

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 62 年度研究報告書

昭 和 63 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3年目の報告であります。

モデル動物の開発は、自然発生の異常形質の発見、特性の分析、遺伝的背景の均一化など、極めて長い年月を必要としております。しかし、最近では分子生物学の発展により、従来の実験動物技術と組合せた発生工学的手法を用いて、積極的にモデル動物を作出する研究も行われるようになりました。

本研究班は、従来技術によるモデル動物の開発、改良、特性の分析を行うと共に、新しい技術によるモデル動物の開発技術の研究も行いました。その結果、新しい手法による筋ジストロフィー症モデル動物を作出する可能性が示唆されております。これら、昭和62年度の班員各位の研究成果をここにまとめました。

今後とも、私どもは筋ジストロフィー症研究をすすめるため、より良いモデル動物の開発改良に努力いたしますので、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に心から感謝いたします。

昭和63年3月

野 村 達 次

# 目 次

筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究総括概要（3年間） .....	1
野村達次	
筋ジストロフィー症に関する文献調査（1987） .....	5
野村達次	
神経原性病変とミトコンドリア電子伝達系の異常 .....	13
埜中征哉	
研究協力者 大滝悦生	
古賀靖敏	
遺伝子導入によるヒト疾患モデルの作成 .....	27
勝木元也	
筋ジストロフィー（C57BL/6- <i>dy</i> ）マウスの計画生産への体外受精法の応用 .....	35
横山峯介	
研究協力者 日置恭司	
塩野博子	
長谷川孝徳	
遠藤幸夫	
<i>mdx</i> マウスのDMD遺伝子について .....	39
高松研	
研究協力者 塚田裕三	
筋ジストロフィーマウス（ <i>mdx</i> ）骨格筋線維の壊死と再生 .....	47
菊池建機	
研究協力者 守屋弘美	
松崎哲也	

筋ジストロフィー症研究のためのGAD・MDX複合マウス系統の育成 ..... 63

富田 武  
研究協力者 山崎 一斗  
榊原 朱実  
向山 昌邦  
菊池 建機

筋ジストロフィー症動物モデルとしてのセロトニンミオパチー ..... 79

三池 輝久  
研究協力者 鳴神 浩  
吉岡 毅

ミエリン形成異常ウズラについて ..... 91

水谷 誠  
研究協力者 布谷 鉄夫

C57BL/6-dy生産方法の改良-ビニールアイソタータを用いた卵巣移植の試み ..... 99

斉藤 宗雄  
研究協力者 江袋 進  
日置 恭司

## 筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究 総括概要(3年間)

主任研究者 野村達次\*

### 1. 3年間の研究班の研究目標とその成果

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維持・生産、②開発・改良、③新しい胚操作技術によるモデル動物の開発を分担研究目標とした。

#### ① モデル動物の維持・生産

##### 研究目標

筋ジストロフィー症(筋ジス)研究に汎用される、筋ジスマウスC57BL/6-*dy*系、C57BL/10-*mdx*系、筋ジスハムスター、BIO-14.6系、UM-X7.1系ならびに筋ジスニワトリNH-412系、NH-413系を維持・生産し、班員あるいは一般研究者に配布する、と共に維持・生産方式を改良することを目標とした。

##### 研究成果

(1) 筋ジスマウスC57BL/6-*dy*; 1969年より維持し、1983年SPF化を計った。今期(昭和60~62年)は、実験用またはタネ動物を合計約300匹供給した。維持生産方式の改良は、SPF生産の合理化を計るため、卵巣移植手術用アイソレータを製作し、滅菌方法、移植技術等に工夫を加え、アイソレータ内無菌的卵巣移植技術を確立した。また、発症前*dy*ホモマウスを得るための体外受精技術の開発は前期(昭和57~59年)の育成率(体外受精卵を移植し産仔まで育成した率)が30%であったものが、技術的改良を加え、今期の育成率は50%以上となり実用化できる見通しがたった。

.....  
\* (財)実験動物中央研究所

(2) 筋ジスマウスC57BL/10-*mdx*; 1983年イギリスから導入して以来、ビニールアイソレータで維持し、研究班員にタネ動物を供給している。導入以来、60機関に約500匹のタネ動物を供給した。

(3) 筋ジスハムスター; 1982年よりBIO-14.6系、UM-X7.1系を維持し、育種学的改良を加えている。BIO-14.6系の筋ジス遺伝子*my*を省きコントロール系の育成を試みたが、世代と共に指標とする舌白斑の発現にバラツキがみられ育成が困難となった。そこで、*my*因子を他の系統に導入する、新しい筋ジス系の育成を試み、現在N3に達している。

(4) 筋ジスニワトリ; NH-413系ならびにコントロールのNH-412系を維持し、受精卵を研究班員に供給している。供給数は年間約10,000個である。なお、これらNH-413、NH-412は、筋ジス遺伝子*am*以外の遺伝的背景も異なる。そこで、*am*因子をファイオミ種のGsN/2系および白色レグホン種のWL-GM系に導入し、GsN/2-*am*系とWL-GH-*am*系を育成した。

#### ② モデル動物の開発・改良

##### 研究目標

既存の実験動物マウス、ラット、ウズラ等の中から、新しいミュータント形質の探索、それらの成因の解明ならびに筋ジスモデル動物については形質の比較検討を行い、モデル動物としての評価を行うことを目標とした。

