

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59年度研究報告書

昭和60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開発・供給」班は本年度をもって初期の計画の3年間を終了することになりました。本研究班は神経疾患ならびに筋ジストロフィー症のモデル動物の1) 開発・改良、2) 生産・供給、3) 飼育管理方法の検討を目的として組織されたものであります。

3年間にわたる各班員の多大な努力によって、多くの神経・筋異常動物について、それらの成因の解明とヒト疾患との対比が行われ、それによっていくつかの有望なモデル動物が開発されました。また、従来から利用されていたモデル動物の改良や、それらの飼育管理、生産・供給体制の整備に関しても多くの成果をあげることができました。

しかし、モデル動物の開発には長い年月と、多くの経費がかかるものであります。また、実験動物学分野、育種学分野の研究者と各疾患についての医学分野の専門的研究者との密接な連携が必要であります。今後も諸先生方のご協力をお願い申しあげる次第であります。

3年間の研究班を終わるにあたり、多大の成果をあげていただいた班員各位、ならびに本研究依託費の取扱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感謝し、心から御礼申し上げます。

昭和60年3月

野 村 達 次

目 次

I. 「筋ジストロフィー症動物の開発・供給に関する研究」総括報告書	1
野村達次	
II. 筋ジストロフィー症に関する文献調査(1984)	5
野村達次	
III-1. 筋ジストロフィー症モデル動物の開発 <i>mdx</i> マウス骨格筋の病理学的研究	13
杉田秀夫	
研究協力者 田辺雄三	
埜中征哉	
江崎孝三郎	
野村達次	
III-2. 進行性に筋力低下を示す突然変異マウスの骨格筋に見られる Vacuole 形成	33
辻繁勝	
III-3. 筋ジストロフィー症マウスと小人症マウス：筋成熟成長障害の比較	45
戸塚武	
研究協力者 渡辺貴美	
浦本勲	
III-4. キメラマウスを用いた筋ジストロフィー症の研究	53
勝木元也	
横山峯介	
III-5. 震えを伴う起立不能症鶏の病態と遺伝	57
富田武	
研究協力者 若菜茂晴	
加藤重夫	
若杉昇	
渡辺徹	

Ⅲ-6. ファヨウミ種において出現した筋ジストロフィー鶏について 77

水谷 誠
藤田 武久
埜中 征哉
杉田 秀夫

Ⅲ-7. 筋ジストロフィー鶏骨格筋の脂質と血管系の構築 93

研究協力者 菊池 建機
齋 喜明
菅原 幸浩
大和田 修一

N-1. 筋ジストロフィーハムスターの計画繁殖ならびに系統育成について 111

研究協力者 斉藤 宗男
田中 亨
松崎 哲也

N-2. C57BL/10Sc - *mdx* の飼育・繁殖 115

研究協力者 斉藤 宗男
江崎 孝三郎
日置 恭司

N-3. 体外受精法による筋ジストロフィーマウス
(C57BL/6-*dy/dy*) の作品 119

研究協力者 江崎 孝三郎
横山 峯介

I. 「筋ジストロフィー症動物の開発・供給に関する研究」総括報告書

野村 達次*

研究目的ならびに目標

本研究班は神経疾患ならびに筋ジストロフィー症モデル動物の①開発・改良、②生産・供給、③飼育管理方法の検討を目的として、次の諸目標をたてた。

1. モデル動物の開発

マウス、ウズラ、ニワトリを対象として、新しいミュータント形質の探索とそれらの成因の解明、モデルとしての評価をおこなう。また、外国で発見されたモデル動物についても積極的に情報を収集し、必要な動物の導入をはかる。

2. モデル動物の改良

筋ジストロフィーニワトリおよびハムスターにおける疾患動物と対照正常動物の遺伝的背景を均一化する。また、筋ジストロフィー遺伝子と他の異常遺伝子の複合動物を作成しその特性を検索する。

3. モデル動物の生産・供給

筋ジストロフィーマウス、ハムスター、ニワトリの安定した生産・供給を行う。また、従来は症状の発現によって、正常と異常を区別して実験に供試していた dy マウスを、 dy ホモであることの確実な胎子および新生子の生産方法を確立し、発症以前の dy マウスの使用を可能にする。

4. 飼育管理方法の検討

筋ジストロフィーニワトリの飼育における感染症の防弊対策を確立する。

研究成果

1. モデル動物の開発

(1)新しいモデル動物の開発：マウスにおいては、前外側下腿筋群萎縮 (pma)、 dy 遺伝子の複対立突然変異 (dy^k)、脂質異常を伴う筋力弱化学症の3種の変異が、ウズラにおいては、糖尿病 (gs) および頭部骨格異常の2種のミュータントが、ニワトリにおいては2種の異なる神経疾患および筋ジストロフィー (am) に類似する筋疾患の計3種のミュータントが発見され、これらの異常発現の現因の検索ならびにモデル動物としての評価がおこなわれた。

前外側下腿筋群萎縮マウスにおいては、神経病理学的検索によって、総腓骨神経が欠如しているが、それは変性脱落したものではなく、総腓骨神経に分枝すべきものが分枝せず他の神経内に迷走したものと判断された。また、筋の病理像などと考えあわせると、このマウスは Werdnig-Hoffmann 病の神経と筋の分化の関連をみるうえで、あるいは先天性多発性関節拘縮症の病因を考えるうえで有用なモデルであると考えられた。

