文部省

科学研究費補助金総合研究A

(課題番号 00537030)

新たに発見された二つの神経・筋異常マウスの 成因の解析と疾患モデルとしての評価

(代表者 江崎 孝三郎)

昭和55~57年度 研究成果報告書

(財)実験動物中央研究所

昭和58年3月

報告書作成にあたって

最近、ヒトの疾患のモデルとなる動物の開発が重要視されるようになるとともに、いくつかの研 究班が組織され、積極的にモデル動物を開発する努力がなされています。一方、ヒト疾患について は医学分野の研究者によって、モデルとなる可能性をもつ異常動物についての研究は実験動物学、 獣医学分野の研究者によって別個に行われることも多く、両者の連携は必ずしも緊密であるとはい えないのが現状であります。しかし、動物に発見された異常形質がヒトの疾患のモデルとなり得る か否かの評価のためには、異常発現要因の解析、ヒト疾患との類似点と相違点の検討、動物の遺伝 ・的改良などが医学、実験動物学分野の研究者の強力な連携のもとになされねばならないと考えられ ます。

このような観点から、本研究班は、新たに発見された二種の異常動物について、実験動物学、基礎医学、臨床医学の各分野の研究者がそれぞれの専門分野で解析するとともに、モデル動物としての総合的な評価をおこなうために組織されたものであります。

各班員の多大な努力のおかげで、初期の目標以上の成果をあげることができたものと感じており ます。昭和55年度からの3年間の研究期間を終了するに当り、得られた成果をまとめてこゝに刊 行することに致しました。この報告書が神経・筋疾患分野での研究者に少しでもお役に立てば幸に 存じます。

本研究班は一応終了致しますが、こゝで紹介した異常動物にはまだ解明しなければならない点も 多々残されています。班員の諸先生方はさらに研究を続けられる予定になっていますが、今後は班 員以外の先生方にも動物をお渡しできるよう努力する所存であります。こゝで報告します二種の異 常動物に興味をお持ちになった方は御申し出いたゞきたいと存じます。

おわりに当り、終始御協力いたゞいた班員各位、ならびに公開合同班会議の際にご援助いただいた「医学総合研究の推進に関する研究」班代表者 森亘 教授、和歌山医科大学松下宏教授に深く感謝いたします。

昭和58年3月

代表者 江 崎 孝三郎

課題番号	1
研究課題	1
研究組織	1
研究経費	1
研究発表	2
· A. 学会誌等 ·······	2
B. 口答発表	2
C. 出版物	3
研究成果	
I. 遺伝性前・外側下腿筋群萎縮 (pma)マウスの成因の解析と疾患モデ	:
ルとしての評価	5.
1. pmaマウスの発見の経過と遺伝分析ならびに解剖所見	7
2. pmaマウスの解剖・組織学的検索	13
3. pmaマウスの病因に関する病理組織学的研究	29
4. pmaマウスの病因に関する発生学的検索	41
5. pmaマウスの生化学的解析	45
Ⅱ. 乳時期に運動失調を起して死亡する (mdy)マウスの成因の解析と救	Ē
患モデルとしての評価	53
1. mdyマウスの発見の経過と遺伝様式の分析	55
2. mdyマウスの組織化学的解析	59
3. mdyマウスの神経病理学的研究	75
4. mdyマウスの電気生理学的解析	85
5. md yマウスの生化学的解析	89

文部省科学研究費補助金

(総合研究A)研究成果報告書

課題番号:00537030

研究課題:新たに発見された二つの神経・筋異常マウスの成因の解析と疾患モデルとしての評価

研究組織:

•研究代表者:江	崎	孝三郎	(実中研)	
研究分担者:有	嶋	和義	(麻布大・農)	55 年度
江	崎	孝三郎	(実中研)	55-57 "
石	原	傳幸	(東埼玉病院)	57 "
北	浦	孝	(金沢大·教養)	57 "
小	浜	一弘	(東京大・医)	55-56 "
宮	Ħ	雄 平	(東医歯大・医)	55-57 "
中	村	昌 弘	(大阪大・医)	55-57 "
埜	中	征哉	(神経センター)	57 "
小	Л	恵 弘	(都神経研)	55-57 "
遠	Щ	正 弥	(大阪大・医)	55-57 "
上	Щ	義 人	(東海大・医)	55-57 "
研究協力者:早	Л	純一郎	(金沢大・医)	
今	西	美知子	(都神経研)	
岡		春 美	(都神経研)	
多	Ħ	愛子	(神経センター)	
豊	福	照 子	(神経センター)	
吉	村	幸 夫	(実中研)	

āt	9,000千円
昭和57年度	3,000千円
昭和56年度	3,000千円
研究経費:昭和55年度	3,000千円

-1-

研究発表:

A. 学会誌等

- 1. 中村昌弘、林宏、倉田陽一、小野啓郎、遠山正弥、塩坂貞雄、江崎孝三郎、安田幸雄:運動 ニューロン疾患モデル(遺伝性前・外側下腿筋群萎縮マウス)の神経解剖学的検討。中部整災 誌、23:305,1980.
- 中村昌弘、林宏、倉田陽一、小野啓郎、遠山正弥、塩坂貞雄、江崎孝三郎、安田幸雄:運動
 ニューロン疾患モデル(遺伝性前・外側下腿筋群萎縮マウス)の神経解剖学的検討 ヘテロ
 マウスについて 中部整災誌、23:1363,1980.
- 江崎孝三郎、安田幸雄、中村昌弘、林宏、小野啓郎:遺伝性前・外側下腿筋群萎縮マウス、 実験動物、30:151,1981.
- 4. 中村昌弘、林宏、倉田陽一、大川敦子、小野啓郎、遠山正弥、塩坂貞雄、江崎孝三郎、安田 幸雄:運動ニューロン疾患モデルーー遺伝性歩容異常マウスの神経解剖学的研究ーー神経研究 の進歩、25:229,1981.
- 5. 宮田雄平:運動ニューロンの発生と分化、神経研究の進歩、26:495,1982、
- Miyata, Y. : A new mutant mouse with motor neurone disease. Develop. Biol. (inpress)
- B. 口答発表
- 江崎孝三郎:新たに発見された二種類の神経筋異常マウスの現在までの知見(文部省総合研究(A)神経筋異常マウス研究班報告).公開シンポジウム話題の自然発症ヒト疾患モデル動物、1981年2月、大阪.
- 2. 江崎孝三郎、吉村幸夫、小川恵弘、宮田雄平:新たに発見された遺伝性・神経原性筋異常マ ウス. 第16回日本実験動物学会、1981年、東京.
- 北浦 孝: Developmental properties of muscular proteins in the normal and diseased mouse. 体力科学 30; 375(1981)
- 江崎孝三郎:「新たに発見された二つの神経・筋異常マウスの成因の解析と疾患モデルとしての評価」班報告・公開合同班研究発表会、疾患モデル動物の開発と利用、1982年11月、 大阪、
- 5. 中村昌弘:前外側下腿筋群萎縮マウスの成因の解析と疾患モデルとしての評価、その1.公 開合同班研究発表会、疾患モデル動物の開発と利用、1982年11月、大阪.
- 6. 埜中征哉:前外側下腿筋群萎縮マウスの成因の解析と疾患モデルとしての評価、その2.公 開合同班研究発表会、疾患モデル動物の開発と利用、1982年11月、大阪.
- 小川恵弘:乳仔期に発生する神経筋異常マウスの成因の解析と疾患モデルとしての評価、その1.公開合同班研究発表会、疾患モデル動物の開発と利用、1982年11月、大阪.

8. 宮田雄平:乳仔期に発生する神経筋異常マウスの成因の解析と疾患モデルとしての評価、その2. 公開合同研究班研究発表会、疾患モデル動物の開発と利用、1982年11月、大阪.

C. 出版物

- 1. 中村昌弘、小野啓郎:自然発症内反足症(CF1マウス).疾患モデルハンドブックM2、 pp.221-228,医歯薬出版、東京、(1982).
- 2. 江崎孝三郎、中村昌弘、遠山正弥:遺伝性前・外側下腿筋群萎縮マウスの疾患モデルとして の検討. 自然発症疾患モデル動物の開発と利用. pp.230-240,清至書院、東京、 (1982).

I. 遺伝性前・外側下腿筋群萎縮 (pma) マウスの成因の解析と疾患モデルとしての評価

[-1. pmaマウス発見の経過と遺伝分析ならびに解剖所見

江 崎 孝三郎*

はじめに

マウスの遺伝性筋異常としては、dystrophya muscularis (遺伝子記号 dy および dy^{2J} , muscular dysgenesis (mdg), myodystrophy (myd), muscule deficient (mdf) および motor end - plate disease (med) などが報告されている。

筆者らは、CF#1マウスを近親交配している過程で、筋疾患に起因すると推定される歩様異常を ・示す個体を発見し、この異常形質を保存するとともに、遺伝様式の分析と解剖学的検索をおこなっ たので報告する。

異常動物の発見までの経過

異常の発見された動物の起源は、実験動物中央研究所が1967年にCarworth Inc. U. S. A. よ)導入し、クローズドコロニーで維持していたCF#1マウスである。翌68年から、卵白アルブミ ン投与によるアナフィラキシーに対する高・低感受性の系統の育成が、江崎によって開始された。 1976年に、協同研究者の安田が、高感受性系統(CAS)の兄妹交配21代の一腹の産仔(雌4頭、 雄2頭)のうち、雌2頭に歩行異常のみられることを発見した。これらの雌2頭を同腹の正常雄と 交配したところ、1組の交配から出生した雌2頭、雄3頭のうち、雌、雄各1頭が雌親と同様の異 常を示した(図1)。そこで以後は、同腹の異常雌と正常雄の交配、または正常雌と異常雄の交配 によってこの異常形質を保存し

ている。

なお、後述の遺伝様式の分析 によって、この異常を支配する 主遺伝子は常染色体上の劣性遺 伝子であると推定されたので、 この主遺伝子を peroneal muscular atrophy,遺伝子記号を pmaと命名した。

I. 異常マウスの外見的症状
 異常マウス(以後 pmaマウス)
 の外見的症状をみると、出生時
 には後肢は両側ともに棒状で、
 *(財)実験動物中央研究所



図 1. 異常を発現するラインと正常ラインの系統図

-7-

内側に回転し、いわゆる内反尖足を呈している。成長に伴い、足関節の背面への自動的屈折と足指 の伸展が困難になり、後肢をひきずるように下垂足歩行を行う(図2)。しかし、関節の拘縮は認 められない。加齢に伴い、症状は次第に悪化するが、顕著ではない。また、症状の発現には多少の 個体差が認められる。



図2. 前・外側下腿筋群萎縮(pma)マウス

異常 (pma)マウスの成長は、同腹の正常(ヘテロ)マウスと比較してやや遅く、低体重である。 繁殖は雌、雄ともに可能であるが、雄の生殖能力は比較的早期(4~6月齢)に低下する傾向がみ られる。これは、加齢に伴う症状の悪化によって、交尾行動が困難になるためと推測された。

Ⅱ. 遺伝的支配の分析

A. 同系内での交配実験

異常雌、雄の交配からは、異常マウスのみが得られた。また、前述の系統維持のための交配、すなわち、同腹の異常マウスと正常マウスの交配からは、異常と正常がほぼ1:1の割合で出現した(表1)。

		仔	Ø	表	現	型
交配の種類	正 常		異 常			
	雌	雄	É	雌	雄	
異常×異常	0	(0	36	40	76
異常×正常 [*]	33	4	0	37	30	140

表1. 異常 (pma) 系内での交配実験成績

*同腹の異常マウスと正常マウス

B.近縁の系統との交配実験

異常マウスをそれと同一血縁の正常マウス の系統(CAS,図1参照)と交配し、F1, F2, F1 と正常系統のマウスとのもどし交配およ びF1 と異常マウスとの 交配における異常マ ウスの発現を観察した。

表2に示すごとく、 F_1 世代および F_1 と正 常マウスのもどし交配においては、正常マウ スのみが得られた。 F_2 世代においては、135 頭中28頭に異常が発現した。また、 F_1 と異 常マウスのもどし交配で得られた仔において は、66頭中32頭に異常が出現した。

これらの異常マウス出現頻度は、この異常 が常染色体上の1個の劣性遺伝子に支配され ていると仮定したときの理論的分離化、すな わち、 F_2 においては3:1、 F_1 と異常マウ スのもどし交配においては1:1とよく一致 していた。

表2. 異常(pma)マウスと正常(CAS)*

マウスの交配実験成績

	仔の表現型					
交配の種類	正	常	異	常	스키	
	雌	雄	雌	雄	10 ā l	
異常 ×正常	14	11	0	0	25	
$F_1 \times T_1$	10	13	0	0	23	
$F_1 \times F_1$	55	52	16	12	135	
F1 × 異常	15	19	12	20	66	

C.他の系統との交配実験

* CAS: pma と同一起源の正常系(図1参照)

異常マウスとC3H/He マウスとの交配を行い、 F_1 , F_2 , F_1 とC3H/He とのもどし交配 および、 F_1 と異常マウスとのもどし交配における異常マウスの発現を観察した。

表3.	異常 (pma) マウスと正常 (C3H/He)
	マウスの交配実験成績

		仔の	表	現 型	U	
交配の種類	正 常		異 常		ム社	
	雌	雄	雌	雄		
異常×正常*	27	43	0	Ø	70	
F ₁ × 正常	19	31	0	0	50	
$F_1 \times F_1$	206	192	13	29	440 **	
$F_1 \times$ 異常	60	76	31	30	197**	

* C3H/He マウス

** p < 0.01, 理論比との有意差

表3に示すごとく、F,世代およびF, とC3H/He とのもどし交配においては、 異常マウスは発現しなかった。F,世代に おいては、440頭中42頭に、F,と異常 マウスとのもどし交配で得られた仔にお いては、197頭中61頭に異常が発現し た。しかし、異常マウスの発現頻度は、 この異常が1個の劣性遺伝子によって支 配されていると仮定したときの理論的発 現頻度より低かった。また、異常個体に おいても、異常の程度が極めて軽症のも

の、片側性のものなど、表現度に種々のバラツキがみられた。

以上の交配実験から、この異常は、常染色体上の1個の遺伝子によって強く支配されているが、 その表現度は他の遺伝子、すなわち遺伝的背景によって影響されるものと考えられる。

Ⅳ. 解剖学的所見

A.骨格系の変化

内臓を除去して剝皮した後、95%エタノールで固定した体軀を2%KOHで透明化し、骨格を アリザリンレッドSで染色した後、風乾して骨格標本を作製し、観察した。

外見的所見と同様に、後肢以外には骨格異常を認めることはできなかった。pmaマウスの後肢の うち、下腿骨の長さおよび足の長軸の長さは、前肢に比べて相対的に短く、脛骨および腓骨の発達 が正常より悪かった。また、pmaマウスの脛骨と腓骨の間隙は、正常マウスに比べて著明に狭い。 さらに、距骨の腓骨関節面の角度に異常がみられた。すなわち、正常マウスの距骨・腓骨関節面は

-9-

中線に対しほぼ直角であるのに対し、pma マウスでは約60度の角度となり(図3)、 趾面が内反していた。さらに、一部の個体 では足根骨の癒合がみられた。

しかし、これらの骨格系の異常はいずれ も1次的なものではなく、後述の前外側下 腿筋群の萎縮による2次的な変化であると 考えられた。



B. 骨格筋の変化

皮膚および皮下組織を除き、全身の骨格 筋を露出して解剖学的に観察した。離乳後

図 3. 距骨関節面の角度の異常 左:異常マウス、右:正常マウス

成熟に至るまでのいずれの動物においても、脛骨の前・外側に位置する筋群に著明な萎縮がみられ、 腱成分のみがはっきりと観察された。

HE 染色によって観察すると、pma マウスにおいては、前・外側下腿筋群、すなわち前脛骨筋、 長母趾伸筋、長趾伸筋および腓骨筋群に著明な萎縮および脂肪変性などの異常がみられた。異常筋 においては、脂肪変性に陥り、筋線維が全くみられない部位、 large group atrophy を起こし、 正常な筋線維がほとんどみられない部位、筋線維は認められるが、著しい大小不同と円形化を示す 部位などがみられた。