## 研究成果

(1) GAD(*gracile axonal dystrophy*) マウス; 前期 CBA/Nga と RFM/Nga の交配実験 F2 で発見された後肢麻痺マウス (*hind limb paralysis-hlp*) は、病理組織学的検索の結果、延髄の薄束核およびそれに続く骨髄の背索にある薄束に局限する変性病変に起因する軸索ジストロフィー (*gracile axonal dystrophy*) であることが明らかとなった。そこで *hlp* マウスを改めて、GAD マウスと命名した。さらに、このマウスの病因の解明のため C57BL/10-*mdx* と組合せた複合異常マウスの育成に着手し、N3 に達した。

(2) SRK(*shaking rat kawasaki*) ラット; 無菌 ウイスターコロニーで発見された後肢麻痺ラットである。遺伝様式は常染色体劣性遺伝しホモ型は生後 2 週齢頃から発症し、生後 3~4 週齢で死亡する。病理学的検索では末梢神経・筋肉系に発育・分化の遅れが見られる以外異常のないことが明らかにされた。中枢神経の形態学的検索により主病変が神経細胞の位置異常であることが明らかとなった。従って、このラットは筋ジストロフィーのモデルとはなり難いが、中枢神経系の研究に有用であると思われる。

(3) 糖尿病 II 型ウズラ; 前期発見された糖尿病 II 型モデルウズラである。RW 系を維持し以下の育種学的改良を加えた。RW 系は有色卵を産卵するので、検卵容易な白色卵系へ、RW 因子を導入し RWE 系を育成した。さらに、胚操作実験を容易とするためアルビノ形質を RWE 系に導入し RWA 系を育成した。

また、ミエリン形成異常ウズラが発見されており、この形質の遺伝様式は、常染色体劣性遺伝し、ホモ型は若齢時死亡率が高く受精率も低

いことが明らかとなっている。

(4) C57BL/6-*dy* 及び C57BL/10-*mdx* マウスの骨格筋の組織学的検討; 前述の体外受精技術により発症前の若齢 *dy* ホモマウスが得られたことから、詳細な検索が可能となった。

*dy*、*mdx* マウス共に生後 7~10 日齢頃まで筋線維の発育と分化は正常であったが、それ以後に筋線維の壊死がはじまった。壊死は両者とも全ての筋に活発にみられ、症状の少ない *mdx* マウスに強かった。壊死に続く再生線維は *mdx* に多く、*dy* マウスは散在性であった。筋線維の大小不同、結合織の増生は *dy* マウスに著明であったが *mdx* マウスでは、間質結合織の増生はなかった。*mdx* マウスでは生後 2~3 日以後壊死線維は減少し、再生線維で置換されていた。両者の血管病変を検討したが、明かな差は認められなかった。

## ③ 新しい胚操作技術によるモデル動物の開発

### 研究目標

発展の著しいバイオテクノロジーと従来の実験動物技術とを組合せた、新しい胚操作技術を用いて、ヒト筋ジストロフィー症の疾患モデル動物を開発・育成することを目標とする。

### 研究成果

(1) 遺伝子導入マウスの作出; 遺伝子 DNA 導入技術確認のために、免疫関連遺伝子 IL-2 の DNA をマウス受精卵に注入し遺伝子導入マウスの作出を試みた。その結果、得られた遺伝子導入マウスの中には行動異常を示すものが出現し、これらの解析の結果、マウス個体で発現し小脳欠損を示し、この遺伝子 DNA 導入技術は、ほぼ確立されたものと考えられる。

(2) DMD 遺伝子の解析; ヒト DMD 変異遺伝子の一部が明らかとなったので、DMD 遺伝子

の2個所に相当する遺伝子を化学合成し、これをプローブとして *mdx* マウスの検索を行った。*mdx* マウスでは DMD mRNA の発現は正常マウスに比べ10分の1程度で染色体遺伝子パターンは検索を行った限りでは正常との間に変化を認めることはなかった。*mdx* では、DMD 遺伝子の軽度の異常が存在することが示唆された。

(3) キメラマウスによる筋ジストロフィー症の解析；集合法により C57BL/6-*mdx* と C3H/He ならびに BALB/c のキメラマウスを作出し、組織学的検索ならびに筋力測定による症状を検討した。組織学的には C3H/He 系に特異的に反応する抗体で筋組織等を検索した結果、筋組織は複雑にまざりあいキメラ状を呈することが明らかとなった。筋力測定においてはキメラ個体は正常個体に近い筋力を有することが明らかとなった。

なお、新しい試みとして、ラットにおけるセロトニンミオパチーの筋崩壊機序の検討を行った。1つの簡便な動物実験系となる可能性がある。

## 2. 当該研究における未解決の問題点とその解決の見通し

① モデル動物の維持・生産；現在、維持生産されているモデル動物の、遺伝的微生物的統御は充分とは言えない。筋ジスハムスターやニワトリはコンベンショナルで、適切なコントロール系も育成されていない。引き続きこれらの改良が必要である。

② モデル動物の開発改良；前述の様に GAD マウス、SRK ラット、糖原病Ⅱ型ウズラミエリン形成異常ウズラ等が発見され、病因の解明がなされた。しかし、モデル動物としての評価の検討は不十分で、さらに研究を続ける必要がある。

ある。

③ 新しい胚操作技術によるモデル動物の開発；ヒト遺伝子 DNA を注入した遺伝子導入マウスの作出は、導入技術が確認され、ヒト DMD の DNA も得られるものと思われることから、目標とする DMD のモデルマウスは胚操作により比較的早く作出されるものと期待される。

## 3. 今後当該分野の研究の進め方についての意見

① モデル動物の維持・生産；筋ジストロフィー症の研究において、これらモデル動物の維持生産は不可欠である。このための経費と労力はかなりなものが必要である。一方、凍結保存技術の最近の進歩は著しいものがあり早急にとりいれるべきと考える。

