

# 1) 中毒性筋障害とその形態学的研究

## — vincristin sulfate によるラット骨格筋障害の形態学的検討 —

茂 在 敏 司\*

研究協力者 小 西 慎 吾\* 岸 田 修 三\* 増 井 義 一\*

### 目 的

Vincristin sulfate(以後VCR)は、*vinca rosa* Linn より抽出された oncolytic alkaloid である<sup>1)</sup>。VCRが有糸分裂を阻害する事はよく知られているが、その薬理作用機序はあまり知られていない。現在、有糸分裂阻害剤である Vincristin は抗腫瘍薬として使用されるが、その副作用として、四肢遠位部の脱力、腱反射の消失をきたすことがよく知られている。そういった例における、神経筋の詳細な検索も行われている<sup>2)</sup>。又、Rat等の動物へのVCRの大量投与により、短期日の内に骨格筋障害が起ることも報告されているが<sup>3)-7)</sup>、我々は、筋障害のなりたちを実験的に検討する目的で、VCRによるラット骨格筋の障害を形態学的に検討した。

### 方 法

Wister系ラット、オス、体重100~150gにVCR 0.2及び0.4mg/kg/dayを腹腔内に投与し、経時的に腓腹筋を採取し、光顕的、及び電顕的に検索した。VCR投与量、投与回数、腓腹筋採取時期は、表1に示す如くである。光

表1

### Result

Rat NO.	VCR dosage (mg/kg/day)	injection times	killed days	General observation	LM finding		EM finding membranous body
					myopathic change	neuropathic change	
1	0.4	1	15	N	-	-	
2	0.4	1	15	D	-	-	
3	0.4	1	15	D	-	-	-
4	0.4	3	15	D, P <sub>C</sub>	-	+	
5	0.4	1	2	N	-	-	
6	0.4	1	2	N	-	-	
7	0.4	2	3	D, P <sub>C</sub>	+	-	+
8	0.4	2	3	D, P <sub>i</sub>	+	-	
9	0.4	3	4	D, P <sub>i</sub>	+	-	
10	0.4	3	4	D, P <sub>i</sub>	+	-	+
11	0.4	3	4	D, P <sub>i</sub>	+	-	
12	0.2	4	5	D, P <sub>C</sub>	+	-	+
13	0.2	4	5	D	-	-	
14	0.2	5	6	D	-	-	
15	0.2	5	6	D, P <sub>C</sub>	+	-	+
16	0.2	5	6	D	-	-	
17	0.2	6	7	D	-	-	
18	0.2	6	7	D, P <sub>C</sub>	+	-	+
19	0.2	8	9	D	+	+	
20	0	0	0	N	-	-	-
21	0	0	0	N	-	-	-
22	0	0	0	N	-	-	-

N: not particular

D: Diarrhea

P<sub>C</sub>: hind legs complete paralysis

P<sub>i</sub>: hind legs incomplete paralysis

LM finding: 光学顕微鏡所見

EM finding: 電子顕微鏡所見

\* 大阪医科大学第一内科

学顕微鏡的検索は、無固定、ドライアイス・アセトン凍結、クリオスタット切片 ( $8\mu$ ) について、Hematoxylin Eosin 染色, Trichrome 染色 Gomori 変法, PAS 染色, Oil red O 染色 Sudan black B 染色, Oxidative enzyme 染色 (NADH-TR, SDH), Phosphorylase 染色, ATPase 染色 (preincubation pH 9.4, pH 4.2) を行い観察した。なお, Rat の筋線維は、組織化学的に、Oxidative enzyme の染色態度が、人間の筋線維とやや異なるが、fiber type の記載に関しては、今回の報告では、ATPase 染色 (preincubation pH 9.4, pH 4.2) から type I, type II のみの分類による記載をした。電子顕微鏡観察は、ラットを断頭後、直ちに腓腹筋を採取、2.6% 燐酸緩衝 glutar aldehyde 固定液にて2時間固定後、 $OsO_4$  後固定を行なった。次いで、etanol 系列脱水を行い Luft 法に従い Epon 樹脂包埋をした。まず  $1\mu$  光顕用切片を作製し、toluidin blue 染色にて光顕観察を行い、電顕切片作製部位を選択した。電顕切片は、Uranyl acetate と、鉛の二重染色をし、日立

