

筋と運動ニューロンの結合がラット横隔膜 の収縮特性に及ぼす影響

宮田浩文*・Wen-Zni Zhan**・Y.S. Prakash**,
Gary C. Sieck**

Influence of myoneural interactions on contractile properties of rat diaphragm

Hirofumi MIYATA, Wen-Zni Zhan**, Y.S. Prakash** and
Gary C. Sieck**

Abstract

We hypothesize that the adaptation of rat diaphragm muscle to inactivity is affected by myoneural interactions. We compared two models of hemidiaphragm inactivity; 1) Denervation (DV) of phrenic nerve, where the interaction between motoneuron and muscle is disrupted; and 2) Spinal transection (ST) by hemisection of the spinal cord at the C2 level, where the interaction between motoneuron and muscle remains intact. Following 2 weeks of inactivity, *in vitro* isometric and isotonic contractile properties were assessed using direct supramaximal muscle stimulation. Maximal tetanic force (P_o) was normalized for cross-sectional area, and maximal unloaded shortening velocity (V_o) was determined using a slack test. Isometric fatigue resistance was assessed by repetitive stimulation at 40 Hz, and a fatigue index (FI) was then calculated as the ratio of force after 2 min to initial force. Expression of different myosin heavy chain (MHC) isoforms was determined by SDS-PAGE gel. Compared to control (CT) group, there was a reduction in P_o in both experimental groups, but this decrease was greater in the DV group than in the ST group. V_o also decreased in the DV group, but was unchanged in the ST group. FI was higher in the DV group than in the CT group, but was unchanged in the ST group. These adaptations in the physiologic properties of muscles were attributable to changes in the expression of MHC isoforms. The relative contribution of fast MHC isoforms was decreased in the DV group, but was unchanged in the ST group compared to that in the CT group. Our results suggest that intact interactions between muscle and motoneurons play an important role in regulating physiological adaptations of diaphragm muscle to inactivity.

Key words : myoneural interaction, muscle inactivity, rat diaphragm

* 山口大学教養部運動生理学研究室 (〒753 山口市吉田1677-1 山口大学)

* Department of Exercise Physiology, Faculty of Liberal Arts, Yamaguchi University

** Departments of Anesthesiology, Physiology and Biophysics, Mayo Clinic, USA

** Mayo Clinic (SMH), Rochester Minnesota, 55905, USA

I. 緒言

骨格筋の構造や機能に及ぼす不活動の影響については、主に後肢筋の不活動モデルを用いて検討されている^{15,23,24,38,39}。一方、筋とその支配運動ニューロンが結合を維持している不活動モデルの場合、骨格筋の変化は比較的小さいことが示されている。^{2, 29,33}。Pierottiら³³は、ネコの腰髄内運動ニューロンへの入力を絶つ処置 (Spinal Isolation; SI) を施し、筋と運動ニューロンの結合を保持した状態で後肢筋を不活動にしたとき、前頸骨筋の収縮特性が変化しないことを報告している。この結果は、筋の興奮・収縮以外の因子が筋の収縮特性の調整に重要な役割を持つことを示している。しかし、このSIモデルで用いられたネコの頸骨前部の筋は正常な状態での活動時間が著しく低いこと (総記録時間の2%程度)²⁹、脊髄切断後も筋電図が記録される場合があること³⁰等も報告されている。したがって、SI前後の筋活動に大きな変化がなく、不活動の影響が顕著でないことも考えられる。このように、筋の不活動状態の変化を明らかにするためには、筋を不活動にする処置の前後で活動量を定量し、その差を考慮することが不可欠である。しかし、後肢筋の活動は多種多様であり、その活動量を定量することは容易でない。

一方、呼吸活動の主働筋である横隔膜は、周期的に活動しており、その活動量の定量が比較的容易である。また、横隔膜は他の筋に比べると活動時間が著しく長く、ラットの場合、その活動時間は総記録時間の30~40%⁴⁰と報告されている。さらに、周期的な活動リズムは延髄の呼吸中枢で発生し、単シナプス結合で頸髄内のPhrenic運動ニューロンに伝えられる。¹⁰。したがって、延髄から運動ニューロンへの経路を切断することにより、運動ニューロンと横隔膜を完全に不活動にすることができる¹⁸。

以上より、横隔膜の不活動モデルでは、処置前後の活動量の差が大きく、横隔膜に生じる変化が大きいものと推定される。そこで、本研究はラット横隔膜を用いて、筋と運動ニューロンの結合が不活動筋に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。そのため、筋と運動ニューロンの結合を完全に破壊する片側横隔膜神経切断モデルとその結合を維持する頸髄半切モデルを用い、2週間の不活動期間後の横隔膜収縮特性および収縮タンパクの変化を比較・検討した。

