

A Histochemical Study on the Soleus Muscle of Rats following Spinal Cord Transection at the Mid-Thoracic Level with Immobilization of the Ankle Joint in Various Positions

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7969

胸髄切断と筋の固定位置がラットヒラメ筋に与える影響

— 組織化学的検討 —

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 野村 進教授)

井 上 昭

(昭和62年7月31日受付)

神経と筋の栄養的な相互作用がどのような機序で行われるのかはいまだ不明な点が多い。筋の固定位置に関する研究によると、筋の伸張位では筋紡錘の活動により脊髄反射が亢進するために筋の活動性が高まり筋は肥大し、短縮位ではこの反射が減少するために萎縮を生じるものとされている。本研究では胸髄切断により上位中枢からの神経支配を遮断し、後肢の脊髄反射径路を温存したラットを作製し、筋の固定位置が錘外筋の組織化学的变化に及ぼす影響について検索した。ウィスター系雌ラットを正常群と脊損群の2群に分け、それぞれを左足関節背屈位固定群、底屈位固定群、非固定群とした。ヒラメ筋は背屈位固定では伸張位となり、底屈位固定では短縮位となる。脊髄切断により二次ニューロンの変性を伴うことなく運動神経の活動性は低下する。また、ヒラメ筋運動神経の持続性活動は短縮位により相動性活動に変化するが、伸張位では筋紡錘の活動性亢進により持続性活動は増加する。術後1週および2週目にヒラメ筋を採取し、adenosine triphosphatase(ATPase)染色を行った。正常群では、短縮位によりすべての筋線維タイプの萎縮とタイプ1線維の比率の減少を認めたが、伸張位ではタイプ1線維は肥大し筋線維タイプの比率は変化しなかった。脊損群では、非固定と短縮位はすべての筋線維タイプの萎縮とタイプ1線維の比率の著明な減少を認めたのに対し、伸張位ではタイプ1線維の萎縮や筋線維タイプの比率の変化は軽度であった。以上のことから、筋の活動パターンの変動により筋線維タイプに変化を生じ、筋の活動の量により筋線維横断面積に変化を生じるものと考えられる。また、タイプ1線維の組織化学的特性を維持するためには、筋の持続性活動が必要であると思われる。

Key words muscular atrophy, spinalization, histochemistry

骨格筋萎縮の研究は古く¹⁾²⁾、これまでも組織化学的变化^{3)~5)}や生化学的变化^{6)~9)}や電気生理学的変化^{10)~13)}について種々の報告がなされている。最近では、筋細胞培養¹⁴⁾¹⁵⁾による研究もおこなわれるようになってきた。このような種々の研究により骨格筋は以前に考えられていたほど静かな組織ではなく、成熟筋においても、絶えずその大きさや性質を比較的短い時間で新しい状況に応じて変化させていることが判明してきた⁹⁾。

これらを調節している因子としては、筋細胞自身の中に存在している自己の大きさや性質を制御する内因性調節機構¹⁶⁾と神経¹⁷⁾やホルモン¹⁸⁾などの外因性調節

機構が考えられる。特に運動神経はその電気的活動¹⁹⁾や軸索流²⁰⁾を通じて筋肉に大きな影響を与えているが、最近の研究では逆に筋の活動性が運動神経の性質を規定していることも明らかになってきた²¹⁾。

つまり、以前のように神経と筋とを別々にとらえていくのではなく、神経と筋は相互に栄養的な相互作用(trophic interaction)を及ぼしあっていると理解されるようになり、神経筋運動単位全体の問題として筋萎縮をとらえるようになってきた。しかし、この栄養的な相互作用がどのような機序で行われるのかはいまだ不明な点が多い。神経と筋の栄養的な相互作用を研究する上で一番の問題点は、神経活動と筋活動とを完全

Abbreviations: ATPase, adenosine triphosphatase; AHP, after-hyperpolarization; RNA, ribonucleic acid.

に分離することが極めて困難なことである。脱神経を行った場合には、筋に対する神経活動の影響はなくなるが、同時に筋活動も低下してしまう。また、関節固定により筋を不動化した場合でも、伸張反射を介した神経活動の影響は存在するものである。

ところで、不動化による筋萎縮を生じる場合には固定肢位における筋の緊張状態によってその萎縮の程度に違いがある²²⁾²³⁾ことが知られており、筋の緊張が筋線維タイプの変化や栄養にとって重要な役割をしているものと考えられる。しかし、脱神経筋萎縮では廃用性筋萎縮と異なり、筋の固定位置を種々に変化させても筋線維タイプにはほとんど変化を生じないことが知られている²⁴⁾。そこで、胸髄切断により二次ニューロンの変性を伴うことなく後肢を支配している運動神経の活動を低下させた場合には廃用性筋萎縮や脱神経筋萎縮と異なる変化を生じるかどうかを今回の実験で検討した。

まず、胸髄切断により後肢を支配している神経筋運動単位の上位中枢からの神経支配を遮断した。これにより随意的神経活動は消失し²⁵⁾、脊髄前角細胞の変性を伴わずに神経活動を低下させることができると考え

た。次に、筋を伸張位および短縮位に固定することにより神経筋運動単位の活動性を変化させた。筋を伸張位にすることにより、単なる機械的な張力の増加と同時に筋紡錘の活動も高まり、脊髄反射を介して筋収縮を発生し、これによっても筋に張力を生じると思われる。その結果、機械的張力と筋収縮による張力の両者により筋の活動性が高まるものと考えられる。

筋の活動性の変化することによって生じた筋の生理学的変化を検索する手段としては、筋の収縮特性を良好に反映することが知られている adenosine triphosphatase (ATPase) 染色²⁶⁾²⁷⁾を用いて検討した。なお、対象とする筋肉としては、組織化学的に筋線維タイプの構成が明確であり、個体差が少ないとされているヒラメ筋を用いた。

材料および方法

I. 動物

生後8週齢のウィスター系雌ラットを使用した。実験途中で死亡した例や脊損により褥創を生じた例や自己共食により筋肉に損傷を生じた例を除き、本実験に用いたラットは脊損群60匹、正常群60匹であり、

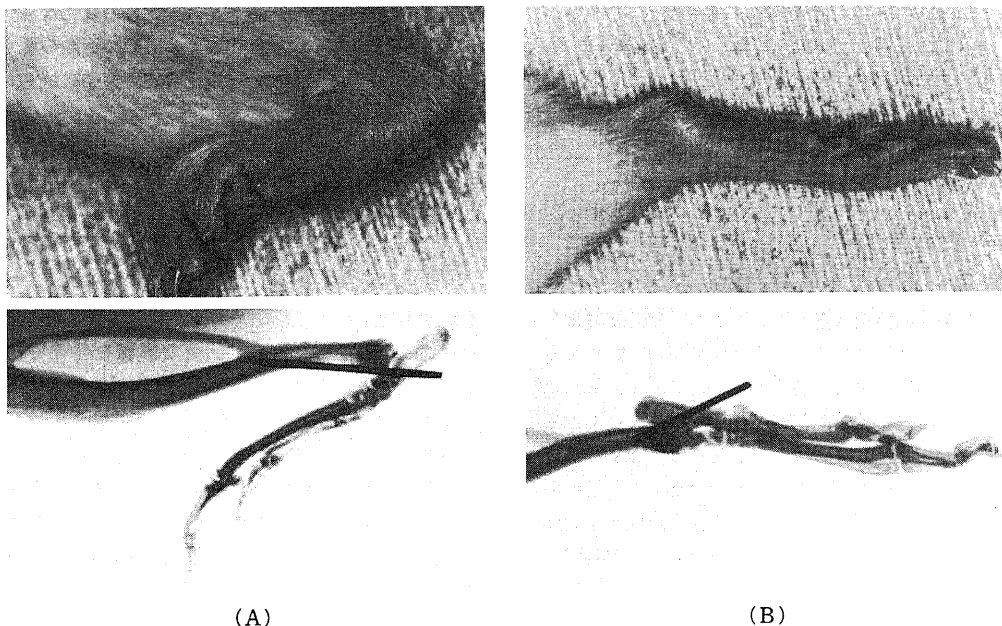


Fig. 1. The left ankle joint was immobilized by the insertion of a K-wire into the calcaneus and bone marrow cavity of the distal end of tibia.

A) The left ankle joint was immobilized in dorsiflexion to keep the soleus muscle in a lengthened position.

B) The left ankle joint was immobilized in plantarflexion to keep the soleus muscle in a shortened position.