H 500 型電子顕微鏡にて観察した。

## 結 果

一般状態：表1に示す如く、VCR 0.4mg/kg/day 1回投与例のNo.1, No.5, No.6 と対照群のNo.20, No.21, No.22をのぞいて他のすべてに下痢症状を認めた。下痢症状は、VCR投与中止後1週間以上生存例のNo.2, No.3, No.4でみると、VCR投与中止後3~4日で消失した。四肢機能については、その障害はすべて後肢にみられ、0.4mg/kg/day 3日連続投与例のNo.4, 0.4mg/kg/day 連続6日投与例のNo.18に後肢の完全麻痺を認め、0.4mg/kg/day 連続2日投与のNo.8, 0.4mg/kg/day 連続3日投与例のNo.9, No.10, No.11に後肢の不完全麻痺を認めた。

No.4では、VCR 0.4mg/kg/day 投与中止後さらに12日、状態を観察したが、後肢完全麻痺は、VCR投与中止後3日目にて、完全に消失した。

光学顕微鏡所見：光顕的に何らかの異常を、表1の如く、0.4mg/kg/day 連続3~4日投与

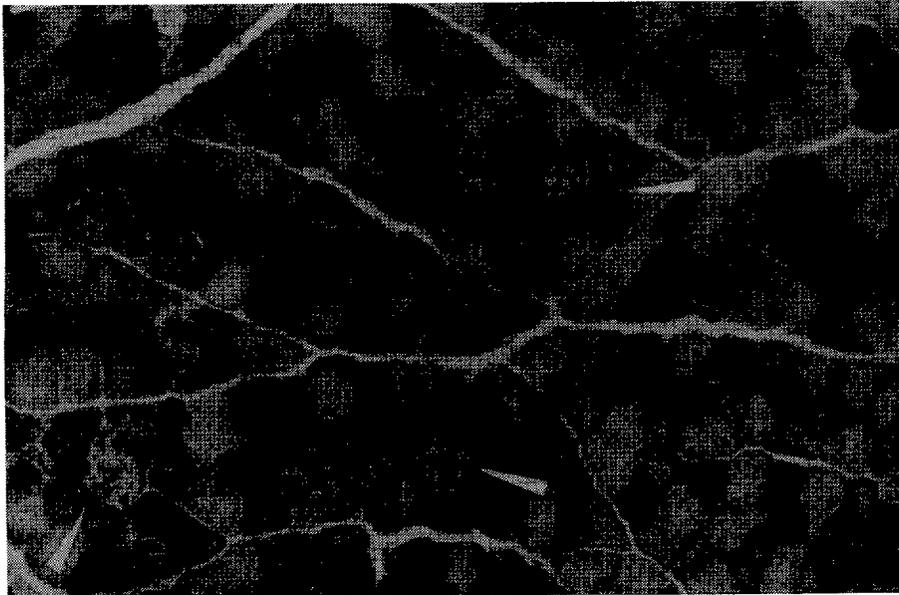


写真1 Vincristine 投与 Rat, 腓腹筋 NADH-TR 染色  $\times 100$   
矢印：異常筋線維

群のすべて (No.4, 7, 8, 9, 10, 11) と 0.2mg/kg/day 連続投与群の内No.12, 15, 18, 19の各動物に認めた。その他例では、明らかな異常所見を認めなかった。異常を認めた例の内No.4を除き共通する所見は、次の如くである。