筋ジストロフィーマウス (dy^k) に関しては遺伝分析の結果、 dy 遺伝子座の新しい突然変異であることが判明した。 dy 遺伝子座においてはすでに dy と dy^{23} の2つの突然変異が発見され、発症時期や症状の程度が異なることが報告されている。新しく発見された dy^k を加えて比較することによって、ヒト疾患の個体差などの解明

* (財) 実験動物中央研究所

のてがかりになることが期待される。

脂質代謝異常をとともなう筋力弱化ミュータントにおいては、加齢と共に体重の異常増加ならびに高血糖を示し、さらに高脂血症、骨格筋中への中性脂肪、コレステロール、ルン脂質の蓄積がみとめられた。病理組織学的には筋線維中に autophagia による remmed 型の vacuole の形成が認められた。これらの点からこの異常はヒトの distal myopathy に類似するものと推察された。

糖原病ウズラについては種々の検索によって、酸性マルターゼ欠乏による筋・肝臓へのグリコーゲン蓄積症であり、ヒトの糖原病Ⅱ型に類似し、モデル動物として極めて有用なものと考えられた。

頭部骨格異常ウズラにおいては、耳口異常などが見られることから脳の形態あるいは機能異常を伴っていると期待されるが、さらに検索を進める必要がある。

ニワトリに発見された第1の神経疾患では中枢神経系とくに大脳における血管変性ならびに頸部脊髄の変性・脱落が特徴であり、第2の神経疾患 (trembler) では小脳のプルキニエ細胞の異常が特徴であることが判明したがいずれもヒト疾患との比較が今後の課題である。

筋ジストロフィー様の異常は、すでに報告されている筋ジストロフィーニワトリ (*am*) と同じ遺伝子座の遺伝子に支配されていることが判明した。しかし、従来の筋ジスニワトリと比較して、Opaque fiber 数が多いこと、胞体内空胞の少ないことが観察され、新しい系統の育成が期待される。

(2) モデル動物の導入：筋ジストロフィーのモデル動物としては外国で開発されたものも多い。そこで研究者の要望に応じてそれらの導入も積

極的に実施した。筋ジストロフィーニワトリはすでに導入されていたが、今期は筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 系をアメリカから、UMX 7.1 系をカナダから導入し生産・供給をおこなった。さらに、性染色体上に位置する遺伝子によって支配され、ヒトの Dushenne 型筋ジストロフィーとの相同性が期待される C 57 BL/10-*mdx* マウスをイギリスから導入し、生産を開始した。

2. モデル動物の改良

(1) 筋ジストロフィーハムスターの改良：BIO 14.6 ハムスターとコントロールとして使用されている BIOFIB ハムスターは遺伝的背景が互いに異なっている。そこで遺伝的背景が近似したコントロール系を作出するために、BIO 14.6 系のジストロフィー因子を除いた正常系を育成した。現在6世代を経過し、あと2-3世代で実験に使用することが可能になる予定である。

(2) 筋ジストロフィーニワトリの改良：筋ジストロフィー 413 系と正常ニワトリ 412 系はそれらの育成過程で互いの遺伝的背景が異なってきた。そこで、わが国で系統として確立されているニワトリ、白色レグホーン岩谷系およびファイオミー種へ筋ジス遺伝子 (*am*) を導入することを実施した。

(3) 筋ジス遺伝子と矮小遺伝子の複合：マウスおよびニワトリにおいて、筋ジス遺伝子と矮小遺伝子の両遺伝子を同時にもつ動物を作出した。これらの動物では筋ジストロフィーの発症所見が異なることが判明した。

(4) 発生工学技術の応用：モデル動物の開発にこの技術を応用するために、キメラ動物の作出等の基礎的検討をおこなった。

3. モデル動物の生産・供給

(1)動物の生産・供給：筋ジストロフィーマウスおよびニワトリは一時期を除き順調に生産・供給された。

ハムスターについては、従来輸入に頼っていたが、生後5週齢以上のオスに限られるという制約があったので、国内での生産体制の確立を検討した。その結果、来期からは国内での生産・供給が可能になった。

新たに導入した、mdx マウスについては、種動物の準備ができ、小規模であれば生産・供給できる体制にある。

(2) dy ホモマウスの生産：発症後でなければ dy ホモを識別することが出来ないために、発症前の dy マウスを用いる実験に大きな支障があった。そこで、dy ホモマウスの卵および精子を採取し、体外で人工的に受精させ、一定時期まで発生させた胚を正常偽妊娠メスの子宮内に移植した。移植胚の約30%が生まれ離乳までそだった。この手法によって、dy ホモの確実な胎子あるいは新生子を実験に使用することが可能になった。

4. 飼育管理方法の検討

(1)筋ジスニワトリの飼育方法：コクシジウム症の感染によって、実験に大きな障害となっていたが、これの予防方法を検討し、解決した。

(2)筋ジスハムスターの飼育方法：Wet tail 病が筋ジスハムスター生産の障害になっている。その対策を検討中であるが満足できる対策はみつかっていない。

未解決の問題点

1. モデル動物の開発改良での問題点

(1)新しいミュータント形質が次々に発見されたが、それらの成因の解析、ヒト疾患との比較やモデル動物としての評価は十分におこなわれたとはいえない。一方、異常形質の発見者はかならずしもその異常形質についての専門家ではない。従って、異常形質についての上記の解析や評価を行うことが困難なことが多い。各異常についての医学分野からの協力を得て困難な点を解決したい。

