

厚生科学研究費補助金
(脳科学研究事業)

(生検材料による神経・筋疾患等の成因解明と治療に関する研究)

平成11年度研究報告書

主任研究者 埜 中 征 哉

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
総括研究報告書

生検材料による神経・筋疾患等の成因解明と治療に関する研究

主任研究者 埜中征哉 国立精神・神経センター武蔵病院院長

研究要旨：本年度は倫理面をクリアした書式を用い、許可を得た検体登録が1000件を越すことになった。その検体を使用しての研究が開始され、その研究結果が公表されるようになった。その中で代表的なのは肢帯型筋ジストロフィーに関するもので80という多くの検体を使用し、カルパインパチーを21人診断した（肢帯型の28%）。また武蔵病院と神経研究所、国立療養所宮城病院間ではRRNの検体が広く利用され、研究面での大きな進展をみた。

分担研究者氏名・所属施設名
及び所属施設における職名

橋本和季	国立療養所道北病院 神経内科医長
石川幸辰	国立療養所八雲病院 副院長
木村 格	国立療養所山形病院 院長
石原傳幸	国立療養所 東埼玉病院 副院長
宮内 潤	国立小児病院 研究検査科長
斉田孝彦	国立療養所 宇多野病院 院長
高橋桂一	国立療養所 兵庫中央病院 院長
澁谷統壽	国立療養所川棚病院 院長
岩崎祐三	国立療養所宮城病院 院長
研究協力者	
本吉慶史	国立療養所 下志津病院 医長

A. 目的

神経・筋疾患の原因・病態解明には研究対象となる組織、培養細胞、DNAなど患者からの検体が不可欠である。筋疾患では診断のために筋生検が行われる。末梢神経、皮膚生検も行われる。これらの検体を上記の研究目的に使用するため全国規模の生検材料のバンクシステムを作ることを計画した。最終年度はまず診断、検体保存、そ

の使用のルールにそって、倫理面をクリアした検体を使っての研究を開始する。

B. 方法

1) 検体供与

バンク入りした検体を研究用に供与を開始した。供与に関しては今回様式を作成し使用のルール化をはかった。様式に記入してある研究内容と検体の保存料を検討し、供与を開始した。

2) 供与された検体を使用され、いくつかの研究を進めた。

C. 結果：

1) 筋ジストロフィーに関する研究

他施設共同で筋ジストロフィーの診断に関する研究が進展した。特に今まで実体が不明であった肢帯型筋ジストロフィーの解明が進みつつあることの意義は大きい。埜中班員らは常染色体劣性遺伝をとる肢帯型筋ジストロフィー80例についてカルパイン3遺伝子変異を調べ21名（28%）に変異を認めた。その中で4種類の変異が日本人の変異の72%を占めることを明らかにした。石原班員らは欠失、重複を認めないデュシェンヌ型筋ジストロフィーでジストロフィン遺伝子のシーケンスを行い、微小欠失や点変異を見だし、遺伝相談に役立てることができた。石川班員らはジストロフィン遺伝

子研究のための mRNA バンクを樹立した。宮内班員らは小児の特に先天性ミオパチー、先天性筋ジストロフィーの病理学的研究をまとめた。高橋班員らは本邦できわめてまれなサルコグリカノパチーの症例をバンクの中から見だし、その遺伝子解析を進めている。

2) 筋疾患とアポトーシス

岩崎班員らは R R N に登録されている検体の中から各種疾患の病態についてアポトーシスの観点から検討を進めた。生検組織に *in situ* nick translation 法を応用して Single Strand Breaks (SSB) の検出を試み、DNA 障害の病態への関与について検討した。筋疾患では筋炎、眼咽頭型筋ジストロフィーで SSB 増加が認められた。埜中班員らは Rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーにおいて核の変性を高率に電子顕微鏡的に証明し、また Tunel 法でもそれらが陽性に出て、アポトーシスの関与を証明した。

3) その他

橋本班員らは末梢神経における神経周膜の基底膜異常について研究し、ラミニン、メロシンの発現について検討した。糖尿病や多発性神経炎ではラミニンの減少があることを見いだした。木村班員は東北地方の R R N の拠点となるべく大学などとも共同し検体の収集に当たった。多施設との共同研究の基盤を作ったことの意義は大きい。渋谷班員らは R R N の構築や運用面について努力した。その基盤を作り、登録が容易となるようにした。

D. 考察

過去 3 年間で RRN (Research Resource Network: 研究資源バンクネットワーク) 研究では、研究に使用する検体の保存、使用について十分な論議を尽くし、倫理面をクリアしたことが大きい。さらに全国規模での患者生検材料の登録

が HospNet を通じて可能になったことで、全国レベルでの共同研究が進んだことの意義も大きい。

最終年度はすでに R R N に登録されている検体を使用され、種々の研究がスタートしたことは特筆すべきことである。特に国立精神・神経センターを中心とした R R N の共同研究が進んだ。研究成果は幾つかの国際誌に掲載される予定である。

E. 結論

本 RRN 研究により、検体を利用した研究がスタートした。筋ジストロフィー、特に肢帯型の分子生物学的研究が進んだ意義は大きい。また診断面でもジストロフィン遺伝子の微細変異をみつける試みがなされたことは、遺伝相談に不可欠であり、本 R R N 研究がなければできなかったことであろう。今後、バンクの材料を利用した研究が進行するよう、さらにサポートしたい。

F. 研究発表

- 1) Nonaka I, Murakami N, Suzuki Y, et al. Distal myopathy with rimmed vacuoles. *Neuromuscul Disord* 1998; 8:333-7.
- 2) Nonaka I. Distal myopathies. *Curr Opin Neurol* 1999; 12:493-9.
- 3) 埜中征哉. 臨床のための筋病理. 東京:日本医事新報社、1999.
- 4) Minami N, Nishino I, Kobayashi O, Ikezoe K, Goto Y, Nonaka I. Mutations of calpain 3 gene in patients with sporadic limb-girdle muscular dystrophy in Japan. *J Neurol Sci* 1999; 171:31-37.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

生検筋バンクを使用している筋ジストロフィー研究

分担研究者 埜中征哉 国立精神・神経センター武蔵病院院長

研究要旨：倫理面をクリアして、バンク入りした検体を使用し、未だに原因不明なものが多くある肢帯型筋ジストロフィーについて、特にカルpain 3 遺伝子変異について、病理組織化学的研究を行った。21例の生検筋では筋線維の壊死・再生に加えて多くの分葉線維(lobulated fibers)を認めた。この分葉線維には筋原線維の変性、核の変化を高率に認めた。

A.目的

筋ジストロフィーの中で比較的頻度が高い肢帯型筋ジストロフィー (limb-girdle muscular dystrophy: LGMD)は常染色体優性と劣性遺伝に2大別されている。大半の患者は後者の劣性遺伝をとる。劣性遺伝は8型(LGMD2A-2H)に再分類されている。しかし日本人にどの型が多いのか、その頻度、臨床的特徴、病理学的特徴は明らかにされていない。今回はカルpain 3 遺伝子変異についてその病理学的特徴を明らかにすることを目的とした。

