

Characteristics of multiple sclerosis in
Japanese and treatment effect of
interferon-beta 1b.
Symposium: 15th International Congress
of Neurology, London June 15th 2001.

Saida T
Immunoglobulin treatment trial in
Japanese patients with multiple
sclerosis.
MS Forum 13th Modern Management
Workshop 1 April 2001 Oxford, UK.

小牟禮 修、小河秀郎、斎田孝彦
Machado-Joseph 病における心血管系
自律神経障害。第42回日本神経学会
総会 東京、2001.5

斎田孝彦、田代邦雄、糸山泰人、佐藤
猛、大橋靖雄、インターフェロンβ1b
グループ。
日本人多発性硬化症におけるインタ
ーフェロン療法
第42回日本神経学会総会 東京、
2001.5

精神・神経・筋疾患の実験用研究資源の活用に関する研究（有馬班）

ハンチントン病の1剖検例と遺伝子解析の問題点

分担研究者 高橋 桂一 国立療養所兵庫中央病院 名誉院長

研究要旨

神経筋疾患の病態解明や診断に保存資料の遺伝子解析が不可欠な例が増加している。一方倫理的な配慮や制限により、遺伝子解析が必ずしも容易に行い得ない例も少なくない。ハンチントン病の1例を示し、遺伝子解析の方法、検査の実施可能度、倫理等について現状を解析し、考察を行った。

A. 研究目的

神経筋疾患の病態解明や診断に資料の保存と遺伝子や組織の解析が不可欠な例が増加している。一方倫理や社会的要因により、遺伝子解析が容易に行えない例も少なくない。ハンチントン病（HD）の1例を示し、遺伝子解析の方法、結果、検査の実施の問題点、倫理など報告し考察する。

B. 研究方法と結果

症例は1938年生，男性37歳頃より落ち着きがなくなり，39歳で上肢，体感の不随意運動と知能低下が出現し，HDの診断を受けた。85年当院に入院し，漸次増悪。脳のCTで側脳室の拡大，尾状核の萎縮，シルビウス溝の拡大が著明でHDの所見であった。92年4月53歳で両側肺炎で死亡した。脳重量925g，側脳室の拡大，尾状核，被殻の著明な萎縮と神経細胞の消失とastrogliosisが観られた。家族の同意を得て，半側脳を緩徐凍結し-70℃で保存，確定診断が求められていた。

脳のDNA抽出：脳は脂質が多いので工夫が必要であるが，血液用に開発されたGenomixBを用いて比較的簡単に行えることが判った。CAGリピート数の測定はプライマーラベル法と直接シーケンス法（DS）があるが，後者を実施した。PCR反応にはformamide 3.5～4%，あるいはDMSO 4～6%が至適で必須であった。DMSOの8～10%では明らかな反応抑制がみられた。T社GC Bufferも使用が可能であった。生成物はagaroseの調整用ゲルとMicrocon-100で精製し，キャピラリーでDSを行い，43リピートを確定した。

C. 考察

HDの遺伝子解析に関しては倫理や保険など社会経済的要因がからんで複雑である。事実日本でも他の疾患の遺伝子解析を商業ベースで行っている業者はかなりの数にのぼるが，HDの遺伝子解析を依頼しても，自粛しているとか，技術的に出来ないなどの返事が帰ってきて検査依頼は不可能である。発症した患者の血液を用いて，プライマーラベル法でCAG反復数の決定は確定診断法として大学の研究室などで行われている。発症前の家族の遺伝子解析は我々も行っていない。診断が確定すれば必ず発症する疾患故，1992～3年JAMA紙上などで議論が戦わされた。ELSI（倫理的，法的，社会的発布）の必要の例として知られている。結論は当事者の意志を最大限に尊重するものであること（自己決定）で，支えるのはカウンセリングである。実施面に関して重要なことは臨床医や研究者の考え方あるいは生き方であり，倫理は絶対普遍の部分と社会要因で変化する部分があることを認識し，対応することが必要である。