② モデル動物の開発・改良；自然発症の異常動物からのモデル動物の開発は今後とも期待される分野である。常時フィールドを監視しモデルとして可能性のある異常動物を抽出・検索するシステムが国家レベルで確立されることが望まれる。

③ 新しい胚操作技術によるモデル動物の開発；ヒト筋ジストロフィー症のモデル動物の開発において、現在、最も積極的に実施すべき分野である。このためには、DNA をクローニング解析するグループ、DNA を注入し遺伝子導入マウスを作出・育成するグループ、育成された遺伝子導入マウスを評価・検索するグループが表裏一体となって研究する必要がある。

## 4. 当該分野に対する国外の研究状況の概要

① モデル動物の維持・生産；1つの研究グループで、このように多種多様な筋ジスモデル動物を維持しているところは、国外にない。

② モデル動物の開発・改良；アメリカの Jackson 研究所では、毎月、維持・生産コロニーで発見される異常動物の“市”が開かれ、研究者は、興味のあるものを選び研究・検索し、世界的に有用な多くのモデル動物を育成している。我国には、このようなシステムはない。

③ 新しい胚操作技術によるモデル動物の開発；DNA の個体レベルでの発現についての遺伝子導入動物の研究は、世界的に行われている。

しかし、この技術でモデル動物を開発し医学研究に応用しようとするグループは国外にはない。

モデル動物の開発・研究は、基本的に対照とする病気の研究を支援するものと考えられる。従って、本研究班の継続に当たっては、筋ジストロフィー研究者（患者を理解している医者）の監視・指導の下に運営されるべきであると思う。



## 筋ジストロフィー症に関する文献調査(1987)

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、MEDLINEに  
入力された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(1987年分)を以下に紹介する。

### M I C E

Ariyasu, R.G., Ellisman, M.H.: The distribution of (NA<sup>+</sup> +K<sup>+</sup>) ATPase is continuous along the axolemma of unensheathed axons from spinal roots of "dystrophic" mice. *J. Neurocytol.*, 16(2), 239-48, 1987.

Kuhn, D.E., Logan, D.M.: Fiber-specific cholesterol changes in murine dystrophy. *Biochim. Biophys. acta*, 921(1), 13-24, 1987.

Moschella, M.C., Ontell, M.: Transient and chronic neonatal denervation of murine muscle: A procedure to modify the phenotypic expression of muscular dystrophy. *J. Neurosci.*, 7(7), 2145-52, 1987.

Carnwath, J.W., Shotton, D.M.: Muscular dystrophy in the mdx mouse: Histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J. Neurol. Sci.*, 80(1), 39-54, 1987.

Jackson, M.J., Edwards, R.H.: Development of changes in cation content of muscles from the 129 REJ dystrophic mouse. *Comp. Biochem. Physiol (A)*, 87(2), 349-54, 1987.

Rabbani, N., Moses, L., Anandaraj, M.P.: Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor in tissues of dystrophic and normal mice. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 37(3), 282-6, 1987.

Sugita, H., Nonaka, I.: Animal models utilized in research on muscular diseases in Japan. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 229, 271-86, 1987.

.....  
\* (財)実験動物中央研究所

- Heilig, R., Lemaire, C., Mandel, J.L., Dandolo, L., Amar, L., Avner, P.: Localization of the region homologous to the Duchenne muscular dystrophy locus on the mouse X chromosome. *Nature*, 328(6126), 168-70, 1987.
- Brockdorff, N., Cross, G.S., Cavanna, J.S., Fisher, E.M., Lyon, M.F., Davies, K.E., Brown, S.D.: *Nature*, 328(6126), 166-8, 1987.
- Kominami, E./ Kunio, I., Katunuma, N.: Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.*, 127(3), 461-6, 1987.
- Tremblay, J.P., Gregoire, L., Sasseville, R., Belhumeur, C.: Repeated stimulation of the dystrophic mouse neuromuscular junctions. *Muscle Nerve*, 10(4), 303-11, 1987.
- Entrikin, R.K., Abresch, R.T., Sharman, R.B., Larson, D.B., Levine, N.A.: Contractile and EMG studies of murine myotonia (MTO) and muscular dystrophy (dy/dy). *Muscle Nerve*, 10(4), 293-8, 1987.
- Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Colletti, C.A.: Molecular genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51(Pt. 1), 349-51, 1986.
- Davis, H.L.: Sciatic nerve protein composition in normal and dystrophic C57BL/6J mice. *Neurosci. Lett.*, 75(1), 95-100, 1987.
- Clow, D.W., Boegman, R.J.: Effect of denervation on adenine nucleotides in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. *Exp. Neurol.*, 96(2), 334-43, 1987.
- Lucas-Heron, B., Loirat, M.J., Ollivier, B., Leoty, C.: Calcium-related defects in cardiac and skeletal muscles of dystrophic mice. *Comp. Biochem. Physiol. (B)*, 86(2), 295-301, 1987.
- Kirkeby, S., Moe, D.: Esterase in normal and dystrophic muscle. *Cell Mol. Biol.*, 33(1), 101-9, 1987.
- Gopalan, P., Dufresne, M.J., Warner, A.H.: Thiol protease and cathepsin D activities in selected tissues and cultured cells from normal and dystrophic mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65(2), 124-9, 1987.

Torres, L.F., Duchen, L.W.: The mutant mdx: Inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*, 110(Pt. 2), 269-99, 1987.

Thakur, M., Sebag, M., Srivastava, U.: Biochemical changes in progressive muscular dystrophy. XII. Cyclic nucleotides in lymphoid and nonlymphoid organs of dystrophic mice. *Biochem. Cell Biol.*, 64(12), 1339-48, 1986.

