

理学療法基礎系 1

573 機械刺激の減少に伴う筋線維の形態学的変化

— コスタメアに着目した観察 —

加藤 茜¹⁾, 藻垣友恵²⁾, 笹井宣昌³⁾, 縣 信秀³⁾, 宮津真寿美¹⁾, 清島大資⁴⁾, 河上敬介¹⁾, 早川公英⁵⁾

1) 名古屋大学医学部保健学科学療法学専攻, 2) 会田記念リハビリテーション病院
3) 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, 4) 名古屋大学大学院医学系研究科細胞情報医学専攻
5) 科学技術振興機構・SORST・細胞力覚プロジェクト

key words コスタメア・骨格筋・機械刺激

【目的】身体の不活動により筋の収縮活動は低下し、それに伴い筋は萎縮する。この筋萎縮には、筋に加わる機械刺激により誘導される細胞内シグナル伝達経路が関与していると考えられている。筋線維と細胞外基質の間には、細胞外の力を伝達する役割を持つ、コスタメア構造がある。そのコスタメアに類似した構造として、線維芽細胞や上皮細胞に見られる焦点接着装置がある。これらの細胞の焦点接着装置では、機械刺激により構成タンパクの局在が変化することで、細胞内シグナル伝達経路の活性が変化する。このことから、筋のコスタメア構成タンパクも、機械刺激の有無によりその局在が変化する事が考えられる。そこで本研究では、除神経による萎縮筋のコスタメア構成タンパクの局在を明らかにした。

【方法】対象はラットのヒラメ筋 (n=5) である。左坐骨神経切断を施したヒラメ筋を除神経群、同一個体の除神経しない右ヒラメ筋を対照群とした。除神経3日後に、各筋を急速凍結した。筋腹の中央部付近から取り出した筋組織より横断切片を作成し、H-E染色を施し、落射蛍光顕微鏡像を取得した。画像解析ソフト (Scion Image) にて筋線維100本の筋線維断面積を測定した。また筋腹の中央部付近から取り出した筋組織より縦断切片を作成し、コスタメアの構成タンパク質の一つである Paxillin に対する抗体で蛍光抗体染色し、共焦点レーザー顕微鏡像を取得した。この染色で Paxillin は横紋様のバンド状に染色されたので、そのバンド間の距離とバンドの幅を測定した。各個体の画像から筋細胞膜付近が観察可能な筋線維を2本ずつ選び、画像処理ソフト MetaMorph (Universal Imaging, Co) にて解析した。

【結果】除神経群の筋線維横断面積は $1468 \pm 143 \mu\text{m}^2$ で、対照群 $2172 \pm 174 \mu\text{m}^2$ に比べ有意に小さかった。縦断切片では、微分干渉像でZバンドの配列やバンド間の距離に関して、二群間で大きな差はなかった。Paxillin抗体による蛍光染色像では、両群とも先行研究と同様にZバンド付近が横紋のバンド様に観察された。染色バンドのバンド間距離は、対照群 $1.98 \pm 0.14 \mu\text{m}$ と除神経群 $1.84 \pm 0.45 \mu\text{m}$ であり、群間の差はなかった。一方バンドの幅の平均は対照群で $0.78 \mu\text{m}$ 、除神経群で $0.81 \mu\text{m}$ あった。ヒストグラムで表すと対照群が $0.80 \mu\text{m}$ をピークとする一峰性、除神経群は $0.60 \mu\text{m}$ と $1.07 \mu\text{m}$ をピークとする二峰性となり、除神経群のばらつきが大きかった。

【考察】除神経筋では Paxillin の局在が変化した。Paxillin と結合する部位を持つ Focal Adhesion Kinase (FAK) の活性は、心筋細胞の筋節構造の維持と肥大に関与すると報告されている。また Paxillin と FAK の結合を阻害すると、機械刺激による FAK の活性化が阻害される事が報告されている。よって、除神経によって筋中の Paxillin の局在が変化したことにより FAK の活性が変化し、筋の萎縮が誘導されたのかもしれない。

理学療法基礎系 1

574 関節固定後のラットヒラメ筋のコラーゲン線維に対するストレッチの影響

沖田 実¹⁾, 井上貴行²⁾, 日比野至³⁾, 坂野裕洋¹⁾, 中野治郎⁴⁾, 鈴木重行²⁾

1) 星城大学リハビリテーション学部, 2) 名古屋大学大学院医学系研究科, 3) 日本医療福祉専門学校理学療法学科
4) 長崎大学医学部保健学科

key words 関節固定・コラーゲン線維・ストレッチ

【目的】臨床においては、ギプスや装具などによる関節固定の結果、二次的に拘縮に至る場合が多く、その発生メカニズムの一つに骨格筋のコラーゲン線維の変化が指摘されている。具体的には、関節固定によって不活動状態に曝された骨格筋は含有するコラーゲン量が増加し、線維化の進行を認めるとした報告や塩や酸などにも可溶化されない不溶性コラーゲン量が増加し、強固な分子間架橋の形成が推察されるとした報告、あるいは筋内膜を構成するコラーゲン線維に配列変化を認めるとした自験例の報告などがある。一方、拘縮の治療にはストレッチを主体とした運動療法が広く行われているが、コラーゲン線維の変化に焦点をあて、その治療効果を検討した報告は少ない。本研究の目的は、関節固定後のラットヒラメ筋のコラーゲン線維に対するストレッチの影響を生化学的に検討することである。

【方法】Wistar系雄性ラットを無処置の対照群と両側足関節を最大底屈位で4週間ギプス固定する実験群に振り分け、実験群はさらに1) 固定のみの群 (固定群), 2) 固定終了後に1, 2週間、足関節底屈筋群にストレッチを行う群 (治療群), 3) 固定終了後に1, 2週間、ストレッチは行わず、通常飼育する群 (非治療群) に分けた。治療群の各ラットには自作の他動運動機器を用い、麻酔下で足関節底背屈運動を4秒に1回のサイクルで1日30分、週6回実施し、足関節底屈筋群をストレッチした。各群の実験期間終了後はヒラメ筋を検索材料に供し、中性塩、酸、ペプシン各々による可溶性コラーゲン、ならびに不溶性コラーゲンを抽出した。そして、コラーゲンの定量としてコラーゲンに特有の構成アミノ酸であるヒドロキシプロリンの含有量を測定し

た。なお、本実験は星城大学と名古屋大学医学部の動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

【結果】対照群と固定群を比較すると、塩可溶性コラーゲン量は有意差を認めなかったが、酸・ペプシン可溶性コラーゲン量、不溶性コラーゲン量、全コラーゲン量は固定群が有意に高値を示した。次に、治療群と非治療群を比較すると、1, 2週目ともすべての可溶性コラーゲン量は有意差を認めなかったが、不溶性コラーゲン量は治療群が有意に低値を示した。また、治療群と不動群の比較ではすべての可溶性コラーゲン量と全コラーゲン量は有意差を認めなかったが、不溶性コラーゲン量は治療群が有意に低値を示した。

【考察】今回の結果から、関節固定によって不活動状態に曝されたヒラメ筋は線維化の進行と含有するコラーゲン線維に強固な分子間架橋が形成されていると推察される。そして、今回のストレッチは、筋の伸張-弛緩を繰り返す方法であるが、この様なストレッチでは一端形成されたコラーゲン線維の分子間架橋を改善させ得る可能性が窺えた。ただ、筋の線維化の改善には好影響はもたらさず、治療時間や期間などについて今後検討が必要と思われる。