

報 告

mdx マウスの後肢筋群に対する等尺性収縮運動の影響*

中野 治郎¹⁾ 沖田 実²⁾ 吉村 俊郎³⁾ 東 登志夫³⁾
 加藤 克知²⁾ 田原 弘幸²⁾ 大木田 治夫¹⁾ 辻 畑 光 宏¹⁾

要旨

今回われわれは、筋ジストロフィーの実験動物モデルである *mdx* マウスを用い、等尺性収縮運動が筋線維におよぼす影響を形態学的、病理学的所見から検討した。8週齢の雄の *mdx* マウスを用い、5匹ずつ運動群と非運動群に分け、対照として同週齢の C57BL/10 ScN 雄マウスを同様に2群に分けた。等尺性収縮による運動負荷は1日1回10分間、週5回、4週間実施した。結果、長趾伸筋において、*mdx* マウス・対照マウス両者とも運動群に筋肥大が認められた。また、*mdx* マウスの運動群では小径線維並びに fiber splitting の割合が少なかった。したがって等尺性収縮運動は筋肥大をもたらす、また筋病変の進行を抑制する可能性が示唆された。

キーワード *mdx* マウス、等尺性収縮運動、筋線維

はじめに

筋ジストロフィーの実験動物モデルの一つである *mdx* マウスは、Bulfield ら¹⁾により開発されたものでヒトデュシャンヌ型筋ジストロフィー(以下、DMD と略す)と同じX染色体劣性遺伝形式をとる。また、DMDではジストロフィン遺伝子欠損、*mdx* マウスでは点変異と異なっているが、

両者ともジストロフィンが欠損しており、筋線維の病理学的所見も類似している。さらに、*mdx* マウスの筋病理学的変化の特徴としては、生後10～15日頃より筋病変が始まり、4～8週目頃までは筋線維の壊死と再生が活発で、8週目頃にはほとんどすべての線維に中心核が観察され、一度壊死した後再生してきた線維に置き換わる。この時期を過ぎると壊死線維は散在性となり、あまり活発な壊死は見られなくなり、筋病変の進行は緩やかで、骨格筋の筋力低下も軽度であるとされている。このように DMD では筋線維の再生が悪く、周知のごとく進行性の筋力低下が生じていくが、*mdx* マウスでは筋線維の再生が活発で壊死を代償するために筋力低下も軽度である特徴がある²⁾。

ところで、筋ジストロフィー者に対するリハビリテーションにおいては、機能を保っている筋細胞を刺激し、残存機能を十分に働かせ、機能維持

* Effects of Isometric Exercise in *mdx* Mice Hindlimb Muscles

1) 長崎北病院

(〒852 長崎県長崎市滑石5-4-61)

Jiro Nakano, RPT, Haruo Ohkida, RPT, Mitsuhiro Tsujihata, MD: Nagasaki-Kita Hospital

2) 長崎大学医療技術短期大学部 理学療法学科

Minoru Okita, RPT, Katsutomo Kato, Ph. D., Hiroyuki Tahara, RPT: Department of Physical Therapy, School of Allied Medical Science, Nagasaki University

3) 同 作業療法学科

Toshiro Yosimura, MD, Toshio Higashi, OTR: Department of Occupational Therapy, School of Allied Medical Science, Nagasaki University

(受付日 1997年7月3日/受理日 1998年1月24日)

を積極的に講ずることが重要とされる³⁾。しかし、運動負荷が筋病変を進行させる可能性も指摘されており⁴⁾⁵⁾運動負荷の方法や負荷量の設定には細心の配慮が要求される。

これまでに、諸家は各種の筋ジストロフィーの実験動物モデルを用い、運動負荷が骨格筋におよぼす影響を検討し、適度な運動負荷は筋肥大や筋病変の進行を抑制する有益なものであると報告している^{6~10)}。しかし、これらの報告で実施された運動負荷の方法は、トレッドミル走行や回転車輪での自由走行、さらには強制水泳などで、主に骨格筋に対する等張性収縮運動の影響を検討したものであり、等尺性収縮運動の影響を検討した報告はほとんど見あたらない。

そこで、今回われわれは、*mdx* マウスに対する等尺性収縮運動が後肢筋群の筋線維におよぼす影響を形態学的、病理学的所見から検討したので報告する。

対象と方法

1. 実験動物

8週齢の雄の *mdx* マウス 10 匹を用い、5 匹ずつ運動群と非運動群に分けた。また、対照として同週齢の C57BL/10 ScN 雄マウス 10 匹を用い、同様に運動群と非運動群に分けた。