D. 結論

この研究班のような医療職能集団のプロとしての自治意識の確立が遺伝子解析に関しても極めて重要である。

E. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

共同研究者：国立療養所兵庫中央病院内科 宮内章光，同研究検査科病理 原 喜与一，神戸大学医学部第一病理 伊東恭子

「精神・神経・筋疾患の実験用研究資源に関する研究」(有馬班)
保存リンパ球を用いた免疫性神経疾患における末梢血 Th1/Th2 バランスの検討
およびT細胞レセプターβ鎖レパトアの特性解析
分担研究者 渋谷統寿 国立療養所川棚病院長

研究要旨

免疫性神経疾患のT細胞の機能解析は、発症機序解明のため重要であるが、希少疾患が多く症例の蓄積が困難であり、また急性期の検体を新鮮な状態で適切な研究機関に輸送することも困難である。急性期の患者から採血、分離し凍結保存したリンパ球を用いて機能解析が可能であれば検体の集積が容易となり、多施設での共同研究も容易となる。今回我々は長期に凍結保存したリンパ球の機能解析が可能かを検討するため、凍結保存リンパ球の機能をTh1/Th2バランスの解析およびT細胞レセプターβ鎖レパトアの解析から検討した。その結果、凍結保存されたリンパ球はその機能解析に有用であり、リサーチソースとして利用できることを示した。

研究協力者

神原千晶、松尾秀徳 国立療養所川棚病院神経内科
松本 陽 東京都神経科学総合研究所分子神経病理

A. 研究目的

凍結保存末梢血リンパ球が共同研究の試料となりうるかを検討するために、凍結リンパ球を用いて免疫性神経疾患の病態解析を下記の方法により行った。

1. 免疫性神経疾患のTh1/Th2バランス解析
2. T細胞レセプターβ鎖レパトアの解析

B. 研究方法

1. Th1/Th2 バランス解析

健常対照者(control)2名、フィッシャー症候群(FS)患者3名、ギランバレー症候群(GBS)患者2名を対象とした。FS患者、GBS患者では血漿交換(PE)前後で採血をした。対象者末梢血より比重遠心法で分離したリンパ球を凍結し、1ヶ月から2年間保存した。解凍したリンパ球をPMA-Ionomycin 刺激下に48時間培養。培養上清中のTh1サイトカイン(IFN-γ)とTh2サイトカイン(IL-4)の濃度をELISA法で測定した。

2. T細胞レセプターβ鎖レパトアの特性解析

重症筋無力症患者(MG)26名より採血し、うち7例では経時的に採血を行った。末梢血リンパ球を分離、凍結保存後、total RNAを抽出した。CDR3領域スペクトラタイピングは、TCRβ鎖1-24に対するプライマーを用いて、RT-PCR産物を電気泳動し、スペクトラタイピングパターンを蛍光イメージアナライザーで記録する方法で行った。

(倫理面への配慮)

採血にあたっては、本研究班が提唱する承諾書を用い、研究についてのインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1. FS患者、GBS患者ではcontrolと比較しリンパ球培養上清中のIL-4濃度が高値であり、そのためTh1/Th2バ

ランスはTh2に傾いていた。さらにFS患者においてはPE後にTh1/Th2バランスが是正される傾向が示された。2. MG患者のリンパ球では78.8%で特定のT細胞のexpansionを確認し、control 54.5%に比較し高頻度であった。特にVβ8、9、16、23の増幅頻度が高く、経過を追って解析した7例中5例では特定のVβサブタイプの増加が持続していた。

D. 考察

ヘルパーT細胞はそのサイトカイン産生パターンよりIFN-γを産生するTh1細胞(細胞性免疫)とIL-4、5、6、10を産生するTh2細胞(液性免疫)とに分類され、免疫性神経疾患の発症機序にはこのTh1/Th2バランスの偏奇が関与しているとされている。今回の研究結果はFS患者、GBS患者では発症時にTh1/Th2バランスはTh2に偏奇しており、液性因子が発症機序に重要な役割を果たしているとするこれまでの報告と矛盾しない結果であった。

