

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-

名古屋大学大学院医学系研究科
リハビリテーション療法学専攻

森 友洋

平成 29 年度学位申請論文

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-

名古屋大学大学院医学系研究科

リハビリテーション療法学専攻

指導：亀高 諭 教授

森 友洋

要旨

表題：

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—

【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、筋損傷による炎症に対しては、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ついても記載した。満期退学後は、慢性筋痛症によく認められる局所的な索状硬結、結節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 をエレクトロ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 を用いると、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。

要旨

Strenuous exercise can cause structural damage to muscles, resulting in a reduced capacity to produce and sustain force. Muscle injury or recovery from muscle injury requires to be demonstrated in a quantitative manner in order to verify the efficacy of physical therapy. Accordingly, we attempted to develop a muscle injury model by lengthening contraction (LC), which is considered to be similar to clinical muscle injury. In general, factors that determine the extent of muscle injury by LC include the range of articular movement, frequency of contraction, and angular velocity. Under isoflurane anesthesia, LC was repeatedly induced in rat ankle extensor muscles at different stretch speeds (angular velocities of 50, 100, 200, and 400 deg/sec) over a fixed stretch range of motion (90°). The number of muscle fibers labeled with Evans blue dye, a marker of muscle fiber damage associated with increased membrane permeability, increased with the angular velocity of LC (by 20% of all myofibers at 400 deg/sec). Isometric torque of dorsiflexion measured 2 days after LC decreased progressively with LC angular velocity (by 68% reduction at 400 deg/sec). The angular velocity of muscle stretch during LC is thus a critical determinant of the degree of damage, and LC appears to damage type IIB fibers preferentially, resulting in a disproportionate reduction in isometric torque.

Subsequently, we examined the recovery process from muscle injury by using this model. For the evaluation, we used the maximum torque of the ankle joint dorsiflexion by electric stimuli and the cross sectional area of the muscle fiber of the dystrophin positive and the developmental myosin heavy chain (dMHC) positive after dual-fluorescent immunostaining. As a result, we were able to observe the expression of small-diameter muscle fibers with the elapse of time after the injury and their growth, as well as how the injury was recovering with the fluctuation of the ratio of dMHC positive muscle fibers and the increase in the torque of the ankle joint dorsiflexion influencing each other. Subsequently, we investigated the cellular mechanisms and therapeutic effect of post-injury stretch on the recovery process from muscle injury induced by LC. One day after LC, a single 15-min bout of muscle stretch was applied at an intensity of 3 mNm. The maximal isometric torque was measured before and at 2–21 days after LC. The myofiber size was analyzed at 21 days after LC. dMHC cells were observed in the early recovery stage (2–5 days after LC). We observed that LC-induced injury markedly decreased isometric torque and myofiber size, which recovered faster in rats that underwent stretch than in rats that did not. Regenerating myofiber with dMHC-ir cells was observed earlier in rats that underwent stretch. These results indicate that post-injury stretch may facilitate the regeneration and early formation of

new myofibers, thereby promoting structural and functional recovery from LC-induced muscle injury.

目次

| | |
|--|----|
| I. 背景及び目的 | 3 |
| I-1. <u>筋損傷について</u> | 3 |
| I-2. <u>筋損傷の回復促進に対する方策</u> | 4 |
| I-3. <u>筋損傷からの回復促進効果を明らかにするために解決すべき問題点</u> | 4 |
| I-4. <u>筋損傷モデルに対する伸張刺激の回復促進効果を明らかにする</u> | 6 |
| II. 方法 | 6 |
| II-1. <u>再現性の高い筋損傷モデル作製のための伸張性収縮条件の検証</u> | 7 |
| II-2. <u>筋損傷からの回復過程における組織及び筋力の変化</u> | 11 |
| II-3. <u>伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果</u> | 12 |
| III. 結果 | 15 |
| III-1. <u>直接電極と表面電極との間の足関節最大等尺性背屈トルクの違い</u> | 15 |
| III-2. <u>再現性の高い筋損傷モデルの作製のための伸張性収縮刺激条件</u> | 15 |
| III-3. <u>筋損傷からの回復過程における組織及び最大等尺性背屈トルクの変化</u> | 20 |
| III-4. <u>伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果</u> | 20 |
| IV. 考察 | 28 |
| IV-1. <u>伸張性収縮の角速度に依存する筋損傷について</u> | 28 |
| IV-2. <u>筋損傷や損傷からの回復を評価するために用いた足関節最大等尺性背屈トルク測定について</u> | 28 |
| IV-3. <u>角速度に依存する機能的な筋損傷について</u> | 29 |
| IV-4. <u>再現性の高い筋損傷モデル作製のための伸張性収縮条件</u> | 30 |
| IV-5. <u>筋損傷からの回復過程における構造及び最大等尺性背屈トルクの変化</u> | 30 |
| IV-6. <u>伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果</u> | 31 |
| V. まとめ | 32 |
| VI. 参考文献 | 33 |
| 参考研究. 光遺伝学を用いた慢性筋痛症モデル作製について | 38 |
| 1. <u>背景及び目的</u> | 38 |
| 2. <u>方法</u> | 42 |
| 3. <u>結果</u> | 43 |
| 4. <u>考察</u> | 45 |
| 5. <u>参考文献</u> | 46 |

謝辭 47

I. 背景及び目的

本章では、まず筋損傷の発生機序や回復機序について概説する。次に、これまで一般的に考えられてきた筋損傷からの回復に必要な条件、及びそれとは異なると考えられる条件について説明し、不明な点を明らかにする。そして、筋損傷の回復促進に対する方策が現状でもまだ不明である理由を述べ、本研究の目的であるその解決策について述べる。

I-1. 筋損傷について

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 [1, 2]。この筋損傷には、衝突や踏まれたり蹴られたりなどの外力によって発生する損傷と、外力によらず自家筋力によって発生する損傷とがある [3, 4]。前者を筋挫傷、後者を筋断裂や肉離れとよぶ。特に肉離れは、様々な年齢層において、プロ、アマチュアを問わず様々なスポーツで起こるといわれている。例えば、スポーツ競技が原因で肉離れと診断された患者 1239 例を対象とする以下の研究が報告されている [5]。種目別では陸上競技が 18.2 % (207 例) と最も多く、次いでサッカーが 13.1 % (163 例) と報告されており、競技からの離脱を強いられていることも多い。スポーツ競技により受傷した場合、受傷前よりもパフォーマンスの低下や傷害の再発に対しての不安や恐怖、早く競技に復帰しなければライバルに遅れをとり、指導者に見放されるかもしれないという焦燥感や切迫感、どうせこの傷害は完治しないという諦めや絶望感など、様々な心理的苦痛を経験すると述べており [6]、身体的な問題だけでなく、精神的な面においても影響を及ぼす。よって、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学にとって重要であると考えられる。

筋損傷の初期症状として、強い疼痛、損傷部位の腫脹、熱感、内出血が出現することがある。この病理的所見としては、実験動物による報告がある。光学顕微鏡レベルでの報告では、受傷 1 日後における筋線維の壊死や組織の浮腫の出現が確認されている [7]。電子顕微鏡レベルでの報告では、受傷直後における Z 線の局所的な歪みや崩壊、隣接する A 帯の崩壊 [8-13]、原形質膜の破壊 [14] が確認されている。また、生化学検査結果において、受傷直後より血漿 Creatin Kinase (CK) 活性の上昇 [10, 12-14] が確認されている。しかし、これらの筋損傷初期における組織学的所見や生化学的所見の量と、筋負荷量との定量的な相関を明らかにした報告はない。

一方、損傷からの回復に関しても、実験動物によって検証された報告がある。この損傷からの回復過程において中心的な役割を果たすのが筋衛星細胞であるといわれている。筋衛星細胞とは、筋線維の基底膜と形質膜との間に散見される単核の前駆細胞で、未分化な骨格筋細胞である [15]。普段は休止状態にあるが、トレーニングや損傷などにより生じたストレスに応じて活性化し、筋芽細胞の増殖・分化を経て新たな筋線維を形成したり、既存の筋線維に融合することができる [16]。そして、損傷から 1 か月後には筋全体として形態的、機能的に回復するとの報告がある [17]。しかし、これら損傷からの回復過程における組織学的所見の経時的変化も定量的に評価されているわけではない。

以上のように筋損傷の病態の評価が定量的に明らかにされていないと、治療効果を客観

的に評価することは困難である。そこで、本研究では、スポーツで起こる肉離れを模擬した伸張性収縮 (Lengthening Contraction, LC) による筋損傷の病態と、その回復過程を定量的に明らかにすることとした。

I- 2. 筋損傷の回復促進に対する方策

一般的に、筋損傷による炎症に対しては、RICE (Rest 安静 [18], Icing 冷却 [19-24], Compression 圧迫 [25], Elevation 挙上 [22]) に準じた処置が行われている [26]。例えば、筋損傷翌日からトレッドミル運動を行うと、損傷を拡大させるという報告がある [27]。よって Rest は筋損傷からの回復に有効な処置だと考えられている。Icing は、損傷部位の組織温度を低下させ、結果として代謝要求を減少させ、血管収縮の誘発及び出血の抑制を行わせ、二次的損傷を抑制するといわれる。また、自由神経終末及びシナプスにおける閾値を上げることにより疼痛を軽減させると考えられている [26]。Compression は、炎症過程に起因する浮腫性腫脹を軽減することを目的としている。患部周辺もしくは上流部分の動脈を圧迫し、一時的に患部の血流量を減らすことによって血小板による血管修復のペースを出血量が上回らないようにしている [26]。負傷した部分の Elevation は、患部を心臓の位置よりも高く挙上することにより、局所血管の圧を低下させ、出血を抑制させるのに役立つと考えられている [26]。

しかし、筋損傷 3 日後からトレッドミル運動を行うと、損傷からの回復を促進させるという報告がある [28]。彼らは、筋毒である Notexin をヒラメ筋へ注射することにより筋損傷を作製した。損傷 3 日後よりトレッドミル運動 (週 5 回, 10-30 m/min の間で漸増, 1 日 1-2 時間の間で漸増) を実施した群では、損傷 42 日後に筋湿重量及び筋腹横断面積の完全な回復を認めたが、運動を行っていない群では損傷 42 日後でも筋湿重量が低下したままの状態であった。これ以外にも、損傷筋に対して超音波刺激が回復を促進させるという報告がある [29, 30]。Karnes らは、ラット長趾伸筋に対して LC を用いることにより筋損傷を作製し、損傷 3, 5, 7 日後に 1.0 MHz の超音波刺激 (0.5 W/cm^2 , 1 日 5 分間) を与えた。その結果、損傷 7 日後には超音波刺激を与えていない群と比較して最大等尺性足関節背屈筋力に有意な改善を示したと報告している [29]。また、前項で述べたように、筋損傷からの回復には、筋損傷後すぐに生じる筋衛星細胞などの筋前駆細胞の活性化が必要不可欠である [31]。この筋衛星細胞の活性化が、伸張刺激により促進されるという報告がある [32]。以上のことより、損傷筋に対して、筋衛星細胞が活性化する時期に伸張刺激を与えると、損傷からの回復を促進する可能性が考えられるが、いまだ定量的な評価で明確な証拠を示した報告はない。

このように筋損傷に対する効果的な治療が明確でない状況が続いている理由には、以下に述べる 2 つの解決すべき問題点があると考ええる。

I- 3. 筋損傷からの回復促進効果を明らかにするために解決すべき問題点

1 つ目の問題点は、常に一定の損傷を起こす再現性のある筋損傷モデルが作られていないということである。一般に、筋損傷の量は LC を行う角速度、関節運動の範囲、収縮回数によって異なるといわれている [33, 34]。しかし、これらの条件の違いによる筋損傷後の筋力の低下の違いを定量的に評価したり、再現性のある LC の方法を検証した報告はな

い。その理由には、これらの条件を高い精度で制御しながら LC を行ったり、筋力を測定する方法が確立していないことが挙げられる。また、そもそも、これまでの研究で用いられているモデルは、どれ程再現性の高いモデルを用いているのかを組織レベルで定量的に確認している報告がない。これまでの研究では Hematoxylin and eosin (H&E) 染色により、損傷か非損傷かを判断している場合が多い [28, 35-38]。しかし H&E 染色では、損傷初期において、非損傷筋線維と損傷筋線維とを明瞭に判定することが困難である。よって、これらの研究では、どのくらいの量の筋損傷をもつモデルを用いたのか十分な説明がない。藤本ら [47]は、H&E 染色で検出が困難な損傷初期の筋細胞を、Evans Blue Dye (EBD) によって確認することが可能であると報告しているが、その定量的評価法については報告がない。Hamer らは、LC の効果を研究するために、増加した筋膜透過性（細胞損傷の指標）のマーカーとして初めて EBD を導入した [37]。EBD 染色は、H&E 染色のような標準的な組織学的技術によって検出されない微妙な膜の損傷に対して非常に感受性が高いようであった。さらに、筋を EBD によって染色すると、損傷の有無が曖昧な筋線維はほとんどなく、分析を大いに容易にした [37]。したがって、EBD 陽性筋線維数を測定することにより、筋損傷を示す組織学的変化を定量化することができると考えた。

2 つ目の解決すべき問題点として、治療を行わない損傷筋がどれ程の量や速度で自然に回復しているかを、組織学的な視点から定量的に評価した報告がないということである。近年、筋の肥大や新生に関わるメカニズムの研究の発展に伴い、筋損傷からの回復過程で発現する分子や、活性化する分子が明らかになってきた。そして、それらの分子に対する免疫組織学的手法を用いて、筋の肥大や新生の過程を詳細に観察する研究も増えてきた [36, 39-42]。しかし、これらの研究は始まったばかりで、筋損傷からの回復過程を定量的にみたものはほとんどない。岡元ら [43] は、Bupivacaine によるラット前脛骨筋の筋損傷モデルに対して、細胞膜に特異的に存在する Dystrophin immunoreactivity (Dystrophin-ir) と、新生筋線維に特異的に発現する Developmental myosin heavy chain immunoreactivity (dMHC-ir) の蛍光免疫染色を用いることで、簡単で、客観的に筋損傷からの回復が評価できることを示した。しかし、この損傷モデルは、Bupivacaine を注入した領域の全ての筋線維が損傷を起こす。臨床でスポーツ時に頻発する肉離れ等に近い LC を用いた損傷筋モデルに対して、同様のことが起こるかは不明である。さらに、理学療法にとって、筋損傷からの回復効果をみるためには、組織学的側面だけでなく、最終的に日常生活動作に大きな影響を及ぼす、筋力という機能的側面からの変化を明らかにすることも重要である。一般的に筋力を測定する方法には、生体外へ取り出した筋に電気刺激を与えた時の張力を測定する方法が多い [18, 38, 44-47]。また、外科的手技により剖出した神経に電気刺激を与えることで、生体内の筋の等尺性収縮時のトルクを測定する方法が多い [48, 49]。しかし、これらの測定方法は生体に侵襲を加えるため、繰り返し何回も測定することが難しく、同一個体で筋力の回復という経時的な変化を観察することは不可能である。そこで、非侵襲的な表面電極を用いた筋力測定方法にて、これまでと同等のトルクの出力が得られるのか、そして経時的な変化を観察することができるのかを検証する必要がある。

以上のことより、本研究では、まず EBD を用いた定量的な筋損傷の評価を開発して LC の条件と組織学的な損傷との関係を調べ、表面電極による筋力測定方法を用いて LC の条件と筋力の関係を調べた。そして、これらの結果より、臨床的損傷に近い LC で再現性の

高い筋損傷モデルを作製した。

I-4. 筋損傷モデルに対する伸張刺激の回復促進効果を明らかにする

マウスの長指伸筋に対して LC を行う 2 週間前に伸張刺激を与えると、LC 3 日後の時点で伸張刺激を与えていない群と比較して筋力の低下が軽減し、さらに損傷筋線維数の割合が少なかったという報告がある [50]。また、4 週間の足部不動後、体重をかける前にラットヒラメ筋に伸張刺激を与えると、損傷筋線維数の割合が少なかったとの報告もある [51]。これらの結果は、筋に対する伸張刺激が、不動後の再荷重時に筋損傷を予防することにより Heat shock protein 25, 72 の発現量を低下させたと述べている。一方、筋損傷後の回復に及ぼす運動または伸張刺激の治療効果についても報告されている。Richard-Bulteau らは、Notexin 注射による損傷 3 日後よりトレッドミル運動を実施すると、運動を行っていない群よりも損傷 42 日後で筋湿重量や筋線維横断面積が完全な回復を認めた [28] と報告している。しかしながらこれらの研究で用いられた筋毒である Notexin による筋損傷モデルでは、運動時の肉離れ等に近いと考えられる LC による筋損傷に対する伸張刺激の治療効果を実証する研究としては不十分である。さらに、伸張刺激の治療効果におけるメカニズムはほとんど知られていない。そこで我々は、LC による筋損傷のモデルラットを用いた損傷からの回復過程における伸張刺激の影響を調べた。その中でも、我々は、dMHC-ir で標識された新たに形成された筋線維の組織学的発現に特別の注意を払った。筋機能については、筋に対する伸張刺激の効果を調べるために最大等尺性背屈トルクを測定することによって確認した。

以上、これまで述べてきたことより、我々は、作製した筋損傷モデルを用いて、損傷からの自然回復の過程における構造と筋力の変化を明らかにすることを目的とした。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を目的とした。

II. 方法

まず、LC の条件の違いと、筋損傷線維数や筋力との関係を調べ、できるだけ再現性の高い筋損傷モデルラットを作製するための LC 条件を決定した。次に、決定した再現性の高い LC 条件で作製した筋損傷モデルを用いて、筋損傷からの回復過程における構造と筋力の変化を調べた。そして、回復過程が明らかになった LC 条件による筋損傷モデルを用いて、伸張刺激が筋損傷からの回復を促進するかどうか、構造と筋力の変化で明らかにするとともに、そのメカニズムの一端を調べた。なお、本研究は名古屋大学動物実験委員会の承認（承認番号：022-016, 023-015, 024-030, 025-022）を得、学術研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針のもと行った。実験に当たり、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（文部科学省告示第 71 号平成 18 年 6 月 1 日）及び「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議 平成 18 年 6 月 1 日）

を遵守し、整備された飼育施設にて快適な環境下で飼育するように最大限の努力を払って実施した。さらに、以下に述べる飼育および苦痛の軽減、動物の処分等については以下の政令等にも配慮し、実験に用いる動物の生命を常に尊重して行った。

II- 1. 再現性の高い筋損傷モデル作製のための伸張性収縮条件の検証

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 を加えた (図 1)。LC 24 時間後に腹腔内へ EBD を投与し、48 時間後に前脛骨筋の採取を行い、組織標本を作製した。また、LC の前と筋採取の直前に、表面電極を用いた電気刺激による等尺性収縮における足関節の最大等尺性背屈トルクを測定した。そして、LC の角速度と EBD 陽性筋線維数や足関節最大等尺性背屈トルクとの関係を検討し、できるだけ再現性の高い筋損傷モデルラットを作製するための LC 条件を決定した。

【実験動物】

8週齢 Wistar系雄性ラット 65匹 (225-265g; SLC Inc., Shizuoka, Japan) を使用した。すべてのラットを、12時間毎に明暗を切り替えられる (明時間 08:00-20:00) 空調の管理されたクリーンルーム (室温 23°C) にて、1ケージにつき 2匹で飼育した。実験期間中は、餌とろ過されたクリーンウォーターとを好きな時に好きなだけ飲食できる環境で飼育した。また、実験後には、頸椎脱臼による安楽死処理を行った。

【筋損傷モデルの作製方法】

筋損傷モデルを作製するために、イソフルランガス吸入麻酔 (濃度 1.5%, 大日本製薬) 下にてラット (n=47) の左前脛骨筋に対して LC を加えた。LC は、その条件設定を正確に調整できる小動物用足関節運動装置 (NDH-1; Bio Research Center, Co., Ltd., Nagoya, Japan) を用いて、角速度を 50 deg/sec (n= 7), 100 deg/sec (n= 8), 200 deg/sec (n= 25), 400 deg/sec (n= 7) に設定して加えた。Train duration は、角速度の遅いものから 2000, 1100, 650, 425 msec とした。まずラットを側臥位で寝かせ、体幹と大腿部は装置の固定用ベッドに固定した (図1A)。次にラット外側からの観察で、腓骨外果から 3 mm 前方の位置に回転軸としてトルクセンサーの軸を合わせ、足部を足底板に固定した (図1B)。そして、1 cm² の表面電極を左下腿前外側面に貼り付け、電気刺激装置 (SEN-3301; Nihon Kohden Corp., Tokyo, Japan.) により定電圧の電気刺激 (electronic current 5 mA, stimulation frequency 100 Hz, duration 1 ms) を前脛骨筋に与えて収縮させた。電気刺激開始から 200 msec 後に装置のモーターが回転し、足関節を他動的に底屈方向へ運動させた。なお、LC 中の運動範囲を正確に測定できるように 3つの軸 (大腿軸: 第三転子と大腿外側顆を結ぶ線, 下腿軸: 腓骨頭と腓骨外果を結ぶ線, 足部軸: 第5中足骨に沿った線) を設定した。これらの軸を基本として、運動開始時の膝関節の成す角度は 90 deg, 足関節の成す背屈角度は 60 deg とし、そこから足関節を 90 deg 底屈させた。また、収縮回数は 10回を 1セットとして 5セット行った。収縮と収縮の間は 10 sec 休憩させ、セット間は 60 sec 休憩させた (図1C)。この運動中の足関節に加わるトルクは、トルクセンサーで測定した (図1C, D)。なお、対照群として、LC を加えていない Control 群 (n=18) を作製した。

