

## 4) ジストロフィーチキン骨格筋の経時的变化

中村 晴 臣\*

研究協力者 頼田 孝 男\* 今岡 健 次\*  
埜 中 征 哉\*\*

筋ジストロフィー症の動物モデルのうち、ジストロフィーチキン (Dy チキン) は line によって臨床像および組織所見にかなりの差異があるようである (Ashmore et al, 1971). 我国で使用されはじめた Dy チキン (line 413) については、まだ十分な報告に接しない。本報告では、孵化後比較的早期における骨格筋の変化を経時的に追求し、特に変性筋線維の出現状態と、筋線維の再生とについて検討を加えた。

### 方 法

Dy チキン (line 413) 10羽、対照チキン (line 412) 11羽を使用。孵化後5日目より34日目まで、4~9日間隔にて浅胸筋、上腕二頭筋、腓腹筋を麻醉下に摘出し、生食水に浸したガーゼの間に約10分間放置して収縮を除いたのち、次の3方法にて検索した。

1. 液体窒素にて冷却したイソペンタンにて骨格筋を凍結し、クリオスタット10 $\mu$ 切片を作製し、H-E染色、NADH-TR染色、myosin ATPase染色を施した。筋線維直径および細胞核数の測定にあたっては、横断切片のH-E染色標本から at random に数ヶ所を選び、その約670倍拡大写真を使用した。筋線維直径は Tosi らの法 (1976) にならい、

直交する最大直径のうち短い方を使用した。細胞核は筋鞘膜内あるいはこれに密着して認められるものを選び、明らかに間質細胞と思われるものは除外した。

2. 2.5% glutaraldehyde (pH 7.3) にて固定後、Ashford らの方法 (1972) を modify して glycol methacrylate resin (GMA) に包埋し、1~2 $\mu$  H-E 染色標本を作製し、組織学的検討を行なった。

3. 34日目の浅胸筋について、衛星細胞を筋鞘核から区別して検索するため、2.5% glutaraldehyde (pH 7.3) 固定後、lanthanum 染色 (Revel-Karnovski 法, 1967) を加え、型の如く脱水して、Epon 包埋超薄切片を作り、酢酸ウラニール、クエン酸鉛の二重染色を施して、電顕的検索に供した。

### 結 果

1. 筋線維直径：その平均値および標準偏差は表1の如くである。いずれの部位においても、対照チキン、Dy チキンともに、経過とともに筋線維直径は増大する。まず Dy チキンの浅胸筋をみると、孵化後5日目では対照との間に差をみないが、12日目の筋線維直径 ( $17.2 \pm 5.8 \mu$ ) は対照 ( $13.3 \pm 4.6 \mu$ ) より大である ( $P < 0.005$ )。またその標準偏差値、あるいは筋線維直径のヒストグラム (図1) から分る如く、直径分布幅の増大、特に大径線維の増加が明らかである。孵化後20日

\* 鳥取大学医学部脳研究施設神経病理

\*\* 鳥取大学医学部脳研究施設脳神経小児科

表1 筋線維直径と線維当りの細胞核数 (A:浅胸筋, B:上腕二頭筋, C:腓腹筋)

