

# 1) 進行性筋ジストロフィー症生検筋の Maximow double cover slip 法による培養所見

祖父江 逸 郎\*

研究協力者 若 山 吉 弘\*

## はじめに

我々は骨格筋再生機構の解明および疾患による筋の培養に対する態度の違いなどを検討するため各種筋疾患生検筋の培養を試みている。現在までに有意な筋再生所見は得られていないが、筋の変性過程に若干の興味ある知見が得られたので報告する。

## 材料と方法

昭和50年11月10日現在までに PMD (Duchenne 型) 1 例, PMD (FSH 型) 1 例, Myotonic dystrophy 1 例, Polymyositis 1 例, Kugelberg-Welander 病 1 例, Myasthenia gravis 1 例, ALS 1 例, PMD Carrier 1 例, normal control として整形外科手術例 2 例の計 10 例の生検筋を培養した。

培養方法は Rat の尾より抽出した collagen を塗布した cover glass 上に実体顕微鏡下で生検筋の結合織を可及的に取り除き、筋線維束を 0.5~1mm 大に細切したものを 2 個ずつ置き、Eagle basal medium 13, Hanks の B.S.S.9. Horse serum 9, Chick embryo extract 5. 10% glucose 2 より成る medium 中で Maximow double cover slip 法にて培養した。培養後連日、光学顕微鏡下で観察を行ない、また培養 1・3・5・7 日目 (1 部は 1 週間まで連日) の標本を 2.5% glutaraldehyde, 4% OsO<sub>4</sub> で 2 重固定し、alcohol および Propylene oxide にて脱水後、epon に包埋した。包埋標本は thick section したものを methylene blue にて染色し、光顕で観察、ト

リミングの後 thin section をウラニール、鉛の 2 重染色し、日立 HU-11D-S 型電顕にて観察した。

## 結 果

培養 3 日後には Duchenne 型 PMD 生検筋では植えつけた組織片のまわりに紡錘形の単核細胞の散在性の発育がみられ、7 日目には、かなりの数の fibroblast の増殖がみられたが、筋の再生は観察できなかった (図 1) また Kugelberg-Welander 病 (以下 KW 病) の 1 例でも程度は軽いものの上記と同様の所見が得られた。

一方対照 2 例を含むその他の疾患の症例では 1 週間目まで有意な細胞増殖はみられなかった (図 2)。

Epon 包埋による thick section の methylene blue 染色標本では Duchenne 型の症例で培養 4 日目には変性筋線維のまわりに有意な phagocytosis の所見がみられ、培養 1 週間目には一見 myositis を思わせるような顕著な phagocyte や間質の fibroblast などの増殖がみられた (図 3)。

また KW 病の生検筋の培養でも軽度ではあるが同様の所見が得られた。しかし正常対照を含む、その他の疾患の症例では、変性筋線維に対する有意な細胞性反応や間質の構成細胞の増殖はみられなかった (図 4)。

更に電顕的に培養筋線維を観察すると培養 24 時間目には正常対照を含めて、筋線維の mitochondria に電子密度の高い物質の沈着や結晶様封入体を認めた (図 5・6・7)。またこの時点で大部分の筋線維の横紋は消失するが、

\*名古屋大学医学部第一内科

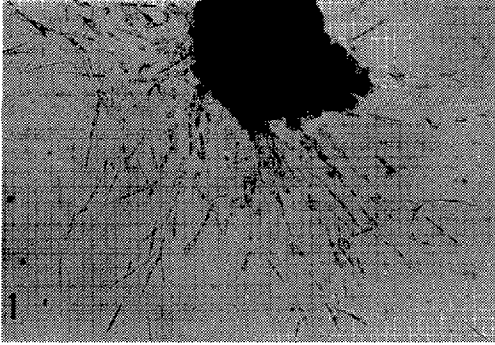


図1 PMD (Duchenne 型) 生検筋の培養標本、培養7日目には植えつけた組織片のまわりに多数の fibroblast の増殖がみられる。(無染色×80)

