

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

主論文の要旨

論文題目

伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果 —伸張性収縮による筋損傷モデルを用いて—

氏名

森 友洋

論文内容の要旨

【背景】一般的に、骨格筋は、外傷や高強度の運動によって損傷される。筋損傷は、筋力の出力や筋持久力を低下させ、日常生活動作能力や運動能力を低下させる。この筋損傷からの回復を促進させ ADL の早期獲得やスポーツへの早期復帰させることは、理学療法士にとって重要な役割である。一般的に、筋損傷の治療には、RICE (Rest 安静, Icing 冷却, Compression 圧迫, Elevation 挙上) に準じた処置が行われるが、これとは相反する運動刺激による回復促進効果の報告もあり、筋損傷に対する理学療法の効果には不明な点が多い。その理由には、常に一定の損傷を起こす再現性のある筋損傷モデルがないことが挙げられる。また、理学療法効果を検証するために必要な、筋損傷からの組織学的、生理学的な回復過程が定量的に明らかにされていないこともある。さらに、理学療法の効果検証に不可欠な、筋に対して再現性のある力学刺激を与える方法がないことが挙げられる。

【目的】本研究の目的は、まず臨床的筋損傷に近いと考えられる伸張性収縮 (Lengthening Contraction: LC) による再現性の高い筋損傷モデルの作製を行うことである。次に、我々が作製した筋損傷モデルを用いて、Control としての損傷からの回復過程における構造と筋力の変化を明らかにすることである。そして、この確立した筋損傷モデルと損傷からの回復評価方法を用いて、伸張刺激が筋損傷からの回復に及ぼす影響を明らかにし、そのメカニズムの一端について明らかにする事である。

【方法】全ての実験は Wistar 系雄性ラットを対象とし、名古屋大学動物実験委員会の承認を得て行った。まず、再現性の高い筋損傷モデル作製のための LC 条件を検証するために、小動物用足関節運動装置を用いて、角速度 50, 100, 200, 400 deg/sec の条件でラットの前脛骨筋に LC を加え、筋損傷モデルを作製した。全ての条件において、足関節運動範囲は 90 deg, 収縮回数は 10 回× 5 セット (収縮間 10 sec, セット間 60 sec の休憩) とした。損傷の評価は、LC 48 時間後に行う電気刺激による足関節の最大等尺性背屈トルクと、Evans Blue Dye (EBD) と Laminin を用いて前脛骨筋横断切片の EBD 陽性筋線維数とで行った。筋損傷からの回復過程の評価は、足関節の最大等尺性背屈トルクと前脛骨筋横断切片の筋線維横断面積を測定して行った。最大等尺性背屈トルクの評価は、LC の前、2, 7, 14 日後に測定し、LC 前に測定した値に対する比を算出することにより行った。また、筋線維横断面積の評価のために、LC 14 日後に前脛骨筋を採取し、凍結横断切片を作製した。そして、筋細胞膜に特異的に局在する

Dystrophin の蛍光免疫染色後に、筋横断切片における筋線維横断面積を測定した。伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果を調べるために、LC のみ行う LC alone 群、LC 後に伸張刺激を行う LC+伸張刺激群、LC も伸張刺激も行わない Control 群に振り分けた。LC+伸張刺激群には、小動物用足関節運動装置を用い、LC 1 日後に 15 分間（足関節底屈位・中間位を 5 秒毎に繰り返す）を行った。足関節底屈位時のトルクは 3 mNm とした。伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果の評価は、LC の前、2, 7, 14, 18, 21 日後に最大等尺性背屈トルクの測定と LC 21 日後に採取した筋を用いた筋線維横断面積の測定により行った。また、LC 2, 3, 4, 5 日後に、LC+伸張刺激群 と LC alone 群の筋を対象として、新生筋線維の指標となる Developmental myosin heavy chain immunoreactivity (dMHC-ir) の蛍光染色を行った。そして、筋横断切片中に存在する筋線維の中で、dMHC-ir 陽性筋線維の数や割合を算出し、経時的な変化を捉え、新生筋線維の発現や活性時期の違いを調べた。