D. 末梢神経の変化

解剖学的に坐骨神経の走行をみると、総腓骨神経に異常がみられた。外見的に極めて軽症のマウ スでは、総腓骨神経が細くなっているのが認められ、重症のものではそれが欠損していた。脛骨神 経および腓腹神経の走行には異常はみられなかったが、正常マウスのそれらと比較してやや太くな っているのが認められた(図4)。

V. 考 察

解剖学的検索によって、この異常は総腓骨神経の退縮または欠損による前外側下腿筋群の萎縮に よることが示唆されたことから、この異常はヒトの Charcot-Marie Tooth 型筋萎縮症 あるいは Werdnig-Hoffmann 病のモデル動物となる可能性が考えられる。

一方、前外側下腿筋は萎縮しているけれども明らかに存在していること、脂肪変性をまぬがれた 筋においては神経・筋終板が認められる点からみると、総腓骨神経が発生の過程で退縮を起した可 能性、あるいはこの筋群の一部が総腓骨神経以外の神経、例えば脛骨神経の分岐などによって代行 的に支配されている可能性などが考えられる。これらの点に関してはさらに詳細な検索をする必要 がある。



図4. 坐骨神経の走行。異常マウスには総腓骨神経がみられない。 (左:異常マウス、右:正常マウス)

次に、遺伝的支配を分析するための交配実験をおこなったところ、同系内の交配および近縁の系 統との交配では、この異常が常染色体上の1個の劣性遺伝子によって支配されていると推定された。 しかし、血縁のない系統との交配では、発現した異常の程度に重症、軽症、片側性、両側性など種 々のバラツキがみられ、異常個体の発現頻度は理論的な分離比より低かった。これらの点から、こ の異常は常染色体上の1個の劣性遺伝子によって強く支配されているけれども、その表現度は他の 遺伝子、すなわち遺伝的背景に影響されるものと考えられる。この主遺伝子を peroneal muscular atrophy、遺伝子記号を pma と命名する。

なお、この遺伝子の表現度が遺伝的背景によって影響されることは、この異常をヒト疾患のモデ ルとして利用するときに、種々の程度の症状を示す動物を作出できる可能性をもつものと考えられ る。

要 約

CF #1 マウスを近親交配している過程で発見された歩様異常マウスを、解剖・組織学的に検索 したところ、総腓骨神経は退縮または欠損し、前・外側下腿筋群は萎縮していることが明らかにな った。

また、交配実験によって遺伝的支配を分析したところ、この異常は常染色体上の1個の劣性遺伝 子によって強く支配されているけれども、その表現度は遺伝的背景によって影響されるものと推定 された。この主遺伝子を peroneal muscular atrophy、遺伝子記号を pma と命名する。

文 献

- 1) Duchen, L. W. (1970). J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 33, 238-250.
- 2) Gluecksohn-Waelsch, S. (1963). Science 142, 1269-1276.
- Lane, P. W., T. C. Beamer and D. D. Myers (1976). J. Hered.
 67, 135-138.
- 4) Meier, H. and J. L. Southard (1970). Life Sci. 9 (part Π), 137-144.
- 5) Michelson, A. M., E. S. Russell and P. J. Harman (1955). Proc. Nat. Acad. Sci. 41, 1079-1083.
- 6) Womack, J., A. MacPick and H. Meier (1977). Mouse News Letter, 56, 40.

[-2. pma マウスの解剖・組織学的検索

中村昌弘*

遠 山 正 弥**

はじめに

江崎、安田により開発された常染色体劣性遺伝形式を有する pma マウスは、ヒト内反足と似た足 変形を示し、両後肢をひきずるようにして足外側縁ないし足背部で荷重して歩く(図1)。当初、



図 1. pmaマウス…内反足変形を呈する(×0.7)

我々はこの pmaマウスがヒト先天性内反足のモデル動物になるのではないかと考えて、以下に述べる種々の検索を加えた。

基礎的検索

A. 外観的特徴

pmaマウスは、前述のごとく常染色体劣性遺伝形式を有するために、1) pma マウス、2) 症状 の発現しないヘテロマウス(外観上および機能上正常マウスと全く同じマウス)、3) 本症に関与 する異常遺伝子を全くもたない正常マウスの三種類のマウスをかけ合わせ方を工夫すれば同腹で同 時に得ることができる。

この pma マウスは、同腹のヘテロマウスや正常マウスと比較して成長が遅く、体が小さい。両後 肢の異常については既に述べたが、その異常は膝より末梢においてであり、膝関節や股関節の形態 異常や動きの異常は認めなかった。

* 大阪大学医学部整形外科

** 大阪大学医学部高次神経研

.....

B. 骨格の異常

アリザリン赤で染色した骨格標本を作製して、同じ週齢の正常マウスと比較した。

外観上の変化と同様に骨格も全体に pma マウスの方が少し小さいこと以外に特別の変形や奇形を 認めない。内反足ということで、足根骨の形状や配列を入念に検索したがヒト先天性内反足にみら れる距骨の形態異常や距骨・踵骨・舟状骨の配列異常はなかった。

ただし正常マウスと比べて脛骨、腓骨および足の長軸の長さが短かく、かつ楔状骨癒合症の合併 頻度が高い。

C. 骨格筋の異常

後肢骨格筋の変化に主眼を置いて検索したところ、肉眼で前および外側下腿筋群に著明な萎縮を 見た(図2、A:正常マウス、B: pmaマウス…前、および外側下腿筋群は正常マウスと異なり萎縮している)。

マウス下腿筋群は表1に示すように主として、①前下腿筋群、②後下腿筋群(浅層)、③後下腿 筋群(深層)、④外側下腿筋群、の四つの筋群に分けられる。

表1. マウス下腿筋の筋肉およびその支配神経

MUSCLES OF THE LEG

I.	Anterior Crural Muscles	
	l) M.Tibialis anterior	deep peroneal nerve
	2) M.Extensor digitorum longus	deep peroneal verve
	 M.Extensor hallucis longus 	deep peroneal nerve
II.	Posterior Crural Muscles:Superfic	cial
	 M.Gastrocnemius 	tibial nerve
	2) M.Soleus	tibial nerve
	3) M.Plantaris	tibial nerve
III.	Posterior Crural Muscles:Deep	
	l) M.Popliteus	tibial nerve
	M.Flexor hallucis longus	tibial nerve
	M.Flexor digitorum longus	tibial nerve
	4) M.Tibialis posterior	tibial nerve
IV.	Lateral Crural Muscles	
	l) M.Peroneus longus	superficial peroneal nerve
	2) M.Peroneus brevis	superficial peroneal nerve
	3) M.Peroneus digiti quarti	deep peroneal nerve
	4) M.Peroneus digiti quinti	deep peroneal nerve

-14-



図 2. a:正常マウス、b: pmaマウス…… antero-lateral crural muscles が正常マウスと異なり萎縮に陥っている。

前下腿筋群には、前脛骨筋、長趾伸筋、長母趾伸筋の三筋があり、外側下腿筋群は、長腓骨筋、 短腓骨筋、第四趾腓骨筋、第五趾腓骨筋の四筋から成る³⁾。 後肢骨格筋の変化を詳細に検討するために正常マウスおよび pmaマウスの後肢をホルマリン固定 後脱灰して連続横断切片を作製した。pmaマウスでは、図2bの肉眼所見と同様に横断切片でも前 および外側下腿筋群が高度の萎縮に陥っている。

殊に、深腓骨神経により運動支配を受けていると考えられている前脛骨筋、長母趾伸筋、長趾伸筋、第四趾腓骨筋、第五趾腓骨筋は著明な筋萎縮のために個々の筋肉を同定できない。そして、その多くは脂肪組織に置換されている。残存筋線維の多くはその直径が極めて細くいわゆる small round fiber となり、小さいものでは直径約3 μ m と正常の $1/5 \sim 1/30$ の小径化を示し large group atrophyの像を呈する。 浅腓骨神経に支配されると考えられている長・短腓骨筋では一部筋線維の小径化を観察した。特に長腓骨筋では小径化した筋線維がやや多数みられるが、全体として筋組織はよく温存されている(図3:マウス下腿横断面。黒枠は前および外側下腿筋群を示す。a:正常マウス、b: pmaマウス…前および外側下腿筋群は高度の萎縮に陥っている。特に深腓骨神経により支配されている筋群は、高度の変性を示す。)。



図3. マウス下腿横断面。黒枠は前および外側下腿筋群を示す。a:正常マウス、 b:pmaマウス…前および外側下腿筋群は高度の萎縮に陥っている。とくに 深腓骨神経により支配されている筋群は、高度の変性を示す。

D. 末梢神経の異常

解剖学的に坐骨神経の走行をみると、萎縮した前および外側下腿筋群の支配神経である総腓骨神 経が肉眼的に認められない。脛骨神経と腓腹神経の走行異常はないが、特に腓腹神経は正常マウス と比べて太い(図4、正常マウスおよび pmaマウスの坐骨神経の横断面、a:骨盤内での坐骨神経、

b:大転子部での坐骨神経、c:大腿末梢部)



図 4. 正常マウスおよび pma マウス(AFFECTED)の坐骨神経、a:骨盤内の坐骨神経
 b:大転子部での坐骨神経… pma マウスの sural nerve の方が太い。c:大腿末梢
 部での脛骨神経などを示す。

E.脊髄の異常

頸椎から仙椎まで椎弓切除を行い、後根が脊髄に入いる部位を指標にして各髄節を同定し、髄節 毎に連続切片を作製した。

HE染色およびKliver-Barrera染色により光顕的に観察した。変性所見や炎症性変化は全くみられない。しかし、腰髄、仙髄では脊髄前角の大型細胞が正常マウスに比べ減少傾向を示していた。

以上の基礎的な検索によって、この pmaマウスは生下時よりすでに内反足変形を示すものの足根 骨ことに距骨や踵骨に形状の異常や配列異常がなく脊髄前角細胞の減少および総腓骨神経の欠損に よりその支配筋である前および外側下腿筋群が著明な萎縮、変性を示し、そのために生じた麻痺性 内反足であることが判明した。

しかし前および外側下腿筋群の運動支配神経である総腓骨神経が欠損しているにもかかわらず一 部の筋肉がなぜほぼ正常の筋組織を維持しているのかとの疑問が生じてくる。

かつて総腓骨神経が存在して、何らかの原因で総腓骨神経のみが変性、消失してしまったものか、 あるいは総腓骨神経が発生、分化の過程の異常のために形成されなかったのか、またその発生、分 化の異常として神経自体に原因があるのかそれとも target organ である前および外側下腿筋群に 原因があるのか、もっと単純に考えて、長および短腓骨筋は腓骨神経以外の神経支配を受けている のかなどが推測される。

そこど pmaマウスと同じCF#1の正常マウスとヘテロマウスを用いて、これに pma マウスを加 えた3 グループに分けて以下の検索をおこなった。

-17-

- 1) 組織学的、組織化学的染色…各マウスの前および外側下腿筋群の筋組織の比較検討。
- 2) コリンエステラーゼ(ChE)染色… 同下腿筋群における神経筋終板の検索と比較。
- 3) 鍍銀法(鈴木法)…同下腿筋群における末梢神経の検索と比較検討。
- HRP(horseradish peroxidase)法…同下腿筋群を支配する体性運動性神経の脊髄にお ける起始核の比較検討。

Ⅱ. 組織学的、組織化学的染色による筋の検索

正常マウスとヘテロマウスは、10週齢、体重30gの雄を、またpmaマウスは、14週齢、体 $重31gの雄を用いて、それぞれの前および外側下腿筋群をとり出し、10<math>\mu$ の厚さの新鮮凍結切 片を作製して、HE染色およびNADH - tetrazolium reductase 染色を行った。

正常マウスとヘテロマウスを比較すると、両者ともに病的所見はみられないが(図5a、5b) 正常マウスでは、NADH濃染線維が58.3%占め、ヘテロマウスでは69.8%であった。筋線維 の直径は正常マウスが濃染線維、薄染線維ともに50μをピークとする分布を示すのに対し、ヘテ ロマウスでは両線維ともにその直径が35μをピークとする分布であった。(図6、前および外側 下腿筋群のNADH-TR染色、a:正常マウス、b:ヘテロマウス)(図7)



図 5. a:正常マウス(×150)、b:ヘテロマウス(×150)、c: pma マウス… 白く抜けて いるところは脂肪変性の部位で、写真の上半分は large group atrophy を示している。 筋線維の温存されているところもあるが(写真の下半分)その直径に大小不同があり、 正常マウスと比べ小径化を示す。



図 6. 前および外側下腿筋群のNADH-TR染色 左:正常マウス(×100)…濃染線維および薄染線維がモザ イクパターンを示す。右:ヘテロマウス…正常マウスとほ ぼ同様のパターン。



図7. マウス前および外側下腿筋群のNADH-TR染色による筋 線維の直径のヒストグラム。

- a:正常マウス…濃染線維、 薄染線維ともに 50 μを ピークとする分布を示す。 る分布を示す。
- b:ヘテロマウス…両線維と もに35μをピークとす

いっぽう、pmaマウスの前および外側下腿筋群は著しい大小不同を示しながらも筋線維が温存さ れている部位もあれば、large group atrophy に陥り正常の筋線維がほとんど見られない部位や、 脂肪変性に陥り筋線維が全くみられない部位もあり(図5c)、明らかな神経原性筋萎縮の像を呈 している。

Ⅲ. コリンエステラーゼ(ChE)染色による神経筋終板の検索

Ⅱと同様のマウスで、それぞれの前および外側下腿筋群を取り出し、10μの厚さの新鮮凍結切 片を作製した。Gerebutzoff法にのっとりChE染色を施行したところ正常マウス、ヘテロマウス の前および外側下腿筋群には、多数のChE染色陽性を示す神経筋終板が認められた(図8、a: 正常マウス、b:ヘテロマウス、c:pmaマウス)。



図8. 前および外側下腿筋群における神経筋終板。(ChE染色)
 a:正常マウス(×250)、 b:ヘテロマウス(×250)、 c:pmaマウス(×250)

また pma マウスでも、 large group atrophy や脂肪変性を免れた筋線維には少数ながらもChE 染色陽性を示す神経筋終板が認められ(図7 c)、それぞれの神経筋終板の間に反応の強さや光学 顕微鏡 レベルでの著しい形態上の差は見られなかった。

Ⅳ. 鍍銀法(鈴木法)による末梢神経の検索

pmaマウスでは、総腓骨神経が肉眼的には認められないにもかかわらず ChE 染色陽性の神経筋 終板が観察されたことより、なんらかのかたちで pma マウスの前および外側下腿筋群に末梢神経が 入ってきていると考えられた。そこで萎縮下腿筋群の鍍銀法(鈴木法)を行なったところ、残存筋 組織に末梢神経が認められ(図9 c)、正常マウスやヘテロマウスのそれらと比較して光学顕微鏡 レベルで著明な差は見られなかった(図9a、9b)。



