

つけるようになった。両側性に腰部傍脊柱筋の一部、小臀筋、大内転筋、大腿屈筋群、前脛骨筋は脂肪に置換されていた。ただし大腿二頭筋長頭は残存傾向であった。上腕二頭筋などで、筋原性変化を認めたが、著しく萎縮した前脛骨筋では脱神経電位はみられたが、生検できる筋では検査した限り脱神経電位はみられなかった。上腕二頭筋生検でタイプ1線維にも大小不同がみられたが、RVはみられなかった。

大腿後面と下腿前面、胸鎖乳突筋が萎縮した典型的な臨床所見で、針筋電図で筋原性変化ながら、筋生検でRVを認めなかった。診断にRVが必須とは言えない。

#### 【症例5】3人兄弟例

父が同症であった可能性が高いが、筋生検所見を含めて、詳細不明である。

長男は同症で、40歳 呼吸不全死した。

次男39歳は、軽症で、前脛骨筋、長母趾伸筋、半腱様筋に脂肪置換を認め、小臀筋にもわずかに脂肪浸潤を認めた。

三男(弟)32歳は、20歳代前半から歩き方がおかしいと周囲から言われ、27歳頃からスリッパで歩きにくくなった。両側性に、下腿は前面優位に、大腿は大腿屈筋群などが脂肪に置換され、大内転筋も萎縮していた。

三男の半腱様筋では、RVが多数の典型的な組織所見を認めたが、次男の半腱様筋にはRVはみられず、両者のGNE遺伝子 exon は正常だった。

三男はDMRVの臨床症状で、筋生検でもRVが多数みられた。しかし優性遺伝形式の可能性があり、GNE遺伝子異常が見出されなかった同胞例である。DMRVは、責任遺伝子が単一疾患とは言えない可能性がある。

【症例6】51歳女性。37歳頃 スムーズに走れなくなった。42歳 筋力低下の自覚なかったが、踵立ちができなかった。49歳 爪先が引っかかって転ぶことがあった。上下肢ともに右優位に筋萎縮・筋力低下があり、右利きだが、握力も右11kg、左24kg、手関節背屈などが弱く、股関節内転・膝屈曲はMMT 4で、比較的保たれているが、右<左であった。また翼状肩甲がみられた。筋生検所見はDMRVとして矛盾なかったが、GNE遺伝子 exon に異常がみられなかった。家族歴に、姉が同症で、50歳代に歩行できなくなった。

本例のように左右差が目立つこともある。

【症例7】症例1の父親 60歳は健常だが、A578Tホモ接合体であった。

GNE遺伝子異常ホモ接合体で筋萎縮なく、無症状であることから、GNE遺伝子異常の存在のみでDMRVと診断することは出来ない。

#### D. 考察

発症年齢は10代半ば~40代半ばと、従来の記載の20-30歳代よりも広く分布している。

罹患筋の選択性は著しく、発症は前脛骨筋筋力低下であることが多いものの、罹患分布自体は必ずしも遠位優位というわけでもない。また *quadriceps-sparing myopathy* という別名もあるが、大腿四頭筋全体が保たれるわけでもない。大腿四頭筋の萎縮も外側広筋から始まったり、内側広筋から目立ったり、患者により様々である。

筋生検でも生検できる筋では筋原性変化があっても、RVが現れやすい筋とそうでない筋があると考えられ、必ずしもRVが認められないことがある。RVを診断の必須条件とすることは出来ないと考える。

殆どの症例では左右差がみられないが、症例によっては、かなりの左右差もみられる。

GNE遺伝子の異常が認められない症例に関しては、典型例も非典型例もあり、今後の検討が必要である。

DMRVは病名も診断基準も問題があるが、現時点では臨床所見と筋生検所見ないし遺伝子診断を総合して、診断している。病名としては、必ずしも遠位型ともいえない点や必ずしもRVが認めない点では *Online Mendelian Inheritance in Man* のように *Nonaka myopathy* とすれば良いが、一部の患者ではGNE遺伝子異常によらない可能性がある。

#### E. 結論

GNE遺伝子異常を伴うDMRVの診断は臨床所見のみからは難しいことがあり、筋罹患分布も一定の傾向がみられるものの、かなり多様である。一部の患者はGNE遺伝子異常ではない可能性がある。

F. 健康危険情報 とくになし。

G. 研究発表 1. 論文発表 未発表  
2. 学会発表 未発表

H. 知的財産権の出願・登録 なし。

## 武蔵病院遺伝カウンセリング外来の現況と今後の課題

分担研究者 後藤雄一 国立精神・神経センター神経研究所

### 研究要旨

国立精神・神経センター武蔵病院において、平成 13 年 4 月に遺伝カウンセリング外来が開設された。今回の正式な遺伝カウンセリング外来の開設は、平成 13 年 3 月に公表された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に対応したシステムを構築することが一義的な目的であった。平成 15 年 1 月までの 1 年 10 月で 29 例を経験し、ミレニアム研究関連のケースが 3 例で、残り 19 例は院内の小児神経科や他院から紹介されたケースであった。相談内容は、疾患の遺伝性に関するものが 10 例、出生前・保因者診断に関するものが 8 例、発症前診断に関するものが 2 例であった。今後は、遺伝子診断サービスとの有機的な連携、遺伝子解析研究における試料等提供者への援助を中心に、スタッフ確保を含めたシステムの充実を図りたい。

### A. 研究目的

精神・神経・筋疾患の実験用研究資源を収集し、保存し、活用するためには、平成 13 年 3 月に公表された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（以下指針という）に対応したシステムを構築する必要がある。そのため、平成 13 年度の分担研究において、研究資源の提供に関わるインフォームド・コンセントを確実にするために、説明資料、説明文書、同意文書を全面的に改訂したことを報告した。

さらに、指針に記載されているもう一つの重要事項として、遺伝カウンセリングがある。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究における遺伝カウンセリングは、対話を通じて、提供者及びその家族又は血縁者に正確な情報を提供し、疑問に適切に答え、その人たちの遺伝性疾患等に関する理解を深め、ヒトゲノム・遺伝子解析研究や遺伝性疾患等をめぐる不安又は悩みにこたえることによって、今後の生活に向けて自らの意思で選択し、行動できるように支援し、又は援助することを目的とする」

（指針 第 3 の 10 の（1））と明記されている。この目的に沿って、国立精神・神経センター武蔵病院では、平成 13 年 4 月に遺伝カウンセリング外来を正式に開設した。以来平成 15 年 1 月までの 1

年 10 月で経験した 29 例の内容を分析することで、現状の把握と今後の課題を提示する。

### B. 体制と方法

#### 1. カウンセリング体制

スタッフは、日本人類遺伝学会臨床遺伝専門医制度指導医が 2 名、臨床心理士 2 名であり、症例カンファレンスには、臨床遺伝研修医が若干名が加わった。外来日は週 1 回の定期外来枠に加え、相談者にあわせて適宜カウンセリングを行った。場所は、武蔵病院遺伝カウンセリング室、もしくは小児神経科外来で行った。1 回のカウンセリングの時間は厳密には記録していないが、平均 1 時間を超えていることは確実である。また、原則として、医師と臨床心理士がペアでカウンセリングを行い、その後に全員で症例カンファレンスを行って方針を決め、結果として一人の相談者に複数回のカンファレンスを行った。

