

ラット薄筋移植モデルにおける移植筋の回復に関する研究

—電気生理学的・組織学的・酵素組織化学的・生化学的手法による
脱神経筋・self-reinnervation筋との比較検討—

吉村 浩太郎

ラット薄筋移植モデルにおける移植筋の回復に関する研究

—電気生理学的・組織学的・酵素組織化学的・生化学的手法による
脱神経筋・self-reinnervation筋との比較検討—

吉村 浩太郎

筋肉移植に関する研究の始まりは19世紀に遡るが⁸⁹⁾、すべてが血管神経縫合を行わない遊離移植であったため、いずれも壊死に陥り線維組織に置換されるのみであった⁵⁵⁾。1960年代以後には、移植前に脱神経や薬物などの処置を施すことにより、筋肉移植が可能になるとした報告^{19, 71, 77)}や細片化した筋肉(minced muscle)の移植の試み¹⁸⁾などが相次いだ。機能回復の見地からはその結果には否定的な意見^{30, 79)}も数多く見られた。現在に至っては機能的な筋肉移植にはやはり神経血管吻合は不可欠と考えられている。

一方微小血管神経縫合を用いた遊離筋肉移植は、1970年 Tamai et al.による犬の大腿直筋を用いた報告⁷⁴⁾に始まり、臨床的には1973年波利井が陳旧性ベル麻痺の症例に対して薄筋移植による動脈の再建に成功し³⁹⁾、さらに Chen¹⁷⁾(1975)や 生田ら⁴²⁾(1976)が Volkmann拘縮に対して大胸筋移植による動脈の再建に成功している。以後、血管柄付き遊離筋肉移植は陳旧性の顔面神経麻痺や腕神経叢麻痺などの外科的治療として一般的に用いられるようになってきているが、未だに、移植筋の回復過程に長期間を要する、その筋力が不十分である、再建結果の確実性に欠けるきらいがある、などの問題点を抱えている。現在では神経血管柄付き筋肉移植の臨床例は多いが、臨床的には術後の移植筋を経時的に採取してその変化を検索することは困難であり、未だ不明の点も多い移植筋の術後変化の観察は実験的手法に頼らざるを得ない。

実験的研究としては、久保(1975)⁴⁹⁾に始まり、Terzis et al.(1978)⁷⁰⁾、吉岡(1981)⁸⁸⁾、山田(1982)⁸⁵⁾らの報告がみられ、それぞれ筋力回復の程度に差異がみられるが、臨床的に十分応用可能である結果が得られている。その後も種々の研究^{29, 86)}が試みられているが、血管縫合の技術的な問題もからみ主に犬もしくは家兎を用いておりその多くは光顕下における組織学的所見を基にしたものである。ラットを用いた研究としては、光嶋⁴⁶⁾(1987)が腓腹筋を同所性に移植している(但し血管吻合は行っていない)。逆に神経縫合は行っていないが、ラットを用いた異所性の血管柄付き遊離筋肉移植を、de la Pena et al.(1988)²³⁾、Briones et al.(1989)⁶⁾が前鋸筋および広背筋を鼠径部へ、Yim et al.(1991)⁸⁷⁾が薄筋を対側へ、それぞれ行っている。ラットを用いた神経血管吻合を伴う筋肉移植モデルは、Wolff & Stiller(1992)⁸⁴⁾が腹直筋を同部位へ同種移植している報告のみである。ラットは、扱いやすく安価であるだけでなく、骨格筋に関する情報量が非常に多い、多様な種類の骨格筋を持つ、哺乳動物の中で例外的に成長における筋の発達が遅れる、などの利点を有している。今回、ラットを用いた新たな異所性神経血管柄付き筋肉移植モデルを作製した。

すでに17世紀から筋線維には2つの異なったタイプが存在することが知られており、その生理学的性質の違いからそれぞれ遅筋および速筋と呼ばれるようになったが、現在ではさらにいくつかの分類がなされている(表1)。構造蛋白の面からみると、遅筋と速筋ではアクチンは同一であるがミオシンは異なっており、遅筋と速筋の間の収縮機能や酵素活性

の違いはこのミオシンの相違に由来している^{4, 89)}。そして数多くの種類のミオシンアイソザイム(アイソフォーム)が存在し、神経刺激などによって合成されるミオシンアイソザイムが変化することが観察されている⁹⁰⁾。また調節蛋白であるトロポニンやトロポミオシンについても速筋と遅筋では異なることが明らかになっている^{24, 82, 87)}。酵素組織化学的には、ミオシンATPase活性、脱水素酵素活性、解糖系酵素活性などの違いから、筋線維はタイプ1線維(遅筋)とタイプ2線維(速筋)に分かれ、さらに前者はあまり一般的ではないがリン酸分解酵素活性(phosphorylase activity)¹⁷⁾や中性脂肪沈着³⁷⁾の違いよりタイプ1aおよびタイプ1bに分けることができ、後者は酸性液で前処理したミオシンATPase活性の違いなどによりさらにタイプ2a、タイプ2b、タイプ2cに分けることができる⁹¹⁾。近年では免疫組織化学的手法によりミオシンアイソフォーム毎のモノクローナル抗体を用いてより本質的な分析が可能となり、電気泳動法とともに大きな成果が得られおり^{6, 13, 14, 41, 88, 81)}。組織化学的筋線維タイプとミオシンアイソザイムの相関についても少しずつ明らかになってきた^{9, 32, 59)}が、いまだ研究途上である。

筋タンパクのなかでも、筋線維の持つ様々な性質(収縮速度、酵素活性など)を規定する最も大きな要因となるミオシンには、分子量約50万、2本のH鎖(分子量約20万)と4本のL鎖(分子量約2万)よりなる六量体で、互いに規則正しく集合して太いフィラメントを形成している。ミオシンには数多くのアイソフォーム isoform (アイソエンザイム isoenzyme、イソ酵素)が存在し、筋線維の発生から成熟に至る成長の過程において、そのアイソフォームが変化することが知られている。従来よりSDSポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法(SDS-PAGE)によってミオシンのサブユニット(H鎖、L鎖)レベルの分析が行われていたが、Hoh et al. (1976)³⁸⁾、d'Albis et al. (1979)¹⁸⁾によりピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PPI-PAGE)が開発され、以後未解離の分子状態(non-dissociating condition)でのミオシンアイソフォームの分析が可能となった。以後ミオシン分子アイソフォームには、大きく分けて4種類のものがあることが明らかになった^{81, 82)}。すなわち、ラットの場合胎児期にみられる 胎児ミオシン(embryonic myosin、以後EM)は 出生数日前より徐々に現れる 新生児ミオシン(neonatal myosin、以後NM)、に置き換えられて行く。新生児ミオシンは出生後当初の多神経支配から単神経支配と変化するにつれ、成体型である速筋ミオシン(fast myosin、以後FM) (IM: Intermediate myosinについてはFM₂と同一であることが指摘された⁷⁵⁾) もしくは遅筋ミオシン(slow myosin、以後SM)に取って代わられ生後5~6週には完全に消失する⁸²⁾(図1)。こうした変化は、生来成長に合わせてプログラムされているとともに、神経制御や一部のホルモンなどの影響を強く受けている^{30, 37, 81)}。EM、NMは筋発生期(それぞれ胎児期、新生児期)以外に、筋再生時(筋管細胞期など)にも見られることが観察されている⁸³⁾。ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動でみると、EMは2本、NMおよびFMは3本、SMは1本のバンドとして、それぞれ固有の移動度を示して現れる(図2)⁴⁷⁾。NM、EM、FM、SMの順番に移動度が大きい、すなわち分子量が小さい(一部バンドが重複する)。上記4種のミオシン分子アイソフォームは、すべてそ

のH鎖を異にしているが、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動でみるとL鎖はEM、NM、およびFMにおいては同一である(図3、4a~d、表2)。しかしながら、ミオシンアイソフォームの研究は、成長や筋再生過程を観察したものがほとんどで、神経血管柄付き移植筋については皆無であるのはもとより、脱神経筋やself-reinnervation筋についてもほとんどまだ行われておらず、特に経時的变化については全く報告されていない。以上のように現在まで理解されている内容を前提として、未だ不明の点の多い神経血管柄付き移植筋の術後の変化をいくつかの角度から観察し、臨床的にも解決すべき問題点を探る。また術後に受けるtenotomy、脱神経や再神経支配における筋細胞の変性、新生(再生)や分化がどのように起こるのか、どのような機序によって惹起されるのかを明らかにすべく、移植筋モデルとともに脱神経筋モデルおよびself-reinnervation(本来の支配神経による再神経支配)筋モデルも併せて作成し、比較検討して分析することとした。具体的には、誘発筋電図による電気生理学的分析、H-E染色を用いた組織学的分析、ミオシンATPase染色を用いた酵素組織化学的分析、およびSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法ならびにピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いたミオシンアイソザイムの生化学的分析を行った。

実験目的

以下に本研究の目的を列挙する。

1. 神経血管柄付き遊離移植筋の回復過程を経時的に観察し、脱神経筋およびself-reinnervation筋の変化と比較することにより、臨床的にも解決すべき問題点を検討する。
2. 神経血管柄付き遊離移植筋に関する研究を行う上でまず大きな問題となるより信頼性の高い動物実験モデルをラットを用いて開発する。
3. 神経血管柄付き移植筋における神経制御の影響(再神経支配など)によって引き起こされる組織化学的筋線維タイプおよびミオシンアイソザイムの変化をともに観察することにより、両者の相関関係および筋細胞の可塑性について調べる。
4. 脱神経およびそれに続く再神経支配過程において、筋細胞の変性および再生(新生)が、またその後の分化がどのような時期に行われるか明らかにする。

材料と方法

1 実験材料

Wistar系ラット、雄(400-500g)を使用して、移植筋、脱神経筋、self筋の3種類の標本を下記のごとく作製した。

① 移植筋ラット：麻酔はネンブータル®(pentobarbital sodium) 50mg/kgを腹腔内注射して行なった。ラットを剃毛後仰臥位に固定し、右口角部より右鎖骨上まで皮膚切開を加え、咬筋上に走る顔面神経下顎枝を同定した後、これを剥離、挙上する。顔面神経の挙上後は咬筋よりのmuscular neurotizationの影響を避けるため、切離した咬筋上の結合組織を元の位置に縫合しておく。胸鎖乳突筋上において外頸静脈を、内側において総頸動脈を露出し移植床血管として準備する。続いて、右大腿内側に縦切開を加え、薄筋および鼠径皮弁を複合皮弁として挙上する。薄筋は、大腿動脈から出る薄筋への筋枝のみならず、遠位部においては大伏在動脈から派生する多くの細い分枝によっても栄養されており^{27, 73)}、こちらを残すように工夫した(図5)。薄筋はラットの場合、前葉と後葉に分かれているが両者一塊として挙上する。薄筋および鼠径皮弁を大腿動脈を共通茎とする複合皮弁として採取した後(図6)、これらを直ちに顔面に移植し大腿動脈と総頸動脈(外頸・内頸動脈への分岐部が正常よりかなり中枢側に偏位している例では外頸動脈を用いる)、大腿静脈と外頸静脈、をそれぞれ手術用顕微鏡下に10-0ナイロンを用いて端々吻合する。薄筋筋体は挙上前と同じ長さになるように緊張を加えて、咬筋上に6-0ナイロンで縫合し固定する(図7)。薄筋の運動神経である閉鎖神経薄筋枝は薄筋筋体流入部より5mmの部位で切断して、さきに挙上しておいた顔面神経下顎枝の上口唇へ向かう分枝(上口唇挙筋などを支配)と、10-0ナイロンで手術用顕微鏡下に1針のみ縫合する。血管吻合の開存を確認した後、頸部の皮膚に鼠径皮弁を縫合するように閉創する(図8)。手術時間は平均3時間、阻血時間は平均50分であった。

移植筋ラットは術後皮膚モニターを観察し、皮膚モニターが乾燥・萎縮したり(動脈血栓)、鬱血・浮腫を生じた(静脈血栓)場合には血行再建不良例と見なし、血行再建成功例を35例作製した。

② 脱神経筋ラット：①と同様にラットを麻酔・固定し、薄筋の支配神経である閉鎖神経の運動枝を1cm以上にわたり切除するのみとする。筋剥離や付着部の腱切断など筋自体には一切侵襲を加えていない。計35匹作製した。

③ Self筋ラット：①と同様に麻酔・固定し、薄筋の支配神経である閉鎖神経の運動枝を薄筋への流入部より5mmの部位で切断し、直ちに10-0ナイロンで1針縫合する。脱神経ラット同様、筋自体には一切侵襲を加えていない。計35匹作製した。

II 評価方法

移植筋ラット、脱神経筋ラット、self筋ラットの各群について、術前および術後1、2、3、4、8、12、16週にそれぞれ5匹ずつ屠殺した。なお、移植筋ラットは鼠径皮弁が生着しているモデルにおいてのみ、血管吻合部の開存が得られているとし、筋肉標本の採取に供した。移植筋モデルおよび self筋モデルについては、屠殺時に神経刺激装置を用いて神経縫合部で電気刺激を加えて神経再支配の有無を確認し、再支配が見られたモデルについては誘発筋電図を記録した。

移植筋においては顔面神経下顎枝を、self筋においては薄筋の支配神経をできるだけ中枢寄りで切断し、吻合部すなわち筋体への流入部より5mmの地点において、supra-maximal stimulus(最大上刺激)を与え、刺激後20ms間の誘発電位を記録した。記録にあたっては5、6回針先の位置を変えて刺入し、最大の電気活動が得られた部位を選択した。電極には同心型針電極(直径0.2mm)、刺激および記録には日本光電社製筋電計ニューロパック4を使用した。フィルター設定はlow cutが10Hz、high cutが5KHzとした。刺激によるアーチファクトで誘発電位の第1相の開始時が分かりにくいときは変曲点を第1相の開始時とみなして潜伏および持続時間を計測した。

また、各採取筋の中央部を横切して0. C. T. compound®に包埋し、液体窒素で冷却されたイソペンタン(-80℃)に入れて急速凍結させ組織標本作製に供した。残りの筋肉は液体窒素(-196℃)で急速凍結させてミオシンアイソフォームの分析用として-80℃に保存した。

また正常の表情筋及び咬筋についても同様に分析を行なった。表情筋は、移植床神経である顔面神経下顎枝の上口唇へ向かう枝に支配されている上口唇挙筋(ひげを動かす)を採取した。

III H-E染色およびミオシンATPase染色

凍結した組織標本はクライオスタットにて10μm厚の連続凍結切片を作製し、H-E染色およびミオシンATPase染色を行なった。

H-E標本は光顕的に筋線維の形態の変化を観察し、デジタイザーを用いて、1標本につき無作為に250本以上の筋線維の直径(短径)を計測した。

ミオシンATPase染色は、pH4.2、4.3、4.5、4.6の酸性液、およびpH10.5、10.6、10.7のアルカリ性液にて前処理して行ない、タイプ1線維、タイプ2(a,b)線維、タイプ2c線維に分類し、おのおのの線維数および直径(短径を測定した)をデジタイザーを用いて1標本につき無作為に400本以上計測し、筋線維タイプ別の組成、直径の平均値・標準偏差などを計算した。ミオシンATPase染色における各筋線維タイプ別の染色性を表3に示すが、実際には連続切片とはいえ、数枚の切片から対象となるすべての筋線維タイプを同定するのは困難であるため、部分的にタイプ2c線維がpH4.2およびpH10.5-6においてそれぞれタイプ1線維およびタイプ2(a,b)線維に比べて染色性がやや落ちることを利用した簡便法を用

いて判別を行なった。

IV ミオシン分子アイソフォームおよびミオシンサブユニットアイソフォームの分析

採取した各筋肉を液体窒素で急速凍結し -80°C にて保存した後、粗製ミオシンを抽出し、ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いてミオシン分子アイソフォームの分析を行なった。Hoh et al.²⁰⁾、d'Albis et al.¹⁸⁾の原法を改変した大室ら^{5,4)}の変法を用いた。さらにミオシンサブユニットの分析にはSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた。

また、移植筋のバンドを特定するため遅筋ミオシンと併せて泳動するとともに、遅筋ミオシンと併せて泳動した速筋ミオシン、新生児ミオシン、胎児ミオシンと比較した。

以下にわれわれが用いたピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ならびにSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法の実験方法を記す。

ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

①粗製ミオシンの抽出

液体窒素で冷却したミルを用いて、凍結した筋肉を粉砕する。これに最終濃度 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、 $10\mu\text{g/ml}$ leupeptin、 $1\mu\text{g/ml}$ pepstatin A を含有する Hasselbach-Schneider 溶液(0.6M 塩化カリウム、 0.1M リン酸カリウム緩衝液、 10mM ピロリン酸ナトリウム、 1mM 塩化マグネシウム、 $\text{pH}6.5$)を4倍量加えて 4°C にて15分間 incubation した後、 4°C にて 10000g で遠心分離すると上清として粗製ミオシン溶液(試料)が得られる。

