

厚生省
神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー症モデル動物
の開発に関する研究

野村班

昭和61年度研究報告書

昭和62年3月

研究報告書作成にあたり

この報告書は、昭和60年度より発足した厚生省神経疾患研究委託費による「筋ジストロフィー症モデル動物の開発」に関する研究の2年目の報告書であります。

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開発する必要があります。従って、この研究班では、筋ジストロフィー症モデル動物の生産・供給、新しい筋ジストロフィー症モデル動物の開発・改良、筋ジストロフィー症動物の飼育管理方法の検討等の研究を継続すると共に、新しい技術、例えば発生工学の手法をもちいてのモデル動物の開発・改良に一層の重点をおいて研究が行われました。昭和61年度の研究成果をここにまとめました。

私共は、今後とも、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いたす所存でありますので、諸班の先生方の御協力をお願い申し上げます。

おわりに、御協力下さった班員各位、ならびに本研究費の取り扱いに種々お世話頂いた厚生省当局、国立精神神経センター神経研究所、日本筋ジストロフィー協会の方々から感謝いたします。

昭和62年3月

野村達次

目 次

筋ジストロフィー症に関する文献調査 (1985)	1
野村達次	
筋ジストロフィー (<i>mdx</i> , <i>dy</i>) マウス骨格筋における血管変化	7
埜中征哉	
研究協力者 禹 満	
横山峯介	
江崎孝三郎	
キメラマウス (C57BL/10- <i>mdx</i> ↔ C3H/He) による筋ジストロフィー 症の研究	15
勝木元也	
研究協力者 横山峯介	
日下部守昭	
体外受精による筋ジストロフィー (C57BL/6- <i>dy</i>) マウス受精卵の作出と 凍結保存	25
横山峯介	
研究協力者 小島博子	
ミエリン <i>wolfgram</i> タンパクの cDNA クローニング	31
高松 研	
Shaking rat Kawasaki (SRK) の臨床 - 神経病理学的研究	39
埜中征哉	
江崎孝三郎	
研究協力者 相川久志	
津金隆夫	

GAD(gracile axonal dystrophy) マウスの遺伝育種学的研究 49

富田 武
研究協力者 山崎 一斗
若杉 昇
菊池 建機
向山 昌邦
安藤 一也

軸索ジストロフィーのモデル動物としてのGAD(gracile axonal dystrophy) 59

菊池 建機
研究協力者 向山 昌邦
山崎 一斗
富田 武

糖原病II型系(RWE系)と正常系(AWE系)との交配からのF₁に出現した翼の挙上不能個体 65

水谷 誠
研究協力者 布谷 鉄夫

(財)実中研における最近の筋ジストロフィー症モデル動物の維持と繁殖状況 75

斉藤 宗雄
研究協力者 田中 亨
日置 恭司

筋ジストロフィー症に関する文献調査(1986)

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、トリア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(1986年分)を以下に紹介する。

CHICKENS

- Cauwenbergs, P., Butler, J. and Cosmos, E.: Intraspecific chick/chick chimaeras: Dystrophic mesoderm transplanted to a normal host forms muscles with a dystrophic phenotype. *Neurosci. Let.*, 68(2), 149-154, 1986.
- Narayana, P.A., Delyre, J.L. and Misra, L.K.: In vivo ³¹P NMR studies of avian dystrophic muscles. *Magn. Reson. Med.*, 3(4), 549-553, 1986.
- McLean, B., Mazen-Lynch, L. and Shotton, D.M.: Quantitative freeze-fracture studies of membrane changes in chicken muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 9(6), 501-514, 1986.
- Demichele, S.J., Atallah, M.T., Sweeny P.R. and Brown, R.G.: Connective tissue metabolism in muscular dystrophy. early amino acid changes in collagen types isolated from the gastrocnemius muscle of developing dystrophic chicken embryos. *Comp. Biochem. Physiol. (B)*, 84(2), 225-233, 1986.
- Howlett, S.E., Triggle, C.R. and Hoekman, T.B.: Effects of noradrenaline, serotonin, and selected antagonists on the vascular smooth muscle of normal and dystrophic chickens. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64(5), 545-549, 1986.
- Hudecki, M.S., Kibler, P.K., et al.: Abnormal expression of the calmodulin gene in muscle from the dystrophic chicken. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137(1), 507-512, 1986.
- Allen, E.R. and May, J.F.: A delay in the appearance of myosin in dystrophic chicken embryos. *Anat. Anz.*, 161(3), 239-242, 1986.