B.対象、方法

肢帯型筋ジストロフィーで常染色体遺伝をとると考えられるもの

(大半は孤発例) 80人の生検筋 mRNA を抽出し、RT-PCR で増幅し、直接シーケンスし21人に変異を認めた。その21人の生検筋には各種の組織化学的染色を行い、さらに電子顕微鏡的に検索した。

C.結果

若年で発症まもない者では筋線維の大小不同、壊死・再生がみられた。壊死線維は数本から数十本集合する傾向にあった。デュシェンヌ型筋ジストロフィーにみられるような opaque 線維はほとんどみられなかったことは特記すべきことであった。

病気が進行すると、ほとんどすべての例で分葉線維 (lobulated fiber) がみられた (全症例では1

5人:71%)。この分葉線維はほとんどがタイプ1線維であり、比較的小径線維であることが特徴であった。すなわち病気が進行すると分葉線維が増加する分、タイプ1線維萎縮、タイプ1線維優位となった。

電子顕微鏡でみてみると一番顕著な変化は筋原線維の乱れであり、特に筋線維膜直下の筋原線維の乱れが大きかった。また筋細胞膜直下にはミトコンドリアが著明に増加していたが個々のミトコンドリア形態には異常がなかった。また分葉線維の核はクロマチンの凝集などアポトーシス様の変化を示していた。

D. 考察

肢帯型筋ジストロフィーの中で、カルパインパチーは比較的頻度が高い(26%)ことが明らかにされた。筋ジストロフィーで何故筋線維が壊死するのか、それを説明するのは膜説であった。代表的なのはデュシェンヌ型筋ジストロフィーで、ジストロフィンという膜蛋白が欠損している。膜の脆弱性は細胞外液に高濃度に含まれる Ca^{2+} の細胞内への流入を来す。そのために筋細胞は過収縮(opaque fiber)を来し、Ca 依存性の蛋白分解酵素(protease)の活性化をきたし、筋原線維は崩壊する。筋線維は壊死

の像をとるようになる。

しかしカルパイン3は膜蛋白ではない。コネクチン(titin)という構造蛋白の調節蛋白である。その欠損がなぜ壊死を起こすか、その機序については明らかにされていない。本症では opaque fiber が少なかったのは膜の異常によらない筋線維の壊死を反映しているのかもしれない。

分葉線維(lobulated fiber)の意義は不明である。ただ、これは慢性に筋原線維が変性した結果と捉えることができる。この分葉線維の成立機序の解明がカルパインパチーの病態解明にもっとも関連していると考えられた。

E. 結論

肢帯型筋ジストロフィーの中でカルパインパチーは約30%と高頻度であることがわかった。病理学的には他の筋ジストロフィーにはほとんど見られない分葉線維を多く見つけた。この分葉線維は本症の病態をみるのに重要な所見と思われた。

F. 研究発表

論文

- 1) 林中征哉：筋線維壊死と再生のメカニズム—再生を中心として。臨床神経 38:997-1000,1998

2) Minami N, Nishino I, Kobayashi O,
Ikezoe K, Goto Y, Nonaka I.
Mutations of calpain 3 gene in
patients with sporadic limb-girdle
muscular dystrophy in Japan. *J*
Neurol Sci 1999; 171:31-37.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

糖尿病患者にみられた血管炎の免疫組織学的検討

分担研究者 橋本 和季 国立療養所道北病院神経内科医長

研究要旨：血管周囲の細胞浸潤を有する糖尿病性末梢神経障害における神経周膜の基底膜異常について免疫組織学的に検討した。電顕では基底膜は肥厚し、部分的な不鮮明化はなかった。ラミニンの発現は神経周膜で部分的に不鮮明で、通常神経周膜には認めないメロシンの発現がみられた。糖尿病性末梢神経障害は神経周膜のラミニンの異常が存在し、その病態に重要な役割を果たしていると推定された。

A.研究目的

我々は、これまで末梢神経病変における神経周膜異常を検討してきた。糖尿病性末梢神経障害では神経周膜の異常が報告されており、まれに血管周囲の細胞浸潤の存在も知られている。今回我々は、血管炎所見を有する糖尿病性末梢神経障害患者の生検神経を用い、その神経周膜病変について、形態的および免疫組織学的に検討した。

B.研究方法

対象は、1例の糖尿病性末梢神経障害患者で、緩徐進行性の四肢対称性で遠位に強い運動感覚障害を有している。方法は、生検腓腹神経をエボン包埋し、トルイジンブルー染色および電顕で観察した。また、凍結標本を用い、抗メロシンおよびラミニンモノクローナル抗体でABC法で免疫染色した。さらに、リンパ球表面マーカーについても検討した。

C.研究結果

HE染色では、神経外鞘の小血管周囲に単核細胞浸潤を認めた。トルイジンブルー染色では、著明な有髄神経の減少がみられ、残存している有髄神経は小径化しているものが多く、cluster formationがみられた。神経内鞘の血管基底膜の肥厚がみられた。光顕上は神経周膜に異常なかった。電顕では神経周膜のbasal laminaは淡明化し厚くな

っていたが、部分的な欠損はなかった。免疫組織学的には、神経周膜は一部でラミニンの発現がみられないところがあり、また、神経周膜では通常発現しないメロシンの染色性を示す個所がみられた。表面マーカーの検討では、浸潤細胞はT細胞とマクロファージが主体であった。一部の神経内鞘の血管にユビキチンの発現がみられた。

D.考察

本例の病理像は、慢性軸索型の神経変性があり、神経内鞘血管の基底膜の肥厚や電顕による神経周膜の基底膜の肥厚がみられ、従来知られた糖尿病性末梢神経障害の病理像と矛盾しなかった。糖尿病末梢神経障害でみられる血管炎所見はこれまで虚血に伴う反応性細胞浸潤と考えられていたが、浸潤細胞は多発性動脈炎(PN)や非全身性血管炎性末梢神経障害でみられるパターンと同様で、以前我々が検討したように神経周膜のラミニンの発現パターンもPNと同様であった。このようなことから糖尿病性末梢神経障害においても、ほかの血管炎同様神経周膜の機能障害が病態形成に関与している可能性が考えられた。

E.結論

糖尿病性末梢神経障害では、神経周膜のラミニンの異常があり、その病態に重要な役割を果たしていると考えられた。

新しいLysosomal pepstatin-insensitive peptidase (LPIP)について —Late-infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (LINCL)の酵素診断—

分担研究者 石川幸辰 国立療養所八雲病院小児科 副院長

研究要旨: 1997年に、小児期で最も致死的な神経変性疾患であるlate infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (LINCL)の原因遺伝子が同定され、lysosomal pepstatin-insensitive peptidase (LPIP)をコードすることが判明した。上記疾患が示唆される症例がいたため、早速、LPIP酵素活性測定系を確立した。末梢白血球、リンパ球、培養皮膚線維芽細胞を含め、剖検大脳、肺、肝、腎、心筋、骨格筋でLPIP活性を測定した。今後、Research Resource Networkを通じて得られたLINCL生検、剖検組織でLPIP活性を測定し、リソゾーム蓄積性疾患としてのLINCLの酵素診断を確立する予定である。