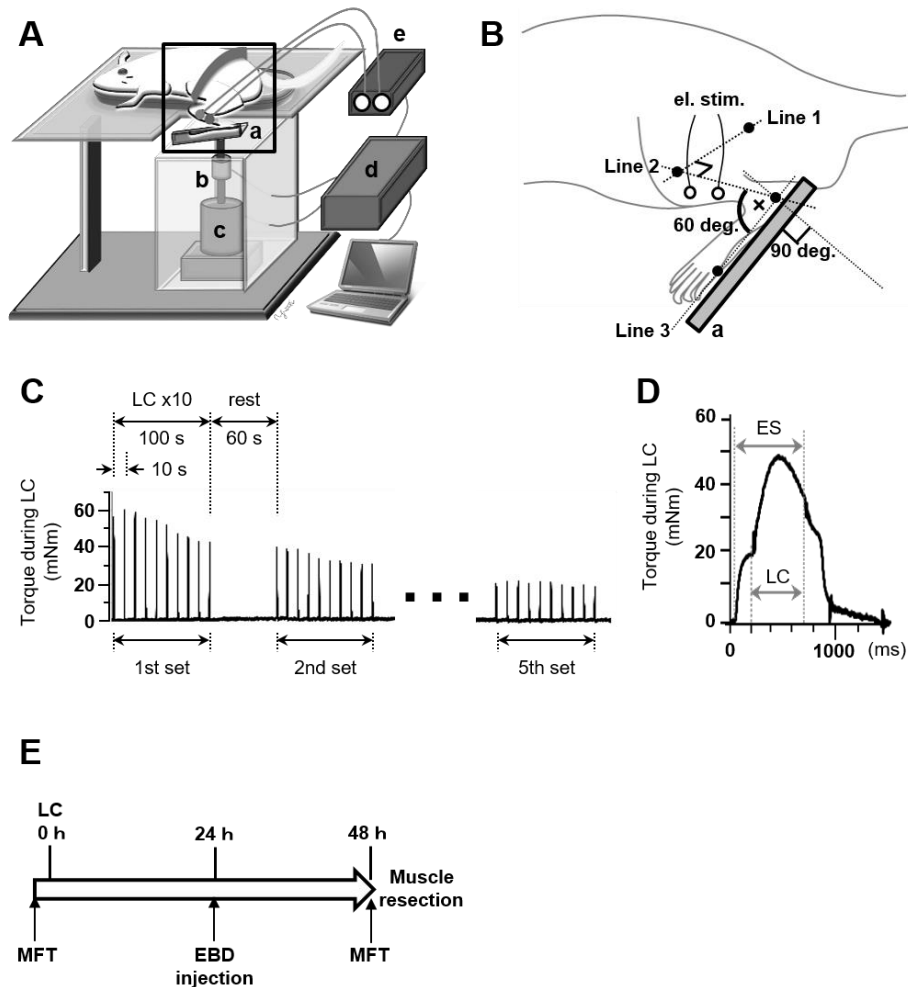


図 1. 小動物用足関節運動装置と本装置を用いた筋損傷モデルの作製方法.

(A) 小動物用足関節運動装置. ラットは本装置上に固定した. 足底板 (a) に取り付けられた足部の前脛骨筋へ表面電極を介して反復電気刺激を与え, 最大等尺性背屈トルクを誘発した. 足関節背屈筋は, 制御ボックス (d) を介してコンピューターからの信号によって駆動されるステッピングモーター (c) により伸張させた. 伸張は電気刺激 (e) による筋収縮と同期させながら繰り返し行うことにより LC を与えた. LC 中に発生するトルクはトルクセンサー (b) によって検出した. (B) A 中の四角で囲んだ領域の拡大図. LC を行う前の開始肢位 (足関節背屈 30deg, すなわち, Line 2 と Line 3 が交差する角度 60deg) を示す. Line 1: 第三転子と大腿外側上顆を結ぶ線, Line 2: 腓骨頭と外果を結ぶ線, Line 3: 外果と第 5 中足骨の骨頭を結ぶ線. 足関節回転軸 (x) は, 腓骨外果の前 3mm の位置とした. (C) 角速度 200 deg/sec で LC を行った時のトルク変化を例に, 繰り返し LC のタイミングと休息時間を示す. 各 LC は 10 秒ごとに 10 回繰り返し行い, これを 1 セットとした. セット間を 60 秒空けて合計 5 セット行った. (D) C の 1 セット 5 回目の LC 時に計測されたトルク曲線を示す. ES: 電気刺激の期間. ES 開始から足関節の底屈開始まで 200 ms 遅延させた. (E) 実験のタイムラインを示す. 筋機能テスト (Muscle Functional Test: MFT) として足関節の最大等尺性背屈トルクを測定後, 前脛骨筋の筋損傷ラットを作製した. LC の 24 時間後に EBD を投与し, LC 48 時間後に足関節の最大等尺性背屈トルクを測定し, 組織学的分析のために前脛骨筋を採取した.

【組織標本の作製と染色】

全てのラットの左前脛骨筋は、イソフルランガス吸入麻酔（濃度 1.5%，大日本製薬）下で採取した。採取した筋は、長軸に対し垂直方向に 3 等分に横切断し、中間部をコルクに載せた後、液体窒素にて冷却したイソペンタン内で急速凍結し、 -80°C 下で保存した。凍結した各試料は、クライオスタット (CM 1510, Leica) を用いて $10\ \mu\text{m}$ 厚の筋横断切片を作製した。

損傷筋線維を同定する目的のために、角速度 50 deg/sec 群 (n= 7), 100 deg/sec 群 (n= 8), 200 deg/sec 群 (n= 19), 400 deg/sec 群 (n= 7) の前脛骨筋については、LC 24 時間後にラット腹腔内に 1% EBD (1% Body Weight, 14220 - 52; 関東化学株式会社, Tokyo, Japan) in phosphate buffered saline (PBS : pH 7.4) を投与し、LC 48 時間後に採取した (図 1E) [37]。本目的のために Control 群 (n=6) にも同時間に同様の処置をした。EBD は、血中の Albumin に結合し、炎症領域で細胞膜が損傷している筋線維内に流入する [37]。EBD シグナルは蛍光顕微鏡の 568 nm 波長によって検出される。よって、Albumin に結合した EBD を指標に、損傷している筋線維を判定することができる (図 4)。本処置を実施後作製した筋横断切片に対して、以下の手順で、Laminin の蛍光免疫染色と核染色を施した。まず、4% Paraformaldehyde で室温にて 15 分間固定し、その後、PBS で洗浄した。非特異的な反応を防ぐため、1% Albumin from bovine serum (SIGMA) に 4°C で 6 時間以上浸した。Rabbit polyclonal anti-Laminin (1:20000, L9393; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) に 37°C で 1 時間浸した。その後、PBS で洗浄し、Alexa Fluor® 568 -labeled goat anti-rabbit IgG (1:400, A11036; Molecular Probes, Rockville, MD) に 37°C で 1 時間浸した。その後、核を観察するために、4',6-Diamidino-2- phenylindole (DAPI, 1:10000, D - 9564 ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を用いて視覚化して免疫標識化した。

また、筋損傷時に損傷する筋線維タイプを検証するために、角速度 200 deg/sec 群の LC 3 日後のラット (n=6) と Control 群 (n=12) の前脛骨筋の筋横断切片を作製した。このうち、角速度 200 deg/sec 群の LC 3 日後のラット (n=6) と Control 群 (n=6) には、LC 後に損傷により消失した筋線維の大きさを把握するために、筋線維横断面積の測定を行った。測定は以下の手順で、筋線維膜に局在する Dystrophin-ir の蛍光免疫染色と核染色を施して行った。まず、4% Paraformaldehyde で室温にて、15 分間固定し、PBS で洗浄した。その後、非特異的な反応を防ぐため、1% Albumin from bovine serum (SIGMA) に 4°C で 6 時間以上浸した。rabbit polyclonal anti-dystrophin (1:400, Santa Cruz Biotech) に 37°C で 1 時間浸した。その後、PBS で洗浄し、Alexa Fluor® 568-labeled goat anti-rabbit IgG (1:400, Molecular Probes) に 37°C で 1 時間浸した。また、核を観察するために DAPI (1:10000, SIGMA) 染色を行った。残りの Control 群 (n=6) には、本ラットの前脛骨筋の各筋線維タイプの筋線維横断面積を調べた。測定は以下の手順で、各 myosin heavy chain の蛍光免疫染色と核染色を施して行った。myosin heavy chain (MHC) slow monoclonal primary antibody (1:40, VP-M67 ; Vector Laboratories, Burlingame, CA), mouse anti-MHC IIa mouse monoclonal primary antibody (1:40, SC-71 ; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) , Iowa , IA), anti-MHC IIb mouse monoclonal primary antibody (1:40, BF-F3 ; DSHB) を用いてそれぞれ免疫染色し、Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG (1:400, A11036 ; Molecular Probes), Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (1:400, A11029 ; Molecular Probes), Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgM

(1:400, A21042 ; Molecular Probes) を用いて視覚化して免疫標識化した．同時にこれらの切片には, anti-dystrophin rabbit polyclonal primary antibody (1:400, SC-15376 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)で蛍光免疫染色を行った．そして, すべての切片を洗浄後, 90 %グリセロール in PBS で包埋した．

【損傷筋線維数の測定方法】

損傷筋線維を同定するために作製した切片を用いた筋横断切片全体をバーチャルスライドスキャナ (Nano Zoomer RS 2.0, 浜松ホトニクス, Shizuoka, Japan) で観察, 撮影した．Image-J 画像解析ソフト (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて, 抗 Laminin 抗体によって細胞膜に沿って標識された領域内が EBD で標識されている筋線維を, 筋線維中の色素の量とは無関係に「陽性」と判断した．筋横断切片に存在する筋線維数に対する EBD 陽性筋線維数を, ImageJ ソフトウェアによる蛍光画像から測定した．

【足関節の最大等尺性背屈トルクの測定方法】

筋の機能的な評価として, 足関節の最大等尺性背屈トルクの測定を行った．この測定方法には, 腓骨神経を侵襲的に剖出して, 神経に直接双極電極 (直接電極) を引っかけて電気刺激を与えて実施する方法が多い．しかし, 本研究では経時的なトルク変化を検証したいという目標があった．そこで, 表面電極による前脛骨筋への非侵襲的な電気刺激で最大等尺性背屈トルクの測定をし, 侵襲的測定によるトルク値との比較をした．足関節最大等尺性背屈トルクは, LC を実施する前と, LC を実施した 48 時間後に測定した．イソフルランガス吸入麻酔 (濃度 1.5%, 大日本製薬) 下のラットを, 側臥位で体幹と大腿部を足関節運動装置の固定用ベッドに固定した (図 1). ラット外側からの観察で, 腓骨外果から 3 mm 前方の位置に回転軸としてトルクセンサーの軸を合わせ, 足部を足底板に固定した．なお, 測定肢位は, 膝関節は, 大腿骨と脛骨の成す角度が 90 deg, 足関節は, 脛骨と第 5 中足骨の成す角度が 90 deg とした．そして, 1 cm² の表面電極を左下腿前外側面に貼り付け, 前脛骨筋に経皮的に定電圧の電気刺激 (electronic current 5 mA, stimulation frequency 100 Hz, duration 1 ms, train duration 650 ms) を与えて等尺性収縮させた．この時の足関節の最大等尺性背屈トルクを, トルクセンサーで測定した．

【筋損傷時に損傷する筋線維タイプの検証】

筋損傷時に損傷する筋線維タイプを検証するために作製した筋横断切片のうち, Dystrophin 免疫染色及び DAPI 染色を視覚化した LC 群及び Control 群の横断切片 (LC 群: n=6, Control 群: n=6) における全ての筋線維の横断面積を Image-J 画像解析ソフトを用いて測定しそのヒストグラムを作成した．この 2つのヒストグラムから LC により消失した筋線維横断面積を調べた．次に, Control 群 (n=6) の切片を用いて, 3つの筋線維タイプの MHC (I 型, IIa 型, IIb 型) で染色した筋線維タイプごとの筋線維横断面積を測定した．この 2つの結果を用いて, LC 後に損傷のため消失した筋線維がどの筋線維タイプに属しているのかを検証した．

なお, それぞれの筋線維の横断面積は, Image-J 画像解析ソフト (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて測定した．

【統計処理】

結果は mean \pm SEM で表した。LC 48 時間後の足関節最大等尺性背屈トルクと EBD 陽性筋線維数との相関係数を算出した。また、LC の角速度と足関節最大等尺性背屈トルクとの関係、LC の角速度と足関節 EBD 陽性筋線維数との関係については、一元配置分散分析後、対比較のための Tukey's post hoc test によって比較した。全 LC における LC 48 時間後の足関節最大等尺性背屈トルクと EBD 陽性線維数との関係、LC の角速度と LC 中のピークトルクとの関係を、Spearman 検定によって分析した。LC の角速度と筋線維横断面積との関係を、一元配置反復測定分散分析後、Sidak の多重比較検定によって分析した。いずれの統計手法も有意水準は 5%未満とした。

II-2. 筋損傷からの回復過程における組織及び筋力の変化

筋損傷からの回復過程における組織や筋力の変化を明らかにするために、角速度 200 deg/sec で LC を加え、LC 3, 5, 7, 10, 14 日後に足関節最大等尺性背屈トルクの測定を行い、各日にちにおいて前脛骨筋の採取を行った。そして、Dystrophin と dMHC の蛍光免疫染色を施し、回復過程における組織学的評価を行った。

【実験動物と筋損傷モデルの作製方法】

対象は、8週齢 Wistar 系雄性ラット 44匹 (232-265g ; SLC Inc., Shizuoka, Japan) を用いた。この内、32匹は LC を加えた LC 群、12匹は Control 群とした。II-1 で示した方法で、角速度 200 deg/sec、足関節運動範囲 90 deg、収縮回数 10回 \times 5セットの LC を行い、筋損傷モデルを作製した。そして、LC 3, 5, 7, 10, 14日後 (n= 6, 6, 6, 7, 7) に筋を採取する 5群に分けた。また、Control 群として、LC をしていない自然飼育下の同種ラット 8週齢 (n= 6)、10週齢 (n= 6) を用いた。すべてのラットは、12時間毎に明暗を切り替えられ (明時間 08:00-20:00)、空調管理されたクリーンルーム (室温 23°C) にて 1ケージにつき 2匹で飼育された。実験期間中は、濾過されたクリーンウォーターとエサは好きな時に好きなだけ飲食できるようにした。また、実験後には、頸椎脱臼による安楽死を行った。

【組織標本の作製】

イソフルランガス吸入麻酔 (濃度 1.5%, 大日本製薬) 下で、全てのラットから前脛骨筋を採取した。採取した筋を長軸方向に対し垂直に 3等分に切断し、中間部をコルクに載せて固定し、液体窒素にて冷却したイソペンタン内で急速凍結し、-80 °C 下で保存した。急速凍結させた後、クライオスタット (CM 1510, Leica) を用いて 5 μ m 厚の横断切片を作製した。そして、これらの横断切片に対し、以下の手順で、筋線維膜に局在する Dystrophin、及び新生筋線維の指標となる dMHC の蛍光免疫染色と核染色の三重染色を施した。まず、4% Paraformaldehyde で室温にて、15分間固定し、PBS で洗浄した。その後、非特異的な反応を防ぐため、1% Albumin from bovine serum (SIGMA) に 4 °C で 6時間以上浸した。Mouse monoclonal anti-developmental myosin heavy chain (1:100, Vector Laboratories) と、rabbit polyclonal anti-dystrophin (1:400, Santa Cruz Biotech) に 37 °C で 1時間浸した。その

後, PBSで洗浄し, Alexa Fluor® 488-labeled goat anti-mouse IgG (1:400, Molecular Probes)と, Alexa Fluor® 568-labeled goat anti-rabbit IgG (1:400, Molecular Probes) に 37°Cで 1時間浸した. また, 核を観察するために DAPI (1:10000, SIGMA) 染色を行った.

【足関節最大等尺性背屈トルク測定方法】

LC 14日後の群では, LC 2, 3, 5, 7, 14日後に, II-1と同様の方法で, 足関節最大等尺性背屈トルクを測定し, 筋力の回復過程の指標とした. なお, その他の群も LC 14日後の群と条件を統一するために, 筋採取までの間, 同じ日程で足関節最大等尺性背屈トルク測定を行った.

【損傷からの回復における組織学的評価】

LC 3, 5, 7, 10, 14日後に採取し, 蛍光免疫染色を施した筋横断切片を用いて, 筋線維横断面積を測定した. まず筋横断切片全体を蛍光顕微鏡 (Nano Zoomer RS 2.0; Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) で観察, 撮影した. Dystrophin 蛍光免疫染色像で, Dystrophin が明瞭な輪として観察される筋線維を Dystrophin-ir 陽性筋線維とした. Dystrophin-ir 陽性筋線維のうちdMHC-ir 陽性のものをdMHC-ir 陽性筋線維とした. 画像解析ソフトにて, 筋腹横断面における前脛骨筋の浅層部, 中間部, 深層部から, それぞれ一辺が0.5 mmの正方形の範囲を抽出した (計 0.75 mm²). 抽出した正方形に含まれる Dystrophin-ir 陽性筋線維の横断面積と数及び dMHC-ir 陽性筋線維の横断面積と数を測定した.

【統計処理】

結果は mean ± SEM によって表した. LC 後の日数と筋線維横断面積との関係, LC 後の日数と足関節最大等尺性背屈トルクとの関係を, 一元配置分散分析後, 対比較のための Tukey's post hoc test によって比較した. また, LC 前の LC 群と Control 群との比較, LC 14日群と Control 群との比較には t 検定を用いた. なお, いずれの統計手法も有意水準は 5% 未満とした.

II-3. 伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果

伸張刺激による筋損傷からの回復過程における構造や筋力の変化を明らかにするために, 角速度 200 deg/sec で, LC を行い, LC を行った 24 時間後に伸張刺激を与えた. LC から 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21 日後に足関節最大等尺性背屈トルクの測定を行い, 各日にちにおいて前脛骨筋の採取を行った. そして, Dystrophin と dMHC の蛍光免疫染色を施し, 伸張刺激における回復過程の組織学的評価を行った.

