

# 骨格筋再生過程におけるミオシン重鎖 アイソフォームとmyogenin・MyoD発現について

原 温子<sup>1)</sup>，山田 崇史<sup>1)</sup>，若居佐恵子<sup>1)</sup>，森永 慎也<sup>1)</sup>，弓削 類<sup>2)</sup>，  
堤 恵理子<sup>2)</sup>，梶原 博毅<sup>2)</sup>

キーワード (Key words) : 1. myogenin 2. MyoD  
3. ミオシン重鎖アイソフォーム (myosin heavy chain isoforms)

骨格筋再生過程におけるミオシン重鎖 (MHC) アイソフォーム発現とmyogenin, MyoDタンパクの発現様式との関連性を検討するために，塩酸プビバカインを用いてマウスヒラメ筋損傷モデルを作成し，損傷筋の再生過程を組織形態学的に確認すると同時に，再生各段階におけるMHCアイソフォームと，myogeninおよびMyoDタンパク発現を経時的に検索した．本研究における筋損傷は塩酸プビバカインをマウス (C57BL/10SnSlc) のヒラメ筋に注入することで作成した．

組織学的には，塩酸プビバカイン投与後3日目で筋線維はほとんど消失し，処置後6日目で中心核を有する再生筋線維がかなり出現し，処置後28日目では対照群のものと同程度まで回復した．

生化学的分析では，対照群ヒラメ筋はMHC (34.3±1.7%)とMHC a (65.7±1.7%)で構成されていた．実験群ヒラメ筋ではMHC は処置後14日目まで減少し，その後増加傾向を示し，処置後90日目では36.3±2.9%となった．また，正常ヒラメ筋では検出されない速筋型MHC (MHC d, MHC b)が処置後3日目から28日目まで検出された．

Western blotを用いた分析では，myogeninタンパク正常ヒラメ筋 (遅筋) で検出された一方，前脛骨筋 (速筋) においては検出できなかった．実験群ヒラメ筋では，myogeninは対照群と比較して処置後3日目より増加し (3.1±0.5)，処置後6日目でピークに達した (5.8±0.8)．それからmyogeninタンパクは徐々に減少していったが，処置後90日目においてもなお対照群ヒラメ筋の1.8倍の発現を維持し続けた．一方，MyoDタンパクは正常前脛骨筋において正常ヒラメ筋の3.3倍の発現が認められた．MyoDは処置後3日目で対照群ヒラメ筋と比較して5.4倍になりピークに達した．その後は徐々に減少し始めた．しかし処置後90日目においても2.2倍の発現があった．これらのことから筋の再生過程においては速筋タイプの筋細胞が出現するmyogeninとMyoDは衛星細胞の分化と筋の再生に密接に関係していることが示唆された．

## 緒 言

骨格筋の発生段階において，中胚葉の細胞から筋芽細胞，筋管細胞への分化・成熟を制御しているmyogeninおよびMyoDは，筋線維の表現型の維持や変化にも関与していることが近年報告されている<sup>1)</sup>．また，これらの報告は，遅筋線維が増加したときにはmyogeninの発現量が増加し，速筋線維が増加したときにはMyoDの発現量が増加することを示しており，遅筋線維の発現とその維持にはmyogeninが，速筋線維にはMyoDの発現が関与していることを示唆している．しかしながら，筋線維タイプの変化が生じているにも関わらずmyogeninと

MyoD発現は変化しないという報告もあり<sup>2)</sup>，筋線維タイプの変化にこれら2つのタンパク質が必須であるかどうかはまだ明らかになっていない．

成体マウスヒラメ筋は，ミオシン重鎖 (Myosin Heavy Chain: 以下，MHC) およびMHC aにより構成されているが，損傷後の再生過程において，正常ヒラメ筋では存在しない速筋型MHC (MHC dおよびMHC b)が一時的に出現する．骨格筋再生過程において，MHC発現を制御する因子として神経支配や成長因子などが報告されているが<sup>3, 4)</sup>，myogeninおよびMyoDタンパクとの関与を検討した研究はほとんどない．本研究ではヒラメ筋損傷モデルを作成し，再生過程を組織形態学

・ Expression of myogenin, MyoD and MHC isoforms in regenerating skeletal muscle.  
・ 所属: 1) 広島大学大学院医学系研究科保健学専攻 2) 広島大学医学部保健学科理学療法学専攻  
・ 広島大学保健学ジャーナル Vol. 2(1): 12~18, 2002

