により SU II が欠損し，二次的に他の SU の量のミトコンドリアでの減少を来している可能性は否定できない．しかしながら，

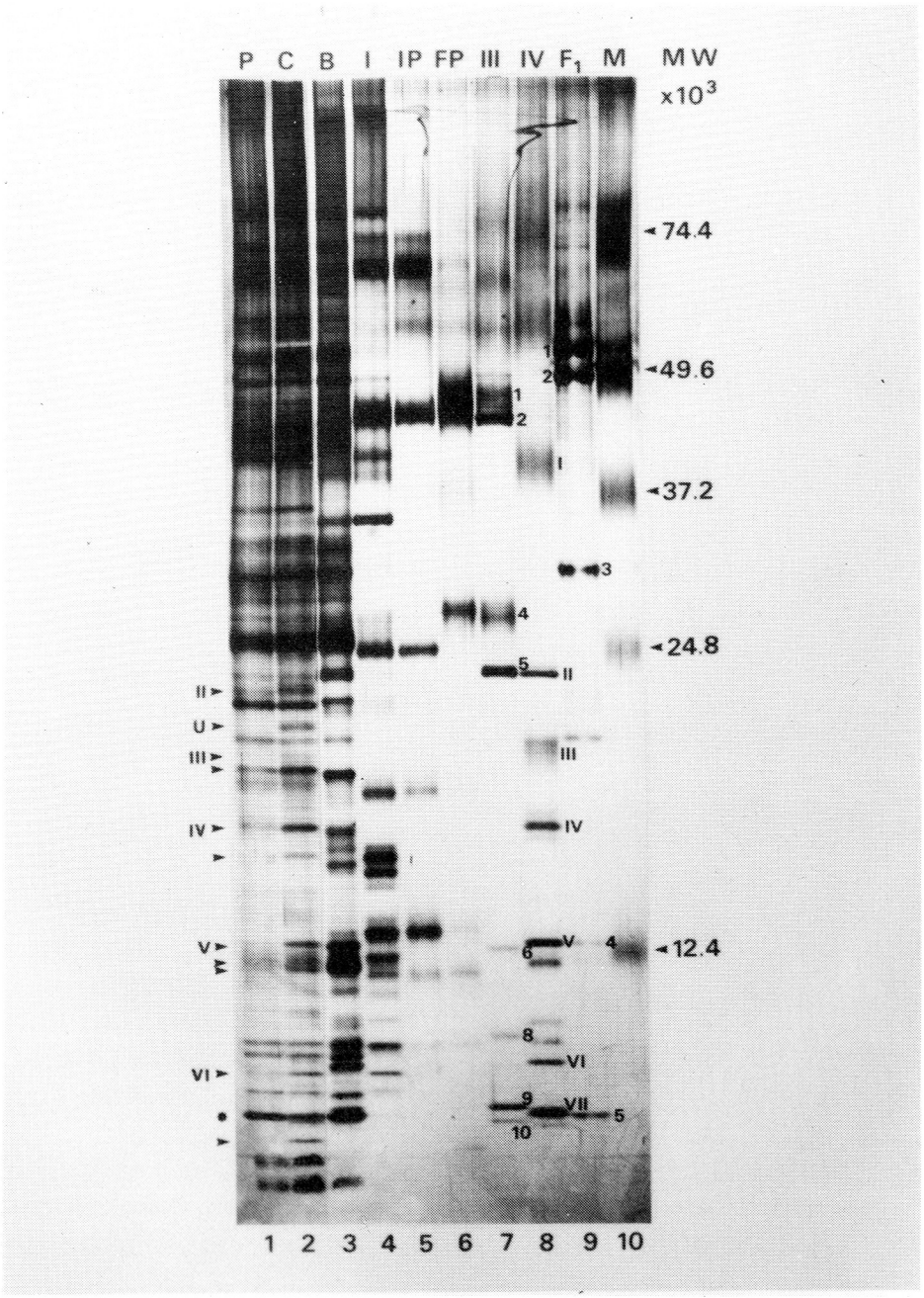


図5　高分解能一次元電気泳動によるミトコンドリアの蛋白質の分析

患者ミトコンドリアの蛋白質の異常がCCOのSUの欠損のみにとどまらず，他の少なくとも6種のポリペプチドの著しい減少に及び，さらにcomplex I，IIIのSUの軽度の減少を伴っていることは，CCOのSU IIをコードしているミトコンドリアのDNAの異常のみでは説明し難い．むしろこの患者の主病変は，一群のミトコンドリア蛋白質の合成・輸送に関与する核のDNAによってコードされた蛋白質の異常に帰さるべきものであろう．この異常が骨格筋に限局していることから，その遺伝子はミトコンドリアの蛋白質の生合成に対する骨格筋に特有な制御機構と深いかかわりを有しているものと推測される．

文　献

1）小沢高将，錦見盛光，田中雅嗣：ミトコンドリア電子伝達系とその異常．神経内科，24：81-91，1986.

47) ミトコンドリア脳筋症の成因に関する遺伝子の解析 (第Ⅰ報)

高 守 正 治*

研究協力者　奥 村 誠 一*　松 原 四 郎*

はじめに

ミトコンドリアは細胞内小器官で，クエン酸回路，電子伝達系，酸化的リン酸化，脂肪酸のβ-酸化などを行い細胞におけるエネルギー代謝に深く関与している．また，ミトコンドリアは核とは異なった独自の遺伝系をもち，遺伝子を複製し，その情報を発現し，蛋白質を合成する能力を持っている．脊椎動物のミトコンドリアのDANの研究がおこなわれるようになったのは，1966年ニワトリのミトコンドリアDANが分離されてからであるが，ヒトのミトコンドリアについては1981年B.G. Barrellら[1]が完全な塩基配列を報告した．また同じ頃，G. Attardiら[2]はヒトのミトコンドリアDNA（mtDNA）のRNAへの転写を解析した．ヒトのmtDNAは16569塩基よりなる2重らせんの環状構造をしており，13種の蛋白質，22種のtRNA，2種のrRNAがコードされている（表1）．13種の蛋白質のうちチトクロームC酸化酵素のサブユニットⅠ，Ⅱ，Ⅲ，ATPaseのサブユニット6，チトクロームbの5種の蛋白質が同定されている．同定されていないものについても，実際に蛋白質が合成されていることは認められている．これらの事実をふまえて，本研究はミトコンドリアの機能異常を本態とするミトコンドリア脳筋症で，ミトコンドリアの遺伝子そのものに異常が存在するか否かを明らかにするための検討をおこなった．

材料と方法

正常対照6例および以下に述べる2症例について末梢血白血球よりミトコンドリア分画を抽出し，mtDNAを分離し[3)~7)]制限酵素による解析を行った．すなわち，末梢血よりデキストランを用い白血球を分離し，この白血球からホモジネイト，遠沈の操作によりミトコンドリア分画を抽出した．RNA，核DNAの混入を防ぐために，ミトコンドリア分画をRNase，DNaseで処理し，さらにSDScで処理後，EtBr-CsClによる超遠沈によりmtDNAを分離した．得られたmtDNAについて種々の制限酵素による処理をおこない，1％アガロースゲルを用い電気泳動を行った後，EtBr染色をおこない，トランスルミネーターにてDNAバンドを検出した．

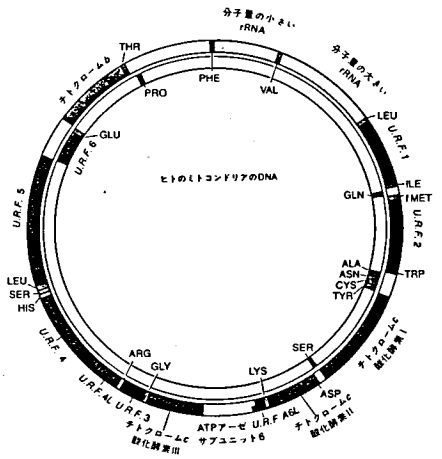
症　例

症例1：53歳，女性．先天性白内障で，17歳の時，両側水晶体摘出術を受けた．また14歳よりあった月経が17歳で停止した．30歳頃より眼瞼下垂があり，49歳頃より上肢筋力低下を自覚していた．神経学的に，両側眼瞼下垂，全方向への眼球運動障害，顔面筋，頚筋，四肢筋とくに上肢近位筋に筋力低下，筋萎縮を認めた．左尺側手根屈筋生検では筋線維横径の大小不同，横断面円形化，中心核増加などのミオパチー性変化を認め，またtrichome変法では，赤染する不規則な局面をともない，ragged-red fiberを認めた．電顕ではミトコンドリアの集積や多数の結晶様封入体がみられた．

症例2：42歳，男性．満期産で周産期に異常はなかったが，乳幼児期より運動と知能の発達が遅延し，処女歩行は4歳であった．35歳頃より歩行障害と構音障害が増悪した．神経学的に知能障害，全外眼筋麻痺，視神経萎縮，四肢・体幹の失調と

*金沢大学神経内科

表1　ヒトのミトコンドリアのDNA[10]



PEPT	3307	4262	PRESUMPTIVE PROTEIN 1 (ATA START CODON; TA STOP CODON)
PEPT	4470	5511	PRESUMPTIVE PROTEIN 2 (ATT START CODON; T STOP CODON)
PEPT	5904	7445	CYTOCHROME OXIDASE SUBUNIT 1 (AG STOP CODON)
PEPT	7586	8269	CYTOCHROME OXIDASE SUBUNIT 2
PEPT	8366	8572	PRESUMPTIVE PROTEIN A6L
PEPT	8527	9206	ATPASE 6 (TA STOP CODON)
PEPT	9207	9990	CYTOCHROME OXIDASE SUBUNIT 3 (T STOP CODON)
PEPT	10059	10404	PRESUMPTIVE PROTEIN 3 (ATA START CODON; T STOP CODON)
PEPT	10470	10766	PRESUMPTIVE PROTEIN 4L
PEPT	10760	12137	PRESUMPTIVE PROTEIN 4 (T STOP CODON)
PEPT	12337	14148	PRESUMPTIVE PROTEIN 5 (ATA START CODON)
PEPT	14673	14149 (C)	PRESUMPTIVE PROTEIN 6 (AGG STOP CODON)
PEPT	14747	15887	CYTOCHROME B (T STOP CODON)
TRNA	577	647	PHE-TRNA (NAR: 1455)
TRNA	1602	1670	VAL-TRNA (NAR: 2053)
TRNA	3230	3304	LEU-TRNA (UUR) (NAR: 1054)
TRNA	4263	4331	ILE-TRNA (NAR: 0997)
TRNA	4400	4329 (C)	GLN-TRNA (NAR: 0597)
TRNA	4402	4469	MET-TRNA-F (NAR: 1297)
TRNA	5512	5579	TRP-TRNA (NAR: 1897)
TRNA	5655	5587 (C)	ALA-TRNA (NAR: 0097)
TRNA	5729	5657 (C)	ASN-TRNA (NAR: 0297)
TRNA	5826	5761 (C)	CYS-TRNA (NAR: 0497)
TRNA	5891	5826 (C)	TYR-TRNA (NAR: 1997)
TRNA	7516	7445 (C)	SER-TRNA-UCN (NAR: 1697)
TRNA	7518	7585	ASP-TRNA (NAR: 0397)
TRNA	8295	8364	LYS-TRNA (NAR: 1197)
TRNA	9991	10058	GLY-TRNA (NAR: 0797)
TRNA	10405	10469	ARG-TRNA (NAR: 0197)
TRNA	12138	12206	HIS-TRNA (NAR: 0897)
TRNA	12207	12265	SER-TRNA-AGY (NAR: 1656)
TRNA	12266	12336	LEU-TRNA-CUN (NAR: 1097)
TRNA	14742	14674 (C)	GLU-TRNA (NAR: 0697)
TRNA	15888	15953	THR-TRNA (NAR: 1797)
TRNA	16023	15955 (C)	PRO-TRNA (NAR: 1597)
RRNA	648	1601	12S RRNA
RRNA	1671	3229	16S RRNA

構音障害が存在しましたが，外眼筋以外の筋症状はなかった．上腕二頭筋生検のtrichrome変法で，20%の線維で筋鞘下に狭い赤紫色に染まる部分がみられた．電顕では筋鞘下にミトコンドリアの異常な集積がみられ，myofibrileの間隙にも多数のミトコンドリアがみられた．

なお，この2症例の詳細については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年度研究報告書に報告している[8]．

結　　果

図1に，Hpa IとSac IIによる切断パターンを示した．マーカーとしてLamb da-phaseのDNAをHind IIIで切断したものを用いた．この両者の組み合わせでは5ヶ所の切断部位があり，5のフラグメントが泳動されている．しかし，症例1，症例2および正常対照との間に泳動パターンの差はみられなかった．図2には，Hind IIIとPst Iの組み合わせによる泳動パターンをしめすが，症例間と正常対照との間に泳動パターンの差はみられなかった．その他，表2に示す様に9種類の制限酵素を用い合計38ヶ所の切断部位について検討を行ったが，正常対照との間に明確な泳動パターンの差をみいだす事はできなかった．

考　　按

現在までにミトコンドリア遺伝子の変異としてよく知られているものにクロラムフェニコール耐性があり，本耐性現象は培養細胞の細胞融合実験により細胞質遺伝することがわかっていたが[9]，塩基配列の検討の結果16sRNA遺伝子のヌクレオチド1個が置換していることが明らかになった[5]．同様の観点から，本研究では脳筋症の臨床像に注目し解析を行ったわけであるが，検討しえた症例と制限酵素の組み合わせの範囲内ではmtDNAの制限酵素による泳動パターンに明確な異常はみいだしえなかった．しかし，末梢血からの僅少の試料からもこの種の解析が可能なことに

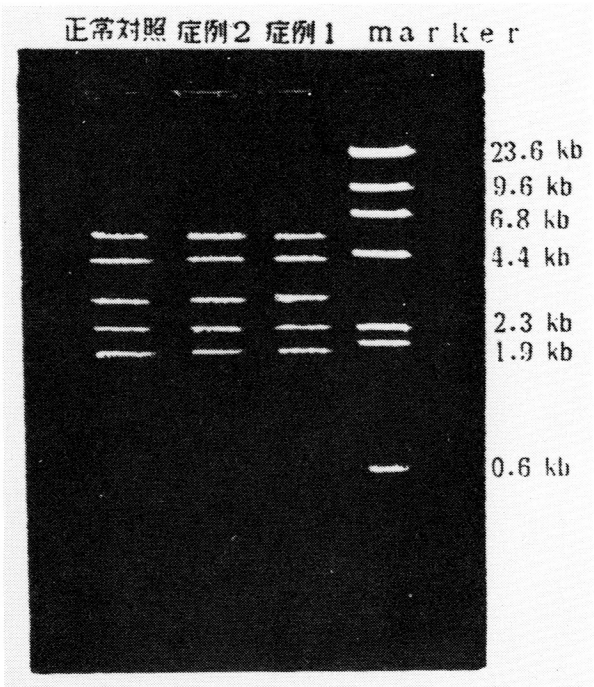


図1　Hpa I＋Sac II

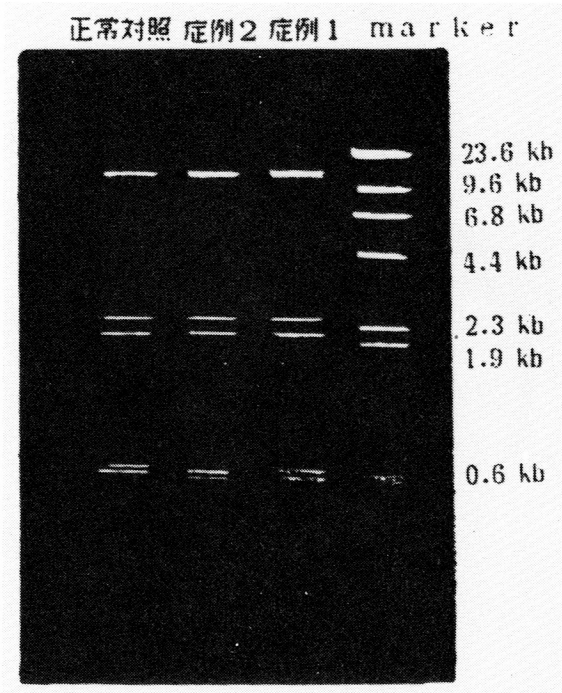


図2　Hind III＋Pst I

表2　制限酵素による解析

切断部位 制限酵素	チトクロム酸化酵素 ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ1	 ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ2	 ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ3	チトクロムｂ	ＡＴＰase6	ｒＲＮＡ 12S	 16S	その他
ＡｃｃＩ	4	2		1		1		
ＡｐａＩ	1		1					2
ＣｆｒＩ		1			2		1	3
EcoＲＩ	1		3					4
HindＩＩＩ	1							2
HgiＣＩ	1			2			1	
ＨｐａＩ								3
ＰｓｔＩ	1			1				
ＳａｃＩＩ						1	1	

意義を付したい．今回は症例数が少なく，ともに孤発例であったこと，さらにはアガローズゲル電気泳動による解析では制限酵素による切断部位が数多くなると泳動パターンの解析が困難になることから用いた制限酵素の種類が限られてしまった事などの問題があった．今後，症例の選択，電気泳動法の改良が求められ，塩基配列の解析も必要となろう．

ミトコンドリアは独自のDNAと蛋白合成系を備えているが，ミトコンドリアのDNAがコードしているのは蛋白質では，わずか13種にしかすぎず，これはミトコンドリア構成蛋白質の数%程度にすぎない[10]．この小器官の機能であるエネルギー産生に関与している他の酵素類をはじめ，DNA複製やミトコンドリア内の蛋白質合成のための蛋白質をも含め，多くの蛋白質は核のDNAにコードされ，細胞質のリボゾーム上で合成されミトコンドリア内に送り込まれている[11]．この様にミトコンドリアの機能を遺伝子レベルで考えるとき核の遺伝子による支配については十分に考慮しなければならないが，ミトコンドリア自体が独自のDNAと蛋白合成系を備えているという事実は，ミトコンドリアの機能を遺伝子レベルで解明しようとするとき，ミトコンドリア自身の遺伝子情報について，まず十分な検討が必要であることを意味する．従って，ミトコンドリアの機能異常が主たる病態であるミトコンドリア脳筋症で，ミトコンドリア自身の遺伝子情報を検討することは，その病態を明らかにする上で生化学的検討とともに，重要な手段であると考えられる．

結　　語

ヒト末梢血白血球よりmtDNAを分離し，制限酵素による解析が可能なことを明らかにした．13種の蛋白質，22種のtRNA，2種のrRNAがコードされている16569塩基からなるヒトmtDNAの環状構造の中に，ミトコンドリア機能異常を本態とする筋脳症の成因を求めるべく，正常対照6例と対比して本病2症例の検討を行った．9種の制限酵素による38ヶ所の切断部位について解析するかぎり異常は見出せなかった．しかし，症例の選択，電気泳動法の改良をはかって，本症の成因を遺伝子レベルから明らかにすることは，その生化学的検討とともに有用なものと評価した．

文　　献

1) Anderson, A. et al.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature, 290：475, 1981.

2) Crews, S & Attardi, G.: The sequences of the small ribosomal RNA gene and the pheylalanine tRNA gene are joined end to end in human mitochondrial DNA. Cell, 19：775, 1980.

3) Kasamatu, H. et al.: A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68：2252, 1971.

4) Smith, C.A. et al.: In vivo effects of intercalating durgs on the superhelix density of mitochondrial DNA isolated from human and mouse cells in culture. J. Mol. Biol., 59：255, 1971.

5) Blanc, H. et al.: Different nucleotide changes in the large rRNA gene of the mitochondrial DNA confer chloramphenicol resistance on two human cell lines. Nucleic Acids Res., 9：5785, 1981.

6) Hayashi, J. et al.: Mitochondrial DNA analysis of mouse-rat hybrid cells: effect of chloramphenicol selection on the relative amounts of parental mitochondiral DNAs. Somatic Cell Genet., 8：67, 1982.

7) 米川博通，林　純一：免疫実験操作法，XII：4045, 1983.

8) 高守正治，松原四郎ら：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.210.

9) Bunn, C.L. et al.: Cytoplasmic inheritance of chloramphenicol resistance in mouse tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71：1681, 1974.

10) Clayton, D.A.: Transcription of the mammalian mitochondrial genome. Ann. Rev. Biochem., 53 : 573, 1984.
11) Maccechini, M.L. et al.: Import of proteins into mitochondria: Precursor forms of the extramitochondrially made F_1-ATPase subunits in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 343, 1979.

VII. CK・エネルギー代謝・蛋白代謝

48) Duchenne型筋ジストロフィーにおける血清CK isoenzymesについて
── 高感度enzyme immunossay法による検討 ──

杉 村 公 也*

研究協力者　杢 野 謙 次*　陸　重 雄**
高 橋　昭*　加 藤 兼 房***

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）患者において，血清あるいは筋組織中のCK isoenzymesの異常，すなわちB型isoenzyme（MB, BB）の増加が認められることは，従来数多く報告されており，最近ではNanjiのreviewにまとめられている．

しかしながら，これまでのCK isoenzymesの測定法は，精度などの点でやや不十分であった．

最近，共同研究者の加藤らにより，CK isoenzymesの高感度分別測定法が開発された．そこで，今回この方法を利用し，DMD患者の血清CK isoenzymes（MM, MB, BB）を測定したので，その結果を報告する．また，血清CK-MBの由来については，従来，骨格筋か心筋か議論があるが，この点についても若干検討を加えた．

対象・方法

対象としたのは，DMD患者50例（年齢5～28歳）である．また，control群は，男児患者（非神経，筋，心疾患）22例（5～14歳）と健康男子17例（15～19歳）からなる計39例である．

これらの対象者について，CK isoenzymes（CK-MM, -MB, -BB）をenzyme immunoassay（EIA）法により測定した．CK-MBは，CK-MMあるいはCK-BBの測定系に一部交叉するが，交叉率から補正し各isoenzyme値を算出した．

またDMD患者については，同時に血清carbonic anhydrase III（CA-III）値を測定し，採血とほぼ同じ時期に心電図を記録した．

結　果

1）CK isoenzymesの測定値（図1）

CK-MM値は，control群では，68.45±28.12（mean±SD）ng/ml（range, 25.01—145.36）であったが，DMDでは高く，2062.96±2645.52ng/ml（64.03—14134.5）であった．CK-MB値は，control群では，0.97±0.48ng/ml（0.37—2.40）であったが，DMD群では，98.46±137.60ng/ml（1.9—896.0）と明らかな高値を認めた（P<0.001）．control群の上限値（mean+2SD）を越す異常例は，50例中49例（98%）であった．また，CK-BB値も，DMD群では，3.97±4.96ng/ml（0—21.0）と，control群の値1.07±0.72ng/ml（0.25—2.37）に比べ有意に高かった（P<0.001）．CK-BBの上昇例は，DMD50例中22例（44%）であった．

2）各isoenzyme値と年齢との関係（図2-a, -b, -c）

DMDにおける各isoenzyme値と年齢との関係を調べたが，図2-a, -b, -cに示した如く，CK-MMだけでなく，CK-MB, CK-BBも年齢とともに下降傾向を認めた．

3）各isoenzyme値とCA-III値との相関関係

CA-IIIとtotal CK（MM+MB+BB）との相関

＊名古屋大学医学部神経内科
＊＊藤田学園保健衛生大学医学部神経内科
＊＊＊愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所生化学部門

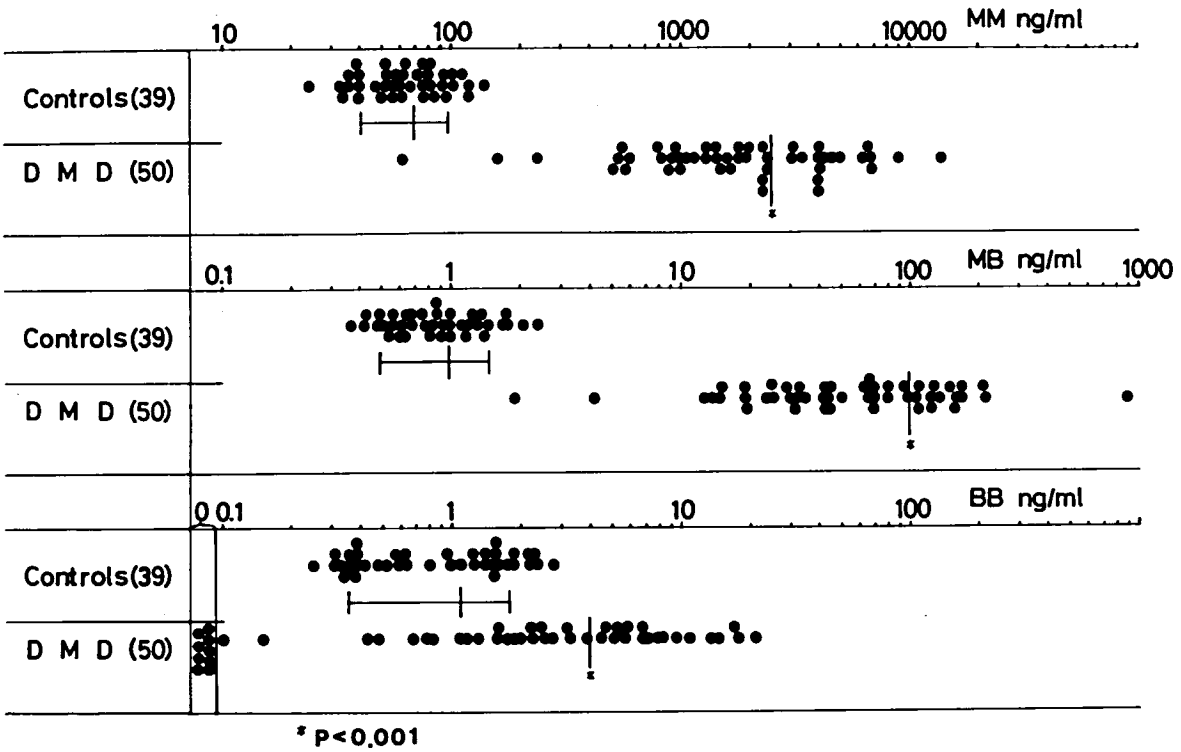
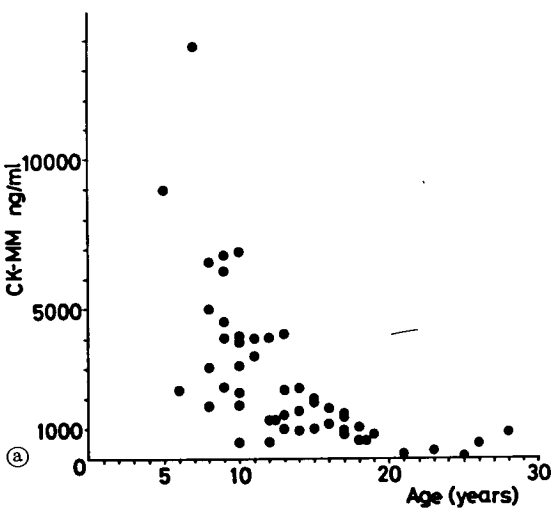
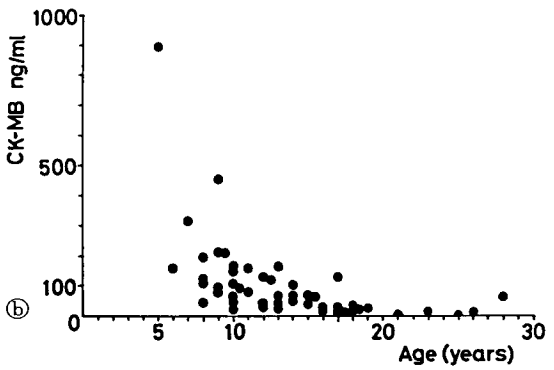


図1　DMD 患者および control 群における血清 CK isoenzymes（CK-MM, -MB, -BB）値





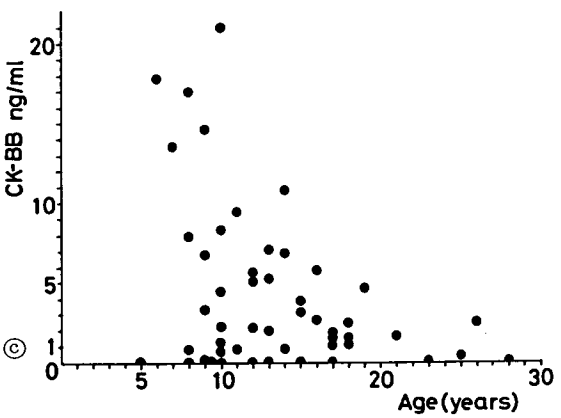


図2-a, -b, -c　DMD 患者における血清 CK isoenzyme 値と年齢との関係
2-a（CK-MM），2-b（CK-MB），2-c（CK-BB）．