①H. E. 染色では、筋細胞の均等なエオシン濃染を示す線維、筋核周辺及びsarcolemma近くに多い塩基性物質の沈着を示す線維、又わずかではあるがmyophagiaの像を示す線維を認めた。②Trichrome 染色 Gomori 変法では、原形質が、暗緑色に濃染する変性筋線維を散在性に認めた。③Oxidative enzyme 染色 (NADH-TR 染色, SDH 染色) では、筋原線維間網状構造の破綻と, formazan の異常沈着が H. E. 染色における好塩基性物質の沈着とほぼ同様の分布でみられる筋線維を認めた。(写真1) ④Sudan Black B 染色では、筋原線維間網状構造の破綻と脂質の異常沈着を、やはりH. E. 染色における

好塩基性物質の沈着と同様の分布で示す線維がみられた。(写真2) ⑤Oil red O 染色では、明らかな異常染色像を示す線維はみられなかった。⑥PAS 染色では筋原線維間網状構造の破綻と、少数ではあるが、弱いPAS陽性物質の沈着を認める変性筋線維がみられた。⑦Phosphorylase 染色では、活性の完全に消失した障害筋線維を認めた。⑧ATPase 染色 (pH9.4 preincubation) では、type II 線維よりさらに強い活性を示す線維を認めた。⑨これらの異常筋線維は、type II 線維のみよりなる領域に優位にみられた。ちなみに我々が検討した正常ラット腓腹筋における type 分布を図1に示す。障害筋線維は主として図1の斜線部位に散在してみられた。その他、VCR 0.4 mg/kg/day 連続3回投与、VCR投与開始時より15日目検索例 (No.4) では、small group atrophy, target-fiber といった神経原性の変化を示す所見のみを認め、先に述べた様な変化は、まったく認めなかつ

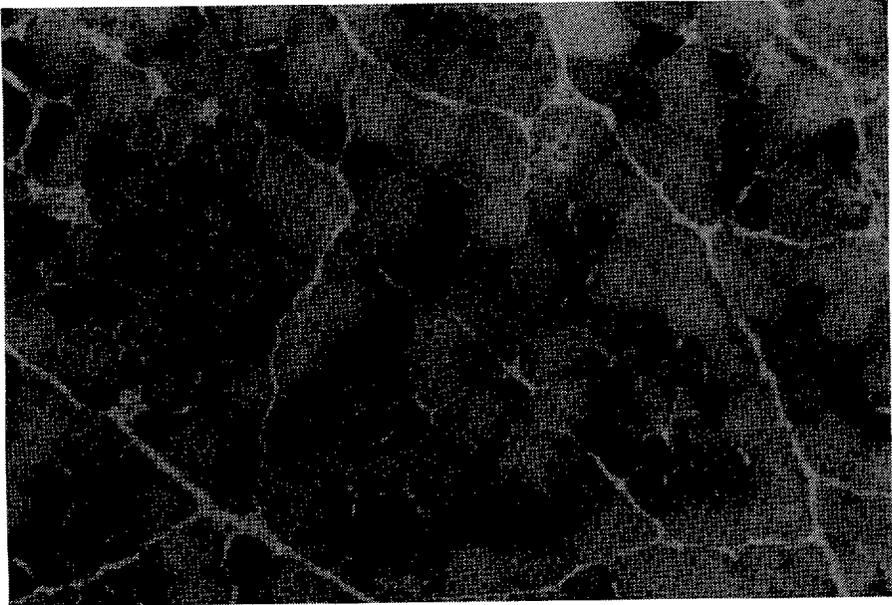


写真2 Vincristine 投与 Rat, 腓腹筋生検 Sudan black B 染色 ×100

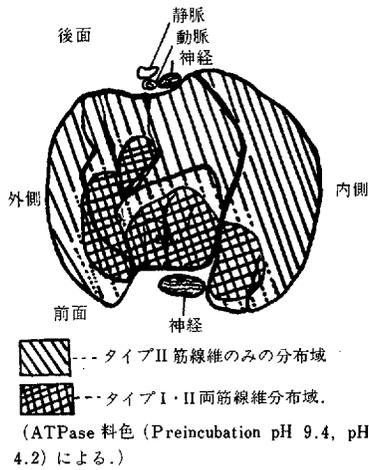


図1 ラット腓腹筋横断面、筋線維タイプ分布

た。又、VCR 0.2 mg/kg/day 連続 8 日投与、投与開始後 9 日目検索例(No.19)では、先に述べた共通異常所見の他に、angular fiber よりなる、small group atrophy の混在を認めた。

