

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19700438

研究課題名（和文） 多発性筋炎に対する効果的な運動療法の模索的基礎研究

研究課題名（英文） The basic research for searching effective exercise for polymyositis.

研究代表者

榊原 淳（SAKAKIBARA ATSUSHI）

長崎大学・病院・技術職員

研究者番号：00423624

研究成果の概要（和文）：今回、多発性筋炎のメカニズムや、筋炎に対する効果的な運動療法を模索するために、抗原の異なる多発性筋炎モデルラットの骨格筋に対する運動負荷の影響について比較検討した。異なる抗原（ラミニン、ミオシン）で 2 種類のモデルラットを作成し、各ラットの一側下肢に電気刺激による筋収縮運動を 2 週間実施した。その結果、弱い反応であったが筋炎を確認し、運動負荷により、非運動側に比べ運動側の前頸骨筋で壊死細胞、再生細胞の増加を確認することができた。しかしながら、モデルラット作成の再現性が未確立であったため、2 種類のモデルラット間での比較を行うまでには至らなかった。今後の課題として、免疫機能の調整を行う方法を追加することでモデルラット作成の再現性を高め、モデルラット間での比較と、多発性筋炎に対する有効な運動負荷を模索することを継続していく予定である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to grope for the effective motion for polymyositis. The experiment carried out muscle contraction motion by electric stimulation to the one foot of myositis model rat of two kinds reported in a past. The model rat used and immunized laminin and myosin for the antigen. As the result, there was the increase of necrosis cell and regenerative cell of stimulated foot than not stimulated foot. However, it was not possible to compare between model rats of two kinds without establishing the reproducibility of the model rat preparation. Future problem is to establish the reproducibility of the model rat preparation first.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総 計	2,200,000	390,000	2,590,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：リハビリテーション科学・組織学

キーワード：リハビリテーション・理学療法学

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎（polymyositis;PM）は、急性または慢性に、黄紋筋の炎症を認める自己免疫疾患であると考えられており、臨床的には近位筋優位の筋力低下を示す。

また、PM 患者の中で、特異的あるいは非特異的な皮膚症状を伴うものを皮膚筋炎（dermatomyositis;DM）と呼ぶ。これらは病理組織学的には、筋線維の変性・壊死とリンパ球を主体とした単核炎症細胞の浸潤が主病変で、自己免疫説が有力であるが病因は不明であり、近年の研究では、PM と DM の病因は異なった機序が作用しているという考えが強くなっている。

しかしながら、リハビリテーションの臨床場面において、これら PM・DM 患者に対しては、その区別なく、また明確な方法が確立されていないまま治療プログラムが実施されているのが現状である。PM・DM 患者の多くは、筋病変が進行すると身体活動の低下するため廃用性筋萎縮などの二次的障害が発生し、これがさらに種々の機能・能力障害を悪化させる。そのため、早期からリハを実施し、機能を保っている筋細胞を刺激することによって残存機能を十分に働かせ、廃用性筋萎縮などを予防させることが重要である。ところが、PM・DM に対する運動療法は、先に述べたように、運動負荷が、どのようなメカニズムでどのような影響があるのか、また、炎症を伴う筋に対してどのような筋力トレーニング方法がより安全でより効果的であるかは一切検討されていないのが現状である。

これらの背景には、適切なモデル動物の開発とそれによる検討の遅れがあると考えられる。これまで、PM・DM モデル動物として、収縮環を構成するミオシンを抗原とした多発性筋炎モデルラットが多く報告されてきた。ところが、病態などに関する報告はあるものの、運動負荷など筋炎に対する刺激が及ぼす影響について検討した報告は、国内外をみても見当たらない。

一方、我々のグループでは、昨年、筋線維基底膜を構成するタンパク質の一つであるラミニンを抗原とした新モデルラットを発表した。

そこで、筋細胞の収縮環と基底膜という異なる場所に存在し、役割の異なるタンパク質であるミオシンとラミニンを抗原としたモデルラットを用い、運動負荷の影響について

組織学的・免疫組織化学的・超微形態学的・生化学的に比較検討することで、多発性筋炎の運動負荷に対する脆弱性の根拠を明らかにすることができるのではないかと考えた。

また、本研究の成果により多発性筋炎に対する安全かつ効果的な筋力増強方法を提案すれば、臨床において多発性筋炎患者のリハビリテーションを早期から開始でき、廃用性筋萎縮などの二次的障害を防げる効果が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、異なるタンパク質を抗原とした2種類の多発性筋炎モデルラットの骨格筋について組織学的・免疫組織化学的・生化学的・免疫学的に比較し、併せてこれらに対する運動負荷の影響についても比較検討することで、1)多発性筋炎のメカニズムや、運動負荷に対して脆弱である根拠を導く、2)多発性筋炎モデルラットに対して種々の方法で運動負荷を探索的に行い、炎症症状を助長することなく筋線維肥大効果が得られる方法を検索することである。

