

研究報告

ラット脱神経横隔膜における機能的・構造的変化 に対する加齢の影響*

今北英高^{1) #} 佐伯佑介²⁾ 庄野恵美子²⁾
吉村理³⁾ 飛松好子⁴⁾ 宮田浩文⁵⁾

要旨

速筋、遅筋の混合筋であるラット横隔膜において片側横隔膜神経切除後の他側横隔膜収縮による間歇的伸張刺激に対する筋線維の加齢による変化について調べた。若齢 (10週齢) および老齢 (2年齢) のWistar系雄性ラットにおいて一側の横隔膜神経を切除し、4週後の横隔膜について等尺性収縮特性、筋線維組成、ミオシン重鎖アイソフォーム発現を筋線維電気刺激に対する筋収縮変化、酵素組織化学染色、ドキシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて調べた。若齢ラットにおいては、脱神経により片側横隔膜の収縮張力の低下や単収縮時間の延長、fast-twitch glycolytic 線維の急激な萎縮などの退行性変化だけでなく、fast-twitch oxidative glycolytic 線維の肥大やslow oxidative 線維の萎縮抑制、ミオシン重鎖1の相対的増加が認められた。老齢ラットにおいては、すべての筋線維タイプにおいて顕著な萎縮が生じ、ミオシン重鎖1の相対的増加も認められなかった。脱神経によって引き起こされた変化は若齢ラットと老齢ラットの間で異なっていた。脱神経後、若齢ラット横隔膜の遅筋化は、対側横隔膜の収縮によるストレッチ刺激に影響を受けた可能性が考えられた。

キーワード 脱神経横隔膜, 間歇的ストレッチ, 加齢変化

緒言

身体活動を行うために必要不可欠な骨格筋の加齢変化としては、筋量の減少¹⁾とそれに伴う発揮筋力の低下²⁾³⁾がみられる。さらに、細胞レベルでは選択的な速筋線維の萎縮⁴⁾、ミトコンドリア酵素や解糖系酵素活性の低下⁵⁾などが報告されている。

理学療法の場面では、筋萎縮をいかに抑制出来るかが重要な課題の一つである。これまで、筋萎縮の進行を抑制する方法として電気刺激療法が一般的に使われてきたが、近年注目されているのがストレッチ効果である⁶⁾⁷⁾。一般的にストレッチは筋線維や軟部組織の持続的伸張による身体の柔軟性を高める一つの手法であり、筋緊張を低下させ関節可動性 (柔軟性) を改善する効果がある。しかし、この効果以外にもストレッチの機械的刺激により筋線維の肥大が促進されると報告されている⁸⁾⁹⁾。Dixら¹⁰⁾はウサギの筋をストレッチして固定したところ、筋重量が増大したことを報告した。さらに、Vandenburghら¹¹⁾はシリコン培地にニワトリ骨格筋細胞を培養し、培地を間歇的に伸展することで筋細胞が肥大することを*in vitro*の実験系で証明している。*In vivo*におけるストレッチの研究としては坐骨神経切除や後肢懸垂後の退行性変化に対して足関節の底背屈を他動的に行うモデルが報告されている¹²⁾¹³⁾。

骨格筋の中で横隔膜は左右両側が腱中心部に融合した1枚の膜状筋であり、その活動は呼吸活動における吸気筋として最も貢献している。その活動様式も特徴的であり、両側が効率良く同期し、個体差や環境によりばらつ

* The Effect of Aging on Functional and Morphological Changes in the Denervated Diaphragm Muscle of Rats

1) 広島大学大学院保健学研究科保健学専攻

(現所属：〒635-0832 奈良県北葛城郡広陵町馬見中4-2-2 畿央大学健康科学部理学療学科)

Hidetaka Imagita, RPT, PhD: Health Sciences Major, Graduate School of Health Sciences, Hiroshima University

2) 山口大学農学部生物機能科学科

Yusuke Saiki, Emiko Syouno, MS: Department of Biological Science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University

3) 広島市身体障害者更生相談所

Osamu Yoshimura, MD: Hiroshima City Counseling Center for the Physically Disabled

4) 広島大学大学院保健学研究科

Yoshiko Tobimatsu, MD: Department of Health Sciences, Hiroshima University of Medicine

5) 山口大学農学部生物機能科学科

Hirofumi Miyata, PhD: Department of Biological Science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University

E-mail: himagita@kio.ac.jp

(受付日 2005年1月6日/受理日 2005年11月12日)

きはあるが1分間に約80回、24時間休むことなく収縮・弛緩を繰り返す。また、横隔神経は横隔膜唯一の運動神経であり、左右両側で胸腔内を下降し、右横隔神経は右横隔膜を、左横隔神経は左横隔膜を支配している。横隔神経の片側切除により同側の横隔膜は麻痺を生じ不活動となるが、対側の横隔膜が収縮することにより呼吸に同期した間歇的ストレッチが負荷されると考えられる。