②試料の調整

得られた粗製ミオシン溶液に 10mM ethylene-glycol-bis- N,N,N',N' -tetraacetic acid (EGTA)、 2.5mM dithiothreitol (DTT) を添加した $\text{pH}8.5$ の 200mM ピロリン酸ナトリウム溶液を等量加え溶解後、冷グリセロールを50%になるように加える。試料は -20°C で保存できる。

③ゲルの作製

3.8% acrylamide、 0.101% N,N' -methylene-bisacrylamide、 20mM ピロリン酸ナトリウム、 10% グリセロール溶液を塩酸で $\text{pH}8.5$ に調整し充分脱気する。この溶液 10ml に 8% 過硫酸アンモニウム $70\mu\text{l}$ 、 N,N,N',N' -tetra-methylenediamine (TEMED) $15\mu\text{l}$ を加え、ゲルカラムに 60mm の高さに分注し、水を重層し重合させる。ゲルカラムとしては内径 3mm 、高さ 70mm のガラス管を用いた。ゲルは 4°C で保存する。

④泳動条件

泳動緩衝液としては 10% グリセロール、 0.02% 2-mercaptoethanol を含有する 20mM ピロリン酸ナトリウム溶液($\text{pH}8.5$)を用いた。円型ディスクゲル用 泳動槽 (KS-8102型、Maysol社製)を使用し、 4°C 、 11V/cm で30分間の前泳動の後、前述の希釈した試料 $5\sim 20\mu\text{l}$ を乗せ、 4°C 、 11V/cm で16時間泳動を行なった。

⑤ゲルの固定および染色

泳動終了後直ちにゲルを20%トリクロロ酢酸(TCA)で10分間固定した後、0.25% Coomassie Brilliant Blue(CBB R-250)-7%酢酸で60分間、60℃に加温して染色する。脱色は7%酢酸-10%エタノール溶液を用いて行ない、7%酢酸中に保存して、写真撮影および吸光度の測定に供した。

⑥吸光度の測定

デンシトメーター(Cliniscan 2, Helena研究所製)を用いて、ゲル上の各バンドの595nmにおける吸光度を測定した。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法

ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法における上記の①～④の過程において得られたゲルをTCA固定処理せずに、0.1%CBB-3.5%酢酸-5%エタノールで軽く(約30分)染色する。5%エタノールで脱色(約15分)し、蒸留水に置換する。染色されたミオシンのバンドを切り出して、2%SDS-2%2mercaptoethanol-0.1Mトリス塩酸(pH6.8)に4分間浸す。

SDS-PAGEには、15%のミニスラブゲルを使用し、Stacking gelには4%ゲルを用いた。ミニスラブゲルの各ウェルに切り出したゲルを入れ、4℃、15mAで泳動した。ゲルの染色には、銀染色を用いた。染色後、デンシトメーターにて吸光度を測定した。

実験結果

1. 神経再支配の時期

移植筋は、術後2週後には5匹中1匹において電気刺激に肉眼的に反応がみられた。術後3週では5匹中2匹、4週では5匹全てが電気刺激に反応した。8週以降については、やはり全てにおいて神経再支配が確認された。血行再建不良例においては、移植筋は壊死に陥り、いくらかの線維組織を残すのみであったが、鼠径皮弁の皮膚モニターで再建血行が良好であったものでは全てにおいて移植筋が確認された。血行再建成功例を41例作製するまでに11例の血行再建不良例がみられた(成功率:79%、表4)。

一方 self筋は、術後3週にて5匹中2匹、4週では5匹中4匹、8週以降は全てにおいて神経再支配がみられた(表5)。

2. 電気生理学的所見

正常薄筋、移植筋(4,8,16週)および self筋(4,8,16週)の誘発電位の結果を表6に示した(各N=5)(誘発電位の第1相の開始時点と最終相の終了時点を示印で示してある)。

a) 正常薄筋: 正常薄筋誘発電位の潜時latencyは 1.04 ± 0.18 (平均±標準偏差、以下同じ)ms、持続時間durationは 8.16 ± 0.77 ms、波形は二相性で、振幅amplitudeは 9.80 ± 0.74 mVであった(図9)。

b) 移植筋: 筋収縮が認められた当初の4週の筋電図では、正常筋と比較して、潜時が 3.36 ± 0.50 msと長く、持続時間も 14.12 ± 0.85 msと長く、また波形は多相性で、振幅は 0.90 ± 0.09 mVと小さかった。

神経再支配が進行した16週の筋電図では、潜時が 1.26 ± 0.27 msと短くなり(4週と8週、4週と16週; $p < 0.01$ 、検定はWilcoxon検定による、以下すべて同検定による)、持続時間も 8.32 ± 0.90 msと短くなっている(4週と8週; $p < 0.01$ 、8週と16週; $p < 0.05$)。波形は、最初に持続時間の短い二相性の振幅の大きい波形につづいて振幅の小さい波形が生じる。最大振幅は、 2.43 ± 0.45 mVであった。このように16週になると、潜時、持続時間ともにほぼ正常と同程度まで短くなり(16週と正常;有意差なし)、波形も類似しているが、振幅はおよそ正常の1/4までしか回復しなかった(図10)。

c) Self筋: 吻合神経への電気刺激により収縮が認められたモデルでは、同様に筋電図を記録した。

再支配当初の4週では、潜時が 3.65 ± 0.70 ms、持続時間が 12.55 ± 1.38 ms、やはり多相性で、振幅は 2.29 ± 0.24 mVであった。その後の変化は、移植筋の場合と類似しているが、8週にて振幅が 3.97 ± 0.60 mVとすでに16週の移植筋を大きく上回り(8週self筋と16週移植筋; $p < 0.01$)、16週においては 8.80 ± 1.19 mVと、正常薄筋近くまで回復した(self筋16週と正常筋;有意差なし)(図11)。

3. 組織学的所見 (H-E染色所見)

1) 筋線維および周辺組織の形態の変化

- a) 正常薄筋: 正常筋線維が規則的に並んでいる。筋束間(周鞘, perimysium)や筋線維間(内鞘, endomysium)の結合組織はごく僅かである(図12)。
- b) 移植筋: 術後2週には、筋線維が萎縮し大小不同が見られた。中心核線維が約1割に見られ、筋束間の結合組織が増加し、単核球(リンパ球)の浸潤が著明に認められた(図13)。術後3週には、筋線維はさらに萎縮し、直径は正常の1/3程度であった(図14)。4週ではさらに筋線維内鞘にも結合組織が増殖し、筋束が不明瞭になってきたが、リンパ球の浸潤は減少してきた(図15)。8週になると、内鞘の線維組織が減少し、明瞭な筋線維束を形成した。しかし筋束間の結合組織は厚く残っていた。中心核は、局所的に多数見られるところがあった(図16)。12週から16週においては、中心核は減少し、局所的に脂肪変性がみられた。筋束間の結合組織は僅かであるがさらに厚くなっていた。残存する筋線維数は明らかに減少し、筋線維の直径は正常の1/2程度であった(図17、18)。
- c) 脱神経筋: 移植筋と同様に術後萎縮していくが、4週以降も萎縮・変性を続け、食食細胞の浸潤がみられた。8週になると群萎縮した筋束のところどころに逆に肥大した線維がみられ、12週から16週ではさらに増え、変性・萎縮した線維と肥大した線維に一見二分化していくように見えた。内鞘、周鞘ともに結合組織が増殖し筋線維の配列が不規則であった(図19)。
- d) Self筋: 術後やはり筋線維は萎縮して細く扁平になったが、移植筋の場合に比べリンパ球の浸潤が少なかった。4週以降筋線維の大きさは着実に回復していった。移植筋と比較して、明らかに筋線維内鞘及び周鞘の結合組織が少なく、残存する筋線維数もはるかに多い。16週には正常近くの大きさに回復し、ごく僅かな配列の乱れを認めるのみである(図20)。

2) 筋線維の直径の変化

移植筋、脱神経筋、self筋各群について術後の直径(短径)の変化を表およびグラフに示した(図21、表7)。表には各5標本の短径の平均の平均および標準偏差を記した。一方、グラフ中のS.D.は各1標本内の標準偏差を示している。

移植筋の場合、筋線維の直径は初めの2週において急速に減少し(0週と1週、1週と2週: $p < 0.01$)、再支配が始まった以降も著明な回復はみられず(4週と8週、8週と12週、4週と16週: 有意差なし、12週と16週: $p < 0.05$)、電気生理学的には再支配が完了していると思われる16週においても正常薄筋の1/2程度であった。一方、self-reinnervation筋においては、当初は同様な萎縮がみられたが(0週と1週、1週と2週、2週と3週: $p < 0.01$)、筋線維の直径は4週以降明らかに増加し(4週と8週、8週と12週: $p < 0.01$ 、12週と16週: 有意差なし)、16週においては正常薄筋に近い値まで回復した。また、16週のヒストグラム(図22)で比較すると、脱神経筋においてはグラフが右方まで伸び、筋線維の大小不同が著しい。

実際、標準偏差が平均値の50%以上あり、明らかに異常な分布を示している(正常な筋線維の分布では通常25%以下²⁸⁾)。Self筋は正常薄筋の分布にかなり近づいている。

4. 酵素組織化学的所見 (ミオシンATPase染色所見)

① 筋線維タイプ別の直径の変化

移植筋、脱神経筋、self筋各群について、筋線維タイプ別の直径(短径)の変化を表およびグラフに表した(図23~25、表8~9)。表には各5標本の短径の平均の平均および標準偏差を記した。一方、グラフ中のS.D.は各1標本内の標準偏差を示している。

タイプ1線維は全過程を通してタイプ2線維よりも径が小さく、移植筋およびself筋においてはタイプ1線維もタイプ2線維も同じような増大・縮小の変化を示した。一方、脱神経筋においては両者は当初は同じように萎縮していったが、8週以降にはタイプ2線維では逆に肥大するものが多く認められたが(8週と12週、8週と16週; $p<0.03$ 、12週と16週;有意差なし)、タイプ1線維はさらに萎縮していった(8週と12週; $p<0.01$ 、12週と16週; $p<0.03$)(図26)。

② 筋線維タイプ別の組成の変化

移植筋、脱神経筋、self筋それぞれについて、筋線維タイプをタイプ1、タイプ2aおよび2b、タイプ2cの3種に分類して、筋線維タイプ別の組成(%)を表および棒グラフに表した(図27~29、表10)。

ラットの薄筋は前腹と後腹からなり、正常薄筋では前腹はタイプ2線維優位であり(図30)、一方後腹はタイプ1線維優位であり(図31)、全体としては同程度に(タイプ1:タイプ2=45:55)両線維が交じりあっていた。一方、表情筋(上口唇挙筋)および咬筋はすべてタイプ2線維のみよりなっていた(図32、33)。

移植筋においては、術後タイプ1線維の減少(1週と2週、2週と4週; $p<0.03$ 、0週と2週、3週と4週; $p<0.05$ 、0週と1週、2週と3週;有意差なし)、タイプ2c線維の増加がみられ(0週と1週、0週と2週、1週と4週; $p<0.05$ 、1週と2週、2週と3週;有意差なし)(図34、35)、8週においてタイプ1線維は $5.8\pm2.1\%$ まで減少し、タイプ2a+b線維が $87.8\pm3.8\%$ と増加した(図36)。しかし12週、16週においてはタイプ1線維の割合が逆に増加(8週と16週; $p<0.05$)(タイプ2a+b線維が減少)する傾向がみられた。しかし、明らかなタイプグルーピングは見られなかった(図37)。

脱神経筋においては、やはり術後移植筋に比べゆるやかであるが同様にタイプ1線維の減少(0週と2週; $p<0.01$)、タイプ2c線維の増加(0週と1週、0週と2週、2週と3週; $p<0.05$ 、3週と4週; $p<0.01$)がみられ、8週以降もタイプ1線維は減少し(8週と12週、12週と16週; $p<0.01$)、タイプ2a+b線維が増加した(8週と12週、12週と16週; $p<0.01$)。

Self筋においては、術後脱神経筋と同様なタイプ1線維のゆるやかな減少(0週と1週、1週と2週; $p<0.05$)、およびタイプ2c線維の増加(0週と1週; $p<0.03$ 、0週と2週; $p<0.01$)がみられ、タイプ2c線維の割合は8週において $17.5\pm2.7\%$ と最も多くなった。8週標本

ではタイプ2c線維を通してタイプの変換が起こり、タイプグルーピングを形成している様子がうかがえた(図38)。その後タイプ1線維の増加(8週と12週、12週と16週; $p<0.03$)、タイプ2c線維の減少(8週と12週、12週と16週; $p<0.01$)が見られた。タイプ2a+b線維の割合は見かけ上はあまり変化しなかった。16週標本では、タイプグルーピングが明らかに認められた(図39)。

5. 生化学的所見 (ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動所見)

①正常薄筋および表情筋(上口唇挙筋)

正常薄筋はSMとFMが同程度に混在していたが、表情筋においてはFMのみが検出された(図40)。

②移植薄筋

移植薄筋は移植後徐々にSMが減少していき8週においては検出されないが、12週以降では再び増加してきた。しかし、移植前に比べればSMの割合は小さかった(図41)。

③移植筋ミオシンとEM、NMとの比較

移植筋のミオシンにSMを加えて泳動し、胎児ミオシン(EM)および新生児ミオシン(NM)にSMを加えて泳動したものと比較した。EM、NMはSMはもちろんFMに比べても僅かに移動度が大きく(分子量が小さく)、SMと混ぜて泳動させてSMとの移動度の違いを比較することによって泳動度の近いFMとEM、NMを容易に区別することができる。8週、12週、16週の移植薄筋のミオシンをEM、NMと比較したが、全過程を通してEM、NMと同じ移動度のバンドは認められなかった。すなわち、移植薄筋のミオシンはSMとFMのみ(もしくはFMのみ)からなっていると考えられた(図42)。

④脱神経筋

脱神経筋においては、術後徐々にSMが減少していき、12週以降においては全検体においてSMが検出されず、FMのみとなった。術後2ないし4週において、EMもしくはFMと思われる移動度の大きいミオシンアイソフォームが検出された(図43)。また、同時期において試料によってはSMのバンドが1本ではなく、2ないし3本みられた。すなわち、わずかに移動度の大きい新たなバンドが1ないし2本検出された(図44)。

⑤Self筋

Self筋においては、術後4週までは徐々にSMが減少していったが、8週以降は16週に至るまでSMの増加がみられた。脱神経筋の場合と同様に術後2ないし4週において、EMもしくはFMと思われる移動度の大きいミオシンアイソフォームが検出された(図45)。また、やはり脱神経筋と同様に同時期においてSMよりわずかに移動度の大きいバンドが1ないし2本検出された(図46)。[注: 図41、43、45における一連の変化のなかで、泳動しているミオシン抽出試料は適宜1ないし20倍に希釈してあるため、横方向で比較してもバンドの色の濃さはミオシン量を反映していない。]

1. 神経血管柄付き遊離筋肉移植と実験モデルの作製

本研究においては移植筋の筋線維タイプ及び構造蛋白に対する支配神経の影響についても観察する目的があったため、筋肉毎(支配神経毎)の組織化学的筋線維タイプ別の組成がより明確に異なっているラットを使用した。ラットは扱いやすく安価であるのみならず、ヒトはもとより他の小動物と比較しても、筋肉毎にそれを構成する筋線維タイプが多様であり(鳥類、両生類にも言えるが哺乳類とは多くの相違点がある)、遅筋線維が9割を占める筋(ヒラメ筋など)もあれば、ほぼ速筋線維のみから構成される筋(胸鎖乳突筋²¹⁾、咬筋、長趾伸筋など多数)も存在する。また遅筋と速筋が同程度に混ざっている筋(横隔膜²¹⁾、薄筋など)も存在する。さらに哺乳動物の中でも例外的に成長における筋の発達が遅れる利点を有している。そのため上記の様な目的には最適な実験動物といえよう。しかし今回の移植筋ラットにおいては、移植床の総頸動脈は大腿動脈よりもやや太く、また外頸静脈は大腿静脈よりもやや細く、移植床血管の条件としては決して望ましいものではない。そのうえ移植組織が非常に繊細な筋弁であるが、経験と改良を重ね8割程度の成功率が得られるようになった。すなわち主要栄養血管である大腿動脈からの筋枝のみならず大伏在動脈からの薄筋への血行をも温存し、さらに鼠径皮弁との複合皮弁とする工夫を加えた。そのけい皮弁は、大腿動脈において薄筋への筋枝が分岐する位置よりわずかに末梢から出る浅腹壁動脈により栄養されており血行豊富な安定した皮弁として挙上することができる。