等尺性収縮運動は、マウスを逆さにし、前肢・後肢をつかき金網にしがみつかせることにより行ない、これを強制的に 10 分間実施した。運動は 1 日 1 回、週 5 回、4 週間行なった (図 1)。また、*mdx* マウス、対照マウス両者とも、非運動群並びに運動群の運動実施以外の時間帯は通常飼育とし、餌と水は自由に摂取させた。なお、今回の実験は長崎大学医学部附属動物実験施設を使用し、長崎大学における動物実験指針に従った。¹¹⁾

2. 光学顕微鏡による検索

実験終了後は、エーテル麻酔下で長趾伸筋とヒラメ筋を摂取した。筋は液体窒素で冷却したイソペンタン液内で凍結し、クライオスタットにて 6

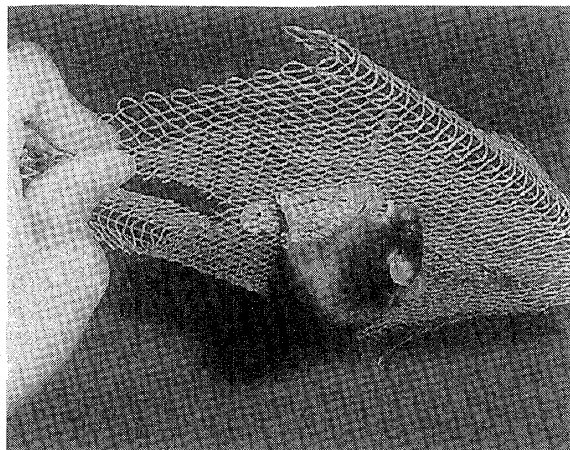


図 1 等尺性収縮運動

マウスを金網に逆さにしがみつかせることにより後肢筋群に同時収縮を起こさせた。

μm 厚の連続横断切片を作製した。そして、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡にて検鏡した²⁾。なお、検索対象とした長趾伸筋とヒラメ筋は、それぞれマウスの足部の屈筋・伸筋の働きを有し、主とする筋線維タイプの構成も Type II・Type I と異なっている¹²⁾。そして本実験では相反する機能・特性を有する骨格筋に対する等尺性収縮運動の影響を検索するために上記の 2 筋を選択した。

3. 定量解析

定量解析には、画像解析ソフト NIH image Ver 1.59 を用い、以下に示す指標を得た。

1) 筋線維直径

全筋線維の筋線維直径を計測し、各筋線維の直径分布並びに平均筋線維直径を算出した。

2) 小径線維

ジストロフィー筋に対する運動負荷の影響を筋病理学的所見から検討する際、最も反映されやすい所見としては、筋の壊死が挙げられる。しかし、壊死線維は染色性が低く、また進行すると貪食細胞が浸潤し原型をとどめず、定量的に検出することが困難である²⁾。斎田らは、*mdx* マウスの筋線維は正常マウスに比べ、小径線維の割合が大きく、また筋線維の壊死・再生を繰り返すと、小径線維の割合が増加すると報告している¹³⁾。つまり、小径線維の割合は筋線維の壊死の程度を反映すると

考えられる。そこで、本研究では、*mdx* マウスの筋線維の再生能力が優れている点¹⁴⁾を考慮し、再生が始まって間もない線維、つまり小径線維の比率の点から運動負荷の影響を検討した。なお、小径線維の定義については、これまでに明らかにされていないが、本研究では対照マウスにおいて出現頻度の極めて少ない $10\mu\text{m}$ 以下の筋線維を小径線維と定義し、全線維に対するその割合を求めた。

3) fiber splitting

fiber splitting はジストロフィー筋の代表的な病理学的所見であり、一本の筋線維が2～3本に分割することを指している。fiber splitting が生じる原因としては、肥大筋線維がなんらかのストレスの結果として分裂することや¹⁵⁾、再生した筋管の融合の欠如などが挙げられる¹⁶⁾。

筋線維が分割することにより筋力低下が生じるか否かは明らかにされていないが、fiber splitting の程度は臨床上的の病変進行度と相関するとされ¹⁷⁾、筋病変の進行の指標として用いられる⁸⁾。