的に確認すると同時に、再生過程におけるmyogeninおよびMyoDタンパクの発現様式とMHCアイソフォームのタンパク発現を経時的に観察し、その関連性を検討した。

## 対象と方法

### 1. 被検動物および実験プロトコル

実験には8-11週齢マウス (C57BL/10SnSlc) 55匹を使用した。4% 抱水クロラール (400mg/kg) を腹腔内に投与し、麻酔下においた。皮切後、直視下にて右側ヒラメ筋に0.5%塩酸ピバカイン0.1 を数カ所に分け注射し、実験群 (以下、E群) とした。一方、反対側ヒラメ筋を対照群とした。処置後、覚醒するまでの間ケージ内で保温した。処置後3, 6, 14, 28, 90日目 (以下、E3群, E6群, E14群, E28群, E90群) にヒラメ筋を摘出し、組織学的分析と生化学的分析に用いた。また生化学的分析に用いるため、対照群より前脛骨筋を同時に摘出し、正常前脛骨筋とした。対象筋を採取後、被検動物は失血死させた。被検動物は、広島大学医学部附属実験施設において、12時間の明暗サイクル、温度 $23.0 \pm 2.0$  , 相対湿度 $50 \pm 10\%$  の一定条件下で飼育した。また餌、水は自由摂取とした。なお、この研究は広島大学医学部附属動物実験施設倫理委員会の承認のもとに行った。

### 2. 分析項目

#### (1) 組織学的分析

採取した筋は筋湿重量測定後、直ちに液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結を行った。筋凍結試料は-25 に設定したクリオスタット内で厚さ10 $\mu$ m に薄切後、ヘマトキシリンエオジン染色を行い光学顕微鏡にて観察した。

#### (2) 生化学的分析

##### MHCアイソフォームの分離

和田ら<sup>5)</sup>の方法に準じて、採取した全筋を40倍の抽出液 (5 M urea, 2 M thiourea, 10mM sodium pyrophosphate, 0.1% (V/V) 2-mercaptoethanol) 中でホモジナイズし、筋原線維蛋白を抽出した。得られた抽出液をincubation medium (0.5M Tris-HCl; pH 6.8, 2% (W/V) SDS, 10% (V/V) glycerol, 5% (V/V) 2-mercaptoethanol, 0.02% (W/V) bromophenol blue) で希釈し、-70 で保存した。この溶液を4の条件下において、160V定電圧で44-48時間、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (以下、SDS-PAGE) を用いて、全筋に含まれるMHCを分画した。泳動終了後、銀染色を行いタンパクを可視化した。ゲルの解析はバンドをデジタルカメラで撮影し、パーソナルコンピューターに取り込んだ後、画

像解析ソフトNIH Image (Ver. 1.61) を用いて各バンドの量比を算出した。

#### myogeninおよびMyoD分析

採取した筋を50倍量の抽出液 (125mM tris-HCl, 20% (V/V) glycerol, 2% (W/V) SDS, 4% (V/V) 2-mercaptoethanol, 0.02% (W/V) bromophenol blue) 中でホモジナイズして蛋白を抽出し、myogeninおよびMyoDをWestern blot法により分析した。SDS-PAGEに用いた分離アクリルアミド濃度は12%とし、40mA定電流にて泳動を行った。泳動終了後、メンブレン (hybond-ECLニトロセルロース膜) にプロットングを行った。1次抗体にはmyogeninおよびMyoDポリクローナル抗体 (Santa Cruz社) を1000倍希釈で用い4 下にて1時間反応させた後、HRPで標識された1000倍希釈の2次抗体と反応させた。その後ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Pharmacia Biotech社) を用いて目的抗原シグナルを検出させた。検出したバンドはデジタルカメラで撮影し、パーソナルコンピューターに取り込んだ後、画像解析ソフトNIH Image (Ver. 1.61) を用いて、各サンプルのバンドと毎回スタンダードとして泳動したサンプルとの量比を算出した。

#### (3) 統計学的解析

各群間における筋湿重量の比較はt検定を用い、myogeninおよびMyoDの比較には分散分析を行った。分散分析にて有意差が認められた場合にはScheffe法に基づき多重比較検定を行った。なお、危険率は5%未満とし、本文中の測定値はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