### C. 結果

#### 1. 対象期間と例数

平成 13 年度（平成 13 年 4 月-平成 14 年 3 月）15 例、平成 14 年度（平成 14 年 4 月-平成 15 年 1 月）14 例の計 29 例を経験した。

## 2. ミレニアムプロジェクトとの関連

設立の契機となったミレニアムプロジェクト関連は2例で、残りの27例はミレニアムプロジェクトと関係がない。

## 3. 紹介元

武蔵病院小児神経科からの紹介が17例、神経内科・精神科から3例の紹介があった。他院からの紹介が7例、紹介がなく直接相談者が来られた例が2例あった。

## 4. 発症期別分類

小児疾患（小児神経疾患・染色体異常症など）22例、成人疾患（痴呆症・成人発症神経変性疾患など）7例であった。

## 5. 当院で遺伝子検査を行っている疾患に関わる例

武蔵病院のDNA診断・治療室や神経研究所疾病研究第一部や第二部で行っている遺伝子検査サービスとの関連での相談が12例と全体の約40%を占めた。その内訳は、ミトコンドリア脳筋症6例、デュシェンヌ型筋ジストロフィー5例、レット症候群1例であった。

## 6. 診断目的別分類

罹患されている方の診断に関する相談が15例と最も多く、それ以外に出生前診断に関する相談10例、保因者診断に関する相談3例、発症前診断に関する相談が2例であった。特に、出生前診断に関する場合は、妊娠前に相談が2例、妊娠してからの相談が8例であった。

## D. 考察

### 1. 小児疾患が多い

スタッフである医師がともに小児科出身であるという事情からか、小児科疾患に関わる相談が多かった。

### 2. 発症前／出生前診断への対応

遺伝子検査の広く行われることになると、当然発症前診断や出生前診断の相談が多くなる。しかし、実際にそれらを行うか行わないかは、病気の重症度、予防法・治療法の有無、家族構成、患者や親の人生観など種々の要因が関係する。特に妊娠してから来られる相談者が多かったという経験を踏まえ、ある病気に対して、相談者および担当するカウンセリングスタッフによって対応が大きく異なることはできるかぎり避ける必要性を感じた。そのためには、疾患毎にカウンセリングを行

う際の手順を前もって決めておく必要がある。

## 3. 遺伝子診断部門との連携

武蔵病院や神経研究所で行っている遺伝子検査に関連する遺伝カウンセリングが比較的多かった。この点は、遺伝子検査の意義やその解釈に関して相談者にしっかり説明し理解していただくことができるという点で、さらに充実させていることが必要である。また、武蔵病院まで来られない相談希望者にも配慮し、疾患情報や遺伝子診断情報をさらに発信する方法を考えるべきである。

## E. 結論

武蔵病院遺伝カウンセリング外来は、まずまずの滑り出しを遂げた。しかしながら、遺伝カウンセリングには保険点数もなく、経済的な基盤がないことから、その維持には病院、研究所の援助が必要である。遺伝子解析研究や遺伝子診療にとって不可欠な役割を担うことは明らかである以上、この制度を確立、維持できる政策の早期実施が望まれる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 後藤雄一：ミトコンドリア病（広義）の概念と分類、213-217、諏訪庸人編集「ミトコンドリアとミトコンドリア病」日本臨床社、大阪、2002
- 2) 後藤雄一：遺伝形式からみたミトコンドリア病の分類と遺伝相談、693-697、諏訪庸人編集「ミトコンドリアとミトコンドリア病」日本臨床社、大阪、2002
- 3) 後藤雄一：ミトコンドリア脳筋症、神経研究の進歩46：841-849、2002
- 4) Junko Fujitake, Haruo Mizuta, Hayato Fujita, Yasuhiko Ishikawa, Kenji Sasamoto, Yu-ichi Goto, Ikuya Nonaka, Yoshihisa Tatsuoka: Leber's hereditary optic neuropathy with intracranial arteriovenous malformation: a case report. Acta Neurol Belg 102:82-86, 2002

### 2. 学会発表

- 1) 久保田健夫、山田祐子、服部恵子、後藤雄一：  
国立精神・神経センター武蔵病院遺伝カウンセ  
リング外来の現況、第47回日本人類遺伝学会総  
会、名古屋、11.13、2002

H. 知的所有権の取得状況

なし

多数の好塩基性封入体を認めた孤発性若年性筋萎縮性側索硬化症に関する研究

分担研究者 箭原 修 国立療養所道北病院副院長

研究要旨 多数の好塩基性神経細胞内封入体を有する孤発性若年性筋萎縮性側索硬化症を報告した。この封入体の成因については不明であるが、数少ない報告からは若年性の症例に特徴的なものと思われた。神経病理学的特徴と免疫組織所見につき報告した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は中年以降に発症することが多く、家族性ALSを除けば若年発症はきわめてまれである。今回われわれは多数の好塩基性神経細胞内封入体を有する孤発性若年性筋萎縮性側索硬化症で神経病理学的特徴と免疫組織所見について検討した。

B. 研究方法

24歳の女性。1997年9月に右肘の脱力感が出現してから徐々に右上肢の脱力が増悪し、10月には右上肢がほぼ完全麻痺。1998年2月中旬、左上肢の脱力、同下旬には頸部の脱力と歩行障害も出現。3月18日、上肢に強い近位筋優位の筋萎縮と弛緩性四肢麻痺、頸筋の筋力低下、両上肢の腱反射減弱を認めた。Babinski徴候は認めなかった。検査でPaCO<sub>2</sub>軽度上昇、髄液蛋白の上昇を認めた。針筋電図では上肢で運動単位数の減少、筋線維撃縮を認めた。上肢の運動神経伝導速度検査は正常だが振幅は低下していた。感覚神経伝導速度は正常であった。脳・脊髄MRIには異常なし。4月23日死亡、全経過7ヵ月。

(倫理面の配慮)

遺族との承諾書に基づき配慮がなされて行われた。

C. 研究結果

病理所見は肉眼的には頸髄前根がやや褐色で萎縮性であったが、ほかには異常なし。顕微鏡学的には頸髄に強く脊髄前角神経細胞の脱落・変性とグリオシスを認めた。類円形・分葉形の好塩基性封入体が脊髄前角細胞、大脳運動野・顔面神経核・舌下神経核・視床・歯状核・黒質・脳幹網様体・橋核・中脳被蓋・クラーク柱などの神経細胞に認められた。大脳運動野皮質下白質に反応性アストログリアを認めた、脊髄側索の変性は明らかではないが、反応性アストログリアが散見された。Bunina小体は見られなかった。好塩基性封入体の免疫組織学的にはリン酸化ニューロフィラメントに対する抗体(SMI31)、抗ユビキチン抗体、抗シスタチンC抗体、抗TGN46、抗MG160抗体ではほとんどが染色されなかった。電顕による微細構造検討では granules を伴った thick filaments 構造からなっていた。

D. 考察

本例は比較的急速に進行した若年性ALSで、臨床的には下位運動ニューロンの障害のみが示唆された。病理学的には下位運動ニューロンの変性・脱落に加え上位運動ニューロンの変性・脱落を軽度認めた。最も特異な病理所見は好塩基性細胞質内封入体が残存運動ニューロンのみならず広範に多系統に認められたことである。一般的には孤発性ALSにはこのような封入対は認められない。今まで、孤発性若年性筋萎縮性側索硬化症で5例に報告されており、運動細胞だけでなく、視床、黒質、中脳の被蓋に認められる。またこの封入体はlewy body like inclusionやALSの痴呆患者に見られるユビキチン陽性のinclusionとは異なっていた。すくなくともこの封入体の形成には関与してないものと思われる。最近ゴルジ装置を染める抗体で、ALSの運動細胞にゴルジ装置のfragmentationが報告されているが、今回用いた抗体では染色性がなく、この可能性は低かった。

