

ISSN 1343-9480
MBPT

理学療法の 医学的基礎

Volume 6. No 2. December
2002

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

総 説

筋骨格コンピュータモデルの理学療法への応用

元田英一¹⁾

キーワード:筋骨格コンピュータモデル・運動療法・コンピュータシミュレーション

はじめに

理学療法の中でも運動療法は筋肉・骨・靭帯等の運動器に対して様々な負荷をかけることが基本となる。例えば骨折外傷等の後療法としての理学療法は関節拘縮の予防・治療のための可動域訓練と廃用性による筋骨の萎縮の防止・改善のための筋トレ、荷重負荷等が行われる。しかし、負荷が強すぎれば、損傷部に傷害を与えるし、弱すぎれば効果が少なくなる。個々の疾病、傷害にあった最適な運動の方法は、たぶんに経験則からもたらされたものが多く、理論的なうらづけのあるものは少ないと思われる。人体に対するさまざまな運動負荷が各運動器(骨、関節、筋肉、靭帯等)にどのような力を与えているかを知ることができれば、以上の問題に答えることができる。

しかし、このような力を直接測定することは困難である。生体にセンサーつきの人工骨頭を使用しての、股関節合力、関節面応力の測定のような方法も存在するが、倫理的な問題があり、一般的にできる方法ではない。通常は屍体標本を使用した骨折、靭帯損傷の実験的解析が行われているが、現実の環境に即した条件でシミュレーションを実施することは難しく、与える外力などの多くはきわめて単純な条件であり、日常生活動作からもたらされる、生理的な外力が与えられているわけではない。

一方、近年のコンピュータ技術の発展によって、歩行分析を始めとする動作分析の手法は、3次元グラフィッ

クの発達で、精密な人体モデルを使ったアニメーションが利用されるようになった。しかし、動きの変化に主眼がおかれ、動作により関節・筋肉・骨にどのような力が加わっているかと言う問題には十分に答えられていない。工学の世界では機械の設計、建造物の設計に際して、コンピュータシミュレーションの導入によって各部分に加わる応力を計算し、力学的に最適なデザイン設計を行うことは常識化している。医療の分野でも3D-CTなど3次元画像技術が急速に発達してきており、そのデータを使用して有限要素法のようなコンピュータシミュレーションの手法を使用した骨関節の力学解析も行われるようになってきた。

そこで、運動器(骨、筋肉、関節など)で構成した仮想人体をコンピュータ上に作成し(筋骨格コンピュータモデル)、そのモデルに様々な動作をさせ、その時の筋力、関節間力、関節面応力等を計算できるシステムを作れば、人体実験をしなくても目的が達成できる。例えば、どのような姿勢が物を持ち上げるときに最も腰に負担が少ないか、下肢の骨折の手術後にどの程度の荷重をかけて歩いても良いか等の様々なリハビリテーションに役に立つ情報を得ることができる。また整形外科の手術にあたって、術前に手術の効果を知り、最適な手術方法を選択することも可能になる。例えば脳性麻痺の患者の歩行がアキレス腱をどの程度延長するともっとも良くなるかを術前に推察することが可能となる。

方法の概略(図1)

レントゲン写真・CT・MRIのデータを使用し、3次元の骨・筋肉・靭帯のコンピュータモデルを作製する。運動計測装置を用いて人体の動作データを採取し、モデルのデータと組み合わせて、計測結果のアニメー

1) 労災リハビリテーション工学センター
(〒455-0018 名古屋市港区港明1-10-5)
Eiichi GENDA, MD
Rosai Rehabilitation Engineering Center
(受付日 2002年8月6日/受理日2002年10月25日)

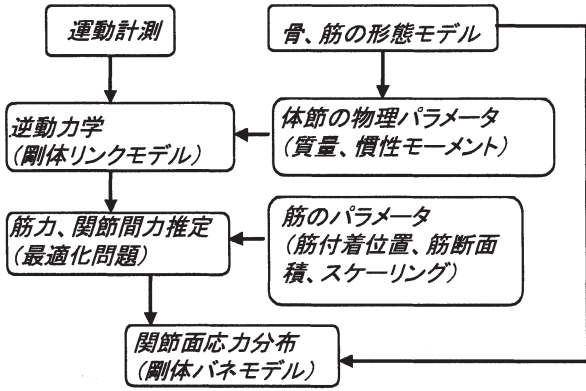


図1. 方法のフローチャート.

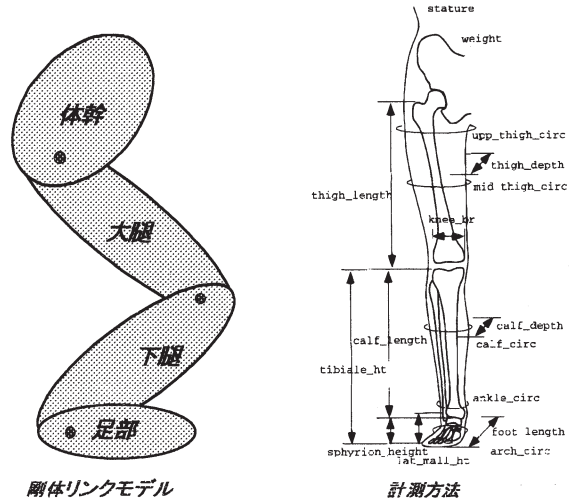


図3. 下肢を骨盤、大腿、下腿、足部の4セグメントに分け、体表よりの計測から質量と慣性モーメントを計算により求める。

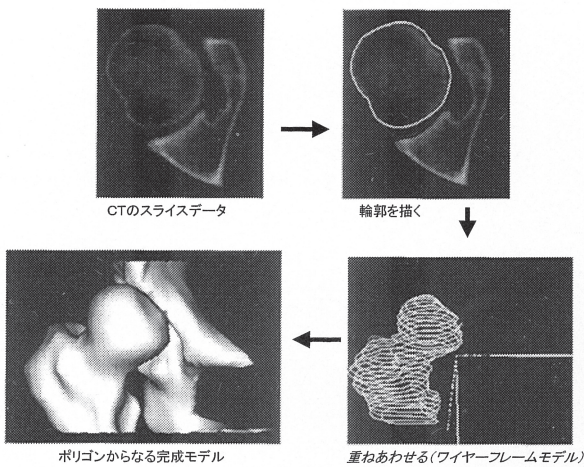


図2. CT写真より3次元のモデルを作製する.

シヨン表示を可能にする。人体の計測から手足など各運動単位ごとに分けられた部分の質量、慣性モーメントを計算し、運動計測装置から得られた動作分析のデータと組み合わせて逆動力学の手法で各運動単位に働く力を求める。これに各筋肉の位置、太さのデータより最適化手法を用いて、筋力、関節に働く力を求める。剛体バネモデル、有限要素法を使用して、関節面圧、骨内の応力を計算する。

作業の過程を詳しく述べる。

1) 骨と筋肉の形態モデルの作製

CT、MRIの画像データを使用し、各画像のスライスデータから骨や筋の外周部をデジタル化し、それを重ね合わせてワイヤーフレームモデルを作る。それから3次元のポリゴンで構成される形態モデルを作成する(図2)。このモデルは、靭帯の位置の入力や関節面のモデルを作るのに使用する。

2) 剛体リンクモデル

身体を足部、下腿、大腿等の体節(セグメント)に分け、各セグメントをひとかたまりで動く剛体と考え、その質量と慣性モーメントをもとめる。下肢は骨盤、大腿、下腿、足部の4セグメントに分け、図3のように計測を行い質量と慣性モーメントを計算により求める。各セグメントは関節でつながり、セグメント間の力の伝達は関節を介して行われる。このようなモデルを剛体リンクモデルと言う。

3) 運動計測と運動中の関節モーメント、セグメント間力の計算

運動計測装置を用いて人体の動作データを採取し、それと同時に、歩行動作などでは床反力計による下肢に加わる力のデータも取り込む。ここでは VICON250を使用した。座標計測装置のマーカ位置のデータより各セグメント単位の運動データを得て、その運動データと剛体リンクモデルから、逆動力学の手法を使い、セグメント間に働く力とモーメントを計算する。逆動力学(inverse dynamic)とは

物体に力が加われば運動がおこる。力の大きさがわかれば物体の運動が計算で予測できる。これを動力学という。逆に物体の運動がわかれば、その物体にどのような力が加わったかを計算できる。これを逆動力学という。

4) 筋力、関節合力の計算

ここまでで、セグメント間に働く力とモーメントが

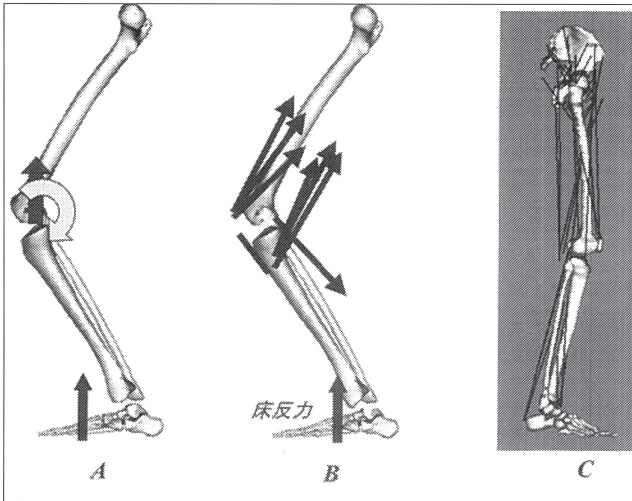


図4 大腿と下腿の両セグメント間に働く力とモーメントを示す(A)。この力が関節面に加わる力ではなく、(B)セグメント間に働く力と筋力の総和が関節面に作用する力である。(C)筋肉は起始、停止を結ぶ直線要素でモデル化し、その直線の方に筋力が働くと仮定した。

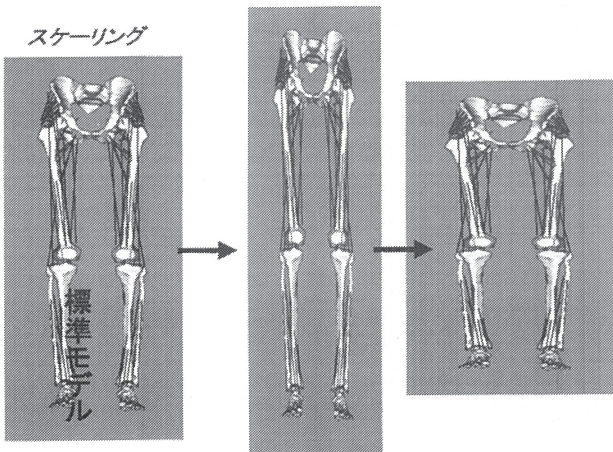


図5 スケーリングメソッド：標準の筋の起始停止位置のモデルを基準にして、各個人の骨格の大きさを計測し、立て横高さの3方向に拡大縮小することにより、個々の症例の筋の起始停止位置を求める。

