

ISSN 1343-9480

MBPT

理学療法の 医学的基礎

Volume 5. No 1. May 1
2001

理学療法の医学的基礎研究会雑誌

The Society for the Study of Medical Basis of Physical Therapy

MBPT

シンポジウム

理学療法のための動物実験 ー草創期での挑戦ー

動物実験の基礎知識

古川 敏紀

広島大学医学部附属動物実験施設副施設長

19世紀の科学者クロードベルナールの「実験医学序説」では、「あらゆる生命現象の不思議は正しい科学的実験の積み重ねによって解明せられるべきであって、方法論的には生物体の科学も無生物の科学も決して別のものではない」と述べられています。この言葉に始まる動物実験の科学の進歩に果たした役割は大きく、今日の社会生活に大きくかかわっております。現在においてもこの言葉は動物実験を行う立場を明確に表現しており、実施するための科学的な根拠ともなっています。

無生物の実験がより細かくなると同様、動物実験でもそこから得られる知識や実施技術は拡大の一途を辿り、近年では個体の遺伝子を操作するという段階に到り、このことで生命の根源の操作にまで迫ろうとしています。時代の推移とともに動物実験は内容も精緻なものになり、またその依ってたつ基盤も大きく拡大してきました。動物実験がより精密に、より核心に迫るとともに生物としてのヒトの特異性を明らかにすることにもなり、また地球はヒトのためにのみ存在するのではなく、あらゆる生物の存在そのものが地球のために必要なのだとすることから動物実験がヒトのためだけのものではないとする立場も生まれてきています。

そのため今日では動物実験を行うための財政基盤はふくらむ一方であり、また倫理の面からも社会に受け入れられる動物実験を行うために実験者はより大きな負担に耐えなければならなくなっていることも事実です。

今回は現在の動物実験の知識や技術の全てを紹介することは困難ですが、「小過去」における動物実験はどのようなものだったのか、また変貌の激しい「現

在」における動物実験の概略をお話できればと思っています。また研究室の片隅で行なわれてきた動物を使用しての実験が精緻さを増すとともに窮屈になってきています。このような進展が続くと科学の研究はすべての人に開かれているのではなく、一部の人のためだけに存在するようになるのかもしれないという危惧を抱かせる気持ちになることもあります。

動物実験の基礎知識は大変に大きな問題ですが、私にとってもこれを機会に改めて動物実験というものを考え直すきっかけともなり、さらには「これから」の動物実験とは何かということについて皆さまとともに考えられるテーマを提起出来れば幸いです。

キーワード

動物・実験・科学

シンポジウム

理学療法のための動物実験 ー草創期での挑戦ー

ラットの関節拘縮モデルにおける筋結合組織の形態学的検討

沖田 実

長崎大学医療技術短期大学部理学療法学科

【目的】

臨床では、臥床やギプス・装具などによる関節の不動化によって関節拘縮（以下、拘縮）が発生するが、その機序や病態は未だ解明されていない。本研究は、拘縮の病態を明らかにする目的で、ギプス固定法を用いラット足関節に尖足拘縮を発生させ、ヒラメ筋内の結合組織の形態変化を検討した。また、併せて拘縮に対する伸張運動の影響についても検討した。

【方法】

8週齢のWistar系雄ラット56匹を実験群（n=31）と対照群（n=25）に振り分け、実験群は、両側足関節を最大底屈位で1、2、4、8、12週間継続してギプス固定した。また、4週間ギプス固定したラットの一部は、固定後に麻酔下で1日30分間（週6回）、述べ2週間、テープで足関節を最大背屈位に保持し、ヒラメ筋を伸張した（以下、伸張群）。なお、伸張群の比較対照に用いたラットには、4週間のギプス固定の後に同期間、麻酔のみをかけた（以下、非伸張群）。実験終了後は、麻酔下で両側足関節の背屈角度を測定し、その後両側ヒラメ筋を摘出した。右側ヒラメ筋は、急速凍結後、その横断切片を光学顕微鏡で検鏡し、左側ヒラメ筋は、4g重錘にて伸張した状態のまま3%グルタルアルデヒドで組織固定、その縦断切片を同様に検鏡した。また、試料の一部は筋細胞を溶解し、筋内膜コラーゲン線維網を走査電子顕微鏡で検鏡した。

【結果】

足関節背屈角度は、対照群に比べ固定1週で17%、2週で29%、4週で57%、8週で68%、12週で72%減少した。筋節長は、対照群に比べ固定1週で有意に

短縮し、筋内の結合組織も固定1週で増殖していた。一方、筋内膜コラーゲン線維網の形態は、固定1、2週では多くのコラーゲン細線維が筋線維の長軸方向に対して縦走し、対照群と同様であったが、固定4週以降は横走するコラーゲン細線維が増加した。次に、伸張群と非伸張群で足関節背屈角度には有意差を認めなかったが、筋節長は伸張群が有意に長く、結合組織の増殖も伸張群が軽度であった。また、筋内膜コラーゲン線維網の形態は、非伸張群はまだなお筋線維長軸方向に対して横走しているのに対して、伸張群は縦走するコラーゲン細線維が多く認められた。

【考察】

今回の結果から、1、2週間の固定で起こる拘縮は、筋線維自体の伸張性低下や結合組織の増殖によるものと考えられ、この程度の固定期間では、コラーゲン線維の滑動性は保たれていると推測される。しかし、4週間以上の固定になるとコラーゲン線維網の形態も変化していた。すなわち、拘縮は上記の影響に加え、コラーゲン線維の滑動性低下の影響が加わることでさらに進行すると推察される。一方、4週間のギプス固定によって生じた筋線維やコラーゲン線維網の形態変化は、自然回復の場合より伸張運動を行う方が改善していた。したがって、伸張運動は拘縮に対して有効な理学療法手段であると考えられる。

キーワード

ラット・拘縮・コラーゲン線維

シンポジウム

理学療法のための動物実験 ー草創期での挑戦ー

嚥下と呼吸の相互関連性の解析 ーウサギおよびヒトをモデルにした研究からー

藤野 英己

吉備国際大学保健科学部理学療法学科

【目的】

嚥下第2相では嚥下物が気道と食道の分岐点を通過するため、嚥下と呼吸運動間には高度の協調性が要求される。この嚥下第2相時には嚥下に一致した呼吸変動（嚥下呼吸）が現れることが知られているが、その発生のメカニズムや意義については未だ明確ではない。一方、誤嚥は脳に障害を受けたときに、しばしば発生する。脳損傷時には中枢神経系でのシナプス伝達障害が予測され、嚥下と呼吸との相互関連にも乱れが生じると考えられる。本研究では、動物を用いて、嚥下と呼吸の相互関連について検証をおこない、動物実験で得られた結果に基づき、健常成人、高齢者および嚥下障害者を対象とした嚥下機能の測定をおこなった。これらの結果から、嚥下呼吸の発生を確認すると共に、その発生の意義について考察し、嚥下と呼吸の関連性について検討した。

【方法】

実験動物としてウサギを使用した（実験1）。ウレタン麻酔後に上喉頭神経を電気刺激し、嚥下を誘発した。嚥下第2相の指標として、舌骨筋活動と喉頭挙上運動を記録し、呼吸変動の指標として、横隔膜活動および呼吸運動（下部胸郭部）を記録した。さらに気管を正中切開し、内圧センサーを気管内へ挿入留置し、気管内圧の測定をおこなった。筋活動、喉頭挙上運動、呼吸運動および気道内圧のシグナルはサンプリング周波数10kHzでA/D変換し、パーソナルコンピュータで解析をした。次に健常な成人男女と高齢者男女および嚥下障害者を対象とした実験をおこなった（実験2）。実験2では、5mlの水を嚥下した時の喉頭挙上運動および呼吸運動を記録し、実験1同様に、各シグナルをパーソナルコンピュータへ入力し、

解析をおこなった。

【結果および考察】

ウサギの場合、嚥下第2相の開始66±19msec後に嚥下呼吸の発生が認められた。この時に横隔膜は一過性に活動を示し、同時に気管内圧の低下も観察された。このことから嚥下呼吸は嚥下第2相時に積極的に生じる呼吸運動であることが確認できた。一方、健常成人の場合も同様に、嚥下第2相の開始後238±32msec遅延して、嚥下呼吸が発生した。高齢者においても181±32msec遅延して、嚥下呼吸が生じた。嚥下第2相から嚥下呼吸が発生するまでの潜時は健常成人と高齢者間に有意差は認められなかった。したがって、この相互関連は高齢者においても維持されていることが認められた。しかし、誤嚥時には嚥下第2相に先行して、嚥下呼吸が認められ、嚥下と呼吸運動に乱れを生じていることが観察できた。これらの結果から第2相開始直後に嚥下呼吸が発生することは正常な嚥下のためには重要であることが示唆された。気管切開患者では、誤嚥が多く観察され、嚥下時の気管閉鎖力が低下するとの報告もあることから、嚥下呼吸は気道閉鎖をサポートし、嚥下物の気道への侵入を防御していることが推察された。