一方、免疫性神経疾患でのT細胞レセプターβ鎖レパトアの解析の意義は特定のHLAとの関連が解明されれば疾患特異的な抗原の特定しうる可能性があり、特定のT細胞の増加が認められれば治療の標的として利用できる可能性がある。今回、MG患者のリンパ球では78.8%でいくつかのT細胞のexpansionを確認し、control 54.5%に比較し、高頻度であった。しかし疾患特異的なスペクトラタイプの特定には至らなかった。免疫性神経疾患は希少疾患が多く、症例の集積が困難だが、リンパ球バンクを構築することで効率的な研究が可能になることが予想された。

E. 結論

凍結リンパ球を用いてTh1/Th2バランスおよびT細胞レセプターβ鎖レパトアの解析が可能であった。リンパ球の凍結保存は種々の疾患の病態解析に利用可能であり、神経・筋試料と同様にリンパ球登録システムを構築することで多施設での研究に貢献できると考えられる。

脊髄小脳変性症の臨床遺伝子検査の現状と問題点

分担研究者 中島孝 国立療養所犀潟病院神経内科医長、臨床研究部病態生理室長

研究要旨

脊髄小脳変性症において、症状・身体機能の維持・向上や QOL 向上の観点から遺伝子検査の臨床的な意味についての留意点をまとめ、診療における遺伝子検査の意義や重要性をまとめる必要がある。遺伝性脊髄小脳変性症の常染色体優性を示すものとして SCA1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12, 13,14,16,17, DRPLA があり、そのおおくは容易に末梢血採血により診断確定が可能である。常染色体劣性のものとしては、ビタミン E 単独欠損性失調症、EAOH、Friedreich ataxia がありこれも可能である。遺伝診断に基づく詳細病名の必要性について、Barthel index, BI と International cooperative ataxia rating scale, ICARS、音声波形解析などの詳細な比較が必要である。詳細診断名を早期につけ臨床経過を追い、転帰を確定し、剖検することで、EBM に基づく診療モデルの妥当性が評価でき、適切な診療ガイドラインやクリティカルパスが作成できると考えられた。

共同研究者：渡部弘美（臨床検査科）、福原信義（副院長）

I はじめに

遺伝性脊髄小脳変性症（SCD）において、標準化した診療モデルとそれに対応したクリティカルパス（critical path 以下パス）を作成するためには、詳細病名に基づいて臨床データを評価・解析する必要があると思われる。このために臨床遺伝子検査が必要である。SCD において、症状・身体機能の維持・向上や QOL 向上の観点から遺伝子検査の臨床的な意味についての留意点をまとめ、診療における遺伝子検査の意義や重要性をまとめる必要がある。

II. 脊髄小脳変性症（SCD）臨床における EBM と遺伝子検査の必要性

米国健康政策・研究局（AHCPR）は Evidence の水準を以下のとおり定めている。I a：無作為化対照比較試験のメタアナリシスから得られた根拠。I b：少なくとも1つの、無作為化対照試験から得られた根拠。II a：少なくとも

1つの、無作為化はしていないがよい対照比較研究から得られた根拠。II b：少なくとも1つの、よくデザインされたその他の準実験的研究からの根拠。III：比較研究、相関研究、症例対照研究といったよくデザインされた非実験的記述研究からの根拠。IV：専門委員会、代表的権威者の意見や臨床経験からの根拠。

SCD の領域では診断法、治療法、リハビリテーション技術、緩和医療、看護・介護技術などのすべての分野において EBM の I, II レベルに基づく知見は乏しい。それは、SCD としての疾患単位の多様性がおおく遺伝子検査が導入される以前の臨床データは多様性が著しいためと考えられる。

SCD は分類のための病名であり、実際には遺伝子診断に基づく詳細な診断名により、診断方法、合併症、介護度、予後が異なると考えられる。詳細な診断としては孤発性として MSA (OPCA, SND, SDS) と CCA がある。遺伝性の常染色体優性として、SCA1,2,3,6,7,8,12,14, 17, DRPLA などがあり、常染色体劣性として、ビタミン E 単独欠損性

失調症、低アルブミン血症と眼球運動失行をともなう早発性失調症 (EAOH) などがある。

SCD の遺伝子検査に基づく詳細な診断名の地域分布の偏りと有病率の著しい差が認められている¹⁾。SCD のデータは地域に依存して母集団の差がおおきく臨床試験の結果は地域により一定にならない。したがって、詳細な診断名に基づいてデータを収集すべきと思われる。詳細な診断名を早期に診断できるアルゴリズムを確立することも必要である。