## 結 果

### 1. 筋湿重量 (図1)

処置後3日目では124%と一時的に筋質重量が増加した ( $32.6 \pm 1.3\text{mg}$ )。その後減少がみられるものの、処置後28日目には99%まで回復した。

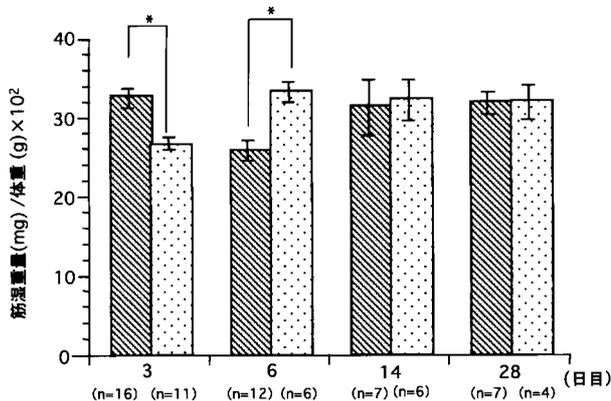


図1 筋湿重量 (ヒラメ筋)

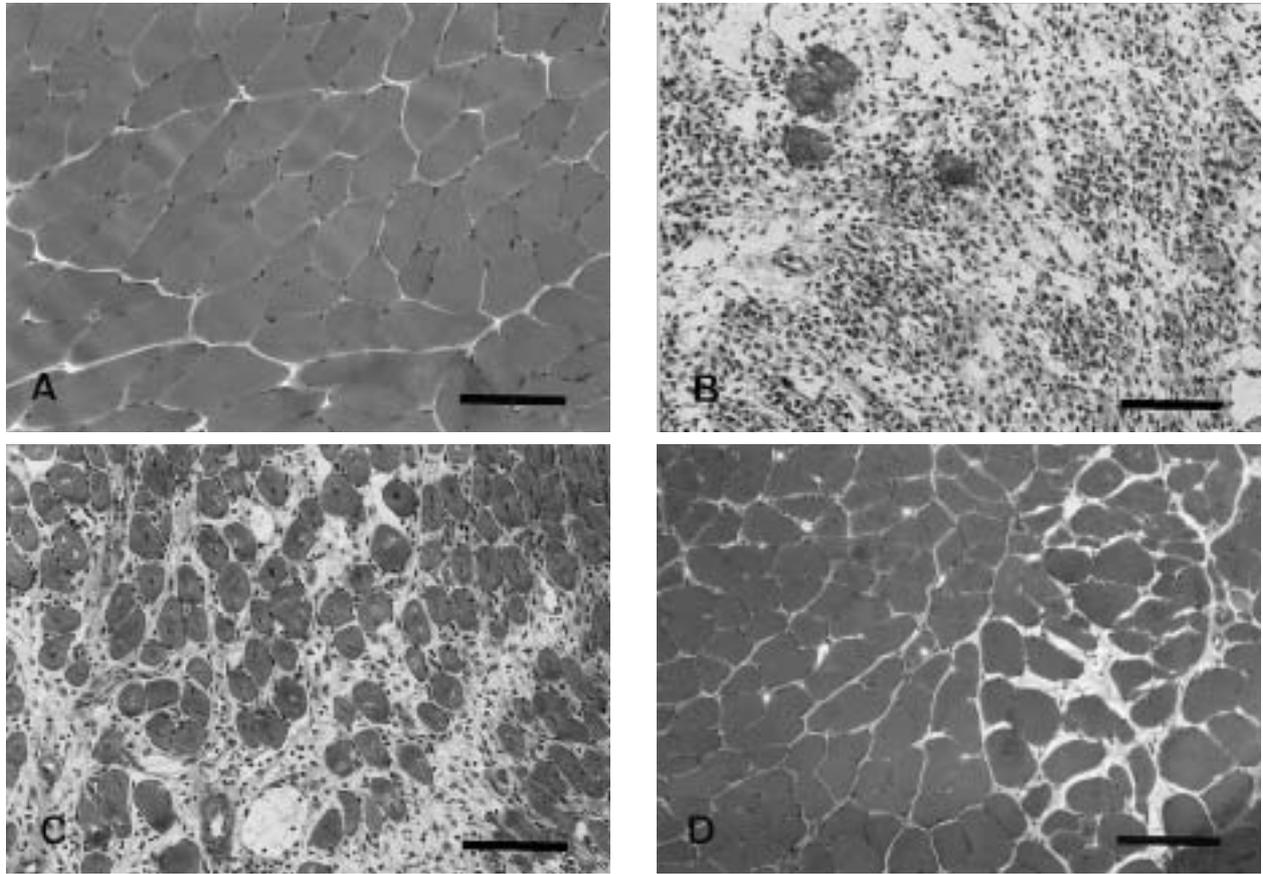


図2 ヘマトキシリン・エオジン染色所見(ヒラメ筋) scale bar : 100 μm

A : 正常筋 B : E3群 C : E6群 D : E28群

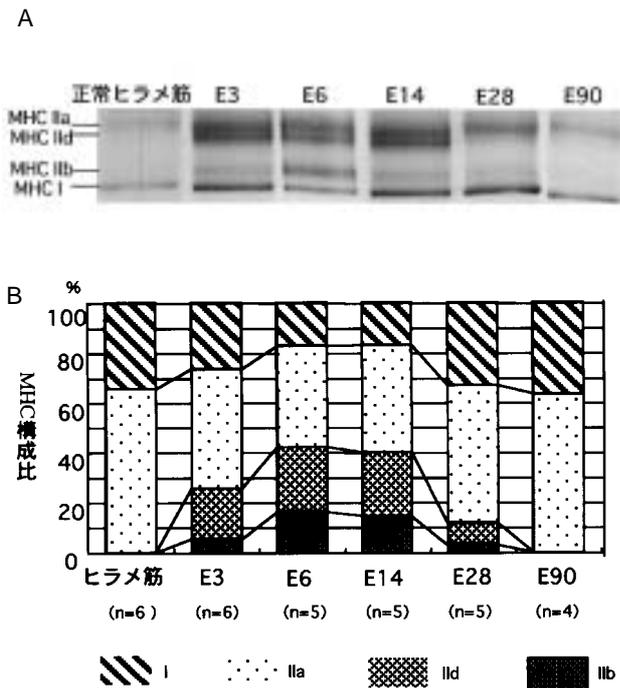


図3 MHCアイソフォーム構成比

A : 典型的な泳動パターン B : MHC構成比

## 2. 組織学的検索

ヘマトキシリン・エオジン染色(図2)

