

氏名(本籍) 萩野谷 和裕

学位の種類 医学博士

学位記番号 医第 2226 号

学位授与年月日 平成 2 年 2 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最終学歴 昭和 56 年 3 月  
弘前大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Heterogeneity of mitochondria within the muscles of patients with mitochondrial myopathy : an electron-microscopic analysis of cytochrome oxidase.

(ミトコンドリアミオパチーにおけるミトコンドリアの組織内異質性に関する電顕酵素組織化学的研究)

(主査)

論文審査委員 教授 多田啓也 教授 岩崎祐三

教授 近藤尚武

# 論 文 内 容 要 旨

## (目 的)

ミトコンドリア (mit.) ミオパチーはその臨床的多様性ととも組織化学的、生化学的および免疫生化学的異質性が認められる。これは、その最も主な原因となっている mit. 電子伝達系酵素が核および mit. の DNA により合成される subunit の複合体であり、その分子遺伝学的異常の多様性を反映するものであると考えられている。著者は、本症患者からの生検筋において、mit. 電子伝達系酵素の 1 つである、チトクローム c 酸化酵素 (CCO) を電顕的に検討し、各細胞内の個々の mit. レベルでその酵素活性の障害の状況を検討し、本症の病態発生機序について考察した。

## (対 象 及 び 方 法)

対象：乳児致死型 1 名、MERRF (ragged red fiber を伴うミオクロヌステんかん) 1 名、MELAS (高乳酸血症、卒中様発作を伴う mit. 脳筋症) 2 名の計 4 名の mit. 脳筋症患者および本症が否定された対照の生検筋について検討した。組織化学：凍結切片にて、H & E, modified Gomori-trichrome および一連の組織化学染色を行った。免疫組織化学：mit. 電子伝達系酵素 Complex-III および CCO のポリクローナル抗体にて凍結切片を Avidin-Biotin Complex 法にて染色した。電顕組織化学：生検筋は小片を 20 分間、2% glutaraldehyde にて固定後、Seligman の方法に準じて 4°C over night にて染色した。未固定凍結切片についても行い、同様に固定後、37°C 3 hrs にて同様の染色をし、電顕用に包埋した。生化学：生検筋は 0.2 M sucrose, 0.13 M NaCl, 1 mM Tris-HCl (pH 7.4) 中でホモジナイズし、1 例は 600 g 遠心後上清にて、他は mit. 分画を得て mit. 電子伝達系酵素の Complex-I, I-II, I-III, CCO の各酵素活性を測定した。

## (結 果)

組織化学：ragged-red fiber は症例 1 を除き 3 例に認められた。CCO 染色では、症例 1 では全体に反応は弱く、高倍でみると活性陽性の線維と陰性の線維がモザイク状に混在していた。症例 2 では同様にモザイク状に活性陰性線維が分布しているが長軸方向の切片では、1 本の線維内で陽性から陰性に segmental に変化しているのが認められた。症例 3, 4 は陰性線維が散在する partial deficiency を示した。これらはいずれも segmental に 1 本の線維内で陽性から陰性に变化した。免疫組織化学：症例 3, 4 では CCO 陰性線維に一致して Complex-I, CCO とも

に染色性が低下していた。症例 1, 2 では、CCO 活性陰性線維に一致して CCO の抗原性の低下を示した。しかし、症例 1 では組織全体の染色性の低下が顕著だった。電顕組織化学：対照では、検討した筋線維及び間質細胞の全ての mit. が染色されており、mit. 間における染色性の異質性は認められなかった。症例 1 では、筋線維全体の mit. が陽性のものと陰性のものがあり、長軸方向の切片でも segmental な変化は認められず、細胞間モザイクをなしていた。症例 2, 3, 4 では長軸切片にて、mit. が陽性から陰性に segmental に変化しているのが認められた。その境界では反応の弱い mit. が散在していた。陰性部に隣接する毛細血管細胞の mit. には活性は認められ、またこれら陰性と陽性の mit. には形態的相違は認められなかった。症例 3, 4 では、少数の筋線維内において陰性の筋線維内に活性陽性の mit. が散在している像が認められた。間質の活性は全例に認められた。生化学：生検筋の mit. 電子伝達系酵素活性はいずれも複数の酵素活性が低下していた。

#### (結論および考察)

最近ミトコンドリアミオパチーにおいて、mit. DNA の異常が相次いで報告されており、欠失をもった mit. DNA と正常な mit. DNA が患者組織で共存していることが解ってきている。これら 2 つの mit. DNA が細胞間、細胞内あるいは mit. 内においてどの様に共存しているのかは不明である。今回検討した 4 例で共通していることは 1) 生化学および組織化学の所見を合わせ考えると mit. 電子伝達系の複数の酵素の障害が認められること、2) 間質の酵素活性は認められ、筋組織にのみ CCO の異常所見が存在するという組織特異的障害、3) 電顕組織化学的に筋線維間および筋線維内に CCO 染色性の異質性が認められる点である。これらの所見から筋内において正常と異常の mit. が存在していることは明かと言える。異種細胞間 hybrid の実験報告では初め同量存在していた両種の mit. DNA が継代するうちに様々な割合で各細胞内にふりわけられ、次第に細胞内において一方の mit. DNA が優位となりもう一方の mit. DNA が脱落する mitotic segregation が認められる。このプロセスはかなり緩徐で mit. の細胞内異質性は世代を越えて伝達されることが解ってきている。筋細胞は発生早期に筋芽細胞が融合し、その後の細胞分裂は殆ど認められないことから、mitotic segregation により、mutant mit. DNA が脱落する機会も少ないと考えられる。以上より、検討した 4 症例における筋線維間あるいは筋線維内の mit. の CCO 活性の異質性は筋細胞の融合前に各筋芽細胞内で進行していた正常および異常な mit. DNA の mitotic segregation の様々なプロセスを反映しているものと考えられる。

## 審査結果の要旨

ミトコンドリアミオパチーは近年注目されている代謝性疾患であるが一部の症例を除き未だその一次的異常の解明は進んでいない。著者は本症患者生検筋における光顕的組織化学および生化学的検索結果を基にして、個々のミトコンドリアにおけるチトクロームC酸化酵素を電顕的に検索することにより、以下の結果を得た。

1. 乳児致死型ではチトクロームC酸化酵素陽性および陰性のミトコンドリアは筋細胞間のモザイクをなしている。

2. 高乳酸血症、卒中様発作をともなうミトコンドリア脳筋症 (MELAS) およびragged red fiberをともなうミオクローヌステんかん (MERRF) では一本の筋線維内において分節状にチトクロームC酸化酵素陰性のミトコンドリアが存在し、これらは活性陽性のミトコンドリアと形態的差異はなく、この陰性の分節中には活性陽性のミトコンドリアが散在する所見が認められ、陰性および陽性のミトコンドリアが筋細胞内においてモザイクをなすことを明らかにした。

3. 検討した全例において、間質の細胞には陰性のミトコンドリアを認めず、組織特異的な障害が存在することを明らかにした。

以上の所見は筋組織内において正常と異常のミトコンドリアが存在することを電顕的に証明している。異なるミトコンドリアをもつ細胞同士の融合実験の報告から考察すると、異常と正常のミトコンドリアDNAはランダムに分裂後の細胞に振り分けられる事から、著者の所見は筋芽細胞における異常と正常の様々なミトコンドリアDNAの割合が融合後の筋細胞に反映していることを示唆するものである。

以上の研究成果は、ミトコンドリアミオパチーの病態解明における、形態学的側面からの有用な検索手段を確立したものであり、医学博士の授与に値するものと判定された。