この鼠径皮弁は、単に術後の血管吻合のモニターとして機能するのみならず、移植筋弁の血流抵抗を軽減し、術前後の血行動態の急激な変化を柔らげるのに役立っている。実際、薄筋弁単独で移植した場合その静脈還流はごく僅かであり、Yim et al.の報告⁴⁷⁾に反して信頼性の高い血行再建は得られなかったが、鼠径皮弁との複合皮弁とすることにより移植の成功率が飛躍的に向上した。血流抵抗を軽減し静脈還流を増大させるという意味では、この場合の鼠径皮弁は一種のシャントとして機能しているといえる。一定以上の静脈還流を確保することは微小血管吻合における高い成功率を確保するには非常に重要な要素であると考えられる。こうした意味合いから言えば、鼠径皮弁の代わりに大伏在動脈と同静脈の末梢断端において実際にシャントを作成することによっても解決できるかもしれない。しかし鼠径皮弁が術後血流開存の皮膚モニターとして利用できることは、とくに長期間のモデルも必要となるこうした実験の円滑かつ計画的な遂行には大きな助けとなった。

2. 移植筋の変化(脱神経筋、self筋との比較)

今回の実験において移植筋は術後2ないし4週において神経再支配が認められ、神経再支配が始まる時期では移植筋とself筋との間には有意な差は認めなかった。しかし誘発筋電図を記録して比較すると、筋線維に神経の再支配が行き渡っていく速さは同程度であるが、両者の最終的な最大誘発電位の大きさには大きな開きがあった。すなわち、術後16週

において移植筋の誘発電位は正常筋の約25%、一方self筋の誘発電位は正常筋の約80%まで回復した。筋線維そのものの回復の違いもさることながら、最終的に存在している筋線維数の差からくる影響が大きいと思われる。

形態面からself筋と比較すると、筋線維の成熟の過程において、移植筋の方では初期に炎症細胞の浸潤が多い、変性・壊死線維が多く線維組織が増える、筋線維の成熟がやや遅れる、などの相違点が見られたが、とくに筋線維の直径の回復ぶりの違いが目立つ。移植筋線維の直径は、4週以降脱神経筋線維と比較すると再支配の影響が認められるものの(8週、12週、16週において移植筋と脱神経筋: $p<0.01$)、著明な直径の回復を示しているself-reinnervation筋線維(正常時の約9割にまで回復)とは異なり、正常時の約1/2の短径を維持する程度であった。また、神経再支配が始まっている4週以降においても、脂肪変性が進行したり直径の回復が見られないなどは注目すべき所見で、後述する神経支配以外の要因が影響していることが強く示唆された。今回の実験では収縮力については検討していないが、これまでの移植筋の回復に関する実験と比較すれば、以上のようにあまり良好な回復は得られなかった。

筋線維タイプ別の短径の変化では、移植筋およびself筋においてはタイプ1線維とタイプ2線維との間に明らかな相違は認められなかった。一方、脱神経筋においては12週以降タイプ1線維は萎縮が進行していったが、タイプ2線維では肥大した線維がみられ、なかには正常筋と同程度まで肥大した線維も認められた。

3. 移植筋に関する問題点

今回の実験モデルにおいて、移植筋とself筋との本質的な相違点には、

- ①血行再建(血行動態の変化)の有無
- ②tenotomy(腱切断)の有無、すなわち緊張状態の違い
- ③筋切断、手術侵襲の違い(本実験においては筋肉の部分移植を行っている)
- ④力学的筋活動(不動性)の違い(self筋の場合、日常運動による起始・停止間の変動すなわち受動的な運動がある)
- ⑤支配神経の違い(閉鎖神経薄筋枝と顔面神経下顎枝との間のインパルスパターンやトロフィック物質の違い)

などが挙げられ、それぞれの影響が重なり合っているであろう。①、③による筋線維の壊死の影響や④による影響も大きいと思われるが、現実には②の影響が最も大きいと考えられる。⑤による影響については未だ不明点が多い。

Tenotomyを行われた筋が急速に萎縮し変性することは広く知られているが、伸展していない状態で筋を収縮させると萎縮がより顕著になるという報告もあるという^{7,21}。また関節を固定して筋を不動化させる実験では緊張位に固定した場合より弛緩位に固定した場合の方が筋萎縮の程度が強く、初期においては緊張位群ではむしろ肥大することが観察されている^{7,22}。さらに筋が受動的に伸展されることによって蛋白質の分解が抑制されると

いう報告もみられる⁴⁵⁾。Tenotomyの持つ意味は不動化(廃用)だけではなく、筋線維が全く伸展(緊張)していない状態に置かれているということもあり、後者が与える影響がより大きいであろう。とくに今回の実験のように筋の部分移植の場合、一度tenotomyを行った筋肉を両側の腱の部分を切除したうえで数針の縫合糸によって本来の均等かつ強力な緊張状態を再現することは不可能である。さらに筋収縮が始まることによって、固定状態(緊張状態)にとってより望ましくない変化が生じているかもしれない。こうして弱く不均一な緊張状態に置かれることによって、当然残存し成熟していく筋線維の数も激減することになるであろう。

以上のような移植筋の置かれた環境の著しい変化は、すべて(とくに①、②)臨床的にも避けたいことである。今回の実験では非常に短い神経莖であったが、実際の臨床においては神経再支配が生じるまでの期間にさらなる不可逆的なダメージを受けることになるであろう。Self筋の著明な回復は、脱神経を経た筋のもつ潜在的な回復力の大きさを如実に表しているが、一方では臨床的に解決すべき問題の大きさを物語っている。

4. 筋線維タイプの変化

筋線維タイプは、成長に伴う変化(幼若なタイプ2cからタイプ1、2a、2bへの分化)以外にも、以下のような条件によって変化することが明らかになっている。すなわち、

1. 神経支配(脱神経、交差神経支配、self-reinnervationなど)
2. 運動(持続運動、固定による不動化など)
3. 緊張(腱切断など)
4. 電気刺激(周波数や持続時間の変化など)
5. ホルモン(とくに甲状腺ホルモン)

などである。神経支配による筋線維タイプの変化の機序については、神経インパルスによって引き起こされる筋活動、トロフィック物質による調節などが指摘されているが、未だ確かな結論は得られていない。

遊離移植筋においても同様の変化が惹起されることは、山田⁴⁶⁾が家兎の大腿直筋を用いた研究結果より示唆しているが、今回の実験においても同様に新たな支配神経によると思われる移植筋線維タイプの変化が観察された。

今回移植筋において観察された初期の変化は、脱神経及びtenotomyに伴う低緊張によるものと考えてよいだろう(廃用性萎縮やtenotomyではタイプ1線維の萎縮・減少がみられる⁴⁷⁾)。その後、顔面神経(速筋型運動ニューロン)による新たな支配を受けることによりさらにタイプ2線維が増加したと思われる。さらにその過程において未分化型あるいは移行型と称される⁴⁸⁾タイプ2c線維が観察された。しかし、12週以降に見られたタイプ1線維の増加は単純な異神経支配の結果としてとらえることはできない(詳細後述)。Muscular neurotizationの影響も、咬筋がタイプ2線維のみから構成されていることから否定でき

る。

脱神経筋においては、最終的にはタイプ1線維の割合の減少と著しい萎縮を認めた。しかしながらこれまでの数多くの報告において、タイプ1線維およびタイプ2線維どちらの萎縮が強いかは諸家により結論は全く一致しておらず、様々である。なかには遅筋と速筋において逆の結果が得られた報告も見られる⁴⁴⁾。

Self-reinnervation筋においては、当初脱神経筋と同様な変化の後、再神経支配によりタイプ1線維が再び増加した。この過程においてとくに8週においてはタイプ2c線維の割合の増加が顕著である。16週においてはタイプグルーピングがみられることから、それまでの間にタイプ1⇌タイプ2、双方向の変化が同時に生じているためであろう(タイプ1→タイプ2と変化する線維もあれば、タイプ2→タイプ1と変化する線維もある)。このように2ないし4週においてみられる再神経支配に遅れて筋線維タイプの移行が始まり、8週から12週あたりで再支配による移行が最も盛んに進行していると思われる。

タイプ1線維とタイプ2線維との間の移行に関して Billeter et al.⁵⁾ は次のような移行パターンを紹介している。すなわち、

$$1a \rightleftharpoons 1b \rightleftharpoons 2c' \rightleftharpoons 2c \rightleftharpoons 2c'' \rightleftharpoons 2a \rightleftharpoons 2b$$

ここで2c'とは酸性で強く染色されアルカリ性で弱く染色される線維、2c''とは酸性で弱く染色されアルカリ性で強く染色される線維、2cは酸性・アルカリ性ともに中等度に染色される線維を指している。こうしてみるとタイプ2c線維をタイプ1→タイプ2、タイプ2→タイプ1、双方向の変化の大きさの合計を反映したものとしてとらえることができる。

最近、Schiaffinoらのグループにより、ミオシンATPase染色ではタイプ2b線維と同じ染色性を示すため区別できないが、免疫組織化学染色もしくはSDH染色と組み合わせることにより識別されるタイプ2x線維(タイプ2a線維、タイプ2b線維とは異なるミオシンII鎖を持つ)の存在が明らかにされ、タイプ2aとタイプ2bとの間の移行タイプ(2a⇌2x⇌2b)の可能性などが考えられている^{35, 60)}。

5. 交差神経支配(cross-reinnervation、異神経支配foreign-innervation)について

交差神経支配については多くの研究がなされ、新たな神経支配によって筋の持つ様々な性質が変化することが知られている。1960年代より筋線維タイプの様々な表現型は、神経支配の影響に依っていると考えられてきた^{10, 11)}。すなわち筋線維は反対のものにも変化することができる可塑性を持ち、表現型は神経から受け取るインパルスのパターンによって決まるとされた^{57, 60)}。

しかし、実際に起こる変化は100%完全に理論通りにはならない場合がほとんどである。例えば、筋線維のタイプが逆転するとはいえ、やはり以前のタイプが明らかに残存していたり、筋の性質の多くには逆転が認められるものの一部の性質は元のままであったりする。

無論、あらゆる研究において実験内で様々な誤差が生じるのは当然のこととはいえ、何か別の要素が関与している可能性もやはり否定できない。

1970年代にHoh et al.³⁸⁾、d'Albis et al.¹⁸⁾によりピロリン酸電気泳動法が開発され、以後分子レベルでのミオシンアイソザイムの研究が進展した。そして新生児期に脱神経すると速筋ミオシン(タイプ2線維)は合成されるようになるが¹³⁾、遅筋ミオシン(タイプ1線維)は現れない³⁹⁾ことが観察された。また、筋の変性・再生過程においても同様のことが観察され⁴¹⁾、胎児ミオシン→新生児ミオシン→速筋ミオシンの発生過程は元来プログラムされており神経がなくても進行することができるが、遅筋ミオシンは神経支配があって初めて合成されるようになる(Whalen et al., 1984)⁸¹⁾とする考え方が生まれた。さらに、タイプ2線維の発生、成長(速筋ミオシンの合成)は甲状腺ホルモンによって強く制御されていることも明らかになった^{14, 19, 30)}。

一方、外眼筋⁸²⁾や咀嚼筋⁸¹⁾でこれまでにない速筋ミオシンH鎖が発見され、それをきっかけに新たな展開も見られるようになった。Hoh et al.は精力的な研究を通して、近年新たな仮説を提示している⁴¹⁾。すなわち、筋には内的に異なる性質を持ったいくつかの異型(allotype)が存在し(下肢の筋肉と咀嚼筋では異なる)、それぞれにおいて異なるように運命づけられた2~3種の筋線維型(isotype)が存在し、これらが支配神経の影響を受けて、それぞれが持つ固有の可塑性(plasticity)の範囲内で変化して表現型(phenotype)を示す。一例を示すと、下肢の筋肉には筋発生初期においてfast, intermediate, slowと3種のisotypeが存在し、それらは成長段階において神経刺激の影響を受けて表現型phenotypeを変えるが本来のallotype, isotypeは変化しない。そして速筋型運動ニューロンの影響を受けてfast(phenotype)を示していたslow isotypeの筋線維は脱神経を受けることによって神経支配の影響を逃れ、肥大してslow myosinを合成するようになる、などというものであり、筋線維は本来より均一なものとしては存在していないとしている。

われわれの移植筋で12週以降にみられたタイプ1線維の増加は、Whalen et al.⁸¹⁾の考えに基づけば、移植床神経(顔面神経下顎枝)に從來存在しなかった遅筋型運動ニューロンが何らかの理由で新たに出現したことを意味している。一方、Hoh et al.⁴¹⁾の仮説に照らせば、遅筋型運動ニューロンに支配されることによってslow phenotypeを示していたfast isotypeの線維が新たに速筋型運動ニューロンの支配を受けてfast phenotypeを示すようになる。それとともに、slow isotypeの線維の可塑性に乏しい一部が脱神経で萎縮したのち速筋型運動ニューロンの支配を受けていながら成熟してslow myosinを合成しているのかもしれない。このようにslow(fast) isotypeの線維もその可塑性の大きさによって2種類に分かれるのかもしれないし、もしくは一部には可塑性に乏しい筋線維が存在するのかもしれない。16週の移植筋にみられるタイプ1線維に明確なタイプグルーピングがみられないことも、遅筋型運動ニューロンの再支配を受けたとは考えにくく納得がいく。さらに、脱神経筋において12週以降みられたタイプ2線維の肥大も、遅筋型運動ニューロンから解放されたfast isotypeの線維の変化と考えると分かりやすい。また、脱神経につい

でも遅筋型か速筋型かどちらの運動ニューロンによりそれまで支配されていたかにより脱神経後の変化が異なってくることになるため、脱神経による実験結果が諸家により様々であることも理解しやすい。

2段階の変化が観察された交差神経支配の実験結果より、筋紡錘の感覚神経再支配が成立した以降に求心性のフィードバックが働いてから遅延性(2回目)の変化が起こるのではないかとする報告⁴⁶⁾なども見られ、まだ一定の見解が得られているとは言えない。哺乳類の間においても種による若干の相違点も認められ、さらなる広範な研究結果の蓄積が求められている。

6. 組織化学的筋線維タイプとミオシンアイソフォームの相関

今回の実験で、移植筋の構成ミオシンでは、脱神経、tenotomy、および顔面神経による新たな再支配による影響と考えられるSMの減少がみられた。しかし、12週以降再びSMの増加が認められ、組織化学的検索と一致をみた。組織化学的検索においては3種すべてのモデルにおいて筋線維タイプ移行時に様々な割合でタイプ2c線維が認められたが、今回のミオシン分子アイソフォームの検索においてはEMやNMは検出されず、SMおよびFMのみが見られた。

一方、脱神経筋、self筋においては、ミオシンATPase染色による組織化学的検索結果では、とくに4週から12週においてタイプ2c線維が観察された。とくに術後8週のself筋においては20%弱のタイプ2c線維が認められた。しかし、構成ミオシンアイソフォームの分析結果では、2~4週にてEMもしくはNMと思われるバンドが僅かに見られたがそれ以降は認められず、4週から16週においてはSMおよびFMしか認められず、EMやNMは検出されなかった。すなわち、移行型のタイプ2c線維はSMとFM(主にFMa)が混在している筋線維であって、未分化型のタイプ2c線維とは本質的に(構成ミオシンは)異なっているのではないかと考えられる。

Schaffinoらのグループはタイプ1線維、タイプ2a線維、タイプ2b線維それぞれに特異的な抗体を使用し、抗タイプ1抗体と抗タイプ2a抗体双方と反応する線維や、抗タイプ2a抗体と抗タイプ2b抗体双方と反応する線維は存在するが、抗タイプ1抗体と抗タイプ2b抗体双方と反応する線維は存在せず、 $1 \rightarrow 2a$ 、 $2a \rightarrow 2b$ というタイプ移行の変化を表しており、前者の連続的な変化の中でタイプ2c線維が現れているとしている⁵⁹⁾。

同一筋線維にSMとFMが同時に存在できるのか否かについては当初は否定的な意見が多かったが^{38, 80)}、成長期^{32, 63)}や長期電気刺激の後^{56, 64)}において、“単一”筋線維の電気泳動分析もしくはSM、FMの特異的抗体を用いた研究によって、SM、FM両方が同時に存在する線維の存在が観察された。こうして交差神経支配や電気刺激などでみられる筋線維のタイプ(構成ミオシン)の変化において、新しい線維が成長するのではなく、既存の線維の中でタンパク合成のプログラムが変化することによってこの変化がもたらされていることが示唆された。その後、一部の正常筋においてもSM、FM双方の特異的抗体と反応する線維が存在

することが観察された³¹⁾。ハイブリッドタイプ (FMのH鎖にSMのL鎖の組み合わせなど) の存在の可能性も疑われたが^{40, 31)}、単純に2種のみオシシン分子アイソフォームの混在かもしれない。