キーワード

嚥下・呼吸・嚥下呼吸

シンポジウム

理学療法のための動物実験 一草創期での挑戦一

病態モデルラットの疼痛と血管反応に関する 電気生理学および動物行動学的研究

肥田 朋子

名古屋大学医学部保健学科理学療法専攻

慢性関節リウマチ、反射性交感神経性萎縮症、糖尿病などでは痛みを伴うことが多い。本来、痛みは生体防御としてなくてはならない感覚の一つであるが、慢性病態における痛みは生体防御の意味をなさないものであり、患者にとっては苦痛である。これらの疾患に対して、それぞれモデル動物が作成されており、慢性痛の機構に関しても研究が行われている。これらのモデル動物では、交感神経を電気刺激、あるいは交感神経の伝達物質であるノルアドレナリンを動脈内投与すると、痛覚線維は興奮することが見出された。これは、痛覚線維末端に存在するアドレナリン α_2 受容体の数が病態時には増加しているために起こると考えられている。病態時には、痛覚系にみられたような変化が、交感神経系においても起こっている可能性が考えられる。そこで今回は、慢性関節リウマチのモデルであるアジュバント炎症ラット（以下、AIラット）の交感神経系の変化を血流反応から検討した結果を、AIラットの身体的特徴や痛覚反応とともに紹介する。

実験にはLewis系雄ラットを使用した。AIラットの作成は、結核死菌を熱処理したFreundの完全アジュバントを流動パラフィンで懸濁し、ラットの尾遠位1/3部の皮下に注入した。投与12日後には体重は減少し、全身の関節の中でも特に足関節が腫脹し、後肢足底面を床から離床して破行する。このころのラットの足部容積を測定すると投与前の約2倍だった。投与3週後をピークに徐々に破行や他の炎症症状は快方に向かうが、関節は破壊されており、足部容積は増加したまま戻らない。足背部に一定の速度で加重していくと、足を引っ込めたり、鳴いたりするので、そのときの重さから疼痛閾値を測定する

Randall-Selitto-Test法がある。Butler (1992) によれば、この方法で測った疼痛閾値は、足容積の増加よりも後で低下する。

このようなAIラットを使って、麻酔下でL4以下の交感神経幹を電気刺激し、足底皮膚血流をレーザー Doppler 血流計で測定した。健常ラットでは血流は減少したが、AIラットでは、血流が増大する部位と減少する部位があった。血流増大部位は測定個所の約半数を占めた。このように、病態時には自律系機能にも変化が起こっていることが示された。さらに、この皮膚血流増大反応の機構を解明するために、いろいろな受容体を薬理的にブロックした結果、アドレナリン α_2 受容体とNK-1受容体が関与していることが示唆された。

病態時に、通常は痛みとして感じない刺激に反応したり、交感神経刺激に対する血管反応が変化することは、理学療法という物理的刺激に対しても、健常者とは違った反応を示す可能性があることを考慮して、物理療法の効果を検証していく必要があると考えられる。

キーワード

アジュバント炎症ラット・交感神経刺激・皮膚血流反応

シンポジウム

理学療法のための動物実験 一草創期での挑戦一

中枢神経障害後の運動学習セラピー；ラットにおける 神経・生理学的アプローチ

一原 里江

札幌医科大学大学院保健医療学研究科

【緒言・目的】

従来、障害後の回復過程では、障害部周辺の代償、機能変化に注目が置かれていた。しかし近年、健常側の大脳半球の変化にも注目が置かれるようになってきた。Jonesら(1999)は、運動学習訓練の効果を行動面の評価だけではなく健常側の大脳半球でのシナプス数、密度の増加という脳の組織学的変化と結びつけ証明した。しかしこれらは静的な変化の証明であり、変化がどのような機能を果たしていたかについては未知の段階である。そこで本研究は、大脳皮質障害後、運動学習訓練時にみられる脳の変化について電気生理学的手法を用い動的側面に焦点をあて検討した。

【研究方法】

[対象] Wistar系雄ラット(4-6週令)18匹。障害を与え複雑な訓練をする群(skilled訓練群)、単純な訓練をする群(simple訓練群)、訓練しない群。Sham-operationを行いskilled訓練をする群、simple訓練をする群、訓練しない群の6群(各々n=3)。
[障害モデルの作成・実験方法] 深麻酔下で大脳皮質微小電気刺激を行ない前肢が反応する閾値を計測し、前肢領域を確認した上で右半球大脳皮質感覚運動野に電氣的障害(1mA)を与えた。1ヶ月の訓練終了後、健常側(左半球)にて再び微小電気刺激を行ない、前肢が反応する領域、閾値を計測した。
[訓練方法] skilled訓練群は、手術後80cmはしご、平行棒上の走行、simple訓練群は、80cmの平面上の走行を障害後1日1時間、1ヶ月間行なった。行動評価として課題遂行時間を計測した。全群でえさ箱に健肢が接地してから患肢が接地するまでの時間を計測し非対称性の回復を測定した。
[組織学的方法] 1ヶ月の訓練

終了後、灌流固定を行ない脳を前頭断、100 μ mでスライスした後Cresyl violet染色し組織切片を作成した。3群間で障害の範囲、程度について検討した。

【結果】

1) 組織標本より、大脳皮質感覚運動野領域の障害に3群間で差はなかった。2) skilled訓練群は障害を与えた後(術後2-6日)、課題遂行時間が著しく遅延したが、緩やかに回復した。3) 前肢の非対称性測定では、健肢が接地してから患肢が接地するまでの時間はskilled訓練群で着実な回復傾向が見られた。4) 大脳微小電気刺激にて、skilled訓練群で前肢領域の拡大、刺激閾値の低下傾向を示した。

【考察】

障害形成後、skilled訓練を行なったラットで課題遂行時間が回復していった経過は、Jonesら(1998)が示した健常側大脳半球での神経の成長、発芽の時間経過と一致していた。健肢を自然な形で用い運動を再学習・代償していった過程は、大脳半球における可塑的变化を促した可能性が示唆された。また先行研究の大脳健常半球でのシナプス数、密度の増加の報告、大脳微小電気刺激で健常側大脳半球に変化があったことから、運動学習を含む訓練が、障害後、障害側の大脳半球だけではなく、健常側さらにはシステムとしての脳機能全体に影響を与えている可能性が推測された。

キーワード

障害・運動学習・システム

電位依存性Na⁺チャンネルアイソフォーム間における β - pompilidotoxin の感受性の検討

前島 洋¹⁾, 木下英司²⁾, 吉村 理¹⁾, 瀬山一正²⁾

- 1) 広島大学医学部保健学科
- 2) 広島大学医学部生理学第一

【目的】

電位依存性Na⁺チャンネルは、理学療法学の対象とする運動の中樞処理、末梢への伝導、更に感覚伝導の素子として働き、その分子構造の解明は重要である。中枢・末梢神経、心筋、骨格筋の興奮・伝導の素子である電位依存性Na⁺チャンネルは、アイソフォーム間におけるチャンネル開閉 Kinetics の相違とともに、特異的神経毒への感受性の違いによる Kinetics への影響においても相違を示す。カリウドバチ毒素より合成したペプチド性神経毒 β - pompilidotoxin (β - PMTX) は、中枢神経由来のNa⁺チャンネル (rBII) に対して特異的に作用し、不活性化機構を阻害する。前回の研究会では、 β - PMTX感受性を示すrBIIと感受性を示さない心筋由来Na⁺チャンネル (rH) 間の一次構造の検討より、rBIIにおける β - PMTX作用部位がドメイン4セグメント3-4間の1616番目グルタミン酸であることを報告した。本研究ではrBII1616番グルタミン酸の存在が他のアイソフォームに対する感受性との特異的な相違であることを確認するため、 β - PMTX感受性を示さない骨格筋由来Na⁺チャンネル (μ 1) における相応するアミノ酸のポイントミュータントを作成し検討した。

【方法】

β - PMTX感受性を示さない骨格筋由来Na⁺チャンネル (μ 1) において、rBII1616番目アミノ酸に相応する1431番目グルタミンを、グルタミン酸に点変異させたポイントミュータント (Q1431E) を作成した。HEK293細胞上に発現させたQ1431Eに対して、パッチクランプ法により全細胞電流を計測し、 β - PMTX感受性を検討した。

【結果】

Q1431Eにおいて、rBIIと同様に β - PMTX感受性が認められ、不活性化機構が阻害された。また、その作用程度も rBII とほぼ同一であった。

【考察】

本研究の結果から、rBII における 1616 番グルタミン酸の存在により、他のアイソフォームの感受性との特異的な相違を示すことが確認された。一方、前回の研究において、rHの相応部位のポイントミュータントではrBII以上の感受性が認められたのに対し、Q1431Eにおいては感受性がrBIIとほぼ同様であった。このことから、他ドメインの3次元構造の違いが作用部位であるrBII1616グルタミン酸に対する結合性を調整していることが示唆された。