そこで本研究では、筋線維の分割が進行しつつあるもののみを検索対象とし、全筋線維数に対する fiber splitting 数の割合を求めた。

4. 統計処理

統計処理として、各群の平均筋線維直径の比較には Student の *t* 検定を用い、*mdx* マウスの運動群と非運動群における小径線維、並びに fiber splitting の割合の比較には χ^2 検定を用いた。なお、有意水準は 5% 未満とした。

結 果

1. 長趾伸筋

mdx マウスでは非運動群、運動群ともに筋線維の大小不同や壊死線維、再生線維、さらに fiber splitting も認められた。一方、対照マウスではこれらの病理学的所見は認められなかった。また、*mdx* マウス、対照マウスともに運動群に筋肥大が見受けられた (図2)。

そこで、筋線維直径分布を求め、非運動群と運

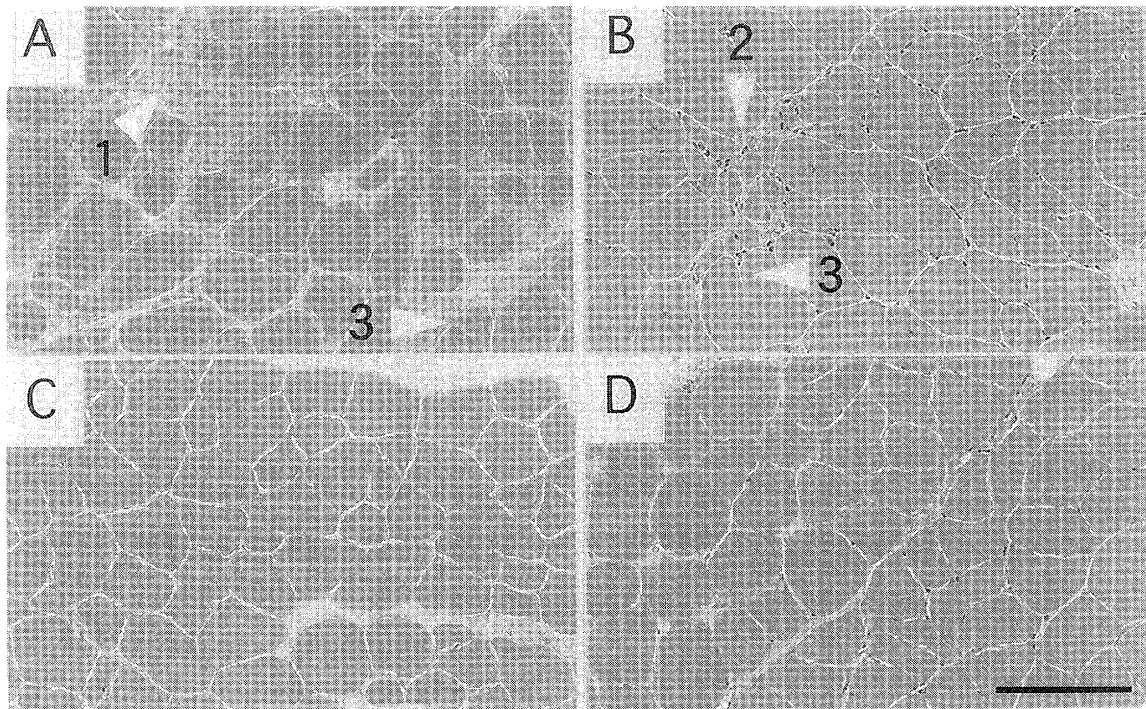


図2 長趾伸筋の筋組織像

A; *mdx* マウス非運動群. B; *mdx* マウス運動群. C; 対照マウス非運動群. D; 対照マウス運動群.

mdx マウスでは非運動群、運動群ともに筋線維の大小不同や壊死線維 (矢印1)、再生線維 (矢印2) さらに fiber splitting (矢印3) が認められる。また *mdx* マウス・対照マウスともに非運動群に比較し運動群に筋肥大が見受けられる。Bar= $100\mu\text{m}$.