(2)バイオテクノロジーはモデル動物の開発にも有効な手段になると考えられる。しかし現在ただちに応用するためには、未解決な点が多いので、基礎的研究をさらに進める必要がある。

2. モデル動物生産・供給での問題点

ハムスターの生産において wet tail 病が障害になっている。SPF 化などによって解決する必要がある。

Ⅱ. 筋ジストロフィー症に関する文献調査 (1984)

野村達次*

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、トリー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、海外における筋ジストロフィーに関する文献(1984年分)を以下に紹介する。^{1~5)}

M I C E

Shivers, R.R., Atkinson, B.G.: The dystrophic murine skeletal muscle cell plasma membrane is structurally intact but "leaky" to creatine phosphokinase. A freeze-fracture analysis. *Am. J. Pathol.*, 116(3), 482-96, 1984.

John, H.A., Purdom, I.F.: Myelin proteins and collagen in the spinal roots and sciatic nerves of muscular dystrophic mice. *J. Neurol. Sci.*, 65(1), 69-80, 1984.

Beitner, R.: Control of levels of glucose 1,6-bisphosphate. *Int. J. Biochem.*, 16(6), 579-85, 1984 (Review).

Wilkinson, M.: Abnormal gonadotrophin release from pituitaries of muscular dystrophic mice and hamsters. *J. Reprod. Fertil.*, 71(2), 463-6, 1984.

Mrak, R.E.: Isolation and characterization of transverse tubule from normal and dystrophic mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 774(1), 35-42, 1984.

Bryers, P.S., Ecob, M.S.: Differentiation in dystrophic muscle cultures from mice of different ages. *Muscle Nerve*, 7(4), 332-6, 1984.

Gisiger, V., Stephens, H.R.: Decreased G4(10S) acetylcholinesterase content in motor nerves to fast muscles of dystrophic 129/ReJ mice: lack of a specific compartment of nerve acetylcholinesterase? *J. Neurochem.*, 43(1), 174-83, 1984.

*財 実験動物中央研究所

- Mussini, E., Colombo, L., De Ponte, G., Marcucci, F.: Low 3-methylhistidine levels in skeletal muscles of genetically dystrophic mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 43(3), 477-86, 1984.
- Reichmann, H., Pette, D.: Enzyme activities and activity profiles in muscle fibers of dystrophic, immature-normal, and adult-normal BL6 mice. *Muscle Nerve*, 7(2), 121-6, 1984.
- Younger, L.E., Silverman, H.: Chronic phenytoin administration alters the metabolic profile of superficial gastrocnemius muscle fibers in dystrophic mice. *Exp. Neurol.*, 84(1), 140-52, 1984.
- Ontell, M., Feng, K.C., Klueber, K., Dunn, R.F., Taylor, F.: Myosatellite cells, growth, and regeneration in murine dystrophic muscle: a quantitative study. *Anat. Rec.*, 208(2), 159-74, 1984.
- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., Moore, K.J.: X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(4), 1189-92, 1984.
- Cossu, G., Eusebi, F., Molinaro, M.: Reduced acetylcholine sensitivity in dystrophic mouse myotubes in vitro. *Muscle Nerve*, 7(1), 73-6, 1984.
- Ward, K.M., Wareham, A.C.: Intracellular activity of sodium in normal and dystrophic skeletal muscle from C57BL/6J mice. *Exp. Neurol.*, 83(3), 629-33, 1984.
- Noireaud, J., Leoty, C.: A comparative study of contractile responses in diaphragm muscles of normal and dystrophic (C57BL/6J dy2J/dy2J) mice. *Exp. Neurol.*, 83(3), 589-603, 1984.
- Bateson, D.S., Parry, D.J.: Motor units in a fast-twitch muscle of normal and dystrophic mice. *J. Physiol. (Lond.)*, 345, 515-23, 1983.
- Grounds, M.D.: Skeletal muscle precursors do not arise from bone marrow cells. *Cell Tissue Res.*, 234(3), 713-22, 1983.
- Wilkinson, M., Manchester, E.L.: Strain differences in brain alpha2- and beta-adrenergic receptor binding in dystrophic mice. *Brain Res. Bull.*, 1(6), 743-5, 1983.
- Volpe, P., Mrak, R.E., Costello, B., Fleischer, S.: Calcium release from sarcoplasmic reticulum of normal and dystrophic

mice. *Biochim. Biophys. Acta*, 769(1), 67-78, 1984.

Lindenbaum, M.H., Livett, B.G.: Acetylcholinesterase molecular forms in C57BL/6J dystrophic mice. *Muscle Nerve*, 6(9), 638-45, 1983.

Semple, J.W., Szewczuk, M.R.: Enhanced natural killer (NK) cell activity and NK-sensitive thymic cells in murine muscular dystrophy. *Cell Immunol.*, 82(2), 316-25, 1983.

Dux, L., Martonosi, A.N.: Membrane crystals of Ca²⁺-ATPase in sarcoplasmic reticulum of normal and dystrophic muscle. *Muscle Nerve*, 6(8), 566-73, 1983.

Gisiger, V., Stephens, H.: Correlation between the acetylcholinesterase content in motor nerves and their muscles. *J. Physiol. (Paris)*, 78(8), 720-8, 1982-3.

