

厚生省  
神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー症動物の開発・  
供給に関する研究

野村班

昭和57年度研究報告書

昭和58年3月

## 研究報告書作成にあたり

厚生省神経疾患研究依託費による「筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究」班は昭和57年度をもって3年間の研究期間を終了し、一応の成果をあげることができました。しかし、ヒト疾患のモデルとなる動物の開発は一朝一夕にできるものではなく、また、モデル動物の生産・供給は研究がおこなわれている限り続けねばなりません。そこで今年度より「筋ジストロフィー症動物の開発・供給」班が発足することになりました。

モデル動物の開発には異常形質の発見、特性の分析、遺伝的背景の均一化など、極めて長い年月を要するものであります。また、飼育・維持方法によっては疾病感染により実験に供することができなくなるなどの問題点もあり、モデル動物の飼育・管理の方法も併せて実施する必要があります。従って、この班の目的は、前の班での目的、1) 筋ジストロフィー症モデル動物の生産・供給、2) 新しい筋ジストロフィー症モデル動物の開発・改良、および 3) 筋ジストロフィー症動物の飼育管理方法の検討、をそのまま引きつぐことになりましたが、本研究班では哺乳動物におけるモデル動物の開発・改良に一層の重点をおくために、一部班員の交代が行なわれました。

本研究班では、筋ジストロフィー症研究の進展のため、より良いモデル動物の開発・改良を目指すとともに、大量の実験動物を供給できるよう努力を致す所存であります。そのために、新しい技術、例えば発生工学の手法をもちいてモデル動物を開発するなど、の検討も進めております。

今後も、諸班の先生方のご協力をお願い申しあげる次第であります。

おわりに、ご協力下さった班員各位、ならびに本研究委託費の取扱いに種々お世話いただいた厚生省当局、国立神経センター、日本筋ジストロフィー協会の方々に心から感謝いたします。

昭和58年3月

野 村 達 次

# 目 次

I 筋ジストロフィー症に関する文献調査 .....	1
野村達次	
II 筋ジストロフィー症モデル動物の開発	
1. 新しい筋ジストロフィー症マウスの一般症状並びに dy マウスおよびmyd マウスとの比較 .....	7
辻 繁 勝	
2. 筋ジストロフィーハムスターの繁殖ならびに改良について .....	17
斉藤 宗 雄 江崎 孝三郎	
3. 筋ジストロフィー鶏骨格筋の再生能 .....	23
杉田 秀 夫	
4. 筋ジストロフィー鶏の骨および鰓後体C細胞 .....	45
菊池 建 機	
5. Fayoumi 鶏に出現した遺伝性の神経疾患 .....	55
水谷 誠	
6. ニワトリの行動異常トレンブラー (trembler) に 関する研究 .....	65
若杉 昇	

# I. 筋ジストロフィー症に関する文献調査 (1982)

野村 達次\*

研究協力者 大田 佑\*

筋ジストロフィー症モデル動物の開発研究の一環として「疾患モデル動物」、「哺乳類、トリ類における筋ジストロフィーとその近縁疾患」ならびに「筋ジストロフィーとその近縁疾患に関する動物実験」についての文献調査をおこなった。それらの中から、筋ジストロフィーに関する文献(1982年分)を以下に紹介する<sup>1-3)</sup>。

## M I C E

(Study of membrane proteins in skeletal muscle of normal or dystrophic mice. Effects of isaxonine phosphate.) Lucas-Heron, B. and Guiheneuc, P. *Nouv. Presse. Med.*, 11(16), 1250-3, 1982.

Glucagon immunoreactivity in plasma from normal and dystrophic mice. Ahren, B. and Lundquist, I. *Diabetologia*, 22(4), 258-63, 1982.

X-ray diffraction from striated muscles and nerves in normal and dystrophic mice. Kurg, T., Stinson, R.H. and Millman, B.M. *Muscle Nerve*, 5(3), 238-46, 1982.

Calcium-mediated myopathy at neuromuscular junctions of normal and dystrophic muscle. Leonard, J.P. and Salpeter, M.M. *Exp. Neurol.*, 76(1), 121-38, 1982.