筋線維タイプ移行時にみられるタイプ2c線維においてはSMとFMが混在しており、ミオシンATPase染色をおこなった場合SMが存在するために酸性液で前処理すると活性を示し、また一方でFMが存在するためにアルカリ性液で前処理してもやはり活性を示すため、結果的に酸性、アルカリ性双方でATPase活性を示すことになる(すなわち酵素組織化学的にはタイプ2c線維に分類されることになる)。しかし、純粋なタイプ1線維やタイプ2線維と比較するとSMおよびFMの含有率が少ないために、pH4.2~4.3においてタイプ1線維より、およびpH10.4~10.6(Routine)においてタイプ2線維より、移行型のタイプ2c線維はやや染色性が落ちるのであろう。

移植筋においては、術後の血行動態の急激な変化、手術侵襲(このモデルのような筋肉の部分移植の場合特に大きい)などの影響による筋線維の壊死・変性およびそれに伴う新たな再生がみられるため、EMやNMもいくらかは生じるはずであるが、その量(割合)が非常に少ないためわれわれの方法では検出されるには至らなかったと思われる。

FM(タイプ2線維)には共通のL鎖構成ながらATPase活性が異なるもの(FMa, FMbすなわちタイプ2a, 2b線維)が存在するため、H鎖にそのATPase活性などの異なる性質を決定づけている部分があるのであろう。また、FMとやはり共通のL鎖を持ちながらATPase活性の異なるEM、NM(未分化型のタイプ2c線維)においてもそのH鎖によって決定づけられているのであろう。

以上のことから、組織化学的筋線維タイプとミオシンアイソフォームとの相関は表11のごとく整理することができる。このように未分化型のタイプ2c線維(EMまたはNM、もしくは両者の混在)と移行型のタイプ2c線維(SMとFMの混在)では、ATPase活性上の表現型は同一であるが、本質的(構成ミオシン)には全く異なっている可能性が示唆された。

今回の脱神経筋、self筋の実験においては、2ないし4週において、移植筋の分析では検出されなかったEMもしくはNMと考えられるミオシンが認められた。結論からいえば、この結果は筋肉標本の単位重量あたりのミオシン含有量の相違によるものと考えられる。脱神経筋、self筋と異なり移植筋の場合、脱神経による筋萎縮に加え、tenotomyによる低緊張ならびに部分移植(筋切断)や血流の変化による侵襲が大きい。単位重量あたりのミオシン含有量が非常に少なくなっていると思われる。したがって、ミオシン抽出試料中のミオシン含有量が少なくなっており、そのために移植筋のミオシン抽出試料を原液で泳動させても(正常筋では原液を5ないし20倍に薄めて泳動している)検出されなかったものとする。(具体例を示すと、正常腓腹筋を原液で泳動した場合全体の90%を占めるSMはぶ厚い帯となり、10%しかないFMがきれいに現れるが、10倍に希釈するとSMは細い1本のバンドになり、FMは消失して検出されない。)

7. 脱神経後に見られるミオシンアイソフォームの変化

脱神経筋、self筋において、脱神経後2ないし4週においてみられたミオシンアイソフォームの変化、すなわちEMもしくはNMと思われる移動度の大きいバンドが検出されたこと、はどのように解釈すればよいであろうか。

手術侵襲などによって受けた損傷に伴う、もしくは脱神経によって引き起こされる変性に伴う筋再生(新生)が見られた結果と解釈することもできるが、一部のSMやFMが“逆分化”dedifferentiatedし、EMもしくはNMが生じたと考えることも否定できない。

これまでの生化学的研究の報告からは、成長の初期(胎児期、新生児期)のみならず、筋線維の再生時にもEM、NMがみられることはよく知られており^{6,53}、EM→NM→FM、SM という一方向の分化が定説となっている。ここで提起したいのは、FM、SM→NM→EM という“逆分化”がミオシンアイソフォームにおいて“一部”生じているのではないかという問題である。

筋肉が脱神経後、終板以外の膜表面のいたるところにおいてもアセチルコリン(以下ACh)過敏性になることはよく知られている。胎児期の骨格筋もやはり、そのすべての膜表面においてACh過敏性を示すため^{2,54}、脱神経されることによって、胎児期の状態に“逆分化”するのではないかとしばしば考えられてきた^{7,61}。(ここで用いている逆分化という言葉は、あたかも逆戻りしたかのように以前と類似した性質を示したことから使われており、本来の意味合いから言えば決して最適ではなく、異なる方向への分化と表現すべきかもしれない。^{3,41})

Bambrick L. & Gordon T. (1987)²⁷ は、ACh受容体の定量的分析を行い興味深い結果を報告している。すなわち、ラット成体を脱神経した場合ACh受容体の数は増加するが約2週間でプラトーになり、その値は生後1週間の新生児の値に相当する。生下時はその数倍のACh受容体を持っているがそこまでは増加しない。しかし、生後1～2週の新生児を脱神経した場合は生下時程度(もしくはそれ以上)にまで増加するという。

以上のように、ラットの成体においては脱神経によって“限られた範囲”(生後1週レベルという時期は神経との相互作用の欠如がその筋線維の維持に致命的にならなくなる時期と一致していることは興味深い^{3,41})の逆分化が観察されることから、今回のミオシンアイソフォームの変化もこのような逆分化を反映したものではないかと推察することができる。すなわち、脱神経後2～4週においてEMもしくはNMと思われるアイソフォーム(ACh受容体の結果から推察するとほとんどがNMであろう)が出現するが、対象筋のミオシン全体の量からみれば“ごく一部”であり、“限られた範囲”の逆分化で止まり、それ以後再びFMもしくはSMに再分化していくのであろう。この再分化していく過程において、self筋においては新たな神経再支配の影響が大きいであろうが、一方、脱神経筋の場合にもこの再分化(FMへの再分化)が見られていることは、逆分化が“ごく一部”かつ“限られた範囲”であるとともに“一時的”なものである(数週間)であることを表している。なお、ACh受容体の増加に関しては長期間維持されるとの報告⁷⁰がありこの点に関してはやや隔たりが見られる。

脱神経を受けた筋肉は、新たな神経再支配を受けやすいように臨戦態勢(筋細胞膜全面

におけるAch感受性の上昇)を整えるが、それは数週間しか続けることができず、神経支配のないまま^{Whalen et al. 813}の云う“プログラムされている分化”(新生児期に脱神経されても、すなわち神経支配がなくてもEM+NM+FMの変化は進行する。SMは神経支配がないと現れない。)を開始するのであろう。

以上のように、脱神経後数週間に見られるAch感受性の変化をはじめとする一連の変化は、ミオシンアイソフォームの逆行性の変化を伴っており、構造タンパクの面からもまさに“逆分化”(未分化な状態への逆行性変化)と表現できる可能性が示唆された。また、この逆分化は“ごく一部”において生じ、かつ“限られた範囲”までしか進行せず、しかも数週間という“一時的”なもので、その後はミオシンアイソフォームは神経支配のあるなしにかかわらず再分化を始めることが示唆された。

ここでどうしてももうひとつの可能性について言及しておかなければならない。それは、2~4週にみられたEMもしくはNMが脱神経後にみられる変性に引き続いて起こる再生を表している可能性である。この場合、むしろ逆分化ではないが、この再生過程は全体から見ればごく一部で生じ、数週間というやはり一時的なもので、適切な神経支配が得られないと(脱神経筋の場合に相当)その活発な再生活動を維持できなくなるのであろう。これらの未成熟なミオシンはそれ以上の分化を断念して消滅するのかもしれない。

8. 新たなSMアイソフォーム

SMについては、2種のアルカリL鎖(LC1sa, LC1sb)および1種のDTNB-L鎖が存在することが明らかになっている。したがって、本来FMと同様に2種のアルカリL鎖のhomodimer各2種とheterodimer1種の計3種のバンドが検出されるべきであるが、LC1saとLC1sbとの分子量が非常に近い(等電点が異なるため2次元SDS-PAGEで分離できる)ために、上記3種のアイソフォームは1つのバンドとして検出されてしまう⁸⁰⁾。

しかしながら今回の実験では脱神経筋、self筋双方において、術後2~4週に本来のSMよりわずかに移動度が大きい1~2本のバンドが検出された。このようなバンドについての明確な報告はこれまで見られず、類似していると推察されるバンドの報告が僅かにみられるのみである(神経支配非依存性のSMかと記されている)²⁰⁾。今回検出されたSMよりわずかに移動度の大きいバンドについては、SMのH鎖(S-MHC)とFMのL鎖(LC1f, LC2f, LC3f: SMのL鎖よりも分子量が小さい)のハイブリッドタイプの可能性^{40, 51)}などが考えられるが、この時期にだけ検出されたことへの関連も含め、より踏み込んだ分析、検討が必要である。

参考文献

- 1) Arkansas, V., and Engel, W.K. : Distinct subtypes of type I fibers of human skeletal muscle. *Neurology*, 25:879-887, 1975.
- 2) Bambrick, L. and Gordon, T. : Acetylcholine receptors and sodium channels in denervated and botulinum-toxin-treated adult rat muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 382:69-86, 1987.
- 3) Bär, A., and Pette, D. : Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 235:153-155, 1988.
- 4) Bárány, M., Bárány, K., Reckard, T. Volpe, A. : Myosin of fast and slow muscles of the rabbit. *Arch. Biochem. Biophys.* 109:185-191, 1965.
- 5) Billeter, R., Weber, H., Lutz, H., Howald, H., Eppenberger, H.M. and Jenny, E. : Myosin types in human skeletal muscle fibers. *Histochem.*, 65:249-259, 1980.
- 6) Billeter, R., Heizmann, C.W., Howard, H. and Jenny, E. : Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibers. *Eur. J. Biochem.*, 116:389-395, 1981.
- 7) Booth, F.W. : Time course of muscular atrophy during immobilization of hind limbs in rats. *J. Appl. Physiol.*, 43:656-661, 1977.
- 8) Briones, R., Lineaweaver, W.C., Newlin, L., Whitney, T.M. and Buncke, H.J. : Single pedicle microvascular transfers of the serratus anterior and latissimus dorsi muscles in rats. *Microsurgery*, 10:269-273, 1989.
- 9) Brooke, M.H. and Kaiser, K.K. : Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch. Neurol.*, 23:369-379, 1970.
- 10) Buller, A.J., Eccles, J.C. and Eccles, R.M. : Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb. *J. Physiol.*, 150:399-416, 1960.
- 11) Buller, A.J., Eccles, J.C. and Eccles, R.M. : Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J. Physiol.*, 150:417-439, 1960.
- 12) Burke, R.E., Levine, D.N., Zajac, F.E., Tsairis, P. and Engel, W.K. : Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science*, 174:709-712, 1971.
- 13) Butler-Browne, G.S., Bugaisky, L.B., Cuénoud, S., Schwartz, K. and Whalen, R.G. : Denervation of newborn rat muscles does not block the appearance of adult fast myosin heavy chain. *Nature*, 299:830-833, 1982.
- 14) Butler-Browne, G.S. and Whalen, R.G. : Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev. Biol.*, 102:324-334, 1984.

- 15) Carlson, B.M. : A quantitative study of muscle fiber survival and regeneration in normal, pre-denervated and marcaine-treated free muscle grafts in the rat. *Exp. Neurol.*, 52:421-432, 1976.
- 16) Carlson, B.M. and Guttman, E. : Development of contractile properties of minced muscle regenerates in the rat. *Exp. Neurol.*, 36:239-249, 1972.
- 17) Chen, C.W. : The free muscular transplant. A case report from the limb replantation research unit, Number 6 Peoples Hospital, Shanghai City. *Zhonghua Yixue Zazhi*, 8:530-538, 1975.
- 18) d'Albis, A., Pantaloni, C. and Bechet, J.-J. : An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content. *Eur. J. Biochem.*, 99:261-272, 1979.
- 19) d'Albis, A., Lenfant-Guyot, M., Janmot, C., Chanoine, C., Weinman, J. and Gallien, C.L. : Regulation by thyroid hormones of terminal differentiation in the skeletal dorsal muscle. I. Neonatal mouse. *Dev. Biol.*, 123:25-32, 1987.
- 20) d'Albis, A., Couteaux, R., Janmot, C., Roulet, A. and Mira, J.C. : Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. *Eur. J. Biochem.*, 174:103-110, 1988.
- 21) d'Albis, A., Couteaux, R., Janmot, C. and Roulet, A. : Specific programs of myosin expression in the postnatal of rat muscles. *Eur. J. Biochem.*, 183:583-590, 1989.
- 22) Dalla Libera, L., Sartore, S., Pierobon-Bormoli, S. and Schaffino, S. : Fast-white and fast-red isomyosins in guinea pig muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96:1662-1670, 1980.
- 23) de la Pena, J., Lineaweaver, W.C. and Buncke, H.J. : Microvascular transfer of the serratus anterior of the rat. *Microsurgery*, 9:18-21, 1988.
- 24) Dhoot, G.K. and Perry, S.V. : Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. *Nature*, 278:714-718, 1979.
- 25) Diamond, J. and Miledi, R. : A study of foetal and new-born rat muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)*, 162:393-408, 1962.
- 26) Dubowitz, V. : *Muscle biopsy: a practical approach*. 2nd ed. p82-128, Baillière Tindall, East Sussex, 1985.
- 27) Dux, L., Meszaros, M.G., Rohan, J., Gajdos, L., Jakab, G. and Guba, F. : The value of simple lipid stains for typing skeletal muscle fibers. *Histochem. J.*, 13:63-71, 1981.
- 28) Engel, W.K., Brooke, M.H. and Nelson, P.G. : *Histochemical studies of*

denervated or tenotomized cat muscle. Illustrating difficulties in relating experimental animal conditions to human neuromuscular diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 138:160-185, 1966.

29) Frey, M., Gruber, H., Havel, M., Steiner, E. and Freiliger, G. : Experimental free-muscle transplantation with microneurovascular anastomoses. *Plast. Reconstr. Surg.*, 71:689-702, 1983.

30) Gambke, B., Lyons, G.E., Haselgrove, J., Kelly, A.M. and Rubinstein, N.A. : Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett.*, 156:335-339, 1983.

31) Garnett, R.A.F., O'Donovan, M.J., Stephens, J.A. and Taylor, A. : Motor unit organization of human medial gastrocnemius. *J. Physiol.*, 287:33-43, 1978.

32) Gauthier, G.F., Lowey, S. and Hobbs, A.W. : Fast and slow myosin in developing muscle fibers. *Nature*, 274:25-29, 1978.

33) Gauthier, G.F. and Lowey, S. : Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types. *J. Cell Biol.*, 81:10-25, 1979.

34) Gordon, T., Bambrick, L. and Orozco, R. : Comparison of injury and development in the neuromuscular system. **DISCUSSION. Plasticity of the neuromuscular system.** Wiley, Chichester (Ciba Foundation 138) 222-226, 1988.

35) Gorza, L. : Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, 38:257-265, 1990.

36) Harii, K., Ohmori, K., and Torii, S. : Free gracilis muscle transplantation, with microneurovascular anastomoses for the treatment of facial paralysis. *Plast. Reconstr. Surg.*, 57:133-143, 1976.

37) Henrich, H.N. and Hecke, A. : A gracilis muscle preparation for quantitative microsurgery studies in the rat. *Microvasc. Res.*, 15:349-356, 1978.

38) Hoh, J.F.Y., McGrath, P.A. and White, R.I. : Electrophoretic analysis of multiple forms of myosin in fast-twitch and slow-twitch muscles of the chick. *Biochem. J.*, 157:87-95, 1976.

39) Hoh, J.F.Y. : Light chains distribution of chicken skeletal muscle myosin isoenzymes. *FEBS Lett.*, 90:297-300, 1978.

40) Hoh, J.F.Y. : Developmental changes in chicken skeletal myosin isoenzyme. *FEBS Lett.*, 98:267-270, 1979.

