

## 1) 培養筋の実験的変性と再生

石川 春 律\*

最近、局所麻酔剤の一つである Bupivacaine (Marcaine®) が選択的に骨格筋を変性させることが報告された (Sokoll et al., 1968; Liebelius et al., 1970; Benoit & Belt, 1970). Marcaine により障害された筋は迅やかにかつ完全に再生することから、この薬剤は筋再生の研究の有力な手段になっている (Jirmanová & Thesleff, 1972; Ichikawa & Ichikawa, 1975). 他方、この薬剤の筋毒性作用を分析することは筋細胞の特異性をよりよく把握するのに役立つと思われる。いかえれば、筋毒効果が筋分化とどのような関係にあるか興味ある課題である。これにより、筋疾患の成因の解明のための糸口がつかめることが期待される。われわれはこの観点に立って、培養筋について Marcaine の筋毒効果を調べ、さらに再生過程を追跡した。

### 材料と方法

材料として、孵卵10日のニワトリ・エンブリオ胸筋を単層および組織片培養したものをを用いた。単層培養には、胸筋を細切し、0.2% トリプシン・BSS 液で37°C、30分処理し、細胞を解離させた。細胞数0.5~1×10<sup>6</sup>個を1mlの培養液に懸濁させ、35mm径のプラスチックシャーレを用い、collagen 処理したカバーグラス上に培養した。培養は Eagle MEM, 馬血清, ニワトリ胚抽出液の8:1:1からなる培養液で、5%炭酸ガス、95%空気、飽和水蒸気、37°Cの条件で炭酸ガス培養器内で行った。培養0日から7日までの各時期につい

て、異なる濃度の Marcaine 処理を37°Cの炭酸ガス培養器内で行った。この処理は Marcaine を含む培養液で置換して行い、その経過を位相差顕微鏡で観察した。染色標本は、メタノール固定後、Jacobson 法で染色した。回復ないし再生については、一定時間処理後、薬剤を含まない培養液で置換、その後時間を追って観察した。電子顕微鏡観察のためには、厚い collagen 床の上に培養したものを用い薬剤処理を行い、時間を追って、型のごとく固定・包埋を行った。

### 結 果

#### (1) 筋毒効果について

単層培養1日から7日までの各時期について、培養液に溶かした0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.001% Marcaine で処理、その効果を調べた。0.1%の濃度で、確実にそして選択的に筋変性が認められた。処理時間10~15分に変性が明らかになるが、まず、多核の筋管細胞 (myotube) の表面に散発性に細胞質膨隆が見られた。小型筋管細胞では数珠状を呈するものもあった。処理30分で、筋管細胞の変性は進み、底面より剝離し始めた。60分で、ほとんどの筋管細胞は著明な変性に陥り、底面より剝離した。核は piknotic になり、筋原線維の横紋は乱れ、細胞質に多数の空胞が認められた。このような筋毒効果は培養日数や筋管細胞の発達程度とは有意の差を認めなかった。また、Marcaine によって多核の筋管細胞のみ障害され、単核細胞には著変は認められなかった。したがって、筋管細胞が剝離した跡が、単核細胞を欠く糸として明瞭

\* 東京大学医学部解剖学

に認められた。0.1%、60分で、すべての筋管細胞が変性壊死に陥ることは、その後の回復実験からも明らかである。

0.5% Marcaine では、より短時間で強い変性像が認められた。また、この濃度では、単核細胞もその外形が幾分円形化する傾向を示した。0.05%では、60分処理でも、不完全な筋変性が起るのみで、0.01%以下ではほとんど筋障害は認められなかった。

## (2) 回復および再生について

単層培養の各時期について、0.1% Marcaine 60分処理を行い、その後の回復および再生過程を追跡した。培養0日、すなわち播種直前に60分処理してから、正常培養液で培養した場合、無処理対照群とほぼ同程度の筋発生を示した。これに対して、培養1日で処理した場合、形成されていた筋管細胞は変性剝離し、その後の新しい筋管細胞の形成は少なく、6日後になっても散石性に小型筋管細胞を認めるに過ぎなかった。単核細胞の増殖は何ら影響を受けていないように見えた。培養2日以後の処理では、新しい筋管細胞の形成はほとんど起らず、形成されても、稀に2・3核の最小筋管細胞が見出されるのみであった。単核細胞は筋管細胞の形成がないため、かえって対照群より増加しているように見えた。