本研究はこのような横隔膜の特性に着目し、*in vivo*において間歇的ストレッチを負荷することで脱神経筋がどのように反応するのか、また、成長期にある10週齢ラットと比較して老齢期にある2年齢ラットでは、脱神経筋の変化に差が生じるかどうかを収縮特性、酵素組織化学染色および収縮タンパク発現様式について分析することを目的とした。

対象および方法

1. 被験動物および手術手順

実験動物には、6週齢および100週齢のWistar系雄ラット各16匹（平均体重±標準偏差=186±10および603±83g）を用いた。ラットは1匹ずつ、25×30×25cmのケージ内で飼育し、餌、飲水ともに自由摂取とした。

各週齢グループをシャム群と脱神経群に二分し、脱神経群には片側横隔神経の脱神経手術を施した。頸部腹側を約4cm正中切開し、手術用顕微鏡下で表層筋を注意深く剥離した後、右横隔神経を露出した。横隔神経線維を1~2cm切除することにより片側横隔膜の活動を停止させた。シャム群には、脱神経以外はすべて同じ処置を施すシャム手術を行った。手術後2日間は、抗生物質（ピクシリン0.1ml/日）を注入し、体重測定と行動観察により回復過程を監視した。

シャム手術または脱神経手術から4週間後、すなわち生後10週齢（以下、若齢）および2年齢（以下、老齢）時に体重を測定し（表1）、以下の実験に供した。ペントバルビタールナトリウム（50mg/kg）を腹腔投与し麻酔した後、開腹して横隔膜を摘出し、筋線維の走行方向に沿って幅5mm程度の横隔膜筋サンプルを4~5個作成した。なお、先行研究において、横隔膜肋骨中央部

には筋線維組成の部位差は無いことが報告されているが¹⁴⁾¹⁵⁾、正確を期するために横隔神経付着部の切片を等尺性収縮特性および構造特性の評価用に、その背側の切片をミオシン重鎖（Myosin Heavy Chain；以下、MHC）アイソフォーム構成比の分析用に、腹側の切片を予備として保存した。

なお、全ての実験は、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（昭和55年3月、総理府告示第6号）」に基づく山口大学農学部動物実験指針に従い実施した。

2. 筋の収縮測定

横隔膜に付着している両側の腱のうち、肋骨側をクリップに固定し、腱中心側をトランスデューサーに連結してリンガー液中に固定した。リンガー液には95% O₂-5% CO₂を継続的に通入しpH 7.4、25℃を保持した。横隔膜をトランスデューサー（三栄測器、45196A）に連結固定した後、プレート電極を介して筋に直接的に電気刺激（2ms矩形波）し、最大単収縮張力が得られる至適筋長に設定した。刺激強度は最大単収縮力が得られる強度の125%に設定した。デジタルオシロスコープ上の単収縮曲線から最高電位差、単収縮時間、1/2弛緩時間を測定した。また、より随意収縮に近い収縮を得るため単収縮から完全強縮に至るまでの張力変化を調査した。張力-刺激頻度関係は5、10、20、30、50、70、100Hzの各1秒間刺激によって発生した張力曲線の最高電位差を測定し、10gのキャリブレーションをもとに張力に換算した。なお、筋疲労が生じないように各刺激間には最低1分のインターバルをおいた。張力測定後、測定した至適筋長と筋重量を用い、Mendez & Keys¹⁶⁾の式によって筋横断面積を求め、各刺激頻度に対する単位断面積あたりの張力を算出した。使用した横隔膜は至適筋長に固定した状態で液体窒素を用いて凍結し、組織化学分析に供するまで-80℃のフリーザー中に保存した。

3. 構造特性

至適筋長で凍結した横隔膜から、凍結ミクロトーム（ライカCM1510）を用いて厚さ10μmの連続横断切片を作成し、コハク酸脱水素酵素（Succinic dehydroge-

表1 各群における手術時および実験終了時の体重の比較

	若齢		老齢	
	シャム	脱神経	シャム	脱神経
対象数（匹）	8	8	8	8
手術時（g）	186 ± 11	186 ± 10	601 ± 96	604 ± 75
実験終了時（g）	284 ± 13 *	282 ± 12 *	597 ± 94	599 ± 77