【結果・考察】EBD 陽性筋線維は角速度 50 deg/sec, 100 deg/sec の LC 48 時間後においてほとんど観察されなかった。また、角速度 200 deg/sec では 1677.2 ± 133.2 個 ($25.0\% \pm 0.4\%$)、400 deg/sec では 2252.6 ± 285.8 個 ($37.0\% \pm 1.6\%$)であり、200 deg/sec でばらつきが少なかった。そこで、ばらつきの少なかった 200 deg/sec のモデルを用いて、筋損傷からの回復過程を検証した。LC 10 日後、LC 14 日後の筋線維横断面積は、LC 5 日後に比べ有意に大きかった。さらに LC 14 日後は LC 7 日後に比べ有意に大きかった。また、LC 後の筋線維横断面積のヒストグラムを作成し、各日数における全筋線維数に対する $800 \mu\text{m}^2$ 以下の筋線維の割合を算出したところ、小径の筋線維数は LC 5 日後をピークにして徐々に減少した。一方、回復過程において、全筋線維のうちの dMHC-ir 陽性筋線維の割合を算出したところ、LC 3 日後で 0.8%、LC 5 日後で 21.9%、LC 7 日後で 5.7% であり、LC 10 日後と LC 14 日後ではほとんど観察されなかった。なお、LC 5 日後では、筋線維横断面積が $800 \mu\text{m}^2$ 以下の筋線維のうち 84.1%が dMHC-ir 陽性筋線維であった。一方、最大等尺性背屈トルクは LC 2 日後に有意に低下し、その後徐々に増大し、LC 14 日後には 23.7 ± 2.9 mNm まで回復した。しかし、LC 14 日後の最大等尺性背屈トルクは、同週齢の Control 群に比べて有意に低かった。新生した筋線維が収縮機能を発揮するためには運動神経の再支配が必要であると言われている。よって、LC 14 日後で筋線維横断面積が回復した新生筋線維において運動神経の再支配がまだ完了してなかったのではないかと考える。そして、伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果を検証した。LC alone 群の LC21 日後の筋線維横断面積は Control 群よりも有意に小さかった。しかし LC+伸張刺激群は LC alone 群よりも有意に大きく、Control 群と有意差がない筋線維横断面積まで回復した。最大等尺性背屈トルクについて、LC 21 日後における LC+伸張刺激群は LC alone 群に比べ有意に大きく、Control 群の間に有意な違いはなかった。さらに、小型の dMHC-ir 筋線維 ($< 800 \mu\text{m}^2$) が LC alone 群よりも LC+伸張刺激群でより早期に発現した。LC 3 日後及び 4 日後の筋線維数全体に対する dMHC-ir 筋線維数の比率は、LC alone 群よりも LC+伸張刺激群で有意に高かった。筋衛星細胞を含む単離した筋線維に対して伸張刺激を与えると、筋衛星細胞が活性化したという報告がある。本研究で行った LC 1 日後の伸張刺激は、筋衛星細胞の活性化を促進させたと考えられる。以上のことから、本研究で行ったラット前脛骨筋に対する LC 1 日後の伸張刺激は筋衛星細胞の活性化を促進させ、新生筋線維の新生を促進させることにより、最大等尺性背屈トルクや筋線維横断面積の回復を促進させたと考えられる。

【光遺伝学を用いた慢性筋痛症モデル作製について】本学位論文には、満期退学後からこれまでに行ってきた研究内容の経過に関しても記載した。満期退学後は、慢性筋痛症によく認められる局所的な筋硬結様症状を持つモデルの作製を行ってきた。470 nm の青色光照射によって活性化される Channelrhodopsin-2 (ChR2) を対象筋の一部の筋線維内に発現させ、青色光により選

択的に繰り返し収縮させることによるモデルの作製を目指した。筋線維内への ChR2 遺伝子導入には、プラスミド DNA を電ポレーションする方法と、3 種のアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus : AAV) ベクターを用いる方法を試みた。現在、AAV10 を用いれば、遺伝子導入による収縮が確認できた。まだ、繰り返し収縮による局所的な索状硬結や結節の確認にまでは至っていないため、さらなる検討が必要である。