E. 結論

孤発性若年性筋萎縮性側索硬化症で多数の好塩基性神経細胞内封入体を有する症例を報告した。免疫組織所見からはニューロフィラメントやユビキチン、またゴルジ装置のfragmentationからなる封入体の主たる構成成分とは考えにくい。封入体の病因としての意義についてはさらに検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

進行性核上性麻痺における123I-MIBG心筋シンチグラフィについて. 神経内科 56: 243-244 2002

2. 学会発表

パーキンソン病におけるうつ症状-SNRIの有用性について- 第43回日本神経学会総会 札幌 2002

当院における脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断—過去8年間のまとめ—

分担研究者 石川幸辰 国立療養所八雲病院 副院長

**研究要旨** 小児期発症脊髄性筋萎縮症(SMA)の責任遺伝子 survival motor neuron (SMN) geneが報告されて以来、SMAの分子病態の解明が進んでいる。当院では、1995年8月より、SMAのSMN遺伝子欠失診断を開始し、現在まで42症例（type 1: 12例、type 2: 23例、type 3: 7例）が確定診断された。最近の動向として、type 1 SMA疑診にて乳児期呼吸障害発症以前の遺伝子診断確定例が増加しており、人工呼吸管理の適応など倫理的問題がクローズアップされてきた。

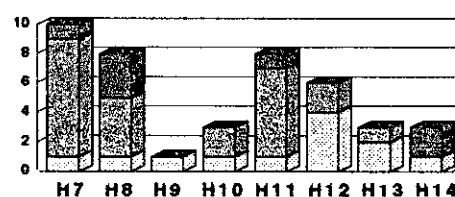
**【はじめに】** 1995年に小児期発症脊髄性筋萎縮症(SMA)の責任遺伝子 survival motor neuron (SMN) geneが報告されて以来、SMAの分子病態の解明が進んでいる。SMA type 1では、98%以上でSMN1 (telomeric SMN) exon 7/8がホモ接合性に欠失しており、これに加え近傍のH4F5、NAIP、BTF2p44遺伝子など広範囲な遺伝子欠失を伴うことが多い。一方、SMA type 2、3では、一部は、SMN1から2へのgene conversionや、点変異と欠失アリルとのヘテロ接合も認められている。当院では、1995年8月より、SMAのSMN遺伝子欠失診断を開始した。過去8年間の遺伝子診断のまとめと動向について報告する。

**【対象と方法】** 1995年8月より、当院外来・入院あるいは、他施設より診断依頼のあったSMAおよび疑診の紹介患者を遺伝子診断の対象とした。遺伝子診断は十分なインフォームドコンセントのもとに実施した。臨床診断は、International Consortium on SMA (1991)に基づいて行った。SMN遺伝子exon 7、8欠失はmismatch-PCR、NAIP exon 5はtelomeric 特異的PCR、BTF2p44はSSCPで行なった。一部の症例は、保因者診断として、CA repeat C212、C272によりハプロタイプ解析、A群色素性乾皮症の責任遺伝子XPAC exon 4を内部標準として蛍光ラベルによる遺伝子量解析によりSMN2、SMN1のSMN遺伝子コピー数を調べた。

**【結果】** 過去8年間に42症例が遺伝子診断にて確定診断された。内訳は、type 1: 12例、type 2: 23例、type 3: 7例であった。年次推移として、若干の変動はある

が、各年度1～10例であった(図1)。

図1. 確定診断された脊髄性筋萎縮症の年次推移



□ type 1 ■ type 2 ▣ type 3

最重症型のtype 1は、各年度で1例以上診断されており、計12症例であった。全例 SMN exon 7を欠失していたが、2例はexon 8をretainしていた。NAIPを含むlarge deletionを伴った症例は4例あり、発症時期は全例1ヵ月と臨床的に重症であった。人工呼吸管理は、11例で施行され、1例は宗教的理由で中断し死亡していた。平成11年より、呼吸障害発症より以前に遺伝子診断される症例が増加し、計4症例存在した。人工呼吸管理は、10例が気管切開、1例が非侵襲的人工換気(NIPPV)を施行されていた。在宅療養は3症例のみであった。

**【考察】** SMAは、Ducenne型筋ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィーについて本邦では頻度の高い小児期発症の神経・筋疾患である。その遺伝子診断は、無用の筋生検を避ける意味でも重要である。特に、type 1症例では、乳児期呼吸障害発症前での診断は長期人工換気の適応について倫理的問題を提起している。一方、type 1でのSMN exon 7欠失/exon 8 retainの症例は、本症の臨床的重症度を考える上で意味深く、今後、5p13領域での詳細なSMN遺伝子の構造解析が必要と思われる。

Research Resource Bank(BrainBank)の整備とネットワーク  
を利用した神経・筋疾患臨床研究

分担研究者 木村 格（国立療養所山形病院神経内科）

研究協力者 亀谷 剛、関 晴朗、津田丈秀（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、東北労災病院病理）

研究主旨：国立精神神経センター武蔵病院を拠点とし、全国横断的に各地域国立医療機関に神経、脳及び筋組織を保存管理し、必要に応じて再配分ができる研究資源バンク・ネットワークが構築された。当院では東北管内の拠点病院の1つとして、神経難病疾患の病理診断と遺伝子解析、剖検と生検研究材料の登録・管理・追跡システムの基盤整備を行った。研究材料の確保と登録症例数の増加は計るために、近傍県の関連大学研究室、国立療養所神経内科との間で地域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求めてきた。年間の剖検数と生検材料数も暫時増加の傾向にある。今後、本研究事業を継続することによって、基盤整備とその成果が期待できる。

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神経・筋疾患を対象にした分子生物学的基礎・応用研究の推進を計り、本研究事業の成果を検証する。

B. 主な研究成果

(1) 拠点病院における機能付与と施設整備  
東北大学医学部神経内科、同大病理学教室、(財)広南病院病理部門、国立療養所西多賀病院、山形大学医学部第三内科、同大病理学教室と病理解剖および病理診断について契約を締結し、本研究班で定められた運営ガイドラインにもとづいて研究材料の採集と登録・管理を可能な環境を整えた。その中で全国都道府県平均に比して当該地域において有病率

が有意に高い遺伝性脊髄小脳変性疾患を中心に、変性神経難病を研究対象にして、遺伝子診断と病態解明のためにDNA、RNA解析など遺伝子研究のできる基盤整備を行った。

(2) 東北管内国立療養所神経内科とのサブ・ネットワークの構築

平成12年11月以降、東北管内で神経内科と病理機能を有する9国立療養所と国立病院神経内科担当医と施設長に参加を呼び掛け、神経政策医

療ネットワーク・東北サブ会議を年3回-4回定期的に開催。その検討課題として当院と国立療養所宮城病院に開設している本研究班脳バンクを連携して利用すること、国立医療機関外の関連施設に対して登録と共同利用を推進している。これまで、遺伝性脊髄小脳変性症の疫学的調査とその遺伝子診断、磁気刺激治療による機能予後の影響について山形大学医学部第3内科、国立療養所米沢病院、西多賀病院との間で実施、また神経内分泌腫瘍を対象とする分子生物学的研究を東北大学医学部病理、東北労災病院病理との間で実施してきた。