図 9. 前および外側下腿筋群の鍍銀法(鈴木法)
 a:正常マウス(×250)、b:ヘテロマウス(×250)、c: pmaマウス(×250)。
 矢印が神経を示す。萎縮下腿筋群で筋線維の温存されているところに末梢神経が観察された。

V. HRP法による脊髄起始核の検索

以上のことから pma マウスの萎縮に陥った前および外側下腿筋群は総腓骨神経以外の運動神経支 配を受けていることが強く示唆されたので、正常マウス、ヘテロマウス、 pma マウスそれぞれ7~ 10週齢、体重20~30gの雌雄を用いて、各グループ4匹ずつに HRP 法を施行した。

すなわち、それらマウスの右側前および外側下腿筋群に HRP を体重1g あたり 0.1mg の割合で 注入し、24時間後にグルタール・ホルモール混液で灌流固定する。ただちに頸椎から仙椎まで椎 弓切除、硬膜切開を行ない、同液中に4℃にて 6~24時間後固定する。ついで頸髄から仙髄まで 各髄節ごとに、後根が脊髄を出る高さで同定し切離する。

これら各髄節を30%蔗糖を含む緩衝液中に6~12時間浸漬後、35µの連続切片を作製し tetramethyl benzidine (TMB)反応⁵⁾を行なう。

各髄節ごとにHRPにより標識される細胞の分布、数、形状、大きさなどを観察した。

1) 正常マウスでは、第8胸髄から第5腰髄までのHRP注入側と同側(右側)の多数の前角細胞が標識された(図10a)。

髄節内分布をみると、胸髄および第1腰髄では、その前角細胞は dorsomedial nuclei (DM) と ventromedial nuclei (VM)より構成されており、 $^{2)8}$ DMでは同側の第8胸髄から第1腰髄ま で標識され、その標識細胞数は第11胸髄をピークとする分布を示した。TMでは、同側の第10 胸髄から第1腰髄にかけて標識され、その数は第12,13胸髄をピークとする分布を示し、それ ら標識細胞はすべて中型、紡錘形細胞であった(第1腰髄の前角細胞は、胸髄と同じ細胞群により



 図10. 右後肢の前および外側下腿筋群の HRP 法により標識された脊髄前角細胞の分布。
 a:正常マウス…第8胸髄から第5腰髄までの広い範囲にわたって同側の前角に多数の 標識細胞が観察された。胸髄レベルで、反対側の前角にも少数ながら HRP 標識細胞が 見られた。b:ヘテロマウス…正常マウスのものと比べて、同側の前角における標識細 胞数はやや少ないが、それらの分布はほぼ同じである。いっぽう、反対側の前角細胞は 正常マウスにおけるよりも多数標識された。c:pmaマウス…第11胸髄から第4腰髄 までの同側の前角細胞が標識された。反対側の前角細胞は、全く標識されなかった。 DL, dorsolateral nucleus; LS, lumbosacral nucleus

構成されているので第1腰髄の観察結果は胸髄の項に含めた(図11 a))。

腰髄では、その前角細胞群は主として ventrolateral nuclei (VL), dorsolateral nuclei (DL)および lumbosacral nuclei (LS)より構成されており²)、標識細胞の髄節内分布をみる と、DLは同側の第2腰髄から第4腰髄まで分布し、第3腰髄で極めて多数標識された。

VLは、同側の第2~5腰髄において標識され、その数は第4腰髄をピークとする分布を示した(図11a)。

LSは、同側の第2、3腰髄で標識された。これら腰髄における標識細胞はすべて大型の多極細胞であった(図12b)。

また正常マウスの4例中1例に第9、第10 胸髄において HRP 注入側と反対側(左側)のDM の若干の細胞にも標識細胞が観察された(図12a)(表 2a)。

2) ヘテロマウスでは、同側の前角における標識細胞の分布は正常マウスとほぼ同じであったが、 標識細胞数は正常マウスに比べやや少なかった(図10b)。

髄節内分布をみると、正常マウスに比べ胸髄におけるDM、腰髄におけるVLでの標識細胞数は





図 11. 前および外側下腿筋群の HRP 法によ り標識された同側の前角細胞の分節内分 布とその数(棒グラフの数値は、同側の 前角における標識細胞数の平均値を示す)。 a:正常マウス…胸髄と腰髄にそれぞれ ピークをもつ二峰性分布を示す。b:へ テロマウス…正常マウスと比べて、胸髄 のDMと腰髄のVLでの標識細胞数が少 ない。c:pmaマウス…胸髄における標 識細胞数が著しく減少している。

С

DL, dorsolateral nucleus; DM, dorsomedial nucleus; VL, ventrolateral nucleus; VM, ventromedial nucleus. 図12. a:胸髄における HRP 標識
 細胞。反対側のDMも標識されている。小型の紡錘形細胞
 である。

b:腰髄の同側のVLおよび DLが標識されている。大型 の多極細胞である。

b

*

表 2.

1.1		case 1	case 2	case 3	case 4
-	VM	0	1	0	0
104	DM	5	5	1	32
Th.	VM	0	0	0	4
	DM	25	27	6	53(5)
	VM	0	1	1	13
Thie	DM	35	49	33	53(2)
Th.,	VM	- 14	5	5	64
1213	DM	50	57	16	55
-	VM	28	54	105	61
1015	DM	52	12	17	109
This	VM	40	68	83	40
	DM	11	20	44	37
Lı	VM	15	33	57	3
	DM	1	23	20	21
	VL	18	44	41	44
L	DL	60	43	86	41
	LS	22	2	16	38
	۷L	65	25	63	41
L,	DL	202	205	133	292
	LS	9	50	12	35
	VL	79	139	49	138
L.	DL	54	100	79	44
	LS	0	0	0	20
	VL	2	78	8	0
	DL	0	0	0	1
	LS	0	1,	0	0

		case 1	case 2	case 3	case 4
	VM	0	0	0	0
The	DM	0	1	0	9
Th.	VМ	0	0	0	7
	DM	12	13	1	52(6)
The	VM	0	2	1	7(1)
7 G10 -	DM	28	4	7	89(10)
ть	VM	16	12	6	24
101	DM	15	3	34	56(10)
m 1	VM	47	29	52	51
1 112	DM	17	17	23	20
 m	VM	46	31	80(1)	142
1 0 19	DM	14(2)	19	72	29
L,	VМ	22(2)	5	30(1)	89
	DM	29	11	25	21
	VM	2(1)	0	0	12(3)
•	۷L	4	8	8	29
P.5 .	DL	53	6	31	54
	LS	0	9	14	0
	VL	42	34	8	59
L, `	DL	142	28	124	112
-	LS	0	0	13	33
	VL	57	9	61	114
L.	DL	172	5	148	303
	LS	13	0	20	8
	۷L	13	0	28	69
L	DL	34	0	14	57
	LS	0	0	4	2
		1		1	

		case 1	case 2	case 3	case 4
	VM	0	0	0	0
Thu	DM	0	13	3	2
	VM	0	6	3	6
Thiz	DM	0	7	1	0
-	VM	0	0	20	8
140	DM	0	0	0	0
	VM	0	0	0	0
La	DM	0	0	0	0
	VM	0	0	0	0
١.	V L	0	0	0	0
L.	DL	54	13	31	0
	LS	0	0	0	0
	٧L	2	5	31	12
L	DL	190	200	272	220
	LS	2	0	0	2
	VL	5	21	20	20
L.	DL	9	113	2 38	152
	LS	1	0	0	3

表2. HRP 法による脊髄前角での標識細胞数のまとめ。数値は各 case ごとの各髄節での標識細胞 数であり、()内の数値は反対側の前角における標識細胞数を示す。 a:正常マウス… case 4 で反対側の前角細胞も少数ながら標識されている。b:ヘテロマウ ス… case 1, 3, 4 で反対側の前角細胞も標識されている。c: pmaマウス…反対側の前角細 胞は全く標識されない。

減少しているものの、第4、第5腰髄DLにおける標識細胞数は正常マウスにおけるそれより多数 であった(図11b)。

さらに、ヘテロマウスでは高頻度に(4 例中3 例)反対側の前角細胞にも多数の標識細胞が観察 された(表 2 b)。

3) pmaマウスでは、同側の第11~13胸髄と第2~4腰髄において標識されたがその標識細胞数は正常マウスやヘテロマウスに比べ著しく少なかった(図10 c)。とくに胸髄における標識細胞数が著しく減少しており、胸髄で全く標識されないものも見られる(表2 c)。

髄節内分布をみると、胸髄レベルのDM、VMと腰髄レベルのVLでの標識細胞数が著しく減少 している反面、DLでの標識細胞数は正常マウスやヘテロマウスでのそれらよりも多数であった (図10 c)。

反対側の前角細胞は、全く標識されなかった(表2c)。

₩.考察

従来、変性実験などにより、マウス前および外側下腿筋群は第4~6腰髄の前角細胞より運動支

-24-

配を受けていると考えられていた。3)

4)50 しかしながら最近開発された逆行性軸索輸送を利用したHRP法を用いて再検討を加えたところ、 従来考えられていたよりも幅広い範囲の脊髄前角より運動支配を受けていることが明らかとなった。 すなわち、これらの筋群は同側の第8胸髄から第5腰髄までの広い範囲の前角細胞より神経支配を 受けており、さらに胸髄における反対側のごく少数の前角細胞からも神経線維を受けており、両側 性支配のあることが判明した。

上述した正常マウスにおける標識前角細胞の分布と比べてみると、ヘテロマウスでは、胸髄レベルのDMにおける標識細胞数の減少が目立ち、pmaマウスでは、胸髄のVM、DMにおける標識細胞数が、ともに著明に減少していることが判明した。

またヘテロマウスでは、主として胸髄で反対側の前角細胞にも、かなり多数の標識細胞が観察されたがpmaマウスでは反対側の前角細胞は全く標識されなかった。

以上の事実から、このpmaマウスの病因のひとつとして胸髄レベルにおける支配ニューロンの減少によることが推測される。

今まで述べたpmaマウスの所見をまとめると、

- (1) HRP 標識細胞数はとくに下位胸髄レベルで著明に減少している。
- (2) 総腓骨神経が肉眼的に認められない。
- (3) 腓腹神経は、正常マウスのそれよりも太い。
- (4) 前および外側下腿筋群のほとんどは神経原性萎縮を示し、脂肪組織におきかわっているところ もみられる。
- (5) 前および外側下腿筋群のうち萎縮や脂肪変性を免れた筋組織には、神経筋終板および末梢神経 が存在する。

故に、このpmaマウスは脊髄前角細胞より末梢の下位運動ニューロンの異常により発症した麻痺 性内反足マウスである。

なおヘテロマウスで、胸髄レベルで反対側の前角細胞にもかなり多数の標識細胞が観察されたと いう事実のもつ意味を説明するのは困難ではあるが、ひとつには同側の前角細胞の機能異常を反対 側で代償しているとも考えられるが証拠はない。

Ⅶ. モデルとしての有用性

pmaマウスは、前述のごとく整形外科領域で関心の高い先天性内反足の疾患モデルでなく、むしろ、

(1) 脊髄前角細胞の減少と総腓骨神経の欠損、すなわち下位運動ニューロンの異常が主である。

(2) 支配筋(前および外側下腿筋群)に神経原性萎縮がみられる。

(3) 常染色体劣性遺伝を示す。

(1)~(3)の特徴は脊髄性進行性筋萎縮症(SPMA)、 神経性進行性筋萎縮症(Charcot-Marie-Tooth 病)などの主として下位運動ニューロンに異常をきたす疾患モデルになると考えられる。し かし、

(1) 生下時よりすでに発症していて、症状の進行が明らかでない。

(2) 末梢神経、筋肉の病理学的変化にも明らかな進行はみられない。

(3) 脊髄に萎縮や変性や脱髄所見を認めず、また再生を示唆する所見もない。

これらのことは、進行性の変性疾患を考える上で矛盾する点であるが、pmaマウスにおいては、 胎生初期に変性が進行してしまったとも考えられる。

また整形外科領域で難病のひとつとされる多発性関節拘縮症の病理所見として、

(1) 脊髄前角細胞の減少がみられるが、変性や脱髄あるいは炎症所見はない。

(2) 罹患部の骨格筋に神経原性萎縮をみることがある。

以上の所見が本症のヒト胎児の剖検にて報告されている。

pmaマウスでは両足関節以外の関節に拘縮や変形など認められず、臨床症状は異なるが病理変化 はヒト多発性関節拘縮症に類似している点もあるので、この疾患との関連性も検討する必要があろ う。

₩. 関連する他のモデル動物

マウスでは、1959年 Robins⁷⁾が発表した先天性内反足モデルマウスがある。 このマウスは同 腹の正常マウスより体が小さく、下腿筋は萎縮していて個々の筋肉を分離することが困難であり、 骨格異常として足根骨の癒合がみられたと報告している。また常染色体劣性遺伝を示すなどpmaマ ウスと類似した点が多いが、詳細な研究はなされていないようである。

遺伝性の神経筋疾患を持つ突然変異マウスは現在まで100種以上あるとされている。 その中に は日本で発見された rolling mouse Nagoya のような運動失調を特徴とするものや falter のよう に麻痺が進行して死亡するものもある。しかし、pmaマウスのように生下時よりすでに発症してい て、麻痺は後肢に限られ、症状の進行がほとんどみられないマウスは前述の Robins の マウス以外 には文献的に見当らない。

マウス以外では1968年Nixon⁶⁾がみつけた後肢のみに進行性麻痺をきたす Syrian ハムスターが 有名である。pmaマウスと異なる点としては、(1) sex-linked mutation で雌に発症しない。(2)麻 痺は生後 6 ~ 1 0 ヵ月頃より出現して進行する。(3)麻痺は痙性である。(4)脊髄に変性所見がある。

類似点としては、(1)麻痺は後肢のみに限局される。(2)脊髄前角細胞の減少を認める。などがあげられる。

イヌでは1979年山内ら⁹⁾が発表した神経性筋萎縮症モデルや、1979年 Cork¹⁾がHereditary canine spinal muscular atrophy として発表したものなどがある。これらはいずれも生後4~5 カ月頃より発症し、麻痺は進行性で全身に拡がることなど *pma* マウスとは異なる。

この pma マウスは多発性関節拘縮症や Char cot-Marie-Tooth 病など、下位運動ニューロンおよび骨格筋の異常をきたす疾患を研究する上で、また脊髄、末梢神経、骨格筋の分化、発育を研究する上で貴重なモデルと考えている。

文 献

- Cork, L.C., Griffin, J.W., Munnell, J.F., Lorenz, M.D., Adams, R.J. and Price, D.L.: Hereditary canine spinal muscular atrophy. J. Neuropath. Exp. Neurol. 38: 209-221, 1979.
- Crosby, E.C., Humphrey, T. and Lauer, E.W.: Correlative anatomy of the nervous system. The Macmillan Co., New York, 1962.
- Greene, E.C.: The anatomy of the rat, Hafner Publ. Co., New York, 1935.
- 4) Hardy, H. and Heimer, L.: A safer and more sensitive substitute for diaminobenzidine in the light microscopic demonstration of retrograde axonal transport of HRP. Neurosci. Lett., 5: 235-240, 1977.
- 5) Mesulum, M.M.: Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: A non-carcinogenic blue reaction with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. J. Histochem. Cytochem., 26: 106-117, 1978.
- Nixon, C.W. and Connelly, M.E.: Hind-leg paralysis: a new sexlinked mutation in the Syrian hamster. J. Hered. 59: 276-278, 1968.
- 7) Robins, M.W.: A mutation causing congenital clubfoot in the house mouse. J. Hered. 50: 188-192, 1959.
- 8) Sidman, R.L., Angevine, J.B. and Taber-Pierce, J.E.: Atlas of the mouse brain and spinal cord, Harvard University Press, Cambridge; Massachusetts, 1971.
- 9) 山内忠平,稲田七郎,井形昭弘 : 神経性筋萎縮症モデル(イヌ).神経進歩 23 (5):987 ~ 991, 1979.