.....
* (財)実験動物中央研究所

Mitkowski, J.A.: Tissue culture studies on muscle disorders: Part 2. Biochemical studies, nerve-muscle culture, metabolic myopathies, and animal models. *Muscle Nerve*, 9(4), 283-298, 1986.

Zeza, D.J. and Heywood, S.M.: Analysis of tcrNA102 associated with myosin heavy chain-MRNPS in control and dystrophic chick rectoralis muscle. *J. Biol. Chem.*, 261(16), 7461-7465, 1986.

Zeza, D.J. and Heywood, S.M.: The localization of a tcrNA102 Gene near the 3' OH terminus of a fast myosin heavy chain gene. A comparison between normal and dystrophic chickens. *J. Biol. Chem.*, 261(16), 7455-7460, 1986.

Hollands, K.G., Grunder, A.A. and Gavora, J.S.: Divergent selection for incidence of degenerative myopathy of the musculus supracoracoideus of meat-type chickens. *Poult. Sci.*, 65(3), 417-425, 1986.

Kawamoto, R.M. and Baskin, R.J.: Isolation and characterization of sarcoplasmic reticulum from normal and dystrophic chicken. *Muscle Nerve*, 9(3), 248-256, 1986.

Murphy, M.E. and Kehrer, J.P.: Activities of antioxidant enzymes in muscle, liver and lung of chickens with inherited muscular dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 134(2), 550-556, 1986.

Repasky, E.A., Pollina, C.M., et al.: Increased concentration of spectrin is observed in avian dystrophic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(3), 802-806, 1986.

Leskawa, K.C., Erwin, R.E. and Hogan, E.L.: Phospholipid biosynthesis during normal and dystrophic avian muscle cell differentiation in culture. *Life Sci.*, 38(2), 147-153, 1986.

Perry, G., Wible, L. and Brinkley, B.R.: Microtubules are not altered in the dystrophic chicken. *Exp. Cell Res.*, 163(1), 266-272, 1986.

MICE

Fink, R.H., Stephenson, D.G. and Williams, D.A.: Calcium and strontium activation of single skinned muscle fibres of normal and dystrophic mice. *J. Physiol.*, 373, 513-525, 1986.

- Manda, P. and Kakulas, B.A.: The effect of the myotoxic agent iodoacetate on dystrophic mice 129/Re. *J. Neurol. Sci.*, 75(1), 23-32, 1986.
- Semple, J.W. and Szewczuk, M.R.: Natural killer cells in murine muscular dystrophy. IV. Characterization of percoll fractionated splenic and thymic natural killer cells and natural killer-sensitive thymocyte targets. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 41(1), 116-129, 1986.
- Semple, J.W. and Szewczuk, M.R.: Natural killer cell activity in murine muscular dystrophy. III. NK-sensitive myoblast cells and lack of NK activity in beige/dystrophic hybrid mice. *Cell Immunol.*, 100(1), 20-33, 1986.
- Fong, C.N., Atwood, H.L. and Charlton, M.P.: Intracellular sodium-activity at rest and after tetanic stimulation in muscles of normal and dystrophic (dy2J/dy2J) C57BL/6J mice. *Exp. Neurol.*, 93(2), 359-368, 1986.
- Cossu, G., Adamo, S., et al.: Altered distribution of protein kinase C in dystrophic muscle cells and its modulation by liposome-delivered phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137(2), 752-758, 1986.
- Johnstone, D., Jaros, E. and Harris, J.B.: Spontaneous electrical activity in muscles of dystrophic (dy/dy) mice. *J. Neurol. Sci.*, 73(3), 339-349, 1986.
- Ontell, M.: Muscular dystrophy and muscle regeneration. *Hum. Pathol.*, 17(7), 673-682, 1986.
- Johnson, M.I. and Ovalle, W.K.: A comparative study of muscle spindles in slow and fast neonatal muscles of normal and dystrophic mice. *Am. J. Anat.*, 175(4), 413-427, 1986.
- Butcher, L.A. and Tomkins, J.K.: Protein profiles of sarcoplasmic reticulum from normal and dystrophic mouse muscle. *J. Neuro. Sci.*, 72(2), 159-169, 1986.
- Bridges, L.R.: The association of cardiac muscle necrosis and inflammation with the degenerative and persistent myopathy of mdx mice. *J. Neurol. Sci.*, 72(2-3), 147-157, 1986.