[はじめに] Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (NCL) は、視力障害、行動変化、てんかん、進行性の知能低下を主徴とする神経変性疾患である。NCLは、発症時期、病理組織像より、乳児型から成人型のCNL1~4に加え、variantのCNL5~7までの7型に分類される¹⁾。近年、小児期で頻度の高い致死的な神経変性疾患であるlate-infantile NCL (LINCL, CLN2)の原因遺伝子が Sleatら²⁾により1997年、同定され、lysosomal pepstatin-insensitive peptidase (LPIP)をコードすることが判明した。上記疾患が示唆される症例がいたため、私共は、LPIP酵素活性測定系を確立した。末梢白血球、リンパ球、培養皮膚線維芽細胞を含め、剖検大脳、肺、肝、腎、心筋、骨格筋でLPIP活性を測定したので報告する。

[対象および症例] 分析対象は、剖検にて得られた大脳白質、灰白質、肺、肝、腎、心筋、骨格筋を用いた。対象症例: 当院来院時、3歳9ヵ月の男児。主訴は、難治性てんかん、退行。家族歴で、母方兄が強直発作、肺炎のため、3、11歳で死亡。2歳時より、痙攣が出現。多剤で抑制されず、Lennox-Gastaut症候群または進行性ミオクローヌステんかんが疑われていた。 β Hex'se、 β Gal'se、Aryl-sulf'se A活性はすべて正常範囲内。臨床的にLINCLが疑われた。

[方法] LPIP活性測定は、Sleatらの原法を変更して行なった。基質としてbovine hemoglobin (5% TCA-terated, 150 μ g/ml)を用いた。反応液(25mM ぎ酸緩衝液、pH3.5、2 μ M pepstatin、0.1mM E-64、0.15M NaCl、0.1% triton X-100)に酵素源として25-50 μ g蛋白を添加、37°C、1時間、incubateした。同量の10% TCAを加え、16000 rpm、15分間遠沈後、TCA可溶性上清に100mM ホウ酸緩衝液pH8.6

: 4mM Flurum (Fluorescamine) in Acetone (2:1, v/v)を加え、4°C、遮光10分間放置後、室温、3000 rpm、5分遠沈し、excitation: 365 nm、emission: 475 nmで蛍光測定した。L-Leu-L-Ala-NH₂を用いて標準曲線を求めた。

[結果および考案] 同一剖検組織におけるLPIP活性は、各々、大脳灰白質: 20、白質: 40、肝: 128、肺: 52、腎臓: 64、骨格筋: 118、心筋: 188、白血球: 100 nmol/mg protein/hrであり、LPIP遺伝子mRNAの発現の多い心筋で活性が高かった。LINCLを疑われた症例では、白血球: 110 nmol/mg protein/hr (n=5; 100-184)、培養皮膚線維芽細胞: 144 nmol/mg protein/hr (n=2; 130, 150)とLPIP活性が認められ、LINCLは否定された。また、国立精神・神経センター疾病第2部倉地由季子先生により行なわれた培養皮膚線維芽細胞由来蛋白を用いたウエスタンブロットでも、正常と同サイズのバンドを確認した。最近、LPIPは、tripeptidyl peptidase I (TPP I)と同一であることが、ゲノム構造より証明され、LINCL症例で欠損していることが報告された。Bovine hemoglobinを基質とした場合、blankが高いため、今後、TPPの合成基質であるAla-Ala-Phe-MCAを用いた方が感度、安定性の面で良いと思われた。今後、Research Resource Networkを通じて得られたLINCL生検、剖検組織でLPIP活性を測定し、リソゾーム蓄積性疾患としてのLINCLの酵素診断を確立する予定である。

[文献]

- 1) Goebel H H, Mole S E, Lake B D, ed. *The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten disease)*, IOS Press, 1999.
- 2) Sleat DE et al. Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Science* 1997;277:1802-5.

国立Research Resource Bank(Brain Bank)の整備とその地域 ネットワークを利用した神経変性症の遺伝子学的研究

分担研究者 木村 格（国立療養所山形病院神経内科）
共同研究者 亀谷 剛、関 晴朗、永田哲也、高橋健二（国立療養所山形病院神経内科）
木村伯子（東北大学医学部第二病理学、東北労災病院病理部）

研究要旨：国立精神神経センター武蔵病院を拠点とした全国国立病院脳バンク・ネットワークの東北地方拠点病院の1つとして、国立療養所山形病院神経内科に神経難病の病理診断・遺伝子解析および剖検と生検研究材料の登録・管理システムの基盤整備を行った。単一施設での研究材料の確保・登録を促進するために、近傍県の大学研究室、基幹病院神経内科との間で研究支援サブ・ネットワークを構築し、研究材料の共同管理および共同利用への可能性を試みた。平成11年度には本脳バンクを利用して、山形、宮城県に特に頻度が高い小脳変性症など、神経変性症を対象に、遺伝学的検索を実施して、成果を得た。

A. 研究目的

本研究ネットワーク構築の目的に沿って、当病院に東北地方における神経・筋疾患の研究を促進するために必要な剖検・生検材料の登録・管理・再分配のできる脳バンクの機能と施設設備を行う。単一施設での研究材料確保と登録の不足を補うために近隣県の大学と基幹病院神経内科施設との間で、研究支援ネットワークを構築し、事業の促進を計る。合わせて、脳バンクを応用した遺伝性神経変性症を対象に遺伝子検索と疫学から発症メカニズムを検討する。

B. 主な研究成果

当院では、生検・剖検組織のみならず、末梢血リンパ球より抽出したDNAも"research resource"と考え、収集・保存を行って現在、31名の検体が得られている。内訳は、遺伝性脊髄小脳変性症(SCD)6名、非遺伝性脊髄小脳変性症4名、筋萎縮性側索硬化症(ALS)5名、脊髄性筋萎縮症2名、ハンチントン舞踏病(及びその疑い)3名、筋強直性ジストロフィー(及びその疑い)2名、進行性核上性麻痺2名、痙性対麻痺1名、副腎白質ジストロフィー1名、肢帯型筋ジストロフィー1名、多発性硬化症1名、その他3名(ナルコレプシー1、ミオクロオス1、ジストニア1)である。

このうち、遺伝性SCD患者6名中3名に歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症(DRPLA)の遺伝子異常を、1名にSCA1の遺伝子変化をみた。これら患者の臨床症状は、ほぼ既報と同様であったが、臨床症状からDRPLAと診断されていた1名において、SCA1遺伝子異常が認められた。

残る2名は検討中である。院内外からの遺伝相談・遺伝子診断の件数は8件で、その内訳は筋ジストロフィー3件、ハンチントン舞踏病(及びその疑い)3件、DRPLA(及びその疑い)2件、ALS1件であった。筋ジストロフィー3件のうち1件は筋強直性ジストロフィーの遺伝子診断の依頼で、もう1件はミトコンドリアミオパチーとの鑑別のため、ミトコンドリアDNAの突然変異の有無の検索依頼、残る1件は出産を控えての遺伝相談で、遺伝子検索は行わなかった。DRPLAとハンチントン舞踏病はいずれも遺伝子診断まで行った。痴呆を伴うALS1件で、APOEの遺伝子型検索依頼があった。

