

学 位 論 文 題 名

ニホンウズラの突然変異体（LWC系）に認められた
筋緊張性ジストロフィー様疾患の骨格筋病変に関する
超微形態学的、組織化学的、免疫組織化学的研究

学位論文内容の要旨

筋ジストロフィーは筋原性ミオパチーの一つであり、筋線維の進行性変性を特徴とする。ヒトの筋ジストロフィーは、遺伝様式、発症年齢、症状の進行度合い、病変の分布などにより分類がなされている。筋緊張性ジストロフィー（MyD）はヒトの筋原性筋疾患の中で、最も頻度が高い重篤な疾患である。本症は常染色体性優性遺伝であり、家系内に多数の患者をみることが多く、同一家系内でも臨床症状が多岐に渡り、患者間で発症年齢、筋力低下の進行度に大きな差違がみられる。本症の臨床症状は多彩で、骨格筋のみならず中枢神経系、眼球、内分泌系、免疫系、循環系と多くの臓器が侵される多臓器疾患である。臨床的には、患者が手を握りしめると、こぶしを開くのに時間がかかること（grip myotonia）、筋腹をハンマーで叩くと、その部分の筋が収縮し容易に弛緩しない症状（percussion myotonia）が認められる。電気生理学的には、針電極を筋に刺入した時、筋電図上で刺入電位の持続（myotonic discharge）が認められる。本疾患の発生機序は未だ不明であり、適切な疾患モデル動物の開発が強く望まれている。

著者の所属する研究室において、ヒトのMyDに酷似する筋疾患がニホンウズラの一系統（LWC）に見出され、系統維持されている。本疾患は性差を示さない常染色体性優性遺伝で、ホモ致死である。臨床的に発症したLWC系ウズラは翼を背方に挙げると（翼挙上試験）その挙上に抵抗し、仰向けに寝かせると（フリップテスト）起きあがることができず、筋電図検査ではミオトニア放電が認められる。病理組織学的には、骨格筋病変は2型筋線維のみに認められ、1型筋線維には認められず、2B型筋線維の萎縮と2Aおよび2B型筋線維におけるring fiberとsarcoplasmic massの形成が特徴であった。また、精巢の変性、萎縮、白内障など多臓器にわたる病変も認められる。著者は、このLWC系ウズラの骨格筋病変の発生機序を明らかにするため本研究を実施した。

第1章では、LWC系ウズラの骨格筋病変の超微形態学的特徴を明らかにする目的で研究を行った。

検索材料としては、臨床的に特有の症状である翼の挙上不能を示したLWC系ウズラ8羽（13～72週齢）と、正常対照ウズラ5羽（13～60週齢）の浅胸筋を用いた。超微形態学的検索の結果、ring fiberは筋線維細胞膜と正常筋原線維束との間に、正常筋原線維束を輪状に取り巻く筋原線維束として観察された。ring fiberを構成する筋原線維は、ほとんどの例で正常筋原線維と同様に、A帯、I帯、M線、Z線を明瞭に有していたが、Z線以

外の筋節の構造が不明瞭な例もみられた。sarcoplasmic mass は筋線維細胞膜と正常筋原線維束との間に存在し、断片化した筋原線維、三つ組、ミトコンドリア、多数のグリコーゲン顆粒とリボゾームの不規則な集合により構成されていた。これらの構造間に秩序だった相互関係は認められなかった。萎縮した筋線維では、筋原線維が部分的に消失し、ここに自己貪食空胞、ライソゾーム、グリコーゲン顆粒、クリスタが濃縮したミトコンドリア、横行小管が増生、集合したと考えられる蜂巢状構造が認められた。また、萎縮した筋線維の細胞膜に多数の陥凹を認め、余剰になった基底膜が筋線維間の間質に突出している像もみられた。蜂巢状構造は萎縮筋線維でしばしば認められたが、一見正常に見える筋線維内にもみられる例があった。胸筋の浅層部筋束のほとんどの2B型筋線維では、直径の減少が認められたが、超微形態学的には異常は認められなかった。

以上の所見より、LWC系ウズラの骨格筋病変の形成は、細胞内小器官の配列を制御する細胞内骨格の欠陥が関与しているものと解された。

第II章では、LWC系ウズラ5羽（9～60週齢）と正常対照ウズラ5羽（9～60週齢）の浅胸筋を用いて、組織化学的ならびに免疫組織学的に検索した。組織化学的検索としてはmyofibrillar ATPase染色を、免疫組織学的検索としてはニワトリのadult fast typeとslow typeのmyosin heavy chain（MHC: 筋線維を構成するミオシンフィラメント分子の重鎖）に対するモノクローナル抗体、ニワトリのneural cell adhesion molecule（N-CAM: 細胞接着因子の一つで、筋線維において神経支配の完了以前または完了以後では、脱神経支配が起きたときに筋線維内やその近接部の間質に発現し、神経を誘導する）に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色を行った。