平均値±標準偏差。

*：各群の手術時体重との有意差（ $p < 0.05$ ）。

nase ; 以下, SDH) 染色および Myofibrillar ATPase 染色に用いた。SDH 染色は, Blanco ら¹⁷⁾ の方法に基づき, コハク酸ナトリウムとニトロブルーテトラゾリウムを含むリン酸緩衝液 (pH 7.6) 中で8分間インキュベーションした。ニトロブルーテトラゾリウムが還元され, 蓄積した Diformazan の濃度を SDH 活性の指標として用いた。Myofibrillar ATPase 染色は, Brook and Kaiser¹⁸⁾ の方法に基づき, pH 4.6 と pH 10.3 で前処理を行った後, 30分間インキュベーション (pH 9.4) を行った。これらの染色画像をパーソナルコンピュータに取り込み, Myofibrillar ATPase 染色画像より筋線維タイプを分類し, 画像処理システム (ライカ DC100 および Scion Image) を用いて, 最終倍率 500 倍で撮影された SDH 染色画像より計測可能なすべての筋線維において横断面積を測定した (25-300 本)。また, 各筋線維タイプの本数をカウントし, 筋線維タイプ組成比を求めた。

4. MHC アイソフォーム分析

凍結保存された筋サンプルに, ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; 以下, SDS-PAGE) を行い, ミオシン重鎖 (以下, MHC) アイソフォームを分離した。筋組織を 3~18 mg にトリミング後, マイクロチューブ内にてホモジナイズし 40 倍抽出液を作製した。さらに, 得られた抽出液を Incubation medium にて 75 倍に希釈し, 電気泳動に使用した。作製した筋原線維タンパク抽出液を 1 レーンあたり 5 μ l 注入し, 4 $^{\circ}$ C にて 160 V の定電圧で 44 時間~48 時間電気泳動を行った。泳動終了後, ゲルに対して銀染色を施行し, 各バンド (MHC1, 2a, 2d, neonatal, 2b) の構成比をデンストメーターおよび画像解析ソフトにより算出した。なお, 各サンプルにおいて再現性を高めるため, 1 サンプルにつき 3 回の SDS-PAGE および画像処理を行い, 平均値をそのサンプルの値とした。

5. 統計処理

結果はすべて平均値および標準偏差で表示した。各群間の比較は正規性・等分散性が認められた場合は Non-

paired Student's t-test を, 認められなかった場合は Mann-Whitney 検定を行った。いずれの場合も危険率 5% 未満をもって有意とした。

結 果

1. 体重

各年齢群の手術時および実験終了時の体重を表 1 に示した。若齢ラットにおいては, シヤム群および脱神経群ともに発育に伴う有意な体重変化が認められた。老齢ラットにおいては, シヤム群および脱神経群ともにわずかな体重減少が認められたが, 有意な差はなかった。また, いずれの週齢群においてもシヤム群と脱神経群の間に体重差は認められなかった。

2. 筋収縮特性

単収縮張力および単収縮時間, 1/2 弛緩時間を表 2 に示す。単収縮張力については, 若齢ラットのシヤム群に比べ脱神経群では有意に低下したのに対し, 老齢ラットにおいてはシヤム群と比較して脱神経群では低下傾向を示したが, ばらつきが大きく有意差は認められなかった。単収縮時間については, 若齢ラットのシヤム群に比べ脱神経群の有意な延長が認められたのに対し, 老齢ラットではシヤム群と脱神経群の間には有意差は認められなかった。また, 1/2 弛緩時間についても単収縮時間と同様の傾向が観察された。すなわち, 若齢ラットの脱神経群はシヤム群に比べ有意な延長が認められたのに対し, 老齢ラットでは認められなかった。以上のように, シヤム群と脱神経群の収縮特性の比較において有意な変化が認められたのはすべて若齢ラットであった。

図 1 に各刺激頻度で発生した単位断面積あたりの張力を示した。若齢ラットでは低頻度刺激から高頻度刺激までのすべてにおいてシヤム群に対し脱神経群で有意に低値を示した。一方, 老齢ラットでは単収縮張力と同様 5 Hz 刺激においては両群に有意な差が認められなかったが, 10 Hz 以上の刺激において脱神経群で有意に低値を示した。また, 20 Hz 以上の刺激頻度においては, 若齢ラットおよび老齢ラットともに脱神経群はシヤム群の約 1/2~1/3 の張力に低下した。張力の最大値は, シヤ

表 2 各群における横隔膜筋線維の収縮特性の変化

	若 齢		老 齢	
	シヤム	脱神経	シヤム	脱神経
単収縮張力 (N/cm ²)	6.6 \pm 1.5	3.9 \pm 1.3 *	5.9 \pm 2.5	2.8 \pm 3.9
単収縮時間 (ms)	53.2 \pm 6.2	75.4 \pm 8.9 *	69.4 \pm 10.7 †	67.3 \pm 11.8
1/2 弛緩時間 (ms)	57.0 \pm 10.9	80.1 \pm 15.9 *	58.0 \pm 14.9	52.8 \pm 9.0