【実験動物と筋損傷モデルの作製方法】

対象は, 8週齢 Wistar 系雄性ラット 114匹 (225-265g; SLC Inc., Shizuoka, Japan) を用いた. II-1 で示した方法で, 角速度 200 deg/sec, 足関節運動範囲 90 deg, 収縮回数 10回 × 5セットの LCを加え, 筋損傷モデルを作製した. そして, LC 21日後に筋を採取した. すべてのラットは, 12時間毎に明暗を切り替えられ (明時間 08:00–20:00), 空調管理されたクリーンルーム (室温23°C) にて 1ケージにつき 2匹で飼育された. 実験期間中は, ろ

過されたクリーンウォーターとエサは好きな時に好きなだけ飲食できるようにした。また、実験後には、頸椎脱臼による安楽死をされた。

【伸張刺激の方法】

イソフルランガス吸入麻酔（濃度 1.5%，大日本製薬）下のラット（n=70）を，側臥位で体幹と大腿部を足関節運動装置の固定用ベッドに固定した（図 2）。LC+伸張刺激群（n=11）には，LC を加えた時と同じ小動物用足関節運動装置（NDH-1; Bio Research Center, Co., Ltd.）を用いて，LC 1 日後に前脛骨筋を含む足関節背屈筋群の反復伸張刺激を 15 分間与えた。伸張刺激時の運動範囲を正確に定義できるように，伸張開始肢位は，LC で設定した 3 軸（大腿骨軸，下腿軸，足部の軸）を用いて，膝関節と足関節とを 90 deg に設定した。足関節運動中の回転軸は，腓骨外果より前 3 mm の位置とした。伸張刺激は足関節を底屈方向へ 50 deg/sec の速度で行った。その後，3 mNm の強度に達した時点でそのトルク値で 5 秒間保持し，続いて 5 秒間の休止期間をおいて繰り返し行った（図 2D）。伸張刺激の強度は，足関節を他動的に背屈させた時のトルク（図 2E）の変化を参考に決定した。すなわち，他動的伸張では足関節のトルクが 3 mNm を越えると，トルクの急激な増加が観察され，腱，靭帯及び関節のような筋以外の組織の硬度や伸張反射の関与が考えられたため，本トルク値を設定した。なお，LC も伸張刺激も行わない Control 群（n=12）と，LC を行った後伸張刺激を行わない LC alone 群（n=12）とを設定した。また，異なる開始時期や頻度による回復促進効果の違いを確認するために，LC 直後（n=15）に 1 回のみ伸張刺激を与える実験，LC 3~20 日後に毎日伸張刺激（n=6）を与える実験，LC3~20 日後に隔日で伸張刺激（n=14）を与える実験も行った。

【組織標本の作製】

横断切片の作製は，II-2 と同様に横断切片に対し，筋線維膜に局在する Dystrophin，及び新生筋線維の指標となる dMHC の蛍光免疫染色と核染色の三重染色を施した。

【足関節最大等尺性背屈トルク測定方法】

II-1 と同様の方法で，LC+伸張刺激群の LC 2，3，5，7，14，18，21 日後の足関節最大等尺性背屈トルクを測定し，LC alone 群や Control 群と比較し，筋力の回復過程の指標とした。

【組織学的評価】

組織標本作製後，蛍光免疫染色を施した筋横断切片全体を，蛍光顕微鏡（Nano Zoomer RS 2.0; Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan）で観察，撮影した。Dystrophin 蛍光免疫染色像で，Dystrophin が明瞭な輪として観察される筋線維のうち，dMHC-ir 陽性のものを dMHC-ir 陽性筋線維とした。画像解析ソフトにて，筋腹横断面における前脛骨筋の浅層部，中間部，深層部から，それぞれ一辺が 0.5 mm の正方形の範囲を抽出した（計 0.75 mm²）。抽出した正方形に含まれる Dystrophin が明瞭な輪として観察される筋線維の横断面積と数及び dMHC-ir 陽性筋線維の横断面積と数を測定した。

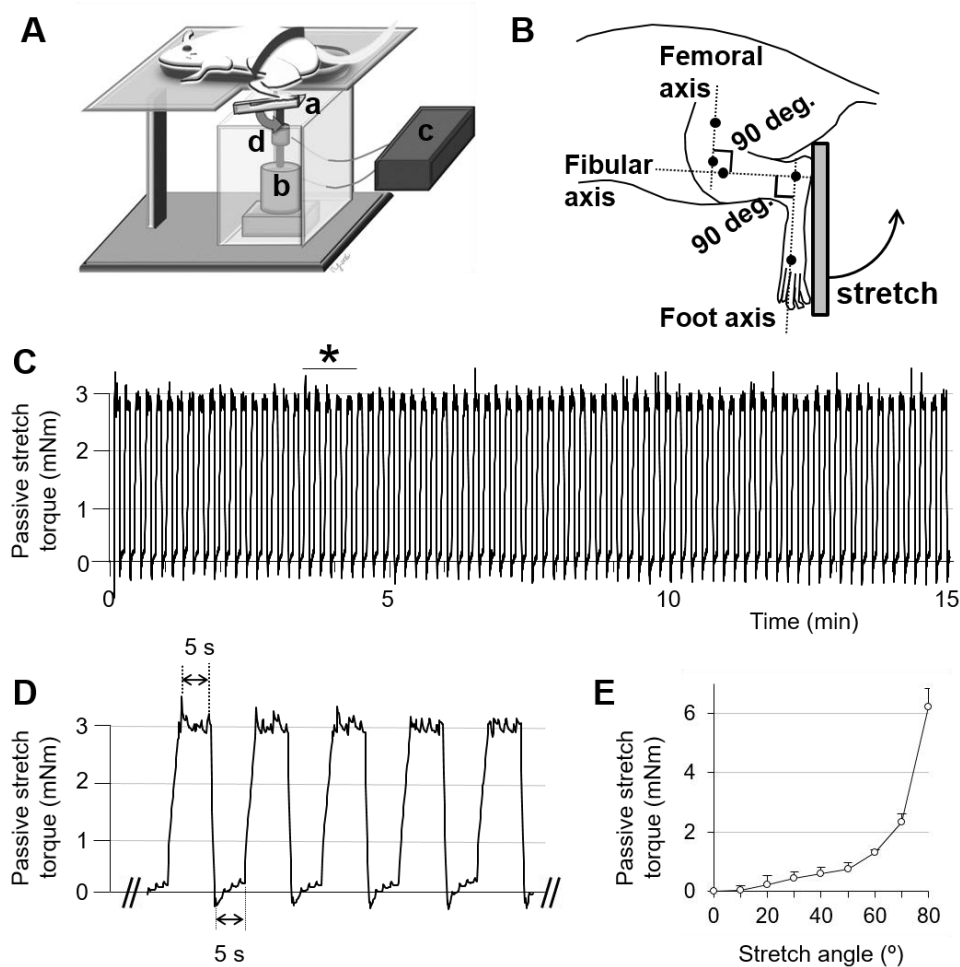


図 2. 小動物用足関節運動装置と本装置を用いた他動的な伸張刺激の方法.

(A) 小動物用足関節運動装置. 足底板 (a), ステッピングモーター (b), コントロールボックス (c), トルクセンサー (d) から構成されている. (B) 他動的伸張刺激開始肢位および等尺性トルク測定肢位. Femoral axis: 第三転子と大腿外側上顆を結ぶ線, Fibular axis: 腓骨頭と外果を結ぶ線, Foot axis: 外果と第 5 中足骨頭を結ぶ線. 開始肢位はそれぞれの軸の交点が 90° となるように設定. (C) 3mNm で 15 分間の伸張刺激を与えたときに測定した足関節トルク値. (D) C の * における 5 回の他動的な伸張刺激時のトルク曲線の拡大画像. 他動的な伸張刺激は 50 deg/sec の角速度で 5 秒間, ついで 5 秒間の休止期間を繰り返して行った. (E) 角速度 50 deg/sec で足関節底屈角度を増やしたときに発生するトルクの変化を示した ($n=3$).

【統計処理】

結果は $\text{mean} \pm \text{SEM}$ によって表した. LC 前の足関節最大等尺性背屈トルクに対する LC 後各日数のトルクの割合の変化を, 二元配置反復測定分散分析後, 対比較のための Tukey's post hoc test によって比較した. 各群間における LC 21 日後の筋線維横断面積を, 一元配置分散分析後, Tukey's post hoc test によって比較した. LC alone 群と LC+伸張刺激群にお

ける dMHC-ir 筋線維の割合を Fisher の正確確率検定を用いて分析した。なお、いずれの統計手法も有意水準は 5%未満とした。

III. 結果

III-1. 直接電極と表面電極との間の足関節最大等尺性背屈トルクの違い

足関節の最大等尺性背屈トルクが電気刺激の与え方により異なるかどうかを検証した。直接電極 / 表面電極を比較した。その結果、直接電極 / 表面電極は、10Hz 時 $3.8 \pm 1.1 \text{mNm} / 2.3 \pm 0.4 \text{mNm}$, 20Hz 時 $4.5 \pm 0.8 \text{mNm} / 3.2 \pm 0.5 \text{mNm}$, 30Hz 時 $6.3 \pm 1.7 \text{mNm} / 5.0 \pm 0.7 \text{mNm}$, 40Hz 時 $9.3 \pm 1.7 \text{mNm} / 6.6 \pm 1.4 \text{mNm}$, 50Hz 時 $13.1 \pm 2.0 \text{mNm} / 12.0 \pm 1.6 \text{mNm}$, 60Hz 時 $16.9 \pm 1.4 \text{mNm} / 19.6 \pm 1.4 \text{mNm}$, 80Hz 時 $21.0 \pm 1.2 \text{mNm} / 25.1 \pm 1.1 \text{mNm}$, 100Hz 時 $22.4 \pm 1.2 \text{mNm} / 26.9 \pm 1.1 \text{mNm}$, 140Hz 時 $24.2 \pm 1.3 \text{mNm} / 28.1 \pm 1.2 \text{mNm}$, 180Hz 時 $24.3 \pm 1.1 \text{mNm} / 29.1 \pm 1.3 \text{mNm}$ となり、両群間に有意差は認められなかった (図 3)。そこで本研究では、経時的なトルク変化を検証するのに都合が良い、表面電極による非侵襲的な電気刺激で最大等尺性背屈トルクの測定を行うこととした。

III-2. 再現性の高い筋損傷モデルの作製のための伸張性収縮刺激条件

【角速度と EBD 陽性筋線維数の関係】

LC の伸張速度と筋損傷の重症度との関係を調べるために、ラット足関節背屈筋群の最大収縮をさせながら、それぞれ異なる角速度 (50, 100, 200, 400 deg/sec) で足関節を他動的に底屈させ LC を加えた。LC 24 時間後に、腹腔内へ EBD 投与し、LC 48 時間後に前脛骨筋を採取した。採取した前脛骨筋の横切断切片を抗 Laminin 抗体を用いて免疫蛍光標識を行い、EBD 陽性筋線維数の分析を行った。その結果、EBD 陽性線維は LC の伸張速度が速いほど増加するように観察された (図 4)。また、EBD 陽性筋線維は比較的大きな直径の筋線維に多く観察された。対照的に、LC を加えていないラットの前脛骨筋筋腹横断面では、EBD 陽性筋線維は見られなかった (図 5)。LC 48 時間後の前脛骨筋筋腹横断面中にある EBD 陽性筋線維数は、角速度が速くなるほど多く、角速度 50 deg/sec (31.9 ± 14.0 個) または 100 deg/sec (598.8 ± 241.4 個) と比較して 200 deg/sec (1677.2 ± 133.2 個, $n = 19$) または 400 deg/sec (2252.6 ± 285.8 個, $n = 7$) において有意に多かった (図 6A, $p < 0.05$, 一元配置分散分析後, Tukey's post hoc test)。角速度 200 deg/sec の LC 48 時間後のラット前脛骨筋筋腹横断面全体で計測した筋線維の総数は 11487 個であった。また、前脛骨筋の筋腹全体の中で全ての筋線維横断面積のうち、EBD 陽性筋線維が占める割合もまた角速度が速いと高かった (50 deg/sec : $1.8\% \pm 0.1\%$, $n = 7$; 100 deg/sec : $10.4\% \pm 1.3\%$, $n = 8$; 200 deg/sec : $25.0\% \pm 0.4\%$, $n = 19$; 400 deg/sec : $37.0\% \pm 1.6\%$, $n = 7$; 図 6B)。さらに、前脛骨筋の総湿重量及び筋腹横断面積は LC の角速度が速くなると有意に増大した (表 1)。

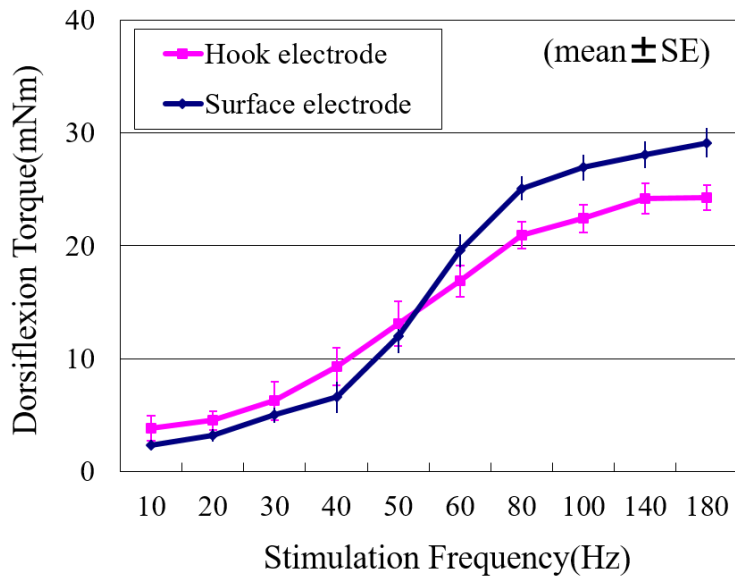


図 3. 電気刺激方法の違いによる足関節最大等尺性背屈トルクと刺激周波数の関係.

侵襲的に腓骨神経を剖出し、神経に直接双極電極を引っかけて電気刺激を与える方法(紫)方法と、非侵襲的に経皮的に下腿前面に表面電極を貼り付けて電気刺激を与える方法(青)とを比較した。両刺激間で、有意な差はなかった。データは mean \pm SEM で示す ($p < 0.05$, 二元配置反復測定分散分析後, Tukey's post hoc test).

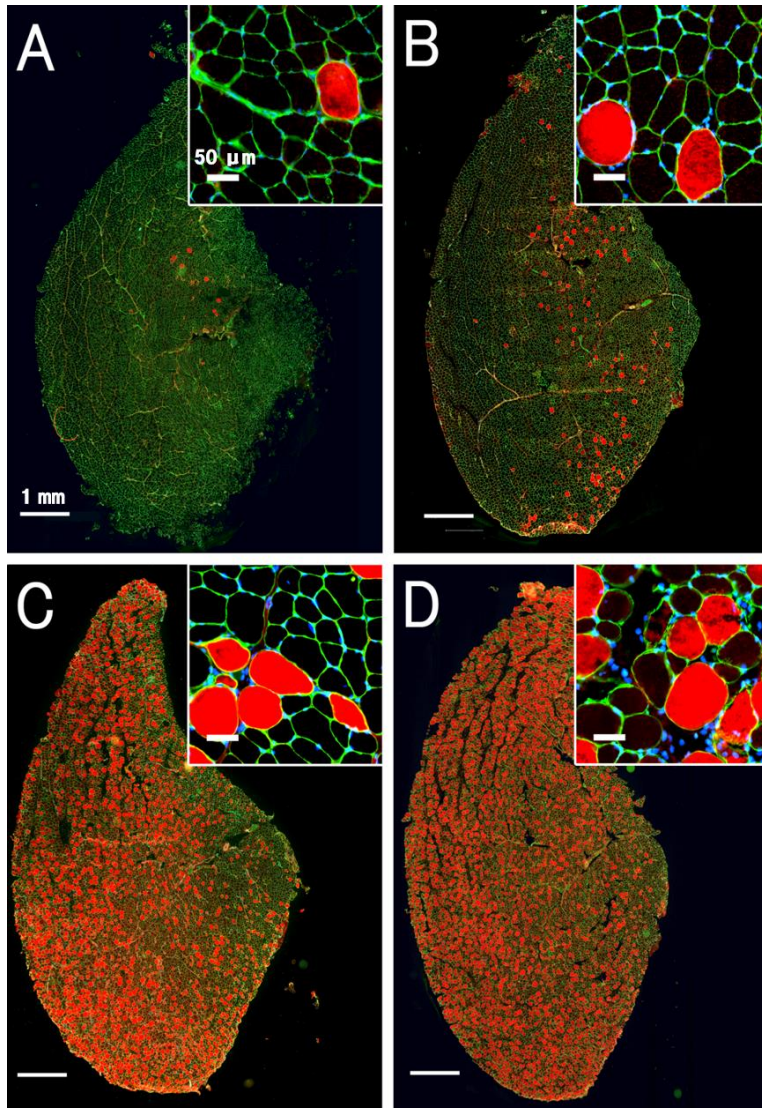


図 4. 各角速度における前脛骨筋横断切片全体の免疫組織像.

LC 時の異なる角速度 (50 deg/sec (A), 100 deg/sec (B), 200 deg/sec (C), 400 deg/sec (D))における, LC 2日後の前脛骨筋筋腹横断面全体の三重免疫組織像の代表例である。赤は EBD 陽性の筋線維, 緑は抗 Laminin 抗体で染色された筋線維基底膜を示す。青色は DAPI 染色による核を示す。各写真の右上の写真はその一部の拡大像である。EBD 陽性筋線維数は, LC の角速度が速くなると増加する。

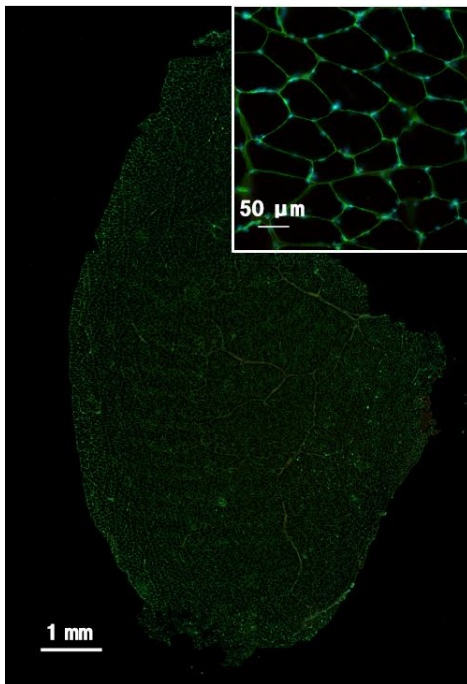


図 5. LC を加えていない前脛骨筋横断切片全体の免疫組織像.

EBD 陽性の筋線維を赤で, Laminin-ir で染色された筋線維基底膜を緑で染色した. 青: DAPI 染色による核. 右上の写真はその一部の拡大像である. EBD 投与 1 日後の筋では, EBD で染色された筋線維は確認できなかった.

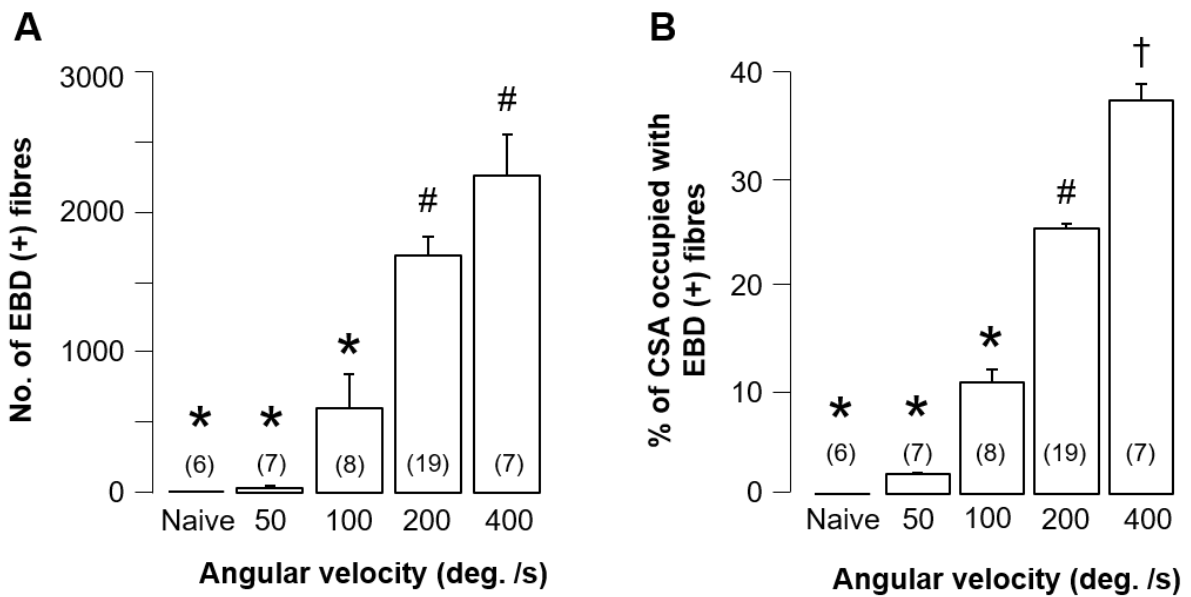


図 6. LC 時の角速度と EBD 陽性筋線維の数 (A) 及びその割合 (B) の関係.

(A) 各 LC 角速度と LC2 日後の前脛骨筋の EBD 陽性筋線維数を示す. (B) 筋腹横断面の筋線維数中に EBD 陽性線維が占める割合を示す. ()内の数字はサンプル個体数を示す. データは mean \pm SEM で示す. 記号が異なる Bar は有意差があることを示す ($p < 0.05$, 一元配置分散分析後, Tukey's post hoc test).