正常ウズラの浅胸筋のmyofibrillar ATPase 染色では、1型筋線維（遅筋）は深層部の筋束にのみ少数分布し、2Aおよび2B型筋線維（速筋）は表層から深層の全層の筋束に分布し、これは特に浅層部の筋束において特徴的な分布を示した。すなわち、2A型筋線維は筋束の中央部に集まり、2B型筋線維はそれを囲むように分布していた。

免疫染色では、1型筋線維は抗slow type MHC抗体に強く染まり、抗adult fast type MHC抗体には全く反応しなかった。抗adult fast type MHC抗体には、2A型筋線維は強く染色されたのに対して、2B型筋線維はほとんど染まらなかった。また、2A型および2B型筋線維とも抗slow type MHC抗体に対する反応は示さなかった。抗N-CAM抗体に対する反応は、神経筋接合部と神経線維以外にはみられなかった。

LWC系ウズラの浅胸筋では、myofibrillar ATPase 染色および抗adult fast type MHC抗体を用いた免疫染色を行った両切片で、浅層の筋束における2A型筋線維の染色性の減少、2B型筋線維の直径の縮小をともなった両染色に対する染色性の増加が認められた。なお、深層部筋束はそれらの染色性に変化を示さなかった。

ほとんどのsarcoplasmic mass は、adult fast とslow 両type のMHCに対する抗体で陽性に染色された。抗N-CAM抗体による免疫染色では、浅層から中間層の筋束内の筋線維にさまざまな濃度で散在性に陽性像が認められた。一部のsarcoplasmic mass とring fiber が抗N-CAM抗体に染色されたが、N-CAMの発現とsarcoplasmic massならびにring fiber形成との間に相関関係は認められなかった。

以上の所見より、sarcoplasmic massの形成は異常な細胞骨格の存在のもとで発生した筋線維の肥大による結果であることが示唆された。また、LWC系ウズラの浅胸筋では、ミオトニアによる筋線維の長期間の連続収縮の結果、筋線維内の収縮性蛋白のアイソフォームが変化し、2A、2B型両筋線維において形態学的、組織化学的ならびに免疫組織化学的变化が生じたものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	板倉	智敏
副査	教授	橋本	晃
副査	教授	渡邊	智正
副査	教授	岩永	敏彦

学位論文題名

ニホンウズラの突然変異体（LWC系）に認められた 筋緊張性ジストロフィー様疾患の骨格筋病変に関する 超微形態学的、組織化学的、免疫組織化学的研究

申請者は、ヒトの筋緊張性ジストロフィーに酷似する病態を示すニホンウズラの1系統（LWC系）の骨格筋病変の形態学的特徴と、その病理発生を明らかにした。

LWC系ウズラの骨格筋では、病理組織学的には筋線維辺縁部におけるring fiberとsarcoplasmic massの形成および筋線維の萎縮が特徴的であった。超微形態学的には、ring fiberは正常筋原線維束を輪状に取り巻く筋原線維束として観察された。sarcoplasmic massは断片化した筋原線維、三つ組、ミトコンドリア、多数のグリコーゲン顆粒とリボゾームの不規則な集合により構成されており、これらの構造間に秩序だった相互関係は認められなかった。萎縮した筋線維では、筋原線維が消失し、ここに自己食空間胞、ライソゾーム、グリコーゲン顆粒、クリスタが濃縮したミトコンドリア、蜂巢状構造が認められた。以上の結果から、LWC系ウズラの骨格筋病変の形成には、細胞内小器官の配列を制御する細胞骨格の欠陥が関与しているものと解された。

組織化学的ならびに免疫組織化学的には、myofibrillar ATPase染色および抗fast type myosin heavy chain (MHC) 抗体を用いた染色を行った両切片において、2A型筋線維の染色性の減少、2B型筋線維の直径の縮小を伴った染色性の増加が認められた。sarcoplasmic massは抗fastならびにslow両typeのMHC抗体で陽性に染色された。また、抗neural cell adhesion molecule (N-CAM) 抗体陽性の筋線維が散在性に認められ、一部のsarcoplasmic massならびにring fiberを形成した筋線維においても陽性像が見られた。しかし、N-CAMの発現とsarcoplasmic massならびにring fiber形成との間に相関関係は認められなかった。

以上の所見より、sarcoplasmic massは異常な細胞骨格の存在のもとで発生した筋原線維の新生による結果であることが示唆された。また、LWC系ウズラの浅胸筋では、ミオトニアによる筋線維の長期間の連続収縮の結果、筋線維内の収縮性蛋白のアイソフォームが変化し、2A、2B型両筋線維において形態学的、組織化学的ならびに免疫組織化学的变化が生じたものと考えられた。

以上のように、申請者は本疾患の筋病変の形態学的特徴を明らかにし、諸変化の病理発生的一端を明らかにした。この成果は、本疾患の本態の究明に大きく貢献する。よって審査員一同は、田中聡氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。