

厚生省
神経疾患研究委託費

筋の発生と分化に関する
基礎的研究

江橋 班

昭和56年度研究報告書

昭和57年3月

研究報告書の作成に当って

本年も厚生省神経疾患研究委託費による筋ジストロフィー症の研究の報告書をお送りすることになりました。

過去3年間「筋ジストロフィー症の基礎的研究班」として多くの研究成果を挙げてきた班を発展的に解消し、新に二名の班員を加え「筋の発生と分化に関する基礎的研究班」として本年度より出発致しました。新しい班の名称には「筋ジストロフィー症の研究」という言葉は表面的には入っておりません。しかしこれは筋ジストロフィー症の研究の最も重要な方向の一つを便宜的に班の名称を用いたものにすぎません。筋ジストロフィー症の研究には一日の懈怠も許されません。従って班の名称は上記のようではありますが、我々の目的とするところはあくまでも筋ジストロフィーという難病を如何にして解決するかということでありませぬ。

我々はこの目的のために、これまで用いていた筋ジストロフィー症ニワトリのほかにも同症ハムスターを導入し、本年は差当ってその基礎データを集めることを目的としました。そしてすでにいくらかの新しい結果を得ております。

本年度から出発する新しい班が組織されたのは56年の初夏のことではありますが、研究費の配分が可能になったのは12月に入ってからのことでありました。このような事情にもかかわらず、12月初旬に開かれた班会議では、この報告書にみられるような高度の研究成果が発表されました。このことはいうまでもなく班員および研究協力者各位の筋ジストロフィー症解決に対する熱意と努力の賜物であります。

本年度も班会議後わずかの間に報告集をまとめることができました。多忙な中を執筆下さいました班員各位に御礼申し上げます。また本委託金の取扱いに色々とお骨折り下さった厚生省医務局、国立武蔵療養所、日本筋ジストロフィー協会の方々に御礼申し上げます。

昭和 57 年 3 月

班長 江橋 節郎

目 次

I 特別レポート

1. ジストロフィ・ハムスターに関する知見 3
野々村 禎 昭

II 発生生物学・細胞培養

2. 哺乳動物の発生初期で起こる
細胞間のCompactionに関する細胞表面分子 11
岡 田 節 人
3. バクテリオファージ入にパッケージした
遺伝子の培養細胞への挿入 14
岡 田 善 雄
4. 家鶏ジストロフィー筋の培養法による研究 16
米 沢 猛
5. 筋ジストロフィー(dy/dy)マウス筋芽細胞の
分裂能低下の機作の研究 19
香 川 務
6. トランスフェリンと筋細胞の成長 26
小 沢 鏡二郎

III Whole Animal

7. ジストロフィー筋などの移植に関する研究
— 筋再生に及ぼす神経支配の影響 33
寺 尾 寿 夫

8. ジストロフィーおよび正常チキンにおける 筋線維数の経時変化	39
	大塚正徳
9. 筋ジスマウスの筋線維の成熟成長障害	44
	戸塚武
10. 三つの筋神経系異常マウスにおける 指標酵素の活性変動の比較	49
	松下宏

IV 生理学

11. L6筋芽細胞培養における テトロドトキシン感受性活動電位の発達	59
	加濃正明
12. 筋細胞膜における膜興奮機能の発生	64
	高橋國太郎
13. 両生類骨格筋の遅速筋線維の比較	69
	遠藤實

V アセチルコリンセプター

14. 眼瞼型重症筋無力症における抗-AChR-抗体	79
	栗山熙
15. 培養筋細胞のAChレセプターの代謝安定性と神経細胞由来因子	82
	萩原彌四郎
16. 培養骨格筋細胞におけるアセチルコリン受容体の合成と分化	86
	杉山博之

17. 発生初期におけるジストロフィー筋の
アセケルコリンレセプターの代謝速度 91
堀田 健

VI 微細構造

18. 鶏骨格筋の凍結切断像について 101
岩崎 祐三
19. 細胞骨格の分化発達 — 急速凍結エッチングレプリカ観察 106
石川 春律

VII 構造蛋白・その他

20. ミオシンH鎖及びL鎖 isoformの発生過程における発現様式 113
江橋 節郎
21. ウサギ骨格筋トロポニン成分の局在 124
大槻 磐男
22. 再生筋における筋蛋白質の分化 127
嶋田 裕
23. 骨格筋の発生・成長に伴うミオシンアイソザイム
及びC-タンパク質の分子種変異 135
大日方 昂
24. ニワトリ胸筋の“Native High MW Protein” 141
丸山 工作
25. ジフテリア毒素によるEF2の
ADPリボシル化を抑制する因子と筋発生におけるその変化 144
真崎 知生