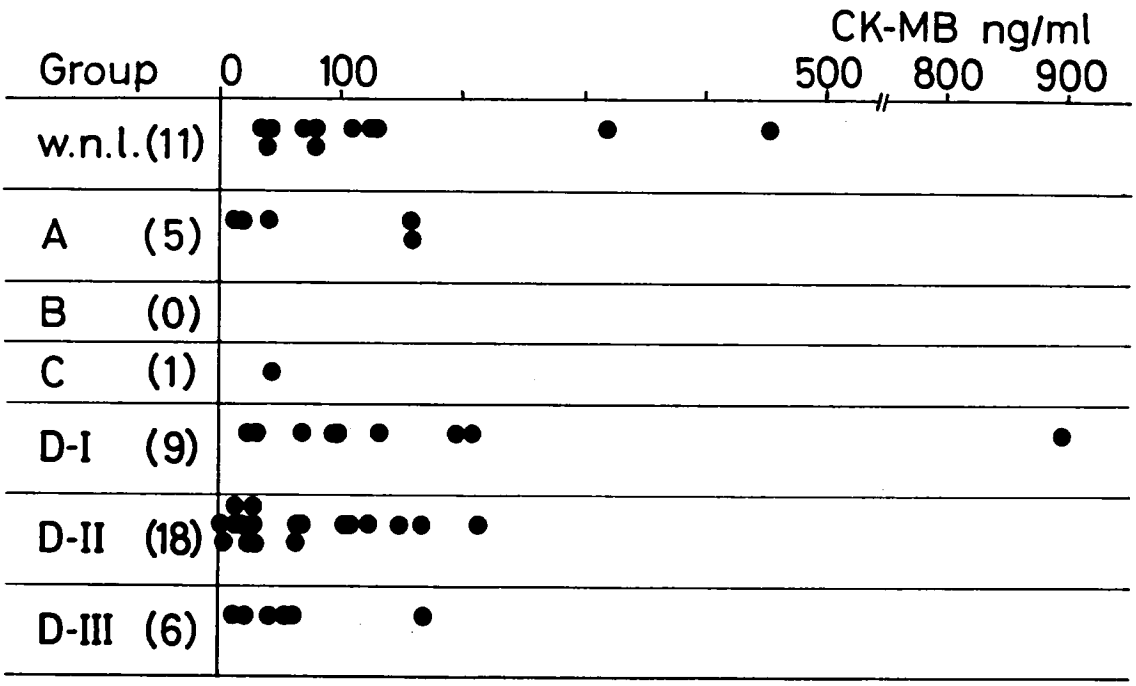


図3　DMD 患者における血清 CK-MB 値と心電図所見との関係

係数は，0.4925（P<0.001, Y=4.517X+954.6）であった．各 isoenzyme との相関係数は，CK-MM（γ=0.4786, P<0.001, Y=4.234X+960.3），CK-MB（γ=0.5711, P<0.001, Y=0.2765X−7.136）と，この両者では，total CK の場合とほぼ同様であったが，CK-BB（γ=0.3485, P<0.05, Y=0.006098X+1.721）ではやや低かった．

4）CK-MB 値と心電図所見との関係（図3）

DMD 患者における CK-MB 値と心電図所見とを比較検討した．

まず，DMD 患者を心電図所見から，Gilroy らの分類に従い以下の各グループに分けた．

正常（w.n.l.）群：特に異常所見の認められないもの，A 群：異常 R 波（V.R>1mV）のみられるもの，B 群：不完全右脚ブロック（IRBBB）あるいは右室肥大（RVH）に異常 R 波を伴うもの，C 群：IRBBB あるいは RVH を伴うもの，D 群は，心筋障害の所見（Q 波，異常 T 波の出現など）を呈するもので，その程度により，軽度（DI），中等度（D II），高度（D III）に分けた．各群の CK-MB 値は，w.n.l.群（n=11）135.12±131.49（mean±SD）ng/ml，A 群（n=5）78.62±74.04ng/ml，B 群（n=0），C 群（n=1）45.6 ng/ml，D I（n=9）195.23±270.66ng/ml，D II（n=18）69.52±62.87ng/ml，D III（n=6）60.67±56.56ng/ml であった．これら各群の値は，推計学的に有意な差は認められなかった．

考　　察

DMD 患者の血清中に CK-MB が高率に出現することは，Van Der Veen の報告以来数多くみられる．その出現率は，報告により異なり，Cao らの35%から，Somer ら，Goedde らの100%まで様々である．一方，これらの報告の中で正常者の血清 MB については明らかではなく，Somer らが，152例の control 者の 2 例に MB を認めたとしている他，おおよそ正常には検出されないと述べられている．

さて，本研究では，従来の CK isoenzymes の

測定法とは異なる高感度EIA法で検討を行った．その結果，CK-MBは，正常者にも存在することが明らかとなった．また，DMDでは，多数に異常値を認め，その異常率は98%であり，従来の結果とほぼ同じである．さらに，DMDのMB値は，CKのほとんどを占めるCK-MMと同様に，年齢とともに下降傾向を示し，Silvermannら，Takahashiらの結果を裏付けるものである．

この血清MB値の由来については，骨格筋か心筋か議論のあるところである．我々もこの点について検討したが，CK-MBは，骨格筋に特異的に存在するCA-IIIの血清値と有意の相関を示し，またMB値と心電図所見とは明らかな関係がみられなかった．これらの結果からも，血清CK-MBの主たる由来は骨格筋と考えた方が良いと思われる．

ところで，DMD血清中のCK-BBの存在についての報告は少ない．Takahashiらは，DMD51例中3例の血清にCK-BBを認めたとしている．今回の結果では，異常値は，50例中22例と高率に認めており，この異常率の違いは測定法によるものと思われる．血清CK-BBの由来については，Takahashiらは，DMDの進行例では，平滑筋臓器，神経組織などもある程度障害されることから，これらの組織由来である可能性を示唆している．しかしながら，今回の結果では，CK-BBは，CK-MM，-MBと同様進行例よりも若年者で高い値を示している．また，CK-BBはDMD患者の筋組織中，あるいは再生筋線維にも認められている事実も考え合わせると，血清CK-BBの主たる由来は，骨格筋ではないかと推定されるが，今後更に検討が必要であると考えられる．

文　献

1) Van Der Veen KJ, Willerbrands AF: Isoenzymes of creatine phosphokinase in tissue extracts and in normal and pathological sera. Clin Chim Acta 13: 312, 1966.

2) Cao A, De Virgillis S et al: Serum and muscle creatine kinase isoenzymes and serum aspartate aminotransferase isoenzymes in progressive muscular dystrophy, Enzyme 12: 49, 1971.

3) Somer H, Dubowitz V et al: Creatine kinase isoenzymes in neuromuscular diseases, J Neurol Sci 29: 129, 1976.

4) Silverman LM, Mendell JR et al: Significance of creatine phosphokinase isoenzymes in Duchenne dystrophy. Neurology 26: 561, 1976.

5) Takahashi K, Shutta K et al: Serum creatine kinase isoenzymes in Duchenne muscular dystrophy. Clin Chim Acta 75: 435, 1977.

6) Goedde HW, Christ I et al: Creatine kinase isoenzyme patterns in Duchenne muscular dystrophy. Clin Gen 14: 257, 1978.

7) Nanji AA: Serum creatine kinase isoenzymes: A review. Musle Nerve 6: 83, 1983.

8) Kato K, Shimizu A et al: Highly sensitive enzyme immunoassay for human creatine kinase BB isozyme. Clin Chim Acta 150: 31, 1985.

9) Kato K, Mokuuo K: Distribution of immunoreactive carbonic anhydrase III in various human tissues determined by a sensitive enzyme immunoassay method. Clin Chim Acta 141: 169, 1984.

10) Gilroy J, Cahalan JL et al: Cardiac and pulmonary complications in Duchenne's progressive muscular dystrophy. Circulation 27: 484, 1963.

49) ジストロフィー筋(*in vitro*)よりの creatine kinaseの遊離

高 木 昭 夫*

研究協力者　小 島　進*　藤 田 武 久**
荒 木　誠**　杉 田 秀 夫**

血清 creatine kinase (CK) 活性は Duchenne 型筋ジストロフィーで著増している．また血清 CK 値は体動により影響をうけることも知られている．この CK 値増加の機序はまだ充分解明されてはいない．この問題を検討するため筋ジスハムスター長趾伸筋 (EDL) を使用して，*in vitro* における CK 遊離の実験を行った[1]．実験に使用した筋肉の収縮特性や形態的指標の分析を併せ行った．

方　法

生後3－6ヶ月の筋ジスハムスター (BIO14.1, 体重97±15g, n=10, mean±S.D.) と対照 (BIO FIB, 119±13g, n=10) を使用した．pentobarbital 麻酔下で採血し，瀉血屠殺後，EDL を無傷状態で摘出した．一部の筋標本については凍結切片の組織化学染色を行った．

CK 遊離実験には，EDL を2.0ml Krebs-Ringer 液を含む小槽にマウントし，0.5g 静止張力が生ずるよう伸展した．還流液には通常95% O_2－5% CO_2 を通気した．無酸素状態にするためには95% N_2－5% CO_2 の混合ガスを使用した．還流液は30分毎に交換し，液中の CK 活性を測定した．CK 活性は CPK activated-UV-test (Boehringer Mannheim GmbH, FRG) を使用して25℃で測定した．CK 活性の 1 unit は 1 micromole ATP formed/minute と定義した．筋ホモジェネートと血清サンプルは必要に応じて，ホモジェネート作製用溶液で稀釈した．蛋白濃度はビューレット法で測定した．Krebs-Ringer 液組成は118mM NaCl, 3.4mM KCl, 0.8mM $MgSO_4$, 1.2mM KH_2PO_4, 25mM $NaHCO_3$, 2.5mM $CaCl_2$, 11 mM glucose, 1mg/dl D-tubocurarine, 10mM reduced glutathione を含んだ．実験を通じて筋束の収縮特性をモニターした．筋束に平行に対置した白金板電極により電気刺激を行った．反復単収縮は1Hz, 30V, 10msec の矩形波パルスを使用した．張力測定はストレインゲージ (SB-1T-H, 日本光電) とレクチコーダー (RJG 4022, 同) で行った．実験終了後，筋肉は 9 倍量の溶液 (1mM EDTA, 1mM β-mercaptoethanol, 5mM Na bicarbonate) でホモジェネートを作製し，上清につき蛋白と CK 活性を定量した．データ検定には Cochran-Cox の t 検定を行った．

結　果

1．血清および筋 CK 活性など (表1)

血清 CK 活性は11,716±7,236U/L (筋ジス), 802±896 (対照) であった．動物の成長につれ血清 CK 値は筋ジスでは低下し，対照では増加傾向を呈した．EDL 湿重量は対照より筋ジスで大きい．しかし単位湿重量の可溶蛋白量には差はみとめられない．筋ジスにおいて EDL 筋の CK 全活性は対照の92%に減少していた．また EDL の発生する強縮張力は筋ジスでは低下傾向をみせたが，統計的に有意差はみとめられていない．

EDL の形態的検索によると，筋ジスは0-1.5%の壊死筋線維，2.8—26.4%の Type 2C 線維がみとめられた．対照 EDL にはこれらの変化は認め

＊虎ノ門病院神経内科
＊＊国立神経センター

表1　筋ジスハムスターと対照における血清CK，筋CKその他の比較

	Control	Dystrophic	P values**
Serum CK (units/l)	802±896 (7)*	11,716±7,236 (10)	0.001
Wet weight of EDL muscle (mg)	28.2±4.5 (15)	35.7±8.1 (20)	0.003
Soluble protein (mg/wet g)	54.3±7.3 (14)	54.3±13.8 (20)	n.s.
Muscle CK (units/g)	2,202±433 (15)	1,941±310 (19)	0.05
Tetanus tension (g/cm^2)	101±47 (9)	89±25 (10)	n.s.
Tetanus tension after 4 h (g/cm^2)	42±11 (9)	46±14 (10)	n.s.

*Means±SD, with numbers of experiments in parentheses. **Statistical significance was determined by Cochran-Cox *t*-test. n.s.: not significant

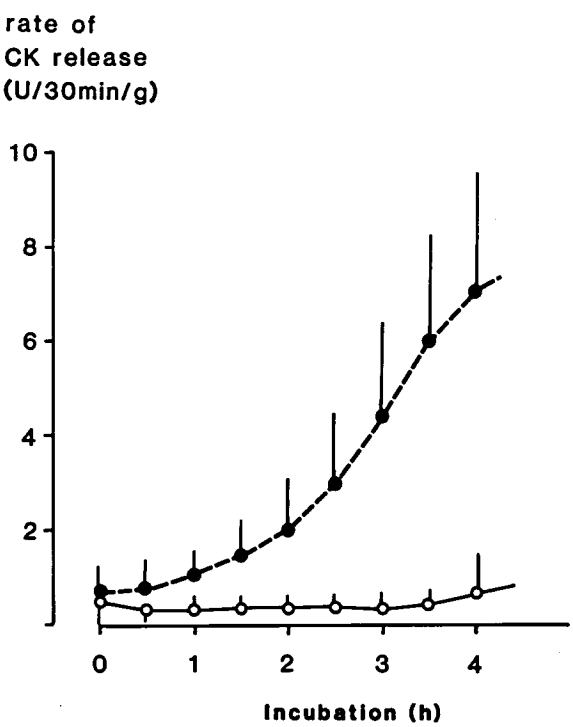


図1　静止時EDL（*in vitro*）よりのCK遊離速度．黒丸：筋ジス（n＝7），白丸：対照（n＝4），平均±S.D.

られていない．

2．EDLよりのCK遊離

まず酸素混合ガスを通気した溶液における静止筋からのCK遊離を筋ジスと対照の間で比較した（図1）．インキュベーション開始直後の1時間は

表2　無酸素状態（95%N_2－5%CO_2）によるCK遊離速度（U/g/30分）の変化

	95%O_2－5%CO_2	95%N_2－5%CO_2
対　照	0.51±0.08(8)	1.58±0.32(8) *
筋ジストロフィー	0.88±0.41(8) **	0.83±0.14(8)

*P<0.01，**P＝0.05

両者ともにCK遊離速度は大きい．1時間以降はCK遊離は著減してほぼ一定速度に戻った．各々の時点におけるCK遊離速度は対照と筋ジス間に差を認めなかった．4時間を通してのCK遊離速度の平均は，対照0.40±0.11U/g/30min（mean±S.D.，n＝8），筋ジス0.60±0.17（n＝8，P＝0.01）であり，筋ジスでCK遊離は大きかった（表2）．この状態で5時間に遊離されたCK総活性は筋肉中の0.3%（対照）と0.6%（筋ジス）に相当した．

95% N_2-5% CO_2で飽和した溶液中では，CK遊離は対照筋において0.51U/g/30minより1.58に増加した（P<0.01）．しかし筋ジスでは無酸素の影響は観察されなかった（表2）．

別の実験では，CK遊離が一定速度となってから，1Hzの単収縮を反復しCK遊離への影響を観察した．筋ジスでは単収縮開始後，CK遊離は増加しはじめた（図2）．これに対して対照筋のCK遊離は電気刺激に影響されることはなかった．4時間にわたる反復単収縮中に放出されたCK活性は対照で0.2%，筋ジスで1.5%であった．

*in vitro*における4時間の反復単収縮後の筋組織検査を行った．対照と筋ジス両者で間質浮腫がみとめられた．一部筋線維は膨化し，染色性は低下していた．このような筋線維（ghost fibers）の頻度は両者でほぼ同一であった．反復単収縮の前後において強縮張力の大きさを比較した．筋ジスでは52%に減少し，対照では42%に減少していた．この差は有意ではなかった（表1）．

考　　案

Duchenne型筋ジストロフィー患者血清でCK

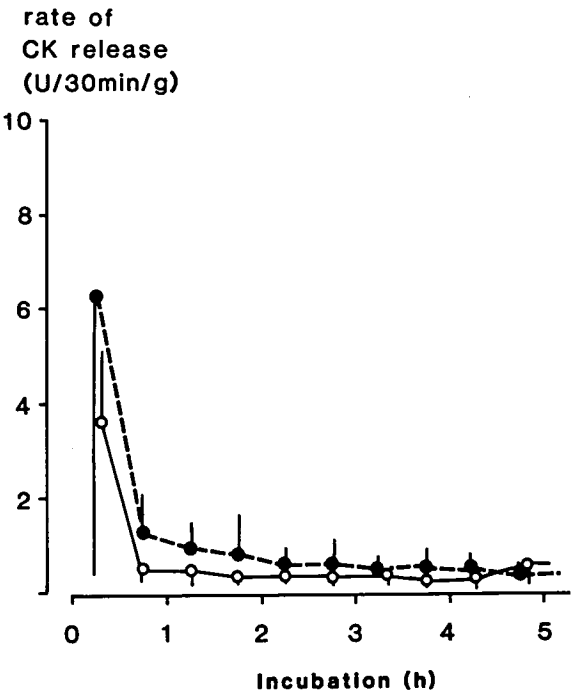


図2　反復単収縮時（1Hz）におけるEDLからのCK遊離速度.黒丸：筋ジス（n＝6），白丸：対照（n＝5）.

活性が著増することはEbashiらにより最初に報告された[2]．このCK増加の機序として，（i）壊死筋線維の破綻した筋膜を通して酵素が血中に流出してくる．（ii）筋表面膜異常のため活動中の筋細胞より酵素が濾出してくる（leaky membrane theory）などの仮説がいわれている[3]．"leaky membrane"説の立場から，aldolase, lactate dehydrogenase, CKなどの酵素の骨格筋からの流出が従来より問題とされてきた．Suarez-KurtzとEastwoodは正常カエル足趾筋から一定速度のCK遊離が生じること，CK遊離速度は筋標本の大きさに依存することなどを明らかにした[4]．無酸素状態，代謝阻害剤，Caイオン，表面活性剤，脱分極などが酵素流出に大きく影響した．また脱神経筋やジストロフィー筋で酵素遊離の増加が観察された（文献1を参照）．

今回の筋ジスハムスターEDLを使用した実験において，静止時CK遊離は対照と同一かあるいはわずかに大きい程度であった．しかし反復単収縮により筋ジスでのみCK遊離の著明な増加をみとめた．mdxマウスEDLを使用した実験において，同様な結果を得ている（未発表）．無酸素状態は対照筋にのみ影響を与え，CK遊離は約3倍に増加した．筋ジスは無酸素の影響をうけなかった．この理由は不明であるが，エネルギー代謝系の相違を反映するのかもしれない．

単収縮を反復する時，何故筋ジスからのみ著明なCK遊離が生ずるのであろうか？　筋ジスEDLには0—1.5%の壊死線維が存在する．しかしCK遊離の時間経過からみて，既存の壊死線維からのみに由来するとは考えにくいであろう．反復単収縮後の形態検査あるいは強縮張力の推移から判断して，筋ジスEDLがより破壊されやすいとはいいにくい．このような状況から，CK活性は形態的に異常のない活動性を有する筋線維に由来するものと推定している．この機序として，（i）筋線維の幼若性，（ii）ATP供給障害などを考慮している．まず筋ジスEDLは最大26%に達するtype 2 Cすなわち分化途上の再生線維を含んでいる．幼若筋では膜透過性が相違し，CK遊離が生じ易い可能性があろう．これは検証の必要がある．成熟筋ではMM型CKはM帯近傍に結合して分布するといわれる[5]．幼若筋ではCK分布が異なり動員されやすいのかもしれない．猫下肢筋からのCK遊離は運動負荷により筋内ATP含量低下した状態で増加した[6]．また低酸素のためATPとクレアチン燐酸の低下したモルモット心筋において，CK遊離は増加した[7]．このようにCK遊離は細胞内ATP減少により増加してくる．筋ジスにも同様な機序の関与が推定されよう．ただ，筋糖原病やミトコンドリアミオパチーではATP低下が予想されるが，病像は筋ジスとははっきり異なっている．したがってATP濃度の関与は少ないかもしれない．

結　　論

筋ジストロフィーハムスターと対照のEDLを使用して，*in vitro*でのCK遊離速度を測定した．両者において静止筋からのCK遊離は，摘出後1

時間以内に著明に減少し，その後4時間は一定の遊離速度を呈した．各々時点におけるCK遊離速度は両者間に差をみとめない．電気刺激による反復単収縮の状態では，筋ジスにおいてのみCK遊離は著明に増加した．このCK遊離の増加は，活動する筋細胞に由来すると推定された．

文　献

1) Takagi A, Ikai T, Fujita T, Sugita H : Release of creatine kinase in vitro from extensor digitorum longus muscle of the dystrophic hamster. Biomed Res 5 : 311-316, 1984.

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

3) Rowland LP : Biochemistry of muscle membranes in Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve 3 : 3-20, 1980.

4) Suarez-Kurtz G, Eastwood AB : Release of sarcoplasmic enzymes from frog skeletal muscle, Amer J Physiol 241 : c98-c105, 1981.

5) Eppenberger HM : Expression of the muscle-specific isoprotein form of creatine kinase, In "Neuromuscular Diseases (ed. Serratrice G.) Raven Press, New York, pp5-8, 1984.

6) Thomson WHS, Sweetin JC, Hamilton IJD : ATP and muscle enzyme efflux after physical exertion, Clin. Chim Acta 59 : 241-245, 1975.

7) Gebhard MM, Denkhaus H, Sakai K, Spieckermann PG : Energy metabolism and enzyme release, J Mol Med 2 : 271-283, 1977.

50) 骨格筋における Ca^{++} paradox について

高　守　正　治*

研究協力者　橋　井　美奈子*　井　手　芳　彦*

目　的

膜異常，細胞内過剰カルシウムが原因となり展開する病態とジストロフィー筋との類似性が論じられ，カルシウムを中心とした本病々因論[1]が注目されてから久しい．しかしながら細胞内へカルシウムが過剰に入る最初の引き金については多くの議論がある[2]．本報では，心筋で知られている Ca^{++} paradox すなわち，筋細胞を囲む外液の Ca^{++} 濃度を free から正常へ戻す時，非生理的に Ca^{++} が細胞内へ多量に流入し著明な心筋障害が出現する現象[3]が骨格筋でも起こりうるかを検討し，またこのイオン流入の機序につき考察を加えた．

方　法

ウイスター系雄ラット（250～300g）の横隔膜筋をとり出し，ガス（O_2：CO_2＝95：5）負荷，36～37℃の一定温下，クラーレ10γ/ml を含む Ringer 液（122mM NaCl, 4.7mM KCl, 15.5 mM $NaHCO_3$, 1.2mM $MgCl_2$, 1.2mM KH_2PO_4, 2.6mM $CaCl_2$, 11.5mM glucose）で灌流しつつ，等尺性筋張力計にセット，白金板電極による刺激で単収縮 Pt，強縮張力 Po を記録した．ひきつづき，5つの方法（図1），すなわち1）Ca^{++}-free Ringer 液（OCPC 法で Ca0.0 mg/dl を確認）灌流を15分間行なった後，正常 Ringer 液に戻す処理，2）Ca^{++}-free Ringer 液灌

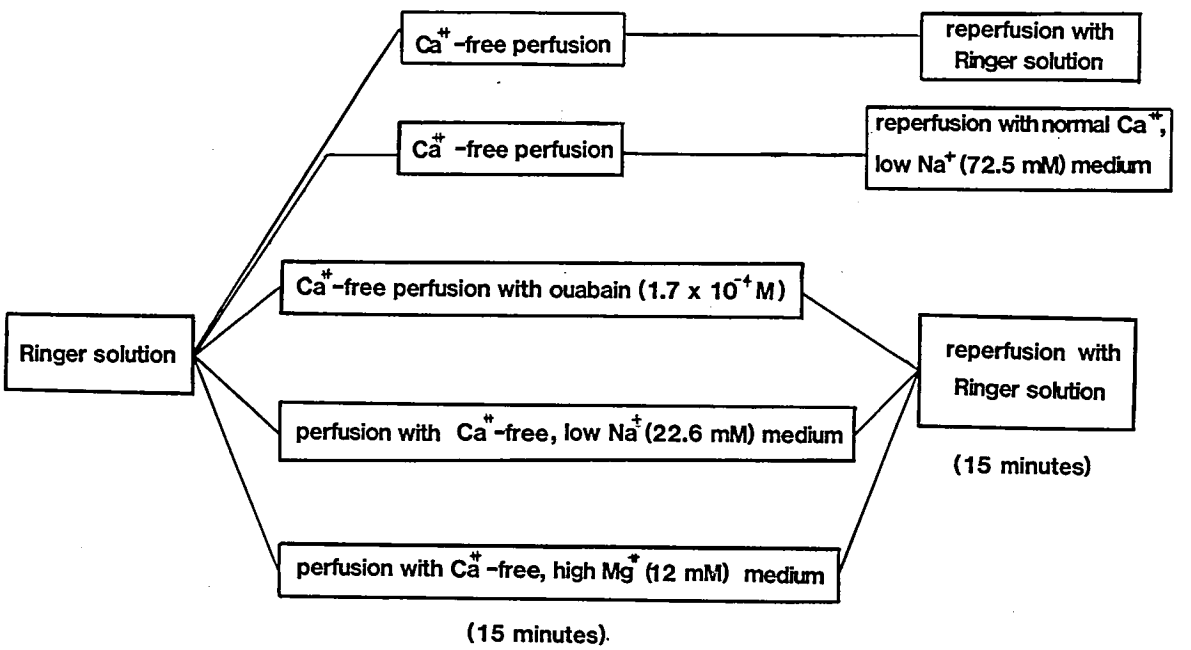


図1

＊金沢大学医学部神経内科

流15分後 low Na^+ (72.5mM) Ringer 液(浸透圧補正のため Sucrose で置換)に戻す処理, 3) Ouabain1.7×10^{-4}M を添加した Ca^{++}-free Ringer 液灌流15分後, 正常 Ringer 液で再灌流する処理, 4) Ca^{++}-free, low Na^+ (22.6mM) Ringer 液 (Sucrose で置換) 灌流15分後, 正常 Ringer 液で再灌流する処理, 5) Ca^{++}-free, high Mg^{++} (12mM) Ringer 液灌流15分後, 正常 Ringer 液で再灌流する処理を行ない, いずれも再灌流15分後に単収縮 Pt, 強縮張力 Po を記録, 諸処理前の Pt, Po に対する割合を算出した. また, 細胞内電極法を用い, 横隔膜筋の直接刺激による誘発筋活動電位及び静止膜電位を, 処理前, Ca^{++}-free 溶液灌流中, Ringer 液再灌流後でそれぞれ記録した.

細胞内イオン濃度は Ouabain1.7×10^{-4}M 添加 Ca^{++}-free 溶液で灌流, 正常 Ringer 液で再灌流した処理筋を, 硝酸・硫酸で加水分解し, 600℃にて乾式灰化後, 塩酸を加え乾固, ついで硝酸溶液で溶解し, ion chromatography にて測定し, dry weight あたりの Ca^{++}, Na^+, K^+, Mg^{++} content を算出, 正常 Ringer 液で30分間灌流した対照筋のそれと対比した.

結　　果

Ca^{++}-free 溶液灌流後, 正常 Ringer 液で再灌流した処理筋では, 単収縮 (Pt), 強縮張力 (Po) 共に低下がみられた (図2). 活動電位は Ca^{++}-free 溶液灌流中, 振幅の低下, 持続時間の延長がみられ, 静止膜電位は処理前平均−77mV から Ca^{++}-free 溶液灌流中には平均−55mV と脱分極を示し, Ringer 液再灌流後は一時, 平均−82mV とやや過分極に傾いた (図2).

条件を変えた他の4つの処理について, Ca^{++}-free 溶液灌流後 low Na^+ Ringer 液で再灌流した処理, 及び Ouabain 添加 Ca^{++}-free 溶液灌流後正常 Ringer 液で再灌流した処理では, 張力の低下は一層著明となったが, Ca^{++}-free・low Na^+ Ringer 液灌流及び, Ca^{++}-free・high Mg^{++} 溶液灌流の後, 正常リンゲル液で再灌流した場合の張力低下は, Ca^{++}-free 溶液処理のみの場合と比べて有意な差は得られなかった(図3). 各結果をまとめて表1に示す.