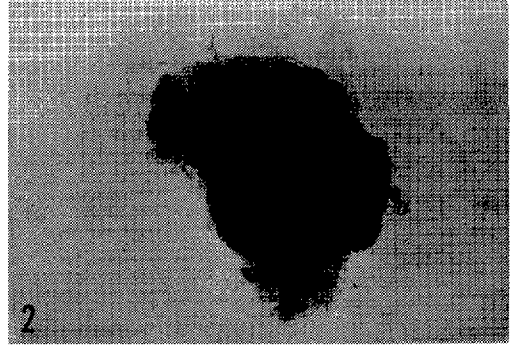


図2 正常対照例の培養標本、培養7日目でも植えつけた組織片のまわりに細胞増殖はみられない。(無染色×80)

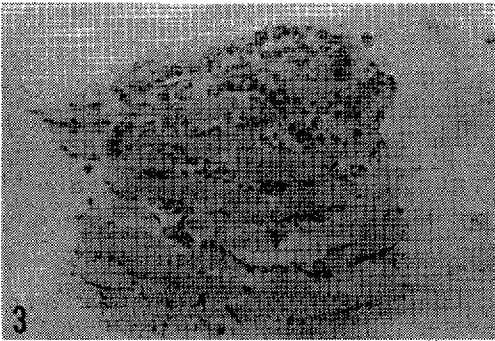


図3 PMD (Duchenne 型) 生検筋の培養標本、培養7日目には筋線維のまわりに一見炎症を思わせるような細胞増殖がみられる。(epon 包埋, methylene blue 染色×200)

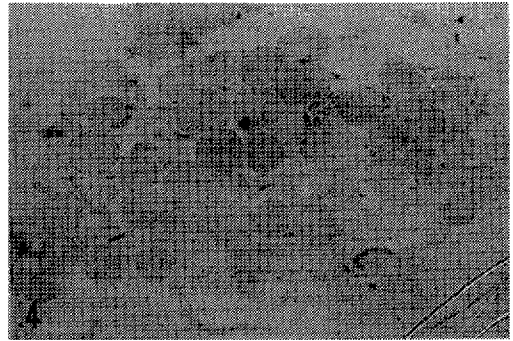


図4 正常対照例の培養標本、培養7日目でも筋線維のまわりには、ほとんど細胞増殖はみられない。(epon 包埋, metlylene blue 染色×200)

培養3日目でも横紋構造がかなり残されている筋線維も見られる。これらの筋線維ではZ帯が選択的に消失し、A帯は比較的良好に残されている(図5・6)。

また、培養1・3日目の標本の骨格筋の plasma membrane と basement membrane とにはさまれた satellite cell には、その胞体内に lysosome を含んでいるのが観察された(図5)。また間質の単核細胞には primary lysosome, secondary lysosome などを多数もった貪食細胞がみられた。

培養1週間目には変性筋線維の横紋構造は消失し、mitochondria には高電子密度物質の沈着、結晶様封入体がしばしば見られるよ

うになり(図7)、また Duchenne 型 PMD と KW 病の症例の生検筋の培養では変性筋線維の basement membrane の内側に核がクロマチンに富み細胞突起を出した細胞(図8)や粗面小胞体 Golgi 小体など細胞小器官がよく発達した細胞(図9)が観察された。

#### 考 察

今回の生検筋の培養では培養24時間後に早くも培養筋のZ帯の消失が見られたが、同様な所見は Mastaglia<sup>1)</sup>による筋の transplantation の実験でも見られている。培養液中の  $Ca^{++}$  濃度が  $10^{-4}M$  以上になるとこのような現象がみられ、 $Ca^{++}$  の濃度を  $10^{-6} \sim 10^{-8}M$  にする



図5 PMD (Duchenne 型) 生検筋の培養標本, 培養24時間後には筋原線維のZ帯の消失, mitochondria 内高電子密度物質の沈着, satellite cell 内の lysosome の出現がみられる. (×24,000)