| Day | Fiber diameter ( $\mu$ ) |                | Cell nuclei per muscle fiber |               |                 |
|-----|--------------------------|----------------|------------------------------|---------------|-----------------|
|     | Control                  | Dy-chicken     | Control                      | Dy-chicken    |                 |
| A   | 5                        | 8.7 $\pm$ 2.6  | 8.9 $\pm$ 3.5                | 1.1 $\pm$ 0.6 | 1.1 $\pm$ 0.6   |
|     | 12                       | 13.3 $\pm$ 4.6 | 17.2 $\pm$ 5.8**             | 1.1 $\pm$ 0.7 | 1.8 $\pm$ 1.1** |
|     | 20                       | 19.2 $\pm$ 3.6 | 27.0 $\pm$ 9.4**             | 1.4 $\pm$ 0.8 | 2.6 $\pm$ 1.4** |
|     | 25                       | 20.1 $\pm$ 6.3 | 26.3 $\pm$ 9.4**             | 1.5 $\pm$ 0.9 | 2.1 $\pm$ 1.3** |
|     | 34                       | 23.9 $\pm$ 6.7 | 23.2 $\pm$ 8.1               | 1.7 $\pm$ 0.9 | 2.8 $\pm$ 1.5** |
| B   | 5                        | 12.2 $\pm$ 2.4 | 9.6 $\pm$ 2.0**              | 1.1 $\pm$ 0.6 | 1.5 $\pm$ 0.6** |
|     | 12                       | 18.1 $\pm$ 2.9 | 21.5 $\pm$ 5.0**             | 1.2 $\pm$ 0.7 | 2.2 $\pm$ 1.1** |
|     | 20                       | 21.8 $\pm$ 3.8 | 30.5 $\pm$ 6.7**             | 1.2 $\pm$ 0.8 | 2.6 $\pm$ 1.4** |
|     | 25                       | 25.2 $\pm$ 3.9 | 40.7 $\pm$ 9.3**             | 1.6 $\pm$ 0.8 | 4.7 $\pm$ 2.0** |
|     | 34                       | 26.5 $\pm$ 4.9 | 31.2 $\pm$ 12.1**            | 1.3 $\pm$ 0.8 | 2.4 $\pm$ 1.4** |
| C   | 5                        | 12.0 $\pm$ 2.8 | 12.8 $\pm$ 3.2**             | 1.4 $\pm$ 0.7 | 1.2 $\pm$ 0.7** |
|     | 12                       | 15.6 $\pm$ 3.3 | 13.5 $\pm$ 3.5**             | 1.2 $\pm$ 0.7 | 1.3 $\pm$ 0.7   |
|     | 20                       | 15.8 $\pm$ 3.4 | 18.7 $\pm$ 5.8**             | 1.3 $\pm$ 0.7 | 2.4 $\pm$ 1.1** |
|     | 25                       | 20.0 $\pm$ 5.8 | 21.5 $\pm$ 9.8*              | 1.6 $\pm$ 0.8 | 2.9 $\pm$ 1.6** |
|     | 34                       | 20.7 $\pm$ 3.7 | 20.8 $\pm$ 9.4               | 1.3 $\pm$ 0.7 | 2.3 $\pm$ 1.1** |

n = 300

\* p < 0.025

\*\* p < 0.005

目および25日目の浅胸筋でも、対照に比し筋線維直径の高値と大径線維の増加が認められた。しかし34日目においては、対照との間に差をみなかった。

上腕二頭筋においても、孵化後5日目以降、浅胸筋同様に筋線維直径の高値 (P < 0.005)

と分布幅の増加がみられた(表1)。腓腹筋においては、孵化後5日、20日および25日目の筋線維直径は対照より大きい、12日目の値はむしろ対照より低く、34日目では対照との間に差はみられない。従って腓腹筋の線維直径は必ずしも対照より大きい傾向を示さない。

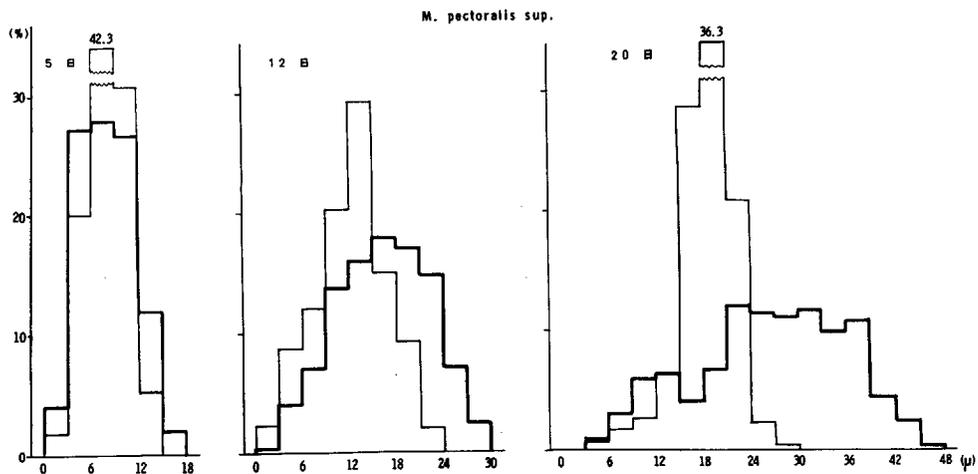


図1 浅胸筋の筋線維直径ヒストグラム

太線: Dy チキン, 細線: 対照 (横線は線維直径, 縦線は線維数の%)