### C. 主な発表論文及び学会発表

- ①Kimura N, Kimura I et al(2000)Immunohistochemical expression of chromogranins A and B, and prohormone convertase 2 and 3, and amidating enzyme in carcinoid tumors and pancreatic endocrine tumors. *Modern Pathology* 13:140-148
- ②Kimura N, Kimura I et al(2000) Synaptotagmin I expression in mast cells of normal and neoplastic human tissues, and human mast cell line, HMC-1. 3rd international Academy of Pathology 15-20 Oct 2000, Nagoya
- ③Kimura N, Kimura I et al(2001)Synaptotagmin I Expression in Mast cells of Normal Tissues, Systemic Mast cell Diseases, and Human mast cell leukemia. *J Histochem Cytochem* 49:341-345
- ④ Kimura N, Kimura I et al(2002) A proposal for a new classification of pheochromocytomas based on morphological and biological analysis. XXIVth International Congress of the International Academy of Pathology, Amsterdam, Netherlands, October 5-10
- ⑤ Kimura N, Kimura I et al(2002): Neurofibromin and NF1 gene analysis in composite pheochromocytoma and ganglioneuroma and tumors associated with von Recklinghausen's disease. *Modern Pathol*15 : 183-188
- ⑥ Kimura N, Kimura I et al(2002): Loss of neurofibromin-NF1 gene product and composite pheochromocytoma. *Ann NY Acad Sci.*971:536-538

### D. 倫理面への配慮

剖検および生検資料については本研究班指定書式に基づいて「遺族および本人またはそれに代わる親権者から研究使用についてのイ

ンフォームド・コンセント」を得て登録、研究に供した。特に遺伝子診断はその結果によって生ずる被験者および家系に対する影響を十分考慮し、被験者および家族に対して十分なインフォームド・コンセントの下に実施した。本研究での全ての個人情報については、個人が同定できないように測定値など結果は全て一般化してその保護に務めた。



平成14年度 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 川村 潤 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が、微小変異は検出が困難なことから未検出で残された検体も多く存在する。末梢血あるいは筋バンクに保存された凍結筋より直接塩基配列決定法で検索したジストロフィン遺伝子異常のなかで、スプライシング異常からジストロフィン遺伝子 EXON 2 の部分重複が検出された例を報告した。Exon 2 の部分重複は重複全体の約10%に認められ、重複の中では頻度が高いと考えられた。

#### 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。われわれは現在まで保存試料を含むDMD患者検体から微小変異の検出を検討してきた。今年度は筋バンクを利用したジストロフィン遺伝子の微小変異の検出の過程でスプライシング異常が検出され、これからジストロフィン遺伝子の exon 2 の部分重複が検出できた DMD 症例を検討した。

#### 研究方法

対象は Multiplex PCR 法でジストロフィン遺伝子のホットスポットに欠失が検出できなかった DMD 患者で、血液から 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。また血液から DNA も抽出しサザンブロットを行った。サザンブロット法のプローブは従来の cDNA とともに、genomic DNA から PCR で増幅した産物も検討した。またプローブのラベルは非放射性化学発光標識を用いた。遺伝子診断は十分なインフォームドコンセントのもとに実施し、試料の研究使用についても同意を得た。また当院の倫理委員会でも承認されたものである。

#### 研究結果

対象とした DMD 患者のうち 5 例でスプライシング異常を認めた。これらの症例の DNA をサザンブロットで解析した結果、exon 2 の単独重複が検出された。当院で現在までに検出したジストロフィン遺伝子の重複例は 48 家系で、exon 2 はホットスポットと並んで重複の頻

度の高い部位であることが判明した。またスプライシング異常は同一症例でも複数のメッセンジャーが出現しており、またスプライシング異常が生じる部位も exon 2 の周辺には限られていなかった。

#### 考察

従来微小変異の検索には効率的な方法がなく、multiplex PCR 法やサザンブロット法でジストロフィン遺伝子に異常が検出できない場合はそれ以上微小変異の検索が行われず検体が保存されていることが多い。われわれは本研究班でジストロフィン遺伝子の微小変異検出の研究を行ってきたが、部分重複の症例でも mRNA でスプライシング異常をきたす場合があることを明らかにしてきた。今回、われわれはスプライシング異常を認めた DMD 症例のうち、5 例で exon 2 の単独重複を認めた。これら重複が検出された家系では確定診断はもとより保因者診断も実施可能であることから、筋バンクの存在により、患者が死亡した場合も保存された検体の遺伝子診断を通して患者家族に有用な情報を還元できると考えられた。また exon 2 のメッセンジャーに認められたスプライシング異常はフレームを修正しようとする過程とも考えられ、興味ある所見であった。今後は重複例の筋肉でのメッセンジャーの検討が必要であると考えられた。

#### 結論

ジストロフィン cDNA の直接塩基配列決定法により凍結保存されている筋生検検体、あるいは末梢血からジストロフィン遺伝子の変異を検出することが可能であり、欠失以外の変異による DMD 家系の遺伝相談や保因者診断に有用な情報をもたらすと考えられた。

脊髄小脳失調症 17 型における遺伝子異常の検討  
分担研究者 齊田 孝彦 国立療養所宇多野病院長

研究要旨：脊髄小脳失調症 17 型 (SCA17) の原因遺伝子である TATA-binding protein (TBP) 遺伝子の CAG/CAA リピート数の正常・異常範囲を決定するため、脊髄小脳変性症患者 685 例および正常対照 162 例、パーキンソン病 (PD) 患者 216 例において、本遺伝子内のトリプレットリピート数のスクリーニングを行った。その結果、42 リピート以下は正常、48 リピート以上は病的と考えられた。一方、43～47 リピートについては、正常および PD 群との間に重なりを認めること、および同一家系内で同じリピート数を有しても、発症・非発症の差異が生じることより、この範囲では浸透率が 100% ではない可能性が考えられた。また、SCA17 の遺伝子異常においても、遺伝子量効果 (gene dosage effect) が存在する可能性が示唆された。

A. 研究目的

常染色体優性遺伝を示す小脳失調症の中には、遺伝子の転写を調節する TATA-binding protein (TBP) の遺伝子内に存在する CAG/CAA トリプレットリピートの異常伸長を認める家系があり、脊髄小脳失調症 17 型 (SCA17) と呼ばれている。TBP 遺伝子内の CAG/CAA リピート数の基準としては、既報告例では 42 リピート以下が正常で、46 リピート以上で発症とされてきた。しかし、最近 43 リピートでの発症が報告されており、本遺伝子の CAG/CAA リピート数の正常・異常域については、未だ一定の見解が得られていない。

今回我々は、SCA17 の発症に結びつく TBP 遺伝子の最小の CAG/CAA リピート数を決定することを目的として、本遺伝子内のトリプレットリピート数のスクリーニングを行った。

B. 研究方法

既知の遺伝子異常について DNA 解析を

行い、SCA1, SCA2, Machado-Joseph 病, SCA6, SCA7, 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) が除外された脊髄小脳変性症 (SCD) 患者 685 例を対象とした。また、正常対照 (NC) 162 例および疾患対照としてパーキンソン病 (PD) 患者 216 例についても、同様の検査を実施した。