Avner, P., Amar, L., Arnaud, D., Hanauer, A., Cambrou, J.: Detailed ordering of markers localizing to the XQ26-XQter region of the human X chromosome by the use of an interspecific mus spretus mouse cross. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84(6), 1629-33, 1987.

Milner, T.E., Hoffer, J.A.: Long-term peripheral nerve and muscle recordings from normal and dystrophic mice. *J. Neurosci. Methods*, 19(1), 37-45, 1987.

Vilmann, H., Kirkeby, S.: Histomorphometry of masticatory muscles in the muscular dystrophic mouse. *Acta Anat. (Basel)*, 127(4), 303-7, 1986.

Kelly, S.S., Morgan, G.P., Smith, J.W.: The origin of (+)-tubocurarine in dystrophic mice. *Br. J. Pharmacol.*, 89(1), 47-53, 1986.

Gopalan, P., Dufresne, M.J., Warner, A.H.: Evidence for a defective thiol protease inhibitor in skeletal muscle of mice with hereditary muscular dystrophy. *Biochem. Cell Biol.*, 64(10), 1010-9, 1986.

Senni, M.I., Eusebi, F., Coletta, M., Sommi, M., Poiana, G., Molinaro, M., Cossu, G.: A muscle cell line from dystrophic mice expressing an altered phenotype in vitro. *Differentiation*, 32(2), 181-4, 1986.

Dangain, J., Pette, D., Vrbova, G.: Developmental changes in succinate dehydrogenase activity in muscle fibers from normal and dystrophic mice. *Exp. Neurol.*, 95(1), 224-34, 1987.

Karpati, G., Carpenter, S.: Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer deleterious consequences of dystrophic gene expression. *Am. J. Med. Genet.*, 25(4), 653-8, 1986.

Peterson, E.R., Masurovsky, E.B., Spiro, A.J., Crain, S.M.: Duchenne dystrophic muscle develops lesions in long-term coculture with mouse spinal cord. *Muscle Nerve*, 9(9), 787-808, 1986.

Desautels, M., Dulos, R.A.: Unchanged nonshivering thermogenic capacity of dystrophic mice. *Metabolism*, 35(12), 1106-9, 1986.

Dangain, J., Vrbova, G.: Response of normal and dystrophic muscles to increased functional demand. *Exp. Neurol.*, 94(3), 796-801, 1986.

Meiri, H., Weiss, Y., Lallkin, A., Collins, I.: Distribution and possible abnormality in antigenic composition of sodium channels in peripheral axons of dystrophic mice. *Brain Res.*, 384(2), 355-61, 1986.

Rabinowitz, J.L., Cossu, G.: Alterations of lipid composition in a dystrophic muscle cell line. *Biochim. Biophys. Acta*, 879(3), 394-8, 1986.

Liang, R.C.: Studies on mitochondria from dystrophic skeletal muscle of mice. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 36(2), 172-8, 1986.

Ovalle, W.K., Dow, P.R.: Alterations in muscle spindle morphology in advanced stages of murine muscular dystrophy. *Anat. Rec.*, 216(2), 111-26, 1986.

Yang-Feng, T.L., Degennard, L.J., Francke, U.: Genes for synapsin I, a neuronal phosphoprotein, map to conserved regions of human and murine X chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83(22), 8679-83, 1986.

Cossu, G., Senni, N.I., Eusebi, F., Giacomoni, D., Molinaro, M.: Effect of phorbol esters and liposome-delivered phospholipids on the differentiation program of normal and dystrophic satellite cells. *Dev. Biol.*, 118(1), 182-9, 1986.

Hargroder, G.T., Talmadge, R.J., Silverman, H.: Age-related changes in oxidative capacity of the gastrocnemius muscle in normal and dystrophic (dy2J/dy2J) mice. *Exp. Neurol.*, 94(2), 400-15, 1986.

## R A T S

Lotz, B.P., Engel, A.G.: Are hypercontracted muscle fibers artifacts and do they cause rupture of the plasma membrane? *Neurology*, 37(9), 1466-75, 1987.

Yoshimura, T., Schotland, D.L.: Freeze fracture analysis of muscle plasma membrane in bupivacaine HCl-induced degeneration and regeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 46(5), 522-32, 1987.

Askanas, V., Martinuzzi, A., Engel, W.K., Kobayashi, T., Stern, L.Z., Hsu, J.D.: Accumulation of CK-MM is impaired in innervated and contracting cultured muscle fibers of Duchenne muscular dystrophy patients. *Life Sci.*, 41(8), 927-33, 1987.

Martonosi, A., Dux, L., Taylor, K.A., Ting-Beall, H.P., Varga, S., Csermely, P., Mullner, N., Papp, S., Jona, I.: Structure of CA<sup>2+</sup>-ATPase in sarcoplasmic reticulum. *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 41, 257-86, 1987.

Baker, J.H., Margolis, R.N.: Calcium-activated protease activity in tenotomized muscle. *Muscle Nerve*, 10(1), 34-40, 1987.

Sperelakis, N., Clouva-Molyvdas, P., Forbes, M.S., alleva, F.R., Balazs, T.: 6-mercaptopurine treatment affects the membrane potentials of rat skeletal muscle fibers. *Toxicol. Ind. Health*, 2(2), 81-97, 1986.

Infante, J.P.: De novo SN-glycerol-3-phosphorylcholine synthetase activity in lung and muscle and its subcellular location. *Mol. Cell Biochem.*, 71(2), 135-7, 1986.