現時点の SCD の診療モデルは、「SCD は早期に詳細病名を確定して早期から適切なリハビリをすれば機能低下の程度を最小限に抑えられ QOL の低下が最小限にできる」という考え方である。このモデルが正しいかどうか、また、どのようなリハビリをどのくらいすればよいのかのデータ集積は現時点では十分ではない。

III. 臨床評価のための評価尺度の利用

このような遺伝子検査に基づく診療モデルを実証するためには、多施設で比較できる臨床評価尺度の標準化がまず必要である。小脳症状の評価スケール ICARS (International Cooperative ataxia rating scale) と日常生活動作の評価スケールである Barthel index の利用が有用とされている²⁾。QOL 評価スケールも必要だが、SCD に利用できるものは現時点ではない。ICARS は多施設の薬理試験を目標に作成されたが、薬剤臨床試験で有意差がでた薬剤がないことと標準化のための inter-rater reliability のデータがないこと、ICARS は感度や定量性が十分とは言えないことが問題である。これらの欠点を補うために、私たちは小脳性構音障害の音声波形解析法を客観的評価尺度として検討している。Taltirelin hydrate (TH) は第 II、III 相臨床試験で、短期および長期にわたる体幹・四肢運動失調、構

音障害の改善効果が認められたとされているが、実際に改善効果があるかどうか音声波形解析と ICARS を用いて検討した。Machado-Joseph 病患者における TH の短期有用性と、治療効果判定の定量的指標として検討した。MJD10 名について TH を 4 週投与し、臨床評価をおこなった。音声波形解析では改善効果を証明できたが、ICARS では検出できなかった³⁾。

IV. SCD の標準診療マニュアルとパス作成にむけて

常染色体優性遺伝性の SCD はポリグルタミン病であり、臨床症状や予後が異なっても将来は同じ治療薬により発症抑制が行える可能性がある。その時代の診療モデルは「SCD は早期に発症前遺伝子診断し、発症前から治療薬を開始し、発症抑制を行う」ということになる。現時点では残念ながら、そのような薬剤は存在せず、リハビリテーションや緩和医療 (広義) が中心となる。

当院では SCA3 (MJD) 患者に対して、定期的リハビリ入院 (約一ヶ月) を勧めることで症状の改善や悪化予防を行っている。これを標準的な診療として普及させるために、適切な臨床研究で有意差をもって改善効果を示す必要がある。予備的検討で、MSA では ICARS は急速に進行するが、SCA3 では定期的なリハビリ入院 (1 年に 2 回程度) により、ICARS はほとんど悪化しない。

現時点では、早期の詳細診断名に基づいて適切にリハビリテーションや薬剤投与と症状緩和を行い、ADL を改善すれば、QOL が高まるという考え方を持っている。その内容については臨床試験により統計的有意差をだし、EBM レベルを上げていくことが今後必要である。

VI. 結び

いままで述べたように、SCD は詳細な診断名ごとに罹病率などの地域差が極めて大きい。また、遺伝子検査に基づく詳細な診断名ごとの重症度・介護度などの予後はまったく異なる。したがって、現時点では、SCD という大きな分類に対応する包括医療をおこなえる根拠はなく、診療モデルや評価尺度が不十分のまま DRG/PPS を行うことはまず不可能である。まず、SCD の診断確定のために遺伝子検査、MRI、SPECT 検査をいれ、早期に詳細診断名を確定できるようにする必要がある。

詳細診断名を早期につけ臨床経過を追い、転帰を確定し、剖検に基づいて詳細な検討と積み重ねをすることで、SCD 領域で EBM を基にした診療モデルの妥当性の評価と診療ガイドラインやクリティカルパスが作成できると思われる。

研究発表

1. 中島孝、神経内科領域での医療情報システム活用、臨床医、Vol.25, No.4:445-450,1999.
2. 中島孝、実用モデル「愛言葉」の誕生－視線入力意思伝達装置の科学と哲学、難病と在宅ケア、Vol.7, No.7:15-19,2001.
3. 湯浅龍彦、西宮仁、中島孝他、神経ネットワークで実施されるべき共同研究について、医療、Vol.55, No.2:65-72,2001.
4. 林恒美、中島孝、福原信義、マシャド・ジョセフ病における臨床症状と123I-IMP SPECT所見の評価について、臨床神経学、41, 9, 2001 (in press)
5. 渡部弘美、大野清、中島孝、制限酵素活性に及ぼすフェノールの影響、医学検査、Vol50, No 5, 669-672,2001.