41) Hoh, J.F.Y., Hughes, S., Hugh, G. and Pozgaj, I. : Three hierarchies in

- skeletal muscle fiber classification : allotype, isotype and phenotype. In Cellular and Molecular Biology of Muscle Development. UCLA Symp. on Molec. Cell Biol. 93 (edited by Stockdale, F. and Kedes, L.), 15-26, Alan R. Liss, Inc., New York., 1989.
- 42) Ikuta, T., Kubo, T. and Tsuge, K. : Free muscle transplantation by microsurgical technique to treat severe Volkmann's contracture. *Plast. Reconstr. Surg.*, 58:407-414, 1976.
- 43) James, N.T. : Identification of muscle fiber types in the experimentally denervated tibialis anterior muscle of the rabbit. *Br. J. Exp. Pathol.*, 55:808-828, 1974.
- 44) Jaweed, M.M., Herbisjon, J.G. and Ditunno, F.J. : Denervation and reinnervation of fast and slow muscles. *J. Histochem. Cytochem.*, 23:808-827, 1955.
- 45) Kameyama, T. and Etlinger, J.D. : Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degeneration in muscle. *Nature* 279:344-346, 1979.
- 46) Käser, L. and Müntener, M. : Delayed muscle transformation after foreign-reinnervation of excessive muscle tissue. *Anat. Rec.*, 223:347-355, 1989.
- 47) 川嶋孝雄、吉村浩太郎、川戸明広、山田 敦、波利井清紀：ピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法によるラット正常骨格筋myosin isoformの分析。日形会誌, 13:615-625, 1993.
- 48) 光嶋 勲：神経血管柄付筋肉移植の研究 一第1報：移植筋の変性と再生に関する光顕的電顕的検索— 日形会誌, 7:478-489, 1987.
- 49) 久保 敬：Microsurgeryを応用した遊離筋肉移植の実験的研究。一特に移植筋中のmotor endplateの変化及び回復状態について— 日整会誌, 49:985-993, 1975.
- 50) Lavine, D. and Cochran, T.A. : The failure to survive of autogenous free grafts of whole gracilis muscles in dog. *Plast. Reconstr. Surg.*, 58:221-227, 1976.
- 51) Lutz, H., Weber, H., Billeter, R. and Jenny, E. : Fast and slow myosin within single skeletal muscle fibers of adult rabbits. *Nature*, 281:142-144, 1979.
- 52) 宮沢 寛：不動化による筋萎縮に対する筋の緊張および電気刺激の影響 一実験的研究— 日整会誌, 60:1003-1016, 1986.
- 53) 岡田理美、桒中征哉、石浦章一、杉田秀夫：ラット筋線維の発育・分化に関する組織化学的研究。神経内科, 15:363-370, 1981.
- 54) 大室弘美：ミオシンアイソフォーム—ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析—細胞, 17:127-130, 1985.
- 55) Peer, L.A. : Transplantation of tissues, Vol.2, p337, Williams &

Wilkins, Baltimore, 1955.

56) Pette, D. and Schnez, U. : Coexistence of fast and slow type myosin light chains in single muscle fibers during transformation as induced by long term stimulation. FEBS Lett., 83:128-130, 1977.

57) Pette, D. and Vrbová, G. : Invited review: neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. Muscle & Nerve, 8:676-689, 1985.

58) Pierobon-Bormioli, S., Sartore, S., Vitadello, M. and Schiaffino, S. : 'Slow' myosins in vertebrate skeletal muscles. An immunofluorescence study. J. Cell Biol., 85:672-681, 1980.

59) Pierobon-Bormioli, S., Sartore, S., Dalla Libera, M., Vitadello, M. and Schiaffino, S. : "Fast" isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle. J. Histochem. Cytochem., 29:1179-1188, 1981.

60) Pinter, K., Mabuchi, K. and Sréter, F.A. : Isoenzymes of rabbit slow myosin. FEBS Lett. 128:336-338, 1981.

61) Rowlerson, A., Rope, B., Murray, J., Whalen, R.B. and Weed, A.G. : A novel myosin present in cat jaw-closing muscles. J. Musc. Res. Cell Motil., 2:415-438, 1981.

62) Roy, R.K., Sréter, F.A. and Sarkar, S. : Changes in tropomyosin subunits and myosin light chains during development of chicken and rabbit striated muscles. Dev. Biol., 69:15-30, 1979.

63) Rubinstein, N.A., Pepe, F.A., and Holtzer, H. : Myosin types during the development of embryonic chicken fast and slow muscles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74:4524-4527, 1977.

64) Rubinstein, N., Mabuchi, K., Pepe, F., Salmons, S., Gergely, J. and Sréter, F. : Use of type-specific antimyosins to demonstrate the transformation of individual fibers in chronically stimulated rabbit fast muscles. J. Cell Biol., 79:252-261, 1978.

65) Sartore, S., Gorza, L. and Schiaffino, S. : Fetal myosin heavy chains in regenerating muscle. Nature, 298:294-296, 1982.

66) Salmons, S. and Sréter, F.A. : Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type. Nature, 263:30-34, 1976.

67) Salviati, G., Betto, R., and Danieli, D. : Polymorphism of myofibrillar proteins of rabbit skeletal-muscle fibres. Biochem. J. 207:261-272, 1982.

68) Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Vianello, M., Gundersen, K. and Lomo, T. : Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. J. Muscle Res. Cell Motil.,

10:197-205, 1989.

- 69) Seidel, J.C., Sréter, F.A., Thompson, M.M. and Gergely J. : Comparative studies of myofibrils, myosin and actomyosin from red and white rabbit skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17:662-667, 1964.
- 70) Steinbach, J.H. : Neuromuscular junctions and α -bungarotoxin-binding sites in denervated and contralateral cat skeletal muscles. *J. Physiol. (Lond.)* 313:513-528, 1981.
- 71) Sturdivant, A.N. and Bosova, N.N. : Development of atrophic muscular tissue in condition of transplantation in place of mechanically damaged muscle. *Arkh. Anat. Gist.*, 39: 18-32, 1960.
- 72) 杉田秀夫、石浦章一 : 筋線維型の分化. 筋発生の細胞生物学. 小沢鎮二郎 他 編, p304-313, 学会出版センター, 東京, 1983.
- 73) Swain, D.P. and Lalone, B.J. : Rat gracilis muscle preparation for combined macro and microvascular research. *Am. J. Physiol.* 242 (Heart Circ. Physiol. 11): H713-H721, 1982.
- 74) Tamai, S., Komatsu, S., Sakamoto, H., Sano, S. and Sasauchi, N. : Free muscle transplantation in dogs, with microsurgical neurovascular anastomoses. *Plast. Reconstr. Surg.* 48:219-225, 1970.
- 75) Termin, A. and Pitte, D. : Myosin heavy-chain-based isomyosins in developing, adult fast-twitch and slow-twitch muscles. *Eur. J. Biochem.*, 195:577-584, 1991.
- 76) Terzis, J.K., Sweet, R.C., Dykes, R.W. and Williams, H.B. : Recovery of function in free muscle transplants using microneurovascular anastomoses. *J. Hand Surg.*, 3:37-59, 1978.
- 77) Thompson, N. : Autogenous free grafts of skeletal muscle. A preliminary experimental and clinical study. *Plast. Reconstr. Surg.*, 48:11-27, 1971.
- 78) Vrvová, G., Gordon, T., and Jones, R. : Nerve-muscle interaction. Chapman & Hall, London, 1978.
- 79) Watson, A.C.H. and Mair, A.R. : Failure of free muscle grafts in dogs. *Br. J. Plast. Surg.*, 29:27-33, 1976.
- 80) Weeds, A.G. and Hall, R. : Characterization of myosin light chains from histochemically identified fibres of rabbit psoas muscle. *FEBS Lett.*, 49:320-324, 1975.
- 81) Whalen, R.G., Butler-Browne, G.S., Bugaisky, L.B., Harris, J.B. and Herliocoviez, D. : Myosin isozyme transitions in developing and regenerating rat muscle. In *Gene Expression in Muscle* (Strohman, R.C. and Wolfe, S., eds.) 249-258, Plenum Press, New York, 1984.

- 82) Whalen, R.G., Sell, S.M., Butler-Browne, G.S., Schwartz, K., Bouveret, P. and Pinset-Harstom, I. : Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature*, 292:805-809, 1981.
- 83) Wieczorek, D.F., Periasamy, M., Butler-Browne, G.S., Whalen, R.G. and Nadal-Ginard, B. : Co-expression of multiple myosin heavy chain genes, in addition to a tissue-specific one, in extraocular musculature. *J. Cell Biol.*, 101:618-629, 1985.
- 84) Wolff, K.-D. and Stiller, D. : Functional aspects of free muscle transplantation : atrophy, reinnervation and metabolism. *J. Reconstr. Microsurg.*, 8:137-142, 1992.
- 85) 山田 敦 : 微小血管神経縫合法による筋肉移植の実験的研究. 日形会誌, 2:147-163, 1982.
- 86) 安永 博 : 遊離筋肉移植に関する実験的研究 — 阻血、脱神経および再神経支配が移植筋の形態ならびに機能に及ぼす影響について — 日整会誌, 58:1267-1279, 1984.
- 87) Yim, K.K., Lineaweaver, W.C., Siko, P.P. and Buncke, H.J. : Microvascular transfer of anterior and posterior gracilis muscles in rats. *Microsurgery*, 12:262-267, 1991.
- 88) 吉岡 薫、生田義和、畑野栄治、平松伸夫 : 遊離筋肉移植の実験的研究 日整会誌, 55:1384-1385, 1981.
- 89) Zielonko, J. : Ueber die Entwicklung und Proliferation von Epithelien und Endothelien. *Arch. Mikrosk. Anat.*, 10:351-376, 1874.

筋線維タイプ		リン酸分解酵素活性		
Type 1 (slow twitch)	1 a	low	oxidative	slow-red
	1 b	high	(transitional)	
Type 2 (fast twitch)	2 a		oxidative, glycolytic	fast-red, intersidiate
	2 b		glycolytic	fast-white
	2 c		(transitional)	
				fatigue resistant (postural)
				fatigue resistant (phasic)
				fatiguable (phasic)

表 1 哺乳類骨格筋の筋線維タイプの分類

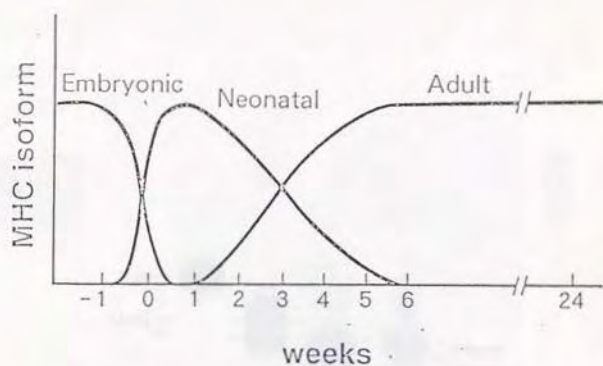


図1 ラット骨格筋のミオシンアイソフォームの成長による変化

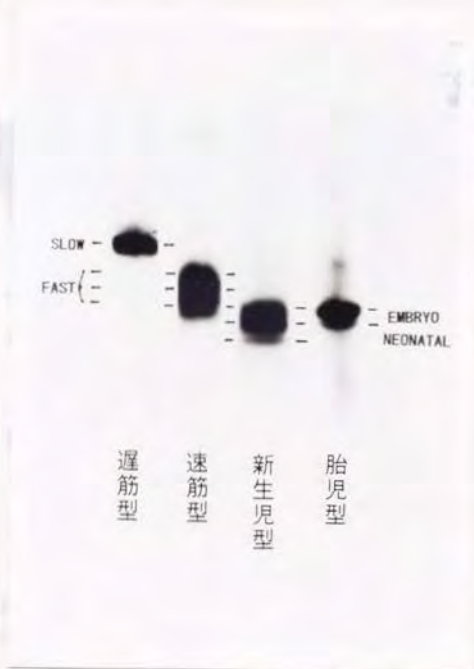


図2 ラット骨格筋から抽出した未解離状態のミオシン(ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による)

左から slow myosin (成体ラット腓腹筋)
 fast myosin (成体ラット長趾伸筋)
 neonatal myosin (生後1日目ラット下肢筋)
 embryonic myosin (妊娠15日目胎児ラット下肢筋)

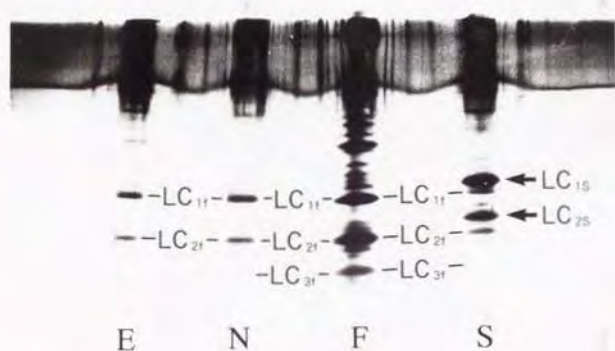


図3 ラット骨格筋から抽出した解離状態のミオシン・サブユニット
(SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法による)

LC₁, LC₂は遅筋ミオシンのL鎖、LC₁₁, LC₂₁, LC₃₁は速筋ミオシンのL鎖
速筋ミオシン、新生児ミオシン、胎児ミオシンのL鎖は共通しているのがわかる。
注: 成体ラット腓腹筋はおよそ10%の速筋を含んでいる。

S: slow myosin (成体ラット腓腹筋)
F: fast myosin (成体ラット長趾伸筋)
N: neonatal myosin (生後1日目ラット下肢筋)
E: embryonic myosin (妊娠15日目胎児ラット下肢筋)

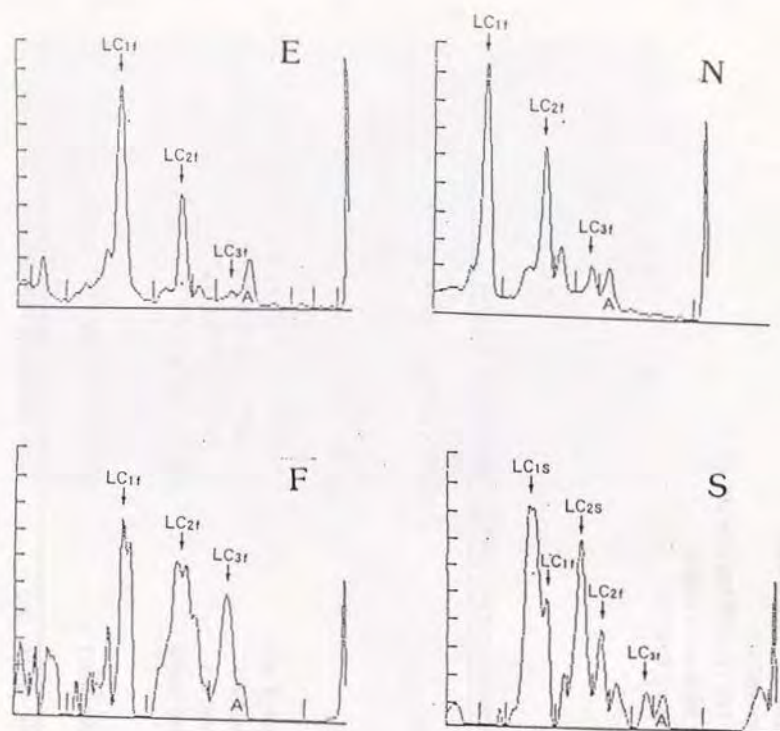


図4 ラット骨格筋から抽出した解離状態のミオシン・サブユニット
(SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法後デンストメーターにより吸光度を測定)

注1) A: artifact、注2) 成体ラット腓腹筋はおおよそ10%の速筋を含んでいる。

S: slow myosin (成体ラット腓腹筋)

F: fast myosin (成体ラット長趾伸筋)

N: neonatal myosin (生後1日目ラット下肢筋)

E: embryonic myosin (妊娠15日目胎児ラット下肢筋)

myosin (molecule)	heavy chain (HC)	light chain (LC)
slow myosin (SM) SM ₁ , (SM ₂ , SM ₃)	S-MHC (MHCI)	LC _{1s} (LC _{1sa} , LC _{1sb}), LC _{2s} *
fast myosin (FM) FMA ₁ , FMA ₂ , FMA ₃ (=IM) FMB ₁ , FMB ₂ , FMB ₃ FMD/x ₁ , FMD/x ₂ , FMD/x ₃	F-MHC (MHCI) MHCI a MHCI b MHCI d/x	LC _{1f} , LC _{2f} *, LC _{3f} LC _{1f} , LC _{2f} *, LC _{3f} LC _{1f} , LC _{2f} *, LC _{3f} LC _{1f} , LC _{2f} *, LC _{3f}
neonatal myosin (NM) NM ₁ , NM ₂ , NM ₃ , NM ₄	N-MHC	LC _{1f} , LC _{2f} *, LC _{3f}
embryonal myosin (EM) EM ₁ , EM ₂ , (EM ₃ , EM ₄)	E-MHC	LC _{1f} , LC _{2f} *, (LC _{3f} , LC _{emb})

* regulatory light chain (DTNB light chain)

表2 哺乳類骨格筋ミオシンとそのサブユニット

通常は(FMaを例にとると)、2種のアルカリL類(例:LC_{1f}, LC_{3f})と1種の調整(DTNB)L類(例:LC_{2f})が存在するため、2種のアルカリL類のhomodimer2種(例:{LC_{1f}}₂{LC_{2f}}, MHCI a = FMa₃, {LC_{3f}}₂{MHCI a = FMa₁})とheterodimer1種(例:{LC_{1f}}{LC_{2f}}, MHCI a = FMa₂)の計3種のミオシン分子アイソフォーム(例:FMa₁, FMa₂, FMa₃)が存在する。