剖検例では、パーキンソニズムで発症した運動ニューロン病患者の1例につき、遺伝子解析を試みた。臨床的にも病理学的にも下位運動ニューロン障害が主体で、錐体路障害はほとんど見られなかったため、球脊髄性筋萎縮症の原因遺伝子であるアンドロゲン受容体のCAGリピート伸長と、脊髄性筋萎縮症の候補遺伝子であるSMN遺伝子・NAIP遺伝子の欠失について検討したが、異常は認めなかった。また、大脳皮質に多数の老人斑を認めたことから、APOEの遺伝子型を検討したところ、ε3/ε4であった。このほか、病理学的には淡蒼球、視床下核、黒質の神経細胞脱落が目立つなど、病変の分布などが特異であり、今後更なる検討を行う予定である。

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）分担研究報告書
筋ジストロフィー遺伝子に関する研究
分担研究者 石原傳幸 国立療養所東埼玉病院 副院長

研究要旨：Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）の1/3はジストロフィン遺伝子の微小変異が原因となっている。しかし微小変異の効率的な検出法がない現在、通常の遺伝子検査で異常が認められないDMD患者の資料の保存は筋ジストロフィーの臨床において重要な課題である。またこれはDMD家系における保因者診断にも重要である。そこで本研究ではまず剖検時の脾臓を凍結保存し、これより抽出したDNAあるいはRNAを用いてジストロフィン遺伝子の検査が可能であることを確認した。次にスクリーニングが困難である微小変異の検出法について検討し、リンパ球から抽出したRNAよりRT-PCR法でcDNAを増幅し、これを直接塩基配列決定することにより、微小変異の検出が可能であることを示した。またこの方法により検出できた微小変異の家系の保因者診断もDNAの直接塩基配列決定にて可能であることを示した。最後にジストロフィン遺伝子のcoding region以外のイントロン領域の変異も検出可能であることを示した。以上より、現在スクリーニングできないジストロフィン遺伝子の微小変異の検出および保因者診断には凍結臓器からのRNAを逆転写-直接塩基配列決定するのが有用な手段のひとつと考えられた。

研究目的

現在DMDの約30%の原因とされる微小変異を簡便にスクリーニングする技術はないが、患者からの生体試料を保存管理しておけばこれらの異常も将来の技術によって解明される可能性が高い。そこで本研究では将来の遺伝子検査のための資料の保存、および現在検出できない変異の検出法について検討を加えた。

研究方法

遺伝子診断のための資料保存については剖検時に抽出した脾臓を凍結し、これよりDNA、RNAを抽出して遺伝子検査を実施し検討した。微小変異検出の対象は定量的サザンプロット法、あるいはmultiplex PCR法で変異が検出できなかったDMD患者である。対象者の末梢血リンパ球からRNAを抽出し逆転写反応でジストロフィンcDNAを合成し、nested PCRで増幅した後、直接塩基配列決定を行った。ジストロフィンcDNAに異常を認めた場合は、genomic DNAを直接塩基配列決定した。

研究結果

剖検時凍結脾臓からのDNAではサザンプロット法やmultiplex PCR法による検査が可能であった。また凍結脾臓からのRNAを逆転写反応、nested PCR法で増幅することによりジストロフィンcDNAの解析が可能であった。

微小変異の検出では、ジストロフィンcDNAの直接塩基配列決定により対象となったDMD患者44名のうち37名でなんらかの微小変異を認めた。その内訳は1塩基挿入4例、微小欠失7例、ナンセンス点変異18例、イントロン異常5例、その他3例であった。これらのDMD患者の臨床症状は1エクソン以上にまたがる欠失のDMD患者と差異はなかった。また家系内の母親や姉妹などの保因者診断もgenomic DNAの直接塩基配列決定により可能であった。

考察

ジストロフィン遺伝子の変異は多くが1エクソン以上にまたがる欠失または重複であるが、われわれはDMDの約40%は微小変異であることを報告してきた。微小変異の検索には効率的な方法がないのが現状である。われわれは直接塩基配列決定法を用いて微小変異の検索を行い、DMD41名のうち37名に微小変異を検出した。直接塩基配列決定法によるジストロフィン遺伝子の微小変異の検索は微小変異の検索にも有効であることが確認できた。

結論

今回の研究から従来のスクリーニングでジストロフィン遺伝子に変異を検出できないDMD患者の変異の検出にはジストロフィンcDNAの直接塩基配列決定法が有力な方法であると考えられた。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

家族性前頭側頭型痴呆（frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17）におけるタウ遺伝子の N279K 変異はパーキンソンニズム優位の臨床像を呈するサブグループを形成する

分担研究者 齋田 孝彦 国立療養所宇多野病院長
協力者 小牟禮 修 国立療養所宇多野病院神経内科

研究要旨 淡蒼球黒質ルイ体変性症の 1 家系において、タウ遺伝子変異：N279K を発見した。N279K 変異は淡蒼球橋黒質変性症として記載された家系と同一の変異であり、両者の臨床的、病理学的、分子遺伝学的特徴は類似しており、他の FTDP-17 家系とは異なるサブグループを形成していた。N279K 変異家系では、病初期には筋固縮・無動優位のパーキンソン症状が前景に立った。レボドパ治療は効果に乏しく、中期以降になると痴呆、性格変化、精神症状も明らかになった。病理学的には、皮質病変に比べ皮質下病変が高度であり、タウ陽性物質の著しい沈着を神経細胞、グリア細胞のいずれでも認めた。N279K 変異ではエクソン 10 のスプライシングが増加し、4 リピートタウの発現量の増加を認めた。線条体、黒質において著明なドパミン濃度の低下がみられ、被殻においてドパミン取り込み部位の著しい減少を認めた。しかし、ドパミン受容体については、D1・D2 受容体のいずれも変化を認めず、レボドパ治療に対する反応性の乏しさは、ドパミン受容体の変性によるものではない可能性が考えられた。

A. 研究目的

微小管結合蛋白質の一種であるタウが脳内に蓄積する神経変性疾患の一群はタウオパチーと呼ばれる。遺伝性のタウオパチーである家族性前頭側頭型痴呆（frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 : FTDP-17）の原因遺伝子として、タウ遺伝子の変異が同定された。これまでにエクソンのミスセンス変異およびイントロンの変異など 10 種類以上の変異が報告されている。最近我々は、以前に淡蒼球・黒質・ルイ体変性症（pallido-nigro-luysian degeneration : PNLD）として記載した家系において、タウ遺伝子の変異：N279K を発見した。

N279K 変異は淡蒼球・橋・黒質変性症（pallido-ponto-nigral degeneration : PPND）として記載されたアメリカ人家系と同一の変異であり、両者の臨床像は類似しており、他の FTDP-17 とは異なるサブグループを形成すると考えられた。今回はその臨床的、病理学的、分子遺伝学的特徴を明らかにするとともに、PNLD 剖検脳における生化学的変化について報告する。