キーワード

Na⁺チャンネル・ β - pompilidotoxin・パッチクランプ法

本研究の独創的な点

Na⁺チャンネル研究のプロープとなり得る β - PMTX の作用部位と作用機構についての解明をおこなった。

正常筋ならびに廃用性萎縮筋に対する下り坂走行の影響

豊田紀香, 片岡英樹, 沖田 実, 吉村俊朗

長崎大学医療技術短期大学部

【目的】

諸家によれば、遠心性収縮は他の運動様式に比べ筋線維損傷の発生が著しいと報告している。また、運動によって骨格筋動脈血の酸素濃度が低下することも知られており、これは骨格筋線維のエネルギー産生に影響し、筋線維損傷との関連も考えられる。しかし、これら報告の多くは正常筋を対象としたものであり、運動負荷に対して許容範囲が狭いとされる廃用性萎縮筋について検討したものは少ない。そこで、本研究では、遠心性収縮要素が強いとされる下り坂走行を正常筋と廃用性萎縮筋に負荷し、筋線維ならびに筋内血管におよぼす影響を組織・形態学的に検討した。

【方法】

Wistar系雄ラット35匹を対照群(20匹)と廃用性筋萎縮を惹起させた後肢懸垂群(15匹)に分け、この2群をさらに非運動群と運動群に分けた。各々の運動群には、傾斜-16度としたトレッドミルにて分速20mで90分間下り坂走行を負荷した。筋の摘出の24時間前に全てのラットの腹腔内に1%エバンスブルー溶液を注入し、麻酔下でヒラメ筋と長趾伸筋を摘出した。なお、運動群は運動負荷した2、24、48、72時間後に摘出した。摘出筋は、急速凍結の後に連続横断切片を作製し、一部はそのまま蛍光顕微鏡で検鏡、一部はヘマトキシリンエオジン(H&E)染色し、光学顕微鏡で検鏡した。さらに、dys1、dys2、dys3の3種類のジストロフィン抗体を用いたABC法による免疫染色も実施した。なお、ジストロフィンの分子量は大きく、ジストロフィンの部分欠損も生じうるため、N末端、rod部分、C末端を認識する3種類の抗体を使用した。定量解析として、エバンスブルーによって蛍光発色した筋線維ならびに貪食細胞の浸潤が認められる壊死線維の数を算出し、筋線維総数に対する割合を求めた。また、H&E染色像で確認されるすべての血管の内腔面積を算出した。

【結果】

正常筋、廃用性萎縮筋ともに運動の影響が全くな

い個体や筋線維損傷の発生が疑われる個体など、病理所見の出現は個体間でばらついた。また、最も運動の影響のあった個体の発色・壊死線維の割合をみても非運動群より1%程度の増加にとどまっていた。そして、運動によるジストロフィンの欠損や不足を示す所見も認められなかった。次に、血管内腔面積は、正常筋では非運動群、運動群ともに50 μ m平方以下の血管が全体の約30%を占め、廃用性萎縮筋の非運動群も同様であった。しかし、廃用性萎縮筋の運動後2時間では、50 μ m平方以下の血管が全体の7%に減少し、内腔面積の大きい血管が増加した。そして、運動後24、48、72時間では、その時間経過とともに50 μ m平方以下の血管が全体の約30%に近づいた。

【考察】

今回負荷した下り坂走行では、正常筋、廃用性萎縮筋ともに筋線維損傷の誘起はないか、あったとしても軽微で、Komulainenらが報告しているようなジストロフィンの欠損も認められなかったことから、筋線維自体に対する運動の悪影響は考えにくい。しかし、筋内血管に対しては正常筋ではなんら影響はないものの、廃用性萎縮筋では運動後2時間で内腔面積の増加を認め、これは血管拡張が誘起されたためと考えられる。したがって、同じ運動を正常筋と廃用性萎縮筋に負荷しても、筋内微小循環に対しては異なった影響をおよぼすと考えられる。そして、今後はこの微小循環の影響がどのような現象あるいは病態に進展していくのかを検索する必要がある。

キーワード

正常筋・廃用性萎縮筋・下り坂走行

本研究の独創的な点

正常筋と廃用性萎縮筋で下り坂走行の影響が異なることを筋内の血管の形態変化から示した点。

等尺性収縮運動の負荷量の違いがmdxマウスの骨格筋におよぼす影響

田崎 洋光¹⁾, 沖田 実²⁾, 吉村 俊朗²⁾, 中野 治郎³⁾, 大久保 篤史³⁾

- 1) 西諫早病院
- 2) 長崎大学医療技術短期大学部
- 3) 長崎北病院

【目的】

筋力低下と筋線維の変性・壊死を伴う筋ジストロフィー症は、ジストロフィン遺伝子の異常によりジストロフィンが欠損、もしくは不足していることが知られている。そして、ジストロフィンは筋細胞膜の裏うち構造の重要なタンパク質で、これが欠損していたり不足していたりすることで、運動に伴って筋線維損傷が生じやすくなると考えられる。そのため、運動療法においては運動方式や負荷量の設定に注意を要するが、これらの点についてはほとんど検討されていない。そこで本研究では、筋ジストロフィーの実験モデルであるmdxマウスを用い、2種類の異なる負荷量の等尺性収縮運動が骨格筋におよぼす影響を組織病理学的に検討した。

【方法】

8週齢のmdx雄マウスを運動群と対照群に振り分け、運動群には80°の傾斜の金網に強制的にしがみつかせることで後肢筋群に等尺性収縮運動を負荷した。また、その際には自重のみと体重の30%の重錘を尾部につけることで異なった負荷量を設定し(以下、Ex群、30%Ex群)、これを1日10分間、週5回、延べ2週間行った。実験終了後は、麻酔下で1%エバンスブルー溶液を腹腔内に注入し、その24時間後に長趾伸筋とヒラメ筋を摘出した。摘出筋は、急速凍結の後に10μm厚の連続横断切片を作製し、一部の切片はそのまま蛍光顕微鏡にて検鏡、エバンスブルーによって蛍光発色した筋線維の数を求めた。また、一部の切片はヘマトキシリンエオジン染色を施し、光学顕微鏡にて検鏡、中心核線維とsplitting fiberの数を求めた。また、画像解析ソフト(NIH Image)を用い、筋線維直径も計測した。

【結果】

長趾伸筋、ヒラメ筋ともに中心核線維やsplitting

fiberの数は対照群、Ex群、30%Ex群の3群間に有意差を認めなかった。また、両筋ともに蛍光発色した筋線維の数は対照群とEx群に有意差を認めなかったが、30%Ex群は対照群やEx群より有意に多かった。さらに、平均筋線維直径は両筋ともに対照群とEx群に有意差を認めなかったが、30%Ex群は対照群やEx群より有意に小さかった。

【考察】

諸家によれば、筋細胞膜の透過性の亢進、あるいはそれが損傷された場合にエバンスブルーによって蛍光発色する筋線維が認められ、この筋線維は結果的に壊死へ陥る可能性が大きいとされている。したがって、今回行った体重の30%の重錘を尾部につけての等尺性収縮運動は、筋線維壊死を助長していると考えられる。また、筋線維萎縮の出現は、このことが影響したものと推察され、運動負荷量としては不適切であるといえる。一方、自重のみの場合、運動の悪影響はないものの、筋線維肥大などの効果も認められなかった。したがって、今回の結果のみでは有効かつ安全な等尺性収縮運動の負荷量を明らかにすることは出来ず、今後の検討課題である。ただ、筋ジストロフィー症に対する運動負荷量の設定には細心の注意を要するの事実であろう。

キーワード

等尺性収縮運動・負荷量・mdxマウス・骨格筋

本研究の独創的な点

運動負荷量の違いによる骨格筋への影響から筋ジストロフィー症の運動療法におけるリスク面を明らかにした。

X染色体劣性遺伝 myotubular myopathy の遺伝子解析

内田英二¹⁾, 小塚直樹²⁾, 舘 延忠²⁾, 武田秀勝²⁾, 仙石泰仁²⁾, 小田中芳子¹⁾

1) 札幌医科大学大学院保健医療学研究科

2) 札幌医科大学保健医療学部

【緒言】

遺伝性筋疾患であり、X染色体劣性遺伝形式をとる X-linked myotubular myopathy (XLMTM) は、出生前あるいは幼若期より発症する筋疾患である。出生前に発症する場合、羊水過多と胎動の減少が認められる。臨床症状として、筋線維の成熟が阻害されることにより、重症な筋緊張低下、筋萎縮および筋力低下などが四肢や顔面筋に観察される。また多くの場合、呼吸機能不全により早期に死に至る。XLMTMの原因遺伝子である myotubularin(MTM1)遺伝子はX染色体長腕部28(Xq28)に遺伝子座があり、2.4kbのmRNAから成り、15個の翻訳領域(exon)から構成される。本研究では出生直後より著明な筋緊張低下と呼吸不全を示し、筋生検の結果、重症型のXLMTMと診断された男児2症例に対し、MTM1遺伝子の遺伝子解析を実施した。