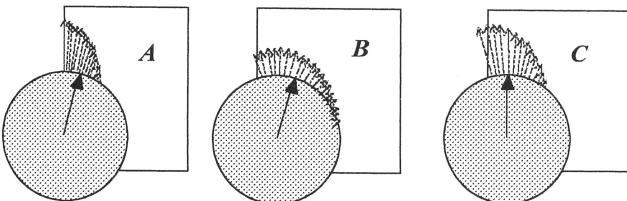


図6 AとBでは力の方向と大きさは等しいが、関節面の大きさの違いより応力分布は異なる。BとCでは関節面と力の大きさは等しいが、力の方向が異なるため、応力分布は異なる。

計算できたが、関節に働く力には、数多くの筋の関与が含まれており、セグメント間に働く力がそのまま実際の関節面に作用する力ではない(図4 A、B)。そのため筋力を求めることが必要で、そのためには、筋肉を含めたモデルが必要になる。筋肉は起始、停止を結ぶ直線要素でモデル化し、その直線の方に筋力が働くと仮定する。中殿筋、大殿筋等の幅のある筋は数本の直線で表す(図4 C)。このモデルから各筋の力と関節合力を計算するが、筋の解剖学的データと計算方法が問題になる。筋の起始停止位置を被験者毎に測定する事は、非侵襲的にはMR I・CTを使用して理論上は可能であるが、その労力を考えると実用的ではない。Brantは死体標本の筋の起始停止を計測し、骨盤の形、大腿骨の長さ、下腿骨の長さ等のパラメータとの関係性を求め、パラメータの計測より各筋肉の起始停止を計算により求める方法を提唱した(スケーリングメソッド、図5)。ここでは彼の方法を採用して、基準となるモデルの起始停止位置を、容易に同定可能なランドマークを指標に、縦・横・高さの縮尺を変えて、任意の被験者の骨格に合わせた起始停止位置をもとめることにした。

筋力は関節モーメントの釣り合いを考慮して計算するが、関節に関与する多数の筋がそれぞれに出す力の組み合わせは無数にあり、拮抗する筋や二関節筋の影響も含まれている。そのため、関節に関与する多くの筋力と関節に作用する力を通常の計算で算出することは不可能である。例えば、膝関節の屈筋は内外側のハムストリングで4筋、伸筋は大腿4頭筋で4筋になり、これが釣り合って、膝の関節モーメントが0になるとき、それぞれの筋が出す力の組み合わせは無数にあり通常の方法では求めることができない。そこで、筋の他の性質を利用して解を得る方法を考える。

ある値を最小化(または最大化)するという目標をさだめる事によって、解を得る方法を最適化手法という。たとえば、ハンバーガー店が各商品をいくらかで販売するかを考えると、その組み合わせは無数にあるが、もっとも利益が上がるという事を目標とすると、最適な組み合わせを求めることが可能である。ここでは、以前より行われている筋力をその筋肉の生理的断面積で割った数の3乗を各筋肉でもとめ、その総和を最小にするという目標を使用した。この目標の意味は各筋肉のストレスの総和が最小になることであり、簡単に言えば各筋肉がなるべく均等に力を出すようにするという意味がある。

5) 関節面の応力分布を求める

以上の手法により、筋力と各関節面に加わる力が計算できた。しかし、関節軟骨に対するストレスを解析する時、関節合力では不十分である。等しい関節合力でも、

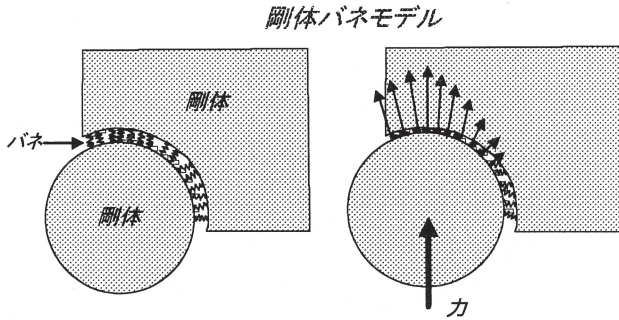


図7 関節を骨を剛体、軟骨を多数のバネでモデル化する。力を加えたときの各バネに加わる力より圧分布が求められる。

関節面の形状が異なれば関節面の応力分布は異なり、関節合力の大きさが等しくても方向が違えば、関節面の応力分布は異なる(図6)。そのため剛体バネモデルを利用して、関節面の応力分布を計算する。

剛体バネモデル(図7)

関節に力が加わった場合、主に変型するのは軟骨・靭帯で骨の変型は小さいため、骨を変形しない物体(剛体)、軟骨・靭帯をバネと仮定することが可能である。骨から関節に力が加わると、その力の方向によって関節面に分布するバネの圧縮を受ける大きさが関節面の場所によって異なってくる。バネの圧縮によって生じた反発力の合計が骨から受ける力と等しくなるように関節面のバネ式を解けば、各バネの位置に相当する場所の応力が得られる。

応用例1

股関節の外転運動、SLR運動

変形性股関節症患者に対する運動療法で外転運動、SLR運動が良く行われているが、その療法が関節軟骨に対して過重な負荷を与えていないかを検討する必要がある。軟骨の変性は関節面全体に加わる力の総和、すなわち関節合力ではなく、関節面に分布する局所的な力の大きさ、すなわち応力(ストレス)に関係する。筋力の強化が股関節の安定性を増し、軟骨に対するストレスを減少する反面、訓練により過度のストレスを関節に加えることは関節症の進行を早めることになる恐れがある。

健常成人男性1名1股、白蓋形成不全女性2名3股を対象とした。

KIN-COMを用いて毎秒30度の速さで外転およびSLRの最大努力下での求心性と遠心性の等速運動を行い、股関節の角度とそのトルクを記録した。

SLR運動(図8)

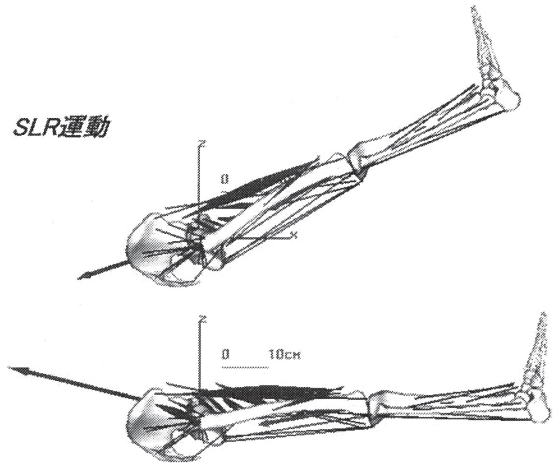


図8 SLR運動：伸展位で股関節合力は絶対値も大きく前方に向いている。屈曲位では後方に向き、その絶対値も小さくなっている。

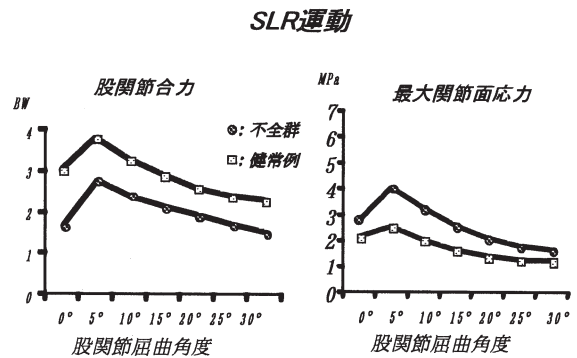


図9 股関節合力と最大関節面応力との違い

股関節伸展時には股関節合力は前方に、屈曲時には後方に向いていた。前額面では内側に8度から10度と大きな変化はなかった。

体重比の股関節合力は伸展時で大きく、屈曲時に小さく、また健常者の合力が形成不全群より大きくなっていた。一方、最大関節面応力は形成不全群で大きく、特に股関節伸展位でより大きくなっていた(図9)。

外転運動(図10)

外転角度が小さいときには股関節合力は上方に向き、かつ絶対値も大きい。外転が大きくなると合力方向は内側に傾き、その大きさも小さくなっていた。股関節合力は健常者の合力が形成不全群の合力より大きかったが、最大関節面応力には両者の差はほとんどなかった(図11)。

以上より、外転運動は比較的 안전한運動療法だが、股関節伸展位でのSLR運動は関節症を悪化させる危険が大きいといえる。

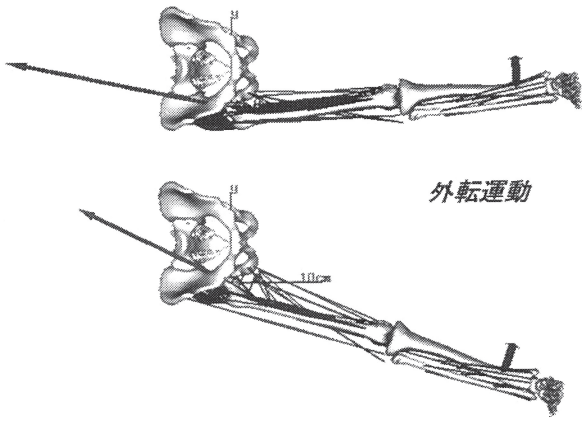


図10 外転運動：合力方向は内側に向いており、外転角度が大きくなるとさらに内側に傾く。

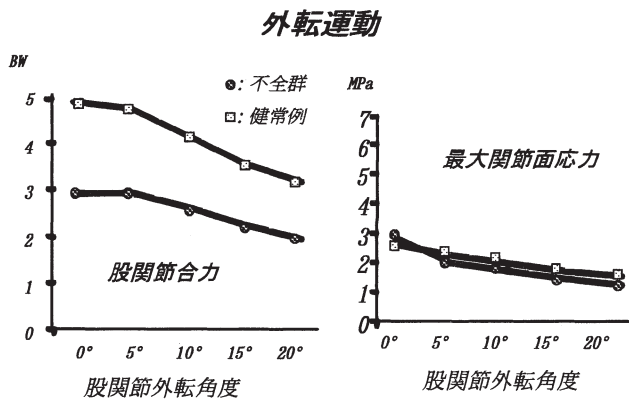


図11 股関節合力と最大関節面応力との違い

応用例 2

Open Kinetic Chain Exercise(OKC) and Closed Kinetic Chain Exercise (CKC)

膝の周りの筋肉を強化することは、膝関節症を予防するために重要であるが、訓練方法によって膝関節に対する負担が異なる。前十字靭帯の再建術後の筋力訓練では閉運動連鎖訓練 (CKC) が注目されている。

CYBEX6000を使用して、OKCとして通常の座位での膝伸展運動を、CKCとして、河村が考案した足部にアタッチメントをつけたKIN-COMで背臥位でのレッグプレス動作を行わせた。側方よりビデオ撮影をして膝、股関節、足部のマーカーの動きをデータ入力した。

OKCでは大腿四頭筋が主に働き、ハムストリングはほとんど働いてないのがわかる。これに反してCKCでは大腿四頭筋とハムストリングがともに働いているのがわかる (図12、13)。その結果、脛骨の前方方向の引出し力を見ると、OKCでは伸展位付近では前方引き出し力が働いているが、CKCでは、ハムストリングの共同収縮により、前方引き出し力はほとんど働かないことがわかる (図14)。