26. 脱神経及び神経再生による支配筋の
 分離筋小胞体膜の Ca-uptake 筋について 149
 酒井敏夫

VIII Proteinase

27. ニワトリ発生における筋組織プロテアーゼの動態 157
 高橋健治
28. 骨格筋のチオールプロテアーゼインヒビターの
 諸性質と筋ジストロフィー症における活性変動 162
 勝沼信彦
29. 筋肉代謝網に対する酵素阻害物質の影響 168
 青柳高明
30. 筋発生分化におけるプロテアーゼの役割 173
 今堀和友
31. Ca 依存性プロテアーゼの生体内での作用 178
 杉田秀夫

I 特別レポート

- 1 ジストロフィ・hamsterに関する知見 3

1 ジストロフィ・ハムスターに関する知見

野々村 禎 昭

ジストロフィ・ハムスターは 1962 年, Hom-burger らによってはじめて導入された。¹⁾ジストロフィ実験動物としてはマウス, 鶏に遅れて検討されたわけであるが, そのいくつかの特徴によって筋ジストロフィ実験動物としては秀れたものであり, 我国においても今後もっと利用すべきものとする。先ず簡単にこれ迄得られている知見をまとめておく。

遺伝型はもっとも単純な常染色体劣性型である。はじめは BIO 1.50 line としてとられたが, 現在は BIO 14.6 line という系が広く用いられており, この系は白色化してあるので利別が容易である。ジストロフィ・マウス, 鶏と較べて異常の発現が筋細胞に限局されるのが特徴であり, 骨格筋だけでなく心筋にも障害が発現する。

筋障害の発現は緩徐であり, 心筋障害に対する代償として心肥大が生後 100 日位よりはじまり, 心不全をおこして死に到るが 180 日位から死亡するものが出, 一年位の経過では全く死亡する。この間血中 CPK 値は生後 30 日頃より上昇しはじめ 70~80 日頃ピークに達し以後少し減少したまま或る高値を維持する。他の初期診断法としては筋肉の生検法, 水浴運動法などがあるが容易ではない。最近, 舌の下側部に 1~5 mm の白斑の出現が舌筋障害の可視化であり, 心筋障害の発現と平行化するといわれている。²⁾

心筋障害に関して Bhan らは³⁾ミオシン軽鎖-2 に特異的な蛋白分解酵素がジストロフィ・ハムスターの心筋では増加していることを報告しその精

製を行った。心筋障害が進行し, 壊死部分が広がっていくと共に心筋ミトコンドリア中のカルシウムイオン含量が増加していく。⁴⁾

本研究においてはジストロフィ・ハムスターの主として骨格筋の各種を経時的に光顕レベル及び電顕レベルで観察し組織的变化を概観することを試みた。

材料と方法 材料として BIO 14.6 ジストロフィ・ハムスター雄を用いた。各種筋を腱付きでとりだし, 齒科用ワックス上に生体長迄伸展して固定し, 4%グルタルアルデヒド, 0.135 M カコジル酸緩衝液で 1 時間前固定し, 緩衝液で洗い標本をはずし, 細切する。1%オスミック酸・カコジル緩衝液で 45 分後固定後, 水洗, 1%酢酸ウランでブロック染色後アルコール・アセトン脱水しエポキシに包埋した。標本は厚切してトルイジンブルー染色し光顕下で観察し, 薄切したものは鉛染色して電顕下で観察した。心臓は動脈切断後そのままグルタルアルデヒド固定し, 30 分後心房, 心室にわけ, 細切してさらに 30 分固定し, 以下他骨格筋と同様に処理した。骨格筋の障害程度を測るのは主として横断切片光顕観察をもちい, 縦断切片のものもこれに加えた。