Normal function in sarcoplasmic reticulum from mice with muscular dystrophy. Mrak, R.E. and Fleischer, S. *Muscle Nerve*, 5(2), 143-51, 1982.

Purine nucleotide cycle enzymes in dystrophic and normal mouse muscle. Fitt, P.S. and Parliament, M.B. *Biosci. Rep.*, 2(3), 177-83, 1982.

Successful treatment of murine muscular dystrophy with the proteinase inhibitor leupeptin. Sher, J.H., Stracher, A., Shafiq, S.A. and Hardy-Stashin, J. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 78(12), 7742-4, 1981.

Observations on the effects of low frequency electrical stimulation on fast muscles of dystrophic mice. Vrbova, G. and Ward, K. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 44(11), 1002-6, 1981.

\* (財)実験動物中央研究所

The number and size of motoneurons in the soleus motor nucleus of the normal and dystrophic (C57BL/6J DY2J/DY2J) mouse. Parry, D.J., McHanwell, S. and Haas, N. *Exp. Neurol.*, 75(3), 743-54, 1982.

Thyroxine reverses deficits of nerve growth factor and epidermal growth factor in submandibular glands of mice with muscular dystrophy. Watson, A.Y., Radie, K., McCarthy, M., Larsen, P.R. and Murphy, R.A. *Endocrinology*, 110(4), 1392-401, 1982.

Adenylate cyclases in vertebrate retina: Enzymatic characteristics in normal and dystrophic mouse retina. Ferrendelli, J.A., Campau, K.M. and De Vries, G.W. *J. Neurochem.*, 38(3), 753-8, 1982.

The purine nucleotide profile in mouse, chicken and human dystrophic muscle: An abnormal ratio of inosine plus adenine nucleotides to guanine nucleotides. Shuttlewood, R.J. and Griffiths, J.R. *Clin. Sci.*, 62(1), 113-5, 1982.

Plasma membrane changes in murine cardiomyopathy. Monckton, G., Chisholm, S.A. and Pehowich, E. *J. Comp. Pathol.*, 91(3), 447-50, 1981.

Endocytosis and lysosomal enzyme activities in dystrophic muscle: The effect of denervation. Libelius, R., Lundquist, I., Tagerud, S. and Thesleff, S. *Acta Physiol. Scand.*, 113(2), 259-61, 1981.

Intracellular activity of potassium in normal and dystrophic skeletal muscle from C57BL/6J mice. Shalton, P.M. and Wareham, A.C. *Exp. Neurol.*, 74(3), 673-87, 1981.

Creatinine excretion as an index of myofibrillar protein mass in dystrophic mice. Murray, C.E., Warnes, D.M., Ballard, F.J. and Tomas, F.M. *Clin. Sci.*, 61(6), 737-41, 1981.

In vivo morphometric analysis of muscle microcirculation in dystrophic mice. Burch, T.G., Prewitt, R.L. and Law P.K. *Muscle Nerve*, 4(5), 420-4, 1981.

Abnormal distribution of skeletal muscle acetylcholinesterase molecular forms in dystrophic mice. Skau, K.A. and Brimijoin, S., *Exp. Neurol.*, 74(1), 111-21, 1981.

Myelination-dependent axonal membrane specializations demonstrated in insufficiently myelinated nerves of the dystrophic mouse. Wiley-Livingston, C.A. and Ellisman, M.H. *Brain Res.*, 224(1), 55-67, 1981.

Effects of low frequency electrical stimulation on enzyme and isozyme patterns of dystrophic mouse muscle. Reichmann, H., Pette, D. and Vrbova, G. *Febs. Lett.*, 128(1), 55-8, 1981.

## CHICKENS

Lipid composition of transverse tubular membranes from normal and dystrophic skeletal muscle. Sumnicht, G.E. and Sabbadini, R.A. Arch. Biochem. Biophys., 215(2), 628-37, 1982.