正常ヒラメ筋では図2Aで示す如く、筋線維が密に配列し、細胞質内には筋原線維が充満し、核は細胞膜直下に分布していた。処置後3日目では、筋線維はほとんど消失し、好中球、リンパ球、マクロファージなどの炎症細胞が多数浸潤していた(図2B)。処置後6日目では、再生筋細胞がかなり出現し、ほとんどの細胞では細胞内に筋原線維と共に、細胞中心部に核を有していた(図2C)。間質には炎症細胞浸潤と共に、線維芽細胞の増生と膠原線維の増加が見られた。再生筋線維はその後も増加するが、中心核を有する筋線維は次第に減少し、処置後28日目ではほとんどの筋線維は良く分化し、核は筋細胞膜直下に分布していた。しかし、少数であるが中心核を有する筋線維もみられた。この時期では、間質には膠原線維がみられるものの、炎症細胞浸潤はほとんどみられなかった(図2D)。

## 3. 生化学的分析

(1) MHCアイソフォーム(図3)

対照群のヒラメ筋はMHC (34.3 ± 1.7%), MHC a

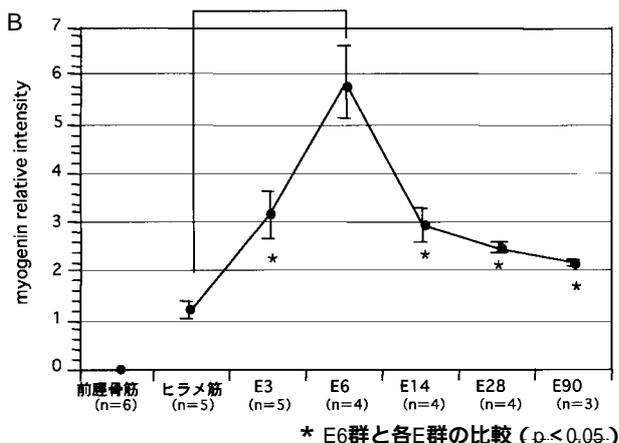
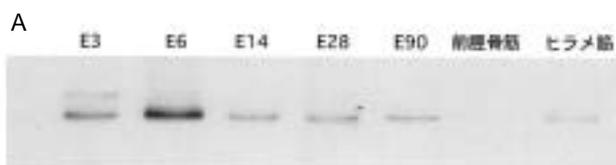