しかしその直径値の分布幅は常に対照より大であった。

2. 筋線維当りの細胞核数：表1にその測定値を示した。浅胸筋で見ると、孵化後5日目の値は対照との間に差はない。しかし12日目の細胞核数(1.8±1.1)は対照のそれ(1.1±0.7)より有意に大であり(P<0.005)、孵化20日目以降も同様である。上腕二頭筋では孵化後5日目以降、浅胸筋と同様に、線維当りの細胞核数が対照よりも増加している(P<0.005)。腓腹筋においても20日目以降に核数の増加が認められた。

3. 酵素活性：myosin ATPase 活性の染色に当っては、preincubation medium のpHを9.4, 4.6および4.3にて検討した。その結果では、浅胸筋と上腕二頭筋は、Dy チキン、対照チキン共に type 2A 線維のみから成立し、少くとも孵化34日目までには酵素活性の分化は認められない。これに反し腓腹筋では、孵化後5日目より type 2A 線維に少数の type 1 線維を混じ、成熟するに従い混在の程度が著明となる。

4. 筋組織所見：先ず浅胸筋についてみると、孵化後5日目では比較的細い筋線維の集合よりなり、大小不同も目立つが対照との間

に特別の差異をみない。細胞核は明るく大形で、大部分は筋線維辺縁部に認められ、中心核を有する線維は少数である。筋鞘核が2~3個集合している線維も少数認められる。極めて少数の変性筋線維をみる。即ち好酸性同質化、空胞化あるいは myophagia などの特徴づけられる線維である。孵化後12日目のものでは、筋線維直径の増大と大小不同が目立ち、筋鞘核も対照より多数で、稀には核の aggregation をみる。中心核は約10%の筋線維にみられる。変性線維は極めて少数である。孵化後20日目になると、線維直径の大小不同が一層明瞭になると共に、中心核も約30%の線維にみられるが、中心核は対照チキンでもほぼ同程度に出現している。筋鞘核の aggregation も散在する。変性筋線維は少数ながら散在性にみられるが、再生筋線維はなお認められない。

孵化25日目になると筋線維直径の大小不同は一層著明となる。中心核は20日目と同様である。目立つことは多数の変性線維が散見されることであり(図2)、かかる線維では myosin ATPase 活性の減弱と、NADH 染色で myofibril の乱れが認められる。少数の線維には splitting を示すものがみられる。間質

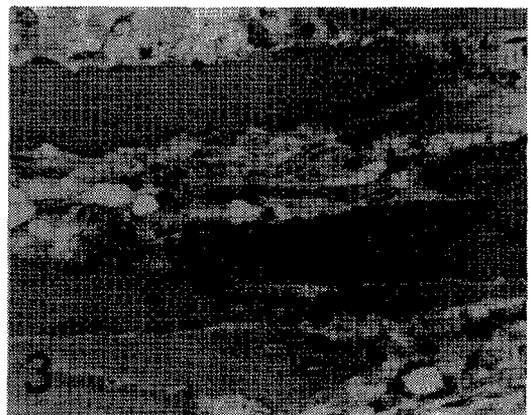
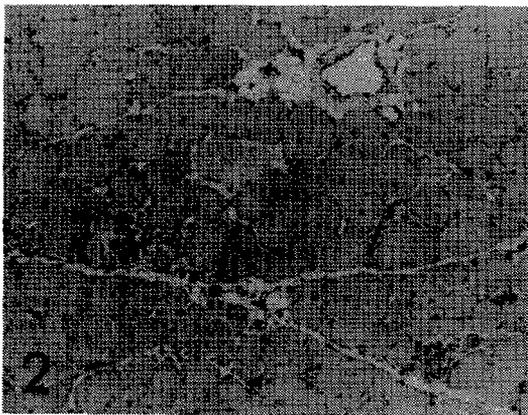


図2 Dy チキン25日目浅胸筋。変性線維の散在と、間質の脂肪浸潤。GMA 2 $\mu$  切片，H-E， $\times 175$ 。

図3 Dy チキン34日目浅胸筋。好塩基性再生線維が写真中央の変性部にみられる。GMA 2 $\mu$  切片，H-E， $\times 350$ 。

の脂肪織も増加する。なお、大小の空胞を含む筋線維が散在するが、その myofibril は比較的良く保たれている。壊死線維に接して、明瞭な核小体、明るい大形の核、塩基性の胞体などをもつ小径線維が認められ(図3)、再生線維と考えられた。孵化後34日目のものは、壊死線維、再生線維ともに増加し、空胞を含む線維も少なからず認められる。間質の増殖と脂肪浸潤も著しくなる。