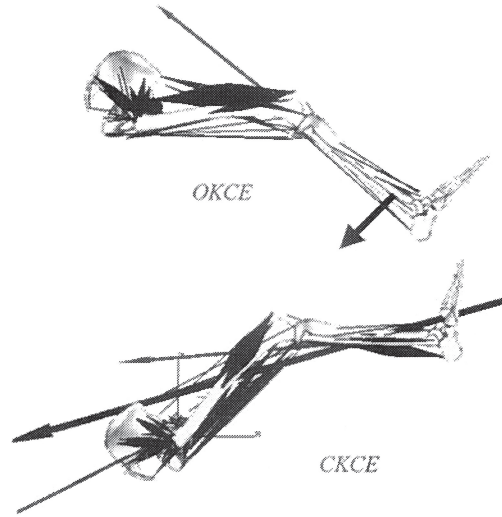


図12 Open Kinetic Chain Exercise (OKCE) と Close Kinetic Chain Exercise (CKCE)

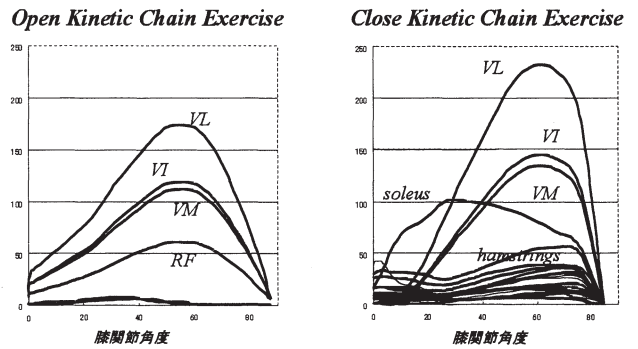


図13 OKCE と CKCE での筋力分布の違い

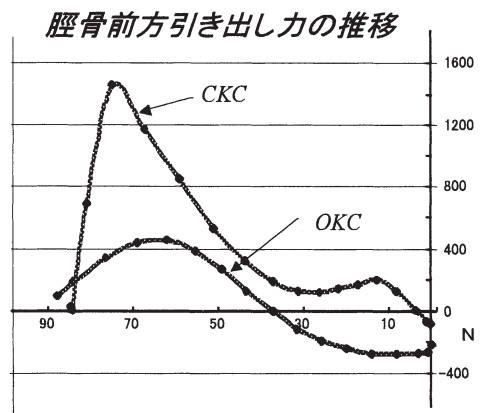


図14 OKCE と CKCE での脛骨前方引き出し力の違い

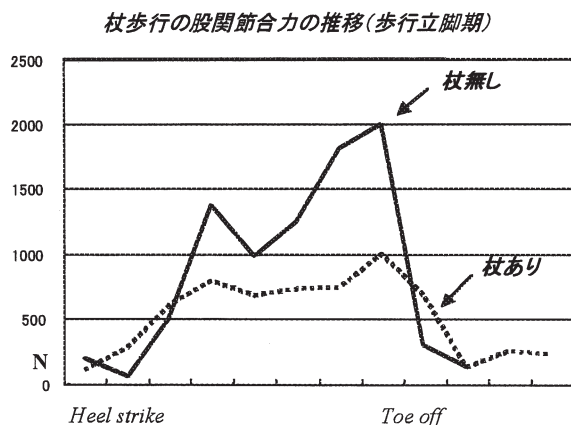


図15 杖が股関節合力効果を減少させる

応用例3

杖歩行による股関節の免荷

歩行時には股関節には体重の3倍の力が加わることが知られており、変形性股関節症の患者に杖の使用が勧められている。Maquetは簡単にてこの原理を使用した計算式で片脚立位するとき、体重47kgの人で杖に17kgかければ股関節合力は杖を用いない時の176kgから30kgに減少すると述べている。この計算は歩行中ではないし、筋力も中殿筋のみ考慮され、2次元の解析という限界がある。そこで筋骨格モデルを使用した解析を試みた。グラフ(図15)は杖なしと、杖を軽くつく感覚で歩いた例を示す。杖に最大12kgかけて歩くと、反対側の股関節合力は最大約200kgから100kgと半減するが、Maquetの式のように5~6分の1にはならなかった。今回は健常人での解析だが、今後、股関節疾患の患者を被検者にして、杖の長さ、杖への荷重の大小を変えて解析をしたいと計画している。

おわりに

筋骨格コンピュータモデルは方法論としては1970年代に提案された方法であるが、最近のコンピュータ技術の発達、特に3次元コンピュータグラフィックスの

発達で臨床応用が身近になってきた。しかし、モデルもまだまだ単純なものであるし、計測方法にも問題がある。結果の信頼性の検討も必要である。様々な限界が存在するが、今後、この方法はコンピュータ技術の発達と平行して進歩し、より精密な解析が可能になると考えられる。最後に一緒に仕事をしてくれた、鈴木康雄氏、金井章氏、河村顕治氏に感謝します。

【文献】

- 1) Brand RA, et al: A Model of Lower Extremity Muscular Anatomy. J Biomech Eng 104: 304-310, 1982.
- 2) Crowninshield RD et al: A Physiologically Based Criterion of Muscle Force Prediction in Locomotion. J Biomech, 14: 793-801, 1981.
- 3) E Genda N, Konishi Y, Hasegawa H, Iwata A: computer simulation study of normal and abnormal hip joint contact pressure. Arch Orthop Trauma Surg 114: 202-206, 1995
- 4) Kawai T and Takeuchi N: A discrete method of limit analysis with simplified element. American Society Civil Engineers International Conference on Computing in Civil Engineering, New York, 1981
- 5) 金井章 他: 股関節外転筋等尺性収縮時の股関節接触面応力について, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, Vol.20:93-96, 1999.
- 6) 金井章, 元田英一, 鈴木康雄: 「SLR運動時の股関節接触面応力の検討」日本臨床バイオメカニクス学会誌, Vol.21, 83-86, 2000
- 7) 元田英一: 日常生活動作での股関節接触面圧の変化, Hip Joint, Vol.23:19-22, 1997.
- 8) 元田英一: 寛骨臼回転骨切り術のコンピュータシミュレーション Hip Joint, vol. 23: 416-419, 1997
- 9) 鈴木康雄, 元田英一: 「筋骨格システムのコンピュータモデルとその応用」. 日本災害医学会会誌, Vol. 47: 667-672, 1999

原 著

筋強直性ジストロフィー症の遺伝子変異と筋力との関係

小塚直樹¹⁾ 舘 延忠¹⁾ 菊池 真²⁾ 内田英二²⁾
 仙石泰仁¹⁾ 大屋一博³⁾ 横山雄一⁴⁾ 武田秀勝¹⁾

キーワード：筋強直性ジストロフィー・CTG リピート・筋力

はじめに

筋強直性ジストロフィー症 (Myotonic Dystrophy, 以下DM) は、常染色体優性遺伝を示す緩徐進行性の筋原性疾患で、ミオトニア (筋収縮後の弛緩障害)、筋萎縮、筋力低下を主症状として、その他に白内障、知能障害、内分泌異常、心筋障害、呼吸器障害など、様々な障害を併せ持つ全身多臓器疾患である¹⁾。これらの臨床症状(表現型)は個体差が大きく、同一家系内においても異なる²⁾。DMは発症時期により、先天型、小児期発症型、成人発症型に分類される¹⁾。本疾患は20～30歳代で発症することが多いため、成人発症型が研究対象となることが多かったが、近年、フロッピーインファントとして出生し、その後も呼吸器障害、哺乳力低下などの重篤な症状を示す先天型がその対象として注目されている³⁾。一般的に、先天型はDMの責任遺伝子を持つ母親から生まれ、母親よりも重度な諸症状を示す²⁾。それら母親の中には、白内障のみを示すような軽症型、あるいは

全く臨床症状を示さない無症候型(保因者)が存在し、DM患児の出生を契機に異常を指摘される場合がほとんどである。このようにDM家系では世代を経て症状、障害度が強まり(potentiation)、あるいは発症年齢も早まる(anticipation)現象が認められ、これらを総称して表現促進現象(広義のanticipation)という²⁾。

DMの遺伝子異常は19番染色体の長腕部13.3(19q13.3)に存在し、myotonin protein kinaseを発現させるMT-PK遺伝子の非翻訳領域に存在する不安定なCTGの三塩基反復配列(CTGリピート)の増大であることが1992年に報告された^{4,5)}。このリピート数は正常では5～37回であるのに対し、DM患者では50回以上、特に先天型では2000回以上にまで達する^{4,5)}。この遺伝子異常(遺伝子型)がどのようなメカニズムでDMの発症に関わるかは現時点では不明であり、研究が進められている。またリピート増大と重症度や発症年齢との間に相関関係があると報告されている^{4,12)}。さらに同一家系内における表現促進現象との関連性についても研究^{9,11)}が進められている。このように、これまで表現型と遺伝子型との関係については多々報告されてきたが、臨床症状の重症度を定量化し、遺伝的要因との関係を比較検討した報告^{6,12)}は非常に少ない。

本研究では、DM患者に対して、CTGリピート数の測定および筋力に関する定量的評価を試み、その関連性について検討することを目的とした。このような定量的検討は、今後DM患者の予後予測や治療効果判定、臨床症状に与える環境要因などを検討していくうえで、意義のある研究であると考えられる。

対 象

対象は、1999年までに札幌医科大学小児科を受診し

-
- 1) 札幌医科大学保健医療学部
 (〒060-8556 札幌市中央区南3条西17丁目)
 Naoki KOZUKA, PT, PhD
 Nobutada TACHI, MD
 Yasuhito SENGOKU, OT, MA
 Hidekatsu TAKEDA, PhD
- 2) 札幌医科大学大学院保健医療学研究科
 Shin KIKUCHI, PT
 Eiji UCHIDA, MS
- 3) 青森県立中央病院小児科
 Kazuhiro OHYA, MD
- 4) 北海道医療大学歯学部
 Yuichi YOKOYAMA, MD
- (受付日 2001年12月10日/受理日2002年10月29日)

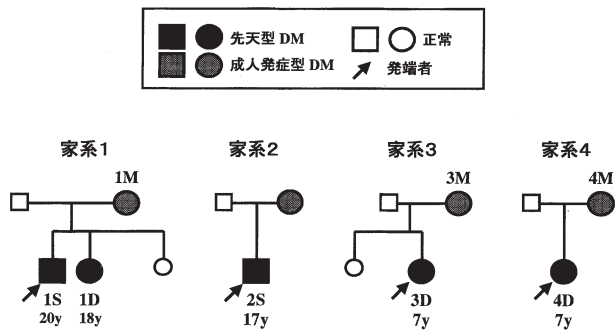


図1 検索対象としたDM 家系

検索対象としたDMの4家系である。家系1：1Sは発端者、20歳男性、1Dは妹、18歳、1Mは母親、家系2：2Sは発端者、17歳男性、家系3：3Dは発端者、7歳女性、3Mは母親、家系4：4Dは発端者、7歳女性、4Mは母親である。