II. 実験方法

A. 一般の手順

雄性のSprague-Dawleyを、対照 (CT; n=8) 群、右横隔膜神経を頸部で切断するDenervation (DV; n=8) 群および右第二頸髄で脊髄を切断するSpinal Transection (ST; n=8) 群の3群に分けた (CT群; 265 ± 10 g, DV群; 280 ± 10 g, ST; 286 ± 5 g, 平均体重 \pm 標準誤差)。全てのラットをKetamine (60mg/kg) + Zylazine (2.5mg/kg) の筋内注入により麻酔し、滅菌消毒した手術用具を用いて各処置を施した。手術中はヒーターと連結したパットを用いて体温を一定に保つと同時に、心電図をモニターした。手術後、処置部に出血がないことを確認した上で筋と皮膚をそれぞれ縫合し、傷口はBetadineにより消毒した。手術後2日間は、抗生物質のFlou-sillin (25,000 units/kg) を筋内に注入し、体重測定と行動観察により回復過程を注意深く監視した。2週間後、右横隔膜Costal部を摘出し、幅5mm (長さ2cm, 厚さ2mm) 程度の筋切片を4~5個作成した。これらの筋切片を用い、収縮 (Isometric および Isotonic) 特性およびミオシン重鎖分子種 (myosin heavy chain (MHC) isoform) の定量を行った。本研究の手順は、アメリカ生理学会のAnimal care guidelinesに基づくMayo Clinic Animal use committeeにより許可された。

B. 横隔膜不活動モデル

1) DV群 手術用顕微鏡下で頸部腹側の中心線を約4cm切開し、表層筋を注意深く開いた後、右横隔膜神経軸索を露出した。軸索内に残る栄養物質の影響をなくすために、横隔膜神経軸索を1~2cm取り除いた。

2) ST群 頸部背側の中心線を約5cm切開し表層筋を注意深く開いた後、背側laminectomyを施し第二頸髄を露出した。硬膜の一部を開き、幅2mmの手術用マイクロナイフで脊髄内の右側部および腹側部の索束を切断した。この際、背側索束にはできるだけ傷をつけないように配慮した。

手術の効果は、いずれも手術中および実験終了時 (2週間後) に横隔膜筋電図をモニターすることによって確認した。筋電信号は右横隔膜のCostal部に埋め込んだワイヤー電極 (直径0.1mm) により双極性に誘導し、バンドパスフィルター (20~2KHz) を通し、生体アンプで増幅後、オシロスコープ (Nicolet 410) でモニターし、同時に磁気デスクに

保存した。

C. Isometric 収縮特性

作成した筋切片をリンガー液 (137mM Na⁺, 5mM K⁺, 5.04mM Ca²⁺, 2mM Mg²⁺, 121mM Cl⁻, 20mM HCO₃⁻, 1.9mM HPO₄²⁻, 0.012mM d-tubocurarine) 中に垂直に固定した。リンガー液には95% O₂-5% CO₂を通入し, pH 7.4, 26°Cに保持した。横隔膜切片の片側をForce Transducerに連結固定し, マイクロマニピレーターにより最大単収縮力が見られる筋長(至適筋長)に設定した。筋を2ms幅の矩形波で直接刺激し, 強度は最大単収縮力が見られる強度の(約150mV)の125%に設定した。張力-刺激頻度関係は, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100Hzの各1秒間刺激によって求め, その中の最大値を最大張力(Po)とした。筋横断面積をMendez & Keys³¹⁾の式により求め, 単位横断面積あたりの張力を算出した。筋の疲労耐性(FI)は, Burkeら⁵⁾の方法に従い, 2分間刺激(40Hz, 330ms幅)後の張力を初期張力に対する比で表した。

D. Isotonic 収縮特性

筋切片の中心側の腱を張力計に連結したアルミホイール片に瞬間接着剤で固定し, 他方の腱をマイクロマニピレーターに連結したクランプに固定し, 至適筋長を設定した。筋は約1cm離して置いたプラチナ板を介して, 超最大強度の0.2ms幅の矩形波によって刺激した。最大無負荷短縮速度(Vo)は, 瞬間的に生じる様々な筋長変化(dl)を回復するために要する時間(dt)を計測して求めた(Slack test)^{9,14)}。測定は, 様々なdlに対するdtの違いを明確に示すため, 前述リンガー液を15°Cに冷却し, 筋短縮速度を遅くして行われた。Cambridge system (Model 300B Cambridge Technology Inc.)による筋長および張力の信号は, オシロスコープに表示すると同時に磁気ディスクに保存した。これらのデータから平均Vo(dl/dt)を求めた。

E. MHC isoform fractions

ミオシンは, Bulter-Brown & Whalen⁶⁾の方法に従ってpH6.5, 4°Cの条件下で抽出した。ミオシンフィラメントを含む固形成分をサンプルバッファー(0.5M NaCl, 10mM NaH₂PO₄)中に溶かし, SDSサンプル緩衝液(62.5mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride, 2% (wt/vol) SDS, 10% glycerol, 5% (vol/vol) 2-mercaptoethanol, and 0.001% (wt/vol) bromophenol blue,

pH6.8)²⁵⁾により100倍希釈した。得られたサンプルは2分間煮沸後, -80°Cのフリーザー中に保存した。

異なるMHC isoformはLaemmli²⁵⁾およびLa Framboiseら²⁷⁾の方法によるSDS-PAGE gelにより分離した。ゲルは30%のアクリルアミド(28.5% acrylamide & 1.5% Bis)から作成した。電気泳動は垂直スラブゲルユニット(SE600 Hoefer Scientific Instrument)を用い, 11.5cmの分離ゲル(架橋度5%, 総アクリルアミド濃度5%)と4.5cmの濃縮ゲル(架橋度5%, 総アクリルアミド濃度3%)上で行った。通電は120Vで24時間行い, 通電中Tris/glycine running buffer (pH 8.3)を15°Cに保った。通電後, 分離ゲルに銀染色を施した。^{25,26,28)}。ゲル中の各MHC isoform (MHC-Neo, MHC-Slow, MHC-2B, MHC-2XおよびMHC-2A)のバンドは先にimmunoblotting法を用いて決定されている。^{26,28)}。MHC isoformの相対的な比をdensitometryのよって測定し, それぞれの相対量に基づいて, Fast MHC isoform (2A+2B+2X)の総MHC isoformに対する比を算出した。

