

1) 筋ジストロフィーチキン筋の組織培養に 関する研究

I. 初期形態について

若山吉弘*

研究協力者 杉村公也* 松岡幸彦*
高柳哲也* 祖父江逸郎*

dystrophy chicken の筋の組織培養は、この chicken の開発後間もなくからいくつか試みられてきた¹⁾⁻³⁾ しか、現在まで病因への直接的な手掛りは勿論、重要な病理所見も、対象との決定的な有意差も得られているとは言えない。本研究班でも江橋ら⁴⁾ は、組織培養上では正常例、罹患例の間で明瞭な差異を認めなかったと報告している。我々もこれまで dystrophy 筋の培養に関していくつかの検討を加えてきた⁵⁾ が、今回 dystrophy chicken の embryo 筋の培養を行ない病理学的に興味深い所見を得たので報告する。

材料と方法

材料は本研究班所有の New Hampshire 種 chicken の California 大学 413 line (dystrophy) と 412 line (normal) の 9~11 日目の embryo を用いた。

方法として、embryo から胸筋部を取り出し、器管培養と単層分離培養を行なった。

器管培養では、取り出した胸筋を培養液中で細切し、collagen を塗布した round glass 上にのせ、Maximow double cover slip 法で 35°C、2~4 日間培養した。培養液は 2 日目

毎に交換した。培養液は Hanks' B. S. S. 25%、Eagle's M. E. M. 25%、fetal calf serum 25%、chick embryo extract 25% とした。

単層分離培養では、胸筋部を Ca^{++} 、 Mg^{++} を除いた P. B. S. 中で細切し、0.25% trypsin を 37°C、30 分間作用させ、stainless mesh で filtrate し、その後 2000^{rpm} 10 分間遠沈、trypsin を除去する。さらにこれを Hanks' B. S. S. で洗浄し、再び遠沈する。この洗浄操作を 2 回繰返した後、培養液中に浮遊させ、pipetting し十分に細胞を分離、細胞数を 1×10^6 /ml に調整する。これを 60^{mm} の glass シャーレに入れ、その中の plastic sheet 上に培養した。培養は CO₂ incubator で 35°C、2~3 日間行なった。培養液は、Eagle's M. E. M. 80%、fetal calf serum 10%、chick embryo extract 10% とした。

培養後は 10% formaline 液で固定し、sheet のまま Hematoxylin-Eosin 染色または、Hematoxyline 単染色を行なった。

結 果

細胞癒合過程は単層分離培養により観察した。それによれば 2 日目において dystro-

*名古屋大学医学部第一内科

ph 筋, control 筋とも活発な細胞癒合を行ない myotube を形成する. しかし dystrophy 筋では各 myoblast の細胞癒合の時間的ばらつきが大きく, maturation の進んだ myotube に隣接してまだ全く細胞癒合を示さない myoblast が存在していた (図1). それに反し control 筋では myotube 形成期の時間的ばらつきがなく, 2日目全体としては, dystrophy 筋に比し, myotube の maturation がむしろやや遅れて進行する様に思われた (図2). しかし, 3日目では, myotube の maturation に, dystrophy 筋, control 筋の時間的な差異を見ることが出来なかった. しかし, dystrophy 筋では myoblast が myotube の長軸にそって癒合しないものが多数みられ, そのため三角形などを形成する myotube がみられた (図3). control 筋では,

myoblast は myotube の長軸にそって癒合し, dystrophy 筋にみられる様な像は検索した限りでは見当らなかった (図4).

器管培養においては, 3日目から dystrophy 筋の筋細胞内に微小空胞を認めた. 4日目になると空胞は増大するが空胞化は一部の筋細胞に限局する変化であり, 大部分は intact であった (図5). 空胞化した筋細胞の出現頻度は dystrophy 筋で高率であったが control 筋にも認められた. また4日目において核の集簇した筋線維を認めた. それは, 線維形成を認める良好な maturation を示した筋線維の一部があたかも "multinucleation" の状態の phase で maturation が停止した様な核の集積像である (図6). しかしこれらの所見もまれではあるが control 筋にも認められた.