た4名の先天型DM患者を発端者とする互いに血縁関係のない4家系8名(図1)である。家系1は先天型の長男(発端者)、同じく先天型の長女、成人発症型の母、家系2は先天型の長男(発端者)、家系3は先天型の次女(発端者)、成人発症型の母、家系4は先天型の長女(発端者)、成人発症型の母である。また対照群として健常大学生男性11名、健常大学生女性12名、健常小学生男女4名とした。被験者は口頭および紙面にて本研究に関する説明を実施し、その後、同意の得られた者とした。

方法

1. 遺伝子解析

1) PCR法

末梢血白血球よりDNAを抽出し、それを鋳型としてDM特有のCTGリピート部を含む領域をPCR(Polymerase Chain Reaction)法にて増幅した。プライマー⁹⁾は#406(5'-GAAGGGTCCTTGTAGCCGGGAA-3')、#409(5'-GGAGGATGGAACACGGACGG-3')を使用し、DNA合成酵素としてEx Taq Polymerase(TakaRa)を使用した。また4塩基(ACGT)の原料となるdNTP mixture(TakaRa)、および合成反応調整液(塩濃度調整緩衝液)として10×Ex Taq buffer(TakaRa)を使用した。増幅の目的領域は塩基配列中にCG配列を豊富に含む領域であるため、グリセロールを20%相当量添加した。

増幅反応にはDNA Thermal Cycler 480(PERKIN-ELMER/CETUS Co.)を使用した。合成反応液は95℃にて3分間加熱後、①95℃にて1分30秒間保持、二本鎖DNAを一本鎖とし、②65℃にて1分間保持、その後③

72℃にて2分間という①~③までの3段階1サイクルとして、35サイクルを繰り返し、最後は72℃にて7分間の後、4℃で保存した。反応終了後のPCR産物は1%アガロースゲル中で、100Vにて50分間電気泳動した。泳動緩衝液には1×TAE(Tris-酢酸、エチレンジアミン四酢酸緩衝液)、を用いた。その後エチジウムブロマイド染色処理を施し、紫外線照射下にてポラロイド撮影を行った。

2) サザンハイブリダイゼーション

PCR産物泳動後のゲルを0.25N HCl中で15分間振盪後、滅菌蒸留水で洗浄し、さらに0.4N NaOH中にて15分間振盪した後、同じく0.4N NaOH中にてDNAをナイロンフィルターへと転写した。転写後のナイロンフィルターは2×SSC(Saline-Sodium Citrate; 塩濃度調整液)で洗浄した。次に化学発光現象を利用した検出キット、Gene Images AlkPhos Direct™ labeling-detection system(Amersham Pharmacia Biotech)によりハイブリダイゼーションおよび信号検出を行った。プローブ¹³⁾には(CTG)10リピートを使用した。化学発光体を施したプローブをナイロンフィルターにハイブリダイズした後、X線フィルム(Kodak:X-Omat)に感光させた。露光条件は室温にて15分間とした。現像後のフィルムから19q13.3のCTGリピート部分に結合したプローブ部分を計測し、CTGリピート数を推定した。

2. 筋力測定

1) 握力・背筋力

一般的なスポーツテスト¹⁴⁾と同様の条件下で行った。30秒間以上の休憩をはさんで2回測定し、値の大きい方をデータ(単位;kg)として採用した。握力測定は利き側のみとした。

2) 膝関節・足関節周囲筋力測定

Cybox 2000(Lumex Inc., Ronkonkoma, NY)を使用して等尺性筋力を測定した。膝関節屈伸筋力の測定肢位は、股関節80°屈曲座位にて膝関節60°屈曲位とした。また足関節底背屈筋力の測定肢位は膝関節伸展位での腹臥位とし、底屈筋力は背屈5°、背屈筋力は底屈10°とした。なお上肢の肢位は制限せず、全て利き側のみの測定とし、運動方向が変わる際には60秒間の休憩の後、数回の練習を行った。測定は全て等尺性収縮を10秒間持続とし、2回の測定中、値の大きいものをデータとして採用した。2回の測定間には30秒間の休憩をはさんだ。データはピークトルクを%体重比(%WB)として換算したものを採用した。

3) 咬合力測定

デンタルプレスケール(富士写真フィルム社)を使用

し、意識的最大の噛みしめ時の咬合力を測定した。デンタルプレスケールは加圧することにより赤く発色するフィルムで、専用スキャナーで読みとり、発色の程度により咬合面にかかった圧力(N)を計測することができる。このフィルムを上下歯列間に介在させ、最大噛みしめをさせた。ワックスタイプのフィルムにて咬合部の型を取った後、計測用のフィルムにて1回のみ実施し、前者の型と比較して計測が正確に行われたかを確認した。

結果

1. 遺伝子解析結果(図2)

1) 正常対照

サザンハイブリダイゼーションの結果、健常成人コントロールでは全例に約0.2kb(約20~40CTGリピート、1kbは1000塩基対)のフラグメント(DNA断片)が確認された。

2) DM患者

先天型では6kb(約2000CTGリピート)以上、成人発症型または無症候型では0.5kb~5kb(約100~1500CTGリピート)程度の正常と比較して増大したフラグメントが確認された。

家系1:全例(3例)において約0.2kbの正常フラグメントの他に、増大したフラグメントがスメア状に検出

された。発端者である長男(1S)および長女(1D)では、2~7kb(約600~2200CTGリピート)付近に増大したフラグメントが認められた。また母(1M)では0.5kb~5kb(約100~1600CTGリピート)付近に達する増大フラグメントが検出された。世代間でリピート数は増大しており、長男、長女のフラグメントは母より大きいことが示された。

家系2:発端者である長男(2S)においては2~20kb(約600~6600CTGリピート)程度まで増大したフラグメントが確認された。家系3:発端者である次女(3D)では2~7kb(約600~2200CTGリピート)付近に達する増大フラグメントが認められた。母(3M)では0.5kb~2kb(約100~650CTGリピート)に増大フラグメントが確認された。世代間でのリピート増大が認められた。家系4:発端者の長女(4D)は2~7kb(約600~2200CTGリピート)付近まで、増大フラグメントが確認された。母(4M)では0.5~3kb(約100~900リピート)の増大フラグメントが確認された。世代間でのリピート増大が認められた。

2. 筋力測定

1) 解析方法

DM患者の筋力測定値を同性、同年代の正常対照群の平均値に対するパーセンテージとして比較した。

2) 欠損値

腰痛のため背筋力測定と足関節の検査が不能であった1例(1M)、局所的な圧が高く、咬合力がスケールアウトした3例(1S、3D、4D)、膝関節、足関節の検査を拒否した1例(1D)、足関節の検査課題が理解および遂行困難であった2例(1Sは足背屈、3Dは足底屈)を欠損値とした。

3) CTGリピートとの関連(図3-9)

CTGリピートが3000回以上まで達していた先天型の2S(家系2、長男、17歳)の筋力測定結果では足関節背屈筋力をのぞき、すべての結果で正常対照よりも低値を示していた。またほぼ同世代で先天型の1S(家系1、長男、20歳)および1D(家系1、長女、18歳)では、CTGリピートは2Sより小さく約2200回に達するものであったが、筋力測定結果では2S同様に正常対照よりも低値を示しているものの2Sとの明確な差は認められなかった。

成人発症型の1M(家系1、母、40歳代)では、先天型よりもCTGリピート数は少なく約1600回であったが、筋力測定結果は正常対照よりも低値であり、先天型の1S、1D、2Sとの差異がなかった。同じく成人発症型の4M(家系4、母、30歳代)では、CTGリピート数は約900回と1Mより少なく、咬合力が1Mとほぼ同

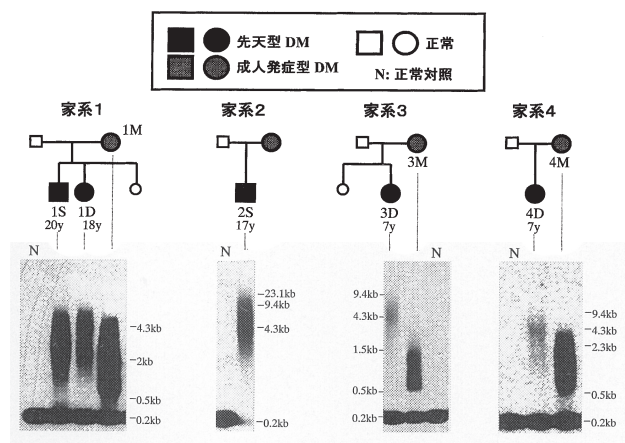


図2 DM家系のサザン法によるCTGリピート数の解析結果である。上段の家系図に対するサザン法の結果を下段に示し、点線で結んだ。家系1:3例とも約0.2kbのフラグメントの他に、1Sと1Dでは2~7kb付近にフラグメントを認め、1Mでは0.5kb~5kb付近にフラグメントを認めた。家系2:2Sにおいては2~20kb程度までのフラグメントを認めた。家系3:3Dでは2~7kbのフラグメントを認め、3Mでは0.5kb~2kbにフラグメントを認めた。家系4:4Dは2~7kbのフラグメントを認め、4Mでは0.5~3kbのフラグメントを認めた。

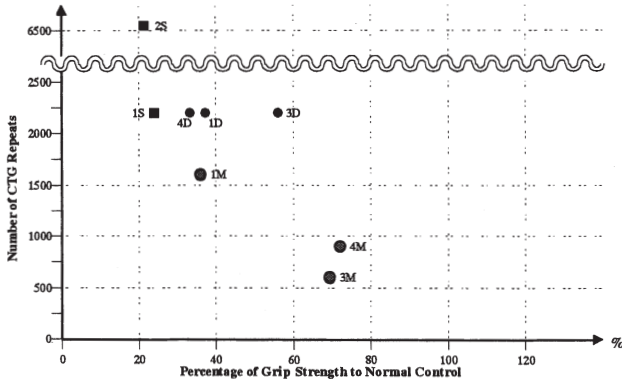


図3 DM患者のCTGリピート数(縦軸)と握力との関係を同性、同年代の正常対照群の平均値(横軸)に対するパーセンテージとして比較した。傾向としてリピート数と反比例した筋力値を示していた。

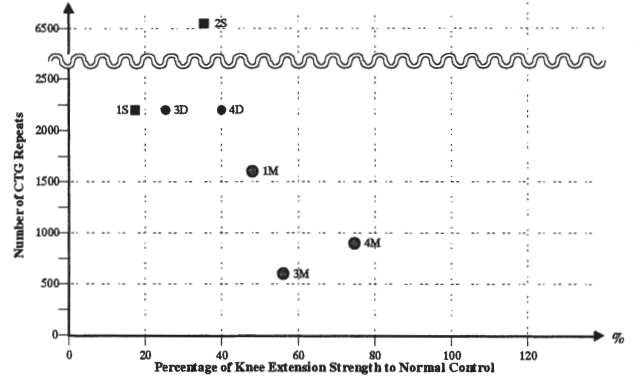


図6 DM患者のCTGリピート数(縦軸)と膝伸展力との関係を同性、同年代の正常対照群の平均値(横軸)に対するパーセンテージとして比較した。

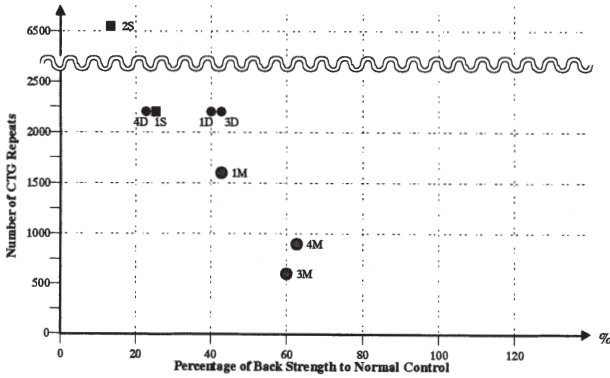


図4 DM患者のCTGリピート数(縦軸)と背筋力との関係を同性、同年代の正常対照群の平均値(横軸)に対するパーセンテージとして比較した。傾向としてリピート数と反比例した筋力値を示していた。