それぞれ 20 匹づつ足関節背屈位固定群、底屈位固定群、非固定群とした。

II. 足関節固定方法

ペントバルビタールナトリウム(ネプタール, 大日本製薬)腹腔内投与(40 mg/kg)による全身麻酔下に左下肢に直径 0.8 mm のキルシュナー鋼線を踵骨より脛骨まで 1 本刺入することにより足関節を固定した(図 1)。ヒラメ筋は腓骨頭に起始し、アキレス腱を介して踵骨に付着している 1 関節筋であるので、足関節背屈位固定ではヒラメ筋は伸張位に固定され、底屈位固定では短縮位に固定される。筋肉採取時に鋼線の位置を確認したが、鋼線は骨外に迷入しておらず、筋肉などの周囲組織には損傷はみられなかった。

III. 脊髄切断方法

同様にラットを麻酔し、顕微鏡下に第 6 胸椎に対して椎弓部分切除術を施行し、第 7~8 胸髄レベルで脊髄をマイクロ手術用メス(フタバ替刃メス No. 111)を用いて完全に横切断し、切断部にカーゼを挿入した。なお、筋肉採取時に脊髄が完全に切断されていることを確認した。

脊髄切断によりラットは術直後より両下肢麻痺となり排尿障害を生じた。12 時間毎にクレープ法にて用手的に排尿させるとともに、尿路感染を防ぐために硫酸アミカシン(万有製薬)を 5 mg/kg 皮下注した。また、褥創を防ぐために飼育用ケージの中敷き(おがくず)を厚くし 4 日毎に交換し、皮膚を清潔に保つことに努めた。脊損ラットは前肢にて移動することが可能であり、水分や食餌を摂取することが出来た。術後 10 日目頃より瘻性膀胱となり、反射的に排尿が認められるようになり、下肢への痛み刺激に対して下肢伸展反射が出現したので、この時期を瘻性出現時期と考えた。また、全経過観察期間を通じて、両下肢には随意運動は認められなかった。

なお、脊損ラットの生存率は術後 1 週目が約 85% であり、術後 2 週目が約 80% であった。死亡原因は術後 1~2 日目では脊損による呼吸不全が大部分を占め、術後 1 週以降は尿路感染症によるものが多かった。

IV. 組織化学的検索

経時的に術後 1 週および 2 週目にペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下に左下肢よりヒラメ筋を採取し、ただちに液体窒素にて冷却したアセトンで急速に凍結固定し、クリオスタットにて厚さ 8 μ m の凍結切片を作製した。連続切片に対して種々の pH において myosin ATPase 染色(pH 9.4, 4.6, 4.3)を施行した(図 2)。タイプ 1 線維は pH 9.4 では中等度に染まり、pH 4.6 や 4.3 では濃染する。タイプ 2 A 線維は pH 9.4 では濃染するが、pH 4.6 や 4.3 では染まらない。タイプ

2 C 線維は pH 9.4 では濃染するが、pH 4.6 では中等度に染まり、pH 4.3 では淡染する。このように pH によって各筋線維の染色性が異なるので何組かの組織写真を用いて判定することにより、筋線維のタイプ分類が可能である²⁶⁾²⁷⁾。

筋線維は各ヒラメ筋につき筋の横断組織切片より無作為に 2 ケ所を写真撮影し、各々、100 本づつ合計 200 本の筋線維を数えた。個体ごとに各筋線維タイプの比率を計算し、更に各群ごとに平均値を算出した。また、各筋線維の横断面積を COSMOZONE(Nikon)にて測定し、各群ごとに筋線維タイプ別に平均値を算出するとともに度数分布曲線を作製した。なお、度数分布曲線は各群につき 1 個体 200 本づつ合計 10 個体の総和である 2000 本の筋線維の測定値をもとにして作製した。

なお、脊損群では snake coil や target fiber や targetoid/core fiber 等の種々の変性線維²⁸⁾²⁹⁾が散見されたが、本実験目的に必要な性が少ないと考え今回は測定より除外した。

V. 統計的処理

得られた値はすべて平均値±標準誤差で表した。体重の変化量と各筋線維タイプの出現率および筋線維横断面積の比較には Duncan's multiple range test にて検定し、p 値が 0.01 未満の場合を有意差ありと判定した。

成 績

I. 体重の変化

今回用いた生後 8 週齢のラットは成長期に相当し、平均体重は 184.6 \pm 1.6~204.5 \pm 2.9 g であり、体重は経時的に増加した(表 1)。

体重の増加率は正常群では術後 2 週目に非固定が 20.3 \pm 1.5% であるのに対して、関節固定では伸張位が 14.6 \pm 1.3% で短縮位が 15.0 \pm 2.0% であり、非固定例に比べて関節固定例での体重増加率は有意に少なかった(p<0.01)。これは固定により全身の運動に制限が加わったためと思われた。脊損群では術後 1 週目に固定方法の有無にかかわらず正常群の非固定に比べると非固定で 9.1 \pm 1.7%、伸張位で 11.4 \pm 2.1% そして短縮位で 8.2 \pm 1.3% の体重減少を認めた(p<0.01)。これは脊髄切断により全身状態の悪化を生じたためと推定される。術後 2 週目でも体重は術前よりも低値であるが、1 週目よりは増加しており、徐々に全身状態は改善していた。しかし、体重の増加率は正常群の半分以下であり、脊髄損傷がかなり影響しているものと思われた。なお、脊損群では関節固定の有無により体重の変化率が異なることはなかった。

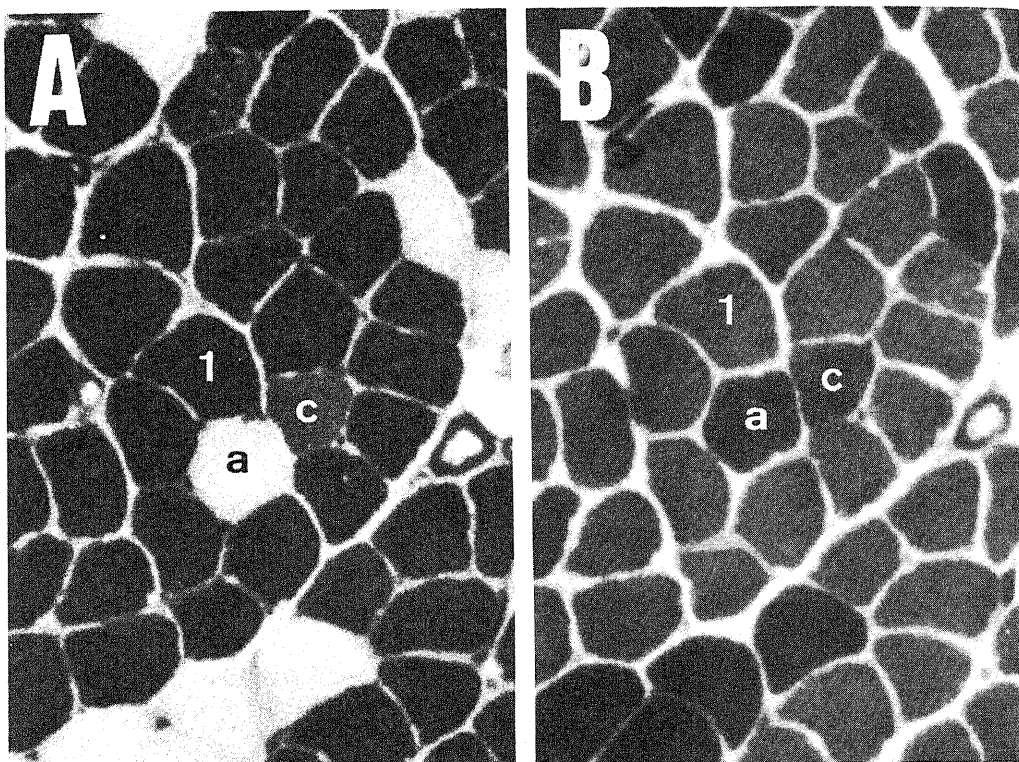


Fig. 2. Cross sections of soleus muscle. ATPase stain. $\times 225$.

A) ATPase stain preincubated at pH 4.6.

B) ATPase stain preincubated at pH 9.4.

1, type 1 fiber; a, type 2A fiber; c, type 2C fiber.