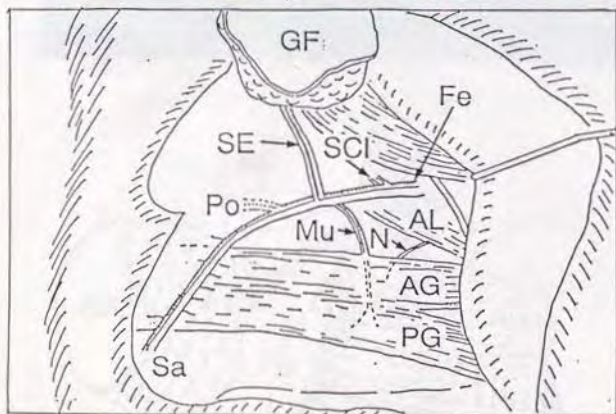
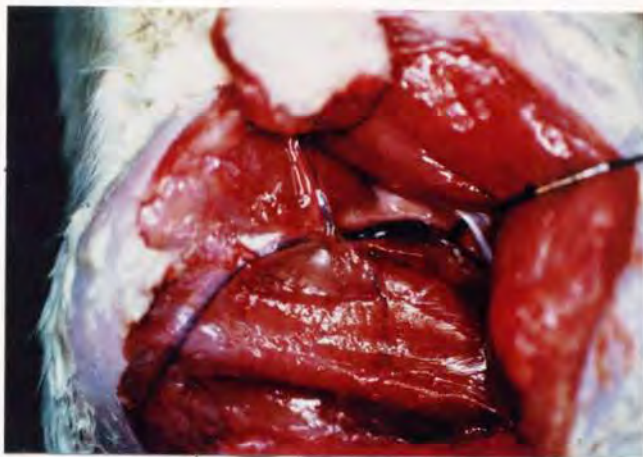


図5 移植薄筋採取部(ラット大腿内側)。そけい皮弁は挙上されている。

AG:薄筋前腹、PG:薄筋後腹、AL:長内転筋、GF:そけい皮弁

N:閉鎖神経の枝(薄筋の支配神経)、Fe:大腿動静脈

SE:浅腹壁動静脈、Sa:great saphenous artery and vein

Mu:大腿動静脈の筋枝、Po:膝窩動静脈、SCI:浅腸骨回旋動静脈

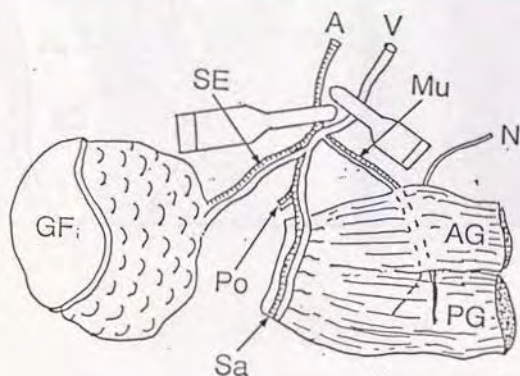
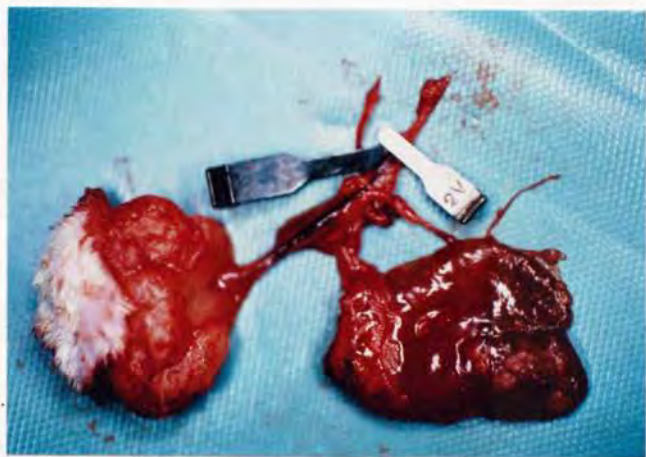


図6 挙上された薄筋-そけい複合皮弁(移植直前の状態)。大腿動静脈はそれぞれマイクロ血管クリップにてクランプされている。

A:大腿動脈、V:大腿静脈、N:閉鎖神経の枝(薄筋の支配神経)

AG:薄筋前腹、PG:薄筋後腹、GF:そけい皮弁、

Sa:great saphenous artery and vein、SE:浅腹壁動静脈、

Mu:大腿動静脈の筋枝、Po:膝窩動静脈、

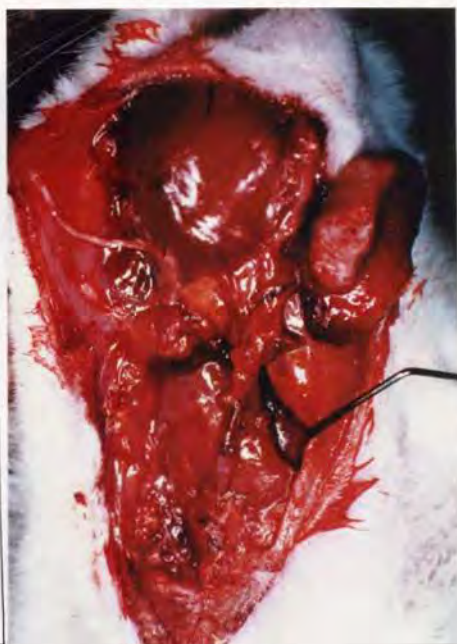
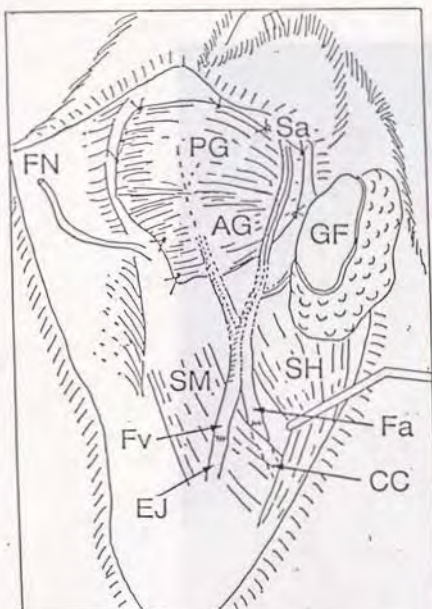


図7 移植された薄筋-そけい複合皮弁(血管吻合直後の状態)。神経縫合はまだ行っていない。移植薄筋は咬筋の上に固定してある。

AG: 移植された薄筋前腹、PG: 同じく薄筋後腹、FN: 顔面神経下顎枝(移植床神経)

GF: そけい皮弁、Sa: great saphenous artery and vein

Fa: 大腿動脈、Fv: 大腿静脈、CC: 総頸動脈、EJ: 外頸静脈

SH: 胸骨舌骨筋、SM: 胸骨乳突筋



図8 移植術が終了した状態。そけい皮弁は閉創の際頸部に縫合してある。
術後このそけい皮弁を観察することによって血管吻合の開存状態を
知ることができる。

	pH 4.2-4.3	pH 4.5-4.6	pH 10.5-10.7
Type 1	+	+	-
Type 2a	-	-	+
2b	-	+	+
2c	+	+	+

表3 ミオシンATPase染色による筋線維タイプと染色性の関係

移植筋ラット	血行再建成功例 血行再建失敗例	41例 11例	(うち中途死亡 6例)
脱神経筋ラット		35例	(中途死亡 0例)
Self筋ラット*		35例	(中途死亡 0例)
正常成体ラット		20例	
妊娠ラット(15日)		6例	

表4 実験に供したラットの一覧

*Self-reinnervation筋ラット

	1週	2週	3週	4週	8週	12週	16週
移植筋	0/5	1/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Self-reinnervation筋	0/5	0/5	3/5	4/5	5/5	5/5	5/5

表5

再神経支配の時期(再神経支配が見られた検体数)

	潜時(ms)	持続時間(ms)	振幅(mV)
正常薄筋	1.04±0.18	8.16±0.77	9.80±0.74
移植薄筋(4週)	3.36±0.50	14.12±0.85	0.90±0.09
移植薄筋(8週)	1.32±0.32	9.32±0.80	1.92±0.22
移植薄筋(16週)	1.26±0.27	8.32±0.90	2.43±0.45
Self-reinnervation筋(4週)	3.65±0.70	12.55±1.38	2.29±0.24
Self-reinnervation筋(8週)	1.36±0.29	8.40±0.77	3.97±0.60
Self-reinnervation筋(16週)	1.32±0.32	4.60±0.78	8.80±1.19

表 6

筋電位の変化
(各N=5, 但しself4週はN=4) [mean±SD]

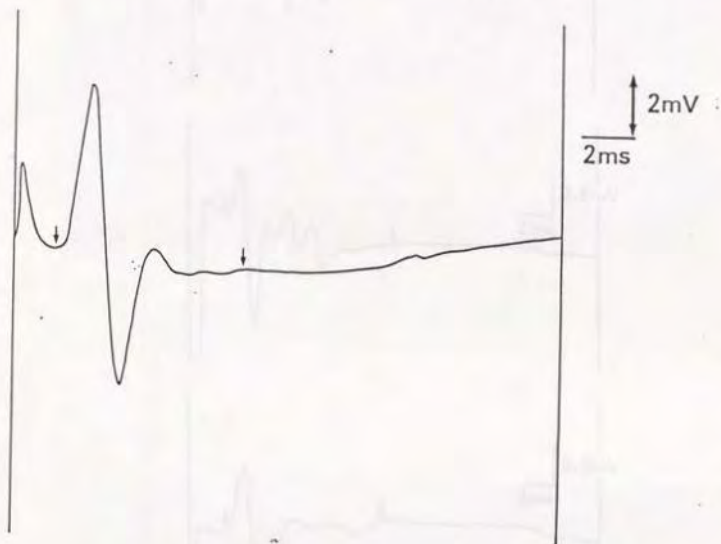


図9 正常薄筋の誘発筋電図

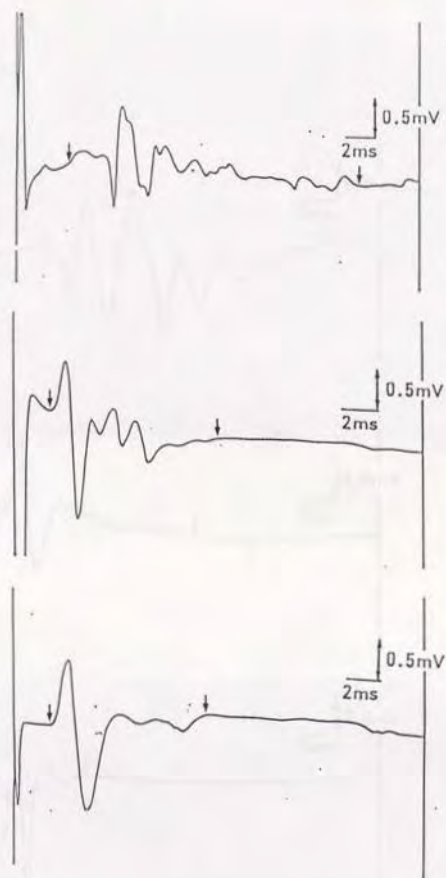


図10 移植薄筋の誘発筋電図

上:移植後4週、中:移植後8週、下:移植後16週

移植後16週においても振幅は正常薄筋のおよそ1/4程度であった。

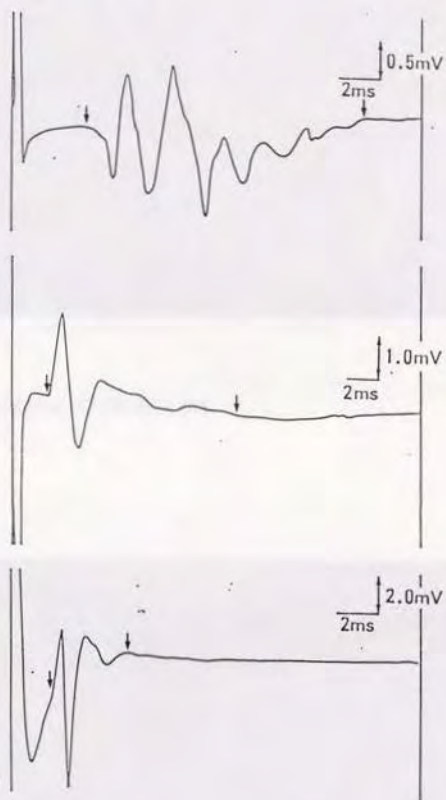


図11 Self-reinnervation筋の誘発筋電図

上:移植後4週、中:移植後8週、下:移植後16週

移植後16週において振幅は正常薄筋のおよそ80~90%まで回復した。



図12 正常薄筋のH-E染色($\times 100$)

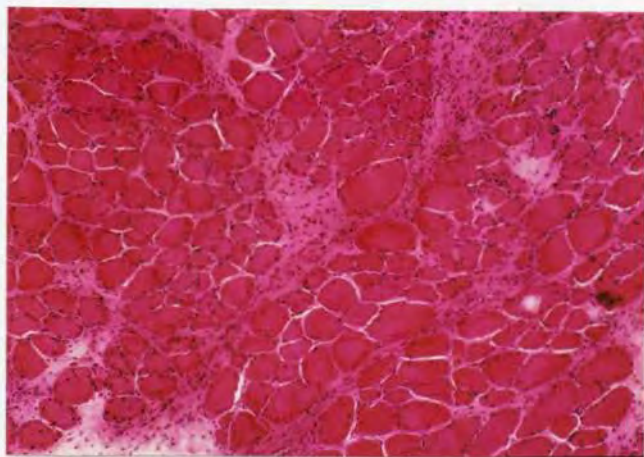


図13 2週後の移植薄筋のH-E染色($\times 100$)

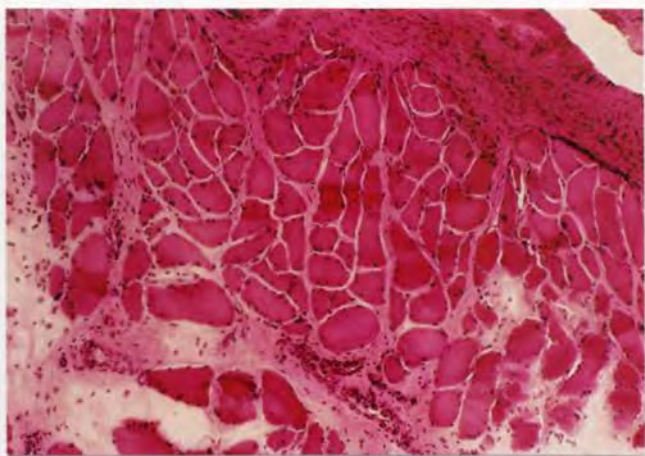


図14 3週後の移植薄筋のH-E染色($\times 100$)

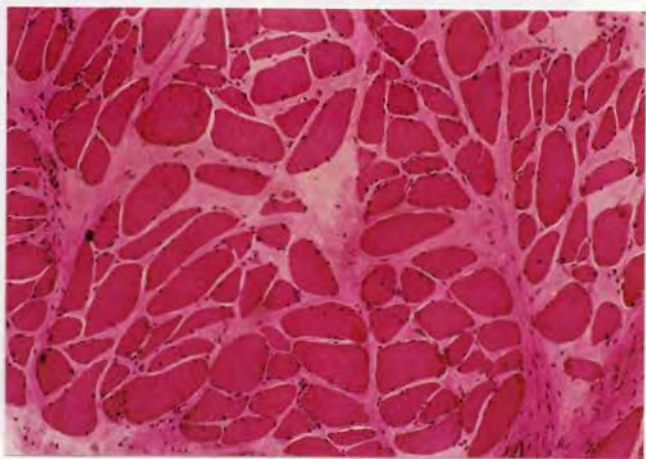


図15 4週後の移植薄筋のH-E染色($\times 100$)

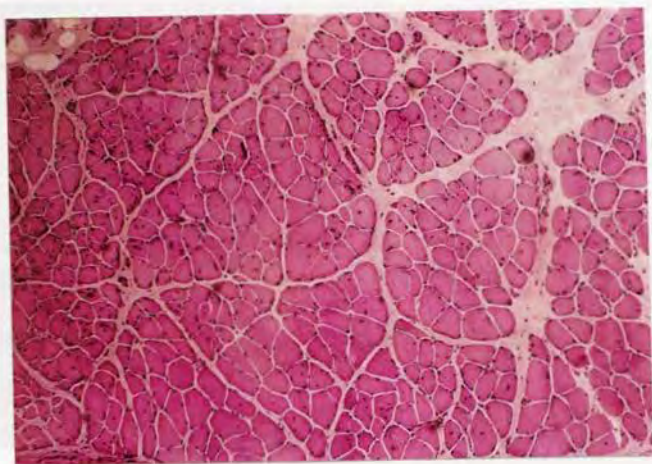


図16 8週後の移植薄筋のH-E染色($\times 100$)