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの遺伝子診断に関する研究

分担研究者 園田至人 国立療養所南九州病院神経内科

研究要旨 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)では第4染色体長腕末端部(4q35-qter)の3.3kbの繰り返し配列(D4Z4)の欠失が見られ、EcoRIでのDNAのshort fragmentationが見られるが、このshort fragmentationの病態との関連は明らかではない。今回、これまでの検討のまとめとFSHD遺伝子診断の問題点を検討した。

A.研究目的

FSHDの遺伝子診断は第4染色体長腕のEcoRIでのshort fragmentationをp13E-11をprobeに用いSouthern blotで証明す事が可能であるが、このshort fragmentationの病態との関連は明らかではない。これまでの検討のまとめを行い、現時点での問題点を検討する。(倫理面への配慮)

遺伝子解析において本人へのインフォームドコンセントを十分行い、鹿児島大学倫理委員会にて本人より同意を確認の上、研究を行った。

B.研究方法

FSHDと診断された症例の末梢血よりDNAを抽出後EcoRI,あるいはEcoRIとBlnIでdigestionし、0.5% agarose gel上で電気泳動。nylon membraneに転写後、 α -³²P-dCTPでラベルしたp13E-11とhybridし、fragmentationを検討した。

C.研究結果

- ①106例の検討でFSHD全体の約85%に35kb以下のshort fragmentationが認められた。その中でも5歳以下での早期発症者、網膜血管走行異常、感音性難聴の見られる例では前例にshort fragmentationが見られた。
- ②同一家系内でanticipationと考えられる例も見られたが、fragment sizeは同一であった。

C.考察

FSHD遺伝子診断の今後の問題点(研究課題)として以下の点が考えられた。

- ①.Short fragmentationと病態発現との関連。
- ②fragment sizeと臨床像との関連性の検討。
- ③anticipationとshort fragmentationの関連
- ④4番染色体に関連していない家系の検討
- ⑤より簡便かつ確実な遺伝子異常の検索方法の開発。

D.結論

FSHDは臨床的にも遺伝学的にも多様性があり、病態は不明の部分が多い。今後上記問題点の検討から病態解明、治療法の確立が望まれる。

G.研究発表

論文発表

- 1)Nakagawa M., Matsuzaki T., Higuchi I., et al.: Facioscapulohumeral muscular dystrophy: clinical diversity and genetic abnormalities in Japanese patients. Intern Med. 36: 333-339. 1997
- 2)Nakagawa M., Higuchi I., Yoshidome H., et al.: Familial facioscapulohumeral muscular dystrophy: phenotypic diversity and genetic abnormality. Acta Neurol Scand. 93: 189-192. 1996

厚生科学研究費補助（脳科学研究事業）

分担研究報告書

「精神・神経・筋疾患の実験用研究資源に関する研究」

分担 研究者 今野 秀彦

国立療養所西多賀病院臨床検査科 科長

研究目的：多系統萎縮症(MSA)の脳に特徴的に出現するオリゴデンドログリア内封入体(GCI)の形成機序は不明であるが、本疾患の病態に大きく関与していることが想定されている。大脳白質に高度な組織崩壊を示した長期症例で、GCIの形成及びその後の推移について組織学的に検討した。