電子顕微鏡所見：電子顕微鏡観察は、表1の如く、No. 3, 7, 10, 12, 15, 18, 20, 21, について行ったが、No. 3, 20, 21の例では、特に異常所見は認めなかった。No. 7, 10, 12, 15, 18例では、次のごとき異常所見を認めた。

程度の差こそあれ、すべての筋線維に mitochondria の変性と異常層状構造物の出現を、筋原線維間、および筋鞘膜下に多数認めた。(写真3, 4) この層状構造物は2層が対となり同心円構造をとり、時にその内側層と外側

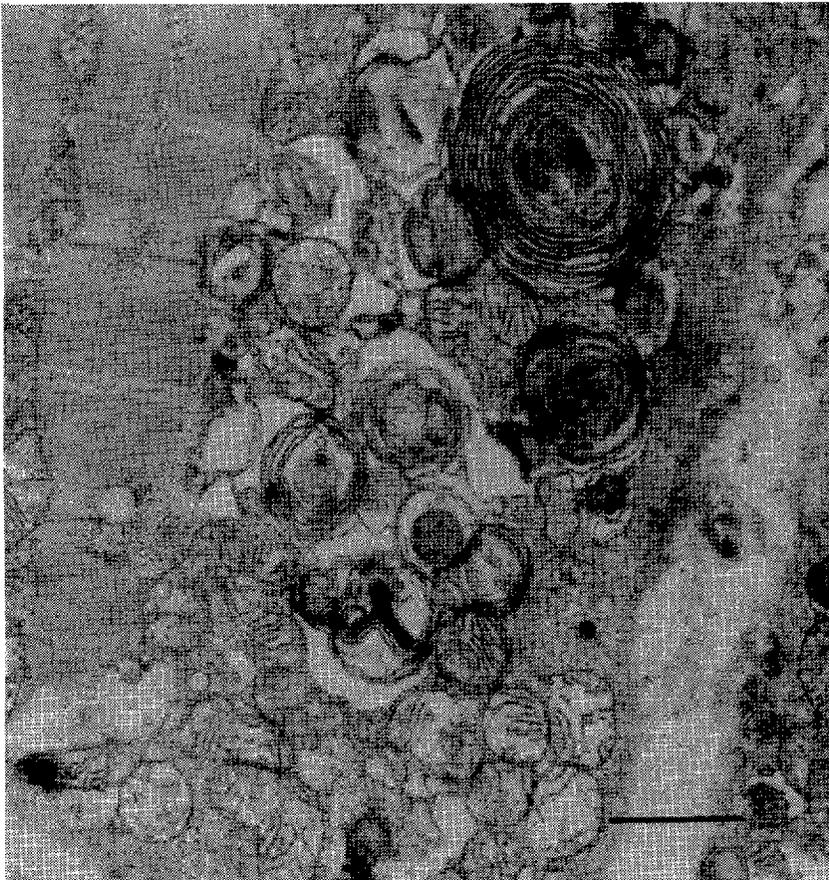


写真3 Vincristine 投与 Rat, 腓腹筋電顕像 多数の層状構造物と変性の著明な mitochondria が認められる。

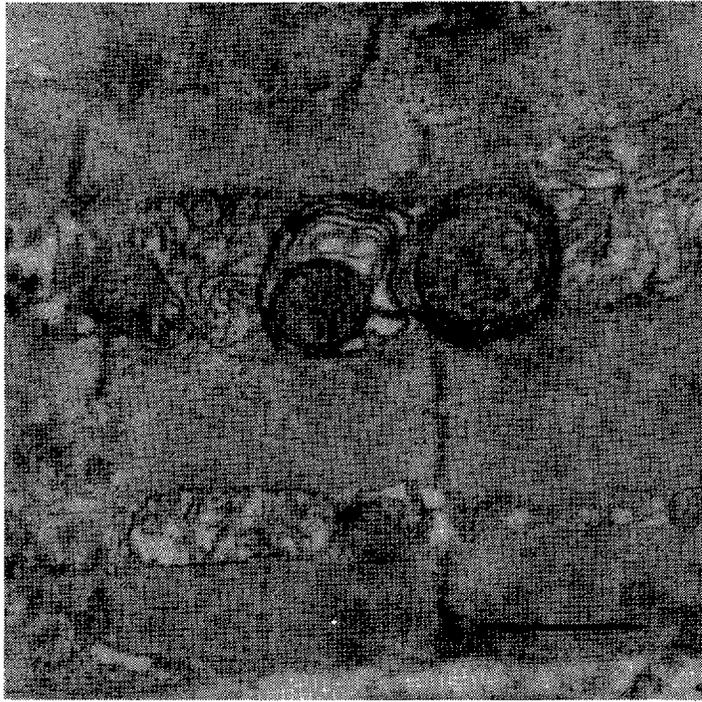


写真4 Vincristine 投与 Rat, 腓腹筋生検電顕像 層状構造物の中心部に  
変性した mitochondria が認められる。  
筋原線維間の mitochondria も変性が著明である。

層が2層対構造で数ヶ所つながっている。又しばしば中心部に変性した mitochondria あるいは glycogen 顆粒が存在し、周辺部に 変性した sarcoplasmic reticulum と思われる構造が隣接して認められた。先に述べた光顕異常所見に一致すると思われる部の trimming block より作製した電顕試料の観察では、同様の層状構造も認められるが、筋原線維の変性崩壊および myophagia の像が主体であった。筋組織内末梢神経の電顕的観察では、No. 7, 10, 12, 15では、明らかな変化を認めなかったが、0.2 mg/kg/day 連続6日投与、7日目検索例 (No.18) では、軸索内に、髓鞘の myelin に接して、筋線維にて観察された層状構造物に類似の異常構造物を認めた。