Fitzsimons, R.B., Hoh, J.F.: Myosin isoenzymes in fast-twitch and slow-twitch muscles of normal and dystrophic mice. *J. Physiol. (Lond.)*, 343, 539-50, 1983.

Kerr, L.M., Sperelakis, N.: Ca²⁺-dependent slow action potentials in normal and dystrophic mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 245(5, Pt. 1), C415-22, 1983.

Ballard, F.J., Nield, M.C., Tomas, F.M.: Effects of insulin on protein synthesis in muscles from normal and dystrophic mice. *Muscle Nerve*, 6(7), 520-3, 1983.

Bray, G.M., David, S., Carlstedt, T., Aguayo, A.J.: Effects of crush injury on the abnormalities in the spinal roots and peripheral nerves of dystrophic mice. *Muscle Nerve.*, 6(7), 497-503, 1983.

Dangain, J., Vrbova, G.: Elimination of polyneuronal innervation in a fast muscle of normal and dystrophic mice. *J. Physiol. (Lond.)*, 342, 267-75, 1983.

Wirtz, P., Loermans, H.M., Peer, P.G., Reintjes, A.G.: Postnatal growth and differentiation of muscle fibres in the mouse. II. A histochemical and morphometrical investigation of dystrophic muscle. *J. Anat.*, 137(Pt. 1), 127-42, 1983.

Skau, K.A.: The acetylcholinesterase abnormality in dystrophic mice is a reflection of a maturational defect. *Brain Res.*, 276(1), 192-4, 1983.

Parry, D.J., Desypris, G.: Slowing of twitch of dystrophic mouse muscle in partially due to altered activity pattern. *Muscle Nerve*, 6(6), 397-407, 1983.

Gisiger, V., Stephens, H.R.: Asymmetric and globular forms of AChE in slow and fast muscles of 129/ReJ normal and dystrophic mice. *J. Neurochem.*, 41(4), 919-29, 1983.

HAMSTERS

Wilkinson, M.: Abnormal gonadotrophin release from pituitaries of muscular dystrophic mice and hamsters. *J. Reprod. Fertil.*, 71(2), 463-6, 1984.

Moore, P.B.: UM-X7.1 myopathic hamster heart shows altered calcimedien protein levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 121(3), 915-21, 1984.

Wickler, S.J., Horwitz, B.A.: Blood flow in normal and dystrophic hamsters during nonshivering thermogenesis. *Am. J. Physiol.*, 247(1, Pt. 2), R189-95, 1984.

Johnson, R.M.: Membrane protein phosphorylation in the intact erythrocytes of genetically dystrophic hamsters. *Muscle Nerve*, 7(5), 369-73, 1984.

Eppenberger, M.E., Schoenenberger, R., Eppenberger, H.M.: Myofibrillar M-line structure in normal and dystrophic hamster muscle. *Muscle Nerve*, 7(4), 304-11, 1984.

Schlenker, E.H.: An evaluation of ventilation in dystrophic Syrian hamsters. *J. Appl. Physiol.*, 56(4), 914-21, 1984.

Smith, N.K., Morris, S.S., Richter, M.R., Cameron, I.L.: Intracellular elemental content of cardiac and skeletal muscle of normal and dystrophic hamsters. *Muscle Nerve*, 6(7), 481-9, 1983.

Klamut, H.J., Lin, C.H., Strickland, K.P.: Calmodulin content and Ca-activated protease activity in dystrophic hamster muscles. *Muscle Nerve*, 6(6), 436-41, 1983.

CHICKENS

Kieny, M., Mauger, A., Goetinck, P.F.: Distribution of extracellular matrix components during muscle development in normal and dysgenic chick embryos. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 151, 199-212, 1984.

Stewart, P.A., Hayakawa, B.N., Rathbone, M.P.: Accelerated loss of motor neurons in the brachial lateral motor column in muscular dystrophic chicks. *Brain Res.*, 316(2), 271-7, 1984.

Kline-K, Sanders, B.G.: Evaluation of cell-mediated immunity in hereditary muscular dystrophic chickens. *Transplantation*, 38(2), 189-91, 1984.

Chiasson, R.B., Goulet, E.W.: Muscle fiber types in the dystrophic puboischiofemorals of commercial broilers. *Avian Dis.*, 28(2), 489-96, 1984.

Hogan, E.L., Chien, J.L., Dasgupta, S.: Glycosphingolipids of chicken skeletal muscle in early development and genetic dystrophy. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 174, 287-96, 1984.

Young, R.B., Schneible, P.A.: Myosin heavy chain concentration, synthesis rate and degradation rate in normal and dystrophic chicken muscle cells in culture. *Eur. J. Cell Biol.*, 34(1), 75-9, 1984.

Entrikin, R.K.: Avian muscular dystrophy: Use of proper "controls" (Letter). *Muscle Nerve*, 7(4), 337-8, 1984.

Bandman, E.: Myosin components of the latissimus dorsi and the pectoralis major muscles in the dystrophic chicken. *Muscle Nerve*, 7(4), 312-26, 1984.

Kester, M., Privitera, C.A.: An elevated content of a unique lipid in dystrophic chicken embryonic myoblast membranes. *J. Exp. Zool.*, 230(1), 159-62, 1984.

Kline, K., Sanders, B.G.: Suppression of Con A mitogen-induced proliferation of normal spleen cells by macrophages from chickens with hereditary muscular dystrophy. *J. Immunol.*, 132(6), 2813-9, 1984.