Wirtz, P., Loermans, H. and Wallinga-de Jonge W.: Long term functional improvement of dystrophic mouse leg muscles upon early immobilization. Br. J. Exp. Pathol., 67(2), 201-208, 1986.

Infante, J.P.: Defective synthesis of polyunsaturated phosphatidylcholines as the primary lesion in duchenne and murine dy muscular dystrophies. Med. Hypotheses, 19(2), 113-116, 1986.

Akindede, J., Oresajo, C., et al.: Enrichment of dystrophy-associated antigen from erythrocyte membranes of mice with muscular dystrophy. J. Neurogenet., 3(1), 49-59, 1986.

Kang, E.S., Capaci, M.T., et al.: Fatty acid metabolism and mitochondrial proteins in the C57BL/6J-dy2Jdy2J dystrophic mice. Comp. Biochem. Physiol. (B), 83(3), 545-550, 1986.

Bourke, D.L. and Ontell, M.: Modification of the phenotypic expression of murine dystrophy: A morphological study. Anat. Rec., 214(1), 17-24, 1986.

Eusebi, F., Cossu, G., et al.: Liposome-delivered phosphatidylcholine enhances the acetylcholine sensitivity of dystrophic mouse myotubes. Biochim. Biophys. Acta, 855(1), 197-9, 1986.

Parry, D.J. and Falconer, A.: Number and size of motoneurons in a forelimb motor nucleus of normal and dystrophic (C57BL/6J dy2J/dy2J) mice. Exp. Neurol., 91(1), 183-192, 1986.

HAMSTERS

Davis, E.C. and Shivers, R.R.: Freeze-fracture analysis of intramembrane particles of erythrocytes from normal and dystrophic hamsters. Anat. Rec., 215(2), 95-98, 1986.

Kopecky, J., Sigurdson, L., et al.: Thyroxine 5'-deiodinase in brown adipose tissue of myopathic hamsters. Am. J. Physiol., 251(1), Pt. 1, E8-13, 1986.

Campbell, J.B. and Stoward, P.J.: Acid phosphatase activity in soleus and plantaris muscle fibres of normal and dystrophic hamsters. A quantitative histochemical study. *Histochemistry*, 84(4-6), 580-585, 1986.

Nicholls, D.M., Teichert-Kuliszewska K. and Kuliszewski, M.J.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA. Activity and amount in dystrophic hamster muscle. *J. Neurol. Sci.*, 73(1), 97-110, 1986.

Desautels, M. and Dulos, R.A.: Effects of cold acclimation in dystrophic hamsters: Reduction of heart necrosis. *Am. J. Physiol.*, 250(2), Pt. 2, R167-174, 1986.

OTHERS

Vos, J.H., Van der Linde-Sipman, J.S. and Goedegebuure, S.A.: Dystrophy-like myopathy in the cat. *J. Comp. Pathol.*, 96(3), 335-341, 1986.