-27-

[-3. pmaマウスの病因に関する病理組織学的研究

埜 中 征 哉^{*}

研究協力者 豊福照子,多田愛子

総腓骨神経支配下の前・外側下腿筋群の選択的萎縮を認める遺伝性マウスが江崎らにより見出され、peroneal muscular atrophy (*pma*)マウスと命名された¹⁾ これらのマウスでは、後肢の内反足が生下時よりみられるが、症状は非進行性であることより、総腓骨神経支配下の筋の形成不全が推定されてきた。事実これらの動物では総腓骨神経の欠如が認められている。中村ら²⁾ は詳細な病理学的検索を行い、総腓骨神経の欠如は脊髄前角細胞の異常に起因するのではないかと推論し、このマウスはヒト先天性多発性関節拘縮症のモデル動物となりうるだろうとした。

我々は今回 pma マウスの骨格筋を再度組織化学的に検索し、また脊髄前根の有髄神経のヒストクラムを作成し、pma マウスの病因につき検討したので報告する。

対象・方法

対象としたのは生後2~3月の pmaマウスと同系(CF#1)正常マウスである。

骨格筋の検索は萎縮の著明な前脛骨筋、長指伸筋、それと外見的には正常なヒラメ筋、腓腹筋である。正常マウスからも同じ筋をとり出した。筋は横断面が得られるように液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結し、組織化学染色用に10μの連続切片を作成した。切片に hematoxyline and eosin(HE)、modified Gomori trichrome, NADH-TR, ATPase(routine, pH 4.5, 4.3)、 acetylcholinesterase(Ach E)、酸フォスフェターゼ染色を行った。³⁾ またグルタール固定後の筋束にもAch E染色をし、運動終板の存在を確めた。

萎縮した前脛骨筋の一部は電子顕微鏡検索用にカコジル酸ナトリウム緩衝グルタールアルデヒド 固定を行った。固定後同緩衝液で洗滌、OsO4液にて後固定、アルコール脱水、エポキシ樹脂に包 埋した。

脊髄前根、末梢神経検索のためにはマウスを全身麻酔下に開胸し、左心室よりグルタールアルデ ヒド液を注入、灌流固定した。固定後脊髄をとり出し、第3、第4腰髄前根、坐骨神経をOsO4で 後固定し、エポキシ樹脂に包埋した。14 厚切片にトルイジンブルー染色を行い、最終倍率×1.000 の写真を作成、横断面での有髄神経総数、神経線維径を測定した。

結 果

(1) 萎縮筋の組織学的、組織化学的所見

萎縮筋(前脛骨筋、長指伸筋)は大半のpmaマウスで正常の 1/0 以下と細く線維化のため白く弾 力性に乏しかった。横断面でみると筋線維径が10 μ以下のものが大半で結合織に埋もれたように *国立武蔵療養所神経センター 存在した(図1)。また脂肪織も増加していた。細い筋線維はしばしば胞体の中心に大型で円形の



図 1. pmaマウスの前脛骨筋。筋線維は細く結合織に埋没したようにみえる。核は大き く円形で、胞体の中心に位置する線維(矢印)が多い。脂肪組織(f)も増加して いる。 HE, ×800.

核をもっていた。このように強く 侵された筋では連続切片でみても Ach Eの活性はなく運動終板の存 在は確認されなかった。そこで前 脛骨筋全体をグルタール固定し Ach Eの活性をしらべたが、pma マウスでは全く活性がみられなか った(図2)。

萎縮筋が比較的よく保たれた筋 では筋線維は太く、その数も多か った。しかしこのような比較的軽 症例は極めてまれであった。軽症 例ではAchEの活性がわずかにみ られたが(図3)、正常に比べる とはるかに活性は低く、その範囲 も狭かった。またNADH-TR染



図 2. pmaマウスの萎縮筋(A)には対照筋(B)にみられるようなAchE活性(矢頭印)の部がみられない。長指伸筋、グルタールアルデヒド液固定、AchE染色、×100.

-30-



 図 3. 比較的よく保たれた筋をもつpmaマウス(A)では AchE 活性をわずかに認める (円内)が、対照(B)の AchE活性部(矢印)に比べるとはるかに活性は低い。 長指伸筋、AchE,×400.



図 4. 比較的萎縮の軽い pmaマウス(A)でも対照(B)のように酸化酵素反応で分別 できるような筋線維タイプの分化はなく、一様に高い活性を示している。長 指伸筋、NADH-TR染色、×400.

色でみると重症例と同じく筋線維は一様に高活性を示し、正常のような高活性と低活性の筋がモザ イクをなして存在する像は得られなかった(図4)。すなわち筋線維タイプの明らかな分別がみら れなかった。また細胞内の網目様構造(intermyofibrillar network)も整然とせず不規則であり、 筋原線維の配列異常が推定された。 central core はみられなかった。

細い10 μ径以下の筋線維はATPase 染色のアルカリ、酸性前処置いずれにも濃染しいわゆるタ イプ2Cの反応を示した(図5)。やゝ大径の筋線維が時に混在したが、それはしばしば分化した タイプ2Aの反応を示していた。



図 5. pmaマウス萎縮筋はアルカリ前処理の routine ATPase(A)でも、酸性側 (pH4.3)
 処理(B)でも濃染するいわゆるタイプ2C反応を示す。前脛骨筋、×400.

pmaマウスのヒラメ筋、腓腹筋には著明な変化は見出せなかったが、一匹のみ腓腹筋に神経原性変化(軽い fiber type grouping)を認めた。

(2) 電子顕微鏡所見

筋線維は細かったがほとんど全てに筋原線維の形成をみた(図6)。筋核は大きく、しばしば明 瞭な核小体を認めた。筋内にはまれに有髄神経を数本みるのみであり、神経筋接合部の存在は確め られなかった。筋衛星細胞の増加はみられなかった。

筋原線維の形成はあっても筋原線維が極めて少くミトコンドリアが集塊した線維(図7)、sarcomere が十分に形成されず帯構造が全くみられない線維(図8)が多く混在した。ネマリン小体 は存在しなかった。



図 6. pmaマウス萎縮筋の電子顕微鏡像。筋線維径は小さく胎児期の筋(筋管細胞)に 似るが筋衛星細胞の増加はない。前脛骨筋。



図7. pmaマウスの萎縮筋では写真下にみられるように帯構造がかなり形成されたもの もあるが、上部の筋のように筋原線維があまり存在しないきわめて未熟な感じの する線維が多数混在する。前脛骨筋。



図8. 筋原性はかなり存在しても帯構造の形成がきわめて悪い線維も多く存在する。 pmaマウス前脛骨筋。

(3) 末梢神経所見

マウスの脊髄根はその高さ(第3~第5腰髄)を決定し、坐骨神経は本幹の最近位部を選んだ。 しかし個体差、採取の位置などによりその値の偏差が大きく数量的な検討を加えるには尚検体数が 必要であると考え、この報告からは除外した。

*pma*マウスには著明な左右差の存在するのがまれにいる。今回、左後肢は全く正常、右後肢は典型的 *pma*マウスという例を *pma*×C3H/He の子孫より得ることができた。このマウスの左前脛骨筋、長指伸筋などは組織学的に全く正常であったが、右後肢では総腓骨神経は肉眼的には確認しえず、その支配下の筋は *pma*マウスにみられるのと共通の所見を示した(図9)。このような例では個体差を考慮する必要はないし、また固定などの条件による差も考慮にいれる必要はなく、左と右の神経を数量的に比較するのみで明瞭な解答が得られる利点がある。そこで一検体ではあったが、有髄神経数を数えその直径を計測し、左右で比較した。

第3、第4腰髄前根、坐骨神経での計測値は表1に示した。表でみられるように有髄神経の総数、 平均直径、偏差値には左右比較し有意の差はなかった。組織学的にみても、左右ともに神経線維の 脱落、変性像はみられなかった(図10)。また正常マウスの脊髄前根と比較してもその形態に差 はなかった。

有髄神経線維径のヒストグラムを作成し、線維径の分布をみたが、第3腰髄、第4腰髄(図11)、 坐骨神経(図12)、いずれでも左と右を比較して有意な差は認められなかった。また脊髄横断面 で左右とも前角細胞の脱落、変性の所見は得られなかった。



図 9. 同一個体で左後肢は正常、右後肢は内反足を示したマウスの前脛骨筋。 左(L)と右(R)で筋線維径が著しく異ることがわかる。HE,×800.

表 1.	左右差のある	pmaマウスの	脊髄前根、	坐骨神経内の	有髓神経線維維	診数	と直径
------	--------	---------	-------	--------	---------	----	-----

(777		<u>/</u> -+-		左 (健常側)		右 (罹患側)	
	口)			総数	直 径 (μ)	総数	直径(μ)
1	第 3	腰	髄	742	5.9 6 \pm 2.5 8	692	$5.5\ 8\pm 2.5\ 4$
	第 4	腰	髄	835	5.4 7 \pm 2.2 6	863	$5.1\ 6\pm 2.1\ 8$
4	坐骨	神	経	4,0 57	4.30 ± 2.24	4.276	$3.0~3\pm3.3~1$



図10. 図9と同一マウスの第4腰髄前根。健常な左(L)と萎縮側の右(R)を比較しその 間に何らかの形態学的差を認めない。有髄神経の数、径、密度とも等しい。エポ ン包埋切片、トルイジンブルー染色、×600.



図11. 左右差のある pmaマウスの第4 腰髄前根有髄 神経線維径ヒストグラム。



考 察

pmaマウスでは、総腓骨神経の先天性欠如が最も大きな形態学的変化としてみられることは江崎 ら¹⁾、中村ら²⁾によりすでに確認されている。総腓骨神経によって支配される筋(前脛骨筋、長指伸 筋、長母指伸筋、長腓骨筋、短腓骨筋、第4および第5指腓骨筋)は細く、ほとんど索状に近い。 個々の筋の同定は可能で少くとも前脛骨筋、長指伸筋は個々にとり出すことができるので、これら の筋は無形成ではなく低形成であることがわかる。

これらの筋を組織学的に検索すると、筋線維は細く、核は大型で胞体の中心部に位置し、胎生期 の筋、すなわち筋管細胞に酷似する。組織化学的にも未分化なタイプ2C反応を示した。

-36-
ヒトを含め多くの哺乳類で胎牛早期の筋は組織化学的に赤筋(タイプ1)、白筋(タイプ2)の 分別がない。ヒトでは生下時にほゞ筋線維タイプは分化した形をとっているが、ラットではまだ未 分化である^{4,5)} AT Pase 染色でみるとこの未分化な線維はアルカリ前処理、酸性前処理何れでも活 性を失わない(分化したタイプ1線維はアルカリ前処理で活性を失い、タイプ2線維は pH 4.6 で 活性を失うタイプ2A線維とそれ以下の pH で活性を失うタイプ2B線維が存在する)。6) このよう なタイプ1と2線維の分別のない未分化な線維はタイプ2C線維と呼ばれている。ラットでは生後 急速にこのタイプ2C線維から分化したタイプ1、2A、2B線維に分化するが、⁴⁾生下時に坐骨神 経を切除すると筋線維は小径のまゝ残 $y^{7,8}$ また対照に比べ長くタイプ2C反応を持続し、なか なか分化した形とならない。すなわち筋線維がタイプ2C線維からタイプ1、2A、2B線維へと 分化するには神経の支配が必要であることを意味している。^{7~9)} pma マウスの萎縮筋がタイプ2 C 反応を示したことは、これらの筋が神経の支配をうけていないことを裏づけている。萎縮筋にAchE 活性が見出されなかったこと、電子顕微鏡的にも有髄神経がほとんどなく、運動終板が確認されな かったことは、肉眼的に総腓骨神経が欠如していたことと考えあわせて、この筋萎縮は神経支配の 欠如に由来すると結論できる。まれに萎縮筋内に正常にやゝ近い筋線維が存在し、タイプ2C線維 でなく分化した形をとるものがあったことは、総腓骨神経の完全欠如例ばかりでなく部分欠如例の あることを示している。

筋が分化する以前に脱神経をうけたため、筋線維の多くが小径で未分化な状態で持続する疾患に Werdnig-Hoffmann病がある。) pmaマウスの萎縮筋はAchEの活性はないがWerdnig-Hoffmann 病では存在するので、後者の筋は一度神経支配をうけその後脱神経をうけたと考えられる。そのよ うな多少の相違点はあっても、pmaマウスの萎縮筋はWerdnig-Hoffmann 病罹患筋の病態を知る 上に重要な情報を与えてくれるものと思われる。

総腓骨神経の欠如を説明するものとして①脊髄前角細胞の異常(無~低形成)、②総腓骨神経へ と分岐する部での異常、③一度できた総腓骨神経が変性脱落、の3つの可能性が考えられる。もし 脊髄前角細胞の異常であり、総腓骨神経を支配すべき神経細胞が欠如しているとするならば腰髄下 部の前根有髄神経線維が減少しているはずである。例えばWerdnig-Hoffmann病や、筋萎縮性側索 硬化症では前角神経細胞の減少と平行して前根有髄神経線維の変性脱落がみられ、その数の著明な 減少がある。⁽⁰⁾

pmaマウスでは第3、第4腰髄で前根内有髄神経を検索したが、数、直径に何ら変化なく、また 変性所見もみられなかった。さらにそれ以下の坐骨神経本幹でも有髄神経に何の変化もみられなか った。この事実は少くともpmaマウスは脊髄前角細胞の異常による疾患でないことを示している。 また坐骨神経のどの部にも有髄神経がよく保たれていたことは③の総腓骨神経の退行性変化の可能 性も否定できる。もし③であるとするならば、坐骨神経に何らかの逆行性病変が存在するはずだか らである。

以上の結果からpmaマウスは総腓骨神経へと分岐するはずの神経束が分岐せず、他の神経束と迷 走している可能性が強くなった。他の神経へというと腓腹神経が最も可能性が高い。pmaマウスで

-37-

はこの腓腹神経が異常に太いことが指摘されていることはその可能性をさらに強くするが、総腓骨 神経となるべき神経束が腓腹神経と共に走行しているとしても、どこに終っているかは不明である。 さらに、何故総腓骨神経が分岐しなかったのか、それは筋自体に責任があるのか、あるいは神経系 に責任があるのか今後解明すべき大きな問題である。

何れにしてもこのpmaマウスは発育期における神経と筋の相互作用を知る上に、また神経と筋線 維の発育分化の関係を知る上にも重要なモデル動物であることは疑いがない。またWerdnig-Hoffmann 病や先天性多発関節拘縮症の病因、病態を知る上にも極めて有用なモデル動物と考えられる。

まとめ

pmaマウスでは総腓骨神経支配下の筋は索状に細く、筋線維は未分化で胎生早期の筋の組織学的、 組織化学的特徴をもっていた。筋内に有髄神経がきわめてまれにしかみられなかったこと、筋線維 にAchE活性がなかったことより、これらの萎縮筋は神経支配をうけなかった結果発育、分化しな かったと考えられた。筋萎縮の著明なpmaマウスでも下部腰髄前根内、坐骨神経内の有髄神経総数、 直径とも対照に比べ差がなく、病理学的変化がみられなかった。このことはpmaマウスでは脊髄前 角細胞、前根、総腓骨神経分岐部より中枢側には異常なく、分岐部以下の異常であると推定された。 総腓骨神経がなぜ分岐しなかったのか、分岐すべき総腓骨神経はどこに終っているのか、今後解決 すべき大きな課題である。

文 献

- 江崎孝三郎,安田幸雄,中村昌弘,林宏,小野啓郎 : 遺伝性前・外側下腿筋群萎縮マウス。
 実験動物,30:151-155,1981.
- 2)中村昌弘,林宏,倉田陽一,大川敦子,小野啓郎,遠山正弥,塩坂貞夫,江崎孝三郎,安田幸雄:運動ニューロン疾患モデル 遺伝性歩容異常マウスの神経解剖学的研究 .神経進歩,25:229-239,1981.
- Dubowitz, V. & Brooke, M. H.: Muscle Biopsy. A Modern Approach. Saunders, London.Philadelphia.Tronto, 1973.
- 4) 岡田理美, 埜中征哉, 石浦章一, 杉田秀夫 : ラット筋線維の発育・分化に関する組織化学的 研究. 神経内科, 15:363-370, 1981.
- 5) Brooke, M. H., Williamson, E. & Kaiser, K. K.: The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle. Arch. Neurol., 25: 360-366, 1971.
- 6) Brooke, M. H. & Kaiser, K. K.: Muscle fibre types: How many and what kind? Arch. Neurol., 23: 369-379, 1970.