Matsuda, R., Spector, D., Micou Eastwood, J., Strohman, R.C.: There is selective accumulation of a growth factor in chicken skeletal muscle. II. Transferrin accumulation in dystrophic fast muscle. *Dev. Biol.*, 103(2), 276-84, 1984.

Ashmore, C.R., Lee, Y.B., Summers, P., Hitchcock, L.: Stretch-induced growth in chicken wing muscles: nerve-muscle interaction in muscular dystrophy. *Am. J. Physiol.*, 246(5, Pt. 1), C378-84, 1984.

- Entrikin, R.K., Patterson, G.T., Wilson, B.W.: Drugs in muscular dystrophy of the chicken: corticosterone-21-acetate. *Muscle Nerve*, 7(2), 130-6, 1984.
- Lee, Y.B., Ashmore, C.R., Hitchcock, L.: Effects of stretch and denervation on protease activities of normal and dystrophic chicken muscle. *Exp. Neurol.*, 84(2), 420-7, 1984.
- Kline, K., Sanders, B.G.: Analyses of muscular dystrophy and Con A deficiency traits in testcross progeny of chickens. *J. Hered.*, 75(1), 31-3, 1984.
- Baskin, R.J., Kawamoto, R.: Stereological analysis of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum isolated from normal and dystrophic skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.*, 771(2), 109-18, 1984.
- Wolitzky, B.A., Hudecki, M.S., Segal, H.L.: Turnover of myofibrillar proteins in cultured muscle cells from normal and dystrophic chick embryos. *Biochim. Biophys. Acta*, 803(1-2), 106-14, 1984.
- Baxter, J.H., Suelter, C.H.: Multiple acid phosphatases in avian pectoral muscle -- the postmicrosomal supernatant acid phosphatase is elevated in avian dystrophic muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 228(2), 397-406, 1984.
- Schneible, P.A., Young, R.B.: Leucine pools in normal and dystrophic chicken skeletal muscle cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 259(3), 1436-40, 1984.
- McElligott, M.A., Dice, J.F.: Intracellular protein degradation in cultures of dystrophic muscle cells and fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 150(2), 442-51, 1984.
- Dux, L., Martonosi, A.N.: Membrane crystals of Ca²⁺-ATPase in sarcoplasmic reticulum of normal and dystrophic muscle. *Muscle Nerve*, 6(8), 566-73, 1983.
- Pizzey, J.A., Barnard, E.A., Barnard, P.J.: Involvement of fast and slow twitch muscle fibres in avian muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, 61(2), 217-33, 1983.
- Tovar, A.M., Verjovski, Almeida, S.: Lipid composition and catalytic properties of sarcoplasmic reticulum from normal and dystrophic chicken muscle. *Mol. Cell Biochem.*, 56(1), 39-48, 1983.

Johnson, D.D., Wilcox, R., Wenger, B.: Precocious in vitro development of satellite cells from dystrophic chicken muscle. *In Vitro*, 19(9), 723-9, 1983.

OTHERS

Patipaporn, K., Wilairat, P., Komaratat, P.: Altered property of sarcoplasmic Ca-ATPase from vitamin E-deficient dystrophic rabbit is associated with the protein and not the lipid component. *Biochem. Int.*, 6(3), 335-8, 1983.

Beitner, R.: Control of levels of glucose 1,6-bisphosphate. *Int. J. Biochem.*, 16(6), 579-85, 1984 (Review).

Irons, M.J., Kalnins, V.I.: Distribution of microtubules in cultured RPE cells from normal and dystrophic RCS rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 25(4), 434-9, 1984.

Common diseases of sheep. *Mod. Vet. Pract.*, 63(5), 431-3, 1982.

Nelson, D.R.: Noninfectious causes of lameness (above the foot) in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. (Large Anim. Pract.)*, 5(3), 491-7, 1983.

Nordstoga, K.: Muscular and myocardial degeneration in rapidly growing male mink kits. *Acta Vet. Scand.*, 24(3), 321-4, 1983.

Gisiger, V., Stephens, H.: Correlation between the acetylcholinesterase content in motor nerves and their muscles. *J. Physiol. (Paris)*, 78(8), 720-8, 1982.

Bonagura, J.D., OGrady, M.: ECG of the month. Muscular dystrophy with involvement of sinoatrial and atrioventricular nodal tissues. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 183(6), 658-9, 1983.

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, 1980.
- 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, 1981.

- 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, 1982.

- 4) 野村達次：筋ジストロフィー症に関する文献調査（1982），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」班，昭和57年度研究報告書，1-5，1983.
- 5) 野村達次：筋ジストロフィー症に関する文献調査（1983），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」班，昭和58年度研究報告書，1-9，1984.