平均値 \pm 標準偏差。

* ; シヤム群との有意差 (p < 0.05)。

† ; 若齢ラットのシヤム群との有意差 (p < 0.05)。

ム群では50 Hzまたは70 Hzの刺激頻度で発生したが、脱神経群ではほとんどの場合、30 Hzまたは50 Hzで最大値が得られた。

3. 筋形態特性

各群の筋線維タイプ組成比および横断面積を表3に示した。若齢ラットおよび老齢ラットともに脱神経群にお

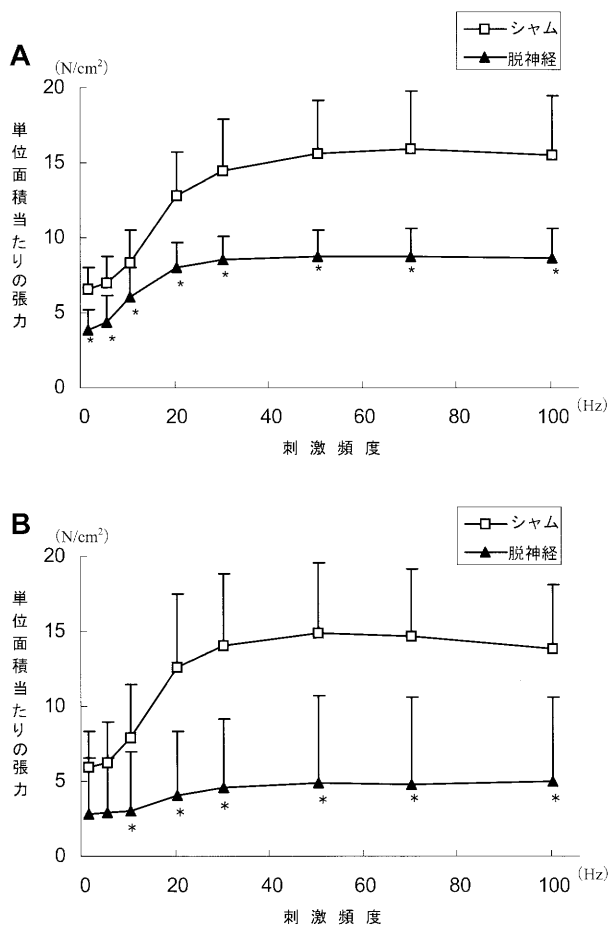


図1 各周波数における収縮張力の変化

平均値±標準偏差。

* ; 各群における各周波数でのシャム群との有意差 (p < 0.05)。

A : 若齢ラット, B : 老齢ラット。

いては、シャム群に比べSO線維およびFOG線維比率の減少、それに対応したFG線維比率の増加傾向が観察されたが、脱神経群とシャム群の間に有意な差は認められなかった。

筋線維横断面積については、若齢ラットの脱神経群では脱神経後4週間経過しているにもかかわらず、SO線維はほとんど変化しておらず、FOG線維では有意な増大も観察された。一方、FG線維では約40%の著明な筋萎縮が観察された。老齢ラットではすべての筋線維タイプにおいて有意に低下した。特にFG線維ではシャム群に対して約60%の著明な萎縮が生じた。

4. ミオシン重鎖アイソフォーム分析

脱神経された横隔膜を収縮タンパクレベルで調べるため、SDS-PAGEにてMHCアイソフォーム組成比を分析した(図2)。成熟骨格筋におけるMHCアイソフォームは1つのslow type myosinと3つのfast type myosinで構成されており、電気泳動法によってMHCアイソフォームの泳動パターンは上方からMHC2a, MHC2d, MHC2b, MHC1に分離される。若齢ラットおよび老齢ラットのシャム群では4つのMHCアイソフォームが分離され、特に2dが濃く染色された。若齢ラットの脱神経群ではMHC2bが薄くなり、MHC1とMHC2aが濃く染色された。同様に老齢ラットの脱神経群もMHC2bが薄くなり、MHC1が濃く染色された。

分離されたMHCアイソフォームについて画像処理を

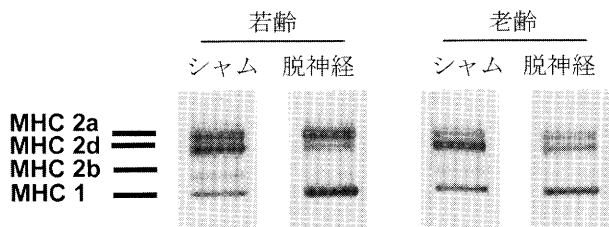


図2 各群における横隔膜MHCアイソフォームの変化

表3 各群における筋線維タイプ組成比および筋線維横断面積の変化

	若齢		老齢	
	シャム	脱神経	シャム	脱神経
筋線維組成比 %				
SO	35.0 ± 2.8	34.1 ± 10.5	42.5 ± 4.5 †	40.0 ± 10.8
FOG	43.3 ± 3.6	37.0 ± 11.6	36.0 ± 6.6 †	32.4 ± 9.8
FG	21.7 ± 4.3	29.0 ± 17.7	21.5 ± 6.4	27.6 ± 7.5
筋線維横断面積 μm ²				
SO	959.7 ± 146.6	953.8 ± 148.9	1255.4 ± 161.2 †	886.6 ± 210.4 *
FOG	1072.2 ± 154.2	1214.0 ± 120.2 *	1349.5 ± 238.8 †	1014.6 ± 110.6 *
FG	2429.3 ± 362.4	1451.0 ± 236.1 *	2755.8 ± 579.6	1160.6 ± 134.9 *