上腕二頭筋の所見もほぼ浅胸筋のそれと同一であるが、筋紡錘は浅胸筋よりもはるかに多数認められる。この筋紡錘および筋内線維には、浅胸筋、上腕二頭筋ともに、特別の変化をみない。

腓腹筋では対照チキンとの間に著明な差異をみないが、ただ20日目以降においては筋鞘核が対照チキンよりやや多いようにみられた。中心核を有する線維は、対照と同様約10%以下の線維に認められるに過ぎない。変性線維、

再生線維は認められなかった。

5. 衛星細胞：孵化後34日目の浅胸筋の横断切片について、低倍率電顕像によって筋線維とそれに附属する筋鞘核、衛星細胞を算定した。対照チキンでは、筋線維177本に対して筋鞘核145、衛星細胞16であり、筋線維当りの衛星細胞数は0.09、全細胞数に対する衛星細胞の割合は9.9%である。他方Dyチキンでは、筋線維127本についてみると筋鞘核151、衛星細胞60であり、筋線維当りの衛星細胞数は0.47、全細胞数に対する衛星細胞の割合は28.4%となり、いずれも対照値に比し有意に大きく(それぞれ $P < 0.005$ )、衛星細胞の増加を示している。

次にDyチキンの個々の衛星細胞を検討してみると、相互に細胞膜が接している twin satellite cells と考えられるものがみられるほか、胞体内小器管や caveolae の増加、あるいは T-tubule の形成を伴う activated

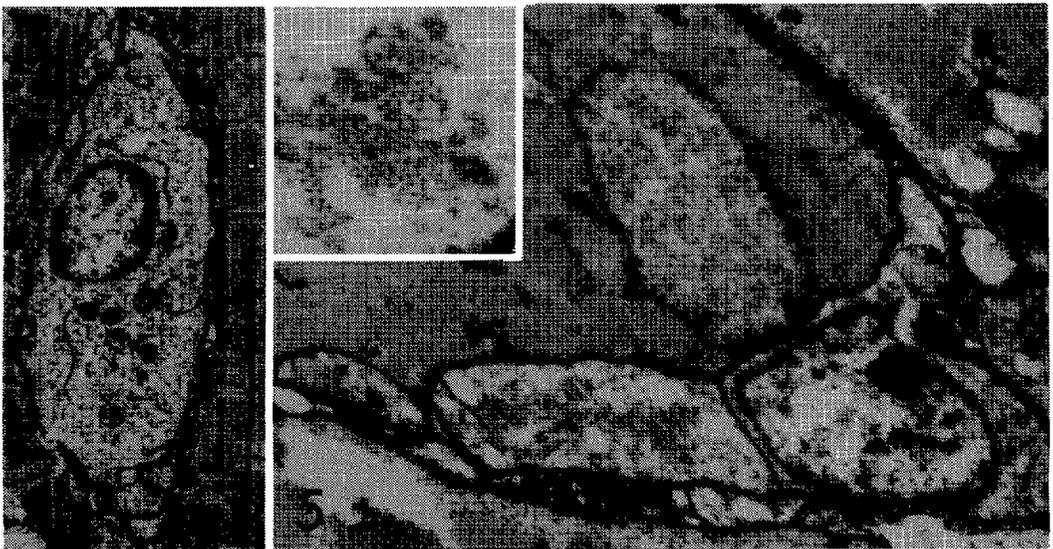


図4 Activated satellite cell. Dyチキン34日目浅胸筋. Caveolae および T-tubules 形成を示す. 右方の parent fiber にも多数の caveolae がみられる. Lanthanum 染色,  $\times 6,300$ .

図5 34日目 Dyチキン浅胸筋. 図の下半分に3ヶの satellite cells がならんでみられるが, 中央のものは myofilaments を有し, 明らかに premyocyte と考えられる. Lanthanum 染色,  $\times 9,600$ . 挿図は myofilaments の拡大図,  $\times 30,000$ .

satellite cells が少なからず認められる (図 4). また胞体内に myofilaments 形成がみられる. premyocyte も少数認められた (図 5).