【方法】

対象はXLMTMと診断された男児2名(患者1および2)とした。遺伝子解析に用いるDNAは遠心分離された末梢血白血球の細胞ペレットから抽出した。抽出されたDNAはpolymerase chain reaction(PCR)法により、MTM1遺伝子の各exonに対応するprimerを用いて増幅させた。PCRは、DNA Thermal Cycler PJ480(Perkin-Elmer/CETUS Co.製)を用いて行った。遺伝子変異のスクリーニングは、患者および対照とする正常PCR産物を用いたheteroduplex法(HD)およびsingle-strand conformation polymorphism法(SSCP)の2つの方法により、変異を有するexonを同定した。スクリーニングにより変異が確認されたexonについては直接塩基配列決定を行った。塩基配列決定はDNAシーケンサーSQ5500E(日立電子エンジニアリング?製)を用いた。

【結果】

HDの結果、患者1および2のいずれもhetero-duplexバンドが観察され、またそれぞれの母親にも同様同様のバンドが観察された。患者1はexon4に泳動度の異なるバンドが2本、患者2ではexon3に泳動度の異なるバンドの存在が確認された。またSSCPでは、患者1はexon4で観察できた3本のバンドすべてが対照に比較し速い泳動度を示し、患者2ではexon3で対照と泳動度が異なるバンドが観察された。シーケンスによる塩基配列決定の結果、患者1はMTM1遺伝子のexon4で193から196にかけて4塩基(AAAG)の欠失が確認された。これによりフレームシフト変異を生じ、下流に終止コドンが出現した。患者1の母親はこの欠失遺伝子と正常遺伝子をheterozygoteに有しており保因者と診断した。患者2はexon3の塩基163CがTに置換し、このためTGA(終止コドン)となりナンセンス変異となっていた。患者2の母親および一卵性の姉は同一の変異および正常遺伝子をheterozygoteに有しており保因者と診断した。XLMTMの場合、アミノ酸が変化する結果、タンパク質の発現低下を起こすミスセンス変異では症状は中等度から軽症であり、長期生存例もみられるが、タンパク質の発現を失うナンセンス変異およびフレームシフト変異では重症である。本研究で検討した遺伝子解析結果から、患者の症状は筋生検結果と同様に重症であることが確認された。

キーワード

X染色体劣性遺伝myotubular myopathy (XLMTM)・MTM1・遺伝子解析

独創的な点

XLMTMに対して遺伝子解析を実施し、変異を同定した点。

萎縮した骨格筋の疲労過程について —遅筋と速筋の相違—

大西智也¹⁾, 藤野英己²⁾, 武田 功²⁾, 襦屋俊昭²⁾

- 1) 吉備国際大学大学院保健科学研究科
- 2) 吉備国際大学保健科学部理学療法学科

【目的】

骨格筋は遅筋線維と速筋線維に分類できる。遅筋線維は収縮速度が遅いが、疲労しにくく、速筋線維は収縮速度が速く、疲労しやすいことが、解明されている。しかし、遅筋線維や速筋線維がギプス固定後の収縮特性について未だ明らかにされていない。そこで、本研究では萎縮した遅筋及び速筋に対して、単収縮を繰り返し与えたときの疲労過程について検討した。

【対象と方法】

Wistar系雄ラット13匹(8~13週齢、体重307±6g)を使用し、これらが無作為にギプス固定群(CAST群、n=7)と対照群(CONT群、n=6)に分類した。CAST群には、大腿部から足部にかけて2週間の底屈位でギプス固定を施した。麻酔(pentobarbital sodium、50mg/kg、I.P.)後、ヒラメ筋(SOL)と長趾伸筋(EDL)を摘出し、37°Cのクレブス液中(O₂95%、CO₂5%の混合ガス注入)で保生した。摘出筋の両側を糸で結紮し、一端を固定、他端を張力トランスジューサに吊した。トランスジューサを歪増幅器に接続し、収縮曲線を記録した。刺激は白金輪状電極を用いて、最大刺激電圧(持続時間1msec、頻数1Hz)の2倍で矩形波刺激を30分間摘出筋に与えた。刺激波形および収縮曲線は1kHzでA/D変換してコンピュータに記録し、張力と潜時(刺激開始から収縮までに要する時間)を算出した。

【結果と考察】

CONT群では、SOLの張力が30分後に49%まで徐々に低下したのに対し、EDLでは5分後に62%まで低下し、30分後には80%まで低下した。潜時では、SOLが一次関数的に21%に延長したのに対し、EDLでは指数

関数的に41%延長した。一方、CAST群では、SOLの張力が30分後に56%まで徐々に低下し、EDLは5分後に52%まで低下した。その後は徐々に84%まで低下した。潜時では、SOLが35%、EDLが66%と一次関数的に延長した。これらの結果から、遅筋はギプス固定によって易疲労状態となったが、速筋はギプス固定による変化が現れなかった。また、潜時は、ギプス固定によって遅筋、速筋ともに延長した。これまで、萎縮したSOLはtype 0線維割合の減少、静止膜電位の上昇、組織学的な変化がみられると報告されている。一方、固定後のEDLは結合組織の増加が報告されている。また、単収縮を遅筋や速筋に繰り返し与えることは膜興奮性や横行小管の応答性に影響を及ぼすとInamuraらが報告している。これらのことから、ギプス固定後のSOLでは、膜の易疲労性に加え、type 0線維の減少及び形態的变化が生じ、EDLでは、筋線維が萎縮するのみで線維タイプの変化や形態的变化が生じにくいことが考えられる。つまり、ギプス固定によってSOLは筋全体が易疲労状態に変化し、EDLは膜のみに疲労性が生じたと推察される。

キーワード

萎縮筋・疲労・遅筋・速筋・単収縮

本研究の独創的な点

本研究では、ギプス固定後のヒラメ筋と長趾伸筋が疲労性にどのような過程を示すか検討及び比較を行った。

モーターポイントの解剖学的位置

村岡史江¹⁾, 加賀祐子²⁾, 河上敬介³⁾, 木山喬博³⁾, 小林邦彦³⁾

- 1) 総合上飯田第一病院
- 2) 青木記念病院
- 3) 名古屋大学医学部保健学科

【目的】

モーターポイントは電気刺激により最も筋が収縮しやすい部位である。この部位は神経が筋に入る部位、またはend plateが多くある部位とされるが、それを明確に示した報告はない。そこで臨床的に治療筋となることの多い、長腓骨筋、前脛骨筋、腓腹筋を対象に、体表からの電気刺激により収縮しやすい部位を明らかにし、肉眼解剖学的な神経が筋に入る部位との関係を調べた。

【方法】

閾値の低い部位の確認：健常女性4名(24～25歳)の長腓骨筋、前脛骨筋、腓腹筋にクロナキシーメーターで、通電時間0.1 ms、被験者ごとに一定の電流量(17～26 mA)で筋が収縮する部位とその部位の閾値を調べた。腓骨頭を通る水平線と各筋の閾値の低い部位(以下、低閾値部位)との距離を測定し縦軸方向の位置とした。神経が筋に入る部位の確認：献体された遺体7体のうち下腿9例で、長腓骨筋、前脛骨筋、腓腹筋について神経が筋に入る部位を肉眼解剖学的に観察し、その位置を低閾値部位と同様の方法で表した。

【結果】

長腓骨筋：低閾値部位は全例で起始部から腓骨頭の遠位6 cmまでの領域にあった。また、解剖所見では、全例でこの領域に神経が入っていた。しかし、この領域に加えて1例では腓骨頭の遠位12～15 cmの領域に低閾値部位があったが、解剖所見ではこの領域に神経が入っている例はなかった。なお、神経が筋に入る部位は1～5箇所と個体により異なっていた。

腓腹筋外側頭：低閾値部位は全ての例で腓骨頭の近位7 cmから腓骨頭の遠位2 cmの高さの領域にあった。解剖所見では、全ての例でこの領域に神経が入っていた。しかし、この領域に加えて3例では低閾値部位が腓骨頭の遠位6～12 cmの高さの領域にもあった

が、解剖所見においてこの領域に神経が入る例はなかった。なお、神経が筋に入る部位は1～3箇所と個体により異なっていた。

腓腹筋内側頭：低閾値部位は腓骨頭の近位6 cmから腓骨頭の遠位1 cmの領域にあった。解剖所見では、全ての例でこの領域に神経が入っていた。しかし、この領域に加えて2例では腓骨頭の遠位4～6 cmの高さで、また1例で腓骨頭の遠位7～12 cmの高さでも低閾値部位があったが、解剖所見でこの領域に入る神経はなかった。なお神経が筋に入る部位は1または2箇所であった。

前脛骨筋：低閾値領域は、2例で腓骨頭の遠位2～7 cmの高さの領域に、別の2例では7～11 cmの高さと13～18 cmの高さの領域にあった。解剖所見においては1～3本に枝分かれした神経が低閾値領域とほぼ同様の領域に散在していた。

【考察】

一般にモーターポイントは一筋に対して1～2箇所が示されている。本研究は同一個体における閾値測定と神経進入部位の比較ではない。しかし神経が筋に入る部位は2箇所以上のものが多かったことや、閾値の低い部位で神経の進入が見られないものがあったことを考えると、長腓骨筋、腓腹筋では全てのモーターポイントが神経が筋に入る部位とは考えにくく、今後end plateの分布との関係などについて調べる必要があると考える。