TBP 遺伝子の CAG/CAA リピートを含む領域について、5'-(6FAM)CCTTATGGCACT-GGACTGAC-3', 5'-GTTCCCTGTGTGCCTGCTG-3' を primer として、PCR 法により増幅を行い、その産物を ABI 3100 Genetic Analyzer, GeneScan ver. 3.7 software を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

被検者からインフォームドコンセントを得たうえで研究に使用した。

C. 研究結果

正常範囲の上限と考えられる 42 リピートを超える例を、SCD 群の 8 例で認め

た (56 リピート : 1 例, 48 : 1 例, 47 : 2 例, 45 : 2 例, 44 : 1 例, 43 : 1 例)。このうち 5 例では家族歴を認め、小脳失調以外の症状として、痴呆、精神症状、不随意運動、錐体路徴候などを認めた。一方、NC 群でも 42 リピートを超える例が 3 例存在し (45 リピート : 1 例, 44 : 1 例, 43 : 1 例), PD 群においても 2 例が 43 リピートを有していた。

SCD 群の患者 III (34 歳, 男性) は, 47/44 リピートのホモ接合体であった。発症年齢は 25 歳で, 緩徐進行性の小脳失調に加えて, 痴呆, ミオクローヌス, 錐体路徴候を認めた。父親 : 63 歳, 母親 : 58 歳はいずれも無症状であったが, CAG/CAA リピート数は 44/36, 47/36 であり, 42 リピートを超えるアレルをヘテロで有していた。また, 患者 V (45/37 リピート) の妹も無症状であったが, 患者同様 45 リピートのアレルをヘテロで有していた。一方, 患者 VIII (43/33 リピート) の弟は小脳失調を認めたが, CAG/CAA リピート数は 36/33 と正常リピート数を示した。

#### D. 考察

SCD 群の患者 I : 56 リピート, II : 48 リピートについては, 家族歴を認め, TBP 遺伝子の CAG/CAA リピート数についても, 正常および疾患対照群との間に重なりを認めないことより, 真に病的意義を有するものと考えられた。一方, 患者 III ~ VIII : 43 ~ 47 リピートについては, 正常および疾患対照群との間に重なりを認めること, および同一家系内で同じリピート数を有しても, 発症・非発症の差異が

生じることより, この範囲では浸透率が 100% ではない可能性が考えられた。

SCD 群の患者 III は中間体のホモ接合体と考えられた。患者 III は今回 SCA17 と考えられた症例の中で最も若年発症であり, TBP 遺伝子異常においても, 遺伝子量効果 (gene dosage effect) が存在する可能性が示唆された。

#### E. 結論

SCA17 の遺伝子異常については, TBP 遺伝子内の CAG/CAA リピート数が 48 リピート以上の場合には真に病的意義を有するが, 43 ~ 47 リピートについては浸透率が 100% ではない可能性が考えられた。また, SCA17 の遺伝子異常においても, 遺伝子量効果が存在する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nishimura M, Kawakami H, Komure O, Maruyama H, Morino H, Izumi Y, Nakamura S, Kaji R, Kuno S. Contribution of the interleukin-1 $\beta$  gene polymorphism in multiple system atrophy. *Mov Disord* 17: 808-811, 2002.

##### 2. 学会発表

金一暁, 小牟禮修, 吉田園代, 瀧川智子, 大江田知子, 松井真, 小澤恭子, 小西哲郎, 齊田孝彦 : 動作性ミオクローヌス, パーキンソン症状を伴った脊髄小脳失調症 6 型の 1 例。第 77 回日本神経学会近畿地方会, 高槻市, 2002 年 11 月 30 日。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

・該当事項なし

## Dysferlin 欠損の 2 症例

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は生検筋や剖検資料を凍結保存することにより、解析手段の進歩によって明らかにすることが出来る。dysferlin 染色欠如の 2 症例をし報告し、その意義を考察した。

### 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、生検や剖検の保存資料の解析により病態を解明し、遺伝相談をより正確に行うことが可能となる。

### B. 研究方法

生検および剖検資料の RRN への登録行う。未診断 2 例の臨床経過の解析と生検筋および剖検筋の dysferlin の免疫染色を行った。遺伝子解析は本人、家族および遺族の十分なインフォームドコンセントのもとに実施した。

### C. 研究結果

#### 1) 登録の現状

平成 15 年 1 月現在で剖検（脳、脊髄、筋その他）43 例、生検筋 45 例を登録した。

#### 2) 症例検討

症例 1：1974 年生、女性。24 歳時、高 CK 症で当院へ紹介。その後大腿の筋萎縮、動揺性歩行など出現。筋生検：dys-trophin 染色正常。サザンで 1-2a 領域（Hind III/SphI）に異常バンドあり、direct sequencing で intron8 の 109,097~99 の 3 塩基（TCA）の欠失が見つかったが病因不詳。その後下腿の CT の低吸収化が出現、保存生検筋の dysferlin 染色で陰性。LGMD2B と診断した。

症例 2：1946 年生。20 歳階段登り困難、29 歳手摺必要。家族歴なし。39 歳時来院。高口蓋あり、当初は diffuse atrophy、その後、遠位優位の CT 低吸収化進行。血清 CK は軽度上昇。時に血中ビルビン酸および乳酸の軽度上昇がみられたが、生検筋の RRF はなく、筋線維型不均衡もなかった。55 歳で呼吸不全で亡。腸腰筋の dysferlin 染色陰性。dystro-phin 染色部分的陽性。両症例の遺伝子解析は施行中。症例 1 は典型例であるが、症例 2 の dysferlin 染色欠如は二次性の可能性有り他の膜構成成分に関し検討の必要性がある。

### D. 考察

これまで神経筋疾患の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。病態や病因の解明には生検時や剖検時に施行出来る検索手法がなくても、その後の学問の進歩と相俟って診断や病因が明確化することがある。今回の症例でも臨床経過特に CT 所見が診断手法の方向付けに役立ち、抗体の入手が可能になって診断が方向づけられた。

### E. 結論

凍結保存資料は診断および遺伝子解析に不可欠である。

特異な臨床像を呈するミオパチー同胞例  
分担研究者 澁谷統壽 国立療養所川棚病院長

研究要旨：同胞 8 名中 4 名に特異な臨床像を呈するミオパチーの兄弟例を報告する。鑑別診断として Danon 病やサルコグリカノパチーが考えられたが確定診断には至っていない。症状や臓器障害の出現が多様な疾患の診断には遺伝子学的検索が重要であるが、現時点ではスクリーニングとしての解析は難しい。本例のような分類不能な疾患群を能率的に蓄積して将来の解析に備える必要がある。

研究協力者

福留隆泰 国立療養所川棚病院神経内科  
後藤公文 国立療養所川棚病院神経内科  
松尾秀徳 国立療養所川棚病臨床研究部  
西野一三 国立精神・神経センター  
埜中征哉 国立精神・神経センター

A. 研究目的

同胞 8 名中 4 名に類似の症状を認めるミオパチーの兄弟例を報告する。精神遅滞と肥満、下肢・近位筋優位の筋力低下および腓腹筋の仮性肥大があり心電図異常を認めた。

B. 研究方法・結果

症例は 38 歳（兄）と 36 歳（妹）の兄弟例。同胞は 8 名で、第 4 子（35 歳）と第 5 子（33 歳）にも類似の症状を認めている。また、第 7 子と第 8 子には筋症状はないが、精神症状があり他施設に入所している。長崎県の離島に在住で、明らかな血族婚はない。