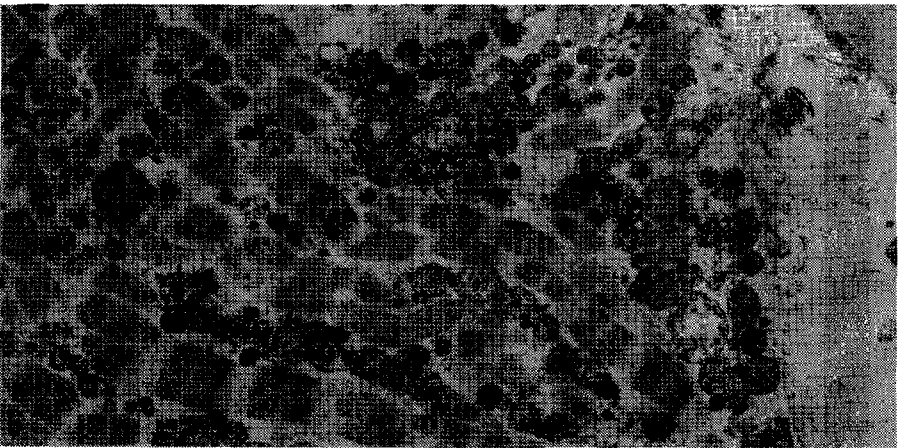


図6 PMD (Duchenne 型) 生検筋の培養標本, 培養3日後には筋原線維のZ帯の消失, mitochondria 内高電子密度物質の沈着などがみられる. 右上の筋線維では筋原線維の配列は乱れている. (×6,000)

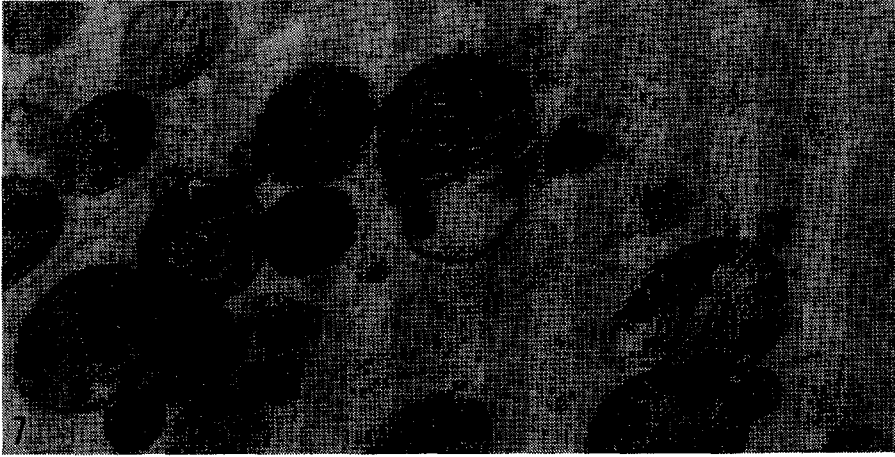


図7 正常対照例の培養標本, 培養7日目には筋線維の筋原線維の配列が乱れ, mitochondria内高電子密度物質の沈着, cristal内結晶様封入体の出現がしばしば観察される. (×40,000)



図8 PMD (Duchenne 型) 生検筋の培養標本, 筋線維の基底膜の内側に2個のsatellite細胞がみられ, そのうち右側のは核がクロマチンに富み, 長い細胞突起を出している. (培養7日目×6,000)

とかかる現象は認められないという<sup>2)</sup>. Mastagliaの実験ではZ帯の消失と共に部分的にrod-like bodyの形成がみられるが, 我々の実験でも $Ca^{++}$ 濃度を $10^{-6}M \sim 10^{-8}M$ とするとZ帯の消失はなくなるが, むしろrod-like bodyの形成が認められる可能性もあり, 今後検討を要する点であろう. またこのようにmyofilamentの配列が培養3日頃迄比較的よく保たれている筋線維と, 全くmyofilament

の配列がばらばらになってしまう筋線維とが認められたが, これがfiber typeの差によるものかどうかとも問題となる所であろう.