### 考 察

幼弱チキンの骨格筋を観察していると、かなりの個体差が認められる. 本報告の筋線維直径は、いずれも 1 例ずつの値であり、個体差が考慮されていないので、標準の数値にはなりえない. しかしこれらの値は、Dy チキンの浅胸筋、上腕二頭筋が、対照チキンに比し平均直径が大であり、大小不同がより著しいことを示唆しているといえよう.

Dy チキンの筋病変が Dy マウスのそれ (Okada ら, 1976) と異なる点は、病変分布が慢性にみられて、小径線維の束状出現の如き pattern を示さないこと、筋線維の変性像が著明であること、その変性線維が早期に多数出現すること、好塩基性の所謂再生筋線維の出現が目立つことなどである. 変性筋線維は孵化早期から認められたが、その著明な出現に呼応するが如く、孵化後 25 日目には所謂再生筋線維が出現して来る. ここに再生筋線維とした特徴の一つは、その胞体の好塩基性である. Neerunjun ら (1977) によれば、病的骨格筋にみられる好塩基性線維は、常に RNA 活性および acid phosphatase 活性が高く、再生した筋線維であるという. かかる線維が常に変性線維に添うが如く、あるいは変性線維と混じて認められたことは、筋線維の変性が刺激となって、再生機転が出現したと想像される.

変性と再生とがみられる孵化後 34 日目の Dy チキン浅胸筋において、電顕的に認めえたことは、衛星細胞数の増加と、筋細胞への分化を示す activated satellite cell あるいは premyocyte の存在とである. 筋線維の再生には衛星細胞が重要な役割を演ずるであろうことは、多くの報告の指摘する点である. しかし病的骨格筋における筋線維再生は、必ず

しも myogenesis と同一ではなく、神経支配の有無と傷害の程度が大きな影響を与える (Chou ら, 1977). Dy チキンの如き進行性病変においては、変性と再生との間に特殊な関連性が想像されるので、今後は変性線維と衛星細胞との相互関係を追求する必要があるであろう.

### 総 括

Dy チキン (line 413) 骨格筋の変化を、孵化後 5 日から 34 日に亘り経時的に追求し、対照チキンと比較した結果、浅胸筋と上腕二頭筋では①筋線維直径および線維当りの細胞数の増加がみられ、②対照チキン同様、type 2 A 線維のみからなり、また③孵化後 5 日目から少数の変性筋線維がみられ、20 日目にはやや増加し、25 日目からは多数の変性筋線維が認められると共に、好塩基性の再生筋線維の出現がみられた. ④孵化後 34 日目の浅胸筋にて、衛星細胞の増殖と、その筋細胞への分化とが認められた.

### 文 献

- 1) Ashford, A. E., Allaway, W. G. and McCully, M. E. : Low temperature embedding in glycol methacrylate for enzyme histochemistry in plant and animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 20 : 986, 1972.
- 2) Ashmore, C. A. and Doerr, L. : Postnatal development of fiber types in normal and dystrophic skeletal muscle of the chick. *Exper. Neurol.*, 30 : 431, 1971.
- 3) Chou, S. M. and Nonaka, I. : Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscles. *J. Neurol. Sci.*, 34 : 131, 1977.
- 4) Neerunjun, J. S. and Dubowitz, V. : Concomitance of basophilia, ribonucleic acid and acid phosphatase activity in regenerating muscle fibers. *J. Neurol. Sci.*, 33 : 95, 1977.

- 5) Okada, E., Mizuhira, V. and Nakamura, H. : Distribution of histological changes on the limb muscles of dystrophic mice. Okajima Fol. Anat. Jap., 53 : 11, 1976.
- 6) Revel, J. P. and Karnovsky, M. J. : Hexagonal array of subunits in intracellular junctions of mouse heart and liver. J. Cell Biol., 33 : 7, 1967.
- 7) Tosi, C. and Jerusalem, F. : Selektive Muskelfasertypomanalien bei neuromuskulären Erkrankungen. J. Neurol., 214 : 13, 1976.

↓  
**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  
↓

筋ジストロフィー症の動物モデルのうち,ジストロフィーチキン(Dy チキン)は line によって臨床像および組織所見にかなりの差異があるようである(Ashmore et al,1971).我国で使用されはじめた Dy チキン(line 413)については,まだ十分な報告に接しない.本報告では,孵化後比較的早期における骨格筋の変化を経時的に追求し,特に変性筋線維の出現状態と,筋線維の再生とについて検討を加えた.