筋細胞内イオン濃度は, paradox 処理筋で Ca^{++}・Na^+ の増加, K^+ の低下が認められた (表2).

考　　察

Ca^{++} paradox は1966年 Zimmermann らにより報告され[3], 以後細胞内過剰カルシウムによる心筋障害のメカニズム解明のため多くの研究がされてきた. Ca^{++} paradox により心筋収縮の消失がみられる[4]他, creatine phosphate や ATP の減少[5], 基底膜の破壊をはじめとする形態学的変化[6], 筋小胞体・ミトコンドリアの Ca^{++} uptake 増加[7]等の所見がみとめられる. 骨格筋における Ca^{++} paradox については1983年 Carpenter & Karpati の報告[8]があり, EDTA を加えた Ca^{++}-free 溶液灌流により, 基底膜剥離・組織壊死等の形態学的変化をみとめているが, 用いた Chelating agent の量は121mM と極めて大きかった. ラット横隔膜筋を用いた我々の実験結果は, Ca^{++} paradox が骨格筋でも起こりうることを示すとともに, 低 Na^+ での再灌流やウアバインで膜を脱分極させることにより, この現象は一層著明となること, 本現象は細胞内 Ca^{++} の増加を伴っていること, Ca^{++}-free 溶液に Na^+ 低下, 或いは Mg^{++} 増加処理を加えても, この現象を阻止しえなかったことを示した (図2, 3; 表1, 2).

Ca^{++} paradox で Ca^{++}が細胞内へ過剰に流入する機序について, 心筋では Na^+-Ca^{++} 交換輸送系を介する説, slow channel theory, Ca-K 交換説, 単純拡散説等がいわれている[9]が, 最も有力なのは Na^+-Ca^{++} 交換輸送系を介する説である. すなわち, Ca^{++}-free 溶液灌流時には$[Na^+]_o-[Ca^{2+}]_i$ 交換系を介するか, 或いは Ca^{++} channel を Na^+ が通ることにより細胞内 Na^+ 濃度が高まり, ついで正常 Ringer 液に戻すと, Na^+-Ca^{++} 交換輸送系を介して Na^+ は細胞外へ出, Ca^{++} が細胞内に多量に流入するという考え方である. この Na^+-Ca^{++} 交換輸送系の関与を間接的に確かめる方法として, Ca^{++}-free 溶液灌流時に $[Na^+]_i$ を増加[10], 或いは減少させたり[5], Na^+-Ca^{++} 交換輸送

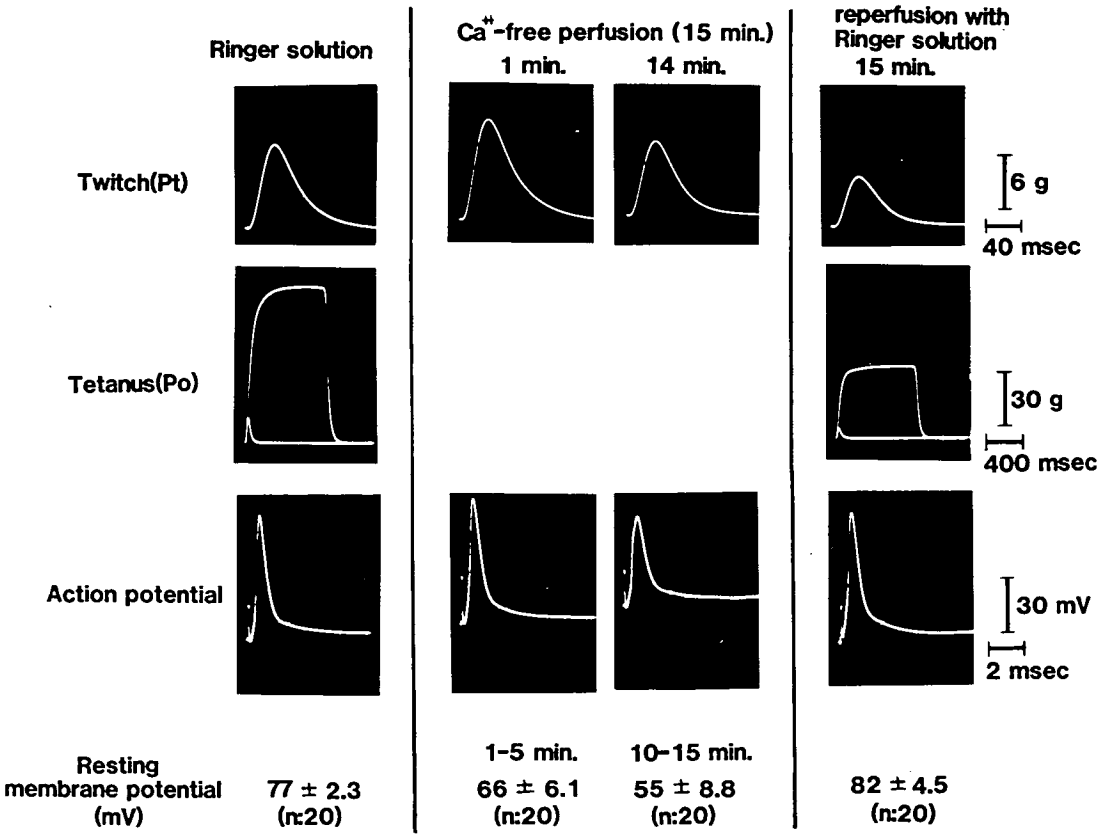


図 2

系の担体を介して Ca^{++} と拮抗的にとりこまれる Mg^{++}[11] を加える操作，Ringer 液再灌流時に〔Na^{+}〕$_{o}$ を減少させる操作[4] などがある．骨格筋を用いたわれわれの実験では，Ca^{++}-free 溶液灌流中 Ouabain を添加したり，Ringer 液再灌流時に low Na^{+} 処理を加えることにより本現象が更に著明となった事実は，骨格筋 Ca^{++} paradox でも Na^{+}-Ca^{++} 交換輸送系が関与していることを示唆したが，Ca^{++}-free 溶液灌流中 low Na^{+}, high Mg^{++}処理を加えても影響をうけなかった点は，本現象の全てを Na^{+}-Ca^{++} 交換輸送系で説明できないことを示唆した．

Duchenne muscular dystrophy (DMD) では細胞内カルシウム増加[12] と共に膜は脱分極に傾いており[13]，また超微形態異常がみとめられない時期にすでに Na potential の変化がみられる[13] との報告もあるので，本症の細胞内カルシウム増加には膜の ion transport も関与していることが示唆される．従って，Ca^{++} paradox の研究は，膜の機能の面から，DMD の病態を解釈する糸口として有用であろう．

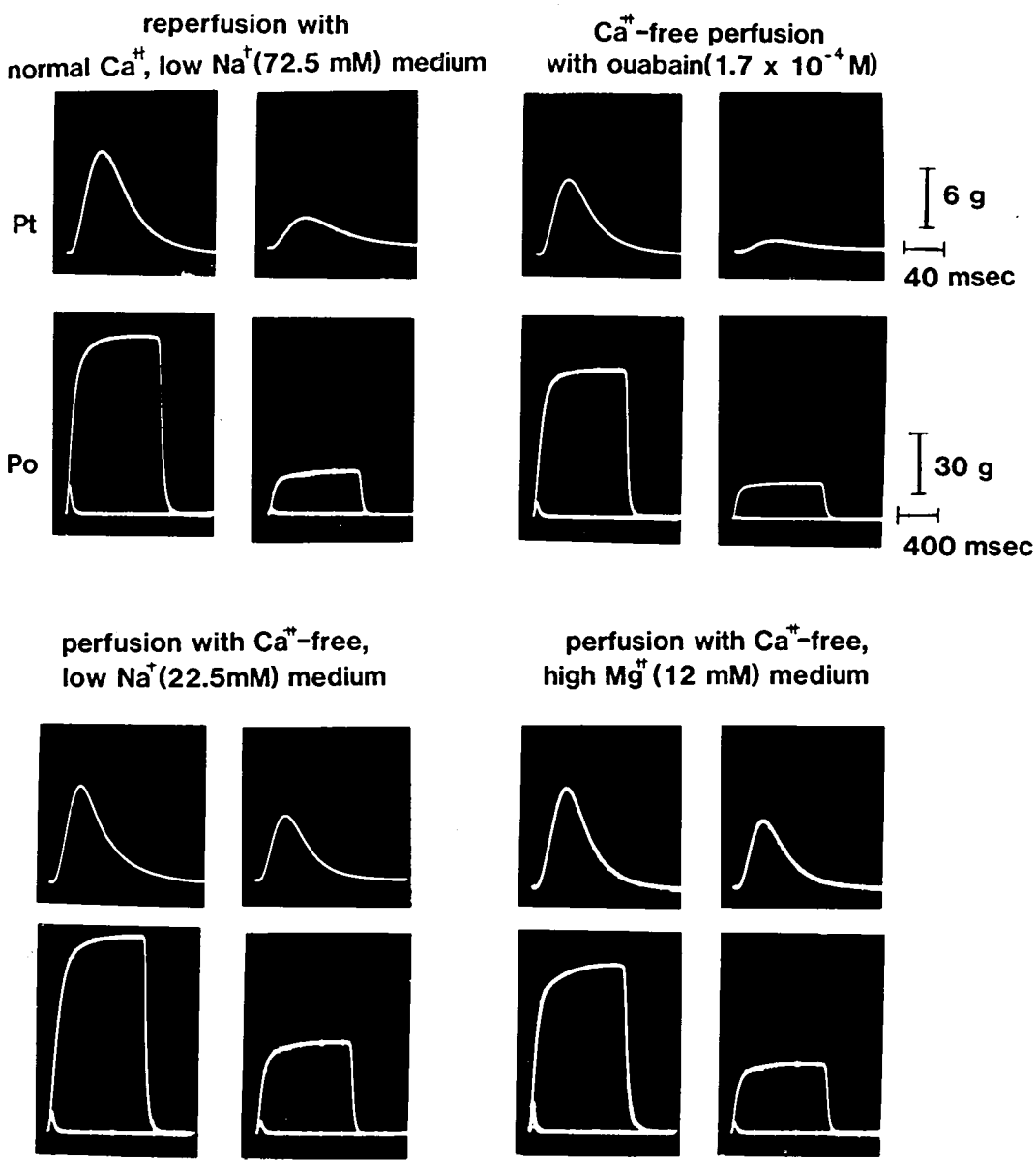

reperfusion with
normal Ca++, low Na+(72.5 mM) medium
Ca++-free perfusion
with ouabain(1.7 x 10-4 M)
Pt
Po
6 g
40 msec
30 g
400 msec
perfusion with Ca++-free,
low Na+(22.5mM) medium
perfusion with Ca++-free,
high Mg++ (12 mM) medium

図 3

表 1

	Pt	Po	
Ca^{++}-free perfusion	63 ± 11 %	61 ± 8 %	(n :12)
Ca^{++}-free perfusion → reperfusion with normal Ca^{++}, low Na^{+} (72.5 mM) medium	33 ± 12 %	34 ± 13 %	(n : 7)
Ca^{++}-free perfusion with ouabain (1.7×10^{-4} M)	21 ± 8 %	27 ± 2 %	(n :5)
perfusion with Ca^{++}-free, low Na^{+} (22.6 mM) medium	65 ± 4 %	67 ± 12 %	(n :5)
perfusion with Ca^{++}-free, high Mg^{++} (12 mM) medium	65 ± 12 %	67 ± 6 %	(n : 5)

(Mean ± S.D.)

表 2　Lon content in muscle (umoles/g of dry weight)

	Ca	Na	K	Mg
Control (n : 11)	5 ± 0.3	102 ± 13	320 ± 11	32 ± 4
Ca paradox (n : 3)	13 ± 1	155 ± 27	208 ± 16	38 ± 2
	↑	↑	↓	≒

結　　語

心筋で知られている Ca^{++} paradox 現象が，骨格筋でも起こりうることを，ラット横隔膜筋を用い，*in vitro* で生理学指標で証明するとともに，これが細胞内 Ca^{++} 濃度増加を伴うことを ion chromatography で明らかにした．ジストロフィー筋類似の病態成立にかかわる膜の生理につき，Na^{+}-Ca^{++} 交換輸送系を中心に考察を加えた．

文　　献

1) Bodensteiner JP & Engel AG: Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies.: A study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. Neurology (NY) 28: 439, 1978.

2) Sagawa F, Gergely J: Biochemistry of muscle and of muscle disorders. In Siegel GJ

et al (eds) : Basic Neurochemistry, 3 rd ed, Little Brown : Boston, 1981, pp. 529-561.

3) Zimmerman ANE & Hulsmann WC : Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes in the isolated rat heart. Nature 211 : 646, 1966.

4) Alto LE & Dhalla NS : Myocardial cation contents during induction of calcium paradox. Am. J. Physiol. 237 : H713, 1979.

5) Uemura S et al : Low sodium attenuation of the calcium paradox in the newborn rabbit myocardium. Am. J. Physiol. 248 : H 345, 1985.

6) Elz JS & Nayler WG : Ultrastructural damage associated with the calcium paradox. Am. J. Pathol. 117 : 131, 1984.

7) Dhalla NS et al : Role of Na^{+}-Ca^{++} exchange in the development of cardiac abnormalities due to calcium paradox. European Heart J. 4(Suppl. H) : 51, 1983.

8) Carpenter S & Karpati G : Calcium paradox in skeletal muscle. Neurol. 34(Suppl. 1), 1984.

9) Grinwald PM & Nayler WG : Calcium entry in the Calcium paradox. J of mol. Cell. Cardiol. 13 : 867, 1981.

10) Ruaño-Arroyo G et al : Calcium paradox in the heart is modulated by cell sodium during the calcium-free period. J. mol. Cell. Cardiol. 16 : 783, 1984.

11) 若林繁夫・五島喜与太：Na^{+}-Ca^{++} 交換輸送系とその生理的役割り．蛋白質・核酸・酵素，26：2055，1981.

12) Jackson MJ et al : Measurement of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with muscular dystrophy. Clinica Chimica Acta. 147 : 215, 1985.

13) Kerr LM & Sperelakis N : Membrane alterations in skeletal muscle fibers of dystrophic mice. Muscle Nerve 6 : 3, 1983.

51) 骨格筋細胞内のelemental composition 特にカルシウムイオンの動きについて

吉 岡 利 忠*

緒　言

骨格筋の興奮収縮連関における筋細胞内のイオン動態を直接測定し分析することは，正常，異常，病的条件にかかわらずそれらのメカニズム解明に大きく寄与するものである．生物細胞に存在する重要なイオンは，Na，Mg，P，S，Cl，K および Ca であるが，このなかで Ca イオンが収縮機構に最も重要であり，これまで Ca 電極法[6]，発光蛋白である Aequorin のシグナル[1]，Ca 感受性色素である Quin 2[12] や Arsenazo III[8] の吸光度変化によって測定され収縮との関連について述べられている．電子プローブ微量分析法を用いた場合，全てのイオンを同時に分析することが可能である[7]．この方法を用いてカフェイン拘縮，キニーネ拘縮の筋細胞内イオン環境を測定し，病的筋細胞内イオン分析への応用についてその可能性を考察することを目的とした．

実験方法

アメリカ産のカエル Rana pipiens の半腱様筋から20～30本の筋束を得て正常リンゲル液に浸漬し冷蔵庫内で数時間放置した．損傷した筋束や電気刺激に対して弱い反応を示すものを除いた．多くの場合右側の筋束をコントロール，他側を実験筋とした．またウィスター系ラット（体重100g 程度）の長趾伸筋（EDL）やヒラメ筋（SOL）も使用した．カフェイン，塩酸キニーネは正常リンゲル液で種々の濃度の溶液を作成した．数例において瞬時凍結時（後述）に細胞内の氷結晶を少なくするために 4％ BSA（ウシ血清アルブミン）が加えられた．筋束は一側の腱を固定し，他側は張力測定用歪計（シンコー社）に接続し，電気刺激はフィールド方式を用いた．単一収縮と強縮張力を記録し，筋束の凍結には Somlyo ら[9] によって開発された方法を用いた．すなわちテフロン製のビーカーにフレオン22液を約200ml 入れ，液体窒素の入った容器に置く．ビーカー中にはスターラーがあり攪拌することができる．フレオンの温度は連続的にモニターされ，－165±5℃に冷却されたときにビーカーを80-100cm/秒の速さで shoot-up させ筋束を凍結させた．図 1 には5mM カフェイン拘続中の張力の経過が示されている．この拘縮曲線は 2 ～ 3 のピークを持つ．キニーネ拘縮でもほぼ同様の傾向が示された．凍結された筋試料

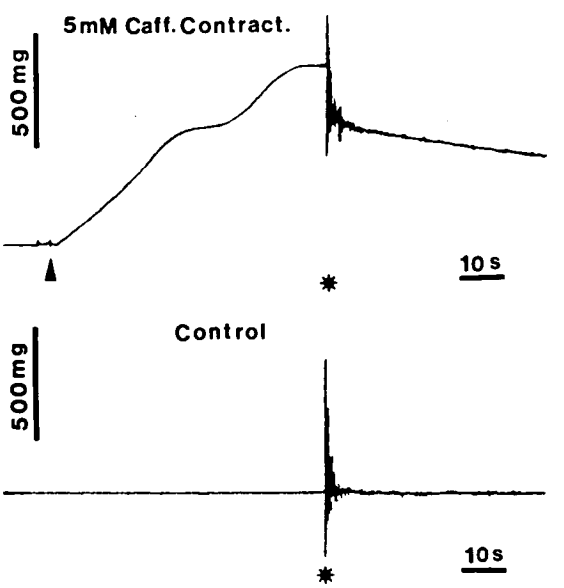


図 1　5mM カフェイン拘縮曲線（上のトレース）．瞬時凍結は星印のところで行なわれた．

＊東海大学医学部生理学教室

は超薄凍結切片が得られ（LKB社），真空乾燥後，定量分析を行なった．Philips EM400の電子顕微鏡が使用され，Kevex Si (Li) および Tracor Northern 社の X 線検出器より得られたスペクトルはコンピュータで数値化された[7]．測定された元素は Na, Mg, P, S, Cl, K および Ca であり m mole/kg dry weight で示した．

実験結果

5mM カフェイン拘縮の張力は強縮の60—80%であり，1.5mM 以下のカフェイン濃度では拘縮を生じなかった．約1分後にカフェイン拘縮張力の最大値が得られることから，5mM の濃度が選ばれた．フレオン液の shoot-up 後の細いドリフトは筋束を保持しているタングステン線から生じたものである（図1）．図2には無染色の凍結超薄切片から得られた電子顕微鏡写真が示されている．凍結状態がよく氷の結晶がみられない部位は，通常フレオンと接触した表面から10μm 以下である．規則正しい筋節がみられ，ミトコンドリアは電子密度が高い（図2，A）．両棲類の筋線維であることから筋小胞体（SR）の終槽（TC）は，Z 帯を挟んで両側に存在し，電子密度が高い．カフェイン拘縮中では，不規則な筋節像が過伸展あるいは超収縮された状態で示される（図2，B）．ミトコンドリア像は静止状態のものと同じである．これらの形態的特徴は，通常の電子顕微鏡像と極めてよく似ている．しかし筋原線維の太・細フィラメントは不明瞭であった．拘縮中のものでは，筋節中の A 帯の位置にバラツキが生じている．これはカリウム拘縮[3]やキニーネ拘縮にもみられる．

電子プローブ分析から得られた各元素のスペクトルの1例を図3に示す．TC の Ca のピークはカフェイン拘縮で著しく減少しており（図3，2），Mg 量は増加している．ミトコンドリアでは拘縮後に微量な Ca 量の増加がみられるが（図3，4），数値化することによりその変化がより明らかになった．静止状態[13]，1.2秒間の強縮[10]，5mM カフェイン拘縮1分後[13]，5mM キニーネ拘縮3分後の細胞と細胞内小器官の元素分析の結果は表1に示されている．静止状態の TC 中の Ca 量は110—120mmole/kg dry weight であるが，強縮では48，カフェイン拘縮では40，キニーネ拘縮では34と60—70%の Ca が遊離された（表1の“＊”印）．また TC には強縮や拘縮後に Mg 量，K 量の増加がみられた（表1の“＊＊”印）．P を除いて Na, S, Cl については大きな変動は認められない．ミトコンドリアは一般に静止状態での Ca 量はほとんどゼロであるが，カフェイン拘縮後にはかなりの量の Ca を取り込み，キニーネ拘縮でもその傾向がみられた（表1）．核やミトコンドリアを除いた筋細胞内元素の分布は，それぞれの条件下でも大きな変動は認められなかった．

ラットの EDL 筋静止状態の元素分析の結果は表2に示されているが，TC 中の Ca 量は両棲類の場合と比較すると約半量であった．他の元素ではほとんど同じ量が結果として示された．

考　　察

カエル骨格筋細胞では強縮[10]，カフェイン拘縮[13]およびキニーネ拘縮で筋小胞体から60%以上のカルシウムが遊離された．このことは今回の電子プローブ微量分析結果がこれまでの報告[2]を支持するものである．カルシウムが遊離すると同時に，筋小胞体には Mg や K の取り込みがみられた．これは強縮や拘縮後にみられる特徴であり，カルシウム遊離機構が筋小胞体膜のチャンネルを介して行なわれるとすれば，Ca および Mg は同じチャンネルを介して遊離あるいは取り込みが行なわれるものと考えられる．TC と同時に分析した I 帯の Ca 量から，遊離した Ca はトロポニンと結合し残りの多くの Ca はパルブアルブミンによって結合し[5]，カエルの場合は約1.0mM に増加する．次の結果からも上述したことが言える．すなわち静止時では I 帯で2.4mmole/kgdry weight[13]，4.5[10]，3.2であるが，強縮では8.7，カフェインでは5.7，キニーネ拘縮では7.3の結果から考察されるものである．Mg 量の回復過程では強縮後300秒で静止時にもどるが，Ca 量は0.6秒後で70%程度，2.3秒後で80%以上復帰することが TC の分析で報告されている[11]．しかしカフェイン拘縮後，キニーネ拘縮後の時間的経過について

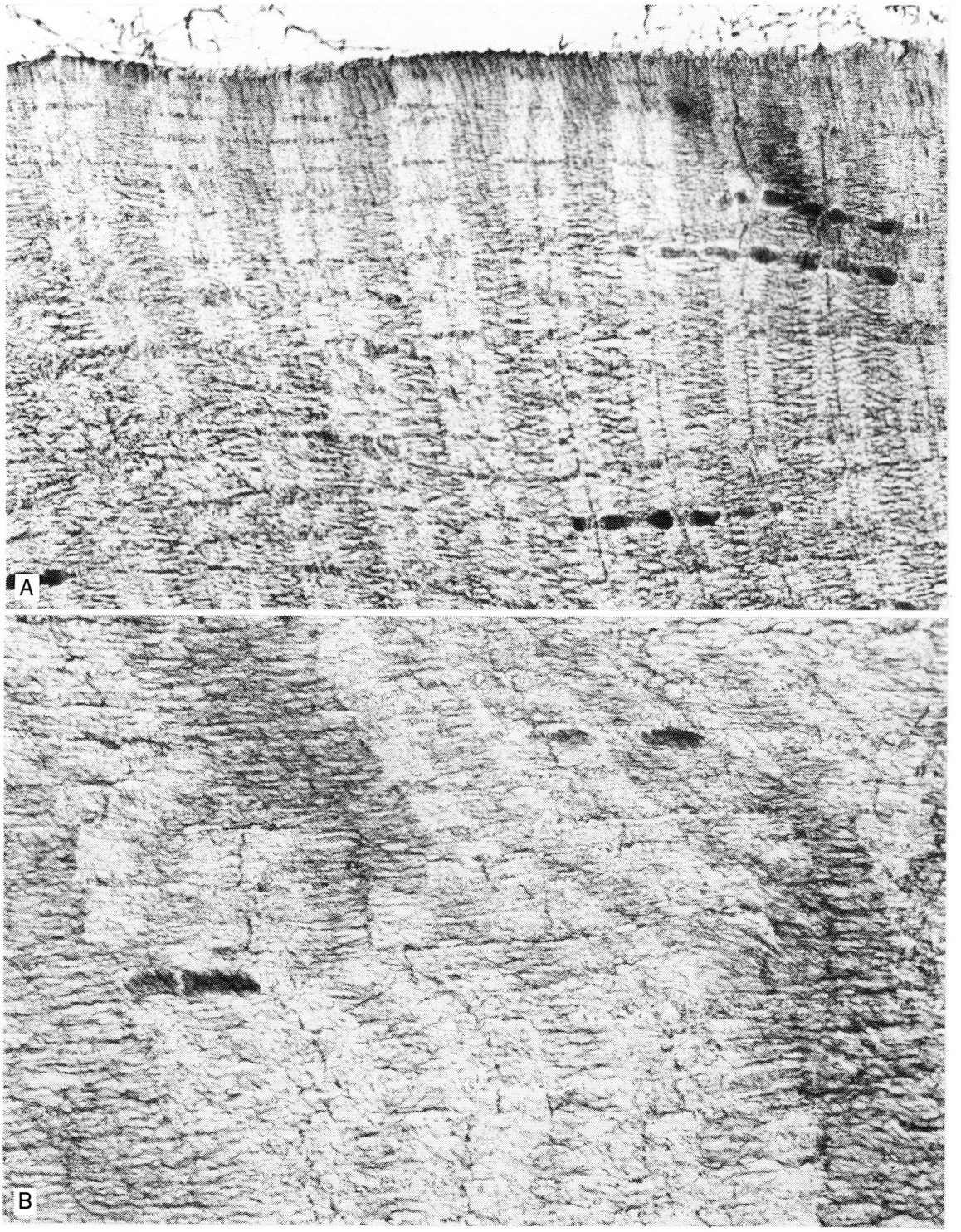


図2　凍結超薄無染色標本の電子顕微鏡，静止状態(A)，5mM カフェイン拘縮1分後(B)．倍率A：6,200×，B：7,700×

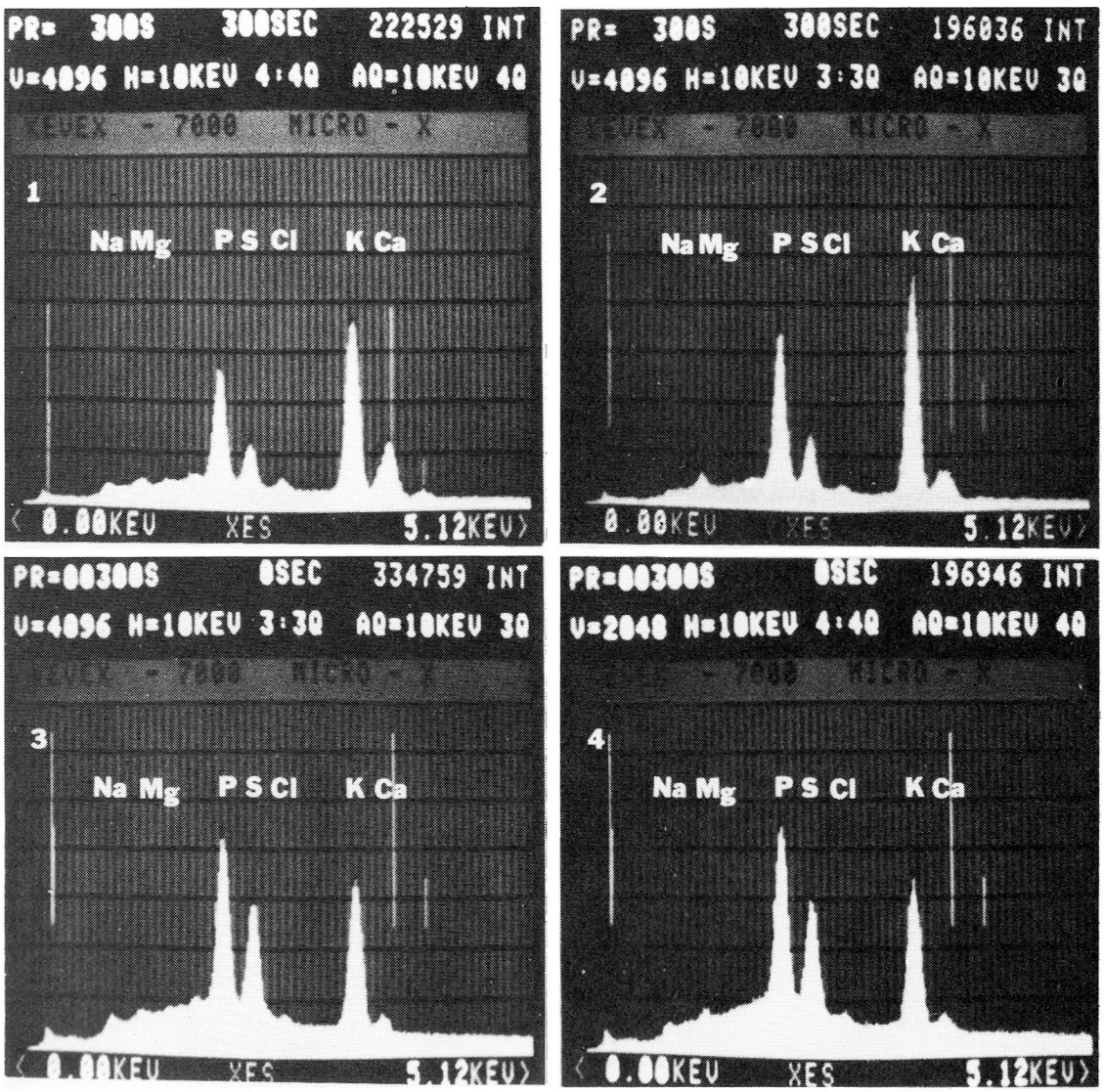


図3　筋小胞体（1，2）およびミトコンドリア（3，4）から得られる各元素のスペクトル像．静止状態（1，3）および5mMカフェイン拘縮1分後（2，4）．

は，いまだ報告されていない．

ミトコンドリアのCa取り込みは，強縮[10]や疲労した筋[4]ではみられなかったが，カフェイン拘縮ではみられた．さらに損傷された細胞では多量のCaの取り込みが報告されている[10]．現在のところその機構は不明である．