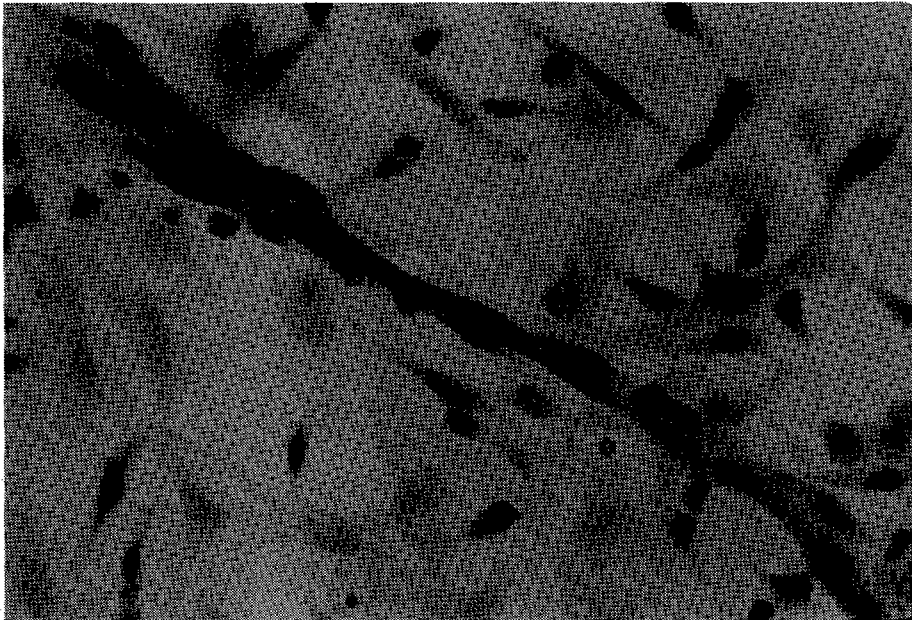


図1 dystrophy 筋の単層培養2日目. maturation の進んだ myotube と, まだ細胞癒合を示さない myoblast が混在する.

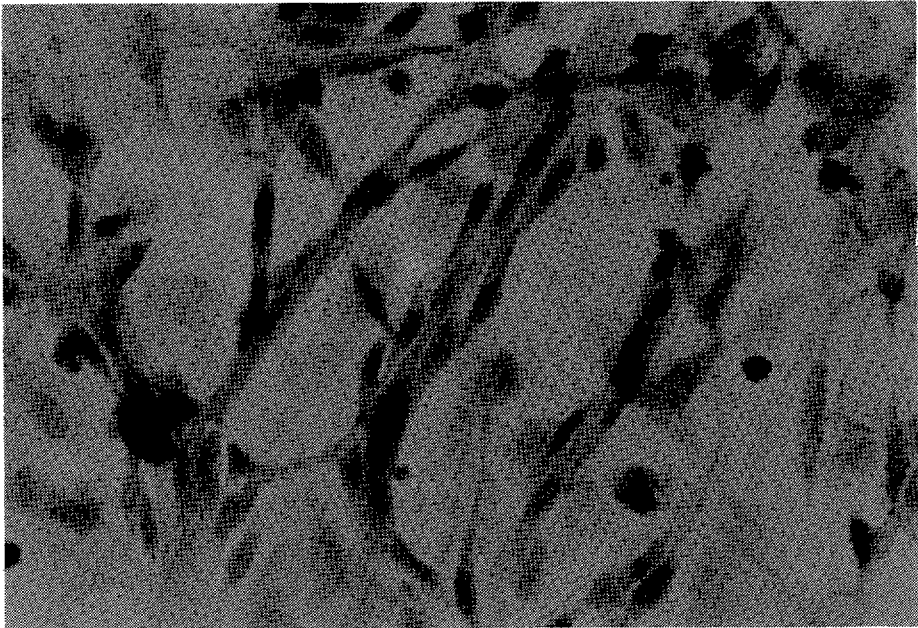


図2 control 筋の単層培養2日目. myotube 形成期が一致し, 一様の maturation を示す. dystrophy 筋にみられる maturation の進行した myotube は見られない.