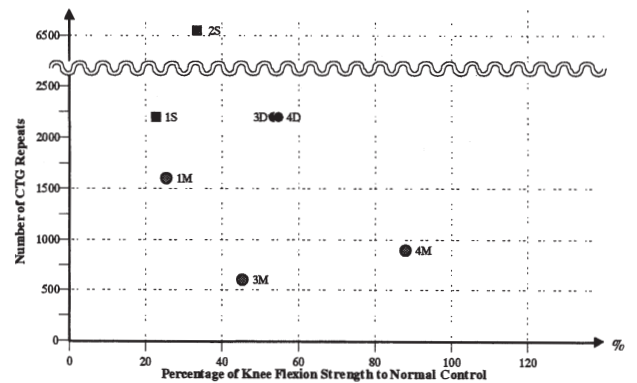


図7 DM患者のCTGリピート数(縦軸)と膝屈曲力との関係を同性、同年代の正常対照群の平均値(横軸)に対するパーセンテージとして比較した。

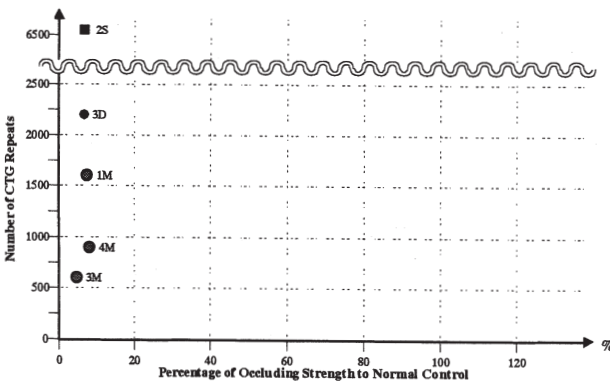


図5 DM患者のCTGリピート数(縦軸)と咬力との関係を同性、同年代の正常対照群の平均値(横軸)に対するパーセンテージとして比較した。

等であった以外は、1Mより高い値が得られた。正常対照と比較すると、膝関節屈曲・足関節底屈および背屈筋力では明確な差は得られなかったが、他では低値を示した。

成人発症型3M(家系3、母、30歳代)についてはCTGリピート数は他家系の母よりも少なく650回程度であったが、筋力は4Mとほぼ変わらないが、それよりも低値を示していた。

先天型で低年齢の3D(家系3、二女、7歳)および4D(家系4、長女、7歳)では、CTGリピートは約2200回まで増大していたが、筋力測定結果では正常対照と比べて低値ではあるもののその差は小さかった。

それぞれの筋力測定項目ごとに見ると、DM患者は握力・背筋力・足底屈筋力では、傾向としてリピート数と

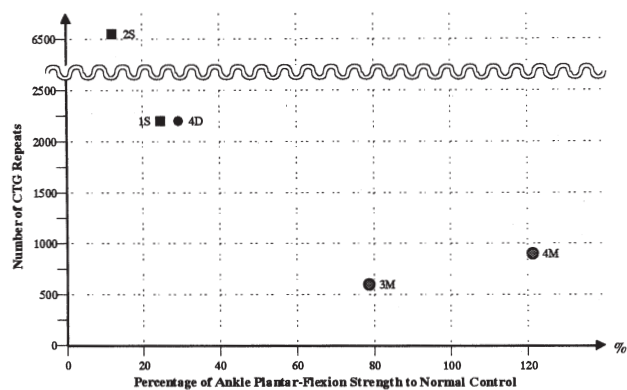


図8 DM患者のCTGリピート数(縦軸)と足底屈力との関係を同性、同年代の正常対照群の平均値(横軸)に対するパーセンテージとして比較した。傾向としてリピート数と反比例した筋力値を示していた。

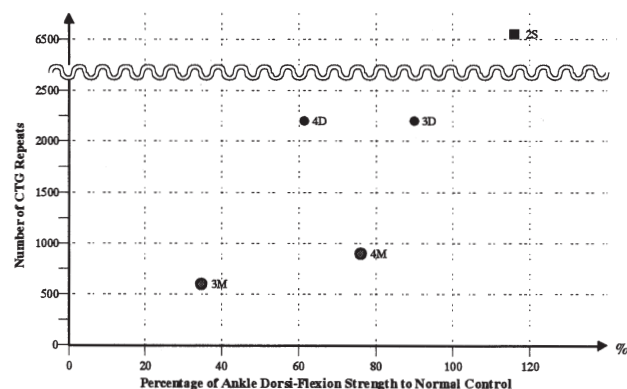


図9 DM患者のCTGリピート数(縦軸)と足背屈力との関係を同性、同年代の正常対照群の平均値(横軸)に対するパーセンテージとして比較した。

反比例した筋力値を示していた。咬合力・膝伸展および屈曲筋力では正常対照より低値を示したが、リピート増大の程度との明確な関連性が認められなかった。足背屈筋力に関しては、健常者との差が認められなかった。

考察

1) 遺伝子解析

CTGリピート解析では先天型はCTGリピート数が2000回以上、成人発症型では100~1500回に増大しており、同一家系内における表現促進現象と一致する結果が得られ、これまでの報告と一致した^{9,11)}。なお、今回用いた化学発光現象によるサザンプロット法は、安定した再現性を示し、Radioactive Isotope(RI)を用いた従来の方法と比較しても劣らぬ結果であることが確認できた¹⁵⁾。

2) 筋力との比較

握力、背筋力に関しては報告例がなく他との比較ができないが、今回の結果からは、CTGリピート数から本疾患の進行度が推測可能な項目である可能性が示唆された。本疾患は、不正咬合¹⁶⁾や顔面筋力低下による逆V字型口唇がみられる¹⁷⁾。今回のDM患者も一様にこれらの特徴(特に下顎前突による不正咬合)が見られ、咬合力低下は明らかであったが、検査中に歯列中の一点に集中して大きな圧がかかる場合が多く、最大咬力発揮が困難であると考えられた。その結果、各症例間での差が生じなかった可能性を否定できない。

下肢筋力に関しては、本研究では一個人内での筋力低下にばらつきがあった。また足関節背屈筋群が先天型において維持されているのに対し、成人発症型において低下している傾向にあった。低下しているとする報告¹²⁾と個体間でばらつきがあるとする報告⁶⁾とがあり、先行研究においても一致していない。これら個人内・個人間の差については、測定した部位による進行速度の違いや個々による発症パターンの違い、CTGリピート以外の遺伝的要因あるいは環境要因による影響なども考えられるが、定量的な検討や縦断的検討が非常に少なく、発症機構も不明であることから、明確な事実に言及できない。

今回、低年齢患者の正常対照群が少なかったが、握力、背筋力に関しては本研究の対照群から得られたデータは、東京都立大学体育学研究室によりまとめられた体力標準値¹⁴⁾とほぼ一致する値であった。

以上のように今回の結果では、握力、背筋力、足関節底屈筋力においてはCTGリピート数と反比例する傾向にあったが、江口ら⁶⁾は対象を40歳代に限定し、筋症候と歩行能力を主とした日常生活動作能力により3群に分類して、リピート数との関連性を調査した結果、相関性が認められたと報告している。本研究では年齢層を統一していないため、症状の進行による影響を除外できなかった。先天型の症例では、今後筋力がさらに低下することも予想される。今回、CTGリピートの増大と筋力低下との明確な関連性を指摘するには至らなかったが、個体内、個体間の相違や進行パターンに関する研究の必要性を示唆することができた。単一筋の筋力測定を目的とした咬合力検査や下肢筋力検査に比べ、握力、背筋力は上肢筋群、下肢筋群、体幹筋群の総合的な筋力を反映しており、これら指標とCTGリピート数との関連を今後のデータの蓄積により解明していくことが重要と考える。このように、今後はこれらのいくつかの目的に沿った研究が進められることにより、予後予測あるいはリハビリテーション治療、理学療法効果の研究に結びついていくものと考えられる。

【文献】

- 1)Harper PS: Myotonic dystrophy 2nd ed. W B Saunders, London, 1989
- 2)Harper PS, Harley G, Reardon W, Shaw DJ: Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem. *Am J Hum Genet* 51: 10-16, 1992
- 3)Harper PS: Congenital myotonic dystrophy in Britain. I. clinical aspects. *Arch Dis Child* 50: 503-513, 1975
- 4)Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, Sohn R, Zemelman B, Snell RG, Rundle SA, Crow S, Davies J, Shelbourne P, Buxton J, Jones C, Jvonen V, Johnson K, Harper PS, Shaw DJ, Housman DE: Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase. *Cell* 68: 799-808, 1992
- 5)Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, Neville L, Narang M, Barcelo J, O'hoy K, Leblond S, Earle-Mcdonald J, de Jong PJ, Wieringa B, Korneluk RG: Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255:1253-1255, 1992
- 6)江口郁代,小池亮子,小野寺理,田中恵子,近藤浩,辻省次:筋緊張性ジストロフィーにおける遺伝子不安定領域の変化と臨床症候の関連について. *臨床神経学* 34:118-128, 1994
- 7)Gharehbaghi-Schnell EB, Finsterer J, Korschineck I, Mamoli B, Binder BR: Genotype-phenotype correlation in myotonic dystrophy. *Clin Genet* 53: 20-26, 1998
- 8)Hamshere MG, Harley H, Harper P, Brook JD, JFY Brookfield: Myotonic dystrophy: the correlation of (CTG) repeat length in leucocytes with age at onset is significant only for patients with small expansions. *J Med Genet* 36: 59-61, 1999
- 9)Harley HG, Rundle SA, MacMillan JC, Myring J, Brook JD, Crow S, Reardon W, Fenton I, Shaw DJ, Harper PS: Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 52(6):1164-1174, 1993
- 10)Hunter A, Tsilfidis C, Mettler G, Jacob P, Mahadevan M, Surh L, Korneluk R: The correlation of age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy. *J Med Genet* 29: 774-779, 1992
- 11)Ohya K : Analysis of the CTG trinucleotide repeat expansion in patients with congenital myotonic dystrophy. *札幌医誌* 66 : 169-182, 1997
- 12)檜沢公明,山形宗久,長根百合子,東儀英夫 : 筋緊張性ジストロフィーにおけるCTGリピートの増大と重症度,筋ヒストグラムとの関連. *日本臨牀* 55 : 130-134, 1997
- 13)Brugnoni R, Morandi L, Brambati B, Briscioli V, Cornelio F, Mantegazza, R: A new non-radioactive method for screening and prenatal diagnosis of myotonic dystrophy patients. *J Neurol* 245: 289-293, 1998
- 14)東京都立大学体育学研究室編:日本人の体力標準値. 第4版. 東京,不昧堂出版,1989
- 15)小塚直樹,館延忠,菊池真,内田英二,仙石泰仁,大屋一博 : 筋緊張性ジストロフィー症のCTGリピートのnon-RI PCR Southern法による解析. *臨床小児医学*. (投稿中,2002)
- 16)中村広一,川井充 : 筋強直性ジストロフィー患者の歯科的問題点について. *厚生省精神・神経疾患研究平成10年度報告書* p.403-405, 1999
- 17)館延忠,大屋一博,佐藤俊哉 : 筋緊張性ジストロフィー症のDNA診断. *小児科診療* 57: 457-461, 1994