平均値±標準偏差。

* ; シャム群との有意差 (p < 0.05)。

† ; 若齢ラットのシャム群との有意差 (p < 0.05)。

表4 各群におけるMHCアイソフォーム構成比の変化(%)

	若齢		老齢	
	シャム	脱神経	シャム	脱神経
MHC1	19.4 ± 2.0	33.8 ± 9.8 *	27.7 ± 5.3 †	29.8 ± 10.7
MHC2a	23.4 ± 2.0	42.1 ± 7.5 *	21.6 ± 2.9	42.0 ± 7.8 *
MHC2d	48.7 ± 4.8	22.3 ± 11.0 *	44.8 ± 6.6	27.6 ± 7.5 *
MHC2b	8.5 ± 7.0	1.8 ± 2.4 *	5.8 ± 5.3	0.5 ± 0.5 *

平均値 ± 標準偏差.

* ; シャム群との有意差 ($p < 0.05$).

† ; 若齢ラットのシャム群との有意差 ($p < 0.05$).

行い、各バンドの比率を表4にまとめた。若齢ラットにおいては、シャム群と比較して脱神経群でMHC1およびMHC2aの有意な増加とそれに付随したMHC2dおよびMHC2bの減少が認められた。老齢ラットにおいてはMHC1で有意な変化は認められなかったが、MHC2aの有意な増加とMHC2dおよびMHC2bの有意な減少が認められた。

考 察

本研究は、若齢ラット(10週齢)と老齢ラット(2年齢)の比較において、横隔膜筋線維の①横隔神経切除による脱神経横隔膜の変化、②年齢による脱神経横隔膜の変化の違いを分析することを目的とした。その結果、①脱神経横隔膜において機能的・構造的遅筋化が示された。しかし、②老齢ラットにおける変化は若齢ラットのそれとは異なり、加齢が脱神経横隔膜の変化に影響を及ぼしたと考えられる。

1. 手術における影響

各年齢群の手術時および実験終了時(手術後4週)での体重は、若齢ラットにおいては発育に伴う増加は観察されたが、手術による体重減少などの影響はなかったと思われる。また、老齢ラットでは実験期間中に体重減少が観られたが、有意な減少ではなく、シャム群と脱神経群との間にも有意な差は認められなかった。以上より、本研究における脱神経モデルの手術の影響はなかったものとする。

2. 脱神経横隔膜の変化

一般的に骨格筋萎縮は、加齢に伴う自然発生的なものや骨折など外傷で安静状態に強いられることによるもの、また中枢神経系や末梢神経系病変の麻痺など様々な形で生じる。筋萎縮は筋タンパク含有量の低下によって生じるが、筋タンパク含有量の低下は合成と分解のバランスが崩れた際に生じる。本研究で使用した脱神経モデルは、他の萎縮モデルに比べ筋タンパクの合成が顕著に抑制され、筋萎縮に及ぼす影響が最も大きい¹⁹⁾。脱神経モデルとしてよく使用される方法は坐骨神経を切除

し、ヒラメ筋や足底筋、腓腹筋への神経伝達を遮断するモデルで、その変化は筋線維横断面積の減少やそれに伴う筋の発揮張力などに影響を及ぼす²⁰⁾²¹⁾。また、ヒラメ筋に関しては遅筋線維が速筋線維に移行する速筋化が生じると報告されている²²⁾。

本研究で実施した脱神経横隔膜モデルの若齢ラットでは、神経伝達を遮断された横隔膜筋線維において坐骨神経切除後のヒラメ筋で観察されるような速筋化とは対照的に、収縮特性として単収縮張力や強縮張力の低下、単収縮時間や1/2弛緩時間の延長、形態特性として筋線維横断面積におけるSO線維の萎縮抑制とFOG線維の肥大、FG線維の著明な萎縮が認められた。また、収縮タンパクの相対的発現量もfastest MHCであるMHC2bやMHC2dの低下と、それに伴うslow MHCであるMHC1と中間的な性質を持つMHC2aの相対的な増加が認められた。このSDS-PAGEに基づく結果は、FG線維に著明な萎縮が生じたことが主な原因であると考えられる。すなわち、筋内に含まれているMHC2bおよびMHC2dの発現量の減少が生じ、全MHC発現量に対するMHC1やMHC2aの相対値は有意に増加したと解釈される。これらは他の先行研究とはほぼ一致する見解であり、脱神経横隔膜は遅筋化が生じたと考えられる²³⁾²⁴⁾。以上の結果を総合して考えると、脱神経によりFG線維の主要な収縮タンパクであるMHC2bとMHC2dの合成が抑制されたのに対し、MHC1とMHC2aの合成は維持または促進され、横隔膜は遅筋化に至ったと考えられる。これらの原因として以下の3点が考えられる。