Table 1. Change of body weights

Group		Before (g)	After (g)	Difference (%)
Normal (1 week)	non-immobilized	190.4 \pm 1.0	203.9 \pm 2.0	7.1 \pm 0.8
	lengthened	190.8 \pm 1.0	194.3 \pm 2.8	1.9 \pm 1.5*
	shortened	184.6 \pm 1.6	192.0 \pm 2.2	4.0 \pm 1.2
Normal (2 weeks)	non-immobilized	188.8 \pm 1.6	227.0 \pm 1.4	20.3 \pm 1.5
	lengthened	194.1 \pm 1.9	222.4 \pm 3.4	14.6 \pm 1.3*
	shortened	190.2 \pm 2.1	218.6 \pm 4.2	15.0 \pm 2.0*
Spinalized (1 week)	non-immobilized	200.4 \pm 2.0	182.1 \pm 3.8	-9.1 \pm 1.7 †
	lengthened	204.5 \pm 2.9	181.2 \pm 4.8	-11.4 \pm 2.1 †
	shortened	196.8 \pm 1.8	180.7 \pm 3.3	-8.2 \pm 1.3 †
Spinalized (2 weeks)	non-immobilized	196.8 \pm 1.2	190.6 \pm 1.3	-3.1 \pm 1.0 †
	lengthened	197.9 \pm 2.5	189.2 \pm 3.8	-4.4 \pm 1.6 †
	shortened	195.9 \pm 1.1	189.4 \pm 2.2	-3.3 \pm 1.0 †

Each value is expressed as mean \pm S. E. Ten animals were used in each group.

*, Significant differences between non-immobilized and lengthened or shortened, $p < 0.01$.

†, Significant differences between normal and spinalized, $p < 0.01$.

II. 筋線維タイプの比率

成熟ラットヒラメ筋は遅筋であり、タイプ1線維を多く含んでいる(図3)。今回の実験で用いた生後8週

齢のラットは成長期に相当し、正常群の非固定は1週目ではタイプ1線維が $73.0 \pm 0.9\%$ 、タイプ2 A線維が $21.2 \pm 0.5\%$ 、タイプ2 C線維が $5.9 \pm 0.9\%$ であっ

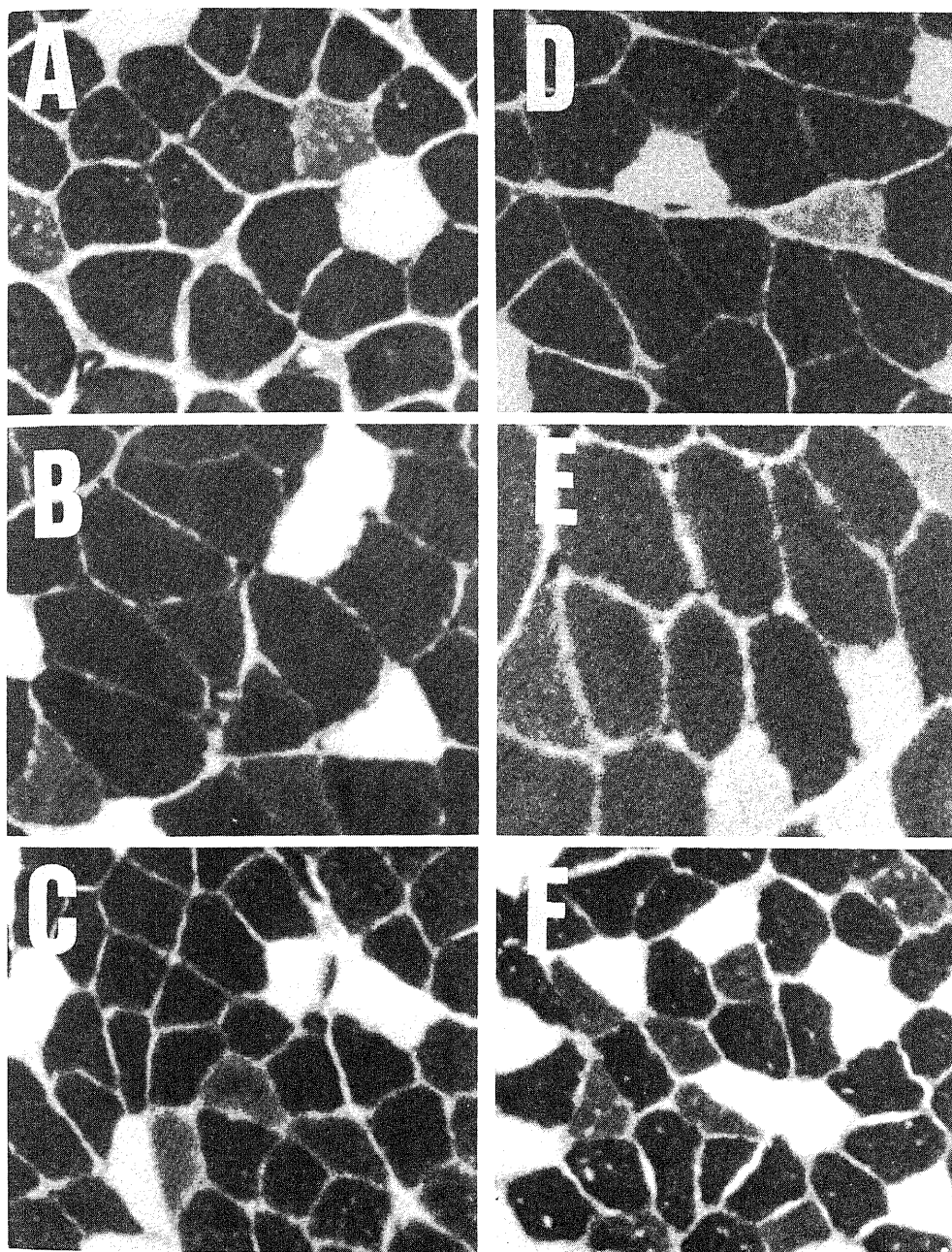
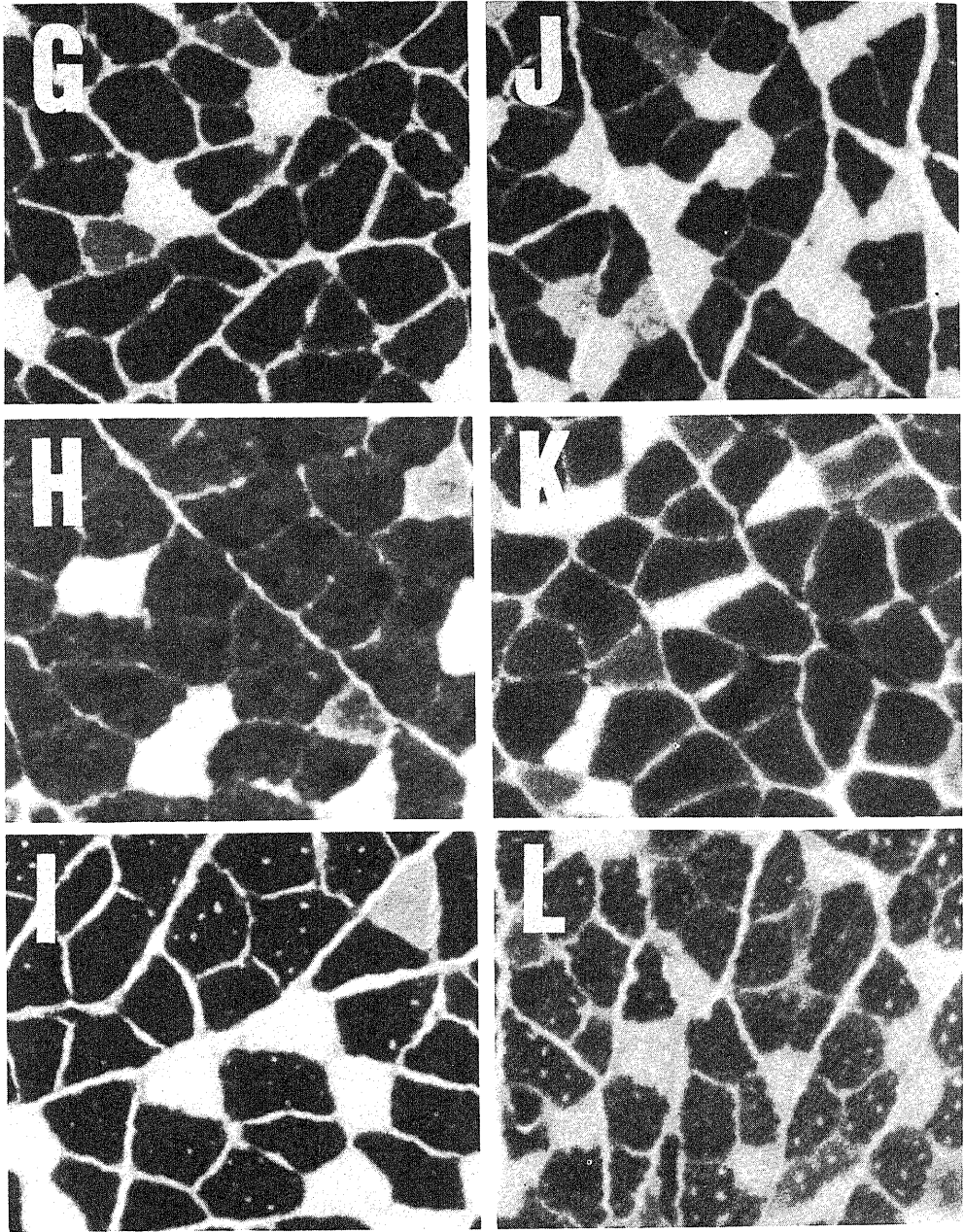