- * Werdnig-Hoffmann 病罹患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, 18:491-498, 1978.
- 8) Engel, W. K. & Karpati, G.: Impaired skeletal muscle maturation following neonatal neurectomy. Dev. Biol., 17: 713-723, 1968.
- 9) Ishiura, S., Nonaka, I., Sugita, H. & Mikawa, T.: Effect of denervation of neonatal rat sciatic nerve on the differentiation of myosin in a single muscle fiber. Exp. Neurol., 73: 487-495, 1981.
- 10) Chou, S. M. & Nonaka, I.: Werdnig-Hoffmann disease: Proposal of a pathogenetic mechanism. Acta Neuropathol. (Berl.), 41: 45-54, 1978.

[-4. pma マウスの病因に関する発生学的検索

中	村	븝	弘*
遠	山	Æ	弥**
汇	崎	麦 =	三郎***

はじめに

pmaマウスの後肢の異常は出生時にすでに発症している。このマウスの異常発症時期を知ること は本症の病因の解明にとって重要なことであると考えられる。本研究ではpmaマウスの発生の各時 .期の組織学的検索をおこない、正常マウスと比較した。

材料と方法

posterior footplate が分化してくる胎生12日(Stage 20)および四肢が急速な発達を遂げる胎生13日(Stage 21)を主眼において、胎生10日(Stage 16)から胎生16日(Stage 24)の pmaマウスおよび正常マウスの胎仔の後肢の肉眼的および光顕的観察を行い、 骨格筋や末梢神経の発生、分化について比較検討した。

結果

胎生10日(Stage 16)ではpmaマウス、正常マウスともに体長3~4mmで、hind limb bud がやっと現われたところである。

後肢と呼ぶべきものもなく肉眼的観察で両者に差はない。

胎生11日(Stage 18)では両マウスともに体長約5~6mmとなるがやはり hind limb bud の 段階にあり、後肢と呼ぶべきものはない。

胎生12日(Stage 20)

pmaマウスの胎仔は体長約8mmで足(posterior footplate)が下腿より分化してくる時期にあたる。正常マウスの胎仔も体長約8mmで、やはりposterior footplateが下腿より分化しており、ともに外観上の差異はない。(図1. 胎生12日の胎仔、a:pmaマウス、b:正常マウス)

後肢の連続横断切片(約4µ)を作製し、HEおよびボディアン染色を施行した。

光顕にて観察したところ、骨格筋の分化は見られず、総腓骨神経はじめ脛骨神経、腓腹神経などの末梢神経を同定することができない(図2. 胎生12日胎仔の下腿横断面。HE染色。a:pma マウス、b:正常マウス)。

- * 大阪大学医学部整形外科
- ** 大阪大学医学部高次神経研
- *** 実験動物中央研究所

-41-



図1. 胎生12日胎仔。a: pmaマウス、b:正常マウス…ともに体長約8mm。外観上後肢などに差を認めない。





胎生16日(Stage 24)

体長14~17mm で正常マウスの16日胎仔と比べ pmaマウスでは下腿筋の発育が全体に悪い。 とくにその前および外側下腿筋群に、筋組織が見られるもののその muscle volume は正常マウス に比べ著明に減少している。

胎生13日(Stage 21)

両マウスともに体長約10mm で、前肢後肢ともにその長さを 増している。外観上両者間に著 明な差はない。(図3. 胎生13 日胎仔、a:pmaマウス、b: 正常マウス)

下腿横断面で、骨格筋が分化 の途上にあるがまだ明瞭に個々 の筋肉を同定することができな い。pmaマウスの胎仔では、そ の前および外側下腿筋群にあた る部位の組織学的観察でも特別 の異常は認めない。末梢神経で は、脛骨神経、腓腹神経は見ら れるが腓骨神経は既にない。他 方正常マウスではこれら三つの 末梢神経が明確に観察される。 (図4. 胎生13日胎仔下腿横 断面。a : pmaマウス…脛骨神 経、腓腹神経は見られるが、腓 骨神経は観察できない。b: 正 常マウス)。

胎生14日(Stage 22)で は体長約11~12mmで、footplateで個々の指が分離してく る。

両マウスとも、下腿横断面で の骨格筋および末梢神経の所見 は胎生13日の胎仔と同じであ る。



図 3. 胎生13日胎仔。a:pmaマウス、b:正常マウス…
 体長約10mmで四肢に著しい発育を見る。両者を比べて、外観上後肢に差異を認めない。



図 4. 胎生13日胎仔の下腿横断面。

 a:pmaマウス、b:正常マウス。
 T,脛骨。F,腓骨。tn,脛骨神経。sn,腓腹神経。pn,腓骨神経。pmaマウスでは、既に腓骨神経が見られない。

考 察

pmaマウスは胎生初期の後肢が分化してくる Stage 21(胎生13日)で既に腓骨神経の分化が 見られない。この時期に骨格筋は正常マウスと比べ大きな差は認めない。

以上より、まず神経側に第一の病因があり、骨格筋の変化は二次的なものと推測される。

I-5. pma マウスの生化学的解析

北 浦 孝* 小 浜 一 弘**

はじめに

ヒトの疾患モデル動物としては、筋ジストロフィーマウスや自然発症高血圧ラットをはじめ数多 くのものが知られている。我々は最近新しく発見された歩行異常を呈するpmaマウス¹⁾の成因と疾 患モデルとしての評価を行うために、筋肉および血清の生化学的解析を行ったので報告する。

筋肉に関しては、2種類(速筋型と遅筋型)の収縮特性が古くから知られており、それは筋肉を 構成する筋蛋白の種類に依存して決定されると考えられている。中でも収縮蛋白と呼ばれるものの 1つであるミオシンは最も重要なものと考えられ、速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの存在量が筋 肉の収縮特性を決めると考えられている。また、この他にも制御蛋白と呼ばれるものとして、トロ ポミオシン、トロポニンなどが知られており、これらも収縮特性と何らかの関係があると考えられ ている。従って、本研究ではこれら諸蛋白の筋肉内における質量的変化および差を正常なものと比 較することによって検討した。

筋肉はまた収縮のためのエネルギー代謝を必要としており、そのシステムの違いにより有酸素的 代謝型と無酸素的代謝型にも分類できる。疾患のある細胞では代謝異常の発生が考えられるところ から、この点についても収縮特性と同様に検討を行った。

また、器管の異常は多くの場合血液成分の変化として反映され、疾患の程度や臓器特性が明らか になる場合がある。従って、血液特に血清成分の検討も試みた。

方法と材料

江崎らの報告にもあるように、pmaマウスは前・外側下腿筋群に異常を呈するところから、我々 は、下腿筋群の筋蛋白の分布パターンを第一に調べた。マウスはペントバルビタール・ソーダを腹 腔内投与(40mg/Kg)し、深麻酔後、頸動脈からの放血により処置した。放血した血液の一部は血 清成分の分析に用いられた。マウスは、pmaマウス及び正常な同腹のマウスが対照(Control)と して用いられた。また、正常なものは、特に発育の基礎資料として、発育段階の異なるものが余分 に調べられた。

下腿筋群は、最も異常の大きいと思われる前脛骨筋(Tibialis anterior muscle)と外見上も 組織学上も異常の認められない足底筋(Plantaris muscle)とヒラメ筋(Soleus muscle) が 調べられた。各々の筋を、ガラスホモジナイザーにより試料調製液(A)-(9.5 M Urea、2% Nonidate P-40、5% 2-Mercaptoethanol、1.6% Ampholine(pH5-7)、0.4% Ampholine

*金沢大学教養部

** 東京大学医学部

-45-

(pH 3.5 – 10)) とともに均一化した後、等電点電気泳動(IEF)とSDSポリアクリルアミ ドゲル電気泳動(SDS–PAGE)を組み合わせた二次元電気泳動法により分画を行った。二次元 電気泳動法は基本的にはO'Farrell(1975)の方法²⁾に従った。分画された筋蛋白はCoomassie brilliant blue 法により染色を行った。また、遅筋の代表として知られるヒラメ筋はマウスの場 合、遅筋型線維と速筋型線維及び中間型線維の存在が認められており、発育に伴って、それらの量 的関係が変化することが考えられている。発育状態を検索するために、単一筋線維(Single muscle fiber)についても、上記とほぼ類似の方法により調べた。染色は、蛋白量が微量なため、 Oakley ら(1980)による銀染色法³⁾に従って行った。筋蛋白の同定は、既知の蛋白を抽出・精 製した後 co-migrationを行って同定した。

筋肉はまた、代謝特性を知るために、別の試料溶液(B)-(0.1 M KCl, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.0)において均一化を行い、600×g にて10分間 遠心をした後上清を乳酸脱水素酵素(LDH)のアイソザイム分析にかけた。 LDHは筋肉型(Mtype)と心臓型(H-type)の二種のアイソザイムがあり、前者は細胞の無酸素的代謝と関係が 深く、また後者は有酸素的代謝と関係があると考えられており、それらの細胞内における割合が、 その代謝特性を表わすと考えられている。LDHの分画は、DietzとLubranoの方法(1967)⁴⁾ に基本的に従って行った。ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画されたアイソザイムは、テ トラゾリウム塩を用いる活性染色法により可視化し、デンシトメーターにより定量した。更に、単 一筋線維の特性を知るために、一部の筋の単一筋線維においてもLDHのアイソザイムの検討を行 い、収縮特性と代謝特性の関連性についての検討もあわせて行った。

血清成分の分析は、臓器特性を知るためのスクリーニングとして行い、ヒトの臨床検査において もよく調べられる、LDH, α-ヒドロキン酪酸脱水素酵素(α-HBDH)、クレアチンキナーゼ (CPK)、グルタミン酸オキサル酢酸トランスアミナーゼ(GOT)およびグルタミン酸ピルビン 酸トランスアミナーゼ(GPT)の活性を酵素法により測定した。

結 果

一般的に知られている哺乳類の骨格筋における二次元電気泳動法によるモデルパターンを図ー 1 に示した。通常速筋型(Fast-type)は分子量4万3千以下の酸性の筋蛋白としてアクチン (Actin, A)、 α 型トロポミオシン(α -Tropomyosin, α -TM)、速筋型トロポニンC(f-Troponin C, fTN-C)を1種類づつ、そして3種類の速筋型ミオシン軽鎖(f-Myosin Light Chains, fLC1, fLC2, fLC3)を持ち、遅筋型は、アクチン(A)、 β 型トロポミオシン(β -TM)、遅延型トロポニンC(sTN-C)を1種類づつと、2種類の遅筋型ミオシン軽鎖(s-Myosin Light Chains, sLC1, sLC2)を持つと考えられている。 両型を混合する と図 - 1 の中央 下に示すようになり、各々の異種性を同定することができる。正常(Normal)な群とpmaマウス 群における筋全体の分画パターンを速筋としての前脛骨筋(Tibialis anterior muscle)は図-2、 足 底 筋(Plantaris muscle)は図 - 3、 そして 遅筋としてのヒラメ筋(Soleus

-46-



図1. 2次元電気泳動法による筋蛋白のモデルパターン

muscle) は図-4に示した。これらの筋でNormalとpmaを比較すると、異常の最も著明な Tibialis anterior muscle (図-2)の5週齢において、Normal は図-1に示すように ミ オシンがほぼ速筋型であるのに対し、pmaでは fLC1 に対する sLC1 の存在比が大きく、 また TN-Cにおいても遅筋型の sTN -Cが存在しており、筋蛋白の分化の遅れまたは異常が示唆されて いる。驚くべきことに、一見正常に見える Soleus muscle (図-4)においても同様なことが発見 された。遅筋としての Soleus muscle は発育に伴ない Slow-typeの蛋白成分が増加するのが普通 であるのに対し、 図 - 4 の 5 週 齢 における ミオシン軽鎖成分が pmaにおいては Normal より Fast-type のものが多量に存在しており、また TN-Cにおいても pma でFast-type が多く存在し、 分化が遅れていることを示していた。しかし、Plantaris muscle ではそのような差は見られなか った。これらは障害のある部分はもちろん、正常に見える筋、特に遅筋のSoleus muscle でも蛋 白質の遺伝子発現が異常になっていることを示すものである。Soleus muscleの単一筋線維で調べ た場合には、 図 - 5に示すような 2種類の存在が認められただけで、Normal も pmaも細胞は 正常であることが確認され、 図 - 4 の示す 結 果 はこれら2 種類の存在量の違いによるものと考 えられた。このような分化の遅延は pmaの正常な筋では少くとも2ヶ月齢までで、以後は Normal と同じような分化が認められた。しかし、異常のある Tibialis anterior muscleでは一定した変 化が認められなかった。

次に、代謝特性を示すLDHのアイソザイムパターンを示す(図-6)。ここでは、長指伸筋
 (Extensor digitorum longus muscle)、Tibialis anterior muscle, Soleus muscle, 心
 筋(Cardiac muscle)と血清における結果を示した。 図-6から明らかなように、 萎縮の著
 しいEDL, TIBの活性が顕著に低くなっている。 これらの結果を表 -1にまとめた。表 -

-47-



図 2. 前脛骨筋の筋蛋白の分布パターン

WHOLE MUSCLE PROTEINS PATTERN OF





図 3. 足底筋の筋蛋白の分布パターン





図 4. ヒラメ筋の筋蛋白の分布パターン



図 5. ヒラメ筋の単一筋細胞の典型的遅筋型線維(左)と中間型線維(右)の筋蛋白の 分布パターン



表 1	. L	DHの	71	ソザイ	ムの割合

		LDH	ISOZYME
		H-type(%)	M-type(%)
EDI	(N)	20.3	79.7
LDL	(P)	16.3	83.7
TIR	(N)	13.6	86.4
	(P)	15.2	84.8
SOL	(N)	42.0	58.0
	(P)	31.9	68.1
CAPD	(N)	53.1	46.9
	(P)	53.6	46.4

図 6. LDHのアイソザイムパターン

1 では pmaにおいて、EDLとSOLの代謝がM-typeが増加しているところから無酸素的代謝 の増進が認められた。特に遅筋と言われるSOLの無酸素的代謝の増大は、先の筋蛋白の分化の遅 延化と一致する傾向を示している。単一筋線維で調べたところSOLでは先の筋蛋白による分類と ほぼ一致するLDHのアイソザイム分布が存在することが示された(図-7)。典型的な遅筋型線 維(Typical slow fiber)で45~55% M-typeの分布があるのに対し、中間型線維(Intermediate fiber)はそれが60~70%であった。 先の表 - 1の結果と合わせて考えると、中 間型線維の増大即ち分化の遅れが pmaにおいて生じていることを示すものである。

最後に血清の諸酵素の活性についての結果を表 - 2 に まとめた。ここでは、Normal と pma の間にいずれの酵素においても著名な差がみられなかった。これは、 pmaの萎縮筋の変化が完全に 生じた後で、すでに細胞の変性が完了したために血清中に異常の出現がみられなかった可能性があ る。

⁽N): NORMAL, (P): PMA



図 7. ヒラメ筋の単一筋細胞の LDH アイソザイムと 筋蛋白の分布パターン

表2. 血清中の酵素活性

ENZYME ACTIVITY OF SERUM (Unit/1)

	CONTROL	PMA	
SEX	1	*0	
AGE(WK)	20±4(5)	20±7(6)	
B.W. (g)	27.4±3.0(5)	25.2±1.6(6)	
LDH	126±33(4)	112±34(4)	
α−HBDH	14.8±5.5(3)	15.2±7.7(4)	
CPK	146±50(4)	141±34(5)	
GPT	1.8±0.6(2)	5.6±2.8(2)	
GOT	0.6±0.3(3)	1.0±0.8(2)	

 $[\]overline{X} \pm S.D.(No. of samples)$

考察

以上 pmaマウスの生化学的解析 の結果、このマウスは収縮特性、 代謝特性のいずれの面からみても、 筋細胞分化の遅れが示唆された。 それはまた、外見上異常のみられ ない筋においても確認された。神 経支配上、関係のないと思われる 筋における分化の遅れは、筋原性 の因子による可能性がうかがわれ るが、歩行異常による移動能の低 下による発育への影響の可能性も 残されている。

- 対 対
- Esaki, K., Yasuda, Y., Nakamura, M., Hayashi, H., & Ono, K. A new mutant in the mouse: Peroneal muscular atrophy. Exp. Anim. 30; 151-155 (1981)
- 2) O'Farrell, P.H.