## HAMSTERS

Burbach, J.A.: Ultrastructure of cardiocyte degeneration and myocardial calcification in the dystrophic hamster. *Am. J. Anat.*, 179(3), 291-307, 1987.

Burbach, J.A., Schlenker, E.H., Johnson, J.L.: Morphometry, histochemistry, and contractility of dystrophic hamster diaphragm. *Am. J. Physiol.*, 253(2, Pt. 2), R275-84, 1987.

- Shen, D.G., Araki, M., Higuchi, I., Matsumoto, K., Tamai, M., Liu, K.T., Sugita, H.: The effect of DDB on dystrophic hamsters: An *in vivo* and *in vitro* study. *Muscle Nerve*, 10(5), 391-6, 1987.
- Howlett, S.E., Gordon, T.: Calcium channels in normal and dystrophic hamster cardiac muscle. (3H) nitrendipine binding studies. *Biochem. Pharmacol.*, 36(16), 2653-9, 1987.
- Klamut, H.J., Kotarba, J.A., Strickland, K.P.: Calmodulin levels in developing muscle tissues and primary cultures of normal and dystrophic (UM-X7.1) hamsters. *Muscle Nerve*, 10(1), 69-76, 1987.
- Watson-Wright, W.M., Wilkinson, M.: Beta-adrenergic ((3H) cgp-12177) receptors are elevated in slices of soleus muscle from CHE 147 dystrophic hamsters. *Life Sci.*, 40(12), 1171-7, 1987.
- Bhattacharya, S.K., Crawford, A.J., Pate, J.W.: Electrocardiographic, biochemical, and morphologic abnormalities in dystrophic hamsters with cardiomyopathy. *Muscle Nerve*, 10(2), 168-76, 1987.
- Mardini, I.A., Schlenker, E.H., Burbach, J.A.: Effects of dystrophy and age on hamster tracheal smooth muscle function. *Respir. Physiol.*, 66(2), 157-70, 1986.
- Crawford, A.J., Bhattacharya, S.K.: Excessive intracellular zinc accumulation in cardiac and skeletal muscles of dystrophic hamsters. *Exp. Neurol.*, 95(2), 265-76, 1987.
- Elbrink, H. Hunter, E.G.: Glucose oxidation in white adipose tissue from BIO 14.6 dystrophic hamsters. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64(10), 1321-4, 1986.
- Karpati, G., Carpenter, S.: Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer deleterious consequences of dystrophic gene expression. *Am. J. Med. Genet.*, 25(4), 653-8, 1986.
- Hulsebos, T., Wieringa, B., Hochstenbach, R., Smeets, D., Schepens, J., Oerlemans, F., Zimmer, J., Ropers, H.H.: Toward early diagnosis of myotonic dystrophy: Construction and characterization of a somatic cell hybrid with a single human der (19) chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.*, 43(1-2), 47-56, 1986.

Desautels, M., Dulos, R.A., Yuen, H.M.: Effects of fasting and food restriction on brown adipose tissue composition in normal and dystrophic hamsters. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64(7), 970-5, 1986.

Klamut, H.J., Lin, C.H., Strickland, K.P.: Normal and dystrophic hamster myoblast and fibroblast growth in culture. *Muscle Nerve*, 9(7), 597-605, 1986.

#### CHICKENS

Maeda, Y., Hayashi, K., Mizutani, M., Hashiguchi, T.: Fractional rates of muscle protein synthesis and degradation in chickens with genetic muscular dystrophy. *Poult. Sci.*, 66(4), 757-9, 1987.

Sugita, H., Nonaka, I.: Animal models utilized in research on muscular diseases in Japan. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 229, 271-86, 1987.

Hironaka, T., Ikari, Y.: Dystrophic symptoms prevented by phenobarbital in avian muscular dystrophy. *Neurosci. Res.*, 4(4), 337-41, 1987.

Obinata, T., Shinbo, K.: Slow-type C-protein in dystrophic chicken fast pectoralis muscle. *Muscle Nerve*, 10(4), 351-8, 1987.

Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Colletti, C.A.: Molecular genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51(Pt. 1), 349-51, 1986.

Narayana, P.A., Brey, W.W., Kulkarni, M.V., Misra, L.K.: In vivo proton spin-lattice relaxation times of normal and dystrophic muscles. *Magn. Reson. Med.*, 4(2), 153-61, 1987.

Barnard, E.a., Barnard, P.J., Jarvis, J.C., Lai, J.: Low frequency chronic electrical stimulation of normal and dystrophic chicken muscle. *J. Physiol. (Lond)*, 376, 377-409, 1986.

Ashmore, C.R., Summers, P.J., Lee, Y.B.: Proteolytic enzyme activities and onset of muscular dystrophy in the chick. *Exp. Neurol.*, 94(3), 585-97, 1986.

Howlett, S.E., Hoekman, T.B.: Electrophysiologic differences between normal and dystrophic avian muscle. *Exp. Neurol.*, 94(2), 416-25, 1986.

Walter, R.J., Hyun, J.: Increased viability and differentiation of normal and dystrophic striated muscle in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 22(9), 535-41, 1986.

Cauwenbergs, P., Butler, J., Cosmos, E.: Impaired muscle-nerve interaction (motility) characterizes the brachial region of dystrophic embryos. *Exp. Neurol.*, 94(1), 41-53, 1986.

#### OTHERS

Jamison, J.M., Baird, J.D., Smith-Maxie, L.L., Hulland, T.J.: A congenital form of myotonia with dystrophic changes in a Quarterhorse. *Equine Vet. J.*, 19(4), 353-8, 1987.