図4 Myogenin経時的変化

A : 典型的なバンド一例

B : myogenin relative intensity

(65.7 ± 1.7%) の2つのアイソフォームから構成されていた。E3群より速筋化の傾向を示し始め、対照群では見られなかったMHC d, MHC bが発現し、E6群まで増加し続けた。E90群ではMHC d, MHC bの発現は認められなかった。一方で、MHC , MHC aはE14群まで減少し、E28群よりMHC の増加が始まった。E90群ではMHC Iは36.3 ± 2.9%であった。

### (2) myogenin発現 (図4)

myogeninは速筋である正常前脛骨筋では検出できなかった。実験群のヒラメ筋では、myogeninはE3群より増加し (3.1 ± 0.5), E6群でピークに達した (5.8 ± 0.8)。その後、徐々に減少し始め、E28群では2.5 ± 0.1であった。しかし、E90群でなお対照群の1.8倍の発現を維持し続けた (2.2 ± 0.1)。

### (3) MyoD発現 (図5)

MyoDは正常前脛骨筋において正常ヒラメ筋の3.3倍の発現が認められた。実験群のヒラメ筋において、MyoDはE3群で著明に増加し、ピークに達した (5.4 ± 0.8)。その後は徐々に減少していった。しかしE90群においても2.2倍の発現を維持し続けた (2.4 ± 0.5)。

## 考 察

### 1. 骨格筋傷害・再生モデルについて

骨格筋に再生能力があることは広く知られており、進行性筋ジストロフィーや多発性筋炎の他、外傷 (機械的外力, 加熱, 冷却, 薬物) などで再生がみられる<sup>6-9)</sup>。ま

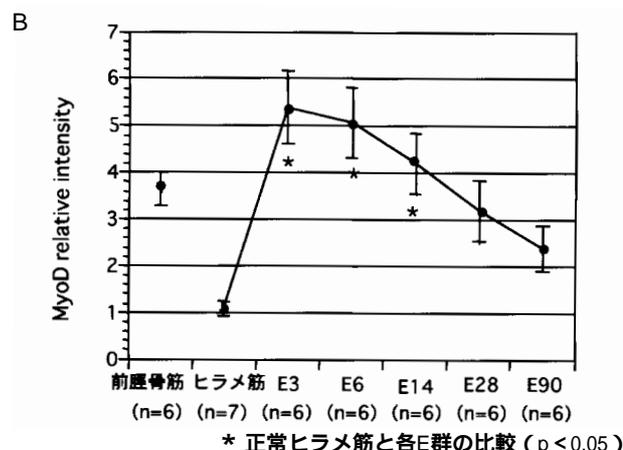
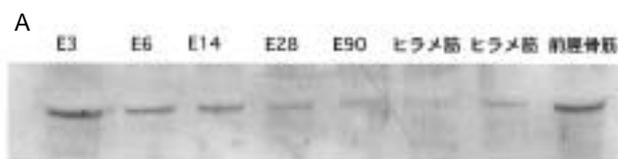


図5 MyoD経時的変化

A : 典型的なバンド一例

B : MyoD relative intensity

た培養系においてもラット骨格筋起源の衛星細胞にマーカーを注入すると再生現象が確認できる<sup>10)</sup>。骨格筋傷害・再生過程についての研究は数多くなされ、実験的に筋に傷害を与える方法として、今までさまざまなモデルが用いられてきた。本研究を行うにあたり実施した予備実験において、機械的な損傷としてCrush injuryやドライアイスを用いた凍傷を試みた。しかし、これらの方法では対象筋全体に均一で再現性のある傷害を起こすことが困難であった。