High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250; 4007-4021 (1975).

- 3) Oakley, B.R., Kirsch, D.R., & Morris, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 105, 361-363 (1980).
- 4) Dietz, A.A., & Lubrano, T: Separation and quantitation of lactate dehydrogenase isozymes by desk electrophoresis. Anal. Biochem. 20; 246-257 (1967).
- 5) 北 浦 孝

Developmental properties of muscular proteins in the normal and diseased mouse. 体力科学 30; 375 (1981). II. 乳時期に運動失調を起して死亡する (mdy)マ ウスの成因の解析と疾患モデルとしての評価 **Ⅱ**−1. *mdy*マウスの発見の経過と遺伝様式の分析

江 崎 孝三郎*

研究協力者 吉 村 幸 夫*

筆者らは、ICRマウスを近親交配している過程で、神経・筋疾患に起因すると考えられる運動 失調を示す個体を発見した。この異常形質を保存するとともに、遺伝様式の分析をおこなったので その成績を報告する。

異常動物発見までの経過

1976年に日本クレア(株)より入手した、noninbred の Jcl: ICRマウスを起源とした 近交系を育成する目的で兄妹交配をおこなっていたところ、第6代の雌・雄1組の交配より出生し た初産仔3匹のうち2匹に、後肢をひきずるように行動する異常が生後17日に発見された。この 異常仔は2匹とも離乳前に死亡した。そこで同じ雌・雄の交配を続け2産次以降の仔を観察したと ころ、各産次で初産の仔にみられたと同様の異常を発現するものがみられた。しかし、異常を発現 した仔はいずれも離乳前に死亡するため、これらの動物を繁殖に使用することはできなかった。従 って、この形質の保存のためには後述の後代検定を用いた系統維持をおこなう必要があった。

Ⅱ. 異常マウスの外見的症状

出生時には外見的な異常は認められず、同腹の正常仔と区別することはできない。生後10~12 日頃になると、異常仔は後肢が麻痺したようになり、後肢をひきずるように前肢のみでほふく前進 する。症状は次第に進行し、後肢は反転したようになり、時には体を回転することもみられる。生 後15~16日頃より衰弱がはげしくなり、呼吸困難の様相もみられ、通常は生後20日以前に死 亡する。生後10~12日の症状発現開始の時期に同腹の正常仔を淘汰して、母親に異常仔のみを 哺育させると、22~23日齢まで生残することもある。

Ⅱ.遺伝様式の分析

A. 同系内における交配実験

異状を発現した個体は離乳前に死亡するため交配実験に使用することはできなかった。そこで、 異常個体が出現した腹の正常雌・雄を組にして交配実験をおこなった。得られた成績を表1に示し た。16組の交配をおこなったところ、8組の交配からは異常仔は出現しなかったけれども、残り の8組の交配では異常仔が出現し、総産仔数121匹中正常仔が91匹、異常仔が30匹であった。

この異常が常染色体上の1個の劣性遺伝子に支配されていると仮定した場合、交配の全組合せの * (財)実験動物中央研究所

	表1	異常	(m d y)	系内での)交	配実験	成緩
--	----	----	---	-------	---	------	----	-----	----

交配の組	数 <mark>f</mark> ī	子の表 E常	現 型 異常	
8	1	00	0	100
16 8		91	30	121
exp.* ² 7.	1	91	30	121

うち異常仔の出現する組の割合の理論 値は4/9、そこでの正常仔と異常仔 の比の理論値は3:1となる。上記の 交配実験の成績はこれらの理論値とよ く一致していた。

B. 血縁関係のある正常ラインとの 交配実験

*1:異常マウスと同腹の、正常雌・雄を交配 *2:理論的期待値

異常仔を出産させたことのある雄

(carrier)をICRの正常ラインの雌と交配した時の F_1 および F_2 の成績を表2に示した。 F_1 においては得られた41匹(雌14匹、雄27匹)のすべてが正常であった。次に、 F_1 どうしの交 配を14組おこなったところ、10組の交配においては異常仔の出現はみられなかったけれども、 残りの4組の交配では異常仔の出現がみられ、総産仔数80匹中、正常仔が58匹、異常仔が22 匹であった。これらの成績は前項と同様にこの異常が常染色体上の1個の劣性遺伝子に支配されて いると仮定したときの理論値と良く一致している。

_	the second se		
交配の組合せ	仔の表 正常 雌雄	現型 <u>異常</u> 雌雄	計
保因マウス×ICR	14 27	0 0	4 1
$\begin{array}{ccc} \mathbf{F_1} \times \mathbf{F_1} \\ & 10 \\ 14 \\ & 4 \end{array}$	94 104 2	$0 \\ 0 \\ 0 \\ 9 \\ 2 \\ 2 \\ 2 \\ 2 \\ 3 \\ 2 \\ 3 \\ 3 \\ 3 \\ 3$	198 80
exp. ^{*1} 3.5	60	20	80

表2 mdy 保因マウスと正常 ICRマウスとの交配実験成績

*1:理論的期待值

C. 血縁関係のない正常ライン(C57BL/6)との交配実験

異常仔を出産させたことのある雄(carrier)をC57BL/6と交配し、そこで得られた成績 を表3に示した。Fiにおいては得られた12匹のすべてが正常であった。次に、Fiどうしの交配を 6組おこなったところ、5組からは異常仔は出現しなかったけれども、1組の交配から生れた88 匹中22匹に異常仔が出現した。

交配の組合せ	仔 正 雌	の 常 雄	表	現 <u>異</u> 雌	型 常 雄	at a
保因マウス×C57BL/6	6	6		0	0	1 2
$F_1 \times F_1$						
5	34	41		0	0	75
· 1	3 7	2 8		11	1 2	8 8
	6	5		2	3	
exp. *1 1.5	6	6		2	2	88

表3 mdy 保因マウスとC57BL/6マウスとの交配実験成績

*1:理論的期待值

以上3種の交配実験によって、この異常は常染色体上の1個の劣性遺伝子に支配されているもの と結論できる。この遺伝子をmotorneuron disease-Yoshimura、遺伝子記号を*mdy*と仮称する。

Ⅱ-2. mdyマウスの組織化学的解析

石原傳幸*

今回、実験動物中央研究所で新しく発見された mutant, mdyマウスを検討する機会に恵まれた。 mdyマウスは生後10日目頃より歩容異常を発症し、四肢の筋力低下が急速に進行し生後20日 目頃に死亡するという極めて急速な経過をたどる。遺伝的には常染色体劣性遺伝形式をとることが 既に解明されている。生後間もなく発症し、急速な経過をとるなどヒトにみられる Werdnig-Hoffmann 病のモデルになりうるかという可能性も考えられた。

末だ、mdyマウスの筋肉についての組織化学的検討はされていないことから、筆者はこのマウスの 下肢筋を中心に組織化学的検討を行ない、さらに神経筋接合部についても検索を行ない若干の知見 を得たので報告する。

対象および方法:

対象は mdy マウス 25匹(雄14匹、雌11匹)、生後12~17日、対照として生後12~21 日のマウス(主に mdy マウスの litter-mate) 26匹(雄14匹、雌12匹)である。

エーテルにて麻酔後、前脛骨筋、ヒラメ筋、大腿四頭筋などを採取した。筋肉はトラガカントゴ ムによりコルク片に垂直に接着、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速に凍結固定し、-70 ての冷凍庫に保存した。

-25℃のクリオスタットで厚さ10 μmの連続切片を作成した。

ヒラメ筋、前脛骨筋:H&E染色、PAS染色、Gomori のトリクローム変法、oil red 0 染 色、ATPase 染色 (routine, pH 4.6, pH 4.2)、NADH-TR染色、menadione-linked α-glycerophosphate dehydrogenase 染色、nonspecific esterase 染色、acetylcholinesterase 染色、acid および alkaline phosphatase 染色、phosphorylase 染色 を施行した。¹⁾

大腿四頭筋: Pestronk と Drachman により1978年に報告された、神経末端と神経終板を 同時に染色する方法²⁰で神経筋接合部を観察した。クリオスタットで厚さ50 μの切片を、クリオス タット中で冷却したスライドガラスに付着させた後、原法に従って染色した。

生後14日目の2例(雄と雌)を、2%グルタールアルデヒドで灌流固定し、背髄、前根、未梢 神経を採取した。標本は2%グルタールアルデヒドで2時間固定、固定後2%オスミウム酸にて後 固定(2時間)、アルコールにて脱水後、エポン包埋し、thick sectionを作成、トルイジン ブルーにて染色、光学顕微鏡で観察した。

* 国立療養所東埼玉病院

結果:

生後14日目の mdy マウスを灌流固定し第3 腰髄前角、前根および坐骨神経を光学顕微鏡で観察 したが、背髄前角神経細胞、前根神経および坐骨神経の軸索および髄鞘には明らかな異常は認めな かった。

mdy マウス19匹(雄12匹、雌7匹)、対照マウス12匹(雄7匹、雌5匹)について前脛骨筋(白筋)、ヒラメ筋(赤筋)を採取し組織化学的に検討を行なった。

mdyマウスでは、筋線維直径の大小不同は軽度に認めるものの筋線維の壊死、変性、再生はみら れなかった。また小径線維や群集萎縮、標的線維も見られず、円型細胞浸潤や脂肪、グリコーゲン の貯留も認めなかった。トリクローム変法ではネマリン小体はなく、セントラルコアを思わせる所 見もNADH-TR 染色には認めなかった。ATP ase 染色でも I と II 型線維への分化は明らかであ り、本 mutant が単純な末梢神経障害やヒトの筋ジストロフィーおよび先天性ミオパチーのよう な筋厚性疾患とは異なる所見を示していることが明らかとなった。

図1には生後12日目の対照マウスとmdyマウスのH&E染色の結果を示す。上段の前脛骨筋で は筋直径が殆んど両者間に差がないが、下段のヒラメ筋では対照で筋直径が大であることがわかる。

図2には生後14日目の対照マウスとmdyマウスのH&E染色結果を示す。前脛骨筋では12日 目の図1と同様に筋線維直径がmdyマウスでやや小さい傾向はあるものの両者の差はほとんどない が、ヒラメ筋では mdyマウスで明らかに小であった。

生後17日目となると、(図3)前脛骨筋でも筋線維の直径は対照マウスの1/2程度となりヒ ラメ筋では約1/3程度となっている。以上からmdyマウスでは対照マウスに比べ、筋線維直径が、 発症後進行性に小さくなることが判明したが、この原因として筋萎縮が起こるのか、筋の発育障害 で両群の差が出現するのかの2つの可能性が考えられた。

図4には生後12日目の対照マウスとmdyマウスのATP ase染色(pH 4.2)の染色結果を示 す。図でわかる通り、type 1と2への分化には異常がないと思われ、両タイプ共にmdyマウスで 直径が小であることが(特にヒラメ筋)観察された。

図5には生後17日目の対照マウスとmdyマウスのATP ase 染色(pH 4.6)の結果を示す。 mdyマウスでは対照マウスに比べ、type 1、type 2型線維共に直径が小さくなっていることが 明らかである。

図6には生後12日目と17日目の対照マウスとmdyマウスの前脛骨筋でのATP ase 染色結 果を示す。対照マウスでは5日間の間に筋線維直径は大となり、mdyマウスでは筋直径が殆んど変 化しないところから、筋萎縮が進行すると考えるより成長(発育)の障害が存在する可能性が高い。

図7には図6と同様にヒラメ筋でのATP ase 染色の結果を示す。

以上のように筋原性異常、通常の末梢神経障害を示す異常は筋病理所見上全く見られず、筋の発 達障害の存在が強く示唆された。次に、神経筋接合部の形態について検討した。Pestronk & Drachman の方法によれば神経末端と運動終板が同時に染色される。

図8は生後17日目のmdyマウス(雄)での染色結果を示す。この染色では終板を支配する神経



 図1
 生後12日目、発症まもなくのmdyマウスの下髄筋のH&E染色を示す。

 1:対照マウスの前脛骨筋
 3:対照マウスのヒラメ筋

 2:mdyマウスの前脛骨筋
 4:mdyマウスのヒラメ筋



生後14日目、H&E染色 ×85 図2

 1:対照マウスの前脛骨筋
 3:対照マウスのヒラメ筋

 2:mdyマウスの前脛骨筋
 4:mdyマウスのヒラメ筋



図 3 生後17日目の所見 H&E染色 1:対照マウスの前脛骨筋 **2:**mdyマウスの前脛骨筋 **4:**mdyマウスのヒラメ筋

3:対照マウスのヒラメ筋



 図4
 生後12日目の所見、ATP ase 染色(pH 4.2)
 ×85

 1:対照マウスの前脛骨筋
 3:対照マウスのヒラメ筋

 2:mdyマウスのヒラメ筋
 4:mdyマウスのヒラメ筋



 図5
 生後17日目の所見、ATP ase 染色(pH 4.6) × 85

 1:対照マウスの前脛骨筋
 3:対照マウスのヒラメ筋

 2:mdyマウスの前脛骨筋
 4:mdyマウスのヒラメ筋



図6 生後12日目と生後17日目の比較、前脛骨筋、ATP ase 染色、×85
 1:対照マウスの前脛骨筋 生後12日 3:対照マウスの前脛骨筋 生後17日
 2:mdyマウスの前脛骨筋 生後12日 4:mdyマウスの前脛骨筋 生後17日
 上段はpH 4.2、下段はpH 4.6のATP ase 染色



図7 生後12日目と生後17日目の比較、ヒラメ筋、ATP ase 染色、×85
 1:対照マウスのヒラメ筋、生後12日
 3:対照マウスのヒラメ筋、生後17日
 2:mdyマウスのヒラメ筋、生後12日
 4:mdyマウスのヒラメ筋、生後17日
 上段はpH4.2、下段はpH4.6のATP ase 染色