【伸張性収縮によって損傷する筋線維のタイプ】

LC 後の組織学的所見で、筋線維横断面積が大きな筋線維に EBD 陽性が多く観察され、筋線維横断面積の大きな筋線維が LC によって優先的に損傷されることを示唆していると考えた。そこで我々は、200 deg/sec で LC を加えた LC 群 (n=6) 及び LC を加えていない Control 群 (n=6) の筋線維横断面積の分布を測定した (図 7A, B)。その結果、筋線維横断面積の分布は LC によって変化し、特に筋線維横断面積 $> 3200\mu\text{m}^2$ で顕著であった。二元配置反復測定分散分析において、LC の角速度における筋線維横断面積の微分感度が一致して、筋線維横断面積間における相互作用があることを ($F [15, 150] = 9.08, P < 0.0001$) 明らかにした。また、Control 群と LC 群とにおける筋線維横断面積の分布 (ばらつき) には有意差は認められなかったが ($F [1, 10] = 0.14, P > 0.05$)、筋線維横断面積が $1200\sim 1600\mu\text{m}^2$, $3600\sim 4000\mu\text{m}^2$, $4000\sim 4400\mu\text{m}^2$, $4400\sim 4800\mu\text{m}^2$ の範囲にある筋線維においては 2 群間に明らかな違いがあった ($P < 0.05\sim 0.0001$, Sidak test, 図 7C)。優先的に損傷した筋線維横断面積の範囲の概算を得るために、Control 群の筋線維横断面積と筋線維タイプとの関係を調べた。I 型線維 ($1212.5 \pm 141.3\mu\text{m}^2, n = 6$, 図 7D) 及び IIa 型線維 ($1327.5 \pm 146.5\mu\text{m}^2, n = 6$, 図 7E) の筋線維横断面積は、IIb 型線維 ($3238.1 \pm 231.6\mu\text{m}^2, n = 6$, 図 7F) の 1/2 未満であった ($P < 0.05$, 一元配置分散分析後, Tukey's post hoc test, 図 7G)。すなわち、筋線維横断面積が $3200\mu\text{m}^2$ より大きい筋線維が LC により減少したため、LC は IIb 型線維を優先的に損傷すると考えた。

【角速度と足関節最大等尺性背屈トルクの関係】

LC による筋損傷に伴い、LC 2 日後に足関節最大等尺性背屈トルクの低下が認められた (図 8A)。LC 2 日後の足関節最大等尺性背屈トルクは LC 前 ($26.0 \pm 0.4\text{ mNm}, n = 41$) と比較して有意に小さく、LC 時の角速度が速いほど低かった (50 deg/sec: $22.7 \pm 0.5\text{ mNm}, n = 7$, LC 前から 13% 低下; 100 deg/sec: $15.7 \pm 1.4\text{ mNm}, n = 8$, LC 前から 40% 低下; 200 deg/sec: $9.9 \pm 0.5\text{ mNm}, n = 19$; LC 前から 62% 低下; 400 deg/sec: $8.4 \pm 1.1\text{ mNm}, n = 7$; LC 前から 68% 低下)。しかし、400 deg/sec における足関節最大等尺性背屈トルクは $8.4 \pm 2.9\text{ mNm} (n = 7)$ であり、200 deg/sec との間で有意な差は認められなかった。

LC 中のピークトルクは LC の角速度が速いほど大きくなり、LC の角速度と LC 中のピークトルクの間に相関が認められた ($n = 41$, Spearman $r = 0.382, P < 0.05$, 表 2)。ピークトルクは角速度が 50 deg/sec と 400 deg/sec との間で有意に異なっていた (一元配置分散分析後, Tukey's post hoc test, $p < 0.05$, 表 2)。

【EBD 陽性筋線維数と足関節最大等尺性背屈トルクの関係】

LC を行った全てのラット ($n = 41$) において、LC 48 時間後の足関節最大等尺性背屈トルクと前脛骨筋筋腹横断面中の EBD 陽性筋線維数の関係を調べた (図 8B)。その結果、EBD 陽性筋線維数が増加すると足関節最大等尺性背屈トルクが低下し、強い負の相関が認められた (Spearman $r = -0.85, p < 0.0001$)。

表 1. LC 2 日後の筋湿重量と筋腹横断面積.

| | Naive | Angular velocity (deg./s) | | | |
|-------------------------------------|----------------|---------------------------|----------------|------------------|------------------|
| | | 50 | 100 | 200 | 400 |
| Muscle wet weight (mg) | 471.8±19.1 (6) | 431.8±9.0 (7) | 479.4±12.5 (8) | 494.0±11.0 (19)* | 521.6±17.8 (7)** |
| Muscle belly CSA (mm ²) | 33.2±2.2 (6) | 32.1±0.8 (7) | 37.9±1.6 (8) | 38.1±1.1 (19)* | 43.2±1.7 (7)**** |

データは mean ± SEM として示す()内の数字はサンプル個体数を示す). LC の角速度が速くなるにしたがって, 前脛骨筋の筋湿重量と筋腹横断面積は増加した. ****p < 0.01 versus naive, *p < 0.05 and **p < 0.01 versus 50 deg/sec, 一元配置分散分析後 Tukey's post hoc test.

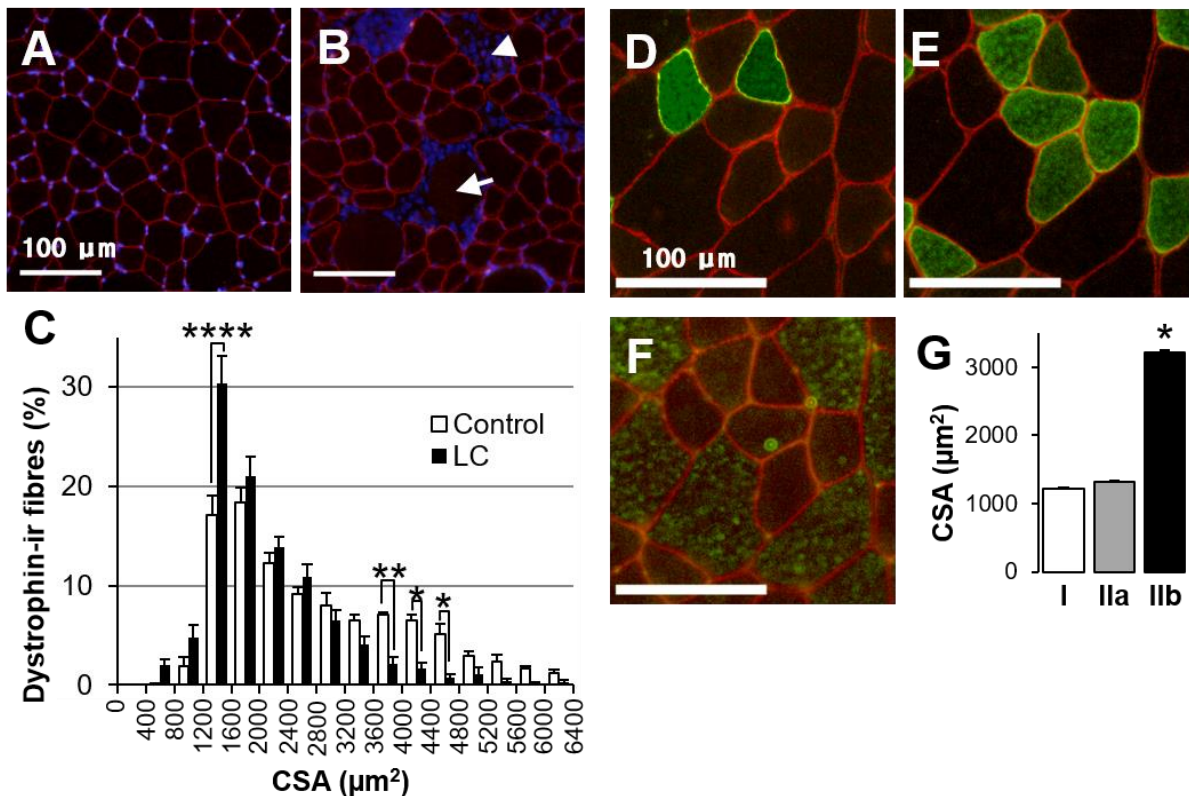


図 7. LC によって損傷される筋線維タイプ.

A は LC を行っていない Control 群の前脛骨筋横断面の免疫組織像, B は角速度 200deg/sec で LC 3 日後の前脛骨筋横断面の免疫組織像. 赤: Dystrophin-ir を含む筋線維膜 (Dystrophin-ir). 青: DAPI 染色による核. 矢印: Dystrophin-ir のない壊死線維. 矢頭: 核の集積. (C) Dystrophin-ir を含む筋線維膜が明瞭に観察される筋線維 (赤) の数をビン幅 400 μm² の筋線維横断面積で表したヒストグラム. Open bar: Control (n = 6), Filled bar: LC (n = 6). *p < 0.05 ** p < 0.01 **** p < 0.0001, 一元配置分散分析後に Tukey's post hoc test. (D-F) Control 群のラット前脛骨筋切片における異なる筋線維タイプの免疫組織像. 赤: Dystrophin-ir を含む筋線維膜. 緑: D は I 型 MHC 陽性筋線維, E は IIa 型 MHC 陽性筋線維, F は IIb 型 MHC 陽性筋線維である. (G) Control 群における各筋線維タイプの筋線維横断面積. IIb 型線維 (n=6) は I 型線維 (n=6) や IIa 型線維 (n=6) よりも有意に大きかった (*p < 0.05, 一元配置分散分析後に Tukey's post hoc test).

III-3. 筋損傷からの回復過程における組織及び最大等尺性背屈トルクの変化

【伸張性収縮による筋損傷からの回復過程における組織学的変化】

LC 後の筋線維横断面積を調べた。その結果、LC 10 日後 ($1969.8 \pm 219.7 \mu\text{m}^2$)、LC 14 日後 ($2223.9 \pm 154.6 \mu\text{m}^2$) は、LC 5 日後 ($1522.9 \pm 344.0 \mu\text{m}^2$) に比べ有意に大きかった (図 9, 10A)。さらに LC 14 日後は LC 7 日後 ($1678.8 \pm 268.0 \mu\text{m}^2$) に比べ有意に大きかった (図 9, 10A)。また、LC 後の筋線維横断面積のヒストグラムを作成したところ、LC 5 日後の筋線維横断面積では、 $600 \mu\text{m}^2$ と $1400 \mu\text{m}^2$ をピークとする二峰性の山を呈し、小径の Dystrophin-ir 陽性筋線維が多数観察された (図 10C)。そこで、筋損傷からの回復過程において、小径の筋線維がどれくらい存在しているのかを確認するために、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。その結果、LC 3 日後で 7.0%、LC 5 日後で 25.0%、LC 7 日後で 19.8%、LC 10 日後で 9.5%、LC 14 日後で 7.8% となり、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、新生筋線維がどのくらい存在しているのかを確認するために、全筋線維のうちの dMHC-ir 陽性筋線維の割合を算出した。その結果、全筋線維のうちの dMHC-ir 陽性筋線維の割合は、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 dMHC-ir 陽性筋線維はほとんど観察されなかった。なお、LC 5 日後では、Dystrophin-ir 陽性筋線維横断面積が $800 \mu\text{m}^2$ 以下の筋線維のうち 84.1% が dMHC-ir 陽性筋線維であった。

【伸張性収縮による筋損傷からの回復過程における最大等尺性背屈トルクの変化】

LC の前と、2, 3, 5, 7, 10, 14 日後に足関節最大等尺性背屈トルク測定を行った (図 10B)。LC 前の足関節最大等尺性背屈トルクは $26.8 \pm 3.6 \text{ mNm}$ であり、Control 群の $24.4 \pm 2.7 \text{ mNm}$ と有意差はなかった。一方、LC 2 日後に $7.8 \pm 1.0 \text{ mNm}$ と大きく低下し、その後徐々に増大し、LC 14 日後には $23.7 \pm 2.9 \text{ mNm}$ まで回復した。しかし、LC 14 日後の足関節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。

III-4. 伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果

【ラット体重の群間比較及び経時的変化】

最大等尺性背屈トルクの測定結果は体重変動の影響を受けるため、我々は実験開始時に 3 群間においてラットの体重を揃えることをした。体重は、LC の前、LC 2, 7, 14, 18, 21 日後に測定した (表 3a)。3 群間で体重に有意差はなかった ($p < 0.05$; 二元配置反復測定分散分析)。

【伸張刺激による筋損傷からの組織学的な回復促進効果】

LC による筋損傷からの組織学的な回復促進効果を明らかにするために、LC 21 日後に採取した LC+伸張刺激群の前脛骨筋の筋線維の形状や横断面積を Control 群や LC alone 群と比較した (図 11)。その結果、LC+伸張刺激群の筋線維の形状は Control 群と類似しており、多くの筋線維は多角形を呈していた。一方、LC alone 群の筋線維は楕円形を呈

表 2. LC の角速度と LC 中に発生するピークトルクとの関係.

| Angular velocity (deg./s) | 50 | 100 | 200 | 400 |
|---------------------------|------------|------------|------------|--------------|
| No. of animals tested | 7 | 8 | 19 | 7 |
| Peak torque (mNm) | 42.1 ± 2.1 | 44.0 ± 6.6 | 45.9 ± 3.2 | 48.9 ± 1.6 * |

LC の角速度が速くなるにしたがって、LC 中に発生するピークトルクは増大する。データは mean ± SEM で示す (*p < 0.05 vs 50 deg/sec, 一元配置分散分析後 Tukey's post hoc test).

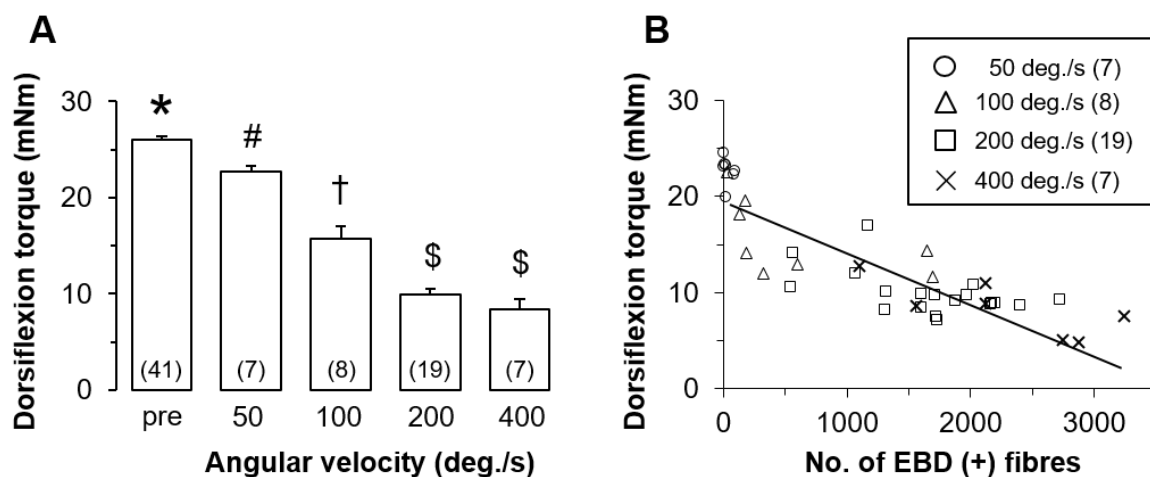


図 8. LC の角速度と最大等尺性背屈トルクの関係 (A) 及び EBD 陽性筋線維数と LC 2 日後の最大等尺性背屈トルクの関係 (B) .

(A) 各角速度で LC 2 日後に測定した足関節背屈筋群の最大等尺性背屈トルクを示す (() 内の数字はサンプル個体数を示す). LC 時の角速度が大きいほど最大等尺性背屈トルクが減少する。データは mean ± SEM で示す。異なる記号の Bar 間には有意差があることを示す (p < 0.05, 一元配置分散分析後, Tukey's post hoc test). (B) LC を実施したすべての個体における EBD 陽性筋線維数と LC2 日後の最大等尺性背屈トルクとの関係を示し, 有意な負の相関が認められた (Spearman $r = 0.85$, $p < 0.0001$). ()内の数字はサンプル個体数を示す.

していた (図 11A, B, C). LC alone 群 ($2629.4 \pm 137.6 \mu\text{m}^2$; $n=11$) の筋線維横断面積は Control 群 ($3158.3 \pm 64.4 \mu\text{m}^2$; $n=13$) よりも有意に小さかった ($p < 0.01$, 一元配置分散分析後, Tukey post hoc test, 図 11B). しかし LC+伸張刺激群 ($3033.1 \pm 103.5 \mu\text{m}^2$; $n=12$) 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ていた (図 11D).

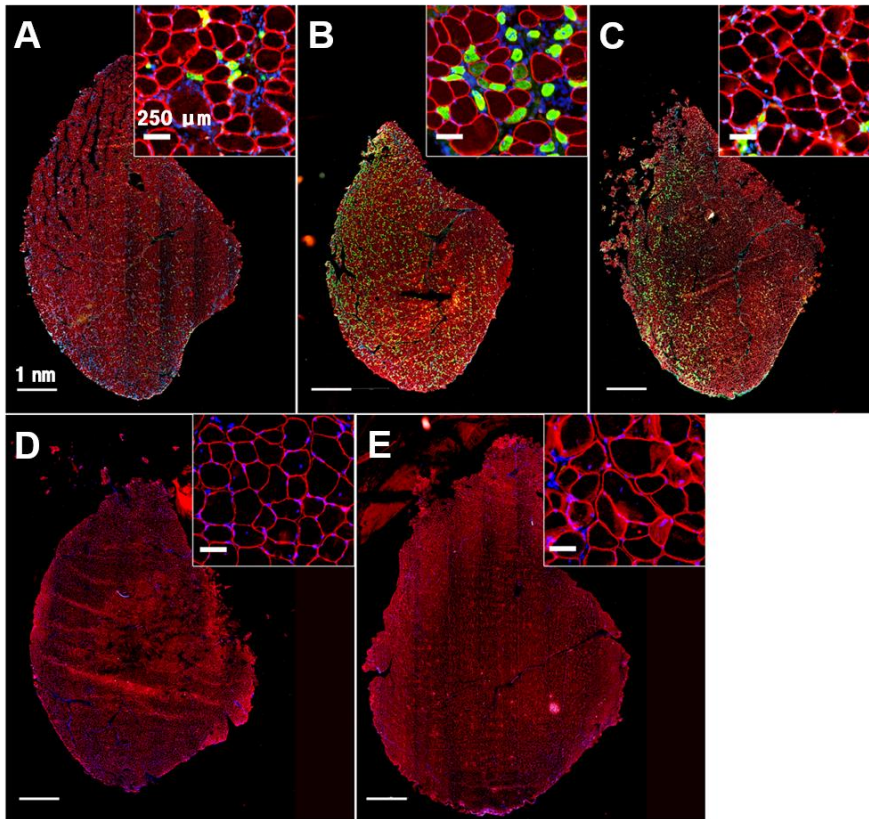


図 9. 筋損傷からの回復過程における免疫組織像.

筋損傷からの回復過程における免疫組織像の代表例を示す. LC 3 日後 (A), 5 日後 (B), 7 日後 (C), 10 日後 (D), 14 日後 (E) の前脛骨筋横断切片全体の免疫組織像であり, 各写真の右上の写真はその一部の拡大像である. 緑: dMHC-ir を含む筋線維 (dMHC-ir). 赤: Dystrophin-ir を含む筋線維膜 (Dystrophin-ir). 青: DAPI 染色による核.

【伸張刺激による筋損傷からの最大等尺性背屈トルクの回復促進効果】

LC による筋損傷からの筋力の回復促進効果を明らかにするために, LC+伸張刺激群の LC の前, 2, 7, 14, 18, 21 日後の最大等尺性背屈トルクを Control 群及び LC alone 群と比較した (図 12). 最大等尺性背屈トルクの絶対値を表 3 に示す. LC 2 日後の LC alone 群及び LC+伸張刺激群の最大等尺性背屈トルクは, Control 群の 23.9%であった. LC 7 日後では, LC+伸張刺激群は LC alone 群に比べ有意に大きく (LC+伸張刺激群: $46.1 \pm 1.5\%$, LC alone 群: $39.0 \pm 1.6\%$), それ以降 21 日後まで同様の結果を示した. LC 21 日後では, LC+伸張刺激群と Control 群の間に有意な違いはなかった (Control 群: $98.9 \pm 1.7\%$, LC+伸張刺激群: $90.6 \pm 3.3\%$, 図 12).

【伸張刺激の異なる開始時期や頻度による回復促進効果の違い】

異なる開始時期や頻度による回復促進効果の違いを確認するために, LC 直後に 1 回のみの伸張刺激を与える実験, LC 3~20 日後に毎日伸張刺激を与える実験, LC 3~20 日後に隔日で伸張刺激を与える実験を行い, LC 1 日後に 1 回のみの伸張刺激を与える実験と比較した (図 13). しかし, どの群間においても LC 21 日後における前脛骨筋の筋線維横断面積及び足関節の最大等尺性背屈トルクに違いは認められなかった (図 13).