B. 症例報告

家族歴：父がパーキンソン症状のため 42 歳で死亡。姉も 45 歳よりパーキンソン症状、ついで痴呆が出現し、49 歳で死亡している。

病歴：41歳より動作緩慢，安静時振戦が出現。その後歩行障害，仮面様顔貌，抑うつ傾向が加わった。45歳某院に入院し，手指振戦・筋固縮を伴うアキネジア，垂直性眼球運動障害，易興奮性，幻覚・妄想を伴う精神症状，自発言語の低下，記銘力障害，失計算を指摘された。レボドパ療法によりパーキンソン症状の改善を認めたものの，同時に頸部・上肢に著明な不随意運動がみられた。その後も筋固縮・無動優位のパーキンソン症状および痴呆は進行性であり，48歳時には高度の痴呆，同語反復，核上性垂直性眼球運動障害，眼瞼痙攣を伴う開眼失行，頸部硬直，著明な筋固縮・痙性を伴う高度の無動，バビンスキー反射を伴う錐体路徴候を認めた。49歳からは完全な臥床・緘黙状態となり，呼吸不全にて死亡した。

C. 研究方法

死後9時間で剖検を行い，脳の左半分をホルマリン固定し，病理学的検索に，右半分を凍結保存し，分子遺伝学および生化学的検索に用いた。

神経病理学的検索は，H-E染色，Holzer染色，Bielschowsky変法鍍銀染色，Gallyas-Braak染色および抗タウ抗体を用いた免疫染色により行った。

分子遺伝学的検索は，凍結側頭葉よりゲノムDNAを抽出したのち，PCR法によりタウ遺伝子の全エクソン（イントロン部を含む）を増幅し，直接シーケンス法により遺伝子変異を解析した。また，RNA splicing assayにより，タウ転写産物におけるエクソン10のスプライシング比を検討した。

生化学的検索として，凍結脳より前頭葉，側頭葉，頭頂葉，後頭葉，尾状核，被殻，淡蒼球外節，黒質緻密帯を切り出し

たのち，choline acetyltransferase (CAT) 活性， γ -アミノ酪酸 (GABA) 濃度，ドパミン濃度，ホモバニリン酸 (HVA) 濃度およびドパミン取り込み部位，ドパミン受容体結合能について解析した。

D. 研究結果

脳重は1175gで，肉眼的には前頭葉，側頭葉（特に前方）の萎縮と黒質，青斑核の脱色素化を認めた。前頭葉，側頭葉（特に前方）では，神経細胞の脱落，ニューロピルの空胞変性，グリオシスに加えて，ballooned neuron，嗜銀性でタウ陽性の細胞内封入体，変性神経突起，neuropil threadを認めた。Lewy小体，Pick球，アミロイド沈着物は認めなかった。大脳皮質以外では，淡蒼球，ルイ体，扁桃核，マイネルト基底核，黒質，脳幹運動核（動眼神経核）において，神経細胞の脱落，グリオシスがみられ，嗜銀性でタウ陽性のglobose tangleをはじめとする細胞内封入体，変性神経突起，neuropil threadを認めた。タウ陽性の細胞内封入体は，神経細胞，グリア細胞のいずれにおいても認められた。

タウ遺伝子の解析にて，エクソン10において，837番の塩基がTからGに置換したため279番のアミノ酸がアスパラギンからリシンにミスセンス変異したN279Kがヘテロ接合で認められた。このN279K変異は，100名の正常対照および50名の孤発性前頭側頭型痴呆患者では認められなかったため，本疾患の原因遺伝子変異と考えられた。RNA splicing assayでこのN279K変異がスプライシングに与える影響を調べたところ，エクソン10のスプライシングを増加させ，4リピートタウの発現増加を導くことが明らかとなった。

生化学的検討では、CAT 活性は前頭葉および側頭葉で正常対照の各々 61 %、36 %に低下していたが、頭頂葉、後頭葉では変化を認めなかった。一方、GABA 濃度は大脳皮質、尾状核、被殻では変化を認めなかったが、淡蒼球外節、黒質で正常対照の各々 40 %、31 %に低下していた。

ドパミンおよび HVA 濃度は、尾状核、被殻、淡蒼球外節、黒質のいずれにおいても、正常対照の各々 0.2 %・9.4 %、0.3 %・11 %、4.8 %・20 %、0.7 %・19 %と著しい減少を示した。また、被殻におけるドパミン取り込み部位 (3H-GBR-12935 binding) も正常対照の 12 %と著しい減少を示した。これに対して、ドパミン受容体結合能は D1 受容体 (3H-SCH23390 binding) および D2 受容体 (3H-spiperone binding) のいずれにおいても変化を認めなかった。

E. 考察

タウ遺伝子における N279K 変異は、我々の家系 (PNLD) 以外に、アメリカ人家系 (PPND) およびフランス人家系で報告されており、この 3 家系の臨床像、病理学および分子遺伝学的特徴は極めて類似している。

N279K 変異家系では、病初期には筋固縮・無動優位のパーキンソン症状が前景にたつ。レボドパ治療は効果に乏しく、経過とともに垂直性眼球運動障害、開眼失行、錐体路徴候などの症候を認める。中期以降になると、痴呆、性格変化、精神症状も明らかになってくる。病理学的には、皮質および皮質下組織で神経細胞の脱落、グリオシスを認めるが、皮質下病変が比較的高度である。黒質は高度に障害されているが、Lewy 小体は認めない。ballooned neuron およびタウ陽性物質の著しい沈着を神経細胞、グリア細

胞のいずれにおいても認める。N279K 変異では塩基配列が TAAGAA から GAAGAA に変化してスプライシング促進配列にな

り、エクソン 10 のスプライシングが増加し、4 リピートタウの発現量が増加する。

これに対して、多くの FTDP-17 家系では、脱抑制行為をはじめとする行動異常、痴呆が早期より症状の主体をなす。これらの家系においてもパーキンソン症状は認められるものの、比較的後期になって出現することが多い。著しい大脳皮質病変に比べ、黒質病変は比較的軽度である。これらの家系ではエクソン 9、10、12、13 においてミスセンス変異を認めるが、N279K 変異と異なり、エクソン 10 のスプライシングには影響がみられず、微小管重合促進能の低下を示すことが報告されている。

N279K 変異において早期よりパーキンソン症状が前景にたつ原因として、病初期より黒質-線条体ドパミン神経の機能低下が存在することが挙げられている。PPND 家系では、保因者では発症前よりすでに黒質-線条体ドパミン神経の機能低下が存在することが報告されている。今回我々の示した PNLD での線条体、黒質における著明なドパミン、HVA 濃度の低下および被殻におけるドパミン取り込み部位の著しい減少も、この考えを支持するものと考えられる。

しかし、ドパミン受容体については、D1、D2 受容体のいずれにも変化を認めなかった。従って、N279K 変異でみられたレボドパ治療に対する反応性の乏しさは、postsynaptic なドパミン受容体の変性によるものではなく、他の要因-例えば淡蒼球病変の関与などを考慮する必要がある。事実、カイニン酸注入による選