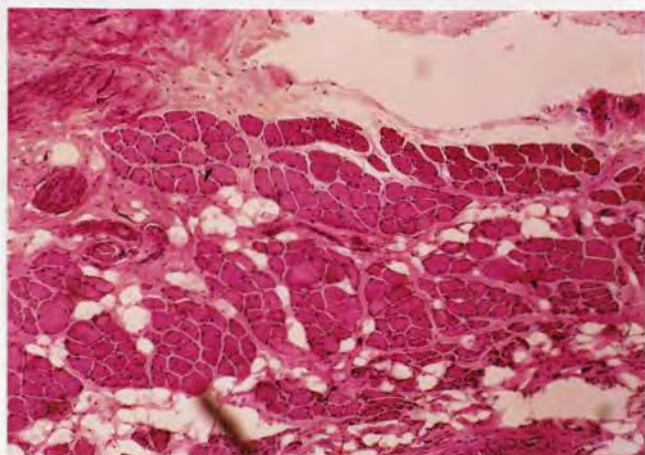


図17 12週後の移植薄筋のH-E染色($\times 100$)

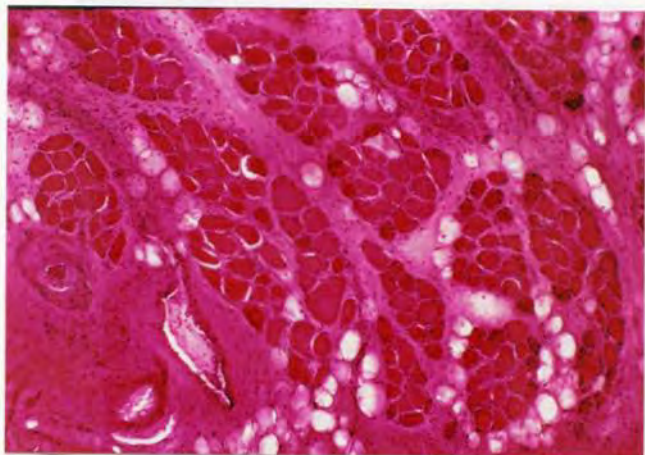


図18 16週後の移植薄筋のH-E染色(×100)

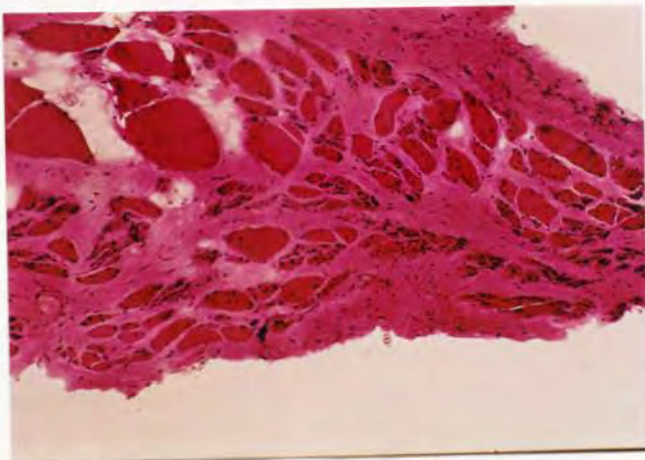


図19 16週後の脱神経筋のH-E染色(×100)
変性・萎縮した線維とともに肥大した線維が認められる。
間質の結合組織が非常に増殖している。

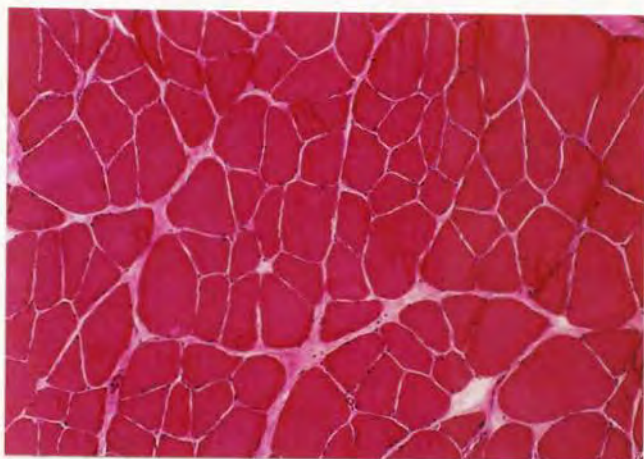


図20 16週後のself-reinnervation筋のH-E染色($\times 100$)
間質の結合組織が少なく、正常に近い状態まで回復している。

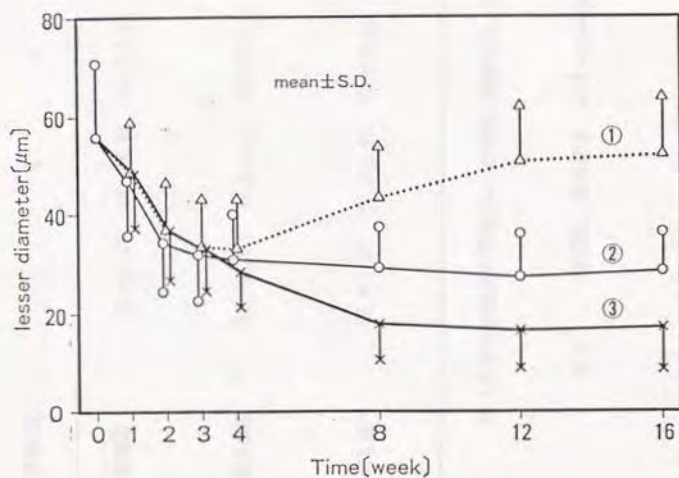


図21 術後の筋線維短径の変化の比較

①Self-reinnervation筋、②移植筋、③脱神経筋

Self-reinnervation筋は、正常筋の9割程度まで回復している。移植筋は神経再支配がみられた4週以降も引きつづき萎縮がみられ、正常筋の5割を維持する程度であった。

術後(週)	0	1	2	3	4	8	12	16
移植筋	55.9±1.87	46.1±2.66	33.3±2.11	32.1±1.40	30.5±3.44	29.5±2.03	27.3±1.35	29.1±1.00
脱神経筋	55.9±1.87	47.0±1.63	36.3±1.51	32.5±1.60	26.5±1.48	16.8±0.83	15.8±0.74	17.0±0.74
Self.筋*	55.9±1.87	47.3±1.37	37.0±0.99	32.7±1.94	33.9±1.44	42.9±3.29	51.1±1.43	52.4±1.54

注：各標本の短径の平均(n=5)の平均±標準偏差、単位 μ m.

* : Self-reinnervation筋

表 7

移植筋、脱神経筋、self-reinnervation筋における筋線維短径の変化

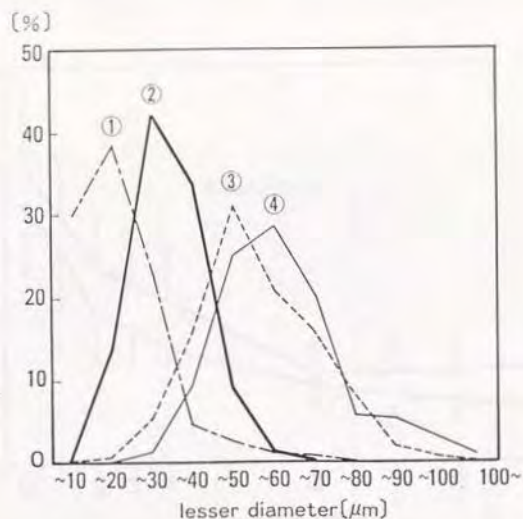


図22 筋線維短径のヒストグラムの比較

①脱神経筋、②移植筋、③self-reinnervation筋、④正常薄筋
脱神経筋においては大小不同が特に著しい。

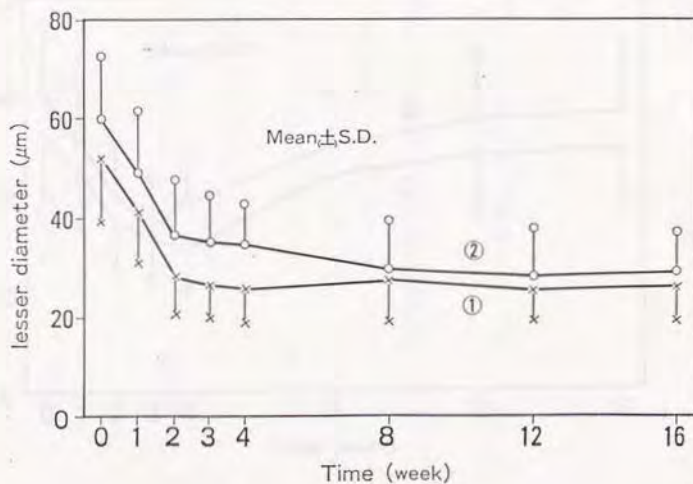


図23 移植筋におけるタイプ1線維およびタイプ2線維の短径の変化
①タイプ1線維、②タイプ2線維

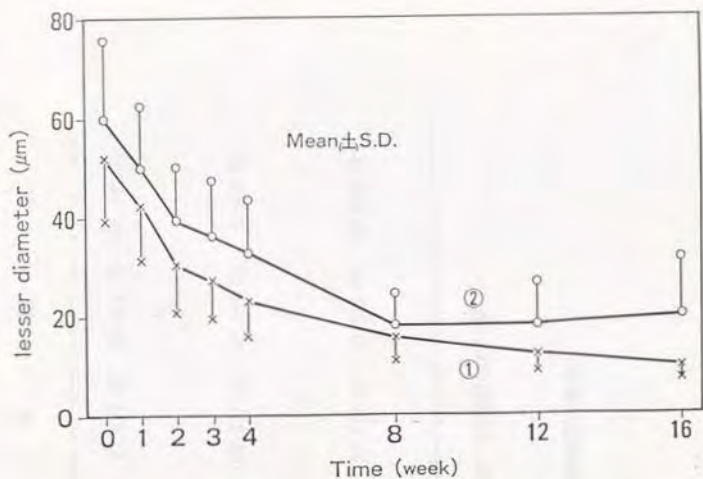


図24 脱神経筋におけるタイプ1線維およびタイプ2線維の短径の変化
 ①タイプ1線維、②タイプ2線維
 8週以降タイプ1線維とタイプ2線維の変化に若干の相違が見られる。

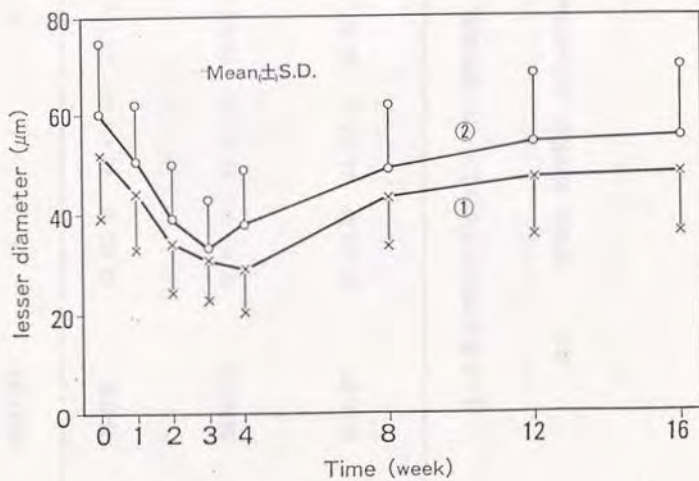


図25 Self-reinnervation筋におけるタイプ1線維およびタイプ2線維の短径の変化
 ①タイプ1線維、②タイプ2線維

術後(週)	0	1	2	3	4	8	12	16
移植筋	52.4±1.50	42.4±1.34	27.7±1.79	25.7±1.42	25.1±2.32	27.6±1.48	23.6±1.70	25.1±1.79
脱神経筋	52.4±1.50	42.0±1.38	30.2±1.32	25.8±0.84	22.1±1.03	16.6±1.24	12.4±1.33	9.9±0.96
Self. 筋*	52.4±1.50	43.9±1.11	34.3±1.41	31.2±1.05	28.8±1.15	39.7±3.70	47.5±1.60	47.9±0.89

注：各標本の短径の平均(n=5)の平均±標準偏差、単位μm.

*: Self-reinnervation筋

表8 移植筋、脱神経筋、self-reinnervation筋におけるタイプ1線維短径の変化

術後(週)	0	1	2	3	4	8	12	16
移植筋	60.4±2.35	49.4±2.38	36.4±2.21	35.2±1.46	33.8±1.69	29.3±2.32	27.7±0.62	29.2±0.82
脱神経筋	60.4±2.35	48.6±1.01	39.5±1.16	36.6±1.08	32.5±1.18	17.8±0.92	19.9±0.92	22.0±2.30
Self.筋*	60.4±2.85	50.2±1.89	39.5±1.50	33.4±2.20	37.7±1.93	44.5±4.27	54.3±2.50	55.3±2.22

注：各標本の短径の平均(n=5)の平均±標準偏差、単位μm.

*: Self-reinnervation筋

表 9

移植筋、脱神経筋、self-reinnervation筋におけるタイプ2線維短径の変化

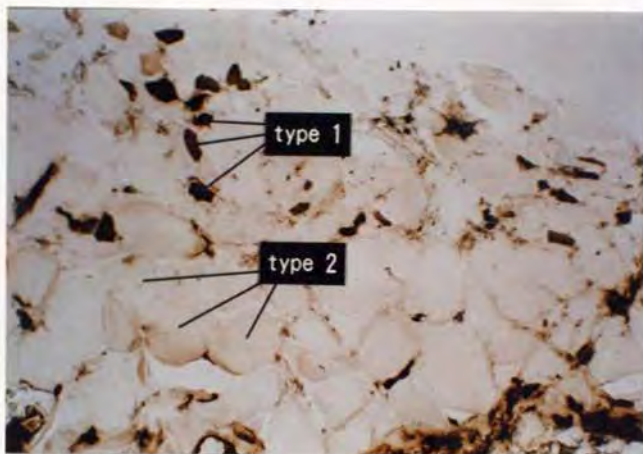


図26 16週後の脱神経筋のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)
 タイプ1線維は数も少ないが萎縮して非常に小さい。一方、タイプ2線維には肥大しているものも多く認められる。

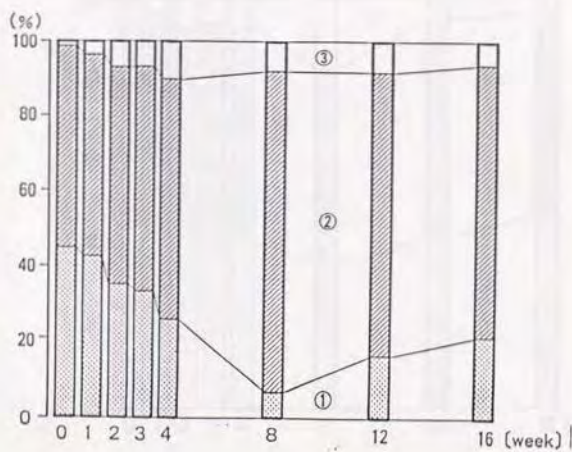


図27 移植筋における筋線維タイプ組成の推移
 ①タイプ1線維、②タイプ2(a+b)線維、③タイプ2c線維

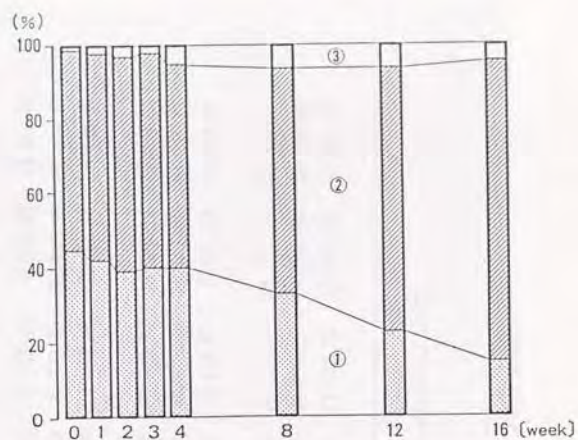


図28 脱神経筋における筋線維タイプ組成の推移
 ①タイプ1線維、②タイプ2(a+b)線維、③タイプ2c線維

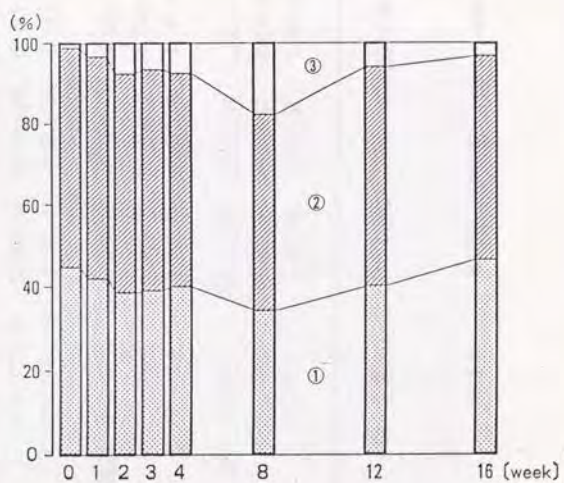


図29 Self-reinnervation筋における筋線維タイプ組成の推移
 ①タイプ1線維、②タイプ2(a+b)線維、③タイプ2c線維

術後(週)	0	1	2	3	4	8	12	16
移植筋								
タイプ1	44.9±2.76	42.0±2.43	35.7±3.21	32.7±2.05	26.9±4.30	5.8±2.07	9.2±5.52	12.5±4.69
タイプ2(a,b)	53.9±2.80	54.8±1.99	57.3±3.11	62.8±3.67	65.9±6.59	87.8±3.81	85.7±6.18	82.4±4.97
タイプ2c	1.3±1.04	3.2±1.30	5.0±3.58	4.5±1.73	7.2±3.28	6.3±2.06	5.1±1.36	5.1±1.85
脱神経筋								
タイプ1	44.9±2.76	41.9±2.77	39.3±1.10	40.2±1.55	39.2±1.04	33.5±2.58	23.4±0.97	15.8±1.21
タイプ2(a,b)	53.9±2.80	54.7±2.27	56.7±2.08	57.7±2.29	55.0±1.85	60.3±3.95	70.4±1.93	81.5±1.07
タイプ2c	1.3±1.04	3.4±1.29	4.1±1.87	2.1±0.85	5.5±1.39	6.2±1.63	6.2±1.83	3.0±0.82
Self.筋*								
タイプ1	44.9±2.76	41.3±1.79	38.3±1.70	39.5±2.90	40.0±1.74	36.2±1.95	40.0±2.20	46.1±2.81
タイプ2(a,b)	53.9±2.80	54.9±1.47	56.4±3.05	56.5±2.35	55.5±2.97	46.3±4.30	54.3±2.04	50.7±3.08
タイプ2c	1.3±1.04	3.8±1.01	5.3±1.70	3.9±1.68	4.5±1.43	17.5±2.70	5.7±1.12	3.2±1.29