Fig. 3. Cross section of soleus muscles. ATPase stain preincubated at pH 4.6. $\times 225$.
 A) Soleus of a normal 9-week-old rat. B) Normal soleus 1 week after lengthening. C) Normal soleus 1 week after shortening. D) Soleus of a normal 10-week-old rat. E) Normal soleus 2 weeks after lengthening. F) Normal soleus 2 weeks after shortening.

たのが、2週目ではタイプ1線維が $80.9 \pm 2.5\%$ 、タイプ2 A線維が $13.2 \pm 2.3\%$ 、タイプ2 C線維が $6.0 \pm 0.7\%$ であり、経時的にタイプ1線維の増加とタイプ2

A線維の減少をみた(表2)。

術後1週目では正常群も脊損群も固定方法にかかわらず各タイプの比率には有意差を認めなかった。術後



G) Soleus 1 week after spinalization. H) Soleus 1 week after spinalization and lengthening. I) Soleus 1 week after spinalization and shortening. J) Soleus 2 weeks after spinalization. K) Soleus 2 weeks after spinalization and lengthening. L) Soleus 2 weeks after spinalization and shortening.

2週目では正常群の伸張位は非固定とすべてのタイプで比率に有意差はなかったが、正常群の短縮位ではこれらに比べると、タイプ1線維が約20%減少しており、タイプ2Aと2C線維はそれぞれ約10%づつ増加していた。脊損群では正常群の非固定と比べて、全般にタイプ1線維は低値であり、タイプ2Aおよび2C線維は高値であった(p<0.01)。特に脊損群の非固定と短縮位では正常群の非固定に比べるとタイプ1線維は約25%低値であり、タイプ2A線維は約10%、タイプ2C線維は約15%それぞれ高値であった。しかし、脊損群の伸張位ではタイプ1線維の比率は70.4±

1.6%であり、脊損群の非固定の55.3±2.1%や短縮位の56.4±2.1%に比べると有意に高値であった(p<0.01)。なお、脊損群の非固定と短縮位の間では各タイプの比率に有意差はなかった。また、正常群の短縮位と脊損群の非固定および短縮位とはタイプ1と2A線維の比率にはそれぞれ有意差はなかった。

以上の結果は、正常群も脊損群もヒラメ筋を伸張位にすることによりタイプ1線維からタイプ2Aおよび2C線維への変化は阻止されるが、短縮位ではタイプ1線維からタイプ2Aおよび2C線維への変化を生じることを示す所見であった。

Table 2. Proportion of muscle fiber types (%)

Group		type 1	type 2A	type 2C
Normal (1 week)	non-immobilized	73.0±0.9	21.2±0.5	5.9±0.9
	lengthened	79.0±2.2	15.2±1.7	5.9±0.9
	shortened	74.5±1.5	18.2±2.0	7.3±1.3
Normal (2 weeks)	non-immobilized	80.9±2.5	13.2±2.3	6.0±0.7
	lengthened	79.0±2.0	15.5±1.5	5.6±0.9
	shortened	61.8±2.3*	23.7±2.9*	15.6±1.5*
Spinalized (1 week)	non-immobilized	73.9±2.0	18.3±1.9	7.9±0.8
	lengthened	76.0±1.9	15.5±1.6	8.6±1.1
	shortened	72.9±2.3	19.8±2.0	7.3±0.9
Spinalized (2 weeks)	non-immobilized	55.3±2.1 †	23.9±2.2 †	20.9±2.1 †
	lengthened	70.4±1.6*†	17.5±1.7*	12.2±1.2*†
	shortened	56.4±2.1	23.8±1.9	19.9±1.8 †

Each value is expressed as mean±S.E. Ten animals were used in each group.

*, Significant differences between non-immobilized and lengthened or shortened, p<0.01.

†, Significant differences between normal and spinalized, p<0.01.

Table 3 Fiber cross-sectional areas (μm²)

Group		type 1	type 2A	type 2C
Normal (1 week)	non-immobilized	2317± 87	1897± 44	1813± 65
	lengthened	2810±127*	1896±118	1936±122
	shortened	1525± 46*	1383± 46*	1244± 43*
Normal (2 weeks)	non-immobilized	2595±128	2089± 96	1865± 85
	lengthened	3182±103*	1850± 88*	1889±104
	shortened	1300± 71*	1282± 83*	1098± 54*
Spinalized (1 week)	non-immobilized	1669± 78 †	1294± 54 †	1232± 68 †
	lengthened	2060±101*†	1235± 96 †	1215± 73 †
	shortened	1660± 99	1213± 56	1153± 63
Spinalized (2 weeks)	non-immobilized	1386± 61 †	1141± 52 †	1064± 42 †
	lengthened	1736± 99*†	999± 71 †	1059± 77 †
	shortened	1339± 49	1135± 68	1061± 50

Each value is expressed as mean±S.E. Ten animals were used in each group.

*, Significant differences between non-immobilized and lengthened or shortened, p<0.01.

†, Significant differences between normal and spinalized, p<0.01.

III. 筋線維横断面積

正常群の非固定のラットヒラメ筋の筋線維横断面積は1週目ではタイプ1線維が $2317 \pm 87 \mu\text{m}^2$ と最も大きく、タイプ2Aと2C線維の面積はそれぞれ 1897 ± 44 , $1813 \pm 65 \mu\text{m}^2$ でありほぼ等しかった(表