括的淡蒼球神経細胞障害を有するサルでは、動作の緩慢が観察されている。

本患者の脳皮質における CAT 活性の低下が、病理学的変化の著しい前頭・側頭葉でのみ認められたことは興味深い。PNLD ではマイネルト基底核にも中等度の病変を有する。従って、前頭・側頭葉での CAT 活性の低下は、マイネルト基底核から脳皮質に投射しているコリン作動性神経の神経終末が、当該領域において trans-synaptic retrograde に変性を受けたために生じた可能性が考えられる。

最後に、淡蒼球外節における GABA 濃度の低下は、本患者でみられたレボドパ治療の際の著しいジスキネジアが、線条体 - 淡蒼球外節 GABA 神経の機能低下により生じた可能性を示唆している。

F. 結論

家族性前頭側頭型痴呆 (FTDP-17) におけるタウ遺伝子の N279K 変異はパーキンソンニズム優位の臨床像を呈するサブグループを形成する。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) M. Yasuda, T. Kawamata, O. Komure, S. Kuno, I. D'Souza, P. Poorkaj, J. Kawai, S. Tanimukai, Y. Yamamoto, H. Hasegawa, M. Sasahara, F. Hazama, G.D. Schellenberg and C. Tanaka : A mutation in the microtubule-associated protein tau in pallido-nigro-lusian degeneration. *Neurology* 1999; 53: 864-868

2) M. Yasuda, O. Komure, S. Kuno and C. Tanaka : Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) - kindreds with N279K mutation. *Neurology* 2000; 54: in press

3) T. Sato, M. Oyake, K. Nakamura, K. Nakao, Y. Fukusima, O. Onodera,

S. Igarashi, H. Takano, K. Kikugawa, Y. Ishida, T. Shimohata, R. Koide, T. Ikeuchi, H. Tanaka, N. Futamura, R. Matsumura, T. Takayanagi, F. Tanaka, G. Sobue, O. Komure, M. Takahashi, A. Sano, Y. Ichikawa, J. Goto, I. Kanazawa, M. Katsuki, and S. Tsuji : Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable with those in DRPLA patients. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 99-106

4) Y. Kaseda, H. Kawakami, Z. Matsuyama, R. Kumagai, M. Toji, O. Komure, M. Nishimura, Y. Izumi, F. Udaka, M. Kameyama, T. Nishio, N. Sunohara, Y. Kuroda, and S. Nakamura : Spinocerebellar ataxia type 6 in relation to CAG repeat length. *Acta Neurol Scand* 1999; 99: 209-212

5) M. Mogi, A. Togari, T. Kondo, Y. Mizuno, O. Komure, S. Kuno, H. Ichinose and T. Nagatsu : Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1999; 270: 45-48

6) S. Yasuda, K. Inoue, M. Hirabayashi, H. Higashiyama, Y. Yamamoto, H. Fuyuhiko, O. Komure, F. Tanaka, G. Sobue, K. Tsuchiya, K. Hamada, H. Sasaki, K. Takeda, H. Ichijo, and A. Kakizuka : Triggering of neuronal cell death by accumulation of activated SEK1 on nuclear polyglutamine aggregations in PML bodies. *Genes to Cells* 1999; 4: in press

2. 学会発表

なし

生検および剖検資料を用いた神経・筋疾患の遺伝子解析に関する研究

分担研究者 高橋 桂一 国立療養所兵庫中央病院 院長

研究要旨：神経筋疾患の原因は未だ不明の疾患が多く、また遺伝性のものが少なくない。原因の解明や遺伝相談を的確に行うためには、生検や剖検で得られた資料を適当な条件下で保存し、日進月歩の技術により解析し、患者やその家族に還元することが重要である。当院の過去3年間のRRN登録の実績と、sarcoglycan異常症例について報告する。

A. 研究目的

神経筋疾患には原因の未だ不明の疾患が少なくない。学術の進歩により、既に死亡した症例の原因が保存資料の存在により解明され、また遺伝相談をより正確に行うことが可能となる。当院のResearch Resource Network(RRN)への登録の現状と解析例を述べる。

B. 研究方法

生検および剖検資料のRRNへの登録を行う。保存生検筋の免疫組織化学と患者DNAの解析を行う。

C. 研究結果

1)登録の現状

平成11年11月現在で剖検脳および脊髄10例、生検筋36例を登録した。

2)肢帯型筋ジストロフィーは近年の分子生物学の進歩に伴って、分子～遺伝子レベルで診断され、分類されるようになった。サルコグリカン(SG)の異常を示し、骨格異常を伴った症例を提示する。

症例：男1983年生、生下時より啼泣弱く、頸定5ヶ月、座り9ヶ月、伝い歩き12ヶ月、独歩15ヶ月。89年某院受診、登攀性起立、高CKを認められ、当院へ紹介された。現症は全身の筋萎縮と弱力あり近位優位、高口蓋、側彎があり、筋弱力は緩徐進行性、13歳入院精査。

既往歴：先股脱および停留辜丸の手術。

家族歴：血族結婚なし。父：高口蓋、CK 92, 215 IU/l(～197), 母：症状なし CK 336, 187 IU/l(～180)。

検査：CBC正常。免疫系異常なし。GH 1.8 ng/ml(<0.42), LH 6.8(1.8～5.2), FSH 4.8(2.9～8.2)mIU/ml. CK 320(MM94.6%), LDH 625 IU/l, S-Cr 1.29, S-Crn 0.1mg/dl, U-Cr 559, U-Crn 175mg/day. EKG inverted T in V1-3, %VC 64.6%, FEV1.0% 58.6%. dystrophin遺伝子欠失なし。筋CT：筋原性萎縮近位優位。

筋生検：脂肪変性、RRFなし、type1 線維優位、dystrophin染色正常、 α -sarcoglycan(SG)および γ -SG染色陰性。

遺伝子解析：筋のRT-PCR及びgenomic DNAのPCRで α -SGの各exonのdirect sequencing(DS)異常無し、以下genomic DNAの γ -SGのSSCPおよびDS、 δ -SGの β -SGとの塩基配列の相違するexon2およびexon8、あるいは過去に異常の報告のあるexon7のDSは異常無し。 β -SGのexon3の上流21bpにforwardとreverseともにCとTのヘテロが検出された。Exon3には異常がなかった。

D. 考察：

この症例では両親の β -SGの解析、RT-PCRによる β -SGのexon skippingの有無の検索を行う必要がある。

過去3年間でかなり特異な症例を含む生検と剖検材料の登録をすることが出来た。病因の解明のなされていない症例も少なくないが、学問の進歩を待って解明するための、最も現実的な手段としてのRRN(Bank)の推進は益々重要である。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