現病歴：兄は 10 歳頃から歩行障害があり 38 歳になって車椅子を用いるようになった。軽度の知的障害があり、中学卒業後就労していない。妹は中学時代から走るのが遅かったが、22 歳頃から歩行障害が出現し 27 歳から車椅子使用となる。軽度の知的障害があるが、中学卒業後 22 歳まで紡績工場勤務していた。兄弟共に心不全や呼吸不全兆候なし。

現症：兄は身長 165cm、体重 72kg。肝腫大なし。神経学的には軽度の精神遅滞があり、脳神経系及び感覚系は正常。運動系では近位筋・下肢筋優位の脱力があり、腓腹筋の仮性肥大を認めた。妹もほぼ同様の所見を呈する。

検査所見：兄は CPK543IU/L、aldolase7.6IU/L、BNP<4.0。心電図にて abnormal Q wave と CCWR、心エコーでは拡張型心筋症の所見を認め左室収縮能が軽度低下していた。妹は CPK306IU/L と上昇していたが、その他の筋原性酵素は正常。心電図および心エコーで異常所見を

認めなかった。

下肢 MRI：兄弟ともに両側大腿・下腿の筋群に著明な脂肪変性を認め大腿筋群は萎縮していた。

筋生検：兄弟共に筋線維大小不同と type 2c 線維を認めるが、兄で著明であった。壊死・再生線維は兄では認めず妹で 1 本のみ認めた。兄弟共に空胞変性や炎症細胞浸潤なし。

（倫理面への配慮）

筋生検の実施にあたって、本研究班が提唱する承諾書を用いた。

C. 考案

本症例の鑑別診断として、精神遅滞を伴うミオパチーおよび心筋症の所見から伴性優性遺伝の Danon 病および、腓腹筋の仮性肥大を伴う肢帯型筋ジストロフィーとして常染色体性劣性遺伝のサルコグリカノパチーが考えられた。Danon 病の従来報告と比較して本例では心不全症状を認めず筋症状が強かった。また、筋生検所見で空胞変性を認めないなど非典型的である。一方サルコグリカノパチーでは精神遅滞を来した報告例はなく、膜関連蛋白の免疫組織学的検索でも  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  および  $\delta$  サルコグリカンの欠損を証明できていない。 $\epsilon$ -サルコグリカノパチーでは知的障害を生じる可能性が示されているが、ミオパチーは呈さないとされている。

D. 結論

Danon 病やサルコグリカノパチーは症状や臓器障害の発現が多様であり、診断には遺伝子学的検索が重要となる。しかし、現時点では遺伝子解析をスクリーニングとして用いるのは経費や労力のみならず倫理的にも問題がある。類似の症例を蓄積した上での再検討が妥当と考えられるが、分類不能な疾患の登録や検索に現在の生検情報データベースを利用できることが望まれる。

## 次期RRNバンクシステムのシステムソフトウェアに関する研究

分担研究者 本吉慶史 国立療養所下志津病院神経内科医長

### 研究要旨

現行 RRN システムの問題点を検討して、次期バンクシステムのプロトタイプを作成した。リレーショナル型データベース管理システムである PostgreSQL とプログラム言語 PHP4 により、WWW サーバ Apache 上で動作する Web アプリケーションを開発したが、患者や検体情報の適切なアクセス権管理が可能で、ユーザインターフェースも見通しのよいものとなり、今後の社会情勢やニーズの変化にも柔軟に対応できるものと考えられた。

### A. 研究目的

本研究班（以下RRN）のバンクには、2002年1月時点で生検1400件、剖検1000件以上が登録されている。これほど大規模なバンクは本邦では類をみず、研究資源として貴重であるばかりでなく、患者情報や診療情報の集積の方法、或はセキュリティ対策について本研究班で培われたノウハウは、同種のリソースバンク構築の基盤としても重要である。一方、研究班の発足以来、社会情勢は大きく変化し、個人情報保護など考慮すべき点も明らかとなり、グループウェアを用いた現行システムでは対応が困難となつてきている。

本研究の目的は、この様なニーズの変化に対応できる柔軟なバンクシステムの構築にある。

### B. 研究方法

システムに求められる機能を明確にするソフトウェア要求定義には、環境の変化に対して対応が容易なデータ中心アプローチ（DOA）を用い、患者の診療情報、生検や剖検の検体情報を実体関連図（E-R図）により分析し、リレーショナル型データベース（RDBMS）のスキーマを設計した。

Linux サーバで RDBMS エンジン PostgreSQL によりデータベースを構築し、WWW サーバ Apache 上で稼動する Web アプリケーションを作成した。

尚、本研究で構築するシステムは患者個人情報を取扱うが、インフォームドコンセントに基づいて患者が承諾した患者・検体情報のみを公開することとし、これを操作できる者を管理者と登録施設の医師に限る様にして、倫理面に配慮した。

### C. 研究結果

データベース設計については、登録施設と医師、性別・生年月日などの患者情報、診断、生検・剖検など検査の種別、各検体の情報について E-R 図を作成し正規化を行つて、医師、施設、患者、診断、疾病、検査、検体のテーブルを作成した。

Web アプリケーションは、集積するデータの種類や処理方法、ニーズの変化に柔軟に対応するため、クラスによる継承とセッション管理の可能なプログラム言語 PHP4 を採用した。登録者、患者、検査、診断、検査、検体に関するデータを各々独立して扱うために、それぞれのクラスを作成して、データや処理方法の変更の際には各クラスを継承してメンバやメソッドの変更が容易に行える様にした。またクラスの実体（インスタンス）をセッション変数としてセッション管理を行うことにより、登録者がログインすると所属施設の登録一覧が表示され、患者を選択すると当該患者の診断や検査内容が表示されて編集や新規登録が可能となるという様に、登録者、患者、検査などのデータ入力画面を分離することができ、見通しのよい入力インターフェースとなつた。また患者情報のアクセスを登録施設に限り、公開許可フラグのない患者情報は非公開とするなどアクセス権管理も可能となつた。

サーバとクライアント間の通信は WWW サーバ Apache の SSL (secure socket layer) を用いて暗号化し、入力データについてもクロスサイトスクリプティングなどのクラック防止対策を行い、安全性を考慮した。

#### D. 考察

RRN の様に組織的にデータを集積する方法としては従来アプリケーション独自のデータ様式が用いられてきたが、近年のインターネットの普及に伴って、特定のベンダやアプリケーションに依存しない「標準」の利用手段により信頼できる場所にデータを集約する DBMS が主流となってきた。DBMS ではデータの集中制御と複数ユーザによる安全なデータ利用が可能であり、その応用アプリケーション開発を支援する環境も整いつつある。

今回作成した Web アプリケーションでも、RDBMS と PHP4 を用いることにより、適切なアクセス権管理と見通しのよい入力インターフェースを実現でき、充分実用になるものと考えられた。また Windows のアプリケーション開発と比べて開発効率、保守性ともに向上しており、患者情報匿名化など今後の社会情勢やニーズの変化にも柔軟に対応できるものと考えられる。