#### 考 察

VCR 投与 Rat の、四肢機能障害は、VCR

の大量投与で、わずか数日の内に後肢に出現した。機能障害が出現した時点で腓腹筋を採取し、光顕的に観察すると、不完全麻痺例から、完全麻痺を示す例までのすべてに、散在性に type II 線維 fiber 優位に筋線維変性崩壊と、H. E. 染色で好塩基性物質の沈着、Oxidative enzyme 染色にて formazan の異常沈着、Sudan black B 染色にて異常沈着を示す筋線維を認めた。対照動物ではもちろん、VCRを投与したが、下肢麻痺を認めなかった動物10匹中9匹では、光顕的異常所見を認めなかった。従って筋原性変化と考えられる此の組織学的所見はVCR投与によりもたらされ、且、後肢麻痺の原因の一つと推測される。しかし光顕的異常所見を認めない筋線維においても、電顕的観察では異常層状構造物の出現が広範囲に認められた。此の層状構造物は対照動物筋線維には全くみられない。従って此の

層状構造物はVCRの筋への作用により早期にもたらされる特徴的な変化であると考えられる。Clarkeらは<sup>5)</sup>、1972年同様の所見を報告し、又、1967年Graff et al<sup>8),9)</sup>は、VCR投与と神経切断を組合せて実験し、RatにおけるVCRの作用は、骨格筋に直接の作用であるとしている。又、1977年若山<sup>7)</sup>らは、培養筋にVCRを作用させ、電顕的に同様の異常層状構造を認めている。これらの報告からするとVCRはラット骨格筋に直接作用し、形態学的異常を起させるものと考えられる。