次に培養1日目から骨格筋のmitochondria内高電子密度物質の沈着およびcristal内のlinearな結晶様封入体の出現が観察されたが, このようなmitochondriaの変化はMastagliaのmuscle transplantationの実験<sup>1)</sup> Karpapatiのexperimental ischemic myopathy

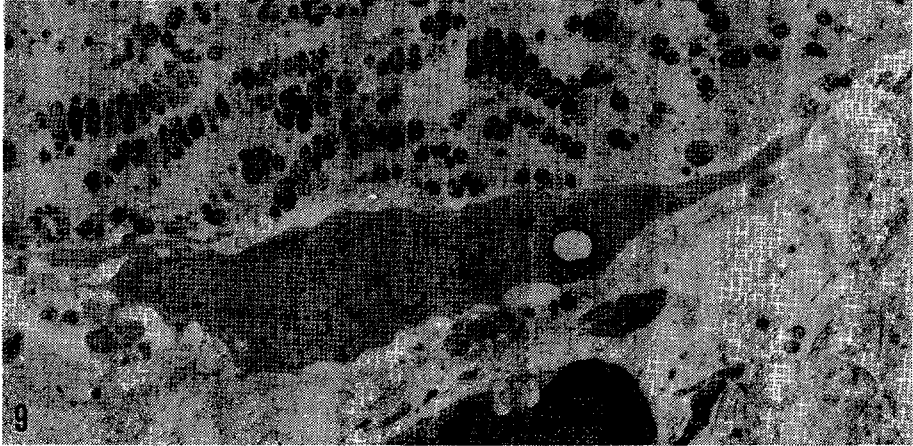


図9 PMD (Duchenne 型) 生検筋の培養標本,筋線維の基底膜の内側に存在する細胞には,粗面小胞体が多く, secondary lysosome も観察される。

(培養7日目×6,000)

の実験<sup>3)</sup>, Melmed の experimental mitochondrial myopathy の実験<sup>4)</sup>でも観察されている。このような結晶様封入体は生検筋にみられる mitochondria 内結晶様封入体より簡単な構造を有するが,その発生機序の解明に何らかの手がかりを与える実験モデルとなりうる可能性を有していると思われる。

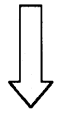
さて骨格筋の satellite cell は骨格筋には存在するが,心筋には存在せず,筋の再生に関与するといわれている<sup>5)</sup>。今回の我々の実験では筋線維とその基底膜との間に,核がクロマチンに富み一見 satellite cell の核を思わせるが,細胞突起を出した細胞や,粗面小胞体の非常によく発達した一見 fibroblast 様ではあるが,胞体内に secondary lysosome を有する細胞が見られ,これらの細胞が satellite cell 由来のものか,間葉系の migrating cell が筋線維の基底膜を穿孔してきたものかは不明であるが, satellite cell 由来のものであれば,本細胞は貪食能をももちうる可能性もあり,本細胞の機能につき,更に検討を加える必要があると思われる。

以上,生検筋培養でみられた特異な変化に

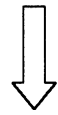
つき若干の考察を加えた。今後症例を重ね,筋の再生機構の検討を進めたい。

#### 文 献

- 1) Mastaglia, F.L., Dawkins, R.L. & Papadimitriou, J.M.: Morphological changes in skeletal muscle after transplantation: A light and electron-microscopic study of the initial phase of degeneration and regeneration, *J.Neurol. Sci.* 25: 227, 1975.
- 2) 杉田秀夫: personal communication
- 3) Karpati, G., Carpenter, S., Melmed, C. & Eisen, A.A.: Experimental ischemic myopathy *J.Neurol. Sci.* 23: 129, 1974.
- 4) Melmed, C., Karpati, G. & Carpenter, S.: Experimental mitochondrial myopathy produced by in vitro uncoupling of oxidative phosphorylation, *J.Neurol. Sci.* 26: 305, 1975.
- 5) Wakayama, Y.: Electron microscopic study on the satellite cell in the muscle of Duchenne muscular dystrophy, *J.Neuropathol. & Exp. Neurol.* (in press).



**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



はじめに

我々は骨格筋再生機構の解明および疾患による筋の培養に対する態度の違いなどを検討するため各種筋疾患生検筋の培養を試みている。現在までに有意な筋再生所見は得られていないが、筋の変性過程に若干の興味ある知見が得られたので報告する。