Goedegebuure, S.A.: Spontaneous primary myopathies in domestic mammals: A review. *Vet. Q.*, 9(2), 155-71, 1987.

Elbrink, J., Malhotra, S.K., Hunter, E.G.: Duchenne muscular dystrophy: Assessment of experimental data from animals in relation to the human diseases. *Med. Hypotheses*, 23(2), 131-6, 1987.

Richards, R.B., Passmore, I.K., Bretag, A.H., Kakulas, B.A., Mcquarde, N.C.: Ovine congenital progressive muscular dystrophy: Clinical syndrome and distribution of lesions. *Aust. Vet. J.*, 63(12), 396-401, 1986.

Valentine, B.A., Cooper, B.J., Cummings, J.f., Delahunta, A.: Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: Light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 71(3-4), 301-10, 1986.

Gopalakrishnakone, P.: Muscular dystrophy in white pekin ducks. *Am. J. Pathol.*, 125(1), 218-9, 1986.



## 神経原性病変とミトコンドリア電子伝達系の異常

埜中 征哉\*

研究協力者 大滝悦生\*, 古賀靖敏\*

### <はじめに>

乳児脊髄性筋萎縮症 infantile spinal muscular atrophy の重症型に分類される Werdnig-Hoffmann 病は、神経原性疾患の中で代表的疾患として知られている。その臨床像は、生後3カ月以内に筋緊張低下、哺乳力低下で発症しさらに筋力低下を伴い1歳未満で多くは死亡する予後不良の疾患である。病理学的には脊髄前角細胞の変性、脱落がみられ骨格筋は、群萎縮と呼ばれる著名な神経原性萎縮所見を示す(図1)。

最近、我々は、Werdnig-Hoffmann 病の生検骨格筋で脂肪滴を選択的に染色する oil red O 染色で筋線維細胞内に著明な脂肪滴を認め(図2)またミトコンドリア電子伝達系酵素のうちの complex IV (cytochrome c oxidase) 染色にて群萎縮に一致して染色性の低下(図3)を認めた症例を経験した。1986年、Kelleyら<sup>1)</sup>は、Werdnig-Hoffmann 病で尿中に異常な量のアジピン酸、セバシン酸等のジカルボン酸を認めミトコンドリア内の脂肪酸代謝系路の異常を合併した症例を報告した。これらより我々は、神経原性疾患とミトコンドリア機能異常との間には関連があるのではないかと考えその関連性を明確にするため Werdnig-Hoffmann 病の生検骨格筋そして除神経操作を加えたラットの生検骨格筋について生化学的、病理学的検討を行ったので報告する。

### <対象・方法>

対象は、Werdnig-Hoffmann 病3例(症例1. 3カ月男児、症例2. 6歳男児、症例3. 27生日女児)の生検骨格筋について筋病理検査、ミトコンドリア電子伝達系酵素を測定した。

またラットでは SPF-Wistar 系、雄、体重180~200g、18匹を用いてエーテル麻酔下で右股関節のレベルで坐骨神経を1cm切除し、左側を対照とした。切除後1週、2週、3週後にエーテル麻酔下にて左右の赤筋主体のヒラメ筋(SOL)、白筋主体の長指伸筋(EDL)を起始部から終始部まで摘出した。それぞれ重量測定したのち筋病理用とミトコンドリア分離用の2つに分けた。

筋病理では生検筋をコルク片の上に筋線維の方向が垂直になるようにトラガカントゴムで固定し、液体窒素中で冷却したイソペンタン中で急速凍結固定した<sup>2)</sup>。なおラットではヒラメ筋の左右を並置し(side by side)、同時に固定した。長指伸筋も同様に固定した。凍結した標本は、厚さ10 $\mu$ で連続凍結切片を作製し、Haematoxytin and eosin(HE), modified Gomori trichrome, NADH-TR, SDH, cytochrome c oxidase(cco)の各染色を行った<sup>2)</sup>。

生化学では Bookelman らの方法<sup>3)</sup>に従って生検筋よりミトコンドリアを分離し NADH-cytochrome c reductase(NCCR),

\*国立精神神経センター 神経研究所 微細構造部

succinate-cytochrome c reductase (SCCR) は、Mackler の方法<sup>4)</sup>、cco は、Orii の方法<sup>5)</sup>に従って分光光度計(日立320形)を用いて測定した。なおNCCR測定ではロテノン感受性をも検索した。蛋白測定は、Lowry らの方法<sup>6)</sup>に従った。対照側と除神経側の比較検討は、Student's t tests を用いた。

### <結 果>

(1) Werdnig-Hoffmann病の3例についてcco活性を測定した。症例1、症例2は、コントロールに対して22%、15%と低下を示したが症例3の27生日女児では低下は認めなかった(表1)。cco染色についても同様に症例1、症例2では対照と比較して染色性の低下が認められた。

表1. Werdnig-Hoffmann病3例のcco活性

activity ( nmoles/min/mg protein )		
case 1	3m M	60.2 ( 22% )
case 2	6y M	40.0 ( 15% )
case 3	27d F	212.6 ( 79% )
control		270.7 ± 133.0

(2) ラットについて (N=18)

筋重量については除神経1週後では対照側と比較してSOL, EDLともに有意差は認めなかった。2週、3週後は明らかな有意差(P=0)を認めた。ミトコンドリア分離に用いた筋の湿重量あたりの蛋白濃度については、対照側と比較してSOL, EDLともに1週、2週、3週すべて有意差は得られなかった。