そこで本研究では0.5%塩酸プビパカインを直接、筋に注入する方法で筋傷害モデルを作成した。塩酸プビパカインは長時間作用性の局所麻酔剤である。神経膜のナトリウムチャンネルをブロックし、神経における活動電位の伝導を可逆的に抑制し、一時的に知覚神経および運動神経を遮断する。また、本剤は筋細胞膜を破壊することで、注入場所に強い壊死を引き起こすが、筋細胞の基底膜、血管、末梢神経、神経筋接合部は破壊されないために、速やかで完全な再生筋を得ることが出来るといわれている<sup>11-13)</sup>。さらに再生線維形態は均一で再現性があるため、生化学的分析などの量的検討を行うのに適していた。また本方法は簡便であり、短時間の処置時間で行えるという利点があった。

### 2. 骨格筋表現型変化とmyogeninおよびMyoD発現について

筋特異的転写調節因子であるmyogeninおよびMyoDは、筋芽細胞および筋管細胞への決定・分化に関与して

いる。本研究では、組織学的分析により処置後6日目に筋管細胞が多く観察されたことから、この時期までに、筋芽細胞（衛星細胞）の増殖・維持および筋管細胞への分化が起こっているものと推察される。よって、本研究においてMyoDが処置後3日目に、myogeninが処置後6日目に顕著に増加した原因として、筋発生時と同様に、再生過程早期における発達段階において、筋細胞の分化を制御するためにMyoDおよびmyogeninの合成が促進されたと考えることが出来る。

本研究においてMyoDの発現は処置後3日目にピークに達し、myogeninは処置後6日目にピークに達した。これらの結果はMyoDおよびmyogenin発現には時間的な差があることを示している。先行研究ではMyoDは分裂を繰り返している筋芽細胞において発現することが示されている<sup>14)</sup>。また、塩酸ピバカイン処置後にDNA合成期の衛星細胞を観察した報告では、処置後3日前後で衛星細胞の分裂が減少する傾向が認められている<sup>15)</sup>。これらの知見から、本研究においてMyoD発現がmyogenin発現に先行して、処置後3日目にピークを迎えたのは、MyoDが再生筋において衛星細胞の分裂・融合に関与しているからであると推察される。

速筋に慢性的な電気刺激を行い筋線維タイプの遅筋化を招来した先行研究では、myogenin発現の増加が報告されている<sup>16)</sup>。一方、甲状腺ホルモンを投与することにより、ヒラメ筋の速筋線維の割合を増加させた先行研究においてMyoD発現の増加が認められることが報告されている<sup>17)</sup>。これらの知見から、遅筋および速筋線維の発現には、それぞれmyogeninとMyoDが特に関与している可能性が示唆されている。今回の研究においても、myogeninは遅筋であるヒラメ筋では認められたが、速筋である正常前脛骨筋ではmyogeninは検出されず、MyoDは正常前脛骨筋において遅筋である正常ヒラメ筋の3.3倍の発現が認められた。よってmyogenin、MyoDがそれぞれ遅筋、速筋で特に関与していると考えることが出来る。

次に、本研究において、正常なヒラメ筋では認められなかったMHC dおよびMHC bが、処置後3日目から28日目まで検出され、この時期にMyoD発現量が高いレベルを維持し続けた事実は、MyoDが再生過程早期の筋芽細胞の増殖・維持だけでなく、これら速筋型MHC (MHC dおよび b) 発現の調節にも関与している可能性が示唆される。また、in vitroでMyoDを強制発現させるとMHC b promoterが増加するという報告<sup>18)</sup>は、この考えを支持するものである。

図3に示すように処置後90日目のヒラメ筋は再び正常ヒラメ筋と同様にMHC とMHC aから構成され、MHC dおよびMHC bは認められなかった。MHC dおよびMHC bが認められないにも関わらず依然として

速筋に関与すると思われるMyoDが正常ヒラメ筋よりも高値を示したことは、処置後90日目のヒラメ筋で認められたMHC aがMHC よりもMHC dおよびMHC bに近い性質をもつと考えられた。またBigardらが蛇毒で処置を施した再生筋に対して持久性トレーニングを実施し、MHCアイソフォームの可塑性を検討した結果、正常筋よりも再生筋においてMHCアイソフォームの可塑性が高かったと報告している<sup>19)</sup>。このことから本実験においてMyoDタンパクが再生筋 (E90群) において高値を維持し続けたことは再生筋におけるMHCアイソフォームの可塑性に影響していることが示唆された。