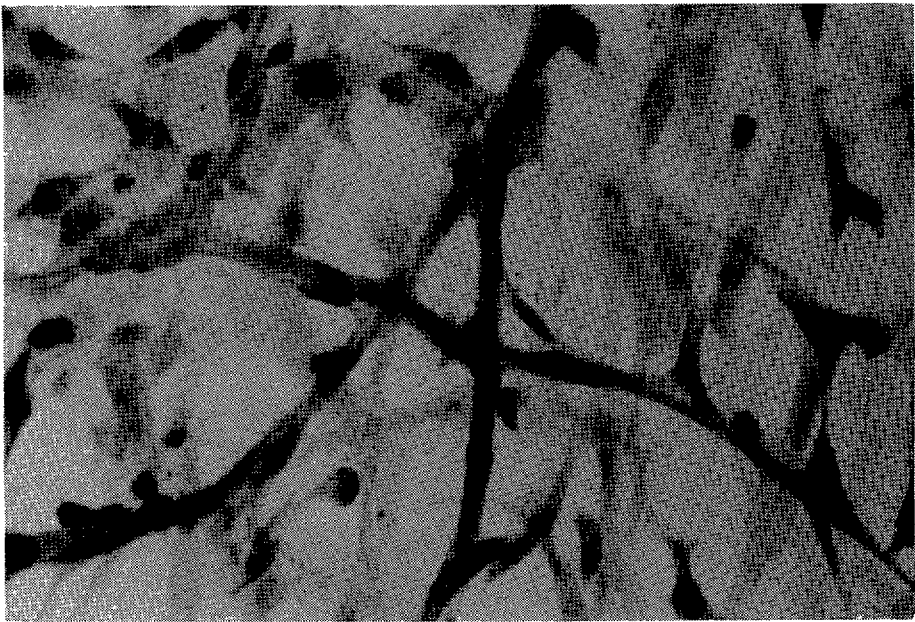


図3 dystrophy 筋の単層培養3日目. 細胞癒合が不規則で, myotube が互いに多辺形を形成している.



図4 control 筋の単層培養3日目. 各 myotube は一定の方向性をもって形成されている.

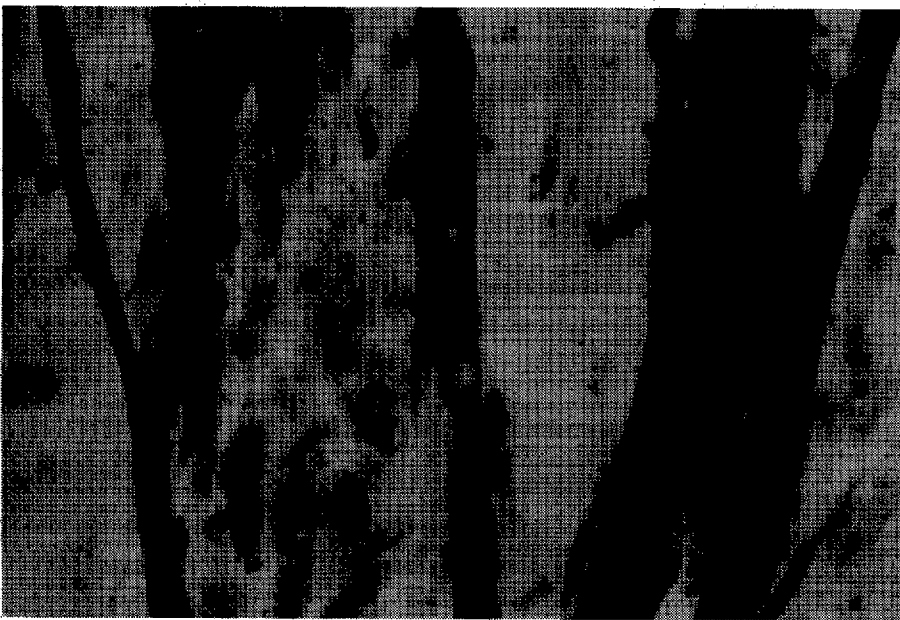


図5 dystrophy 筋の器管培養4日目. 筋細胞内にみられた空胞.