遺伝性神経疾患の遺伝子検査について、ミトコンドリア病の  
遺伝子網羅的解析方法の検討

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

**要旨：**神経難病専門病では臨床・病的にミトコンドリア病と診断されても既存の遺伝子異常を見出せない場合がある。網羅的な DNA 解析に際しては、ミトコンドリア遺伝子配列には Sequence polymorphism が多く問題があるが、最近 MITOMAP, A human mitochondrial genome database (Emory University) で情報が容易に閲覧できるようになった。次に、ミトコンドリア遺伝子に類似の核内の pseudogene が存在し問題である。ヒトゲノム解析がほぼ終了し、Web を使いゲノム遺伝子の相同配列が短時間で出来るようになった (BLAST the Human genome ,NCBI)。これらを踏まえて、臨床 DNA 検査として Akanuma の方法 (J Hum Genet,2000) を取り入れてミトコンドリア遺伝子の網羅的な遺伝子検査方法を試験的にこなしてみたので報告する。

共同研究者：渡部弘美（臨床検査科）、福原信義（副院長）

**A. 研究目的**

ミトコンドリア遺伝子異常による神経内科疾患としては KSS/CPEO, MELAS, MERRF, LHON, NARP/Leigh 症候群などが臨床単位として知られているが、常染色体異常による遺伝子検査よりさらに評価が難しい点が重要である。

臨床的にミトコンドリア遺伝子異常を疑っても、既存の遺伝子異常を確定できない場合がある。ミトコンドリア遺伝子解析結果を臨床に利用する際の問題として、第 1 にミトコンドリア遺伝子配列に Sequence polymorphism が多いことである。Web 上で、MITOMAP, A human mitochondrial genome database (Emory University, Atlanta) <http://infinity.gen.emory.edu/mitomap.html> で情報が容易に確認できる。次に、ミトコンドリア遺伝子とほぼ同じ核酸配列を示す核内の pseudogene の存在が問題である。ヒ

トゲノム解析がほぼ終了し、遠隔から Web を使いゲノム遺伝子の相同配列が短時間で出来るようになり、BLAST the Human genome (NCBI)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/Heteroplasmy>により確認可能である。

今回はまず、MELAS ミトコンドリア塩基番号 3243A→G の変異の Heteroplasmy の定量を行い、genome 内のミトコンドリア DNA 類似配列による定量間違いがあるか検討した。次に、未知のミトコンドリア遺伝子異常の検索方法を検討し、症例の診断に応用した。

**B. 研究方法**

1. Blast search で MELAS の解析の際に、genome pseudogene の増幅になる可能性があるか検討した。Akanuma ら (J Hum Genet,2000) の Long PCR 法で 16,569bp のミトコンドリア DNA を二つの fragment に分けて増幅 (6.5kb fragment + 11.2kb fragment) し、LA Taq (Takara) を使い



MELAS 患者末梢血白血球 DNA の shuttle PCR を行った。この 6.5kb fragment から nested PCR したものと直接 PCR したものについて、ヘテロプラスミーの割合を定量し、相関を測定した。

## 2. 未知のミトコンドリア病の遺伝子変異決定

全ミトコンドリア DNA を網羅する 33primer sets (Maca-Meyer et al. BMC Genetics, 2:13,2001) を用いて、ミトコンドリア DNA の全塩基配列決定のルーチン検査の方法を検討した。末梢血白血球からの DNA 抽出し、Long PCR によるミトコンドリア DNA の 6.5kb fragment, 11.2kb fragment の増幅をおこなった。それぞれを template にして 33primer sets により PCR し、66 個サイクルシーケンス (順、逆) をおこない、ABI3100 で配列決定した。一晩で配列決定し、その後、contig をつなぎ、Mitomap を利用し評価した。疾患に関係するミトコンドリア遺伝子異常は Heteroplasmy を呈すると考えた。

## 3. 症例検討

女性 (死亡時 48 才)

主訴：四肢筋力低下、筋萎縮

既往歴：36, 40 才 帝王切開、家族歴：母 痴呆、

現病歴：1990 年 (36 才時) に糖尿病、難聴、腎障害を指摘された。1994 年より通院せず。

2000 年秋より易疲労感を認め、2001 年 1 月頃からは上肢の筋力低下と筋萎縮が出現。6 月頃からは起立不能となった。6 月 29 日に高血糖性昏睡となり近医に入院。精査目的で 8 月 21 日に転院。経過中に脳卒中様発作の既往はなかった。

神経学的所見：知能低下、性格変化、脳神経系では舌萎縮(±) 運動系では下肢優位で四肢に遠位部優位の筋力低下、筋萎縮(+), 小脳症状は認めなかった。感覚系：両下肢振動覚低下、表在覚正常姿勢・歩行：起立不安定、歩行不能。

検査結果：乳酸 25.2 mg/dl (3.7~16.3)ピル

ビン酸 2.68 mg/dl (0.3~0.9)と高値だったが、筋生検では RRF(-)だった。

経過：全身状態が悪化し、死亡し、剖検された。家族から病理学的検索、DNA 検索の文書同意を得た。Greter pectral muscle に RRF(+) だった。脳の chorodal epithelial cell の電顕像で異常ミトコンドリアの集簇をみとめた。筋ミトコンドリア遺伝子配列決定：前述の方法でミトコンドリア全遺伝子配列を決定し、ミトコンドリア DNA 基準配列 j01415 と比較した。38 個の不一致点があったが、MITOMAP 上で 36 個は既存の正常 polymorphism であることがわかった。3206CtoT(16S ribosomal RNA), 5261GtoA(RNA12)の polymorphism が残ったがシーケンス上はヘテロプラスミーを認めなかった。

## (倫理面への配慮)

生検組織の検索は臨床文書での同意を得た。また、剖検組織および臨床 DNA 検索については家族より文書での同意を得た。既存の臨床遺伝子検査に関する各種ガイドライン (案) などを遵守した。患者の疾病に関する病理解剖に伴う検索として、ヒトゲノム解析研究に対応しないと考えられ匿名化は行われなかった。

## C. 結果および考察

ミトコンドリア遺伝子塩基番号 3243 前後には対応する genome pseudogene が存在するが、Goto et al. (Nature 1990) の方法で MELAS3243 の A to G の変異を検出する PCR-RFLP 法は genome pseudogene の影響を受けない。未知のミトコンドリア遺伝子異常症に対して genome pseudogene の配列を誤検出しないために、long PCR 法を使った Akanuma らの方法を利用した。効率よい全ミトコンドリア遺伝子配列決定方法が可能と思われる。症例のように、臨床病理的にミトコンドリア病を疑った場合は網羅的な DNA 検査が可能である。しかし、異常がはっきりし

ない場合は今後ミトコンドリア構成蛋白の核内遺伝子異常を検討すべきである。

#### D. 結論

ミトコンドリア全遺伝子配列決定が臨床的に応用できることを示した。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 論文発表

1. Fukutake T, Kamitukasa I, Arai K, Hattori T, Nakajima T, A patient homozygous for the SCA6 gene with retinitis pigmentosa. Clin Genet 61(5)375-379,2002
2. 亀井啓史、中島孝、福原信義、錐体外路系疾患における脳血流 SPECT の統計学的解析による検討、脳と神経 54(8)667-672,2002
3. 中島孝、脊髄小脳変性症のクリニカルパスにむけて、医療 56(7)420-422,2002
4. Koide T, Nakajima T, Makifuchi T, Nobuyoshi F, Systemic mastocytosis and recurrent anaphylactic shock, The Lancet Vol.359,9323,p 2084,2002
5. Koide T, Ohtake H, Nakajima T, Furukawa H, Sakai K, Kamei H, Makifuchi T, Nobuyoshi F, A patient with dementia with Lewy bodies and codon 232 mutation of PRNP, Neurology 59:1619-1621,2002
6. 袖山千恵子、村松林子、平野美鈴、二ノ宮正、山岸恵美子、山岸とし江、黒崎みや子、北沢真喜子、小出隆司、中島孝、福原信義、プリオン遺伝子コドン 232 変異を持つ痴呆患者の看護と在宅指導についての経験、医療 56(11)664-667,2002
7. Hayakawa Y, Nakajima T, Takagi M, Fukuhara N, Abe H, Human cerebellar activation in relation to saccadic eye movements: an fMRI study,