研究方法：全経過約16年と長期経過を示した以下の症例で、中枢神経組織について一般的な組織染色と複数の抗体を用いた免疫染色との併用によって、顕微鏡学的に検討した。

症例は、家族歴のない死亡時67才男性で、51才時に歩行時のふらつき感で発症し、3年後には介助歩行、書字拙劣や不明瞭な話し方になっていた。55才時の神経学的所見は、長谷川式簡易知能スケール29/30点。失調性の運動機能障害が主症状で、感覚障害(-)、四肢深部腱反射は正常で、病的反射(-)。起立性低血圧、神経因性膀胱などの自律神経症状も確認された。脳MRIで脳幹・小脳の萎縮が見られOPCAの診断であった。寡動状態、球麻痺症状が進行し、56才時に気管切開術を受けたが、肺炎をくり返し人工呼吸器使用となり全経過約16年で死亡。

病理所見：脳重量800g。小脳、脳幹の高度な萎縮。大脳白質は鉛色状に変性。組織学的には、被殻の構造は失われグリア線維からなる粗な網目構造に崩壊し、黒質でも同様であった。尾状核も高度なグリオーシスを示したが、淡蒼球は比較的保持されていた。橋核の神経細胞消失は著しく、線維消失は中小脳脚から小脳白質も広がり、組織の粗鬆化が目立った。プルキンエ細胞層の細胞消失、下オリブ核の高度な細胞消失とグリオーシス、脳幹部では青斑核、迷走神経背側核の神経細胞の脱落が明瞭であった。脊髄では中間質外側核やOnuf核の細胞脱落、側索の変性も明らかであった。更に、本症例で目立った所見は大脳白質病変である。特に前頭葉では組織の崩壊が著しく、小血管を含む細いグリア線維を残すのみであった。頭頂葉や側頭葉の前半部でも同様であったが、後頭葉に移行するにつれその程度は軽度となり線維の減少とグリオーシスが目立った。嗜銀性を示し α -synuclein或いはubiquitin等

に陽性反応を示すGCIが広範囲に確認されたが、組織崩壊の激しい前頭葉白質には見られず、変性が軽度であった後頭葉白質に著明であった。

考察：MSAに特徴的なGCIは、従来より前頭葉の皮質下白質に好発し、側頭葉や後頭葉には発現しにくいとされている。本症例は、臨床的にも組織学的にもMSAと診断されるが、全経過が16年と長い点が特異的である。この長期間でGCIの好発部位では変性が進行し、組織崩壊に至り一度形成されたGCIも消失したものと考えられる。白質変性は前頭葉から後頭葉に向けて広がりその過程にある後頭葉白質にGCIが多数発現したものと想定された。

結論：MSAにおける白質病変はGCI形成を伴いながら前頭葉から後頭葉に向けて連続性に進行していくものであり、一度形成されたGCIは病変の進行とともに残存することなく消化吸収されるものであることが示された。

研究発表：

論文発表

1)SMON長期例における病理像。

脳と神経 53;875-880, 2001

2)多発性硬化における軸索変性。

別冊・医学のあゆみ

21世紀の神経免疫学 71-73, 2001

学会発表

1)脳損傷の長期例にみられた老人斑

第42回日本神経病理学会

2)著明な大脳白質病変を示した多系統萎縮症の長期例 第69回日本神経学会東北地方会

知的財産権の出願・登録：なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

マルチプレックスウエスタンブロット解析による calpain 3 蛋白異常の検出

分担研究者 南 成祐 国立精神・神経センター武蔵病院 DNA 診断・治療室

研究要旨：肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）2A 型は calpain 3 遺伝子の異常を原因とし、LGMD 全体の約 1/4 を占める。遺伝子診断が可能になっているが、対象者を絞り込む良い手段がないために非効率的な作業を強いられている。今回我々は、ミニマルチプレックスウエスタンブロット（MMW）法により、LGMD2A 型患者を calpain 3 蛋白の量的異常として判定できるか検討した。その結果、LGMD2A 型患者 31 名のうち 29 名(94%)について calpain 3 蛋白の欠損～減少あるいは分子量の異常を認め、対照群から判別することができた。本研究により、LGMD2A 型患者を MMW 法によって高感度、高特異性に検出できることが証明され、また、遺伝子診断に先立つスクリーニング法としても有用な手段であると考えられた。