骨格筋組織障害度の判定は光顕下観察で Hom-burger ら⁵⁾に従い, 光顕で不確かなところは連続切片の電顕観察で確認した。判定は次の様になる。

正常(+) 異常全くなし

疑異常(±) 縦断 100 細胞中 4 以下核列状配列, 又は横断 100 細胞中 4 以下の中心核, 筋紡錘, 核周辺空孔数の増加

軽度異常(+) 上記同様の变化及び 100 細胞中 4 以上

* 東京大学医学部第二薬理

の核列状配列と中心核

中程度異常(卅) 長い核列状配列と100横断細胞中
8以上の中心核

空胞化を伴った核の細胞外突出

高度異常(卅卅) 多数の中心核, pyknosis や fra-
gmentation, hyperchromatosis 等
の核異常

極度異常(卅卅) 壊死細胞出現, 再生細胞の出現, マ
クロファージの浸出, 間質組織の増殖

一応この判断規準に従って, 77日, 97日, 110日各時期の各種骨格筋を判定した。同時に心筋も心房筋, 心室筋にわけて骨格筋同様固定包埋し切片をつくって観察した。77日の数種の筋をホモジェナイズして, 微量二次元電気泳動にかけ, 主として酸性蛋白質側についてコントロールとジストロフィーの収縮蛋白質パターンについて検討した。結果と考察 各時期にわたって心房筋には著しい変化は認められなかった。心室筋は全く正常の場所もあった。この様に比較的正常な場所での Intercalated-Disk についても特に間隙が広がっているようなことはなかった。独立したブロックの約半数の心室筋では異常が認められた。これらの場所ではポリゾームが増加していた。細胞内間隙がみられ, 異常の強いところでは空胞変性が認められた。この様な場所では, Intercalated-Disk 間隙が広がっていたが, これは細胞変性の結果のように思われた。

骨格筋としては上肢筋, 肩筋, 腹直筋, 横隔膜各種下肢筋と, 食道横紋筋の12種の筋を調べた。最終結果は表1に示すが, 全ての筋が少くとも77日以降においては異常像を示していた。

中心核は異常の判定にもっとも容易である(第1図)。再生細胞に中心核が認められることから, 中心核の存在を再生現象を考えるグループもあるが, 少くともジストロフィーハムスターにおいては再生とは全く関係なく生来このような状態に筋細胞があったと思われる。理由は全ての組織に中心核をもった細胞が認められ, 肩筋や背筋の様に異常度の高い組織では全ての細胞が中心核をもっ

ている。これを再生とすると全て再生細胞ということになってしまう。一方一部中心核がある細胞組織でも, いわゆる幼若, 未熟型の再生細胞が共存しているような像はほとんどなく, 真の再生像の中に中心核があるようなパターンが認められていない。以上の様な理由でジストロフィーハムスター骨格筋に認められる中心核は特徴的な変化で本来発達途上で周辺核となるべき機構が失われて中心核のまま細胞が成長してしまったと考えられる。本来の骨格筋でない食道横紋筋にも異常が認められた。この細胞は直径が小さいので横断像では中心核を決めるのが難しいと考えられるが, 実際は周辺核とはかなり異なっているので比較的容易に判定出来る。食道横紋筋は下端附近迄存在しているが, 異常は中心核だけでなく壊死細胞を含んでいるものまであり, 又縦断像では第2図にみるように仮りに核が周辺にあっても列状配列をしているので容易に異常といえる。この列状配列は長く続くことが多いので, 横断像で正常の周辺核の出現頻度に較べて圧倒的に中心核の出現が多くみえる理由である。第2図にみられるような核小体の多数が認められることが多い。核の異常としては核周辺空孔があるが, Homburger はこれを(卅)より入れているが, むしろ(卅)以上の異常度の高いものに多い。

中心核の他はほとんど正常の細胞が多い。しかし電顕観察によってポリゾームが正常に較べて多数存在することがわかる。さらに膜結合型リボゾーム又は粗面小胞体も存在することもわかる。これは正常筋では生後70日以降ではほとんど認められないものである。筋紡錘が多出するといわれているが, 確かに比較的頻ぱんに筋紡錘を認めることが出来た。

壊死を生じている細胞の現われ方に3種類認められた。ひとつは比較的異常の少ない細胞群の中に突然壊死細胞が出現しているような型で, この時は空胞変性的なものが多い。他は異常度の高い細胞群の中に生じるもので, 筋線維走行の乱れの著しいものであるが, 縦断像でこの経過をたどって