哺乳類の筋小胞体はカエルに比較して約半量であったが，分析時の条件でビーム（電子線の）の直径がその結果に大きく影響する．EDLのTCは，凍結切片標本中その直径は小さく，ビームをその直径まで絞る必要がある．周囲に電子線が照射あるいは反射されるときには正しいTC中のイオン分布を得ることはできない．TCはA-I帯に存在し，その直径も小さく容積も少ないことから今後の分析では注意を要する．今回得られたTC中のCa量が妥当なものとすると，TCの数はカエ

表1 THE ELEMENTAL COMPOSITION OF FROG SEMITENDINOUS MUSCLE: RESTING AND DURING TETANUS[2], CAFFEINE[1], AND QUININE[3] CONTRACTURES (Mean±S.D. mM/kg dry weight)

	n	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca
at Rest[1]								
Lg-Cyt	100	37 ± 25	43 ± 12	293 ± 60	197 ± 32	72 ± 21	445 ± 76	4.9 ± 3.5
Mt	98	16 ± 15	29 ± 10**	428 ± 68	249 ± 50	23 ± 12	291 ± 57	0.6 ± 2.2
TC	152	46 ± 23	57 ± 12	482 ± 66	213 ± 34	60 ± 24	622 ± 77	114.9 ± 30.4*
Tetanus[2]								
Lg-Cyt	49	33 ± 22	39 ± 12	267 ± 69	228 ± 52	58 ± 26	419 ± 92	8.6 ± 4.8
Mt	41	23 ± 19	22 ± 9	403 ± 72	259 ± 40	13 ± 8.4	218 ± 60	0.5 ± 3.7
TC	222	58 ± 37	72 ± 23**	413 ± 82	225 ± 56	42 ± 20	604 ± 103	48 ± 20
Caffeine[1]								
Lg-Cyt	115	39 ± 17	40 ± 13	302 ± 41	202 ± 24	64 ± 22	462 ± 61	4.2 ± 3.7
Mt	120	23 ± 17	32 ± 9	462 ± 62	237 ± 49	18 ± 9	289 ± 68	11.4 ± 17.5
TC	134	57 ± 23	88 ± 21**	565 ± 88	220 ± 42	53 ± 23	681 ± 131	39.6 ± 13.5*
Quinine[3]								
Lg-Cyt	38	44 ± 33	47 ± 12	344 ± 63	223 ± 30	69 ± 19	504 ± 97	5.2 ± 4.3
Mt	52	30 ± 20	31 ± 9	497 ± 86	244 ± 51	39 ± 16	328 ± 70	3.1 ± 2.9
TC	45	69 ± 36	97 ± 36**	631 ± 89	240 ± 36	71 ± 21	750 ± 108	34 ± 18*

1) : Yoshioka and Somlyo. J.Cell Biol., 99: 558-568, 1984.
2) : Somlyo,A.V., Gonzalez-Serratos, Shuman, Mc Clellan, and Somlyo,A.P. J.Cell Biol., 90: 577-594, 1981.
3) : Yoshioka and Somlyo. Unpublished results.
Lg-Cyt : Large Cytoplasm, Mt : Mitochondria, TC : Terminal Cisternae

表2 ELEMENTAL COMPOSITION OF RAT EDL MUSCLE AT REST (Mean±S.D. mM/kg dry weight)

	n	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca
Lg-Cyt	4	74 ± 66	54 ± 9	462 ± 42	355 ± 29	73 ± 31	472 ± 36	7.0 ± 1.8
Mt	4	55 ± 61	37 ± 15	393 ± 66	393 ± 47	55 ± 19	284 ± 79	2.2 ± 2.8
TC	6	116 ± 100	70 ± 7	528 ± 96	520 ± 79	58 ± 14	686 ± 148	57.0 ± 22.4

Lg-Cyt : Large Cytoplasm, Mt : Mitochondria, TC : Terminal Cisternae

ルより倍位あることから，全体量とすれば哺乳類のTCもカエルのものと同程度となる．充分な分析例が得られていないため今後の問題となろう．

損傷された筋肉あるいは筋ジストロフィーの筋細胞では，細胞全体に含まれるCa量が議論されている．全体としてCa量に変化がないとすれば，筋小胞体中のCa量とI帯のCa量から正常筋細胞中のそれとを比較することは興味深い．またミトコンドリアは正常，静止状態ではCaを含まない．病的条件下ではどのような態度をとるものか今後の問題としたい．

文　献

1) Blinks, J.R., Wier, W.G., Hess, P. and Prendergast, F.G.(1982) Progr. Biophys. Mol. Biol., 40: 1-114.
2) Ebashi, S. and Endo, M.(1968) Progr. Biophys. Mol. Biol., 18: 123-183.
3) Eisenberg, B.R. and Eisenberg, R.S.(1982) J. gen. Physiol., 79: 1-19.
4) Gonzalez-Serratos, H., Somlyo, A.V., McClellan, G., Shuman, H., Borreo, M. and Somlyo, A.P.(1978) 75: 1329-1333.

5) Gosselin-Rey, C. and Gerday, C.(1982) Biochim. Biophys. Acta, 492: 53-63.
6) Marban, E., Rink, T.J., Tsien, R.W. and Tsien, R.Y.(1980) Nature, 286: 845-850.
7) Shuman, H., Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P. (1976) Ultramicroscopy, 1: 317-339.
8) Smith, S.J., MacDermott, A.B. and Weight, F.F.(1983) Nature, 304: 350-352.
9) Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. and Shuman, H. (1970) J. Cell Biol., 81: 316-335.
10) Somlyo, A.V., Gonzalez-Serratos, H., Shuman, H., McClellan, G. and Somlyo, A.P. (1981) J. Cell Biol., 90: 577-594.
11) Somlyo, A.V., McClellan, G., Gonzalez-Serratos, H. and Somlyo, A.P.(1985) J. Biol. Chem., 260: 6801-6807.
12) Tsien, R.Y.(1980) Biochemistry, 19: 2396-2404.
13) Yoshioka, T. and Somlyo, A.P.(1984) J. Cell Biol., 99: 558-568.

52) ラット赤筋・白筋のglucose uptakeに影響を及ぼす諸因子

庄 司 進 一*

筋疾患の発症機序を追求する際，muscle fiber typeによるvulnerabilityに着眼するapproachがある．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，soleus（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報告した．今年度はその原因追求の基礎として，赤筋と白筋のglucose uptakeを左右する因子を検討した．

材料と方法

実験動物：Wistarラット（40—60g）メスを用い，赤筋SOLと白筋EDLをtendonsと共に取り出しstretchしてholderで固定しincubationした．

glucose uptake測定：mediumは95% O_2-5% CO_2飽和Krebs-Henseleit bicarbonate buffer（pH7.4）に5mM sodium pyruvate，〔^{3}H〕-3-0-methylglucose（1mM, 1MCi/ml），〔^{14}C〕-sucrose（1mM, 0.2μCi/ml）を含むものを基本にした．30分のincubation後，洗浄を0℃の0.9% NaCl溶液中で40分毎に液を換え3回行なった．腱を取り除き，湿重量を測定し，Soluene350で可溶化，酢酸で中和，Scintisol Ex-Hを加え，scintillation counterでradioactivityを測定した．3-0-methyl glucose spaceとsucrose spaceの差から3-0-methyl glucose uptakeを算出した．

無酸素条件（Anoxia）はincubation mediumをN_2で飽和したものを用いた．

*信州大学第三内科

結　　果

インシュリン：インシュリンを10^{-6}U/mlから10^{-1}U/mlまでの濃度で変化させ，EDLとSOLのglucose uptakeに対する影響を検討した．表1と図1に示す如く，basalではSOLのglucose uptakeが大で，この傾向は10^{-3}U/mlまで続き，10^{-2}U/ml以上ではEDLのglucose uptakeが逆に大きくなっていた．これはインシュリンによるglucose uptakeの促進がEDLでSOLより大きいことによる．しかし10^{-1}U/mlのインシュリン存在下のglucose uptakeのbasal uptakeとの差をmaximum insulin induced increase in glucose uptake 100%とすると，10^{-3}U/mlのインシュリン存在下では，SOLはinsulin induced increase in glucose uptake 92%に達するのに対し，EDLでは58%で10倍の濃度の10^{-2}U/mlで90%に達した．

無酸素条件（Anoxia, Anaerobic condition）：表2にそれぞれ10対の筋で行なった結果を示す．EDLで無酸素条件でglucose uptakeが有意な増加を示した．

2，4-dinitrophenol：表2にそれぞれ4対の筋で行なった結果を示す．2，4-dinitrophenol 5μMでEDL，SOL共にglucose uptakeの有意な増加を示した．増加の割合はEDLが52%，SOLが25%でEDLで大であった．

無酸素条件とインシュリン：表2にそれぞれ4対の筋で行なった結果を示す．インシュリン10^{-1}U/mlと10^{-2}U/mlで共に無酸素条件ではEDLとSOL共にインシュリンによるglucose uptakeの増加は認められなかった．

cytochalasin B：表2にそれぞれ6対の筋で行なった結果を示す．cytochalasin B 10μMでは

表1 Effect of insulin on 3-0-methylglucose uptake in extensor digitorum longus and soleus muscles

Insulin Concentration	3-0-methylglucose uptake	
	E.D.L.	Soleus
Control	42.5 ± 1.7[a] (31)	53.4 ± 2.2 (31)[d]
10^{-6} U/ml	41.1 ± 4.0 (10)	55.8 ± 4.0 (10)[e]
10^{-5}	41.1 ± 2.9 (10)	61.4 ± 4.5 (10)[d]
10^{-4}	40.7 ± 1.3 (22) f	56.1 ± 2.1 (22)[d] g
10^{-3}	66.7 ± 3.7 (6)[b] g	73.2 ± 6.3 (6)[c]
10^{-2}	80.4 ± 4.6 (12)[b]	69.7 ± 5.1 (12)[c]
10^{-1}	84.5 ± 6.7 (8)[b]	74.9 ± 7.8 (8)[c]

a: mean ± SEM, unit = n moles/g wet weight/30 min at 37°C, 3-0-methylglucose = 1 mM

number in parenthesis is number of muscles used

b: P < 0.001 vs control, c: P < 0.01 vs control, d: P < 0.001 vs E.D.L., e: P < 0.01 vs E.D.L.

f: P < 0.01 between two groups, g: P < 0.025 between two groups

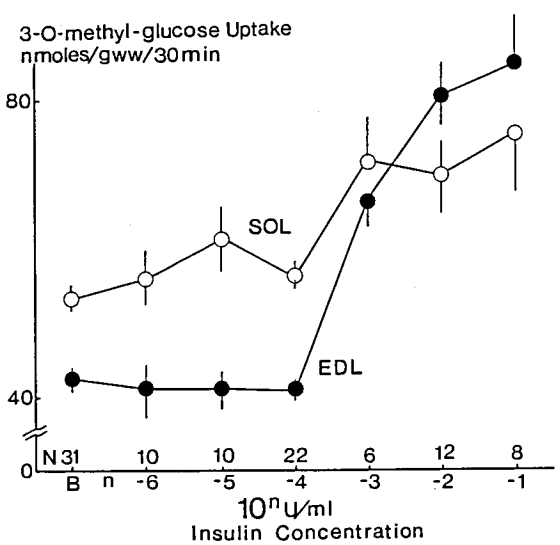


図1 Effect of insulin on glucose uptake

表2 Glucose uptake under various conditions

Conditions	N	Glucose uptake ratio EDL	SOL
Anaerobic	10	119*	107
2,4-dinitrophenol			
5μM	4	152*	125*
50μM	4	91	97
Anaerobic, Insulin			
10^{-2}U/ml	4	104	95
10^{-1}U/ml	4	82	81
Cytochalasin B			
10μM	6	93	94
100μM	6	65*	54*

N number of pairs for measurement

* P < 0.05

glucose uptakeに影響ないが100μMでSOL, EDL共にglucose uptakeの有意な抑制が認められた．cytochalasin Bによるinhibitable glucose uptakeはSOLで16.0，EDLで11.0n moles/g wet weight/30minとSOLで大であった．

考　　案

今回のデータはインシュリンが無い又は低濃度下では，SOLの3-0-methyl glucoseの細胞膜を介する運搬のcapacityは大で，高濃度では逆にEDLの方が大であった．赤筋と白筋のインシュリン作用を比較した研究は，Goodmanらがインシュリン2×10^{-4}U/mlでラットhindquarterを用いたperfusion実験で2-deoxyglucose uptakeをSOLとEDLで比較しSOLが大であったと報告[1]し，Bonenらが3×10^{-5}U/mlから4×10^{-3}U/mlの濃度下でマウスのisolated SOLとEDLで2-deoxyglucose uptakeを比較しこの濃度下ではSOLが大であったと報告[2]している．これら2つの報告は10^{-2}U/ml以下のインシュリン濃度で，今回のデータと矛盾しない．Bonenらの結果では3×10^{-4}U/mlのインシュリン濃度で2-deoxyglucose uptakeの最大値が両筋で認められた[2]．しかし今回の結果は両筋とも10^{-1}U/mlで最大の3-0-methyl glucose uptakeが認められた．この相異の原因は不明であるが，ラットとマウスの種の相異や3-0-methyl glucoseと2-deoxyglucoseの相異によるものである可能性も考えられる．

インシュリンによる最大glucose uptakeがSOLとEDLでbasal uptakeのそれぞれ1.4と2.0倍であった．Bonenらの報告[2]ではそれぞれ1.6と1.9倍で今回のデータと近い．Goodmanら[1]はそれぞれ6.8と5.9倍（4週令）であった．Isolated muscleとperfusionの方法の相異が種の相異よりこのインシュリンによるmaximum glucose uptakeの増加率に大きな影響をもつようである．Goodmanら[1]はこの率が年齢と共に低下したと報告している．SOLに関してはさらに3つの報告[3),4),5)]がある．いずれもisolated muscleでインシュリンの濃度は10^{-3}，10^{-1}と10^{-1}U/mlでuptakeの増加率はそれぞれ2.3，2.9と1.8倍であり，前二者[3)4)]は3-0-methyl glucose，最後[5)]がglucoseのuptakeを測定している．

今回のインシュリンのデータから下記の様に考えられる．生理的又は低濃度のインシュリン存在下では，tonic muscleではphasic muscle以上にenergyが必要である．何らかの刺激でインシュリン分泌亢進または外来性インシュリンの投与でインシュリン濃度が上昇すると，先づ赤筋が反応してglucose uptakeの増加が飽和するのが速く，白筋では最終的には増加率は赤筋より大で絶対値でも赤筋より大となる．

anaerobic conditionでglucose uptakeが増加したとの報告はchaudryら[6)]がSOLで，Morganら[7)]がperfused heartで報告している．しかし今回のデータは白筋では有意な増加（+52%）が認められたが，赤筋では+7%の増加で有意でなかった．従来の報告の赤筋や心筋以上に白筋では無酸素による嫌気解糖の増加が著明であることを今回のデータは示している．

2,4-dinitrophenol（5μM）でEDL及びSOLのglucose uptakeが有意な増加を示したが，EDLの増加は+52%でSOLの+25%の2倍であった．

無酸素，2,4-dinitrophenolは共にoxidative phosphorylationを阻害し，ATP産生が低下する．ATP低下はglucose uptakeを促進する．この促進は白筋で赤筋より強く現われる．

無酸素下（Anaerobic condition）ではインシュリンのglucose uptakeに対する促進効果は消失する．Morganら[7)]がperfused heartで無酸素でinsulinのglucose uptake促進作用が亢進したと報告した．YuらはSOLで無酸素でxylose uptakeのinsulin sensitivityが低下したと報告[8)]した．今回のデータの赤筋に関してはYuらのデータと一致し，Morganらの報告と合せると心筋と骨格筋とでは無酸素下でのインシュリンの感受性が異なる．

cytochalasin B（100μM）はglucose uptakeをSOL，EDL両筋で抑制した．抑制の割合（46%と35%）も絶対値（16.0対11.0）もSOLで大であった．これはplasma membraneのglucose car-

riers の数が SOL で大であることを示していると考えられる.

図2に全体のシェーマを図示した. インシュリンの glucose uptake 促進作用は microsomal storage から glucose carriers を plasma membrane に transposition することによると考えられ, これには ATP が必要である. 無酸素で起こる白筋の glucose uptake の促進は, glucose carrier の数は変らずその能率を上げるためのようである. 何故なら無酸素ではインシュリン感受性が無いことから, ATP 低下で microsomal storage からの glucose carrier の plasma membrane への transposition が起こらないと考えられるからである.

結　論

1) 赤筋と白筋で glucose uptake に対するインシュリン感受性が異なる. インシュリン低濃度では赤筋の glucose uptake が大で, 高濃度では白筋が大となる.

2) 無酸素, 2, 4- dinitrophenol 等で oxidative phosphorylation を阻害すると白筋でより強く glucose uptake の促進が現われる.

3) 無酸素下では glucose uptake に対するインシュリン感受性が消失する.

4) cytochalasin B による glucose carrier の阻害は赤筋で大である.

5) oxidative phosphorylation 阻害による glucose uptake の促進は, plasma membrane の glucose carrier の数の変化を伴なわず, その能率を上げることによる.

文　献

1) Goodman MN, Dluz SM, McElaney MA, Belur E, Ruderman NB: Glucose uptake and

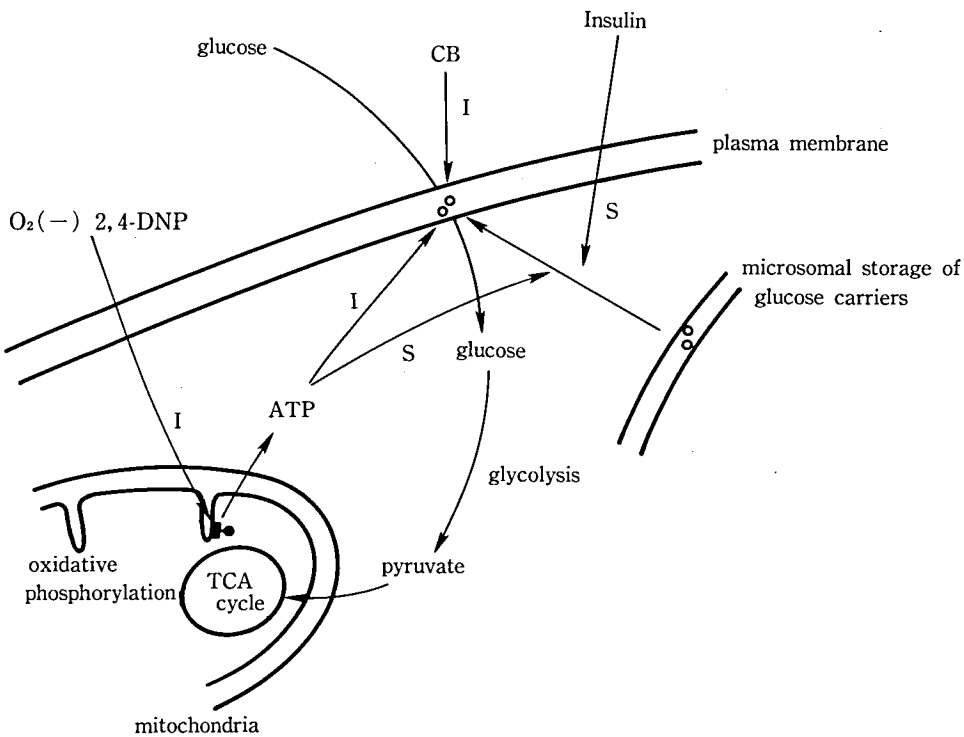


図2　Regulation of glucose uptake into muscle cell
I : inhibition, S : stimulation

insulin sensitivity in rat muscle: changes during 3-96 weeks of age. Am J Physiol 244 (Endocrinol Metab 7) : E93-E100, 1983.

2) Bonen A, Tan MH, Watson-Wright WH: Insulin binding and glucose uptake differences in rodent skeletal muscles. Diabetes 30: 702-704, 1981.

3) Kohn PG, Clausen T: The relationship between the transport of glucose and cations across cell membranes in isolated tissues VI. The effect of insulin, ouabain, and metabolic inhibitors on the transport of 3-0-methylglucose and glucose in rat soleus muscles. Biochim Biophys Acta 225: 277-290, 1971.

4) Clausen T: The effect of insulin on glucose transport in muscle cells. Curr Top Membr Transp 6: 169-226, 1975.

5) Chaudry IH, Gould MK: Effect of externally added ATP on glucose uptake by isolated rat soleus muscle. Biochim Biophys Acta 196: 327-335, 1970.

6) Chaudry IH, Gould MK: Kinetics of glucose uptake in isolated soleus muscle. Biochim Biophys Acta 177: 527-536, 1969.

7) Morgan HE, Regen DM, Henderson MJ, Sawyer TK, Park CR: Regulation of glucose uptake in muscle. VI. Effects of hypophysectomy, adrenalectomy, growth hormone, hydrocortisone, and insulin on glucose transport and phosphorylation in the perfused rat heart. J Biol Chem 236: 2162-2168, 1961.

53) 発育期鶏骨格筋phosphofructokinaseに関する研究

水 野 美 邦*

研究協力者　大 田 恵 子*

Phosphofructokinase（PFK）は，解糖系の律速段階を担う重要な酵素であり，種々の動物におけるその性状に関してさまざまな検索が成されているが，鶏の骨格筋に関しては，現在まだ少数の報告しかない．今回，鶏骨格筋PFKの発育期における総活性及びisozymeの変化について検討し，さらにジストロフィー鶏における変化との比較も行なった．筋ジストロフィー症及びその動物モデルにおけるPFK値に関しては，1967年DiMauroら[1]がヒト生検筋において低下していることを報告している他，1978年Beitnerら[2]が7～8週齢のジストロフィーマウス後肢筋においてpH8.2での測定では正常，pH6.9では低値を報告，1981年にはYoungら[3]がジストロフィー鶏胎生期の培養筋細胞では正常であることを，Reichmannら[4]が成熟ジストロフィーマウスの前脛骨筋では低下していることを，1983年にはWicklerら[5]が12週齢までのジストロフィーハムスターの腓腹筋，半腱様筋では正常であることをそれぞれ報告している．孵化後のジストロフィー鶏については，検索した範囲で報告は認められなかった．

方　法

対象動物はNew Hampshire系ジストロフィー鶏（line413）とその対照鶏（line412）で孵化後1日，4日，1週，2週，4週目に各3～6羽を屠殺しその浅胸筋と腓腹筋を材料として用いた．

PFKの総活性については，筋肉に10倍量の50mM Tris-Cl buffer pH8.2c̄ 1mM EDTAを加え，Dounce型ホモジェナイザーにてホモジェナイズし，4℃ 7000g，10分遠心後の上清を用い，Opie & Newsholmeの方法[6]を一部改変した方法にてpH8.2の条件下で測定した．なお昨年pH7.4 KClにてホモジェナイズした浅胸筋のPFK活性値を報告したが，この方法では抽出過程で活性が著明に低下することが明らかとなったため，今回はpH8.2 Tris-Cl bufferを用いた．蛋白はLowryら[7]の方法により測定した．

PFKのisozymeについては，Dunawayら[8]，Tsaiら[9]の方法を参考とし，アガロースゲル電気泳動法にて分析した．筋肉に10倍量の50mM Tris-PO_4 buffer pH8.2c̄ 10mM NaF，0.1mM EDTAを加えてホモジェナイズし，4℃10,000g，20分遠心後の上清を検体として用いた．100mM Tris-PO_4 buffer pH8.2c̄ 10mM NaF，0.1mM EDTA，1mM ATP，0.25mM dithiothreitolを緩衝液とし，275V，2.5hrs通電後nitro blue tetrazoliumを用いた酵素染色法によりbandを描出した．

結　果

PFK活性の測定結果を図1，2に示す．浅胸筋では組織1gあたりの活性は，孵化後2週目まで急速に上昇し，2週目には1日目の10倍以上に達した．control，dystrophyともに同様の傾向だったが，孵化後2週目と4週目でdystrophyのほうが有意に低値となった．蛋白1mgあたりの比活性も同様の傾向であったが，control，dystrophy間に有意差は認められなかった．一方腓腹筋では，孵化後1日目の活性は，浅胸筋より高値だったが，その後の上昇は軽度で2週目で約2倍程度にとどまった．control，dystrophy間には，組織1gあたり，蛋白1mgあたりともに有意差は認められなかった．

＊自治医科大学神経内科

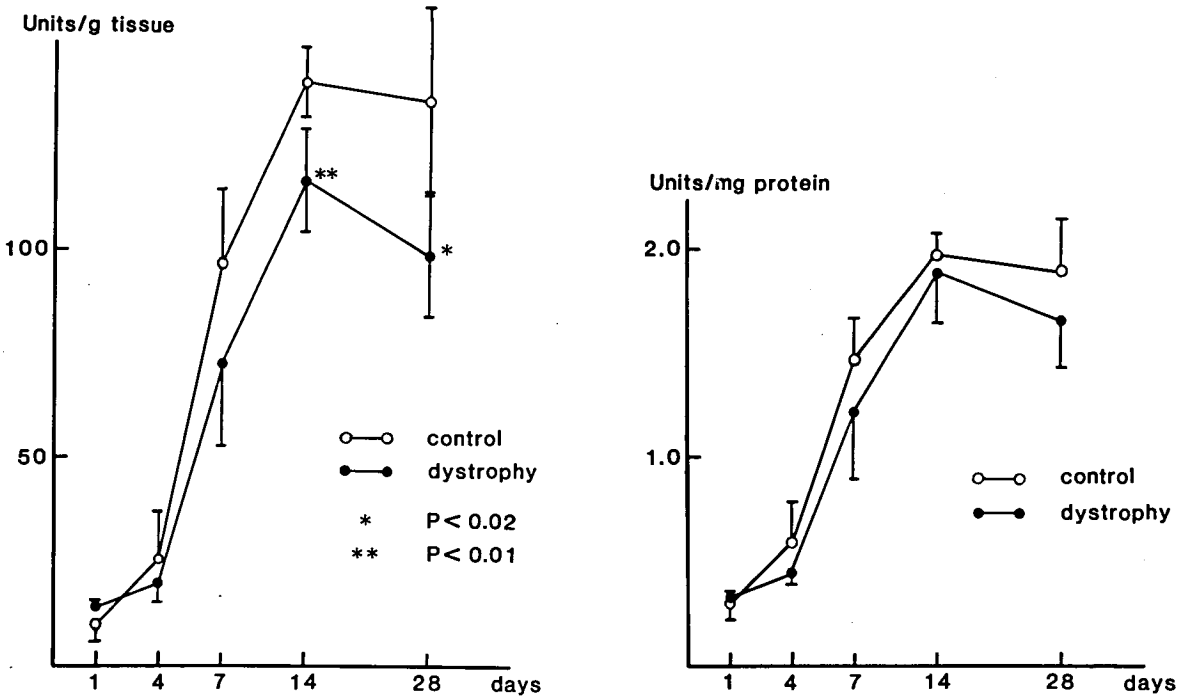


図1　浅胸筋 phosphofructokinase 活性
mean±SE（n＝3～6）
1 unit＝1分間に1μmole の fructose-1, 6-diphosphate を生成する酵素活性