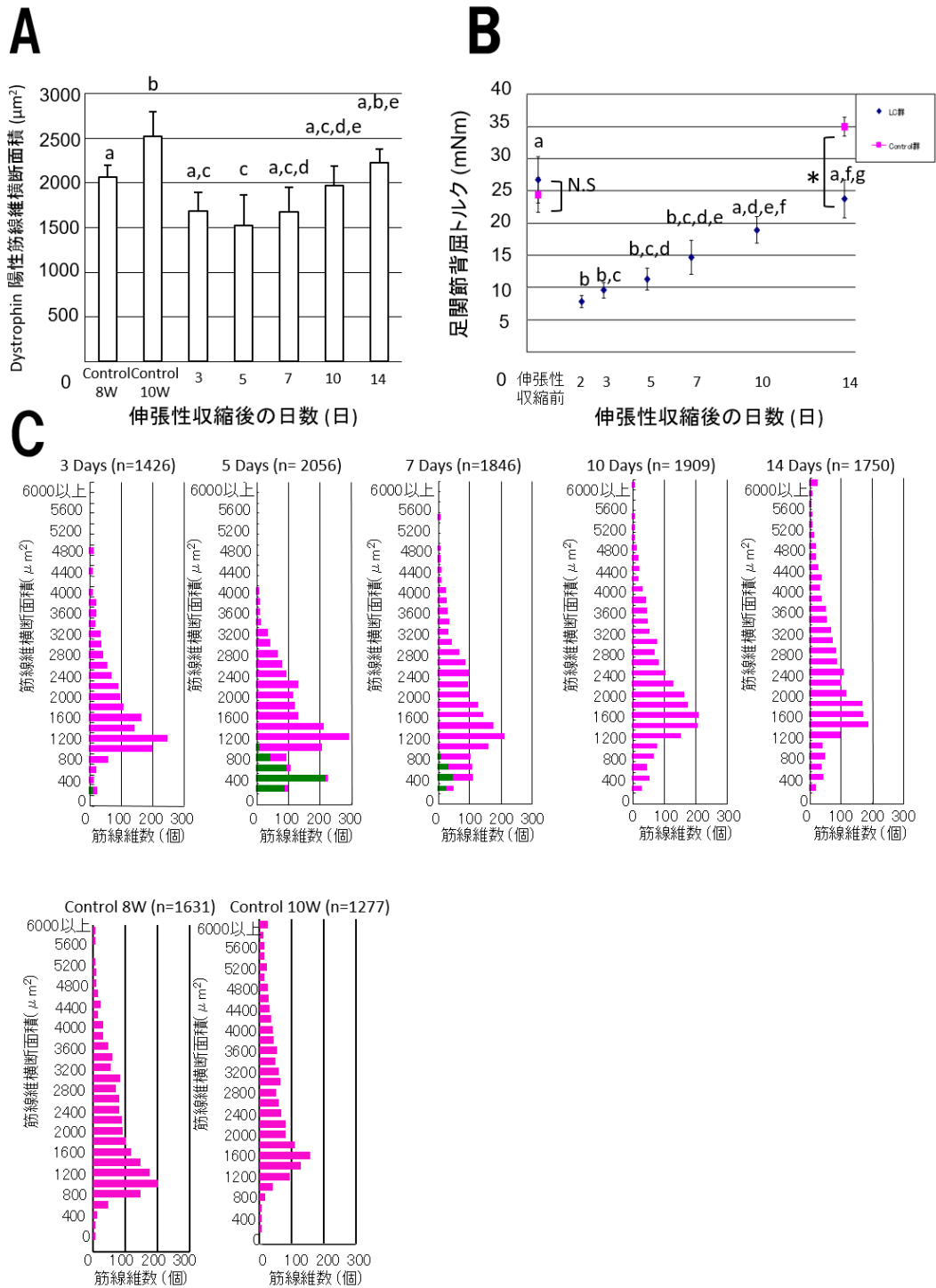


図 10. 筋損傷からの回復過程における筋線維横断面積及び最大等尺性背屈トルクの変化。(A) LCからの日数と筋線維横断面積との関係を示す(())内の数字はサンプル個体数を示す。(B) LCからの日数と足関節最大等尺性背屈トルクとの関係を示す。(C) Dystrophin-irを含む筋線維膜が明瞭に観察される筋線維 (赤) 及び dMHC-ir 陽性筋線維 (緑) の数をビン幅 $200\mu\text{m}^2$ の筋線維横断面積で表したヒストグラム。A, B のグラフ中の a~g は、異なる文字の場合、多重比較検定により有意差があることを示す ($p < 0.05$)。また、t 検定にて有意差のあるものを*で示す ($p < 0.05$)。

表 3. 実験動物の体重と最大等尺性背屈トルクの変化.

| Variable | Time points of measurement | | | | | |
|---|----------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| | Before LC | 2 days after LC | 7 days after LC | 14 days after LC | 18 days after LC | 21 days after LC |
| Rat body weight^a | | | | | | |
| Control (12) | 244.4 ± 3.6 | 255.9 ± 3.2 | 279.3 ± 2.2 | 311.9 ± 3.1 | 324.8 ± 5.3 | 334.5 ± 5.7 |
| LC-alone (12) | 244.0 ± 2.9 | 258.2 ± 4.4 | 279.9 ± 2.0 | 311.1 ± 2.4 | 323.8 ± 2.6 | 332.8 ± 3.2 |
| LC+Stretch (11) | 248.4 ± 2.9 | 254.8 ± 2.4 | 275.1 ± 1.5 | 304.3 ± 3.2 | 317.6 ± 3.5 | 325.2 ± 3.9 |
| Maximal isometric torque (mNm)^b | | | | | | |
| Control (12) | 36.9 ± 1.0 | 38.3 ± 1.2 | 43.6 ± 0.9 | 46.1 ± 1.2 | 47.5 ± 1.5 | 49.8 ± 1.1 |
| LC-alone (12) | 36.4 ± 1.3 | 8.9 ± 0.3** | 16.1 ± 0.5** | 29.8 ± 0.5** | 35.4 ± 0.8** | 39.4 ± 0.7** |
| LC+Stretch (11) | 34.9 ± 0.7 | 8.6 ± 0.6** | 17.8 ± 0.5** | 31.0 ± 0.6** | 37.7 ± 0.8** | 41.1 ± 0.5** |

LCのみ加えた群 (LC alone)と LC1日後に1回15分間のみ加えた群 (LC+Stretch)に分けた. 対照群としてLCも伸張刺激も加えない群 (Control)を設定した. ()内の数字はサンプル個体数を示す. データは mean ± SEM で示す. 体重(a)は, Control群, LC alone群, LC+Stretch群との間に有意な差はなかった. 最大等尺性背屈トルク(b)は, LC後のすべての時点でLC alone群とLC+Stretch群はControl群との間に有意な差があった (** p < 0.01 vs Control, 二元配置反復測定分散分析後, Tukey's post hoc test).

【伸張刺激による筋損傷からの新生筋線維の発現影響】

伸張刺激による筋損傷からの新生筋線維の発現への影響を明らかにするために, LC+伸張刺激群とLC alone群との筋線維の形状や, 筋線維横断面積とd-MHC-ir陽性筋線維横断面積及びそれらの数を調べた(図14). 測定は, 伸張刺激による最大等尺性背屈トルクの有意な回復がLC7日後(伸張刺激6日後)以降に認められたので, LC2~5日後(すなわち, 伸張刺激1~4日後)に行った. LC alone群及びLC+伸張刺激群のLC2日後の画像では, 筋損傷時に起こる壊死性筋線維及び単核細胞の浸潤が観察された. LC alone群ではこれら壊死性筋線維及び単核細胞はLC5日後でも観察された(図14A). LC alone群のdMHC-ir陽性筋線維は, LC4日後までほとんど観察されなかったが, LC+伸張刺激群ではLC3日後から観察された. 筋線維横断面積のヒストグラムでは, 小型のdMHC-ir筋線維(<800 μm²)がLC alone群よりもLC+伸張刺激群でより早期に発現されたことが明らかとなった(図14B). LC3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(図14C).

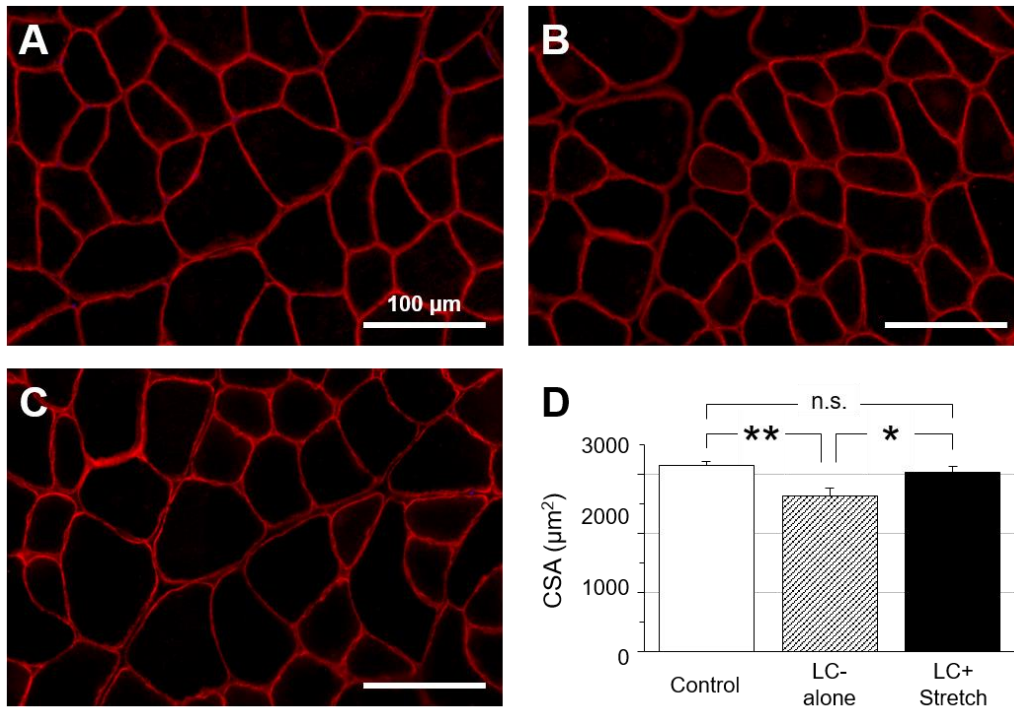


図 11. 筋損傷に対する伸張刺激による筋線維横断面積への影響.

LC も伸張刺激も加えない群 (Control, A), LC のみを加えた群 (LC alone, B), LC 1 日後に伸張刺激を 1 回 15 分間のみ与えた群 (LC+Stretch) の LC 21 日後の前脛骨筋横断切片の Dystrophin-ir 染色像である. (D) 各群における LC21 日後の Dystrophin-ir を含む筋線維膜が明瞭に観察される筋線維の筋線維横断面積を示す. LC alone 群の筋線維横断面積は Control 群や LC+Stretch 群に比べて有意に小さかった. しかし, LC+Stretch 群の筋線維横断面積は Control 群と有意な差はなかった (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 一元配置分散分析後, Tukey's post hoc test).

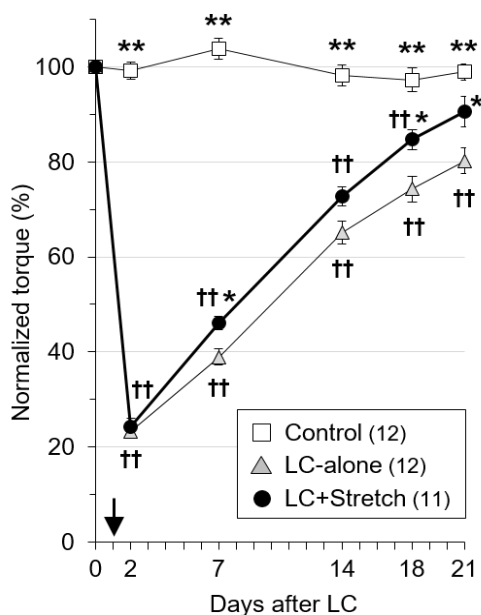


図 12. 筋損傷に対する伸張刺激による最大等尺性背屈トルクへの影響.

伸張刺激は, LC1 日後 (x 軸上の ↓) に 1 回 15 分間のみ加えた. LC のみ加えた群 (LC alone) と LC1 日後に 1 回 15 分間のみ加えた群 (LC+Stretch) に分けた. 対照群として LC も伸張刺激も加えない群 (Control) を設定した. LC alone 群及び LC+Stretch 群の LC 2 日後の最大等尺性背屈トルクは, Control 群に比べて有意に低値を示した. しかし, LC+stretch 群の最大等尺性背屈トルクは回復が早く, LC21 日後では LC alone 群より有意に大きく, Control 群と有意な差がなかった (* $p < 0.05$ vs LC alone, ** $p < 0.01$ vs LC alone, †† $p < 0.01$ vs Control, 二元配置反復測定分散分析後, Tukey's multiple comparison test).

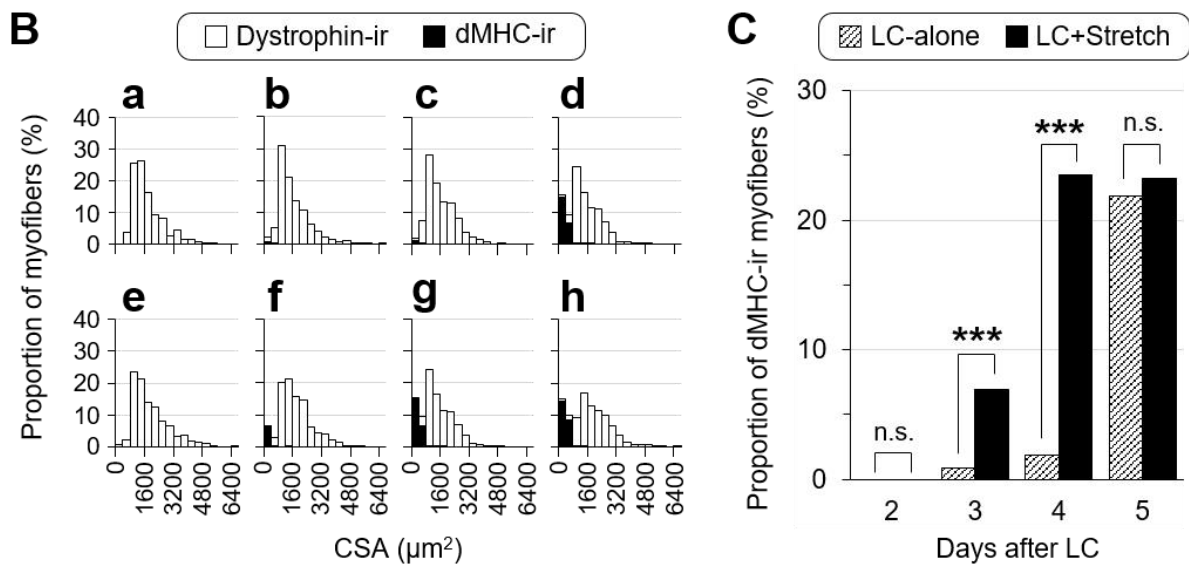
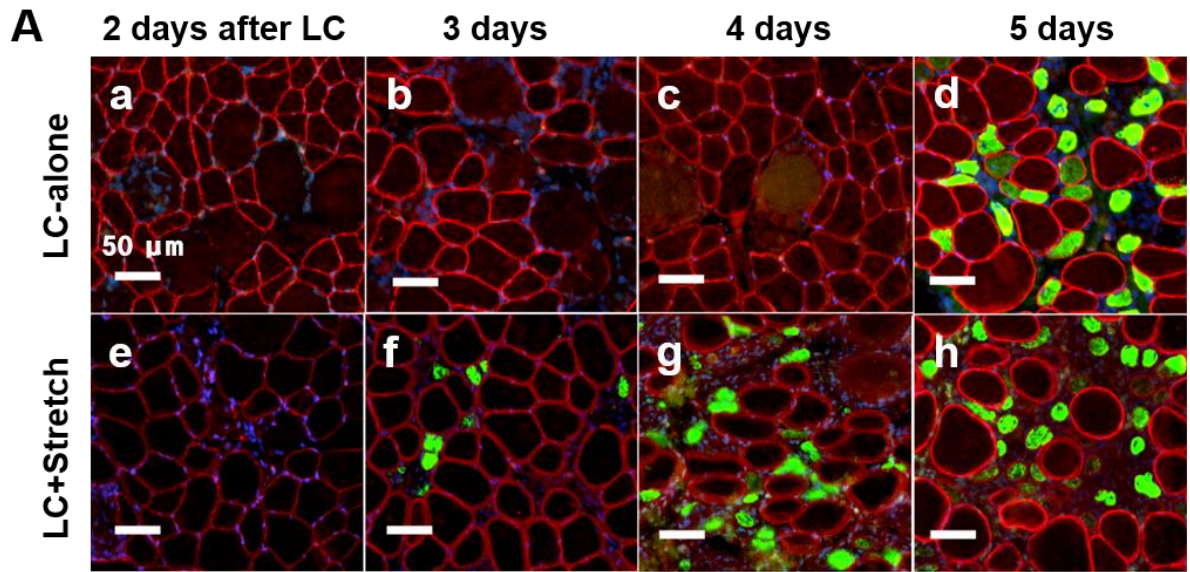


図 14. 筋損傷後 5 日間における伸張刺激による dMHC-ir 筋線維発現への影響.

(A) LC のみ加えた群 (LC alone) と伸張刺激を LC1 日後 1 回 15 分間のみ与えた群 (LC+Stretch) の免疫組織像である(a, e LC 2 日後, b, f LC 3 日後, c, g LC 4 日後, d, h LC 5 日後). 緑: dMHC-ir を含む筋線維 (dMHC-ir). 赤: Dystrophin-ir を含む筋線維膜 (Dystrophin-ir). 青: DAPI 染色による核. Bar=50 μm . (B) Dystrophin-ir を含む筋線維膜が明瞭に観察される筋線維 (Open bar) 及び dMHC-ir 陽性筋線維 (Filled bar) の数の割合をビン幅 $400\mu\text{m}^2$ の筋線維横断面積で表したヒストグラム. a-h は A の a-h に対応している. (C) LC2 日後から 5 日後における筋線維全体に対する dMHC-ir 陽性筋線維数の割合. LC 3 日後及び 4 日後の LC+stretch 群の dMHC-ir 筋線維の割合は, LC alone 群に比べて有意に多かった (***) $p < 0.001$, Fisher's exact probability test).

IV. 考察

IV-1. 伸張性収縮時の角速度に依存する筋損傷について

我々は、LCによって筋が損傷し最大等尺性背屈トルクが低下することを明らかにした。また、LCの角速度が大きくなると、その筋損傷量が増え、最大等尺性背屈トルクの低下量が大きくなることを明らかにした。すなわち、筋の伸張速度を上げると筋損傷量や筋収縮張力の低下量が大きくなると考えられた。McCullyらは、これと同様の結果を、単離したマウスの筋を用いて報告している [52]。彼らの研究では、電気刺激 (0.2 ms, 1-3V) を与え収縮させたマウスの単離長趾伸筋に、筋長 (Lf) の 20%まで伸張速度 0.2, 0.5, 1.0 Lf/sec で引き伸ばし、損傷の組織学的徴候を調べた。その結果、0.2 Lf/secを除く 0.5 Lf/sec 及び 1.0 Lf/sec で炎症細胞の浸潤がみられた。したがって、マウス長趾伸筋が筋損傷を引き起こす閾値は 0.2 Lf/sec と 0.5 Lf/sec の間である [52]。一方、我々の実験結果で EBD 陽性筋線維数は、200 deg/sec で LC 後に有意に増加したが、100 deg/sec では、LC を行わない Control 群と差がなかった (図 6A)。よって、我々の研究で筋損傷を引き起こす閾値は 100 deg/sec ~ 200 deg/sec の間であると考えられた。ちなみに、この角速度を筋伸張速度に概算すると、閾値は 1.1 Lf/sec ~ 2.2 Lf/sec の間となり、McCully らの筋損傷を引き起こす閾値よりも 4 倍ほど早いことになる。ただ、McCully らが自然長から 20% 伸張させたのに対して、我々の研究では足関節背屈 30 度と筋が緩んだ肢位から 16% (概算値) 伸張させたことになる。よって、損傷閾値の違いは筋の伸張の開始肢位や伸張割合の違いによるものではないかと考えているが、実験動物の種が異なることも含め、さらに検討する必要があると考える。

また、我々の研究でも McCully らの研究でも、ともに伸張速度が速くなると LC 中に発生するピークトルクが増加することを見出した。よって、本当に伸張速度の違いが損傷量を決定しているのか、それともピークトルク (McCully の研究では最大張力) が筋損傷量を決定しているのかという疑問も残る。しかし本実験の設定では、伸張速度とピークトルクの影響を分けて評価することは困難である。ただ、本研究で提示されているように、角速度及びそれに伴うピークトルクが正の相関を有するため、角速度に依存するピークトルクが筋損傷の直接の原因であると考えている。

IV-2. 筋損傷や損傷からの回復を評価するために用いた足関節最大等尺性背屈トルク測定について

ラットの足関節最大等尺性背屈トルクを測定する方法には、膝窩外側部で剖出した腓骨神経に電気刺激を与える方法がある [18, 41, 48]。しかし、皮膚や神経に侵襲を加えるため、経時的な変化を追うことはできない。そこで今回、表面電極を下腿外側面に貼り付けて電気刺激を与えることにより、非侵襲で何回も評価が可能な足関節最大等尺性背屈トルクの評価法を用いた。ただ、本評価方法がこれまで行われてきた、剖出した神経への電気刺激による評価方法と同様の刺激周波数で、足関節最大等尺性背屈トルクが測定できるかどうかは不明であった。そこで、予備実験として、両刺激方法を同一の刺激条件で比較した。その結果、表面電極を用いる方法で測定した足関節最大等尺性背屈トルクは刺激周波数 20

Hz から 80 Hz まで増大し、80 Hz 以上でほぼ一定となり、剖出した腓骨神経に直接電気刺激を与える方法の測定結果と同じ変化を示した (図 3)。また、神経に対する刺激方法を用いた Hentzen ら [41]や岡元ら [43]の測定結果とも同じ結果であり、本刺激方法でも周波数 100 Hz で足関節最大等尺性背屈トルクを測定することにした。本実験方法を用いれば、非侵襲的に最大等尺性背屈トルクを測定でき、経時的な変化を捉えることが可能となり、筋損傷からの回復やその治療効果のみならず、筋損傷以外の様々な筋に対する病態の検証やその運動療法の効果などの機能学的な研究にも役立つと考える。

