

機関番号：32643

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21800052

研究課題名(和文) 筋線維構成比の簡易測定法の提案とその有用性の検討

研究課題名(英文) Suggestion of simplified measurement system for skeletal muscle fiber composition, and the consideration of this usability

研究代表者

渡辺 彰吾 (WATANABE SHOGO)

帝京大学・医療技術学部・助教

研究者番号：20548341

研究成果の概要(和文)：

筋生検による従来の筋線維構成比の測定法は、身体への侵襲性および手技の煩雑さのため、研究や臨床検査などの限られた用途でしか実施できなかった。したがって、本研究では、速筋線維と遅筋線維とでは強縮に至る刺激周波数が異なることを利用した新しい筋線維構成比の簡易推定法を考案し、動物を用いた基礎実験によってその有用性を検討した。本手法によって、加齢や運動不足、寝たきり、筋力トレーニング等、日常生活での筋線維構成比の変化を低侵襲かつ簡便に知ることができた。これらの成果は国内・国外の学会で発表され、国際ジャーナルへの投稿も予定されている。

研究成果の概要(英文)：

The ordinary measurement method of muscle fiber composition by the muscular biopsy was performed only by the limited uses such as a study or clinical assay because of its invasiveness for patient's body and troublesome technique. Then, the new measurement method for muscle fiber composition which applied that tetanic stimulation frequencies were different from Fast-MU in Slow-MU was devised, and this usability was considered by the fundamental experimental experiment using animal. As the results, the change of muscle fiber composition during daily life such as aging, underexercising and muscle training was easily measured with low invasiveness. These results were presented at some conferences, and intended to submit some international journals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	420,000	126,000	546,000
総計	1,410,423	447,000	1,857,423

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：筋線維構成比，強縮，リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の筋線維は、形態学的・機能学的観点から、遅筋線維および速筋線維に分類できる。前者は、収縮速度が遅く、また大きな

収縮力を発揮することはできないものの、ミトコンドリア、ミオグロビンを多く含むため、持続性の長い筋収縮に適し、疲労しにくい特性を持つ。そのため、脊柱起立筋、ヒラメ筋など、骨格の保持姿勢を保つ骨格筋に多く分布する。一方、後者は、嫌氣的解糖系に依存するため、持続性がなく、疲労しやすいものの、収縮速度が速く、大きな力発揮に適している。そのため、腓腹筋や上腕二頭筋など、運動動作に必要とされる骨格筋に多く分布する。このように、哺乳動物の骨格筋は、その役割に応じて筋線維の構成比が異なる。これらの筋線維の構成は、先天的にその比率が決定されるものの、トレーニングや加齢、廃用性筋萎縮、一部の筋原性疾患など、後天的な要因によっても変化することが知られている(Thompson LV, et al., J. Appl. Physiol., 84, 1937-1942, 1998.)。したがって、筋線維構成比の変化は、私たちの日常生活に非常に密接に関係しており、スポーツ分野、リハビリテーション分野、臨床医学分野など多岐にわたる。

筋線維構成比を測定するためには、筋生検による ATPase 染色法が主流であるが、筋生検の際に、被験者に多大な苦痛を強要すること、染色の pH コントロールが難しく、手技が煩雑であること等が問題であった。また、現在では核磁気共鳴画像法(MRI)を用いた筋線維タイプの分類も、研究レベルで試みられているが、機器が高額なため設置機関が限局され、測定の際にも高度な技術を要する。以上の理由から、筋線維構成比の測定は、研究や臨床検査など限られた用途でしか実施されていないのが実情である。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまで、ラットのヒラメ筋、中間広筋、腓腹筋を電気刺激して筋張力を測定し、強縮の進行度を評価できる Fusion index(FI)と電気刺激周波数との関係(FI-Frequency Curve:FFC)が、①2つのパラメータ(k, h)で構成されるシグモイド関数(FFC-equation)で表現できること、②kパラメータは骨格筋の種類によって変化し、筋線維構成比を反映する可能性があることを示した(Shogo Watanabe et al, J. Electromyogr. Kinesiol., 2009, in press)。この手法は、侵襲性が比較的低く、測定方法も非常に簡便であるため、筋生検による ATPase 染色法や MRI 法に代わる新しい筋線維の構成比測定法となることが期待できる。しかしながら、研究代表者らは、筋線維構成比が極端に異なるヒラメ筋(遅筋線維優