F. 統計処理

得られた結果は1要因または2要因の分散分析によって検定し, 有意差の認められた項目についてはTurkey法によりposthoc analysisを行った。収縮特性と% Fast MHC isoformの関係は直線回帰分析によって検定した。有意水準は全ての場合においてp<0.05とした。結果は全て平均±標準誤差で表した。

III. 結果

A. 不活動モデルの検証

ラットの平均体重は実験の最終段階において, 三群間で差は認められなかった(CT群; 318±7g, DV群; 338±12g, ST群; 321±12g) DVまたはSTによって麻痺した右横隔膜から記録した筋電図をFig. 1に示した。手術後, 横隔膜の筋放電は規則的に発生し, Duty cycleは30~40%であった。いずれの場合も, 自発性の筋放電は手術直後に消失した。また2週間後においても, 筋放電は認められなかった。これらの結果から, 右横隔膜の麻痺は2週間継続したものと推定される。

B. 収縮特性

刺激頻度と張力(a)および最大張力に対する相対張力との関係(b)をFig. 2に示した。Fig. 2(a)

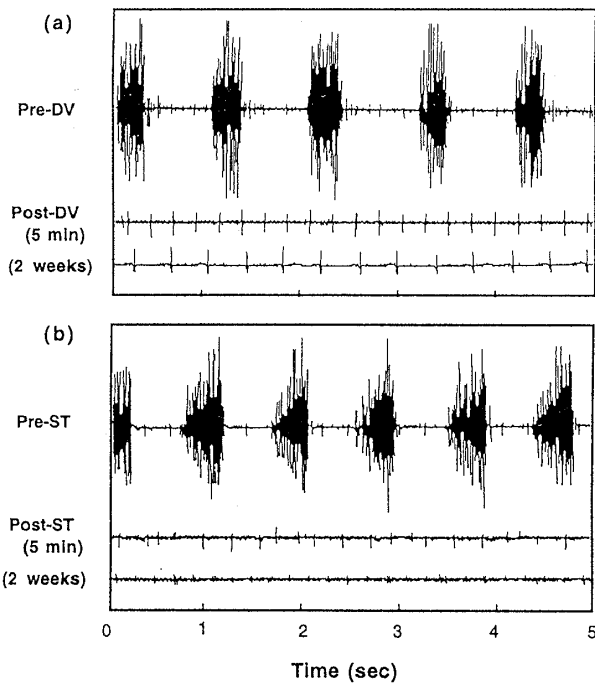


Fig. 1 Electromyographic (EMG) activity taken from the right diaphragm muscle of rats subjected to a denervation (DV) of right phrenic nerve (a), and a right spinal transection (ST) at cervical C2 level (b), respectively. Top, middle and bottom recordings in each panel were recorded before, 5 minutes after surgery and 2 weeks after surgery, respectively. In both cases, spontaneous inspiratory-related EMG activity disappeared completely after surgery and remained inactive for 2 weeks (time of terminal of experiments).

から明らかのように、同一刺激頻度に対する張力は、DV群<ST群<CT群であった。全ての刺激条件で、DV群とCT群の張力の間有意差が認められた。一方、ST群の張力は75および100HzでCT群の値より有意に低かった。最大張力(P₀)が得られた刺激頻度は、DV群で30~50Hz、ST群はCT群と同様に、75Hzまたは100Hzであった (Fig. 2 (b))。

Fig. 3 (a) に示すようにDV群とST群のP₀は2週間の不活動によって有意に低下した。V₀は、DV群のみが他の2群より有意に低かった (Fig. 3 (b))。ST群のV₀はCT群とほぼ同じであった。FIは、DV群、ST群ともにCT群より高かったが、CT群との間に有意差が認められたのはDV群のみであった (Fig. 3 (c))。