3)。それぞれの面積の比率はタイプ1:タイプ2A:タイプ2Cはほぼ5:4:4の割合であった。

上述の如く筋線維タイプは術後1週目では変化を認めなかったのに対し、筋線維横断面積は術後1週目にすでに変化を生じた。正常群の伸張位では、タイプ1

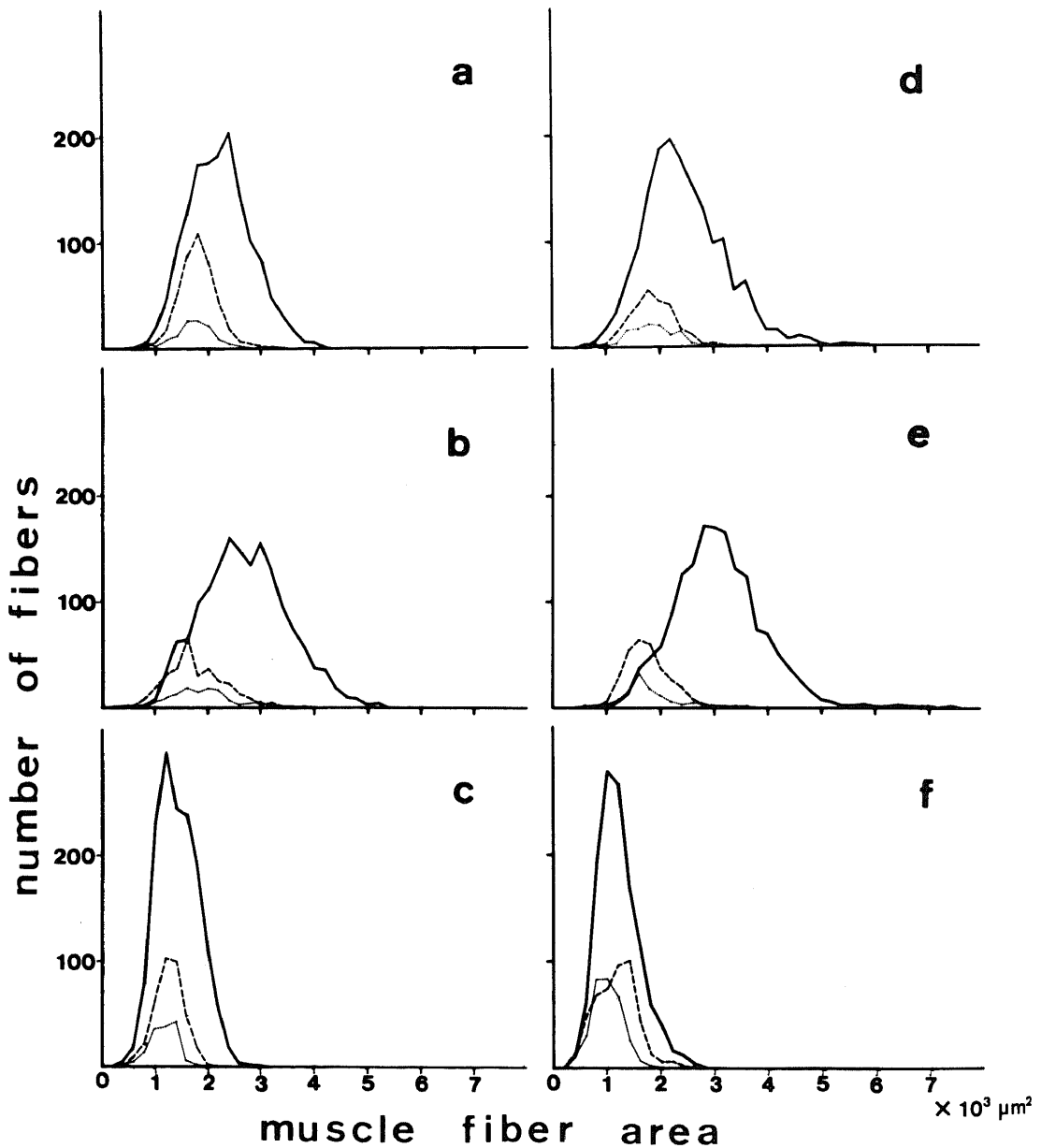


Fig. 4A. Frequency curve of soleus muscles.

- a) Soleus of a normal 9-week-old rat. b) Normal soleus 1 week after shortening. c) Normal soleus 1 week after lengthening. d) Soleus of a normal 10-week-old rat. e) Normal soleus 2 weeks after shortening. f) Normal soleus 2 weeks after lengthening.
 (—), type 1 fiber; (---), type 2A fiber; (.....), type 2C fiber.

線維は非固定と比べると術後1週目は $2810 \pm 127 \mu\text{m}^2$ 、2週目は $3182 \pm 103 \mu\text{m}^2$ とそれぞれ約20%肥大していたが、タイプ2C線維は非固定と有意差はなく、タイプ2A線維は術後2週目に $1850 \pm 88 \mu\text{m}^2$ と

約10%の萎縮をみた。また、正常群の伸張位では、各筋線維タイプの面積比がタイプ1：タイプ2A：タイプ2Cはほぼ5：3：3の割合であった。これに対して、正常群の短縮位と脊損群の非固定および短縮

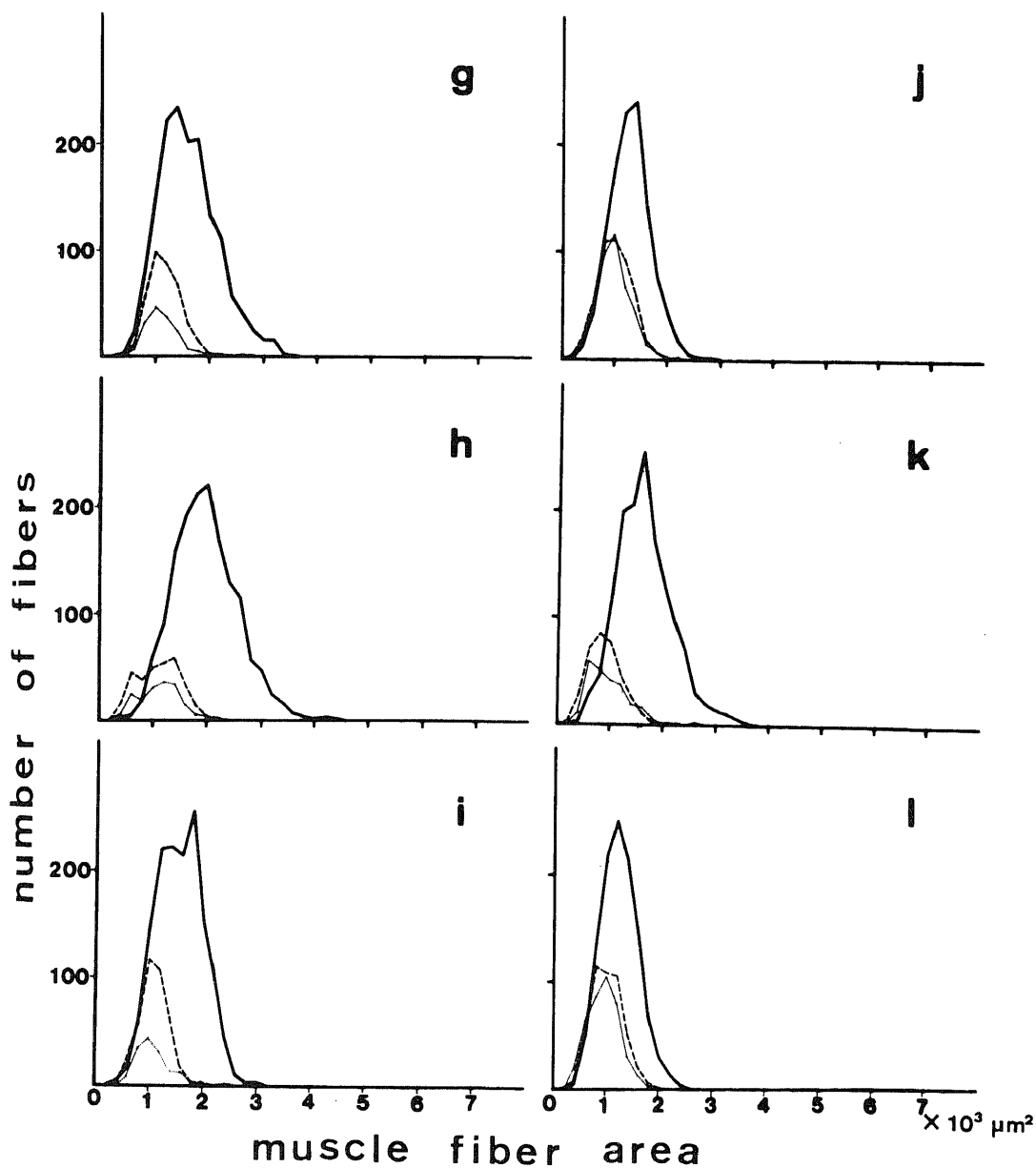


Fig. 4B. Frequency curve of soleus muscles.

g) Soleus 1 week after spinalization. h) Soleus 1 week after spinalization and lengthening.

i) Soleus 1 week after spinalization and shortening. j) Soleus 2 weeks after spinalization.

k) Soleus 2 weeks after spinalization and lengthening. l) Soleus 2 weeks after spinalization and shortening.

(—), type 1 fiber; (- - -), type 2A fiber; (.....), type 2C fiber.

(—), type 1 fiber; (- - -), type 2A fiber; (.....), type 2C fiber.