第1にストレッチの効果である。Zhanら²⁵⁾はウサギの横隔膜において片側の脱神経を実施し、sonomicrometerを用いて麻痺側筋線維のストレッチの程度を定量し、横隔膜肋骨中央部では横隔膜筋線維長の約5%の伸展が吸気局面で生じていることを報告している。これら脱神経横隔膜に対し対側横隔膜の収縮が機械的ストレッチを引き起こし、その結果SO線維の筋萎縮の抑制とFOG線維の筋肥大という特徴的な変化を引き起こしたのかもしれない。近年、筋における機械的ストレッチ刺激はDNAの転写を促進する働きをもち、細胞の活性化を示すc-fosやc-junの発現、その後続く筋特異的転写

因子である myogenin などの発現, さらには筋構成タンパクであるミオシンやアクチンの遺伝子発現に寄与することが報告されている²⁶⁾²⁷⁾。本研究において脱神経横隔膜が対側の横隔膜によってこのような作用を受けていた可能性が考えられる。

第2に対側横隔膜神経における再神経支配の可能性である。横隔膜は2本の横隔膜神経が胸腔内を下降し, 横隔膜肋骨中央部で筋線維に接している。この対側における横隔膜神経が脱神経横隔膜を再神経支配し, 結果的に若齢ラットの筋萎縮抑制効果に影響を及ぼしたのかもしれない。Miyata²³⁾らは片側横隔膜神経切除後, 2週において筋電図で再神経支配が起こっていないことを確認しているが, 本研究においては神経切除後4週経過しており, 対側からの神経支配が引き起こされた可能性も考えられる。

第3に横隔膜という構造特性に関係するのかもしれない。横隔膜は各血管の吻合も豊富であり, 小動脈や細小動脈, 毛細血管の形態および分枝の状態は他の骨格筋と同様であるが, 毛細血管密度は横隔膜が最も高いといわれている²⁸⁾。Borisovら²⁹⁾は4ヶ月齢ラットを使用し, 坐骨神経切除後のヒラメ筋における萎縮率が低いことの原因として, ヒラメ筋においてはType I線維で豊富な血管があり, 脱神経後も毛細血管が保持されるということを挙げている。それらのことから脱神経横隔膜においても毛細血管密度が高く, 遅筋線維における萎縮が少なかったのかもしれない。

以上の要因が考えられるが, どの要因が主に影響しているのか, また, 他に違った要因があるのか, それとも予測した要因が影響し合いながら変化したのかは不明であり, さらなる究明が必要である。

3. 加齢による脱神経横隔膜の変化の違い

本研究において脱神経横隔膜の特異的な変化は若齢ラットと老齢ラットの間で異なっていた。若齢ラットでは片側横隔膜神経切除を行うことで, 筋直接刺激における収縮張力の低下や収縮-弛緩時間の延長, SO線維の不変とFOG線維の肥大, FG線維の萎縮, MHCにおけるfastest MHCの減少とslow MHCの相対的増加が認められた。一方, 老齢ラットでは脱神経により収縮特性として単収縮張力や単収縮時間, 1/2弛緩時間において有意な差は認められなかった。形態特性としてSO線維やFOG線維, FG線維のすべての筋線維横断面積において萎縮が認められた。MHCの相対的発現量においてはfastest MHCであるMHC2bやMHC2dの低下と, それに伴うslow MHCであるMHC1と中間的な性質を持つMHC2aの相対的増加という遅筋化が認められた。