図8 生後17日目のmdyマウス大腿四頭筋の染色の結果、×170、矢印は運動終 板を示すが、図9の対照マウスに比べ神経末端の分岐が多く複雑な形態を持っ ている。(Pestronk & Drachman法)



図9 図8と同じ方法による染色。対照マウスでは神経末端の分岐数が少なく比較的 単純な形態である。×340。 末端の分岐の数(terminal branch points)と運動終板の長さ(endplate length)が定量 的に計測可能となる。図の矢印が終板の部分であり、複雑な形態をとっていることが明らかである。 図9には対照マウス生後17日目の終板の形態を示す。比較的濃く染色されている部分が運動終板 であり、神経末端分岐数は比較的少なく形態は図9のmdyマウスに比し単純なことが観察された。 運動終板の長さについては、対照15ケ、mdy17ケの終板で比較したが、前者で51±17 μ 、 後者が54±10 μ と有意差をみなかった。しかし分岐数については表1のような結果を得た。雄 マウスのみで比較したものである。生後17日目のmdyマウスの神経末端分岐数は明らかに増加し ており、立体的にこれを図示すると図10のようになる。

表1 mdyマウスおよび対照マウスの神経終板の分岐数の比較

AGE	CONTROL	MDY MOUSE
10 DAYS	3.5	
13	3.5	
17		8.3
20	2.5	

TERMINAL BRANCH POINTS

さらに詳細に観察するとmdyマウスでは図11の矢印のように一つの運動終板に複数の神経末端 が入り込んでいる (polyneuronal innervation) ことが多く、分岐数の増加はこれに起因する ことが考えられた。この polyneuronal innervation を示す運動終板の割合を検討し表2に示 す。mdyマウスでは polyneuronal innervation を持つ運動終板の割合が明白に高く、立体ヒ ストグラムに図示すると図14のようになる。

考察:

適当な疾患モデル動物を発見することは疾患の病因解明、治療上大きな意味を持つと考えられて いる。但し、モデル動物である以上、当然ヒトとは病態が異なることは避けられず、疾患モデル動 物の研究にはおのずから限界があることは当然と思われる。筆者は今回筋肉の形態学という立場か ら、このmutantを検討した。筋自体の変化を示すmutantは数は少く、dyマウス³⁾、dy²¹⁴⁾マ ウスがよく知られているが発症時期が生後数週とmdyマウスとは異なる経過を示し、急速に死の転



- 図10 mdyマウスおよび対照マウスの神経終板の分岐数の比較
- 表2 *mdy*マウスおよび対照マウスの polyneuronal innervation を持つ神経終板 の比率

POLYNEURONAL INNERVATION

AGE	CONTROL	MDY MOUSSE
10 DAYS	38. 9%	
17	9. 7	47.5
19	12.1	· · ·

帰をとることから、ヒトのWerdnig-Hoffmann病に対応するモデル動物になりうるかと期待された。筋病理の上からはこのWerdnig-Hoffmann病にみられる大群集萎縮が全く認められず、 また筋ジストロフィーを思わせる筋原性所見もみられなかった。また、検索例数は少ないが、中枢 神経系や坐骨神経にも著変なく当初は筋力低下の原因が全く(形態学的には)不明であった。そこ で神経筋接合部を検索してみたところ、結果は分岐数の増加が発見され、その原因としてpolyneuronal innervation を持つ終板の割合が著増していることが想定されるに至ったわけであ



図11 大きな矢印が示す運動終板には、小さな矢印で示すように、2つの神経が入り込み、複雑な形態となっている。この polyneuronal innervation がmdyマウスにおける分岐数の増加の原因と考えられる。
 (Pestronk & Drachman 染色) ×340



POLYNEURONAL INNERVATIONRUN

図12 mdyマウスおよび対照マウスの polyneuronal innervation を もつ神経終板の比率 1976年Brown らは⁵⁾ 正常 ラットのヒラメ筋では polyneuronal innervation を持つ運 動終板は生下時100%であり、生後13~15日目で50%、約20日で殆ど0%になると報告 している。この報告と比較しても、mdyマウスでは polyneuronal innervation を持つ終板の 割合は高率であることは明らかである。今回は単に形態学的に検索したのみであり、電気生理学的 アプローチは行なわなかったので、終板の立体的広がりを隅々まで観察することは不可能であり、 polyneuronal innervation を understimateしている可能性は非常に高く、実際にはもっと 高い値をとると思われる。

前述のように、出生後polyneuronal innervation は徐々に減少し、一つの終板は一つの神 経により支配されるようになるが、このプロセスの障害の存在がmdyマウスの症状の原因でありう るかについては明らかではない。

小川の観察によれば背髄前角細胞の分布異常があると報告されており、宮田の電気生理学的な検索によれば、①Ca イオンに対する感受性の異常、②神経伝導速度の異常など、神経原性の異常の存在が示唆され、神経筋接合部異常疾患というよりも、背髄前角細胞の異常が原因となり、何らかの trophic factor の欠如により発症すると考えるのが一番合理的であると考えられる。

mdyマウスと同じような運動異常マウスとしてDuchenらが1967年に報告したmedマウスが 知られている。⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ 遺伝形式、発症時期、症状、死亡時期などmdyマウスと全く同様であり、形態 学的には神経筋接合部異常が強度であり、神経筋接合部異常疾患と考えられている。medマウスで は terminal sprouting が著明であるが、本mdyマウスでも ultraterminal sproutingを 示唆する所見が一部には見られている。宮田はmdyでは伝導速度がおくれることを報告しているが、 medマウスでは正常であるとされ、この点では全く異なり、mdyマウスが独立した、新しいmutant であることが強く示唆されるが、両者が本当に独立した疾患単位なのかどうかは、もう少し詳細に 比較検討が必要ではないだろうか。

さて、ヒトとの関連については、ヒトのWerdnig-Hoffmann病のモデルには、mdyマウスは 不適当であると結論せざるを得ないが、神経筋接合部の発達のメカニズム解明については有用な示 唆を与えるモデル動物となりうると考えられる。

結論:

mdyマウスの筋および神経筋接合部を形態学的(組織化学的)に解析した。

- ① 筋は進行性に萎縮するというより、発達の遅延、停止が見られるのみで、type 1、2への 分化もよく、筋原性、神経原性の所見をみない。
- ② 神経筋接合部では polyneuronal innervation を持つ運動終板の割合が高く、発達の遅 延又は停止の存在が考えられた。
- ③ 上記の発達障害は、他のアプローチによる結果と合わせると、背髄前角神経細胞の異常に起因すると予想される。

る。

④ 神経筋接合部発達のメカニズム解明には有用な動物モデルと考えられる。

文 献

- Dubowitz V. & Brooke M.H. : Muscle biopsy: A modern approach.
 Philadelphia, PA, WB Saunders, 1973.
- Pestronk, A. & Drachman, D.B.: A new stain for quantitative measurement of sprouting at neuromuscular junctions. Muscle & Nerve 1: 70-74, 1978.
- 3) Michelson, A.M., Russell, E.S. & Harman, P.J.: Dystrophia muscularis: A hereditary primary myopathy in the house mouse. Proc. Nat. Acad. Sci., 41: 1079-1084, 1955.
- Meier, H. & Southard, J.L. : Muscular dystrophy in the mouse caused by allele at the dy-locus. Life Science, 9 (Part 2): 137-144, 1970.
- 5) Brown, M.C., Jansen, J.K.S. & van Essen, D.: polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its alimination during maturation., J. Physiol. 261: 387-422, 1976.
- 6) 小川恵弘:「新たに発見された二つの神経・筋異常マウスの成因の解析と疾患モデルとして の評価」研究班、昭和57年度班会議、昭和57年12月29日、大阪・
- 7) 宮田雄平:「新たに発見された二つの神経・筋異常マウスの成因の解析と疾患モデルとして の評価」研究班、昭和57年度班会議、昭和57年12月29日、大阪・
- 8) Duchen, L.W., Searle, A.G. & Strich, S.J. : An hereditary motor end-plate disease in the mouse., J. Physiol., 189, 4-6P, 1967.
- 9) Duchen, L.W.: Hereditary motor end-plate disease in the mouse: light and electron microscopic studies., J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 33: 238-250, 1970.
- 10) Duchen, L.W. & Stefani, E. : Electrophysiological studies of neuromuscular transmission in hereditary "motor end-plate disease" of the mouse., J. Physiol. 212: 535-548, 1971.

-73 -

Ⅱ-3. *mdy*マウスの神経病理学的研究

小 川 恵 弘^{*} 研究協力者 今西美知子^{*}、岡 春美^{*}

江崎、吉村らによってICR系マウスに新たに発見された mdyマウスの臨床所見の発現に神経系 がどのように関与しているかを知る目的で中枢神経系、末梢神経系および筋肉について対照群と比 較しながら光学顕微鏡や電子顕微鏡などを用いて種々の日令の症例について主に病理形態学的に研 究を進めた。また一部の例については形態計測による定量的研究も行った。

方 法

I. 光学顕微鏡的研究:ネムブタール腹腔内投与による麻酔のあと4%パラホルムアルデヒドを 左心室より注入し全身を灌流固定した。固定後大脳、中脳、橋、延髄、小脳や脊髄を形をくずさな いように取り出した。摘出後同じ固定液で一晩冷蔵庫内で固定し肉眼観察後パラフィン切片用の切 り出し材料とした。大脳は前額断に3等分したものと矢状断に切り出し、小脳は歯状核を含むよう に前額断と矢状断に切り出した。中脳、橋、延髄は前額断に、脊髄は頸髄・胸髄・腰髄をそれぞれ ーケ所前額断に切り出した。末梢神経は頸髄および腰髄の根部、上腕、前腕、大腿、下腿はそれぞ れの神経と一部の例では後根神経節を摘出した。筋肉は上腕筋、前腕筋、上腿筋、下腿筋、足筋お よび肋間筋を材料とした。染色法は神経系についてはルクソール・ファースト・ブルーとヘマトキ シリン・エオシンの重染色、ボディアン鍍銀法を行い、末梢神経についてはマロリー染色も行った。 筋肉はヘマトキシリン・エオシン染色、リン・タングステン酸ヘマトキシリン染色を行い、一部の 例では末灌流凍結切片につきアセチルコリンエステラーゼ反応を行った。

I. 電子顕微鏡的研究:ネムブタール麻酔後、0.1モルリン酸緩衝液加2%グルタールアルデヒ ド液にて灌流固定をした。標本摘出部位は光学顕微鏡のための検索部位と同じである。エタノール 脱水後通常の方法でエポキシ樹脂包埋をした。1ミクロン切片作製後トルイジンブルー染色をし光 学顕微鏡による検索資料とした。その後一部をトリミングし超薄切片を作製し鉛とウランの2重染 色後電子顕微鏡による検索に供した。

II. 形態形測による定量的研究:Iと同じ方法で固定した動物の第3腰髄前根を取り出し、エタノール脱水・エポキシ樹脂包埋したブロックから1ミクロン切片を作りトルイジンブルー染色をした。光学顕微鏡で全体像写真を作製し面積を測定した。また高倍率写真を全面積についてもれなく撮影し、その後2000倍前後に拡大した(症例によって拡大率が違う)。この写真を用いて面積当りの有髄神経線維の数を知り、また各有髄神経線維の外周長を計測し直径に換算した後直径と本数

* 東京都神経科学総合研究所神経病理

の関係を知るためにヒストグラムを作製した。 全研究に使用した動物は次の如くであった。

日令	mdy	Control
12日	6	3
13日	0	0
14日	3	0
15日	2	2
16日	3	3
17日	8	4
18日	3	3
19日	5	2
20日	4	0
22日	0	1
	34例	18例

結

I. 光学顕微鏡的研究

1)大脳:クモ膜、血管では全例とも正常対照と 同様著度は認められなかった。前頭葉、頭頂葉、後 頭葉、側頭葉とも神経細胞の層構造は各日令の正常 対照例と差はなく、また各神経細胞の大きさ・細胞 質の性状・核の状態も正常対照例と差はなかった。 萎縮・変性・脱落はもとより核と細胞質の比も正常 対照例に比して特に大きなものもなく発育障害を示 唆する所見もみられなかった。大脳白質のルクソー ル・ファースト・ブルーによる染色性は正常対照例 とその巾や濃度において差はなく各々の有髄神経線 維にも変性などの所見は認められなかった。

2)小脳:分子層、プルキニエ細胞層、顆粒層など小脳皮質は正常対照例とその発育において差 はなかった。また、変性、萎縮、脱落等病的な所見も認められなかった。白質でも発育は良く、神 経線維の変性・脱落などの所見もみられなかった。歯状核も良く保たれ特に異常を思わせる所見は なかった。上・中・下小脳脚もそれぞれ特に異常を示唆する所見は認められなかった。

3) 中脳:大脳脚、中心灰白質、赤核、黒質などその構成要素には特に異常は認められなかった。

4)橋:顔面神経核、三叉神経核、青斑核などのすべての核と網様体及び橋核と横行線維及びそれらの間を走る大脳皮質脊髄路にも特に異常な所見はなかった。

5) 延髄:同様に異常を思わせる所見はなかった。

6) 脊髄:生後12日目では前角細胞は腹外側群、腹内側群、背外側群などほぼ同じ大きさの神 経細胞がみられ、全体としてやや小さく背外側群に小数正常対照例と同じくらいの大きさのものを 認める。正常対照群では前述3群のうち、背外側群には大きな良く発達した神経細胞が認められ、 腹外側群や腹内側群にも大きな神経細胞が少数認められる。生後15日のmdy例では背外側群と腹 外側群にはほぼ同じ大きさの神経細胞が認められるようになり、腹内側群の神経細胞は前2群に比 べて小さい。一方、正常対照群では3群の神経細胞がほぼ同じ大きさとなるが腹内側群の神経細胞 はやや小さい。生後18日になると、mdy例では腹外側群と背外側群の神経細胞はほぼ同じ大きさ となり腹内側群との差が出てくる。対照群も同様の所見を示す。

これらの発達の進行とは別に mdy例では、胞体が濃染される小さい神経細胞や核の占める割合の 大きな比較的小さな神経細胞で凹凸の強い萎縮を思わせる細胞や細長い神経細胞などの所見が時に 認められることがある。12日例ではこの変化を思わせるわずかな所見を示す細胞が時に認められ る。14日から16日以後になると更に明瞭にこれらの所見を示す細胞が前角神経細胞群の中に時 に出現してくる。脊髄の白質や後角における所見は正常対照群との差は認められなかった(図1a、 b)。



図1. mdyマウス(生後19日)の頸髄。白質に異常は認められない。 腹外側、背外側に大きい神経細胞がみられる。

7) 末梢神経:同日令の正常対照群に比べて mdy群の末梢神経では、ルクソールファーストブル -染色標本でみると一般にやや淡く染色される。縦切片標本でしかもシュワン細胞などの核が多く 存在するものもある。強拡大にすると髄鞘の薄い線維や細い線維が多く、しかも時に有髄神経線維 が髄鞘塊のように虚脱に陥っているものもみられる(図2)。この所見は幼若なものにほど良く認 められ、しかも18日例でもみられたが、後者の所見は15日例以後のものに稀に認められるよう になった。

8) 筋肉:正常対照例では各グループの大きさには特に差を認めない。しかし、12日例では1 つのグループの筋線維には大小不同をわずかに認められた。15日例ではほぼこの所見はみられな くなり筋線維にほぼ同じ太さとなる。一方、mdy例では所々にグループ全体が小さいものが認めら れ(図3)、幼若例ではこのグループの中の各筋線維にも大小不同がみられたが20日例でもこの 所見を示すものがあった。また線維の角が丸かったり、中心核も時に認められた。縦切片では筋線 維鞘の核も多くみられた。PTAH染色では横紋は対照例とほぼ同じであったが、マロリー染色で 黄染する筋線維では横紋が不明瞭なものもみられた。