位では、正常群の非固定と比べると、すべてのタイプの筋線維に術後1週目では約30%、術後2週目では約40%の著明な萎縮を生じ($p < 0.01$)、しかも各筋線維タイプの横断面積は均一化する傾向にあった。ところが、脊損群の伸張位では脊損群の非固定および短縮位と比較するとタイプ2 Aおよび2 C線維に関しては同程度の萎縮がみられたが、タイプ1線維は逆に約25%程度肥大していた。しかも、脊損群の伸張位では各筋線維タイプの面積比はタイプ1:タイプ2 A:タイプ2 Cはほぼ5:3:3の割合であり、正常群の伸張位とほぼ同じ面積比であった。なお、正常群の短縮位と脊損群の非固定および短縮位とはすべての筋線維タイプで筋線維横断面積に有意差はなかった。

以上の結果は、ヒラメ筋を伸張位にすることにより正常群ではタイプ1線維の肥大を生じ、脊損群ではタイプ1線維の萎縮は軽度であるのに対し、短縮位では正常群でも脊損群でもすべての筋線維タイプに萎縮を生じることを示す所見であった。

IV. 度数分布曲線

以上の結果を各筋線維横断面積の分布が明瞭となるように度数分布曲線を作製した(図4)。なお、度数分布曲線の縦軸は筋線維の数を表し、横軸は筋線維の横断面積を表している。

タイプ1線維は正常群の伸張位では出現頻度の分散が大きくかつピークも右方移動していた、即ち各々の筋線維面積の不均一化と筋線維面積の増大を示していた。正常群の短縮位および脊損群の非固定と短縮位では分散が小さくかつピークの増加と左方移動を認めた、即ち各々の筋線維面積の均一化と筋線維面積の減少を示していた。脊損群の伸張位でもタイプ1線維は正常群の非固定と比べると分散の減少とピークの左方移動をみたが、脊損群の非固定や短縮位に比べると右方移動しており、正常群の伸張位での右方移動と良く似た現象を示していた。なお、正常群の短縮位と脊損群の非固定および短縮位はタイプ1線維に関しては同じような形の度数分布曲線となった。

タイプ2 Aおよび2 C線維は、正常群の伸張位では、正常群の非固定とほぼ同じような形の度数分布曲線であり、伸張位の影響はタイプ2 Aと2 C線維には生じなかったことを示している。しかし、正常群の短縮位と脊損群のすべてでタイプ2 Aと2 C線維の出現頻度の分散は小さくかつピークの増加と左方移動を認めた、即ち各々の筋線維面積の均一化と筋線維面積の減少を示していた。

以上の結果はヒラメ筋を伸張位にすることによりタイプ1線維からタイプ2 Aおよび2 C線維への変化は阻止されるとともにタイプ1線維は肥大するが、短

縮位ではタイプ1線維からタイプ2 Aおよび2 C線維への筋線維タイプの変化を生じるとともにすべてのタイプの筋線維に萎縮を生じることを示している所見であった。

考 察

ラットヒラメ筋は生下時にはすべての筋線維はタイプ2 C線維よりなっており、生後にタイプ1や2 A線維へと分化していく³⁰⁾⁻³²⁾。そして、成熟期には90%以上がタイプ1線維となり、遅筋としての性質を完成させる。今回の実験では正常群の非固定で生後10週にタイプ1線維が $80.9 \pm 2.5\%$ 、タイプ2 A線維が $13.2 \pm 2.3\%$ 、タイプ2 C線維が $6.0 \pm 0.7\%$ であり、諸家の報告と一致していた。なお、今回は成長期のラットを用いたが、これは成長期の方が筋線維に変化を生じ易いと考えたからである。

成熟期のヒラメ筋を短縮位にした廃用性筋萎縮の場合では、タイプ2線維が増加しタイプ1線維は減少することが知られている²⁹⁾³³⁾。今回用いた成長期のヒラメ筋でも、正常群の短縮位では固定後2週目にタイプ1線維の減少とタイプ2 Aと2 C線維の増加をみた。ところが、同じ廃用性筋萎縮でも伸張位ではこの変化を生じなかった。つまり、ヒラメ筋が遅筋としての組織化学的特性を維持するためには筋の緊張が必要と考えられる²⁹⁾。

Karpatiら³⁾はモルモットのヒラメ筋を用いて脊髄切断によりタイプ1線維が減少し、タイプ2線維が増加することを報告し、Lieberら³⁴⁾はこの増加したタイプ2線維はタイプ1線維が変化したものであることを見いだした。今回の実験でも脊損群の非固定と短縮位では2週目にタイプ1線維の減少とタイプ2 Aおよび2 C線維の増加をみた。このことより、筋萎縮でみられる筋線維タイプの変化を生じるには運動神経の存在が必要であり、脊損による筋萎縮と廃用性筋萎縮とは筋線維タイプの変化に関しては同じような変化をするものといえる。

ところで、前角細胞が支配する筋線維のタイプはその前角細胞のタイプに対応しており、遅筋は相対性運動神経により支配され、遅筋は持続性運動神経により支配されている¹⁾³⁵⁾³⁶⁾ことが知られている。Salmonsら³⁷⁾はヒラメ筋を速筋である長趾伸筋を支配する神経で交差縫合しても、この神経に遅筋型の活動パターンである低頻度電気刺激を加えると遅筋としての生理学的性質が保たれることを示し、筋の特性はその支配運動神経が本来有している性質ではなくて運動神経の活動パターンによって決定される³⁸⁾³⁹⁾ことを報告した。

さて、運動神経の活動パターン(興奮頻度)と非常に強い相関を示すものとしてその運動神経の活動電位に続く後過分極(after-hyperpolarization, AHP)の期間がある⁴⁰⁾。Czeh⁴¹⁾や Gallego ら²¹⁾は、ヒラメ筋とこれを支配する運動神経の AHP の期間を詳細に研究した結果、ヒラメ筋の運動神経の AHP の期間は支配筋肉から運動神経軸索を媒介する逆行性のシグナルによって維持され、この逆行性シグナルは筋の代謝活動に依存していると考えた。また、この逆行性シグナルは逆行性軸索流によって媒介されている可能性を仮定した。このように、以前は運動神経が筋の性質を決定するものと考えられたが、最近の研究では筋の活動パターンが逆に運動神経の性質を規定する可能性も示唆されるようになってきた。つまり、神経の活動パターンではなくて筋の活動パターンが筋と神経の性質の両方を規定しており、筋の収縮特性を維持するには筋の活動特性そのものが必要であると考えられるようになってきた。

今回の実験では、正常群は短縮位よりタイプ1線維からタイプ2 A や 2 C 線維へのタイプの変化を認めたが、伸張位ではこの変化をほとんど認めなかった。この原因としては、短縮位では筋の活動パターンが相動性パターンに変化するのに対して、伸張位ではこれが持続性パターンのままである⁴²⁾⁴³⁾ことが関係しているものと思われる。つまり、タイプ1線維としての組織化学的特性の維持には、筋の持続性活動パターンが必要と思われる。脊損群の伸張位では、脊損群の短縮位と比較するとタイプ1線維の増加とタイプ2 A および 2 C 線維の減少をみた。これは、たとえ脊髄切断により運動神経の随意的活動性が消失していても、筋を伸張位にすることにより筋の持続性活動パターンがある程度維持されたことが原因と考えられる。また、正常群の短縮位と脊損群の非固定と短縮位でのタイプの変化がほとんど同じであることより、筋の活動性を維持するためには筋に絶えず張力が加わることが必要であると考えられる。

真崎¹⁶⁾は免疫化学的方法を用いて、筋構造蛋白質には、それぞれ数種類の分子種が存在し、これらの分子種の種類は筋細胞の種類によって決まっており、筋細胞の分化の過程で順次出現と消失を繰り返しながら変化していき、最終的にそれぞれの筋細胞に特徴的な細胞の構造と機能を決定することを示した。今回の実験より、この筋タイプの変化には筋の活動パターンの変動が大きく関与しているものと考えられる。特にタイプ1線維に特有のミオシン蛋白質の分子種の発現や維持には筋の持続性活動が必要と思われる。つまり、真崎のいう如く筋細胞が有している種々の筋構造蛋白質

分子種の遺伝子構造が筋の性質を大きく決定しており、筋に生じる活動のパターンがそれらの遺伝子の発現を調節しているものと考えられる(図5)。また、今回の実験で正常群も脊損群も術後1週目では筋線維タイプに変化を生じなかった事実は、新しい筋構造蛋白質分子種が発現するためにはある程度の時間を要することを示すものかもしれない。しかし、筋の活動(張力)パターンの変化が、いかなる機序で新しい筋構造蛋白質分子種の遺伝子の発現に関与しているかは依然として不明のままであり、今後の検討が必要である。

関節の不動化による筋の萎縮はその固定位置に左右され、一般に短縮位では萎縮が著明であるのに対し、伸張位ではあまり萎縮は認められず、かえって肥大をみることが多い⁶⁾²²⁾。今回の実験では、正常群の伸張位固定ではタイプ1線維の肥大をみたが、タイプ2 A や 2 C 線維には変化はなく、伸張位固定に対する反応性が筋線維タイプにより異なっていた。これは短縮位固定ではすべての筋線維タイプにほぼ同程度の筋萎縮をみたとはかなり異なっている所見であった。