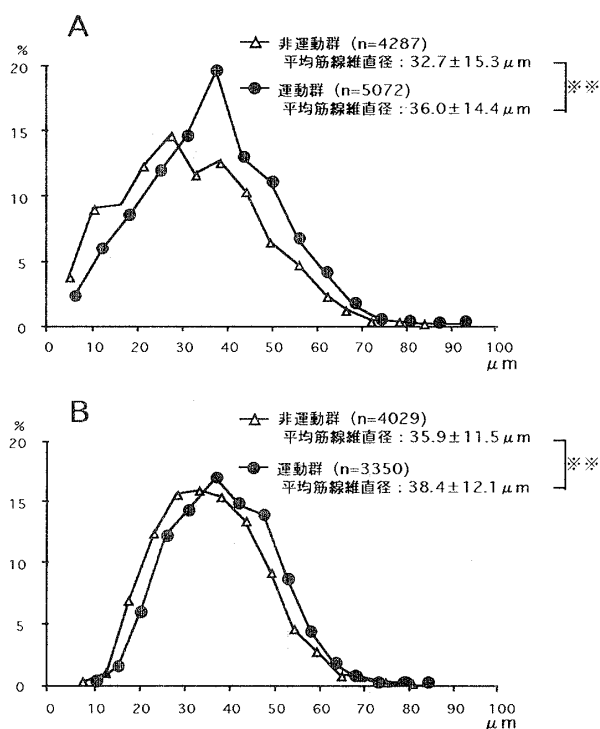


図3 長趾伸筋の筋線維直径分布

A; mdx マウス. B; 対照マウス.
両者ともに運動群の分布は非運動群より右方に位置しており、平均筋線維直径も有意差が認められた。***; p < 0.05.

運動群と比較した。mdx マウスでは、非運動群の分布の中心は 20 ~ 30 μm 付近にあるが、運動群の分布の中心は 30 ~ 40 μm にあり、非運動群に比べ右方に位置していた。また、平均筋線維直径も有意差が認められ、運動群の筋肥大は明らかであった (図 3 A)。同様に、対照マウスにおいても運動群の分布は非運動群より右方に位置し、有意な筋肥大を認めた (図 3 B)。

次に、mdx マウスの長趾伸筋の病理学的所見

を比較した。小径線維の割合は非運動群 5.5%、運動群 2.8% で有意差が認められ運動群の小径線維の割合は少なかった。同様に fiber splitting の割合も、非運動群 1.2%、運動群 0.4% で有意差が認められ、運動群の fiber splitting の割合は少なかった (表 1)。

2. ヒラメ筋

病理学的所見としては長趾伸筋とほぼ同様で、mdx マウスに筋線維の大小不同や壊死線維、再生線維、fiber splitting などが認められた。しかし、肉眼では両マウスとも運動群に筋肥大は認められなかった (図 4)。

筋線維直径分布の比較では、mdx マウスは、非運動群・運動群とも分布の中心は 30 ~ 40 μm にあり、平均筋線維直径も有意差はなかった (図 5 A)。また、対照マウスにおいても両群類似した分布を示し、平均筋線維直径も有意差はなかった (図 5 B)。

ヒラメ筋における小径線維の割合は、非運動群 7.6%、運動群 5.4% で有意差が認められ、運動群の小径線維の割合は少なかった。一方 fiber splitting の割合は非運動群 0.5%、運動群 0.4% で、有意差はなかった (表 1)。

考 察

マウスの骨格筋は、出産直後は未分化であり、約 8 週齢で分化が完了するとされている²⁾。また、Mokharian ら¹⁸⁾は、離乳時期にある mdx マウスに対する運動負荷は、筋に有害となると報告して

表 1 病理学的所見の比較

		筋線維数		筋線維数	
		直径 ≤ 10 μm	直径 > 10 μm	fiber splitting	その他
長趾伸筋	非運動群 (n=4,287)	236 (5.5%)	4,051 (94.5%)	51 (1.2%)	4,236 (98.8%)
	運動群 (n=5,072)	144 (2.8%)**	4,928 (97.2%)	20 (0.4%)**	5,052 (99.6%)
ヒラメ筋	非運動群 (n=3,736)	285 (7.6%)	3,451 (92.4%)	19 (0.5%)	3,717 (99.5%)
	運動群 (n=4,569)	247 (5.4%)**	4,322 (94.6%)	18 (0.4%)	4,528 (99.6%)

全線維に対する筋線維直径 10 μm 以下の線維 (小径線維)、fiber splitting の割合を求めた。小径線維: χ² 検定の結果、長趾伸筋およびヒラメ筋ともに運動群の小径線維は有意に少なかった。fiber splitting: χ² 検定の結果、長趾伸筋では運動群の fiber splitting は有意に少なかった。一方ヒラメ筋においては有意差は認められなかった。***; p < 0.05.