3. 研究の方法

1) 実験動物

7週齢のLewis系雌ラット50匹を用い、これを実験群（40匹）と対照群（10匹）に振り分ける。

2) 多発性筋炎モデルラットの作成

<実験群>

①ラミニン免疫群 20匹

ラミニン+アジュバント混合液（0.3ml）を皮内注射3回（1回/2週）実施した。

②ミオシン免疫群 20匹

ミオシン+アジュバント混合液（0.3ml）を皮内注射3回（1回/2週）実施した。

<対照群>

10匹 PBS+アジュバント混合液（0.3ml）を皮内注射3回（1回/2週）実施した。

実験群、対照群とも毎回百日咳毒（2μg）を皮下注射し、免疫活性を促した。

3) 運動負荷実験

最後の免疫注射翌日から実験群各10匹、対照群5匹に対し運動負荷実験を開始した。

運動負荷は経皮的電気刺激法にて大腿神経および腓骨神経を刺激し、それぞれ膝関節伸展、足関節底屈を等張性収縮運動にて行った。

<刺激条件>

刺激装置：トリオシステム300（酒井医療株式会社）

刺激強度：パルス巾 250 μ sec 電流 4mA 周波数 10Hz

刺激時間：大腿部、下腿部各 15 分

運動負荷頻度：5 回/週

実施期間：2 週間

4) 実験終了後

実験終了後、1%エバンスブルー液をラットに静注し、1 日通常飼育を行う。

・尾静脈から血液を採取 → 生化学的検索

・後肢からヒラメ筋、前脛骨筋、大腿四頭筋、大腿二頭筋を摘出 → 組織学的・免疫組織学的・電気顕微鏡検索

5) 検索方法

<組織学的、免疫組織化学的染色>

凍結筋試料から横断連続切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色等を施す。また、蛍光顕微鏡を用いてエバンスブルー陽性筋線維を検出し、それを壊死線維として同定する。

免疫組織化学的染色は、抗ラミニン抗体、抗ジストロフィン抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗マクロファージ抗体、抗 B-cell 抗体を一次抗体に用い、順法の ABC 法で行う。

<生化学的検索>

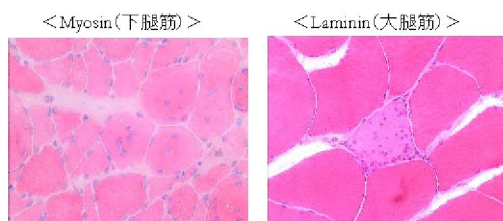
Western Blot 法を利用して、血清内の抗ラミニン抗体、抗ミオシン抗体を検出する。

<電子顕微鏡検索>

炎症細胞の動態と筋線維の基底膜・形質膜の病態を解析。

4. 研究成果

1) ミオシンおよびラミニンを用いて免疫を行うと、単核細胞の増殖と筋炎の惹起が認められた。しかし、炎症の程度は弱く、発生率も低く、安定したモデルラット作成の再現性は得られなかった。



【図1.免疫後2週間の筋組織(H-E染色)】

2) 運動側と非運動側の比較

図2に電気刺激による運動側と非運動側で炎症反応に違いが認められた典型例を示す。

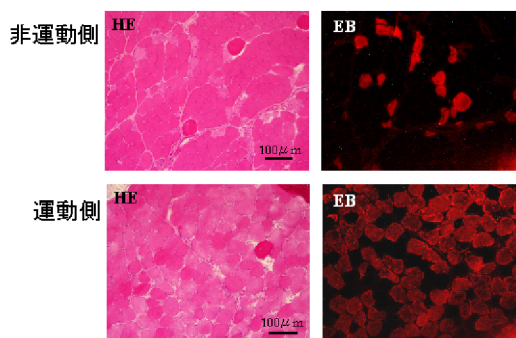
ラミニン免疫群で、非運動側に比べ、刺激側の前脛骨筋、長趾伸筋では、細胞浸潤を伴う壊死線維、中心核線維のほか、細胞浸潤を伴わない円形化・膨張した壊死筋線維が多く認められた。