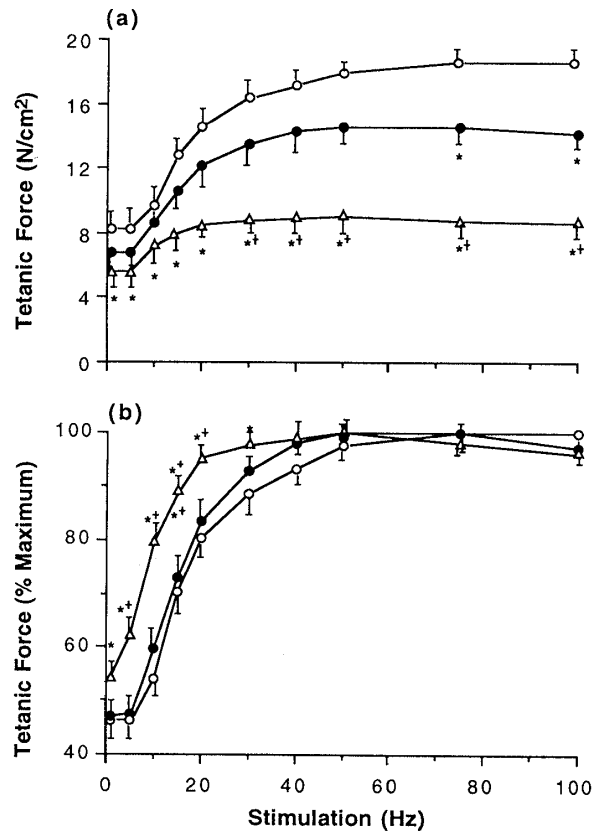


Fig. 2 Force/frequency relationship of the diaphragm muscle in DV and ST models. Force/frequency curve of diaphragm muscle was affected by 2 weeks of inactivity induced by DV and ST (a), Normalized force-frequency curves of right diaphragm muscle were shifted to leftward after 2 weeks of inactivity induced by DV, but not in ST group (b).

*P<0.05 (vs. CT values).

○, ● and △ for CT, ST and DV groups, respectively.

C. MHC isoform fractions

各群における横隔膜のMHC isoform構成比をTable 1に示した。ST群のMHC isoform構成比はいずれもCT群の各値とほぼ同じであった。しかし、DV群のMHC-2XおよびMHC-2B isoformの構成比はCT群の各値より減少し、MHC-SlowおよびMHC-2A isoformの構成比はCT群の各値より増加した。また、DV群では、8例のうち2例でわずかながらMHC-Neo isoformが検出された。

Fig. 4には、Fast MHC isoform構成比とP₀ (a)、V₀ (b)、およびFI (c)との関係が示されている。

Table 1. Myosin heavy chain (MHC) isoform fractions in each group.

Group	MHC isoform fraction(%)				
	MHC-Neo	MHC-Slow	MHC-2A	MHC-2X	MHC-2B
CT	--	21.2±0.8	32.8±1.5	33.5±1.3	12.5±2.2
DV	0.6±1.3	33.9±1.3*	37.2±2.0*	24.9±1.8*	4.0±1.1*
ST	--	23.7±0.8	28.0±0.8	32.2±0.7	16.1±1.4

Values: Means±SE (n=8 in each group). CT: control, DV: denervation and ST: spinal transection.

*p<0.05 (vs. CT group)

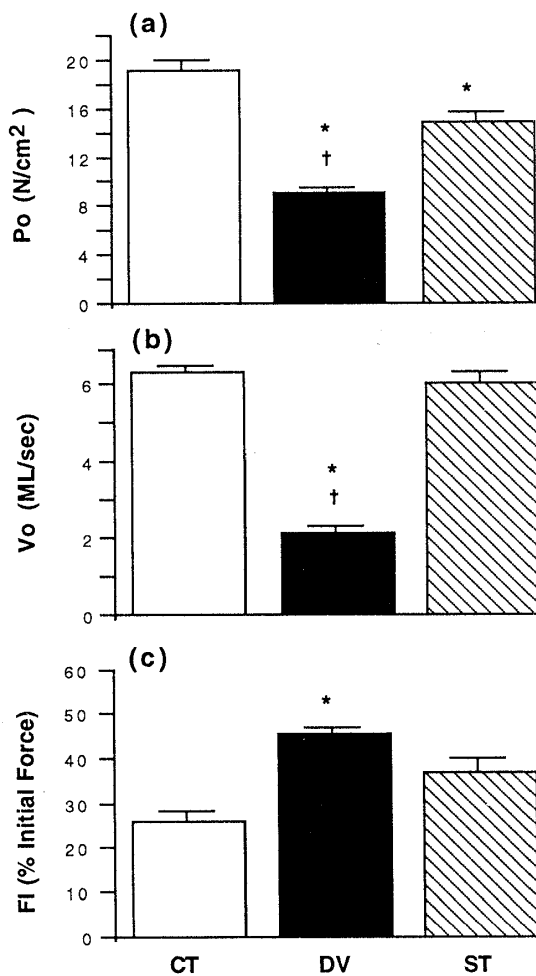


Fig. 3 Changes in maximum tetanic tension (Po), maximum unloaded shortening velocity (Vo) and fatigue index (FI) of right hemidiaphragm muscle after 2 weeks of inactivity induced by DV and ST. *p<0.05 (vs. CT group) and †p<0.05 (vs. ST group).