精神・神経リサーチリソースネットワーク (RRN) の今後の課題
RRN ネットワーク委員会委員長 渋谷統寿 国立療養所川棚病院長

研究要旨

平成 9 年から 11 年までの 3 年間で、国立医療機関における脳神経科学の研究を効率的・効果的に推進するための精神・神経 RRN が完成した。これは HOSPnet 内のイントラネットとして、各施設に分散して保存されている生検・剖検組織をデータベース (DB) として登録し、有効利用するためのネットワーク環境を整備することである。これまでに RRN ソフトウェアと RRN セキュリティを定義し、システムの管理・運用規定を定め倫理上のガイドラインを作製して運用が開始された。今後の課題は RRN の長期継続と発展であり、このためには RRN システムを外部へ公開しバンク資料の共有化を図ると共に研究班研究から事業化することである。そこで今年度は共有化、事業化へむけて今後の課題を抽出しその方策について検討した。

RRN委員会

高嶋幸男	国立精神・神経センター 武蔵病院臨床検査部長
埜中征哉	国立精神・神経センター 武蔵病院院長
後藤雄一	国立精神・神経センター 神経研究所室長
伊藤雅之	国立精神・神経センター 神経研究所研究員
巻淵隆夫	国立療養所犀潟病院 研究検査科長

A. 研究目的

精神・神経 RRN システムの共有化と事業化に向けて RRN システムの現状を分析し問題点を探り、今後の対策をたてることを目的とした。

B. 研究方法

精神・神経 RRN システムは生検、剖検、ネットワーク、倫理の 4 つのワーキンググループのもとで管理運用され、倫理規定やバンク組織利用のガイドラインが定

めてある。しかしネットワークは HOSPnet 内のイントラネットとして存在し、精神・神経疾患専門の国立医療機関内部組織のみで利用されているに過ぎない。そこで RRN システムと DB を外部組織へ公開し DB の共同利用をするために RRN のセキュリティ、管理・運用上の問題点、RRN における生検・剖検バンク組織の提供・利用のガイドライン等について RRN 委員会で検討した。

C. 研究成果と今後の課題

I. 共有化にむけては精度の高いバンク資料の集積は勿論であるが、少なくとも i) 患者のプライバシーの保護、ii) 倫理性、iii) 合法性、および iv) 運用性が確保されることが必要であり、そのためのとるべき対策を協議した。

①生検・剖検のバンク資料については精度の高い資料の集積のために現行のマニュアルを検討し、生検・剖検材料を疾患毎に採取や保存の標準的手順（方法）をより詳細定めるべきである。

②データベースの構築について

a. 診断名のCodingを現行のICD-9 NAからICD-10 NAをbaseにした検索コードとし、診断名のその他の診断の入力項目を極力少なくすべきであること。

③個人情報の保護のためバンクのデータファイルにIDを添付して分割し、添付したIDをキーとして患者のイニシャル、医療機関名、地域等を記したAファイルとその以外の患者の特定ができない医療情報のみを記載したBファイルに分割し(表1)、このBファイルのみをバンク資料として共有化に提供して共同研究を推進すべきである。

④Bファイルの提供はHOSPnetの外にFirewal1を介して外部サーバーを設置して(図1)、Bファイルデータのみを提供することで共有化を可能とする等の対策が必要と考えられた。

⑤また将来的に外国の脳バンクと連携し国際共同研究を行うためにはファイルの英語化も必要と考えられた。

II. 事業化に向けての方策 精
 神・神経RRNを長期継続し、よりよいDBとして発展させるためには研究班研究から事業化に繋げることが必須であると考えられた。このためにはこの精神・神経RRNを国の事業(政策医療)として精神・神経の政策医療ネットワーク協議会の経費の中で管理・運営していくべきであろうとの意見が大であった。

D. まとめ

精神・神経RRNシステムが完成し、WWWブラウザを利用した生検・剖検DBとしてバンク資料が集積されつつある。このDBは脳・神経科学の研究のツールの一つとして有用であり、長期継続と今後の発展が望まれる。そのためには精神・神経RRNはHOSPnetのイ

ントラネットとしてではなくインターネット上に積極的に公開してバンク資料の共有化を推進すべきであるが、共同利用に於いてはi)Patient privacy、ii)Accountability、iii)Ethical and legal acceptability、iv)Requirementsなどの機能を有していることが必要であると結論された。

表1. データ分割の概念

ID	名前	年齢/性	生年月日	臨床診断	所見	住所	医療機関名
1234	NS	42/F	1958322	MS	—	xxx	aaa病院
2345	XA	67/M	1932234	MG		yyy	bbb病院
6789	DV	25/F	1944891	XX		zzz	ccc病院

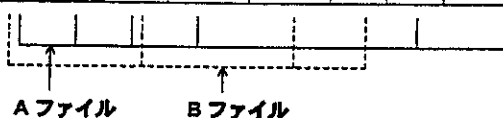
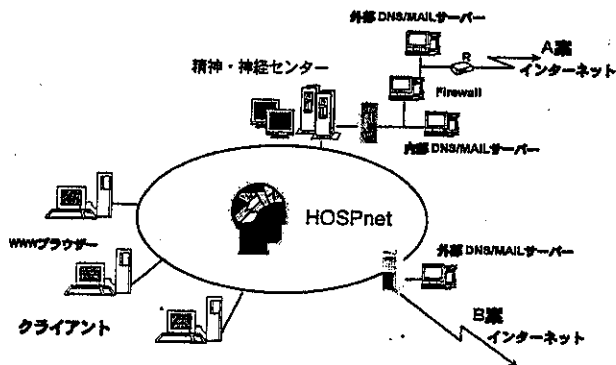


図1. 精神・神経RRNシステム



筋疾患における DNA 傷害の検出および病態への関与について

分担研究者 岩崎祐三 国立療養所宮城病院長

研究要旨

本班会議により設立された Research Resource Network 等より筋疾患 19 例 (PM 5 例、IBM 5 例、OPMD 4 例、ALS 5 例) および正常筋 7 例の凍結筋組織の提供をうけ、in situ Nick Translation 法により Single-Strand Breaks (SSB) の検出を試み、DNA 傷害の病態への関与について検討した。SSB は黒色銀粒子として認められ、炎症性筋疾患である PM、IBM のみならず OPMD においても著明な増加が認められた。一方、神経原性疾患である ALS や正常筋では SSB 増加は認められなかった。SSB 増加は、DNA 損傷および DNA 修復障害を示しており、これらが病態に関与している可能性が示唆された。

飛田宗重、岩崎祐三
国立療養所宮城病院神経内科

A. 研究の目的及び意義

近年、炎症性疾患における神経・筋細胞の変性機序に DNA 修復障害が関与している可能性が指摘されるようになった。我々は既に、HTLV-1 associated myelopathy (HAM) 脊髄において脊髄実質細胞および血管周囲、髄膜周囲の一部で SSB 増加が著明であり、炎症性脊髄病変での SSB 増加と病態機序との関連性について報告した (Tobita et al, 1999)。昨年度は筋疾患に応用し、少数例の検討ながら炎症性筋疾患において SSB 増加を見出した (Tateyama et al, in press)。今回は、症例数を増やして筋疾患における DNA 傷害の検出、病態への関与について検討した。