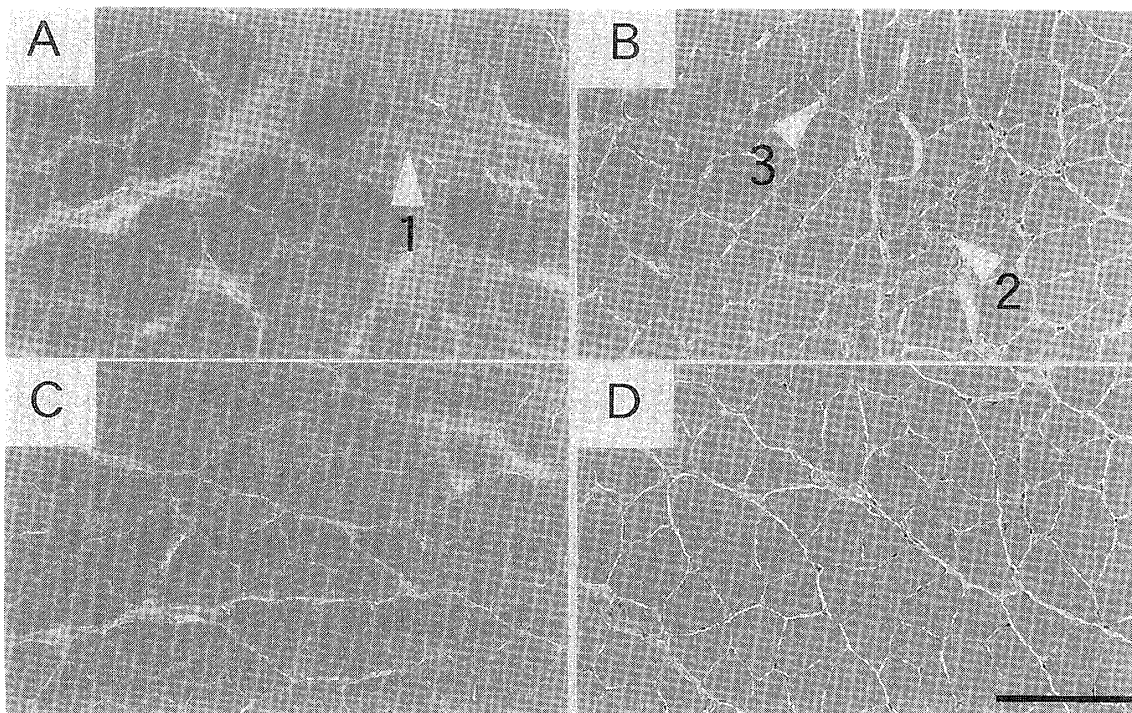


図4 ヒラメ筋の筋組織像

A; *mdx* マウス非運動群. B; *mdx* マウス運動群. C; 対照マウス非運動群. D; 対照マウス運動群.
mdx マウスでは非運動群, 運動群ともに筋線維の大小不同や壊死線維 (矢印1), 再生線維 (矢印2) さらに fiber splitting (矢印3) が認められる. *mdx* マウス・対照マウスともに運動群に筋肥大は見受けられない. Bar= 100 μ m.