Ⅲ-1. 筋ジストロフィー症モデル動物の開発

mdx マウス骨格筋の病理学的研究

杉田 秀夫*

研究協力者 田辺雄三*, 埜中征哉*

江崎孝三郎**, 野村達次**

進行性筋ジストロフィー症の病態に関する知見は近年、急速に増加しその本態が次第に明らかになってきている。しかしながら未だその究極の原因は不明であり、根本的治療法も確立されていない。ヒト筋ジストロフィーにおける研究には自ずから制約があり、より類似した動物モデルの研究を通して、病態生理、治療法を知る事が実際的であると考えられる。

mdx マウスは、最近イギリスのBulfield¹⁾らがmutantのスクリーニング中にcreatine kinase, pyruvate kinase 活性が高値を示すmutantを発見し新たに確立した筋ジストロフィー動物である。

彼らによる遺伝解析の結果、これまでのジストロフィーモデル動物と異なりX染色体劣性の遺伝形式をとり、hemizygoteとhomozygoteとの交配により出生したマウスの全例に筋ジストロフィー様変化を見ることが一つの特徴である。彼らは若干の筋病理学的検討を行っており、生後数週目に中心核線維が著明に出現してくると述べているが、その詳細は明らかでない。

最近我々は本動物の検索の機会を得、筋病理学的検討を行ったので報告する。

対象・方法

C57BL/10Sc-*mdx* マウス並びにその対照系であるC57BL/10Sc マウスを使用した。それぞれ出生直後、5日、10日、15日、20日、30日、60日、90日、120日、180日の各時点を選び両者10匹ずつの体重変化を調べた。同時に臨床症状を観察し、臨床試験としてwire-net climbing test²⁾を施行した。testは約50℃のホットプレート上に金網を被せ、それをよじ登ったマウスが10分間に落下した総時間を測定し、筋力低下を評価しようとするものである。

次いで上記各時期に*mdx* マウス、対照マウス共5匹ずつを対象に右長指伸筋(白筋)、右ヒラメ筋(赤筋)をとり出し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で固定し連続凍結切片を作成した。切片には、hematoxylin and eosin (HE), Gomori trichrome 変法、NADH-TR、酸フォスファターゼ染色をおこなった。120日目、180日目では長指伸筋、ヒラメ筋の他に、前脛骨筋、上腕二頭筋、大腿直筋、浅胸筋よりも切片を作製し、アルカリフォスファターゼ、ATPase (routine, pH 4.5, 4.3) acetylcholinesterase (Ach E), nonspecific esterase (NSE) 染色を行った。長指伸筋、ヒラメ筋に

* 国立武蔵療養所神経センター

** 実験動物中央研究所

における中心核線維の比率を検討するため、*mdx* マウスを生後 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 日の各時点 3 匹ずつを選び (計 21 匹) 各筋 300 本ずつの筋線維中の中心核線維の比率 (%) を算定した。

又、上記光顕標本を作製する際、左長指伸筋、左ヒラメ筋を採取し、カコジル酸ナトリウム緩衝グルタルアルデヒド固定を行った。さらに OsO_4 液にて後固定、アルコール脱水エポキシ樹脂に包埋し、電顕検索用標本とした。*mdx* マウス、対照マウスをそれぞれのヒラメ筋電顕用標本より 1 μ 厚切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い、最終倍率 $\times 1000$ の写真を作製、横断面での総筋線維数、筋線維直径を測定した。

結 果

(1) 体重変化

mdx マウス、対照マウスの各時点における体重の推移を見ていくと、両者共差異なく、120 日目に至るまで次第に増加していた (図 1)。120 日目を以降 180 日目までは体重変化は殆んどなかった。*dy* マウスでは発症したものは、

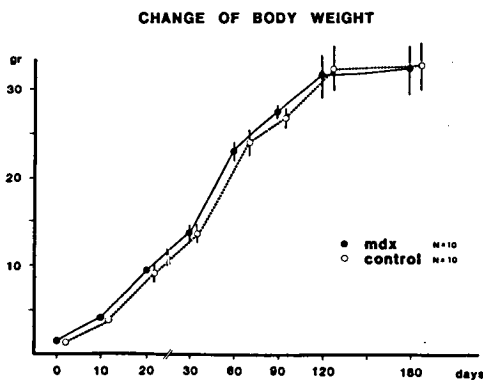


図 1. *mdx* マウス、対照マウス両者の経時的体重変化。180 日目まで差はない

体重増加不良となるが、このような現象は *mdx* マウスには存在しなかった。

(2) 臨床症状

180 日目に至るまで、外見上明らかな筋力低下などの臨床症状は示さなかったため、wire-net climbing test を行った。20 日目頃より次第に落下するマウスの数が増してゆき、180 日目では個体差はあるものの、全例が落下した。なおこの test が適応可応なのは 15 日目を以降であった。(図 2)

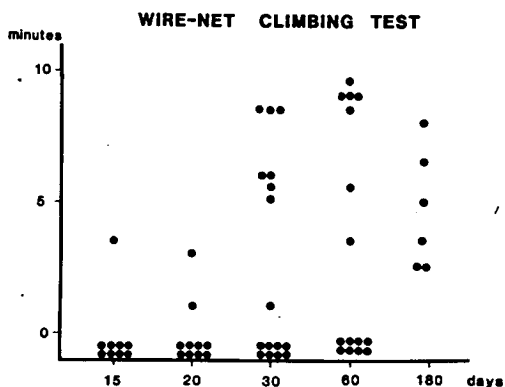


図 2. 金網よじ登り試験
20 日目すぎ頃より落下するマウスが出現する。

(3) 平均線維径・総線維数

前記の如く、ヒラメ筋を対象に 5 日目より 30 日目における平均線維径並びに総線維数の推移について検討した (図 3)。まず総線維数は (図 3, 下段) 両者共大きな差異なく、5 日より 30 日目に至るまでしだいに増加して行き、*mdx* マウスにおいて筋線維数の減少は認められなかった。平均線維径について見ると (図 3, 上段) やはり同様に 20 日目までは差異なく次第にその径が増大していった。しかしながら 30 日目ともなると *mdx* マウスの方が大となった