位)、中間広筋(遅筋+速筋線維)、腓腹筋(速筋線維優位)の k パラメータが有意に異なることを示したのみであり、骨格筋の正確な構成比と k パラメータの相関関係については、詳細に考察されていなかった。したがって、本研究の目的は、低侵襲かつ簡便な筋線維測定法の提案であり、その有用性を検討するために、動物を用いて以下の基礎実験を行うこととした。

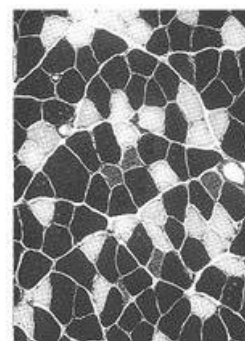
- (1)筋線維構成比と k パラメータの相関関係について検討する
- (2)k パラメータを用いて、廃用性筋萎縮による筋線維構成比の変化を評価する

3. 研究の方法

【平成 21 年度】

筋線維構成比と k パラメータの相関関係の検討

k パラメータが、筋線維構成比を反映していることを確認するためには、精密に筋線維構成比を測定する必要がある。最も精密かつ学術的根拠に裏付けされた筋線維構成比の測定法は、筋生検による ATPase 染色法(図 1 参照)であるが、筋生検は被験者への身体的な苦痛を強要するため、ラットを用いた動物実験によって、筋線維構成比と k パラメータとの相関関係を考察した。本研究代表者は、これまでもラットを対象として、電気刺激時の筋張力測定を行ってきた実績があり、安全かつ正確に動物実験を行うことができる。加えて、これらの動物実験は、ヘルシンキ宣言に則り、帝京大学医療技術学部の倫理委員会の承認を受けて行った。



白:速筋線維
黒:遅筋線維

画像解析ソフトを用いて、筋線維の断面積比を測定する。

図 1 ATPase 染色

① kパラメータの測定

被験筋は、速筋線維優位である腓腹筋、遅筋線維優位であるヒラメ筋、これらをバランス良く含む中間広筋を対象とした。図3に動物実験の模式図を示す。ラットを麻酔した後に、皮膚を切開して被験筋を露出させ、末梢側の腱を切断して、最大発揮張力が得られる筋長で筋張力を測定した。電気刺激は、パルス幅1ms、単極負極性の矩形波を用い、刺激強度は全MUが発火する電流値に設定した。刺激パルスは5秒間に1~50Hzまで時間軸に対して対数的に刺激周波数を増加させ、強縮を誘起させた。図2に実験で得られたFFCに対してFFC-equationを適用させた代表例を示す。FFC-equationは、 $FI(\%) = f h / (k h + f h) * 100$ で表現されるシグモイド関数である。kはFIが50%のときの刺激周波数を示し、hはFFCの勾配を反映する。kおよびhのパラメータは、最小2乗和法を使って、実験的に得られたFFCに近似させるように決定した。図4に示すように、kパラメータが増加すると、FFCは右方推移し、hパラメータが増加すると、FFCの勾配は急峻となる。