キーワード

モーターポイント・解剖・電気刺激

本研究の独創的な点

電気刺激による筋収縮閾値の低い部位が、神経が筋に入る部位以外にも存在する可能性を明らかにした。

生活身体活動評価法の試み

— アクティブトレーサーを用いた single cosinor 法での日内リズム解析 —

西山 保弘¹⁾, 佐藤 義則²⁾, 和田とも子¹⁾

1) 九州大学生体防御医学研究所附属病院 慢性疾患診療部

2) 同上 医療情報室

【はじめに】

cosinor 法とは Halberg らがリズム変化の定量的評価法として導入したもので、日内リズム変動に最小二乗法を用いて余弦波をあてはめる方法である。その内、single cosinor 法は個人の分析に用いられる方法で測定データが少ない離散データである場合のリズム解析に用いられる方法である。今回我々は、RA の日常生活活動記録をもとに、日内リズム解析を試みたので報告する。

【対象と方法】

対象：RA 患者 20 名（外来 6 名、平均年齢 60.2 ± 7.1 歳、入院患者 14 名平均年齢 61.3 ± 5.9 歳）、健常女性 5 名（平均年齢 45.2 ± 6.2 歳）。方法：日常生活活動評価は、GMS 社製 AC-100（以下アクティブトレーサー）で実施した。アクティブトレーサーは季節を限定せず 2 日～3 日間腰部に装着し記録した。解析はオリジナルソフトを用いて TXT 変換したデータを 1 分毎に読み込み、1 時間毎の加算データを 1 日分（24 個）を作成して single cosinor 法でリズム解析を行った。評価方法は single cosinor で得られた MESOR（平均）、amplitude（振幅）、acrophase（頂点位相）を用い、acrophase より時間を求め各データの日内リズム周期を検討した。その他の評価として Lansbury 評価法（以下 AI）と血沈（以下 ESR）、CRP、steinbrocker の stage と class 分類、10m 歩行時間を測定した。

【結果】

入院患者の ESR の平均は 72.26 ± 42.19mm/1 時間、CRP は平均 4.18 ± 2.74mg/dl、AI は平均 63.7 ± 20.5 %、10m 歩行時間は 15.24 秒であった。ESR、CRP、AI の相互間に相関を認めた（ $p < 0.01$ ）。外来患者の ESR の平均は 48.5 ± 12.8mm/1 時間、CRP は平均 2.5 ± 0.5mg/dl、AI は平均 46 ± 5.3%、10m 歩行時間は 9.6 秒であった。

全対象に single cosinor 法での 24 時間周期のリズ

ムは認められた。また外来患者 1 例に acrophase より求めた時間が 20:30 分を示した。この患者は仕事のため毎日夜間作業を行っているため外来患者の対象より外して検討を行った。外来 RA 患者の amplitude は平均 4,367.78 で入院 RA 患者の amplitude は平均 2,326.41 と外来患者に比べて約半分と少ない値を示した。正常人の amplitude は平均 5,477.74 で外来 RA 患者と比べても外来と入院患者ほどの大きな差は認めなかった。また、同一症例でも午後帯の活動量が午前帯の対し大きく減少した場合はリズムが認められないことも分かった。

【考察】

RA では身体活動の日内リズムがないことが予想されたが、実際は健常人と同様の活動様式を行っているため 24 時間周期の日内リズムは確認された。ただ、易疲労性のためか午後帯の活動低下が生じた場合は、リズムが認められないケースも確認された。これは炎症による易疲労性の活動低下が算出上に関与してリズムを損なわせていることが示唆される。健常人の生活身体活動量にはリズムが認められた。疾病により易疲労性が、生活活動リズムを損なうこともあることが示唆された。

【まとめ】

RA の生活活動からの日内リズム解析を single cosinor 法を用いて行った。今回の結果から RA にも日内リズムがあることが確認された。

キーワード

慢性関節リウマチ・日内リズム・cosinor 法

本研究の独創的な点

アクティブトレーサーを用いて、RA の生活身体活動量の日内リズム解析を single cosinor 法を用いて実施した。

運動による脂質過酸化反応に対する Xanthine Oxidase の影響について

花房祐輔¹⁾, 大成浄志²⁾, 川口浩太郎²⁾

1) 広島大学大学院医学系研究科保健学専攻博士課程後期

2) 広島大学医学部保健学科

【目的】

近年、生体の抗酸化能力以上に活性酸素が産生されるような状態、すなわち酸化ストレスの状態が、様々な疾患において実際に生じていることが明らかになってきた。これまで我々は運動時に生じるとされる、xanthine oxidase (XOD) 由来の活性酸素による脂質過酸化現象について検討を行ってきた。その結果、XODが関与する脂質過酸化は運動終了後に引き起こされる可能性が示唆された。しかし、XODが影響する機序が生体内のどこで、どの程度引き起こされるかについて検討した報告はみられない。そこで本研究ではXODの酵素活性阻害剤(アロプリノール)を投与することで、運動による脂質過酸化に及ぼす影響について検討することとした。

【対象および方法】

対象は、10週令のWistar系雄ラットとし、運動負荷を行う2時間前にアロプリノールを投与する群(Allo.群、n=10)、生理食塩水を投与する群(生食群、n=10)の2群を設定した。実験を行う1週間前から動物用トレッドミルにて10m/min、15分の運動を、本実験においては、20m/minにて疲労困憊に至る運動を行わせた。実験を行う前日は絶食させ、運動直後、運動後5時間で断頭により殺処分し、血清、肝、長指伸筋(EDL m.)、ヒラメ筋(Soleus m.)を採取、液体窒素にて凍結した。肝は採取する前に生理食塩水にて灌流した。各検体は分析を行うまで-70℃にて凍結保存した。得られた検体から、血清は内藤らの方法、筋、肝はKosugiらの方法をそれぞれ用い、TBARS(チオバルビツール酸反応物質)濃度の分析を行った。

【結旺および考察】

生食群では、運動終了時及び5時間後の血清、肝、Soleus m.におけるTBARS濃度はすべて安静値と比べ増加を示していたが、EDL m.では両時点ともに安静値と有意な差は認められなかった。一方、Allo.群では運動後5時間の血清、肝、Soleus m.におけるTBARS値は生食群の5時間後の値と比較し、有意に低い値を示した。しかし、EDL m.については生理食塩水投与群と比較して有意な差は認められなかった。これらのことから、運動後に認められる脂質過酸化に、XODが関与してると考えられる。しかし、Allo.群の血清やSoleus m.におけるTBARS値は生食群の安静値より有意な高値を示していたことから、XOD以外の経路に由来する活性酸素も運動後の脂質過酸化に関与していた可能性が考えられた。Allo.群で運動後5時間の肝におけるTBARS値と生食群の値との間に有意な差が認められなかった。このことから、肝における運動後の脂質過酸化現象には、XODに由来する活性酸素が大きく影響することが示唆された。

キーワード

過酸化脂質・xanthine oxidase・運動

本研究の独創的な点

運動により脂質過酸化を引き起こす経路を限局し、その経路が生体内のどの部位での反応かを明らかにした点。

脊髄半切ラットの歩行運動回復メカニズムに関する研究 — 対側皮質脊髄路の残存と歩行運動回復の関連 —

中野治郎, 前田洋平, 堤恵理子, 梶原博毅

広島大学医学部保健学科病態解析学教室

【目的】

小動物の脊髄を半側切断しても、歩行運動機能が著明に回復する。その代償機序として対側皮質脊髄路の側枝を支持する報告が多い。しかし小動物では、左右の皮質脊髄路が後索中央で隣接しており、厳密な脊髄半切モデル動物を作成することは難しい。そこで本研究では、脊髄(胸髄)半切ラットの腰髄に軸索逆行性トレーサーとして Horseradish peroxidase (以下、HRP)を注射し、それによって標識される大脳皮質神経細胞の分布から対側皮質脊髄路の残存状況を判定した。そして対側皮質脊髄路の残存と歩行運動機能回復との関連について検討した。

【方法】

実験動物にはウイスター系雄ラット17匹(6週齢)を用い、実験群(n=12)と対照群(n=5)に分けた。実験群の脊髄右側(T8)を麻酔下で半切断し、5週間にわたって16満点の歩行運動機能スコアで両下肢を評価した。実験終了後、すべてのラットに半切側(右側)腰髄(L1)にHRP注射し、その2日後に屠殺して脊髄と脳を摘出、凍結保存した。そして脊髄半切部、HRP注射部、大脳運動野範囲から連続横断切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびHRP発色を施して検鏡した。

【結果】

HRP陽性の脳皮質神経細胞の分布を検索したところ、対照群では両側皮質で多数のHRP陽性神経細胞が認められ、その数は左側の方が多かった。一方、実験群のHRP陽性皮質神経細胞の分布は様々であった。そこでその分布状況から判断して以下の4群に分けた；両側皮質脊髄路が残存している群(以下、B群:n=1)、左側皮質脊髄路の大部分が残存している群(以下、HC