脱神経横隔膜における収縮特性の変化として老齢ラットでは単収縮張力に有意な低下が認められなかった。し

かし老齢ラットの脱神経群においてはデータのばらつきが大きく, 平均値だけをみるとシャム群と比較して大きく低下していた。この原因としては老齢ラットにおいては個体差が大きいためと考えられた。体重変化からも観察されるが老齢ラットにおいては個体間にばらつきが大きく, 同じ老齢ラットでも老齢化の進んだものや老齢化初期のものが混在していた可能性が考えられる。その結果, 収縮張力においてもばらつきが現れたのではないかと思われる。また, 単収縮時間においても有意な差は認められなかった。これは老齢ラットがすでに加齢による遅筋化を引き起こしており, 若齢ラットの単収縮時間よりも有意に延長していた。そのために老齢ラットにおいてシャム群と脱神経群との間に有意な差が生じなかったのではないかと思われる。老齢ラットにおいて若齢ラットと大きく異なる点は1/2弛緩時間に有意な変化が認められなかったこととSO線維, FOG線維, FG線維すべての筋線維において有意に萎縮したことである。1/2弛緩時間にはCa²⁺の取り込みという筋小胞体の機能が大きく関与しており, 今回の脱神経横隔膜では若齢において筋小胞体機能に影響を及ぼしたが, 老齢ラットにおいては影響を及ぼさなかった可能性が考えられる。脱神経横隔膜における構造特性の変化として老齢ラットではSO線維, FOG線維, FG線維すべての筋線維において横断面積が有意に低下した。このことは先に述べたストレッチ効果や横隔膜の構造特性, 対側からの再神経支配などに関する影響を受けていないため, すべての筋線維で萎縮した可能性が示唆される。

最終的に収縮タンパクの合成促進が生じなかった原因は非常に複雑で複合的であることが考えられる。近年, McBride³⁰⁾は, 遠心性収縮を負荷したラットの下腿筋筋線維を電気生理学的に分析し, 老齢ラットにおける伸張性刺激に対する反応性の低下を報告している。今後, 脱神経横隔膜における細胞の活性化を示すc-fosやc-junの発現, その後に続く筋特異的転写因子であるmyogeninなどの分析やストレッチ感受性チャンネルの解明が必要であると思われる。

本研究の結果, 骨格筋としての横隔膜筋線維は脱神経においてSO線維の萎縮抑制とFOG線維の肥大という特異的な変化が認められた。また, これら脱神経横隔膜の特異的な変化は年齢による相違が認められ, 若齢ラットでは萎縮抑制の効果があつたのに対して, 老齢ラットではすべての筋線維で萎縮を生じ, 年齢の違いが骨格筋への反応の違いとして現れた。このように選択的ではあるが筋萎縮が生じなかった原因として, それが呼吸性の間歇的ストレッチによるものであるかは議論の余地があるが, そうならば麻痺筋や不活動筋における萎縮予防の新しい理学療法アプローチとなる可能性を示唆するものであつた。例えば, 持続的他動運動装置(CPM)のよう

な装置にて持続的に関節運動を行うことで僅かな筋線維の伸張が得られるなら、それにより筋線維の萎縮予防につながるかもしれない。また、関節運動を伴わなくとも何らかの形で筋線維に僅かな間歇的伸張が加えられれば萎縮予防が可能かもしれない。しかし、脱神経横隔膜における変化が年齢によって異なったことは、加齢により反応性が低下した可能性がある。したがって加齢による反応性の低下をいかにして予防するかが今後の課題であると思われる。