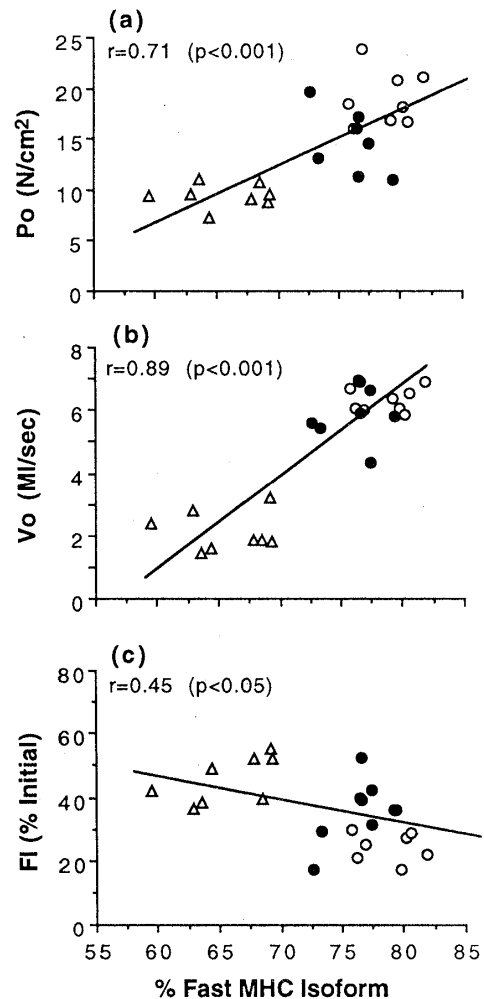


Fig. 4 Relationships of Po (a), Vo (b) and FI (c) to the percentage of Fast myosin heavy chain (MHC) isoform including MHC-2A, MHC-2X and MHC-2B. ○, ● and △ for CT, ST and DV groups, respectively.

Po または Vo と Fast MHC isoform 構成比との間に有意な正の相関関係が認められた。FI と Fast MHC isoform 構成比との間には負の低い相関が認められた。

IV. 考 察

本研究において、片側横隔膜神経切断または第二頸髄半切は、横隔膜の収縮力および短縮速度の低下、疲労耐性の増加などの変化をもたらすことが明らかになった。また、これらの変化は、特に片側神経切断群で顕著であること、MHC isoform 構成比の変化に起因していることが明らかになった。以上のような横隔膜の変化およびその程度の違いをもたらした要因として、不活動、受動的ストレッチ、筋と運動ニューロンの結合等が考えられる。

A. 不活動に対する収縮特性の変化

これまで、後肢筋の不活動に対する変化を調べた先行研究では、多くの相反する結果が報告されている。例えば、St-Pierre ら⁴⁵⁾ はラット座骨神経への2週間にわたる Tetrodotoxin (TTX) 処置の結果、ヒラメ筋と腓腹筋において等尺性収縮時間および1/2弛緩時間の延長、すなわち筋の遅筋化を認めた。一方、Roy ら³⁶⁾ はネコの胸髄レベルで脊髄を切断した結果、ヒラメ筋の等尺性収縮時間は短縮し、ヒラメ筋と腓腹筋の最大収縮速度およびミオシン ATPase 活性は有意に増加したことを報告している。加えて、Spector⁴⁴⁾ は TTX 処置を施したラットヒラメ筋の短縮速度が増加したことを示している。これらの結果は、いずれも筋の収縮速度の増加すなわち速筋化を意味している。以上の矛盾した結果は、各実験に用いられた不活動モデル、不活動の期間、被験動物および被験筋の違いに一部起因していると考えられるが、すべてを納得させる明確な説明はなされていない。しかし、不活動筋の速筋化を示す報告が比較的多いこと、活動量が増加すると筋は遅筋化することが広く認められていること³²⁾を考慮すると、不活動筋は速筋化すると考えた方が一般的かもしれない。

一方、本研究で用いた片側横隔膜の不活動モデルについては、横隔膜の遅筋化が報告されている。例えば、Hopkins ら²¹⁾ は、Intermediate (Type I) 線維の肥大および White (Type IIb) 線維の萎縮を、また、Zhan & Sieck⁴⁹⁾ は収縮力および収縮速度の低下を認めている。さらに、このモデルを用いた多く

の研究が不活動筋の筋線維肥大を報告している^{43,48)}。このように、不活動になった片側横隔膜の遅筋化、肥大という一般的には考えにくい現象は、反対側横隔膜の周期的収縮によるストレッチに起因すると考えられている。

B. 受動的ストレッチの影響

Goldspink ら¹⁷⁾ は、ストレッチ刺激により Fast MHC isoform の発現が抑制され、Slow MHC isoform の発現が促進されることをウサギの下肢筋において示している。この結果から、本研究で得られた不活動横隔膜の遅筋化も反対側横隔膜の活動による受動的ストレッチの影響と考えるべきであろう。しかし、ストレッチ刺激単独で筋が遅筋化したり、肥大したりする点には反論もある。例えば、Roy ら³⁵⁾ は、脊髄を切断されたネコの後肢筋を人工的にストレッチしても筋量はほとんど変化しないことを明らかにしている。また、本研究では、DV 群と同じ受動的ストレッチを受けている ST 群において、MHC isoform の発現および収縮特性の変化程度は DV 群のそれらと明らかに異なっていた (Table 1, Fig. 3)。これらの結果は、ストレッチ刺激単独では極端な遅筋化が起こりにくいことを示していると考えられる。筋と運動ニューロンの結合が保たれているモデルではストレッチ刺激の影響が現れにくいことから、運動ニューロン由来栄養因子の関与が推測される。