群:n=4)、左側皮質脊髄路の一部が残存している群(以下、HP群:n=4)、両側皮質脊髄路が切断されている群(以下、N群:n=1)。次に、半切側の歩行運動機能スコアを見ると、その回復の進行はB群、HC群、HP群の順に早かった。半切5週後にはB群、HC群、HP群とも14~16点まで回復した。B群、HC群、HP群の半切対側の歩行運動機能スコアも半切側と同じ傾向で、すべて15~16点まで回復した。N群の回復は両側とも他の3群より遅かったが、13点まで回復した。

【考察】

今回の結果から、脊髄半切ラットの歩行運動機能回復には対側皮質脊髄路の残存が影響すると考えられる。すなわち、皮質脊髄路は代償機能を備えており、その代償は半切後早期で発揮されると推測される。一方、N群の歩行運動機能の回復は他群よりも遅かったが、ある程度の4足歩行が可能なレベルまで回復した。したがって、脊髄半切ラットの歩行運動機能回復は対側皮質脊髄路のみで代償されるものではなく、その他の経路による代償も大きく影響していると推察される。

キーワード

脊髄半切ラット・歩行運動機能・軸索逆行性トレーサー

本研究の独創的な点

脊髄半切ラットの対側皮質脊髄路の残存状況を軸索逆行性トレーサーを用いて判定した。

短縮位に固定されたラットヒラメ筋組織中の結合組織における細胞間物質の ヒアルロン酸含有量に関する予備的検討

中 徹¹⁾, 秋山純一¹⁾, 藤野英己¹⁾, 大西智也²⁾, 中嶋正明¹⁾, 武田 功¹⁾

1) 吉備国際大学保健科学部理学療法学科

2) 吉備国際大学大学院保健科学研究科修士課程

【はじめに】

理学療法士が日常的に接する病態である筋の短縮・萎縮については、諸家が結合組織における膠原線維であるコラーゲン線維の形態や生化学的特性から検討を加えているが、結合組織における細胞間物質の側面からの検討は行われていない。今回我々は、細胞間物質の中でも結合組織の柔軟性に関わっているとされるヒアルロン酸 (HA) に注目し、その筋組織中含量を測定し、筋の短縮・萎縮と筋組織中のHA濃度の変化の関連性を検討した。

【対象と方法】

10週齢雄 Wister 系ラットを使用し、短縮位固定群4匹 (G群)、対照群4匹 (C群) とした。G群は麻酔下にて一側後肢足関節を底屈位でギプス固定し、ヒラメ筋を短縮位固定した。C群には麻酔のみを与えた。両群とも餌と水を十分に与えて飼育し、2週間後に麻酔下でヒラメ筋を摘出し、湿重量と筋長を測定した。各群1例には筋組織の形態観察を目的にヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色) を施した。各群3例からは各筋の筋長の1/2相当の長さの筋組織を筋腹中央部より切り出して0.1M pH7.4 リン酸緩衝液中にてHAを抽出し、プロテインバイディング法にて筋組織中のHA含有量を定量した。

【結果】

HE染色から、短縮位固定筋に筋細胞の萎縮、細胞核の増加、線維芽細胞、膠原線維の増加が認められた。湿重量はG群 89.2 ± 4.03 mg、C群 134.4 ± 10.97 mgで、C群よりG群に萎縮傾向が認められた。筋長はG群 21 ± 2.65 mm、C群 25 ± 0 mmで、C群よりG群で短縮していた。HA酸含有量はG群 $86.68 \pm 13.15 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、C群 $103.48 \pm 8.43 \mu\text{g}/\text{mg}$ で、C群よりもG群で

HA含有量が減少していた。

【考察】

HAはすべての結合組織に含まれるムコ多糖類で、結合組織に保水性や滑性、弾性を与えるといわれ、筋の結合組織にも存在し、筋の伸長性や柔軟性を決定する重要な因子の一つであると考えられる。今回の実験において、短縮位固定されたラットのヒラメ筋では筋の短縮・萎縮が起こり、結合組織を構成する膠原線維は増加していたが、細胞間物質であるHAの筋の単位重量当たり量は減少していた。膠原線維やHAは線維芽細胞により産生されるため、短縮位固定が生じさせた不動と張力負荷減少という外力環境に結合組織の中の線維芽細胞が対応し、膠原線維が多く産生され、逆にHAの含有量は相対的あるいは絶対的に減少したと考えられる。今後、観察固体数を増やすとともに、種々の外力環境下で筋の結合組織における膠原線維や他のムコ多糖類の質的・量的変化も含めて観察し、まだ不明であるところの短縮筋においてHA量が減少する機構や、HA量が筋の伸長性や柔軟性に及ぼす影響を検討する予定である。

キーワード

ヒアルロン酸・ヒラメ筋・ラット

独創的な点

筋の短縮や萎縮を、結合組織の細胞間物質であるヒアルロン酸の変化から論じた点。

廃用性筋力低下を生じる階層的メカニズムについて — ヒトにおける非侵襲的研究 —

金子 文成¹⁾, 村上 恒二²⁾, 川口浩太郎²⁾, 車谷 洋¹⁾, 大成 浄志²⁾

- 1) 広島大学大学院医学系研究科
- 2) 広島大学医学部保健学科

先行研究からヒトにおける廃用性筋力低下に中枢神経系の機能的変化が関与しているということは明らかである。本研究では、さらに皮質運動ニューロンおよび脊髄運動ニューロンのどちらが強く関与しているのか、もしくは両方において関与しているのかという意味においての階層的なメカニズムを検索した。対象は整形外科的治療のために肘関節から手関節にかけてギプス固定を3-6週間行われた症例8名であった。対照群として、健康な大学生8名について測定した。各症例ではギプス固定除去後（不活動期）とギプス除去後2ヶ月（回復期）に測定を行った。手関節掌屈のMVC発揮中のEMGを利き手の橈側手根屈筋から記録した。次に正中神経の電気刺激により最大上M波を記録した。また、経頭蓋磁気刺激による運動誘発電位（MEP）と電気刺激によるH波を、安静時、そして随意的筋力発揮時に誘発した。症例ではMVCの10%強度およびMVC実行中に、また対照群ではMVCの20%、40%、60%の筋収縮中にも測定した。M波の振幅に有意差はなかったが、MVC発揮中のRoot-Mean-Square value（RMS値）は不活動期が有意に低下しており、不活動期の運動出力低下は随意運動に特徴的であった。安静時のMEPおよび10%MVC時のMEPは有意差がなかった。MVC時には、不活動期のMEPが対照群と比較して有意に低かったが、回復期と比較した場合には有意差がなかった。H波の振幅は安静時および10%MVC時に有意差がなかった。MVC時のH波は不活動期が回復期および対照群と比較して有意に低かった。不活動期のH波は刺激前の背景筋電図RMS値に比例して低下していたのに対して、MEPは背景筋電図RMS値の低下に依存して減少していた症例と、そうでない症例に分けられた。以上の結果から、不活動

後の随意的筋力低下には、末梢神経から脊髄への求心性入力に対する脊髄運動ニューロンの応答性の変化が強く関わっていることが示唆された。

キーワード

不活動・筋力低下・運動誘発電位・経頭蓋磁気刺激・H波

本研究の独創的な点

階層的にヒトにおける廃用性筋力低下のメカニズムを探ろうとした点。

筋再生における筋原線維形成過程と筋衛星細胞の変化

小澤淳也¹⁾, 甲斐 悟¹⁾, 榊間春利²⁾, 松浦奈津江¹⁾, 川真田聖一¹⁾

1) 広島大学医学部保健学科

2) 鹿児島大学医学部保健学科

【目的】

筋再生における筋原線維の形成過程と衛星細胞の変化を観察し、電顕レベルで探ることを目的とした。

【方法】

8週齢マウスの腓腹筋に70%エタノールを注射して損傷を起こし、15分、12、24時間、2、3、4、5、7、14日後に光顕及び電顕で観察した。

【結果と考察】

注射部位の筋線維は、変性壊死した。注射後24時間には生存筋線維近傍で細胞質が豊富な衛星細胞が観察され、注射後2日には衛星細胞の分裂像が観察された。注射後3日では、壊死した筋線維が好中球やマクロファージに処理された場所に少数の筋芽細胞や筋管細胞が出現し、これらの細胞質ではアクチンフィラメントが網状に配列するものから、アクチンとミオシンフィラメントが整列して筋フィラメントの束を形成したもので様々であった。正常な筋線維に隣接した衛星細胞でも、筋フィラメントを形成しているのが認められ、分裂後の衛星細胞が筋線維に融合することを示唆する像も観察された。注射後4日には、筋芽細胞や筋管細胞が多数見られた。筋フィラメントの量や配列は様々で、筋フィラメントの束とZ帯の前駆体を持つものや、A帯とI帯を形成して比較的明瞭なZ帯を持ち、T系とL系が三つ組を形成しているものも観察された。注射後5日には、筋芽細胞や筋管細胞の数や大きさが更に増して、筋節のA帯、I帯、Z帯やM線が明瞭に区別でき、完成した筋原線維が出現した。注射後7、14日には、細胞質を筋原線維で満たされた筋線維が出現した。筋フィラメントが出現して筋原線維が構築される過程は筋の発生過程と類似していたが、筋が発生する時には筋原