Ophthalmologica 216:399-405,2002  
Nemoto H, Toda H, Nakajima T, Hosokawa S, Okada Y, Ymamaoto K, Horicuchi R, Endo K, Masahiko M, Goto, F, Fluvoxamine modulates pain sensation and affective processing of pain in human brain, NeuroReport (in press)

#### G. 知的財産権の出願など

なし。

## 皮膚生検によるジストロフィノパチーの診断

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**：Duchenne 型筋ジストロフィーや mdx マウスでは骨格筋のみならず平滑筋でもジストロフィンの欠損が報告されている。皮膚の平滑筋組織である立毛筋のジストロフィン染色は、筋生検同様にジストロフィノパチー診断に有用か否かを免疫組織化学的に比較検討した。

### A. 研究目的

ジストロフィンは骨格筋、心筋や平滑筋の細胞膜下に存在し、ジストロフィンの異常により Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD)・Becker 型筋ジストロフィー (BMD) が引き起こされる。これらの疾患は、臨床症状・遺伝子検査・筋生検などにより診断される。DMD や mdx マウスの平滑筋でもジストロフィンの欠損が報告されている。立毛筋は皮膚の平滑筋組織であり、皮膚生検が筋生検と同様に DMD/BMD の診断に有用かどうかを検討するため、進行性筋ジストロフィー患者の立毛筋におけるジストロフィン発現を免疫組織化学的に比較検討した。

### B. 研究方法

DMD 6 例, BMD 1 例, 症候性保因者 1 例, 肢体型筋ジストロフィー (L-G) 5 例, 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー 1 例, 脊髄性筋萎縮症 3 例ならびに正常コントロール 2 例の上腕または前腕から皮膚を採取した。皮膚組織は生検直後にイソペンタンを用いて急速凍結し液体窒素内に保存。その後、クリオスタットでカットし連続切片を作製した。作製した各疾患の標本を、H.E.染色と平滑筋のマーカであるアクチン、ジストロフィン (C 末, N 末, Rod) に対する抗体を用い ABC 法にて免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

生検は十分なインフォームド Consent のもと実施した。正常コントロールは皮膚筋炎を疑われ皮膚及び筋肉の生検を十分なインフ

ォームド Consent のもと行い、結果的に炎症所見を認めなかった生検皮膚を本人の同意のもとに用いた。

### C. 研究結果

平滑筋のマーカであるアクチンは、全ての疾患の皮膚組織で立毛筋・汗腺の筋上皮細胞・血管壁に発現していた。

立毛筋のジストロフィン染色は、DMD で C 末が軽度発現し、N 末・Rod は染色されなかった。BMD は C 末・N 末の発現が低下し、Rod の発現が著しく低下していた。症候性保因者では、C 末・N 末・Rod とともにジストロフィン陽性細胞と陰性細胞が混在するモザイクパターンを示した。その他の疾患は、正常コントロールを含め C 末・N 末・Rod 全て陽性であった。

### D. 考察

立毛筋のジストロフィン発現様式はジストロフィノパチーとこれ以外の疾患では明らかに異なり、筋生検同様に皮膚生検でもジストロフィノパチーの診断は可能である。

### E. 結論

皮膚生検は、筋生検と同様にジストロフィノパチーの診断に有用と考えられた。

### F. 研究発表

論文発表

1) Niiyama T., Higuchi I., et al.: Diagnosis of dystrophinopathy by skin biopsy. Muscle Nerve 25: 398-401. 2002

## 運動ニューロン病における横隔膜病変に関する組織学的研究

分担研究者 今野秀彦 国立療養所西多賀病院臨床検査科長

**研究要旨：**運動ニューロン病における横隔膜病変の成り立ちについて、脊髄病変および臨床経過との関連で検討した。第4頸髄前角にある横隔膜神経の起始細胞は、経過とともに減少し横隔膜病変の程度と相関するが、全経過が5年以上になると高度な神経細胞脱落の程度に対し横隔膜の筋病変は軽微であった。その一要因として脊髄側索路の変性が考えられた。

### A. 研究目的

運動ニューロン病(MND)の呼吸機能障害は予後を決定する大きな要因であるが、その主役である横隔膜病変の程度は症例により様々である。病変の程度に影響を与える因子を明らかにする目的から、臨床的にMNDと診断された15症例で横隔膜病変の程度と罹病期間および脊髄病変との関連について検討を行った。

### B. 研究方法

対象症例は、男性8例、女性7例の15例で、年齢別では50才台が2例、60才台が8例、70才台が4例、80才台が1例である。全経過は9ヶ月から11年で、5年未満が11例、5年以上が4例である。横隔膜では筋肉部のH.E.およびelastica Masson染色標本で観察を行った。脊髄では、phrenic nerveの起始細胞が分布する第4頸髄から、厚さ5 $\mu$ のパラフィン切片を25 $\mu$ 毎に5枚作成しK.B.染色を施行して前角内の運動ニューロンの数をカウントした。phrenic nerveの起始細胞は前角の前方中央部に一群をなして位置することから、この領域に位置し粗大なNissl顆粒を有する大型の神経細胞の数をカウントし、左右あわせた数で比較検討した。尚、2症例については第5頸髄を対象とした。正常対照例として、44才、47才、74才の非神経疾患3症例の第4頸髄を用いた。尚、倫理面については、遺族から研究使用についてのインフォームドコンセントをえて実施した。

### C. 研究成果

正常対照例の運動神経細胞数は、それぞれ21、28、35であった。これに対し、MND例では著明な減少がみられた。罹病期間が9ヶ月例では10、1年5ヶ月例では6、2年3ヶ月例では4、3年例では2、3年6ヶ月例では3であった。人工呼吸器の援助もなく5年、6年、9年と生存し得た3症例では、いずれも3個の神経細胞数が残存していた。11年間生存し得た例では、その約8年間、人工呼吸器が使用されており残存細胞はなかった。横隔膜病変であるが、罹病期間が9ヶ月と短い例では、ほぼ正常径の筋細胞間にangular fiberが散見されるのみで、target/targetoid fiberやopaque線維が目立つものの横隔膜の構造はよく維持されていた。罹病期間が1年5ヶ月の例では、angular fiberが目立ち、small group atrophyも見られるが、円形で小型の線維が主体をなし、横隔膜の厚さは比較的保持されていた。1年10ヶ月で細胞数4の例では、横隔膜の厚さはほぼ維持されていたものの、筋線維の大小不同が顕著で、小径で円形の線維が目立った。3年6ヶ月例では、横隔膜の厚さは明らかに減少し、group atrophyは広範囲に及んでいたが、萎縮線維はいずれも小径で円形の形態を示すものであり、他の骨格筋に出現するpiknotic nuclear crampは確認されなかった。罹病期間が3年3ヶ月の一例では、約2年間の補助呼吸を受け細胞数も1個と減少していた例である。横隔膜は明らかに薄く小径、円形線維が大部分