電顕観察における異常層状構造は、1966年Slotwiner et al<sup>3)</sup>が spheromembranous body, 1970年Bradley<sup>4)</sup> W. G. が multilamellar whorled bodies, そして1972年Clarke J. T. R. et alが membranous arrayと記載しているものに一致すると思われる。その層状構造の本態については、Clarke<sup>5)</sup>らは、その組織化学的および生化学的検索から、脂質代謝異常にもとづくものであろうとしている。我々の組織化学的検索結果は、Clarke J. T. R. らの報告にほぼ一致している。又、その層状構造の由来については、mitochondria由来を推測する報告、あるいはその両者に由来すると推測する報告等が有る<sup>3)-7)</sup>が、我々の観察では、その層状構造は、しばしば中心部に変性した mitochondria を持ち、又、周辺部に変性した sarcoplasmic reticulum と思われる構造が隣接しており、mitochondria, あるいは、sarcoplasmic reticulum あるいはその両者に由来するものと考えられるが、さらに検討が必要と思われる。

#### 結 語

VCR投与時のラットにおける筋変化を検討し、VCR大量投与にて、わずか2~3日という短期間に、光顕的に type II fiber 優位に障害が惹起されることを明らかにした。すなわち組織学的・組織化学的検索により筋線維の散在性の筋原性変化、formazan, あるいは脂質、あるいはPAS弱陽性物質の沈

着がみられた、電顕的検索では、光顕的に変性を認めない線維においても異常層状構造、いわゆる spheromembranous bodyの出現が特徴的に認められた。

最後に、電顕的観察にあたり、御助力をいただいた、大阪医科大学微生物学教室、中井益代助教授、大阪医科大学中央研究室、内藤継也技師に深謝致します。

#### 文 献

- 1) Svoboda, G. H. : Alkaloids of *Vinca rosea* (*Cantharanthus roseus*): IX. Extraction and Characterization of Leurosidine and Leurocristine, *Lloydia* 24 : 173, 1961.
- 2) Bradley, W. G., Laesman, L. P., G. W. Pearce and J. N. Walton : The Neuromyopathy of Vincristine in man, Clinical, Electrophysiological and Pathological Studies, *J. Neurol. Sci.*, 10 : 107-131, 1970.
- 3) Slotwiner, P., S. K. Song and P. J. Anderson : Spheromembranous degeneration of muscle induced by vincristine, *Arch Neurol. (Chic)*, 15 : 172-176, 1966.
- 4) Bradley, W. G. : The Neuromyopathy of vincristine in the guinea pig ; an electrophysiological and pathological study, *J. Neurol. Sci.*, 10 : 133-162, 1970.
- 5) Clarke, J. T. R., Karpati, G., S. Carpenter and L. S. Wolfe : The effect of vincristine on skeletal muscle in the rat. A correlative histochemical, ultrastructural and chemical study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 31 : 247, 1972.
- 6) 佐藤猛, 佐橋功, 新名清成 : Vincristineによるラット末梢神経と筋の障害の電顕的研究, 臨床神経 (第15回日本神経学会総会抄録) : 14 : 932, 1974.

- 7) Y. Wakayama, and I. Sobue : A Tissue Culture of the Toxic Effect of Vincristine on Skeletal Muscle ; exp. Neurol ; 55, 112-121, 1977.
- 8) Graff, G. L. A. et al : Action du sulfate de vincristine sur le gastrocnémien de rat. I. Mise en évidence de deux compartiments, métaboliquement distincts, pour le phosphate inorganique ; effects sur les phosphates organiques acidodissolubles et les phospholipides, C. R. Soc. Biol., 161 : 2645, 1967.
- 9) Graff, G. L. A. : Action du sulfate de vincristine sur le gastrocnémien de rat. II. Effets Indépendants de l'acidoalcalose et de la dénervation motrice sur le métabolisme des phosphates inorganiques, organiques acidodissolubles et des phospholipides. C. R. Soc. Biol., 162 : 588, 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  
↓

## 目的

Vincristin sulfate(以後 VCR)は,vinca rosa Linn より抽出された oncolytic alkaloid である 1).VCR が有糸分裂を阻害する事はよく知られているが,その薬理作用機序はあまり知られていない.現在,有糸分裂阻害剤である Vincristin は抗腫瘍薬として使用されるが,その副作用として,四肢遠位部の脱力,腱反射の消失をきたすことがよく知られている.そういった例における,神経筋の詳細な検索も行われている 2).