実験群のmyogeninタンパク量は、処置後6日目にピークに達した後も発現量は高値を維持し続け、組織学的に正常な大きさを取り戻した処置後90日目でも1.8倍の値を示していた。先行研究において再生後のヒラメ筋におけるMHC の占有率が、正常ヒラメ筋と比較して増加したという報告があり<sup>20)</sup>、本研究においても処置後90日目にMHC Iの占有率が対照群のものを上回る傾向が認められた。ヒラメ筋におけるMHC Iの占有率が再生筋において増加するメカニズムについてはほとんど見解が得られていないが、本研究において再生ヒラメ筋におけるmyogeninタンパク量が正常ヒラメ筋と比較し、高値を示し続けたことから、この現象にはmyogeninが関与しているのかもしれない。

myogenin、MyoDタンパクが筋線維表現型の調節に関与していることが本研究からも示唆された。さらに今後、筋線維表現型の柔軟性におけるmyogeninおよびMyoDとさらに上位の筋特異転写調節因子についても明らかにしていく必要があると考えられる。

## 文 献

1. Sakuma, K., Watanabe, K., Sano, M., Uramoto, I., Sakamoto, K. and Totsuka, T.: The adaptive response of MyoD family proteins in overloaded, regenerating and denervated rat muscle. *Biochem. Biophys. Acta*, 1428: 284-292, 1999
2. Mozdziak, P., Greaser, M. and Schultz, E.: Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. *J. Appl. Physiol.*, 84: 1359-1364, 1998
3. Megighian, A., Germinario, E., Rossini, K., Midrio, M. and Danielli-Betto, D.: Nerve control of type 2A MHC Isoform expression in regenerating slow skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 24: 47-53, 2001
4. Kristy, J., Miller, D. T., Sarah, M. and Grace, K.: Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 278: C174-C181, 2000
5. 和田正信, 土路恭子, 新畑茂充, 菊地邦雄: ミオシン重鎖

- 分離のための電気泳動条件 . 広島大学総合科学部紀要 理系編, 19 : 72-78, 1993
- 6 . Robertson, T., Papadimitriou, J. and Grounds, M. : Fusion of myogenic cell to the newly sealed region of damaged myofibres in skeletal muscle regeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 19: 350-358, 1993
  - 7 . Louboutin, J., Fichter-Gagnepain, V., Pastoret, V., Thaon, E., Noireaud, J., Sebille, A. and Fardeau, M. : Morphological and functional study of extensor digitorum longus muscle regeneration after iterative crush lesions in mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.*, 5: 489-500, 1995
  - 8 . Reimann, J., Irintchev, A. and Wernig, A. : Regenerative capacity and the number of satellite cell in soleus muscle of normal and mdx mice. *Neuromuscul. Disord.*, 10: 276-282, 2000
  - 9 . Hunter, M. and Marcia, O. : Regeneraiton of dystrophic muscle following multiple injection of bupivacaine. *Muscle Nerve*, 11: 588-596, 1988
  - 10 . Funanage, V.L., Smith, S. M. and Minnich, M. A. : Entactin promotes adhesion and long-term maintenance of cultured regenerated skeletal myotubes. *J. Cell Physiol.*, 150: 251-257, 1992
  - 11 . Hall-Griggs, E. and Singh-Seyan, H. : Histochemical changes in innervated and denervated skeletal muscle fibers following treatment with bupivacaine ( Marcain ). *Exp. Neurol.*, 46: 345-354, 1975
  - 12 . Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H. and Sugita, H. : Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride ( Marcaine ). *Acta Nueopathol. (Berl.)*, 60: 167-174, 1983
  - 13 . Ishiura, S., Nonaka, I. and Sugita, H. : Biochemical aspects of bupivacaine-induced acute muscle degradation. *J. Cell Sci.*, 83: 197-212, 1986
  - 14 . 鍋島陽一 : 筋細胞分化の遺伝子制御ネットワーク . 蛋白質・核酸・酵素, 41 : 1008-101, 1996
  - 15 . 埜中征哉, 斉藤陽子 : 筋再生における筋衛星細胞の活性化時期. 平成2年度 厚生省研究報告書, : 35-43, 1991
  - 16 . Hu, P., Zhang, K. -M., Wright, L. D., Spratt, J. A., Briggs, F. N.: Correlations between MyoD, myogenin, SERCA1, SERCA2 and phospholamban transcripts during transformation of typeII to typeI skeletal muscle fibers. *Pflgers Arch.*, 434: 209-211, 1997
  - 17 . Hughes, S. M., Taylor, J. M., Tapscott, S. J., Gurley, C. M., Carter, W. J. and Peterson, C. A.: Selective accumulation of MyoD and Myogenin mRNA in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*, 118: 1137-1147, 1993
  - 18 . Wheeler, M. T., Snyder, E. C., Patterson, M. N. and Swoap, S. J.: An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is required for gene expression in fast muscle. *Am. J. Physiol.*, 276: C1069-C1078, 1999
  - 19 . Bigard, A. X., Janmot, C., Sanchez, H., Serrurier, B., Pollet, S. and D'Albis, A. : Changes in myosin heavy chain profile of mature regenerated muscle with endurance training in rat. *Acta Physiol. Scand.*, 165: 185-192, 1999
  - 20 . Bigard, A. X., Serrurier, B., Merino, D., Lienhard, F., Berthelot, M. and Guezennec, CY. : Myosin heavy chain composition of regenerated soleus muscles during hindlimb suspension. *Acta Physiol. Scand.*, 161 : 23-30, 1997