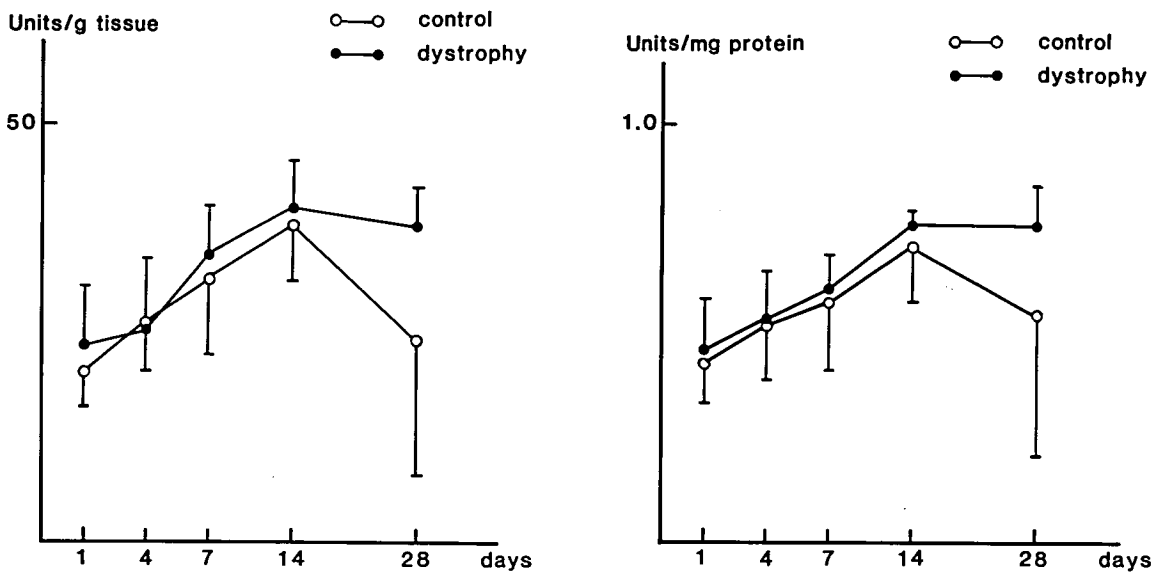


図2　腓腹筋 phosphofructokinase 活性
mean±SE（n＝3～6）
1 unit＝1分間に1μmole の fructose-1, 6-diphosphate を生成する酵素活性

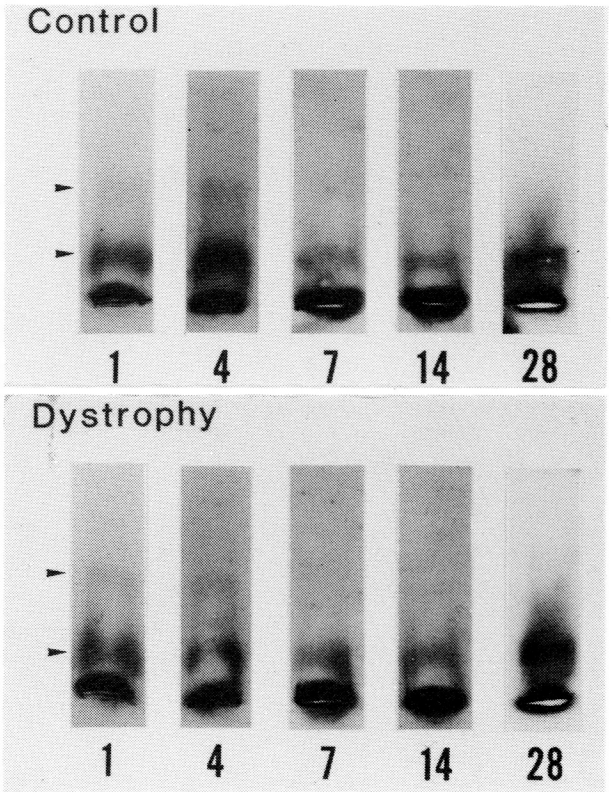


図3　浅胸筋 PFK isozyme patterns
数字は孵化後の日数を示す

正常及びジストロフィー鶏浅胸筋の PFK isozyme pattern を図3に示す．孵化後1日目と4日目では移動度の異なる2つの band が認められた．移動度の大きい方の band は淡く，成長とともに消褪し，7日目以降には認められなくなった．この isozyme pattern の経時的変化はジストロフィー鶏も正常鶏と同様だった．次に正常及びジストロフィー鶏腓腹筋の PFK isozyme pattern を図4に示す．腓腹筋では孵化後1日目に浅胸筋と同様の2つの band が認められるが，移動度の大きい方の band は浅胸筋と異なり，7日目以降も消失せず，むしろ鮮明になっていく傾向が認められた．この経時的変化もジストロフィー鶏と正常鶏で差異はなかった．

考　　察

今回の測定により，浅胸筋の PFK 総活性はジストロフィー鶏において孵化後2週目と4週目で有意に低値であることが明らかとなった．昨年ジストロフィー鶏において，活性酸素関連酵素の多くが孵化後1週以内に上昇することを報告したが，今回の PFK 値の低下はこれに比べ出現が遅く，2次的変化であることが予想される．

PFK の骨格筋における isozyme pattern については，De Faria ら[10] が各種の脊椎動物について検索しており，ヒト，ラットをはじめ哺乳類の多くでは骨格筋 PFK の isozyme は1種類であり，鳥類である鶏，ハトでは2種類認められたと報告している．動物の年齢，骨格筋の部位については記載されていない．鶏の浅胸筋は白筋であり，腓腹筋は混合筋であるが主として赤筋から成ること

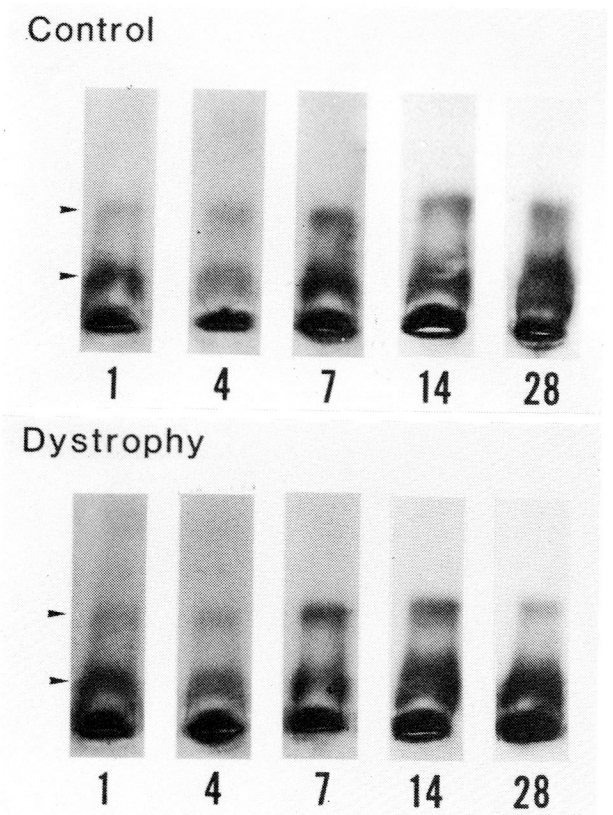


図4　腓腹筋 PFK isozyme patterns
数字は孵化後の日数を示す

が知られており，今回示したように浅胸筋と腓腹筋で発育期の PFK isozyme pattern の経時的変化が異なることは，筋の分化過程，赤筋，白筋の機能や代謝の相違を考える上で興味深いことと思われる．鶏ではまだこの方面での詳細な研究はなく，今後さらに検討の価値ある分野と考えられる．

ま と め

鶏骨格筋 PFK の発育期における総活性及び isozyme の変化について検討し，ジストロフィー鶏における変化との比較もあわせて行なった．PFK の総活性は，孵化後 2 週目まで浅胸筋では急速な，腓腹筋では緩徐な上昇を示した．ジストロフィー鶏における変化も同様であったが，孵化後 2 週目と 4 週目の浅胸筋 PFK 値は有意に低値だった．また発育期における PFK isozyme pattern は浅胸筋と腓腹筋で異なった経時的変化を示した．正常鶏とジストロフィー鶏の間で差は認められなかった．

文　　献

1）DiMauro, S., Angelini, C. and Catani, C.: Enzymes of the glycogen cycle and glycolysis in various human neuromuscular disorders. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, **30**: 411-415, 1967.

2）Beitner, R., Haberman, S., Nordenberg, J. and Cohen, T.J.: The levels of cyclic GMP and glucose 1,6-diphosphate, and the activity of phosphofructokinase, in muscle from normal

and dystrophic mice. Biochim. Biophys. Acta, 542: 537-541, 1978.

3) Young, R.B., McConnell, D.G., Suelter, C.H. and Phillips, T.A.: Normal and dystrophic embryonic chicken pectoralis muscle cultures: I. cell differentiation, protein synthesis, and enzyme levels. Muscle Nerve, 4: 117-124, 1981.

4) Reichmann, H., Pette, D. and Vrbova, G.: Effects of low frequency electrical stimulation on enzyme and isozyme patterns of dystrophic mouse muscle. FEBS Lett., 128: 55-58, 1981.

5) Wickler, S.J. and Horwitz, B.A.: Metabolic organization of muscle and brown fat of normal and dystrophic hamsters. Am. J. Physiol., 244: R407-411, 1983.

6) 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.

7) 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.

8) Dunaway, G.A., Leung, G.L.-Y., Cooper M.D., Thrasher, J.R. and Wagle, S.R.: Distribution of hepatic phosphofructokinase isozymes in parenchymal and sinusoidal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 71-74, 1978.

9) Tsai, M.Y. and Kemp, R.G.: Isozymes of rabbit phosphofructokinase. J. Biol. Chem, 248: 785-792, 1973.

10) De Faria, J.B., Crivellaro, O. and Bacila, M.: Multiple forms of phosphofructokinase in animals from the phylum Chordata. Comp. Biochem. Physiol., 55B: 323-329, 1976.

54) 生体におけるクレアチンの代謝経路：人（健常並びにDMD）及びラット腸管内容物におけるクレアチン分解活性と菌種類

紫芝良昌*

研究協力者　清水多恵子*　門脇紀子*
三好和夫*　足立克仁**

私達は従来筋ジストロフィー症の原因をクレアチン代謝の面から研究している[1)2)]．昨年度はラットin vivo実験で，腹腔内に注射した標識クレアチンから尿中に標識尿素が生ずることを明らかにした[3)]．今回，同様にしてサルコシンが生ずることを示し，またこのような分解活性の一部を説明する腸管内容物の活性と原因と思われる菌の種類について検索した結果を述べる．

材料と方法

I．in vivo 実験

ラットを用い，皮下に放射活性クレアチンを注射して，尿中に排出される放射活性のクレアチンとサルコシンを測定した．ラットはウィスター系オス約200gで通常飼育（オリエンタル酵母社製通常飼料）にて飼育した．放射性クレアチンは^{14}C-1-クレアチン（New England Nuclear社製）20 μCi/mgをラットの皮下に注射した．注射後，代謝ケージで採取した尿（一部は屠殺して採取した尿）を沪過し，その20mlをHPLC（エルマー光学HPLC8710）で分画し，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Nucleosil 10SAを8mm×30cmのカラムに充填し，buffer 0.01M $KH_2PO_4H_3PO_4$ pH3.7をmobile phaseとして用い，25℃ column pressure40kg/cm^2 2ml/minで分画した．

^{14}C-クレアチンの分解のpositive controlとしてpseudomonas creatinase（東洋紡研究所製[4)]）を使用した．

II．in vitro 実験

ラット腸管内容物のクレアチン分解活性を調べるに際しては，ラットをエーテル麻酔下に開腹し結腸を露出し，その内容物を採取した．内容物は直ちに計量した後，50mMリン酸緩衝液（pH7.2）を加え，ホモジナイズし，5％，10％溶液とした．これに0.5μCi/mlの^{14}C-(amidine labeled) クレアチンを加え，3時間37℃にてインキュベートした．インキュベート終了後，トリクロル酢酸（TCA）を最終濃度5％になるように加え，遠沈し，上清を分離し，1N NaOHで溶液を中和した後0.45mμのフィルターで沪過しHPLCで分画した．

腸管内容物の一部はtripticase soy agar培地にて培養し，E coli, pseudomonas aeruginosa, proteus vulgarisを分離した．このうちpseudomonas aeruginosaについては培地から菌をかき取り，約10mgを50mMリン酸緩衝液に加え，^{14}C-(amidine labeled) クレアチン0.5μCi/mlを加えて37℃ 3時間インキュベートし，前述のように処理してHPLCで解析した．また別に採取した菌をDME培養液に1mg/mlのクレアチンを加えた溶液中に加え，16時間37℃でインキュベートし，^{14}C-クレアチン0.5μCiを加えて更に3時間インキュベートした後，前述のように処理してHPLCにて解析した．

健常人の糞便及びDMD患者の糞便もラット腸管内容物と同様の方法でクレアチン分解活性について調べた．腸管内容物の採取は，健常人は30歳

＊冲中記念成人病院研究所
＊＊徳島大学医学部第一内科

男性の検診に提出された便を，DMD 患者については入院中の検便に用いられた便の一部を使用した．

成　　績

(1) ^{14}C-(sarcosine labeled) クレアチンを用いた in vivo 実験

通常飼育ラットに ^{14}C-1-クレアチン20μCi を皮下注射し，24時間後に屠殺し，膀胱内尿を採取して HPLC で検索した成績を図1に示す．

図1の下段は注射した ^{14}C-1-サルコシンのものを示した．基準物質では放射活性の99%以上のものはクレアチンであり，残りの0.4%が urea その他の不純物と考えられた．中段は ^{14}C-1-クレアチン約4000cpm を pseudomonas creatinase (0.0625unit) と37℃ 1時間 phosphate buffer 中でインキュベートした場合の成績である．^{14}C-クレアチン92.7%及びサルコシン7.3%のピークが認められる．図1の上段は ^{14}C-1-クレアチン注射ラットの尿の成績である．クレアチン及びサルコシンに一致した活性ピークは，尿中の総活性に対してクレアチン74.3%，サルコシン6.13%であった．図2は昨年報告した ^{14}C-(amidine)-creatine からの ^{14}C-urea 産生を参考のために記したものである．

(2) 腸管内容物のクレアチン分解活性

a）ラット腸管内容物のクレアチン分解活性 (^{14}C-(amidine labeled)) クレアチンを用いた urea の産生）を図3に示す．下段は pseudomonas creatinase によるクレアチン分解の結果であり，クレアチン，urea の放射活性がそれぞれ92%，5.5%にみられる．

上段は腸管内容物5%ホモジネートを用いた成績であり，放射活性の11.3%が urea の位置に認められた．中段は10%ホモジネートを用いたもので放射活性の52.3%が urea の位置に認められた．

b）ラット腸管内容物より分離した pseudomonas aeruginosa のクレアチン分解活性を図4に示す．

上段は Tripticase soy agar 培地から得た菌を直ちに ^{14}C-クレアチンと3時間インキュベートしたものである．^{14}C-urea が1.9% (50μg のクレアチンから1μg) 産生された．

中段は培地にクレアチン1mg/ml を加え，16時間インキュベートした後の菌についての同様の成績である．図にみるごとく ^{14}C-urea の産生が2.9%に認められた．この%は，培地のクレアチン量1mg/ml に対するもので，上のクレアチンを加えない場合に比して約30倍とはるかに多量の urea の産生をみたことになる．

c）健常人の糞便中のクレアチン分解活性についての成績を図5に示す．

ラットと同様に人腸管内容物の5%，10%ホモジネートを ^{14}C-クレアチンとインキュベートすると，^{14}C-urea がそれぞれ41.2%，56.3%産生された．産生量は10%ホモジネートの方が若干多い．

d）筋ジストロフィー症患者 (DMD) の糞便中のクレアチン分解活性を図6に示す．

患者A，患者Bの糞便の10%ホモジネートを作り，^{14}C-クレアチンとインキュベートすると ^{14}C-urea が患者A（9歳男児）で14.8%，患者B（9歳男児）で8.8%産生された．この他3例の DMD 症例について検討したが，いずれの例でもクレアチン分解活性が認められた．

考　　察

私達は従来，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．

今回はまず，ラット in vivo 実験において，昨年度の成績，すなわちラット腹腔内に ^{14}C-(amidine labeled) クレアチンを注射して尿中に ^{14}C-urea が出現する実験を補充した．すなわち，ラットに同様に ^{14}C-1-クレアチンを注射して尿中に ^{14}C-サルコシンが産生されることを確かめた．このことは，ラット体内に注射されたクレアチンは creatinase によって urea とサルコシンに分解されることを示している．クレアチンのこの分解活性は，一部がラット体内の機構に基因することが推定されるが，多くの部分が腸内細菌叢によるであろうことは前回[3]も述べた．

今回の実験では次いで，ラットさらに人の腸管内容物について直接にこの活性を調べ，ラット，人ともに腸管内容物に強いクレアチン分解活性の

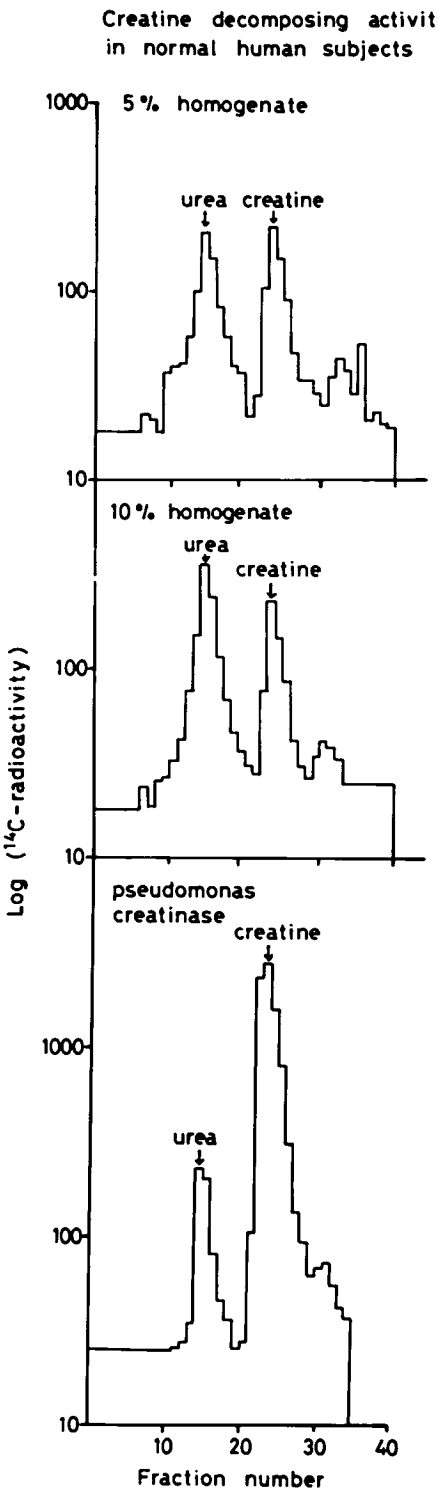

Creatine decomposing activity
in normal human subjects
5 % homogenate
urea
creatine
10 % homogenate
urea
creatine
pseudomonas
creatinase
creatine
urea
1000
100
10
Log (14C-radioactivity)
10
20
30
40
Fraction number

図 1

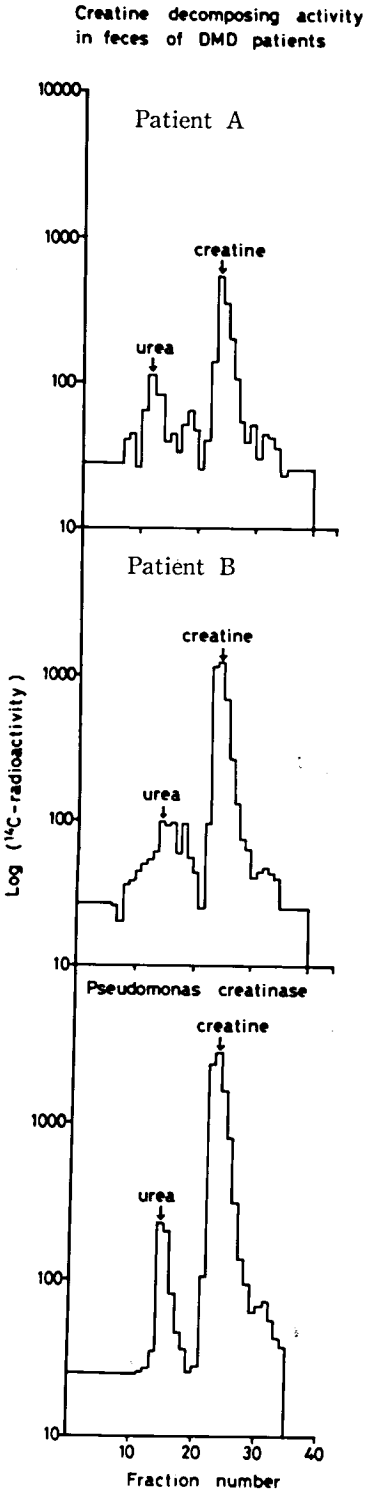

Creatine decomposing activity
in feces of DMD patients
Patient A
creatine
urea
Patient B
creatine
urea
Pseudomonas creatinase
creatine
urea
10000
1000
100
10
Log (14C-radioactivity)
10
20
30
40
Fraction number

図 2

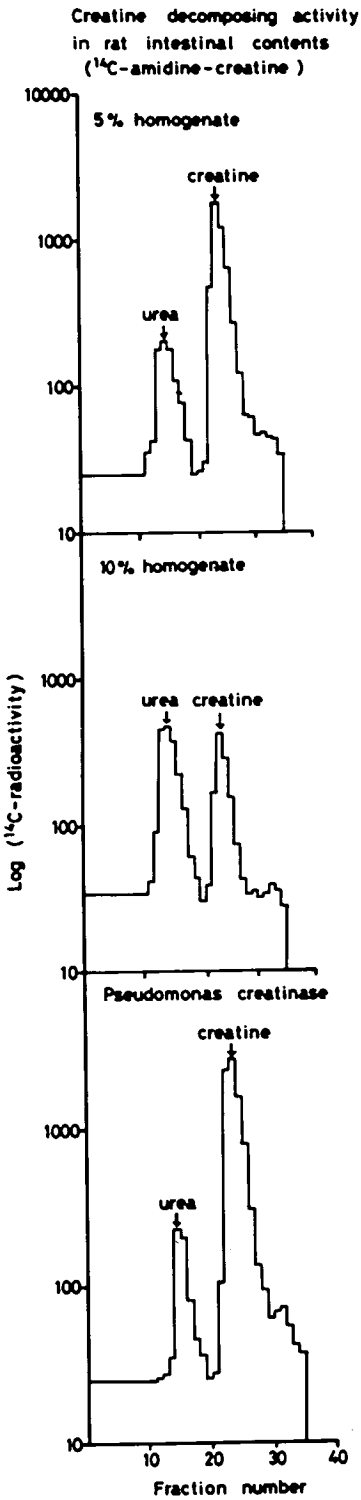

Creatine decomposing activity
in rat intestinal contents
(14C-amidine-creatine)
5% homogenate
creatine
urea
10% homogenate
urea creatine
Pseudomonas creatinase
creatine
urea
Log (14C-radioactivity)
10000
1000
100
10
10 20 30 40
Fraction number

図 3

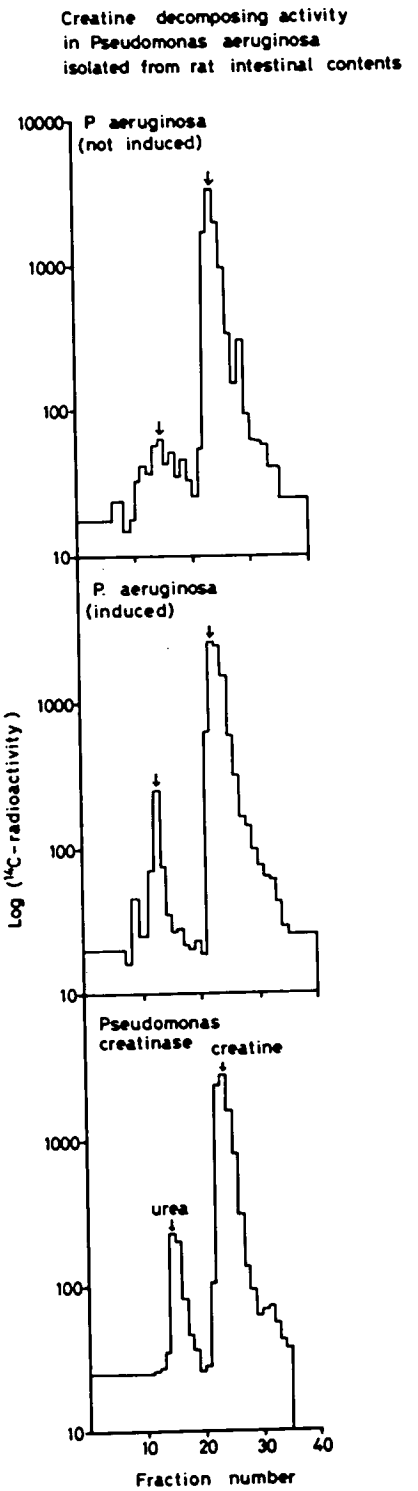

Creatine decomposing activity
in Pseudomonas aeruginosa
isolated from rat intestinal contents
P aeruginosa
(not induced)
P. aeruginosa
(induced)
Pseudomonas
creatinase
creatine
urea
Log (14C-radioactivity)
10000
1000
100
10
10 20 30 40
Fraction number

図 4

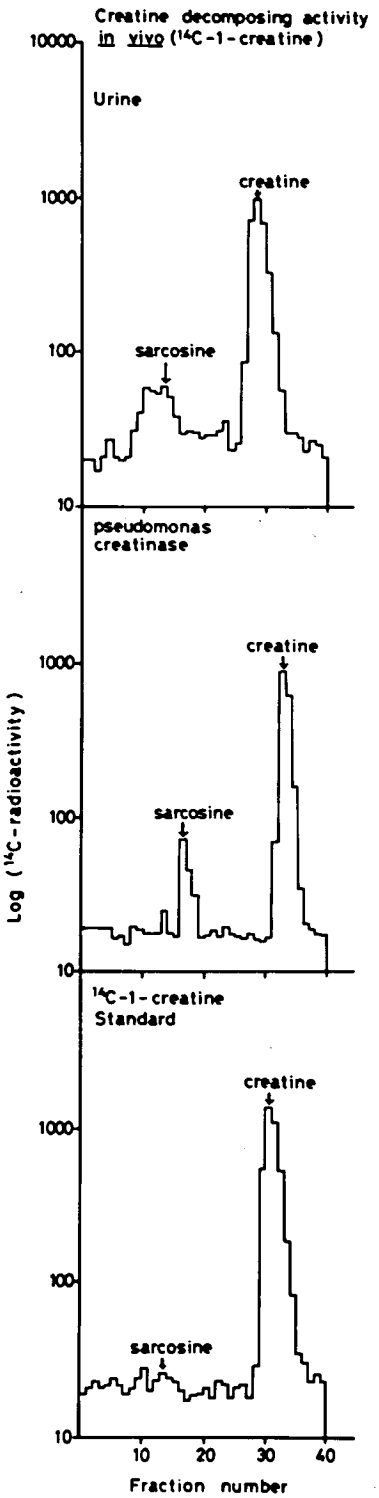

Creatine decomposing activity
in vivo (14C-1-creatine)
Urine
creatine
sarcosine
pseudomonas
creatinase
creatine
sarcosine
14C-1-creatine
Standard
creatine
sarcosine
10000
1000
100
10
Log (14C-radioactivity)
10
20
30
40
Fraction number

図 5

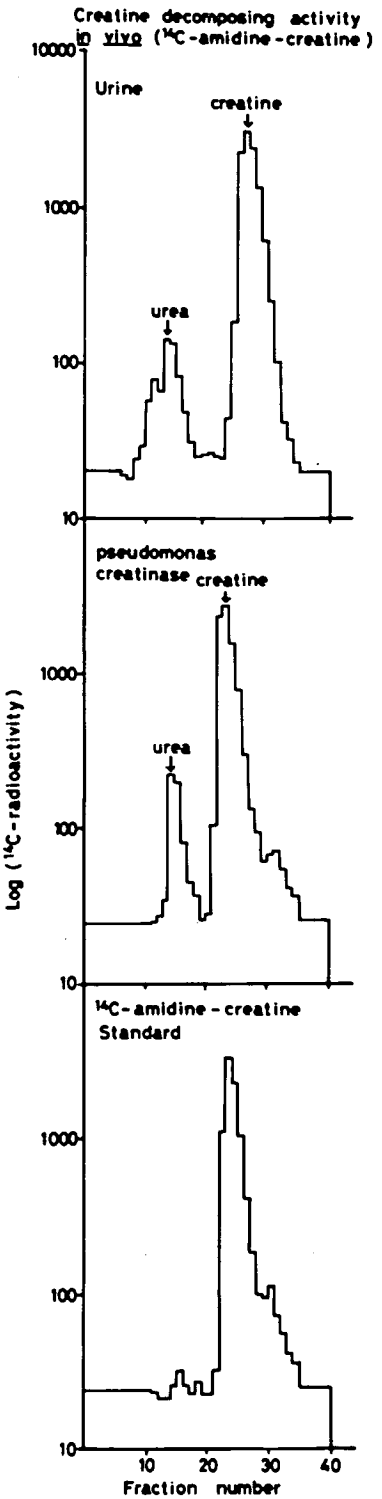

Creatine decomposing activity
in vivo (14C-amidine-creatine)
Urine
creatine
urea
pseudomonas
creatinase
creatine
urea
14C-amidine-creatine
Standard
10000
1000
100
10
Log (14C-radioactivity)
10
20
30
40
Fraction number

図 6

あること（10%ホモジネート使用で総活性の50%のurea産生）が認められた．通常飼育の動物や健常人の腸管内容物にクレアチン分解活性を証明した成績は文献にはみあたらない．

本実験ではさらにラット腸管内容物から菌培養分離を行い pseudomonas aeruginosa の培養液にクレアチンを分解する活性が認められることを示した．活性は，培地のクレアチンが微量であるときは少なく，クレアチン添加によって明らかに増大した．すなわちクレアチンによって分解活性が誘導されるが，誘導が partial であるか total であるかについては，動物や人の体細胞の場合とも関連して興味深く，追求したい．文献的には古く人尿中より分離した pseudomonas aeruginosa が atypical に変異し，partially adaptive に creatinase を産生した報告がある[5]．しかし，生体における代謝面についてはふれられていない．

尚，腸管内容物のクレアチン分解活性について，本実験では，DMD症例では健常人に比してはるかに低い成績をえたが，摂取栄養など条件を検討してその意味を明らかにしたい．人とくにDMDにおけるクレアチン代謝の論議には，生体自体と，これと緊密に共生してみられる腸内菌類による代謝を総合的に考慮に入れる要のあることが痛感される．

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）紫芝良昌，三好和夫他：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．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，1985．p. 213.