C. 筋と運動ニューロンの結合の影響

DV 群と ST 群の横隔膜はいずれも不活動に対して同様な変化を示したが、その程度は異なっていた。Zhan & Sieck⁴⁹⁾ は、ハムスター横隔膜の不活動に対する形態的・機能的変化は、DV 群に比べ、軸索の活動電位伝搬のみが阻害されている TTX 群で小さいことを報告している。また、TTX 群では、DV 群に比べて、神経末端の発芽³⁾、アセチルコリン受容体密度の増加量²⁾、筋線維の静止膜電位の低下^{2,12)}の程度が小さいことが認められている。TTX 群と DV 群の最も異なる点は、軸索流が維持されているか否か、すなわち運動ニューロンと筋の間で栄養因子が相互に交換されているか否かである^{2),12)}。本研究の ST 群では、軸索流が正常に行われていることが HRP の逆行性輸送で確認されている (未発表データ)。したがって、ST 群と DV 群の間に見られた収縮特性の違いは、栄養因子の有無に依存すると考えられる。

栄養因子が筋に及ぼす影響に関しては、神経抽出物質を用いて多数研究されている。例えば、Davis & Kiernan¹¹⁾は神経組織からの抽出物質が神経切断によって生じるラット下肢筋の萎縮を阻止することを示している。このような神経由来の栄養因子、特に神経・筋接合部の形態を制御している因子として、神経終末に存在する Calcitonin gene-related peptide (CCRP) が候補として挙げられている⁴⁷⁾。しかし、Sieckら⁴²⁾は、ほとんどの Phrenic 運動ニューロンは CGRP mRNA を発現しないことから、CGRP が横隔膜における神経由来栄養物質である可能性は低いとしている。最近、Helgrenら¹⁹⁾は、Ciliary neurotrophic factor (CNTF) を神経由来栄養因子として挙げており、CNTF の投与が神経切断後生じるラットヒラメ筋の萎縮を阻止する結果を示している。CNTF が Phrenic 運動ニューロンに発現するか否かは不明であるが、現段階では候補の1つと考えられる。

D. MHC isoforms と収縮特性

本研究では、DV 群の 8 例中 2 例において微量の MHC-Neo isoform の再発現が確認された (Table 1)。横隔膜の MHC-Neo isoform は生後 28 日にすでに消失すること²²⁾、後肢筋の MHC-Neo isoform は神経切断により再発現することが免疫組織化学的手法によって明らかにされている³⁸⁾。しかし、本研究と同様な生化学的手法を用いた研究^{8,30)}では、DV 処置後に MHC-Neo isoform の出現を認めておらず、この点に関してはさらに検討する必要がある。

本研究において、Fast MHC isoform の構成比と P_o との間に有意な直線関係が認められた (Fig. 4 (a))。Eddinger & Moss¹³⁾は、type I の最大張力は type II のその 68% であることを報告している。さらに、Sieck & Fournier⁴¹⁾は、Slow unit の P_o が Fast unit の約 50% 相当であることをネコの横隔膜において示している。これらの結果から、本研究で得られた Fast MHC isoform の構成比と P_o 間の正の相関関係は説明される。筋線維タイプによって P_o が異なる一つの理由は、筋原線維密度の違いであろう。すなわち、type I (Slow) 筋線維は type II (Fast) 筋線維より高密度のミトコンドリアを有しており、その分筋原線維密度は低いことが予想される。しかしながら、この筋原線維密度の違いだけで、大きな P_o の違いを説明することは難しい。これまで指摘されているように、クロスブリッジ脱着速度、

強く結合している状態でのクロスブリッジ数、各クロスブリッジの結合力等に違いがあるのかもしれない¹⁶⁾。筋の短縮速度に関しては、高い Fast MHC isoform 構成比をもつ単一筋線維ほど速い短縮速度を示すことが明らかにされている^{4,34,38,46)}。また、全筋レベルにおいても、張力-速度関係から求められた最大短縮速度は MHC isoform 構成比と相関していることが報告されている⁷⁾。本研究では、Slack test によって得られた短縮速度と Fast MHC isoform との間に高相関があることを示した (Fig. 4 (b))。これらの高い相関関係は、筋線維タイプと myosin ATPase 活性が密接に関連し³⁷⁾、その ATPase 活性と最大短縮速度が極めて高い正相関を示すこと¹⁾から十分に予想される。FI と Fast MHC isoform の構成比との間には、密接な相関関係がみられなかった (Fig. 4 (c))。疲労耐性には筋の酸化酵素活性や SR における Ca^{2+} の取り込み、放出の能力などの要素が複合的に影響しており、Fast MHC isoform 構成比の直接的な寄与は少ないと考えられる。

V. 結論

本研究は、筋と運動ニューロンの結合が不活動筋に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。そのため、運動ニューロンと筋の結合を完全に絶つ片側横隔膜神経切断モデル (Denervation; DV) とその結合が維持されている頸髄半切モデル (Spinal Transection; ST) における横隔膜の収縮特性および収縮タンパクの変化を比較・検討した。2 週間の不活動後、単位断面積当たりの最大収縮力 (P_o)、無負荷最大短縮速度 (V_o) および疲労耐性 (FI) を *in vitro* で測定した。ミオシン重鎖分子 (Myosin heavy chain; MHC) isoform は SDS-PAGE で分析した。