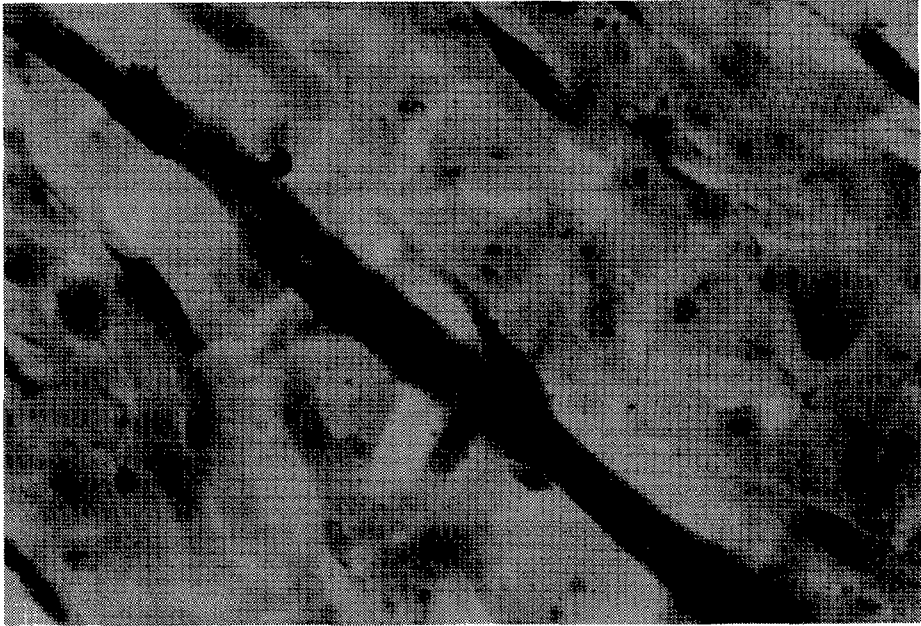


図6 dystrophy 筋の器管培養4日目、筋線維の一部にみられた核の集簇化。

考 察

今回我々は二つの異った方法により培養を行なった。器管培養は組織片をそのまま培養するので個々の細胞は *in vivo* に近い状態を維持できる。しかし培養初期では組織片が厚く、組織片からの *sprouting* も充分でなく、細胞癒合過程を検討することはかなり困難と思われる。それに反し単層分離培養では細胞分離のため *trypsin* 処理などの人工的操作を行なうので *artifact* が出現しやすい。しかし細胞が単層に分布するため初期から観察が容易で、細胞癒合過程の検討のためには優れた方法と思われる。したがって、筋の発生分化過程の観察には単層分離培養を用い、*myotube* 形成後の形態学的検討は主として器管培養を用いることが合理的であると考えられる。

myotube 形成期に *dystrophy* 筋は *control* 筋に比しその開始時期の時間的ずれがやや大きく、癒合も不規則な様に思われた。しかし、これらの異常は *dystrophy* 筋の一部に認め

られるもので、その変化も *minor* なものであり、*control* 筋との有意差を確定するには、何らかの定量化が必要と思われた。

器管培養においてみられる小空胞や多核化筋線維は *in vivo* に認められる変化と類似した所見であり、培養上の *dystrophy* 筋における重要な所見と思われる。しかしこの変化は *control* 筋においても時に認められ、これらを *dystrophy* 筋の特異的初期変化と断定することは困難であろう。しかし *dystrophy chicken* での発症の有無がこれらの *abnormal* な筋の混入率の多少によっても考えられるので、これらの所見の定量化の問題を含め、今後長期培養へと進める中で検討を続けたい。

ま と め

dystrophy chicken の *embryo* 筋の培養を行ない、その2～4日目の初期形態について、*control* 筋と対比検討した。

単層分離培養上での myotube の形成に関して開始時期や細胞癒合状態の不規則性がみられ、器管培養における myotube 形成後の変化として小空胞や多核化筋線維の出現が認められた。しかし、これらの変化は全体としては minor なものであり、さらに必ずしも dystrophy 筋に特異的とはいえず control 筋との有意差を確定するには何らかの定量化が必要であると考えられた。

文 献

- 1) HERRMANN, H., KONIGSBERG, U. R., and ROBINSON, G. : Observation on culture in vitro of normal and dystrophic muscle tissue. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 105 : 217-221, 1960
- 2) ASKANAS, V., SHAFIQ, S. A., and

MILHORAT, A. T. : Normal and dystrophic chicken muscle at successive stages in tissue culture. Arch. Neurol. 24 : 259-265, 1971

- 3) PEACOCK, J.H., and NELSON, P. G. : Synaptogenesis in cell cultures of neurones and myotubes from chickens with muscular dystrophy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 36 : 389-398, 1973
- 4) 江橋節郎, 野々村禎昭, 大槻馨男, 他 : ジストロフィーチキンについての予備的観察. 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51年度研究報告書, 1977, p. 9-14
- 5) 祖父江逸郎, 若山吉弘 : 進行性筋ジストロフィー症生検筋の Maxmow double cover slip 法による培養所見. 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50年度研究報告書, 1976, p. 133-137

↓
検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります
↓

Dystrophy chicken の筋の組織培養は、この chicken の開発後間もなくからいくつか試みられてきた 1) ~ 3) しかし、現在まで病因への直接的な手掛りは勿論、重要な病理所見も、対象との決定的な有意差も得られているとは言えない。本研究班でも江橋ら 4) は、組織培養上では正常例、罹患例の間で明瞭な差異を認めなかったと報告している。我々もこれまで dystrophy 筋の培養に関していくつかの検討を加えてきた 5) が、今回 dystrophy chicken の embryo 筋の培養を行ない病理学的に興味深い所見を得たので報告する。