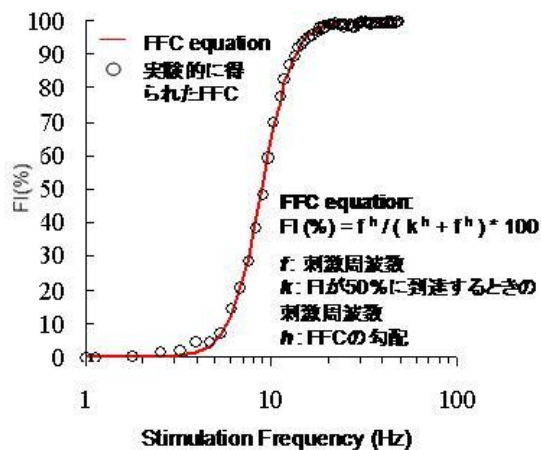


図2 Fusion Index - Frequency Curve (FFC)の模式図

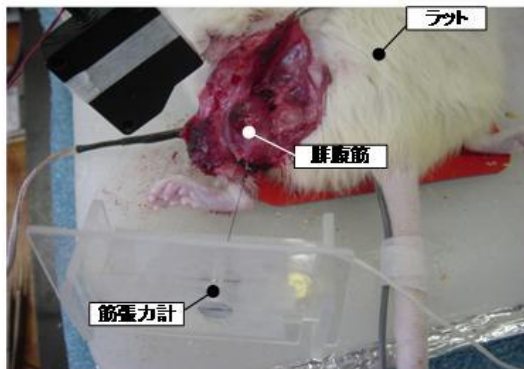


図3 動物実験の模式図

② 筋生検によるATPase染色

前述における各被験筋のkパラメータの測定後、被験筋の筋線維構成比をATPase染色で測定した。具体的には、被験筋を切断して採取し、剃刀で断端の形を整えた後、小さなコルク台の上に組織を固定した。そして、液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結ブロックを作成した。その後の凍結ブロックの薄切およびATPase染色は、非常に特殊な試薬、熟練した技能を必要とするため、(株)札幌総合病理研究所に外部委託した。図1にATPase染色された筋線維断面像を示す。同図のように、筋線維タイプ別に染め分けされるため、画像解析用ソフトウェアを用いて、筋線維の構成比(断面積比)を測定した。本研究代表者らは、これらの実験手技を行った実績を持つため、遅延無く研究を遂行できた。

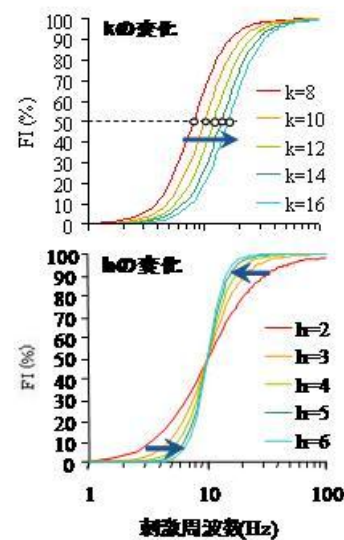


図4 k, hパラメータの変化

③ 筋線維構成比とkパラメータの相関関係

腓腹筋、中間広筋、ヒラメ筋から採取したkパラメータとATPase染色から算出した筋線維構成比との相関関係について考察した。図5に予想される相関関係の模式図を示す。同図のように、速筋線維の構成比が高い骨格筋ほど、kパラメータが大きくなることが期待される。

【平成22年度】

kパラメータを用いた廃用性筋萎縮の評価
筋線維の構成比を変化させる手段として、ギプス固定による廃用性筋萎縮を選択した。廃用性筋萎縮とは、骨格筋の長期間の不使用によって、筋線維が退化して萎縮した状態と定義され、筋線維の速筋化が特徴である (Robert J. et al, J. Appl. Physiol., 81,

2540-46, 1996.)。ラットの廃用性筋萎縮モデルの作成法は、すでに確立されており、後肢を2週間懸垂させることで容易に筋萎縮を惹起できる。この手法に則って、廃用性筋萎縮の前後におけるkパラメータを測定し、廃用性筋萎縮を評価した。なお、廃用性筋萎縮で筋線維が速筋化したことをATPase染色によっても確認した。

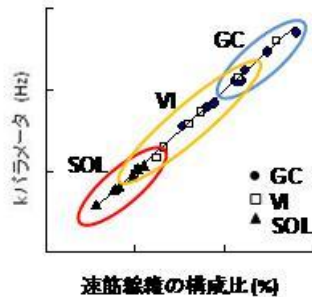


図5 予想される相関関係の模式図

4. 研究成果

これまでに行われてきた、国内外における筋線維の構成比の測定法と比較して、最も独創的な点は、(1)侵襲性が少なく、(2)簡便かつ安価に筋線維構成比を推定できることである。