Molecular and Clinical Studies in myotonic dystrophy

- The Relation between trinucleotide (CTG) repeat and muscle strength -

Naoki KOZUKA, PhD¹⁾, Nobutada TACHI, MD¹⁾, Shin KIKUCHI, PT²⁾, Eiji UCHIDA, MS²⁾,
Yasuhito SENGOKU, MA¹⁾, Kazuhiro OHYA, MD³⁾, Yuichi YOKOYAMA, MD⁴⁾, Hidekatsu
TAKEDA, PhD¹⁾

1) School of Health Sciences, Sapporo Medical University

2) Graduate School of Health Sciences, Sapporo Medical University

3) Department of Pediatrics, Aomori Prefectural Central Hospital

4) School of Dentistry, Health Science University of Hokkaido

Abstract: Introduction: The purpose of this study was to discuss the relation between an expansion of a trinucleotide (CTG) repeat in myotonic dystrophy (DM) and their muscle strength. Subjects 4 families consisted of 8 patients (5 congenital DM and 3 adult onset / carrier DM) were studied. For the normal control, 2 advanced students groups (13 men and 14 women) were included.

Method: To detect an expansion of CTG repeat, polymerase chain reaction (PCR) analysis and non-radioactive Southern blot analysis were performed. For evaluation of muscle strength, occluding strength, grip strength, back strength, isometric extension and flexion strength of the knee, isometric dorsi- and plantar-flexion strength were measured.

Results and discussion: By the Southern blot analysis, fragment include CTG repeat were detected. In normal control subjects, the number of CTG repeat were under 20 repeat, in contrast, in the congenital DM, expanded over 2000 repeat, and in the adult onset / carrier DM, the number of CTG repeat were about 100-1500. Grip strength, back strength, plantar-flexion strength tended to decrease in inverse relation to the size of CTG repeat, though, others were not related. Further patients are necessary, successive study will be needed.

Key Words: myotonic dystrophy, CTG repeat, muscle strength

原 著

交感神経軸索密度の局所的差異
—ラット長指伸筋内の細動脈に関わる交感神経を対象として—竹内義享^{1, 2)} 浅本 憲²⁾ 野条良彰²⁾

キーワード: arteriole・skeletal muscle・sympathetic nerve fibers muscle spindle

はじめに

骨格筋支配の自律神経は、動脈を狭小化させて血流を抑える血管運動性の交感神経が主である。ラットの骨格筋の場合、直径が20～30 μmの細動脈に交感神経軸索の密度が高く¹⁻³⁾、筋内血流調節作用の中心をなすと考えられる。われわれは以前からラットの長指伸筋(EDL)で筋紡錘に近接する細動脈に交感神経軸索が密度高く存在することを認めており、すでにアミン組織蛍光法を用いた観察で指摘した⁴⁾。今回、この点をより客観的に示す必要性から5-hydroxydopamine (5-OHDA) 前処置電子顕微鏡法を用いて細動脈壁内の交感神経軸索を数えた。交感神経からは主としてnoradrenalin (NA)とneuropeptide tyrosine (NPY)が放出されて細動脈壁の平滑筋線維を収縮させる⁵⁻⁸⁾。一方、nitric oxide (NO)やvasoactive intestinal peptide (VIP)を含有するコリン作働性線維も到来し、acetylcholine (Ach)は細動脈壁内の平滑筋を弛緩させ血管を拡張させる^{2, 9, 10)}。コリン作働性の線維は交感神経節に由来すると考えられる¹¹⁾。相反する機能の線維が交感神経節由来であるのは、ちょうど、皮膚の汗腺やその周囲の動脈がアドレナリン作働性線維とコリン作働性線維の双方を受けるのに似ている¹²⁾。また、筋紡錘に与える交感神経の直接的影響は、ラット・ネコ・ラビットの咬筋^{13, 14)}、ネコの虫様筋¹⁵⁾、ネコの

tenuissimus muscle¹⁶⁾で交感神経によって求心性線維が促通され、γ系を介して錘内筋線維を収縮させることが分かっている。一方、錘外筋線維に直接交感神経線維が進入することを示す報告として、ヒトの下肢筋への交感神経線維の支配がタングステン微小電極を末梢神経束に刺入して調べられており、交感神経線維群は横臥位から立位を取る時、体位の傾斜角の増加に伴ってその活動muscle sympathetic nerve activity (MSA)が強くなるとしている^{17, 18)}。この種の交感神経は筋交感神経muscle sympathetic nerveと呼ばれている。このように、従来から骨格筋の交感神経支配に関する報告は多いが、筋内の細動脈を筋紡錘との関連から2群に分け、両者間に分布する交感神経軸索数の比較をおこなった報告はみられない。今回、細動脈壁にみられる無髄神経線維内の交感神経軸索数と、細動脈内壁の周囲長に対する交感神経軸索数の比率(交感神経軸索数/周囲長)を求めて比較することで、筋紡錘の血液供給に交感性制御が強く関与している可能性を見出した。本研究は、筋紡錘の血液供給は細動脈において強い交感性制御のもとにおかれており、交感神経の緊張による過度の血流制御が筋紡錘の機能に何らかの影響を及ぼす可能性を指摘したもので、今後、筋肉の病態生理学的研究をおこなう上での新たな視点を提示するものと考えられる。

1) 帝京大学短期大学

(〒192-0395 東京都八王子市大塚359)

Yoshitaka TAKEUCHI, PT, PhD

Teikyo University Junior College

2) 福井医科大学解剖学講座

Ken ASAMOTO, Yoshiaki NOJYO

(受付日 2002年1月21日/受理日2002年8月20日)

材料と方法

200 - 250 gの雄性Sprague-Dawleyラット14匹を使用した。試料は、光学顕微鏡(×50)によって筋紡錘から30 μm以内の範囲で観察された細動脈と、筋紡錘から少なくとも1mm²の範囲内に観察できなかった細動脈を区分けして選択し、その対象とした。両者の比較

は、1)アミン組織蛍光法による観察、2)免疫組織化学法による観察、3)電子顕微鏡による交感神経軸索数の計測から行った。特に3)については、電子顕微鏡で細動脈壁内に観察できた無髄神経線維内の交感神経軸索数、さらに細動脈内壁の周囲長に対する交感神経軸索数の比率(交感神経軸索数/周囲長)を算出し、2群間の比較をおこなった。いずれの細動脈も直径は20~30 μmであった。方法を以下に示す。

1)アミン組織蛍光法による観察

Falck-Hillarpアミン組織蛍光法¹⁹⁾は、交感神経軸索に含まれるNAを蛍光物質に変換するものである。8匹のラットを抱水クロラル(400 mg/kg)で麻酔下にパーズリン(200 mg/kg, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を腹腔内に投与し、約1時間低温状態で放置した。その後、EDLを摘出、液体窒素で冷却したイソペンタン内で

急速凍結し、約1週間の真空凍結乾燥を行なった。ホルムアルデヒドガス内で約1時間処理しパラフィン包埋を行なった。10~15 μmの横断、あるいは縦断パラフィン切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。励起側はviolet filter (BV)フィルター、二次側フィルターY500フィルターを使用した。

2)免疫組織化学法による観察

細動脈内の交感神経軸索の分布状況を別の視点から確認するため、免疫組織学的観察を併せておこなった。NA等を含有するカテコールアミン(catecholamine)は、免疫組織学的に軸索内に存在するtyrosine hydroxylase (TH-IR)を証明することで判断できる。

3匹のラットを4%パラホルムアルデヒド/0.1 M 燐酸緩衝液(pH 7.4)で還流固定し、両側のEDLを摘出した。さらに2時間室温にて同じ固定液で後固定を行

表1. 筋紡錘に近接する細動脈(筋紡錘+)とその他の細動脈(筋紡錘-)における交感神経軸索数(GV+)と非交感神経軸索数(GV-)

	(GV+)	(GV-)	合計	細動脈の周長(μm)	(GV+)/周長
筋紡錘+					
標本1	9	4	13	112	0.08
標本2	10	8	18	98	0.10
標本3	9	7	16	97	0.09
筋紡錘-					
標本1	2	3	5	128	0.02
標本2	2	3	5	83	0.02
標本3	6	6	12	263	0.02

GV (Granular vesicle): 5-OHDA 前処置によって黒化した小型顆粒小胞を示す

表2. 筋紡錘に近接する細動脈とその他の細動脈間の交感神経軸索数 (GV+)と非交感神経軸索数 (GV-)の平均値の比較

	(平均±標準偏差)	
	筋紡錘に近接する細動脈	その他の細動脈
(GV+)	9.3 ± 0.5	3.3 ± 2.3
(GV-)	6.3 ± 2.0	4.0 ± 1.7
合計	15.6 ± 2.5	7.3 ± 4.0
(GV+) / 周長	0.09 ± 0.02	0.02 ± 0.01

筋紡錘に近接する細動脈とその他の細動脈間で、交感神経軸索数と(GV+)/周長に有意差を認めた。
(* P < 0.05, ** P < 0.01)

なった。リン酸緩衝食塩液(PBS)で固定液を洗浄した後、4℃の冷蔵内で20%蔗糖/0.1M燐酸緩衝液中に約1-2日入れて氷結防止をした。試料をOCT compound (Tissue-Tek, Tokyo, Japan)で包埋、凍結し、クリオスタットで10μmの横断・縦断切片を作製しゼラチンでコートされたスライドガラスに貼り付けた。これをTriton PBSで洗浄し0.3% H₂O₂エタノールでブロックした。更にPBSで洗浄し、正常ヤギ血清(Vector, Burlingame, CA, USA. PBSで×10希釈)で1時間処理を行った後、一次血清(ウサギ抗TH抗体: Eugene Tech, Ridgefield Park, NJ, USA. PBSで×2000希釈)に2日間、4℃で反応させた。PBSで洗った後、二次血清(ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体、Vector, Burlingame, CA, USA. PBSで×100希釈)に1時間反応後、ABC試薬(Vector, Burlingame, CA, USA. PBSで×50希釈)で1時間反応させた。切片をPBSで洗った後、DAB反応{DAB 20 mg/トリス緩衝液(pH 7.5) 100 mlにH₂O₂ 15 μl滴下}を常温で約2~3分間行い、ヘマトキシリン染色後、型どおりに脱水、封入して光学顕微鏡による観察を行った。