線維形成後に出現するといわれるT系やL系が、再生時には筋原線維形成と並行して出現した。

キーワード

筋・再生・筋原線維・衛星細胞

本研究の独創的な点

筋再生時における筋原線維形成の過程をステージ分類し、衛星細胞の形態の経時的な変化を電顕で観察した点。

神経刺激によるラットヒラメ筋の筋節傷害と回復

松浦奈津江¹⁾, 小澤淳也¹⁾, 甲斐悟¹⁾, 榎間春利²⁾, 安孫子幸子¹⁾, 川真田聖一¹⁾

1) 広島大学医学部保健学科

2) 鹿児島大学医学部保健学科

【目的】

筋への過負荷によって筋節の傷害が生じることが知られているが、その発生機序や回復過程は明確ではない。今回、運動の代わりにラット坐骨神経を電気刺激して、ヒラメ筋を経時的に観察した。また、筋線維への過大な張力が傷害の一因とされているため、張力の筋への影響についても検討した。

【方法】

8週齢のWistar系ラット雌27匹を使用した。坐骨神経を30分電気刺激(50 Hz, 4-6 V)し、刺激終了直後、刺激終了後6、12時間、1、3、7日にヒラメ筋を採取した。さらに、傷害発生と張力の関係を調べるため、アキレス腱と足底筋腱を切断して、同様に電気刺激したり、電気刺激を行わず、アキレス腱と足底筋の腱を600 gまたは1,200 gの重りで30分牽引した後、前記と同様にヒラメ筋を採取した。ヒラメ筋の微細構造の変化を顕微鏡で観察し、筋線維面積に占める傷害部面積の割合を求めた。

【結果】

電気刺激や牽引によって傷害が生じ、それらは筋節の過収縮、筋節の過伸展、Z帯異常、筋フィラメント配列異常および筋フィラメント消失の、5種類に大別できた。電気刺激終了直後には筋節の過収縮が傷害の大半を占め、腱を切断して電気刺激を行った場合にも同様であったが、牽引のみでは筋節の過収縮は見られず、傷害の多くが筋フィラメント消失であった。傷害部面積の割合は、電気刺激終了直後には全体の18.8%、刺激終了後6時間に9.7%、12時間には22.0%と最高になり、1日には13.1%、3日には4.9%と徐々に減少し、7日には0.5%でほぼ消失した。刺激終了6時間になると、筋節の過収縮は見

られなくなり、筋節の過伸展やZ帯異常が観察された。また、傷害が最も広範となる12時間には、筋フィラメント配列異常が傷害の大半を占め、刺激終了後の時間経過で、観察される傷害像が異なった。

【考察】

電気刺激終了後生じた筋節の傷害は、運動(Ogilvie et al., 1988)や免荷後の再荷重(Krippendorf, 1994)による傷害と類似していた。牽引しただけでは、傷害が軽度で傷害像も異なったことから、筋の傷害発生には受動的な張力の影響は少ないと考えられる。傷害が起こるメカニズムは不明だが、Duncan (1987)が報告しているように、今回生じた筋節の過収縮は、実験的に細胞内カルシウム濃度が上昇した時に生じた異常像と似ていた。電気刺激により生じた傷害のなかには、複数の変化が混合したものも観察されており、傷害像の経時的変化は、傷害が新たに新生したというよりも、筋節の過収縮が、筋節の過伸展、Z帯や筋フィラメントの乱れに移行して生じた可能性が高いと考えられる。また、このような傷害の移り変わりは、修復過程に伴う変化であるかもしれないが、今後さらに検討する必要があると思われる。

キーワード

傷害・回復・骨格筋

本研究の独創的な点

腱切断により張力を除去して電気刺激を行ったり、筋を牽引して、筋傷害と張力との関係について調べた。

肋間筋における神経終末の形態学的研究

宮本英高¹⁾, 金村尚彦¹⁾, 洲崎悦子²⁾, 小林隆司¹⁾, 渡邊誠¹⁾, 高木昭輝³⁾, 片岡勝子²⁾
梶原博毅³⁾, 吉村理³⁾

1) 広島大学大学院医学系研究科

2) 広島大学医学部医学科

【目的】

横隔膜および肋間筋は呼吸において重要な役割を果たす横紋筋である。また、呼吸理学療法においては、これらの呼吸筋にアプローチすることが呼吸改善・全身機能の向上へとつながっていく第一歩であり、その機能的構造を知ることはさらなる理論への裏づけになると考える。本研究は組織化学的な実験によって肋間筋における神経の走行、神経終末の形態を明らかにすることを目的とした。

【方法】

生後5ヶ月齢のICRマウスを用いた。4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、第9・10・11肋間筋を肋骨付着のまま摘出し、EDTAにて脱灰した。急速凍結の後、20 μ の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、アセチルチオコリン染色および免疫組織化学的染色を行った。免疫組織化学的染色は、抗protein gene product 9.5 (PGP9.5, Ultra Clone, UK)を1次抗体として用いた。続いて、Vectastain ABCkit(Vector, US.)を使用し、アビジン・ビオチン酵素複合体による酵素抗体法を行って、3,3'-diaminobenzidineで発色させた。染色した組織標本は光学顕微鏡(Nikon, E-600, JAPAN)にて観察した。

【結果】

アセチルチオコリン法では各肋間筋の中央部(筋腹にあたる部分)が赤褐色に濃染されたが、神経終末の詳細な形状は不明瞭であった。我々はその部分に分布する微細な神経終末の形態を明らかにするため、抗PGP9.5抗体を用いた染色を行った。その結果、肋間神経は肋骨の近傍を走行し、分枝した神経線維が肋間中央部に多くの神経終末となり、筋線維に接合していることを確認できた。

【考察】

今回使用した一次抗体であるPGP9.5は脊椎動物のニューロンにおいて高発現している細胞質タンパクである。このタンパク質に対する抗体を用いて神経終末を染色することを試みた結果、肋間筋において、いくつかの違った形態を有した神経終末が確認された。筋線維には、運動神経終末や感覚神経終末、また血管を支配する自律神経終末など、機能的に異なった神経終末が存在する。また一方で骨格筋そのものにもtype 0、type I A、type I X、type I Bなどの異なるタイプの筋線維が存在し、各々に分布する神経終末もタイプが分けられる可能性も示唆される。今回観察された神経終末の形態的な違いは各々が機能的に異なった終末であることを示唆している。

今後はさらに詳細な神経終末のタイプ分けを進め、こういった機能を果たす終末であるかを同定していきたい。

キーワード

肋間筋・神経終末・免疫組織化学

本研究の独創的な点

肋間筋に分布する神経終末の局在と形態について組織化学的研究を行い、筋腹部に多く存在していることを確認した。

ラット膝前十字靭帯におけるメカノレセプターの免疫組織化学的観察

金村尚彦¹⁾, 宮本英高¹⁾, 洲崎悦子²⁾, 小林隆司¹⁾, 渡邊誠¹⁾, 高木昭輝³⁾, 片岡勝子²⁾
梶原博毅³⁾, 吉村理³⁾

- 1) 広島大学大学院医学系研究科
- 2) 広島大学医学部医学科
- 3) 広島大学医学部保健学科

【目的】

関節の運動制御や安定性の向上には靭帯の力学的作用だけではなく、メカノレセプターの解明が重要である。現在、膝前十字靭帯(以下ACLと略す)では、塩化金染色法によりレセプターが観察されている。今回の研究では、免疫組織化学的染色法を用いACLに存在するレセプターを詳細に観察することを試みた。

【方法】

10週齢のWistar系雄性ラット3匹を実験に供した。購入したラットを動物実験施設で1週間の適応期間をおいた後をバントバルビタールナトリウム麻酔後脱血屠殺した。両後肢膝関節より脛骨、大腿骨に付着した状態で6靭帯を摘出した。直ちに4℃で保たれたZamboni液で固定した。その後10%EDTA脱灰液にて7日から10日程度脱灰したのち、骨に付着した状態でACLを凍結した。その後クリオスタットにて45 μ m厚さの連続切片を作製した。

神経を免疫染色するために、各切片において一次抗体として抗protein gene product 9.5抗体(PGP9.5、Ultra Clone、UK)を反応させた後、Vectastain ABCkit(Vector、USA)を用いて、アビジン・ビオチン酵素複合体による酵素抗体法を行った。は3,3'-diaminobenzidineで発色させた。組織標本は光学顕微鏡(Nikon、E600、JAPAN)にて観察した。

【結果】

ラットACLにおいて、パチニ様終末、ルフィニ小体、自由神経終末という3タイプの神経終末を認めた。これらの神経終末は、靭帯の内部よりも表層部に、また靭帯の中央部よりも骨の付着部に比較的多くみられた。パチニ様終末は同心円盤状の層板構造