Stereoscopic views of a dystrophic sarcotubular system: Selective enhancement by a modified golgi stain. Scales, D.J. and Yasumura, T. J. Ultrastruct. Res., 78(2), 193-205, 1982.

Stretch-induced growth in chicken wing muscles: Effects on hereditary muscular dystrophy. Ashmore, C.R. Am. J. Physiol., 242(3), C178-83, 1982.

Comparison of the molecular forms of the cholinesterases in tissues of normal and dystrophic chickens. Lyles, J.M., Silman, I., Di Giamberardino, L., Couraud, J.Y. and Barnard, E.A. J. Neurochem., 38(4), 1007-21, 1982.

The chicken dystrophic model: Does hypersensitivity to glucocorticoids cause atrophy? Dubois, D.C. and Almon, R.R. Exp. Neurol., 75(3), 555-65, 1982.

Mechanics and energetics of muscle contraction in normal and dystrophic chickens. Polinski, W.J. and Rall, J.A. Am. J. Physiol., 242(1), C19-24, 1982.

Demonstration of a cellular defect in the thymus of hereditary muscular dystrophic chickens. Kline, K. and Sanders, B.G. Thymus, 4(1), 9-18, 1982.

The purine nucleotide profile in mouse, chicken and human dystrophic muscle: an abnormal ratio of inosine plus adenine nucleotides to guanine nucleotides. Shuttlewood, R.J. and Griffiths, J.R. Clin. Sci., 62(1), 113-5, 1982.

Thymic mast cell deficiency in avian muscular dystrophy. Befus, A.D., Johnston, N., Nielsen, L., Bienenstock, J., Butler, J. and Cosmos, E. Thymus, 3(6), 369-76, 1981.

Biochemical and cytochemical comparison of surface membranes from normal and dystrophic chickens. Malouf, N.N., Samsa, D., Allen, R. and Meissner, G. Am. J. Pathol., 105(3), 223-31, 1981.

Isolation of multiple genomic sequences coding for chicken myosin heavy chain protein. Robbins, J., Freyer, G.A., Chisholm, D. and Gilliam, T.C. J. Biol. Chem., 257(1), 549-56, 1982.

Evidence that the actin site is impaired by  $Ca^{2+}$ -activated degradation of the heavy chain of dystrophic myosin. Pemrick, S.M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 102(3), 877-94, 1981.

Rate of axoplasmic transport in the dystrophic chicken. Stromska, D., Ochs, S. and Muller, J. *Exp. Neurol.*, 74(2), 530-47, 1981.

Erythrocyte alloantigens in the storrs strain of hereditary muscular dystrophic chickens and segregating testcross progeny. Sanders, B.G., Kline, K. and Briles, W.E. *J. Hered.*, 72(4), 279-81, 1981.

Baclofen, Procainamide, verapamil, and prenylamine in hereditary muscular dystrophy of the chicken. Entrikin, R.K., Patterson, G.T. and Wilson, B.W. *Exp. Neurol.*, 74(1), 86-92, 1981.

Molecular forms of the cholinesterases inside and outside muscle endplates. Jedrzejczyk, J., Silman, I., Lyles, J.M. and Barnard, E.A. *Biosci. Rep.*, 1(1), 45-51, 1981.

#### HAMSTERS

Tracer and marker techniques in the microscopic study of skeletal muscles. Karpati, G., Carpenter, S. and Pena, S. *Methods Achiev. Exp. Pathol.*, 10, 101-37, 1981.

3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in normal and dystrophic hamsters. Greenough, M.C. and Boegman, R.J. *Biochem. J.*, 201(3), 501-4, 1982.

Impaired muscle differentiation in hamster hereditary polymyopathy: A study in explant cultures. Tautu, C. and Jasmin, G. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 41(1), 87-103, 1982.

Parathyroid ablation in dystrophic hamsters. Effects on Ca content and histology of heart, diaphragm, and rectus femoris. Palmieri, G.M., Nutting, D.F., Bhattacharya, S.K., Bertorini, T.E. and Williams, J.C. *J. Clin. Invest.*, 68(3), 646-54, 1981.