IV-3. 角速度に依存する筋機能低下について

前述したマウスの単離長趾伸筋に対する LC の実験では、LC 後の筋収縮時の筋張力が伸張速度依存的に低下した [52]。我々の研究でも LC 2 日後の足関節の最大等尺性背屈トルクは、LC の角速度が増大するにつれて、漸進的に低下した (図 8A)。トルクの低下は筋機能の低下を意味するため、LC の角速度の増大は、これらの機能低下の決定的要因であると考えられる。また、組織学的な損傷量に関しても、角速度依存的に EBD 陽性筋線維数が増加していた。すなわち、機能低下と、組織学的な筋損傷との間には強い負の相関があると考えられた。ただ、LC によって引き起こされた筋機能低下の割合は、組織学的な筋損傷量の増大の割合に比べ大きかった。実際に、200 deg/sec で LC 2 日後の最大等尺性背屈トルクは LC 前の 62%に低下したのに対して筋損傷線維数は 15%であり、400 deg/sec で LC 2 日後の最大等尺性背屈トルクは LC 前の 68%に低下したのに対して損傷筋線維数は 20%であった。このピークトルクの低下と損傷筋線維の割合との間の顕著な相違について、損傷した筋線維のタイプが最大等尺性背屈トルクに関与していることが考えられる。健常筋と LC による損傷筋との間の筋線維横断面積のヒストグラムの違いを分析した結果、I 型及び IIa 型線維よりも筋線維横断面積が 2 倍以上大きく、この IIb 型線維が優先的に損傷していたことが示唆された (図 7C)。IIb 型線維は他の筋線維タイプと比較して大きな張力を発生させる。よって、LC 2 日後の筋機能低下の割合は、損傷された筋線維数の減少の割合から想定される筋機能低下の割合よりも大きかったと考える。しかしながら、角速度 50 deg/sec の LC において、筋腹横断面中のほとんどの筋線維が EBD 陰性筋線維であっても最大等尺性背屈トルクが低下しており (図 4A, 8A)、筋機能の低下は、EBD で観察される組織学的な所見だけでは分からない部分があると考えられた。実は、Friden らは、20~34 歳の健常成人を対象として建物の 10 階から 1 階まで階段を走って降りることを 10 回繰り返し行って運動負荷を与えた [53]。その 1 週間後にヒラメ筋を採取し、光学顕微鏡では、損傷筋線維を観察できなかったが、電子顕微鏡にて観察したところ Z 線の歪みや崩壊を確認したと述べている。この程度の運動負荷量では筋線維自体の損傷は考えにくいですが、張力発揮の主な構造物である筋原線維の崩壊は筋張力の低下を導くと考えられる。

以上のように、今回の LC による損傷筋線維が IIb 型線維に多かったこと、光学顕微鏡では確認できない筋原線維の損傷の可能性があることから、LC により損傷する筋線維数の割合から推察される最大等尺性背屈トルクの低下と実際のトルクの低下との間に差異があったと考えられるが今後の検討課題である。

IV- 4. 再現性の高い筋損傷モデル作製のための伸張性収縮条件

再現性の高い LC による筋損傷モデルを作製するためには、どのような LC の条件が適しているのかを明らかにする必要がある。背景でも述べたように、LC による筋の損傷量を決定する因子には、収縮する筋を伸張させるための角速度、関節運動の範囲、収縮回数がある。よって、これら 3 つの LC 条件とその損傷や機能低下との関係に関して、ラットの前脛骨筋を用いて調べられた報告が多数ある [48, 54-57]。しかしながら、その結果は報告により大きく異なり再現性の高い筋損傷モデルを作製するのに適した LC の条件を検討した報告はない。そこで、足関節運動範囲、収縮回数、角速度に関して、これまで報告されている LC の条件を基に、我々の作製した精度の高い足関節運動装置を用いていくつかの予備実験を行った。まず、LC 時の足関節運動の範囲に関しては、これまでの研究で 38 deg から 150 deg まで用いられていた [40, 48, 54-57]。そこで、予備実験として、LC の回数を 50 回、角速度を 200 deg/sec に定め、足関節運動範囲を 60, 90, 120 deg とした時の筋損傷量を調べた。その結果、足関節運動範囲が 60 deg では EBD 陽性筋線維はほとんど観察されなかった。足関節運動範囲が 90 deg と 120 deg では EBD 陽性筋線維が多く観察されたが、90 deg では個体間のばらつきが少なそうであった。LC 時の収縮回数に関しては、これまでの研究で 1 回から 240 回まで用いられていた [48, 54-57]。そこで、予備実験として、LC の角速度を 200 deg/sec 足関節運動範囲を 90 deg に定め、収縮回数を 1, 15, 50, 150 回とした時の筋損傷量を調べた。その結果、収縮回数が 1 回や 15 回では EBD 陽性筋線維がほとんど観察されなかった。一方、収縮回数が 50 回と 150 回とでは、EBD 陽性筋線維が多く観察された。なお、150 回では、薬物による損傷モデルのようにほとんどの筋線維の損傷が観察され、運動時によく起こる筋損傷のモデルとしては不適格と考えた。以上のことより、LC の足関節の運動範囲は 90 deg を、収縮回数は 50 回を採用することにした。また、繰り返し収縮による筋張力の低下をできるだけ防止するために、Cutlip ら [56] を参考に、10 回の収縮を 1 セットとし、セット間に 60 sec の休憩をとることにした。LC 時の角速度に関しては、これまで研究で 37.5 deg/sec から 900 deg/sec まで用いられていた [48, 54-57]。しかし、足関節運動装置の機構の特性により 500 deg/sec 以上では刺激の精度が安定しないため、本研究では角速度を 50 deg/sec から 400 deg/sec で条件を変えて、損傷量の違いや足関節最大等尺性背屈トルクの違いについて詳細に検討した。その結果、角速度 50 deg/sec, 100 deg/sec では EBD 陽性筋線維がほとんど観察されなかった (図. 4)。角速度 200 deg/sec, 400 deg/sec では EBD 陽性筋線維数がそれぞれ 1677.2 ± 133.2 個 ($\pm\%$)、 2252.6 ± 285.8 個 ($\pm\%$)であり、200 deg/sec でばらつきが最も少なかった (図 6)。以上のことより、我々は LC の条件を角速度 200 deg/sec、関節運動範囲を 90 deg、収縮回数 50 回と設定することとした。

IV- 5. 筋損傷からの回復過程における構造及び最大等尺性背屈トルクの変化

筋線維横断面積は、LC 5日後に最も小さくなり、そこから徐々に回復し、LC 14日後には LC 5日後に比べ、約 $700 \mu\text{m}^2$ 大きくなった (図10A)。しかし、筋線維横断面積のヒストグラムにおけるピークは、LC 5日後で $1200 \sim 1400 \mu\text{m}^2$ 、LC 14日後で $1400 \sim 1600 \mu\text{m}^2$ と若干大きくなるだけであった (図. 10C)。ただ、LC 5日後の $800 \mu\text{m}^2$ 以下の筋線維の数は LC 14日後に比べて非常に多く、筋線維横断面積の平均値の増大には $800 \mu\text{m}^2$ 以下の小径の筋

線維の減少が関与していると考えられた。また、LC 5日後の小径の筋線維の多くは dMHC-ir 陽性筋線維であった。この dMHC-ir 陽性筋線維は LC 7日後で大きく減少し、LC 10日後以降ではほとんど観察されなかったことから、新生した筋線維は新生後数日間のうちに、しかも正常の大きさの筋線維に成長する前に成熟した筋線維の機能を持つ Myosin heavy chain に変化することが考えられた。Smith [58] らは、トレッドミル走行によるヒラメ筋の筋損傷 4日後に dMHC-ir 陽性筋線維の発現が増加し、最も多数存在するのが 7日後であると報告している。また、BPVC 投与 5日後に dMHC-ir 陽性筋線維が最も多く発現するというものもあり [43]、本研究とほぼ同様の結果であった。

一方、足関節最大等尺性背屈トルクは、LC前と比べて、LC 48時間後に 29% まで低下し、その後徐々に回復し、LC 14日後には 89%まで回復したが、Control 群よりも小さい値であった。この結果は、Faulkner ら [34] の結果とほぼ同様の結果であった。また、McCully [59] やBrooksら [60] は、LCによる筋損傷からの組織や機能の完全な回復には、30日間が必要であると報告している。よって、今後、本研究により作製した筋損傷モデルで、完全に回復するまでの過程を知るためには、長期的な観察が必要だと考えた。一方、LC 14日後の筋線維横断面積は、Control 群に比べ、若干小さい値ではあるが、有意差は認められなかった。すなわち、LC 14日後の筋線維横断面積はほぼ回復しているにも関わらず、足関節最大等尺性背屈トルクは回復していないことが判明した。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 [61]。よって、LC 14日後の新生筋線維では運動神経の再支配がまだ完了してなかったのかもしれない。このことを明らかにするためには、筋の組織学的変化だけを検証するのではなく、神経の再支配の評価も必要であると考え、今後の検討課題である。

IV- 6. 伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果

我々は LC 1日後に 3 mNm の強度で 15 分間の反復伸張刺激を 1 回のみ行うことにより、LC による筋損傷からの回復が促進されることを本研究により実証した。すなわち、LC 後に減少した筋線維横断面積や最大等尺性背屈トルクは、伸張刺激を与えたラットにおいて LC 21 日後までに正常レベルにまで回復した。一方、Richard-Bulteau らは、ヘビ毒である Notexin の筋内注射によって起こる筋損傷後の再生過程において、運動による損傷からの回復促進効果を報告した [62]。彼らの研究では、損傷 4 日後から運動プログラム (トレッドミル歩行：斜度 5~8%，速度 10~30m/min，1 日 1~2 時間を週 5 日間) を実施したところ損傷 21 日後までに筋湿量及び筋線維横断面積が回復した。我々の研究で与えた伸張刺激の強度は、最大等尺性背屈トルク (約 36 mNm) の約 8% に相当する。損傷による炎症で浮腫状態になった筋に対して、関節の動きをほとんど伴わないで軽く伸張する程度の機械刺激である。よって、この強度は Richard-Bulteau らが実施した運動プログラムで筋に加わる張力に比べてはるかに小さいと考えられる。また、我々の研究の伸張刺激は LC 1 日後に 1 回のみ行っており、Richard-Bulteau らの運動を実施させた時期よりも早く、その回数も少ない。実は、我々の実験では、同じ伸張刺激 LC 3 日後から毎日行っても、LC 3 日後から 1 日おきに行っても、LC 1 日後に 1 回のみ行ったものと同程度の回復促進効果があることを確認している (図 13)。以上のことから、筋損傷からの回復促進には運動負荷でも軽い伸張刺激でも有効であること、刺激を与える時期や回数にはあまり関係ないことが考

えられた。

しかし、筋損傷からの回復は以下のような段階を辿る。損傷直後から好中球やマクロファージなどの炎症性細胞の浸潤が生じる。同時期にこれらの細胞から放出されるサイトカインや増殖因子によって筋衛星細胞は活性化される(第一段階) [63-65]。損傷数時間後から数日の間で、活性化した筋衛星細胞は増殖し筋芽細胞へと分化する(第二段階)。それと並行して1週間程度の間筋芽細胞は互いに融合し、多核の筋管細胞となる(第三段階)。筋管細胞は肥大して成熟した筋線維へと変化する(第四段階)。よって、損傷1日後に行った伸張刺激と損傷3日後から約3週間継続的に Richard-Bulteau らが行った運動負荷や我々の行った伸張刺激とは異なるフェーズに行っており、その効果が起こった理由が異なるはずである。すなわち、損傷1日後に行った伸張刺激では筋衛星細胞の活性化に対して効果をもたらしたのに対して、損傷3日後から約3週間継続的に Richard-Bulteau らが行った運動負荷や我々の行った伸張刺激では筋管細胞の肥大に対して効果をもたらしたと考えられる。後者の運動負荷や伸張刺激による筋管細胞の肥大に関する報告はたくさんある [66-68]。一方、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 [32]。また、我々の研究では LC alone 群では LC 5 日後に新生筋線維の指標である dMHC-ir 筋線維が出現したが、LC+伸張刺激群では、LC 3 日後(すなわち、伸張刺激 2 日後)に dMHC-ir 筋線維の出現がみられた。よって、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していると考えられた。以上のことから、伸張刺激によって筋衛星細胞が活性化し、新生筋線維の形成が促進され、その結果最大等尺性背屈トルクや筋線維横断面積の回復が促進したと考える。

V. まとめ

臨床的な筋損傷に近いと考えられる LC による損傷モデルを作製し、再現性の高い筋損傷モデルの作製を試みた。その結果、足関節運動範囲 90 deg, 収縮回数 10回×5セット(収縮間 10 sec, セット間 60 sec の休憩), 角速度 200 deg/sec で前脛骨筋の LC を行わせると、再現性の高い損傷モデルが作製できると考えた。次に本モデルを用いて、筋損傷からの回復過程を検証した。その結果、損傷からの日数経過に伴い、小径筋線維の発現とその成長、損傷5日頃をピークとして起こる新生筋線維数の増加、足関節の最大等尺性背屈トルクの増大が定量的に検出できた。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。その結果、LC 1 日後に1回のみ伸張刺激を与えるだけで、筋線維横断面積、最大等尺性背屈トルクの回復が促進されることが分かった。本結果は、長期間の運動や伸張刺激と同様の効果を得ることができ、早期にスポーツや社会復帰が必要な筋損傷患者に対して重要な知見であると共に、医療経済学的にも有用な知見である。今後は、この機械刺激による回復促進効果のメカニズムをさらに明らかにしていくと共に、本結果が臨床応用できるかどうかを明らかにしていく必要があると考える。

VI. 参考文献

1. Armstrong, R., *Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review*. Med Sci Sports Exerc, 1984. **16**(6): p. 529-538.
2. Proske, U. and T.J. Allen, *Damage to Skeletal Muscle from Eccentric Exercise*. Exercise and Sport Sciences Reviews, 2005. **33**(2): p. 98-104.
3. Garrett, W.E., *Muscle strain injuries: clinical and basic aspects*. Medicine and science in sports and exercise, 1990. **22**(4): p. 436-443.
4. Garrett, W.E., *Muscle strain injuries*. The American journal of sports medicine, 1996. **24**(6 Suppl): p. S2-8.
5. 武田寧, 内山英司, *スポーツ損傷としての肉離れの疫学的調査-スポーツ種目特性, 年齢-*. MB Orthopaedics, 2010. **23**(12): p. 1-10.
6. 岡浩一朗, 竹中晃二 et al., *スポーツ傷害をめぐる受傷選手の心理的諸問題-研究の動向と課題-*. 健康心理学研究, 1995. **8**(2): p. 30-43.
7. Lu, H., et al., *Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair*. The FASEB Journal, 2011. **25**(10): p. 3344-3355.
8. Fridén, J. and R. Lieber, *Structural and mechanical basis of exercise induced muscle injury*. Med Sci Sports Exerc, 1992. **24**(5): p. 521-530.
9. Newham, D., et al., *Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle*. J Neurol Sci 1983. **61**: p. 109-122.
10. Takekura, H., et al., *Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle*. The Journal of Physiology, 2001. **533**(2): p. 571-583.
11. Lieber, R.L., T.M. Woodburn, and J. Friden, *Muscle damage induced by eccentric contractions of 25% strain*. J Appl Physiol (1985), 1991. **70**(6): p. 2498-507.
12. Armstrong, R.B., R.W. Ogilvie, and J.A. Schwane, *Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1983. **54**(1): p. 80-93.
13. Komulainen, J., J. Kytola, and V. Vihko, *Running-induced muscle injury and myocellular enzyme release in rats*. J Appl Physiol (1985), 1994. **77**(5): p. 2299-304.
14. McNeil, P.L. and R. Khakee, *Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage*. Am J Pathol, 1992. **140**(5): p. 1097-1109.
15. Birbrair, A., et al., *Role of Pericytes in Skeletal Muscle Regeneration and Fat Accumulation*. Stem Cells and Development, 2013. **22**(16): p. 2298-2314.
16. Hawke, T.J. and D.J. Garry, *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. Journal of Applied Physiology, 2001. **91**(2): p. 534-551.
17. CARLSON, B.M. and J.A. FAULKNER, *The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review*. Medicine & Science in Sports & Exercise, 1983. **15**(3): p.

- 187-198.
18. 石道峰典, 平野朋枝 et al., 協働筋切除に伴う過負荷が再生時骨格筋の機能的, 形態的特性に及ぼす影響. 体力科学, 2003. **52**(3): p. 241-247.
 19. Bleakley, C., S. McDonough, and D. MacAuley, *The Use of Ice in the Treatment of Acute Soft-Tissue Injury*. The American Journal of Sports Medicine, 2004. **32**(1): p. 251-261.
 20. Schaser, K.-D., et al., *Local Cooling Restores Microcirculatory Hemodynamics after Closed Soft-Tissue Trauma in Rats*. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2006. **61**(3): p. 642-649.
 21. Awerbuck, D., et al., *Skeletal Muscle Form and Function after 4 hr Ischemia-Hypothermia*. Journal of Surgical Research, 1994. **57**(4): p. 480-486.
 22. Sloan, J.P., R. Hain, and R. Pownall, *Clinical benefits of early cold therapy in accident and emergency following ankle sprain*. Archives of Emergency Medicine, 1989. **6**(1): p. 1-6.
 23. Basur, R.L., E. Shephard, and G.L. Mouzas, *A cooling method in the treatment of ankle sprains*. Practitioner, 1976. **216**(1296): p. 708-11.
 24. Hocutt, J.E., et al., *Cryotherapy in ankle sprains*. The American Journal of Sports Medicine, 1982. **10**(5): p. 316-319.
 25. Kraemer, W.J., et al., *Continuous Compression as an Effective Therapeutic Intervention in Treating Eccentric-Exercise-Induced Muscle Soreness*. Journal of Sport Rehabilitation, 2001. **10**(1): p. 11-23.
 26. van den Bekerom, M.P.J., et al., *What Is the Evidence for Rest, Ice, Compression, and Elevation Therapy in the Treatment of Ankle Sprains in Adults?* Journal of Athletic Training, 2012. **47**(4): p. 435-443.
 27. 春日規克, 小坂井留美 et al., 67.骨格筋再生時の運動負荷と神経筋接合部の変化. 体力科学, 1995. **44**(6): p. 640.
 28. Richard-Bulteau, H., et al., *Recovery of skeletal muscle mass after extensive injury: positive effects of increased contractile activity*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2008. **294**(2): p. C467-C476.
 29. Karnes, J.L. and H.W. Burton, *Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats*. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 2002. **83**(1): p. 1-4.
 30. Rantanen, J., et al., *Effects of Therapeutic Ultrasound on the Regeneration of Skeletal Myofibers After Experimental Muscle Injury*. The American Journal of Sports Medicine, 1999. **27**(1): p. 54-59.
 31. Cooper, R.N., et al., *In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle*. Journal of Cell Science, 1999. **112**(17): p. 2895-2901.
 32. Wozniak, A.C., et al., *C-Met Expression and Mechanical Activation of Satellite Cells on Cultured Muscle Fibers*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2003.

- 51(11): p. 1437-1445.
33. Brooks, S.V. and F.J. Faulkner, *Severity of contraction-induced injury is affected by velocity only during stretches of large strain*. J Appl Physiol, 2001. **91**: p. 661-666.
 34. Faulkner, J., S. Brooks, and J. Oplteck, *Injury to skeletal muscle fibers during contractions conditions of occurrence and prevention*. Phys Ther., 1993. **73**: p. 911-921.
 35. Kojima, A., et al., *Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats*. J Orthop Sci, 2007. **12**(1): p. 74-82.
 36. Duguez, S.p., Marie-Catherine Le Bihan, Domin-, L.o.F.a. ique Gouttefangeas, and Damien Frey-, and ssetet., *Myogenic and nonmyogenic cells differentially express proteinases, Hsc/Hsp70, and BAG-1 during skeletal muscle regeneration*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **285**: p. E206–E215.
 37. Hamer, P.W., et al., *Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability*. J Anat, 2002. **200**: p. 69-79.
 38. Hwang, J.H., et al., *Therapeutic Effect of Passive Mobilization Exercise on Improvement of Muscle Regeneration and Prevention of Fibrosis After Laceration Injury of Rat*. Arch Phys Med Rehabil, 2006. **87**(1): p. 20-26.
 39. Oishi, Y., et al., *Heat stress increases myonuclear number and fiber size via satellite cell activation in rat regenerating soleus fibers*. J Appl Physiol, 2009. **107**(5): p. 1612-1621.
 40. Peters, D., *Asynchronous functional, cellular and transcriptional changes after a bout of eccentric exercise in the rat*. J Physiol 2003. **553**(3): p. 947-957.
 41. Hentzen, E., *Stress-dependent and -independent expression of the myogenic regulatory factors and the MARP genes after eccentric contractions in rats*. The Journal of Physiology, 2005. **570**(1): p. 157-167.
 42. Kami, K. and E. Senba, *In vivo activation of STAT3 signaling in satellite cells and myofibers in regenerating rat skeletal muscles*. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2002. **50**(12): p. 1579-1589.
 43. 岡元信弥, 森友洋 et al., *塩酸 Bupivacaine 溶液による損傷筋の筋力の回復と組織学的変化*. 理学療法学 Supplement, 2010. **2009**: p. A4P2006-A4P2006.
 44. Awerbuck, D., et al., *Skeletal muscle form and function after 4 hr ischemia-hypothermia*. J Surg Res, 1994. **57**(4): p. 480-486.
 45. Ryall, J., et al., *Intramuscular β 2-agonist administration enhances early regeneration and functional repair in rat skeletal muscle after myotoxic injury*. J Appl Physiol 2008. **105**: p. 165-172.
 46. Plant, D., F. Colarossi, and G. Lynch, *Notexin causes greater myotoxic damage and slower functional repair in mouse skeletal muscles than bupivacaine*. Muscle & Nerve, 2006. **34**(5): p. 577-585.
 47. Plant, D., Felice Beitzel, and L. GS., *Length-tension relationships are altered in*

- regenerating muscles of the rat after bupivacaine injection.* J Appl Physiol 2005. **98**: p. 1998-2003.
48. Komulainen, J., et al., *The disruption of myofibre structures in rat skeletal muscle after forced lengthening contractions.* Pflügers Arch – Eur J Physiol, 1998. **436**: p. 735-741.
 49. Hesselink, M.K., et al., *Structural muscle damage and muscle strength after incremental number of isometric and forced lengthening contractions.* J Muscle Res Cell Motil, 1996. **17**(3): p. 335-41.
 50. Koh, T.J., et al., *Passive Stretches Protect Skeletal Muscle of Adult and Old Mice From Lengthening Contraction-Induced Injury.* The Journals of Gerontology: Series A, 2003. **58**(7): p. B592-B597.
 51. Inoue, T., et al., *Effects of Passive Stretching on Muscle Injury and HSP Expression during Recovery after Immobilization in Rats.* Pathobiology, 2009. **76**(5): p. 253-259.
 52. McCully, K.H. and J.A. Faulkner, *Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers.* J Appl Physiol, 1986. **61**(1): p. 293-299.
 53. Friden, J., M. Sjostrom, and B. Ekblom, *A morphological study of delayed muscle soreness.* Experientia, 1981. **37**(5): p. 506-7.
 54. Lovering, R., *Contractile function, sarcolemma integrity, and the loss of dystrophin after skeletal muscle eccentric contraction-induced injury.* AJP: Cell Physiology, 2004. **286**(2): p. 230C-238.
 55. Sakamoto, K., et al., *Creatine kinase release from regenerated muscles after eccentric contractions in rats.* European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology, 1996. **73**(6): p. 516-520.
 56. Cutlip, R., *Impact of muscle length during stretch-shortening contractions on real-time and temporal muscle performance measures in rats in vivo.* J. Appl. Physiol., 2004. **96**(2): p. 507-516.
 57. Geronilla, K., et al., *Dynamic force responses of skeletal muscle during stretch-shortening cycles.* Eur J Appl Physiol, 2003. **90**(1-2): p. 144-153.
 58. Smith, K.H., et al., *Expression of developmental myosin and morphological characteristics in adult rat skeletal muscle following exercise-induced injury.* European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology, 1999. **80**(2): p. 84-91.
 59. McCully, K. and J. Faulkner, *Injury to skeletal muscle fibers of mice following lengthening contractions.* J Appl Physiol, 1985. **59**(1): p. 119-126.
 60. Brooks, S. and J. Faulkner, *Contraction-induced injury recovery of skeletal muscles in young and old mice.* Am J Physiol, 1990. **258**: p. C436C442.
 61. Yoshimura, K., et al., *The effect of reinnervation on force production and power output in skeletal muscle.* The Journal of surgical research, 1999. **81**(2): p. 201-208.