4）Tsuru, D., Oka, I. and Yoshimoto, T.: Creatinine decomposing enzymes in pseudomonas putida. Agr. Biol. Chem. 40: 1011, 1976.

5）Kopper, P.H.: An atypical strain of pseudomonas aeruginosa. J. Bact. 54: 359, 1947.

55) 糖原病VII型における高尿酸血症の成因
── 筋運動による尿酸産生の亢進 ──

垂　井　清一郎*

研究協力者　嶺　尾　郁　夫*　河　野　典　夫*　原　　尚　子*
川　知　雅　典*　山　田　祐　也*　清　水　孝　郎*

はじめに

最近，糖原病VII型（筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症）に，高率に高尿酸血症や痛風の合併することが明らかになり注目を集めている[1-3]．ところが，一般に高尿酸血症の成因については，これまで専ら肝におけるプリン体の de novo の合成機構や，腎における尿酸輸送機構に関する研究がなされているのみで，筋型酵素の欠損症で肝・腎に異常のない本症に[4,5]，高尿酸血症が合併する機構は全く不明であった．私共は，部分的阻血下前腕運動試験において，患者骨格筋では筋運動によってプリン体の異化が著しく亢進することを見出し，これがVII型に合併する高尿酸血症の成因をなすと考えた[1,6-8]．本研究では，筋原性高尿酸血症とも称すべき新しい病態概念を確立する目的で，糖原病VII型患者の尿酸代謝に対する筋運動および身体安静の影響について分析した．

方　　法

患者：高尿酸血症を示す43歳男性糖原病VII型患者を対象とした．なお，本症例の兄（VII型患者）も高尿酸血症を呈している[1,3,9]．

自転車エルゴメーター運動：2時間の安静臥床後，自転車エルゴメーターを用いて，脚運動を行った．一般に，糖原病VII型患者の運動持続能は著しく障害され，また過度の運動負荷はミオグロビン尿により腎不全を招くおそれもあるため[10]，運動負荷量は図1の如く極めて軽いものから段階的に増量して行き，且つ適当な休息を取りながら実施した（2時間で延40分間の脚運動）．運動後は再び2時間安静臥床とした．この間，経時的に採尿および前腕部から採血を行った．

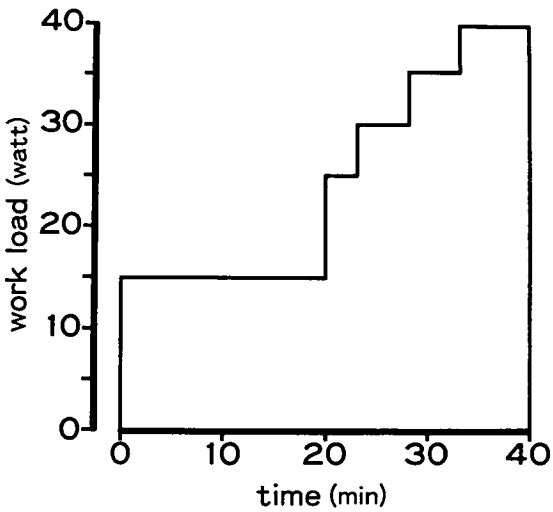


図1　自転車エルゴメーター運動の負荷量．

ベッド安静：前日まで通常の日常生活を過ごした後，当日入院してからは，食事や洗面の他はベッド上で2日間安静を保たせ，経時的に採尿・採血を行った．

測定：尿および採血後直ちに分離した血漿を，測定まで−80℃で凍結保存した．既に報告した方法に従い[1]，尿酸は酵素法で，イノシンとヒポキサンチンは過塩素酸処理抽出液を HPLC 法で測定した．クレアチニンの測定は，自動分析装置を用いて Jaffé 法で行った．

＊大阪大学第二内科

結　　果

自転車エルゴメーター運動：血漿イノシンとヒポキサンチンは，運動直後に著明に上昇した．その後安静により比較的速やかに低下して行き，運動終了後120分には，ほぼ前値に復した（図２）．一方，血漿尿酸は，前値10.6mg/dl に対し，運動後も次第に上昇を続け，運動終了後60分に頂値14.6mg/dl に達した．運動終了後120分にも，依然高値（14.5mg/dl）を持続した（図２）．エルゴメーター運動前，運動中，運動後（各々２時間）に採取した尿中の尿酸排泄量を，**表１**に示した．運動前に比べ，運動中の尿酸排泄は軽度増加し，運動後には約２倍に増加した．

ベッド安静(図３)：外来来院時，血漿および尿中のヒポキサンチンや尿酸は，著明な高値を示した．イノシンは，血漿レベルは正常であったが，来院時の尿中では高値であった．ベッド安静後，血漿ヒポキサンチンは比較的速かに低下し，３時

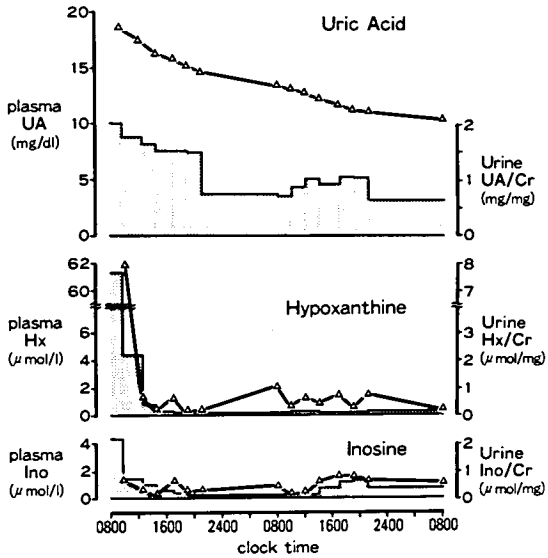


図３　ベッド安静によるVII型患者の血漿（△—△）および尿中（▨）イノシン，ヒポキサンチン，尿酸値の変動．

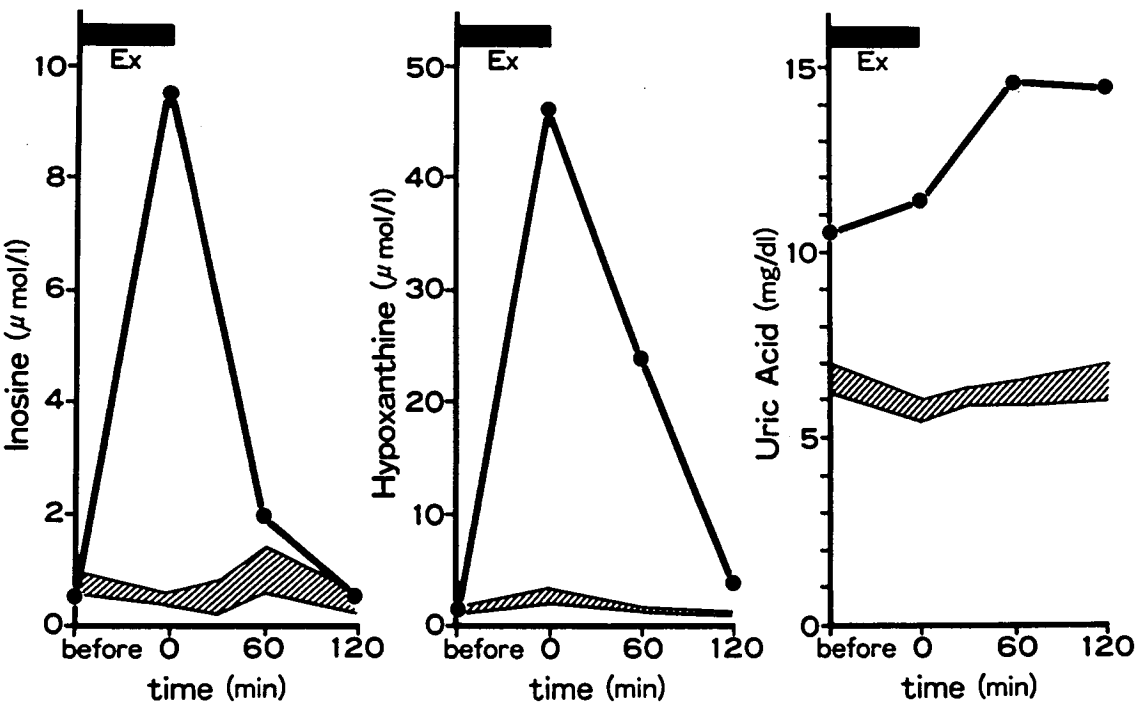


図２　筋運動による血漿イノシン，ヒポキサンチン，尿酸値の変動．
●—●：糖原病VII型患者
▨：健常者（平均±SE, n＝４）

表1　筋運動によるVII型患者の尿中尿酸排泄量の変動.

	Uric Acid/Creatinine (mg/mg)		
	before ex.	during ex.	after ex.
patient	0.81	0.91	1.57
controls(n=4)			
mean	0.48	0.48	0.49
SD	0.14	0.06	0.09

間後には正常化した．一方，血漿尿酸値も，緩徐であるが，安静により著明に低下し，18.6mg/dl から48時間後には10.6mg/dl に至った．これら血漿中の各メタボライトの変動にほぼ平行して，尿中のメタボライトも，それぞれ安静により減少した．24時間の総尿中尿酸排泄は，ベッド安静初日には1054mg/day，2日目には625mg/day であった．

考　　察

糖原病VII型に合併する高尿酸血症は，筋運動時に骨格筋でのプリン体の異化が亢進することによって発現すると，私共は推察した（筋原性高尿酸血症）．本研究は，この仮説の正当性をさらに強く裏づけるものである．

部分的阻血下前腕運動試験において，運動筋局所の血液循環系である肘静脈血中で，イノシンやヒポキサンチン濃度が著増することを既に報告した[1,6-8,11]．本研究では，これらのメタボライトが，全身循環系の血中においても，筋運動後に著明に増加することを明らかにした．これは，糖原病VII型患者の運動筋でのプリン体異化が，量的に極めて著しいことを示している．骨格筋においては，キサンチンオキシダーゼ活性が非常に低いため，ヒポキサンチンがプリン体異化代謝における終末代謝物と考えられる．事実，部分的阻血下前腕運動試験では，肘静脈血中の尿酸値は，VII型患者でも，ほとんど変化しなかった[1,6-8]．ところが，エルゴメーター運動後の全身循環系の血中では，尿酸値が著しく増加した．しかも，この尿酸上昇は，増加したイノシンやヒポキサンチンが運動後の回復期に低下するのと，時間的に一致している．また，運動中の尿への尿酸排泄は低下することなく，運動後に増加した．したがって，VII型患者の血漿尿酸の上昇は，運動筋から血中へ放出された多量のイノシンやヒポキサンチンが尿酸に合成された結果と思われる．血漿中のヒポキサンチンは肝に速かに取り込まれることから，主として肝において尿酸に代謝されるものと考えられる．

運動筋におけるプリン体の異化亢進に起因して，高尿酸血症が発現するという仮説が正しいとすれば，筋運動を制限することによって，逆に尿酸値は低下するはずである．そこで，本研究では長時間の身体安静の効果を検討した．入院時には，尿酸値と共に，血中あるいは尿中のヒポキサンチンやイノシンの著しい高値が認められた．これは，当科来院までの道程において要した身体運動に基づくものと思われる．つまり，糖原病VII型患者では，日常生活における通常の身体活動時にも，筋のプリン体異化が亢進し，したがって高尿酸血症を招来し得ることを示唆している．さて，血漿尿酸値は，予想通り，ベッド安静により著明に低下し，これに伴って尿中への尿酸排泄も減少した．これは，亢進していた尿酸合成が安静によって正常化するためと考えられる．

以上，本研究では，糖原病VII型患者の尿酸代謝が筋運動と密接に関連して変動することを明らかにし，本症の高尿酸血症が筋原性機序に基づくこ

とを証明した．また，前年度の成績と合わせ[11]，二次性高尿酸血症として，新たに筋原性高尿酸血症と称すべき病態の存在することを示した．

結　　語

高尿酸血症を合併する糖原病VII型患者を対象に，筋運動および身体安静による尿酸代謝の変動を分析した．

軽い負荷量の自転車エルゴメーター運動後，患者の血漿イノシンやヒポキサンチンは著増し，これに引き続き血漿尿酸値も増加した．尿中への尿酸排泄は，運動中に低下することなく，運動後に増加した．

外来来院時，患者の血漿ヒポキサンチンや尿酸は著しい高値を呈したが，ベッド安静によって，ヒポキサンチンは比較的速かに正常化し，尿酸値も緩徐であるが著明に低下した．同様に，これらメタボライトの尿中への排泄量も，安静により減少した．

糖原病VII型では，軽度の筋運動によっても，イノシンやヒポキサンチンが筋から血中へ多量に放出される結果，尿酸産生が亢進し，高尿酸血症が発現すると考えられる．

文　　献

1）Mineo I, Kono N, Shimizu T, Hara N, Yamada Y, Nonaka K and Tarui S: Excess purine degradation in exercising muscles of patients with glycogen storage disease types V and VII. J. Clin. Invest. 76: 556-560, 1985.

2）Fogelfeld L, Sarova-Pinhas I, Meytes D: Glycogen storage disease type VII myopathy (Tarui) associated with hemolysis and gout. J. Neurol. 232 (suppl): 186, 1985.

3）嶺尾郁夫，河野典夫，清水孝郎，鷲見誠一，松沢佑次，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.

4）Tarui S, Kono N, Nasu T and Nishikawa M: Enzymatic basis for the coexistence of myopathy and hemolytic disease in inherited muscle phosphofructokinase deficiency. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34: 77-83, 1969.

5）Shimizu T, Kono N, Mineo I, Sumi S, Nonaka K and Tarui S: 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.

6）Mineo I, Kono N, Shimizu T, Sumi S, Hara N, Yamada Y, Takahashi M, Nonaka K and Tarui S: Accelerated muscle purine degradation in muscular glycogenoses. A pathogenesis of hyperuricemia in muscle phosphofructokinase deficiency. J. Neurol. (suppl) 232: 44, 1985.

7）Kono N, Mineo I, Shimizu T, Hara N, Yamada Y, Nonaka K and Tarui S: Increased plasma uric acid after exercise in muscle phosphofructokinase deficiency. Neurology 36: 106-108, 1986.

8）嶺尾郁夫，河野典夫，清水孝郎，鷲見誠一，原尚子，山田祐也，野中共平，垂井清一郎：糖原病VII型における高尿酸血症の成因―筋プリンヌクレオチドの異化亢進―について．尿酸 8：131-135, 1984.

9）Tarui S, Okuno G, Ikura Y, Tanaka T, Suda M and Nishikawa M: Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. A new type of glycogenosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19: 517-522, 1965.

10）嶺尾郁夫，垂井清一郎：糖原病V型（McArdle病）とVII型（Tarui病）．内科セミナー，永井書店，分子病II：pp185-202, 1982.

11）垂井清一郎：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．筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究(杉田班)．昭和59年度研究報告書：pp226-229, 1984.

56) 収縮の燐核磁気共鳴による研究

山 田 和 広*

研究協力者　米 谷 快男児*　田之倉　優*
北 野 敬 明*　河 野 義 久*

筋肉の収縮は，ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントが互いに滑りこむことによって生じる．この過程はATPの分解を伴っている．すなわちATPの化学エネルギーが力学的エネルギーに転換される．しかし，ATPの分解は，クレアチンキナーゼ反応のために，実際にはクレアチン燐酸PCrの分解として観測される．クレアチン燐酸の分解は，それと化学量論的に等しい無機燐酸(P_i)の遊離を伴うと信じられてきた．上にのべたような理由から，筋収縮におけるエネルギー変換過程の研究には，力学的エネルギーの産生と，化学的エネルギー利用との対応を調べることが必要となる．化学分析法による，化学的エネルギーの利用の測定は，この方法が破壊的であるために多くの困難を伴う．とくに，化学的エネルギーの利用の経時的変化を知るためには，燐核磁気共鳴(^{31}P NMR)のような非破壊的方法を用いることは大変有利である．

我々は，これまでに，多数の筋組織を用いて燐NMRの感度を向上させ，収縮に伴うクレアチン燐酸および無機燐酸レベルの変化の高時間分解能測定を行った．その結果，低温における収縮の弛緩の直後には遊離した無機燐酸に十分見合う量のクレアチン燐酸が分解されていないこと，およびそれに引続く回復過程において，クレアチン燐酸の分解（したがってATPの分解）がP_iの遊離を伴わないで進行する事実を見出した[1]．

これまでに得られた以上のような結果は，収縮の弛緩の直後において認められるクレアチン燐酸の分解よりも余計に遊離されるP_iの部分，すなわち収縮後のクレアチン燐酸の分解（post-contractile PCr utilization）は，収縮タンパクであるアクチンとミオシンの間の反応に由来するという可能性を示していた．その理由は，1）収縮後のクレアチン燐酸の分解量は収縮の持続によらずほぼ一定であること[1]，2）その量は筋のミオシン含量に近い（筋組織のグラム重量当り0.28 μmol[2]）こと，および3）ATPase反応中間体（ミオシンの場合はアクチン—ミオシン・ADP・P複合体）から先ずP_iが遊離され，引き続いてADPが遊離されるという性質は，アクトミオシンATPaseに特徴的であることによる．

1．筋収縮の燐核磁気共鳴による研究方法の進歩

本研究は大口径NMR試料管（外径25mm）を用い，8匹のウシガエルから得た16の縫工筋を生理的状態に保ち，燐NMR測定の感度の向上をはかった．酸素の供給および温度調節のために，約60ml/minの速度でリンガー液による灌流を行った．NMR装置はブルーカWM200wbを用いた．電流刺激によって筋（合計約10g）は約5kgの張力を生じた．測定は4秒おきに行い，4および16回の測定結果を加算して得たスペクトルについて，計測を行った．したがって測定の時間分解能はそれぞれ16秒および64秒である．また必要に応じて「シングルスキャン」を用いたが，この場合には時間分解能は100ミリ秒以下である．さらに収縮をくり返して，それぞれの収縮に同期した信号を加算することによって，スペクトルのS/N比をさらに向上させることが必要であった．精度のよい計測のためには，64回程度の収縮をくり返すことが必要であった．一方NMR測定における誤差の

*大分医科大学

最大の原因は「飽和」によって生じる．NMR 測定を2秒程度の間隔でくり返すとき，それぞれの分子種によって生じるピークの面積はかなり減少する．この「飽和」による効果は補正が可能であるが，このためには測定のくり返し時間を厳密に制御しなければならない．

2．高速燐 NMR による収縮におけるエネルギー利用の動態

クレアチン燐酸の収縮後分解．図1aは，4℃における2秒間の強縮刺激による収縮の弛緩後の，回復過程における無機燐酸（Pi）およびクレアチン燐酸（PCr）の変化の経過を，上にのべたような方法を用いて，燐 NMR によって測定した結果を示したものである．測定は4秒間隔で行い，4回の測定を加算して一つの測定単位としているので，最小の時間分解能は16秒となる．また40分の間隔で16回の収縮を行わせ，収縮に同期した信号を加算して，スペクトルの S/N 比をさらに向上させた．積分によって各ピークの面積強度を求め，「飽和」の補正を行い，次いで摘出後で刺激開始前の静止筋に存在するクレアチン燐酸の量が筋単位重量当り27μmol として，各々の燐化合物の絶対濃度を算出した．図に示しているように，収縮による無機燐酸（P_i）の増大は，張力の弛緩直後に最も大きな値を示し，以後次第に回復する．この過程は一つの指数関数によって説明することができる．一方，収縮弛緩直後のクレアチン燐酸の分解量は，P_iの増加量を説明できるほど大きくない．PCr 分解はこれに続く回復過程においてさらに減少が数分間持続する．この事実は，特に低温においては，筋の収縮弛緩後の回復過程の初期に，収縮に利用された ATP に加えてさらに ATP を消費することを意味している．回復過程初期の数分間をのぞくと，PCr の回復による増大の経過は，P_iの回復過程と同じ時定数をもつ指数曲線によってよく説明することができる．

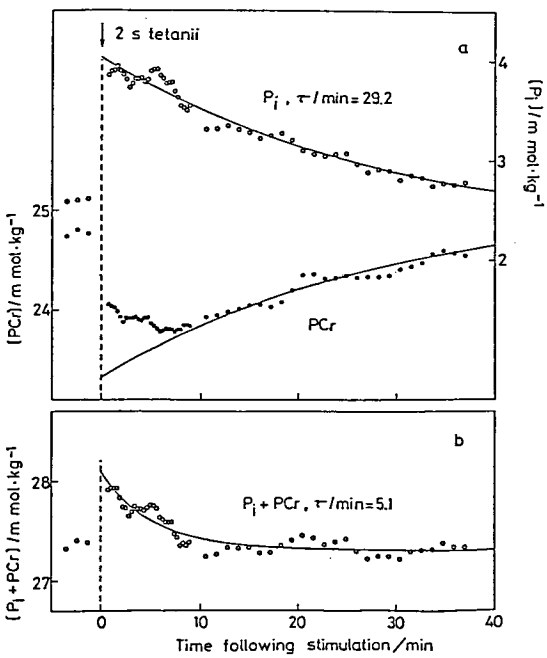


図1　a．短い（持続2秒）等尺性強縮による P_i および PCr の変化とその回復時間経過（4℃）．
b．a における P_i と PCr の和を示す．

燐化合物の全量の変化．化学分析法と比べるとき，燐 NMR 法では水溶液相においてかなり自由な燐化合物のみを計測している．短い収縮によって実際に変化する燐化合物は P_i と PCr のみであるから，燐化合物全量は P_i+PCr と考えてよい．上にのべた結果を燐化合物の全量として示すとき，収縮弛緩後の回復過程初期においては，一時的に燐化合物全量が増大している（図1b）．このことは，収縮の弛緩直後には結合燐化合物（P_iであろう）がすでに遊離しているが，ATP の利用はこれにさらに遅れると考えるとよく説明することができる．

温度の影響．これまでにのべた収縮後の ATP 利用の減少が真にアクトミオシン ATPase などの化学過程を反映しているならば，温度の影響を強く受けるはずである．このような温度の影響は実際の測定で確かめられた．すなわち，1℃における測定では収縮後の ATP 利用の相はかなり遷延するのに対して，これとは逆に10℃においては収縮後の ATP 利用の相は，この測定における時間分解能のもとではほとんど認められなくなる．以上の結果は，収縮後の ATP 利用の過程の温度依存性を示しているとともに，このような減少が単

なる測定システムに由来するアーティファクトである可能性を否定する．

回復過程．図1aに示すように，P_iの回復過程は一つの指数曲線によって表わすことが出来る．図には測定点に最も良く一致する指数曲線とその時定数の値が示してある．回復過程の時定数は温度の影響を受け，10℃の上昇によって25—30%減少する．一方，筋組織における酸素の拡散速度は1℃当り1%しか増加しない．このことから，この実験に用いたウシガエル縫工筋について，回復過程の速度を規定している因子は，酸素の拡散速度だけではなく，回復過程自体の速度も加わっていると言うことができる．

ATPの収縮後利用の相にたいする筋節長の影響．上にのべたように，収縮後のATP利用の現象がアクトミオシン機構によるものであるとすると，この現象はフィラメント間の重なり，すなわち筋の長さに依存するはずである．このことを調べるために，最近我々は，同様の方法を半腱様筋に適用して，筋の長さの影響を調べている．半腱様筋は，伸展性が大きいため，クロスブリッジ生成が殆どない（張力が殆ど発生しない）長さまで筋を引きのばすことができる．これまでに得られた結果はこの現象がアクトミオシン機構すなわちクロスブリッジによるものであることを示している．

3．筋肉におけるエネルギー転換機構研究の展開

筋肉の収縮に際しては，ATPの分解によってそのエネルギーが供給されているのだから，収縮によるエネルギーの遊離量は，ATPの分解量と一致していなければならない．しかし，この両者を比較するときエネルギーの遊離はATPの分解量よりも大きく，エネルギー収支は成り立っていない[3]．短かい収縮では，収縮中にATPおよびPCr以外の燐化合物の分解は認められていないから，収縮によるこの余分のエネルギー産生分は，収縮後のATPすなわちPCr分解によって相殺されているはずである．このように，PCrの収縮後分解は予想されることであった．しかし一方では，このような収縮後のPCr分解を化学的分析によって証明しようとする試みが，これまでにいくつかなされているが，その結果には多くの矛盾がみられる．本研究における燐NMR法によってはじめて，収縮後のPCr利用相が明らかとなった．また，燐NMR法を用いてはじめて，P_iの遊離とPCrの分解の間には時間的なずれが生じていることが示された．このことは，溶液中に遊離された自由な分子だけを測定するという，NMR法に内在する特質あるいは利点を強く示している．それでは，このようなP_i遊離とPCr利用の時間的な分離，すなわち収縮後のPCr利用が，生じるメカニズムはどのようなものであろうか．さきにのべたように，弛緩直後におけるPCr分解に対応しないP_i遊離量（この量は収縮後のPCr分解量と一致すると考えられる）は，筋のミオシン量に一致している．したがってそのメカニズムはアクトミオシンATPase反応によると考えられる．収縮の定常状態においてミオシン分子の大部分がアクチン—ミオシン—ADP複合体（A-M・ADP）であるとすると，この複合体はすでにP_iを遊離しているが，弛緩に際してM・ADP複合体は，特に低温においてはADPをゆっくりと遊離した後ATPを再結合すると考えられるので，上にのべた実験の結果をよく説明することができる．ミオシンのサブフラグメント1からのADP遊離は温度依存性が非常に大きいことが知られている[4]．

4．研究の展望とジストロフィー症研究

以上のように，燐NMR法を筋収縮のメカニズムの研究，とくにそのエネルギー転換機構の研究に用いることによって，新しい研究の展開がなされた．それは，従来の化学分析法にとってかわるものではないが，化学分析法では達成し得ないいくつかの大変重要な特性を備えている．今後，筋収縮において達成された方法をモデルとして，収縮のみならず他の多くのエネルギー転換過程の研究が，燐NMRを用いて行われることが予想される．

本研究で新らたに用いた，半腱様筋を対象とする筋チェンバーは，その刺激電極等の形態に特徴があるため，ラット下肢のいくつかの筋の研究にそのまま用いることが可能であると思われる．し

たがってmdxマウス下肢筋を対象として，そのNMRスペクトルの特徴，収縮によるエネルギー利用の動態の研究が急速に進展する段階に至った．

文　献

1) Yamada, K. & Tanokura, M.: Post-contractile phosphocreatine splitting in muscle as revealed by time-resolved ^{31}P nuclear magnetic resonance. Jpn. J. Physiol. 33: 909-919, 1983.