#### OTHERS

Collagen levels in tissues from selenium deficient ducks. Brown, R.G., Sweeny, P.R. and Noran, E.T., Jr. *Comp. Biochem. Physiol. (A)*, 72(2), 383-9, 1982.

(Glutathione peroxidase activity in sheep erythrocytes as dependent on the selenium supply and selenium level of the blood.) Wiesner, E., Berschneider, F., Hubner, B., Willer, H. and Willer, S. *Arch. Exp. Veterinarmed.* 36(2), 211-9, 1982.

Comparative effects of sodium selenite and selenomethionine upon nutritional muscular dystrophy, selenium-dependent glutathione peroxidase, and tissue selenium concentrations of turkey poults. Cantor, A.H., Moorhead, P.D. and Musser, M.A. *Poult. Sci.*, 61(3), 478-84, 1982.

Effect of vitamin E deficiency on rabbit intramuscular collagen. Chizzolini, R., Bracchi, P., Cabassi, E. and Maggi, E. Am. J. Clin. Nutr., 35(5), 1018-22, 1982.

#### 文 献

- 1) 野村達次 : 筋ジストロフィー症に関する文献調査(1978), 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究」班, 昭和54年度研究報告書, 1-7, 1979.
- 2) 野村達次 : 筋ジストロフィー症に関する文献調査(1979), 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究」班, 昭和55年度研究報告書, 1-15, 1980.
- 3) 野村達次 : 筋ジストロフィー症に関する文献調査(1980, 1981), 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究」班, 昭和56年度研究報告書, 1-12, 1981.



## Ⅱ. 筋ジストロフィー症モデル動物の開発

### 1. 新しい筋ジストロフィー症マウスの一般症状並びにdyマウスおよびmydマウスとの比較

辻 繁 勝\*

研究協力者 早 川 純一郎\*\*

#### はじめに

ヒトの進行性筋ジストロフィー症の病因解明のための研究手段の一つとして類似の症状を自然発症する疾患モデル動物の存在が近年その重要性を増している。然し、その一方では既に幾つか開発されている所謂「疾患モデル動物」の示す発現症状がかならずしもヒトの筋ジストロフィー症のそれと一致しない例が多いことから、これら動物モデルを用いての病因追求研究の有用性を疑問視する研究者も又少なくない。

ヒト以外の動物に見られる筋ジストロフィー症がたとえ同一の病因によって発現され、且巨視的に観て類似の症状を呈したとしても、元来種の異なる、従って体制や生理機構の違うヒトの筋ジストロフィー症の発現症状とは微細な点で差異があることは至極当然なことであり、これによって病因そのものの相違を論ずることは、両者の病因遺伝子そのものの相同性を確認する手段の困難な現段階では時期尚早と考えなければならない。むしろ疾患モデル動物を用いた研究の本来目的とする所は、ヒトを含めて各種動物の間に見られる類似の筋ジストロフィー症に共通な発現症状を追求することに依って疾患に対する一般的理解を深め、個々の動物での病因解明を行うことであり、又、このことによって始めてヒトの疾患の持つ特殊性、或いは複雑性も理解出来、病因解明への手掛りともなるものと期待される。この様な意味からも動物における自然発症筋ジストロフィー症をより多く作り出し、疾患モデル動物としてその有用性を開発することは、ヒトの筋ジストロフィー症の病因解明にとって緊急且重要な課題の一つであると考えられる。我々は最近金沢大学動物実験施設で飼育中のSM/J系マウス・コロニー中に発見された突然変異体が進行性筋ジストロフィー症状を発現することを知ったので、この変異体マウスの疾患モデル動物としての有用性を開発する試みを行なっている。又一方、既に知られている自然発症筋疾患マウスのうち発現症状が互に類似していると思われるdyマウス(*dystrophia muscularis*)<sup>1)</sup>およびmydマウス(*myodystrophy*)<sup>2)</sup>と新しい変異体マウスの発現症状を比較検討することによって、3者に共通な症状および、それぞれの持つ特徴点を追求し、病因解明に一步近付こうと計画している。本年度は新しい変異体マウスの示す一般症状、組織像変化、骨格筋中血清中および脳中でのマーカー酵素群の活性変動などを測定し、dyマウス或いはmydマウスのそれに就いて比較検討を行なった。