筋を伸張位にした場合に筋肥大を生じる機序として、Goldspink⁶⁾は伸張位では筋の蛋白質や ribonucleic acid (RNA) の量が増加することをみいだした。今回の実験では術後1週目にすでに筋線維横断面積に変化を生じていることより、既存の筋構造蛋白質分子種の分解や合成の調節は比較的短時間で行われているものと考えられる⁶⁾⁷⁾。

筋細胞の培養実験で神経支配がなくとも、Brevet ら¹⁴⁾は電気刺激を与えることにより、そして Vandenburg ら¹⁵⁾は張力を作用させることによりミオシンの合成が増加することをみいだした。また、Goldspink⁴⁴⁾

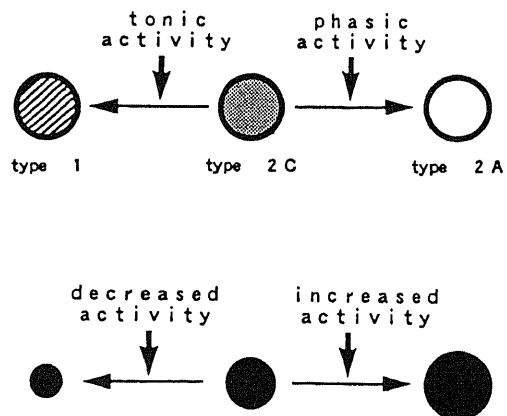


Fig. 5. The muscle fiber types are dependent on the activity patterns of muscle, and the cross-sectional areas of muscle fiber are dependent on the amount of muscle activity.

は伸張反射のない除神経筋でも伸張位に固定することにより蛋白合成の増加による筋肥大を生じることを示した。つまり、神経支配ではなくて筋細胞に対する直接的な機械的作用である張力とその栄養に大きく関与しているといえる。すなわち、神経系はその活動による筋収縮によって発生した張力を通じて筋の栄養に関与していると考えられる。

Hnfk⁴⁵⁾はラットヒラメ筋を用いて、脊髄を切断した場合に比べて、坐骨神経切断を追加した場合の方が萎縮がより強くみられたとし、Solandtら⁴⁶⁾は脊髄切断後の筋萎縮は術後2週目に最大となるが40~50日後には切断前の重量に回復することを示した。Lieberら⁴⁷⁾は脊髄切断後1年ではラットヒラメ筋はタイプ1線維のほうがタイプ2線維よりも萎縮が著明であることを報告した。

これに対して、末梢神経損傷の場合では、Girlandaら⁴⁷⁾はウサギの坐骨神経を挫滅したところヒラメ筋はタイプ2線維のほうがタイプ1線維よりも萎縮が著明であることを示し、畑野ら⁴⁸⁾はラットの坐骨神経を切断すると赤筋に比べて白筋線維が著明に萎縮し、8週目では酵素組織化学的な特徴が失われるために筋線維をタイプ別に識別するのが非常に困難になったことを報告した。このように、一次ニューロンの障害による場合と二次ニューロンの障害による場合とでは筋萎縮の組織化学的变化が異なることが知られている。

今回の実験では脊損により運動神経の活動性を低下させた場合には、非固定や短縮位では各筋線維タイプの面積の比率はタイプ1:タイプ2 A:タイプ2 Cはほぼ5:4:4の割合であり、すべての筋線維タイプにはほぼ同程度の筋萎縮を生じ、しかも各筋線維タイプの横断面積は均一化する傾向にあった。しかし、脊損群の伸張位ではこの比率がほぼ5:3:3の割合であり、脊損群の非固定や短縮位と比較すると明らかにタイプ1線維の萎縮は軽度であった。また、脊損群の伸張位でみられたこの筋線維タイプの面積比は正常群の伸張位の比率とほぼ同じであった。以上の結果より、伸張位の影響はタイプ1線維にのみ生じることは明らかである。また、正常群の伸張位と脊損群の伸張位では各筋線維タイプの面積比がほぼ同じであることより、伸張位による影響は両者で同一であると考えられる。伸張位によるこの影響がタイプ1線維にのみ生じる機序としては、①伸張位による運動神経の活動性の亢進が持続性アルファ運動神経にのみ生じ、相動性アルファ運動神経には生じない、②伸張位という持続的張力に対する反応性がタイプ1線維とタイプ2線維とは異なることなどが考えられる。後者については速筋ではその筋構造が遅筋とは異なり、持続的張

力に反応するようにはできていない⁴⁹⁾ことが理由としてあげられる。

なお、今回の実験では、ラットの後肢には術後10日に痙性が出現したが、筋紡錘などのγ系を介しての脊髄運動神経の活動状態の差が筋線維タイプや筋線維横断面積にどの程度影響しているかについては検討できなかった。

結 論

筋線維のタイプの変化と栄養の機序を検討するために、胸髄切断および足関節固定を行ったラットのヒラメ筋をAPTase染色を用いた組織化学的方法により、比較検討し、以下の結果を得た。

1. 正常群では筋の短縮位により術後2週目にタイプ1線維の約20%の減少をみたが、伸張位では変化はみられなかった。

2. 脊損群の非固定と短縮位では術後2週目にタイプ1線維の約25%の減少をみたが、伸張位ではタイプ1線維の減少は約10%と軽度であった。

3. 正常群では短縮位によりすべての筋線維タイプに萎縮をみたが、伸張位ではタイプ1線維は肥大していた。

4. 脊損群の非固定と短縮位ではすべての筋線維タイプに萎縮をみたが、伸張位ではタイプ1線維の萎縮は軽度であった。

以上のことより、筋の活動パターンの変動により筋線維タイプに変化を生じ、筋の活動の量により筋線維横断面積に変化を生じるものと考えられた。また、タイプ1線維の組織化学的特性を維持するためには筋の持続性活動が必要であると思われる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師、野村 進教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始直接御指導を戴きました金沢大学医療技術短期大学部立野勝彦教授に感謝の意を表します。(本研究は金沢大学医学部付属動物実験施設を利用して行われた。)

文 献

- 1) Lipschütz, A. & Audova, A.: The comparative atrophy of the skeletal muscle after cutting the nerve and after cutting the tendon. *J. Physiol.*, 55, 300-304 (1921).
- 2) Eccles, J. C.: Investigations on muscle atrophies arising from disuse and tenotomy. *J. Physiol.*, 103, 253-266 (1944).
- 3) Karpati, G. & Engel, W. K.: Correlative histochemical study of skeletal muscle after