本研究の第一に特徴的な点は、測定時の侵襲性が少ないことである。筋生検のATPase染色による筋線維構成比の測定法は、1971年にRingqvist M.らによって初めて確立され、現在でも最も普及している測定法として知られている(Ringqvist M., Scand J Dent Res., 79(5), 366-8, 1971.)。しかしながら、筋生検は、局所麻酔下で生検針もしくは直接切開によって筋線維を採取する必要があるため、麻酔覚醒後の被験者に与える苦痛は非常に大きい。一方、研究代表者らが提案する手法は、電気刺激の周波数を変化させると、筋線維構成比によって強縮を引き起こす周波数(kパラメータ)がそれぞれ違うことを利用している。本手法では、経皮的に運動神経を電気刺激する。経皮的な電気刺激は、末梢神経伝導速度や体性感覚誘発電位の測定等の臨床検査分野でも日常的に行われていることから、被験者への侵襲性は従来の筋生検によるATPase染色法よりも極端に小さい。

本研究の第二に特徴的な点は、簡便かつ安価に構成比を測定できることにある。とりわけ、筋生検を行うには、専門的な技術を持つ神経科医の協力が不可避であり、さらには、

採取した筋線維を液体窒素で急速に凍結して組織ブロックを作成し、pHコントロールが難しいATPase染色を行う必要があった。これらは、専門的な技術者および施設を必要とするため、簡便に構成比を測定することは非常に困難であった。また、MRIによる構成比の測定法は、MRI機器そのものが非常に高価・大型であり、配置できる機関が限局されること、そして専門的な知識を持つ技術者を必要とするなどの問題点があった。一方、提案する手法は皮膚表面に電極を塗布して電気刺激を行い、強縮時の筋張力を測定するのみで良いため、測定に際して特別な技能を必要とせず、さらには機材および設備も極めて安価である。

本研究で提案する筋線維構成比の測定法は、筋線維構成比によって強縮を引き起こす周波数に違いがあることを利用した極めて独創的な手法である。この手法の特徴として、低侵襲、簡便、安価が挙げられる。前述のATPase染色法やMRI法は、その手技の侵襲性、煩雑さ、コスト高のため、汎用性の面で不十分であった。しかしながら、構成比の変化は、筋力トレーニングや加齢、寝たきりによる筋線維萎縮など、ごく日常的にも起こりうる変化であるため、ヘルスプロモーションとしての人々の関心は非常に強い。研究代表者らは、本手法の特許を取得し、将来的には家庭向けの筋線維構成比の簡易測定装置の開発を目指している。本手法によって、低侵襲かつ簡便、安価に筋線維の構成比の変化が測定できれば、自らの手で健康の維持・増進を図ることができ、疾病の予防にも貢献できると考える。

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1件)

- ① 渡辺彰吾, 北脇知己, 岡久雄: 変位筋音図の Fusion index 曲線と筋線維構成比との関係, バイオメカニズム 20, 査読有, 207-216, 2010.

※ 現在, Journal of electromyography and Kinesiology にも投稿予定である。

【学会発表】(計3件)

- ① 渡辺彰吾, 北脇知己, 岡久雄: 変位筋音図の FFC-equation と筋線維構成比の関係, 第25回生体・生理工学シンポジウム, 2010年9月23日-25日, 岡山.
- ② S. Watanabe, T Kitawaki, H Oka: TETANIC PROGRESSION OF A MECHANOMYOGRAM

OBSERVED USING THE SIGMOID FUNCTION,
The XVIII Congress of the
International Society of
Electrophysiology and Kinesiology,
June 16-19, 2010, Denmark.

- ③ 渡辺彰吾, 石井圭, 北脇知己, 岡久雄,
シグモイド関数を用いた変位筋音図の強
縮過程の検討, 第24回生体・生理工学シ
ンポジウム, 2009年9月25日、東北大
学

【図書】(計0件)

【産業財産権】

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

【その他】

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
渡辺 彰吾 (WATANABE SHOGO)
帝京大学・医療技術学部・助教
研究者番号：20548341

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：