生化学的検索ではNCCRは、すべてロテノン感受性を示し、除神経後第2週のSOLにお

いてのみ対照と比較して有意に低かった(P<0.005)。SCCRではSOL, EDLともに1、2、3週すべて有意差は認められなかった。

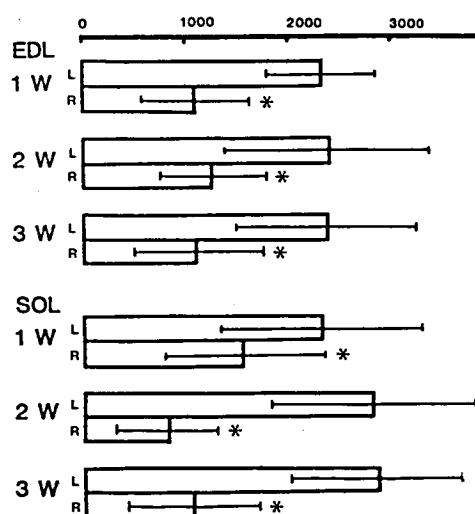
cco活性値ではSOL, EDLともに1、2、3週すべてが対照と比較して有意に低かった(P<0.05)(表2)。除神経後、第1週の対

表2. 除神経後のcco活性(経時的变化)

\* P<0.05

L:対照側

R:除神経側



照側EDLのcco活性値は、2289.4 ± 548.0 nmoles/min/mg proteinであり除神経側EDLのcco活性値は、1133.7 ± 546.8

nmoles/min/mg proteinで、対照と比較して低値であった(P<0.005)。同じく第1週の対照側SOLのcco活性値は、2326.5 ± 1058.9 nmoles/min/mg proteinで、除神経側は、1435.5 ± 760.5 nmoles/min/mg proteinであり有意に低かった(P<0.05)。除神経後、第2週のEDLでは対照側、除神経側、それぞれ2326.5 + 1058.9 nmoles/min/mg protein、1203.4 ± 506.5 nmoles/min/mg proteinであり除神経側が有意に

低かった ( $P < 0.05$ )。同様に第2週の SOL では対照側、除神経側、それぞれ  $2832.9 + 1072.4$  nmoles/min/mg protein、 $863.5 \pm 491.7$  nmoles/min/mg protein であり除神経側が有意に低かった ( $P < 0.005$ )。第3週の EDL でも  $2320.6 \pm 896.4$  nmoles/min/mg protein、 $1089.3 \pm 549.8$  nmoles/min/mg protein であり除神経側が有意に低かった ( $P < 0.05$ )。第3週の SOL も同様に  $2928.0 \pm 837.8$  nmoles/min/mg protein、 $1054.4 \pm 664.9$  nmoles/min/mg protein で除神経側が有意に低かった ( $P < 0.05$ )。

筋病理では除神経後第1週より対照側に比較して SOL, EDL ともに筋線維萎縮が認められ cco 染色にて除神経側が軽度ではあるが染色性の低下が認められた (図4)。第2週でも SOL, EDL ともに対照側に比較して染色性の低下が著明であった (図5)。第3週にても SOL, EDL ともに対照側に比較して染色性の低下が著明であった (図6、図7)。なお図4、5、6は、ヒラメ筋であり図7は、長指伸筋を示す。また NADH-TR, SDH 染色では SOL, EDL ともに1週、2週、3週すべて対照側に比較して染色性の低下は認められなかった。

#### <考 察>

Werdnig-Hoffmann 病 (W-H 病) は、病理学的には脊髄前角細胞の変性と脱落を主病変とする考えが一般に知られているが前根が一次病変で前角が二次的に障害されたとする意見もある<sup>7)</sup>。またこれは、新生児ラットの腰部神経叢を絹糸で結紮し1~2カ月後、長指伸筋およびヒラメ筋にて W-H 病の筋病理所見である large group atrophy を認めたことによ

り前角細胞のみならずそれ以下の末梢神経の障害でも W-H 病と同じ病理像を認めることが証明された<sup>8)</sup>。

今回、我々は、W-H 病3例について cco 活性を測定したが症例1 (3カ月男児) および症例2 (6歳男児) では、それぞれ正常コントロール値の22%、15%の活性を示したにすぎなかった。症例3 (27生日女児) は、79%であり低下は認められず症例を増やして検討すれば加齢と病態進行度と cco 活性について関連性が認められると思われる。症例2は、長期にわたり人工呼吸器を使用され筋病理学的には W-H 病の病像で筋線維内に著明な脂肪滴を認めた例で尿中ジカルボン酸は、測定していないが (筋カルニチンは測定予定) ミトコンドリア機能に何らかの障害があると考えられる。一方、同例では cco 活性は、著明な低下を認めたが同じ電子伝達系酵素である NCCR, SCCR については対照と比較して低下は認められなかった。また同じく NADH および SDH 染色についてもそれらの染色性の低下は認められなかった。最近、我々は、筋原性疾患として代表的な福山型筋ジストロフィーにても cco 活性が正常対照との活性比が15%、22%と著明に低下していた2例を経験した。おそらく神経原性疾患のみならず筋原性疾患の中の重症例には cco 活性が低下している症例が隠れていると思われる。

また我々は、成熟ラットを用いて坐骨神経切除して神経原性病変 (筋線維萎縮) を示した EDL, SOL について cco 活性が低下することを証明した。Kriegler ら<sup>9)</sup> は、ラット腓腹筋を用いて持続的運動負荷または下肢固定を行うことによりミトコンドリア呼吸能は変動すると報告している。また Nemeth ら<sup>10)</sup> は、モ