をもった楕円形をしていた。ルフィニ小体は、クラスターもしくは単体として存在しており、紡錘形をしていた。

【考察】

PGP9.5は脊椎動物のニューロンにおいて高発現している細胞質タンパクである。今回、抗PGP9.5抗体を用いた免疫組織化学的染色法によって、パチニ様終末、ルフィニ小体、自由神経終末を同定することができた。これらのレセプターは、ACLの表層部や付着部に多く観察された。その理由として、膝関節の動きに対し、靭帯内部よりも表層部、また中央部よりも骨の付着部の方がより多くの力学的負荷がかかるため、力学的な刺激をより鋭敏に感知しやすいからではないかと推測される。ヒトにおいては先行研究の塩化金染色法により4タイプのメカノレセプター(パチニ様終末、ルフィニ小体、ゴルジ様終末)が観察されているが、ラットにおいては3タイプのPGP9.5陽性神経終末を認めた。今後はさらに詳細な形態的タイプ分けを検討していく予定である。

キーワード

膝前十字靭帯・メカノレセプター・免疫組織化学染色

本研究の独創的な点

ラット前十字靭帯のメカノレセプターを免疫組織化学染色法で同定し、3タイプを識別することができた点。

歩行運動と毎分心拍出量の調節

松川寛二, 土持裕胤, 小峰秀彦, 村田潤

広島大学医学部保健学科

【目的】

歩行運動時に心臓から拍出される血液量（毎分心拍出量）は増加する。毎分心拍出量は前負荷である心室充満度、心臓興奮リズム、心収縮力および後負荷である末梢血管抵抗により影響される。これら変数は血中アドレナリンや心臓局所メカニズム（スターリング則）とともに、心臓自律神経活動による神経性調節を受ける。今回、歩行運動中の心臓交感神経性調節を明らかにするため、心臓交感神経活動と心拍数・一回心拍出量・毎分心拍出量を直接計測した。

【方法】

対象にはネコ（雑種、体重 3.0-3.5kg、2匹）を用いた。ネコをトレッドミル(10-50m/min)上で歩くように訓練した後、ハロセン麻酔下において右開胸手術により、上行大動脈にドップラー血流量計を埋め込み頸動静脈にカテーテルを挿入した。数週間の回復期間において再手術を行った。左開胸し左心臓に分布する心臓交感神経に電極を埋め込んだ。麻酔から回復後、ネコをトレッドミル上で歩かせ歩行時にみられる心臓交感神経活動、上行大動脈血流量および頸動脈血圧を同時記録した。この上行大動脈血流量から毎分心拍出量および一回心拍出量を求めた。これらデータを解析し、心臓交感神経活動と心拍数・一回心拍出量・毎分心拍出量の相互関係を調べた。

【結果と考察】

歩行運動の開始と共に心臓交感神経活動は増加した。この初期増加は運動強度依存性が少なく、むしろ歩行開始とカップルして高位中枢性に出現するように思われた。交感神経活動の上昇に対応して、運動初期に心拍数および毎分心拍出量も増加した。歩

行が持続した場合、低強度では心臓交感神経活動はやや低下しプラトーレベルに到達したが、より高い強度では交感神経活動の初期増加はそのまま持続した。対照的に、心拍数および毎分心拍出量は運動の持続と共に漸増性に増加しプラトーレベルに達した。以上の結果は、心臓交感神経活動が歩行運動時にみられる毎分心拍出量の増加、特に運動初期にみられる増加に重要な役割を果たすことを示唆した。また、運動持続時には心臓交感神経活動以外に他の因子が付加し心拍数や毎分心拍出量の増加に関係することが推察された。

キーワード

歩行運動・心臓交感神経活動・心拍数・一回心拍出量・毎分心拍出量

本研究の独創的な点

世界で初めて心臓に分布する交感神経活動と心拍出量を同時記録し、毎分心拍出量の自律神経調節を解明する点。

骨格筋収縮時の心臓交感神経活動の応答： 自発収縮と電気刺激による誘発収縮の比較

村田 潤, 松川寛二, 土持裕胤, 小峰秀彦

広島大学医学部保健学科

【目的】

運動にともない心拍数や動脈血圧はする。この時の自律神経制御機構として、中枢性に起こる feedforward 制御と効果器から反射的に調節を受ける feedback 制御が考えられている。しかしながら、これらの制御についてどのような違いがあるのか不明な点が多い。この疑問を解明するために本研究では除脳ネコを用いた。除脳ネコは不定期に自発的な骨格筋の収縮（自発収縮）を繰り返す。この自発収縮と電気刺激によって誘発的に骨格筋を収縮（誘発収縮）させた時の心臓交感神経活動、心拍数および動脈血圧の応答の違いを比較した。つまり自発収縮時の心・循環初期応答は中枢性の影響を受け、誘発収縮では反射性のみの影響を受けると考えられる。

【方法】

実験にはネコ5匹（雑種、体重2.6-3.8 kg）を用いた。ハロセンガス麻酔を使用し左開胸手術にて心臓交感神経に双極の電極を装着した。右大腿動静脈にカテーテルを挿入し、動脈血圧および収縮期血圧の周期から心拍数を測定した。双極の刺激電極を左後脛骨神経に装着し、また筋電図記録用の電極を下腿三頭筋に装着した。終脳と脳幹部との連絡を絶つため、除脳を上丘前-乳頭体吻側部レベルで施行した。除脳が完了した後に麻酔を停止し、3-5時間の回復期間をおいて計測を開始した。除脳ネコは不定期に自発的な収縮を繰り返すため、この自発収縮時の心臓交感神経活動・動脈血圧・心拍数の応答と後脛骨神経の電気刺激によって誘発された骨格筋収縮時の応答を比較した。

【結果】

心臓交感神経活動は自発的な収縮時にともなう筋

放電に 0.3 ± 0.2 sec 先行して増加した。一方、誘発された骨格筋収縮時に対する応答は筋放電に 1.3 ± 0.3 sec 遅れて増加した。この結果を反映し心拍数、動脈血圧の応答に関しても両者で時間的な差がみられた（心拍数： 6.6 ± 2.0 sec、動脈血圧 7.0 ± 1.7 sec）。

【考察】

これらの成績は、心臓交感神経活動は central command によって feedforward 制御の影響を受け自発的な運動に先行して、あるいは同時に増加することを示唆した。一方、誘発収縮にともなう活動筋受容器からの反射性調節は数秒間遅れて心臓交感神経活動を増加させることから、両者の収縮パターンにおける心・循環応答の違いには、心臓交感神経活動増加の時間的な差がその要因の一つであると考えられる。

キーワード

心臓交感神経活動・自発的骨格筋収縮・誘発的骨格筋収縮・除脳ネコ

本研究の独創的な点

自発的および電気刺激による誘発的骨格筋収縮に対する心・循環応答の違いを自律神経活動レベルで検討した。

随意運動に伴う高位中枢の関与が血压反射に及ぼす影響

小峰秀彦, 松川寛二, 土持裕胤, 村田潤

広島大学医学部保健学科

【目的】

動脈血圧は大動脈弓及び頸動脈洞を受容器、延髄神経核を反射中枢とする動脈血圧反射によって一定値に保たれると考えられてきた。血圧が上昇すると、動脈血圧反射は効果器である心臓に作用して徐脈、及び末梢血管に作用して血管拡張を起し、血圧を安静値へ戻す。しかしながら、運動中は血圧が上昇するにもかかわらず心拍数も同時に上昇する。これは、中枢神経系の関与によって血圧反射特性が変化するためと考えられているが、その詳細は不明である。そこで、随意運動に伴う高位中枢の関与が血圧反射に及ぼす影響を検討するために本研究を行った。

【方法】

実験に先立ち、ネコ (n=2、体重 2.8-3.2kg) を訓練して 10-30 秒間の前肢によるレバー押し運動を習得させた。ネコが運動を習得した後、ハロセン麻酔下で大動脈神経に双極電極を埋め込み、頸動脈にカテーテルを挿入した。手術から回復後、運動時及び安静時に大動脈神経を電気刺激して人工的に血圧反射を誘発し、心拍数と動脈血圧を記録した。また、心臓交感神経及び心臓迷走神経がこの血圧反射応答に与える影響を調べるために、交感神経 β 受容体のアンタゴニストであるプロプラノロール (0.5-1mg/kg) 及び副交感神経ムスカリニック受容体のアンタゴニストである硫酸アトロピン (0.05-0.1mg/kg) をそれぞれ頸静脈から投与した。

【結果及び考察】

安静時に大動脈神経を電気刺激すると、血圧反射応答として徐脈および血圧降下がみられた。一方、随意運動中に大動脈神経を刺激した場合には、血圧反射応答による徐脈は安静時と比較して20-60%小さく

なった。プロプラノロール投与後も運動に伴う血圧反射性徐脈の減少は観察された。しかし、硫酸アトロピン投与後、この徐脈応答は安静時及び運動時ともに消失した。以上の結果は、運動に関わる上位中枢が血圧反射を修飾し、運動中の血圧反射を中枢性に抑制する可能性を示唆した。また、血圧反射に対する上位中枢の修飾には、心臓交感神経よりも心臓迷走神経を介する経路が大きく関与することが示唆された。

キーワード

血圧反射、随意運動、意識下ネコ、心臓交感神経、心臓迷走神経

本研究の独創的な点

随意運動の開始に伴って循環調節血圧反射が高位中枢性に抑制されることを世界で初めて見つけた。