3) 電子顕微鏡による交感性軸索の計測

3匹のラットに5-OHDAの水溶液(100 mg/kg)を腹腔内に投与した²⁰⁾。2時間経過後、ネブタール麻酔下(50 mg/kg, i.p)に2%パラホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド/0.1M燐酸緩衝液(pH 7.4)による固定液を環流した後、両側のEDLを摘出した。さらにPBSで洗った後、1%四酸化オスmium固定を行って型通りの脱水過程を経てEpok 812に包埋した。包埋試料はすべて1μmの超薄横断切片とし、それぞれをトルイジンプルーで染色して筋紡錘や細動脈の判定を行った。切片は透過型電子顕微鏡(日立H-600、東京)で観察した。まず弱拡大(×1,000)で細動脈の全周を撮影した。つぎに、細動脈壁内に観察された無髄神経線維、あるいは無髄神経線維束の部分を選拡大(×6,000及び×15,000)で撮影した。弱拡大写真は筋紡錘と近接する細動脈で3組、筋紡錘を全く伴わない細動脈で3組作成し、それら全てに張り合わせ(photomontage)をおこなった。そして、それぞれに5-OHDAによって黒化した小型顆粒小胞(granular vesicles: GV)を目安

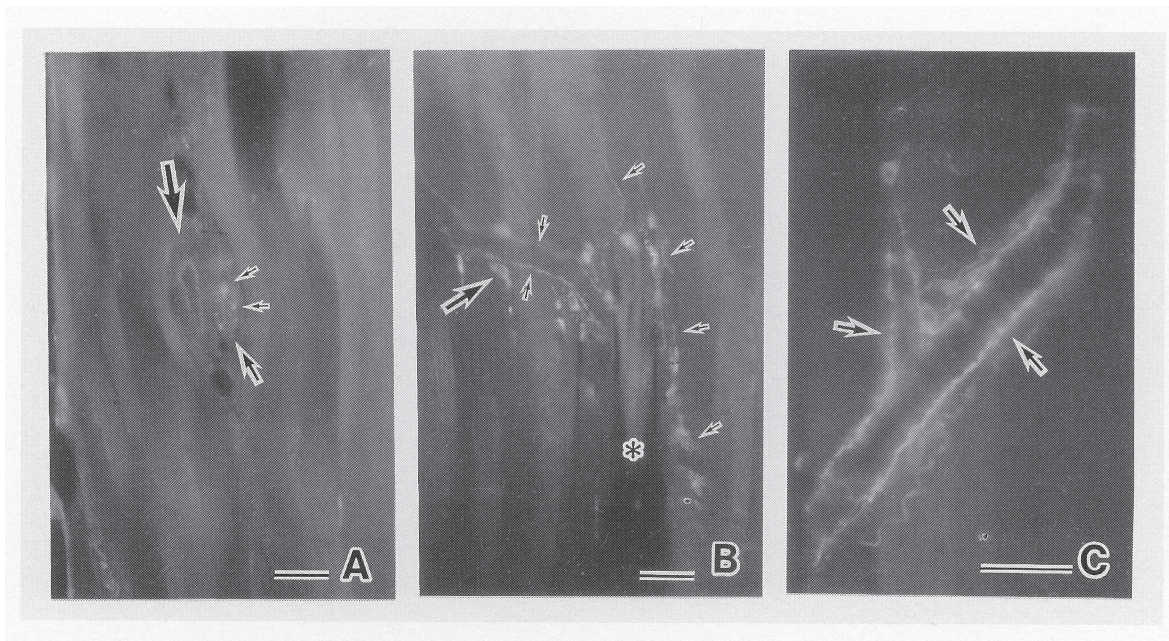


図1. ラットの長指伸筋における交感神経軸索の蛍光顕微鏡写真

A, B, C のいずれも筋紡錘に近接する細動脈における蛍光写真を示す。ノルアドレナリン(NA)を蛍光物質に変換する Falck-Hillar 組織蛍光法によるパラフィン切片。NAを含む交感神経は、明るい線維束として観察され、線状に、あるいは点状に横断された像を呈する。いずれの写真も筋線維は縦に走行している。

- A. 筋周膜のなかを走る小動脈(太い矢印)と細動脈(中矢印)の横断像が写真中央部に見られる。小動脈の壁には蛍光を示す交感神経線維束が見られない。それに対して、右側に隣接する細動脈の壁には5本の交感神経線維束(小矢印)が認められる。
- B. 筋紡錘に近接する細動脈とそれに伴走する交感神経線維束(小矢印)。筋紡錘の数本の錘内筋線維は途切れている(クローバー印)。細動脈は筋紡錘に巻きつくように走行している。なお、細動脈に沿って蛍光を呈する肥満細胞(中矢印)が多数観察できる。
- C. 筋紡錘に近接する細動脈とそれに伴走する交感神経線維束(矢印)。交感神経が細動脈の壁を作る平滑筋層に外側方向から密着して走っているのが分かる(Bの拡大図)。スケールバーはいずれも50μmである。

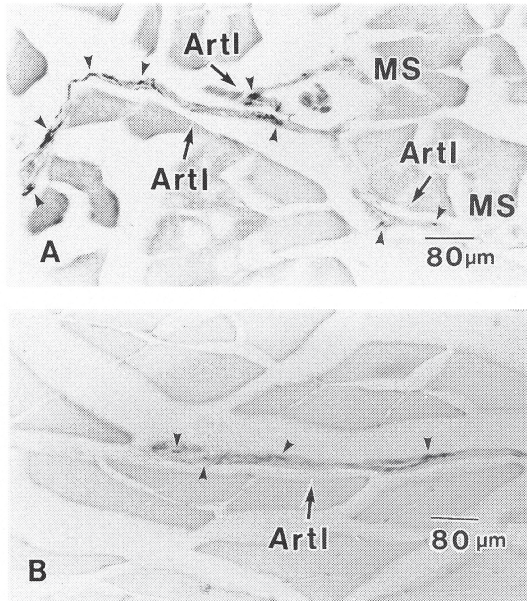


図2. TH-陽性線維の光学顕微鏡写真

- A. 筋紡錘(MS)に近接する細動脈(Artl)にはTH陽性線維(矢印頭)が黒く血管に張り付くように認められ、密度高く分布している。中央のMSは、赤道部を示している。
- B. 筋紡錘を全く伴わない細動脈(Artl)では、黒い部分が弱々しく散在しており、TH陽性線維の密度がきわめて低いことが分かる。

として、細動脈壁で観察された無髄神経内の交感神経軸索数と非交感神経軸索数を数え、必要に応じて×6,000及び×15,000の強拡大写真を利用して判断をおこなった。統計的処理は対象数がそれぞれに3例と少ないため、等分散を仮定しないt検定をおこない、この間の傾向を示すにとどめた。解析には統計解析システムSPSS (Statistical Package Social Science)を用いた。なお、検定は5%水準をもって統計的有意とした。

結果

1) アミン組織蛍光法による観察

NAを含む交感神経は、縦断像では明るい線維束として連珠状構造、あるいは網状構造として観察できた。特に筋紡錘に近接する細動脈の線維束は動脈壁の平滑筋層に外側から密着して取り巻いていた(図1)。横断像では、細動脈の外膜に大小さまざまな明瞭な点状として観察できた。このように筋紡錘に近接する細動脈には豊富なアミン組織蛍光の陽性線維を認め、筋紡錘を全く伴わない細動脈と比較して明らかにNA交感神経軸索が高密度であった。

2) 免疫組織化学法による観察

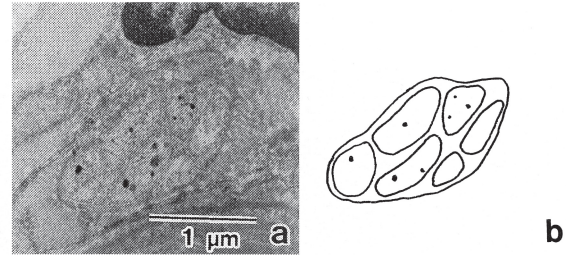


図3. 筋紡錘に近接する細動脈壁に存在する無髄神経軸索の電子顕微鏡写真

細動脈壁に散在する無髄神経線維の一つを示す。a. は電子顕微鏡写真、b. はその描画図である。描画図から無髄神経軸索が6本観察できるが、そのうち、黒質の小型顆粒小胞(GV)を含有した軸索は交感神経軸索であり、4本であることが判断できる。

筋紡錘に近接する細動脈にはTH陽性線維が豊富に観察でき(図2A)、筋紡錘を全く伴わない細動脈にはTH陽性線維が極めて少なかった(図2B)。

3) 電子顕微鏡による交感神経軸索の観察

5-OHDA前処置により、細動脈の周囲に分布する有髄・無髄神経線維のうち、無髄神経線維内にGVを有するものと有しないものの2通りが観察された(図3)。前者の神経終末は交感神経軸索で、後者は非交感神経終末(知覚神経)である。無髄神経線維はこのようにGV含有の有無によって交感神経軸索と非交感神経軸索の二種類に分けられる。今回、細動脈と筋紡錘との関連性の有無から2グループに分類した際の交感神経軸索と非交感神経軸索の比較結果が表1, 2である。交感神経軸索の数と交感神経軸索数/周囲長の比は2グループで有意に異なる(前者: $p < 0.05$ 、後者: $p < 0.01$)ことがわかる。また、非交感神経軸索については両者間で有意差はなかった。

考察

本研究は、ラット後肢のEDLで筋紡錘に近接する細動脈と、筋紡錘を全く伴わない細動脈に分布する交感神経軸索の数を比較したもので、前者は後者と比べて交感神経軸索数とその周長に対する比において有意に高いことを明らかにした。すなわち、筋紡錘への血流調節は細動脈壁に高密度に分布する adrenergic neurons の交感神経制御のもとにおかれており、過度の交感神経の緊張が筋紡錘の血液供給に何らかの影響を及ぼす可能性を指摘したものである。全身の循環機能の調節は交感神経が主役を演じているが、骨格筋内の主な感覚受容器である筋