A. 研究目的

マルチプレックスウエスタンブロット法は複数の蛋白の発現量を同時に定量的に比較検討することができる方法であり、calpain 3 蛋白に対する抗体を含めることで LGMD2A 型の診断にも利用できることが報告されている。しかし、calpain 3 蛋白は試験管内で強い自己消化活性を示すことから、試料調製の間に分解して偽陽性となる危険性が考えられる一方、遺伝子異常によって自己消化活性を失えば安定化して偽陰性となったり、むしろ発現量が増すことも理論的には考えられる。したがって、実際の診断に用いる上でどの程度の信頼性があるのか調査する必要があるが、そのような調査報告はない。今回我々は、凍結保存されている少量の生検筋から LGMD2A 型患者を蛋白レベルの異常として診断できれば遺伝子診断に先立つスクリーニング法として有用であると考え、小スケール化したミニマルチプレックスウエスタンブロット（MMW）法を用い、その診断上の感度と特異性について調査した。また、試料調整時における calpain3 蛋白の安定性についても検討した。

B. 研究方法

遺伝子診断を終了し calpain 3 遺伝子異常が同定されている LGMD2A 型患者 31 名(患者群)

と、何ら異常が認められなかったその他の LGMD 患者 36 名(対照群)を対象とし、凍結筋切片約 10 枚を用いて MMW 法によるイムノブロットを行った。抗体は、dystrophin, dysferlin, calpain 3, α -sarcoglycan, β -dystroglycan, caveolin-3 に対するものを混合して用いた。発色後のプロット像をスキャナーで取り込み、各蛋白バンド内のグレースケール値の総和を求めた。この値を別の電気泳動ゲルのクーマジー染色像から得られたミオシン重鎖のグレースケール値で割ることで筋蛋白量を標準化し、さらにすべてのプロットに同一試料を流しておき、その試料にたいする各蛋白バンドの相対的定量値を求めた。

また、試料調整時における calpain 3 の安定性を調べるため、凍結筋切片を 30℃で 1～30 分間インキュベートしてから溶解バッファーを加え、MMW 法を行った。

(倫理面への配慮)

本研究班において作成され、当センター倫理委員会で承認された承諾書を用い、生検筋を保存し使用する許可を得た。

C. 研究結果

LGMD2A 型患者 31 名のうち 28 名において calpain 3 蛋白の欠損～減少が認められた。2 名

においては蛋白量が比較的保たれており、対照群の下限值よりもやや高い値を示した。この2名は R461C 変異ないし S581C 変異を有していた。残る1名においては 94kDa から 88.5kDa への分子量の減少が認められた。この患者は cDNA 上でエクソン 16 をインフレームに欠失する異常を有していた。

試料調整の前に、凍結筋切片を 30℃ でインキュベートし融解させると、1 分後には既に calpain 3 蛋白量は著減し、5 分後には検出することが困難になった。それとともに約 35kDa の新たな蛋白断片が出現し、増加した。その他に、dystrophin や α -sarcoglycan の蛋白量にも若干の減少が認められた。

D. 考察

今回の結果では、LGMD2A 型患者 31 名のうち 29 名を、calpain 3 蛋白の欠損～減少または分子量異常として、対照群から区別することができた。正常値と異常値の境界線をどこに引くかという問題があるが、仮に今回の対照群の平均値マイナス 2 倍標準偏差未満を異常値とすると、上記の 29 名がすべて含まれ、診断上の感度は 94%、特異性は事実上 100%となる。まだ研究の余地はあるが、MMW 法だけでもかなりの信頼性で LGMD2A 型を診断できる可能性がある。しかし、今回の結果は、わずかではあるが MMW 法で偽陰性となる症例があり、最終的には遺伝子診断が重要であることも示している。遺伝子診断に先立つスクリーニングを目的として、100%の感度が得られるように境界線を正常群の下限值よりやや上に設定しても、ほとんどの正常群を除外することが可能である。そして、calpain 3 蛋白量が比較的保たれている症例については、R461C 変異や S581C 変異を優先的に調べると良いかもしれない。

予想していた以上に LGMD2A 型患者の診断において有効な MMW 法であるが、試料調整時の凍結筋切片の不用意な融解は絶対に避けなければならない。さもないと、calpain 3 は数分のうちに分解し、診断上の偽陽性を生むことになる。