培養0日処理の場合、その後正常に近い筋発生を見ることは、単核の筋発生細胞(推定筋芽細胞, presumptive myoblast)が線維芽細胞同様に Marcaine による障害を受けず、生き残ったことを示す。培養1日では、筋細胞の多くはすでに分化を開始しており、したがって Marcaine による変性を蒙り、生き残る筋発生細胞が少ないため新しい筋管細胞形成が起り難いものと考えられる。この解釈は培養が進んでから処理するほど、その後の筋発生が障害される事実をよく説明できる。いずれにしても、Marcaine は多核筋管細胞を非可逆的に変性・壊死させ、その後の筋発生は生き残ったいわゆる未分化な単核筋発生細胞からのみ起ることが結論される。ただし、こ

の培養条件下では、分化を開始した単核の筋芽細胞(myoblast)は直ちに細胞融合により多核化するため、筋芽細胞が Marcaine によりどのような影響を受けるか決定できなかった。培養条件を変えて、今後調べる必要がある。また、培養1日では、なお多くの未分化細胞が存在すると考えられるが、処理後の筋発生が予期以上に障害されるのは筋細胞数の減少のみならず、線維芽細胞の相対的增加による接触抑制(contact inhibition)も関与するためであろう。

組織片培養(explant)についても、単層培養と同様の結果が得られた。しかし、培養0日処理では、2日後も組織は底面に定着しなかった。これについては、さらに追試の必要がある。

## (3) 薬剤の細胞増殖能に及ぼす影響

Marcaine による単核細胞への影響を調べる一つの指標として、増殖能をとり上げ、DNA合成を調べるために、 $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みの光顕ラジオオートグラフィーを行った。培養3日の材料を3群に分け、(1) Marcaine-1%-60分処理中の $^3\text{H}$ -thymidine (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ )の取り込み、(2) Marcaine-30分処理後、正常培養液中での60分間取り込み、(3)無処理対照例での60分間取り込みを比較した。処理中の単核細胞へのアイソトープの取り込みは対照例に比して著しく減少していたが、停止はしていなかった。処理後60分間の回復は迅やかで、核上の銀粒子数では対照例と大差はなかった。

## 考 察

Bupivacaine (Marcaine) はラット下肢への皮下注射により、直下の筋の筋線維を選択的かつ非可逆的に障害し、支持組織、血管、神経線維にみるべき障害を残さない(Benoit & Belt, 1970; Jirmanová & Thesleff, 1972)。われわれの培養筋についての研究は生体での成績を支持するものである。すなわち、培養筋において、一定濃度以上の Marcaine の存在で多核筋細胞はすべて変性・壊

死するが、いわゆる未分化筋細胞を含む単核細胞は生き残る。さらに、われわれの研究から、Marcaine のこのような毒作用は分化した筋細胞の発達程度とは無関係であり、分化開始直後の筋管細胞に対しても働くことが明らかである。したがって、連続皮下注射による実験から、分化中の筋細胞—幼若筋線維—はこの薬剤に障害されないという Benoit & Belt (1970) の解釈は支持できない。

培養材料は薬物の影響を調べるのに幾つかの利点がある。中でも、培養材料では変化過程を逐次直接観察できること、薬剤の作用濃度をかなり正確に決定できること、作用が均一に働くことなどは生体ではあまり期待できないことである。

Marcaine の筋毒効果の作用機序は明らかでない。Procaine など他の局所麻酔剤にも筋毒性があることが古くからいわれているが、詳細な研究はなく、筋再生と関連づけられていない (Brun, 1959; Murray, 1960)。Marcaine の Analogues 間の比較で、筋毒効果は親水性三次の Amino nitrogen についた末端基の長さや相関があり、この長さが減ると筋毒効果が弱まるか消失するという (Libelius et al., 1970)。Libelius et al. (1970) は、また、他の局所麻酔剤、例えば Tetracaine や Dibucaine では麻酔効果は Marcaine より強いにもかかわらず、高濃度でも筋毒効果はないと報告している。このことは筋毒効果が局所麻酔作用とは別の作用機序によることを示唆している。筋毒効果の確立のためには、さらに、骨格筋以外の筋、すなわち心筋や平滑筋、また神経細胞自身についての影響も調べられなければならない。