\* 和歌山医科大学 第二生理学教室

\*\* 金沢大学医学部 動物実験施設

## 材料と方法

新らしく見出された筋ジストロフィー症マウス (SM/J-mut 系、mut マウスと仮称) は金沢大学、医学部動物実験施設より提供された保因マウスを、又 dy マウスは C57BL/6J-dy 系、myd マウスは MYD/J-my d 系ヘテロペアーを Jackson 研究所より輸入し、当教室で自家繁殖して得たマウスをそれぞれ 8~12 週齢で実験に使用した。

血清は断頭採血後、30 分間室温放置後 2,000 rpm 10 分遠心分離して取出し、直ちに酵素標品として使用した。後肢筋は断頭瀉血後、すみやかに採出し、10 倍容の 0.32 M 蔗糖液に入れ、テフロンホモジナイザーでホモジナイズし、通常の Schneider 法に従って可溶性分画を分離し、酵素活性測定に使用した。脳中のミエリン局在酵素の活性測定には断頭瀉血後採出した脳から嗅脳を除いたものを 20 倍容の 0.32 M 蔗糖液に入れ、ホモジナイズする。以下 Norton 法<sup>3)</sup>に従って purified myelin 分画を分離し、更に 0.3 mg/ml の Triton X-100 液を加えて 1 時間放置して膜構造の破壊を行ない、ホモジナイズしたものを CNP 酵素 (2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase) 活性測定用標品として使用した。又 CEH 酵素 (cholesterol ester hydrolase) 活性測定用標品には purified myelin 分画をタウロコール酸 2  $\mu$  moles/ml を含むリン酸緩衝液中に浮遊させ、1 時間放置後ホモジナイズしたものを使用した。

酵素活性測定は以下の諸法に準じて行なった。即ち Creatine phospho kinase (CPK) は Hess らの UV 法<sup>4)</sup>、Glutamate-Oxaloacetate transaminase (GOT) は Karmen 法<sup>5)</sup>、Lactate dehydrogenase (LDH) は Wroblewski 法<sup>6)</sup>、Pyruvate Kinase (PK) は Tanaka らの方法<sup>7)</sup>、Ca<sup>++</sup>-dependent neutral protease (CANP) は Dayton 法<sup>8)</sup>、CNP は Sogin 法<sup>9)</sup>、CEH は遊離したコレステロールをコレステロールオキシダーゼ法<sup>10)</sup>によって定量する方法<sup>11)</sup>がそれぞれ用いられた。又尿中のクレアチンおよびクレアチニン量測定は Jaffe の方法<sup>12)</sup>、酵素標品中の蛋白含量は Lowry 法によってそれぞれ測定した。

## 結果

**新しい変異体マウスの示す一般症状** : 新たに見出された突然変異体 (mut マウス、仮称) に始めて明確な症状が発現するのは生後 3 週間頃で、まず後肢の引き摺りが現われる。次に後肢に痙攣発作が頻繁に見られる様になり、次第に症状が進行し、5 週齢を過ぎると後肢の完全な麻痺および固直状態が認められ、終には身体全体に著しいい瘦を来たすのが主徴である。又後肢筋の症状進行に並行して眼瞼筋の著しい萎縮状態および白内障がしばしば発現するが dy マウスの特徴的症状の一つである脊椎の著しい彎曲 (Kyphosis) は、この mut マウスではそれ程顕著ではない。症状の進行は他の筋ジストロフィー症マウスに比較してかなり速く、大体 4 ヶ月齢迄には殆んど疾病マウスが全身のい瘦および四肢の固直を来たして死亡する。死因は主として摂食不能および呼吸筋の麻痺によるものと思われる。

**新しい変異体マウス後肢筋での組織像変化** : mut マウスの萎縮骨格筋における組織像の変化に就いては、8 週齢の疾病マウスから gastrocnemius 筋および tibialis anterior 筋を採出し、H.