紡錘への血流調整についても細動脈壁に分布する交感神経が強く制御していることを明らかにした。

1) 筋紡錘と血管分岐回数について

骨格筋を栄養する動脈は筋肉内で二分岐を繰り返しながら筋肉内に広く展開して行く²¹⁾。この分岐回数について、Miyoshiら²²⁾はラビット後肢の *tenuissimus muscle* で筋紡錘に至る最終毛細血管までの動脈の分岐回数は3~4回であるのに対し、錘外筋線維に至る最終毛細血管までの動脈の分岐回数は6~8回であると報告している。また、Erikssonら²¹⁾もネコの *tenuissimus muscle* で、錘外筋線維に至る最終毛細血管までの分岐回数はさらに多くて11回であったとしている。このように錘外筋線維に至る最終毛細血管までの分岐回数が多い理由として、錘外筋線維が本数も多く、また、筋線維を栄養するために毛細血管床として面積を増大する必要性のあることは想像できる。逆に筋紡錘は筋周膜内に存在し、体積も極めて小さいことから動脈の分岐回数が少なくすむことは容易に考えられる。さらに、錘内筋線維の核袋部に巻き付く Ia 知覚終末にはミトコンドリアが大量に含まれて筋紡錘内での酸素消費量が高いとされており²²⁾、より太い毛細血管からの急速な血液供給が要求されることが予測できる。したがって、筋紡錘の毛細血管網が筋紡錘の周辺に存在する錘外筋線維間にまで連続して展開し、栄養する可能性は極めて低いかもしれない。すなわち、筋紡錘に至る毛細血管網と錘外筋線維間に存在する毛細血管網はそれぞれに独立しており連続性は低いと想像できる。実際、われわれが予備的に行ったラット EDL の血管鑄型標本の観察では、筋紡錘の毛細血管網は周辺の錘外筋線維間の毛細血管網からは独立していることを確認している(未発表所見)。以上のことから、筋紡錘を栄養する毛細血管系と錘外筋線維を栄養する毛細血管系とは独立していると推察される。

2) 血管系における交感神経支配

骨格筋を栄養する動脈に分布する交感神経軸索の分布密度は動物種、動脈の太さ(ラット^{5, 7)}、モルモット^{1, 23)}、イヌ³⁾)、組織、筋肉内の部位によって異なるとされている。つまり、動物種、組織、あるいは組織内の動脈の太さによって交感神経軸索の密度の不均一性は普遍的なことと言える。一般的に1-2層の平滑筋が壁を作る直径20~30 μm の細動脈が最も交感神経軸索の密度が高く、血管血流調節に深く関与することがラットやモルモットで明らかになっている¹⁻³⁾。しかし、その分布は前毛細血管までで毛細血管には至ることはな

く、同様な報告も多く見られている^{2, 24)}。今回は骨格筋の細動脈を対象に筋紡錘と近接する細動脈とその他の細動脈に分類して交感神経軸索の分布密度を比較したもので、このような比較検討をおこなった報告は現在のところ見られない。

3) 骨格筋における交感神経支配

ラットの EDL における交感神経軸索は細動脈に特に強く分布しているが、そこから波及して筋紡錘にまで進入することはなかった。ネコやラビットでは交感神経軸索が錘内筋線維や錘外筋線維などの骨格筋線維間に進入することが形態学的観察^{14, 25)}、生理学的実験^{13, 16)}で明らかになっている。交感神経軸索が錘内筋線維に影響を及ぼす可能性については、形態学的にネコの *tenuissimus muscle* で核鎖線維に0.8~1.4 μm まで接近した報告がある²⁵⁾。さらに、錘外筋線維にまで分岐して近接する可能性が、ラビットとヒトの外眼筋で²⁶⁾、また、生理学的研究から哺乳類の外眼筋への直接支配も報告されている²⁷⁾。今回の観察からは、交感神経軸索が錘内筋線維や錘外筋線維に直接進入することはなかった。ラット EDL の細動脈壁に存在する多数の交感神経軸索は筋紡錘を含め、その周辺域における血流の抑制的調節に強く働いていることが考えられる。交感神経線維は細動脈の平滑筋を収縮させる機能が主体の血管運動性の神経と考えるべきであろう。

おわりに

ヒトの筋肉は、微妙に調節された筋緊張と強く素早い収縮力が主たる機能である。それを保証するのが自律神経の役割といえる。一方、臨床的観察から交感神経の反射性興奮に対して末梢血管が持続的に収縮し、組織の低酸素、アシドーシスを直接的に引き起こす相互作用が知られている²⁸⁾。筋紡錘についても血流障害によって正常な反射機構がおこなわれなくなり、筋緊張に異常が生じる可能性を仮説として提起した。伊藤²⁹⁾は、著書の「まえがき」で、コムラガエリの成因について二つの仮説を挙げており、その一つに足の冷えによる感覚神経機能低下から筋紡錘の感覚信号が不良となり、運動を遂行するに十分な情報が得られず、それを補うために運動ニューロンへの下降性の運動命令信号が異常に高まり、末梢からのフィードバック調節が無いままで筋の収縮を強めたために起きるのではないかと解説している。この足の冷えが交感神経に影響を与えたものか、単なる一過性の循環障害を引き起こしたものかは不明だが、交感神経支配が細動脈を介して血液供給不全をもたらす可能性と、その結果として筋紡

錘の機能に何らかの影響を及ぼす可能性については明らかになっておらず、今後さらに検討の必要があると考えている。

【文献】

- 1) Anderson RL, Gibbins IL, Morris JL: Non-noradrenergic sympathetic neurons project to extramuscular feed arteries and proximal intramuscular arteries of skeletal muscles in guinea-pig hindlimbs. *J Auto Nerv Syst* 61: 51-60, 1996
- 2) Burnstock G, Griffith SG, Sneddon P: Autonomic nerves in the precapillary vessel wall. *Cardiovas Pharm* 6: 344-353, 1984
- 3) Rygaard K., Moller M, Henriksen: Presence of nerve fiber collaterals from the sympathetic arteriolar plexus to the concomitant venules in dog skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 143: 115-118, 1991
- 4) 野条良彰、竹内義享、朝本憲: 骨格筋に進入する自律神経. *PTジャーナル* 33: 428-430, 1999
- 5) Bernard PF, Ian LG, Judith LM, Bren JG: Noradrenergic and peptidergic innervation of the extrinsic vessels and microcirculation of the rat cremaster muscle. *Microvasc Res* 38: 255-268, 1989
- 6) Edvinsson L, Gulbenkian S, Whaton J, Jansen I, Polak JM: Peptide-containing nerves in the rat femoral artery and vein. *Blood Vess* 26: 254-271, 1989
- 7) Marshall JM: The influence of the sympathetic nervous system on individual vessels of the microcirculation of skeletal muscle of the rat. *J Physiol* 332: 169-186, 1982
- 8) Ohlen A, Klein AT, Lindbom L, Hokfelt T, Hedqvist P: Substance P and NPY innervation of microvessels in the rabbit tenuissimus muscle. *Microvasc Res* 36: 117-129, 1988
- 9) Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980
- 10) Matsukawa K, Shindo T, Shirai M: Direct observation of sympathetic cholinergic vasodilation of skeletal muscle small arteries in the cat. *J Physiol* 500: 213-225, 1997
- 11) Steven MM, Leonid GE, Joseph HS, Pamela IH, Stephen B: Selective disruption of neurotransmission by acetylcholinesterase antibodies in sympathetic ganglia examined with intracellular microelectrodes. *J Auto Nerv Syst* 67: 156-167, 1997
- 12) Lefkowitz RJ, Hoffman BB, Taylor P: The autonomic and somatic motor nervous systems. In: Goodman and Gilman's *The pharmacological basis of therapeutics*, 9th edn (Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE et al., eds) McGraw-Hill, New York, 105-139, 1996
- 13) Passatore M, Fillippi GM, Grassi C: Cervical sympathetic nerve stimulation can induce an intrafusal contraction in the rabbit. In: Boyd IA, Gladden MH (eds) *The muscle spindle*. Macmillan Press, London, 221-226, 1985
- 14) Passatore M, Grassi C, Fillippi M: Sympathetically-induced development of tension in jaw muscles: the possible contraction of intrafusal muscle fibers. *Pflugers Arch* 405: 297-304, 1986
- 15) Hunt CC, Jami L, Laporte Y: Effects of stimulating the lumbar sympathetic trunk on cat hindlimb muscle spindles. *Arch Ital Biol* 120: 371-384, 1982
- 16) Barker D, Saito M: Autonomic innervation of receptors and muscle fibers in cat skeletal muscle. *Proc R Soc Lond B* 212: 317-332, 1981
- 17) Henriksen O: Sympathetic reflex control of blood flow in human peripheral tissues. *Acta Physiol Scand* 143: 33-39, 1991
- 18) Iwase S, Mano T, Saito M, Ishida G: Effects of a centrally-acting muscle relaxant, eperisone hydrochloride, on muscle sympathetic nerve activities in humans. *Funct Neurol* 7: 459-470, 1992
- 19) Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* 10: 348-354, 1962
- 20) Tranzer JP, Thoenen H: Electron micro-

- scopic localization of 5-OHDA, a new false sympathetic transmitter. *Experimentia* (Basel) 23: 743-745, 1967
- 21) Eriksson E, Myrhage R: Microvascular dimensions and blood flow in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 86: 211-222, 1972
- 22) Miyoshi T, William R, Kennedy R: Microvasculature of rabbit muscle spindles. *Arch Neurol* 36: 471-475, 1979
- 23) Morris JL, Grasby DJ, Andeon RL, Gibbins IL: Neurochemical distinction between skeletal muscle vasodilator neurons and pelvic vasodilator neurons in guinea-pigs. *J Auto Nerv Syst* 71: 64-68, 1998
- 24) Mary PW, Ronald FT, Harvey NM: Defining the precapillary sphincter. *Microvasc Res* 12: 71-75, 1976
- 25) Ballard KJ: Typical sympathetic noradrenergic endings in a muscle spindle of the cat. *Phys Soc Univ of Glasgow G12 8QQ*: 61-62, 1978
- 26) Tsukahara S: Histochemistry of catecholamine (CA) in the rabbit and human extraocular muscle. *Jap J Ophthal* 12: 123-131, 1968
- 27) Eakins KE, Katz RL: The role of the autonomic nervous system in extraocular muscle function. *Invest Ophthal* 6: 253-260, 1967
- 28) Livingston W: *Pain Mechanisms: A physiological interpretation of causalgia and its related state*. New York, Macmillan, 1943
- 29) 伊藤文雄: 筋感覚. 名古屋, 名古屋大学出版会, 1994

Differences in the density of sympathetic nerve axons

- For sympathetic axons concern with the arteriolar walls of the rat extensor digitorum muscle -

Yoshitaka TAKEUCHI ^{1,2)}, Ken ASAMOTO ²⁾, Yoshiaki NOJYO ²⁾

1) Teikyo University Junior College

2) Department of Anatomy, Fukui medical University

Abstract: In this study, we electron-microscopically investigated the number of sympathetic axons in the arteriolar walls of the extensor digitorum longus muscles of the rat rear leg. Arterioles in the muscle were divided into two groups: one group consisted of arterioles with accompanying muscle spindles, and the other consisted of arterioles without accompanying muscle spindles. The number of sympathetic axons present in the arteriolar walls and the ratios to the total number of sympathetic and non-sympathetic axons were compared between the groups. For electron-microscopic identification of sympathetic axons, 5-hydroxydopamine, a pseudotransmitter agent, was used. The number and ratio of sympathetic axons were significantly higher in arterioles with accompanying muscle spindles than arterioles possibly unrelated to muscle spindles. From these results, we would like to suggest that one of the actions of sympathetic nerve is strong inhibition of blood flow in muscle spindle by reduction the arteriolar diameter.

Key Words: arteriole, sympathetic nerve fibers, muscle spindle, skeletal muscle