E. 結論

MMW 法によって LGMD2A 型患者を高感度、高特異性に検出できることを証明した。遺伝子診断に先立つスクリーニング法としても非常に有用な手段である。ただし、凍結筋切片の融解は calpain 3 をきわめて不安定化するので、適切に試料調整を行い、人工的な偽陽性を作らないようにしなければならない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Chae J, Minami N, Jin Y, Nakagawa M, Murayama K, Igarashi F, Nonaka I: Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 11:547-555, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名: 論文タイトル名. 発表誌名 巻号: ページ, 出版年
Adachi N, Arima K, Asada T, Mato M, Minami N, Goto Y, Onuma T, Ikeuchi T, Tsuji S, Hayashi M, Fukutani Y: Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) presenting with psychosis. <i>J Neuroschiatry Clin Neurosci</i> 13: 258-260, 2001
Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Kuzubski W, Takahashi K, Tabira T: Genetic analysis in patients with familial and sporadic frontotemporal dementia: two tau mutations in only familial cases and no association with Apolipoprotein e4. <i>Dement Geriatr Cogn Disord</i> 12: 387-392, 2001
Nonaka I, et al: Limb-girdle muscular dystrophy research in Japan. <i>Acta Myologica</i> 20: 83-86, 2001
Chae J, Minami N, Jin Y, Nakagawa M, Murayama K, Igarashi F, Nonaka I: Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. <i>Neuromuscul Disord</i> 11:547-555, 2001
Akagi M, Inui K, Tsukamoto H, Sakai N, Muramatsu T, Yamada M, Matsuzaki K, Goto Y, Nonaka I, Okada S: A point mutation of mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh syndrome. <i>Neuromuscul Disord</i> 12:53-55, 2002
大矢寧, 當山潤, 小川雅文, 埜中征哉, 川井充: 顔面・肩甲・上腕に強い筋罹患を示し、致死的な心筋障害をともなった皮膚筋炎・強皮症の合併例. <i>臨床神経</i> 41:289-295, 2001
大矢寧, 森田浩之, 小川雅文, 埜中征哉, 辻野精一, 川井充: 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー一類似の筋罹患分布を示した成人型酸性マルターゼ欠損症の1例. <i>臨床神経</i> 41:390-396, 2001
Goto Y, Nonaka I, Hayashi J-I: Mitochondrial DNA deletion and duplication in human disease and mouse model. <i>Acta Myologica</i> 20: 110-114, 2001

Nakada K, Inoue K, Chu-Shih Chen C-H, Nonaka I, Goto Y, Ogura A, Hayashi J-I:
Correlation of functional and ultrastructural abnormalities of mitochondria in mouse
heart carrying a pathogenic mutant mtDNA with a 4696-bp. *Biochem Biophys Res
Commun* 288: 901-907, 2001

後藤雄一: ミトコンドリア脳筋症. *日本臨床* 59: 615-621, 2001

伊藤崇, 橋本和季: 骨格筋症候群-その他の神経筋疾患を含めて-パラインフルエンザウイルス.
日本臨床 領域別症候群シリーズ 35: 171-173, 2001

湯浅龍彦, 西宮仁, 中島孝他: 神経ネットワークで実施されるべき共同研究について. *医療*
55:65-72, 2001

Yasuda M, Takamatsu J, Komure O, Kuno S, Souza LD, Kawamata T, Hasegawa M,
Iwatubo T, Poorkaj P, Goedert M, Schellengerg GD, Tanaka C: Tau mutations altering
splicing of tau exon 10 in japanese frontotemporal dementia. *Neuroscientific Basis of
Dementia* 81-84, 2001

Kuroki S, Saida T, Nukina M, Yoshioka M, Seino J: Three patients with ophthalmoplegia
associated with *Campylobacter jejuni*. *Pediatr Neurol* 25:71-74, 2001

松井真, 王会雲, 荒谷信一, 齋田孝彦: 中枢性脱髄疾患とケモカイン/ケモカイン受容体. *神経
免疫学* 9: 213-218, 2001

IV. 研究成果の刊行物・別刷

20010637

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。