文 献

- 1) Ansved T, Larsson L: Effects of denervation on enzyme-histochemical and morphometrical properties of the rat soleus muscle in relation to age. *Acta Physiol Scand* 139: 297-304, 1990.
- 2) Narayanan N, Jones DL, *et al.*: Effects of aging on sarcoplasmic reticulum function and contraction duration in skeletal muscles of the rat. *Am J Physiol* 271: C1032-C1040, 1996.
- 3) Luff AR: Age-associated changes in the innervation of muscle fibers and changes in the mechanical properties of motor units. *Ann NY Acad Sci* 854: 92-101, 1998.
- 4) Pette D, Staron RS: Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* 115: 359-372, 2001.
- 5) Holloszy JO, Chen M, *et al.*: Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mech Ageing Dev* 60: 199-213, 1991.
- 6) Loughna PT, Morgan MJ: Passive stretch modulates denervation induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain mRNA levels. *Pflugers Arch* 439: 52-55, 1999.
- 7) De Deyne PG: Formation of sarcomeres in developing myotubes: role of mechanical stretch and contractile activation. *Am J Physiol, Cell Physiol* 279: C1801-C1811, 2000.
- 8) Yellin H: Changes in fiber types of the hypertrophying denervated hemidiaphragm. *Exp Neurol* 42: 412-428, 1974.
- 9) Vandenburg HH, Hatfaludy S, *et al.*: Skeletal muscle growth is stimulated by intermittent stretch-relaxation in tissue culture. *Am J Physiol* 256: C674-C682, 1989.
- 10) Dix DJ, Eisenberg BR: Myosin mRNA accumulation and myofibrillogenesis at the myotendinous junction of stretched muscle fibers. *J Cell Biol* 111: 1885-1894, 1990.
- 11) Vandenburg H, Kaufman S: In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science* 203: 265-268, 1979.
- 12) 西田まどか, 沖田 実・他: 持続的伸張運動と間歇的伸張運動が拘縮と筋線維におよぼす影響. *理学療法学* 31(5): 304-311, 2004.
- 13) 深堀栄一, 中村仁哉・他: ラットの脱神経筋萎縮に対する持続的筋伸張運動の影響. *理学療法学* 28(1): 25-27, 2001.
- 14) Metzger JM, Scheidt KB, *et al.*: Histochemical and physiological characteristics of the rat diaphragm. *J Appl Physiol* 58: 1085-1091, 1985.
- 15) Reid WD, Hards JM, *et al.*: Proportions and sizes of muscle fiber types in the hamster diaphragm. *Muscle and Nerve* 12: 108-118, 1989.
- 16) Mendez A, Keys A: Density and composition of mammalian muscle. *Metabol* 9: 184-188, 1960.
- 17) Blanco CE, Sieck GC, *et al.*: Quantitative histochemical determination of succinic dehydrogenase activity in skeletal muscle fibers. *Histochem J* 20: 230-243, 1988.
- 18) Brooke MH, Kaiser KK: Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23: 369-379, 1970.
- 19) 山田 茂: 骨格筋萎縮の可逆性. 「運動と生体諸機能」, 森谷敏夫 (編), NAP, 東京, 1999, pp108-122.
- 20) Herbison GJ, Jaweed MM, *et al.*: Muscle atrophy in rats following denervation, casting, inflammation, and tenotomy. *Arch Phys Med Rehabil* 60: 401-404, 1979.
- 21) d'Albis A, Couteaux R, *et al.*: Response to denervation of rabbit soleus and gastrocnemius muscles. Time-course study of postnatal changes in myosin isoforms, fiber types, and contractile properties. *Biol Cell* 85: 9-20, 1995.
- 22) Huey KA, Bodine SC: Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. *Eur J Biochem* 256: 45-50, 1998.
- 23) Miyata H, Zhan WZ, *et al.*: Myoneural interactions affect diaphragm muscle adaptations to inactivity. *J Appl Physiol* 79: 1640-1649, 1995.
- 24) Zhan WZ, Watchko JF, *et al.*: Isotonic contractile and fatigue properties of developing rat diaphragm muscle. *J Appl Physiol* 84: 1260-1268, 1998.
- 25) Zhan WZ, Farkas GA, *et al.*: Regional adaptations of rabbit diaphragm muscle fibers to unilateral denervation. *J Appl Physiol* 79: 941-950, 1995.
- 26) Ikeda S, Yoshida A, *et al.*: Repetitive stretch induces c-fos and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. *Arch Phys Med Rehabil* 84: 419-423, 2003.
- 27) McBride TA: Stretch-activated ion channels and c-fos expression remain active after repeated eccentric bouts. *J Appl Physiol* 94: 2296-2302, 2003.
- 28) 里字明元: 呼吸の運動学. *総合リハ* 18: 377-384, 1990.
- 29) Borisov AB, Huang SK, *et al.*: Remodeling of the vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. *Anat Rec* 258: 292-304, 2000.
- 30) McBride T: Increased depolarization, prolonged recovery and reduced adaptation of the resting membrane potential in aged rat skeletal muscles following eccentric contractions. *Mech Ageing Dev* 115: 127-138, 2000.

〈Abstract〉**The Effect of Aging on Functional and Morphological Changes
in the Denervated Diaphragm Muscle of Rats**

Hidetaka IMAGITA, PhD, RPT

Health Sciences Major, Graduate School of Health Science, Hiroshima University

Yusuke SAEKI, Emiko SYONO, MS

Department of Biological Science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University

Osamu YOSHIMURA, MD

Hiroshima City Counseling Center for the Physically Disabled

Yoshiko TOBIMATSU, MD

Department of Health Sciences, Hiroshima University of Medicine

Hirofumi MIYATA, PhD

Department of Biological Science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University

The purpose of this study was to investigate changes after denervation in rats diaphragm. Old (2-year, n = 16) and young (10-week, n = 16) male Wistar rats were used. The unilateral diaphragms of eight rats in each age group was denervated by cutting the phrenic nerve at the cervical level, and sham operation was performed on the other eight in each. The undenervated side diaphragms of old and young sham rats were studied to investigate the age-related changes. Four weeks after the denervation, isometric contraction properties, fiber type composition, and expression of myosin heavy chain (MHC) isoforms in all groups were observed. The changes caused by denervation were observed in each age group. The difference of the changes was compared between old and young groups. After the denervation, in the young rats, the area of slow oxidative (SO) fibers were not significantly different from those of the same age sham group. Further fast-twitch oxidative glycolytic (FOG) fibers were significantly larger than those of the same age sham group. On the contrary, in the old rats, the area of SO fibers and FOG fibers were significantly smaller than those of the sham group. The changes caused by denervation were different depending upon the case of the young rats and that of the old rats. The characteristics of slower muscles in the diaphragm of young rats after the denervation were considered to be due to the effect of the stretch stimuli caused by the respiratory contraction of the contralateral diaphragm.