P_o は、対照 (CT) 群に比べ DV 群、ST 群とも低下し、その低下は DV 群の方が顕著であった。 V_o は DV 群では低下したが、ST 群は変わらなかった。FI は、DV 群では高値を示したが、ST 群は変わらなかった。これらの横隔膜収縮特性における変化は、MHC isoform の構成比の変化に起因していると考えられる。すなわち、CT 群に比べ、MHC-2X と 2B isoform の減少および MHC-Slow と 2A isoform の増加が DV 群では認められたのに対し、ST 群では大きな変化はなかった。これらの結果は、筋と運動ニューロンの結合が横隔膜の収縮特性の調整に重要

な役割を持つことを示している。

謝 辞

本論文を作成するにあたり、御助言をいただきました杉浦崇夫博士、曾根涼子博士（山口大学）に対し深く感謝の意を表します。本研究は、National Heart, Lung and Blood Institute Grants HL-37680 (USA) の補助をうけた。

参考文献

- 1) Bárány M (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50: 197-218.
- 2) Bary J J, Hubbard J I and Mills R G (1979) The trophic influence of tetrodotoxine-inactive nerves on normal and reinnervated rat skeletal muscle. *J Physiol* 297: 479-491.
- 3) Betz W J, Caldwell J H and Ribchester R R (1979) Sprouting of active nerve terminals in partially inactive muscles of the rat. *J Physiol* 303: 281-297.
- 4) Bottinelli R, Schiaffino S and Reggiani C (1991) Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform composition of skinned fibers from rat skeletal muscle. *J Physiol* 437: 655-672.
- 5) Burke R E, Levine, D N, Tsairis P and Zajac F E (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234: 723-748.
- 6) Butler-Brown G S, and Whalen R G (1984) Myosin isoenzyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev Biol* 102: 324-334.
- 7) Caiozaa V J, Herrick R E and Baldwin K M (1991) Influence of hyperthyroidism on maximal shortening velocity and myosin isoform distribution in skeletal muscles. *Am J Physiol* 261 (Cell Physiol 30): C285-C295.
- 8) Carraro U, Morale D, Mussini I, Lucke S, Cantini M, Betto R, Catani C, Libera L, Betto D and Noventa D (1985) Chronic denervation of rat hemidiaphragm: Maintenance of fiber heterogeneity with associated increasing uniformity of myosin isoforms. *J Cell Biol* 100: 161-174.
- 9) Clafin D R and Faulkner J A (1985) Shortening velocity extrapolated to zero load and loaded shortening velocity of whole rat skeletal muscle. *J Physiol* 359: 357-363.
- 10) Choen M I, Piercey M F, Gootman P M and Wolotsky P (1974) Synaptic connections between medullary inspiratory neurons and phrenic motoneurons as revealed by cross-correlation. *Brain Res.* 81: 319-324.
- 11) Davis H L and Kiernan K K (1981) Effect of nerve extract on atrophy of denervated or immobilized muscle. *Exp Neurol* 72: 582-591.
- 12) Drachman D B, Stanley E F, Pestronk A, Griffin J W and Price D L (1982) Neurotrophic regulation of two properties of skeletal muscle by impulse-dependent and spontaneous acetylcholine transmission. *J Neuroscience.* 2: 232-243.
- 13) Eddinger T J and Moss R L (1987) Mechanical properties of skinned single fibers of identified types from rat diaphragm. *Am J Physiol* 253 (Cell Physiol 22) : C210-C218.
- 14) Edoman K A (1979) The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibers. *J Physiol* 291: 143-159.
- 15) Finol H J, Lewis D M and Owens R (1981) The effects of denervation on contractile properties of rat skeletal muscle. *J Physiol* 391: 81-92.
- 16) Fitts R H, McDonald K S and Schluter J M (1991) The determinations of skeletal muscle force and power: their adaptability with changes in activity pattern. *J Biomech* 24: 111-122.
- 17) Goldspink G, Scutt A, Loughna P T, Wells D J, Jaenicke T and Gerlach G F (1992) Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am J Physiol* 262 (Regulatory Integrative Comp Physiol 31) : R356-363.
- 18) Guth L (1976) Functional plasticity in the respiratory pathway of the mammalian spinal cord. *Exp Neurol* 51: 414-420.
- 19) Helgren M E, Squinto S P, Davis H L, Parry D J, Boulton T G, Heck C S, Zhu Y, Yancopoulos G D, Lindsay R M and DiStefano P S (1994) Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 76: 493-504.
- 20) HERNBERGEN E and KERNELL D (1993) Daily duration of activity in ankle muscle of cats. XXXII nd IUPS (Clasgow) Abstr: 205.
- 21) Hopkins D, Manchester K L and Gregory M (1983) Histochemical and biochemical characteristics of the transient hypertrophy of the denervated rat hemidiaphragm. *Exp Neurol* 81: 279-293.
- 22) Kappati G and Enge W K (1968) Correlative histochemical study of skeletal muscle after suprasedgmental denervation, peripheral nerve section, and skeletal fixation. *Neurology* 18: 681-692.