62. Richard-Bulteau, H., et al., *Recovery of skeletal muscle mass after extensive injury: positive effects of increased contractile activity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **294**: p. C467 - C476.
63. Tatsumi, R., et al., *HGF/SF Is Present in Normal Adult Skeletal Muscle and Is Capable of Activating Satellite Cells*. Developmental Biology, 1998. **194**(1): p. 114-128.
64. Tidball, J.G., *Inflammatory processes in muscle injury and repair*. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2005. **288**(2): p. R345-R353.
65. Tidball, J.G. and S.A. Villalta, *Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration*. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2010. **298**(5): p. R1173-R1187.
66. Agata, N., et al., *Repetitive stretch suppresses denervation-induced atrophy of soleus muscle in rats*. Muscle & Nerve, 2009. **39**(4): p. 456-462.
67. Williams, P.E., *Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle*. Annals of the Rheumatic Diseases, 1990. **49**(5): p. 316-317.
68. Adachi, R., K. Yabusaki, and T. Obinata, *Uptake of Albumin is Coupled with Stretch-Induced Hypertrophy of Skeletal Muscle Cells in Culture(Cell Biology)*. Zoological science, 2003. **20**(5): p. 557-565.

参考研究.

光遺伝学を用いた慢性筋痛症モデル作製について

近年高齢化社会の中で、腰痛や肩こりといった筋の症状をもつ症候（筋・筋膜性疼痛症候群，MPS）が多く取り上げられるようになってきた。この MPS の原因も筋損傷が原因と考えられている。しかし、この MPS における筋損傷は、これまで述べてきた LC 強度による筋損傷とは異なり、弱い繰り返し LC などによる筋原線維や周囲の結合組織への微細な損傷が原因だと考えられている。そこで満期退学後これまでの間に田口先生や縣先生のもとで、この MPS の病態を解明し、理学療法の方法やその効果を検証する目的で、この MPS モデルの作製に着手することにした。その方法としては、光遺伝学を駆使し、Channelrhodopsin-2 (ChR2) の筋内異所性発現により、ChR2 が発現する筋細胞のみを選択的に収縮させ、筋の一部に限局した微細な損傷を作製することを考えている。そこで、本その経過と現在までに明らかになってきたことについて報告する。

1. 背景及び目的

【慢性筋痛症の概要とモデルラット作製】

運動器（筋，筋膜，関節など）に起因する痛みは高頻度で [1, 2]、遷延化しやすく、難治性である。日本の成人人口の約 40% が運動器疼痛を有し、約 9% (910 万人) が日常生活動作に支障をきたしている [1]。この割合は加齢により右肩上がりに増加するため [3]、高齢化社会が進行する先進諸国において、高齢者 QOL の低下だけでなく、大きな医療経済的負担を生じ、国際的な問題となっている。なかでも、MPS など、筋や筋膜に起因する痛みは頻度が高く、日常生活制限に直結するため、病態機構の解明と治療に向けた基礎研究が急務である。MPS の病態は明らかとなっていないが、筋内の一部の筋線維に索状硬結があり、その一部に結節が存在するという報告がある [4] (図 15)。索状硬結や結節は、運動などによる微細な筋損傷とそこからの回復過程におけるさらなる筋損傷の繰り返しが原因であると考えられている。一方、痛みの基礎研究は実験手法の発展とともに、この 40 年間に飛躍的に進歩した。しかし、主たる研究対象は“皮膚”であり、罹患者の多い運動器の痛みは著しく研究が遅れている。Hayashi らは遅発性筋痛を生じる伸張性収縮を長期間負荷することで慢性筋痛症の動物モデルを開発し、このモデルの痛覚過敏に再生筋細胞で産生される神経成長因子 (NGF) が重要であることを実証した [5]。さらに、NGF をヒトに反復投与するトランスレーショナル実験を行い、NGF がヒトと動物の慢性筋痛症に共通した重要な原因物質の 1 つであることを明らかにした [6]。また、Hayashi らは、げっ歯類で筋の痛みを定量的、かつ再現良く作製・測定するために小動物用足関節運動装置 (NDH-1; Bio Research Center, Co., Ltd., Nagoya, Japan) を用いて、筋痛を生じる筋収縮パラメータを同定し、角速度が速くなるのに伴い、痛覚過敏も増加することを解明した [7]。

しかしながら、このようなモデルでは電気刺激により筋全体を収縮させてしまうため、臨床的に特徴的な、筋の一部に限局した筋硬結を作り出すことが困難である。そこで、本研究ではこの問題を解決するため、光遺伝学を駆使し、Channelrhodopsin-2 (ChR2) の筋内

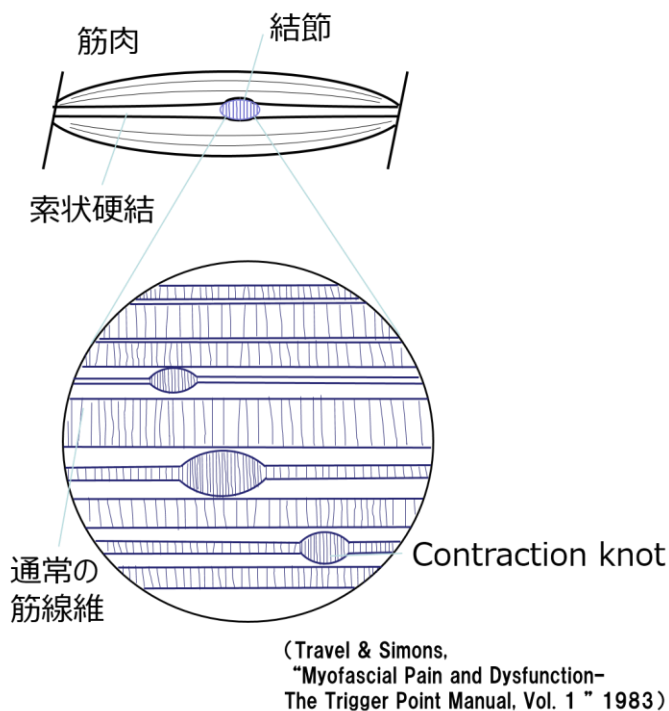


図 15. 筋・筋膜性疼痛症候群の病態.

筋中の一部の筋線維に索状硬結があり，その一部に結節 (contraction knot) が存在するといわれている(Travel et al. ⁷²⁾ を一部改変).

異所性発現により，ChR2 が発現する筋線維のみを選択的に繰り返し収縮させ，従来とは異なる，より臨床所見に近い動物モデルの開発を目指した。

【筋への Channelrhodopsin-2 の導入について】

ChR2 とは，緑藻の一種であるクラミドモナス由来の光活性化非選択的陽イオンチャネルのことである (図 16A). 約 470 nm の青色光を吸収するとチャネルが開いてプロトンや陽イオンを透過させ，その結果 ChR2 発現細胞の興奮を誘発する．光照射からチャネルが開くまでの反応時間は非常に早く，30 μ sec 以内とされている．チャネルのコンダクタンスは 40-150 fS 程度と考えられ，他のイオンチャネルや電位依存性チャネルと比較して数百分の 1 から数十分の 1 程度と非常に小さい．また，活性化している時間は 1msec 程とされている．ただ，脱感作しやすく光照射を止めて次の ChR2 活性化が完全に戻るまで 25 sec 程かかると報告されている [8]. そして，470 nm の青色光照射によって，不活性化状態からの回復促進が得られる．また，大量の ChR2 を細胞に発現させ過ぎると細胞内で凝集体を形成し，細胞体を傷害させて光応答が見られなくなることがあるため，発現量を調節することも反応を得るために必要である．これまでイオンが通過する開口部の構造が不明であったが，Kato らの報告 (2012)により ChR2 を結晶化法を用いて解析した結果，ChR2 が強固な二量体を形成していること，さらに ChR2 の分子表面を調べたところ，この二量体の境界面にはイオンを透過する空間が見当たらず，単量体内で強い負電荷を帯びた空間が存在していることを明らかにした [9].

Philippらは、遺伝子操作により ChR2 を発現するマウスを作製し、外科的に摘出したこのマウスの喉頭筋に対して、2msec間の青色光照射することにより、筋収縮が得られたことを報告した [10]。また、青色光の照射時間と照射強度を調節することで、筋収縮力を微調整できることも明らかにした。

そこで、まず我々は ChR2を筋線維内に発現させるために、筋線維内に光活性化タンパクであるChR2を投与する方法を検討した。プラスミド DNAをエレクトロポレーションする方法と、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus : AAV) ベクターを用いる方法の2つを行うこととした (図17)。さらに、エレクトロポレーションもしくは AAVベクター投与による ChR2 導入後、共に同部位への青色光照射 (波長:約570nm) により局所的な筋収縮が惹起できるかどうかを調べた。そして、この時に必要な光量や照射方法、照射時間など、筋収縮が強く、また再現性が高く惹起できる光照射パラメータを同定することとした。

すべての動物実験は名古屋大学動物実験委員会、及び、国際疼痛学会の指針 (Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 16: 109-10, 1983) に則り、“動物の愛護及び管理に関する法律” を遵守して適切に行った。特に、動物実験実施時の“3R” (Replacement/Reduction/Refinement) に最大限配慮した。アデノ随伴ウイルスベクターや遺伝子改変動物を用いた実験は、名古屋大学組換えDNA 実験安全委員会の承認を得て行った。

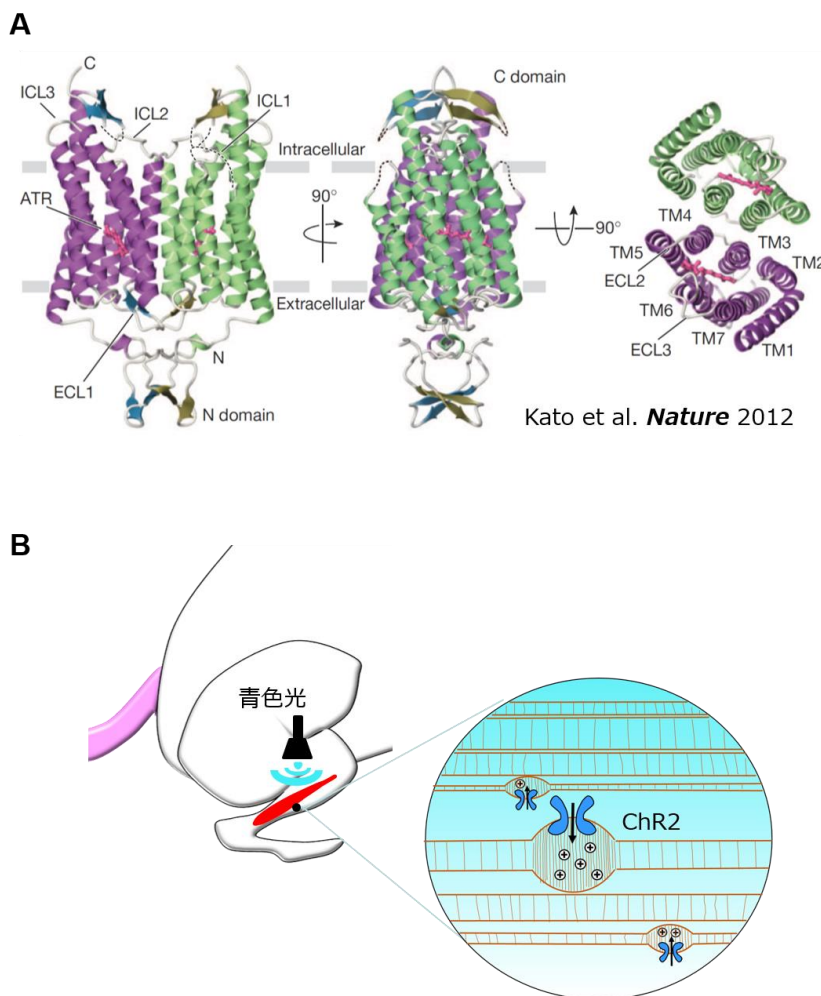


図 16. ChR2 の構造とその働き。

(A) ChR1 及び ChR2 のキメラ全体の構造。緑藻類クラミドモナスの眼点から同定された、唯一の光活性化非選択的陽イオンチャネルである (Kato et al. ⁷⁷⁾ を引用)。 (B) 光遺伝学による筋収縮が起こる仕組み。ChR2 は、青色光 (最適 470 nm) を感知することにより活性化し開口する。開口部から非選択的に陽イオンを細胞外から細胞内へ流入させることによって膜電位が脱分極し、筋収縮が誘発される。

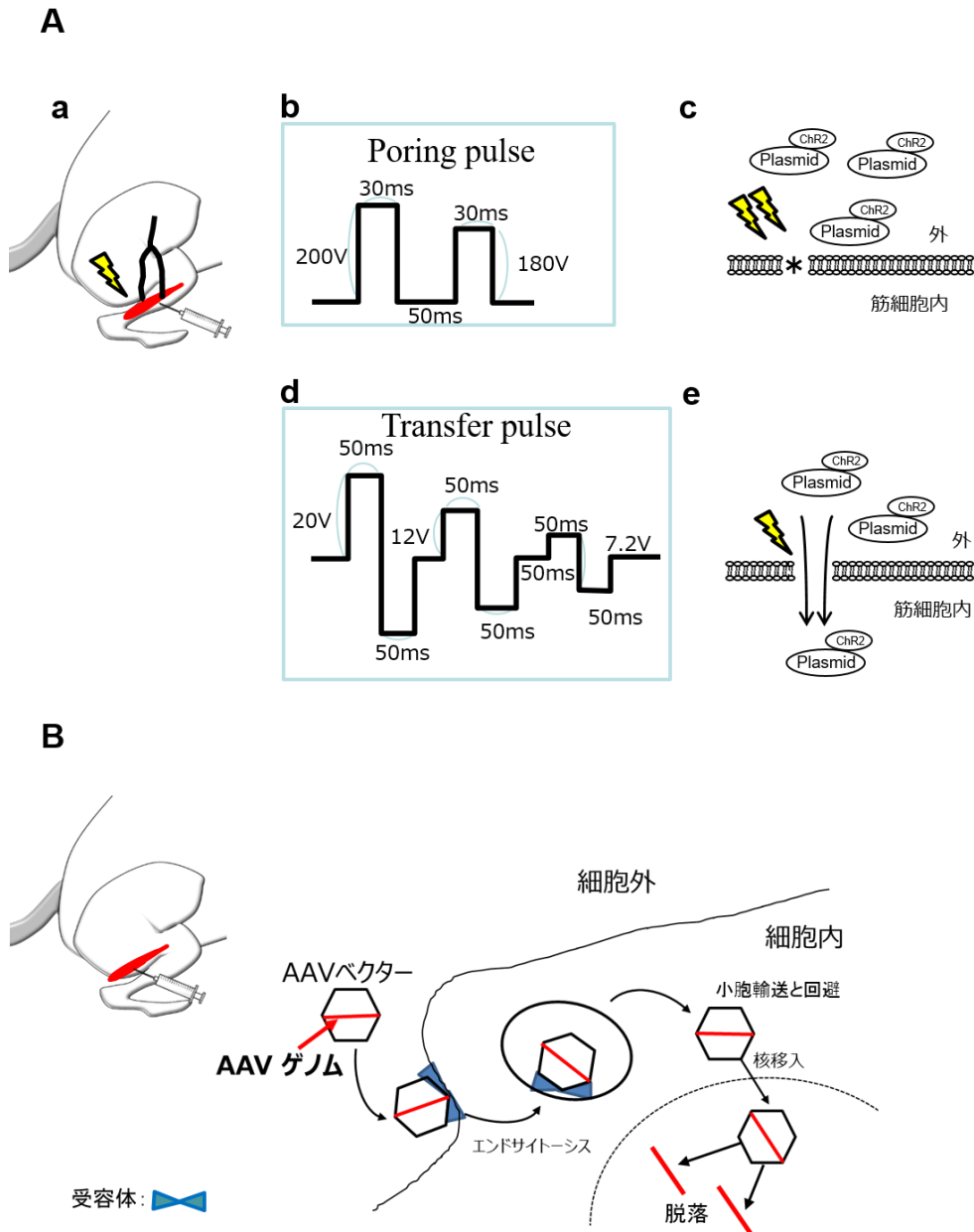



図 17. ChR2 の導入方法.

(A) エレクトロポレーションによる遺伝子導入方法の模式図である. ChR2 遺伝子を発現させるプラスミドを注射器により前脛骨筋筋腹中央部に投与する (a). 投与直後に, 足関節背屈筋群を陽極と陰極で挟み, 電気パルスをかけてプラスミドを細胞内へ送り込む. まず Poring pulse (b) という強い電圧をかけて細胞膜に小さな穴 (c の*)を開ける. それに引き続き Transfer pulse (d)という双極性の弱い電圧をかけ, Poring pulse により開けられた細胞膜の穴から細胞外にあるプラスミドを細胞内へ流入させる (e). (B) アデノ随伴ウイルス (AAV) による遺伝子の導入方法である. AAV ベクターを注射器により前脛骨筋筋腹中央部に投与すると, AAV ベクターは受容体 () 媒介型エンドサイトーシスを経て細胞内に侵入する. 侵入した AAV ベクターはクラスリン被覆小胞を介して核に移入される. AAV ベクターが核内に移行すると, ビリオンカプシドが脱落し, ウィルスゲノムが放出される.