# Expression of myogenin, MyoD and MHC isoforms in regenerating skeletal muscle.

Atsuko Hara<sup>1)</sup>, Takashi Yamada<sup>1)</sup>, Saeko Wakai<sup>1)</sup>, Shinya Morinaga,<sup>1)</sup>  
Rui Yuge<sup>1)</sup>, Eriko Tsutsumi<sup>1)</sup> and Hiroki Kajihara<sup>2)</sup>

1 ) Health Sciences, Graduate School of Medical Sciences, Hiroshima University

2 ) Division of Physical Therapy, Institute of Health Sciences, Faculty of Medicine, Hiroshima University

Key words : 1 . myogenin 2 . MyoD 3 . myosin heavy chain isoforms

To investigate the precise mechanism of skeletal muscle cell regeneration, the changing pattern of myosin heavy chain (MHC) isoforms during the regenerating process was observed with relation to the activation of myogenin and MyoD. In addition, histopathological observation of the damaged muscles was performed throughout the experiment.

In this study, muscle damage was induced by intramuscular injection of bupivacaine hydrochloride in the soleus muscle of mice (C57BL/10SnSc).

In the light microscopic observation, muscle cells had almost disappeared at 3 days after bupivacaine treatment with severe inflammatory cell infiltration. At 6 days after treatment, a considerable number of regenerating muscle cells containing centrally located nuclei appeared in the damaged soleus muscle. At 28 days, these regenerating muscle cells showed almost the same appearance as the control muscle cells containing subsarcolemmal nuclei, although a small number of muscle cells with central nuclei were still recognized.

In the biochemical analysis, control soleus muscles contained only MHC I ( $34.3 \pm 1.7\%$ ) and MHC IIa ( $65.7 \pm 1.7\%$ ). In the damaged muscles, MHC I was decreased toward 14 days after treatment, and then gradually increased. At 90 days, the contents of MHC I was finally recovered to  $36.3 \pm 2.9\%$ . In addition, MHC IIc and MHC IIb appeared in the damaged muscle from 3 to 28 days after treatment. However, they had disappeared at 90 days.

Using western blot analysis, myogenin protein was recognized in the control soleus muscles (slow type muscle), while the myogenin could not be found in the first type muscle of the anterior tibial muscle. The myogenin contents increased to about three fold ( $3.1 \pm 0.5$ ) at 3 days after treatment compared with those of control muscles and reached the maximum level ( $5.8 \pm 0.8$ ) at 6 days after treatment. Then, myogenin contents gradually decreased, although they still remained high (1.8 times) at the end of experiment (90 days after treatment). In contrast to the myogenin protein, a high level (3.3 times) of MyoD protein was detected in the anterior tibial muscle compared with that of control soleus muscles. In the damaged soleus muscles, MyoD contents reached a maximum level (5.4 times) at 3 days after treatment compared with that of control soleus muscles, and then gradually decreased toward the end of experiment. However, MyoD protein still remained 2.2 times compared with that of control soleus muscles.

These findings described above indicate that, 1) a property of fast type muscle cells appeared in the regenerating muscle cells during the regenerating process, and 2) myogenin and MyoD are closely related to the differentiation of the satellite cells and regeneration of the skeletal muscle cells.