- suprasegmental denervation, peripheral nerve section, and skeletal fixation. *Neurology*, **18**, 681-692 (1968).
- 4) **Cooper, R. R.**: Alterations during immobilization and regeneration of skeletal muscle in cats. *J. Bone Joint Surg.*, **54-A**, 919-953 (1972).
 - 5) **Herbison, G. J., Jaweed, M. M. & Ditunno, J. F.**: Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **59**, 301-305 (1978).
 - 6) **Goldspink, D. F.**: The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J. Physiol.*, **264**, 267-282 (1977).
 - 7) **Goldspink, D. F.**: The influence of activity on muscle size and protein turnover. *J. Physiol.*, **264**, 283-296 (1977).
 - 8) **Booth, F. W.**: Time course of muscular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.*, **43**, 656-661 (1977).
 - 9) **Booth, F. W. & Seider, M. J.**: Early change in skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.*, **47**, 974-977 (1979).
 - 10) **Davis, C. J. F. & Montgomery, A.**: The effect of prolonged inactivity upon the contraction characteristics of fast and slow mammalian twitch muscle. *J. Physiol.*, **270**, 581-594 (1977).
 - 11) **Burke, R. E., Levine, D. N., Tsairis, P. & Zajac, III, F. E.**: Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol.*, **234**, 723-748 (1973).
 - 12) **Ward, K. M. & Wareham, A. C.**: Effect of denervation during development upon membrane potential and intracellular potassium and sodium activities of skeletal muscle of the rat. *Exp. Neurol.*, **93**, 261-269 (1986).
 - 13) **Mayer, R. F., Burke, R. E., Toop, J., Hodgson, J. A., Kanda, K. & Walmsley, B.**: The effect of long-term immobilization on the motor unit population of the cat medial gastrocnemius muscle. *Neuroscience*, **6**, 725-739 (1981).
 - 14) **Brevet, A. & Pinto, E.**: Myosin synthesis increased by electrical stimulation of skeletal muscle cell cultures. *Science*, **193**, 1152-1154 (1976).
 - 15) **Vandenburgh, H. & Kaufman, S.**: In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science*, **203**, 265-268 (1979).
 - 16) **眞崎知生**: 筋蛋白質分化とその意義. *日本臨床*, **43**, 1055-1064 (1985).
 - 17) **Samaha, F. J., Guth, L. & Albers, R. W.**: The neural regulation of gene expression in the muscle cell. *Exp. Neurol.*, **27**, 276-282 (1970).
 - 18) **Fitts, R. H., Winder, W. W., Brooke, M. H. & Kaiser, K. K.**: Contractile, biochemical, and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, **238**, C15-C20 (1980).
 - 19) **Wan, K. K. & Boegman, R. J.**: Response of rat skeletal muscle to neural application of batrachotoxin or tetrodotoxin: Effect on sarcoplasmic reticulum. *Exp. Neurol.*, **74**, 439-446 (1981).
 - 20) **Albuquerque, E. X., Warnick, J. E., Tasse, J. R. & Sansone, F. M.**: Effects of vinblastine and colchicine on neural regulation of the fast and slow skeletal muscles of the rat. *Exp. Neurol.*, **37**, 607-634 (1972).
 - 21) **Gallego, R., Kuno, M., Núñez, R. & Snider, W. D.**: Dependence of motoneuron properties on the length of immobilized muscle. *J. Physiol.*, **291**, 179-189 (1979).
 - 22) **Spector, S. A., Simard, C. P., Fournier, M., Sternlicht, E. & Edgerton, V. R.**: Architectural alterations of rat hind-limb skeletal muscles immobilized at different lengths. *Exp. Neurol.*, **76**, 94-110 (1982).
 - 23) **宮沢 寛**: 不動化による筋萎縮に対する筋の緊張および電気刺激の影響—実験的研究—. *日整会誌*, **60**, 1003-1016 (1986).
 - 24) **染矢富士子, 立野勝彦**: 不動性脱神経筋の組織化学的変化. *医学のあゆみ*, **131**, 599-600 (1984).
 - 25) **Alaimo, M. A., Smith, J. L., Roy, R. R. & Edgerton, V. R.**: EMG activity of slow and fast ankle extensors following spinal cord transection. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.*, **56**, 1608-1613 (1984).
 - 26) **Brooke, M. H. & Kaiser, K. K.**: Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch. Neurol.*, **23**, 369-379 (1970).
 - 27) **Dubowitz, V. & Brooke, M. H.**: Muscle biopsy: A modern approach, p.20-33, W. B. Saunders, London, 1973.
 - 28) **Engel, W. K.**: Muscle target fibres, a newly recognized sign of denervation. *Nature*, **191**, 389-390 (1961).

- 29) **Schmitt, H. P. & Volk, B.** : The relationship between target, targetoid, and targetoid/core fibers in severe neurogenic muscular atrophy. *J. Neurol.*, **210**, 167-181 (1975).
- 30) **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).
- 31) **Engel, W. K. & Karpati, G.** : Impaired skeletal muscle maturation following neonatal neurectomy. *Develop. Biology*, **17**, 713-723 (1968).
- 32) **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).
- 33) **Booth, F. W. & Kelso, J. R.** : Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. *Pflügers Arch.*, **342**, 231-238 (1973).
- 34) **Lieber, R. L., Fridén, J. O., Hargens, A. R. & Feringa, E. R.** : Long-term effects of spinal cord transection on fast and slow rat skeletal muscle: II. Morphometric properties. *Exp. Neurol.*, **91**, 435-448 (1986).
- 35) **Burke, R. E.** : Motor unit types of cat triceps surae muscle. *J. Physiol.*, **193**, 141-160 (1967).
- 36) **Dum, R. P., Burke, R. E., O'Donovan, M. J., Toop, J. & Hodgson, J. A.** : Motor-unit organization in flexor digitorum longus muscle of the cat. *J. Neurophysiol.*, **47**, 1108-1125 (1982).
- 37) **Salmons, S. & Sréter, F. A.** : Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type. *Nature*, **263**, 30-34 (1976).
- 38) **Lómo, T. & Westgaard, R. H.** : Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. *Proc. R.Soc. Lond. B.*, **187**, 99-103 (1974).
- 39) **Cotter, M. & Phillips, P.** : Rapid fast to slow fiber transformation in response to chronic stimulation of immobilized muscles of the rabbit. *Exp. Neurol.*, **93**, 531-545 (1986).
- 40) **Eccles, J. C., Eccles, R. M. & Lundberg, A.** : The action potentials of the alpha motoneurons supplying fast and slow muscles. *J. Physiol.*, **142**, 275-291 (1958).
- 41) **Czéh, G., Gallego, R., Kudo, N. & Kuno, M.** : Evidence for the maintenance of motoneurone properties by muscle activity. *J. Physiol.*, **281**, 239-252 (1978).
- 42) **Granit, R., Phillips, C. G., Skoglund, S. & Steg, G.** : Differentiation of tonic from phasic alpha ventral horn cells by stretch, pinna and crossed extensor reflexes. *J. Neurophysiol.*, **20**, 470-481 (1957).
- 43) **Fischbach, G. D. & Robbins N.** : Changes in contractile properties of disused soleus muscles. *J. Physiol.*, **201**, 305-320 (1969).
- 44) **Goldspink, D. F.** : The influence of passive stretch on the growth and protein turnover of the denervated extensor digitorum longus muscle. *Biochem. J.*, **174**, 595-602 (1978).
- 45) **Hník P.** : Changes in muscle weight following section of the spinal cord in the rat. *Physiol. Bohemoslov.*, **9**, 390-400 (1960).
- 46) **Solandt, D. Y. & Magladery, J. W.** : A comparison of effects of upper and lower motor neurone lesions on skeletal muscle. *J. Neurophysiol.*, **5**, 373-380 (1942).
- 47) **Girlanda, P., Dattola, R., Vita, G., Oteri, G., Lo Presti, F. & Messina, C.** : Effect of electrotherapy on denervated muscles in rabbits: An electrophysiological and morphological study. *Exp. Neurol.*, **77**, 483-491 (1982).
- 48) **畑野栄治, 津下健哉, 生田義和, 宮本義洋, 吉岡薫, 平松伸夫, 住田佳樹, 越智光夫** : 脱神経筋に関する実験的研究. *総合リハ* **9**, 949-954 (1981).
- 49) **Page, S. G.** : A comparison of the fine structures of frog slow and twitch muscle fibres. *J. Cell Biol.*, **26**, 477-497 (1965).

A Histochemical Study on the Soleus Muscle of Rats following Spinal Cord Transection at the Mid-Thoracic Level with Immobilization of the Ankle Joint in Various Positions Akira Inoue, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., **96**, 773—787 (1987)

Key words : muscular atrophy, spinalization, histochemistry

Abstract

Histochemical changes following transection of the spinal cord at the mid-thoracic level with immobilization of the ankle joint in various positions were studied to investigate the trophic interaction between muscle and motoneuron using myosin ATPase staining. Rats were divided into two groups, normal and spinalized. In spinalized rats, the activity of the soleus motoneuron was decreased without any degeneration of the motoneuron itself. The left ankle joint of one-third of each group was immobilized in dorsiflexion and another one-third in plantarflexion by the insertion of a K-wire into the calcaneus and the bone marrow cavity of the distal end of tibia. The soleus muscle was held in a lengthened position by immobilization of the ankle joint in dorsiflexion and in a shortened position by plantarflexion. It is known that the tonic activity of soleus motoneuron is converted into phasic activity in the shortened position, and is increased through the hyperactivity of muscle spindle in the lengthened position. The soleus muscles were then histochemically examined with myosin ATPase staining at pH 9.4, 4.6 and 4.3. In normal rats, the shortened position resulted in the atrophy of all fiber types and a decreased proportion of type 1 fiber; whereas the lengthened position resulted in the hypertrophy of type 1 fiber without any proportional changes of muscle fiber types. In spinalized rats, the shortened position resulted in the atrophy of all fiber types with a marked decrease in proportion of type 1 fiber, but the lengthened position partially prevented these changes. These results indicate that the muscle fiber types are dependent on the activity patterns of muscle and the cross-sectional areas of muscle fiber are dependent on the amount of muscle activity. These findings suggest that the tonic pattern of muscle activity is necessary to maintain the histochemical property of type 1 fiber.