ルモットを用いて除神経を行った2週後よりヒラメ筋でcco活性が対照に比較して低下したと報告している。以上より除神経病態がミトコンドリア電子伝達系酵素cco活性に対して何らかの影響を与えるのは事実と考えられる。今回、我々の実験結果からは他のミトコドリア電子伝達系酵素NCCR, SCCRについては除神経後2週間めのSOLのNCCRが有意に低下したのみで他はすべて有意差は得られなかった。一方Nemethら<sup>10)</sup>は、モルモットではcco活性同様にSDH活性も対照と比較して低下がみられたといい、またJoffeら<sup>11)</sup>は、ラットを用いて除神経された腓腹筋、前脛骨筋、腓骨筋等を4週後に同時にcco活性測定したところcco活性は、対照と比較して低下は明らかでなかったと報告している。Nemethらは、モルモットの腓腹筋を用い、Joffeらは、我々と同じWistar系ラットを用いたが赤筋と白筋を分けることなく同時に一緒に活性測定したためか明らかな原因はわからないが我々と同一の結果は得られなかった。我々の組織化学標本は除神経側と対照側の筋を並置し、連続凍結切片標本作製し染色を行ったので全く同一の条件下で比較できたが3週までのNADH, SDH染色は、cco染色の結果と異なり対照と比較して染色性の低下は認められなかった。NCCR, SCCR, NADH染色、SDH染色については経過観察期間をさらに延長して検討する必要があると思われるがSOL, EDLについては除神経側の筋線維萎縮がさらに進行した場合は同一検体で組織化学用とミトコンドリア分離用の二つに分けて採取するのは量的に困難かと思われる。ラットよりも大型の動物を対象として長期にわたって実験するのが望ましいと考える。

SOLのcco染色についてみると除神経後第

1週(図4)では除神経側の染色性の低下は軽度だが第2週(図5)、第3週(図6)は、著明になってくる。一方それぞれの対照と除神経側の活性比をみると表2より60%、30%、35%であり除神経側のcco活性が正常対照値の30~35%に低下すると染色性も低下するようだ。またヒトの筋ではcco活性低下を示した19例について実際の活性値とその染色性について検討したところ対照との活性比が30%以下に低下した症例は、その染色性も対照と比較して低下を認めた。ラットもヒトも対照とのcco活性比が30%ほどに低下するとその染色性も低下すると考えられる。これよりcco染色の結果のみからでは活性低下の判定には不十分であり酵素活性とともに判断すべきと思われる。また同じく表2よりSOLでは対照側cco活性をみると第1週より第2週、第3週の方がやや高値を示しているがKriegler<sup>9)</sup>の意見に従って考えるとこれはおそらく除神経側の麻痺のため対照側に負荷が増加し、狭いゲージの中のため速筋主体のEDLより遅筋主体のSOLのミトコンドリア機能が高められてcco活性が高くなったのではないかと推測した。以上のことより筋のミトコンドリア電子伝達系酵素、cco活性は、二次的要因により変動すると思われる。またミトコンドリア関連酵素は、筋肉の活動自身により二次的酵素誘導をうける<sup>12)</sup>という意見もあり除神経状態が長期に続く場合cco活性は、影響をうけやすく、神経は、cco活性の調節因子の一つであると考えた。

#### <結 語>

(1) Werdnig-Hoffmann病の中にはミトコンドリア電子伝達系酵素cytochrome

c oxidase(cco) 活性が低下を示す例があることがわかった。

(2) ラット除神経筋で cco 活性の低下を認めた。

(3) cco 活性は、二次的要因により影響を受けやすく神経は、cco 活性の調節因子の一つであると考えた。

### <文 献>

- 1) Kelley RI, Sladky JT : Dicarboxylic aciduria in an infant with spinal muscular atrophy  
Ann Neurol 20: 734-736, 1986.
- 2) 埜中征哉 : 臨床のための筋病理入門, 筋病理組織標本の作り方. P13-P21, 日本医事新報社, 1987.
- 3) Bookelman H, J.M.F. Trijbels, R.C.A. Sengers et al :  
Measurement of Cytochromes in Human Skeletal Muscle Mitochondria, Isolated from Fresh and Frozen Stored Muscle Specimens.  
Biochem Med 19: 366-373, 1978.
- 4) Mackler B : Microsomal DPNH-Cytochrome c Reductase.  
Methods in enzymology, 10, 551-553, 1967.
- 5) Orii Y, Okuyuki K : Studies on cytochrome a, J.Biochem, 58, 6, 561-568, 1965.
- 6) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al : Protein measurement with the folin phenol reagent, J Biol chem, 192, 265-275, 1951.
- 7) Chou SM, 埜中征哉 : Werdnig-Hoffmann 病—その病理発生を中心として—  
小児神経学の進歩, 6, 88-103, 1977.
- 8) 埜中征哉, Chou SM : Werdnig-Hoffmann 病罹患者筋の組織化学的検討—実験動物との対比を中心として—臨床神経学, 18, 8, 491-498.
- 9) Kriegler DA, Tate CA, Wood JM et al : Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. J Appl Physiol, 48:23-28, 1980.
- 10) Nemeth PM, Mayer D, Kark RAP: Effects of denervation and simple disuse on rates of oxidation and on activities of four mitochondrial enzymes in type 1 muscle.  
J Neurochem, 35, 1351-1360, 1980.
- 11) Joffe M, Bscons, Savage N et al : Biochemical functioning of mitochondria in normal and denervated mammalian skeletal muscle.

Muscle Nerve, 4, 514-519,  
1981.

12) 古賀精敏, 埜中征哉 : ミトコンドリア・

電子伝達系の異常—臨床面.

Mecical Way, 4, 8, 60-66,  
1987.