2) Ebashi, S., Endon, M. & Ohtsuki, I.: Control of muscle contraction. Quart. Rev. Biophys. 2: 351-384, 1969.

3) Gilbert. C., Kretzschmar, K. M., Wilkie, D. R. & Woledge, R. C.: Chemical change and energy output during muscular contraction. J. Physiol. 218: 163-193, 1971.

4) Bagshaw, C. R.: The kinetic mechanism of the manganous ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin subfragment 1. FEBS Lett. 58: 197-201, 1975.

57) Duchenne型筋ジストロフィーの筋変性壊死機構
── opaque線維の役割を中心に ──(第2報)

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（DMD）の生検筋中には壊死筋線維（necrotic muscle fiber; NF）や再生筋線維（regenerating muscle fiber; RF）に混じて，いわゆる"opaque muscle fiber"（OF）と呼ばれ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1981年以来，このOFについて生化学的検討を加え，DMDの筋変性壊死機構におけるOFの病的意義について報告してきた[1)~3)]．今回は，DMDの病初期より末期にいたる臨床経過で，OFが病気の進行に伴ない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およびRFはいかなる経時変化を示すのかを明らかにするため，前回の報告[4)]に更に症例を加え，OF・NF・RF頻度と年齢との相関について統計学的検討を行ったので報告する．

対象と方法

対象は前回報告した12例のDMDに更に5例を加えた合計17例のDMD患者（年齢4～24歳）で，2例を除いて他は全て腓腹筋にて筋生検を行った（表1）．生検筋は液体窒素で－150℃に冷却したイソペンタン中で凍結し，クリオスタットにて厚さ8μの凍結切片を作成し，組織化学染色（hematoxyline-eosin, modified Gomori trichrome, myosin ATPase染色など）およびacridine orange染色標本を作成した．光学顕微鏡下に33倍の倍率で一標本あたり10～20ヶ所のブロックに分けて写真撮影を行い，最終倍率200倍のカラー写真を作成した．これらの写真を用いて各生検筋中に含まれる全筋線維数に対するOF，NF，およびRF数を数えて，それぞれの頻度を百分率で算定した．但し，人工産物を生じやすい切片標本の周辺部は計算から除外した．またOF・NF・RF出現頻度とDMD患者年齢との間に一定の相関があるか否かについて相関図を作成し，相関係数・回帰直線を求め，t検定にて統計学的に検討した．なおRFの検索にあたってはmyosin ATPase染色（pH10.4，4.6，4.3）によるtype 2C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RFの指標に用いた[5)6)]．

結　果

DMD17例で検索した筋線維総数は13,938本（200～1,856，$\bar{x}$＝820）で，OF頻度は症例により変動するが，平均8.3%に認められた．NFは平均0.4%に認められたが，若年で高率で，年齢が長ずるに従って減少した（表1）．RFはtype2C線維頻度で平均10.9%，acridine orange染色陽性（AO positive）線維頻度で平均5.7%に認められ，type2C線維頻度が高値を示したが，いずれも17～18歳以降は著減しており，極めて近似した経時的変動パターンを示した（表2）．

OF，NF，RF出現頻度とDMD患者年齢との相関について検討するため，横軸に患者年齢，縦軸にOF，NF，RFの各出現頻度をプロットして相関図を作成すると図1，2，3のようになる．OF頻度と年齢との相関係数は$r=-0.46$で負の相関がみられ，$y=12.90-0.34x$の回帰直線が得られた（図1）．但しt検定では危険率10%の水準

＊熊本大学第一内科

表1　Percentage of opaque and necrotic muscle fibers in 17 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	1.306	129(9.9)	12(0.9)
3	12	Gastrocnemius	1.856	284(15.3)	3(0.2)
4	13	Tibialis ant	1.309	37(2.8)	6(0.5)
5	15	Gastrocnemius	1.051	107(10.2)	6(0.6)
6	15	Gastrocnemius	1.199	153(12.8)	4(0.3)
7	16	Gastrocnemius	666	26(3.8)	5(0.7)
8	16	Gastrocnemius	454	6(1.3)	1(0.2)
9	17	Gastrocnemius	603	42(7.0)	0(0)
10	17	Gastrocnemius	1.198	81(6.8)	0(0)
11	17	Gastrocnemius	957	25(2.6)	3(0.3)
12	18	Gastrocnemius	650	86(13.2)	0(0)
13	20	Gastrocnemius	1.025	91(8.9)	3(0.3)
14	20	Gastrocnemius	212	18(8.5)	0(0)
15	24	Gastrocnemius	593	19(3.2)	0(0)
16	24	Gastrocnemius	220	8(3.6)	0(0)
17	24	Gastrocnemius	200	6(3.0)	0(0)
		Total	13.938	1.163(8.3)	55(0.4)

では有意な相関がみられたものの，危険率5％の水準では有意な相関は得られなかった．NF出現頻度と患者年齢との相関係数rは－0.83で，y＝1.93－0.09xの回帰直線が得られた（図2）．t検定では危険率0.1％の水準で有意な相関がみられた．RF頻度と年齢との相関については，type2C線維およびacridine orange陽性線維頻度とも17歳前後までは高率に認められ，それ以降は急速に減少しており，相関図からは必ずしも直線的な相関ではないように思われたが，相関係数を求めてみると，type2C線維はr＝－0.72で2％の危険率で有意な相関がみられ，acridine orange陽性線維はr＝－0.90で0.1％の危険率で有意な相関がみられた（図3）．

表2　Percentage of type 2C & AO positive fibers in DMD 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	1,789	133(7.4)	1,715	120(7.0)
3	12	1,706	279(16.4)	416	36(8.7)
5	15	281	37(13.2)	605	33(5.5)
6	15	416	36(8.7)	362	25(6.9)
9	17	—	—	603	22(3.6)
10	17	470	54(11.5)	397	27(6.8)
11	17	355	40(11.3)	213	7(3.3)
12	18	147	7(4.8)	330	3(0.9)
14	20	60	0(0)	48	0(0)
16	24	83	1(1.2)	64	0(0)
17	24	63	0(0)	46	0(0)
Total		5,370	587(10.9)	4,799	273(5.7)

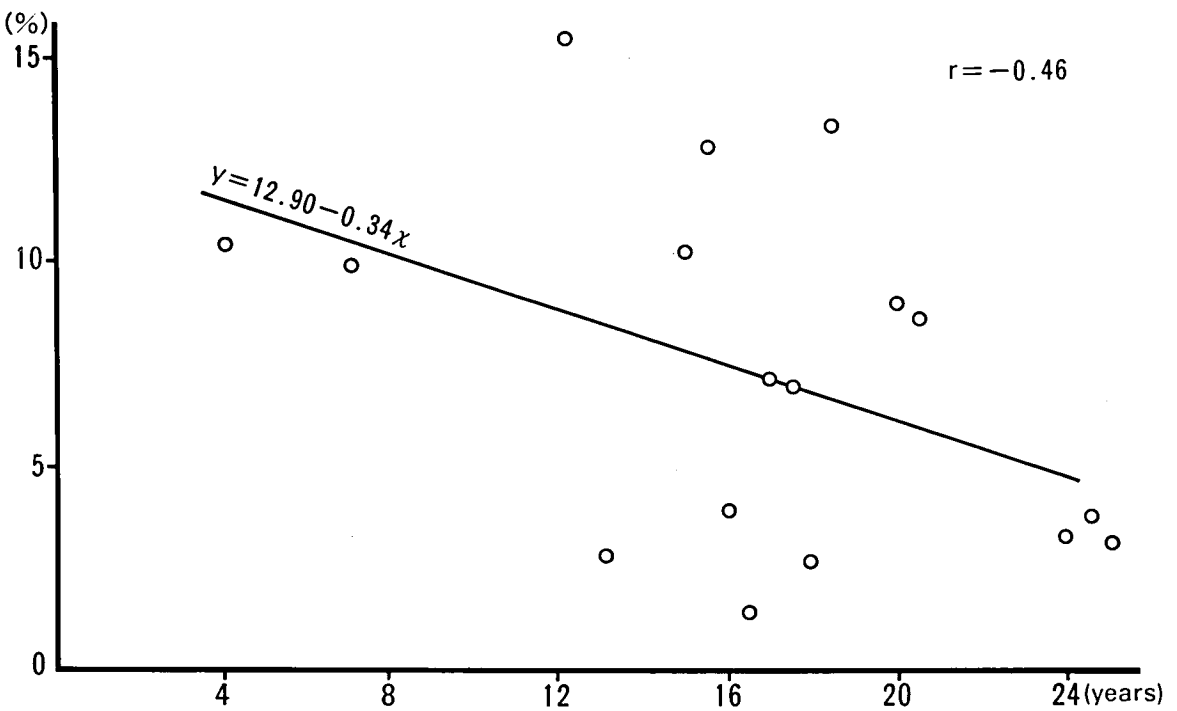


図1　Change over time in the frequency of opaque muscle fibers in DMD muscles

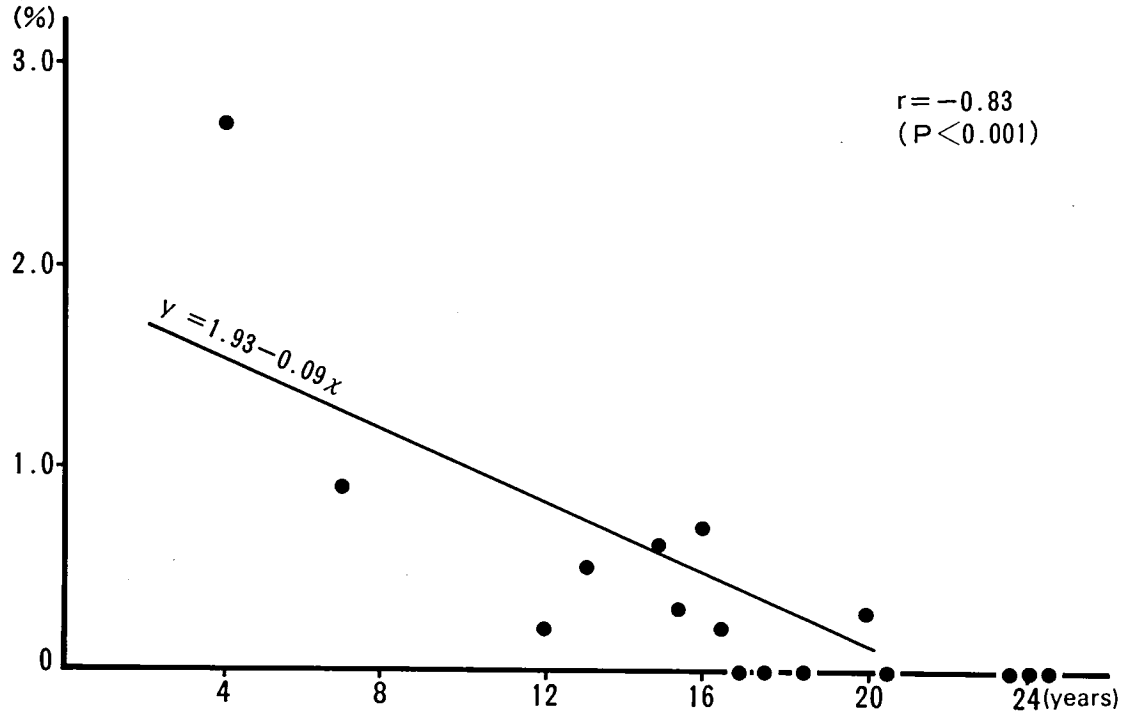


図 2　Change over time in the frequency of necrotic muscle fibers in DMD muscles

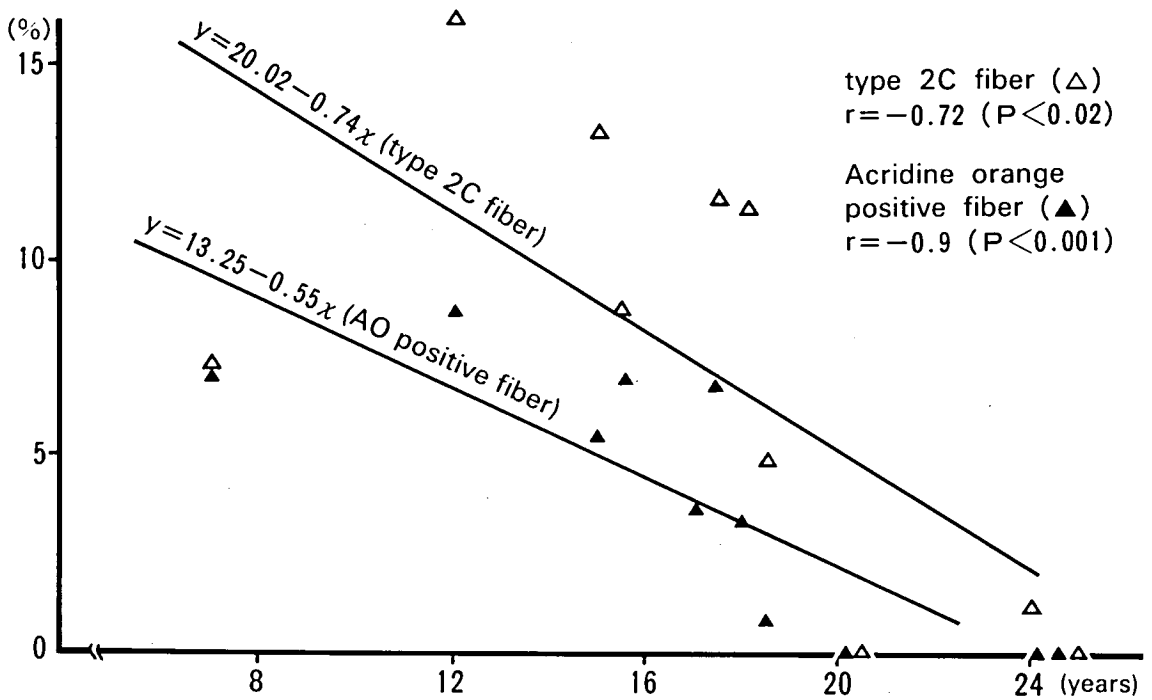


図 3　Change over time in the frequency of regenerating muscle fibers in DMD muscles

考　　案

DMDの成因究明には，近年盛んに研究が進められている分子遺伝学的立場からの病的遺伝子の単離・構造解析[7)8)]とともに，病的遺伝子によって筋線維の変性壊死が発現する一連の機構を明らかにしていくことが必要である．我々はDMDの筋変性壊死機構を解明していく一つの手段として，筋変性の初期変化像か人工産物かで長く論議されてきたOFに着目し，single fiberによる筋構造蛋白の分析を続けてきた．その結果OFの一部はα-actininおよびdesminの有意な減少など特徴的な筋構造蛋白の変化を示すところから，"壊死前段階"の病的筋線維が含まれている可能性が高いことを報告した[3)]．この観点に立てば，DMD骨格筋では正常筋線維がOFをへて，NFとなり，再生活動によりRFが形成され，OF→NF→RFの筋変性・再生サイクルのもとに回転していると考えられるので，OF，NF，およびRFは互いに密接な関連をもって経時的に変動していることが予想される．そこで今回DMDの病初期から末期にいたるOF，NF，およびRFの出現頻度の経時的変動パターン並びに年齢との相関について検討したが，OF・NF・RFは年齢との間にいずれも負の相関を示し，年齢が長ずるに従って減少する傾向を示した．ただこの中でNFとRFは特に高い負の相関を示し，推計学的にも有意な相関を示したが，OFは推計学的には有意な相関を示さなかった．このことに関連して，Mastagliaら[9)10)]は3～17歳のDMD11例について検討し，NF，RFとも年齢が長ずるに従って減少する傾向があることを認めており，DMDにおけるRFにはしばしば形態異常があることを報告している．またBradleyら[11)]はpreclinical stageの2.5週から6歳のDMD19例について検討し，Hyaline fiber (OF)が2.5週でも高頻度に認められること，年齢とともにphagocytosisが増加するが，RFは次第に減少することを述べている．今回の検索結果からはOFとNFの経時変化が必ずしも相関していないようにも判断されるが，これまで明らかにした生化学的所見[1)~3)]とも合わせ，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るので，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と考えられる．

一方RFも年齢との間に有意な負の相関を示したが，相関図からは単なる直線的な相関ではなく，17歳前後までは比較的一定した高い出現頻度を示し，それ以降は急速に減少するという独自の変動パターンを示しているようにも解釈できる．この解釈が妥当であるか否かは更に多数例での検討が必要であるが，筋再生の反復の結果，17～18歳頃に筋再生を疲弊させ，再生活動が急速に減衰する何らかのcritical pointが存在するのではないかと推定される．この点に関してWakayamaら[12)]は1～17歳のDMD15例についてDMD stageで2～3のmildないしmoderate stageの症例でsatellite cellの数が著明に増加し，advanced stageでは少なくなることを述べているが，17歳以降の症例については検索されていないため，さらに年長例ではsatellite cellの数が急速に減少するか否かは不明である．またSchmalbruch[13)]は2例のDMD生検筋の連続切片標本による検索で，DMD筋には神経支配を受けていないと思われるRFが多数存在し，そのため再生活動が不完全で最終的には消滅することを述べている．

今回の検索でNFは年齢と共に減少し，20歳以降は殆ど認められなくなったが，全体の筋線維数の減少に伴う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の関与が示唆され，これらの点については今後更に詳細な検討が必要であろう．

要約並びに結論

(1) 4～24歳のDMD17例について，各年齢別のopaque線維（OF），壊死線維（NF），再生線維（RF）の出現頻度を検索した．

(2)生検筋中のOF頻度は症例により変動するが，平均8.3%に認められ，NFは若年で高率で，年齢が長ずるに従って減少し，平均0.4%に認めら

れた．RF は17歳頃までは 7 ～16%に認められ，それ以降は急速に減少した．

(3) OF, NF, RF 頻度と年齢との相関係数は，それぞれ－0.46, －0.83, および－0.90で，OF を除いて統計学的に有意な相関（P＜0.001）を示した．

(4) OF は統計学的には年齢との間に有意な相関を示さなかったが，これまで明らかにした生化学的所見とも合わせ，人工産物的 OF と“壊死前段階”の病的 OF を区別して再検する必要があり，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と考えられた．

文　献

1）内野誠，荒木淑郎ら：Duchenne 型筋ジストロフィーにおける opaque fiber の筋構造蛋白に関する研究．臨床神経23：706, 1983.

2）内野誠，荒木淑郎ら：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25：166, 1985.

3）Uchino M, Araki S et al : Structural proteins of the opaque muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. Neurology 35 : 1364, 1985.

4）内野誠，荒木淑郎ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症の筋変性壊死機構－opaque 線維の役割を中心に－．臨床神経25：944, 1985.

5）Nonaka I, Takagi A et al : The significance of type 2C muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve 4 : 326, 1981.

6）Miike T, Tamari H et al : A fluorescent microscopy study of biopsied muscles from infantile neuromuscular disorders. Acta Neuropath (Berl) 59 : 48, 1983.

7）Conneally PM : Probe for muscular dystrophy. Nature 316 : 763, 1985.

8）Monaco AP, Bertelson CJ et al : Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. Nature 316 : 842, 1985.

9）Mastaglia FL, Kakulas BA : Regeneration in Duchenne muscular dystrophy : A histological and histochemical study. Brain 92 : 809, 1969.

10) Mastaglia FL, Papadimitriou JM et al : Regeneration of muscle in Duchenne muscular dystrophy : An electron microscope study. J neurol Sci 11 : 425, 1970.

11) Bradley WG, Hudgson P et al : Structural changes in the early stages of Duchenne muscular dystrophy. J Neurol Neurosurg Psychiat 35 : 451, 1972.

12) Wakayama Y, Schotland DL et al : Quantitative ultrastructural study of muscle satellite cells in Duchenne dystrophy. Neurology 29 : 401, 1979.

13) Schmalbruch H : Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy : A serial section study. Neurology 34 : 60, 1984.

58) Nemaline myopathyの筋構造蛋白

小　口　喜三夫*

研究協力者　武　田　伸　一**　庄　司　進　一**　柳　沢　信　夫**
田　中　恵　子***　宮　武　　正***　三　池　輝　久****

はじめに

Nemaline myopathyは異常構造物としてnemaline rodを有する一方で，組織化学的にfiber typeの異常を呈することが知られている．nemaline rodについては，杉田らの精力的な研究[1]があるが，fiber typeの異常については充分明らかにされていない．我々は，電気泳動的手法を用いて生検筋のmyosin light chainの解析を行なってきた[2)3)]．これまでuniform type 1 fiberあるいはtype 1 fiber predominanceを呈したnemaline myopathy筋の分析では，slow form優位でfast formのlight chain 2を欠如した特異なmyosin light chain構成を認め[2)]，単一筋線維の解析でも検索された汎ての線維で同一の構成を認めた[3)]．今回は，nemaline myopathyの家族例を対象として，同一例の複数筋の解析をする事ができた．一部の生検筋については，単一筋線維を単離し，更に別の生検筋については，組織対応法により，type 1 fiberとtype 2 fiberを分離採取し，それぞれ筋構造蛋白の解析を行なった．

対象と方法

nemaline myopathy家系の同胞3例（新潟大学症例）の計5生検筋と，別家系1例（熊本大学症例）の1生検筋を対象とした（表）．

(1) 組織化学的検索：生検筋の凍結切片について，hematoxylin-eosin染色，Gomori-trichrome染色，NADH-TR染色，ATPase染色などを施し，観察に供した．

表

Cases

No.	Age	Sex	Part of biopsy
1.	14	F	biceps brachii / gastrocnemius
2.	* 11	M	biceps brachii / gastrocnemius
3.	9	F	gastrocnemius
4.	** 1	M	biceps brachii

* Niigata University (Drs. Toyoshima & Tanaka)

** Kumamoto University (Dr. Miike)

(2) whole homogenateの分析：各生検筋の凍結切片あるいは凍結乾燥切片一枚を材料として，O'Farrellのlysis buffer下で充分にhomogenizeし，既に報告したマイクロ二次元電気泳動法[4)]を一部改変して行なった．染色はOakleyの方法[5)]を改変した銀染色法により，撮影はポラロイドシステムを用いた．

(3) 単一筋線維の分析：一例の凍結生検筋について，実体顕微鏡下，relaxing solution中で，単一筋線維を単離し，lysis buffer下でhomogenize後，二次元電気泳動法と銀染色法を用いて分析を行なった．

(4) 組織対応法[6)]による分析：一部の症例の凍結乾燥切片について，連続した凍結切片の組織化学的所見を対照しながら，実体顕微鏡下でtype 1 fiberとtype 2 fiberを分離して採取し，それぞれlysis bufferに浸し，上記の二次元電気泳動法と銀染色法により分析した．

＊国立長野病院
＊＊信州大学第3内科
＊＊＊新潟大学脳研究所神経内科
＊＊＊＊熊本大学発達小児科

結　　果

(1)　生検筋の組織化学的所見：生検筋の組織化学的所見は生検部位により異なる傾向があった．症例1～3のgastrocnemiusでは，Gomori-trichrome染色でみると，殆どの筋線維にnemaline rodが認められ，NADH-TR染色では，濃染する傾向の線維と淡染する傾向の線維が認められるものの，fiber typeの分別は困難であった．しかもこれらの線維はATPase染色でみると殆どがtype 1 fiberであった．一方，症例1～2のbiceps brachiiでは，Gomori-trichrome染色でみると，小径の線維（平均直径30～35μ）のみにnemaline rodが認められ，大径の線維（平均直径60～80μ）には殆ど認められなかった．NADH-TR染色では，小径の線維は濃染するtype 1 fiber，大径の線維は淡染するtype 2 fiberであり，ATPase染色の結果も一致していた．症例4のbiceps brachiiでは，fiber typeの分化は良好で，type 1 fiberが優位を占めるfascicleとtype 2 fiberが優位を占めるfascicleが認められた．

(2)　生検筋の筋構造蛋白：症例1～3のgastrocnemiusのwhole homogenateの電気泳動では，**図1**に示すように，myosinのlight chainについては，slow formのlight chain 1と2が主体で，fast formのlight chain 1と3を混じ，fast formの light chain 2を欠如した特異なhybrid patternを呈した．その他の蛋白についてみると，actin, tropomyosinには著変なく，troponin Cについてはslow formのみが存在し，desminは増加していた．一方，症例1～2のbiceps brachiiについて電気泳動を行なうと，**図2**に示すようにmyosin light chainはむしろfast form優位であって，fast formのlight chain 1，2，3とslow formの light chain 1，2が混在するmixed patternを呈した．troponin C は fast form とslow formの両型が存在し，desminは増加していた．症例4のbiceps brachiiについても症例1～2のbiceps brachiiとほぼ同じ結果を得た．

(3)　単一筋線維の解析：myosin light chainの分析でfast form優位のmixed patternを呈した症例4のbiceps brachii標本について，10本余りの単一筋線維を単離し解析する事ができた．個々の筋線維のmyosin light chainについてみると，**図3**に示すように，light chain 1と2について

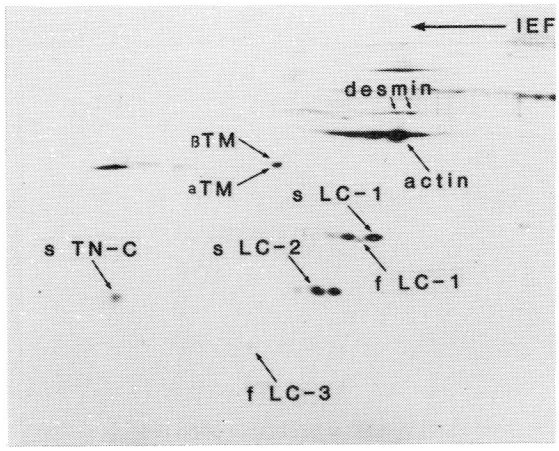


図1　症例3，gastrocnemiusの二次元電気泳動像．等電点電気泳動（IEF）からSDS-PAGEへの二次元像を示す．myosinのlight chain（LC）1，2，3，actin，tropomyosin（TM），troponin C（TN-C），desminの各スポットが示されている．slow form(s)優位でfast form (f)のlight chain 2が発現していない事に注目．acrylamide 15%，銀染色（以下同じ）．

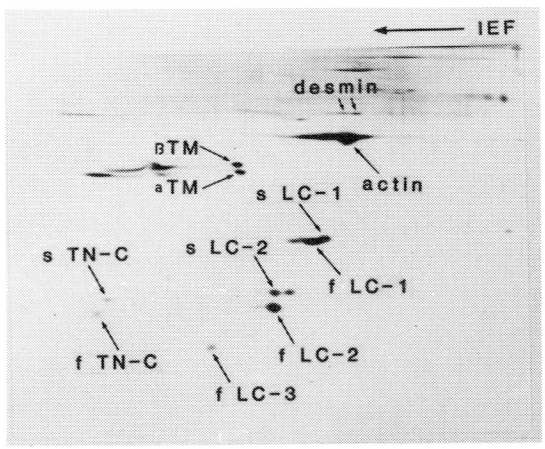


図2　症例2，biceps brachiiの二次元電気泳動像．myosinのlight chainはfast form (f)優位のmixed patternでtroponinC (TN-C)もfast form (f)，slow form (s)共に存在する事に注意．

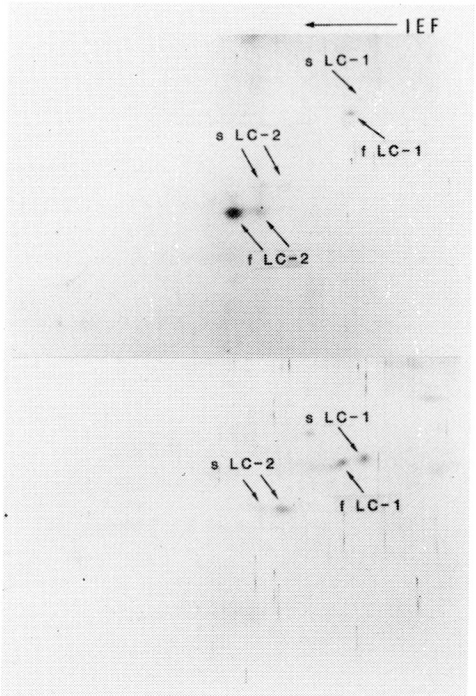


図3　症例4，biceps brachiiの単一筋線維の二次元電気泳動像. myosin light chainについてmixed patternであるが,fast form（f）が優位である例（上段）と，slow form（s）が優位でfast formのlight chain 2（fLC-2）を欠如した例（下段）を示す.

mixed patternを示すもの，mixed patternであるがfast formが優位であるもの，slow formが優位であるものに加えて，slow formのlight chain 1と2及びfast formのlight chain 1が発現し，fast formのlight chain 2が欠如したpatternを示すものが約30%に認められた．whole homogenateでは，fast form優位のmixed patternを呈する筋でも，個々の筋線維のレベルでは，fast formのlight chain 2を欠如した特異な構成の筋線維が含まれている事が明らかとなった.