注：各標本(n=5)における組成の 平均±標準偏差、単位%。 *：Self-reinnervation筋

表10 移植筋、脱神経筋、self-reinnervation筋における筋線維タイプ組成の変化



図30 正常薄筋前腹のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)
タイプ2線維が優位である。



図31 正常薄筋後腹のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)
タイプ1線維が優位である。

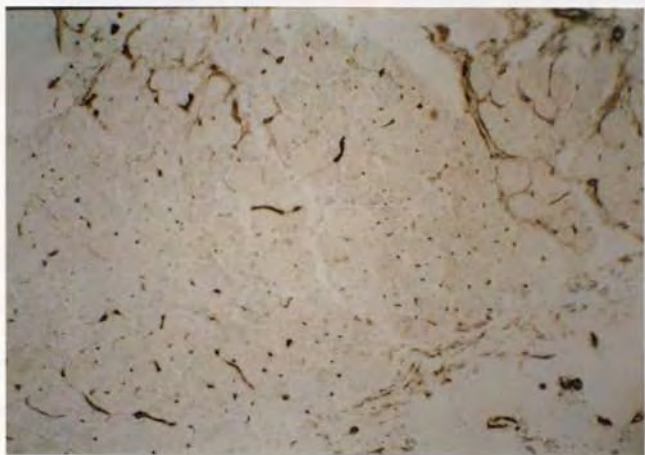


図32 正常上口唇挙筋のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)
タイプ2線維のみからなっている。



図33 正常咬筋のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)
タイプ2線維のみからなっている。

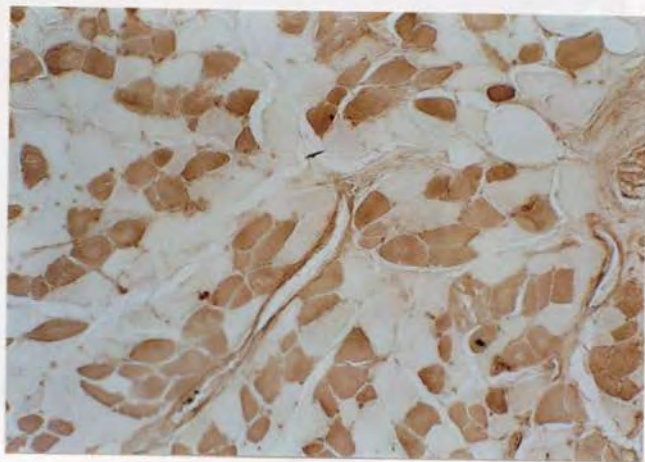


図34 2週後の移植筋のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)

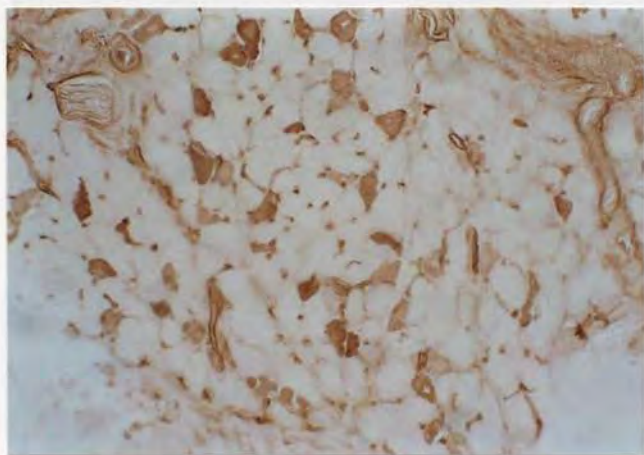


図35 4週後の移植筋のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)

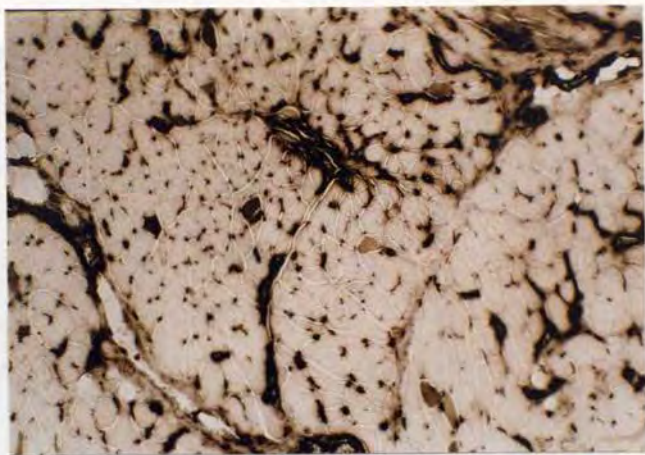


図36 8週後の移植筋のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)
タイプ1線維は非常に少ない。

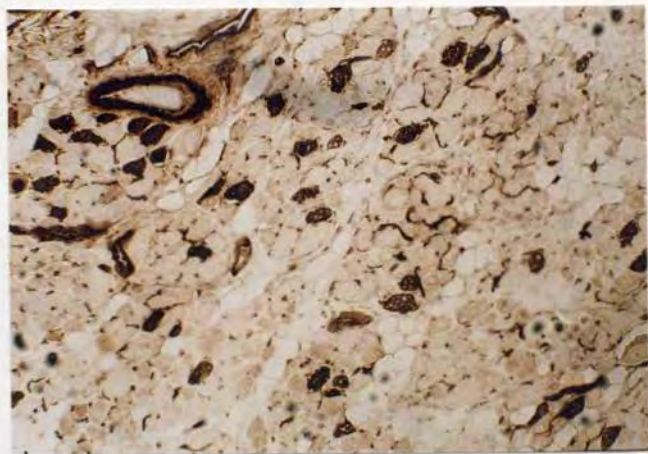


図37 16週後の移植筋のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)
濃く染色される線維が認められる。明らかなタイプIIグルーピングは見られない。

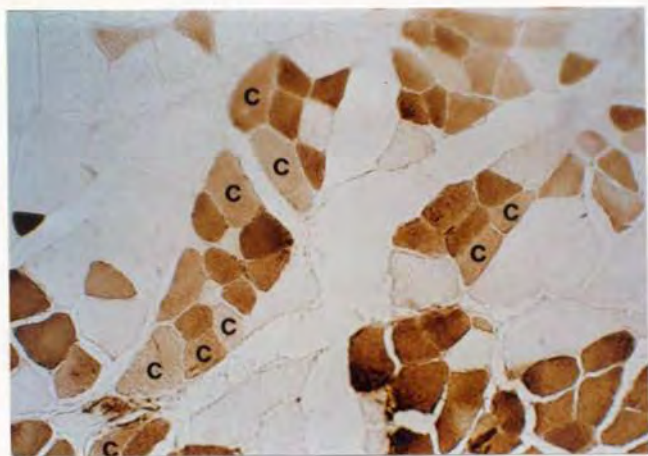


図38 8週後のself-reinnervation筋のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)
 多くのタイプ2c線維("c"で示した)が筋線維タイプ移行の途中で観察された。
 タイプ2c線維はpH4.3で薄く中間色に染色されており、その濃さは様々であった。



図39 16週後のself-reinnervation筋のミオシンATPase染色(pH4.3, $\times 100$)
 明かなタイプグルーピングが観察される。



図40 正常薄筋および表情筋(上口唇挙筋)から抽出した未解離状態のミオシン
(ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による)
左: 正常薄筋、右: 表情筋(上口唇挙筋)

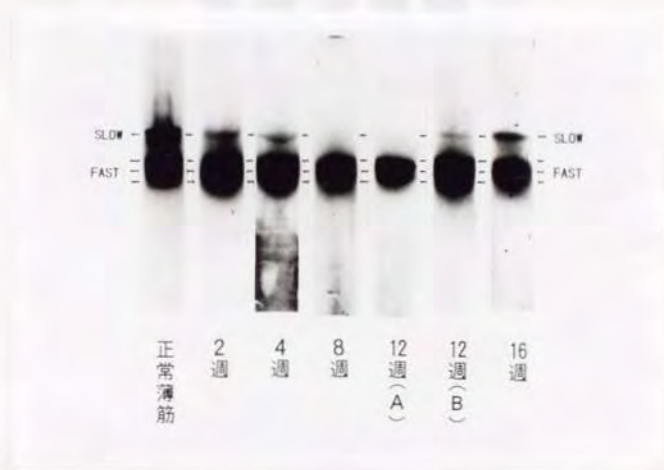


図41 移植筋から抽出した未解離状態のミオシン(ピロリン酸ポリアクリル
アミドゲル電気泳動法による)
左から移植前、移植後2週、4週、8週、12週(A)、12週(B)、16週
12週においては検体によってはSMが認められる。

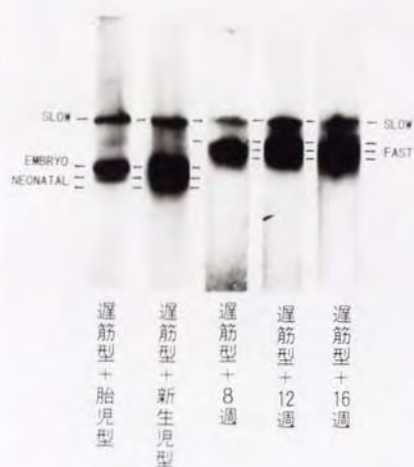


図42 再神経支配後の移植筋ミオシンと胎児ミオシン(EM)、新生児ミオシン(NM)との比較
(ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による)

左から、遅筋ミオシン+胎児ミオシン

遅筋ミオシン+新生児ミオシン

遅筋ミオシン+8週移植筋ミオシン

遅筋ミオシン+12週移植筋ミオシン

遅筋ミオシン+16週移植筋ミオシン

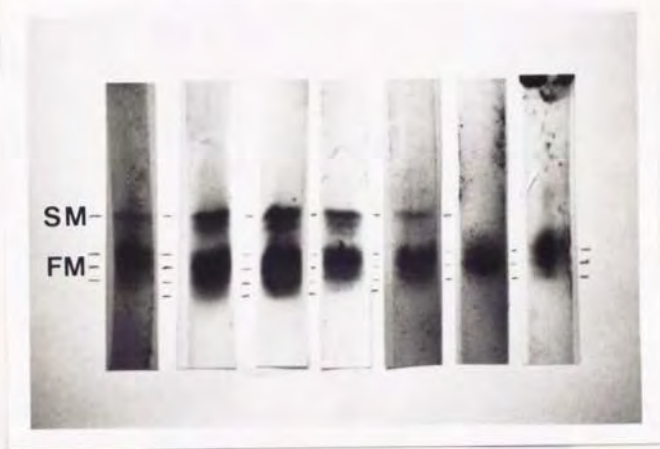


図43 脱神経筋から抽出した未解離状態のミオシン(ピロリン酸ポリアクリル
アミドゲル電気泳動法による)
左から移植前、移植後2週、3週、4週、8週、12週、16週
2～4週においてFMより移動度の大きいバンド(EMもしくはNMと思われる)が観察される。



図44 3週後の脱神経筋ミオシン(拡大)(ピロリン酸ポリアクリル
アミドゲル電気泳動法による)

FMよりもわずかに移動度の大きいEMもしくはNMと思われるバンドが検出される(矢印)
とともに、SMよりもわずかに移動度の大きいバンドが2本観察される(三角印)。

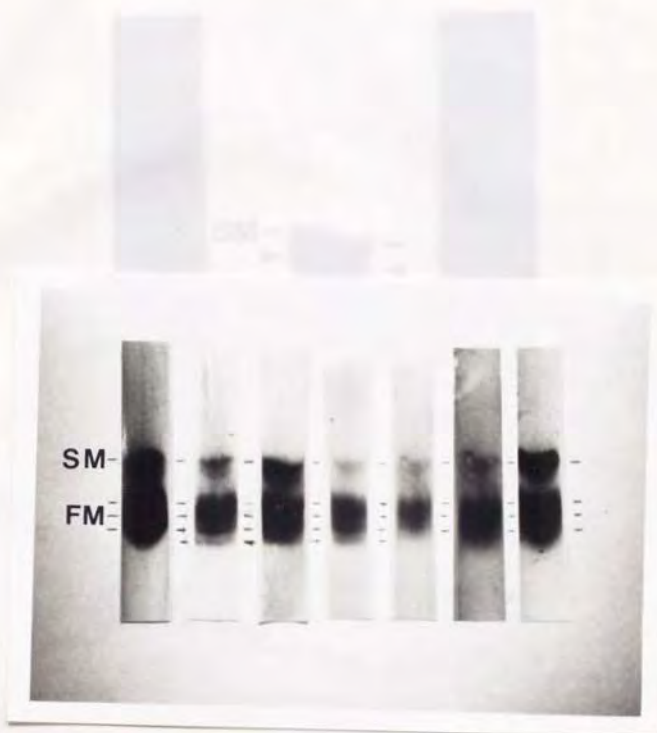


図45 Self-reinnervation筋から抽出した未解離状態のミオシン(ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による)

左から移植前、移植後2週、3週、4週、8週、12週、16週

2～4週においてFMより移動度の大きいバンド(EWもしくはNMと思われる)が観察される。

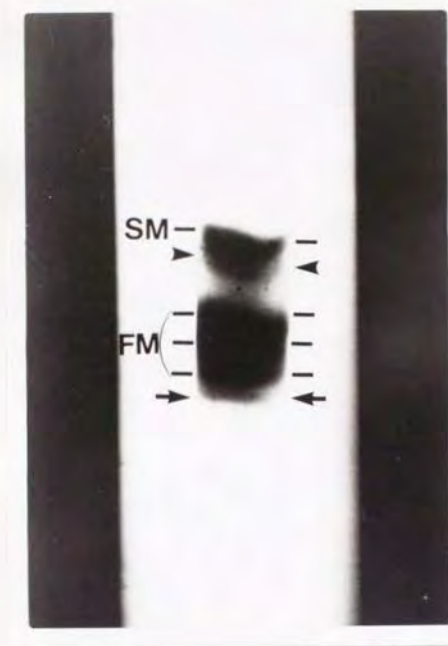


図46 3週後のself-reinnervation筋ミオシン(拡大)(ピロリン酸ポリアクリル
アミドゲル電気泳動法による)

FMよりもわずかに移動度の大きいEMもしくはNWと思われるバンドが検出される(矢印)
とともに、SMよりもわずかに移動度の大きいバンドが1本観察される(三角印)。

Type 1	SH
Type 2a	FWa
Type 2b	FWb
Type 2c (transitional)	SH+FW
Type 2c (undifferentiated)	EHorNM

表 1 1 組織化学的筋線維タイプとミオシン分子アイソフォームの関係