B. 研究方法

筋疾患および組織学的に正常と診断された 26 例の凍結生検組織を用いた。内訳は

polymyositis (PM) 5 例、inclusion body myositis (IBM) 5 例、oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) 4 例、ALS 5 例および正常筋 7 例である。凍結筋組織を 10 μ に薄切し既に報告した in situ Nick Translation 法 (Tobita et al, 1995) により Single-Strand Breaks (SSB) の検出を試みた。

C. 研究結果

(1) 本研究に先立ち、炎症性胃粘膜病変を用いて DNA 傷害の定量的評価に関して予備実験を施行し、本法により DNA 傷害の定量的評価が可能であること、SSB 増加の程度は炎症の程度及び細胞傷害の程度と相関することを示した (Yabuki et al, 1997)。

(2) SSB は黒色銀粒子として認められ、炎症性筋疾患である PM、IBM のみならず OPMD においても著明な増加が認められた。PM においては、再生線維および浸潤単核球、壊死線維近傍の線維で SSB 増加が著明だった。IBM では、再生線維、小角化線維、正常と思われる筋線維で SSB 増加が認められた。

OPMD では、小角化線維、正常と思われる筋線維で SSB 増加が認められた。また、ALS、正常筋では SSB 増加は認められなかった。

D. 考察

炎症性筋疾患である PM、IBM のみならず rimmed vacuole を伴う OPMD においても著明な SSB 増加が認められた。一方、神経原性疾患である ALS や正常筋では SSB 増加は認められなかった。以上の結果は、炎症性疾患と rimmed vacuole を伴う筋疾患において SSB 増加すなわち DNA 損傷および DNA 修復障害が病態に何らかの役割を果たしている可能性を示唆していると考えられる。今後、SSB 増加が具体的にどのように炎症性疾患と rimmed vacuole を伴う筋疾患の病態機序に関与しているか明らかにする必要がある。DNA 傷害の意義の解明とともにさらなる検討が急務であり、今後の課題と考えられた。

E. 結論

(1) SSB は黒色銀粒子として認められ、炎症性筋疾患である PM、IBM のみならず rimmed vacuole を伴う OPMD において増加が認められた。一方、神経原性疾患である ALS や正常筋では SSB 増加は認められなかった。

(2) 炎症性疾患と rimmed vacuole を伴う筋疾患における SSB 増加は、DNA 損傷および DNA 修復障害を示しており、これらが病態に関与している可能性を示唆している。

(3) 本法は DNA 傷害の検出に有用であると考えられた。炎症性疾患と rimmed vacuole を伴う筋疾患の病態機序における DNA 傷害の意義についてはさらに検討が必要であり、今

後の課題である。

F. 研究発表

・論文発表

- 1) Tobita M., Nagano I., Nakamura S., Itoyama Y., Kogure K.: DNA single-strand breaks in postischemic gerbil brain detected by in situ nick translation procedure. *Neuroscience Letters*, 200:129-132,1995
- 2) Yabuki N., Sasano H., Tobita M., Imatani A., Hoshi T., Kato K., Ohara S., Asaki S., Toyota T., Nagura H.: Analysis of cell damage and proliferation in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa from patients with gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 151:821-829, 1997
- 3) Tateyama M., Tobita M., Takeda A., Chida K., Onodera Y., Takahashi T., Itoyama Y.: Analysis of DNA damage in muscle fibers of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD). *Neurology*, 50, Suppl.4, A 136, 1998
- 4) Tobita M., Konno H., Hara H., Tago H., Hinuma Y., Iwasaki Y., Itoyama Y.: DNA Single-strand breaks increase in the spinal cord lesions in HTLV-1 (human t-lymphotropic virus type-1) associated myelopathy / tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Neurology*, 52, Suppl.2, A 427, 1999
- 5) Tateyama M., Tobita M., Takeda A., Chida K., Onodera Y., Kikuchi A., Aoyagi N., Itoyama Y.: DNA single-strand breaks in muscle diseases with rimmed vacuoles. *Acta Neuropathologica*, in press

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

生検材料による神経・筋疾患等の成因解明と治療に関する研究

研究協力者 本吉慶史 国療下志津病院神経内科医長

研究要旨： デュシェンヌ型筋ジストロフィー剖検例の末梢神経と腰髄をアセチルコリン受容体 α サブユニット(AchR α)抗体により免疫組織化学的に検討した。他の筋萎縮症とは異なり、本症では末梢神経の軸索、腰髄の前角細胞が染色され、筋萎縮による二次性変化とは異なる異常が末梢神経系に存在する可能性が示唆された

A 研究目的

これまでの本研究で、筋ジストロフィー生検筋では抗アセチルコリン受容体 α サブユニット(AchR α)抗体により、筋鞘は輪状に、変性した小径線維では内部が強く染色される傾向にあり、特にベッカー型とデュシェンヌ型(DMD)では筋内の末梢神経も強く染色されたが、神経原性筋萎縮症ではこの様な傾向は認められなかった。

本年度は剖検組織を用いて、末梢神経と脊髄について検討した。

B 研究方法

本研究のネットワークにより蓄積された剖検症例のうち、DMD19歳例の脊髄前根、腓腹神経、DMD33歳例の横隔神経の剖検凍結標本、ならびにDMD19～27歳の3例、筋強直性ジストロフィー(MyD)42～62歳の3例、福山型筋ジストロフィー(FCMD)11、21歳の2例の腰髄ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて、ニューロフィラメント(NF)、AchR α に対する抗体により免疫組織化学染色を行ない、その発現様式を観察した。対照としては、慢性炎症性脱髄性神経根炎(CIDP)13歳例の腓腹神経生検標本と筋萎縮性側索硬化症(ALS)70歳例の腰髄標本を用いた。

C 研究結果

末梢神経： 19歳DMDの脊髄前根と腓腹神経、33歳DMDの横隔神経では、抗NF抗体で染まる軸索が、抗AchR α 抗体に

ていづれも濃染した。しかしCIDP例の腓腹神経生検標本では、軸索は抗AchR α 抗体にて染色されなかった。

腰髄： DMD3例のうち、19歳、22歳の2例では、腰髄前角細胞が抗NF抗体、抗AchR α 抗体ともに染色された。残る27歳のDMD1例では抗NF抗体にて髄内根や前根は染色されたが腰髄前角細胞は染色されず、抗AchR α 抗体による染色性も示さなかった。その他の、MyD3例、FCMD2例、ALS1例についても同様に、腰髄前角細胞は、抗NF抗体、抗AchR α 抗体ともに染色されなかった。

D 考察および結論

DMDの末梢神経剖検標本では軸索が抗AchR α 抗体で染色され、腰髄においても、1例を除くDMD2例で前角細胞が抗NF抗体、抗AchR α 抗体ともに染色されるのに対し、他の疾患群では染色性は認められなかった。

筋支配線維のない、腓腹神経剖検標本の軸索も抗AchR α 抗体により染色されていることより、この所見がAchR α の存在を意味するものではなく、非特異的である可能性が高いが、対照とした腓腹神経生検標本ではこの様な染色性は認められない。

今回の結果は、DMDにおいては末梢神経ならびに腰髄前角細胞に変化を生じ、それが筋萎縮に伴う二次性の変化とは限らないことを示唆するものと考えられる。