Witkowski, J.A.: Tissue culture studies of muscle disorders: Part 2. Biochemical studies, nerve-muscle culture, metabolic myopathies, and animal models. *Muscle Nerve*, 9(4), 283-298, 1986.

Roneus, B. and Essen-Gustavsson, B.: Muscle fibre types and enzyme activities in healthy foals and foals affected by muscular dystrophy. *Zentralbl. Veterinarmed. (A)*, 33(1), 1-12, 1986.

Norton, S.A. and McCarthy, F.D.: Use of injectable vitamin E and selenium-vitamin E emulsion in ewes and suckling lambs to prevent nutritional muscular dystrophy. *J. Anim. Sci.*, 62(2), 497-508, 1986.

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.
- 6) 野村達次：筋ジストロフィー症に関する文献調査（1984），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59年度研究報告書，5-12，1985.
- 7) 野村達次：筋ジストロフィー症に関する文献調査（1985），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60年度研究報告書，1-9，1986.

筋ジストロフィー (mdx, dy) マウス 骨格筋における血管変化

梶 中 征 哉*

研究協力者 禹 満*, 横山峯介**
江崎孝三郎**

<はじめに>

前回、筋ジストロフィーのモデル動物である dy マウス (C57BL/6J-dy/dy) と mdx マウス (C57BL/10ScSn-mdx) における筋線維の発育分化と壊死線維との関連について述べた¹⁾。すなわち、dy マウスでは生後10日目頃より壊死線維が散見されるが、その後の再生過程が壊死を完全には代償し得ず、進行性の経過をたどる。これに対して mdx マウスでは、生後15日目頃より群を成して壊死線維が現われ、そのほとんど全てが中心核線維として再生し、壊死を再生がほぼ完全に代償する。壊死線維が出現するまでの生後早期には、dy, mdx マウスともにその発育分化に遅れは認められず、両者ともいったんある程度まで筋線維が成熟したのちに壊死に陥ることがわかった。この壊死発現の成因を考えるうえで筋肉内血管の変化について検討する必要がある。特に mdx マウスでは、大きな群を成して筋線維が数十本の単位で一度に壊死に陥るのであるが、これが血管の閉塞等による虚血性の変化が関与しているか否かを確認せねばならない。今回、我々は、dy および mdx マウスの筋線維の壊死再生がはじまってくる生後15日目に重点を置き、その筋肉内毛細血管について形態学的定量的分析を行なった。

<対象・方法>

対象は、mdx マウスおよび体外受精法によって作出された dy マウス²⁾ の生後15日目のもの各4匹と、対照として C57BL/10ScSn マウス4匹である。

それぞれのマウスからヒラメ筋を採取し、1.5%グルタルアルデヒドで前固定ののち1.3%四酸化オスミウムで後固定した。エタノール脱水ののちエポキシ樹脂 (Epon 812) で包埋し、超薄切片作製後に酢酸鉛とウラニールで二重染色を施こして電顕観察 (H-600) を行なった。

最終倍率3,000倍の電顕写真を作製し、その写真中の筋線維数 (MF) とそれを取り囲む毛細血管数 (Cp) をかぞえ、筋線維当たりの毛細血管数 (Cp/MF) を算出した。さらに、壊死あるいは再生線維に接している毛細血管 (壊死部) と、非壊死線維に接している毛細血管 (非壊死部) とに分けて、それぞれの毛細血管の面積 (CA)、内腔の面積 (LA)、短径が $1 \mu m$ 以上の核をもつ内皮細胞1個の面積 (ENA) を semiautomatic image analyzer (Kontron) を用いて計測した。また、毛細血管を構成している内皮細胞が占めている部分の面積 (EA = CA - LA) および、EA の CA に対する面積比 (%E = EA/CA × 100%) を算出した。なお、今回対象とした毛細血管は CA が $60 \mu m^2$ 以下のものに限った。

* 国立精神神経センター神経研究所微細構造研究部

** 財実験動物中央研究所