2. 方法

【実験動物】

12週齢 Sprague-Dawley系雄性ラット (SLC Inc., Shizuoka, Japan) を使用した。すべてのラットは、12時間毎に明暗を切り替えられ (明時間 08:00–20:00), 空調管理されたクリーンルーム (室温 23°C) にて 1ケージにつき 2匹で飼育した。実験期間中は、ろ過されたクリーンウォーターとエサは好きな時に好きなだけ飲食できるようにした。

【ChR2 に対する青色光照射】

本研究が目指すところは、ChR2 が発現する筋線維のみを選択的に繰り返し収縮させ、従来とは異なる、より MPSの臨床所見に近い動物モデルを開発することである。そのためには、青色光照射により対象筋の収縮をコントロールできることが必須となる。そこで、本実験では以下のような方法で青色光照射した (図16B)。ChR2 導入1週間後 (エレクトロポレーションにより作製したモデル) または2週間後 (AAVベクター投与により作製したモデル) の動物モデルを固定台に固定し、青色光照射プローブを前脛骨筋の位置に接触させて固定した。その後、青色光照射 (波長:約570nm) を数回行い、局所的な筋収縮が惹起できるかどうかを調べた。

【エレクトロポレーションによる遺伝子導入方法】

2つ目の方法として、プラスミドのエレクトロポレーションによる遺伝子導入がある (図17)。すべてのラットは、イソフルランガス吸入麻酔 (濃度 1.5%, 大日本製薬) 下にて実験を行った。前脛骨筋筋腹中央部に ChR2 遺伝子を発現させるプラスミドを 10 μ l 投与した (図17A)。それに続いて、プラスミド投与部を電極で挟み込み、Poring pulseという強い電圧 (200V) をかけて細胞膜を開き、その後 Transfer pulse (20V) により細胞外にあるプラスミドを細胞内へ流入させた。投与 1週間後に筋採取を行った。

【アデノ随伴ウイルスによる筋への ChR2 導入方法】

1つ目は、筋細胞特異的に ChR2 を発現させる AAV ベクターを骨格筋内に投与する方法についてである (図17B)。すべてのラットは、イソフルランガス吸入麻酔 (濃度 1.5%, 大日本製薬) 下にて実験を行った。それぞれに特異的なプロモーター下 ChR2- enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) の構築物を組み込んだ骨格筋への導入に向いているとされる AAV9, AAVDJ, AAV10 の AAV ベクターを骨格筋内に投与した。対象は前脛骨筋であり、筋腹中央部に 10 μ l 投与し、その 2週間後に筋採取を行った。前脛骨筋の筋薄切標本作製し、ChR2 の発現量や発現パターンから、最適な AAV ベクターを同定した。なお、本実験では、最もよく利用されているサイトメガロウイルスをプロモーターにした AAV ベクターの筋内投与により、投与 2週間後に ChR2 が骨格筋に発現しているかどうかを調べた。

【組織標本の作製】

イソフルランガス吸入麻酔 (濃度 1.5%, 大日本製薬) 下で、全てのラットから前脛骨筋を採取した。採取した筋を長軸方向に対し垂直に 3等分に切断し、中間部をコルクに載せ

て固定し、液体窒素にて冷却したイソペンタン内で急速凍結し、 -80°C 下で保存した。急速凍結させた後、クライオスタット (CM 1510, Leica) を用いて $10\ \mu\text{m}$ 厚の横断切片を作製した。そして、これらの横断切片に対し、H&E染色を施した。さらに、これらの連続横断切片を作製して蛍光顕微鏡で ChR2 の発現を確認するために包埋した。

【ChR2 導入の組織学的評価】

ChR2のそれぞれの導入後に採取した筋で組織標本作製後、H&E染色を施した。そして、筋横断切片全体を、光学顕微鏡 (Nano Zoomer RS 2.0; Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) で観察、撮影した。また、H&E染色を施していない横断切片に対しては、ChR2の発現を確認するために筋横断切片全体を蛍光顕微鏡 (Nano Zoomer RS 2.0; Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) で観察、撮影した。

3. 結果

【エレクトロポレーションによる遺伝子導入】

エレクトロポレーション 1週間後に、青色光照射し、筋収縮を確認し、その後凍結横断切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。注射 1週間後のマウス前脛骨筋筋腹部に対して、青色光照射することで筋収縮を肉眼的に観察することができた (図18A)。一方、注射 1週間経過したマウスの前脛骨筋筋腹横断面の H&E染色像にて、核の集積が確認され、筋腹の広範囲に渡って筋線維の損傷が疑われた (図18B, C)。次に、エレクトロポレーションによる電気刺激のみで筋線維の損傷を引き起こしているかどうかを確認するため、生理食塩水の投与後にエレクトロポレーションを行い、その 1週間後に筋横断切片を観察した。その結果、前脛骨筋筋腹横断面の H&E染色像にて、プラスミド注射した時と同様に核が集積し、損傷を示唆する像が確認された (図19A, B)。

【アデノ随伴ウイルスによる筋への ChR2導入】

AAVベクター投与して 2週間後に、青色光照射し、筋収縮を確認し、その後凍結横断切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察した (図20)。AAV 9, AAV DJ を投与した前脛骨筋に対して青色光照射したところ、筋収縮は確認できなかった。さらに免疫組織像において ChR2の発現も確認できなかった (図20A, B)。また、H&E染色像では核の集積がみられ損傷を示唆する像が広範囲に確認できた (図20Aa, b)。一方、AAV 10を用いて青色光照射すると筋収縮が確認できたが、非常に微弱な収縮であった。さらに、ChR2の免疫蛍光染色像にて緑色に染色される ChR2 の導入が確認できた (図20C)。なお、H&E染色像では損傷は認められなかった (図20c)。

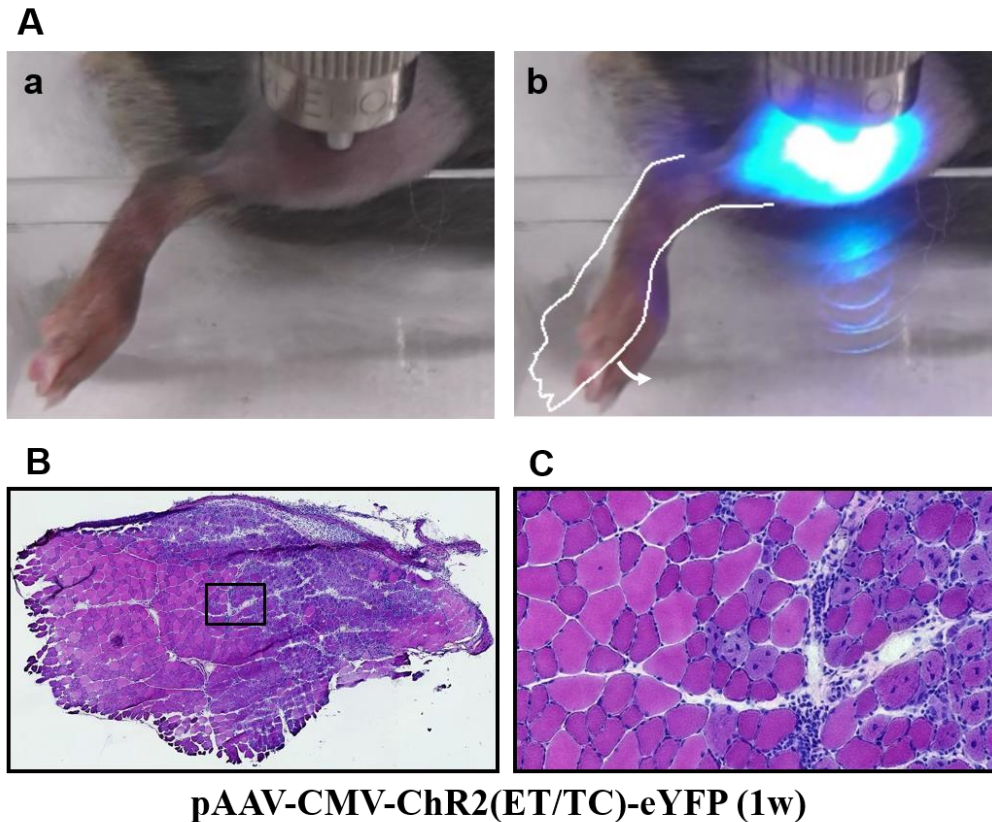


図 18. エレクトロポレーションによる ChR2 導入後の青色光照射前後の足部の動きとその後作製した組織学的所見.

(A) 前脛骨筋へのエレクトロポレーションにより ChR2 投与 1 週間後に青色光を照射し、その前 (a)及び後 (b)における足部の拡大写真である. b の白線は照射前の足部の位置を示す. 前脛骨筋部への青色光照射により筋が収縮し足部の背屈 (→)が観察された. (B) 青色光照射後の前脛骨筋の H&E 染色像. (C) B 中の□で囲まれた範囲の拡大像. H&E 染色により、核が集積し筋線維の損傷を示唆する像が筋腹の広範囲に渡って確認できた (B,C).

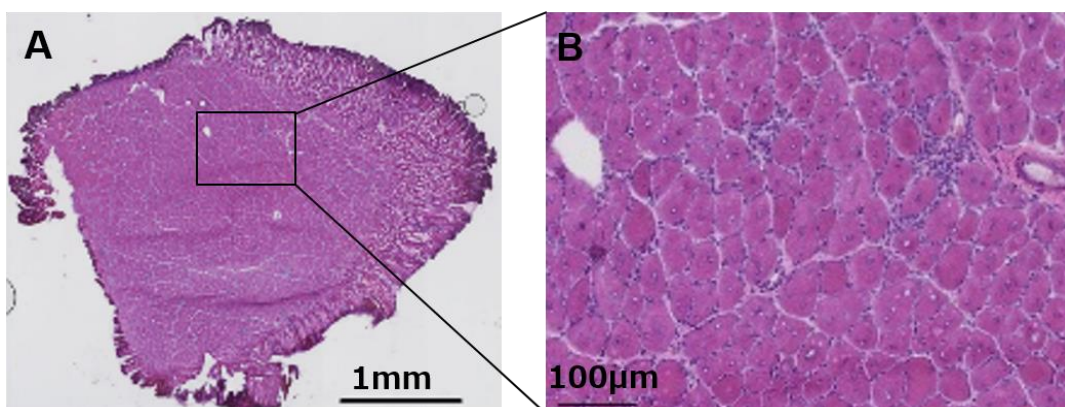


図 19. 前脛骨筋へ生理食塩水注入しエレクトロポレーションを行った 1 週間後の組織学的所見.

(A) 筋腹全体の組織像. (B) A 中の□で囲まれた範囲の拡大像. H&E 染色により、核が集積し筋線維の損傷を示唆する像が筋腹の広範囲に渡って確認できた.

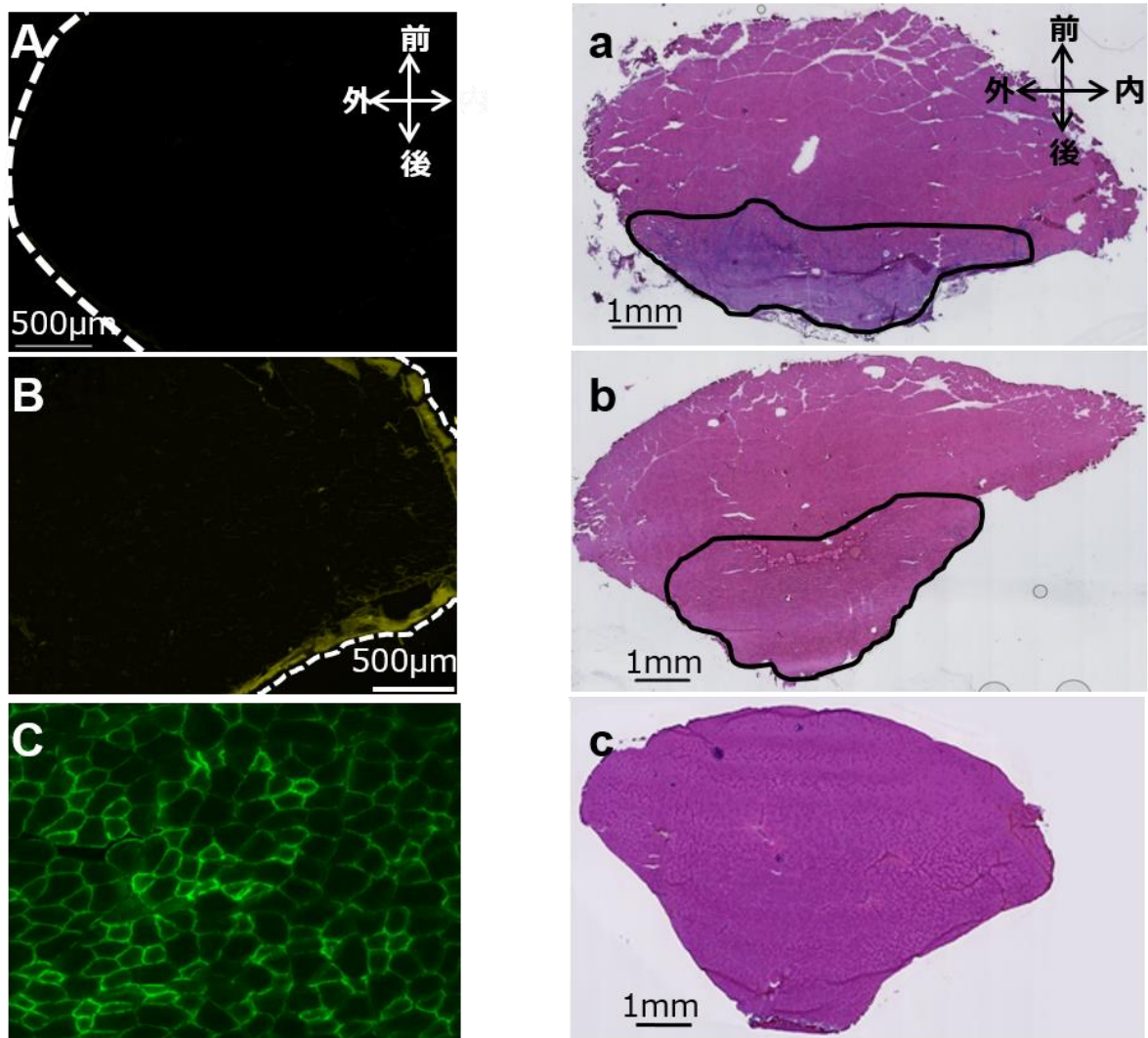


図 20. 前脛骨筋への AAV 投与 2 週間後における ChR2 の発現と損傷の組織学的検証。
 (A, B, C) ChR2 蛍光染色像. (a, b, c) H&E 染色像. (A, a) AAV9-CMV-ChR2 (ET/TC) -eYFP
 を投与した筋横断切片像. (B, b) AAV (DJ)-CMV-ChR2 (ET/TC) -eYFP を投与した筋横断切
 片像. (C, c) AAV10-CMV-ChR2 (ET/TC) -eYFP を投与した筋横断切片像. (A, B) 白点線は
 筋腹横断面の外周を示す. AAV10-CMV-ChR2 (ET/TC) -eYFP を投与した筋では ChR2 の
 導入が確認でき (C), さらに H&E 染色により損傷像がないことが確認できた(c). なお,
 AAV9-CMV-ChR2 (ET/TC) -eYFP, AV (DJ)-CMV-ChR2 (ET/TC) -eYFP では, ChR2 蛍光染
 色像にて ChR2 の発現を確認できず (A, B), H&E 染色像により, マクロファージの集積が
 あり筋損傷像 (黒実線で囲われた範囲) が確認できた (a, b).

4. 考察

エレクトロポレーションによる遺伝子導入により, 筋収縮は確認でき, ChR2 が導入さ
 れたと考えた. ただ, 青色光照射直後に採取した標本の像では H&E染色による核の集積

が広範囲に渡って観察され、筋損傷が示唆された。しかし、青色光照射程度の弱い収縮数回でこのような広範囲に渡る筋損傷が起こることは考えにくい。そもそも、青色光照射直後に採取した筋でマクロファージの集積を示唆する核の集積が起こることも考えにくい。さらに、生理食塩水の投与後にエレクトロポレーションを行い、その1週間後に筋横断切片を観察したが、同様に核の集積が観察され、損傷を示唆する像が確認された。よって、この筋損傷は ChR2を導入するためのエレクトロポレーションを行った時点で起こったものだと考えられた。よって、現設定におけるエレクトロポレーションによる ChR2 導入は難しいと考えた。

一方、AAVベクターを用いた遺伝子導入法では、筋への遺伝子導入が起こりやすいといわれている3種の AAVベクターを用いた。H&E染色では、AAV9、AAVDJのベクターはエレクトロポレーションを用いたラットで観察された筋損傷を示唆する像が観察されたが、AAV10を用いたものでは観察されなかった。また、免疫組織像では AAV10を用いたもののみが ChR2 の発現が確認された。さらに、AAV10を用いたラットのみが、青色光照射による筋収縮が認められた。ただ、その収縮はエレクトロポレーションを用いたラットに比べて非常に弱いものであった。

以上のことより、AAV10を用いれば、十分な収縮のコントロールは難しいが、筋損傷を起こさずに遺伝子導入が可能であることが判明した。ただ、局所的な索状硬結や結節の確認にまでは至っていない。索状硬結、結節は、運動などによる微細な筋損傷とそこからの回復過程におけるさらなる筋損傷の繰り返しが原因だといわれている。よって、本モデルの作製のためには、まず青光照射による十分な収縮が可能になることが必要だと考える。そのためには、AAV10による ChR2 の筋線維内発現量を変化させることで対処しようと考えている。また、青色光照射を繰り返し行い、その頻度や時間の条件をコントロールしながら検証する必要があると考える。これらのことを行うことにより、最終的に MPSのモデル作製が可能となり、そのメカニズムの解明や理学療法の検証が可能となり、より効果的な理学療法へとつながると考える。

5. 参考文献

1. Suka, M. and K. Yoshida, *Musculoskeletal pain in Japan: prevalence and interference with daily activities*. Modern Rheumatology, 2005. **15**(1): p. 41-47.
2. Suka, M. and K. Yoshida, *The National Burden of Musculoskeletal Pain in Japan: Projections to the Year 2055*. The Clinical Journal of Pain, 2009. **25**(4): p. 313-319.
3. Gibson, W., et al., *Increased pain from muscle fascia following eccentric exercise: animal and human findings*. Experimental Brain Research, 2009. **194**(2): p. 299.
4. Travell, J.G., *Myofascial pain and dysfunction*. Trigger point manual, 1983.
5. Hayashi, K., et al., *Involvement of NGF in the Rat Model of Persistent Muscle Pain Associated With Taut Band*. The Journal of Pain, 2011. **12**(10): p. 1059-1068.
6. Hayashi, K., et al., *Repeated intramuscular injections of nerve growth factor induced progressive muscle hyperalgesia, facilitated temporal summation, and expanded pain areas*. PAIN®, 2013. **154**(11): p. 2344-2352.
7. Hayashi, K., et al., *Muscular mechanical hyperalgesia after lengthening*

- contractions in rats depends on stretch velocity and range of motion.* European Journal of Pain, 2017. **21**(1): p. 125-139.
8. Nagel, G., et al., *Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 13940-5.
 9. Kato, H.E., et al., *Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel.* Nature, 2012. **482**(7385): p. 369-74.
 10. Bruegmann, T., et al., *Optogenetic control of contractile function in skeletal muscle.* Nature Communications, 2015. **6**: p. 7153.

謝辞

今回の研究を行うにあたり、常葉大学保健医療学部理学療法学科の縣信秀助教、名古屋市総合リハビリテーションセンターリハビリテーション科の岡元信弥氏、名古屋大学医学部附属病院リハビリテーション部の柴田篤志氏、愛知医療学院短期大学リハビリテーション学科の宮津真寿美准教授をはじめとする皆様に多くのご支援、ご指導を頂きました事について、ここに深く感謝の意を記します。

博士学位論文を提出するにあたって、多くの方々のご指導とご助力をいただきました。主査を引き受けていただきました名古屋大学大学院医学系研究科リハビリテーション療法学専攻理学療法学講座教授 杉浦英志先生に厚く御礼申し上げます。本研究を臨床的な側面からもポジティブな面や今後の発展に必要なことについてシンプルかつ明確に指摘してくださったことに、厚く御礼申し上げます。

そして、10年間、直接ご指導をいただきました大分大学健康福祉科学部教授 河上敬介先生に厚く御礼申し上げます。私が名古屋大学医学部附属病院で働き、日々の臨床に疑問を持ち悩んでいる折、私を大学院に導いてくださったことにはじまり、研究の右も左も分からない私を、研究の初歩から修士論文、そして博士学位論文作成まで辛抱強くご指導いただきました。河上先生とは対照的に、きわめて活動レベルの低い研究生活を送る私を温かく見守り、常に叱咤激励していただいたことは、私にとって何にも替え難い貴重な財産となりました。心より感謝申し上げます。本論文を提出するにあたり、3名の先生に副査をお願いしてご助言を賜りました。名古屋大学医学部保健学科教授 亀高諭先生には、副査を担当していただいた時から、有益なご指摘と心温まる励ましをいただきました。同じ骨格筋を対象とする基礎研究の一端が共通しているとはいえ、亀高先生が開拓なさっているメンブレントラフィックに関する研究に、直接的には関連しない研究テーマを受け入れ、ご指導いただけたことに、まず感謝致します。名古屋大学保健学科准教授 石田和人先生には、明晰かつ厳密に、そして丁寧で温かいご指導をいただきました。石田先生のご指導により、本研究にいつそう深く取り組むことができました。そして、本論文をより磨き上げることができたと感じております。謹んで感謝申し上げます。

新潟医療福祉大学リハビリテーション科教授 田口徹先生にも、長年ご指導をいただきました。私が河上敬介先生の研究室を離れる際に誘っていただき、論文のご指導、筋損傷

と疼痛の関係や、光遺伝学を用いた筋硬結モデルラットの開発の一端を担うことをさせていただきました。本研究に取り組めたのは、田口先生のおかげです。心より感謝申し上げます。常葉大学の縣信秀先生、名古屋学院大学の伊東佑太さんには、学術論文執筆の際に共同研究者としてご助言いただきました。本当にありがとうございました。また、論文を書くにあたり、ご指導をいただきました名古屋大学大学院医学系研究科 特任教授 曾我部正博先生、中部大学大学院生命健康科学研究科生命医科学専攻教授 水村和枝先生、愛知医療学院短期大学リハビリテーション科准教授 宮津真寿美先生にも、心より御礼申し上げます。これまで私が研究を続けてこられたのも、名古屋大学大学院医学系研究科博士後期課程所属 柴田篤志君をはじめ、河上敬介先生の研究室に所属する皆様が日々実験環境を整えてくださっており、夜遅くまで時間を忘れて皆で意見を言い合えた時間があったからです。私にとって何にも代えがたい大変貴重な時間を過ごさせていただきました。みなさまの日々のご支援がなければ、この論文は完成しませんでした。誠にありがとうございました。

最後に、調査、実験に協力してくださった全ての方々にお礼を申し上げるとともに、私をサポートしてくれた友人・家族にも感謝致します。

皆様ありがとうございました。

2018年 3月 4日

森 友洋