図3にラミニン免疫群における運動負荷実験後の壊死細胞および中核細胞の数を運動側と非運動側とで比較したグラフを示す。

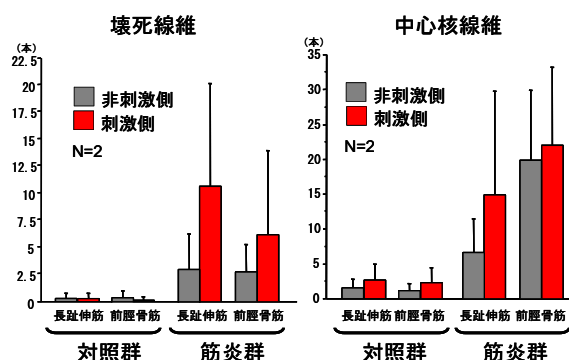
対照群では、壊死線維、中心核線維の出現

はほとんど認められず、且つ、運動側と非運動側で差はない傾向を示した。

一方、筋炎群のうちラミニンで免疫したモデルで、非運動側に比べ、運動側が壊死線維、中心核線維が多い傾向を示した。



【図2.非運動側と運動側の比較(組織学的染色)】



【図3.運動負荷実験後の壊死細胞および中心核線維の数】

5. 考察

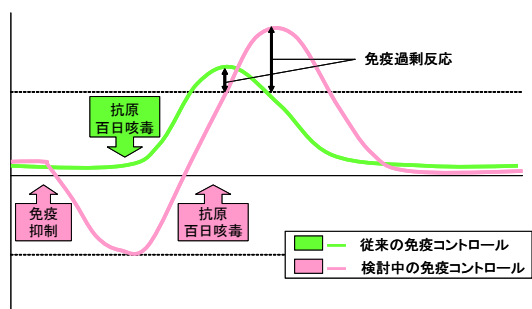
今回の実験で、多発性筋炎モデルラットの運動負荷に対する脆弱性が示唆された。しかしながら、本研究の目的である抗原の異なるモデルラット骨格筋の組織学的検索等による比較を行うまで至らなかった。

これらの結果は、モデルラット作成の再現性の困難さが要因であった。モデルラット作成については、抗原の一回注入量、注入回数、注入間隔の変更等、また実験動物の週齢の変更、百日咳毒注入量の変更による免疫活性等試みたが、いずれも有効な結果を得ることができなかった。

本実験では、正常ラットに対し、抗原とともに百日咳毒を注射し、免疫活性を高めることで、免疫反応を過剰にすることで筋炎の惹起を促した。この方法は、先行研究のモデルラット作成方法を参考にしたが、これまでモデルラットを用いた実験が行われていないのは、実験に十分な筋炎の発生率の確立にいたっていないことが予測される。今後の課題として、筋炎の発生率を向上させ、モデルラット作成の再現性を高めることが不可欠と

なると考える。

現在、実験動物の免疫活性のコントロール方法について検討しており、従来の正常なラットに薬物投与することで免疫活性を高める方法から、正常なラットに何らかの方法を用いて一旦免疫を抑制し、抑制されていた免疫がリバウンドする機能を活用することを検討している。方法としては、ステロイド等の免疫抑制剤の投与や、脊髄に対する放射線照射により免疫を一旦抑制し、そのリバウンドが起こる時期にこれまでと同じように抗原と百日咳毒などを注射し免疫反応を活性化させる。このことにより従来の方法に比べ、免疫の過剰反応をさらに高めることができるのではないかと考えている（図4）。



【図4. 免疫コントロールによる免疫機能変化の仮説】

この仮説に基づいてモデル作成を行うためには、①免疫抑制の方法、②実験動物の感染、死亡に影響を及ぼさない免疫抑制の程度、③免疫抑制中止によるリバウンド仮説の検証、④免疫機能変化の動態確認など検証すべき課題が考えられる。

今後は、これらの検証を行い、モデルラット作成方法を確立し、多発性筋炎に対する効果的で安全な運動療法の基礎となる運動負荷の探索を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 淳 (SAKAKIBARA ATSUSHI)

長崎大学・病院・リハビリテーション部・技術職員

研究者番号：00423624

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：