(4)　組織対応法による解析：組織化学的所見の上でfiber typeの分化が良好でmyosin light chainがfast form優位のmixed patternであった症例2のbiceps brachiiの凍結乾燥切片についてtype 1，type 2 fiberを分離採取し，二次元電気泳動法により分析した．一枚の凍結乾燥切片から各タイプ60～80個の筋線維を比較的短時間に採取する事が可能であった．切片全体のmyosin light chainのpatternは図4に示すように，fast formとslow formのmixed patternであるのに対して，type 2 fiberでは，fast form優位のmixed patternを呈していた．一方，type 1 fiberではslow formが主体を成していた．特に40～60個の筋線維の分析では，fast formのlight chain 2は認められなかったが，60～80個の筋線維を分析してみると，わずかではあるがfast formのlight chain 2が混在していた．fast formの混在する比率から考えて，fast formのlight chain 2を欠如した線維の存在が考えられるが，type 1 fiberというcategoryの中には，fast formのlight chain 2を有する線維も存在する事が示された.

考　　察

本研究では以下の3点が明らかにされた.

(1)　nemaline myopathy骨格筋では，生検部位により所見が異なっていた．gastrocnemiusではNADH-TR染色でfiber typeの分化が悪くATPase染色ではtype 1 fiber主体でありnemaline rodが全体に散在していた．biceps brachiiではfiber typeの分化が良好で，nemaline rodは小径のtype 1 fiberに多く認められた.

(2)　myosin light chainのpatternをみると，分化の悪いgastrocnemiusでは，slow formのlight chain 1と2が主体でfast formのlight chain 2が欠如する特異なhybrid patternを呈し，troponin Cもslow formのみが存在した．一方，分化の良いbiceps brachiiではfast formのlight chainにslow formのlight chainが混在するmixed patternを示し，troponin Cについてもfast, slow両型が存在していた.

(3)　分化の良い骨格筋の単一筋線維及び組織対応法による分析では，分離されたtype 1 fiberの中にfast formのlight chain 2を欠如した特異な構成の筋線維が存在する事が示された.

以前から,nemaline myopathy骨格筋は様々な

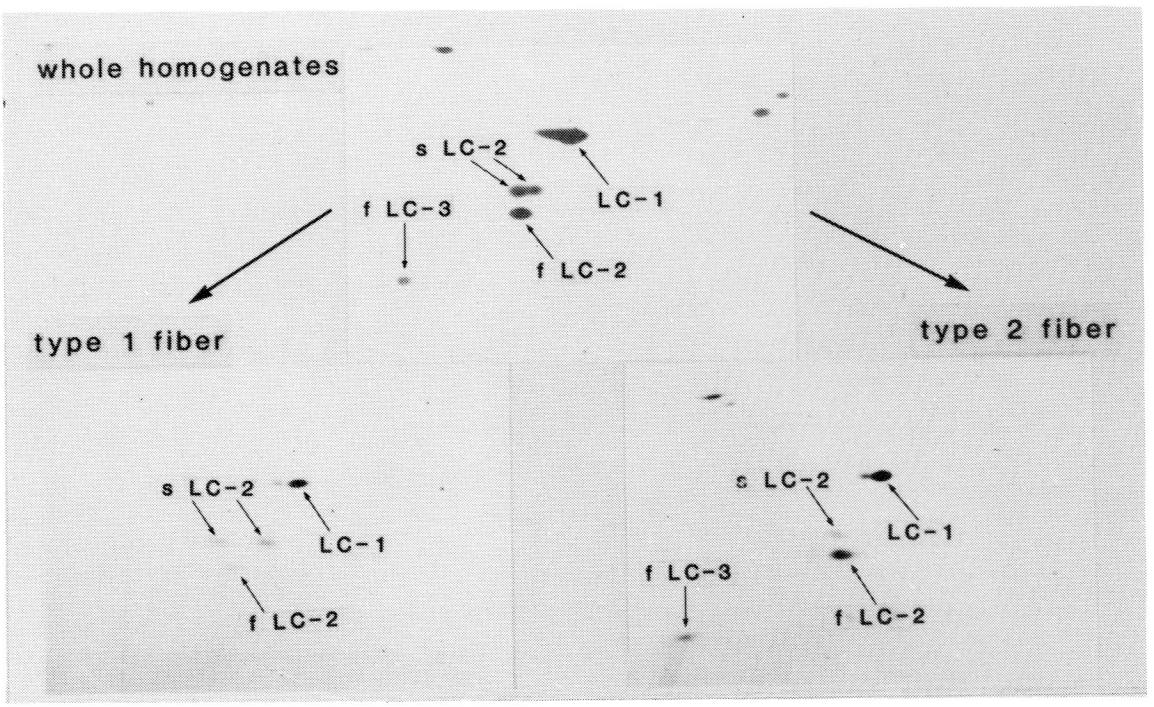


図4　症例2，biceps brachii の組織対応法による myosin light chain の分析．上段に示す whole homogenates が，fast form (f) と slow form (s) の mixed pattern であるのに対して，type 2 fiber は fast form (f) 優位の mixed pattern, type 1 fiber も slow form (s) 優位の mixed pattern である事を示す．

組織化学的所見を呈する[7]とされてきた．本研究は，こうした差の少なくとも一部が生検部位による事を明らかにした．ただし，骨格筋の部位と組織所見との関連については，biceps brachii でも分化の悪い症例[2]があり，症例による侵襲の程度により変わり得ると考えられる．一方，nemaline myopathy では nemaline rod の量と臨床症状との間には相関がない[8]とされているが，今後は骨格筋の分化状態と臨床症状との間に相関があるかどうか検討する必要がある．

組織学的所見と myosin light chain 及び troponin C の pattern が一致している点は，nemaline myopathy の骨格筋分化を考える上で極めて興味深い．特に筋の分化と myosin light chain の pattern が生検筋の部位によって異なる事から，こうした異常は，nemaline myopathy の primary genetic abnormality を直接反映しているとは言い難い事になる．殊に筋分化の悪い組織学的所見あるいは myosin light chain の特異な hybrid pattern が，筋線維の未熟性あるいは筋線維の slow form への変換を反映していると考えられる事から，筋線維の分化に関連した因子に異常を生じている事が予想される．

単一筋線維及び組織対応法による分析は，異常を生じている因子が神経原性の因子である可能性を示唆している．先に明らかにした[2)3)]分化の悪い骨格筋の単一筋線維ばかりでなく，分化の良い骨格筋の type 1 fiber の一部にも特異な myosin light chain 構成が認められたからである．こうした特異な構成は，DMD 筋や central core 病でも認める事がある[9]とされるが，denervation 筋で多く認められる事[10]が注目される．従来，nemaline myopathy の神経系には denervation に相当する所見がないとされているが，神経筋接合部の異常を指摘した報告[11]もあり，機能的な denervation あるいは脊髄前角細胞レベルでの異

常発火がtype 1 fiberの特異な構成に結び付いている可能性がある．筋による差は，神経原性の障害を前提とすると背景となる筋肉の違い，侵襲の強弱によっても説明可能である．

今後は，nemaline myopathyに類似した筋線維分化の異常を来たしている実験動物及び他の先天性ミオパチー骨格筋の分析が必要である．更に，実験的なdenervation筋で単一筋線維の筋構造蛋白のpatternを検討する事が重要と考えられる．

おわりに

1．nemaline myopathy家系の患者の複数骨格筋の生検標本について，組織化学的及び筋構造蛋白の検索を行なった．

2．組織化学的所見は，生検部位により異なっていた．NADH-TRではgastrocnemiusは分化が悪く，biceps brachiiは良く分化していた．

3．分化の悪い骨格筋のmyosin light chainは，slow form優位で，fast formのlight chain 2を欠いた特異なhybrid patternを呈し，分化の良い骨格筋はfast form優位のmixed patternを示した．

4．分化の良い骨格筋の単一筋線維並びに組織対応法による分析では，type 1 fiberの中に特異なhybrid patternの線維が存在していた．

文　献

1）Sugita, H., Ishiura, S., Nonaka, I., Ohashi. K. & Maruyama, K.: Gel electrophoretic study of nemaline muscle. Proc. Japan Acad., 57B: 59, 1981.

2）武田伸一，堀米啓一，中台　昭，小口喜三夫，柳沢信夫：タイプⅠ線維のみを呈し，特異なミオシンL鎖構成を認めたネマリンミオパチーの1例．臨床神経，26(2)：印刷中，1986.

3）庄司進一，武田伸一：Nemaline myopathyの筋構造蛋白．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，1985，p197.

4）Mikawa, T., Takeda, S., Shimizu, T. & Kitaura, T.: Gene expression of myofibrillar proteins in single muscle fibers of adult chicken-micro two dimensional gel electrophoretic analysis. J. Biochem., 89: 1951, 1981.

5）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.

6）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.

7）Sreter, F.A., Åström, K-E., Romanul, F.C.A., Young, R.R. & Jones, H.R. Jr.: Characteristics of myosin in nemaline myopathy. J. Neurol, Sci., 27: 99, 1976.

8）Nienhuis, A.W., Coleman, R.F., Brown, W.J., Munsat, T.L. & Pearson, C.M.: Nemaline myopathy, a histopathologic and histochemical study, Am. J. Clin. Pathol, 48: 1, 1967.

9）Takagi, N., Ishiura, S., Nonaka, I. & Sugita, H.: Myosin light chain components in single fibers of Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve 5: 399, 1982.

10）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.

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

59) ネマリンミオパチーの筋構造蛋白のモノクロナル抗体による解析

萬 年 徹*

研究協力者 清 水 輝 夫* 中 瀬 浩 史*

ネマリンミオパチーでは特異な桿状体(nemaline rod)の存在に加え，ミオシン分子の発生にも異常のあることが示されてきている[1)2)]．私共はネマリンミオパチーがアクチンフィラメントのみでなくミオシンフィラメントにもその構成蛋白のアイソプロテイン組成や形態形成に変化があるか否かを検討するためモノクロナル抗体法をつかってミオシンフィラメント構成蛋白特にミオシンH鎖とC-蛋白の動向について実験を行なっている．今年度はC-蛋白に対するモノクロナル抗体をつかった結果について報告する．

方 法

成人男子大腿四頭筋(剖検材料，非神経筋疾患)よりミオシン分画を抽出，その100μgずつをBalb/cマウスに免疫．その脾臓細胞をP3NPミエローマ細胞とPEG4000を使い通常の方法に従って細胞融合した．融合細胞よりミオシンまたはC-蛋白に対する抗体産生細胞を選び，今回とくにC-蛋白に対する抗体産生細胞株QM2-1を3回くりかえしてクローン化し細胞系を確立した．この抗体をつかい，間接螢光抗体法にて成人コントロール，デュシャンヌ型筋ジストロフィー（3歳男)，ネマリンミオパチー（8ヶ月男）の大腿四頭筋（生検筋）を検討した．

結 果

昨年度報告したトリ砂嚢アクチン(γ型)に対するモノクロナル抗体の中からActin 2と名づけた抗体をネマリンミオパチーの大腿四頭筋に反応させると，血管壁平滑筋に強く結合し，骨格筋にはよわく反応した．骨格筋内の染色性は一様でなく不均一な染まり方で，ネマリン桿状体は非常につよく反応した．従ってアクチンの細胞内分布がかなり不均一であることが示唆された．

QM 2-1は分子量約140KdのC蛋白に対する抗体IgGを分布していることがイムノブロット法により明らかにされた．成人コントロールの大腿四頭筋で組織化学的ATPase染色とこの抗体の染色性を比較検討すると，この抗体はタイプ1，2a，2bのいずれの線維とも反応した．タイプ1線維はタイプ2線維より染色性がやや弱かったが2aと2b線維はほぼ同程度の染色性であった（図1)．3歳男性のデュシェンヌ型筋ジストロフィーでは一部の2c線維で染色性のわるいものがあったが，タイプ1，2a，2b，2c線維のいずれも染色され，2a，2b，2c線維は強く，1線維はやや弱く染色された．これに対しネマリンミオパチーでは13%の線維がQM 2-1に対し染色されず87%の線維はほぼ同程度に染色された(表1)．染色された筋線維はタイプ1と2a，2c線維であった．染色されなかった線維は組織化学上タイプ1と2c線維であった．タイプ2b線維は検索した領域ではほとんどみとめられなかった．この結果は，組織化学的にタイプ1，2cと分類された筋線維が各々異なったC蛋白を含んでいることをあらわす．タイプ1線維292本中染色されなかった線維は46本(16%）であり（表1，図2）タイプ2c線維では50%が染色されなかった(表1，図3)．今後さらにC蛋白・ミオシンに対するモノクロナル抗体をふやし検討したい．

＊東京大学医学部脳研神経内科

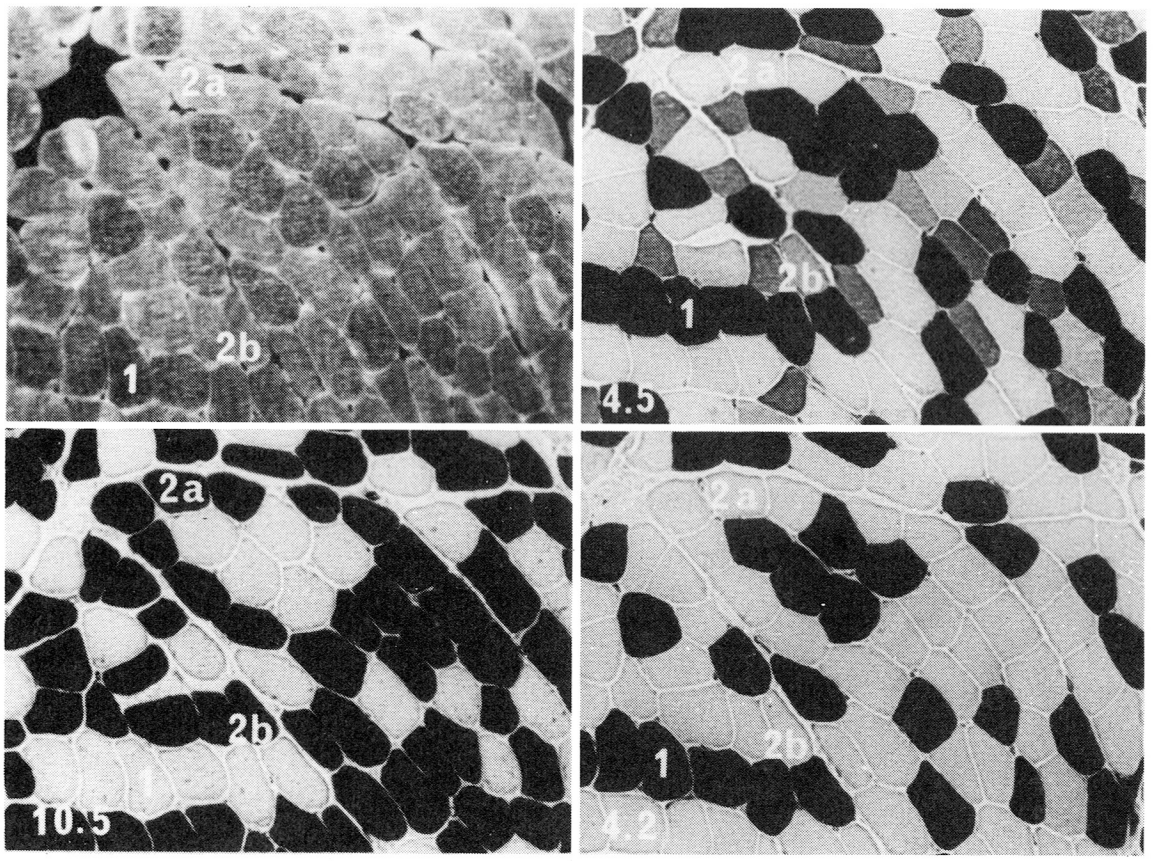


図1　成人コントロールの大腿四頭筋とQM 2-1との染色性．左上；間接螢光抗体法．1；タイプ1線維，2a；タイプ2a線維，2b；タイプ2b線維．左下；pH10.5で前処理後の組織化学的ATPase染色．右上；pH4.5の前処理後のATPase染色．右下；pH4.2の前処理後のATPase染色．

表1　Nemaline myopathyにおけるQM2−1の染色性

	n	QM 2 − 1 (+)	(−)
type 1	292	246	46(16%)
2a	131	131	0
2b	1	1	0
2c	30	15	15(50%)
	454	393	61

考　　察

組織化学的ミオシンATPase活性は主としてミオシンの性状により規定されると考えられている．ミオシンATPase活性は基本的にはミオシンH鎖にあるがL鎖によっても修飾をうける．従って組織化学的ATPase活性はミオシンH鎖とL鎖複合体を反映すると理解される．これに対しC蛋白はミオシンフィラメント上に存在する蛋白であるがATPase活性，アクチン・ミオシン相互作用には積極的な関与はないとされるものの，その生理学的意味あいは未解決である．筋発生過程でミオシンH鎖は少なくともembryo，perinatal，adultの三型が存在し，C蛋白も幼若期（心筋型）perinatal，adultと三型がミオシンH鎖にほぼ同期して発現されることがトリ胸筋でわかってきている．もしC蛋白・ミオシンH鎖などミオシンフィラメント構成蛋白がほぼ同期して発現されるならば，C蛋白のアイソプロテインとミオシンH鎖のアイソプロテインは同一の型（速筋型と遅筋

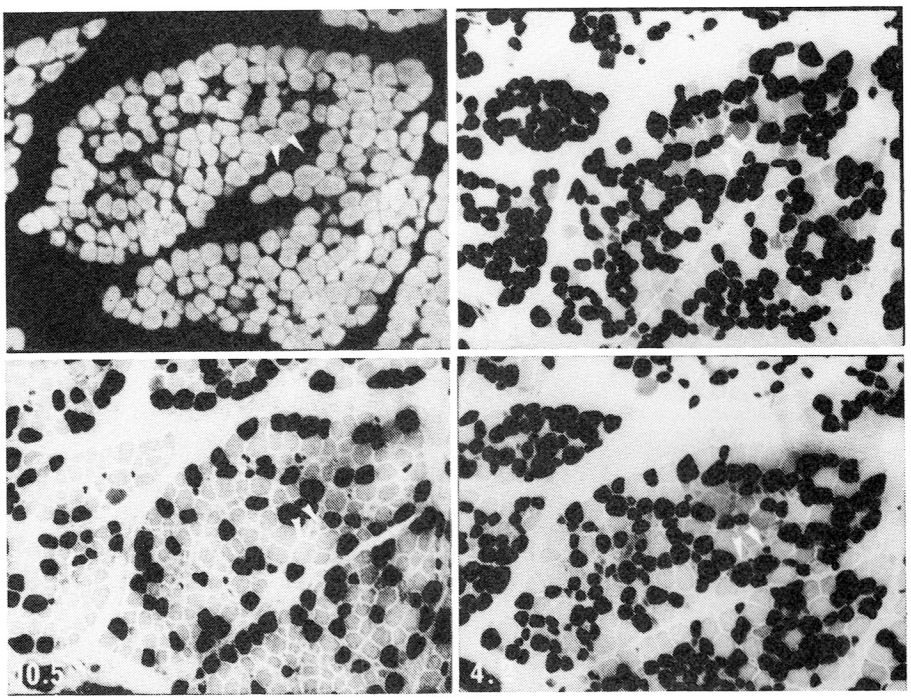


図2　ネマリンミオパチーの大腿四頭筋とQM 2-1との染色性．構成は図1と同じ．矢印はタイプ1線維を示す．

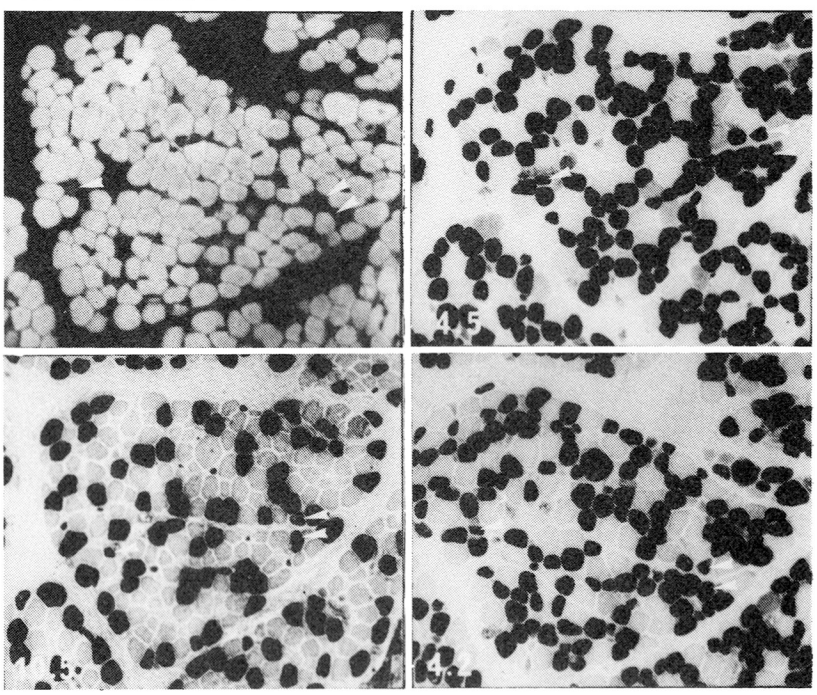


図3　図2と同一で，矢印はタイプ2c線維を示す．

型のように）になっていると考えられる．しかし今回の実験結果はタイプ2cと1線維でC蛋白とミオシンとの間で必ずしも同期していない分布を示した．タイプ1線維は16%の線維と比較的少数例であり，多くの線維はC蛋白とミオシンとは一致していた．しかしタイプ2c線維はほぼ半数の線維でC蛋白のタイプが異なると考えられる．ジストロフィー患者のタイプ2c線維はほとんど均一なC蛋白と考えられるので，ネマリンミオパチーのタイプ2c線維に特異的にみられる変化である可能性がある．即ちネマリンミオパチーではミオシンフィラメント構成蛋白の発現に同期性が失なわれているのではないかと考えられる．我々のデータは，ネマリンミオパチーではnemaline rodに代表されるようにアクチンフィラメント構成蛋白の異常のみでなく，ミオシンフィラメント側にも発生上異常がみられるとの考えを支持するものである．今後この考えをさらに明確にするためミオシンH鎖とC蛋白の抗体をつかい検討し，フィラメント構成上の異常がないかをしらべたい．

文　献

1）武田伸一，庄司進一：Nemaline myopathyの筋構造蛋白．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．197-202.

2）Biral, D., Daimiani, E., Margreth, A., Scarpini, E. and Scarlato, G.: Slow myosin heavy chain isozyme in nemaline myopathy. Neurology 35: 1360-1363, 1985.

昭和60年度研究班名簿

昭和60年度　杉田班　名簿

区分	氏名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
班長	杉田秀夫	国立武蔵療養所神経センター 〒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 〒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 〒173　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 〒113　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 〒105　港区虎の門2-2-2	部長	03—588—1111
監事	荒木淑郎	熊本大学医学部第一内科 〒860　熊本市本荘1-1-1	教授	096—344—2111
班員	小口喜三郎	国立長野病院 〒389-08　長野県更級郡上山田町	副院長	0262—75—1581
	納光弘	鹿児島大学医学部第三内科 〒890　鹿児島市宇宿町1208-1	助教授	0992—64—2211
	川井尚臣	徳島大学医学部第一内科 〒770　徳島市蔵本町2-50	講師	0886—31—3111
	木下真男	東邦大学医学部大橋病院 〒153　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 〒889　宮崎県宮崎郡清武町木原5200	助教授	0985—85—1510
	後藤幾生	九州大学医学部脳研神経内科 〒812　福岡市東区馬出3-1-1	助教授	092—641—1151
	木南英紀	徳島大学医学部酵素研 〒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 〒616　京都市右京区鳴滝音戸山	部長	075—461—5121
	紫芝良昌	冲中記念成人病研究所 〒105　港区虎の門2-2-2	主任研究員	03—583—5528
	庄司進一	信州大学医学部附属病院 〒390　松本市旭3-1-1	講師	0263—35—4600
	杉村公也	名古屋大学医学部神経内科 〒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部 〒113　文京区本駒込3-18-22	部長	03—823—2101
	高瀬貞夫	東北大学医学部脳研神経内科 〒980　仙台市星陸町1-1	助教授	0222—74—1111

区　分	氏　名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
班　員	高守正治	金沢大学医学部附属病院 〒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 〒060　札幌市北区北15条西7丁目	助教授	011—716—1161
	田辺　等	東京都立神経病院 〒182　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 〒113　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 〒305　茨城県新治郡桜村天王台	教授	0298—53—3196
	中村晴臣	鳥取大学医学部脳研神経病理 〒683　米子市西町86	教授	0859—33—1111
	埜中征哉	国立武蔵療養所神経センター 〒187　小平市小川東町4-1-1	部長	0423—41—2711
	福原信義	金沢大学医学部附属病院神経内科 〒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 〒833　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神経内科 〒113　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 〒329-04　栃木県河内郡南河内町 大字薬師寺3311-1	助教授	0285-44-2111
	宮武　正	新潟大学医学部脳研神経内科 〒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 〒569　高槻市大学通2-7	教授	0726—83—1221
	吉田瑞子	国立武蔵療養所神経センター 〒187　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 〒227　横浜市緑区藤が丘1-30	助教授	045—971—1151
	中野今治	国立療養所下志津病院神経内科 〒284　四街道市鹿渡934-5	医長	0434—22—2511
	堀　真一郎	東京都神経科学総合研究所 〒183　府中市武蔵台2-6	副参事 研究員	0423—25—3881
	桃井真理子	自治医科大学小児科 〒329-04　栃木県河内郡南河内町 大字薬師寺3311-1	講師	0285—45—2111
	山田和弘	大分医科大学生理学 〒879-56　大分県大分郡挾間町 医大ヶ丘1-1506	教授	0975—49—4411

区　分	氏　名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
公募班員	小沢高将	名古屋大学医学部生化学 〒466　名古屋市昭和区鶴舞町65	教授	052—741—2111
	古庄敏行	杏林大学保健学部疫学 〒192　八王子市宮下町476	教授	0426—91—0011
	吉岡利忠	東海大学医学部生理学科 〒259-11　伊勢原市望星台	助教授	0463—93—1121
顧問	三好和夫	冲中記念成人病研究所 〒105　港区虎の門2-2-2	所長	03—588—1111
	黒岩義五郎	九州大学医学部脳研神経内科 〒812　福岡市東区馬出3-1-1	教授	092—641—1511
	豊倉康夫	東京都立養育院附属病院 〒173　板橋区栄町35-2	院長	03—964—1131
	宇尾野公義	国立静岡病院 〒420　静岡市城東町24-1	院長	0542—45—0101