- 23) Johnson B D, Wilson L E, Zhan W Z, Watchko J F, Daood M J and Sieck G C (1994) Contractile properties of the developing diaphragm correlate with myosin heavy chain phenotype. *J Appl Physiol* 77: 481-487.
- 24) Kotsias B A and Muchnik S (1987) Mechanical and electrical properties of denervated rat skeletal muscle. *Exp Neurol* 97: 516-528.
- 25) Laemmli U (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage of T4. *Nature* 227: 680-685.
- 26) LaFramboise W A, Daood M J, Guthrie R D, Moretti P, Schiaffino S and Ontell M (1990a) Electrophoretic separation and immunological identification of type 2X myosin heavy chain in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1035: 109-112.
- 27) LaFramboise W A, Daood M J, Guthrie R D, Butler-Browne G S, Whalen R G and Ontell M (1990b) Myosin isoforms in neonatal rat extensor digitorum longus, diaphragm and soleus muscle. *Am J Physiol* 259 (Lung Cell Mol Physiol 3): L116-L112.
- 27) LaFramboise W A, Daood M J, Guthrie R D, Schiaffino S, Moretti P, Brozanski M P, Ontell M P, Butler-Browne G S, Whalen R G and Ontell M (1991) Emergence of the mature myosin phenotype in the rat diaphragm muscle. *Dev Biol* 144: 1-15.
- 29) Margreth A, Libera L D, Salviati G and Ischia N (1980) Spinal transection and the postnatal differentiation of slow myosin isoenzymes. *Muscle & Nerve* 3: 483-486.
- 30) Matsuda R, Spector D and Strohman R C (1984) Denervated skeletal muscle displays discoordinate regulation for the synthesis of several myofibrillar proteins. *Proc Natural Acad Sci USA* 81: 483-486.
- 31) Mendez and Keys A (1960) Density and composition of mammalian muscle. *Metabolism* 9: 184-188.
- 32) Pette D (1992) Fiber transformation and fiber replacement in chronically stimulated muscle. *J Heart Lung Transplant* 11: S299-305.
- 33) Pierotti D J, Roy R R, Bodine-Fowler S C, Hodgson J A and Edgerton V R (1991) Mechanical and morphological properties of chronically inactive cat tibialis anterior motor units. *J Physiol* 444: 175-192.
- 34) Reiser P J, Moss R L, Giulian G G and Greaser M L (1985) Shortening velocity and myosin heavy chains of developing rabbit muscle fibers. *J Biol Chem* 260: 14403-14405.
- 35) Roy R R, Pierotti D J, Flores V, Rudolph W and Edgerton V R (1992) Fiber size and type adaptation to spinal isolation and cyclical passive stretch in cat hindlimb. *J Anat* 180: 491-499.
- 36) Roy R R, Sacks R D, Baldwin S K, Short M and Edgerton V R, (1984) Interrelationships of contraction time, Vmax, and myosin ATPase after spinal transection. *J Appl Physiol* 56: 1594-1601.
- 37) Saltin B and Gollnick P D (1983) Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In Peachey L D Handbook of Physiology, section 10 Skeletal muscle, 555-631, Waverly Press Inc., Maryland
- 38) Schiaffino S, Gorza L, Pitton G, Saggin L, Ausoni S, Sartore S. and Lomo T (1988b) Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and paralyzed rat skeletal muscle. *Dev Biol* 127: 1-11.
- 39) Schiaffino S, Ausoni S, Gorza, L, Gundersen S K and Lomo T (1988a) Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibers. *Acta Physiol Scand* 134: 575-576.
- 40) Schlenker E H and Goldman M (1985) Ventilatory responses of aged male and female rats to hypercapnia and to hypoxia. *Gerontology* 31: 301-308.
- 41) Sieck G C and Fournier M (1991) Developmental aspects of diaphragm muscle cells: structural and functional organization. In: *Developmental Neurobiology of Breathing*, G. G. Haddad and J. P. Farber (Eds), Lung Biology in Health and Disease Series, 375-428, New York, Marcel Dekker.
- 42) Sieck G C, Popper P, Zhan W Z and Micevych P E (1991) Absence of CGRP mRNA expression in phrenic motoneurons. *Society for Neuroscience Abstr* 17: 467.
- 43) Sola O M and Martin A W (1953) Denervation hypertrophy and atrophy of the hemidiaphragm of the rat. *Am J Physiol* 172: 324-332.
- 44) Spector S A (1985) Effects of elimination of activity on contractile and histochemical properties of rat soleus muscle. *J Neuroscience* 5: 2177-2188.
- 45) St-Pierre D M M and Gardiner P E (1985) Effects of "disuse" on mammalian fast-twitch muscle: joint fixation compared with neurally applied tetrodotoxin. *Exp Neurol* 90: 635-651.
- 46) Sweeney H L, Kushmerick M J, Katsuhide M, Sreter F A and Gergely J (1988) Myosin alkali light chain and heavy chain variations correlate with altered shortening velocity of isolated skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 263: 9034-9039.

- 47) Tsujimoto T and Kuno M (1988) Calcitonin gene-related peptide prevents disuse-induced sprouting of rat motor nerve terminals. *J Neuroscience* 8: 3951-3957.
- 48) Yellin H (1974) Changes in fiber types of the hypertrophing denervated hemidiaphragm. *Exp Neurol* 42: 412-428.

- 49) Zhan W Z and Sieck G C (1992) Adaptation of diaphragm and medial gastrocnemius muscle to inactivity. *J Appl Physiol* 72: 1445-1453.

(平成7年2月8日受付)
(平成7年7月7日受理)