MEAN FIBER DIAMETER & TOTAL FIBER NUMBERS
IN SOLEUS MUSCLE

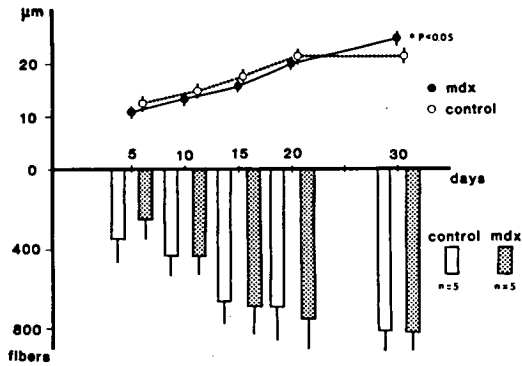


図3. ヒラメ筋総線維数(下段)平均直径(上段) 30日目では *mdx* マウスの方が平均直径が大となる

($P < 0.05$)。この事は、後述する肥大線維の出現にほぼ一致した結果であり、この傾向はそれ以降も続くと思われた。

(4) 組織学的・組織化学的所見

180日目のヒラメ筋では本マウスの典型的病理所見をみた(図4)。すなわち明らかな筋線維大小不同、染色性に乏しい壊死線維、単核の貪食細胞の出現があった。それに加えやや大型核で胞体が basophilic な、いわゆる再生線維の存在があり、しかもその再生線維はしばしばグループを成して存在するのが特徴であった。また多くの線維は中心核線維で、中には肥大線維、fiber splitting の所見も見られた。その時期でも endomysial fibrosis は軽度に留まり、脂肪織の増加はなかった。group atrophy, small angulated fiber などの神経原性変化や空胞変性は認められなかった。Gomori trichrome 変法でも特に異常なかった。NADH-TR では壊死、再生線維に一致して intermyofibrillar network

が乱れた線維が存在したが、その他の構造異常は認められなかった。酸フォスファターゼ染色では壊死・再生線維に一致して高活性を示す線維が存在した(図5,6)。しかしながら、アルカリフォスファターゼ、AChE, NSE 染色では異常は明らかでなかった。

これらの変化は長指伸筋にも同等に認められ(図7)、赤筋・白筋間に明らかな差異はなかった。さらに、前脛骨格(図8)、大腿直筋(図9)、上腕二頭筋(図10)、浅胸筋(図11)でもほぼ同様の変化がみられ、肥大線維、fiber splitting はこれらでなお一層明らかな傾向を示した。以上の如くいわゆるジストロフィー変化は全身に及んでいた。

120日目の心筋について検索したが肉眼的に肥大化、壊死巣、Ca沈着などもなく又、光顕的にも異常は明らかでなかった。

対照マウスにも上記同様病理学的検索を行ったが、赤筋・白筋共壊死線維、再生線維の存在はなく、肥大線維などその他の変化も全く認めなかった。

次に経時的に見て病理変化がいつ頃から明らかになってくるかについて、主に、ヒラメ筋、長指伸筋、前脛骨筋について調べた。生後すぐでは、筋線維は大型の核を持ち胞体が basophilic な細胞が互いに融合し合った幼若な像を呈しており(図12)、生後5日目では細胞境界が明らかとなり、大型核は少数となっているが未だ壊死線維の存在は明らかでなかった(図13)。それに対し、10日目になると貪食反応を伴った壊死線維が集塊を成して認められた(図14)。20日目では、10日目同様やはり壊死再生線維が多くは、集塊をつくり現われていた(図15)。

更に30日目頃になると壊死再生の変化に加

中心核線維が多数認められ、肥大線維も出現していた(図16)。以後これらの変化は、先に示した180日目の病理像へと続いていた。

30日目頃より中心核線維が明らかであったので、ヒラメ筋、長指伸筋について中心核線維の比率について定量的検討を加えた(図17)。

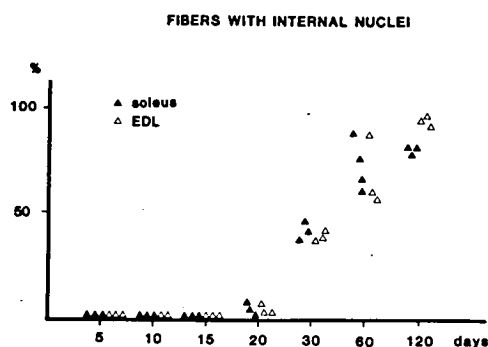


図17. ヒラメ筋、長指伸筋での中心核線維の頻度を経時的に見たもの。筋線維300本に対する比率で表わしてある

それによると両筋共30日目頃より急速に増加して行き、60日目では半分以上の線維が、120日目に至っては大部分の線維が中心核線維となっていた。

この他の組織化学的变化として壊死線維の中にカルシウム染色(GBHA法)陽性線維の出現も見られた(図18)。

以上の病理学的所見をまとめたのが図19である。

考 察

mdx マウスはイギリスの Bulfield らによって近年 C57BL 系より見出されたものである。

X染色体性劣性の遺伝形式をとり、全ての homozygote は交配が可能で出生するマウス全てにジストロフィーの変化を見る事ができ

る。heterozygote の場合は CK の異常、筋病理上共に明らかな異常はないと言う¹⁾。

体重増加不良などの発達異常もなく、臨床的には軽度の筋力低下に留まり、*dy* マウスの如く³⁾後肢ひきずりや twitching も見られない。ただし wire-net climbing test によっては比較的早期に差が示されるマウスを見る事がある。何れにせよ著明な筋力低下はない。以上が *mdx* マウスの臨床的特徴であるが、これらの事はヒト筋ジストロフィー症、とりわけデュシャンヌ型筋ジストロフィー症の臨床症状と大きな差異を示している。