われわれの研究で、未分化な筋発生細胞は Marcaine による障害を受けないが、分化開始直後の筋細胞は感受性をもつことは作用機序の上で興味深いことである。この筋毒効果が高度に選択的であることと考え合せると、薬剤は筋細胞の特異的な蛋白 (分化産物) に作用して障害をもたらす可能性が強い。Marcaine 処理により、培養筋細胞が通常の変

性より迅やかに床面より剝離することは、細胞表面膜の粘着能の障害か、筋原線維の異常収縮が考えられる。しかしながら、筋原線維の横紋構造は光顕的にも電顕的にも変化が遅いこと、筋原線維形成のほとんどない初期筋管細胞も障害されることから、筋原線維に直接作用した結果ではないようである。したがって、細胞膜への作用が最も考えやすい。また、糸粒体には早くから膨大、空胞化が認められるが、第一義的かどうか明らかでない。これに関して、糸粒体の発達した赤筋線維が白筋線維より障害されやすいという報告は興味深い (Benoit & Belt, 1970)。核の piknotic な変化についても、直接作用かどうか明らかでない。細胞膜や小胞体膜については、膜の研究に有力な手段であるフリーズ・レプリカ法を主とする電顕的研究を今後進めていきたい。

培養筋において、いわゆる未分化な筋発生細胞がこの薬剤によって障害されないことは、生体筋における再生実験で、衛星細胞 (satellite cell) が生き残り、再生時の筋芽細胞になるとする観察を支持するものである (Jirmanová & Thesleff, 1972; Ichikawa & Ichikawa, 1975)。他の実験的筋再生と比較して、この Marcaine 実験で迅やかな筋再生が起るのは、衛星細胞が全く障害されないことに加えて、筋線維基底膜 (sarcolemmal tube)、神経要素、結合組織、血管要素が器質的にも場所的にも障害を受けないことによると考えられる。

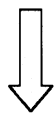
単核細胞に及ぼす影響もさらに追求する必要がある。われわれの  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込みによる DNA 合成の検索では、Marcaine 処理中取り込みが低下していることは一過性の機能障害があることを示す。また、洗い出しにより、直ちに取り込みが回復することは、この薬剤の麻酔効果が長時間作用性であることと関連して興味深い。今後、他のいろいろな代謝機能への影響についても調べる必要がある。

## 結 語

培養筋について、局所麻酔剤 Bupivacaine の筋毒効果と回復について検索した .0.1%以上の Marcaine を含む培養液下で、多核の分化筋細胞はすべて変性・壊死に陥った。この効果は選択的であり、未分化筋細胞を含む単核細胞は見るべき障害を受けなかった。回復実験から、筋再生は生き残った筋発生細胞によると結論された。

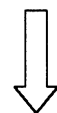
## 文 献

- 1) Benoit, P.W. & Belt, D. : J. Anat. (Lond.), 107, 547-556 (1970).
- 2) Brun, A. : Acta Anaesth. Scand., 3, 59-73 (1959).
- 3) Ichikawa, A. & Ichikawa, M. : Proc. 10th Int. Cong. Anat., 328 (1975).
- 4) Jirmanová, I. & Thesleff, S. : Z. Zellforsch., 131, 77-97 (1972).
- 5) Murray, M.R. : In The Structure and Function of Muscle (G.H.Bourne, ed.), Vol. 1, pp. 111-136. Academic Press, New York, 1960.
- 6) Libelius, R., Sonesson, B., Stamenovič, B.S. & Thesleff, S. : J. Anat. (Lond.), 106, 297-309 (1970).
- 7) Sokoll, M.D., Sonesson, B. & Thesleff, S. : Europ. J. Pharmacol., 4, 179-187 (1968).



## 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



最近,局所麻酔剤の一つである Bupivacaine(Marcaine®)が選択的に骨格筋を変性させることが報告された (Sokol et al.,1968;Liebelius et al.,1970;Benoit & Belt,1970).Marcaine により障害された筋は迅やかにかつ完全に再生することから,この薬剤は筋再生の研究の有力な手段になっている (Jirmanova & Thesleff,1972;Ichikawa & Ichikawa,1975).他方,この薬剤の筋毒性作用を分析することは筋細胞の特異性をよりよく把握するのに役立つと思われる。いかえれば,筋毒効果が筋分化とどのような関係にあるか興味ある課題である。これにより,筋疾患の成因の解明のための糸口がつかめることが期待される。われわれはこの観点に立って,培養筋について Marcaine の筋毒効果を調べ,さらに再生過程を辿跡した。