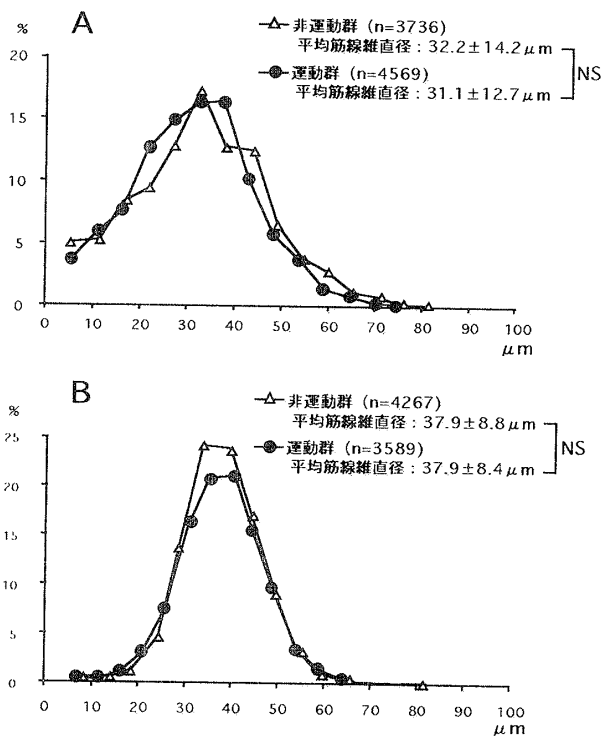


図5 ヒラメ筋の筋線維直径分布

A; *mdx* マウス. B; 対照マウス.
 両者ともに非運動群・運動群に差は認められなかった. NS; 有意差なし.

いる。そこで、本研究ではこれらのことを考慮し、8週齢のマウスを用いたが、今回の実験時期は、臨床的には筋ジストロフィーの筋病変の進行期にあたり、運動療法が不可欠な時期と考えられ、その時期における等尺性収縮運動の影響を検討した。

今回の結果から、1日10分間の等尺性収縮運動を4週間実施すると *mdx* マウス、対照マウスともに長趾伸筋は筋肥大を示した。従来より、等尺性収縮運動は1日1回の実施でも筋力増強がみられるとされているが¹⁹⁾、*mdx* マウスに対しても、筋肥大をもたらさうる運動方法であった。また、運動群の小径線維の割合は非運動群に比較し有意に少なく、このことから等尺性収縮運動が筋線維の壊死を抑制する可能性が推察された。さらに、fiber splitting についても運動群でその割合は有意に低かった。William ら⁸⁾は *mdx* マウスに対してトレッドミルによる強制走行を実施し、ジストロフィー筋に対する運動負荷の影響を検討している。そして、運動負荷により壊死線維並び

に split fiber の減少を示し、適度な運動負荷は筋病変の進行を抑制すると報告している。したがって、本研究の等尺性収縮運動は *mdx* マウスの筋線維に対して悪影響はなく、筋病変の進行を抑制する可能性が推察され、有効な運動方法であると思われる。

一方、ヒラメ筋については、運動による明らかな筋肥大は認められなかった。ヒラメ筋は大部分が Type I 線維で形成されているのに対し、長趾伸筋は Type II 線維が主であり、筋線維自体の性質は異なっている¹²⁾。しかし、Hayes ら²⁰⁾は *mdx* マウスに回転車輪での自由走行を実施し、長趾伸筋およびヒラメ筋の変化を検討し、Type I、Type II 線維両者に筋張力の改善効果があったと報告している。したがって、*mdx* マウスのヒラメ筋に対する影響が少なかった今回の結果は、筋線維の性質の違いによるものとは考えにくく、運動負荷の方法が影響していると思われる。また、対照マウスの筋線維直径も運動群と非運動群に有意差はなく、このことから上記の影響が伺われる。山内ら²¹⁾²²⁾はラットを用いて、廃用性萎縮筋に対する等尺性収縮運動負荷の影響をヒラメ筋について検討したところ、回復が助長されたと報告している。そして、この報告で用いられた等尺性収縮運動の方法は 60° および 80° に傾斜させた金網の床面に 30 分間ラットをしがみつかせるもので、今回の運動負荷の方法とは異なるものであった。したがって、今回の方法では、抗重力筋であるヒラメ筋が作用しにくい可能性もあり、今後は、等尺性収縮による運動負荷方法の検討も必要と思われる。