Ⅱ. 電子顕微鏡的研究:

光学顕微鏡的に異常な所見の認められなかった大脳・小脳・中脳・橋・延髄については1 ミクロン切片作製とそれらの光学顕微鏡的検索のみで終った。脊髄、末梢神経及び筋肉の所見につき以下 に述べる。脊髄前角細胞内に認められた小空胞は小胞体の拡大したものと判明した。これはゴルジ装置の 周辺の小胞と関連するものであって対照群においても同様な所見を認めた。前角神経細胞の核や核



図2. mdyマウス(生後19日)の大腿神経。髄鞘のうすいものが多くみられる。


図 3. mdy マウス(生後15日)の大腿筋。グループ萎縮がみられる。

膜及び細胞質内のミトコンドリアやニッスル顆粒といわれる粗面小胞体などの細胞小器官や神経細 管などには特に異常な所見はみられなかった(図4)。またシナプスの構造や数も正常対照例と差 はなかった。

末梢神経では光学顕微鏡的にみられた虚脱した線維以外、軸索内にミエリン様小体など変性産物 を思わせる構造が極稀に認められたがフィラメントの増加などの所見はなく、正常対照例と差はな かった。またシュワン細胞や周囲間質にも異常な所見は認められなかった。

筋肉では19日例の上腕筋線維朝細胞の細胞質内に筋原線維の太さぐらいの線維構造物がグルー プをなして散在する。神経筋接合の神経終末部にはシナプス小胞やミトコンドリアもみられたが、 その数は少ないものもあった。またシナプス小胞の膜が不明瞭なものもみられた(図5)。しかし これらの小器官の明らかに断定しうる変性所見は認められなかった。一方、後シナプスの構造であ る synaptic cleft をみると secondary synaptic cleftが筋細胞側に少ない所もあり丸味をおびて ていた。細胞質内に100オングストローム前後の線維性構造物が所々集積してめられた。他の小器 管に関しては正常対照例と差はなかった。筋線維では各バンドなどの構造は良く保たれていたが、 時に流れているような所見もみられた(図5)。

Ⅲ. 形態計測による定量的研究

結果は表1、図6および7に示す如くであった。 生後17、19、20日齢、各1例であるが、発症例の有髄神経線維数の実数は正常対照例に比し

-79 -



図 4. mdy マウス(生後17日)の脊髄前角神経細胞。特に異常な所見はない。



図 5. mdy マウス(生後19日)の上腕外筋の神経終板。説明は本文参照。

て少なく、(19日例を除いて)しかも単位面積当りの有髄線維数は発症例の方が多く、日令が進 むにつれて対照例の値に近くなる。これらのことは組織学的に脊髄前角の神経細胞の脱落だけで説 明することはできなく、脱落のみならず発育の不良にもとずくと都合が良さそうである。

中枢神経系での話であるが軸索の太さが0.2 / 以上にならないと髄鞘はできてこないという。

ヒストグラムでみると正常対照例では2峯性の分布を示すが、発症例ではそれがはじめは明らか だがだんだん一峯性になっていく傾向にある。しかし細い線維の占める割合が多くなってくる。こ れは、一つには序々にではあるが発育していると考えるか、ある程度まで発育した線維が萎縮しつ つあるためかどちらかであり計測結果だけからでは不明確である。

Animal		Ares	Number of myelinated	Number
		µ ²	fiber	m.f./ $1\mu^2$
P17 (MDY	.C 10)	17247.5	839	0.049
P17 (MDY.	.A 18)	9440.1	609	0.065
P19 (MDY.	.C 15)	15486.3	727	0.047
P19 (MDY	.A 20)	15666.6	865	0.055
P20 (MDY.	C 23)	18365.3	1133	0.062
P20 (MDY.	A 24)	12331.7	767	0.062

表1. 対照マウスと mdyマウスの第3 腰髄前根における 有髄神経線維の数

P : day after birth

MDY.C : control

MDY.A : affected (homozygote)



図 6. 生後17日のマウスの第3腰髄前根における有髄神経線維 の太さと数の関係。上段:対照マウス、下段: mdyマウス



図7. 生後20日のマウスの第3腰髄前根における有髄神経線維 の太さと数の関係。上段:対照マウス、下段: mdyマウス

考 察

結果の項で述べた如く光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いての形態学的検索によりマウスの所見とし て認められたのは脊髄以下筋肉までである。

脊髄前角の各神経細胞群からの神経線維は一般的にいうと脊髄の髄節が上部ほど頭部の筋へ行き しかも外側ほど軀幹から遠い所を支配する。その細胞はヒトでは長径1004、短径30~704と いわれ非常に大きな神経細胞よりなる。前角神経細胞の数は正常対照側に比しmdy群は少ないとい うことはなかった。しかし前角を構成する各神経細胞群の日令による大きさの変化をみるとmdy群 では正常対照群に比して大きさ細胞が遅れて出てくる。しかし注意深く管理をして生後20日まで 生存した例でも同日令の対照と同じようにはならなかった。このことはこの群が正常対照群に比し て発育が遅れていると考えられる。

器質的に mdy マウスの神経細胞に認められた小空胞や神経細胞全体が小さく濃く染色されるいわゆる dark cell といわれるものは正常対照例にも時に賑められ、いわゆる固定操作中の人工産物といわれるものに一致する。²⁾

末梢神経の光学顕微鏡、電子顕微鏡による観察でも検索した範囲では結果の項で述べた如く両者 の差はほとんどなかった。しかし、有髄線維を比較すると細い線維が多かったことと、太い軸索に もかかわらず髄鞘の厚さが対照例ほどではなかったものがみられた。これらのことは形態計測の結 果に良く一致した。

Tessa³⁾ がラットの坐骨神経の有髄神経線維を低栄養とコレステロール合成阻害剤投与例で計測 した結果は我々の形態計測の結果に一致する所が多く発育不良と早期退縮が混在しているものと予 想される。

筋肉の電顕所見で軸索末端部ではシナプス小胞もミトコンドリアも多く対照例と差が認められな かったが、筋細胞側の post synaptic cleft の部では膜の肥厚がみられたが凹凸が少なく、即ち secondarv synaptic cleft の形成が悪かった。これはシナプスの発育を含めた形成の不良ともい える。また、筋細胞の核周囲などの細胞質内には100オングストローム前後の線維性構造物が認め られたが種々の細胞の変性時にしばしばこのような構造物がみられることがあることと考え合わせ ると発達の遅延に何らかの原因でこの部に更に障害が現われたと考えられはしないだろうか。

結 論

神経筋接合部の発育の遅延と変性にもとすく遺伝的患疾マウスと思われる。

- Brown, A. & Brierley, J.B.,: Anoxic-ischemic cell change in rat brain. Light and fine-structural observations. J. Neurol. Sci., 16:59-84, 1972.
- Cammermeyer, J.,: The importance of avoiding "dark" neurons in experimental neuropathology. Acta Neuropathol. (Berl.), 1:245-270, 1961.
- 3) Hedley-Whyte, T.E.,: Myelination of rat sciatic nerve: comparison of undernutrition and cholesterol biosynthesis inhibition. J. Neuropath. Exp. Neurol., 32: 284-302, 1973.
- Gonzenbach, H.R. and P.G. Waser,: Electron microscopic studies of degeneration and regeneration of rat neuromuscular junctions. Brain Res., 63:167-174, 1973.
- 5) Teräväinen, H.,: Development of the myoneural junction in the rat. Zeitsch. Zell-forsch. 87: 249-265, 1968.
- Ghadially, F.N.,: Ultrastructural pathology of the cell. 1975. Butterworths, London and Boston. pp424-428.

-84 -

Ⅱ-4. mdyマウスの電気生理学的解析

宮田雄平

新たに発見された神経・筋異常動物のうち離乳前に死亡するマウス(以下mdyと呼ぶ)の運動系 に異常があるか否かを電気生理学的手法により検索した。

mdyマウスのヒラメ筋あるいは内側腓腹筋をその支配神経と伴に切り出し、in vitro で実験を行なった。標本はKrebs液で灌流した。

灌流液中の Ca 濃度を下げるあるいは Mg 濃度を上げることはシナプス伝達を抑制する。図1は そのようなイオンの影響を調べたものであり、正常Krebs 液(Ca, 2.52 mM: Mg, 1.25 mM)下 で神経刺激に応じて発生する筋収縮高を10%に取った。Ca濃度を下げた場合、正常とmdyマウス との間には差は見られなかった。 Mg 濃度を上げてゆくと、正常に比べmdyマウスでの筋収縮はよ り強く抑えられた。シナプス伝達に及ぼす Mg イオンの作用をさらに検討するために、終板部筋線 維にガラス微小電極を刺入し量子的解析を試みた。10 mMの Mg 濃度下において神経刺激に応じ て発生する電位は mdyでは all or none的であった。つまり、全く終板電位は発生しないか、ある いは発生した終板電位が閾値に達し活動電位を生ずるかのいずれかであった。この現象は、Mg イ オンが神経終末ではなく軸索に直接作用して活動電位の発生を抑えていることを考えさせた。



図 1. シナプス伝達におよぼす Ca および Mg イオンの影響

○----〇:mdyマウス、●----●:正常マウス.

* 東京医科歯科大学医学部

図2は軸索に対する高濃度Mgイオンの影響を示す。坐骨神経を切り出し、一側の断端を刺激し 発生する複合活動電位を他端より記録し、正常Krebs液下で発生する電位を100%とした。15mM Mg 適用により mdy(白丸)神経の活動電位は著るしく減少し、正常液にもどすことにより電位



図2. 軸索に対する高濃度 Mg イオンの影響

○: mdyマウス、●:正常マウス

は回復した。しかし回復はしばしば不完全であった。 無 Ca 液適用によっては電位は変化しなかっ た。一方、正常マウス(黒丸)の軸索活動電位は高濃度 Mg および無 Ca 液適用により影響はなか った。したがって、図1の結果は高濃度 Mg が mdyの神経軸索に直接作用し活動電位の発生を抑え ているものと解釈される。テトロドトキシン(10⁻⁷g/ml)は正常・mdyマウス共に活動電位発生を 完全に抑制した(図2右端)。つまり、mdyマウスにおいても Na イオンによって活動電位が発生 していると言える。

Mg イオンにより軸索の活動電位発生が抑制されることから、同じ2価イオンである Ca イオン によっても活動電位発生が抑制される可能性が考えられる。神経刺激に応じて発生する筋収縮をペ ンレコーダーに描記し、Ca イオンの影響を図3に示す。15 mM Caにより mdy マウスでの神経刺

-86 -



A:mdyマウス、B:正常マウス

激に応じて発生する筋収縮は抑 制された(A)。正常神経筋標 本にはほとんど高濃度Caの影 響は見られなかった(Ba)。

正常標本に15 mM Mg 液を 適用した場合の収縮高は滑らか に減少する(Bb)のに対し、15 mM Ca による mdyでの収縮減 少経過は階段状であった(A)。 このことは、Ca イオンが軸索 に直接作用し、活動電位発生を 抑制していることをさらに強く 示唆する。

これらの結果から、mdyマウ スの軸索膜はMg、Caイオンに より興奮性が抑制されると結論 される。mdyマウスの血清 Ca、 Mg 濃度は正常マウスと同じで あったことから、これら2価イ オンに対する反応は in vitro で 見られる異常と考えられる。

mdyマウスは生後10日目頃 より次第に動きが鈍くなり、特

に下肢の動きは14日以降にはほとんど見られず離乳前に死亡する。しかしながら前述のように in vitroで神経を刺激した場合に筋収縮が発生することは in vivo での行動異常を説明し得ない。

支配神経を前根まで遊離し部位を変えて刺激すると、生後14日目以降には坐骨神経刺激に応じ ての筋収縮は発生するが前根刺激によって筋収縮はおこらなかった。図4は18日令mdyマウスの 例を示す。前根刺激は筋収縮を全くひき起さなかった。模式図に示すようにA、B、Cと刺激部位 を末梢側に移動するにつれ筋収縮高は増加した(b、c。各記録の2段目のトレースが筋収縮)。 最小の筋収縮をひき起すに必要な刺激強度も末梢に移動するにつれ減少した(a。3番目のトレー スが刺激強度)。これらの結果は、mdyマウスの個体の内で運動ニューロンの軸索が中枢側から末 梢側に向って次第に興奮性を失なってゆくことを示唆する。

図4上の模式図に示すように総腓骨神経の断端より活動電位を同時に記録した(各記録の最初の トレース)。A・Bいずれの部位での活動電位はほぼ同じ程度であった。さらに後根を刺激するこ とによっても同程度の電位が記録された。すなわち、この活動電位は知覚神経由来のものであり、

-87 -



図 4. 神経線維の各部位を刺激したときの筋の収縮。(本文説明参照)

知覚神経は正常であることが示唆される。このことは二価イオンに対しても類推されることで、二 価イオンの適用により軸索の活動電位は完全には消失しなかった(図2参照)。

以上の結果から、*mdy*マウスにおいては運動ニューロンの異常があり、かつ機能の脱落が個体の 内で進行していると結論される。このマウスは motorneuron disease Yoshimura (*mdy*)マウス と呼ぶのが適当と思われる。正常のマウスで坐骨神経を切断し、術後経時的に神経の興奮性を調べ ても二価イオンによる興奮性消失は見られなかったことから、*mdy*の運動ニューロンの異常は単純 な変性ではないと考えられる。 **Ⅱ**-5. *mdy*マウスの生化学的解析

	北	浦	孝*
	小	浜	一 弘**
研究協力者	早	Л	純一郎***

最近新しく発見された運動失調マウス(mdy)の成因と疾患モデルとしての評価の一環として、 筋および血清の生化学的解析をおこなったので報告する。

方法と材料及び結果

mdyマウスは発症後の生存期間が極めて短く、個体の多きさも 10 gに満たないものが多い。検討した内容及び方法は先述の pma (I – 5参照)とほぼ同じである。図1に筋全体としてみた場合の筋蛋白の分布を示した。mdy(マウス)では、個体の大きさが Normal の 2/3 ~ 1/2 であるにもかかわらず、下肢の筋の分化はほぼ同じように進行しているように思われ、著明な差は見られなかった。図2に LDH のアイザムバターンを示し、表1にその割合をまとめたが、Normal と mdyの間にはあまり大きな違いがみられなかった。ヒラメ筋と前脛骨筋においては mdy で、若干M-typeの増加がうかがわれ、発育の遅れが示唆された。



図1. 筋蛋白の分布パターン

- 金沢大学教養部
- •• 東京大学医学部
- ••• 金沢大学医学部



		LDH ISOZYME		
		H-type (%)	M-type(%)	
EDL	(N)	7.8	92.2	
	(M)	9.9	90.1	
TIB	(N)	9.6	90.4	
	(M)	4.9	95.1	
SOL	(N)	27.2	72.8	
	(M)	23.4	76.6	
CARD	(N)	45.2	54.8	
	(M)	46.3	53.7	

図 2. LDHのアイソザイムパターン

C:正常マウス、M: mdyマウス

(N): NORMAL, (M): MDY 表1. LDHのアイソザイムの割合

考察及び結論

以上mdyにおける生化学的解析の結果、代識特性の面から細胞の分化の遅れが示唆された。しか し、収縮特性と関連のある筋蛋白の上からは、大きな差が対照群との間で認められず、他の臓器 に帰因する発育不良の可能性が考えられた。