病理学的変化としては、成熟マウスに至るまでに明らかな筋ジストロフィー症の病理像が赤筋、白筋に等しく生じ全身が侵される。病理的变化は生後10日目頃より出現し始め、20日目になると壊死線維は特徴的に集簇を成す傾向となる。30日目すぎより中心核線維が増加し始めさらに肥大線維、fiber splitting の所見が加わってくる(図19参照)。

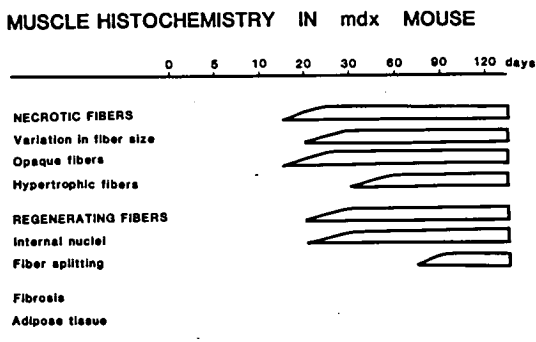


図19. *mdx* マウス骨格筋の経時的病理像を示したもの

120日目頃には殆どどの筋線維が中心核線維となっている事から、それまでに少なくとも一度は殆ど全ての筋線維が壊死に陥り、それに続いて非常に活発な再生がほぼ完全な形で行わ

れると考えられる。この事は前述の如く著明な筋力低下を示さない臨床像をよくうらづけている。無論180日目でも明らかな壊死線維塊は存在し続ける訳であるから壊死→再生→壊死のプロセスが繰り返すが、ヒト筋ジストロフィーと異なり、ほぼ完全な再生が常におこっているのが特異点である。

さらに生後よりの発達途上において筋線維径、線維総数、光顕の形態変化を見る限り、ジストロフィーチキンの様に筋の分化の遅れ、それに加えてジストロフィー様病理像を有してくる⁴⁾とは考えにくく、比較的急激に壊死線維の出現を見るのは大きな特徴で、その発生病理を考慮するにあたって極めて興味深い。この点で進行性の筋力低下を示すジストロフィーチキン並びに *dy* マウスと *mdx* マウスの対比を、再生過程の差異という観点に加え、未分化線維の存在の有無とジストロフィー変化出現という視点で捉えて行く必要があるかもしれない。

COMPARATIVE MUSCLE HISTOCHEMISTRY IN ANIMAL MUSCULAR DYSTROPHIES

	<i>mdx</i>	<i>dy/dy</i>	Chick	Hamster
Progressive muscle weakness	±	+	+	±
Cardiac muscle involvement				+
NECROTIC FIBERS	+*	+	+	+*
Variation in fiber size	+	+	+	+
Opaque fibers	+	+	±	+
Calcium-loaded fibers	+	+	±	+
VACUOLATED FIBERS			+	
Hypertrophic fibers	+		+	
REGENERATING FIBERS	+*	+	+	+*
FIBROSIS	±	+	+	
Adipose tissue		+	+	
AFFECTED MUSCLE	W+R	W+R	W	W+R

W: white
R: red

* frequently seen in large groups

図 20. *mdx* マウス、*dy* マウス、チキン、ハムスターの各ジストロフィー動物の臨床像、病理像の比較を示す

mdx マウスの特徴をこれまでのジストロフィー動物と比較すると(図 20)臨床的には、*dy* マウス、チキンとは違いハムスター⁵⁾ 類似の軽度の筋力低下に留まり、病的には他の動物と同様なジストロフィー変化が赤筋、白筋共に出現するが、チキンに見られる空胞化線維はなく又神経原性の変化もない。筋再生がほぼ完全であり、間質の結合織化も軽度に留まる。明らかな心筋障害を除き、全体的にはハムスターに最も近いモデルと考えられる。

以上よりヒト筋ジストロフィーの直接のモデルと考えるには諸種の難点があるが、これまでのモデルと異なり出生後全例に homozygote が得られる事は今後の治療実験の有力な動物モデルとなるであろうし、又、ほぼ完全な再生が得られる事は筋病理学上不可欠な再生現象についてさらに多くの知見を与えてくれると期待される。

文 献

- 1) Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A.L. and Moore, K. J.: X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1189-1192, 1984.
- 2) 渡辺貴美, 戸塚武: 筋ジストロフィーハツカネズミの後肢運動能力を指標とした病状進行の病期分類, 医学と生物学 95:237-239, 1977.
- 3) Coleman, D.L. and West, W.T.: Effects of nutrition on growth, life span and histopathology of mice with

- hereditary muscular dystrophy
J. Nutrition, 73: 273-281,
1961.
- 4) Nonaka, I. and Nakamura, H.:
Muscle differentiation and
regeneration in chicken
muscular dystrophy. Ed. by
Ebashi, S., University of
Tokyo Press, Tokyo, 1982, pp.
63-77.
- 5) Homburger, F.: Myopathy of
hamster dystrophy; history
and morphologic aspects.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 317; 2-17,
1979.