文 献

- 1) Bulfield G, Siller WG, *et al.*: X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 81 (4): 1189-1192, 1984.
- 2) 埜中征哉: 臨床のための筋病理. 日本醫事新報社, 東京, 1993, pp 42-51, 174-176.
- 3) 野島元雄: 筋ジストロフィー症に対するリハビリテーション: リハビリテーションの必要性. 臨床リハ 3 (1): 921-923, 1994.
- 4) Petrofsky JS, Phillips CA, *et al.*: Blood flow and metabolism during isometric contractions in cat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 51: 493-502, 1981.
- 5) 松田良一, 大仲広美・他: *mdx* マウスに対する重力負荷の影響. 厚生省精神・神経疾患研究 4 年度研究報告書. 筋ジストロフィーに関する細胞生物学的基礎研究 57-61, 1992.
- 6) 灰田信英: 運動療法の科学的基礎・1—末梢神経・筋障害を中心として—, *PT ジャーナル* 23(3): 203-209, 1989.
- 7) 養老栄樹, 佐藤福志・他: 筋ジストロフィー鶏に対する運動負荷の運動機能と筋組織変化とに及ぼす影響. *理学療法学* 24 (1): 31-38, 1997.
- 8) William MF, Richard TA, *et al.*: High-repetitive submaximal Treadmill exercise training; Effect on normal and dystrophic mice. *Arch Phys Med Rehabil* 71 (8): 552-557, 1990.
- 9) Sacco P, Jones DA, *et al.*: Contractile Properties and susceptibility to exercise-induced damage of normal and *mdx* mouse tibialis anterior muscle. *Clinical Science* 82 (2): 227-236, 1992.
- 10) Dupont-Versteegden EE, Roger JM, *et al.*: Voluntary exercise decrease progression of muscular dystrophy in diaphragm of *mdx* mice. *J Appl Phys* 77 (4): 1736-1741, 1994.
- 11) 長崎大学医学部附属動物実験施設: 動物実験施設利用の手引き.
- 12) Joseph WC, David MS: Muscular dystrophy in the *mdx* mouse; Histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neuro Sci* 80: 39-54, 1987.
- 13) 齋田恭子, 板垣泰子・他: *mdx* マウスにおける筋再生能の検討. 厚生省精神・神経疾患研究 4 年度研究報告書. 筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究 255-258, 1995.
- 14) Tanabe Y, Esaki K, *et al.*: Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. *Acta Neuropathologica* 69: 91-95, 1986.
- 15) Swash M, Schwartz MS, *et al.*: Pathogenesis of longitudinal splitting of muscle fiber in necrogenic disorders and in polymyositis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 4: 99-115, 1978.
- 16) Schmalbruch H: Muscle fiber splitting and regeneration in diseased human muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2: 3-19, 1976.
- 17) Pastoret C, Sebille A, *et al.*: *mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 129 (2): 97-105, 1995.
- 18) Mokharian A, Lefaucheur JP, *et al.*: Effect of treadmill and High-fat feeding on muscle de-

- generation in *mdx* mice at the time of weaning. *Clinical Science* 89(4): 447-452, 1995.
- 19) 岩倉博光, 田口順子: 理学療法士のための運動療法. 金原出版株式会社, 東京, 1993, pp 64-70.
- 20) Hayes A, Williams DA: Beneficial effects of voluntary wheel running on the properties of dystrophic mouse muscle. *J Appl Physiol* 80(2): 670-679, 1996.
- 21) 山内秀樹, 米本恭三: 廃用性萎縮に対する等尺性運動の効果と加齢の影響. *リハ医学* 34: 46-51, 1997.
- 22) 山内秀樹, 米本恭三: 老齢期の廃用性萎縮筋の機能回復に及ぼす運動負荷の影響—ヒラメ筋の変化—. *リハ医学* 34: 212-217, 1997.

〈Abstract〉

Effects of Isometric Exercise in *mdx* Mice Hindlimb Muscles

Jiro NAKANO, RPT, Haruo OHKIDA, RPT, Mitsuhiro TSUJIHATA, MD
Nagasaki-Kita Hospital

Minoru OKITA, RPT, Katsutomo KATO, Ph. D., Hiroyuki TAHARA, RPT
Department of Physical Therapy, School of Allied Medical Science, Nagasaki University

Toshiro YOSIMURA, MD, Toshio HIGASHI, OTR
Department of Occupational Therapy, School of Allied Medical Science, Nagasaki University

The effects of isometric contraction on muscle fibers were investigated from morphological and pathological aspects using *mdx* mouse, an animal model of muscular dystrophy. Ten male *mdx* mice at 8 weeks of age were divided into 2 groups: one group was loaded with an exercise of isometric contraction and the other was not loaded. As the control, male mice of C57BL/10ScN at the same age were similarly assigned into the two groups. The loading of isometric contraction was carried out 5 times per week for daily 10 min during a period of 4 weeks. A significant thickening of the long extensor muscle of digits was observed in both loaded groups of *mdx* mice and control. In addition, the proportion of fibers having a small diameter and the degree of fiber splitting were smaller in the loaded group of *mdx* mice. These results suggest that isometric contraction might result in muscular thickening and repress the progressing of myopathy.